



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0028637
(43) 공개일자 2017년03월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/46 (2006.01) C07K 16/40 (2006.01)
C07K 16/42 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/468 (2013.01)
C07K 16/40 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0125494

(22) 출원일자 2015년09월04일

심사청구일자 2015년09월04일

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

강세병

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

민준선

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

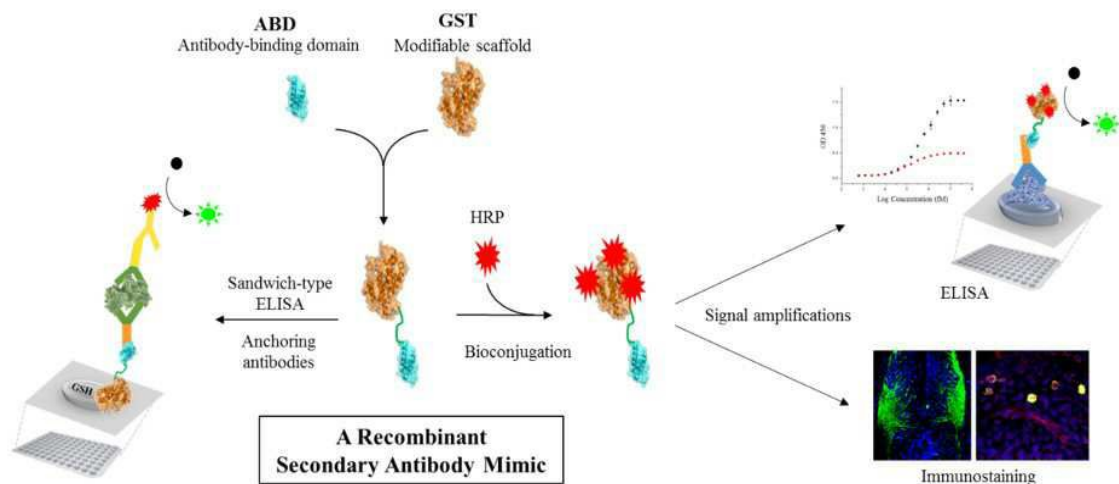
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 면역화학적 분석에서 신호증폭과 항체의 표면 고정을 담당하는 범용성 재조합 2차 항체 유사체

(57) 요약

본 발명은 면역화학적 분석에서 신호증폭과 항체의 표면 고정을 담당하는 범용성 재조합 2차 항체 유사체에 관한 것으로서, 글루타치온-S-트랜스퍼레이즈(glutathione-S-transferase; GST) 단백질 및 1차 항체의 Fc 부위에 결합하는 항체 결합 도메인(antibody-binding domain, ABD) 단백질이 융합된 GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체; 또는 겨자무 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP) 단백질, 글루타치온-S-트랜스퍼레이즈(glutathione-S-transferase; GST) 단백질 및 1차 항체의 Fc 부위에 결합하는 항체 결합 도메인(antibody-binding domain, ABD) 단백질이 융합된 HRP-GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체를 제공한다. 본 발명의 범용성 재조합 2차 항체 유사체는 값싸고 대량생산이 가능하며, 면역화학적 분석에서 2차 항체를 대체할 수 있으므로, 그 활용도가 매우 높을 것으로 예상된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/42 (2013.01)

C12N 15/70 (2013.01)

C12Y 111/01007 (2013.01)

C12Y 205/01018 (2013.01)

G01N 33/5306 (2013.01)

G01N 33/54306 (2013.01)

(72) 발명자

박태주

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

송은경

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A1008228

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 신진연구

연구과제명 단백질 나노입자 기반 표적형 테라노스틱 나노플랫폼의 개발

기 여 율 1/1

주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

글루타치온-S-트랜스퍼레이즈(glutathione-S-transferase; GST) 단백질 및 1차 항체의 Fc 부위에 결합하는 항체 결합 도메인(antibody-binding domain, ABD) 단백질이 융합된 GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 GST 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 ABD 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체.

청구항 4

GST 단백질을 코딩하는 유전자 및 ABD 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 GST 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 3의 염기서열로 표시되고, 상기 ABD 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 4의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 따른 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 미생물은 대장균인 것을 특징으로 하는 재조합 미생물.

청구항 8

제6항에 따른 재조합 미생물을 배양하여 GST-ABD 재조합 단백질을 발현시키는 단계; 및
상기 GST-ABD 재조합 단백질을 분리하는 단계를 포함하는 GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체 생산방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체를 항원-포획 항체(antigen-capturing antibodies)의 고정 매개체(anchoring adaptor)로 사용하는 샌드위치-타입 간접 ELISA(Sandwich-type indirect ELISA) 면역화학적 분석방법.

청구항 10

겨자무 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP) 단백질, 글루타치온-S-트랜스퍼레이즈(glutathione-S-transferase; GST) 단백질 및 1차 항체의 Fc 부위에 결합하는 항체 결합 도메인(antibody-binding domain, ABD) 단백질이 융합된 HRP-GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체.

청구항 11

제6항에 따른 재조합 미생물을 배양하여 GST-ABD 재조합 단백질을 발현시키는 단계;
상기 GST-ABD 재조합 단백질을 분리하는 단계; 및

상기 분리된 GST-ABD 재조합 단백질에 HRP 단백질을 화학적으로 결합하는 단계를 포함하는 HRP-GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체 생산방법.

청구항 12

제10항에 따른 HRP-GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체에 1차 항체를 특이적으로 결합시키는 단계; 및

상기 1차 항체에 특이적인 항원을 처리하여 항원-항체 특이적 결합을 검출하는 단계를 포함하는 면역화학적 분석방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 면역화학적 분석방법은 단순 간접 ELISA(Simple indirect ELISA) 또는 티라미드 신호 증폭(Tyramide signal amplification; TSA) 면역염색법인 것을 특징으로 하는 면역화학적 분석방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 면역화학적 분석에서 신호증폭과 항체의 표면 고정을 담당하는 범용성 재조합 2차 항체 유사체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역화학적 분석에서는 일반적으로 표적(target)에 특이적인 1차 항체(primary antibodies) 및 효소와 결합되어 있는 2차 항체(enzyme-conjugated secondary antibodies)로 구성되어 있다. 1차 항체와 2차 항체 모두 소동물에서 생성, 분리하여 사용함으로써 그 비용과 시간이 많이 드는 단점이 존재한다. 특히 1차 항체는 표적 특이성을 결정하는 반면, 2차 항체는 표적과 무관하게 표적에 결합되어 있는 1차 항체의 Fc 부위와 결합하여 신호를 증폭시킴으로써 미량의 시료를 매우 높은 감도로 측정할 수 있게 한다. 2차 항체는 표적 특이성이 없으므로, 1차 항체와 결합하는 특성을 지닌 대체 물질을 적은 비용으로 빠르게 생산할 수 있다면, 면역화학적 분석의 비용과 시간을 획기적으로 줄일 수 있다.

[0003] 기존의 바이오센서 소재들은 각각의 표적에 특이적인 탐침(probe)에 초점을 맞추어왔지만, 대부분 한, 두가지 표적에만 사용되어진다는 단점이 있다. 본 발명에서는 한정된 표적 특이적인 탐침을 개발하는 대신에 표적에 결합하는 다양한 종류의 탐침(primary antibodies)을 모두 인식하여 범용으로(universally) 신호를 증폭시킬 수 있는 시스템을 구축하고, 소동물에서 생산하는 대신 값싼 대장균 발현 시스템을 이용하여 대량생산을 이룸으로써 면역화학적 분석의 장점을 그대로 유지하거나 향상시킴으로써 비용과 시간을 획기적으로 절감할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2012-0070692호(2012.07.02)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 글루타치온-S-트랜스퍼레이즈(glutathione-S-transferase; GST) 단백질 및 1차 항체의 Fc 부위에 결합하는 항체 결합 도메인(antibody-binding domain, ABD) 단백질이 융합된 GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체 또는 겨자무 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP) 단백질을, 글루타치온-S-트랜스퍼레이즈(glutathione-S-transferase; GST) 단백질 및 1차 항체의 Fc 부위에 결합하는 항체 결합 도메인(antibody-binding domain, ABD) 단백질이 융합된 HRP-GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체를 제공하는 데에 있다.

[0006] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 2차 항체 유사체 생산방법을 제공하는 데에 있다.

[0007] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 2차 항체 유사체를 이용한 면역화학적 분석방법을 제공하는데 있다.

다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 글루타치온-S-트랜스퍼레이즈(glutathione-S-transferase; GST) 단백질 및 1차 항체의 Fc 부위에 결합하는 항체 결합 도메인(antibody-binding domain, ABD) 단백질이 융합된 GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체를 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 겨자무 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP) 단백질, 글루타치온-S-트랜스퍼레이즈(glutathione-S-transferase; GST) 단백질 및 1차 항체의 Fc 부위에 결합하는 항체 결합 도메인(antibody-binding domain, ABD) 단백질이 융합된 HRP-GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체를 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 GST 단백질을 코딩하는 유전자 및 ABD 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터, 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체 또는 HRP-GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체 생산방법을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체 또는 HRP-GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체를 이용한 면역화학적 분석방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명은 면역화학적 분석에서 신호증폭과 항체의 표면 고정을 담당하는 범용성 재조합 2차 항체 유사체에 관한 것으로서, 1차 항체의 Fc 부위와 선택적으로 강하게 결합을 하는 항체 결합 도메인(antibody-binding domain, ABD)과 GST를 융합하여 면역화학적 분석에서 2차 항체를 대체할 수 있는 값싸고 대량생산이 가능한 범용성 재조합 2차 항체 유사체를 개발하였다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 재조합 2차 항체 유사체인 GST-ABD의 제조 및 적용에 대한 모식도이다.
- 도 2는 GST-ABD가 세 개의 다른 중 유래 포획 프리 IgGs 뿐만 아니라 고정화된 IgGs에도 결합한다는 것을 나타내고 있다. (A-C) 금 QCM 센서 상의 GST-ABD(검은 선) 또는 GST(붉은 선)의 QCM 공진 주파수 변화 (ΔF) 프로파일을 나타낸다. GST-ABD(검은 선) 또는 GST(붉은 선)의 단일층 상의 마우스 (A), 토끼 (B) 및 랫트 (C) IgGs에 대한 결과이다. (D-F) IgG-고정화된 금 SPR 센서 GST-ABD(검은 선) 및 적용 곡선(색깔로 표시된 선)의 SPR의 센서그램(sensorgrams)을 나타낸다. 마우스 (D), 토끼 (E) 및 랫트 (F). (G) 표시된 항체에 대한 결합(associating; k_a) 및 해리(dissociating; k_d) 비율 상수 수치 및 결합(associating; K_a) 및 해리(dissociating; K_d) 상수 수치를 나타낸다.
- 도 3은 간접 ELISA에서 신호를 증폭하는 HRP-GST-ABD 2차 항체 유사체에 대한 것이고(A-G), 샌드위치-타입 간접 ELISA에서 GSH-코팅된 플레이트의 표면에 방향성-조절 방식으로 항원-포획 항체의 고정 매개체로서 적용되는 GST-ABD에 대한 것이다(H-K). (A) 1차 항체와, HRP-결합 2차 항체 또는 HRP-GST-ABD의 다양한 조합을 나타내는 모식도이다. (B-E) BSA (B-C) 또는 EpCAM (D-E)가 ELISA 플레이트 표면에 고정화되었고, 다양한 농도의 토끼 항-BSA (B) 또는 마우스 항-BSA 1차 항체 (C), 토끼 항-EpCAM (D) 또는 마우스 항-EpCAM 1차 항체 (E)를 적용하였다. HRP-GST-ABDs (검은색 사각형, B-E) 또는 항-토끼 2차 항체 (붉은색 원, B-E)에 OPD 및 H_2O_2 를 첨가한 후, 450nm에서 흡광도를 측정하고 플롯하였다. 각 측정값의 선형 반응은 각 그래프에 삽입하여 플롯하였다. BSA (F) 및 EpCAM (G)에 대한 각 측정값의 LODs를 플롯하였다. (H) 항원-포획 항체의 고정 매개체로서 GST-ABD의 적용 모식도를 나타낸다. (I-J) GST-ABDs를 GSH-코팅된 플레이트의 표면에 처리하였고, 포획 항체인 항-BSA 토끼 IgGs (I) 또는 항-EpCAM 토끼 IgGs (J)로 포화시켰다. 다양한 양의 BSA (I) 또는 EpCAM (J)를 첨가하였고, HRP-결합 항-토끼 2차 항체에 OPD 및 H_2O_2 를 첨가한 후, 450nm에서 흡광도를 측정하고 플롯하였다(I-J). 각 측정값의 선형 반응은 각 그래프에 삽입하여 플롯하였다. (K) 상기 포맷에서의 BSA 및 EpCAM의 LODs를 플롯하였다.

도 4는 HRP-GST-ABD가 TSA-기반 면역염색에 있어 신호를 효과적이고 효율적으로 증폭시킬 수 있다는 것을 보여준다. (A) 절단된 개구리(Xenopus) 샘플에서 신경 섬유를 검출하기 위해서, 항-아세틸화된 튜불린(Anti-

acetylated tubulin) 1차 항체 (마우스)를 사용하였다. 전뇌(forebrain) 부위를 횡단 절편하였고, 신경 섬유는 HRP-GST-ABD 및 tyramide-Alexa 488 (녹색)으로 가시화되었다. 핵은 DAPI로 염색되었다 (파란색). 전뇌의 신경 섬유는 녹색으로 선명하게 염색되었고(A'), 섬모 축사(ciliary axonemes)는 단지 다-섬모세포(multi-ciliated cells)에서만 특이적으로 염색되었다(A''). A' 및 A''에서의 스케일 바는 각각 20 μm 및 5 μm 이다. (B) 증식 세포를 검출하기 위해서, 항-포스포-히스톤 H3(Anti-phospho-histone H3) 1차 항체 (토끼)를 사용하였다 (녹색). TSA 반응 후, 튜불린은 항-튜불린 항체 (토끼)로 염색하였고 (붉은색), Alexa-555 접합 항-토끼 2차 항체로 비교 염색되었다. B' 및 B''에서의 스케일 바는 각각 20 μm 및 5 μm 이다. (C) 세포 외 매트릭스를 검출하기 위해서, 항-피브로넥틴(anti-fibronectin) 1차 항체 (마우스)를 사용하였다 (녹색). C' 및 C''에서의 스케일 바는 각각 20 μm 및 5 μm 이다. (D-E) 항-포스포-히스톤 H3 1차 항체 (토끼, D) 또는 항-아세틸화 튜불린 1차 항체 (마우스, E)를 전체 마운트 배아를 염색하기 위해 사용하였다. 항-액틴 항체는 세포 경계를 가시화하기 위해 사용하였다 (붉은색) (D). D' 및 D''는 표시된 절단면의 공초점 이미지를 나타낸다. (E) HRP-GST-ABD는 전체 마운트 배아체로 성공적으로 침투하였고, 전체 마운트 샘플에 있어서 특이적으로 표적 분자의 신호를 증폭하였다. D 및 E에서의 스케일 바는 20 μm 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 이에, 본 발명은 1차 항체의 Fc 부위와 선택적으로 강하게 결합을 하는 항체 결합 도메인(antibody-binding domain, ABD)과 다양한 종류의 단백질을 융합하여 면역화학적 분석에서 2차 항체를 대체할 수 있는 값싸고 대량 생산이 가능한 범용성 재조합 2차 항체 유사체를 개발하고, 이를 ELISA, 웨스턴 블랏(western blot), 면역염색(immunostaining) 등에 적용하여 유용성을 검증하고 본 발명을 완성하였다.
- [0016] 본 발명은 글루타치온-S-트랜스퍼레이즈(glutathione-S-transferase; GST) 단백질 및 1차 항체의 Fc 부위에 결합하는 항체 결합 도메인(antibody-binding domain, ABD) 단백질이 융합된 GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체를 제공한다.
- [0017] 바람직하게는, 상기 GST 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시될 수 있으며, 상기 ABD 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 또한, 본 발명은 GST 단백질을 코딩하는 유전자 및 ABD 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.
- [0019] 바람직하게는, 상기 GST 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 3의 염기서열로 표시될 수 있으며, 상기 ABD 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 4의 염기서열로 표시될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명에 있어서, “벡터”는 클론유전자(또는 클론 DNA의 다른 조각)를 운반하는데 사용되는 스스로 복제되는 DNA분자를 의미한다.
- [0021] 본 발명에서 있어서, “발현 벡터”는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택 성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비 형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 암피실린(ampicilin), 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol) 과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에 의해 적절히 선택 가능하다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현벡터로 형질전환된 재조합 미생물을 제공한다. 바람직하게는 상기 미생물은 대장균일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 상기 발현벡터를 미생물에 도입하여 형질전환하는 방법은 바람직하게 본 발명의 DNA를 포함하는 발현 벡터를 당 업계에 공지된 방법, 예를 들어 이에 한정되지는 않으나, 일시적인 형질감염(transient transfection), 미세 주사, 형질 도입(transduction), 세포 융합, 칼슘 포스페이트 침전법, 리포좀 매개된 형질감염(liposemmiated transfection), DEAE 텍스트란-매개된 형질 감염(DEAE Dextran-mediated transfection), 폴리브렌-매개된 형질 감염(polybrene-mediated transfection), 전기 침공법(electroporation) 등의 공지 방법으로 미생물에 도입하여 형질전환시킬 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 재조합 미생물을 배양하여 GST-ABD 재조합 단백질을 발현시키는 단계; 및 상기 GST-ABD 재조합 단백질을 분리하는 단계를 포함하는 GST-ABD 재조합 2차 항체 유사체 생산방법을 제공한다.

- [0025] 또한, 본 발명은 상기 GST-ABD 제조합 2차 항체 유사체를 항원-포획 항체(antigen-capturing antibodies)의 고정 매개체(anchoring adaptor)로 사용하는 샌드위치-타입 간접 ELISA(Sandwich-type indirect ELISA) 면역화학적 분석방법을 제공한다.
- [0026] 또한, 본 발명은 겨자무 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP) 단백질, 글루타치온-S-트랜스퍼레이즈(glutathione-S-transferase; GST) 단백질 및 1차 항체의 Fc 부위에 결합하는 항체 결합 도메인(antibody-binding domain, ABD) 단백질이 융합된 HRP-GST-ABD 제조합 2차 항체 유사체를 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 상기 제조합 미생물을 배양하여 GST-ABD 제조합 단백질을 발현시키는 단계; 상기 GST-ABD 제조합 단백질을 분리하는 단계; 및 상기 분리된 GST-ABD 제조합 단백질에 HRP 단백질을 화학적으로 결합하는 단계를 포함하는 HRP-GST-ABD 제조합 2차 항체 유사체 생산방법을 제공한다.
- [0028] 또한, 본 발명은 상기 HRP-GST-ABD 제조합 2차 항체 유사체에 1차 항체를 특이적으로 결합시키는 단계; 및 상기 1차 항체에 특이적인 항원을 처리하여 항원-항체 특이적 결합을 검출하는 단계를 포함하는 면역화학적 분석방법을 제공한다.
- [0029] 상기 면역화학적 분석방법은 항원-항체의 특이적 결합을 확인할 수 있는 방법은 모두 가능하며, 가시적(visually), 광학적(optically), 전기화학적(electrochemically) 방법을 통한 면역화학적 분석방법일 수 있다.
- [0030] 바람직하게는, 단순 간접 ELISA(Simple indirect ELISA) 또는 티라미드 신호 증폭(Tyramide signal amplification; TSA) 면역염색법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0032] <실험예>
- [0033] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0034] 1. 제조합 2차 항체 유사체(GST-ABD)의 구축, 발현 및 정제
- [0035] N-말단에 27개의 추가적인 아미노산을 가진 항체 결합 도메인(antibody-binding domain, ABD, 58개의 아미노산)을 코딩하는 최적 유전자를 합성하였고, N-말단에 헥사히스티딘 태그를 포함하는 글루타치온-S-트랜스퍼레이즈(glutathione-S-transferase; GST)의 C-말단에 유전적으로 접합시켰으며, IPTG-유도 pETDuet 발현 벡터(Invitrogen) 내로 삽입시켰다. 증폭된 DNAs는 competent *E. coli* 균주 BL21(DE)로 형질전환시켰고, 제조합 2차 항체 유사체(GST-ABD)는 500 μ M 이소프로필 p-D-1-티오갈락토피라노사이드(isopropyl p-D-1-thiogalactopyranoside; IPTG)를 첨가하여 30℃에서 밤새도록 과발현시켰다. 세포는 고속 원심분리를 통해 얻었고, 용해 완충액(50 mM phosphate, 100 mM NaCl 및 pH 6.5)에 순차적으로 부유시켰다. 라이소자임(50 μ g/ml)이 포함된 재현탁 용액으로 상온에서 1시간 동안 처리한 후, 30초 간격으로 10분 동안 초음파처리하였다. 그 후, GST-ABD가 포함된 상등액을 얻기 위해서 1시간 동안 12000g로 원심분리하였다. 최종적인 GST-ABD는 고정 금속 친화 크로마토그래피(immobilized metal affinity chromatography; IMAC)에 의해 추가 정제되었다. GST-ABD의 순도 및 분자량은 SDS-PAGE, UV/가시광선 분광광도계 및 질량분석기로 확인하였다.
- [0036] 2. 수정 진동자 마이크로밸런스(Quartz crystal microbalance; QCM) 측정
- [0037] Standard gold QCM sensors and Q-Sense E4 (Biolin Scientific)가 사용되었다. 전체적인 시스템은 25.0 $\pm$ 0.1℃에서 온도를 유지시키는 펌프를 가진 플로우 모드(flow mode)에서 수행되었다. 각 샘플 용액은 펌프를 가진 측정 챔버 내에 주입되었고, 각 샘플 적용 전, 세척을 위해 포스페이트 완충액 (50 mM phosphate, 100 mM NaCl, pH 6.5)을 사용하였다. 0.1 mg/ml GST-ABD와 GST, 또는 토끼, 마우스 및 랫트 IgGs는 동일한 포스페이트 완충액에 적용되었다. 7개의 하모닉(5, 15, 25, 35, 45, 55 및 65 MHz)에서 공진 주파수(Resonance frequencies)를 동시에 측정하였고, 명확성을 위해 3번째 오버톤(overtone)의 표준화된 주파수만을 나타냈다.
- [0038] 3. 표면 플라스몬 공명(Surface plasmon resonance; SPR) 분석
- [0039] SPR 실험은 Biacore 3000 device 상의 카르복실 텍스트란 CM5 표준 금 센서 칩으로 25℃에서 수행하였는데, 고정화 용액으로 HBS-EP 완충액 및 작용 용액으로 PBS 완충액을 사용하였다. 토끼, 마우스 및 랫트 IgGs는 표준 아민-커플링 화학을 통해 CM5 센서 칩 표면 상에 노출된 카르복실 기능기에 초기에 커플링되었다. 간단히 설명하면, EDC (0.5 mg/ml) 및 NHS (0.5 mg/ml)의 혼합물은 부드럽게 섞고, 센서 칩의 카르복실기를 활성화시키기

위해서, 10 μ l/min의 유량으로 센서 칩 상에 주입하였다. 그 후, 센서 칩의 표면 상에 고정시키기 위해서, 0.1 mg/ml의 토끼, 마우스 및 랫트 IgGs를 개별적으로 3개의 다른 채널에 동일한 유량으로 7분 동안 주입하였다. CM5 센서 칩의 미사용된 잔여 반응기는 1M 에탄올아민 (pH 8.0)으로 차단되었다. 다양한 농도의 GST-ABD 또는 GST(54, 108, 216 및 432 nM)을 IgG-고정화된 CM5 센서 칩에 10 μ l/min의 유량으로 7분 동안 로딩하였다. 다양한 IgGs에 대한 GST-ABD의 결합 및 방출 동역학은 1:1 Langmuir binding model을 이용하여 Biaevaluation software에 의해 분석되었다.

[0040] **4. GST-ABD와 형광 염료 또는 HRP의 화학적 결합**

[0041] 티올-반응성 형광 염료인 플루오레세인-5-말레이미드(fluorescein-5-maleimide; F5M)와 GST-ABD를 접합시키기 위해서, GST-ABD를 10 mol 동량의 F5M와 상온에서 밤새도록 격렬하게 흔들어 반응시켰다. 포스페이트 완충액 (50 mM phosphate, 100 mM NaCl, pH 6.5)에 대한 집중적인 투석을 통해 밤새도록 미반응된 프리 F5M를 제거하였다. GST-ABD에 대한 F5M의 접합 정도는 ESI-TOF mass spectrometry 및 UV/Vis spectrophotometer로 측정하였다. 평균적으로 3개의 플루오레세인이 하나의 GST-ABD에 부착되었다. HRP-접합된 GST-ABD (HRP-GST-ABD)는 EZ-Link Maleimide Activated Horseradish Peroxidase (Mal-HRP, Thermo Scientific)를 GST-ABD에 접합시킴으로써 제조되었다. GST-ABD는 2.5, 5 또는 10 mol 동량의 Mal-HRP와 상온에서 밤새도록 격렬하게 흔들어 반응시켰다. 미접합된 프리 Mal-HRPs 및 GST-ABDs는 centricon ultrafiltration (Millipore, MWCO: 100,000 Da)을 사용하여 제거하였다. HRP-GST-ABD를 생산하기 위해 GST-ABD와 10 mol 동량의 Mal-HRP를 처리하여 GST-ABD를 완전히 소비시켰고, centricon ultrafiltration에 의해 쉽게 제거할 수 있는 약간의 잔여 프리 Mal-HRPs가 남았다.

[0042] **5. 단순 간접 ELISA(Simple indirect ELISA)**

[0043] 모델 항원인 BSA 및 EpCAM은 Santa Cruz 및 Sino Biological Inc.로부터 구입하였다. 적절한 단백질 용액 (최종 2 nM)을 제조하기 위해서, BSA 및 EpCAM은 PBS에 용해시켰다. 각각의 단백질 용액 (각 100 μ L)을 Immuno MicroWell 96-well plate (Maxisorp, flat-bottom, pinchibar, 400 μ L)의 웰에 로딩하였고, 표적 단백질을 물리적 흡착을 통해 플레이트 표면 상에 고정시키기 위해서 4°C에서 밤새도록 반응시켰다. 다음 날, 각 웰을 0.1% Tween 20이 포함된 250 μ L PBS 완충액 (PBST)으로 3번 씻어냈다. 차단 완충액 (PBS, 0.5% Tween 20, 5% goat serum)을 로딩하였고(각 200 μ L), 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 차단 후, BSA에 대한 1차 항체 (Santa Cruz Biotech로부터 구입한 토끼 항체 및 Abcam으로부터 구입한 마우스 항체) 또는 EpCAM에 대한 1차 항체 (Sino Biological Inc.에서 구입한 토끼 및 마우스 항체) 용액을 PBS 완충액으로 연속 희석하여 제조하였다. 상기 제조액 (각 100 μ L)은 BSA 또는 EpCAM-고정화된 플레이트의 웰에 로딩하였고, 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 각 웰은 250 μ L PBST로 3번 씻어냈다. 그 후, 샘플 웰을 제조하기 위해서 HRP-접합된 항-토끼 및 항-마우스 2차 항체를 첨가하였고(각 100 μ L), 혼합물은 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 250 μ L PBST로 3번 씻어냈다. HRP 기질 용액은 SIGMAFAST OPD kit (Sigma-Aldrich)을 사용하여 제조사의 지시에 따라 제조하였고(0.4 mg/mL o-phenylenediamine (OPD), 0.4 mg/mL urea hydrogen peroxide, 0.05 M phosphate-citrate, pH 5.0), 100 μ L 용액을 각 웰에 로딩하였다. 반응은 상온에서 샘플 세트에 따라 1분 또는 5분 동안 진행되었고, 반응을 정지시키기 위해 100 μ L의 2N H₂SO₄ 용액을 즉시 각 웰에 첨가하였다. multimode microplate reader인 infinite 200 PRO (TECAN)를 통해 각 웰의 450 nm 흡광도를 관측하였다. 모든 실험은 독립적으로 3번 반복하여 수행하였고, 오차를 포함하여 플롯팅하였다.

[0044] **6. 샌드위치-타입 간접 ELISA(Sandwich-type indirect ELISA)**

[0045] 4 nM의 최종 농도를 얻기 위해서, GST-ABD는 PBS에 녹여 제조하였다. 제조된 GST-ABD 용액 (각 100 μ L)을 글루타치온(glutathione; GSH)-코팅된 플레이트 (Clear, 8-well strips, Thermo Scientific Pierce) 상에 로딩하였고, GST-ABD와 플레이트 표면상에 고정화된 GSH를 결합시키기 위해, 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 잔여 GST-ABD를 제거하기 위해서, 각 웰은 250 μ L PBST로 3번 씻어냈다. BSA에 대한 포획-1차 항체 (rabbit IgG, Santa Cruz Biotech) 및 EpCAM에 대한 포획-1차 항체 (rabbit IgG, Sino Biological Inc.)는 제조되었고, GST-ABD-부착된 웰에 첨가하였다(각 100 μ L). 4°C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 각 웰은 250 μ L PBST로 3번 씻어냈다. BSA 및 EpCAM 용액은 다양한 농도로 제조되었고, 준비된 웰에 독립적으로 로딩되었다(각 100 μ L). 혼합물은 37°C에서 1시간 동안 반응시켰고, 각 웰은 다시 씻어냈다. BSA에 대한 검출-1차 항체 (mouse IgG, Abcam) 및 EpCAM에 대한 검출-1차 항체 (mouse IgG, Sino Biological Inc.)는 제조되었고, 준비된 웰에 로딩되었다(각 100 μ L). 혼합물은 37°C에서 1시간 동안 반응시켰고, 각 웰은 250 μ L PBST로 3번 씻어냈다. HRP-접합된 항-마우스 2차 항체 (Abcam)는 첨가되었고(각 100 μ L), 37°C에서 1시간 동안 추가로 반응시켰으며, 혼합물은 250 μ

L PBST로 3번 씻어냈다. 그 후, 100 μ L 기질 용액을 각 웰에 로딩하였고, 반응은 100 μ L의 2N H₂SO₄ 용액을 각 웰에 첨가함으로써 2분 후에 정지되었다. multimode microplate reader인 infinite 200 PRO (TECAN)를 통해 각 웰의 450 nm 흡광도를 관측하였다. 모든 실험은 독립적으로 3번 반복하여 수행하였고, 오차를 포함하여 플랫폼하였다.

[0046] 7. TSA-기반 세포 면역염색

[0047] 티라미드 신호 증폭(Tyramide signal amplification; TSA) 키트는 Life Technology로부터 구입하였고, 모든 시약을 제조사의 지시에 따라 준비하였다. 세포주 SKBR3 및 KB 세포는 한국세포주은행(Korean cell line bank; KCLB)에서 구입하였다. SKBR3 및 KB 세포는 L-글루타민 (300 mg/L), 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum; FBS, Invitrogen), 항생제 (1000 units/ml 페니실린, 10000 μ g/ml 스트렙토마이신 및 25 μ g/ml 앰포테리신 B), 25 mM HEPES 및 25 mM NaHCO₃이 포함된 RPMI1640 배지로 5% CO₂ 존재 하에서 37°C로 배양하였다.

[0048] TSA 분석을 위해, SKBR3 및 KB 세포는 12-well microscopy chambers (1x10⁵ cells/well)에서 배양하였고, PBST로 씻어냈으며, 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 4°C에서 20분 동안 고정시켰고, 마지막으로 PBST로 다시 씻어냈다. 고정된 세포는 0.1% Triton[®] X-100 용액으로 상온에서 10분 동안 투과시켰고, PBST로 행귀냈다. 고정된 SKBR3 및 KB 세포는 항-HER2 토끼 1차 항체 및 항-인테그린 $\alpha\beta\gamma_3$ 마우스 1차 항체로 각각 상온에서 1시간 동안 처리하였고, 미결합 또는 비-특이적인 결합 항체를 제거하기 위해서 PBST로 씻어냈다. HRP-접합 토끼 또는 마우스 2차 항체는 스톡(stock) 용액을 1% 차단 용액에 1/100로 희석함으로써 제조하였고, HRP-GST-ABD는 동일한 용액에 녹여 동량으로 제조하였다. 1차 항체-처리된 세포는 HRP-접합 2차 항체 또는 HRP-GST-ABD (각 100 μ L) 용액으로 상온에서 1시간 동안 처리하였고, HRP-접합체를 제거하기 위해서 PBST로 다시 행귀냈다. 티라미드 작용 용액(Tyramide working solution)은 반응 직전 티라미드 스톡(stock) 용액을 0.0015% H₂O₂가 포함된 증폭 완충액에 1/100로 희석함으로써 새롭게 제조하였고, 100 μ L를 각 샘플에 첨가하였다. 반응 혼합물은 상온에서 10분 동안 반응시켰고, PBST로 행귀냈다. 또한, 세포의 핵은 6-디아미디노-2-페닐인돌(6-diamidino-2-phenylindole; DAPI, Sigma)로 독립적으로 염색하였다. 형광 세포 이미지는 Olympus Fluoview FV1000 confocal microscope (Olympus, UOBC)를 이용하여 얻었다.

[0049] 8. 배아 샘플 제조

[0050] 제조합 2차 항체 유사체 (HRP-GST-ABD)를 분석하기 위해서, 본 발명자들은 MEMFA(MEM salts 및 4% 포름알데히드) 또는 Dent's fixative solution (메탄올 및 20% DMSO)를 이용하여 40 내지 45 단계 사이의 배아를 고정시켰다. 그 후, 고정된 배아는 직접적인 면역염색법에 사용되거나, 생체미세절단기(vibratome)를 이용하여 50 μ m 두께로 제조된 전뇌(forebrain) 횡단 절편에 사용되었다.

[0051] 9. 절단된 배아 슬라이스 및 전체 배아의 TSA-기반 면역염색

[0052] 비-특이적 결합을 차단하기 위해서, 배아 또는 절단된 배아 슬라이스는 차단 용액 (5% BSA + 2% DMSO in TBS + 0.1% Triton X-100)으로 상온에서 30분 동안 반응시켰다. TSA-염색은 다음의 1차 항체를 1:300 또는 1:1000으로 희석하여 상온에서 3시간 동안 수행되었다: anti-acetylated Tubulin (Sigma-Aldrich), anti-phospho-Histone H3 (Abcam), anti-Fibronectin (DSHB), 및 anti-MHC (DSHB). 샘플은 TBST (TBS + 0.1% Triton X-100)로 행귀냈다. 퍼옥시다제(Peroxidase) 표지는 HRP-접합된 2차 항체 (Sigma-Aldrich) 또는 HRP-GST-ABD를 1:1000으로 희석하여 2시간 동안 수행하였다. HRP-GST-ABD에 대해서는, 표시된 1차 항체를 HRP-GST-ABD와 1:1 비율 (각 0.8 ng/ μ L)로 미리 반응시켰고, 조직 샘플은 혼합하여 반응시켰다. 티라미드(Tyramide) 표지는 0.00015% 과산화수소(hydrogen peroxide)가 포함된 증폭 완충액에 녹인 tyramide Alex-488를 사용하여 수행하였다. 혼합물은 상온에서 2분 동안 반응시켰고, 조직 샘플은 TBST로 행귀냈다. 조직의 핵은 독립적으로 DAPI (Abcam)로 염색하였다. BA:BB (벤질 알코올/벤질 벤조에이트, 1:2)에서 투명화시키기 전에, 모든 절단된 슬라이스는 100% 메탄올로 씻어내고 반응시켰고, 이미지화를 위해 슬라이드에 마운팅하였다. 이미지는 공초점 현미경 분석 (LSM700)을 사용하여 캡처하였다.

[0053] <실시예 1> 1차 항체의 Fc 부위에 선택적으로 결합하는 2차 항체 유사체 플랫폼 구축

[0054] 1차 항체의 Fc 부위에 선택적으로 결합하는 항체 결합 도메인(antibody-binding domain; ABD)과 글루타치온-S-트랜스퍼레이즈(glutathione-S-transferase; GST)를 유전적으로 결합하여 2차 항체 유사체 플랫폼을 구축하고, 대장균에서 대량생산할 수 있는 시스템을 구축하였다. 상기와 같이 대량생산된 제조합 2차 항체 유사체는 ELISA

및 면역염색을 포함하는 다양한 면역화학적 분석 시스템에서 2차 항체를 대체하거나, 샌드위치-타입 간접 ELISA(sandwich-type indirect ELISA)에서 고정화된 항원-포획 항체의 고정 매개체(anchoring adaptor)로 적용하고자 하였다(도 1).

[0055] GST-ABD는 박테리아 과발현 시스템에 의해 대량생산되었고, 1 단계 Ni-NTA 아가로스 컬럼 크로마토그래피를 사용함으로써 비용 및 시간을 최소화 및 최적화하여 간단히 분리하였다. 고순도의 GST-ABD (> 99%)를 얻을 수 있었는데, 이는 SDS-PAGE로 확인하였으며, GST 및 ABD가 성공적으로 융합되었는지는 ESI-TOF MS를 통하여 확인하였다.

[0056] <실시예 2> GST-ABD와 항체의 결합능 분석

[0057] GST-ABD와 3개의 다른 종(마우스, 토끼 및 랫트)으로부터 유래한 항체와의 결합능을 확인하기 위해서, 본 발명자들은 우선 고정화된 GST-ABD와 프리 IgGs 사이의 상호작용을 수정 진동자 마이크로밸런스(Quartz crystal microbalance; QCM)을 사용하여 실시간으로 관측하였다(도 2A, B 및 C). 3개 타입의 다른 IgGs를 독립적으로 첨가하면 GST-ABD-단일층화된 QCM 센서의 공진 주파수(Resonance frequencies)는 크게 감소한 반면(검은 선), GST-단일층화된 샘플의 경우에는 변화가 없었다(붉은 선)(도 2A, B 및 C). 여러 타입의 IgGs에 대한 GST-ABD의 결합 및 해리 특성을 정확하게 확인하기 위해서, 본 발명자들은 표면 플라즈몬 공명(Surface plasmon resonance; SPR) 분석을 수행하였다(도 2D, E 및 F). QCM 연구와 반대로, 본 발명자들은 우선 각각의 IgG 분자(마우스, 토끼 또는 랫트 유래)를 표준 SPR CM5 chips 상에 고정화시킨 후, 여러 다른 농도의 GST-ABD를 적용하였다. 다양한 농도의 GST-ABD 용액 및 세척 완충액을 각각 적용하면, SPR 반응 유닛(response unit; RU)에 있어 급격한 증가와 매우 느린 감소를 관찰한 반면(도 2D, E 및 F), GST 단백질과 완충액을 적용하면 거의 변화가 없음을 확인할 수 있었다. GST-ABD는 3개의 다른 종에서 유래한 모든 타입의 IgGs와 강하게 결합하는 것으로 나타났다. 한편, 토끼 IgG와는 가장 강력하게 결합하였으며(K_d 1.31 nM), 마우스 IgG와는 가장 약하게 결합하였다(K_d 16.8 nM). 마우스 IgGs의 상대적으로 빠른 해리 비율 상수(dissociation rate constant)는 해리율(dissociation constant) 차이를 야기할 수도 있다(도 2G). 다양한 IgGs를 통한 QCM 및 SPR 연구 결과, GST-ABD가 간단한 분자 인식을 통해 고체 표면 상의 포획 프리 IgGs 뿐만 아니라 고정화된 IgGs와 결합하는 범용성(universal) IgG 인식 분자로서 적용될 수 있음을 나타냈다.

[0058] <실시예 3> 간접 ELISA에서 효소 결합 재조합 2차 항체 유사체인 HRP-GST-ABD의 적용

[0059] GST-ABD의 GST 부위는 4개의 시스템이 있어 말레이미드(maleimide) 기능기가 연결된 신호증폭이 가능한 효소를 화학적으로 접합할 수 있다. 효소 중 활성화된 겨자무 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP)를 GST-ABD에 접합하여 HRP-GST-ABD를 생성하고 다양한 종류의 면역화학적 분석에서 HRP 접합 2차 항체 대용으로 사용하고 있다. GST-ABD 한 분자당 평균 3개의 HRP를 화학적으로 접합함으로써 신호증폭과 측정감도를 2-3배 향상시킬 수 있다.

[0060] 일반적으로 사용되는 HRP-접합 2차 항체 대용으로서 HRP-GST-ABD의 능력을 평가하기 위해서, 본 발명자들은 우선 단순 간접 ELISA(simple indirect ELISA)를 수행하였다. 본 발명자들은 물리적 흡착을 통해 ELISA 플레이트 표면에 항원 모델로서 일정량의 BSA를 고정시켰고, 여러 농도의 토끼 항-BSA 1차 항체를 적용하였다. 그 후, 본 발명자들은 집중적으로 세척한 후 HRP-접합 항-토끼 2차 항체 또는 HRP-GST-ABD를 로딩하였다. 다음으로, 본 발명자들은 o-페닐렌디아민(o-phenyldiamine; OPD) 기질 용액을 첨가하였고, 즉시 또는 5분 후에 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 수치는 HRP-GST-ABD 및 항-토끼 HRP-표지된 2차 항체 처리된 샘플에서 1차 항체의 농도가 증가함에 따라, 약 40 pM 내지 5 nM의 범위에서 일직선으로 증가하였다(도 3A 및 삽입). 흥미롭게도, 중간 및 고농도에서 HRP-GST-ABD 처리된 샘플은 항-토끼 HRP-표지된 2차 항체 보다 상당히 향상된 신호를 나타냈다(도 3A). 이는 HRP-GST-ABD에 접합된 HRP의 수가 더 많아서일 것으로 예상된다(GST-ABD 한 분자당 평균 3개의 HRP). 비록 본 발명자들은 중간 및 고농도의 1차 항체에서 상당히 향상된 신호를 관찰하였으나, 검출한계(the limit of detection; LOD)의 유의성 있는 증가는 확인할 수 없었다(HRP-GST-ABD; 22 pM 및 항-토끼 HRP-표지된 2차 항체; 25 pM)(도 3A 및 3E).

[0061] GST-ABD가 어떤 변형 없이도 토끼 IgG 뿐만 아니라 마우스 IgG와도 결합하므로(도 2), 본 발명자들은 HRP-GST-ABD가 다양한 종에서 유래한 여러 타입의 IgGs에 대한 범용성 2차 항체 유사체로서 사용될 수 있는지 시험하였다. 본 발명자들은 토끼 1차 항-BSA IgG를 마우스 1차 항-BSA IgG로 치환하였고, 상기와 동일하게 실험을 수행하였다. 항-토끼 HRP-표지 2차 항체 처리된 샘플은 적용된 모든 농도 조건에서 아무런 신호를 나타내지 않은 반면, HRP-GST-ABD 처리된 샘플은 토끼 1차 항-BSA IgG의 결과와 거의 동일한 그래프를 나타냈다(도 3B). 하지만, 마우스 1차 항체에 대한 HRP-GST-ABD 결합 친화도가 약해서, LOD (29 pM) 및 신호 반응 결과를 얻는데 5분이 소

요되었다(도 3B). 추가로, 본 발명자들은 다른 항원 단백질로서 순환 종양세포(circulating tumor cells; CTC)의 바이오마커로 알려진 상피세포 부착 분자(epithelial cell adhesion molecule; EpCAM)를 이용하여 유사한 실험을 수행하였다. 본 발명자들이 토끼 1차 항-EpCAM IgG 및 HRP-GST-ABD를 적용했을 때, 거의 동일한 LOD (25 pM) 및 BSA에 대한 선형 범위 (40 pM - 2.5 nM)를 얻었다(도 3C 및 3F). 또한, 마우스 1차 항-EpCAM는 BSA와 거의 동일한 결과를 나타냈다(도 3D). 종합하면, 상기 결과는 토끼, 마우스 및 랫트 등 종의 기원과는 무관하게 관련된 1차 항체를 구할 수 있으면, HRP-GST-ABD가 어떤 타입의 항원 분자에 대해서도 신호 증폭을 위한 2차 항체 유사체로 적용될 수 있음을 나타낸다.

[0062] <실시예 4> 재조합 2차 항체 유사체인 GST-ABD를 항원-포획 항체의 고정 매개체로 적용

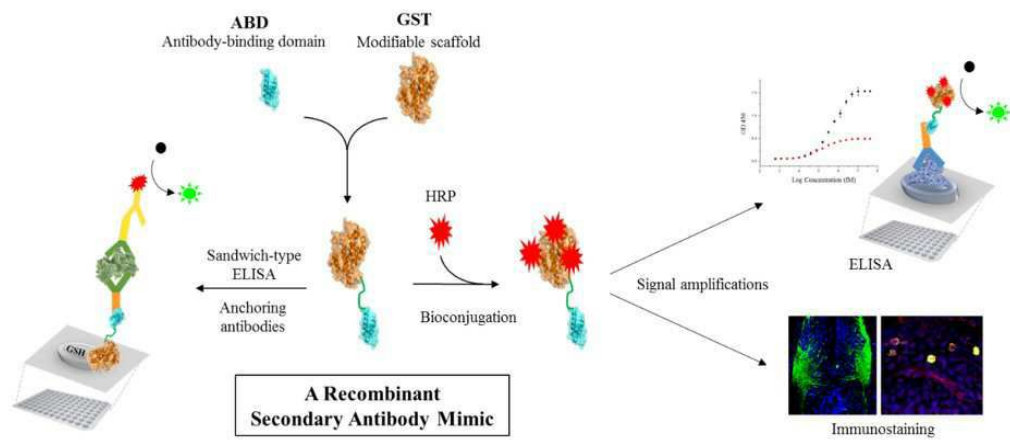
[0063] 샌드위치-타입 간접 ELISA 시스템은 가장 많이 사용하는 포맷 중 하나이다. 복잡한 생물학적 샘플에서 표적 항원 분자를 포획하기 위해서, 항원-포획 항체는 적절한 방향성을 가지고 ELISA 플레이트의 표면에 단단히 고정화되어 있어야 한다. 항원-포획 항체의 화학적 고정화나 이와 관련된 방법들은 항체의 항원-결합 사이트의 변형, 변성 또는 잘못된 방향성으로 인해, 포획 항체의 항원-결합 능력을 종종 손상시킨다. GST-ABD는 한쪽 말단 (ABD)에는 중-독립적인 항체-결합 능력을 가지고 있으며, 다른 말단 (GST)에는 글루타치온(glutathione; GSH)-결합 능력을 가지고 있으므로, GST-ABD의 GST 부분은 GSH-코팅된 플레이트의 표면에 결합할 수 있고, 나머지 ABD 부분은 표적 항원을 검출하기 위해 적절한 방향성을 가진 포획 항체의 Fc 부위에 결합할 수 있다(도 3G 및 3H). 본 발명자들은 상업적으로 구할 수 있는 GSH-코팅 플레이트에 여러 농도의 GST-ABDs를 처리하였다. 대조군(mono-streptavidin-fused ABD)과 달리, GST-ABD의 농도가 증가함에 따라 증가하다가 최종적으로는 포화되는 일반적인 곡선을 관찰하였다. 다음으로, 본 발명자들은 항원을 검출하기 위한 시스템에 적용하기 전, 샌드위치-타입 간접 ELISA의 각 단계에서 사용되는 시약의 최적 용량을 결정하였다. 본 발명자들은 GSH-코팅된 플레이트의 표면 상에 일정량의 GST-ABD를 고정화시켰고, 항-BSA 또는 항-EpCAM 토끼 IgGs에 대한 포획 항체로 각각 포화시켰으며, 다양한 양의 BSA 또는 EpCAM를 첨가하였고, 정상적인 샌드위치 타입 간접 ELISA에 사용되는 항원의 양을 결정하였다(도 3G 및 3H). 이전에 실험한 단순 간접 ELISA와 비교시, LODs (BSA; 33 pM 및 EpCAM; 36 pM) 및 선형 반응에 있어 거의 동일한 결과를 얻었다(도 3). 상기와 같은 결과는 본 발명의 GST-ABD가 화학적, 물리적 변형 없이 단순히 분자들 간의 상호작용을 이용함으로써, ELISA의 복잡한 항원-포획 항체 고정과정에서 일반적으로 발생하는 항체의 비활성화, 잘못된 방향성 등의 부작용을 최소화함으로써 샌드위치-타입 간접 ELISA 과정을 단순화하고 결과의 재현성을 담보할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0064] <실시예 5> 면역화학적 염색에서 HRP-접합 2차 항체 대응으로 HRP-GST-ABD의 적용

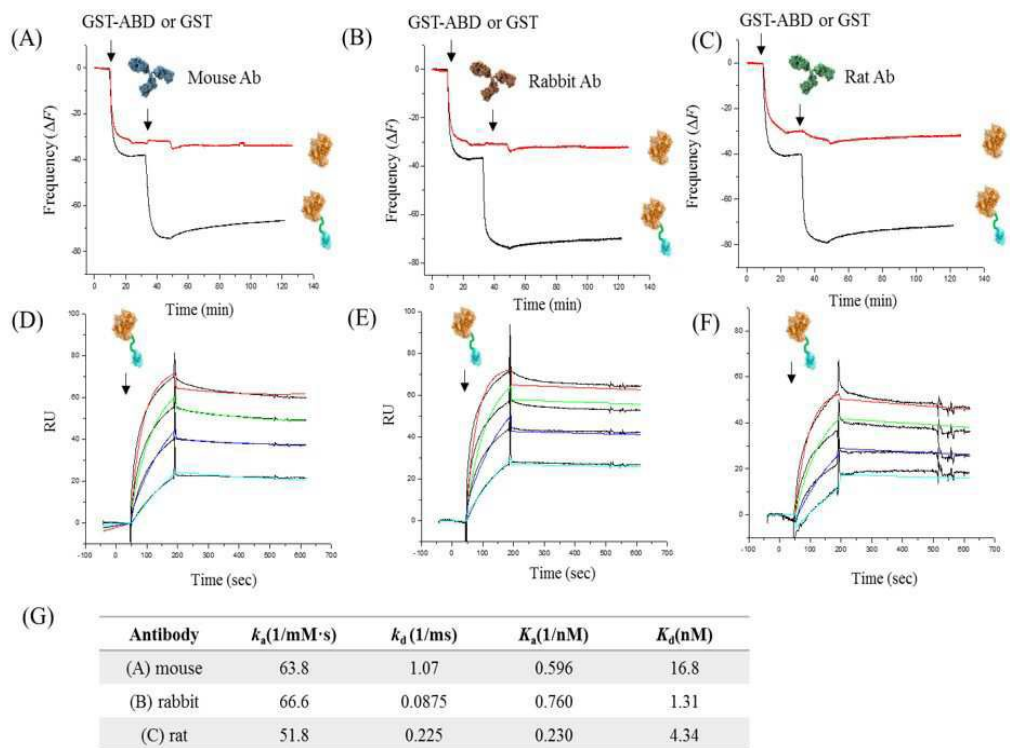
[0065] 티라미드 신호 증폭(Tyramide signal amplification; TSA) 분석은 세포 및 조직 내에 단백질, DNAs 및 RNAs과 같은 낮은 농도의 생체분자를 검출하기 위해 자주 사용된다. 본 발명자들은 면역염색 시스템에서 HRP-GST-ABD가 HRP-접합된 2차 항체 대응으로 사용할 수 있는지 확인하였다. 우선 본 발명자들은 세포 표면에 HER2 및 인테그린 $\alpha\beta\gamma_3$ 수용체를 각각 과발현하는 2개의 다른 암세포주인 SKBR3 및 KB 세포에서 관련된 1차 IgGs (각각 항-HER2 토끼 및 항-인테그린 $\alpha\beta\gamma_3$ 마우스 IgGs)로 TSA-기반의 면역염색을 수행하였다. 본 발명자들은 측정된 모든 범위에 있어서 샘플을 처리한 HRP-GST-ABD 및 HRP-접합 2차 항체 모두 거의 동일한 신호 증가를 관측하였다. 절단된 조직 또는 전체 마운트 샘플에 대한 TSA-기반 면역염색은 배양된 세포의 면역염색 보다 더 어려운데, 이는 더 높은 특이성 및 신호 대 노이즈 비율이 요구될 뿐만 아니라 샘플의 이질성(heterogeneity) 및 복잡성(complexity)도 높기 때문이다. 이에, 본 발명자들은 개구리(Xenopus) 배아를 준비하였고, HRP-GST-ABD로 TSA-기반의 면역염색을 수행하였다. 43단계 개구리(Xenopus) 배아는 주로 기관 및 조직으로 발달되고, 절단된 또는 전체 마운트 샘플에서 특정 조직을 염색하기에 적당하다. 본 발명자들은 신경 섬유 및 근육을 각각 가시화하기 위해서, 항-아세틸화 튜불린(anti-acetylated tubulin) 항체 및 항-미오신 중쇄(anti-myosin heavy chain; MHC) 항체와 같은 여러 조직 특이적 항체를 시험하였다(도 4A 및 도 4E). 또한, 절단 및 전체 마운트 샘플에서 표적의 세포 내 위치를 검출하기 위해서, 항-포스포 히스톤 H3(anti-phospho histone H3)(도 4C) 및 항-피브로넥틴(anti-fibronectin) 항체(도 4D)를 시험하였다. 모든 경우에 있어서, 절단(도 4A 내지 4C) 및 전체 마운트 샘플(도 4D 및 도 4E)에서 HRP-GST-ABD는 높은 표적-특이적 신호 증폭 결과를 나타냈고, 사용된 1차 항체의 기원(토끼 또는 마우스)과 무관하게 HRP-접합 2차 항체와도 거의 유사했다. 또한, 항체 응집을 피하기 위해서 1차 항체 및 2차 항체를 순차적으로 처리하던 기존의 방법과는 달리, 샘플 처리 전에 1차 항체 및 HRP-GST-ABD를 동시에 반응시킴으로써 상당량의 샘플을 제조하는 시간을 감소할 수 있었다. 한편, HRP-GST-ABD는 HRP 접합 2차 항체 보다 분자의 크기가 현저히 작아 세포나 조직의 깊은 곳까지 침투할 수 있어 더 유리하며, 다량의 HRP 접합으로 현저히 높은 퍼옥시다아제 활성을 통해 미량의 시료도 고감도로 측정이 가능하다.

도면

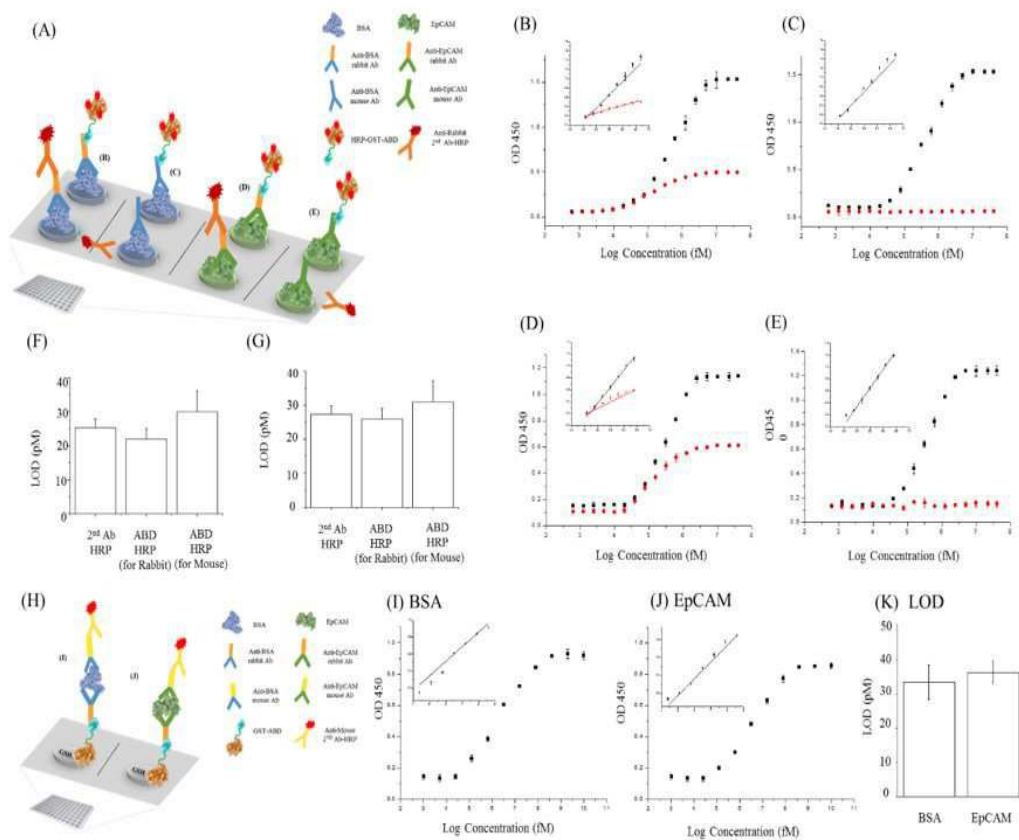
도면1



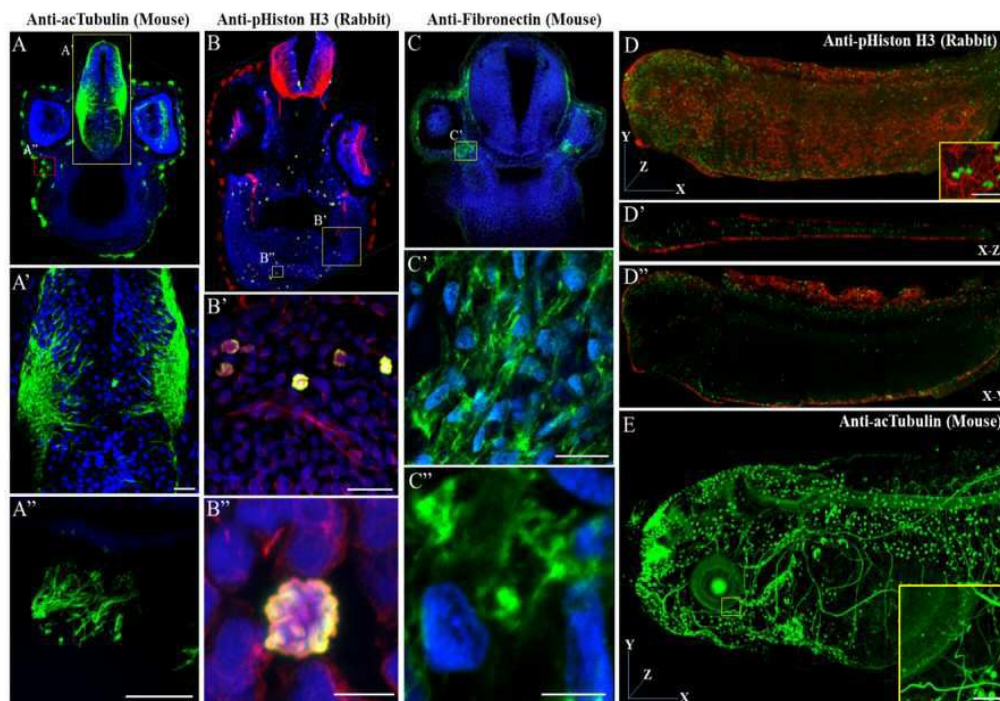
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> UNIST Academy-Industry Research Corporation

<120> Recombinant Secondary Antibody Mimic as a Target-specific Signal
Amplifier and an Antibody Immobilizer in Immunoassays

<130> ADP-2015-0257

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GST

<400> 1

Met Ser Pro Ile Leu Gly Tyr Trp Lys Ile Lys Gly Leu Val Gln Pro
1 5 10 15

Thr Arg Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Glu Glu Lys Tyr Glu Glu His Leu
20 25 30

Tyr Glu Arg Asp Glu Gly Asp Lys Trp Arg Asn Lys Lys Phe Glu Leu
35 40 45

Gly Leu Glu Phe Pro Asn Leu Pro Tyr Tyr Ile Asp Gly Asp Val Lys
50 55 60

Leu Thr Gln Ser Met Ala Ile Ile Arg Tyr Ile Ala Asp Lys His Asn
65 70 75 80

Met Leu Gly Gly Cys Pro Lys Glu Arg Ala Glu Ile Ser Met Leu Glu
85 90 95

Gly Ala Val Leu Asp Ile Arg Tyr Gly Val Ser Arg Ile Ala Tyr Ser
100 105 110

Lys Asp Phe Glu Thr Leu Lys Val Asp Phe Leu Ser Lys Leu Pro Glu
115 120 125

Met Leu Lys Met Phe Glu Asp Arg Leu Cys His Lys Thr Tyr Leu Asn
130 135 140

Gly Asp His Val Thr His Pro Asp Phe Met Leu Tyr Asp Ala Leu Asp
145 150 155 160

Val Val Leu Tyr Met Asp Pro Met Cys Leu Asp Ala Phe Pro Lys Leu

165 170 175
Val Cys Phe Lys Lys Arg Ile Glu Ala Ile Pro Gln Ile Asp Lys Tyr
180 185 190
Leu Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ala Trp Pro Leu Gln Gly Trp Gln Ala
195 200 205
Thr Phe Gly Gly Gly Asp His Pro Pro Lys Ser Asp
210 215 220
<210> 2
<211> 57
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> ABD
<400> 2
Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu

1 5 10 15
His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser
20 25 30
Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys
35 40 45
Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys
50 55
<210> 3
<211> 660
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> GST
<400> 3
atgtccccta tactagggtta ttggaaaatt aagggccttg tgcaaccac tcgacttctt 60

ttggaatatc ttgaagaaaa atatgaagag catttgtatg agcgcgatga aggtgataaa 120
tggcgaagaa aaaagtttga attgggtttg gagtttccca atcttcttta ttatatgtat 180
gggtgatgtta aattaacaca gtctatggcc atcatacgtt atatagctga caagcacaac 240
atgttgggtg gttgtccaaa agagcgtgca gagatttcaa tgcttgaagg agcggttttg 300
gatattagat acggtgtttc gagaattgca tatagtaaag actttgaaac tctcaaagtt 360

gattttctta gcaagctacc tgaaatgctg aaaatgttcg aagatcgttt atgtcataaa	420
acatatattaa atggatgatca tgtaacccat cctgacttca tgttgtatga cgctcttgat	480
gttgttttat acatggaccc aatgtgcctg gatgcgttcc caaaattagt ttgttttaaa	540
aaacgtattg aagctatccc acaaattgat aagtacttga aatccagcaa gtatatagca	600
tggcctttgc agggctggca agccacgttt ggtggtggcg accatcctcc aaaatcggat	660
	660
<210> 4	
<211> 171	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> ABD	
<400> 4	
gataacaaat ttaacaaaga acagcagaac gcgttttatg aaattctgca tctgccgaac	60
ctgaacgaag aacagcgcaa cgcgtttatt cagagcctga aagatgatcc gagccagagc	120
gcgaacctgc tggcgggaagc gaaaaaactg aacgatgcgc aggcgccgaa a	171