



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년11월23일
(11) 등록번호 10-1678946
(24) 등록일자 2016년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/115 (2010.01) G01N 33/52 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/115 (2013.01)
G01N 33/52 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0093260
(22) 출원일자 2015년06월30일
심사청구일자 2015년06월30일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110126742 A*
W02009104075 A2*
US20120135540 A1
논문1:Luminescence
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
바디텍메드(주)
강원도 춘천시 동내면 거두단지1길 43 ()
(72) 발명자
구만복
서울특별시 동대문구 천장산로9가길 25-3 (이문동)
이방현
서울특별시 강남구 선릉로 221, 101동 907호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
권영섭
서울특별시 동대문구 무학로42길 14-4 102호 (용두동)
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 이영기

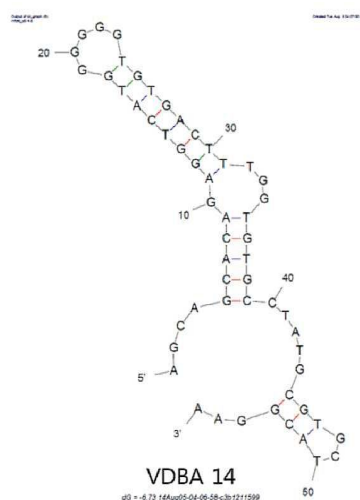
(54) 발명의 명칭 25-하이드록시 비타민 디3에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitamin D3)에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitamin D3)에 특이적으로 결합하는 멀티플 핵산 앵타머, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

본 발명의 핵산 앵타머 및 이를 이용한 바이오센서는 높은 민감도와 정확성으로 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitamin D3)를 검출할 수 있으므로 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitamin D3) 결핍 관련 질병의 진단에 유용하다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

G01N 33/53 (2013.01)

G01N 33/587 (2013.01)

C12N 2320/13 (2013.01)

C12Q 2525/205 (2013.01)

G01N 2800/04 (2013.01)

G01N 2800/2814 (2013.01)

G01N 2800/32 (2013.01)

G01N 2800/347 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 표시되는, 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머:

여기서, 상기 핵산 앵타머가 RNA인 경우에는 상기 염기서열에서 T는 U임을 특징으로 함.

청구항 2

제1항의 핵산 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)의 검출방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 시료는 물, 토양, 폐기물, 식품, 동식물 장내 및 동식물 조직, 동식물 분변 중 어느 하나 이상에서 채취된 것임을 특징으로 하는 검출방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 검출은 금 나노입자 기반의 색도 분석 방식으로 검출하는 것을 특징으로 하는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitamin D3)의 검출방법.

청구항 5

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitamin D3) 검출용 조성물.

청구항 6

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitamin D3) 검출용 센서.

청구항 7

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitamin D3) 검출용 키트.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 25-하이드록시 비타민 디3에 특이적으로 결합하는 멀티플 핵산 앵타머, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 핵산 앵타머 및 이를 이용한 바이오센서는 높은 민감도와 정확성으로 25-하이드록시 비타민 디3를 검출할 수 있어, 25-하이드록시 비타민 디3의 검출에 유용하다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)는 신체의 거의 모든 조직에서 그 수용체가 발견되기 때문에 각종 질병과의 연관성이 매우 높은 물질이다. 과거 수십 년 동안은 체내 비타민 디의 농도를 검사할 때, 비타민 디의 완전 활성 형태인 1,25(OH)₂ Vitamin D3를 측정했는데, 간이나 혈액내의 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)가 주로 신장에서 1,25(OH)₂ Vitamin D3로 변하기 때문에 최근 연구에 따르면 이것은 현재 체내 비타민 저장량이 아니라 신장의 기능을 반영한다고 판단, 요즘은 혈중 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3)의 농도를 측정한다.
- [0004] 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)의 결핍정도에 따라 대사증후군 합병 및 심장병 발병 위험을 뿐만 아니라 치매에 걸릴 위험도 비례해서 높아진다는 연구결과가 있다. 또한, 200개 이상의 유전자에 영향을 미치고 있다고 알려진 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)는 특히 수명을 연장시키는 Klotho라는 유전자와 연계해서 수명단축을 억제하는 역할도 한다. 특히, 한국인의 비타민D 부족수준이 세계 최저임을 볼 때, 정기적으로 경제적이면서도 간단한 방법을 통해 혈중 비타민D 농도를 측정할 수 있는 방법을 개발하는 것이 필요한 실정이다.
- [0005] 앵타머(aptamer)는 10^{12~14} 정도의 다양성을 가지는 랜덤 핵산 라이브러리로부터 얻어지는 특정 타겟에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA 또는 RNA 분자 구조체를 말한다. 또한, 앵타머는 센서 분야에서 이용되는 기존의 감지물질인 항체와는 달리 핵산 구조체이므로 열 안정성이 우수하며, 시험관내(in vitro)에서 합성되기 때문에, 동물이나 세포가 따로 필요하지 않아 생산 비용 면에서도 경제적이며, 타겟 물질에 제약이 없어 단백질, 아미노산 같은 생분자 물질부터 환경호르몬, 항생제, 잔류 의약품 등의 저분자 유기화학 물질, 박테리아, 바이러스 등의 다양한 타겟에 대한 앵타머를 합성할 수 있다. 따라서 다양한 타겟 물질에 대한 앵타머가 만들어지고 있으며, 표적 물질과 특이성과 강한 친화도를 가지고 결합하는 앵타머의 특성으로 인해 최근 들어 앵타머를 신약 개발, 약물 전달 시스템 그리고 바이오센서 등에 응용하는 많은 연구가 이루어지고 있다. 따라서, 앵타머는 극미량의 잔류 농약의 검출방법에 도입하기에 매우 적절한 물질이며, 이를 활용한 나노 바이오 기술을 통해 특정 잔류 농약 물질을 검출하는데도 응용할 수 있다.
- [0006] 금 나노입자 기반의 색도진단법은 그 준비의 편리성과 간단한 작동법 그리고 육안으로 색 변화를 관찰할 수 있다는 점에서 최근 들어 on-site 탐지의 새로운 대안으로 떠오르고 있다(Zhao, W., Brook, M.A., Li, Y., 2008a. ChemBioChem 9, 236323711). 이러한 금 나노입자 기반 앵타 센서에는 두 가지 종류가 있는데 하나는 금 나노입자 표면을 변형하여 앵타머를 금 나노입자 표면에 공유결합 등으로 고정하여 타겟 물질이 있을 때 두 개 이상의 금 나노입자 거리가 서로 가까워짐으로 인해 응집(aggregation)이 일어나서 금 나노입자 용액의 색이 붉은색에서 푸른색 계열로 변하는 특징을 이용한 것이고, 다른 하나는 변형되지 않은 금 나노입자 표면에 앵타머가 물리적으로 흡착되어 있다가 타겟 물질이 있을 때 흡착되어 있던 앵타머와 타겟과의 결합으로 인해 금 나노입자의 표면에서 떨어져 나오는 현상에 의해 색이 변하는 특성을 이용하는 것이다.
- [0007] 앵타머 개발 방법에 있어서 가장 중요한 요소는 타겟에 결합한 DNA(혹은 RNA)와 결합하지 않은 DNA를 구별하는 것인데 이를 위하여 일반적으로 타겟을 고정하거나 DNA 랜덤 라이브러리를 고정하여 DNA를 구별하는 연구를 진행해왔다. 그러나 이러한 고정화 방식의 가장 큰 어려움은 고정화 수율이 낮을 수 있다는 점이고 고정화 수율 자체를 분석하는데 많은 비용과 시간이 소모되고 있다는 점이다. 또한 고정화에 사용되는 분리용 물질(자성 비드, 컬럼 등)에 DNA가 직접 결합할 가능성을 완전히 배제할 수 없다는 점과 분리용 물질에 고정된 타겟에 결합한 DNA를 다시 분리 해내는 과정에서 나타날 수 있는 DNA 풀 손실의 가능성 등은 고정화 방식의 한계이자 문제점으로 남아 있다. 특히 DNA 라이브러리를 고정하는 방식에서 발생할 수 있는 낮은 DNA 고정율 문제는 앵타머 개발 과정에서 피해야 하는 가장 중요한 손실인 DNA 풀의 손실과 직결되어 큰 한계점이 된다. 그 외에도 고정화 자체가 어려운 중금속 이온 등은 고정화 방식으로는 앵타머를 개발하기가 어려워 고정화 방식에는 타겟 선정에도 제약이 있을 수 있다. 그러나 비고정화 방식의 앵타머 개발 기술을 이용하게 되면 위에서 열거한 모든 한계를 극복할 수 있으며 타겟의 결합부위가 제한적이지 않기 때문에 앵타머 개발에 필요한 선별 과정 반복 횟수를 줄일 수 있는 장점도 가지고 있다. 그렇기 때문에 비고정화 방식으로 앵타머를 개발할 수 있는 기술 발명을 위해 종래에 미세전자기계 시스템(MEMS), 모세관 전기이동 시스템(Capillary Electrophoresis) 기술 등이 활용되었으나 고가의 장비, 장치 사용의 복잡성, 숙련된 인력의 필요성 등은 여전히 문제점으로 남아있다. 한편, 그래핀은 2차원 구조의 탄소 구조체로서 열안정성, 전기적 특성 및 강도가 매우 우수하며 단일가닥 DNA의 염기 부분과 π -스태킹을 통해 결합하기 때문에 이러한 특성들을 응용한 광범위한 연구가 실시되고 있다.

[0008] 순수한 금 나노입자의 용액 색은 붉은색이고, 앵타머가 물리적으로 금 나노입자에 흡착이 된 후 타겟을 넣어주면, 앵타머와 타겟 간의 친화도가 앵타머와 금 나노입자 간의 친화도보다 크기 때문에 앵타머는 타겟과 결합하게 된다(Y. S. Kim, et al., A novel colorimetric aptasensor using gold nanoparticle for a highly sensitive and specific detection of oxytetracycline, Biosensors and Bioelectronics, Volume 26, Issue 4, 15 2010). 이때, NaCl을 첨가해주면 타겟을 첨가해준 튜브에서는 금 나노 입자가 뭉치게 되면서 색깔 변화를 관찰할 수 있다. 반면, 타겟이 없는 튜브에서는 앵타머가 NaCl로 인한 금 나노 입자의 응집(aggregation)을 방해하기 때문에, 색 변화를 관찰할 수 없다. 이러한 특성을 바탕으로 앵타머-금 나노입자를 이용하여 타겟 물질을 검출할 수 있다. 또한, 금 나노입자 용액을 UV 분광광도계(spectrophotometer)로 흡광도를 측정하면, 순수한 금 나노입자 용액은 520 nm 에서 가장 높은 흡광도를 보이는 반면에 색이 푸른 계열로 변한 후에는 650 nm 에서 가장 높은 흡광도를 보이게 된다. 따라서 650 nm 에서의 흡광도 값을 520 nm 에서의 흡광도 값으로 나눈 값은 타겟에 의해 응집(aggregation)이 일어난 정도와 비례해서 증가한다.

[0009] 기존의 25-하이드록시 비타민 디3의 검출방법은 25-하이드록시 비타민 디3와 결합할 수 있는 항체를 포함하고, 2-8℃에 보관되어야만 하는 키트를 이용하여 25-하이드록시 비타민 디3를 검출하는 방법을 주로 사용한다. 그러나, 기존의 방법은 항체를 사용하기 때문에 반응 온도가 중요하며, 7-14일의 짧은 키트의 사용기간 뿐만 아니라, 한 번의 테스트당 소모되는 비용이 매우 높고 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 특히 혈중 25-하이드록시 비타민 디3의 분석은 POCT 분석(Point-of-Care Testing) 분석이 중요한데, 기존의 검출방법은 주로 기기분석에 기대고 있기 때문에, 현장 분석이 거의 불가능한 단점이 있다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 대표적인 주요 비타민인 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3)에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 핵산 앵타머를 개발하였다. 또한, 상기 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 포함하는 금 나노입자 기반 색도 분석기법을 사용할 경우, 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3)를 효과적으로 검출할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머를 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 핵산 앵타머를 이용한 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)의 검출방법을 제공하는데 있다.

[0014] 본 발명의 또다른 목적은 상기 핵산 앵타머를 포함하는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3) 검출용 조성물, 검출용 센서 및 검출용 키트를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 8 중 어느 하나의 염기서열을 가지는, 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머를 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)의 검출방법을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, 핵산 앵타머를 포함하는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3) 검출용 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한, 핵산 앵타머를 포함하는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3) 검출용 센서를 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한, 핵산 앵타머를 포함하는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3) 검출용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3) 검출용 핵산 앵타머, 이를 포함하는 25-하

트록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)의 검출방법, 검출용 조성물, 검출용 센서 및 검출용 키트는 높은 정확도와 민감성으로 시료 중 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)를 검출할 수 있어, 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3) 결핍 관련 질병 진단에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0024]

- 도 1은 핵산 앵타머를 이용한 금 나노입자 기반의 색도 분석법을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)에 특이적으로 결합 가능한 핵산 앵타머 제조 과정의 모식도이다.
- 도 3은 각 selection round 에서부터 얻어진 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)에 결합하는 ssDNA의 양이 증가함을 보여주는 그래프이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 서열번호 1의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 서열번호 2의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명에 따른 서열번호 3의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 7은 본 발명에 따른 서열번호 4의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 8은 본 발명에 따른 서열번호 5의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 9는 본 발명에 따른 서열번호 6의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 10은 본 발명에 따른 서열번호 7의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 11은 본 발명에 따른 서열번호 8의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 12는 본 발명에 따른 핵산 앵타머의 타겟 정확도를 측정한 결과이다.
- 도 13는 본 발명의 핵산 앵타머 VDBA14를 이용한 다양한 검출시료의 금 나노입자 기반 색도 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 14은 본 발명에 따른 핵산 앵타머 VDBA14를 이용한 다양한 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3) 농도의 금 나노입자 기반 색도 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025]

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 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0027]

본 발명에서는, 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)에 특이적으로 결합 가능한 핵산 앵타머를 선별하기 위하여 GO SELEX 프로세스를 수행하였다. 그 결과 서열번호 1 내지 8로 표시되는 핵산 앵타머가 상기 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다. 즉, 본 발명의 일 실시예에서는, 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 GO SELEX 프로세스를 이용하여 선별하였다. 본 발명에 사용된 GO SELEX 프로세스는 임의적으로 합성된 DNA 또는 RNA의 집합에서 특정 분자에 대해 높은 결합력을 지니는 DNA 또는 RNA를 선별하여 증폭시킴으로써 해당 분자의 DNA 결합 서열을 알아내는 방법(J.W. Park, R.Tatavarty, D.W.Kim, H.T.Jung and M.B.Gu (2012), Immobilization-free screening of aptamers assisted by graphene oxide, Chemical Communications, 48,15,2071-2073)을 말한다.

[0028]

본 발명의 용어 "GO SELEX 프로세스"란 임의적으로 합성된 DNA 또는 RNA의 집합에서 특정 분자에 대해 높은 결합력을 지니는 DNA 또는 RNA를 선별하여 증폭시킴으로써 해당 분자의 DNA 결합 서열을 알아내는 방법을 말한다.

[0029]

따라서, 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1 내지 8 중 어느 하나의 염기서열을 가지는, 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머에 관한 것이다.

[0030]

본 발명에 있어서, 상기 핵산 앵타머가 RNA인 경우에는 상기 핵산서열에서 T는 U임을 특징으로 할 수 있다.

[0032]

본 발명의 앵타머는 또한 이 기술분야에서의 자체 공지 방법에 의해 화학 합성할 수 있다.

- [0033] 본 발명의 앵타머는, 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)에 대한 결합성, 안정성 등을 높이기 위해, 각 뉴클레오타이드의 당 잔기(예, 리보오스나 디옥시리보스)가 수식된 것이어도 좋다. 당잔기에서 수식되는 부위로서는, 예컨대 당잔기의 2'부위, 3'부위 및/또는 4'부위의 산소원자를 다른 원자로 치환한 것 등을 들 수 있다. 수식의 종류로서는, 예컨대 플루오로화, O-알킬화(예, O-메틸화, O-에틸화), O-알릴화, S-알킬화(예, S-메틸화, S-에틸화), S-알릴화, 아미노화(예, -NH)를 들 수 있다. 이러한 당잔기의 변형은, 자체 공지의 방법에 의해 행할 수 있다(예컨대 Sproat *et al.*, (1991) *Nucle. Acid. Res.* 19, 733-738; Cotton *et al.*, (1991) *Nucl. Acid. Res.* 19, 2629-2635; Hobbs *et al.*, (1973) *Biochemistry* 12, 5138-5145 참조).
- [0034] 본 발명의 앵타머는 또한 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)에 대한 결합성 등을 높이기 위해, 핵산염기(예, 푸린, 피리미딘)가 변형(예, 화학적 치환)된 것이어도 좋다. 이러한 변형으로서는, 예컨대 5부위 피리미딘 변형, 6 및/또는 8부위 푸린 변형, 환외(環外) 아민에서의 변형, 4-티오우리딘으로의 치환, 5-브로모 또는 5-요오드-우리실으로의 치환을 들 수 있다.
- [0035] 또한, 뉴클레아제 및 가수분해에 대하여 내성을 갖도록, 본 발명의 앵타머에 포함되는 인산기가 변형되어 있어도 좋다. 예컨대 P(O)O기가, P(O)S(티오에이트), P(S)S(디티오에이트), P(O)NR₂(아미데이트), P(O)R, R(O)OR', CO 또는 CH₂(포름아세탈) 또는 3'-아민(-NH-CH₂-CH₂-)으로 치환되어 있어도 좋다 [여기서 각각의 R 또는 R'은 독립적으로, H이거나, 또는 치환되어 있거나, 또는 치환되어 있지 않은 알킬(예, 메틸, 에틸)이다]. 연결기로서는, -O-, -N- 또는 -S-가 예시되고, 이들의 연결기를 통하여 인접하는 뉴클레오타이드에 결합할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서의 변형은 또한, 캡핑과 같은 3' 및 5'의 변형을 포함하여도 좋다.
- [0037] 변형은 또한, 폴리에틸렌글리콜, 아미노산, 펩티드, inverted dT, 핵산, 뉴클레오시드, 미리스토일(Myristoyl), 리소콜릭-올레일(Lithocolic-oleyl), 도코사닐(Docosanyl), 라우로일(Lauroyl), 스테아로일(Stearoyl), 팔미토일(Palmitoyl), 올레오일(Oleoyl), 리놀레오일(Linoleoyl), 그 외 지질, 스테로이드, 콜레스테롤, 카페인, 비타민, 색소, 형광물질, 항암제, 독소, 효소, 방사성 물질, 비오틴 등을 말단에 부가함으로써 행해질 수 있다. 이러한 변형에 대해서는, 예컨대 미국특허 제5,660,985호, 미국특허 제5,756,703호를 참조한다.
- [0039] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 제조방법을 제공한다:
- [0040] a) 양끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30 내지 50개의 임의의 염기를 가지는 단일가닥 핵산 풀(pool)과 타겟물질 또는 카운터 타겟물질을 완충용액에서 혼합하여 상온에서 결합을 유도하는 단계;
- [0041] b) 상기 혼합액과 그래핀을 반응시켜 타겟물질과 결합한 또는 카운터 타겟물질에 결합하지 않는 단일가닥 핵산을 제거하는 단계
- [0042] c) 상기 단계에서 얻은 타겟물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥 핵산에 대해 상기 PCR용 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하여 증폭시키는 제3단계
- [0043] d) 상기 타겟물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥 핵산에 대해 타겟물질과 카운터 타겟물질을 이용하여 그래핀 기반 선별(selection) 및 카운터 선별(counter selection)하는 과정을 반복 수행하는 단계
- [0044] e) 상기 그래핀 기반 카운터 선별 단계에서 카운터 타겟물질에 결합하는 타겟 비특이적인 단일가닥 핵산을 제거하고, 그래핀에 결합된 타겟 특이적인 단일가닥 핵산에 대해 타겟에 의한 배좌 변위(Conformational change)를 유발시켜 그래핀으로부터 타겟 특이적인 앵타머를 분리하는 단계.
- [0045] 본 발명의 방법에서, 상기 d) 단계에서 프라이머 쌍 중 하나에 플루오레세인(fluorescein)이 붙여진 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 후, 전기영동을 통해 기 변성된 단일가닥 DNA를 분리하는 단계를 더 포함하는 것 특징으로 한다.
- [0047] 본 발명은 또한, 본 발명의 핵산 앵타머를 포함하는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3) 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0048] 본 발명의 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3) 검출용 조성물은 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)를 검출하기 위한 것으로, 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)는 신체의 거의 모든 조직에서 그 수용체가 발견된다는 점으로 미루어 볼 때, 각종 질병과의 연관성 또한 높다. 따라서, 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)의 검출을 위해 본 발명의 핵산 앵타머를 이용하여 어떠한 형태로도 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 핵산 앵타머를 자성비드에 고정화시켜 25-하이드록시 비타민 디

3(25-hydroxy Vitamin D3)를 결합시키게 되면 결합된 DNA 앵타머- 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3) 복합체(complex)를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)를 분리함으로써 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)만을 선택적으로 검출할 수 있게 된다.

- [0049] 본 발명의 구성물을 이용하는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)의 제거방법의 한 예를 들면, 상기 핵산 앵타머가 고정화된 자성비드를 컬럼(column)에 채운 후 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)를 포함하는 시료를 통과시켜 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)만을 선택적으로 제거할 수 있다.
- [0051] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 핵산 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)의 검출방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명에서는 금 나노입자 기반의 색도 분석으로 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)를 검출할 수 있다. 즉, 금 나노입자 표면을 변형하여 앵타머를 금 나노입자 표면에 공유결합 등으로 고정하여 타겟 물질이 있을 때 두 개 이상의 금 나노입자 거리가 서로 가까워짐으로 인해 응집(agggregation)이 일어나서 금 나노입자 용액의 색이 붉은색에서 푸른색 계열로 변하는 특징을 이용하거나, 변형되지 않은 금 나노입자 표면에 앵타머가 물리적으로 흡착되어 있다가 타겟 물질이 있을 때 흡착되어 있던 앵타머와 타겟과의 결합으로 인해 금 나노입자의 표면에서 떨어져 나오는 현상에 의해 색이 변하는 특징을 이용하여 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)를 검출할 수 있다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)는 물, 토양, 식품, 폐기물, 동식물 장내 및 동식물 조직, 동식물 분변 중 어느 하나 이상에서 채취된 시료로부터 검출되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이때, 상기 물은 강수(江水), 해수(海水), 호수(湖水) 및 우수(雨水) 등을 포함하고, 폐기물은 하수, 폐수 등을 포함하며, 상기 동식물은 인체를 포함한다.
- [0054] 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 서열번호 1 내지 8로 표시되는 핵산 앵타머 중 가장 높은 친화도를 보인 서열번호 1로 표시되는 핵산서열인 앵타머 VDBA14에 대하여 금 나노입자 기반 색도 분석을 수행한 결과, 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3) 특이적으로 결합함을 확인하였다.
- [0055] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서 상기 핵산 앵타머를 포함하는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3) 검출용 센서에 관한 것이다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 센서는 고병원성 조류독감바이러스 및 저병원성 조류독감바이러스를 구별할 수 있는 것을 특징으로 할 수 있고, 고병원성 조류독감바이러스는 바람직하게는 H5N1 또는 H5N8인 것을 특징으로 할 수 있고, 저병원성 조류독감바이러스는 H5N2인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0057] 본 발명은 또한 상기 핵산 앵타머를 포함하는 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3) 검출용 키트에 관한 것이다.
- [0058] 본 발명의 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3) 검출용 키트는 병, 통(tub), 작은 봉지(sachet), 봉투(envelope), 튜브, 앰플(ampoule) 등과 같은 형태를 취할 수 있으며 이들은 부분적으로 또는 전체적으로 플라스틱, 유리, 종이, 호일, 왁스 등으로부터 형성될 수 있다. 용기는, 처음에는 용기의 일부이거나 또는 기계적, 접착성, 또는 기타 수단에 의해 용기에 부착될 수 있는, 완전히 또는 부분적으로 분리가 가능한 마개를 장착할 수 있다. 용기는 또한 주사바늘에 의해 내용물에 접근할 수 있는, 스톱퍼가 장착될 수 있다. 상기 키트는 외부 패키지를 포함할 수 있으며, 외부 패키지는 구성 요소들의 사용에 관한 사용설명서를 포함할 수 있다.
- [0060] 본 발명에 따른 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)에 특이적으로 결합하는 앵타머는 또한, 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)만을 특이적으로 검출하는바, 이를 포함하여 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)의 검출 또는 제거용 구성물을 제공할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에게 자명한 것이다.
- [0061] 본 발명은 또 다른 관점에서, 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용한 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)의 제거방법에 관한 것이다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 바람직하게는 상기 앵타머가 고정된 비드를 컬럼에 충전하고 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)가 포함된 시료를 통과시켜 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy Vitamin D3)를 제거할 수 있다.
- [0063] [실시예]
- [0064] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위

한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0066] **실시예 1: 임의의 염기서열을 가지는 DNA pool 합성**

[0067] 56mer DNA pool로서 양 끝에 PCR을 위한 프라이머 영역(primer region)이 있고 중앙에 임의의 염기를 가진 DNA pool을 아래와 같은 방법으로 합성하였다. 본 발명에 사용된 DNA pool은 Genotech Inc. Korea에 화학적으로 합성을 의뢰하였다.

[0068] AGCAGCACAGAGGTCATG-random region-TTCCGTAGCACGCATAGG

[0069] 서열번호 9: AGCAGCACAGAGGTCATG

[0070] 서열번호 10: TTCCGTAGCACGCATAGG

[0072] **실시예 2: 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3) 에 특이 DNA 앵타머의 선별**

[0073] 상기 실시예 1에서 합성된 랜덤 DNA pool을 카운터 타겟 [리소콜릭에시드(Lithocholic acid), 케노디옥시콜릭에시드(Chenodeoxycholic acid), 디옥시콜릭에시드(Deoxycholic acid), 소듐디옥시콜레이트(Sodium deoxycholate), 콜레스테롤(Cholesterol)] 과 버퍼용액(20mM Tris-Cl buffer, pH 7.6 contained 100mM NaCl, 2mM MgCl₂, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 0.02% Tween20)에 넣고 혼합하여 30분간 상온에서 반응시킨 후, 카운터 타겟과 결합하지 않은 DNA를 확보하기 위해 위의 혼합액과 그라핀 옥사이드 용액을 30분간 상온에서 반응시켰다. 이때 카운터 타겟과 결합하지 않은 단일가닥 DNA는 그라핀의 표면에 π -스태킹을 통해 강력하게 흡착하게 된다. 원심분리를 통해 카운터 타겟과 결합한 DNA를 제거하였다. 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3)에 특이적으로 결합하는 DNA를 확보하기 위해 그라핀만 있는 위 튜브에 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3)를 첨가한후 30분간 상온에서 반응시킴으로서, 배와 변위(Conformational change)를 유발시켜 그라핀으로부터 타겟 특이적인 앵타머를 분리한 후, 에탄올 침전법으로 타겟 특이적DNA를 확보하였다. 이렇게 얻어진 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3) 에 특이적으로 결합하는 DNA의 양을 측정하였다.

[0074] 도 3에 개시된 바와 같이, 각 선별단계(selection round)에서 얻어진 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3)에 결합하는 DNA의 양이 증가하고 있음을 확인하였다.

[0076] **실시예 3: 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3)에 결합 가능한 DNA 앵타머 pool의 제조**

[0077] 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3) 와 결합 특이적인 DNA의 양을 늘리기 위해 이미 알고 있는 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0078] PCR 생산물은 두 가닥의 DNA이므로 이를 단일가닥으로 분리하기 위한 과정을 위하여, 아래와 같이 하나의 프라이머에는 플루오레세인(fluorescein)을 고정하였다.

[0079] forward (APTFf) 5-fluorescein-AGCAGCACAGAGGTCATG-3:

[0080] reverse (APTR) 5- CCTATGCGTGCTACGGAA-3:

[0081] PCR 반응물을 정제키트(purification kit)를 이용하여 정제한 후 이중가닥의 DNA를 단일가닥으로 만들기 위해 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동을 실시하였다. 10%의 폴리아크릴아마이드 젤에는 6M의 요소(urea), 20%의 포름아마이드(formamide)가 포함되어 있어 전기영동 후에는 두 개의 밴드가 생기는데, 이는 전기영동 과정에서 두 가닥의 DNA가 변성되어 플루오레세인이 붙어있는 DNA 가닥은 위에, 붙어있지 않은 DNA 가닥은 아래에 각각 위치하게 된다. 플루오레세인이 붙어 있는 DNA 밴드를 잘라내어 젤 추출(gel extraction)을 실시한 후 다시 에탄올 침전법으로 분리된 DNA를 확보하였다. 이 때 확보된 DNA pool은 다시 처음의 카운터 타겟 [리소콜릭에시드(Lithocholic acid), 케노디옥시콜릭에시드(Chenodeoxycholic acid), 디옥시콜릭에시드(Deoxycholic acid), 소듐디옥시콜레이트(Sodium deoxycholate), 콜레스테롤(Cholesterol)]이 녹아있는 버퍼용액과 혼합하여 새로운 선별과정을 시작한다. 이러한 과정의 모식도를 도 2에 나타내었고, 일련의 과정(GO-SELEX process)을 한 번의 선별(selection)이라 하면 총 3번의 선별과정을 거쳐 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3)에 결합하는 DNA pool을 얻었다. 최종적으로 얻어진 DNA pool을 Quiagen cloning kit를 이용하여 클로닝(cloning)하고 얻어진 콜로니에서부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행할 결과, 서로 다른 8종의 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3)에 특이적으로 결합하는 핵산 구조체를 확보하였다.

[0083] **실시예 4: 8종의 DNA 앵타머의 염기서열 분석 및 특이성 분석**

[0084] 서로 다른 8종의 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3) 에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 DNA의 염기서열을 분석한 결과를 하기 표 1에 개시하였다. 또한, 이 8종의 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3) 앵타머의 2차 구조를 m-fold 프로그램을 이용하여 예측한 결과를 도 4 내지 11에 나타내었다.

표 1

[0085] 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3) 에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 서로 다른 8종의 DNA 앵타머의 염기서열

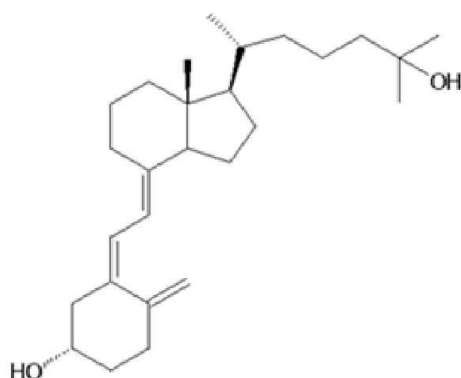
서열번호	앵타머	염기서열 (5'-3')
1	VDBA14	AGCAGCACAGAGGTCATGGGGGGTGTGACTTTGGTGTGCCTATGCGTGCTACGGAA
2	VDBA16-1	AGCAGCACAGAGGTCATGTGTGTGGGTTTCATTAGACGCCCTATGCGTGCTACGGAA
3	VDBA22	AGCAGCACAGAGGTCATGGGCACCTCGTATCAGTGCATCCTATGCGTGCTACGGAA
4	VDBA31	AGCAGCACAGAGGTCATGGTGTGAGGCGGCTGTGTTGTCCCTATGCGTGCTACGGAA
5	VDBA32	AGCAGCACAGAGGTCATGTACGTGTACGGTAGGATTGCCTATGCGTGCTACGGAA
6	VDBA34	AGCAGCACAGAGGTCATGGTGTGGTGTGTGGGTGTGGGCCTATGCGTGCTACGGAA
7	VDBA35	AGCAGCACAGAGGTCATGCGCGGTCGTTGTGCAGGGTGCCTATGCGTGCTACGGAA
8	VDBA28	AGCAGCACAGAGGTCATGCGGTGGTGTGCGGGGTTGGCCCTATGCGTGCTACGGAA

[0086] 상기 8종의 DNA 앵타머 중에서 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3) 에 대한 특이성이 가장 높은 2종의 앵타머를 다음과 같이 선택하였다.

[0087] 80uM의 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3)[화학식 1], 리소콜릭에시드(Lithocholic acid)[화학식2], 케노디옥시콜릭에시드(Chenodeoxycholic acid)[화학식3], 디옥시콜릭에시드(Deoxycholic acid)[화학식4], 소듐디옥시콜레이트(Sodium deoxycholate)[화학식5], 콜레스테롤(Cholesterol)[화학식6] 과 10uM의 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3) 결합 앵타머를 상온에서 10분간 흡착 반응시킨 후 11nM의 금 나노입자를 첨가하여 5분간 반응시켰다. 상기 용액에 0.0625M NaCl을 첨가하여 salt induced gold aggregation을 유도한 후 금 나노입자 용액의 UV 흡광도를 측정하였다.

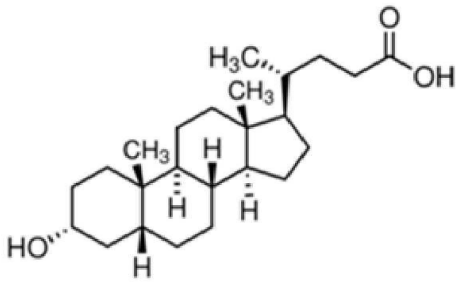
[0088] 그 결과, 도 12에 개시된 바와 같이, 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3)와 결합력이 가장 높은 앵타머는 VDBA14인 것을 확인하였으며, UV 흡광도 그래프 및 반응 후 샘플 사진은 도13에 개시된 바와 같다.

[0089] [화학식 1]



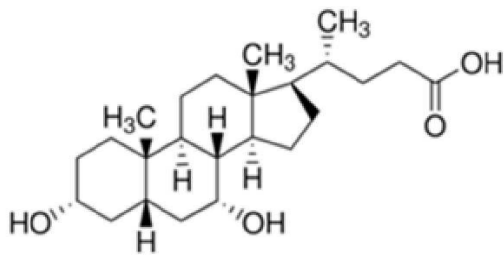
[0090]

[0091] [화학식 2]



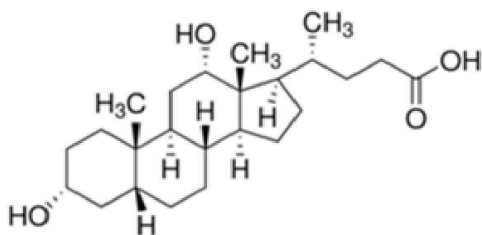
[0092]

[0093] [화학식 3]



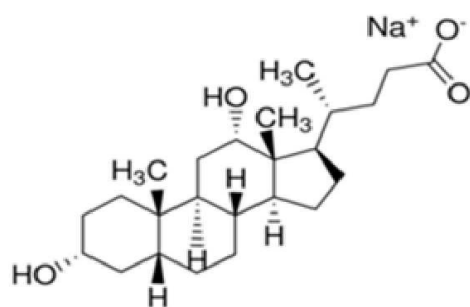
[0094]

[0095] [화학식 4]



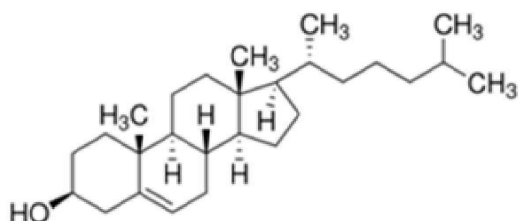
[0096]

[0097] [화학식 5]



[0098]

[0099] [화학식6]



[0100]

[0102] 실시예 5: DNA 앵타머의 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3) 와의 결합력 분석

[0103] 서로 다른 8종의 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3) 에 특이적으로 결합하는 앵타머 중에서 가장

특이도가 높은 애포머인 VDBA14와 다양한 농도의 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3) 와의 결합을 분석하였다.

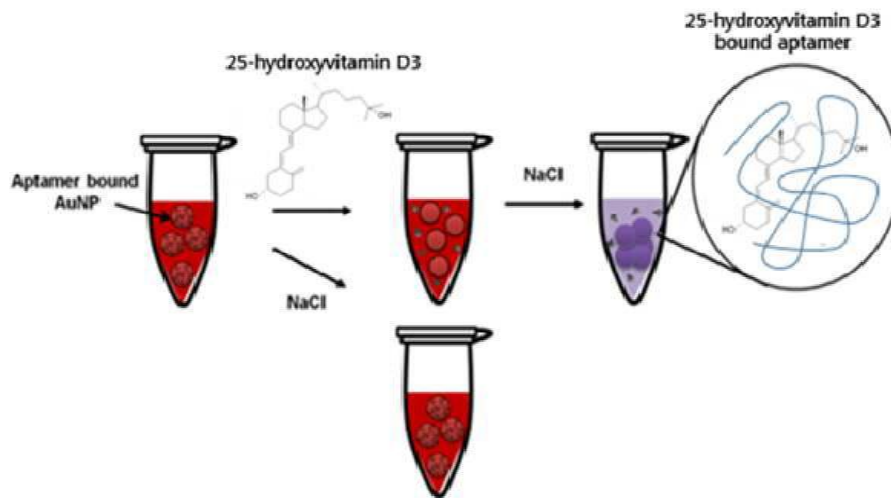
[0104] 80uM의 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3) 과 10uM의 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3) 결합 애포머를 상온에서 10분간 흡착 반응시킨 후 11nM의 금 나노입자를 첨가하여 5분간 반응시켰다. 상기 용액에 0.0625M NaCl을 첨가하여 salt induced gold aggregation을 유도한 후 금 나노입자 용액의 UV 흡광도를 측정하였다.

[0105] 도 14에 개시된 바와 같이, UV 흡광도 및 반응 후 샘플의 색깔이 매우 낮은 농도의 25-하이드록시 비타민 디3(25-hydroxy vitaminD3)에도 특이적으로 변화하는 것을 확인 할 수 있었다.

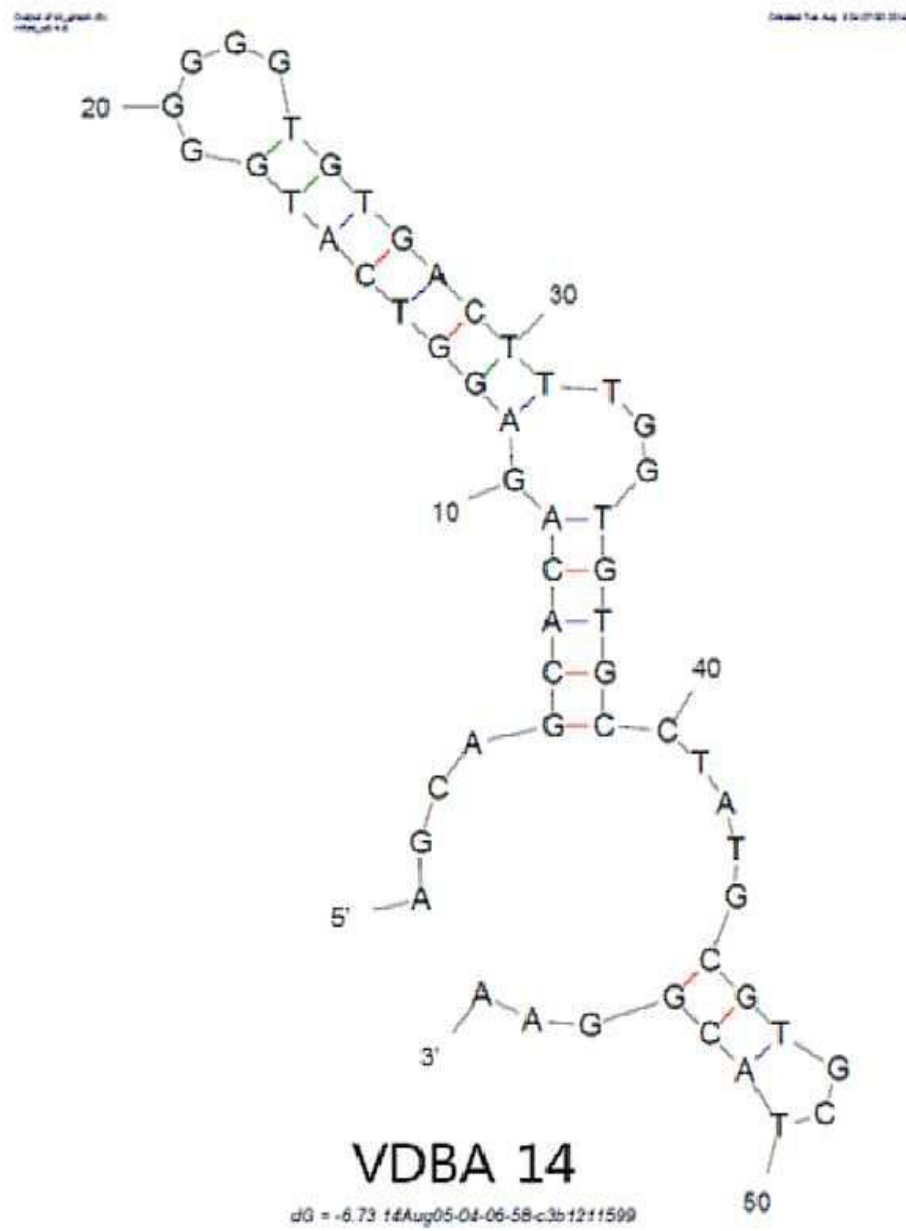
[0107] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

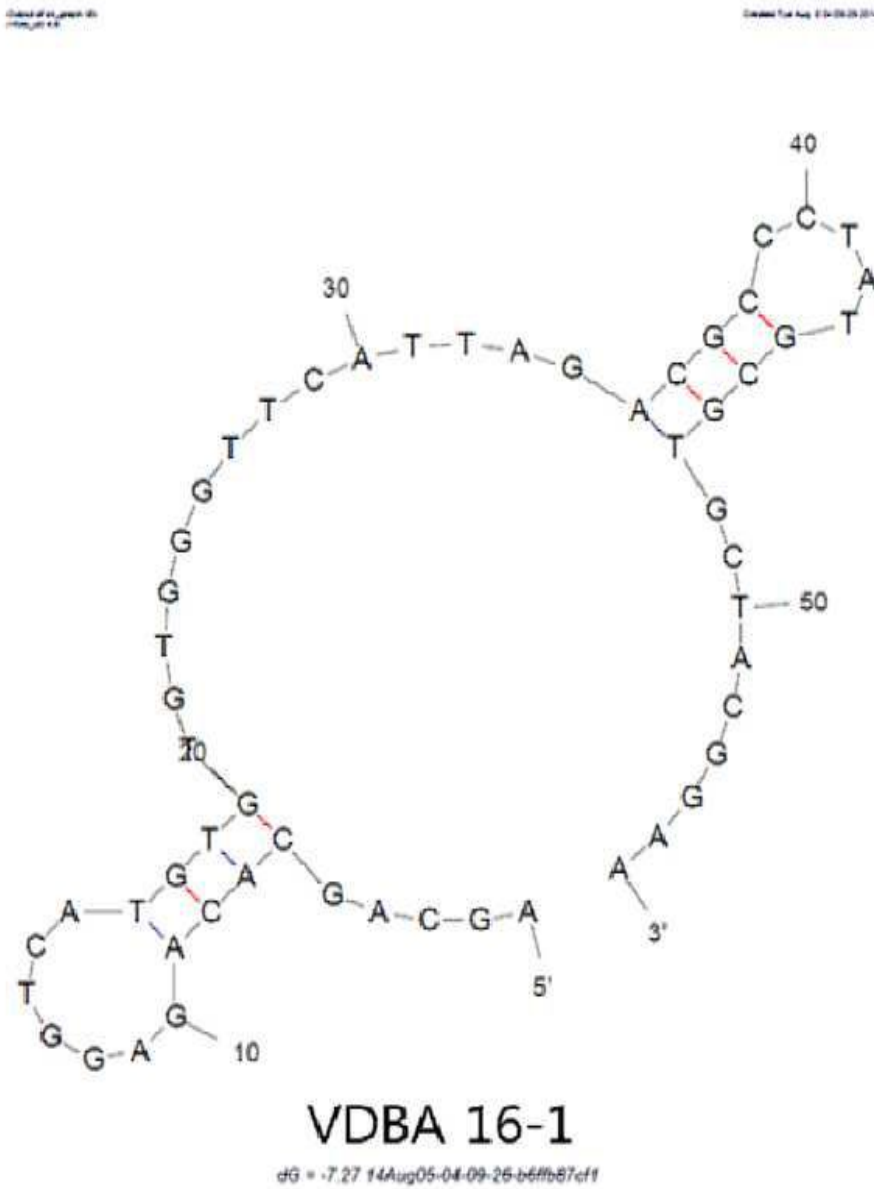
도면1



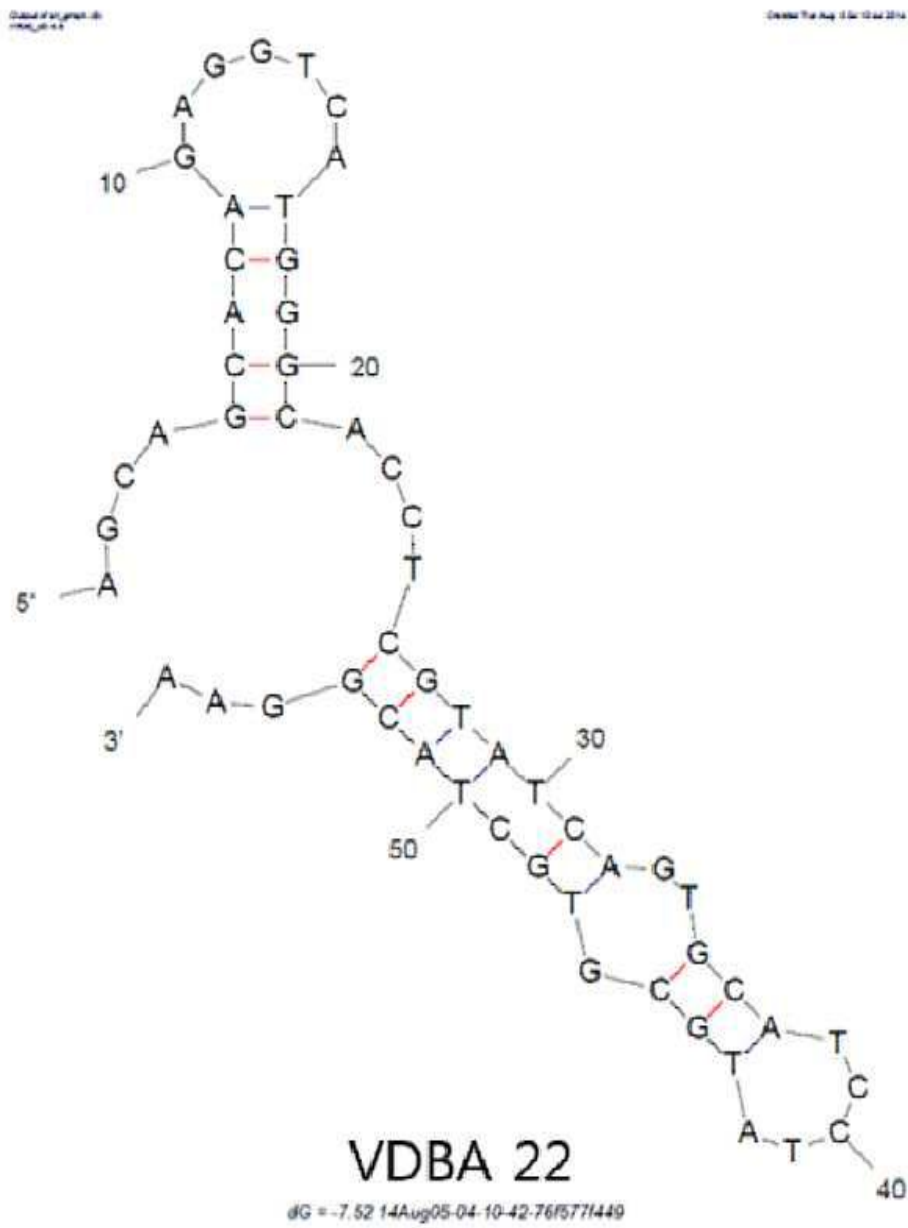
도면4



도면5



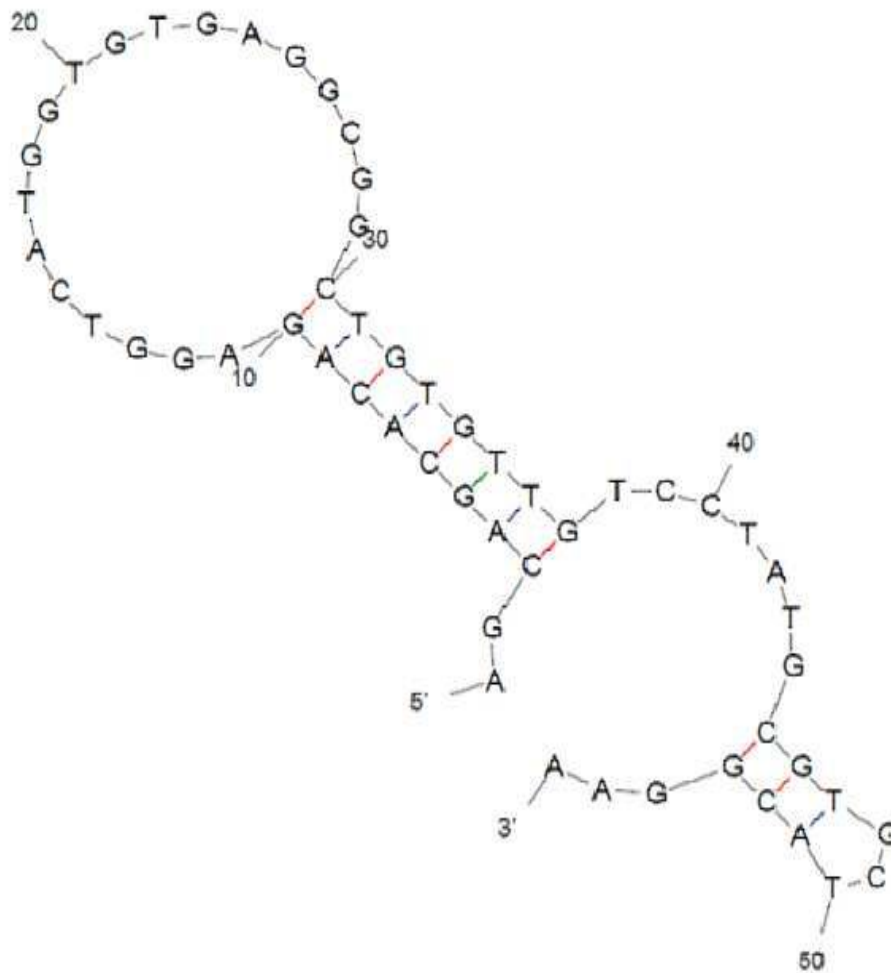
도면6



도면7

Output of mfold 3.6
mfold 3.6

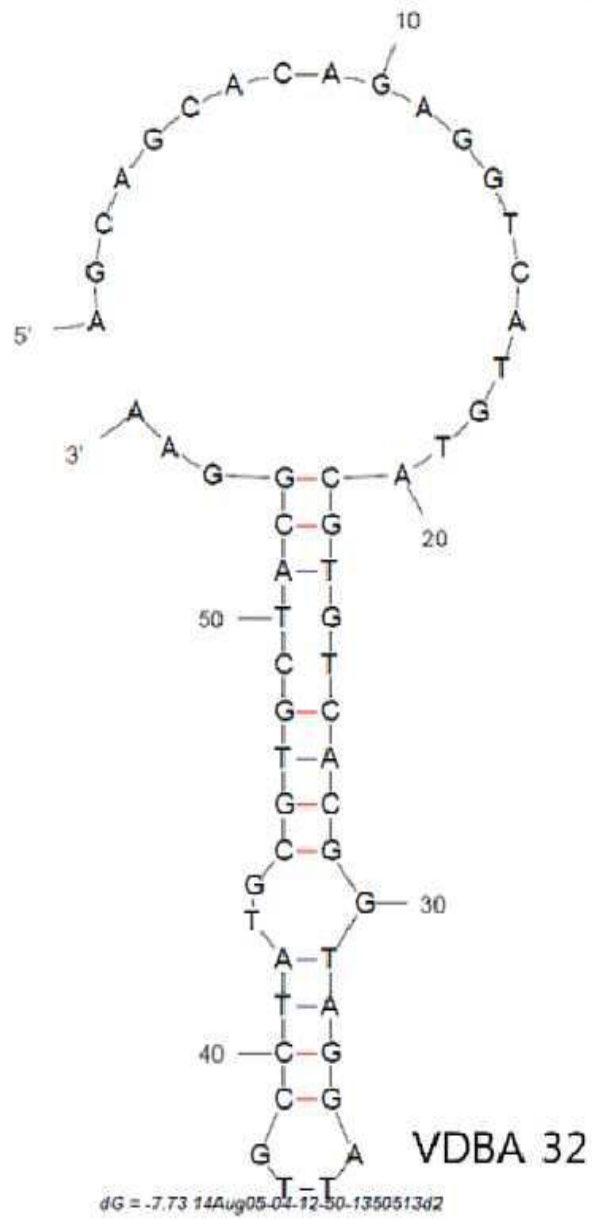
Created Thu Aug 5 04:11:03 2014



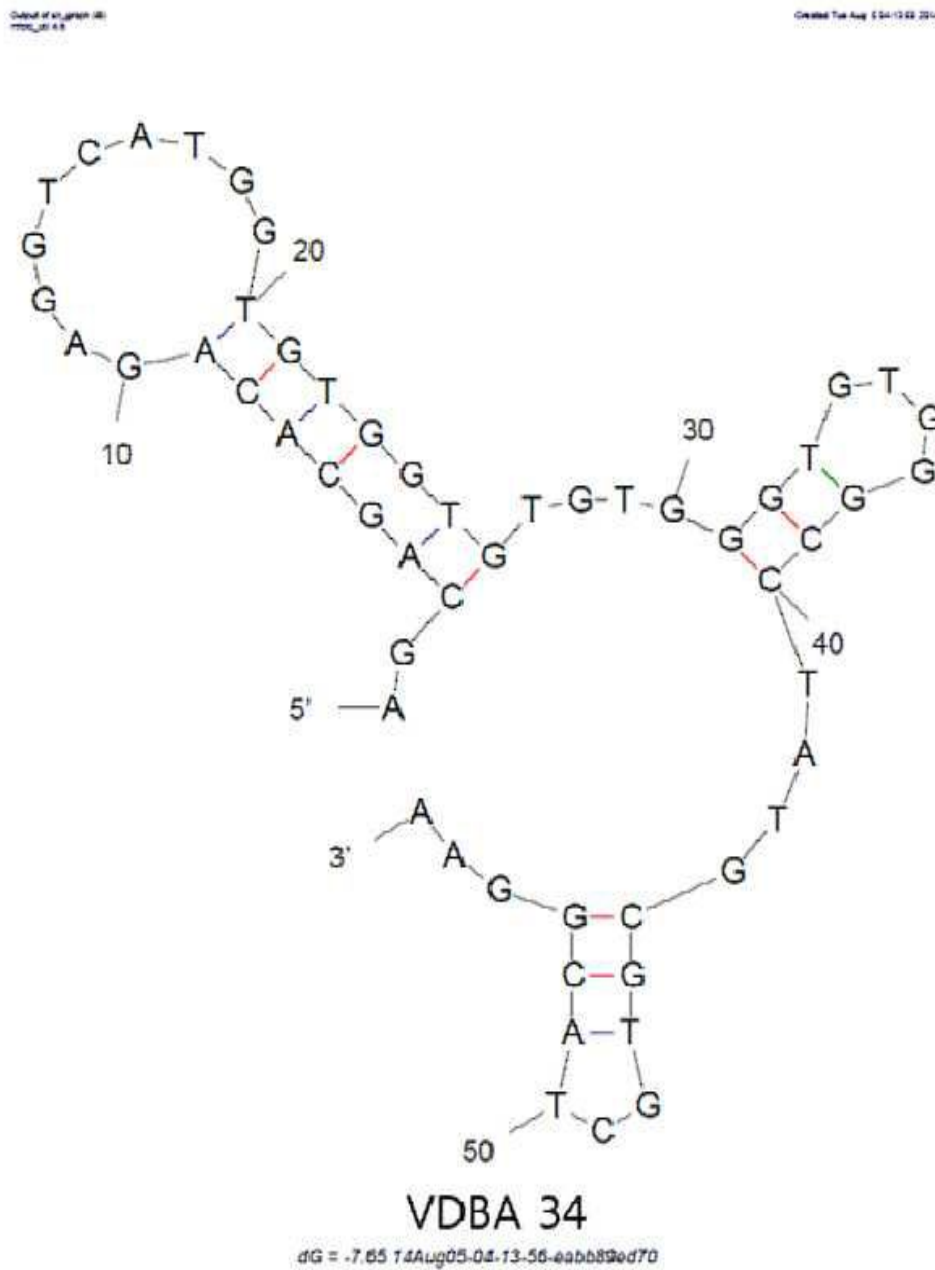
VDBA 31

dG = .6.41 14Aug05-04-11-53-57738a4efc

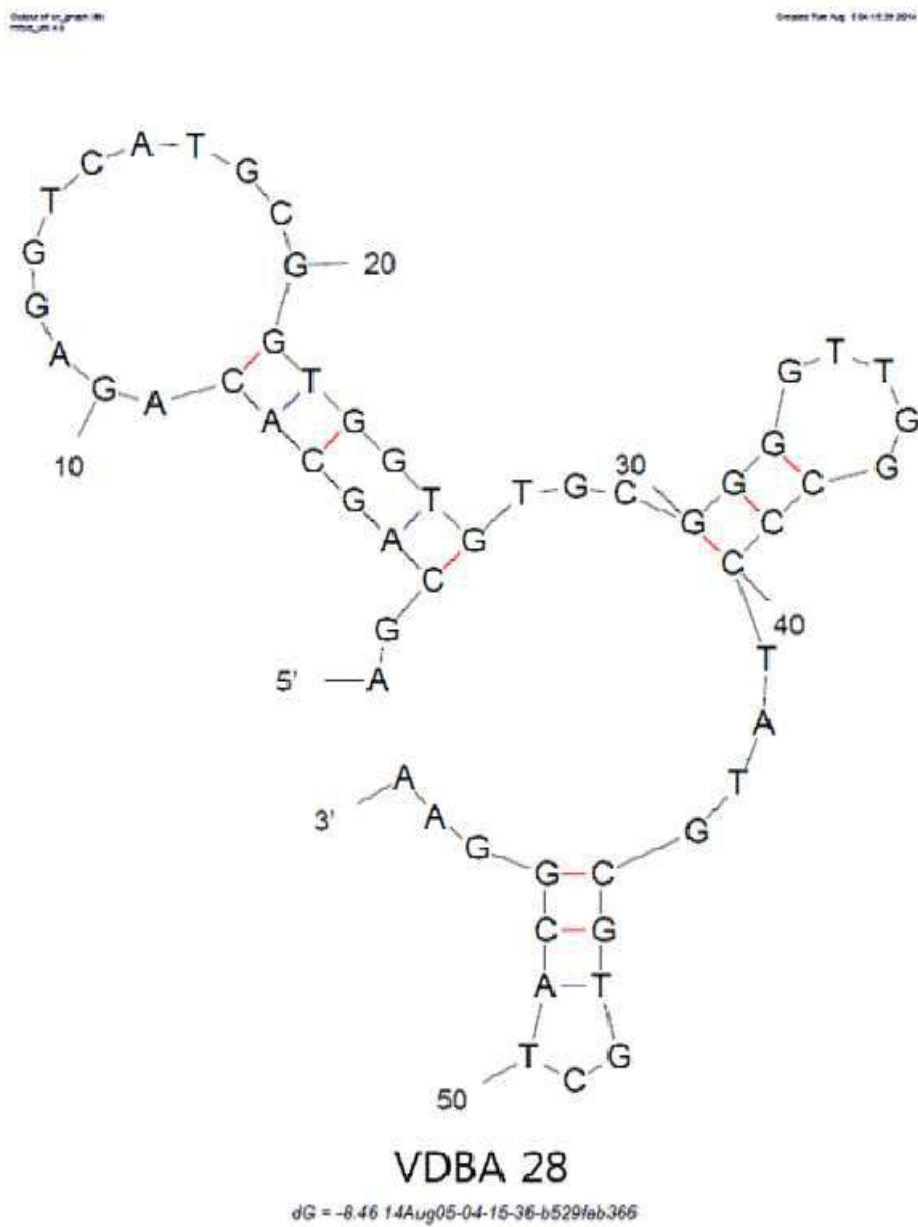
도면8



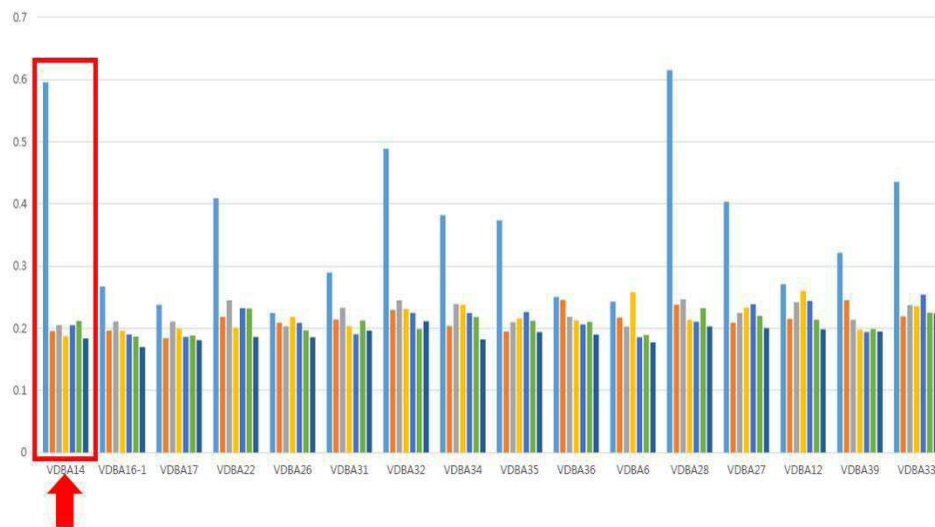
도면9



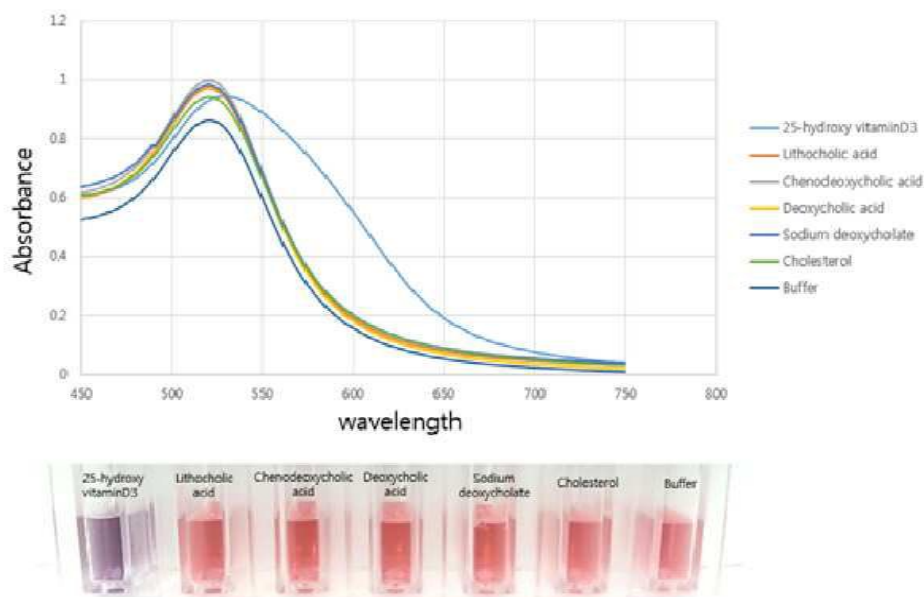
도면11



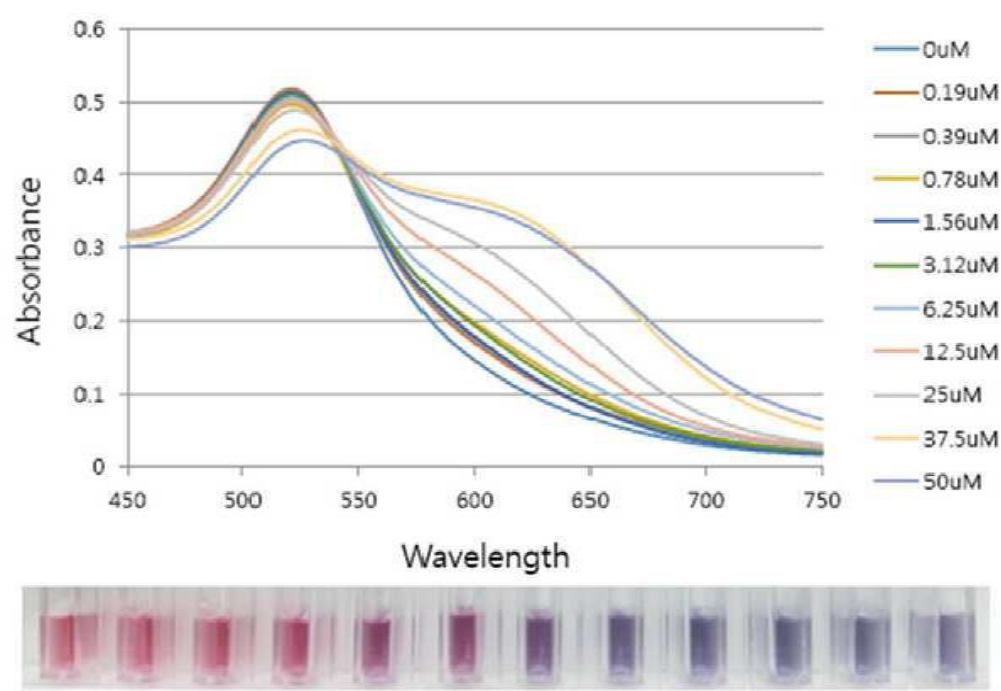
도면12



도면13



도면14



서 열 목 록

<110>	Korea University Research and Business Foundation	
<120>	Nucleic Acid Aptamer Capable of Specifically Binding to 25-hydroxy Vitamin D3 and Uses Thereof	
<130>	P15-B161	
<160>	10	
<170>	Kopatent In 2.0	
<210>	1	
<211>	56	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	VDBA14	
<400>	1	
	agcagcacag aggtcatggg ggggtgtgact ttggtgtgcc tatgcgtgct acggaa	56
<210>	2	
<211>	56	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	VDBA16-1	

<400> 2
 agcagcacag aggtcatgtg tgtgggttca ttagacgccc tatgcgtgct acggaa 56
 <210> 3
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VDBA22
 <400> 3
 agcagcacag aggtcatggg cacctcgat cagtgcattcc tatgcgtgct acggaa 56
 <210> 4
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VDBA31
 <400> 4
 agcagcacag aggtcatggt gtgaggcggc tgtgtgtgcc tatgcgtgct acggaa 56
 <210> 5
 <211> 56
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> VDBA32
 <400> 5
 agcagcacag aggtcatgta cgtgtcacgg taggattgcc tatgcgtgct acggaa 56
 <210> 6
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VDBA34
 <400> 6
 agcagcacag aggtcatggt gtggtgtgtg ggtgtgggcc tatgcgtgct acggaa 56
 <210> 7
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> VDBA35

<400> 7

agcagcacag aggtcatgcg cggtcgttgt gcagggtgcc tatgcgtgct acggaa 56

<210> 8

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VDBA28

<400> 8

agcagcacag aggtcatgcg gtggtgtgcg gggttgcccc tatgcgtgct acggaa 56

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Foward primer

<400> 9

agcagcacag aggtcatg 18

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Backward primer

<400> 10

ttccgtagca cgcatagg 18