



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0117779
(43) 공개일자 2015년10월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/115 (2010.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0043210
(22) 출원일자 2014년04월10일
심사청구일자 2014년04월10일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
구만복
서울특별시 동대문구 천장산로9가길 25-3 (이문동)
누를하늬
서울특별시 성북구 안암로 145, 자연계 생명공학원 녹지캠퍼스 543호 (안암동5가)
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 10 항

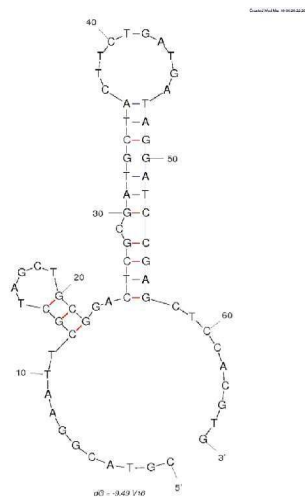
(54) 발명의 명칭 베스핀에 특이적으로 결합가능한 앵타머 및 이를 이용한 바이오 센서

(57) 요약

베스핀(vaspin)에 특이적으로 결합가능한 앵타머 및 이를 이용한 바이오센서에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 베스핀(vaspin)에 특이적으로 결합가능한 앵타머 및 듀얼 DNA 앵타머를 이용한 샌드위치 타입 바이오센싱방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 이용하여 혈중 베스핀(Vaspin) 농도를 보다 민감하게 검출할 수 있다. 혈중 Vaspin 농도의 변화추이는 비만과 혈당대사와 연관되어 있으므로 Vaspin의 혈중 농도를 측정함으로써 제2형당뇨를 진단할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013030837

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원_핵심연구

연구과제명 [2차년도] 진단 및 분리기술 플랫폼을 위한 그래핀 셀렉스 기반 애플타머 나노 소재 복합체 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.05.01 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 11 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 베스핀(vaspin)에 특이적으로 결합가능한 앵타머.

청구항 2

제1항의 앵타머를 포함하는 베스핀(vaspin) 검출용 조성물.

청구항 3

다음 단계를 포함하는 베스핀의 검출방법:

(a) 베스핀 함유 검체 시료와 베스핀에 선택적으로 결합하는 제1항의 앵타머를 접촉시켜, 베스핀-앵타머 복합체를 수득하는 단계; 및

(b) (a) 단계에서 수득된 복합체를 검출하는 단계.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 검체 시료는 물, 토양, 폐기물, 식품, 동식물 장내 및 동식물 조직으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 (b) 단계는 자기공명장치인 SPR(Surface Plasmon Resonance) 장비를 이용하여 검출하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

다음 단계를 포함하는 듀얼 앵타머를 이용한 베스핀의 검출방법:

(a) 제1앵타머로서, 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머가 고정된 고체상에 베스핀 함유 시료를 접촉시켜, 베스핀과 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머를 결합시키는 단계; 및

(b) 상기 제1 앵타머와 결합한 베스핀에 제2앵타머로서, 서열번호 11의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머를 첨가하여 결합시킨 다음, 상기 서열번호 11의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머의 결합여부를 분석하여 베스핀을 검출하는 단계.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 제2앵타머는 형광물질, 양자점, 방사능 표지, 금 나노입자, 효소, 효소 기질 및 전기화학적 작용기 (electrochemical functional group)으로 구성된 군에서 선택된 표지물질로 표시되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항의 베스핀(vaspin)에 특이적으로 결합가능한 앵타머를 이용하는 것을 특징으로 하는 베스핀의 제거방법.

청구항 9

제1항의 베스핀(vaspin)에 특이적으로 결합가능한 앵타머를 함유하는 베스핀 검출용 센서.

청구항 10

제1항의 베스핀(vaspin)에 특이적으로 결합가능한 앵타머를 함유하는 베스핀 검출용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

베스핀(vaspin)에 특이적으로 결합가능한 앵타머 및 이를 이용한 바이오센서에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 베스핀(vaspin)에 특이적으로 결합가능한 앵타머 및 듀얼 DNA 앵타머를 이용한 샌드위치 타입 바이오센싱 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

에디오키아인은 지방세포에서 우세하게 분비되는 사이토카인 단백질로서 면역계와 신경계의 대사작용에 중요한 역할을 한다. 에디오키아인 중 하나인 Vaspin은 복부 지방세포에서 분비되는 호르몬의 일종으로 비만과 포도당 대사 등과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며, 비만과 제2형 당뇨병의 예방과 진행에 중요한 역할을 한다는 사실이 알려져 있다(Hida K, *et al. Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(30):10610-5, 2005). 비만 정도와 체지방 분포, 인슐린 민감성, 포도당 대사능력 등이 다른 187명과 제2형 당뇨병 환자 및 포도당 대사능력이 정상인 사람은 혈중 Vaspin 농도를 조사한 결과 포도당 대사능력이 정상인 사람은 혈중 Vaspin 농도는 체질량지수[BMI:몸무게(kg)를 키의 제곱(m²)으로 나눈 값]에 비례하여 증가하고 인슐린 민감성과 비례하여 감소하는 것으로 나타났다. 하지만 제2형 당뇨병 환자의 경우에는 체중과 Vaspin 농도 사이에 비례관계가 성립하지 않는 것으로 드러났다. 그러나 이들의 경우에도 운동을 하면 혈중 Vaspin 농도가 크게 증가하는 것으로 나타나 혈중 Vaspin 농도를 비만과 제2형 당뇨병의 진단 및 치료효과의 임상적 지표로 활용할 수 있을 것으로 보인다. 즉혈중 Vaspin 농도의 변화추이는 비만과 혈당대사와 연관되어 있으므로 Vaspin의혈중 농도를 측정함으로써 제 2형당뇨를 진단할 수 있다.

[0003]

한편, 기존 바이오센서 분야에서 이용되는 다양한 감지물질 중 민감도 면에서 우위에 있는 것이 항체를 이용한 타겟물질의 검출이다. 이는 검출하고자하는 타겟물질(항원)을 동물의 몸에 주입하여 생체의 면역시스템을 통해 만들어지는 항체를 확보한 후 정제 과정을 거치기 때문에 시간이 많이 들고 고비용이라는 점이 첫 번째 문제점이라 할 수 있다. 또한 타겟물질에 있어 제약이 거의 없는 앵타머에 비해 항원으로 사용할 수 있는 타겟물질이 제한적이어서 독성물질과 같은 저분자 화학물질들에 대한 항체의 제작에 어려움이 있다. 일반적으로 항체는 그 크기가 100kDa 이상인 매우 큰 단백질이기 때문에 전기화학 기반 등의 바이오센서로 응용 시에 신호 검출 부분에 있어 제약이 있고, 열 안정성이 DNA나 다른 화학물질에 비해 현저히 떨어지는 문제가 있다. 그러므로 기존의 혈중 바이오마커의 진단에 있어 항체를 이용한 기술은 비용과 시간 면에서 효율적이지 않고, 적용범위가 다양하지 않으며 바이오센서로 응용하는 데에 있어 제한적인 문제점들이 있다. 이러한 문제점들을 개선하기 위한 새로운 감지물질로서 다양한 타겟물질에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 핵산 구조체인 앵타머를 이용하는 연구가 많이 이루어지고 있다.

[0004]

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 핵산구조체이므로 열 안정성이 우수하며, 시험관 내(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.

[0005]

앵타머 개발방법에 있어서 가장 중요한 요소는 타겟에 결합한 DNA(혹은 RNA)와 결합하지 않은 DNA를 구별하는 것인데 이를 위하여 일반적으로 타겟을 고정하거나 DNA 랜덤라이브리리를 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(자성비드, 컬럼 등)에 DNA가 직접 결합 할 가능성을 완전히 배제할 수 없다는 점과 분리용 물질에 고정된 타겟에 결합한 DNA를 다시 분리해 내는 과정에서 나타날 수 있는 DNA 풀 손실의 가능성 등은 고정화 방식의 한계이자 문제점으로 남아있다. 특히 DNA 라이브러리를 고정하는 방식에서 발생할 수 있는 낮은 DNA 고정율 문제는 앵타머 개발과정에서 피해야 하는 가장 중요한 손실인 DNA 풀의 손실과 직결되어 큰 한계점이 된다. 그외에도 고정화 자체가 어려운 중금속 이온 등은 고정화방식으로는 앵타머를 개발하기가 어려워 고정화 방식에는 타겟 선정에도 제약이 있을 수 있다. 그러나 비고정화 방식의 앵타머 개발기술을 이용하게되면 위에서 열거한 모든 한계를 극복할 수 있으며 타겟의 결합부위가 제한적이지 않기 때문에 앵타머 개발에 필요한 선별과정 반복 횟수를 줄일 수 있는 장점도 가지고 있다. 그렇기 때문에 비고정화 방식으로 앵타머를 개발할 수 있는 기술발명을위해 종래에 미세 전자기계 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 탄소구조체로서 열안정성, 전기적 특성 및 강도가 매우 우수하며 단일가닥 DNA의 염기부분과 π -스태킹을 통해 결합하기 때문에 이러한 특성들을 응용한 광범위한 연구가 실시되고 있다.

[0006]

샌드위치 타입의 바이오센서의 경우 하나의 타겟물질에 대하여 서로 다른 부위에 결합하는 두 개의 다른 리셉터 물질이 필요하다. 샌드위치 타입의 바이오센서는 센서의 민감도 향상을 시킬 수 있는 수단이 형광물질, 양자점, 방사능 표지, 금 나노입자, 효소, 효소 기질, 및 전기화학적 작용기(electrochemical functional group)로 표지함으로써 다양하여 광범위하게 사용된다. 따라서 앵타머를 사용한 샌드위치 타입의 바이오 센서는 하나의 타겟물질의 다른 부위에 결합하는 2종 이상의 듀얼 앵타머가 반드시 필요하다.

[0007]

이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 에디포카인 중 하나인 베스핀(Vaspin)에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 핵산 구조체인 DNA 앵타머를 비고정화방식 그래핀 SELEX를 통해 개발한 다음, 또한, 상기 하나의 베스핀(Vaspin)의 다른 부위에 특이적으로 결합 가능한 듀얼 DNA 앵타머를 포함하는 금 침기반 SPR(surface plasmon resonance)에 관한 조성물을 이용한 샌드위치 기반 바이오센서를 통하여 베스핀(Vaspin)을 효과적으로 검출할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008]

본 발명의 목적은 베스핀(Vaspin)을 효과적으로 검출할 수 있는 DNA 앵타머를 제공하는데 있다.

[0009]

본 발명의 다른 목적은 상기 DNA 앵타머를 함유하는 베스핀 검출용 조성물을 제공하는데 있다.

[0010]

본 발명의 또 다른 목적은 상기 DNA 앵타머를 이용한 베스핀의 검출방법을 제공하는데 있다.

[0011]

본 발명의 또 다른 목적은 듀얼 앵타머를 이용한 베스핀의 검출방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012]

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 11 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 베스핀(vaspin)에 특이적으로 결합가능한 앵타머를 제공한다.

- [0013] 본 발명은 또한, 상기 DNA 앵타머를 함유하는 베스핀 검출용 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, (a) 베스핀 함유 검체 시료와 베스핀에 선택적으로 결합하는 제1항의 앵타머를 접촉시켜, 베스핀-앵타머 복합체를 수득하는 단계; 및 (b) (a) 단계에서 수득된 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 베스핀의 검출방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한, (a) 제1앵타머로서, 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머가 고정된 고체상에 베스핀 함유 시료를 접촉시켜, 베스핀과 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머를 결합시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 시료에 제2앵타머로서, 서열번호 11의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머를 첨가하여 반응시킨 다음, 상기 서열번호 11의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머의 결합여부를 분석하여 베스핀을 검출하는 단계를 포함하는 듀얼 앵타머를 이용한 베스핀의 검출방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 상기 베스핀(vaspin)에 특이적으로 결합가능한 앵타머를 이용하는 것을 특징으로 하는 베스핀의 제거방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, 상기 베스핀(vaspin)에 특이적으로 결합가능한 앵타머를 함유하는 베스핀 검출용 센서를 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한, 상기 베스핀(vaspin)에 특이적으로 결합가능한 앵타머를 함유하는 베스핀 검출용 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명에 따르면 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 이용하여 혈중 베스핀(Vaspin) 농도를 보다 민감하게 검출할 수 있다. 혈중 Vaspin 농도의 변화추이는 비만과 혈당대사와 연관되어있으므로 Vaspin의 혈중 농도를 측정함으로써 제2형당뇨를 진단할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도1은 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 제조과정을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 각 selection round 에서부터 얻어진 베스핀(Vaspin)에 결합하는 ssDNA 의 양이 증가함을 나타내는 그래프이다
- 도 3은 본 발명에 따른 서열번호 1의 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 서열번호 2의 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 서열번호 3의 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명에 따른 서열번호 4의 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 7은 본 발명에 따른 서열번호 5의 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 8은 본 발명에 따른 서열번호 6의 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 9는 본 발명에 따른 서열번호 7의 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.
- 도 10 은 본 발명에 따른 서열번호 8의 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명에 따른 서열번호 9의 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명에 따른 서열번호 10의 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명에 따른 서열번호 11의 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명에 따른 DNA 앵타머 서열번호 1 내지 서열번호 11을 이용한 다양한 검출시료의 자기공명장치인 SPR(Surface Plasmon Resonance) 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 DNA 앵타머V1, V4, V14 및 V49를 이용한 다양한 베스핀(Vaspin) 농도의 자기공명장치인 SPR(Surface Plasmon Resonance) 측정결과를 나타낸 것이다.

도 16은 듀얼 DNA 앵타머 V1, V49를 이용한 샌드위치 타입의 SPR 기반 베스핀 검출 방법의 모식도를 나타낸 것이다.

도 17은 듀얼 DNA 앵타머 V1, V49를 이용한 샌드위치 타입의 SPR 기반 베스핀 검출의 실제 측정 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 일 관점에서, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 11 중 어느 하나의 염기서열을 포함하는 베스핀(vaspin)에 특이적으로 결합가능한 앵타머에 관한 것이다.
- [0022] 본 발명에서 '앵타머'란, 소정의 표적 분자에 대한 결합활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 앵타머는, 소정의 표적 분자에 대하여 결합함으로써, 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 본 발명의 앵타머는 DNA, RNA, 수식(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 본 발명의 앵타머는 또한, 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 '베스핀(vaspin)'이란 아디포사이토카인(adipocytokine)으로 알려졌으며, 풀 네임은 'visceral adipose tissue-derived serpin (vaspin)'이다.
- [0024] Vaspin cDNA는 Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) 랫트의 내장부위 백색 지방 조직(WATs)으로부터 분리되었고, 랫트, 마우스 및 인간 베스핀은 각각 392, 394, 및 395 아미노산으로 구성되었고, 알파1-엔티트립신과 약 40%의 호모로지지를 나타낸다(Hida K, *et al. Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(30):10610-5, 2005).
- [0025] 본 발명의 일 양태에서는 상기 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 GO SELEX 프로세스를 이용하여 선별하였다.
- [0026] 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 방법이다 (J.W. Park *et al., Chemical Communications*, 48:2071, 2012).
- [0027] 본 발명의 DNA 앵타머에서, 상기 DNA 앵타머는 상기 SELEX 프로세스에 의해 선택된 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합하는 어떠한 염기서열의 DNA 앵타머일 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 1 내지 서열번호 11중 어느 하나의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명의 상기 베스핀 특이적 DNA 앵타머는 하기 단계를 포함하는 방법으로 제조할 수 있다:
- [0029] a) 양끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30 내지 50개의 임의의 염기를 가지는 단일 가닥 핵산 풀(pool)과 타겟물질 또는 카운터 타겟물질을 완충용액에서 혼합하여 상온에서 결합을 유도하는 단계;
- [0030] b) 상기 혼합액과 그래핀을 반응시켜 타겟물질과 결합한 또는 카운터 타겟물질에 결합하지 않는 단일가닥 핵산을 제거하는 단계;
- [0031] c) 상기 단계에서 얻은 타겟물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥핵산에 대해 상기 PCR용 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하여 증폭시키는 제3단계;

- [0033] d) 상기 타겟물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥 핵산에 대해 타겟물질과 카운터타겟 물질을 이용하여 그래핀 기반 선별(selection) 및 카운터선별(counterselection)하는 과정을 반복수행하는 단계; 및
- [0034] 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.
- [0035] 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.
- [0036] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 포함하는 베스핀(Vaspin) 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명의 조성물에서, 상기 DNA 앵타머는 서열번호 1 내지 11의 앵타머인 것을 특징으로 한다.
- [0038] 본 명세서에서 언급된 "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.
- [0039] 본 발명의 앵타머는 또한 이 기술분야에서의 자체 공지 방법에 의해 화학 합성할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 앵타머의 길이는 특별히 한정되지 않고, 통상 약 15~약 200 뉴클레오타이드일 수 있지만, 예컨대 약 100 뉴클레오타이드 이하이고, 바람직하게는 약 80 뉴클레오타이드 이하이며, 본 발명의 일 구체예에서 본 발명의 앵타머의 길이는 특별히 한정되지 않으나, 대략 76 뉴클레오타이드 내외로 개발될 수 있고, post-SELEX 과정을 통해 보다 효율적인 20-30 뉴클레오타이드 크기로 modification 되어 사용될 수 있다. 총 뉴클레오타이드수가 적으면, 화학합성 및 대량 생산이 보다 용이하고, 또한 비용면에서의 장점도 크다. 또한 화학수식도 용이하고, 생체내 안정성도 높으며, 독성도 낮다고 생각된다. 본 발명의 앵타머에 포함되는 각 뉴클레오타이드는 각각, 동일 또는 상이하여, 리보오스(예, 피리미딘 뉴클레오타이드의 리보오스)의 2'부위에서 히드록실기를 포함하는 뉴클레오타이드(즉, 미치환인 뉴클레오타이드)이거나, 또
- [0041] 는 리보오스의 2'부위에서, 히드록실기가, 임의의 원자 또는 기로 치환되어 있는 뉴클레오타이드일 수 있다. 이러한 임의의 원자 또는 기로서는, 예컨대 수소원자, 불소원자 또는 -O- 알킬기(예, -O-Me기), -O-아실기(예, -O-CHO기), 아미노기(예, -NH₂기)로 치환되어 있는 뉴클레오타이드를 들 수 있다. 본 발명의 앵타머는 또한 적어도 1 종(예, 1, 2, 3 또는 4종)의 뉴클레오타이드가, 리보오스의 2'부위에서, 히드록실기, 또는 전술한 임의의 원자 또는 기, 예컨대 수소원자, 불소원자, 히드록실기 및 -O-Me기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 2종(예, 2, 3 또는 4종)의 기를 포함하는 뉴클레오타이드일 수 있다. 본 발명의 앵타머는 또한, 모든 뉴클레오타이드가, 리보오스의 2'부위에서, 히드록실기, 또는 전술한 임의의 원자 또는 기, 예컨대 수소원자, 불소원자, 히드록실기 및 -O-Me기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 동일한 기를 포함하는 뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 앵타머의 일례는, 단일쇄 부분, 제1 스템 부분, 인터널 루프 부분, 제2 스템 부분, 인터널 루프 부분으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 부분을 포함하는 잠재적 2차 구조를 가질 수 있다. 본 발명의 앵타머의 다른 예는, 단일쇄 부분, 제1 스템 부분, 인터널 루프 부분, 제2 스템 부분, 인터널 루프 부분으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 부분을 포함하는 잠재적 2차 구조를 가질 수 있다.
- [0043] 본 명세서에서 기재된 '잠재적 2차 구조'란, 생리 조건하에서 안정적으로 존재할 수 있는 2차 구조를 말하고, 예컨대 잠재적 2차 구조를 갖는지의 여부는, 실시예에 기재한 구조 예측 프로그램에 의해 결정할 수 있다. 스템 부분이란, 2 이상의 연속하는 뉴클레오타이드에서의 염기쌍(예, G-C, A-U, A-T)에 의해, 2중쇄가 형성되는 부분을 말한다. 인터널 루프 부분이란, 2개의 상이한 스템 부분 사이에서 형성되는 비시스템 부분을 말한다. 헤어핀 루프 부분이란, 하나의 스템 부분에 의해 형성되는 부분 구조로서, 앵타머쇄의 5' 말단 및 3' 말단에 대하여 반대측에 형성되는 루프 부분을 말한다. 단일쇄 부분이란, 폴리뉴클레오타이드쇄의 말단 부분으로서, 상기한 스템 부분, 인터널 루프 부분 및 헤어핀 루프 부분에 해당하지 않는 부분을 말한다.
- [0044] 본 발명의 앵타머는, 베스핀(Vaspin)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 플루

오로화, 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.*, *Nucle. Acid. Res.* 19, 733-738, 1991; Cotton *et al.*, *Nucl. Acid. Res.* 19, 2629-2635, 1991; Hobbs *et al.*, *Biochemistry* 12, 5138-5145, 1973).

[0045] 본 발명의 앵타머는 또한 베스핀(Vaspin)에 대한 결합성 등을 높이기 위해, 핵산염기(예, 푸린, 피리미딘)가 변형(예, 화학적 치환)된 것이어도 좋다. 이러한 변형으로서, 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.

[0046] 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(아미테이트), 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.

[0047] 본 발명에서의 변형은 또한, 캡핑과 같은 3' 및 5'의 변형을 포함하여도 좋다.

[0048] 변형은 또한, 폴리에틸렌글리콜, 아미노산, 펩티드, inverted dT, 핵산, 뉴클레오시드, 미리스토일(Myristoyl), 리쓰콜릭-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.

[0049] 본 발명의 상기 베스핀(Vaspin) 검출용 조성물은 혈중 베스핀의 농도에 따라 제2형 당뇨병의 진단을 판별할 수 있다. 따라서, 베스핀(Vaspin)의 검출을 위해 본 발명의 DNA 앵타머를 이용하여 어떠한 형태로도 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 DNA 앵타머를 자성비드에 고정화시켜 베스핀(Vaspin)을 결합시키게 되면 결합된 DNA 앵타머-베스핀(Vaspin)복합체(complex)를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 베스핀(Vaspin)을 분리함으로써 베스핀(Vaspin)만을 선택적으로 검출할 수 있게 된다.

[0050] 본 발명의 조성물을 이용하는 베스핀(Vaspin)의 제거방법의 한 예를 들면, 상기 DNA 앵타머가 고정화된 자성비드를 컬럼(column)에 채운 후 베스핀(Vaspin)을 포함하는 시료를 통과시켜 베스핀(Vaspin)만을 선택적으로 제거할 수 있다.

[0051] 또 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 베스핀 함유 검체 시료와 베스핀에 선택적으로 결합하는 제1항의 앵타머를 접촉시켜, 베스핀-앵타머 복합체를 수득하는 단계; 및 (b) (a) 단계에서 수득된 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 베스핀의 검출방법에 관한 것이다.

[0052] 특히, 본 발명에서는 금칩 기반의 SPR(surface plasmon resonance) 분석으로 베스핀(Vaspin)을 검출할 수 있다. 즉, 이것을 위하여 금칩(bare gold chip)의 표면을 개질하여 각각의 DNA 앵타머를 칩 위에 고정시킨 후 그 위에 타겟물질을 농도 별로 반응시키고, 그 결합력을 확인하며 특이적 결합능 분석을 위해 다른 카운터 타겟물질에 대한 결합력을 테스트한다.

[0053] 상기 베스핀(Vaspin)은 물, 토양, 식품, 폐기물, 동식물 장내 및 동식물 조직 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 11으로 표시되는 핵산앵타머 중 가장 높은 특이성을 보인 서열번호 1, 3, 5 및 11로 표시되는 핵산서열인 앵타머 V1, V4, V14 및 V49에 대하여 다양한 베스핀 농도에 따른 금칩 기반의 SPR(surface plasmon resonance) 분석을 수행한 결과, 베스핀(Vaspin) 특이적으로 결합능을 확인하였다. 따라서, 본 발명은 상기 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합하는 앵타머를 함유하는 베스핀(Vaspin)의 검출센서에 관한 것이다.

[0055] 또 다른 관점에서, 본 발명은 (a) 제1앵타머로서, 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머가 고정된 고체상에 베스핀 함유 시료를 접촉시켜, 베스핀과 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머를 결합시키는 단계; 및 (b) 상기 제1 앵타머와 결합한 베스핀에 제2앵타머로서, 서열번호 11의 염기서열로 표시되는 핵산 앵

타머를 첨가하여 결합시킨 다음, 상기 서열번호 11의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머의 결합여부를 분석하여 베스핀을 검출하는 단계를 포함하는 듀얼 앵타머를 이용한 베스핀의 검출방법에 관한 것이다.

[0056]

본 발명에 따른 일 양태에서는 베스핀 특이적 핵산 앵타머는 각각을 듀얼 앵타머(제1 앵타머 및 제2 앵타머)로 하는 샌드위치 결합 방식을 이용하여 베스핀의 검출 또는 제2형 당뇨병 진단에 이용될 수 있다. 본 발명의 다른 실시예에서는, 샌드위치 결합 방식을 이용하여 베스핀의 검출능을 비교한 경우, 서열번호 1의 앵타머 V1을 제1 앵타머로서 고체상에 고정시키고 타겟물질인 베스핀을 가한 후 서열번호 11의 앵타머 V49을 제2 앵타머로 2차 반응시키는 2차 반응시키는 샌드위치 결합을 수행하는 경우 민감하게 베스핀을 검출할 수 있는 것으로 나타났다.

[0057]

즉, 본 발명의 검출방법은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머가 고정된 고체상에 베스핀 함유 시료를 접촉시키고, 서열번호 11의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머를 첨가하여 반응시킨 다음, 상기 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머의 결합여부를 분석하여 베스핀을 검출하는 것을 특징으로 할 수 있다. 이때, 제2 앵타머의 결합여부는 그 결합여부를 확인할 수 있는 것이면 어떤 형태의 신호처리 기법도 적용될 수 있는데, 예로 제2 앵타머에 표지물질을 결합시켜 표지물질 자체 또는 그 반응을 검출함으로써 결합여부를 확인할 수 있다. 표지물질은 제2 앵타머에 간접적 또는 직접적인 방법으로 부착될 수 있으며, 표지물질로는 이온 제한되는 것은 아니나, 형광물질, 양자점, 방사능 표지, 금 나노입자, 효소, 효소 기질, 및 전기화학적 작용기(electrochemical functional group) 등이 사용될 수 있고, 이때, 형광물질의 종류는 특별히 한정되지 않으나, 예를 들면 Cy3 또는 Cy5와 같은 형광색소나, 루시페라아제(luciferase), GFP와 같은 형광 단백질과 같은 공지의 형광물질이 사용될 수 있다. 아울러, 상기 표지물질 또는 그 반응의 검출은 일반적으로 알려진 표지물질 또는 그 반응의 분석방법에 의하여 이루어질 수 있다. 예컨대 형광물질을 표지물질로서 사용한 경우 타겟 물질의 존재 시 발광 또는 색 변화가 발생하는바, 이를 측정함으로써 타겟물질을 검출할 수 있다. 예시적으로 형광염료를 탐지할 수 있는 이미지 스캐너 등을 통하여 반응을 일으킨 웰을 스캔하여 타겟물질의 검출 여부를 확인할 수 있고, 이미지를 소프트웨어를 통해 진하기 정도를 측정함으로써 검출량을 측정할 수 있다.

[0058]

또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 베스핀(vaspin)에 특이적으로 결합가능한 앵타머를 함유하는 베스핀 검출용 센서 또는 베스핀 검출용 키트에 관한 것이다.

[0059]

상기 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합하는 앵타머를 함유하는 검출센서시스템은, 키트(kit)의 형태로 제공될 수 있다. 베스핀(Vaspin) 검출용 키트는 병, 통(tub), 작은봉지(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 기타수단에 의해 용기에 부착될 수 있는, 완전히 또는 부분적으로 분리가 가능한 마개를 장착할 수 있다. 용기는 또한 주사 바늘에 의해 내용물에 접근할 수 있는, 스톱퍼가 장착될 수 있다. 상기 키트는 외부패키지를 포함할 수 있으며, 외부패키지는 구성요소들의 사용에 관한 사용설명서를 포함할 수 있다.

[0060]

본 발명에 따른 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합하는 앵타머는 또한, 베스핀(Vaspin)만을 특이적으로 검출하는 바, 이를 포함하여 베스핀(Vaspin)의 검출 또는 제거용 조성물을 제공할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에게 자명한 것이다.

[0061]

본 발명은 또 다른 관점에서, 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용한 베스핀(Vaspin)의 제거방법에 관한 것이다.

[0062]

본 발명의 일 양태에 따르면, 바람직하게는 상기 앵타머가 고정된 비드를 컬럼에 충전하고 베스핀(Vaspin)이 포함된 시료를 통과시켜 베스핀(Vaspin)을 제거할 수 있다.

[0063]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명한 것이다.

[0064]

실시예 1: 임의의 염기서열을 가지는 DNA pool 합성

[0065]

66mer 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 합

성을 의뢰하였다.

[0066] CGTACGGAATTCGCTAGC-random region-GGATCCGAGCTCCACGTG

[0067] 서열번호 12: CGTACGGAATTCGCTAGC

[0068] 서열번호 13: GGATCCGAGCTCCACGTG

[0069] 실시예 2: 베스핀(Vaspin) 에 특이 DNA 앵타머의 선별

[0070] 실시예 2에서 합성된 랜덤 DNA pool을 카운터 타겟 [아디포넥틴(Adiponectin), 비스파틴(Visfatin), Retinol-binding protein 4(RBP4), Human serum albumin(HAS), 레지스틴(resistin)]와 버퍼용액(20mM Tris-Cl buffer, pH 7.6 contained 100mM NaCl, 2mM MgCl₂, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 0.02% Tween 20, 10% MeOH)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 제거하고, 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합하는 DNA를 확보하기 위해 그라핀만 있는 위 튜브에 베스핀(Vaspin)을 첨가한 후 30분간 상온에서 반응시켜, 배좌 변위(Conformational change)를 유발시키고 그라핀으로부터 타겟 특이적인 앵타머를 분리한 후 에탄올 침전법으로 타겟 특이적 DNA를 확보하였다. 이렇게 얻어진 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합하는 DNA의 양을 측정하였다. 도 2에서는 eluted ssDNA의 양이 각각의 선별단계(selection round)각 선별단계(selection round)에서 얻어진 베스핀(Vaspin)에 결합하는 DNA의 양이 증가하고 있음을 보여주었다.

[0071] 실시예 3: 베스핀(Vaspin) 에 결합 가능한 DNA 앵타머 pool의 제조

[0072] 베스핀(Vaspin)과 결합 특이적인 DNA의 양을 늘리기 위해 이미 알고 있는 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0073] PCR 생산물은 두 가닥의 DNA이므로 이를 단일가닥으로 분리하기 위한 과정을 위하여, 아래와 같이 하나의 프라이머에는 플루오레세인(fluorescein)을 고정하였다.

[0074] forward (APTFf) 5-fluorescein-CGTACGGAATTCGCTAGC-3: (서열번호: 14)

[0075] reverse (APTR) 5-CACGTGGAGCTCGGATCC-3: (서열번호: 15)

[0076] PCR 반응물을 정제키트(purification kit)를 이용하여 정제한 후 이중가닥의 DNA를 단일가닥으로 만들기 위해 폴리아크릴아마이드젤 전기영동을 실시하였다.

[0077] 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 [아디포넥틴(Adiponectin), 비스파틴(Visfatin), Retinol-binding protein 4(RBP4), Human serum albumin(HAS), 레지스틴(resistin)]이 녹아있는 버퍼용액과 혼합하여 새로운 선별과정을 시작하였다. 이러한 과정의 모식도를 도 1에 나타내었고, 일련의 과정(GO-SELEX process)을 한 번의 선별(selection)이라 하면 총 6번의 선별과정을 거쳐 최종적으로 80% 이상이 베스핀(Vaspin)에 결합하는 DNA pool을 얻었다. 도 3에서 각각의 선별(selection)에서 글라이코세이트가 고정된 자성비드에서부터 용리된 ssDNA의 퍼센트를 제시하였다. 최종적으로 얻어진 DNA pool을 Qiagen cloning kit를 이용하여 클로닝(cloning)하고 얻어진 콜로니에서부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행할 결과, 서로 다른 11종의 베스핀(Vaspin)에 특이적으로 결합하는 핵산 구조체를 확보하였다.

[0078] 실시예 4: 11종의 DNA 앵타머의 염기서열 분석 및 특이성 분석

[0079] 서로 다른 11종의 베스핀(Vaspin)에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 DNA의 염기서열을 분석한 결과

를 하기 표 1에 제시하였다. 또한, 이 11종의 베스핀(Vaspin)애타머의 2차 구조를 m-fold 프로그램을 이용하여 예측한 결과를 도 3-도 13에 나타내었다.

표 1

[0080]

베스핀에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 11종의 애타머 서열

서열번호	애타머	염기서열 (5'-3')
1	V1	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGGCGGCCTGGGGCGGGCCGCCGATGGGATCCGAGCTCCACG TG
2	V3	CGTACGGAATTCGCTAGCCATGGGTGGGATGGGATGGGTACAAGGTGGAGCATGCTGGGGATCCGAGCTCCACG TG
3	V4	CGTACGGAATTCGCTAGCTAAGCTTTAGGCTGATGAGGAGTTCCTCGGATCCGAGCTCCACGTG
4	V7	CGTACGGAATTCGCTAGCTACGGGGGAGGCGGGTGGGTGGAAATGTGACCATGGCTGTGGGATCCGAGCTCCAC GTG
5	V14	CGTACGGAATTCGCTAGCACCCATGAAGCGGTTCGCGCCATATAGGTGGATCCGAGCTCCACGTG
6	V16	CGTACGGAATTCGCTAGCTGCGGACTCGCGATGCTACTTCTGATGATAGGATCCGAGCTCCACGTG
7	V21	CGTACGGAATTCGCTAGCATGACACAGCAAGATGTGCGGCGAGTTCGTGGATCCGAGCTCCACGTG
8	V23	CGTACGGAATTCGCTAGCGATCTATGTTAGCGTGTACATCAGCTAGATGGATCCGAGCTCCACGTG
9	V30	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGCCAGTGTCCGTGTATATGTAGGTGCGCATTCTACGATGGATCCGAGCTCCACG TG
10	V42	CGTACGGAATTCGCTAGCGTATGTGCAGCTCGGTGAATGTGGCGATTGGATCCGAGCTCCACGTG
11	V49	CGTACGGAATTCGCTAGCGGTGGCTCTAGGGCTATCGTTGCGCCGACGGATCCGAGCTCCACGTG

[0081]

베스핀(Vaspin)에 강하게 결합하는 11 종의 애타머들이 다른 혈중 단백질에는 결합하지않고 오직 베스핀(Vaspin) 에만 특이적으로 결합함을 보여주는 실험은 금침에 애타머를 고정시켜서 SPR(Surface Plasmon Resonance) 장치를 이용하여 수행하였다. 베스핀(Vaspin)은 에디포카인 중의 하나이므로 베스핀(Vaspin) 애타머가 베스핀(Vaspin) 에만 특이적으로 결합하는 것을 보여주기 위한 가장 좋은 대조군으로서 또 다른 에디포카인(RBP4, 아디포넥틴, 레지스틴,Nampt)과 HSA를 사용하였다.

[0082]

먼저, 50 mM의 3,3'-디티오디프로피온산으로 금침의 표면에 카르복실기(-COOH)를 만든 다음 EDC/NHS를 이용하여 자기조립 단분자층(SelfAssembly Monolayer)을 형성시켰다. 그 위에 스트렙타비딘을 고정시키고 바이오틴이 붙어있는 각각의 애타머를 고정시켰다. 여기에 200 nM의 베스핀(Vaspin)과 대조군인 RBP4, 아디포넥틴, 레지스틴,Nampt 그리고 HSA를 버퍼용액(100 mMNaCl, 2 mM MgCl2, 5 mM KCl, 1 mM CaCl2 및 0.02% Tween 20을 포함하는 20 mM Tris-Cl 버퍼용액, pH 7.6)안에서 각각 30 분간 반응시킨 후 같은 버퍼용액으로 결합하지 않은 단백질을 씻어냈다. 최종적으로 SPR 결과를 분석하여 베스핀(Vaspin) 애타머가 다른 단백질들보다 베스핀(Vaspin)에 월등하게 잘 결합하는 것을 확인할 수 있었다(도 14).

[0083]

실시에 5: 베스핀(Vaspin)에 대한 해리 상수(Kd)의 측정

[0084]

실시에 4에서 제작한 서로 다른 11 종의 베스핀(Vaspin) 결합 특이적인 애타머 중에서 특이성 및 결합력이 가장 높은 V1, V4, V14 및 V49번 애타머의 베스핀(Vaspin) 에 대한 결합분석(binding assay)을 실시하였다.

[0085]

금침에 실시예 4와 동일한 방법으로 애타머를 고정시킨 후 25 nM 부터 2 μM의 서로 다른 농도의 베스핀(Vaspin) 을 버퍼용액(100 mM NaCl, 2 mM MgCl2, 5 mM KCl, 1 mM CaCl2 및 0.02% Tween 20을 포함하는 20 mM Tris-Cl 버퍼용액, pH 7.6)에서 30 분간 반응시켰다. 해리상수를 구하기 위해서 각각의 반응 정도는 비선형 회귀법과 단일 부위 포화형 리간드 결합법으로 Graphpad Prism 5.0을 이용하여 플로팅(plotting) 되었고, 여기에 $Y = B_{max} * X^h / (K_d^h + X^h)$ 식이 이용되었다(y는 포화도, Bmax는 최대 결합 위치, Kd는 해리상수, X 는 결합하지 않은 베스핀(Vaspin), h는 hill slope 상수). 그 결과, 도출된 V1, V4, V14 및 V49번 애타머의 Kd 값이 각각 170.3, 312.7, 279.6, 243.7 nM로써 베스핀(Vaspin) 에 강력하게 결합하는 것이 확인되었다(도 15).

[0086]

실시에 6 : 베스핀에 대한 샌드위치 결합이 가능한 듀얼 애타머(제1 애타머, 제 2애타머)의 결합 확인

[0087]

샌드위치 결합 법을 통한 베스핀의 검출 샌드위치 결합 방식 (도 16)을 이용하여 베스핀을 검출하기 위한 최적의 조성, 즉 최적의 제1 애타머 (고체상에 고정되는 애타머) 및 제2 애타머 (제1 애타머에 결합한 타겟물질에

결합하며, 표지 물질 등으로 표지되는 앵타머)를 찾기 위하여 다음의 실험을 수행하였다.

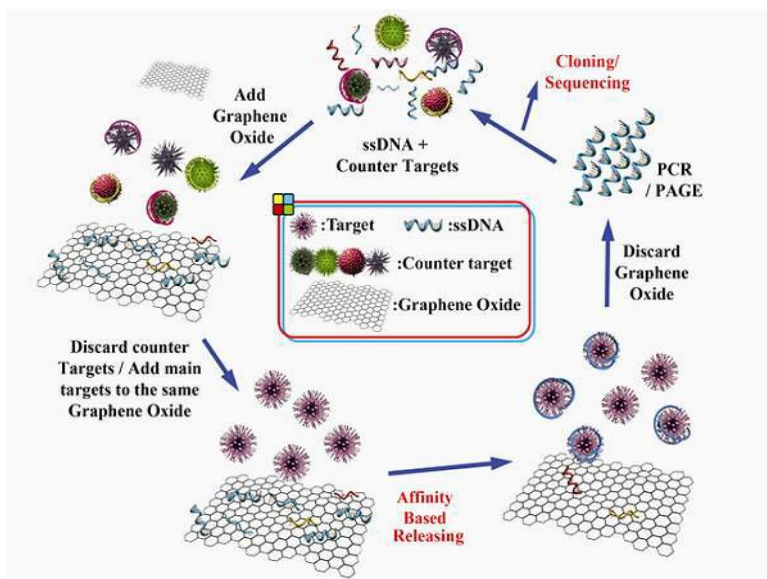
[0088] 먼저, 상기 실시예 5에서 가장 강한 친화도를 보이는 것으로 확인된 2종의 앵타머를 대상으로 하여 실시예 5와 동일한 방법으로 금 칩 상에 1종의 앵타머(앵타머 V1 (서열번호 1))를 고정시킨 후, 베스핀을 결합시킨 후 다시 여기에 추가적으로 1종의 앵타머 (앵타머 V49 (서열번호 11))를 결합시켜 보았다. 여기서 앵타머 V49 (서열번호 11)은 SPR 신호 증폭을 위하여 금 나노 입자와 결합시켜 사용하였다(도 16).

[0089] 그 결과, Kd가 가장 낮은 앵타머 V1 (서열번호 1)를 고정하고, Kd가 가장 두 번째로 낮은 앵타머 V49 (서열번호 11)을 2차 반응시켰을 때 두 종의 앵타머 모두 베스핀에 결합한 결과를 얻을 수 있었으며, 이는 도 17과 같다. 즉, 서열번호 1의 앵타머 V1을 제1 앵타머로서 고체상에 고정시키고 타겟물질인 베스핀을 가한 후 서열번호 11의 앵타머 V49을 제2 앵타머로 2차 반응시키는 샌드위치 결합을 수행하는 경우 민감하게 베스핀을 검출할 수 있는 것으로 나타났다.

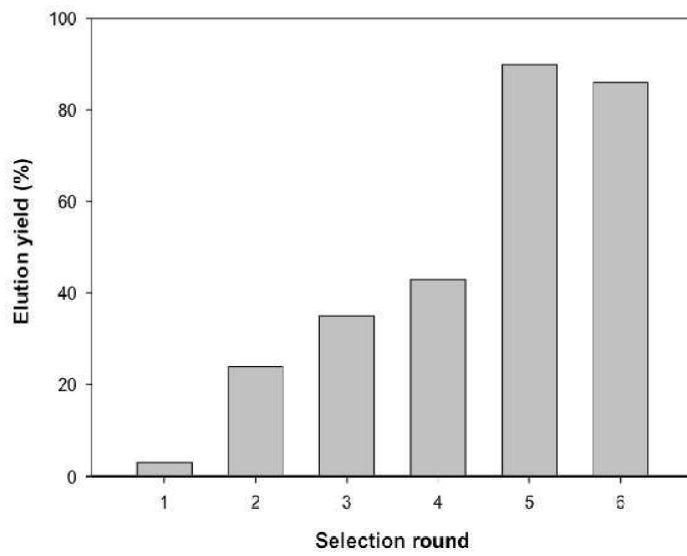
[0090] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



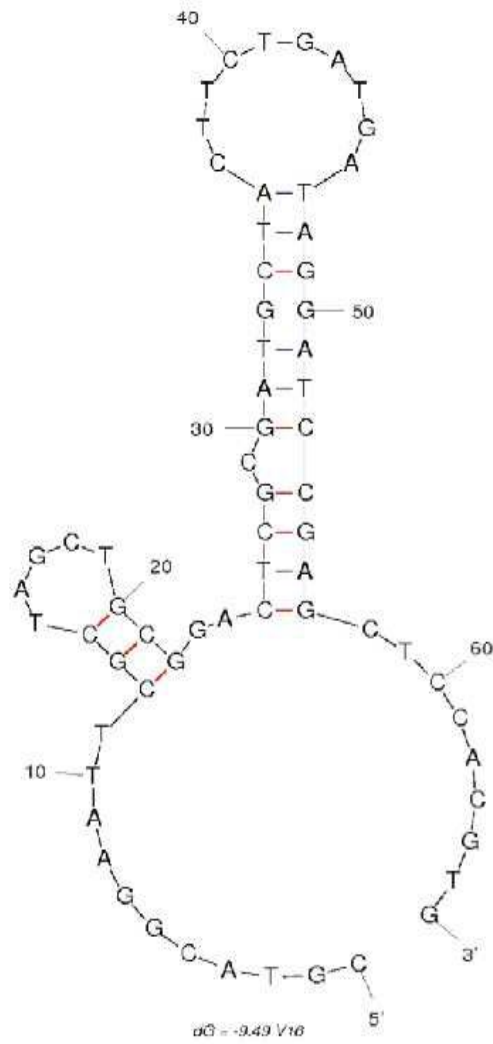
도면2



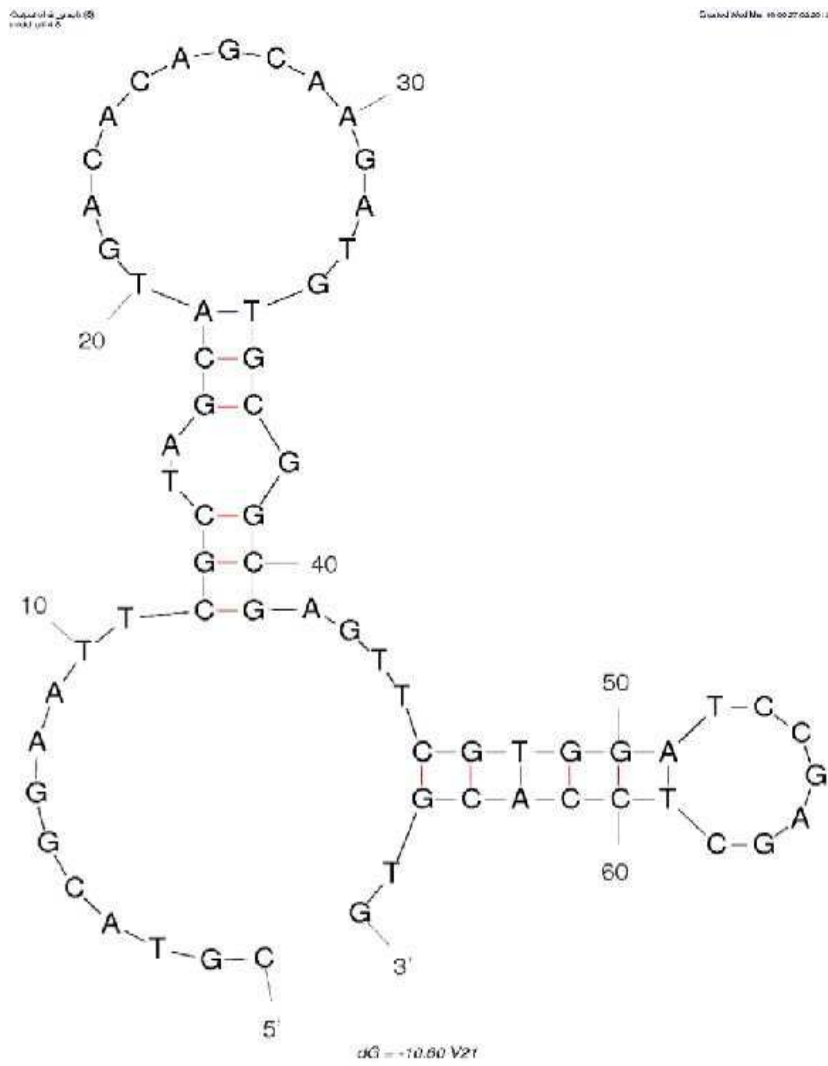
도면3

Chemical structure (5)
1000 1000

Chemical structure (5)
10 00 20 30 40



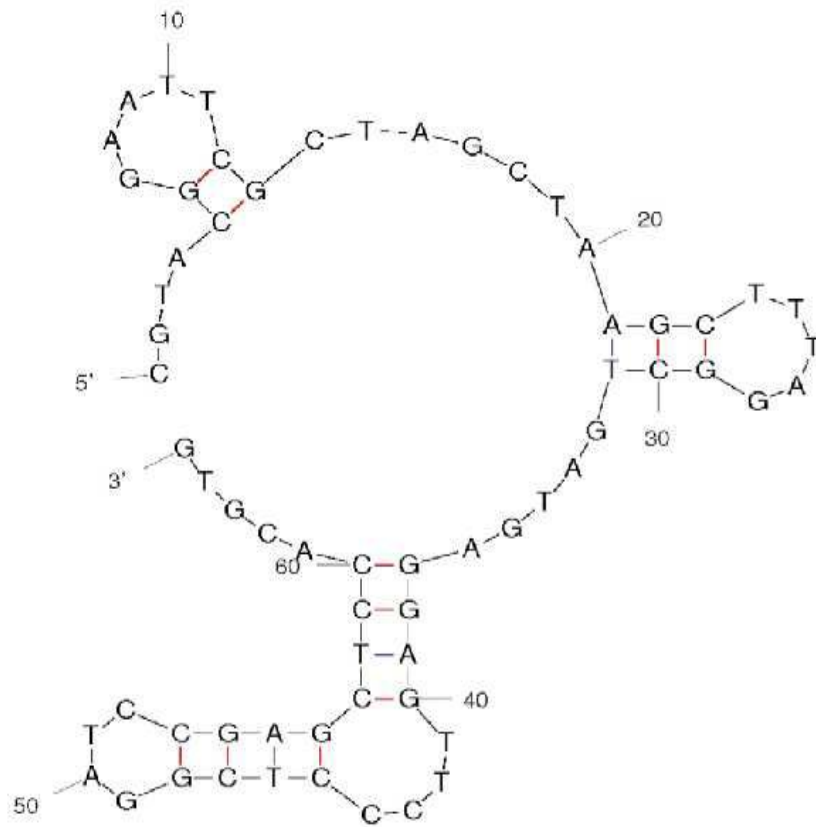
도면4



도면7

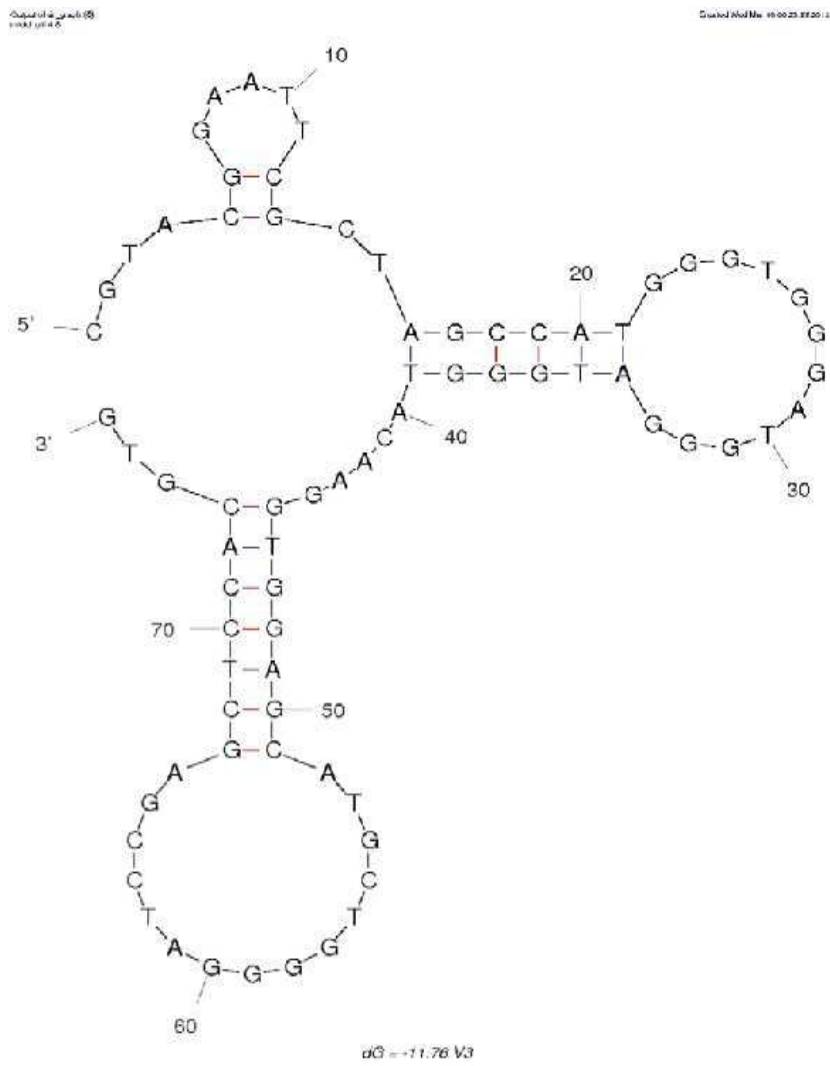
bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/014145>; this version posted April 1, 2014. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/014145>; this version posted April 1, 2014. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted bioRxiv a license to display the preprint in perpetuity. It is made available under aCC-BY-NC-ND 4.0 International license.

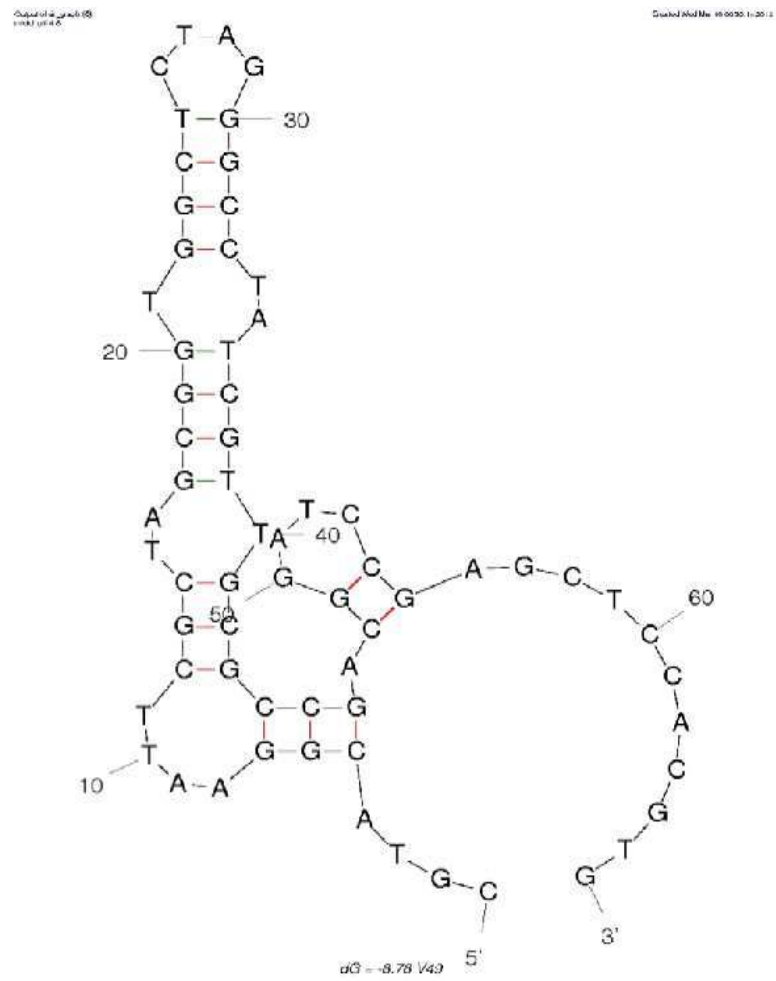


dC = -9.49 V4

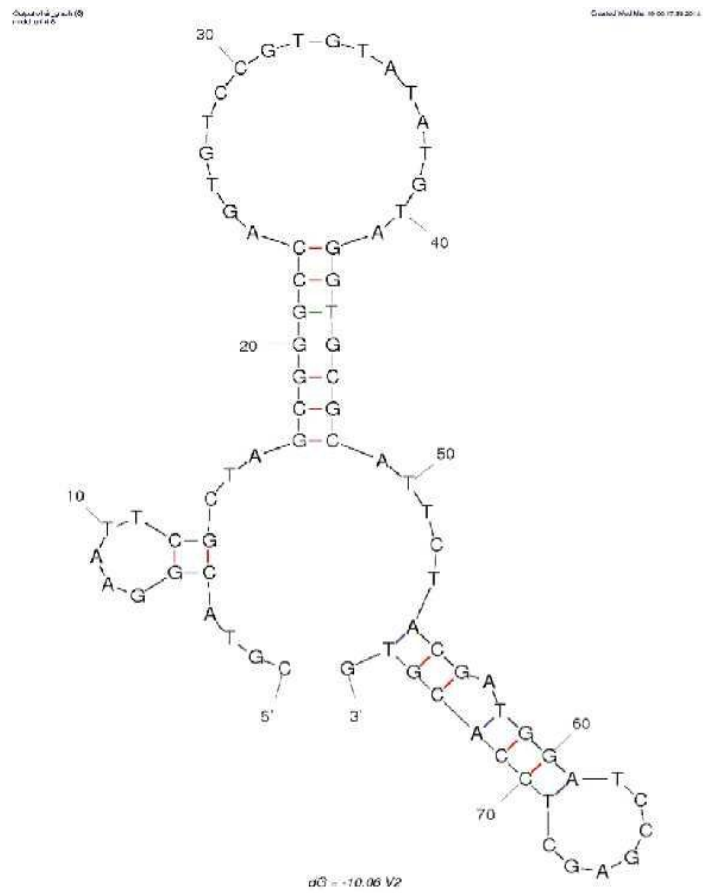
도면8



도면10



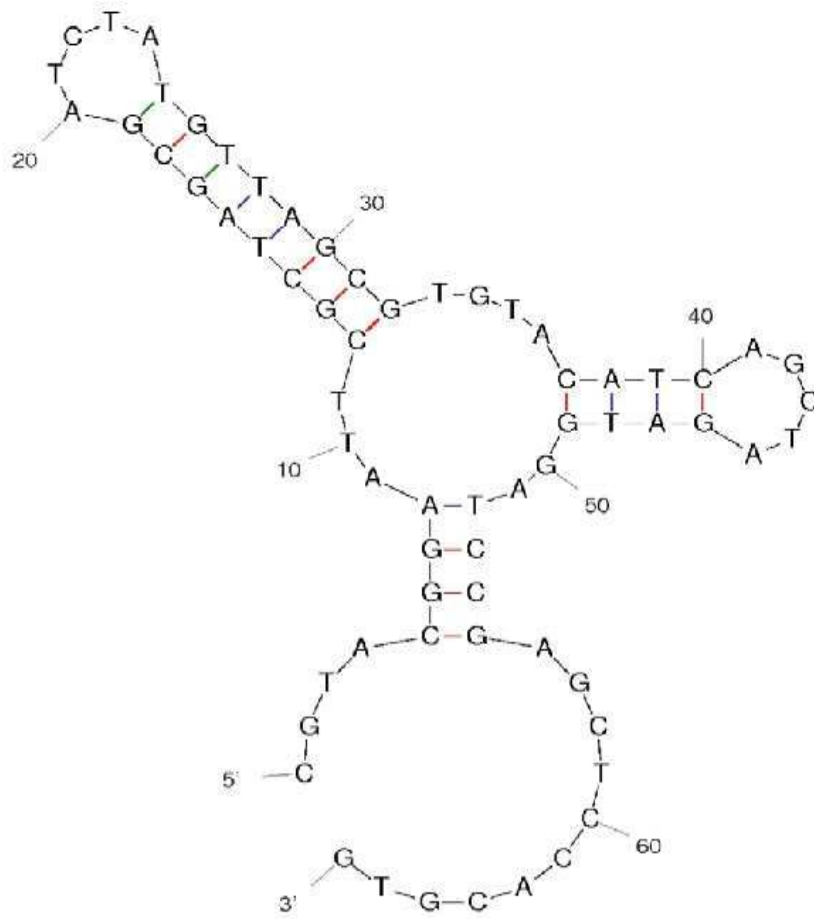
도면11



도면12

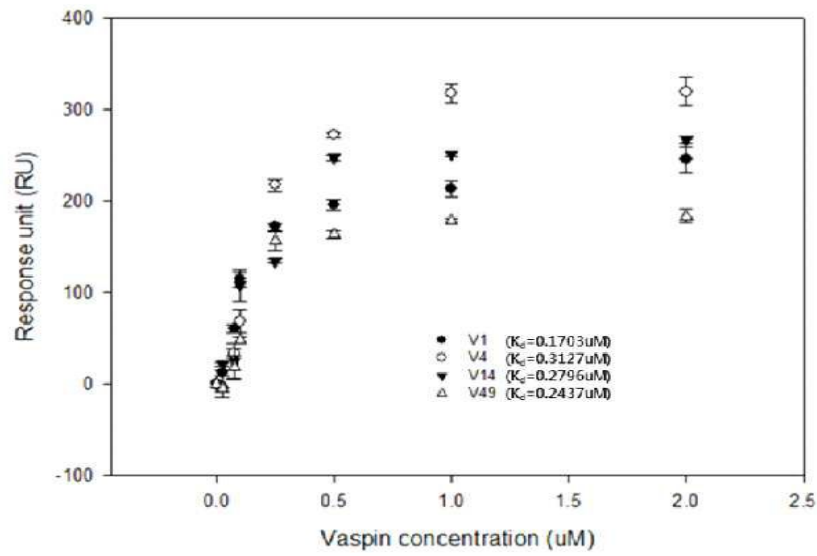
Chemical structure (5)
100% (1/1)

Chemical structure (5)
100% (1/1)

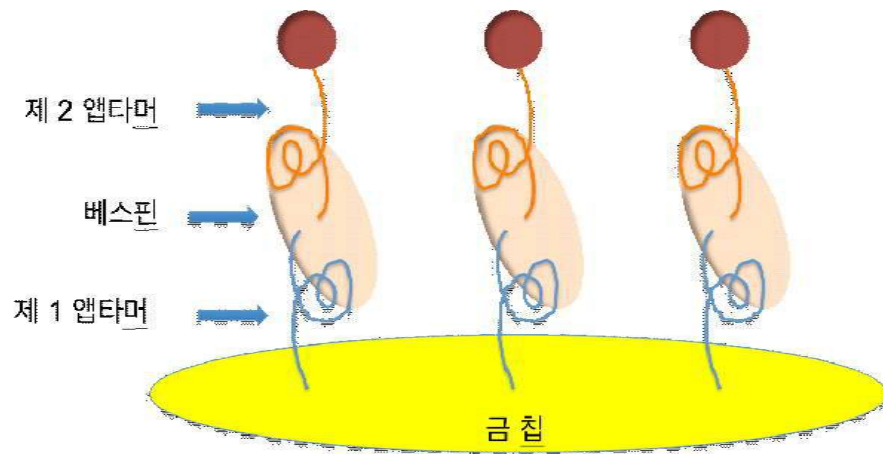


dG --10.27 V23

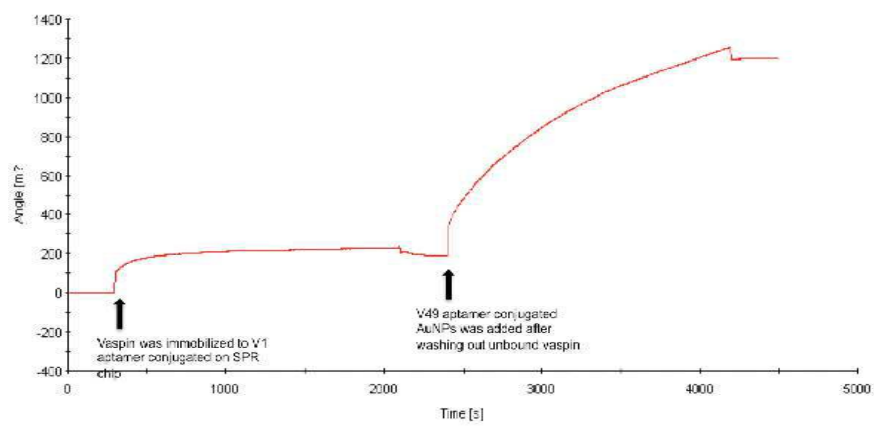
도면15



도면16



도면17



서열목록

<110> Korea University Research and Biusiness Foundation

<120> Aptamer having specific binding ability for vaspin and Biosensor
Using thereof

<130> P14-B123

<160> 15

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer

<400> 1

cgtagcgaat tcgctagctg atggtgtggc gggggcggcc tggggcgggc cgccgatggg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 2

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer

<400> 2

cgtagcgaat tcgctagcca tgggtgggat gggatgggta caaggtggag catgctgggg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 3

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer

<400> 3

cgtagcgaat tcgctagcta agctttaggc tgatgaggag ttcctcgga tccgagctcc 60

acgtg 65

<210>

> 4

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer

<400> 4

cgtacggaat tcgctagcta cgggggaggc ggggtgggtgg aaatgtgacc atggctgtgg 60

gatccgagct ccacgtg 77

<210> 5

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer

<400> 5

cgtacggaat tcgctagcac ccatgaagcg gttccgcgcc atataggtgg atccgagctc 60

cacgtg 66

<210> 6

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer

<400> 6

cgtacggaat tcgctagctg cggactcgcg atgctacttc tgatgatagg atccgagctc 60

cacgtg 66

<210> 7

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer

<400> 7

cgtacggaat tcgctagcat gacacagcaa gatgtgcggc gagttcgtgg atccgagctc 60

cacgtg 66

<210> 8

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	aptamer	
<400>	8	
cgtacggaat tgcctagcga tctatgttag cgtgtacatc agctagatgg atccgagctc		60
cacgtg		66
<210>	9	
<211>	76	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	aptamer	
<400>	9	
cgtacggaat tgcctagcgg gccagtgtcc gtgtatatgt aggtgcgcat tctacgatgg		60
atccgagctc cacgtg		76
<210>	10	
<211>	65	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	aptamer	
<400>	10	
cgtacggaat tgcctagcgt atgtgcagct cgggtgaatgt ggcgattgga tccgagctcc		60
acgtg		65
<210>	11	
<211>	66	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	aptamer	
<400>	11	
cgtacggaat tgcctagcgg tggctctagg gcctatcgtt gcgccgacgg atccgagctc		60
cacgtg		66
<210>	12	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer region of aptamer	

<400>	12	
cgtacggaat tcgctagc		18
<210>	13	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer region of aptamer	
<400>	13	
ggatccgagc tccacgtg		18
<210>	14	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	14	
cgtacggaat tcgctagc		18
<210>	15	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	15	
cacgtggagc tcggatcc		18