

(11) 공개번호 10-2021-0038034
(43) 공개일자 2021년04월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/6827 (2018.01) G01N 27/327 (2006.01) (52) CPC특허분류 C12Q 1/6827 (2018.05) G01N 27/3275 (2013.01) (21) 출원번호 10-2019-0120637 (22) 출원일자 2019년09월30일 심사청구일자 2019년09월30일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가) (72) 발명자 나성수 서울특별시 성북구 안암로 145 박찬호 서울특별시 성북구 안암로 145 유영은 서울특별시 성북구 안암로 145 (74) 대리인 정은열, 김태훈
---	---

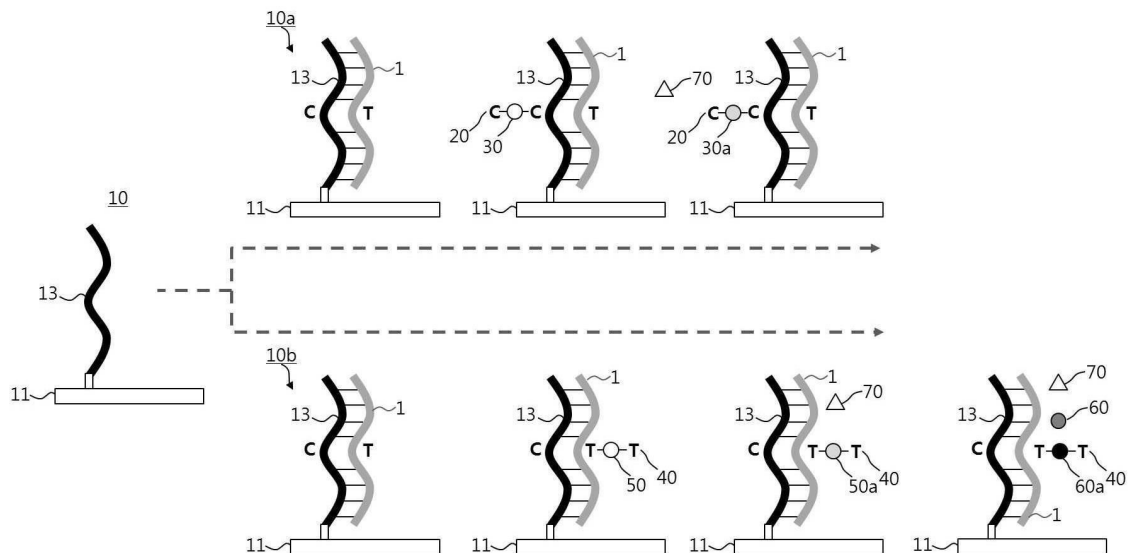
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **단일염기변이 검출센서 및 검출방법**

(57) 요약

본 발명은 단일염기변이 검출센서 및 검출방법에 관한 것으로, 본 발명의 일 실시예에 따른 단일염기변이 검출센서는 전극 부재(11), 및 상기 전극 부재(11)에 결합되고 타겟 DNA(1)와 혼성화되어 DNA 이중체(DNA duplex)를 형성하는 적어도 하나 이상의 단일 가닥 프로브 DNA(13)를 포함하는 한 쌍의 전극부(10), 한 쌍의 전극부(10) 중 (뒷면에 계속)

대표도



어는 하나인 제1 전극부(10a)와 반응하는 단일 시토신 모노머(single cytosine monomer, 20), 제1 전극부(10a)에 형성된 DNA 이중체의 불일치(mismatch) 염기인 시토신과, 단일 시토신 모노머(20) 사이에 포획되고, 은(Ag, 30a)으로 환원되는 은 이온(30), 한 쌍의 전극부(10) 중 다른 하나인 제2 전극부(10b)와 반응하는 단일 티민 모노머(single thymine monomer, 40), 제2 전극부(10b)에 형성된 DNA 이중체의 불일치(mismatch) 염기인 티민과, 단일 티민 모노머(40) 사이에 포획되고, 수은(Hg, 50a)으로 환원되는 수은 이온(50), 금(Au)으로 환원되고, 수은(50a)과 반응하여 금 아말감(Au amalgam, 60a)을 형성하는 금 이온(60), 및 은 이온(30), 수은 이온(50), 및 금 이온(60)을 환원시키는 환원제(70)를 포함한다.

(52) CPC특허분류

G01N 27/3277 (2013.01)

C12Q 2563/137 (2013.01)

C12Q 2565/607 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2016R1A5A1010148
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학분야(S/ERC)
연구과제명	나노-생체유체 검사 연구단
기 여 율	50/100
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2016.06.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2015M3A9D7031026
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	헬스케어원천기술개발
연구과제명	액체생검기반 맞춤형 암 진단 및 치료 기술 개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2015.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

전극 부재, 및 상기 전극 부재에 결합되고 타겟 DNA와 혼성화되어 DNA 이중체(DNA duplex)를 형성하는 적어도 하나 이상의 단일 가닥 프로브 DNA를 포함하는 한 쌍의 전극부;

한 쌍의 상기 전극부 중 어느 하나인 제1 전극부와 반응하는 단일 시토신 모노머(single cytosine monomer);

상기 제1 전극부에 형성된 상기 DNA 이중체의 불일치(mismatch) 염기인 시토신과, 상기 단일 시토신 모노머 사이에 포획되고, 은(Ag)으로 환원되는 은 이온;

한 쌍의 상기 전극부 중 다른 하나인 제2 전극부와 반응하는 단일 티민 모노머(single thymine monomer);

상기 제2 전극부에 형성된 상기 DNA 이중체의 불일치(mismatch) 염기인 티민과, 상기 단일 티민 모노머 사이에 포획되고, 수은(Hg)으로 환원되는 수은 이온;

금(Au)으로 환원되고, 상기 수은과 반응하여 금 아말감(Au amalgam)을 형성하는 금 이온; 및

상기 은 이온, 상기 수은 이온, 및 상기 금 이온을 환원시키는 환원제;를 포함하는 단일염기변이 검출센서.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 프로브 DNA는, 금(Au) 입자와 결합되는 적어도 하나 이상의 티올(thiol) 기를 구비하고,

상기 전극 부재는, 상기 티올 기와 결합되는 금(Au) 입자 층을 구비하는 단일염기변이 검출센서.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 제1 전극부, 및 상기 제2 전극부 각각에 전기적으로 연결되고, 상기 은 또는 상기 금 아말감에 의해 발생하는 산화 환원 전류를 측정하는 DPV(Differential Pulse Voltammetry) 장치;를 더 포함하는 단일염기변이 검출센서.

청구항 4

청구항 3에 있어서,

상기 DPV 장치에 의해 측정된 신호 피크 값의 상대적 크기를 비교하여 상기 타겟 DNA의 단일염기 불일치를 검출하는 단일염기변이 검출센서.

청구항 5

전극 부재에 적어도 하나 이상의 단일 가닥 프로브 DNA가 결합된 한 쌍의 전극부를 준비하는 단계;

DNA 이중체(DNA duplex)가 형성되도록, 한 쌍의 상기 전극부 각각에, DNA 용액을 공급하여, 상기 프로브 DNA와 상기 용액 내의 DNA를 혼성화하는 단계;

한 쌍의 상기 전극부 중 어느 하나인 제1 전극부에 단일 시토신 모노머(single cytosine monomer) 및 은(Ag) 이온을 반응시키고, 다른 하나인 제2 전극부에 단일 티민 모노머(single thymine monomer) 및 수은(Hg) 이온을 반

응시키는 단계;

상기 은 이온을 은으로 환원하고, 상기 수은 이온을 수은으로 환원하는 단계;

상기 수은에 금(Au) 이온을 반응시키고, 환원시켜 금 아말감(Au amalgam)을 형성하는 단계; 및

상기 제1 전극부, 및 상기 제2 전극부 각각에 대해 산화 환원 전류 신호를 측정하는 단계;를 포함하는 단일염기 변이 검출방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 제1 전극부에 형성된 상기 DNA 이중체에 불일치(mismatch) 염기로서 시토신이 존재하는 경우에, 상기 시토신과 상기 단일 시토신 모노머 사이에, 상기 은 이온이 포획되어 환원되는 단일염기 변이 검출방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서,

상기 제2 전극부에 형성된 상기 DNA 이중체에 불일치(mismatch) 염기로서 티민이 존재하는 경우에, 상기 티민과 상기 단일 티민 모노머 사이에, 상기 수은 이온이 포획되어 환원되고, 상기 금 이온과 반응하여 상기 금 아말감이 형성되는 단일염기 변이 검출방법.

청구항 8

청구항 5에 있어서,

상기 혼성화 단계와, 상기 모노머 및 이온 반응 단계 사이에,

한 쌍의 상기 전극부 각각에, 상기 프로브 DNA와 상보적으로 결합되는 야생형 DNA(wildtype DNA) 용액을 공급하여, 비혼성화된 상기 프로브 DNA와 상기 야생형 DNA를 혼성화하는 단계;를 더 포함하는 단일염기 변이 검출방법.

청구항 9

청구항 5에 있어서,

상기 이온 환원 단계와, 상기 금 아말감 형성 단계 사이에,

상기 제1 전극부에 상기 은 이온을 추가 반응시키고, 상기 제2 전극부에 상기 수은 이온을 추가 반응시키는 단계;를 더 포함하는 단일염기 변이 검출방법.

청구항 10

청구항 5에 있어서,

상기 신호 측정 단계 이전에,

상기 제1 전극부, 및 상기 제2 전극부를 세척하는 단계;를 더 포함하는 단일염기 변이 검출방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서,

상기 세척은, 음파처리(sonication)에 의해 수행되는 단일염기변이 검출방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단일염기변이 검출센서 및 검출방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 단일염기 불일치 DNA를 불일치 종류별로 구분 검출할 수 있는 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암은 전 세계 모든 지역에서 사망률이 높은 질병 중 하나에 해당한다. 암의 조기 진단은 사망률과 밀접한 관련이 있기 때문에, 암으로 인한 사망자 수를 줄이기 위해서는 정확하고 빠른 암 진단이 필수적이다. 현재까지 암 진단은 고형 조직을 사용하는 생검(고체 생검) 결과를 기반으로 하였으나, 인간 혈액에서 순환성 세포유리 DNA(circulating cell-free DNA, cfDNA)가 발견되면서 암과 cfDNA 사이의 관계에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 정상적인 인간 혈액에는 cfDNA가 포함되어 있는데, 이는 세포 사멸로 인한 것이다. 그러나 암 환자의 경우, 암 조직이 성장하는 동안 다수의 암 세포가 혈액으로 방출된다. 결과적으로 순환종양세포(circulating tumor cell, CTC)의 사멸로 인해, 혈액 내에 다량의 암 관련 돌연변이 DNA가 용해되어 존재하게 된다. 이 돌연변이 DNA를 순환종양 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)라고 하는데, ctDNA의 분석을 통해 암 진단, 예후 및 치료 정보를 얻을 수 있어서 ctDNA를 사용한 액체 생검의 중요성이 증대되고 있다. 액체 생검은 고체 생검보다 많은 장점이 있다. 고체 생검과 달리 액체 생검은 비침습적이므로, 환자는 통증을 겪지 않고 예후를 쉽게 얻을 수 있다. 또한, 단일 암 조직에서 단일 암 특성을 식별할 수 있는 고체 생검과 달리 액체 생검은 환자에게 존재하는 모든 종양의 유전적 특성을 확인할 수 있다.

[0004] 암 환자의 혈액에는 대량의 정상적인 야생형 DNA(wildtype DNA)와 매우 적은 양의 돌연변이 DNA가 동시에 존재하는데, 특히 단일염기변이(single nucleotide polymorphism, SNP)가 DNA 돌연변이 중에서 가장 빈번하게 발생한다. 단일염기변이는 DNA 염기서열에서 하나의 염기가 치환되어 나타나는 유전적 변이로, 병의 원인 또는 치료제에 대한 반응성 등에 있어 개인차가 있다. 이에 단일염기서열 변이의 검출과 확인은 맞춤 의약품 아니라 신약 개발에도 연결되기 때문에 그에 대한 관심이 증대되고 있다. 단일염기서열 변이의 신속한 검출을 위해서 다양한 방법이 사용되고 있다. 예를 들어, 정량적 PCR (Thierry, A.R., et al., The Journal of Molecular Diagnostics, 2011. 13(1): p. 64-73), digital PCR (Laurent-Puig, P., et al., Nat Med, 2014. 20(4): p. 430-435), 하부 변성 온도 PCR에서의 동시 증폭 (Zuo, Z., et al., Modern Pathology, 2009. 22(8): p. 1023-31) 및 켈빈 프로브 힘 현미경(KPFM) 등이 있다 (Jang, K., et al., Biosensors and Bioelectronics, 2017. 87: p. 222-228). 그러나 표적 유전자를 증폭시킴으로써 작동하는 PCR 기법은 몇 가지 증폭 단계를 수행하므로 필연적으로 가격이 비싸고 검출 과정 또한 매우 복잡하며, KPFM 방법은 실험실 환경의 요구, 높은 운영 비용 및 복잡한 치료 절차를 거쳐야 하는 단점이 있다.

[0005] 폐암은 가장 흔한 형태로서 사망률이 높은 암에 해당하고, 소세포폐암(small cell lung cancer, SCLC)과 비소세포폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC)의 두 가지 유형이 있다. 폐암 환자 중 약 80%에 이르는 NSCLC 환자에서 KRAS(Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) 돌연변이가 발견되는데, 최근 연구에서 KRAS 돌연변이가 약물을 사용한 NSCLC의 치료를 억제하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, KRAS 돌연변이의 검출을 통해 NSCLC 치료를 증진할 수 있을 것으로 기대된다.

[0006] KRAS 돌연변이 서열에서, 점 돌연변이(point mutation)는 엑손 2 내의 코돈 12 및 13에서 대부분 발생한다. 대부분의 돌연변이는 코돈 12 글리신 돌연변이(codon 12 glycine mutation)이기 때문에, 대부분의 점 돌연변이는 구아닌(guanine)에서 아데닌(adenine)으로, 구아닌(guanine)에서 티민(thymine)으로 치환된다. 이러한 이유로, KRAS 돌연변이는 대부분 시토신(cytosine) 또는 티민(thymine), 예컨대 AC 또는 TC 불일치(mismatch)를 포함하는 점 돌연변이이다. 따라서, 시토신 또는 티민이 존재하는 점 돌연변이의 검출은 KRAS 돌연변이 DNA의 검출에 필수적이다.

[0007] 이에 종래 단일염기변이 검출 기술의 문제점을 해결하고 고감도, 고선택성으로 단일염기변이를 검출하고 불일치 종류를 구분할 수 있는 기술이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 상술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 일 측면은 금속 이온 매개 DNA 이중체(metal ion-mediated DNA duplexe) 및 DPV(differential pulse voltammetry)를 사용하여, DPV 신호의 크기를 비교함으로써 5 가지 유형의 단일염기 불일치(CT, CC, TT, AC 및 TG)를 검출 및 구분할 수 있는 단일염기변이 검출센서 및 검출방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출센서는 전극 부재, 및 상기 전극 부재에 결합되고 타겟 DNA와 혼성화되어 DNA 이중체(DNA duplex)를 형성하는 적어도 하나 이상의 단일 가닥 프로브 DNA를 포함하는 한 쌍의 전극부; 한 쌍의 상기 전극부 중 어느 하나인 제1 전극부와 반응하는 단일 시토신 모노머(single cytosine monomer); 상기 제1 전극부에 형성된 상기 DNA 이중체의 불일치(mismatch) 염기인 시토신과, 상기 단일 시토신 모노머 사이에 포획되고, 은(Ag)으로 환원되는 은 이온; 한 쌍의 상기 전극부 중 다른 하나인 제2 전극부와 반응하는 단일 티민 모노머(single thymine monomer); 상기 제2 전극부에 형성된 상기 DNA 이중체의 불일치(mismatch) 염기인 티민과, 상기 단일 티민 모노머 사이에 포획되고, 수은(Hg)으로 환원되는 수은 이온; 금(Au)으로 환원되고, 상기 수은과 반응하여 금 아말감(Au amalgam)을 형성하는 금 이온; 및 상기 은 이온, 상기 수은 이온, 및 상기 금 이온을 환원시키는 환원제;를 포함한다.
- [0012] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출센서에 있어서, 상기 프로브 DNA는, 금(Au) 입자와 결합되는 적어도 하나 이상의 티올(thiol) 기를 구비하고, 상기 전극 부재는, 상기 티올 기와 결합되는 금(Au) 입자 층을 구비할 수 있다.
- [0013] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출센서에 있어서, 상기 제1 전극부, 및 상기 제2 전극부 각각에 전기적으로 연결되고, 상기 은 또는 상기 금 아말감에 의해 발생하는 산화 환원 전류를 측정하는 DPV(Differential Pulse Voltammetry) 장치;를 더 포함할 수 있다.
- [0014] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출센서에 있어서, 상기 DPV 장치에 의해 측정된 신호 피크 값의 상대적 크기를 비교하여 상기 타겟 DNA의 단일염기 불일치를 검출할 수 있다.
- [0015] 한편, 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출방법은 전극 부재에 적어도 하나 이상의 단일 가닥 프로브 DNA가 결합된 한 쌍의 전극부를 준비하는 단계; DNA 이중체(DNA duplex)가 형성되도록, 한 쌍의 상기 전극부 각각에, DNA 용액을 공급하여, 상기 프로브 DNA와 상기 용액 내의 DNA를 혼성화하는 단계; 한 쌍의 상기 전극부 중 어느 하나인 제1 전극부에 단일 시토신 모노머(single cytosine monomer) 및 은(Ag) 이온을 반응시키고, 다른 하나인 제2 전극부에 단일 티민 모노머(single thymine monomer) 및 수은(Hg) 이온을 반응시키는 단계; 상기 은 이온을 은으로 환원하고, 상기 수은 이온을 수은으로 환원하는 단계; 상기 수은에 금(Au) 이온을 반응시키고, 환원시켜 금 아말감(Au amalgam)을 형성하는 단계; 및 상기 제1 전극부, 및 상기 제2 전극부 각각에 대해 산화 환원 전류 신호를 측정하는 단계;를 포함한다.
- [0016] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출방법에 있어서, 상기 제1 전극부에 형성된 상기 DNA 이중체에 불일치(mismatch) 염기로서 시토신이 존재하는 경우에, 상기 시토신과 상기 단일 시토신 모노머 사이에, 상기 은 이온이 포획되어 환원될 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출방법에 있어서, 상기 제2 전극부에 형성된 상기 DNA 이중체에 불일치(mismatch) 염기로서 티민이 존재하는 경우에, 상기 티민과 상기 단일 티민 모노머 사이에, 상기 수은 이온이 포획되어 환원되고, 상기 금 이온과 반응하여 상기 금 아말감이 형성될 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출방법에 있어서, 상기 혼성화 단계와, 상기 모노머 및 이온 반응 단계 사이에, 한 쌍의 상기 전극부 각각에, 상기 프로브 DNA와 상보적으로 결합되는 야생형 DNA(wildtype DNA) 용액을 공급하여, 비혼성화된 상기 프로브 DNA와 상기 야생형 DNA를 혼성화하는 단계;를 더 포함할 수 있다.

- [0019] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출방법에 있어서, 상기 이온 환원 단계와, 상기 금 아말감 형성 단계 사이에, 상기 제1 전극부에 상기 은 이온을 추가 반응시키고, 상기 제2 전극부에 상기 수은 이온을 추가 반응시키는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출방법에 있어서, 상기 신호 측정 단계 이전에, 상기 제1 전극부, 및 상기 제2 전극부를 세척하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출방법에 있어서, 상기 세척은, 음파처리(sonication)에 의해 수행될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 특징 및 이점들은 첨부도면에 의거한 다음의 상세한 설명으로 더욱 명백해질 것이다.
- [0024] 이에 앞서 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이고 사전적인 의미로 해석되어서는 아니되며, 발명자가 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명에 따르면, DNA-DNA간 혼성화 반응, 불일치 염기인 시토신(C), 티민(T)에의 $C-Ag^+-C$, $T-Hg^{2+}-T$ 결합 반응, 및 금속 이온 치환 반응을 통해 얻어지는 DPV 신호 크기를 비교 분석함으로써, 저비용 및 고감도로 단일 불일치 DNA를 검출하고 그 불일치 종류를 구분할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출센서의 전극부를 개략적으로 도시한 사시도이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출센서를 작동순서에 따라 개략적으로 도시한 도면이다.
- 도 3은 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출센서에 의해 측정되는 DPV (Differential Pulse Voltammetry) 피크 그래프의 일례이다.
- 도 4는 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출방법의 순서도이다.
- 도 5의 (a)는 실시예에 따른 Ag 이온의 추가 공급 전(black line)과 후(red line)의 DPV 피크 그래프, 도 5의 (b)는 실시예에 따른 Hg 이온의 추가 공급 전(black line)과 후(red line)의 DPV 피크 그래프이다.
- 도 6은 실시예에 따른 전극 표면의 주사전자현미경(SEM) 이미지이다.
- 도 7은 대조 실험에 따라 측정된 DPV 피크 그래프이다.
- 도 8은 타겟 DNA의 농도에 따라 측정된 DPV 피크 그래프이다.
- 도 9는 단일 불일치 DNA 종류에 따라 측정된 결과 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 본 발명의 목적, 특정한 장점들 및 신규한 특징들은 첨부된 도면들과 연관되어지는 이하의 상세한 설명과 바람직한 실시예들로부터 더욱 명백해질 것이다. 본 명세서에서 각 도면의 구성요소들에 참조번호를 부가함에 있어서, 동일한 구성 요소들에 한해서는 비록 다른 도면상에 표시되더라도 가능한 한 동일한 번호를 가지도록 하고 있음에 유의하여야 한다. 또한, "제1", "제2" 등의 용어는 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하기 위해 사용되는 것으로, 구성요소가 상기 용어들에 의해 제한되는 것은 아니다. 이하, 본 발명을 설명함에 있어서, 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 관련된 공지 기술에 대한 상세한 설명은 생략한다.

- [0031] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시형태를 상세히 설명하기로 한다.
- [0033] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출센서의 전극부를 개략적으로 도시한 사시도이고, 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출센서를 작동순서에 따라 개략적으로 도시한 도면이다.
- [0034] 도 1 내지 도 2에 도시된 바와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 단일염기변이 검출센서는 전극 부재(11), 및 상기 전극 부재(11)에 결합되고 타겟 DNA(1)와 혼성화되어 DNA 이중체(DNA duplex)를 형성하는 적어도 하나 이상의 단일 가닥 프로브 DNA(13)를 포함하는 한 쌍의 전극부(10), 한 쌍의 전극부(10) 중 어느 하나인 제1 전극부(10a)와 반응하는 단일 시토신 모노머(single cytosine monomer, 20), 제1 전극부(10a)에 형성된 DNA 이중체의 불일치(mismatch) 염기인 시토신과, 단일 시토신 모노머(20) 사이에 포획되고, 은(Ag, 30a)으로 환원되는 은 이온(30), 한 쌍의 전극부(10) 중 다른 하나인 제2 전극부(10b)와 반응하는 단일 티민 모노머(single thymine monomer, 40), 제2 전극부(10b)에 형성된 DNA 이중체의 불일치(mismatch) 염기인 티민과, 단일 티민 모노머(40) 사이에 포획되고, 수은(Hg, 50a)으로 환원되는 수은 이온(50), 금(Au)으로 환원되고, 수은(50a)과 반응하여 금 아말감(Au amalgam, 60a)을 형성하는 금 이온(60), 및 은 이온(30), 수은 이온(50), 및 금 이온(60)을 환원시키는 환원제(70)를 포함한다.
- [0036] 본 발명에 따른 단일염기변이 검출센서는 단일염기 불일치 DNA를 불일치 종류별로 구분 검출할 수 있는 센서에 관한 것이다. 여기서, 단일염기변이는 단일염기의 차이를 보이는 변이로서, 단일염기다형성(single nucleotide polymorphism, SNP) 및 점 돌연변이(point mutation)를 포함하는 개념으로 사용된다. 일례로, 단일염기변이는 KRAS(Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) 돌연변이를 포함할 수 있고, 바람직하게는 엑손 2 내의 코돈 12 및 13에서 발생하는 점 돌연변이일 수 있다. 상기 KRAS 유전자 변이는 여러 종류의 암과 관련된 유전체 변이로 알려져 있으며, 폐암의 경우 anti-EGFR 화학요법에 내성이 있는 환자에게서 KRAS 변이가 나타나는 것이 확인되었는데, KRAS 변이를 진단한다면 치료의 예후를 예측함으로써 환자의 치료방침을 미리 결정할 수 있는 유용한 정보를 제공할 수 있다. 따라서 본 발명에 있어서, 단일염기변이 검출은 폐암환자의 약물에 대한 반응성을 예측하기 위한 것일 수 있고, 상기 폐암은 비소세포 폐암일 수 있다. 다만, 본 발명에 따른 단일염기변이 검출센서가 반드시 폐암이나 상기 용도에 한정되어 사용되는 것은 아니다.
- [0037] 구체적으로, 본 발명에 따른 단일염기변이 검출센서는 전극부(10), 단일 시토신 모노머(20), 은 이온(30), 단일 티민 모노머(40), 수은 이온(50), 금 이온(60), 및 환원제(70)를 포함한다.
- [0039] 여기서, 전극부(10)는 전극 부재(11), 및 프로브 DNA(13)로 형성된다. 전극 부재(11)는 전기전도성을 가지는 부재로서, 그 표면에 프로브 DNA(13)가 결합된다. 프로브 DNA(13)는 야생형(wildtype) 또는 타겟 DNA(1)와 혼성화되는 단일 가닥의 DNA 단편으로 구현된다. 여기서, 혼성화(hybridization)는 2개의 단일 가닥 핵산이 상보적인 염기서열들의 페어링(pairing)에 의해 DNA 이중체 구조(DNA duplex structure)를 형성하는 것으로서, 상기 프로브 DNA(13)와 야생형 DNA 간에 상보성이 완전하여 완전상보 결합(perfect match)되거나, 또는 상기 프로브 DNA(13)와 타겟 DNA(1) 간에 일부 불일치(mismatch) 염기가 존재하는 경우에도 일어날 수 있다.
- [0040] 한편, 프로브 DNA(13)가 전극 부재(11)에 결합되기 위해서, 프로브 DNA(13)는 적어도 하나 이상의 티올(thiol) 기(14)를 구비할 수 있다. 티올 기(14)는 금(Au) 입자와 강한 공유결합을 하므로, 전극 부재(11)의 표면에 금(Au) 입자 층(15)이 구비됨으로써, 프로브 DNA(13)가 티올 기(14)를 매개로 전극 부재(11)에 결합될 수 있다. 여기서, 티올 기(14)는 프로브 DNA(13)의 말단에 연결되는 것이 바람직하지만, 양말단 사이의 중간부에 연결되어도 무방하며, 하나 또는 그 이상 다수 개가 구비될 수 있다.
- [0041] 이렇게 형성되는 전극부(10)는 2개가 한 쌍으로 마련되며, 그 중 하나인 제1 전극부(10a)에는 $C-Ag^+-C$ (Cytosine- Ag^+ -Cytosine) 결합이, 다른 하나인 제2 전극부(10b)에는 $T-Hg^{2+}-T$ (Thymine- Hg^{2+} -Thymine) 결합이 유도된다.
- [0043] 단일 시토신 모노머(single cytosine monomer, 20), 및 은 이온(30)은 상기 $C-Ag^+-C$ 결합을 유도하기 위해 제1 전극부(10a)에 제공된다. 이때, 용액에 분산된 상태로 공급될 수 있다. 제1 전극부(10a)에 형성된 DNA 이중체에

불일치 염기로서 시토신이 포함된 경우, 그 불일치 염기인 시토신과 단일 시토신 모노머(20) 사이에 은 이온(30)이 포획되어 C-Ag⁺-C 결합이 형성된다.

[0045] 한편, 단일 티민 모노머(40)(single thymine monomer), 및 수은 이온(50)은 제2 전극부(10b)에 공급되어, 상기 T-Hg²⁺-T 결합을 형성한다. 이때, 용액에 분산된 상태로 공급될 수 있다. 제2 전극부(10b)의 DNA 이중체에 불일치 염기로서 티민이 포함된 경우, 그 불일치 염기인 티민과 단일 티민 모노머(40) 사이에 수은 이온(50)이 포획되어 T-Hg²⁺-T 결합이 생성된다.

[0047] 환원제(70)는 시토신 모이어티(moieties) 사이에 결합된 은 이온(30), 및 티민 모이어티 사이에 결합된 수은 이온(50)을 각각 환원시킨다. 따라서, DNA에 존재하는 불일치 시토신에는 은(30a)이, 불일치 티민에는 수은(50a)이 결합된다. 여기서, 사용되는 환원제(70)의 일례로는 하이드로퀴논(hydroquinone)을 들 수 있다.

[0048] 또한, 환원제(70) 존재하에서, 은 이온(30)과 수은 이온(50)이 환원된 뒤에 상기 은 이온(30) 및 수은 이온(50)이 추가로 공급될 수 있다. 이 경우에, 이미 환원되어 불일치 염기에 결합된 은(30a) 및 수은(50a), 즉 금속 입자를 중심으로, 추가 공급된 은 이온(30) 및 수은 이온(50)이 그 금속 입자 주변으로 환원됨에 따라 금속이 증폭된다. 이러한 금속 증폭으로 인해 고감도의 감지 신호를 얻을 수 있다.

[0050] 한편, 금 이온(60)은 상기 제2 전극부(10b)에 공급된다. 여기서, 금 이온(60)은 상기 환원제(70)에 의해 환원되면서, 불일치 염기에 결합된 수은(50a)과 반응하여, 금 아말감(Au amalgam, 60a)을 형성하게 된다. 결국, 제1 전극부(10a)에 시토신을 포함하는 단일 불일치가 존재하는 경우에 그 DNA 돌연변이에는 은(30a)이 결합되고, 제2 전극부(10b)에 티민을 포함하는 단일 불일치가 존재하는 경우에 그 DNA 돌연변이에는 금 아말감(60a)이 생성된다. 한편, 제1 전극부(10a) 및/또는 제2 전극부(10b)에 형성된 DNA 이중체에 단일 불일치 염기가 존재하지 않는 경우, 즉 야생형 DNA와 프로브 DNA(13)가 혼성화된 경우에는, 제1 전극부(10a) 및/또는 제2 전극부(10b)에는 은(30a)이나 금 아말감(60a)이 결합되지 않는다.

[0052] 상기와 같이, 은(30a) 및 금 아말감(60a) 생성이 완료되면, DPV(Differential Pulse Voltammetry) 신호를 측정한다. 이를 위해, DPV 장치가 사용되는데, DPV 장치는 제1 전극부(10a) 및 제2 전극부(10b) 각각에 전기적으로 연결되어, 은(30a) 또는 금 아말감(60a)에 의해 발생하는 산화 환원 전류를 측정한다. 여기서 측정된 DPV 신호 피크 값의 상대적 크기를 비교하여 타겟 DNA(1)의 단일염기 불일치를 검출할 수 있다. 이때, 피크 값은 전극부(10)에 생성된 금속의 양에 비례한다.

[0053] 도 3은 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출센서에 의해 측정되는 DPV 피크 그래프의 일례이다. 여기서, 회색 라인(gray line)은 제1 전극부(10a)의 은(30a)에 의한 피크이고, 노란색 라인(yellow line)은 제2 전극부(10b)의 금 아말감(60a)에 의한 피크를 나타낸다. 도 3의 (a)는 야생형 DNA인 경우에서의, 도 3의 (b)는 CT 불일치 DNA인 경우에서의, 도 3의 (c)는 CC 불일치 DNA의 경우에서의 DPV 신호이다. 도 3을 참고로, 야생형 DNA의 경우에는 제1 전극부(10a) 및 제2 전극부(10b)에 은 이온(30)과 수은 이온(50)이 결합하지 못하므로 은(30a)에 의한 피크와 금 아말감(60a)에 의한 피크가 모두 발생하지 않는다. 반면, CT 불일치 DNA의 경우에는 불일치 염기인 시토신(C)에 은 이온(30)이 결합되고, 불일치 염기인 티민(T)에 수은 이온(50)이 결합하여, 은(30a) 및 금 아말감(60a) 모두에 피크가 나타난다. 또한, CC 불일치 DNA의 경우에는 은 이온(30)과 결합할 수 있는 곳, 즉 불일치 염기(시토신)가 2개 존재하지만, 수은 이온(50)과 결합할 수 있는 곳이 없으므로, 은(30a)에 의한 피크가 CT 불일치 DNA일 때보다 상대적으로 더 높게 나타나고, 금 아말감(60a)에 의한 피크는 나타나지 않는다. 한편, 도시되지는 않았지만 위와 같은 원리로, TT 불일치 DNA의 경우에는 은(30a)에 의한 피크가 나타나지 않고, 금 아말감(60a)에 의한 피크가 CT 불일치 DNA에 비해 높게 나타난다. 또한, CA 불일치 DNA에서는 은(30a)에 의한 피크가 나타나지만, 금 아말감(60a)에 의한 피크는 나타나지 않는다. 이와 반대로, TG 불일치 DNA의 경우에는 은(30a)에 의한 피크가 나타나지 않고, 금 아말감(60a)에 의한 피크만 나타난다. 따라서, 본 발명에 따른 단일염기변이 검출센서에 따르면, 단일 불일치 DNA를 검출하고 다섯 가지 종류의 불일치(CT, CC, TT, CA, TG)를 구분할 수 있다.

- [0055] 이하에서는 본 발명에 따른 단일염기변이 검출방법에 대해 설명한다. 여기서, 단일염기변이 검출센서에서 설명한 내용과 중복되는 사항에 대해서는 설명을 생략하거나 간단하게만 기술한다.
- [0056] 도 4는 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출방법의 순서도이다.
- [0057] 도 4를 참고로, 본 발명의 실시예에 따른 단일염기변이 검출방법은 전극 부재에 적어도 하나 이상의 단일 가닥 프로브 DNA가 결합된 한 쌍의 전극부를 준비하는 단계(S100), DNA 이중체(DNA duplex)가 형성되도록, 한 쌍의 상기 전극부 각각에, DNA 용액을 공급하여, 프로브 DNA와 용액 내의 DNA를 혼성화하는 단계(S200), 한 쌍의 전극부 중 어느 하나인 제1 전극부에 단일 시토신 모노머(single cytosine monomer) 및 은(Ag) 이온을 반응시키고, 다른 하나인 제2 전극부에 단일 티민 모노머(single thymine monomer) 및 수은(Hg) 이온을 반응시키는 단계(S300), 은 이온을 은으로 환원하고, 수은 이온을 수은으로 환원하는 단계(S400), 수은에 금(Au) 이온을 반응시키고, 환원시켜 금 아말감(Au amalgam)을 형성하는 단계(S500), 및 제1 전극부, 및 제2 전극부 각각에 대해 산화 환원 전류 신호를 측정하는 단계(S600)를 포함한다.
- [0059] 본 발명에 따른 단일염기변이 검출방법은 전술한 단일염기변이 검출센서를 이용해 단일염기변이를 검출하는 방법에 관한 것으로, 전극부 준비 단계(S100), 혼성화 단계(S200), 모노머 및 이온 반응 단계(S300), 이온 환원 단계(S400), 금 아말감 형성 단계(S500), 및 신호 측정 단계(S600)를 포함한다.
- [0061] 전극부 준비 단계(S100)에서는 전극 부재에 적어도 하나 이상의 프로브 DNA가 결합된 한 쌍의 전극부를 준비한다. 여기서, 표면에 금 입자가 코팅되어 금 입자 층이 형성된 전극 부재와, 적어도 하나 이상의 티올 기를 구비하는 프로브 DNA를 준비하고, 티올 기와 금 입자 층 사이에 공유결합을 유도하여 전극부를 2개 준비할 수 있다. 이때, 프로브 DNA는 야생형(wildtype) 또는 타겟 DNA와 혼성화되는 단일 가닥의 DNA 단편을 사용한다.
- [0063] 혼성화 단계(S200)는 한 쌍의 전극부 각각에 DNA 용액을 공급하여, 전극부의 프로브 DNA와 DNA 용액 내의 DNA 간에 DNA 이중체를 형성하는 공정이다. 여기서, DNA 용액은 검출 대상이 되는 DNA를 포함하는 시료로서, 그 용액을 둘로 나누어, 한 쌍의 전극부 중 하나인 제1 전극부와 다른 하나인 제2 전극부에 공급한다. 이때, DNA 용액 내에 함유된 DNA가 야생형 DNA인 경우에는 프로브 DNA와 완전 상보적으로 결합하지만, 그 DNA가 돌연변이 DNA(타겟 DNA)인 경우에는 DNA 이중체에 단일 불일치 염기가 존재하게 된다.
- [0064] 한편, 각각의 전극부는 적어도 하나 이상의 프로브 DNA를 가지는데, 그 중 DNA 용액 내의 DNA와 혼성화되지 않은 프로브 DNA가 있을 수 있다. 이에, 야생형 DNA 용액을 공급함으로써, 상기 혼성화 단계(S200)에서 비혼성화된 프로브 DNA와 야생형 DNA를 혼성화하여, 비혼성화된 프로브 DNA가 존재하지 않도록 조절할 수 있다.
- [0066] 모노머 및 이온 반응 단계(S300)에서는, 각각 DNA 이중체가 형성된 제1 전극부에 단일 시토신 모노머 및 은 이온을 반응시키고, 제2 전극부에 단일 티민 모노머 및 수은 이온을 반응시킨다. 이때, DNA 이중체에 단일 불일치 염기로서 시토신이 존재하는 경우에는 제1 전극부에서 시토신과 단일 시토신 모노머 사이에 은 이온이 포획되어 $C-Ag^+-C$ (Cytosine- Ag^+ -Cytosine) 결합이 생성된다. 또한, 단일 불일치 염기로서 티민이 존재하면, 티민과 단일 티민 모노머 사이에 수은 이온이 포획되어 제2 전극부에 $T-Hg^{2+}-T$ (Thymine- Hg^{2+} -Thymine) 결합이 생성된다. 반면, 야생형 DNA가 전극부와 반응한 경우에는 그 전극부에 상기와 같은 결합이 유도되지 않는다.
- [0068] 이온 환원 단계(S400)는 환원제를 사용하여 은 이온과 수은 이온을 각각 환원시키는 공정이다. 이때, 환원제로서 하이드로퀴논(hydroquinone)을 사용할 수 있다. 여기서, 은 이온은 은으로, 수은 이온은 수은으로 환원된다.
- [0069] 한편, 금속 이온이 환원된 후에, 시차를 두고 금속 이온을 추가 반응시키는 금속 증폭 단계(S450)를 추가적으로 진행할 수 있다. 여기서, 환원제 존재하에, 제1 전극부에 은 이온을 추가로 반응시키고, 제2 전극부에 수은 이온을 추가로 반응시킨다. 이때, 제1 전극부에 결합된 은 금속 입자 주변으로 추가된 은 이온이 환원되어 은 금속이 증폭되고, 제2 전극부에 결합된 수은 금속 입자 주변으로 추가된 수은 이온이 환원되어 수은 금속이 증폭

된다.

[0071] 금 아말감 형성 단계(S500)에서는 환원제 존재하의 제2 전극부에 금 이온을 첨가하여, 금과 수은 간의 반응을 통해 금 아말감을 형성한다.

[0072] 다음에, 원치 않은 이유로 남아있는 금속을 제거하기 위해서, 제1 전극부 및 제2 전극부에 대해서 세척 공정을 진행할 수 있다. 이때, 세척은 음파처리(sonication)에 의해 수행될 수 있다.

[0074] 신호 측정 단계(S600)는 제1 전극부 및 제2 전극부 각각에 대해 DPV를 이용해 산화 환원 전류 신호를 측정하는 공정이다. 여기서, DPV 신호는 제1 전극부에 생성된 은의 양과, 제2 전극부에 생성된 금 아말감의 양에 따라 상대적 크기가 결정된다. 따라서, 시료(DNA 용액) 내의 DNA가 야생형 DNA인 경우에는 은 및 금 아말감에 의한 DPV 피크 신호가 존재하지 않지만, 불일치 DNA인 경우에는 은 및/또는 금 아말감에 의한 피크 신호가 존재하고, 그 양에 따라 피크 값의 상대적인 크기가 달라진다. CT 불일치 DNA인 경우에는 은 및 금 아말감에 의한 DPV 피크 신호가 존재하게 되고, CC 불일치 DNA인 경우에는 금 아말감에 의한 신호는 발생하지 않고 CT 불일치 DNA에 비해 은에 의한 피크가 더 높게 나타난다. 또한, TT 불일치 DNA의 경우에는 은에 의한 피크가 발생하지 않고, 금 아말에 의한 피크가 CT 불일치 DNA보다 상대적으로 높게 나타난다. CA 불일치 DNA에서는 은에 의한 피크만 존재하고, TG 불일치 DNA에서는 금 아말감에 의한 피크만이 존재하게 된다.

[0076] 종합적으로, 본 발명에 따르면, 시토신 모이어티 사이에 결합된 은 이온, 및 티민 모이어티 사이에 결합된 수은 이온의 특성을 이용하여 점 돌연변이 검출을 수행할 수 있다. 여기서, 각 금속 이온을 돌연변이 DNA에 결합시키고 금속 이온을 환원시킨 후 DPV 신호를 측정하며, 추가적인 신호 증폭을 통해 저농도 DNA를 검출할 수 있다.

[0078] 이하에서는 구체적인 실시예 등을 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0080] 1. 재료 및 방법

[0081] 1-1. 재료

[0082] 본 발명의 실시예 등에 사용된 질산은(AgNO_3), 수은 (II) 클로라이드 (HgCl_2), 금 (III) 클로라이드 용액 (HAuCl_4), 염화나트륨(NaCl), Tris-HCl 용액 (pH 8.3), 트리스 (2-카르복시에틸) 포스핀 하이드로클로라이드 (tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride, TCEP), 시티딘 5'-모노포스페이트 (cytidine 5' -monophosphate, $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_8\text{P}$), 티미딘 5'-모노포스페이트(thymidine 5' -monophosphate, $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8\text{P}$), 하이드로 퀴논(hydroquinone, $\text{C}_6\text{H}_4\text{-1,4-(OH)}_2$) 및 포스페이트 완충 식염수(PBS, pH 7.4)를 시그마 알드리치(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 올리고뉴클레오타이드는 Integrated DNA Technology(CA, USA)에서 구매하고 고성능 액체 크로마토 그래피(HPLC)로 정제하였다. DNA의 서열은 표 1과 같다.

표 1

[0083]

DNA	DNA sequences (5' to 3')
Probe DNA	/Thiol/ACT CTT GCC TAC GCC ACC AGC TCC AAC TAC
Wildtype DNA	GTA GTT GGA GCT GGT GGC GTA GGC AAG AGT
Target DNA (c.35 G>T)	GTA GTT GGA GCT GTT GGC GTA GGC AAG AGT
CC mismatched DNA	GTA GTT GGA GCT GGT GCC GTA GGC AAG AGT
TT mismatched DNA	GTA GTT GGA GCT GGT GGC GTT GGC AAG AGT
AC mismatched DNA (c.35 G>A)	GTA GTT GGA GCT GAT GGC GTA GGC AAG AGT
TG mismatched DNA (c.39 C>T)	GTA GTT GGA GCT GGT GGT GTA GGC AAG AGT
SH-C10 DNA	/Thiol/CCC CCC CCC C
C10 DNA	CCC CCC CCC C
SH-T10 DNA	/Thiol/TTT TTT TTT T
T10 DNA	TTT TTT TTT T

Random DNA 1	GAC ATC ACG GTA CAC TCT TGC CTA CGC CAC AGT AC
Random DNA 2 (EGFR)	AGA AAG TTA AAA TTC CCG TCG CTA TCA AGG CAT CTC CGA AAG CCA ACA AGG AAA TCC TCG

- [0084] 또한, 표면 직경이 4mm 인 220 AT Gold screen-printed electrode(SPE), 금 작업전극(gold working electrode), 금 상대전극(gold counter electrode), 은 기준전극(silver reference electrode)을 사용하였다 (Dropsens, Spain).
- [0085] 1-2. SPE 기능화
- [0086] Thiol-modified DNA를 활성화하기 위해 TCEP 10mM과 프로브 DNA 200 nM을 올리고 23 °C에서 1시간 동안 반응시켰다. Gold Screen Printed Electrode(SPE)에 활성화된 프로브 DNA 200nM을 4시간 동안 반응시켰다. DI water로 세척하고 다양한 농도(200 nM ~ 2 pM)의 타겟 DNA와 NaCl 200 mM을 올리고 45분 동안 기다렸다. 이후 DI water로 세척하고 야생형 DNA 200 nM을 넣고 45분 동안 반응시켜서 남아있는 단일 DNA를 제거했다.
- [0088] 1-3. C-Ag⁺-C 및 T-Hg²⁺-T 결합 및 증폭
- [0089] 하나의 gold SPE에 250 μM AgNO₃와 1 μM C monophosphate를, 남은 하나의 gold SPE에 500 μM HgCl₂와 1 μM T monophosphate를 올렸다. 동시에 넣으면 서로 간섭이 발생하므로 타겟을 나누어 2가지로 실험했다. 30분 후, DI water로 세척하고 0.5 M Hydroquinone을 올려서 10분 동안 환원시켰다.
- [0090] 0.5 M Hydroquinone에 250 μM AgNO₃와 500 μM HgCl₂를 각각 넣어서 10분 동안 증폭시켰다. 이후 HgCl₂를 넣은 샘플에는 1 mM HAuCl₄를 넣고 10분 동안 기다려서 금 아말감을 생성했다. 증폭이 끝난 각각의 샘플에는 gold SPE에 원치 않게 남아있는 금속이 있으므로 음파처리(sonication)을 통해 이들을 제거했다.
- [0092] 1-4. 전기화학 측정
- [0093] Compactstat(Ivium Technologies BV, Netherlands)를 사용하여, 0.01 M PBS 및 0.3 M Tris HCl 용액에서 DPV 측정을 수행하였다. 이때, equilibration time은 5 s, pulse time은 10 ms, pulse amplitude은 50 Mv, E step은 2 mV, scan rate는 50 mV/s로 설정하였다. Ag의 경우 전위 범위는 0 내지 0.2 V, Hg의 경우는 -0.25 내지 0.25 V였다.
- [0095] 1-5. TM-AFM (Tapping-mode atomic force microscopy) 분석
- [0096] bare Au SPE, 프로브 modified Au SPE 및 타겟 modified Au SPE 사이의 표면 거칠기 차이를 확인하기 위해 AFM 이미지를 분석하였다.
- [0098] 2. 결과
- [0099] 2-1. 추가적인 금속 환원을 통한 신호 증폭 효과 확인
- [0100] 신호 증폭은 SNP를 고감도로 검출하기 필요하다. 전술한 바와 같이, 환원제인 하이드로퀴논을 사용한 후 금속 이온을 추가로 첨가했다. 금속 이온의 추가적 첨가가 없는 경우에, 환원된 금속의 양은 매우 적다. 그러나 금속 이온의 추가적 첨가를 통해서 DNA 붙일지 당 많은 금속 이온이 환원된다. 이를 통해 고감도로 돌연변이 DNA를 검출할 수 있다.
- [0101] 도 5의 (a)는 실시예에 따른 Ag 이온의 추가 공급 전(black line)과 후(red line)의 DPV 피크 그래프, 도 5의 (b)는 실시예에 따른 Hg 이온의 추가 공급 전(black line)과 후(red line)의 DPV 피크 그래프이다. 도 5를 참고로, 금속 이온의 추가적 첨가에 따른 금속 증폭으로 인해 DPV 피크 값이 상당히 증가하는 것을 알 수 있다.
- [0102] 도 6은 실시예에 따른 전극 표면의 주사전자현미경(SEM) 이미지이다. 도 6의 (a)는 bare 전극 표면의 SEM 이미지로, bare 전극의 표면에는 어떠한 것도 부착되지 않았기 때문에 전극 표면 이외의 물질이 발견되지 않았다.

도 6의 (b)는 프로브 DNA가 부착된 전극 표면의 SEM 이미지인데, SEM으로는 DNA를 확인할 수 없기 때문에, 프로브 DNA가 부착된 전극도 bare 전극처럼 비교적 깨끗하게 보였다.

[0103] 도 6의 (c) 및 (e)는 신호 증폭 전의 전극 표면의 SEM 이미지로, 도 6의 (c)에서는 DNA 불일치 사이에 결합된 Ag 이온이 환원된 것이 확인되고, 도 6의 (e)에서는 Hg 이온이 환원되고 Au 이온과 반응하여 형성된 Au 아말감이 확인된다.

[0104] 도 6의 (d) 및 (f)는 증폭 처리 후의 SEM 이미지이다. 환원제 사용 후에 더 많은 Ag 이온이 첨가되었기 때문에, 도 6의 (c)에서보다 (d)에서 더 많은 입자가 관찰된다. 마찬가지로, 환원제와 반응한 후 추가적인 Hg 및 Au 이온의 첨가로 인해 도 6의 (e)에서보다 (f)에서 더 많은 아말감 입자가 관찰된다. 종합적으로, 신호 증폭은 전극 표면에서 더 많은 금속을 환원시켜 고감도 감지 신호를 생성한다.

[0106] 2-2. 대조 실험 결과

[0107] 본 발명에 따른 불일치 DNA의 검출이 제대로 이루어지는지 확인하기 위해 대조 실험을 수행하였다. 도 7은 대조 실험에 따라 측정된 DPV 피크 그래프로서, (a)는 Ag 이온을, (b)는 Au 아말감을 사용하여 표적 DNA를 검출하는 DPV 피크 그래프이다. 본 대조 실험은 0 M (gray line) 및 200 nM (red line) 타겟 DNA와 200 nM 야생형 DNA (black line)를 사용하여 수행하였다.

[0108] 도 7을 참고로, 200 nM 야생형 DNA 및 0 M 타겟 DNA가 존재할 때에, 두 그래프에는 피크가 매우 작았다. 그 이유는 야생형 및 0 M 타겟에 대한 실험에서 DNA 이중체 사이에 불일치가 없어서, Ag 이온과 Hg 이온이 결합되지 않았기 때문이다. 반면, 200 nM 타겟 DNA의 존재 하에서는 큰 피크가 나타났다. 이는 Ag 이온과 Hg 이온이 불일치한 DNA 이중체에 결합되고 환원제(하이드로퀴논)에 의해 완전히 환원되었기 때문이다. 대조 실험의 결과는 Ag 이온 및 Hg 이온을 사용한 SNP 검출이 잘 작동함을 보여준다.

[0110] 2-3. 타겟 DNA 검출 효과 검증

[0111] 도 8은 타겟 DNA의 농도에 따라 측정된 DPV 피크 그래프로서, Ag 이온 및 Hg 이온을 사용하여 타겟 DNA를 검출한 결과이다. 여기서, 다양한 농도의 타겟 DNA를 사용하여 검출을 수행하였다. 도 8의 (a) 및 (b)는 Ag 이온을 사용한 타겟 검출 결과를 나타내는데, 타겟 DNA의 농도가 감소함에 따라, Ag로 인한 DPV 피크도 감소하였다. 이는 타겟 DNA의 양이 증가함에 따라 더 많은 Ag 이온이 결합하고 결과적으로 전극 표면에서 환원된 Ag의 양도 증가한다는 것을 의미한다. 이러한 이유로, 높은 농도의 타겟이 존재할 때에 높은 DPV 피크가 나타난다.

[0112] 도 8의 (c) 및 (d)는 Au 아말감을 사용한 타겟 검출 결과를 나타낸다. 이를 참조로, Ag 이온을 사용한 경우와 같이, Au 아말감으로 인한 DPV 피크도 타겟 DNA의 농도가 감소함에 따라 감소하였다. 이는 타겟의 농도가 증가함에 따라 단일 불일치 DNA 이중체의 양이 증가하고, 이로 인해 더 많은 Hg 이온이 결합하며, Hg 이온이 많을수록 Au 이온으로 환원될 때 Au 아말감이 더 많이 생성되는 것을 의미하고, 높은 농도의 타겟이 존재할 때 큰 DPV 피크가 나타나는 이유가 된다.

[0113] 본 방법의 검출한계(LOD)는 3가지 표준 편차 규칙에 의해 계산되었다. 2 pM 타겟의 경우, DPV 피크는 대조군에 비해 유의미하지 않았다(0 M). 그러나, 20 pM의 농도에서 DPV 값은 대조군의 표준 편차보다 11.5 (Ag 이온을 사용한 검출) 배 및 3.9 (Au 아말감을 사용한 검출) 배였다. 이 결과는 본 방법의 LOD가 20 pM임을 보여준다.

[0115] 2-4. 점 돌연변이 불일치 판별 평가

[0116] 본 발명은 각각 시토신 및 티민과 반응하는 Ag 이온 및 Hg 이온을 사용하고, 2개의 금속 이온으로부터 생성된 DPV 값의 크기를 비교함으로써 시토신 및 티민이 존재하는 모든 DNA 불일치를 구별할 수 있다.

[0117] 도 9는 단일 불일치 DNA 종류에 따라 측정된 결과 그래프로서, CT, CC, TT, AC 및 TG 불일치 DNA 별 Ag 이온 및 Au 아말감에 의한 측정 결과를 나타낸다. 여기서, DNA의 농도는 200 nM이었고, 검은색 막대는 Ag 이온을, 빨간색 막대는 Au 아말감을 각각 사용하여 감지된 단일 불일치 DNA의 DPV 결과를 나타낸다. 그래프에서 Normalized I_p 는 I_{CT}/I_A 값을, I_{CT} 는 CT 불일치 DNA의 DPV 피크 값을, I_A 는 CT, CC, TT, AC, 및 TG 불일치 DNA 각각의 DPV 피크 값을 나타낸다.

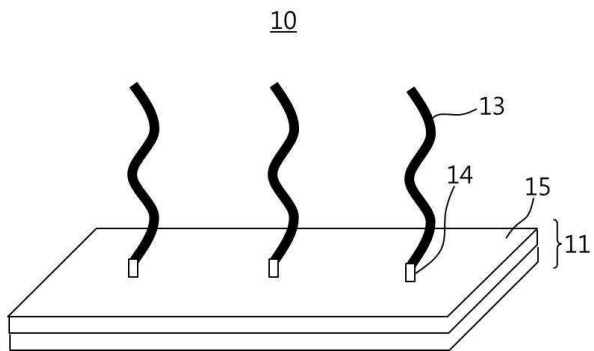
- [0118] CT, CC 및 AC 불일치 DNA는 시토신과 관련되므로, Ag 이온이 결합된다. CT, TT 및 TG 불일치 DNA에는 티민이 포함되어 있기 때문에 Hg 이온이 결합하여 Au 아말감이 생성된다. CT 불일치 DNA가 검출되었을 때, Ag-유도 DPV 신호 및 Au 아말감-유도 DPV 신호가 모두 나타난다. 이는 Ag 이온이 시토신에 결합하고, Hg 이온이 티민에 결합했기 때문이다.
- [0119] CC 불일치 DNA 및 TT 불일치 DNA 검출 결과에서는 각각 Ag 유도 DPV 신호와 Au 아말감 유도 DPV 신호만이 나타났다, 각 신호는 다른 값에 비해 매우 크다. CC 불일치 DNA에서는 Hg가 결합할 수 없기 때문에 Au 아말감 유도 DPV 신호는 거의 나타나지 않았고, Ag 이온은 단일 시토신과 프로브 DNA 사이, 및 단일 시토신과 타겟 DNA 사이의 다른 두 영역에 결합하므로, 다른 검출 결과와 비교하여 큰 DPV 신호가 관찰된다. TT 불일치 DNA는 CC 불일치 DNA와 동일한 이유로 상대적으로 큰 Au 아말감 유도 DPV 신호를 생성한다.
- [0120] AC 및 TG 불일치 DNA 검출 결과에서는 Ag와 Hg로 인한 DPV 신호만이 관찰되는데, 이는 Ag 이온만이 AC 불일치 DNA에 결합하고, Hg 이온만이 TG 불일치 DNA에 결합할 수 있기 때문이다. 그러나 각 DPV 신호의 크기는 CC 및 TT 불일치일 때의 크기보다 작고, CT 불일치 DNA의 크기와는 거의 동일하게 나타난다. 이는 CC 및 TT 불일치와 달리 AC 및 TG 불일치 DNA의 경우에는 Ag 이온과 Hg 이온이 결합할 수 있는 곳이 하나뿐이기 때문이다.
- [0121] 위의 결과를 토대로, Ag 유도 DPV 및 Au 아말감 유도 DPV 신호의 상대적 크기를 비교함으로써 시토신 또는 티민을 함유하는 불일치 DNA의 종류를 구별할 수 있다.
- [0123] 이상 본 발명을 구체적인 실시예를 통하여 상세히 설명하였으나, 이는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명은 이에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상 내에서 당 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의해 그 변형이나 개량이 가능함이 명백하다.
- [0124] 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 모두 본 발명의 영역에 속한 것으로 본 발명의 구체적인 보호 범위는 첨부된 특허청구범위에 의하여 명확해질 것이다.

부호의 설명

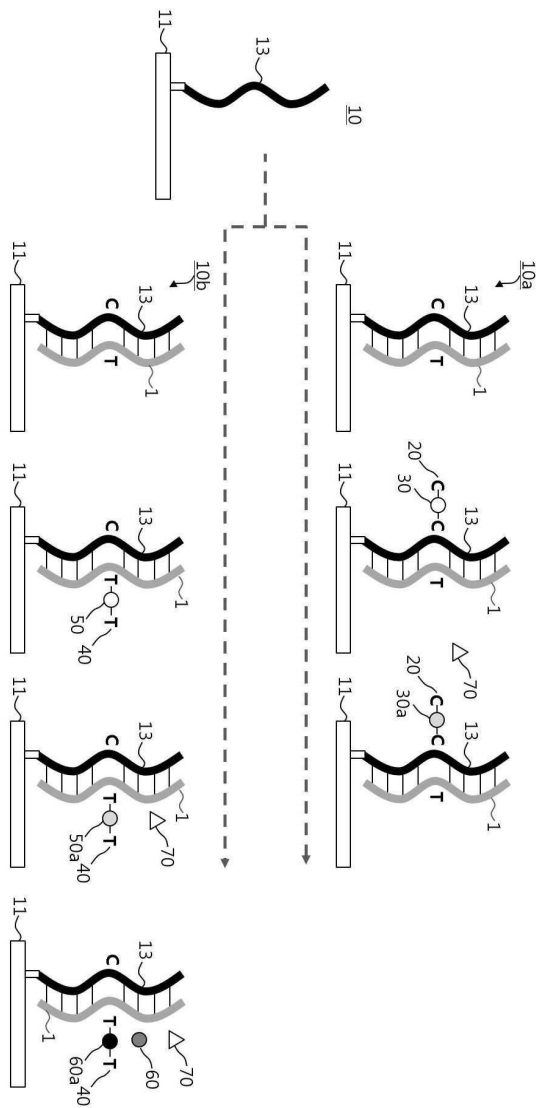
- [0126] 1: 타겟 DNA 10: 전극부
- 10a: 제1 전극부 10b: 제2 전극부
- 11: 전극 부재 13: 프로브 DNA
- 14: 티올 기 15: 금 입자 층
- 20: 단일 시토신 모노머 30: 은 이온
- 30a: 은 40: 단일 티민 모노머
- 50: 수은 이온 50a: 수은
- 60: 금 이온 60a: 금 아말감
- 70: 환원제

도면

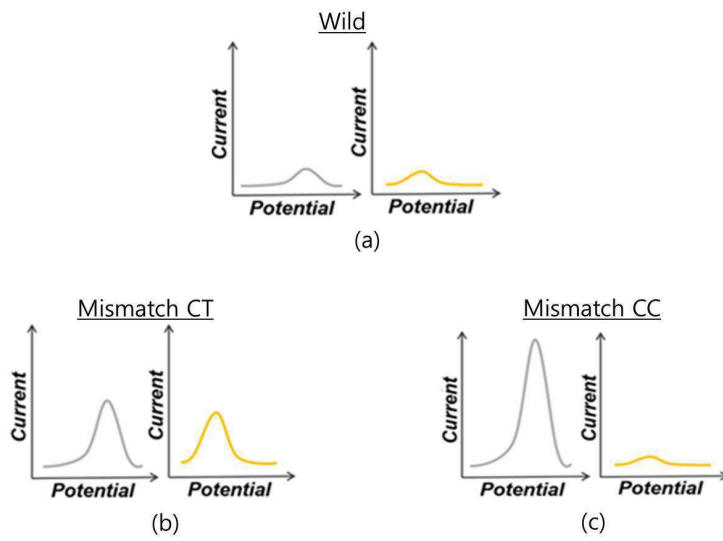
도면1



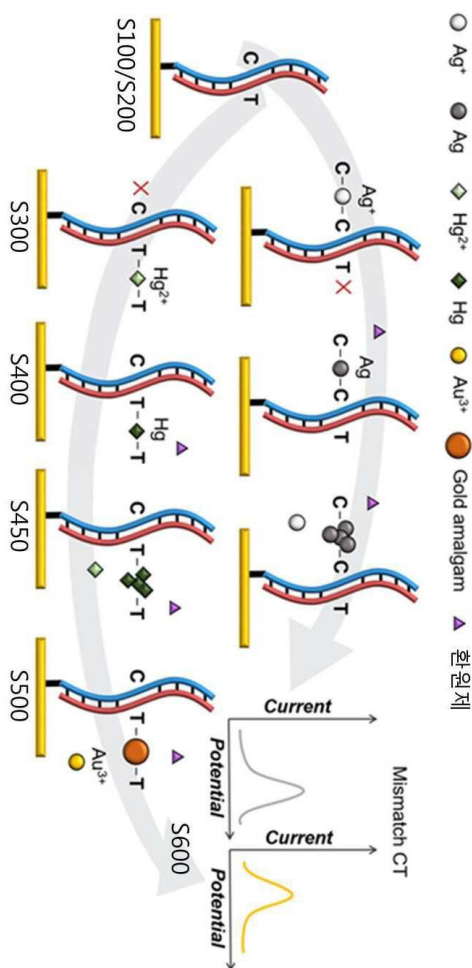
도면2



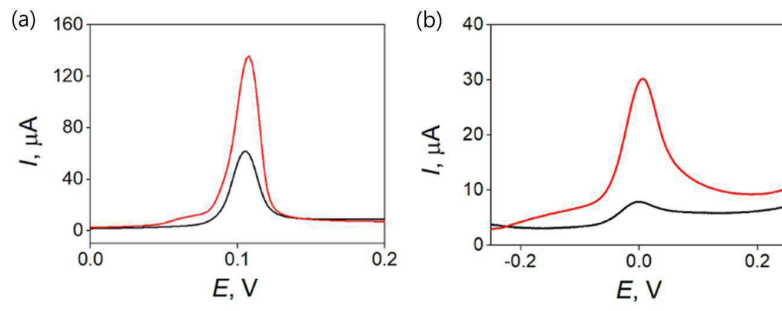
도면3



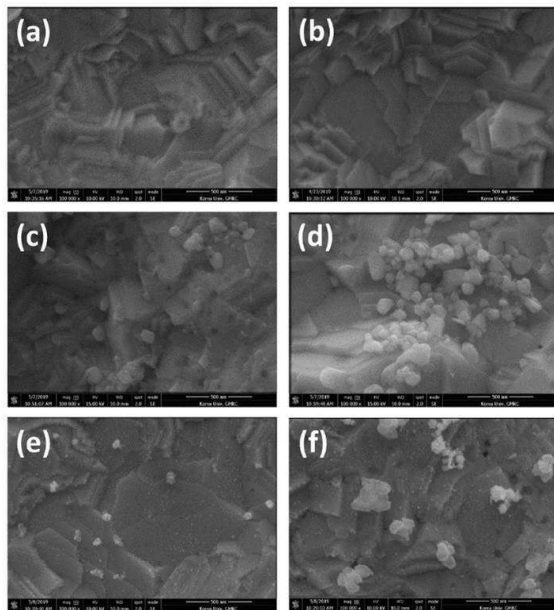
도면4



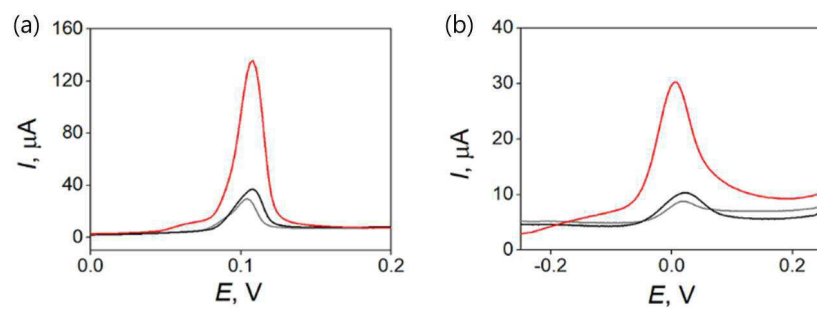
도면5



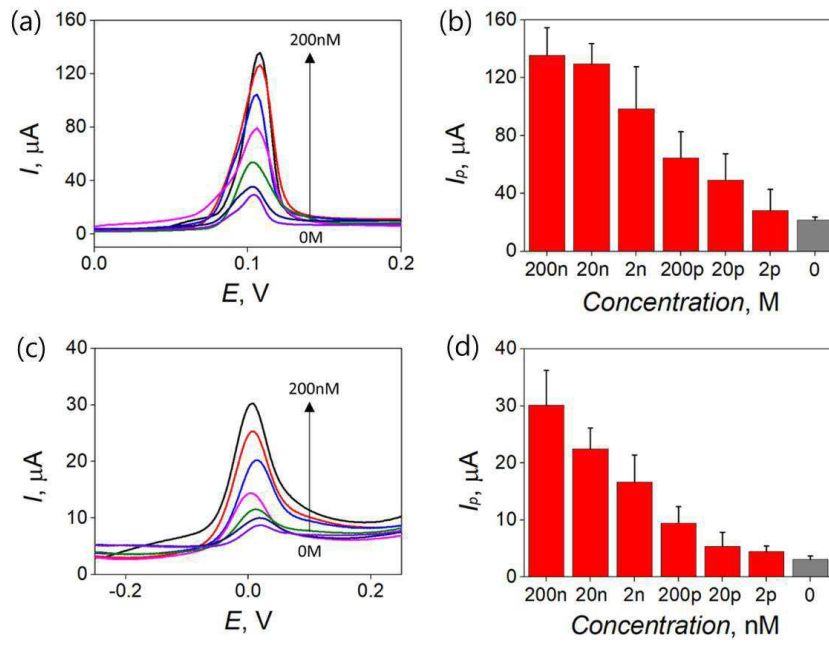
도면6



도면7



도면8



도면9

