



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0129221  
(43) 공개일자 2014년11월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)  
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7026232
- (22) 출원일자(국제) 2013년05월21일  
심사청구일자 2014년09월24일
- (85) 번역문제출일자 2014년09월19일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2013/001639
- (87) 국제공개번호 WO 2013/175313  
국제공개일자 2013년11월28일
- (30) 우선권주장  
61/649,418 2012년05월21일 미국(US)

- (71) 출원인  
에스알씨, 인코퍼레이트  
미국, 뉴욕 13212, 노쓰 시러큐스, 라운드 폰드  
로드 7502
- (72) 발명자  
설리만, 후다 시라젤딘  
미국, 뉴욕 13212, 노쓰 시러큐스, 460 에스. 메  
인 스트리트 #143  
마쓰리크, 스테이시 안  
미국, 뉴욕 13210, 시러큐스, 139 제임스빌레 애  
버뉴  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
강명구

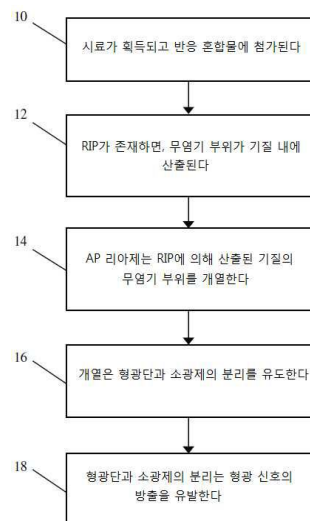
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 리신과 기타 리보솜 비활성화 단백질의 검출을 위한 방법과 시스템

(57) 요약

시료 내에 리신 독소를 비롯한 리보솜 비활성화 단백질 활성의 검출을 위한 장치, 방법, 그리고 시스템. 한 구체예에 따라, 시료 내에 리보솜 비활성화 단백질은 아데닌을 표지된 DNA 기질로부터 제거하여 무염기 부위를 산출한다. AP 리아제는 이후, 무염기 부위에서 DNA 기질을 개열하여, DNA 기질의 한쪽 단부에서 또는 단부에 근접하여 위치하는 형광단 및 DNA 기질의 다른 단부에서 또는 단부에 근접하여 위치하는 소광제가 공간적으로 분리할 수 있도록 한다. 일단 형광단과 소광제가 충분히 분리되면, 형광단은 형광 신호를 방출할 것이다. 리보솜 비활성화 단백질 활성을 지시하는 증가하는 형광은 검출 시스템을 이용하여 실시간으로 모니터링될 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**스티데스, 프란세스 루이제**

미국, 버지니아 20147, 애쉬번, 21360 샤우어 스퀘어

**모쉬에르, 티모씨 프란시스**

미국, 뉴욕 13069, 폴턴, 676 발드윈 로드

**닥터, 켈튼 아씨**

미국, 뉴욕 13057, 이스트 시러큐스, 706 웨스트 마닐루스 스트리트

**밀리스, 제프리 하롤드**

미국, 뉴욕 13090, 리버풀, 5 아본 파크웨이, 아파트먼트 9

**캠벌린, 리사 헬렌**

미국, 뉴욕 13057, 이스트 시러큐스, 36 워터트리 드라이브

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

시료 내에 리보솜 비활성화 단백질 표적의 존재를 검출하기 위한 방법에 있어서, 리보솜 비활성화 단백질 표적은 핵산 기질과 상호작용하여 무염기 부위를 산출할 수 있고, 상기 방법은 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

시료를 반응 혼합물에 첨가하여 두 번째 혼합물을 산출하는 단계, 여기서 반응 혼합물은 AP 리아제 및 핵산 기질의 복수의 분자를 포함하고, 여기서 상기 핵산 기질은 표적 서열, 형광단, 그리고 소광제를 포함하고;

리보솜 비활성화 단백질 표적이 핵산 기질 내에 표적 서열에서 무염기 부위를 산출하고, 그리고 AP 리아제가 산출된 무염기 부위를 개열하는데 충분한 조건 하에 상기 두 번째 혼합물을 향온 처리하는 단계, 여기서 상기 리보솜 비활성화 단백질 표적이 상기 시료 내에 존재하면, 상기 형광단과 상기 소광제는 분리하고 상기 형광단은 통지 신호를 발생시키고; 그리고

상기 통지 신호를 검출하는 단계, 여기서 상기 신호는 상기 시료 내에 상기 리보솜 비활성화 단백질 표적의 존재를 지시한다.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 리보솜 비활성화 단백질 표적은 리신인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 통지 신호는 실시간으로 검출되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 4

청구항 3에 있어서, 통지 신호는 형광 검출 시스템에 의해 실시간으로 검출되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 핵산 기질은 dsDNA, ssDNA, RNA, 올리고뉴클레오티드, 키메라 핵산, 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6

청구항 1에 있어서, 핵산 기질은 비-핵산 성분을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7

청구항 1에 있어서, 표적 서열은 사르신-리신 루프인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 8

시료 내에 리보솜 비활성화 단백질 표적의 존재를 검출하기 위한 시스템에 있어서, 여기서 리보솜 비활성화 단백질 표적은 핵산 기질과 상호작용하여 무염기 부위를 산출할 수 있고, 상기 시스템은 하기를 포함하는 것을 특징으로 하는 시스템:

시료, 상기 시료는 상기 표적을 잠재적으로 포함하고;

AP 리아제 및 핵산 기질의 복수의 분자를 포함하는 반응 혼합물, 여기서 상기 핵산 기질은 표적 서열, 형광단과 소광제를 포함하고, 여기서 상기 시료가 반응 혼합물에 첨가되어 두 번째 혼합물이 산출되고, 그리고 두 번째 혼합물이 리보솜 비활성화 단백질 표적이 핵산 기질 내에 무염기 부위를 산출하고, 그리고 AP 리아제가 산출된 무염기 부위를 개열하는데 충분한 조건 하에 향온 처리될 때, 상기 형광단은 통지 신호를 발생시키고; 그리고

센서, 여기서 상기 센서는 상기 통지 신호를 검출하도록 구성되고, 상기 통지 신호의 검출은 상기 시료 내에 상기 리보솜 비활성화 단백질 표적의 존재를 지시한다.

**청구항 9**

청구항 8에 있어서, 리보솜 비활성화 단백질 표적은 리신인 것을 특징으로 하는 시스템.

**청구항 10**

청구항 8에 있어서, 센서는 통지 신호를 실시간으로 검출하는 것을 특징으로 하는 시스템.

**청구항 11**

청구항 10에 있어서, 센서는 형광 기초된 검출에 의해 통지 신호를 검출하는 것을 특징으로 하는 시스템.

**청구항 12**

청구항 8에 있어서, 핵산 기질은 dsDNA, ssDNA, RNA, 올리고뉴클레오티드, 키메라 핵산, 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 시스템.

**청구항 13**

청구항 8에 있어서, 핵산 기질은 비-핵산 성분을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 시스템.

**청구항 14**

청구항 8에 있어서, 표적 서열은 사르신-리신 루프인 것을 특징으로 하는 시스템.

**청구항 15**

시료 내에 리신의 존재를 검출하기 위한 방법에 있어서, 상기 방법은 하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법:

시료를 반응 혼합물에 첨가하여 두 번째 혼합물을 산출하는 단계, 여기서 반응 혼합물은 AP 리아제와 DNA 기질을 포함하고, 여기서 DNA 기질은 형광단과 소광제를 포함하고;

리신이 DNA 기질 내에 무염기 부위를 산출하고, 그리고 AP 리아제가 산출된 무염기 부위를 개열하는데 충분한 조건 하에 두 번째 혼합물을 항온 처리하는 단계, 여기서 리신이 상기 시료 내에 존재하면, 상기 형광단과 상기 소광제는 분리하고 상기 형광단은 통지 신호를 발생시키고; 그리고

상기 통지 신호를 검출하는 단계, 여기서 상기 신호는 상기 시료 내에 리신의 존재를 지시한다.

**청구항 16**

청구항 15에 있어서, DNA 기질은 합성된 핵산인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 17**

청구항 15에 있어서, 핵산 기질은 비-핵산 성분을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18**

청구항 15에 있어서, DNA 기질은 사르신-리신 루프를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

청구항 15에 있어서, 통지 신호는 실시간으로 검출되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 20**

청구항 19에 있어서, 통지 신호는 형광 기초된 검출 시스템에 의해 실시간으로 검출되는 것을 특징으로 하는 방법.

**명세서**

## 기술분야

- [0001] 관련된 출원에 대한 교차 참조
- [0002] 본 출원은 2012년 5월 21일자 제출된 U.S. Provisional Patent Application Ser. No. 61/649,418 (발명의 명칭: "리신과 기타 리보솜 비활성화 단백질의 검출을 위한 형광 검정")에 우선권을 주장하고, 이의 전체 내용은 본원에 참조로서 편입된다.
- [0003] 발명의 배경
- [0004] 1. 발명의 분야
- [0005] 본 발명은 리신과 기타 리보솜 비활성화 단백질의 검출, 더욱 구체적으로, 리신과 기타 리보솜 비활성화 단백질의 검출을 위한 형광 검정에 관계한다.

## 배경기술

- [0006] 2. 관련된 기술에 관한 설명
- [0007] 리신은 피마자유 식물 리시누스 콤무니스 (*Rcinus communis*)에 의해 생산되는 강력한 단백질 독소이다. 리신은 이황화 결합에 의해 연결된 A 사슬과 B 사슬로 구성되는 66 kDa 리보솜 비활성화 단백질 ("RIP")이다. 32 kDa B 사슬은 세포의 표면 상에서 갈락토오스 잔기에 결합하는데, 이것은 리신의 내재화를 유발한다. 일단 세포 내에서, 34 kDa A 사슬은 B 사슬로부터 분리하고 시토플라스마 내로 전좌하고, 여기서 이것은 효소 활성을 수행한다. 리신 A 사슬은 특정한 아데닌 (A4324)을 리보솜 RNA로부터 제거하고, 따라서 이들 리보솜에 의한 단백질 합성을 저해하고 세포 사멸을 유발함으로써 작용한다. 리신에 대한 자연 기질은 28S 진핵 리보솜 RNA의 잘 보존된 "사르신-리신 루프"인데, 이것은 정상적으로, 단백질 합성 동안 신장 인자 (elongation factor)에 결합하는데 이용된다. 리신은 성인을 죽일 수 있는 식탁염 (table salt)의 수개 알갱이의 크기의 분량으로 흡입되거나, 주사되거나, 또는 섭취되면, 극히 유독하다. 이러한 극도의 치사성으로 인해, 그리고 피마자씨로부터 정제의 용이함으로 인해, 리신은 생물 무기로서 이용되었고 여전히 이용되고 있다. 결과적으로, 리신의 검출을 위한 시스템과 방법이 지속적으로 요구된다. 리신 검출에 더하여, 유사하게, Shiga 독소, 트리코산틴, 러핑, 아브린, 그리고 사포린이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 기타 리보솜 비활성화 단백질의 신속하고, 효율적이고, 그리고 활용가능한 검출이 지속적으로 요구된다.
- [0008] 효소 결합 면역흡착 검정 ("ELISA") 및 세포 없는 번역 시스템을 비롯한 현재의 리신 검출 검정은 복잡하고, 시간 소모가 많고, 비경제적이고, 그리고 실험실 분석에 더욱 적합하다. 많은 시험관내 검정은 표적화된 사르신-리신 루프의 합성 모방체를 이용하지만, 이차 구조로 인하여 이들 기질은 검출을 위한 최종 용융과 어닐링 단계를 필요로 한다. 이러한 유형의 종점 검정은 현장 검출 시스템에서 이용에 이상적이지 않고, 따라서 리신 활성의 실시간으로 신속한 검출을 위한 검정이 지속적으로 요구된다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0009] 발명의 간단한 요약
- [0010] 첫 번째 양상에 따라, 시료 내에 리보솜 비활성화 단백질 표적의 존재를 검출하기 위한 방법이 제시되고, 여기서 리보솜 비활성화 단백질 표적은 핵산 기질과 상호작용하여 무염기 부위를 산출할 수 있고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (i) 시료를 반응 혼합물에 첨가하여 두 번째 혼합물을 산출하는 단계, 여기서 반응 혼합물은 AP 리아제 및 핵산 기질의 복수의 분자를 포함하고, 여기서 상기 핵산 기질은 표적 서열, 형광단, 그리고 소광제를 포함하고; (ii) 리보솜 비활성화 단백질 표적이 핵산 기질 내에 표적 서열에서 무염기 부위를 산출하고, 그리고 AP 리아제가 산출된 무염기 부위를 개열하는데 충분한 조건 하에 상기 두 번째 혼합물을 향온 처리하는 단계, 여기서 상기 리보솜 비활성화 단백질 표적이 상기 시료 내에 존재하면, 상기 형광단과 상기 소광제는 분리하고 상기 형광단은 통지 신호를 발생시키고; 그리고 (iii) 상기 통지 신호를 검출하는 단계, 여기서 상기 신호는 상기 시료 내에 상기 리보솜 비활성화 단백질 표적의 존재를 지시한다.
- [0011] 한 양상에 따라, 리보솜 비활성화 단백질 표적은 리신이고, 그리고 핵산 기질은 dsDNA, ssDNA, RNA, 올리고뉴클레오티드, 키메라 핵산, 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된다. 다른 구체예에 따라, 핵산 기질은 비

-핵산 성분을 더욱 포함한다. 표적은 예로서, 사르신-리신 루프를 포함할 수 있다.

- [0012] 다른 양상에 따라, 통지 신호는 형광 기초된 검출 시스템, 예를 들면, 정량적 PCR 플랫폼에 의해 실시간으로 검출된다.
- [0013] 두 번째 양상에 따라, 시료 내에 리보솜 비활성화 단백질 표적의 존재를 검출하기 위한 시스템이 제시되고, 여기서 리보솜 비활성화 단백질 표적은 핵산 기질과 상호작용하여 무염기 부위를 산출할 수 있고, 상기 시스템은 하기를 포함한다: (i) 시료, 상기 시료는 상기 표적을 잠재적으로 포함하고; (ii) AP 리아제 및 핵산 기질의 복수의 분자를 포함하는 반응 혼합물, 여기서 상기 핵산 기질은 표적 서열, 형광단과 소광제를 포함하고, 여기서 상기 시료가 반응 혼합물에 첨가되어 두 번째 혼합물이 산출되고, 그리고 두 번째 혼합물이 리보솜 비활성화 단백질 표적이 핵산 기질 내에 무염기 부위를 산출하고, 그리고 AP 리아제가 산출된 무염기 부위를 개열하는데 충분한 조건 하에 향온 처리될 때, 상기 형광단은 통지 신호를 발생시키고; 그리고 (iii) 센서, 여기서 상기 센서는 상기 통지 신호를 검출하도록 구성되고, 상기 통지 신호의 검출은 상기 시료 내에 상기 리보솜 비활성화 단백질 표적의 존재를 지시한다.
- [0014] 시스템의 한 양상에 따라, 리보솜 비활성화 단백질 표적은 리신이고, 그리고 핵산 기질은 dsDNA, ssDNA, RNA, 올리고뉴클레오티드, 키메라 핵산, 그리고 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된다. 다른 구체예에 따라, 핵산 기질은 비-핵산 성분을 더욱 포함한다. 표적은 예로서, 사르신-리신 루프를 포함할 수 있다.
- [0015] 시스템의 다른 양상에 따라, 통지 신호는 형광 기초된 검출 시스템, 예를 들면, 정량적 PCR 플랫폼에 의해 실시간으로 검출된다.
- [0016] 세 번째 양상에 따라, 시료 내에 리신의 존재를 검출하기 위한 방법이 제시되고, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: (i) 시료를 반응 혼합물에 첨가하여 두 번째 혼합물을 산출하는 단계, 여기서 반응 혼합물은 AP 리아제와 DNA 기질을 포함하고, 여기서 DNA 기질은 형광단과 소광제를 포함하고; (ii) 리신이 DNA 기질 내에 무염기 부위를 산출하고, 그리고 AP 리아제가 산출된 무염기 부위를 개열하는데 충분한 조건 하에 두 번째 혼합물을 향온 처리하는 단계, 여기서 리신이 상기 시료 내에 존재하면, 상기 형광단과 상기 소광제는 분리하고 상기 형광단은 통지 신호를 발생시키고; 그리고 (iii) 상기 통지 신호를 검출하는 단계, 여기서 상기 신호는 상기 시료 내에 리신의 존재를 지시한다.
- [0017] 다른 양상에 따라, DNA 기질은 합성된 핵산이다. 다른 구체예에 따라, DNA 기질은 사르신-리신 루프를 포함하고, 및/또는 비-핵산 성분을 포함한다.
- [0018] 방법의 다른 양상에 따라, 통지 신호는 형광 기초된 검출 시스템, 예를 들면, 정량적 PCR 플랫폼에 의해 실시간으로 검출된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0019] 여러 도면의 간단한 설명
- 본 발명은 첨부된 도면과 함께, 하기의 상세한 설명을 읽음으로써 더욱 완전하게 이해되고 인지될 것이다:
- 도 1은 구체예에 따른 형광 검정을 이용한, 리신과 기타 리보솜 비활성화 단백질의 검출을 위한 방법의 흐름도이다;
- 도 2는 리신 독소의 완전한 구조의 대표적인 리본 다이어그램 (ribbon diagram)이다;
- 도 3은 리신 A 사슬에 의한 표적 기질로부터 아데닌의 제거의 대표적인 분자 다이어그램이고, 여기서 DNA 기질은 구체예에 따라, 형광단 (6-FAM)과 소광제 (BHQ-1)로 표지된다;
- 도 4는 구체예에 따라, AP 리아제에 의한 기질의 무염기 부위의 개열 (아데닌이 도 3에서 묘사된 바와 같이, 리신 A 사슬에 의해 제거된 이후), 그리고 형광단이 형광 신호를 방출할 수 있도록 하는 형광단과 소광제의 차후 분리를 묘사하는 대표적인 분자 다이어그램이다;
- 도 5는 구체예에 따라, 형광계에서 리신 A 사슬을 이용하여 3가지 상이한 기질 (서열 번호 1, 서열 번호 3, 그리고 서열 번호 4)의 성과를 비교하는 그래프이다;
- 도 6은 구체예에 따라, 하기 3가지 기질: 서열 번호 1, 서열 번호 3, 그리고 서열 번호 4의 이차 구조를 도시하는 대표적인 다이어그램이다;

도 7은 구체예에 따라, 형광계에서 서열 번호 1 기질을 이용하여 리신 A 사슬의 활성을 보여주는 그래프이다;  
 도 8은 구체예에 따라, 형광계에서 서열 번호 1 기질과 리신 A 사슬을 이용하여 검출 한계를 보여주는 그래프이다;  
 도 9는 구체예에 따라, RAZOR™ EX에서 서열 번호 2를 이용하여 리신 A 사슬의 활성을 보여주는 그래프이다;  
 도 10은 구체예에 따라, 형광계에서 서열 번호 1을 이용하여 리신 독소의 활성을 보여주는 그래프이다; 그리고  
 도 11은 형광계에서 서열 번호 1을 이용하여 리신 A 사슬과 리신 독소이드의 활성을 보여주는 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0020] 발명의 상세한 설명
- [0021] 한 구체예에 따라, 한쪽 단부에서 형광단으로 표지되고, 그리고 다른 단부에서 소광제로 표지된 DNA 기질을 활용하는 방법과 검정이 제시된다. 리신 또는 기타 RIP 표적은 아데닌 또는 기타 염기를 표지된 기질로부터 제거하여 무염기 부위가 산출되고, 그 이후에 무염기 부위에서 리아제에 의해 개열될 것이다. 이것은 형광단과 소광제가 공간적으로 분리하여 형광 신호를 방출할 수 있도록 할 것이다. 형광 신호는 실시간으로 모니터링되고, 독소의 효소 활성을 추적할 것이다. 이러한 검정은 또한, 리신 독소 이외에, 그리고 리신에 추가하여 RIP를 검출하는데 이용될 수 있다.
- [0022] 도면 (여기서 유사한 참조 번호는 전체에 걸쳐 유사한 부분을 지칭한다)을 참조하면, 구체예에 따라, 형광 검정을 이용한 리신과 기타 리보솜 비활성화 단백질의 검출 방법의 흐름도가 도 1에서 도시된다. 단계 10에서, 시료가 반응 혼합물에 첨가된다. 시료는 특정 위치 내에 땅, 물, 또는 공기로부터를 비롯한 누군가 또는 무언가로부터 획득될 수 있다. 분석을 위한 시료를 획득하는 것은 당분야에 널리 알려져 있다. 도 2는 A와 B 사슬로 구성되는 완전한 리신 독소의 대표적인 리본 다이어그램이다. 도 3은 무염기 부위를 산출하는, 리신 A 사슬에 의한 표적 DNA 기질 (형광단 (6FAM™)과 소광제 (BHQ™1)로 표지됨)로부터 아데닌의 제거를 나타내는 분자 다이어그램이다. 차후에, AP 리아제는 리신 A 사슬에 의해 산출된 무염기 부위를 개열하고, 형광단과 소광제의 공간적 분리를 가능하게 하여 방출된 형광 신호를 유발한다. 형광에서 증가는 FilterMax® F5 형광계, Genedrive®, RAZOR™ EX, 또는 Rotor-Gene® Q 시스템이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 적절한 온도 제어된 형광 판독기에 의해 모니터링될 수 있다.
- [0023] 한 구체예에 따라, BEI Resources (Manassas, VA)로부터 제조한 리신 A 사슬을 이용한 검정이 개발되고, 이후 BEI Resources (Manassas, VA)로부터 리신 독소를 이용하여 재-분석되었다. BEI Resources (Manassas, VA)로부터 리신 독소이드 (화학적으로 비활성화된 리신 독소)는 연구 중인 리신 활성에 대한 검정의 특이성을 입증하는데 이용되었다. 리신 A 사슬은 통상적으로 연구 목적에 이용되고 완전한 생물학적 활성을 갖는다 (도 2 참조). 기존 문헌에서 리신 A 사슬은 자연과 합성 기질 둘 모두로부터 아데닌을 제거하는데 이용될 수 있는 것으로 보고된다. 구체예에 따라, 이들 연구는 6-FAM™/BHQ™1 형광단/소광제 쌍 또는 Alexa Fluor® 488/BHQ™1 형광단/소광제 쌍으로 설계되고 합성된 형광 표지된 뉴클레오티드 기질 (서열 번호 1 내지 12) (표 1 참조)을 이용하여 수행되었다. 실험 조건에는 또한, Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO)로부터 구입된 구연산 나트륨 3염기성 이수화물 (sodium citrate tribasic dihydrate), Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO)로부터 구입된 구연산 일수화물 (citric acid monohydrate), 그리고 New England Biolabs (Ipswich, MA)로부터 구입된 엔도뉴클레아제 VIII이 포함되었다.

**표 1**

합성된 형광 뉴클레오티드 기질

[0024]

명칭	서열 (5'에서 3')
서열 번호 1	(6FAM™)-ATGCAGCAGCAGAGAGAAGCAATTCGT-(BHQ™1)
서열 번호 2	(Alexa Fluor® 488)-ATGCAGCAGCAGAGAGAAGCAATTCGT-(BHQ™1)
서열 번호 3	(6FAM™)-ACGAATTGCTTCTCTCTGCTGCTGCAT-(BHQ™1)
서열 번호 4	(6FAM™)-ATGCAGCAGCAGGGGAAGCAATTCGT-(BHQ™1)
서열 번호 5	(6FAM™)-ATGCATGCAGCAGAGAGAAGCAATTCGT-(BHQ™1)
서열 번호 6	(6FAM™)-AAAAAAAAAAGAGAAAAAAAAAAAA-(BHQ™1)
서열 번호 7	(6FAM™)-AAAAAAGAAAGAGATTACAAAAAAA-(BHQ™1)
서열 번호 8	(6FAM™)-AAAAAAAAAAGGAGACTAAAAAAA-(BHQ™1)



서열 번호 9	(6FAM <sup>TM</sup> )-ATGCCTCCAGCAGAGAAGCAATTCGT-(BHQ <sup>TM</sup> 1)
서열 번호 10	(6FAM <sup>TM</sup> )-TGCTCCTAGTACGAGAGGACCGAGTG-(BHQ <sup>TM</sup> 1)
서열 번호 11	(6FAM <sup>TM</sup> )-ATGCAGCAGCAGUGAGAAGCAATTCGT-(BHQ <sup>TM</sup> 1)
서열 번호 12	(6FAM <sup>TM</sup> )-CCTGCTAGCAGACGAGAGGAGCAATTGCTTG(BHQ <sup>TM</sup> 1)

[0025]

[0026]

표 1에서, (6FAM<sup>TM</sup>) = 6-카르복시플루오레세인 (또는 기타 형광단), (Alexa Fluor® 488) = Invitrogen (Grand Island, NY)에 의해 생산된 형광단의 패밀리 중에서 한 가지 (또는 기타 형광단), 그리고 (BHQ<sup>TM</sup>1) = 블랙 홀 소광제<sup>TM</sup> 1 (또는 기타 소광제). 다른 변형이 가능하다.

[0027]

발명의 구체예에 따라, 기질은 예로서, DNA (단리된 DNA와 게놈 DNA 포함), dsDNA, ssDNA, RNA, 올리고뉴클레오티드, 그리고 키메라 핵산 (가령, 단일 가닥과 이중 가닥 영역을 내포, 또는 RNA와 DNA 둘 모두를 포함)이 포함되지만 이들에 국한되지 않는, RIP 활성화에 의해 작동될 수 있는 무언가 뿐만 아니라 많은 다른 유형의 기질 중에서 하나 또는 그 이상의 비-핵산 성분, 분자 또는 요소와 함께 핵산, 예를 들면, RNA 및/또는 DNA 둘 모두를 포함하는 분자이다. 한 구체예에 따라, 기질은 예로서, 최소한 하나의 GAG 서열을 내포하는 DNA인데, 그 이유는 이러한 서열이 리신 A 사슬에 대한 가장 작은 기질인 것으로 밝혀졌기 때문이다. 대안으로, 기질은 최소한 GAGA 서열을 내포할 수 있고, 또는 검출되는 표적에 따라 임의의 표적 서열을 내포할 수 있다. 기질은 복수 표적의 검출을 위한 복수의 표적 서열을 유사하게 포함할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 기질은 복수의 표적 및/또는 비-표적 서열을 포함하는 매우 긴 DNA 분자일 수 있다. 연구는 6-FAM<sup>TM</sup>/BHQ<sup>TM</sup>1 형광단/소광제 쌍 또는 Alexa Fluor® 488/BHQ<sup>TM</sup>1 형광단/소광제 쌍으로 설계되고 합성된 형광 표지된 뉴클레오티드 기질 (서열 번호 1 내지 12)을 이용하여 수행되었다 (표 1). 따라서 반응 혼합물은 바람직하게는, 분자의 한쪽 단부 상에, 단부에서 또는 단부에 근접하여 위치하는 형광단으로 표지되고, 그리고 분자의 반대 또는 다른 단부 상에, 단부에서 또는 단부에 근접하여 위치하는 소광제로 표지된, 전술한 바와 같은 기질을 내포한다. 본원에서 설명된 바와 같은 Alexa Fluor® 488/BHQ<sup>TM</sup>1 형광단/소광제 쌍은 바람직하게는, 현장 기구, 예를 들면, RAZOR<sup>TM</sup> EX를 지지하고, 그리고 둘 모두 FilterMax® F5를 지지하였다. 하지만, 많은 다른 형광단/소광제 쌍이 가능하고 및/또는 심지어, 이용된 플랫폼 및/또는 실험 조건에 따라 더욱 바람직할 것이다.

[0028]

상기 방법의 단계 12에서, 표적 (가령, 리신 또는 다른 RIP)이 시료 내에 존재하면, 표적은 아데닌을 기질 (가령, GAG 서열)로부터 제거하여, 무염기 부위 (일명, AP (퓨린 결여/피리미딘 결여) 부위)를 산출함으로써 기질에 작용하고, 여기서 퓨린 또는 피리미딘 염기가 부재하지만, 전체 DNA 분자를 관통하여 개열하지는 않을 것이다. 예로서, 도 3을 참조한다.

[0029]

한 구체예에 따라, 기질 설계는 리신에 대한 자연 표적, 다시 말하면, 28S 진핵 리보솜 RNA의 사르신-리신 루프를 조사함으로써 시작된다. GAG 서열이 포함되지만 이에 국한되지 않는, 사르신-리신 루프로부터 요소는 초기에, 합성 DNA 기질의 설계에 통합되었다 (표 1). 기질의 다른 이형 역시 설계되고 합성되었다 (표 1). 일부 합성된 기질의 성과는 외견상으로, 서열에 추가하여 또는 서열과 독립적으로 구조에 의존하였다. 도 5는 서열 번호 1, 서열 번호 3 및 서열 번호 4의 성과를 비교하는 도해적 표현이다. 서열 번호 1은 서열 번호 3과 유사한 성과를 갖는다. 서열 번호 3은 비록 GAGA 또는 GAG 서열을 갖지 않지만, 서열 번호 1과 유사한 형상을 갖는다 (도 6에 도시됨). 서열 번호 4는 서열 번호 1만큼 만족스러운 성과가 없었다. 서열 번호 4는 GAGA 서열이 GGGG로 대체된 점을 제외하고, 서열 번호 1과 동일한 서열이다. 서열 번호 1과 서열 번호 4 둘 모두 동일한 형상을 갖는다. 이런 이유로, 형상과 서열 둘 모두 설계된 기질의 리신에 의한 촉매 작용에서 일정한 역할을 하는 것으로 보인다. 이들 구조는 28S 진핵 리보솜 RNA의 사르신-리신 루프에서 발견되는 GAGA 테트라루프 (tetraloop)를 모방할 수도 있다.

[0030]

상기 방법의 단계 14에서, 표적에 의해 변형된 기질은 이후, 개열된다. 한 구체예에 따라, 반응 혼합물 내에 존재하는 (차후 단계에서 첨가된) 퓨린 결여/피리미딘 결여 (AP) 리아제 - 리아제, 예를 들면, 엔도뉴클레아제 VIII가 포함되지만 이에 국한되지 않음 -는 시료 내에 리신 또는 다른 리보솜 비활성화 단백질에 의해 산출된 DNA 내에 무염기 부위를 개열한다. 예로서, 도 4를 참조한다. AP 리아제는 DNA 수복에서 기능하고 무염기 부위를 특이적으로 표적으로 하는 효소이다. AP 리아제는 통상적으로, 이중 가닥 DNA 내에 무염기 부위를 표적으로 하지만, 일부는 ssDNA 내에 무염기 부위를 표적으로 하는 능력을 갖는다. RIP에 의해 변형된 이후, DNA 기질을 개열하는 다른 방법이 가능한데, 여기에는 그 중에서도 특히, 수산화나트륨 (sodium hydroxide), 푸트레신 중염산염 (putrescine dihydrochloride), 그리고 아닐린을 이용하는 것이 포함되지만 이에 국한되지 않는다.



- [0031] 상기 방법의 단계 16에서, 무염기 부위를 갖는 기질의 AP 리아제 또는 기타 분리 방법에 의한 개열은 기질 분자의 한쪽 단부 상에, 단부에서 또는 단부에 근접하여 위치하는 형광단 및 기질 분자의 반대 또는 다른 단부 상에, 단부에서 또는 단부에 근접하여 위치하는 소광제가 서로 분리할 수 있도록 한다. 예로서, 도 4를 참조한다.
- [0032] 단계 18에서, 형광단과 소광제가 서로 분리함에 따라서, 소광제의 소광 효과가 줄어들고, 그리고 형광단은 형광 신호를 방출할 수 있다. 형광 신호는 이후, 검출될 수 있는데, 이것은 시료 내에 RIP의 존재를 지시한다.
- [0033] 최초 검정 개발은 FilterMax® F5 형광계에서 수행되었는데, 그 이유는 이것이 온도 제어되고 (25°C - 45°C) 시간의 흐름에서 형광에서 변화를 정확하게 검출할 수 있기 때문이고, 복수의 판독이 규칙적인 간격에서 이루어졌다. 현재, 검정물은 하기 조건 하에 리신 A 사슬 활성을 검출하기 위해 최적화되고: 40 mM 구연산-구연산나트륨 완충액 pH 4.0, 500 nM 기질 (표 1), 10 단위의 엔도뉴클레아제 VIII, 그리고 37°C에서 항온 처리되었다. 전형적으로, 연구는 FilterMax® F5 형광계에서 50 µl 반응 부피를 이용하여 수행되고 37°C에서 2시간 동안 진행되고, 판독이 1분 간격에서 이루어졌다. 도 7은 FilterMax® F5 형광계에서 검출된, 서열 번호 1과 100 ng의 리신 A 사슬을 이용한 리신 A 사슬 활성의 도해적 표현이다.
- [0034] FilterMax® F5 형광계에서 리신 검정의 검출 한계를 결정하기 위해, 500 nM 서열 번호 1은 하기 양의 리신 A 사슬: 12.5 ng, 25 ng, 50 ng, 그리고 100 ng를 포함하는 50 µl 반응물에서 항온 처리되었다. 반응 조건은 또한, 40 mM 구연산-구연산나트륨 완충액 pH 4.0 및 10 단위의 엔도뉴클레아제 VIII를 포함하고, 그리고 37°C에서 2시간 동안 항온 처리되고, 형광 판독이 1분 간격에서 이루어졌다.
- [0035] 도 8은 FilterMax® F5 형광계에서 수행된 리신 A 사슬에 대한 검출 한계 연구의 도해적 표현이다. 서열 번호 1을 이용한 리신 검정에 대한 현재의 검출 한계는 12.5 ng의 리신 A 사슬이다.
- [0036] 한 구체예에 따라, 형광을 측정할 수 있는 기구를 이용하여 리신 및/또는 기타 RIP의 검출을 위한 현장 검정 (fieldable assay)이 제시된다. 형광-기초된 효소 활성 검정은 실시간 정량적 중합효소 연쇄 반응 (qPCR) 플랫폼을 비롯한 다양한 기구를 이용하여 분석될 수 있다. 실시간 qPCR은 게놈 데옥시리보핵산 (gDNA)의 특정한 영역을 증폭함으로써 생물학적 샘플체를 검출하기 위한 매우 민감하고 신속한 방법이고, 그리고 샘플체에 의해 생산된 독소를 코딩하는 유전자를 검출하는데 이용될 수 있다. 실시간 qPCR 기구는 단백질 독소의 활성을 검출하는 것에 더하여, 전체 생물체 생물학적 위협을 검출하는 이점을 제공한다. 본원에서 설명된 RIP-검출 방법은 예로서, 검출과 분석을 위해 Idaho Technology, Inc. (Salt Lake City, Utah)에 의해 생산된 RAZOR™ EX를 이용할 수 있다. RAZOR™ EX는 형광을 검출하는 능력을 갖고 생체방어 (biodefense)에 통상적으로 이용되는 qPCR-기초된 플랫폼이다. 이러한 기구는 이상적인데, 그 이유는 이것이 현장 이용을 위해 설계된 견고한 플랫폼 (ruggedized platform)이고, 그리고 1시간 이내에 결과를 산출할 수 있기 때문이다. RAZOR™ EX에서 검정을 수행하기 위해, 37°C까지 가열하는 산출된 등온 사이클링 (isothermal cycling) 프로토콜이 적용되었다 (상기 사이클링 프로토콜에 관한 더욱 상세한 정보를 위해, 2012년 12월 3일자 제출된 U.S. Provisional Application No. 61/732,436을 참조하고, 이의 전체 내용은 본원에 참조로서 편입된다). 리신 검출 검정을 위한 전형적인 반응은 12x1 파우치 (40 mM 구연산-구연산나트륨 완충액 pH 4.0, 500 nM 서열 번호 2, 그리고 10 단위의 엔도뉴클레아제 VIII를 내포하는 웰당 200 µl 부피)에서 수행되었다. 반응물은 37°C에서 45분 동안 항온 처리되고, 형광 판독이 1분 간격에서 이루어졌다. 도 9는 RAZOR™ EX 기구에서 검출된, 서열 번호 2를 이용한 리신 A 사슬 활성의 도해적 표현이다. 완충액 시스템 (40 mM 구연산-구연산나트륨 완충액 pH 4.0)의 낮은 pH는 6FAM™ 형광단에 의해 방출되는 형광 강도에서 감소를 유발하고, 이것은 결과적으로, RAZOR™ EX 기구의 더욱 낮은 민감성으로 인해 검출될 수 없다. 이런 이유로, 서열 번호 2는 서열 번호 1로부터 서열 및 pH에서 변화에 의해 영향을 받지 않는 형광단 Alexa Fluor® 488을 이용하여 합성되었다. 이런 이유로, 서열 번호 2는 리신 A 사슬의 활성이 RAZOR™ EX에서 검출될 수 있도록 한다. 더욱 민감한 기구, 예를 들면, FilterMax® F5 형광계는 6FAM™ 형광단을 이용하여 기질에서 리신 A 사슬 활성을 검출할 수 있다.
- [0037] 이런 이유로, 한 구체예에 따라, 리신 또는 다른 RIP는 아데닌을 표지된 DNA 기질 (ssDNA 기질이 포함되지만 이에 국한되지 않음)로부터 제거하여, 무염기 부위를 산출할 것이다. AP 리아제는 이후, 무염기 부위에서 DNA 기질을 개열하여, DNA 기질의 한쪽 단부에서 형광단 및 DNA 기질의 다른 단부에서 소광제가 공간적으로 분리할 수 있도록 할 것이다. 일단 형광단과 소광제가 충분히 분리하면, 형광단은 형광 신호를 방출할 것이다. 리신 활성을 지시하는 증가하는 형광은 검출 시스템, 예를 들면, qPCR 시스템을 이용하여 실시간으로 모니터링될 것이다.
- [0038] 발명의 구체예는 리신 할로독소를 이용하여 FilterMax® F5 형광계에서 서열 번호 1을 이용하여 검증되었다. 리신 A 사슬 검출에 이용된 동일한 실험 조건이 리신 할로독소 연구에 이용되었다: 40 mM 구연산-구연산나트륨 완

충액 pH 4.0, 500 nM 서열 번호 1, 그리고 10 단위의 엔도뉴클레아제 VIII를 내포하는 웰당 50  $\mu$ l 부피. 검정물은 37°C에서 2시간 동안 항온 처리되고, 형광 판독이 1분 간격에서 이루어졌다. 3가지 상이한 양: 250 ng, 500 ng, 그리고 1000 ng의 리신 할로독소가 조사되었다. 도 10은 리신 할로독소 활성의 도해적 묘사이다.

[0039] 따라서 한 가지 목적은 리신/RIP의 생물학적 활성 형태만을 검출할 수 있는 검정을 설계하는 것이다. 이런 이유로, 화학적으로 비활성화된 것으로 알려져 있는 리신의 이형 (리신 독소이드)이 서열 번호 1을 이용한 연구 동안 FilterMax® F5 형광계에서 산정되었다. 도 11은 리신 A 사슬 활성과 비교하여 리신 독소이드 활성의 도해적 표현이다. 1000 ng, 250 ng, 그리고 100 ng의 리신 독소이드와 리신 A 사슬은 각각, 하기 조건에서 조사되었다: 40 mM 구연산-구연산나트륨 완충액 pH 4.0, 500 nM 서열 번호 1, 그리고 10 단위의 엔도뉴클레아제 VIII를 내포하는 웰당 50  $\mu$ l 부피. 검정물은 37°C에서 2시간 동안 항온 처리되고, 형광 판독이 1분 간격에서 이루어졌다. 이러한 실험으로부터 결과는 증가하는 리신 A 사슬 양은 증가하는 형광 시도를 제공하는 반면, 조사된 임의의 양에서 리신 독소이드는 형광 신호에서 증가를 제공하지 못한다는 것을 증명한다. 이런 이유로, 리신 독소의 비활성 형태는 검출되지 않았는데, 그 이유는 이것이 효소적으로 활성이 없었기 때문이다.

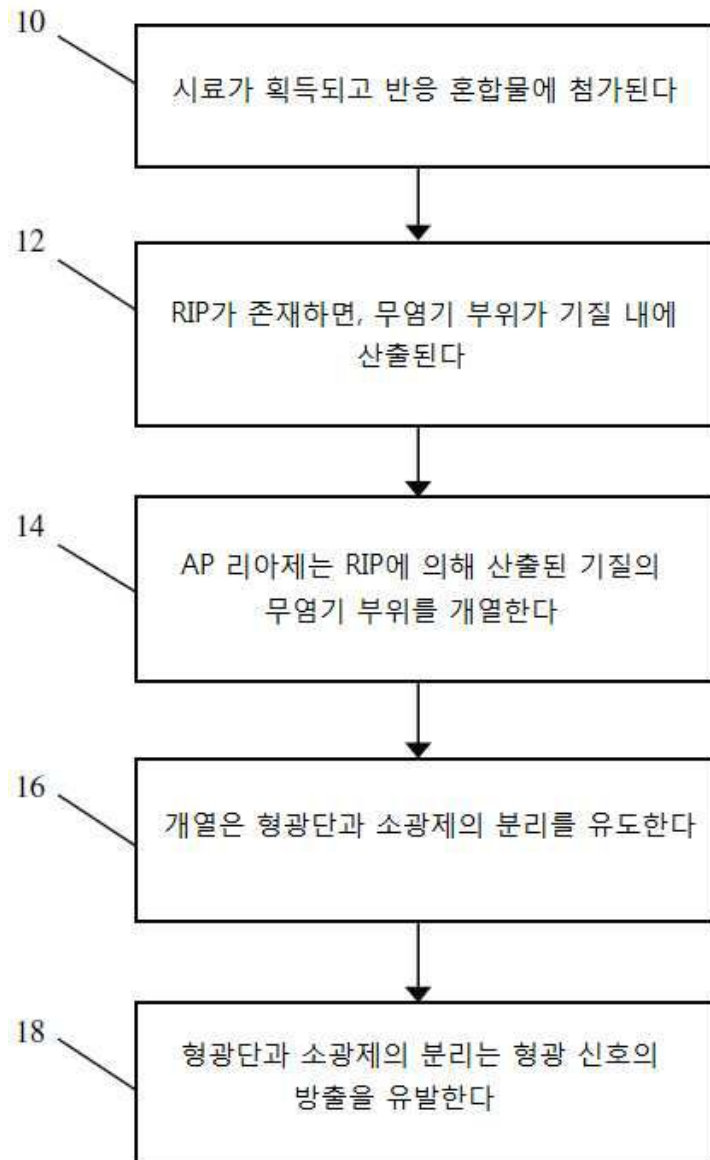
[0040] 한 구체예에 따라, 시료 내에 RIP의 검출을 위한 키트가 제시된다. 키트는 성분의 최소 보체, 예를 들면, 기질을 포함할 수 있다. 대안으로, 키트는 AP 리아제 및/또는 qPCR 검출 시스템을 포함할 수 있지만 이들에 국한되지 않는다.

[0041] 다양한 구체예가 본원에서 설명되고 예시되긴 했지만, 당업자는 기능을 수행하고 및/또는 본원에서 설명된 결과 및/또는 하나 또는 그 이상의 이점을 획득하기 위한 다양한 다른 수단 및/또는 구조를 용이하게 인지할 것이고, 그리고 이런 이형 및/또는 변형 각각은 본원에서 설명된 구체예의 범위 내에 있는 것으로 간주된다. 더욱 일반적으로, 당업자는 본원에서 설명된 모든 파라미터, 치수, 재료, 그리고 배열이 예시로서 의도되고, 그리고 실제 파라미터, 치수, 재료 및/또는 배열이 이들 교시가 이용되는 특정 적용 또는 적용들에 좌우된다는 것을 용이하게 인지할 것이다. 당업자는 단지 일과적인 실험을 이용하여, 본원에서 설명된 특정 구체예의 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이런 이유로, 전술한 구체예는 단지 실례로서 제공되고, 그리고 첨부된 청구항과 이들의 등가물의 범위 내에서, 구체예는 특정하게 설명되고 청구된 바와 달리 실시될 수도 있는 것으로 이해되어야 한다. 발명의 구체예는 본원에서 설명된 각 개별 특질, 시스템, 물품, 재료, 키트 및/또는 방법에 관계한다. 이에 더하여, 2가지 또는 그 이상의 이런 특질, 시스템, 물품, 재료, 키트 및/또는 방법의 임의의 조합은 이런 특질, 시스템, 물품, 재료, 키트 및/또는 방법이 상호 모순되지 않으면, 본 발명의 범위 내에 포함된다.

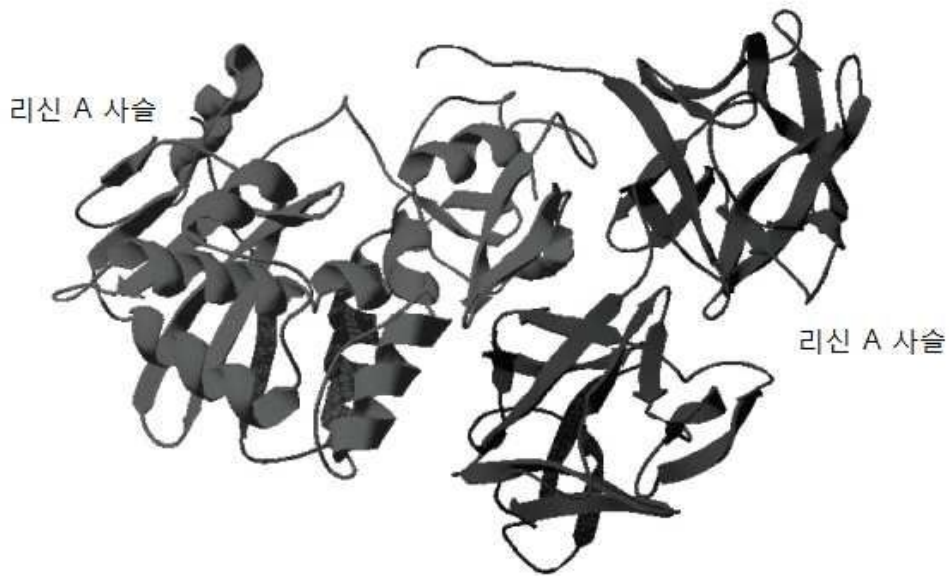
[0042]

도면

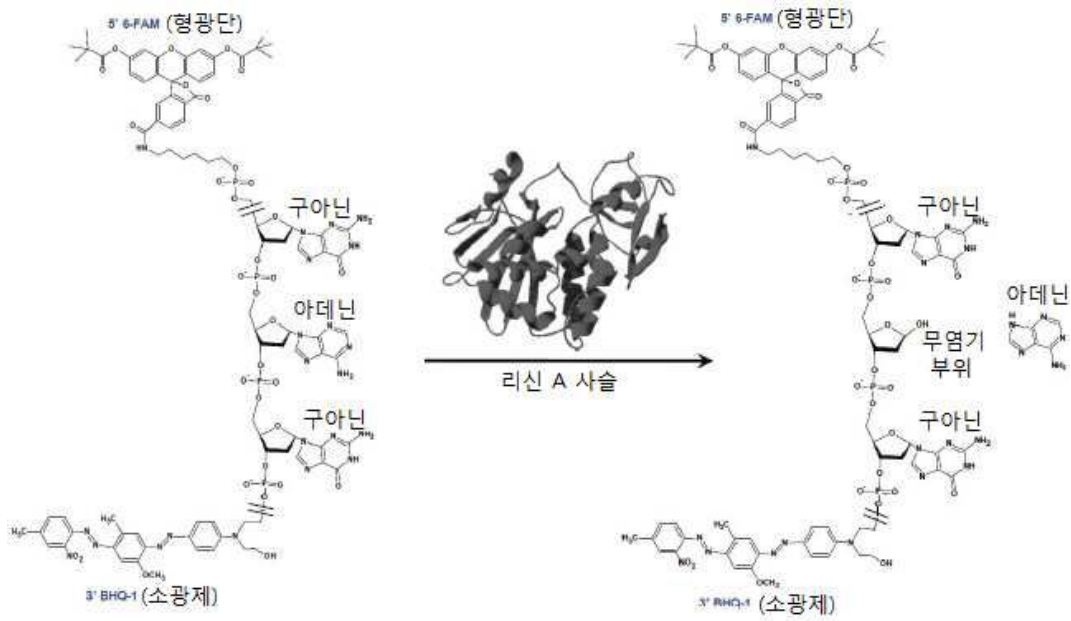
도면1



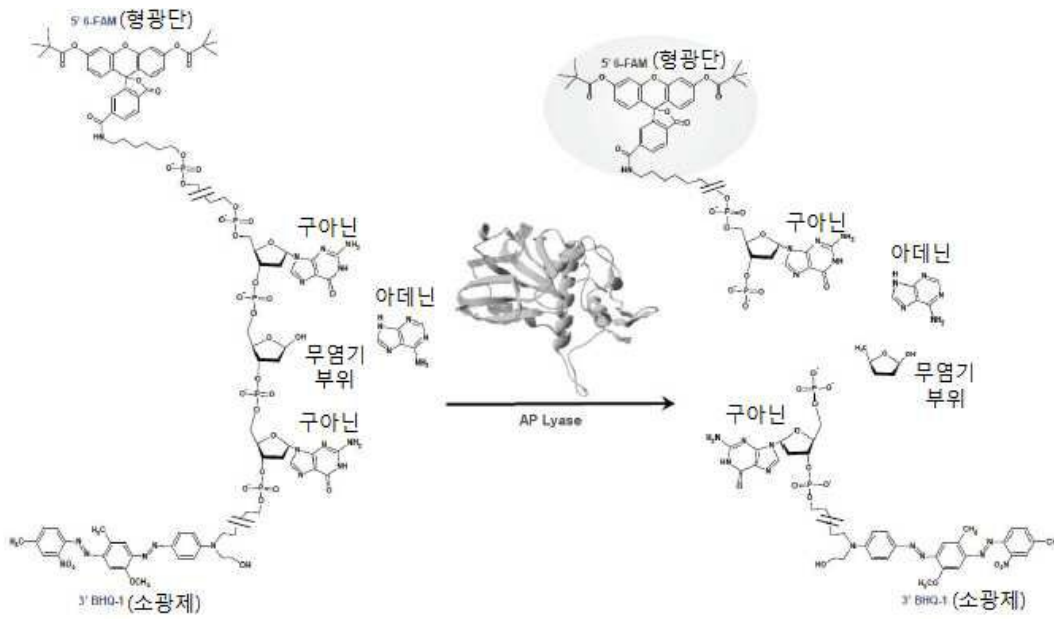
도면2



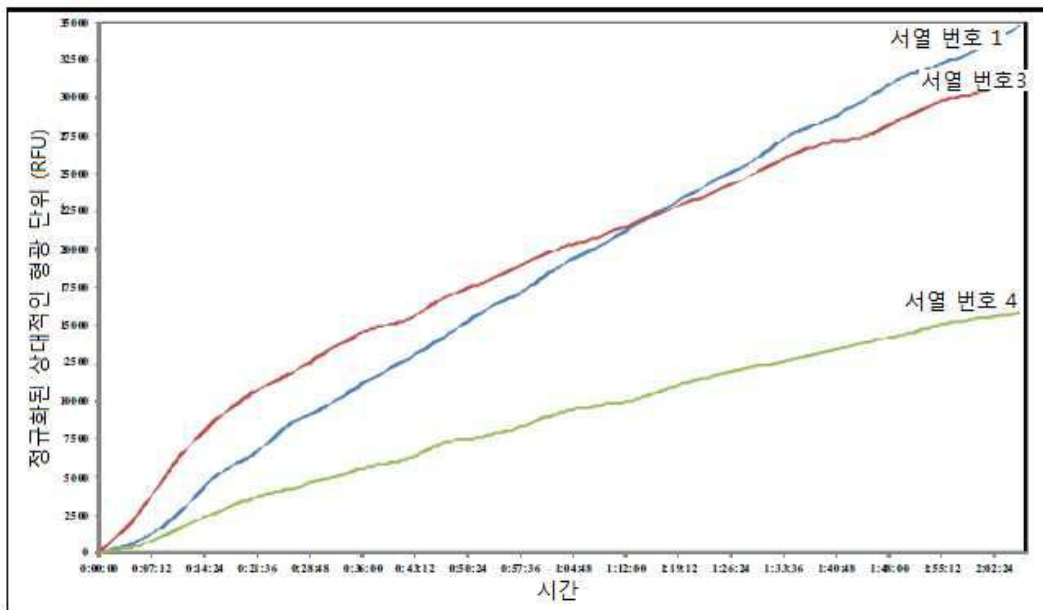
도면3



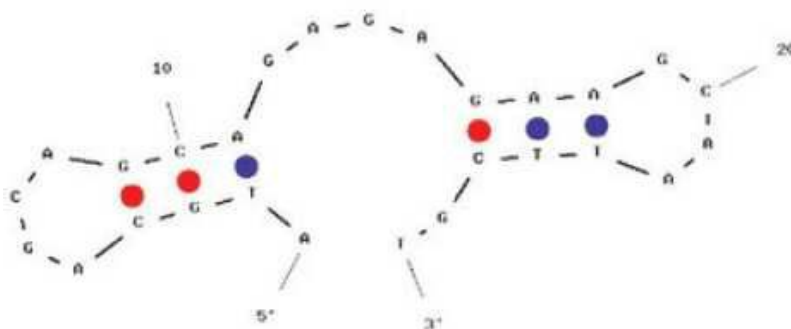
도면4



도면5



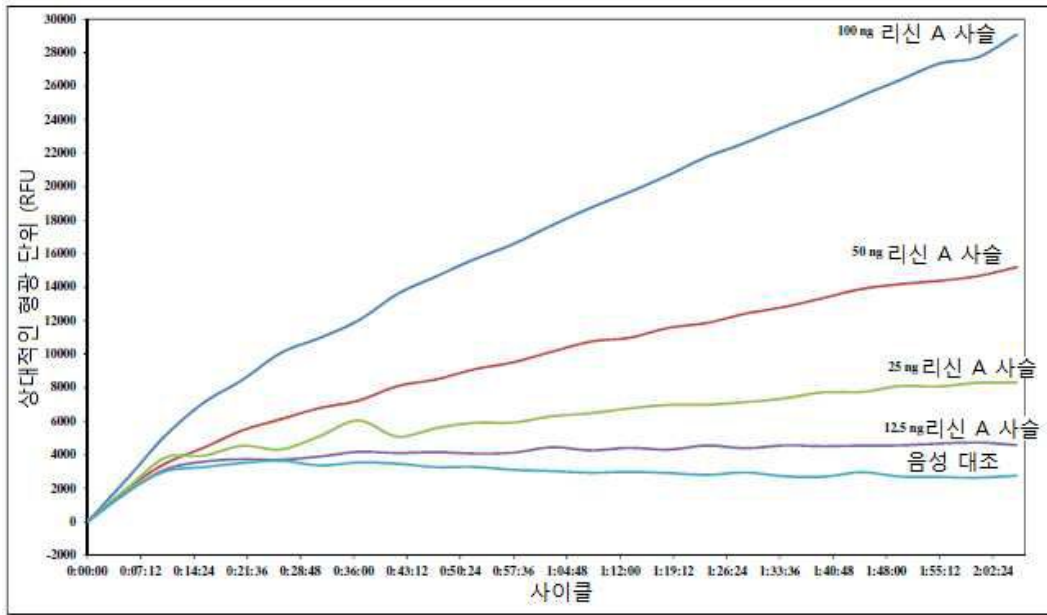
도면6a



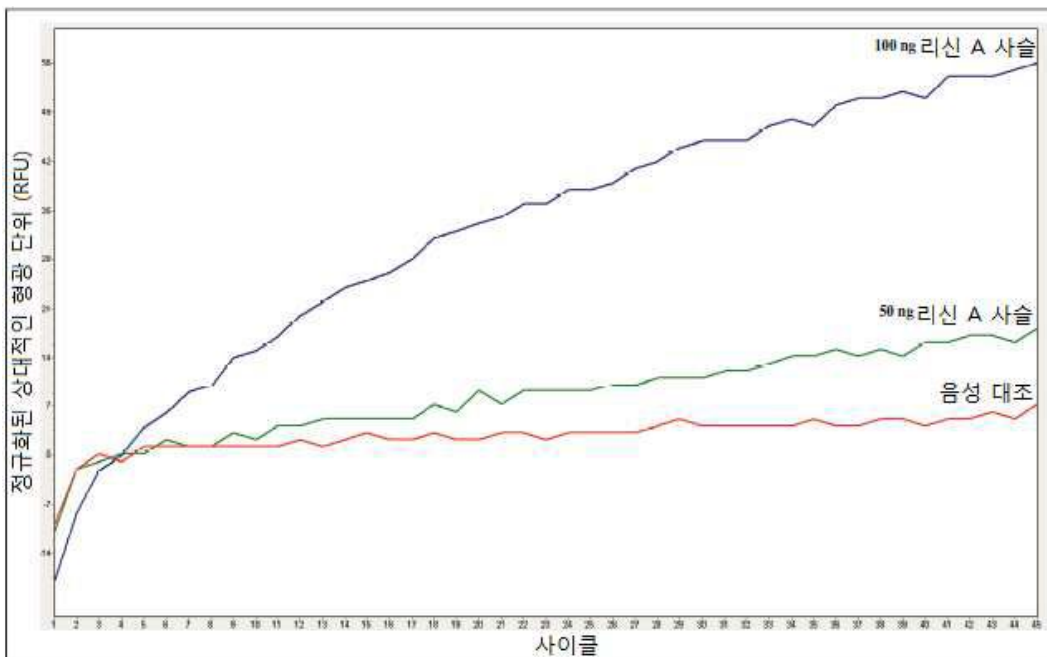




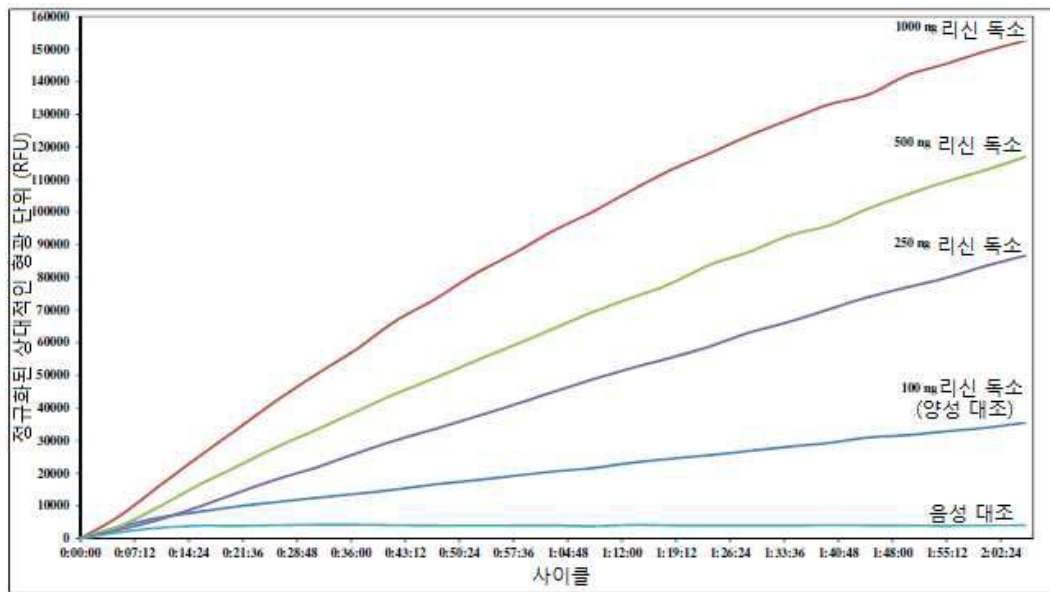
도면8



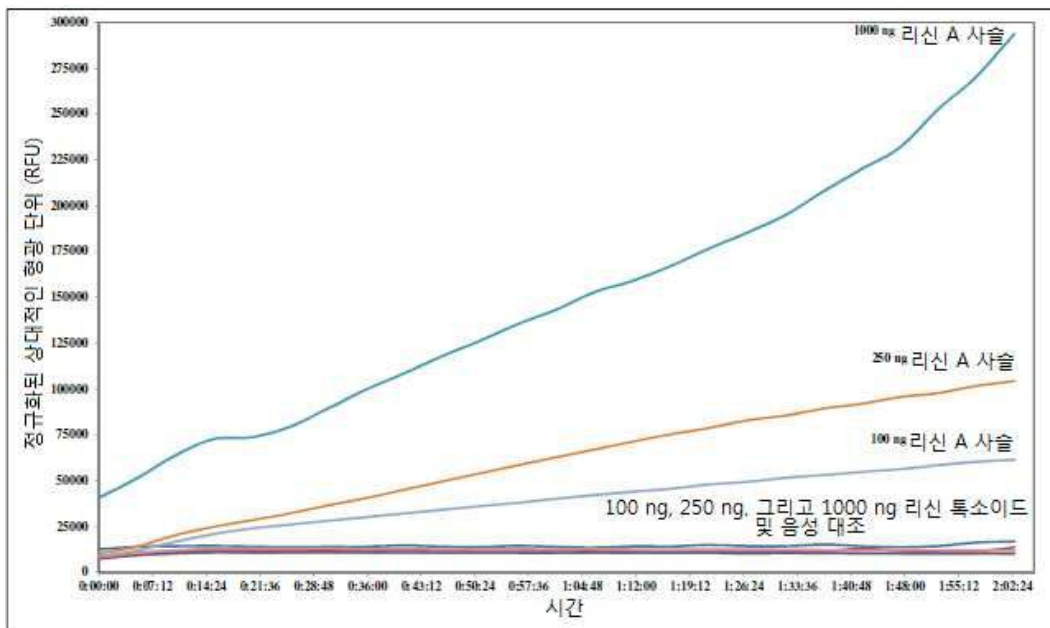
도면9



도면10



도면11



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SRC, Inc.

<120> Methods and Systems for the Detection of Ricin and Other Ribosome  
Inactivating Proteins

<130> 700P101A

<140> 13/898,917

<141> 2013-05-21  
 <150> 61/649,418  
 <151> 2012-05-21  
 <160> 12  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> oligonucleotide  
 <400> 1  
 atgcagcagc agagagaagc aattcgt 27  
 <210> 2  
 <  
 211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> oligonucleotide  
 <400> 2  
 atgcagcagc agagagaagc aattcgt 27  
 <210> 3  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> oligonucleotide  
 <400> 3  
 acgaattgct tctctctgct gctgcat 27  
 <210> 4  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> oligonucleotide  
 <400> 4  
 atgcagcagc agggggaagc aattcgt 27

<210> 5  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> oligonucleotide  
 <400> 5  
 atgcatgcag cagagagaag caattcgt 28  
 <210> 6  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> oligonucleotide  
 <400> 6  
 aaaaaaaaaa agagaaaaaa aaaaaa 26  
 <210> 7  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> oligonucleotide  
 <400> 7  
 aaaaaaagaa agagattaca aaaaaa 26  
 <210> 8  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> oligonucleotide  
 <400> 8  
 aaaaaaaaaa ggagactaaa aaaaaa 26  
 <210> 9  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> oligonucleotide  
 <400> 9

atgcctccag cagagaagca attcgt 26

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> oligonucleotide

<400> 10

tgctcctagt acgagaggac cggagtg 27

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> oligonucleotide

<400> 11

atgcagcagc agugagaagc aattcgt 27

<210> 12

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> oligonucleotide

<400> 12

cctgctagca gacgagagga gcaattgctt g 31