



- (51) 국제특허분류: *C12Q 1/68* (2006.01) *G01N 1/30* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/009499
- (22) 국제출원일: 2015년 9월 9일 (09.09.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2015-0043473 2015년 3월 27일 (27.03.2015) KR
- (71) 출원인: 서강대학교 산학협력단 (INDUSTRY-UNIVERSITY COOPERATION FOUNDATION SOGANG UNIVERSITY) [KR/KR]; 04107 서울시 마포구 백범로 35, 서강대학교 페이아르관 306, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 조규봉 (JO, Kyu Bong); 10374 경기도 고양시 일산서구 후곡로 36, 후곡마을 4단지 404 동 703 호, Gyeonggi-do (KR). 이성현 (LEE, Seong Hyun); 15851 경기도 군포시 고산로 185 번길 6 한솔솔파크아파트 102 동 302 호, Gyeonggi-do (KR). 스위츠 데이비드 (SCHWARTZ, David, C.); 53706 위스콘신주 메디슨 425 헨리 몰 유더블유 바이오테크놀로지센터, Wisconsin (US).
- (74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo Hyun); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301 호, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, 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, ST, 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).

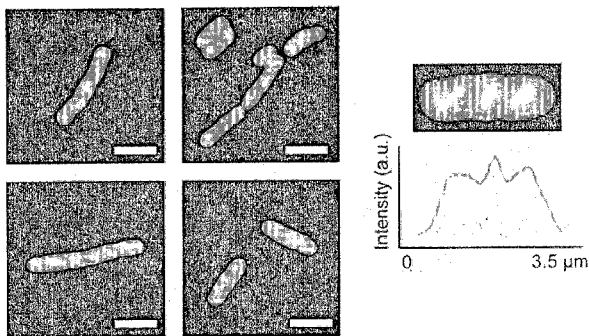
[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR STAINING DNA, CONTAINING DNA BINDING PEPTIDE

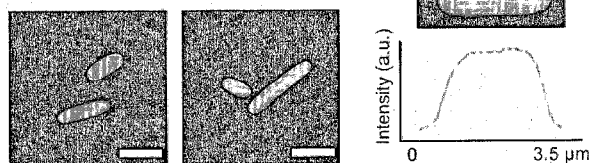
(54) 발명의 명칭 : DNA 결합 펩타이드를 포함하는 DNA 염색용 조성물

도 4

a Peptide-tagged eGFP (DNA Staining)



b Control eGFP



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for staining DNA, the composition being applicable to various fields by inhibiting a DNA photocleavage phenomenon while being safely used by researchers. According to the present invention, when staining DNA by using a particular peptide binding to DNA and a fluorescent protein, a DNA photocleavage phenomenon can be inhibited and efficient DNA staining such as reversible staining is enabled, while the composition is safe for researchers. Therefore, the composition for staining DNA, of the present invention, can be variously used in DNA related research.

(57) 요약서: 본 발명은 연구자들이 안전하게 사용할 수 있으면서 DNA 광분해 현상을 방지하여 다양한 분야에 응용될 수 있는 DNA 염색용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, DNA에 결합하는 특정 펩타이드와 형광 단백질을 이용하여 DNA를 염색하는 경우, 연구자에게 안전하면서 DNA 광분해 현상을 억제하고 가역적 염색이 가능해지는 등 효율적으로 DNA를 염색할 수 있다. 따라서 본 발명의 DNA 염색용 조성물은 DNA 관련 연구에 다양하게 이용될 수 있다.

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

【명세서】

【발명의 명칭】

DNA 결합 펩타이드를 포함하는 DNA 염색용 조성물

5 【기술 분야】

본 발명은 대한민국 미래창조과학부의 지원하에서 과제번호 2014R1A2A2A04003870 에 의해 이루어진 것으로서, 상기 과제의 연구관리전문기관은 한국연구재단, 연구사업명은 “중견연구자지원사업”, 연구과제명은 “단일분자 DNA 를 이용한 초민감 DNA 손상검출 바이오센서”,
10 주관기관은 서강대학교 산학협력단, 연구기간은 2014/05/01 ~ 2017/04/30 이다.

본 특허출원은 2015 년 3 월 27 일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2015-0043473 호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

15 본 발명은 DNA 결합 펩타이드를 포함하는 DNA 염색용 조성물에 관한 것이다.

【배경 기술】

유전공학적으로 변형된 형광 단백질의 사용과 그에 따른 발전은 세포
20 생화학과 분자생물학을 획기적으로 발전시켜왔다. 형광 단백질은 특정 단백질에 결합하여 살아있는 세포 내에서 단백질의 위치와 분자수준에서의 이동을 실시간으로 시각화함으로써 단백질의 기능을 이해할 수 있도록 해주었다. 한편, DNA 분자와 관련하여 형광단백질을 이용하여 DNA 분자위에서 특정 단백질의 이동을 연구한 결과는 있지만, DNA 분자를
25 시각화하기 위하여 DNA 분자 자체를 형광단백질을 이용하여 염색한 연구결과는 아직까지 보고된 바가 없다.

DNA 분자를 염색하기 위해서는 일반적으로 형광 유기 염료(fluorescent organic dye)를 주로 사용하고 있다. 예를 들어, 전기영동 후 DNA 염색을 위해서는 Ethidium Bromide(EtBr)이 일반적으로
30 사용되며, 형광 현미경을 사용하는 경우에는 YOYO(oxazole yellow homodimer)와 같은 염료를 사용하여 거대 DNA 분자를 시각화하기도 한다(4).

살아있는 세포의 경우, 세포막을 투과할 수 있는 SYTO 와 같은 염료를 사용하기도 한다(5).

위와 같은 삽입 염료들은 간단한 과정을 통해 DNA 를 염색할 수 있다는 점과, 신호-잡음 비(signal-to-noise ratio)가 높고, 낮은 해리 상수(EtBr 의 $K_d=12.2 \mu\text{M}$, YOYO-1 의 $K_d=12.1 \text{ nM}$)를 나타낸다는 장점을 가진다(4,5). 그러나 이러한 유기 염료들은 그 본질적인 특성 상 다음과 같은 단점들이 있다. 생체 외 도입 물질인 까닭에 잠재적인 돌연변이 유발 요인으로 작용하여 제반 실험 시 연구자의 주의를 요구하며, 형광을 위해 레이저 광원을 조사하였을 때 라디칼 중간체(radical intermediate)를 형성하여 DNA 인산 골격을 광분해(photocleavage)함으로써 시료를 더 이상 실험에 사용할 수 없게 한다(8-12). 이와 같은 문제점을 해결하기 위하여 많은 연구자들이 안전하고 사용이 편리한 DNA 염색 물질의 개발을 위해 노력중이다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

본 발명자들은 연구자들이 안전하게 사용할 수 있으면서 DNA 광분해 현상을 방지하며 다양한 분야에 응용이 가능한 DNA 염색용 물질을 발굴하고자 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 DNA 에 결합하는 특정한 펩타이드를 이용하고 여기에 형광 단백질을 연결하는 경우, 연구자에게 안전하고 DNA 광분해 현상을 억제하며 효율적으로 DNA 를 염색할 수 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

본 발명의 목적은 DNA 결합 펩타이드를 포함하는 신규한 DNA 염색용 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

【과제의 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음 일반식 1, 일반식 2 또는 일반식 3 으로 표시되는 DNA 결합 펩타이드를 포함하는 DNA 염색용 조성물을 제공한다:

5 일반식 1
(XY)_m-(시그널 발생 물질)

일반식 2
(시그널 발생 물질)-(XY)_m

상기 일반식 1 및 2 에서, X 는 Lys 또는 Arg 이고, Y 는 Trp 또는
10 Tyr 이고, X 와 Y 의 순서는 앞뒤로 바뀔 수 있으며, m 은 1 내지 10 의 정수이다.

일반식 3
(XY)_m-(시그널 발생 물질)-(X' Y')_n

상기 일반식에서, X 는 Lys 또는 Arg 이고, Y 는 Trp 또는 Tyr 이고,
15 X 와 Y 의 순서는 앞뒤로 바뀔 수 있으며, X' 은 Lys 또는 Arg 이고 Y' 는 Trp 또는 Tyr 이고, X' 과 Y' 의 순서는 앞뒤로 바뀔 수 있으며, 그리고 m 및 n 은 1 내지 10 의 정수이다.

본 발명의 DNA 염색용 조성물은 DNA 결합 펩타이드 및 시그널 발생물질을 포함한다.

20 DNA 결합 펩타이드는 다음과 같은 양전하를 띠는 아미노산과 방향족 고리를 가진 아미노산의 반복적인 연결로 구성된다: (XY)_m.

X 는 양전하를 띠는 아미노산으로서 라이신 또는 아르기닌이고, Y 는 방향족 고리를 가진 아미노산으로서 트립토판 또는 타이로신이며, X 와 Y 의 순서는 앞뒤로 바뀔 수 있다. 바람직하게는 X 는 라이신, Y 는 트립토판이다.

25 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 라이신과 트립토판의 조합으로 DNA 를 염색한 결과, 선명하게 DNA 를 시각화할 수 있었다. m 은 1 내지 10 의 정수이다. m 이 낮을수록 결합 친화도는 낮으나 백그라운드에 노이즈가 적은 반면, m 이 높을수록 결합 친화도는 높으나 백그라운드에 노이즈가 증가할 수 있다. 본 발명의 어떤 구현예에 따르면, m 이 2 인 경우 백그라운드
30 노이즈 없이 선명하게 DNA 를 시각화할 수 있었다.

DNA 결합 펩타이드는 시그널 단백질의 N-말단에 위치할 수도 있고 C-말단에 위치할 수도 있으며, 또는 N-말단 및 C-말단 모두에 위치할 수도 있다. DNA 결합 펩타이드가 N-말단 및 C-말단 모두에 위치하는 경우, 결합 특이성이 높아져 백그라운드 노이즈를 감소시킬 수 있다. 본 발명의

5 구체적 구현예에 따르면, DNA 결합 펩타이드가 N-말단 및 C-말단 모두에 위치하고, m 이 2 인 경우 백그라운드 노이즈 없이 선명하게 DNA 를 시각화할 수 있었다.

본 발명의 시그널 발생물질은 검출 가능한 시그널을 발생시킬 수 있는 물질로서 형광단백질, 발광단백질, 발색반응-촉매하는 효소(예컨대, 알칼린 포스파타아제, 퍼옥시다아제, β -갈락토시다아제 또는 β -글루코시다아제 등), 화학물질(예컨대, 바이오틴 등), 형광물질(예컨대, 플루오레세인, TAMRA, Cy5, Cy3, HEX, TET, Dabsyl 또는 FAM 등), 발광물질 또는 화학발광(chemiluminescent) 물질 등을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 시그널 발생물질은 형광단백질 또는 발광단백질이다.

10 본 발명의 구체적 구현예에 따르면, 녹색 형광단백질과 적색 형광단백질을 사용하여 DNA 를 시각화 하였다.

본 발명에서 DNA 결합 펩타이드와 시그널 발생물질은 링커(linker)를 통해 연결될 수 있다. 시그널 발생물질의 종류에 따라 DNA 결합 펩타이드와 시그널 발생물질을 연결시킬 수 있는 다양한 종류의 링커가 사용될 수 있다.

20 구체적으로 글라이신, 세린, 라이신 및 알라닌으로 구성된 군으로 선택되는 최소 2 개의 아미노산을 포함하는 펩타이드 링커를 사용하며, 더 구체적으로 라이신 및 알라닌을 포함하는 펩타이드 링커를 사용한다. 본 발명의 구체적 구현예에 따르면, 라이신 및 알라닌을 포함하는 KKA 링커를 사용하여 성공적으로 DNA 를 시각화 하였다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 조성물을 DNA 를 포함하는 시료에 적용하는 단계를 포함하는 DNA 를 염색하는 방법을 제공한다.

본 발명의 조성물이 적용되는 시료는 생물학적 시료(예컨대, 세포, 조직 및 체액)를 포함하며, 상기 생물학적 시료는 예컨대, 바이러스, 세균, 조직, 세포, 혈액(전혈, 혈장 및 혈청 포함), 분리된 DNA 를 포함하는 용액,

30

림프, 골수액, 타액, 우유, 소변, 분변, 안구액, 정액, 뇌 추출물, 척수액, 관절액, 흉선액, 복수 및 양막액이다.

본 발명의 조성물을 시료에 적용하는 방법은 상기 조성물을 시료에 직접 접촉시키는 방법, 상기 조성물을 발현할 수 있는 벡터를 세균 또는 세포에 도입하는 방법을 포함한다. 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물을 발현할 수 있는 벡터를 대장균 내에 도입하여 대장균 내에서 상기 조성물이 발현될 수 있도록 함으로써 성공적으로 대장균의 DNA 를 시각화 하였다.

10 【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 DNA 결합 펩타이드를 포함하는 DNA 염색용 조성물을 제공한다.

(b) 본 발명의 DNA 염색용 조성물은 인체에 안전하며, DNA 광분해 현상을 억제하고 가역적 염색이 가능한 특징을 가지고 있으므로 다양한 연구분야에 응용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

도 1 은 펩타이드가 연결 된 형광 단백질을 사용하여 단일 분자 DNA 를 염색한것을 보여주는 형광 현미경 사진이다. 박테리오파지 λ DNA(48.5 kb)를 (a)는 DNA 염색 eGFP 로, (b)는 적색 형광 단백질인 mCherry 로, (c)는 유기 염료인 YOYO-1 로 각각 염색한 것이며, (d)는 λ DNA 연쇄체(concatemer)를 DNA 염색 eGFP 로 염색한 것이다. 기준자의 크기는 5 μ m 이다.

도 2 는 전기영동 이동 분석법(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)을 통한 DNA 결합 형광 단백질의 해리 상수를 분석한 도면이다. 전기영동 겔 사진은 DNA 염색 형광 단백질이 DNA 에 결합하는 모습을 나타낸 것이다.

도 3a 는 MALDI-TOF 질량 분석을 통한 A, C, G, T 와의 결합 친화도 및 트립토판 효과를 보여주는 도면이다.

도 3b 는 MALDI-TOF 질량 분석을 통한 라이신을 아르기닌으로 대체한 경우의 결합 친화도를 보여주는 도면이다.

도 4 는 E. coli(BL21) 세포 내에서 DNA 염색 형광 단백질에 의해 DNA 가 염색된 것을 보여주는 사진이다. (a)는 펩타이드(KWKWKKA)가 연결 된 eGFP 를 발현하는 E. coli(BL21) 세포의 사진 및 그에 해당하는 형광 신호 세기를 나타내는 도면이며, (b)는 대조군으로서 펩타이드를 포함하지 않는 eGFP 를 발현하는 E. coli 세포의 사진 및 그 형광세기를 나타내는 도면이다. 기준자의 크기는 5 μ m 이다.

도 5 는 DNA 염색 형광 단백질을 사용하였을 때 광분해(photocleavage) 현상이 억제되는 것을 보여주는 사진이다. 기준자의 크기는 5 μ m 이다.

도 6 은 DNA 염색 형광 단백질을 사용하였을 때 가역적인염색(reversible staining)이 가능하다는 것을 보여주는 사진이다. 비오틴(biotin)이 표지 된 λ DNA 를 Neutravidin 으로 개질된 표면에 부착한 것으로서, 가역적인 DNA 의 염색이 흐름 채널(flow channel)에 흐르는 완충 용액의 pH 에 의해 가능하다는 것을 나타낸다. 기준자는 10 μ m 이다.

도 7 DNA 염색 형광 단백질을 사용하였을 때에도 동일한 윤곽길이(contour length)를 나타낸다는 것을 보여주는 도면으로서 신장된 λ DNA 의 윤곽 길이 및 그 연쇄체(concatemer)를 나타낸 히스토그램이 점선으로 표시된 λ DNA 의 이론적인 윤곽 길이(48,502 bp x 0.34 nm/bp = 16.49 μ m)와 일치한다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험재료 및 실험방법

시험물질 및 시약

모든 DNA 프라이머와 올리고(Oligo)는 Bioneer(Daejeon, Korea)의 제품을 사용하였다. 모든 효소들은 New England Biolabs(Ipswich, MA)의 제품을 사용하였다. λ DNA는 Bioneer의 제품을 T4 GT7 DNA는 Nippon Gene(Tokyo, Japan)의 제품을 사용하였다. E.coli 균주는 모두 Yeastern(Taipei, Taiwan)의 것을 사용하였다. 바이오틴이 표지된 소 혈청 알부민(Biotin-labeled bovine serum albumin)은 Sigma(St. Louise, MI)의 제품을, Neutravidin은 Pierce(Rockford, IL)의 제품을, BSA는 New England Biolabs의 제품을, 에폭시(Epoxy)는 Devcon(Riviera Beach, FL)의 제품을, N-trimethoxymethylsilylpropyl-N,N,N-trimethylammonium chloride (50% Methanol)은 Gelest(Morrisville, PA)의 제품을 각각 사용하였다. Ni-NTA 아가로스 레진과 칼럼은 Qiagen(Venlo, Netherlands)의 제품을, Non-SDS TBE-PAG은 Komabiotech(Seoul, Korea)의 제품을 각각 사용하였다. 기타 표기되어 있지 않은 시약은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

DNA 염색용 형광 단백질의 준비

DNA 염색용 형광단백질의 발현벡터 제작을 위해 pET-15b(Novagen, Germany)벡터를 사용하였다. 형광 단백질인 eGFP(pEGFP-N1, Clontech, USA)의 양쪽 끝에 DNA 결합 펩타이드를 연결하기 위하여, 포워드 프라이머(5' -ATG TTG CAT ATG AAA TGG AAA TGG AAA AAA GCG ATG CGT-3')와 리버스 프라이머(5' -ATG TTG GGA TCC TTA TTT CCA TTT CCA TTT TTT CGC CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC-3')를 사용하였으며, 이들 프라이머에는 제한 효소 NdeI 및 BamHI에 의해 잘려지는 서열이 포함하도록 디자인하였다. 합성된 DNA 염색용 eGFP DNA를 일반적인 서브클로닝 방법으로 pET-15b vector에 삽입하여 단백질 발현벡터를 제작하였다. 단백질 발현을 위해 제작된 발현벡터를 이용하여 E. coli BL21(DE3) 균주를 형질전환 하였다. 형질전환된 단일 콜로니를 선택하여 LB 배지에 암피실린(ampicillin)과 함께 접종하였다. 접종 후 OD 600nm에서의 흡광도가 0.8이 될 때까지 37 °에서 배양한 다음, IPTG를 최종 농도 1 mM가 되도록 넣어주고, 실온보다 낮은 온도에서 24시간 이상 배양하였다. 배양된 세포들을 12,000

X g, 10분으로 원심분리를 하여 수집하였다. 이후 단백질 용해 버퍼(50 mM Na₂HPO₄, 300mM NaCl, 10mM Imidazole, pH 8.0)로 잔류 배지를 씻어준 다음, 초음파소닉레이션(ultrasonication)으로 1 시간 동안 세포벽 및 세포막을 분해하였다. 이후 원심분리로 세포 파쇄물(cell debris)을 제거하였다.

- 5 세포추출물로부터 단백질을 분리하기 위하여 Ni-NTA 아가로스 레진(agarose resin)을 세포추출물(crude extract)과 섞은 후 4 °C에서 6 시간 동안 반응시켰다. 레진에 흡착된 단백질들을 중력하 크로마토그래피를 위한 칼럼에 채운 다음, 단백질 세척 버퍼(50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole, pH 8.0)로 수 차례 세척하였다. 이후 단백질 용출 버퍼(50 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazole, pH 8.0)로 추출하였다. 실험에
- 10 사용된 DNA 염색용 eGFP단백질의 농도는 10 mg/ml이었다. 동일한 방법으로 DNA 염색용 mCherry(pmCherry-N1, Clontech, USA) 단백질을 제작하였으며 실험에 DNA 염색용 mCherry 단백질의 농도는 6 mg/ml이었다. 모든 단백질은 50% w/w 글리세롤/TE 버퍼를 사용하여 실험에 적당한 농도로 희석하여
- 15 사용하였다.

실험에 필요한 커버 슬립 및 장치의 제작

1. 커버 슬립 및 개질된 표면 준비

- 20 DNA 염색용 형광단백질을 이용하여 DNA를 염색하는 실험에 필요한 커버 슬립을 다음과 같은 과정을 통해 제작하였다. 유리 커버 슬립을 Teflon rack에 끼우고 piranha etching solution(30% v/v H₂O₂/H₂SO₄)에 2시간 동안 담가 둔 후, 3차 증류수로 수 차례 씻어낸 후, 이와 같이 산 세척 표면(acid cleaned surface)을 바로 단백질 코팅 표면에 사용하였다.

- 25 유리 표면을 양전하로 개질하기 위하여 산 세척 표면을 수용액(50% 메탄올에 녹인 N-trimethoxymethyl silylpropyl-N,N,N-trimethyl ammonium chloride 200 μ l를 200 ml의 3차 증류수에 넣어 제작)에 담그고 65 °C에서 12시간 동안 두었다. 개질된 표면은 모두 2주 안에 소비하였다.

2. 마이크로 채널 및 나노 슬릿 준비

- 30 4 μ m 높이의 마이크로 채널 및 450 nm의 나노 슬릿을 위한 실리콘 웨이퍼(silicon wafer)를 리소그래피를 통하여 제작하였다. SU-8 2005 포토레지스트(Microchem, Newton, MA)를 실리콘 웨이퍼 스펀-코팅(spin-

coating)한 후, 베이킹(baking)하여 350 nm UV에 노광시켜 패턴을 만들었다. 이후 다시 베이킹한, 즉 패턴이 인쇄된 웨이퍼를 SU-8 디벨롭퍼(developer, Microchem)로 디벨롭하였다. 이와 같이 제작한 마이크로 채널을 더 이상의 처리를 하지 않고 사용하였다(soft lithography).

5 나노 슬릿을 제작하기 위하여 450 nm 높이의 하드 리소그래피 패턴(etching pattern)을 이용하였으며, 4 μm 높이의 마이크로 채널 레이어를 위와 같은 방식으로 얹어 제작하였다. 이후 만들어진 다양한 패턴 위에 Polydimethylsiloxane(PDMS) Sylgard 184 Elastomer(Dow corning, MI, USA)를 굳혀 사용하였다.

10 3. 흐름 장치(Flow Cell)

DNA의 한 쪽 끝을 고정한 후, 유체의 흐름을 이용해 DNA를 길게 펴주기 위해 흐름 장치를 만들었다. 우선, 커버 슬립을 슬라이드 글래스 위에 100 μm 정도 높이의 양면 테이프로 고정하였다. 현미경용 슬라이드 글래스에는 입구와 출구를 위하여 다이아몬드 코팅된 드릴로 작은 구멍을
15 내었다. 모든 글래스는 피란하 용액(Piranha solution)으로 세척하였다. 노란색 파이펫 팁(Yellow pipette tip)을 이용하여 시료를 입구에 장착하였고, 출구를 튜브와 연결하고 에폭시(epoxy)로 주위를 막아 시료의 손실을 방지하는 한편 정확한 흡입 압력이 가해지도록 하였다. 흐름 장치의 규격은 약 3 x 17 x 0.1 mm (L x W x H)이며, 총 부피는 5.1 μl 정도이었다.
20 실험에 사용 된 용액을 일정한 속도(0.150 mL/min = 8.3 mm/sec)로 조절하기 위해 Syringe pump NE-1000(New Era Pump Systems Inc., Wantagh, NY)를 사용하였다.

4. 단백질로 개질된 표면 준비

미소유체 흐름 장치의 유리 표면을 단백질로 개질하기 위해 희석된
25 바이오틴-BSA(1 mg/mL, 10mM Tris, 50mM NaCl, pH8.0)로 코팅하였다. BSA가 흡착되도록 5분 동안 반응시킨 다음, Neutravidin 용액(0.25 mg/mL 10mM Tris, 50mM NaCl, pH8.0)을 주입하고 실온에서 5분 동안 놓아 두었다. 뉴트라비딘(neutravidin)이 표면에 흡착되도록 5분 정도 반응시킨 다음, BSA를 약 1%로 희석하여 장치에 주입하고 다시 실온에서 5분 동안 놓아
30 두었다.

DNA 염색용 형광단백질을 이용한 DNA 단일분자의 염색

상기 방법으로 정제한 단백질을 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 희석하고, 염색하고자하는 타겟 DNA를 희석한 다음(0.2 $\text{ng}/\mu\text{l}$, 1X TE, pH 8), 희석된 DNA와 DNA 염색용 형광단백질을 1:1 v/v의 비율로 섞은 후, 튜브에서 5분 동안 실온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 DNA 염색용 형광단백질-DNA 샘플을
5 상기 방법으로 제작한 마이크로 채널(높이 4 μm)에 흘려주면서 바닥 표면에 정전기적으로 붙어 신장되게 한 후, 형광 현미경으로 관찰하였다.

형광 현미경 및 DNA 시각화

10 현미경 구성을 위해 역방향 광학 현미경(Olympus IX70, Tokyo, Japan)에 63x 및 100x의 Olympus UPlanSapo oil immersion 대물렌즈를 연결하였으며, 고체 레이저(LBX488 및 SLIM 532, Oxxius, Lannion, France)를 사용하였다. 레이저 빛은 multimode optical fiber(BFH-22-550, Thorlabs, Newton, NJ)를 통해 집속되었고, 각 파장과 일치하는 notch
15 filter(Semrock, Rochester, NY)를 사용하여 레이저가 EMCCD 카메라로 들어오는 것을 방지하였다. 형광 현미경 사진을 EMCCD 디지털 카메라 장치(Qimaging Rolera EM-C2, Surrey, BC, Canada)를 통해 16 bit TIFF 형식으로 저장하였으며, 소프트웨어로 Image Pro Plus(Media Cybernetics, Rockville, MD, USA)를 사용하였다. 이미지 보정과 길이 측정을 위해
20 ImageJ 소프트웨어와 발명자들이 개발한 Java plug-in을 사용하였다.

DNA 염색용 형광단백질의 해리상수 분석: EMSA(Electrophoretic Mobility Shift Assay)

52-mer의 올리고뉴클레오티드(5' - CTA CTA GCA CAA TCG ACT GTA
25 CGG ACC GAT CGA GTC ACT AGC AGT CTA GCA A - 3')와 그것의 상보적인 서열을 하이브리다이제이션(hybridization)하여 이중가닥 DNA(double strands DNA)로 만들었다. 이를 위해 동일한 농도의 두 올리고뉴클레오티드를 튜브에 넣은 다음, 끓는 물에 담그고 다시 상온에 놓아두었다. 만들어진 이중가닥 DNA를 1 x TE 버퍼를 사용하여 0.5
30 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (31.4 nM)로 희석하였다. DNA 염색용 형광단백질을 50% v/v 글리세롤/ 1 x TE 버퍼를 사용하여 각각 74 nM, 740 nM, 1.48 μM , 3.7 μM , 7.4 μM ,

14.8 μM , 37 μM , 74 μM 및 148 μM 농도가 되도록 희석하였다. 각각의 희석한 형광단백질, 이중가닥 DNA 및 50% v/v 글리세롤/ 1 x TE 버퍼를 전체 부피가 10 μL 이 되도록 샘플 튜브에 넣은 다음, 각 샘플을 6 x 젤 로딩 버퍼와 섞은 후 0.5 x TBE 4-20% polyacrylamide precast gel (TBE-PAG)에 로딩하였다. 151 V에서 75분 동안 전기영동을 진행한 다음, EtBr을 사용하여 5분 동안 젤을 염색하였다. 이동속도가 느린 DNA의 이미지를 UV transilluminator (WUV-M20, Daihan Scientific Co., Korea)에서 CCD 카메라(WGD-20, Daihan Scientific Co., Korea)를 이용하여 캡처하였다. 각 레인의 Fraction Bound를 Bound protein/Free DNA의 intensity profile로 나타내었으며, ImageJ Gel Analyze을 이용하여 분석하였다. 단백질 농도에서의 Apparent 해리상수(Kd) 값을 다음의 공식을 이용하여 계산하였다:

$$Kd = (1-f)/f \times [\text{Protein}]_{\text{total}} \quad (f: \text{fraction bound})$$

15 DNA 염색용 형광단백질의 DNA 서열특이성 분석

DNA 염색용 형광단백질의 DNA 서열특이성 분석을 위하여 MALDI-TOF 질량 분석을 수행하였다. DNA 올리고뉴클레오타이드와 펩티드의 결합반응 후 MALDI-TOF 질량 분석을 진행하였다. 실험에 사용한 모든 올리고뉴클레오타이드는 TE 버퍼에 100 μM 농도로 희석하였으며, 펩티드는 3차 정제수에 100 μM 농도로 희석하여 사용하였다. 펩티드 결합반응을 위해 타이드 결합 반응은 총 20 μL 의 반응 부피에서 진행되었다. 10 μL 의 올리고뉴클레오타이드와 10 μL 의 펩티드를 샘플 튜브에 섞어 총 20 μL 의 반응 부피로 맞추는 다음, 실온에서 30분간 반응시켰다. 반응이 완료된 샘플을 매트릭스 용액(130 mM 2, 5-Dihydroxybenzoic acid(DHB))과 1:1 v/v의 비율로 섞은 다음, Bruker MTP 384 polished steel MALDI sample support target plate 위에 올려두었다. 실온에서 결정화된 샘플과 Matrix를 Bruker Autoflex™ Speed(Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA) 장치를 이용하여 linear positive ion mode로 분석하였다. 1000 Hz, 500 laser shot의 합으로 질량 스펙트럼을 얻을 수 있었다.

DNA 염색용 형광단백질을 이용한 in vivo에서의 DNA 염색

DNA 염색용 형광단백질을 이용하여 in vivo에서 직접 DNA를 염색하기 위하여, 상기 DNA 염색용 형광 단백질의 준비과정에서 DNA 염색용 형광단백질 단백질 발현벡터로 형질전환시킨 E. coli BL21(DE3) 균주를 이용하였다. 세포를 OD 600nm이 2.0을 초과할 때까지 배양한 다음, IPTG를
 5 최종 농도 1 mM가 되도록 넣어주었다. IPTG를 넣어주고 충분한 시간이 지난 세포를 1 μ l 취하여 22 x 22 mm 커버 슬립에 올려놓은 다음 다른 특수한 처리 없이 현미경으로 관찰하였다.

DNA 염색용 형광단백질에 의한 광분해 현상 분석

10 DNA 염색용 형광단백질에 의해 광분해 현상이 일어나는지 분석하기 위하여 다음과 같은 커버 슬립을 제작하였다. 정사각형 구멍(20 x 20 mm)이 있는 아크릴 수지의 고정 판 위에 커버 슬립을 올려 놓은 다음, 한쪽 유리면을 제외한 가장자리חות농을 이용하여 도포함으로써, 실험을 수행 할 한쪽 유리면을 노출시킴과 동시에 전기 전도를 위한 용액(50 mM EDTA)이
 15 흘러나오지 않도록 하였다. 또한 DNA 이동을 위한 전극을 만들기 위해 아크릴 고정판 위에 구리선을 정사각형 구멍의 대각선 방향으로 부착하였다. 준비 된 커버 슬립에 상기 방법으로 제작한 450 nm 높이의 PDMS 나노 슬릿을 올린 다음, DNA 염색용 eGFP 단백질과 T4GT7 DNA를 섞은 용액을 흘려준 후, 구리선을 통해 전기가 전도될 수 있도록 약 400 μ l의 50 mM
 20 EDTA 용액을 주위에 채워 넣었다. DNA 분자를 전기적 인력으로 조작하여 마이크로 채널사이로 형성되어 있는 나노 슬릿 사이에 들어갈 수 있도록 하기 위하여 30 V의 전압 하에서 양 극의 방향을 조절할 수 있는 스위치가 장착된 장치를 이용하였다. DNA 분자를 나노 슬릿 사이에 들어가게 한 다음, 레이저를 조사하여 광분해 현상이 일어나는지를 관찰하였다.

가역적 염색(Reversible Staining)

25 뉴트라비딘(neutravidin)이 코팅된 표면을 준비한 다음, 220 pM의 λ DNA overhang oligo(5'-pGGGCGGCGACCT-TEG-biotin-3')를 미소유체 장치로 주입한 후, 실온에서 5분 동안 놓아두었다. 여기에 λ DNA, T4 DNA 리가아제(ligase) 및 반응버퍼를 주입하고 다시 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 상기 방법으로 제작한 흐름장치를 이용하여 DMA의 한쪽 끝을

바닥에 고정한 후, 유체의 흐름을 이용하여 DNA를 길게 펴준 다음, DNA 염색용 eGFP로 DNA 분자를 염색하여 시각화 하였다.

가역적 염색이 가능한지를 확인하기 위하여, pH를 조절하면서 다음의 과정을 진행하였다. 우선, DNA에 결합한 DNA 염색용 eGFP를 분리하기 위해 50 μ l의 TE 버퍼(pH 11)를 주입하여 pH를 높여 주었다. DNA와 DNA 염색용 eGFP가 분리된 상태에서 다시 가역적인 염색이 가능한지를 확인하기 위하여 200 μ l의 TE 버퍼(pH 8)를 20 μ l/min의 유속으로 흘려주어 pH를 낮추면서 DNA 분자가 염색이 되는지를 확인하였다.

DNA 염색용 형광단백질에 의한 DNA 윤곽길이 영향 분석

상기 가역적 염색에 사용된 DNA 분자들의 정지 화상을 촬영한 다음, ImageJ 프로그램을 이용하여 DNA 윤곽길이를 측정하였다. 총 295개의 단일분자 DNA를 분석하였다.

실험결과

DNA 염색용 형광단백질을 이용한 DNA 단일분자의 염색

DNA 염색용 형광단백질을 이용하여 DNA 단일 분자를 염색하였다. 이를 위한 DNA 결합 펩타이드로서 라이신과 트립토판의 조합에 링커(라이신-알라닌, KA)를 연결시킨 KWKKKA를 사용하였으며, 링커를 형광 단백질의 N-말단에 연결시켜 DNA 염색용 형광단백질을 제작하였다.

전기영동 이동 분석법(Electrophoretic mobility shift assay)을 통하여 확인한 결과 KWKKKA가 연결된 형광 단백질은 DNA와 결합은 하였지만, 형광 현미경을 이용하여 염색 여부를 확인하기에는 충분하지 못한 결합력을 가지고 있는 것으로 나타났다. 따라서 결합 친화도를 높이기 위해 아미노산의 반복수를 늘리는 작업을 하였다. 이와 같은 아이디어는 KKKKK, KWKKKK, KWKKKW와 같이 라이신을 다섯개로 고정한 후 트립토판의 갯수를 늘리면서 펩타이드들의 결합력을 측정한 논문(12, 15)으로부터 얻은 것으로서, 트립토판의 개수가 늘어나면 높은 결합 상수를 갖는다는 현상을 이용하였다. 이러한 아이디어를 바탕으로 더 높은 결합 친화도를 가진 형광 단백질인 (KW)5KKA-eGFP를 제작하였다. (KW)5KKA-eGFP를 이용하여 DNA를 염색한 결과, 형광 현미경에서 거대 단일 분자 DNA를 시각화하는데 성공하였으나, DNA 분자 이외의 다른 영역에서 노이즈와 같은 밝은 점, 즉

단백질 응집체로 추정되는 물질들이 화면상에 다수 나타났다. 이러한 문제를 해결하고자 (KW)5KKA 펩타이드를 eGFP의 C-말단에 추가로 부착하여 (KW)5KKA-eGFP-AKK(WK)5의 구조를 갖는 형광 단백질을 제작하였다. 이는 하나의 단백질이 양전하를 보다 많이 띄게 하여 원하지 않는 단백질-
 5 단백질간의 상호작용을 최소화하기 위한 것이었다. 그러나 (KW)5KKA-eGFP-AKK(WK)5의 구조를 갖는 형광 단백질을 이용하는 경우, 상기 노이즈와 같은 밝은 점은 사라졌으나 DNA 분자가 시각화 되지 않는 현상이 나타났다. 이는 펩타이드를 길게 늘려주는 것으로 인해 발생하는 과량의 양전하가 단백질이 DNA에 붙지 못하도록 서로를 방해하는 효과를 발생시켰기 때문인 것으로
 10 추정되었다. 따라서 이보다 조금 길이가 짧아진 (KW)2KKA를 형광 단백질의 양단에 연결시켜 (KW)2KKA-eGFP-AKK(WK)2의 구조를 갖는 형광 단백질을 제작하였다. (KW)2KKA-eGFP-AKK(WK)2의 구조를 갖는 형광 단백질을 사용하는 경우, 노이즈 없이 선명하게 DNA를 염색하여 시각화할 수 있었다(도 1).

DNA 염색용 형광단백질의 해리상수 분석

DNA 염색용 형광단백질의 해리상수 분석하기 위하여, EMSA(Electrophoretic Mobility Shift Assay)를 수행하였다(도 2). DNA 염색 형광 단백질의 해리 상수인 K_d 는 $14.7 \mu\text{M}$ 정도로 측정되었는데, 이는
 20 EtBr의 $12.1 \mu\text{M}$ 와 비슷한 값이며, YOYO-1 의 12.1 nM 보다 높은 값이었다.

DNA 결합 펩타이드의 DNA 서열특이성 분석

상기 DNA 단일분자 염색에서 DNA의 염색이 전체적으로 고르지 못한 현상을 발견하였는데(도 1), 이는 DNA 염색이 서열 특이적으로 일어날 수
 25 있는 가능성을 제시해 주는 것이었다. 기존의 연구결과에 의하면 KWKn의 펩타이드는 티민(T), 아데닌(A), 시토신(C)의 순서대로 결합 선호도를 나타내는 것으로 보고되었다(12, 15). 따라서 이를 통해 KWK 펩타이드는 AT가 풍부한 서열(AT-rich sequence)에 더 높은 친화도를 갖는다고 유추할 수 있었으며, 이를 확인하기 위해 MALDI-TOF 질량 분석 실험을 수행하였다.
 30 분석 결과, 예상과 일치하는 선호도를 확인할 수 있었다(도 3a). 라이신 및 트립토판으로 이루어진 펩타이드를 각각 A: A9, B: C9, C: G9 및 D: T9로

구성된 올리고뉴클레오타이드와 결합시켜 분석하였다. 상대적 세기(relative intensity)를 비교하면 A와 D에서, 즉 아데닌과 티민 서열을 가진 DNA에 대해 펩타이드가 강하게 결합하는 결과를 나타내었다. E는 대조군으로서 펩타이드의 트립토판을 알라닌으로 교체한 것이었는데, D와 비교하여 상대적 결합 친화도가 낮은 것을 알 수 있었다. F는 대조군으로서 전체 서열이 알라닌인 것이었는데, DNA와 결합하지 않는다는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과를 통해 라이신과 트립토판 잔기를 포함한 펩타이드는 DNA와의 친화도가 높다는 것과 DNA 염기 서열 중 T에 대한 친화도가 가장 높다는 것을 알 수 있었다.

한편, DNA 결합 펩타이드의 라이신을 양전하를 띠는 다른 아미노산으로 대체하는 경우에도 결합력을 가지는지 확인하고자 하였다. 라이신을 아르기닌(Arg, R)으로 대체하여 MALDI-TOF 질량 분석 실험을 수행하였다(도 3b). T9로 구성된 올리고뉴클레오타이드와 RWRWRR, RRRRRR와 결합시켜 분석한 결과, KWKWKK, KKKKKK와 같은 결합 친화도를 가지고 있는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 본 발명의 DNA 염색용 형광단백질의 결합 펩타이드로서 라이신 이외에도 아르기닌을 사용하는 것이 가능하다는 것을 보여주는 것이다.

DNA 염색용 형광단백질을 이용한 in vivo에서의 DNA 염색

DNA 염색용 형광단백질을 이용하여 in vivo에서도 DNA가 염색되는지를 확인하기 위하여, 박테리아 세포(E.coli BL21)에서 DNA 염색용 형광단백질로 (KW)2KKA-eGFP-AKK(WK)2을 이용하여 실험을 수행하였다. 대조군으로 사용한 일반 eGFP와 비교하였을 때, DNA 염색용 형광단백질은 자라나는 세포에서 고유한 패턴을 나타내었다(도 4). DNA 염색용 형광단백질은 박테리아 세포의 양 끝과 가운데 지점과 같이 셋 또는 넷의 격리된 영역에 구역화(localization)되어 있었다. 이와 같은 결과는 녹색 형광 단백질이 연결된 DNA 중합효소(DNA polymerase)를 이용하여 박테리아 DNA를 시각화한 기존의 박테리아 DNA 사진과 일치하는 것으로서, 본 발명의 DNA 염색용 형광단백질이 in vivo에서도 DNA를 성공적으로 염색할 수 있다는 것을 보여주는 것이다.

DNA 염색용 형광단백질에 의한 광분해 현상 분석

DNA 염색용 형광단백질을 사용하는 경우에도 기존의 DNA 염색물질에서와 같은 광분해 현상이 일어나는지를 확인하기 위하여, DNA 염색용 형광단백질에 의해 염색된 DNA를 10초간 레이저에 노출 시킨 후
 5 관찰하였다. 관찰결과, DNA 염색용 형광단백질에 의해 염색된 DNA는 손상이 전혀 없었으나, YOYO-1에 의해 염색된 DNA는 완전히 조각난 것을 관찰하였다(도 5). 일반적으로 DNA 염색 유기 염료는 레이저에 의해 손쉽게 DNA 절단을 유도하는데, 이는 형광체가 수 없이 많은 여기-방출(excitation-emission) 과정을 거치면서 DNA 골격 주위에 광화학적
 10 반응을 일으킬 확률을 높이기 때문이다. 하지만 본 발명의 DNA 염색용 형광단백질의 경우, DNA와 결합하는 부분(펩타이드)과 형광을 내는 부분(eGFP)이 공간적으로 분리되어 있기 때문에 광분해에 대한 위험이 줄어들게 된다. 이와 같이 본 발명의 DNA 염색용 형광단백질은 광분해(photocleavage)의 위험성이 줄어들므로 기존의 DNA 염색물질로는
 15 한계가 있었던 장시간에 걸친 영상화를 가능하게 할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

가역적 염색(Reversible Staining)

DNA 염색용 형광단백질을 사용하여 가역적 염색이 가능한지를
 20 확인하고자 하였다. 이를 위해 pH를 단계적으로 변경하면서 DNA 염색 상태변화를 확인하였다(도 6). 관찰결과, 초기 조건인 pH 8 에서, DNA 염색용 형광단백질로 시각화된 DNA는 곧이어 pH가 11인 완충 용액을 흘려줌으로서 형광 현미경 상에서 암전되었으나, 이후 pH 8인 완충 용액에 녹아있는 DNA 염색용 형광단백질을 흐름 채널 장치 내부로 흘려주면 다시
 25 DNA가 염색되는 것을 확인하였다. 이와 같은 염색-탈색의 순환은 수 차례 반복에도 불구하고 동일한 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 본 발명의 DNA 염색용 형광단백질을 사용하는 경우, 용액의 pH를 조절하는 간단한 과정만으로 가역적인 염색이 가능하다는 것을 보여주는 것이다. 따라서 이러한 특징을 이용하여 관찰이 끝난 형광단백질을 새로운 형광단백질로
 30 교체하는 방법을 사용한다면 지속적인 추적 및 관찰이 필요한 실험에서 큰 장점으로 작용할 수 있을 것이다.

DNA 염색용 형광단백질에 의한 DNA 윤곽길이 영향 분석

DNA 염색용 형광단백질에 의해 DNA 윤곽길이가 변하는지를 확인하기 위하여 한쪽 끝이 고정되어 있는 λ DNA의 최대 윤곽 길이(full contour length)를 미소유체흐름장치(microfluidic flow)를 이용하여 관찰하였다(도 5 7). 관찰결과, λ DNA 단량체의 길이가 약 16.5 μm 로 나타났는데, 이는 이론적으로 예측할 수 있는 값인 16.49 μm (48,502 bp $\times$ 0.34 nm/bp = 16.49 μm)와 일치하는 것이었다. 이러한 결과는 YOYO-1 등으로 염색하는 경우와는 다르게 DNA 염색용 형광단백질이 DNA 윤곽길이에 영향을 미치지 않는다는 것을 나타내는 것이다. 이는 트립토판의 인돌 고리(indole ring)는 부분적으로 염기 쌍 사이에 삽입(partially inserted into stacked bases)되기 때문에 트립토판의 삽입이 DNA 윤곽 길이에 영향을 미치지 않기 때문인 것으로 추정된다.

15 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 구체적인 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

20

참고문헌

- [1] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, Science (1994) 263, 802-805.
- [2] A. Graneli, C. C. Yeykal, R. B. Robertson, E. C. Greene, Proc Natl Acad Sci (2006) 103, 1221-1226.
- [3] M. J. Waring, Journal of Molecular Biology (1965) 13, 269-&.
- [4] A. N. Glazer, H. S. Rye, Nature (1992) 359, 859-861.
- [5] R. P. Haugland, S. T. Yue, P. J. Millard, B. L. Roth, Google Patents, 1995.
- 30 [6] R. M. Martin, H. Leonhardt, M. C. Cardoso, Cytometry PartA (2005) 67, 45-52.

- [7] S. Saeidnia, M. Abdollahi, Daru (2013) 21; V.L.Singer, T.E.Lawlor, S.Yue Mutat Res-Gen Tox En (1999) 439, 37-47.
- [8] M. A. Tycon, C. F. Dial, K. Faison, W. Melvin, C. J. Fecko, Analytical Biochemistry (2012) 426, 13-21.
- 5 [9] Y. Kim, K. Jo, Chem Commun (2011) 47, 6248-6250.
- [10] Montenay.T, C. Helene, Nature (1968) 217, 844-& C.Helene, J.L.Dimicoli, FEBS Lett (1972) 26, 6-10.
- [11] J. L. Dimicoli, C. Helene, Biochemistry (1974) 13, 714-723.
- [12] D. P. Mascotti, T. M. Lohman, Biochemistry (1992) 31, 8932-8946.
- 10 [13] M. Reuter, D. T. F. Dryden, Biochemical and Biophysical Research Communications (2010) 403, 225-229; F.M.Pohl, T.M.Jovin, W.Baehr, J.J.Holbrook, Proc Natl Acad Sci (1972) 69, 3805-3809.
- [14] E. Lehmann, R. Zenobi, Angew. Chem. Int. Ed (1998) 37, 3430-3432.
- [15] D. P. Mascotti, T. M. Lohman, Biochemistry (1993) 32, 10568-10579.
- 15 [16] S. Park, K. Jo, H. Bin Oh, Analyst (2011) 136, 3739-3746.
- [17] K. Jo, Y. L. Chen, J. J. de Pablo, D. C. Schwartz, Lab Chip (2009) 9, 2348-2355.
- [18] G. Desoye, D. Porschke, Biophysical chemistry (1993) 46, 283-294.
- [19] C. Robinow, E. Kellenberger, Microbiological Reviews (1994),58,
- 20 211-232.
- [20] S. Bakshi, H. Choi, N. Rangarajan, K. J. Barns, B. P. Bratton, J. C. Weisshaar, Applied and Environmental Microbiology (2014) 80, 4977-4986.
- [21] I. A. Berlatzky, A. Rouvinski, S. Ben-Yehuda, P Natl Acad Sci
- 25 (2008) 105, 14136-14140.
- [22] K. P. Lemon, A. D. Grossman, Science (1998) 282, 1516-1519.
- [23] W. Wang, G.-W. Li, C. Chen, X. S. Xie, X. Zhuang, Science (2011) 333, 1445-1449.
- [24] H. I. Adler, Hardigre.Aa, Journal of Bacteriology (1965) 90, 223-
- 30 &.
- [25] J. K. Fisher, A. Bourniquel, G. Witz, B. Weiner, M. Prentiss, N.

Kleckner, Cell (2013) 153, 882-895.

【특허청구범위】

【청구항 1】

다음 일반식 1 또는 2로 표시되는 DNA 결합 펩타이드 및 시그널 발생 물질을 포함하는 DNA 염색용 조성물:

5

일반식 1

$(XY)_m$ -(시그널 발생 물질)

일반식 2

-(시그널 발생 물질)- $(XY)_m$

상기 일반식 1 및 2에서, X는 Lys 또는 Arg이고, Y는 Trp 또는 Tyr이고, X와 Y의 순서는 앞뒤로 바뀔 수 있으며, m은 1 내지 10의 정수이다.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 DNA 염색용 조성물은 다음 일반식 3으로 표시되는 것을 특징으로 하는 DNA 염색용 조성물:

15

일반식 3

$(XY)_m$ -(시그널 발생 물질)-(X' Y')_n

상기 일반식에서, X는 Lys 또는 Arg이고, Y는 Trp 또는 Tyr이고, X와 Y의 순서는 앞뒤로 바뀔 수 있으며, X' 은 Lys 또는 Arg이고 Y' 는 Trp 또는 Tyr이고, X' 과 Y' 의 순서는 앞뒤로 바뀔 수 있으며, 그리고 m 및 n은 1 내지 10의 정수이다.

【청구항 3】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 (XY) 및 $(X' Y')$ 는 링커를 통해 상기 시그널 발생 물질에 간접적으로 연결된 것을 특징으로 하는 DNA 염색용 조성물.

25

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 링커는 글라이신, 세린, 라이신 및 알라닌으로 구성된 군으로 선택되는 최소 2개의 아미노산을 포함하는 펩타이드 링커인 것을 특징으로 하는 DNA 염색용 조성물.

【청구항 5】

30

제 4 항에 있어서, 상기 링커는 글라이신 및 세린을 포함하는 펩타이드 링커인 것을 특징으로 하는 DNA 염색용 조성물.

【청구항 6】

제 4 항에 있어서, 상기 링커는 라이신 및 알라닌을 포함하는 펩타이드 링커인 것을 특징으로 하는 DNA 염색용 조성물.

【청구항 7】

5 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 m 및 n은 1 내지 5의 정수인 것을 특징으로 하는 DNA 염색용 조성물.

【청구항 8】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 X 및 X'은 Lys인 것을 특징으로 하는 DNA 염색용 조성물.

10 【청구항 9】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 Y 및 Y'는 Trp인 것을 특징으로 하는 DNA 염색용 조성물.

【청구항 10】

15 제 1 항에 있어서, 상기 시그널 발생 물질은 형광단백질, 발광단백질, 발색반응-촉매하는 효소, 형광물질, 발광물질 또는 화학발광 물질인 것을 특징으로 하는 DNA 염색용 조성물.

【청구항 11】

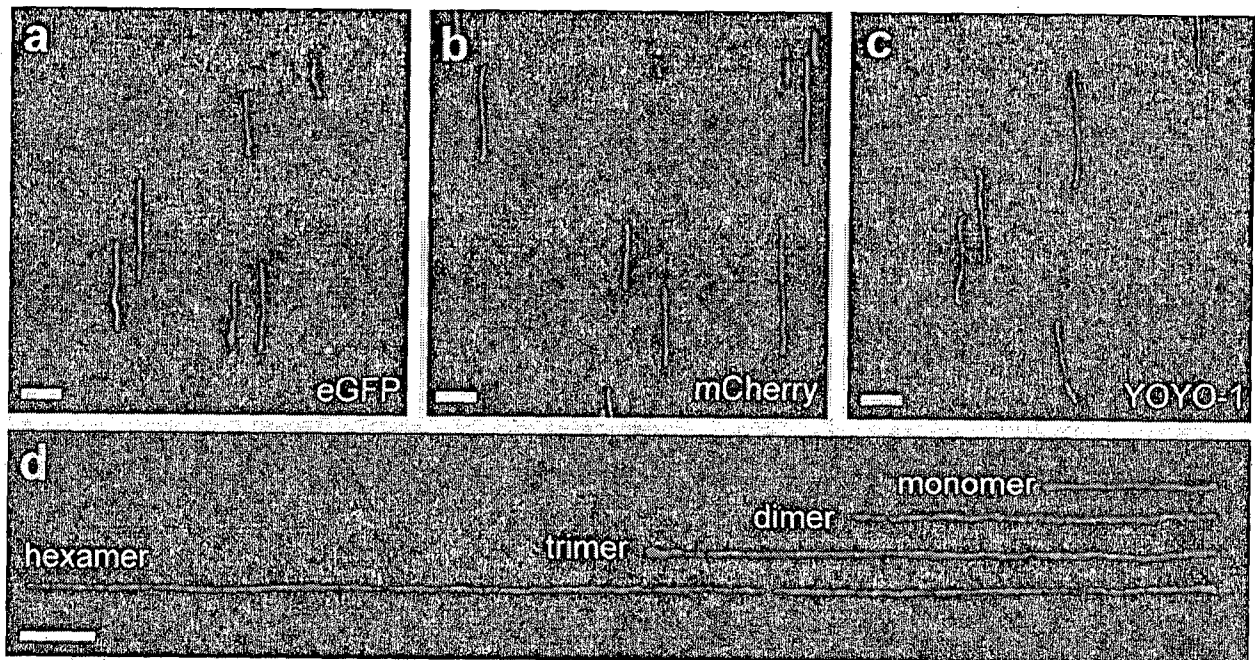
제 10 항에 있어서, 상기 시그널 발생 물질은 형광단백질 또는 발광단백질인 것을 특징으로 하는 DNA 염색용 조성물.

20 【청구항 12】

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 조성물을 DNA를 포함하는 시료에 적용하는 단계를 포함하는 DNA를 염색하는 방법.

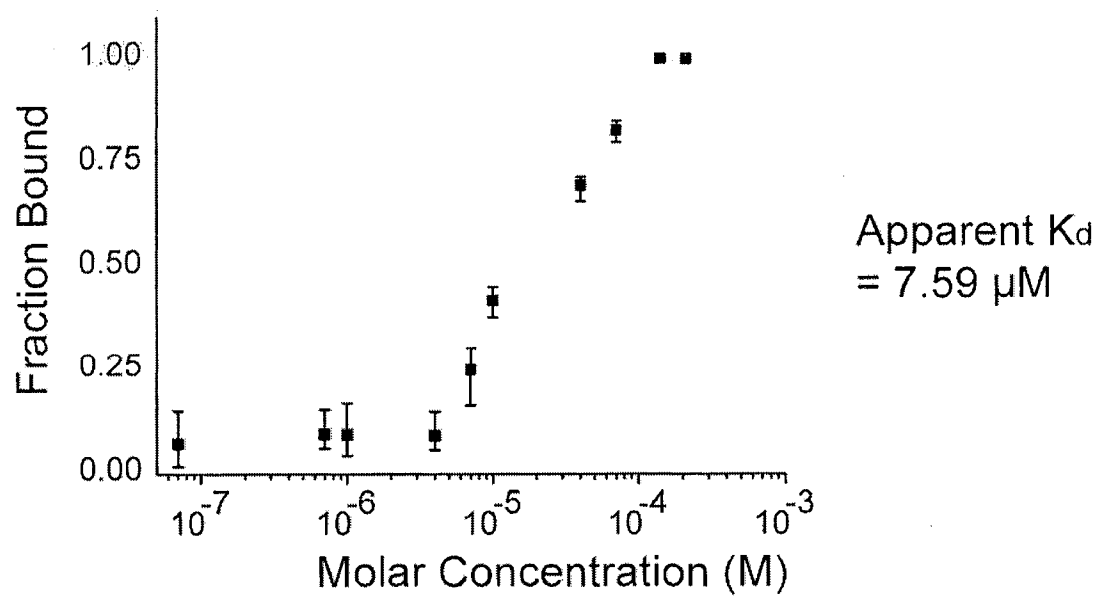
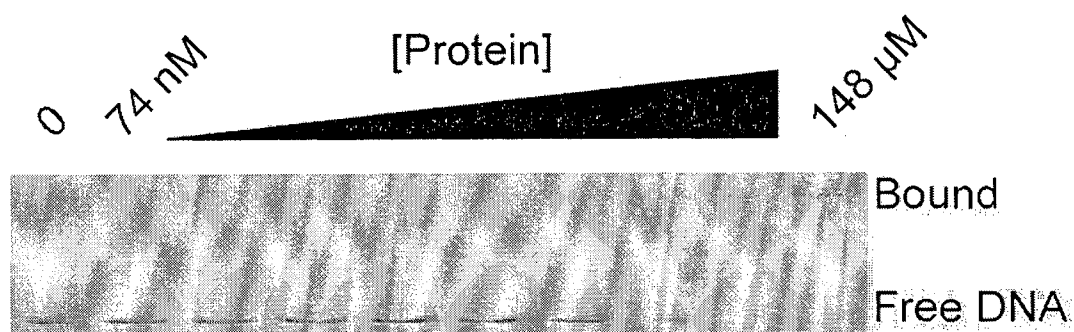
1/8

도 1



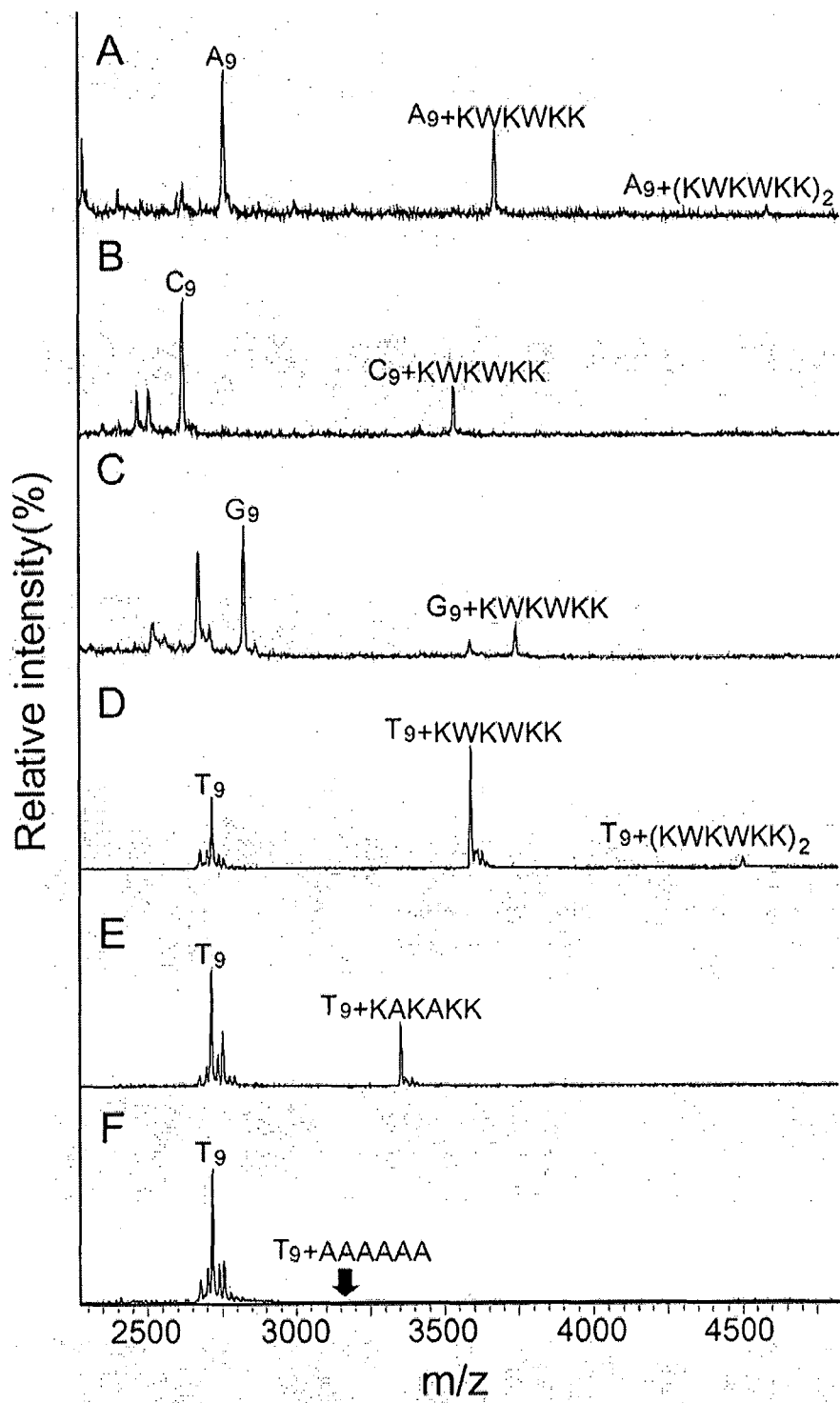
2/8

도 2



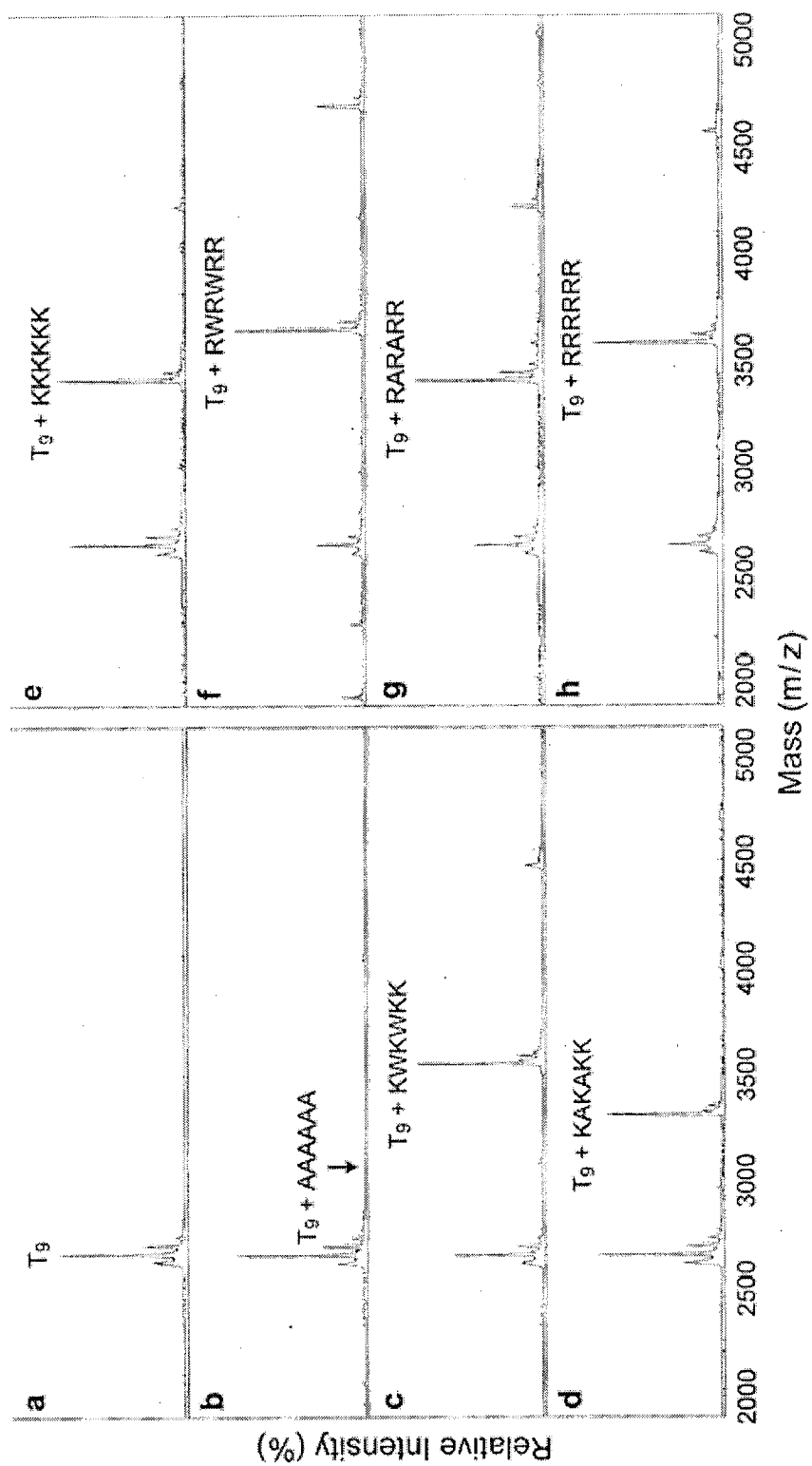
3/8

도 3a



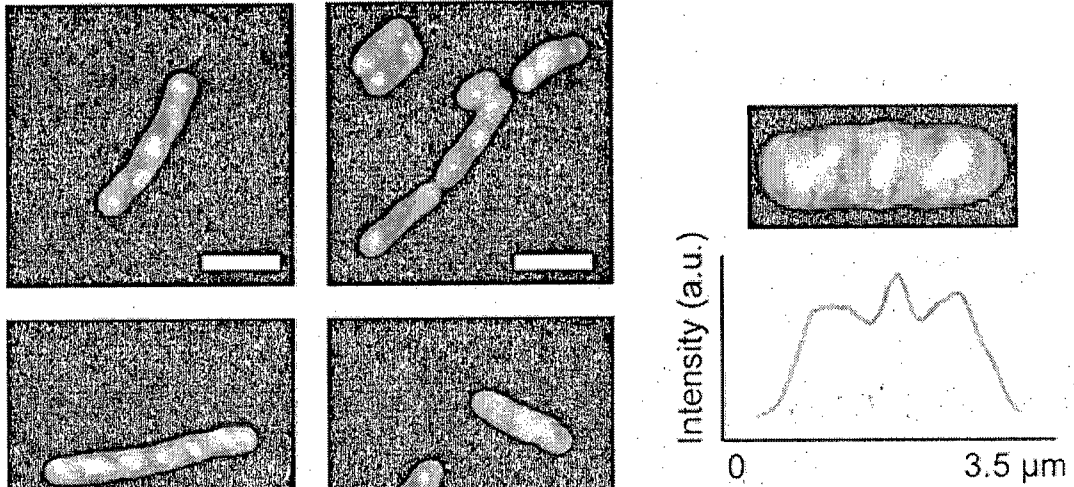
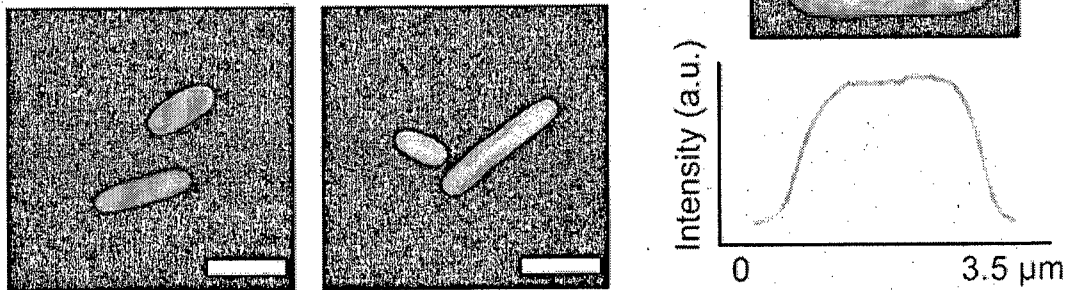
4/8

Figure 3b



5/8

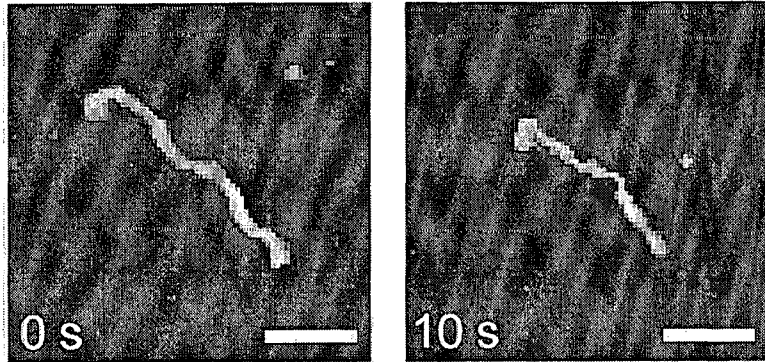
도 4

a Peptide-tagged eGFP (DNA Staining)**b** Control eGFP

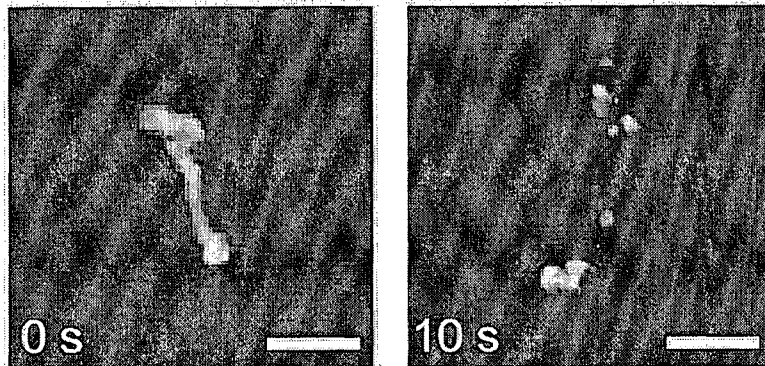
6/8

도 5

DNA staining eGFP



YOYO-1



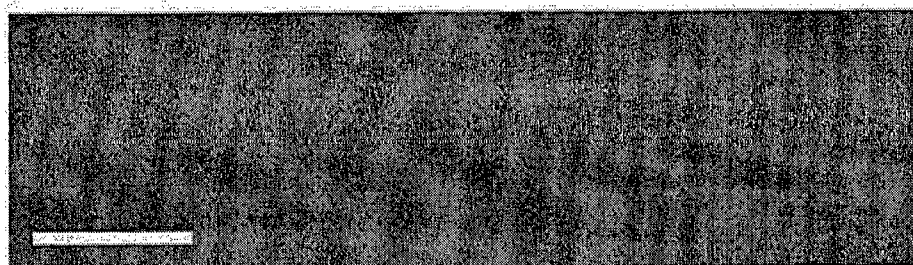
7/8

도 6

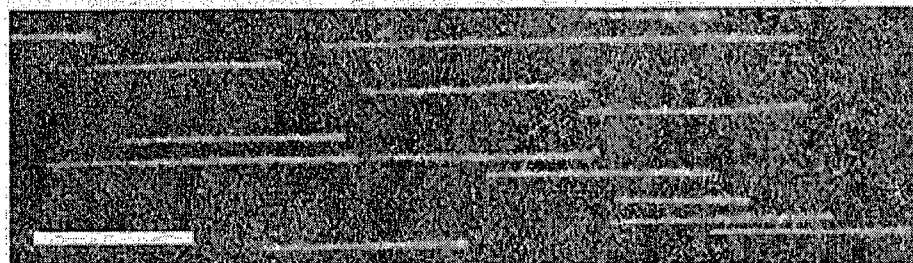
pH 8.0, 0 sec



pH 11.0, 150 sec

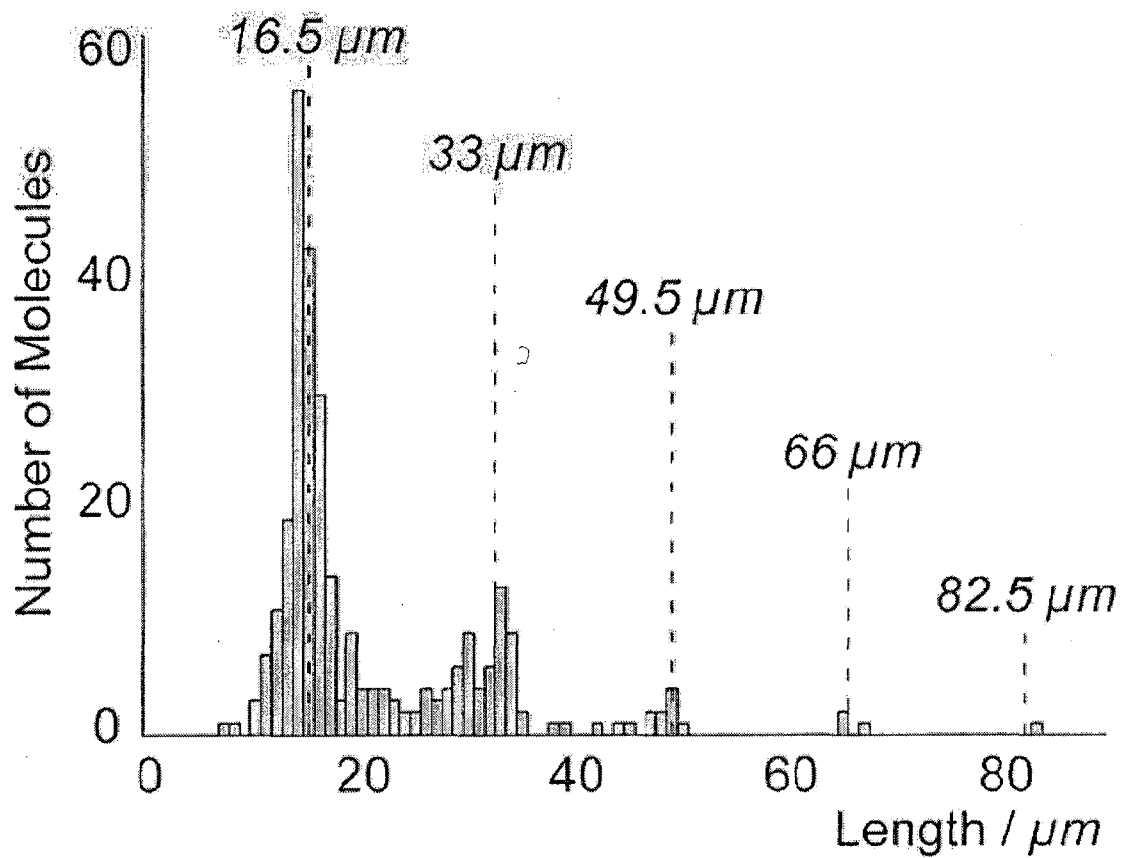


pH 8.0, 300 sec



8/8

도 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/009499

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 1/30(2006.01)i

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; A61K 38/00; C07K 1/00; G01N 1/30

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: DNA dyeing, DNA binding peptide, signal generating material

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FEDOREYEVA et al., "Penetration of Short Fluorescence-labeled Peptides into the Nucleus in HeLa Cells and in Vitro Specific Interaction of the Peptides with Deoxyribonucleotides and DNA" Biochemistry (Moscow), Vol. 76, No. 11, pp. 1210-1219 (2011) See abstract; pages 1211-1212; and figure 2.	1-11
A	US 6348317 B1 (THOMPSON et al.) 19 February 2002 See abstract; and claims 1-26.	1-11
A	MINOSHIMA et al., "Development of a Fluorogenic Probe based on a DNA Staining Dye for Continuous Monitoring of the Histone Deacetylase Reaction", Analytical Chemistry, Vol. 86, No. 15, pp. 7925-7930 (2014) See the entire document.	1-11
A	BOUTORINE et al., "Fluorescent Probes for Nucleic Acid Visualization in Fixed and Live Cells", Molecules, Vol. 18, No. 12, pp. 15357-15397 (2013) See the entire document.	1-11



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

10 NOVEMBER 2015 (10.11.2015)

Date of mailing of the international search report

10 NOVEMBER 2015 (10.11.2015)

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/KR2015/009499

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JAPARIDZE et al., "Influence of DNA Binding Dyes on Bare DNA Structure Studied with Atomic Force Microscopy", <i>Macromolecules</i> , Vol. 48, No. 6, pp. 1860-1865 (e-pub. 05 March 2015) See the entire document.	1-11
PX	LEE et al., "DNA Binding Fluorescent Proteins for the Direct Visualization of Large DNA Molecules", <i>Nucleic Acids Research, Advanced Access</i> , Article No. gkv834, internal pages 1-9 (11 August 2015) See the entire document.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/009499

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: **12**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/009499

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 6348317 B1	19/02/2002	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, G01N 1/30(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; A61K 38/00; C07K 1/00; G01N 1/30

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: DNA 염색, DNA 결합 펩타이드, 시그널 발생 물질

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	FEDOREYEVA 등, 'Penetration of short fluorescence-labeled peptides into the nucleus in HeLa cells and in vitro specific interaction of the peptides with deoxyribonucleotides and DNA' Biochemistry (Moscow), Vol.76, No.11, pp.1210-1219 (2011) 요약; 페이지 1211-1212; 및 도 2 참조.	1-11
A	US 6348317 B1 (THOMPSON 등) 2002.02.19 요약; 및 청구항 1-26 참조.	1-11
A	MINOSHIMA 등, 'Development of a fluorogenic probe based on a DNA staining dye for continuous monitoring of the histone deacetylase reaction' Analytical Chemistry, Vol.86, No.15, pp.7925-7930 (2014) 전체 문헌 참조.	1-11
A	BOUTORINE 등, 'Fluorescent probes for nucleic acid visualization in fixed and live cells' Molecules, Vol.18, No.12, pp.15357-15397 (2013) 전체 문헌 참조.	1-11

☒ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 11월 10일 (10.11.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 11월 10일 (10.11.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 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	JAPARIDZE 등, 'Influence of DNA binding dyes on bare DNA structure studied with atomic force microscopy' Macromolecules, Vol.48, No.6, pp.1860-1865 (e-pub. 05 March 2015) 전체 문헌 참조.	1-11
PX	LEE 등, 'DNA binding fluorescent proteins for the direct visualization of large DNA molecules' Nucleic Acids Research, Advanced access, Article No.gkv834, internal pages 1-9 (11 August 2015) 전체 문헌 참조.	1-11

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 6348317 B1	2002/02/19	없음	

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☒ 청구항: 12
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.