



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월27일

(11) 등록번호 10-1515723

(24) 등록일자 2015년04월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

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

G01N 33/533 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0166052

(22) 출원일자 2013년12월27일

심사청구일자 2013년12월27일

(56) 선행기술조사문헌

JP2009080011 A*

KR1020130087274 A

KR1020130005757 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

하상수

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

서승관

서울 노원구 한글비석로 479, 104동 607호 (상계동, 보람아파트1단지)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 21 항

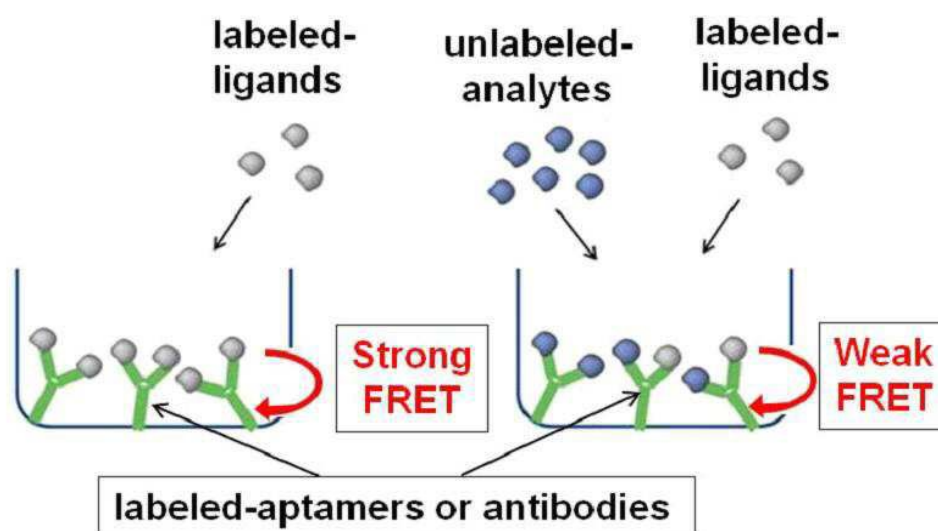
심사관 : 김승오

(54) 발명의 명칭 형광공명 에너지 전이 현상을 유발시키는 형광물질이 표지된 앵타머를 포함하는 표적물질 검출 또는 정량분석용 조성물

(57) 요약

본 발명은 FRET 현상을 유발시키는 형광물질이 표지된 앵타머를 포함하는 표적물질 정량분석용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 표적물질 정량분석용 키트, 상기 조성물 또는 키트를 사용하여 표적물질을 정량분석하는 방법, FRET 현상을 유발시키는 형광물질이 표지된 앵타머를 포함하는 표적물질 검출용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 표적물질 검출용 키트 및 상기 조성물 또는 키트를 사용하여 표적물질을 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 표적물질 검출 또는 정량분석용 조성물을 이용하면, 시료에 표적물질이 존재하는지의 여부 또는 시료에 포함된 표적물질의 수준을 fmol 수준에서 확인할 수 있고, 앵타머의 특성상 제조와 보관이 용이하므로, 보다 효과적으로 표적물질을 검출 또는 정량분석하는데 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

송성은

광주 남구 백서로 74, 801호 (양림동, 무등파크맨션)

오홍범

서울 성동구 성수일로8길 47, 106동 1502호 (성수동2가, 성수롯데캐슬파크)

황상현

서울특별시 송파구 잠실로 62 트리지움 331동 1302호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0021956

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국과학재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 애플타머를 이용한 관심 금속이온의 선택적 추출

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2011.09.01 ~ 2014.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 형광공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 현상을 유발시키는 도너(donor) 또는 어셉터(acceptor) 역할을 수행하는 제1 형광물질이 표지된 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg); 및,

(b) 상기 제1 형광물질과 반응하여 FRET 현상을 유발시키는 제2 형광물질이 결합되고, 상기 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)과 결합할 수 있는 앵타머를 포함하는, 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg) 정량분석용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1 형광물질과 제2 형광물질은 플루오레신(fluorescein), 6-FAM, 로다민, 텍사스 레드(Texas Red), 테트라메틸로다민, 카르복시로다민, 카르복시로타민 6G, 카르복시로돌, 카르복시로다민 110, 캐스케이드 블루(Cascade Blue), 캐스케이드 옐로우(Cascade Yellow), 코마린, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy-크롬, 피코에리트린, PerCP(페리딘 클로로필-a 단백질), PerCP-Cy5.5, JOE(6-카르복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오레신), NED, ROX(5-(및-6)-카르복시-X-로다민), HEX, 루시퍼 옐로우(Lucifer Yellow), 마리나 블루(Marina Blue), 오레곤 그린(Oregon Green) 488, 오레곤 그린(Oregon Green) 500, 오레곤 그린(Oregon Green) 514, 알렉사 플루오어(Alexa Fluor, 상표명) 350, 알렉사 플루오어 430, 알렉사 플루오어 488, 알렉사 플루오어 532, 알렉사 플루오어 546, 알렉사 플루오어 568, 알렉사 플루오어 594, 알렉사 플루오어 633, 알렉사 플루오어 647, 알렉사 플루오어 660, 알렉사 플루오어 680, 7-아미노-4-메틸코마린-3-아세트산, 보디피(BODIPY, 상표명) FL, 보디피 FL-Br2, 보디피 530/550, 보디피 558/568, 보디피 564/570, 보디피 576/589, 보디피 581/591, 보디피 630/650, 보디피 650/665, 보디피 R6G, 보디피 TMR 및 보디피 TR로 구성된 군으로부터 선택되고, 상호작용에 의하여 FRET 현상을 나타낼 수 있는 형광물질인 것인 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 앵타머는 서열번호 1의 RNA인 것인 조성물.

청구항 5

제1항, 제2항, 또는 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg) 정량분석용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 앵타머가 결합된 기관 또는 비드를 추가로 포함하는 것인 키트.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 앵타머와 결합하지 않아 측정된 방출형광의 수준에 영향을 미치지 않는 내부 대조군을 추가로 포함하는 것인 키트.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 내부 대조군은 BSA(bovine serum albumin)인 것인 키트.

청구항 9

(a) 도너 형광물질의 흡수파장의 빛을 조사하면서, FRET 현상을 유발시키는 도너 또는 어셉터 역할을 수행하는 제1 형광물질이 표지된 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)과 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)의 존재를 확인하고자 하는 분리된 시료를, 상기 제1 형광물질과 반응하여 FRET 현상을 유발시키는 제2 형광물질이 결합되고, 상기 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)과 결합할 수 있는 앵타머에 동시에 가하여 반응시키는 단계; 및,

(b) 상기 반응물로부터 도너 형광물질 또는 어셉터 형광물질의 방출형광의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg) 정량분석 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 도너 형광물질의 방출형광이 검출되지 않는 경우에는 상기 시료에 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)이 존재하지 않는 것으로 판정하고, 상기 도너 형광물질의 방출형광이 검출되는 경우에는 상기 시료에 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)이 존재하는 것으로 판정하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 (b) 단계에서, 상기 도너 형광물질의 흡수파장의 빛을 조사하면서, 상기 앵타머에 표지된 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)을 가하여 반응시키고 상기 반응물에서 측정된 도너 형광물질의 방출형광의 수준을 내부 대조군으로 사용하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 (b) 단계에서, 상기 도너 형광물질의 흡수파장의 빛을 조사하면서, 상기 앵타머에 표지된 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)과 상기 앵타머에 결합하지 않는 물질을 동시에 가하여 반응시키고 상기 반응물에서 측정된 도너 형광물질의 방출형광의 수준을 내부 대조군으로 사용하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제11항 또는 제12항에 있어서,

상기 내부 대조군으로서 측정된 도너 형광물질의 방출형광의 수준을 기준으로 하여 상기 (b) 단계에서 측정된 도너 형광물질의 방출형광 수준의 증가여부를 판정하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 14

(a) 형광공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 현상을 유발시키는 도너 또는 어셉터 역할을 수행하는 제1 형광물질이 표지된 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg); 및,

(b) 상기 제1 형광물질과 반응하여 FRET 현상을 유발시키는 제2 형광물질이 결합되고, 상기 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)과 결합할 수 있는 앵타머를 포함하는, 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg) 검출용 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 앵타머와 결합하지 않아 측정된 방출형광의 수준에 영향을 미치지 않는 내부 대조군, 표준곡선 작성에 필요한 농도별 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg) 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 내부 대조군은 BSA(bovine serum albumin)인 것인 조성물.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg) 정량분석용 키트.

청구항 18

(a) 도너 형광물질의 흡수파장의 빛을 조사하면서, FRET 현상을 유발시키는 도너 또는 어셉터 역할을 수행하는 제1 형광물질이 표지된 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)과 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)의 존재를 확인하고자 하는 분리된 시료를, 상기 제1 형광물질과 반응하여 FRET 현상을 유발시키는 제2 형광물질이 결합되고, 상기 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)과 결합할 수 있는 앵타머에 동시에 가하여 반응시키는 단계; 및,

(b) 상기 반응물로부터 도너 형광물질 또는 어셉터 형광물질의 방출형광의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg) 검출방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 앵타머에 시료 대신에 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)을 농도별로 가하여 반응시키고 이로

부터 측정된 방출형광의 수준을 이용하여 표준곡선을 작성하는 단계; 및, 상기 (b) 단계에서 측정된 방출형광의 수준을 상기 표준곡선에 적용하여 시료에 포함된 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)의 수준을 정량 분석하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제18항에 있어서,

상기 도너 형광물질의 흡수파장의 빛을 조사하면서, 상기 앵타머에 표지된 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)을 가하여 반응시키고 상기 반응물에서 측정된 도너 형광물질의 방출형광의 수준을 내부 대조군으로 사용하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제18항에 있어서,

상기 도너 형광물질의 흡수파장의 빛을 조사하면서, 상기 앵타머에 표지된 표적물질인 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)과 상기 앵타머에 결합하지 않는 물질을 가하여 반응시키고 상기 반응물에서 측정된 도너 형광물질의 방출형광의 수준을 내부 대조군으로 사용하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 내부 대조군은 BSA(bovine serum albumin)인 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 형광공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 현상을 유발시키는 형광물질이 표지된 앵타머를 포함하는 표적물질 검출 또는 정량분석용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 FRET 현상을 유발시키는 형광물질이 표지된 앵타머를 포함하는 표적물질 정량분석용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 표적물질 정량분석용 키트, 상기 조성물 또는 키트를 사용하여 표적물질을 정량분석하는 방법, FRET 현상을 유발시키는 형광물질이 표지된 앵타머를 포함하는 표적물질 검출용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 표적물질 검출용 키트 및 상기 조성물 또는 키트를 사용하여 표적물질을 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

앵타머(aptamer)는 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산 (DNA, RNA 또는 변형핵산)이다. 앵타머는 무작위적인 서열을 가지는 핵산 라이브러리인 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) 과정을 통해 얻을 수 있다. 상기 앵타머는 항체의 좋은 대안으로 여겨지고 있는데, 많은 앵타머들은 금속이온들과 작은 화학분자들, 단백질들, 심지어 세포에 대해서 나노몰에서 피코몰 수준의 해리 상수를 가질 만큼 특이적으로 결합한다고 알려져 있다. 또한, 앵타머는 항체와 비교하여 구체적인 실험에서 보다 유리한 다음과 같은 특징들이 있다. 첫번째 특징은 앵타머가 어떤 분자들 (작은 무기이온들부터 세포까지)을 표적으로 정할 수 있게 구축된 핵산 라이브러리로부터 얻을 수 있다는 점이다. 이와 같은 특징은 세포나 동물로부터 얻어져야 하는 항체의 제한점을 극복할 수 있게 한다. 두 번째 특징은 선정된 앵타머를 PCR (Polymerase chain reaction) 과정을 통해 증폭과정을 수행하거나 높은 순도를 가지는 많은 양의 앵타머를 얻기 위해 전사과정을 진행할 수 있다는 점들을 수 있다. 세 번째 특징은 앵타머가 비교적 단순한 화학적 구조를 가졌기 때문에 고체표면에 고정화하는 등의

다른 목적으로 사용하고자 하는 경우에 그 작용기를 변화시키기 쉽다는 점이다. 마지막으로, 앵타머는 항체보다 훨씬 더 안정하기 때문에 좀 더 거친 조건 (높은 온도나 극단의 pH에 대해서도)을 필요로 하는 화학적 응용 과정에 이용될 수 있다. 그 밖에도 앵타머는 화학적으로 대량 합성이 가능하므로 경제성이 우수하고, 항체에 버금가는 표적 친화력을 가지고 있으며, 항체에 비해 크기가 월등히 작다 (약 1~2nm정도)는 특징을 가지고 있다.

[0003] 이와 같은 항체에 비해 우수한 앵타머의 효과로 인해 앵타머를 이용한 특정 분자에 대한 바이오센서를 개발하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다. 예를 들어, 한국 특허공개 제2008-0084029호에는 형광표지된 앵타머를 사용하여 표적 단백질을 검출하는 방법 및 이에 사용되는 키트가 개시되어 있고, 한국 특허공개 제2011-0126942호에는 기준 전극 및 분석 대상 물질과 결합하는 앵타머(Aptamer)가 고정화될 수 있는 작업 전극이 구비된 기판을 포함하여 전기화학적 신호를 검출할 수 있는 바이오칩 및 그의 이용 방법이 개시되어 있으며, 한국 특허공개 제2013-0087274호에는 기판에 결합된 앵타머와 쿠마씨 블루 용액을 이용하여 표적 단백질을 검출하는 방법이 개시되어 있다.

[0004] 그러나, 이들 기술은 앵타머를 단순한 결합용 매체로만 사용하고 있을 뿐, 종래의 항체에 비하여 뚜렷한 장점을 나타내는 앵타머를 활용하지 못하고 있다는 문제점이 있었다. 예를 들어, 항체를 이용한 대표적인 분석키트인 ELISA 키트의 경우, 항체에 표지물질이 결합된 상태로 제작된다. 상기 항체에 표지물질을 직접적으로 결합시킬 경우, 항체의 구조 또는 기능이 변질되어 검출감도가 저하되는 등의 문제점이 발생하므로, 현재는 항체에 표지물질을 결합시키는 방법으로서, 항체에는 그의 구조 및 기능을 변질시키지 않는 바이오틴을 결합시키고, 표지물질에는 스트렙타비딘을 결합시킨 후, 바이오틴과 스트렙타비딘의 결합을 통해 항체와 표지물질을 간접적으로 결합시키는 방식이 사용되고 있다. 이같은 방법으로 ELISA 키트를 제작할 경우에는, 제작비용과 제작시간이 과다하게 소요된다는 문제점이 있는데, 이러한 문제점은 본질적으로 항체를 사용하기 때문에 발생하므로, 이러한 항체를 앵타머로 대체하는 방안이 연구되고 있다. 그러나, 아직까지는 항체를 대체하여 앵타머를 사용하는 방법에 대한 뚜렷한 연구결과가 보고되지 않고 있는 실정이다.

[0005] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 종래의 항체와 구별되는 앵타머의 장점을 활용하고자 예의 연구노력한 결과, 형광공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 현상을 이용하여, 도너(donor) 역할을 수행하는 형광물질이 표지된 표적물질 및 어셉터(acceptor) 역할을 수행하는 형광물질이 표지되고, 상기 표적물질과 결합할 수 있는 앵타머를 포함하는 조성물을 사용할 경우, 경쟁분석을 통해 상기 표적물질을 포함하는 시료로부터 상기 표적물질을 검출하거나 또는 정량분석할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 FRET 현상을 유발시키는 형광물질이 표지된 앵타머를 포함하는 표적물질 정량분석용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 표적물질 정량분석용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물 또는 키트를 사용하여 표적물질을 정량분석하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 FRET 현상을 유발시키는 형광물질이 표지된 앵타머를 포함하는 표적물질 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 표적물질 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물 또는 키트를 사용하여 표적물질을 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 FRET 현상을 유발시키는 형광물질이 표지된 앵타머를 포함하는 표적물질 정량분석용 조성물을 제공한다.

- [0013] 구체적으로, 본 발명의 표적물질 정량분석용 조성물은 (a) 형광공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 현상을 유발시키는 도너 또는 어셉터 역할을 수행하는 제1 형광물질이 표지된 표적물질; 및, (b) 상기 제1 형광물질과 반응하여 FRET 현상을 유발시키는 제2 형광물질이 결합되고, 상기 표적물질과 결합할 수 있는 앵타머를 포함한다.
- [0014] 본 발명자들은 종래의 항체와 구별되는 앵타머의 장점을 활용하고자 다양한 연구를 수행하던 중, 형광공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 현상을 이용한 표적물질 검출방법에 주목하게 되었다.
- [0015] FRET은 두개의 형광물질이 근접할 경우, 공명에 의해 에너지가 전달되는 현상을 의미하는데, 두개 형광물질 중에서 에너지를 전달하는 형광물질을 도너(donor)라고 하고, 에너지를 받는 형광물질을 어셉터(acceptor)라 하며, 상기 도너의 흡수 및 방출파장 값은 어셉터의 흡수파장 값보다 작고, 상기 도너의 방출파장 값이 어셉터의 흡수파장 값과 유사하며, 상기 도너와 어셉터의 간격이 1 내지 10 nm인 조건에서 발생한다. 상기 도너와 어셉터를 포함하는 조성물에 도너의 흡수파장의 빛을 조사하면, 상기 도너는 조사된 빛을 흡수하여 형광을 방출하지만, 어셉터는 그의 흡수파장과 조사된 빛의 파장이 상이하기 때문에 형광을 미약하게 방출하게된다. 이러한 조건에서 상기 도너가 어셉터에 접근하면, 도너로부터 발생된 방출파장의 형광이 어셉터의 흡수파장의 빛으로 작용하여, 어셉터에 흡수되고, 어셉터는 상기 도너로부터 방출된 파장의 빛을 흡수하여 다시 형광을 방출하게 된다. 따라서, 도너의 흡수파장의 빛을 조사한 조건에서 상기 도너와 어셉터가 격리되면 도너의 형광이 검출되고, 상기 도너와 어셉터가 접근하거나 결합되면 어셉터의 형광이 검출된다.
- [0016] 본 발명자는 최초로 FRET 현상을 표적물질 및 상기 표적물질에 결합하는 앵타머에 적용하여 경쟁적 결합을 통해, 표적물질과 앵타머가 결합되었는지의 여부를 검출 및 정량분석하는 방법을 개발하였다. 즉, 도너 또는 어셉터 형광물질을 표적물질에 표지하고, 이와 짝을 이루는 어셉터 또는 도너를 앵타머에 표지한 다음, 상기 도너의 흡수파장의 빛을 조사하는 조건하에 상기 표적물질과 앵타머를 반응시키고, 방출되는 형광을 측정할 경우, 도너에서 방출되는 형광이 검출되면, 상기 표적물질과 앵타머가 결합하지 않는다고 판단할 수 있고, 어셉터에서 방출되는 형광이 검출되면, 상기 표적물질과 앵타머가 결합한다고 판단할 수 있다.
- [0017] 본 발명자들은 최초로, FRET 현상을 발생시키는 표적물질이 각각 표지된 표적물질과 앵타머를 사용하여, 시료내 표지되지 않은 표적물질과의 경쟁적 결합을 통해, 시료내에 존재하는 표적물질을 정량분석하는 방법을 개발하였다. 예를 들어, 도너의 흡수파장의 빛을 조사하는 조건에서 도너 형광물질이 표지된 앵타머에 어셉터 형광물질이 표지된 표적물질과 일련의 농도의 표지되지 않은 표적물질을 같이 가하여 반응시키고, 도너 형광물질의 방출형광의 수준을 측정하여 표준곡선을 작성한 다음, 도너의 흡수파장의 빛을 조사하는 조건에서 어셉터 형광물질이 표지된 앵타머에 도너 형광물질이 표지된 표적물질과 표적물질을 포함하는 목적하는 시료를 같이 가하여 반응시키고 도너 형광물질의 방출형광의 수준을 측정하며, 측정된 방출형광의 수준을 표준곡선에 적용하여 상기 시료에 포함된 표적물질을 정량할 수 있다. 이같은 정량방법은 도너 형광물질이 표지된 표적물질과 시료에 포함된 표적물질이 상호 경쟁적으로 앵타머에 결합하기 때문에 수행될 수 있는데, 시료에 포함된 표적물질이 많을수록 일정한 농도의 도너 형광물질이 표지된 표적물질 보다도 앵타머에 더 많이 결합함으로써, FRET 현상을 억제하는 비율이 증가하여 결과적으로는 도너의 방출형광의 수준이 증가하게 된다. 반대로, 시료에 포함된 표적물질이 적을수록 일정한 농도의 도너 형광물질이 표지된 표적물질 보다도 앵타머에 더 적게 결합함으로써, FRET 현상을 발생시키는 비율이 증가하여 결과적으로는 어셉터의 방출형광의 수준이 증가하게 된다. 구체적인 예로서, Cy3 흡수파장의 빛을 조사하는 조건하에서, 어셉터 형광물질인 Cy5로 표지된 HBV 표면항원(HBsAg)과 도너 형광물질인 Cy3로 표지된 항-HBsAg 앵타머를 반응시키면서 표지되지 않은 HBsAg를 서로 다른 농도로 가하고, Cy3 및 Cy5의 방출형광의 수준변화를 측정하면, 표지되지 않은 HBsAg의 농도가 증가할수록 도너 형광물질인 Cy3 방출형광의 수준이 증가하고, 어셉터 형광물질인 Cy5 방출형광의 수준이 감소한다. 이는 표지되지 않은 HBsAg가 도너 형광물질(앵타머)과 어셉터 형광물질(HBsAg) 사이의 결합에 간섭하여, Cy3와 Cy5를 격리시킴으로써 나타나는 것으로 분석되었다.

- [0018] 따라서, FRET 현상을 유발시키는 도너 또는 어셉터 역할을 수행하는 제1 형광물질이 표지된 표적물질과, 상기 제1 형광물질과 반응하여 FRET 현상을 유발시키는 제2 형광물질이 결합되고, 상기 표적물질과 결합할 수 있는 앵타머를 포함하는 표적물질 검출용 조성물을 사용하면, 시료에 목적하는 표적물질이 존재하는지의 여부를 확인할 수 있을 뿐만 아니라, 상기 시료에 포함된 표적물질을 정량분석할 수 있다.
- [0019] 이처럼 본 발명에서 제공하는 표적물질 정량분석용 조성물은 항체 대신에 앵타머를 사용하고, 상기 앵타머 및 상기 앵타머와 특이적으로 결합할 수 있는 표적물질에 각각 FRET를 유발시킬 수 있는 형광물질을 표지함으로써 구성될 수 있다. 만일, 앵타머 대신에 항체를 이용하여 동일한 효과를 나타내는 조성물을 수득하기 위하여는 도너 또는 어셉터 형광물질을 항체에 표지시켜야 하는데, 통상적으로 상기 형광물질은 화학적 반응에 의하여 표지되기 때문에, 형광물질을 표지시키기 위한 화학반응에 의하여 항체의 구조가 손상되어, 항원과의 결합특이성이 훼손될 수 있다는 위험성이 있다. 그러나, 본 발명의 앵타머는 항체에 비하여 안정성이 높고 화학적 반응에 대한 내성이 우수하기 때문에, 형광물질을 표지한 후에도 표적물질에 대한 결합특이성이 그대로 유지될 수 있으며, 이러한 앵타머의 특징은 항체를 사용할 경우에는 도저히 달성될 수 없는 신규한 기술이라고 할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 용어 "앵타머(aptamer)"란, 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적물질에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오티드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 앵타머는 표적물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며, 합성이 용이한 폴리뉴클레오티드로 구성되어 있으므로, 형광물질을 표지하여 표적물질 검출용 조성물의 구성요소로서 사용될 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 앵타머는 특별히 이에 제한되지 않으나 표적물질과 결합할 수 있는 앵타머가 될 수 있고, 그 예로서, 형광물질로 표지되고, 표적물질과 결합할 수 있는 앵타머가 될 수 있으며, 표적물질이 B형 간염 바이러스인 경우 형광물질로 표지되고, B형 간염 바이러스의 표면항원에 결합할 수 있는 앵타머가 될 수 있다. 그 예로, Cy3로 표지된 서열번호 1의 앵타머가 될 수 있으며, 구체적인 실시예에서 상기 Cy3로 표지된 앵타머의 정량분석 효과를 확인하였다.
- [0022] 본 발명의 용어 "표적물질(target)"이란, 시료내에 존재하고 앵타머와 결합함으로써 정량분석 또는 검출의 대상이 되는 물질을 의미한다. 앵타머에 결합함으로써 정량분석 또는 검출될 수 있는 물질은 제한없이 포함되며, 그 예로, 단백질, 핵산, 화합물 등이 될 수 있다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 표적물질은 앵타머에 결합할 수 있는 한, 특별히 제한되지 않으나, 앵타머와 결합할 수 있는 단백질성 물질이 될 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 대표적인 예로 B형 간염바이러스의 표면항원인 HBsAg를 표적물질로 사용하였다. 본 발명자들은 이처럼 B형 간염 바이러스의 표면항원을 표적물질로 사용하여 이를 정량분석 하기 위하여, 본 발명에서 제공하는 방법을 적용한 결과, B형 간염 바이러스의 표면항원을 용이하게 정량분석할 수 있음을 확인하였다.
- [0024] 본 발명의 용어 "형광물질"이란, 특정한 파장의 빛을 흡수하여 검출가능한 영역의 빛을 방출하는 물질을 통칭하여 의미한다. 상기 검출가능한 영역이라 함은 육안 또는 다양한 계측기기를 사용하여 방출되는 빛의 수준을 정량할 수 있는 영역을 의미한다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 형광물질은 표적물질 및 상기 표적물질에 특이적으로 결합할 수 있는 앵타머에 각각 표지되어, FRET 현상을 일으킬 수 있는 물질로 해석될 수 있는데, 상기 형광물질은 FRET 현상을 유발시키는 형광물질은 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 플루오레신(fluorescein), 6-FAM, 로다민, 텍사스 레드(Texas Red), 테트라메틸로다민, 카르복시로다민, 카르복시로다민 6G, 카르복시도돌, 카르복시로다민 110, 캐스케이드 블루(Cascade Blue), 캐스케이드 옐로우(Cascade Yellow), 코마린, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy-크롬, 피코에리트린, PerCP(페리딘 클로로필-a 단백질), PerCP-Cy5.5, JOE(6-카르복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오레신), NED, ROX(5-(및-6)-카르복시-X-로다민), HEX, 루시퍼 옐로우(Lucifer Yellow), 마리나 블루(Marina Blue), 오레곤 그린(Oregon Green) 488, 오레곤 그린(Oregon Green) 500, 오레곤 그린(Oregon Green) 514, 알렉사 플루오어(Alexa Fluor, 상표명) 350, 알렉사 플루오어 430, 알렉사 플루오어 488, 알렉사 플루오어 532, 알렉사 플루오어 546, 알렉사 플루오어 568, 알렉사 플루오어 594, 알렉사 플루오어 633, 알렉사 플루오어 647, 알렉사 플루오어 660, 알렉사 플루오어 680, 7-아미노-4-메틸코마린-3-아세트산, 보디피(BODIPY, 상표명) FL,

보디피 FL-Br2, 보디피 530/550, 보디피 558/568, 보디피 564/570, 보디피 576/589, 보디피 581/591, 보디피 630/650, 보디피 650/665, 보디피 R6G, 보디피 TMR, 보디피 TR 등의 형광물질 중에서 흡수파장과 방출파장이 유사한 형광물질의 쌍을 선택하여 사용할 수 있고, 그 예로서 Cy3-Cy5, 알렉사 플로어 488-알렉사 플로어 532 등의 형광물질쌍을 사용할 수 있으며, 본 발명의 실시예에서는 대표적인 예로 도너 형광물질로서 Cy3 및 어셉터 형광물질로서 Cy5를 사용하여 본 발명에서 제공하는 방법이 정상적으로 수행될 수 있음을 확인하였다.

[0026] 아울러, 보다 정확한 정량분석을 위하여, 내부 대조군으로 사용하기 위한 BSA, 표준곡선 작성에 필요한 농도별 표적물질 등을 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 항-HBsAg RNA 앵타머를 수득하기 위한 DNA 폴리뉴클레오티드(서열번호 5)를 제작하고(실시예 1), 상기 제작된 DNA 폴리뉴클레오티드를 기반으로 하여 RNA 앵타머(서열번호 1)를 합성한 다음(실시예 2), 상기 합성된 앵타머에 도너 형광물질인 Cy3를 표지하여 Cy3로 표지된 앵타머를 수득하였다(실시예 3). 또한, 어셉터 형광물질인 Cy5가 표지된 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)를 수득하였다(실시예 4). 그런 다음, 상기 수득한 Cy3로 표지된 앵타머, 상기 수득한 Cy5가 표지된 HBsAg 및 표지되지 않은 HBsAg/BSA(bovine serum albumin)를 사용하여, BSA에 의하여는 상기 표지된 앵타머와 HBsAg에 의하여 발생하는 FRET 현상이 간섭받지 않으나, HBsAg에 의하여는 상기 표지된 앵타머와 HBsAg에 의하여 발생하는 FRET 현상이 간섭받아, 본 발명의 표지된 앵타머와 표지된 표적물질을 포함하는 조성물을 사용하면, 표적물질을 fmol 수준으로 검출할 수 있음을 확인하였다(도 2). 끝으로, 상기 수득한 Cy3로 표지된 앵타머, 상기 수득한 Cy5가 표지된 HBsAg 및 표지되지 않은 HBsAg를 사용하여, 표지되지 않은 HBsAg의 농도에 따라 도너 형광물질(앵타머)과 어셉터 형광물질(HBsAg) 사이의 결합수준이 변화되는지를 확인한 결과, 표지되지 않은 HBsAg의 농도가 증가할 수록 도너 형광물질인 Cy3 방출형광의 수준이 증가하고, 어셉터 형광물질인 Cy5 방출형광의 수준이 감소하므로, 본 발명의 표지된 앵타머와 표지된 표적물질을 포함하는 조성물을 사용하면, 표적물질을 fmol 수준으로 정량분석할 수 있음을 알 수 있었다(도 3).

[0028] 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 표적물질 정량분석용 키트를 제공한다.

[0029] 본 발명의 키트는 표적물질을 포함하는 시료로부터 표적물질의 수준을 정량분석하는데 사용될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 FRET 현상을 유발시키는 도너 또는 어셉터 역할을 수행하는 제1 형광물질이 표지된 표적물질 및 상기 제1 형광물질과 반응하여 FRET 현상을 유발시키는 제2 형광물질이 결합되고, 상기 표적물질과 결합할 수 있는 앵타머 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수도 있다.

[0030] 구체적인 일례로서, 본 발명의 표적물질 검출용 키트는 상기 표지된 앵타머가 기관 또는 비드 등의 지지체에 결합된 형태의 키트일 수 있다.

[0031] 본 발명의 용어 "기관(substrate)"이란, 앵타머를 부착시킬 수 있는 지지체를 의미한다. 상기 기관의 종류는 당업계에 통상적으로 사용되는 앵타머를 고정시킬 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 유리, 알루미늄, 세라믹, 탄소, 금, 은, 구리, 알루미늄, 화합물 반도체, 실리콘 등이 될 수 있다. 상기 기관은 앵타머를 결합시키기 위하여 표면 처리될 수 있는데, 상기 표면 처리는 앵타머를 고정화시키기 위한 관능기를 포함할 수 있도록 수행될 수 있으며, 바람직하게는 알데히드기, 카르복실기, 아민기 또는 티올기로 개질될 수 있다. 예를 들어, 유리 기관이나 반도체 기관을 사용할 경우, 실란 처리를 하여 아미노기(-NH², -NH² 등) 또는 티올기를 형성할 수 있고, 상기 실란 처리를 효과적으로 하기 위해 실란 처리 전에 하이드록실(hydroxyl)(-OH)기를 만들기 위한 처리를 할 수도 있다.

[0032] 본 발명의 용어 "비드(bead)"란, 앵타머를 부착시킬 수 있는 지지체의 일종으로서 구상의 형태를 나타내는 지지체를 의미한다. 상기 비드의 종류는 당업계에 통상적으로 사용되는 앵타머를 고정시킬 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 상술한 기관의 재질로서 사용되는 유리, 알루미늄, 세라믹, 탄소, 금, 은, 구리, 알루미늄, 화합물 반도체, 실리콘 뿐만 아니라, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리비닐 화합물, 염화비닐 화합물 등의 무기화합물 재질 또는, 세파로스, 세파텍스 등의 유기화합물 재질 등으로 구성될 수 있다. 상기 비

드는 상술한 기관과 마찬가지로 앵타머를 결합시키기 위하여 표면 처리될 수 있다.

[0033] 상기 비드는 기관에 비하여 앵타머의 반응성을 증대시킬 수 있는데, 한자리에 고정된 기관과는 달리 비드는 반응액내에서 능동적으로 움직이면서 표적물질과 앵타머를 더욱 효과적으로 결합할 수 있도록 한다.

[0034] 아울러, 본 발명의 키트는 상기 표지된 앵타머가 결합된 기관/비드 및 표지된 표적물질 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 보다 정확한 정량분석을 위하여, 내부 대조군으로 사용하기 위한 BSA, 표준곡선 작성에 필요한 농도별 표적물질 등을 단독으로 또는 조합하여 포함할 수 있다.

[0035] 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 표적물질 정량분석용 조성물 또는 표적물질 정량분석용 키트를 사용하여 시료로부터 표적물질을 정량분석하는 방법을 제공한다.

[0036] 구체적으로, 본 발명의 표적물질 정량분석방법은 (a) 도너 형광물질의 흡수파장의 빛을 조사하면서, 상기 표지된 앵타머에 표지된 표적물질과 표적물질의 존재를 확인하고자 하는 시료를 동시에 가하여 반응시키는 단계; 및, (b) 상기 반응물로부터 도너 형광물질 또는 어셉터 형광물질의 방출형광의 수준을 측정하는 단계를 포함한다. 이때, 상기 조성물 또는 키트에 시료 대신에 표적물질을 농도별로 가하여 반응시키고 이로부터 측정된 방출형광의 수준을 이용하여 표준곡선을 작성한 다음, 상기 (b) 단계에서 측정된 방출형광의 수준을 상기 표준곡선에 적용하여 시료에 포함된 표적물질의 수준을 정량분석하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상술한 표적물질 검출방법에 개시한 바와 같이, 보다 정확한 검출을 위하여, 도너 형광물질의 흡수파장의 빛을 조사하면서, 상기 표지된 앵타머에 표지된 표적물질을 가하여 반응시키고 상기 반응물에서 측정된 도너 형광물질의 방출형광의 수준을 내부 대조군으로 사용하거나 또는 도너 형광물질의 흡수파장의 빛을 조사하면서, 상기 표지된 앵타머에 표지된 표적물질과 상기 앵타머에 결합하지 않는 BSA 등의 물질을 가하여 반응시키고 상기 반응물에서 측정된 도너 형광물질의 방출형광의 수준을 내부 대조군으로 사용하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0037] 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 FRET 현상을 유발시키는 형광물질이 표지된 앵타머를 포함하는 표적물질 검출용 조성물을 제공한다.

[0038] 구체적으로, 본 발명의 표적물질 검출용 조성물은 (a) 형광공명 에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 현상을 유발시키는 도너 또는 어셉터 역할을 수행하는 제1 형광물질이 표지된 표적물질; 및, (b) 상기 제1 형광물질과 반응하여 FRET 현상을 유발시키는 제2 형광물질이 결합되고, 상기 표적물질과 결합할 수 있는 앵타머를 포함한다. 이때, 형광물질, 표적물질, 앵타머 등은 상술한 바와 동일하다.

[0039] FRET 현상을 발생시키는 표적물질이 각각 표지된 표적물질과 앵타머를 사용하면, 시료내에 표적물질이 존재하는지의 여부를 판단할 수 있다. 예를 들어, 도너의 흡수파장의 빛을 조사하는 조건에서 어셉터 형광물질이 표지된 앵타머에 도너 형광물질이 표지된 표적물질과 표적물질이 존재하는 것으로 기대되는 시료를 같이 가하여 반응시키고, 방출되는 형광을 측정할 경우, 대체로 도너에서 방출되는 형광이 검출되면, 표지된 표적물질과 경쟁적으로 앵타머에 결합할 수 있는 표적물질이 상기 시료에 존재한다고 판단할 수 있고, 대체로 어셉터에서 방출되는 형광이 검출되면, 표지된 표적물질과 경쟁적으로 앵타머에 결합할 수 있는 표적물질이 상기 시료에 존재하지 않는다고 판단할 수 있으며, 도너에서 방출되는 형광과 어셉터에서 방출되는 형광이 함께 검출되면, 상기 시료에 표지된 표적물질보다는 적은량의 표적물질이 존재하는 것으로 판단할 수 있다(도 1). 도 1은 표지된 앵타머와 표지된 표적물질의 결합에 의해 발생하는 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 현상이 표지되지 않은 표적물질에 의해 변화되는 원리를 도시한 개략도이다.

[0040] 상술한 바와 같이, 표지된 표적물질과 시료에서 유래된 표지되지 않은 표적물질은 표지된 앵타머에 경쟁적으로

결합될 수 있는데, 시료에 소량으로라도 표적물질이 존재할 경우, 표지된 표적물질과 경쟁적으로 표지된 앵타머에 결합할 수 있고, 이로 인하여 모든 표지된 앵타머에 표지된 표적물질이 결합됨으로써 발생되지 않는 도너 형광물질의 방출형광의 수준보다 증가된 수준으로 도너 형광물질의 방출형광을 검출할 수 있다. 따라서, 본 발명의 표적물질 검출용 조성물을 이용하면 시료에 표적물질이 존재하는지의 여부를 검출할 수 있다.

[0041] 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 표적물질 검출용 키트를 제공한다.

[0042] 본 발명의 키트는 표적물질을 포함하는지의 여부를 확인하고자 하는 시료로부터 표적물질을 검출하는데 사용될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 FRET 현상을 유발시키는 도너 또는 어셉터 역할을 수행하는 제1 형광물질이 표지된 표적물질 및 상기 제1 형광물질과 반응하여 FRET 현상을 유발시키는 제2 형광물질이 결합되고, 상기 표적물질과 결합할 수 있는 앵타머 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수도 있다.

[0043] 구체적인 일례로서, 본 발명의 표적물질 검출용 키트는 상기 표지된 앵타머가 기관 또는 비드 등의 지지체에 결합된 형태의 키트일 수 있다. 이때, 상기 기관 및 비드는 상술한 바와 동일하다.

[0044] 본 발명의 키트는 상기 표지된 앵타머가 결합된 기관 및 표지된 표적물질 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 보다 정확한 검출을 위하여, 내부 대조군으로 사용하기 위한 앵타머와 결합하지 않아 측정된 방출형광의 수준에 영향을 미치지 않는 BSA 등을 포함할 수 있다.

[0045] 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 표적물질 검출용 조성물 또는 표적물질 검출용 키트를 사용하여 시료로부터 표적물질을 검출하는 방법을 제공한다.

[0046] 구체적으로, 본 발명의 표적물질 검출방법은 (a) 도너 형광물질의 흡수파장의 빛을 조사하면서, 상기 표지된 앵타머에 표지된 표적물질과 표적물질의 존재를 확인하고자 하는 시료를 동시에 가하여 반응시키는 단계; 및, (b) 상기 반응물로부터 도너 형광물질 또는 어셉터 형광물질의 방출형광을 검출하는 단계를 포함한다. 이때, 상기 도너 형광물질의 방출형광이 검출되지 않는 경우에는 상기 시료에 표적물질이 존재하지 않는 것으로 판정하고, 상기 도너 형광물질의 방출형광이 검출되는 경우에는 상기 시료에 표적물질이 존재하는 것으로 판정할 수 있다. 또한, 보다 정확한 검출을 위하여, 도너 형광물질의 흡수파장의 빛을 조사하면서, 상기 표지된 앵타머에 표지된 표적물질을 가하여 반응시키고 상기 반응물에서 측정된 도너 형광물질의 방출형광의 수준을 내부 대조군으로 사용하거나 또는 도너 형광물질의 흡수파장의 빛을 조사하면서, 상기 표지된 앵타머에 표지된 표적물질과 상기 앵타머에 결합하지 않는 BSA 등의 물질을 가하여 반응시키고 상기 반응물에서 측정된 도너 형광물질의 방출형광의 수준을 내부 대조군으로 사용하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 내부 대조군으로서 측정된 도너 형광물질의 방출형광의 수준을 기준으로 하여 시료를 처리하여 얻어진 도너 형광물질의 방출형광 수준의 증가여부를 판정할 수 있다.

발명의 효과

[0047] 본 발명의 표적물질 검출 또는 정량분석용 조성물을 이용하면, 시료에 표적물질이 존재하는지의 여부 또는 시료에 포함된 표적물질의 수준을 fmol 수준에서 확인할 수 있고, 앵타머의 특성상 제조와 보관이 용이하므로, 보다 효과적으로 표적물질을 검출 또는 정량분석하는데 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 표지된 앵타머와 표지된 표적물질의 결합에 의해 발생하는 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 현상이 표지되지 않은 표적물질에 의해 변화되는 원리를 도시한 개략도이다.

도 2는 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)에 결합된 Cy5와 앵타머에 결합된 Cy3의 FRET 반응이 표지되지 않은 HBsAg에 의해 특이적으로 억제됨을 나타내는 그래프이다.

도 3은 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)에 결합된 Cy5와 앵타머에 결합된 Cy3의 FRET 반응결과가 표지되지 않은 HBsAg에 의해 농도의존적으로 변화됨을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 실시예 1: 항-HBsAg RNA 앵타머를 수득하기 위한 DNA 폴리뉴클레오타이드의 제작

[0051] 하기 서열번호 2의 DNA 폴리뉴클레오타이드를 PCR을 주형으로 하고, 서열번호 3 및 4의 프라이머를 사용한 PCR을 수행하여, 항-HBsAg RNA 앵타머를 수득하기 위한 서열번호 5의 DNA 폴리뉴클레오타이드를 수득하였다. 이때, PCR 조건은 95℃ 30초, 30 cycle(95℃ 15-30초, 45-68℃ 60초, 68℃ 1분) 및 68℃, 5분의 조건으로 수행하였다. 상기 수득한 PCR 산물을 에탄올 침전법으로 정제하여 수득하였다.

[0052] 주형: 5'-GTATGTGGGC TGAACCAAT CAGGTCCCAA TCCCAACAT ACACATGACC CGTCGTTTAC GATCATTATA GACGGCCATG ATTGACACGC AATCAACCCC CTATAGTGAG TCGTATTA-3'(서열번호 2)

[0053] 정방향 프라이머: 5'-GTATGTGGGCTGAAC-3'(서열번호 3)

[0054] 역방향 프라이머: 5'-TAATACGACTCACTA-3'(서열번호 4)

[0055] 5'-TAATACGACT CACTATAGGG GGTGATTGC GTGTCAATCA TGGCCGTCTA TAATGATCGT AAACGACGGG TCATGTGTAT GTTGGGGATT GGGACCTGAT TGAGTTCAGC CCACATAC-3'(서열번호 5)

[0056] 실시예 2: RNA 합성

[0057] 공지된 방법에 따라 GSMP(5'-deoxy-5'-thioguanosine-5'-monophosphorothioate) 키트(Invitro transcription)를 이용하여 상기 수득한 PCR 산물로부터 RNA를 합성하였다(Tetrahedron Letters 51:3446-3448,2010). 대략적으로, 상기 수득한 PCR 산물 40 μ l, 상기 키트에 포함된 전사완충액(10 X) 16 μ l, rNTP 혼합물(20 mM) 2 μ l, GSMP(40 mM) 100 μ l, RNase 억제제 2 μ l 및 증류수 20 μ l를 격렬하게 혼합하고, 원심분리한 다음, T7 RNA 중합효소 20 μ l를 가하고 37℃에서 4 내지 5시간 동안 반응시켜서, GSMP-RNA(서열번호 1)를 합성하고, 합성된 GSMP-RNA를 에탄올 침전법으로 정제하여 수득하였다.

[0058] 앵타머: 5'-GGUUGAUUGC GUGUCAAUCA UGGCCGUCUA UAAUGAUCGU AAACGACGGG UCAUGUGUUA GUUGGGGAU GGGACCUGAU UGAGUUCAGC CCACAUAC-3'(서열번호 1)

[0059] 상기 GSMP-RNA 10 μ l에 ALP(Alkaline phosphatase) 1 μ l, NBE 완충액 10 μ l 및 DEPC water 80 μ l를 가하여 격렬하게 혼합한 다음, 37℃에서 1시간 동안 반응시키고, 상기 반응물에 EGTA 2 μ l를 가한 후, 65℃에서 10분동안 반응시켜서, B형 간염바이러스 표면항원인 HBsAg에 특이적으로 결합할 수 있는 앵타머인 5'-HS-RNA를 수득하였다.

[0060]

실시예 3: Cy3로 표지된 앵타머의 수득

[0061]

PBS 완충액(pH 7.2)에 DMSO에 용해된 sulfo-SMCC 50 nmole 및 Cy3 500 nm을 가하고 상온에서 2시간동안 반응시켜 1차 반응물을 수득하고, 상기 1차 반응물에 상기 실시예 2에서 수득한 앵타머 5 nmole을 가하여 상온에서 하룻밤동안 반응시켜 2차 반응물을 수득하였다. 상기 2차 반응물을 30k Armicon에 가하여 13,000rpm으로 10분간 원심분리하여 잔여물을 제거하고, 이에 세척용 완충액 600 μ l를 가하고 13,000rpm으로 30분간 원심분리하는 과정을 4회 반복하였다. 그런 다음, 용출완충액 300 μ l를 가하고 13,000rpm으로 10분간 원심분리하는 과정을 2회 반복하여 Cy3가 표지된 앵타머를 용출하였다. 상기 용출된 시료를 회전증발기에 적용하여 농축하고, PBS 완충액(pH 7.2)으로 희석하여 Cy3가 표지된 앵타머를 수득하였다.

[0062]

실시예 4: Cy5로 표지된 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)의 수득

[0063]

NHS 에스터 반응을 이용하여 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)을 Cy5로 표지하였다.

[0064]

구체적으로, 1 nmole HBsAg를 0.1 M 탄산염 완충액(pH 9.3)으로 희석시키고, 상기 희석액과 DMSO에 용해된 Cy5-NHS 에스터를 1:8(v/v)로 혼합하였다. 상기 혼합물을 압조건 및 실온에서 4시간 동안 교반하고, 이를 vivaspin에 적용한 후, 3회 이상 반응완충액(0.1 M sodium acetate pH 9.3)으로 세척하였으며, 용출액(50 mM Tris-HCl pH 7.5)으로 용출시키고, 용출된 시료의 흡광도를 UV scan을 사용하여 분석하였다. 이때, HBsAg에 표지된 Cy5의 비율과 물농도는 Beer's law에 기초하여 산출하고, 물흡광계수는 표면항원의 아미노산 서열에 기초하여 추정하였다. 그 결과, 단백질에 대한 형광물질의 평균비율은 1.01이고, 표지된 단백질의 평균농도는 0.8mM 이었다.

[0065]

끝으로, Cy5로 표지된 HBsAg를 암실에서 4 °C에 보관하였다.

[0066]

실시예 5: FRET 현상을 이용한 HBsAg 검출

[0067]

상기 실시예 3에서 수득한 Cy3로 표지된 앵타머(80 pmol / 200 μ l)를 반응완충액(20mM Tris-HCl, 140mM NaCl 및 5mM MgCl)에 가하고, 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, 상기 반응물에 Cy5로 표지된 HBsAg(5 pmol / 600 μ l)과 0 내지 50pM의 표지되지 않은 HBsAg 또는 15 내지 45pM의 표지되지 않은 BSA를 동시에 가하고 4°C에서 12시간 동안 반응시킨 후, 반응물 200 μ l를 취하여 분광광도계로 측정하였다(도 2). 도 2는 B형 간염 바이러스 표면항원(HBsAg)에 결합된 Cy5와 앵타머에 결합된 Cy3의 FRET 반응이 표지되지 않은 HBsAg에 의해 특이적으로 억제됨을 나타내는 그래프이다. 도 2에서 보듯이, 대조군으로 사용한 BSA를 처리할 경우에는 FRET가 전혀 영향을 받지 않았으나, 표지되지 않은 HBsAg를 사용한 경우에는 시료에 포함된 표지되지 않은 HBsAg의 농도가 증가할 수록 이에 반비례하여 HBsAg에 결합된 Cy5와 앵타머에 결합된 Cy3의 FRET 반응이 저해될 뿐만 아니라, 500 fmoI(0.5 pmol) 내지 50 pmol의 농도로 시료에 포함된 HBsAg를 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0068]

따라서, 본 발명의 표지된 앵타머와 표지된 표적물질을 포함하는 조성물을 사용하면, 표적물질을 fmoI 수준으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0069]

실시예 6: FRET 현상을 이용한 HBsAg 정량분석

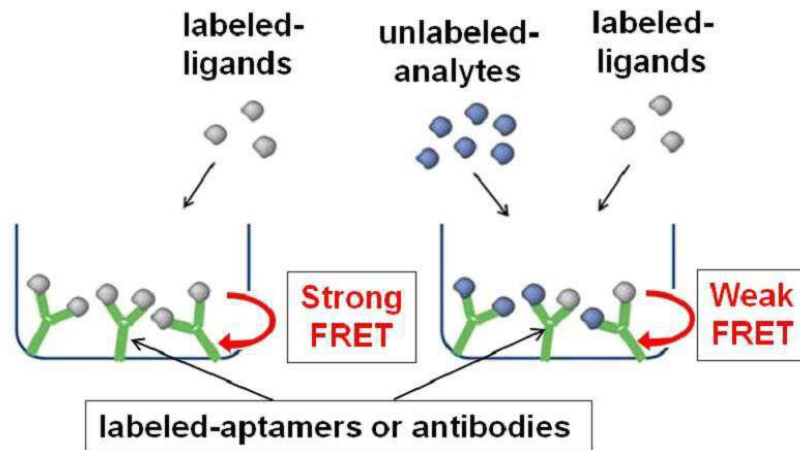
[0070]

상기 실시예 3에서 수득한 Cy3로 표지된 앵타머(80 pmol / 200 μ l)를 반응완충액(20mM Tris-HCl, 140mM NaCl 및 5mM MgCl)에 가하고, 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, 상기 반응물에 Cy5로 표지된 HBsAg(5 pmol / 600 μ l)과 0 내지 50pM의 표지되지 않은 HBsAg를 동시에 가하고 4°C에서 12시간 동안 반응시킨 후, 반응물 200 μ l를 취하여 분광광도계로 측정하였다(도 3). 도 3은 B형 간염바이러스 표면항원(HBsAg)에 결합된 Cy5와 앵타머에 결합된 Cy3의 FRET 반응결과가 표지되지 않은 HBsAg에 의해 농도의존적으로 변화됨을 나타내는 그래프

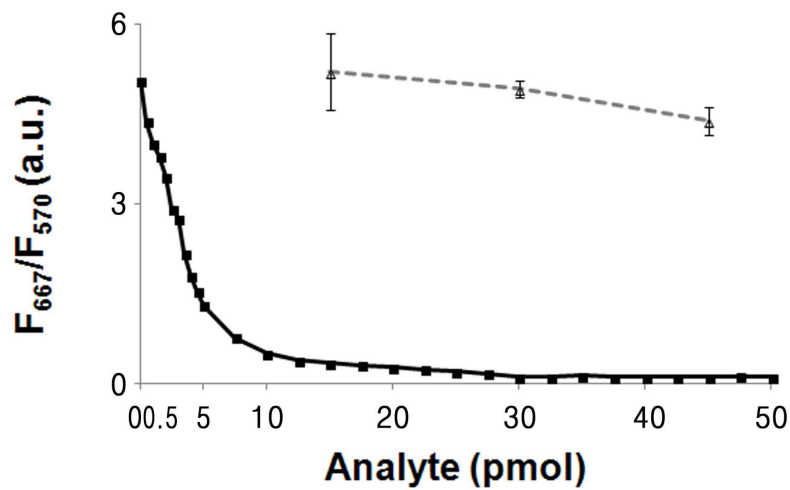
이다. 도 3에서 보듯이, 표지되지 않은 HBsAg의 농도가 증가할 수록 도너 형광물질인 Cy3 방출파장의 수준이 증가하고, 엑셉터 형광물질인 Cy5 방출파장의 수준이 감소함을 확인하였다. 이는 표지되지 않은 HBsAg가 도너 형광물질(애포타머)과 엑셉터 형광물질(HBsAg) 사이의 결합에 간섭하여, Cy3와 Cy5를 격리시킴으로써 나타나는 것으로 분석되었다.

도면

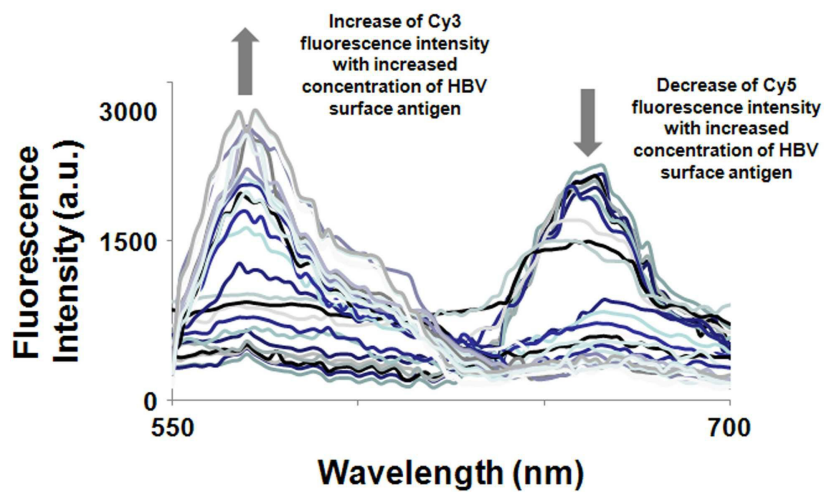
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Composition for detecting or quantitative analysis comprising
aptamer tagged by fluorescent substance with fluorescence
resonance energy transfer

<130> PA130982/KR

<160> 5

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 98

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> aptamer

<400> 1

gguugauugc gugucaauca ug gccgucua uaaugaucgu aaacgacggg ucauguguau

60

guuggggauu gg gaccugau ugaguucagc ccacauac

98

<210> 2

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> template

<400> 2

gtatgtgggc tgaactcaat caggtcccaa tcccaacat acacatgacc cgtcgtttac

60

gatcattata gacggccatg attgacacgc aatcaacccc ctatagtgag tcgtatta	118
<210> 3	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer	
<400> 3	
gtatgtgggc tgaac	15
<210> 4	
<211> 15	
<212> DNA	
<213>	
Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer	
<400> 4	
taatacgact cacta	15
<210> 5	
<211> 118	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR product	
<400> 5	
taatacgact cactataggg ggttgattgc gtgtcaatca tggccgtcta taatgatcgt	60
aaacgacggg tcatgtgtat gttggggatt gggacctgat tgagttcagc ccacatac	118