

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0023568 (43) 공개일자 2013년03월08일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/68 (2006.01) C12Q 1/56 (2006.01) C12N 15/115 (2010.01) (21) 출원번호 10-2011-0086425 (22) 출원일자 2011년08월29일 심사청구일자 2011년08월29일		(71) 출원인 인천대학교 산학협력단 인천광역시 연수구 아카데미로 119, 11호 12 (송도동) (72) 발명자 김규원 인천광역시 서구 원당동 LG자이아파트 702-902 김현진 인천광역시 계양구 작전동 동부아파트 102동 912호 (74) 대리인 특허법인 충정

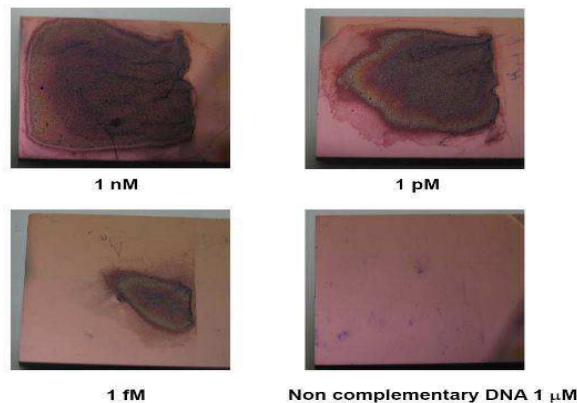
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 트롬빈 표지를 포함하는 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트

(57) 요약

본 발명은 고체기재, 상기 고체기재 상에 결합되고 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브 분자를 포함하는 DNA 센서; 상기 프로브 분자와 결합된 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 리포터 분자; 상기 리포터 분자에 특이적으로 결합하고 효소활성을 갖는 트롬빈; 및 피브리노젠을 포함하는 용액;을 포함하는, 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트를 제공한다. 또한, 본 발명은 표적 DNA의 검출방법을 제공한다. 본 발명에 따른 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트는 표지물질로서 효소활성을 갖는 트롬빈을 사용하고 트롬빈이 기질인 피브리노젠을 피브린으로 변화시켜 피브린의 정량을 통해 표지물질의 효과를 효과적이고 신속하게 정량할 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110017219

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업-중견연구자지원사업-핵심연구지원사업(개인연구)

연구과제명 트롬빈의 효소반응을 활용한 초고감도 타겟 검출법 개발

주관기관 한국연구재단

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

고체기재, 상기 고체기재 상에 결합되고 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브 분자를 포함하는 DNA 센서;
상기 프로브 분자와 결합된 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 리포터 분자;
상기 리포터 분자에 특이적으로 결합하고 효소활성을 갖는 트롬빈; 및
피브리노겐을 포함하는 용액;을 포함하는, 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 피브리노겐을 포함하는 용액은 피브린 생성에 대한 신호 증가를 위한 표지물질을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는, 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 신호 증가를 위한 표지물질은 컬러 입자(color bead), 형광을 띠는 입자, 양자점, 금(gold) 입자, 전기화학적으로 활성을 가지는 입자, 탄소 나노튜브, 그래핀, 풀러렌, 형광을 띠는 단백질, GOX(Glucose oxidase), ALP(Alkaline Phosphatase) 및 HRP(Horse-Radish Peroxidase)로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 프로브 분자는 아비딘 또는 스트렙타아비딘을 매개로 하여 고체기재 상에 결합되는 것을 특징으로 하는, 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 트롬빈은 공유결합에 의해 리포터 분자와 직접 결합되는 것을 특징으로 하는, 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 리포터 분자는 티올화된 리포터 분자이고, 양 단부에 각각 NHS와 말레이미드 그룹이 형성된 2 관능성 링커를 이용하여 공유결합되는 것을 특징으로 하는, 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트.

청구항 7

제1항에 있어서,
상기 트롬빈은 아비딘 또는 스트렙타아비딘을 매개로 하여 리포터 분자와 결합되는 것을 특징으로 하는, 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트.

청구항 8

제1항에 있어서,
상기 트롬빈은 트롬빈 압타머를 매개로 하여 생물특이적 결합을 통해 리포터 분자와 결합되는 것을 특징으로 하

는, 표적 DNA 검출용 키트.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 트롬빈 압타머는 리포터 분자에 포함되어 있고, 이들 사이에 1 또는 다수개의 티민염기가 포함되어 있는 것을 특징으로 하는, 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트.

청구항 10

표적 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브 분자가 표면에 결합된 DNA 센서를 제작하는 단계;

상기 DNA 센서 표면에 시료를 반응시키는 단계;

상기 시료와 반응한 DNA 센서 표면에 프로브 분자와 결합된 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 리포터 분자를 반응시키는 단계;

상기 리포터 분자와 반응한 DNA 센서 표면에 리포터 분자에 특이적으로 결합하는 트롬빈을 반응시켜 리포터 분자-트롬빈 복합체를 형성하는 단계; 상기 트롬빈과 반응한 DNA 센서 표면에 피브리노겐(fibrinogen)을 포함하는 용액을 반응시키는 단계; 및

피브린을 측정하는 단계;를 포함하는 표적 DNA의 검출방법.

청구항 11

표적 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브 분자가 표면에 결합된 DNA 센서를 제작하는 단계;

상기 DNA 센서 표면에 시료를 반응시키는 단계;

프로브 분자와 결합된 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 리포터 분자와 상기 리포터 분자에 특이적으로 결합하는 트롬빈을 반응시켜 리포터 분자-트롬빈 복합체를 형성하는 단계;

상기 시료와 반응한 DNA 센서 표면에 리포터 분자-트롬빈 복합체를 반응시키는 단계;

상기 리포터 분자-트롬빈의 복합체와 반응한 DNA 센서 표면에 피브리노겐(fibrinogen)을 포함하는 용액을 반응시키는 단계; 및

피브린을 측정하는 단계;를 포함하는 표적 DNA의 검출방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서,

비특이적 결합된 리포터 분자-트롬빈 복합체를 제거하는 단계;를 더욱 수행하는, 표적 DNA의 검출방법.

청구항 13

제10항 또는 제11항에 있어서,

표적 DNA가 부존재시에는 리포터 분자-트롬빈 복합체가 없거나 검출감도 이하인 것을 특징으로 하는, 표적 DNA의 검출방법.

청구항 14

제10항 또는 제11항에 있어서,

상기 프로브 분자는 아비딘 또는 스트렙타아비딘을 매개로 하여 기재 상에 결합되는 것을 특징으로 하는, 표적 DNA의 검출방법.

청구항 15

제10항 또는 제11항에 있어서,

상기 리포터 분자는 트롬빈과 공유결합되는 관능기를 포함하고 있거나, 비오틴화되어 아비딘 또는 스트렙타아비

딘과 결합되거나, 트롬빈 압타머를 포함하는 것을 특징으로 하는, 표적 DNA의 검출방법.

청구항 16

제10항 또는 제11항에 있어서,

상기 피브리노젠을 포함하는 용액은 피브린 생성에 대한 신호 증가를 위한 표지물질을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는, 표적 DNA의 검출방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 트롬빈 표지를 포함하는 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트에 관한 것이며, 또한 본 발명은 상기 키트를 이용하여 표적 DNA를 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 일반적으로 바이오센서란 유전자, 항원, 환경호르몬 등 특정 생체물질의 존재 여부를 확인하기 위하여, 특정 물질과 선택적으로 반응 및 결합할 수 있는 생체감지 물질과 신호 변환기로 구성되어 있는 장치를 통틀어 일컫는 말이다. 바이오센서 기술은 현재 의료용 진단분야의 응용이외에도, 식품의 안정성 조사 및 환경 감시분야 등에서도 유용하게 쓰일 수 있어 연구 개발의 필요성이 크게 증가하고 있다. 따라서 기존의 기술이 가지는 한계를 극복하고, 신속성, 고감도성, 고선택성 등의 센서 특성을 향상시키는 연구가 수반되어야 한다. 이러한 고기능의 센서기술 중에서도 가장 주목을 받는 분야는 감도 향상 부분이다.

[0003] 이를 위해서는 검출 신호를 효소를 이용하여 증폭하는 방법이 널리 이용되어 왔다. 최근 들어 나노기술을 접목하여 형광이나 효소 대신에 표지로 나노입자를 이용하는 연구가 활발히 진행되고 있으며(대한민국공개특허 제2011-0007844호, 대한민국공개특허 제2011-0000549호 등 참조), 미국의 Northwestern 대학의 Mirkin 그룹에서 개발된 금 나노입자와 silver staining 기법을 이용한 검출 신호를 증폭시키는 나노바이오센서가 대표적인 예가 될 수 있다. 그 외에도 백금이나 금 나노입자 등의 전기촉매현상 등을 이용한 증폭반응들도 개발되어 왔다(대한민국공개특허 제2011-0065231호 및 대한민국공개특허 제2011-0007844호 참조). 그러나 이런 기술이 뛰어난 감도를 가지고 있다고 하더라도 나노입자 고유의 불안정성 및 비특이적인 흡착문제로 인해 제약을 받고 있다.

[0004] 이에 이러한 표지화의 번거로움을 극복하기 위하여 surface plasmon resonance (SPR), quartz crystal microbalance (QCM), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), 질량분석기 등을 이용하는 비표지 바이오센서 기술들이 앞다투어 개발되고 있다. 하지만 이 또한 값비싼 장치를 사용해야 하는 부담을 극복해야한다. 가장 최근 들어서는 한국화학연구원, 한국전자통신연구원, 포항공과대학 및 국외 대학 등에서 실리온 나노선이나 탄소 나노튜브를 이용한 고감도 무표지 바이오센서들이 소개되고 있으나 센서제작 및 결과의 도출에 있어 재현성이 중요한 문제점으로 대두되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 트롬빈을 이용하여 간단한 검출과정을 통해 값비싼 검출기 없이도 저비용으로 타겟을 고감도로 검출할 수 있는 표적 DNA 검출 키트를 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 트롬빈을 이용한 표적 DNA 검출 키트를 이용하여 표적 DNA를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 고체기재, 상기 기재 상에 결합되고 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브 분자를 포함하는 DNA 센서; 상기 프로브 분자와 결합된 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 리포터 분자; 상기 리포터 분자에 특이적으로 결합하고 효소활성을 갖는 트롬빈; 및 피브리노젠을 포함하는 용액;을 포함하는, 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트 제공한다.

- [0008] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 피브리노겐을 포함하는 용액은 피브린 생성에 대한 신호 증가를 위한 표지 물질을 더욱 포함할 수 있다.
- [0009] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 신호 증가를 위한 표지물질은 컬러 입자(color bead), 형광을 띠는 입자, 양자점, 금(gold) 입자, 전기화학적으로 활성을 가지는 입자(은, 구리, 납, 카드뮴, 철, 아연), 탄소 나노튜브, 그래핀, 풀러렌, 형광을 띠는 단백질, GOX (Glucose oxidase), ALP(Alkaline Phosphatase) 및 HRP(Horse-Radish Peroxidase)로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다.
- [0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프로브 분자는 아비딘 또는 스트렙타아비딘을 매개로 하여 기재 상에 결합 될 수 있다.
- [0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 트롬빈은 공유결합에 의해 리포터 분자와 직접 결합될 수 있다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 리포터 분자는 티올화된 리포터 분자이고, 양 단부에 각각 NHS와 말레이미 드 그룹이 형성된 2 관능성 링커를 이용하여 공유결합될 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 트롬빈은 아비딘 또는 스트렙타아비딘을 매개로 하여 리포터 분자와 결합될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 트롬빈은 트롬빈 압타머를 매개로 하여 생물특이적 결합을 통해 리포터 분자와 결합될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 트롬빈 압타머는 리포터 분자에 포함되어 있고, 이들 사이에 1 또는 다수개의 티민염기가 포함될 수 있다.
- [0016] 또한, 본 발명은,
- [0017] 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브 분자가 표면에 결합된 DNA 센서를 제작하는 단계;
- [0018] 상기 DNA 센서 표면에 시료를 반응시키는 단계;
- [0019] 상기 시료와 반응한 DNA 센서 표면에 프로브 분자와 결합된 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 리포터 분자를 반응시키는 단계;
- [0020] 상기 리포터 분자와 반응한 DNA 센서 표면에 리포터 분자에 특이적으로 결합하는 트롬빈을 반응시켜 리포터 분자-트롬빈 복합체를 형성하는 단계;
- [0021] 상기 트롬빈과 반응한 DNA 센서 표면에 피브리노겐(fibrinogen)을 포함하는 용액을 반응시키는 단계; 및
- [0022] 피브린을 측정하는 단계;를 포함하는 표적 DNA의 검출방법을 제공한다.
- [0023] 또한, 본 발명은,
- [0024] 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브 분자가 표면에 결합된 DNA 센서를 제작하는 단계;
- [0025] 상기 DNA 센서 표면에 시료를 반응시키는 단계;
- [0026] 프로브 분자와 결합된 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 리포터 분자와 상기 리포터 분자에 특이적으로 결합하는 트롬빈을 반응시켜 리포터 분자-트롬빈 복합체를 형성하는 단계;
- [0027] 상기 시료와 반응한 DNA 센서 표면에 리포터 분자-트롬빈 복합체를 반응시키는 단계;
- [0028] 상기 리포터 분자-트롬빈의 복합체와 반응한 DNA 센서 표면에 피브리노겐(fibrinogen)을 포함하는 용액을 반응시키는 단계; 및
- [0029] 피브린을 측정하는 단계;를 포함하는 표적 DNA의 검출방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 트롬빈을 반응시키는 단계 이후 비특이적 결합된 리포터 분자-트롬빈 복합체를 제거하는 단계;를 더욱 수행할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일실시예에 있어서, 표적 DNA가 부존재시에는 리포터 분자-트롬빈 복합체가 없거나 검출감도 이하일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프로브 분자는 아비딘 또는 스트렙타아비딘을 매개로 하여 기재 상에 결합

될 수 있다.

[0033] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 리포터 분자는 트롬빈과 공유결합되는 관능기를 포함하고 있거나, 비오틴화되어 아비딘 또는 스트렙타아비딘과 결합되거나, 트롬빈 애타머를 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 피브리노겐을 포함하는 용액은 피브린 생성에 대한 신호 증가를 위한 표지 물질을 더욱 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0035] 본 발명에 따른 트롬빈이 포함된 표적 DNA 검출용 키트를 이용하여 시료를 반응시킨 결과 표적 DNA가 존재시 트롬빈이 기재 상에 고정되어 피브리노겐을 피브린으로 변화시키는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명에 따른 트롬빈이 포함된 키트는 간편하면서도 정확한 측정 방법으로 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 단순화된 검출 과정을 통해서 고가의 장치 없이 육안으로도 타겟물질을 고감도로 검출할 수 있다. 이에 따라, 질병 조기 진단의 정확성과 편의성을 동시에 가져다 줄 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1a 내지 1c는 본 발명의 일실시예에 따른 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트를 이용하여 표적 DNA 를 검출하는 과정을 보여준다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트와 그 기질인 피브리노겐 용액을 반응시킨 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트

[0038] 본 발명은 DNA 검출에 있어서 표지로 사용되는 일반적인 효소나 나노입자 대신에 트롬빈을 도입하고자 한다. 트롬빈은 혈액응고 반응에 관여하는 효소로 잘 알려져 있다. 혈액응고 과정을 살펴보면, 혈액이 혈관 밖으로 나오면 혈액 내의 혈소판이 파괴되어 트롬보플라스틴이 생기고, 트롬보플라스틴은 혈액 속의 칼슘이온(Ca^{2+})과 함께 작용하여 혈장 단백질의 하나인 프로트롬빈을 트롬빈으로 변화시킨다. 이 트롬빈은 혈액 속의 가용성 피브리노겐을 가수분해하여 불용성인 피브린으로 변화시키는 반응을 촉매한다. 피브린은 실 모양의 물질로서, 그물처럼 얽히고 그 속에 혈구를 가둔 채, 시간이 지날수록 점점 작아지는데, 트롬빈은 피브리노겐에 대한 기질 특이성이 매우 높고, 피브리노겐의 아르기닌과 글리신 잔기 사이의 4개의 펩티드 결합을 자른다. 또한, 이러한 반응의 최적 pH는 중성 또는 약알칼리성 부근이며, 주성분은 단백질로서 최소 분자량은 8,000이며 중합하기 쉬운 성질을 가진다.

[0039] 이러한 트롬빈의 검출에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있다. 트롬빈은 심장 혈관 질환, 안티-클로팅 치료, 염증 프로세스 조절, 혈관 벽에서의 조직 복구, 그리고 폐의 전이의 진단에 중앙 표지자로 이용되어 질병 치료 연구에 있어 매우 중요한 역할을 하기 때문이다. 또 다른 이유는 트롬빈-애타머에 대한 연구가 본격화되었기 때문이다.

[0040] 그러나 본 발명은 이러한 트롬빈 관련한 기존의 연구와는 달리 트롬빈을 검출하고자하는 것이 궁극적인 목적이 아니라 트롬빈의 효소 작용인 coagulation(혈액응고 작용에서도 수반되는) 반응을 센서의 신호를 증폭할 목적으로 광범위하게 사용하고자 한다. 이 반응을 이용하면 트롬빈을 직접 검출하는 경우에도 사용가능하고 트롬빈을 일반 효소처럼 표지로 도입하여 신호증폭의 목적으로 이용할 수 있게 되므로 매우 유용하다.

[0041] 이와 같은 트롬빈 표지화 도입은 일반적인 샌드위치 검출법에 비해 검출의 절차를 간소화시킬 뿐 아니라 검출 비용도 매우 절약되는 효과가 예상된다. 이 과정은 트롬빈 자체를 검출하는데도 사용가능하며 트롬빈을 일반 효소처럼 표지화 하면 표지 사용이 가능한 모든 종류의 화학 및 바이오센서에 적용이 가능한 유용한 방법이 될 것으로 판단된다.

[0042] 본 발명의 샌드위치 타입의 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트는 고체기재, 상기 기재 상에 결합되고 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브 분자를 포함하는 DNA 센서; 상기 프로브 분자와 결합된 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 리포터 분자; 상기 리포터 분자에 특이적으로 결합하고 효소활성을 갖는 트롬빈; 및 피브리노겐을

포함하는 용액;을 포함한다.

- [0043] 즉, 고체기재 상에 표적 DNA와 결합될 수 있는 프로브가 고정되어 있고, 타겟 DNA가 여기에 반응하게 되며 타겟 DNA의 결합여부를 확인하기 위한 리포터 분자가 고정되면 리포터 분자의 존재를 확인하기 위한 표지로서 트롬빈이 결합된다. 이러한 트롬빈은 용액 중에 존재하는 피브리노겐을 불용성의 피브린으로 변화시키는 촉매 작용을 수행하며 이후 센서 표면에 쌓이게 되는 피브린의 양을 조사하여 정량 분석이 가능해진다. 즉, 피브린의 양을 관찰함으로써 그 양에 비례하는 트롬빈의 양을 예상할 수 있다.
- [0044] 피브린의 양을 정량하는 방법은 예를 들어 보정곡선을 그리듯이 트롬빈 농도를 달리하면서 차등의 색 세기를 보이게 결과를 얻은 뒤 미지 트롬빈의 양을 이 결과와 비교하는 비색법을 적용할 수 있다.
- [0045] 한편, 피브린의 coagulation 반응이 고체기재 상에서 수행되어 반응 전과 효율이 저하될 염려가 있으나 본 발명의 발명자들이 확인한 바에 따르면 트롬빈이 무작위로 흡착된 고체표면상에서 진행된 시험을 통해 피브린의 침전이 잘 형성됨을 확인하였다.
- [0046] 다만, 피브린은 백색의 펩타이드 침전물로 색깔이 눈에 띄지 않으므로 색깔을 띠는 나노 또는 마이크로 입자를 부가하면 피브린 침전시 공침되어 육안으로도 쉽게 침전의 구별 및 양의 파악이 가능해질 것이다.
- [0047] 이에, 일실시예에 따르면 상기 피브리노겐을 포함하는 용액은 피브린 생성에 대한 신호 증가를 위한 표지물질을 더욱 포함할 수 있다. 상기 신호 증가를 위한 표지물질은 트롬빈의 함량에 대응하는 피브린의 생성량에 비례하여 측량될 수 있는 것으로서 일 예에 따르면, 피브린의 함량에 비례하여 발광량 또는 발색량이 달라지게 되는 발광 분자 또는 유색 분자나 질량변화를 증폭할 수 있는 질량보강 분자를 들 수 있다. 구체적인 예에서 컬러 입자(color bead), 형광을 띠는 입자, 양자점, 금(gold) 입자, 전기화학적으로 활성을 가지는 입자, 탄소 나노튜브, 그래핀, 풀러렌, 형광을 띠는 단백질, GOX(Glucose oxidase), ALP(Alkaline Phosphatase), HRP(Horse-Radish Peroxidase)등을 들 수 있으며, 상기 전기화학적으로 활성을 가지는 입자는 바람직하게 은, 구리, 납, 카드뮴, 철 또는 아연일 수 있다. 이러한 표지물질의 발광량 또는 발색량은 UV-Vis 분광기를 이용하여 흡광도를 측정함으로써 알 수 있을 것이다. 또는 표지물질의 질량 변화를 수정미세저울을 사용하여 측정할 수도 있다.
- [0048] 본 발명의 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트에서는 트롬빈의 효소 작용인 coagulation 반응을 이용하고 있으므로 트롬빈의 효소활성이 필수적이다. 다른 효소 작용과 마찬가지로 트롬빈의 활성은 온도에 매우 민감할 수 있다. 또한 센서 표면에 고정된 소량의 트롬빈이 반응하므로 용액과는 외부 온도에 더욱 민감하게 영향을 받을 수 있다. 따라서, 반응 온도, 트롬빈의 표면 농도, 피브리노겐의 농도, 반응 시간, 세척 방법 등에 있어서 트롬빈의 효소 활성이 저해되지 않도록 유지하고 최적화하는 것이 매우 중요할 것이다.
- [0049] 또한, 트롬빈의 반응이 표적 DNA의 센싱으로서 유효하기 위해서는 트롬빈의 비특이적인 흡착이 방지되어야 한다. 이러한 트롬빈이 비특이적인 흡착은 트롬빈 검출에 있어 결정적인 방해 요인으로 작용함은 당연하다.
- [0050] 이에 트롬빈의 비특이적인 흡착을 줄임과 동시에 트롬빈 고정에 적절한 간격을 유지시키기 위해 고체기재에서 트롬빈이 고정될 아래층에 아비딘(avidin) 또는 스트렙타아비딘을 먼저 고정한다. 상기 아비딘의 크기(M.W.)는 휴먼 또는 보바인 트롬빈과 유사하며 아비딘이 트롬빈이 비특이적인 흡착을 방지하는 버퍼역할도 수행할 수 있어 트롬빈의 효율적인 고정이 가능해질 것으로 판단되기 때문이다.
- [0051] 이를 위한 하나의 바람직한 예에서, 상기 프로브 분자를 아비딘 또는 스트렙타아비딘을 매개로 하여 기재 상에 결합한다. 즉, 바이오틴-아비딘의 결합반응을 이용하며, 이 때 바이오틴의 표면 밀도가 아비딘의 밀도를 결정하는 결정적 요소이고 나아가 트롬빈의 고정을 최적화하는 데 중요한 변수이다. 따라서, 고체기재 표면의 실란화 및 바이오틴 고정화를 최적화할 필요가 있다. 물론, 폴리에틸렌글리콜, BSA, 기단 계면활성제(surfactant) 등의 활용을 혼용하여 비특이적 흡착을 최소화하는 것도 병행될 수 있다.
- [0052] 본 발명에서 트롬빈은 리포터 분자에 특이적으로 결합하는 바 리포터 분자와의 결합 방법은 특별히 제한되지 않는다.
- [0053] 하나의 바람직한 예에서, 트롬빈과 리포터 분자는 공유결합에 의해 직접 결합될 수 있다. 예를 들어, 리포터 분자를 티올화 한 후, 일 말단에 티올과 공유결합하는 말레이미드기를 갖고 타 말단에 트롬빈과 공유결합할 수 있

는 관능기, 예를 들어 NHS가 결합된 2 관능성 링커를 이용하여 공유결합할 수 있다. 여기서 리포터 분자와 트롬빈의 1:1 반응을 위해 출발 물질들의 비율을 적당히 조절해야 할 것이고 공유결합 후 트롬빈의 활성이 저해되지 않도록 주의해야 할 것이다.

[0054] 또 다른 하나의 예에서, 상기 트롬빈 분자는 매개 물질을 사용하여 리포터 분자에 간접적으로 결합될 수 있다. 예를 들어, 아비딘-바이오틴 상호작용을 이용할 수 있다. 즉, 바이오틴이 결합된 DNA 올리고머와 바이오틴이 결합된 트롬빈을 아비딘과 반응시켜 아비딘 또는 스트렙타아비딘을 매개로 간접적으로 결합되게 하는 것이다.

[0055] 또 다른 예에서, 트롬빈 압타머를 매개로 하여 생물특이적 결합을 통해 결합될 수 있다. 이 방법은 일반적인 샌드위치 검출법에 비해 검출의 절차를 간소화시킬 뿐 아니라 검출 비용도 매우 절약되며 트롬빈의 활성을 저해하지 않을 가능성이 높다. 상기 트롬빈 압타머는 리포터 분자의 단부에 트롬빈 압타머에 해당되는 염기서열을 추가함으로써 용이하게 제조할 수 있다.

[0056] 하나의 바람직한 예에서 트롬빈과 압타머 부분의 상호작용을 보다 효율적으로 유도하기 위해서 1 또는 다수개, 바람직하게는 열 개 정도의 티민(Thymine) 염기를 리포터 분자와 압타머 서열 사이에 집어넣는 합성을 할 수 있다.

[0057] 한편, 본 발명에 따른 키트에서 DNA 센서는 고체기재와 그 기재 상에 고정된 프로브 분자를 포함한다. 바람직한 고체기재는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 프로브 분자의 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 상기 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 고체기재에 결합될 수 있다.

[0058] 본 발명의 표적 DNA 검출키트는 샌드위치 타입으로서 상보서열에 의한 DNA 혼성화를 이용한다. 이에, 표적 DNA는 프로브 분자 및 리포터 분자에 모두 혼성화 반응을 한다. 즉, 상기 프로브는 표적 DNA에 특이적으로 결합할 수 있는 분자이고, 상기 리포터 분자는 프로브 분자와 결합된 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 분자로서, 이들은 모두 DNA의 혼성화반응이 일어날 수 있도록 표적 DNA와 상보서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.

[0059] 본 발명의 프로브 분자 또는 리포터 분자는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 포함하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타겟 뉴클레오타이드(핵산) 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 상기 프로브 분자 또는 리포터 분자는 클로닝, 효율적인 방법, 화학적 교차결합기술, 직접적 화학적 합성, 또는 그들의 조합에 의해 제조될 수 있다.

[0060] 본 발명에 따른 프로브 분자 또는 리포터 분자는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오타이드일 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브 분자 또는 리포터 분자는 자연 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브 분자 또는 리포터 분자는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대, 펩타이드 핵산 (PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미테이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카일 DNA, 핵소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에틸-, 프로피닐-, 알카일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카일-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

[0061] 상기 프로브 분자와 고체기재 상에 프로브 분자를 고정시키는 방법은 특별히 제한되지 않으며 직접 결합 또는 바이오틴-아비딘 반응을 이용한 결합 등을 포함한다. 필요에 따라 고체기재와 프로브 분자의 결합력을 높이기 위해 전처리를 수행할 수 있는 바 예를 들어, 실란화(silanization)를 통해 티올(thiol)기가 연결된 단분자막을 형성시키고, 상기 단분자막 표면에 말레이미드-PEO₂-비오틴(maleimide-PEO₂-biotin) 용액을 떨어뜨려 비오틴을 고정시키며 아비딘 또는 스트렙타비딘을 비오틴에 결합시킬 수 있다. 이 경우 프로브는 비오틴화되어 아비딘 또는 스트렙타비딘에 결합된다.

- [0062] 이상 살펴본 바와 같이 본 발명의 샌드위치 타입의 표적 DNA 검출용 키트는 효소활성을 갖는 트롬빈이 가지는 기본적인 효소 기능을 이용하여 표적 DNA의 검출신호를 초고감도까지 증폭시킬 수 있으며 신호 증가를 위한 표지물질 첨가를 통해 육안으로 검출결과를 확인할 수 있다.
- [0063] 표적 DNA의 검출방법
- [0064] 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 표적 DNA의 검출방법을 제공할 수 있다.
- [0065] a. 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 프로브 분자가 표면에 결합된 DNA 센서를 제작하는 단계;
- [0066] b. 상기 DNA 센서 표면에 시료를 반응시키는 단계;
- [0067] c. 상기 시료와 반응한 DNA 센서 표면에 프로브 분자와 결합된 표적 DNA에 특이적으로 결합하는 리포터 분자를 반응시키는 단계;
- [0068] d. 상기 리포터 분자와 반응한 DNA 센서 표면에 리포터 분자에 특이적으로 결합하는 트롬빈을 반응시켜 리포터 분자-트롬빈 복합체를 형성하는 단계;
- [0069] e. 상기 트롬빈과 반응한 DNA 센서 표면에 피브리노젠(fibrinogen)을 포함하는 용액을 반응시키는 단계; 및
- [0070] f. 피브린을 측정하는 단계.
- [0071] 상기 단계들은 순차적이고 개별적으로 수행될 수도 있지만 동시에 수행될 수도 있다. 예를 들어, 리포터 분자, 트롬빈, 피브리노젠을 센서 표면에 반응시키는 것은 순차적으로 수행될 수도 있고 동시에 이루어질 수도 있다.
- [0072] 또 다른 예에서, 리포터 분자와 트롬빈의 결합의 효율을 증진시키기 위해, 리포터 분자와 트롬빈을 먼저 반응시켜 리포터 분자-트롬빈의 복합체를 형성한 후 이를 시료와 반응한 DNA 센서 표면에 반응시킬 수도 있다. 다만 이 경우 다수개의 트롬빈 압타머가 트롬빈과 결합할 수 있고 이 형태는 표면에서 효소의 활성이 저해될 가능성이 있으므로 주의해야 한다.
- [0073] 본 발명의 표적 DNA 검출방법에 따르면 표적 DNA가 존재시에는 리포터 분자-트롬빈 복합체가 고체 기재 상에 고정되는 반면, 표적 DNA가 부존재시에는 리포터 분자가 결합되지 못하게 됨으로써 리포터 분자-트롬빈 복합체가 없거나 검출감도 이하가 될 것이다.
- [0074] 여기서 표적 DNA와 결합하지 않은 비특이적으로 결합된 리포터 분자와 트롬빈의 복합체가 존재한다면 표적 DNA 검출의 노이즈가 된다. 따라서, 분석의 속도와 정확도를 증진시키기 위해 상기 트롬빈을 반응시키는 단계 이후 비특이적 결합된 리포터 분자-트롬빈 복합체를 제거하는 단계;를 더욱 수행하는 것이 바람직하다. 상기 리포터 분자-트롬빈 복합체를 제거하는 단계는 통상 세척을 통해 수행되는 바, 세척과정을 통해 검출하고자 하는 표적 피분석물 이외의 원치 않는 물질을 제거하여 노이즈로 작용하는 배경신호를 방지하는 데 필요하다. 세척은 당업자에게 공지된 일반적 방법을 통해 수행될 수 있다.
- [0075] DNA 센서에 샘플시료를 반응시킨 후 리포터 DNA를 반응시키고, 이때 트롬빈을 같이 섞어 주든지 후처리 해주게 되면 검출이 가능한 샌드위치 형태가 만들어지게 된다. 이 때 트롬빈이 반응할 수 있는 공간이 충분해야 하므로 프로브 분자의 간격의 조절이 선행되어야 할 것이다. 이를 위해, 상기 프로브 분자는 앞서 살펴본 바와 같이 아비딘 또는 스트렙타아비딘을 매개로 하여 기재 상에 결합됨으로써 트롬빈이 결합되는 리포터 분자 하부에 아비딘층이 형성될 수 있다.
- [0076] 상기 리포터 분자는 트롬빈과 특이적으로 결합하는 바, 앞서 예시한 바와 같이 트롬빈과 공유결합되는 관능기를 통해 상호 공유결합되거나, 비오틴화되어 아비딘 또는 스트렙타아비딘과 결합되거나, 또는 트롬빈 압타머가 연결됨으로써 트롬빈과 생물특이적으로 결합될 수 있다.
- [0077] 상기 방법에서 상기 피브리노젠을 포함하는 용액은 피브린 생성에 대한 신호 증가를 위한 표지물질을 더욱 포함할 수 있으며, 상기 물질은 앞서 상술한 바와 같다.
- [0078] 이상과 같이 트롬빈이 포함된 표적 물질 검출용 키트를 이용하여 표적 물질을 검출하는 본 발명에 따른 방법은

보다 정확하고 신속한 표적 물질의 검출을 위해 검출 신호를 증폭할 수 있는 트롬빈을 표지로 사용하였다는 점에 특징이 있다.

[0079] 따라서 본 발명에서는 빠르고 정확하게 표적 물질을 검출할 수 있을 것이고 트롬빈을 표지로 사용하여 용이하고 효과적으로 검출신호를 증폭시킬 수 있어 표지 물질을 정확하게 검출할 수 있으며, 나아가 종전에 사용하던 광학장비나 전기화학 장비를 사용하지 않아도 되기 때문에 검출이 간편한 특징이 있으며, 육안으로 관찰 시에도 aM 수준까지 검출할 수 있는 초고감도를 갖는다는 특징이 있다. 이에 따라, 질병 조기 진단의 정확성과 편의성을 동시에 가져다 줄 것으로 기대된다.

[0080] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0081] <실시예 1>

[0082] 본 발명에 따른 DNA 센서의 제작

[0083] 깨끗이 세척된 금을 머캅토운데카노익애시드 (mercaptoundecanoic acid) 와 머캅토운데카놀 (mercaptoundecanol) 이 각각 1uM 및 3uM 들어있는 에탄올(ethanol) 용액에 24 시간 담겨서 표면에 아세트익애시드(acetic acid) 가 들어간 자기조립 박막을 형성하였다. 이후 EDC 와 NHS 가 각각 200mM 및 50mM로 첨가된 수용액과 반응시켜 아세트익애시드를 활성화된 에스터(ester)를 형성시킨 뒤, 아민-PEG₂-비오틴(amine-PEG₂-biotin) 5uM와 반응시켰다. 이후, 스트렙타아비딘 10ug/ml 를 반응시키고 비오틴-DNA를 반응시켜 DNA 센서를 제작하였다.

[0084] <실시예 2>

[0085] 본 발명의 DNA 센서 및 트롬빈을 이용한 표적 물질의 검출

[0086] 도1b에서와 같이, 상기 제작된 DNA 센서(110)에 표적 DNA(120)를 반응시켰다. 그런 다음 트롬빈 압타머가 결합된 리포터 분자(130) 1uM을 반응시켰다. 다음으로 트롬빈(140)을 반응시키고, 마이크로 입자 (폴리스티렌, 3um) 가 들어있는 피브리노겐 용액(150)을 전극표면에 올려서 일정시간이 지난 후에 고분자가 생성여부에 따라 표적 DNA의 존재 유무를 판단하였다. 상기 실험에서 사용한 DNA 센서, 표적 DNA 및 리포터 분자의 염기서열은 다음에 기재된 바와 같이 제작하여 사용하였다.

[0087] DNA 센서 (110) : 5'-ATTTAACAATAATCCTTTTTTTT-Biotin-3'

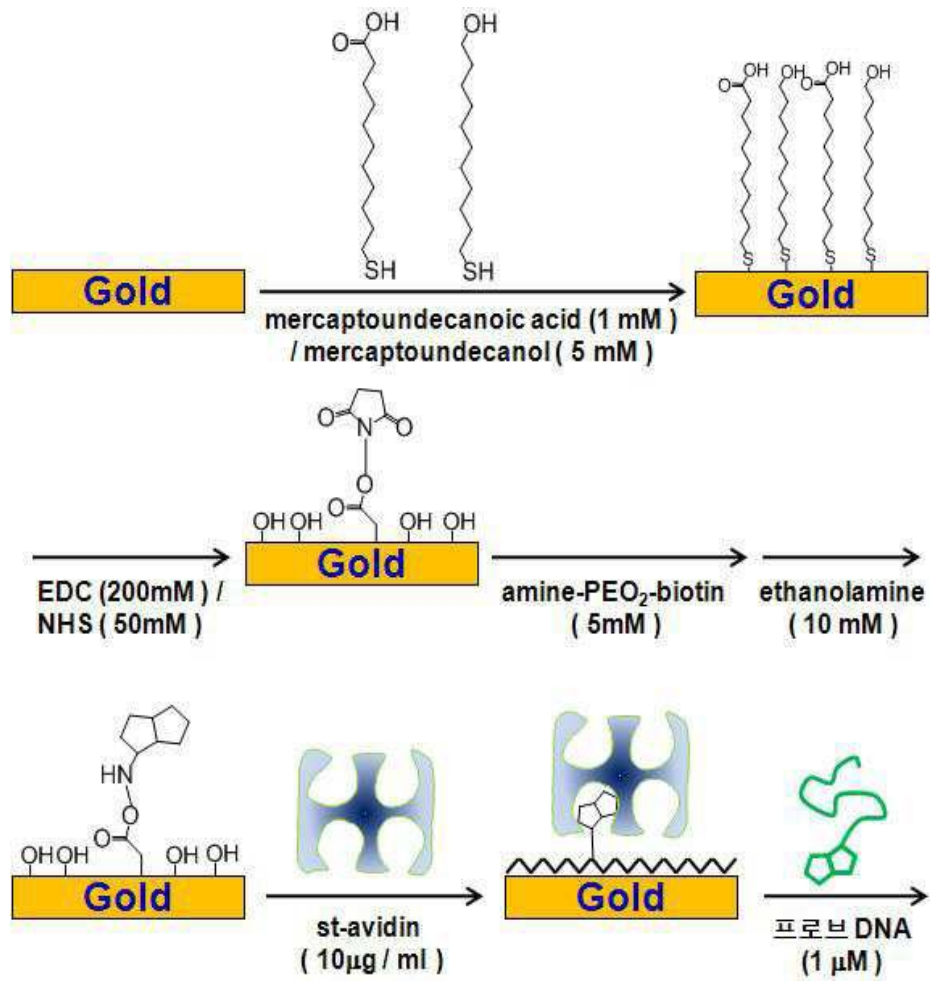
[0088] 표적 DNA (120) : 5'-GGATTATTGTTAAATATTGATAAGGATAG-3'

[0089] 리포터 분자 (130) : 5'-GGTTGGTGTGGTGGTTTTTTTCTATCCTTATCAAT-3'

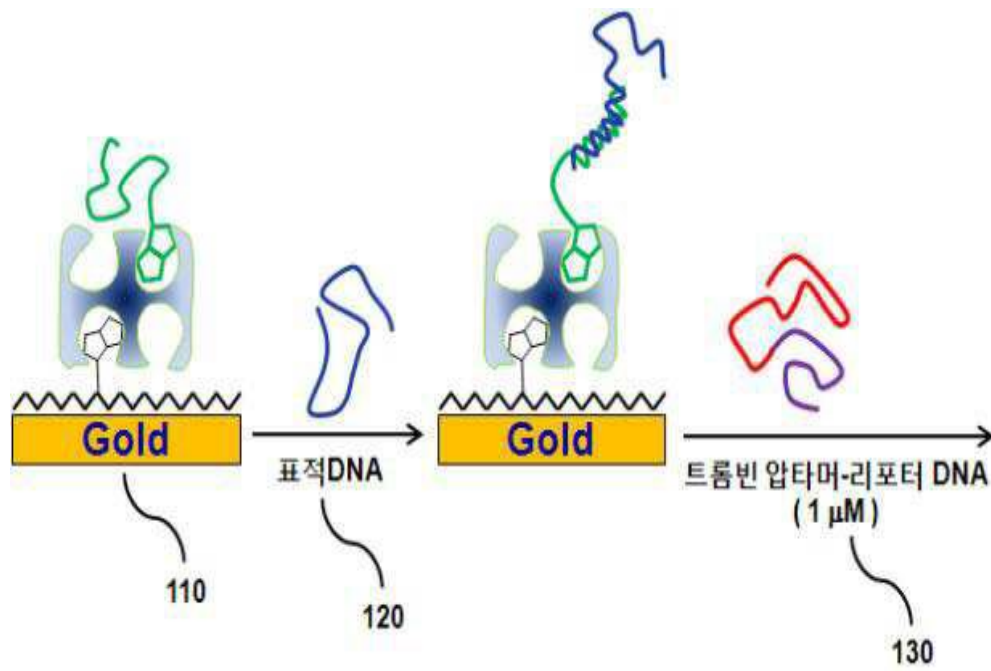
[0090] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

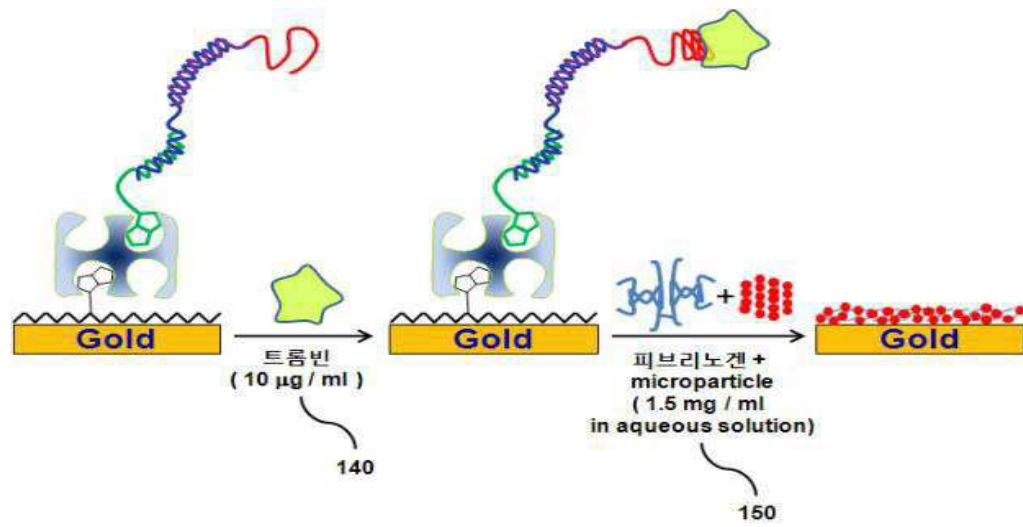
도면1a



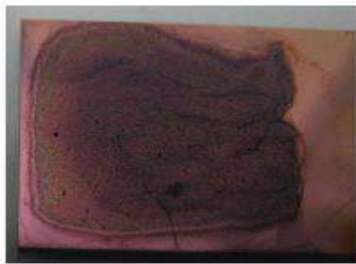
도면1b



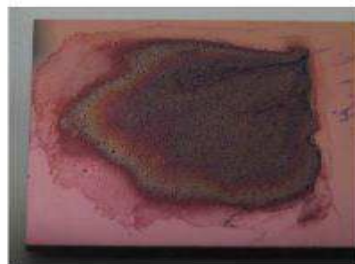
도면1c



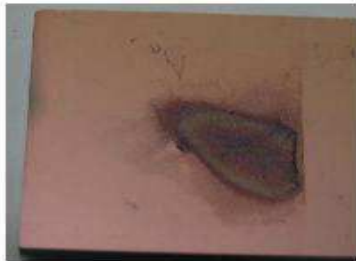
도면2



1 nM



1 pM



1 fM



Non complementary DNA 1 μ M