



- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 21/25 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) B82Y 15/00 (2011.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/005707
- (22) 국제출원일: 2013년 6월 27일 (27.06.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0093900 2012년 8월 27일 (27.08.2012) KR
- (71) 출원인: 고려대학교산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 136-701 서울시 성북구 안암동 5가 고려대학교, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 심상준 (SIM, Sang Jun); 135-506 서울시 강남구 선릉로 221 도곡테크아파트 301-803, Seoul (KR). 최승필 (CHOI, Seung Phill); 431-725 경기도 안양시 동안구 귀인로 157 목련우성아파트 707-905, Gyeonggi-do (KR). 송민선 (SONG, Min Sun); 361-160 충청북도 청주시 흥덕구 두꺼비로 38 번길 3-10, Chungcheongbuk-do (KR).
- (74) 대리인: 이처영 (LEE, Cheo Young) 등; 135-080 서울시 강남구 역삼동 648-23 여삼빌딩 11층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

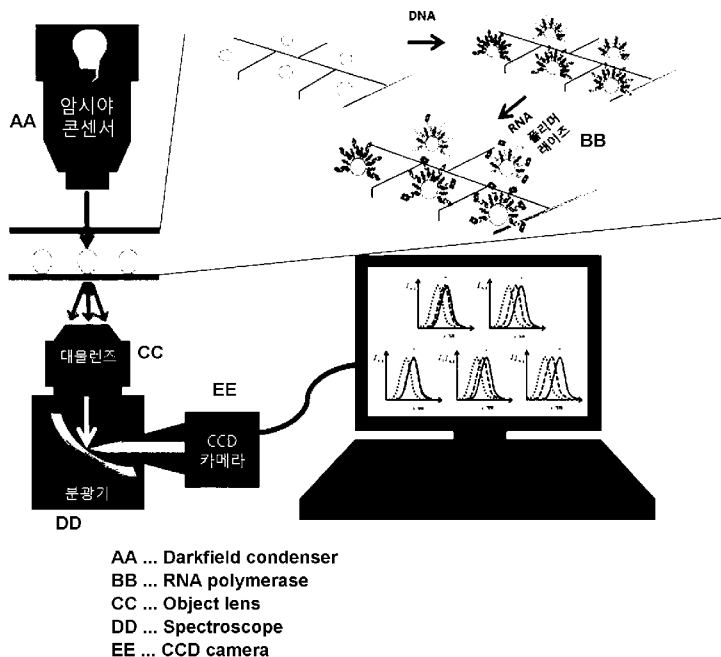
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: GENE TRANSCRIPTION ANALYSIS METHOD USING SURFACE PLASMON RESONANCE SENSOR

(54) 발명의 명칭: 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용한 유전자 전사 분석방법



(57) Abstract: The present invention relates to gene transcription analysis using a surface plasmon resonance sensor, and more specifically, relates to a method for analysing interaction and binding activity between DNA and proteins by using a surface plasmon resonance sensor to which gold nanoparticles are secured. The analysis method using the surface plasmon resonance sensor of the present invention makes it possible to measure the activity of a promoter without a separate marking process by observing interaction between the DNA and protein even without measuring the amount of RNA that has been synthesised by means of transcription, and makes it possible to easily check the importance of each base in a DNA sequence in an interaction with a target protein by measuring, on a single gold nanoparticle, how the interaction with the protein varies in accordance with single base variations in the DNA.

(57) 요약서: 본 발명은 표면 플라즈몬 공명 센서(surface plasmon resonance sensor)를 이용한 유전자 전사 분석에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 금 나노입자가 고정되어있는 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용하여 DNA와 단백질의 상호작용을 분석하는 방법이다. 본 발명의 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용한 분석 방법은, 전사를 통해 합성된 RNA의 양을 측정하지 않고도 DNA와 단백질의 상호작용을 관찰하여 별도의 표지과정 없이 프로모터의 활성을 측정할 수 있으며, DNA의 단일 염기 변이에 따른 표적 단백질의 상호작용을 단일 금 나노입자 위에서 측정함으로써 단백질과의 상호작용에 있어서 DNA 서열상의 각 염기의 중요도를 손쉽게 확인할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용한 유전자 전사 분석방법

기술분야

- [1] 본 발명은 표면 플라즈몬 공명 센서(surface plasmon resonanse sensor)를 이용한 유전자 전사 분석에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 금 나노입자가 고정되어있는 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용하여 DNA와 단백질의 상호작용 및 결합활성을 분석하는 방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 핵산(DNA)-단백질의 상호작용은 유전적 정보처리에 있어서 기본적인고 필수적이기 때문에 DNA의 기능과 그 DNA에 결합하는 단백질을 규명하고 서로 간의 상호작용을 밝혀내는 것은 중요하며, 이러한 정보는 세포의 발달과정과 관련된 유전자 조절 네트워크를 밝히는데 있어서 없어서는 안 될 중요한 존재이다. 유전적 정보에 있어서 중요한 분야는 유전자 발현을 조절하는 프로모터의 활성화로, 프로모터의 활성화는 살아있는 유기체들의 활발한 성장과 유용한 물질들의 대량 생산뿐만 아니라 암세포의 비정상적인 성장과도 관련된 중요한 요소이다.
- [4] 이러한 프로모터의 활성을 연구하기 위해 그동안 RNA와 단백질 수준에서 간접적으로 프로모터와 RNA 폴리머레이즈의 상호작용을 관찰하는 체내 또는 체외 전사/번역 과정과 같은 다양한 생화학적 방법들이 이용되어 왔다. 하지만, 이러한 방법들은 시간이 오래 소요되고 복잡할 뿐만 아니라 전사 생성물에만 중점을 둔 간접적인 연구들이었다. 따라서, 빠르고 간편하면서도 직접적으로 유전적 정보처리과정을 모니터링 할 수 있는 새로운 접근 방법이 필요한 실정이다 (S. W. Ho *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103:9940, 2006; Shin, J. Kim *et al.*, *proceedings of the National Academy of Sciences*, 97:3891, 2000).
- [5] 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance: SPR) 방법은 복잡한 사전 정제 및 표지화 공정 없이 정량적으로 반응을 감지할 수 있기 때문에, 표면에 고정된 생체분자 사이의 상호작용에 관한 많은 연구에서 다양하게 사용되어 왔다. 지난 수십 년 동안 항원/항체, 리간드/수용체, 단백질/단백질 반응 및 DNA 혼성체화를 포함하여 특정 생체 피분석물에 대한 생체재료 농도, 두께 및 결합 반응속도 데이터를 측정하기 위하여 SPR에 기초한 다양한 생체분자 상호작용 분석이 수행되어 왔다 (A. D. McFarland *et al.*, *Nano letters*, 3:1057, 2003; G. L. Liu *et al.*, *Nature nanotechnology*, 1:47, 2006; A. J. Haes *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 124:10596, 2002; J. N. Anker *et al.*, *Nature materials*, 7:442, 2008; Iain K *et al.*, *J. Mol. Recognit*,

12: 322, 1999; M.E. Conway *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298:625, 2002).

- [6] 이에 본 발명에서는 효과적으로 프로모터 활성을 분석하기 위해 예의 노력한 결과, 금 나노입자가 고정되어있는 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용하여 DNA와 단백질의 상호작용 및 결합활성을 분석할 수 있는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- [7]
- [8] 발명의 요약
- [9] 본 발명의 목적은 금 나노입자가 고정된 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용하여 DNA-단백질 상호작용 및 결합활성을 분석하는 방법과 프로모터 활성을 분석하는 방법을 제공하는 데 있다. 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, (a) 투명한 지지체에 금 나노입자를 고정시키는 단계; 및 (b) 금 나노입자가 고정된 표면을 표적 DNA와 유기 흡착제를 고정시키는 단계를 포함하는 DNA-단백질 상호작용 검출용 표면 플라즈몬 공명 센서(surface plasmon resonanse sensor)의 제작방법을 제공한다.
- [10] 본 발명은 또한, 상기의 방법에 의해 제작되고, 투명한 지지체에 고정된 금 나노입자 표면에 표적 DNA와 유기 흡착제가 고정되어 있는 표면 플라즈몬 공명 센서를 제공한다.
- [11] 본 발명은 또한, (a) 상기 표면 플라즈몬 공명 센서에 단백질을 접촉시켜 표적 DNA와 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장이동을 통해 표적 DNA와 단백질의 상호작용을 분석하는 단계를 포함하는 DNA-단백질 상호작용의 분석방법을 제공한다.
- [12] 본 발명은 또한, (a) 상기 표면 플라즈몬 공명 센서에 단백질을 접촉시켜 표적 DNA와 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동도와 반응속도 상수의 분석을 통해 표적 DNA와 단백질의 결합활성을 분석하는 단계를 포함하는 DNA-단백질 결합활성의 분석방법을 제공한다.
- [13] 본 발명은 또한, (a) 상기 방법에 의해 제작되되, 정상적인 염기서열 및 단일 염기가 변이된 염기서열이 포함된 각각의 DNA가 고정된 표면 플라즈몬 공명 센서에 단백질을 접촉시켜 DNA와 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장이동을 통해 단일 염기 변이 DNA와 단백질의 상호작용을 분석하는 단계를 포함하는 DNA서열의 각 염기에 대한 단백질 상호작용의 분석방법을 제공한다.
- [14] 본 발명은 또한, (a) 상기 방법에 의해 제작되되, 정상적인 염기서열 및 단일 염기가 변이된 염기서열이 포함된 각각의 DNA가 고정된 표면 플라즈몬 공명

센서에 단백질을 접촉시켜 DNA와 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동도와 반응속도 상수의 분석을 통해 단일 염기 변이 DNA와 단백질의 결합활성을 분석하는 단계를 포함하는 DNA서열의 각 염기에 대한 단백질 결합활성의 분석방법을 제공한다.

[15] 본 발명은 또한, (a) 상기 방법에 의해 제작되되, 프로모터가 고정된 표면 플라즈몬 공명 센서에 RNA 폴리머레이즈를 접촉시켜 프로모터와 RNA 폴리머레이즈의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장이동을 통해 프로모터와 RNA 폴리머레이즈의 상호작용을 분석하는 단계를 포함하는 프로모터-RNA 폴리머레이즈 상호작용의 분석방법을 제공한다.

[16] 본 발명은 또한, (a) 상기 방법에 의해 제작되되, 프로모터가 고정된 표면 플라즈몬 공명 센서에 RNA 폴리머레이즈를 접촉시켜 프로모터와 RNA 폴리머레이즈의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동도와 반응속도 상수의 분석을 통해 프로모터 활성을 분석하는 단계를 포함하는 프로모터 활성 측정 방법을 제공한다.

[17] 본 발명은 또한, (a) 상기 방법에 의해 제작되되, 프로모터가 고정된 표면 플라즈몬 공명 센서에 RNA 폴리머레이즈를 접촉시켜 프로모터와 RNA 폴리머레이즈의 결합을 유도하는 단계; (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동도와 반응속도 상수의 분석을 통해 프로모터 활성을 분석하는 단계; 및 (c) 분석된 프로모터의 활성을 이용하여 유전자 전사활성을 분석하는 단계를 포함하는 유전자 전사활성을 예측하는 방법을 제공한다.

[18]

도면의 간단한 설명

[19] 도 1은 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용한 유전자 전사 분석 방법에 대한 전체적인 과정을 도식화한 그림이다.

[20] 도 2는 생체물질들의 부착에 따른 단일 금 나노입자가 고정된 표면 플라즈몬 공명 빛 산란 스펙트럼 이동을 나타내 것이다.

[21] 도 3은 표면 플라즈몬 공명 센서의 DNA와 유기 흡착제의 표면 개질 비율에 따라 단백질의 결합으로 인한 금 나노입자의 파장 이동 값을 비교한 그래프이다.

[22] 도 4는 단일 염기 변이로 인한 프로모터의 서열 변화에 따라 변화된 RNA 폴리머레이즈의 결합률을 금 나노입자의 최대 파장 이동 값을 통해 비교한 그래프이다.

[23] 도 5는 광 산란 스펙트럼을 통해 프로모터-RNA 폴리머레이즈 결합과정을

실시간으로 모니터링 한 그래프이다.

- [24] 도 6은 프로모터의 서열 변화에 따른 프로모터의 활성을 비교 분석한 그래프이다.
- [25] 도 7은 프로모터의 서열 변화에 따른 In vitro 전사과정을 통해 얻은 전사효율을 비교 분석한 그래프이다.
- [26] 도 8은 비 표적 단백질들을 대상으로 실시한 비특이적 결합 실험의 결과를 나타낸 것이다.

[27]

[28] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예

- [29] 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 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [30] 본 발명은 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용하여 유전자 전사 분석에 관한 새로운 분석 방법에 관한 것으로, 유전자의 조절 네트워크를 밝히는데 필수적인 DNA-단백질 상호작용을 탐구하는데 있어서 기존의 복잡하고 시간 소모가 큰 문제점을 금 나노입자의 국지화된 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용하여 별도의 표지물질 없이 DNA와 단백질의 결합을 직접적으로 관찰하여 해결하였다.
- [31] 본 발명은 일 관점에서, (a) 투명한 지지체에 금 나노입자를 고정시키는 단계; 및 (b) 금 나노입자가 고정된 표면을 표적 DNA와 유기 흡착제를 고정시키는 단계를 포함하는 DNA-단백질 상호작용 검출용 표면 플라즈몬 공명 센서(surface plasmon resonanse sensor)의 제작방법에 관한 것이다.
- [32] 본 발명에 있어서, 투명지지체는 유리인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [33] 본 발명에 있어서, 금 나노입자의 평균입자크기는 15 내지 25nm인 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 20nm이다.
- [34] 본 발명에 있어서, 유기 흡착제는 $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OH}$ 인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [35] 본 발명의 유기 흡착제 $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OH}$ 는 단백질이 비특이적으로 금 나노 입자 표면에 흡착되는 것을 방지하고 단백질과 DNA와의 반응성을 높이기 위한 공간 확보자의 역할로서 사용하였으며, 티올기(-SH) 및 하이드록실기(-OH)가 결합되어있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [36] 본 발명에 있어서, 표적 DNA와 유기 흡착제는 1:1 내지 1:10의 몰 비율로 혼합된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [37] 본 발명은 다른 관점에서, 상기의 방법에 의해 제작되고, 투명한 지지체에 고정된 금 나노입자 표면에 표적 DNA와 유기 흡착제가 고정되어 있는 표면 플라즈몬 공명 센서에 관한 것이다.
- [38] 본 발명의 일 실시예에서, 표면 플라즈몬 공명 센서의 성능 향상을 위해 DNA와 유기 흡착제의 혼합 비율을 확인하는 실험을 진행하였다. 그 결과, DNA 와

- HS(CH₂)₁₁(OCH₂CH₂)₃OH의 비율이 1 : 8 일 때 DNA-단백질 결합으로 인한 파장이동이 가장 크게 나타났으므로 1 : 8의 비율이 최적임을 알 수 있다 (도 3)
- [39] 본 발명의 일 양태에서, 본 발명의 표면 플라즈몬 공명 현상을 기반으로 한 DNA-단백질 상호작용 검출용 센서를 제작하기 위해서 약 20nm 정도의 금 나노입자를 합성하였고 이 금 나노 입자에 유기 리간드를 통해 원하는 표적 물질(DNA)을 고정화시켰다. 금 나노 입자가 고정화된 RC-30 폐쇄형 챔버 안으로 티올기(-SH)가 유도된 1μM DNA와 유기흡착제 (HS(CH₂)₁₁(OCH₂CH₂)₃OH)가 1 : 8의 몰 비율로 혼합된 혼합물 200μl를 주입하여 12시간 동안 반응시킴으로써 DNA(SP6 프로모터)와 유기 흡착제를 금 나노 입자 표면에 고정화시켜 DNA-단백질 상호작용 검출용 센서를 제작하였다. 표면 개질 과정 이후에는 3차 증류수로 세정과정을 거쳐 미반응된 불순물들을 제거하였다. 불순물 제거 후에는 SP6 프로모터에 선택적으로 결합하는 SP6 RNA 폴리머레이즈 200μl(0.05 Unit/μl)를 챔버에 주입하고 30분 동안 40℃에서 반응시켜 프로모터와 RNA 폴리머레이즈 간의 결합을 유도하였다. 고정화가 이루어지는 단계마다 암시야 공명 현미경을 이용한 실시간 빛 산란 스펙트럼 측정을 통해 그 전 단계의 데이터와 비교하여 데이터 분석을 한 결과, 고정화 단계마다 최대 파장이 오른쪽으로 이동함을 확인하였으며, 이러한 파장의 이동은 DNA와 단백질의 결합에 따른 단일 금 나노입자 주위의 굴절률변화에서 기인한 것으로 최대파장의 이동도와 반응속도 상수의 분석을 통해 결과적으로 프로모터를 구성하는 각 염기의 중요도 및 프로모터 활성을 비교 분석할 수 있었다.
- [40] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 표면 플라즈몬 공명 센서에 단백질을 접촉시켜 표적 DNA와 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장이동을 통해 표적 DNA와 단백질의 상호작용을 분석하는 단계를 포함하는 DNA-단백질 상호작용의 분석방법에 관한 것이다.
- [41] 본 발명에 있어서, 상기 (a)단계는 35 내지 45℃의 조건으로 20 내지 40분 동안 반응시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [42] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 표면 플라즈몬 공명 센서에 단백질을 접촉시켜 표적 DNA와 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동도와 반응속도 상수의 분석을 통해 표적 DNA와 단백질의 결합활성을 분석하는 단계를 포함하는 DNA-단백질 결합활성의 분석방법에 관한 것이다.
- [43] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 방법에 의해 제작되되, 정상적인 염기서열 및 단일 염기가 변이된 염기서열이 포함된 각각의 DNA가 고정된 표면 플라즈몬 공명 센서에 단백질을 접촉시켜 DNA와 단백질의 결합을 유도하는

단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장이동을 통해 단일 염기 변이 DNA와 단백질의 상호작용을 분석하는 단계를 포함하는 DNA서열의 각 염기에 대한 단백질 상호작용의 분석방법에 관한 것이다.

[44] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 방법에 의해 제작되되, 정상적인 염기서열 및 단일 염기가 변이된 염기서열이 포함된 각각의 DNA가 고정된 표면 플라즈몬 공명 센서에 단백질을 접촉시켜 DNA와 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동도와 반응속도 상수의 분석을 통해 단일 염기 변이 DNA와 단백질의 결합활성을 분석하는 단계를 포함하는 DNA서열의 각 염기에 대한 단백질 결합활성의 분석방법에 관한 것이다.

[45] 본 발명의 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용한 분석 방법은, DNA의 단일 염기 변이에 따른 표적 단백질의 결합을 단일 금 나노입자 위에서 모니터링 함으로서 단백질과의 상호작용에 있어서 DNA 서열상의 각 염기의 중요도를 손쉽게 밝혀낼 수 있었다.

[46] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 방법에 의해 제작되되, 프로모터가 고정된 표면 플라즈몬 공명 센서에 RNA 폴리머레이즈를 접촉시켜 프로모터와 RNA 폴리머레이즈의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장이동을 통해 프로모터와 RNA 폴리머레이즈의 상호작용을 분석하는 단계를 포함하는 프로모터-RNA 폴리머레이즈 상호작용의 분석방법에 관한 것이다.

[47] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 상기 방법에 의해 제작되되, 프로모터가 고정된 표면 플라즈몬 공명 센서에 RNA 폴리머레이즈를 접촉시켜 프로모터와 RNA 폴리머레이즈의 결합을 유도하는 단계; 및 (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동도와 반응속도 상수의 분석을 통해 프로모터 활성을 분석하는 단계를 포함하는 프로모터 활성 측정 방법에 관한 것이다.

[48] 본 발명은 전사과정을 거치지 않고도 빠르고 손쉽게 프로모터의 활성을 분석하기 위하여 DNA-단백질 결합과정을 실시간 광 산란 스펙트럼을 통해 모니터링 하고 최대파장의 이동도와 반응속도 상수를 분석하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[49] 본 발명의 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용하여 프로모터 서열 변화에 따른 RNA 폴리머레이즈의 결합 효율의 변화를 확인하기 위해 기존의 프로모터에서 단일 염기 변이시킨 변이 프로모터를 준비하고 이 각각의 프로모터에 RNA 폴리머레이즈를 결합시켜 스펙트럼의 파장 이동을 측정하였다. 그 결과, SP6

프로모터와 단일염기가 변이된 각각의 변이 프로모터들은 RNA 폴리머레이즈가 결합했을 때 서로 다른 파장 값 이동을 나타냈다. 정상적인 SP6 프로모터가 가장 큰 최대 파장 값 이동을 보였으며, 변이 프로모터들은 정상적인 SP6 프로모터에 비해 파장 값 이동이 감소하는 것을 확인하였다. 정상적인 SP6 프로모터, Mut(-17), Mut(-6) 및 Mut(-11) 프로모터의 순으로 파장 값이 많이 이동하였고, SP6 프로모터 서열을 포함하지 않는 프로모터(서열번호 5)는 파장 값이 거의 이동하지 않았다 (도 4).

[50] RNA 폴리머레이즈의 결합으로 인한 굴절률 변화의 응답으로 최대 파장 값이 이동하는 것이므로, 결과로부터 각 프로모터에 따른 RNA 폴리머레이즈의 결합 효율의 정도를 추측할 수 있다. 프로모터의 -17, -11, -6 자리 잔기들은 모두 RNA 폴리머레이즈가 결합하는데 관여하고 있으며, RNA 폴리머레이즈가 프로모터를 선택적으로 인식함에 있어서 -11 위치의 잔기가 -17과 -6 위치의 잔기에 비해 중요한 역할을 하는 것을 확인하였다. 또한, SP6 프로모터 서열을 포함하지 않는 프로모터의 결과로부터 SP6 RNA 폴리머레이즈가 SP6 프로모터에 선택적으로 결합하며 RNA 폴리머레이즈가 비 특이적으로 흡착되지 않았다는 것을 알 수 있다.

[51] 본 발명의 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용하여 DNA와 단백질의 상호작용 과정을 면밀히 살피기 위해 각 단일 염기 변이된 프로모터에 RNA 폴리머레이즈가 결합하는 과정을 광 산란 스펙트럼을 통해 실시간으로 측정 한 결과, 각각의 프로모터마다 서로 다른 결합속도를 보였으며, $k = \ln 2 / t_{1/2}$ (수학식 1)을 이용하여 각각의 반응 속도 상수를 구하였다. 각각의 반응 속도 상수는 정상적인 SP6 프로모터, Mut(-17), Mut(-11) 및 Mut(-6) 프로모터의 순서로 각각 0.1047 s⁻¹, 0.889 s⁻¹, 0.0186 s⁻¹ 및 0.0448 s⁻¹로 확인하였다 (도 5).

[52] 상기의 반응속도를 이용해 프로모터의 활성을 분석하기 위해 프로모터의 활성을 나타내는 식 $v = ktK$ 을 다음과 같은 가정들로 인해 하기와 같은 수학식 2로 변경하여 분석하였다.

[53]

[54] 수학식 2

[55] $RV_i = K_{b,i} \Delta\lambda_{\max,i} / K_{b,\text{consensus}} \Delta\lambda_{\max,\text{consensus}}$

[56]

[57] 이때, K_t 는 전사과정의 전체 반응속도 상수, K 는 결합상수, RV 는 상대 프로모터 활성, K_b 는 프로모터에 대한 RNA 폴리머레이즈의 결합 속도 상수, $\Delta\lambda_{\max}$ 는 단백질의 결합으로 인한 파장 이동 값, 아래 첨자 i 는 각 변이 프로모터의 종류를 나타낸다. 스펙트럼의 파장 이동 값은 단백질의 결합 정도와 비례하기 때문에 이는 결합 친화도 즉, 결합상수의 척도가 될 수 있다. 본 실험에서는 프로모터의 결합 도메인에서만 단일 염기 변이를 일으켰기 때문에 결합과정을 제외한 개시, 신장, 종결단계의 모든 전사과정에서는 변이 프로모터의 종류와 상관없이 반응 속도가 동일하다고 가정할 수 있으며, 결합 단계의 속도가 다른

단계들의 속도보다 느려 속도 제한 단계로 작용하므로 오직 결합 단계의 반응 속도만을 고려하여 상대적인 프로모터 활성을 측정할 수 있다.

- [58] 상기의 수학적식을 이용해 프로모터 염기 변화에 따른 프로모터의 활성을 분석한 결과, 추산된 Mut(-17), Mut(-6) 및 Mut(-11) 프로모터의 활성은 정상적인 SP6 프로모터와 비교하여 각각 68.16%, 20.23% 및 3.55%로 나타난 것을 확인하였다 (도 6). 즉 RNA 폴리머레이즈가 프로모터를 선택적으로 인식함에 있어서 -11 위치의 잔기가 -17과 -6 위치의 잔기에 비해 중요한 역할을 하는 것을 확인하였다.
- [59] 본 발명의 또 다른 관점에서, (a) 상기 방법에 의해 제작되며, 프로모터가 고정된 표면 플라즈몬 공명 센서에 RNA 폴리머레이즈를 접촉시켜 프로모터와 RNA 폴리머레이즈의 결합을 유도하는 단계; (b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동도와 반응속도 상수의 분석을 통해 프로모터 활성을 분석하는 단계; 및 (c) 분석된 프로모터의 활성을 이용하여 유전자 전사활성을 분석하는 단계를 포함하는 유전자 전사활성을 예측하는 방법에 관한 것이다.
- [60] 본 발명의 표면 플라즈몬 공명 센서는 금속입자의 광산란 현상을 이용하여 DNA의 전사 효율을 모니터링하고 프로모터의 반응상수를 이용하여(kinetic study)프로모터의 활성을 측정할 수 있으며, 또한 이를 이용하여 유전자의 전사활성을 측정할 수 있다.
- [61] 프로모터 활성 결과의 정당성을 확인하기 위해 *In vitro*에서 전사 효율을 분석한 결과, Mut(-17), Mut(-11), Mut(-6) 및 SP6 프로모터 서열을 포함하지 않는 프로모터의 *In vitro* 전사 효율은 정상적인 SP6 프로모터와 비교하여 각각 80.65%, 2.76%, 26.37% 및 0%로 나타났으며, 실험예 5의 결과와 일치하는 것을 확인하였다. 이는 본 발명의 DNA와 단백질의 염기 특이적 상호작용을 나노 플라즈모닉 센서를 통해 정확하면서도 빠르고 간편하게 프로모터의 활성을 측정 가능함을 시사한다.
- [62] 본 발명의 표면 플라즈몬 공명 센서의 DNA-단백질 특이적 결합의 데이터가 신뢰성을 갖기 위해서는 노이즈를 발생시킬 가능성이 있는 비 표적 단백질과의 상호작용 관찰 또한 필수적이다. 따라서 실험에 사용된 SP6 RNA 폴리머레이즈와 가장 유사하지만 각기 자신들 고유의 프로모터 서열에만 선택적으로 결합하는 T3 및 T7 RNA 폴리머레이즈를 가지고 비특이적 결합 실험을 진행한 결과, SP6 RNA 폴리머레이즈를 제외한 비표적 단백질인 T3 및 T7 RNA 폴리머레이즈에서는 파장 이동이 거의 일어나지 않는 것을 확인하였으며(도 7), 본 발명의 표면 플라즈몬 공명 센서가 표적 단백질만을 선택적으로 검출하는 것을 확인할 수 있었다.
- [63]
- [64] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에

의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[65]

[66] 실시예 1: DNA-단백질 상호작용 검출용 표면 플라즈몬 공명 센서 제작

[67]

[68] 본 발명의 표면 플라즈몬 공명 현상을 기반으로 한 DNA-단백질 상호작용 검출용 센서를 제작하기 위해서 약 20nm 정도의 금 나노입자를 합성하였고 이 금 나노 입자에 유기 리간드를 통해 원하는 표적 물질(DNA)을 고정화시켰다. 본 발명에서는 RNA 폴리머레이즈(polymerase)와 프로모터(promoter)의 결합 정도를 가지고 프로모터의 활성을 검출하고자 다음과 같은 방법으로 표적 물질을 고정화하였다.

[69] 금 나노 입자가 고정화된 RC-30 폐쇄형 챔버 안으로 티올기(-SH)가 유도된 1 μ M DNA(표 1)와 유기흡착제(HS(CH₂)₁₁(OCH₂CH₂)₃OH)가 1 : 8의 몰 비율로 혼합된 혼합물 200 μ l를 주입하여 12시간 동안 반응시킴으로써 DNA(SP6 프로모터)와 유기 흡착제를 금 나노 입자 표면에 고정화시켜 DNA-단백질 상호작용 검출용 센서를 제작하였다.

[70] 이때 유기 흡착제 HS(CH₂)₁₁(OCH₂CH₂)₃OH는 단백질이 비특이적으로 금 나노 입자 표면에 흡착되는 것을 방지하고 단백질과 DNA와의 반응성을 높이기 위한 공간 확보자의 역할로서 사용하였다.

[71] 표면 개질 과정 이후에는 3차 증류수로 세정과정을 거쳐 미반응된 불순물들을 제거하였다. 불순물 제거 후에는 SP6 프로모터에 선택적으로 결합하는 SP6 RNA 폴리머레이즈 200 μ l(0.05 Unit/ μ l)를 챔버에 주입하고 30분 동안 40 °C에서 반응시켜 프로모터와 RNA 폴리머레이즈 간의 결합을 유도하였다.

[72] 고정화가 이루어지는 단계마다 암시야 공명 현미경을 이용한 실시간 빛 산란 스펙트럼 측정을 통해 그 전 단계의 데이터와 비교하여 데이터 분석을 하였으며, 데이터 분석을 위해, 측정을 통해 얻어진 스펙트럼에 로렌치안 알고리즘을 적용하였고 OriginPro 7.5 프로그램을 통해 최대 파장 값을 결정하였다.

[73] 그 결과, 고정화 단계마다 최대 파장이 오른쪽으로 이동함을 확인하였으며, 이러한 파장의 이동은 DNA와 단백질의 결합에 따른 단일 금 나노입자 주위의 굴절률변화에서 기인한 것으로 최대파장의 이동도와 반응속도 상수의 분석을 통해 결과적으로 프로모터를 구성하는 각 염기의 중요도 및 프로모터 활성을 비교 분석할 수 있었다.

[74]

[75] 실험예 1: 생체물질들의 부착에 따른 단일 금 나노입자의 국제화된 표면 플라즈몬 공명 빛 산란 스펙트럼 이동 측정

[76] 단일 금 나노입자를 DNA-단백질 상호작용 검출용 센서로 활용하기 위한 표면 플라즈몬 공명 센서의 성능을 측정하였다. 초기 상태의 금 나노 입자와 비교하여 금 나노입자 표면에 SP6 프로모터를 포함하는 DNA를 고정화시켰을 때는

스펙트럼의 최대 파장 값이 30.02nm 장파장 쪽으로 이동하였으며, RNA 폴리머레이즈가 금-DNA 나노 복합체의 프로모터 부위를 인식하고 결합하였을 때는 스펙트럼의 최대 파장 값이 37.85nm 장파장 쪽으로 이동하는 것을 확인하였다 (도 2). 이는 단일 금 나노 입자 표면으로의 DNA 고정화와 RNA 폴리머레이즈의 특이적 결합이 금 나노 입자의 유전 환경을 변화시켜 스펙트럼이 장파장으로 이동한 것이라고 볼 수 있다.

[77]

[78] 실험에 2. DNA와 유기 흡착제의 표면 개질 비율에 따른 표면 플라즈몬 공명 센서의 성능 비교

[79] 표면 플라즈몬 공명 센서의 성능 향상을 위해 DNA와 유기 흡착제의 혼합 비율을 확인하는 실험을 진행하였다. 이때 사용된 유기 흡착제 $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OH}$ 는 단백질이 비특이적으로 금 나노 입자 표면에 흡착되는 것을 방지하고 단백질과 DNA와의 반응성을 높이기 위한 공간 확보자의 역할로서 사용되었으며 DNA와 다양한 비율로 혼합되어 금 나노 입자 표면을 개질 하였다.

[80] 그 결과, DNA 와 $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OH}$ 의 비율이 1 : 8 일 때 DNA-단백질 결합으로 인한 파장이동이 가장 크게 나타났으므로 1 : 8 의 비율이 최적임을 알 수 있다 (도 3).

[81]

[82] 실험에 3. 프로모터 서열 변화에 따른 RNA 폴리머레이즈 결합 효율 변화 비교

[83] 본 발명의 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용하여 프로모터 서열 변화에 따른 RNA 폴리머레이즈의 결합 효율의 변화를 확인하기 위해 기존의 프로모터에서 단일 염기 변이시킨 변이 프로모터를 준비하고 이 각각의 프로모터에 RNA 폴리머레이즈를 결합시켜 스펙트럼의 파장 이동을 측정하였다.

[84] 본 발명에 사용된 DNA와 단백질은 SP6 프로모터와 SP6 RNA 폴리머레이즈로서 프로메가(Promega Corporation)로부터 구입하였다. 프로모터의 종류는 모두 5가지로 SP6 프로모터, 각각 -17, -11 및 -6 위치의 염기가 치환된 단일 염기 변이 SP6 프로모터 및 SP6 프로모터 서열을 포함하지 않는 프로모터를 사용하였다 (표 1).

[85]

[86] 표 1

[Table 1]

	DNA sequence
Consensus SP6 promoter(서열번호 1)	5'-thiol-(C6)-AGCTTGAGTCTTCTATAGTGTCACCT AAATAGC-3'
Mutant(-17) SP6 promoter(서열번호 2)	5'-thiol-(C6)-AGCTTGAGTCTTCTATAGTGTCACCT AAACAGC-3'
Mutant(-6) SP6 promoter(서열번호 3)	5'-thiol-(C6)-AGCTTGAGTCTTCTATAGGGTCACCT AAATAGC-3'
Mutant(-11) SP6 promoter(서열번호4)	5'-thiol-(C6)-AGCTTGAGTCTTCTATAGTGTCAACT AAATAGC-3'
Non SP6 promoter(서열번호5)	5'-thiol-(C6)-AGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAG GACTATAA-3'

[87]

[88] 그 결과, SP6 프로모터와 단일염기가 변이된 각각의 변이 프로모터들은 RNA 폴리머레이즈가 결합했을 때 서로 다른 파장 값 이동을 나타냈다. 정상적인 SP6 프로모터가 가장 큰 최대 파장 값 이동을 보였으며, 변이 프로모터들은 정상적인 SP6 프로모터에 비해 파장 값 이동이 감소하는 것을 확인하였다. 정상적인 SP6 프로모터, Mut(-17), Mut(-6) 및 Mut(-11) 프로모터의 순으로 파장 값이 많이 이동하였고, SP6 프로모터 서열을 포함하지 않는 프로모터(서열번호 5)는 파장 값이 거의 이동하지 않았다 (도 4).

[89]

[90] 실험에 4. 광 산란 스펙트럼을 통한 DNA-단백질 결합과정의 실시간 모니터링
 [91] 본 발명의 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용하여 DNA와 단백질의 상호작용 과정을 면밀히 살피기 위해 각 단일 염기 변이된 프로모터에 RNA 폴리머레이즈가 결합하는 과정을 광 산란 스펙트럼을 통해 실시간으로 측정하였다.

[92] 그 결과, 각각의 프로모터마다 서로 다른 결합속도를 보였으며, 다음의 수학적 식 1을 이용하여 각각의 반응 속도 상수를 구하였다.

[93]

[94] 수학적 식 1[95] $K = \ln 2 / t_{1/2}$

[96]

[97] 각각의 반응 속도 상수는 정상적인 SP6 프로모터, Mut(-17), Mut(-11) 및 Mut(-6)프로모터의 순서로 각각 0.1047 s⁻¹, 0.889 s⁻¹, 0.0186 s⁻¹ 및 0.0448 s⁻¹로 확인하였다 (도 5).

[98]

- [99] 실험에 5. 프로모터 서열 변화에 따른 프로모터의 활성 비교
- [100] 프로모터의 활성을 나타내는 식 $v=K_iK$ 는 다음과 같은 가정들로 인해 하기와 같은 수학적 2로 변경될 수 있다.
- [101]
- [102] 수학적 2
- [103] $RV_i=K_{b,i} \Delta\lambda_{\max,i}/K_{b,\text{consensus}} \Delta\lambda_{\max,\text{consensus}}$
- [104]
- [105] 이때, K_i 는 전사과정의 전체 반응속도 상수, K 는 결합상수, RV 는 상대 프로모터 활성, K_b 는 프로모터에 대한 RNA 폴리머레이즈의 결합 속도 상수, $\Delta\lambda_{\max}$ 는 단백질의 결합으로 인한 파장 이동 값, 아래첨자 i 는 각 변이 프로모터의 종류를 나타낸다. 스펙트럼의 파장 이동 값은 단백질의 결합 정도와 비례하기 때문에 이는 결합 친화도 즉, 결합상수의 척도가 될 수 있다.
- [106] 그 결과, 이 식을 통해 추산된 Mut(-17), Mut(-6) 및 Mut(-11) 프로모터의 활성은 정상적인 SP6 프로모터와 비교하여 각각 68.16%, 20.23% 및 3.55%로 나타난 것을 확인하였다 (도 6).
- [107]
- [108] 실험에 6. 표면 플라즈몬 공명 센서를 통해 얻은 프로모터의 활성과 *In vitro* 전사 효율 비교
- [109] 본 발명의 표면 플라즈몬 공명 센서를 통해 얻은 프로모터 활성 결과의 정당성을 확인하기 위해 *In vitro* 전사 효율을 비교하였다. SP6 프로모터 변이들에 대한 *In vitro* 전사 활성은 표면 플라즈몬 공명 센서 실험과 동일한 조건 하에서 개별적으로 측정하였다.
- [110] 그 결과, Mut(-17), Mut(-11), Mut(-6) 및 SP6 프로모터 서열을 포함하지 않는 프로모터의 *In vitro* 전사 효율은 정상적인 SP6 프로모터와 비교하여 각각 80.65 %, 2.76 %, 26.37 % 및 0 %로 나타났으며, 실험에 5의 결과와 일치하는 것을 확인하였다. 이는 본 발명의 DNA와 단백질의 염기 특이적 상호작용을 표면 플라즈몬 공명 센서를 통해 정확하면서도 빠르고 간편하게 프로모터의 활성을 측정 가능함을 시사한다.
- [111]
- [112] 실험에 7. 표면 플라즈몬 공명 센서의 비 특이적 결합 실험
- [113] 상기 실험 예들에서 보인 DNA-단백질 특이적 결합의 데이터가 신뢰성을 갖기 위해서는 노이즈를 발생시킬 가능성이 있는 비 표적 단백질과의 상호작용 관찰 또한 필수적이다. 따라서 실험에 사용된 SP6 RNA 폴리머레이즈와 가장 유사하지만 각기 자신들 고유의 프로모터 서열에만 선택적으로 결합하는 T3 및 T7 RNA 폴리머레이즈를 가지고 비특이적 결합 실험을 진행하였다.
- [114] 그 결과, SP6 RNA 폴리머레이즈를 제외한 비표적 단백질인 T3 및 T7 RNA 폴리머레이즈에서는 파장 이동이 거의 일어나지 않았으며(도 7), 이는 본 발명의 표면 플라즈몬 공명 센서가 표적 단백질만을 선택적으로 검출해 낼 수 있음을 나타낸다.

[115]

산업상 이용가능성

[116] 본 발명의 표면 플라즈몬 공명 센서를 이용한 분석 방법은 전사를 통해 합성된 RNA의 양을 측정하지 않고도 DNA와 단백질의 상호작용을 관찰하여 별도의 표지과정 없이 프로모터의 활성을 측정할 수 있으며, DNA의 단일 염기 변이에 따른 표적 단백질의 상호작용을 단일 금 나노입자 위에서 측정함으로써 단백질과의 상호작용에 있어서 DNA 서열상의 각 염기의 중요도를 손쉽게 확인할 수 있다.

[117]

[118] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 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.

[119]

서열목록 Free Text

[120] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] 다음 단계를 포함하는 DNA-단백질 상호작용 검출용 표면 플라즈몬 공명 센서(surface plasmon resonanse sensor)의 제작방법:
(a) 투명한 지지체에 금 나노입자를 고정시키는 단계; 및
(b) 금 나노입자가 고정된 표면에 표적 DNA와 유기 흡착제를 고정시키는 단계.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 투명한 지지체는 유리인 것을 특징으로 하는 제작방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 금 나노입자의 평균입자크기는 15 내지 25nm인 것을 특징으로 하는 제작방법.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 유기 흡착제는 $\text{HS}(\text{CH}_2)_{11}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_3\text{OH}$ 인 것을 특징으로 하는 제작방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 표적 DNA와 유기 흡착제는 1 : 1 내지 1 : 10의 몰 비율로 혼합된 것을 특징으로 하는 제작방법.
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제작되고, 투명한 지지체에 고정된 금 나노입자 표면에 표적 DNA와 유기 흡착제가 고정되어 있는 표면 플라즈몬 공명 센서.
- [청구항 7] 다음 단계를 포함하는 DNA-단백질 상호작용의 분석방법:
(a) 제6항의 표면 플라즈몬 공명 센서에 단백질을 접촉시켜 표적 DNA와 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및
(b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장이동을 통해 표적 DNA와 단백질의 상호작용을 분석하는 단계.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, (a)단계는 35 내지 45°C의 조건으로 20 내지 40분 동안 반응시키는 것을 특징으로 하는 분석방법.
- [청구항 9] 다음 단계를 포함하는 DNA-단백질 결합활성의 분석방법:
(a) 제6항의 표면 플라즈몬 공명 센서에 단백질을 접촉시켜 표적 DNA와 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및
(b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동도와 반응속도 상수의 분석을 통해 표적 DNA와 단백질의 결합활성을 분석하는 단계.
- [청구항 10] 다음 단계를 포함하는 DNA서열의 각 염기에 대한 단백질 상호작용의 분석방법:
(a) 제1항의 방법에 의해 제작되되, 정상적인 염기서열 및 단일 염기가 변이된 염기서열이 포함된 각각의 DNA가 고정된 표면

플라즈몬 공명 센서에 단백질을 접촉시켜 DNA와 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및

(b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장이동을 통해 단일 염기 변이 DNA와 단백질의 상호작용을 분석하는 단계.

[청구항 11]

다음 단계를 포함하는 DNA서열의 각 염기에 대한 단백질 결합활성의 분석방법:

(a) 제1항의 방법에 의해 제작되되, 정상적인 염기서열 및 단일 염기가 변이된 염기서열이 포함된 각각의 DNA가 고정된 표면 플라즈몬 공명 센서에 단백질을 접촉시켜 DNA와 단백질의 결합을 유도하는 단계; 및

(b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동도와 반응속도 상수의 분석을 통해 단일 염기 변이 DNA와 단백질의 결합활성을 분석하는 단계.

[청구항 12]

다음 단계를 포함하는 프로모터-RNA 폴리머레이즈 상호작용의 분석방법:

(a) 제1항의 방법에 의해 제작되되, 프로모터가 고정된 표면 플라즈몬 공명 센서에 RNA 폴리머레이즈를 접촉시켜 프로모터와 RNA 폴리머레이즈의 결합을 유도하는 단계; 및

(b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장이동을 통해 프로모터와 RNA 폴리머레이즈의 상호작용을 분석하는 단계.

[청구항 13]

다음 단계를 포함하는 프로모터 활성 측정 방법:

(a) 제1항의 방법에 의해 제작되되, 프로모터가 고정된 표면 플라즈몬 공명 센서에 RNA 폴리머레이즈를 접촉시켜 프로모터와 RNA 폴리머레이즈의 결합을 유도하는 단계; 및

(b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여 실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동도와 반응속도 상수의 분석을 통해 프로모터 활성을 분석하는 단계.

[청구항 14]

다음의 단계를 포함하는 유전자 전사활성을 예측하는 방법:

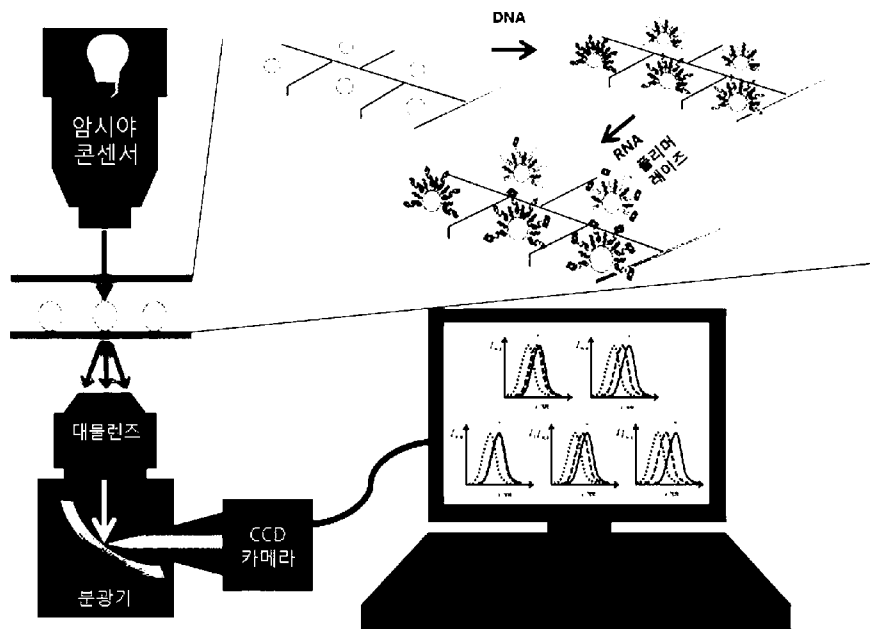
(a) 제1항의 방법에 의해 제작되되, 프로모터가 고정된 표면 플라즈몬 공명 센서에 RNA 폴리머레이즈를 접촉시켜 프로모터와 RNA 폴리머레이즈의 결합을 유도하는 단계;

(b) 암시야 공명 현미경(dark-field microscopy)을 이용하여

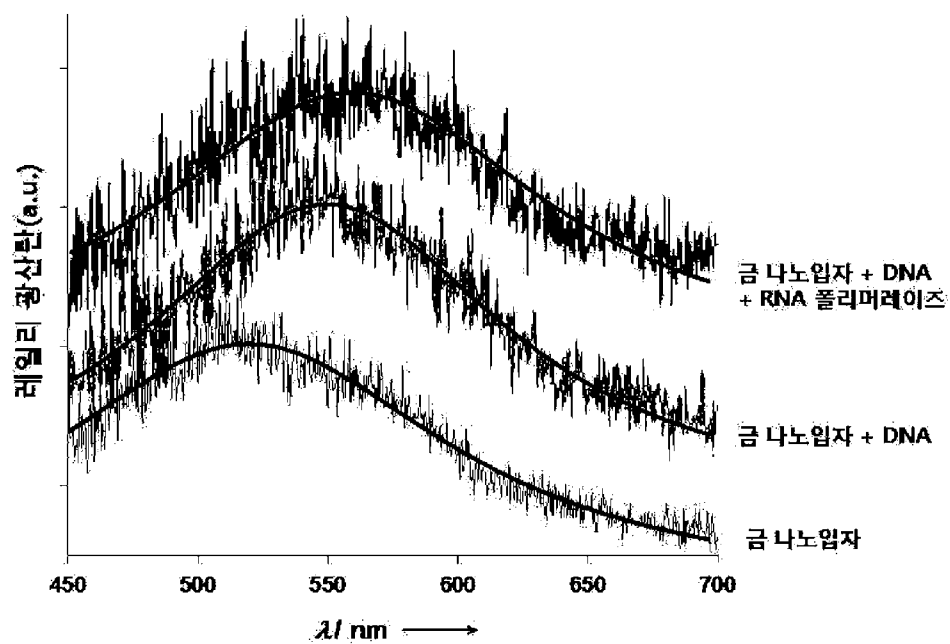
실시간으로 광산란 스펙트럼을 측정하고, 이로부터 수득된 최대 파장 이동도와 반응속도 상수의 분석을 통해 프로모터 활성을 분석하는 단계; 및

(c) 분석된 프로모터의 활성을 이용하여 유전자 전사활성을 분석하는 단계.

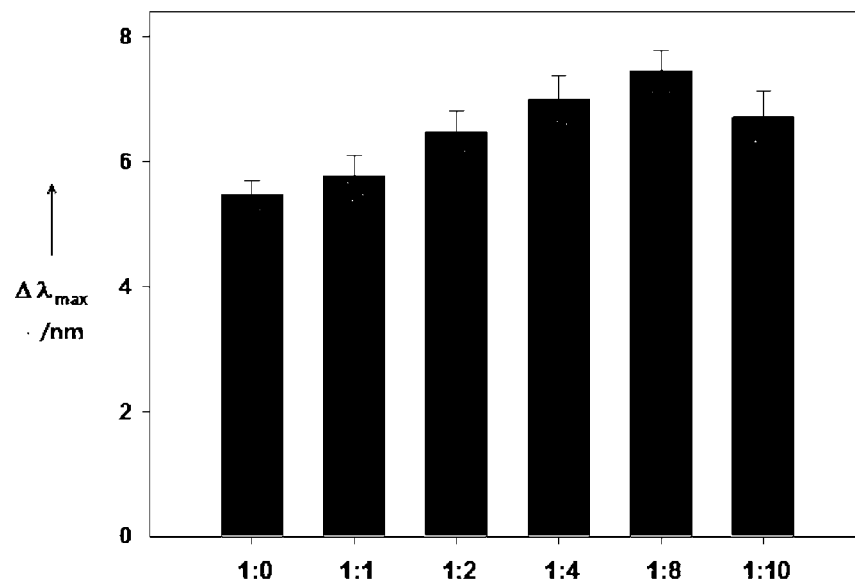
[Fig. 1]



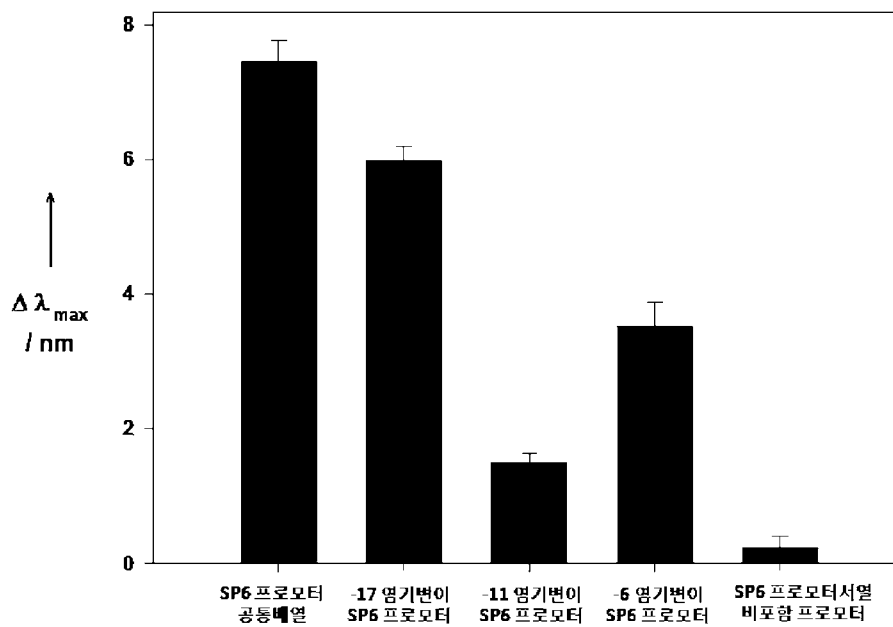
[Fig. 2]



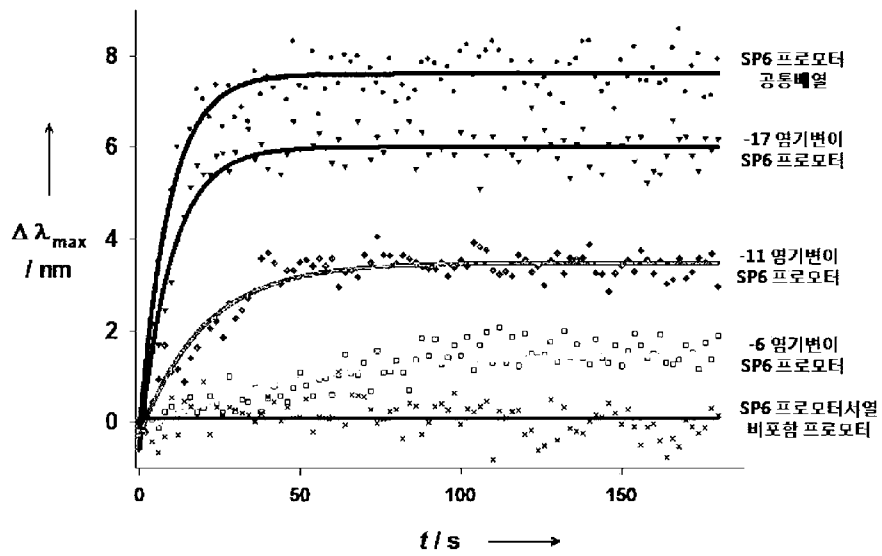
[Fig. 3]



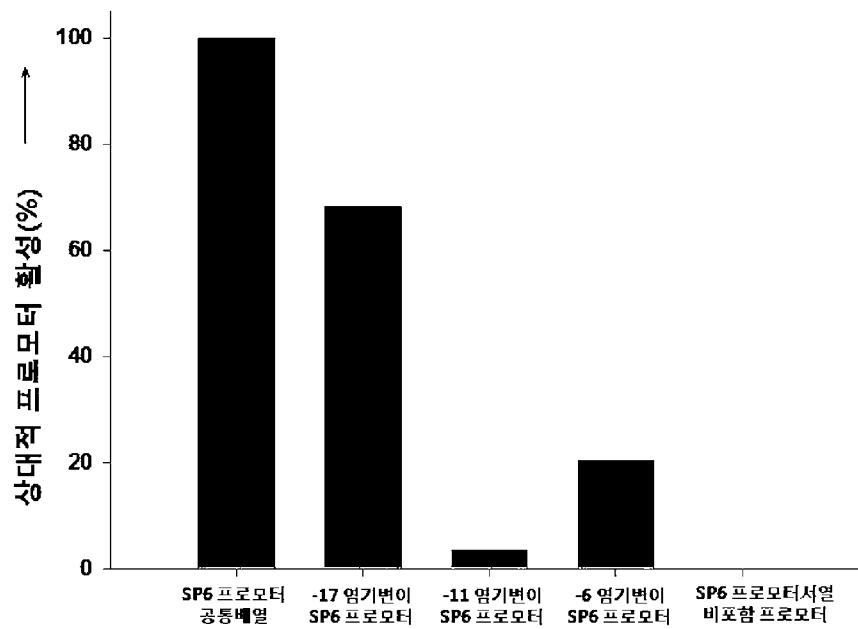
[Fig. 4]



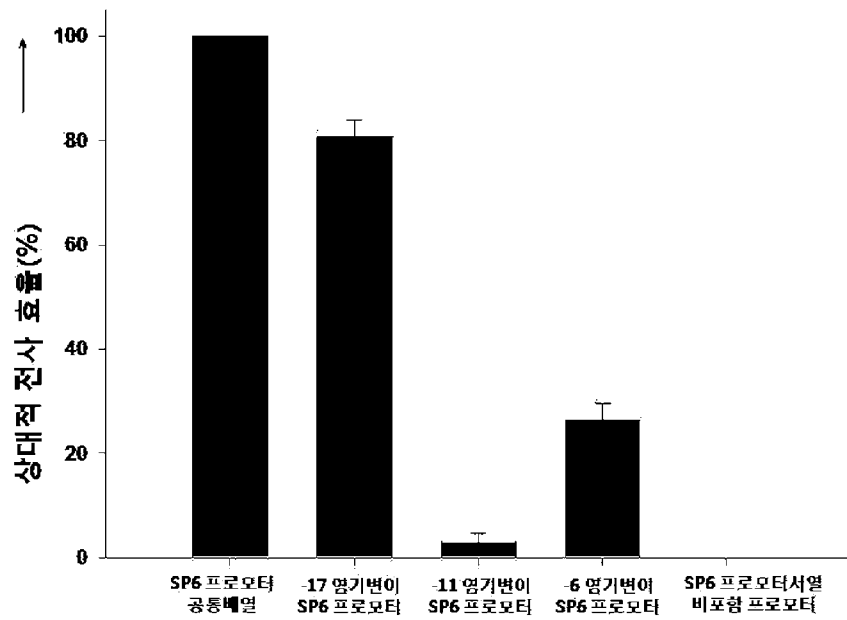
[Fig. 5]



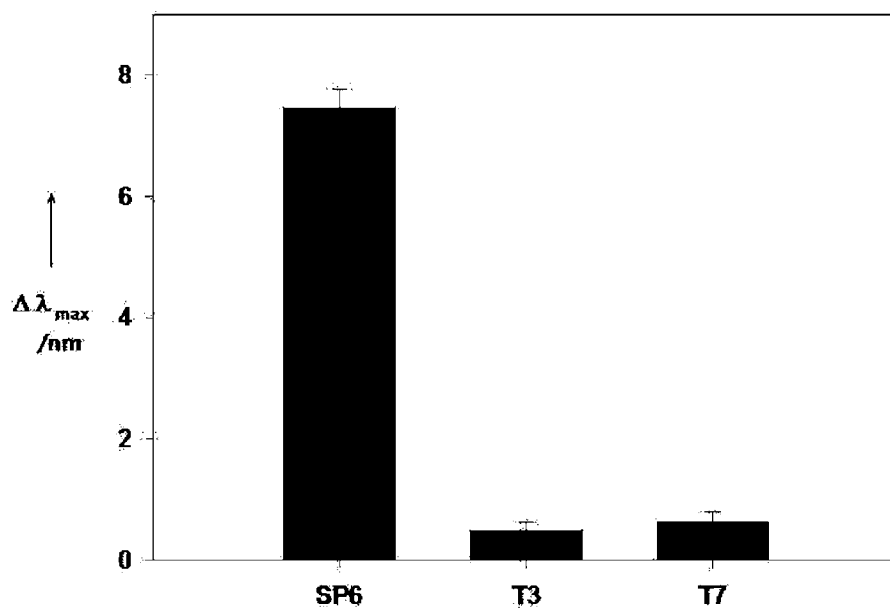
[Fig. 6]



[Fig. 7]



[Fig. 8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/005707**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 21/25(2006.01)i, B82Y 15/00(2011.01)n***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/68; G01N 33/48; G01N 21/17; G01N 33/68; G01N 21/25; B82Y 15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: surface plasmon resonance sensor, DNA-protein, SPR, LSPR, promoter-polymerase, interaction, transcription activity

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-0962290 B1 (RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION SUNGKYUNKWAN UNIVERSITY) 11 June 2010 See abstract and claims 1-5, 8-11.	1-14
Y	SHUMAKER-PARRY et al., "Microspotting streptavidin and double-stranded DNA arrays on gold for high-throughput studies of protein-DNA interactions by surface plasmon resonance microscopy" Analytical Chemistry, vol.76, no.4, pp.918-929 (2004) See abstract; figure 1; and pages 919, 929.	1-14
A	MATSUI et al., "SPR sensor chip for detection of small molecules using molecularly imprinted polymer with embedded gold nanoparticles" Analytical Chemistry, vol.77, no.13, pp.4282-4285 (2005) See the entire document.	1-14
A	SCHUBERT et al., "Comparative thermodynamic analysis of DNA-protein interactions using surface plasmon resonance and fluorescence correlation spectroscopy" Biochemistry, vol.42, no.34, pp.10288-10294 (2003) See the entire document.	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 AUGUST 2013 (21.08.2013)

Date of mailing of the international search report

21 AUGUST 2013 (21.08.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/005707

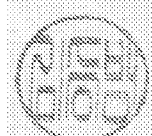
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OLOFSSON et al., "Surface-based gold-nanoparticle sensor for specific and quantitative DNA hybridization detection" Langmuir, vol.19, no.24, pp.10414-10419 (2003) See the entire document .	1-14
PX	SONG et al., "Real-time, sensitive, and specific detection of promoter-polymerase interactions in gene transcription using a nanoplasmonic sensor" Advanced Materials, vol.25, no.9, pp.1225-1225 (March 2013) See the entire document .	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/005707

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-0962290 B1	11/06/2010	US 2011-0014724 A1 WO 2009-102092 A1	20/01/2011 20/08/2009

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, G01N 21/25(2006.01)i, B82Y 15/00(2011.01)n		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/68; G01N 33/48; G01N 21/17; G01N 33/68; G01N 21/25; B82Y 15/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 표면 플라즈몬 공명 센서, DNA-단백질, SPR, LSPR, 프로모터-폴리머레이즈, 상호작용, 전자활성		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-0962290 B1 (성균관대학교산학협력단) 2010.06.11 요약 및 청구항 1-5, 8-11 참조.	1-14
Y	SHUMAKER-PARRY 외, 'Microspotting streptavidin and double-stranded DNA arrays on gold for high-throughput studies of protein-DNA interactions by surface plasmon resonance microscopy' Analytical Chemistry, Vol.76, No.4, pp.918-929 (2004) 요약; 도면 1; 및 pp.919,929 참조.	1-14
A	MATSUI 외, 'SPR sensor chip for detection of small molecules using molecularly imprinted polymer with embedded gold nanoparticles' Analytical Chemistry, Vol.77, No.13, pp.4282-4285 (2005) 전체 문헌 참조.	1-14
A	SCHUBERT 외, 'Comparative thermodynamic analysis of DNA-protein interactions using surface plasmon resonance and fluorescence correlation spectroscopy' Biochemistry, Vol.42, No.34, pp.10288-10294 (2003) 전체 문헌 참조.	1-14
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2013년 08월 21일 (21.08.2013)		국제조사보고서 발송일 2013년 08월 21일 (21.08.2013)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371 

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	OLOFSSON 외, 'Surface-based gold-nanoparticle sensor for specific and quantitative DNA hybridization detection' Langmuir, Vol.19, No.24, pp.10414-10419 (2003) 전체 문헌 참조.	1-14
PX	SONG 외, 'Real-time, sensitive, and specific detection of promoter-polymerase interactions in gene transcription using a nanoplasmonic sensor' Advanced Materials, Vol.25, No.9, pp.1225-1225 (March 2013) 전체 문헌 참조.	1-14

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2013/005707

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-0962290 B1

2010/06/11

US 2011-0014724 A1

2011/01/20

WO 2009-102092 A1

2009/08/20