

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2017-0131864 (43) 공개일자 2017년12월01일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 21/65 (2006.01) G01N 21/59 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)	
(52) CPC특허분류 G01N 21/658 (2013.01) G01N 21/59 (2013.01)	(72) 발명자 심상준 서울특별시 강남구 선릉로 221, 301동 803호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)	
(21) 출원번호 10-2016-0062554	(74) 대리인 이처영, 장제환	
(22) 출원일자 2016년05월23일 심사청구일자 없음		

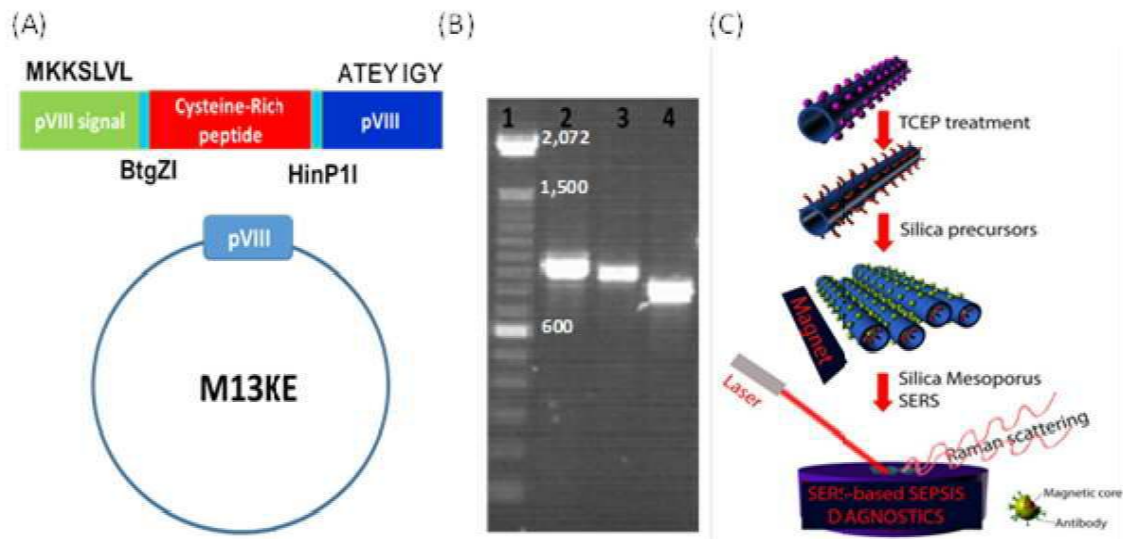
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 시스테인 풍부 펩타이드의 파지 디스플레이를 이용한 기공성 표면 증강 라만 산란(SERS) 기질의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 시스테인 풍부 펩타이드의 파지 디스플레이를 이용한 기공성 표면 증강 라만 산란(SERS) 기질의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 플라즈모닉 메조기공성 골격을 기반으로 한 SERS 기질은 파지 디스플레이(phage display)를 이용하여 SERS 효과를 증폭시킬 수 있고, 이를 이용한 SERS 기반 검지 방법은 질병의 진단과 같은 의학 분야에 응용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2021/5903 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015027673
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 (이공)중견연구자지원_도약연구
연구과제명 생물공정의 실시간 고속 모니터링을 위한 나노 플라즈몬 검지 플랫폼 기술 개발
기 여 율 6/10
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015032220
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 (재)한국이산화탄소포집및처리연구개발센터
연구사업명 거대과학연구개발사업(Korea CCS 2020사업)
연구과제명 [2-2차년도] 생물학적 이산화탄소 고속전환 유기 자원화 기술
기 여 율 3/10
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015048709
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 이공학분야지원사업
연구과제명 진단/치료용 고분자 소재 연구센터
기 여 율 1/10
주관기관 성균관대학교 산학협력단
연구기간 2015.09.01 ~ 2016.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

시스테인 풍부 펩타이드를 파지에 디스플레이 하는 단계를 포함하는 티올기가 표면에 도입된 파지의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 시스테인 풍부 펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 시스테인 풍부 펩타이드는 파지의 pVIII 외피 단백질에 디스플레이 되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 서열번호 5로 표시되는 펩타이드와 서열번호 1로 표시되는 시스테인 풍부 펩타이드가 순차적으로 결합되어 파지의 pVIII 외피 단백질에 디스플레이 되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 파지는 M13인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 파지는 대장균을 통해 증식 및 분리되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

다음 단계를 포함하는 파지 기반 메조기공성 구조체의 제조방법:

- (a) 제1항의 방법으로 제조된 파지에 프리 티올기를 형성시키는 단계;
- (b) 실리카 전구체 혼합물을 처리하여 비정형 겔을 형성시키는 단계; 및
- (c) 상기 형성된 비정형 겔을 하소 (calcine)하는 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 (a) 단계는 파지를 DTT (dithiothreitol), TCEP (tris-(2-carboxyethyl)phosphine) 또는 환원제로 처리하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 실리카 전구체는 테트라에틸 오르토실리케이트, 테트라메틸 오르토실리케이트, 메틸 트리에톡시실란, 페닐 트리에톡시실란, 디메틸 디메톡시 실란, 에틸 트리에톡시실란, 티타니아 테트라이소프로폭사이드 및 테트라에틸 게르마늄으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 실리카 전구체 혼합물은 TEOS (tetraethyl orthosilicate)와 APTES (3-aminopropyl triethoxysilane)의 10:1 molar 비로 혼합된 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 (b) 단계의 비정형 겔을 55℃에서 24시간 동안 반응시킨 후 세척 및 건조하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 12

제7항에 있어서, 상기 (c) 단계는 600℃에서 3시간 동안 수행하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 13

제7항의 방법으로 제조된 파지 기반 메조기공성 구조체.

청구항 14

제13항의 파지 기반 메조기공성 구조체에 자성 및 플라즈모닉 특성을 부여하는 단계를 포함하는 SERS 기질인 자성 플라즈모닉 메조기공성 구조체의 제조방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 금으로 코팅된 자성 면역 금 나노입자를 첨가하여 자성 및 플라즈모닉 특성을 부여하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 16

제14항의 방법으로 제조된 자성 플라즈모닉 메조기공성 구조체.

청구항 17

다음 단계를 포함하는 질환 특이적 바이오마커의 검지 방법:

- (a) 혈청과 SERS-태그를 결합시키는 단계;
- (b) 상기 혈청과 SERS-태그 결합체를 제16항의 자성 플라즈모닉 메조기공성 구조체와 항원-항체 반응시키는 단계;
- (c) SERS-태그/바이오마커/자성 골격체의 샌드위치 구조를 형성시키는 단계; 및

(d) 표면 증강 라만 산란(SERS) 강도를 측정하는 단계.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 질환은 패혈증인 것을 특징으로 하는 검지 방법.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 질환 특이적 바이오마커는 프로칼시토닌 (procalcitonin, PCT), C-반응성 단백질 (C-reactive protein, CRP) 및 골수 세포에서 발현되는 용해성 트리거링 리셉터-1 (Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1, sTREM-1)인 것을 특징으로 하는 검지 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 SERS-태그는 패혈증 특이적인 바이오마커에 대한 항체로 제작되는 것을 특징으로 하는 검지 방법.

청구항 21

제17항에 있어서, 상기 (d) 단계는 ATP, R6G 또는 TAMRA 라만 염료를 사용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 검지 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 시스테인 풍부 펩타이드의 파지 디스플레이를 이용한 기공성 표면 증강 라만 산란(SERS) 기질의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 표면 증강 라만 산란 (surface enhanced Raman scattering, SERS)을 이용한 분석은 분석물과 기질간의 상호작용에 의해 크게 영향을 받기 때문에, SERS의 성능을 최적화하기 위하여 우선적으로 고려해야 할 것은 SERS 기질이다. 따라서, 기질의 기능을 향상시키기 위하여 새로운 SERS 기질의 개발은 주목을 받고 있는 분야이다.

[0004] 메조기공성 (mesoporous) 물질은 직경 2~50 nm의 기공을 가지는 물질 (Groen *et al.*, 60:1-17, 2003)로, 나노입자를 기공 내에 삽입하여 생물/화학적 촉매 (Vera-Robles *et al.*, 31:9188-9179, 2015) 또는 이미징 (Ghosh *et al.*, 7:677-682, 2012) 등의 새로운 기능을 가지도록 한바 있다. 그러나, 나노입자가 함유된 (nanoparticle-embedded) 메조기공성 물질을 표면 증강 라만 산란 (Surface Enhanced Raman Scattering, SERS)의 기질 (substrate)로의 활용은 현재까지 보고된 바가 없다.

[0005] 메조기공성 (mesoporous) 물질은 거대 생물분자 기반의 골격을 이용하는 방법을 통해 합성할 수 있으며, 이러한 방법은 화학적인 생체접합을 이용하여 정확한 구조와 일정한 크기를 가지도록 할 수 있는 상당한 이점이 있다.

[0006] 생체물질 골격으로서, M13 박테리오파지는 자기조립과 다른 금속 나노입자와의 결합을 통하여 조합된 하나의 구조체를 형성할 수 있다 (Blaik *et al.*, 10: 324-332, 2016). 또한, 특정한 작용기로 M13 박테리오파지를 기능화하는 것으로 M13의 특성을 보다 향상시킴으로써 골격의 제작 (Li *et al.*, 21:1369-1377, 2010) 및 파지 기반 진단법 (Swift *et al.*, 94:175-179, 2013)에 응용할 수 있다.

[0007] 파지의 뛰어난 생화학적 특성은 다양한 분야에 응용할 수 있는데, 파지 외피단백질의 타겟에 특이적으로 결합하는 펩타이드를 발현하여 제조한 광학 센서로 이용할 수 있으며, 또한 파지의 자기조립 특성은 플라즈몬 현상

및 SERS 기질로도 응용할 수 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 표면 증강 라만 산란 (surface enhanced Raman scattering, SERS)의 기능을 향상시키기 위한 새로운 SERS 기질을 개발하고자 예의 노력한 결과, 시스테인 풍부 펩타이드 (cysteine-rich peptide)가 발현된 M13 파지 기반의 메조기공성 SERS 기질을 이용하면 SERS의 효과가 증폭되고, 이러한 SERS는 의료용으로 사용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 파지 기반 자성 플라즈모닉 메조기공성 구조체의 SERS 기질 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 SERS 기질을 이용한 질환 특이적 바이오마커의 검지 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 시스테인 풍부 펩타이드를 파지에 디스플레이하는 단계를 포함하는 티올기가 표면에 도입된 파지의 제조방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 파지에 프리 티올기를 형성시키는 단계; 실리카 전구체 혼합물을 처리하여 비정형 겔을 형성시키는 단계; 및 상기 형성된 비정형 겔을 하소 (calcine)하는 단계를 포함하는 파지 기반 메조기공성 구조체의 제조방법을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 파지 기반 메조기공성 구조체를 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 파지 기반 메조기공성 구조체에 자성 및 플라즈모닉 특성을 부여하는 단계를 포함하는 SERS 기질인 자성 플라즈모닉 메조기공성 구조체의 제조방법을 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 자성 플라즈모닉 메조기공성 구조체를 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, 혈청과 SERS-태그를 결합시키는 단계; 상기 혈청과 SERS-태그 결합체를 상기 자성 플라즈모닉 메조기공성 구조체와 항원-항체 반응시키는 단계; SERS-태그/바이오마커/자성 골격체의 샌드위치 구조를 형성시키는 단계; 및 표면 증강 라만 산란(SERS) 강도를 측정하는 단계를 포함하는 질환 특이적 바이오마커의 검지 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 플라즈모닉 메조기공성 골격을 기반으로 한 SERS 기질은 파지 디스플레이 (phage display)를 이용하여 SERS 효과를 증폭시킬 수 있고, 이를 이용한 SERS 기반 검지 방법은 질병의 진단과 같은 의학 분야에 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1의 (A)는 pVIII 부위에 시스테인 풍부 펩타이드 삽입 모식도이며, (B)는 M13KE의 pVIII 단백질에 시스테인 풍부 펩타이드가 삽입된 것을 확인한 콜로니 PCR의 결과이고, (C)는 파지 디스플레이 과정에서 SERS 기질 제조까지의 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 티올기를 가지는 합성된 메조기공성 골격의 FTIR 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.

도 3의 (A)는 금 나노입자의 TEM 이미지이고, (B)는 Au-MNS의 TEM 이미지이며, (C)는 베어 금 나노입자 (bare AuNP)와 항체로 기능화된 금 나노입자의 UV/Vis 스펙트럼 결과이다.

도 4의 (A)는 재조합 및 야생형 M13 파지 표면의 시스테인 기반 티올기의 정량 결과이며, (B)는 메조기공성 SERS 골격의 성질 분석한 SERS 기질의 라만 스펙트럼 결과이다.

도 5의 (A)는 자성 골격 상의 Au-MNS의 분포 및 티올화된 파지 골격에 티올-금 원자 간 결합을 통한 Au-MNS의 결합을 나타낸 것이며, (B)는 메조기공성 SERS 골격체의 EDX 분석 결과이다.

도 6의 (A)는 메조기공성 SERS 골격 상에 면역 금 콜로이드가 결합한 후의 SEM 이미지이며, (B)는 파지 기반 자성 메조기공성 골격과 골격 상에 면역 금 콜로이드가 결합한 이후의 기공의 크기를 나타낸 것이다.

도 7의 (A)는 구조체 상에서 각각의 타겟과 대응되는 라만 염료의 SERS 스펙트럼 결과이며, (B)는 검지 플랫폼의 특이도 검사 결과이고, (C)는 PCT, CRP, sTREM-1 농도의 선형 피팅 결과 및 피크의 세기를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0025] 본 발명에서는 시스테인 풍부 펩타이드 (cysteine-rich peptide)가 디스플레이된 M13 파지 기반의 메조기공성 SERS 기질을 개발하고, 이를 이용한 임상 조건에서 패혈증의 진단에 적용하고자 하였다. 이에, 기질은 금으로 코팅된 자성 나노입자와 특이적인 항체로 개질되었다. 금 나노입자에 라만 염료와 혈청 내의 바이오마커를 검출하기 위한 특이적인 항체를 고정하여 SERS-태그를 제작하였다. SERS-태그는 메조기공성 기질에 항원-항체 결합을 통하여 클러스터 또는 적층 구조를 이루어 라만 신호의 증강을 이루었다. SERS 스펙트럼은 세 종류의 패혈증 특이적인 바이오마커인 C-반응성 단백질 (C-reactive protein, CRP), 프로칼시토닌 (procalcitonin, PCT), soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1)에 대응되는 태그의 구별되는 피크를 보여주었으며, 각각의 검출 한계는 27 pM, 103 pM, 78 pM 이었다. 이러한 접근 방법을 통하여, SERS는 의료용 목적으로 사용할 수 있으며, 화학적인 변조가 아닌 파지 디스플레이 (phage display)를 이용하여 효과를 증폭할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 용어 "시스테인 풍부 펩타이드 (cysteine-rich peptide)"란 아미노산 10~11개당 1개 이상의 시스테인을 포함하고 있는 경우, 시스테인 풍부 펩타이드라고 할 수 있으며, 본 발명의 시스테인 풍부 펩타이드는 77개의 아미노산 중 1개의 시스테인을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 시스테인 풍부 펩타이드를 파지에 디스플레이하는 단계를 포함하는 티올기가 표면에 도입된 파지의 제조방법에 관한 것이다.
- [0028] 종래에는 파지 골격 상에 나노입자를 도입하기 위하여 파지의 표면을 티올 공여체 (thiol-donor) 처리하는 과정이 필요하지만 (Vera-Robles *et al.*, 31:9188-9197, 2015; Chung *et al.*, 9:5825-5836, 2014), 이 과정은 파지 전체 구조의 화학적 변조를 필요로 하며, 이는 파지 표면의 변성을 일으켜 조립 및 결합 등 파지의 본래의 특성에 영향을 줄 수 있다. 이를 극복하기 위해서, 파지 디스플레이 기법 (phage display)을 통해 M13 파지의 화학적 변조 없이 티올기 등의 작용기를 표면에 발현시킬 수 있다.
- [0029] 이론적으로, M13 박테리오파지는 800~900 nm 길이에 6.5 nm 직경의 긴 막대 형상을 가진다. 단백질 외피 전체는 2,700개의 pVIII 주 외피단백질 (major coat protein)로 구성되어 있으며, 양쪽 끝은 각각 두 종류의 외피단백질 (pVII, pIX와 pVI, pIII)이 각각 3~5개씩 포함되어 있다. 이들 중 외피단백질 pVIII와 pIII가 일반적으로 펩타이드 디스플레이에 이용되며, 이는 단백질의 응집을 방지하기 위함이다.
- [0030] 파지의 뛰어난 생화학적 특성은 다양한 분야에 응용되었다. 파지는 다른 유기 또는 무기 물질과 결합하여 센서와 광전 소자의 기반 물질로 사용되었으며, 파지 외피단백질에 타겟에 특이적으로 결합하는 펩타이드를 발현하여 제조한 광학 센서로 이용할 수 있다. 또한, 파지의 자가조립 특성은 플라즈몬 현상 및 SERS 기질로의 응용에 기여할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 시스테인 풍부 펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 시스테인 풍부 펩타이드는 파지의 pVIII 외피 단백질에 디스플레이 되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0033] 본 발명에 있어서, 서열번호 5로 표시되는 펩타이드와 서열번호 1로 표시되는 시스테인 풍부 펩타이드가 순차적으로 결합되어 파지의 pVIII 외피 단백질에 디스플레이 되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 파지는 M13인 것이 바람직하며, 유전자 조작되지 않은 M13KE를 음성대조군 (negative control)으로 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 파지는 대장균 (ER2738 *E.coli*)을 통해 증식 및 분리되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 방법으로 제조된 파지에 프리 티올기를 형성시키는 단계; 실리카 전구체 혼합물을 처리하여 비정형 겔을 형성시키는 단계; 및 상기 형성된 비정형 겔을 하소 (calcine)하는 단계를 포함하는 파지 기반 메조기공성 구조체의 제조방법에 관한 것이다.
- [0038] 메조기공성 물질은 i) 동시적인 기능화를 통한 단일 단계의 메조구조체 (mesostructure) 합성과 (ii) 거대 생물 분자 기반의 골격을 이용한 메조기공성 물질의 합성의 두 가지 방법을 통해 합성할 수 있다. 그러나, 첫 번째 방법은 계면활성제의 자가조립 특성이 균일한 구조체의 수급에 영향을 미칠 수 있다는 한계점이 있다. 두 번째 방법은 화학적인 생체접합을 이용하여 정확한 구조와 일정한 크기를 가지도록 할 수 있다는 특성으로 인해 메조구조체의 합성에 상당한 이점을 가지고 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 파지를 DTT (dithiothreitol), TCEP (tris-(2-carboxyethyl)phosphine) 또는 환원제로 처리하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 실리카 전구체는 테트라에틸 오르토실리케이트, 테트라메틸 오르토실리케이트, 메틸 트리에톡시실란, 페닐 트리에톡시실란, 디메틸 디메톡시 실란, 에틸 트리에톡시실란, 티타니아 테트라이소프로폭사이드 및 테트라에틸 게르마늄으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 실리카 전구체 혼합물은 TEOS (tetraethyl orthosilicate)와 APTES (3-aminopropyl) triethoxysilane)의 10:1 molar 비로 혼합된 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 비정형 겔을 55℃에서 24시간 동안 반응시킨 후 세척 및 건조하는 단계를 추가로 포함하는 것이 바람직하며, 상기 하소는 600℃에서 3시간 동안 수행하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 방법으로 제조된 파지 기반 메조기공성 구조체에 관한 것이다.
- [0045] 플라즈모닉 나노입자는 형광 기술의 약점을 극복할 수 있다 (Sharma *et al.*, 15:16-25, 2012). 플라즈모닉 금속 나노입자는 표면에 전자기적 진동과 국재적인 공명 여기 특성을 가지고 있으며, 이로 인해 전자기장을 증폭하여 전자기적인 SERS 증강 효과를 일으킨다. 분석물이 금속 나노입자 표면에 흡착되거나 (화학적 기작) 나노입자의 플라즈모닉 밴드 내에 위치할 경우 (전자기적 기작) 분석물의 SERS 스펙트럼이 강하게 (10^9 - 10^{11}) 증폭된다.
- [0046] 기질의 제작은 연구의 목적과 연구실의 기자재에 따라 상향식 (bottom-up) (Sharma *et al.*, 38:615-623, 2013) 또는 하향식 (top-down) (Abu Hatab *et al.*, 2:377-385, 2008)으로 제작되어 왔다. 상향식 방법으로는, 나노로드 (Tsvetkov *et al.*, 8:250-257, 2013), 나노스타 (Nguyena *et al.*, 2015), 나노스피어 (Joseph *et al.*, 42:1736-1742, 2011) 등을 기반으로 하여 적층 방식으로 핫 스팟 (hot-spot)을 형성한 바 있다. 이러한 방식으로, 기질의 플라즈몬 공명 특성 및 기질의 표면과의 거리에 반비례하는 증강 인자 (enhancement factor)의 평균을 조절할 수 있다.
- [0047] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 파지 기반 메조기공성 구조체에 자성 및 플라즈모닉 특성을 부여하는 단계를 포함하는 SERS 기질인 자성 플라즈모닉 메조기공성 구조체의 제조방법에 관한 것이다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 금으로 코팅된 자성 면역 금 나노입자를 첨가하여 자성 및 플라즈모닉 특성을 부여하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0049] SERS 이론에 따르면 (Sharma *et al.*, 15:16-25, 2012), Au-MNS에 근접한 위치에서는 전자기장이 강화되어 SERS-기반 검지법의 SERS 신호 세기가 향상된다. 메조기공성 골격은 면역 금 Au-MNS로 수식되고, 면역 금 콜로

이드는 티올화된 골격에 결합하여 그 표면에 커플링되거나 클러스터를 형성한 나노입자를 형성하였다. 커플링된 나노구조체는 금 나노입자 사이의 전자기장의 커플링을 일으켜 검지 물질의 라만 스펙트럼의 세기를 증폭시킬 수 있다. 또한, 메조기공성 구조의 빈 공간은 면역 금 나노입자를 붙잡아서 SERS의 신호 증폭 효과를 향상시킨다 (Nguyen *et al.*, 790:358-365, 2015).

[0050] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 방법으로 제조된 자성 플라즈모닉 메조기공성 구조체에 관한 것이다.

[0052] 본 발명은 또 다른 관점에서, 혈청과 SERS-태그를 결합시키는 단계; 상기 혈청과 SERS-태그 결합체를 상기 자성 플라즈모닉 메조기공성 구조체와 항원-항체 반응시키는 단계; SERS-태그/바이오마커/자성 골격체의 샌드위치 구조를 형성시키는 단계; 및 표면 증강 라만 산란(SERS) 강도를 측정하는 단계를 포함하는 질환 특이적 바이오마커의 검지 방법에 관한 것이다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 질환은 패혈증인 것이 바람직하며, 상기 질환 특이적 바이오마커는 프로칼시토닌 (procalcitonin, PCT), C-반응성 단백질 (C-reactive protein, CRP) 및 골수 세포에서 발현되는 용해성 트리거 링 리셉터-1 (Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1, sTREM-1)인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 SERS-태그는 패혈증 특이적인 바이오마커에 대한 항체로 제작되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0055] 패혈증은 병원체 감염뿐만 아니라 감염으로 인한 염증 반응으로도 일어날 수 있으며 (Reinhart *et al.*, 25:609-634, 2012; Rittirsch *et al.*, 8:776-787, 2008; Rascher *et al.*, 59:251-258, 2014), 특히, 급성 복합 장기 부전을 일으킬 수 있기 때문에, 즉각적인 치료를 위해 초기에 정확한 진단을 필요로 한다. 이에 본 발명에서는 새로운 SERS 기질을 이용하여 SERS 기반 패혈증 진단 기술을 개발하였다.

[0056] 병원체의 직접적인 검출 과정에서, 혈액 배양 방식의 단점으로는 많은 시간 소모와, 30%에 불과한 낮은 민감도, 그리고 감염되는 박테리아의 약 30%는 배양이 불가능하다는 점이다 (Calandra *et al.*, 22:1538-1548, 2005). 다중 검지 실시간 PCT 기법을 이용한 혈류 내 병원체의 검진은 박테리아의 DNA가 혈액 내에 존재하지 않는 환자에 대해 위음성 (false negative)의 결과를 낼 위험이 있어, 패혈증 특이적인 바이오마커 분자의 검지가 고려되어 왔다. 그러나, 단 한 종류의 특이적인 바이오마커만을 이용한 특이적이고 민감한 검지 방법은 아직 확립되지 않았다. 이에 대한 대안은 임상적으로 의미 있는 일군의 바이오마커들을 이용하는 것이다 (Gibot *et al.*, 186:65-71, 2008). 본 발명의 일 실시예에서 사용한 세 종류의 바이오마커인 C-반응성 단백질, 프로칼시토닌, sTREM-1은 패혈증의 바이오마커로서 승인되었다 (Zachariah *et al.*, 36:1507-1512, 2008).

[0057] 본 발명에 있어서, SERS 측정은 ATP, R6G 또는 TAMRA 라만 염료를 사용하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0058] SERS의 강도는 SERS 활성 분자의 종류뿐만 아니라 입사광의 편광 방향과 파장에도 영향을 받기 때문에 (Seung *et al.*, 8:3244-3247, 2008), 본 발명의 실시예에서는 입사하는 레이저 빛 (785 nm)의 편광의 방향을 제어하기 위하여 linear polarizer (PRM1/M, Thorlabs)를 사용하였다. 이합체 (dimer)의 경우, 라만 신호 강도는 입사광의 편광 방향이 이합체의 축에 평행한 방향일 때 가장 높다 (Xu *et al.*, 4:1001-1005, 2003). 그러나, 나노입자가 두 개 이상이 클러스터를 형성하고 있는 SERS 기반 면역분석 과정에서는 모든 편광 방향에 대해 보다 균일한 강도를 보이며, 이는 클러스터를 형성한 나노입자들의 복잡한 전자기적 커플링으로 인한 결과이다 (Xu *et al.*, 4:1001-1005, 2003).

[0060] 본 발명에서는 M13 파지 상의 시스테인을 화학적 변조가 필요 없는 티올 공여체로 작용하도록 활성화시켰으며, 이후 실리카 전구체를 이용하여 고분자화하여 비정형 생체소재 겔을 형성시켰다. 고분자를 하소 처리하여 메조기공성 골격을 형성하였으며 티올-금 결합을 통해 Au-MNS를 골격 상에 고정하여 자성 메조기공성 구조체를 제작하였으며, 자성 구조체의 특성은 TEM, SEM, FTIR, BET, 라만 산란 기법으로 분석하였다.

[0061] 그 다음 자성 구조체는 패혈증에 특이적인 바이오마커와 결합하는 특이적인 항체를 이용하여 패혈증 검지에 활용하였다. 인간 혈청 내의 CRP, PCT, sTREM-1의 삼중 검지는 높은 특이도와 민감도를 나타냄에 따라, 자성 골격 기반 SERS 기반 삼중 검지는 패혈증의 임상에서의 조기 검지의 대안으로 기대된다. 마지막으로, M13 파지로 구성된 메조기공성 구조는 SERS 기질, 촉매, 티올-산화환원 반응을 통한 약물의 결합 및 전달 등의 의생명 분야에

도 응용될 것으로 기대할 수 있다.

[0063] [실시예]

[0064] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0066] 실시예 1: M13KE를 이용한 pVIII에 디스플레이된 시스테인 풍부 펩타이드의 제조

[0067] M13KE의 pVIII DNA 서열은 New England Biolabs (NEB)의 DNA maps and DNA sequences and Maps Tool 데이터베이스에서 얻었다. pVIII 단백질에 시스테인 풍부 펩타이드 (서열번호 1)를 디스플레이하고 0.05 M tris (2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride 용액을 처리하여 티올화된 파지를 생성하였다. 파지 변이종 (M13KE, $F' \text{ } proA^+ B^+ lacI^f D(lacZ)M15zzf$)을 유전자 삽입을 위한 구조체로 사용하였다. XL-10 gold ultracompetent cells ($F' \text{ } lacI^f ZM15$) (Aligent genomics)에 재조합 DNA를 형질전환 하고, 파지의 증식에는 NEB의 *E.coli* (ER2738)를 이용하였다.

[0068] 먼저, pVIII에 디스플레이될 시스테인 풍부 펩타이드는 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 통해 복제하였다. PCR은 다음의 서열번호 1 및 2의 프라이머를 이용하여 진행하였다.

[0069] 서열번호 3: aaagcgatgATGCCCAAGTGCCCTCG (gcgatg; BtgZI site)

[0070] 서열번호 4: aaagcgcATTGAAAGTGTAGCTTTC (gcgc; HinP1I site).

[0071] 그 다음 PCR 결과물은 BtgZI (10 units/ μ l)과 HinP1I (10 units/ μ l)를 이용하여 절단하고, 유전자의 삽입을 위하여 Ph.D.TM-12 phage display kit (New England Biolabs)의 야생형 M13KE를 같은 효소를 이용하여 절단하였다. 타겟 펩타이드, 즉 시스테인 풍부 펩타이드의 DNA 서열 (서열번호 2: GBSI01000616.1)은 야생종 pVIII의 특정 위치 (DNA maps and sequences of NEB의 위치 1301~1522)인 개시 코돈과 리더 펩타이드 (leader peptide) 사이에 삽입하고 (도 1A), 시스테인 풍부 펩타이드가 올바르게 접혀서 파지 표면에 발현되도록 하기 위해 MKKSLVLKASVAVATLVVPMLSFA (서열번호 5) 펩타이드의 DNA 서열은 리더 펩타이드 (leader peptide) 내에 삽입하였다(도 1A). 벡터와 삽입 유전자는 T4 DNA Ligase를 이용하여 결합시켜, 재조합 DNA는 상용 분리 키트 (Qiagen, USA)를 이용하여 분리하였고 시퀀싱 업체를 통하여 서열을 확인하였다.

[0072] 최종 유전자는 XL-10 gold ultracompetent cells에 도입하였으며 LB/IPTG/Xgal 플레이트 상에서 푸른 군집을 골라내고, 재조합 파지는 ER2783 안에서 37°C로 5시간 동안 증식하였다. M13KE를 음성대조군 (negative control)으로 하여, 재조합 유전자의 콜로니 PCR 결과물을 DNA 전기영동법으로 확인한 결과, 야생종 보다 243 bp 더 긴 재조합 유전자를 확인할 수 있었다(도 1B).

[0073] 세포 서스펜션 (cell suspension)은 4°C에서 20분간 원심분리 하고, 상층액의 파지는 20% PEG/2.5 M NaCl (ratio 1:6) 용액에서 두 차례 침전시켰다. 시스테인 풍부 펩타이드가 발현된 파지는 tris-buffered saline에 다시 분산시켜 저장하였다.

[0075] 실시예 2: 파지 기반 메조기공성 자성 골격의 합성

[0076] 실시예 1에서 제조된 파지는 5% tris-(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) (T2556, Thermo) 처리를 거쳐 자성을 갖는 골격의 형성에 이용하였다.

[0077] TCEP 처리로 활성화된 티올기를 만든 후, 파지는 실리카 전구체 혼합물인 TEOS (tetraethyl orthosilicate) : APTES (3-aminopropyl) triethoxysilane)의 10:1 molar 비의 혼합물을 150 μ l로 처리하였다 (Vera-Robles *et al.*, 31:9188-9197, 2015). 파지는 2.0 mg/ml의 액정 구조체로 자기조립 되었으며 이후 비정형의 실리카 전구체를 첨가하고 30분 후, 파지를 화학적으로 티올화한 것 (Vera-Robles *et al.*, 31:9188-9197, 2015)과 유사하게, 현탁액 상에서 백색의 겔로의 상전이를 거쳐 티올-골격 기반 실리카 메조기공성 네트워크가 형성되었다. 가수분해-축합중합을 완료하기 위해, 겔을 24시간 동안 55°C의 배양기에서 반응시킨 후 주위 온도 (ambient

temperature)에서 세척하고 건조하였다. 생성물은 마지막으로 3시간 동안 600℃에서 하소 (calcinate)하였으며, 파지 생체골격 상에서 Si-O 구조가 형성되어 메조기공성 구조체를 형성하였다. 도 1C에 SERS 자성 골격을 형성하는 모식도를 나타냈다.

[0078] 메조기공성 골격의 티올기는 FTIR을 이용하여 확인하였다. 티올화, 기능화와 하소 과정까지의 합성 과정에서의 FTIR 스펙트럼을 확인하여 표면의 변화를 모니터링 하였다. S-H 진동으로 인한 2580 cm^{-1} 에서의 약한 피크 (Oh *et al.*, 6:911-917, 2006)가 세 단계의 스펙트럼에서 모두 발견됨으로써 티올기가 사라지지 않았음을 확인할 수 있다 (도 2). 기능화된 골격에서 실리카 전구체의 존재는 Si-O의 강한 신축 진동 (stretching vibration)으로 인한 1358 cm^{-1} 의 신호 (Tian *et al.*, 26:4563-4566, 2010)의 존재로 확인할 수 있었다. 하소 처리된 골격에서 2580 cm^{-1} 의 약한 SH 피크가 발견되어 600 °C에서의 하소 과정에서도 SH기가 분해되지 않았음을 보여준다. 티올기는 금 나노입자를 메조기공성 골격에 결합시키는 위치를 제공한다.

[0080] 실시예 3: 금-코팅된 자성 나노스타의 합성과 면역 금 콜로이드의 제조

[0081] 실시예 2에서 제조된 골격에 금으로 코팅된 자성 면역 금 콜로이드 (immunogold colloid)를 첨가하여 자성 및 플라즈몬 특성을 부여하였다.

[0082] 금으로 코팅된 자성 나노스타 (Au-MNS) (도 3A)는 시드 성장 방식 (seeded growth method)으로 합성하였다 (Kouassi *et al.*, 78:3234-3241, 2006; Khoury *et al.*, 2008:1884918859, 2008.). 간략하게, 20 nm 금 나노입자 (도 3B)를 0.2 M CTAB 용액에 분산시킨 후 0.2 M CTAB, 10 mM HAuCl₄, 100 mM AgNO₃과 0.25 mM sodium citrate를 포함하는 성장 용액 (growth solution)에 첨가하여 tip-to-tip과 tip-to-core 플라즈몬 공명을 가지는 35 nm 나노스타를 합성하였다. 금 나노입자 (596.7 nm)와 Au-MNS (653.8 nm)의 가시광선 스펙트럼을 확인하였다 (도 3C). Au-MNS와 AuNP의 표면에 있는 CTAB와 citrate는 0.1 mM OEG6: OEG3 (1:3) 혼합물로 치환하였으며, 비특이적인 부위는 phosphate-buffered saline에 녹인 1% BSA를 이용하여 차단하고 항체 결합을 위해 4℃에서 보관하였다.

[0083] 라만 염료가 결합된 면역 금 콜로이드인 SERS-태그는 일반적인 EDC/NHS 생접합 과정을 통해 제조하였다. 금 나노입자와 Au-MNS 표면에 특이적인 항체를 접합함에 따라 각각의 파장대가 596.7 nm에서 608.2 nm로, 그리고 653.8 nm에서 667.1 nm로 이동하였다 (도 3C).

[0084] 금 나노입자와 Au-MNS의 표면 플라즈몬의 흡수 피크는 전도체와 절연체의 접촉면에서의 전자의 집합적인 여기 (excitation)로 인하여 발생하기 때문에, 나노입자 표면의 항체 결합은 표면의 플라즈몬 특성을 변화시키고 나노입자 표면 굴절률을 증가시켜 표면 플라즈몬 공명 스펙트럼을 적색-이동하는 결과를 나타낸다. 이는 비표지 SPR 바이오센싱 기술의 기초이다 (Nguyen *et al.*, 66:497-503, 2015; Brolo *et al.*, 6:709-713, 2012; Hall *et al.*, 115:1410-1414, 2011). 또한, 흡수 피크의 폭이 넓어지거나 피크 신호의 세기가 감소하는 등의 입자의 응집으로 인하여 발생하는 현상은 항체의 결합 과정에서 발견되지 않았다.

[0086] 실시예 4: 패혈증 검지를 위한 자성 파지 골격의 형성

[0087] 실시예 2 및 실시예 3과 같이, 시스테인 풍부 펩타이드는 0.05 M TCEP로 처리하여 활성이 있는 티올기를 형성시키고, 티올화된 파지 골격은 Au-MNS로 수식하여 자성 파지 골격을 형성시켜 패혈증 검지를 위한 자성 파지 골격을 제작한 후, 티올화된 파지의 티올기 정량 결과, 재조합 파지는 시스테인을 파지 디스플레이한 결과 야생종 파지에 비해 많은 양의 시스테인 이황화물을 포함하고 있는 것을 확인하였다 (도 4A).

[0088] 티올화된 파지는 실리카 전구체 혼합물 (TEOS/APTES)을 첨가하여 고분자화한 후, 비정형의 겔을 형성시켜 600℃에서 4시간 동안 하소하였고, 실리카 메조기공성 구조체의 형성 결과는 라만 분광법을 이용하여 확인하였다.

[0089] 그 결과, 실리카 메조기공성 구조체의 라만 스펙트럼은 200에서 2500 cm^{-1} 범위에서 547.9 cm^{-1} 위치의 피크를 나타냈다 (그림 4B). 이 스펙트럼은 메조기공성 구조체의 Si와 O 원자의 운동으로 인한 것으로 볼 수 있다 (Kingma *et al.*, 79:269-273, 1994). 600 cm^{-1} 의 약한 피크들은 Si-O의 신축 운동으로 나타나며, 368 cm^{-1} 의 피크는 O-Si-O의 굽힘 운동 (bending mode)에 대응된다.

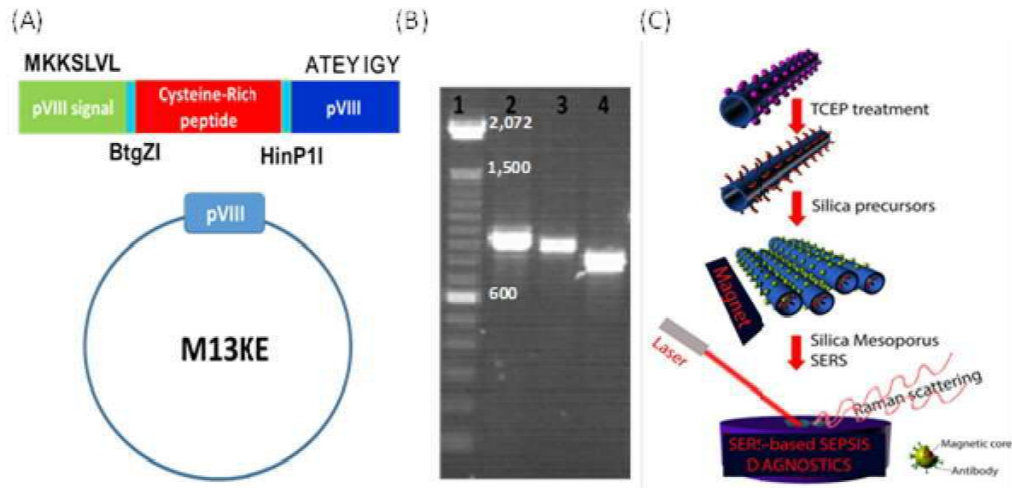
- [0090] SERS-기반 검지법의 SERS 신호 세기 향상을 위해, 메조기공성 골격은 면역 금 Au-MNS로 수식하여 (도 5A), 면역 금 콜로이드는 티올화된 골격에 결합하고 그 표면에 커플링되거나 클러스터를 형성한 나노입자를 형성하였다. 골격을 형성하는 원자들을 에너지 분산 X선 분광분석기 (energy-dispersive X-ray spectroscopy, EDX)을 이용하여 분석한 결과 Fe, Au, Si가 골격에 포함되어 있음을 확인하였다 (도 5B). 도 5A의 TEM (JEM-2100F) 이미지는 골격에 수식된 Au-MNP가 고밀도로 집적된 구조를 형성했음을 보여준다.
- [0091] 골격 표면의 기공의 크기는 BET 표면적 분석법으로 측정하였으며, 분석 결과 측정된 비표면적은 $183 \text{ m}^2/\text{g}$ 이었다 (도 6B). 이는 Vera-Robles *et al.*, 31:9188-9197, 2015에서 제시된 값 ($160 \text{ m}^2/\text{g}$)보다 높은 값이나, Mao *et al.*, 51:6411-6415, 2012에서 측정되었던 값 ($341.57 \text{ m}^2/\text{g}$)보다는 낮은 결과이다. 이러한 차이는 메조기공성 구조를 구성하는 물질의 길이의 차이로 해석할 수 있다. Au-MNS를 티올기를 이용하여 고정하는 데에는 약 35 ~ 40 nm 정도의 기공이 적합한 크기이며, 면역 금 콜로이드가 결합한 구조체의 SEM 이미지는 Au-MNS와 SERS-태그가 파지 기반 메조기공성 골격의 기공 내에 형성되어 있음을 보여준다 (도 6A). 즉, 이는 상기 제작한 골격이 검지를 위한 SERS 기질로 사용될 수 있음을 보인다.
- [0093] **실시예 5: SERS 기반 패혈증 특이적 바이오마커의 삼중 검지**
- [0094] 실제 혈청 시료를 모방하기 위해 1pM에서 1nM 범위의 CRP, PCT, sTREM-1을 포함한 패혈증 특이적인 재조합 바이오마커를 1ml의 시판되는 인간 혈청 (H4522, Sigma)에 녹여 준비하였다. 각각의 항원에 대한 1mM 농도의 SERS-태그 $50\mu\text{l}$ 를 혈청에 첨가하여 30분간 약하게 혼합하면서 반응시키고, 결합하지 않은 바이오마커는 원심분리를 통해 제거하였다. PBS에 분산된 자성 골격체 $200\mu\text{l}$ 를 패혈증 특이적인 바이오마커와 결합한 SERS-태그에 첨가하고 30분간 반응시켜 항원-항체 반응을 통해 SERS-태그/바이오마커/자성 골격체의 샌드위치 구조를 형성하도록 하였다. 복합체는 DynaMega™-2 자석 (12321D, Invitrogen)을 통해 결합하지 않은 SERS-태그로부터 분리한 후 5회 세척하였다. SERS의 측정은 라만 스펙트럼 특이적인 지문 피크 (specific fingerprinting peaks)를 기반으로 알려진 공식을 사용하여 계산하였다 (Nguyen *et al.*, 70:358-365, 2015). 대조군은 2mg/ml의 소 혈청 알부민과 시판되는 인간 혈청 (H4522, Sigma)를 사용하였다.
- [0095] SERS의 강도는 SERS 활성 분자의 종류뿐만 아니라 입사광의 편광 방향과 파장에도 영향을 받기 때문에 (Seung *et al.*, 8:3244-3247, 2008), 본 실시예에서는 입사하는 레이저 빛 (785 nm)의 편광의 방향을 제어하기 위하여 linear polarizer (PRM1/M, Thorlabs)를 사용하였다.
- [0096] CRP, PCT와 sTREM-1을 각각 ATP, R6G와 TAMRA 라만 염료를 이용하여 삼중 검지한 결과, 기록된 스펙트럼에 따르면 삼중 검지에서 4-ATP, R6G와 TAMRA 스펙트럼의 피크는 단일 검지 결과 발생하는 피크와 일치하였다 (도 7A). 이는 세 타겟이 SERS 기반 면역 검지 과정에서 각각에 간섭하지 않음을 나타낸다.
- [0097] 또한, 비특이적인 결합이 나타났을 가능성에 대해, 전립선 특이항원 (prostate-specific antigen, PSA)를 SERS-태그와 자성 골격체와 함께 배양한 결과, 특이적인 바이오마커가 없을 때의 SERS-태그와 자성 골격체 간의 비특이적인 결합 또는 항원과 항체 간의 신호 누화 (crosstalk) 현상 역시 확인하였다 (도 7B). 이 경우에는 특이적인 SERS 피크가 나타나지 않았으며, 이는 샌드위치 구조의 복합체가 형성되지 않았음을 나타내며, 검지 방법의 높은 특이도를 증명한다.
- [0098] 각각의 바이오마커를 1 pM에서 1 nM까지의 농도로 사용하여 각 바이오마커의 검출 한계 (limit of detection, LOD)를 결정하기 위해, 농도에 따라 3회씩 SERS로 측정된 스펙트럼의 평균을 확인하였다 (도 7C). 이는 ATP (1087 cm^{-1}), R6G (1363 cm^{-1}) 및 TAMRA (1650 cm^{-1})의 특징적인 피크의 세기와 CRP, PCT 및 sTREM-1의 농도 간의 선형적 상관관계를 보여준다. CRP, sTREM-1 및 PCT 각각에 대한 회귀식은 하기에 나타났다.
- [0099] CRP: $y = 4.62(x) + 11.36 (r^2=0.97)$
- [0100] sTREM-1: $y=1.69(x)+6.36(r^2=0.98)$
- [0101] PCT: $y=1.08(x)+3.46(r^2=0.97)$
- [0102] 삼중 검지에 사용한 각 바이오마커의 LOD는 CRP, PCT, sTREM-1이 각각 27 pM, 103 pM과 78 pM로 측정되었으며, 이 LOD 값은 패혈증 환자의 바이오마커의 농도와 비교해서 충분히 민감한 것을 알 수 있다 (Schmit *et al.*,

36:213-219, 2008).

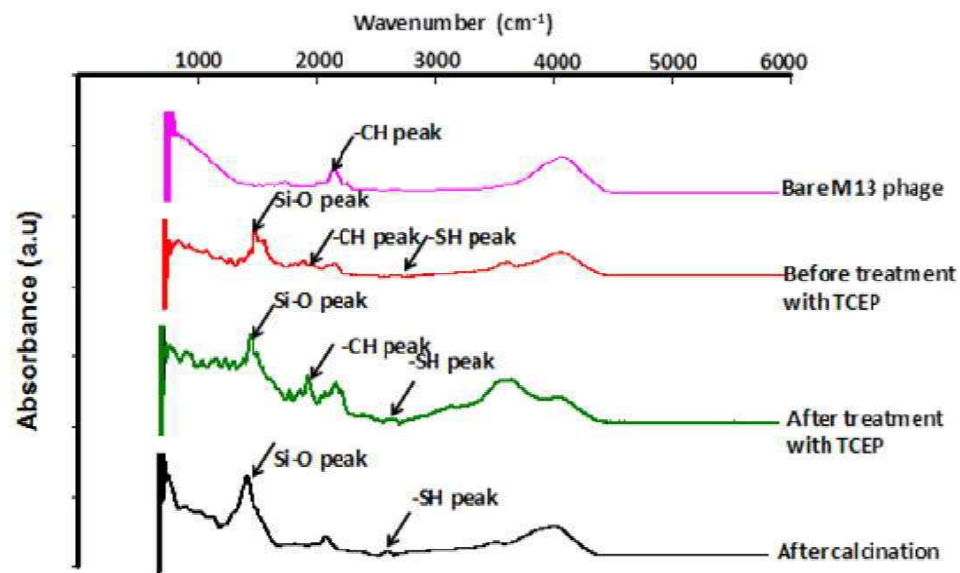
[0104] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

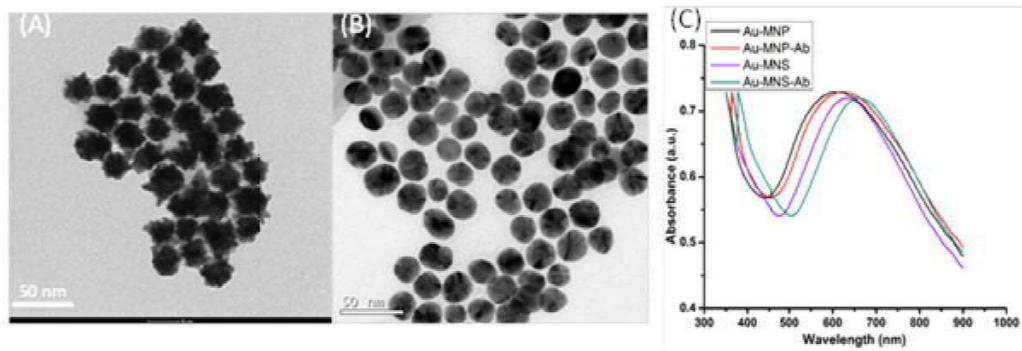
도면1



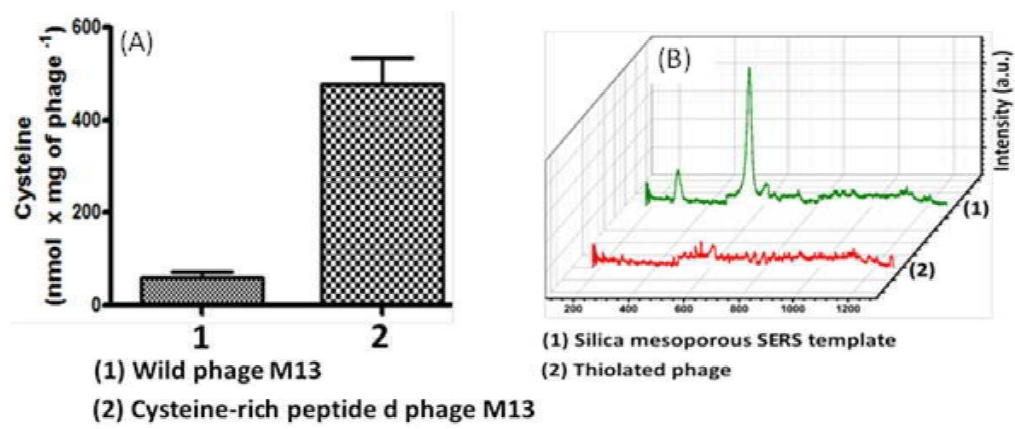
도면2



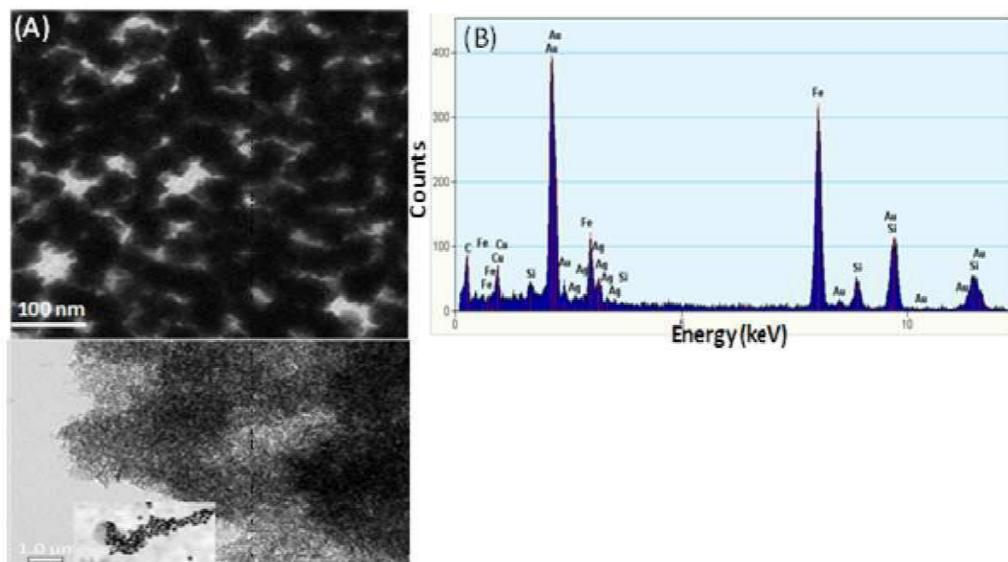
도면3



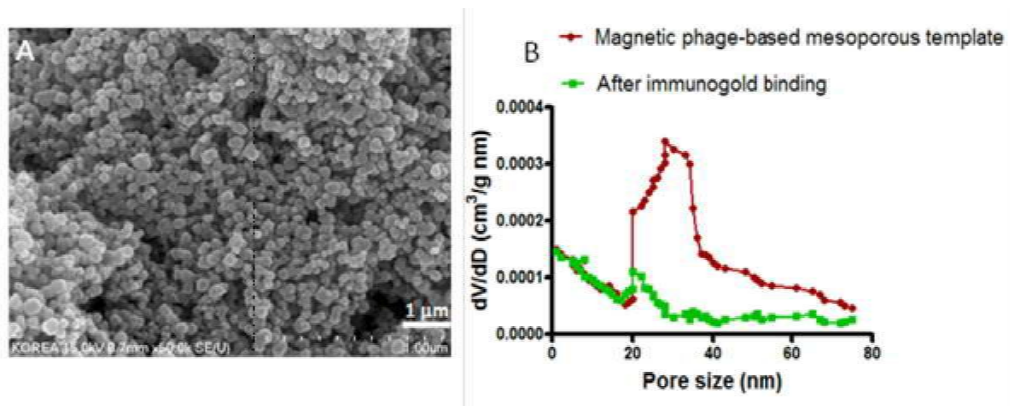
도면4



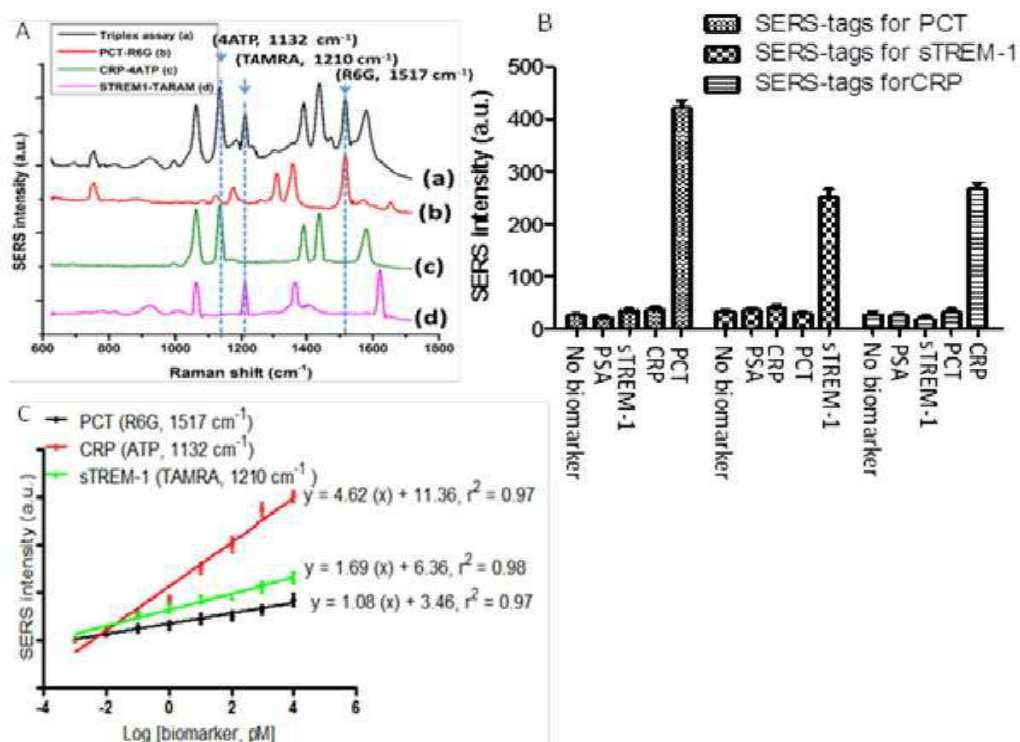
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Method for Preparing Porous SERS Substrate Using Cystein-rich Peptide Phage Display
- <130> P16-B152
- <160> 5
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 77
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CRP

<400> 1

Met Pro Lys Cys Pro Arg Cys Gln Lys Glu Val Tyr Phe Ala Glu Lys

1 5 10 15

Val Thr Ser Leu Gly Lys Asp Trp His Arg Pro Cys Leu Lys Cys Glu

20 25 30

Lys Cys Lys Lys Thr Leu Asn Ala Gly Gly His Ala Glu His Asp Gly

35 40 45

Lys Pro Tyr Cys Asn Tyr Pro Cys Tyr Ala Ala Leu Phe Gly Pro Lys

50 55 60

Gly Phe Gly Arg Gly Gly Ala Glu Ser Tyr Thr Phe Asn

65 70 75

<210> 2

<211> 234

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CRP-DNA

<400> 2

atgcccaagt gccctcgttg tcagaaggag gtctatttcg ctgaaaaagt cacctccctt 60

gggaaagatt ggcaccggcc atgtttgaaa tgtgaaaaat gcaagaagac cttaaattgca 120

ggtggccatg ctgagcatga tgggaaacct tattgcaact acccctgcta tgctgcactg 180

tttggaccca aaggatttgg ccgtggaggt gctgaaagct acactttcaa ttaa 234

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CRP-P1

<400> 3

aaagcgatga tgcccaagtg ccctcg 26

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CRP-P2

<400> 4

aaagcgcatt gaaagtgtag ctttc

25

<210> 5

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> P-CRP

<400> 5

Met Lys Lys Ser Leu Val Leu Lys Ala Ser Val Ala Val Ala Thr Leu

1 5 10 15

Val Val Pro Met Leu Ser Phe Ala

20