



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0062168
(43) 공개일자 2013년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0128615

(22) 출원일자 2011년12월02일

심사청구일자 2011년12월02일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

이지원

서울특별시 광진구 광장동 현대3차아파트 310-204

안금영

경기도 안산시 상록구 이동 702번지 202호

박진승

인천광역시 강화군 강화읍 관청길 86-3

(74) 대리인

특허법인다나

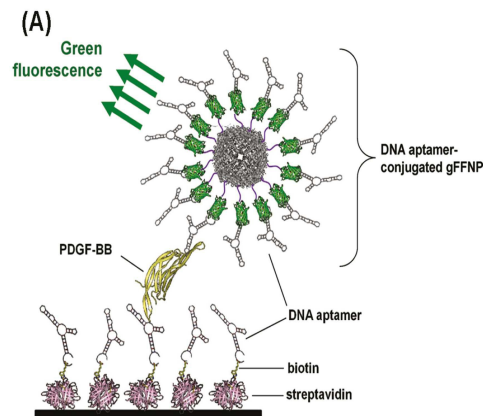
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 재조합 형광 단백질 나노입자

(57) 요약

본 발명은 페리틴(Ferritin)에 형광 단백질이 융합된 단백질 나노입자에 관한 것이다.

대표도 - 도5a



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	[2차년도] 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

페리틴(Ferritin)에 형광 단백질이 융합된 단백질 나노입자.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 페리틴은 서열번호 1로 기재되는 아미노산을 포함하는 페리틴 중쇄 단백질인 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 단백질 나노입자는 페리틴과 형광 단백질 사이에 링커 펩타이드를 추가로 삽입하는 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 링커 펩타이드는 글라이신(glycine) 아미노산을 포함하는 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 5

제 3항에 있어서,

상기 링커 펩타이드는 서열번호 3 내지 7로 기재되는 아미노산 서열 가운데 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 형광 단백질은 녹색 형광 단백질(GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified green fluorescent protein), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP), 적색 형광 단백질(RFP, DSRed), 증강된 적색 형광 단백질(ERFP), 청색 형광 단백질(BFP), 증강된 청색 형광 단백질(EBFP), 황색 형광 단백질(YFP), 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 남색 형광 단백질(CFP), 및 증강된 남색 형광 단백질(ECFP)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 단백질 나노입자는 서열번호 8 내지 9로 기재되는 아미노산 서열 가운데 선택되는 것을 특징으로 하는 단백질 나노입자.

청구항 8

제 1항의 단백질 나노입자의 표면에 앵타머가 융합되어 있는 앵타머 융합 나노입자.

청구항 9

제 8항에 있어서,

단백질 나노입자에 융합된 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP)이 서열번호 12로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 앵타머 융합 나노입자.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 높은 형광 강도를 갖는 재조합 형광 단백질 나노입자 및 이를 이용한 고감도 분자 생물학적 분석 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 초고감도 센서 시스템을 구축하기 위해서는 질환 특이적 마커 단백질을 효과적으로 검출할 수 있는 검출 프로브의 개발과 검출 반응을 통해 생성된 검출 신호를 증폭할 수 있는 기능성 소재의 개발이 필수적이다. 이를 위해 마커 단백질을 효과적으로 인지할 수 있는 프로브 물질을 나노미터 크기의 입자 표면에 고정화하여 검출 효과를 극대화할 수 있는 검출 프로브의 개발이 활발하게 진행되고 있으며, 형광 단백질, 양자 점(quantum dot)과 같은 검출 신호를 증폭할 수 있는 형광 물질들의 기능성 개선을 위한 연구 및 응용이 활발하게 진행되고 있다.

[0003] 질환 특이적 마커 단백질을 효과적으로 검출하기 위하여, 일반적으로 항체를 프로브로 이용하였다. 그러나 낮은 구조적 안정성 및 높은 생산 비용 등으로 인해 이를 대체할 수 있는 새로운 물질이 요구되고 있다. 앵타머(aptamer)는 단일가닥 핵산으로 구성되어 있는 생체소재로써, 안정된 3차 구조와 표적 물질에 대해 높은 친화성과 특이성을 갖는 것으로 알려져 있다. 또한, SELEX(Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) 기법을 통해서 다양한 종류의 앵타머를 생산할 수 있으며, 항체와 비교하여 마커 단백질과 비슷한 수준의 결합 능력을 보이고 있기 때문에 항체를 대체할 수 있는 소재로 각광받고 있다.

[0004] 신호를 증폭하는 광학 리포터(optical repoter)로서, 일반적으로 사용되는 형광 단백질은 구조적 안정성, 높은 양자 효율(quantum yield), 높은 형광 밝기(brightness)를 가지며, 대장균을 통해서 쉽게 생산이 가능하기 때문에 다양한 분야에 응용 연구되고 있다. 이러한 이유로 다양한 센서 시스템의 형광 표지 물질로 사용되고 있지만 상대적으로 낮은 형광 강도(fluorescence intensity)로 인해 낮은 검출 감도를 갖는 단점을 가지고 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해 유전자 변이(mutation) 또는 형광 단백질 복합체 형성 등을 통해 형광 단백질의 형광 강도를 높이기 위한 다양한 연구가 수행되고 있지만 고감도 센서 시스템이 요구하는 높은 수준의 형광 강도를 충족시키지는 못하고 있다. 또한 고감도 검출 한계와 더불어 간소화된 검출 시스템을 동시에 만족시킬 수 있는 새로운 개념의 기능성 소재 개발은 더 많은 연구 개발을 필요로 하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 등록특허 제 10-0772491호

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Analytical chemistry, 2011, 83(15), pp5834-5843

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 초고감도 센서 시스템에 이용할 수 있는 우수한 형광 강도 및 구조적 안정성을 구비한 형광 단백질이 융합된 나노입자를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 페리틴(Ferritin)에 형광 단백질이 융합된 단백질 나노입자를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상술한 단백질 나노입자의 표면에 앵타머가 융합되어 있는 앵타머 융합 나노입자를 제공한다.

[0010] 아울러, 본 발명은 상술한 앵타머 융합 나노입자를 이용한 검출 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 단백질 나노 입자는 형광 단백질에 비하여, 형광 강도가 현저히 우수하며, 상온에서 형광 단백질의 변이를 억제시켜, 구조적인 안정성이 우수하다.

[0012] 또한, 본 발명에 따른 단백질 나노 입자는 추가적으로 링커 펩타이드가 페리틴 나노 입자와 형광 단백질 사이에 삽입되어, 나노입자와 형광 단백질간의 적절한 거리를 유지시킴에 따라 나노입자의 형광 강도를 현저히 증가시키는 효과를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명에 따른 앵타머 융합 나노입자는 상술한 단백질 나노입자의 표면에 앵타머가 공유결합으로 3차원적으로 부착됨으로써, 표면의 형광 단백질 간의 간격을 조절될 뿐만 아니라, 단백질 나노 입자에 부착되는 형광 단백질의 수를 증가시켜 형광 강도를 극대화시키는 효과를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 다양한 형광 단백질(eGFP, DsRed) 페리틴 나노입자의 합성을 위한 융합 유전자를 나타낸 그림으로, 도 a 내지 c는 녹색 형광 단백질인 eGFP와 페리틴 나노입자가 융합된 유전자를, 도 d 내지 e는 적색 형광 단백질인 DsRed와 페리틴 나노입자가 융합된 유전자를 나타내며, 도 b, c, 및 e는 hFTN-H(인간 페리틴 헤비 체인)과 형광 단백질(eGFP, DsRed) 사이에 글라이신 링커 펩타이드(glycine rich linker)를 포함하고 있는 융합 유전자를, 도 a, d는 글라이신 링커 펩타이드를 포함하고 있지 않은 융합 유전자를 나타낸다.

도 2는 본 발명에 따른 eGFP 형광 단백질이 융합된 페리틴 나노입자들(A), 상기 나노입자들의 TEM 분석 사진(B) 및 상기 입자들의 형광 발광 분석 결과(C)를 도면 및 그래프이다.

도 3은 본 발명에 따른 DsRed 형광 단백질이 융합된 페리틴 나노입자들(A), 상기 나노입자들의 TEM 분석 사진(B) 및 상기 입자들의 형광 발광 분석 결과(C)를 도면 및 그래프이다.

도 4는 시간 경과에 따른 eGFP 형광 단백질이 융합된 페리틴 나노입자의 형광 발광 분석결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 DNA 앵타머-gFFNP를 이용한 PDGF-BB 분석 결과를 나타낸 그림으로서,

도 5a는 앵타머 기반의 분자 생물학적 검출 방법을 도식적으로 나타낸 그림이며,

도 5b는 아민, Cy3, 및 비오틴 앵타머가 각각 융합된 gFFNP를 이용한 PBS 버퍼 내에 존재하는 PDGF-BB 검출 결과를 나타낸 그래프이며,

도 5c는 랭뮤어 흡착 등온(Langmuir absorption isotherm)의 선형 형태에 기반한 선형 관계를 나타낸 그래프이다.

도 6은 비오틴 DNA 앵타머-gFFNP를 이용한 생물학적 시료 내에서의 PDGF-BB 분석 결과를 나타낸 그래프로서

도 6A는 비오틴 DNA 앵타머-gFFNP를 이용한 5% 혈청 내에 존재하는 PDGF-BB의 분석 결과를 검출 결과를 나타낸 그래프이며,

도 6B는 랭뮤어 흡착 등온식(Langmuir absorption isotherm)의 선형 형태에 기반한 선형 관계를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명은 페리틴(ferritin)에 형광 단백질이 융합된 단백질 나노입자를 제공한다.

[0017] 본 발명에 따른 단백질 나노 입자의 표면에 형광 단백질이 융합된 단백질 나노 입자는 나노 입자의 구조적 안정성을 극대화시켰으며, 추가적으로 페리틴 중쇄 단백질과 형광 단백질 사이에 링커 펩타이드를 삽입하고, 앵타머를 융합함으로써, 형광 강도가 극대화된 것을 특징으로 한다.

[0018] 상기 단백질 나노입자에 있어서, 상기 페리틴 단백질은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 페리틴 중쇄 단백질(Ferritin Heavy Chain: 이하 "FTN-H"라 칭함)인 것이 바람직하며, 상기 페리틴 단백질은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열로 나타낼 수 있다. 상기 서열번호 1의 아미노산은 NCBI Accession No: NP_002023.2 서열의 N 말단으로부터 79 ~ 85번째에 위치한 서열을 의미한다.

[0019] 또한, 상기 단백질 나노입자에 있어서, 상기 단백질 나노입자는 추가로 페리틴과 형광 단백질 사이에 링커 펩타이드가 삽입될 수 있다. 상기 링커는 페리틴 나노입자와 형광 단백질 사이의 거리를 조절하여 형광의 강도를 증가시키는 효과를 제공한다.

[0020] 상기 링커 펩타이드는 글라이신(Glycine) 아미노산을 포함하는 것이 바람직하며, 바람직하게는 5개 내지는 20개의 아미노산으로 구성될 수 있으며, 상기 링커를 구성하는 아미노산은 5개 내지는 15개의 글라이신(Glycine)을 포함하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 서열번호 3 내지 7로 기재되는 아미노산 서열 가운데 선택되는 것이다.

[0021] 또한, 상기 단백질 나노입자에 있어서, 상기 형광 단백질은 녹색 형광 단백질(GFP), 변형된 녹색 형광 단백질(modified green fluorescent protein), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP), 적색 형광 단백질(RFP, DSRed), 증강된 적색 형광 단백질(ERFP), 청색 형광 단백질(BFP), 증강된 청색 형광 단백질(EBFP), 황색 형광 단백질(YFP), 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 남색 형광 단백질(CFP), 증강된 남색 형광 단백질(ECFP), 광학 리포터(optical)로서 기능할 수 있는 Cy, 알렉사(Alexa Fluor dye), 퀀텀 닷(quantum dot) 및 화학 발광 리포터(chemiluminescent reporter) 등 일 수 있다.

- [0022] 또한, 상기 단백질 나노입자에 있어서, 상기 단백질 나노입자는 서열번호 8 내지 9로 기재되는 아미노산 서열일 수 있으며, 상기 서열번호 8의 단백질 나노입자는 페리틴과 형광 단백질로 eGFP(GenBank: ADQ73885.1, 서열번호 10)을 융합한 단백질 나노입자이며, 상기 서열번호 9의 단백질 나노입자는 형광 단백질로 DsRed(GenBank: BAE53441.1, 서열번호 11)을 융합한 단백질 나노입자이다. 상기 단백질 나노입자는 페리틴과 형광 단백질 나노입자 사이에 본 발명에 따른 링커가 추가적으로 삽입되어 합성된 것을 특징으로 한다.
- [0023] 본 발명의 구체적인 실시양태에서 본 발명자들은 자가조립 FTN-H 나노입자와 형광 단백질을 융합시켰을 때(실시예 1, 실시예 4)에 비하여, FTN-H 나노입자와 형광 단백질 사이에 링커 펩타이드를 삽입하여 제조된 재조합 형광 단백질 나노입자(실시예 2, 5)의 형광 발광 정도와 입자의 안정성이 현저히 증가하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 FTN-H 나노입자가 융합되지 않은 단일 형광 단백질에 비하여 약 20배 이상의 현저한 발광 정도였다. 따라서, 본 발명에 따른 FTN-H의 C 말단에 링커 펩타이드가 융합되고, 이어서 융합 단백질이 융합된 형광 단백질 나노입자(이하, FTN-H::Linker::형광 단백질 형광 단백질 나노입자"라 칭함.)는 우수한 형광 강도 및 안정성을 나타내고 있으므로, 이를 '프로브(probe)'로 유용하게 활용할 수 있을 것으로 예상된다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상술한 단백질 나노입자의 표면에 앵타머가 융합되어 있는 앵타머 융합 나노입자를 제공한다.
- [0025] 상기 형광 단백질 나노입자에 관하여 기재된 내용은 모두 앵타머 융합 나노입자에 모두 적용될 수 있다.
- [0026] 상기 앵타머 융합 나노입자에 있어서, 형광 단백질로 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP)은 서열번호 12로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것이 바람직하다. 상기 아미노산 서열은 서열번호 10으로 기재된 서열의 N 말단으로부터 175번째 세린(Serine)을 시스테인(Cysteine)으로 치환된 서열로서, 상기 변이된 175번째 시스테인에 DNA 앵타머가 공유적으로 결합된다.
- [0027] 상기 앵타머 융합 나노입자에 있어서, 앵타머가 융합된 단백질 나노 입자는 서열번호 13으로 기재되는 아미노산 서열인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 구체적인 실시양태에서, 본 발명자들은 FTN-H::Linker::형광 단백질 나노입자의 표면에 암 마커로 알려져 있는 PDGF-BB 특이적인 DNA 앵타머(서열번호 14)가 결합되어, 앵타머 융합 나노입자(하기 실험예에 DNA 앵타머-gFFNP, 실시예 6 및 8)를 합성하였다. 상기 앵타머 융합 나노입자는 FTN-H::Linker::형광 단백질 입자에 비하여, 형광 강도가 더욱 우수하였는데, 이는 FTN-H의 표면에 융합된 음전하를 띠는 PDGF-BB 특이적인 앵타머가 형광 단백질 사이의 간격을 조절함으로써, FTN-H의 표면의 형광 단백질의 형광 강도를 더욱 높이는 효과를 제공하기 때문이라고 사료되었다.
- [0029] 아울러, 본 발명은 상술한 앵타머 융합 나노입자를 이용한 검출 방법을 제공한다.
- [0030] 발명의 구체적인 실시양태에서, 본 발명자들은 gFFNP의 표면에 DNA 앵타머(aptamer)를 공유결합으로 결합시켰으며, 상기 앵타머가 결합된 gFFNP를 암 진단 바이오마커인 PDGF BB(platelet-derived growth factor B-chain homodimer)의 앵타머 기반의 “샌드위치(sandwich)” 분석(이중 위치 결합 분석(dual-site binding assay))을 위한 3차원적인 신호 증폭을 위한 리포터 프로브로서 이용하였다. 그 결과, PDGF-BB를 포함하고 있는 PBS 수용액 또는 혈청 내에서 우수한 민감도를 보이며, 검출 프로브로서 이용될 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [0031] 발명의 구체적인 실시양태는 예시적으로 이러한 개념을 확인하기 위하여, 암 마커인 PDGF-BB에 대한 특이적인 DNA 앵타머를 이용하였으나, 본 발명에 따른 앵타머 융합 나노입자는 우수한 형광강도 및 안정성을 가지고 있으므로, 융합시키는 앵타머의 종류에 따라, 다양한 검출 방법에 활용될 수 있다.
- [0032] 또한, 페리틴(Ferritin)에 형광 단백질이 융합된 단백질 나노입자는 단량체 형태의 형광 단백질에 비하여 형광 강도가 현저히 우수하며, 구조적으로 안정적이므로, 종래의 형광 단백질 기반의 검출방법, 예를 들어 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 등에도 적용될 수 있다.

[0033] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.

[0034] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0035] <실시예 1 ~ 4> 재조합 형광 단백질 나노입자의 제조

[0036] 본 발명에 따른 형광 단백질이 융합된 단백질 나노입자(재조합 eGFP, DsRed, 및 gFFNP)를 합성하기 위하여, 하기 표 1에 기재된 라이브러리, 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 수행하였으며, 그 결과 하기 6개의 클론을 생성하였다(표 1 및 3 참조). 이때, PCR 반응 조건은 94℃에서 5분(Pre-denaturation), 94℃에서 30초(Denaturation), 52℃(Annealing), 30초 및 72℃, 30초(Extension)으로 30회 반복 실시한 후, 72℃, 5분 반응시켰으며, 전체 반응부피는 20 μ l로 맞추었다.

[0037] 이때, 형광 단백질과 페리틴 나노입자 사이에 삽입되는 링커는 하기 표 2에 기재된 바와 같으며, 하기 실시예에는 서열번호 3으로 기재된 링커를 사용하였다(표 2 참조).

표 1

	클론	PCR 조건
1	N-NdeI-(hFTN-H)-XhoI-C	정방향 프라이머(서열번호 15) 역방향 프라이머(서열번호 16) 주형(Template): human liver cDNA library (clontech, USA)
2	N-NdeI-hexahistidine-(eGFP)-HindIII-C	정방향 프라이머(서열번호 17) 역방향 프라이머(서열번호 18) 주형(Template): pEGFPplasmid(clontech, USA)
3	N-XhoI-eGFP-hexahistidine-HindIII-C	정방향 프라이머(서열번호 19) 역방향 프라이머(서열번호 20) 주형: pEGFPplasmid(clontech, USA)
4	N-XhoI-G3SG3TG3SG3-eGFP-H6-HindIII-C	1 st PCR 서열번호 22, 서열번호 23 주형: pEGFPplasmid (clontech, USA)
		2 nd PCR 서열번호 21, 서열번호 23 주형(Template): 1 st PCR product
5	N-XhoI-(DsRed)-hexahistidine-HindIII-C	정방향 프라이머(서열번호 24) 역방향 프라이머(서열번호 25) 주형(Template): pDsRed-Monomer Vector(clontech, USA)
6	N-XhoI-G3SG3TG3SG3-DsRed-H6-HindIII-C	1 st PCR 서열번호 27, 서열번호 28 주형(Template): pDsRed-Monomer Vector(clontech, USA)
		2 nd PCR 서열번호 26, 서열번호 28 주형(Template): 1 st PCR product

표 2

	서열
서열번호 3	GGGSGGGSGGGSGGG
서열번호 4	GGGGG

서열번호 5	GGGSGGGTGGGSGGG
서열번호 6	GGGSGGGGT
서열번호 7	GGGSGGGGS

[0040] 상기 유전자 클론들은 pT7-7 플라스미드(Novagen, USA)에 라이게이션되었으며, 그 결과 도 1과 같은 다양한 발현 벡터가 제조되었다. 상기 pT7-7 벡터는 하기 표 2에 기재된 각각의 클론들과 라이게이션되어, pT7-GFP, pT7-FTN-GFP, pT7-FTN-RED, pT7-FTH-LNK-GFP, 및 pT7-FTH-LNK-RED 발현벡터가 제조되었다(표 3 참조). 상기 hFTN-H 유전자의 클로닝의 경우, 본 발명자의 이전 등록특허 제10-0772491호에 기재된 바와 동일하다.

표 3

[0041]		발현 벡터	
	대조군 1	pT7-GFP	pT7 플라스미드 벡터 + 클론2
	실시예 1	pT7-FTN-GFP	pT7 플라스미드 벡터 + 클론1 + 클론3
	실시예 2	pT7-FTN-RED	pT7 플라스미드 벡터 + 클론1+ 클론5
	실시예 3	pT7-FTH-LNK-GFP	pT7 플라스미드 벡터 + 클론1 + 링커+ 클론4
	실시예 4	pT7-FTH-LNK-RED	pT7 플라스미드 벡터 + 클론1+ 링커+ 클론6

[0042] 상기 제조된 벡터의 서열분석을 완료한 후, *E. coli* BL21(DE3) [F_{ompThsdSB(rB_{MB})}]에 상기 발현 벡터들을 각각 형질전환시킨 후, 암피실린(ampicillin) 저항성을 갖는 형질전환체를 최종적으로 선별하였다.

[0043] 상기 IPTG(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)에 의하여 유도된 유전자 발현 과정 및 재조합 형광 페리틴(ferritin) 나노입자의 정제 및 상기 정제된 단백질 나노입자의 TEM(transmission electron microscopy) 이미징 분석 방법은 본 발명자들의 이전 연구에 기재된 바와 같다(Park, J. S, et al., J. Nat. Nanotechnol. 2009; Lee, S. H. et al., FASEB J. 2007; Lee, J. H. et al., J. Adv. Funct. Mater. 2010; Seo, H. S. et al., Adv. Funct. Mater. 2010; Ahn, J. Y. et al., J. Nucleic Acids Res. 2005)

[0044] <실시예 5 ~ 9> DNA 앵타머 eGFP, gFFNP, Cy3의 제조

[0045] DNA 앵타머 결합을 위한 eGFP 부위특이적 돌연변이 유도

[0046] 본 발명에서는 SSMCC를 이용하여 화학적으로 DNA 앵타머를 단백질 나노입자 표면에 부착시키는 방법을 이용하였다. 상기 SSMCC는 아민과 티올 헤테로기능 교차 결합(amine-thiol heterofunctional cross-linker)를 생성시켜, 단백질 나노입자와 DNA 앵타머를 공유적으로 결합시킬 수 있게 한다. 그러나, eGFP의 티올(thiol) 기능기를 갖고 있는 2개의 시스테인(cysteine)은 eGFP 구조의 내부에 위치하고 있어, 상기 위치에 앵타머를 부착시키기 용이하지 않다. 이에, 본 발명자들은 eGFP 외부 루프(external loop)에 위치하고 있는 상기 175번째 세린(serine)을 시스테인(cysteine)으로 위치특이적 돌연변이 방법을 이용하여 치환한 후, 이를 DNA 앵타머 부착 위치로 선택하였다.

[0047] DNA 앵타머를 eGFP 및 gFFNP(e-GFP에 융합되어 있는 FFNP, 실시예 1)에 결합시키기 위하여, eGFP의 175번째 잔기를 세린(serine)에서 시스테인(systein)으로 변이시켰으며(Ser175Cys), 이때 사용한 프라이머는 하기와 같다(표 4 참조).

표 4

[0048]		서열(5'-3')
	서열번호 29 (정방향 프라이머)	AACATCGAGGACGGCTGCGTCAGCTCGCC
	서열번호 30 (역방향 프라이머)	GGCGAGCTGCACGCAGCCGCTCCTCGATGTT

[0049] * Genotech,Daejon,(South Korea) 제조, Tm = 86.1℃

[0050] 상기 부위특이적 돌연변이는 본 발명자들의 이전 연구에 기재되어 있는 최적화된 방법을 이용하여 수행되었다(Ahn, J. Y.et al., J. Nucleic Acids Res. 2005). DNA 젤 정제 및 서열 확인작업 후, 상기 E. coli BL21(DE 3)은 상기 부위특이적으로 변이된 eGFP(Ser175Cys), gFFNP + eGFP(Ser175Cys)를 각각 암호화할 수 있는 발현 벡터를 이용하여 형질전환되었으며, 그 후 암피실린(ampicillin) 저항성을 갖는 형질전환체를 최종적으로 선별하였다. 상기와 같은 재조합 유전자 발현 정제 및 형광 페리틴 나노입자의 TEM 이미지 분석 방법은 상기 기술된 방법과 동일하다.

[0051] **PDGF-BB에 특이적인 DNA 앵타머의 합성**

[0052] 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자(gFFNP)에 융합된 앵타머를 이용하여 진단 시스템에 적용 가능한지 확인하고자, 일반적으로 폐, 유방 및 위암과 같은 다양한 암의 검출을 위한 마커로 알려져 있는 PDGF-BB에 대한 특이적인 앵타머를 gFFNP에 융합하였다(Ariad, S., et al., Breast Cancer Res. Treat, 1991; Lubinus, M., et al., M. J. Biol. Chem, 1994).

[0053] PDGF-BB에 특이적이며, 높은 친화력을 갖는 서열번호 14의 앵타머를 합성하였으며, 상기 앵타머에 아민, Cy3 또는 비오틴을 융합시켜 3가지 종류의 앵타머를 합성하였다(표 5 참조).

[0054]

표 5

[0055]

		서열
1	아민(amine)이 변형된 DNA 앵타머	5'NH ₂ -(CH ₂) ₆ - CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTGT-3'
2	Cy3가 변형된 DNA 앵타머	5'Cy3-CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTGT-3'
3	비오틴(biotin)이 변형된 DNA 앵타머	5'biotin-(CH ₂) ₆ -CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTGT- 3'

[0056] * Genotech,Daejon,(South Korea) 제조

[0057] **gFFNP와 DNA 앵타머의 융합(DNA 앵타머-gFFNP)**

[0058] 우선, 상기에서 제조된 앵타머를 활성화시키기 위하여, 증류수에 100 uM의 농도로 제조된 앵타머 40 μl를 PBS 버퍼[137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na2HPO4, 2 Mm KH2PO4, pH 7.4] 100 μl와 2 mg SSMCC(sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate) (Pierce, Rockford, IL)를 포함하는 DMF(dimethylformamide) 60 μl 용액과 35℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 이때 반응되지 않은 과잉의 SSMCC는 QIAEX II Gel Extraction 키트(QIAGEN, Duesseldorf, Germany)를 이용하여 제거하였다.

[0059] 그 후, hFTNH, 링커 펩타이드(linker peptide) 및 상기 변형된 eGFP로 구성된 gFFNP 1ml에 1M의 DTT(dithiothreitol) 100 μl를 첨가하고 35℃에서 30분 동안 반응시켜, 나노입자들 사이에 남아있는 이황화 결합을 제거하였다. 그 후, 원심분리기(Amicon Ultra 100K, Millipore, Billerica, MA)를 이용하여 상기 용액의 부피를 500 μl로 농축시켰다. 그 후, 상기 SSMCC에 의하여 활성화된 DNA 앵타머 및 상기 부피가 감소된 gFFNP를 혼합시킨 후, 상온에서 어두운 상태에서 2시간 동안 반응시킴으로써, PDGF-BB에 특이적인 앵타머를 gFFNP에 융합시켰다.

[0060] 상기 gFFNP과 결합되지 않거나/반응하지 않은 DNA 앵타머를 초미세여과(ultrafiltration) (Amicon Ultra 100 K)를 이용하여 DNA 앵타머와 결합된 gFFNP(DNA 앵타머-gFFNP)와 분리시켰다. 그리고 상기 농축된 버퍼는 상술한 초미세여과를 이용하여 음이온 교환 버퍼 [20 mM[bis(2-hydroxyethyl)amino]tris(hydroxymethyl) methane (Bis-Tris), pH 6.0]로 교환되었다. 그 후, DNA 앵타머와 결합되지 않은 gFFNP를 제거하고, DNA 앵타머-gFFNP을 정제하기 위하여, Q Sepharose fast flow 비드 컬럼(GE Healthcare, Buckinghamshire, U.K.)을 이용한 음이

온 교환 크로마토그래피를 수행하였다.

[0061] 그 후, NaCl 농도를 0에서부터 0.7M(pH 6.0)로 점진적으로 증가시키면서 용리시켰으며, 상기 정제된 DNA 앵타머-gFFNP의 버퍼를 저장 버퍼[150 mM NaCl, 36.4 mM KH₂PO₄, 63.6 mM K₂HPO₄, 5 mM EDTA, pH 7.5]로 교환하였다.

[0062] **eGFP와 DNA 앵타머의 융합(DNA 앵타머- eGFP 및 Cy3)**

[0063] DNA 앵타머- eGFP 의 경우, 상기 실시예 <2-1>의 DNA 앵타머-gFFNP와 동일한 방법으로 DNA 앵타머를 eGFP에 각각 융합시켰다. 다만, 이때 융합되지 않은 DNA 앵타머를 제거하기 위하여, 니켈 친화성 크로마토그래피(nickel affinity chromatography)(QIAGEN)를 이용하였다는 점에서 차이점이 있다. 그 이후의 정제 과정은 상술한 DNA 앵타머-gFFNP와 동일하다.

[0064] 상기 DNA 앵타머- eGFP 또는 DNA 앵타머-gFFNP의 DNA 농도는 260 nm의 흡광도에서 측정되었다. 상기 단백질 나노입자의 농도의 경우, 페리틴(ferritin) 입자 1개 및 24 eGFP 모노머(monomer) (Biovision, Mountain View, CA)를 포함하고 있는 샘플의 흡광도를 gFFNP 1개의 나노입자의 흡광도로 측정한 결과를 기준으로 하고, 브래드포드(Bradford) 방법을 이용하여 측정되었다.

표 6

[0065]

	발현 벡터
실시예 5	pT7-FTH-LNK-GFP (S175C)
실시예 6	pT7-FTH-LNK-GFP (S175C)-앵타머 1
실시예 7	pT7-FTH-LNK-앵타머 2
실시예 8	pT7-FTH-LNK-GFP (S175C)-앵타머 3
실시예 9	pT7-GFP (S175C) -앵타머 1

[0066] **<실험예 1> 형광 단백질 나노입자의 방출(emission)강도의 측정**

[0067] **<1-1> eGFP 형광 단백질 나노입자의 방출 강도(gFFNP)**

[0068] 본 발명자들은 상기 실시예에서 제조된 형광 단백질 나노입자의 방출(emission) 강도 및 상기 입자의 TEM 이미지를 분석하였으며, 구체적으로, 상기 각 입자의 방출 강도를 측정하기 위하여 Tecan(GENios)을 이용하여 측정하였으며, 상기 방법은 하기 논문에 기재된 바와 동일하다(Kim KR et al., Biochem Biophys Res Commun. 2011 408(2):225-9).

[0069] 구체적으로, 상기 실시예 1 내지 9의 형광 단백질 나노입자 가운데, 도 2a에 나타난 입자(실시예 1, 2, 5 및 6)들을 이용하였는데, 이들은 녹색 형광을 나타내는 eGFP가 융합된 단백질들이다. 도 2a의 a는 eGFP와 hFTN-H 융합 단백질을, b는 eGFP와 hFTN-H 사이에 링커 펩타이드가 연결된 융합 단백질을, c는 eGFP의 175번째 세린(serine)이 시스테인(cysteine)으로 변이된 eGFP(Ser175Cys)-hFTN-H를, d는 eGFP(Ser175Cys)-hFTN-H에 앵타머가 연결된 융합 단백질의 모식도를 나타내고 있다(도 2a 참조).

[0070] 형광 페리틴 나노입자의 방출(emission) 정도를 살펴본 결과, 실시예 1의 hFTN-H이 eGFP에 융합된 단백질의 형광 방출정도가 eGFP 단일 형광 단백질(대조군 1)에 비하여 약 11배 정도 증가한 것을 관찰할 수 있었다(도 2c의 막대 2). 그러나, 상기 결과는 하나의 페리틴에 24개의 eGFP가 결합한다는 것을 고려할 때, 약 50% 정도의 증가한 결과로 파악되었다(도 2c, 1번 막대 -eGFP 단일 형광 단백질, 2번 막대-실시예 1의 hFTN-H이 eGFP에 융합된 단백질). (도 2c의 분석에 있어서, 단일 gFFNP로부터 방출되는 형광세기에 대한 단일 eGFP의 형광세기를 비교하기 위하여, gFFNP 용액 내에 존재하는 단백질 나노입자의 수는 DsRed 용액 내의 DsRed 단백질 분자의 수와 동일하게 조정하였다.) 이러한 결과는 eGFP가 gFFNP에 가까이 존재하기 때문에 발생한 형광 퀀칭(quenching)에 의한 결과라고 추정된다. 상기 형광 퀀칭 효과는 일반적으로 상기 형광물질이 각각 1 내지 10 nm 이내에 위치할 때 발생한다고 알려져 있다.

[0071] 또한, 도 2c의 막대 3은 hFTN-H의 C 말단과 eGFP의 N 말단 사이에 링커 펩타이드(G3SG3TG3SG3)(약 4.5 nm)(서열번호 3)를 hFTN-H의 C 말단과 eGFP의 N 말단 사이에 삽입한, 실시예 2의 형광 방출 결과이다(도 1 및 2A 참조). 링커 펩타이드를 eGFP와 hFTN-H 사이에 삽입하였을 때, 링커 펩타이드를 포함하고 있지 않은 실시예 1의

형광 단백질에 비하여, 형광 방출이 약 1.74배 증가하였으며, 이는 eGFP에 비하여 거의 20배 가까이 증가한 것과 같다. 이러한 결과는 링커 펩타이드가 단백질의 유연성 및 용해도를 증가시켜, 퀀칭 효과를 감소시킴으로써 나타나는 것으로 판단되었다.

[0072] 또한, 도 2c의 막대 6은 DNA 앵타머가 융합된 실시예 6의 형광 단백질 나노입자의 형광 방출 정도를 나타낸 결과로서, eGFP 단일(도 2의 C의 막대 1)에 비하여 29배 높은 수치를 나타냈으며, 이는 링커 펩타이드를 갖고 있는 실시예 2의 방출 정도를 기준으로 약 50% 증가한 수치였다. 이러한 결과가 나타난 이유는 gFFNP의 표면에 위치한 eGFP 사이의 공간적인 거리가 융합된 DNA 앵타머 핵산의 음전하의 반발력에 의하여 적절히 유지되며, 이에 따라 퀀칭(quenching) 효과가 감소된 것으로 판단되었다.

[0073] 또한, 도 2c는 실시예 5(FTH-LNK-GFP (S175C)) 및 상기 실시예 5의 형광 단백질 나노입자에 DTT가 처리된 입자의 형광 방출정도를 비교한 결과로서, 형광 단백질 자체의 변이 및 앵타머 융합에 이용된 DTT 처리가 형광 방출 정도에 영향을 미치지 않고 있음이 관찰되었다. 또한, 상기 도 2의 B에 나타난 TEM 이미지 및 히스토그램에서도, 균일한 사이즈를 갖는 페리틴 나노입자가 구형을 형성하는 것을 확인할 수 있었다.

[0074] <1-2> DsRed 형광 단백질 나노입자(rFFNP)

[0075] 상기 실험에 <1-1>과 동일한 방법을 이용하였으며, 다만 형광물질이 eGFP가 아닌 DsRed가 결합된 형광 페리틴 나노입자(rFFNPs, hFTN-H-DsRed)의 형광 세기를 측정하였으며, 이때 페리틴과 DsRed 형광물질 사이에 링커 펩타이드의 유무에 따른 정도를 비교하였다. 즉, 실시예 3과 실시예 4의 나노입자의 특성을 비교하였다. 형광 방출 측정 방법 및 TEM 이미지 분석 방법은 상기 실험에 <1-1>과 동일하다.

[0076] 도 3c의 막대 2는 페리틴 나노입자와 DsRed 형광 물질 사이에 링커 펩타이드가 존재하지 않는 실시예 3을 관찰한 결과로서, 페리틴이 융합되어 있지 않은 DsRed(도 3의 C, 막대 1)에 비하여 형광 방출정도가 약 4배 정도 증가하였다. 즉, 이러한 결과는 링커 펩타이드가 없는 rFFNP의 DsRed 형광 단백질 사이의 퀀칭 효과가 gFFNP의 eGFP에 비하여 현저히 강하게 발생하는 것으로 관찰되었다(도 3의 C의 분석에 있어서, 단일 rFFNP로부터 방출되는 형광세기에 대한 단일 DsRed의 형광세기를 비교하기 위하여, rFFNP 용액 내에 존재하는 단백질 나노입자의 수는 DsRed 용액 내의 DsRed 단백질 분자의 수와 동일하게 조정하였다.).

[0077] 도 3c의 막대 3은 상기 실험에 <1-1>의 gFFNP에 삽입한 것과 동일한 링커 펩타이드를 hFTN-H와 DsRed 사이에 삽입한 실시예 4의 결과를 나타낸 것이며, 형광 방출의 정도는 링커 펩타이드가 삽입되지 않은 rFFNP에 비하여 68% 증가하였다. 또한, 도 3의 B에 나타난 TEM 이미지와 히스토그램은 균일한 사이즈를 갖는 페리틴 나노입자가 구형을 형성하는 것을 확인할 수 있었다.

[0078] 종합하면 도 2 및 도 3의 결과로부터, 상기 hFTN-H와 형광 단백질(eGFP 또는 DsRed)사이에서 삽입한 링커 펩타이드가 FFNP의 발광 정도를 감소시키는 퀀칭(quenching) 효과를 감소시키는데 가장 중요한 것이라는 것을 확인할 수 있었다.

[0079] <실험예 2> 형광 단백질 나노입자의 안정성 측정

[0080] 본 발명에 따른 형광 단백질 나노입자의 안정성은 16일 동안 2일 간격으로 스팟 측정(spot measurement)결과를 통하여 확인하였다. 상기 eGFP 및 gFFNP 샘플은 분석 기간 내내 여기(excitation) 파장에 끊임없이 노출되지 않았으며, 2일 간격으로 노출되었다.

[0081] 마일드(mild)한 온도(25℃)에서의 장기 안정성을 분석한 결과, eGFP의 안정적인 β 통형 구조(β-barrel structure)에도 불구하고, eGFP는 2주 이내에 초기의 방출강도의 60%가 감소하는 반면, gFFNP의 초기 형광 방출 정도의 90% 이상이 상기와 동일한 기간 동안 유지되었다. 이러한 결과는 본 발명에 따른 gFFNP의 안정성이 현저하게 증가하였다는 것을 의미한다(도 4 참조).

[0082] <실험예 3> 형광 단백질 나노입자를 이용한 앵타머 기반의 분자 생물학적 검출 방법

[0083] 상기 실험예를 통하여, 본 발명에 의하여 개발된 형광 단백질 나노입자는 DNA 앵타머와 융합하였을 때, 형광의 세기, 안정성 및 민감도가 매우 우수하다는 것을 확인할 수 있다. 이에, 본 발명자들은 DNA 앵타머-형광 페리틴

나노입자를 프로브(probe)로서 유용하게 활용할 수 있는지 확인하기 위하여, PDGF-BB 특이적인 앵타머와 융합되어 있는 형광 페리틴 나노입자를 이용하여, PBS 수용액 또는 희석된 혈청 내의 PDGF-BB를 검출하는 실험을 수행하였다.

[0084] 구체적으로, 상기 실시예 6 내지 8에서 합성된 아민, Cy3 및 비오틴이 각각 융합된 gFFNP를 프로브로 이용하여 앵타머 기반의 샌드위치 분석을 수행하였다. 이때 gFFNP를 선택한 이유는 eGFP가 DsRed에 비하여 밝기 및 광안정성(photostability)이 더욱 우수하기 때문에 gFFNP를 선택하여 실험을 수행하였다(Shaner, N. et al., Nat. Methods 2005).

[0085] <3-1> DNA 앵타머-gFFNP 프로브를 이용한 96웰 PDGF-BB 검출 방법

[0086] 상기 비오틴-변형된 DNA 앵타머 프로브를 96웰 플레이트(Corning Inc., Corning, NY)에 고정시키기 전에, 코스타의 high-binding 96웰 플레이트를 100 ng의 스타프타비딘(streptavidin) (New England Biolabs, Hitchin, Herts, England)을 포함하는 PBS[137 mM NaCl, 2.7mMKCl, 10mMNa₂HPO₄, 2mMKH₂PO₄, pH7.4] 버퍼와 4℃에서 12 시간 동안 반응시켰다. 그 후, 비오틴-변형된 DNA 앵타머(10 nM) 20 μl를 상기 96웰 플레이트에 1시간 30분 동안 반응시켰다. 상기 플레이트는 그 후 상술한 PBS 버퍼로 5분 동안 세척되었다.

[0087] 1 fM 내지 10 nM 농도의 PDGF-BB(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)를 포함하고 있는 분석물을 포함하고 있는 PBS 버퍼 또는 건강한 인간 혈청(5%) 150 μl은 각각의 웰(well)에 첨가된 후에 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다.

[0088] 그 후, 상기 플레이트는 상술한 PBS 버퍼를 이용하여 5분 동안 세척하였으며, 그 후, 저장 버퍼에 있는 DNA 앵타머-gFFNP(5 μg/mL) 35μl를 각각의 웰에 첨가한 후, 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다.

[0089] 각 웰에 50 μl PBS 버퍼를 첨가하고, 3회 연속하여 세척하는 단계를 거친 후, 상기 형광 신호는 마이크로플레이트 리더(Tecan, GENios)를 이용하여 측정되었다(485 nm excitation / 535 nm emission).

[0090] <3-2> eGFP 및 Cy3 융합된 단백질을 이용한 96웰 PDGF-BB 검출 방법

[0091] 상기 실험에 있어서, 페리틴 나노입자(gFFNP)를 대신하여, eGFP 및 Cy3가 각각 융합된 형광 단백질을 DNA 앵타머와 융합하였다는 점을 제외하고는 동일한 방법으로, DNA 앵타머-eGFP 및 DNA 앵타머-Cy3를 이용하여 96웰 플레이트에서 PDGF-BB를 검출하는 실험을 수행하였다.

[0092] 분석 결과, 도 5의 B에 나타난 바와 같이, 상기 비오틴 DNA 앵타머-gFFNP와 비교하여, DNA 앵타머-eGFP 및 Cy3의 형광 신호는 PDGF-BB 전체 농도 범위에서 현저히 낮았다. 도 5의 B 결과 그래프는 전형적인 랭뮤어-등온(Langmuir-isotherm) 곡선을 나타내고 있는데, 이는 신호는 농도 범위에서 거의 선형이며, 높은 용질 농도에서 포화 값으로 수렴된다는 것을 의미한다. 상기 신호가 포화된 결과는 캡처 프로브(capture probe)의 포화, 용질의 포화로 인한 캡처 프로브의 결합 방해, 및 결합 부위 경쟁(binding-site competition)에 의한 것이라고 추정된다.

[0093] 전형적인 랭뮤어-등온 모델에 따르면(흡착 등온선의 선형 형태, $C/NF = C/NF_{satd} + KD/NF_{satd}$, 이때, C, NF, NF_{satd} 및 KD는 PDGF-BB 농도, 전체 형광(센서 신호), 포화된 전체 형광 및 해리 상수(dissociation constant)를 각각 의미함), 도 5의 C에서 명확하게 나타난 바와 같이, 신호들은 충분히 희석된 농도의 용질에서 모두 선형을 나타냈다.

[0094] 도 5의 C의 랭뮤어 흡착 등온의 선형화된 형태 및 선형화 곡선을 기준으로, 상기 해리 상수(dissociation constant, KD)는 DNA-앵타머-gFFNP, eGFP, 및 Cy3를 각각 이용한 PDGF-BB 분석 방법에 의해서 측정되었으며, 그 결과는 하기 표 6과 같다.

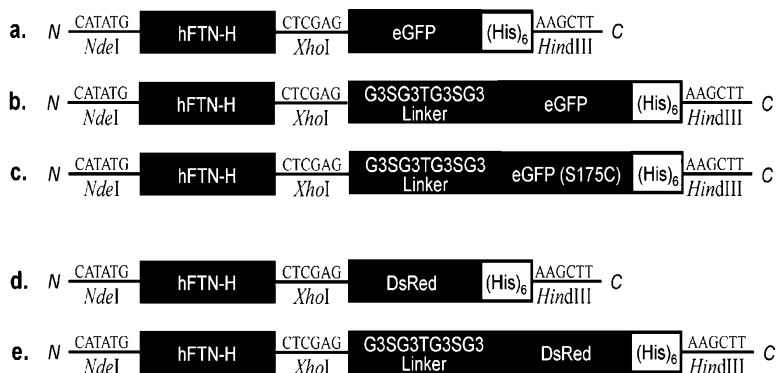
표 7

	DNA-앵타머- FFNPs	DNA-앵타머-eGFP,	DNA-앵타머- Cy3
해리 상수(KD)	6.0 X10 ¹⁴	4.0 X10 ¹¹	5.0 X10 ¹¹

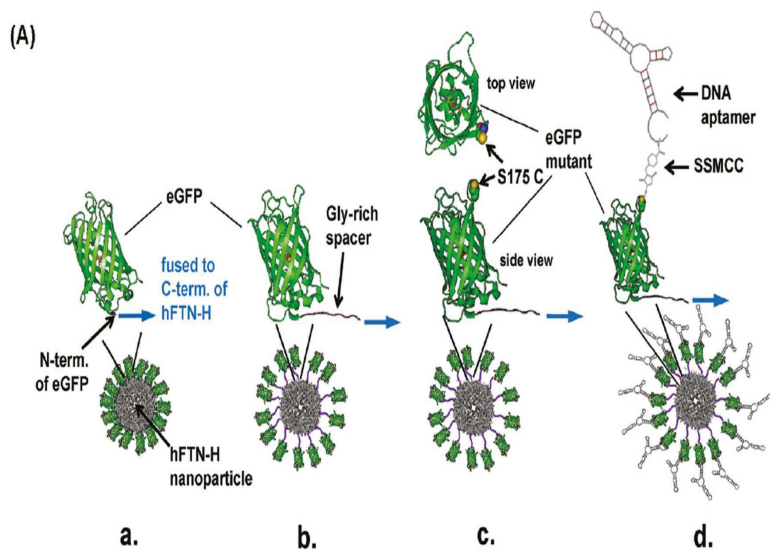
- [0096] *단위: $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
- [0097] 이러한 결과는 상기 DNA-애타머- eGFP 및 Cy3 리포터에 비하여, DNA-애타머-gFFNP의 삼차원 구조, 즉 1개의 구형 gFFNP당 24개의 DNA 애타머가 결합된 구조가 표적 마커 단백질인 PDGF-BB에 gFFNP가 더욱 효과적으로 접근이 가능하게 하여, 검출 민감도를 더욱 상승시킬 수 있게 하는 효과라고 판단할 수 있었다.
- [0098] 즉, 본 발명에 따른 DNA 애타머-gFFNP를 이용한 검출 방법이 검출한계를 eGFP 기반 분석의 피코몰(picomolar) 수준에서 나노몰(nanomolar)의 수준으로 낮출 수 있으므로, 애타머 기반의 분석 방법에 유용하게 사용할 수 있을 것으로 예상된다.
- [0099] 아울러, 도 2의 C에서 확인된 수용액 상태에서 eGFP에 비하여 약 29배 더욱 민감한 정도를 나타낸 DNA 애타머-gFFNP의 결과에서 예상된 바에 비하면 gFFNP 및 eGFP 기반의 분석 사이의 형광 신호의 차이가 작게 관찰되었다. 이러한 결과는 수용액 상태에서 자가 퀀칭(quenching) 현상이 표면에서 더욱 심하게 일어나기 때문이라고 추정된다. 또한, gFFNP에 결합되어 있는 eGFP가 표면에 노출될 때는 gFFNP에 결합되지 않은 eGFP에 비하여 더욱 높은 부분 밀도를 갖고 있기 때문에 2차원 표면에 노출될 때, gFFNP이 eGFP에 비하여 더욱 심하게 자가 퀀칭 현상을 나타내는 것이라고 사료되었다.
- [0100] <3-3> 생물학적 시료를 이용한 DNA 애타머-gFFNP 분석 방법
- [0101] 본 발명에 따른 DNA 애타머-gFFNP를 이용한 분석 방법이 생물학적 시료에서도 우수한 민감도를 보이며 검출 효과를 나타낼 수 있는지 확인하고자, 상기 실험예 <3-1>과 달리, 분석 대상으로 PDGF-BB를 포함하고 있는 혈청을 이용하였다.
- [0102] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 동일한 DNA 애타머 기반의 분석을 통해 건강한 인간의 혈청을 희석한 용액(5%)내의 PDGF-BB 또한 높은 LOD(1 내지 10 Pm PDGF-BB)로 검출되었으며, 이는 본 발명에 따른 분석 방법이 생물학적인 환경 내에서도 유용하게 사용될 수 있다는 것을 의미한다(도 6 참조). 도 6의 A는 또한 전형적인 랭뮤-등온 곡선을 나타내며, 도 6의 B는 상기 신호가 PDGF-BB가 희석된 농도에서 모두 선형임을 나타내고 있다.

도면

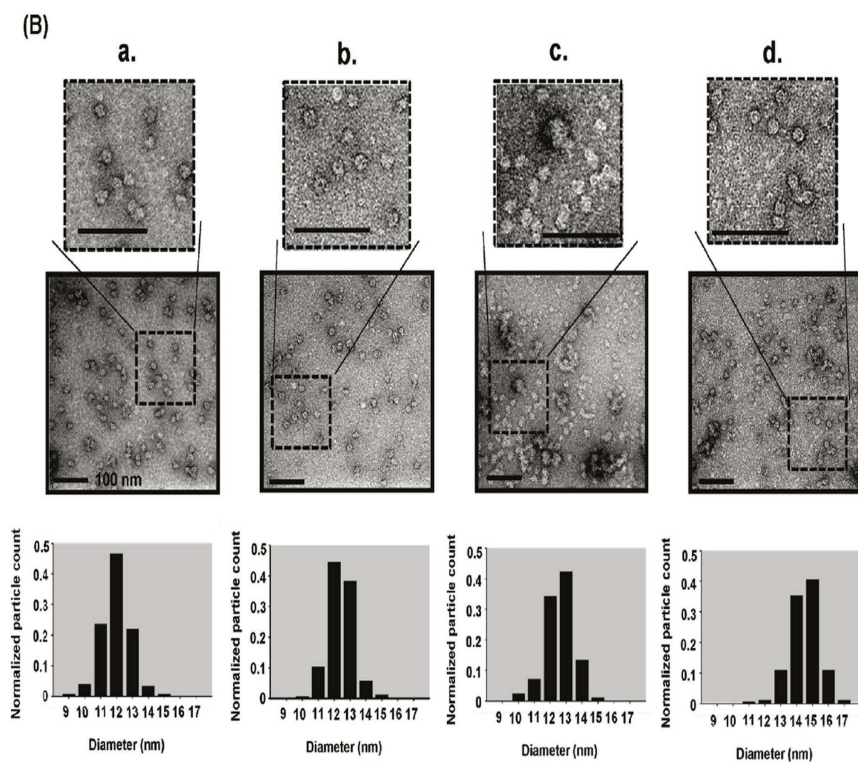
도면1



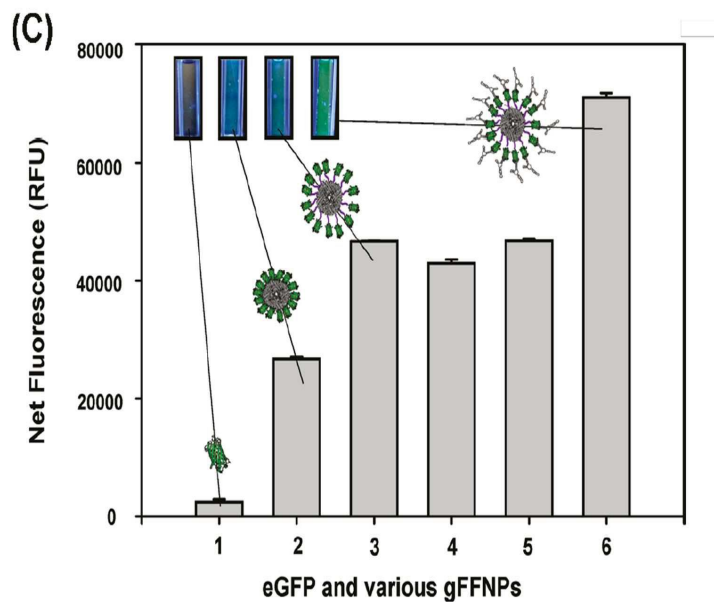
도면2a



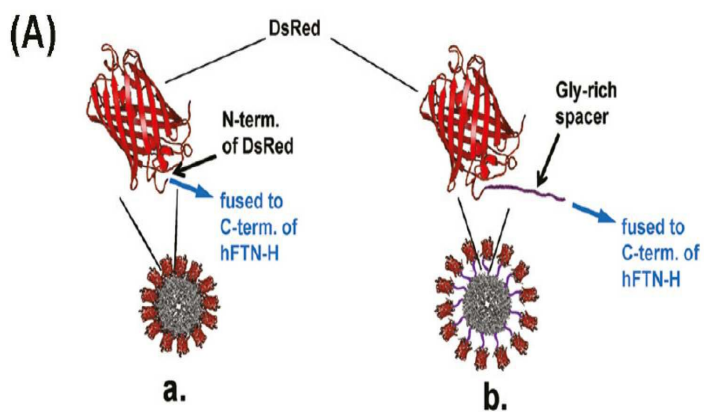
도면2b



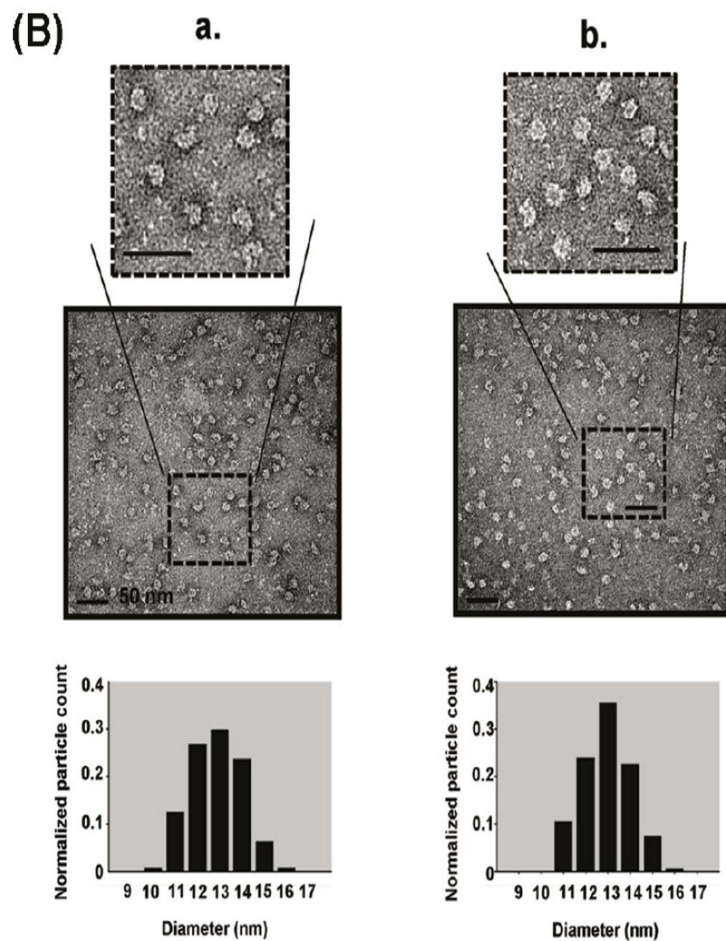
도면2c



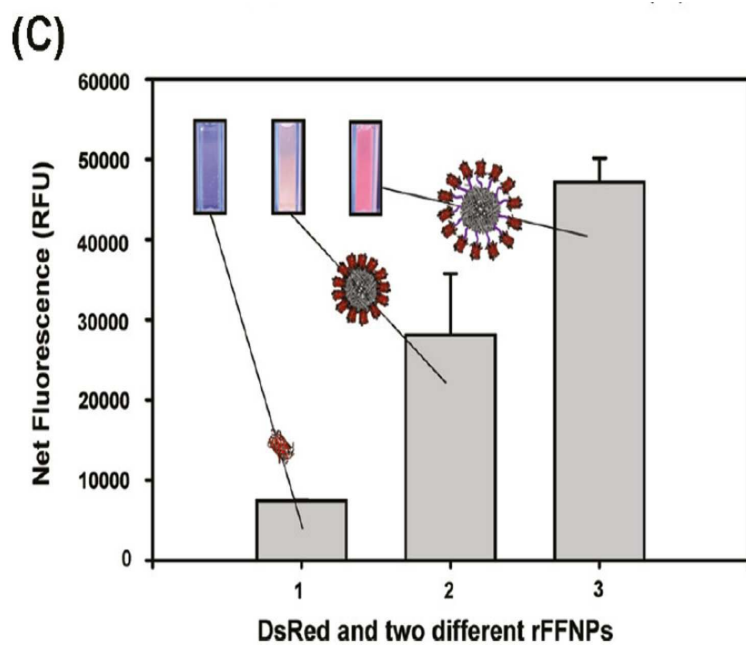
도면3a



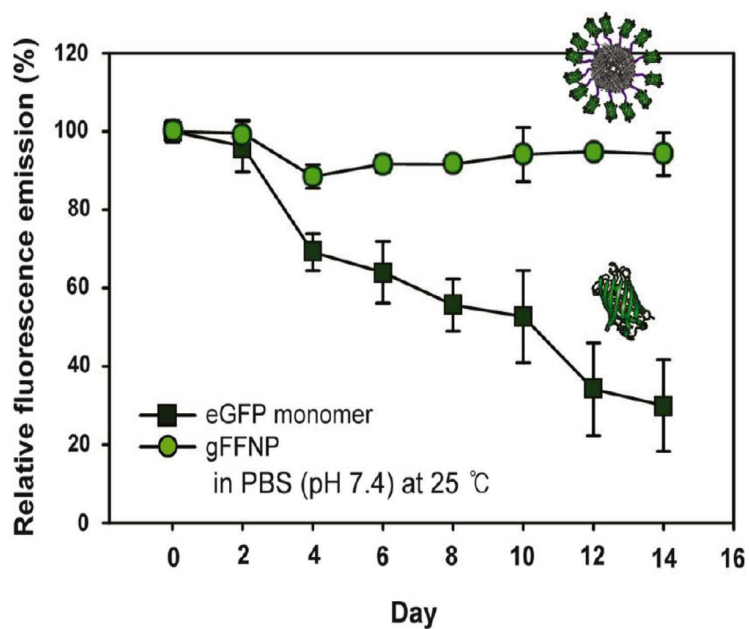
도면3b



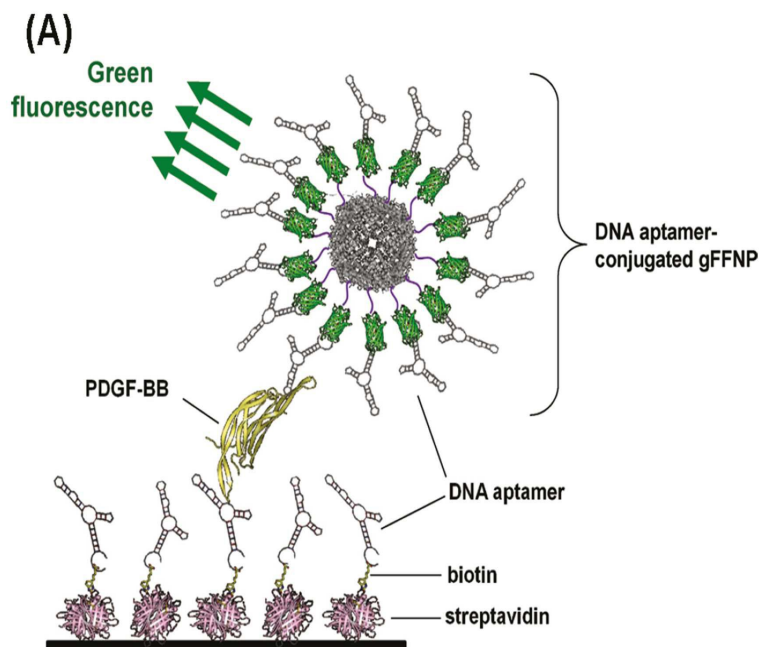
도면3c



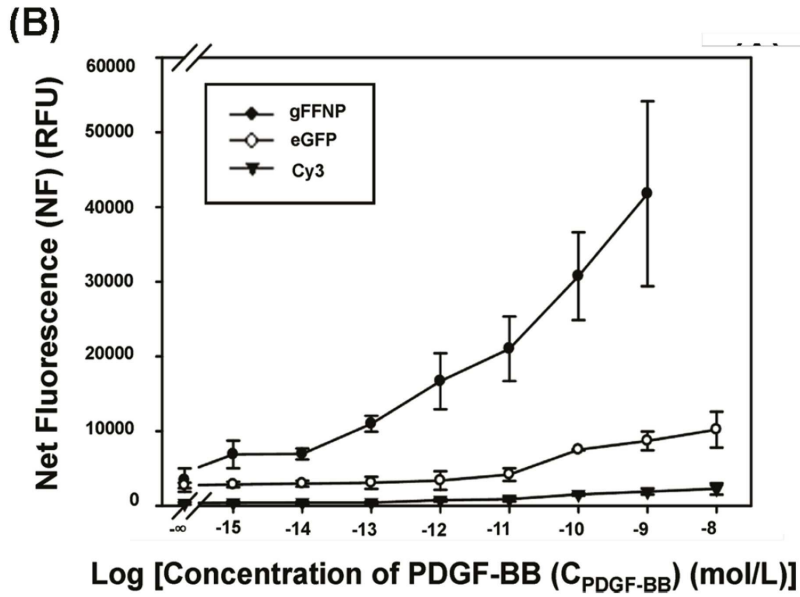
도면4



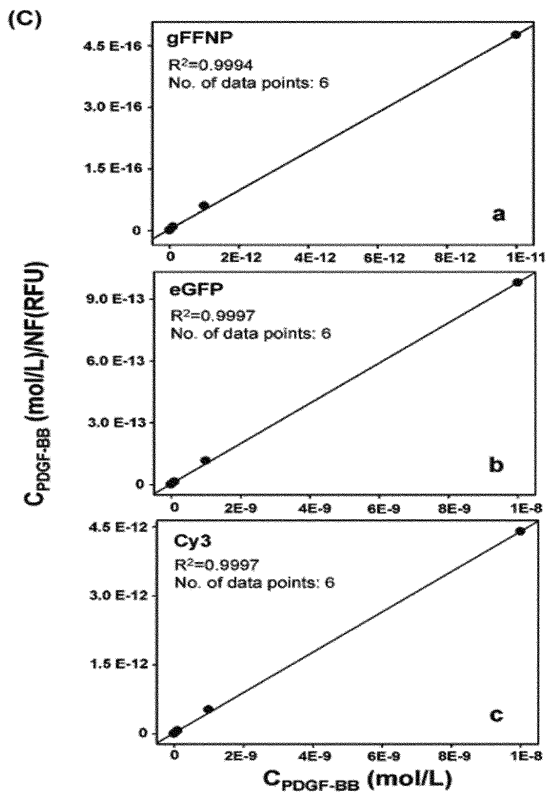
도면5a



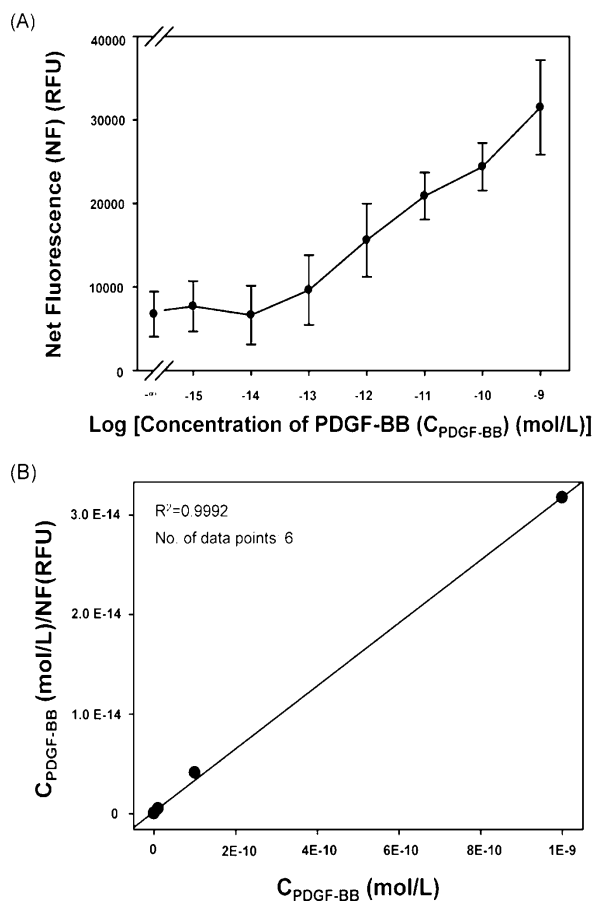
도면5b



도면5c



도면6



서열목록

<110> KOREA UNIVERSITY INDUSTRIAL & ACADEMIC COLLABORATION FOUNDATION

<120> Recombinant fluorescent nanoparticles and the method for
biomolecular detection thereof

<130> HY111352

<160> 30

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gly Arg Ile Phe Leu Gln Asp

1 5

<210> 2

<211> 183

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Thr Ala Ser Thr Ser Gln Val Arg Gln Asn Tyr His Gln Asp

1 5 10 15
Ser Glu Ala Ala Ile Asn Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Tyr Ala Ser
20 25 30
Tyr Val Tyr Leu Ser Met Ser Tyr Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala
35 40 45
Leu Lys Asn Phe Ala Lys Tyr Phe Leu His Gln Ser His Glu Glu Arg
50 55 60
Glu His Ala Glu Lys Leu Met Lys Leu Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg
65 70 75 80

Ile Phe Leu Gln Asp Ile Lys Lys Pro Asp Cys Asp Asp Trp Glu Ser
85 90 95
Gly Leu Asn Ala Met Glu Cys Ala Leu His Leu Glu Lys Asn Val Asn
100 105 110
Gln Ser Leu Leu Glu Leu His Lys Leu Ala Thr Asp Lys Asn Asp Pro
115 120 125
His Leu Cys Asp Phe Ile Glu Thr His Tyr Leu Asn Glu Gln Val Lys
130 135 140
Ala Ile Lys Glu Leu Gly Asp His Val Thr Asn Leu Arg Lys Met Gly

145 150 155 160
Ala Pro Glu Ser Gly Leu Ala Glu Tyr Leu Phe Asp Lys His Thr Leu
165 170 175
Gly Asp Ser Asp Asn Glu Ser
180

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker peptide 1

<400> 3
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 1 5 10 15

<210> 4

<211

> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker peptide 2

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker peptide 3

<400> 5

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

<210> 6

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker peptide 4

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr

1 5 10

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Linker peptide 5

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 8

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant fluorescent nanoparticle(eGFP)

<400> 8

Met Thr Thr Ala Ser Thr Ser Gln Val Arg Gln Asn Tyr His Gln Asp

1 5 10 15

Ser Glu Ala Ala Ile Asn Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Tyr Ala Ser

20 25 30

Tyr Val Tyr Leu Ser Met Ser Tyr Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala

35 40 45

Leu Lys Asn Phe Ala Lys Tyr Phe Leu His Gln Ser His Glu Glu Arg

50 55 60

Glu His Ala Glu Lys Leu Met Lys Leu Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg

65 70 75 80

Ile Phe Leu Gln Asp Ile Lys Lys Pro Asp Cys Asp Asp Trp Glu Ser

85 90 95

Gly Leu Asn Ala Met Glu Cys Ala Leu His Leu Glu Lys Asn Val Asn

100 105 110

Gln Ser Leu Leu Glu Leu His Lys Leu Ala Thr Asp Lys Asn Asp Pro

115 120 125

His Leu Cys Asp Phe Ile Glu Thr His Tyr Leu Asn Glu Gln Val Lys

130 135 140

Ala Ile Lys Glu Leu Gly Asp His Val Thr Asn Leu Arg Lys Met Gly

145 150 155 160

Ala Pro Glu Ser Gly Leu Ala Glu Tyr Leu Phe Asp Lys His Thr Leu

165 170 175

Gly Asp Ser Asp Asn Glu Ser Leu Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

180 185 190

Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe
195 200 205

Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly
210 215 220

His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly
225 230 235 240

Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro
245 250 255

Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser
260 265 270

Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met
275 280 285

Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly
290 295 300

Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val
305 310 315 320

Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile
325 330 335

Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile
340 345 350

Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg
355 360 365

His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln
370 375 380

Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr
385 390 395 400

Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp
405 410 415

His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly
420 425 430

Met Asp Glu Leu Tyr Lys His His His His His His

435

440

<210> 9

<211> 430

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Recombinant fluorescent nanoparticle(DsRed)

<400> 9

Met Thr Thr Ala Ser Thr Ser Gln Val Arg Gln Asn Tyr His Gln Asp

1 5 10 15

Ser Glu Ala Ala Ile Asn Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Tyr Ala Ser

20 25 30

Tyr Val Tyr Leu Ser Met Ser Tyr Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala

35 40 45

Leu Lys Asn Phe Ala Lys Tyr Phe Leu His Gln Ser His Glu Glu Arg

50 55 60

Glu His Ala Glu Lys Leu Met Lys Leu Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg

65 70 75 80

Ile Phe Leu Gln Asp Ile Lys Lys Pro Asp Cys Asp Asp Trp Glu Ser

85 90 95

Gly Leu Asn Ala Met Glu Cys Ala Leu His Leu Glu Lys Asn Val Asn

100 105 110

Gln Ser Leu Leu Glu Leu His Lys Leu Ala Thr Asp Lys Asn Asp Pro

115 120 125

His Leu Cys Asp Phe Ile Glu Thr His Tyr Leu Asn Glu Gln Val Lys

130 135 140

Ala Ile Lys Glu Leu Gly Asp His Val Thr Asn Leu Arg Lys Met Gly

145 150 155 160

Ala Pro Glu Ser Gly Leu Ala Glu Tyr Leu Phe Asp Lys His Thr Leu

165 170 175

Gly Asp Ser Asp Asn Glu Ser Leu Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

180 185 190

Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Asp Asn Thr Glu Asp Val Ile Lys
195 200 205

Glu Phe Met Gln Phe Lys Val Arg Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His
210 215 220

Tyr Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly Glu Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Thr
225 230 235 240

Gln Thr Ala Lys Leu Gln Val Thr Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala
245 250 255

Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe Gln Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val
260 265 270

Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp Tyr Met Lys Leu Ser Phe Pro Glu
275 280 285

Gly Phe Thr Trp Glu Arg Ser Met Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val
290 295 300

Glu Val Gln Gln Asp Ser Ser Leu Gln Asp Gly Thr Phe Ile Tyr Lys
305 310 315 320

Val Lys Phe Lys Gly Val Asn Phe Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Gln
325 330 335

Lys Lys Thr Ala Gly Trp Glu Pro Ser Thr Glu Lys Leu Tyr Pro Gln
340 345 350

Asp Gly Val Leu Lys Gly Glu Ile Ser His Ala Leu Lys Leu Lys Asp
355 360 365

Gly Gly His Tyr Thr Cys Asp Phe Lys Thr Val Tyr Lys Ala Lys Lys
370 375 380

Pro Val Gln Leu Pro Gly Asn His Tyr Val Asp Ser Lys Leu Asp Ile
385 390 395 400

Thr Asn His Asn Glu Asp Tyr Thr Val Val Glu Gln Tyr Glu His Ala
405 410 415

Glu Ala Arg His Ser Gly Ser Gln His His His His His His
420 425 430

<210> 10

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFP

<400> 10

Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val

1 5 10 15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu

20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys

35 40 45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu

50 55 60

Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln

65 70 75 80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg

85 90 95

Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val

100 105 110

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile

115 120 125

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn

130 135 140

Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly

145 150 155 160

Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val

165 170 175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro

180 185 190

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser

195 200 205

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val

210 215 220

Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys

225 230 235

<210> 11

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DsRed

<400> 11

Asp Asn Thr Glu Asp Val Ile Lys Glu Phe Met Gln Phe Lys Val Arg

1 5 10 15

Met Glu Gly Ser Val Asn Gly His Tyr Phe Glu Ile Glu Gly Glu Gly

20 25 30

Glu Gly Lys Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Thr Ala Lys Leu Gln Val Thr

35 40 45

Lys Gly Gly Pro Leu Pro Phe Ala Trp Asp Ile Leu Ser Pro Gln Phe

50 55 60

Gln Tyr Gly Ser Lys Ala Tyr Val Lys His Pro Ala Asp Ile Pro Asp

65 70 75 80

Tyr Met Lys Leu Ser Phe Pro Glu Gly Phe Thr Trp Glu Arg Ser Met

85 90 95

Asn Phe Glu Asp Gly Gly Val Val Glu Val Gln Gln Asp Ser Ser Leu

100 105 110

Gln Asp Gly Thr Phe Ile Tyr Lys Val Lys Phe Lys Gly Val Asn Phe

115 120 125

Pro Ala Asp Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr Ala Gly Trp Glu Pro

130 135 140

Ser Thr Glu Lys Leu Tyr Pro Gln Asp Gly Val Leu Lys Gly Glu Ile

145 150 155 160

Ser His Ala Leu Lys Leu Lys Asp Gly Gly His Tyr Thr Cys Asp Phe

165 170 175

Lys Thr Val Tyr Lys Ala Lys Lys Pro Val Gln Leu Pro Gly Asn His

180 185 190

Tyr Val Asp Ser Lys Leu Asp Ile Thr Asn His Asn Glu Asp Tyr Thr
 195 200 205

 Val Val Glu Gln Tyr Glu His Ala Glu Ala Arg His Ser Gly Ser Gln
 210 215 220
 <210> 12
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> eGFP mutant (S175C)
 <400> 12
 Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val
 1 5 10 15
 Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu
 20 25 30
 Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys
 35 40 45
 Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu
 50 55 60
 Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln
 65 70 75 80
 His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg
 85 90 95
 Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val
 100 105 110

 Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile
 115 120 125
 Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn
 130 135 140
 Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly
 145 150 155 160
 Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Cys Val
 165 170 175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro

180 185 190
Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser

195 200 205
Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val

210 215 220
Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys

225 230 235

<210> 13

<211> 444

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aptamer-Recombinant fluorescent nanoparticle(eGFP)

<400> 13

Met Thr Thr Ala Ser Thr Ser Gln Val Arg Gln Asn Tyr His Gln Asp
1 5 10 15

Ser Glu Ala Ala Ile Asn Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Tyr Ala Ser
20 25 30

Tyr Val Tyr Leu Ser Met Ser Tyr Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala
35 40 45

Leu Lys Asn Phe Ala Lys Tyr Phe Leu His Gln Ser His Glu Glu Arg
50 55 60

Glu His Ala Glu Lys Leu Met Lys Leu Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg

65 70 75 80
Ile Phe Leu Gln Asp Ile Lys Lys Pro Asp Cys Asp Asp Trp Glu Ser

85 90 95
Gly Leu Asn Ala Met Glu Cys Ala Leu His Leu Glu Lys Asn Val Asn

100 105 110
Gln Ser Leu Leu Glu Leu His Lys Leu Ala Thr Asp Lys Asn Asp Pro

115 120 125
His Leu Cys Asp Phe Ile Glu Thr His Tyr Leu Asn Glu Gln Val Lys

130

135

140

Ala Ile Lys Glu Leu Gly Asp His Val Thr Asn Leu Arg Lys Met Gly

145

150

155

160

Ala Pro Glu Ser Gly Leu Ala Glu Tyr Leu Phe Asp Lys His Thr Leu

165

170

175

Gly Asp Ser Asp Asn Glu Ser Leu Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

180

185

190

Thr Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe

195

200

205

Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly

210

215

220

His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly

225

230

235

240

Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro

245

250

255

Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser

260

265

270

Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met

275

280

285

Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly

290

295

300

Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val

305

310

315

320

Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile

325

330

335

Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile

340

345

350

Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg

355

360

365

His Asn Ile Glu Asp Gly Cys Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln

370

375

380

Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr
 385 390 395 400
 Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp
 405 410 415
 His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly
 420 425 430

Met Asp Glu Leu Tyr Lys His His His His His His
 435 440

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDGF-BB aptamer

<400> 14

cacaggctac ggcacgtaga gcatcaccat gatcctgtgt 40

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for Clone1

<400> 15

catatgacga ccgcgtccac c 21

<210>

16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for Clone1

<400> 16

ctcgaggett tcattatcac tgtc 24

<210> 17

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for Clone2

<400> 17

catatgcatc atcaccacca tcatctcgag gtgagcaagg gcgagga 47

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for Clone2

<400> 18

aagcttttac ttgtacagct cgtc 24

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for Clone3

<400> 19

ctcgaggtga gcaagggcga gga 23

<210> 20

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for Clone3

<400> 20

aagcttttag tgatggtgat ggtgatgctt gtacagctcg tc 42

<210>

> 21

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer1 for Clone4

<400> 21

ctcgaggggtg gcggaagtgg gggaggcact ggaggtggca gcggc 45

<210> 22

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer2 for Clone4

<400> 22

actggagggtg gcagcggcgg tggggtgagc aagggcgagg ag 42

<210> 23

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for Clone4

<400> 23

aagcttttag tgatggtgat ggtgatgctt gtacagctcg tc 42

<210> 24

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for Clone5

<400> 24

ctcgaggaca acaccgagga cgtca 25

<210> 25

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for Clone5

<400> 25

aagcttttag tgatggtgat ggtgatgctg ggagccggag tgg 43

<210>

> 26

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer1 for Clone6

<400> 26

ctcgagggtg gcggaagtgg gggaggcact ggaggtggca gcggc 45

<210> 27
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer2 for Clone6
 <400> 27
 actggaggtg gcagcggcgg tggggacaac accgaggacg tca 43
 <210> 28
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for Clone6
 <400> 28
 aagcttttag tgatggtgat ggtgatgctg ggagccggag tgg 43
 <210> 29
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for mutagenesis
 <400> 29
 aacatcgagg acggctgcgt gcagctcgcc 30
 <210> 30
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for mutagenesis
 <400> 30
 ggcgagctgc acgcagccgt cctcgatgtt 30