



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0087274
(43) 공개일자 2013년08월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01)

(21) 출원번호 10-2012-0008482

(22) 출원일자 2012년01월27일

심사청구일자 2012년01월27일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

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

(72) 발명자

하상수

경기도 남양주시 도농동 부영그린타운아파트2단지 210동 1201호

이관호

경상북도 안동시 송현동 우성아파트 101동 1305호

(74) 대리인

손민

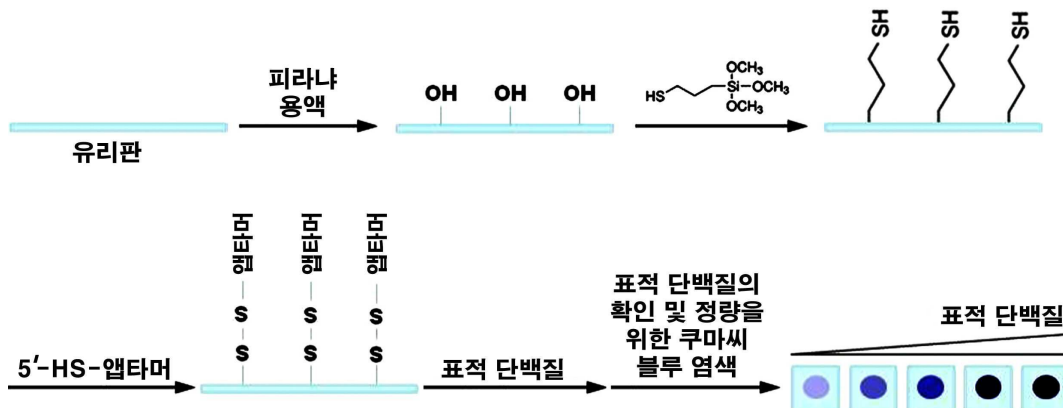
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 애플타머 칩을 이용한 표적 단백질의 검출 및 정량 방법

(57) 요약

본 발명은 애플타머 칩을 이용하여 표적 단백질을 검출하는 방법 및 정량하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 쿠마씨 블루 용액과 상기 표적 단백질이 결합된 애플타머 칩을 반응시켜 표적 단백질을 검출 및 정량하는 방법, 이황화결합으로 결합된 애플타머 칩 및 이의 재사용 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0021956

부처명 교육과학기술부

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 애플타머를 이용한 관심 금속이온의 선택적 추출

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2011.09.01 ~ 2014.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 ST110001M023971

부처명 서울시

연구사업명 서울시 신기술 연구개발 지원사업(현재의 명칭은 서울시 산학연 협력사업)

연구과제명 맞춤형 항암치료를 위하여: 암세포와 백금항암제에 대한 상이한 저항성을 이해하기 위한 정

량적 연구

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2011.08.01 ~ 2013.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

애타머 (aptamer) 칩을 이용한 표적 단백질의 검출 방법에 있어서,

- (a) 표적 단백질을 포함하는 시료를 애타머 칩과 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 표적 단백질이 결합된 애타머 칩과 쿠마씨 블루 (Coomassie Brilliant Blue) 용액을 반응시키는 단계를 포함하는, 애타머 칩을 이용한 표적 단백질의 검출 방법.

청구항 2

애타머 칩을 이용한 표적 단백질의 정량 방법에 있어서,

- (a) 표적 단백질을 포함하는 시료를 애타머 칩과 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 표적 단백질이 결합된 애타머 칩과 쿠마씨 블루 용액을 반응시키는 단계; 및
- (c) 쿠마씨 블루가 반응한 부분의 반응의 세기를 측정하는 단계를 포함하는, 애타머 칩을 이용한 표적 단백질의 정량 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 표적 물질의 검출 방법은 육안으로 측정하는 것인 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 애타머 칩은 기판 상에 애타머가 고정된 것인 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 애타머는 5' 말단에 티올기 (-SH)가 결합된 RNA 애타머인 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 애타머는 올리고히스티딘과 특이적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 (a) 단계의 표적 단백질은 올리고히스티딘으로 표지된 것인 방법.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 기판은 유리, 알루미늄, 세라믹, 탄소, 금, 은, 구리, 알루미늄 및 실리콘으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 기판인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 기관은 실란 처리를 통해 티올기를 관능기로 갖는 것인 방법.

청구항 10

- (a) 이황화결합으로 고정화된 앵타머 칩과 표적 단백질을 포함하는 시료를 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 표적 단백질이 결합된 앵타머 칩과 쿠마씨 블루 용액을 반응시켜서 표적 단백질을 검출 또는 정량하는 단계;
- (c) 상기 앵타머 칩에 이황화결합 환원 용액을 처리하여 앵타머를 분리하는 단계; 및
- (d) 앵타머가 분리된 앵타머 칩에 앵타머 분자를 재고정시키는 단계를 포함하는, 앵타머 칩의 재사용 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 (c) 단계 이전에 우레아를 처리하여 표적 단백질을 분리하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 앵타머는 5' 말단에 티올기 (-SH)가 결합된 RNA 앵타머인 것인 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 앵타머 칩의 기관은 유리, 알루미늄, 세라믹, 탄소, 금, 은, 구리, 알루미늄 및 실리콘으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 기관으로, 실란 처리를 통해 티올기를 관능기로 갖는 것인 방법.

청구항 14

제10항 내지 제13항 중 어느 한 항의 방법에 제공되는 표적 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 앵타머가 기관에 이황화결합에 의해 결합된 앵타머 칩.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 앵타머 칩을 이용하여 표적 단백질을 검출하는 방법 및 정량하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 쿠마씨 블루 용액과 상기 표적 단백질이 결합된 앵타머 칩을 반응시켜 표적 단백질을 검출 및 정량하는 방법, 이황화결합으로 결합된 앵타머 칩 및 이의 재사용 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 앵타머 (Aptamer)는 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산 (DNA, RNA 또는 변형핵산)이다. 앵타머는 무작위적인 서열을 가지는 핵산 라이브러리인 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) 과정을 통해 얻을 수 있다.

[0003] 이와 같은 앵타머는 항체의 좋은 대안으로 여겨지고 있는데, 많은 앵타머들은 금속이온들과 작은 화학 분자들, 단백질들, 심지어 세포에 대해서 나노물에서 피코몰 수준의 해리 상수를 가질 만큼 특이적으로 결합한다고 알려져 있다. 또한, 앵타머는 항체와 비교하여 구체적인 실험에서 보다 유리한 다음과 같은 특징들이 있다. 첫째 특징은 앵타머가 어떤 분자들 (작은 무기이온들부터 세포까지)을 표적으로 정할 수 있게 구축된 핵산 라이브러리로부터 얻을 수 있다는 점이다. 이와 같은 특징은 세포나 동물로부터 얻어져야 하는 항체의 제한점을 극복할 수 있게 한다. 두 번째 특징은 선정된 앵타머를 PCR (Polymerase chain reaction) 과정을 통해 증폭과정을 수행하거나 높은 순도를 가지는 많은 양의 앵타머를 얻기 위해 전사과정을 진행할 수 있다는 점을 들 수 있다. 세 번째 특징은 앵타머가 비교적 단순한 화학적 구조를 가졌기 때문에 고체표면에 고정화하는 등의 다른 목적으로 사용하고자 하는 경우에 그 작용기를 변화시키기 쉽다는 점이다. 마지막으로, 앵타머는 항체보다 훨씬 더 안정하기 때문에 좀 더 거친 조건 (높은 온도나 극단의 pH에 대해서도)을 필요로 하는 화학적 응용 과정에 이용될 수 있다. 그 밖에도 앵타머는 화학적으로 대량 합성이 가능하므로 경제성이 우수하고, 항체에 버금가는 표적 친화력을 가지고 있으며, 항체에 비해 크기가 월등히 작다 (약 1~2nm정도)는 특징을 가지고 있다.

[0004] 이와 같은 항체에 비해 우수한 앵타머의 효과로 인해 앵타머를 이용한 특정 분자에 대한 바이오센서를 개발하고자 하는 연구가 많이 진행되고 있다. 특히 앵타머 어레이 (Aptamer arrays)를 만드는 것은 매우 유용하다. 최근 유전자와 질병을 분석하기 위한 강력한 도구로 각광받고 있는 고집적 DNA기반 마이크로 어레이 (micro arrays)는 DNA와 같은 핵산을 검출하는데 사용되었지만 그 검출결과만으로는 우리에게 필요한 모든 정보를 얻을 수 없기 때문에, 좀 더 많은 정보를 얻기 위한 단백질을 검출 및 정량하기 위한 핵산 형태의 앵타머 기반 마이크로 어레이의 요구가 커지고 있다. 단백질에 대한 정보를 얻기 위해 단백질이 고체표면에 고정화된 단백질기반 마이크로 어레이를 이용하기도 하지만 이는 항체를 고체표면에 고정한 후 이용한다는 점에서 경제성이 낮고, 단백질의 변성 없이 마이크로 어레이에서 유지하기 쉽지 않다는 문제점이 있다. 이러한 측면에서 앵타머 기반 마이크로 어레이는 세포나 발현된 단백질을 인식하기 위한 DNA 기반 마이크로 어레이의 성능을 잠재적으로 확장시킬 수 있다. 앵타머는 핵산이기 때문에, 쉽게 표적 물질을 검출하고 정량하기 위한 앵타머 기반 마이크로 어레이의 발전을 위해서 DNA 어레이 (DNA arrays)를 통해 얻어진 경험들을 적용하여 아주 작은 사이즈의 앵타머 기반 마이크로 어레이를 개발하고자 하는 연구가 이루어지고 있다.

[0005] 전형적인 바이오센서는 일반적으로 두 가지의 구성요소로 이루어져 있다. 구체적으로, 표적을 인식할 수 있는 구성요소 (효소, 항체, 수용체 등) 및 변환기 (transducer) 구성요소로 이루어져 있다. 하나의 물질을 분석하기 위해 여러 분석과정이 필요한 분광광도기 또는 질량 분석기와 같은 다른 분석방법과는 다르게, 바이오센서는 비교적 간단한 과정을 필요로 하는 분석방법이다. 바이오 센서분야에서 앵타머를 응용하는 경우, 앵타머가 표적 물질을 높은 결합력으로 인식할 뿐만 아니라, 앵타머의 특성을 쉽게 조절할 수 있다는 장점을 가진다. 하지만 바이오센서의 감도는 변환기에 의해 큰 영향을 받는 특징이 있기 때문에, 특정분자의 검출정량을 위한 앵타머 기반 바이오 센서에 응용하기 위해서 사용될 수 있는 변환기들이 많이 개발되어 왔다. 그러나 현재까지 개발된 앵타머와 바이오 물질의 결합에 의해 생성된 신호를 변환하기 위한 기술들은 전기화학적 신호 검출 (대한민국 특허 출원 제10-2010-0046498호 참조) 또는 형광 검출을 위한 형태 (대한민국 특허 출원 제10-2007-0025105호 참조)로서, 마이크로 물에서 나노물 수준의 검출 한계를 가지며, 또한 상기 기술들이 적용되기 위해서는 검출 및 정량을 위해 비싼 장비들이나 화학물질이 필요한 문제점이 있어 왔다. 그리고 전기화학적 신호를 이용하거나 형광을 이용한 검출과 정량을 위해서는 산화나 환원이 가능한 화학물질 또는 형광단을 원하는 표적 단백질에 붙여주는 과정이 필요하여, 분석 단계가 여러 단계로 이루어지는 문제점이 있었다.

[0006] 이에 본 발명자들은 기존의 바이오센서가 가지고 있는 고가의 별도의 장비가 필요한 문제점 및 비효율성을 극복하기 위해 예의 노력한 결과, 앵타머 기반 바이오 칩을 쿠마씨 블루 염색법을 이용하여 분석하면 결합한 표적 단백질의 농도에 비례하여 신호의 세기가 증가하는 것을 별도의 장비 없이 육안으로 확인할 수 있으며, 일반적인 분석기를 이용해 표적 단백질의 정량적인 분석이 가능하고, 이항화결합을 환원시켜서 칩의 재사용이 가능함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 하나의 목적은 (a) 표적 단백질을 포함하는 시료를 앵타머 칩과 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 표적

단백질이 결합된 앵타머 칩과 쿠마씨 블루 (Coomassie Brilliant Blue) 용액을 반응시키는 단계를 포함하는, 앵타머 칩을 이용한 표적 단백질의 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 하나의 목적은 (a) 표적 단백질을 포함하는 시료를 앵타머 칩과 접촉시키는 단계; (b) 상기 표적 단백질이 결합된 앵타머 칩과 쿠마씨 블루 용액을 반응시키는 단계; 및 (c) 쿠마씨 블루가 반응한 부분의 반응의 세기를 측정하는 단계를 포함하는, 앵타머 칩을 이용한 표적 단백질의 정량 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 하나의 목적은 (a) 이황화결합으로 고정화된 앵타머 칩과 표적 단백질을 포함하는 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 표적 단백질이 결합된 앵타머 칩과 쿠마씨 블루 용액을 반응시켜서 표적 단백질을 검출 또는 정량하는 단계; (c) 상기 앵타머 칩에 이황화결합 환원 용액을 처리하여 앵타머를 분리하는 단계; 및 (d) 앵타머가 분리된 앵타머 칩에 앵타머 분자를 재고정시키는 단계를 포함하는, 앵타머 칩의 재사용 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 재사용 방법에 사용되는 재사용용 앵타머 칩을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 표적 단백질을 포함하는 시료를 앵타머 칩과 접촉시키는 단계; 및 (b) 상기 표적 단백질이 결합된 앵타머 칩과 쿠마씨 블루 (Coomassie Brilliant Blue) 용액을 반응시키는 단계를 포함하는, 앵타머 칩을 이용한 표적 단백질의 검출 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명에서 용어 "앵타머 칩"이란 "앵타머 어레이", "앵타머 기반 칩"등과 혼용되며, 표면 개질된 유리, 실리콘, 폴리프로필렌 등의 고분자 기판을 포함하는 여러가지 종류의 고체 표면에 앵타머를 정해진 위치에 고밀도로 부착시켜 미세 집적시킨 것의 통칭을 의미하는 것으로, 기판 상에 앵타머가 고정된 것일 수 있다.

[0013] 상기 기판의 종류는 당업계에 통상적으로 사용되는 앵타머 칩 제작을 위한 고체 기판이면 제한 없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 유리, 알루미늄, 세라믹, 탄소, 금, 은, 구리, 알루미늄, 화합물 반도체 및 실리콘 등이 있을 수 있으며, 가장 바람직하게는 유리판을 이용할 수 있다. 상기 기판은 표면 처리되는 데, 표면 처리는 앵타머 분자의 부착 및 고정화를 용이하게 하기 위해 수행된다. 또한 표면 처리는 앵타머 칩의 기질 표면에 앵타머를 고정화시키기 위한 관능기를 포함할 수 있도록 수행될 수 있다. 예컨대 상기 기판은 알데히드기, 카르복실기, 아민기 또는 티올기로 개질될 수 있다. 유리 기판이나 반도체 기판의 경우 실란 처리를 하여 아미노기 ($-NH_3$, $-NH_2$ 등) 또는 티올기를 형성할 수 있다. 또한 실란 처리를 효과적으로 하기 위해 실란 처리 전에 하이드록실 (hydroxyl) ($-OH$)기를 만들기 위한 처리를 할 수도 있다. 가장 바람직하게는 티올기를 관능기로 가질 수 있다. 이와 같은 티올기를 관능기로 가질 수 있도록, 상기 기판을 실란 처리할 수 있다.

[0014] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 유리판의 표면에 피라냐 용액을 처리하여, 유리판의 표면에 $-OH$ 기가 노출되도록 하고, MPTMS ((3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane)를 처리하여, 티올기를 유리판 위에 관능기로 형성하도록 하였다 (실시예 3).

[0015] 본 발명에서 용어 "앵타머"란, 시료 내의 검출하고자 하는 표적 단백질과 특이적으로 결합할 수 있는 물질로 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지는 단일 가닥 핵산 (DNA, RNA, 또는 변형 핵산)을 의미하는 것으로, 상기 결합을 통하여 특이적으로 시료 내의 표적 단백질의 존재를 확인할 수 있다. 앵타머의 제조는 일반적인 앵타머의 제조 방법에 따라, 확인하고자 하는 표적 단백질에 대해 선택적이고 높은 결합력을 가지는 올리고뉴클레오타이드의 서열을 결정하여 합성한 후, 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단이나 3' 말단을 앵타머 칩의 관능기에 결합할 수 있도록, $-SH$, $-COOH$, $-OH$ 또는 $-NH_2$ 로 변형을 시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0016] 본 발명의 목적상 상기 앵타머는 바람직하게는 5' 말단에 티올기 ($-SH$)기가 결합된 RNA 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 표적 단백질과 결합할 수 있는 앵타머는 인비트로 선택 방법인 셀렉스(SELEX)를 이용하여 표적 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오타이드를 선택하여 앵타머로 이용할 수 있다. 셀렉스 방법은 다양한 형태의 선택된 기능을 수행하는 단일쇄 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오타이드를 찾기 위한 인비트로 선택 방법으로서, 셀렉스 방법에 의해, 약 10^{15} 개에 달하는 랜덤 집단의 서로 다른 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드로부터

원하는 기능을 가진 앵타머를 찾을 수 있으며, 이때 각 올리고뉴클레오타이드는 고유한 삼차원 구조를 가지며, 원하는 기능(예를 들어, 표적 단백질에 대한 선택적 인식)을 가지는 올리고뉴클레오타이드에 대한 반복적인 선택, 그리고 전통적인 분자생물학적인 방법에 의해 선택된 올리고뉴클레오타이드의 서열을 증폭하게 된다. 이러한 반복적인 선택과 증폭 과정을 거치면서, 궁극적으로, 원하는 분자나 그 화학 과정에 대한 전이 상태 (transition states)에 대해 선택적인 결합성을 가지는 올리고뉴클레오타이드가 그 집단의 대부분을 차지하게 된다. 그리고 이러한 과정의 마지막에 얻어진 각 앵타머의 서열을 확인하게 된다. 이러한 셀렉스를 자동화한 키트 또한 구매가 가능하다 (예를 들어, 바이오맥 2000 피펫팅 로봇 (Biomek 2000 pipetting robot), Beckman Coulter(USA)).

[0018] 상기 앵타머는 표적 단백질에 따라 자유롭게 선택될 수 있으며, 바람직하게는 올리고히스티딘 (oligo-histidine)과 특이적으로 결합할 수 있는 RNA 앵타머일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 올리고히스티딘은 히스티딘 잔기가 연속되어 있는 것으로, 이에 제한되지는 않으나, 일반적인 히스티딘 태그 (His-tag)로서, 바람직하게는 6개의 히스티딘 잔기가 연속된 것일 수 있다.

[0019] 일반적으로 RNA 앵타머와 올리고히스티딘 사이의 결합력은 Kd 값이 $\sim 3.78 \text{ pM}$ 으로, 단백질과 항체의 결합력 (Kd 값 = $\sim 10^{-5} \sim 10^{-12} \text{ M}$) 보다 더 높거나 이에 상응하기 때문에 효과적으로 단백질과의 결합력을 확인할 수 있다.

[0020] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 His-tagged 단백질인 FAF1 UBX 부분의 His-tagged thoredoxin을 올리고히스티딘에 특이적으로 결합하는 RNA 앵타머를 결합시킨 칩과 반응시켜서 특이적으로 결합하는지 여부를 확인하였다.

[0021] 상기 (a) 단계의 표적 단백질을 포함하는 시료를 앵타머 칩과 접촉시키는 단계는 앵타머와 특이적으로 결합할 수 있는 표적 단백질을 검출하기 위하여 접촉시키는 단계이다.

[0022] 본 발명에 용어 "표적 단백질"이란, 앵타머 칩을 사용하여 시료 내에 존재하고 있는지 여부를 검출하고자 하는 물질로서, 표적 단백질의 종류는 당업계에서 통상적으로 사용되는 물질로서 제한은 없다. 보다 구체적으로, 상기 표적 단백질은 생물에서 유래되거나 이와 유사한 것 또는 생체 외에서 제조된 것을 포함하는 것으로 예를 들어, 효소, 항체, 항원, 펩타이드, 미생물 유래 단백질, 동식물 세포 및 기관 유래 단백질일 수 있다. 상기 표적 단백질은 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 올리고히스티딘으로 표지된 것일 수 있다.

[0023] 본 발명에서 용어 "시료"란 검출하고자 하는 표적 단백질이 들어 있는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 표적 단백질을 포함하는 시료를 앵타머가 고정된 기관과 접촉시키면 시료 내의 표적 단백질과 앵타머의 특이적인 결합반응이 일어난다. 표적 단백질과 앵타머 간의 직접적인 결합을 통해 복합체를 형성하는 반응이 일어나거나, 또는 시료 단백질의 효소작용에 의해 앵타머가 변형 또는 수식되는 반응을 포함한 결합이 일어날 수 있다.

[0025] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 기관 위에 고정된 앵타머와 상보적인 서열을 갖는 표적 단백질이 포함된 시료를 접촉시켜서 특이적인 결합 반응을 수행하였다 (실시예 4).

[0026] 상기 (b) 단계의 표적 단백질이 결합된 앵타머 칩과 쿠마씨 블루 용액을 반응시키는 단계는 앵타머에 특이적으로 결합한 표적 단백질을 육안으로 측정하기 위한 단계이다.

[0027] 본 발명의 쿠마씨 블루는 일반적으로 단백질의 염색에 사용되는 염색약으로 쿠마씨 블루에 존재하는 6개의 페닐기들과 2개의 술폰산기들을 통해서 단백질과 결합하는 염색약이다. 본 발명자들은 기존의 앵타머 칩의 검출 방법으로 사용되는 (i) 앵타머와 표적 분자간의 결합 전후에 나타나는 전자 전달정도를 감응하여 반응하는 전기화학적 방식, (ii) 형광물질 등의 형광측정을 통한 광학적 방식, 그리고 (iii) 표적 물질과의 결합 전후에 나타나는 질량의 차이를 분석하여 측정하는 질량 분석 방식의 복잡하고 고비용의 단점을 극복하고자 연구한 결과, 쿠마씨 블루 용액을 표적 단백질과 결합시키는 방식을 통해서 육안으로 표적 단백질을 특이적으로 검출 및 정량할 수 있음을 최초로 개발하였다. 이와 같은 쿠마씨 블루 용액을 이용한 염색은 별도의 장비 없이 육안으로 관측할 수 있다.

[0028] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 단백질을 결합시킨 칩을 쿠마씨 블루 용액과 함께 4°C 에서 1시간 동안 반응시킨 후, 표적 단백질이 RNA 앵타머와 특이적으로 결합한 것을 육안으로 확인하였다. 아울러, 표적 단백질의

검출 감도도 85 ng/ml인 것을 확인하여 (도 2A), 감도가 높은 것을 확인하였다.

[0029] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 표적 단백질을 포함하는 시료를 앵타머 칩과 접촉시키는 단계; (b) 상기 표적 단백질이 결합된 앵타머 칩과 쿠마씨 블루 용액을 반응시키는 단계; 및 (c) 쿠마씨 블루가 반응한 부분의 반응의 세기를 측정하는 단계를 포함하는, 앵타머 칩을 이용한 표적 단백질의 정량 방법을 제공한다.

[0030] 상기 (a) 및 (b) 단계는 앞에서 설명한 방법과 동일하다.

[0031] 상기 (c) 단계의 쿠마씨 블루가 반응한 부분의 반응의 세기를 측정하는 단계는 시료 내에 존재하는 표적 단백질을 정량 분석하기 위한 단계이다.

[0032] 시료 내에 존재하는 표적 단백질의 농도가 증가할수록 쿠마씨 블루가 결합한 부분의 반응의 세기가 증가하므로 표적 단백질을 정량할 수 있으며, 일반적인 광학 스캐너, 덴시토메트리 (densitometry), 이미지 분석 장치, 아도브 (Adobe) 사의 포토샵 소프트웨어 등을 사용하여 정량할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0033] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 표적 단백질의 농도가 증가할수록 쿠마씨 블루 염색 세기가 증가하는 것을 확인하였으며, 85 ng/ml 내지 425 ng/ml에 이르는 넓은 범위 내의 신호를 정량할 수 있음을 확인하였다 (도 2A 및 B).

[0034] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 이황화결합으로 고정화된 앵타머 칩과 표적 단백질을 포함하는 시료를 접촉시키는 단계; (b) 상기 표적 단백질이 결합된 앵타머 칩과 쿠마씨 블루 용액을 반응시켜서 표적 단백질을 검출 또는 정량하는 단계; (c) 상기 앵타머 칩에 이황화결합 환원 용액을 처리하여 앵타머를 분리하는 단계; 및 (d) 앵타머가 분리된 앵타머 칩에 앵타머 분자를 재고정시키는 단계를 포함하는, 앵타머 칩의 재사용 방법을 제공한다.

[0035] 상기 앵타머 칩의 재사용이란 앵타머 칩을 1회 이상 사용하는 것을 의미하며, 재사용 회수는 이에 제한은 없으나, 검출 세기에 변화가 없는 한 다시 사용할 수 있다.

[0036] 상기 (a) 내지 (b) 단계는 앞에서 설명한 단계에서 사용된 방법 등과 유사하다.

[0037] 본 발명의 재사용에 사용되는 앵타머 칩은 바람직하게는 5' 말단에 티올기 (-SH)가 결합된 RNA 앵타머일 수 있다.

[0038] 상기 앵타머 칩의 기판은 유리, 알루미늄, 세라믹, 탄소, 금, 은, 구리, 알루미늄 및 실리콘으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 기판일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0039] 상기 앵타머 칩의 기판은 바람직하게는 티올기를 관능기로 갖는 것일 수 있다. 이와 같은 티올기를 관능기로 가질 수 있도록, 상기 기판을 실란 처리할 수 있다. 이에 따라 상기 앵타머 칩의 앵타머 및 기판은 이황화결합에 의해 결합할 수 있다. 이와 같은 이황화결합은 기존의 가교결합제 등을 이용한 공유결합 방식으로 결합시킨 앵타머 칩과 달리, 이황화결합의 환원을 통해 칩의 재사용이 가능하다.

[0040] 상기 (c) 단계의 이황화결합을 환원시킬 제제는 제한 없이 사용할 수 있으며, 그 예로 DTT (Dithiothreitol)일 수 있다.

[0041] 바람직하게, 상기 (c) 단계 이전에 우레아를 처리하여 표적 단백질을 분리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 표적 단백질의 분리는 우레아에 의한 단백질의 변성에 의해 수행될 수 있다.

[0042] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 앵타머 칩을 8 M 우레아와 반응시켜서 단백질을 변성시킨 후, DTT를 처리하여 이황화결합을 환원시켜서 앵타머를 제거한 후, 다시 상기 칩에 5' 티올기가 도입된 RNA 앵타머를 칩에 다시 고정화시켜서 재생성된 앵타머 칩을 His-tagged 단백질과 다시 반응시킨 결과, 처음 실험했을 때와 유사한 염색 세기를 나타낸 것을 확인하여 (도 2C), 본 발명의 칩 및 재사용 방법을 사용할 경우, 안정적으로 앵타머 칩을 재사용할 수 있음을 확인하였다.

[0043] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 앵타머 칩의 재사용 방법에 제공되는 표적 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 앵타머가 기판에 이황화결합에 의해 결합된 앵타머 칩을 제공한다.

[0044] 앵타머 칩에 대한 설명은 상기에서 설명한 바와 동일하다.

발명의 효과

[0045] 본 발명의 방법은 특정 표적 단백질의 검출 및 정량을 앵타머 기반 바이오센서 칩 위에서 간편하고 별도의 고가의 장비 없이 표적 단백질의 검출 및 정량을 수행할 수 있어서 경제적이다. 또한 본 발명의 방법에 이용되는 바이오센서는 대부분의 단백질 바이오센서와는 다르게 앵타머를 이용한 바이오센서로 검출한계 및 배경신호가 낮으며, 고감도 검출 능이 있는 장점이 있다. 또한, 본 발명의 앵타머 기반 바이오센서는 앵타머와 표적 단백질 복합체를 우레아 (urea) 등으로 변성시켜 표적 단백질이 분리된 앵타머를 회수할 수 있으며, 이황화결합의 환원으로 칩의 기능을 유지한 채로 여러 번 재사용이 가능할 수 있는 장점이 있어서, 비용 절감 효과를 제공할 수 있을 것이다. 아울러, 다양한 진단 또는 의약품의 개발에 이용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 본 발명의 앵타머 기반 칩의 원리를 개략적으로 나타낸 도이다. 티올기가 5' 말단에 달린 His-tagged 앵타머를 이황화결합을 통해 티올기가 붙은 유리판 위에 결합시킨다.

도 2는 앵타머 기반 칩을 쿠마씨 블루 염색법을 통해 His-tagged 단백질의 확인 및 정량 결과를 나타낸 도이다. A는 His-tagged 표적 단백질의 농도별 결과를 나타낸다. 대조군으로 트롬빈을 사용하였다. B는 His-tagged 표적 단백질의 농도별 신호 세기를 나타낸다. C는 앵타머 칩의 재사용을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0048] 실시예 1: 시약 및 기기의 준비

[0049] 본 발명에서 사용된 화학 물질들은 공급회사로부터 구입하였고, 다른 정제과정 없이 사용하였다. 그리고 모든 실험에서 DEPC (diethyl pyrocarbonate) 처리된 탈이온수 (deionized water)를 사용하였다. UV 흡광도는 Agilent 8453 UV-Visible spectrometer를 사용하여 측정하였다. 모든 실험은 두 번 수행되었다.

[0050] 실시예 2: 앵타머의 제조

[0051] His-tagged 단백질에 앵타머를 선택적으로 결합시키기 위하여 5'의 말단에 티올기가 도입된 RNA 앵타머를 다음의 방법으로 제조하였다.

[0052] His-tagged 단백질에 특이적으로 결합하는 RNA 앵타머는 5'의 끝에 T7 프로모터 서열을 포함하는 상보적인 올리고뉴클레오타이드 (5'-GCCAG CTCCC GGGGC CAATC CCAAC CAGAC CACCC ATAGC CCCCC CTATA GTGAG TCGTA TTAGT CC-3', 서열번호 1)를 사용하여 합성하였다. 합성된 RNA 앵타머의 서열은 다음과 같다:

[0053] 서열번호 2: 5'-GCUAU GGGUG GUCUG GUUGG GAUUG GCCCC GGGAG CUGGC-3'.

[0054] 그리고 합성된 RNA 앵타머는 shin *et al.* 및 Kim *et al.*이 개시한 방법 (shin *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3322-3325 ; Kim *et al. Tet. Lett.* **2010**, *51*, 3446-3448)을 이용하여 5'의 말단에 티올기 (-SH)를 도입하였다. 구체적으로, RNA 앵타머의 5' 말단에 티올기를 도입하기 위해 효소를 이용하여, 5' 말단을 티올기로 변형시켰다. 전사과정에 앞서 효과적인 전사과정을 진행하기 위해서는 구아노신을 필요로 하는 T7 RNA 폴리머라제의 기질로 GSMP 5'-deoxy-5'-thioguanosine-5'-monophosphorothioate를 합성(Kim *et al. Tet. Lett.* **2010**, *51*, 3446-3448)하였다. *In vitro* 전사과정 후에 알칼리성 포스파타제 (Alkaline phosphatase) 처리를 통해 RNA 분자의 5' 말단에 티올기를 도입하였다.

[0055] **실시예 3: 앵타머 칩의 제조**

[0056] 앵타머 기반 칩은 Chen *et al.* 논문의 실험방법을 응용하여 준비하였다 (Chen *et al. Biosensors and Bioelectronics*, **2007**, *22*, 926-932).

[0057] 간략하게 요약하자면, 유리판 (1.5cm × 2cm)을 피라냐 용액 (피라냐 용액은 전체비율을 1로 했을 때, 0.3 비율로 30% H₂O₂ 용액, 0.7 비율로 H₂SO₄ 용액을 이용하였다. Stavyiannoudaki *et al. Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 429-435)으로 80℃에서 1 시간 동안 처리하여 표면을 깨끗하게 만들었다. 그 후, 실온으로 낮춘 다음에 슬라이드를 탈이온수를 이용하여 반복적으로 씻어준 후에, 20 분 동안 음파처리 (sonication)를 하였다. 그리고 유리판을 1 시간 동안 100℃ 오븐에 넣은 후, MPTMS ((3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane)를 처리한 에탄올 용액 (MPTMS : EtOH = 1 : 20)에 담그어 뒀다. 15 분 후에 600 μl의 0.01 M NaOH 수용액을 MPTMS를 처리한 에탄올 용액에 넣어준 후에 30 분 동안 유지시켰다. 그리고 유리판을 반복적으로 탈이온수와 에탄올로 차례대로 씻어 뒀다. 좀 더 변형시키기 전에 실온에서 건조과정을 거쳤다. 티올기를 가진 유리판 위에 1 μl의 5' 말단이 티올기인 RNA 용액 (앵타머)을 spotting하고, 4 ℃에서 이황화 결합을 형성시키기 위해 12 시간 이상 (overnight) 반응시켰다. 다음에 PBS 용액 (pH 7.4)를 반복 이용해 반응하지 않은 RNA를 제거하였다 (도 1).

[0058] **실시예 4: 쿠마씨 블루 염색을 통한 앵타머 칩에 결합한 표적 단백질의 확인 및 정량 분석**

[0059] 앵타머 기반 칩의 His-tagged 단백질에 대한 선택도와 감도를 확인하기 위해, 본 발명자들은 정제시킨 재조합 사람 FAF1 (Fas-associated factor1) UBX (Ultrabithorax) 부분의 His-tagged thoredoxin를 사용하였다 (shin *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 3322-3325). FAF1 UBX 부분은 p97/VCP의 N 말단부분 (nuclear envelope reconstruction 과정, 셀 주기, 후기 마이토콘드리아의 골지 형성, 세포사멸 억제 등과 같은 세포의 여러 과정에서 다양하게 쓰일 수 있는 ATPase 중 하나인 AAA+)에 잘 결합한다고 알려져 있다. His-tagged 단백질 샘플을 과발현시켰고, 이전 논문 등 일반적으로 알려진 실험 절차와 같은 방법으로 정제하였다. His-tagged 단백질 용액을 상기 실시예 3에서 제조한 앵타머 칩과 4 ℃에서 3 시간 동안 배양시켰다. 이후에 PBS 용액 (pH 7.4)으로 결합하지 않은 단백질을 제거하기 위해 3 번 정도 씻어주었다. 대조군으로 His-tagging 하지 않은 트롬빈을 사용하였다.

[0060] 앵타머 기반 칩에 결합하는 표적 단백질의 검출과 정량은 쿠마씨 블루 염색법을 이용하였다. 단백질을 결합시킨 칩을 쿠마씨 블루용액 (Coomassie Brilliant Blue R-250 staining solution, Bio-Rad)과 함께 4 ℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그리고 탈염색 용액 (Destaining solution, EtOH : H₂O : AcOH = 45 : 45 : 10)으로 3 번 정도 씻어주고, PBS 용액으로 씻어 주었다. 그 결과물을 사진을 찍은 후에 얻어진 신호는 Gel-Pro Analyzer (Media Cybernetics)를 이용해서 정량하였다.

[0061] 그 결과, 1시간 반응 시간 내에 85 ng/ml 정도의 낮은 농도의 His-tagged 단백질을 검출할 수 있음을 확인하였다 (도 2A). 아울러, 본 발명의 방법이 85 ng/ml 내지 425 ng/ml에 이르는 넓은 범위 내의 신호를 정량할 수 있음을 확인하였다 (도 2B). 또한, 육안으로도 결합 여부를 확인할 수 있었다. 대조군인 His-tagging 하지 않은 트롬빈은 더 많은 농도인 2 μg/ml을 결합시켰지만 쿠마씨 블루 염색 결과를 나타내지 않았다. 따라서, 표적 단백질만이 선택적으로 앵타머 칩에 결합하는 것을 확인하였다.

[0062] 상기와 같은 결과는 본 발명의 방법이 효과적으로 앵타머 칩을 이용하여 높은 감도로 표적 단백질을 육안으로 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 간단한 장비로 정량을 할 수 있음을 뒷받침하는 것이다.

[0063] **실시예 5: 앵타머 칩의 재사용 확인**

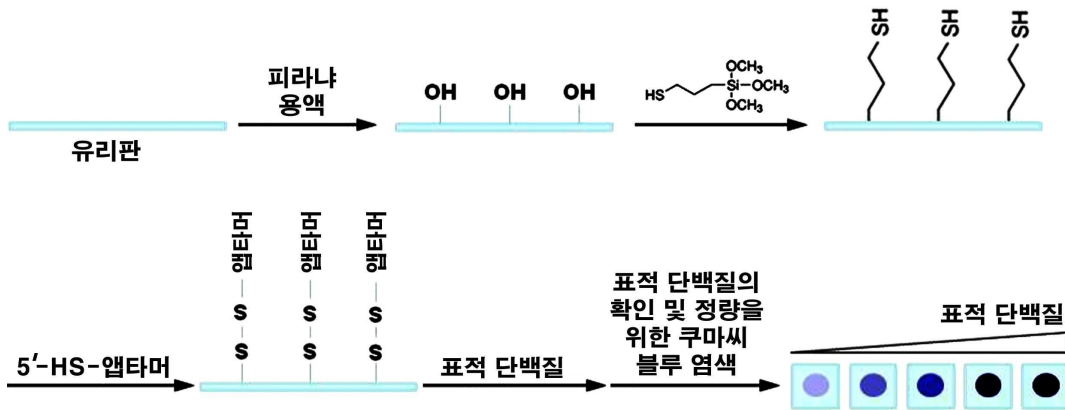
[0064] 본 발명의 앵타머 칩의 재사용 가능 여부를 확인하기 위해, 상기 실시예 4의 염색 과정을 거친 앵타머 칩을 8 M 우레아 (urea)와 40 ℃에서 2 분 동안 반응시켰다. 이후에 이황화결합의 환원을 위해 상기 앵타머 칩에 DTT (dithiothreitol)를 처리하고 PBS 용액 (pH 7.4)으로 3번 세척한 후, 5'에 티올기가 도입된 RNA 앵타머를 칩에 다시 고정화시켰다. 재생성된 앵타머칩을 His-tagged 단백질과 다시 반응시켰다.

[0065] 그 결과, 앵타머 칩을 이용해 처음 실험했을 때와 유사한 염색 세기를 보여주었다 (도 2C).

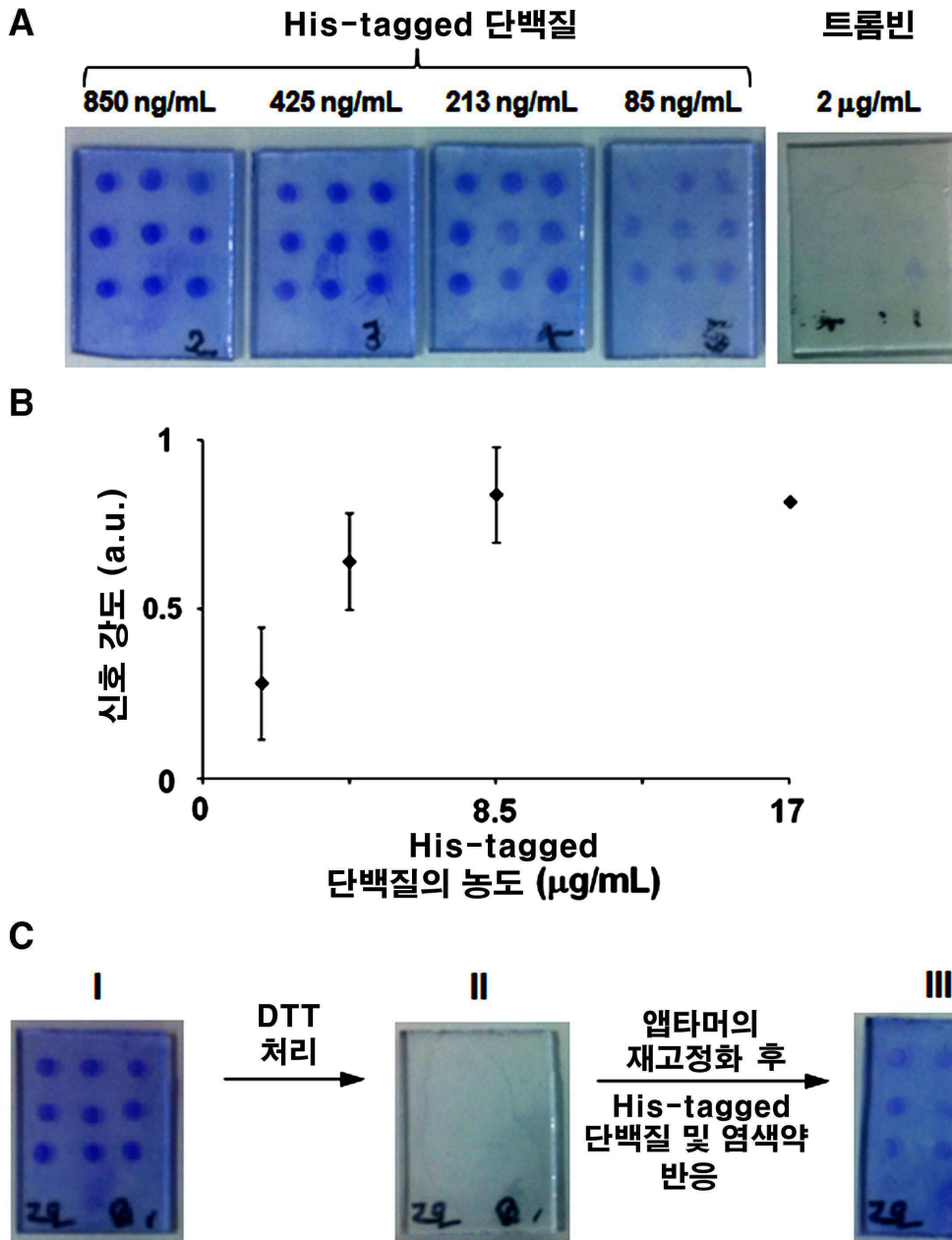
[0066] 이와 같은 결과는 앵타머와 표적 단백질 복합체를 우레아 등으로 변성시켜 표적 단백질이 분리된 앵타머를 회수할 수 있으므로 칩의 기능을 유지한 채로 여러 번 재사용이 가능할 수 있을 것을 뒷받침한다. 또한, 이황화결합으로 앵타머를 표면에 도입한 경우, 가교결합제 등을 이용한 공유결합 방식으로 앵타머를 결합시킨 앵타머칩과는 달리, 이황화결합의 환원을 통해 칩의 재사용이 가능하여 비용 절감 효과를 제공할 수 있음을 뒷받침하는 것으로, 본 발명의 방법이 높은 재현성 및 재사용성을 갖는 앵타머 칩을 제공하는 것을 뒷받침하는 결과이다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Method for detecting and quantifying target proteins
- <130> PA110968/KR
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 67
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> DNA for aptamer synthesis

<400> 1

gccagctccc ggggccaatc ccaaccagac cacccatagc cccccctata gtgagtcgta 60

ttagtcc 67

<210> 2

<211> 40

<

212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aptamer for His-tag

<400> 2

gcuaugggug gucugguugg gauuggcccc gggagcuggc 40