



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0001709
(43) 공개일자 2018년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/68 (2013.01)

C12Q 1/6806 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0080274

(22) 출원일자 2016년06월27일

심사청구일자 2016년06월27일

(71) 출원인

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(72) 발명자

조규봉

경기도 고양시 일산서구 후곡로 36 404동 703호
(일산동, 후곡마을4단지아파트)

(74) 대리인

윤대웅, 공병욱

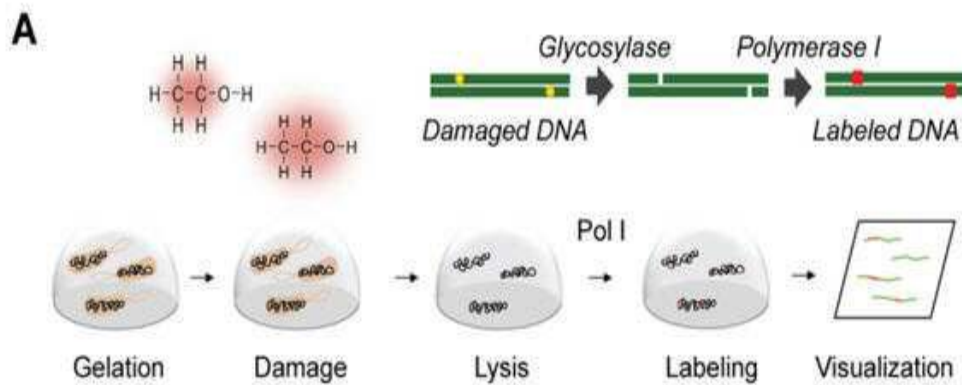
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 피검물질의 DNA 손상 평가 방법

(57) 요약

본 발명은 피검물질의 DNA 손상 평가 방법 및 DNA 손상 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 본 발명은 피검물질에 의한 DNA 손상의 정도를 가시화하여 정량적으로 평가할 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12Q 2521/101 (2013.01)

C12Q 2521/531 (2013.01)

C12Q 2565/629 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A2A04003870

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 이공분야 기초연구사업

연구과제명 단일분자 DNA를 이용한 초민감 DNA 손상검출 바이오센서

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2015.05.01 ~ 2016.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A6A1A03012845

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중점연구소 지원사업 (이공분야)

연구과제명 뇌질환 약물 평가 기능 나노바이오칩 개발

기 여 율 1/2

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2016.05.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 피검물질의 DNA 손상 평가 방법:

- (a) 세포를 배양하여 세포 현탁물을 수득하는 단계;
- (b) 상기 세포 현탁물을 겔화(gelation)하여 세포-포매 겔(cell-embedded gel)을 제조하는 단계;
- (c) 상기 세포-포매 겔을 피검물질과 접촉시키는 단계;
- (d) 상기 세포-포매 겔을 용해시키는 단계;
- (e) 상기 단계 (d)의 결과물에 DNA 글리코실화효소(DNA glycosylase)를 처리하는 단계;
- (f) 상기 단계 (e)의 결과물을 틸새 번역(nick translation)을 통해 표지(labeling)하는 단계;
- (g) 상기 단계 (f)의 결과물로부터 지노믹(genomic) DNA를 추출하는 단계; 및
- (h) 상기 지노믹 DNA를 분석하는 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 세포는 미생물, 동물 세포 및 식물 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 박테리아 현탁물은 대수기(log-phase)의 박테리아를 포함하는 것으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 겔화는 아가로오스(agarose)를 배양매지에 첨가하여 유도되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 박테리아-포매 겔은 10-1000 nm의 기공(air hole)을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (e) DNA 글리코실화효소는 Fpg(formamidopyrimidine [fapy]-DNA glycosylase), Nfo(endonuclease IV), Nei(endonuclease VIII), AlkA(3-methyladenine DNA glycosylase II), UDG(Uracil-DNA glycosylase), Nth(endonuclease III), MutY(adenine DNA glycosylase), AlkC(3-methylpurine DNA glucosylase), AlkD(Akylpurine glycosylase D) 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 DNA 글리코실화효소인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (f)의 표지는 DNA 중합효소(DNA polymerase) 및 형광 표지된 dNTP 혼합물(dATP, dCTP, dGTP, dTTP 및 dUTP)에 의해 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (f)의 분석은 미세유체(microfluidic) 장치를 이용하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 미세유체 장치는 유체가 유입되는 채널 및 상기 채널과 직접적으로 연결된 양전하로 하전된(positively charged) 기판을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

다음의 단계를 포함하는 DNA 손상 억제제의 스크리닝 방법:

- (a) 세포를 배양하여 세포 현탁물을 수득하는 단계;
- (b) 상기 세포 현탁물을 겔화(gelation)하여 세포-포매 겔(cell-embedded gel)을 제조하는 단계;
- (c) 상기 세포-포매 겔에 DNA 손상제 및 DNA 손상 억제 후보물질을 처리하는 단계;
- (d) 상기 세포-포매 겔을 용해시키는 단계;
- (e) 상기 단계 (d)의 결과물에 DNA 글리코실화효소(DNA glycosylase)를 처리하는 단계;
- (f) 상기 단계 (e)의 결과물을 틸라 변역(nick translation)을 통해 표지(labeling)하는 단계;
- (g) 상기 단계 (f)의 결과물로부터 지노믹(genomic) DNA를 추출하는 단계; 및
- (h) 상기 지노믹 DNA를 분석하는 단계.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 세포는 미생물, 동물 세포 및 식물 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1- 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 세포 현탁물은 대수기(log-phase)의 박테리아를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 10 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 겔화는 아가로오스(agarose)를 배양매지에 첨가하여 유도되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 10 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 세포-포매 겔은 10-1000 nm의 기공(air hole)을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 10 항에 있어서, 상기 단계 (e) DNA 글리코실화효소는 Fpg(formamidopyrimidine [fapy]-DNA glycosylase), Nfo(endonuclease IV), Nei(endonuclease VIII), AlkA(3-methyladenine DNA glycosylase II), UDG(Uracil-DNA glycosylase), Nth(endonuclease III), MutY(adenine DNA glycosylase), AlkC(3-methylpurine DNA glycosylase), AlkD(Akylpurine glycosylase D) 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 DNA 글리코실화효소인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 10 항에 있어서, 상기 단계 (f)의 표지는 DNA 중합효소(DNA polymerase) 및 형광 표지된 dNTP 혼합물(dATP, dCTP, dGTP, dTTP 및 dUTP)에 의해 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 10 항에 있어서, 상기 단계 (f)의 분석은 미세유체(microfluidic) 장치를 이용하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 미세유체 장치는 유체가 유입되는 채널 및 상기 채널과 직접적으로 연결된 양전하로 하전된(positively charged) 기관을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피검물질의 DNA 손상 평가 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] DNA 손상의 예방 및 치료는 살아있는 유기체의 생존에 있어 절대적이다. DNA 손상은 여러 건강상의 위협의 주요 원인이며, 다양한 건강 상태와 직접적으로 밀접한 관계에 있다. 더욱이, 가속화되는 고령화의 주요 원인이며, 암을 포함한 다양한 질병을 야기하기도 한다. 자외선 및 환경 오염에 더불어, 음식물 소화와 자연히 발생하는 내인성 대사 역시 DNA 손상을 유발한다. 일례로, 주류는 DNA를 손상시키는 상당량의 활성산소(ROS)를 만들어낸다. 세계보건기구(WHO)의 세계질병부담프로젝트(GBD)에 따르면, 만성적인 알코올 소비는 매해 1,800,000 명의 목숨을 앗아간다.³ 암은 음주가 장기적으로 영향을 미치는 것 중의 하나이다. 과학자들의 연구에 따르면 만성적인 음주는 간, 유방, 위장관의 악성 종양과 관계가 있을 수도 있다.⁴ 하지만, 정반대되는 연구 결과도 있다. 예컨대, 레드 와인은 암을 유발하고, 또 암을 방지하는 속성을 가지고 있다.^{5,6} 이렇게 상반되는 결과로 인해 분석 방법들이 특정 음식의 영향을 명확하게 평가하지 못하게 된다. 그뿐 아니라, 어떤 음식이 가진 건강상의 위협을 평가하는 기존의 방법들은 다른 원리들을 기초로 하고 있으며, DNA 손상에 대해서는 고려된 바가 없다. 따라서, 특정 음식의 도움이 되거나 해가 되는 영향을 적절히 평가하기 위해서 새로운 민감도가 높은 분석 방법이 필요하다.

[0004] DNA 손상을 분석하기 위해 수많은 방법들이 개발되긴 했으나, 단일 분자 DNA 가시화가 최근 DNA 손상을 가장 민감하게 검출하는 수단으로써 여겨지고 있는데, 그 이유는 손상된 DNA 병변이 직접적으로 가시화되고 정량화되기 때문이다.⁷⁻¹² DNA 분석 방법은 일반적으로 DNA 증폭에 기초하고 있다. 하지만, 손상된 DNA는 증폭될 수 없기에, DNA 증폭을 기초로 하는 방법들에게는 상당한 제약이 된다. 지금까지, DNA 손상은 겔에서 스미어링(smearing) 패턴을 측정함으로써 분석되었으며, 이런 방법에는 단일 세포를 이용하는 단일세포 전기영동법(comet assay) 및¹³ DNA 분절화를 이용하는 DNA 래더링(DNA laddering) 방법¹⁴이 있다. 그러나, 스미어링 패턴은 상세한 정보를 제공하지 않는다. 또한 DNA 손상은 오랫동안 이루어지는 과정으로, 매우 드물게 일어나며, 전기영동을 기반으로 하는 분석 방법으로는 이런 손상을 검출하기 어렵다. 따라서, DNA 손상 분석에 있어 높은 민감도를 보이기 때문에 단일 분자 검출이 가장 최적화된 방법이다. 더욱이, 단일분자 DNA 손상 검출은 음식으로 인한 DNA 손상을 정량적으로 평가하기 위한 분석 바이오센서로서의 개발에 커다란 잠재력을 가지고 있다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) T. Lindahl, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1974, 71, 3649-3653.
- (비특허문헌 0002) A. Sancar and W. D. Rupp, Cell, 1983, 33, 249-260.
- (비특허문헌 0003) H. K. Seitz and F. Stickel, Nat Rev Cancer, 2007, 7, 599-612.
- (비특허문헌 0004) V. Bagnardi, M. Blangiardo, C. La Vecchia and G. Corrao, Br. J. Cancer, 2001, 85, 1700-1705.
- (비특허문헌 0005) M. S. Jang, E. N. Cai, G. O. Udeani, K. V. Slowing, C. F. Thomas, C. W. W. Beecher, H. H. S. Fong, N. R. Farnsworth, A. D. Kinghorn, R. G. Mehta, R. C. Moon and J. M. Pezzuto, Science, 1997, 275, 218-220.
- (비특허문헌 0006) G. Testino, S. Leone, A. Sumberaz and P. Borro, Alcohol Clin Exp Res, 2015, 39, 2261-2261.
- (비특허문헌 0007) J. Lee, Y. Kim, S. Lee and K. Jo, Electrophoresis, 2015, 36, 2057-2071.
- (비특허문헌 0008) J. Lee, H. S. Park, S. Lim and K. Jo, Chem. Commun., 2013, 49, 4740-4742.
- (비특허문헌 0009) K. Y. Lee J, Lim S, Jo K Analyst, 2016, 141, 847-852.
- (비특허문헌 0010) J. Gorman and E. C. Greene, Nat. Struct. Mol. Biol., 2008, 15, 768-774.
- (비특허문헌 0011) N. M. Kad, H. Wang, G. G. Kennedy, D. M. Warshaw and B. Van Houten, Mol. Cell., 2010, 37, 702-713.
- (비특허문헌 0012) S. Zirkin, S. Fishman, H. Sharim, Y. Michaeli, J. Don and Y. Ebenstein, J Am Chem Soc, 2014, 136, 7771-7776.
- (비특허문헌 0013) D. Solanky and S. E. Haydel, J. Microbiol. Methods, 2012, 91, 257-261.
- (비특허문헌 0014) A. H. Wyllie, Nature, 1980, 284, 555-556.
- (비특허문헌 0015) NCBI, NC_000913.3 Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, complete genome.
- (비특허문헌 0016) S. R. Nelson, A. R. Dunn, S. D. Kathe, D. M. Warshaw and S. S. Wallace, Proc.

Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2014, 111, E2091-E2099.

(비특허문헌 0017) S. Boiteux, E. Gajewski, J. Laval and M. Dizdaroglu, Biochemistry, 1992, 31, 106-110.

(비특허문헌 0018) M. Dizdaroglu, J. Laval and S. Boiteux, Biochemistry, 1993, 32, 12105-12111.

(비특허문헌 0019) S. Bjelland and E. Seeberg, Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen., 2003, 531, 37-80.

(비특허문헌 0020) K. Frick, M. Schulte and T. Friedrich, Biochemistry, 2015, 54, 2799-2801.

(비특허문헌 0021) D. P. Clark, FEMS Microbiol Rev, 1989, 5, 223-234.

(비특허문헌 0022) S. Huffer, M. E. Clark, J. C. Ning, H. W. Blanch and D. S. Clark, Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77, 6400-6408.

(비특허문헌 0023) P. Echave, M. A. Esparza-Ceron, E. Cabisco, J. Tamarit, J. Ros, J. Membrillo-Hernandez and E. C. C. Lin, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2002, 99, 4626-4631.

(비특허문헌 0024) T. M. Buttke and L. O. Ingram, Biochemistry, 1978, 17, 637-644.

(비특허문헌 0025) D. P. Clark and J. P. Beard, J Gen Microbiol, 1979, 113, 267-274.

(비특허문헌 0026) R. J. F. Haft, D. H. Keating, T. Schwaegler, M. S. Schwalbach, J. Vinokur, M. Tremaine, J. M. Peters, M. V. Kotlajich, E. L. Pohlmann, I. M. Ong, J. A. Grass, P. J. Kiley and R. Landick, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2014, 111, E2576-E2585.

(비특허문헌 0027) B. Soufi, K. Krug, A. Harst and B. Macek, Front Microbiol, 2015, 6.

(비특허문헌 0028) E. A. Zakharova, M. L. Moskaleva, Y. A. Akeneev, E. S. Moiseeva, G. B. Slepchenko and N. P. Pikula, J. Anal. Chem., 2011, 66, 848-853.

(비특허문헌 0029) S. A. Kim and M. S. Rhee, Food Microbiology, 2015, 49, 166-172.

(비특허문헌 0030) J. W. Foster, Nat Rev Microbiol, 2004, 2, 898-907.

(비특허문헌 0031) X. Chen, Q. Lv, Y. Liu and W. Deng, Cytotechnology, 2014, 66, 275-282.

(비특허문헌 0032) S. Yilmaz, F. Unal, D. Yuzbasioglu and M. Celik, Toxicology and Industrial Health, 2014, 30, 926-937.

(비특허문헌 0033) R. Fernandez-Fernandez, J. C. Lopez-Martinez, R. Romero-Gonzalez, J. L. Martinez-Vidal, M. I. A. Flores and A. G. Frenich, Chromatographia, 2010, 72, 55-62.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 미생물(microorganisms)를 이용한 DNA 손상 분석 시스템을 구축하고자 노력하였다. 그 결과, 대표적 박테리아인 대장균(*Escherichia coli*)이 포매된(embeded) 젤을 제조하고 이를 피검물질(analyte)에 접촉시켜 DNA 손상을 유도하고 손상된 DNA를 형광 표지(fluorescent labeling)하여 단일 분자 수준의 가시화(visualization)를 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 피검물질의 DNA 손상 평가 방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 피검물질의 DNA 손상 평가 방법을 제공한다:
- [0015] (a) 세포를 배양하여 세포 현탁물을 수득하는 단계;
- [0016] (b) 상기 세포 현탁물을 겔화(gelation)하여 세포-포매 겔(cell-embedded gel)을 제조하는 단계;
- [0017] (c) 상기 세포-포매 겔에 피검물질을 접촉시키는 단계;
- [0018] (d) 상기 세포-포매 겔 내 세포를 용해시키는 단계;
- [0019] (e) 상기 단계 (d)의 결과물에 DNA 글리코실화효소(DNA glycosylase)를 처리하는 단계;
- [0020] (f) 상기 단계 (e)의 결과물을 표지(labeling)하는 단계;
- [0021] (g) 상기 단계 (f)의 결과물로부터 지노믹(genomic) DNA를 분리하는 단계; 및
- [0022] (i) 상기 단계 (g)의 결과물을 분석하는 단계.
- [0024] 본 발명자들은 미생물을 이용한 DNA 손상 분석 시스템을 구축하고자 노력하였다. 그 결과, 대표적 박테리아인 대장균(*Escherichia coli*)이 포매된 겔을 제조하고 이를 피검물질에 접촉시켜 DNA 손상을 유도하고 손상된 DNA를 형광 표지(fluorescent labeling)하여 단일 분자 수준의 가시화(visualization)를 확립하였다.
- [0026] 본 발명의 피검물질의 DNA 손상 평가 방법을 단계별로 설명한다.
- [0028] 단계 (a): 세포 현탁물의 수득
- [0029] 먼저, 세포를 배양하여 세포 현탁물을 수득한다.
- [0030] 상기 세포는 당업계에서 공지된 어떠한 세포도 가능하다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포는 미생물, 동물 세포 및 식물 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 세포이다.
- [0032] 상기 미생물은 단일 세포로 구성된 생물로서 최소 생활단위의 생물을 의미한다. 상기 미생물은 조류(algae), 균류(bacteria), 원생동물류(protozoa), 사상균류(mold), 효모류(yeast) 및 바이러스(virus)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0033] 상기 동물 세포는 동물의 생체 또는 조직으로부터 분리된 직후의 세포, 초기 배양 세포 및 구축된 세포주(established cell line)를 모두 포함하며, 상기 동물을 인간을 포함한 포유류, 조류, 어류, 곤충류를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0034] 상기 식물 세포는 식물의 기관으로부터 분리된 직후의 세포, 초기 배양 세포 및 구축된 세포주(established cell line)를 모두 포함한다.
- [0035] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 세포는 미생물이다.
- [0036] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 세포는 균류이다.
- [0037] 본 명세서에서 용어 “세포 현탁물”은 생존(live) 세포를 포함하는 어떠한 배양물도 가능하다.
- [0038] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포 현탁물은 배양배지를 포함하는 배양물로부터 세포를 수확(harvest)하여 멸균된 생리식염수(0.85% NaCl 용액)에 현탁(resuspend)한 현탁물이다.
- [0039] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 세포는 최고 속도의 성장을 나타내는 지수기(log-phase 또는 exponential phase)의 세포이다.

- [0040] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 세포 현탁물은 OD₆₀₀에서 0.5의 값을 갖는다.
- [0042] 단계 (b): 세포-포매 겔의 제조
- [0043] 다음, 상기 세포 현탁물을 겔화하여 세포-포매 겔을 제조한다.
- [0044] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 겔화는 아가로오스(agarose), 아가(agar), 카라기난(carrageenan), 겔란검(gellan gum), 젤라틴(gelatin), 펙틴(pectin), 알지네이트(alginate), 피브린(fibrin), 폴리아크릴산(polyacrylate), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 키토산(chitosan), 덱스트란(dextran), 콜라겐(collagen) 및 히아루론산(hyaluronic acid)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 고분자를 상기 세포 현탁물에 첨가하여 실시한다.
- [0045] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 겔화는 아가로오스를 세포 현탁물에 첨가하여 실시한다.
- [0046] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 세포 현탁물에 2% 낮은 겔화온도(low gelling temperature; LGT) 아가로오스를 한방울씩 첨가하여 겔화를 유도한다. 실시예의 ‘아가로오즈 플러그’는 ‘세포-포매 겔’과 동일한 의미이다.
- [0047] 상기 세포-포매 겔은 효소와 소형 분자들이 자유로이 통과할 수 있는 기공(air hole)을 갖는다.
- [0048] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 세포-포매 겔은 10-1000 nm 크기의 기공을 갖는다.
- [0049] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 세포-포매 겔은 50-1000, 50-700, 50-400 또는 50-200 nm의 기공을 갖는다.
- [0051] 단계 (c): 피검물질의 접촉
- [0052] 다음, 상기 세포-포매 겔을 피검물질과 접촉시킨다.
- [0053] 본 명세서에서 용어, “피검물질”은 DNA의 손상에 영향을 미치는 지 여부를 검사하기 위하여 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 피검 물질은 화합물, 단백질, 뉴클레오타이드, 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA 등의 생화학적 물질 뿐 아니라, 의약품, 식품, 화장품, 농약 등의 인공 물질을 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다. 즉, 본원발명의 피검물질의 DNA 손상 평가 방법은 DNA 손상 여부 및 정도를 평가하기 위한 어떠한 물질도 가능하다.
- [0054] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 세포-포매 겔을 피검물질(또는 피검물질을 포함하는 조성물)에 침지하여 피검물질에 의한 DNA 손상을 유도한다.
- [0056] 단계 (d): 세포의 용해
- [0057] 다음, 상기 세포-포매 겔 내 세포를 용해시킨다.
- [0058] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 용해는 용해제(lysis agent)를 처리하여 실시한다.
- [0059] 본 명세서 용어 “용해제”는 세포(예컨대, 박테리아)의 막(membrane)을 파괴하여 세포를 용해시키는 물질을 의미한다. 상기 용해제는 알칼리, 계면활성제, 유기용제 및 효소(예컨대, 단백분해효소 K)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 용해제이다.
- [0060] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 상기 세포-포매 겔에 단백분해효소 K를 처리하여 세포를 용해시킨다.
- [0062] 단계 (e): DNA 글리코실화효소의 처리
- [0063] 다음, 상기 단계 (d)의 결과물에 DNA 글리코실화효소를 처리한다.
- [0064] 본 명세서에서 용어 “글리코실화효소”는 염기 절단 수선(base excision repair)과 관련된 효소로, DNA 내 손상된 염기를 제거하거나 대체하는 EC 3.2.2.에 속하는 효소군을 의미한다.

- [0065] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 DNA 글리코실화효소는 Fpg(formamidopyrimidine [fapy]-DNA glycosylase), Nfo(endonuclease IV), Nei(endonuclease VIII), AlkA(3-methyladenine DNA glycosylase II), UDG(Uracil-DNA glycosylase), Nth(endonuclease III), MutY(adenine DNA glycosylase), AlkC(3-methylpurine DNA glucosylase), AlkD(Akylpurine glycosylase D) 로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 DNA 글리코실화효소이다.
- [0066] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 DNA 글리코실화효소는 Fpg, Nfo 및 Nei로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 DNA 글리코실화효소이다.
- [0067] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 DNA 글리코실화효소는 Fpg, Nfo 및 Nei의 혼합된 DNA 글리코실화효소이다.
- [0068] 상기 Fpg는 ① 이중가닥 DNA의 손상된 퓨린(purine)을 방출하고 AP 부위(apurinic site)를 생성시키고; ② AP 부위의 3' 및 5' 말단을 절단하고 AP 부위를 제거하여 1 염기 갭을 생성시키는 작용을 한다.
- [0069] 상기 Nfo는 5' AP 엔도뉴클레이제(endonuclease)로서, DNA의 염기손실부위의 5'의 인산디에스테르(phosphodiester) 결합을 절단하는 작용을 한다.
- [0070] 상기 Nei는 산화된 피리미딘(pyrimidine)을 절단하는 작용을 한다.
- [0072] 단계 (f): 표지
- [0073] 다음, 상기 단계 (e)의 결과물을 틱새 번역을 통해 표지한다.
- [0074] 상기 표지는 틱새 번역(nick translation)을 이용하여 단일분자 DNA에 표지를 입혀줌으로써 특정 염기서열의 존재 여부를 단일 분자 수준에서 볼 수 있게 한다. 상기 틱새 번역 방법은 상기 단계 (e)에 의해 생성된 DNA 내 갭(gaps) 또는 틱(nicks)을 DNA 중합효소(DNA polymerase)를 이용하여 채워주는데, 시그널 물질이 표지된(labeled) dNTP를 이용하여 지노믹 DNA 상에 형광표지 될 수 있도록 한다.
- [0075] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 표지는 DNA 중합효소(DNA polymerase) 및 시그널 물질이 표지된 dNTP 혼합물(dATP, dCTP, dGTP, dTTP 및 dUTP)에 의해 실시된다.
- [0076] 본 명세서에서 용어, “중합효소”는 DNA의 구성요소인 디옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotide)로부터 DNA 분자를 합성하는 효소를 의미한다. 상기 DNA 중합효소는 다음의 화학 반응을 촉매한다:
- [0077]
$$\text{데옥시뉴클레오사이드 3인산염} + \text{DNA}_n \text{ 2인산염} + \text{DNA}_{n+1}$$
- [0078] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 DNA 중합효소는 엔도뉴클레아제 프리 DNA 중합효소 I(endonuclease free DNA polymerase I)이다.
- [0079] 상기 DNA 중합효소 I은 DNA 손상 과정에서 5'→3' 엑소뉴클레아제(exonuclease) 활성을 통해 틱새 번역을 매개한다.
- [0080] 상기 dNTP는 DNA의 구성요소로, 데옥시아데노신 3인산염(deoxyadenosine triphosphate; dATP), 데옥시구아노신 3인산염(deoxyguanosine triphosphate; dGTP), 데옥시사이티딘 3인산염(deoxycytidine triphosphate; dCTP), 데옥시티미딘 3인산염(deoxythymidine triphosphate; dTTP) 및 데옥시우리딘 3인산염(deoxyuridine triphosphate; dUTP)을 포함한다.
- [0081] 상기 dNTP는 적합한 시그널 물질로 표지되어 있다. 상기 시그널 물질의 구체적인 예는 다음과 같다: 형광단 [예컨대, 플루오리신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민(rhodamine), 리사민(lissamine), Cy3, Cy5(Pharmacia) 등), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P32 및 S35), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.

- [0082] 하기 실시예에 입증된 바와 같이, 37℃에서 1시간 동안 항온반응시켜 DNA 내 갭 및/또는 틈을 표지한다.
- [0084] 단계 (g): 세포-포매 겔의 용해 및 분석
- [0085] 다음, 상기 단계 (e)의 결과물로부터 세포-포매 겔을 용해시키고 결과물을 분석한다.
- [0086] 상기 세포-포매 겔을 용해시켜, 세포의 지노믹(genomic) DNA를 분리한다. 세포의 지노믹 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 실시할 수 있다.
- [0087] 상기 지노믹 DNA를 분석한다.
- [0088] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 미세유체(microfluidic) 장치를 이용하여 실시한다.
- [0089] 본 명세서에서 용어 “미세유체 장치”는 극소량(나노리터 혹은 피코리터의 정도)의 액체나 기체를 극히 소형화시킨 장치 내에서 그 흐름을 제어하는 일련의 기술을 구현한 장치를 의미한다.
- [0090] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 미세유체 장치는 유체가 유입되는 채널 및 상기 채널과 직접적으로 연결된 양전하로 하전된(positively charged) 기판을 갖는다.
- [0091] 상기 기판은 유리, 플라스틱 및 실리콘으로 구성된 군으로부터 선택되는 기판이다.
- [0092] 하기 실시예에서 입증된 바와 같이, 지노믹 DNA를 미세유체 채널에 주입하고 양전하를 갖는 표면 상에 신장(elongated) 및 증착(deposited)시킨다. 다음, 형광 현미경을 이용하여 지노믹 DNA를 관찰한다.
- [0093] 상기 방법에 따라, 피검물질의 DNA 손상 정도를 평가할 수 있다. 이러한 방법은 DNA 손상 정도를 가시화하여 정량적으로 평가할 수 있다.
- [0095] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 DNA 손상 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0096] (a) 세포를 배양하여 세포 현탁물을 수득하는 단계;
- [0097] (b) 상기 세포 현탁물을 겔화(gelation)하여 세포-포매 겔(cell-embedded gel)을 제조하는 단계;
- [0098] (c) 상기 세포-포매 겔에 DNA 손상제 및 DNA 손상 억제 후보물질을 처리하는 단계;
- [0099] (d) 상기 세포-포매 겔을 용해시키는 단계;
- [0100] (e) 상기 단계 (d)의 결과물에 DNA 글리코실화효소(DNA glycosylase)를 처리하는 단계;
- [0101] (f) 상기 단계 (e)의 결과물을 틈새 번역(nick translation)을 통해 표지(labeling)하는 단계; 및
- [0102] (g) 상기 단계 (f)의 결과물로부터 세포-포매 겔을 용해시키고 결과물을 분석하는 단계.
- [0104] 상기 단계 (c)의 “손상제”는 당업계에 공지된 DNA의 손상을 유도하는 어떠한 물질, 방법도 가능하다. 예컨대, 방사선 또는 자외선 조사, 산소라디칼, 탄화수소 등이 포함되나 이에 한정되지 않는다.
- [0106] 상기 단계 (g)의 분석은 다음과 같이 판정한다:
- [0107] (i) DNA 손상제 및 DNA 손상 억제 후보물질을 처리한 군이 DNA 손상제만 처리한 군과 비교하여 DNA 손상이 적게 분석되는 경우에, 상기 DNA 손상 억제 후보물질은 DNA 손상 억제 효과가 있는 것으로 판정한다.
- [0108] (ii) DNA 손상제 및 DNA 손상 억제 후보물질을 처리한 군이 DNA 손상제만 처리한 군과 비교하여 DNA 손상이 유사하거나 동일한 정도로 분석되는 경우에, 상기 DNA 손상 억제 후보물질은 DNA 손상 억제 효과가 없는 것으로 판정한다.
- [0110] 본 발명의 상기 방법은 상기 피검물질의 DNA 손상 평가 방법을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은

본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [0112] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0113] (a) 본 발명은 피검물질의 DNA 손상 평가 방법 및 DNA 손상 억제제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0114] (b) 본 발명은 피검물질에 의한 DNA 손상의 정도를 가시화하여 정량적으로 평가할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0116] 도 1a 및 1b는 대장균(*Escherichia coli*) 지노믹 DNA를 이용한 알코올-유도 DNA 손상의 가시화를 나타낸다. 도 1a는 대장균의 알코올 처리 실험 계획을 도식화하여 나타낸다. 대장균이 포매된 아가로오즈 겔은 쉬어(shear)-유도성 DNA 손상을 억제한다. 다음 단계는 겔화(gelation) 내지 가시화(visualization)를 나타낸다.
- 도 2a 및 2b는 대장균의 에탄올-유도 DNA 손상 분석 결과를 나타낸다. 도 2a는 글리코실화효소 혼합물(Fpg, Nfo 및 Nei)을 이용한 단일 분자 DNA 손상 분석을 원형으로 나타낸다. 각 데이터의 포인트는 5-35 Mbps DNA 이미지 데이터로부터 수득하였다. 오류막대는 3-7회 식품 데이터 세트의 표준편차를 나타낸다. 선형성(linearity)은 $0.98(r^2)$ 이다. 도 2b는 대장균의 에탄올 농도(0-40% 및 15-19%) 증가에 대한 연속희석 스포팅 분석(serial dilution-spotting assays)을 나타낸다. 2차 데이터세트는 에탄올의 장가에 따른 콜로니 감소를 명확하게 나타낸다.
- 도 3a 및 3b는 대장균의 주류-유도 DNA 손상을 나타낸다. 도 3a는 글리코실화효소 혼합물을 이용한 단일 분자 DNA 손상 분석 결과를 나타낸다. 데이터는 3-7회 실험의 평균이고, 오류막대는 표준편차를 나타낸다. 도 3b는 손상된 DNA 분자에 대한 형광 현미경 이미지를 나타낸다. 화살표는 AlexaFluor-647로 표지된 손상 병변을 나타내는 빨간 점을 가리킨다. 스케일바는 20 μ m(49 kbp)를 의미한다.
- 도 4a는 음성 전기분무 이온화 스캐닝을 이용한 레드와인 및 구연산의 ESI-MS 스펙트럼(50-500 m/z)을 나타낸다. 구연산의 191의 피크는 $[M-H]^+$ 피크를 나타내고, 111은 $[M-H-CO_2-2H_2O]^+$ 를 나타낸다.³³ 도 4b는 13 에탄올 및 구연산(0.76 mM)의 혼합물의 단일 분자 DNA 손상 분석 결과를 13% 에탄올, 구연산(0.76 mM) 및 레드와인과 비교하여 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0117] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0119] 실시예

[0120] 실험재료 및 실험방법

[0121] 화학물질

- [0122] Alexa Fluor-647 및 YOYO-1은 Invitrogen ThermoFisher Scientific(Carlsbad, CA)사에서 구입하였다. 포름아미도 피리미딘 DNA 글리코실화 효소(Fpg), 엔도뉴클라아제IV(Nfo), 엔도뉴클라아제VIII(Nei), 프로테이나제K 및 디옥시리보뉴클레오타이드3인산염(dNTPs)은 New England Biolabs(Beverly, MA)사에서 구입하였다. DNA 증합 효소I은 Roche Life Science(Indianapolis, IN)에서 구입하였다. LB 배지는 DifcoLaboratories(LB Broth, Miller)에서 구입하였다. 에탄올(99.8%), EDTA 및 NaCl은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입하였다. 낮은 겔 온도(LGT)의 아가로스Lonza(Rockland, ME)에서 구입하였다. N-트리메틸실릴프로필-N, N, N-트리메틸 암모늄 클로라이드 및 비닐 트리메톡시실레인은 Gelest(Tullytown, PA)에서 구입하였다. 주류인 클라우드(맥주, 5%), 청하(청주, 13%), 참이슬(소주, 20%), 패스포트 스카치(위스키, 40%)는 지역 편의점에서 구입하였

다.

[0124] 박테리아의 성장

[0125] 대장균 K-12 MG 1655 세포는 5 ml의 LB 배지에서 진탕배양기(220 rpm)로 37℃에서 6시간 동안 배양하였다. 박테리아 세포는 원심분리기(10,000×10분)로 얻었으며 0.85% NaCl 용액으로 두 번 세척해서 같은 용액에 다시 재현탁(re-suspended) 하였다. 다음, 이 대장균 현탁액(cell suspension)을 OD₆₀₀이 대략 0.5에서 1 사이가 되도록 희석하여 이후의 반응에 사용하였다.

[0127] 에탄올 또는 주류로 인한 DNA 손상

[0128] 대장균 현탁액(OD₆₀₀=0.5)을 2% LGT 아가로스 용액과 혼합한 후 표면에 20 μl방울로 첨가하고, 냉장고(4℃)에서 10분 동안 고체화시켰다. 그 후, 대장균 포매된(embeded) 아가로스 플러그(agarose plug)를 에탄올 또는 주류에 침지하여 30분 동안 상온에서 배양하였다. 대조실험을 위해, 에탄올(5%-40%) 용액은 99.8% 에탄올과 0.85% NaCl 용액과 혼합시켜서 준비하였고, 대장균 포매된 아가로스 플러그를 배양하기 위해 사용하였다. 배양 후, 아가로스 플러그를 0.85% NaCl 용액에서 30분 동안 세척하였다.

[0130] 단일분자 표지(라벨링)

[0131] 알코올 처리 후, 대장균 포매된 아가로스 플러그를 프로테이나제K 용액[50 units in 500 μl, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0 (1×으로 42℃에서 150분 동안 처리하여 용해시켰다. 그 후 하룻밤 동안 아가로스 플러그를 1 ml 1×에서 세척하였다. 산화된 염기 부가물을 제거하기 위해, 아가로스 플러그를 NEB 완충액2(50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT 및 pH 7.9)에서 10 units Fpg, 10 units Nfo 및 20 units Nei의 혼합액으로 37℃에서 한 시간 동안 배양하였다. 효소 처리 후, 아가로스 플러그를 30분 동안 1 ml 1×완충액에서 2회 세척하였다. 상기 플러그는 그 후 5 unit DNA 중합효소 I, 1 mM AlexaFluor-647 표지된 dUTP 및 dNTP 혼합(1 mM dATP, 1mM dGTP, 100 μM dCTP 및 100 μM dTTP)으로 중합효소 반응 완충액에서 갭(gaps) 또는 틈(nicks)을 표지하기 위해서 37℃에서 한 시간 동안 배양하였다. 이 단계에서, 연구진은 엔도뉴클리아제프리 DNA 중합효소 I(endonuclease free DNA polymerase I)을 사용했는데, 그 이유는 다른 DNA 중합효소들은 동일한 반응 조건에서 더 많은 표지를 만들어냈기 때문이었다. 틈(nick) 번역 후에, 상기 플러그를 1시간 동안 1 ml 1×완충액에서 3회 세척하였다. 다음, 아가로스 플러그를 400 μl 1×완충액에서 65℃, 15분 동안 용해하여 1 μM YOYO-1으로 염색하였다.

[0133] 유리 표면 처리

[0134] 덮개 유리(22mm)를 주문제작한 랙에 쌓고 피라나 용액(황산과 과산화수소 4:1)에서 50분 가열하면서 세척하고 pH가 중성이 될 때까지 탈염수로 헹구었다. 각 덮개 유리는 에탄올(99.8%)에서 세 차례 헹구었다. 그리고, 상온에서 에탄올을 담은 폴리프로필렌 용기에 보관하였다. 표면 유도체화를 위해서, 22개의 유리 표면(22mm 덮개 유리)을 깨끗한 용기에서 테플론(Teflon) 블록 홀더에 두고 상온에서 10분 동안 건조시켰다. 유도체화 용액은 N-트리메틸실릴프로필-N, N, N-트리메틸 암모늄 클로라이드 100 μl를 250 ml의 물에 혼합하여 제조하였다. 상기 용액을 22개 덮개 유리 용기에 붓고 60℃에서 하룻밤 동안 지속적으로 50 rpm으로 진동시켜서 배양하였다. 마지막으로, 표면을 물과 에탄올로 3회 헹구내고 에탄올(99.8%)에 보관하였다.

[0136] PDMS 채널 제조

[0137] 포토레지스트(SU-8 2005) 템플릿은 실리콘 웨이퍼 상에 100 μm(넓이)μm(높이)cm(길이)규모의 채널을 구비하여 제조하였다. 10:1 비율의 PDMS 및 경화제 혼합물을 실리콘 웨이퍼 상의 마이크로채널 템플릿 위로 붓고 65℃에서 3시간 동안 항온반응시켰다. 박리 후, 상기 PDMS 마이크로채널을 대기 중 플라즈마 조건(CuteBasic, Femto, Korea)에서 30초 동안 산화시켰다. 다음, PDMS를 세척 후 물에 보관하였다.

[0139] DNA 마운팅 및 이미징

[0140] PDMS 장치를 양전하로 하전된 표면 위에 마운트하였다. 다음, 낮은 겔 온도(LGT)의 아가로스 플러그로부터 용해된 DNA 분자 용액을 미세유체 채널의 입구로 로드하였다. 상기 용액이 모세관 작용에 의해 마이크로채널을 통해 이동하는 동안, DNA 분자는 양전하로 하전된 표면 상로 늘어지고 침전된다. 형광공명에너지전이(FRET)로 이미징된 YOYO-1 및 AlexaFluor-647의 두 가지 색을 생성하기 위해 고체 상태의 488 nm 레이저(Coherent Sapphire 488)를 사용하였고, 녹색 채널에 대해서는 488-nm 홀로그래픽 노치 필터를, 붉은색 채널에 대해서는 다른 배출 필터(XF3076, Omega Optical, Brattleboro, VT)를 사용하였다. 이미지 분석은 ImageJ를 사용해 분석하였다.

[0142] 연속희석스포팅 분석(Serial Dilution Spotting Assay)

[0143] 알코올 민감성(susceptibility)으로 인해 연속희석 스포팅 분석을 수행하였다. 0.8 ml의 대장균 현탁액을 10 분 동안 10,000×에서 원심분리한 후, 세포펠렛을 다시 재부유하여(re-suspend) 에탄올이나 주류에서 30분 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 대장균현탁액을 10분 동안 10,000×에서 원심분리하고, 세포펠렛을 990 μ l LB 배지에서 다시 재부유하였다. 다음, 세포펠렛을 포함한 LB 배지를 연속희석하여 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 및 10^{-6} 으로 희석된 스포트를 LB 플레이트 배지 상에 5 μ l 부유액(suspension)을 분사함으로써 제조하였다. 세포 배양물을 37°C에서 하룻밤 동안 배양하였다.

[0145] 질량분석법

[0146] ESI-MS는 Varian 500-MS LC이온 트랩 질량 분석기(Palo Alto, CA)로 실시하였다. 질량 스펙트럼은 전자분무 이온화 소스를 음이온 모드에서 사용함으로써 얻었다. 메탄올 용액의 청주와 구연산은 질량 분석기로 직접적으로 분사하였다. 질량 스펙트럼은 50 to 500 m/z에서 스캔하였다. 질량분석기 매개변수 운용은 다음과 같다: 분사바늘전압: 5 kV; 모세관 전압: 5000 V; 건조 온도: 350°C; 건조 질소가스압: 30 psi; 네블라이저 공기압(nebulizer pressure) 35 psi; 주입유량: 200 μ l/min.

[0148] 결과 및 논의

[0149] 도 1은 실험 계획 및 알코올로 인한 DNA 손상의 단일분자 가시화에 대한 대표 형광 이미지를 보여준다. 세포 용해 및 이후의 생화학적 반응 동안 유전체 DNA에 시어(shear)로 인한 기계적 변형을 막기 위해 대장균은 아가로스 겔에 포매되어 있다. 더욱이, 아가로스 겔의 100 nm의 기공은 효소와 소형 분자들이 자유로이 통과할 수 있도록 해준다. DNA 수복효소 및 글리코실화효소는 DNA의 손상된 부분을 인식하고 손상된 뉴클레오티드를 제거함으로써 DNA 내의 외가닥 절단(single stranded breaks; SSB)을 생성한다. 이들 병변은 DNA 중합효소 I을 사용한 틸 변역에 의해 AlexaFluor-647-dUTP로 표지되었다.⁸ DNA 분자가 삽입 염색 YOYO-1로 염색되었기 때문에, 주요 검출 원리는 도 1b에서 보여진 것처럼 DNA 병변을 붉은색 점으로 표시하는 YOYO-1 및 AlexaFluor-647 사이에 형광공명에너지전이를 이용하는 것이다. 가시화를 위해서, 낮은 겔 온도의 아가로스 겔에서 녹인 후, DNA 분자를 미세유체 채널 내에서 N-트리메틸실릴프로필-N,N,N-트리메틸 암모늄(N-trimethylsilylpropyl-N,N,N-trimethyl ammonium) 코팅되어 양전하로 하전된 표면 상에서 늘이고 고정하였다. 대장균 K-12 MG 1655 스트레인 유전체의 길이는 4.6 Mbps지만,¹⁵ 겔에서 녹인 후의 과정은 DNA를 분절화 하였다. 따라서, 표지되고 측정된 대장균 유전체 DNA 분절은 100-350 kb 분절로 가시화되었다. DNA 크기는 분자 길이로 결정되었고, T4 DNA 길이는 염색된 YOYO-1로 계산하였다(166 kb에 68.6 μ m).

[0150] 먼저, 본 연구진은 대장균 유전체의 고유의 단일가닥 절단 개수를 결정하였다. 4개의 다른 데이터 세트에서 15.9 Mbps에 해당하는 64개의 분자 중 2개의 표지를 발견하였다. 따라서, 본 연구진은 대장균 세포를 모델 시스템으로 선택하였다. 구체적으로, 2개의 데이터 세트는 표지가 전혀 발견되지 않았고, 다른 2개의 데이터 세트는 각각 한 개의 표지를 나타내었다. 이 결과에 기초해서, 고유 단일가닥 절단의 제어값은 0.13 병변(lesions)/Mb 또는 대장균 유전체 당 0.58 병변(4.6 Mbps)으로 설정되었다. 이 값은 연구진이 이전에 연구했던 것보다 작은 값으로, 이전 연구에서는 전파된 파지로부터 정제된 122 λ DNA 분자(48.5 kbps)에서 2개의 병

변이 있었고, 이는 0.34 병변/Mb에 해당하였다.⁹ 한편, 이 제어값은 새로이 성장하는 지수증식기 박테리아에서만 유효하였다. 이 값은 다 성장했거나 포화된 정상기 박테리아에서 더 높게 발견되었다. 최적의 실험 조건을 유지하기 위해서, 본 연구의 모든 실험은 지수증식기 박테리아 배양물($OD_{600}=0.5$)을 사용하였다.

[0151] 도 2는 에탄올에 의해 유도된 대장균 계층 상의 DNA 손상을 나타낸다. 도 2a는 에탄올 농도와 DNA 병변 숫자 사이의 완벽한 선형 관계($r^2=0.98$)를 보여준다는 것은 상당히 흥미로운데, 에탄올 농도가 1%씩 증가하면, 병변의 숫자가 유전체당 0.88 병변씩 늘어난다는 점을 시사한다.

[0152] 에탄올의 주요 독성 중 하나는 DNA에 산화적인 손상을 유발하는 과산화물 음이온(superoxide anions)이나 히드록실라디칼(hydroxyl radicals)과 같은 활성산소의 발생에 의한 것으로 생각된다. 이 가정 때문에 포르마마도 피리미딘-DNA-글리코실화효소(Fpg), 엔도뉴클레아제IV(Nfo) 및 엔도뉴클레아제VIII(Nei)와 같이 산화적인 DNA 손상을 인지하고 제거하는 글리코실화효소 3개를 이용하였다.¹⁶⁻¹⁹ 상기 가설은 글리코실화효소 처리가 없는 에탄올 배양에서 유전체당 1.1 내지 1.4 표지만 만들어낸다는 사실을 통해 입증되었다(도 2A 삼각형).

[0153] 그러나, 대장균에서 활성산소로 인해 DNA 손상이 발생하는지는 명확하지 않다. 진핵세포에서, 니코틴아미드 뉴클레오타이드(NAD^+)를 NADH로 환원함으로써 에탄올은 아세트알데히드로 산화되고, 아세트알데히드는 알데히드 수소이탈효소에 의해 다른 NADH가 생성되면서 아세트산으로 산화된다. 아세트알데히드 자체는 직접적인 DNA 손상을 일으킬 수 있지만 미토콘드리아 내 세포 호흡계를 거쳐 생성된 증가된 NADH가 활성산소를 생성시키기 때문에 DNA 손상에 더 중요하다.²⁰

[0154] 대장균에서, 에탄올은 아세트알데히드로 산화되고, 더 나아가 알데히드 수소이탈효소에 의해 NADH 분자 2개 생성 및 아세틸-CoA로 산화된다.²¹ 그러나 대장균에서 에탄올 스트레스는 막(membrane)을 더 유동성 있게 만들어 막 누출의 원인이 된다.²² 본 연구진이 아는 한도 내에서, 대장균에서 NADH 축적에 의한 활성산소 생성을 직접적으로 보여주는 연구 결과는 없었다. 그 대신에, Fe^{2+} 결합 알데히드 수소이탈효소는 하이드록실라디칼을 발생시키는 것으로 알려져 있으며, 이는 대장균에서 활성산소 생성의 메커니즘이 진핵세포와는 다를지도 모른다는 것을 암시한다.²³

[0155] 연구진은 활성산소 발생의 메커니즘을 완전히 이해하지 못했지만, 도 2a는 에탄올이 대장균에서 DNA 손상을 일으키는 활성산소를 발생시킨다는 사실을 나타내고 있다. 알코올로 인한 DNA 손상을 더 이해하기 위해서, 연구진은 연속희석 스포팅 분석(도 2b)을 수행하였다. 이 분석에서 박테리아 세포가 16.4 병변/유전체, 즉 최대 300 kb 당 1병변에 해당하는 17% 이상의 에탄올 농도에서 30분 동안 살아남을 수 없음을 보여주었다. 그러나 세포사멸은 DNA 손상뿐 아니라 펩티도글리칸 생합성이나 지방산 생합성 억제처럼, 에탄올 스트레스에 대한 다양한 여러 물리적 반응이 결합된 영향 때문이기도 했다.^{24,25} 사실, 에탄올은 수많은 메커니즘을 거쳐 박테리아 세포의 생존에 영향을 미친다.²⁶ 최근의 연구는 대장균에서 에탄올 스트레스로 발생한 프로테옴 변화의 양이 상당했음을 보여주었다.²⁷ 그럼에도 불구하고, 도 2는 에탄올 농도 증가와 DNA 손상과 박테리아 세포사멸 사이의 강한 상관관계가 있음을 분명히 보여준다(도 2).

[0156] 도 3은 주류에서 아가로스 플러그를 포함한 대장균을 30분간 배양함으로써 주류로 인한 DNA 손상을 설명한다. 주류는 맥주 5%, 청주(사케로 알려지기도 함) 13%, 소주 20%(쌀, 밀가루, 감자, 타피오카 같은 다양한 탄수화물 원료로 발효한 술에서 증류하고 물로 희석한 한국 술), 위스키 40%의 에탄올 농도에서 이용되었다. 맥주, 소주, 위스키에서는, 손상된 병변의 숫자는 상응하는 에탄올 대조군 5%, 20%, 40%와 유사한 반면, 표준편차는 에탄올 대조군보다 훨씬 컸다. 그러나, 청주 실험의 결과에서는 DNA 병변의 숫자가 13% 에탄올 실험의 결과에서 나타난 숫자보다 현저히 크게 나타났다.

[0157] 이에 대한 더 깊은 이해를 얻고 청주의 성분을 분석하기 위해, 본 연구진은 전기분무질량 분광계 분석을 수행하였으며, 이로써, 구연산이 1차 물질이라는 점을 확인하였다(도 4a). 일반적으로, 구연산은 레드와인이나 포도주 같은 대부분의 와인류에서 자연적으로 발생하는 첨가물이다.^{28,29} 중요한 것은, 구연산이 항균력이 있다는 것인데, 산성 스트레스는 박테리아의 죽음을 야기한다고 잘 알려져 있기 때문이다.³⁰ 최근의 연구들은 구연산 역시 포유류 세포에서 DNA 손상을 유발할 수 있다고 발표했다.^{31,32} 종합적으로 생각해보면, 청주에서의 DNA 손상

영향은 어떻게 성분들(주로 에탄올과 구연산)이 일관되게 DNA에 해를 미치는가를 나타낸다. 이 영향을 입증하기 위해, 연구진은 청주의 pH와 맞추기 위한 pH 3.24가 되기 위해서 구연산(0.014%)으로 적정한 13% 에탄올을 이용하여 DNA 손상 분석을 수행하였다. 깨끗한 청주는 0.1%의 구연산을 함유하고 있지만, 13% 에탄올의 구연산 0.1%는 아마도 다른 성분들 때문에 2.77로 pH가 감소했다고 알려져 있다. pH가 더 중요한 요소이기 때문에, 연구진은 pH 3.24에 해당하는 13% 에탄올 용액을 사용하였다. 현저하게도, 이 조합이 53.3 병변을 만들어냈으며, 이는 도 4b에서 나타내는 것처럼 오차 범위에서 청주로 인한 59.1 병변에 꽤 가까웠다.

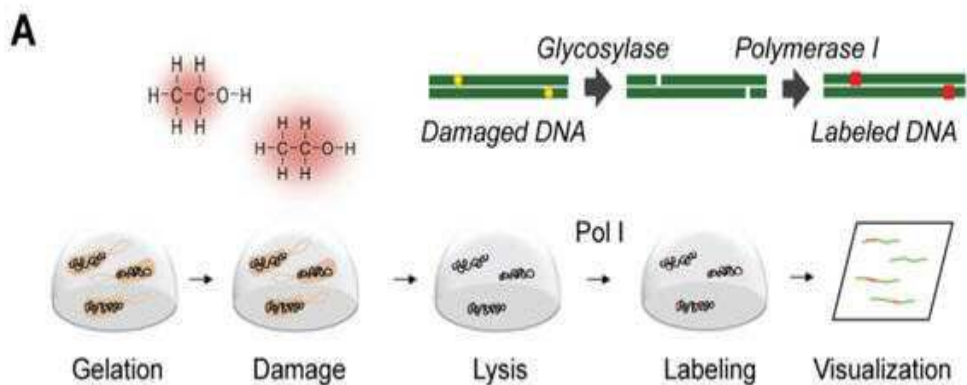
[0159] 결론

[0160] 결론적으로, 본 연구진은 단일 분자 대장균 유전체 DNA에서 알코올로 인한 DNA 손상을 가시화하여 나타내었다. 이 접근법은 연구진이 DNA 손상 병변의 수를 셀 수 있을 정도로 아주 높은 민감도를 보여주었을 뿐 아니라 유해 성분들에 대한 물리적 반응을 모니터할 수 있게 해주었다. 더욱 중요한 것은, 손상된 병변의 숫자가 선형적으로 에탄올 농도의 증가와 비례했다는 것이다. 이 접근법을 사용하면서, 연구진은 주류로 인한 DNA 손상을 평가했다. 흥미로운 것은, 청주의 첨가물인 구연산으로 인한 강화된 DNA 손상을 발견했다는 것이다. 결론적으로, DNA 손상의 가시화는 세포 내에서 유해 성분으로 인한 DNA 손상의 정도를 정량적으로 평가하기에 유용하다. 그뿐 아니라, 이들 반응을 통합하고 미세유체계로 가시화하는 것은 효과적인 바이오센서의 개발이 가능하게 될 것이다.

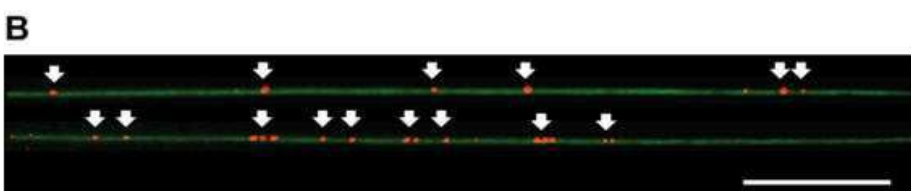
[0162] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

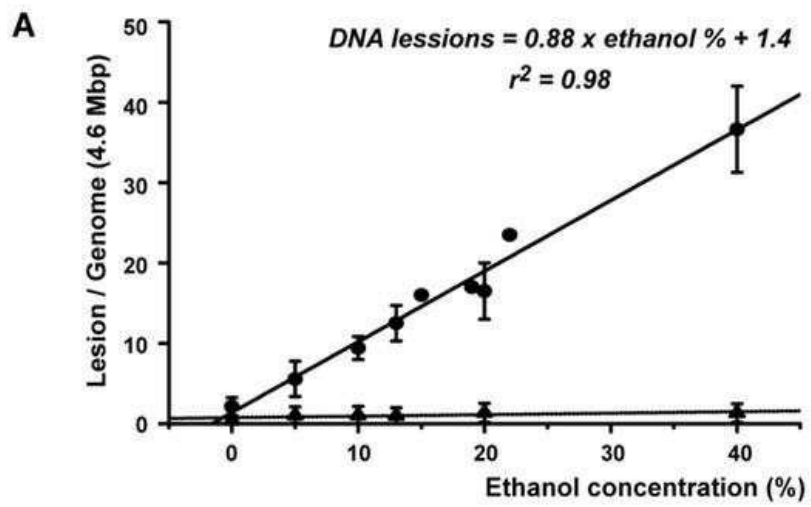
도면1a



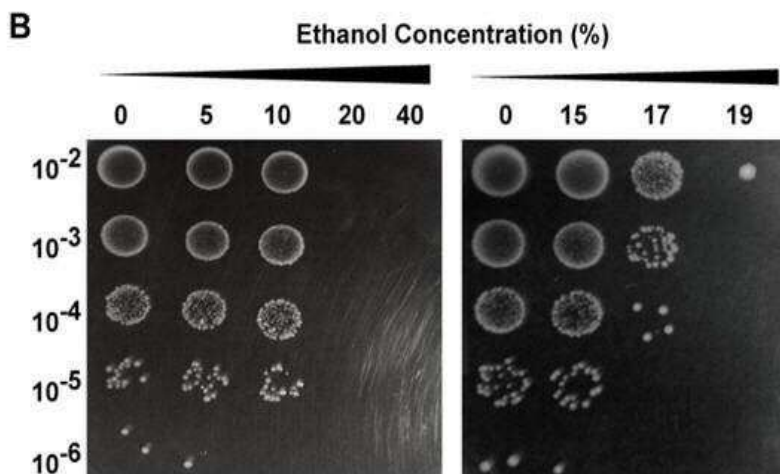
도면1b



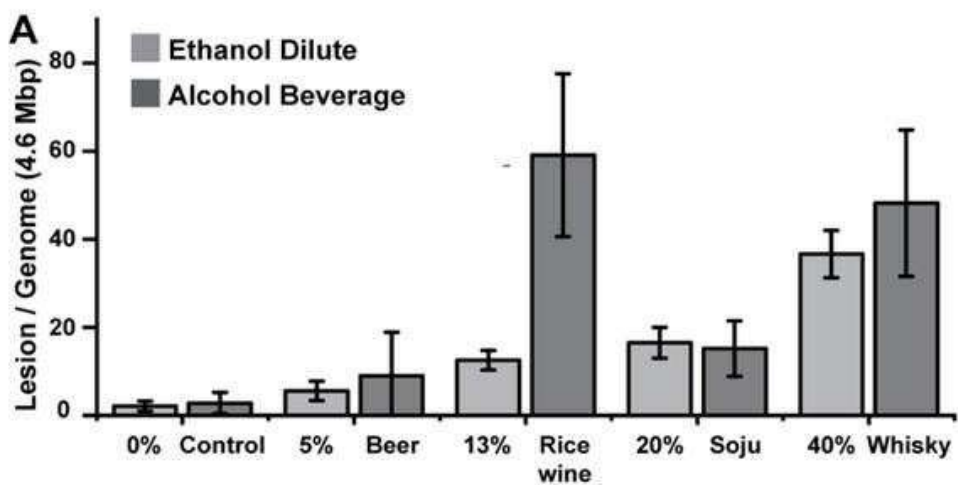
도면2a



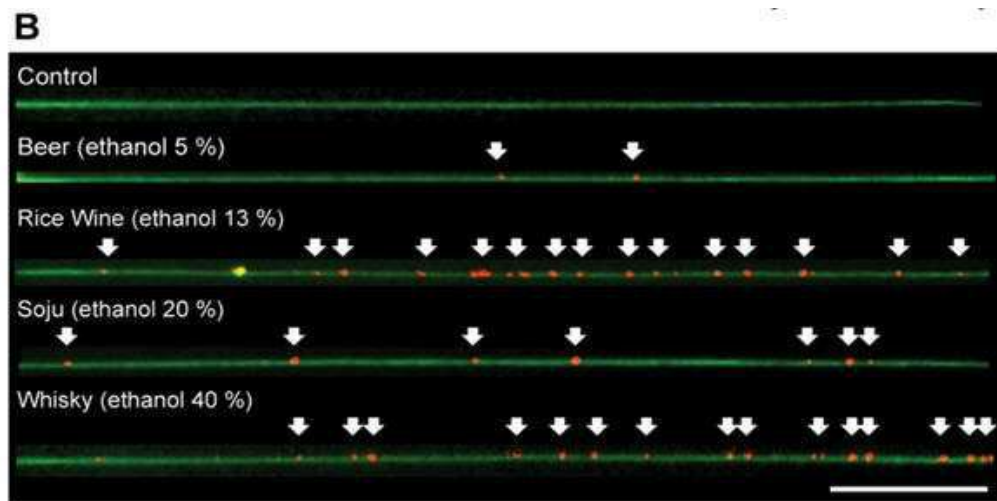
도면2b



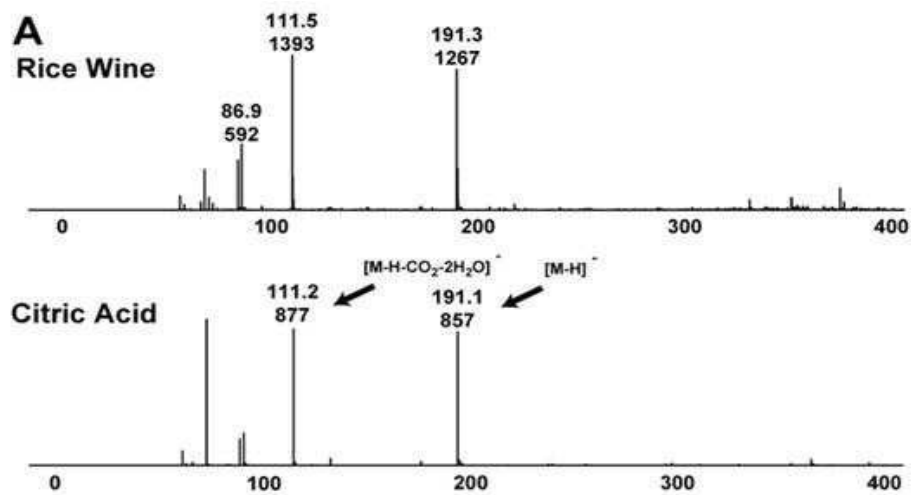
도면3a



도면3b



도면4a



도면4b

