



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0009357

(43) 공개일자 2016년01월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/553* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0089798

(22) 출원일자 2014년07월16일

심사청구일자 2014년07월16일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

심상준

서울특별시 강남구 선릉로 221, 301동 803호 (도곡동, 도곡테크아파트)

원홍안

서울특별시 성북구 개운사2길 13-24 (안암동5가)

(74) 대리인

이처영, 장제환

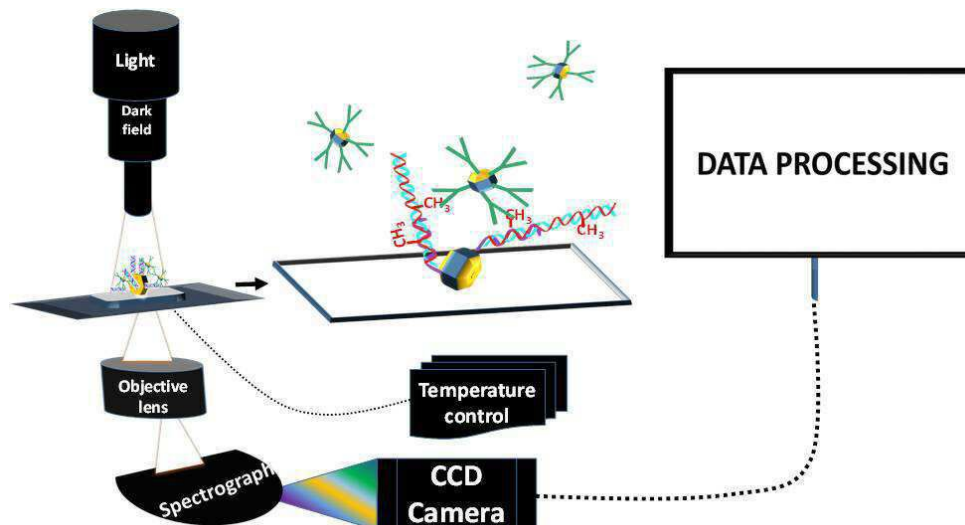
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 레일리 산란을 이용한 순환 종양 DNA(ctDNA)의 종양 특이적 돌연변이와 후성유전학적 변이의 동시 검출방법

(57) 요약

금 나노입자의 국지화된 표면 플라즈몬 공명(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR) 및 플라즈몬 결합(plasmon coupling) 현상을 이용한 순환 종양 DNA(ctDNA)의 종양 특이적 돌연변이와 후성유전학적 변이 동시 검출방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 혈액 내에 매우 낮은 농도로 존재하는 순환 종양 DNA의 돌연변이와 후성유전학적 변이를 동시에 검출할 뿐만 아니라, 체내 낮은 농도로 존재하는 다양한 바이오마커를 동시에 검출하는데 응용가능하다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013R1A2A1A01015644
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	생물공정의 실시간 고속 모니터링을 위한 나노 플라즈몬 검지 플랫폼 기술 개발
기 여 율	5/10
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2014.06.01 ~ 2015.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20100027955
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	이공학분야지원사업
연구과제명	진단/치료용 고분자 소재 연구센터
기 여 율	1/10
주관기관	성균관대학교 산학협력단
연구기간	2013.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	20110031997
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	거대과학 연구개발 사업(Korea CCS 2020사업)
연구과제명	생물학적 이산화탄소 고속 전환 유기자원화 기술
기 여 율	4/10
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2013.06.01 ~ 2014.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 레일리 산란을 이용한 혈액 내 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)의 종양 특이적 돌연변이 및 후성유전학적 변이의 동시 검출 방법:

(a) 종양 특이적 DNA 돌연변이 검출용 핵산 프로브가 고정되어 있는 금 나노입자가 고정된 나노플라스모닉 바이오센서에 혈액 샘플을 주입한 다음, 종양 특이적 DNA 후성유전학적 변이 검출용 항체가 고정된 면역 금 콜로이드를 주입하여 검출 신호를 증폭하는 단계 및;

(b) 암시야 현미경(dark-field microscopy)과 공명 레일리 산란 마이크로스펙트로스코피 시스템을 이용하여 광산란 스펙트럼을 측정하고 최대파장의 이동도를 분석하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 핵산 프로브는, DNA, aptamer, RNA, PNA 및 LNA로 구성된 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 종양 특이적 DNA 후성유전학적 변이는, DNA methylation인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체는 메틸시토신 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 최대파장의 이동도는 상기 나노플라스모닉 바이오센서의 표면에 결합된 순환 종양 DNA의 밀도에 의해 나타나고, 상기 면역금 콜로이드의 플라스몬 결합 현상에 의해 증폭되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 핵산 프로브는 포스파티딜이노시톨 3-인산화효소 촉매 소단위(phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit, PIK3CA)의 542번째 글루탐산의 라이신으로 치환된 변이체(E542K) 및/또는 545번째 글루탐산의 라이신으로 치환된 변이체(E545K)를 검출할 수 있는 PNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 핵산 프로브는 서열번호 1 또는 2로 표시되는 PNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 반응 온도를 일정하게 유지하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 상기 공명 레일리 산란 마이크로스펙트로스코피 시스템에 분광사진기(spectrograph)와 CCD 카메라를 장착하여 최대파장을 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 금 나노입자의 평균입자 크기는 11~70nm이고, 상기 면역 금 콜로이드의 평균입자크기는 10~90nm인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 금 나노입자의 평균입자 크기는 약 50nm이고, 상기 면역 금 콜로이드의 평균입자 크기는 10~30nm인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

포스파티딜이노시톨 3-인산화효소 촉매 소단위(phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit, PIK3CA)의 542번째 글루탐산의 라이신으로 치환된 변이체(E542K) 및/또는 545번째 글루탐산의 라이신으로 치환된 변이체(E545K)를 검출할 수 있는 PNA.

청구항 13

제11항에 있어서, 서열번호 1 또는 2로 표시되는 PNA.

청구항 14

제11항 또는 제12항의 PNA가 고정되어 있는 금 나노입자.

청구항 15

제13항의 금 나노입자가 고정되어 있는 나노플라스모닉 바이오센서.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 금 나노입자의 국지화된 표면 플라즈몬 공명(Localized Surface Plasmon Resonance, LSPR) 및 플라즈몬 결합(plasmon coupling) 현상을 이용한 순환 종양 DNA(ctDNA)의 종양 특이적 돌연변이와 후성유전학적 변이의 동시 검출방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0001]

- [0002] 순환 종양 DNA(Circulating tumor DNA, ctDNA)는 암 세포로부터 분리되어 혈액 내 존재하는 이중가닥 DNA로서, 종양 특이적 돌연변이 및 후성유전학적 변이를 모두 가지고 있으며, 혈액 내 전체 순환 DNA의 매우 적은 양을 차지하고 있는 것으로 알려져 있다(Sunami et al., *Methods in Molecular Biology*, 507:349-356, 2009; Chimonidou et al., *Clinical Chemistry*, 57(8):1169-1177, 2011). 포스파티딜이노시톨 3-인산화효소 촉매 소단위(phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit, PIK3CA) 유전자의 ctDNA에서 발생하는 두 개의 핫스팟 변이-542번째 글루탐산의 라이신으로의 변이(E542K)를 코딩하는 엑손 9의 70271번째 구아닌(G)의 아데닌(A)으로의 변이와 545번째 글루탐산의 라이신으로의 변이(E545K)를 코딩하는 엑손 9의 70282번째 구아닌(G)의 아데닌(A)으로의 변이- 및 메틸레이션은 유방암, 전립선암, 뇌암, 간암, 위암 및 폐암 등의 여러 종류의 암에서 잘 알려진 변이이다(Andreas et al., *PNAS*, 103(5):1475-1479, 2006; Banerji et al., *Nature*, :486-405-409, 2012; Dawson et al., *New England Journal of Medicine*, 368: 1199-1129, 2013).
- [0003] 유전학적 변이와 후성유전학적 변이를 동시에 검출할 수 있는 플랫폼의 개발은 순환 종양 DNA 기반의 진단기법에 있어서 민감도(sensitivity)와 정확도(specificity)를 증가시킬 수 있다. 순환 종양 DNA의 크기는 50bp에서 250bp로 다양하고, 순환 종양 DNA는 혈액 내에서 떠다니고 있으므로, 비특이적인 순환 DNA와의 결합을 억제하고, 특정 순환 종양 DNA만 포획하고 농축할 수 있는 기능은 상기 플랫폼에서 필수적이다.
- [0004] 중성의 펩타이드 핵산(peptide nucleotide, PNA)는 이중가닥 DNA와 특이적으로 융합하는 특징이 있으며, 이 특징으로 인하여 PNA는 가닥 특이적 이중가닥 DNA를 검출하는 바이오센서에서 사용가능한 프로브로서 뛰어난 성능을 지니고 있다(Bhaskar et al., *Journal of the American Chemical Society*, 123:9612-9619, 2001; Zohar et al., *Nanoletter*, 10:4697-4701, 2010). PNA는 상보적인 핵산과 결합함에 있어서 기본 골격이 전기적으로 중성이므로 전기적 반발을 최소화하여 DNA 및 RNA에 비해 강한 친화력을 갖는다(Zohar et al., *Nanoletter*, 10:4697-4701, 2010; Bentin et al., *Biochemistry*, 42:13987-13995, 2003). 특히 PNA/DNA 이중복합체는 부정합(mismatch)에 있어서 DNA/DNA의 부정합에 비해 열안정성이 저하된다. 단일염기 부정합에 있어서 PNA/DNA와 DNA/DNA 이중복합체는 T_m 값이 각각 15°C, 4°C 씩 저하된다(Igloi et al., *PNAS*, 95:8562-8567, 1998; Ray et al., *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14(9):1041-1060, 2000; Park et al., *Bio-interphases*, 1(4):113-122, 2006). 따라서 PNA 분자는 온도가 제어되는 환경에서 위양성 판독을 제거하기 위한 이상적인 프로브이다.
- [0005] 금 나노입자 기반의 나노플라스몬 검출 플랫폼은 뛰어난 민감도, 정확도 및 특이성을 보유하고 있다. 많은 연구그룹이 은에서부터 금에 이르는 다양한 나노입자의 국지화된 표면 플라스몬 공명(localized surface plasmon resonance, LSPR) 현상을 이용하여 DNA 타겟을 검출하는 바이오센싱 플랫폼을 연구하고 있다(Truong et al., *Lab on a chip*, 11:2591-2597, 2011; Willets et al., *The Annual Review of Physical Chemistry*, 58:267-297, 2007). 이러한 바이오센서들은 특정 금속 나노입자의 표면 플라스몬 흡수 밴드의 세기나 주파수가 물질의 종류에 따라 다르고 나노입자가 어떤 물질에 놓여 있는가에 따라 그리고 나노입자의 크기, 모양, 크기 분포에 따라 표면 플라스몬 주파수가 달라지는 특성을 이용하고 있는데, 이러한 특성이 생체물질의 결합을 측정 가능한 광학 신호로 변화시켜주는 것이다. 따라서, 이러한 LSPR 바이오센서를 제작함에 있어서 나노입자 주변의 반사인덱스(local refractive index)를 일정하게 유지하는 것이 중요하다.
- [0006] LSPR 바이오센서의 경우, 최대 파장이 변화하는 정도가 센서의 민감도와 비례한다. 최근 금 나노입자와 면역 금 콜로이드(immunogold colloid)의 플라스몬 결합(plasmon coupling) 모드를 이용하여 LSPR 최대 파장의 변화를 증폭하는 방법이 알려졌다(Truong et al., *Small*, 9(20):3485-3492, 2013; Hall et al., *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(5):1410-1414, 2011). 또한 플라스몬 결합모드에 의한 LSPR 최대 파장은 관찰 가능한 붉은 색 계통으로 변화하는 것으로 알려져 있다(Lange et al., *Langmuir*, 28:8862-8868, 2012).
- [0007] 현재 종양 특이적 변이를 정량적으로 분석하는 방법은 digital PCR과 targeted deep sequencing 두 방법 밖에 없다(Banerji et al., *Nature*, 486:405-409, 2012; Board et al., *Clinical Chemistry*, 54(4):754-760, 2008). 상기 방법의 단점은 표지가 필요하고, 검출 방법이 복잡하며, 유전학적 변이와 후성유전학적변이를 동시에 검출할 수 없다는 것이다. 따라서 최소한의 샘플 처리만 필요하고, 라벨-프리한 순환 종양 DNA 분자의 종양 특이적 돌연변이 및 후성유전학적 변이를 동시에 직접적으로 검출할 수 있는 검출방법이 필요한 실정이다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은 표지 없이, 민감도와 정확도가 높고, 순환 종양 DNA의 종양 특이적 돌연변이와 후성유전학적 변이를 동시에 검출할 수 있는 나노플라스몬 바이오센서를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, LSPR 파장 변화와 플라스몬 결합(plasmon coupling) 모드를 이용한 나노플라스몬 바이오센서를 제조하고, 상기 센서가

혈액 내 순환 종양 DNA의 종양 특이적 돌연변이와 후성유전학적 변이를 매우 높은 민감도와 정확도로 동시에 검출할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 국지화된 표면 플라즈몬 공명(localized surface plasmon resonance) 현상 및 플라즈몬 결합(plasmon coupling) 모드를 이용하여, 혈액 내 순환종양 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)의 종양 특이적 유전학적 변이와 후성유전학적 변이를 동시에 검출하는 방법을 제공하데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 포스파티딜이노시톨 3-인산화효소 촉매 소단위(phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit, PIK3CA)의 종양특이적 변이를 검출할 수 있는 PNA 및 상기 PNA가 고정되어 있는 금 나노입자를 이용한 나노플라스모닉 바이오센서를 제공하데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 종양 특이적 DNA 돌연변이 검출용 핵산 프로브가 고정되어 있는 금 나노입자가 고정된 나노플라스모닉 바이오센서에 혈액 샘플을 주입한 다음, 종양 특이적 DNA 후성유전학적 변이 검출용 항체가 고정된 면역 금 콜로이드를 주입하여 검출 신호를 증폭하는 단계 및; (b) 암시야 현미경(dark-field microscopy)과 공명 레일리 산란 마이크로스펙트로스코피 시스템을 이용하여 광산란 스펙트럼을 측정하고 최대파장의 이동도를 분석하는 단계를 포함하는 레일리 산란을 이용한 혈액 내 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)의 종양 특이적 돌연변이와 후성유전학적 변이의 동시 검출방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 포스파티딜이노시톨 3-인산화효소 촉매 소단위(phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit, PIK3CA)의 542번째 글루탐산의 라이신으로 치환된 변이체(E542K) 및/또는 545번째 글루탐산의 라이신으로 치환된 변이체(E545K)를 검출할 수 있는 PNA를 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 포스파티딜이노시톨 3-인산화효소 촉매 소단위(phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit, PIK3CA)의 542번째 글루탐산의 라이신으로 치환된 변이체(E542K) 및/또는 545번째 글루탐산의 라이신으로 치환된 변이체(E545K)를 검출할 수 있는 PNA가 고정되어 있는 금 나노입자 및 상기 금 나노입자를 포함하는 나노플라스모닉 바이오센서를 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 나노플라스모닉 바이오센서는 혈액 내에 매우 낮은 농도로 존재하는 순환 종양 DNA의 돌연변이 및 후성유전학적 변이를 높은 민감도로 단시간에 동시 검출할 수 있어, 질병 진단에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 레일리 산란을 이용한 순환 종양 DNA(ctDNA)의 종양 특이적 돌연변이와 후성유전학적 변이 검출방법에 대한 개념도이다.

도 2의 (A)는 50nm 크기로 제조된 금 나노입자의 투과전자현미경(TEM) 사진이며, (B)는 1500배 배율에서 금 나노입자의 암시야 이미지이다.

도 3의 (A)는 면역 금 콜로이드를 제작하기 위해 제조된 20nm 크기의 금 나노입자의 투과전자현미경(TEM)사진이며, (B)는 메틸시토신 항체가 고정된 면역 금 콜로이드의 제작 단계에 따른 흡광도 변화 그래프이다.

도 4의 (A)는 온도에 따른 순환 종양 DNA분자와 PNA 프로브의 융합에 의한 LSPR 최대 파장의 변화를 기록한 그래프이고, (B)는 금 나노입자에 ctDNA가 결합하고, ctDNA의 메틸시토신에 메틸시토신 항체가 고정된 면역 금 콜로이드가 결합했을 때, 레일리 광산란 스펙트럼의 최대 파장 변화를 나타낸 그래프이다.

도 5의 (A)의 검은색 컬럼은 ctDNA 농도에 따른 레일리 광산란 스펙트럼의 최대 파장 변화이고, 빨간색 컬럼은 ctDNA의 mCpG 사이트와 결합하는 면역 금 콜로이드를 이용해, 증폭된 LSPR 변화를 측정된 결과이며, (B)는 ctDNA의 농도 및 methylation 상태에 따른 LSPR 변화의 선형 상관관계 분석 그래프이며, (C)는 면역 금 콜로이드를 주입하기 전, ctDNA와 결합한 금 나노입자의 암시야 현미경 사진이고, (D)는 면역 금 콜로이드를 주입한 후의 금 나노입자의 암시야 현미경 사진이며, (E)는 정상 순환 DNA(normal circulating DNA, ncDNA)의 농도에 따른 LSPR 변화를 측정된 그래프이다.

도 6은 사람 혈장과 섞인 E542K 및 E545K ctDNA의 검출 결과를 나타내는 레일리 광산란 스펙트럼의 최대 파장 변화 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0017] 본 발명에서는 혈액 샘플 내 순환 종양 DNA의 돌연변이와 후성유전학적 변이를 동시에 검출할 수 있는 나노플라스모닉 바이오센서를 개발하고자 하였다.
- [0018] 본 발명에서는, 국지적 표면 플라즈몬 공명현상과 플라즈몬 결합모드를 활용한 나노플라스모닉 바이오센서를 이용하여 혈액 내 순환 종양 DNA의 돌연변이 및 후성유전학적 변이의 검출을 수행하였다(도 1). 그 결과, 상기 나노플라스모닉 바이오센서가 매우 높은 민감도와 정확도를 가지고 있음을 확인하였다.
- [0019] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 포스파티딜이노시톨 3-인산화효소 촉매 소단위(phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit, PIK3CA) 유전자의 혈액 내, 순환 종양 DNA의 종양 특이적 돌연변이인 542번째 글루탐산의 라이신으로의 변이(E542K)를 코딩하는 엑손 9의 70271번째 구아닌(G)의 아데닌(A)으로의 변이와 545번째 글루탐산의 라이신으로의 변이(E545K)를 코딩하는 엑손 9의 70282번째 구아닌(G)의 아데닌(A)으로의 변이를 검출할 수 있는 PNA가 고정된 금 나노입자를 제작하고(도 2) 이를 포함하는 나노플라스모닉 바이오센서와 후성유전학적 변이인 CpG 메틸레이션을 검출할 수 있는 메틸시토신 항체가 고정된 면역 금 콜로이드를 제작하고(도 3), 상기 제작된 PNA 프로브가 고정된 금 나노입자를 포함하는 나노플라스모닉 바이오센서와 메틸시토신 항체가 고정된 면역 금 콜로이드를 이용하여 순환 종양 DNA의 종양 특이적 변이와 후성유전학적 변이를 동시에 높은 민감도와 정확도로 검출할 수 있는 것을 확인하였다.
- [0020] 따라서 본 발명은 일 관점에서, (a) 종양 특이적 DNA 돌연변이 검출용 핵산 프로브가 고정되어 있는 금 나노입자가 고정된 나노플라스모닉 바이오센서에 혈액 샘플을 주입한 다음, 종양 특이적 DNA 후성유전학적 변이 검출용 항체가 고정된 면역 금 콜로이드를 주입하여 검출 신호를 증폭하는 단계 및; (b) 암시야 현미경(dark-field microscopy)과 공명 레일리 산란 마이크로스펙트로스코피 시스템을 이용하여 광산란 스펙트럼을 측정하고 최대 파장의 이동도를 분석하는 단계를 포함하는 레일리 산란을 이용한 혈액 내 순환 종양 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)의 종양 특이적 돌연변이와 후성유전학적 변이의 동시 검출 방법에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 프로브는 DNA, 압타머(aptamer), RNA, PNA 및 LNA로 구성된 그룹에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 종양 특이적 DNA 후성유전학적 변이는, DNA methylation인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 항체는, 메틸시토신 항체인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 최대파장의 이동도는 상기 나노플라스모닉 바이오센서의 표면에 결합된 순환 종양 DNA의 밀도에 의해 나타나고, 상기 면역금 콜로이드의 플라즈몬 결합 현상에 의해 증폭되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 프로브는 포스파티딜이노시톨 3-인산화효소 촉매 소단위(phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit, PIK3CA)의 542번째 글루탐산의 라이신으로 치환된 변이체(E542K) 및/또는 545번째 글루탐산의 라이신으로 치환된 변이체(E545K)를 검출할 수 있는 PNA라면 제한 없이 사용할 수 있고, 바람직하게는 서열번호 1 또는 2로 표시되는 PNA일 수 있다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계에서 반응 온도를 일정하게 유지하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 (b) 단계에서 상기 공명 레일리 산란 마이크로스펙트로스코피 시스템에 분광사진기(spectrograph)와 CCD 카메라를 장

착하여 최대파장을 측정하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 금 나노입자의 평균입자 크기는 11~70nm인 것이 바람직하며, 약 50nm인 것이 더욱 바람직하고, 상기 면역 금 콜로이드의 평균입자크기는 10~90nm인 것이 바람직하며, 10~30nm인 것이 더욱 바람직하다.

[0027] 본 발명의 다른 실시예에서는 포스파티딜이노시톨 3-인산화효소 촉매 소단위(phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit, PIK3CA) 유전자의 혈액 내, 순환 종양 DNA의 종양 특이적 돌연변이인 542번째 글루탐산의 라이신으로 치환된 변이체(E542K)를 코딩하는 엑손 9의 70271번째 구아닌(G)의 아데닌(A)으로의 변이와 545번째 글루탐산의 라이신으로 치환된 변이체(E545K)를 코딩하는 엑손 9의 70282번째 구아닌(G)의 아데닌(A)으로의 변이를 검출할 수 있는 PNA 프로브를 제작하고, 상기 PNA가 고정된 금 나노입자를 제조한 후(도 2), 이를 이용한 나노플라스모닉 바이오센서를 제작하였다(도 1). 상기 나노플라스모닉 바이오센서를 활용하여 순환 종양 DNA를 검출한 결과, 200fM(2.0×10^{-13} M) 농도의 ctDNA가 검출 가능함을 확인할 수 있었다(도 4).

[0028] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 포스파티딜이노시톨 3-인산화효소 촉매 소단위(phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit, PIK3CA)의 542번째 글루탐산의 라이신으로 치환된 변이체(E542K) 및/또는 545번째 글루탐산의 라이신으로 치환된 변이체(E545K)를 검출할 수 있는 PNA와 상기 PNA가 고정된 금 나노입자 및 이를 포함하는 나노플라스모닉 바이오센서에 관한 것이다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 PNA는 서열번호 1 또는 2로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 본 발명에 따르면, 매우 높은 민감도로 신속하고 간편하게 혈액 내 순환 종양 DNA를 감지할 수 있어, 순환 종양 DNA의 검출뿐 아니라, 생체 내 낮은 농도로 존재하는 다른 바이오마커의 검출에도 적용될 수 있다.

[0031] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0032] 실시예 1: PNA 프로브의 설계 및 온도 조절을 이용한 ctDNA 포획

[0033] PIK3CA 유전자 ctDNA의 두 가지 핫 스팟 돌연변이는 이미 잘 알려져 있다(Andreas et al., PNAS, 103(5):1475-1479, 2006; Dawson et al., New England Journal of Medicine, 368:1199-1209, 2013). 상기 두 돌연변이를 포함하고 있는 ctDNA는 69bp길이로 합성하였고, 각각의 ctDNA와 100% 매치하도록 하기의 서열번호 1과 서열번호 2의 PNA 프로브를 제작하였다.

[0034] 서열번호 1: 5'-HS-AGTGATTTAGAGAG-3' (E542K probe)

[0035] 서열번호 2: 5'-HS-CCTGCTTAGTGATT-3' (E545K probe)

[0036] PNA/DNA 이중복합체는 부정합(mismatch)에 있어서 DNA/DNA의 부정합에 비해 열안정성이 저하된다. 단일염기 부정합에 있어서 PNA/DNA와 DNA/DNA 이중복합체는 T_m 값이 각각 15°C, 4°C 씩 저하된다(Igloi et al., PNAS, 95:8562-8567, 1998). 온도 조절이 가능한 반응 챔버에서 PNA 프로브와 ctDNA 분자 사이의 결합을 LSPR 변화를 측정하였다. 온도를 40°C에서 76°C까지 변화시키면서 LSPR 변화를 측정하였다.

[0037] 도 1에 나타난 바와 같이, 200fM의 69bp ctDNA를 PNA 프로브가 고정된 금 나노입자가 고정된 이미지 챔버(RC-30HV, Warner instruments)에 주입하면, PNA 프로브와 ctDNA 분자의 결합에 의해 LSPR 변화가 관찰된다. 왜냐하면, LSPR 기반의 플랫폼은 금 나노입자의 광산란을 잘 이용할 수 있고, 주변 환경의 반사 인덱스의 변화에 매우 민감하기 때문이다. PNA 프로브와 정상 순환 DNA 또는 순환 종양 DNA 복합체 사이의 melting temperature의 큰 차이가 금 나노입자의 표면에 ctDNA만 특이적으로 융합시키는데 중요한 요소이다. 정상 순환 DNA를 위상한 후, 융합한 ctDNA의 농도는 각 나노플라스모닉 바이오센서의 LSPR 파장 변화를 측정함으로써 계산할 수 있다.

[0038] 실시예 2: 금 나노입자의 제작 및 기능화

[0039] 10ml의 0.1M의 세실트리메틸암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)와 0.5ml의 0.01M 염화금산(hydrogen tetrachloroaurate, HAuCl₄)이 포함된 반응 용액에 1.0ml의 차가운 0.01M 수소화붕소나트륨(sodium borohydride, NaBH₄)를 첨가하여 빠르게 교반하였다. 그 후, 약 10분간 더 교반하고 나서 상온에서 냉각하였다. 상기와 같은 방법으로 갈색의 평균 약 50nm 크기의 금 나노입자를 제조하고, 투과전자현미경과 암시야 현미경으로 확인하였다 (도 2).

[0040] 제조된 금 나노입자를 잘 알려진 금-황 화학을 이용하여 thiol기로 수식된 PNA 프로브로 수식하였고, UV/Vis 스펙트로스코피(UV-3600, Shimadzu) 및 투과전자현미경(JEM-2100F, 200kV, JEOL)을 이용하여 확인하였다 (도 2). 각각의 PNA 프로브가 고정된 금 나노입자는 밀폐된 반응 챔버의 커버글라스에 고정하였다.

[0041] 실시예 3: 나노플라스모닉 바이오센서의 제작

[0042] LSPR 시스템이 암시야 현미경, 분광사진기(spectrograph) 및 CCD 카메라로 구성되는 것은 잘 알려져 있다. 본 발명에서는 암시야 현미경으로 Nikon사의 Eclipse TE2000-U를 사용하여 각각의 금 나노입자로부터 발생하는 레일리 광산란을 관찰하였다. 분광사진기는 Roper Scientifics사의 Microspec 2300i를 사용하여 레일리 광산란 스펙트럼을 촬영하였으며, CCD카메라로는 Princeton Instruments사의 PIXIS: 400B를 사용하였다 (도 1).

[0043] PNA 프로브로 기능화된 금 나노입자는 머캅토프로필트리에톡시실란(mercaptopropyltriethoxysilane, MPTES)가 처리된 thiol로 수식된 커버글라스에 고정하였다. 상기 커버글라스를 RC-30HV 반응 챔버에 투입하고, 상기 반응 챔버를 Warner Instrument사의 TC-324C 온도 조절기와 연결하였다. 상기 반응 챔버를 암시야 현미경의 재물대에 고정하고, 주사기 펌프(Havard Apparatus)와 결합하였고, 최종적으로 탈이온수로 세척하여 ctDNA 타겟을 검출하기 위해 준비하였다.

[0044] LSPR 변화(shift)는 반사 인덱스(refractive index, RI)의 변화에 의해 발생하며, 단위는 nm/RIU(RIU=refractive index unit)이고, 상기 변화는 ctDNA의 결합에 의한 금 나노입자의 주변 환경의 변화에 의해 일어난다. 따라서 LSPR 변화는 나노플라스모닉 바이오센서의 민감도를 반영하게 된다. 반응 단계에 따라 각각의 금 나노입자의 레일리 광산란 스펙트럼을 측정하여 계산하였으며, 계산식은 $LSPR_{shift} = LSPR_{afterbinding} - LSPR_{beforebinding}$ 이다. 노이즈를 제거하고 스펙트럼을 맞추기 위하여 로렌츠 알고리즘이 있는 Origin Pro 8.6 소프트웨어를 사용하였다.

[0045] 실시예 4: 순환 종양 DNA(ctDNA)의 검출

[0046] 순환 종양 DNA를 검출하는 전체적인 단계는 도 1과 같다. 먼저, 50fM에서 3200fM까지의 합성된 ctDNA를 1X hybridization buffer(PerfectHybTM buffer, Sigma)와 1X 사람 혈장(Sigma-Aldrich)이 혼합된 용액에 준비하였다. 이를 PNA로 기능화된 금 나노입자가 있는 반응챔버에 주입하여 30분간 온도를 변화시켜가면서 LSPR 변화를 측정하였다. 그 결과, 최적의 반응온도가 62°C인 것을 확인할 수 있었다 (도 4). 또한, 검출한계(limit of detection, LOD)를 도출하기 위하여, 200ul의 69bp PIK3CA 유전자 ncDNA 및 사람 유전체 조각(G1521, Promega, USA)를 이용하여 대조 실험을 수행하였고, 각각의 결합 단계에 따른 LSPR 변화를 상기 계산식으로 계산하였다 (도 4).

[0047] 실시예 5: 메틸시토신 항체가 고정된 면역 금 콜로이드의 제작

[0048] 금 나노입자의 자기 조립 단분자층(Self-Assembled Monolayer, SAM)을 형성하기 위하여 티올-올리고 에틸렌 글리콜(thiol-oligo ethylen glycol, OEGs)을 다음과 같은 방식으로 처리하였다. 먼저 8ml의 금 콜로이드 용액에 HS(CH₂)₁₁(OCH₂CH₂)₆OCH₂COOH(HS-OEG6-COOH)/HS(CH₂)₁₁(OCH₂CH₂)₉OH(HS-OEG3-OH) 혼합 용액(1:9 molar ratio (물농도 비)), 0.5mM) 2ml를 첨가하여, 10시간 배양한 후, 10,000rpm에서 20분간 원심분리를 수행하여 결합하지 않은 OEG를 제거하였다. 그 뒤, 메틸시토신 항체를 상기 금 나노입자 고정하기 위해 상기 금 콜로이드 용액에 1M EDC/NHS(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride/Nhydroxylsuccinimide) 용액을 넣고 카르복실기를 활성화 한 후, 1.4ul의 20mM 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol)을 주입하여 반응을 중지시켰다. 그리고 메틸시토신 항체(1μg/ml) 500ul를 혼합한 후에 3시간 동안 배양한 후, 10,000rpm에서 10분간 원심분

리하여 얻은 면역 금 콜로이드를 50mM 인산염 완충용액(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)에 섞어 제작하고, 투과전자현미경으로 확인하였다(도 3). 또한 각 반응 단계별 LSPR 변화를 측정된 결과, 최대 파장이 521nm에서 thiols-oligo ethylene glycol(OEGs)을 처리하여 표면을 개질하였을 때, 530nm로, 메틸시토신 항체를 EDC/NHS를 이용하여 고정 시켰을 때, 534nm로 변화하는 것을 확인하였다 (도 3).

실시예 6: 나노플라스모닉 바이오센서와 면역 금 콜로이드를 이용한 돌연변이와 메틸레이션의 동시 검출

ctDNA의 각 가닥에는 두 개의 메틸레이션된 mCpG 사이트가 존재한다. ctDNA의 첫 번째 검출 이후, ctDNA를 메틸레이션을 검출하고, 검출신호를 증폭하기 위하여, 메틸시토신 항체가 고정된 면역 금 콜로이드를 나노플라스모닉 바이오센서에 주입하였다. 면역 금 콜로이드가 매우 낮은 농도의 분석샘플의 공명 신호를 증폭시킨다는 것은 최근에 알려졌다(Truong et al., Small, 9(20):3485-3492, 2013; Hall et al., The Journal of Physical Chemistry C, 115(5):1410-1414, 2011).

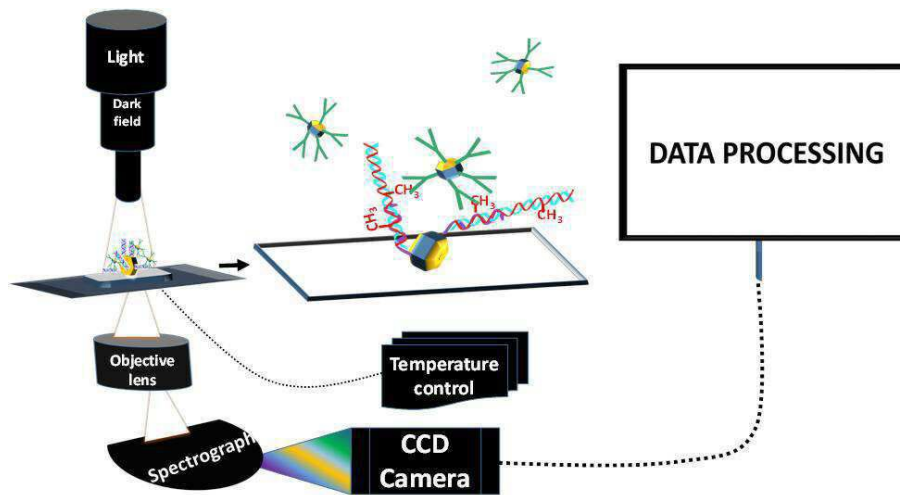
도 1에 나타난 바와 같이, 면역 금 콜로이드 용액을 바이오센서의 주입하여 1시간동안 배양하였고, 그 뒤 탈이온수를 이용하여 표면을 씻어내었다. 증폭된 신호는 LSPR의 변화를 측정함으로써 관찰하였다. 그 결과, 메틸시토신 항체가 고정된 면역 금 콜로이드 용액은 ctDNA의 mCpG 사이트에 결합하여, 플라스몬 결합 모드를 나타내어, LSPR 변화 신호를 증폭시키고(도 4), 그 폭이 4.3nm에서 11.4nm로 증가하는 것을 확인하였다 (도 5A). 면역 금 콜로이드를 주입한 후, 나노플라스모닉 바이오센서 표면에서의 ctDNA methylation의 검출은 암시야 현미경을 통하여 직접적으로 관찰할 수 있었다 (도 5C, 도 5D). 정상 순환 DNA를 사용하였을 경우, 농도에 따른 LSPR 변화 신호의 증폭은 관찰되지 않았다 (도 5E)

또한, 혈액 내 순환 종양 DNA가 1ml의 혈장 당, 5-702 카피 즉, 정상 순환 DNA의 0.01% - 25% 정도 밖에 존재하지 않으므로(Dawson et al., New England Journal of Medicine, 368:1199-1209, 2013), 매우 높은 민감도가 필요하다. PIK3CA의 E542K 또는 E545K를 검출할 수 있는 PNA가 고정된 금 나노입자를 포함하는 나노플라스모닉 바이오센서에 상용 인간 혈장(H4522, Sigma Aldrich)에 50fM의 E542 및 E545K 변이가 있는 ctDNA를 섞은 샘플을 62℃에서 주입하고, 메틸시토신 항체가 고정된 면역 금 콜로이드를 이용하여 LSPR 변화를 증폭한 결과, E542K ctDNA는 11.8nm 및 E545K ctDNA는 15.7nm의 LSPR 변화를 관찰하여, 혈액 내 순환 종양 DNA를 검출할 수 있음을 확인하였다 (도 6).

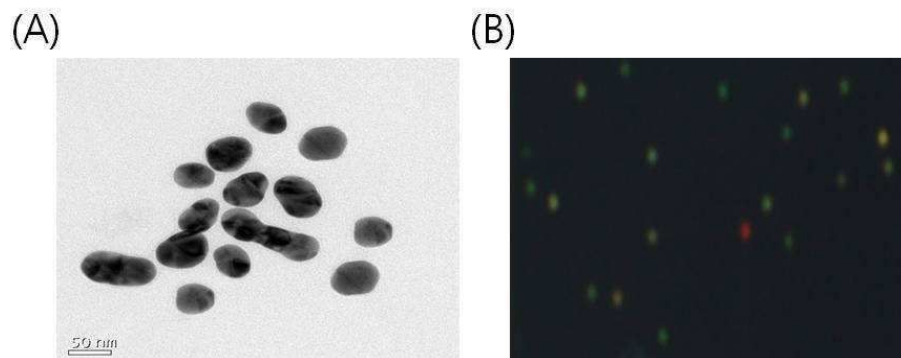
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

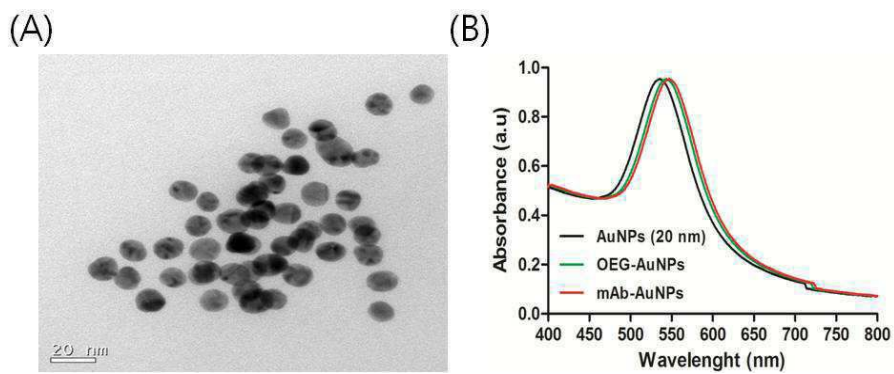
도면1



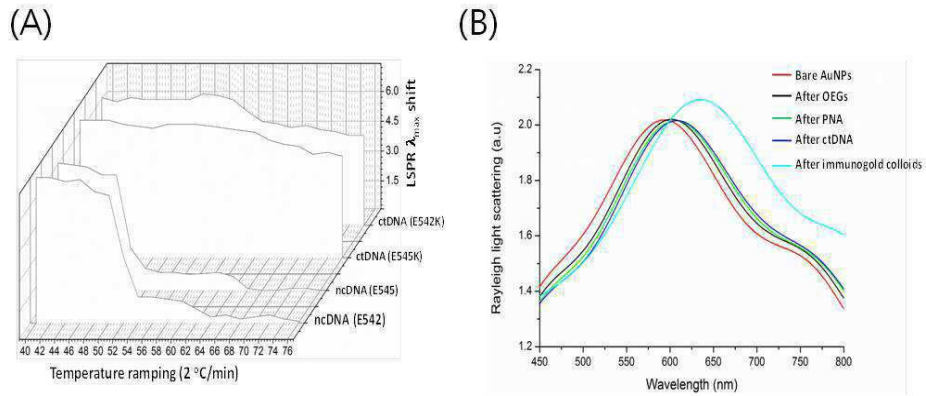
도면2



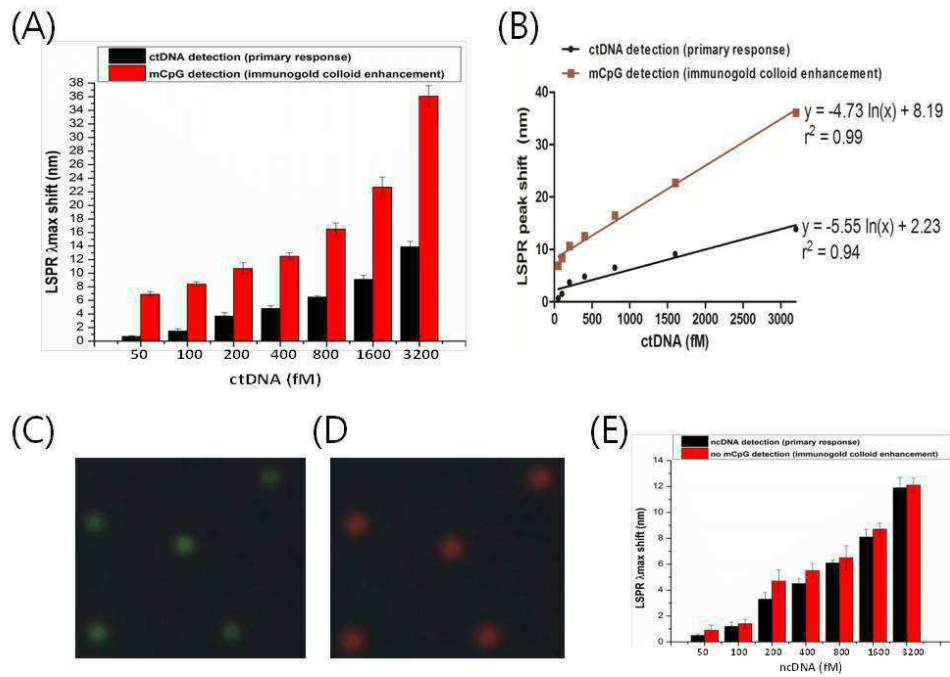
도면3



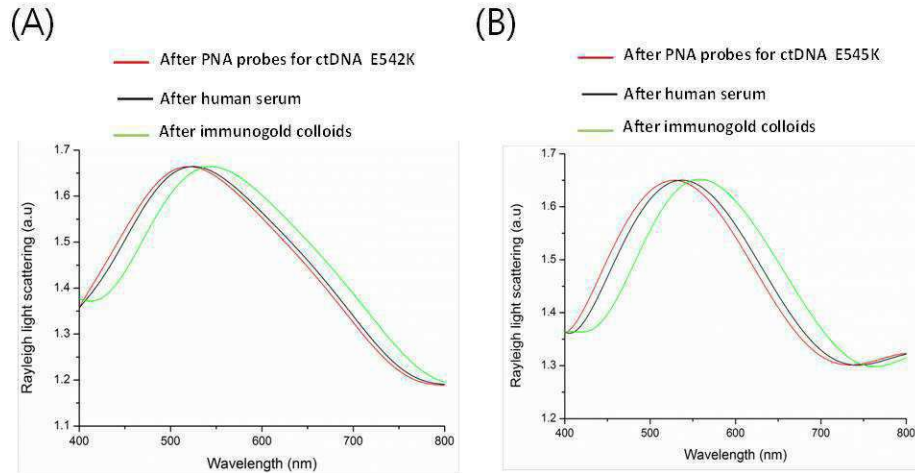
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> Korea University

<120> Method for simultaneously detecting tumor-specific mutation and epigenetic changes of circulating tumor DNA(ctDNA) using Rayleigh light scattering

<130> P14-B208

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> E542K probe_PNA

<400> 1

hsagtgttt tagagag

17

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> E545K probe_PNA

<400> 2

hscctgtta gtgattt

17