(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0044395
(43) 공개일자 2012년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/533 (2006.01) *C12N 15/115* (2010.01)
G01N 33/569 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0093326
(22) 출원일자 2010년09월27일
심사청구일자 2010년09월27일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김진홍
서울특별시 은평구 진관4로 37, 805동 701호 (진관동, 은평뉴타운 상림마을)
(74) 대리인
손민

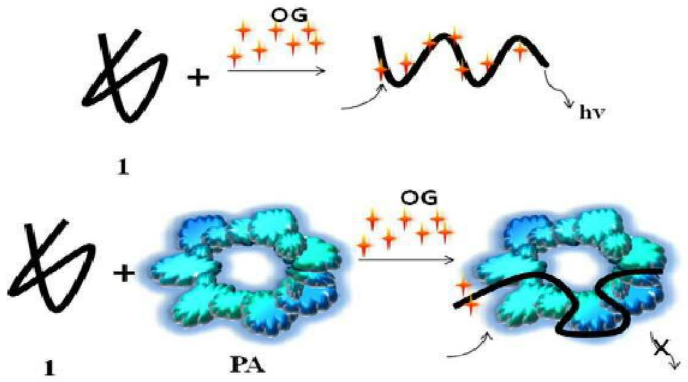
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머를 선별하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 형광표지자의 발색 강도를 이용해 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머를 선별하는 방법, 탄저병 진단을 위한 정보 제공 방법, 및 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머 선별용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 방법을 사용하여, 탄저균 독소의 방어항원에 특이적으로 결합 가능한 앱타머를 선별할 수 있고, 나노몰 이하의 범위에 있는 탄저균 독소까지 정확하고 선택적으로 검출할 수 있으며 탄저병의 진단 기술로도 유용하게 사용가능하다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20100301-061-199-001-03-00
부처명	농림수산식품부
연구사업명	바이오그린 21 사업
연구과제명	바이오마커 인식용 다중인식펩타이드를 이용한 고효율 전기화학적 검출법 개발
주관기관	한양대학교 산학협력단(협동기관:이화여자대학교 산학협력단)
연구기간	2010.01.01 ~ 2010.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	1345076114
부처명	교육과학기술부
연구사업명	우수연구센터육성사업
연구과제명	바이오 선택성 나노구조체 연구
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2008.03.01 ~ 2011.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 시험 앱타머에 형광표지자를 처리하는 단계;

(b) (a) 단계의 시험 앱타머에 결합된 형광표지자의 발색 강도를 측정하는 단계;

(c) (a) 단계의 형광표지자가 결합된 시험 앱타머를 탄저균 독소의 방어항원(Protective antigen:PA)이 포함된 시료에 처리하는 단계;

(d) (c) 단계의 시험 앱타머에 결합된 형광표지자의 발색 강도를 측정하는 단계;

(e) (b) 단계에서 측정된 형광표지자의 발색 강도와 (d) 단계에서 측정된 형광표지자의 발색 강도를 비교하는 단계; 및

(f) (b) 단계에서 측정된 형광표지자의 발색 강도와 비교하여 (d) 단계에서 측정된 형광표지자의 발색 강도가 감소된 경우, 시험 앱타머를 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머로 판정하는 단계를 포함하는 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머를 선별하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 시료는 개체로부터 분리된 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액 및 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 시료인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머의 함량과 (b) 단계에서 측정된 형광표지자의 발색 강도와 비교한 (d) 단계에서 측정된 형광표지자의 발색 강도의 감소량이 비례하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형광표지자는 SYBR® Green(Cat. no. S7563, Cat. no. S7567, Cat. no. S7585, Cat. no. S7580) 또는 올리그린®(Cat. no. O7582, Cat. no. O11492)인 것인 조성물.

청구항 5

(a) 정상 개체로부터 분리된 대조군 시료 및 탄저균 감염이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에 탄저균 독소에 특이적으로 결합 가능한 앱타머를 처리하는 단계;

(b) (a)단계의 시료에 형광표지자를 처리하는 단계;

(c) (b)단계의 시료 내 앱타머에 결합한 형광표지자의 발색 강도를 비교하는 단계; 및

(d) 대조군 시료에 비해 탄저균 감염 의심되는 개체로부터 분리된 시료 내 앱타머에 결합한 형광표지자의 발색 강도가 낮은 경우, 해당 개체를 탄저균 감염 개체로 판정하는 단계를 포함하는 탄저병 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 시료는 개체로부터 분리된 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액 및 세포로 구성된

군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 시료인 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 시료 내 탄저균 독소 함량과 대조군 시료에 비해 탄저균 감염 의심되는 개체로부터 분리된 시료 내 앱타머에 결합한 형광표지자의 발색 강도의 감소량이 비례하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일가닥 DNA 앱타머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형광표지자는 SYBR® Green(Cat. no. S7563, Cat. no. S7567, Cat. no. S7585, Cat. no. S7580) 또는 올리그린®(Cat. no. O7582, Cat. no. O11492)인 것인 방법.

청구항 10

(a) 정상 개체로부터 분리된 대조군 시료 및 탄저균 감염이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머를 처리하는 단계;

(b) (a) 단계의 시료에 형광표지자를 처리하는 단계;

(c) (b) 단계의 시료의 형광표지자의 발색 강도를 비교하는 단계; 및

(d) 상기 단계 (c)의 대조군 시료에 비해 탄저균 감염 의심되는 개체로부터 분리된 시료의 형광표지자의 발색 강도가 낮은 경우, 해당 시료에 탄저균 독소가 포함되는 것으로 판정하는 단계를 포함하는 탄저균 독소를 검출하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 시료는 개체로부터 분리된 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액 및 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 시료인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 시료 내 탄저균 독소 함량과 대조군 시료와 비교한 탄저균 감염 의심되는 개체로부터 분리된 시료 내 앱타머에 결합한 형광표지자의 발색 강도의 감소량이 비례하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일가닥 DNA 앱타머인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 형광표지자는 SYBR® Green(Cat. no. S7563, Cat. no. S7567, Cat. no. S7585, Cat. no. S7580) 또는 올리그린®(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492)인 것인 방법.

청구항 15

시험 앱타머, 형광표지자, 및 탄저균 독소의 방어항원(Protective antigen:PA)이 포함된 시료를 포함하고, 형광표지자가 결합된 시험 앱타머에 탄저균 독소의 방어항원(Protective antigen:PA)이 포함된 시료를 처리하였을 때 시료 처리 전과 비교하여 시험 앱타머에 결합된 형광표지자의 발색 강도가 감소하는 경우 시험 앱타머를 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머 선별용 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 형광표지자는 SYBR® Green(Cat. no. S7563, Cat. no. S7567, Cat. no. S7585, Cat. no. S7580) 또는 올리그린®(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492)인 것인 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 형광표지자의 발색 강도를 이용해 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머를 선별하는 방법, 탄저병 진단을 위한 정보 제공 방법, 및 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머 선별용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 탄저균의 병원성은 주로 독소(exotoxin) 생성능력과 협막(capsule) 형성능력에 의해 결정된다. 이러한 독소와 협막을 결정하는 유전자는 탄저균 내의 플라스미드인 pXO1(181654bp)과 pXO2(96231bp)에 암호화되어 있다. 탄저균 독소는 폴리-D-글루타민산 협막, 부종독소(edema toxin) 및 치사독소(lethal toxin) 등으로 구성되어 있다. 탄저균 독소(anthrax toxin)로 총칭되는 독소구성단백질은 방어항원(protective antigen, PA 유전자 산물), 부종요소(edema factor, EF 유전자 산물), 그리고 치사요소(lethal factor, LF 유전자 산물)가 포함된다. 치사요소는 방어항원과 결합하여 치사독소를 형성하며, 부종요소는 칼슘 칼모둘린(calcium-calmoduline) 의존성 아데닐 사이클라아제(adenylate cyclase)의 한 종류로 방어항원(PA)과 결합하여 피부부종을 일으키는 부종독소를 형성한다. 또한, 그람 양성 바실러스 안쓰라시스(Bacillus anthracis, B. 안쓰라시스)에서 분비되는 상기 세 요소의 단백질 독소 중 대표 성분인 방어항원은 탄저균 독소의 감염인자로써, 네 개의 도메인으로 이루어진 커다란 단백질이며 길고 납작한 구조이다. 탄저균은 형태학적 그리고 DNA의 유사성에 근거하여 바실러스 세레우스(Bacillus cereus, B. 세레우스) 에 속해 있는 B. 세레우스, 바실러스 츄린겐시스(Bacillus thuringiensis, B. 츄린겐시스), 그리고 바실러스 마이코이드(Bacillus mycoides, B. 마이코이드) 등과 유사성이 높다. 또한 DNA 분석 결과 탄저균은 A(아데닌) 과 T(티민)이 풍부한 게놈과 유사성에 있어 이들 균주들과 밀접하게 연관되어 있는 것으로 알려져 있다.

[0003] 탄저균 감염에 의한 치사율은 100 %에 가까우며, 감염된 지 이틀 내지 삼일 내에 죽게 된다. 2001년 미국에서 발생했던 탄저병 공격은 다섯 명의 사망자를 발생시켰고, 이들 중 한 명에게서 사망 전 B. 안쓰라시스 감염이 확인되었다.

[0004] 탄저병 진단은 탄저병 독소 생성 및 실험동물에 대한 병원성에 관한 특성, 생리생화학적 특성, 및 혈청학적 특성 등이 활용되고 있다.

[0005] 분자생물학 기법이 발전하면서, 단순한 동정, 분류뿐만 아니라 진화적인 유연관계 연구에 분자생물학적인 방법들이 많이 이용되고 있다. 즉, G-C% 함량, direct sequencing, restriction fragment length polymorphism(RFLP), ribosomal RNA sequencing, random amplified polymorphic DNA-(olymerase chain reaction(RAPD-PCR) 등이 있다. 그 중 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)과 병행한 RAPD-PCR는 많은 미생물에서 균주들의 동정을 위하여 사용되어져 왔다.

[0006] 또한, B. 안쓰라시스를 검출하기 위해 B. 안쓰라시스 포자, 영양 세포, PA, LF, EF, IgG, 및 캡슐 성분과 같은 다양한 타겟을 사용한 많은 면역 기반 시스템이 연구되고 있다. 그러나 이러한 면역분석방법이 효과적이긴 하지만, 항체 검출이 유효한 양에 도달하기 전에 감염자가 보통 사망해 버린다는 단점이 있다. 실제로 2001년 탄저 포자가 우편배송 되었던 사건에서, 증상이 발현된 후 12일이 되기까지 항 PA 항체가 식별되지 않았다.

[0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 탄저균 독소의 하나인 방어항원에 특이적으로 결합하는 앱타머를 이용하여 탄저균 독소를 검출하고 탄저병을 특이적으로 진단하는 방법에 관해 예의 노력한 결과, 앱타머에 특이적으로 결합하는 형광표지자의 발색 강도를 통해 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머를 효과적으로 선별하고, 탄저병을 진단할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 (a) 시험 앱타머에 형광표지자를 처리하는 단계; (b) (a) 단계의 시험 앱타머에 결합된 형광표지자의 발색 강도를 측정하는 단계; (c) (a) 단계의 형광표지자가 결합된 시험 앱타머를 탄저균 독소의 방어항원(Protective antigen:PA)이 포함된 시료에 처리하는 단계; (d) (c) 단계의 시험 앱타머에 결합된 형광표지자의 발색 강도를 측정하는 단계; (e) (b) 단계에서 측정된 형광표지자의 발색 강도와 (d) 단계에서 측정된 형광표지자의 발색 강도를 비교하는 단계; 및 (f) (b) 단계에서 측정된 형광표지자의 발색 강도와 비교하여 (d) 단계에서 측정된 형광표지자의 발색 강도가 감소된 경우, 시험 앱타머를 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머로 판정하는 단계를 포함하는 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머를 선별하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 하나의 목적은 (a) 정상 개체로부터 분리된 대조군 시료 및 탄저균 감염이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에 탄저균 독소에 특이적으로 결합 가능한 앱타머를 처리하는 단계; (b) (a)단계의 시료에 형광표지자를 처리하는 단계; (c) (b)단계의 시료 내 앱타머에 결합한 형광표지자의 발색 강도를 비교하는 단계; 및 (d) 대조군 시료에 비해 탄저균 감염 의심되는 개체로부터 분리된 시료 내 앱타머에 결합한 형광표지자의 발색 강도가 낮은 경우, 해당 개체를 탄저균 감염 개체로 판정하는 단계를 포함하는 탄저병 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) 정상 개체로부터 분리된 대조군 시료 및 탄저균 감염이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머를 처리하는 단계; (b) (a) 단계의 시료에 형광표지자를 처리하는 단계; (c) (b) 단계의 시료의 형광표지자의 발색 강도를 비교하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (c)의 대조군 시료에 비해 탄저균 감염 의심되는 개체로부터 분리된 시료의 형광표지자의 발색 강도가 낮은 경우, 해당 시료에 탄저균 독소가 포함되는 것으로 판정하는 단계를 포함하는 탄저균 독소를 검출하는 방법 및 시료 내 탄저균 독소 함량과 대조군 시료와 비교한 탄저균 감염 의심되는 개체로부터 분리된 시료 내 앱타머에 결합한 형광표지자의 발색 강도의 감소량이 비례하는 것을 특징으로 하는 탄저병 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 시험 앱타머, 형광표지자, 및 탄저균 독소의 방어항원(Protective antigen:PA)이 포함된 시료를 포함하고, 형광표지자가 결합된 시험 앱타머에 탄저균 독소의 방어항원(Protective antigen:PA)이 포함된 시료를 처리하였을 때 시료 처리 전과 비교하여 시험 앱타머에 결합된 형광표지자의 발색 강도가 감소하는 경우 시험 앱타머를 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머 선별용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 시험 앱타머에 형광표지자를 처리하는 단계; (b) (a) 단계의 시험 앱타머에 결합된 형광표지자의 발색 강도를 측정하는 단계; (c) (a) 단계의 형광표지자가 결합된 시험 앱타머를 탄저균 독소의 방어항원(Protective antigen:PA)이 포함된 시료에 처리하는 단계; (d) (c) 단계의 시험 앱타머에 결합된 형광표지자의 발색 강도를 측정하는 단계; (e) (b) 단계에서 측정된 형광표지자의 발색 강도와 (d) 단계에서 측정된 형광표지자의 발색 강도를 비교하는 단계; 및 (f) (b) 단계에서 측정된 형광표지자의 발색 강도와 비교하여 (d) 단계에서 측정된 형광표지자의 발색 강도가 감소된 경우, 시험 앱타머를 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머로 판정하는 단계를 포함하는 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머를 선별하는 방법에 관한 것이다.

[0013] 본 발명에서 용어, "탄저균"은 탄저의 병원체인 바실러스 안쓰라시스(Bacillus anthracis, B. 안쓰라시스)로 병원균 중 가장 크며, 간균으로, 양쪽 끝이 직각으로 절단된 모양을 하고 있는데, 연쇄상으로 연결된 것도 발견된다. 편모가 없고, 운동도 하지 않으며, 조건이 나쁘면 아포를 만들기도 한다. 가열, 일광, 소독제 등에도 강한 저항성을 갖는 특징이 있다.

[0014] 본 발명에서 용어, "바실러스 안쓰라시스(Bacillus anthracis, B. 안쓰라시스)"는 탄저균 독소를 생산하는 탄저균의 하나로, 그람 양성균이며 포자를 형성하는 구균형태의 박테리아이다. 혐기성 및 호기성 조건에서 모두 생장이 가능하다. B. 세레우스 및 B. 츄린겐시스와 유전적 형태학적으로 유사하나, B. 안쓰라시스의 경우 온도, 영양상태가 나쁜 환경에서도 오랜 기간 생존할 수 있는 저항성을 가지고 있는 특징이 있다.

[0015] 본 발명에서 용어, "탄저균 독소"는 B. 안쓰라시스가 가진 세 가지 독소로 이루어져 있다. 방어항원(protective antigen, PA), 치사 요소(lethal factor, LF) 그리고 부종요소(edema factor, EF)로 구성되어 있으며, 방어항원은 세포 수용체와 결합하여 활성화 과정을 거친 후 LF 혹은 EF를 세포질 안으로 이동시켜 주는 역할을 한다. LF는 금속이온(Zn^{2+}) 의존적 단백질 가수분해 효소로써 탄저병에 감염된 동물들의 치사독소로 작용하게 된다.

[0016] 상기, "방어항원(protective antigen, PA)"은 탄저균이 가지는 외독소 중 하나이다. 방어항원은 독립적으로 병원성을 나타낼 수 없고 LF와 결합하면 "lethal toxin(LTx)"으로 작용하고 부종요소와 결합하면 "edema toxin(ETx)"으로 작용한다. 방어항원이 세포 표면의 수용체 즉, anthrax tixun receptor(ATR)"와 결합하면 퓨린 계열의 단백질 분해효소에 의해 N 말단 일부가 잘리게 되고 방어항원의 일부는 헵타머(heptamer)를 이루게 되어 LF 혹은 EF가 경쟁적으로 붙게 된다. 이렇게 조합된 중합체들은 세포 내로 들어가게 되고 그 즉시 엔도솜의 형태가 된다. 독소 중합체들은 엔도솜 안에서 방어항원의 헵타머안의 낮은 pH 변화에 따라 LF 또는 EF가 엔도솜의 막을 통해 세포질 안으로 이동하게 된다. 세포질 안으로 들어간 EF는 칼슘-킬모듈린 의존적 아데닐레이트 사이클라아제로써 세포질 내에서의 cAMP의 농도를 증가시켜 부종을 일으키게 된다. LF는 금속(Zn^{2+}) 의존적 단백질 가수분해 효소로써 현재까지 세포 내 성장, 분화, 사멸 등의 다양한 신호전달을 조절하는 MAP kinase kinase(MAPKK)를 절단하는 것으로 보고되어 있다.

[0017] 본 발명에서 용어, "앱타머(또는, 핵산 리간드라 칭함)"는 특정의 3차원 입체형태를 채택하는 능력에 의해 표적과 결합하여 표적에 대해 길항 (즉, 억제) 효과를 갖는 핵산을 의미한다. 본 발명의 표적은 탄저균 독소의 방어항원(PA) 이며, 따라서 용어 PA 앱타머가 사용된다. 앱타머에 의한 표적의 억제는 표적의 결합에 의해, 표적을 촉매적으로 변화시키는 것에 의해, 표적 또는 표적의 기능적 활성을 변경/변화시키는 방식으로 표적과 반응하는 것에 의해, 표적에 공유적으로 부착하는 것에 의해, 표적과 다른 분자 사이의 반응을 촉진시키는 것에 의해 일어날 수 있다. 앱타머는 다수의 리보뉴클레오티드 단위, 데옥시리보뉴클레오티드 단위, 또는 두 가지 유형의 뉴클레오티드 잔기의 혼합물로 구성될 수 있다. 앱타머는 하나 이상의 변형된 염기, 당 또는 포스페이트 주쇄 단위를 추가로 포함할 수 있다.

[0018] 앱타머는 올리고머 또는 올리고뉴클레오티드 생산에 관한 임의의 공지된 방법으로 제조할 수 있다. 많은 합성

방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 잔여 퓨린 리보뉴클레오티드를 함유하고, 3'-엑소뉴클레아제에 의한 궁극적인 분해를 막기 위해 적합한 3'-말단, 예를 들어 역전된 티미딘 잔기 또는 3'-말단에서의 2개의 포스포로티오에이트 연결기를 보유하는 2'-O-알릴 개질된 올리고머는 임의의 시판되는 DNA/RNA 합성기에서 고상 베타-시아노에틸 포스포르아미디트 화학에 의해 합성할 수 있다. 이러한 방법은 2'-O-터트(tert)-부틸디메틸실릴(TBDMS) 보호 전략이고, 모든 필요한 3'-O-포스포르아미디트는 시판된다. 또한, 아미노메틸폴리스티렌은 그의 유리한 성질 때문에 지원 물질로서 사용될 수 있다. 플루오레신은 시판되는 플루오레신 포스포르아미디트를 이용함으로써, 합성 중에 기질 RNA의 5'-말단에 첨가될 수 있다. 합성이 종료되면, 모든 염기 불안정 보호기는 55℃에서 밀봉 바이알 중의 진한 암모니아/에탄올 (3: 1 v/v) 수용액으로 8시간 처리함으로써 제거할 수 있다. 동결건조 후, TBDMS 보호된 올리고머를 60℃에서 2시간 동안 트리에틸아민 트리히드로플루오라이드/트리에틸아민/N-메틸피롤리디논의 혼합물로 처리하여 중성 조건하에서의 실릴 보호기의 신속하고 효율적인 제거를 달성할 수 있다. 그 후, 완전히 탈보호된 올리고머는 카탈라(Cathala) 및 브루넬(Brunel)의 방법에 따라 부탄올로 침전될 수 있다. 정제는 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 또는 역상 HPLC와 이온 교환 HPLC의 조합으로 수행할 수 있다. 세포에서 사용하기 위해, 아세톤 중의 과염소산나트륨으로의 침전으로 합성 올리고머를 그의 나트륨 염으로 전환시킬 수 있다. 그 후, 잔류 염의 흔적은 시판되는 작은 일회용 겔 여과 컬럼을 이용하여 제거할 수 있다. 최종 단계로서, 매트릭스 보조의 레이저 탈착 질량 분석법 및 뉴클레오시드 염기 조성물 분석에 의해 단리된 올리고머의 진위를 확인할 수 있다. 뉴클레오티드 서브유닛이 효소적 조작에 이용가능한 경우, 개시된 앱타머는 또한 효소적 방법을 통해 제조될 수 있다.

[0019] 특정 표적 분자와의 핵산 리간드 결합의 정련 또는 강화 또는 추가의 앱타머의 선택을 위해 개조될 수 있는 몇몇 기술이 존재한다. 일반적으로 "시험관내 유전학"으로 언급되는 한 기술은 랜덤한 서열의 풀로부터의 선택에 의한 앱타머 길항제의 단리를 포함한다. 개시된 앱타머가 단리될 수 있는 핵산 분자의 풀은 대략 20 내지 40개의 뉴클레오티드의 가변 서열을 플랭킹(flanking)하는 불변 서열을 포함할 수 있다. 상기 방법은 지수적 향상에 의한 리간드의 선택적 진전 (Selective Evolution of Ligands by EXponential Enrichment; SELEX)이라고 명명되어 왔다. SELEX 및 관련 방법에 의해 본 발명의 앱타머 길항제를 발생시키기 위한 조성물 및 방법은 당업계에 공지되어 있다. 요컨대, SELEX 방법은 결합 친화도 및 선택도에 대한 사실상 임의의 원하는 기준을 달성하기 위해, 동일한 일반적 선택 계획을 이용하여, 후보 올리고뉴클레오티드의 혼합물로부터의 선택 및 선택된 표적으로의 결합의 단계적 반복, 분리 및 증폭을 포함한다. 핵산의 혼합물로부터 출발하고, 전형적으로는 랜덤화된 서열의 절편을 포함하면서, SELEX 방법은 결합에 유리한 조건하에서 혼합물을 표적과 접촉시키는 단계, 미결합 핵산을 표적 분자에 특이적으로 결합된 상기 핵산으로부터 분리하는 단계, 핵산-표적 복합체를 해리시키는 단계, 핵산-표적 복합체로부터 해리된 핵산을 증폭시켜 핵산의 리간드-풍부 혼합물을 수득하는 단계, 그 후 원하는 대로 다수의 주기를 통해 결합의 단계를 반복, 분리, 해리 및 증폭하여 표적 분자에 대한 고특이적성 고친화도 핵산 리간드를 수득하는 단계를 포함한다.

[0020] 본 발명에서 용어, "형광표지자“는 당업계에 공지된 발색을 위한 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 및 발색 기질 등을 포함할 수 있으며 이에 제한되는 것은 아니다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96웰 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 96웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 퍼옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 퍼스파타아제(alkaline phosphatase)가 사용될 수 있고, 형광물질은 fluorescein, rhodamine, Cy3, Cy5, FITC(poly L-lysinefluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate), 아크리디늄 에스테르, 이소루미놀 유도체, 콜로이드, 금, 착색된 라텍스, 또는 Cyber Green®일 수 있고, 바람직하게 Cyber Green(SYBR® Green)(Cat no. S7563, Cat no. S7567, Cat no. S7585, Cat no. S7580) 또는 올리그린®(OliGreen, OG)(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492)일 수 있다.

[0021] 본 발명에서 용어, "올리그린®(OliGreen, OG)(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492) "은 본 발명의 앱타머와 결합하는 탄저균 독소의 방어항원의 양을 정량적으로 측정하기 위해 표지한 형광 표지자로, 수성용액에서 약한 형광색이지만 단일 나선 또는 이중 나선 DNA에 결합하여 여기되면 더 강하게 발색하며, 각각 480 nm 및 520 nm에서 최대 방사량을 나타낸다. 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 알드리치 케미칼 Co. BSA(Aldrich Chemical)에서 제조한 OliGreen®을 상업적으로 구입하여 제조하였다.

[0022] 본 발명에서 용어, “Cyber Green(SYBR® Green)(Cat no. S7563, Cat no. S7567, Cat no. S7585, Cat no. S7580)”은 본 발명의 앱타머와 결합하는 탄저균 독소의 방어항원의 양을 정량적으로 측정하기 위해 표지한 형광 표지자로, 일반적으로 이중가닥 DNA에 결합해서 형광을 방출하는 intercalator의 역할을 하는 형광표지자이다. SYBR® Green을 이용하여 검출 가능한 파장은 254 nm 내지 300 nm의 범위에 있으며, 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, Molecular Probe(Invitrogen, 미국)사에서 입수한 SYBR® Green을 사용하여 본 발명의 앱타머와 방어항원의 결합 정도를 측정하는데 사용하였다.

[0023] 본 발명의 구체적인 실험예에서는, 본 발명의 앱타머와 방어항원과의 결합수준을 측정하기 위해 앱타머에 결합하는 Cyber Green(SYBR® Green)(Cat no. S7563, Cat no. S7567, Cat no. S7585, Cat no. S7580) 또는 올리그린®(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492)을 이용하여 형광 발색정도를 상대적으로 비교하여 정량하였다. 상기 발색정도를 측정하기 위해 당업계 공지된 다양한 방법이 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명에 따른 형광표지자는 앱타머에 결합하는 특성을 가지나, 방어항원이 존재할 경우 앱타머는 방어항원에 특이적으로 결합하므로, 방어항원은 앱타머와 형광표지자의 결합에 경쟁적으로 참여하게 된다. 정상 대조군 시료 내에서 앱타머와 결합하는 형광표지자가 방어항원이 포함된 시료 내에서는 방어항원의 앱타머와의 특이적 결합으로 인해 형광표지자의 앱타머에의 결합능이 감쇠한다. 마우스 유방암 단백질-올리고(dT) 3차 구조의 X-레이 크리스탈 구조에서, 상기 마우스 유방암 단백질과 마주보는 ssDNA의 티민 염기가 아미노산과 수소결합을 형성하고 인산 축은 수성 용액을 향해 있다. 이러한 구조적 특징으로 인해 앱타머 및 방어항원간의 유사한 반응이 형광표지자의 결합에 방해가 된다. 따라서 구체적인 실험예에서 본 발명자들은 방어항원이 없는 정상 대조군 시료에 비하여 방어항원이 존재하는 시료의 경우 형광표지자 중 하나인 Cyber Green(SYBR® Green)(Cat no. S7563, Cat no. S7567, Cat no. S7585, Cat no. S7580) 또는 올리그린®(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492)의 형광 발색 강도가 낮아짐을 알아내었다.

[0025] 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머를 선별하기 위하여, 시험 앱타머에 형광표지자를 처리하고 상기 앱타머에서 발색되는 형광표지자의 발색 강도를 측정하여 이를 기준값으로 하였다. 형광표지자가 표지된 앱타머를 탄저균 독소의 방어항원이 포함된 시료에 처리하고, 상기 방어항원에 처리된 앱타머와 형광표지자의 발색 강도를 측정하여, 발색 강도의 기준이 되는 값인 방어항원과 결합하지 않은 앱타머에서 형광표지자의 발색강도와 비교하였다. 앱타머와 형광표지자만 결합하여 발색된 기준값과 비교하여, 탄저균 독소의 방어항원과 결합한 앱타머에서 형광표지자의 발색 강도가 낮아진 경우, 상기 앱타머를 탄저균 독소의 방어항원에 특이적으로 결합하는 앱타머로 선별하였다.

[0026] 또한, 본 발명의 앱타머 선별 방법은 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머의 함량과, 상기 형광표지자만을 표지한 단계에서 측정된 형광표지자의 발색 강도와 비교하여 방어항원과 결합한 앱타머에서 형광표지자의 발색 강도의 감소량이 비례하는 것을 특징으로 하는 앱타머 선별 방법일 수 있다.

[0027] 본 발명에서 용어, “형광표지자”는 상기에서 설명한 바와 같으며, 바람직하게는 SYBR® Green(Cat. no. S7563, Cat. no. S7567, Cat. no. S7585, Cat. no. S7580) 또는 올리그린®(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492)일 수 있다.

[0028] 본 발명에서 용어, "시료"는 개체로부터 분리된 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇨, 객담, 림프액 및 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 시료를 포함하며, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 정상 개체로부터 분리된 대조군 시료 및 탄저균 감염이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에 탄저균 독소에 특이적으로 결합 가능한 앱타머를 처리하는 단계; (b) (a)단계의 시료에 형광표지자를 처리하는 단계; (c) (b)단계의 시료 내 앱타머에 결합한 형광표지자의 발색 강도를 비교하는 단계;

및 (d) 대조군 시료에 비해 탄저균 감염 의심되는 개체로부터 분리된 시료 내 앱타머에 결합한 형광표지자의 발색 강도가 낮은 경우, 해당 개체를 탄저균 감염 개체로 판정하는 단계를 포함하는 탄저병 진단을 위한 정보 제공 방법에 관한 것이다.

[0030] 본 발명에서 용어, "대조군"은 탄저균에 감염되지 않아서 탄저균 독소가 포함하는 방어항원을 가지고 있지 않은 정상 시료를 의미한다.

[0031] 본 방법은 앱타머의 탄저균 독소의 방어항원과 경쟁적으로 결합하는 특성을 기초로 방어항원이 없는 대조군 시료의 경우 탄저균에 감염된 시료에 비해 형광 발색 강도가 높은 원리를 이용한다.

[0032] 본 발명에서 용어, “형광표지자”는 상기에서 설명한 바와 같으며, 바람직하게는 SYBR® Green(Cat. no. S7563, Cat. no. S7567, Cat. no. S7585, Cat. no. S7580) 또는 올리그린®(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492)일 수 있다.

[0033] 본 발명에서 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것으로서, 본 발명의 목적상, 탄저균 독소의 감염 및 탄저병의 발병 여부를 확인하는 것뿐만 아니라 탄저병의 발병 정도를 판단하는 것을 의미한다.

[0034] 본 발명의 앱타머를 이용하는 경우, 개체의 시료로부터 탄저균 독소의 하나인 방어항원과 본발명의 앱타머가 결합하는 정도를 형광의 강도를 통해 확인함으로써 해당 개체의 탄저병 발병 여부를 확인할 수 있다. 앱타머와 방어항원의 결합 수준을 확인하기 위해 형광광도를 측정하는 방법은 상기에서 서술한 방법과 같다.

[0035] 본 발명에 따른 탄저병 진단을 위한 정보제공 방법은 탄저균 방어항원에 특이적으로 결합하는 앱타머 대조군 시료 및 탄저병 의심 개체에서 분리한 시료에 각각 처리한 후, 이들의 정량적 분석을 위하여 형광표지자를 처리하고 앱타머와 방어항원의 결합 수준을 측정하여 대조군 및 탄저균 감염 의심개체의 형광 발색 강도를 비교함으로써, 달성될 수 있다.

[0036] 바람직하게, 상기 방법은 시료 내 탄저균 독소 함량에 비례하여, 대조군 시료에 비해 탄저균 감염 의심되는 개체로부터 분리된 시료 내 앱타머에 결합한 Cyber Green(SYBR® Green)(Cat no. S7563, Cat no. S7567, Cat no. S7585, Cat no. S7580) 또는 올리그린®(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492) 발색 강도가 감소하는 것을 특징으로 하는 탄저병 진단을 위한 정보 제공 방법 일 수 있다.

[0037] 또한, 상기 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일가닥 DNA 일 수 있다. 본 발명에서는 방어항원과 Cyber Green(SYBR® Green)(Cat no. S7563, Cat no. S7567, Cat no. S7585, Cat no. S7580) 또는 올리그린®(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492)의 앱타머에의 경쟁적 결합으로 인해 탄저균 감염 개체의 경우 방어항원을 가지고 있지 않은 정상의 대조군보다 앱타머와 방어항원의 결합 수준이 높기 때문에 상대적으로 Cyber Green(SYBR® Green)(Cat no. S7563, Cat no. S7567, Cat no. S7585, Cat no. S7580) 또는 올리그린®(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492)의 결합 수준이 낮아지므로, 방어항원이 포함되어 있지 않은 대조군에 비하여 Cyber Green(SYBR® Green)(Cat no. S7563, Cat no. S7567, Cat no. S7585, Cat no. S7580) 또는 올리그린®(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492)의 발색 강도가 낮아지는 것을 확인함으로써 탄저균 감염 여부를 확인할 수 있다.

[0038] 방어항원에 특이적인 앱타머의 제조 및 결합 수준의 측정은 상기에서 서술한 방법과 같으며, 당업계의 공지된 기술에 의해 당업자에게 용이하게 제조될 수 있다.

[0039] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 정상 개체로부터 분리된 대조군 시료 및 탄저균 감염이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머를 처리하는 단계; (b) (a) 단계의 시료에 형

광표지자를 처리하는 단계; (c) (b) 단계의 시료의 형광표지자의 발색 강도를 비교하는 단계; 및 (d) 상기 단계 (c)의 대조군 시료에 비해 탄저균 감염 의심되는 개체로부터 분리된 시료의 형광표지자의 발색 강도가 낮은 경우, 해당 시료에 탄저균 독소가 포함되는 것으로 판정하는 단계를 포함하는 탄저균 독소를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0040] 본 발명은 탄저균 방어항원에 특이적으로 결합하는 앱타머를 대조군 시료 및 탄저병 의심 개체에서 분리한 시료에 각각 처리한 후, 이들의 정량적 분석을 위하여 형광 표지자를 처리하고 앱타머와 방어항원의 결합 수준을 측정하여 대조군 및 탄저균 감염 의심개체의 형광 발색 강도를 비교하여 탄저균 감염 의심 개체의 형광 발색 강도가 낮은 경우, 해당 개체에서 탄저균 독소를 검출할 수 있다.

[0041] 본 발명에서 용어, "형광표지자"는 상기에서 설명한 바와 같으며, 바람직하게는 SYBRGreen(Cat. no. S7563, Cat. no. S7567, Cat. no. S7585, Cat. no. S7580) 또는 올리그린®(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492)일 수 있다.

[0042] 바람직하게, 상기 방법은 시료 내 탄저균 독소 함량에 비례하여, 탄저균 감염 의심되는 개체로부터 분리된 시료 내 앱타머에 결합한 형광표지자의 발색 강도가 감소하는 것을 특징으로 하는 탄저균 독소를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0043] 상기 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 단일가닥 DNA 앱타머인 것을 특징으로 하는 방법일 수 있다.

[0044] 방어항원에 특이적인 앱타머의 제조 및 결합 수준의 측정은 상기에서 서술한 방법과 같으며, 당업계의 공지된 기술에 의해 당업자에게 용이하게 제조될 수 있다.

[0045] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 시험 앱타머, 형광표지자, 및 탄저균 독소의 방어항원(Protective antigen:PA)이 포함된 시료를 포함하고, 형광표지자가 결합된 시험 앱타머에 탄저균 독소의 방어항원(Protective antigen: PA)이 포함된 시료를 처리하였을 때 시료 처리 전과 비교하여 시험 앱타머에 결합된 형광표지자의 발색 강도가 감소하는 경우 시험 앱타머를 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 것으로 판정하는 것을 특징으로 하는 탄저균 독소의 방어항원에 특이적인 앱타머 선별용 조성물에 관한 것이다.

[0046] 앱타머와 방어항원의 결합 수준을 확인하기 위해 형광광도를 측정하는 방법은 상기에서 서술한 방법과 같다.

[0047] 본 발명에서 용어, "형광표지자"는 상기에서 설명한 바와 같으며, 바람직하게는 SYBRGreen(Cat. no. S7563, Cat. no. S7567, Cat. no. S7585, Cat. no. S7580) 또는 올리그린®(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492)일 수 있다.

발명의 효과

[0048] 본 발명에 따른 방법을 사용하여, 탄저균 독소의 방어항원에 특이적으로 결합 가능한 앱타머를 선별할 수 있고, 나노몰 이하의 범위에 있는 탄저균 독소까지 정확하고 선택적으로 검출할 수 있으며 탄저병의 진단 기술로도 유용하게 사용가능하다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 DNA 앱타머, 올리고뉴클레오티드, PA 및 PA-결합 앱타머 1 및 2의 복합체의 형광 변조에 기반한 앱타머의 PA 형광 감지 모식도를 나타낸다.

도 2는 5 mM의 HEPES 버퍼(pH=7.4)에서 40 nM 1(실선), 60 nM PA(점선) 및 1-PA(대시)의 존재하에 올리그린®(OliGreen, OG)(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492) 의 형광 방출 스펙트럼을 나타낸다. 형광 강도는 임의의 단위(au)로 점으로 표시하였다.

도 3은 PA의 서로 다른 농도 첨가 후 OG 및 40 nM 1의 형광 방출 스펙트럼의 변화를 나타낸 것이다. 0에서 50 nM의 PA의 농도범위를 나타낸다. λ_{ex}=480 nm, 5 mM HEPES(pH=7.4) 버퍼에서 측정하였다. 도 3의 오른쪽 상단에 삽입된 그래프는 PA 농도차이에 따른 강도의 차이. I_0는 1의 존재시의 올리그린®(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492)의 형광 강도를 나타낸다.

도 4는 1/C1(실선) 및 PA와 함께 배양된 1/C1(대시)의 존재시 OG의 형광 스펙트럼을 나타낸다. 1+2의 혼합물(실선) 및 PA를 처리한 1+2(대시)의 존재시 OG의 형광 반응을 나타낸다.

도 5은 40 nm의 2 (실선) 및 2-PA (점선)의 존재 하에서의 OG의 형광 방사 대역 (λ_{ex} = 480 nm)을 나타낸다. 2-PA는 40 nM의 2를 60 nm 의 PA와 함께 35 ℃ 의 HEPES (pH = 7.4)에서 5분간 배양하여 제조하였다. 형광 광도는 임의 단위 (au)로 나타내었다.

도 6는 1과 OG(흑색), BSA (오렌지색), 및 1-BSA (적색)의 방사대역을 나타낸 것이다. 1-BSA는 40 nM의 1을 80 nM의 BSA와 함께 HEPES에서 배양하여 제조하였다.

도 7은 N3 (흑색) 및 N3-PA (적색) 존재 하에서의 OG의 방사 대역을 나타낸 것이다.

도 8는 40 nM의 PA, 40 nM의 1, 및 1-PA의 원편광 이색성 대역을 나타낸 것이다. 1-PA는 40 nM의 1을 40 nM의 PA와 함께 HEPES (pH = 7.4)에서 배양하여 제조하였다.

도 9는 5 nM의 인산염 버퍼(pH = 7.4)에 있는 40 nM의 1 (실선) 및 1-PA (점선)의 존재 하에서의 OG의 형광 방사 대역 (λ_{ex} = 480 nm)을 나타낸 것이다.

도 10은 pH=(a) 5.3 및 (b) 8.0인 HEPES 버퍼에 있는 40 nM의 1 (실선) 및 1-PA (점선)의 존재 하에서의 OG의 형광 방사 대역을 나타낸 것이다. 형광 광도는 임의의 단위 (au)로 나타내었다.

도 11은 40 nM의 1/C1 (흑색) 및 1/C1-BSA (적색)의 존재 하에서의 OG의 형광 방사 대역을 나타낸 것이다. 1/C1-BSA는 40 nM의 1/C1을 80 nM의 BSA와 함께 HEPES에서 배양하여 제조하였다.

도 12은 PA, 1/C1, 및 1/C1-PA의 CD 대역을 나타낸 것이다.

도 13는 1/C3 (흑색) 및 1/C3-PA (적색)의 OG의 방사 대역을 나타낸 것이다. 형광 광도는 임의의 단위 (au)로 나타내었다.

도 14는 5 mM HEPES 버퍼조건에서, 40 nM(실선) 및 1-PA(점선, 40 nM 1 및 60 nM PA간의 비교)의 존재하에, SYBR® Green I의 형광 방출 스펙트럼을 나타낸다(λex=497 nm) 형광 강도는 임의의 단위(au)로 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0051] **실시예 1: 재료 및 기기**

[0052] SYBR® Green(Cat. no. S7563, Cat. no. S7567, Cat. no. S7567, Cat. no. S7585, Cat. no. S7580, 인비트로젠, 미국)은 Molecular Probe에서 입수하였으며, 올리그린®(OliGreen: OG) 은 알드리치 케미칼 Co. BSA (Aldrich Chemical Co. BSA)에서 입수하였다.(Cat. no. 07582, Cat. no. 011492, 인비트로젠, 미국) 수성 용액의 제조에 사용된 초순수 물은 밀리포어 엘릭스 A3-밀리큐 시스템(MilliQ, Germany)에서 생산되었다. 올리고뉴클레오타이드는 모두 제노텍 Inc. (대전, 한국)에서 구입하여 써모 하이퍼실 골드 컬럼 (Thermo hypersyl gold column, 0.46 x 25 cm)을 사용한 HPLC로 정제하였다. 올리고뉴클레오타이드 농도는 휴렛팩커드 8452A 다이오드-어레이 분광계 (Hewlett-Packard 8452A diode-array spectrometer)에서 260 nm, ε = 6600 M^{-1} cm^{-1}의 흡광도로

분광광도계적으로 측정하였다. 단일나선 DNA 농도를 측정한 후, 상보적인 DNA를 동일한 몰량으로 혼합하여, 이중나선 DNA를 제조하기 위해 90 ℃에서 10분간 가열 냉각 (annealing)한 다음 상온으로 천천히 냉각하였다.

[0053] 방사 대역은 퍼킨 엘머 LS 55 발색 분광광도계 (Perkin-Elmer LS 55 luminescence spectrophotometer)로 수집하였다. 최적 순환은 자스코 J-810 편광계 (JASCO J-810 polarimeter)를 사용하여 상온에서 측정하였다.

[0054] **실시예 2: 방어항원 (PA)의 제조**

[0055] 방어항원은 공지된 바에 따라 정제하였다(H.-Y. Park and M.-Y. Yoon, DNA aptamer specifically binding to Anthrax toxins and uses thereof, Korea Patent, #10-2010-0012799, 2010.02.11).

[0056] **실시예 3: 앱타머를 이용한 방어항원의 검출 및 분석**

[0057] DNA 앱타머에 특이적으로 결합하는 PA를 신호화하기 위해 OG를 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 비공유적으로 표지하고, 두 가지 앱타머 (서열번호 1의 앱타머를 이하 "1"로, 서열번호 2의 앱타머를 이하 "2"로 표기)를 결합시키는 방법을 사용하였다. 앱타머는 제노텍 회사에 의뢰 합성하였다.

[0058] 앱타머 DNA 및 정제된 PA를 5 mM HEPES (pH 7.4)에 용해시키고 스탁 용액 (stock solutions)을 이용하여 다양한 농도로 제조하였다. 전형적인 분석방법에 따라 앱타머 올리고뉴클레오타이드 (40nM)를 5 mM HEPES 버퍼 (pH = 7.4)에서 측정한 양의 PA 또는 BSA를 처리한 용액을 35 ℃에서 5분간 배양하였다. 그 다음, 상기 용액을 상온에서 형광 측정하기 직전에 OG (0.01X)와 혼합하였다. 본 데이터는 3번의 독립적인 측정의 평균값으로부터 얻어진 것이다. 각각 40 nM의 1, 60 nM의 PA, 및 1-PA (1:1.5)와 반응하는 OG의 형광 강도를 비교하였다. 1-PA는 35 ℃에서 5 mM의 HEPES (pH = 7.4)가 있는 PA에 1을 5분간 배양하여 준비하였다. 1과 함께 있는 OG (0.01X)의 형광 강도는 PA만 있는 것에 비해 크게 증가하였다 (도 2). 1-PA 복합체는 1과 함께 있는 OG의 형광 강도를 유의미하게 감소시켰지만, PA만 있는 것에 비하면 약간 높았다. 1-PA의 3차 구조로부터 예측해 보건데, PA가 1과 OG의 결합에 끼어드는 것으로 보인다. PA에 결합하는 다른 앱타머 (2)를 실험한 결과, 앱타머 1에서 얻어진 것과 유사했다 (도 5). 상온에서 1과 PA간의 결합을 실험한 경우에도 형광 결과가 유사하게 얻어진다는 것을 알 수 있으나, 유사한 결과를 얻기 위해서는 2시간 이상의 긴 배양 시간이 필수적이다.

[0059] **실시예 4: 방어항원에 대한 앱타머의 비특이적인 결합 가능성 검토**

[0060] 같은 조건에서 음성 대조군으로서 PA 대신 보바인 세럼 알부민(BSA)을 사용하였다. 1과 BSA (1:2) 용액을 배양해본 결과, 형광 강도가 약간 감소하였으나, PA와의 결과와는 상대적으로 대비되는 차이를 보였다 (도 6).

[0061] 1 및 2와 전혀 상관이 없는 염기 서열을 포함하는 27-머 올리고뉴클레어타이드를 사용하여 비특이적 결합 가능성을 제거하기 위한 다른 대조 실험도 수행하였다. N3와 PA (1:2)의 용액도 형광 강도를 유의미하게 감소시키지는 않았다(도 7). 종합해 보건데, 형광 강도의 유의미한 감소는 PA와 앱타머의 특이적 결합때문인 것으로 확인된다.

[0062] **실시예 5: 방어항원 복합체 형성의 확인**

[0063] 1-PA 복합체의 형성은 원편광 2색성 (circular dichroism, CD)을 사용하여 확인하였다. 1의 특징적인 CD 프로파일은 약 279 및 309 nm에서 양성 타원율을 보였고, PA의 CD 프로파일은 269, 290, 및 310 nm에서 그러하였다. 1-PA 복합체의 형성에 따라 262 및 298 nm에서 새로운 양성 타원율이 나타났다. 따라서, 상기 형광 실험으로부터 얻어진 결과는 CD 실험으로부터 얻어진 결과와 상통한다.

[0064] PA의 분석은 pH 7.4의 5 mM 인산염 버퍼 조건에서도 검사되었다. 그 결과는 HEPES 버퍼에서의 경우와 거의 동일했다 (도 9). 산성 조건은 PA에 구조적인 변화를 야기하고 그 변화는 PA가 막 확장 β-배럴 구조 (membrane-spanning β-barrel conformation)를 형성하게 한다는 것이 보고되었다. 그러나, 1과 PA간의 반응은 같은 형광 실험에서 낮은 PH (pH 5.3) 및 약간 높은 PH (pH 8.0) 조건에서도 pH에 의해 크게 영향을 받지 않았다(도 10).

[0065] 1에 다양한 농도의 PA를 첨가함에 따른 방사 대역의 점진적인 변화가 pH 7.4의 5 mM 인산염 버퍼 조건 반응 조건에서 관찰되었다(도 3). 0에서 50 nM 범위의 PA 농도와 방사 강도간의 관계는 도 3에 삽입하여 나타내었다.

PA의 농도가 40 nM까지 증가함에 따라, 방사 강도는 점차 감소하였으나, 더 높은 농도에서는 더 이상의 강도 변화가 관찰되지 않았다. PA의 농도와 형광 방사간의 선형적인 관계는 0~40 nM 범위 내에서 잘 관찰되었다. 상기 방법은 0.1 nM의 측정 한계로 PA의 분석을 가능하게 한다. 또한 PA 적정 곡선을 통해 PA가 1에 1:1의 비율로 결합한다는 것을 설명한다.

[0066] **실시예 6: 방어항원 및 앱타머의 결합력 측정**

[0067] PA에 1이 얼마나 강하게 결합하는지와 12개 염기로 구성된 1과 상보적인 서열인 C1(서열번호 4)의 첨가에 따라 1에 결합된 PA가 해리되는지를 측정했다. C1을 상온에서 30분간 1-PA 용액에 처리되었을 때, 유의미한 형광 강도의 변화는 관찰되지 않았다. 상기 용액을 35 ℃에서 5분간 배양했을 때에도, 형광 강도에 근거했을 때 C1과 1의 결합에 따른 이중나선의 1/C1 형성을 얻을 수 없었다. 이를 종합해보면, 이러한 데이터는 상기 조건에서 1과 PA간의 반응이 얼마나 강한지를 나타낸다. 그 다음, 1/C1의 재조합 가능성에 의한 1-PA의 형성을 체크하기 위해 이중나선의 1/C1을 PA로 처리하였다. 상보적인 서열 (5 염기쌍에서만)과 잡종화된 트롬빈 특이적인 DNA 앱타머를 트롬빈-앱타머 복합체를 형성하기 위해 트롬빈과 함께 상온에서 배양하여 재조합하였다. PA에 1/C1 (12 염기쌍)을 상온에서 2시간 배양한 결과, 형광 강도는 1-PA에서 얻어진 정도까지 감소하였는데, 이는 dsDNA의 재조합에 의한 1-PA의 3차 복합체의 형성이 열역학적으로 유리하다는 것을 의미한다. 그러나, BAS와의 배양에 의하면 어떤 유의미한 강도 변화도 관찰되지 않았다 (도 11). 1/C1과 PA의 CD 데이터 역시 1-PA의 형성을 뒷받침한다 (도 12). dsDNA의 형성을 위해 C1 대신 더 긴 상보적인 서열 C3 (29-머)(서열번호 5)를 사용하여 같은 조건에서 PA와 배양한 후에도 그러한 유의미한 형광 감소는 관찰되지 않았다 (도 13). 이는 훨씬 더 많은 수소결합을 갖는 29-머 올리고뉴클레오타이드의 이중나선이 상온에서 PA에 의해 재조합되기에는 상기 올리고뉴클레오타이드의 결합이 더 강하다는 것을 의미한다.

[0068] **실시예 7: 앱타머 및 방어항원의 결합부위 확인**

[0069] 1 및 2의 PA 에의 결합 부위를 이해하기 위해, 1과 2 (1+2)의 혼합 용액을 PA와 배양하여 1 및 2로부터 각각 얻어진 결과 형광 측정을 통해 비교하였다. 1+2를 포함하는 용액에서 얻어진 OG의 형광 강도는 2 단독으로부터 얻어진 결과와 유사하였다. PA와 함께 배양된 1+2 용액은 2와 독립적으로 혼합된 1-PA의 용액에서 얻어진 것과 동일한 강도를 나타냈는데, 이는 1 및 2의 결합 부위가 겹쳐져 있거나 PA 및 높은 친화도로 PA에 결합하는 1과 동일한 부분이라는 것을 의미한다.

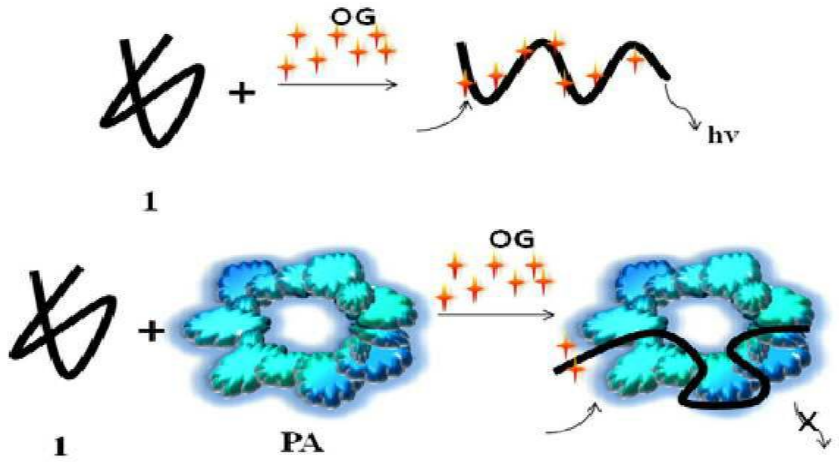
[0070] **실시예 8: SYBR® Green을 이용한 방어항원의 검출 및 분석**

[0071] DNA 앱타머에 특이적으로 결합하는 PA를 신호화하기 위해 SYBR® Green를 사용하여 올리고뉴클레오타이드를 비공유적으로 표지하고, 두 가지 앱타머 (서열번호 1의 앱타머를 이하 "1"로 표기)를 결합시키는 방법을 사용하였다. 앱타머는 제노텍 회사에 의뢰 합성하였다.

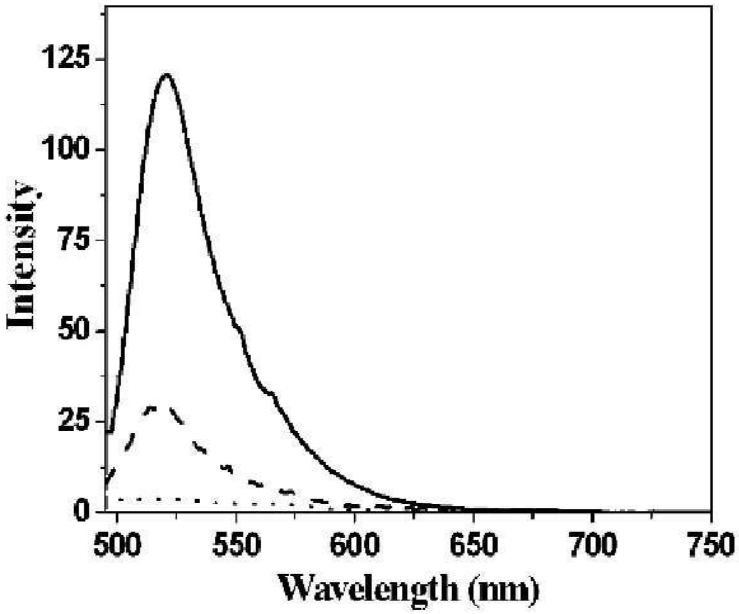
[0072] 실험방법은 실시예 3에서 수행한 방법과 동일한 방법으로 수행하였으며, SYBR® Green(Cat. no. S7563, Cat. no. S7567, Cat. no. S7585, Cat. no. S7580)을 이용한 형광의 발색은 제조사의 지시에 따라 최적화된 조건에서 반응시켰다. 실험결과, 하기 도 14에서 보는 바와 같이 방어항원이 존재하는 경우 앱타머와 형광표지자인 SYBR® Green(Cat. no. S7563, Cat. no. S7567, Cat. no. S7585, Cat. no. S7580)간의 결합보다 방어항원과 앱타머와의 결합으로 인해 SYBR® Green(Cat. no. S7563, Cat. no. S7567, Cat. no. S7585, Cat. no. S7580)의 형광강도가 특이적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

도면

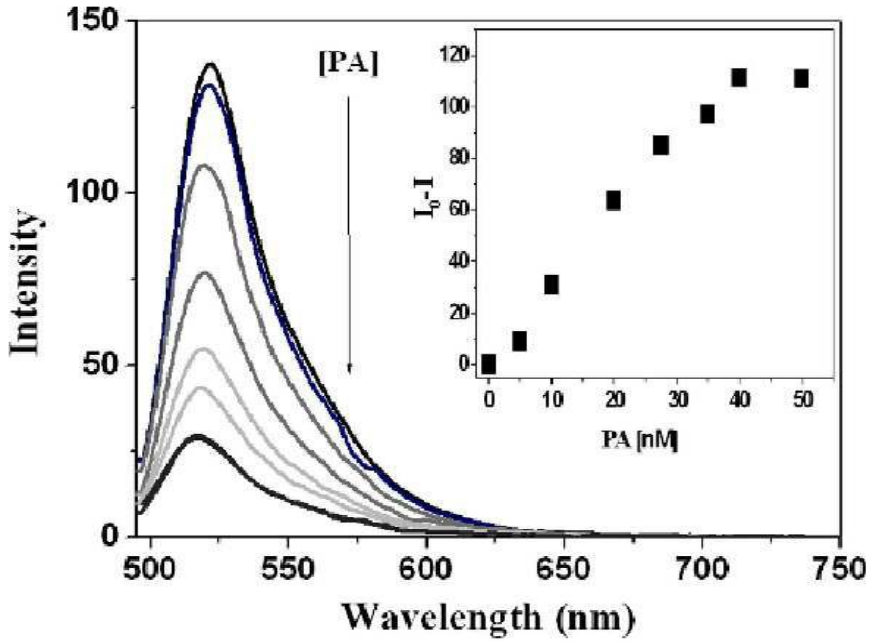
도면1


OG
hv
1
OG
1
PA

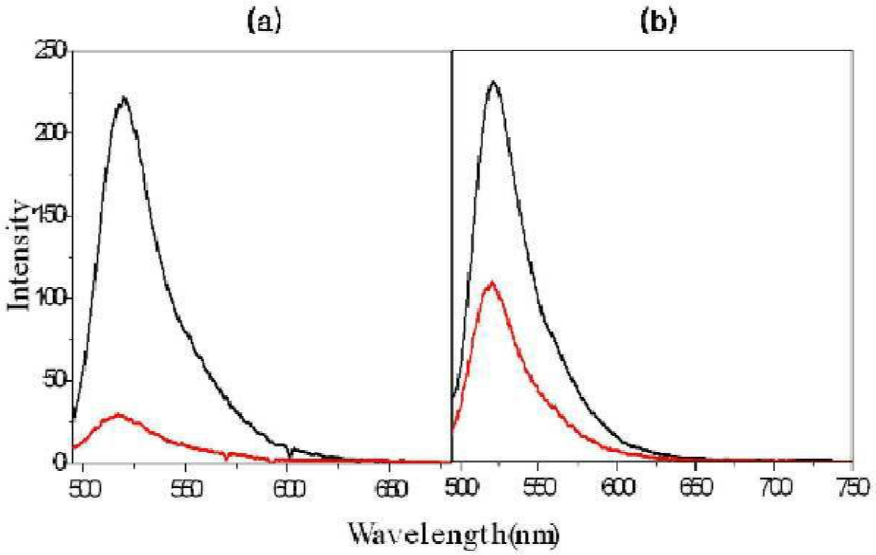
도면2


125
100
75
50
25
0
Intensity
500
550
600
650
700
750
Wavelength (nm)

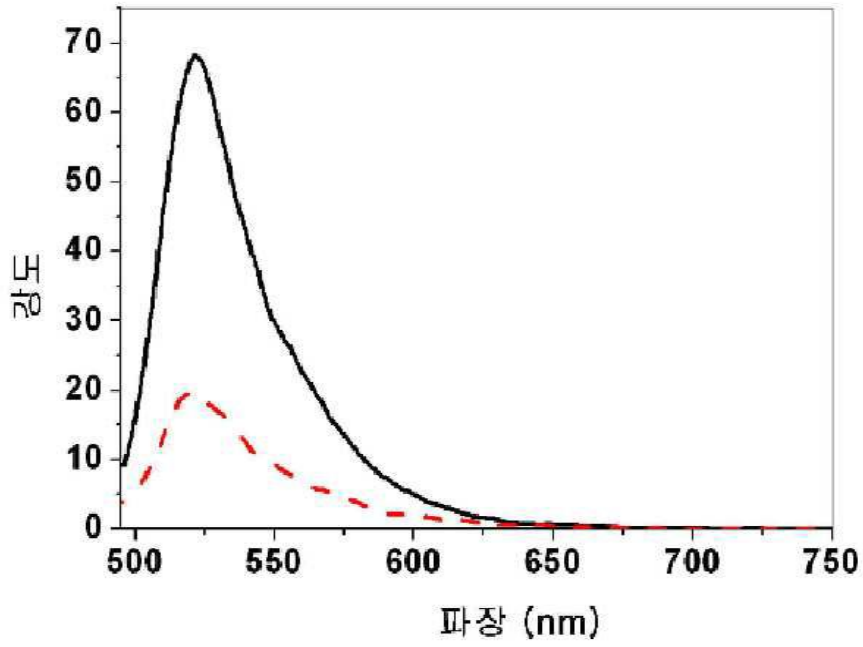
도면3


[PA]
Intensity
Wavelength (nm)
I_0-I
PA [nM]

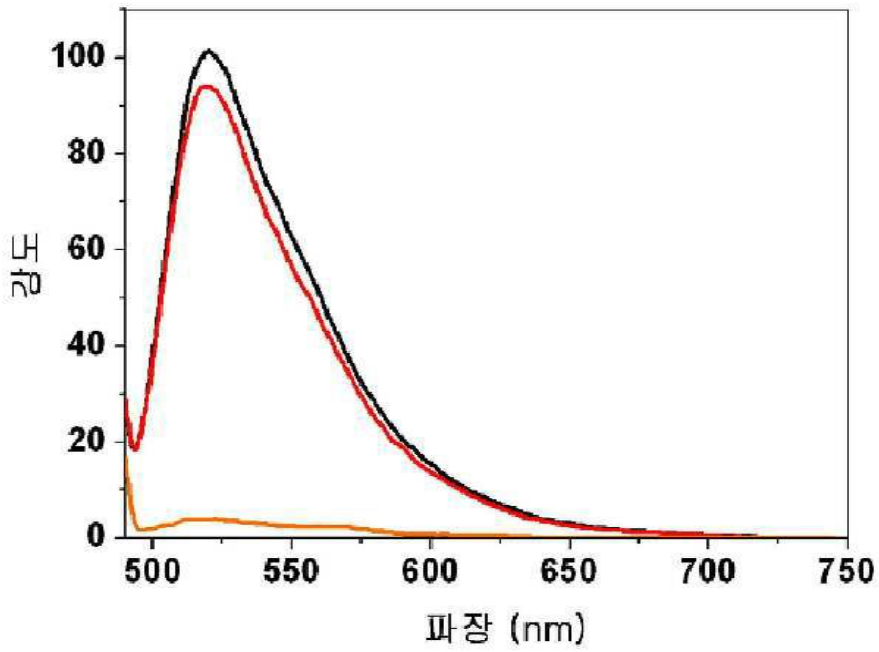
도면4


(a)
(b)
Intensity
Wavelength(nm)

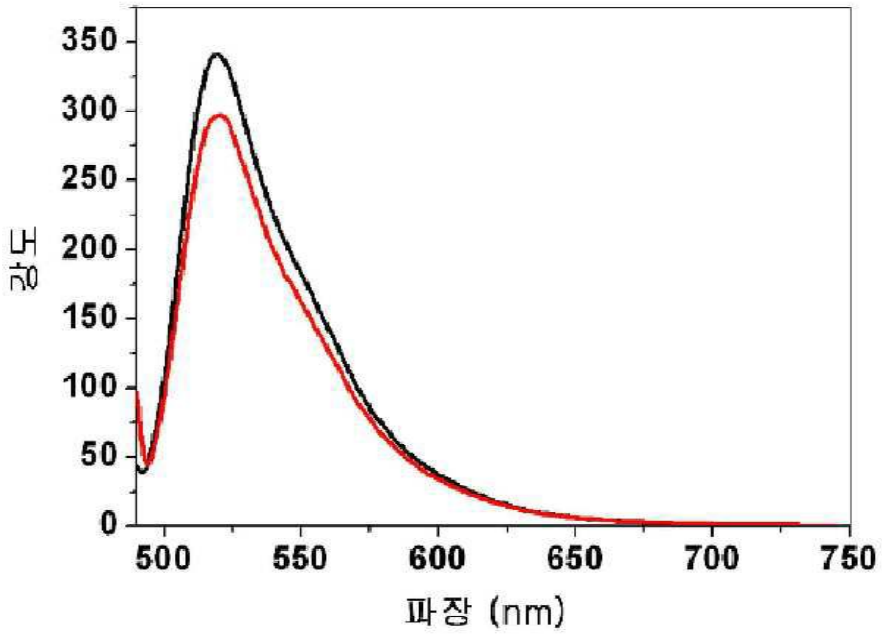
도면5


70
60
50
40
30
20
10
0
강도
500
550
600
650
700
750
파장 (nm)

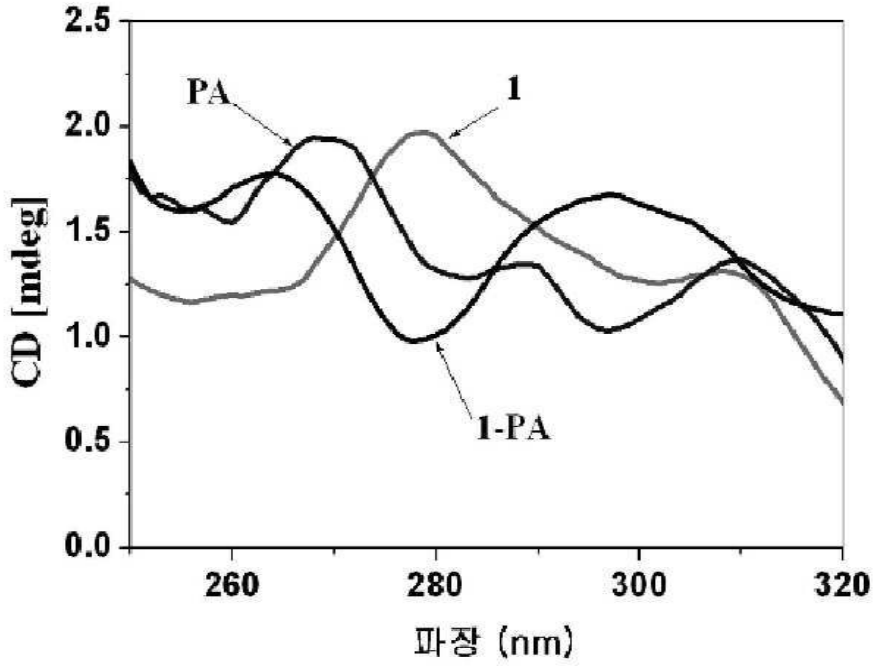
도면6


100
80
60
40
20
0
강도
500
550
600
650
700
750
파장 (nm)

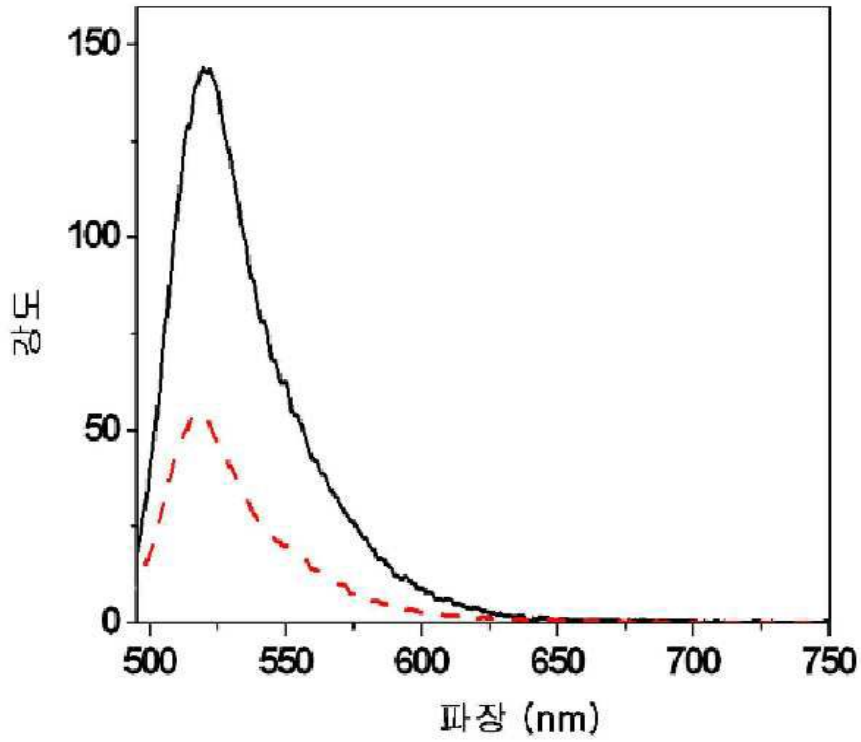
도면7


350
300
250
200
150
100
50
0
강도
500
550
600
650
700
750
파장 (nm)

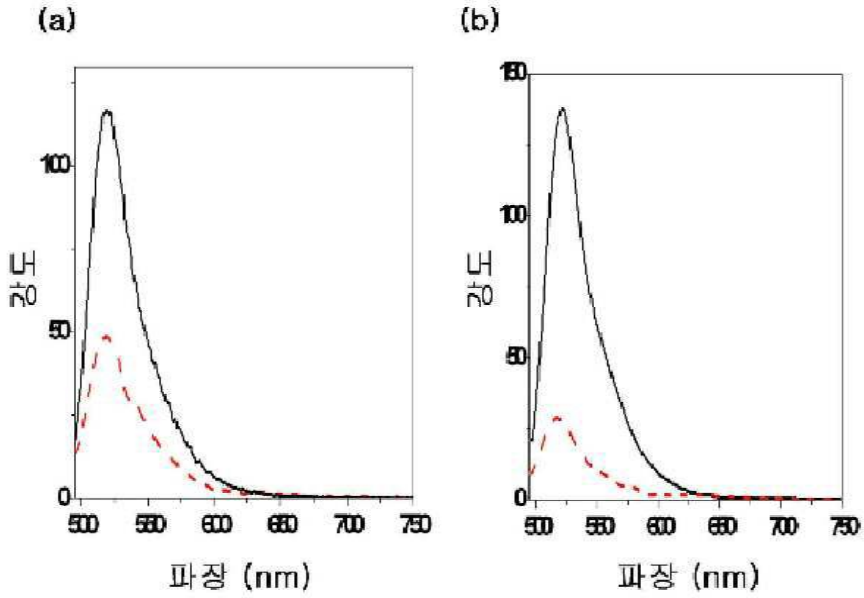
도면8


2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
CD [mdeg]
PA
1
1-PA
260
280
300
320
파장 (nm)

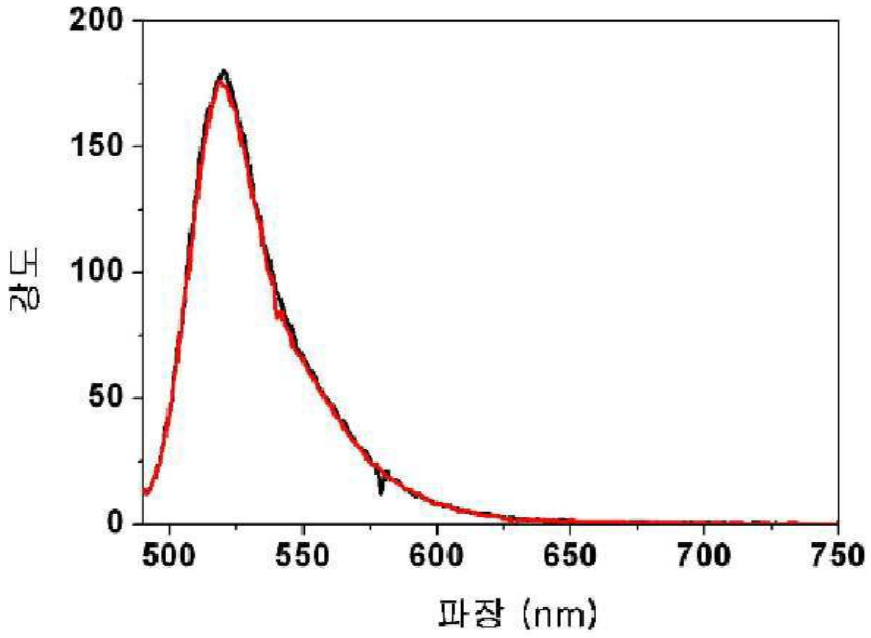
도면9



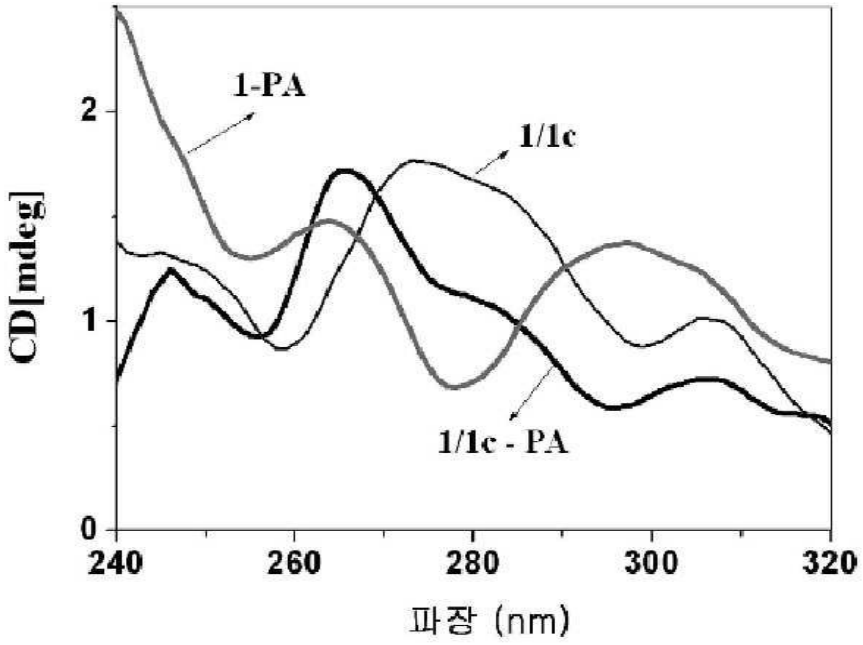
도면10



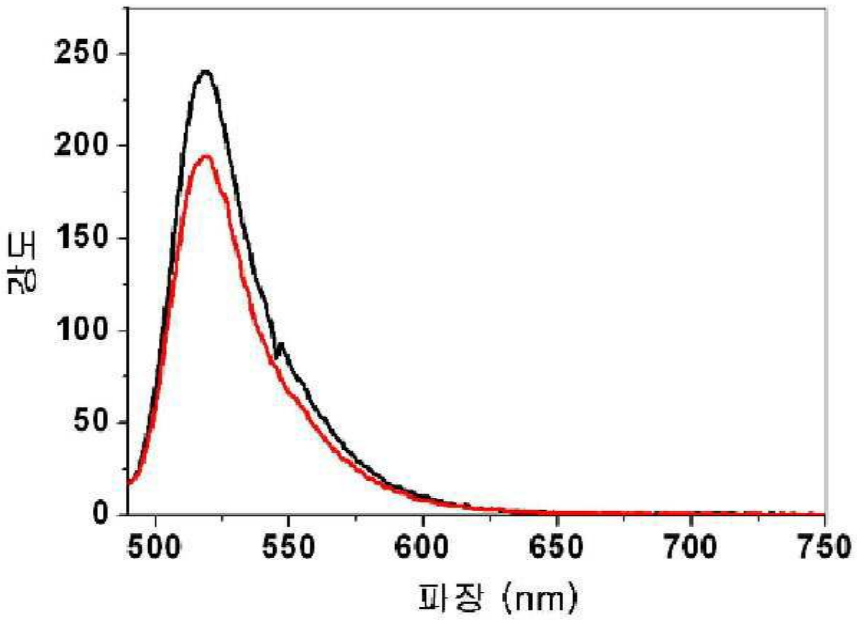
도면11


200
150
100
50
0
강도
500
550
600
650
700
750
파장 (nm)

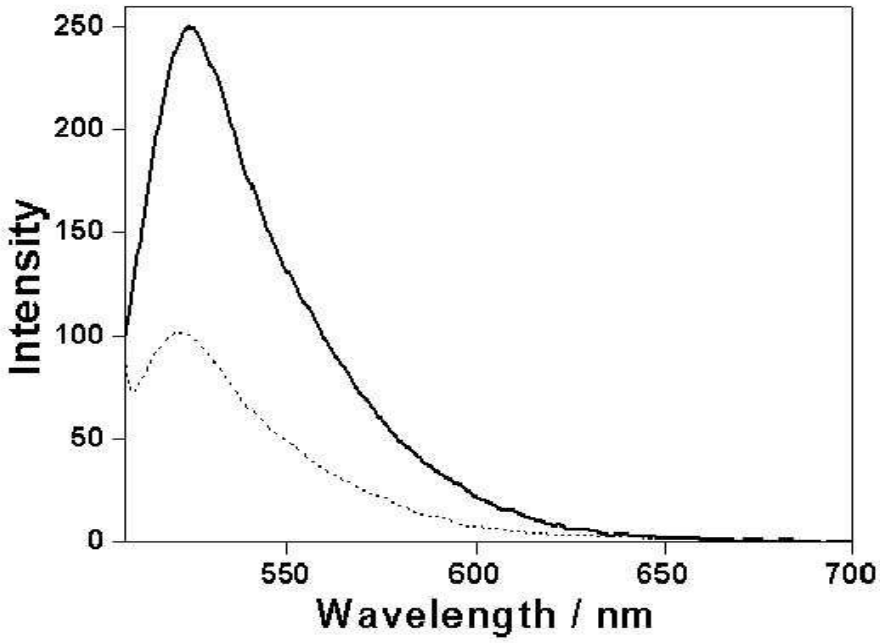
도면12


1-PA
1/1c
1/1c - PA
2
1
0
CD[mdeg]
240
260
280
300
320
파장 (nm)

도면13



도면14



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Selection method of aptamer capable of specifically biding to protective antigen of anthrax toxin

<130> PA100383KR

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 29-mer DNA aptamers 1 for protective antigen

<400> 1

gatgtgggtg tagttggagg gtaaacgtt 29

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 29-mer DNA aptamers 2 for protective antigen

<400> 2

cagaccgtaa gggatgccgc ctaaacacc 29

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N3 oligonucleotide

<400> 3

aaatatatat atgggatata tataaaa 27

<210> 4

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C1 oligonucletide

<400> 4

ctacacccac at 12

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> C3 oligonucleotide

<400> 5

ctacacccac atcaacctcc catttgcaa 29