(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0094347
(43) 공개일자 2008년10월23일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0038683
(22) 출원일자 2007년04월20일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교
한국생명공학연구원
대전 유성구 어은동 52번지
(72) 발명자
김은기
서울특별시 강남구 대치동 316 은마아파트 8-212
정봉현
대전광역시 서구 월평동 누리아파트 113동 607호
백승학
경기 안산시 상록구 본오2동 신안1차APT 102동 1102호
(74) 대리인
이원희

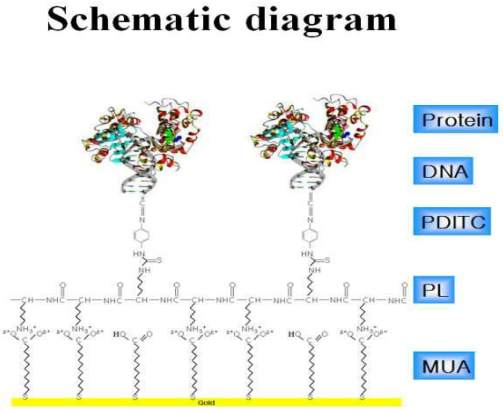
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 금 표면에서의 특이적인 DNA와 단백질의 SPRI 방법

(57) 요 약

본 발명은 MITF 저해제 탐색용 칩 및 이를 이용한 MITF 저해제 탐색방법에 관한 것으로, 구체적으로는 색소 침착과 관련 효소의 유전자 프로머터와 MITF 간의 결합을 억제하여 상기 효소의 발현을 억제하는 MITF 저해제 탐색용 생물학적 마이크로 칩 및 이를 이용한 MITF 저해제 탐색방법에 관한 것이다. 본 발명의 탐색용 마이크로 칩을 이용하면 MITF 단백질과 이와 결합하는 DNA 사이의 결합을 저해하는 저해제를 탐색 및 발굴하여 화장품 신소재 및 피부질환 치료제를 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

MITF(microphthalmia-associated transcription factor)와 MITF-특이적 DNA의 결합을 저해하는 저해물질 탐색용 칩(chip).

청구항 2

제 1항에 있어서, MUOH(11-mercaptoundecanol), 에피클로로하이드린(epichlorohydrin) 및 베타 사이클로덱스트린(β-cyclodextrin, β-CD)이 순차적으로 결합된 기판 및 상기 베타 사이클로덱스트린에 결합하는 MBP(maltose binding protein)-MITF 융합 단백질로 구성되는 것을 특징으로 하는 탐색용 칩.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 칩은 MUA(11-mercaptoundecanoic acid), 폴리 L-라이신(poly L-lysine) 및 PDITC(1,4-phenylenediisothiocyanate)가 순차적으로 결합된 기판 및 상기 PDITC와 결합하는 MITF-특이적 DNA로 구성되는 것을 특징으로 하는 탐색용 칩.

청구항 4

제 1항 또는 제 3항에 있어서, 상기 DNA는 E-box인 것을 특징으로 하는 탐색용 칩.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 E-box는 서열번호 5의 DNA 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 탐색용 칩.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 기판은 재질이 금(gold)인 것을 특징으로 하는 탐색용 칩.

청구항 7

MITF(microphthalmia-associated transcription factor)와 MITF-특이적 DNA의 결합을 저해하는 저해물질 탐색용 키트.

청구항 8

제 7항에 있어서, 제 2항의 탐색용 칩 및 MITF-특이적 DNA를 포함하는 것을 특징으로 하는 저해물질 탐색용 키트.

청구항 9

제 8항에 있어서, MITF-특이적 DNA는 E-box인 것을 특징으로 하는 저해물질 탐색용 키트.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 E-box는 서열번호 5의 DNA 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 저해물질 탐색용 키트.

청구항 11

제 8항에 있어서, DNA는 형광물질로 표지된 것을 특징으로 하는 저해물질 탐색용 키트.

청구항 12

제 11항에 있어서, 형광물질은 FITC(fluorescein isothiocyanate), TRITC(tetramethylrhodamine isothiocyanate), YFP(yellow fluorescent protein), RFP(red fluorescent protein), DAPI(diamidine-2-phenylindole), Cy2, Cy3 및 Cy5로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 저해물질 탐색용 키트.

청구항 13

제 7항에 있어서, 제 3항의 탐색용 칩 및 MITF를 포함하는 것을 특징으로 하는 저해물질 탐색용 키트.

청구항 14

1) 제 2항의 탐색용 칩에 MITF-특이적 DNA 및 MITF-특이적 DNA와 MITF의 결합을 저해하는 피검 화합물을 첨가하는 단계; 및

2) 단계 1)의 피검 화합물 첨가에 의한 상기 MITF-특이적 DNA와 MITF의 결합저해 정도를 확인하는 단계를 포함하는 MITF와 특이적 DNA의 결합을 저해하는 저해물질 탐색방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 단계 2)의 결합저해 정도를 확인하는 단계는 SPR(surface plasmon resonance), SPRI(surface plasmon resonance imaging) 및 형광 스캐닝(scanning)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 분석방법에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 저해물질 탐색방법.

청구항 16

1) 제 3항의 탐색용 칩에 MITF 및 MITF-특이적 DNA와 MITF의 결합을 저해하는 피검 화합물을 첨가하는 단계; 및

2) 단계 1)의 피검 화합물 첨가에 의한 상기 MITF-특이적 DNA와 MITF의 결합저해 정도를 확인하는 단계를 포함하는 MITF와 특이적 DNA의 결합을 저해하는 저해물질 탐색방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, 단계 2)의 결합저해 정도를 확인하는 단계는 SPR(surface plasmon resonance), SPRI(surface plasmon resonance imaging) 및 형광 스캐닝(scanning)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 분석방법에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 저해물질 탐색방법.

청구항 18

제 14항 또는 제 16항에 있어서, 피검 화합물은 인공 화합물 또는 천연 화합물인 것을 특징으로 하는 저해물질 탐색방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<28> 본 발명은 MITF 저해제 탐색용 칩 및 이를 이용한 MITF 저해제 탐색방법에 관한 것으로, 구체적으로는 색소 침착과 관련 효소의 유전자 프로머터와 MITF 간의 결합을 억제하여 상기 효소의 발현을 억제하는 MITF 저해제 탐색용 생물학적 마이크로 칩 및 이를 이용한 MITF 저해제 탐색방법에 관한 것이다.

<29> MITF(melanocyte-specific microphthalmia-associated transcription factor isoform)는 멜라닌 세포(melanocyte)에서 특이적으로 발현되는 단백질로 멜라닌(melanin) 생성에 중요한 조절인자이다. 멜라닌은 멜라닌 세포의 골지(Golgi)에서 티로시나제(tyrosinase), Tyrp1(tyrosinase related protein 1), Tyrp2(tyrosinase related protein 2), DCT(dopachrom tautomerase), DHICA(dihyduoxyinkole carboxylic acid) 산화효소 등과 같은 효소에 의해 산화되어 검은색을 내는 유멜라닌(eumelanin)과 황색 또는 적색을 내는 페오멜라닌(pheomelanin)을 생성한다(T. Ellenberger *et al. Genes Dev.*, **8**, 970, 1994). 상기 효소들은 특이적으로 멜라닌 세포에서 발현되는데 MITF는 타이로시나제 등 상기 색소형성 효소의 유전자 프로모터에 존재하는 E-box(CATGTG)에 결합하여 E-box에 N-말단 전사 활성 도메인(N-terminal transcription activation domain(TAD)(Sato S *et al., Oncogene* 14:3083-3092, 1997), C-말단 TAD(Takeda K *et al. Hum Mol Genet* 9:125-132, 2000)이 결합하는 것을 촉진함으로써(J. M. Jung *et al., Anal Biochem.*, **330**, 251, 2004) 색소 침

착 효소들의 발현을 유도하여 멜라닌 합성을 야기한다. 따라서 MITF와 E-box 결합은 색소형성에 관여하는 주요 효소의 발현을 조절하는데 중요한 부분이다.

<30> 또한 상기 결합의 저해제로 알려진 MITF-DN, PIAS3(protein inhibitor of activated STAT3)은 관련 효소의 발현을 저해한다고 보고된 바 있어(C. Levy *et al. J. Biol. Chem.*, **277**, 1962, 1992) MITF와 E-box의 특이적 결합 저해제는 피부 색소 침착 병변 치료제 및 기능성 화장품의 미백 물질로 사용 가능할 것이라 여겨지고 있다.

<31> 지금까지 이러한 저해제의 탐색방법으로는 gel mobility-shift analysis(C. Jansen *et al.*, *Biochem. J.* 246: 227-232, 1987; K. Ruscher *et al.*, *J. Biotechnol.* 78: 163-170, 2000), Southwestern blotting(B. Bowen *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 8: 120, 1980; W.K. Miskimins *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82: 6741-6744, 1985), ELISA(Y. Choo *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 21, 1993), reporter constructs in yeast assay(S.D. Hanes *et al.*, *Science* 251: 426-430, 1991)가 수행되었으나 상기 방법들은 방사선 동위 원소의 사용, 제한된 실험 수행의 수와 시간, 복잡한 실험 방법 등의 문제점을 가지고 있었다.

<32> 이에 본 발명자들은 본 발명의 MITF(microphthalmia-associated transcription factor) 저해제 탐색용 단백질 기초 마이크로 칩 및 이를 이용한 MITF 저해제 탐색방법은 말토오즈 결합 단백질(maltose binding protein)과 결합하는 β-CD를 칩 표면에 도입하여 MBP 표지된 단백질만을 특이적으로 결합시키도록 함으로써 기존 DNA 기초 마이크로 칩에서 특이적 결합을 위해 요구되는 바이오틴(biotin), 알데하이드(aldehyde), 아민(amine) 표지(Jane Linnell *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 32(4) e44, 2004)와 고순도의 단백질 분리, 정제과정을 생략할 수 있다. 또한 HTS(high throughput screening) 시스템을 적용하여 동시 다발적 실험 수행, 적은 농도 및 작은 분자량의 물질 탐색이 가능하여 미백 관련 표적 단백질인 MITF 저해제를 탐색할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<33> 본 발명의 목적은 MITF(microphthalmia-associated transcription factor)와 MITF-특이적 DNA를 결합을 저해하는 저해물질 탐색용 칩, 저해물질 탐색용 키트 및 저해물질 탐색방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<34> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 MITF와 MITF-특이적 DNA의 결합을 저해하는 저해물질 탐색용 칩을 제공한다.

<35> 또한, 본 발명은 MITF와 MITF-특이적 DNA의 결합을 저해하는 저해물질 탐색용 키트를 제공한다.

<36> 아울러 본 발명은 MITF와 MITF-특이적 DNA의 결합을 저해하는 저해물질 탐색방법을 제공한다.

<37> 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

<38> 본 발명자들은 MIFT와 MITF-특이적 DNA와의 결합을 저해하는 저해자를 탐색하기 위하여 탐색용 마이크로 칩을 제작하였다. 우선 금 기판 위에 MUA, 폴리 L-라이신, PDITC가 순차적으로 결합되어 있으면서, MITF-특이적 DNA와 결합되어 있는 DNA 기초 마이크로 칩을 제조하였으며(도 1 참조), MITF와의 결합이 정상적으로 수행됨을 확인하였다(도 4 참조). 상기 칩는 MITF-특이적 DNA를 고정하여 MITF 및 그의 결합을 저해한다고 추정되는 피검 화합물을 처리하여 MITF와 특이적 DNA와의 결합 저해 여부를 SPRI 방법으로 신속하게 검출할 수 있다. 아울러 본 발명자들은 금 기판에 MUOH, 에피클로로하이드린(epichlorohydrin), 베타 사이클로덱스트린(β-cyclodextrin)이 순차적으로 결합시킨 후 MBP-MITF 융합 단백질을 점적하고, MITF-특이적 DNA를 처리하여 결합 정도를 SPRI 방법으로 확인하였다. 그 결과, 버퍼만을 처리했을 경우와 DNA를 처리했을 경우를 비교했을 확연한 SPRI 결과의 차이를 관찰할 수 있었으며, 아울러 농도의존적으로 그 결합이 증가함을 확인하였다(도 5 참조). 이후 본 발명자들은 DNA를 기초로 한 마이크로 칩에 MITF를 함께 처리하면서 국산 약제인 독활(Araliae Cordatae Radix), 중국산 약제인 영실(Rosae Fructus) 및 중국산 약제 왕불유행(Melandrii Herba)를 함께 농도별로 처리하였고 그중 MITF와 그의 특이적인 DNA의 결합을 저해하는 물질을 탐색하는데 이용하였다(도 8 참조).

<39> 본 발명은 MITF와 MITF-특이적 DNA의 결합을 저해하는 저해물질 탐색용 칩을 제공한다.

<40> 상기 탐색용 칩은 MUOH(11-mercaptoundecanol), 에피클로로하이드린(epichlorohydrin) 및 베타 사이클로덱스트린(β-cyclodextrin)이 수차적으로 결합된 기판 및 상기 베타 사이클로덱스트린에 결합하는 MBP(maltose

binding protein)-MITF 융합 단백질로 구성되는 것을 특징으로 한다.

<41> 또한, 상기 탐색용 칩은 MUA(11-mercaptoundcanoic acid), 폴리 L-라이신(poly L-lysine) 및 PDITC(1,4-phenylenediisothiocyanate)가 순차적으로 결합된 기판 및 상기 PDITC와 결합하는 MITF-특이적 DNA로 구성되는 것을 특징으로 한다. 상기 DNA는 E-box인 것을 특징으로 하며, 상기 서열은 서열번호 5인 것이 바람직하다.

<42> 또한, 상기 탐색용 칩의 기판은 금(gold)인 것이 바람직하다.

<43> 또한, 본 발명은 MITF와 MITF-특이적 DNA의 결합을 저해하는 저해물질 탐색용 키트를 제공한다.

<44> 본 발명의 저해물질 탐색용 키트는 상기 MUOH(11-mercaptoundecanol), 에피클로로하이드린(epichlorohydrin) 및 베타 사이클로덱스트린(β-cyclodextrin)이 수차적으로 결합된 기판 및 상기 베타 사이클로덱스트린에 결합하는 MBP(maltose binding protein)-MITF 융합 단백질로 구성된 탐색용 칩 및 MITF-특이적 DNA를 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 특이적 DNA는 E-box인 것을 특징으로 하며, 상기 서열은 서열번호 5인 것이 바람직하다.

<45> 또한, 본 발명의 저해물질 탐색용 키트는 상기 탐색용 칩은 MUA(11-mercaptoundcanoic acid), 폴리 L-라이신(poly L-lysine) 및 PDITC(1,4-phenylenediisothiocyanate)가 순차적으로 결합된 기판 및 상기 PDITC와 결합하는 MITF-특이적 DNA로 구성된 탐색용 칩 및 MITF 단백질을 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 DNA는 E-box인 것을 특징으로 하며, 상기 서열은 서열번호 5인 것이 바람직하다.

<46> 아울러 본 발명은 MITF와 MITF-특이적 DNA의 결합을 저해하는 저해물질 탐색방법을 제공한다.

<47> 본 발명은 하기의 단계로 구성된 방법을 제공한다: 1) MUOH(11-mercaptoundecanol), 에피클로로하이드린(epichlorohydrin) 및 베타 사이클로덱스트린(β-cyclodextrin)이 수차적으로 결합된 기판 및 상기 베타 사이클로덱스트린에 결합하는 MBP(maltose binding protein)-MITF 융합 단백질로 구성된 탐색용 칩에 MITF-특이적 DNA 및 MITF-특이적 DNA와 MITF의 결합을 저해하는 피검 화합물을 첨가하는 단계; 및 2) 단계 1)의 피검 화합물 첨가에 의한 상기 MITF-특이적 DNA와 MITF의 결합저해 정도를 확인하는 단계.

<48> 또한, 본 발명은 하기의 단계를 구성된 방법을 제공한다: 1) MUA(11-mercaptoundcanoic acid), 폴리 L-라이신(poly L-lysine) 및 PDITC(1,4-phenylenediisothiocyanate)가 순차적으로 결합된 기판 및 상기 PDITC와 결합하는 MITF-특이적 DNA로 구성된 탐색용 칩에 MITF 및 MITF-특이적 DNA와 MITF의 결합을 저해하는 피검 화합물을 첨가하는 단계; 및 2) 단계 1)의 피검 화합물 첨가에 의한 상기 MITF-특이적 DNA와 MITF의 결합저해 정도를 확인하는 단계.

<49> 상기 방법들에 있어서, 단계 2)의 결합저해 정도를 확인하는 단계는 SPR(surface plasmon resonance), SPRI(surface plasmon resonance imaging) 및 형광 스캐닝(scanning)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 분석방법을 이용하는 것이 바람직하다.

<50> 상기 방법들에 있어서, 피검 화합물은 인공 화합물 또는 천연 화합물인 것이 바람직하다.

<51>

<52> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<53> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<54> **실시예 1> MBPek-MITF 발현벡터 제작**

<55> **<1-1> 시약**

<56> 3-글리시독실-트리메톡시실란(3-Glycidoxyl-trimethoxysilane), 11-머캅토-1-운데카놀(11-mercapto-1-undecanol), 2-(2-아미노에폭시)-에탄올(2-(2-aminoethoxy)-ethanol), 베타-사이클로덱스트린(beta-cyclodextrin), 에피클로로히드린(epichlorohydrin), 테트라틸렌 글리콜(tetrathylene glycol), 덱스트란(dextran)은 Sigma 사에서 구입하였으며 소 혈청 알부민(bovine serum albumine)은 Qbiogene 사에서 구입하였다. 미세정렬기(microarrayer)는 프로테오진(CM-100, proteogene)을 사용하였으며 스캐너는 Genfix 4.1 프로그램을 이용하여 확인하였다. SPR은 Autolab 사의 제품을 이용하였으며 SPRI는 한국생명공학연구원 바이오 나노 센터에서 사용하였다.

<57> **<1-2> MBPek-MITF 발현벡터 제작**

<58> pMAL-c2X 벡터는 New England Biolabs 사에서 구입하였으며 글루타치온-S-트랜스퍼라제(Glutathione-S-transferase, GST)-MITF 벡터는 헤브루 대학 하다싸 메디컬 스쿨 생화학부(department of biochemistry,hebrew university-hadassah,medical school)의 Ehud Razin 박사로부터 수득하였다. 본 실험에서는 상기 pMAL-c2X 벡터를 주형으로 서열번호 1(5' - caa aaa cat atg aaa atc gaa ggt aaa ctg gta - 3') 및 서열번호 2(5' - gtg cac gaa ttc agt ctg cgc gtc ttt cag ggc tt-3')로 기재되는 프라이머를 사용하여 하기의 반응조건으로 PCR을 실시하였다. PCR 반응조건은, 표 1과 같이 DNA 중합효소(Unipfu, Takara 사)를 사용하여 상기에 기재된 프라미어 쌍과 주형을 94℃에서 5분 동안 변성시키고, 94℃에서 1분, 55℃에서 1분 및 72℃에서 1분간 30회 반응시키고, 72℃에서 10분간 연장(extension)시켜 반응을 종결하여 MBPek(enterokinase cleavage site)를 수득하였다. MITF도 마찬가지로, 상기 GST-MITF 벡터로부터 MBP와 같은 조건으로 PCR을 실시하여 수득하였다. pET 벡터(Novagen)의 *Eco*R Ⅰ, *Sal* Ⅰ 부위에 MBPek와 MITF를 삽입하여 pETMBPek-MITF 발현 벡터를 제작하였다(도 3의 A 및 B).

표 1

● PCR composition

조 성	Volume (ul)
Primer F-100pM	1
Primer R-100pM	1
dNTP mixture	3
Unipfu	2
Template	2
10X Buffer	10
DW	81
Total	100ul

● PCR condition

Step.	Temp.	Time (min)
Denaturation	95	1
Annealing	58	1
Extension	72	1

<59>

<60> **<실시예 2> MBP-MITF 재조합 융합 단백질 발현 및 분리**

<61> **<2-1> 발현**

<62> pETMBPek-MITF 벡터는 *Escherichia coli* BL21(DE3)에 형질도입하였다. 흡광도 600nm에서 O.D.가 0.6일 때 최종농도 1 mM로 IPTG(isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 처리하여 단백질 발현을 유도하였다. 세포 배양액을 수거하여 6000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 수집하고 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0의 완충액을 이용하여 세포를 현탁하여 부유시킨 후 초음파를 이용하여 5초 간격으로 5분간 세포 파쇄를 수행하였다. 파쇄된 세포는 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7.9의 완충용액을 이용하여 수용성 분획을 수집하고 SDS-PAGE로 확인하였다(도 3의 C).

<63>

<64> **<2-2> 분리**

<65> **실시예 <2-1>**에서 수득한 수용성 분획은 MBP(maltose binding protein) 엑셀로오즈(excellose; Bioprogen)를 충진제로 하여 1.1 cm × 30 cm(Millipore) 컬럼을 이용하였으며 완충액은 20 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4로 하고 이에 10 mM 말토오즈를 포함한 것을 용출 완충액으로 이용하여 4 mL/min의 용출속도로 하여 분리하였다. 분리된 단백질은 SDS-PAGE를 이용하여 확인하였다(도 3의 C).

<66> **<실시예 3> 이중가닥 DNA(E-box)의 제조**

<67> 이중가닥 올리고뉴클레오타이드(olgonucleotide)는 bHLH-LZ(basic helix-loop-helix-Leucine zipper)

서열 중 CATGTG 부분(서열번호 3)을 이용하였으며 Cy3로 표지하였다. 저해제로는 CATGTG 부분을 변형시킨 CTTGAG(서열번호 4, Bioneer 사 제작)를 사용하였다. Cy3의 표지는 Bioneer 사에서 수행하였다(J. M. Jung et al., *Anal Biochem.*, **330**, 251, 2004; M. L. Bulyk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 7158, 2001)

<68> **<실시예 4> 유리 및 골드 기판의 수식화(modification)**

<69> **<4-1> 단백질 기초 마이크로 칩 제작**

<70> 단백질 기초 마이크로 칩 제작을 위하여 골드 기판위에 **<실시예 2>**에서 발현 정제한 MBP-MITF 융합 단백질을 고정화하기 위하여 기판 수식화(modification)를 하였다. 먼저 골드표면에 피라나 용액(piranha solution)에 담근 후 60℃에서 15분간 실란화(silanization)를 수행하였고(baylor college of medicine microarray core facility-silanization protocal), 에탄올 및 물로 10회씩 세척하였다. 실란화된 골드 기판은 1 mM 에탄올릭 MUA 용액(ethanolic 11-mercaptoundecanoic acid solution)에 18시간 동안 담구었다가 에탄올 및 물로 10회씩 세척하였다. 이후 N_2 가스로 건조하였다. 5mM 에피클로로하이드린은(Epichlorohydrin) 10분동안 담구었다. 이후 버퍼(5 mM boric acid 및 0.1 M NaOH로 pH 8.5로 적정) 1 ml당 0.2 mg β-CD(β-cyclodextrin)가 포함된 액체 용액(aqueous solution; 1 mM per lysine residue)에 담구었다. 이후 N_2 가스로 건조하고 물로 헹구어 주었다(도 2). 골드 기판의 제조는 참고문헌의 방법을 이용하여 제조하였다(J. M. Jung *et al., Anal Biochem.*, **330**, 251, 2004; H. Baek et al., Biotechnol. Biopro. Eng. 9(2): 143-146, 2004).

<71> **<4-2> DNA 기초 마이크로 칩 제작**

<72> DNA 기초 마이크로 칩 제작을 위하여 골드 기판위에 **<실시예 3>**에서 제조한 이중가닥 DNA를 고정화하기 위하여 기판 수식화(modification)를 하였다. 먼저 골드 기판을 피라나 용액(piranha solution)에 담근 후 60℃에서 15분간 실란화(silanization)를 수행하였고(baylor college of medicine microarray core facility-silanization protocal), 에탄올 및 물로 세척을 10회 세척하였다. 실란화된 골드 기판은 1 mM 에탄올릭 MUA 용액(ethanolic 11-mercaptoundecanoic acid solution)에 18시간 동안 담구었다가 물 및 에탄올로 10회 세척하였다. 이후 N_2 가스로 건조하였다. 이후 버퍼(5 mM boric acid 및 0.1 M NaOH로 pH 8.5로 적정) 1 ml당 0.2 mg poly L-라이신(lysine)이 포함된 액체 용액(aqueous solution; 1 mM per lysine residue)에 담구었다. 이후 N_2 가스로 건조하고 물로 헹구어 주었다. 이후 0.2%(w/v) PDITC(1,4-phenylenediiosithiocyanate)가 포함된 용액(10% pyridine, 90% dimethylformamide)에 실온에서 2시간 동안 골드 기판을 담구고 N_2 가스로 건조하였다. 이후 5' a-amine-terminated oligonucleotide(0.5 M NaCl을 포함하는 0.1 M sodium bicarbonateted buffer, pH 9.0에 실시예 3에서 제조된 이중가닥 DNA를 1 mM이 되도록 첨가)와 골드 기판을 37℃에서 2시간 동안 반응시켰다 단백질기기명은 마이크로어레이어고 단백질은 사용 한양은 10㎕그램이다. 2시간 후에 커플 반응(couple reaction)을 중단시키기 위하여, 1% NH_4OH의 용액에 실온에서 2분 동안 담구었다. 이후 물로 5분간 행구고 5회 이상 반복적으로 행구어 주었다. 이후 N_2 가스로 건조하였다(도 1). 골드 기판의 제조는 참고문헌의 방법을 이용하여 제조하였다(J. M. Jung *et al., Anal Biochem.*, **330**, 251, 2004; H. Baek et al., Biotechnol. Biopro. Eng. 9(2): 143-146, 2004).

<73> **<실시예 5> 형광 방법을 이용한 미세정렬(microarray) 및 데이터 분석**

<74> **<5-1> 단백질 기초 마이크로 칩의 데이터 분석**

<75> **<실시예 2>**에서 수득한 MBP-MITF 융합 단백질과 완충액(50 mM Tris, 20%(v/v) 글리세롤 혹은 에틸렌 글리세롤(ethylene glycerol, pH 8.0)을 혼합한 후 스틸스 핀(Stealth pin, Model SMP-10, TeleChem)이 장착된 미세정렬기(Proteogen)를 이용하여 **<실시예 4-1>**에서 제작한 기판에 지름 100㎛으로 점적하였다(S. H. Baek et al., Biotechnol. Biopro. Eng. 9(2): 143-146, 2004). 농도는 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 및 1 mg/mL로 점적하였으며 마지막으로 1 IgG mg/mL를 점적하였다. 이 때의 습도는 70~80%이며 상온에서 수행되었으며 약 30분간 MBP-MITF를 결합반응시킨 후 세척 완충액(20 mM Tris-buffer, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7.4)과 증류수로 세척하였다.

<76> 미세정렬 후 기판 상에 결합된 MBP-MITF에 CoverWell Perfusion Chamber(Sigma)를 이용하여 **<실시예 3>**에서 제조한 Cy3 표지 이중가닥 DNA(E-box)와의 결합 반응을 유도하였다. 이를 위하여 상기 coverwell perfusion chamber에 6 mM HEPES, pH 7.8, 40 mM KCl, 0.5 mM EGTG, 6% 글리세롤, 0.25 mg/mL poly-dI-dC, 2% 밀크(milk)와 1 pmol의 Cy3 표지 이중가닥 DNA(E-box)를 혼합하여 처리하였다. 결합시간은 1시간으로 4℃에서

수행하였으며 결합 후 PBS와 PBST(1% Tween-20), PBS/Triton X-100을 이용하여 2번씩 세척하였다.

<77> 건조된 칩을 형광 스캐너 Genfix4.1 프로그램을 이용하여 점적된 MBP-MITF에 결합된 형광 이중가닥 DNA(E-box)의 모양과 강도를 확인하였다. 그 결과, MBP-MITF 농도 의존적으로 이중가닥 DNA(E-box)와 결합함을 확인하였다(도 5).

<78>

<79> **<5-2> DNA 기초 마이크로 칩의 데이터 분석**

<80> **<실시예 2>**에서 수득한 MITF 융합 단백질을 enterokinase로 절단하여 MITF 단백질을 수득하였으며, 완충액(50 mM Tris, 20%(v/v) 글리세롤 혹은 에틸렌 글리세롤(ethylene glycerol, pH 8.0)을 혼합한 후 스틸스핀(Stealth pin, Model SMP-10, TeleChem)이 장착된 미세정렬기(Proteogen)를 이용하여 **<실시예 4-1>**에서 제작한 기판에 지름 100㎛으로 점적하였다(S. H. Baek et al., Biotechnol. Biopro. Eng. 9(2): 143-146, 2004). 농도는 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 및 1 mg/mL로 점적하였으며 마지막으로 1mg/ml IGg 를 점적하였다. 이 때의 습도는 70~80%이며 상온에서 수행되었으며 약 30분간 MBP-MITF를 결합반응시킨 후 세척완충액(20 mM Tris-buffer, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7.4)과 증류수로 세척하였다.

<81> 미세정렬 후 기판 상에 결합된 MBP-MITF에 CoverWell Perfusion Chamber(Sigma)를 이용하여 **<실시예 3>**에서 제조한 Cy3 표지 이중가닥 DNA(E-box)와의 결합 반응을 유도하였다. 이를 위하여 상기 coverwell perfusion chamber에 6 mM HEPES, pH 7.8, 40 mM KCl, 0.5 mM EGTG, 6% 글리세롤, 0.25 mg/mL poly-dI-dC, 2% 밀크(milk)와 1 pmol의 Cy3 표지 이중가닥 DNA(E-box)를 혼합하여 처리하였다.

<82> 건조된 칩을 형광 스캐너 Genfix4.1 프로그램을 이용하여 점적된 MBP-MITF에 결합된 형광 이중가닥 DNA(E-box)의 모양과 강도를 확인하였다. 그 결과, MBP-MITF 농도 의존적으로 이중가닥 DNA(E-box)와 결합함을 확인하였다(도 4).

<83>

<84> **<실시예 6> 표면 플라즈몬 공명(Surface plasmon resonance, SPR) 데이터 분석**

<85> **<6-1> 단백질 기초 마이크로 칩 분석**

<86> SPRI(K-MAC, Manual Type, Korean) 기기에 상기 제조된 골드 기판을 올린 프리즘을 장치하고, 10분 동안 1M NaOH를 흘려주어 안정화시킨 후 완충액(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% Tween-20)을 흘려주어 세척하였다(S. H. Baek et al., Biotechnol. Biopro. Eng. 9(2): 143-146, 2004). 그 결과, 형광방법을 이용한 실험결과와 상응하게 SPRI 시스템에서도 MBP-MITF가 이중가닥 DNA(E-box)와 특이적으로 결합함을 확인하였다(도 7).

<87> 본 SPRI 시스템은 형광방법과는 달리 시료를 Cy3로 표지할 필요가 없고 단백질과 DNA 결합을 실시간으로 분석이 가능하나 동시다발적인 시료 분석이 불가능하다는 단점이 있다.

<88> **<6-2> DNA 기초 마이크로 칩 분석**

<89> SPRI(K-MAC, Manual Type, Korean) 기기에 상기 제조된 골드 기판을 올린 프리즘을 장치하고, (S. H. Baek et al., Biotechnol. Biopro. Eng. 9(2): 143-146, 2004). 각각 MBP-MITF 0.3mg/ml와 IgG 1mg/ml를 1시간 동안 흘려준 후 완충액(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% Tween-20)을 흘려주어 세척하였다. 1 pmol의 이중가닥 DNA(E-box)를 단백질-DNA 결합 완충용액(6 mM HEPES, pH 7.8, 40 mM KCl, 0.5 mM EGTG, 6% glycerol, 0.25 mg/mL poly-dI-dC, 2% milk)과 혼합하여 1 시간 동안 흘려준 후 완충액(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% Tween-20)을 흘려주어 세척하여 확인하였다. 그 결과, 형광방법을 이용한 실험 결과와 상응하게 SPRI 시스템에서도 MBP-MITF가 이중가닥 DNA(E-box)와 특이적으로 결합함을 확인하였다(도 4).

<90> 본 SPRI 시스템은 형광방법과는 달리 시료를 Cy3로 표지할 필요가 없고 단백질과 DNA 결합을 실시간으로 분석이 가능하나 동시다발적인 시료 분석이 불가능하다는 단점이 있다.

<91> **<실시예 7> 표면 플라즈몬 공명 이미지(Surface plasmon resonance image, SPRi) 데이터 분석**

<92> **<7-1> 단백질 기초 마이크로 칩 분석**

<93> 150-W 석영 텅스텐-할로겐 램프(quartz tungsten-halogen lamp, Schott, Germany), 협대역 간섭 필터(narrow interference filter, 647.1 nm, $\Delta\lambda$=1 nm; Oriel Instruments)가 장착된 SPRI 시스템 내의 프리즘 위에 실험이 완성된 골드 기판을 놓은 후, 1/2 인치 전하 결합 소자(Charge Coupled Device, CCD) 카메라

(Sony, Japan)에 의해 반사된 이미지를 확인하였다. 측정 시료 수와 저해제 탐색 방법이 제한적인 SPR의 단점을 보완하고자 SPR에서의 결합을 이미지로 얻을 수 있는 SPRI 방법을 이용하여 확인한 결과, MBP-MITF와 이중가닥 DNA(E-box)가 결합함을 확인하였다. 6 줄 5개씩 점적을 하였으며 농도를 형광 방법과 동일하게 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3 mg/mL로 하여 실험하였다. MBP-MITF의 결합 여부는 0.3mg/ml 이상의 농도에서만 측정이 가능하였고 IgG는 결합하지 못하는 것을 확인하였다. 또한 DNA 크기가 단백질에 비해 매우 작아 결합 여부를 확인하기 불가능하여 DNA를 Cy3로 표지하여 탐지 강도를 높임으로써 농도 의존적인 이중가닥 DNA의 결합을 확인하였다(도 5). 이와 같이 SPRI 시스템은 미세정렬 방법을 이용하여 동시다발적인 시료 분석이 가능하지만 탐지 강도가 낮은 단점이 있었다.

<94> **<7-2> DNA 기초 마이크로 칩 분석**

<95> 150-W 석영 텅스텐-할로겐 램프(quartz tungsten-halogen lamp, Schott, Germany), 협대역 간섭 필터(narrow interference filter, 647.1 nm, Δλ=1 nm; Oriel Instruments)가 장착된 SPRI 시스템 내의 프리즘 위에 실험이 완성된 골드 기판을 놓은 후, 1/2 인치 전하 결합 소자(Charge Coupled Device, CCD) 카메라(Sony, Japan)에 의해 반사된 이미지를 확인하였다. 측정 시료 수와 저해제 탐색 방법이 제한적인 SPR의 단점을 보완하고자 SPR에서의 결합을 이미지로 얻을 수 있는 SPRI 방법을 이용하여 확인한 결과, MBP-MITF와 이중가닥 DNA(E-box)가 결합함을 확인하였다. 6 줄 5개씩 점적을 하였으며 농도를 형광 방법과 동일하게 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3 mg/mL로 하여 실험하였다. 6번 줄에 1 mg/ml IgG 을 처리 하여 결합여부를 확인한 결과, MBP-MITF의 결합 여부는 0.3mg/ml 이상의 농도에서만 측정이 가능하였고 IgG는 결합하지 못하는 것을 확인하였다. 또한 DNA 크기가 단백질에 비해 매우 작아 결합 여부를 확인하기 불가능하여 DNA를 Cy3로 표지하여 탐지 강도를 높임으로써 농도 의존적인 이중가닥 DNA의 결합을 확인하였다(도 5). 이와 같이 SPRI 시스템은 미세정렬 방법을 이용하여 동시다발적인 시료 분석이 가능하지만 탐지 강도가 낮은 단점이 있었다.

발명의 효과

<96> 상기와 살펴본 바와 같이, MITF 저해제 탐색용 단백질 기초 마이크로 칩은 기존의 골드기판이 아닌 유리 기판을 이용하여 결제적으로 보급할 수 있으며, 국내에서 주로 개발되는 DNA 기초 마이크로 칩이 아닌 단백질 기초 마이크로 칩으로서 EMSA(eletrophoretic mobility shift assay) 분석에도 이용할 수 있다. 또한 베타 사이클로덱스트란(beta-cycloderxtran)이 MBP(maltose binding protein)의 융합된 단백질과 특이적으로 결합함으로 항체 사용시와 같은 고순도 단백질 정제가 필요치 않고 유리 기판에서 도시 다발적인 실험을 수행할 수 있으면 적은 농도의 저해제 뿐 아니라. 적은 분자량의 저해제 역시 형광법으로 민감하게 측정하여 스크리닝할 수 있는 장점이 있으므로 MITF 단백질과 이와 결합하는 DNA 사이의 결합을 저해하는 저해제를 탐색 및 발굴하여 화장품 신소재 및 피부질환 치료제를 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> **도 1**은 금 표면에 MUA를 붙인 것에, Poly L-lysine을 붙인 것으로써, PDITC(1,4-phenylenediisothiocyanate)를 붙인 것으로써, amine modified DNA를 이중가닥으로 해서 MBP-MITF를 측정한 것이다.

<2> **도 2**은 에폭시(epoxy) 코팅된 유리 슬라이드에 β-CD(β-cyclodextran), MBP(maltose binding protein)-MITF(microphthalmia-associated transcription factor) 융합 단백질, 이중가닥 DNA(E-box)가 차례로 결합하는 단백질 기초 마이크로 칩의 원리를 나타낸 개략도이다.

<3> **도 3**의 **A**는 단백질 기초 마이크로 칩의 β-CD에 MBP-MITF 융합 단백질을 결합시키기 위하여 제조한 pETMBPek-MITF 발현벡터의 벡터맵이다.

<4> **도 3**의 **B**는 상기 벡터를 PCR하여 MITF 유전자 삽입 여부를 확인하고 그 결과를 나타낸 젤(gel) 사진이다.

<5> 1: 100bp 래더(ladder);

<6> 2: 6HUb(*Nde I*/blunt);

<7> 3: MITF(blunt/*Sal I*);

<8> 4: 3과 동일;

<9> 5: MITF(*EcoR I*/ *Sal I*); 및

<10> 6. 5와 동일.

<11> **도 3**의 **C**는 MBP-MITF 융합 단백질의 친화 컬럼 크로마토그래피(affinity column chromatography) 산물로 SDS-PAGE를 실시한 그림이다.

<12> M: 단백질 마커;

<13> 레인(lane) 1: 전체 분획(total fraction);

<14> 레인 2: 불용성(insoluble);

<15> 레인 3: 수용성(soluble);

<16> 레인 4: 로딩 샘플(loading sample);

<17> 레인 5: 세척 분획(washing fraction);

<18> 레인 6-7: 용리 분획(elution fraction); 및

<19> 레인 8: 한외여과(ultrafiltration) 후의 MBP-MITF.

<20> **도 4**의 **A**는 형광 표지된 MBP-MITF 융합 단백질이 PDITC에 결합하는 반면 대조구인 버퍼(buffer)는 결합하지 않음을 나타낸 SPRI(Surface Plasmon Resonance Imaging) 사진이다.

<21> **도 4**의 **B**는 SPRI(surface plasmon resonance imaging) 시스템을 이용하여 β-CD와 MBP-MITF는 결합하고 버퍼(buffer)는 결합하지 않음을 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

<22> **도 5는** MBP-MITF 융합 단백질의 농도가 높을수록 MBP-MITF 융합 단백질이 β-CD에 더 많이 결합함을 나타낸 SPRI(surface plasmon resonance imaging) 사진(왼쪽)과 SPRI 분석 그래프(오른쪽)이다.

<23> **도 6**은 단백질 기초 마이크로 칩의 MBP-MITF 융합 단백질에 형광 표지된 이중가닥 DNA(E-box), 형광 표지된 돌연변이 이중가닥 DNA, 저해제 + 형광 표지된 이중가닥 DNA(E-box)를 첨가한 후 MBP-MITF와 이중가닥 DNA(E-box)의 결합정도를 나타낸 형광 스캐닝 사진이다.

<24> **도 7**의 **A**는 각각 다른 농도로 MBP-MITF 융합 단백질이 결합된 단백질 기초 마이크로 칩에 형광 표지된 이중가닥 DNA(E-box)를 첨가한 후, MBP-MITF와 이중가닥 DNA(E-box)의 결합정도를 나타낸 형광 스캐닝 사진이다.

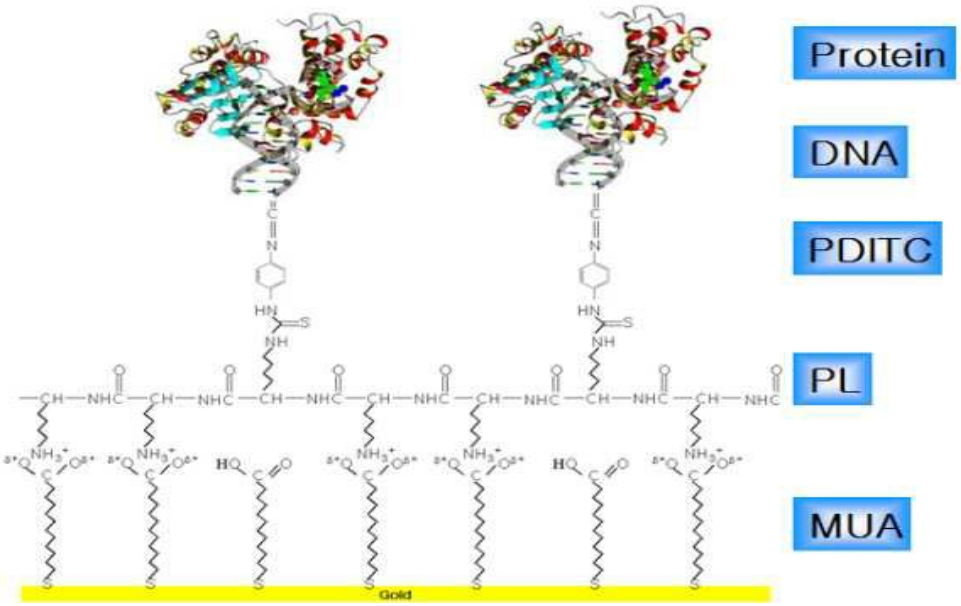
<25> **도 7**의 **B**는 각각 다른 농도로 MBP-MITF 융합 단백질이 결합된 단백질 기초 마이크로 칩에 형광 표지된 이중가닥 DNA(E-box)와 형광 표지되지 않은 저해제를 첨가한 후, MBP-MITF와 이중가닥 DNA(E-box)의 결합정도를 나타낸 형광 스캐닝 사진이다.

<26> **도 8**의 각각의 색소 색소침착은 MITF와 같은 국산 중국산 약제를 모아 놓은 것으로써, 국산 약제인 독활(Araliae Cordatae Radix)과 중국산인 약제인 영실(Rosae Fructus)과 중국산 약제인 왕불유행(Melandrii Herba)이 있다.

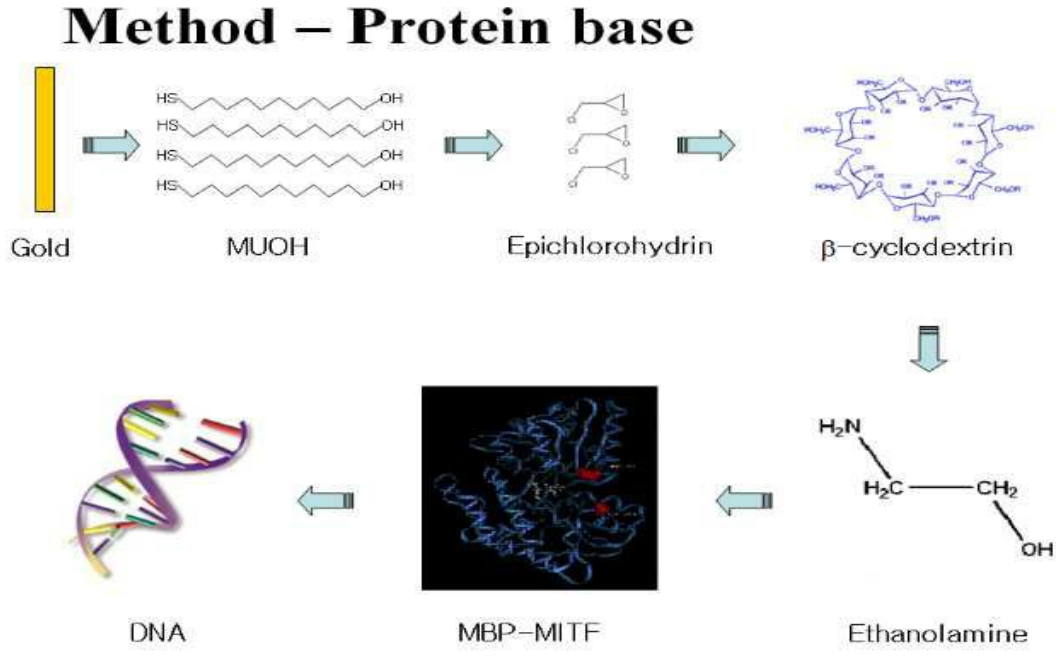
<27>

도면

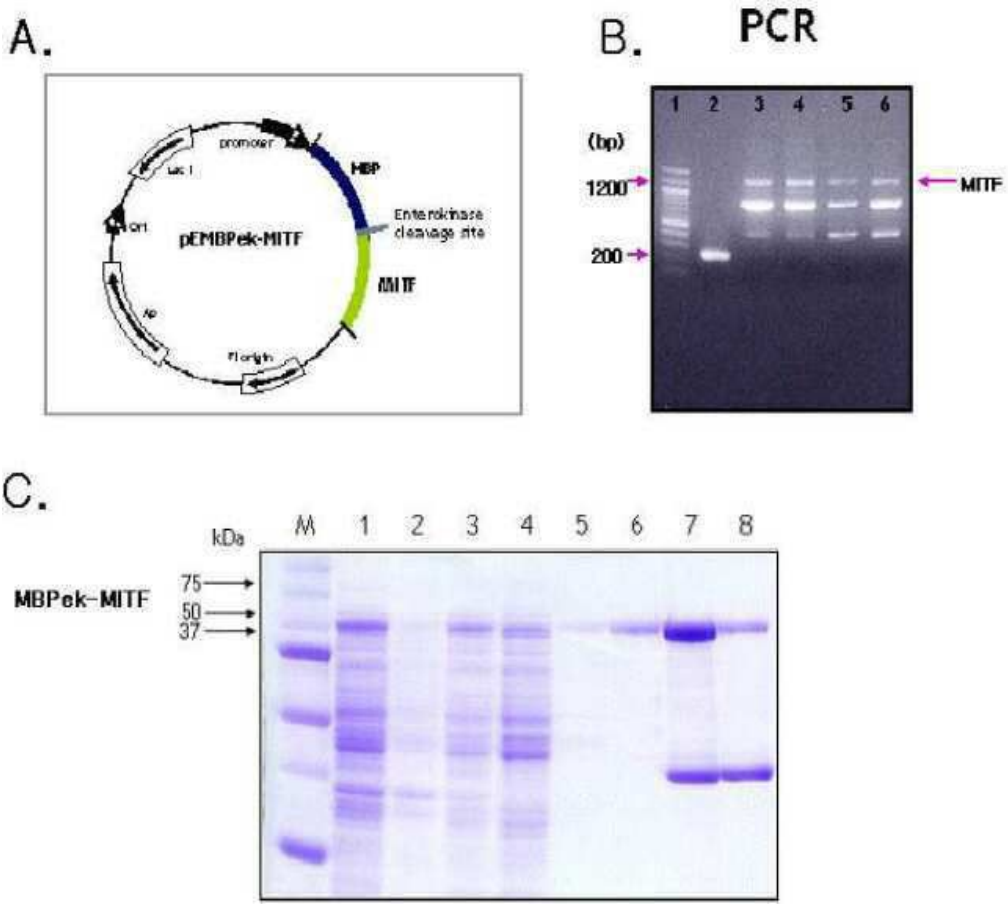
도면1


Schematic diagram
Protein
DNA
PDITC
PL
MUA
Gold

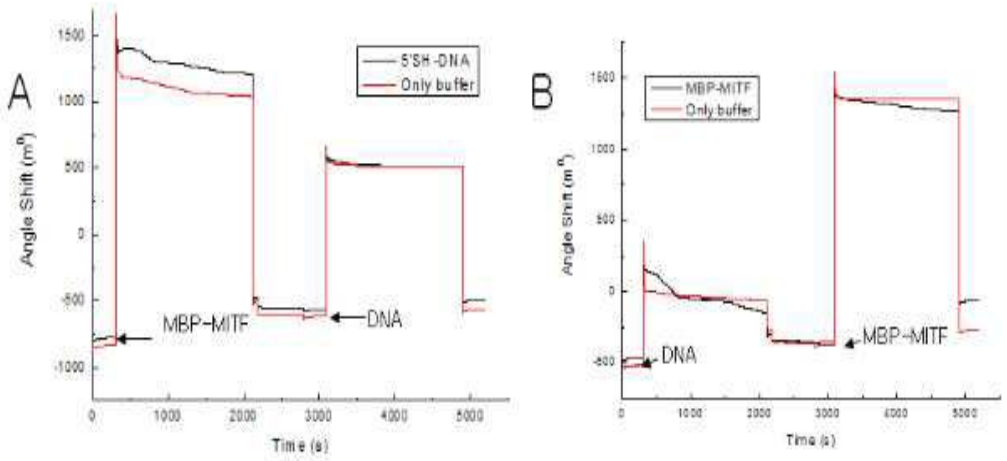
도면2


Method – Protein base
Gold
MUOH
Epichlorohydrin
β-cyclodextrin
DNA
MBP-MITF
Ethanolamine

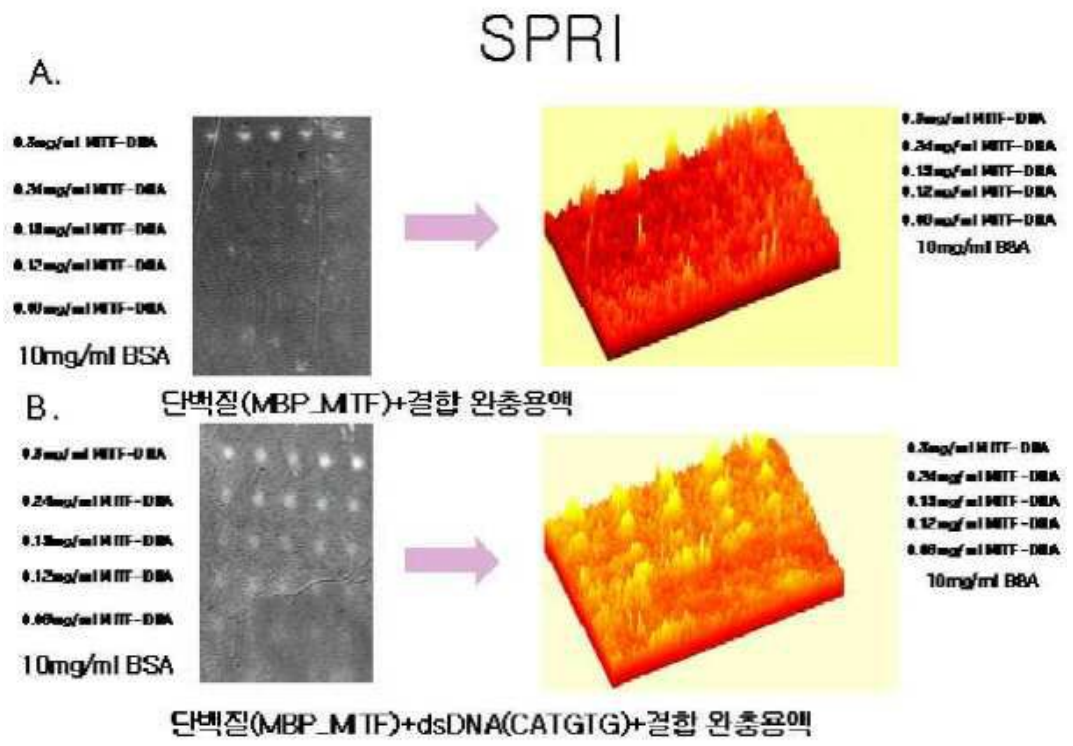
도면3


A.
promoter
MBP
Enterokinase cleavage site
MITF
pEMBPek-MITF
B.
PCR
1 2 3 4 5 6
(bp)
1200
200
MITF
C.
kDa
M 1 2 3 4 5 6 7 8
MBPek-MITF
75
50
37

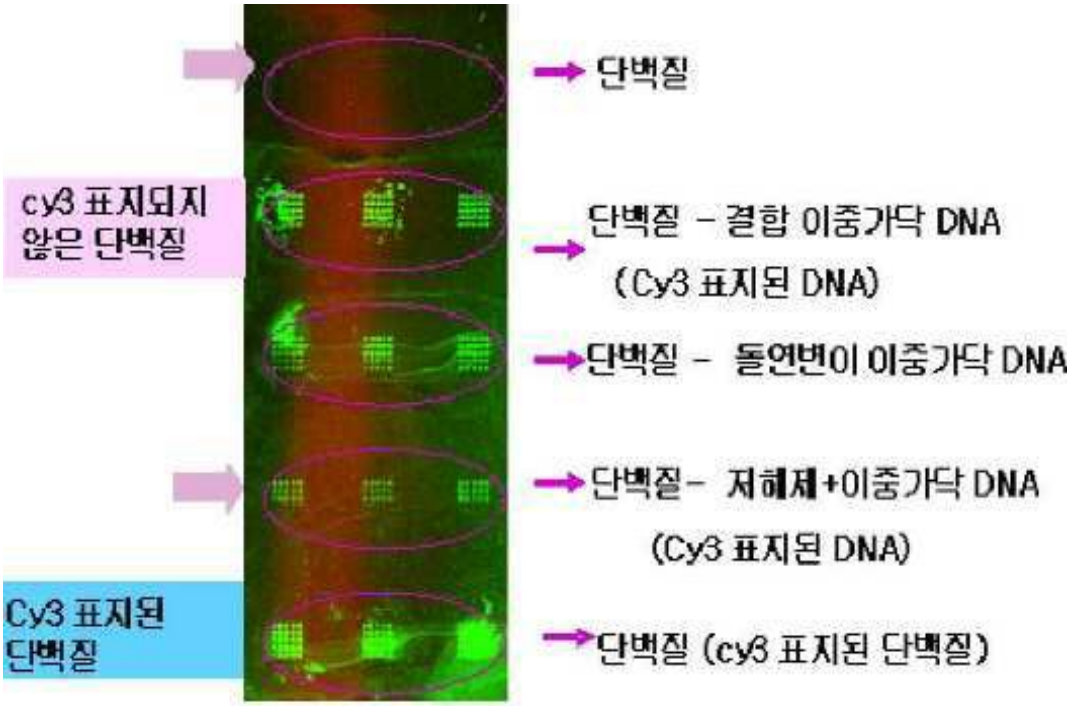
도면4


A
5'SH-DNA
Only buffer
Angle Shift (m°)
MBP-MITF
DNA
Time (s)
B
MBP-MITF
Only buffer
Angle Shift (m°)
DNA
MBP-MITF
Time (s)

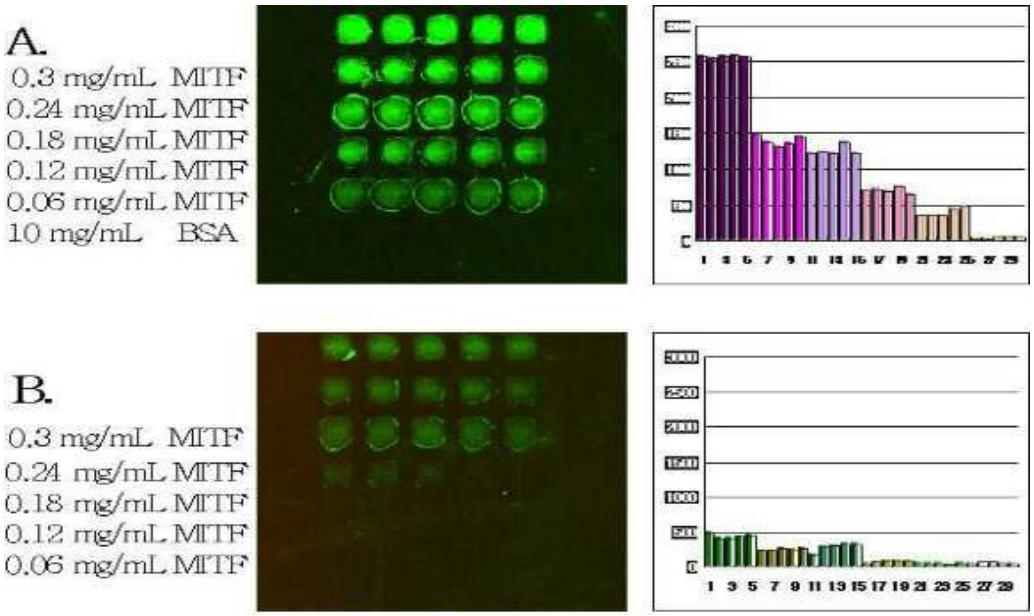
도면5


SPRI
A.
10mg/ml BSA
10mg/ml BSA
B.
단백질(MBP_MITF)+결합 완충용액
10mg/ml BSA
10mg/ml BSA
단백질(MBP_MITF)+dsDNA(CATGTG)+결합 완충용액

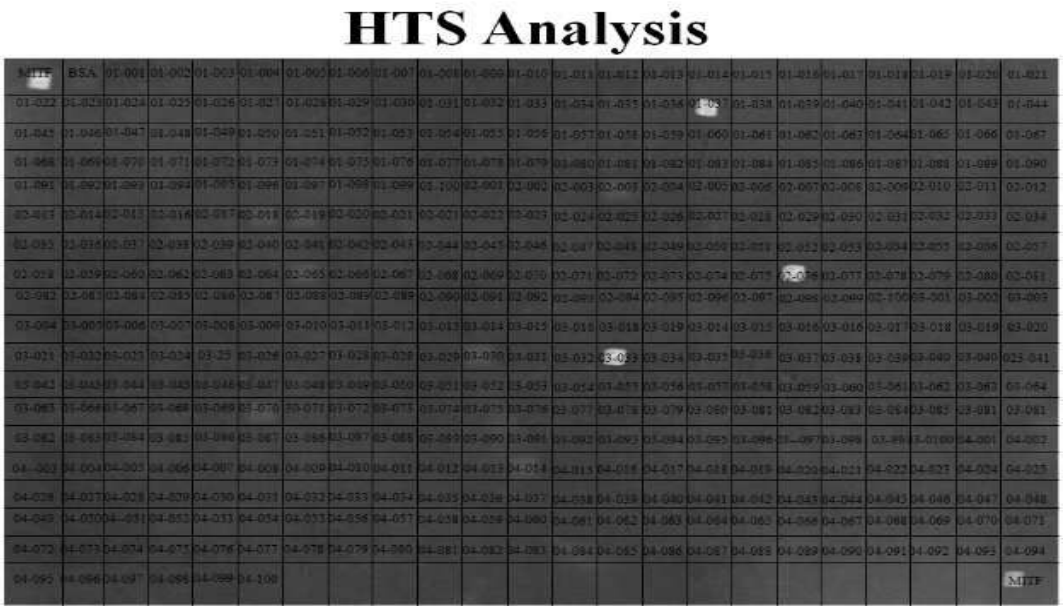
도면6


cy3 표지되지 않은 단백질
Cy3 표지된 단백질
단백질
단백질 - 결합 이중가닥 DNA
(Cy3 표지된 DNA)
단백질 - 돌연변이 이중가닥 DNA
단백질- 저해제+이중가닥 DNA
(Cy3 표지된 DNA)
단백질 (cy3 표지된 단백질)

도면7



도면8



서 열 목 록

<110> INHA UNIVERSITY INDUSTRY PARTHNERSHIP INSTITUTE
Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

<120> Surface Plasmon Resonance Imaging detection of Specific DNA-protein Interaction on Gold Surface

<130> 7p-04-32

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 33
<212> DNA
<213> NMBP-nde I primer

<400> 1
caaaaacata tgaaaatcga aggtaaactg gta 33

<210> 2
<211> 35
<212> DNA
<213> CMBP-Sma I primer

<400> 2
gtgcacgaat tcagtctgcg cgtctttcag ggctt 35

<210> 3
<211> 34
<212> DNA
<213> MITF-EcoRI primer

<400> 3
ggcgaattca tgctggaaat gctagagtac agtc 34

<210> 4
<211> 32
<212> DNA
<213> MITF-Sal I primer

<400> 4
ggcgtcgacc taacatgcat gctccgtttc tg 32

<210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> E-box

<400> 5
ctcacgcccc cggcatgtgg ccgccc 26

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> competitor

<400> 6
ctcacgcccc cggcttgagg cc 22