

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2012-0139962 2012년12월28일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>G01N 33/68</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0059528 (22) 출원일자 2011년06월20일 심사청구일자 2011년06월20일		(71) 출원인 서강대학교산학협력단 서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교) (72) 발명자 조규봉 경기도 고양시 일산서구 후곡로 36, 404동 703호 (일산동, 후곡마을) (74) 대리인 양부현	

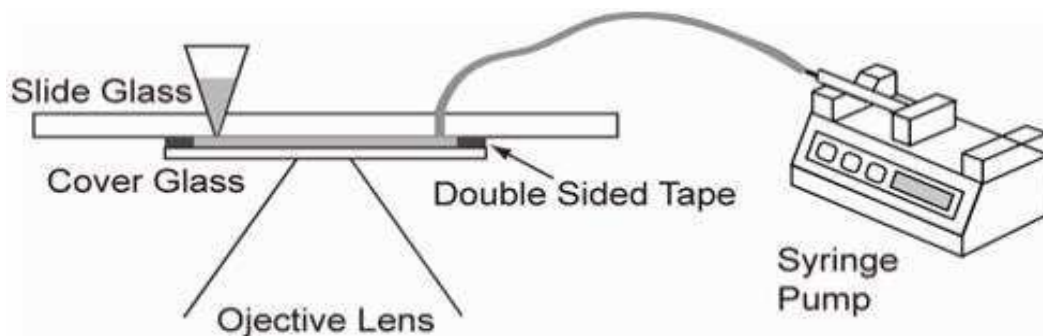
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 단일 핵산 분자 분석용 고상 지지체

(57) 요약

본 발명은 단일 핵산 분자 분석용 고상 지지체에 관한 것으로서, 아비딘, 뉴트라비딘 및 스트렙타비딘으로 구성된 군으로부터 선택되는 단백질이 표면에 코팅된 고상 지지체(solid support)를 포함하는 단일 핵산 분자 분석용 고상 지지체에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 기존의 방법과 비교하여, 화학적인 환경의 변화를 유도하지 않기 때문에 분석물의 소실을 최소화 할 수 있으며, pH를 조절하여 DNA를 가역적으로 고정화 하는 발명으로, 그 방법이 용이하다. 또한 단일 DNA 분자의 가시화는 DNA 크기의 직접적인 측정뿐 아니라 DNA 시료에 위치하는 특정 서열에 대한 정보도 제공 할 수 있고 진보된 게놈 분석 플랫폼의 개발의 가능성이 기대된다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201031039

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 단일세포의 유전체 분석방법 개발

주관기관 서강대학교 산학협력단

연구기간 2010.05.01 ~ 2011.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

아비딘, 뉴트라비딘 및 스트렙타비딘으로 구성된 군으로부터 선택되는 단백질이 표면에 코팅된 고상 지지체(solid support)를 포함하는 단일 핵산 분자 분석용 고상 지지체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단백질은 상기 고상 지지체에 바이오틴-알부민을 통하여 코팅된 것을 특징으로 하는 고상 지지체.

청구항 3

다음 단계를 포함하는 단일 핵산 분자 분석을 위한 고상 표면의 제조방법:

- (a) 아비딘, 뉴트라비딘 및 스트렙타비딘으로 구성된 군으로부터 선택되는 단백질을 고상 지지체(solid support)의 표면에 코팅하는 단계;
- (b) 상기 단백질-코팅 고상 지지체의 표면에 핵산 분자를 로딩 하는 단계;
- (c) 상기 핵산 분자를 흡착 및 스트레칭 하는 단계; 및
- (d) 상기 핵산 분자를 고정화하는 단계.

청구항 4

다음 단계를 포함하는 단일 핵산 분자를 고상 표면에 테터링(tethering) 하는 방법:

- (a) 아비딘, 뉴트라비딘 및 스트렙타비딘으로 구성된 군으로부터 선택되는 단백질을 고상 지지체(solid support)의 표면에 코팅하는 단계;
- (b) 상기 단백질-코팅 고상 지지체의 표면에 바이오틴이 결합된 올리고뉴클레오타이드를 결합시키는 단계; 및
- (c) 상기 단계 (b)의 결과물에 테터링 대상의 핵산 분자 및 리가아제를 처리하여 상기 핵산 분자를 테터링 시키는 단계.

청구항 5

제 3 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 단계 (a)는 바이오틴-알부민을 이용하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 바이오틴-알부민은 0.5-1.5 mg/ml의 농도로 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 3 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 단백질은 0.1-0.5 mg/ml의 농도로 코팅하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 3 항 또는 제 4 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 핵산 분자는 pH 7.0-8.0의 수용액에 용해되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 3 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 단백질은 DNA에 인터칼레이션 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 3 항에 있어서, 상기 단계 (c)는 pH 8.0-9.0의 완충액의 존재 하에서 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 3 항에 있어서, 상기 단계 (d)는 pH 7.0-8.0의 완충액의 존재 하에서 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 3 항에 있어서, 상기 단계 (d)는 염 용액을 이용하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 단일 핵산 분자 분석용 고상 지지체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 각각의 DNA 분자에 대한 효과적인 분석은 광범위하고 유익한 데이터를 얻기 위한 필수적인 요건이다. 1981년, 처음으로 Morikawa 및 Yanagida가 형광 색소(fluorochrome)로 DNA를 염색하고 가시화한 후로, 프리젠테이션, 생화학 및 생물 물리학 분야에서 단일 분자 연구의 많은 중요한 발전이 뒤따랐다.¹⁻⁵ 단일 DNA 분자의 가시화는 DNA 크기의 직접적인 측정뿐 아니라 DNA 시료에 위치하는 특정 서열에 대한 정보도 제공한다. 또한 단일 DNA 분자는 DNA 및 단백질의 상호 작용 연구를 위한 플랫폼으로 사용되고 있다.⁶⁻⁷

[0003] 큰 DNA 분자는 고해상도의 DNA 분석에 부적절한 랜덤 코일 형태로 존재하므로, DNA의 시각적인 분석을 위해서는 코일 형태를 풀어주고 스트레칭(stretching) 하여야 한다. 개개의 형광-염색된 DNA 분자를 분석하는데 충분한 시간이 요구하기 때문에, 표면-고정화(surface-immobilization)를 이용한 많은 DNA 스트레칭 방법이 개발되었다. 예를 들어, 양전하를 띤 표면을 이용한 방법은 DNA 분자를 평행으로 단단하게 늘린다.⁸ 상기 방법은 미생물에서 인간에 이르는 광범위한 게놈(genome)의 분석에 이용되는 매우 효과적인 전체 게놈 분석 플랫폼인 '옵티컬 맵핑(Optical mapping)'의 발달을 이끌었다.⁹⁻¹⁰

[0004] 많은 경우에 표면-고정화 방법은 성공적이지만, 표면에서 유도된 변화(perturbation)가 분자의 특성에 영향을 줄 수 있다.⁵ 이러한 표면 상호작용을 피하기 위해, 큰 DNA 분자를 고정하는데 지질 이중층을 이용하였다.¹¹⁻¹² 지질 유동성 표면(lipid floating surface)의 분자적 위치에 고정하기 위해 바이오티닐레이션(biotinylation)

및 나노패턴 고정(nanopatterned anchoring)이 추가되었다.¹³ 표면 상호 작용을 완전히 피하기 위해 나노채널 컨파인먼트(nanochannel confinement) 및 마이크로유동성(microfluidic) DNA 연장과 같은 나노-/마이크로유동성의 고정화 방법이 개발되었다.¹⁴⁻¹⁸ 그러나 나노-/마이크로유동성 장치에 의한 유동성 DNA 스트레칭은 또다른 반응에 대한 화학적 환경의 변화로 분석물이 소실될 수 있기 때문에 추가적인 생화학적 반응을 허용하지 않는다.

[0005] 발명자는 생체 적합한 환경에서 생화학적 환경을 조작하여 DNA 분자를 효과적으로 연장하고 가역적 고정할 수 있는 새로운 방법을 발명하였다. 상기 발명은 단백질 코팅된 표면에 DNA 분자를 연장하고 고정하는 방법이다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 단일 핵산 분자 분석용 고상 지지체를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 아비딘, 뉴트라비딘 또는 스트렙타비딘으로 코팅된 고상 표면을 이용하는 경우에는 단일 핵산 분자의 분석을 위한 개선된 고상 표면 환경이 제공될 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 단일 핵산 분자 분석용 고상 지지체를 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 단일 핵산 분자 분석을 위한 고상 표면의 제조방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 단일 핵산 분자를 고상 표면에 테터링 하는 방법을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 아비딘, 뉴트라비딘 및 스트렙타비딘으로 구성된 군으로부터 선택되는 단백질이 표면에 코팅된 고상 지지체(solid support)를 포함하는 단일 핵산 분자 분석용 고상 지지체를 제공한다.

[0013] 본 발명자들은 단일 핵산 분자 분석용 고상 지지체를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 아비딘, 뉴트라비딘 또는 스트렙타비딘으로 코팅된 고상 표면을 이용하는 경우에는 단일 핵산 분자의 분석을 위한 개선된 고상 표면 환경이 제공될 수 있음을 확인하였다.

[0014] 본 발명의 단일 핵산 분자 분석용 고상 지지체는 아비딘, 뉴트라비딘 및 스트렙타비딘으로 구성된 군으로부터 선택되는 단백질이 표면에 코팅된 고상 지지체를 포함한다.

[0015] 본 발명에서 이용되는 아비딘, 뉴트라비딘 및 스트렙타비딘은 바이오틴에 특이적으로 결합하는 단백질이다.

[0016] 본 발명에서 이용되는 아비딘은 테트라머 형태를 갖는 바이오틴-결합 단백질이다. 테트라머는 4 종류의 동일한 서브유닛을 갖고 있으며, 각 서브유닛은 바이오틴과 높은 친화력으로 결합할 수 있다. 아비딘의 해리 상수(dissociation constant)는 10^{-15} M로 강한 비공유결합 중 하나이다(Green, 1963). 아비딘은 66-69 kDa의 크기를 갖고, 분자량의 약 10%는 4-5개의 만노즈 및 3개의 N-아세틸글루코사민 잔기로 구성되어있다(Green, 1975).

- [0017] 본 발명에서 이용되는 스트렙타비딘은 52,800 Da의 박테리아 *Streptomyces avidinii*로부터 분리한 테트라머 단백질이다. 스트렙타비딘과 바이오틴의 결합은 자연에 존재하는 강한 비공유결합 중 하나로, 바이오틴-스트렙타비딘 복합체의 해리 상수는 약 10^{-14} M이다(Green, N.M. 1975. Avidin. Adv. Protein Chem. 29 pp 85-133). 스트렙타비딘은 스트렙타비딘-바이오틴 복합체의 유기용매, 변성제(예컨대, 구아니디늄 클로라이드), 계면활성제(예컨대, SDS 및 트리톤), 단백질 가수분해 효소 및 극한의 온도와 pH에 대한 저항력 때문에 분자생물학 및 생물나노공학 분야에서 광범위하게 이용되고 있다.
- [0018] 본 발명서에서 뉴트라비딘은 아비딘(avidin)의 탈당된 형태로 대략 60 kDa의 단백질이다. 당이 제거됨으로서, 렉틴 결합이 감소하고, 바이오틴 결합의 활성에는 당이 불필요하기 때문에 바이오틴 결합은 유지한다. 뉴트라비딘은 비특이적인 상호작용을 최소화하는 거의 중성의 pI(6.3)값을 갖는다. 아비딘처럼, 뉴트라비딘은 바이오틴에 강한 친화력($k_D=10^{-15}$ M⁻¹)을 갖는 테트라머이다. 생화학적 적용에 있어, 스트렙타비딘은 또한 바이오틴에 매우 단단히 결합하여 뉴트라비딘과 상호교환 할 수 있다. 아비딘은 고체 지지체에 고정화되어 바이오틴-표지 단백질 또는 핵산 분자를 수득하는 정제에 쓰인다.
- [0019] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 고상 표면에 코팅되는 단백질은 뉴트라비딘이다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 아비딘, 뉴트라비딘 및 스트렙타비딘은 고상 지지체에 바이오틴-알부민을 통하여 코팅한다.
- [0021] 본 명세서에서 용어 '알부민'은 대개 혈액 플라스마에 존재하며, 일반적으로 수용성 및 열 변성의 특징을 갖고 있다. 그 종류로는 혈청 알부민(예컨대, 인간 혈청 알부민 및 소 혈청 알부민), 오브알부민(ovalbumin), 락트알부민(lactalbumin), 파브알부민(parvalbumin) 및 알파-락트알부민(alpha-lactalbumin)이 있다. 보다 바람직하게는 혈청 알부민이며, 가장 바람직하게는 소 혈청 알부민이다.
- [0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 단일 핵산 분자 분석을 위한 고상 표면의 제조 방법을 제공한다:
- [0023] (a) 아비딘, 뉴트라비딘 및 스트렙타비딘으로 구성된 군으로부터 선택되는 단백질을 고상 지지체(solid support)의 표면에 코팅하는 단계;
- [0024] (b) 상기 단백질-코팅 고상 지지체의 표면에 핵산 분자를 로딩 하는 단계;
- [0025] (c) 상기 핵산 분자를 흡착 및 스트레칭 하는 단계; 및
- [0026] (d) 상기 핵산 분자를 고정화하는 단계.
- [0027] 본 발명의 단일 분자 핵산 분석의 위한 고상 표면의 제조방법을 각각의 단계로 나누어 상세하게 설명하면 다음과 같다:
- [0028] 단계 (a): 단백질을 고상 지지체(solid support)의 표면에 코팅
- [0029] 본 발명에 따르면, 아비딘, 뉴트라비딘 및 스트렙타비딘으로 구성된 군으로부터 선택되는 단백질을 준비한다.
- [0030] 바람직한 구현예에 따르면, 상기 선택되는 단백질은 뉴트라비딘이다.
- [0031] 바람직하게는, 상기 단계는 바이오틴-알부민을 이용하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [0032] 상기 바이오틴은 뉴트라비딘과 매우 강하게 결합한다. 해리상수(dissociation constant) 값은 10^{-15} 정도로 강한 단백질-리간드 결합중 하나이다.
- [0033] 바람직한 구현예에 따르면, 상기 바이오틴-알부민은 0.5-1.5 mg/ml의 농도로 이용하며 보다 바람직하게는 0.7-1.3 mg/ml, 가장 바람직하게는 0.9-1.1 mg/ml이다.
- [0034] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 단계 (a)의 단백질은 0.1-0.5 mg/ml, 보다 바람직하게는 0.1-0.4 mg/ml, 가장 바람직하게는 0.2-0.3 mg/ml이다.

- [0035] 단계 (b): 상기 단백질-코팅 고상 지지체의 표면에 핵산 분자를 로딩
- [0036] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 핵산 분자는 pH 7.0-8.0의 수용액에 녹아 있다.
- [0037] 본 명세서에서 용어 “핵산 분자”는 DNA (gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다 (Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0038] 본 발명에서, 상기 단계(b)의 단백질은 DNA에 인터칼레이션한다. 용어 ‘인터칼레이션’은 분자(또는 그룹)을 두 종류의 다른 분자(또는 그룹) 사이에 가역적으로 포함하는 것을 말한다. 예를 들어, DNA 인터칼레이션 및 혹은 인터칼레이션 합성물이 있다.
- [0039] DNA 인터칼레이션은 리간드와 같은 분자가 DNA와 상호작용 하는 것을 말한다. 리간드는 공유 결합, 정전기적 결합 또는 인터 칼레이션을 통해 DNA와 상호작용한다(Richards, A.D. & Rodgers, A. (2007). "Synthetic metallomolecules as agents for the control of DNA structure". *Chem. Soc. Rev.* 36: 471483). 인터칼레이션은 적절한 크기 및 화학적 성질의 리간드가 DNA의 염기 쌍 사이에 결합하면서 일어난다. 이러한 리간드는 대개 다환, 방향 및 평면적 성질을 갖고 있어, 핵산 염색에 쓰인다. DNA 인터칼레이터(intercalator)는 별버린, 이티디움 브러마이드, 프로플라빈, 다우노마이신, 옥소루비신 및 탈리도마이드가 있다. DNA 인터칼레이터는 빠르게 성장하는 암 세포의 DNA 복제를 억제하기 위한 화학적 치료로 사용한다. 예를 들어, 독소루비신(아드리마이신), 다우노루비신(상기 두 종류의 인터칼레이터는 호지킨림프종(Hodgkin's lymphoma)의 치료에 사용한다.) 및 닥티노마이신(윌름즈 종양(Wilm's tumour), 유잉육종(Ewing's Sarcoma) 및 횡문근육종(rhabdomyosarcoma)에 이용한다.))
- [0040] 염기쌍 사이에 인터칼레이터를 맞게 하기 위해, DNA는 풀림(unwinding)을 통해 염기쌍 사이의 공간을 열어준다. 풀림의 정도는 인터칼레이터에 의존적이다. 예를 들어, 이티디움 양이온(수용액상에서 이티디움 이온의 형태)은 약 26° 풀리지만, 프로플라빈은 약 17° 풀린다. 이러한 풀림은 염기쌍을 분리하여 약 0.34 nm(3.4 Å)의 공간을 만든다. 이러한 풀림은 DNA 가닥의 늘어짐 및 염기쌍의 트위스트와 같은 DNA 가닥의 부분적인 구조 변화를 야기한다. 또한 이러한 구조적인 변화는 종종 전사, DNA 복제 및 DNA 복구의 과정을 억을 억제하는 기능적인 변화를 이끌기 때문에 인터칼레이터는 강력한 돌연변이 유발 요인이다.
- [0041] 단계 (c): 핵산 분자의 흡착 및 스트레칭
- [0042] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단계(c)의 DNA를 흡착 및 스트레칭하기 위해 pH 8.0-9.0의 버퍼를 흘려준다.
- [0043] 단계 (d): 핵산 분자의 고정화
- [0044] 본 발명에 있어, 상기 단계(d)의 DNA를 고정화하기 위해 pH 7.0-8.0의 버퍼를 흘려준다.
- [0045] 바람직한 구현예에 따르면, 상기 pH 7.0-8.0의 버퍼는 염 용액(예컨대, 1 mM MgCl₂, 1 mM NaCl 또는 1 mM CaCl₂)으로 대체 될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 단일 핵산 분자를 고상 표면에 테터링(tethering) 하는 방법을 제공한다:
- [0047] (a) 아비딘, 뉴트라비딘 및 스트렙타비딘으로 구성된 군으로부터 선택되는 단백질을 고상 지지체(solid support)의 표면에 코팅하는 단계;
- [0048] (b) 상기 단백질-코팅 고상 지지체의 표면에 바이오틴이 결합된 올리고뉴클레오타이드를 결합시키는 단계; 및
- [0049] (c) 상기 단계 (b)의 결과물에 테터링 대상의 핵산 분자 및 리가아제를 처리하여 상기 핵산 분자를 테터링 시키는 단계.

- [0050] 단계 (a): 단백질을 고상 지지체(solid support)의 표면에 코팅
- [0051] 상술한 단일 핵산 분자 분석을 위한 고상 표면의 제조방법에서의 내용을 참조하여 설명되기 때문에, 그 기재를 생략한다.
- [0052] 단계 (b): 바이오틴이 결합된 올리고뉴클레오타이드의 결합
- [0053] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 바이오틴이 결합된 뉴클레오타이드, 5' -pGGGCGGGACCT-TEG(triethylene glycol)-바이오틴을 고상 지지체에 로딩한다.
- [0054] 단계 (c): 핵산 분자의 테터링
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 단계(b)의 올리고뉴클레오타이드와 상기 단계(c)의 핵산 분자가 공유적으로 결합한다.
- [0056] 본 발명의 핵산 분자의 테터링은 상기 단계(b)의 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥 DNA와 테터링 목적하는 핵산 분자가 융합하여 이중 가닥을 이루는 것을 말한다.

발명의 효과

- [0057] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0058] (a) 단일 DNA 분자의 가시화는 DNA 크기의 직접적인 측정뿐 아니라 DNA 시료에 위치하는 특정 서열에 대한 정보도 제공 할 수 있다.
- [0059] (b) 화학적인 환경의 변화를 유도하지 않기 때문에 분석물의 소실을 최소화 할 수 있다.
- [0060] (c) 생화학적 환경의 pH를 조절하여 DNA를 가역적으로 고정화 하는 발명으로, 그 방법이 용이하다.
- [0061] (d) 본 발명은 진보된 게놈 분석 플랫폼의 개발의 가능성을 제안 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0062] 도 1은 형광현미경에 얹는 슬라이드의 셋-업을 보여준다. 송유의 부피는 5.1 μ l이며 시린지 펌프의 유속은 0.150 ml/분이다.
- 도 2는 뉴트라비딘 코팅 표면에 연장된 DNA의 가역적인 고정화를 보여주며, DNA 형태의 도식도를 나타낸다. 도 1a는 pH 7.5에서의 λ DNA(48.5 kb)이며, 도 1b는 pH 8.5에서의 부분적인 흡착을 보여주며, 도 1c는 pH 7.5에서 λ DNA의 고정화를 보여주며, 도 1d는 1 mM $MgCl_2$ 에서 λ DNA의 고정화를 보여주며, 도 1e는 pH7.5에서의 T4 DNA(166 kb)를 보여주며, 도 1g는 1 mM $MgCl_2$ 에서의 T4 DNA의 고정화를 보여주며, 스케일바는 20 μ m를 나타낸다.
- 도 3은 뉴트라비딘 코팅 표면의 T4 DNA의 옵티칼 맵을 보여준다. 도 3a는 BbvC I 제한효소로 자른 T4 DNA를 보여주며 스케일바는 20 μ m를 나타낸다. (1)은 λ 연쇄동일순서 래더이며, (2)는 T4 DNA(166 kb)이고, (3)은 BbvC I 처리한 T4 DNA로 68.2, 47.7, 39.8 및 10.0 kb 크기의 절편을 보여주며, 도 3b는 T4 DNA의 인 실리코 맵 열라인을 보여준다.
- 도 4는 바이오틴-테터링 λ DNA 모노머 및 연쇄동일순서의 동적 연장을 보여준다(스케일바=20 μ m). 도 4b는 λ 연쇄동일순서의 길이를 측정한 그래프이다. 측정된 분자의 수는 471 이고, 두 테트라머 및 하나의 펜타머를 사용하였다. 모노머당 22 μ m의 선상의 리그레션이 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0063] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는

것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0064] 실시예

[0065] 재료 및 방법

[0066] 본 실험에 이용된 실험 재료 및 장비는 다음과 같다:

[0067] 모든 효소 및 λ DNA(48.5 kb)(New england biolabs, 미국), T4 GT7 DNA(165,644 bp, 니폰 진(Nippon gene), 일본), 에폭시 수지(epoxy, Devcon, 미국), 바이오틴-표지 소 혈청 알부민(Biotin-labeled bovine serum albumin, Sigma, 미국), 뉴트라비딘(neutravidin, pierce, 미국), 바이오틴 표지 올리고뉴클레오타이드(5' - pGGGCGGCGACCT-TEG(triethylene glycol)-바이오틴, 바이오니아, 대한민국)

[0068] 송유(flow cell)

[0069] 송유는 슬라이드 글래스와 커버슬립(cover slip) 사이에 양면 테이프를 이용해 100 μ m 간격으로 준비하였다. 현미경 슬라이드 글래스에, 다이아몬드-코팅 비트(diamond-coated bit)를 사용하여 주입구 및 유출구를 뚫었다. 글래스는 피란하(piranha) 용액(강산화제 혼합물, 예컨대 황산 및 과산화수소수를 4:1 내지 2:1로 혼합한 용액)으로 30분 동안 세척하였으며, 사용하기 전에 물 및 에탄올로 세척하고, 메탄올에 담궈 보관하였다. 노란 피켓 팁을 주입구 포트(port)에 설치하고 튜빙 라인을 에폭시 수지를 접착하여 연결하였다. 다음, 커버슬립을 3M 양면 테이프로 슬라이드 글래스에 붙였다. 상기 송유의 치수는 3×17×0.1 mm(L×W×H)이며, 총 부피는 5.1 μ l이다. 송유로의 버퍼 전송을 조절하기 위해 시린지 펌프 NE-1000(new era pump system Inc., 미국)을 사용하였다. 유속은 0.150 ml/분으로 8.3 mm/초에 상응한다(도 1).

[0070] 표면 코팅 준비

[0071] 송유의 표면을 처음에 바이오틴-BSA로 코팅한 다음 뉴트라비딘으로 코팅한다. 코팅을 위해, 바이오틴-BSA 용액(10 mg/ml, 10 mM 트리스(Tris), 50 mM NaCl, pH 8.0)을 10 mM 트리스 버퍼로 10배 희석하고 로딩하였다. BSA 흡착 5분 후에, 뉴트라비딘 용액(0.25 mg/ml, 10 mM 트리스, 50 mM NaCl, pH 8.0)을 BSA 코팅된 송유로 로딩하고 상온에서 5분간 대기한다.

[0072] DNA 로딩 및 스트레칭

[0073] λ 연쇄동일순서(concatemer)를 탈융합(dehybridization)하기 위해, DNA 용액을 65℃로 10분 동안 가열하고 재빨리 얼음수조에서 놓았다. YOYO-1 염색 DNA 용액(저장액의 1/50)을 pH 7.5 트리스 버퍼에 희석하여 시린지 펌프를 이용하여 로딩하였다. 랜덤 코일 DNA가 표면에 흡착한 후에, 5분 동안 pH 8.5 트리스 버퍼를 흘려, DNA 분자를 부분적인 흡착 및 스트레칭 하였다. 그런 다음, pH 7.5 트리스-HCl 버퍼를 흘려 주어 스트레칭된 DNA 분자를 고정화하였다. DNA의 고정화를 위해 1 mM MgCl₂로 대체할 수 있다.

[0074] 제한 지도 작성(Restriction Mapping)

[0075] 고정화된 T4 DNA 분자에, BbvC1(4 unit/30ml in 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM 디티오프레itol(dithiothreitol), pH 7.5)을 송유로 로딩하였다. 상온에서 20분 동안 제한효소 반응 후, DNA의 가시화를 위해 0.2 μ M YOYO-1(10 mM Tris, pH 7.5)를 송유로 로딩하였다.

[0076] 테터링된 DNA 라이제이션(Tethered DNA Ligation)

[0077] 바이오틴-BSA 및 뉴트라비딘의 연속 코팅 후에, 바이오틴이 연결된 올리고뉴클레오타이드(5' -pGGGCGGCGACCT-

TEG-바이오틴, 1 μ M)을 로딩하였다. 앵커링(anchoring) 반응 5분 후에, T4 DNA 라이가제(ligase, 200 units) 및 50 μ l λ -DNA 용액을 로딩하였다. 라이게이션 반응 30분 후에, 트리스-HCl 버퍼(10 mM 트리스, pH 8.3)에 든 0.2 μ M YOYO-1을 DNA 가시화를 위해 송유로 로딩하였다.

[0078] 결과

[0079] 뉴트라비딘 표면에 DNA 분자의 고정화

[0080] 발명자는 생체 적합한 환경에서 생화학적 환경을 조작하여 DNA 분자를 효과적으로 연장하고 가역적 고정할 수 있는 새로운 방법을 발명하였다. 상기 발명은 단백질 코팅된 표면에 DNA 분자를 연장하고 고정하는 방법이다. 단백질 코팅은 바이오틴 표지된 소 혈청 알부민(biotin-labeled bovine serum albumin)이 흡착된 글래스 표면을 뉴트라비딘(neutravidin)으로 구성된다. 발명자의 실험 과정은 도 2에서 보여지는 3단계로 구성된다. 첫째, 로딩된 λ DNA(48.5 kb)는 pH 7.5에서 랜덤 코일 형태로 부착한다(도 2a). 그 다음, pH 8.5 완충액을 흘려주어 DNA 분자를 부분적으로 흡착하고 연장한다(도 2b). 일부 DNA는 흐름에 의해 손실되지만, 대부분의 DNA는 pH 8.5에서 스트레칭되어 부분적으로 흡착한다. 그리고 연장된 DNA 분자를 단순히 pH 7.5로 환원하여 표면에 고정화한다(도 2c). 따라서, 단순한 pH의 조절이 뉴트라비딘 표면에 DNA 분자의 고정화하는데 핵심이다. 또한 발명자는 뉴트라비딘 표면의 DNA 분자를 1 mM MgCl₂, 1 mM NaCl 또는 1 mM CaCl₂을 포함하는 수용액 같은 염용액에 의해 고정할 수 있음을 확인하였다. 일례로서, 도 2d는 DNA 분자를 pH 8.5에서 부분적 탈착한 후, 1 mM MgCl₂로 고정화한 결과를 보여준다. 도 2c 및 2d에서 예시되는 것처럼, DNA의 흡착은 가역적이기 때문에 1 mM NaOH로 모든 DNA 분자를 제거 할 수 있다. 발명자는 T4 DNA(166 kb)로 상기 실험을 반복하였다. 큰 T4 DNA 분자는 랜덤 코일 형태로 표면에 흡착하고 DNA 분자는 표면에 고정되어 완전히 연장된다(도 2f).

[0081] DNA 및 뉴트라비딘의 상호작용 분석

[0082] DNA 분자가 뉴트라비딘 코팅 표면에 흡착되는 이유를 알기 위해 발명자는 아비딘(avidin) 및 관련된 단백질의 3D 구조를 단백질 데이터 뱅크(Protein data bank, www.pdb.org)로 분석하였다. 특징적으로, 아비딘은 구조는 라이신(lysine) 및 아스파르트산염(aspartate) 잔기(DIGDDWK)와 함께 돌출된 트립토판(tryptophan) 구조를 갖는다.¹⁹ 트립토판은 H 및 동료에 의해 집중 연구되어 그 구조 사이에 DNA를 삽입 할 수 있는 것으로 알려져 있다.²⁰⁻²¹ 본 발명자의 pH 8.5에서 DNA의 부분적인 탈착 결과와 동일하게 H의 연구진은 Try-Lys으로 구성된 올리고펩타이드에 강력하게 DNA 바인딩하며 pH 8 내지 pH 9에서 친화력(affinity)이 감소한다는 결과를 보고했다(도 2b).²⁰ H의 연구진은 pH 증가로 라이신의 -NH₃⁺이 중성화에 되어 친화력이 감소한다고 설명한다. 또한 염 용액(salty solution)의 영향은 최근 금속 결합 아스파르트산염의 역할을 나타내는 결정학적인(crystallographic) 분석을 통해 설명할 수 있다.²² 발명자의 결과와 유사하게, H의 연구진은 Na⁺ 및 Ca⁺가 DNA-단백질의 인터칼레이션(intercalation) 복합체에 대한 Mg²⁺의 생물학적 공동인자(cofactor)를 대신할 수 있다고 설명한다. 따라서 발명자는 DNA의 뉴트라비딘 결합 기작은 돌출된 인돌 모이에티(moiety)의 인터칼레이션에 의한 것이라고 보며, pH 영향 및 염 용액은 라이신 및 메탈 결합된 아스파르트산염이 트립토판 인터칼레이션 되는 것을 조절한다고 보고한다.

[0083] 제한 지도 작성

[0084] 생체에 적합한 환경에서 단백질 표면에 연장된 DNA 분자를 인터칼레이션 하게하는 것이 본 발명이 갖는 가장 중요한 특징이다. 생화학적 반응을 위해, 마이크로유동성 흐름을 조절하여 부드럽게 이전 시약을 제거하고 새로운 화학물질을 공급 할 수 있다. 예컨대, 뉴트라비딘 코팅 표면에서 제한효소 반응을 하여 생체적합성을 입증 하였다. T4 DNA에 제한효소 BbvC1을 처리하여 제한 시각적 맵(restriction optical map)을 제작하였다.¹⁰ 상기 반응은 DNA 프래그먼트의 흡착을 유지하기 위해 pH 7.5 반응 완충액을 사용하였다. 도 2a는 뉴트라비딘 표면에 결합된 DNA 분자의 작은 프래그먼트도 충분히 단단하게 결합된다는 것을 확인한 뉴트라비딘 표면에서 T4 DNA의 대표적인 제한 맵을 보여준다. 또한, T4 DNA의 제한 맵은 인 실리코 맵과 얼라인 하였을 때, 순환적으

로 변경된 게놈을 확인하였다(도 3b).²³

[0085] 뉴트라비딘 표면의 테더링 분석

[0086] 뉴트라비딘 표면은 생체적합능과 더불어 바이오틴-표지 분자를 테더링(tethering)하는 능력을 갖는 것으로 알려져 있다. 뉴트라비딘은 머쉬룸 형태(mushroom conformation)의 제작하고 DNA 분자가 완전히 스트레칭 되기 위해 DNA 분자의 바이오틴-표지 말단을 선별적으로 붙잡을 수 있다(도 4). 상기 실험에서 뉴트라비딘 표면에 바이오틴-표지 DNA 올리고머(oligomer)를 λDNA 분자의 화합 말단(cohesive end)에 융합하고 T4 DNA 라이가제(ligase)가 추가된 λDNA와 DNA 올리고머를 공유적으로 연결한다. 결과적으로, λDNA분자는 표면에 연결되고 추가적인 λDNA 분자와 라이게이션 한다. 도 3a는 압력구동(pressure driven flow) 스트레칭 λ 연쇄동일순서(concatemers)가 전체 윤곽 길이에 달하며 이는 이전 도면에 보여지는 고정화된 DNA 보다 길다는 것을 보여준다. 동력학적으로 연장된 λ 연쇄동일순서는 λDNA의 전체 윤곽 길이에 해당하는 단량체 당 22 μm의 평균 스트레치를 보인다(도 4b). 또한 상기 DNA 분자를 뉴트라비딘 표면에 1 mM MgCl₂ 수용액으로 고정화 할 수 있으며 이는 분자적 이미지를 기반으로 하는 추가적인 생화학 반응 및 분석에 유익할 것이다. 상기 분자가 쉽게 머쉬룸 형태로 되돌아가는 것을 관찰하였다.

[0087] 결론

[0088] 발명자는 뉴트라비딘 표면에 단순히 화학적인 환경을 조절하여 DNA 분자를 연장 및 가역적으로 고정하는 새로운 방법을 제공한다. 종래의 방법과 비교하여 뉴트라비딘 표면의 이용은 고유의 이점을 제공한다. 첫째, 단백질 코팅 표면은 효소 반응에 알맞은 생체 적합한 환경을 제공한다. 둘째, DNA를 뉴트라비딘 표면에 가역적으로 고정화하여 더 복잡적 및 통합적인 게놈 분석 시스템에 유익하다. 최종적으로 뉴트라비딘 표면은 바이오틴 표지를 사용하여 DNA를 테더링 할 수 있으며, 이는 진보된 게놈 분석 플랫폼의 개발의 가능성을 제안 할 수 있다.

[0089] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0090] 참조 문헌

- [0091] 1. K.Morikawa and M. Yanagida, *J. Biochem.*, 1981, 89, 693-696.
- [0092] 2. D.C.Schwartz, X.Li, L.I.Hernandez, S.P.Ramnarain, E.J.Huff and Y.K.Wang, *Science*, 1993, 262, 110-114.
- [0093] 3. S.Zhou, J.Herschleb and D.C.Schwartz, in *New Methods for DNA Sequencing*, ed. K. R. Mitchelson, *Elsevier Scientific Publishers*, 2007.
- [0094] 4. T.T.Perkins, S.R.Quake, D.E.Smith and S.Chu, *Science*, 1994, 264, 822-826.
- [0095] 5. A.A.Deniz, S.Mukhopadhyay and E.A.Lemke, *J.R.Soc.Interface*, 2008, 5, 15-45.
- [0096] 6. Z.Gueroui, C.Place, E.Freyssingeas and B.Berge, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 2002, 99, 6005-6010.
- [0097] 7. H.Yu and D.C. Schwartz, *Anal.Biochem.*, 2008, 380, 111-121.
- [0098] 8. X.Meng, K.Benson, K.Chada, E.J.Huff and D.C.Schwartz, *Nat.Genet.*, 1995, 9, 432-438.
- [0099] 9. J.Lin, R.Qi, C.Aston, J.Jing, T.S.Anantharaman, B.Mishra, O.White, M.J.Daly, K.W.Minton, J.C.Venter and D.C.Schwartz, *Science*, 1999, 285, 1558-1562.
- [0100] 10. B.Teague, M.S.Waterman, S.Goldstein, K.Potamouisis, S.G.Zhou, S.Reslewic, D.Sarkar, A.Valouev, C.Churas, J.M.Kidd, S.Kohn, R.Runnheim, C.Lamers, D.Forrest, M.A.Newton, E.E.Eichler, M.Kent-First,

U.Surti, M.Livny and D.C.Schwartz, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 2010, 107, 10848-10853.

[0101] 11. B.Maier and J.O.Radler, *Phys.Rev.Lett.*, 1999, 82, 1911-1914.

[0102] 12. A.Graneli, C.C.Yeykal, T.K.Prasad and E.C.Greene, *Langmuir*, 2006, 22, 292-299.

[0103] 13. J.Gorman, T.Fazio, F.Wang, S.Wind and E.C.Greene, *Langmuir*, 2010, 26, 1372-1379.

[0104] 14. H.Cao, Z.N.Yu, J.Wang, J.O.Tegenfeldt, R.H.Austin, E.Chen, W.Wu and S.Y.Chou, *Appl.Phys.Lett.*, 2002, 81, 174-176.

[0105] 15. J.O.Tegenfeldt, C.Prinz, H.Cao, S.Chou, W.W.Reisner, R.Riehn, Y.M.Wang, E.C.Cox, J.C.Sturm, P.Silberzan and R.H.Austin, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 2004, 101, 10979-10983.

[0106] 16. K.Jo, D.M.Dhingra, T.Odijk, J.J.de Pablo, M.D.Graham, R.Runnheim, D.Forrest and D.C.Schwartz, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 2007, 104, 2673-2678.

[0107] 17. T.T.Perkins, D.E.Smith and S.Chu, *Science*, 1997, 276, 2016-2021.

[0108] 18. K.Jo, Y.L.Chen, J.J. de Pablo and D.C.Schwartz, *Lab Chip*, 2009, 9, 2348-2355.

[0109] 19. O.Livnah, E.A.Bayer, M.Wilchek and J.L.Sussman, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 1993, 90, 5076-5080.

[0110] 20. J.L.Dimicoli and C.Helene, *Biochemistry*, 1974, 13, 714-723.

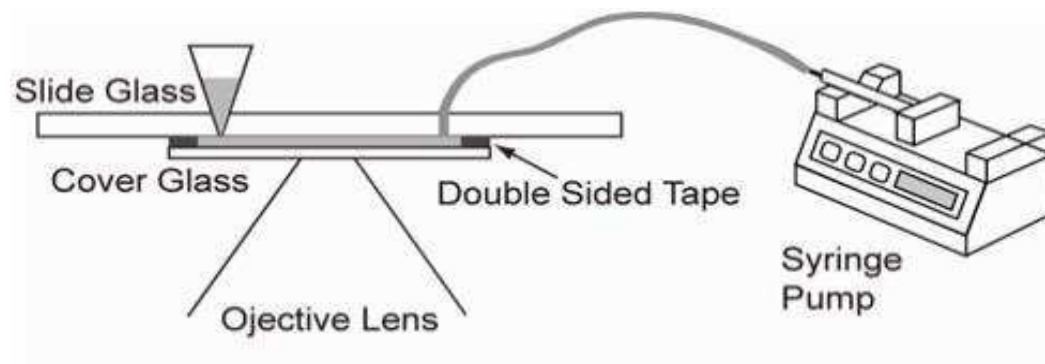
[0111] 21. M.R.Rajeswari, T.Montenay-Garestier and C.Helene, *Biochemistry*, 1987, 26, 6825-6831.

[0112] 22. M.Firczuk, M.Wojciechowski, H.Czapinska and M.Bochtler, *Nucleic Acids Res.*, 2010.

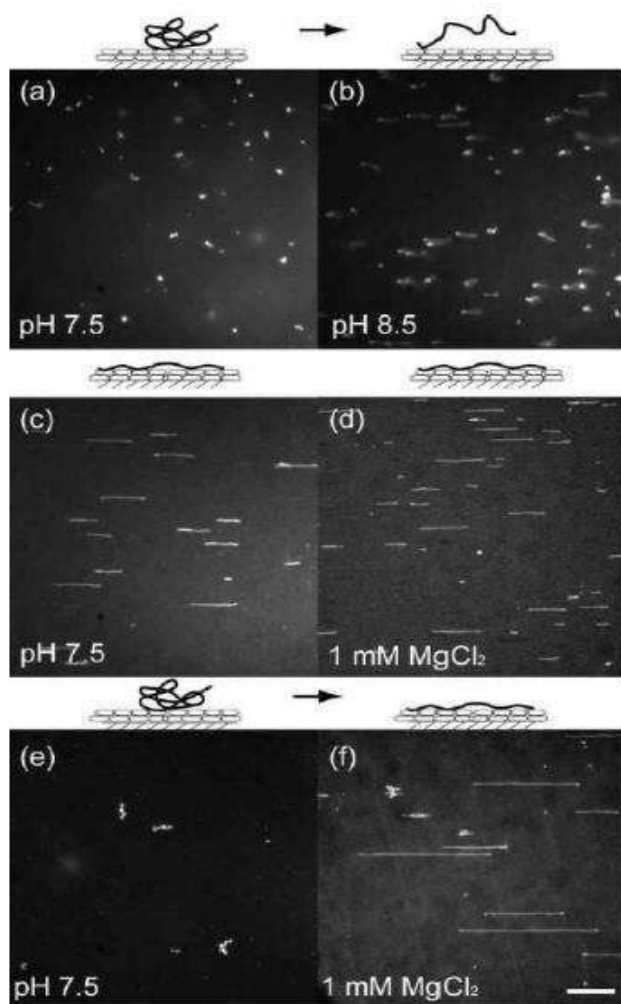
[0113] 23. R.Calendar, *The Bactriophages*, 2nd edn., OXFORD University Press, New York, 2006.

도면

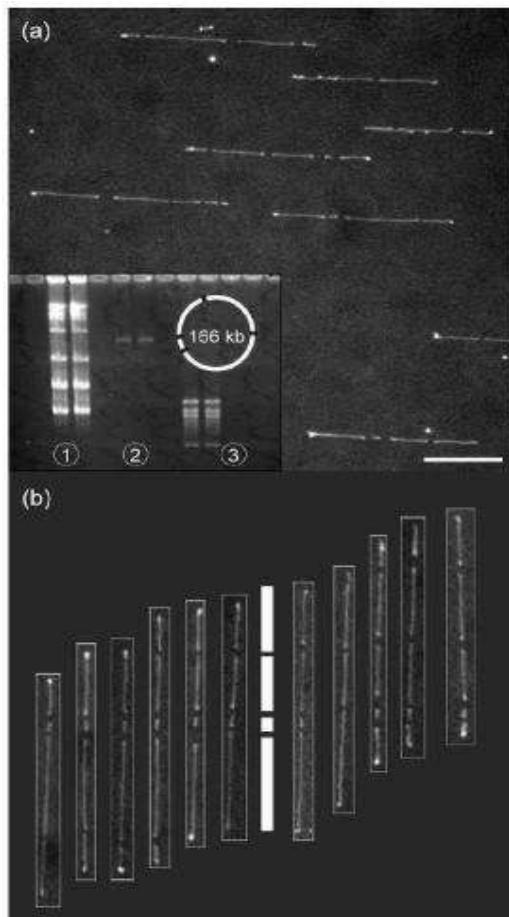
도면1



도면2



도면3



도면4

