(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0110684
(43) 공개일자 2016년09월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/115 (2010.01) *C01B 31/04* (2006.01)
C01G 55/00 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/115 (2013.01)
C01B 31/0438 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0033409
(22) 출원일자 2015년03월10일
심사청구일자 2015년03월10일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
하상수
경기도 남양주시 도농로 34 205동 2903호 (도농동,부영아파트2단지)
조예슬
인천광역시 부평구 부흥로243번길 7 101동 2104호 (부평동,대우아파트)
이은정
서울특별시 동대문구 장안벚꽃로 107 112동 1602호 (장안동,장안현대홈타운아파트)
(74) 대리인
손민

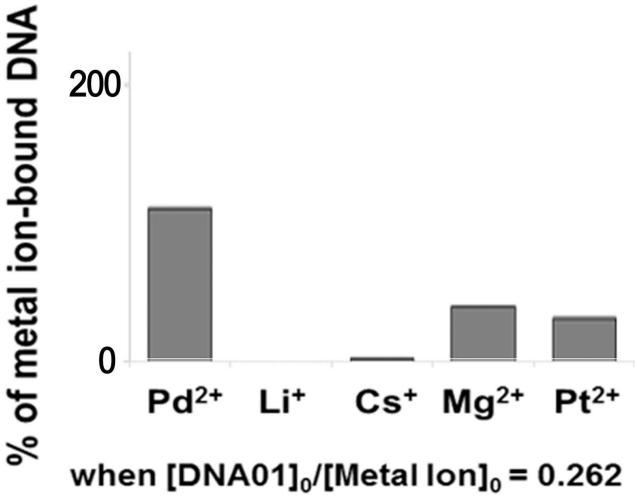
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **팔라듐 이온 특이적 DNA 앱타머 및 이의 선별 방법**

(57) 요 약

본 발명은 특정 염기서열을 갖는 팔라듐 이온 특이적 DNA 앱타머, 상기 팔라듐 이온 특이적 DNA 앱타머를 포함하는 팔라듐 검출 또는 생산용 조성물, 상기 팔라듐 생산용 조성물을 이용하여 팔라듐 이온 함유 시료로부터 팔라듐을 생산하는 방법 및 표면에 산화 그래핀이 흡착된 산화 그래핀-실리카 입자 복합체를 이용하여 표적 물질에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 선별하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C01G 55/00 (2013.01)
C12Q 1/6876 (2013.01)
G01N 33/53 (2013.01)
C12N 2310/16 (2013.01)
C12Q 2525/205 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012-001680
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국과학재단
연구사업명 일반연구자지원사업
연구과제명 나노물질을 이용한 고감도의 DNA 메틴화 정량분석방법 개발
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1, 2 및 4 중 어느 하나로 표시되는 염기서열을 갖는 팔라듐 이온 특이적 DNA 앱타머.

청구항 2

제1항의 팔라듐 이온 특이적 DNA 앱타머를 포함하는 팔라듐 검출 또는 생산용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 DNA 앱타머는 고형 지지체에 접합된 것인 팔라듐 검출 또는 생산용 조성물.

청구항 4

팔라듐 이온을 함유한 것으로 예상되는 시료를 제2항 또는 제3항에 따른 팔라듐 생산용 조성물와 접촉시키는 단계를 포함하는, 팔라듐 이온 함유 시료로부터 팔라듐을 분리 및 제조하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 팔라듐 이온 함유 시료는 해수인 것인 방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

시료로부터 DNA 앱타머와 결합된 팔라듐 이온을 분리하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

분리된 DNA 앱타머와 결합된 팔라듐 이온을 환원시켜 팔라듐을 형성하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 8

표면에 산화 그래핀이 흡착된 산화 그래핀-실리카 입자 복합체에 DNA 앱타머 후보군을 흡착시키는 제1단계;

상기 DNA 앱타머 후보군이 흡착된 산화 그래핀-실리카 입자 복합체를 표적 물질과 반응시키는 제2단계; 및

상기 반응에 의해 탈착된 DNA를 회수하는 제3단계;를 포함하는,

표적 물질에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 선별하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 제1단계는 표면에 아민기를 포함하는 실리카 입자를 산화 그래핀 분산액과 혼합하여 교반하여 반응시켜 산화 그래핀-실리카 입자 복합체를 준비하는 제1-1단계를 추가로 포함하는 것인 DNA 앱타머를 선별하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 제1단계는 실리카 입자를 산화 그래핀 분산액과 혼합하여 교반하여 반응시킨 후 원심분리하여 상층액을 제거하는 제1-2단계를 추가로 포함하는 것인 DNA 앱타머를 선별하는 방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 DNA 앱타머 후보군은 서로 다른 서열을 갖는 1종 이상의 단일가닥 DNA을 포함하는 것인 DNA 앱타머를 선별하는 방법.

청구항 12

제8항에 있어서,

상기 제1단계 이후 원심분리하여 상층액을 제거하는 제1-1단계를 추가로 포함하는 것인 DNA 앱타머를 선별하는 방법.

청구항 13

제8항에 있어서,

상기 표적 물질은 금속 이온, 핵산, 단백질, 세포 및 화합물로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 DNA 앱타머를 선별하는 방법.

청구항 14

제8항에 있어서,

상기 제3단계는 제2단계의 반응액을 원심분리하여 상층액을 회수함으로써 달성되는 것인 DNA 앱타머를 선별하는 방법.

청구항 15

제8항에 있어서,

상기 제3단계 이후, 탈착된 DNA의 염기서열을 분석하는 제3-1단계를 추가로 포함하는 것인 DNA 앱타머를 선별하는 방법.

청구항 16

제8항에 있어서,

DNA 염기서열 분석에 앞서, 제3단계로부터 회수한 DNA를 증폭시키는 제3-2단계를 추가로 포함하는 것인 DNA 앱타머를 선별하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 DNA 증폭은 PCR에 의해 달성되는 것인 DNA 앱타머를 선별하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 특정 염기서열을 갖는 팔라듐 이온 특이적 DNA 앱타머, 상기 팔라듐 이온 특이적 DNA 앱타머를 포함하는 팔라듐 검출 또는 생산용 조성물, 상기 팔라듐 생산용 조성물을 이용하여 팔라듐 이온 함유 시료로부터 팔라듐을 생산하는 방법 및 표면에 산화 그래핀이 흡착된 산화 그래핀-실리카 입자 복합체를 이용하여 표적 물질에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 선별하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 물에 함유된 금속을 킬레이트화하는 것은 환경 보호 및 자원 회수를 위해 중요하다. 특히, 금속-특이적 킬레이팅 수지는 금속 킬레이트화에 있어서 단순한 이온 교환 수지보다 훨씬 더 효과적인데, 그 이유는 그들이 표적 금속에 대해 더 높은 선택성과 더 큰 착물화 상수를 나타내며 음용수 또는 폐수 처리 및 해수로부터 표적 금속 이온의 추출과 같은 실용적 용도에서 유용하기 때문이다.

[0003] 해수는 각종 금속함유 이온 예컨대, 우라늄을 함유하는 우라닐 이온을 비롯하여 인듐 및 팔라듐 등의 희소 금속을 함유한다. 따라서, 해수는 우라늄뿐만 아니라 인듐 또는 팔라듐과 같은 희소 금속의 공급원으로 유용하며, 이로부터 이들 금속함유 이온을 분리하는 것은 매우 중요하다. 예컨대, 팔라듐의 경우, 매장 집중도(98.7%)와 생산 집중도(90.1%)가 모두 높아 공급 불안정성이 매우 높으므로, 이를 보다 간단하고 빠르게 찾아내어 회수하는 방법을 발굴하는 것이 필요하다.

[0004] 한편, 앱타머(aptamer)는 DNA, RNA, 소분자, 펩티드 및 단백질 등의 표적 물질과 높은 특이성 및 친화력을 갖고 결합할 수 있는 비-천연 발생의 구조화된 올리고뉴클레오티드로, 표적 물질에 대한 특이성으로 인해 화학적 항체라고도 불린다. 그러나, 앱타머는 단백질인 항체에 비하여 분자의 크기가 작으며, 필요에 따라 다양한 화학적 변형이 가능하고, 실온에서 보관 및 운반이 용이하며, 변성이 되더라도 짧은 시간 내에 재생시킬 수 있는 장점이 있다. 또한, 앱타머는 면역반응이 아닌 화학적 합성 과정을 통해 제조되므로 생산에 소요되는 비용과 시간을 절약할 수 있으며, 표적의 범위가 더 넓다는 장점을 갖는다. 따라서, 이러한 앱타머의 장점을 이용하여 치료의 수단이나 표적 물질 검출을 위한 센서로 사용하기 위한 다양한 연구가 시도되고 있다.

[0005] 일반적으로 앱타머는 셀렉스(SELEX; systematic evolution of ligands by exponential enrichment)라 불리는 시험관 내 선택 과정에 의해 선별된다. SELEX에서는 보통 10^{15}개 이상의 다양한 염기서열을 갖는 올리고뉴클레오티드 집합체를 앱타머 후보 분자들로 사용할 수 있는데, 각각의 올리고뉴클레오티드는 염기서열에 따라 각기 다른 안정한 3차원적 구조를 가지므로 다양한 표적 물질과 결합할 수 있는 능력을 갖는다(Oliphant A. R. *et al.*, 1989, *Mol. Cell Biol.*, 9: 2944-2949; Ellington A. D. and Szostak J. W., 1990, Nature, 346: 818-822). 예컨대, 특정 올리고뉴클레오티드는 고유의 3차원적 구조를 형성함으로써 특정 표적 물질와 결합할 수 있으므로, 일반적으로 친화력 크로마토그래피 방법을 이용하여 사용한 올리고뉴클레오티드 집합체 중 표적 물질

와 결합하지 않은 올리고뉴클레오티드들을 제거하고 상기 올리고뉴클레이티드와 표적 물질의 결합체를 선택적으로 수득할 수 있다. 이와 같이 선택된 올리고뉴클레이티드와 표적 물질의 결합체에서 표적 물질로부터 올리고뉴클레오티드를 분리하여 증폭시킴으로써 표적 물질에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드 즉, 표적 물질에 특이적인 앱타머를 발굴할 수 있다. 이와 같은 기존의 SELEX 방법은 표적 물질과 올리고뉴클레오티드의 결합 및 상기 결합체의 선택적인 분리를 위하여 크로마토그래피 컬럼 수지에 표적 물질을 고정화하는 과정이 필수적이었다. 따라서, 화학적 반응이 용이한 작용기를 포함하지 않는 유/무기 분자 등에 특이적인 앱타머를 발굴하는 것은 매우 어려우며, 단일 분자 내에 다양한 작용기를 갖는 단백질이나 몇몇 유기 분자에 대한 앱타머를 발굴하는 과정 역시 다소 복잡한 단점이 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 해수로부터 희소 금속 예컨대, 팔라듐을 생산하기 위하여 예의 연구노력한 결과, 팔라듐 이온에 특이적으로 결합하는 특정 염기서열의 DNA 앱타머를 발굴하였다. 또한, 표적 물질의 고정화 과정이 배제된 앱타머 선별 방법을 발굴하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 표면에 산화 그래핀이 흡착된 산화 그래핀-실리카 입자 복합체에 테스트하고자 하는 일련의 DNA 앱타머 후보군을 흡착시키고 이를 표적 물질과 반응시켜 탈착된 DNA를 회수하고 이의 염기서열을 분석함으로써 표적 물질에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 효율적으로 선별할 수 있음을 확인하고, 상기 방법을 이용하여 팔라듐 이온 특이적 앱타머를 개발하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 특정 염기서열을 갖는 팔라듐 이온 특이적 DNA 앱타머를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 팔라듐 이온 특이적 DNA 앱타머를 포함하는 팔라듐 검출 또는 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 팔라듐 이온을 함유한 것으로 예상되는 시료를 상기 팔라듐 생산용 조성물와 접촉시키는 단계를 포함하는, 팔라듐 이온 함유 시료로부터 팔라듐을 분리 및 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 DNA 앱타머 후보군을 흡착시킨, 표면에 산화 그래핀이 흡착된 산화 그래핀-실리카 입자 복합체를 이용하여 표적 물질에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 선별하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 팔라듐 이온에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 제공한다. 상기 DNA 앱타머는 구체적으로 서열번호 1, 2 및 4 중 어느 하나로 표시되는 염기서열을 갖는 팔라듐 이온에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머이다.

[0012] 팔라듐(palladium)은 원자번호 46, 원소기호 Pd로 표시되는 금속으로, 전이금속에 속하는 은백색의 희소원소이며, 10족, 5주기, d-블록에 속한다. 백금과 화학적 성질이 유사한 백금족에 속하는 원소로, 백금족 원소들 중 녹는점과 밀도가 가장 낮다. 구리나 니켈 광석에서 추출되기도 하며, 주로 촉매나 장신구로 사용된다. 0 내지 +4의 산화수를 가질 수 있으며, 가장 흔한 산화상태는 0, +1, +2 및 +4이다. 팔라듐은 자연에서 금이나 백금족 원소들과의 혼합물의 형태로 발견될 수도 있으나, 토양보다 해수에 더 풍부하며, 해수 중에서 주로 사염화팔라듐산 나트륨의 형태로 존재할 수 있으며, 그 유용성에도 불구하고, 특이적으로 검출할 수 있는 캡쳐 프로브로 이용될 수 있는 제제에 한계가 있다. 이에, 본 발명자들은 팔라듐 이온에 특이성이 새로운 높은 앱타머를 개발하였다.

[0013] 예컨대, 상기 서열번호 1, 2 및 4 중 어느 하나로 표시되는 염기서열의 DNA 앱타머와 특이적으로 결합할 수 있는 팔라듐 이온은 사염화팔라듐($PdCl_4^{2-}$)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 전술한 바와 같이, 해수 중에서 팔라듐은 주로 사염화팔라듐산의 형태로 존재하므로 본 발명의 팔라듐 이온에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머

는 해수 중의 사염화팔라듐의 검출 및 분리에 유용하게 사용될 수 있다.

[0014] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 팔라듐 이온 특이적 DNA 앱타머를 포함하는 팔라듐 검출 또는 생산용 조성물을 제공한다.

[0015] 검출 및 생산 공정에 있어서 분리 과정의 편의를 위하여, 상기 DNA 앱타머는 고형 지지체에 접합된 것일 수 있다. 예컨대, 상기 고형 지지체는 아미노폴리스티렌, 보다 구체적으로는 설포석신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카르복실레이트-아미노폴리스티렌 수지일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 또 다른 양태로서, 본 발명은 팔라듐 이온을 함유한 것으로 예상되는 시료를 상기 팔라듐 이온에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머와 접촉시키는 단계를 포함하는, 팔라듐 이온 함유 시료로부터 팔라듐을 분리 및 제조하는 방법을 제공한다.

[0017] 전술한 바와 같이, 해수는 사염화팔라듐산 나트륨의 형태로 팔라듐을 함유한다. 따라서, 팔라듐 생산을 위한 팔라듐 이온 함유 시료의 예는 해수일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 예컨데, 본 발명의 팔라듐 생산시료로부터 DNA 앱타머와 결합된 팔라듐 이온을 분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0019] 또한, 분리된 DNA 앱타머와 결합된 팔라듐 이온을 환원시켜 팔라듐을 형성하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명에 따른 DNA 앱타머는 팔라듐을 함유하는 이온 구체적으로, 사염화팔라듐산에 특이적으로 결합할 수 있다. 예컨대, 팔라듐 이온을 함유하는 시료(예를 들어 해수)와 접촉시킬 경우 본 발명에 따른 DNA 앱타머는 시료 중의 사염화팔라듐산과 결합하여 복합체를 형성할 수 있다. 따라서, 상기 팔라듐 이온을 함유하는 시료로부터 팔라듐을 생산하기 위해서는 상기 시료로부터 팔라듐 이온과 DNA 앱타머 복합체를 분리하고 +2 산화상태의 팔라듐을 환원시켜 중성의 팔라듐 원자 형태로 전환시키는 것이 바람직하다.

[0021] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 표면에 산화 그래핀이 흡착된 산화 그래핀-실리카 입자 복합체에 DNA 앱타머 후보군을 흡착시키는 제1단계; 상기 DNA 앱타머 후보군이 흡착된 산화 그래핀-실리카 입자 복합체를 표적 물질과 반응시키는 제2단계; 및 상기 반응에 의해 탈착된 DNA를 회수하는 제3단계;를 포함하는, 표적 물질에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 선별하는 방법을 제공한다.

[0022] 예컨대, 상기 제1단계는 실리카 입자를 산화 그래핀 분산액과 혼합하여 교반하여 반응시켜 산화 그래핀-실리카 입자 복합체를 준비하는 제1-1단계를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 실리카 입자 표면에서 산화 그래핀의 흡착을 돕기 위하여 상기 실리카 입자로는 표면에 아민기를 포함하는 입자를 사용할 수 있다.

[0023] 한편, 산화 그래핀은 그래핀을 산화시킨 물질로 단일 또는 수 층으로 이루어지며, 물과 유기용매에서 분산력이 우수하고 절연성 및 형광신호를 감소시키는 특징을 갖는다. 또한 산화 그래핀은 그 표면에 단일가닥 DNA를 흡착시킬 수 있는데, 산화 그래핀에 흡착된 단일가닥 DNA와 상보적인 염기서열의 DNA 등 이와 상호작용할 수 있는 물질이 존재할 경우 이들 물질과의 결합을 위하여 산화 그래핀으로부터 탈착된다. 그러나, 상기 산화 그래핀은 자체로서는 일반적인 조건에서의 원심 분리 등에 의해 분리가 어려운 단점이 있다. 이러한 단점은 본 발명자들이 개발한 방법으로 극복하였다.

[0024] 즉, 산화 그래핀 자체로는 원심분리하여도 침전이 어려우나, 본 발명에 따른 실리카 입자에 흡착된 산화 그래핀 즉, 산화 그래핀-실리카 입자 복합체는 원심분리할 경우 침전되어 분리가 용이한 것이 특징이다. 더욱이, 기존에는 산화 그래핀은 상기와 같은 단일가닥 DNA와 흡착되는 원리를 이용하여 단순히 비흡착 DNA를 저거하는 용도

로만 이용되어 왔으나, 본 발명자들은 발상의 전환으로 상기 산화 그래핀을 원심분리에 의해 침전가능하도록 실리카 입자와 결합시키고 이와 같은 복합체에 다양한 DNA 앱타머 후보군을 흡착시킨 후 표적 물질과 반응시켜 표적 물질과 특이적으로 결합하는 앱타머만을 선택적으로 분리할 수 있다. 특히, 이와 같은 방법은 기존의 SELEX의 고정화 단계를 필요로 하지 않는다. 이에 따라, 표적 물질과의 반응 후, 특정 표적 물질에 대한 앱타머만이 탈착되므로, 나머지 DNA 앱타머 후보군을 포함하는 산화 그래핀-실리카 입자 복합체에 제2 표적 물질을 처리하여 상기 과정을 반복함으로써 제2 표적 물질에 특이적인 DNA 앱타머 선별을 위한 라이브러리로서 재사용할 수 있는 장점이 있다.

[0025] 아울러, 실리카 입자에 흡착되지 않은 산화 그래핀을 제거하기 위하여, 상기 제1단계는 실리카 입자를 산화 그래핀 분산액과 혼합하여 교반하여 반응시킨 후 원심분리하여 상층액을 제거하는 제1-2단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명의 실리카 입자에 흡착된 산화 그래핀은 단일가닥 DNA와 정전기적 인력에 의해 비특이적으로 결합할 수 있으며, 산화 그래핀에 결합된 단일가닥 DNA는 이와 특이적으로 결합하는 물질이 존재할 경우 산화 그래핀으로부터 탈탁되어 해당 물질과 결합할 수 있다. 본 발명은 이러한 산화 그래핀과 단일가닥 DNA 간의 상호작용 및 단일가닥 DNA의 일종인 DNA 앱타머와 표적 물질 간의 특이적인 결합력을 접목시켜 DNA 앱타머 선별에 이용한 것이 특징이다. 이때, 상기 표면에 단일가닥 DNA를 흡착시킬 수 있는 산화 그래핀은 실리카 입자에 흡착되어 있어 원심분리에 의해 용이하게 분리될 수 있도록 한 것이 또한 본 발명의 특징이다.

[0027] 예컨대, 상기 DNA 앱타머 후보군은 표적 물질에 특이적으로 결합할 가능성이 있는 것으로 사료되는 서로 다른 서열을 갖는 1종 이상의 단일가닥 DNA을 포함할 수 있다. 이와 같이 2종 이상의 상이한 염기서열을 갖는 DNA 단편들의 집합체 즉, DNA 앱타머 후보군을 동시에 흡착시킨 후 표적 물질을 처리하여 표적 물질과의 특이적인 결합에 의해 산화 그래핀으로부터 탈착되어 표적 물질과 결합하는 DNA 앱타머를 분리 회수하여 분석함으로써 해당 표적 물질에 특이적인 DNA를 선별할 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 앱타머 선별 방법은 표적 물질의 존재에 의해 산화 그래핀으로부터 탈착되는 DNA 앱타머를 회수하여 분석하는 과정을 포함한다. 따라서, 표적 물질로 처리하기 전에는 가능한 모든 DNA 앱타머 후보군은 산화 그래핀에 흡착되어 있는 것이 바람직하며, 이로부터 탈착되어 반응계에 존재하는 자유 DNA는 추후 DNA 분석에 포함되어 결과의 정확성을 감소시킬 수 있다. 따라서, 본 발명의 DNA 앱타머를 선별하는 방법은 분석의 정확성을 향상시키기 위하여, 예컨대, 상기 제2단계 이후 원심분리하여 상층액을 제거함으로써 산화 그래핀에 부착되지 않은 자유 DNA를 제거하는 제2-1단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 앱타머 선별 방법을 적용할 수 있는 표적 물질은 금속 이온, 핵산, 단백질, 세포 또는 화합물일 수 있다. 예컨대, 특정 염기서열의 DNA 단편과 특이적으로 결합할 수 있는 물질이면 그에 특이적인 DNA 앱타머를 선별하기 위하여 본 발명의 방법을 제한없이 적용할 수 있다.

[0030] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따른 앱타머 선별 방법은 실리카 입자에 흡착된 산화 그래핀에 DNA 앱타머 후보군을 흡착시킨 것을 이용하며, 따라서, 표적 물질과 반응 후 원심분리에 의해 실리카 입자에 흡착되고 산화 그래핀은 침전될 수 있고, 상기 산화 그래핀은 표적 물질과의 결합에 의해 탈착된 DNA 앱타머를 제외한 DNA 앱타머 후보군들이 여전히 흡착된 상태이므로 이를 상층액으로부터 분리함으로써 제거할 수 있다. 즉, 상기 제4단계는 제3단계의 반응액을 원심분리하여 상층액을 회수함으로써 달성될 수 있다.

[0031] 한편, 전술한 바와 같이, 팔라듐 등의 금속은 해수 중에 존재시 이온 형태로 염을 이루어 존재할 수 있다. 따라서, 이러한 금속 이온을 표적 물질로 하는 DNA 앱타머를 선별은 염 존재하에 수행될 수 있으며, 이러한 경우 염을 제거하는 탈염 단계를 추가로 포함하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 상기 과정을 통해 회수한 표적 물질과 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 동정하기 위하여 DNA 염기서열 분석을

수행할 수 있다. 이때, DNA 염기서열 분석에 앞서, 제4단계로부터 회수한 DNA를 증폭시키는 제4-1단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 DNA 증폭은 PCR에 의해 달성될 수 있다. 상기 DNA를 증폭시키는 단계를 추가로 수행함으로써 미량의 DNA 앱타머 후보군을 이용한 앱타머 선별을 가능하게 할 수 있다.

[0033] 이와 같은 본 발명의 산화 그래핀-실리카 입자 복합체를 이용한 DNA 앱타머 선별 방버을 이용하여 서열번호 1, 2 또는 4로 표시되는 염기서열을 갖는 팔라듐 이온 특이적 앱타머를 선별하였다. 이와 같은 결과는 본 qkfuad의 앱타머 선별 방법이 손쉽고 높은 특이성으로 DNA 앱타머를 선별할 수 있음을 시사하는 것이다.

발명의 효과

[0034] 본 발명의 팔라듐 이온 특이적 DNA 앱타머는 팔라듐 이온 예컨대, 일반적으로 해수 중에 존재하는 형태인 사염화팔라듐산에 특이적으로 결합하므로 해수로부터 다른 금속 이온의 간섭 없이 팔라듐 이온을 분리하여 회수할 수 있으므로, 희소 금속인 팔라듐의 생산에 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 실리카 입자에 흡착시킨 산화 그래핀은 DNA를 흡착할 수 있을 뿐만 아니라 원심분리에 의해 침전되어 분리를 용이하게 할 수 있으므로, 특정 표적 물질에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머를 선별하기 위한 방법에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 산화 그래핀(graphene oxide; GO)에 흡착된 DNA를 $Na_2(PdCl_4)$와 반응시킨 후 탈착한 DNA를 중합효소연쇄반응(PCR)으로 증폭시킨 결과를 나타낸 도이다. 증폭된 DNA는 2% 아가로스 젤을 이용한 전기영동으로 확인하였다.

도 2는 TA 벡터에 DNA 시료를 클로닝한 후 블루 화이트 스크리닝으로 확인한 결과를 나타낸 도이다. (a)는 첫번째 블루 화이트 스크리닝 결과 배양된 대장균을, (b)는 상기 (a)의 배양된 대장균을 화이트 콜로니(파란 원, 49개) 및 블루 콜로니(빨간 점)으로 구분하여 나타낸 사진이며, (c)는 상기 (b)의 화이트 콜로니를 동일한 조성의 배지에서 추가적인 블루 화이트 스크리닝하여 최종 확인된 44개의 화이트 콜로니를 나타낸 사진이다.

도 3은 $Na_2(PdCl_4)$와 DNA 앱타머 후보군 간의 결합력을 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명에 따른 선별 방법에 의해 선택된 DNA01과 $Na_2(PdCl_4)$ 간의 결합력을 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명에 따른 선별 방법에 의해 선택된 DNA01의 팔라듐 이온에 대한 특이적 결합을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0037] **실시예 1: 물질 및 기기**

[0038] DNA 집합체, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 앱타머 후보군으로서 DNA는 모두 바이오니어로부터 구입하였다. 역방향 프라이머는 중합효소연쇄반응(PCR) 후 수득한 이중가닥 DNA 중 원하는 가닥만을 회수하기 위하여 5' 말단이 바이오틴으로 변형된 것을 사용하였다. DNA 집합체의 염기서열은 5'-CGT ACG GAA TTC GCT AGC-N30-GGA TCC GAG CTC CAC GTG-3'이며, 정방향 프라이머의 염기서열은 5'-CGT ACG GAA TTC GCT AGC-3', 역방향 프라이머의 염기서열은 5'-바이오틴-CAC GTG GAG CTC GGA TCC-3'이다. TA 벡터는 RBC로부터 구입하였으며, 스트렙트아비딘과 사염화팔라듐산 나트륨은 각각 Invitrogen과 Sigma로부터 구입하였다. 이외의 시약은 달리 언급되지 않는 한, 공급자로부터 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 추가적인 정제과정 없이 사용하였다.

[0039] Bio-Rad 사의 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR) 기기를 사용하여 DNA를 증폭시켰으며, 시료의 양을 분석하기 위한 ICP-MS(induced coupled plasma mass spectroscopy)는 서울대학교 공동기기원에 의뢰하

여 수행하였다.

[0040] **실시예 2: 산화 그래핀 및 다공성 실리카 나노입자의 흡착**

[0041] 1 mg 산화 그래핀을 1 ml 용매에 분산시켜 EP 튜브에 담고 10분 동안 음파 처리하였다. 이후 산화 그래핀을 아민 작용기가 도입된 20 mg 다공성 실리카 나노입자와 혼합한 후, 25℃에서 24시간 동안 교반하여 흡착시켰다. 이를 원심분리(13,000 rpm, 10분)하여 상층액과 함께 나노입자에 흡착되지 않은 산화 그래핀을 제거하였다. 회수한 산화 그래핀이 흡착된 다공성 실리카 나노입자를 증류수로 3회 세척하여 흡착되지 않은 산화 그래핀을 제거하고 최종 산화 그래핀-다공성 실리카 나노입자 복합체를 펠렛으로 수득하였다.

[0042] **실시예 3: 산화 그래핀-다공성 실리카 나노입자 복합체를 이용한 $Na_2(PdCl_4)$ 특이적 DNA 앱타머의 선별**

[0043] 상기 실시예 2로부터 수득한 산화 그래핀-다공성 실리카 나노입자 복합체를 200 pmol DNA 집합체와 25℃에서 10분 동안 결합 완충액(0.021 M $NaHCO_3$, 0.1 M HEPES, pH 8.02)에서 반응시켰다. 상기 용액을 원심분리(13,000 rpm, 10분)하여 산화 그래핀-다공성 실리카 나노입자 복합체에 흡착되지 않은 DNA를 제거하였다. 결합 완충액을 이용하여 상기 과정을 3회 더 수행하여 DNA를 추가로 제거하였다. 상기 방법으로 수득한 DNA가 결합된 산화 그래핀-다공성 실리카 나노입자 복합체를 결합 완충액에 용해시킨 $Na_2(PdCl_4)$와 25℃에서 반응시켰다. 반응에 사용한 $Na_2(PdCl_4)$의 농도 및 DNA와의 반응시간을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0044]

반복 횟수	시간 (hr)	$Na_2(PdCl_4)$ 최종 농도 (mM)
1~3	6	5
4	4.5	5
5	4.5	4
6	3	4
7	3	3
8	2	3
9	2	2
10	1	2
11	1	1
12	1	0.1
13	0.25	0.1

[0045] 반응이 완료되면 원심분리(13,000 rpm, 10분)하여 상층액을 회수하였다. 펠렛에 결합 완충액을 첨가하고 원심분리하여 상층액을 한번 더 회수하였다. 회수한 상층액을 합하여 10K 마이크로콘(10K microcon, Millipore)을 통과시켜 $Na_2(PdCl_4)$를 포함한 다른 염들을 제거하고, 8 M 우레아(Bio Basic Canada Inc.)로 3회, 물로 3회 더 세척하여 염을 제거하였다. 용출 후 speed vac으로 용매를 제거하였다. 산화 그래핀-다공성 실리카 나노입자의 펠렛에 8 M 우레아를 첨가하여 95℃에서 10분 동안 항온처리한 후 원심분리(13,000 rpm, 10분)하여 산화 그래핀에 여전히 흡착되어 있는 DNA를 제거하였다. 용매를 제거한 DNA를 100 μl 증류수에 용해시킨 후, 하기 표 2에 나타난 조건으로 PCR을 수행하여 DNA를 증폭시켰다. 이때, 변성-어닐링-신장 단계는 30회 반복하였다. DNA 증폭에 사용한 PCR 반응 시약은 하기 표 3에 나타난 부피비로 혼합하여 구성하였다.

표 2

[0046]

	온도 (℃)	시간 (sec)
초기 단계(initial step)	95	300
변성 단계(denaturation step)	94	30
어닐링 단계(annealing step)	55	30

신장 단계(elongation step)	71	45
최종 신장 단계(final elongation step)	71	420
최종 유지(final hold)	16	-

표 3

[0047]

	부피 (μl)
증류수	35.8
10× DNA Taq 중합효소 완충액	5
dNTP(각 2.5 mM)	4
DNA 주형	1
정방향 프라이머(10 pmol/μl)	2
역방향 프라이머(10 pmol/μl)	2
Taq DNA 중합효소	0.2
총 부피	50

[0048] 상기 방법으로 수득한 PCR 생산물에 상기 생산물의 0.1배 부피의 3 M 소디움 아세테이트(pH 5.2, Sigma)를 첨가한 후, 얼음에서 30분 동안 항온반응을 수행하였다. 이후 95% 에탄올을 전체 부피의 3배에 해당하는 양으로 첨가하고, 20℃에서 유지하면서 30분 이상 반응시켰다. 원심분리(13,000 rpm, 30분, 4℃)하여 상층액을 제거하고, 펠렛에 70% 에탄올을 1 ml 가하고 피펫팅하여 세척하였다. 다시 원심분리(13,000 rpm, 15분, 4℃)하여 상층액을 제거하였다. 이와 같이 수득한 펠렛은 speed vac으로 여분의 에탄올을 제거한 후 물에 용해시켰다. PCR을 통해 증폭된 DNA 이중가닥 중 원하는 단일가닥만을 얻기 위하여 1 mg (아미노메틸)폴리스티렌((aminomethyl)polystyrene; (aminomethyl)PS)과 1 ml 0.1 M 인산나트륨(pH 7.4)에 용해시킨 1 mg 스트렙트아비딘을 0.3 mg 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드, 0.6 mg N-히드록시숙신이미드와 함께 혼합하여 25℃에서 4시간 동안 EDC 커플링 반응을 수행하였다. 원심분리(13,000 rpm, 5분)하여 반응하지 않은 스트렙트아비딘 및 다른 시약들을 제거하고 3회 더 세척하였다. 수득한 PS-스트렙트아비딘을 PCR을 통해 수득한 DNA 1 nmol과 2시간 동안 반응시킨 후, 최종 농도가 7 M이 되도록 우레아를 가하여 95℃에서 10분 동안 항온반응시켰다. 이후 원심분리(13,000 rpm, 5분)하여 상층액을 얻고 우레아를 충분히 제거하기 위하여 마이크로콘(microcon)으로 정제하였으며, 용매를 제거하기 위하여 speed vac을 사용하였다. 상기 과정을 총 13회 반복하였으며, 마지막 13번째 사이클은 에탄올 제거 단계까지만 진행하였다.

[0049] 산화 그래핀을 이용하여 타겟의 고정화 과정이 없는 SELEX를 수행하고 이를 통해 $Na_2(PdCl_4)$, 즉 Pd 이온에 특이적으로 결합하는 앱타머를 발굴하고자 하기 위하여, 먼저 $Na_2(PdCl_4)$가 존재하는 경우 산화 그래핀에 흡착된 DNA가 탈착되는지를 확인하고 이후 해당 DNA의 염기서열을 분석하였다. 구체적으로 산화 그래핀를 흡착시킨 다공성 실리카 나노입자에 DNA를 흡착시킨 후 원심분리하여 상층액을 제거함으로써 흡착되지 않은 DNA를 제거하였고, 이에 결합 완충액에 용해시킨 $Na_2(PdCl_4)$를 1 ml 가하여 5시간 동안 반응시킨 후 원심분리하여 상층액을 회수하고 마이크로콘으로 염을 제거한 후 PCR을 이용하여 수득한 DNA를 증폭시켰다. 증폭시킨 DNA를 2% 아가로스 겔에서 전기영동하여 66mer 위치에서 밴드가 나타나는 것을 확인하였다(도 1). 이로부터 산화 그래핀에 흡착된 DNA 중 $Na_2(PdCl_4)$ 존재시 즉, $Na_2(PdCl_4)$와 특이적으로 결합함으로써 산화 그래핀으로부터 탈착되는 DNA가 존재함을 확인하였으며, 추가적인 실험을 통해서 해당 DNA의 염기서열을 분석하였다.

[0050] **실시예 4: DNA 염기서열 확인**

[0051] 상기 실시예 3의 방법에 따라, 산화 그래핀을 이용하여 수득한 DNA를 PCR로 증폭시키는 과정을 13회 반복 실시하여 최종적으로 수득한 DNA를 TA 벡터에 클로닝하여 삽입하고 블루 화이트 스크리닝으로 그 결과를 확인하였다. 이때 접합 효율을 높이기 위하여 하기 표 4에 나타난 조건으로 A-테일링을 수행하였다.

표 4

[0052]

	부피 (μl)
정제한 중합효소연쇄반응 생산물	0.118
10× 중합효소연쇄반응 완충액	10
10 mM dATP	2
Taq DNA 중합효소	1
증류수	86.882

[0053] 이와 같이 준비한 시료를 4℃에서 밤새 반응시킨 후, 하기 표 5에 나타난 조건에서 TA 벡터와 함께 22℃에서 30분 동안 접합(ligation)시켰다.

표 5

[0054]

부피 (μl)	시료	양성 대조군	음성 대조군
접합 완충액 A(ligation buffer A)	1	1	1
접합 완충액 B(ligation buffer B)	1	1	1
TA 클로닝 벡터	2	2	2
중합효소연쇄반응 생산물	1.7	-	-
T4 DNA 연결효소(ligase)	1	1	1
대조군 DNA	-	3	-
증류수	3.3	2	5
최종 부피	10	10	10

[0055] 수득한 시료 5 μl를 50 μl 컴피턴트 세포(competent cells)에 넣고 얼음에서 10분 동안 반응시킨 후, 42℃에서 1.5분, 다시 얼음에서 2분 동안 반응시켰다. 이후 0.8 ml LB 배지를 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 원심분리(4,000 rpm, 10분)하여 펠렛을 얻고, 20 μl LB 배지를 가하여 재현탁시켰다.

[0056] 10 g 트립톤(Sigma), 5 g 효모 추출물(Sigma), 10 g NaCl(Sigma), 15 g 아가로스를 1L 증류수에 용해시키고 오토클레이브로 살균하였다. 배지를 70℃ 정도로 식힌 후, 50 mg 암피실린을 용해시켜 페트리접시에 배지를 적당히 부어 UV에서 살균 및 건조하였다. 이와 같이 제조한 LB 아가 배지에 100 μl 100 mM 이소프로필-β-D-1-티오갈락토피라노사이드(isopropyl-β-D-1-thiogalactoside; IPTG)와 20 μl 50 mg/ml X-gal을 플레이팅한 후, 4℃에서 30분 정도 방치하여 배지가 IPTG와 X-gal을 흡수할 수 있도록 하였다. 이와 같이 준비한 LB 아가 배지 상에 형질전환한 시료를 도포하고 37℃에서 12시간 정도 성장시켰다. 형성된 콜로니 중 화이트 콜로니만을 취하였으며, 최종적으로 수득한 화이트 콜로니를 각각 5 ml LB 배지에 넣고 암피실린을 최종 농도가 5 μg/ml이 되도록 첨가하였다. 이를 37℃에서 반응시켜 광학밀도(optical density)가 0.4 내지 0.5에 이를 때까지 배양하였다. 배양한 E. coli를 미니프렙(mini prep, Qiagen)하여 플라스미드 DNA를 획득하였다. 제조업자의 지시에 따라 미니프렙을 수행하여 플라스미드 DNA를 분리하였다. 수득한 시료는 0.5× TBE 완충액으로 이루어진 1% 아가로스 겔에서 밴드를 확인하였다. 전기영동은 5 μl 시료에 1 μl 6× 로딩 완충액과 0.1 μl 로딩 스타(Bio-Rad)를 혼합하여 아가로스 겔의 각 웰에 로딩하고 0.5× TBE 완충액에서 전개하여 수행하였다. 밴드를 확인한 시료는 Cosmo Gentech에 의뢰하여, M13 유니버셜 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였고, 그 결과 4개의 후보를 획득하였다. 획득한 DNA 서열을 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

[0057]

	서열	SEQ. ID No.
DNA01	5'-GGGCG GACGC TAGGT GGTGA TGCTG TGCTA CACGT GTTGT-3'	1
DNA02	5'-ACAAG GGGTG CAGGG GTCCG CGATT GTGAC TGTGT GTGCG-3'	2
DNA03	5'-GGGCG GACGC TAGGT GGTAA GGCTG TGCTA CACGT GTTGT-3'	3
DNA04	5'-CCCCG CTGCC CGTGT TCCGT CCTCC CTTGC-3'	4

[0058] **실시예 5: 앱타머 후보 DNA와 금속의 투석 및 ICP-MS 측정**

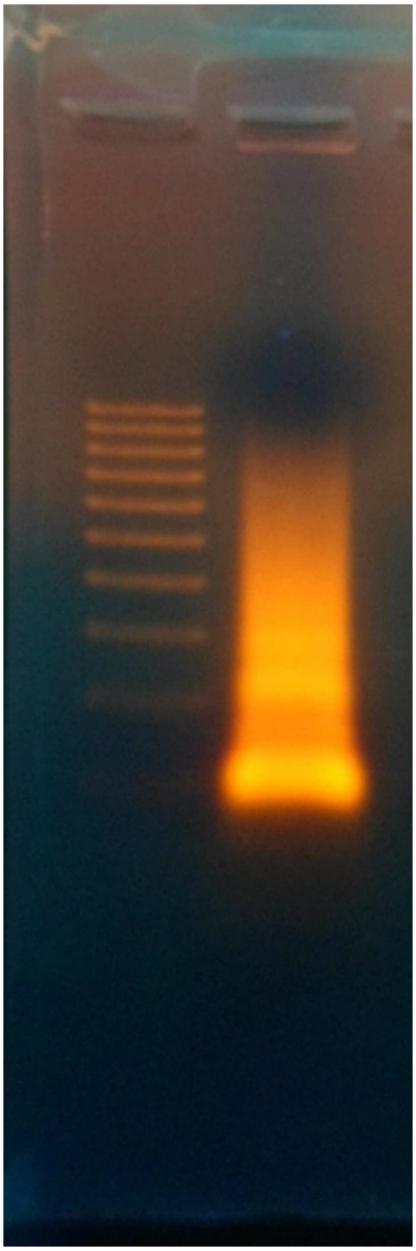
[0059] 투석 키트에 각 시료를 준비하여 18시간 동안 투석하였다. 32 nmol $Na_2(PdCl_4)$는 결합 완충액에 용해시켜 사용하였으며, 키트 내에는 총 부피가 1 ml이 되도록 DNA와 $Na_2(PdCl_4)$를 넣고 완충액으로 부피를 맞추었으며, 키트 밖에는 2.2 ml의 결합 완충액만을 넣었다. 2 μM DNA01에 대해서는 동일한 조건에서 $Na_2(PdCl_4)$와 동일한 몰 수인 32 nmol $NiSO_4$, LiCl, $MgCl_2$, $AgNO_3$, CsCl, $K_2(PtCl_4)$를 각각 투석하였다. 투석 후, Pd와 Cl, Lt와 Cl 사이의 결합을 끊어주기 위하여 하기의 방법으로 전처리를 수행하였다. 구체적으로 투석한 시료를 가열 맨틀(heating mantle)에서 용매를 제거하고, 5 ml의 왕수(35% HCl:70% HNO_3=6:1)를 첨가하여 3시간 동안 환류하며 끓여주었다. 더 가열하여 왕수를 거의 제거하고, 다시 5 ml 왕수를 가하여 3시간 끓여주고, 마찬가지로 더 가열하여 왕수를 거의 제거하였다. 여기에 증류수를 첨가하여 시료를 용해시키고 최종 부피가 20 ml이 되도록 하였다. $Na_2(PdCl_4)$와 마찬가지로 $NiSO_4$, $MgCl_2$, CsCl, $K_2(PtCl_4)$를 각각 32 nmol씩 키트에 넣었으며, 각 키트 내의 1 ml 완충액과 키트 밖의 2.2 ml 완충액에서 단순 확산한다면 최종 농도는 10 μM이었다. 키트 내의 DNA 농도는 모두 2 μM로 고정하였으며, $K_2(PtCl_4)$만 전처리하여 20 ml 증류수에 용해시켰다. 다른 금속 시료는 전처리 없이 키트 안/밖의 용액을 최종 부피가 20 ml이 되도록 증류수에 용해시켜 ICP-MS를 측정하였다. B 값은 전처리 및 시료의 부피를 고려하여 계산하였다. 이와 같이 준비한 시료를 서울대학교 공동기기원에 위탁하여 ICP-MS를 측정하였다.

[0060] 상기 표 6에 나타난 4개 서열을 갖는 DNA(DNA01 내지 DNA04) 각각에 대해 팔라듐 이온에 대한 결합력을 측정하고 그 결과를 도 3에 비교하여 나타내었다. DNA에 결합된 팔라듐 이온의 양은 ICP-MS로 측정한 용액 내의 팔라듐 양으로부터 도출하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, DNA01이 팔라듐 이온에 대해 가장 높은 결합력을 갖는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 DNA01의 $Na_2(PdCl_4)$에 대한 결합력을 측정하였으며, 4.60 μM의 해리상수를 갖는 것을 확인하였다(도 4).

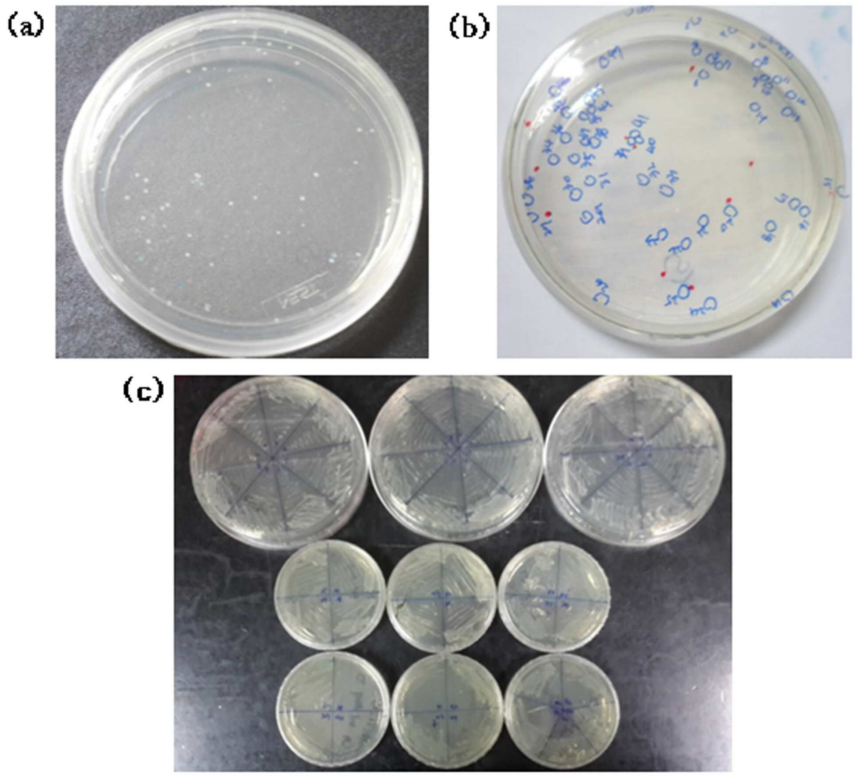
[0061] 나아가, 상기 팔라듐 이온에 대해 높은 결합력을 갖는 것으로 확인된 DNA01이 다른 금속 이온에 대해서도 높은 결합력을 나타내는지 확인하기 위하여 리튬, 세슘, 마그네륨 또는 백금 이온을 포함하는 용액과 반응시키고 팔라듐 이온에 대해서와 동일한 방법으로 각 이온에 대한 결합력을 확인하고, 그 결과를 도 5에 나타내었다. 도 5에 나타난 바와 같이, DNA01은 리튬, 세슘, 마그네슘 또는 백금에 비해 팔라듐 이온에 대해 현저히 높은 결합력을 갖는 것을 확인하였으며, 이는 상기 DNA01이 팔라듐 이온에 특이적으로 결합하는 DNA 앱타머로 작용할 수 있음을 나타내는 것이다.

도면

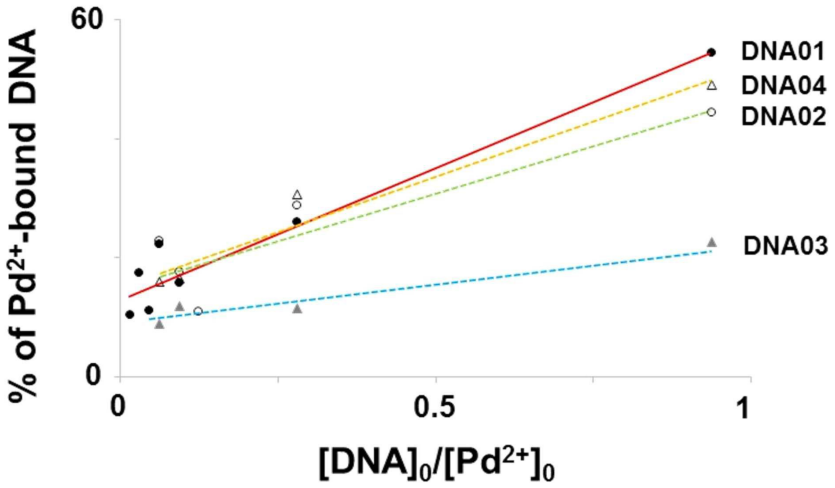
도면1



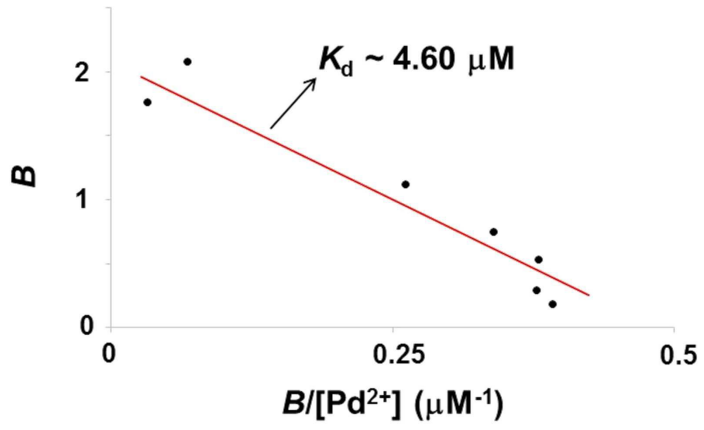
도면2


(a)
(b)
(c)

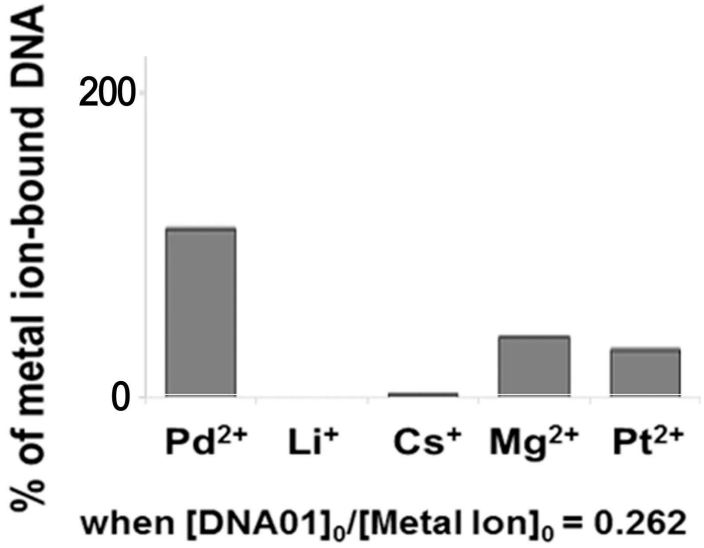
도면3


60
0
0
0.5
1
% of Pd2+-bound DNA
[DNA]0/[Pd2+]0
DNA01
DNA04
DNA02
DNA03

도면4



도면5



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Palladium ion-specific DNA aptamer and a method for selecting the same

<130> KPA150029-KR

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA01

<400> 1

gggcggacgc taggtggtga tgctgtgcta cacgtgttgt 40

<210> 2

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA02

<400

> 2

acaaggggtg caggggtccg cgattgtgac tgtgtgtgcg 40

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA03

<400> 3

gggcggacgc taggtggtaa ggctgtgcta cacgtgttgt 40

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA04

<400> 4

ccccgctgcc cgtgttccgt cctcccttgc 30