



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2014-0102968

(43) 공개일자

2014년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/115 (2010.01)

G01N 33/574 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2013-0016545

(22) 출원일자

2013년02월15일

심사청구일자

2013년02월15일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

하상수

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

신선미

경기 안양시 동안구 학의로 20, 121동 1002호 (비산동, 관악현대아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

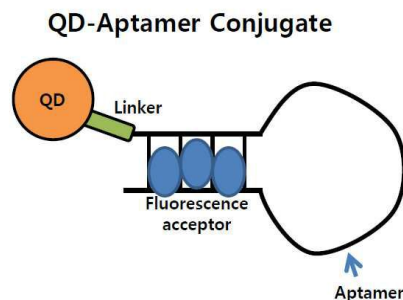
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 양자점-애타머 결합체 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 표적 분자에 특이적인 애타머(aptamer)의 말단 및 양자점(Quantum dot, QD)의 수식기가 링커로 연결된, QD-애타머 결합체로서, 상기 애타머는 형광 수여체(fluorescence acceptor)가 애타머의 이중나선(duplex) 부위에 로딩된 것이고, 상기 양자점은 형광 공여체(fluorescence donor)인 것인 결합체; 상기 결합체를 포함하는 표적 분자 검출용 조성물; 상기 조성물을 포함하는 표적 분자 검출용 키트; 상기 결합체를 이용하여 표적 분자를 검출하는 방법; 상기 결합체를 포함하는 암 진단용 조성물; 상기 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 키트; 및 상기 결합체를 이용한 암의 진단을 위한 정보의 제공 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

남혜연

제주 제주시 광평동로 66, 109동 605호 (노형동,
노형중흥에스-클래스)

이은정

서울 동대문구 장안벚꽃로 107, 112동 1602호 (장
안동, 장안현대홈타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0021956

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 앵타머를 이용한 관심 금속이온의 선택적 추출

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2011.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-001680

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 나노물질을 이용한 고감도의 DNA 메틸화 정량분석방법 개발

기 여 율 1/2

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 표적 분자에 특이적인 앵타머(aptamer)의 말단 및 양자점(Quantum dot, QD)의 수식기가 링커로 연결된, QD-앵타머 결합체를 분리된 시료와 접촉시키는 단계로서, 상기 앵타머는 형광 수여체(fluorescence acceptor)가 앵타머의 이중나선(duplex) 부위에 로딩된 것이고, 상기 양자점은 형광 공여체(fluorescence donor)인 것인 단계;
- (b) 시료 내에 표적 분자가 존재하면 QD-앵타머 결합체의 이중나선 부위가 단일 가닥 구조로 형태가 변형되어 이중나선 부위에 로딩된 형광 수여체가 방출되거나, 시료 내에 표적 분자가 존재하지 않으면 QD-앵타머 결합체의 이중나선 부위의 구조가 변형되지 않아 형광 수여체가 방출되지 않는 단계;
- (c) 형광 공여체 및 형광 수여체 간의 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 신호를 측정하는 단계; 및
- (d) 상기 (c) 단계에서 측정한 FRET 신호가 표적 분자가 존재하지 않는 대조군에 비하여 감소하였으면 표적 분자가 존재하는 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 표적 분자의 검출 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 링커는 설폰-SMCC(sulfo-SMCC), SPDP(N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate), LC-SPDP(long chain-SDPD), sulfo-LC-SPDP, SMPT(succinimidoxycarbonyl- α -methyl- α -(2-pyridyldithio)toluene), sulfo-LC-SMPT, SMCC, MBS(m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester), sulfo-MBS, SIAB(N-succinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate), sulfo-SIAB, SMPB(succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrate), sulfo-SMPB, GMBS(N-(γ -maleimidobutyryloxy)succinimide ester), sulfo-GMBS, SIAX(succinimidyl-6-((iodoacetyl)amino)hexanoate), SIAXX(succinimidyl 6-[6-(((iodoacetyl)amino)-hexanoyl)amino]hexanoate), SIAC(succinimidyl-4-(((iodoacetyl)amino)methyl)cyclohexane-1-carboxylate), SIACX(succinimidyl-6-(((iodoacetyl)amino)methyl)cyclohexane-1-carbonyl)amino)hexanoate) 및 NPIA(p-nitrophenyl iodoacetate)로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 표적 분자는 단백질, 소분자(small molecule), 핵산 및 세포로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 표적 분자는 Muc1(Mucin1) 단백질인 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 형광 수여체는 YOYO-1, YOYO-3, BOBO-3, SYBR 그린 1(SYBR Green 1), 헥스트 염료(Hoechst dye) 33258, 피코그린(PicoGreen) 및 POPO-3로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 앵타머는 서열번호 1로 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함하는, Muc1 결합 앵타머인 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 방법은 표적 분자의 정량 분석에 사용되는 것인 방법.

청구항 8

표적 분자에 특이적인 앵타머(aptamer)의 말단 및 양자점(Quantum dot, QD)의 수식기가 링커로 연결된, QD-앵타머 결합체로서, 상기 앵타머는 형광 수여체(fluorescence acceptor)가 앵타머의 이중나선(duplex) 부위에 로딩된 것이고, 상기 양자점은 형광 공여체(fluorescence donor)인 것인 결합체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 QD-앵타머 결합체는 표적 분자가 결합하면 앵타머의 이중나선 부위가 단일가닥 형태로 구조적 변형되어, 이중나선 부위에 로딩된 형광 수여체를 방출하는 것인 결합체.

청구항 10

제8항 또는 제9항의 결합체를 포함하는, 표적 분자 검출용 조성물.

청구항 11

제10항의 조성물을 포함하는 표적 분자 검출용 키트.

청구항 12

Muc 1(Mucin 1) 단백질에 특이적인 앵타머(aptamer)의 말단 및 양자점(Quantum dot, QD)의 수식기가 링커로 연결된, QD-앵타머 결합체로서, 상기 앵타머는 형광 수여체(fluorescence acceptor)가 앵타머의 이중나선(duplex) 부위에 로딩된 것이고, 상기 양자점은 형광 공여체(fluorescence donor)인 것인 결합체.

청구항 13

제12항의 결합체를 포함하는, 암 진단용 조성물.

청구항 14

제13항의 조성물을 포함하는 암 진단용 키트.

청구항 15

(a) 암 의심 개체의 분리된 생물학적 시료에 제12항의 결합체를 접촉시키는 단계; 및

(b) 형광 공여체 및 형광 수여체 간의 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 신호를 측정하는 단계를 포함하는, 암의 진단을 위한 정보의 제공 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 표적 분자에 특이적인 앵타머(aptamer)의 말단 및 양자점(Quantum dot, QD)의 수식기가 링커로 연결된, QD-앵타머 결합체로서, 상기 앵타머는 형광 수여체(fluorescence acceptor)가 앵타머의 이중나선(duplex) 부위에 로딩된 것이고, 상기 양자점은 형광 공여체(fluorescence donor)인 것인 결합체; 상기 결합체를 포함하는 표적 분자 검출용 조성물; 상기 조성물을 포함하는 표적 분자 검출용 키트; 상기 결합체를 이용하여 표적 분자를 검출하는 방법; 상기 결합체를 포함하는 암 진단용 조성물; 상기 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 키트; 및 상기 결합체를 이용한 암의 진단을 위한 정보의 제공 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 앵타머(Aptamer)는 높은 결합력으로 표적 분자에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산의 특별한 부류이다. 앵타머는 SELEX(Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment)라 불리는 *in vitro* 진화 과정(evolution process)을 통하여, 거대한 무작위-서열 핵산 라이브러리로부터 유래할 수 있다. 현재까지, 나노물 내지 피코물 범위의 해리 상수 값에서, 표적 분자와 결합하는, 광범위한 DNA- 및 RNA-기반 앵타머가 규명되었다. 상기 앵타머는 이의 수많은 독특한 양상으로 인하여 종래의 대표적인 인지 분자였던 항체에 필적하는 것으로 알려져 있다. 우선 첫 번째로, 앵타머는 항체 사용시 요구되었던 세포주 또는 동물을 사용해야만 하는 한계가 극복될 수 있는 장점을 지닌다. 앵타머는 일단 선택되면, 중합 효소 연쇄반응 또는 전사를 통한 후속적인 증폭을 거쳐, 고순도로 많은 양이 생산될 수 있다. 두 번째로, 앵타머는 단순한 화학 구조를 가지므로, 실험적 목적에 따라 작용기를 추가적인 변형시킬 수 있는 이점이 있다. 마지막으로, 앵타머는 항체보다 더 안정적이어서, 가혹한 조건(예컨대, 높은 온도 또는 과한 pH)에 적용하는 경우 항체에 비해 보다 적합한 이점이 있다.

[0003] 상기 앵타머를 이용한 면역분석에 대한 종래의 대안책 중에서, 분자 비콘(molecular beacon) 분석은 시험관 내와 생체 내 실시간 분석 및 비표지 단백질 감지가 가능한 장점을 지니므로 단백질 검출 및 정량적 분석에 있어 이상적인 것으로 알려져 있다. 이러한 장점은, 한쪽 말단에는 표지된 형광 공여체(labeled fluorescent donor)를 가지고, 다른 한쪽 말단에는 형광단(fluorophore) 또는 소광제(quencher)인 수여체(acceptor)를 가지는, 앵타머 프로브로 구성된 분자 비콘의 구조에서 기인한다. 예컨대, 분자 비콘의 표적이 없는 경우에는 분자 비콘의 공여체와 수여체 사이에 형광 공명 에너지 전이(Fluorescence resonance energy transfer, FRET) 반응이 일어나게 된다. 그러나, 표적이 존재하는 경우, 앵타머 프로브와 표적이 서로 결합하여 이에 의해 앵타머 프로브의 구조가 변하게 되고, 이는 비콘의 공여체-수여체 거리를 변형시켜, FRET 효율 변화를 가져온다. 이와 같이 표적의 결합에 따라 공여체의 독특한 파장, 수여체의 독특한 파장 또는 둘 모두에서의 방출 변화를 나타내므로, 이를 기반으로 하여 표적을 정량화할 수 있다. 그러나 양 말단에 형광 리포터가 표지된 앵타머를 사용하는 종래의 분자 비콘 분석은, 표적이 앵타머에 결합하여 앵타머의 구조적 변화를 가져온다 하여도 여전히 양 말단에 형광 물질이 존재하기 때문에 이들 간의 FRET을 완전히 차단할 수 없는 단점을 지닌다. 이러한 단점으로 표적을 정확하게 정량할 수 없으며, 형광 민감도 역시 낮은 문제점이 있었다.

[0004] 앵타머는 금속 이온, 소분자, 단백질 및 심지어 전체 세포와 결합하는 것으로 알려져 있다. 그 중 바이오마커로 사용될 수 있는 단백질에도 특이적으로 결합하는 앵타머 역시 존재한다. 바이오마커로 사용될 수 있는 단백질 중에서 뮤신(Mucin)은 내부 막관통 도메인에 의해 세포에 부착되는, 세포-표면 관련 당 단백질이다. 이 중, 뮤신 1(Mucin1, Muc1)은 31개 아미노산의 소수성 막-횡단(spanning) 도메인, 69개 아미노산의 세포질 도메인, 및 20개 아미노산이 거의 동일하게 반복된 세포외 도메인을 함유한다. Muc1은 병원균에 결합하여 그의 생물학적 역할로서 보호 기능을 가지며, 신호 전달 경로에서 기능하는 것 또한 가능하다. Muc1은 유방, 위, 대장, 폐, 전립선, 난소, 췌장 및 방광암을 포함하는, 거의 모든 인간 상피 세포 선암에서 과발현된다. 게다가, 이들 조직에서 Muc1의 발현은 대개, 정상적인 발현 패턴이 결여되어, 세포 표면 전체에 걸쳐 편재하거나 무작위적으로 발현되어 있는 특성이 있다. 이에 따라, 많은 양의 Muc1 단백질이 암 환자의 혈액 중에서 발견될 수 있으므로, Muc1 단백질에 대한 혈청 분석은 초기 암 진단에 있어 유용한 툴이 될 수 있다. 이와 관련하여, ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay), 점 블로팅(dot blotting), 웨스턴 블로팅, 면역조직화학 및 면역형광을 포함하는 기술이 Muc1 검출 및 정량을 위하여 개발되어 왔다. 특히, 항-Muc1 항체를 사용하는 2개의 면역-기반 분석(two

immune-based assay)이 최근에 개발되어 혈청 중 Muc1의 농도를 성공적으로 모니터링함이 알려져 있다. 그러나, 이들 항체-기반 분석에 대한 특이적 항체의 생산은 시간이 많이들 뿐만 아니라, 수행함에 있어서 그리 간단한 분석 방법이 아니다. 또한, 상기 분석 방법은 대개 민감성 목적으로 방사능 또는 형광으로 표지된 2차 항체를 사용하는 단점이 있다. 따라서, 항체 이외의 방법을 사용하여 Muc1 단백질을 효과적으로 검출함으로써 암을 진단할 수 있는 방법의 개발이 요구되어 왔다.

[0005] 이러한 배경하에 본 발명자들은 앵타머의 이중나선 부위에 형광 수여체가 로딩되고, 형광 공여체인 QD가 링커를 통해 앵타머에 연결된, 신규한 QD-앵타머 결합체를 개발하였고, 상기 QD-앵타머 결합체에 표적 분자가 결합하는 경우, 이중나선 부위가 단일가닥으로 구조적 변화를 일으켜 형광 수여체가 결합체로부터 용이하게 방출시키는 특징이 있음을 확인하여, 상기 결합체를 앵타머에 결합하는 분자의 검출 및 정량, 나아가 질병의 진단에 유용하게 사용할 수 있음을 규명하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 (a) (i) 형광 수여체(fluorescence acceptor)가 앵타머의 이중나선(duplex) 부위에 로딩된 표적 분자에 특이적인 앵타머(aptamer)의 말단, 및 (ii) 형광 공여체(fluorescence donor)인 양자점(Quantum dot, QD)의 수식기가 (iii) 링커를 통해 연결된 것인, QD-앵타머 결합체를 분리된 시료와 접촉시키는 단계; (b) 시료 내에 표적 분자가 존재하면 QD-앵타머 결합체의 이중나선 부위가 단일 가닥 구조로 형태가 변형되어 이중나선 부위에 로딩된 형광 수여체가 방출되거나, 시료 내에 표적 분자가 존재하지 않으면 QD-앵타머 결합체의 이중나선 부위의 구조가 변형되지 않아 형광 수여체가 방출되지 않는 단계; (c) 형광 공여체 및 형광 수여체 간의 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 신호를 측정하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계에서 측정한 FRET 신호가 표적 분자가 존재하지 않는 대조군에 비하여 감소하였으면 표적 분자가 존재하는 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 표적 분자의 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 (i) 형광 수여체(fluorescence acceptor)가 앵타머의 이중나선(duplex) 부위에 로딩된 표적 분자에 특이적인 앵타머(aptamer)의 말단, 및 (ii) 형광 공여체(fluorescence donor)인 양자점(Quantum dot, QD)의 수식기가 (iii) 링커를 통해 연결된 것인, QD-앵타머 결합체를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 결합체를 포함하는 표적 분자 검출용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 표적 분자 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 (i) 형광 수여체(fluorescence acceptor)가 앵타머의 이중나선(duplex) 부위에 로딩된 Muc 1(Mucin 1) 단백질에 특이적인 앵타머(aptamer)의 말단, 및 (ii) 형광 공여체(fluorescence donor)인 양자점(Quantum dot, QD)의 수식기가 (iii) 링커를 통해 연결된 것인, QD-앵타머 결합체를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 결합체를 포함하는 암 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 암 진단용 키트 및 상기 결합체를 이용한 암의 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) (i) 형광 수여체(fluorescence acceptor)가 앵타머의 이중나선(duplex) 부위에 로딩된 표적 분자에 특이적인 앵타머(aptamer)의 말단, 및 (ii) 형광 공여체(fluorescence donor)인 양자점(Quantum dot, QD)의 수식기가 (iii) 링커를 통해 연결된 것인, QD-앵타머 결합체를 분리된 시료와 접촉시키는 단계; (b) 시료 내에 표적 분자가 존재하면 QD-앵타머 결합체의 이중나선 부위가 단일 가닥 구조로 형태가 변형되어 이중나선 부위에 로딩된 형광 수여체가 방출되거나, 시료 내에 표적 분자가 존재하지 않으면 QD-앵타머 결합체의 이중나선 부위의 구조가 변형되지 않아 형광 수여체가 방출되지 않는 단계; (c) 형광 공여체 및 형광 수여체 간의 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 신호를 측정하는 단계; 및 (d) 상기 (c) 단계에서 측정한 FRET 신호가 표적 분자가 존재하지 않는 대조군에 비하여 감소하였으면 표적 분자가 존재하는 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 표적 분자의 검출 방법을 제공한다.

- [0012] 기존 분자 비콘의 경우 양 말단 각각에 형광 공여체 및 형광 수여체가 연결되어 있어, 표적 분자가 결합한다고 하여도 FRET 현상이 일어날 수 있어 표적 분자의 존재 여부를 정확하게 검출할 수 없었으며, 특히 정량 분석에 있어서 그 값의 오차 범위가 커 정확한 정량 분석을 수행할 수 없는 단점이 있었다. 이에 표적 분자의 양에 따른 형광 변화를 정량적으로 정확하게 측정할 수 있으며, 표적 분자가 낮은 농도로 존재하여도 이를 검출할 수 있는 낮은 검출한도(Limit of Detection, LOD)를 지닌 분석 방법의 개발이 요구되고 있다. 이에 본 발명에서는 이중나선 부위에 로딩된 형광 수여체와 QD 간의 FRET이 용이하게 일어날 수 있도록 형광 공여체로서 QD를 앵타머의 한쪽 말단에 링커를 통해서 연결하고, 표적 분자가 결합하면 이중나선 부위가 단일가닥 형태로 구조적 변형되어 이중나선 부위에 로딩된 형광 수여체가 효과적으로 방출되어 노이즈의 발생을 최소화할 수 있는 이점을 지니는 신규한 QD-앵타머 결합체를 개발하였다. 이와 같은 QD-앵타머 결합체는 50nM의 낮은 표적 분자의 농도에서도 시료 내에 표적 분자의 존재를 검출할 수 있어 낮은 검출한도를 지니는 이점이 있을 뿐 아니라, 표적 분자의 양을 적은 오차 범위에서 정량적으로 검출할 수 있는 장점을 지니, 표적 분자의 검출, 나아가 표적 분자의 정량 분석에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0013] 본 발명의 검출 방법에서 (a) 단계는 구체적으로, (a) 표적 분자에 특이적인 앵타머(aptamer)의 말단 및 양자점(Quantum dot, QD)의 수식기가 링커로 연결된, QD-앵타머 결합체를 분리된 시료와 접촉시키는 단계로서, 상기 앵타머는 형광 수여체(fluorescence acceptor)가 앵타머의 이중나선(duplex) 부위에 로딩된 것이고, 상기 양자점은 형광 공여체(fluorescence donor)인 것인 단계이다.
- [0014] 상기 (a) 단계는 본 발명의 QD-앵타머 결합체를 표적 분자를 포함하는 시료와 접촉시켜, QD-앵타머 결합체의 이중나선 부위를 단일가닥으로 변화시킴으로써 이중나선 부위에 로딩된 형광 수여체를 방출시키기 위한 단계이며, 또한, (b) 단계는, 시료 내에 표적 분자가 존재하면 QD-앵타머 결합체의 이중나선 부위가 단일 가닥 구조로 형태가 변형되어 이중나선 부위에 로딩된 형광 수여체가 방출되거나, 시료 내에 표적 분자가 존재하지 않으면 QD-앵타머 결합체의 이중나선 부위의 구조가 변형되지 않아 형광 수여체가 방출되지 않는 단계이다.
- [0015] 본 발명에서 용어, "앵타머(aptamer)"는 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특성을 가진 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형 핵산)을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 앵타머는 구조적으로 이중나선(duplex) 부위를 가지는 앵타머로서, 표적 분자가 결합하면 단일가닥 형태로 풀어지는 특징을 가진 앵타머를 의미하나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 앵타머는 한쪽 말단에 형광 공여체가 링커를 통해 연결되고 이중나선 부위에 형광 수여체가 로딩될 수 있는 구조를 가진다면, 특별히 그 종류에 제한되지 않으나, 그 예로 Muc1(Mucin1) 단백질에 결합하는 앵타머일 수 있고, 이는 5' 말단에 티올기(thiol)를 가진 앵타머로서, 5'-HS-(CH₂)₆-GCGAG CGCAG TTGAT CCTTT GGATA CCCTG GGCTC GC-3'의 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열을 가진 Muc1 단백질에 결합하는 앵타머는 Muc1 단백질 부재하에서 말단에 결합된 형광 공여체와 FRET을 효과적으로 가져올 수 있는 이중나선 부위를 지닌다.
- [0016] 본 발명에서 용어, "표적 분자"는 앵타머가 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 분자를 의미하며, 그 예로 단백질, 소분자(small molecule), 핵산 또는 세포가 있으며, 바람직하게는 단백질이나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 검출 방법에서 표적 분자는 시료 내에 존재하는지를 알고자 하는 대상으로서, 상기 시료는 표적 분자를 포함하기만 하면 특별히 그 종류에 제한되지 않으나, 표적 분자가 특정 질병에서 과발현 또는 저발현되어 있는 바이오마커일 경우에는 그 질병의 의심개체에서 분리된 생물학적 시료일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 대표적인 표적 분자로서 Muc1 단백질을 이용하였다.
- [0017] 본 발명에서 용어, "양자점(QD)-앵타머 결합체"는 QD가 앵타머의 양 말단 중 한쪽 말단에 연결된 형태의 결합체를 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 QD-앵타머 결합체는 적절한 FRET을 가져올 수 있도록 앵타머의 말단에 양자점이 링커를 통하여 연결된 형태이며, 말단에 연결된 양자점과 적절한 FRET을 나타낼 수 있는 위치에 이중나선(duplex) 부위를 가지는 결합체이며, 바람직하게는 (i) 형광 수여체(fluorescence acceptor)가 앵타머의 이중나선(duplex) 부위에 로딩된 표적 분자에 특이적인 앵타머(aptamer)의 말단, 및 (ii) 형광 공여체(fluorescence donor)인 양자점(Quantum dot, QD)의 수식기가 (iii) 링커를 통해 연결된 것인, QD-앵타머 결합체이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 상기 결합체는 표적 분자의 부재시 앵타머의 이중나선 부위에 형광 수여체가 로딩되어, 앵타머 말단

의 QD와 FRET을 나타내는 특성을 지닌다.

- [0019] 본 발명에서 용어, "FRET(fluorescence resonance energy transfer)"은 두 종류의 형광 물질이 가까운 거리에 있을 때 공명에 의해 에너지를 전달하는 현상을 의미한다. 에너지를 전달하는 공여체(donor)가 들뜬 상태에서 바닥 상태로 내려오면서 광자를 내놓을 때, 두 형광 분자가 가까운 거리에 있다면 수여체가 이를 받아들여서 파장이 다른 빛을 내놓게 되는 현상이다.
- [0020] FRET이 일어나는 거리는 10 Å 내지 100 Å으로, FRET의 효율에서 특히 두 분자 간의 거리가 매우 중요한 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명에서는 앵타머의 이중나선 부위에 로딩된 형광 수여체와 앵타머 말단에 연결된 형광 공여체 간에 효과적인 FRET을 나타내는 QD-앵타머 결합체를 제조하기 위하여 형광 공여체를 앵타머 말단에 적절한 링커로 연결하여, 앵타머에 연결된 공여체에 유연성(flexibility)을 부여하고 적절한 거리를 유지하게 함으로써 FRET이 효과적으로 나타날 수 있도록 하였다.
- [0021] 본 발명에서 용어, "형광 공여체"는 FRET에서 에너지를 전달하는 역할을 하는 물질을 의미한다. 상기 공여체는 바람직하게는 수여체의 흡수 파장과 유사한 방출 파장을 지니는 물질로서, 상기 흡수 파장은 단일 파장이 아닌 스펙트럼 형태로 나타나기 때문에 바람직하게는, 공여체의 방출 스펙트럼과 수여체의 흡수 스펙트럼이 겹치는 정도가 큰 물질을 의미하나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 형광 공여체는 바람직하게는 양자점을 의미한다.
- [0022] 본 발명에서 용어, "양자점(Quantum dot, QD)"은 형광성 반도체 결정으로서, 나노미터 크기를 지닌다. 본 발명의 목적상 상기 양자점은 FRET에서 형광 공여체로서 사용되며, 본 발명의 QD-앵타머 결합체에 사용될 형광 수여체의 여기 파장에 따라, 적절한 여기 파장 및 방출 파장을 가지는 것으로 선택될 수 있다. 또한, 상기 QD는 광안정성(phostostability), 좁은 방출 밴드(narrow emission band) 또는 넓은 여기 스펙트럼(broad excitation spectrum) 등의 형광적 특성을 지니는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기과 같은 특성을 지니는 양자점은 그의 물리적 크기에 의하여 결정된 파장에서 넓은 스펙트럼 범위 및 형광에 걸쳐 빛을 흡수하고, 정확하며 좁은 스펙트럼에서 빛을 방출하기 때문에, 빛을 효과적으로 흡수하면서 고도로 안정화된 형광 방출을 가져올 수 있으므로 FRET을 이용함에 있어 유용하게 사용될 수 있는 이점을 지닌다. 또한, 본 발명에서 사용되는 양자점은 링커를 통하여 앵타머와 연결되기 위하여 아미노산 등으로 수식(modification)된 형태, 즉 수식기를 포함하는 양자점일 수 있다. 양자점에 대한 수식의 종류는 연결될 링커의 종류에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 그 예로 설포-SMCC 링커와 연결되는 경우에는 아민기(-NH₂)를 포함하도록 수식될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서는 대표적으로 PEG 및 아미노산으로 수식된 양자점을 사용하여, 양자점의 수식기인 -NH₂기를 통하여 설포-SMCC와 연결하였다.
- [0023] 본 발명에서 용어, "형광 수여체"는 FRET에서 형광 공여체의 방출 파장을 흡수하여 빛을 내놓는 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 형광 수여체는 앵타머의 이중나선 부위에 로딩될 수 있는 형광 수여체라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 그 예로 삽입성 형광 물질, 예컨대 YOYO-1, YOYO-3, BOBO-3, SYBR 그린 1(SYBR Green 1), 헥스트 염료(Hoechst dye) 33258, 피코그린(PicoGreen) 또는 POPO-3일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 그 중 BOBO-3는 핵산의 이중나선 부위에 삽입되면 그 형광이 강화되는 특성을 가진다. 상기 형광 수여체는 앵타머의 이중나선 부위에 로딩될 수 있는 것으로서, 선택된 형광 공여체의 방출 파장과 유사한 흡수 파장을 지닌 것으로 선택될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 BOBO-3를 형광 수여체로서 이용하였다.
- [0024] 본 발명의 앵타머 말단의 QD와 이중나선 부위의 형광 수여체 간의 FRET은, 링커로 QD와 앵타머를 연결함으로써 더욱 더 효과적으로 수행될 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 용어, "링커(linker)"는 앵타머와 형광 공여체, 바람직하게는 양자점을 연결하는데 사용되는 화합물을 의미한다. 상기 링커는 앵타머에 연결된 형광 공여체에 유연성(flexibility)을 제공하며, 앵타머의 이중나선 부위에 로딩된 형광 수여체 간의 FRET을 효과적으로 가져올 수 있는 역할을 수행한다. 상기 링커는 앵타머와 QD를 서로 연결할 수 있다면 그 종류는 특별히 제한되지 않으나, 그 대표적인 예로 설포-SMCC(sulfo-SMCC), SPDP(N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate), LC-SPDP(long chain-SDPD), sulfo-LC-SPDP(NHS 대신 sulfo-NHS를 가지고 있는 LC-SPDP), SMPT(succinimidyloxycarbonyl- α -methyl- α -(2-pyridyldithio)toluene), sulfo-LC-SMPT(NHS 대신 sulfo-NHS를, 그리고 long chain을 가지는 SMPT), SMCC(sulfo-SMCC에서 sulfo-NHS 대신 NHS를 가지는 형태의 링커), MBS(m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester), sulfo-MBS(NHS 대신 sulfo-NHS를 가지는 MBS), SIAB(N-succinimidyl(4-iodoacetyl)aminobenzoate), sulfo-SIAB(NHS 대신 sulfo-NHS를 가지는 SIAB), SMPB(succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)butyrate), sulfo-SMPB(NHS 대신 sulfo-NHS를 가지는 SMPB), GMBS(N-(γ -maleimidobutyryloxy)succinimide ester), sulfo-GMBS(NHS 대신 sulfo-NHS를 가

는 GMBs), SIAX(succinimidyl-6-((iodoacetyl)amino)hexanoate), SIAXX(succinimidyl 6-[6-(((iodoacetyl)amino)-hexanoyl)amino]hexanoate), SIAC(succinimidyl-4-(((iodoacetyl)amino)methyl)cyclohexane-1-carboxylate), SIACX(succinimidyl-6-(((iodoacetyl)amino)methyl)cyclohexane-1-carbonyl)amino)hexanoate) 또는 NP1A(p-nitrophenyl iodoacetate)이 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에서는 대표적인 링커로서 설폰-SMCC를 사용하였다.

[0026] 본 발명의 QD-애타머 결합체는 표적 분자가 결합하는 경우, 애타머의 이중나선 부위가 풀어져 단일 가닥 구조로 변하는 것을 특징으로 한다.

[0027] 본 발명에서는, 이중나선을 가지는 다양한 애타머 중에서도 표적 분자가 결합하면 단일가닥으로 구조적 변화가 이루어지는 애타머가, 본 발명의 결합체를 이용한 표적 분자 검출에 유용함을 최초로 규명하였다. 이중나선을 가지는 애타머에 표적 분자가 결합하여 이중나선 부위에 구조적 변화를 나타내는 애타머라 하더라도, 어떠한 구조로 변화되는지에 따라 FRET 감소 정도가 달라질 수 있다. 예컨대, 이중나선 부위가 애타머의 이중나선 부위가 표적 분자의 결합에 따라 4중 나선(Quadruplex)으로 변하는 애타머의 경우, 형광 공여체가 로딩될 수 있는 공간이 변하여 형광 공여체가 방출될 수 있으나, 표적 분자 결합에 따른 FRET의 감소 정도가 적어, 표적 분자를 낮은 민감도 및 정확도로 측정하는 것에는 여전히 어려움을 가진다.

[0028] 따라서, 표적 분자가 결합하면 애타머의 이중나선 부위가 단일가닥으로 구조적 변화하는 것이 특징인 본 발명의 QD-애타머 결합체의 경우, 적은 농도의 표적 분자가 존재하여도 결합체에 결합하기만 하면 형광 수여체가 효과적으로 방출되어 표적 분자가 결합하였음에도 FRET 반응이 일어나는 노이즈가 적어 낮은 농도의 표적 분자도 효과적으로 검출할 수 있고, 표적 분자의 농도 변화에 따라 FRET 역시 감소하며 정량값의 오차 범위도 적어 표적 분자의 정량 분석에도 유용한 이점을 지닌다.

[0029] 본 발명의 검출 방법의 (c) 단계는, 형광 공여체 및 형광 수여체 간의 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 신호를 측정하는 단계이다.

[0030] 표적 분자가 존재하여 본 발명의 QD-애타머 결합체에 결합하는 경우, QD 및 형광 수여체 간의 FRET을 감소시키므로, FRET 신호를 측정하여 대조군과의 신호와 비교하여 표적 분자의 존재 여부, 나아가 FRET 신호의 변화 정도를 측정하여 표적 분자의 양을 알 수 있다. 이와 같은 FRET 신호의 측정은 형광 공여체의 방출 파장, 형광 수여체의 방출 파장 또는 둘 다를 측정함으로써 수행될 수 있다.

[0031] (c) 단계의 형광의 세기 측정은 트라이어드 멀티모드 디텍터(TRIAD Multimode Detector), 왈락/빅터 형광(Wallac/Victor Fluorescence) 또는 퍼킨-엘머 LB50B 형광분광광도계(Perkin-Elmer LB50B luminescence spectrometer) 등을 이용하여 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당업자에게 공지된 형광 표지자 검출이 가능한 측정 장치라면 모두 이용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 검출 방법의 (d) 단계는, (c) 단계에서 측정한 FRET 신호가 표적 분자가 존재하지 않는 대조군에 비하여 감소하였으면 표적 분자가 존재하는 것으로 판정하는 단계이다.

[0033] 표적 분자가 존재하지 않는 대조군의 경우, 본 발명의 결합체에서 형광 수여체가 방출되지 않으므로, 대조군에 비하여 FRET 신호가 감소하였는지 여부를 통하여 표적 분자의 존재 여부를 알 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에서는 Muc1 단백질에 결합하는 애타머의 5' 말단에 설폰-SMCC를 링커로 사용하여 QD를 연결하였고, 애타머의 이중나선 부위에 BOBO-3를 로딩하여, QD-애타머 결합체를 제조하였다. 상기 결합체에 표적 분자인 Muc1 단백질을 포함하는 시료를 반응시킨 경우, FRET 신호가 효과적으로 감소하며(실시예 1 내지 3, 실험예 및 도 2), Muc1 단백질을 농도의존적으로 반응시켜 FRET 신호의 변화를 측정한 결과, 50nM의 매우 낮은 농도에서도 Muc1 단백질을 검출할 수 있으며, 로그 그래프로 나타냈을 때 직선형태를 나타내며 오차 범위 역시 적음을 확인하여 본 발명의 방법이 표적 분자의 존재, 나아가 이의 정량 분석에 유용함을 확인하였다(실험예 및 도 3).

[0035] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (i) 형광 수여체가 애타머의 이중나선 부위에 로딩된 표적 분자에 특이적인 애타

타머의 말단, 및 (ii) 형광 공여체인 양자점의 수식기가 (iii) 링커를 통해 연결된 것인, QD-애타머 결합체를 제공하며, 구체적으로는, 표적 분자에 특이적인 애타머의 말단 및 양자점의 수식기가 링커로 연결된, QD-애타머 결합체로서, 상기 애타머는 형광 수여체가 애타머의 이중나선 부위에 로딩된 것이고, 상기 양자점은 형광 공여체인 것인 결합체를 제공한다.

[0036] 상기 형광 공여체, 양자점, 애타머, 링커, 형광수여체 및 QD-애타머 결합체에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0037] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 결합체를 포함하는, 표적 분자 검출용 조성물 및 상기 조성물을 포함하는 표적 분자 검출용 키트를 제공한다.

[0038] 상기 결합체 및 표적 분자에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0039] 상기 키트에는 상기 조성물 외에도 검출에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분을 가진 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다.

[0040] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (i) 형광 수여체가 애타머의 이중나선 부위에 로딩된 Muc 1 단백질에 특이적인 애타머의 말단, 및 (ii) 형광 공여체인 양자점의 수식기가 (iii) 링커를 통해 연결된 것인, QD-애타머 결합체를 제공하며, 구체적으로는, Muc 1 단백질에 특이적인 애타머의 말단 및 양자점의 수식기가 링커로 연결된, QD-애타머 결합체로서, 상기 애타머는 형광 수여체가 애타머의 이중나선 부위에 로딩된 것이고 상기 양자점은 형광 공여체인 것인 결합체를 제공한다.

[0041] 상기 형광 공여체, 양자점, 애타머, 링커, 형광 수여체에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0042] 본 발명에서 용어, "Muc1 단백질"은 세포 외 도메인이 O-연결된 글리코실화된 당단백질로서, cell surface associated (MUC1) 또는 polymorphic epithelial mucin (PEM)로도 명명된다. 상기 Muc1 단백질은 폐, 위, 장, 눈 및 그외 여러 기관의 선단 표면에 존재하고 있는 단백질로서, 특히 대장암, 유방암, 난소암, 폐암 및 췌장암에서 Muc1 단백질이 과발현되어 있는 것으로 알려져 있으며, 조기암의 마커로서도 알려져 있다. 이와 같이 Muc1 단백질은 암에 과발현되어 있으므로, 암 의심 개체의 분리된 생물학적 시료에서 상기 QD-애타머 결합체를 이용하여 Muc1 단백질의 존재 여부 및 그 정도를 검출함으로써 암을 진단할 수 있다.

[0043] 본 발명에서 용어, "생물학적 시료"는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 조직 부검 시료(뇌, 피부, 림프절, 척수 등), 세포 배양 상등액, 파열된 진핵세포 및 세균 발현계 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 생물학적 시료를 조작하거나 조작하지 않은 상태로 본 결합체를 반응시켜 Muc1 단백질의 존재 또는 암의 유무를 알 수 있다.

[0044] 본 발명에서 용어, "암"은 Muc1 단백질이 과발현된 암이라면 그 종류가 특별히 제한되지 않으나, 그 예로 대장암, 유방암, 난소암, 폐암 또는 췌장암이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 본 발명의 일 실시예에서는 양자점이 링커인 설폰-SMCC를 통해 애타머에 연결되고, BOBO-3가 로딩된, QD-애타머 결합체로서, Muc1 단백질에 결합하는 애타머 결합체를 제조하였으며, 본 결합체가 Muc1 단백질의 존재 여부에 따라 FRET 신호를 변화시킴을 확인하여 암의 진단에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0046] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 Muc 1 단백질에 특이적으로 결합하는, QD-애타머 결합체를 포함하는, 암 진단용 조성물을 제공한다.

[0047] 상기 형광 공여체, 양자점, 애타머, 링커, 형광 수여체, Muc1 단백질, 암 및 QD-애타머 결합체에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다. 본 발명의 Muc1 단백질에 특이적인 QD-애타머 결합체를 포함하는 진단용 조성물을 사용하여 Muc1 단백질의 발현 여부나 발현 정도와 관련된 질환, 예컨대 암을 진단할 수 있다.

[0048] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 암 진단용 조성물을 포함하는 암 진단용 키트를 제공한다.

[0049] 상기 암 및 암 진단용 조성물에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다. 또한, 상기 암 진단용 키트는 분석방법에

적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분을 가진 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함하여 구성될 수 있다.

[0050] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 암 의심 개체의 분리된 생물학적 시료에 상기 Muc1 단백질에 결합하는 QD-애타머 결합체를 접촉시키는 단계; 및 (b) 형광 공여체 및 형광 수여체 간의 FRET 신호를 측정하는 단계를 포함하는, 암의 진단을 위한 정보의 제공 방법을 제공한다. 상기 암의 진단을 위한 정보의 제공 방법은 암의 진단 방법일 수 있다.

[0051] 상기 암, 생물학적 시료, Muc1 단백질, QD-애타머 결합체, 형광 공여체, 형광 수여체 및 FRET에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0052] 상기 암의 진단을 위한 정보의 제공방법은 본 발명의 Muc1에 특이적인 결합체를 암이 의심되는 개체의 분리된 생물학적 시료와 반응시키고 FRET 신호 변화를 측정함으로써 Muc1 단백질을 검출할 수 있으며, 이를 통해 암의 진단을 위한 정보의 제공을 할 수 있다. 상기 Muc1은 대장암, 유방암, 난소암 또는 췌장암과 다양한 암세포에서 과발현되어 있으므로, 정상 세포 또는 조직과 같은 대조군과 발현량을 비교하여 암을 진단할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0053] 본 발명의 QD-애타머 결합체는 표적 분자가 존재하는 경우 효과적으로 FRET 신호의 변화를 가져오므로, 표적 분자 검출 및 정량 등에 있어 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은, 본 발명의 QD-애타머 결합체의 구조를 모식도로 나타낸 것이다.

도 2는, QD 여기 파장인 365nm의 빛을 조사한 다음 BOBO-3 로딩에 따른 QD-애타머 결합체의 QD 및 BOBO-3 방출 형광을 확인한 결과로서, (a) QD-애타머 결합체의 형광 스펙트럼; (b) BOBO-3와 함께 로딩된 QD-애타머 결합체의 형광 스펙트럼; 및 (c) QD-애타머 결합체의 형광 강도로부터 BOBO-3와 함께 로딩된 QD-애타머 결합체의 형광 강도를 감한, BOBO-3 로딩에 따른 565nm에서 QD 형광의 FRET-매개된 감소 및 605nm에서 BOBO-3 형광의 증가를 각각 나타낸 것이다.

도 3은, BOBO-3가 로딩된, 본 발명의 QD-애타머 결합체를 사용하여 Muc1 단백질을 비표지 정량한 결과를 나타낸 것이다. (a) 각 Muc1 농도에서, 565nm의 파장을 조사하였을 때 QD의 방출 강도를 정상화한 비율(normalized ratio)을 나타내는 것으로, 완충액 내의 결합체가 50nM 내지 20 μ M 농도에서 10 내지 60% FRET 신호 변화를 생산함을 나타내며, QD-애타머 결합체 및 Muc1 단백질 간의 표면상 해리 상수(K_d^{app})가 대략 78pM을 나타낸다. (b) 상기 결과를 로그스케일 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 이하 본 발명의 하기 예에 의해 자세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 범위가 하기 예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0056] 실시예 1: 시약 준비

[0057] 본 실험에서 사용된 시약은 상업적으로 공급된 것을 사용하였으며, 추가적인 정제없이 사용하였다. DEPC(diethyl pyrocarbonate)를 처리한, 탈이온수(deionized water)를 하기 모든 실험에서 사용하였다.

[0058] 565nm의 최대 방출 파장을 가지고, PEG 및 아미노산으로 수식된 QD인 Qdot® 655 ITK™ amino (PEG) QD는 인비트로젠(Carlsbad, CA)사에서 구입하였으며, 본 발명에서 QD 농도는 QD를 구입한 인비트로젠사에서 제공된 흡광 계수(extinction coefficient)를 이용하여 흡광도(optical absorbance)를 측정함으로써 결정하였다. Sulfo-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate(sulfo-SMCC)는 시그마사에서 구입하였으

며, Muc1 단백질은 펩톤(대전, 한국)사에서 구입하였다.

[0059] 또한, Muc1 단백질에 특이적으로 결합하는, HPLC로 정제한 DNA-기반 프로브(5'-HS-(CH₂)₆-GCGAG CGCAG TTGAT CCTTT GGATA CCCTG GGCTC GC-3')는 바이오니아(대전, 한국)에서 주문하여 사용하였다. 상기 Muc1 단백질에 결합하는 앵타머 부위는 5'-GCGAG CGCAG TTGAT CCTTT GGATA CCCTG GGCTC GC-3'는 서열번호 1로 기재하였다.

[0060] 실시예 2: BOBO-3가 로딩된 QD-앵타머 결합체의 제조

[0061] Mucin1 단백질을 검출할 수 있는 본 발명의 QD-앵타머 결합체를 제조하기 위하여 하기와 같은 과정을 수행하였다.

[0062] 구체적으로, 아미노산으로 변형된 QD를 티올기를 포함하는 DNA 앵타머와 sulfo-SMCC 교차 링커를 사용하여 연결하였다. 이를 위하여 우선, Qdot® 565 ITK™ amino (PEG) QD를 50mM 인산나트륨, 150mM 염화나트륨, pH 7.2인 완충액에 현탁시켰다. 그 다음, 상기 sulfo-SMCC 교차 링커를 QD에 첨가한 다음, 1시간 동안 반응시켜, QD와 sulfo-SMCC 교차 링커를 서로 연결시켰다. 그 다음, 반응하지 않은 교차 링커를 제거하기 위하여, 시료를 NAP-5 중력 컬럼(NAP-5 gravity column)으로, 10mM EDTA가 공급된 완충액을 이용하여 필터링하였다.

[0063] 상기 필터링된 QD에, 디티오프레itol(dithiothreitol)을 처리한 후에 상기 5'-티올을 포함하는 DNA 앵타머(5'-thiol-containing DNA aptamer)를 첨가한 다음, 4℃에서 밤새 반응시켜, QD-링커-앵타머의 구조를 가지는 QD-앵타머를 형성시켰다.

[0064] 반응 후, 3개의 아미콘 필터를 이용하여 생산물을 DPBS(Dulbecco's phosphate-buffered saline)로 2회 세척하고, 고염 완충액(1.0M 염화 나트륨, 100mM 시트르산 나트륨, pH 7.2)으로 2회 세척한 다음, 다시 DPBS로 2회 세척하였다. 고염 세척은 DPBS 세척으로 제거되지 않는 정전기적으로 결합된 DNA를 제거하기 위하여 필요한 과정이다. 상기 과정으로 제조한 QD-앵타머를 PBS(200μl)에 녹인 다음, 추가적인 실험을 위해 4℃에서 보관하였다.

[0065] 그 다음, Muc1 검출에 사용하기 위하여 본 발명의 BOBO-3(1,10-(4,4,7,7-테트라메틸-4,7-디아자운데카메틸렌)-비스-4-[3-메틸-2,3-디히드로-(벤조-1,3-티아졸)-2-메틸리덴]-피리딘류 테트라아오이드)가 로딩된 QD-앵타머 결합체는, 상기 QD 앵타머에 PBS에 녹인 10μM BOBO-3를 첨가하여 혼합한 다음, 암전 상태로 한 시간 동안 반응 시킴으로써 제조하였다. 제조한 BOBO-3가 로딩된 QD-앵타머 결합체를 포함하는 시료를 200×g에서 1분동안 원심분리하고, 상등액에 포함된 결합하지 않은 BOBO-3를 제거하여 제조하였다.

[0066]

[0067] 실시예 3: BOBO-3가 로딩된 QD-앵타머 결합체를 이용한 Muc1 단백질의 검출

[0068] Muc1 단백질을 검출하기 위하여, 실시예 2의 BOBO-3가 로딩된 QD-앵타머 결합체에 PBS에 녹인 Muc1 단백질 시료를 최종 부피가 200μl가 되도록 첨가하였다. 1시간 동안 반응시킨 다음, 상기 혼합물을 형광 마이크로플레이트 리더(fluorescence microplate reader)에 옮기고, FRET-매개된 BOBO-3 방출 신호를 측정하였다(365nm 여기, 565 및 605 nm 방출 측정).

[0069] 실험예: 본 발명의 BOBO-3가 로딩된 QD-앵타머 결합체를 이용한, FRET을 통한 Mucin 1 단백질 검출

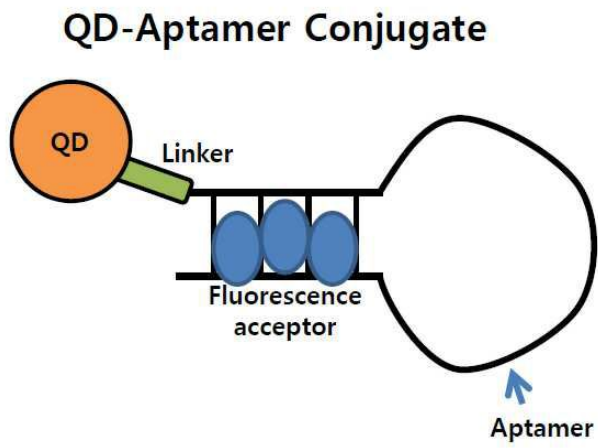
[0070] 상기 실시예 2의 BOBO-3가 로딩된 QD-앵타머 결합체를 이용하여 대표적인 표적 단백질인 Mucin 1 단백질을 검출할 수 있는지를 알아보았다.

[0071] 구체적으로, 표적 단백질인 Muc1 단백질이 없는 경우에는, QD-앵타머 결합체에 로딩된 BOBO-3와 QD 간의 FRET이 일어날 수 있다. 구체적으로, QD의 여기(excitation) 파장인 365nm의 빛을 조사하는 경우, QD는 565nm 파장의 빛을 방출하고, 이는 QD-앵타머 결합체에 로딩된 BOBO-3(570 nm에서 여기, 605 nm에서 방출)가 605nm 파장을 방출 시키게 된다. 반면, 표적 단백질인 Muc1 단백질이 앵타머에 결합하는 경우에는 앵타머의 이중나선(duplex) 부위가 단일가닥 형태로 변하는 구조적 변형을 가져오게 되어 앵타머의 이중나선 부위에 로딩되어 있던 BOBO-3가 방출되게 되고, 이에 따라 365nm 파장의 빛을 조사하여도 FRET이 일어나지 않게 되므로, BOBO-3의 방출 파장인 605nm가 아닌 QD의 방출 파장인 565nm 파장에서 빛을 방출시키게 된다.

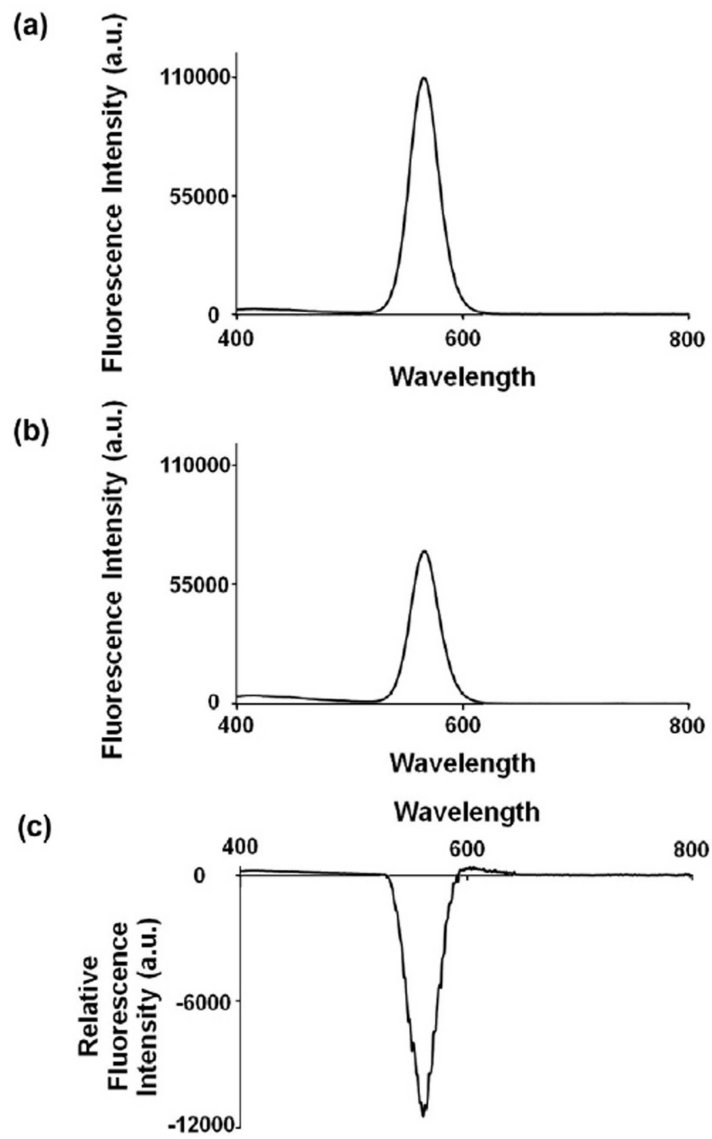
- [0072] 우선, 본 발명의 형광 수여체가 로딩된 QD-애타머 결합체에서 QD와 형광 수여체 간의 FRET이 일어나는 지를 확인하기 위하여, QD의 여기 파장의 빛을 조사하였을 때 QD-애타머 결합체에서 BOBO-3 로딩에 따라 QD 방출 파장의 빛이 감소하는지, BOBO-3 방출 파장의 빛이 증가하는지를 확인하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- [0073] 그 결과, BOBO-3가 로딩된 QD-애타머 결합체의 경우, BOBO-3를 로딩함에 따라 QD 형광(565nm)이 감소하고 BOBO-3 형광(605nm)이 증가한 결과를 나타내었으며, 최대 40%의 에너지 전이 효율을 나타내었다(도 2 (a) 내지 (c)). 이러한 중간 정도의 에너지 전이 효율은, 염료 염색(약 2.5nm)을 위한 애타머 코팅의 두께가 QD와 BOBO-3의 FRET 쌍에 대하여 대략 1/2 포스터 반경(57.7Å)인 점에서 기인했을 것으로 예상된다. 반면, 애타머에 결합할 수 있는 Muc1의 존재는 애타머의 입체형태적 변화를 유도하여, QD-애타머 접합체로부터 BOBO-3의 분리를 초래하게 되어 FRET이 감소하게 되어 FRET-매개된 BOBO-3 방출 형광 감소 및 QD 형광 증가가 관찰된 것으로, 이를 이용하여 Muc1 농도의 정량을 가능하게 할 수 있다.
- [0074] 이어, BOBO-3가 로딩된 본 발명의 QD 애타머 결합체를 이용하여, 클리어 완충액에서 라벨되지 않은 Muc1 단백질의 정량을 수행하였다.
- [0075] 구체적으로, 565nm(QD 방출) 및 605nm(BOBO-3 방출) 각각의 파장에서 방출 강도의 비를 측정하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [0076] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 50nM 내지 20 μ M Muc1 펩타이드의 농도 범위에서 10 내지 60%의 FRET 신호 변화를 나타내었으며(도 3 (a)), 이는 10^3 배 정도의 동적 범위를 나타내는 것이다. 또한, 이를 로그스케일 그래프로 도 3 (b)에 나타내었다. 그 결과, 상기 그래프에 나타나는 바와 같이 본 발명의 방법을 이용할 경우 50nM LOD(검출 한계)를 가질 수 있음을 나타내었으며, 농도 변화에 따른 오차도 적어 표적 단백질의 정량에 유용하게 사용할 수 있음을 시사하였다.
- [0077] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

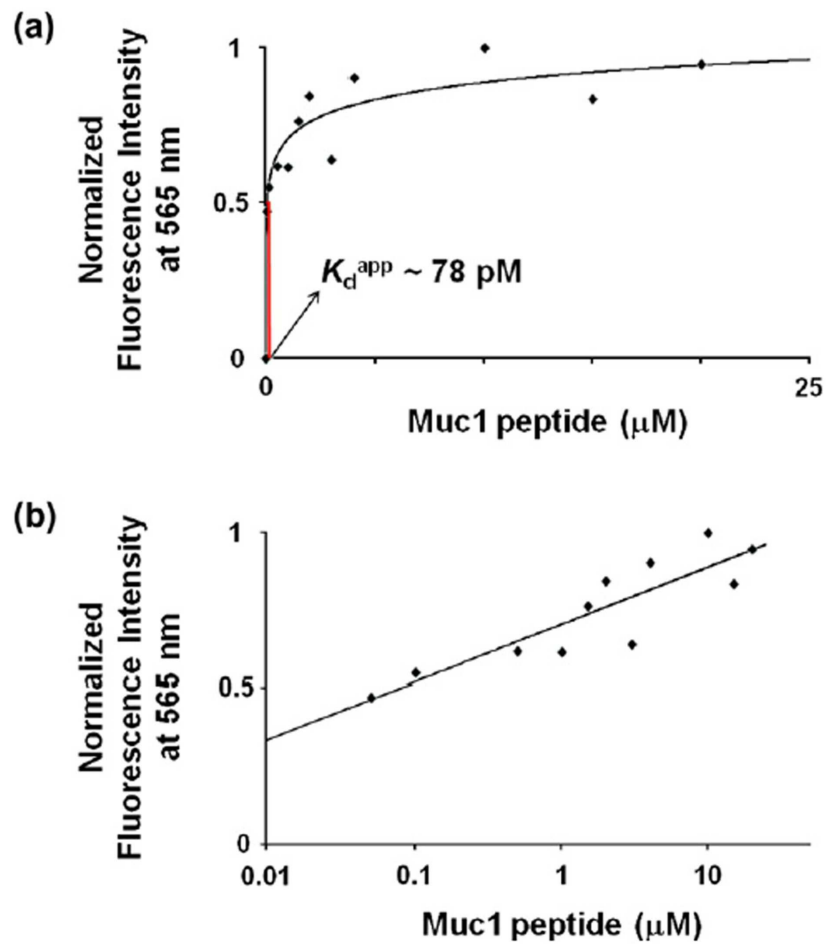
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
 - <120> Novel quantum dot-aptamer conjugate and use thereof
 - <130> PA121147KR
 - <160> 1
 - <170> KopatentIn 2.0
 - <210> 1
 - <211> 37
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> DNA part of DNA-based probe for specific binding to Mucin 1 protein
 - <400> 1
- gcgagcgcag ttgatccttt ggataccctg ggctcgc