

(19)대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>  
G01N 33/53

(45) 공고일자 2005년09월27일  
(11) 등록번호 10-0517112  
(24) 등록일자 2005년09월16일

(21) 출원번호 10-2002-0019950  
(22) 출원일자 2002년04월12일

(65) 공개번호 10-2003-0081624  
(43) 공개일자 2003년10월22일

(73) 특허권자 김희태  
서울 금천구 시흥동 985-18, 202호

(72) 발명자 김희태  
서울 금천구 시흥동 985-18, 202호

(74) 대리인 이종우

심사관 : 신원혜

(54) 지지체로서 멤브레인을 사용한 마이크로웰 플레이트단백질 칩, 이의 제조 방법 및 이를 이용하여 단백질을측정하는 방법

요약

본 발명은 표면상에는 분석하고자 하는 1종 이상의 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항원이나 항체 등의 1종 이상의 단백질이 고정되어 있는 멤브레인 지지체가 각 웰에 부착된 마이크로웰 플레이트 단백질 칩 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이와 같은 마이크로웰 플레이트 단백질 칩을 이용하여 분석하고자 하는 시료내의 성분들을 동시에 분석하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 단백질 칩은 유리 플레이트 또는 플라스틱이나 금속 플레이트 같은 지지체를 사용한 종래 단백질 칩에 비해 시간 등의 면에서 효율적이고, 반응성이 우수하며, 각종 자동화 장비에 쉽게 활용할 수 있어 시험시 뛰어난 효율성과 보다 정확한 분석 결과를 제공한다.

대표도

도 2b

색인어

마이크로웰 플레이트 단백질 칩, 항원, 항체, 멤브레인, 지지체, 흡습지

명세서

도면의 간단한 설명

도 1a는 96-웰 마이크로웰 플레이트를 위에서 촬영한 사진.

도 1b는 96-웰 마이크로웰 플레이트의 각 웰을 확대 촬영한 사진.

도 2a는 표면상에 단백질(항원 또는 항체)을 고정시킨 멤브레인을 개략적으로 도시한 도면.

도 2b는 상기 도 2a의 멤브레인을 도 1a의 웰의 하부에 장착시킨 마이크로웰 플레이트 단백질 칩에서 하나의 웰을 개략적으로 도시한 도면.

도 3은 본 발명에 따른 단백질 칩에 고정된 HCV 항원 단백질과 환자 혈청과의 반응 결과를 촬영한 사진.

## 발명의 상세한 설명

### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 지지체로서 멤브레인을 사용한 마이크로웰 플레이트 단백질 칩 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이와 같은 마이크로웰 플레이트 단백질 칩을 이용하여 분석하고자 하는 시료내의 성분들을 동시에 분석하는 방법에 관한 것이다.

최근, 질병 진단이나 약물 치료 효능 평가 등 병리학, 생명공학 등의 분야에서 시료내 단백질을 분석하기 위한 최첨단의 기술로서 단백질 칩에 대한 연구가 급속도로 이루어지고 있고, 이에 대한 관심 또한 나날이 높아지고 있다. 일반적으로, 단백질 칩은 목적 단백질에 특이적으로 결합하는 항원이나 항체 등의 단백질을 지지체의 표면상에 고정시킨 후, 시료와의 반응, 주로 면역 반응을 이용하여 그 결합 결과를 분석함으로써, 시료내 특정 단백질을 측정하는 것이다.

현재 사용되고 있는 단백질 칩들은 지지체로서 유리 플레이트 또는 플라스틱이나 금속 플레이트 같은 소재의 기관들을 사용하며, 이들 기관들이 갖고 있는 물리적인 특성과 고정시키고자 하는 항원, 항체 등 단백질의 특성을 이용하여 이들 단백질을 지지체의 표면상에 고정시키고 있다. 그 구체적인 방법들로는 다음과 같은 것들이 있다.

그중 첫 번째는 지지체와 단백질 상호간의 소수성을 이용한 방법으로, 소수성(hydrophobic)을 나타내는 플라스틱이나 금속 플레이트의 표면에 단백질의 소수성 부분이 부착되는 특성을 이용하여 단백질을 고정시키는 방법이다. 이 방법은 플라스틱이나 금속의 표면에 단백질이 고정되는데 상당히 오랜 시간이 소요된다는 단점과 함께, 고정된 정도가 매우 불규칙하여 그 정도에 따라 각기 다른 면역 반응 정도를 나타내어 잘못된 시험 결과를 산출시키는 등의 문제점을 갖고 있다. 그리고 고정시키고자 하는 단백질이 그 특성에 따라 각기 다른 고정상태를 나타내므로 여러 종류의 단백질을 함께 고정시키는데 어려움이 있다.

두 번째는 EDC(1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드)를 사용하여 플라스틱 등 지지체 표면의 카르복실기(carboxyl group)를 활성화시킨 후, 합성 단백질의 아미노기(amino group)와 결합 반응시킴으로써, 단백질을 지지체의 표면에 부착하는 기술[참조; Bioorg Khim. Ivanovskaia MG, Naryshkin NA, Shabarova ZA. 21(6):454-60(1995, 6)]이다. 그러나 이 기술에 의해 플라스틱 표면에 단백질을 공유 결합으로 영구 고정시켜 단백질 칩을 제조하는 경우에 있어서도, 플라스틱 표면의 카르복실기와 단백질의 아미노기간의 반응에 상당한 시간이 소요되는 단점을 가지고 있다.

이와 같이, 단백질 칩을 제조하는데 있어, 유리 플레이트 또는 플라스틱이나 금속 플레이트 같은 종래의 지지체 표면에 단백질을 고정시키는데에는 상기와 같은 여러 가지 어려움이 있으며, 특히 마이크로웰 플레이트와 같은 자동화가 가능한 용기나 기구내에 단백질 칩을 제조하기 곤란한 문제점 등을 가지고 있었다.

#### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명은 유리 플레이트 또는 플라스틱이나 금속 플레이트 같은 지지체를 사용한 종래 단백질 칩의 제조과정과 제품의 안정성면에서의 문제점을 인식하고, 이를 해결하기 위해, 시간 등의 면에서 효율적이고, 반응성이 우수하며, 각종 자동화 기기에 쉽게 활용할 수 있는 단백질 칩을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

### 발명의 구성 및 작용

상기한 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 일 관점으로서, 멤브레인 지지체가 마이크로웰 플레이트내에 부착된 단백질 칩, 즉 마이크로웰 플레이트 단백질 칩을 제공한다.

구체적 양태로서, 본 발명은 표면상에 분석하고자 하는 1종 이상의 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 1종 이상의 단백질이 고정되어 있는 멤브레인을 웰 내부에 부착시킨 마이크로웰 플레이트 단백질 칩을 제공한다.

이러한 양태의 일 구체예에 있어서, 상기 고정된 단백질은 비제한적으로 예를 들어, 특정 질환의 지표가 되는 것으로 잘 알려져 있거나 또는 향후 밝혀질 수 있는 단백질, 이 단백질의 코어 단백질 또는 비구조 단백질 등을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 고정된 단백질은 특정 단백질과 복합체를 형성할 수 있는 항원이나 항체일 수 있다. 또한, 상기 멤브레인으로는 나이트로셀룰로스 멤브레인, 나일론 멤브레인 등을 포함할 수 있다. 특히, 나이트로셀룰로스 멤브레인이 바람직하다.

또 다른 양태로서, 본 발명은 지지체로서 사용된 멤브레인과, 그 하부에 장착되어 멤브레인을 투과하는 시료 및 세척 용액들을 흡수할 수 있는 흡습지를 포함하는 마이크로웰 플레이트 단백질 칩을 제공한다.

상기 흡습지는 흡수 능력이 큰 흡수 용지로서, 예를 들어 밀리포어(Millipore)사에서 판매하는 일반적인 흡습지 등을 사용할 수 있다. 이와 같은 흡수 용지는 그 두께가 1cm 이상이 되도록 마이크로웰의 멤브레인 지지체 하부에 장착할 수 있다.

또 다른 관점으로서, 본 발명은 다음과 같은 단계들을 포함하는 마이크로웰 플레이트 단백질 칩의 제조방법을 제공한다:

- (1) 마이크로웰 플레이트 바닥에 흡수 능력이 높은 흡습지를 넣어주는 단계,
- (2) 별도로, 멤브레인의 표면상의 소정의 위치에, 분석하고자 하는 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 1종 이상의 단백질을 분무하는 단계,
- (3) 분무된 단백질이 멤브레인 표면에 흡착 고정되도록 항온처리하는 단계,
- (4) 이와 같이 단백질이 흡착 고정된 멤브레인을 마이크로웰 플레이트의 웰에 들어갈 수 있을 정도의 크기로 절단하는 단계 및
- (5) 절단된 멤브레인을 상기 (1)의 마이크로웰 플레이트의 흡습지 상에 넣어 고정시키는 단계.

멤브레인 표면 상에 분무되는 단백질은 본 명세서에 기술한 바와 같이 1종 이상의 항원 또는 항체일 수 있다. 이와 같은 항원 또는 항체의 분무 양은 0.05 내지 5 $\mu$ l인 것이 바람직하다.

항원 또는 항체 단백질을 멤브레인 표면 상에 분무하는 데에는 통상적인 단백질 칩 제조의 자동화 시스템에 사용되는 마이크로어레이 등을 사용할 수 있다. 분무된 항원 또는 항체는 35 내지 40 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켜 멤브레인 상에 고정시킬 수 있다.

본 발명에 사용되는 마이크로웰 플레이트로는 당해 기술분야에서 사용되는 모든 마이크로웰 플레이트 그리고 유사 시험 기구 등이 모두 가능하며, 96-웰 마이크로 플레이트를 사용하는 것이 여러 면에서 유리하다.

본 발명에서 지지체로 사용된 멤브레인은 표면상에 항원이나 항체 등의 단백질을 분무한 후, 이 단백질들이 표면에 흡착 고정되도록 35 내지 40 $^{\circ}$ C에서 1시간 정도 반응시킴으로써, 종래에 사용하였던 유리 플레이트 또는 플라스틱이나 금속 플레이트에 비해 비교적 용이하고 간편하게 단백질을 고정시킬 수 있으며, 물리적 특성상 유연성이 우수하여 마이크로웰 플레이트 등 각종 자동화 기기에 쉽게 부착 사용할 수 있는 장점이 있다.

또 다른 관점으로서, 본 발명은 본 명세서에 개시된 마이크로웰 플레이트 단백질 칩을 이용하여 생물학적 시료 중의 분석하고자 하는 단백질들을 동시에 측정하는 방법을 제공한다.

구체적 양태로서, 분석하고자 하는 단백질들을 동시에 측정하는 방법은

- (1) 본 명세서에 개시된 마이크로웰 플레이트 단백질 칩의 각 웰에 완충 용액을 주입하여 멤브레인에 고정된 단백질을 활성화시키는 단계,

(2) 상기 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 생물학적 시료를 주입하여 특이 면역 결합을 형성하도록 하는 단계,

(3) 그 다음 마이크로웰 플레이트의 웰에 세척 용액을 주입하여 비특이적인 결합을 이룬 단백질이나 결합되지 않은 단백질을 제거하는 단계, 및

(4) 상기와 같이 면역 특이 결합 반응을 이룬 면역 복합체를 발색 시약을 이용하여 분석하는 단계를 포함한다.

이때, 지지체 표면에 고정된 단백질은 전술한 바와 같이 분석하고자 하는 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 여러 종류의 단백질, 예를 들면 항원이나 항체와 같은 단백질일 수 있다. 구체적인 예로는 C형 간염 바이러스(HCV)의 항원 단백질, 특히 코어 단백질, NS3 단백질(비구조 3 단백질), NS4 단백질(비구조 4 단백질), NS5, NS3 코어, NS34A, NS34B, 코어 80, 코어160, NS3-s26, NS4-DU, NS34-DU, 코어-DU 등을 포함하지만, 이것에 국한되는 것은 아니다.

멤브레인에 고정된 단백질을 활성화시키기 위한 완충 용액으로는 인산 완충액 등과 같은 당해 기술 분야에 통상적으로 사용되는 완충액을 사용할 수 있다. 특히 인산 완충액이 바람직하다. 이와 같은 인산 완충액은 약 50 내지 200 $\mu$ l 범위, 특히 바람직하게는 약 100 $\mu$ l의 양으로 사용하는 것이 적당하다.

생물학적 시료에는 고정된 단백질에 특이적 결합 반응을 하는 것으로 알려지거나 향후 밝혀질 단백질, 예컨대 전술한 HCV 항원 단백질 또는 이의 항체 단백질을 포함하고 있을 것으로 추정되는 시료, 예를 들어 환자의 혈청, 혈액, 혈장, 기타 다른 체액, 세포 추출액 등을 사용할 수 있다. 특이적 결합 반응에는 특별한 반응 조건이 필요하지 않으며, 용액이 흡수되는데 필요한 시간 정도 동안 상온에 방치하면 충분하다.

비특이적인 결합을 이룬 단백질이나 결합되지 않은 단백질을 제거하기 위한 세척에는 1차로 PBS에 혈청과 계면활성제를 첨가한 것을 사용하고, 2차로 PBS를 단독으로 사용한다. PBS외에도, 고정된 단백질의 구조나 활성화에 영향을 미치지 않는 한 당업계에서 일반적으로 사용되는 완충액을 모두 사용할 수 있다.

면역 복합체의 분석에는 형성된 면역 복합체에 특이적으로 결합 반응을 이루는 통상의 표지 물질인 골드 미세분말, 라텍스 분말 등을 사용할 수 있다. 특히, 추가 분석 절차 없이 즉석에서 결과를 확인할 수 있는 골드 미세분말이 바람직하다. 이러한 골드 미세분말은 그 용액을 각 마이크로웰 플레이트의 웰에 주입시 분석하고자 하는 단백질이 고정된 부위에 골드 미세분말이 농축되어 붉은 점을 형성하므로 유관으로 구분이 가능하기 때문에 결과 확인에 필요한 시간을 단축해주는 장점이 있다.

본 발명의 마이크로웰 플레이트 단백질 칩을 사용하여 시료를 분석하는 경우, 시료 반응전 가능한 특이 단백질 결합 반응을 제거하기 위해 BSA(소 혈청 알부민) 등으로 각 웰을 사전에 코팅시켜 주는 것이 바람직하다.

본 발명의 마이크로웰 플레이트 단백질 칩은 개별 단백질 칩을 사용하는 것에 비해, 동시에 많은 시료를 분석할 수 있고, 각종 자동화된 기기들을 이용하는데 유리한 점이 있다.

이와 같은 마이크로웰 플레이트 단백질 칩을 사용하면 용이하게 각종 질환을 진단 및 예측할 수 있다. 따라서, 본 발명은 다른 관점으로서 환자로부터 채취한 시료로부터 본 명세서에 개시된 마이크로웰 플레이트 단백질 칩을 이용하여 다양한 질환을 진단 또는 예측하는 방법을 제공한다. 진단 또는 예측 가능한 질환으로는, 각 질환을 대표하는 지표 인자(예, 단백질 등)가 밝혀져 있는 질환, 예컨대 HCV, HBV, 낭창, 자가면역 질환 등이 있으나, 이것에 국한되지 않음을 당업자라면 충분히 이해하고 있을 것이다.

또 다른 관점으로서, 본 발명은 다양한 질환을 진단 또는 예측하기 위한 본 발명의 마이크로웰 플레이트 단백질 칩 및 당업자에게 공지된 발색 시약을 포함하는 진단용 키트를 제공한다. 이 진단용 키트는 전술한 바와 같은 HCV 질환, HBV 질환, 낭창, 자가면역 질환 등의 진단에 사용할 수 있어 상기 질환의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다. 발색 시약으로는 전술한 바와 같은 골드 미세분말 등이 포함될 수 있다.

또 다른 관점으로서, 본 발명은 환자의 질병 진단이나 치료시 투여한 약물의 효능 분석에 유용한 본 발명의 마이크로웰 플레이트 단백질 칩 및 당업자에게 공지된 발색 시약을 포함하는 진단용 키트도 제공한다.

도 1에는 96-웰 마이크로 플레이트의 상단 촬영 사진(도 1a) 및 각 웰의 확대 사진(도 1b)이 제시되어 있다. 또한, 표면에 단백질(항원 또는 항체)을 고정시킨 멤브레인을 개략적으로 나타낸 도면과 이 멤브레인을 도 1a의 웰 내부 바닥면에 부착시킨 마이크로웰 플레이트 단백질 칩 중 하나의 웰을 개략적으로 나타낸 도면이 각각 도 2a 및 도 2b로서 제공되어 있다.

이하에서는 본 발명의 마이크로웰 플레이트 단백질 칩을 시료 분석 시험에 활용하는 경우를 구체적인 예를 중심으로 실시예로서 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위해 제공된 것으로, 본 발명을 한정하는 것으로 이해되어서는 안된다.

### 실시예 1

#### 생물학적 시료내 HCV 항체 확인 시험

나이트로셀룰로스 멤브레인 표면에 HCV의 항원 단백질중 코어 단백질(core protein), NS3 단백질(비구조 3 단백질), NS4 단백질(비구조 4 단백질), NS5 단백질(비구조 5 단백질) (Fitzgerald 혹은 Abcam 회사 제품을 구입하여 사용함)을 대조군(정상인 혈청)과 함께 각기 0.5 $\mu$ l(변동가능)씩 분무하고, 37 $^{\circ}$ C에서 약 1시간 동안 반응시켜 각 항원 단백질을 멤브레인 표면에 고정시킨 후, 웰 크기에 맞게 절단하였다. 별도로 흡습지를 1cm의 두께로 장착한 마이크로웰 플레이트의 각 웰 상에, 상기 절단된 멤브레인을 부착시켜 마이크로웰 플레이트 단백질 칩을 준비하였다.

상기와 같이 준비된 마이크로웰 플레이트에 인산 완충 용액 100 $\mu$ l를 주입하여 멤브레인에 고정된 항원을 활성화시켜주고, 한양대 병원에서 분석을 의뢰받은 환자의 혈청 100 $\mu$ l를 각 웰에 주입하여 혈청내에 존재하는 HCV 특이 항체가 단백질 칩상의 항원과 특이 면역 반응으로 결합될 수 있도록 하였다. 이 마이크로웰 플레이트는 상온에서 방치하고 마이크로웰에 주입된 혈청 시료액이 멤브레인을 투과하여 멤브레인 아래의 흡습지로 흡수되어 제거되면 세척액 PBS를 주입하여 미결합 항체를 제거하였다. 항체에 대하여 특이적으로 결합할 수 있는 단백질(예컨대, 프로테인 A 또는 프로테인 G)이 부착된 미세 골드 분말 용액을 각 웰에 주입하여 특이적인 결합 반응이 이루어지도록 반응시켰다. 그 반응 결과는 항체와 미세 골드 분말의 특이 결합 반응으로 미세 골드 분말이 농축되어 유관으로 구분이 가능한 붉은 점으로 확인할 수 있다.

그 반응 결과를 사진 촬영하여 도 3에 제시하였다. 이 도 3에 표시된 바와 같이, "음성"은 정상인의 혈청을 반응시킨 대조군으로서 HCV 항체가 존재하지 않음을 나타내고, 붉은 점이 3개 이상인 "양성" 레인은 검체 시료내 HCV에 대한 항체가 존재함을 나타내는 것이다. "@"로 표시된 레인은 HCV 항체가 존재하는 것으로 진단하기에는 결과가 불충분한 것으로서, 재검을 하는 것이 바람직한 시료이다. 이와 같이, 본 발명의 단백질 칩을 이용하면 많은 시료내 항원 항체의 존재를 동시에 용이하고도 신속하게 확인할 수 있다.

### 발명의 효과

본 발명의 마이크로웰 플레이트 단백질 칩은 지지체로서 멤브레인을 사용하므로, 종래에 사용하였던 유리 플레이트 또는 플라스틱이나 금속 플레이트에 비해 비교적 용이하고 간편하게 단백질을 표면에 고정시킬 수 있으며, 개별 단백질 칩을 사용하는 것에 비해, 동시에 많은 시료를 분석할 수 있고, 각종 자동화된 기기들을 이용하는데 유리하므로, 시료 분석을 통한 환자의 질병 진단이나 치료시 투여한 약물의 효능 등 임상 결과 파악 및 병리학 연구 등 관련 분야에서 시험시 뛰어난 효율성과 보다 정확한 분석 결과를 제공한다.

### (57) 청구의 범위

#### 청구항 1.

삭제

#### 청구항 2.

표면상에는 분석하고자 하는 1종 이상의 항원 또는 항체인 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 1종 이상의 항원 또는 항체인 단백질을 고정시키고, 하부에는 흡습지를 장착한 멤브레인 지지체를 마이크로웰 플레이트의 각 웰 내부에 부착시킨 마이크로웰 플레이트 단백질 칩.

### 청구항 3.

삭제

### 청구항 4.

- (1) 마이크로웰 플레이트 바닥에 흡수 능력이 높은 흡습지를 넣어주는 단계,
- (2) 별도로, 멤브레인의 표면상의 소정의 위치에, 분석하고자 하는 1종 이상의 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 1종 이상의 단백질을 분무하는 단계,
- (3) 분무된 단백질이 멤브레인 표면에 흡착 고정되도록 항온처리하는 단계,
- (4) 이와 같이 단백질이 흡착 고정된 멤브레인을 마이크로웰 플레이트의 웰에 들어갈 수 있을 정도의 크기로 절단하는 단계 및
- (5) 절단된 멤브레인을 상기 (1)의 마이크로웰 플레이트의 흡습지 상에 넣어 고정시키는 단계를 포함하는 마이크로웰 플레이트 단백질 칩의 제조방법.

### 청구항 5.

제4항에 있어서, 흡습지의 두께가 1cm 이상인 것이 특징인 마이크로웰 플레이트 단백질 칩의 제조방법.

### 청구항 6.

제4항에 있어서, 멤브레인 표면 상에 분무되는 단백질이 1종 이상의 항원 또는 항체인 것이 특징인 마이크로웰 플레이트 단백질 칩의 제조방법.

### 청구항 7.

제4항에 있어서, 마이크로웰 플레이트가 96웰 마이크로플레이트인 것이 특징인 마이크로웰 플레이트 단백질 칩의 제조방법.

### 청구항 8.

제1항에 제시된 마이크로웰 플레이트 단백질 칩을 이용하여 생물학적 시료 중의 분석하고자 하는 단백질들을 동시에 측정하는 방법.

### 청구항 9.

제8항에 있어서,

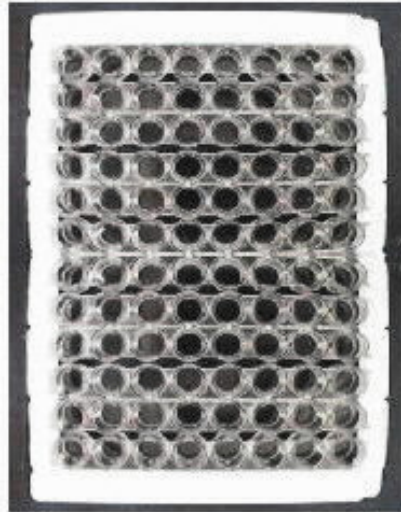
- (1) 제1항에 제시된 마이크로웰 플레이트 단백질 칩의 각 웰에 완충 용액을 주입하여 멤브레인에 고정된 단백질을 활성화시키는 단계,
- (2) 상기 마이크로웰 플레이트의 각 웰에 생물학적 시료를 주입하여 특이 면역 결합을 형성하도록 하는 단계,

(3) 그 다음 마이크로웰 플레이트의 웰에 세척 용액을 주입하여 비특이적인 결합을 이룬 단백질이나 결합되지 않은 단백질을 제거하는 단계, 및

(4) 상기와 같이 면역 특이 결합 반응을 이룬 면역 복합체를 발색 시약을 이용하여 분석하는 단계를 포함하는 것이 특징인, 분석하고자 하는 단백질들을 동시에 측정하는 방법.

도면

도면1a



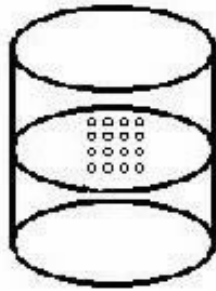
도면1b



도면2a

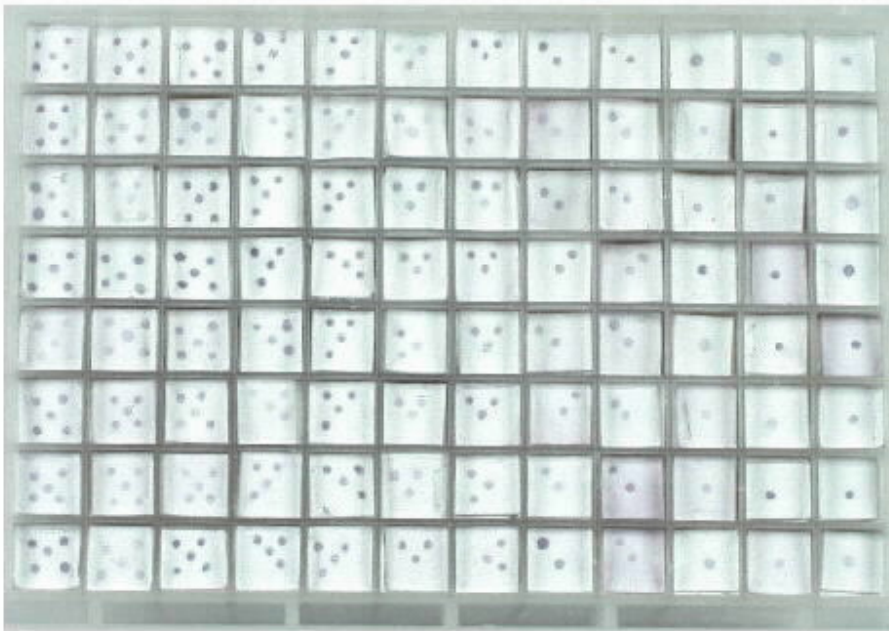


도면2b



- ← 반응조
- ← 멤브레인 단백질 칩
- ← 흡습지 층

도면3



← 양성 → ← (a) → ← 음성 →  
① : 재검 대상 검체