(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0054446
(43) 공개일자 2024년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/115 (2010.01) *C12Q 1/6834* (2018.01)
G01N 30/26 (2006.01) *G01N 30/88* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/115 (2013.01)
C12Q 1/6834 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2022-0134030
(22) 출원일자 2022년10월18일
심사청구일자 2022년10월18일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
윤미용
서울특별시 성북구 화랑로 214, 109동 203호(석관동, 래미안석관)
장대혁
서울특별시 성동구 무학봉12길 2(하왕십리동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리채

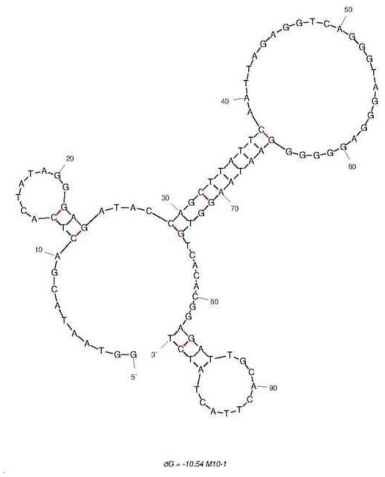
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **망간 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머**

(57) 요 약

본 발명은 망간 이온에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머에 관한 것으로, 상기 앱타머는 망간 이온에 대해 nM 단위의 우수한 결합친화도(nM)를 나타낸다. 본 발명의 앱타머를 이용해 망간 이온을 분리 또는 검출할 수 있으며, 방사성 폐기물에서 방사성 망간을 특이적으로 분리 및 제거하는데 활용될 수도 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
G01N 30/26 (2013.01)
C12N 2310/16 (2013.01)
C12Q 2525/205 (2013.01)
G01N 2030/8859 (2013.01)

(72) 발명자
이선영
서울특별시 도봉구 도봉로136길 19, 201동 401호(창동)
박창제
서울특별시 노원구 한글비석로 91, 108동 405호(하계동, 하계1차청구아파트)
차균호
대전광역시 유성구 문화원로 77, 1005호(봉명동, 그랑펠리체)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415180608
과제번호	20203210100390
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국에너지기술평가원
연구사업명	원전해체방폐물안전관리기술개발
연구과제명	원전 해체발생 방사성폐액 처리 성능 향상을 위한 친환경 바이오 소재 공정 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)래드코어
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기 서열로 이루어진, 망간 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머.

청구항 2

청구항 1의 앱타머를 포함하는 망간 이온 분리 또는 검출용 조성물.

청구항 3

청구항 1의 앱타머를 포함하는 망간 이온 분리 또는 검출용 키트.

청구항 4

청구항 1의 앱타머가 고정화된 기판을 포함하는 망간 이온 분리 또는 검출용 마이크로어레이.

청구항 5

청구항 1의 앱타머가 충진된, 망간 이온의 분리 또는 검출용 컬럼.

청구항 6

청구항 1의 앱타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 망간 이온의 분리 또는 검출 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 시료는 물, 토양 또는 방사성 폐기물 시료인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 망간 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 국내 원전에서 발생하는 방사성 폐액은 방사선 제염 처리를 거쳐 방사성 물질을 제거한다. 방사선 제염 방법, 즉 방사성 물질이 포함된 폐액에서 방사성 물질을 제거하는 방법은 여과 처리법(투과성 매질로 부유물, 불용성 물질 및 고체 입자를 분리하는 방법), 증발처리법(증발기를 통해 휘발성 및 비휘발성 물질을 분리하는 방법), 분리처리법(방사선 입자 및 이온을 분리하는 방법) 등이 있다. 방사선 제염 순도를 높이기 위해 위 공정들이 혼합하여 사용되며, 각 공정에 필요한 다양한 설비들 및 처리 비용이 발생하게 됨. 또한, 각 공정에서 불가분하게 발생하는 여러 폐기물이 나오게 되며 이를 처리하기 위한 추가적인 비용이 발생하게 된다. 따라서, 현재의 방사선 제염 과정은 다양한 처리 과정과 다양한 폐기물 발생, 그에 대한 처리 비용이 요구된다.

[0004] 한편, 앱타머는 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 서열을 갖는 분자이고, 분자 내 수소결합에 의해 특정 3차원 구조를 갖을 수 있으며, 이러한 3차원의 공간적 구조를 통해 표적에 특이적으로 결합할 수 있다. 앱타머는 표적에 특이적이기 때문에, 일부 앱타머는 표적 물질의 기능을 억제할 수 있고, 표적에 결합함으로써 세포 내 신호 전달 경로를 차단할 수 있기 때문에 표적을 특이적으로 억제하기 위한 핵산 약제로서 주목을 받아왔다.

[0005] 앱타머는 SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment)를 통해 선별될 수 있다. 앱타머는 특정 3차원 구조를 형성하여 표적에 결합될 수 있으며, 높은 친화성, 높은 특이성, 합성의 용이성을 가지고 있을 뿐 아니라 친환경 바이오 소재라는 장점을 갖는다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1238297호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 망간 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 망간 이온 분리 또는 검출용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 망간 이온 분리 또는 검출용 마이크로어레이를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 망간 이온 분리 또는 검출용 컬럼을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명은 망간 이온 분리 또는 검출 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 1.서열번호 1의 염기 서열로 이루어진, 망간 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머.

[0015] 2. 위 1의 앱타머를 포함하는 망간 이온 분리 또는 검출용 조성물.

[0016] 3. 위 1의 앱타머를 포함하는 망간 이온 분리 또는 검출용 키트.

[0017] 4. 위 1의 앱타머가 고정화된 기판을 포함하는 망간 이온 분리 또는 검출용 마이크로어레이.

[0018] 5. 위 1의 앱타머가 충진된, 망간 이온의 분리 또는 검출용 컬럼.

[0019] 6. 위 1의 앱타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 망간 이온의 분리 또는 검출 방법.

[0020] 7. 위 6에 있어서, 상기 시료는 물, 토양 또는 방사성 폐기물 시료인 방법.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 앱타머는 망간 이온에 특이적으로 결합한다.

[0023] 본 발명 앱타머는 망간 이온에 대해 nM 단위의 결합 친화도를 가진다.

[0024] 본 발명의 앱타머는 망간 이온 분리 또는 검출에 활용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 앱타머를 이용하여 방사성 폐액을 효율적으로 처리할 수 있으며, 포집된 망간을 재활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 망간 특이적 결합 앱타머를 선별하기 위한 SELEX 과정을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 2는 Epoxy-activated Sepharose 6B 레진과 이미노디아세테이트(iminodiacetate)를 이용한 망간 고정 방법을 나타낸다.

도 3은 앱타머의 망간 이온에 대한 친화도 분석을 위한 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 DNA 앱타머(LOFA-M3)의 SPR(Surface Plasmon Resonance) 측정 결과를 나타낸다.

도 4는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 DNA 앱타머(LOFA-M3)를 이용하여 망간 제거율을 측정한 결과를 나타낸다. Mn(Manganese)은 0.5 mg/L의 $MnCl_2$가 포함된 앱타머 결합 버퍼에 아무것도 넣지 않은 경우, Mn+Con은 0.5 mg/L의 $MnCl_2$가 포함된 앱타머 결합 버퍼에 랜덤 앱타머/비드 복합체를 넣은 경우, 그리고 Mn+LOFA-M3는 0.5 mg/L의 $MnCl_2$가 포함된 앱타머 결합 버퍼에 본 발명의 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 DNA 앱타머를 넣은 경우의 망간 제거율 결과를 나타낸다. y축은 처음 넣은 망간 대비 실험 후 제거되고 남아있는 망간의 비율을 나타낸다. Mn과 비교 p-value: *** < 0.001

도 5는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 DNA 앱타머(LOFA-M3)의 2차구조를 나타낸다.

도 6은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 DNA 앱타머(LOFA-M3)의 망간에 대한 특이성 확인 실험 결과를 나타낸다. 동일한 양의 LOFA-M3/비드 복합체가 포함된 9개의 E-튜브에 각각의 금속 이온 30uM씩을 개별적으로 반응시켜 LOFA-M3가 제거한 금속이온의 양을 ICP-OEC를 통해 측정한 결과이다. 세로축은 초기 금속 이온 농도 대비 제거된 비율을 나타낸다.

도 7은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 DNA 앱타머(LOFA-M3)의 망간에 대한 특이성 및 반응성 측정 실험 결과를 나타낸다. LOFA-M3/비드 복합체가 포함된 한 개의 E-튜브에 5가지 이온(Co^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{2+})이 30 μM씩 혼합된 샘플과 반응시켜 LoFA-M3 앱타머가 제거한 금속이온의 양을 ICP-OES를 통해 측정한 결과이다. 세로축은 초기 금속 이온 농도 대비 제거된 비율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명은 망간 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머를 제공한다.

[0029] 앱타머(aptamer)란 특정 표적 물질에 선택적으로 결합하는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 또는 펩타이드(peptide) 분자를 의미하며, 앱타머는 표적의 3차원적인 구조를 인식해 결합하는 특징을 가지고 있다. 앱타머는 고유의 구조에 따라 표적 물질에 대한 결합능을 가질 수 있다. 또한 생물학적 생산이 아닌 화학적 합성법으로 생산하기 때문에 배치 재현성이 높고 물질 안정성도 우수하며 제조 가격도 저렴하다는 장점을 갖는다. 본 발명의 앱타머는 통상의 기술 분야에 잘 알려진 방법으로 제조된 것일 수 있고, 필요에 따라 적절히 변형된 방법에 의해 제조된 것일 수 있다.

[0030] 본 발명의 앱타머는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 DNA 앱타머이다(서열번호 1: GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATTAGAGGTCAGGGTAGGGAGGGGGGAATAAGGTGTCACACGGAGATTGCACTTACTATCT).

[0031] 본 발명의 앱타머는 상기 서열번호 1의 염기 서열에서 AGAGGTCAGGGTAGGGAGGGGGGAATAAGGTGTCACACGG(40 bp)부분이 동일하고 망간 이온에 특이적으로 결합하는 특성을 유지하는 한, 상기 서열번호 1의 염기 서열과 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상 또는 99% 이상 상동성을 가질 수 있다.

[0032] 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 DNA 앱타머의 망간 이온에 대한 결합친화도(K_D)는 48.85±25.0 nM로, 시료 내에 낮은 농도로 존재하는 망간 이온도 검출 또는 분리할 수 있다.

[0033] 본 발명의 앱타머는 망간 이온에 특이적으로 결합할 수 있어 망간 이온을 포함하는 시료로부터 망간 이온을 검출 또는 분리하는 데에 이용할 수 있다.

[0034] 용어 "검출"은 특정 물질에 대한 선택적 반응을 통해 상기 특정 물질의 존재를 확인하는 모든 행위(예를 들면, 형광 변화, 흡광 변화 등)를 포함하는 것일 수 있다.

[0035] 용어 "분리"는 특정 물질을 함유하고 있거나 함유하는 것으로 의심되는 대상으로부터 상기 특정 물질만을 별도로 구분하는 것을 의미하며, 상기 특정 물질을 대상으로부터 "제거"하거나 특정 물질을 "회수"하여 재사

용하는 것을 포함한다.

[0036] 앱타머는 표적 물질에 대한 결합성 및 안정성을 높이기 위해, 각 뉴클레오티드의 당 잔기, 구체적으로 리보오스 또는 디옥시리보스가 수식될 수 있다. 상기 수식은 당 잔기의 2'위치, 3'위치 및 4'위치로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 산소 원자를 다른 원자로 치환한 것일 수 있다. 수식의 예로는 플루오로화, O-알킬화, O-알릴화, S-알킬화, S-알릴화, 아미노화 등이 포함될 수 있다. 상기와 같은 당 잔기의 변형은 통상적인 방법으로 수행될 수 있다.

[0037] 앱타머는 표적 물질에 대한 결합성을 높이기 위해, 핵산염기가 변형될 수 있다. 상기 핵산염기의 변형은 5위치의 피리미딘 변형, 6위치의 푸린 변형, 8위치의 푸린 변형, 환외(環外) 아민에서의 변형, 4-티오우리딘으로의 치환, 5-브로모로의 치환 또는 5-요오드-우리실로의 치환 등을 포함할 수 있다.

[0038] 앱타머는 뉴클레아제 및 가수분해효소 등에 대해 내성을 갖도록 인산기가 변형될 수 있다. 예를 들면, 상기 인산기는 티오에이트, 디티오에이트, 아미데이트, 포름아세탈, 3'-아민 등으로 치환될 수 있다. 나아가, 상기 DNA 앱타머는 3' 말단 또는 5' 말단의 변형을 포함할 수 있고, 상기 변형은 캡핑이나, 바이오티닐, 폴리에틸글리콜, 아미노산, 펩티드, 핵산, 뉴클레오시드, 미리스토일(myristoyl), 리소콜릭-올레일(lithocolic-oleyl), 도코사닐(docosanyl), 라우로일(lauroyl), 스테아로일(stearoyl), 팔미토일(palmitoyl), 올레오일(oleoyl), 리놀레오일(linoleoyl), 지질, 스테로이드, 콜레스테롤, 카페인, 비타민, 색소, 형광물질, 항암제, 독소, 효소, 방사성 물질, 비오틴 등이 부가된 것일 수 있다.

[0039] 본 발명은 망간 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머를 포함하는 망간 이온의 분리 또는 검출용 조성물을 제공한다.

[0040] 망간 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 앱타머일 수 있다.

[0041] 앱타머는 발색 효소, 형광물질, 방사성 동위 원소 또는 콜로이드 등의 검출체로 표지된 접합체일 수 있다. 발색효소는 퍼록시다제, 알칼라인 포스파타제 또는 산성 포스파타제일 수 있고, 형광물질은 티오우레아(FTH), 7-아세톡시쿠마린-3-일, 플루오레신-5-일, 플루오레신-6-일, 2',7'-디클로로플루오레신-5-일, 2',7'-디클로로플루오레신-6-일, 디하이드로 테트라메틸로사민-4-일, 테트라메틸로다민-5-일, 테트라메틸로다민-6-일, 4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸 또는 4,4-디플루오로-5,7-디페닐-4-보라-3a,4a-디아자-s-인다센-3-에틸, Cy3, Cy5, 폴리 L-라이신-플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 로다민-B-이소티오시아네이트(RITC), PE(Phycoerythrin) 또는 로다민일 수 있다.

[0042] 또한, 앱타머는 앱타머에 특이적으로 결합할 수 있는 리간드를 포함할 수 있다. 상기 리간드는 발색효소, 형광물질, 방사성 동위원소 또는 콜로이드 등의 검출체로 표지된 접합체, 및 스트렙타비딘 또는 아비딘이 처리된 리간드일 수 있다. 본 발명의 망간 이온의 분리 또는 검출용 조성물은 상기 서술한 바와 같은 시약 외에도 이들의 구조를 안정하게 유지시키는 증류수 또는 완충액을 더 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명은 망간 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머를 포함하는 망간 이온의 분리 또는 검출용 키트를 제공한다.

[0044] 망간 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 앱타머일 수 있다.

[0045] 본 발명에 따른 망간 이온의 분리 또는 검출용 조성물을 포함하는 키트는 이에 포함되는 앱타머의 세척이나 복합체의 분리 등과 같은 이후 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질에 결합될 수 있다. 이때, 고형 기질로는 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기판, 금속기판, 유리섬유, 미세구체 또는 미세비드가 사용될 수 있다. 또한, 합성수지로는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 또는 나일론 등이 사용될 수 있다.

[0046] 키트는 당업자에게 알려진 종래의 제조방법에 의해 제조될 수 있으며, 버퍼, 안정화제, 불활성 단백질 등을 더 포함할 수 있다. 상기 키트는 시약의 양을 탐색하기 위해 검출체로서 부착된 형광물질의 형광을 검출함으로써 수행되는 형광법 또는 검출체로서 부착된 방사선 동위원소의 방사선을 검출함으로써 수행되는 방사선법을 통한 초고속 스크리닝(high throughput screening, HTS) 시스템, 검출체의 표지 없이 표면의 플라즈몬 공명 변화를 실시간으로 측정하는 SPR(surface plasmon resonance) 방법 또는 SPR 시스템을 영상화하여 확인하는 SPRI(surface plasmon resonance imaging) 방법을 이용할 수 있다.

[0047] 망간 이온의 분리 또는 검출용 키트는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 앱타머를 포함함으로써 망간 이온을 포함하는 시료로부터 망간 이온을 검출 또는 분리하는 데에 이용할 수 있다.

[0049] 본 발명은 망간 이온의 분리 또는 검출용 마이크로어레이를 제공한다.

[0050] 망간 이온의 분리 또는 검출용 마이크로어레이는 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 앱타머가 고정화된 기판을 포함할 수 있다.

[0051] 용어 "기판"은 본 발명의 DNA 앱타머가 고정화될 수 있는 고체 지지체로서, DNA 앱타머가 고정될 수 있는 형태이면 특별히 그 종류를 한정하지 아니하며, 구체적으로 마이크로티터 플레이트(microtiter plate), 비드(bead), 멤브레인(membrane) 및 칩(chip) 등을 포함하는 개념이다.

[0052] 기판의 소재는 예를 들어 유리, 알루미나, 세라믹, 탄소, 합성 고분자, 천연 고분자, 금, 은, 구리, 알루미늄 또는 실리콘 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 기판이 멤브레인(membrane) 형태인 경우 그 재질로 니트로셀룰로오스를 사용할 수 있다.

[0053] 앱타머를 기판에 고정 또는 적용시키기 전에 앱타머를 변형시켜 고정화를 촉진시키거나 결합 효율을 개선시킬 수 있다. 상기 변형은 단독 중합체 테일링(homopolymer tailing); 지방족기, NH2기, SH기 또는 카르복실기와 같은 상이한 반응성 작용기와의 커플링; 또는 바이오틴, 합텐 또는 단백질과의 커플링;을 포함할 수 있다. 상기 고정은 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들면, 앱타머는 에폭시 화합물 또는 알데하이드기를 포함하도록 변형된 유리 표면에 결합될 수 있고, 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 앱타머는 에틸렌글리콜 올리고머나 디아민과 같은 링커를 통해 기판에 고정될 수도 있다.

[0054] 마이크로어레이란 기판 상에 올리고뉴클레오티드 그룹이 높은 밀도로 일정한 영역에 고정화되어 있는 것을 의미한다. 마이크로어레이는 통상의 기술 분야에 잘 알려진 방법으로 제조된 것일 수 있고, 필요에 따라 적절히 변형된 방법에 의해 제조된 것일 수 있다.

[0055] 본 발명의 마이크로어레이는 망간 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머가 고정화된 기판을 포함하므로 망간 이온을 분리 또는 검출하는 데에 사용될 수 있다.

[0056] 본 발명은 망간 이온의 분리 또는 검출용 컬럼을 제공한다.

[0057] 상기 망간 이온 분리 또는 검출용 컬럼은 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 앱타머가 충진된 것일 수 있다.

[0058] 컬럼은 통상의 기술 분야에 잘 알려진 것을 사용할 수 있으나 앱타머가 충진될 수 있는 것이라면 제한되지 않는다. 컬럼은 기판에 고정화된 앱타머가 충진된 것일 수 있고, 기판은 전술한 범위 내의 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 본 발명의 컬럼은 망간 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머가 충진되어 있으므로 망간 이온을 분리 또는 검출하는 데에 사용될 수 있다.

[0060] 본 발명은 망간 이온의 분리 또는 검출 방법을 제공한다.

[0061] 망간 이온의 분리 또는 검출 방법은 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진, 망간 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0062] 시료는 망간 이온을 함유하고 있거나 함유하고 있는 것으로 의심되는 것이라면 제한되지 않고, 해수, 음용수, 공장 폐수, 축산 폐수, 폐기물, 토양, 공기, 식품, 동식물 장내 및 동식물 조직 중 어느 하나 이상에서 채취된 시료일 수 있으며, 상기 폐기물은 보다 구체적으로 핵에너지를 사용하는 과정에서 발생한 방사성 폐기물일 수 있다.

[0063] 상기 앱타머는 망간 이온에 대해 결합력이 우수하므로, 앱타머를 시료와 접촉시키면 시료 내에 포함된 망간 이온이 앱타머와 결합하여 해당 시료로부터 상기 망간 이온을 검출 또는 분리할 수 있다.

[0064] 앱타머를 시료와 접촉시키는 단계는 통상의 기술 분야에 잘 알려진 방법에 의해 수행되는 것일 수 있고, 예를 들면 앱타머가 충진된 컬럼에 시료를 통과시켜 수행되는 것일 수 있다.

[0065] 컬럼은 앞서 설명한 범위 내의 것을 선택하여 사용할 수 있다.

[0067] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0069] <u>실시예</u>

[0070] 본 발명자들은 망간 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머(LOFA-M3)를 발명하였다. SELEX 기법을 활용하여 망간 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머를 개발하였고, mfold 및 NUPACK 프로그램을 통해 앱타머가 안정적인 2차 구조를 형성하는지 여부를 확인하였다.

[0072] **1. 망간 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머 선별을 위한 SELEX 수행**

[0073] **1.1 PCR을 통한 랜덤 주형 DNA 제작**

[0074] 망간과 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 제작하기 위한 랜덤 주형 DNA를 확보하기 위하여, 40개의 랜덤 서열을 포함하고 있는 100bp의 주형 DNA (서열번호 2: 5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATT-N40-AGATAGTAAGTGCAATCT-3')와 이를 100bp로 증폭할 수 있는 세 개의 프라이머[정방향 프라이머: 5'-GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATT-3'(서열번호 3); 역방향 프라이머: 5'-AGATTGCACTTACTATCT-3'(서열번호 4); 비오티닐화된 (biotinylated) 역방향 프라이머 : 5'-비오틴-AGATTGCACTTACTATCT-3']를 Integrated DNA Technologies (IDT, USA)로부터 합성하였다

[0075] 상기의 프라이머를 이용한 PCR 반응을 통해 100bp의 주형 DNA를 증폭하였으며, 반응 조성은 주형 DNA 1~2 ㎕, 10X PCR 완충용액 5 ㎕, dNTP 혼합물 4 ㎕, 10 μM 정방향 프라이머 2 ㎕, 10 μM 비오티닐화된 역방향 프라이머 1~2 ㎕, Ex Taq 중합효소 (Takara, Japan) 0.25 ㎕(1 unit/㎕)와 증류수를 추가하여 최종적으로 50 ㎕로 구성하였다. 랜덤 주형 DNA의 증폭을 위한 반응 조건은 95℃에서 5분간 변성시키고, 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 그리고 72℃에서 30초간 반응을 5~20주기 반복한 후, 72℃에서 5분간 추가로 신장시키는 반응을 이용하였다. PCR 반응 후 4㎕를 취하여, 2% 아가로오스 겔 전기영동을 통하여 증폭 산물을 확인한 뒤, PCR 정제 키트 (Qiagen, USA)를 이용하여 정제하여 증류수 50 ㎕에 회수하였다.

[0077] **1.2. 가열-냉각 (heat-cooling) 기법을 활용한 ssDNA 제작**

[0078] PCR 기법과 PCR 정제 키트를 이용하여 회수한 DNA 라이브러리 50 ㎕에 증류수 50 ㎕를 첨가하여 부피를 100 ㎕로 조정한 후, 가열-냉각 (heating-cooling) 기법을 이용하여 dsDNA를 ssDNA로 변성 (Denaturation)하였다. 실험 방법을 구체적으로 표현하자면 PCR 기법과 PCR 정제 키트를 이용하여 획득한 dsDNA를 85℃에서 5분 동안 반응하여 dsDNA를 ssDNA로 변성시킨 후, 반응 종료 후 즉시 반응액을 4℃로 냉각시켜 ssDNA를 제작하였다.

[0079] 가열-냉각 기법을 이용하여 확보된 ssDNA 산물 중 비오틴 (Biotin)이 결합되어 있는 ssDNA와 primer를 제거하고 정방향의 ssDNA만을 순수하게 확보하기 위하여, 제작한 ssDNA 100 ㎕의 반응액에 스트렙트아비딘 아가로즈 레진 (streptavidin agarose resin; Thermo scientific, USA) 50 ㎕를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액은 4℃, 13,000 rpm의 원심 분리기를 이용하여 15분간 원심 분리한 후, 상층액만을 회수하여 동일 부피의 PCI (phenol : chloroform : isoamylalcohol = 25 : 24 : 1) 용액을 처리한 후 4℃에서 13,000 rpm 으로 15분간 원심 분리하여 상층액만을 회수하였다. 상층액에 1/100 부피의 tRNA (sigma aldrich, USA), 3 부피의 100% 에탄올을 첨가하여 -70℃에서 1시간 이상 반응시켰다. 반응 후에는 4℃에서 13,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 ssDNA만을 회수하였다. 회수한 ssDNA는 65℃에서 건조시킨 후, 50 ㎕의 증류수에 녹였다.

[0081] **1.3. DNA 앱타머 구조 제작 및 망간과 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머 선별**

[0082] 위 실험에서 확보한 ssDNA 앱타머 100 ㎕에 2X Binding buffer (100 mM phosphate buffer, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl2, 2mM imidazole, pH 7.4) 100 ㎕를 첨가한 후 85℃, 5분간 끓여 변성시킨 뒤 상온에서 1시간 이상 서서히 식혀 DNA 앱타머의 안정한 3차원 구조를 형성하였다.

[0083] 망간과 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 선별하기 위하여, 이미노디아세테이드(imminodiacetate)가 커플링된 Epoxy-activated sepharose6B resin(이하 "sepharose6B resin")을 이용하였다(도 2). sepharose6B resin 100 ㎕를 4℃에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 제거했다. 상층액을 제거한 sepharose6B resin

에 1X Binding buffer buffer (50 mM phosphate buffer, 50 mM NaCl, 1 mM MgCl2, 1mM imidazole, pH 7.4) 500 ㎕을 넣고 4℃에서 10분 동안 교반 하며 반응시켜 활성화시킨 후, 4℃에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 제거했다. 상기 과정을 2회 반복한 후 앞서 구조 형성한 DNA 앱타머 pool과 혼합한 후, 1X Binding buffer로 전체 반응 부피를 300 ㎕로 맞추었으며 이후 4℃에서 1시간 반응시켰다. 이후, 4℃에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 제거한 후, 세척용액 (1X TBS buffer; 20 mM Tris, 0.9% NaCl, pH 7.5) 500 ㎕을 넣어 세척하는 과정을 5회 반복하여 sepharose6B resin 과 결합하지 못한 DNA 앱타머를 제거하였다. 망간망간과 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 용출하기 위하여, DNA 앱타머 용출 용액 (10 mM Tris-EDTA, pH 8.0) 200 ㎕를 넣어 85℃에서 5분동안 반응시켰으며, 이후, 4℃에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심 분리하여 상층의 용출 용액을 얻었다. 상기 과정을 2회 반복하여 상층의 용출 용액을 획득하였다.

[0084] 망간과 이에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머 간의 결합물에서 DNA 외의 불순물을 제거하기 위하여, 용출 용액에 동일 부피의 PCI 용액을 처리한 후 4℃에서 13,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층액만을 회수하였다. 이후, 망간과 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머 만을 회수하기 위하여 PCI 법을 통하여 회수된 상층액에 2배 부피의 100% 에탄올과 1/100 부피의 tRNA를 첨가하여 -70℃에서 1시간 반응 이상 반응시킨 뒤, 반응액을 4℃에서 13,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 DNA 앱타머만을 회수하였다. 회수한 DNA는 65℃에서 건조시킨 후, 50 ㎕의 증류수에 녹였다.

[0086] **1.4. 비특이적 DNA 앱타머 제거를 위한 네가티브 선별 (Negative selection)**

[0087] 망간이 아닌 NTA resin에 결합하는 비특이적인 DNA 앱타머를 제거하기 위하여, SELEX 5회와 6회 사이에 망간을 제거한 resin에 DNA 앱타머 용액을 결합하는 네가티브 선별 (negative selection)을 진행하였다. sepharose6B resin100 ㎕에 chelation buffer (0.5 M EDTA, pH 8.0) 500 ㎕를 넣어준 뒤 반응시켜, 망간을 제거한 다음, 네가티브 선별에 사용하였다. 1X binding buffer를 이용하여, 활성화된 망간 제거 sepharose6B resin에 상온에서 냉각시켜 구조를 형성한 DNA 앱타머 풀 (1 nmol)을 반응시켰으며, sepharose6B resin과 결합하지 않은 상층의 DNA 앱타머 용액을 회수하여, PCI법을 통해 정제를 진행한 뒤, PCR을 진행하였다. 이후 같은 방법으로 SELEX를 총 9회까지 진행하였다.

[0089] **1.5. 각 라운드의 DNA 앱타머 농도 확인**

[0090] SELEX를 마친 후 SELEX 계속 진행 여부 및 각 라운드에서 용리된 DNA 앱타머의 친화성을 정량적으로 확인하기 위하여 각 라운드에서 용리된 DNA의 농도를 나노드랍 스펙트로포토미터 (Nano-drop spectrophotometer, Thermo Scientific)을 이용하여 측정하였다.

[0092] **2. 망간과 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머 후보군 확보**

[0093] 용리된 DNA 농도가 가장 높은 round의 앱타머 풀, 망간과 친화력이 가장 높은 것으로 판단되는, 해당 라운드의 ssDNA 앱타머 풀에 대해 정방향 프라이머: 5'- GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATT -3'와 역방향 프라이머: 5'-AGATTGCACTTA CTATCT-3'를 이용한 PCR 수행으로 dsDNA를 획득하였다. 이렇게 획득한 dsDNA는 T-블런트 클로닝 키트 (SolGent, Korea)를 이용하여 클로닝을 수행하였다.

[0094] 클로닝은 T-벡터 (10ng/㎕) 1 ㎕와 PCR 산물 (20 ng/㎕) 4 ㎕, 6 X T-블런트 버퍼 1 ㎕를 섞어서 25℃에서 5분 동안 반응시키는 조건을 이용하였다. T-블런트 클로닝 반응액 6 ㎕는 100 ㎕의 DH5α와 섞은 후 42℃에서 30초 동안 열충격 (heat-shock)을 가한 후, 2분 동안 얼음에서 반응시켰다. 여기에 900 ㎕의 SOC (2% tryptone, 0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl2, 10 mM MgSO4, 20 mM glucose) 배지를 첨가한 후, 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 이후, 200 ㎕의 배양액을 취하여 암피실린 (ampicillin, 50 ㎍/ml), 카나마이신 (kanamycin, 50㎍/ml), X-gal (50 ㎍/ml), IPTG (5 ㎍/ml)가 포함되어 있는 LB 배양 플레이트 (LB plate)에 스프레딩하고, 37℃에서 O/N 동안 배양시킨 후, 흰색 콜로니만을 선별하여 각 콜로니의 염기서열을 결정하였으며 (Solgent, Korea), 서열 분석을 통하여 중복되지 않고 망간과 친화력이 높은 망간 결합 DNA 앱타머 후보군을 확보하였다.

[0096] 3. SPR 기법을 이용한 최적 망간 앱타머 후보군 선정

[0097] 3.1. 망간과 이에 특이적으로 결합하는 망간 앱타머 후보군들 간의 친화도 측정을 위한 망간 코팅 센서칩 제작

[0098] 망간과 상기 실험에서 획득한 망간 결합 DNA 앱타머 후보군들 간의 친화도를 정량하기 위하여, SPR 검출 시스템 기기인 BIAcore T200 (BIACORE)을 이용하여 표면 플라즈몬 공명 (Surface Plasmon Resonance; SPR) 실험을 실시하였다. 망간과 망간 결합 DNA 앱타머 후보군과의 친화도를 정량하기 위하여 표면이 NTA group으로 코팅된 센서 칩 Series S Sensor chip NTA (Cytiva, Germany)를 이용하였다. 우선 NTA chip 표면을 350 mM EDTA 용액을 30 ㎕/min의 속도로 1분 흘려주어 활성화하였으며, 망간을 고정하기 위하여 0.5 mM $MnCl_2$ (sigma aldrich, USA)를 10 ㎕/min의 속도로 10분 동안 흘려주어 칩 표면을 망간으로 코팅하였다. 각 실험 후 센서칩은 350 mM EDTA로 재생시켰다. 속도 변수는 BIA 평가프로그램(BIACORE)으로 수득, 정량 하였다.

[0100] 3.2. 망간 결합 DNA 앱타머 후보군의 친화력 측정

[0101] 망간과 가장 높은 친화력을 가지는 앱타머를 선별하기 위하여 확보된 망간 결합 DNA 앱타머 후보군을 HBS-EP 버퍼(GE Healthcare, UK)에 각 100 nM, 500 nM, 1000 nM, 1500 nM의 농도로 녹여 준비하였다. 준비한 망간 결합 DNA 앱타머는 아무것도 결합시키지 않은 센서 칩(채널 1 또는 채널 3), 망간이 고정된 센서 칩(채널 2 또는 채널 4)에 다양한 농도 (각 100 nM, 500 nM, 1000 nM, 1500 nM)의 망간 결합 DNA 앱타머 후보군을 주입함으로써 망간과 이에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머 후보군 간의 친화도를 정량화 하였다. 망간에 특이적으로 결합하는 앱타머 중 망간이온에 대한 친화도가 뛰어난 LOFA-M3의 결합 친화도(K_D) 값은 48.85 ± 25.0 nM 이였다. 또한, 친화도 분석을 위해 SPR (Surface Plasmon Resonance)을 측정하였다(표 1, 도 3).

표 1

[0102]

앱타머 명칭	서열	길이(bp)	ΔG(kcal/mol)	K_d 값(nM)
LOFA-M3	서열번호 1	100	-10.54	48.85 ± 25.0

[0103] 4. 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 DNA 앱타머(LOFA-M3)의 망간 특이성(specificity) 및 제거율 측정

[0104] LOFA-M3 앱타머의 망간 특이성(specificity) 및 제거율 측정하였다. 0.5 mg/L의 $MnCl_2$가 포함된 앱타머 결합 버퍼에 아무것도 넣지 않거나 (Mn), 랜덤(random) 앱타머/비드 복합체를 넣은 경우(Mn + Con), 그리고 LOFA-M3/비드 복합체를 넣은 경우(Mn+LOFA-M3)에 대하여 망간 특이성 및 제거율 측정 실험을 진행하였다. 결합 반응 후 비드를 제거하고 ICP-OES(Inductively coupled plasma - optical emission spectrometry) 장비를 통해 버퍼에 잔존하는 망간 농도를 측정하였다(도 4). Mn: Managese(망간), Con: Control, LOFA-M3: 망간 특이적 앱타머. Mn과 비교 p-value: *** < 0.001.

[0106] 5. 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 DNA 앱타머(LOFA-M3)의 망간에 대한 특이성(specificity) 확인

[0108] (1) 9종 금속 이온 샘플에서 망간 이온 제거율 측정

[0109] 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 DNA 앱타머(LOFA-M3)의 망간에 대한 특이성을 확인하기 위해 실험을 진행하였다. 동일한 양의 LOFA-M3/비드 복합체가 포함된 9개의 E-튜브에 9 종류의 금속 이온(Mn^{2+}, Co^{2+}, Cr^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Al^{3+}, Eu^{3+})을 각각 30uM씩을 개별적으로 반응시켜 LOFA-M3가 제거한 금속이온의 양을 ICP-OEC를 통해 측정하였다. 그 결과 망간 이온 제거율은 65.22%로 망간 이온에 대한 특이성을 확인할 수 있었다(도 6).

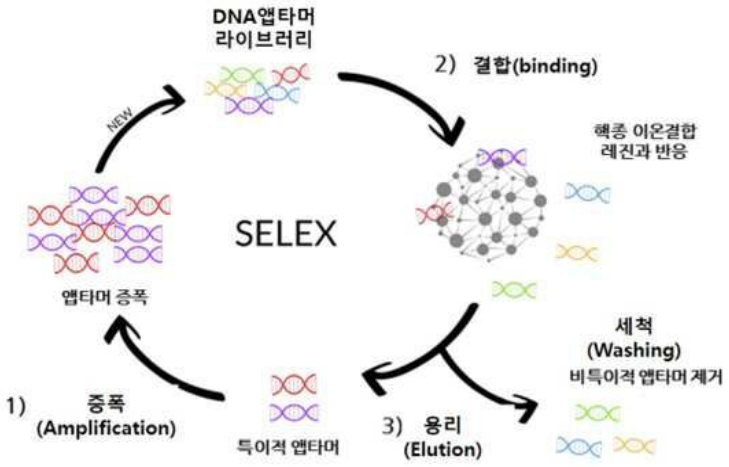
[0111] (2) 5종 금속 이온 혼합샘플에서 각각에 대한 제거율 측정

[0112] 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 DNA 앱타머(LOFA-M3)의 망간에 대한 특이성 및 반응성 측정 실험 결과를 나

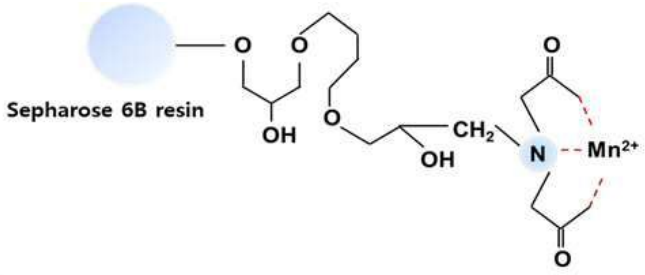
타낸다. LOFA-M3/비드 복합체가 포함된 한 개의 E-튜브에 5종류 이온(Co^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{2+})이 30μM씩 혼합된 샘플과 반응시켜 LoFA-M3 앱타머가 제거한 금속이온의 양을 ICP-OES를 통해 측정한 결과이다. 세로축은 초기 금속 이온 농도 대비 제거된 비율을 나타낸다. 그 결과 망간 이온 제거율은 57.21%로 망간 이온에 대한 특이성을 확인할 수 있었다(도 7).

도면

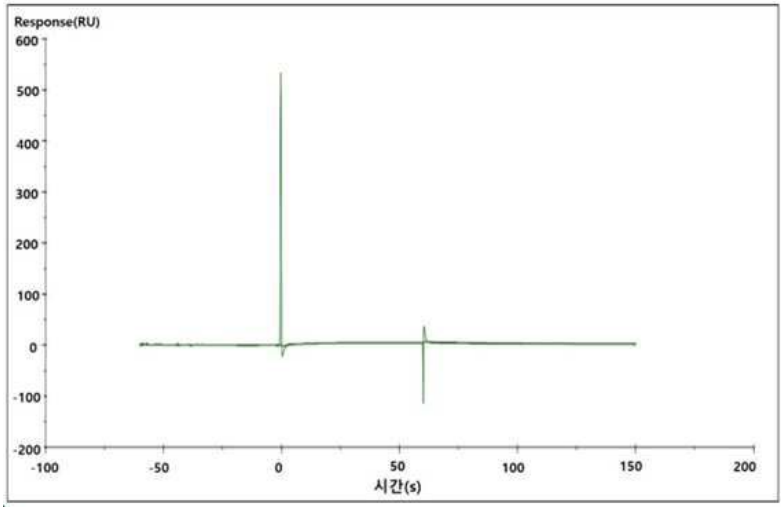
도면1



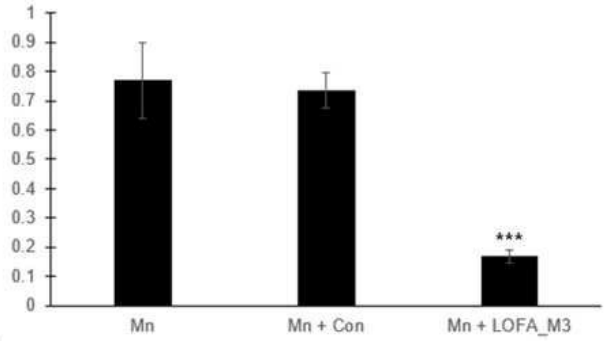
도면2



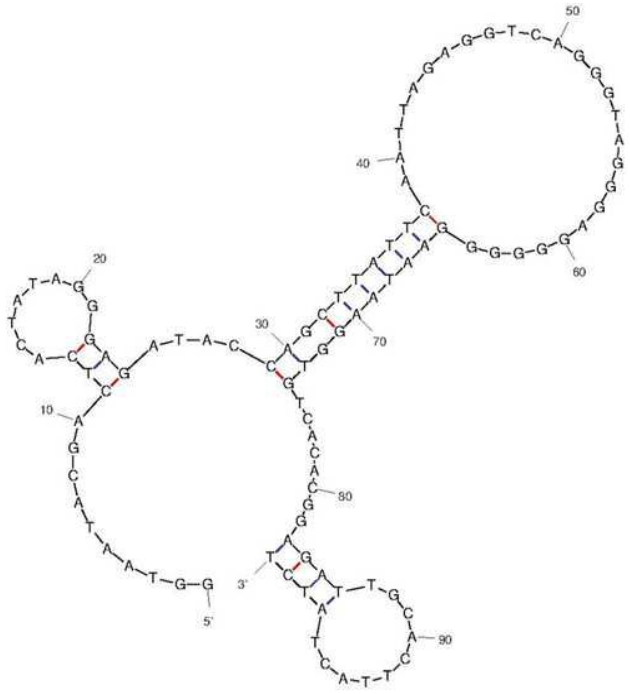
도면3



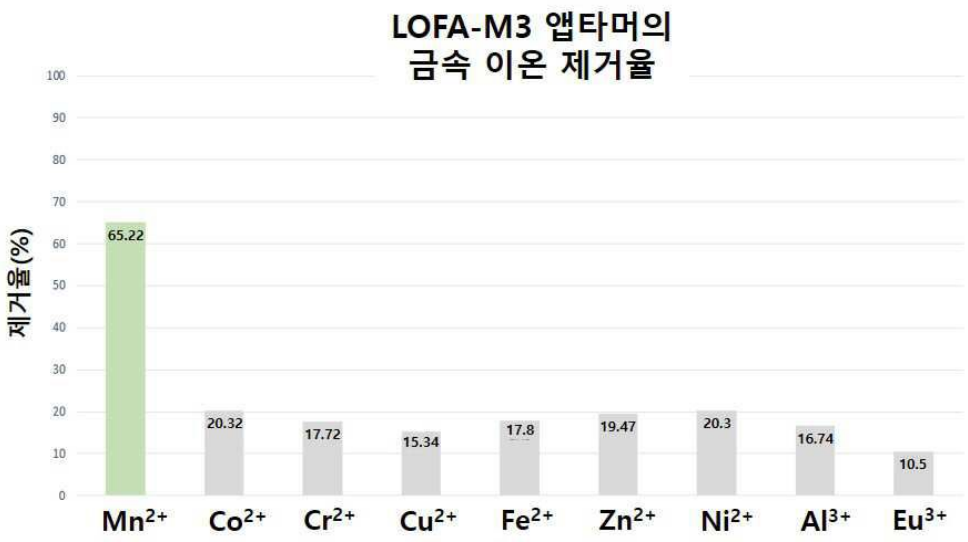
도면4



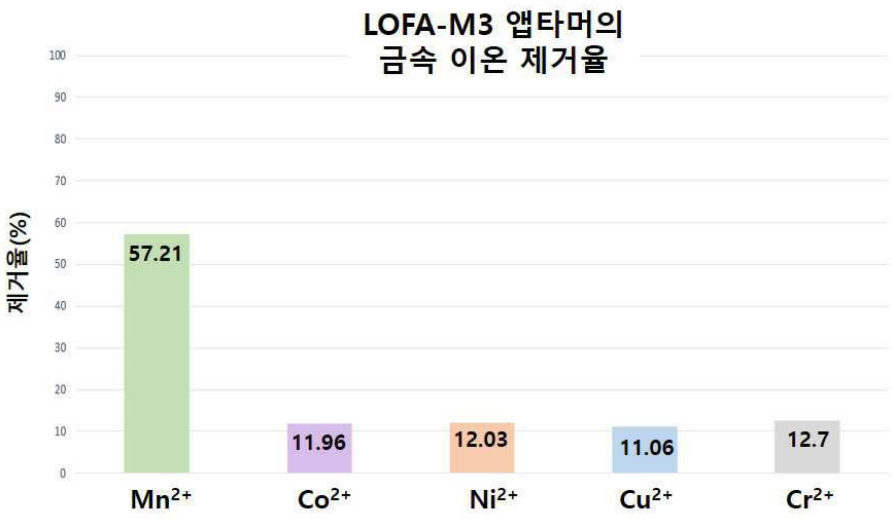
도면5



도면6


LOFA-M3 앱타머의
금속 이온 제거율
제거율(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
65.22
20.32
17.72
15.34
17.8
19.47
20.3
16.74
10.5
Mn2+
Co2+
Cr2+
Cu2+
Fe2+
Zn2+
Ni2+
Al3+
Eu3+

도면7


LOFA-M3 앱타머의
금속 이온 제거율
제거율(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
57.21
11.96
12.03
11.06
12.7
Mn2+
Co2+
Ni2+
Cu2+
Cr2+

서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.