

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0024042 (43) 공개일자 2011년03월09일
(51) Int. Cl. <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>G01N 33/533</i> (2006.01)	(21) 출원번호 10-2009-0081891 (22) 출원일자 2009년09월01일 심사청구일자 2009년09월01일	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내 (72) 발명자 김진홍 서울특별시 은평구 진관동 14번지 은평뉴타운 상림마을 805동 701호 (74) 대리인 특허법인다나

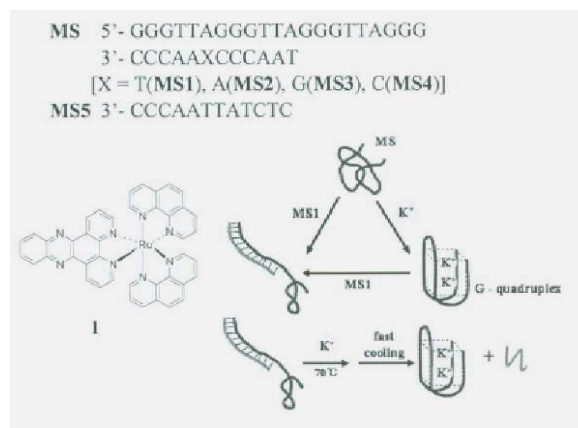
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 포타슘 이온 검출용 형광센서 및 이를 이용한 DNA 서열 분석

(57) 요약

본 발명은 포타슘 이온 검출용 형광센서 및 이를 이용한 DNA 서열 분석에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 단일가닥 앵타머와 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 이중가닥 복합체에 형광물질이 삽입되어 나타나는 형광변화를 이용하여 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 검출할 수 있고, 상기 이중가닥 복합체와 포타슘 이온을 반응시켜 포타슘 이온을 포함하는 4중 가닥 구조의 앵타머로의 구조 전환을 통해 형광물질의 형광 소광을 측정함으로써 별도의 표지 없이 포타슘 이온을 검출할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R11-2005-008-06002-0

부처명 교육과학기술부(구 한국과학재단)

연구관리전문기관

연구사업명 기초과학연구지원사업(우수연구센터지원사업)

연구과제명 바이오선택성 나노구조체 연구

기여율

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2008년 03년 01일 ~ 2011년 02월 28일

특허청구의 범위

청구항 1

서열목록 서열번호 1에 기재된 앵타머; 및

형광물질을 포함하는 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드 검출용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

앵타머가 단일가닥 또는 포타슘 이온을 포함하는 4중 가닥 구조인 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드 검출용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

형광물질은 $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})^{2+}$ ($\text{phen}=1,10\text{-phenanthroline}$, $\text{dppz}=\text{dipyrido}[3,2\text{-}a:2',3'\text{-}c]\text{phenazine}$), $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$, ethidium bromide, OliGreen, 및 CyberGreen으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드 검출용 조성물.

청구항 4

i) 서열번호 1에 기재된 앵타머 및 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 이중가닥 복합체를 제조하는 단계;

ii) 형광물질이 상기 이중가닥 복합체에 삽입되는 단계; 및

iii) 상기 형광물질의 형광 변화를 측정하는 단계를 포함하는 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 검출방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

앵타머는 단일가닥 또는 포타슘 이온을 포함하는 4중 가닥 구조인 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 검출방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

이중가닥 복합체는 70 내지 90℃에서 제조되는 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 검출방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

형광물질은 $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})^{2+}$ ($\text{phen}=1,10\text{-phenanthroline}$, $\text{dppz}=\text{dipyrido}[3,2\text{-a}:2',3'\text{-c}]\text{phenazine}$), $\text{Ru}(\text{phen})_3^{2+}$, ethidium bromide, OliGreen, 및 CyberGreen 으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타드의 검출방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

형광변화는 형광 강도의 증가를 측정하는 것인 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타드의 검출방법.

청구항 9

서열번호 1에 기재된 앵타머 및 상기 앵타머의 상보적인 올리고뉴클레오타드의 이중가닥 복합체; 및 형광물질을 포함하는 포타슘 이온 검출용 형광센서.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 앵타머의 상보적인 올리고뉴클레오타드는 서열번호 2에 기재된 서열을 갖는 포타슘 이온 검출용 형광센서.

청구항 11

제9항의 형광센서와 포타슘 이온을 반응시키는 단계; 및

형광변화를 측정하는 단계를 포함하는 포타슘 이온의 검출방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

반응은 70 내지 90 °C에서 5 내지 10분간 가열한 다음, 4°C 이하로 급냉시키는 것인 포타슘 이온의 검출방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

포타슘 이온은 0.05 μM 내지 1.6mM의 농도를 갖는 포타슘 이온의 검출방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

형광변화의 측정은 형광 소광을 측정하는 것인 포타슘 이온의 검출방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 포타슘 이온 검출용 형광센서 및 이를 이용한 DNA 서열 분석에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 단일 가닥 앵타머와 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 이중가닥 복합체에 형광물질이 삽입되어 나타나는 형광변화를 이용하여 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 검출할 수 있고, 상기 이중가닥 복합체와 포타슘 이온을 반응시켜 포타슘 이온을 포함하는 4중 가닥 구조의 앵타머로의 구조 전환을 통해 형광물질의 형광 소광을 측정함으로써 별도의 표지 없이 포타슘 이온을 검출할 수 있는 포타슘 이온 검출용 형광센서 및 이를 이용한 DNA 서열 분석에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 고체 표면 상에 DNA 검출 서열, 소위 프로브를 고정하여 이중 시료에서 각각의 DNA 서열을 검출하는 기술은 유전자 동정, DNA 프로파일링, 및 DNA 서열분석에 대한 새로운 접근을 위한 기초를 제공한다. 이를 위한 간단하고, 특정적이며, 민감한 검출 도구를 개발하기 위해 강력한 연구들이 전세계적으로 진행되어 왔다. 특히, 효소 및 화학적 절단 연구에서 검출될 수 있는 단일-염기 미스매치에 민감한 분석 방법은 분자생물학적 및 화학적 지노믹스 분야에서 매우 중요하다. 단일 염기 미스매치를 감지하기 위해 보고된 형광 검출은 프로브 가닥의 말단에 형광단을 표지하거나, 또는 프로브 DNA의 양 말단에 형광단 및 소광제(quencher)를 부착하는 것을 기반으로 한다. 최근에는, 표지 없이 DNA 하이브리다이제이션을 형광 검출하기 위해 탄소나노튜브를 이용한다. 형광단을 핵산 프로브로 포괄적으로 적용하기 위해서는 간단하고, 표지 없는 감지 시스템에 대한 더 많은 예시가 요구된다.
- [0003] 폴린 G-quadruplex 구조에서 꼬인 구조로의 앵타머 DNA의 구조적 변형을 이용하여 포타슘 이온의 형광 앵타센서가 개발되었다. 그러나, 대부분의 경우, 이들 방법들은 표지 공정(tagging process) 또는 복잡한 실험 기술들을 포함하고 있다. 다양한 형광 및 소광 물질로 표지할 경우 때때로 앵타머의 표적 결합 특성을 손상시킬 수도 있다.
- [0004] 한편, 폴리피리딘 루테니움 복합체 및 이들과 DNA의 상호작용이 광범위하게 연구되었는데, 이들이 DNA와 결합할 때 광물리학적 특성이 증가하기 때문이다. Barton 및 그의 동료들은 이중가닥 DNA의 주요 홈(groove)으로부터 삽입 시 방향족 Ru 복합체의 형광 증가를 소개한 바 있다.
- [0005] 그러나, 앵타머에 대한 별도의 표지 없이 포타슘 이온, 또는 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 형광 검출한 예는 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 이중가닥 DNA에 삽입된 형광물질의 형광강도의 변화를 이용하여 표적 올리고뉴클레오타이드, 또는 포타슘 이온을 검출할 수 있는 간단하고, 선택적이고, 민감한 검출용 형광 앵타센서 및 이를 이용한 검출방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0008] 서열목록 서열번호 1에 기재된 앵타머; 및
- [0009] 형광물질을 포함하는 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드 검출용 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명은 또한
- [0011] i) 서열번호 1에 기재된 앵타머 및 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 이중가닥 복합체를 제조하는 단계;

- [0012] ii) 형광물질이 상기 이중가닥 복합체에 삽입되는 단계; 및
- [0013] iii) 상기 형광물질의 형광 변화를 측정하는 단계를 포함하는 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 검출방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한
- [0015] 서열번호 1에 기재된 앵타머 및 상기 앵타머의 상보적인 올리고뉴클레오타이드의 이중가닥 복합체; 및
- [0016] 형광물질을 포함하는 포타슘 이온 검출용 형광센서를 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한
- [0018] 본 발명의 포타슘 이온 검출용 형광센서와 포타슘 이온을 반응시키는 단계; 및
- [0019] 형광변화를 측정하는 단계를 포함하는 포타슘 이온의 검출방법을 제공한다.

효 과

- [0020] 본 발명은 단일가닥 앵타머 및 형광물질의 형광변화를 이용하여 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 검출할 수 있다.
- [0021] 본 발명은 또한 앵타머 및 상보적 올리고뉴클레오타이드의 이중가닥 복합체 및 형광물질의 형광변화를 이용하여 별도의 표지 없이 포타슘 이온을 검출할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0023] 본 발명은
- [0024] 서열목록 서열번호 1에 기재된 앵타머; 및
- [0025] 형광물질을 포함하는 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명의 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드 검출용 조성물은 단일가닥 또는 포타슘 이온을 포함하는 4중 가닥 구조인 앵타머를 이용하여 상기 앵타머의 이중가닥 구조에 삽입될 때 형광변화를 나타내는 형광물질의 형광변화를 측정하여 상기 앵타머에 상보적인 올리고뉴클레오타이드, 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 검출할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 상기 앵타머가 단일가닥을 갖는 경우, 표적 올리고뉴클레오타이드와 이중가닥 복합체를 형성하며, 형광물질이 상기 이중가닥에 삽입되어 형광 강도가 증가되므로 형광 측정을 통해 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 검출할 수 있는 것이다.
- [0028] 또한, 상기 단일가닥 앵타머와 이중가닥을 형성할 수 있는 올리고뉴클레오타이드의 단일 염기가 미스매치일 경우 형광물질의 형광변화는 표적 올리고뉴클레오타이드와의 이중가닥 복합체와 비교하여 상대적으로 낮은 형광 증가를 나타내어 이들의 형광강도를 비교하여 미스매치 올리고뉴클레오타이드를 검출할 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 앵타머가 포타슘 이온 하에서 4중 가닥을 형성하는 구조를 가질 경우, 4중 가닥 구조의 앵타머는 표적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드와 이중가닥 복합체를 형성하기 위해 4중 가닥 구조가 풀리면서 포타슘 이온을 방출하고 상기 올리고뉴클레오타이드와 이중가닥 복합체를 형성하며, 상기 이중가닥 복합체에 형광물질이 삽입되어 형광 강도가 증가함으로써 표적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 검출할 수 있다.
- [0030] 상기 앵타머는 서열목록 서열번호 1에 기재된 서열을 가질 수 있다. 상기 서열은 포타슘 결합 서열을 포함하고

있어, 포타슘 이온 하에서 3개의 적층된 G-quartets로 구성된 안정된 골격으로 변형될 수 있다.

[0031] 또한, 상기 앵타머의 이중가닥 구조에 삽입하여 형광변화를 나타낼 수 있는 형광물질로, $\text{Ru(phen)}_2(\text{dppz})^{2+}$ (phen=1,10-phenanthroline, dppz=dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine), Ru(phen)_3^{2+} , ethidium bromide, OliGreen, 또는 CyberGreen 등을 사용할 수 있다.

[0032] 보다 바람직하게는, 상기 $\text{Ru(phen)}_2(\text{dppz})^{2+}$ (phen=1,10-phenanthroline, dppz=dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine)는 이중 나선 DNA의 소수성 염기 쌍 사이에 결합하여 610nm에서 $>10^4$ 의 증가가 가능한 형광을 나타낼 수 있어 좋다.

[0033] 본 발명은 또한

[0034] i) 서열번호 1에 기재된 앵타머 및 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 이중가닥 복합체를 제조하는 단계;

[0035] ii) 형광물질이 상기 이중가닥 복합체에 삽입되는 단계; 및

[0036] iii) 상기 형광물질의 형광 변화를 측정하는 단계를 포함하는 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 검출방법에 관한 것이다.

[0037] 본 발명의 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 검출방법은 앵타머 및 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 이중가닥 복합체에 형광물질의 삽입을 통한 형광변화를 측정함으로써 가능하다.

[0038] 상기 앵타머는 단일가닥, 또는 포타슘 이온을 포함하는 4중 가닥 구조를 가질 수 있는데, 단일가닥 앵타머는 표적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드와 이중가닥 복합체를 형성하며, 형광물질이 상기 이중가닥에 삽입되어 형광 강도가 증가될 수 있다.

[0039] 또한, 상기 앵타머가 포타슘 이온을 포함하는 4중 가닥 구조를 가질 경우, 4중 가닥 구조의 앵타머는 표적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드와 이중가닥 복합체를 형성하기 위해 4중 가닥 구조가 풀리면서 포타슘 이온을 방출하고 상기 올리고뉴클레오타이드와 이중가닥 복합체를 형성하며, 상기 이중가닥 복합체에 형광물질이 삽입되어 형광 강도가 증가할 수 있다.

[0040] 상기 이중가닥 복합체는 단일가닥 앵타머 및 표적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 70 내지 90℃에서 어닐링한 다음 실온에서 서서히 냉각함으로써 제조될 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0041] 또한, 상기 이중가닥 복합체는 포타슘을 포함하는 4중 가닥 구조의 앵타머 및 표적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 실온에서 반응시켜 제조될 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0042] 또한, 상기 앵타머의 이중가닥 구조에 삽입하여 형광변화를 나타내는 형광물질로, $\text{Ru(phen)}_2(\text{dppz})^{2+}$ (phen=1,10-phenanthroline, dppz=dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine), Ru(phen)_3^{2+} , ethidium bromide, OliGreen, 또는 CyberGreen 등을 사용할 수 있다. 보다 바람직하게는, $\text{Ru(phen)}_2(\text{dppz})^{2+}$ (phen=1,10-phenanthroline, dppz=dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine)이 좋다.

[0043] 본 발명의 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드의 검출방법에 따르면, 상기 형광물질의 형광변화를 측정하는 단계는 형광 강도의 증가를 측정하는 것이다.

[0044] 본 발명은 또한

[0045] 서열번호 1에 기재된 앵타머 및 상기 앵타머의 상보적인 올리고뉴클레오타이드의 이중가닥 복합체; 및

- [0046] 형광물질을 포함하는 포타슘 이온 검출용 형광센서에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명의 포타슘 이온 검출용 형광센서는 앵타머 및 상기 앵타머의 상보적인 올리고뉴클레오타이드의 이중가닥 복합체를 고온에서 어닐링한 후 급냉시키면 이중가닥 복합체가 풀리면서 열역학적 특성에 의해 포타슘 이온이 상기 앵타머에 우선적으로 결합하여 앵타머는 포타슘 이온을 포함하는 4중 가닥 구조로 전환되고, 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 유리되며, 이러한 이중가닥 복합체의 4중 가닥 구조로의 전환은 형광물질의 삽입 감소로 이어져 형광 소광을 나타냄으로써 포타슘 이온을 검출할 수 있는 것이다.
- [0048] 상기 앵타머의 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 상기 앵타머와 이중가닥을 형성할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드라면 특별히 제한하지 않으며, 예를 들어, 서열번호 2에 기재된 서열을 사용할 수 있다. 또한, 상기 이중가닥 복합체의 포타슘 이온을 포함하는 4중 가닥 구조의 앵타머로의 전환은 70 내지 90 °C에서 5 내지 10분간 가열한 다음 4°C 이하로 급속히 냉각함으로써 일어날 수 있다.
- [0049] 본 발명은 또한
- [0050] 본 발명의 포타슘 이온 검출용 형광센서와 포타슘 이온을 반응시키는 단계; 및
- [0051] 형광변화를 측정하는 단계를 포함하는 포타슘 이온의 검출방법에 관한 것이다.
- [0052] 본 발명의 포타슘 이온의 검출방법은 이중가닥 복합체의 포타슘을 포함하는 4중 가닥 구조의 앵타머로의 전환단계와 상기 구조 전환에 따른 형광변화를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0053] 상기 이중가닥 복합체가 포타슘을 포함하는 4중 가닥 구조의 앵타머로 전환하는 단계는 70 내지 90 °C에서 5 내지 10분간 가열한 다음 4°C 이하로 급속히 냉각함으로써 일어날 수 있다.
- [0054] 상기 이중가닥 복합체가 포타슘을 포함하는 4중 가닥 구조의 앵타머로 전환함으로써 이중가닥 복합체에 삽입될 수 있는 형광물질이 감소하게 되고, 이로 인해 형광 소광이 나타나므로 이를 측정함으로써 포타슘 이온을 검출할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 포타슘 이온의 검출방법을 통해 검출할 수 있는 포타슘 이온의 농도는 0.05 μM 내지 1.6mM인 것이 바람직하다. 보다 바람직하게는, 0.05 μM 내지 500 μM이 좋다.
- [0056] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 및 본 발명에 따르지 않는 비교예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0057] <실시예 1>
- [0058] 본 실시예에 사용된 물은 MilliQ purification system으로 순수정제하였다. rac-Ru(phen)₂(dppz)²⁺(도 1의 1)은 A.E. Friedman *et al*(*J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 4960)의 방법에 따라 제조하였다. 모든 올리고뉴클레오타이드는 JenoTec Inc.(Daejeon, Korea)에서 구입하였고, Thermo Hypersyl gold column(0.46×25cm)을 이용한 HPLC에서 정제하였다. 다른 화합물질들은 Aldrich로부터 구입하여 사용하였다. 올리고뉴클레오타이드 농도는 Hewlett-Packard 8452A diode-array spectrometer에서 260nm, ε=6600M⁻¹cm⁻¹에서 흡광도를 측정하였다.
- [0059] 단일 염기 DNA 농도는 알려져 있으므로, 이중가닥 DNA를 제조하기 위해 표적 DNA의 동일 몰 함량을 혼합하고, 90°C에서 10분간 어닐링하고 나서 실온에서 서서히 냉각하였다.
- [0060] MS(도 1, 서열번호 1)의 G-quadruplex 형태는 1.6mM K⁺의 존재 하에서 0.4 μM MS로 제조하였다. MS 및 K⁺의 혼합 용액은 70°C에서 30분간 가열한 다음 냉각시켜 G-quadruplex 형태를 형성하였다.
- [0061] 선광도(optical rotation)는 Perkin-Elmer 241 polarimeter를 이용하여 실온에서 측정하였다.

- [0062] 방출 스펙트럼은 Perkin-Elmer LS 55 luminescence spectrophotometer 상에서 수집하였고, 상기 온도는 온수 서머스탯(water thermostat)에서 일정하게 유지하였다.
- [0063] 도 1에 도시된 바와 같이, 프로브로 21-mer의 올리고뉴클레오티드(MS), 표적으로 12개의 일직선으로 나열된 염기쌍을 가진 이중가닥을 형성할 수 있는 12-mer의 올리고뉴클레오티드(MS1, 서열번호 2)를 사용하였다.
- [0064] 이중가닥 DNA에 삽입되어 형광변화를 나타내는 전이금속 착물로 $\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{dppz})^{2+}$ (phen=1,10-phenanthroline, dppz=dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine)(도 1의 1의 화합물)를 사용하였다.
- [0065] <실험예 1> 1의 화합물과, 단일가닥 앵타머 또는 이중가닥 복합체의 형광변화 측정
- [0066] 1의 화합물이 단일가닥 MS 및 이중가닥 MS/MS1과 상호작용할 때 형광 강도를 비교하였다. 이때, 여기파장은 450nm이고, 형광 강도는 임의의 단위(au)로 작성하였다. MS/MS1은 MS 및 MS1을 90℃에서 배양하고, 서서히 냉각하여 제조하였다.
- [0067] 도 2a 및 2b에 도시된 바와 같이, 5mM Tris-buffer(pH7.4) 및 0.4 μM MS에서 1의 화합물의 형광 강도는 MS/MS1 이중가닥에 비해 상대적으로 훨씬 약했다.
- [0068] 도 2c에 나타난 바와 같이, 1.6mM K^+ 를 첨가하여 생성된 MS의 G-quadruplex 구조는 낮은 형광 강도를 나타냈다. 1의 화합물의 dppz 리간드가 구아닌 염기 면 사이에서 포타슘 이온의 선점때문에 중간에 긴 G-quartet 구조로의 삽입 시 정전기적 및 입체적 문제점을 가질 수 있기 때문인 것으로 사료된다.
- [0069] <실험예 2> 상보적 올리고뉴클레오티드 첨가에 따른 앵타머의 G-quartet 구조의 변화 측정
- [0070] 상보적인 MS1을 첨가할 경우 MS의 G-quartet 구조에서 포타슘 이온이 해방되거나 상실될 가능성을 확인하였다.
- [0071] 도 3a는 MS1 농도별 형광 강도의 변화를 나타낸 것으로, 실온에서 포타슘 이온을 갖고 있는 G-quadruplex 구조에 MS1을 첨가하면 1의 화합물의 발광 증가가 관찰되었다. 형광 강도는 이중가닥 MS/MS1의 것과 비교하여 1.0 당량의 MS1의 첨가 시 93% 복원되었다. 이 결과는 상보적 DNA의 첨가는 G-quartet 구조를 풀게 하여 상기 구조에서 포타슘 이온을 유리시키고, 이들 조건 하에서 1.0 당량의 MS1과 이중가닥 DNA를 형성함을 말하는 것이다. 그러나, MS1을 랜덤-코일드 MS와 직접 혼합할 경우에도 유사한 형광 강도를 얻었는데, 이는 동일한 MS/MS1 이중가닥 DNA가 형성됨을 말하는 것이다.
- [0072] K^+ 하에서 G-quadruplex의 폴림 역동학(unfolding thermodynamic)을 조사하기 위한 분광학적 및 열량학적 연구들에서, 전이 온도는 45℃ 이상에서 나타났으며, 형성 엔탈피는 약 -15kcal/mol을 나타내었는데, 유사한 K^+ 앵타머를 갖는 안정적인 분자 내 G-quadruplex의 형성과 일치하는 것이다. 그들은 또한 루프 및/또는 외부 염기 서열의 존재는 quadruplex 구조를 안정화시킨다고 제안하였다. 1의 화합물에서 루프 및 외부 염기 오버행에서 미묘한 차이로 인해, 이들 연구에서 사용된 앵타머 서열과 비교하여, 그러한 구조적 변화가 쉽게 일어날 것으로 사료된다.
- [0073] 또한, MS1을 MS의 G-quadruplex 형태에 첨가 시 이중가닥 DNA의 형성은 circular dichroism(CD) 및 UV-vis 실험을 이용하여 확인하였다. 또한, 260nm 근처에서 양성 타원율을 갖는 G-quadruplex 구조를 위한 특징적인 CD 프로파일은 이중 나선 DNA의 형성으로 사라졌고, MS/MS1의 것과 유사한 스펙트럼을 나타냈다(도 4). MS의 G-quadruplex 형태가 이중 나선 DNA로의 전환은 또한 UV-vis 실험에서도 관찰되었다.
- [0074] 또한, 형광 연구 시 랜덤-코일드 가닥으로부터 이중 나선 MS/MS1의 형성을 및 MS1 처리 시 MS의 G-quadruplex 형성을 비교하였다. 두 시료로부터 형성이 실온에서는 꽤 빨랐기 때문에 상기 실험은 4℃에서 실시하였다.
- [0075] 예상대로, G-quadruplex 구조로부터 MS/MS1의 형성은 상대적으로 느렸는데, 이는 콤팩트 quadruplex 형태에서 포타슘 이온을 갖는 MS 결합 에너지를 극복하는 추가 과정때문이다(도 5).

- [0076] <실시예 2> DNA 서열 분석
- [0077] 올리고뉴클레오타이드의 단일 염기 미스매치를 구별하기 위해 MS1의 아데닌 염기가 각각 티민, 구아닌 및 시티딘으로 치환된 MS2(서열번호 3), MS3(서열번호 4) 및 MS4(서열번호 5)를 이용하여 관찰하였다(도 1).
- [0078] 이를 위해, 5mM Tris-HCl buffer(pH7.4)를 포함하는 완충 수용액에 녹인 0.4 μ M MS의 G-quadruplex 형태를 포함하는 시료를 0.4 μ M 매치 또는 미스매치된 올리고뉴클레오타이드와 실온에서 5분간 혼합하였다. 그리고 나서, $\text{Ru(phen)}_2(\text{dppz})^{2+}$ (4 μ M)을 처리하고 나서 2분 후에 방출 스펙트럼을 측정하였다.
- [0079] 도 3b에 나타난 바와 같이, MS2 내지 MS4와 반응 시, 상대적으로 훨씬 적은 형광 증가를 나타냈다. MS2 처리된 용액에 1 당량의 MS1을 추가로 첨가할 경우 발광은 MS1 단독 처리 시 관찰된 것으로 복귀하였다(미도시됨). MS1에서 얻은 형광 강도의 증가는 MS2 내지 MS4의 경우에서 관찰된 것 보다 약 20배 컸는데, 이는 G-quartet 하이브리드제이션 프로브 MS는 표적 가닥과 단일 돌연변이를 갖는 가닥을 구별할 수 있음을 말하는 것이다.
- [0080] 또한, MS와 6개의 염기쌍을 형성하는 12-mer MS5(도 1, 서열번호 6)를 같은 반응 조건 하에서 사용하였을 때, 하이브리드의 상대적 형광 강도는 MS1 단독에서 관찰된 것과 비교하여 80% 적었다(도 6). 이는 아마도 MS/MS5에서 일치된 염기 쌍의 수가 감소하여 형광 강도가 감소된 것과 연관되어 있을 것이다.
- [0081] <실시예 3> 포타슘 이온의 검출
- [0082] MS의 G-quadruplex 구조가 MS1의 존재 시 이중 나선 DNA로 전환될 때, 포타슘 이온 첨가 시 이중가닥 복합체 MS/MS1이 G-quadruplex 형태로 전환되기 위한 조건을 찾고자 하였다.
- [0083] 이를 위해, 1.6mM K^+ 와 혼합한 MS/MS1(0.4 μ M) 용액을 실온, 또는 70℃에서 30분간 가열하고 4℃ 냉장고에 정치하여 재빨리 냉각시켰다. 그리고 나서, 상기 용액을 실온으로 정치한 후 방출 스펙트럼($\lambda_{\text{ex}}=450\text{nm}$)을 측정하였다.
- [0084] 도 7에 나타난 바와 같이, 실온에서 형광 측정 시 MS/MS1은 1.6mM까지 K^+ 처리에 의해서는 유의한 변화를 나타내지 않았다(7b). 그러나, MS/MS1 및 1.6mM K^+ 를 포함하는 용액을 70℃에서 30분간 배양한 후 재빨리 4℃ 이하로 냉각하면, 측정 전에 실온으로 정치된 용액 내 1의 화합물의 발광 강도는 MS/MS1 이중가닥 복합체(7a)와 비교하여 유의하게 감소하였다(7c).
- [0085] 또한, 상기와 같은 반응 조건 하에서 포타슘 이온을 농도 별로 첨가하여 방출 스펙트럼에서의 점진적 변화를 관찰하였다. 방출 강도와 0 내지 2.5mM의 포타슘 이온 농도 간의 상관관계는 도 8의 그래프 내에 나타내었다.
- [0086] 도 8에 나타난 바와 같이, K^+ 농도가 500 μ M까지 증가하면, 방출 강도는 점차 감소하였고, 이 농도 후에는 거의 변화를 나타내지 않았다. 형광 방출과 K^+ 농도 간의 직선의 상관관계는 0.05-500 μ M의 범위에서 관찰되었다.
- [0087] 또한, DNA의 2개의 형태의 CD 스펙트럼 동정에 의해 확인한 바에 따르면, 이들 형광 변화는 MS의 이중 가닥에서 콤팩트 삼중가닥으로의 구조적 변화때문인 것으로 사료된다(미도시 됨). 그러나, 1.6mM K^+ 하에서 70℃에서 가열한 MS/MS1 용액을 실온으로 서서히 냉각하면, 형광 강도의 그러한 큰 감소는 관찰되지 않았다. 이들 결과는 K^+ 하에서 MS 및 MS1으로부터 이중가닥 복합체 MS/MS1의 형성은 상기 반응 조건에서는 열역학적으로 보다 우호적인 것임을 입증하는 것이다.
- [0088] 또한, 상기의 K^+ 검출용 형광 센서로서의 용도를 확인하기 위해, K^+ 또는 Na^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Rb^+ , Cs^+ 및 Mg^{2+} 등 다양한 다른 금속이온(각각 0.9mM)과 혼합한 MS/MS1(0.4 μ M) 용액을 70℃에서 30분간 가열하고 4℃ 냉장고에 정치

하여 재빨리 냉각시켰다. 그리고 나서, 상기 용액을 실온으로 정치한 후 방출 스펙트럼을 측정하였다.

[0089] 도 9에 나타난 바와 같이, 형광센서는 같은 mole 분획을 포함한 분석 용액에서 이들 양이온에 비해 K^+ 에 대해 유의적으로 반응하였다. 이는 Na^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} , Rb^+ , Cs^+ 및 Mg^{2+} 와 1의 화합물의 방출 시 유의적인 형광 변화가 관찰되지 않음을 입증하는 것이다.

[0090] 따라서, K^+ 농도(0.48mM)는 0.48mM Na^+ 등의 다른 이온 존재 하에서도 이 방법을 이용하여 측정할 수 있다(미도시 됨).

[0091] 결론적으로, 본 발명은 21-mer 올리고뉴클레오타이드 MS를 이용하여 표적 DNA 가닥과 포타슘 이온의 민감한 형광 검출을 위한 간단한 방법을 제공한 것으로, 꼬인 상태의 G-quadruplex 앵타머 MS는 실온에서 상보 가닥을 첨가할 경우 이중가닥 DNA를 형성할 수 있다. 심지어, 본 발명의 방법은 상보가닥 내 단일 염기 미스매치를 갖는 가닥을 구별할 수 있다. 또한, K^+ 과 이중가닥 복합체 MS/MS1를 가열 후 급냉함으로써, 표지 없이 포타슘 이온을 간단히 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0092] 도 1은 본 발명의 앵타머 및 전이금속 착물을 이용하여 상보적 또는 미스매치된 단일 염기를 갖는 올리고뉴클레오타이드 검출 및 포타슘 이온 검출방법을 도시한 것이다.

[0093] 도 2는 0.4 μ M MS(a), MS/MS1의 이중가닥 DNA(b), 및 MS 및 1.6mM K^+ 로 형성된 quadruplex(c) 하에서 전이금속 착물의 형광변화를 비교한 것이다.

[0094] 도 3은 실온에서 상보적 MS1를 함량별로 처리한 경우 MS 및 K^+ 의 G-quadruplex 형태의 형광 스펙트럼(a)과, 실온에서 상보적 MS1, 단일 염기가 미스매치된 상보가닥 MS2, MS3 및 MS4과 혼합된 G-quadruplex 구조의 용액에서 전이금속 착물의 형광변화를 비교한 것이다.

[0095] 도 4는 실온에서 MS(0.4 μ M), MS/MS1, 1.6mM K^+ 하에서 형성된 MS의 G-quadruplex, 및 MS1이 처리된 G-quadruplex 형태의 용액의 CD 스펙트럼(a) 및 UV-vis 스펙트럼(b)을 나타낸 것이다.

[0096] 도 5는 MS1를 MS(각각 0.4 μ M, ●), 및 MS의 G-quadruplex 구조(1.6mM K^+ 로 제조됨, ■)에 첨가한 후 용액의 형광 강도의 시간 대 별 변화를 나타낸 것이다.

[0097] 도 6은 MS/MS1(0.4 μ M) 이중가닥 복합체, MS의 G-quadruplex 형태(0.4 μ M), 및 MS5(0.4 μ M) 처리된 MS의 G-quadruplex 형태를 포함하는 용액의 형광 방출 스펙트럼을 나타낸 것이다.

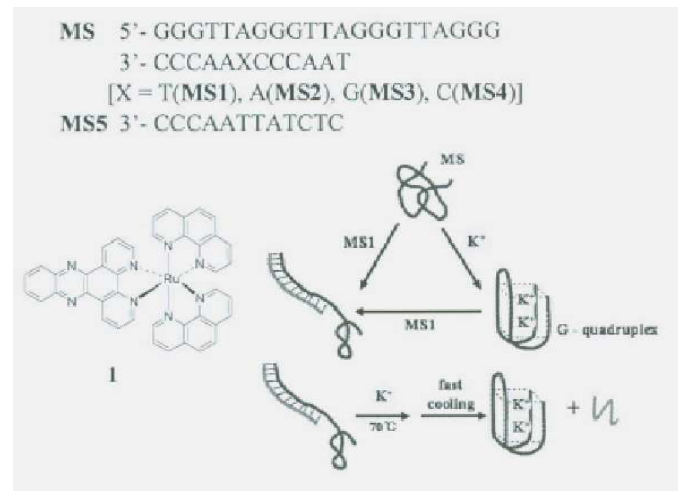
[0098] 도 7은 $\lambda_{ex}=450nm$ 에서 얻은 형광 스펙트럼으로, a)는 0.4 μ M MS/MS1 이중가닥 복합체이고, b)는 실온에서 1.6mM K^+ 과 혼합된 MS/MS1 이중가닥 복합체이고, c)는 1.6mM K^+ 존재 하에서 가열 및 급냉 후 처리된 MS/MS1 이중가닥 복합체에 대한 결과를 나타낸 것이다.

[0099] 도 8은 가열 및 급냉 처리 후 K^+ 농도 별 MS/MS1 이중가닥 복합체 용액의 형광 방출 스펙트럼을 나타낸 것이다.

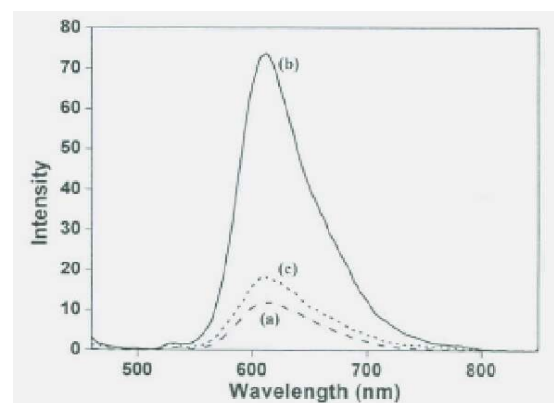
[0100] 도 9는 가열 및 급냉 처리 후 MS/MS1 이중가닥 복합체 및 다양한 금속 이온을 포함하는 용액의 형광 반응을 나타낸 것이다.

도면

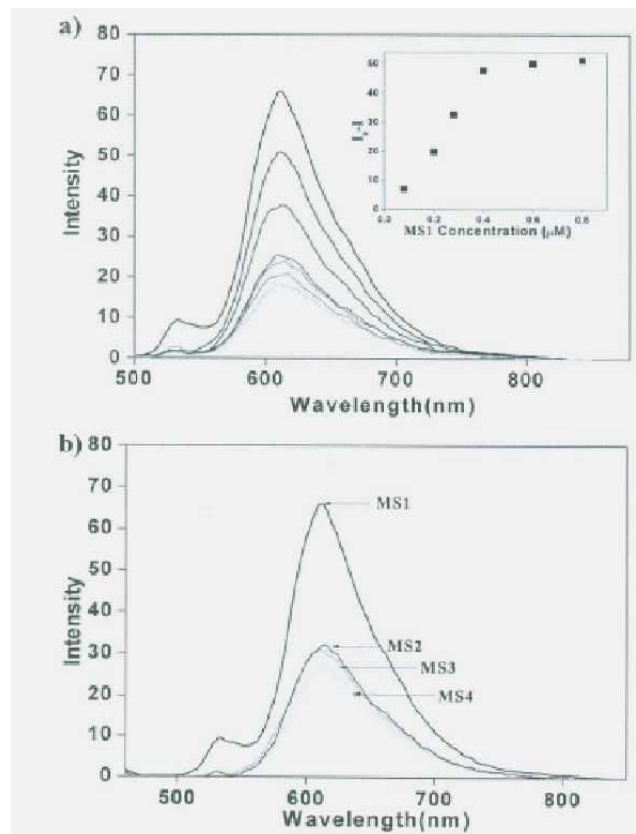
도면1



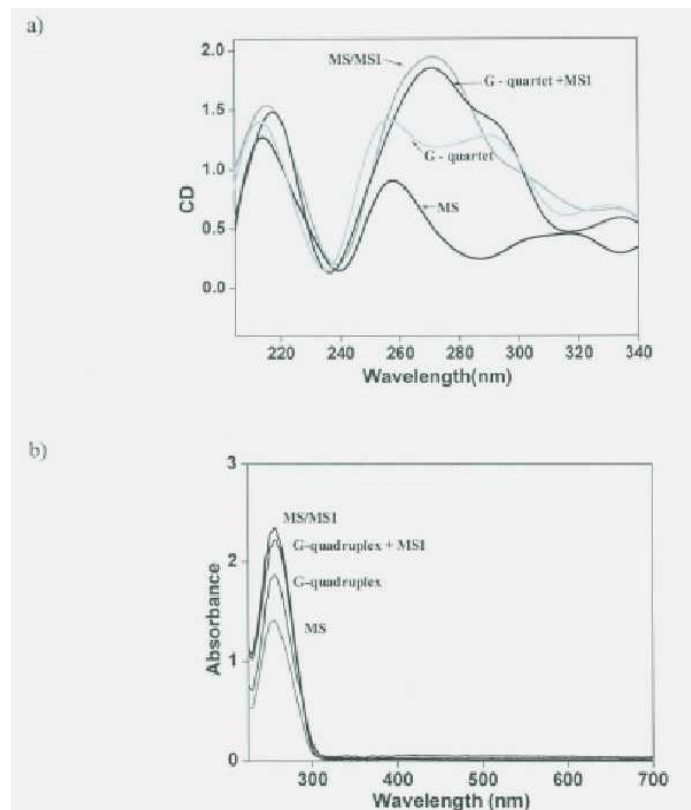
도면2



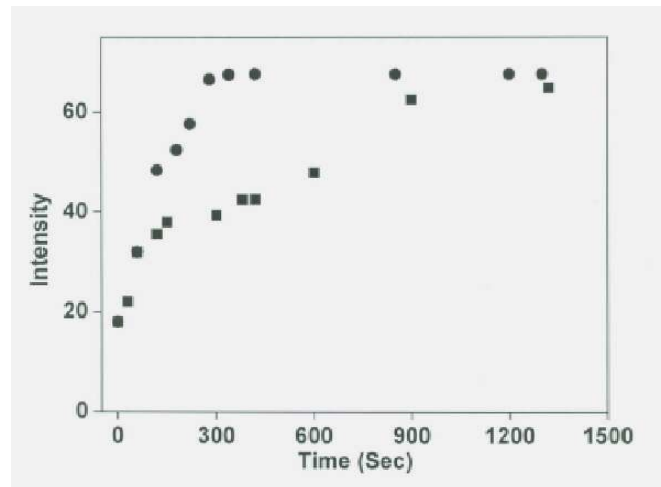
도면3



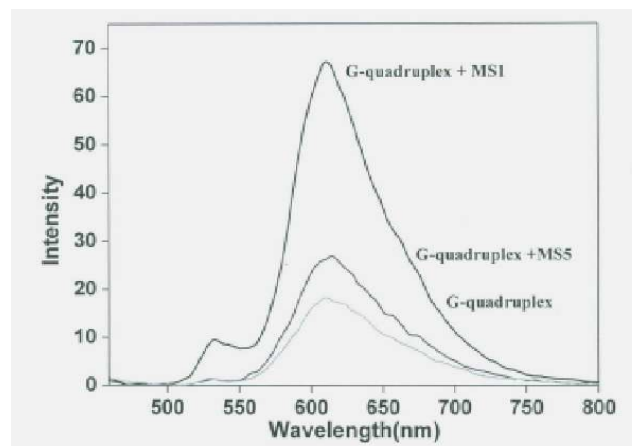
도면4



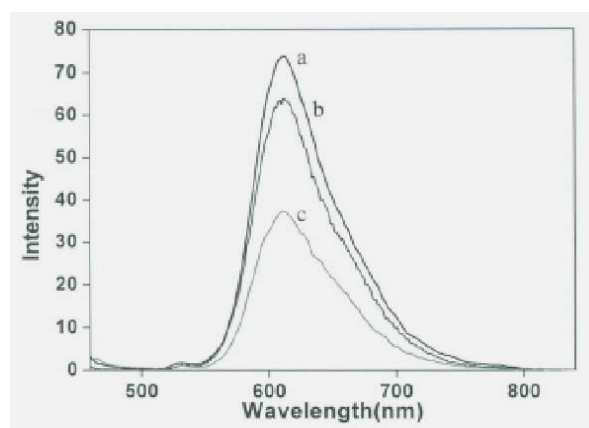
도면5



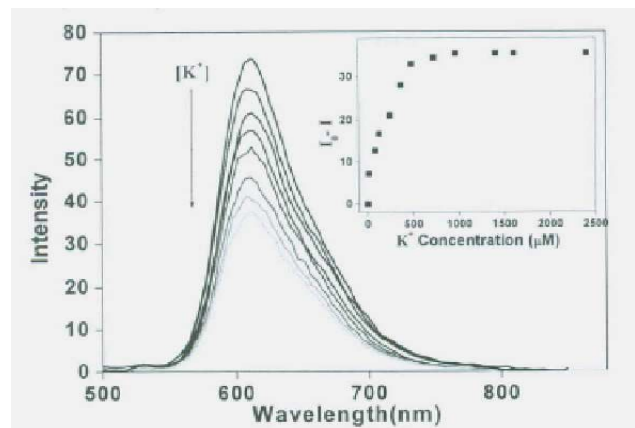
도면6



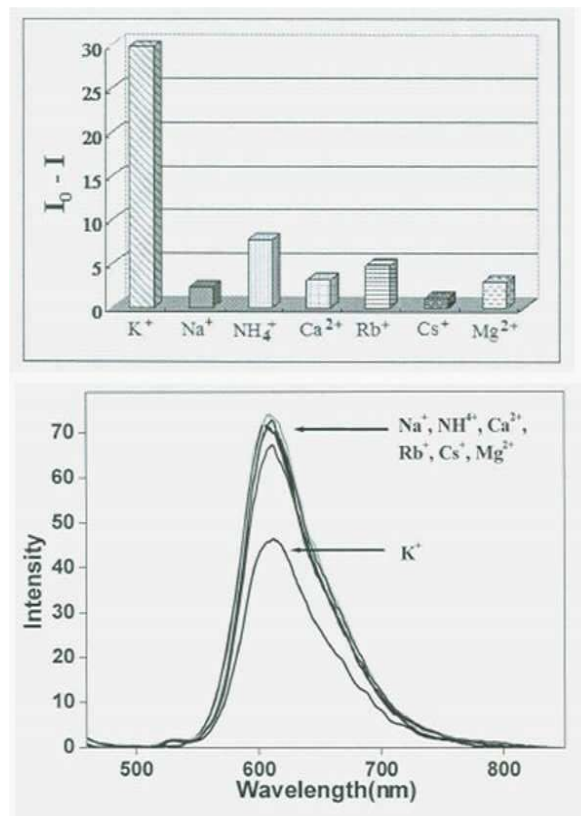
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Fluorescent sensor for detecting potassium ion and DNA sequence analysis using the same

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MS: aptamer

<400> 1

gggttagggt tagggttagg g

21

<210> 2

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MS1: complementary oligonucleotide

<400> 2

cccaatccca at

12

<210> 3

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MS2: oligonucleotide including mismatched single base

<400> 3

cccaaaccca at

12

<210> 4

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MS3: oligonucleotide including mismatched single base

<400> 4

cccaagccca at

12

<210> 5

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MS4: oligonucleotide including mismatched single base

<400> 5

cccaacccca at

12

<210> 6

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MS5: complementary oligonucleotide

<400> 6

cccaattatc tc

12