

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0098469 (43) 공개일자 2014년08월08일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07K 1/04 (2006.01) C07K 17/02 (2006.01)		(71) 출원인 충남대학교산학협력단
(21) 출원번호	10-2013-0011153	대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(22) 출원일자	2013년01월31일	(72) 발명자
심사청구일자	2013년01월31일	김동명
		대전 서구 둔산로 223, 7동 303호 (둔산동, 청솔아파트)
		이경호
		대전 유성구 노은서로76번길 75-14, 404호 (노은동)
		(74) 대리인
		이원희

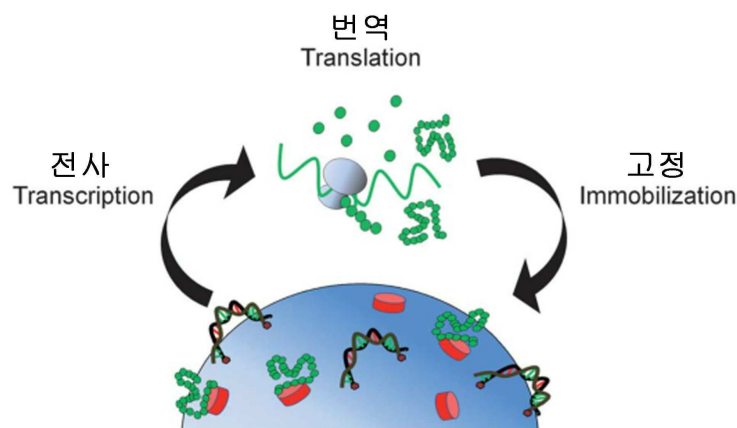
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 유전자가 접합된 마이크로비드 및 겔 매트릭스를 이용한 무세포 단백질 발현 및 동소 고정화 방법

(57) 요약

본 발명은 타겟 유전자 주형이 접합된 제 1 포획체 및 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)가 접합된 제 2 포획체가 결합된 마이크로비드가 담지된 하이드로 겔을 포함하는 동소 고정(*in situ*) 단백질 합성용 겔-매트릭스, 이의 제조방법, 상기 제조방법에 따른 단백질 동소 고정 어레이 및 이를 이용한 단백질의 검출 또는 분석방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 겔-매트릭스는 하나 또는 다종의 유전자를 단백질로 빠르게 합성할 뿐만 아니라, 복잡한 분리정제 과정을 필요로 하지 않는 특징이 있다. 또한, 단백질의 3차원적 구조를 유지할 수 있으므로, 항원항체 반응 등 단백질 검출 및 분석에서 유용하게 사용될 수 있는 것이다. 아울러, 다종의 유전자 접합이 가능하므로, 동시에 다양한 단백질을 합성할 수 있는 특징이 있으므로 단백질 개량기술, 생체 분자합성, 분자진단 및 합성 생물학 분야 등 단백질 관련 연구 및 산업분야에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

타겟 유전자 주형이 접합된 제 1 포획체 및 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid) 반응기가 접합된 제 2 포획체가 결합된 마이크로비드가 담지된 하이드로 겔을 포함하는 동소 고정(*in situ*) 단백질 합성용 겔-매트릭스.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 하이드로 겔 상부에 무세포 단백질 생합성 반응 혼합물을 첨가하여 하이드로 겔 내로 단백질 생합성 반응 혼합물이 침투하는 것을 특징으로 하는 동소 고정 단백질 합성용 겔-매트릭스.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 유전자 주형의 양 말단 또는 어느 한쪽에 바이오틴이 결합한 것을 특징으로 하는 동소 고정 단백질 합성용 겔-매트릭스.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 바이오틴이 유전자의 5'말단에 결합한 것을 특징으로 하는 동소 고정 단백질 합성용 겔-매트릭스.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 유전자 주형이 하나 또는 둘 이상의 서로 다른 종류의 유전자 주형인 것을 특징으로 하는 동소 고정 단백질 합성용 겔-매트릭스.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 제 1 포획체 및 제 2 포획체는 스트랩타비딘, 아비딘, 뉴트라비딘 및 캡트아비딘 중에서 선택된 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는 동소 고정 단백질 합성용 겔-매트릭스.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 마이크로비드는 아가로스 겔, 폴리아크릴아미드 겔, 알킨산 겔, 전분 겔, 폴리비닐알코올 겔 및 실리콘 하이드로 겔 중에서 선택된 어느 하나로 이루어진 것을 특징으로 하는 동소 고정 단백질 합성용 겔-매트릭스.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 하이드로 겔은 아가로스 겔, 폴리아크릴아미드 겔, 알킨산 겔, 전분 겔, 폴리비닐알코올 겔 및 실리콘 하이드로 겔 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 동소 고정 단백질 합성용 겔-매트릭스.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 유전자 주형은 DNA 또는 mRNA인 것을 특징으로 하는 동소 고정 단백질 합성용 겔-매트릭스.

청구항 10

- 1) 포획체가 결합된 마이크로비드에 유전자 주형을 접합시키는 단계;
- 2) 상기 단계 1) 이후에, 유전자 주형과 접합되지 않은 포획체에 NTA(nitrilotriacetic acid)를 접합시키는 단계;
- 3) 상기 포획체에 접합된 NTA(nitrilotriacetic acid)를 Ni^{2+} 이온으로 이온화시키는 단계;
- 4) 상기 단계 3) 이후에, 상기 마이크로비드를 하이드로 겔에 담지하고, 상기 하이드로 겔을 고형화시키는 단계; 및
- 5) 고형의 하이드로 겔 상부에 무세포 단백질 생합성 반응혼합물을 첨가하여 하이드로 겔 내로 스며들게 하는 단계를 포함하는 동소 고정 단백질 합성용 겔-매트릭스의 제조방법.

청구항 11

제 10항의 제조방법에 따라 제조된 겔-매트릭스를 이용하여 단백질 합성하는 단계를 포함하는 동소 고정 단백질 어레이의 생산방법.

청구항 12

제 11항의 생산방법에 따라 생산된 동소 고정 단백질 어레이.

청구항 13

제 12항에 따른 동소 고정 단백질 어레이를 이용하는 단백질의 검출 또는 분석방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 유전자가 접합된 마이크로비드가 담지된 하이드로 겔을 포함하는 동소 고정(*in situ*) 단백질 합성용 겔-매트릭스 및 이의 제조방법, 이로부터 생산된 동소 고정 단백질 어레이 및 이를 이용한 단백질의 검출 또는 분석방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 종래의 단백질 합성기술은 유전자 조작을 통해 타겟 단백질의 유전자를 숙주 세포에 도입한 후, 세포를 배양하는 방법을 이용하였다. 이와 같은 세포배양법을 이용하는 경우, 충분한 양의 단백질을 확보하는데 여러 가지 제약이 따른다. 살아 있는 세포에서 타겟 단백질만 우세하게 합성하도록 조절하는 것이 어렵고, 세포가 성장하면서 생성되는 효소들에 의해 타겟 단백질이 변형 또는 분해되기도 하고 심각하게는 타겟 단백질이 세포의 성장 저해인자인 경우는 세포 내에서 발현하는 것이 매우 제약적이다.

[0003] 이와 같은 문제점을 극복할 수 있는 세포 외(*in vitro*) 시스템에서 타겟 단백질을 합성하는 무세포 단백질 합성 기술이 개발되어 왔다. 무세포 단백질 합성 기술은 단백질 합성 반응을 세포 내의 제한된 공간이 아니라 일반 생화학 반응과 같이 다양한 반응조건 및 환경 하에서 수행할 수 있는 장점을 가지고 있다. 예를 들어, 단백질

합성이 실시간으로 분리할 수 있는 친화력을 가진 매트릭스 상에서도 이루어진다는 것이 보고된바 있고(문헌 [Kim, T.W., Oh, I.S., Ahn, J.H., Choi, C.Y., Kim, D.M.(2006) Cell-free synthesis and in situ isolation of recombinant protein. Protein Expr. Purif. 45, 249-254]), 세포로부터 분리된 단백질 생합성 기구들이 계면활성제나 반응성 화학물질을 포함하는 다양한 반응 조건에서도 활성을 유지한다는 것을 밝힌바 있다(문헌 [Oh, I.S., Kim, D.M., Kim, T.W., Park, C.G., Choi, C.Y. (2006) Providing an oxidizing environment for the cell-free expression of disulfide-containing proteins by exhausting the reducing activity of Escherichia coli S30 Extract. Biotechnol. Prog. 22, 1225-1228]). 즉, 무세포 단백질 발현 시스템은, 단백질 생합성 기구들의 활성에 영향을 미치지 않는 한, 다양한 환경 및 다양한 화학조건 하에서 단백질을 생산할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 하지만, 여전히 발현해야 할 유전자의 개수나 다양한 반응 조건을 적용해야 할 경우에는 증가하는 경우의 수에 비례하여 시간과 노동력이 다시 투자되어야 한다. 즉, 단백질을 발현하는 시간은 수 시간 내로 짧은 반면에 단백질 발현을 위한 준비 과정 자체가 제한 사항으로 작용하게 된다. 이를 해결하고자 자동화 시스템이 적용된 무세포 단백질 합성 시스템이 상업적으로 제시되었지만, 고가의 자동화 시스템이 일반적으로 널리 사용되기에는 부적합하다.

[0004] 이러한 문제점을 해결하고자 동소 생성을 위한 지지체를 이용하여 무세포 단백질 합성 기반의 단백질 어레이 기법이 개발되었다(대한민국 공개특허 10-2010-0052806호). 단백질 생합성 기구들을 포함하는 하이드로 겔이 코팅된 지지체에 유전자를 스핀코팅하여 그로부터 합성된 목적 단백질들이 3차원의 다공성 하이드로 겔에 고정되는 방식이다. 다종의 DNA 또는 mRNA를 소량의 반응용액을 이용하여 어레이 형태의 활성 단백질로 빠르게 전환할 수 있으며, 발현된 단백질들의 변성을 방지하면서 안정적으로 단백질 어레이를 구현할 수 있다. 하지만, 3차원의 다공성 하이드로 겔에 물리적으로 갇혀 있는 상태이기 때문에 일시적인 고정만 가능하지만 단백질의 확산 현상으로 장기간의 고정이 잘 이루어지지 않는 문제점이 여전히 남아 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) [특허문헌 1] 대한민국 공개특허 제 10-2010-0052806호.

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) [비특허문헌 1] Protein Expr. Purif. 2006 45, 249-254.

(비특허문헌 0002) [비특허문헌 2] Biotechnol. Prog. 2006 22, 1225-1228.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 유전자가 접합된 마이크로비드가 담지된 하이드로 겔을 포함하는 동소 고정(*in situ*) 단백질 합성용 겔-매트릭스 및 이의 제조방법, 이로부터 생산된 동소 고정 단백질 어레이 및 이를 이용한 단백질의 검출 또는 분석방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 타겟 유전자 주형이 접합된 제 1 포획체 및 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid) 반응기가 접합된 제 2 포획체가 결합된 마이크로비드가 담지된 하이드로 겔을 포함하는 동소 고정(*in situ*) 단백질 합성용 겔-매트릭스를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은

[0010] 1) 포획체가 결합된 마이크로비드와 유전자 주형을 혼합하여 상기 포획체에 유전자 주형을 접합시키는 단계;

- [0011] 2) 상기 단계 1) 이후에, 유전자 주형과 접합되지 않은 포획체에 NTA(nitrilotriacetic acid)를 접합시키는 단계;
- [0012] 3) 상기 포획체에 접합된 NTA를 Ni^{2+} 이온으로 이온화시키는 단계;
- [0013] 4) 상기 단계 3) 이후에, 상기 마이크로비드를 하이드로 겔에 담지하고, 상기 하이드로 겔을 고형화시키는 단계; 및
- [0014] 5) 고형의 하이드로 겔 상부에 무세포 단백질 생합성 반응혼합물을 첨가하여 하이드로 겔 내로 스며들게 하는 단계를 포함하는 동소 고정 단백질 합성용 겔-매트릭스의 제조방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 겔-매트릭스를 이용하여 단백질 합성하는 단계를 포함하는 동소 고정 단백질 어레이의 생산방법을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 생산방법으로 생산된 동소 고정 단백질 어레이를 제공한다.
- [0017] 아울러, 본 발명은 동소 고정 단백질 어레이를 이용하는 단백질의 검출 또는 분석방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명은 타겟 유전자 주형이 접합된 제 1 포획체 및 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid) 반응기가 접합된 제 2 포획체가 결합된 마이크로비드가 담지된 하이드로 겔을 포함하는 동소 고정(*in situ*) 단백질 합성용 겔-매트릭스, 이의 제조방법, 상기 제조방법에 따른 동소 고정 단백질 어레이 및 이를 이용한 단백질의 검출 또는 분석방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 겔-매트릭스는 하나 또는 다종의 유전자를 단백질로 빠르게 합성할 뿐만 아니라, 복잡한 분리정제 과정을 필요로 하지 않는 특징이 있어서, 다양한 세포 내 단백질의 기능적인 네트워크 분석 연구에서 중요한 도구로 이용될 수 있다.
- [0019] 또한, 단백질의 3차원적 구조를 유지할 수 있고, 평면구조의 칩에 고정된 것이 아니라, 입체적인 비드 위에 또한 이를 담지한 하이드로 겔이 3차원적 공간을 형성하여 보다 많은 양의 단백질이 존재할 수 있으므로 단백질의 검출 민감도를 향상시킬 수 있을 것으로 기대된다. 특히, 항원항체 반응 등 단백질 검출 및 분석에서 유용하게 사용될 수 있는 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 유전자가 접합된 마이크로비드 상에서 무세포 단백질 발현을 통한 동소 고정(*in situ*)을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 용액상의 무세포 합성 시스템에서 발현시킨 마이크로비드의 공초점 레이저 현미경 사진이다:
- A. Cy3-표지된 EGFP DNA가 접합된 마이크로비드(1. 마이크로비드의 광학적 이미지, 2. 마이크로비드 상의 EGFP 형광, 3. 마이크로비드 상의 Cy3 형광, 4. 상기 1, 2 및 3의 병합 이미지)의 사진이다; 및
- B. 마이크로비드 사이의 교차-오염을 확인한 것으로, EGFP 형광이 비표지된 EGFP DNA가 접합된 자체의 마이크로비드 뿐만 아니라 Cy3-표지된 DHFR DNA가 접합된 마이크로비드에서 관찰된 것을 확인한 도이다(1. 마이크로비드의 광학적 이미지, 2. 마이크로비드 상의 EGFP 형광, 3. 마이크로비드 상의 Cy3 형광, 4. 상기 1, 2 및 3의 병합 이미지).
- 도 3은 단백질 합성시스템을 포함하는 아가로스 겔 매트릭스(마이크로비드)에서 단백질 합성 반응 후, 마이크로비드의 공초점 레이저 현미경 사진을 나타낸 도이다:
- A. 음성대조군으로써, DNA가 접합되지 않은 마이크로비드의 이미지; B. 양성대조군으로써, 발현된 EGFP 단백질을 접합시킨 마이크로비드 이미지; C. EGFP DNA와 NTA가 접합된 마이크로비드에서 단백질을 합성하고, 세척하기 전의 마이크로비드 이미지; D. EGFP DNA와 NTA가 접합된 마이크로비드의 단백질 합성하고, 세척한 후의 마이크로비드 이미지; 및 E. NTA는 결합되지 않고, EGFP DNA가 접합된 마이크로비드에서 단백질 합성 후의 마이크로비드 이미지(1. 광학 이미지, 2. 형광 이미지, 3. 병합 이미지).
- 도 4는 DHFR DNA가 접합된 마이크로비드와 EGFP DNA가 접합된 마이크로비드의 혼합물을 동일한 아가로스 겔 매

트릭스에서 단백질 합성 반응을 수행하고 선별된 각각의 마이크로비드의 공초점 레이저 현미경 사진을 나타낸 도이다:

A. Cy3 표지된 DHFR DNA가 접합된 마이크로비드이고, B. 비표지된 EGFP DNA가 접합된 마이크로비드이다(1. 마이크로비드의 광학적 이미지, 2. 마이크로비드 상의 EGFP 형광, 3. 마이크로비드 상의 Cy3 형광, 4. 상기 1, 2 및 3의 병합 이미지).

도 5는 겔 내에서의 단백질 합성과정에서 발현된 단백질이 편재된 비드 고정을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

A. 겔 내에 세포 추출물이 스며있는 상태에서 EGFP DNA 및 DHFR-DNA가 접합된 마이크로비드로부터 단백질을 합성한 후, 형광 스캐너를 이용하여 획득된 이미지이다. 상기 이미지에서 녹색 스팟은 고정된 EGFP 단백질이고, 빨간색은 마이크로비드에 접합된 Cy3로 표지된 DHFR DNA이다; 및

B. 상기 EGFP 형광 마이크로비드로부터 회수된 DNA를 PCR 증폭하고, 1% 아가로스 겔에서 분석한 전기영동 사진이다. C변열은 PCR 증폭된 EGFP 유전자의 고유 크기(1300 bp)이다. C. 루시퍼레이드 DNA가 접합된 마이크로비드의 겔 내에서 단백질 합성 후에 형광상(좌측) 및 EtBr-염색된(우측) 이미지이다.

도 6은 다양한 형태의 주형 DNA로부터 단백질을 합성한 합성효율을 나타낸 그래프이다. 표준 무세포 단백질 합성 반응은 플라스미드를 사용한 경우(컬럼 1); PCR 생성물을 접합시키지 않고 선형 DNA 그대로 사용한 경우(컬럼 2); 및 EGFP 유전자의 PCR 생성물을 접합시킨 마이크로비드(컬럼 3 내지 5)를 사용한 경우에 대하여 수행하였다. 컬럼 3은 양쪽 5'말단에 바이오틴화 된 PCR 생성물을 접합시킨 것이고; 컬럼 4는 센스(sense) 가닥의 5'말단에 바이오틴화 된 PCR 생성물을 접합시킨 것이며; 컬럼 5는 안티센스(antisense) 가닥의 5'말단에 바이오틴화 된 PCR 생성물을 시킨 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 타겟 유전자 주형이 접합된 제 1 포획체 및 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid) 반응기가 접합된 제 2 포획체가 결합된 마이크로비드가 담지된 하이드로 겔을 포함하는 동소 고정(*in situ*) 단백질 합성용 겔-매트릭스를 제공한다.

상기 동소 고정 단백질 합성용 겔-매트릭스는 상기 하이드로 겔 상부에 무세포 단백질 생합성 반응 혼합물을 첨가하여 하이드로 겔 내로 무세포 단백질 생합성 반응 혼합물을 침투시킬 수 있는 것이 특징이다.

상기 무세포 단백질 생합성 반응 혼합물(reaction mixture for cell-free protein synthesis)은 목적에 따라 조성을 변형할 수 있다. 무세포 단백질 생합성 반응 혼합물의 일례로는 타겟 단백질의 합성을 위해 필요한 세포 소기관 및 인자를 포함하는 세포 파쇄액(cell lysate), 아미노산 혼합물, 단백질 합성 에너지원, 유전자 주형 및 완충용액을 포함하는 것이다. 세포 파쇄액을 제조하기 위한 세포로는 대장균, 고초균, 밀배아, 쌀배아, 보리배아, CHO 세포, 하이브리도마 세포 또는 망상 적혈구 세포를 사용할 수 있고, 세포 파쇄액은 S30 추출액(Pratt, J.M. (1984) Coupled transcription - translation in prokaryotic cell-free system. In: Hames, B.D., Higgins, S.J.(Eds.), Transcription and translation: a practical approach, IPL Press, New York, pp. 179) 또는 S12 추출액(한국등록특허 제733,712호) 등 일 수 있다. 아미노산 혼합물은 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 시스테인, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 리신, 아르기닌, 히스티딘, 아스파테이트, 글루타메이트, 아스파라긴 또는 글루타민으로부터 선택되는 L-아미노산의 혼합물인 바람직하고, 필요에 따라 상기 아미노산의 유사체를 사용할 수 있는 것이 특징이다.

단백질 합성 에너지원은 ATP, CTP, GTP, TTP 또는 UTP로부터 선택되는 하나 이상이 바람직하게 사용될 수 있다.

또한, 상기 유전자 주형은 양 말단의 어느 한쪽 또는 둘 다에 바이오틴이 결합할 수 있으며, 바람직하게는 유전자의 5'말단에 바이오틴이 결합하는 것이다. 상기 유전자 주형은 하나 또는 둘 이상의 서로 다른 종류의 유전자 주형일 수 있으며, 유전자 주형은 타겟 단백질을 코딩하는 DNA 또는 mRNA일 수 있다.

상기 제 1 포획체 및 제 2 포획체는 스트렙타비딘, 아비딘, 뉴트라비딘 및 캡트아비딘 중에서 선택된 하나 또는 둘 이상인 것이 바람직하지만, 유전자 주형 및 생성된 단백질을 포획할 수 있는 물질이라면 어느 것이든 무방하게 사용할 수 있으며, 상기 제 1 포획체 및 제 2 포획체가 모두 스트렙타비딘인 것이 더욱 바람직하다.

- [0028] 상기 마이크로비드는 아가로스 겔, 폴리아크릴아미드 겔, 알킨산 겔, 전분겔, 폴리비닐알코올 겔 및 실리콘 하이드로 겔 중에서 선택된 어느 하나로 이루어진 것을 특징이지만 이에 한정하지 않는다.
- [0029] 본 발명에 있어서, '하이드로 겔'은 물의 존재 하에서 겔을 형성하여 부풀게 되는 친수성 네트워크 폴리머를 의미한다. 본 발명에서 하이드로 겔은 단백질 생합성 반응 혼합물의 단백질 합성 활성 및 기능을 나타낼 수 있는 것이면 특별히 제한 없이 사용될 수 있으며, 일례로는 아가로스 겔, 폴리아크릴아미드 겔, 알킨산 겔, 전분겔, 폴리비닐알코올 겔 및 실리콘 하이드로 겔 중에서 선택된 어느 하나일 수 있으나, 본 발명의 범위가 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 상기 포획체 접합된 NTA는 포획체에 결합할 수 있도록 바이오틴이 결합되어 있는 것이 특징이고, NTA와 바이오틴의 결합은 링커에 의해 연결될 수 있다.
- [0031] 본 발명에 따른 동소 고정 단백질 합성용 겔-매트릭스는 습윤 상태에서 2 내지 4℃에서 보관하는 것이 바람직하다.
- [0032] 또한, 본 발명은
- [0033] 1) 포획체가 결합된 마이크로비드에 유전자 주형을 접합시키는 단계;
- [0034] 2) 상기 단계 1) 이후에, 유전자 주형과 접합되지 않은 포획체에 NTA를 접합시키는 단계;
- [0035] 3) 상기 포획체에 접합된 NTA를 Ni^{2+} 이온으로 이온화시키는 단계;
- [0036] 4) 상기 단계 3) 이후에, 상기 마이크로비드에 하이드로 겔을 첨가하고, 고형화시키는 단계; 및
- [0037] 5) 고형의 하이드로 겔 상부에 무세포 단백질 생합성 반응혼합물을 첨가하여 하이드로 겔 내로 스며들게 하는 단계를 포함하는 동소 고정(*in situ*) 단백질 어레이 생성용 겔-매트릭스의 제조방법을 제공한다.
- [0038] 상기 단계 1) 및 2)에서 유전자 주형 및 NTA는 마이크로비드에 결합된 포획체의 접합용량(몰비) 1에 대하여, 2 내지 10배의 유전자 주형 및 NTA를 사용하는 것이 바람직하다.
- [0039] 상기 접합시키는 단계 1) 및 2)에서는 포획체의 접합 능력이 상실되지 않도록 하는 온도 및 완충용액 조건하에 수행하는 것이 바람직하다.
- [0040] 상기 단계 3)에서, 포획체에 접합된 NTA에 Ni^{2+} 이온화하는 것은 NTA의 몰비에 대하여, 2배 이상의 Ni^{2+} 이온 수용액을 사용하는 것이 바람직하다. 특히, 더욱 바람직하게는 최종 농도가 0.5 M의 Ni^{2+} 이온 수용액을 사용하는 것이다.
- [0041] 또한, 본 발명은 상기 겔-매트릭스를 단백질 합성이 일어날 수 있는 조건 하에 두어 단백질 합성이 일어나도록 하는 단계를 포함하는 동소 고정(*in situ*) 단백질 어레이의 생산방법을 제공한다.
- [0042] 상기 겔-매트릭스 상에서의 단백질 합성 반응 온도는 15 내지 45℃인 것이 바람직하지만, 타겟 단백질의 특성에 따라 적절한 온도를 선택할 수 있다.
- [0043] 또한, 반응 시간은 30분 내지 3시간 이내로 수행하는 것이 바람직하며, 타겟 유전자의 발현 효율이 낮을 경우, 반응시간은 연장될 수 있고, 발현 효율이 높을 경우 반응시간을 단축시켜 최적화된 반응 시간을 선택하여 진행할 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명은 상기 생산방법으로 생산된 동소 고정(*in situ*) 단백질 어레이를 제공한다.
- [0045] 상기 동소 고정 단백질 어레이는 2차원적 고체표면이 아니라 3차원의 다공성 하이드로 겔 내에 고정화된 것으로 단위면적당 고정될 수 있는 단백질의 양이 2차원 평면구조의 어레이보다 증가 될 수 있다. 따라서 단백질 어레이의 분석 감도를 현저히 증가시킬 수 있는 장점이 있다. 또한, 단백질의 3차원적 구조를 유지할 수 있으므로, 구조 특이성을 갖는 항원 단백질의 발굴에 매우 유용하게 사용될 수 있는 것이 특징이다.
- [0046] 본 발명의 동소 고정 단백질 어레이의 다른 특징 중 하나는 하이드로 겔 내에 담지된 마이크로비드에 단백질이

고정되어 있어 적당한 조건하에서 장기간 보관하는 것이 가능하다는 것이다.

[0047] 또한, 본 발명은 동소 고정(*in situ*) 단백질 어레이를 이용하는 단백질의 검출 또는 분석방법을 제공한다.

[0048] 보다 상세하게는 상기 동소 고정(*in situ*) 단백질 어레이는 단백질 자체 형광 또는 발광을 이용하는 분석방법, 단백질 염색을 통한 색깔 또는 형광 검출방법, 항원 단백질을 인식하는 항체를 사용하는 항원-항체반응을 이용한 분석 방법, 단백질 내에 도입된 방사선 동위원소를 이용하여 표시하는 분석방법, 비천연 아미노산을 도입을 이용한 분석방법, 타겟 단백질 특이 기질에 대한 색/형광/발광 분석법 등에 이용될 수 있다.

[0049] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0050] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] <실시예 1> 주형 유전자의 제조

[0052] 제한효소 NdeI 및 SalI 자리의 서열을 flanking한 프라이머를 이용하여 플라스미드 pSP-lic+NF(Promega, 미국)로부터 반딧불이 루시퍼레이즈(firefly luciferase) 서열을 PCR 증폭하고 제한효소 NdeI 및 SalI로 자른 후, 증폭된 유전자는 T7 프로모터(promotor)와 T7 터미네이터(terminator) 서열 사이의 pk7 플라스미드로 클로닝 하였다. 플라스미드 pIVEX 2.3d에서의 강화된 녹색 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein; EGFP) 및 디히드로엽산환원효소(dihydrofolate reductase; DHFR)의 ORF는 pk7 플라스미드로 서브클로닝하였다.

[0053] 스트렙타비딘이 코팅된 비드에 접합하기 위한 DNA 주형은 5'-바이오틴화 T7 프로모터 특이 센스 프라이머 및 5'-바이오틴화 T7 터미네이터 특이 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하였다. 비드에 고정된 선형 유전자의 확인을 위해서 5'-바이오틴이 결합된 T7 프로모터 특이 센스 프라이머와 5'-Cy3가 결합된 T7 터미네이터(terminator) 특이 안티센스 프라이머를 이용하여 유전자를 증폭하였다. 모든 PCR 생성물은 상업용 PCR clean-up kit(Promega, 미국)으로 사용 전에 정제하였다.

[0054] <실시예 2> 주형 DNA가 접합된 스트렙타비딘과 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)가 코팅된 마이크로비드의 제조

[0055] 상기 <실시예 1>에 제조된 유전자 주형이 스트렙타비딘이 접합된 마이크로비드에 추가적으로 유전자 주형이 접합되지 않은 스트렙타비딘에 Ni-NTA를 접합시켜 유전자주형과 Ni-NTA 반응기가 공존하는 마이크로비드(microbead)를 제조하였다.

[0056] 구체적으로, 30 μ l 스트렙타비딘(streptavidin; STV)-아가로스 레진 현탁액(Thermo Scientific, 미국)을 3배의 DDW(Deionized distilled water)로 씻어낸 다음, 1 M NaCl을 포함하는 5 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.5) 150 μ l 과 상기 <실시예 1>에서 제조한 20 μ l의 주형 유전자를 혼합하고, 30분 동안 상온에서 인큐베이션한 후, PBS 완충용액(pH 7.4)으로 세척하였다. 이후, 60 μ l biotin-X-NTA를 포함하는 PBS 완충용액(pH 7.4) 100 μ l을 첨가하여 다시 현탁액으로 제조하였다. 상기 현탁액에서 NTA 그룹은 마이크로비드(아가로스 레진)에 접합되고, 0.5 M NiSO₄ 용액을 첨가하여 Ni²⁺으로 이온화된 마이크로비드를 제조하였다.

[0057] <실시예 3> 무세포 단백질 합성 반응을 이용한 단백질 동소 생성

[0058] <3-1> 표준용액 상에서 무세포 단백질 합성 반응을 이용한 단백질 동소 생성

[0059] 상기 <실시예 1> 및 <실시예 2>에서 제조된 마이크로비드를 이용한 단백질 동소 생성을 위한 무세포 단백질 합성을 수행하였다.

[0060] 구체적으로, 1.53 nM 타겟 유전자(플라스미드 형태, 프리 PCR 생성물 또는 비드-접합된 PCR 생성물)는 표준 반응혼합물[57 mM Hepes-KOH(pH 7.5), 1.2 mM ATP, 0.85 mM 각각 GTP, UTP 및 CTP, 80 mM 암모늄 아세테이트, 34 μ g/ml 1-5-포밀-5,6,7,8-테트라하이드로 폴린산(folinic acid), 2.0 mM 각각 20종의 아미노산, 0.3 U/ml 크레아틴 카이네이스(CK), 67 mM 크레아틴 포스페이트 및 4 μ l S12 추출물(한국등록특허 733713호)]과 혼합하여 30℃

에서 교반하면서 반응시켜 무세포 단백질 합성하였다.

[0061] <3-2> 겔 매트릭스 내에서 단백질 합성 반응을 이용한 단백질 동소 생성

[0062] 겔 매트릭스의 마이크로비드에 접합된 DNA로부터 단백질을 합성하였다. 37℃에서 PCR 생성물(유전자 주형)이 접합된 마이크로비드 현탁액 5 μ l와 3%(w/v) 저융점(low melting) 아가로스(Bio-Rad Laboratories, 미국) 겔 용액 65 μ l를 혼합하고, 실온에서 Frame Seal Slide Chamber(Bio-Rad Laboratories, 미국)에서 고형화시켰다. 상기 고형화된 겔의 상부에 65 μ l의 무세포 단백질 합성 혼합물을 첨가하고 4℃에서 30분 동안 흡수시켰다. 항온 수조에서 30℃의 온도 조건으로 1시간 동안 반응시켜 무세포 단백질 합성하였다.

[0063] <실시예 4> 비드 고정된 단백질의 발현 및 분석

[0064] 도 1의 모식도에 나타난 바와 같이, 발현된 단백질은 주변 환경에 노출되어 있는 상기 마이크로비드(microbeads)에 편재되기 때문에, 상기 <실시예 3>에서 기재한 수용액 내 및 겔 내 비드 발현 방식은 무세포 발현된 단백질의 생물학적 활성을 쉽게 분석을 할 수 있다. EGFP 선형 유전자와 Ni-NTA 반응기가 고정된 마이크로비드와 DHFR 선형 유전자와 Ni-NTA 반응기가 고정된 마이크로비드를 개별적으로 준비하고, 무세포 단백질 합성 시 두 종류의 마이크로비드를 혼합하여 실시하였으며, 수용액 내 및 겔 내에서 합성된 단백질의 고정 여부를 확인하였다. 합성된 후, 고정된 단백질들은 공초점 레이저 현미경을 이용하여 분석하였다.

[0065] 수용액 내에서 두 종류의 마이크로비드를 섞어 단백질을 합성하였을 경우에 합성된 단백질이 마이크로비드 내에 고정되기는 하지만, Cy3가 결합된 DHFR 유전자가 고정된 마이크로비드에서도 형광 단백질에 의한 신호가 감지되었다. 즉, 용액 내에서는 합성된 두 종류의 단백질들이 서로의 마이크로비드에 교차되어 고정되는 것을 의미하였다(도 2).

[0066] 한편, 도 3은 EGFP가 접합된 마이크로비드가 겔 내에서 단백질 합성이 잘 이루어지고, 합성된 단백질이 잘 고정된다는 것을 확인한 결과이다. 유전자가 접합되지 않은 마이크로비드에서는 형광이 관찰되지 않았으며(도 3A), 미리 EGFP 단백질을 고정해 놓은 마이크로비드는 뚜렷한 형태의 구형 형광이 관찰되었다(도 3B). 무세포 단백질 합성 반응 후, 세척과정 없이 형광을 관찰하면, 전체적인 형광 신호 때문에 뚜렷한 구형의 형광 신호가 관찰되지 않지만(도 3C), 무세포 단백질 합성 반응 후에 이루어지는 세척과정을 거치게 되면 고정된 목적 단백질에 의하여 뚜렷한 구형의 형광 신호를 관찰할 수 있었다(도 3D). 상기 결과는 마이크로비드에 타겟 단백질만을 고정시킬 수 있음을 의미하는 것이다. 또한, 각기 다른 유전자가 고정된 두 종류의 마이크로비드를 혼합하여 겔 상에서 무세포 단백질 합성법을 통하여 단백질을 합성하고 고정하였다.

[0067] 그 결과, 도 4 및 도 5A에 기재한 바와 같이, 수용액 상에서의 결과와는 달리 두 종류의 단백질들이 서로의 마이크로비드에 교차되지 않고, 고정됨을 확인할 수 있었다.

[0068] 녹색 형광을 띄는 마이크로비드를 피펫으로 수거하여 T7 프로모터 특이 센스 프라이머와 T7 터미네이터 특이 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다. 도 5B와 같이 정확한 크기의 EGFP 선형 유전자가 확인됨으로써, 타겟 단백질이 고정된 비드를 선별하여 유전정보를 알아낼 수 있음을 의미하였다.

[0069] 본 실시예는 도 5C와 같이, 반딧불이 루시페레이즈의 주형 DNA를 이용한 겔 내 매트릭스 비드에서의 반딧불이 루시페레이즈 효소의 발현 및 분석을 실시하였다. 상기 비드-발현된 루시페레이즈(luciferase)의 효소활성은 겔 내 매트릭스 상에서 비드의 화학발광(chemiluminescence) 어세이를 이용하여 결정하였다. 상기 비드가 포함된 아가로스겔 매트릭스를 PBS 완충용액으로 세 번 세척한 후에, 200 μ l의 루시페레이즈 어세이 완충용액[0.5 mM D-luciferin, 0.2 mM ATP, 15 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 4 mM EDTA 및 15 mM KPO₄(pH 7.8)]을 인큐베이션된 아가로스겔 매트릭스 위에 부어 주었다. 또한, 루시페레이즈의 화학발광 이미지는 Molecular Imager ChemiDoc XRS(Bio-RAD, 미국)를 이용하여 획득하였다. 또한, 아가로스 겔 매트릭스는 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)를 이용하여 염색하고 비드에 고정된 DNA의 위치를 확인하였다.

[0070] 그 결과, 도 5C에 나타난 바와 같이, 루시페라아제-결합(luciferase-bound) 마이크로비드에 상응하는 발광점(luminescent spot)들이 EtBr(ethidium bromide)로 염색된 DNA의 위치와도 일치하는 것을 확인하였다(도 5C).

[0071] 한편, 상기 고정되어있지 않거나 고정된 PCR 생산물에서의 단백질 발현 여부를 확인하기 위하여, 상기 <실시예 1>의 5'-바이오틴이 결합된 것과 결합되어 있지 않는 EGFP 유전자를 가지고 비드에 코팅하여 수용액 내에서 무

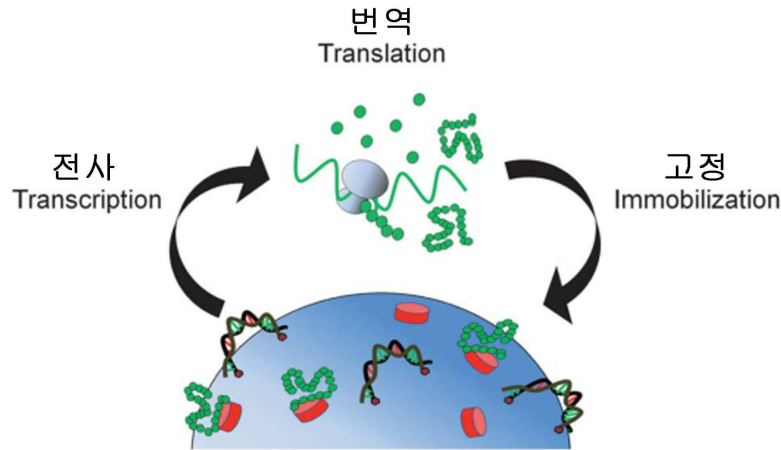
세포 단백질을 합성하여 반응한 후, EGFP 형광을 측정하여 발현량을 확인하였다. 아울러, 양성대조군으로 원본 플라스미드를 사용하였다.

[0072]

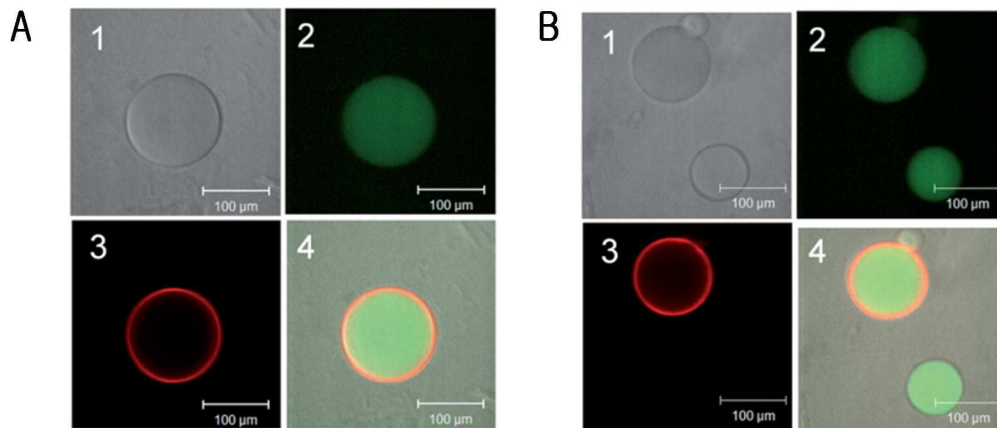
그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 단백질 합성물은 한쪽 끝만 바이오틴화 시킨(biotinylated) DNA는 마이크로 비드에 접합하지 않은 프리(free) 프라이머를 사용한 경우보다 단백질의 발현률이 27% 낮게 나타났으나, 센스 가닥과 안티센스 가닥의 5 말단을 바이오틴화 시킨 DNA가 단백질의 합성효율이 증가 되는 것을 확인하였다(도 6).

도면

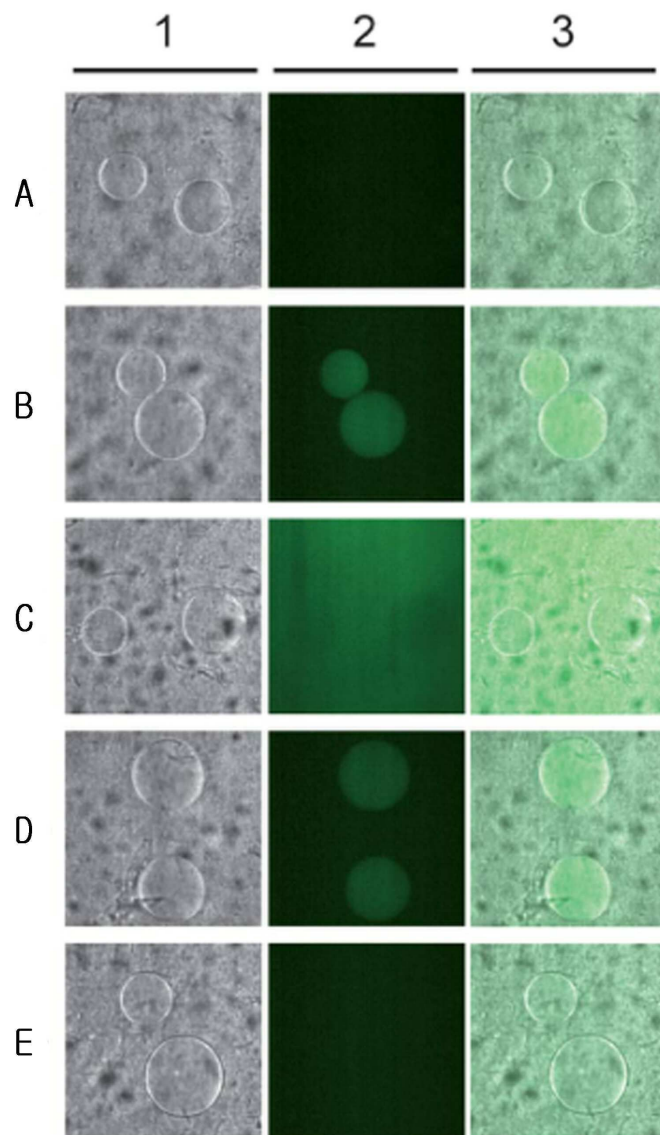
도면1



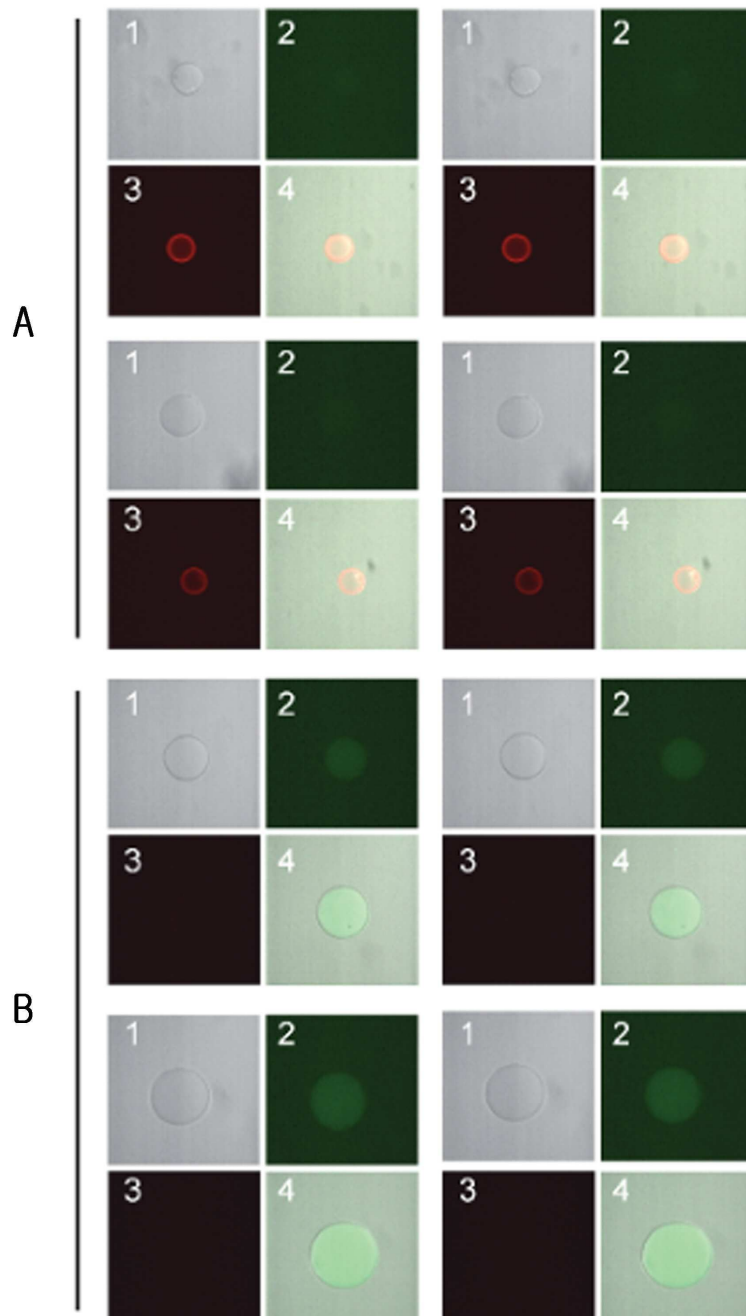
도면2



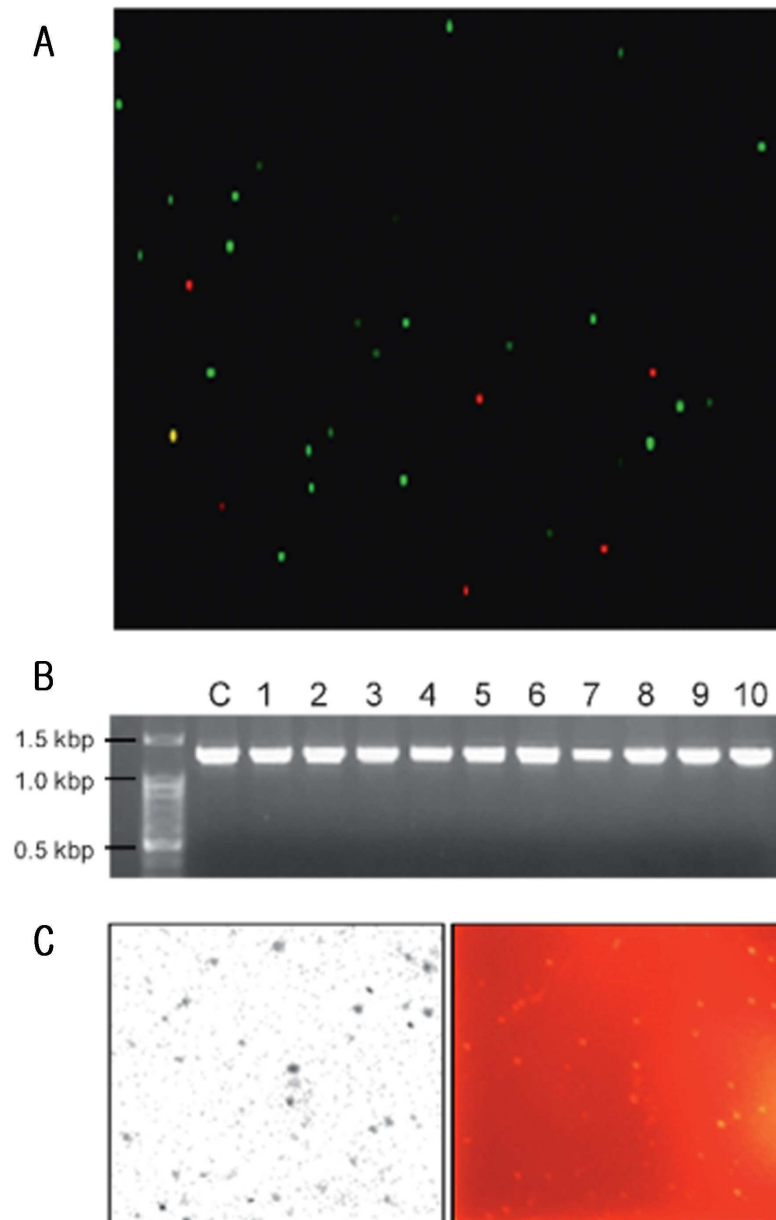
도면3



도면4



도면5



도면6

