

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2017-0101847 (43) 공개일자 2017년09월06일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/68 (2006.01)	(71) 출원인 김성천 서울특별시 마포구 마포대로24길 16, 109동 1304호(아현동, 공덕자이아파트)	
(52) CPC특허분류 C12Q 1/6876 (2013.01) C12Q 1/6834 (2013.01)	(72) 발명자 김성천 서울특별시 마포구 마포대로24길 16, 109동 1304호(아현동, 공덕자이아파트)	
(21) 출원번호 10-2017-0104267	(74) 대리인 특허법인 태웅	
(22) 출원일자 2017년08월17일 심사청구일자 없음		

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 분자계수 방법 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 분자계수기술을 이용한 생체분자 분석방법으로, 구체적으로 표적분자를 인지할 수 있는 프로브와 다양한 색상의 패턴을 형성하는 신호발생영역으로 탐침을 제조하여, 상기 표적분자에 결합한 탐침을 분석함으로써, 생체시료에 포함된 복수의 표적분자들을 한 번의 검사로 분석하여 생체시료에서 표적분자의 생물학적 의미를 결정하는 방법 및 장치를 제공한다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2525/191 (2013.01)

C12Q 2525/205 (2013.01)

C12Q 2600/154 (2013.01)

C12Q 2600/156 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

신호발생물질이 표지된 이중가닥핵산(H 신호태그) 또는 H 신호태그들의 조합으로 구성된 신호발생영역으로 세포 또는 바이러스를 포함하는 표적분자를 지시하고 하나 또는 그 이상의 표적분자를 분자 계수하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 하나 또는 그 이상의 표적분자의 탐색, 동정, 정량 및 생물학적 의미 결정 분야로 생체시료에서 표적분자, 탐색, 정량 및 생물학적 의미 결정을 하기 위한 방법, 키트 및 시스템에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 표적분자를 지시하는 색상지시마코드 신호의 증강을 위한 재료 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 본 발명은 일반적으로 시료에서 생체분자들의 탐색, 동정, 정량 및 생물학적 의미 결정 분야로 분자계수에 의해 구체적으로 구현하는 내용이다.

[0003] 세포에서 DNA에 암호화된 유전정보는 DNA 자신의 복제에 의해 자손에게도 유전, 전달되고, 유전정보가 DNA에서 RNA, 그리고 RNA에서 단백질로 전달되어 발현된다. 모든 세포는 유전정보에 관련된 생체분자들로 구성되어 있고 이들의 존재양상은 생물체 기능에 중요한 영향을 준다.

[0004] 표적분자(바이오마커) 또는 표적분자의 세트는 일반적으로 임상적으로 확인되거나, 그것이 선택된 본래의 의도된 용도를 위한 신뢰할 수 있는 생체분자이다. 생체분자는 질병의 발생 또는 진행과 병행하여 분비되거나 세포가 파괴되어 나오는 바이오마커들을 포함할 수 있고, 조직 또는 병소에 대한 말단 조직으로부터 혈류로 쉽게 퍼진다.

[0005] 대표적인 생체분자인 유전물질인 핵산 및 단백질이다. 유전정보가 발현과정에 영향을 주는 염색체 이상, DNA 메틸화 및 유전자 변이(Gene Variation) 등이 있다. 유전자변이는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)와 구조변이(Structural Variation) 등이 있다. SNP은 DNA 염기서열에서 하나의 염기서열(A, T, G, C)의 차이를 보이는 유전적 변화 또는 변이를 의미한다. 구조변이는 결실, 역위, 첨가, 복제 등과 같은 DNA 구조변이를 의미한다. 유전자 변이는 표현형(phenotype)의 변화, 질병에 대한 민감성, 그리고 치료 약제에 대한 반응의 차이 등 개체 간의 차이를 결정짓는다고 알려졌으며, 특히 질환 발생과 진행과정에 관여하는 변이들을 질환연관 유전적 변이(Disease-associated Genetic Variants)라고 칭한다.

[0006] 각각의 세포에는 5만 내지 10만 개 정도의 유전자가 있지만, 세포는 선택적으로 유전자를 사용한다. 그 중 상당수는 세포 자신의 생명유지활동이나 일상적인 활동을 하기 위한 유전자이다. 내인성 표준 발현 유전자는, 특정 유전자의 기능을 밝히거나, 특정 기능의 유전자를 탐색하거나, 특정 조건의 생물체의 발현 양상 작성 및 그 외의 다양한 분자생물학적 목적에 의해, 특정 혹은 다수의 유전자 발현량의 비교를 위해 개발된 전령 RNA(messenger RNA; 이하 mRNA)의 정량분석을 이용하는 다양한 유전자발현 측정법은 개발되고 있다.

[0007] 대표적인 고속병렬분석 기술인 DNA 마이크로어레이는 단지 혼성화 방식에 의해서 표적 서열을 검출하기 때문에 교차반응에 의한 진양성 문제가 발생되어, 혼성화 시그널의 신뢰도를 개선하여야 하는 문제점이 있다. 또한, 종래의 마이크로어레이의 경우 혼성화 방식에 의해서 검출을 하기 때문에 혼성화 후 까다로운 세척 과정이 요구되는 문제점이 있으며, 혼성화 전에 표적서열을 단일가닥으로 만드는 과정이 필수적으로 요구된다. 한편, 최근에 발표된 on-chip PCR은 혼성화 또는 probe extension방식에 의해 검출하기 때문에, 기존 마이크로 어레이와 같이 heterogenous assay system이며, 실시간 검출이 불가능 하고 정확한 정량이 어렵다는 문제점이 있다.

[0008] 생체분자는 핵산이외에도 단백질, 펩티드, 탄수화물, 지질(lipid), 다당류, 당단백질, 호르몬, 수용체, 항원, 항체, 바이러스, 병원균, 독성 물질, 기질, 대사산물, 전이 상태 유사체(transition state analog), 보조 인자(cofactor), 저해제, 약, 염료, 영양분, 성장 인자, 세포, 조직 등을 포함하고, 이론적으로는 그 범위는 제한이 없으며 거의 모든 화학적 또는 생물학적 작동체(effector)가 될 것이며 다양한 크기의 분자들을 포함하고 있으

며 이들에 대한 효율적인 실시간 검출 및 정확한 정량에 대한 개발이 요망되고 있다.

- [0009] 다양한 생체분자 분석법은 검출감도의 향상 및 다중 분석능의 향상에 있어서 발전을 거듭했지만, 여전히 분석비용절감, 분석시간의 단축, 민감도 향상 및 재현성 증대라는 기술적 과제에 직면해 있다.
- [0010] 궁극적으로 생체시료의 생체분자 분석하거나 총체적으로 분석하는 연구는, 의학적으로 질병에 관련된 생체분자 분석 및 프로파일을 분석함으로써, 질병을 진단할 수 있는 생체분자, 치료성적을 분석할 수 있는 생체분자, 질병 발병 및 진행에 중요한 역할을 하는 생체분자, 질병에 대한 감수성 관련된 생체분자, 및 신약개발의 표적분자를 구명하는 것에 사용할 있을 것이다.
- [0011] 상술한 종래의 생체분자들을 각각 독립적으로 분석하는 기술들의 문제점을 극복하여, 생체분자들을 보다 개선된 효율성 및 민감도로 실시간 분석할 수 있는 기술을 개발하기 위하여 연구한 결과, 본원 발명과 같이 다양한 종류의 생체분자들을 분석할 수 있는 방법을 개발함으로써 본 발명의 목적을 달성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 신호발생물질이 표시된 이중가닥핵산 그리고 신호발생물질이 표시되고 구성 염기쌍사이에 교차결합이 있는 이중가닥핵산인 신호태그, 및 이들로 구성된 신호발생영역을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 복합체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 효율적인 생체분자를 분석하고 생물학적 의미를 결정하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 생체분자는 생체를 구성하고 기능을 담당하는 분자로 가장 주된 것은 단백질, 핵산, 다당류 및 지질과 같은 크기가 큰 거대 분자들과 저분자물질로 아미노산, 뉴클레오타이드, 단당류, 비타민 등의 유기물질, 철, 구리 등의 금속, 무기이온 등이다. 인간의 모든 세포는 생체분자로 구성되어 있고 이들의 존재양상은 생물체 기능에 중요한 영향을 준다.
- [0016] 일반적으로 임상적으로 확인되거나, 그것이 선택된 본래의 의도된 용도를 위한 신뢰할 수 있는 생체분자들이 표적분자(바이오마커) 또는 표적분자의 세트이다. 생체분자는 질병의 발생 또는 진행과 병행하여 분비되거나 세포가 파괴되어 나오는 표적분자들을 포함할 수 있고, 조직 또는 병소에 대한 말단 조직으로부터 혈류로 쉽게 퍼진다.
- [0017] 본 발명에서 프로브는 표적분자들의 동정 및 정량을 위한 분자로 표적분자인 유전자 또는 단백질, 펩티드, 탄수화물, 지질(lipid), 다당류, 당단백질, 호르몬, 수용체, 항원, 항체, 바이러스, 병원균, 독성 물질, 기질, 대사산물, 전이 상태 유사체(transition state analog), 보조 인자(cofactor), 저해제, 약, 염료, 영양분, 성장 인자, 세포, 조직 등을 포함하고, 이론적으로는 그 범위는 제한이 없으며 거의 모든 화학적 또는 생물학적 작동체(effector)가 될 것이며 어떤 크기의 분자들이든 사용될 수 있는 분자의 동정 및 계수를 위한 분자를 의미한다.
- [0018] 바람직하게 표적분자가 핵산인 경우는 프로브는 단일가닥핵산이며 상기 핵산이 아닌 생체분자인 경우는 리간드로일 수도 있다.
- [0019] 리간드는 특정 물질과 결합하고, 상호 작용 또는 그렇지 않으면 특정 물질과 연합하여 특정 물질의 기능에 작용하고, 변화시키고 또는 무효화하는 하나 또는 그 이상의 리간드에 특이적인 분자 또는 분자의 클러스터를 포함하는 구조를 언급한다. 리간드는 대표적으로 항체, 펩타이드, 핵산 및 압타머 등이 있다. 항체는 항원의 항원결정부(epitope)과 특이적 결합을 하여 항원-항체 반응을 일으키는 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함한다.
- [0020] 압타머(aptamer)는 저분자 화합물로부터 단백질까지 다양한 종류의 물질에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특성을 가지는 작은 (20~60 뉴클레오타이드) 단일가닥핵산 (DNA 혹은 RNA) 조각을 뜻한다.
- [0021] 표적분자가 핵산인 경우 프로브는 표적분자인 핵산과 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는

수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며, 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 표적분자 핵산과 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 표적분자 핵산의 존재를 예측할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, 용어, "핵산 정량"은 생물학적 시료에서 마커유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로 mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(northern blotting) 또는 DNA 마이크로어레이 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 생체정보를 암호화하고 있는 DNA상의 유전자 변이는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)와 구조변이(Structural Variation) 등이 있다. 유전자 변이는 표현형(phenotype)의 변화, 질병에 대한 민감성, 그리고 치료 약제에 대한 반응의 차이 등 개인 간의 차이를 결정짓는다고 알려졌으며, 특히 질환 발생과 진행과정에 관여하는 변이들을 질환연관 유전자변이(Disease-associated Genetic Variants)라고 칭한다. SNP는 DNA 염기서열에서 하나의 염기서열 (A, T, G, C)의 차이를 보이는 유전적 변화 또는 변이를 의미한다. 구조변이는 결실, 역위, 첨가, 복제 등과 같은 DNA 구조변이를 의미한다.

[0024] 또한 본 발명에 있어서, 핵산의 메틸화여부 분석은 핵산에 바이설파이트(bisulfite)를 처리하여 발생하는 핵산의 뉴클레오타이드 변형을 포함할 수 도 있다. 상기 핵산에 바이설파이트(bisulfite)를 처리하여 메틸화되지 않은 시토신(cytosine) 잔기는 우라실(uracil) 잔기로 변형되고 메틸화 시토신 잔기는 변형이 없는 상태로 존재한다. 이런 바이설파이트(bisulfite)의 처리 전후의 뉴클레오타이드 변화를 분석할 수 있으며 이 결과로 핵산의 메틸화 유무를 확인할 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서, "단백질 정량"이란 생물학적 시료에서의 표적분자 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 유전자에서 발현된 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 단백질의 양을 확인할 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴블랏(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석법(Radioimmunoassay), 방사면역확산법(Radioimmunoassay), 오우크레로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(Rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complete fixation assay), FACS, 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 현재 생체분자 (DNA, RNA, 단백질, 바이러스, 세균)의 정량은, 단백질, 바이러스 및 세균의 경우는 효소면역측정법(ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay) 와 같이 효소와 기질에 의한 존재신호의 증폭이거나 DNA 와 RNA와 같은 핵산은 PCR과 같은 핵산 증폭 및 형광물질을 사용하여, 증폭된 신호를 기준으로 하고 있다.

[0027] 이와 같은 기존의 방법들은 존재 신호의 증폭이나 형광량으로 전체를 분석하는 방식으로 민감도나, high-throughput, 정확도는 한계가 있다. 생체분자를 정량함에 있어서 가장 정확한 방법은 생체분자를 하나씩 카운트하는 방법이 가장 정확하다. 증폭하지 않고, 각 생체분자를 하나씩 카운트해서 총 합을 계산을 한다면 그것만큼 정확한 정량이 될 것이다.

[0028] 본 발명에서는 상기 생체분자의 분석방법의 한계를 극복하기 위해 하나 또는 그 이상의 표적분자를 카운트하는 방법으로 동시에 표적분자들을 동정 및 정량하는 방법, 키트를 제공하고자한다.

[0029] 상기 표적분자를 카운트하여 생체분자인 mRNA를 계수하여 정량하는 방법(미국 특허등록 번호 US 8,519,115 B2, 및 Nat Biotechnol. 2008 Mar;26(3):293-4)이 제시되고 있고 nCounter Analysis system이 출시되었다.

[0030] 상기 nCounter Analysis system의 색상지시바코드(Digital Color-coded Barcode System)는 긴 단일가닥 DNA (약 6.4kb)에 여러 개의 짧은 단일가닥 RNA(약 0.9kb)인 신호태그 (signal tag)들이 상보적 결합으로 만들어진 이중가닥핵산으로 염기쌍 간에 수소결합으로 연결된 구조체인 신호발생영역(signal region)인 색상지시바코드이다. nCounter Analysis system 신호태그의 골격은 DNA-RNA 하이브리드로 신호태그의 제조는 공지된 방법으로 실시할 수도 있다. 본 발명에서는 신호태그가 연속으로 구성된 구조체를 "염기쌍 신호발생영역"라고 지칭하였다. 표적분자 분자계수하는 리포터는 신호를 발생하는 단일가닥 RNA인 신호태그가 상보적인 단일가닥 DNA에 상보적인 염기쌍의 수소결합으로 결합시키는 형태를 기본으로 하여 연속적으로 단위체가 연결된 신호발생영역과 mRNA를 인지하고 상보적으로 결합하는 단일가닥핵산으로 구성한다(미국 특허등록 번호 US 8,519,115 B2).

- [0031] 상기 nCounter Analysis system의 색상지시바코드는 긴 단일가닥 DNA(약 6.4kb)에 여러 개의 짧은 단일가닥 RNA(약 0.9kb)인 신호태그들이 상보적 결합으로 만들어진 이중가닥핵산으로 염기쌍 간에 수소결합으로 연결된 구조체인 신호발생영역이다.
- [0032] 이중가닥핵산을 구성하는 염기쌍 간의 수소결합의 안정성은 온도, pH, 염, 이온 강도(ionic strength) 등의 영향을 받는다. nCounter Analysis system의 표적분자를 분석하는 과정은 온도, pH, 염, 이온 강도(ionic strength) 등을 고려해야 하는 내재적인 한계가 있다. 또한, 주형을 대상으로 한 체외전사(in vitro transcription) 방법으로 여러 종류의 RNA 제조 공정과 M13 DNA와 제조된 RNA들의 혼성화 공정 등의 복잡한 제조공정으로 색상지시바코드를 제조하여 배치(batch)간 변이(variation)가 생길 가능성이 있다.
- [0033] 본 발명은 nCounter Analysis system의 염기쌍 신호발생영역의 한계를 극복하기 위해, 새로운 신호발생영역을 제안하고 본 신호발생영역을 이용한 제1 탐침으로 하나 또는 그 이상 표적분자를 분석하는 방법 및 키트를 제공하고자한다.
- [0034] 본 발명은 효율적인 분자계수를 위해 표적분자와 결합한 제1 탐침의 수확을 용이하게 하기 위한 제2 탐침을 사용하여 하나 또는 그 이상의 표적분자를 분석하는 방법 및 키트를 제공하고자한다.
- [0035] 구체적으로 표적분자와 결합한 제1 탐침과 제2 탐침 복합체를 분석하여 하나 또는 그 이상의 표적분자를 동시에 동정 및 정량하는 방법을 제공하고자한다.
- [0036] **1. 구성물질**
- [0037] **1-1. 제1 탐침**
- [0038] 본 발명은 신호발생물질이 표지된 이중가닥핵산(H 신호태그), 또는 신호발생물질이 표지되고 구성 염기쌍 간에 공유결합이 있는 이중가닥핵산(C 신호태그)인 구성단위 신호태그(signal tag)로 이루어진 색상지시바코드인 신호발생영역(signal region)으로 구성된 제1 탐침(1st probe)으로 하나 또는 그 이상의 표적분자를 동정, 계수 및 분석하는 방법 및 키트를 제공한다.
- [0039] 본 발명은 상기 신호태그로 신호발생영역을 구성할 수 있다. 바람직하게, 신호태그의 골격은 수소결합으로 이루어진 이중가닥핵산인 신호태그 또는 구성 염기쌍 간에 공유결합이 있는 이중가닥핵산일 수도 있다. 상기 이중가닥핵산은 단일가닥DNA와 단일가닥DNA, 단일가닥RNA와 단일가닥RNA, 단일가닥DNA와 단일가닥RNA, 단일가닥핵산과 단일가닥PNA(peptide nucleic acid)를 특징으로 한다.
- [0040] 본 발명은 상기 신호발생영역을 사용하여 제1 탐침을 제조할 수 있다. 제1 탐침은 표적분자를 인지하는 제1 프로브(1^{ST} P)와 신호발생영역(SR)으로 구성된 비교정 제1 탐침, 또는 비교정 제1 탐침에 부가적인 구성성분을 갖는 고정 제1 탐침이 두 종류가 있을 수 있다.
- [0041] 비교정 제1 탐침은 세포 혹은 바이러스 동정 및 계수에, 고정 제1 탐침은 단백질, 유전자변이, 메틸화 DNA, 염색체이상 또는 mRNA 등을 동정 및 정량에 유용할 수 있다.
- [0042] 신호발생물질이 표지된 이중가닥핵산인 H 신호태그는 비교정 제1 탐침에, 신호발생물질이 표지되고 구성 염기쌍 간에 공유결합이 있는 이중가닥핵산인 C 신호태그는 비교정 제1 탐침과 고유 제1 탐침에 유용할 수도 있다.
- [0043] <도1>은 본 발명에 사용되는 제1 탐침을 나타내고 있다.
- [0044] 본 발명은 비교정 제1 탐침은 표적분자를 적어도 인지하는 제1 프로브(1^{ST} P)가 신호발생영역(SR)의 한 쪽 끝에 부착하여 제조하는 방법 및 이를 이용한 하나 또는 그 이상의 표적분자를 동시에 동정 및 정량하는 방법, 키트를 제공하고자한다.
- [0045] <도1>은 비교정 제1 탐침의 구성으로 5'-제1 프로브(1^{ST} P)-신호발생영역(SR)-3' 구성이고 본 발명에 사용되는 제1 탐침의 일반식(I)은 다음과 같다.
- [0046] $5'-1^{ST} P-SR-3'$ (일반식 I)
- [0047] <도1>의 고정 제1 탐침은 제1 프로브(1st probe: 1^{ST} P), 고정영역(fixation region: FR), 신호발생영역(signal region: SR), 및 결합태그(affinity tag: AT)로 구성된다. 상기 구성단위는 공유 또는 비공유 수

단에 의해 상기 제1탐침에 결합될 수 있다.

- [0048] 본 발명은 고정 제1 탐침은 5'-제1 프로브(1^{ST} P)-고정영역(FR)-신호발생영역(SR)-결합태그(AT)-3' 또는 5'-결합태그(AT)-신호발생영역(SR)-고정영역(FT)-제1 프로브(1^{ST} P)-3' 구조이며 이를 이용한 복수의 표적분자를 동시에 동정 및 정량하는 방법, 키트를 제공하고자한다.
- [0049] $5'-1^{ST} P-FR-SR-AT-3'$ (일반식 II)
- [0050] $5'-AT-SR-FT-1^{ST} P-3'$ (일반식 III)
- [0051] 상기 제1 탐침을 구성하는 구성단위 사이에 있는 스페이스(spacer)는 그 길이는 5~1,000개의 뉴클레오티드로 구성된 단일가닥핵산이며 제1 탐침의 반응성 그룹에 결합하는 리간드 혹은 표적분자의 속성에 따라 그 길이를 결정할 수도 있다.
- [0052] 상기 제1 프로브는 단일가닥핵산 또는 단백질이 바람직하며, 보다 구체적으로는 DNA, RNA, PNA, 압타머(apptamer), 항원, 항체, 합텐 등을 포함한다.
- [0053] 상기 제1 탐침의 반응성 그룹은 표적표자 또는 리간드의 반응성 그룹과 선택적으로 커플링하기에 적합한 임의의 친핵성 또는 친전자성 그룹을 포함하며, 반응성 친핵성 그룹인 디케톤, 아실 베타-락탐, 활성 에스테르, 할로케톤, 사이클로헥실 디케톤 그룹, 알데하이드 또는 말레이미드를 형성하기 위해 배열되는 하나 이상의 C=O 그룹을 포함한다. 다른 그룹은 락톤, 무수물, 및 알파-할로아세트아미드 또는 에폭사이드 및 기타의 공지된 친전자성 그룹이 포함된다. 바람직한 반응성 그룹은 아미노그룹, 카르복실그룹, 치올그룹 등을 포함한다.
- [0054] 본 발명의 고정 제1 탐침은 고정영역(FR)인 골격을 포함할 수도 있다. 고정영역은 단일가닥핵산 단위체가 반복적으로 연결된 구조로 신호발생영역과 공유결합을 하며 10~50개의 뉴클레오티드로 구성된 단위가 앞뒤로 반복적으로 5~10개의 단위체가 연속적으로 연결된 구조가 바람직할 수도 있다. 구성 단위체들의 T_m (melting temperature) 변이를 최소화하도록 염기서열을 구성하며 바람직한 T_m 의 차이는 $1 \sim 2^\circ C$ 이다. 고정영역의 염기서열은 고정핵산분자의 염기서열과 상보적 결합을 하여 제1 탐침을 고정지지체에 고정시키는 역할을 수행할 수 있다. 고정영역은 신호발생영역의 5' 끝 또는 3' 끝 중 어느 한 곳에 결합할 수 있으며 이미지 또는 탐지용 신호발생영역을 포획하거나 고정하는 역할을 하고 고정영역의 상보적인 염기서열을 사용하여 고체 기판에 결합할 수 도 있다. 제1 탐침 또는 제1 탐침-표적 복합체의 affinity-정제 또는 고정하는 핵산으로 고정영역 또는 제1 탐침 또는 표적분자에 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 사용한다. 제1 탐침은 정제 및/또는 고정(고체 표면에)을 위한 결합태그 역할을 하는 고정영역이 최소한 하나 이상으로 구성된다.
- [0055] 본 발명의 고정 제1 탐침 결합태그는 바이오틴(biotin)일 수도 있다. 바이오틴은 신호발생영역의 5'쪽 또는 3'쪽 끝에 부착된다. 바이오틴은 아비딘(avidin)과의 강한 친화력과 신호 증폭효과로 감도를 증폭할 수 있어 바이오틴/아비딘 시스템이 생체분자 분석법에서 널리 사용되고 있다. 또한 바이오틴은 아비딘이 코팅된 고체 기판에 제1 탐침이 결합할 수 있도록 하여 이미지 또는 탐지용 신호발생영역을 포획하거나 고정하는 역할을 한다.
- [0056] 바이오틴 구조에서 아비딘과의 강력한 비공유결합에 크게 작용을 하는 부분은 ureido ring이므로, valeric acid side chain의 carboxyl group을 통한 biotinyl derivatives로의 변형이 가능하다. 아비딘은 당단백질로 tetrameric structure를 가지기 때문에 1분자 당 4개의 바이오틴 결합이 가능하다.
- [0057] 신호발생영역의 한 쪽은 바이오틴, 다른 끝은 고정영역 또는 스페이스와 이들 모두가 결합할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 신호발생영역인 색상지시바코드는 신호발생물질로 이루어진 신호태그가 기본 구성단위이며 표적분자를 특이적으로 지시하도록 신호태그를 연속적으로 공유결합으로 연결한 구조체로 여기서, 바람직하게 2~10 개의 신호태그로 구성될 수 있다. 신호발생영역은 수많은 신호발생물질로 신호태그를 표지하고 여러 종류의 신호태그를 연속적으로 연결하여 신호강도를 강화할 수 도 있다.
- [0059] (신호태그)
- [0060] 색상지시바코드인 신호발생영역의 구성단위인 신호태그의 골격은 나노섬유 또는 이중가닥핵산 등일 수 있으며 바람직하게, 신호태그의 골격은 이중가닥핵산일 수도 있다.
- [0061] 이중가닥핵산을 구성하는 신호태그의 염기쌍사이에 수소결합으로 결합된 경우는 "H 신호태그", 또는 염기쌍사

이에 공유결합이 있는 경우는 "C 신호태그"로 구분할 수 있다. C 신호태그는 H 신호태그보다 이중가닥핵산의 안정성이 높아 다양한 조건에서 표적분자의 정량 분석을 할 수 있다.

- [0062] 본 발명에서 사용되는 신호태그의 골격은 이중가닥핵산이다. 본 발명의 이중가닥핵산은 상기 이중가닥핵산은 단일가닥DNA와 단일가닥DNA, 단일가닥RNA와 단일가닥RNA, 단일가닥DNA와 단일가닥RNA, 단일가닥핵산과 단일가닥PNA(peptide nucleic acid)를 특징으로 한다. 이중가닥핵산을 구성하는 단일가닥핵산은 유기합성이나 효소학적인 방법으로 제조할 수 있다.
- [0063] 이중가닥핵산을 구성하는 단일가닥핵산을 제조하기 위해서는, 모두 4종의 뉴클레오타이드 또는 변형된 뉴클레오타이드 혼합물을 합성 과정중의 각 뉴클레오타이드 부가 단계에 첨가하여, 변형된 염기를 포함하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 어떤 변형된 단일가닥핵산을 상기에 언급된 방법, 장치 및 키트 모두에서 사용할 수 있다.
- [0064] 이중가닥핵산의 가장 대표적인 DNA는 나선구조를 이루는 골격(Backbone chain)와 염기로 구성되어 있으며, 이들 모두 공유결합으로 연결되어 있다. 골격은 당당류인 디옥시리보스(Deoxyribose)에 인산기(Phosphate)가 결합되어 긴 사슬과 같은 형태이다. 염기는 DNA나 RNA의 단량체인 뉴클레오타이드를 이루는 성분으로, 수소 결합을 통해 염기쌍을 형성하여 DNA가 이중 나선 모양을 만드는 데 관여한다. 주요 핵염기는 시토신, 구아닌, 아데닌, 티민, 우라실로 각각 C, G, A, T, U의 약자로 나타낸다.
- [0065] 변형된 염기를 가진 뉴클레오타이드를 포함하는 단일가닥핵산은 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드(즉, 변형되지 않은 뉴클레오타이드)를 포함하는 표준 단일가닥핵산의 성질과는 많이 다르다. 뉴클레오타이드의 변형 방법은 아미드 결합의 사용을 포함한다. 그러나 다른 적절한 변형 방법이 사용될 수 있다.
- [0066] 뉴클레오타이드의 화학적 변형은 2'-위치의 당 변형, 5-위치의 피리미딘 변형(예를 들어, 5-(N-벤질카복시아미드)-2'-데옥시우리딘, 5-(N-이소부틸카복시아미드)-2'-데옥시우리딘, 5-(N-[2-(1H-인돌-3일)에틸]카복시아미드)-2'-데옥시우리딘, 5-(N-[1-(3-트리메틸암모늄)프로필]카복시아미드)-2'-데옥시우리딘 클로라이드, 5-(N-나프틸카복시아미드)-2'-데옥시우리딘, 또는 5-(N-[1-(2,3-디하이드록시프로필)]카복시아미드)-2'-데옥시우리딘), 8-위치의 퓨린 변형, 엑소시클릭 아민(exocyclic amines)에서의 변형, 4-티오우리딘의 치환, 5-브로모- 또는 5-아이오도-우라실(5-iodo-uracil)의 치환, 기본골격(backbone) 변형, 메틸화, 이소베이스 이소시티딘(isobases isocytidine) 및 이소구아니딘(isoguanidine) 등과 같은 비정상적 염기쌍 조합(unusual base-pairing combinations)을 단독 또는 조합하여 포함할 수 있다.
- [0067] 폴리뉴클레오타이드는 또한 2'-O-메틸-(2'-O-methyl-), 2'-O-알릴(2'-O-allyl), 2'-플루오로-(2'-fluoro-) 또는 2'-아지도-리보오스(2'-azido-ribose), 카보시클릭 당 유사체(carbocyclic sugar analogs), α-아노메릭 당(α-anomeric sugars), 아라비노스, 자일로스 또는 리소오스(lyxoses)와 같은 에피메릭 당(epimeric sugars), 피라노오스 당(pyranose sugars), 퓨라노오스 당(furanose sugars), 세도헵툴로오스(sedoheptuloses), 아시클릭 유사체(acyclic analogs) 및 메틸 리보사이드와 같은 염기 결여 뉴클레오타이드 유사체(abasic nucleotide analogs)를 포함하는 당염자에게 일반적으로 잘 알려져 있는 리보오스 또는 데옥시리보오스의 유사체 형태를 포함할 수 있다.
- [0068] 상기에 언급한 바와 같이, 하나 또는 그 이상의 포스포디에스테르 결합들은 대체가능한 연결기(alternative linking group)로 대체될 수 있다. 이러한 대안적 연결기들은 포스페이트가 P(O)S("티오에이트(thioate)"), P(S)S("디티오에이트(dithioate)"), (O)NR2("아미데이트(amidate)"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH2("포름아세탈(formacetal)")로 대체되고, 각 R 또는 R'는 독립적으로 H 이거나 에테르(-O-) 결합, 알릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아랄딜(araldyl)을 선택적으로 포함하는 치환되거나 비치환된 알킬(1-20C)이다. 폴리뉴클레오타이드의 모든 결합이 동일할 필요는 없다. 당, 퓨린 및 피리미딘의 유사한 형태의 치환은 예를 들어, 폴리아미드 기본골격과 같은 대체적 기본골격 구조와 같이 최종 생성물을 설계하는데 유리할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 이중가닥핵산인 신호태그 제조 방법은,
- [0070] (I) 신호발생물질이 있는 뉴클레오타이드 또는 신호발생물질과 반응성이 있는 뉴클레오타이드를 기질로 해서 단일가닥핵산을 합성하는 방법으로,
- [0071] (I-1) 신호발생물질이 있는 뉴클레오타이드가 있는 단일가닥 핵산을 제1 핵산으로 하고, 상기 제1 핵산과 상보적인 서열 또는 그것에 유사한 서열을 갖는 제2 핵산을 혼성화를 하여 이중가닥핵산 합성을 행하여, 상기 신호발생물질이 있는 이중가닥핵산을 합성하는 공정
- [0072] (I-2) 신호발생물질과 결합할 수 있는 단일가닥핵산을 제1 핵산으로 하고, 상기 제1 핵산과 상보적인 서열 또는

그것에 유사한 서열을 갖는 제2 핵산을 혼성화를 하여 이중가닥핵산 합성을 행하여, 상기 신호발생물질이 있는 이중가닥핵산을 합성하는 공정과, 상기 이중가닥핵산 합성 공정

- [0073] (II) DNA 주형으로 신호발생물질이 있는 뉴클레오타이드 또는 신호발생물질과 반응성이 있는 뉴클레오타이드를 기질로 이중가닥핵산을 합성하는 방법으로,
- [0074] (II-1) 신호발생물질이 결합된 이중가닥핵산 합성 공정
- [0075] (II-2) 신호발생물질과 결합할 수 있는 이중가닥핵산을 합성하는 공정과 합성된 이중가닥핵산으로부터 신호발생물질이 결합된 이중가닥핵산을 합성하는 공정이다.
- [0076] 또한, 본 발명의 키트는, 핵산 합성 수단과, 신호발생물질과, 신호발생 빈도 측정 수단을 포함한다.
- [0077] 본 발명의 이중가닥핵산은, 상기한 구조를 가짐으로써, 예컨대, 표적분자를 효과적으로 검출 가능한 표지 물질로서 이용할 수 있다. 단, 본 발명의 이중가닥핵산의 용도는 이들에 한정되지 않고, 어떠한 용도에 이용하더라도 좋다.
- [0078] 상기 검출 방법은 측정가능한 시그널을 생성하는 형광발광, 화학발광, 방사성 핵종 또는 효소/기질 화합물의 조합일 수 있다. 멀티모달 시그널링(multimodal signaling)은 생체분자 분석에서 유일하고 유리한 특성을 가질 수 있다. 상기 분석 방법은 상기 생체분자 값에 대응하는 분석 가능한 시그널을 생성하는 효소/기질 화합물을 분석할 수 있다. 일반적으로, 상기 효소는 분광광도법, 형광발광 및 화학발광을 포함하는 다양한 기술을 사용하여 측정할 수 있는 발색성(chromogenic) 기질의 화학적 변형을 할 수 있다.
- [0079] 바람직하게는, 신호발생영역은 여러 개의 신호발생물질로 이루어진 이중가닥핵산 단위체, 신호태그로 할 수 있으며, 상기 단위체들이 연속적으로 일렬로 이중가닥핵산인 신호발생영역의 구성단위로 한다.
- [0080] 상기 형광 표지는 형광 염료 분자로 상기 형광 염료 분자는 인돌륨 고리의 3-탄소 상의 치환기가 화학적 반응기 또는 복합 물질(conjugated substance)을 포함하는, 적어도 하나의 치환된 인돌륨 고리 시스템(indolium ring system)을 포함한다. 상기 염료 분자는 알렉사플루오르 488(AlexaFluor 488), 알렉사플루오르 532(AlexaFluor 532), 알렉사플루오르 647(AlexaFluor 647), 알렉사플루오르 680(AlexaFluor 680) 또는 알렉사플루오르 1000(AlexaFluor 1000)과 같은 알렉사플루오르 분자를 포함한다. 상기 염료 분자는 두개의 상이한 알렉사플루오르 분자와 같은 제1형 및 제2형의 염료 분자를 포함한다. 상기 염료 분자는 제1형 및 제2형 염료 분자를 포함하고, 두개의 염료 분자는 서로 다른 방출 스펙트럼(emission spectra)를 가진다. 신호태그는 공지된 기술로 염료분자를 코팅하여 가시광선 영역에서 다양한 색상을 구현하도록 제조된 나노섬유 또는 반응성 그룹이 코팅된 금, 은 나노입자를 연결시킨 복합물질 등도 사용할 수도 있다.
- [0081] 형광발광(fluorescence)은 넓은 범위의 분석에 적합한 다양한 기구를 사용하여 측정할 수 있다. 분광형광계로 미세액가 플레이트, 현미경 슬라이드, 프린팅된 어레이(printed array), 큐벳(cuvettes) 등을 분석할 수 있다.
- [0082] 화학발광 물질은 생체분자 값의 검출이 가능하도록 생체분자/리간드 복합체를 표지하는데 선택적으로 사용할 수 있다. 적절한 화학발광 물질은 임의의 옥살릴 클로라이드(oxalyl chloride), 로다민 6G, Ru(bipy)₃²⁺, TMAE(tetrakis(dimethylamino)ethylene), 피로갈롤(1,2,3-트리히드록시벤젠)(Pyrogallol(1,2,3-trihydroxybenzene)), 루시레닌(Lucigenin), 퍼옥시옥살레이트(peroxyoxalates), 아릴 옥살레이트(Aryl oxalates), 아크리디늄 에스테르(Acridinium esters), 디옥세테인(dioxetanes) 및 그 이외의 것들을 포함한다.
- [0083] 상기 신호태그는 형광태그와 화학발광 등이 있으며, 표적분자 값을 분석할 수 있도록 표적분자 또는 리간드를 표지하는데 사용될 수 있다. 상기 신호태그는 공지된 기술(미국 특허등록 번호 US 8,519,115 B2를 참조)을 사용하여 생체분자 또는 리간드에 대하여 특이적으로 지시하도록 구성될 수 있고, 그 후 대응하는 생체분자 값을 검출하기 위하여 사용될 수 있다.
- [0084] 바람직하게, DNA 핵산 주형을 대상으로 Taq polymerase 혹은 RNA polymerase를 핵산가닥을 대량으로 합성할 수도 있다.
- [0085] 본 발명에서는, 신호태그의 제1핵산과 제2핵산의 사슬간의 수소결합으로 형성된 이중가닥핵산인 신호태그를 "H 신호태그"라고 지칭하였으며, H 신호태그에 교차결합(interstrands crosslinking)을 발생시켜 신호태그의 제1핵산 단일가닥 핵산과 상보적인 제2 단일가닥 핵산간의 공유결합으로 신호발생영역을 안정화시키는 단계를 추가할 수도 있다. 이중가닥 핵산에서 사슬간의 교차결합은 미토마이신C, 소랄렌(psoralen), 머스터드 가스 등에 의해 유도할 수 있다. 이를 "C 신호태그"라고 지칭하였다.

- [0086] 수소결합은 N(질소), O(산소), F(플루오린) 등 전기 음성도가 강한 원자와 수소를 갖는 분자가 이웃한 분자의 수소 원자 사이에서 생기는 인력으로 일종의 분자간 인력(분자 사이에 끌어당기는 힘)이다. 수소 결합을 하는 물질은 분자량이 비슷한 다른 분자들에 비해 녹는점과 끓는점이 높고, 용해열과 기화열이 크다. 수소 결합은 분자 내에서 일어나는 원자간의 화학결합이 아니라 분자 사이에서 일어나는 인력에 의한 결합으로, 화학결합과는 다르며 다른 종류의 '분자간 인력' 보다 훨씬 강해 '수소결합' 이라고 부르는데 원자들의 결합보다는 약하여 열 등의 외적 요인으로 쉽게 분리될 수 있다.
- [0087] 본 발명은 nCounter Analysis system의 색상지시바코드인 H 신호태그를 구성하는 염기쌍사이 수소결합에 의해 생길 수 있는 구조적인 안정성의 한계가 있어 이를 극복하기 위해서, 색상지시 바코드인 이중가닥 핵산을 구성하는 염기쌍간 결합에 공유결합을 유도하여 이중가닥 핵산의 안정성을 강화하여 nCounter Analysis system의 색상지시바코드의 한계를 해결하였다.
- [0088] 이중가닥핵산을 구성하는 염기쌍 사이에 공유결합이 일어나는 현상을 교차결합(crosslink)이라고 한다.
- [0089] 공유결합(共有結合, covalent bond)은 결합하려는 원자들이 각각 전자를 내놓아 전자쌍을 만들고 이를 서로 공유하여 결합하는 것으로 화학 결합중 전자를 원자들이 공유하였을 때 생성되는 결합을 이르는 말이다. 공유 결합을 형성하는 분자는 원자핵과 전자쌍간의 인력 및 원자간 척력에 의하여 안정화되어 있다.
- [0090] 상기 C 신호태그는 상기 H 신호태그보다 안정성이 높아 분석단계의 다양한 조건에서 신호태그가 해리되는 것을 방지할 수 있는 장점이 있다.
- [0091] 바람직하게, 본 발명은 이중가닥핵산을 구성하는 염기쌍사이에 공유결합을 인위적으로 유도하는 방법으로 구성 염기쌍 사이에 공유결합이 있는 이중가닥핵산을 제조할 수 도 있다.
- [0092] 또한 신호태그의 골격을 나노섬유인 경우 제조 방법에 따르면, (a) 고분자 나노섬유를 제조하는 단계, (b) 상기 고분자 나노섬유를 코팅하기 위한 2종 이상의 용액을 준비하는 단계, 및 (c) 상기 용액으로 상기 고분자 나노섬유를 코팅하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 신호발생 활성을 가지는 고분자 나노섬유 제조방법을 제안한다.
- [0093] 또한, 상기 단계 (a)에서, 고분자 나노섬유는 폴리스티렌, 염화비닐 수지, 아크릴로니트릴부타디엔스티렌수지, 폴리에틸렌, 아크릴수지, 나일론 및 폴리아세탈수지로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 고분자를 이용하여 제조하는 것을 특징으로 한다.
- [0094] 또한, 상기 단계 (a)에서, 상기 고분자를 에틸아세테이트(EA), 테트라하이드로퓨란(THF), 아세톤(Acetone), 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH), 1-프로판올(PrOH), 1-부탄올(BtOH), 1-펜탄올(PtOH)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 용매에 혼합하여 고분자 나노섬유를 제조하는 것을 특징으로 한다.
- [0095] 또한, 상기 단계 (a)에서, 고분자 나노섬유를 멜트 블로운, 복합 방사, 분할 방사 및 전기 방사 중 선택되는 1종의 방법을 이용하여 상기 고분자 나노섬유를 제조하는 것을 특징으로 한다.
- [0096] 또한, 상기 용액은 형광물질 포함 용액, 금속 산화물 나노입자 포함 용액 및 금속 나노입자 포함 용액으로 구성되는 것을 특징으로 한다.
- [0097] 또한, 상기 형광물질은 이소시오시아네이트(Isothiocyanate), 인도시아닌(Indocyanine), 회흐스트(Hoechst), 프로피디움요다이드(Propidium iodide), 피코에리트린(Phycoerythrin), 아크리딘오렌지(Acridin orange), 악티노마이신(Actinomycin), 텍사스레드(Texas Red) 계 형광물질 및 로다민(Rhodamine)계 형광물질로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종인 것을 특징으로 한다.
- [0098] 또한, 상기 금속 산화물 나노입자는 이산화티타늄루타일(TiO_2 rutile), 이산화티타늄아나타제([0023] TiO_2 anatase), 산화아연(ZnO), 산화텅스텐(WO_3), 스트론튬티아네이트(SrTiO_3), 황화카드뮴(CdS), 지르코늄디옥사이드(ZrO_2), 산화주석(SnO_2), 산화바나듐(V_2O_3) 및 몰리브덴디설텔레나이드(MoSe_2)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종으로 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- [0099] 또한, 상기 금속 나노입자는 금(Au) 또는 은(Ag) 으로 이루어진 것을 특징으로 한다.
- [0100] 또한, 상기 단계 (c)는, (i) 상기 고분자 나노섬유의 표면을 술폰화 시키는 단계, (ii) 상기 술폰화된 표면을 가지는 고분자 나노섬유를 상기 형광물질로 코팅하는 단계, (iii) 상기 형광물질로 코팅된 표면을 가지는 고분자 나노섬유를 상기 금속 산화물 나노입자로 코팅하는 단계 및 (iv) 상기 금속 산화물 나노입자로 코팅된 상기 고

분자 나노섬유를 상기 금속입자로 코팅하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0101] 또한, 상기 단계 (ii)에서 사용되는 형광물질은, 폴리아릴아민염소산((Poly)allylamine hydrochloride)과 형광 이소시오시아네이트(Fluoresceine isothiocyanate), 인도시아닌(Indocyanine), 회흐스트(Hoechst), 프로피디움 이오다이드(Propidium iodide), 피코에리트린(Phycoerythrin), 아크리딘오렌지(Acridin orange), 악티노마이신(Actinomycin), 텍사스레드(Texas Red) 계 형광물질 및 로다민(Rhodamine)계 형광물질 중 선택되는 1종을 반응시킨 상기 형광물질 포함 용액을 상기 고분자 나노섬유에 코팅하는 것을 특징으로 한다.

[0102] 또한, 상기 단계 (iii)후, 상기 금속 산화물 나노입자를 상기 나노섬유에 고정하기 위해 폴리아릴아민염소산((Poly)allylamine hydrochloride)를 코팅하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0103] 그리고, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 신호발생 활성을 가지는 고분자 나노섬유를 제안한다.

[0104] 또한, 상기 고분자 나노섬유는 자외선 영역 및 가시광선 영역에서 신호발생 활성을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0105] 본 발명은 이중가닥핵산을 구성하는 염기쌍 간에 공유결합이 있고 신호발생 물질이 표시된 이중가닥핵산으로 표적분자를 계수하는 색상지시 바코드를 구성하는 안정 신호태그를 제공한다. 여기서, 색상지시 바코드는 색상의 조합으로 표적분자를 지시하는 시스템을 의미한다.

[0106] **(신호발생영역 색상지시 바코드)**

[0107] 상기 신호발생영역은 바코드 시스템(barcode system)으로 동일한 신호발생물질을 길게 늘여트린 상태로 제조된 신호태그를 기본 단위로 하며, 여러 신호발생물질로 제조된 신호태그들을 일정 조합으로 연결시켜 바코드 마다 특이한 신호를 형성할 수 있도록 제작한 구조체로 표적분자를 신호태그들의 조합으로 특이적으로 지시할 수 있다.

[0108] nCounter Analysis system의 신호발생영역은 바코드 시스템(barcode system)으로 4종류의 dye(Alexa dye 3종류, Cy3)를 길게 늘여트린 바코드 마다 특이한 신호를 형성할 수 있도록 제작된 RNA와 단일가닥핵산으로 이루어진 구조체로 생체분자를 특이적으로 지시할 수 있으며, 최대 800개의 종류에 대해 특이한 신호를 형성할 수 있도록 제작하였다. 리포터 분자는 에피 형광 현미경에 의해 촬영할 때의 ~300 nm 나노 스폿을 형성하며, 각각의 선형 순차적 7종류의 표시된 영역을 가진다.

[0109] 바람직하게는, 본 발명은 제1 탐침은 골격은 이중가닥핵산 또는 구성 염기쌍사이에 공유결합이 있는 이중가닥핵산이고 여러 개의 형광물질로 표시된 신호태그의 조합으로 이루어진 신호발생영역을 구성단위로 한다.

[0110] 바람직하게, 본 발명의 신호발생영역, 색상지시 바코드 시스템의 제조는 <도2>에 제시된 바와 같으며 다음과 같이 할 수도 있다.

[0111] 다양한 신호발생물질로 표시된 신호태그들로 신호태그 세트를 구성하는 단계 ;

[0112] 상기 세트에서 선택된 신호태그 하나를 최대로 세트의 신호태그 수에 해당하는 튜브들에 넣고 신호태그 세트에서 선택된 한 종류의 신호태그를 각각의 튜브에 넣어 혼합하는 방법으로 2 개의 신호태그 조합이 있는 용액들을 제조하는 단계 ;

[0113] 상기 2 개의 신호태그 혼합 용액의 한 종류를 최대로 세트의 신호태그 수에 해당하는 튜브들에 넣고 신호태그 세트에서 선택된 신호태그를 각각의 튜브에 넣어 상기 2 개의 신호태그 용액에 신호태그를 혼합하는 방법으로 3 개의 신호태그 조합이 있는 용액을 제조하는 단계 ; 및

[0114] 상기와 동일한 방법으로 신호태그를 한 개씩 추가하는 반응을 실시하여 원하는 만큼 신호태그의 조합이 있는 용액에서 신호태그들이 연속적으로 배열 연결된 구조체를 형성하도록 연결반응을 하여 신호태그들의 연결구조체로 이루어진 리포터 라이브러리를 제작하는 것을 특징으로 하는 신호발생영역인 색상지시 바코드를 제조할 수도 있다.

[0115] **1-2. 제2 탐침**

[0116] 제2 탐침은 검출하고자 하는 생물학적 표적분자를 적어도 인지하는 제2 프로브가 고체 지지체의 표면상에 부착되어 있는 분리용 지지체를 의미한다. 본 발명에 사용되는 제2 탐침은 도 1에 있다.

[0117] <도 1>에 도식된 바와 같이, "제2 탐침"은 제2 프로브와 고체 지지체가 결합한 구조를 말하는 것이며 제2 프로브와 고체 지지체 사이에 5~1,000개의 뉴클레오티드로 이루어진 단일가닥핵산인 스페이서

(spacer)가 있을 수도 있다.

- [0118] 상기 제2 프로브는 올리고뉴클레오타이드 또는 단백질이 바람직하며, 보다 구체적으로는 DNA, RNA, PNA, 압타머 (aptamer), 항원, 항체, 합텐 등을 포함한다. 제2 프로브는 제1 프로브와 최소한 표적분자를 인지하는 부위와 다른 부위를 인지하는 물질로 이루어진다. 또한, 상기 제2 프로브는 다수로 존재할 수 있으며, 이에 한정하는 것은 아니나 상기 수확 입자의 표면에 수십 내지 수백 개의 제2 프로브가 존재할 수 있다. 또한 상기 제2 프로브는 다양한 길이를 가질 수 있으며, 그 길이는 표적 물질, 프로브의 타입 등에 따라 달라질 수 있으며, 당해 기술분야의 통상의 숙련자는 주어진 조건에서 적절한 길이를 쉽게 정할 수 있다.
- [0119] 상기 고체 지지체는 분자가 공유결합 또는 비공유결합 중 하나를 통하여 직접 또는 간접적으로 부착될 수 있는 표면을 가지는 임의의 기질을 말하며, 본 발명에서 제공하는 장치를 제조하는 재료일 수도 있고, 또한, 본 발명에서 상기 지지체에 특정성분을 코팅하여 상기 표지리간드가 결합할 수 있는 기질을 제조할 수 있으며 또한, 상기 지지체에 특정성분들을 코팅하여 시료가 비특이적인 결합할 수 있는 기질을 제조할 수 있다. 본 발명에서 생물분자를 계수하는 장치를 상기 지지체로 제조할 수도 있다.
- [0120] 상기 지지체는 막, 칩(예를 들어, 단백질 칩), 슬라이드(예를 들어, 유리 슬라이드 또는 커버슬립), 컬럼, 속이 빈 형태(hollow), 고체, 반고체(semi-solid), 예를 들어 비드(bead)와 같은 세공(pore) 또는 공동(cavity)을 가지는 입자, 겔(gel), 광섬유 물질(fiber optic material)을 포함하는 섬유(fiber), 매트릭스(matrix) 및 샘플 용기(receptacle)를 포함할 수 있는 다양한 물리적 형태를 가질 수 있다.
- [0121] 지지체인 대표적인 샘플 용기는 샘플 웰(wells), 튜브, 모세관, 바이알 및 샘플을 고정할 수 있는 임의의 다른 관(vessel), 홈(groove) 또는 굴곡(indentation)을 포함한다. 샘플 용기는 미세액가 플레이트(microtiter plate), 슬라이드, 미세유동 장치 등과 같은 다중-샘플 플랫폼 상에 포함될 수 있다. 지지체는 천연 또는 합성 물질, 유기 또는 무기 물질로 이루어질 수 있다. 다른 대표적 용기는 그 안에서 검정 및 관련 조작이 일어날 수 있는 미세액적(microdroplet) 및 미세유체(microfluid)가 조절되거나 부피가 커진 오일(bulk oil)/수성 유제를 포함한다.
- [0122] 적절한 고체 지지체는 플라스틱, 레진, 다당류, 실리카 또는 실리카소재인 물질, 기능화된 유리(functionalized glass), 개질된 실리콘(modified silicon), 탄소, 금속, 무기 유리(inorganic glasses), 막, 나일론, (실크, 울 및 코튼과 같은) 천연 섬유, 폴리머 등을 포함한다.
- [0123] 고분자성 지지체는 폴리스티렌(polystyrene), 폴리에틸렌 글리콜 테트라프탈레이트(polyethylene glycol tetraphthalate), 폴리비닐 아세테이트(polyvinyl acetate), 폴리비닐 클로라이드(polyvinyl chloride), 폴리비닐 피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 폴리아크릴로니트릴(polyacrylonitrile), 폴리메틸 메타크릴레이트(polymethyl methacrylate), 폴리테트라플루오로에틸렌(polytetrafluoroethylene), 부틸 고무(butyl rubber), 스티렌부타디엔 고무(styrenebutadiene rubber), 천연고무, 폴리에틸렌(polyethylene), 폴리프로필렌(polypropylene), (폴리)테트라플루오로에틸렌((poly)tetrafluoroethylene), (폴리)비닐리덴플루오라이드((poly)vinylidene fluoride), 폴리카보네이트(polycarbonate) 및 폴리메틸펜텐(polymethylpentene)을 포함할 수 있다.
- [0124] 사용될 수 있는 적절한 고체 지지체 입자는 루미넥스-타입 코드 입자(Luminex-type encoded particles), 자성 입자 또는 유리 입자와 같은 코드 입자를 포함한다.
- [0125] 본 발명에서는 제2 프로브에 대한 지지체의 부가는 스페이서를 이용하거나 또는 직접 결합할 수도 있다.
- [0126] 제2 프로브가 DNA가 결합된 리간드 또는 DNA인 경우 DNA 말단을 바이오틴으로 그리고 분리용 입자는 스트렙타비딘으로 코팅하고 두 물질을 반응시킴으로써 결합이 이루어질 수 있다. 이 외에도 아민-숙시닐 안하이드라이드, PNA-DNA 결합 및 기타 다양한 방법을 이용하여 분리용 지지체와 제2 프로브의 결합이 이루어질 수 있다. 분리 결합반응 이후에 남아 있는 반응 잔구체의 분리는 분리용 자성 분리 입자를 사용함으로써 자석을 이용하여 분리하고 여액은 폐기하는 방법이 사용될 수 있으며, 또한 원심 분리를 이용하여 입자는 모으고 여액을 버리는 방법을 사용할 수 있다.
- [0127] 고체 지지체에 제2 프로브의 부착을 위해 사용되는 카르복시, 아미노 또는 하이드록실기와 같은 반응성 그룹과 스트렙타비딘 (streptavidin), 아비딘(avidin) 등을 포함할 수 있는 지지체로 구성된다.

- [0128] 상기 제2 프로브는 상기 분리용 지지체의 표면에 직접 부착되는 것도 가능하나, 표면 처리 물질로 상기 수확 입자의 표면을 처리한 후 이것을 링커로 하여 부착되는 것이 효율 면에서 더욱 바람직하다. 이와 같은 표면 처리 물질로서는 실란계, 에폭시계, 카르복실계, 아민계, 알데히드계 등의 물질이 가능하다.
- [0129] 분리용 지지체를 코팅한 이후에는 표적 물질과 부분적으로 상보적인 제2 프로브를 결합시키게 되는데, 이러한 결합반응 이후에 남아 있는 반응 전구체는 다시 한번 분리 과정 후 폐기하여 분석에 영향이 주지 않도록 조치하는 것이 바람직하다. 이때 분리용 지지체와 제2 프로브의 결합은 다양한 방법을 통해 이루어질 수 있다.
- [0130] 이들 자성 물질의 형상은 구형이 바람직하다. 본 발명에 사용되는 이러한 자성 물질의 크기는 분석 농도 및 분석 물질에 따라 변경 되어야 하므로 이를 한정하는 것은 곤란하다. 그럼에도 불구하고, 이들 자성 물질은 이에 한정하는 것은 아니나, 일반적인 자석을 이용해서 분리하기 위해서는 0.1 내지 100마이크로미터의 입경을 갖는 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는 1.0 내지 2.8 마이크로미터, 가장 바람직하게는 1.0마이크로미터의 입경을 갖는다.
- [0131] **1-3. 경쟁분자**
- [0132] 생체분자 분석에서 표적분자가 저분자이거나 프로브가 인지할 수 있는 부위가 제한적인 경우, 유용한 분석 방법은 경쟁적 분석(competitive assay)일 수도 있다. 본 발명의 신호발생영역을 이용하여 제조한 제1 탐침과 표적분자가 반응할 때, 표적분자와 경쟁할 수 있는 물질인 경쟁분자를 사용하여 경쟁적 분석을 실시할 수 있다.
- [0133] <도1>에 도시된 바와 같은, "경쟁분자"는 분석하고자하는 표적분자 또는 표적분자 유사체와 상기 지지체가 결합한 구조를 말하는 것이며 상기 표적분자 또는 표적분자 유사체와 지지체 사이에 10~50염기로 이루어진 단일가닥핵산인 스페이서(spacer)가 있을 수도 있다. 상기 표적분자로 경쟁분자를 제조하는 경우는 제1 프로브와 표적분자의 반응에서 상기 표적분자에 대한 경쟁분자이다. 경쟁분자는 상기 표적분자, 상기 표적분자의 유사체와 상기 제1 프로브를 사용하여 제조할 수도 있다.
- [0134] 본 발명에서는 바람직하게, 경쟁분자의 제조는 표적분자에 대한 고체 지지체의 부가로 스페이서를 이용하거나 또는 직접 결합할 수 있다.
- [0135] **1-4. 고정분자**
- [0136] 본 발명에서 표적분자를 분자계수하기 위해 감지표면에 고정 제1 탐침을 고정시켜 유효한 스폿의 이미지를 형성할 수 있도록 하는 고정분자는 고정영역의 구성단위의 염기서열에 상보적인 염기서열을 갖는 단일가닥핵산과 공유결합 또는 비공유결합 중 하나를 통하여 감지표면에 직접 또는 간접적으로 부착될 수 있는 임의의 기질로 구성된다.
- [0137] <도1>에 도시된 바와 같이, "고정분자"는 제1 탐침의 고정영역을 구성하는 단위체의 염기서열에 상보적인 염기서열로 이루어진 단일가닥핵산과 지지체 결합물질이 결합한 구조이다. 바람직하게 단일가닥핵산은 10~50개의 뉴클레오티드로 구성될 수 있다. 고정분자가 제1 탐침의 고정영역에 상보적으로 결합하여 형성된 복합체는 지지체 결합물질에 의해 지지체에 결합함으로써 제1 탐침을 고정지지체에 고정시켜 유효한 스폿의 이미지를 형성할 수 있도록 한다.
- [0138] "지지체 결합물질"은 공유결합 또는 비공유결합 중 하나를 통하여 지지체에 직접 또는 간접적으로 부착될 수 있는 임의의 기질을 말하는 것으로 "지지체 결합물질"의 제조에 사용하는 특정성분은 카르복시, 아미노 또는 하이드록실기와 같은 반응성 그룹, 스트렙타비딘(streptavidin) 또는 아비딘(avidin)일 수도 있으며, 일실시예에서 아크릴(acrylic)인 지지체에 스트렙타비딘(streptavidin), 아비딘(avidin)이 코팅된 커버슬립이 적층하여 수행할 수도 있다.
- [0139] 바람직하게 고정핵산분자에 대한 지지체 결합물질은 바이오틴이고 단일가닥핵산의 한쪽 끝에 표지될 수 있다.
- [0140] 본 발명은 생물학적 의미 결정을 위한 표적분자를 계수하는 방법에 관한 것으로 생체분자를 다중 검사하는 방법, 시약, 기구, 시스템 및 키트를 포함한다.
- [0141] **2. 분석방법**
- [0142] **2-1. 세포**

- [0143] 세포 혹은 세균 등 단세포는 종류에 따라 차이가 있지만 몇 μm 에 이른다. 표적분자가 세포인 경우 세포에 대한 제1 탐침과 제2 탐침으로 분석할 수도 있다.
- [0144] 제1 탐침의 제1 프로브는 세포의 표면을 구성하는 생체분자들 중 선택되어지는 분자에 대한 리간드이며, 보다 구체적으로는 aptamer, 항원, 항체, 합텐 등을 포함한다. 상기 제조된 리간드에 신호발생영역을 결합시켜 제1 탐침을 제조한다. 제2 탐침은 상기 제1 프로브에 사용되는 표적분자 또는 바람직하게 상이한 표적분자의 리간드를 고체 지지체에 연결한다.
- [0145] 표적분자가 세포인 경우 제1 탐침은 비고정 또는 고정형을 사용할 수 있으며 바람직하게, 비고정 제1 탐침을 사용하여 분석하는 것이 이상적이다.
- [0146] 상기 제조된 제1 탐침과 제2 탐침을 분석하고자하는 표적분자인 세포가 있는 시료에 처리하여 반응시킨 후 형성된 제1 탐침-표적분자-제2 탐침 복합체를 분리 수확하여 분석하여 세포를 동정 및 계수를 한다.
- [0147] 본 발명은 하나 또는 그 이상의 표적분자를 분석하고자하는 시료를 준비하는 단계, 상기 준비된 시료에 비고정 제1 탐침과 제2 탐침을 노출시켜 제1 탐침-표적분자-제2 탐침 복합체를 형성하는 반응용액을 제조하는 단계, 상기 반응용액에서 형성된 비고정 제1 탐침-표적분자-제2 탐침 복합체를 정제하는 단계로 구성한다.
- [0148] 상기 고체지지체가 유리슬라이드의 경우 유리슬라이드에 고정된 제2프로브와 세균이 결합한 제2 프로브-세균 복합체에 제1 탐침이 결합하여 형성된 복합체의 제1 프로브에서 발생하는 세포의 존재 신호로 형성되는 스폿을 분석할 수 있다. 형성된 스폿을 이용하여 표적분자 세포를 계수할 수 있을 것이다.
- [0149] 또한 상기 고체 지지체가 자성입자인 경우 고정된 제2 프로브를 이용하여 제1 탐침과 세균 복합체를 분리 정제하여 복합체에 있는 제1 프로브에서 발생하는 신호를 분석할 수도 있다.
- [0150] 제1 탐침에 있는 색상지시바코드를 이용하여 표적분자를 특이적으로 지시하고 있어 복합체의 색상분석을 통하여 많은 표적분자 세포들을 동시에 분석할 수 있다.
- [0151] **2-2. 바이러스**
- [0152] 바이러스는 핵산(DNA나 RNA)과 이를 둘러싼 단백질이 전부인 복합체로 크기는 세균의 평균 크기에 비해 1000분의 1 정도에 불과해, 막대 모양은 수백nm, 둥근 모양은 지름이 수십nm에 불과하다. 표적분자가 바이러스인 경우 바이러스에 대한 제1 탐침과 제2 탐침으로 분석할 수도 있다.
- [0153] 제1 탐침의 제1 프로브는 바이러스의 표면을 구성하는 생체분자들 중 선택되어지는 분자에 대한 리간드이며, 보다 구체적으로는 aptamer, 항원, 항체, 합텐 등을 포함한다. 상기 제조된 리간드에 신호발생영역을 결합시켜 제1 탐침을 제조한다. 제2 탐침은 상기 제1 프로브에 사용되는 표적분자 또는 바람직하게 상이한 표적분자의 리간드를 제2 프로브로 하여 고체 지지체에 연결하여 준비한다.
- [0154] 표적분자가 바이러스인 경우 제1 탐침은 비고정 또는 고정형을 사용할 수 있다.
- [0155] 상기 제조된 제1 탐침과 제2 탐침을 분석하고자하는 표적분자인 바이러스가 있는 시료에 처리하여 반응시킨 후 형성된 제1 탐침-표적분자-제2 탐침 복합체를 분리 수확하여 분석하여 바이러스를 동정 및 계수를 할 수 있다
- [0156] 상기에 제조된 제1 탐침과 제2 탐침을 분석하고자하는 표적분자인 바이러스가 있는 시료에 처리하여 반응시킨 후 제1탐침-표적분자-제2 탐침 복합체를 분리 수확하여 분석하여 바이러스를 동정 및 계수를 한다.
- [0157] 본 발명은 하나 또는 그 이상의 표적분자를 분석하고자하는 시료를 준비하는 단계, 상기 준비된 시료에 고정 제1 탐침과 제2 탐침을 노출시켜 제1 탐침-표적분자-제2 탐침 복합체를 형성하는 반응용액을 제조하는 단계, 상기 반응용액에서 형성된 제1 탐침-표적분자-제2 탐침 복합체를 정제하는 단계로 구성한다.
- [0158] 제2 탐침이 유리슬라이드에 고정된 경우, 제2 프로브를 유리슬라이드에 고르게 분포하여 결합하도록 제조한다. 유리슬라이드에 고정된 제2 탐침에 결합한 바이러스에 제1 탐침이 결합하여 형성된 복합체에서 바이러스의 존재 신호를 발생하여 형성되는 스폿을 분석할 수 있다. 형성된 스폿을 이용하여 표적분자 세포를 계수할 수 있을 것이다.
- [0159] 제2 탐침이 자성입자에 고정된 경우에 표적분자 바이러스가 자성입자에 고정된 제2 탐침에 결합하고 제1 탐침들이 표적분자인 바이러스에 결합하여 형성된 복합체에서 표적분자의 존재 신호를 발생한다.

형성된 복합체에서 바이러스의 존재 신호를 발생하여 자성입자에 상응하는 신호를 계수할 수 있을 것이다.

[0160] 또한, 상기 정제된 복합체에서 제1 탐침을 분리하여 계수함으로써 바이러스를 계수할 수 있다.

[0161] 제1 탐침에 있는 색상지시바코드를 이용하여 표적분자를 특이적으로 지시하고 있어 복합체의 색상분석을 통하여 복수의 바이러스들을 동시에 분석할 수 있다.

[0162] 2-3. 생체분자

[0163] 2-3-1. 단일가닥핵산을 포함하는 탐침

[0164] (핵산 정량)

[0165] 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함한다. DNA는 인산(H₃PO₄), 디옥시리보스(C₅H₁₀O₄), 염기로 구성되는 뉴클레오티드의 결합체이고 RNA는 D-리보오스를 당성분으로 하는 핵산이다. RNA는 단백질을 지시하는 전자체 뿐만이 아니라 noncoding RNA 전자체(miRNA, siRNA 등)까지도 포함한다.

[0166] 특히, 길이가 짧은 miRNA의 경우 miRNA를 정량하는 다양한 PCR 방법이 개발되고 있다. 본 발명은 miRNA에 효소를 사용하여 poly(A)를 부가하고 역전사하여 상기 설계된 올리고뉴클레오타이드를 부가한 후, 본 발명 분석기술로 miRNA를 분석할 수 있고 stem-loop RT-PCR 방법에서도 프로브인 단일가닥핵산을 설계하여 miRNA를 정량할 수 있다.

[0167] 도 4는 생체시료에서 분리된 핵산에 제1 탐침과 제2 탐침으로 부분적 이중가닥핵산을 형성시킨 후 정량 분석하는 방법을 보여주는 도면이다.

[0168] 본 발명에 사용된 바와 같이, "특정핵산을 인지하는 염기서열인 프로브"는 단일가닥핵산의 혼성화를 허용하기에 충분한 길이의 단일가닥핵산을 의미하고 상보적인 염기서열은 길이가 6~1,000개의 염기서열 범위에 있고 바람직한 범위는 8~50개 염기서열이고 최적으로 10~40개 염기서열 범위이다.

[0169] 본 발명에서는 상기 특정핵산과 같은 방향으로 완전하게 상보적 결합하는 염기서열들 중에서 상류에 있는 위치하는 염기서열을 제1 프로브, 하류에 있는 위치하는 것을 제2 프로브라고 지칭한다.

[0170] 본 발명에 따른 "프로브"는 바람직하게 길이가 6~100개, 보다 바람직하게는 8~80개 및 가장 바람직하게는 10~50개인 뉴클레오타이드이다.

[0171] 제1 프로브와 제2 프로브의 거리는 0~500개 뉴클레오타이드이며 바람직하게는 10~50개 뉴클레오타이드이다.

[0172] 본 발명은 핵산 정량을 위한 탐침은 고정 제1 탐침과 제2 탐침이다.

[0173] 본 발명에 있어서 일례로, 상기 핵산 정량분석을 위해 상기 제1 프로브는 상기 표적분자 핵산과 완전하게 상보적 결합하는 염기서열인 영역 등으로 구성되고, 제2 프로브는 상기 특정핵산과 완전하게 상보적 결합하는 염기서열인 영역 등으로 구성될 수 있다.

[0174] 상기 프로브로 표적분자 유전자를 분석하기 위한, 상기 특정 유전자를 지시하고 분석할 수 있도록 하는 제1 프로브 및 제2 프로브를 공지된 방법으로 만들 수 있다.

[0175] 상기 제1 탐침의 제1 프로브로써, 상기 특정 핵산에 완전하게(perfectly)상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 바람직하게는, 상기 제1 프로브는 본 발명의 특정 표적핵산의 10~30개의 연속 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다.

[0176] 상기 일반식 (II)에 있어서, 제2 프로브(2ND P)는 상기 특정핵산에 상기 제1 프로브(1ST P)의 3' 말단이 결합하는 위치 다음의 염기서열부터 완전하게 상보적 결합을 하는 특이 영역이고 표적 단일가닥핵산을 식별하기 위해서 이용되며 혼성화 반응에서 사용하는 프로브로 적합하도록 설계할 수 있다.

[0177] 상기에 제조된 제1 탐침과 제2 탐침을 분석하고자하는 표적분자인 핵산이 있는 시료에 처리하여 혼성화 반응시킨 후 제1탐침-표적분자-제2 탐침 복합체를 분리 수확하여 분석하여 핵산을 동정 및 정량을 한다.

[0178] 한 표적 핵산에 한 종류의 제1 프로브와 제2 프로브가 결합함으로써 제1 탐침-표적 핵산- 제2 탐침 복합체에서 제

1 프로브를 분자 계수하여 표적 핵산을 계수하고 이 값으로부터 표적핵산을 정량할 수 있다.

- [0179] 본 발명에 이용되는 제1 탐침과 제2 탐침은 주형의 한 영역에 혼성화 또는 어닐링되어, 부분적 이중가닥 구조를 형성한다. 이러한 이중가닥 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C (1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다.
- [0180] 상기에서, 상기 혼성화 반응에서 혼성화(어닐링) 온도는 40℃ 내지 70℃이고 보다 바람직하게는 45℃ 내지 68℃이고, 보다 더 바람직하게는 50℃ 내지 65℃이며, 가장 바람직하게는 60℃ 내지 65℃이다. 혼성화의 엄격조건(stringent condition)은 온도, 이온세기(완충액 농도) 및 유기 용매와 같은 화합물의 존재 등을 조절하여 결정될 수 있다. 이러한 엄격한 조건은 혼성화되는 서열에 따라 다르게 결정될 수 있다.
- [0181] 제2 탐침이 자성입자에 고정된 경우에 표적분자 핵산이 자성입자에 고정된 제2 탐침에 결합하고 제1 탐침들이 표적분자인 핵산에 결합하여 형성된 복합체에서 표적분자의 존재 신호를 발생한다. 즉, 상기 정제된 복합체에서 제1 탐침을 분리하여 계수함으로써 표적 핵산을 계수할 수 있으며 이로부터 표적핵산을 정량할 수 있다.
- [0182] 제1 탐침에 있는 색상지시바코드를 이용하여 표적분자를 특이적으로 지시하고 있어 복합체의 색상분석을 통하여 많은 표적분자 핵산들을 동시에 분석할 수 있다.
- [0183] 추가적으로 형성된 제1 탐침-표적분자 핵산-제2 탐침 복합체에서 분리된 제1 탐침을 분자 계수하여 표적분자 핵산을 동정 및 정량할 수 도 있다.
- [0184] **(유전자변이)**
- [0185] 생체정보를 암호화하고 있는 DNA상의 유전자 변이는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)와 구조변이(Structural Variation), 여맥체 이상 등이 있다. SNP는 DNA 염기서열에서 하나의 염기서열(A, T, G, C)의 차이를 보이는 유전적 변화 또는 변이를 의미한다. 구조변이는 결실, 역위, 첨가, 복제 등과 같은 DNA 구조변이를 의미한다.
- [0186] 본 발명은 특정 유전자변이를 분석하기 위한, 고정 제1 탐침 및 제2 탐침을 만드는 방법 및 키트를 제공한다.
- [0187] 도 5은 생체시료에서 핵산을 포함하는 생체분자들을 분리하여 유전자변이를 포함하고 인접영역에 완전하게 상보적인 결합을 하는 핵산을 포함하는 제1 및 제2 탐침을 제조하여 특정 유전자변이분석을 하는 전체적인 흐름도를 보여주고 있다.
- [0188] 본 발명에 있어서 일례로, 상기 특정 유전자변이를 분석하기 위해 상기 제1 프로브는 상기 표적유전자과 완전하게 상보적 결합을 하는 염기서열 및 3' 말단에 상기 표적핵산의 염기서열을 구분할 수 있는 염기서열인 영역 등으로 구성되고, 상기 제2 프로브는 상기 표적핵산과 완전하게 상보적 결합하는 염기서열인 영역 등으로 구성될 수 있다.
- [0189] 상기 일반식(IV)에서, 제1 프로브는 혼성화하는 표적핵산과 완전하게 상보적 혼성화 서열을 가지는 변이인접 특이 영역이고 유전자 변이에 해당하는 변이 특이 영역을 포함한다.
- [0190] 상기 제1 프로브로서, 상기 SNP를 포함하는 서열에 완전하게(perfectly)상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 바람직하게는, 상기 제1 프로브는 본 발명의 SNP를 포함하는 10~30개의 연속 염기서열 잔기를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는, 상기 제1 프로브의 3' 말단은 상기 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 3' 말단에 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는 제1 프로브에서 말단 영역이 혼성화되지 않으면, 이러한 듀플렉스는 엄격한 조건에서 해체될 수 있다.
- [0191] 상기 일반식(IV)에 있어서, 제2 프로브는 상기 표적핵산과 완전하게 상보적 결합을 하는 변이인접특이 영역이고 변이관련 염기서열이 있는 단일가닥핵산을 식별하기 위해서 이용되며 혼성화 반응에서 사용하는 프로브로 적합하도록 설계할 수 있다.
- [0192] 상기 표적분자 유전자변이가 있는 시료, 제1 탐침 및 제2 탐침을 반응시켜 제1 탐침-표적분자 유전자

변이-제2 탐침을 형성할 수 도 있다. 용액 속에서 상기 복합체를 수확하여 표적분자 유전자변이를 분석할 수 있다.

[0193] 바람직하게, 표적분자 유전자변이를 포함한 시료를 제1 탐침과 제2 탐침에 반응시켜 제1 탐침-표적분자 유전자변이-제2 탐침 복합체를 형성하고 세척단계를 수행하여 정제된 복합체를 수확한다. 형성된 복합체의 부분적 이중가닥 핵산을 신장 및 연결 반응하여 상기 완전한 이중가닥핵산을 형성하는 반응을 두 번 또는 그 이상 반복적으로 수행하여 완전한 이중가닥핵산을 확보할 수 있다.

[0194] 본 발명에 이용되는 제1 탐침과 제2 탐침은 주형의 한 영역에 혼성화 또는 어닐링되어, 부분적 이중가닥 구조를 형성한다. 이러한 이중가닥 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화는 핵산정량의 내용과 동일하거나 유사할 수도 있다.

[0195] 본 발명에 있어서 어닐링은 제1 탐침과 제2 탐침은 주형의 한 영역 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다. 이렇게 증폭된 표적핵산은 하나의 분자 상에 다중 표적위치를 포함하는 표적핵산분자이며, 이를 이용하여 동시에 다중 표적위치를 분석할 수 있다.

[0196] 본 발명에 있어서, 제1 탐침과 제2 탐침은 주형의 한 영역과 혼성화 반응을 하여 형성된 부분적 이중가닥 핵산에서 두 탐침 사이에 신장영역이 있는 경우 신장 반응하고 연결 반응하여 완전한 이중가닥핵산을 형성할 수 있다.

[0197] 본 발명에 사용된 바와 같이, "신장 영역"은 핵산 중합화 활성을 통해 올리고뉴클레오타이드의 신장을 허용하기에 충분한 길이의 뉴클레오타이드를 언급한다. "신장 영역"은 표적 및 주형 핵산의 양태에 존재한다. "신장 영역"은 표적 또는 주형 핵산의 제1 프로브 결합 위치 및 제2 프로브 결합위치 사이에 있다. "신장 영역"은 길이가 약 1~1000개 뉴클레오타이드이고 바람직한 범위는 1~100개 뉴클레오타이드이고 보다 바람직한 범위는 3~50개 및 최적으로 길이가 3~10개의 뉴클레오타이드 범위이다.

[0198] 신장 반응(extension)은 중합효소를 이용하여 상기 신장영역에 뉴클레오타이드들을 추가함으로써 프라이머를 연장시키는 것을 말한다. 핵산에 완전하게 상보적 결합된 올리고뉴클레오타이드를 연장시킨다면, 이 핵산은 연장 반응을 위한 주형으로 작용한다. 본 발명에 있어서, 상기 DNA 중합효소는 Taq DNA 중합효소 및 Pfu DNA 중합효소로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 이에 한정되지 않고, thermostable DNA 중합효소라면 어떤 것이든 사용할 수 있다.

[0199] 연결 반응(ligation)은 제1 프로브의 3' 말단 또는 신장된 제1 프로브의 3' 말단과 제2 프로브에 효소 측매적으로 연결시키는 것을 말한다. 본 발명에 있어서, 상기 리가제는 E. coli DNA 리가제, Taq DNA 리가제, T4 DNA 리가제 및 Ampligase 리가제로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0200] 본 발명에 있어서, 상기 표적핵산, 상기 제1 탐침과 제2 탐침의 혼성화 반응으로 형성된 부분적 이중가닥핵산이 상기 제1 탐침과 제2 탐침사이에 닉(nick)이 있는 경우 연결 반응하여 완전한 이중가닥핵산을 형성할 수 있다.

[0201] 상기 연결반응은 리가제(ligase)에 의한 뉴클레오타이드 서열의 연결을 촉매할 수 있는 반응을 말한다. 특정 길이의 2종의 올리고뉴클레오타이드를 표적핵산에 나란히 완전하게 상보적 결합하도록 한 후, 이 때 형성되는 이중나선의 닉(nick) 영역을 DNA ligase에 의하여 통상의 핵산의 연결 원리에 입각한 통상적인 연결반응을 통해 2종의 올리고뉴클레오타이드를 단일가닥상태로 연결하는 반응이다. 따라서 핵산의 연결을 유도하는 리가제로서 당 업계에서 통상적으로 사용되는 효소를 제한 없이 사용할 수 있다.

[0202] 고체지지체가 자성입자인 제2 탐침인 경우, 표적분자 유전자 변이, 제1 프로브와 제2 프로브가 결합하고 신장과 연결 효소반응을 하거나 연결효소 반응을 한 후 변성반응을 하여 수확된 복합체의 제1 탐침 신호발생영역에서 발생하는 신호 패턴을 분석하여 유전자변이의 유형을 알 수 있다.

[0203] 한 유전자변이 유형에는 한 종류의 제1 프로브와 제2 프로브가 결합함으로 제1 탐침-표적 핵산- 제2 탐침 복합체에서 분리한 제1 프로브를 분자 계수하여 표적 유전자변이를 계수할 수 있다.

[0204] 제1 탐침에 있는 색상지시바코드를 이용하여 표적분자를 특이적으로 지시하고 있어 복합체의 색상분석을 통하여 많은 표적분자 유전자변이들을 동시에 분석할 수 있다.

[0205] (메틸화 DNA)

- [0206] 본 발명은 메틸화 DNA를 분석하기 위한, 고정 제1 탐침 및 제2 탐침을 만드는 방법 및 키트를 제공한다.
- [0207] 본 발명의 한 관점은 유전자의 메틸화 여부 및 비율의 분석방법에 관한 것이다. 이 분석방법은 다음과 같은 단계를 포함하여 이루어진다.
- [0208] 도 1을 살펴보면,
- [0209] 분석하고자하는 시료 DNA를 소듐 바이설파이트로 처리하는 단계;
- [0210] 특정유전자의 메틸화를 확인하여 연결(ligation)을 가능하게 하는 단일가닥핵산으로 구성된 제1 프로브를 포함하는 제1 탐침 및 상기 제1 프로브의 3'말단과 상보적 결합하는 염기 바로 다음의 염기서열과 완전하게 상보적 결합을 하는 제2 프로브를 포함하는 제2 탐침을 준비하는 단계;
- [0211] 상기 소듐 바이설파이트가 처리된 핵산과 상기 제작된 제1 탐침과 제2 탐침을 혼성화 반응을 하여 부분적 이중가닥핵산을 형성하는 단계;
- [0212] 상기 부분적 이중가닥에서 상기 제1 탐침의 3'말단과 상기 제2 탐침의 5'말단이 연결반응을 하여 이중가닥핵산을 형성하는 단계; 및
- [0213] 상기 형성된 완전한 이중가닥핵산을 변성시켜 수확한 제1 탐침과 제2 탐침의 연결된 구조체에서 발생하는 신호를 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 유전자의 메틸화 여부와 비율을 분석하는 절차를 알 수 있다.
- [0214] 발명의 '메틸화(methylation)'는 DNA의 시토신(cytosine)의 5번째 탄소에 메틸기가 첨가되는 것을 의미한다. 시료 DNA를 '소듐 바이설파이트 (Sodium Bisulfate)'로 처리함으로써 시료 DNA의 염기서열 상에서 메틸화된 사이토신은 그대로 유지되고, 비메틸화된 사이토신은 우라실로 전환된다.
- [0215] 제1 프로브(1ST P)를 포함하며, 메틸화 정보를 갖는 제1 프로브는 메틸화 염기를 구분하기 위해 사이토신 또는 우라실과 메치하는 염기인 구아닌 또는 티민을 갖는 단일가닥핵산인 두 종류이다.
- [0216] 제1 프로브는 혼성화하는 표적핵산과 완전하게 상보적 혼성화 서열을 가지는 메틸화인접 특이 영역이고 메틸화 염기에 해당하는 변이 특이 영역을 포함한다.
- [0217] 상기 제1 프로브로서, 상기 메틸화염기를 포함하는 서열에 완전하게(perfectly)상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 바람직하게는, 상기 제1 프로브는 본 발명의 메틸화염기를 포함하는 10~30개의 연속 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는, 상기 제1 프로브의 3'말단은 상기 메틸화염기에 상보적인 염기를 갖는다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 3' 말단에 메틸화 염기에 상보적인 염기를 갖는 제1 프로브에서 말단 영역이 혼성화되지 않으면, 이러한 듀플렉스는 엄격한 조건에서 해체될 수 있다.
- [0218] 상기 제1 프로브는 상기 특정유전자가 메틸화된 경우에 연결(ligation)을 가능하게 하는 염기서열 또는 상기 특정유전자가 비메틸화된 경우에 연결을 가능하게 하는 염기서열을 포함하는 단일가닥핵산 이다.
- [0219] 제2 프로브는 상기 표적핵산과 완전하게 상보적 결합을 하는 메틸화인접특이 영역이고 메틸화 염기가 있는 단일가닥핵산을 식별하기 위해서 이용되며 혼성화 반응에서 사용하는 프로브로 적합하도록 설계할 수 있다.
- [0220] 상기 표적분자 메틸화 DNA가 있는 시료, 제1 탐침 및 제2 탐침을 혼성화 반응시켜 제1 탐침-표적분자 메틸화 DNA-제2 탐침을 형성할 수 도 있다. 용액 속에서 상기 복합체를 수확하여 표적분자 메틸화 DNA를 분석할 수 있다.
- [0221] 본 발명에 이용되는 제1 탐침과 제2 탐침은 주형의 한 영역에 혼성화 또는 어닐링되어, 부분적 이중가닥 구조를 형성한다. ?????장반응 및 연결반응으로 완전한 이중가닥 구조를 형성하게 하여 DNA 메틸화 여부 및 비율을 분석할 수 있다. 혼성화, 신장 및 연결에 대한 내용은 상기 유전자변이 분석과 동일하거나 유사할 수도 있다.
- [0222] 본 발명에 있어서 어닐링은 제1 탐침과 제2 탐침은 주형의 한 영역 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다. 이렇게 증폭된 표적핵산은 하나의 분자 상에 다중 표적위치를 포함하는 표적핵산분자이며, 이를 이용하여 동시에

다중 표적위치를 분석할 수 있다.

- [0223] 본 발명에 있어서, 상기 표적핵산과 상기 제1 탐침과 제2 탐침이 혼성화 반응을 하여 형성된 부분적 이중가닥 핵산이 상기 제1 탐침과 제2 탐침사이에 닉(nick)이 있는 경우 연결 반응하여 완전한 이중가닥핵산을 형성할 수 있다.
- [0224] 바람직하게, 표적분자 메틸화 DNA를 포함한 시료를 제1 탐침과 제2 탐침에 반응시켜 제1 탐침-표적분자 메틸화 DNA-제2 탐침 복합체를 형성하고 세척단계를 수행하여 정제된 복합체를 수확한다. 형성된 복합체의 부분적 이중가닥 핵산을 신장 및 연결 반응하여 상기 완전한 이중가닥핵산을 형성하는 반응을 두 번 또는 그 이상 반복적으로 수행하여 완전한 이중가닥핵산을 확보할 수 있다.
- [0225] 본 발명에 있어서, 제1 탐침과 제2 탐침은 주형의 한 영역이 혼성화 반응을 하여 형성된 부분적 이중가닥 핵산에서 두 탐침 사이에 신장영역이 있는 경우 신장 반응하고 연결 반응하여 완전한 이중가닥핵산을 형성할 수 있다.
- [0226] 제2 탐침이 자성입자에 고정된 경우, 표적분자 메틸화 DNA, 제1 탐침과 제1 탐침들이 형성한 복합체에서 신장과 연결 효소반응을 하거나 연결효소 반응을 한 후 변성반응을 하여 수확된 복합체의 제1프로브 신호발생영역에서 발생하는 신호 패턴을 분석할 수 있다. 신호패턴은 형성된 복합체에서 메틸화 DNA의 존재 신호를 지시하고 있어 특정 메틸화 DNA의 메틸화 여부에 상응하는 신호를 알 수 있다.
- [0227] 제1 탐침에 있는 색상지시바코드를 이용하여 표적분자를 특이적으로 지시하고 있어 복합체의 색상분석을 통하여 많은 표적분자 메틸화 DNA들을 동시에 분석할 수 있다.
- [0228] 추가적으로 형성된 제1 탐침-메틸화 DNA-제2 탐침 복합체에서 분리된 제1 탐침을 분자 계수하여 표적분자 메틸화 DNA를 계수할 수도 있다.
- [0229] 또한, 본 발명은 상기 제1 프로브의 신호발생영역에서 발생하는 신호패턴을 분석하는 결과로, 식별된 메틸화 DNA 염기서열에 대한 정보로 메틸화 여부 및 비율을 제공한다.
- [0230] 게놈(Genome)상의 유전자는 메틸화되었거나 비메틸화 상태로 존재하며 생체시료의 생리적인 상태 및 병리적인 상태에 따라 다양하다.
- [0231] 바람직하게, 특정 유전자가 비메틸화인 경우 제1프로브의 5'말단에 A패턴의 바코드 리포터, 메틸화인 경우는 다른 하나에는 B 패턴의 바코드 리포터로 표지하여 신호분석을 할 수 있다. 즉, 특정유전자를 주형으로 상기 제1 탐침 및 제2탐침을 연결반응하여 획득한 복합체에 있는 표지물질에서 발생하는 신호를 분석하면, 스왑을 계수하여 A 패턴 스왑의 수/B 패턴 스왑의 수의 비율을 알 수 있어 생체시료에 있는 비메틸화 및 메틸화의 비율을 분석하여 이들로부터 생체시료에서 메틸화의 비율을 알 수 있다.
- [0232] 본 발명은 상기 제1 프로브와 신호발생물질이 있는 제1 프로브로 이루어진 제1 탐침을 이용한 특정유전자의 메틸화 여부와 비율 분석방법을 통해 유전자의 메틸화 여부 및 비율 분석을 실시하는 것을 특징으로 하는 키트를 제공한다.
- [0233] **2-3-2. 리간드를 이용한 분석**
- [0234] 본 발명은 리간드를 이용한 생체분자를 분석하기 위한, 고정 제1 탐침 및 제2 탐침을 공지된 방법으로 만드는 방법 및 키트를 제공한다.
- [0235] 생체분자는 단백질, 펩티드, 탄수화물, 지질(lipid), 다당류, 당단백질, 호르몬, 수용체, 항원, 항체, 바이러스, 병원균, 독성 물질, 기질, 대사산물, 전이 상태 유사체(transition state analog), 보조 인자(cofactor), 저해제, 약, 염료, 영양분, 성장 인자, 세포, 조직 등을 포함하고, 이론적으로는 그 범위는 제한이 없으며 거의 모든 화학적 또는 생물학적 작동체(effector)를 의미한다.
- [0236] 리간드는 대표적으로 항체, 펩타이드, 핵산 및 압타머 등이 있다. 항체는 항원의 항원결정부(epitope)과 특이적 결합을 하여 항원-항체 반응을 일으키는 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함한다. 압타머(aptamer)는 저분자 화합물로부터 단백질까지 다양한 종류의 물질에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특성을 가지는 작은 (20~60 뉴클레오타이드) 단일가닥핵산 (DNA 혹은 RNA) 조각을 뜻한다.
- [0237] 본 발명은 리간드를 이용한 표적분자의 동정 및 정량하는 방법은 코팅계수법, 포획계수법과 경쟁계수법으

로 표적분자를 계수 분석하는 방법 및 키트를 제공한다.

- [0238] <도3>는 상기 코팅계수방법의 흐름도이고, <도3>에 도시된 바와 같이, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 표적분자를 분석하고자하는 시료를 준비하는 단계, 상기 준비된 시료를 코팅지지체에 고정시키는 단계, 상기 생체분자가 고정된 코팅지지체에 비고정 제1 탐침을 처리하여 코팅지지체-표적분자-제1 탐침 복합체를 형성하는 반응용액을 제조하는 단계, 상기 반응용액에서 형성된 코팅지지체-표적분자-제1 탐침 복합체를 정제하는 단계로 구성한다.
- [0239] 상기 고정 제1 탐침을 구성하는 구성단위 사이에 있는 스페이스(spacer)는 그 길이는 5~1,000개의 뉴클레오타이드로 구성된 단일가닥핵산이며 제1 탐침의 반응성 그룹에 결합하는 리간드 혹은 표적분자의 속성에 따라 그 길이를 결정할 수도 있다.
- [0240] 상기 제1 프로브는 리간드이며 바람직하며, 보다 구체적으로는 aptamer(아프타머), 항원, 항체, 합텐 등을 포함한다.
- [0241] 상기 제조된 고정 제1 탐침과 제2 탐침을 분석하고자하는 표적분자가 있는 시료에 처리하여 반응시킨 후 형성된 고정 제1 탐침-표적분자-제2 탐침 복합체를 분리 수확하여 분석하여 표적분자를 동정 및 정량을 한다.
- [0242] 상기 코팅지지체는 본원에서 분자가 비공유결합으로 직접 또는 간접적으로 부착될 수 있는 표면을 가지는 임의의 기질을 말하며, 본 발명에서 제공하는 장치를 제조하는 재료일 수도 있고, 또한 본 발명에서 상기 지지체에 특정성분을 코팅하여 상기 시료가 결합할 수 있는 기질을 제조할 수 있으며, 본 발명에서 생물분자를 계수하는 장치를 상기 지지체로 제조할 수도 있다.
- [0243] 본 발명에서 상기 코팅계수방법에서 사용하는 "코팅지지체"는 나이트로셀룰로스(nitrocellulose) 막, ELISA 플레이트, 또는 C4, C8 또는 C18 알킬기(Alkyl group)이 코팅된 비드를 사용할 수도 있다.
- [0244] <도4>은 포획계수방법의 흐름도이고, <도4>에 도시된 바와 같이, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 표적분자를 분석하고자하는 시료를 준비하는 단계, 상기 준비된 시료에 고정 제1 탐침과 제2 탐침을 노출시켜 제1 탐침-표적분자-제2 탐침 복합체를 형성하는 반응용액을 제조하는 단계, 상기 반응용액에서 형성된 제1 탐침-표적분자-제2 탐침 복합체를 정제하는 단계로 구성한다.
- [0245] <도5>는 경쟁계수방법의 흐름도이고, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 표적분자를 분석하고자하는 시료를 준비하는 단계, 상기 준비된 시료에 경쟁분자와 표지분자를 노출시켜 복합체를 형성하는 반응용액을 제조하는 단계 및 상기 반응용액에서 형성된 경쟁분자-제1 탐침 복합체를 정제하는 단계로 구성하는 것을 특징으로 한다.
- [0246] 본 발명은 상기 코팅계수법, 포획계수법과 경쟁계수법에서 정제한 표지리간드가 포함된 복합체의 표지리간드를 계수 분석하고 상기 분석결과로 부터 시료의 생체분자 값을 분석한다.
- [0247] 본 발명에서 코팅계수법 및 포획계수법에서 반응용액에 존재하는 표적분자는 제1 탐침과 결합하여 표적분자-제1 탐침 복합체를 형성하고 복합체의 형성정도는 표적분자의 양에 비례한다. 표적분자에 대한 정량분석 결과인 표적분자 값은 최종적으로 정제된 복합체에서 해리된 제1 탐침에서 발생하는 신호인 스폿의 계수를 분석하여 얻은 결과를 바탕으로 표적분자 값을 분석된다.
- [0248] 특히, 경쟁계수법은 상기 반응용액에서 형성된 경쟁분자-제1 탐침 복합체(complex)를 분리하여 상기 복합체에서 해리된 제1 탐침을 분석하여 결정한다. 즉, 분석하고자하는 표적분자와 경쟁분자의 제1 탐침에 대한 반응은 경쟁적 반응으로 표적분자-제1 탐침 복합체와 경쟁분자-제1 탐침 복합체를 형성한다. 반응용액에서 경쟁분자-제1 탐침 복합체의 형성정도는 표적분자-제1 탐침 복합체의 형성정도에 의존하여 결정됨으로 경쟁분자-제1 탐침 복합체의 신호를 분석하여 표적분자 값을 결정할 수 있다. 경쟁분자-제1 탐침 복합체만을 수확하여 제1 탐침을 해리시켜 해리된 제1 탐침에서 발생하는 신호인 스폿의 계수를 분석하여 얻은 결과를 바탕으로 표적분자 값을 분석된다.
- [0249] 표적분자에 대한 정량분석 결과인 표적분자 값은 최종적으로 정제된 제1 탐침을 포함하는 복합체에서 해리된 제1 탐침을 계수하여 기 작성된 표준곡선을 이용하여 표적분자와 결합하는 제1 탐침의 양을 평가하여 표적분자 값을 결정한다.
- [0250] 상기 코팅계수법, 포획계수법과 경쟁계수법의 상기 표적분자 값은 생물학적 샘플에서 하나 또는 그 이상의 표적분자를 연속적 분석이 가능하게 하는 다중분석을 사용하여 결정할 수 있다.

[0251] 다중분석에서, 개개의 상기 복합체들에서 해리되고 개개의 표적분자를 지시하는 신호발생영역이 있는 제1 탐침들을 지지체 상의 별개의 위치에 직접 또는 간접적으로, 공유결합 또는 비공유결합으로 고정화시킨다. 다중분석은 지지체의 특정영역에 결합한 제1 탐침에 있는 양자점(quantum dot)과 같은 신호발생영역에서 발생하는 독특한 신호에 의해 둘 이상의 표적분자들을 구분할 수 있는 기구에 의해 실현한다. 개개의 기구는 생물학적 샘플에서 검출될 각각의 다중 표적분자 중 하나의 분석을 위하여 사용한다. 개개의 기구는 생물학적 샘플에서 각 표적분자를 동시에 처리할 수 있도록 구성될 수 있다. 예를 들면, 미세역가 플레이트는 플레이트 내의 각 웰이 생물학적 샘플에서 분석될 다중 표적분자 중 하나를 특별하게 분석하는데 사용되는 것처럼 사용할 수도 있다.

[0252] 3. 시료처리

[0253] 분석하고자하는 세포, 바이러스 및 생체분자를 함유하고 있는 것으로 여겨지는 시료의 분석은 일련의 시료 준비 단계를 수반하며, 이들 단계에는 여과, 세포 용해, 핵산 정화, 및 시약과의 혼합을 포함할 수 있다. 핵산 분석 결과에 대한 확신을 갖기 위해서는 시료 준비 과정에 대한 제어가 유용할 것이다.

[0254] 상기 특정리간드에 결합하는 물질, 특정핵산, 메틸화 DNA 및 특정 유전자변이를 포함하는 생체분자를 위해 세포를 포함하는 시료인 경우, 세포를 용해하여 확보한 용해된 시료로부터 특정리간드 결합 물질을 포함하는 생체분자를 분리 정제 및 농축하여 농축된 생체분자 시료를 사용하거나 분석하고자하는 시료가 용해된 시료는 직접 분석할 시료로 사용할 수 있다.

[0255] 바람직하게, 본 발명은 상기 분석하고자하는 생체분자가 있는 용해된 시료는 용해소단위 다음 단계인 핵산소단위로 상기 시료를 직접 주입하는 생체 분자 분석 방법, 키트 및 장비를 제공한다.

[0256] 용해입자인 zirconium silicate(ZS)비드(Biospec products 사,미국) 등이 있는 상태에서 시료를 처리(shaking 또는 vortexing)하여 세포를 용해할 수 도 있다.

[0257] 바람직하게는, 일반적으로 정성정량분석의 경우 각종 시험, 검사시 비교를 위해 분석하고자하는 생체시료에 포함된 생체분자들로 내부정도관리를 한다. 상기 정도관리용 물질은 분석하고자하는 시료에 항상 일정량으로 존재하는 물질이 이상적이나 그렇지 못한 경우 시료에 포함되지 않는 물질인 외래물질을 사용할 수 있으며 바람직하게 분석하고자하는 시료가 생체시료인 경우 상기 생체시료에 포함되지 않는 외래생체분자들로 구성될 수 있다. 정도관리는 관리용 시료와 같은 외적기준을 사용하지 않고, 매회의 측정으로 얻을 수 있는 일군의 검사결과를 분석하여 측정치의 정밀도를 관리해 나가는 내부정도관리를 의미한다.

[0258] 바람직하며, 본 발명에서 내부정도관리용 물질은 인간유래 생체시료를 분석하는 경우 인간유래 생체시료에 포함되지 않는 생체분자로 식물특이생체분자를 사용할 수 있다. 현재 인간 게놈 프로젝트 및 식물의 일종인 애기장대(Arabidopsis thaliana)게놈 프로젝트가 종결되어 식물특이단백질들이 보고되어 있다. 본 발명에서는 인간유래 생체시료를 분석하기 위해, 기준물질로 식물특이단백질을 사용할 수 있다. 본 발명에 있어서, 특정리간드에 결합하는 물질 정량분석의 내부 정도관리는 분석하고자하는 생체시료에 포함되지 않는 물질을 이용할 수 있다.

[0259] 4. 분자계수 장비

[0260] <도6>에 도식된 바와 같은, 생체분자 계수분석 장치(1)는 하나 또는 그 이상의 생체분자를 분석하고자하는 시료를 준비하는 시료처리부(20), 상기 준비된 시료의 생체분자들로부터 복합체를 형성시키고 상기 복합체에서 결합한 표지리간드를 해리하는 반응구(30)와 상기 해리된 표지리간드를 분석하는 분석구(40)가 제작되고, 상기 시료처리부(20), 반응구(30)와 분석구(40)를 상기 지지체(10)에서 노즐(52)로 연결하여 시료, 시약과 유체를 이송하는 유체이송부(50), 상기 장치 구성단위와 유체이송을 통합 운영 제어하는 운영제어시스템(60)와 상기 리포터 분석결과로부터 결정된 생체분자 값을 임상검사 값으로 전환하여 생물학적 의미를 결정하고, 생체정보를 입출력하며 외부 서버와 송수신하는 생물학적 의미 결정 시스템(100)을 포함할 수도 있다. 이는 예시에 불과하며 다른 구성을 더 포함할 수 있으며, 이와 달리 구성 중 일부를 생략하여 구현될 수도 있다.

[0261] 상기 장치(1)는 지지체(10)에 시료처리부(20), 반응구(30), 분석구(40)와 노즐(52)들이 구성될 수도 있다.

[0262] 목적하는 각 질병을 진단하는 생체분자와 리간드를 우선 선별한다. 분석하고자하는 시료(또는 사용자)에 대한 정보가 운영제어시스템(60)에 입력되고 유체이송부(50)는 시료, 포획리간드와 표지리간드가 시료처리부(20)를 걸쳐서 순차적으로 반응구(30)에 이송하고 혼합되어 반응용액을 제조한다. 포획리간드는 특정의 리간

드에 수확물질을 포함하고 있으며 시료에 있는 생체분자와 리간드가 결합할 수 있다. 또한, 표지리간드는 생체분자를 리셉터로 하여 결합할 수 있는 리간드와 형광 태그 또는 양자점(quantum dot)로 이루어진 신호발생영역을 포함하는 리포터 분자로 구성되어 있다. 각 리포터는 신호발생영역의 신호로 특정 생체분자를 독특하게 동정할 수 있다.

[0263] 상기 시료처리구(20)은 상기 시료를 리간드-리셉터 반응이 가능하도록 반응버퍼 등을 첨가하여 반응용액을 제조하는 챔버이고 상기 코팅계수방법에서 시료를 코팅지지체에 결합시키는 반응을 수행하는 챔버일 수도 있다.

[0264] 상기 반응구(30)에서는 노즐(52)을 통해 시료처리구(20)에서 이송된 반응용액에 준비된 시약을 첨가하고 혼합기(31)에 의해 연속회전하면서 으 반응하여 표지리간드를 포함하는 복합체를 제조하고 정제한다. 정제되고 표지리간드를 포함하는 복합체를 포획리간드의 자성비드로 자석(32)에 의해 정제하고 히터(33)로 가열하여 복합체의 표지리간드를 해리시킨 후, 해리된 표지리간드를 함유하는 상징액을 수확한다.

[0265] 반응구(30)에서 수확한 상징액을 분석구(40)로 이송하고 상기 해리된 표지리간드는 표면, 예를 들면, 결합 지지체인 스트랩타미딘-코팅된 표면(41) 위에 표지리간드의 바이오틴에 의해 캡처되고 표지리간드가 고정될 수 있다. 세척용액을 주입하여 세척을 2 ~ 3 회 실시할 수도 있다.

[0266] 운영제어시스템(60)의 관리로 상기 표면(41)을 영상장치(44)에 의해 현미경적으로 이미지화하기에 앞서, 표면(41)상에 모든 복합체를 동일한 방향으로 정렬시키기 위해 전기동장장치(42)로 전계(electric field)을 가하고 고정핵산분자가 주입되면 해리된 표지리간드의 리포터 단일가닥핵산과 고정핵산분자의 단일가닥핵산이 상보적 결합을 하고 고정핵산분자의 바이오틴이 표면(41)에 추가적으로 캡처되고 표지리간드가 고정될 수 있다. 잔여물은 잔여물 수집소(43)로 이송한다.

[0267] 상기와 같이 생체분자의 계수에 의해 정량분석을 위한 목적으로 상업화된 제품을 사용할 수도 있다. 상업적으로 구입가능한 nCounter™ Analysis System(NanoString, Seattle, WA)이 이러한 분석을 할 수 있으나 이에 한정하는 것이 아니며 다른 시스템도 상기 분석에 이용될 수 있다.

[0268] 마이크로유체(가령, "랩-온-칩(lab-on-a-chip)") 장치가 시료에서 생체분자의 정량분석을 위한 본 발명의 방법에 이용될 수 있다. 본 발명의 생체분자 계수분석 장치(1)를 구성하는 시료처리구(20), 반응구(30), 분석구(40)와 유체이송구(50)를 마이크로유체 장치로 구동할 수 있다. 이런 장치는 본 명세서에서 기술된 바와 같이 가공되지 않은 시료에서 특정한 생체분자의 분석에 이용될 수 있다.

[0269] 특정한 생체분자의 수준에서 변화를 검출하기 위해 다양한 영상장치(44)가 이용될 수 있다. 따라서 이런 마이크로유체 칩 기술은 본 명세서에서 기술된 방법에서 이용을 위한 진단과 예후 장치에 이용될 수 있다. 이들 마이크로유체 장치는 표지된 양자점 및 기타 리포터의 레이저 여기(laser excitation)를 통합할 수 있다. 이들 장치는 또한, 가시광선을 비롯한 다양한 검출 기전, 그리고 전하 결합 소자(charge-coupled device) 기초된 카메라를 비롯한 다양한 디지털 이미지화 센서 방법을 통한 결과적인 발광(emission)의 검출을 통합할 수 있다. 이들 장치는 또한, 결과적인 신호와 데이터를 진단 정보로 번역하기 위한 이미지 처리와 분석 능력을 통합할 수 있다.

[0270] 리포터의 특정 신호를 검출 할 수 있는 기술 분야에서 사용 가능한 임의의 수단(44)에 의해 검출된다. 리포터가 형광 표지인 경우, 적절한 광원은 램프, 크세논 램프, 레이저, 발광 다이오드 등이 있으며 이들의 조합 아크에 한정되는 것은 아니다. 적절한 광원관 관련된 광학 검출 시스템은 역위형광 현미경(inverted fluorescent microscope), 에피-형광 현미경(epi-fluorescent microscope) 또는 공초점 현미경(confocal microscope)을 사용한다. 현미경은 리포터에 상응하는 스폿의 형광태그 순서를 결정하기 위해 충분한 공간 분해능으로 검출 할 수 있도록 사용된다. 표적 분자와 복합체를 형성하여 고형지지체에 고정된 리포터의 화상을 얻을 수 있다. 리포터이 세 가지 다른 색상의 알렉사 488 (Alexa 488), Cy3 및 알렉사 647(Alexa 647)를 사용한 경우, 각각의 염색시약은 상이한 채널들에서 분석되며, 스폿들의 행으로 볼 수 있도록 하는 제 1 및 제 2 레지스터는 몇 픽셀을 자리바꿈시켜 각각 개별적으로 등록할 수 있도록 한다(US 특허 제 7,4103,767).

[0271] 현미경 대물렌즈에 대한 중요한 고려 사항은 개구 수(numerial aperture; NA)에 의해 결정되는 광학 해상도이다. 큰 NA를 사용하면 광학 해상도가 더 높다. 필요한 NA는 $\delta = 0.61\lambda / NA$ (δ = 광학 해상도 및 λ = 파장)에 기초하며 바람직하게는 1.07이다. 대물렌즈에 의한 수집되는 광량은 $NA^4 /$ 대물렌즈의 배율²에 의해 결정된다. 따라서, 가능한 많은 광을 수집하기 위해서, 높은 NA 및 낮은 배율인 집안렌즈를 사용하여야

한다.

[0272] CCD 카메라를 선택할 때, 첫 번째 고려 사항은 부분적으로 이미징 시스템의 해상도를 결정하는 최종 픽셀 크기이다. 최적의 광학 해상도는 CCD 카메라에 의해서만 결정되는 것은 아니다. 생체분자에 상응하는 각각의 스폿은 적어도 두개의 화소로 명확하게 구분되기 위해서는 광학 해상도는 210~300 nm이어야 하며 이는 60 X 확대 후에 CCD 칩 상에서는 12.6~18 μm 에 해당한다. 또는, CCD 칩의 화소 크기는 거의 6.3~9.0 μm 이어야한다. 두번째 고려 사항은 화소 사이즈, 양자 효율, 판독 잡음 및 다크 (dark) 노이즈 등의 많은 요인에 의해 결정되는 검출 감도이다. 높은 감도를 달성하기 위해, 큰 집적 영역을 줄 수 있는 큰 픽셀 크기, 높은 양자 효율, 저 노이즈 정성 카메라를 선택해야 한다. 이 기준에 적합한 카메라는 Hamamatsu 사의 Orca-Ag 카메라이다. 칩 크기가 1344 X 1024 픽셀이며 60 나 대물 렌즈를 사용하는 경우, 시야는 144 X 110 μm^2 이다.

[0273] 본 발명의 생체분자는 낮은 1,000조분의 1몰 범위(femtomolar range)의 농도에서 측정되었다. 이것은 2D 겔 및/또는 질량 분석법을 사용하여 얻은 바이오마커 발견 실험에 비하여 약 4차수 정도 낮다.

[0274] 도 5에 도시된 바와 같이, 본 발명은 하나 또는 그 이상의 생체분자를 계수하고 생물학적 의미를 생산하기 위해서, 사용자로부터 하나 또는 그 이상의 생체분자를 분석하고자하는 시료를 준비하는 시료처리구(20), 상기 시료에 포획리간드와 표지리간드를 노출시켜 반응용액에서 으로 생체분자-표지리간드 복합체와 포획리간드-표지리간드 복합체를 형성하는 반응구(30), 상기 형성된 포획리간드-표지리간드 복합체의 리포터를 분석하는 분석구(40), 상기 시료처리구(20), 반응구(30)와 분석구(40)를 노즐로 연결하여 시료, 시약 및 유체를 이송하는 유체이송구(50) 및 상기 장치의 구성단위와 유체이송을 운영 제어하고, 상기 분석구에서 입력되는 리포터 분석결과로부터 하나 또는 그 이상의 생체분자 값을 결정하고 운영제어시스템(60)으로 구성된 생체분자 계수 장치를 제공하고 있다. 이는 예시에 불과하며 다른 구성을 더 포함할 수 있으며, 이와 달리 구성 중 일부를 생략하여 구현될 수도 있다.

[0275] 5. 생물적인 의미 예측 기술

[0276] 본 발명에서 상기 생체분자 정보데이터를 이용한 생물적인 의미 예측시스템은 예시적으로 진단이지만 이에만 국한된 것이 아니다.

[0277] 본 발명으로 생성되는 많은 생체분자 정보 데이터는 고차원의 특성을 갖는 방대한 양의 정보로 세포, 조직이나 질병에 관련된 다양한 정보를 생산할 수 있다. 상기 입력된 데이터를 이용하여 분석 시스템에서 전 처리를 수행하는 모듈은 환자의 상태에 영향을 미치는 특징들을 찾아내고 분류 성능을 향상시키기 위한 다변량 분석방법은 정확한 치료와 진단을 위해 중요 변수를 찾아 차원을 축소하거나 특성의 변형을 통해 주요 특징들을 찾아내는 특징 추출(Feature Selection) 절차이다.

[0278] 특징 추출은 세부적으로 클래스 정보를 학습에 사용하는 지 여부에 따라 무감독 학습(Unsupervised Learning) 또는 감독 학습방식(Supervised Learning) 방식이 있다. 무감독 학습 방식에 주로 활용되고 있는 PCA(Principal Component Analysis) 또는 ICA(Independent Component Analysis)는 변수들의 특성을 고려하여 특징을 추출할 수 있다. 감독방식은 클래스 정보와 변수간의 통계적인 유의성이나 변수들 간의 상관관계를 활용하여 변수를 선택하는 방식이다. 이 방식은 주어진 특징 집합에서 전 방향(Forward) 또는 후 방향(Backward)으로 특징들을 순차적으로 추가하거나 제거해가면서 분류기에 적용시킨 성능을 통하여 주요 특징을 산출할 수 있다.

[0279] 상기 전 처리된 결과를 가지고 학습을 수행하여 환자의 모델을 생성하는 모듈은 선택된 특징들을 적합한 분류기(Classifier)를 통해 각 클래스별로 분류하는 절차이다.

[0280] 본 발명에서 인공신경망(Artificial Neural Network)을 사용하였는데, 입력과 출력에 따라 행동을 결정하는 특성 때문에 패턴인식, 함수근사, 분류기법 등 다양한 분야에서 응용되고 있다. 인공신경망은 그 구조는 여러 개의 층(layers), 노드(nodes), 신경망간 연결 가중치로 구성된다. 본 발명에 사용하는 신경망 층간 연결방식은 전향(Feed-forward)방식이다. 입력패턴에 따라 각 노드에 대한 신경망 연결 가중치와 활성화 함수를 이용하여 출력값을 산출하였다. 생성된 결합정보를 통하여 어떤 일을 처리했을 때 추정된 값과 실제 결과 값이 상이한 경우, 산출된 값을 실제 결과 값과 비교하면서 오차를 줄이는 과정을 반복해서 찾아내는 방식이다.

[0281] 상기 환자의 모델을 생성하는 방법은 선형 모델(linear models), 지지 벡터 기계(support vector machines), 신경망(neural networks), 분류 및 회귀 트리(classification and regression trees), 앙상블 학습법(ensemble

learning methods), 판별식 분석(discriminant analysis), 근접 네이버 방법(nearest neighbor method), 베이지스 네트워크(Bayesian networks), 독립 성분 분석(independent components analysis)으로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 생체분자 분석방법 및 장치를 제공한다.

[0282] 정확하고 종합적인 메커니즘(Mechanism)이 밝혀지지 않은 대다수의 질환들에 대해서는 사례를 기반으로 하는 진단의 중요성이 매우 크다고 할 수 있다. 그러나 특정 기계학습 기법에 국한하여 고안된 기존의 사례 기반 기계학습추론 시스템은 정확도가 낮아 개선된 시스템의 개발이 지속적으로 요구되고 있다. 또한, 기존의 시스템은 학습된 임상 검사 항목 모두를 이용한 질환 판별기로서 고안되어 있으며 각 질환별 임상 검사 항목의 중요도나 우선순위를 활용할 수 있는 방법을 제공하고 있지 않다.

[0283] 본 발명은 의사의 정확한 질환 진단을 지원하기 위한 사례 기반 기계학습 추론을 이용한 질환 진단 및 검사항목 선정 시스템에 관한 것으로, 환자들의 사례 데이터베이스(Database)를 통해 훈련된 인공신경망(Neural Network)로 한 기계학습기인 질환 판별기를 통해 새로운 환자의 검사 정보를 분석하여 질환을 판별하고 예비진단에 의한 각 질환의 최종 판별을 위한 최소의 중요 검사 항목을 선정하여 제공하는 시스템에 관한 것이다. 기계학습 추론을 통한 질환 진단 기법은 기계학습 기법을 개별적으로 적용하여 구성하고 있다. 상기 환자의 모델을 생성하는 방법은 선형 모델(linear models), 지지 벡터 기계(support vector machines), 신경망(neural networks), 분류 및 회귀 트리(classification and regression trees), 앙상블 학습법(ensemble learning methods), 판별식 분석(discriminant analysis), 근접 네이버 방법(nearest neighbor method), 베이지스 네트워크(Bayesian networks), 독립 성분 분석(independent components analysis) 등이 있다.

[0284] 본 시스템의 구성 및 실무에서의 응용은 2가지로 나누어서 구성할 수 있는데 진단만을 위한 독립된(stand alone) 형태의 진단시스템과 기존의 병원정보시스템 즉 OCS, PACS, LIS 등과 연계된 통합된 시스템으로 구성할 수 있다. 통합된 시스템과의 연동을 위해서는 HL7, 및 DICOM 규약에 의거하여 시스템을 구성하여야 한다. 본 시스템은 초기모델로 PMS(Patient Monitoring System)와 연동하여 진단의 정확도를 높게 하였다. 또한 PMS 뿐만 아니라 OCS, EMR, PACS 등 다양한 의료 정보시스템과 연동된 시스템으로 개발하여 다양한 질환인자를 포함하고 있는 보다정확한 진단시스템으로 개발할 수 있다.

[0285] 본 발명에서는 상기 생체분자 정보 데이터를 이용한 생물적인 의미분석을 위한 구성은 환자군의 상기 생체분자 정보와 대조군의 상기 생체분자 정보 데이터를 입력 받고 데이터베이스를 구축하는 모듈; 상기 입력된 정보 데이터를 이용하여 분석 시스템에서 전 처리를 수행하는 모듈; 상기 전 처리된 결과를 가지고 환자의 모델을 생성하는 모듈; 상기 생성된 모델을 로딩하여 내원한 환자에 적용하여 블라인드 테스트(Blind test)인 진단을 수행하는 모듈; 및 교차검정을 통해 시스템의 성능을 평가하는 모듈; 을 포함하는 것을 특징으로 하는 생체분자 분석방법 및 장치를 제공한다.

발명의 효과

[0286] 본 발명은 표적분자를 분자계수기술을 이용하여 분석함으로써 생체 시료에서 표적분자를 높은 감도와 재현성으로 검출할 수 있으며 표적분자의 생물학적 의미를 확인할 수 있다. 더욱이, 한 번의 검사로 다양한 생체분자들을 분석함으로써 생체시료에서 표현형의 변화, 질병에 대한 민감성 그리고 치료 약제에 대한 반응의 차이 등 개인 간의 차이를 효율적으로 결정하여 진단 및 치료에 사용할 수 있는 생물학적 의미를 결정하는 방법을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0287] 이하, 첨부도면과 실시례를 참조하여 본 발명에 따라 하나 또는 그 이상의 생체분자로 구성된 생체시료에 있는 생체분자를 분석하는 핵산분석방법을 상세히 설명한다. 이하의 구체에는 본 발명을 예시적으로 설명하는 것일 뿐 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 아니한다.

[0288] **실시례 1. 시약의 제조**

[0289] **1-1. 제1 탐침**

[0290] 제1 탐침은 표적분자와 결합하여 상응하는 신호를 발생시키는 기능을 하고 구성은 표적분자를 지시하는 신호발생영역과 제1 프로브가 결합된 구조체가 기본이며 이에 추가적으로 고정영역과 결합태그가 추가될 수 있다.

[0291] **<신호태그의 제조>**

[0292] 신호태그는 신호발생영역을 구성하는 단위로 본 실험에서는 M13 DNA를 대상으로 PCR 산물 크기가 약

900bp를 생산할 수 있도록 PCR 프라이머를 디자인하고 제작한다(한국, 바이오니아). 신호태그의 골격 DNA는 M13 DNA로 진뱅크 (GenBank) 데이터 시스템 ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))에서 얻을 수 있는 M13 DNA의 염기서열 정보 (Accession number는 NC_003287)이다.

[0293] M13 DNA를 주형으로 하기 PCR 프라이머 쌍으로 PCR하여 DNA 절편(903 bp)을 제조하였다.

[0294] 정방향 프라이머 atcaggcgaatccgttattg

[0295] 역방향 프라이머 tcggccttgctggtaatatc

[0296] M13 DNA에서 얻은 DNA 절편을 주형으로 3 종류의 dNTP와 aminoallyl-dCTP 를 사용하여 상기 제조된 프라이머 쌍으로 다시 PCR를 하여 aminoallyl-dCTP 표지된 DNA 절편을 제조하였다.

표 1

제한효소	인식부위	일련번호
Eco RI/Sma I Adaptor	5' -AATTC ^{CGGG} --3' 3' -GGGG ^{CCCp} -5'	
Hind III/Not I Adaptor	5' -AGGT ^{TGCGGCCG} --3' 3' -ACGCG ^{GGCGp} -5'	
Xho I/Pst I Adaptor	5' -TCGAGCT ^{GCAGG} --3' 3' -CGACG ^{TCCp} -5'	
Sal I/Bam HI Adaptor	5' -TCGAC ^{GGATCC} --3' 3' -GCCTA ^{GGp} -5'	

[0297]

[0298] 제한효소 아댑터의 염기서열

[0299] 상기 DNA 절편의 제한효소 지도를 작성하여 DNA 산물을 절단할 수 없는 제한효소(Restriction enzyme)로 이루어진 [표 3]의 adaptor들을 구입하였다(Gene Link 사, USA). 상기 adaptor를 aminoallyl-dCTP 표지된 DNA 절편에 아래와 같이 연결하였다.

[0300] 1ST 도메인: 5'-Blunt end-DNA절편-Eco RI/Sma I adaptor-3'

[0301] 2ND 도메인: 5'-Eco RI/Sma I adaptor-DNA절편-Sal I/Bam HI adaptor-3'

[0302] 3TH 도메인: 5'-Sal I/Bam HI adaptor-DNA절편-Hind III/Not I adaptor-3'

[0303] 4TH 도메인: 5'-Hind III/Not I adaptor-DNA절편-Xho I/Pst1 adaptor-3'

[0304] 5TH 도메인: 5'-Xho I/Pst1 adaptor-DNA절편-Sal I/Bam HI adaptor-3'

[0305] 6TH 도메인: 5'-Sal I/Bam HI adaptor-DNA절편-Eco RI/Sma I adaptor-3'

[0306] 7TH 도메인: 5'-EcoRI/Sma I adaptor-DNA절편-3'

[0307] 1ST 도메인은 EcoRI, 2ND 도메인은 EcoRI과 BamHI, 3TH 도메인은 BamHI과 HindIII, 4TH 도메인은 HindIII와 Xho I, 5TH 도메인은 Xho I과 Sal I, 6TH 도메인은 Sal I과 Sma I, 7TH 도메인은 Sma I을 처리하여 반응시킨 후, 정제하여 adaptor가 절단되고 aminoallyl-dCTP 표지된 PCR 절편을 획득하였다.

[0308] 본 발명에서 사용하는 신호발생영역은 4 종류의 신호태그의 조합으로 일렬 연속 7개 도메인으로 배열된 구조체로 이를 제조하기 위해, 4종류의 신호태그가 7개 도메인으로 연속적으로 배열된 구조체를 다음과 같이 제조하였다.

[0309] 핵산 정량, 핵산변이, 메틸화 DNA, 단백질, 바이러스 또는 세균 등의 생체분자를 분자 계수하여 정량하기 위해, N-hydroxysuccinimide(NHS)-ester(에스테르) 형광(Alexa 488, Alexa 594, Alexa 647(미국, Invitrogen) 또는 Cy3(미국, GE Healthcare) 4 종류의 염색시약 세트를 준비한다.

[0310] 제한효소로 절단된 PCR 절편을 4개의 튜브에 나누어 넣고 각각에 한 종류의 염색시약을 넣어 반응시

킨다. 이와 같이 모든 도메인에 사용할 수 있는 PCR 절편을 표지하였다.

[0311] 구체적으로 박테리오파지 M13 DNA를 주형(template)로 정방향 프라이머와 역방향프라이머로 PCR로 얻은 PCR 단편(903 bp)을 주형으로 50 % amino-allyl UTP(Sigma)을 표지되도록 PCR를 하였다. 상기 PCR 단편에 제한 효소 절단부위가 있는 아댑터(adapter)를 연결한 후 제한효소를 처리하였다. amino-allyl UTP가 표지되고 제한 효소 절단부위가 있는 PCR 절편 각각에 4종류의 NHS-에스테르 형광(Alexa 488, Alexa 594, Alexa 647(Invitrogen) 또는 Cy3(GE Healthcare))에서 어느 하나를 먼저 연결하고 순차적으로 4 종류를 연결 하여 신호발생물질이 표지된 이중가닥 DNA인 신호태그를 제조하여 "H 신호태그"라고 지칭하였다.

[0312] <교차결합 유도 및 검증>

[0313] 상기 제조된 H 신호태그를 반응버퍼(10 mM Tris (pH 7.0), 200 mM NaCl)에 녹인 후, 8-methoxypsoralen(8-MOP; 미국, Sigma)을 71.0 mg/mL 최종농도가 되도록 첨가하여 암 상태에서 1시간 반응시켰다. 이 반응물에 자외선 365 nm 파장 (4 W)을 주사하면서 3시간동안 상기 H 신호태그 사슬간 교차결합을 시켜 신호태그 구성 염기쌍간의 공유결합을 유도하였다. 이와 같이 공유결합이 포함된 "C 신호태그"를 준비하였다.

[0314] H 신호태그와 이에 상응하는 C 신호태그를 0.5℃씩 온도를 95℃까지 상승시키면서 UV-1800(Shimadzu 사, 일본)으로 260 nm에서 흡광도를 측정한 결과 <도7>와 같았으며, H 신호태그는 온도가 증가하면서 이중가닥핵산이 해리가 되어 단일가닥핵산으로 전환되고 T_m이 약 85℃ 이고 95℃에서 단일가닥핵산으로 존재하였으며, 반면 C 신호태그는 95℃에서도 이중가닥핵산을 유지하고 있음을 알 수 있었다.

[0315] <신호발생영역, 색상지시바코드의 제조>

[0316] 제조된 H 신호태그 또는 C 신호태그를 이용한 신호발생영역 색상지시바코드(Color-coded barcode)를 제조를 위해, 1차 도메인용 4 종류의 신호태그를 <도 2>와 같이 4 개의 튜브에 각각 넣고 선택되어진 튜브의 신호태그를 4 개의 튜브로 나누어 넣고 각 튜브에 2차 도메인용 4 종류의 신호태그를 한 종류씩 넣어 신호태그들을 혼합시킨다. 나머지 3 개의 2차 도메인용 신호태그도 상기와 같이 처리하여 2 종류의 신호태그를 혼합시킨다. 상기 2 종류의 신호태그가 있는 튜브의 용액을 다시 4 개의 튜브로 나누고 넣고 각각의 튜브에 3차 도메인용 4 종류의 신호태그를 넣는 과정을 모든 2 종류의 태그가 혼합된 용액에 대하여 반복하여 3 종류의 신호태그가 있는 용액을 준비한다. 이와 같은 방법을 반복하여 총 7 개의 신호태그가 있는 튜브를 준비한다.

[0317] 7 개의 도메인용 신호태그가 있는 튜브에 T4 ligase를 처리하여 연결반응을 하여 7 개의 도메인용 신호태그가 일렬로 연속적 배열을 한 최종 구조체를 제조하며 이를 "신호발생영역"이라 지칭하였다.

[0318] 신호발생영역은 생체분자 특이 바코드 시스템(barcode system)로 4종류의 dye(Alexa dye 3종류, Cy3)를 길게 늘어트린 신호태그 마다 특이한 신호를 형성할 수 있도록 제작이 되어 이들의 조합으로 표적분자들을 특이적으로 지시한다. 제1 탐침 분자는 에피 형광 현미경에 의해 촬영할 때의 ~300 um 나노 스폿을 형성하며, 각각의 선형 순차적 7 종류의 표시된 영역을 가진다.

[0319] <탐침의 제조>

[0320] 제1 탐침은 생체분자를 인지하여 결합하고 특이 신호를 발생시켜 표적분자를 지시하고 가시화하는 물질로 제1 프로브와 상기 신호발생영역이 결합한 구조이다.

[0321] 바람직하게, 본 발명에 사용하는 제1 프로브는 핵산정량, 핵산변이 또는 메틸화 DNA 등의 분석을 위해서 단일가닥핵산과 핵산을 제외한 생체분자를 정량하기 위해서 항체와 압타머 등의 리간드일 수도 있다.

[0322] 비교정 제1 탐침은 5'-신호발생영역-스페이서-제1 프로브-3' 구조로 주로 세균, 세포 및 바이러스 등의 계수에 사용할 수도 있다.

[0323] 스페이서 ; 5'-AGAAGCGCAGAGCTTGGGCGCAGAACAC-3'

[0324] 단일가닥핵산인 제1 프로브는 5'-스페이서-제1 프로브-3'를 주문하여 제조하였다(Integrated DNA Technologies 사, USA). 상기 제조된 5'-스페이서-제1프로브-3' 단일가닥핵산과 상기 제조된 신호발생영역을 ligase의 연결반응으로 결합하여 비교정 제1 탐침을 제조하였다.

- [0325] 또한 리간드인 제1 프로브는 5'-스페이서-제1 프로브-3' 구조이고 리간드가 압타머인 경우는 5'-스페이서-제1 프로브-3' 구조의 골격이 단일가닥핵산으로 이를 주문하여 제조하였다(Integrated DNA Technologies사, USA). 리간드가 항체의 경우는 항체에 반응성 그룹 부가 반응을 Thunder-Link[®] oligo conjugation system(Innova Biosciences Ltd., 영국)의 프로토콜에 따라 실시하고 반응성 그룹이 부가된 항체를 제조하였다. 또한 반응성 그룹이 있는 스페이서인 단일가닥핵산을 주문 제조하였다(Integrated DNA Technologies사, USA). 상기 반응성 그룹이 부가된 항체와 상기 반응성 그룹이 있는 스페이서인 단일가닥핵산을 반응시켜 5'-스페이서-항체 구조를 제조하였다.
- [0326] 상기와 같이 제조한 5'-스페이서-제1 프로브-3' 구조와 신호발생영역을 ligase의 연결반응으로 결합시켜 비고정 제1 탐침을 제조하였다.
- [0327] 고정 제1 탐침은 5'-제1 프로브-스페이서-고정영역-신호발생영역-바이오틴-3'(일반식 1)구조로 주로 핵산 및 단백질 등을 계수하여 정량에 사용할 수도 있다.
- [0328] 고정영역: 5'-(GCCACAGCACCTTGGTGCCTAGGATCTG)₁₀-3'
- [0329] 제1 프로브가 단일가닥핵산을 제1 프로브로 사용하는 고정 제1 탐침을 제조하기 위해 먼저,
- [0330] 5'-스페이서-고정영역-3' 단일가닥핵산을 주문 제조하여 준비하였다(Integrated DNA Technologies사, USA). 신호발생영역에 바이오틴을 부가하여 5'-신호발생영역-바이오틴-3' 구조체를 제조하였다. 상기 5'-스페이서-고정영역-3'와 5'-신호발생영역-바이오틴-3' 구조체를 ligase의 연결반응을 하여 5'-스페이서-고정영역-신호발생영역-바이오틴-3'구조체를 제조하고 정제하였다. 상기 제조 정제된 반응물과 제1 프로브를 연결반응을 하여, 5'-제1 프로브-스페이서-고정영역-신호발생영역-바이오틴-3'(일반식 1)인 제1 탐침을 제조하였다.
- [0331] 제1 프로브가 항체를 사용하는 고정 제1 탐침은 5'-항체-스페이서-고정영역-신호발생영역-바이오틴-3' 구조이다.
- [0332] 먼저, 고정 제1 탐침을 제조하기 위해 신호발생영역의 3' 한 쪽에 바이오틴을 부가 반응하여 5'-신호발생영역-바이오틴-3' 구조체를 제조하였다. 5'-스페이서-고정영역-3' 단일가닥핵산을 주문 제조하여 준비하였다(Integrated DNA Technologies사, USA).
- [0333] 상기 5'-스페이서-고정영역-3' 단일가닥핵산과 5'-신호발생영역-바이오틴-3' 구조체를 ligase의 연결반응으로 5'-스페이서-고정영역-신호발생영역-바이오틴-3'(일반식 1) 구조체를 제조하였다.
- [0334] 상기 5'-스페이서-고정영역-신호발생영역-바이오틴-3' 구조체의 5' 끝에 반응성 그룹 부가는 Thunder-Link[®] oligo conjugation system(Innova Biosciences Ltd., 영국)을 사용하여 프로토콜에 따라 실시하였다. 100 μl의 60~100 μM 제작된 구조체를 Oligo Activation Reagent 튜브에 첨가하며, 실온에서 1시간 반응시켜 활성화시켜 수행하였다. 상기 활성화된 반응용액을 준비된 컬럼을 이용하여 탈염시켜 반응성 그룹 부가를 수행하였다.
- [0335] 항체에 대한 반응성 그룹의 부가는 100 ul의 1 mg/ml 항체를 Antibody Activation Reagent 튜브에 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켜 활성화시켰다.
- [0336] 반응성 그룹이 부가된 항체와 상기 탈염된 구조체 적절한 비율로 혼합하여 실온에서 12 ~ 24시간 반응시켰다. Conjugate Clean Up Reagent를 상기 반응혼합용액을 반응용액에 첨가하여 10분간 반응시키고 15,000g에서 5분간 원심분리하여 수확된 반응용액에 Conjugate Clean Up Reagent를 첨가한 후 다시 원심분리하여 정제된 상기 5'-제1 프로브인 항체-스페이서-고정영역-신호발생영역-바이오틴-3' 구조인 제1 탐침을 수확하였다.
- [0337] 압타머를 리간드로 사용하는 고정 제1 탐침은 5'-압타머-스페이서-고정영역-신호발생영역-바이오틴-3'(일반식 2)로 구성된 구조체일 수도 있다.
- [0338] 상기 고정 제1 탐침의 제조는 먼저, 상기 신호발생영역의 3' 끝에 바이오틴을 부가하여 5'-신호발생영역-바이오틴-3' 구조체를 제조하고 5'-압타머-스페이서-고정영역-3' 단일가닥핵산을 주문 제작하였다(Integrated DNA Technologies사, USA). 상기 5'-신호발생영역-바이오틴-3' 구조체와 5'-제1 프로브-스페이서-고정영역-3' 단일가닥핵산을 ligase의 연결반응으로 5'-압타머-스페이서-고정영역-신호발생영역-바이오틴-3' 구조체를 제조하였다.

[0339] (제2 탐침과 경쟁분자)

[0340] 제 2 탐침은 제 2 프로브와 고체 지지체를 결합시켜 제조하고 경쟁분자는 표적분자 또는 표적분자 유사체와 고체 지지체를 결합시켜 제조하였다.

[0341] 이하에서 리간드와 표적분자를 분자로 통칭하여 기술하였으며 구분할 필요가 있을 경우만 나누어 기술하였다.

[0342] 제 2 탐침 또는 경쟁분자는 분자에 직접 자성비드를 결합시키거나, 바이오틴(biotin)이 표지된 단일가닥핵산을 결합시킨 후, 자성비드를 결합시켜 제조하였다. 본 발명에 사용한 리간드와 생체분자는 표 1 및 표 2와 같다.

[0343] 분자와 활성화 자성비드(M-280 Tosylactivated magnetic beads, Dynal Biotech ASA, Norway)를 버퍼용액(0.1 M borate buffer, pH 9.5)에 넣고 상온에서 48시간 반응시켰다. 분자가 결합된 자성비드는 자석을 이용해서 분리가 가능하며, 동일한 버퍼용액으로 비드를 세척하여 결합하지 않은 분자를 제거하였다. 분자가 결합된 자성비드(이하 '포획리간드')는 세척 후 0.1 %의 BSA(Bovine Serum Albumin, Sigma Co.) 용액으로 37℃에서 4시간 반응시켜 분자와 결합하지 않은 토실(tosyl)기를 불활성화시켰다. 이어 수차례 세척 후 버퍼용액(0.1 M PBS, pH 7.4)에 자성비드를 혼합하여 4℃에서 보관하였다.

[0344] 분자에 대한 스페이서를 수확물질 부가는 먼저, 분자의 바이오틴화로 한쪽 끝에 바이오틴이 표지되고 다른 한쪽 끝에 반응성 그룹이 있는 단일가닥핵산을 주문 제조하여(Integrated DNA Technologies 사, USA) 수행하였다. 분자에 대한 반응성그룹의 부가는 Thunder-Link[®] oligo conjugation system (Innova Biosciences Ltd., 영국)을 사용하여 프로토콜에 따라 실시하였다.

[0345] 분자에 대한 반응성 그룹의 부가는 100 μ l의 1 mg/ml 분자를 Antibody Activation Reagent 튜브에 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켜 활성화시켰다. 반응성 그룹이 부가된 분자와 주문 제작된 단일가닥핵산의 결합은 상기 활성화된 반응용액을 준비된 컬럼을 이용하여 탈염시킨 후, 상기 탈염된 분자와 단일가닥핵산을 적절한 비율로 혼합하여 실온에서 12~24시간 반응시켰다. Conjugate Clean Up Reagent을 상기 반응용액에 첨가하여 10분간 반응시키고 15,000 g에서 5분간 원심분리하여 수확된 바이오틴이 표지된 분자에 Conjugate Clean Up Reagent을 첨가한 후 다시 원심분리하여 정제된 바이오틴이 표지된 분자를 수확하여 바이오틴이 표지된 분자를 제조하였다.

[0346] 이상과 같이 준비된 바이오틴이 표지된 분자들과 스트렙타비딘이 코팅된 자성비드(Streptavidin-coupled Dynabeads, Dynal Biotech ASA, Norway)를 연속 회전하면서 반응시켜 자성비드가 부가된 분자를 제조하였고 이를 "제 2 탐침 또는 경쟁분자"라고 지칭하였다.

[0347] (고정분자)

[0348] 고정분자는 리포터분자의 반복구조부의 염기서열에 상보적인 염기서열이며 5' 끝에 바이오틴이 표지된 단일가닥핵산을 주문 제조하여 준비하였다(Integrated DNA Technologies사, USA).

[0349] 실시예 2. 세균

[0350] 대표적인 식중독균인 대장균, 살모넬라균, 리스테리아 및 포도상구균을 <표2>의 항체 및 <표 3>의 압타머로 제조된 비고정 제1 탐침 및 제2 탐침으로 계수하였다.

[0351] 세균 계수에 사용하는 제1 탐침은 7개 도메인 모두 동일한 염색지시약으로 표지된 신호태그로 구성된 신호발생 영역으로 구성하여 사용할 수도 있다. 제2 탐침은 제2 프로브에 바이오틴 또는 다양한 고체 지지대를 고정하여 제조할 수도 있다.

표 2

항체 종류	카탈로그번호	공급회사
E. coli / Anti-E. coli antibody	ab25823	abcam
Listeria / Anti-Listeria Antibody	01-90-95	KPL, Inc.
Salmonella CSA-1 / Anti-Salmonella CSA-1 Antibody	01-91-99	KPL, Inc.

[0352]

[0353] 식중독균 표면분자에 결합하는 항체

표 3

식중독균	염기서열(5'→3')	비고
대장균	cgcaguuugc gcgcgaucca aguucucuca ucacggaaua	대한민국 등록특허 10-0730359
	acacugcgug cuuacgacuu cuggucccau cauucggcua	
	aguucgauga gggugacacc gccaggagug uuugcuagac	
Salmonella typhimurium	5'-dApdGpdGpdTpdCpdTpdGpdTpdApdGpdGpdTpdCpd TpdGpdCpdGpdGpdGpdGpdCpdGpdTpdGpdGp-3'	대한민국 등록특허 10-1459547
	5'-dCpdApdGpdCpdCpdApdGpdGpdApdTpdGpdGpdGp dApdGpdGpdTpdCpdTpdGpdTpdApdGpdGpdTpdCpdTp dGpdCpdGpdGpdGpdGpdCpdGpdTpdGpdGp-3'	
Staphylococcus aureus	5'-dGpdCpdApdApdTpdGpdGpdTpdApdCpdGpdGpdTpd ApdCpdTpdTpdCpdCpdGpdGpdGpdCpdTpdGpdGpdCpd CpdApdGpdApdTpdCpdApdGpdApdCpdCpdCpdGpd GpdApdTpdGpdApdTpdCpdApdTpdCpdCpdTpdTpdGpd TpdGpdApdGpdApdApdCpdCpdApdCpdApdApdApdAp dGpdTpdGpdCpdApdCpdGpdCpdTpdApdCpdTpdTpdTp dGpdCpdTpdApdAp-3'	Aptagen

[0354]

[0355] 식중독균에 결합하는 압타머의 염기서열

[0356] 본 발명에서 세균 분석 반응은 하기 반응용액에서 일어나는 리간드-리셉터 반응이다.

[0357] 반응용액은 항체리간드의 경우는 10 mM PBS 버퍼 (137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, pH 7.4)이며, 압타머 리간드의 경우는 셀렉스버퍼 (20 mM Tris-Cl buffer, pH 7.6 contained 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂ and 0.02% Tween)를 사용하였다. 반응용액에 세균번식저해를 위한 소듐아지드 0.05 내지 0.2%, 비특이적 결합 저해를 위한 우혈청알부민 0.1 내지 0.3%을 포함할 수도 있다. 바람직하게는 반응온도는 20 내지 30℃의 온도이다.

[0358] 세균이 포함된 시료 70μl에 제1 탐침 15μl과 바이오틴이 부가된 제2 프로브 구조체 15 μl를 30분간 흔들어 주면서 반응시켰다. 상기 반응용액 20μl을 아비딘이 코팅된 유리슬라이드에 처리하여 커버슬립을 덮었다. 코팅된 아비딘과 제2 프로브의 바이오틴이 반응하여 제1 탐침이 결합한 세균을 유리슬라이드에 고정된다. 상기 제1 탐침이 결합하여 형성된 복합체에 있는 세균의 존재 신호를 발생하는 스폿들(spots)을 계수하여 표적분자 세포를 계수하였다(도 9).

[0359] 제1 탐침의 한 쪽 끝에 바이오틴을 부가하여 세균과 바이오틴이 부가된 제1 탐침을 반응시킨 후 아비딘이 코팅된 유리슬라이드와 반응시켜 세균-제1 탐침 복합체를 포획하여 형성된 복합체에서 세포의 존재 신호를 발생하여 형성된 스폿들을 계수하여 표적분자 세균을 계수하였다.

[0360] 다양한 신호발생영역으로 다양한 세균을 특이적으로 지시하도록 제1 탐침을 제조하여 여러 종류의 세균을 동시에 동정 및 계수를 제1 탐침과 세균 복합체의 색상분석으로 할 수 있다.

[0361] 실시례 3. 바이러스

[0362] 본 실험에서 간염바이러스 C형을 혈청이나 혈장에서 비교정 제1 탐침 및 제2 탐침을 사용하여 계수하였다.

[0363] AxSYM HCV version 3.0 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA)으로 시행하였다. AxSYM HCV version 3.0은 효소측정법의 한 형태인 MEIA (microparticle enzyme immunoassay) 법을 이용하여 환자의 혈청이나 혈장에서 C형 간염바이러스 항체를 정성적으로 검출하는 방법이다. 결과판정은 anti-HCV ELISA S/CO 값이 1 이상인 경우 양성으로 판정하였다.

[0364] 비교정 제1 탐침의 프로브는 다클론 Hepatitis C Virus (HCV) 항체 고 제2 탐침의 프로브는 Hepatitis C Virus (HCV) NS3 항체이다(EastCoat Bio. Inc. USA).

[0365] 바이러스 계수에 사용하는 제1 탐침은 7개 도메인 모두 동일한 염색지시약으로 표지된 신호태그로 구성된 신호발생영역으로 구성하여 사용할 수도 있다. 제2 탐침은 제2 프로브에 바이오틴 또는 다양한 고체 지지대를 고정

하여 제조할 수도 있다.

[0366] 바이러스 분석을 위한 반응은 혈청이나 혈장에 제1 탐침 및 제2 탐침을 처리하여 항원-항체 반응을 하였다. 반응용액은 10 mM PBS 버퍼 (137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, pH 7.4) 를 사용하였다.

[0367] 반응용액에 세균번식저해를 위한 소듐아지드 0.05 내지 0.2%, 비특이적 결합 저해를 위한 우혈청알부민 0.1 내지 0.3%을 포함할 수도 있다. 반응온도는 바람직하게는 반응온도는 20 내지 30℃의 온도이다.

[0368] HCV가 포함된 혈청 70 μ l에 제1 탐침 15 μ l과 바이오틴이 부가된 제2 프로브 구조체 15 μ l를 30분간 흔들어 주면서 반응시켰다. 상기 반응용액 20 μ l을 아비딘이 코팅된 유리슬라이드에 처리하여 커버슬립을 덮었다. 코팅된 아비딘과 제2 프로브의 바이오틴이 반응하여 제1 탐침이 결합한 HCV를 유리슬라이드에 고정된다. 상기 제1 탐침이 결합하여 형성된 복합체에 있는 HCV의 존재 신호를 발생하는 스팟들(spots)을 계수하여 표적분자 HCV를 계수하였다.

[0369] 또는 제1 탐침의 한 쪽 끝에 바이오틴을 부가하여 HCV와 바이오틴이 부가된 제1 탐침을 반응시킨 후 아비딘이 코팅된 유리슬라이드와 반응시켜 HCV-제1 탐침 복합체를 포획하여 형성된 복합체에서 HCV의 존재 신호를 발생하여 생긴 스팟을 계수하여 표적분자 HCV를 계수하였다.

[0370] 다양한 신호발생영역으로 다양한 HCV를 특이적으로 지시하도록 제1 탐침을 제조하여 여러 종류의 HCV를 동시에 동정 및 계수를 제1 탐침과 HCV 복합체의 색상분석을 통하여 할 수 있다.

[0371] **실시례 4. 생체분자 계수 시료 준비**

[0372] **4-1. 단일가닥핵산을 포함하는 탐침**

[0373] **(핵산 정량)**

[0374] 상기 일반식 (II)와 일반식(III)의 프로브는 [표 11]의 β -actin, IL17 및 IL17R mRNA 의 특이적인 염기서열을 참조하여 유기합성을 하였다(바이오니아, 한국). 정량 분석하는 RNA 정량분석의 대상은 IL17 및 IL17RA 이며 진뱅크 (GenBank) 데이터 시스템 ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))에서 얻을 수 있는 IL17 및 IL17RA 유전자의 염기서열 정보 (IL17의 Accession number는NM_002190, 및 IL17RA의 Accession number: NM_014339)이다.

표 4

종 류	제1 프로브 (5'→3')	제2 프로브 (5'→3')	일련 번호
β -actin mRNA	gggcgacgagggcccagagcaagaga	ggcatcctcacctgaagtacccca	1
	cagatcatgtttgagacctcaaca	ccccagccatgtacgttgctatcca	2
IL17 mRNA	ccctcaggaaccctcactctcaaa	gacagcctcatttcggactaaactc	3
	taaccggaataccaataccaatccc	aaaaggtcctcagattactacaacc	4
IL17RA mRNA	ggagcagaagcctcccagccactag	ccttttgggctcagtcctccaata	5
	gagtacaggataccacaatgcactc	ttcctgcgtagagcacatgttccca	6

[0375]

표적 mRNA에 대한 프로브 서열

[0376]

[0377] 세포 혹은 세포로 이루어진 조직 시료에서 AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen사, 미국)로 생체분자를 분리하였다. 본 발명에서는 사람의 연골조직(Promocell 사, 독일)을 생체시료로 사용하였다. 연골조직을 제조사에 제공된 버퍼로 용해시킨 후 용해된 시료를 컬럼에 처리한 후, 원심분리하여 DNA를 컬럼막에 결합시키고 여과된 용액을 수확하였다. 컬럼막에 있는 DNA분리는 DNA가 있는 컬럼을 세척하고 막에서 DNA를 추출한 후, 원심분리하여 DNA를 수확하였다. 상기 수확된 여과용액을 제조사에서 제공하는 컬럼에 처리하여 여과된 용액에서 단백질을 침전 및 원심분리하여 수확하였다. 또한 컬럼에서 있는 RNA를 세척하고 막에 있는 RNA를 추출한 후 원심분리하여 수확하였다.

[0378] 상기 총 RNA 100ng에 상기 제1 탐침과 제2 탐침을 혼성화 반응하고 세척하여 제1 탐침-표적 mRNA-제2 탐침 복합체인 부분적 이중가닥핵산을 제조하여 핵산 정량을 위한 핵산 분자 계수의 시료를 제조하였다.

- [0379] 혼성화 조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65℃ 조건으로 혼성화하고 세척은 6 xSSC/0.1% SDS에서 48℃ 조건하고 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68℃ 조건으로 0.2 xSSC/0.1% SDS에서 42℃ 조건으로 하였다.
- [0380] 세척된 제1탐침-표적 mRNA-제2 탐침 복합체에서 해리된 제1 탐침을 수확하기 위해서, 상기 정제한 물질에 100 μ l의 0.1X SSPE / 0.1 % tween-20 용액을 첨가하고 95 ℃에서 5 분간 처리한 후, 상기 복합체에서 해리된 제1 탐침을 포함하는 상정액을 수확하였다.
- [0381] 45 μ L의 전체 반응용액을 9 μ L씩 분주하여 표적분자 계수 분석법을 위한 분석시료로 사용하였다. 시료 분석은 3 μ L의 전체 반응용액을 3회 분석하였다.
- [0382] 제1 탐침에 있는 색상지시바코드를 이용하여 표적 mRNA를 특이적으로 지시하고 있어 복합체의 색상분석을 통하여 많은 표적 mRNA들을 동시에 분석할 수 있다.
- [0383] 추가적으로 형성된 제1 탐침-표적 mRNA-제2 탐침 복합체에서 분리된 제1 탐침을 분자 계수하여 표적분자 핵산을 동정 및 정량할 수 도 있다.
- [0384] **(핵산 구조변이)**
- [0385] 핵산 변이 분석을 위해 상기 고정 제1 탐침 및 제2 탐침을 제작하는 단계에 있어서, 상기 고정 제1 탐침의 구성은 (i) 결합태그(AT), (ii) 신호발생영역(SR), (iii) 고정영역(FR), 및 (iv) 표적핵산과 완전하게 상보적 혼성화 서열을 가지는 변이인접 영역과 뉴클레오타이드 변이에 해당하는 변이 영역(V)으로 이루어진 제1 프로브(1ST P)를 포함하며, 뉴클레오타이드 변이정보를 갖는 제1 프로브는 두 종류 또는 그 이상이다.
- [0386] DNA 변이 분석은 IL17 및 IL17RA의 SNP를 대상으로 하였으며 이에 대한 정보는 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>에서 수집하였다.
- [0387] 상기 DNA와 상기 제1 탐침과 제2 탐침을 혼성화 반응하여 부분적 이중가닥핵산을 제조하고, 이어서 부분적 이중가닥핵산을 완전한 이중가닥핵산으로 전환시키는 ligase의 연결반응을 수행하여 분석 시료를 제조하였다.
- [0388] 혼성화 조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65℃ 조건으로 혼성화하고 세척은 6 xSSC/0.1% SDS에서 48℃ 조건하고 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68℃ 조건으로 0.2 xSSC/0.1% SDS에서 42℃ 조건으로 하였다.
- [0389] 10-ml 반응용액은 20mM TrisHCl (pH 7.6), 25mM sodium acetate, 10mM magnesium acetate, 1mM dithiothreitol, 1mM NAD⁺, 0.1% Triton X-100, 상기 세척된 반응물, 1 unit Taq DNA ligase (New England Biolabs, MA, USA)로 구성하여 4시간동안 반응시켰다. 제1탐침-표적 유전자-제2 탐침 복합체의 자성입자를 이용하여 세척 및 분리 수확하였다.

표 5

종 류	제1 프로브 (5'→3')	제2 프로브 (5'→3')	인편 번호
IL17 SNP			
rs10404979	AAACTCATCGTGAAGTCAAAACATTCAA AAACTCATCGTGAAGTCAAAACATTCAAC	ATTGGAAGAAAGAGGTATAGAAAAT	7
rs8193038	GGAACTACTGTATATGTAGGATAGGAAA GGAACTACTGTATATGTAGGATAGGAAAG	TGAAAGCTTTGGTAGGTATTTAAGT	8
rs8193037	TGTCACCCCTGAACCCACTGCGACACA TGTCACCCCTGAACCCACTGCGACACG	CCACGTAAGTGACCACAGAAGGAGA	9
rs8193036	CCCCCTGCCCCCTTTTCTCATCTCTC CCCCCTGCCCCCTTTTCTCATCTCTT	CATCACCTTTTGTCCAGTCTCTATCC	10
rs4711998	TGTATTCTGAGAAGGAACATTCTCA TGTATTCTGAGAAGGAACATTCTCG	AGGACCTGAGTCCAAAGTTCACTCTTA	11
rs3819025	TCATTGGTGGTGAAGTCTGCACTAACA TCATTGGTGGTGAAGTCTGCACTAACG	TGGGATGCTCTTGTCTGATTGGACC	12
rs3819024	AACACCTGCGCAAGGAATCTGTGAGGA AACACCTGCGCAAGGAATCTGTGAGGG	AAAGAAAGATCAAATGGAAAAATCAA	13
rs3804513	CAAAATGTATTTTGATCATTTGACTTCA CAAAATGTATTTTGATCATTTGACTTCT	TACAAATAAGTCTCTGTCTGTGGA	14
rs3740067	TGGGCTGAACCTTTTCTCATACTTAAAG TGGGCTGAACCTTTTCTCATACTTAAAG	TTGCTTCTGCCCATCAGCTCCTTT	15
rs2275913	CTGCCCTTCCCATTTTCTCTCAGAAGA CTGCCCTTCCCATTTTCTCTCAGAAGG	AGAGATTCTTCTATGACCTCATTGG	16
rs1974226	CTGAACCTTTTCTCATACTTAAAGTTCA CTGAACCTTTTCTCATACTTAAAGTTCCG	TTCTGCCCATCAGCTCCTTTCTGG	17
IL17RA SNP			
rs151315255	GATGGCCTGCTGCGGCTGACCTGATC GATGGCCTGCTGCGGCTGACCTGATT	CCCCACCGCTGAAGCCAGGAAGG	18
rs139412425	TGGATCATCTACTCAGCCGACCAACCC TGGATCATCTACTCAGCCGACCAACCC	CTCTACGTGGACGTGGTCTGAAAT	19
rs6518661	CTGTCACTAAGGAGTTAACCCCGCAA CTGTCACTAAGGAGTTAACCCCGCAG	AGCAGTTTTTTCATCAGATCTCTGA	20
rs6518660	CATAGTAGATAGCAATCTATTCAACCA CATAGTAGATAGCAATCTATTCAACCG	TTTCTAGTTTGTGAGACATTTAGAT	21
rs7480864	gcaggttaggttaggagctggagcA gcaggttaggttaggagctggagcG	tttagcccccccctttaccatca	22
rs4819554	TGGGAAGTAACGACTCTCTTAGGTGCA TGGGAAGTAACGACTCTCTTAGGTGCG	GCTGGGACACAGTCTCAGAGACCAG	23
rs2241049	GCATGGGAGGACCTATGGGAGGTTCCA GCATGGGAGGACCTATGGGAGGTTCCG	ATAACATTCAAGTAGCATCTGGCCA	24
rs2241046	ATGCTATTTTCCCTTTTTCCTCTGTTT ATGCTATTTTCCCTTTTTCCTCTGTTT	TCATTGCGAAGAACCAATTCGGGTAA	25
rs2229151	CACCCCTCTACGTGGACGTGGTCTTA CACCCCTCTACGTGGACGTGGTCTTG	AAATTGCCCCAGTTCTGCTCACC	26
rs802643	ACGCTTTCCCAACCAATCCTTCAC ACGCTTTCCCAACCAATCCTTCAG	CTCAGGCATCTCCTGCGGATCCCC	27
rs879577	TCAGCGGTGGGGGATCAGGTGAGCCA TCAGCGGTGGGGGATCAGGTGAGCCG	CAGGCGGCCATCTAAGGAAACAAG	28
rs879576	TGGTGGCTGAGTAGATGATCCAGACC TGGTGGCTGAGTAGATGATCCAGACT	TTCTTGGGCTTACGCGGTGGGGGA	29
rs879576	TGGTGGCTGAGTAGATGATCCAGACC TGGTGGCTGAGTAGATGATCCAGACT	TTCTTGGGCTTACGCGGTGGGGGA	30
rs721930	GTTCTGAGGGGTGATTAGGGAGGAGAC GTTCTGAGGGGTGATTAGGGAGGAGAG	TTTAGTTTAACTTGGAGTCTTCTCAG	31

[0390]

[0391]

[0392]

[0393]

[0394]

[0395]

[0396]

[0397]

유전자 구조변이 분석에 대한 프로브 서열

세척된 제1탐침-표적 유전자변이-제2 탐침 복합체에서 해리된 제1 탐침을 수확하기 위해서, 상기 정제된 물질에 100 μ L의 0.1X SSPE / 0.1 % tween-20 용액을 첨가하고 95 $^{\circ}$ C에서 5 분간 처리한 후, 상기 복합체에서 해리된 제1 탐침을 포함하는 상징액을 수확하였다.

45 μ L의 전체 반응용액을 9 μ L씩 분주하여 표적분자 계수 분석법을 위한 분석시료로 사용하였다. 시료 분석은 3 μ L의 전체 반응용액을 3회 분석하였다.

제1 탐침에 있는 색상지시바코드를 이용하여 유전자변이 및 변이 유형을 특이적으로 지시하고 있어 복합체의 색상분석을 통하여 많은 표적 유전자 변이 및 변이유형을 동시에 분석할 수 있다.

(메틸화 DNA)

핵산 메틸화 여부 분석은 IL17 프로모터-144 위치(Thomas, R.M., et al., 2012, J Biol Chem. 287(30):25049-59.)를 수행하였다.

상기 일반식 (IV)와 일반식(V)의 H는 [표 1]의 IL17 메틸화여부의 특이적인 염기서열 및 T는 [표 2], P는 [표 3]을 참조하여 유기합성을 하였다(바이오니아, 한국).

표 6

종 류	제1 프로브 (5'→3')	제2 프로브 (5'→3')	일련 번호
IL17 메틸화 (프로모터 -144 위치)	tcaaatcaattttaacattatctacaacaag tcaaatcaattttaacattatctacaacaaa	gtcatacttgtgggctggagaccaa aagcc	34

IL 17 프로모터 메틸화 분석에 대한 프로브 서열

DNA 메틸화 분석을 위해 상기 제1 탐침 및 제2 탐침을 제작하는 단계에 있어서, 상기 제1 탐침의 구성은 (i) 결합태그(AT), (ii) 신호발생영역(SR), (iii) 고정영역(FR), 및 (iv) 표적핵산과 완전하게 상보적 혼성화 서열을 가지는 메틸화 인접 영역과 메틸화 염기에 해당하는 영역(V)으로 이루어진 제1 프로브(1st P)를 포함하며, 메틸화 정보를 갖는 제1 프로브는 메틸화 염기를 구분하기 위해 사이토신 또는 우라실과 상보적인 염기인 구아닌 또는 티민을 갖는 단일가닥핵산인 두 종류이다. 비메틸화에 상응하는 신호발생영역 A, 메틸화에 상응하는 신호발생영역 B로 제1 프로브와 연결시킬 수도 있다.

상기 연결조직에서 특정 DNA의 메틸화 유무를 분석하기 위해 키트를 이용하여, 연결조직에서 지놈 DNA를 추출하고 Nano Drop을 이용하여 그 농도를 측정하였다. 이후, 추출한 DNA 약 1~2 μ g정도를 0.5 N 농도의 수산화나트륨과 섞어 16 $^{\circ}$ C로 만들어 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시켜 DNA가 단일가닥 형태가 되도록 변형시켰다. 이후, 3.5M 농도의 소듐 바이설파이트 (Sodium bisulfate)와 0.01M 농도의 하이드로퀴논 (Hydroquinone) 시약을 첨가하고 56 $^{\circ}$ C에서 16시간 화학 반응시켰다. 이후 에탄올을 이용한 침전반응을 수행하여 변환된 DNA만을 농축시켜 순수 분리하여 50 $^{\circ}$ C의 3차 증류수로 녹인 후, 0.1M 농도가 되도록 수산화나트륨을 첨가하고 상온에서 15분간 반응함으로써 사이토신의 탈황산화 반응을 수행하고 다시 한 번 에탄올 침전반응으로 농축시키고, 최종적으로 30 $^{\circ}$ C의 3차 증류수에 녹여서 20 $^{\circ}$ C에 보관하였으며 메틸화유무를 분석하기 위한 표적핵산으로 사용하였다.

상기 메틸화 DNA가 있는 시료, 제1 탐침과 제2 탐침을 혼성화 반응하여 제1 탐침-메틸화 DNA-제2 탐침 부분적 이중가닥핵산을 제조하고, 이어서 부분적 이중가닥핵산을 완전한 이중가닥핵산으로 전환시키는 ligase의 연결반응을 수행하여 분석 시료를 제조하여 메틸화 DNA를 분석할 수 있다.

혼성화 조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65 $^{\circ}$ C 조건으로 혼성화하고 세척은 6 xSSC/0.1% SDS에서 48 $^{\circ}$ C 조건하고 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68 $^{\circ}$ C 조건으로 0.2 xSSC/0.1% SDS에서 42 $^{\circ}$ C 조건으로 하였다.

10-ml 반응용액은 20mM TrisHCl (pH 7.6), 25mM sodium acetate, 10mM magnesium acetate, 1mM dithiothreitol, 1mM NAD⁺, 0.1% Triton X-100, 상기 세척된 반응물, 1 unit Taq DNA ligase (New England Biolabs, MA, USA)로 구성하여 4시간 반응하였다. 제1탐침-메틸화 DNA-제2 탐침 복합체의 자성입자를 이용하여 세척 및 분리 수확하였다.

세척된 제1탐침-메틸화 DNA-제2 탐침 복합체에서 해리된 제1 탐침을 수확하기 위해서, 상기 정제한 물질에 100 μ l의 0.1X SSPE / 0.1 % tween-20 용액을 첨가하고 95 $^{\circ}$ C에서 5 분간 처리한 후, 상기 복합체에서 해리된 제1 탐침을 포함하는 상정액을 수확하였다.

45 μ L의 전체 반응용액을 9 μ L씩 분주하여 표적분자 계수 분석법을 위한 분석시료로 사용하였다. 시료 분석은 3 μ L의 전체 반응용액을 3회 분석하였다.

제1 탐침에 있는 색상지시마크드를 이용하여 메틸화 DNA의 메틸화 여부를 특이적으로 지시하고 있어 복합체의 색상분석을 통하여 많은 표적 메틸화 DNA의 메틸화 여부 및 메틸화 비율을 동시에 분석할 수 있다.

바람직하게, 특정 DNA가 비메틸화인 경우 제1 탐침의 5'말단에 신호발생영역 A, 메틸화인 경우는 다른 하나에는 신호발생영역 B5로 형광분석을 할 수 있다. 즉, 특정 DNA를 주형으로 상기 제1 탐침 및 제2 탐침을 ligase의 연결반응을 진행하며 제1 탐침의 5'말단의 상보적인 결합 여부에 따라 완전한 이중가닥DNA 또는 부분적인 이중가닥DNA로 존재하게 된다. 즉 메틸화 DNA는 신호발생영역 B와 연결된 제1 탐침과 제2 탐침이 완전한 이중가닥을

형성하고, 비메틸화 DNA는 신호발생영역 A와 연결된 제1 탐침과 제2 탐침이 이중가닥을 형성한다.

본 발명은 상기 제1 탐침과 제2 탐침을 이용한 특정 DNA의 메틸화 여부와 비율 분석방법을 통해 DNA의 메틸화 여부 및 비율 분석을 실시하는 것을 특징으로 하는 키트를 제공한다.

4-2. 리간드를 포함하는 탐침

본 발명에 사용된 리간드는 항체와 압타머를 사용하였으며 표 1 및 표 2와 같이 준비하였다.

항체와 압타머 리간드로 제조된 고정 제1 탐침과 제2 탐침을 사용하여 표적분자를 분자계수하고 정량할 수도 있다.

단백질 정량분석을 위한 제1 프로브는 상기 표적분자 단백질의 특정부위를 인지하는 리간드로 구성되고, 제2 프로브는 상기 특정 단백질의 제1 프로브가 인지하는 부위와 다른 부위를 인지하는 리간드로 구성될 수 있다.

표 7

표적분자 / 항체	카탈로그번호	제조사
NGF/NGF β /Anti-NGF/NGF β antibody	OKBB00229	Aviva Systems Biology
Amyloid beta (A4) Precursor Protein (APP) / Anti-Amyloid beta (A4) Precursor Protein (APP) antibody	ab12266	abcam
τ (Tau) / Anti- τ (Tau) antibody	T6402	SIGMA
phospho-Tau (pSer400) / Anti-phospho-Tau (pSer400) antibody	T1700	SIGMA
C Reactive Protein (CRP)/ Anti-C Reactive Protein (CRP)antibody	ab99995	abcam
TGF alpha / Anti-TGF alpha antibody	ab9585	abcam
IL1 beta / Anti-IL1 beta antibody	ab2105	abcam
Serum Amyloid A / Anti-Serum Amyloid A antibody	ab200584	abcam
p53 / p53 Antibody (DO-7)	MA5-12557	abcam
CEACAM5 / CEACAM5 Polyclonal Antibody	MBS170144	BioSource
alpha Fetoprotein / alpha Fetoprotein antibody (alpha-Fetoprotein) (N-Term)	ABIN356914	Biocompare
E. coli Enoyl-ACP Reductase/ Anti-E. coli Enoyl-ACP Reductase antibody		Sino Biological Inc. 중국
Phototropin 1 / Anti-Phototropin 1 antibody		Cosmo Bio Co. Ltd. 일본

리간드를 이용한 분석법에 사용된 표적분자와 이에 상응하는 항체

Salmonella typhimurium와 Staphylococcus aureus 등의 2종 세균을 사용하였다.

- [0425] 경쟁계수법 및 항체 리간드를 이용한 분자계수 분석 방법의 표적분자는 cortisol, cortisone, testosterone, progesterone, androstendione과 aldosterone 등 6종류의 저분자 Steroid hormone과 NGF/NGF β , Amyloid beta (A4) Precursor Protein (APP), τ (Tau), phospho-Tau (pSer400), C Reactive Protein (CRP), TGF alpha, IL1 beta, Serum Amyloid A, p53, CEACAM5, alpha Fetoprotein 등 11종류의 고분자 단백질을, 그리고 표준물질로 E. coli Enoyl-ACP Reductase(FabI, 28kD)와 Phototropin 1(nph, 120kD) 등 2종류를 사용하였다.
- [0426] 포획계수법 및 압타머 리간드를 위한 생체분자는 Kanamycin와 Streptomycin 등 2종류의 저분자 항생제와 CEA, HER 2, Interferon- γ , EGFR, PSMA, Thrombin, Tumor necrosis factor- α (TNF α), VEGF (165), Prion Protein, Acetylcholine Receptor Antibody, Human Osteopontin, ErbB2, HIV-1 R5 gp120, HIV-1 R5 SU Glycoprotein 등의 14종류의 고분자 단백질을 사용하였다.
- [0427] □ 표적분자와 탐침 반응
- [0428] 표적분자 계수를 코팅계수법, 포획계수법과 경쟁계수법으로 수행하기 하기에서 다음과 같이 표적분자를 포함하는 시료를 준비하였다.
- [0429] 본 발명에서 생체분자 분석을 위한 반응은 하기 반응용액에서 일어나는 리간드-리셉터 반응이다. 반응용액은 항체리간드의 경우는 10 mM PBS 버퍼 (137 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, pH 7.4) 이며, 압타머 리간드의 경우는 셀렉스버퍼 (20 mM Tris-Cl buffer, pH 7.6 contained 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂ and 0.02% Tween) 를 사용하였다.
- [0430] 반응용액에 세균번식저해를 위한 소듐아지드 0.05 내지 0.2%, 비특이적 결합 저해를 위한 우혈청알부민 0.1 내지 0.3%를 포함할 수도 있다. 반응온도는 압타머리간드의 경우는 SELEX 수행온도보다는 낮은 온도에서 수행하는 것이 이상적이며, 바람직하게는 반응온도는 20 내지 30℃의 온도이다.
- [0431] (코팅계수방법)
- [0432] 25 μ l의 생체분자 용액을 75 μ l의 반응용액에 첨가하고 코팅지지체인 나이트로셀룰로오스 막(Nitrocellulose membrane) disc를 넣어 30분간 흔들어 주면서 반응시켜 시료를 준비하였다. 앞서 제작된 1 μ l의 제1 탐침 용액을 투입하여 30분간 반응시켜 디스크에 부착된 표적분자-제1 탐침 복합체를 형성하였다. 과다 제1 탐침과 비특이적 결합한 제1 탐침을 제거하기 위해서, 상기 반응용액에 있는 상기 형성된 표적분자-제1 탐침 복합체가 부착한 디스크를 150 μ l의 0.1X SSPE / 0.1 % tween-20 용액을 첨가하여 3회 세척하고 정제하였다.
- [0433] 세척된 디스크에 부착된 표적분자-제1 탐침 복합체에서 해리된 제1 탐침을 수확하기 위해서, 상기 정제한 물질에 100 μ l의 0.1X SSPE / 0.1 % tween-20 용액을 첨가하고 95 ℃에서 5 분간 처리한 후, 상기 복합체에서 해리된 제1 탐침을 포함하는 상정액을 수확하였다.
- [0434] 45 μ L의 전체 반응용액을 9 μ L씩 분주하여 표적분자 계수 분석법을 위한 분석시료로 사용하였다. 시료 분석은 3 μ L의 전체 반응용액을 3회 분석하였다.
- [0435] (포획계수방법)
- [0436] 25 μ l의 생체분자 용액, 1 μ l의 제1 탐침 용액과 1 μ l의 제2 탐침 용액을 첨가한 100 μ l의 반응용액을 실온에서 30분간 연속 회전하면서 반응시켜 제1 탐침-생체분자-제2 탐침 복합체를 형성시켰다.
- [0437] 과잉 제2 탐침, 제1 탐침-생체분자-제2 탐침 복합체, 비특이적 결합으로 결합한 제1 탐침을 제거하기 위해서, 상기 반응용액에 150 μ l의 반응용액 / 0.1 % tween-20 용액을 첨가하여 5 분간 연속 회전한 후 제2 탐침의 자성비드 (Invitrogen 사, USA)로 수확하는 방법으로 3 회 정제하였다. 비특이적 결합으로 제1 탐침을 제거하기 위해서, 추가적으로 상기 수확한 침전물에 150 μ l의 0.1X SSPE / 0.1 % tween-20 용액을 첨가하여 제2 탐침의 자성비드 (Invitrogen 사, USA)로 수확하는 방법으로 3 회 정제하였다.
- [0438] 세척된 제1 탐침-표적분자-제2 탐침 복합체에서 해리된 제1 탐침을 수확하기 위해서, 상기 정제한 물질에 100 μ l의 0.1X SSPE / 0.1 % tween-20 용액을 첨가하고 95 ℃에서 5 분간 처리한 후, 상기 복합체에서 해리된 제1 탐침을 포함하는 상정액을 수확하였다.

- [0439] 45 μL 의 전체 반응용액을 9 μL 씩 분주하여 표적분자 계수 분석법을 위한 분석시료로 사용하였다. 시료 분석은 3 μL 의 전체 반응용액을 3회 분석하였다.
- [0440] **(경쟁계수방법)**
- [0441] 경쟁계수방법은 시료를 구성하는 생체분자, 경쟁분자와 제1 탐침의 반응은 상기 반응용액에서 일어나는 경쟁적 리간드-리셉터 반응을 이용한 분석이다.
- [0442] 25 μL 의 생체분자 용액, 1 μL 의 경쟁분자 용액과 1 μL 의 제1 탐침 용액을 첨가한 100 μL 반응용액을 실온에서 30분간 연속 회전하면서 반응시켜 생체분자-제1 탐침 복합체와 경쟁분자-제1 탐침 복합체를 형성시켰다.
- [0443] 생체분자-제1 탐침 복합체와 비특이적 결합으로 결합한 제1 탐침을 제거하기 위해서, 상기 반응용액에 150 μL 의 반응용액 / 0.1 % tween-20 용액을 첨가하여 5분간 연속 회전한 후 경쟁분자의 자성비드 (Invitrogen 사, USA)로 수확하는 방법으로 3 회 정제하였다. 비특이적 결합으로 제1 탐침을 제거하기 위해서, 추가적으로 상기 수확한 침전물에 150 μL 의 0.1X SSPE / 0.1 % tween-20 용액을 첨가하여 경쟁분자의 자성비드 (Invitrogen 사, USA)로 수확하는 방법으로 3 회 정제하였다.
- [0444] 세척된 경쟁분자-제1 탐침 복합체에서 해리된 제1 탐침을 수확하기 위해서, 상기 정제한 물질에 100 μL 의 0.1X SSPE / 0.1 % tween-20 용액을 첨가하고 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5 분간 처리한 후, 상기 복합체에서 해리된 제1 탐침을 포함하는 상정액을 수확하였다.
- [0445] 45 μL 의 전체 반응용액을 9 μL 씩 분주하여 표적분자 계수 분석법을 위한 분석시료로 사용하였다. 시료 분석은 3 μL 의 전체 반응용액을 3회 분석하였다.
- [0446] 본 발명은 상기 코팅계수법, 포획계수법과 경쟁계수법에서 정제한 제1 탐침이 포함된 복합체의 제1 탐침을 계수 분석하고 상기 분석결과로 부터 시료의 생체분자 값을 분석한다.
- [0447] 본 발명에서 코팅계수법 및 포획계수법에서 반응용액에 존재하는 표적분자는 제1 탐침과 결합하여 표적분자-제1 탐침 복합체를 형성하고 복합체의 형성정도는 표적분자의 양에 비례한다. 표적분자에 대한 정량분석 결과인 표적분자 값은 최종적으로 정제된 제1 탐침을 포함하는 복합체에서 해리된 제1 탐침에서 발생하는 신호인 스폿의 계수 분석하여 얻은 결과를 바탕으로 표적분자 값을 분석된다.
- [0448] 특히, 경쟁계수법은 상기 반응용액에서 형성된 경쟁분자-제1 탐침 복합체(complex)를 분리하여 상기 복합체에서 해리된 제1 탐침을 분석하여 결정한다. 즉, 분석하고자하는 표적분자와 경쟁분자의 제1 탐침에 대한 반응은 경쟁적 반응으로 표적분자-제1 탐침 복합체와 경쟁분자-제1 탐침 복합체를 형성한다. 반응용액에서 경쟁분자-제1 탐침 복합체의 형성정도는 생체분자-제1 탐침 복합체의 형성정도에 의존하여 결정됨으로 경쟁분자-제1 탐침 복합체의 신호를 분석하여 표적분자 값을 결정할 수 있다. 경쟁분자-제1 탐침 복합체만을 수확하여 제1 탐침을 해리시켜 해리된 제1 탐침에서 발생하는 신호인 스폿의 계수 분석하여 얻은 결과를 바탕으로 표적분자 값을 분석된다.
- [0449] 표적분자에 대한 정량분석 결과인 표적분자 값은 최종적으로 정제된 제1 탐침을 포함하는 복합체에서 해리된 제1 탐침을 계수하여 기 작성된 표준곡선을 이용하여 표적분자와 결합하는 제1 탐침의 양을 평가하여 표적분자 값을 결정한다.
- [0450] 상기 코팅계수법, 포획계수법과 경쟁계수법의 상기 표적분자 값은 생물학적 샘플에서 하나 또는 그 이상의 표적분자를 연속적 분석이 가능하게 하는 다중분석을 사용하여 결정할 수 있다.
- [0451] 다중분석에서, 개개의 상기 복합체들에서 해리되고 개개의 표적분자를 지시하는 신호발생영역이 있는 제1 탐침들을 지지체 상의 별개의 위치에 직접 또는 간접적으로, 공유결합 또는 비공유결합으로 고정화시킨다. 다중분석은 지지체의 특정영역에 결합한 제1 탐침에 있는 양자점(quantum dot)과 같은 신호발생영역에서 발생하는 독특한 신호에 의해 둘 이상의 표적분자들을 구분할 수 있는 기구에 의해 실현한다. 개개의 기구는 생물학적 샘플에서 검출될 각각의 다중 표적분자 중 하나의 분석을 위하여 사용한다. 개개의 기구는 생물학적 샘플에서 각 표적분자를 동시에 처리할 수 있도록 구성될 수 있다. 예를 들면, 미세액가 플레이트는 플레이트 내의 각 웰이 생물학적 샘플에서 분석될 다중 표적분자 중 하나를 특별하게 분석하는데 사용되는 것처럼 사용할 수도 있다.
- [0452] **실시예 5. 계수 분석**

- [0453] 핵산정량, 핵산변이, 메틸화 DNA, 리간드를 이용한 표적분자 정량 분석 등은 표적분자를 특이적으로 인지하고 결합하는 프로브를 매개로 표적분자의 정보가 제1 탐침의 신호발생영역으로 전환되는 과정을 상기에서 실시하였다. 따라서 실시례에서 준비한 분석시료에 있는 제1 탐침의 신호발생영역을 분자계수하면 표적분자의 정보를 분석할 수 있다.
- [0454] 상기 실시례에서 준비한 분석시료를 하기와 같이 처리하여 제1 탐침 신호발생영역을 분자 계수를 하였다.
- [0455] 단일가닥핵산을 프로브로 하는 핵산정량은 제1 탐침-표적 핵산-제2 탐침 복합체를 세척하고 수확하여 해리된 제1 탐침을 계수하여 표적 핵산을 정량할 수 있다. 표적 mRNA와 제1 탐침은 일대일로 결합함으로 제1 탐침의 계수 값은 mRNA의 계수 값에 상응하다. 미리 작성된 표준커브를 이용하여 결정된 mRNA 계수 값을 이용하여 mRNA를 정량화하였다.
- [0456] 유전자 변이 유무 및 유형 분석은 제1 탐침-유전자 변이-제2 탐침 복합체에 신장반응 또는 연결반응 등의 효소 반응으로 얻은 반응물에서 해리된 제1 탐침, 실시례에서 얻은 반응물에 있는 제1 탐침 혹은 제1 탐침-제2 탐침 연결체를 계수하여 할 수 있다. 전자는 신장반응 혹은 연결반응을 할 수 없는 상태로 표적 핵산의 변이부위와 제1 프로브의 V영역이 미스 매칭임을 의미하는 것이다.
- [0457] DNA 메틸화 여부 및 비율은 제1 탐침-메틸화 DNA-제2 탐침 복합체에 신장반응 또는 연결반응 등의 효소반응으로 얻은 반응물에서 해리된 제1 탐침, 실시례에서 얻은 반응물에 있는 제1 탐침 혹은 제1 탐침-제2 탐침 연결체를 계수하여 할 수 있다. 전자는 신장반응 혹은 연결반응을 할 수 없는 상태로 표적 DNA 메틸화 부위와 제1 프로브의 V영역이 미스 매칭임을 의미하는 것이다.
- [0458] 프로브가 리간드인 표적분자 분석은 제1 탐침-표적분자-제2 탐침 복합체를 세척하고 수확하여 해리된 제1 탐침을 계수하여 정량할 수 있다. 표적 분자와 제1 탐침은 일대일로 결합함으로 제1 탐침의 계수 값은 표적분자의 계수 값에 상응하다. 미리 작성된 표준커브를 이용하여 결정된 표적분자 계수 값을 이용하여 mRNA를 정량화하였다.
- [0459] 상기 반응물에 있는 제1 탐침 계수 분석은 아래와 같이 수행하였다.
- [0460] 생체분자 계수분석을 위해서, 시료는 제조사의 프로토콜을 참조하여 본 발명의 분석방법에 따라 n카운터 플랫폼 스테이션 (나노스트링 테크놀로지사, Seattle, WA-USA)을 통해 가공되었고, n카운터 디지털 분석기 (나노스트링 테크놀로지사, Seattle, WA-USA)로 수행하였다.
- [0461] 0.1 % Tetraspeck 형광 마이크로 스피어 용액(Invitrogen 사, USA)을 1:5,000로 희석한 1 μ l의 시약을 상기 실시례4에서 준비된 정제된 복합체 용액에 첨가하여 분석시료를 준비하였다. 상기 준비된 분석시료를 스트랩타비딘이 코팅된 커버 슬립(Optichem, Accelr8 Technology Corporation)이 포함되는 NanoString 유체 장치에 로딩하여 30 μ m 깊이인 미세유동 채널을 생성하였다. 분석시료는 수압에 의해 채널로 이동하여 상기 복합체에서 해리된 제1 탐침의 바이오틴과 결합지체인 채널에 있는 스트랩타비딘에 강력하게 결합하였다. 고정한 후, 표면을 90 μ l의 1x TAE 용액으로 한번 세척하고, 각 웰에 40 μ l의 TAE를 첨가하여 퍼지도록 하였다. 제1 탐침은 유체 채널에 1 분 동안 160 V /cm을 적용하여 퍼진 상태로 정렬하였다. 퍼진 제1 탐침은 60 μ l의 500 nM 고정분자(모든 제1 탐침 존재하는 반복구조에 상보적인 바이오틴이 표지된 올리고뉴클레오타이드)를 첨가하여 표면에 추가적으로 고정화시켰다. 고정화 과정을 동안, 전류는 5 분 동안 유지되었다. 고정한 후 TAE 용액을 제거하고, 촬영용 안티광표백제(antiphotobleaching) SlowFade 시약 (Invitrogen 사)를 첨가하였다.
- [0462] 제1 탐침이 결합한 결합지지체는 Perfect Focus, 1.4 NA Plan Apo VC 60X oil-immersion lens (Nikontk, 일본), anX-cite 120 metal halide light source (Exfo 사, USA), automated H117 stage (Prior Scientific)와 Smart Shutter (Sutter Instrument, USA)가 갖추어진 Nikon Eclipse(니콘 이클립스) TE2000E로 촬영하였다. 전형적인 촬영 밀도는 FOV당 100~200개의 리포터를 카운팅하였다. 각각의 field of view에 대해, 다른 여기 파장 (480, 545, 580, 622)에 네 개의 이미지는 MetaMorph(Universal Imaging Corporation, USA) 또는 사용자 정의 소프트웨어로 제어하는 Orca Ag CCD camera (Hamamatsu사, 일본)로 촬영하였다(도10).
- [0463] 분석기 해상도는 600 FOV(field of view)로 설정하였다. 데이터를 다운로드 하고, 추천된 바와 같이 (n카운터 데이터 분석 지침들) 엑셀 상에서 분석하였다. 데이터는 처음에 제공된 양성 검정 대조군의 표준곡선을 사용하여 시료내의 기준물질 및 표적분자를 정상화하였다. 정상화된 값은 시료에 포함된 기준물질들의 값을 사용하여 표적분자 값을 전반적으로 평균 정상화를 수행하였다. 개별적 표적분자들을 위한 3회 수행한 에서 표적분자 수치들의 평균을 취하여 계산하였다.

- [0464] 사용한 특정 생체시료에서 mRNA 정량을 분자 계수 분석방법으로 한 결과, 제1 탐침-특정 mRNA-제2 탐침 복합체에서 해리된 제1 탐침에 의해서 발생하는 표적분자의 존재신호로 형성된 스폿을 확인하였다. 이는 표적 mRNA에 대한 RT-PCR 결과와 유사하였다.
- [0465] 사용한 생체시료의 유전자변이를 분자계수 방법으로 확인한 결과, 특정 유전자 변이 유형을 지시하는 제1 탐침의 신호발생영역의 색상 패턴에 상응하는 신호로 형성된 스폿을 확인하였다. 유전자 변이 유형은 모두 야생형(wild type), 모두 돌연변이형(mutant type), 야생형과 돌연변이형이 같이 존재하는 경우가 다양하게 존재하고 있었다. 이는 염기서열 방법으로 확인한 결과와 동일하였다.
- [0466] DNA 메틸화 여부 및 비율을 분자계수 방법으로 확인한 결과, 특정 DNA 메틸화 유무를 지시하는 제1 탐침의 신호발생영역의 색상 패턴에 따라 존재에 상응하는 신호로 형성되는 스폿을 확인하였다. DNA 메틸화 유형은 메틸화 또는 비메틸화 형태로 동일 시료에 함께 존재하고 있었으며 그 비율은 특정 색상 패턴의 비율로 조사할 수 있었다. 이는 기존 염기서열 방법으로 확인한 결과와 유사함을 확인할 수 있었다.
- [0467] 상기 코팅계수분석법으로 항체 리간드를 이용한 반응은 11종의 단백질, 2종의 표준물질, 그리고 압타머 리간드를 이용한 반응은 14종의 단백질을 분석하였다. 상기 포획계수분석법으로 항체 리간드를 이용한 반응은 11종의 단백질, 3종의 세균, 2종의 표준물질, 그리고 압타머 리간드를 이용한 반응은 3종의 단백질, 2종의 세균을 분석하였다. 상기 경쟁계수방법으로 항체리간드를 이용한 반응은 6종의 저분자인 steroid hormone, 11종의 단백질, 2종의 표준물질, 그리고 압타머 리간드를 이용한 반응은 2종의 저분자인 항생제, 14종의 단백질을 분석하였다.
- [0468] 생체분자 계수방법에 의한 2 종류의 표준물질로 구성된 모의(mock) 비교구와 표준물질을 포함한 여러 물질로 구성된 대조구에 대해 3회 분석하였다. 항체리간드를 이용한 분석결과를 살펴보면 다음과 같다. 표준물질로 이루어진 모의 비교구는 모든 반응을 위한 표준 농도 곡선을 작성하였으며 반응, 정제 및 포집 효율에서 약간의 차이가 있는 데이터를 정규화하기 위해 사용하였다. 먼저 2종류 표준물질의 선형성, 동적범위(dynamic range) 및 재현성을 조사했다(도11). 포획계수법에 의해 표준물질을 분석한 이미지는 도10이며, 도 13은 포획계수법에, 도 14는 경쟁계수법에 의해 모의 비교구의 표준물질을 측정된 결과이며, (N = 6), 로그-로그 플롯상의 점을 중첩하여 나타낸 바와 같이, 각 분석에 대한 제어 신호의 값 (카운트) 0.5 fM과 50 fM 사이에서 재현성이 매우 높았다. 또한 분석 결과는 농도 대 카운트의 선형 회귀 상관 계수는 농도의 2.5 이상 로그에서 ≥ 0.998 로 고도로 선형성이 있었다.
- [0469] 그런 다음, 샘플링 효율과 검출한계(limits of detection)를 검토했다. 샘플링 시스템의 효율은 그 반응에 있어서 대상의 이론적인 분자의 수로 생체분자에 대해 카운트 수를 나눔으로써 추정 할 수 있다. 예를 들어, 각 반응에서 ~ 0.1 fM의 생체분자는 $\sim 1,800$ 분자이다. 모의 표본이 생체분자에 대한 평균 측정은 25카운트임으로 샘플링 효율은 $\sim 1\%$ 이다. 분석의 검출 한계는 스튜던트 t-test를 이용하여 음성 대조군의 카운트와 가장 낮은 농도인 양성 대조군의 카운트를 비교하여 결정 하였다. 본 발명 반응에서 최저검출한계는 0.1 및 0.5 fM 사이였다.
- [0470] 항체 리간드를 이용한 포획계수법에 의한 13종의 생체분자인 단백질들과 코팅계수법에 의한 압타머 리간드를 이용한 14종의 생체분자인 단백질을 측정하는 시스템의 재현성을 평가하였다. 항체 리간드를 이용한 13종류의 생체분자에 대해 2번의 독립적인 반응에 대한 정규화 된 수는 로그-로그 스케일로 표시하였다(도 15). 본 발명의 시스템의 자료에 대한 선형회귀 분석결과는 상관계수는 0.9982로 재현성이 높음을 알 수 있다. 압타머 리간드를 이용한 경우도 이와 유사한 결과를 얻었다.
- [0471] **실시예 6. 생물학적 의미의 분석**
- [0472] 생체시료인 혈액을 이용하여 급성심근경색 또는 패혈증 등의 만성질환을 검진하고 있으며 특히 일반적으로 환자 모니터링용 생체분자 3~4개를 검사하고 결과의 cut-off 수치만을 참고함으로 진단을 하고 있다.
- [0473] 여러 표적 생체분자들을 정량 검사하고 그 결과를 바탕으로 정상인 집단과 환자 집단 간의 함수관계를 정량적으로 분석하여 진단할 수 있는 방법인 체외진단다지표검사(In Vitro Diagnostic Multivariate Index Assays; IVDMA)는 생물학적 의미인 질병이나 다른 상태를 진단, 치료, 완화, 처치, 예방을 목적으로 해석함수를 사용하여 표적 생체분자의 복수결과들을 결합시켜 환자의 특이적 결과로 "분류", "점수", "지수" 등을 산출하는 장치 또는 기술이다.
- [0474] 본 발명의 생물학적 의미를 결정하는 임상 의사 결정 지원 시스템(Clinical Decision Support System)은 분자계

수 분석 방법을 통해 생산된 표준물질 및 표적분자 분석결과를 보정한 데이터와 OCS(operation control system) 시스템의 환자정보를 입력으로 한다. 출력은 임상가가 분석결과를 입력하고 확인하는 화면과, 진단의가 위험성과 분류를 환자에게 설명할 수 있는 화면과 환자에게 가시적으로 설명할 수 있는 화면을 갖는다. 생물학적 의미 분석 시스템은 증폭산물 분석 장치, OCS와 Interface를 갖고 있어야 하며, Data Mining을 통해 얻어진 결과를 DB에 저장할 수 있어야 한다. HL7에 정의된 XML 데이터를 처리하기 위해 XML Repository를 갖고 있다. Data Mining할 때 필요한 항목을 설정하고 Mining 엔진을 제어할 수 있다.

[0475] 도 4에 도시된 바와 같이, 상기 임상 의사 결정 지원 시스템의 학습 엔진 모듈은 상기 표적 분자를 지시하는 탐침을 이용한 분자계수 분석결과를 이용하여 질환을 판단하기 위해 필요한 인공지능 학습 엔진 모듈이다.

[0476] 생물학적 의미 분석 시스템은 HL7을 지원하도록 한다. 생물학적 의미 분석 시스템 내부에서 데이터를 처리할 때, HL7에 정의된 Schema를 포함하도록 데이터 구조를 설계하는 것을 의미한다. XML 문서의 Schema 정보를 저장하고 사용하기 위해 XML Repository Module과 XML Repository Client를 갖는다.

[0477] 표적분자를 지시하는 탐침을 이용한 분자계수 분석결과를 분석할 수 있는 분석 장치와의 연동을 위해 분자계수 분석결과 Interface Module을 갖는다. 분자계수 분석결과에서 SDK(software development kit)를 제공하는 경우에는 Gateway를 개발하는 것을 원칙으로 한다. OCS Interface Module은 OCS에서 환자 정보를 읽어 Data Mining에 필요한 정보를 제공한다. 또한 Data Mining에 의해 분석된 질환 정보를 OCS(LIS)에 저장한다.

[0478] 도 5에 도시되어 제시하는 바와 같이, 상기 임상 의사 결정 지원 시스템의 생물학적 의미 분석은 크게 네 개의 부분 시스템으로 구성되어 있으며, 생물학적 의미 결정 엔진인 '데이터분석/예측모델 생성' 모듈과 '진단클라이언트' 모듈, 그리고 애플리케이션 데이터를 생성하는 증폭산물 분석 장치와의 연동 모듈인 '증폭산물 분석 장치 인터페이스', 다른 모듈간의 통신과 데이터 저장을 담당하는 '통신서버'가 유기적으로 결합된 시스템이다. 시스템의 구동은 크게 시스템 구축단계와 시스템 적용 단계로 구분된다.

[0479] 시스템 구축 단계는 ① 질병의 특성을 잘 반영하도록 구성된 정상인/환자 시료 집합을 구성하여, ② 해당 시료 집합에 대한 정도관리 및 측정용의 표준물질을 활용한 표적분자를 분자계수 분석을 실시하고, ③ 표적분자 분자계수 분석 정보를 '분자계수 분석 장치 인터페이스' 모듈을 통해 시스템에 입력, ④ '데이터 분석/예측모델 생성' 모듈에서 기본적인 전처리를 하여 인공지능망 알고리즘의 '학습데이터' 생성, ⑤ 인공지능망 알고리즘으로 학습데이터를 이용하여 생물학적 의미 분석 모델 생성, ⑥ 생성된 생물학적 의미 분석모델을 컴퓨터에 저장하는 과정을 거친다.

[0480] 도 6에 도시되어 제시하는 바와 같이 시스템 적용 단계는 ① DB에 저장된 생물학적 의미 분석모델을 '생물학적 의미 분석 클라이언트'에 장착, ② '생물학적 의미 분석 클라이언트' 구동, ③ 생물학적 의미 분석 대상자의 분자계수 및 분자계수 분석 장치를 이용한 분석결과 정보 생성, ④ '분자계수 분석 장치 인터페이스'를 통한 데이터 입력, ⑤ '생물학적 의미 분석 클라이언트'에서 생물학적 의미 분석 및 결과 가시화, ⑥ 생물학적 의미 분석결과 DB에 저장으로 구성된다.

[0481] 도 7에 도시되어 제시하는 바와 같이, 표적분자 분석결과를 표적분자 양태 정도를 나타내는 것이다. 수치 데이터는 분자계수 데이터로부터 얻어진 것으로, 각 값은 하나의 표적분자의 값을 의미하며, 숫자 값은 각 표적분자에 대한 양태의 정도를 의미한다고 할 수 있다.

[0482] 표적분자 정보와 함께 시스템에서 입력으로 받는 것은 각 환자에 대한 임상 정보이다. 각 환자들에 대한 나이, 성별, 혈압, 가계 상의 질병 내력, 흡연 여부 등 각 환자에 대한 임상 정보 역시 입력으로 받는다. 이들 자료들은 모두 데이터베이스에 저장된다. 시스템 구축을 위해 사용되는 임상 데이터는 기본적으로 협력 의료기관에서 받는 것으로 하며, 표적분자의 양태 데이터는 분자계수 데이터를 이용하는 것으로 한다.

[0483] 도 8에 도시되어 제시하는 바와 같이, 분자계수 분석 실험 결과는 분자계수 분석 장치를 통해 수치 데이터로 변환된다. 질환 생물학적 의미 결정 시스템에서 이 데이터를 직접 사용하기 위해서는 표적분자를 지시하는 탐침을 이용한 분자계수를 읽을 수 있는 분자계수 분석 장치와 생물학적 의미 결정 시스템을 연동시키는 것이 필요하다. 따라서 SDK를 제공하는 분자계수 분석 장치를 사용하는 것을 기본으로 하여, 생물학적 의미를 결정하는 임상 의사 결정 지원 시스템과의 연동을 위한 게이트웨이(gateway)를 개발한다.

[0484] 한편 생물학적 의미 결정을 위한 임상 데이터는 OCS 시스템의 환자 정보가 입력으로 들어오도록 한다. OCS로부터 환자 정보를 OCS interface module을 통해 읽어서, 데이터마이닝에 필요한 정보들을 시스템 엔진에 제공한다.

- [0485] 도 8에 도시되어 제시하는 바와 같이, 질병에 대한 생물학적 의미 결정에 대한 지표 예측은 데이터베이스 내의 정보들을 기반으로 이루어진다. 저장되어있는 정보들을 이용하여 여러 가지 기계학습(machine learning) 방법을 적용하면, 질병에 대한 지표 분석이 가능하다. 인공신경망(artificial neural network), 결정트리(decision tree), 베이즈안망(Bayesian network), 서포트벡터머신(support vector machine, SVM) 등의 대표적인 기계학습 방법이 분석을 위한 핵심 알고리즘으로 사용된다. 일반적으로 이들 방법들은 벡터 형태의 수치 데이터가 입력으로 들어오면, 이를 학습하여 새로운 데이터에 대한 예측을 가능하게 해준다. 인공신경망과 서포트벡터머신은 데이터를 분류하는 데에 있어서 우수한 성능을 보이기 때문에 기계학습 분야의 연구에서 가장 많이 사용되는 분류 알고리즘들이다. 또한 결정트리와 베이즈안망은 결과를 사람이 이해하기 쉽도록 가시화 할 수 있다는 장점을 가진다. 본 생물학적 의미 결정 시스템은 인공신경망 알고리즘을 통해 지속적인 테스트를 거치면서 학습 모델을 최적화(optimize)하고, 이를 통해 질병지표 예측 성능이 우수하게 나올 수 있도록 한다.
- [0486] 정도관리 및 보정용의 표준물질을 이용한 새로운 환자에 대한 하나 또는 그 이상의 표적분자를 탐침을 이용한 분자계수 분석방법에 의해 생산된 분석결과 정보와 임상정보가 입력으로 들어오면, 분석 시스템에서는 여러 가지 다양한 형태로 특정한 질병에 대한 지표를 비롯한 분석 결과를 보여준다. 의료진들이 질병에 관한 의사 결정을 하는데 있어서 도움을 줄 수 있는 정보들을 보여주는 것이다. Client에서는 질병지표에 대한 단순한 수치 정보뿐 아니라, 생물학적 네트워크 등을 통해 보다 가시적으로 질병지표 정도를 보여줄 수 있도록 한다. 특정 질병에 대한 분석 결과는 의료진뿐 아니라 환자들이 본인의 질병에 관련된 지표와 그 원인 등에 대해 보다 쉽게 이해하는데 도움이 될 수 있도록 한다.
- [0487] 통신서버는 생물학적 의미를 결정하는 임상 의사 결정 지원 시스템의 통신을 제어한다. 분자계수 분석 장치 인터페이스, 생물학적 의미 결정 엔진, 생물학적 의미 결정 클라이언트, 데이터베이스 서버 등 데이터가 오가는 모든 부분을 제어한다. 즉, 환자의 실험 정보를 DB에 입력하고, 생물학적 의미 결정 엔진은 환자의 실험 정보를 가져와서 진단하고, 생물학적 의미 결정 결과를 DB에 저장하고, 생물학적 의미 결정 결과를 생물학적 의미 결정 클라이언트 화면에 내보내는 등 데이터를 관리하는 모든 부분을 담당한다. 그리고, 데이터베이스 서버는 환자의 검사 정보, 환자의 실험 정보, 생물학적 의미 결정에 필요한 학습 정보, 생물학적 의미 결정 엔진 모델 정보, 시스템 설정 정보, 시스템 로그 정보, 생물학적 의미 결정 결과 정보 등 다양한 데이터를 저장한다. 통신서버와 데이터베이스는 상호 밀접한 관계를 가지며, 각 모듈별 데이터 전송을 관리한다.
- [0488] 도 9에 도시한 바와 같이, 상기 정도관리 및 보정용의 표준물질이 첨가된 혈액시료를 분자계수 분석 방법으로 혈액시료에서 상기 표준물질의 분석결과를 기준으로 상기 표적분자의 분석결과를 확인할 수 있으며 또한 급성심근경색 환자 또는 폐혈증 환자의 혈청 생체분자의 분석결과가 상이함을 확인하여 생물학적 의미를 결정할 수 있다.
- [0489] 도 10은 생산된 분석결과를 질환군별로 구성된 데이터베이스 및 인공신경망을 이용한 임상 의사 결정 지원 시스템으로 특정한 사람의 혈액시료에 대해 생체분자 분석결과를 생산하여 질병을 진단하는 흐름도이다. 도11에 제시한 바처럼, 많은 생체시료에서 생산되는 분석결과로 구축된 데이터베이스를 생물정보학기술로 분석하여 얻은 유용한 정보로 생물학적 의미를 결정할 수 있다.
- [0490] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 일 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [0491] 본 발명은 표적분자에 대한 분자계수 기술을 이용하여 생체시료에 있는 표적분자들을 높은 감도와 재현성으로 한 번의 분석으로 검출할 수 있으며 표적분자들의 생물학적 의미를 효율적으로 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명은 한 번의 검사로 다양한 표적분자들을 분석함으로써 생체시료에서 표현형의 변화, 질병에 대한 민감성 그리고 치료 약제에 대한 반응의 차이 등 개인 간의 차이를 효율적으로 결정하는 방법을 제공하여 진단 및 치료 기술의 발전에 기여를 함으로써 인간 질병 극복에 크게 여기하며, 경제적 차원에서 의료 산업상 매우 유용한 효과가 있다.