



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월24일

(11) 등록번호 10-1515306

(24) 등록일자 2015년04월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/115 (2010.01) *G01N 33/53* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0166051

(22) 출원일자 2013년12월27일

심사청구일자 2013년12월27일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020100093502 A*

비특허문헌1(2010)*

KR1020130087274 A*

US20110262922 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

박상수

경기 남양주시 도농로 34, 210동 1201호 (도농동, 부영그린타운)

박준희

경기 고양시 일산서구 후곡로 35, 503동 904호 (일산동, 후곡마을5단지아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 15 항

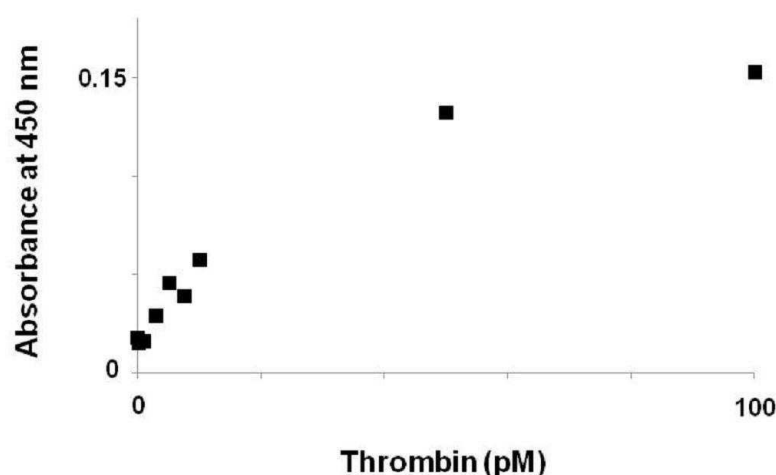
심사관 : 김승오

(54) 발명의 명칭 **엡타머를 포함하는 ELISA 변형키트**

(57) 요약

본 발명은 항체 대신에 표적물질과 결합할 수 있는 두 종류의 엡타머를 기관과 표적물질에 각각 결합시키는 단계를 포함하는 ELISA 변형키트를 이용하여 표적물질을 정량하는 방법, 상기 ELISA 변형키트를 이용하여 표적물질을 검출하는 방법, 상기 방법에 사용되는 ELISA 변형키트 및 상기 ELISA 변형키트의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 ELISA 변형키트를 이용하면, 종래의 항체를 포함하는 ELISA 키트보다도 현저히 낮은 수준의 검출한계값(LOD)를 나타내고, 반응시간이 단축되며, 오류발생율이 감소하여 정확도가 증가하며, 키트의 제작단가를 저하시켜 경제적인 생산을 가능하게 할 수 있으므로, 표적물질의 보다 효과적인 검출 및 정량에 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

조예슬

인천 부평구 부흥로243번길 7, 101동 2104호 (부평동, 대우아파트)

이은정

서울 동대문구 장안벚꽃로 107, 112동 1602호 (장안동, 장안현대홈타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0021956

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국과학재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 앵타머를 이용한 관심 금속이온의 선택적 추출

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2011.09.01 ~ 2014.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-001680

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국과학재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 나노물질을 이용한 고감도의 DNA 메틸화 정량분석방법 개발

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

(a) (i) 기관에 부착되고 표적 물질에 특이적으로 결합하는 제1 앵타머 및, (ii) 표지물질과 직접 결합되고 표적물질에 특이적으로 결합하는 제2 앵타머를 포함하는 ELISA 변형키트에, 표적물질을 포함하는 시료를 처리하여 반응시키는 단계; 및

(b) 상기 제2 앵타머에 직접 결합된 표지물질의 수준을 측정하여, 제1 앵타머 및 제2 앵타머에 동시에 결합된 표적물질의 양을 검출 또는 정량하는 단계를 포함하는 표적물질의 정량방법으로서,

상기 표지물질은 HRP(Horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(Alkaline phosphatase), 글루코오즈 옥시다아제(Glucose Oxidase), 베타-D-갈락토시다아제(β -D-galactosidase), 말산탈수소효소(MDH: malate dehydrogenase), 아세틸콜린에스터라아제(acetylcholinesterase), 이들의 유사체 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 효소인 것인, 표적물질의 정량방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 표지물질은 HRP(Horseradish peroxidase)인 것인 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 표적물질은 트롬빈인 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 앵타머는 각각 서열번호 1 및 2의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 기관은 유리, 알루미늄, 세라믹, 탄소, 금, 은, 구리, 알루미늄, 화합물 반도체, 실리콘 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 물질인 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 기관은 실란 처리를 하여 표면에 아미노기 또는 티올기가 형성된 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 상기 시료를 제1 앵타머와 먼저 반응시켜 기관-제1 앵타머-표적물질 형태의 제1 복합체를 구성하고, 상기 제1 복합체에 제2 앵타머를 가하여 반응시켜서 기관-제1 앵타머-표적물질-제2 앵타머-표지물질 형태의 제2 복합체를 구성하며, 상기 제2 복합체에 결합된 표지물질의 수준을 측정함으로써 수행하는 것인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 ELISA 변형키트에 상기 표적물질을 농도별로 처리하여 각각의 측정값을 수득한 다음, 이를 기준으로 상기 시료로부터 측정된 값을 분석하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 10

(a) (i) 기관에 부착되고 표적 물질에 특이적으로 결합하는 제1 앵타머 및, (ii) 표지물질과 직접 결합되고 표적물질에 특이적으로 결합하는 제2 앵타머를 포함하는 ELISA 변형키트에, 표적물질을 포함하는 시료를 처리하여 반응시키는 단계; 및

(b) 상기 제2 앵타머에 직접 결합된 표지물질의 수준을 측정하여, 제1 앵타머 및 제2 앵타머에 동시에 결합된 표적물질의 양을 검출 또는 정량하는 단계를 포함하는 표적물질의 검출방법으로서,

상기 표지물질은 HRP(Horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(Alkaline phosphatase), 글루코오즈 옥시다아제(Glucose Oxidase), 베타-디-갈락토시다아제(β -D-galactosidase), 말산탈수소효소(MDH: malate dehydrogenase), 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase), 이들의 유사체 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 효소인 것인, 표적물질의 검출방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 ELISA 변형키트에 포함된 앵타머와 결합하지 않는 대조군을 처리하고 이의 측정값을 수득한 다음, 이를 기준으로 상기 시료로부터 측정된 값을 분석하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 방법에 사용되고, 기관에 부착되고 표적 물질에 특이적으로 결합하는 제1 앵타머 및 표지물질과 직접 결합되고 표적물질에 특이적으로 결합하는 제2 앵타머를 포함하는, ELISA 변형키트로서,

상기 표지물질은 HRP(Horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(Alkaline phosphatase), 글루코오즈 옥시다아제(Glucose Oxidase), 베타-디-갈락토시다아제(β -D-galactosidase), 말산탈수소효소(MDH: malate dehydrogenase), 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase), 이들의 유사체 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 효소인 것인, ELISA 변형키트.

청구항 13

- (a) 표적물질에 결합할 수 있고, 서로 다른 염기서열을 가지는 제1 앵타머와 제2 앵타머를 수득하는 단계; 및,
(b) 상기 제1 앵타머는 기관에 결합시키고, 제2 앵타머는 표적물질과 직접 결합시키는 단계를 포함하는 ELISA 변형키트의 제조방법으로서,

상기 표적물질은 HRP(Horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(Alkaline phosphatase), 글루코오즈 옥시다아제(Glucose Oxidase), 베타-디-갈락토시다아제(β -D-galactosidase), 말산탈수소효소(MDH: malate dehydrogenase), 아세틸콜린에스터라아제(acetylcholinesterase), 이들의 유사체 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 효소인 것인, ELISA 변형키트의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 표적물질은 HRP(Horseradish peroxidase)인 것인 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

- (a) 표적물질에 결합할 수 있는 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 제1 앵타머를 합성하고, 이를 기관에 결합시켜서, 기관에 결합된 제1 앵타머를 수득하는 단계; 및

- (b), 표적물질에 결합할 수 있고, 제1 앵타머의 폴리뉴클레오티드 서열과는 다른 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 제2 앵타머를 표적물질이 결합된 폴리뉴클레오티드를 사용하여 수득하는 단계를 포함하는 ELISA 변형키트의 제조방법으로서,

상기 표적물질은 HRP(Horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(Alkaline phosphatase), 글루코오즈 옥시다아제(Glucose Oxidase), 베타-디-갈락토시다아제(β -D-galactosidase), 말산탈수소효소(MDH: malate dehydrogenase), 아세틸콜린에스터라아제(acetylcholinesterase), 이들의 유사체 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 효소인 것인, ELISA 변형키트의 제조방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 표적물질은 HRP(Horseradish peroxidase)인 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 앵타머를 포함하는 ELISA 변형키트에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 항체 대신에 표적물질과 결합할 수 있는 두 종류의 앵타머를 기관과 표적물질에 각각 결합시키는 단계를 포함하는 ELISA 변형키트를 이용하여 표적물질을 정량하는 방법, 상기 ELISA 변형키트를 이용하여 표적물질을 검출하는 방법, 상기 방법에 사용되는 ELISA 변형키트 및 상기 ELISA 변형키트의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

앵타머(aptamer)는 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수

있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산 (DNA, RNA 또는 변형핵산)이다. 앵타머는 무작위적인 서열을 가지는 핵산 라이브러리인 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) 과정을 통해 얻을 수 있다. 상기 앵타머는 항체의 좋은 대안으로 여겨지고 있는데, 많은 앵타머들은 금속이온들과 작은 화학 분자들, 단백질들, 심지어 세포에 대해서 나노몰에서 피코몰 수준의 해리 상수를 가질 만큼 특이적으로 결합한다고 알려져 있다. 또한, 앵타머는 항체와 비교하여 구체적인 실험에서 보다 유리한 다음과 같은 특징들이 있다. 첫번째 특징은 앵타머가 어떤 분자들 (작은 무기이온들부터 세포까지)을 표적으로 정할 수 있게 구축된 핵산 라이브러리로부터 얻을 수 있다는 점이다. 이와 같은 특징은 세포나 동물로부터 얻어져야 하는 항체의 제한점을 극복할 수 있게 한다. 두 번째 특징은 선정된 앵타머를 PCR (Polymerase chain reaction) 과정을 통해 증폭과정을 수행하거나 높은 순도를 가지는 많은 양의 앵타머를 얻기 위해 전사과정을 진행할 수 있다는 점들을 들 수 있다. 세 번째 특징은 앵타머가 비교적 단순한 화학적 구조를 가졌기 때문에 고체표면에 고정화하는 등의 다른 목적으로 사용하고자 하는 경우에 그 작용기를 변화시키기 쉽다는 점이다. 마지막으로, 앵타머는 항체보다 훨씬 더 안정하기 때문에 좀 더 거친 조건 (높은 온도나 극단의 pH에 대해서도)을 필요로 하는 화학적 응용 과정에 이용될 수 있다. 그 밖에도 앵타머는 화학적으로 대량 합성이 가능하므로 경제성이 우수하고, 항체에 버금가는 표적 친화력을 가지고 있으며, 항체에 비해 크기가 월등히 작다 (약 1~2nm정도)는 특징을 가지고 있다.

[0003]

이와 같은 항체에 비해 우수한 앵타머의 효과로 인해 앵타머를 이용한 특정 분자에 대한 바이오센서를 개발하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다. 특히 앵타머 어레이 (Aptamer arrays)를 만드는 것은 매우 유용하다. 최근 유전자와 질병을 분석하기 위한 강력한 도구로 각광받고 있는 고집적 DNA기반 마이크로 어레이 (microarrays)는 DNA와 같은 핵산을 검출하는데 사용되었지만 그 검출결과만으로는 우리에게 필요한 모든 정보를 얻을 수 없기 때문에, 좀 더 많은 정보를 얻기 위한 단백질을 검출 및 정량하기 위한 핵산 형태의 앵타머 기반 마이크로 어레이의 요구가 커지고 있다. 단백질에 대한 정보를 얻기 위해 단백질이 고체표면에 고정화된 단백질기반 마이크로 어레이를 이용하기도 하지만 이는 항체를 고체표면에 고정화한 후 이용한다는 점에서 경제성이 낮고, 단백질의 변성 없이 마이크로 어레이에서 유지하기 쉽지 않다는 문제점이 있다. 이러한 문제점을 해결하는 방안으로서 앵타머를 활용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0004]

예를 들어, 한국 특허공개 제2008-0084029호에는 형광표지된 앵타머를 사용하여 표적 단백질을 검출하는 방법 및 이에 사용되는 키트가 개시되어 있고, 한국 특허공개 제2011-0126942호에는 기준 전극 및 분석 대상 물질과 결합하는 앵타머(Aptamer)가 고정화될 수 있는 작업 전극이 구비된 기판을 포함하여 전기화학적 신호를 검출할 수 있는 바이오칩 및 그의 이용 방법이 개시되어 있으며, 한국 특허공개 제2013-0087274호에는 기판에 결합된 앵타머와 쿠마씨 블루 용액을 이용하여 표적 단백질을 검출하는 방법이 개시되어 있다.

[0005]

그러나, 이들 기술은 앵타머를 단순한 결합용 매체로만 사용하고 있을 뿐, 종래의 항체에 비하여 뚜렷한 장점을 나타내는 앵타머를 활용하지 못하고 있다는 문제점이 있었다. 예를 들어, 항체를 이용한 대표적인 분석키트인 ELISA 키트의 경우, 항체에 표지물질이 결합된 상태로 제작된다. 상기 항체에 표지물질을 직접적으로 결합시킬 경우, 항체의 구조 또는 기능이 변질되어 검출감도가 저하되는 등의 문제점이 발생하므로, 현재는 항체에 표지물질을 결합시키는 방법으로서, 항체에는 그의 구조 및 기능을 변질시키지 않는 바이오틴을 결합시키고, 표지물질에는 스트렙타비딘을 결합시킨 후, 바이오틴과 스트렙타비딘의 결합을 통해 항체와 표지물질을 간접적으로 결합시키는 방식이 사용되고 있다. 이같은 방법으로 ELISA 키트를 제작할 경우에는, 제작비용과 제작시간이 과다하게 소요된다는 문제점이 있는데, 이러한 문제점은 본질적으로 항체를 사용하기 때문에 발생하므로, 이러한 항체를 앵타머로 대체하는 방안이 연구되고 있다. 그러나, 아직까지는 항체를 대체하여 앵타머를 사용하는 방법에 대한 뚜렷한 연구결과가 보고되지 않고 있는 실정이다.

[0006]

이러한 배경하에서, 본 발명자들은 종래의 항체와 구별되는 앵타머의 장점을 활용하고자 예의 연구노력한 결과, 종래의 항체를 사용하는 ELISA에서 상기 항체를 앵타머로 대체할 경우, 항체와는 달리 앵타머에 표지수단을 직접적으로 결합시켜서, 보다 신속하고 경제적으로 ELISA 키트를 제작할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 하나의 목적은 항체 대신에 앵타머를 사용하는 ELISA 변형키트를 사용하여 표적물질을 정량하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 ELISA 변형키트를 사용하여 표적물질을 검출하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법에 사용되는 ELISA 변형키트를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 ELISA 변형키트의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 항체 대신 앵타머를 포함하는 ELISA 변형키트를 사용하여 표적물질을 검출 또는 정량하는 방법을 제공한다.
- [0012] 구체적으로, 본 발명의 표적물질의 검출 또는 정량방법은 (a) (i) 기관에 부착되고 표적 물질에 특이적으로 결합하는 제1 앵타머 및, (ii) 표적물질과 직접 결합되고 표적물질에 특이적으로 결합하는 제2 앵타머를 포함하는 ELISA 변형키트에, 표적물질을 포함하는 시료를 처리하여 반응시키는 단계; 및 (b) 상기 제2 앵타머에 직접 결합된 표적물질의 수준을 측정하여, 제1 앵타머 및 제2 앵타머에 동시에 결합된 표적물질의 양을 검출 또는 정량하는 단계를 포함한다. 이때, 상기 시료는 ELISA 변형키트에 포함된 제1 앵타머와 먼저 반응시켜 기관-제1 앵타머-표적물질 형태의 제1 복합체를 구성하고, 상기 제1 복합체에 제2 앵타머를 가하여 반응시켜서 기관-제1 앵타머-표적물질-제2 앵타머-표적물질 형태의 제2 복합체를 구성하며, 상기 제2 복합체에 결합된 표적물질의 수준을 측정함으로써 표적물질을 검출하거나 정량할 수 있다.
- [0013] 상기 검출결과를 정확히 판단하기 위하여, 상기 ELISA 변형키트에 포함된 앵타머와 결합하지 않는 대조군을 처리하고 이의 측정값을 수득한 다음, 이를 기준으로 상기 시료로부터 측정된 값을 분석하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0014] 상기 정량결과를 정확히 판단하기 위하여, 상기 ELISA 변형키트에 상기 표적물질을 농도별로 처리하여 각각의 측정값을 수득한 다음, 이를 기준으로 상기 시료로부터 측정된 값을 분석하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명자들은 종래의 항체와 구별되는 앵타머의 장점을 활용하고자 다양한 연구를 수행하던 중, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 키트에 주목하게 되었다. 일반적으로, ELISA 키트는 효소와 결합된 항체를 이용하여 목적하는 표적물질의 검출 또는 정량분석을 수행하기 위하여 사용되는데, 상업적으로 판매되는 ELISA 키트는 민감도 및 특이도를 향상시키기 위하여 대체로 샌드위치 ELISA 키트의 형태로 제조된다. 상기 샌드위치 ELISA 키트는 표적물질에 결합할 수 있는 두 종류의 항체를 포함하는데, 하나는 고정화기관에 결합된 형태이고, 다른 하나는 효소와 결합되어 발색반응을 수행하기 위하여 사용된다. 상기 샌드위치 ELISA 키트를 사용하는 방법은, 항체가 결합된 고정화기관에 시료를 가하여 시료에 존재하는 항원을 상기 기관에 결합된 항체에 결합시켜 기관-항체-항원 복합체를 형성한 다음, 상기 기관에 발색반응을 수행하는 효소가 결합된 다른 항체를 가하여 반응시켜서 기관-항체-항원-항체-효소의 복합체를 형성하고, 이에 상기 효소에 의해 발색되는 기질을 가하여 반응시켜서, 상기 기질로부터 발색여부를 확인하거나 또는 발색수준을 측정함으로써, 상기 시료에 목적하는 항원(표적물질)이 존재하는 지 또는 상기 항원의 양이 얼마나 되는지를 확인하게 된다. 만일, 상기 시료에 목적하는 항원이 없다면, 기관-항체-항원-항체-효소의 복합체가 형성되지 않으므로, 상기 기질을 가하여도 발색반응이 일어나지 않는다.
- [0016] 이에, 본 발명자들은 ELISA 키트에 포함된 항체를 앵타머로 대체한 결과, 항체에 비하여 제조가 용이하고, 표적물질을 결합시키기가 용이하며, 안정성이 우수하여 상온에서 장기간 동안 보관이 가능하고, 고온 또는 극한의 pH 조건에서도 표적물질과 정상적으로 결합할 수 있다는 앵타머의 장점이 그대로 반영된 형태의 ELISA 변형키트를 제작할 수 있었다.
- [0017] 예를 들어, 본 발명자들은 트롬빈에 결합하는 것으로 알려진 15-mer(서열번호 1) 및 29-mer(서열번호 2)의 앵타머를 이용하여 트롬빈 검출용 ELISA 변형키트를 제작하였다. 상기 제작된 트롬빈 검출용 ELISA 변형키트는 15-mer(서열번호 1)의 앵타머가 결합된 기관과, 말레이미드링커를 사용하여 HRP(Horseradish peroxidase)가 직접적

으로 결합된 형태의 29-mer(서열번호 2)의 앵타머를 포함한다.

- [0018] 상기 제작한 트롬빈 검출용 ELISA 변형키트는 말레이미드링커를 사용하여 HRP가 직접적으로 결합된 형태의 29-mer(서열번호 2)의 앵타머를 포함한다는 점에서 종래의 ELISA 키트와 구별된다.
- [0019] 먼저, 종래의 ELISA 키트는 HRP가 직접적으로 결합된 항체를 사용할 수 없는데, 약 44kDa의 크기를 갖는 HRP를 100 내지 200kDa의 항체에 직접 결합시키면, HRP로 인하여 항체의 구조가 변화되어 정상적인 항체의 기능을 수행할 수 없기 때문이다. 따라서, 종래의 ELISA 키트는 HRP가 결합된 2차 항체를 사용하거나 또는 바이오틴-스트렙타비딘 링커를 이용하여 간접적으로 HRP가 결합된 항체를 포함하도록 제작되었다.
- [0020] 이에 반하여, 본 발명의 ELISA 변형키트는 말레이미드링커를 사용하여 HRP가 직접적으로 결합된 형태의 29-mer(서열번호 2)의 앵타머를 사용할 수 있는데, 약 9kDa의 크기를 갖는 29-mer(서열번호 2)의 앵타머는 약 44kDa의 상대적으로 거대한 크기를 갖는 HRP가 결합되어도 트롬빈과의 결합력에 영향을 받지 않기 때문이다. 따라서, 본 발명의 ELISA 변형키트는 HRP가 직접적으로 결합된 앵타머를 포함하도록 제작되었다.
- [0021] 한편, ELISA 키트의 제작공정의 측면에서, 상기 본 발명의 ELISA 변형키트와 종래의 ELISA 키트를 비교하면, 본 발명의 ELISA 변형키트는 말레이미드링커를 사용하여 앵타머에 HRP를 직접 결합시키는 공정을 수행하는 것으로 충분한 반면, 종래의 ELISA 키트는 HRP가 결합된 2차 항체를 제작하는 공정 또는 항체에 바이오틴을 결합시키고, HRP에 스트렙타비딘을 결합시킨 후, 다시 바이오틴과 스트렙타비딘을 반응시키는 공정이 수행되어야 하므로, 상대적으로 제작에 비용과 시간이 과다하게 소요됨을 알 수 있다.
- [0022] 아울러, ELISA 키트의 사용방법의 측면에서, 본 발명의 ELISA 변형키트는 종래의 ELISA 키트보다도 월등하게 낮은 수준의 LOD(limit of detection) 값을 나타낸다. 상술한 서열번호 1 및 2의 앵타머를 사용하여 제작한 트롬빈 검출용 ELISA 변형키트를 사용하여 트롬빈을 대상으로 LOD 값을 측정한 결과, 0.1 내지 100pM의 LOD 값을 나타냄을 알 수 있었다. 이는 종래의 ELISA 키트에서 측정되는 μM 수준의 LOD와는 약 백만배의 검출수준 차이를 나타내는 것으로 확인되었다. 이러한 검출수준의 차이는 전적으로 앵타머를 사용하였기 때문인데, 앵타머는 항체보다도 표적물질에 대한 결합특이성이 우수할 뿐만 아니라, 결합된 표적물질에 의한 구조적인 변화가 발생하지 않기 때문인 것으로 분석되었다.
- [0023] 뿐만 아니라, 상기 본 발명의 ELISA 변형키트와 종래의 ELISA 키트를 비교하면, 본 발명의 ELISA 변형키트를 사용할 경우에는 상대적으로 단순한 구조로 인하여 극히 낮은 수준의 반응오류율을 나타내는 반면, 종래의 ELISA 키트를 사용할 경우에는 상대적으로 복잡한 구조로 인하여 비교적 높은 수준의 반응오류율을 나타낸다.
- [0024] 이처럼, 본 발명의 ELISA 변형키트는 신속하고 경제적으로 제작할 수 있을 뿐만 아니라, 절대적으로 낮은 수준의 LOD 값을 나타내고, 상대적으로 낮은 반응오류율을 나타내므로, 종래의 ELISA 키트에 비하여 뚜렷한 장점을 갖는다고 할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 용어 "ELISA 변형키트"란, 통상적인 샌드위치 ELISA 키트에 있어서, 항체를 앵타머로 대체한 형태의 변형된 ELISA 키트를 의미한다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 ELISA 변형키트는 기관에 부착되고 표적 물질에 특이적으로 결합하는 제1 앵타머 및 표지물질과 직접 결합되고 표적물질에 특이적으로 결합하는 제2 앵타머를 포함한다. 특히, 상기 제2 앵타머에 직접 결합되는 표지물질로는 효소, 형광물질, 방사성 물질 등의 종래에 표지물질로 사용되어온 것을 모두 사용할 수 있으면서도, 상기 직접적인 결합으로 인하여 입체장애 등이 발생하지 않는다는 장점이 있다.
- [0027] 상기 표적물질은 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 항체 또는 앵타머와 결합할 수 있는 단백질성 물질이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 두개의 서로다른 염기서열을 가지는 앵타머와 동시에 결합할 수 있는 단백질성 물질이 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 트롬빈이 될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 용어 "앵타머(aptamer)"란, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오티드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 앵타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오티드로 구성되어 있으므로, ELISA 키트의 제조시 항체를 대체하여 사용될 수 있다.

- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 앵타머는 특별히 이에 제한되지 않으나 표적물질과 결합할 수 있는 제1 앵타머 및 제2 앵타머가 될 수 있고, 바람직하게는 상기 제1 앵타머와 제2 앵타머는 서로 다른 폴리뉴클레오티드 서열로 구성되어, 상기 표적물질과 동시에 결합할 수 있으며, 보다 바람직하게는 트롬빈과 결합할 수 있고, 기관에 부착되며, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 앵타머 및 트롬빈과 결합할 수 있고, 표지물질과 직접 결합되며, 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 앵타머가 될 수 있다.
- [0030] 제1 앵타머: 5'-GGT TGG TGT GGT TGG-3'(서열번호 1)
- [0031] 제2 앵타머: 5'-AGT CCG TGG TAG GGC AGG TTG GGG TGA CT-3'(서열번호 2)
- [0032] 본 발명의 용어 "기관(substrate)"이란, 앵타머를 부착시킬 수 있는 지지체를 의미한다. 상기 기관의 종류는 당 업계에 통상적으로 사용되는 앵타머를 고정시킬 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 유리, 알루미늄, 세라믹, 탄소, 금, 은, 구리, 알루미늄, 화합물 반도체, 실리콘 등이 될 수 있다. 상기 기관은 앵타머를 결합시키기 위하여 표면 처리될 수 있는데, 상기 표면 처리는 앵타머를 고정화시키기 위한 관능기를 포함할 수 있도록 수행될 수 있으며, 바람직하게는 알데히드기, 카르복실기, 아민기 또는 티올기로 개질될 수 있다. 예를 들어, 유리 기관이나 반도체 기관을 사용할 경우, 실란 처리를 하여 아미노기(-NH₂, -NH₂ 등) 또는 티올기를 형성할 수 있고, 상기 실란 처리를 효과적으로 하기 위해 실란 처리 전에 하이드록실(hydroxyl)(-OH)기를 만들기 위한 처리를 할 수도 있다.
- [0033] 본 발명의 용어 "표지물질"이란, 본 발명의 ELISA 변형키트에 포함된 자유 앵타머에 결합되어 상기 자유 앵타머가 표적물질에 결합되었는지의 여부를 확인할 수 있게 하는 수단을 의미한다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 표지물질은 특별히 이에 제한되지 않으나, Q dot(Quantum dot), 효소, 콜로이드 금(Colloid gold), 형광물질(Fluorescein), 방사성 물질 및 색소(Dye) 등이 사용될 수 있다. 상기 효소는 표지물질로서 사용될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, HRP(Horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(Alkaline phosphatase), 글루코오즈 옥시다아제(Glucose Oxidase), 루시페라아제(luciferase), 베타-D-갈락토시다아제(β -D-galactosidase), 말산탈수소효소(MDH: malate dehydrogenase), 아세틸콜린에스테라아제(acetylcholinesterase), 또는 이들과 유사한 활성을 나타내는 유사체 등이 될 수 있고, 상기 유사체는 H₂O₂를 생성하는 나노물질 등이 될 수 있다. 이러한 효소 또는 유사체를 사용할 경우에는 합성된 앵타머에 상기 효소 또는 유사체를 결합시킨 후, 상기 효소 또는 유사체에 의하여 발색반응을 나타낼 수 있는 기질을 추가하여 반응시킴으로써, 상기 표지물질의 결합여부를 확인할 수 있다.
- [0035] 또한, 형광물질 역시 표지물질로서 사용될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 플루오르신이소티오시아네이트(fluoresceine isothiocyanate), 피코빌리프로테인(phycobili proteins), 6-카르복시플루오레세인(6-carboxyfluorescein), 헥사클로로-6-카르복시플루오레세인(hexachloro-6-carboxyfluorescein), 테트라클로로-6-카르복시플루오레세인(tetrachloro-6-carboxyfluorescein), FAM(5-carboxy fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichloroflorescein), Cy3(cyanine-3), Cy5(cyanine-5), 6-카르복시테트라메틸-로다민(6-carboxytetramethyl-rhodamine), TAMRA(5-Carboxytetramethylrhodamine), BHQ3(black hole quencher 3) 등을 사용할 수 있다. 이러한 형광물질을 사용할 경우에는 합성된 앵타머에 상기 형광물질을 결합시킨 후, 형광현미경 등으로 형광물질을 검출함으로써, 상기 표지물질의 결합여부를 확인할 수 있다.
- [0036] 끝으로, 방사성 물질 역시 표지물질로서 사용될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁴C, ³H 등을 사용할 수 있다. 이러한 방사성 물질을 사용할 경우에는 합성된 앵타머에 상기 방사성 물질을 결합시킨 후, X-선 필름 등으로 방사성 물질을 검출함으로써, 상기 표지물질의 결합여부를 확인할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일실시예에 의하면, 앵타머 결합용 유리기관을 준비하고, 상기 준비된 유리기관에 서열번호 1의 앵타머를 결합시켜서 앵타머가 결합된 기관을 수득하고, HRP가 결합된 앵타머를 제조하여, 상기 앵타머가 결합된 기관과 HRP가 결합된 앵타머를 포함하는 ELISA 변형키트를 제작하였다(실시예 1). 또한, 상기 앵타머가 결합된 기관을 수득하고, Cy3가 표지된 앵타머를 제조하여, 상기 앵타머가 결합된 기관과 Cy3가 표지된 앵타머를 포함하는 ELISA 변형키트를 제작하였다(실시예 2). 끝으로, 상기 실시예 1에서 제작된 ELISA 변형키트를 사용하여 트

트롬빈을 정량분석한 결과, 낮은 농도의 트롬빈을 포함하는 시료는 트롬빈의 농도에 비례하여 흡광도(450 nm)가 증가하였으나, 고농도의 트롬빈을 포함하는 시료는 일정수준 이상으로 흡광도(450 nm)가 증가하지 않았으며, 상기 ELISA 변형키트는 0.1 내지 100pM 의 검출범위(LOD)에서 트롬빈을 검출할 수 있음을 확인하였다(도 2).

- [0038] 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 표적물질을 검출 또는 정량하는 방법에 사용되는 ELISA 변형키트를 제공한다.
- [0039] 상술한 바와 같이, 상기 ELISA 변형키트는 통상적인 샌드위치 ELISA 키트에 있어서, 항체를 앵타머로 대체한 형태의 변형된 ELISA 키트를 의미하는데, 구체적으로는 기관에 부착되고 표적 물질에 특이적으로 결합하는 제1 앵타머 및 표지물질과 직접 결합되고 표적물질에 특이적으로 결합하는 제2 앵타머를 포함한다.
- [0040] 경우에 따라서는, 상기 표지물질의 수준을 측정하는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수도 있다.
- [0041] 본 발명에서 제공하는 ELISA 변형키트는 표적물질에 동시에 결합할 수 있는 두개의 앵타머(제1 앵타머 및 제2 앵타머)를 포함하기 때문에, 표적물질을 포함하는 시료를 가할 경우, 상기 각 앵타머가 표적물질과 동시에 결합하여 기관-제1 앵타머-표적물질-제2 앵타머-표지물질 형태의 복합체를 형성할 수 있다.
- [0042] 특히, 상기 제2 앵타머는 표지물질과 직접적으로 결합된 형태로 구성되는데, 종래의 샌드위치 ELISA 키트와는 달리 기관에 결합되지 않은 앵타머가 바이오틴-스트렙타비딘 링커 등을 사용하지 않기 때문에, 제작이 용이하면 서도 시료에 포함된 극히 낮은 수준의 표적물질까지도 검출할 수 있다는 장점이 있으며, 이러한 특징은 종래의 샌드위치 ELISA 키트와는 명백히 구별되는 기술적 특징이라 할 수 있다.
- [0043] 이처럼 표지물질과 직접적으로 결합된 제2 앵타머는 앵타머를 합성한 후 상기 표지물질을 직접 결합시켜서 제작 할 수도 있고, 상기 표지물질이 결합된 뉴클레오티드를 사용하여 앵타머를 합성하여 제작할 수도 있다.
- [0044] 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 ELISA 변형키트의 제조방법을 제공한다.
- [0045] 구체적으로, 본 발명의 ELISA 변형키트를 제조하는 한 가지 방법은 (a) 표적물질에 결합할 수 있고, 서로 다른 염기서열을 가지는 제1 앵타머와 제2 앵타머를 수득하는 단계; 및, (b) 상기 제1 앵타머는 기관에 결합시키고, 제2 앵타머는 표지물질과 직접 결합시키는 단계를 포함한다.
- [0046] 상기 방법을 사용할 경우, 앵타머를 합성한 다음, 표지물질을 결합시켜서 제2 앵타머를 수득하기 때문에, 상기 표지물질로서 상술한 효소, 형광물질, 방사성 물질 등을 제한없이 사용할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 ELISA 변형키트를 제조하는 다른 방법은 (a) 표적물질에 결합할 수 있는 염기서열을 갖는 제1 앵타머를 합성하고, 이를 기관에 결합시켜서, 기관에 결합된 제1 앵타머를 수득하는 단계; 및 (b), 표적물질에 결합할 수 있고, 제1 앵타머의 폴리뉴클레오티드 서열과는 다른 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 제2 앵타머를 표지물질 이 결합된 뉴클레오티드를 사용하여 수득하는 단계를 포함한다.
- [0048] 상기 방법을 사용할 경우, 제2 앵타머의 제조시 표지물질을 결합시키는 단계를 생략할 수 있어, 보다 효과적으 로 ELISA 변형키트를 제작할 수 있다. 이때, 사용되는 표지물질은 폴리뉴클레오티드의 합성에 영향을 미치지 않 으면서도, 폴리뉴클레오티드 합성과정에서 표지물질로서의 활성을 손실하지 않는 형광물질 등을 사용함이 바람 직하다.
- [0049] 특히, 표지물질이 결합된 뉴클레오티드를 사용하여 앵타머를 합성하는 기술은 항체를 포함하는 종래의 ELISA 키 트에는 도저히 적용될 수 없는 기술로서, 항체 대신에 앵타머를 사용하는 본 발명의 ELISA 변형키트의 장점을 명확히 나타내는 것이라 할 수 있다.

발명의 효과

- [0050] 본 발명의 ELISA 변형키트를 이용하면, 종래의 항체를 포함하는 ELISA 키트보다도 현저히 낮은 수준의 검출한계 값(LOD)을 나타내고, 반응시간이 단축되며, 오류발생율이 감소하여 정확도가 증가하며, 키트의 제작단가를 저하시켜 경제적인 생산을 가능하게 할 수 있으므로, 표적물질의 보다 효과적인 검출 및 정량에 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0051] 도 1은 TMB 용액을 가하고 정지완충액을 가하여 반응이 종료된 상태의 바이알을 나타내는 사진이다.
- 도 2는 본 발명의 ELISA 변형키트를 사용하여 트롬빈을 정량분석한 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 3은 Cy3로 표지된 앵타머를 포함하는 ELISA 변형키트를 사용하여 대조군, 0.1pM, 0.1nM 또는 1000nM의 트롬빈을 포함하는 시료를 검출한 결과를 나타내는 형광현미경 사진으로서, 1은 대조군, 2는 0.1pM의 트롬빈을 포함하는 시료, 3은 0.1nM의 트롬빈을 포함하는 시료, 4는 1000nM의 트롬빈을 포함하는 시료를 각각 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

- [0053] 실시예 1: 항체대신 HRP가 표지된 앵타머를 포함하는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 변형키트의 제작

- [0054] 앵타머가 결합된 기관과 HRP가 결합된 앵타머를 제조하고, 이들을 포함하는 ELISA 변형키트를 제작하였다.

- [0055] 실시예 1-1: 앵타머 결합용 유리기관의 준비

- [0056] 1.0 cm x 2.0 cm 크기의 유리기관을 초음파로 5분간 처리하고 세척하였다. 상기 세척된 유리기관을 piranha solution($\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{SO}_4 = 1:3(\text{w/w})$)에 침지하고 상온에서 2-3시간 동안 반응시킨 다음, 증류수로 상기 유리기관을 세척하고, 100℃에서 1시간 동안 건조시켰다. 상기 건조된 유리기관을 반응용액((3-mercaptopropyl)-trimethoxy-silane(MPTMS):EtOH = 1:20(v/v))에 침지하고 20분동안 반응시킨 다음, 이를 바이알에 넣고 4 ml의 MPTMS 용액을 가하였다. 이어, 0.01 M NaOH를 가하고 30분동안 반응시킨 다음, 증류수로 세척하여, 앵타머 결합용 유리기관을 준비하였다.

- [0057] 실시예 1-2: 앵타머가 결합된 기관의 수득

- [0058] PBS 완충액(pH 7.2)에 서열번호 1의 앵타머 10 nmole, DMSO에 용해된 sulfo-SMCC 100 nmole 및 NH_2 를 가하고 상온에서 3시간 동안 반응시켜서 반응물을 수득하였으며, 상기 수득한 반응물을 3K microcon에 가하여 잔여량의 sulfo-SMCC를 제거하였다.

- [0059] 이어, 상기 실시예 1-1에서 준비한 유리기관에 100 μl 씩 점적하고 상온에서 하룻밤동안 방치시켰다. 그런 다음, 상기 유리기관을 PBS로 3회 이상 세척하여 기관에 결합되지 않은 앵타머를 제거함으로써, 앵타머가 결합된 기관을 수득하였다.

[0060]

실시예 1-3: HRP가 결합된 앵타머의 수득

[0061]

PBS 완충액(pH 7.2)에 서열번호 2의 앵타머 1 nmole, SATA 10 nmole 및 NH_2 를 가하고 상온에서 2시간 동안 반응시켜서 반응물을 수득하였으며, 상기 반응물에 600 μl 의 Deacetylation solution(증류수 100 ml, NH_2OH 1.65 g, sodium phosphate 1.20 g 및 EDTA 0.327 g)을 가하고 상온에서 3시간 동안 반응시켜 최종 반응물을 수득하였다. 상기 최종반응물을 3K microcon에 가하여 잔여량의 sulfo-SMCC를 제거함으로써, 티올기가 부가된 앵타머를 수득하였다. 상기 티올기가 부가된 앵타머와 말레이미드가 결합된 활성화된 HRP를 PBS 완충액에 가하고, 상온에서 하룻밤동안 반응시켰으며, 상기 반응물을 30K microcon에 가하여 HRP가 결합되지 않은 앵타머를 제거함으로써, HRP가 결합된 앵타머를 수득하였다.

[0062]

실시예 2: 항체대신 Cy3가 표지된 앵타머를 포함하는 ELISA 변형키트의 제작

[0063]

상기 실시예 1-2에서 수득한 앵타머가 결합된 기관과 Cy3가 표지된 앵타머를 포함하는 ELISA 변형키트를 제작하였다.

[0064]

상기 Cy3가 표지된 앵타머는 다음과 같이 수득하였다:

[0065]

먼저, PBS 완충액(pH 7.2)에 DMSO에 용해된 sulfo-SMCC 50 nmole 및 Cy3-NH_2 5 nmol을 가하고 상온에서 2시간 동안 반응시켜 1차 반응물을 수득하고, 상기 1차 반응물에 5'-말단에 티올기가 포함된 서열번호 2의 앵타머 5 nmole을 가하여 상온에서 하룻밤동안 반응시켜 2차 반응물을 수득하였다. 상기 2차 반응물을 30k Armicon에 가하여 13,000rpm으로 10분간 원심분리하여 잔여물을 제거하고, 이에 세척용 완충액 600 μl 를 가하고 13,000rpm으로 30분간 원심분리하는 과정을 4회 반복하였다. 그런 다음, 용출완충액 300 μl 를 가하고 13,000rpm으로 10분간 원심분리하는 과정을 2회 반복하여 Cy3가 표지된 앵타머를 용출하였다. 상기 용출된 시료를 회전증발기에 적용하여 농축하고, PBS 완충액(pH 7.2)으로 희석하여 Cy3가 표지된 앵타머를 수득하였다.

[0066]

실시예 3: ELISA 변형키트의 성능 테스트

[0067]

실시예 3-1: HRP로 표지된 ELISA 변형키트의 성능 테스트

[0068]

상기 실시예 1에서 제작된 ELISA 변형키트를 통해 검출할 수 있는 표적물질인 트롬빈을 사용하여 상기 ELISA 변형키트의 성능을 점검하였다.

[0069]

먼저, 상기 실시예 1에서 제작한 ELISA 변형키트에 포함된 서열번호 1의 앵타머가 결합된 기관을 바이알에 넣고, 0 내지 100pM의 트롬빈을 포함하는 각 시료용액을 100 μl 씩 가한 다음, 상온에서 2시간동안 반응시켰다. 그런 다음, 상기 실시예 1에서 제작한 ELISA 변형키트에 포함된 HRP가 결합된 서열번호 2의 앵타머 100 μl 를 가하고 상온에서 2시간 동안 추가로 반응시켰으며, 반응이 종료된 후, 상기 기관을 PBS 완충액(pH 7.2)으로 세척하였다. 상기 세척된 기관이 담겨진 바이알에 TMB 용액 20 μl 를 가하고 상온에서 2분 동안 반응시킨 후, 정지완충액(1M H_2SO_4) 20 μl 를 가하여 반응을 종료시켰으며, 상기 기관을 대상으로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다(도 1 및 2).

[0070]

먼저, 도 1은 TMB 용액을 가하고 정지완충액을 가하여 반응이 종료된 상태의 바이알을 나타내는 사진이다. 도 1에서 보듯이, 트롬빈의 처리량에 따라 반응액에 포함된 노란색의 정도가 상이함을 알 수 있었다.

[0071]

다음으로, 도 2는 본 발명의 ELISA 변형키트를 사용하여 트롬빈을 정량분석한 결과를 나타내는 그래프로서, 본 발명의 ELISA 변형키트를 사용하여 측정된 트롬빈의 처리량에 따른 450 nm에서의 흡광도의 변화를 나타낸다. 도

2에서 보듯이, 본 발명의 ELISA 변형키트는 0.1 내지 100pM 수준의 LOD 범위에서 트롬빈을 검출할 수 있고, 검출결과를 분석하면 트롬빈의 함량이 적을 때에는 트롬빈의 함량에 비례하여 흡광도가 증가하고, 트롬빈의 함량이 과다하게 증가하면 상기 흡광도가 더 이상 증가하지 않고 일정수준을 유지하는 포화곡선을 나타냄을 확인하였다.

[0072] 상기 결과는, 본 발명의 ELISA 변형키트가 pM 수준의 LOD를 나타내어 종래의 μ M 수준의 LOD 범위를 갖는 ELISA 키트보다도 현저하게 우수한 민감성을 나타내고, 상기 LOD 범위에서 측정된 검출결과가 포화곡선을 나타내어, 검출신뢰도 역시 우수함을 시사하는 것으로 분석되었다.

[0073] **실시예 3-2: Cy3로 표지된 ELISA 변형키트의 성능 테스트**

[0074] 상기 실시예 2에서 제작된 ELISA 변형키트를 통해 검출할 수 있는 표적물질인 트롬빈을 사용하여 상기 ELISA 변형키트의 성능을 점검하였다.

[0075] 상기 실시예 2에서 제작한 ELISA 변형키트에 포함된 서열번호 1의 앵타머가 결합된 기관에, 0pM(대조군), 0.1pM, 0.1nM 또는 1000nM의 트롬빈을 포함하는 각각의 시료를 100 μ l씩 가하고, 상온에서 2시간동안 반응시켜 1차 반응물을 수득하였다. 그런 다음, 상기 1차 반응물에 실시예 2에서 제작한 ELISA 변형키트에 포함된 Cy3가 결합된 서열번호 2의 앵타머 100 μ l를 가하고 상온에서 2시간 동안 추가로 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 상기 기관을 PBS 완충액(pH 7.2)으로 세척하고, 이에 UV를 조사하면서 형광현미경하에서 Cy3로부터 유래된 형광발색 여부를 확인하였다(도 3). 도 3은 Cy3로 표지된 앵타머를 포함하는 ELISA 변형키트를 사용하여 대조군, 0.1pM, 0.1nM 또는 1000nM의 트롬빈을 포함하는 시료를 검출한 결과를 나타내는 형광현미경 사진으로서, 1은 대조군, 2는 0.1pM의 트롬빈을 포함하는 시료, 3은 0.1nM의 트롬빈을 포함하는 시료, 4는 1000nM의 트롬빈을 포함하는 시료를 각각 나타낸다. 도 3에서 보듯이, Cy3로 표지된 앵타머를 포함하는 ELISA 변형키트는 0.1nM의 트롬빈을 포함하는 시료는 다소 불명확하게 검출되었으나, 1000nM의 트롬빈을 포함하는 시료는 명확하게 검출할 수 있음을 확인하였다.

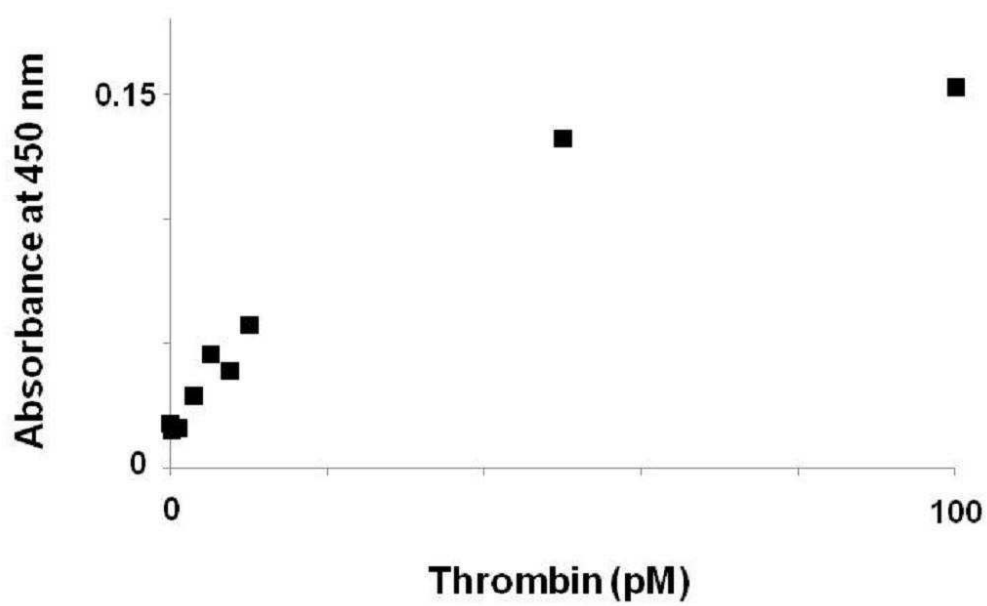
[0076] 이러한 검출한계값(LOD)을 실시예 1에서 제작한 ELISA 변형키트의 LOD와 비교하면, 다소 검출한계값이 높은 수준을 나타냄을 확인하였는데, 이러한 차이는 HRP에 의한 신호증폭 여부에 의한 것으로 분석되었다. 즉, Cy3가 표지된 앵타머를 사용하면, 앵타머가 표적물질에 결합하는 결합수준에 비례하여 형광발색 수준이 결정되므로, 시료에 미량의 표적물질이 존재하는 경우에는 형광발색 수준 역시 낮은 값을 나타내게 된다. 반면, HRP가 표지된 앵타머를 사용하면, 표적물질에 결합된 앵타머의 수준이 낮은 값을 나타내더라도, 이에 HRP의 기질을 대량으로 처리하면, HRP의 지속적인 효소반응에 의하여 검출신호가 증폭되므로, 시료에 미량의 표적물질이 존재하는 경우에도 비교적 높은 수준의 검출신호를 얻을 수 있다. 결과적으로, 표지물질을 어떤 것으로 사용하는지에 따라, LOD 값이 변화될 수 있고, 형광물질보다는 효소를 사용할 경우 LOD 값의 범위를 확장시킬 수 있는 것으로 분석되었다.

도면

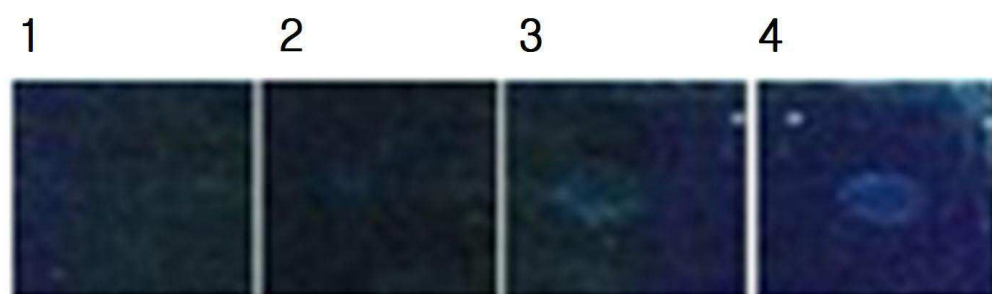
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110>	University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University	
<120>	Alternative ELISA kit comprising aptamer	
<130>	PA130896/KR	
<160>	2	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	first aptamer	
<400>	1	
	ggttggtgtg gttgg	15
<210>	2	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	second aptamer	
<400>	2	
	agtccgtggt agggcaggtt ggggtgact	29