(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0071718
(43) 공개일자 2024년05월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/315 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/315 (2013.01)
C12N 15/70 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0153536
(22) 출원일자 2022년11월16일
심사청구일자 2022년11월16일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
박민
서울특별시 마포구 토정로4길 26 ,1층1호(합정동)
박종민
서울특별시 동작구 상도로34길 27
김성기
강원도 강릉시 주문진읍 주문로 144 현대아파트 806호
(74) 대리인
강현욱

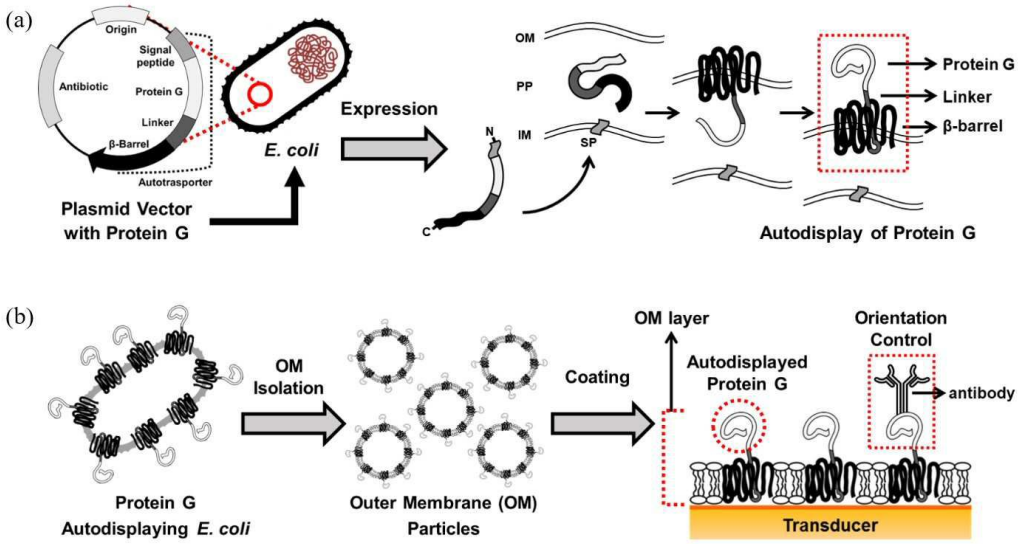
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **자가 표지된 연쇄상구균 단백질 G의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 (a) 연쇄상구균의 단백질 G를 코딩하는 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; (b) 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 형질전환하는 단계; 및 (c) 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 상기 단백질 G를 숙주세포의 외막에 발현하는 단계를 포함하는, 자가 표지된(autodisplayed) 연쇄상구균 단백질 G의 제조방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345334440
과제번호	2021R1I1A3055700
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	NADH 산화효소 표면발현을 통한 직접전자전달 NADH 바이오센서 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2024.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 연쇄상구균의 단백질 G를 코딩하는 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계;

(b) 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 형질전환하는 단계; 및

(c) 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 상기 단백질 G를 숙주세포의 외막에 발현하는 단계를 포함하는,

자가 표지된(autodisplayed) 연쇄상구균 단백질 G의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

(c) 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 상기 단백질 G를 숙주세포의 외막에 발현하는 단계 이후에,

(d) 상기 단백질 G가 발현된 숙주세포의 세포 외막을 분리하는 단계를 추가로 포함하는, 자가 표지된(autodisplayed) 연쇄상구균 단백질 G의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 숙주세포는 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피뮤리움, 비브리오 콜레라, 마이코박테리움 보비스, 시겔라, 바실러스, 유산균, 스테필로코커스, 코리네 박테리아, 리스테리아 모노싸이토제네스 및 스트랩토코커스로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나인, 자가 표지된(autodisplayed) 연쇄상구균 단백질 G의 제조방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 제조방법에 따라 제조된, 자가 표지된(autodisplayed) 연쇄상구균 단백질 G.

청구항 5

연쇄상구균의 단백질 G를 코딩하는 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포.

청구항 6

세포 외막에 연쇄상구균 단백질 G가 자가 표지된(autodisplayed) 숙주세포.

청구항 7

제6항의 숙주세포로부터 분리한 세포 외막.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 자가 표지된 연쇄상구균 단백질 G의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 바이오센서 및 생물검정은 혈액, 혈청, 소변 및 뇌척수액과 같은 생리학적 샘플에서 분석물의 농도를 결정하기 위한 분석 장치 및 방법이다. 바이오센서는 분자 인식 층, 트랜스듀서 및 신호 발생기의 세 부분으로 구성된다. 분자 인식 층은 분자 인식 분자로 이루어지며, 항체는 특이성, 단순성, 비용 효율성 및 고정화의 용이성 때문에 분자 인식 분자로서 가장 빈번하게 사용된다. 이러한 장점 때문에 항체를 이용한 면역센서 및 면역검정은 다양한 샘플의 검출 및 임상 진단에 널리 적용되어 왔다.

[0003] 항체는 2개의 중쇄와 2개의 경쇄로 구성되어 Y 형상 구조를 형성하고, 중쇄와 경쇄가 만나는 두 개의 종점인 Fab 영역(항원 결합 부위)과 두 중쇄가 만나는 Fc 영역이 존재한다.

[0004] 항체는 비대칭 구조 때문에 지지체 상에 고정화될 때 사이드온, 테일-온, 헤드온, 또는 플랫-온과 같은 무작위 배향을 가진다. 면역센서에서 분석물은 센서의 항체에 결합되어야 하므로, 바이오센서 또는 면역검정의 감도를 향상시키기 위해 항체의 배향을 조절하는 것은 매우 중요하다.

[0005] 포도상구균(Staphylococcus) 단백질 A 또는 연쇄상구균(Streptococcus) 단백질 G와 같은 항체 결합 단백질은 항체의 Fab 영역 또는 Fc 영역과 결합하여, 항체의 항원 결합 부위를 효과적으로 노출시켜 항체의 배향을 조절할 수 있는 것으로 알려져 있다(J.B. Fishman, E.A. Berg, Protein A and protein G purification of antibodies, Cold Spring Harbor Protocols, 2019(2019) pdb. prot099143.).

[0006] 최근에 포도상구균 단백질 A의 B 도메인으로부터의 조작된 펩티드인 Z-도메인이 민감한 면역검정 및 바이오센서에서 항체의 배향을 조절하기 위해 사용되었으며, Z-도메인을 효과적으로 고정하기 위해 자가 표지(Autodisplay) 기술이 사용되었다. 자가 표지 기술은 AIDA-I, IgA1 프로테아제와 같은 자가수송체(Autotransporter)를 사용하여 그람 음성균의 세포 표면에 표적 단백질을 발현하는 표면 발현 기술이다.

[0007] 자가 표지에 사용될 수 있는 그람 음성균으로는 예를 들어, 대장균, 살모넬라 타이피, 살모넬라 타이피뮤리움, 비브리오 콜레라, 마이코박테리움 보비스, 시겔라, 바실러스, 유산균, 스테필로코커스, 코리네 박테리아, 리스테리아 모노싸이토제네스 및 스트랩토코커스를 사용할 수 있다.

[0008] 세포 내에서 발현된 Z-도메인은 α-나선형 링커를 통해 박테리아 세포의 외막(OM)에 자연적으로 존재하는 단백질인 β-배럴에 연결되어 외막에 고정된다. 이렇게 Z-도메인이 자가 표지된 세포는 항체와 결합하여 항체의 배향을 조절함으로써 면역검정 및 바이오센서의 감도를 향상시키는데 사용되었다.

[0009] Z-도메인을 포함하는 포도상구균 단백질 A는 인간, 래트, 기니피그 및 토끼를 포함한 다양한 포유동물 종의 항체에 대해 강한 결합 친화도를 갖는다. 그러나 빈번하게 사용되는 포유동물 종 중에서, 포도상구균 단백질 A는 마우스 IgG1 및 염소 IgG에 대해 약한 친화도를 갖는다는 단점이 있다.

[0010] 반면, 연쇄상구균 단백질 G는 마우스 및 염소 IgG에 대해 $14.3 \cdot 10^{-9}$ M^{-1}의 친화도 상수(평형 상수)값의 강한 결합 친화도를 가지며, 인간 및 토끼 IgG에 있어서도 포도상구균 단백질 A보다 더 큰 친화도 상수를 갖는다. 따라서 연쇄상구균 단백질 G의 자가 표지는 포도상구균 단백질 A보다 높은 항체 결합 친화도 및 배향 제어 효과를 보여, 면역센서 및 면역검정에 사용되었을 때 더 높은 민감도와 활용도를 나타낼 것으로 예상된다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) J.B. Fishman, E.A. Berg, Protein A and protein G purification of antibodies, Cold Spring Harbor Protocols, 2019(2019) pdb. prot099143.).

(비특허문헌 0002) M. Park, Orientation Control of the Molecular Recognition Layer for Improved Sensitivity: a Review, BioChip Journal, 13(2019) 82-94.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 항체를 이용한 면역센서 및 면역검정에 있어서 항체 결합 친화도 및 배향 제어 효과를 향상시키는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예에서 (a) 연쇄상구균의 단백질 G를 코딩하는 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; (b) 상기 재조합 벡터를 숙주세포에 형질전환하는 단계; 및 (c) 상기 형질전환된 숙주세포를 배양하여 상기 단백질 G를 숙주세포의 외막에 발현하는 단계를 포함하는, 자가 표지된

(autodisplayed) 연쇄상구균 단백질 G의 제조방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 다른 실시예에서, 연쇄상구균의 단백질 G를 코딩하는 서열을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 제조방법에 따라 제조된 자가 표지된(autodisplayed) 연쇄상구균 단백질 G를 제공한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 세포 외막에 연쇄상구균 단백질 G가 자가 표지된(autodisplayed) 숙주세포 및 이의 외막을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 자가 표지된 연쇄상구균 단백질 G는 높은 항체 결합 친화도 및 배향 제어 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 연쇄상구균 단백질 G의 자가 표지 과정(a) 및 자가 표지된 연쇄상구균 단백질 G가 고정된 세포 외막을 사용한 면역친화성 층의 구성(b)을 나타낸 도면이다(SP: 신호 펩티드, IM: 내막, PP: 주변 세포질 및 OM: 외막).

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 연쇄상구균 단백질 G가 자가 표지된 숙주세포의 외막 단백질을 전기영동으로 분석한 결과이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 자가 표지된 단백질 G의 IgG 결합 특성을 형광 표지된 항체로 시험한 결과이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 연쇄상구균 단백질 G가 자가 표지된 숙주세포를 기반으로 하는 면역검정 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[0020] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 구성을 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0021] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.

[0022] **실시예**

[0023] **재료 준비**

[0024] C-반응성 단백질(CRP)에 대한 염소 다중클론 항체, 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase, HRP)에 대한 염소 다중클론 항체, HRP로 표지된 CRP에 대한 염소 다중클론 항체, 및 인간 면역글로불린 IgG에 대한 플루오레세인 접합된 토끼 다중클론 항체를 Abcam(Cambridge, UK)으로부터 수득하였다. Tris-HCl 완충액(pH 8.0), Tris-glycine 완충액, 인산완충식염수(PBS), Luria-Bertani(LB) 배양액, 암피실린, 및 소듐 도데실 설페이트(SDS)-로딩 완충액을 LPS solution(대전, 한국)으로부터 구입하였다. 96-웰 마이크로플레이트를 SPL Life Sciences(포천, 한국)으로부터 입수하였다. 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB) 기질 키트를 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)으로부터 구입하였다. 트리톤 X-100, 이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG), 수크로스, 리소자임, HRP, CRP 및 기타 분석 등급 화학물질을 Merck(Darmstadt, Germany)로부터 수득하였다. 제한 효소로서 XhoI 및 KpnI, 그리고 리가아제는 New England Biolabs(Ipswich, MA, US)로부터 구입하

였다.

[0025] **제조예 1: 연쇄상구균 단백질 G 자가 표지 벡터의 제조**

[0026] 연쇄상구균 단백질 G(Uniprot: P06654)를 코딩하는 유전자는 5' 말단 XhoI 및 3' 말단 KpnI 제한 부위를 코딩하는 추가 서열을 사용하여 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 증폭되었다. PCR 산물을 KpnI 및 XhoI를 사용하여 절단하고 아가로스 겔을 이용한 전기영동법으로 확인하였다. 동시에, 유도성 자가 표지 벡터 pET-SH7을 동일한 제한효소 KpnI 및 XhoI을 사용하여 절단하였다. 상기 절단된 단백질 G를 코딩하는 PCR 산물과 pET-SH7을 모두 겔 추출 키트(Qiagen, Hilden, Germany)로부터 추출한 다음, 리가아제에 의해 라이게이션하여 단백질 G 자가 표지 벡터를 제조하고 이를 pJP002라 명명하였다(도 1 (a)).

[0027] **제조예 2: 세포 외막에 자가 표지된 연쇄상구균 단백질 G의 제조**

[0028] 단백질 G 자가 표지 벡터의 제조 후, pJP002 플라스미드를 열 충격에 의해 대장균(*E. coli*) BL21(DE3) 세포로 형질전환시켰다. 형질전환된 대장균 세포를 암피실린을 함유하는 LB broth 배지에서 밤새 37℃에서 격렬하게 진탕하면서 성장시켰다. 밤새 배양된 세포를 37℃에서 격렬하게 진탕하면서 광학 밀도(OD)가 0.5(600nm)에 도달할 때까지 신선한 배지로 100배 희석하였다. 다음으로, 자가수송체를 이용한 단백질 G의 유도를 위해 대장균 세포에 1mM IPTG를 첨가하고, 대장균 세포를 30℃에서 2시간 동안 배양하였다. 배양 후, 세포를 수확하고 OD600 값을 1.0으로 조정하였다.

[0029] **제조예 3: 자가 표지된 단백질 G를 포함하는 세포 외막(Outer Membrane)의 단리**

[0030] 단백질 G가 외막에 자가 표지된 대장균 세포의 경질 펩티도글리칸 층을 리소자임 처리에 의해 가수분해하여 스페로플라스트를 형성하였다. 이어서, 단리된 외막(OM) 입자를 형성하기 위해 트리톤 X-100을 함유하는 추출 완충액을 스페로플라스트에 첨가하였고, 생성된 OM 입자는 순차적 원심분리에 의해 정제되었다.

[0031] **실험예 1: 분리된 세포 외막 입자의 전기영동 분석**

[0032] 상기 제조예 3에 따라 분리된 OM 입자의 자가 표지된 단백질 G를 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE)에 의해 분석하였다.

[0033] 또한 OM 입자를 95℃에서 15분 동안 소듐 도데실 설페이트와 혼합하여 변성시키고, 30mA의 정전류로 폴리아크릴아미드 겔 전기영동을 사용하여 분리하였다. 분리 후 겔 내의 단백질은 쿠마시 블루로 처리하여 염색하고, ChemiDoc 겔 이미징 시스템(Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, 미국)을 사용하여 영상화하였다.

[0034] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 각각 37kDa 및 35kDa의 분자량을 갖는 외막 단백질(Omp) F 및 OmpA는 두 개의 가장 일반적인 포린이며, 도 2의 37 kDa 주변의 투명한 밴드에서도 발견된다. 이는 OM이 SDS-PAGE에 의해 성공적으로 격리되고 시각화되었음을 의미한다.

[0035] 또한, 자가 표지 벡터가 없는 형질전환되지 않은 대장균 세포의 OM(lane 1)과 비교하여, 단백질 G가 자가 표지된 대장균 세포의 OM(lane 2)은 70 kDa에서 추가로 뚜렷하게 두꺼운 밴드를 나타내었다. 이러한 밴드의 크기는 신호 펩티드가 없는 완전 자가수송체 융합 단백질의 아미노산 서열로부터 계산된 분자량과 일치하였다. 이는 자가 표지 벡터의 형질전환이 단백질 G를 표적으로서 포함하는 자가수송체를 생성하고, 발현된 단백질이 대장균 세포의 OM에 고정되었음을 의미한다. OmpA는 세포당 10^5개의 분자로 존재하는 것으로 알려져 있으며, 따라서 밀도측정법에 의해 단백질 G 자가수송체의 발현 수준을 계산하기 위한 내부 표준으로서 사용되었다. 밀도측정법을 사용하여, 단백질 G는 세포당 2×10^6 copies의 밀도를 갖는 것으로 결정되었다. 이 숫자는 자가 표지된 단백질 G가 고밀도로 대장균 세포 상에서 발현되고 표시되었음을 나타낸다.

[0036] **실험예 2: 자가 표지된 단백질 G의 IgG 결합 특성 시험**

[0037] 상기 제조예 2에 따른 자가 표지된 단백질 G의 IgG 결합 특성을 형광 표지된 항체로 염색하여 시험하였다. 인간 IgG를 단백질 G 자가 표지된 대장균 세포에 1시간 동안 첨가하고, 플루오레세인으로 표지된 인간 IgG에 대한 이차 항체를 순차적으로 1시간 동안 첨가한 다음, 세포를 유리 슬라이드에 놓고 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0038] 도 3에 나타난 바와 같이, 단백질 G 자가 표지된 대장균 세포는 강렬한 형광 신호를 나타내었으며, 이는 플루오레세인 표지된 항체의 결합을 나타낸다. 대조적으로, 형질전환되지 않은 대장균 세포는 항체 처리 후에도 유의한 형광 신호를 나타내지 않았다. 형광 이미지를 위상 이미지 상에 오버레이했을 때, 모든 단백질 G 자가 표지 대장균 세포가 형광을 나타내었다. 이는 단백질 G가 모든 대장균 세포에서 자가 표지되었고 특이적 항체 결합

활성을 유지하였음을 나타낸다.

[0039] 또한, 항체가 대장균의 막을 통과할 수 없기 때문에 단백질 G는 대장균 세포의 OM에 자가 표지 되었음을 보여준다. 이들 결과로부터, 단백질 G는 IgG 결합 활성과 함께 고밀도로 대장균 세포의 OM에 자가 표지되는 것으로 확인되어, 향후 면역검정 및 바이오센서에 적용하기에 적합한 것으로 나타났다.

[0040] **실험예 3: 단백질 G로 자가 표지된 대장균 세포에 기초한 면역검정**

[0041] 상기 제조예 2에 따른 단백질 G 자가 표지 대장균을 면역검정에 적용하고 항체 고정화를 위한 고체 지지체로서 활용하였다. 자가 표지된 단백질 G의 IgG 결합 친화도를 단백질 A의 B 도메인으로부터 조작된 단백질인 자가 표지된 Z-도메인과 비교하였다. HRP는 퍼옥시다제가 검출 항체 처리 없이 비색, 형광 또는 발광을 사용하여 TMB와 같은 다양한 기질에 의해 과산화물의 존재 하에서 직접 정량화될 수 있기 때문에, 모델 분석물로 선택되었다. 자가 표지된 친화성 단백질로 대장균 세포를 제조하고, 1h 동안 포획 항체 및 염소 다중클론 항-HRP의 다양한 농도로 재현탁시켰다. 세척 후, 분석물 HRP의 1 ng/mL를 1h 동안 처리하였다. 대장균 세포에 결합된 HRP는 TMB 발색 반응에 의해 정량화되었고, OD 값은 도 4 (a)에 기재된 바와 같이 450 nm의 파장에서 측정되었다.

[0042] 단백질 G 및 Z 도메인 자가 표지된 대장균 모두 항-HRP 농도 증가와 함께 OD_{450nm} 값 증가를 보였다. 이는 두 자가 표지된 친화성 단백질 모두가 염소 다중클론 항체와 결합 친화도를 갖는다는 것을 나타낸다. 그러나, 단백질 G 자가 표지 대장균(■)은 모든 항-HRP 농도에서 Z-도메인(●)보다 더 높은 OD_{450nm} 값을 나타내었다. 또한, 불변 HRP의 검출에 필요한 최소 항체 농도는 자가 표지 단백질 G 및 Z-도메인에 대해 각각 150 및 500 ng/mL로 계산되었다. 이들 수치는 자가 표지된 단백질 G가 Z-도메인보다 염소 항체에 대한 더 높은 친화도를 갖는다는 것을 나타낸다. 두 개의 자가 표지된 친화성 단백질 사이의 신호 차이는 항체의 농도가 2.3 μg/mL에 도달하고 그 농도 후에 포화될 때까지 증가하였다(도 4 (a), inlet). 이러한 결과로부터, 면역검정 및 바이오센서 응용을 위한 포획 항체의 최적 농도는 2.3 μg/mL였다.

[0043] HRP 및 CRP 면역검정은 단백질 G 자가 표지 대장균 세포를 사용하여 수행하였다. 도 4 (b)에 나타낸 바와 같이, 대장균 세포 기반 면역검정은 0.1 - 300 ng/mL의 HRP 농도 범위에서 수행되었다. 단백질 G 자가 표지 대장균(■)의 분석 곡선은 시그모이드(sigmoidal) 성장 곡선을 보여주었고 100ng/mL HRP로 포화에 도달했다. 검출 한계 (LOD)는 세 시그마를 사용하여 평가되었으며 동적 범위 1-100 ng/mL로, 약 1 ng/mL로 계산되었다.

[0044] IgG 결합 친화도를 단백질 G와 비교하기 위해, Z-도메인 자가 표지 대장균 세포(▲)를 고체 지지체로서 시험하고 20 ng/mL의 LOD를 나타냈다. 분석 곡선은 300 ng/mL의 HRP 농도에서 포화되지 않았다. 이러한 결과는 단백질 G가 단백질 A보다 염소 IgG에 대해 훨씬 더 높은 결합 친화도를 가지며, 심지어 이들 친화성 단백질의 자가 표지 이후에도 그러함을 시사한다.

[0045] 또한, 항체의 배향 효과를 확인하기 위해, HRP 면역검정에 의해 수행될 수 있도록 랜덤 배향(▼)을 갖는 간단한 물리적 흡착에 의해 마이크로플레이트 상에 고정화되었다. 물리적 흡착 분석의 OD_{450nm} 값은 모든 HRP 농도에서 단백질 G 자가 표지 대장균의 값보다 낮았으며, 이 분석의 LOD는 20 ng/mL로 추정되었다. 이러한 결과는 단백질 G 자가 표지 대장균 세포의 민감도가 항체의 배향 조절에 의해 개선되었음을 나타낸다.

[0046] 대조적으로, 자가 표지 벡터가 없는 무손상 대장균 세포(●)를 사용한 검정은 HRP의 최대 100ng/mL까지 유의한 증가를 보이지 않았다. 이는 무손상 대장균 세포가 어떠한 차단 단계 없이 비특이적 결합을 감소시킬 수 있음을 의미한다.

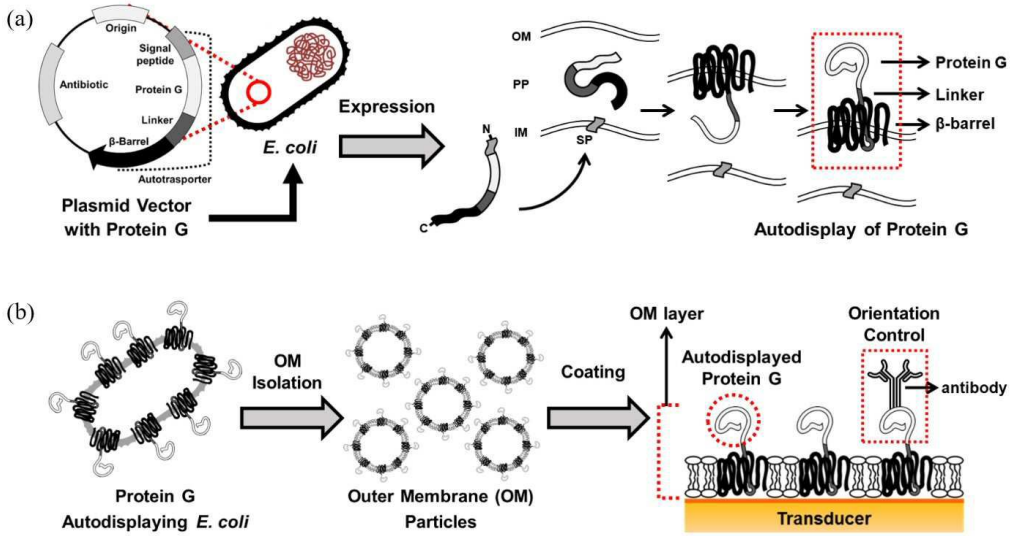
[0047] 면역검정에 대한 적용 가능성의 확인에 기초하여, CRP는 0.25 - 1,000 ng/mL의 농도 범위에서 단백질 G 자가 표지 대장균 세포를 사용하여 검출되었다 (도 4 (c)). CRP는 간에서 합성된 혈청 단백질이며, 감염, 자가면역 질환, 류마티스 관절염, 신증후군 및 만성 신부전과 같은 다양한 염증성 질환의 진단에 널리 사용되는 바이오마커이다. HRP 면역검정과 유사하게, 단백질 G(■)에 대한 분석 곡선은 시그모이드 성장 곡선을 나타내었다. 이 경우, 곡선은 300 ng/mL의 CRP 농도에서 포화되었다. 단백질 G 자가 표지 대장균 세포에 기초한 CRP 면역검정의 LOD는 2 ng/mL로 추정되었다. 따라서, CRP 면역분석의 동적 범위는 2 ng/mL 내지 300 ng/mL 범위로 확인되었다. Z-도메인 자가 표지 대장균 세포(▲)는 모든 CRP 농도에서 단백질 G(■)보다 낮은 OD_{450nm} 값을 보였고 LOD는 4 - 200 ng/mL의 동적 범위로 4 ng/mL로 계산되었다. 포화에서, 단백질 G는 Z-도메인보다 3배 더 높은 OD_{450nm} 값을 나타내었다. 이는 염소 IgG에 대한 결합 친화도의 차이 때문에 단백질 G의 결합능이 Z-도메인의 결합능보다 높다는 것을 나타낸다. Z-도메인과 유사한 물리적 흡착(▼)의 경우, OD_{450nm} 값은 모든 CRP 농도에서 단백질 G의 값

보다 낮았으며, 이 분석의 LOD는 6 ng/mL로 계산되었다. 대장균 세포에 자가 표지된 단백질 G-기반 면역검정은 Z-도메인 또는 물리적 흡착보다 세 배 높은 LOD를 나타내었다. 단백질 G가 Z 도메인보다 더 강한 결합 친화도를 갖기 때문에, LOD 차이는 자가 표지된 대장균 세포에 결합된 항체의 양의 차이에서 비롯된다. 무작위 배향을 갖는 물리적 흡착과 비교하여, 감도는 자가 표지된 단백질 G의 배향 제어에 의해 개선된다. 이들 데이터로부터, 단백질 G 자가 표지 대장균은 Z-도메인보다 염소 IgG에 대해 더 강한 결합 친화도를 갖는 것으로 확인되었고, 항체의 배향 조절로 인해 감도를 향상시킬 수 있는, 항체 고정화를 위한 고체 지지체로서 면역검정에 적용하기에 적합하다는 것을 확인할 수 있었다.

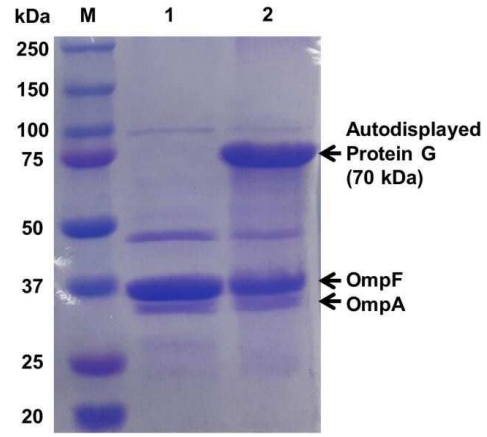
[0048] 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

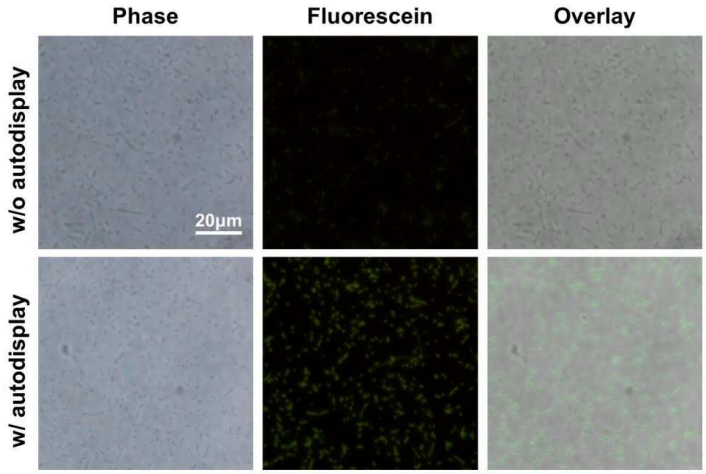
도면1



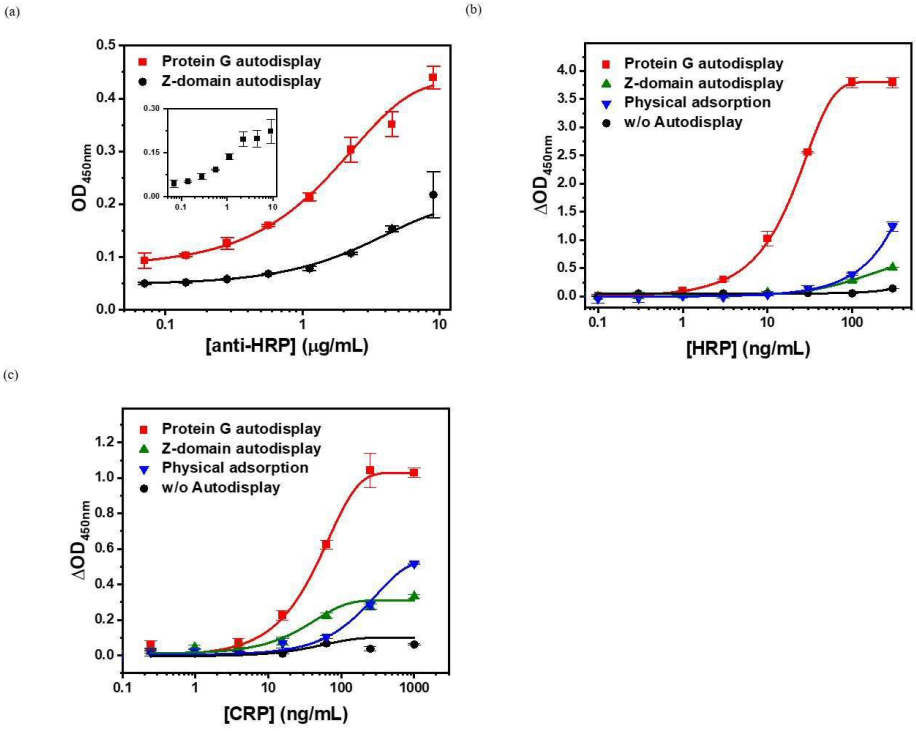
도면2



도면3


Phase
Fluorescein
Overlay
w/o autodisplay
w/ autodisplay
20μm

도면4


(a)
Protein G autodisplay
Z-domain autodisplay
OD450nm
[anti-HRP] (μg/mL)
(b)
Protein G autodisplay
Z-domain autodisplay
Physical adsorption
w/o Autodisplay
ΔOD450nm
[HRP] (ng/mL)
(c)
Protein G autodisplay
Z-domain autodisplay
Physical adsorption
w/o Autodisplay
ΔOD450nm
[CRP] (ng/mL)