

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호
WO 2012/081908 A2

(43) 국제공개일
2012년 6월 21일 (21.06.2012)

- (51) 국제특허분류:
C12N 15/115 (2010.01) A61K 31/7105 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) C12R 1/44 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2011/009631
- (22) 국제출원일: 2011년 12월 14일 (14.12.2011)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2010-0129767 2010년 12월 17일 (17.12.2010) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **한국 식품연구원 (KOREA FOOD RESEARCH INSTITUTE)** [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 백현동 516, 463-746 Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자; 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **조용진 (CHO, Yong Jin)** [KR/KR]; 서울 송파구 잠실동 잠실엘스 138동 404호, 138-220 Seoul (KR). **김철진 (Kim, Chul Jin)** [KR/KR]; 경기도 경기 성남시 분당구 금곡동 청솔마을 동아아파트 1002-902, 463-941 Gyeonggi-do (KR). **김남수 (Kim, Nam Soo)** [KR/KR]; 서울 동대문구 답십리 2동 두산아파트 107-402, 130-754 Seoul (KR). **김종태 (Kim, Chong Tai)** [KR/KR]; 경기도 성남시 분당구 구

미동 무지개마을 1208-1801, 463-714 Gyeonggi-do (KR). **맹진수 (Maeng, Jin Soo)** [KR/KR]; 경상남도 창원시 마산합포구 월포동 2-147 한성가고파아파트 805, 631-410 Gyeongsangnam-do (KR). **이성욱 (Lee, Seong Wook)** [KR/KR]; 서울 성북구 석관 1동 두산아파트 121-602, 136-761 Seoul (KR). **이영주 (Lee, Young Ju)** [KR/KR]; 서울 노원구 공릉 2동 태강아파트 1018-1501, 139-773 Seoul (KR). **한승철 (Han, Seung Ryul)** [KR/KR]; 서울 구로구 고척 1동 벽산블루밍아파트 210-2203, 152-784 Seoul (KR).

- (74) 대리인: **김영관 (KIM, Young Kwan)**; 서울 서초구 반포동 736-8 신대양빌딩 801호, 137-810 Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[다음 쪽 계속]

(54) Title: RNA APTAMER FOR TEIOCOIC ACID IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS

(54) 발명의 명칭 : 포도상구균의 테이코산에 대한 RNA 앵타머

[Fig. 6]

(57) Abstract: The present invention relates to a RNA aptamer for teiocoic acid in staphylococcus aureus, and more particularly, to a RNA aptamer that specifically binds the teiocoic acid in staphylococcus aureus, which is useful for detecting the teiocoic acid in staphylococcus aureus, a primary cause for food poisoning, etc., by having a base sequence of sequence number 1, in which the hydroxyl group of uracil (U) and cytosine (C) are substituted with a fluoro group, which can prevent rotting of food products by specifically binding to and suppressing the activity of the teiocoic acid in staphylococcus aureus, and which is useful for preventing and treating a disease selected from a group consisting of staphylococcal pneumonia, septicemia, osteomyelitis, staphylococcal enteritis, food poisoning, staphylococcal scalded skin syndrome (SSSS), and toxic shock syndrome (TSS).

(57) 요약서: [요약] 본 발명은 포도상구균의 테이코산에 대한 RNA 앵타머에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 포도상구균의 테이코산에 특이적으로 결합하고, 그 염기 중 우라실(U) 및 시토신(C)의 2' 히드록실기가 플루오르기로 치환되어 있는 서열번호 1의 염기서열을 가짐으로써 식중독 등의 주요 원인이 되는 포도상구균의 검출에 유용하고, 포도상구균에 특이적으로 결합하여 그 작용을 억제함으로써 식품의 부패를 방지할 수 있으며, 포도상구균성 패혈증, 패혈증, 골수염, 포도상구균장염, 식중독, 포도상구균성 열상유사증후군(SSSS) 및 독소성 충격증후군(TSS)으로 이루어진 군에서 선택된 질환의 예방 및 치료에 유용한 RNA 앵타머에 관한 것이다. [대표도] 도 6

Clone 2

WO 2012/081908 A2



(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

명세서

발명의 명칭: 포도상구균의 테이코산에 대한 RNA 앵타머 기술분야

- [1] 본 발명은 포도상구균(*Staphylococcus aureus*)에 특이적으로 결합하는 RNA 앵타머에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 포도상구균은 황색포도상구균으로도 불리며 피부감염, 연조직 감염, 골관절염, 폐렴, 균혈증, 식중독 등을 일으키는 병원균으로 적절한 항생제 치료를 하지 못했을 때 이환율과 치명률이 높다. 황색포도상구균 자체는 80°C에서 30분간 가열하면 죽지만 황색포도상구균이 생산한 장 독소는 100°C에서 가열하여도 파괴되지 않기 때문에 황색포도상구균에 오염된 식품을 가열하여도 식중독을 유발할 수 있게 된다. 이러한 황색포도상구균은 자연계에 널리 퍼져 있고 여러 종류의 식품에서 증식이 가능하기 때문에 그 원인식품 또한 매우 다양하다.
- [3] 황색포도상구균 감염은 비강정착자에게서 자주 발생하고 중환자실에는 메티실린 내성 황색포도상구균(Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*, MRSA)에 감염되거나 집락이 형성된 환자들이 입원하기 쉽기 때문에 이들 환자들에서 다른 환자들에게로 전염이 일어날 가능성이 매우 높다. 따라서 선별검사를 통하여 적절한 예방조치를 취하는 것이 중요하다.
- [4] 이와 같은 필요성으로 인해 오랫동안 감염질환 원인균인 포도상구균을 동정하고자 하는 진단방법들이 연구 및 개발되어 왔다. 지난 10년 동안에 많은 미생물을 검출하는데 상당한 진보가 있어 왔지만 현재 이용되고 있는 진단방법들은 여전히 많은 노동을 필요로 하고 있고 민감도 및 특이성이 낮은 형편이다.
- [5] 한편, 앵타머는 짧은 가닥의 올리고 뉴클레오타이드로 높은 친화도와 특이성으로 표적물질에 결합할 수 있는 3차원 구조를 형성하고 있다. 이러한 앵타머의 대부분은 표적 단백질에 특이적으로 결합할 수 있을 뿐만 아니라 효율적으로 그 기능을 억제할 수도 있어 표적 단백질의 기능을 알아내는데 이용될 수 있다.
- [6] 항체(antibody)의 대체물질로 인식되는 앵타머는 항체와 마찬가지로 검출분석시스템에서 분자를 인식할 수 있는 바이오센서의 요소로 이용될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 기반의 앵타머는 단백질 기반의 항체에 비하여 몇 가지 장점을 가지는데 첫째, 앵타머의 수득은 생체 외(in vitro)에서 이루어지며, 둘째, 독소를 비롯한 다양한 유기물과 무기물들이 앵타머의 표적 분자로 이용될 수 있으며, 셋째, 일단 표적분자에 특이적으로 결합하는 특정 앵타머가 확인되어 수득되면 자동화된 올리고머 합성방법에 의해 낮은 비용과 높은 일관성(batch-consistency)으로 재생산이 가능하다. 또한, 앵타머는 형광분자

또는 광반응성 그룹 등과 같은 유용한 기능 그룹들을 도입하는 것이 항체에 비해 상대적으로 용이하며, 그 구조도 열에 의한 변성-회복과정(denaturation-renaturation)이 가역적이므로 항체에 비해 긴 시간의 활성을 가질 수 있다.

- [7] 이러한 장점을 지닌 앵타머 중 RNA 앵타머는 반복된 생체 외 선별과정을 통해 임의의 RNA 라이브러리로부터 특이적인 RNA분자, 즉 앵타머를 선별하는데, RNA라이브러리의 사이즈가 크고 생체 외 효소작용에 의하므로 RNA 라이브러리는 고 친화도 앵타머를 선별하기 위한 다른 생물학적 라이브러리 또는 합성 라이브러리보다 우수하다. 이리하여 치료제로서 RNA 앵타머의 잠재적인 용도에 대한 흥미가 증가하고 있으며 고 친화도 RNA 앵타머는 SELEX 과정에 의해 선별될 수 있다.
- [8] 또한, RNA 앵타머는 표적 단백질에 넓은 결합부위를 제공하기 때문에 작은 화학물질보다 억제제로서 이점이 있다. 또한, 병리학적인 단백질-단백질 상호작용은 RNA 앵타머의 훌륭한 표적이 될 수 있는데 이는 고 친화도 RNA가 표적 단백질에 결합하여 복합체에서 다른 단백질과의 결합을 방해하기 때문이다. 더욱이 RNA 앵타머는 세포에서 RNA 벡터시스템을 이용하여 인트라머로 발현될 수 있다.
- [9] 그리하여 이러한 앵타머를 이용한 다양한 약제에 대한 특허들이 제안된 바 있으며 한국 특허공개 제2004-14307호에는 응고 및 섬유소 용해를 촉진하는 RNA 앵타머를 제시하고 있다. 그러나 포도상구균의 테이코산에 특이적으로 결합하는 RNA 앵타머에 대해서는 공개되어 있지 않은 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명은 포도상구균의 테이코산의 RNA 분해효소 저항성 RNA 앵타머 및 이의 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [11] 본 발명은 포도상구균의 테이코산에 특이적으로 결합하며, U(우라실)와 C(시토신)의 2' 히드록실기가 플루오르기로 치환되어 있는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 RNA 분해효소 저항성 RNA 앵타머를 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 위 RNA 앵타머를 포함하는 바이오 센서를 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 위 RNA 앵타머를 포함하는 포도상구균성 폐렴, 패혈증, 골수염, 포도상구균장염, 식중독, 포도상구균성 열상유사증후군(SSSS) 및 독소성 충격증후군(TSS)의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 식품 첨가제 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [14] 본 발명의 RNA 앵타머는 식중독의 주요 원인이 되는 포도상구균의 테이코산에 특이적으로 결합함으로써 포도상구균의 검출에 유용하다.

- [15] 본 발명의 RNA 앵타머는 포도상구균에 특이적으로 결합하여 그 작용을 억제함으로써 식품의 부패를 방지할 수 있다.
- [16] 본 발명의 RNA 앵타머는 포도상구균에 의한 여러 질환, 즉 포도상구균성 폐렴, 패혈증, 골수염, 포도상구균장염, 식중독, 포도상구균성 열상유사증후군(SSSS) 및 독소성 충격증후군(TSS)의 예방 및 치료용 약학 조성물에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 포도상구균의 테이코산에 결합하는 RNA 앵타머를 선별하기 위한 SELEX 방법을 나타낸다.
- [18] 도 2 및 3은 발굴된 6번 SERNA 앵타머 클론이 포도상구균에 특이적으로 결합하는지 확인하기 위하여 실시간 PCR을 수행한 결과를 나타낸다.
- [19] 도 4는 발굴된 6번 SERNA 앵타머 클론들의 염기서열분석결과를 나타낸다.
- [20] 도 5는 발굴된 6번 SERNA 앵타머 클론들 중 포도상구균의 테이코산에 높은 친화도로 결합하는 최적화된 앵타머를 선별하기 위하여 실시간 PCR을 수행한 결과이다.
- [21] 도 6은 선별된 클론 #2 RNA 앵타머의 구조를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [22] 본 발명은 포도상구균의 테이코산에 특이적으로 결합하고, 그 염기 중 우라실(U) 및 시토신(C)의 2' 히드록실기가 플루오르기로 치환되어 있는 서열번호 1의 염기서열을 가짐으로써 식중독 등의 주요 원인이 되는 포도상구균의 검출에 유용하고, 포도상구균에 특이적으로 결합하여 그 작용을 억제함으로써 식품의 부패를 방지할 수 있으며, 포도상구균성 폐렴, 패혈증, 골수염, 포도상구균장염, 식중독, 포도상구균성 열상유사증후군(SSSS) 및 독소성 충격증후군(TSS)으로 이루어진 군에서 선택된 질환의 예방 및 치료에 유용한 RNA 앵타머에 관한 것이다.
- [23] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [24] 본 발명의 RNA 앵타머는 특정의 구조를 갖는 포도상구균의 테이코산에 특이적으로 결합하는 것이다. 본 발명의 RNA 앵타머는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니며 서열번호 1의 염기서열에 임의의 염기서열을 추가로 포함하는 것이라도 포도상구균의 테이코산에 특이적으로 결합할 수 있는 것이라면 실질적으로 본 발명의 RNA 앵타머와 동일하다고 볼 수 있다.
- [25] 서열번호 1의 염기서열 중 우라실(U) 및 시토신(C)은 그 2' 히드록실기가 플루오르기로 치환된 것이다. 이러한 변형은 RNA 분해 효소에 저항성 있는 RNA를 제조하기 위해 수행된다.
- [26] 본 발명의 RNA 앵타머는 식중독을 일으키는 주요 균주 중 하나인 포도상구균에 특이적으로 결합하기 때문에 음료 등의 식품에 포도상구균이

포함되어 있는지를 확인할 수 있고, 환자가 포도상구균에 의한 여러 질환, 즉 포도상구균성 폐렴, 패혈증, 골수염, 포도상구균장염, 식중독, 포도상구균성 열상유사증후군(SSSS) 및 독소성 충격증후군(TSS)에 걸렸는지를 확인하는 센서로 기능할 수 있다.

- [27] 또한, 본 발명의 RNA 앵타머는 포도상구균에 특이적으로 결합하여 그 기능을 저하시킬 수 있기 때문에, 이를 포함하는 약학 조성물은 포도상구균에 의한 여러 질환, 즉 포도상구균성 폐렴, 패혈증, 골수염, 포도상구균장염, 식중독, 포도상구균성 열상유사증후군(SSSS) 및 독소성 충격증후군(TSS)의 예방 또는 치료에 효과적일 수 있다.
- [28] 또한, 본 발명의 RNA 앵타머를 식품 첨가제에 포함시켜 사용하면 포도상구균의 번식을 막을 수 있다.
- [29] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 이는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 하기 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

[30]

[31] 실시예

[32] 실시예 1

[33] 1. RNA 앵타머의 발균

[34] SELEX 과정을 수행하는데 필요한 RNA 라이브러리를 제조하기 위하여 먼저 40개의 염기가 무작위로 들어간 단일 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)를 주형으로 이용하여

[35] 5'-프라이머(5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGGAAGCGTGCTGG G-3')와

[36] 3'-프라이머(5'-GGGGGGATCCATCGACCTCTGGGTTATG-3')로 PCR을 통해 DNA 라이브러리를 제작하였다. 5'-프라이머는 RNA를 합성하기 위한 T7 RNA 중합효소 프로모터 부분을 포함하고 있다.

[37] 0.25 μ M의 5'-프라이머, 0.25 μ M의 3'-프라이머, 10X PCR 버퍼, 200 μ M의 dNTP 혼합물, DNA taq 중합효소(Finzzyme) 3 유닛을 혼합하여 PCR을 수행하였다. PCR 주기로는 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초의 조건으로 10 사이클을 반복한 뒤, 마지막으로 72°C에서 7분으로 다양한 DNA 라이브러리를 제조하였다.

[38] PCR을 통해 만들어진 DNA 라이브러리를 주형으로 T7 RNA 중합효소(Epicentre Technologies)를 이용하여 시험관 내 전사 과정을 거쳐 다양한 염기서열을 갖는 RNA 라이브러리를 제조하였다. 이때 RNA 분해 효소에 저항성 있는 RNA를 제조하기 위하여 2' 테옥시 2' 플루오로 CTP와 UTP (Epicentre Technologies) 그리고 정상적인 GTP와 ATP들과 T7 RNA 중합효소를 이용하여 시험관에서 합성된 주형의 전사에 의해 플루오로 그룹으로 매 2번 위치가

- 피리미딘기로 변형된 RNA를 생산하였다.
- [39] 구체적으로 DNA 라이브러리, 5X 전사 버퍼, 5mM DTT, 5mM ATP, GTP, 2'-F CTP, 2'-F UTP, T7 RNA 중합효소, DEPC-H₂O로 20 μ l로 맞추고 37°C에서 6시간 동안 반응시켰다. DNaseI(Epicentre Technologies)를 처리하여 37°C에서 30분간 처리하여 주형으로 사용된 DNA를 제거한 후 7M 유레아-8% 폴리아크릴아미드 겔에서 RNA 라이브러리를 추출하였다.
- [40] 얻어진 아래의 RNA 라이브러리 염기서열은 A, G, C 및 U가 각각 위치의 같은 몰로 혼합된 40개의 뉴클레오티드를 나타내는 N40
- [41] (5'GGGAGAGCGGAAGCGTGTGGCCN40CATAACCCAGAGGTCGATGGA TCCCCC 3')이었다.
- [42] 도 1은 SELEX 방법을 이용한 포도상구균의 테이코산에 특이적인 RNA 앵타머를 발굴하는 개략도를 나타내며 이하 SELEX 방법을 이용한 포도상구균의 테이코산에 특이적인 RNA 앵타머 발굴과정을 상세히 설명한다.
- [43] 처음 300 피코몰의 테이코산을 폴리스티렌 96 well에 100 μ l 고정화 완충액 (1% BSA, 1XPBS)에서 16시간 동안 고정화했다. 그 후 200 μ l 결합 완충액 (30mM TrisHCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 2mM 디티오프레이트, 및 1% BSA)으로 2회 씻어낸 후 300 피코몰의 RNA 라이브러리를 테이코산을 처리하지 않은 빈 well에 실온에서 20분 동안 반응시켜 well에 결합하는 RNA를 제거한 뒤 테이코산이 고정화되어 있는 well에 옮겨 실온에서 20분간 반응시켰다. 결합 완충액 200 μ l로 3회 씻어낸 후 95°C에서 데워져 있는 DEPC-H₂O 200 μ l를 넣어주어 테이코산과 결합하여 있는 RNA를 변성시켜 얻어내었다. 이렇게 얻어진 RNA를 역 전사-유전자 증폭기술과 시험관 전사를 반복하여 6번의 셀렉션 후 증폭된 DNA를 클로닝한 다음 22개의 클론의 염기서열을 분석하였다.
- [44] 도 4는 위 과정을 거쳐 선별된 6번 SERNA 앵타머 클론들의 염기서열 분석결과를 나타낸 것이며 구체적인 염기서열은 이하와 같다.
- [45] GGGAGAGCGGAAGCGUGCUGGGCCGGGAAGUUUUGAUACGGCUUCAUG CAAGUAAUGUUUUUAUCAUAACCCAGAGGUCGAUGGAUCCCCC(클론 # 2 RNA 앵타머)
- [46] GGGGCGGAAGCGUGCUGGGCCAGGAUAGGGGAUGAAGAAAAAAGAA GGGUGCCGUGGGCGCAUAACCCAGAGGUCGAUGGAUCCCCC(클론 # 4 RNA 앵타머)
- [47] GGGAGAGCGGAAGCGUGCUGGGCCGUGAAGAAAAGGGGCGGAUUGG GUAGUAGGGAGGAGAUCCAUAACCCAGAGGUCGAUGGAUCCC(클론 # 5 RNA 앵타머)
- [48] GGGAGAGCGGAAGCGUGCUGGGCCUAUGACAUAAGGUGGGCUGGGGAAG CUAGAGCAUGUAAGGCAUAACCCAGAGGUCGAUGGAUCCC(클론 # 6 RNA 앵타머)
- [49] GGGAGAGCGGAAGCGUGCUGGGCCACUUGGGGACGACGAGUAGAUAGU

- AAGGUGGAGACCUUGGUCAUAACCCAGAGGUCGAUGGAUCCCCC(클론 # 7 RNA 앵타머)
- [50] GGGAGAGCGGAAGCGUGCUGGGCCGUUAAUACGGUGUCUUUUUCGGUC GUGUAUAAAACGGAAUCAUAACCCAGAGGUCGAUGGAUCCCCC(클론 # 10 RNA 앵타머)
- [51] GGGAGAGCGGAAGCGUGCUGGGCCUCCGAACAGCGGAAGGUGGUUCGA AGUUGGGGCUUUGGACAUAACCCAGAGGUCGAUGGAUCCCCC(클론 # 11 RNA 앵타머)
- [52] GGGAGAGCGGAAGCGUGCUGGGCCUAGGACAGUUCGUCCUCAUUACAU CGCCGCCUAACACAUCCAUAACCCAGAGGUCGAUGGAUCCCCC(클론 # 14 RNA 앵타머)
- [53] GGGAGGCGGAAGCGUGCUGGGCCUAGAAGUAGCCUGCUACGCAUGGU CGACUUCAAGAAUCGCAUAACCCAGAGGUCGAUGGAUCCCCC(클론 # 16 RNA 앵타머)
- [54] GGGAGAGCGGAAGCGUGCUGGGCCUCCGAACAGCGGAAGGUGGUUCGA AGUUGGGGCUUUGGACAUAACCCAGAGGUCGAUGGAUCCCCC(클론 # 17 RNA 앵타머)
- [55] GGGAGAGCGGAAGCGUGCUGGGCCUCCGAACAGCGGAAGGUGGUUCGA AGUUGGGGCUUUGGACAUAACCCAGAGGUCGAUGGAUCCCCC(클론 # 19 RNA 앵타머)
- [56] GGGAGAGCGGAAGCGUGCUGGGCCAGUCUGACCACGUAGACAGUUCUA UUACUUUACGUCGAGACAUAACCCAGAGGUCGAUGGAUCCCCC(클론 # 21 RNA 앵타머)
- [57] GGGAGAGCGGAAGCGUGCUGGGCCACAGUGUUCUAAUGCGACAAUGGA GUCUGUGGCAAAGUGUCAUAACCCAGAGGUCGAUGGAUCCCCC(클론 # 23 RNA 앵타머)
- [58] GGGAGAGCGGAAGCGUGCUGGGCCUCUCAGGCCGACAUAUCUGAGAAC GCGAGGCGUAUUGAAGCAUAACCCAGAGGUCGAUGGAUCCCCC(클론 # 24 RNA 앵타머)
- [59] GGGAGGCGGAAGCGUGCUGGGCCUUCAAGUAGGGGCGGUUUACUAUCU GGAUCUUGUAGUUAUCAUAACCCAGAGGUCGAUGGAUCCCCC(클론 # 26 RNA 앵타머)

[60]

[61] 2. 발골된 앵타머(6번 SERNA 앵타머 클론)의 포도상구균의 결합 어세이(실시간 PCR 이용)

[62] 6th SERNA 앵타머 클론이 포도상구균에 특이적으로 결합하는지 확인하기 위하여 실시간 PCR을 3회 수행하여 테이코산에 결합한 RNA양을 측정하였고 그 결과는 도 3에 나타내었으며 도 2는 CT값을 나타낸 것이다. 도 2를 살펴보면 1, 2,

3회 모두 테이코산 + 6번 RNA 앵타머(1) 및 테이코산 + 6번 RNA 앵타머(2)의 CT값이 대조군들에 비해 비교적 낮게 산출되었으며, 상대적인 RNA양도 6번 앵타머+PBS는 327.4를 나타내는데 비해 6번 앵타머 + 테이코산은 1684.4를 나타내는 것으로 보아 이로써 선별된 6번 SERNA 앵타머 클론이 테이코산에 결합함을 확인하였다.

- [63] 이하, 6번의 SELEX 과정이 수행된 RNA와 초기의 RNA 라이브러리를 이용하여 수행된 RT PCR과 실시간 PCR과정에 대해 상세히 설명한다.
- [64] 6번의 SELEX 과정이 수행된 RNA와 초기의 RNA 라이브러리 각각 300펩토몰과 테이코산을 각각 반응시켜 테이코산에 결합하는 RNA를 얻어내었다.
- [65] 폐놀 추출물/에탄올 침적 과정을 통해 RNA를 얻어낸 후 DEPC-H₂O를 넣어 RNA를 녹이고 여기에 200nM 3' 프라이머를 넣고 65°C에서 5분간 가열한 뒤 상온에서 10분간 RNA와 3' 프라이머를 결합시켰다.
- [66] 1mM dNTP, 5X RTase 버퍼, 200 유닛 M-MLV RTase (Finzzyne)를 첨가하여 42°C에서 1시간 반응한 뒤 95°C에서 5분간 RTase를 불활성화시켰다. 역 전사한 단일 DNA 중 1/3만 PCR 주형으로 사용하였다.
- [67] 이때, 생성된 DNA의 실시간 양을 측정하기 위해 실시간 PCR (Rotor Gene RG-6000)을 다음과 같은 조건으로 사용하였는데 구체적으로 cDNA, 100nM 5'프라이머, 100nM 3' 프라이머, 10X PCR 버퍼 10 μ l, 500 μ M dNTP, 5X RTase 버퍼 7 μ l, 100X Syber green, 2 유닛 Taq 중합효소(Finzyne)를 혼합하여 처음 95°C에서 5분간 유지한 후 95°C에서 30초, 58°C에서 30초, 72°C에서 30초의 조건으로 40 사이클을 반복하여 얻어진 RNA의 양을 측정하였다.

[68]

[69] **3. 발굴된 앵타머의 테이코산을 갖는 포도상구균과의 결합여부 측정을 통한 선별**

- [70] 발굴된 6번 SERNA 앵타머 클론들 중 포도상구균의 테이코산에 높은 친화도로 결합하는 최적화된 앵타머를 발견하기 위하여 실시간 PCR을 수행하였다. 도 5를 보면, ompC 앵타머와 발굴된 RNA 앵타머 중 클론 #11 RNA 앵타머 및 클론 #18 RNA 앵타머의 CT값에 큰 차이를 보이지 않으며, 결합된 상대적인 RNA양도 적게 측정되는 것으로 보아 발굴된 RNA 앵타머 클론중에 클론 #2 RNA 앵타머가 포도상구균의 테이코산에 높은 친화도로 결합하는 것을 확인하였다. 이로써 클론 #2 RNA 앵타머가 테이코산에 결합하여 포도상구균을 검출하는데 이용될 수 있음을 예상할 수 있으며 도 6은 선별된 클론 #2 RNA 앵타머의 구조 및 염기서열을 나타내는 것이다.
- [71] 이하, 포도상구균의 테이코산에 결합하는 최적화된 앵타머를 발견하기 위하여 수행된 실시간 PCR 실험과정을 상세히 설명한다.
- [72] 선별된 RNA 앵타머와 비특이적 RNA들의 3' 말단에 A16 tail을 하였다. A16 tail된 RNA 10 피코몰과 dT(16)-비오틴 100 피코몰을 실온에서 10 μ l

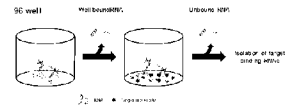
DEPC-H₂O에서 30분간 반응시켰다. 결합시킨 혼성 RNA를 1X10⁸의 포도상구균과 200 μ l 결합 완충액 (30mM TrisHCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 2mM 디티오프레톨 및 1% BSA)에서 반응한 뒤 침전하여 펠렛을 400 μ l 결합 완충액으로 2번 씻어 주었다. 얻어진 RNA는 실시간 PCR을 통하여 확인하였다.

- [73] 본 발명의 포도상구균의 테이코산에 대해 특이적이고 높은 친화력으로 결합할 수 있는 앵타머 염기서열은 서열번호 1과 같았다.

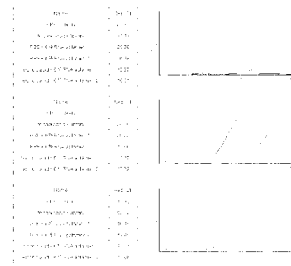
청구범위

- [청구항 1] 포도상구균의 테이코산에 특이적으로 결합하는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 RNA 앵타머.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 서열번호 1의 우라실(U) 및 시토신(C)은 2' 히드록실기가 플루오르기로 치환된 것인 RNA 앵타머.
- [청구항 3] 청구항 1 또는 2의 RNA 앵타머를 포함하는 포도상구균 검출용 바이오 센서.
- [청구항 4] 청구항 1 또는 2의 RNA 앵타머를 포함하는 포도상구균성 폐렴, 폐혈증, 골수염, 포도상구균장염, 식중독, 포도상구균성 열상유사증후군(SSSS) 및 독소성 충격증후군(TSS)으로 이루어진 군에서 선택된 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 청구항 1 또는 2의 RNA 앵타머를 포함하는 식품 첨가제 조성물.

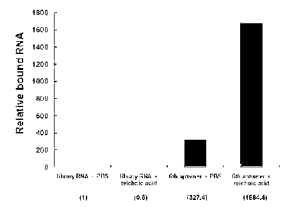
[Fig. 1]



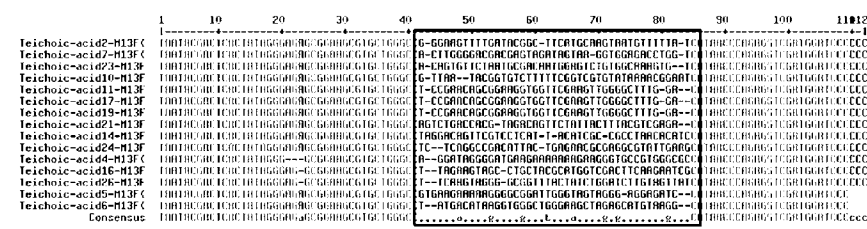
[Fig. 2]



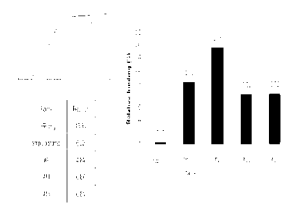
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



[Fig. 6]

Clone 2