



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0080042
(43) 공개일자 2010년07월08일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/563 (2006.01) C12N 15/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0138659

(22) 출원일자 2008년12월31일

심사청구일자 2008년12월31일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

오민규

서울특별시 강남구 압구정동 현대아파트 104동 605호

김중배

서울특별시 강남구 역삼동 레미안펜타빌 101동 1501호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인주원

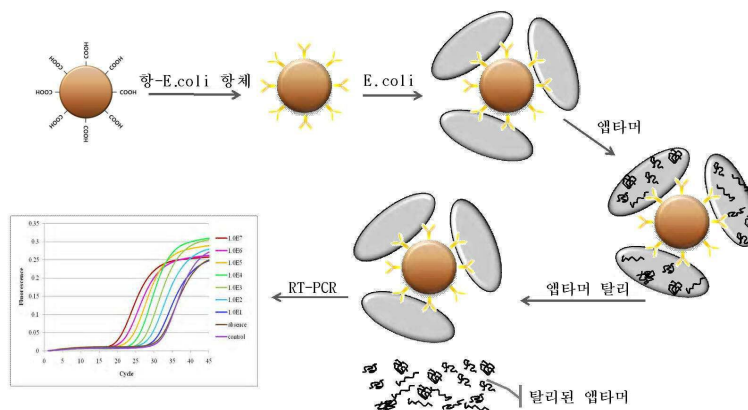
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 앵타머의 증폭을 이용한 세포 검출법

(57) 요약

본 발명은 세포의 검출법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 자석비드 (magnetic bead)에 세포 결합 항체 및 목적 세포를 순차적으로 결합시키고 자력에 의해 분리한 후, 세포 결합 앵타머를 상기 세포에 결합시키고 이를 자력에 의해 분리한 다음, 상기 세포 결합 앵타머를 탈리 및 증폭시켜 그 양을 실시간 증합효소 연쇄반응 (real time polymerase chain reaction)으로 분석하는 방법에 관한 것이다. 앵타머는 분석 대상에 강한 친화도를 가지고 항체에 비해 열안정성이 뛰어나며, 실시간-PCR은 상대적으로 작은 양을 정량화할 수 있어 결합의 특이성 및 분리의 신속성을 개선하고, 검출의 민감도와 정확성을 제고함으로써, 세포 자체를 측정하는 대신 세포 내부의 성분을 측정하고 이로부터 세포의 양을 간접적으로 파악하는 종래 검출법의 단점을 극복할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김영근

서울특별시 강남구 압구정2동 한양아파트 72-1109

이혜진

경기도 안산시 상록구 사1동 숲속마을 107동 603호

김경우

서울특별시 성동구 성수2가1동 두산위브아파트 10
2동 801호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 No. M10711160001-08M1116-00110/K2060100000209E010

부처명 교육과학기술부/한국연구재단

연구사업명 미래유망 융합기술 파이오니어사업/해외우수연구기관유치사업

연구과제명 자성천이와 영속발광 특성을 갖는 복합기능 마그네틱-포토닉 나노결정을 활용한 바이오메
디컬혁신기술개발/[2단계1차]바텔연구소 유치활용을 통한 급성 호흡기 감염 및 중증 패혈증 조기진단용 나노바이
오 시스템 개발

주관기관 고려대학교/고려대학교 산학협력단

연구기간 2008년 07월 01일 ~ 2014년 02월 28일/2009년 07월 01일 ~ 2010년 06월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

(A) 자석비드 (magnetic bead)와 세포 결합 항체를 혼합하여, 상기 세포 결합 항체가 상기 자석비드의 표면에 결합된 항체-자석비드를 제조하는 단계;

(B) 상기 항체-자석비드를 세포가 함유된 피시험 용액에 첨가하여, 상기 세포가 상기 항체-자석비드의 상기 세포 결합 항체에 결합된 세포-항체-자석비드를 제조하는 단계;

(C) 상기 피시험 용액으로부터 세포-항체-자석비드를 자력으로 분리하는 단계;

(D) 상기 세포-항체-자석비드와 세포 결합 앵타머를 혼합하여, 상기 세포 결합 앵타머가 상기 세포-항체-자석비드의 세포에 결합된 앵타머-세포-항체-자석비드를 제조하는 단계;

(E) 상기 세포-항체-자석비드의 세포에 결합되지 않은 미반응 세포 결합 앵타머를 제거하는 단계;

(F) 상기 앵타머-세포-항체-자석비드의 세포 결합 앵타머를 탈리시키는 단계; 및

(G) 상기 탈리된 세포 결합 앵타머를 실시간 중합효소 연쇄반응 (real time polymerase chain reaction)으로 증폭시킨 후 정량분석하는 단계

를 포함하는 세포 검출법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 단계 (A) 이후 단계 (B) 이전에,

(H) 상기 항체-자석비드 중 자석비드 표면의 미반응 결합부위를 보호하는 단계

를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 검출법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 세포 결합 항체와 상기 자석비드의 결합은 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합, 아비딘(avidin)-바이오틴 결합, EDC (ethyl-3-dimethyl-aminopropyl carbodiimide) 커플링, 설프하이드릴아민(sulphydrylamine) 커플링, 또는 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)-히스티딘 결합에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 세포 검출법.

청구항 4

청구항 1 또는 청구항 3에 있어서,

상기 단계 (A) 이후 단계 (B) 이전에,

(I) 상기 단계 (A)에서 제조된 항체-자석비드를 자력으로 분리하고 세척하는 단계

를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 검출법.

청구항 5

청구항 2 또는 청구항 3에 있어서,

상기 단계 (A) 이후 단계 (H) 이전에,

(I) 상기 단계 (A)에서 제조된 항체-자석비드를 자력으로 분리하고 세척하는 단계

를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 검출법.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 청구항에 있어서,

상기 단계 (C)는

(C') 상기 피시험 용액과 상기 세포-항체-자석비드를 자력으로 분리하고, 상기 세포-항체-자석비드를 세척하는 단계

인 것을 특징으로 하는 세포 검출법.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 청구항에 있어서,

상기 세포는 대장균, 박테리아, 암세포, 분화세포, 또는 암줄기세포인 것을 특징으로 하는 세포 검출법.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 청구항에 있어서,

상기 애플타머는 그 서열을 구성하는 염기의 수가 50 내지 250 개인 것을 특징으로 하는 세포 검출법.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 청구항에 있어서,

상기 자석비드는 표면에 중성 카르복시기($-COOH$), 그의 이온($-COO^-$), 중성 아민기($-NH_2$), 그의 이온($-NH^+$ 또는 $-NH_3^+$), 중성 티올기($-SH$), 및 그의 이온($-S^-$)으로 이루어진 군에서 선택된 작용기를 구비한 것을 특징으로 하는 세포 검출법.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 청구항에 있어서,

상기 단계 (A) 이전에,

(J) 자석비드와 EDC (ethyl-3-dimethyl-aminopropyl carbodiimide) 용액을 혼합하여 반응시킨 후, 상기 자석비드를 자력으로 고정시키고, 미반응 EDC 용액을 제거하는 단계

를 추가로 포함한 것을 특징으로 하는 세포 검출법.

청구항 11

청구항 4에 있어서,

상기 단계 (I)의 세척은 완충액으로 수행하는 것을 특징으로 하는 세포 검출법.

청구항 12

청구항 5에 있어서,

상기 단계 (I)의 세척은 완충액으로 수행하는 것을 특징으로 하는 세포 검출법.

청구항 13

청구항 6에 있어서,

상기 단계 (C')의 세척은 완충액으로 수행하는 것을 특징으로 하는 세포 검출법.

청구항 14

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 청구항에 있어서,

상기 세포는 대장균인 것을 특징으로 하는 세포 검출법.

청구항 15

청구항 14에 있어서,

상기 앵타머는 서열 5'- GGG AGA GCG GAA GCG UGC UGG GUC GCA GUU UGC GCG CGU UCC AAG UUC UCU CAU CAC GGA AUA CAU AAC CCA GAG GUC GAU-3'의 대장균 특이성 RNA 앵타머인 것을 특징으로 하는 세포 검출법.

청구항 16

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 청구항에 있어서,

상기 단계 (G)의 정량분석은 앵타머의 문턱주기 (threshold cycle)와 앵타머 양, 및 상기 앵타머 양과 세포 수 사이의 상관관계를 이용한 것을 특징으로 하는 세포 검출법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포의 검출법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 자석비드 (magnetic bead)에 세포 결합 항체 및 목적 세포를 순차적으로 결합시키고 자력에 의해 분리한 후, 세포 결합 앵타머를 상기 세포에 결합시키고 이를 자력에 의해 분리한 다음, 상기 세포 결합 앵타머를 탈리 및 증폭시켜 그 양을 실시간 중합효소 연쇄반응 (real time polymerase chain reaction)으로 분석하는 방법에 관한 것이다. 이를 통해, 세포 자체를 측정하는 대신 세포 내부의 성분을 측정하고 이로부터 세포의 양을 간접적으로 파악하는 종래 검출법의 단점을 극복할 수 있다.

배경 기술

[0002] 생물학적 산물의 생산을 위한 미생물 배양공정에서는 배양액 중의 미생물 양에 대한 정보를 신속하게 파악함으로써 기질공급량 등의 운전조건을 최적화할 수 있고, 의료 또는 환경 분야에서는 특정 미생물에 의한 오염 여부 및 그 정도를 신속하게 파악해야만 이에 대한 시의적절한 대처가 가능하다.

[0003] 따라서, 피시험 유체 중의 세포의 존재 및 그 양을 직접적이고 신속 정확하게 파악하는 것은 다양한 분야에서 필수적으로 요청되는 기본기술에 해당한다.

[0004] 배양액 중의 미생물 양을 아는 방법으로서 배양액의 일부를 원심분리나 여과함으로써 세포를 분리한 다음 110℃ 전후에서 장시간 건조하여 건조중량을 측정하는 방법, 배양액의 일부를 채취하여 현미경으로 세포 개체수를 세는 방법, 배양액의 탁도(濁度)를 측정함으로써 세포 농도를 추정하는 방법 등이 있고, 또 산소의 소비속도 또는 이산화탄소의 생성속도에서 세포 양을 추정하는 방법도 알려져 있다.

[0005] 그러나, 건조중량을 측정하는 방법은 배양액을 채취하고 나서 측정결과를 얻기까지 10 시간 이상이나 걸리는 문제점이 있고, 균수를 직접 세는 방법은 계수치의 불균형이 큰 문제점이 있다. 따라서 이 두 방법으로는 배양액 중의 미생물 양을 신속하고 정확하게 알 수 없다.

[0006] 그리고, 탁도로부터 세포 농도를 추정하는 방법에서는 배양액이 투명할 것을 전제로 하나, 공업적으로 행하는 배양에서는 배양액이 상당히 착색되어 있고, 세포 이외의 고형분을 포함하는 일이 많기 때문에, 세포 농도를 정확히 아는 것은 곤란하다.

[0007] 또한, 산소소비속도 및 이산화탄소 생성속도에서 세포 양을 추정하는 방법은 단위 미생물량 당의 산소소비속도 또는 이산화탄소 생성속도가 일정하다고 가정하고 있지만, 그것은 환경조건, 특히 이산화탄소 분압으로 커다란 영향을 받아 일정하지는 않다.

[0008] 이상과 같이 미생물의 배양에 있어서, 배양액 중 특정 미생물의 균체량을 신속하고 정확하게 분석하는 방법은 아직 확립되어 있지 않다. 그로 인해, 미생물 균체량에 대응하여 기질공급량을 제어하는 배양방법 역시 아직 확립되어 있지 않은 실정이다.

[0009] 한편, 대장균 (*Escherichia coli*)은 일반적으로 창자 내에 서식하며, 대개 비병원성이고, 창자 내에서 유익한 기능을 수행한다. 그러나, 식수에 존재하는 대장균은 다른 병원성 장내 세균에 의해 오염이 이루어졌을 가능성

을 나타낸다.

- [0010] 세계보건기구 (World Health Organization)는 오염된 식수에 의해 전염되는 장티푸스, 설사, 이질, 아메바증, 회색질척수염, 및 간염과 같은 감염증이 전세계적으로 연간 20억 명 이상을 감염시키는 것으로 추정했다.
- [0011] 따라서, 대장균의 신속하고 특이적인 검출은 생명공학, 의료진단, 환경 분야 및 바이오테러 방지에 있어서 대단히 중요하다.
- [0012] 대장균에 대한 다양한 생분석(bioassay) 감도를 증폭시키기 위해 생인식(biorecognition) 상황으로부터 분석신호를 증폭시키기 위한 수많은 기술이 개발되었다. 이들 중에는 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction. PCR), 면역분석, DNA 마이크로에레이, 표면 플라스몬 공명 (surface plasmon resonance. SPR), 및 은 나노셸(nanoshell)에 결합된 항-대장균 항체를 이용한 대장균 검출에 대한 몇몇 최근 보고서도 포함되어 있다.
- [0013] 그러나, 상기 언급된 대부분의 방법은 대장균 자체가 아니라, DNA 또는 단백질과 같은 대장균의 구성성분을 검출대상으로 한다. 이러한 구성성분을 검출대상으로 하는 분석은 샘플 준비과정에서 표적의 고유량이 손실될 가능성을 갖고 있어, 검출 결과에서 감도가 낮아질 수 있다.
- [0014] 나아가, 상기 대장균을 포함한 대부분의 세포 검출 또는 그 수의 정량분석방법은 상기 세포의 낮은 농도 범위 때문에 전체 검출시간을 줄이는 것이 매우 어렵다.
- [0015] 이상과 같이 대장균이나 그 밖의 다른 세포의 존재 또는 그 양을 신속하고 정확하게 파악하는 것은, 발효공학이나 환경공학 등 다양한 분야에서 그 필요성이 끊임없이 강하게 제기되어 왔으나, 아직도 명쾌한 분석방법이 제시되지 못하고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0016] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 자석비드에 항체를 결합하여 세포를 포획하고 이를 자력으로 분리한 후 앵타머를 결합시킨 다음, 상기 앵타머를 탈리시키고 이를 실시간-PCR로 증폭시켜 그 양을 측정하는 세포 검출법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

과제 해결수단

- [0017] 본 발명의 세포 검출법은 상술한 바와 같은 목적을 달성하기 위하여,
- [0018] (A) 자석비드 (magnetic bead)와 세포 결합 항체를 혼합하여, 상기 세포 결합 항체가 상기 자석비드의 표면에 결합된 항체-자석비드를 제조하는 단계;
- [0019] (B) 상기 항체-자석비드를 세포가 함유된 피시험 용액에 첨가하여, 상기 세포가 상기 항체-자석비드의 상기 세포 결합 항체에 결합된 세포-항체-자석비드를 제조하는 단계;
- [0020] (C) 상기 피시험 용액으로부터 세포-항체-자석비드를 자력으로 분리하는 단계;
- [0021] (D) 상기 세포-항체-자석비드와 세포 결합 앵타머를 혼합하여, 상기 세포 결합 앵타머가 상기 세포-항체-자석비드의 세포에 결합된 앵타머-세포-항체-자석비드를 제조하는 단계;
- [0022] (E) 상기 세포-항체-자석비드의 세포에 결합되지 않은 미반응 세포 결합 앵타머를 제거하는 단계;
- [0023] (F) 상기 앵타머-세포-항체-자석비드의 세포 결합 앵타머를 탈리시키는 단계; 및
- [0024] (G) 상기 탈리된 세포 결합 앵타머를 실시간 중합효소 연쇄반응 (real time polymerase chain reaction)으로 증폭시킨 후 정량분석하는 단계
- [0025] 를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 또한, 본 발명의 세포 검출법은 상기 단계 (A) 이후 단계 (B) 이전에,
- [0027] (H) 상기 항체-자석비드 중 자석비드 표면의 미반응 결합부위를 보호하는 단계
- [0028] 를 추가로 포함할 수 있다.

- [0029] 또한, 상기 세포 결합 항체와 상기 자석비드의 결합은 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합, 아비딘(avidin)-바이오틴 결합, EDC (ethyl-3-dimethyl-aminopropyl carbodiimide) 커플링, 설프하이드릴아민(sulphydrylamine) 커플링, 또는 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)-히스티딘 결합에 의해 이루어지는 것이 바람직하다.
- [0030] 또한, 상기 자석비드는 표면에 작용기, 바람직하게는 중성 카르복시기($-COOH$), 그의 이온($-COO^-$), 중성 아민기($-NH_2$), 그의 이온($-NH^+$ 또는 $-NH_3^+$), 중성 티올기($-SH$), 또는 그의 이온($-S^-$)을 가질 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명의 세포 검출법은 상기 단계 (A) 이전에,
- [0032] (J) 상기 자석비드와 EDC 용액을 혼합하여 반응시킨 후, 상기 자석비드를 자력으로 고정시키고, 미반응 EDC 용액을 제거하는 단계
- [0033] 를 추가로 포함할 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명의 세포 검출법은 상기 단계 (A) 이후 단계 (B) 이전에,
- [0035] (I) 상기 단계 (A)에서 제조된 항체-자석비드를 자력으로 분리하고 세척하는 단계
- [0036] 를 추가로 포함할 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 세포 검출법은 상기 단계 (A) 이후 단계 (H) 이전에,
- [0038] (I) 상기 단계 (A)에서 제조된 항체-자석비드를 자력으로 분리하고 세척하는 단계
- [0039] 를 추가로 포함할 수 있다.
- [0040] 또한, 상기 단계 (C)는
- [0041] (C') 상기 피시험 용액과 상기 세포-항체-자석비드를 자력으로 분리하고, 상기 세포-항체-자석비드를 세척하는 단계
- [0042] 일 수 있다.
- [0043] 또한, 상기 앵타머는 그 서열을 구성하는 염기의 수가 50 내지 250 개인 것이 바람직하다.
- [0044] 또한, 상기 앵타머 중 컨넥터를 제외한 부분의 염기수가 50 내지 250 개인 것이 바람직하다.
- [0045] 또한, 상기 세포는 대장균과 같은 박테리아, 유방암, 폐암, 구강암, 후두암, 식도암, 방광암, 신장암, 췌장암, 직장결장암, 위암 등을 일으키는 암세포, PC12와 같은 분화세포, 또는 CD133과 같은 암줄기세포일 수 있다.
- [0046] 또한, 상기 단계 (I) 또는 (C')의 세척은 완충액으로 수행하는 것이 바람직하다.
- [0047] 또한, 상기 세포는 대장균일 수 있다.
- [0048] 또한, 상기 세포는 대장균이고, 앵타머는 대장균 특이성 RNA 앵타머 (5'- GGG AGA GCG GAA GCG UGC UGG GUC GCA GUU UGC GCG CGU UCC AAG UUC UCU CAU CAC GGA AUA CAU AAC CCA GAG GUC GAU-3')일 수 있다.
- [0049] 또한, 상기 단계 (G)의 정량분석은 앵타머의 문턱주기 (threshold cycle)와 앵타머의 양, 및 상기 앵타머의 양과 세포 수 사이의 상관관계를 이용한 것이 바람직하다.

효 과

- [0050] 본 발명의 세포 검출법은 세포 표면 단백질과 항체 및 특정 앵타머 사이의 면역원성 능력에 기초한다. 세포의 검출은 항체 결합 자석비드 및 앵타머의 순차적 결합에 따라, 특이적 결합, 분리 및 신호화에 의해 가능하다.
- [0051] 상기 항체 결합 자석비드의 사용은 다양한 성분을 함유한 환경에서 세포를 분리해 내는 데 유용하다. 그리고, 앵타머는 분석 대상에 강한 친화도를 가지며, 항체에 비해 열안정성이 뛰어나다.
- [0052] 또한, 앵타머를 기초로 한 실시간-PCR은 실시간으로 진행되는 PCR 반응을 모니터링하는 데 사용되는 기법으로서, 상대적으로 작은 양을 정량화할 수 있다는 장점이 있다.
- [0053] 종래의 세포 검출법중 가장 민감도가 높은 방법인 PCR의 경우 DNA와 같은 세포 내부의 구성성분을 검출대상으로 함으로써, 샘플 준비과정에서 표적의 고유량이 손실될 가능성이 있고, 이는 필연적으로 검출 결과에서 감도

를 저하시키는 요인이 되어 왔다. 이에 반해 본 발명의 세포 검출법은 세포 내 구성성분이 아니라 먼저 세포 자체를 포획한 후, 이러한 세포 외부에 실제 분석의 대상이 되는 물질을 결합시키고, 이 분석대상물질의 양을 증대시킨 다음 분석함으로써 분석 감도를 획기적으로 상승시키는 장점이 있다.

- [0054] 이러한 개념을 기초로 한 본 발명의 면역자력학적 분리 및 실시간-PCR을 이용한 앵타머 증폭은 세포의 검출에 있어서, 결합의 특이성 및 분리의 신속성을 개선하고, 검출의 민감도와 정확성을 제고하는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0055] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 첨부도면을 참조하여 상세히 설명한다. 또한, 하기의 설명은 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐 이러한 특정 사항들 없이도 본 발명이 실시될 수 있음은 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명하다 할 것이다. 그리고, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0056] 본 발명자는 자석비드에 결합된 세포 항체를 이용한 면역자력학적 접근이 높은 효율로 목적 세포를 검출 및 분리할 수 있음을 발견했다. 나아가, 실시간-PCR을 통해 세포에 결합된 앵타머(aptamer)를 증폭(amplification) 시킴으로써 고감도를 달성할 수 있었다.
- [0057] 앵타머는 펩티드, 작은 분자, 핵산과의 결합 및 다양한 화학반응의 촉매작용과 같은 원하는 기능을 위해, 특정 표적분자에 대해 선택된 단일가닥 핵산 리간드이다. 앵타머는 항원-항체 결합체에 비견될 만한 높은 친화도로 표적분자와 특이적 결합을 이룬다. 앵타머는 항체에 비해 여러 장점을 가지고 있어, 단백질의 친화도 분석에서 항체의 매력적인 대안이 된다.
- [0058] 즉, 앵타머는 보다 작고 안정적이며, 화학적 개질이 보다 용이하고, 지수적 증폭 (SELEX)에 의한 리간드의 체계적인 전개(evolution)를 통하여 스크리닝될 수 있으며, 생체 외에서 대량으로 합성될 수 있다. 또한, 앵타머는 증폭이 지원되는 PCR에 의해 훌륭한 탐침이 된다.
- [0059] 다만, 종래의 PCR은 반응의 말단에서 측정이 이루어져 실시간으로 결과를 확인하는 것이 불가능하다. 뿐만 아니라, 전기영동 결과로부터 정량적인 농도를 판단할 수 없고, 특히 저농도 범위에서는 식별 자체가 불가능하여 정량분석을 기대하기 어렵다.
- [0060] 종래의 PCR이 이러한 한계를 갖는 데 반해, 실시간-PCR은 문턱주기(threshold cycle, CT)를 측정변수로 함으로써 민감도 및 특이성 측면에서 보다 우수하고, 이에 따라 실시간 정량적 분석이 가능하다. 이러한 분석은 높은 민감도와 특이성을 가지고, 현재 용이하게 수행할 수 있으며, 자동화도 가능하다.
- [0061] 이에 본 발명자는 실시간-PCR을 통해 신호 증폭이 촉발되는 특이적 RNA 앵타머, 및 자석비드에 결합된 세포 항체를 이용한 민감도 높은 세포 검출법을 고안하였다. 세포의 항체 및 앵타머에 대한 특이적 친화도는 SPR에 의해 확인되며, 자석비드에 결합된 세포 항체의 면역자력학적 분리 능력은 플레이트 계수법 (plate counting method)에 의해 증명된다. 목적 세포는 자석비드에 결합된 항체에 의해 포획되고, 이어서 앵타머의 결합이 진행되며, 이는 실시간-PCR에 의해 확인 및 정량화된다. 본 발명자들은 본 발명의 방법에 의해 ml 당 10 개의 세포가 존재하는 샘플까지 분석이 가능함을 확인하였다.
- [0062] 도 1은 대장균을 분석대상으로 한 본 발명 세포 검출법의 일 실시예의 과정을 도시한 개략도이다.
- [0063] 본 발명의 세포 검출법은 먼저, 존재 및 그 양을 분석하고자 하는 목적 세포의 포획을 위해 자석비드에 상기 세포와 결합하는 항체를 결합하는 것으로부터 시작된다.
- [0064] 여기서, 자석비드와 항체와의 결합은 일반적으로 자석비드 표면에 구비된 작용기와 항체의 작용기 사이의 반응에 의해 이루어진다. 자석비드 표면에 구비되는 작용기로는 카르복시기(-COOH), 그의 이온(-COO⁻), 중성 아민기(-NH₂), 그의 이온(-NH₃⁺ 또는 -NH₂⁺), 중성 티올기(-SH), 및 그의 이온(-S⁻)으로 이루어진 군에서 선택된 작용기 등을 들 수 있다.
- [0065] 상기 자석비드 표면에 구비된 작용기는 항체의 아민기와 같은 작용기와 직접 결합할 수도 있고, 다른 물질이 매개된 결합, 예컨대 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합, 아비딘(avidin)-바이오틴 결합, EDC (ethyl-3-dimethyl-aminopropyl carbodiimide) 커플링, 설프하이드릴아민(sulphydrylamine) 커플링, 또는 Ni-NTA(nitrilotriacetic acid)-히스티딘 결합을 통해 항체와 결합될 수도 있다.

- [0066] 하나씩 설명하면 스트렙타비딘(streptavidin)-바이오틴(biotin) 결합이나 아비딘(avidin)-바이오틴 결합은, 자석비드 또는 항체의 어느 한쪽에 스트렙타비딘 또는 아비딘을 결합시키고 반대쪽에 바이오틴을 결합시켜, 이들 사이의 결합반응을 통해 결과적으로 자석비드와 항체를 결합시키는 것이다.
- [0067] 그리고, EDC 커플링은 먼저 표면에 카르복시기를 구비한 자석비드에 EDC를 첨가함으로써, 자석비드의 카르복시기를 활성화시켜 아민그룹과 결합할 수 있는 형태로 만든다. 그런 다음 항체를 첨가하면 항체의 아민기가 자석비드의 카르복시기와 아미드 결합함으로써 결과적으로 자석비드와 항체를 결합시키는 것이다.
- [0068] 설포하이드릴아민 커플링은 먼저 2-Mercaptoethylamine·HCl(MEA)을 이용하여 항체의 황-황 결합을 쪼개 티올기(-SH)를 생성시킨다. 그런 다음, 이를 SMCC (succinimidyl-4-N-maleimidomethyl-cyclohexane carboxylate) 링커를 이용하여 자석비드 표면의 티올기와 결합함으로써 결과적으로 자석비드와 항체를 결합시키는 것이다.
- [0069] 마지막으로 Ni-NTA-히스티딘 결합은 자석비드 상의 카르복시기에는 Ni-NTA를 반응시켜 아미드 결합으로 결합시키고, 항체에는 히스티딘을 결합시켜, 상기 Ni-NTA와 히스티딘을 결합함으로써 결과적으로 자석비드와 항체를 결합시키는 것이다.
- [0070] 상기 자석비드는 항체와의 혼합 전에 자력으로 고정하고 세척하는 단계를 거치는 것이 더욱 바람직하며, 항체와 결합한 후에도 역시 자력으로 고정하고 세척함으로써 미반응 항체를 제거하는 것이 바람직하다. 이 경우 세척은 전자의 경우 중성 또는 약알칼리성 물을 사용하고, 후자의 경우 PBS와 같은 완충액으로 하는 것이 바람직하다.
- [0071] 나아가, 상기 항체 결합 후에 자석비드 표면에 존재하는 미반응 작용기가 이후 반응에 예기치 못한 결과를 야기하는 것을 방지하기 위해 BSA (bovine serum albumin) 등으로 보호(blocking)하는 것이 바람직하다. 이 경우에도 보호처리 후 완충액 등으로 세척하는 것이 바람직하다.
- [0072] 상기 과정을 거쳐 수득한 항체 결합 자석비드, 즉 항체-자석비드는 분석하고자 하는 세포가 함유된 피시험 용액과 혼합하여, 상기 세포가 상기 항체-자석비드의 상기 항체에 결합된 세포-항체-자석비드를 제조한다.
- [0073] 본 발명의 검출법에서 검출 또는 정량분석하고자 하는 세포는 별도의 제한 없이 모든 세포를 그 대상으로 할 수 있다. 그 중에서도 앞서 언급한 대장균 등의 박테리아와 각종 암세포, 예컨대 유방암, 폐암, 구강암, 후두암, 식도암, 방광암, 신장암, 췌장암, 직장결장암, 위암 등을 일으키는 암세포, 또는 CD133과 같은 암줄기세포, 그리고 PC12와 같은 분화세포 등을 검출하는 데 요긴하게 이용될 수 있다. 즉, 이들 세포를 저농도 범위에서도 신속하게 정확하게 검출 또는 정량분석할 수 있다는 점이 본 발명의 장점이다.
- [0074] 상기 세포-항체-자석비드는 본 발명의 최종 분석신호 발생원인 앵타머와 반응시키기에 앞서, 다양한 성분이 혼합된 배지성분과의 분리를 위해 자력으로 고정된다. 보다 바람직하게는 전술한 바와 같이 자력으로 분리하고 완충액으로 세척하는 것이 권장된다. 이 단계의 세척을 통해 배지성분 뿐만 아니라 항체-자석비드에 결합하지 않은 세포 역시 제거된다.
- [0075] 분리된 상기 세포-항체-자석비드는 상기 세포에 특이적으로 결합하는 앵타머와 혼합하여, 상기 앵타머가 상기 세포-항체-자석비드의 세포에 결합된 앵타머-세포-항체-자석비드를 제조한다. 제조된 상기 앵타머-세포-항체-자석비드를 자력으로 고정하고 완충액 등으로 세척함으로써 미반응 앵타머를 제거하는 것이 바람직하다.
- [0076] 여기서 상기 세포 결합 앵타머는, 분석하고자 하는 목적 세포와 친화도가 높고 동시에 이러한 목적 세포에만 결합하는 성질을 가질수록 더욱 우수한 검출결과를 얻을 수 있다.
- [0077] 나아가, 본 발명의 세포 검출법에서 사용되는 세포 결합 앵타머는 그 서열을 구성하는 염기의 수가 50 내지 250 개인 것이 바람직하다. 상기 염기 수가 50 개 미만이면 실시간 중합효소 연쇄반응을 실시하기에 길이가 너무 짧으며, 염기 수가 250 개를 초과하는 앵타머는 제작이 곤란하여 실용적이지 않다. 상기 염기 수는 특히 컨넥터(connector)를 제외한 부분의 갯수인 것이 더욱 바람직한데, 이로써 짧은 앵타머에 별도로 컨넥터를 붙이는 과정을 생략하는 것이 가능하다.
- [0078] 후술할 실시예에서 목적 세포는 대장균이며, 이 경우 앵타머는 하기 서열 (서열목록 1)을 갖는 RNA 앵타머를 제작, 사용하였다:
- [0079] 5'- GGG AGA GCG GAA GCG UGC UGG GUC GCA GUU UGC GCG CGU UCC AAG UUC UCU CAU CAC GGA AUA CAU AAC CCA GAG GUC GAU-3'.
- [0080] 상기 앵타머-세포-항체-자석비드는 바람직하게는 완충액에 재현탁시키고, 이어서 PCR 증폭을 위해 앵타머를 탈

리시킨다. 여기서 탈리 방법은 예컨대 70 내지 95 °C의 온도에서 수십 분 동안 가열함으로써 이루어진다.

[0081] 이렇게 탈리된 앵타머는 실시간 중합효소 연쇄반응 (real time polymerase chain reaction, RT-PCR)으로 증폭시킨 후 정량분석함으로써 목적 세포의 존재 및 그 양을 신속하고 정확하게 파악할 수 있다.

[0082] 상기 정량분석의 구체적 예를 들면, 실험에 의해 앵타머와 세포 양 사이의 상관관계를 구하고, 이와 별도로 기지의 앵타머 농도와 실시간-PCR의 문턱주기(threshold cycle, C_T) 사이의 상관관계를 구한다.

[0083] 그런 다음, 실제 샘플로부터 문턱주기를 구하여, 이로부터 앵타머 농도 및 실제 세포 양을 알 수 있는 것이다.

[0084] 이하, 본 발명의 실시예에 대하여 설명한다. 하기 실시예는 전술한 다양한 세포들 중 대장균에 대해 수행되었으며, 하기 실시예가 본 발명의 권리범위를 제한하지 않음은 당연하다.

[0085] 실시예

[0086] 실시예 1: 세포 배양

[0087] 대장균, *Salmonella typhimurium* 및 *Listeria monocytogenes* 를 각각 37 °C의 루리아-베르타니(Luria-Bertani, LB) 배지에서 15 시간 동안 배양하였다. 기지 농도의 세포 현탁액을 요구하는 실험을 위해, 철야 배양물을 원심분리하고, 10 mM PBS (Phosphate buffered saline, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5.4 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 , pH 7.4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 세척한 후, 필요에 따라 PBS (10 mM, pH 7.4)에 희석시켰다. 세포 농도는 분광계를 사용하여 측정하였으며, 플레이트 계수를 통해 확인하였다. 세척 후 세포를 재현탁하기 위해 사용된 완충액의 부피는 세포의 목적 농도를 맞추기 위해 조정하였다. 저농도 세포를 위해서 일련의 10배 희석이 PBS 중에서 수행되었다.

[0088] 실시예 2: 앵타머 특이결합에 대한 표면 플라즈몬 공명 (SPR)

[0089] SPR 실험을 위해 Biaevaluation 소프트웨어를 장착한 Biacore 2000 SPR 바이오센서 장치 (Biacore Inc.)를 사용하였다. SPR 분석용 다클론성 1차 항체 (20 ng/ μl , polyclonal primary antibody, Abcam, MA, USA)는 아민 커플링법에 의해 센서칩 CM5 (Biacore Inc. Piscataway, NJ, USA)의 유동 세포 상에 고정화되었다. 대장균, *Salmonella typhimurium* 및 *Listeria monocytogenes* 에 대한 다클론성 항체가 10 분 동안 5 μl /분의 유속으로 각각 주입됨으로써 다른 센서 채널 상에 고정화되었다. 다클론성 항체의 고정화 후, 미반응 N-하이드록시석신이미드 (N-hydroxysuccinimide, NHS) 에스테르가 불활성화되고, 과량의 에탄올아민 하이드로클로라이드가 주입되었다. 이어서 비결합 다클론성 항체가 100 mM HCl로 표면으로부터 세척되었다. 다클론성 항체의 고정화 후, 우혈청 알부민 (bovine serum albumin, BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 임의의 가용한 유리 금 표면이 보호되었다. 이 단계에서 모든 경우의 평균 SPR 신호는 유사하며, 약 7000 RU 증가했다.

[0090] 이어서 실시예 1의 세포 현탁액을 10 분 동안 5 μl /분의 유속으로 표면에 주입하였으며, 이를 통해 결합된 항체가 세포와 상호작용하여 세포를 포획했다. 실험한 박테리아의 농도는 10^8 cfu/ml이었으며, SPR 신호는 평균적으로 60 RU 만큼 증가했다.

[0091] 다음으로 대장균 특이성 RNA 앵타머 (100ng/ μl , 서열: 5'- GGG AGA GCG GAA GCG UGC UGG GUC GCA GUU UGC GCG CGU UCC AAG UUC UCU CAU CAC GGA AUA CAU AAC CCA GAG GUC GAU-3')가 5 분 동안 5 μl /분의 유속으로 주입되었다.

[0092] 이상의 SPR 과정을 거쳐, 상기 앵타머가 본 실험의 목적인 대장균에만 특이적으로 결합하는지 확인하였다. 대장균에 결합되는 앵타머는 SPR에서 공명단위 (resonance units, RU)로서 측정되는데, 이는 센서 표면에서의 질량 변화로부터 야기되는 편향각을 측정한 것이다. 즉, 애널리이트(analyte)의 결합은 대응되는 굴절률의 변화를 야기하고, 이는 광학 신호로 변환되어 공명 단위 (resonance units, RU)로서 표현된다.

[0093] 도 2에 나타낸 바와 같이, 앵타머는 대장균에만 특이적으로 결합했음을 확인할 수 있다. 구체적으로, 대장균 고정화 채널에서의 RU는 회합모드에서 290 RU까지 상승한 후, 분리모드에서 감소했다. 이에 반해, *Salmonella* 와 *Listeria*에 대한 다른 채널에서는 대장균 채널에 비해 RU 값의 변화 폭이 미미했다. 상기 SPR 결과를 통해, 본 발명에서 사용되는 앵타머는 대장균에 대해 높은 특이성을 갖고 있음을 알 수 있다.

[0094] 실시예 3: 대장균 포획을 위한 항체 결합 자석비드 (항체-자석비드)의 제조

[0095] 대장균의 포획을 위해 항-대장균 항체가 코팅된 자석비드(항체-자석비드)를 다음과 같이 준비했다. 항체(Ab,

polyclonal primary antibody. Fitzgerald Inc. Concord, MA, USA)는 EDC 커플링법을 사용하여 자석비드(MB, Superparamagnetic beads, Dynabeads[®] MyOne[™] 카르복시산, 직경 1.05 μm)에 결합되었다.

- [0096] 먼저, 자석비드 ($20 \mu\text{l}$, $7-12 \times 10^9$ 비드/ ml)를 0.01 M NaOH 및 탈이온수로 세척하였다. 세척 후, 용액을 자석장치 (DynaL Biotech Inc. Lake Success, NY, USA) 위에 1 분간 정치한 다음, 세척 용액을 제거하였다.
- [0097] 이어서, EDC 용액 ($500 \mu\text{l}$, 20 mg/ ml)을 첨가하였다. 상기 자석비드를 포함한 EDC 용액을 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30 분 동안 220 rpm으로 반응시켰다. 반응 후, 용액을 자석장치 위에 1 분간 정치한 다음, EDC 용액을 제거하였다.
- [0098] 그 다음, 490 μl 의 PBS (10 mM, pH 7.4)에 재현탁된 상태의, 1차 아민기를 함유한 항체를 고정화시켰다. 구체적으로, 항-대장균 항체 용액 ($10 \mu\text{l}$, 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)을 상기 EDC 용액으로 처리한 자석비드와 완전히 혼합한 후, 실온에서 1 시간 동안 220 rpm에서 반응시켰다. 이때 카르복실기로 기능화된 자석비드가 아미드 결합으로 항체와 결합되었다. 반응 후, 용액을 자석장치 위에서 1 분간 정치한 다음, 500 μl 의 PBS (10 mM, pH 7.4)로 3 회 세척함으로써 결합하지 않은 항체를 제거하였다.
- [0099] 자석비드 표면 상에서 반응하지 않은 카르복시기를 보호하기 위해, 500 μl 의 보호용액 (0.1 % BSA)을 첨가하고 실온에서 220 rpm으로 반응시켰다. 반응 후, 용액을 자석장치 위에서 1 분간 정치한 다음, 500 μl 의 PBS (10 mM, pH 7.4)로 3 회 세척함으로써 BSA 용액을 제거하였다.
- [0100] 결합된 항체의 양은 BCA 방법을 사용하여 분석하였다. 여기서 BCA 법이란, 자석비드와 결합 전후 비신초닌산 (bicinchoninic acid)의 UV 흡수도 차이를 측정함으로써 결합된 항체의 양을 간단히 정량화하는 방법을 가리킨다.
- [0101] 측정 결과, 2.0×10^8 비드/ ml 에 고정화된 항체의 추정량은 $\sim 4.42 \mu\text{g}$ 이었다. 이러한 측정을 기초로, 하나의 자석비드는 약 9000 개의 항체와 결합한 것으로 추정되었다.
- [0102] 제조된 항체 결합 자석비드 (항체-자석비드)의 대장균 포획능력 및 효율의 신뢰도를 위해, 플레이트 계수법이 사용되었다.
- [0103] 다양한 CFU 농도의 대장균 샘플 1 ml 를 담은 시험관에 상기 항체-자석비드를 분산시켰다. 배양 후, 상기 항체-자석비드의 항체에 대장균이 포획된 대장균-항체-자석비드는 자력에 의해 수집되고, 상청액은 플레이트 계수에 의한 정량화를 위해 새로운 시험관으로 옮겼다. 대장균-항체-자석비드는 PBS로 3 회 세척 후, 이어서 탈이온수 200 μl 에 재현탁시켰다. 상청액은 Luria-Bertani 배지에 플레이트팅시킨 후, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15 시간 동안 배양하였다.
- [0104] 항체-자석비드의 포획 효율을 측정하기 위해, 콜로니를 계수하고, 포획 효율을 계산하였다. 표 1은 이러한 면역자력학적 분리를 이용했을 때의 세포 포획 효율을 나타낸 것으로서, 용액 중 약 95 % 이상의 대장균이 포획되었음을 알 수 있다.

표 1

대장균 CFU/ ml	대장균 포획 효율
1.0×10^7	99.87 %
1.0×10^6	99.57 %
1.0×10^5	97.59 %
1.0×10^4	98.90 %
1.0×10^3	95.48 %
1.0×10^2	99.99 % [*]
1.0×10^1	99.99 % [*]

[0106] * 상청액에서 대장균 콜로니 검출되지 않음

[0107] 실시예 4: 항체 결합 자석비드 (항체-자석비드)를 사용한 대장균의 검출 및 앵타머의 실시간-PCR

- [0108] 실시간-PCR에서 앵타머 서열의 증폭효율을 측정하기 위해, 정량표준곡선 (quantitative standard curve)을 작성하였다. 상기 곡선은 10 ng/ μ l 내지 10 pg/ μ l의 범위 내에서 10 배씩 희석한 앵타머에 대해 문턱주기 (threshold cycle, C_T)를 표시하여 작성되었다.
- [0109] 도 3a는 PCR 산물의 실시간 증폭곡선이고, 도 3b는 상기 C_T 값을 앵타머 농도의 로그값에 대응시킨 그래프이다. 도 3b에서 알 수 있는 바와 같이, C_T 값과 앵타머 농도의 로그값 사이에는 상당한 선형 관계가 존재한다.
- [0110] 이러한 표준곡선은 대장균으로부터 탈리된 RNA 앵타머의 정량적 정보에 대한 외삽 또는 내삽 기준을 얻는 데 사용될 수 있는데, 이는 또한 피시험 샘플에 존재하는 대장균의 수를 추정 및 탐지하는 데 사용된다.
- [0111] 본 발명 검출법의 정량화 능력을 평가하기 위해, 다양한 농도의 대장균 샘플에서 앵타머의 특이적 결합이 검토되었다.
- [0112] PBS로 희석한 다양한 농도 (10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 또는 10 / ml)의 대장균 샘플 1 ml를 항체-자석 비드 용액에 첨가, 혼합하고, 실온에서 2 시간 동안 220 rpm으로 배양하여, 대장균-항체-자석비드를 수득했다. 배양 후, 자석장치 위에 1 분간 정지한 다음, 500 μ l의 PBS (10 mM, pH 7.4)로 3 회 세척하여 결합하지 않은 대장균을 제거하였다.
- [0113] RNA 앵타머 5 μ l (100 ng/ μ l)를 대장균-항체-자석비드에 첨가하였다. 혼합 및 1 시간 동안의 배양 후, 자석장치 위에 1 분간 정지한 다음, PBS (10 mM, pH 7.4)로 2 회 세척하고, 50 μ l의 PBS에 재현탁시켜, 상기 대장균-항체-자석비드의 대장균에 앵타머가 결합된 앵타머-대장균-항체-자석비드를 수득하였다.
- [0114] 상기 앵타머-대장균-항체-자석비드 중 대장균에 결합된 RNA 앵타머를 80 $^{\circ}$ C에서 15 분 동안 가열하여 탈리시키고, 이어서 2 단계의 실시간-PCR로 정량화하였다.
- [0115] 탈리된 앵타머를 iScriptTM cDNA 합성키트 (cat.no. 170-8890. Bio-Rad. Hercules, CA, USA)로 역전사하고, SYBR[®] Green Supermix (cat.no. 170-8880. Bio-Rad.)를 사용하여 iTaq DNA 폴리머라제로 cDNA를 증폭시켰다. 사용된 프라이머는 Geno-Tech Co. (Dea-jeon, Korea)에서 구했으며 서열은 다음과 같다: 순방향 프라이머 (forward primer) 서열: 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GAG A-3' 및 역방향 프라이머 (reverse primer) 서열: 5'-ATC GAC CTC TGG GTT ATG TAT TC-3'.
- [0116] 샘플은 95 $^{\circ}$ C에서 3 분간 가열된 후, 94 $^{\circ}$ C에서 20 초 동안 변성(denaturation), 56 $^{\circ}$ C에서 20 초 동안 풀림 (annealing), 72 $^{\circ}$ C에서 20 초 동안 신장(extention), 및 4 $^{\circ}$ C로의 냉각(cooling)을 45 회 반복했다.
- [0117] DNA 증폭이 이루어지는 동안 형광을 모니터하였으며, 자료는 MJ Opticon MonitorTM 분석 소프트웨어 버전 3.1 (Bio-Rad.)로 분석하였다.
- [0118] 도 4a에 나타난 바와 같이, 모든 대장균 함유 샘플은 대조군에 비해 현저하게 짧은 주기만에 형광도가 증가하는 것을 알 수 있다. 즉, 대장균의 수가 증가할수록 실시간-PCR 분석에서 C_T 값은 감소하며, 이는 대장균-항체-자석비드에 결합된 앵타머의 수가, 샘플 중의 대장균 수에 비례함을 의미한다. 본 발명의 검출법에 의하면 ml 당 10 개의 대장균까지 검출할 수 있다.
- [0119] 특히, 대장균과 앵타머 사이에는 단순 흡착 동역학(kinetics)을 나타낸다는 점이 중요한데, 이는 도 3b의 표준 곡선에서 예상된 바 있고, 도 5에서 확인된다.
- [0120] 이러한 현상은 대장균-항체-자석비드가 서로 응집하여 덩어리화(clumped)하기 때문인 것으로 생각된다. 즉, 대장균의 수가 많아질수록, 대장균-항체-자석비드가 더 많이 덩어리 형태로 응집된다는 것이다.
- [0121] 이 경우, 앵타머는 대장균의 표면에만 결합될 뿐, 덩어리 내부의 대장균에는 결합하지 못한다는 것이다.
- [0122] 그럼에도 불구하고, 대장균의 존재 및 그 수를 추정하는데 흡착관계를 이용하는 것은 여전히 유효한데, 이는 낮은 농도 범위에서, 대장균 숫자 및 앵타머가 좋은 선형관계를 보이기 때문이다 (도 4b).
- [0123] 이상에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대해서 도시하고 설명하였으나, 본 발명은 상술한 특징의 실시예에 한정되지 아니하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본원 발명의 요지를 벗어남이 없이 다양한 변형 실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 범위는 위의 실시예에 국한해서 해석되어서는 안되며, 후술하는 특허청구범위 뿐만 아니라 이 특허청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 할 것이다.

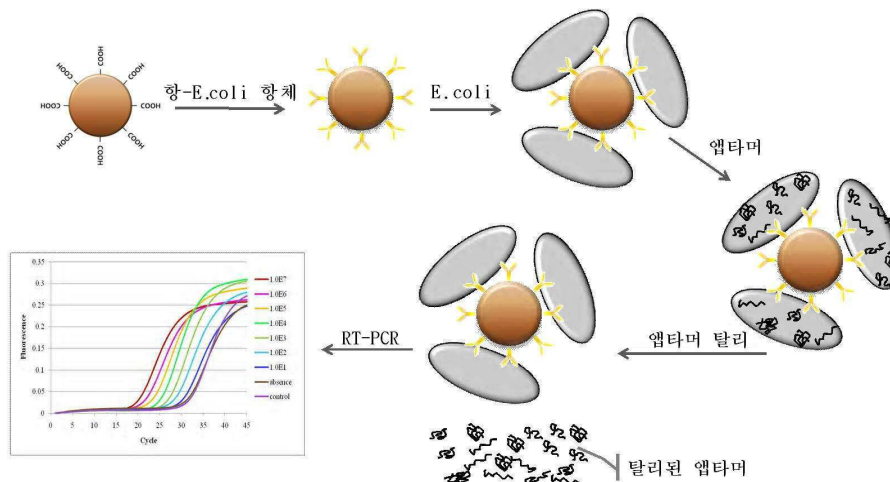
[0124] 본 발명은 교육과학기술부의 미래유망 융합기술 파이오니어사업 (No. M10711160001-08M1116-00110)의 지원을 받아 수행되었다.

도면의 간단한 설명

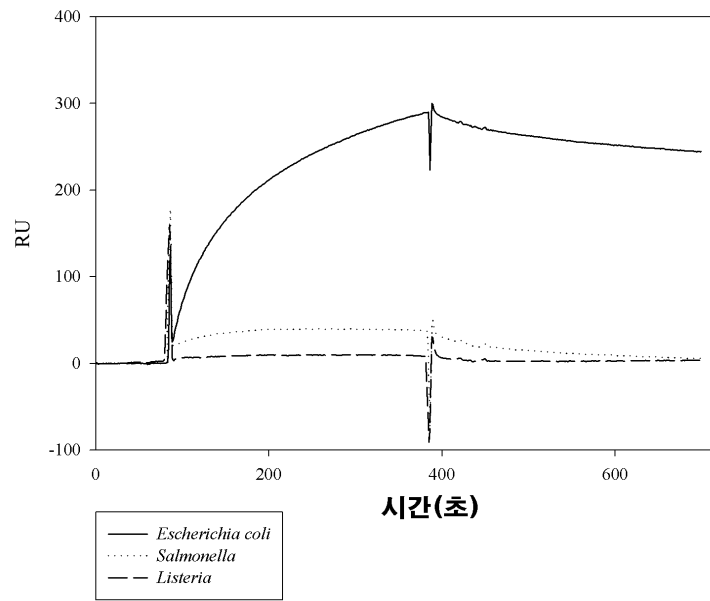
- [0125] 도 1은 대장균을 분석대상으로 한 본 발명 세포 검출법의 일 실시예의 과정을 도시한 개략도이다.
- [0126] 도 2는 대장균을 분석대상으로 한 본 발명 세포 검출법의 일 실시예에서 애타머의 표면 플라스몬 공명 결과를 나타낸 그래프이다.
- [0127] 도 3a는 대장균을 분석대상으로 한 본 발명 세포 검출법의 일 실시예에서 PCR 주기 vs. 형광 (애타머 양)을 도시한 표준곡선이다.
- [0128] 도 3b는 대장균을 분석대상으로 한 본 발명 세포 검출법의 일 실시예에서 문턱주기(C_T) vs. 초기 애타머 양을 도시한 표준곡선이다.
- [0129] 도 4a는 대장균을 분석대상으로 한 본 발명 세포 검출법의 일 실시예에서 실제 PCR 주기 vs. 형광 (애타머 양)을 도시한 곡선이다.
- [0130] 도 4b는 대장균을 분석대상으로 한 본 발명 세포 검출법의 일 실시예에서 실제 문턱주기(C_T) vs. 대장균 형성단위(CFU)를 도시한 곡선이다.
- [0131] 도 5는 대장균을 분석대상으로 한 본 발명 세포 검출법의 일 실시예에서 실제 대장균 형성단위(CFU) vs. 애타머 양을 도시한 곡선이다.

도면

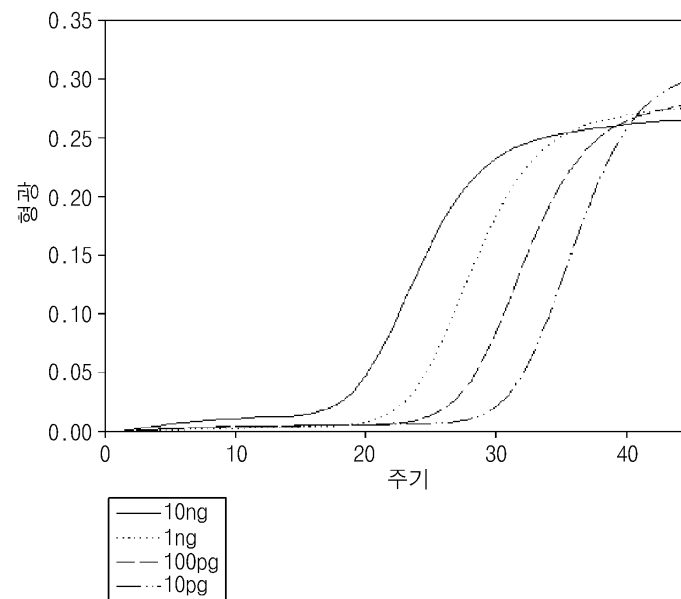
도면1



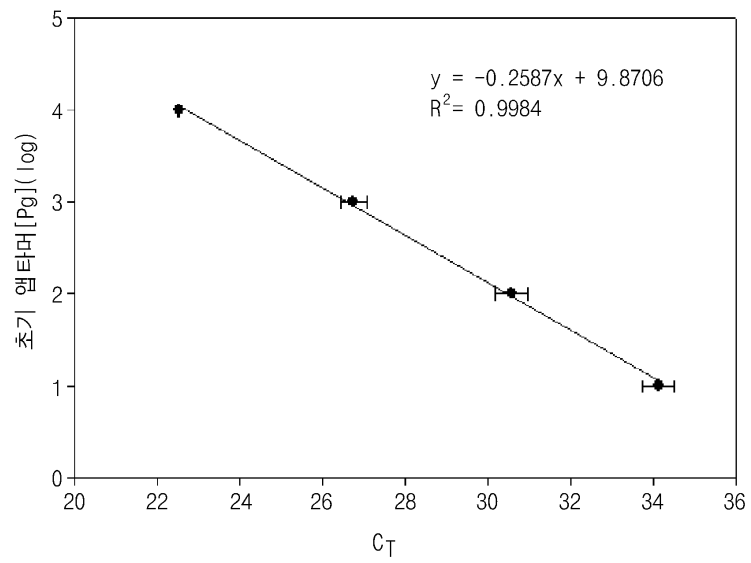
도면2



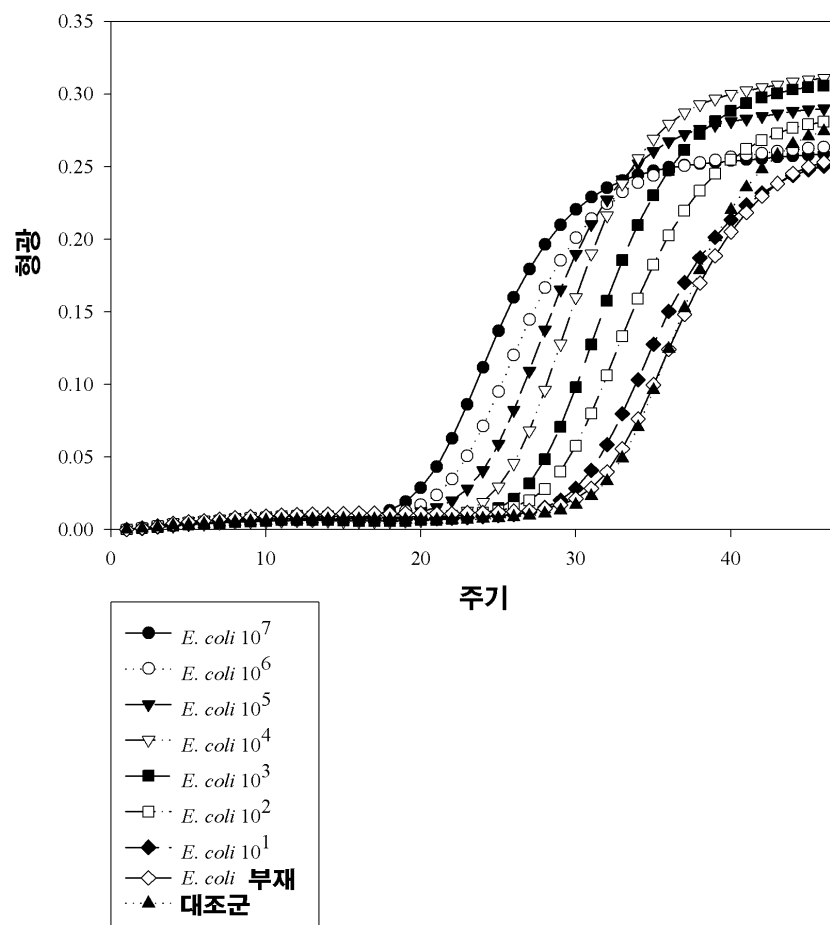
도면3a



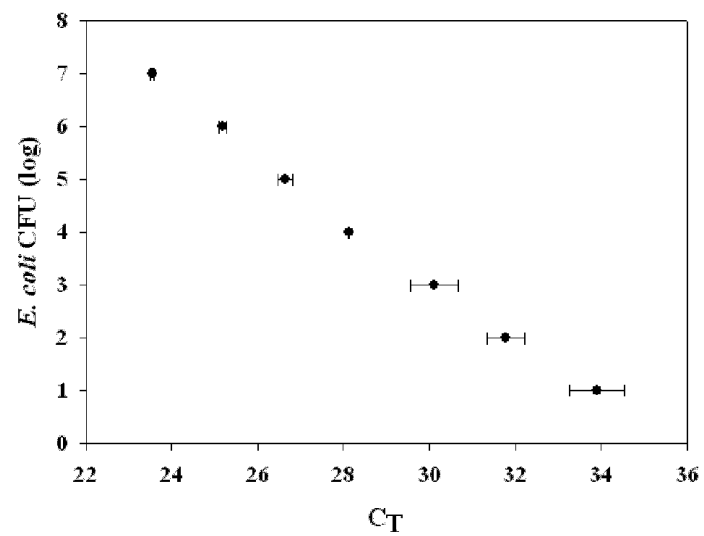
도면3b



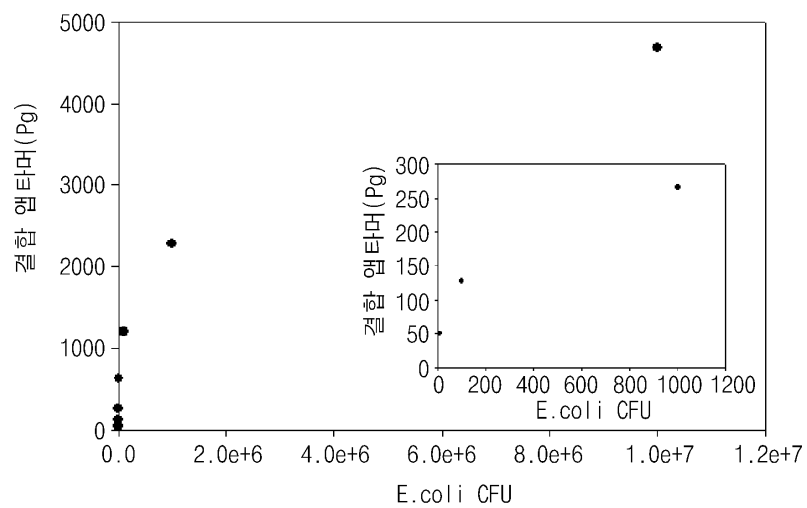
도면4a



도면4b



도면5



서열 목록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
 <120> Cell Detection Method Using Amplification of Aptamer

<130> M08-6718-FD

<160> 1

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 81
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Aptamer for E.coli

<400> 1
 gggagagcgg aagcgugcug ggucgcaguu ugcgcgcguu ccaaguucuc ucaucacgga 60

auacauaacc cagaggucga u 81