



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0033082
(43) 공개일자 2023년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/552 (2014.01) G01N 21/25 (2006.01)
G01N 21/55 (2014.01) G01N 33/543 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 21/554 (2013.01)
G01N 21/25 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0113442
(22) 출원일자 2021년08월26일
심사청구일자 2021년08월26일

(71) 출원인
서울시립대학교 산학협력단
서울특별시 동대문구 서울시립대로 163 (전농동, 서울시립대학교내)
한밭대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 동서대로 125 (덕명동)
(72) 발명자
최인희
서울특별시 동대문구 서울시립대로 163 (전농동, 서울시립대학교내)
안현지
서울특별시 동대문구 서울시립대로 163 (전농동, 서울시립대학교내)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 플라즈몬 금속 나노입자를 이용한 세포핵 내 단백질 검출방법

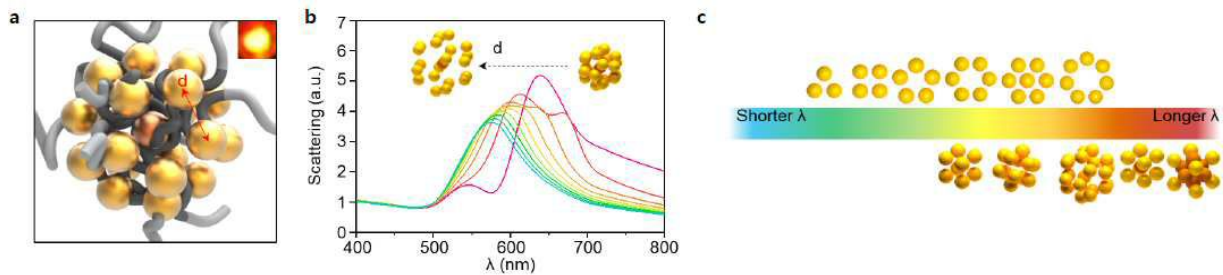
(57) 요약

본 발명은 세포핵 내부에 검출 대상 단백질들을 포함하는 세포에 상기 단백질에 대한 항체와 플라즈몬 금속 나노입자의 결합체를 포함하는 프로브를 처리하는 단계;

상기 세포에 대한 프로브의 산란 이미지와 파장에 따른 스펙트럼을 얻는 단계; 및

상기 스펙트럼을 분석하여 상기 단백질들의 분포 정보를 획득하는 단계;를 포함하는, 세포핵 내 단백질 검출 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/54346 (2013.01)

G01N 2021/258 (2013.01)

G01N 2021/555 (2013.01)

G01N 2800/7042 (2013.01)

(72) 발명자

박현성

서울특별시 동대문구 서울시립대로 163 (전농동, 서울시립대학교내)

장수정

서울특별시 동대문구 서울시립대로 163 (전농동, 서울시립대학교내)

김학춘

서울특별시 동대문구 서울시립대로 163 (전농동, 서울시립대학교내)

송지환

서울특별시 성북구 길음로 9길 50 래미안 906동 302호

김윤

대전광역시 유성구 현충원로295번길 23, 201호 (덕명동, 석송)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711110817
과제번호	2018R1A4A1025985
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초연구실지원사업
연구과제명	세포의 경험이 기록된 히스톤 코드의 새로운 해석
기 여 율	40/100
과제수행기관명	서울시립대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711128702
과제번호	2020R1A2C2005760
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	빛 또는 열에 감응하는 하이브리드 플라스몬 소재의 초간단 제조 및 고감도 나노광
학센서와 약물전달시스템에 응용	
기 여 율	30/100
과제수행기관명	서울시립대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711137549
과제번호	2021R1F1A1062856
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	차세대 2차전지 시스템의 멀티스케일-멀티피직스 설계 기술 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	한밭대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

세포핵 내부에 검출 대상 단백질들을 포함하는 세포에 상기 단백질에 대한 항체와 플라즈몬 금속 나노입자의 결합체를 포함하는 프로브를 처리하는 단계;

상기 세포에 프로브의 산란 이미지와 파장에 따른 스펙트럼을 얻는 단계; 및

상기 스펙트럼을 분석하여 상기 단백질들의 분포 정보를 획득하는 단계;를 포함하는, 세포핵 내 단백질 검출 방법.

청구항 2

세포핵 내부에 검출 대상 단백질들을 포함하는 세포에 상기 단백질에 대한 항체와 플라즈몬 금속 나노입자의 결합체로 구성된 프로브를 처리하는 단계;

상기 세포의 제1 시점과 제2 시점에서의 프로브의 산란 이미지와 파장에 따른 스펙트럼을 얻는 단계;

상기 스펙트럼을 분석하여 상기 제1 시점과 상기 제2 시점에서의 단백질들의 분포 정보를 획득하는 단계; 및

상기 제1 시점과 상기 제2 시점 사이의 상기 세포핵 내 검출 대상 단백질의 공간 내 분포 변화를 판단하는 단계;를 포함하는, 세포핵 내 단백질 분포 변화 검출 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 플라즈몬 금속 나노입자는 금 나노입자, 은 나노입자 및 이들의 조합으로부터 선택되는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 스펙트럼은 산란 스펙트럼을 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 분석은 플라즈몬 커플링 효과에 따른 스펙트럼 변화 분석하는 것을 포함하는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 방법은 단백질들의 분포가 다른 세포를 대상으로 측정 또는 시뮬레이션에 의해 얻어진 스펙트럼을 미리 준비하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 방법은, 상기 분포 정보를 통해서 상기 세포의 세포 노화 단계를 판단하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 단백질은 이질염색질의 마커로서의 수식화된 히스톤인, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 히스톤은 H3K9me3, H3K27me3, H3K56me3, H3K64me3 및 H4K20me3로부터 선택되는, 방법.

청구항 10

세포핵 내 이질염색질의 히스톤 마커들에 상기 히스톤 마커에 대한 항체와 플라즈몬 금속 나노입자의 결합체로 구성된 프로브를 처리하는 단계;

상기 세포핵에 대한 프로브의 산란 이미지와 파장에 따른 스펙트럼을 얻는 단계;

상기 스펙트럼을 분석하여 상기 히스톤 마커들의 분포 정보를 획득하는 단계;를 포함하는, 세포핵 내 이질염색질의 히스톤 마커 검출 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 플라즈몬 금속 나노입자는 금 나노입자, 은 나노입자 또는 이들의 조합으로부터 선택되는, 방법.

청구항 12

세포핵 내 이질염색질의 히스톤 마커 항체가 결합된 플라즈몬 금속 나노입자를 포함하는 세포핵 내 이질염색질의 히스톤 마커들의 분포 정보 검출용 프로브.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 플라즈몬 금속 나노입자 프로브를 이용하여 세포핵 내 단백질의 검출방법, 구체적으로 세포핵 내부 단백질 간의 분포 정보를 획득하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 세포핵 내부에 존재하는 히스톤 수식화는 염색질에서 나타나는 급격한 위상 변화의 주요 원인이다. 히스톤의 다양한 수식화 조합인 '히스톤 코드'는 다양한 기록 효소(writer enzyme)와 삭제 효소(eraser enzyme) 사이의 균형에 의해 결정된다. 히스톤 코드의 정보는 전사, 복구, 복제 및 염색질 위상과 같은 염색질의 거의 모든 이벤

트에 관여하는 판독 단백질(reader protein)에 의해 인식된다. 예를 들어, 판독기 단백질인 이질염색질(heterochromatin) 단백질-1(HP1)의 염색체영역은 3번 히스톤의 9번째 라이신 잔기의 트리메틸인 H3K9me3을 인식하고 결합한다. 결합 후 HP1은 자체적으로 올리고머화하고, HP1의 올리고머화는 염색질 구조를 보다 조밀하게 만든다. 따라서 H3K9me3은 응축된 염색질 구조인 이질염색질에서 종종 발견된다. HP1과 핵막의 내막을 구성하는 구조 단백질인 lamin A의 상호작용으로 인해, H3K9me3가 핵막의 내막에 가깝게 위치하게 된다. 이러한 메커니즘을 통해, H3K9me3은 염색질 영역의 구조와 3차원 위치를 결정할 수 있다. H3K27me3, H3K56me3, H3K64me3 및 H4K20me3과 같은 다른 이질염색질 히스톤 마커까지 확장되는 최근의 발견은 히스톤 코드와 염색질 위상 간의 관계를 복잡하게 한다. 암 돌연변이의 유전자 전체 분석은 히스톤, DNA/히스톤 변형 효소, 삭제 효소 및 염색질 리모델링 복합체를 암호화하는 수십 개의 유전자를 암 유발 유전자로 확인했으며, 이는 히스톤 코드 및 염색질 구조의 변화가 암 발병과 밀접한 관련이 있음을 시사한다. 따라서, 세포 수준에서 히스톤 수식화의 공간적 분포를 시각화 하면 노화뿐만 아니라 암 또는 기타 질병 특이적 세포 표현형을 진단하기 위한 확장된 적용을 허용할 수 있다.

[0004] 플라즈몬 금속 나노입자 프로브를 이용하여 히스톤 코드의 공간 분포를 분석하기 위한 새로운 이미징 방법을 개발하기 위해, 종양유전자 유발 노화(Oncogene-Induced Senescent, OIS) 과정이 이종염색질 분포의 급격한 변화를 유도했기 때문에 OIS 세포를 모델 시스템으로 이용한다. Ras, Raf 및 Myc 같은 종양 유전자는 종양 억제 유전자의 추가 돌연변이가 없는 경우 세포 노화를 유발한다. H3K9me3에 특이적인 항체를 이용한 OIS 세포의 면역염색은 노화 관련된 이질염색질 병소(SAHF)로 명명된 H3K9me3의 뚜렷한 무리를 이룬 패턴을 나타낸다. 대조적으로, 성장 세포에서 H3K9me3은 핵 내부에 분산된 패턴으로 검출되고 핵막의 내막을 따라 집중된다. OIS 과정 동안 H3K9me3, H3K27me3 및 해당 판독기 단백질과 같은 여러 히스톤 수식화의 공간적 재분포는 SAHF 대형을 형성한다. 따라서 핵에서 히스톤 수식화의 정확한 공간적 분포는 성장, 노화 또는 종양 세포의 후성 유전적 상태의 고유한 특징을 나타낼 수 있다.

[0005] 기존의 유기 형광염료를 이용한 히스톤 영상화 방법은 광표백(photobleaching), 해상도 저하, 2차항체의 의무적 이용 등의 한계가 있다. (비특허문헌 1, T Chandra, Molecular Cell 47, 203-214) 기존의 유기 형광단의 단점을 극복하기 위해 양자점과 금속 나노입자를 포함한 나노 크기의 무기 프로브가 주목받고 있다. 최근 금 나노입자(GNP), 은 나노입자(SNP)와 같은 플라즈몬 금속 나노입자는 우수한 광학적 특성, 광안정성, 생체적합성, 합성 및 표면 개질 용이성으로 인해 다양한 이미징 및 센싱 응용 분야에 활용되고 있다. 플라즈몬 금속 나노입자 입자의 광학 특성은 모양, 크기 및 구성을 조절하여 조정할 수 있다. 특히, 2개 이상의 플라즈몬 금속 나노입자가 근접하게 위치할 때, 흡광도 및 산란과 같은 스펙트럼의 이동을 유도하는 플라즈몬 커플링 효과를 나타낸다. 이러한 스펙트럼 이동은 입자간 거리, 분포 및 플라즈몬 금속 나노입자 입자의 유형에 밀접한 관련이 있다. 플라즈몬 금속 나노입자의 우수한 광학적 특성에도 불구하고 지금까지 핵에서 히스톤 수식화를 시각화하려는 시도는 없었다.

[0006] 이에, 세포핵 내부의 단백질들의 공간적 배치를 플라즈몬 금속 나노입자를 통해서 분석하려는 목적하에 세포핵 내부에 히스톤 마커에 대한 항체와 플라즈몬 금속 나노입자의 결합체를 이용하여 살아있는 세포 핵 내 히스톤 마커를 표지하고, OIS를 유도하였을 때 세포의 노화과정에서 발생하는 히스톤 마커의 공간적 재배치에 따라서 플라즈몬 금속 나노입자 프로브의 동적 색상 변화와 스펙트럼 변화를 확인하게 되어 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 일 목적은 세포핵 내 단백질, 예를 들면 수식화된 히스톤 간의 거리 또는 분포에 관한 정보를 획득하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 플라즈몬 금속 나노입자를 이용하여 세포핵 내 단백질 간의 거리 및 공간 내 분포 변화를 판단하는, 단백질 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 세포의 노화 단계를 판단하는데 있어서 플라즈몬 금속 나노입자를 활용하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 일 측면에서, 세포핵 내부에 검출 대상 단백질들을 포함하는 세포에 상기 단백질에 대한 항체와 플라즈몬 금속 나노입자의 결합체를 포함하는 프로브를 처리하는 단계;
- [0013] 상기 세포핵 프로브의 산란 이미지와 파장에 따른 스펙트럼을 얻는 단계; 및
- [0014] 상기 스펙트럼을 분석하여 상기 단백질들의 분포 정보를 획득하는 단계;를 포함하는, 세포핵 내 단백질 검출 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 다른 측면에서, 세포핵 내부에 검출 대상 단백질들을 포함하는 세포에 상기 단백질에 대한 항체와 플라즈몬 금속 나노입자의 결합체로 구성된 프로브를 처리하는 단계;
- [0016] 상기 세포의 제1 시점과 제2 시점에서의 프로브의 산란 이미지와 파장에 따른 스펙트럼을 얻는 단계;
- [0017] 상기 스펙트럼을 분석하여 상기 제1 시점과 상기 제2 시점에서의 단백질들의 분포 정보를 획득하는 단계; 및
- [0018] 상기 제1 시점과 상기 제2 시점 사이의 상기 세포핵 내 검출 대상 단백질의 공간 내 분포 변화를 판단하는 단계;를 포함하는, 세포핵 내 단백질 분포 변화 검출 방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또 다른 측면에서, 세포핵 내 이질염색질의 히스톤 마커 항체가 결합된 플라즈몬 금속 나노입자를 포함하는 세포핵 내 이질염색질의 히스톤 마커들의 분포 정보 검출용 프로브를 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 세포핵 내 단백질 검출 방법은 플라즈몬 금속 나노입자를 검출 프로브로 이용함에 따라, 종래에 이용되어 온 유기 형광 분자를 이용한 영상과 달리 2차항체의 이용을 필요로 하지 않으며, 더 높은 해상도의 영상화가 가능하며, 플라즈몬 금속 나노입자의 커플링에 따른 스펙트럼 변화를 분석하여 단백질 간의 거리 및 공간 내 분포에 대한 정보를 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 플라즈몬 금속 나노입자 프로브 제조를 위한 금 나노입자에 대한 1차 항체의 결합 방법의 일 실시예를 나타낸다.
- 도 2는 금 나노입자의 거리 또는 분포에 따른 시뮬레이션결과를 보여주고 있으며, 도 2의 a 부분은 이질염색질에 분포된 플라즈몬 금속 나노입자 프로브의 개략도를 나타내고, 도 2의 b 부분은 상기 개략도의 분포에서 플라즈몬 금속 나노입자 간의 거리에 따른 산란 스펙트럼을 나타내고, 도 2의 c 부분은 플라즈몬 금속 나노입자 프로브의 분포에 따른 산란 스펙트럼 피크($\lambda_{\max}$)의 경향을 나타낸다.
- 도 3은 세포핵 내 OIS 과정 동안 각 시점에 재분포되는 단일 히스톤 마커(H3K9me3)에 결합한 금 나노입자 프로브의 암시야 산란 영상을 나타낸다.
- 도 4는 성장 세포 및 노화 세포에서 이질염색질의 히스톤 마커를 표적으로 하는 플라즈몬 금속 나노입자 프로브의 가상도 및 암시야 산란 영상이다. 스케일 바는 10 μm 이다.
- 도 5는 세포핵 내 OIS 과정 동안 각 시점에 재분포되는 단일 히스톤 마커(H3K9me3)에 결합한 유기 형광 프로브의 형광 영상을 나타낸다.
- 도 6a는 OIS 세포핵 내 여러 개의 지점에서 측정한 히스톤 마커(H3K9me3)에 결합한 금 나노입자 프로브의 재분포에 의한 산란 색 및 스펙트럼을 나타내고,
- 도 6b는 OIS 과정 동안 각 시점에 15개 이상 세포에서 측정한 50개의 산란 스펙트럼 최대 산란 파장($\lambda_{\max}$)분포를 나타내고,
- 도 6c는 OIS 과정 동안 각 시점에 금 나노입자 프로브의 최대 산란 파장 변화를 나타낸다.
- 도 7은 금 나노입자의 분포에 따른 광학 시뮬레이션에 관한 도면으로, a 부분은 금 나노입자의 트리머에서 헵타

머까지의 2D 분포를 나타내고, b 부분은 2D분포에서의 목표 최대 산란 파장($\lambda_{\max}$)에 따른 산란 스펙트럼을 나타내고, c 부분은 2D분포에서의 목표 최대 산란 파장($\lambda_{\max}$)에 따른 입자간 거리를 나타내고, d 부분은 금 나노입자의 옥타머, 노나머, 도데카머, 테트라데카머, 아이코사머까지의 3D 분포를 나타내고, e 부분은 3D분포에서의 목표 최대 산란 파장($\lambda_{\max}$)에 따른 산란 스펙트럼을 나타내고, f 부분은 3D분포에서의 목표 최대 산란 파장($\lambda_{\max}$)에 따른 입자간 거리를 나타낸다.

도 8은 금 나노입자 프로브로 구성된 2D 및 3D 분포에 따른 산란 스펙트럼의 시뮬레이션에 관한 도면으로, a 부분은 트리머, b 부분은 테트라머, c 부분은 펜타머, d 부분은 헥사머, e 부분은 중심 금 나노입자를 가진 헥사머, f 부분은 헵타머, g 부분은 옥타머, h 부분은 노나머, i 부분은 도데카머, j 부분은 중심 금 나노입자를 가진 도데카머, k 부분은 테트라데카머, l 부분은 아이코사머, m 부분은 중심 금 나노입자를 가진 아이코사머를 나타낸다.

도 9는 모든 금 나노입자 프로브가 같은 방향으로 부착되어 있다고 가정하고, 금 나노입자 프로브간의 거리를 기반으로 히스톤 마커 사이의 거리를 판단하는 개략도이다.

도 10a는 동종의 금 나노입자 및 이종의 금과 은 나노입자를 이용하여 이중 히스톤 마커(H3K9me3 및 H3K27me3)의 분석에 적용할 때의 개념도이고(좌:동종의 나노입자, 우:이종의 나노입자),

도 10b는 이중 히스톤 마커에 대한 4-OHT 처리 후 14시간에서의 세포핵 암시야 산란 영상이며(좌:동종의 나노입자, 우:이종의 나노입자),

도 10c는 암시야 산란 영상으로 뭉쳐진 산란 색을 단일 산란 색으로 분류하는 픽셀을 나타내고(좌:동종의 나노입자, 우:이종의 나노입자),

도 10d는 관찰된 산란 색 및 산란 스펙트럼을 나타내고(좌:동종의 나노입자, 우:이종의 나노입자),

도 10e는 10c에서 분류된 단일 픽셀에서의 산란 스펙트럼 및 평균 스펙트럼을 나타내고(상:동종의 나노입자, 하:이종의 나노입자),

도 10f는 15개 이상 세포에서 측정한 50개의 산란 스펙트럼의 최대 산란 파장($\lambda_{\max}$)분포를 나타낸다(좌:동종의 나노입자, 우:이종의 나노입자).

도 11은 금 나노입자 프로브(중심) 및 은 나노입자 프로브(위성)로 구성된 2D 및 3D 분포에 따른 산란 스펙트럼의 시뮬레이션에 관한 도면이다.

도 12는 시뮬레이션으로 분석한 이중 히스톤 마커(H3K9me3 및 H3K27me3)에 결합한 금 나노입자 프로브의 산란 스펙트럼과 최대 산란 파장의 변동 범위를 나타낸다.

도 13은 단일 히스톤 마커(H3K9me3)에 금 나노입자 프로브를 이용한 시뮬레이션과 측정된 산란 스펙트럼의 상관을 나타낸다.

도 14는 시뮬레이션으로 분석한 H3K9me3 및 H3K27me3에 각각 결합한 금 나노입자 프로브 및 은 나노입자 프로브의 산란 스펙트럼과 최대 산란 파장의 변동 범위를 나타낸다.

도 15는 이중 히스톤 마커에 결합한 동종의 금 나노입자 프로브의 시뮬레이션과 측정된 산란 스펙트럼의 상관을 나타낸다.

도 16은 H3K9me3 및 H3K27me3에 각각 결합한 금 나노입자 프로브 및 은 나노입자 프로브의 시뮬레이션과 측정된 산란 스펙트럼의 상관을 나타낸다.

도 17은 도 16의 우측에 제시된 시뮬레이션과 측정된 산란 스펙트럼의 상관을 기반으로 히스톤 마커간의 거리를 분석한 것을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 실시 형태는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시 형태로 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 실시 형태는 당해 기술분야에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명

을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다.

- [0026] 나아가, 명세서 전체에서 어떤 구성요소를 "포함"한다는 것은 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0028] 본 발명의 일 측면은,
- [0029] 세포핵 내부에 검출 대상 단백질들을 포함하는 세포에 상기 단백질에 대한 항체와 플라즈몬 금속 나노입자의 결합체를 포함하는 프로브를 처리하는 단계(단계 1);
- [0030] 상기 세포에 대한 프로브의 산란 이미지와 파장에 따른 스펙트럼을 얻는 단계(단계 2); 및
- [0031] 상기 스펙트럼을 분석하여 상기 단백질들의 분포 정보를 획득하는 단계(단계 3);를 포함하는, 세포핵 내 단백질 분포 검출 방법을 제공한다.
- [0032] 상기 검출 방법은 임의의 분포 정보와의 비교를 통하여 분포 변화를 판단하는 단계(단계 4)를 더 포함하여, 세포핵 내 단백질 분포의 변화를 검출하는 방법을 제공할 수 있다.
- [0033] 상기 검출 방법과 유사한 다른 측면에서 본 발명은, 세포핵 내부에 검출 대상 단백질들을 포함하는 세포에 상기 단백질에 대한 항체와 플라즈몬 금속 나노입자의 결합체로 구성된 프로브를 처리하는 단계(단계 1');
- [0034] 상기 세포의 제1 시점과 제2 시점에서의 프로브의 산란 이미지와 파장에 따른 스펙트럼을 얻는 단계(단계 2'); 및
- [0035] 상기 스펙트럼을 분석하여 상기 제1 시점과 상기 제2 시점에서의 단백질들의 분포 정보를 획득하는 단계(단계 3'); 및
- [0036] 상기 제1 시점과 상기 제2 시점 사이의 상기 세포핵 내 검출 대상 단백질의 공간 내 분포 변화를 판단하는 단계(단계 4');를 포함하는, 세포핵 내 단백질 분포 변화 검출 방법을 제공한다.
- [0038] 상기 검출 방법에 대해서 설명한다.
- [0039] 상기 검출의 대상이 되는 단백질의 분포 정보는 검출 대상 단백질들에 있어서 단백질들의 거리에 따라 플라즈몬 커플링의 결과 스펙트럼 변화가 발생하게 되므로, 상기 분포 정보는 스펙트럼의 변화를 발생시키게 되는 정보를 의미하게 되며, 이는 기본적으로는 단백질들간의 거리에 관한 정보를 포함하며, 나아가 단백질들의 분포, 단백질들의 응집도, 단백질들의 분포나 응집 패턴 등의 정보를 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 단백질의 분포나 응집 패턴으로는 트리머, 테트라머, 펜타머, 헥사머, 헥사머*, 헵타머 등을 포함한다. 상기 응집 패턴 내에서 입자간의 거리에 관한 정보가 포함될 수 있다.
- [0041] 첫 번째 단계는 프로브를 처리하는 단계(단계1 및 단계1')이다.
- [0042] 상기 세포핵은 살아있는 세포 또는 죽은 세포를 모두 포함하며, 살아있는 세포를 대상으로 하는 경우, 살아있는 세포에 대한 단백질의 분포 정보를 실시간으로 얻을 수 있다.
- [0043] 상기 단백질은 핵내외의 단백질을 포함하나, 특히 핵내의 단백질을 포함하며, 상기 핵내의 단백질의 일례로 히스톤 단백질을 포함한다, 상기 히스톤 단백질은 이질염색질의 마커가 될 수 있는 수식화된 히스톤을 포함한다. 상기 단백질은 단백질의 전체가 될 수도 있고, 해당 단백질의 특정 영역(domain)을 의미할 수도 있다.
- [0044] 상기 수식화의 일례로 메틸화가 있으며, 수식화된 히스톤은 H3K9me3, H3K27me3, H3K56me3, H3K64me3 및 H4K20me3 등을 포함한다.
- [0045] 상기 프로브는 상기 검출 대상 단백질에 대한 항체와 항체와 결합되는 플라즈몬 금속 나노입자를 포함한다.
- [0046] 상기 항체는 검출 대상 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 의미한다. 상기 항체는 공지된 항체로부터 선택하여 이용 가능하다.
- [0047] 상기 플라즈몬 금속 나노입자는 표면 플라즈몬 공명 현상을 일으킬 수 있는 금속 나노입자를 의미한다. 입자의 크기는 5 내지 100 nm, 30 내지 50 nm 범위에서 선택될 수 있다.

- [0049] 이때, 상기 플라즈몬 금속 나노입자의 평균 직경이 5 nm 미만이면 산란 색을 효과적으로 시각화할 수 없는 문제가 발생하고, 100 nm 초과이면 세포로 효과적으로 침투할 수 없는 문제가 발생한다. 또한, 상기 금속 나노입자는 플라즈몬 공명 효과(Plasmonic resonance effect)를 나타내는 금속을 이용할 수 있으며, 구체적인 예로는 금(Au) 나노입자, 은(Ag) 나노입자, 또는 금(Au) 나노입자와 은(Ag) 나노입자를 함께 이용할 수 있다. 상기 플라즈몬 공명 효과는 흡광도 및 산란 스펙트럼으로 확인이 이 가능하고, 특히 2개 이상의 플라즈몬 금속 나노입자가 근접하게 위치할 때, 흡광도 및 산란 스펙트럼의 이동을 유도하는데, 이를 플라즈몬 커플링 효과라고 한다. 상기 플라즈몬 커플링 효과는 동종의 금속 나노입자간에도 발생하지만, 이종의 금속 나노입자간에는 동종의 금속 나노입자간의 플라즈몬 커플링 효과와 차별화되는 바이메탈 플라즈몬 커플링 효과가 나타난다. 은의 파장에 따른 굴절률의 변화가 금에 비해 더 크기 때문에 은의 광학 특성은 입사 파장에 따라 더 광범위하게 변한다. 따라서 금 나노입자와 은 나노입자 사이의 바이메탈 플라즈몬 효과 스펙트럼은 광범위하고, 독특한 다중 피크의 스펙트럼을 보여준다. 이러한 광범위하고, 독특한 스펙트럼은 한 종류의 금속 나노입자를 이용하는 것보다 나노입자의 분포를 더 정확하게 분석할 수 있게 한다.
- [0050] 상기 검출 방법에 있어서, 두 번째 단계는 스펙트럼을 얻는 단계(단계2; 단계2')이다.
- [0051] 상기 스펙트럼은 표면 플라즈몬 공명 현상에 따른 암시야 현미경 산란 영상을 얻는 단계에서 시작한다. 그리고, 상기 영상에 있어서 파장에 따른 산란 스펙트럼을 포함하며, 상기 스펙트럼은 특정 위치에서의 프로브의 산란 이미지와 파장에 따른 스펙트럼일 수 있다. 상기 특정 위치는 특정 금속 나노입자의 위치이며, 이 위치는 해당 프로브가 결합된 검출 대상 단백질 또는 단백질의 특정 도메인의 위치로 해석할 수 있다. 상기 스펙트럼은 주변에 영향을 미치는 또 다른 플라즈몬 금속 나노입자와의 거리에 따라서 변화한다. 주변의 금속 나노입자는 동일 또는 서로 다른 금속 나노입자일 수 있다. 상기 특정 위치는 프로브의 금속 나노입자와 무관하게 기준이 되는 세포핵내의 특정 위치가 될 수도 있다. 해당 위치에서의 표면 플라즈몬 공명 현상에 따른 스펙트럼을 얻음으로써, 해당 위치에 있어서의 금속 나노입자의 분포, 결국 금속 나노입자가 결합된 단백질의 분포를 해석할 수 있다. 단계 2'은 동일한 세포에 대해서 시점을 달리하여 스펙트럼을 얻는 것이다. 상기 스펙트럼을 얻는 단계는 측정 영역내의 소정 개수의 위치를 선정한 후, 각 위치별로 각 위치에 있어서의 산란 스펙트럼을 얻고, 각 위치에서의 산란 스펙트럼의 피크가 나타나는 파장을 구하고, 이어서 각 피크의 파장 분포율에 관한 정보를 획득하는 단계를 더 포함한다. 각 피크의 파장은 일정 파장 영역으로 분할할 수 있고, 파장 영역은 1 내지 100 nm 단위로 임의로 설정할 수 있다.
- [0052] 상기 분포율은 동일한 측정 세포핵에 대하여 시계열적인 변화를 구하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 검출 방법에 있어서, 세 번째 단계는 단백질의 분포 정보를 획득하는 단계(단계3; 단계3')이다.
- [0053] 상기 분포 정보는 앞서 얻은 스펙트럼으로부터 해석에 의해서 얻을 수 있으며, 해석을 위해서는 분포 정보가 알려진 스펙트럼을 미리 준비하여 이와 비교를 통하여 해석할 수 있다.
- [0054] 상기 분포 정보가 알려진 스펙트럼은 실제 측정 또는 시뮬레이션을 통하여 얻어진 것을 포함하되, 본 발명에서는 일례로 시뮬레이션을 통하여 얻는 것을 포함한다. 시뮬레이션은 금속 나노입자의 거리 및 분포에 있어서, 트리머, 테트라머, 펜타머, 헥사머 등의 분포 또는 응집 패턴별로 시뮬레이션 수행하는 것을 포함한다. 그리고, 각 패턴별로 거리에 따른 산란 스펙트럼을 시뮬레이션하는 것을 포함할 수 있고, 패턴별로 시뮬레이션을 통해 얻어진 산란 스펙트럼을 분석하는 것을 더 포함할 수 있다. 특정 피크 파장에 대해서 각 패턴에 있어서의 입자간 거리에 대한 정보를 생성할 수 있다. 상기 시뮬레이션은 동종의 금속 나노입자를 포함하는 프로브, 서로 다른 금속 입자를 포함하는 프로브를 사용하는 경우마다 수행할 수 있다. 검출하고자 하는 단백질이 1종 이상인 경우를 포함하며, 예를 들면 1종 또는 2종을 포함한다. 상기 단백질은 하나의 단백질 내의 서로 다른 도메인 각각을 의미할 수 있다. 상기 도메인은 서로 다른 단백질에 위치할 수 있다. 단계 3'은 동일한 세포에 대해서 시점을 달리하여 얻은 스펙트럼으로부터 단백질들의 분포 정보를 얻는 것이다. 상기 분포 정보를 통해 세포의 노화 단계를 판단할 수 있다. 세포핵 내 단백질은 세포의 노화 단계에 따라서 공간 내 분포가 변화하게 되며, 예를 들면, 이질염색질의 마커인 수식화된 히스톤은 세포의 성장, 즉 노화 단계에 따라서 공간 내 재배치가 발생하게 된다. 따라서, 세포 분포 정보와 세포의 성장 또는 노화 단계에 관한 사전 정보를 미리 준비함으로써, 세포의 분포 정보를 해석하여 세포의 성장 또는 노화 단계를 판단할 수 있다.
- [0055] 상기 검출 방법에 있어서, 네 번째 단계는 단백질의 분포 변화를 판단하는 단계(단계4; 단계4')이다.
- [0056] 단계 3에서 얻은 단백질의 분포 정보를 임의의 분포 정보와 비교하여 분포 변화를 판단하는 단계이며, 상기 임의의 분포 정보는 동일한 세포핵의 임의 시점에서의 분포 정보이거나, 또 다른 세포핵의 분포 정보일 수 있다. 두 분포 정보의 비교를 통하여 분포 변화를 판단할 수 있다. 동일한 세포핵을 대상으로 임의의 두 시점에서 얻

은 스펙트럼을 통해 단백질들의 분포 정보를 얻고, 이를 비교하여 단백질들의 공간 내 분포 변화를 판단할 수 있다(단계 4').

- [0058] 본 발명의 또 다른 일 측면은,
- [0059] 세포핵 내 이질염색질의 히스톤 마커들에 상기 히스톤 마커에 대한 항체와 플라즈몬 금속 나노입자의 결합체로 구성된 프로브를 처리하는 단계;
- [0060] 상기 세포핵에 대한 프로브의 산란 이미지와 파장에 따른 스펙트럼을 얻는 단계;
- [0061] 상기 스펙트럼을 분석하여 상기 히스톤 마커들의 분포 정보를 획득하는 단계를 포함하는, 세포핵 내 이질염색질의 히스톤 마커 검출 방법을 제공한다.
- [0062] 상기 히스톤 마커 검출 방법의 구성요소에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0063] 본 발명의 또 다른 일 측면은,
- [0064] 세포핵 내 이질염색질의 히스톤 마커 항체가 결합된 플라즈몬 금속 나노입자를 포함하는 세포핵 내 이질염색질의 히스톤 마커간의 거리에 기반한 정보 검출용 프로브를 제공한다.
- [0065] 상기 검출용 프로브의 구성요소에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0066] 본 발명의 또 다른 측면에서, 플라즈몬 금속 나노입자는 서로간의 거리가 가까워지고 응집도가 높아지는 분포의 변화에 따라서 산란 스펙트럼에 있어서 적색 파장으로의 시프트가 발생하게 된다. 따라서, 산란 스펙트럼에 있어서 장파장으로의 시프트가 보이는 경우, 이는 검출하고자 하는 단백질들간의 거리가 가까워지거나 응집도가 높아지는 공간내 분포 변화가 일어나는 것을 의미한다.
- [0067] 본 발명의 또 다른 측면에서, 세포 내에서 이질 염색질은 세포의 노화에 따라서 대체적으로 측정 영역내의 파장대의 분포율에 변화가 생긴다. 측정 영역내에 존재하는 각 측정 위치마다의 스펙트럼의 분석을 통하여 파장대의 분포율 분석을 통하여 세포의 노화 정도를 판단할 수 있다. 이때 세포의 노화에 따라서 파장 범위 530~570 nm대의 분포율은 감소하고, 파장 범위 570~640 nm의 분포율은 증가한다.
- [0069] 이하, 본 발명을 제조예, 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0070] 단, 하기의 제조예, 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용과 범위가 하기 내용으로 한정되는 것은 아니다.
- [0072] **실험 내용:**
- [0073] 1. 재료 준비
- [0074] Dulbecco의 변형된 Eagle 배지(DMEM)와 페니실린/스트렙토마이신(PenStrep)은 Gibco-Life Technologies(Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. 태아 소 혈청(FBS)은 MP Biomedicals(Irvine, CA, USA)에서 구입하였다. 소 혈청 알부민(BSA), 인산 완충 식염수(PBS) 및 40 nm 은 나노입자(SNP)는 Sigma-Aldrich(St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 40 nm 금 나노입자(GNP)는 BBI Solutions(Crumlin, UK)에서 구입하였다. 항-히스톤 H3(트리 메틸 K9) 항체 및 항-히스톤 H3(트리 메틸 K27) 항체는 Abcam(Cambridge, MA, USA)에서 구입하였다.
- [0075] 2. 항체와 플라즈몬 금속 나노입자의 결합
- [0076] 도 1에 도시된 바와 같이 플라즈몬 금속 나노입자에 대한 항체의 생체 결합은 다음 절차를 이용하여 세포속신이 미달 6-[3'-(2-피리딜디티오)-프로피온아미도] 헥사노에이트 (Sulfo-LC-SPDP, 21650, Thermo)를 이용하여 수행되었다. 총 100 μ M 설폰-LC-SPDP를 이용 직전에 초순수에 준비하였다. 그런 다음, 25 μ L의 설폰-LC-SPDP를 0.5 mL의 PBS-EDTA(100 mM 인산나트륨, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 0.02% 아지드화나트륨, pH 7.5) 0.5 mL에 용해된 10 μ g IgG에 첨가하고 30분 동안 실온(RT)에서 인큐베이션하였다. 결합된 항체는 10K MWCO 원심분리 필터(Millipore)를 이용하여 40 mM HEPES 완충액으로 교환되었다. 플라즈몬 금속 나노입자(40 nm 금 나노입자 및 40

nm 은 나노입자)를 원심분리(3000 x g, 15분)하고 항체 결합 전에 40 mM HEPES 완충액에 재현탁시켰다. 플라즈몬 금속 나노입자와 항체를 1:250 몰비로 혼합하고 4° C에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0077] 3. 레트로바이러스 발현 벡터의 구축 및 레트로바이러스 생산

[0078] ΔB-Raf:ER 융합 단백질은 생쥐 B-Raf(449-804aa)의 단백질 키나제 도메인과 생쥐 에스트로젠 수용체의 호르몬 결합 영역의 돌연변이 형태(281-599aa, 단일 아미노산이 525에서 글리신에서 아르기닌으로 치환)로 구성되며, 이들은 4-하이드록시 타목시펜(4-OHT)에 의해 발현이 유도된다. 1 mM의 4-OHT를 에탄올에 제조하여 100 nM 농도로 희석하여 이용하였다.

[0079] 4. OIS 세포 배양

[0080] 인간 폐 섬유아세포인 IMR-90 세포를 ATCC(#CCL-186)에서 구입하였다. IMR90 세포는 ΔB-Raf:ER을 인코딩하는 레트로바이러스로 형질도입 되었다. 세포는 10% 소 태아 혈청(FBS), 100 IU/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신이 보충된 Eagle's Minimum Essential Medium(MEM; #10-009-CV, Corning)에서 배양되었다. 모든 세포는 37° C에서 5% CO₂를 포함하는 가습 공기 하에 배양되었다.

[0081] 5. 플라즈몬 금속 나노입자 프로브를 이용한 세포 배양

[0082] OIS 세포를 처리하기 전에 플라즈몬 금속 나노입자 프로브를 0.1% BSA 차단 용액에 희석하였다. OIS 세포를 4% 파라포름알데히드(PFA)로 15분 동안 고정하고 실온에서 PBS로 세척하였다. 투과화는 PBS에서 10분 동안 0.4% Triton X-100을 이용하고 PBST(PBS에서 0.05% Tween-20)로 3회 세척한 후 5분 동안 수행하였다. PBST에서 5% BSA로 세포를 1시간 동안 차단한 후, 플라즈몬 금속 나노입자 프로브를 처리하고 4° C에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0083] 6. 암시야 현미경을 통한 단일 OIS 세포 영상화

[0084] 초분광 영상화 분광 광도계(CytoViva, Auburn, AL, USA)가 장착된 암시야 현미경(Olympus BX43, Tokyo, Japan)을 이용하여 플라즈몬 금속 나노입자 프로브가 표적으로 하는 히스톤 코드의 영상화 및 다양한 OIS 시간동안 세포의 산란 스펙트럼 측정하였다. 영상화를 위해 40× 대물렌즈를 이용하였으며, 산란 스펙트럼을 수집하기 위한 노출 시간은 0.3초였다.

[0085] 7. 플라즈몬 금속 나노입자 프로브의 산란 스펙트럼의 시뮬레이션 분석

[0086] 거리, 숫자, 분포에 따른 플라즈몬 금속 나노입자의 광학 거동을 판단하기 위해 파동 광학 시뮬레이션을 수행하였다. 400-800 nm 파장의 평면 전자파를 적용하였다. 모든 시뮬레이션은 상용 소프트웨어 (COMSOL Multiphysics 5.4)를 이용하여 수행되었다.

[0087] 8. 1차 항체와 형광 염료가 결합한 2차항체를 이용한 기존의 유기 형광 프로브

[0088] 세포를 PBS로 세척하고, 4% 파라포름알데히드를 포함한 PBS로 실온에서 15분 동안 고정한다. 0.4% Triton X-100을 포함한 PBS로 5분 동안 투과한 다음, PBST (0.05% Tween 20을 함유하는 PBS)로 세척하였다. 세포를 실온에서 1시간 동안 5% BSA를 함유하는 PBST를 처리하여 블로킹 후 1차 항체를 처리하여 밤새(16시간) 인큐베이션하였다. PBST 완충액으로 세척 후, 세포를 Alexa Fluor® 488(Invitrogen A-11034)이 결합된 2차항체(1:500)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 다시 PBST 완충액으로 세척 후, 슬라이드 글라스에 올려 관찰하였다.

[0089] <실시예 1> 금 나노입자간의 분포 및 응집도에 따른 스펙트럼 시뮬레이션

[0090] 금 나노입자간의 분포 및 응집도에 따른 광학적 특성을 알아보기 위해 다양한 분포와 입자간 거리에 대한 시뮬레이션을 수행하였다. 도 2에 도시된 바와 같이 산란 스펙트럼은 금 나노입자(GNP)가 가까워지고, 금 나노입자의 수(N_{GNP})가 증가함에 따라 적색 편이를 나타낸다. 이러한 금 입자간의 거리 및 분포에 따라 달라지는 스펙트럼의 변화를 이용하여, 세포핵 내에서의 표적 단백질의 공간내 분포 변화를 검출할 수 있다.

[0092] <실시예 2> 금 나노입자 프로브를 이용한 OIS 세포에서 H3K9me3 재분포 영상화

[0093] IMR90-ΔB-RAF:ER세포에 4-OHT를 처리하면 ΔB-RAF:ER 융합 단백질이 안정화되어 IMR90-ΔB-RAF:ER세포에서 OIS 과정이 시작된다. OIS 세포에서 억제성 히스톤 마커 H3K9me3의 재분포를 시각화하기 위해, H3K9me3 항체와

금 나노입자가 결합체로 구성된 플라즈몬 금 나노입자 프로브를 이용하였다. OIS 세포에서 플라즈몬 나노 프로브의 산란 색상과 스펙트럼은 분광 광도계와 결합된 암시야 현미경을 통해 수집되었다. 세포당 50개의 임의 지점에서 산란 스펙트럼을 측정하였다. 도 3에 도시된 바와 같이 플라즈몬 금 나노입자 프로브를 이용할 때, 플라즈몬 커플링 효과로 인해 OIS 과정 동안 표적 히스톤 마커 간의 거리가 가까워짐에 따라 다양한 산란 색상이 나타나는 시각화된 영상을 얻는다. 플라즈몬 금 나노입자 프로브를 이용한 세포핵의 산란 이미지는 OIS 과정 동안 녹색에서 노란색 또는 주황색으로 점진적인 색상 변화를 나타낸다. 또한, 노화 세포에서는 SAHF의 형성이 관찰된다.

[0094] 성장 세포와 노화 세포에 있어서의 이질 염색질의 공간 분포를 고려하여 이질 염색질에 특이적인 항체를 결합한 금 나노입자 프로브가 이질 염색질에 결합하였을 때의 가상도 및 암시야 산란 영상을 도 4에 나타내었다. 도 4의 암시야 산란 영상은 4-OHT를 처리 후 0시간과 144시간에 대응된다.

[0095] 한편, 후술할 비교예 1의 유기 형광체를 이용하여 얻은 영상은 도 5에서 확인되는 바와 같이, 형광 색상의 변화가 나타나지 않고 전체적으로 해상도가 높지 않으며 SAHF의 형성도 명확하게 확인되지 않는다.

[0096] 도 6a에 도시된 바와 같이 OIS 세포핵 내 여러 개의 지점에서 측정한 히스톤 마커(H3K9me3)에 결합한 금 나노입자 프로브의 재분포에 의한 산란 색 및 스펙트럼을 측정한다. 도 6b 및 도 6c에 도시된 바와 같이 4-OHT 처리 후 지정된 시간 동안 임의의 지점마다 산란 스펙트럼을 얻되, 50개 지점에서 각 지점에 대응되는 산란 스펙트럼을 얻은 후, 10 nm 파장 간격으로 산란 양상을 체계적으로 분석한다. 도 6b 및 도 6c와 같이 산란 피크의 분석을 기반으로 OIS 과정 동안 산란 피크의 분포가 동적으로 변화하는 것을 알 수 있다. 성장 세포(4-OHT 처리 전)에서 대부분의 산란 지점은 원래 금 나노입자 프로브의 산란 파장에 가까운 530~560 nm 범위의 피크를 보인다. OIS가 진행됨에 따라 파장 범위 530~570 nm의 피크는 감소했지만 570~640 nm의 피크는 눈에 띄게 증가한다. 4-OHT 처리 후 144시간에 명백한 SAHF가 형성되었으며, 570~580 nm 범위에서 가장 큰 산란 피크 집단이 관찰된다. 600 nm(최대 640 nm) 이상의 파장의 산란 피크는 노화된 세포 핵에서 노란색과 주황색으로 자주 관찰된다. 이러한 피크 파장 변화는 OIS중 SAHF에서 표적 H3K9me3의 근접으로 인해 발생하는 금 나노입자 프로브 사이의 강력한 플라즈몬 커플링으로 인해 발생한다.

[0098] <비교예 1> 기존의 유기 형광 프로브를 이용한 OIS세포에서 H3K9me3 재분포 영상화

[0099] 상기 실시예 2와 유사한 방법으로, 이용한 금 나노입자 프로브를 기존의 유기 형광 프로브로 변경하여 실시하였다. 도 5에 도시된 바와 같이 4-OHT가 없는 경우 H3K9me3 1차 항체와 형광 염료가 결합한 2차항체를 이용한 기존의 형광 프로브는 세포의 핵에서 H3K9me3의 확산 패턴을 시각화한다. 4-OHT로 48시간 처리한 후, H3K9me3이 무리를 이룬다. 144시간 후, SAHF가 확실히 들어나는데, 이는 OIS가 공간적으로 이질염색질을 재분포하는 것을 시사한다. 그러나 기존의 유기 형광단으로 부터의 방출색의 번짐현상으로 인해 SAHF에서 밀집하게 분포된 H3K9me3의 해상도는 OIS 동안 H3K9me3의 공간적 재분포를 조사하기에는 너무 제한적이다. 또한, 형광 프로브가 결합한 H3K9me3 수식화는 분포 변화에 관계없이 동일한 녹색 방출 색상을 나타낸다.

[0101] <실시예 3> 금 나노입자 프로브를 이용한 OIS 세포에서 H3K9me3 재분포 시뮬레이션 분석

[0102] 도 7에 도시된 바와 같이, 입자간 거리와 OIS 세포핵 내 분포에 따른 금 나노입자 프로브의 산란 신호를 더욱 이해하기 위해 컴퓨터 시뮬레이션을 수행하였다. 2차원(2D)과 3차원(3D)을 포함한 다양한 구성들을 서로 다른 입자 수(N_{GNP})와 입자간 거리(d_{GNP})를 고려하여 시뮬레이션 한다. 도 7의 a 부분 및 d 부분에 도시된 바와 같이 광학 시뮬레이션 영역은 영상화를 위해 금 나노입자가 유리 위에 놓인 채로 마운팅 솔루션과 유사한 굴절률의 물에 잠긴 형태로 구성된다. 입사광의 평면파는 z 방향을 따라 전파된다. 금 나노입자의 2D 분포의 경우 6가지 유형의 일반적인 구조가 고려된다: 트리머($N_{GNP} = 3$), 테트라머($N_{GNP} = 4$), 펜타머($N_{GNP} = 5$), 헥사머($N_{GNP} = 6$), 중심 금 나노입자가 있는 헥사머(즉, 헥사머*, $N_{GNP} = 7$) 및 헵타머($N_{GNP} = 7$). 금 나노입자의 3차원 분포의 경우, 5가지 가능한 구조가 고려된다: 옥타머($N_{GNP} = 8$), 노나머($N_{GNP} = 9$), 도데카머($N_{GNP} = 12$), 테트라데카머($N_{GNP} = 14$) 및 아이코사머($N_{GNP} = 20$). 옥타머, 도데카머, 아이코사머의 경우 금 나노입자는 이러한 다면체의 꼭짓점에 배치된다. 노나머 및 테트라데카머의 경우 금 나노입자는 옥타머의 내부에 추가된다. 입자간 거리의 영향을 조사하기 위해 금 나노입자와 가장 가까운 입자 사이의 거리로 결정되는 d_{GNP} 는 1 nm에서 9 nm까지 다양하

게 고려한다.

[0103] 먼저, 금 나노입자 기반 구조의 광학적 특성을 특징화하기 위해 다양한 분포와 입자간 거리에 대한 시뮬레이션을 수행한다. 도 8에 도시된 바와 같이 산란 스펙트럼은 금 나노입자가 가까워지고, N_{GNP} 가 증가함에 따라 적색편이를 나타낸다. 도 6a 내지 6c에서 관찰된 실험 결과와 연관시키기 위해, 도 7의 b 부분 및 e 부분에 λ_{max} 가 주요 산란 피크(580 nm, 600 nm, 620 nm 및 640 nm)인 스펙트럼을 나타낸다. 결과는 일반적으로 λ_{max} 가 증가하고 N_{GNP} 가 증가함에 따라 산란 스펙트럼의 강도가 증가함을 보여주었다.

[0104] 다음으로, λ_{max} 에 따른 각 분포의 d_{GNP} 는 도 7의 c 부분 및 f 부분에 도시되어 있다. λ_{max} 가 580 nm일 때 금 나노입자 구조 간의 d_{GNP} 는 넓은 범위에 분포하는 반면, 금 나노입자 분포에 따른 d_{GNP} 의 차이는 λ_{max} 가 증가함에 따라 감소한다. 이러한 시뮬레이션 결과를 고려하여 도 9에 도시된 바와 같이 모든 금 나노입자 프로브가 동일한 방향으로 부착되었다고 가정하고, 금 나노입자 프로브가 결합된 히스톤 마커 H3K9me3 사이의 거리를 판단한다. 히스톤 마커간의 거리는 금 나노입자 프로브간의 거리와 금나노입자 프로브의 직경(40 nm)의 합이다(즉, $d_{\text{히스톤 마커}} = d_{GNP} + 40 \text{ nm}$). 도 6a의 4-OHT 처리 후 144시간이 지난 실험 결과에서 산란 피크의 가장 높은 비율은 580 nm에서 나타난다. 도 7의 b, c, e 및 f 부분의 시뮬레이션 분석 결과에서 2D 및 3D분포에서 580 nm의 산란 최대 파장이 생기는 금 나노입자 프로브간의 거리는 3.4~10.7 nm이다. 따라서 4-OHT 처리 후 144시간이 지난 OIS 세포의 산란 영역에 여러 H3K9me3 마커는 43.4~50.7 nm의 평균 거리 내에 분포되어 있음을 의미한다. 마찬가지로 노화 세포에서 여러 산란 지점의 최대 피크가 약 640 nm라는 관찰은 금 나노입자 프로브가 결합한 H3K9me3은 해당 산란 영역에서 40.3 ~ 42.0 nm의 짧은 거리 내에 분포되어 있음을 나타낸다.

[0106] <실시예 4> 금 나노입자 프로브 및 은 나노입자 프로브를 이용한 OIS세포에서 H3K9me3 및 H3K27me3의 재분포 동시 영상화

[0107] 상기 실시예 3과 유사한 방법으로, 단일 히스톤 수식화(H3K9me3)에서 2개의 히스톤 수식화(H3K9me3 및 H3K27me3)의 동시 표적으로 변경하여 실시한다. 또한 H3K9me3 또는 H3K27me3 항체에 결합된 플라스몬 금속 나노입자 프로브는 두 가지의 다른 조합을 실시한다(도 10a 참조). 먼저 도 10a에 도시된 바와 같이 H3K9me3 및 H3K27me3 항체 모두에 금 나노입자가 결합된 프로브 및 H3K27me3 항체에 은 나노입자를 결합한 프로브를 준비하였다.

[0108] 실시예 4-1:

[0109] H3K9me3 항체 및 H3K27me3 항체에 모두 금 나노입자가 결합된 두 종류의 프로브를 이용하여 세포핵에 대하여 실시예 2와 유사하게 OIS에 따른 영상화를 수행하였다.

[0110] 실시예 4-2:

[0111] H3K9me3 항체에는 금 나노입자 및 H3K27me3 항체에 은 나노입자가 결합된 두 종류의 프로브를 이용하여 세포핵에 대하여 실시예 2와 유사하게 OIS에 따른 영상화를 수행하였다.

[0112] 두 경우 모두 단일 히스톤 수식화를 표적(도 3)의 경우보다 더 큰 산란 지점(도 10b, 10c)이 자주 관찰된다. 이는 H3K9me3 및 H3K27me3이 소형 SAHF를 구성하고 따라서 SAHF의 히스톤 마커를 표적으로 하는 플라스몬 나노입자 프로브의 수가 증가했기 때문이다. 따라서 도 10e에 도시된 바와 같이 각 지점에서 산란 신호를 수집하기 위해 단일 SAHF를 차지하는 픽셀에서 스펙트럼을 수집하고 평균화한다. H3K9me3의 단일 표적과 비교하여, H3K9me3 및 H3K27me3의 동시 표적은 산란 색상 및 강도의 급격한 변화를 보여주었으며(도 10d), 이는 산란 지점에 공존하는 플라스몬 나노입자 프로브 간의 더 강한 플라스몬 커플링 효과의 영향이다. 또한, 단일 히스톤 마커 영상(도 6b)과 비교하여 OIS 과정 동안 재분포된 H3K9me3 및 H3K27me3을 표적화할 때 700 nm에 달하는 더 큰 적색이동이 관찰된다. (도 10f)

[0114] <실시예 5> OIS세포에서 H3K9me3 및 H3K27me3에 분포된 나노입자 프로브의 광학적 특성에 대한 시뮬레이션 분석

[0115] 실시예 4-2에서 수행된 H3K9me3 및 H3K27me3를 표적화하기 위해 서로 다른 플라스몬 나노입자 프로브, 즉 40nm 금 나노입자 프로브 및 40nm 은 나노입자 프로브를 이용할 때 수집된 산란 양상이 다양하고 피크 이동 범위가

넓다. 도 11에 도시한 바와 같이 금 나노입자 프로브와 은 나노입자 프로브로 구성된 이중 플라즈몬 나노입자 프로브 분포의 광학 특성을 조사하기 위해 입자 간 거리를 변화시켜 가능한 2D 및 3D 분포에 대한 스펙트럼 시뮬레이션을 수행한다.

[0116] 도 12는 시뮬레이션으로 분석한 이중 히스톤 마커(H3K9me3 및 H3K27me3)에 결합한 금 나노입자 프로브의 산란 스펙트럼과 최대 산란 파장의 변동 범위를 나타내고, 도 13은 단일 히스톤 마커(H3K9me3)에 금 나노입자 프로브를 이용한 시뮬레이션과 측정된 산란 스펙트럼의 상관을 나타내고, 도 14는 시뮬레이션으로 분석한 H3K9me3 및 H3K27me3에 각각 결합한 금 나노입자 프로브 및 은 나노입자 프로브의 산란 스펙트럼과 최대 산란 파장의 변동 범위를 나타내고, 도 15는 이중의 히스톤 마커에 결합한 동종의 금 나노입자 프로브의 시뮬레이션과 측정된 산란 스펙트럼의 상관을 나타내고, 도 16은 H3K9me3 및 H3K27me3에 각각 결합한 금 나노입자 프로브 및 은 나노입자 프로브의 시뮬레이션과 측정된 산란 스펙트럼의 상관을 나타내고, 도 17은 도 16의 우측에 제시된 시뮬레이션과 측정된 산란 스펙트럼의 상관을 기반으로 히스톤 마커간의 거리를 분석한 것을 나타낸다.

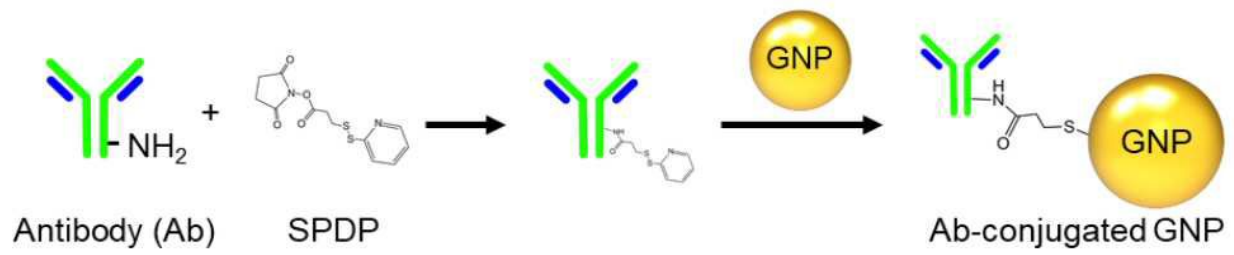
[0118] 금 나노입자 프로브/금 나노입자 프로브 결합 구조(도 12)와 비교할 때 은 나노입자 프로브/금 나노입자 프로브 결합 구조(도 14)는 입자간 거리가 변할 때 산란 스펙트럼에 대해 더 넓은 범위의 이동을 보여준다. 은의 파장에 따른 굴절률의 변화가 금에 비해 더 크기 때문에 은의 광학 특성은 입사 파장에 대해 더 동적으로 변한다. 또한 은 나노입자 프로브/금 나노입자 프로브 결합 3D 구조는 도 14의 하단 부분과 같이 독특한 다중 피크를 보여준다. 이러한 독특한 스펙트럼은 은 나노입자와 금 나노입자 프로브 사이의 바이메탈 플라즈몬 커플링 효과에서 발생한다. 은 나노입자 프로브/금 나노입자 프로브 결합 구조의 이러한 광범위하고 독특한 스펙트럼은 두 가지 다른 히스톤 수식화의 분포를 분석하는 데 유용할 수 있다. 즉, 한 종류의 나노입자 프로브를 이용하는 것보다 서로 다른 나노입자 프로브가 결합된 히스톤 마커의 분포를 보다 정확하게 분석할 수 있다.

[0119] 도 15는 두 가지 유형의 히스톤 마커(H3K9me3 및 H3K27me3)의 표적화에 대한 산란 스펙트럼을 보여준다. 도 15에 도시된 바와 같이 두 바이오 마커에 대한 금 나노입자 프로브로 표지했을 때, 관찰된 지점의 나노입자 프로브가 표지된 두 마커 사이의 거리는 46.0~47.0 nm로 판단된다. 이 결과는 표적 히스톤 수식화된 H3K9me3 및 H3K27me3이 각 뉴클레오솜의 크기(약 11-13 nm)를 고려하여 서로 다른 뉴클레오솜에 위치할 수 있음을 시사한다.

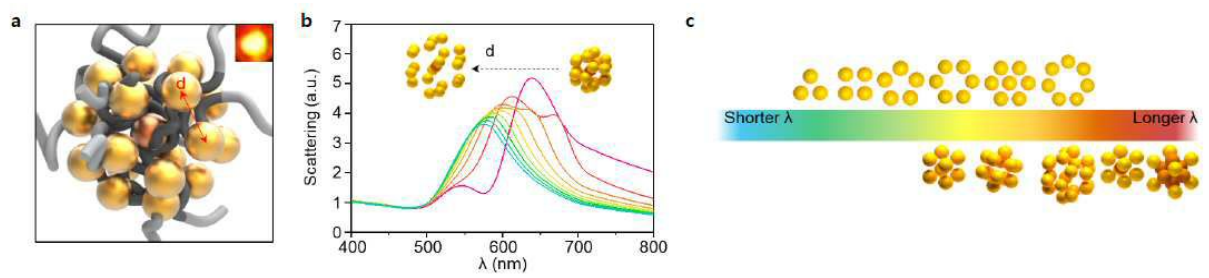
[0120] 도 16에 도시된 바와 같이 금 나노입자 프로브 및 은 나노입자 프로브를 함께 이용하면 도 15의 스펙트럼과 뚜렷한 차이가 난다. 도 16에 도시된 바와 같이 산란 지점에 따라, 스펙트럼 특징은 단일 지배 피크에서 강한 이중 피크까지 다양하다. 이러한 유의미한 차이는 시뮬레이션 결과에서도 확인할 수 있다. 2개의 서로 다른 나노입자 프로브를 이용한 이중 표적화로부터 보다 다양한 스펙트럼으로 많은 양의 정보를 얻고, 이를 바탕으로 실험과 시뮬레이션에서 얻은 스펙트럼을 정확하게 비교할 수 있다. 도 16의 히스톤 수식화는 각각 거리가 9.0 nm 및 3.0 nm인 중심 금 나노입자 프로브를 갖는 2D 헥사머* 및 3D 아이코사머의 형태로 판단된다. 위의 판단에 기초하여, 나노입자 프로브가 표지된 히스톤 수식화는 도 17에 도시된 바와 같이 핵내에서 43.0 nm 내지 49.0 nm 내에 위치하였음을 판단할 수 있다. 또한 이중 표적화 영상에서 수집된 스펙트럼을 기반으로 표적화된 히스톤 수식화가 3차원적으로 배치될 가능성을 확인하였다. 따라서 두 종류의 나노입자 프로브를 이용하여 얻은 독특하고 다양한 산란 스펙트럼은 핵에서 히스톤 수식화의 공간적 분포를 이해하는데 큰 도움이 될 수 있다. 이용한 나노입자 프로브의 직경(40 nm)과 뉴클레오솜의 크기(약 11-13 nm)를 고려할 때 단일 뉴클레오솜에서 다중 히스톤 수식화를 검출하고 핵의 모든 히스톤 마커를 표적화하는 것은 불가능하다. 그러나 히스톤 마커에 제안된 특이적인 나노입자 프로브(즉, 1차 항체 결합 플라즈몬 금속 나노입자)는 OIS 동안 표적 히스톤 마커의 분포에서 동적 변화를 성공적으로 추적할 수 있다.

도면

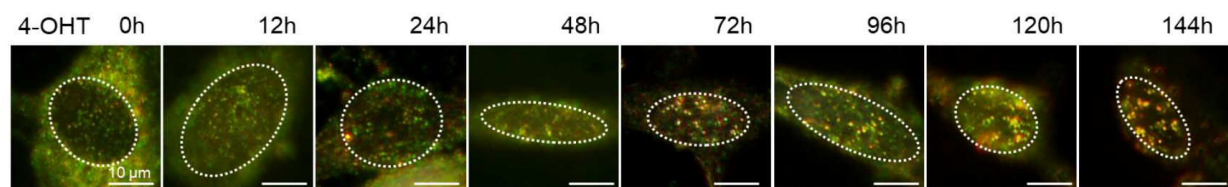
도면1



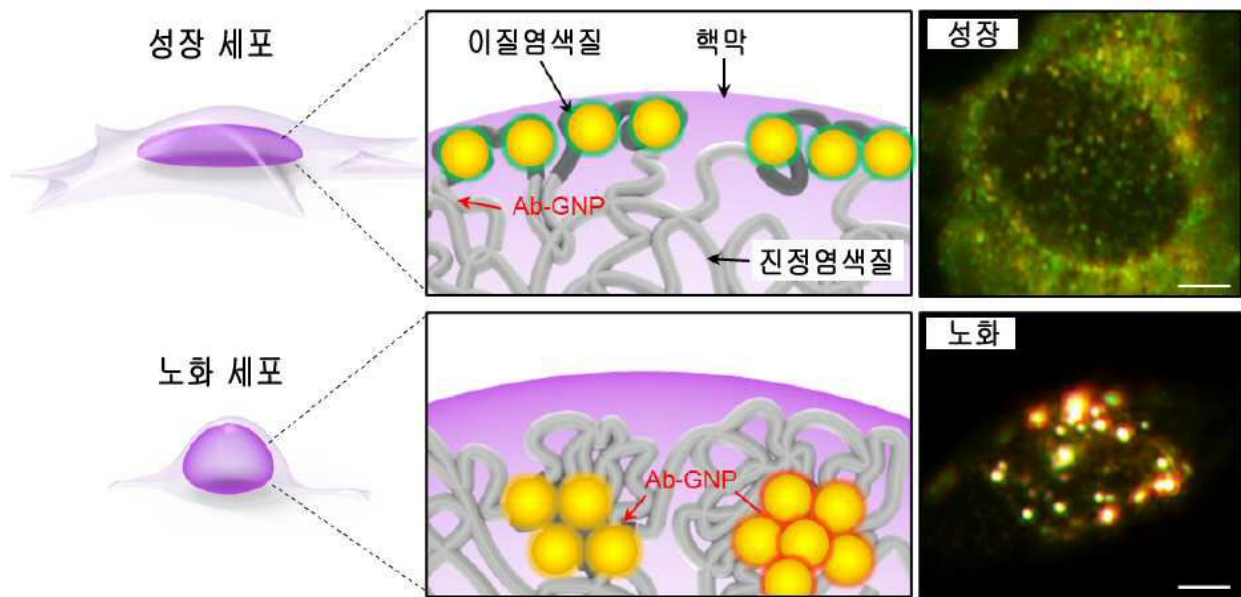
도면2



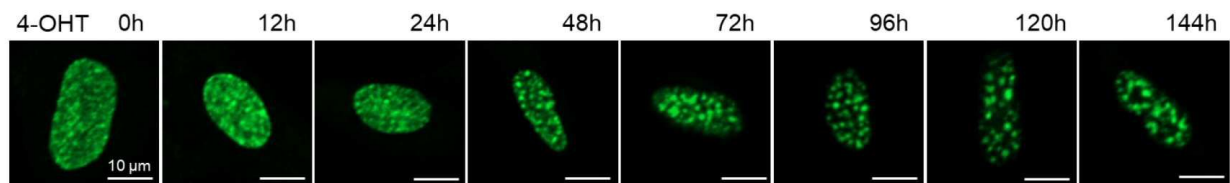
도면3



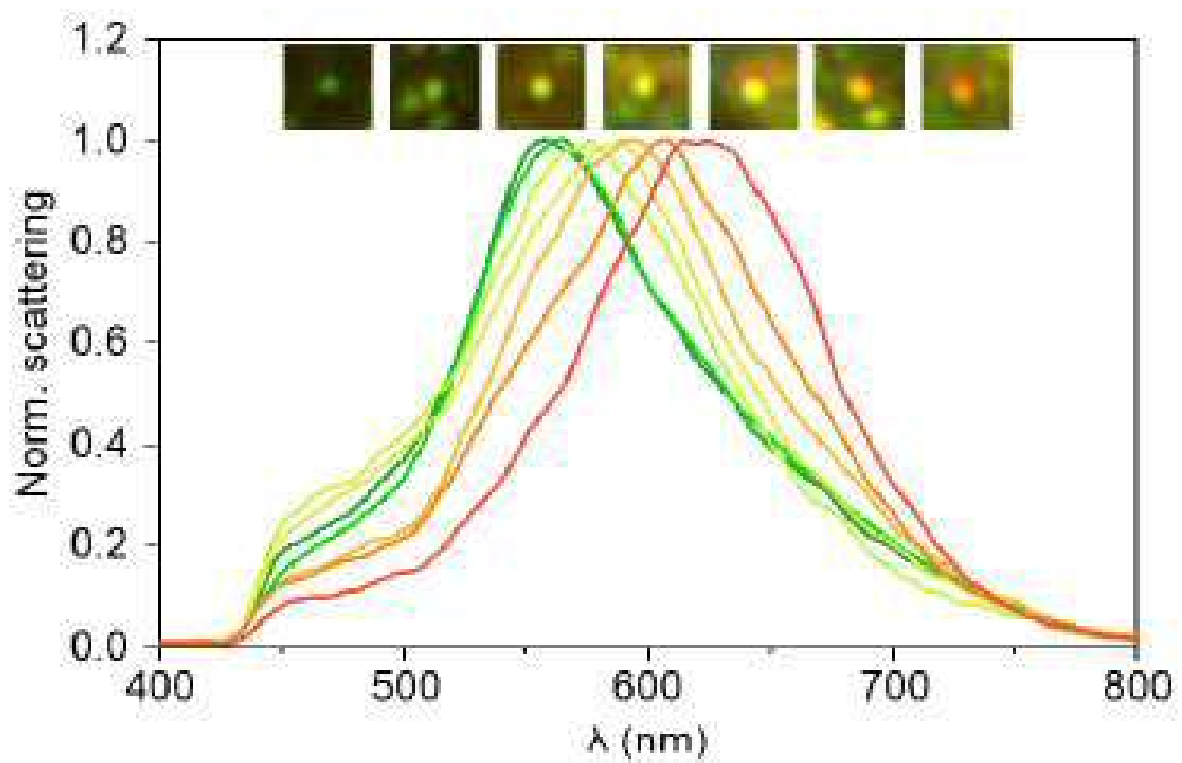
도면4



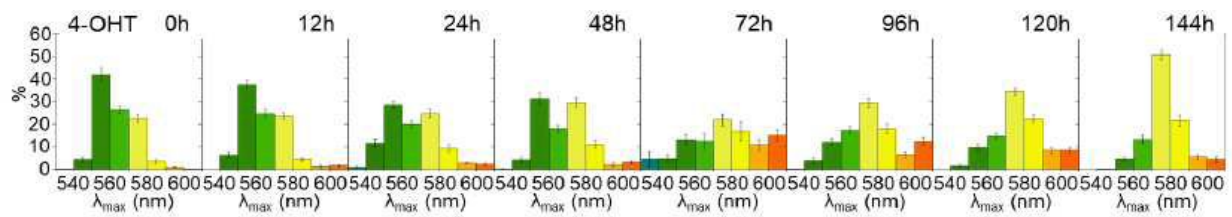
도면5



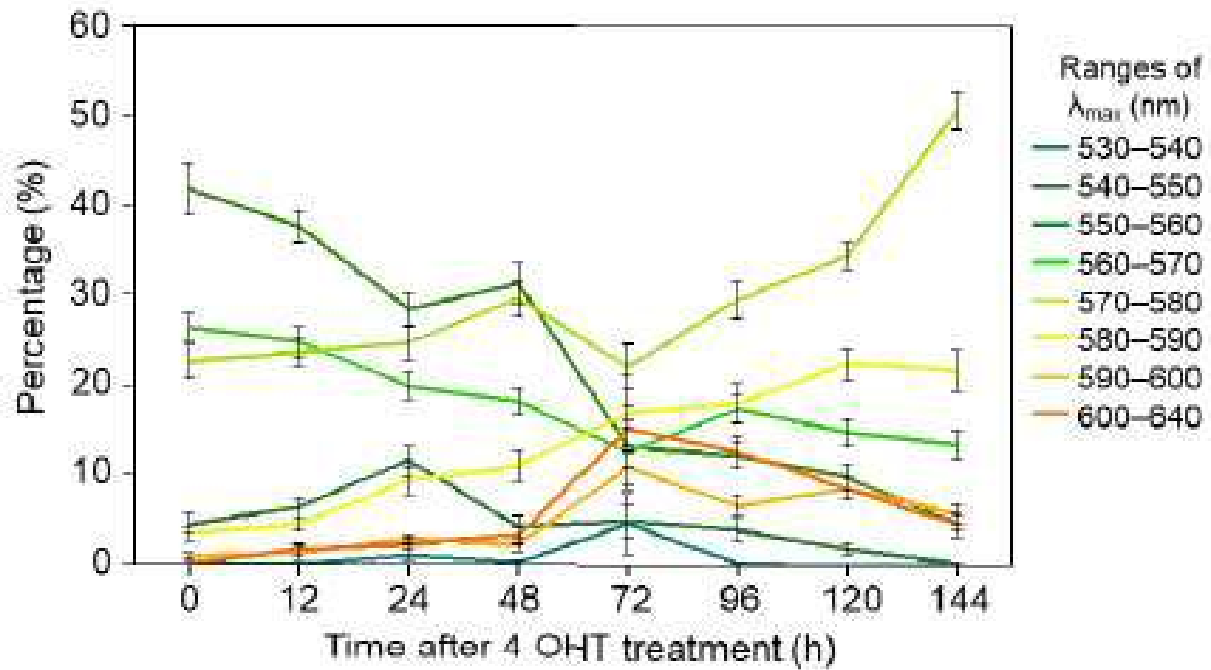
도면6a



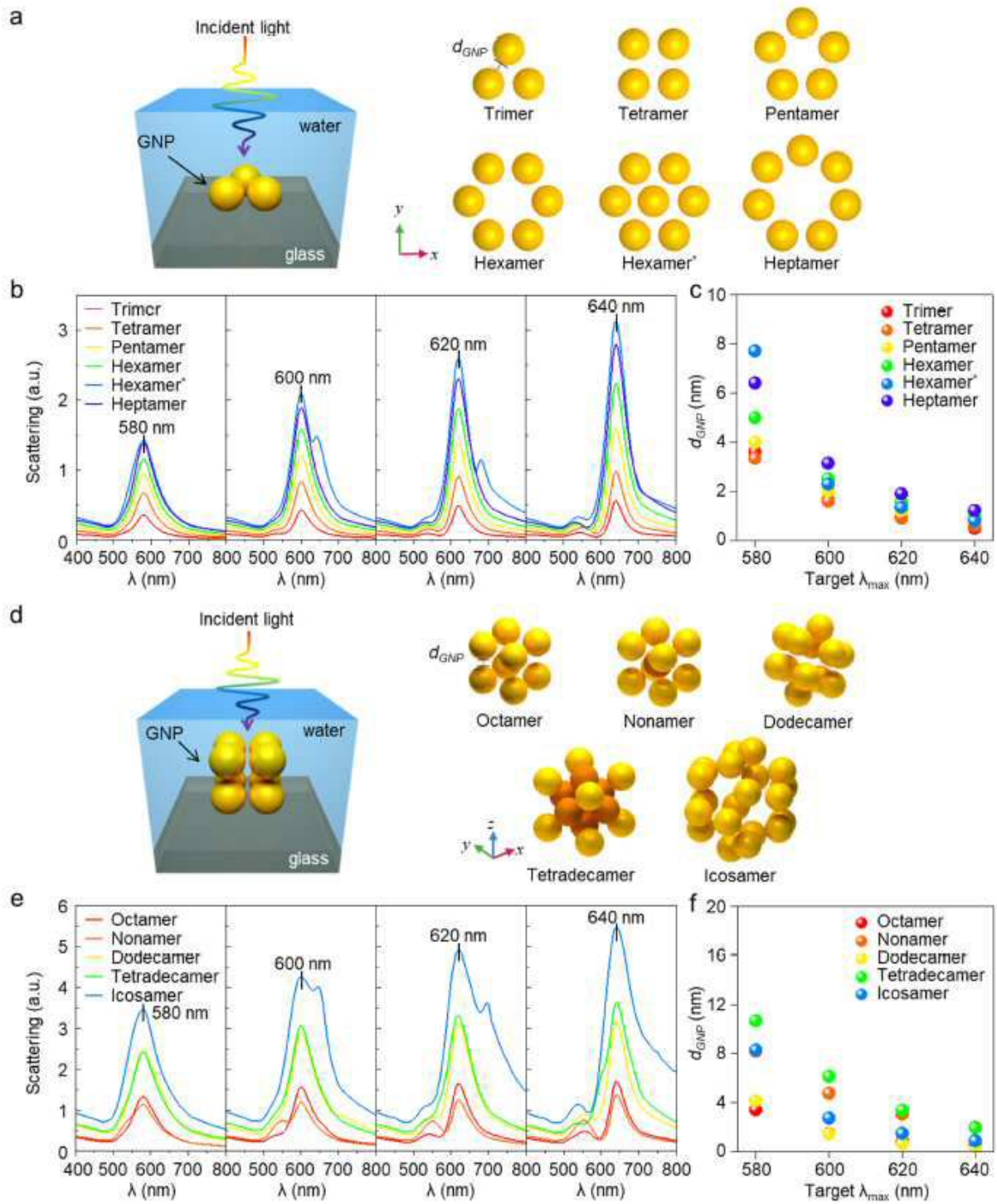
도면6b



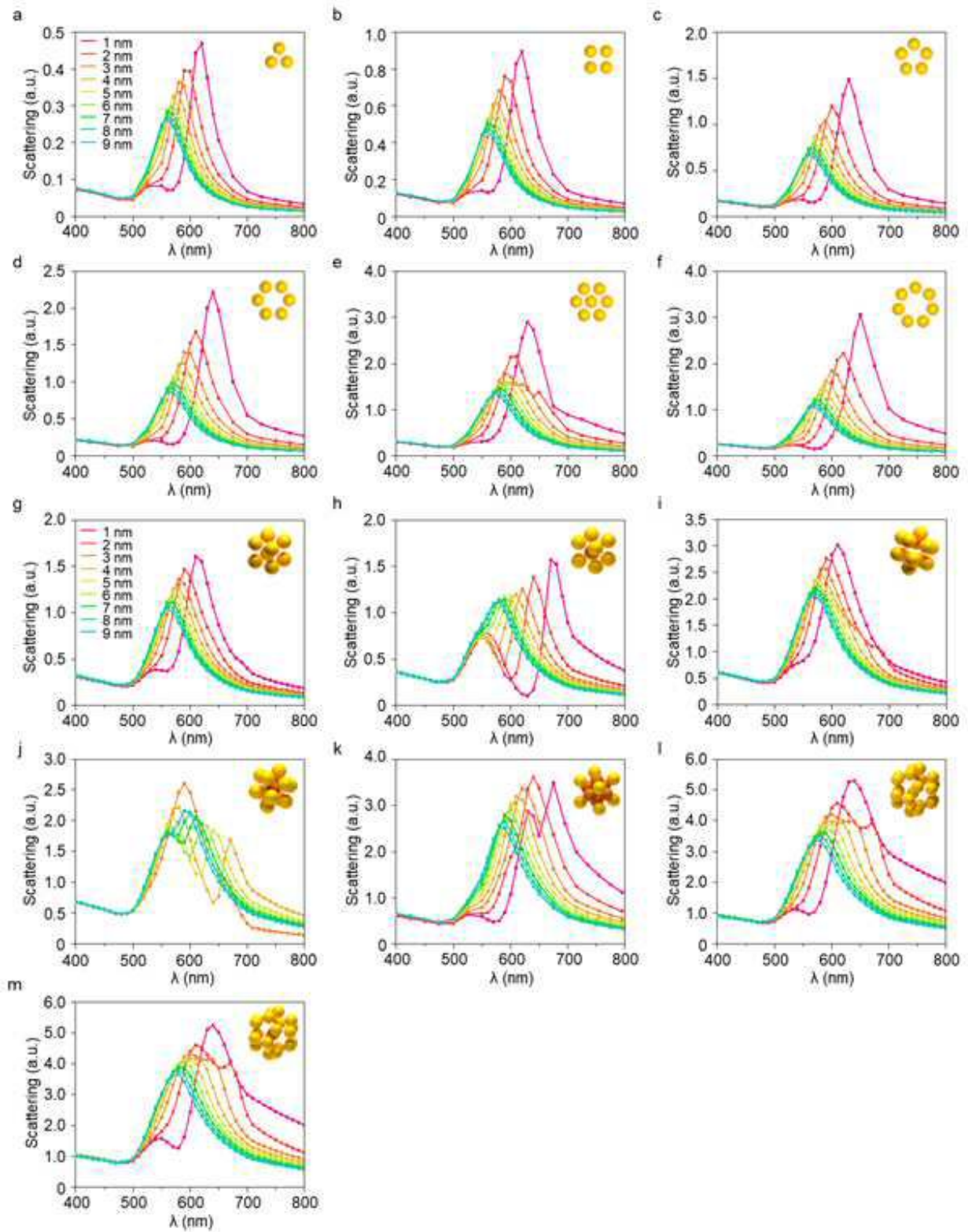
도면6c



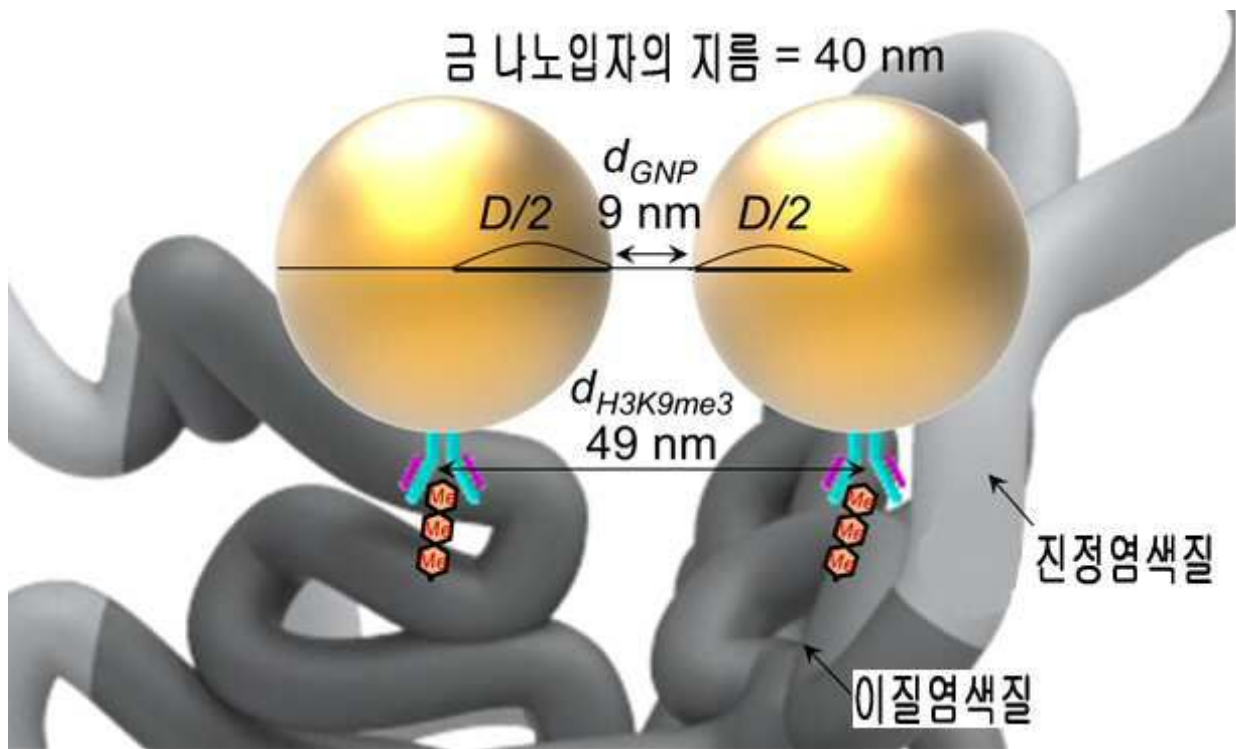
도면7



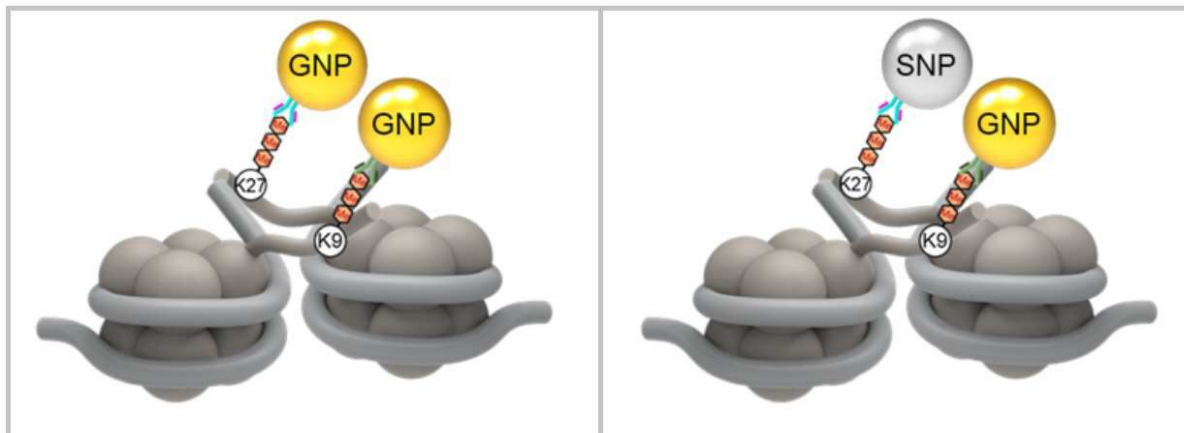
도면8



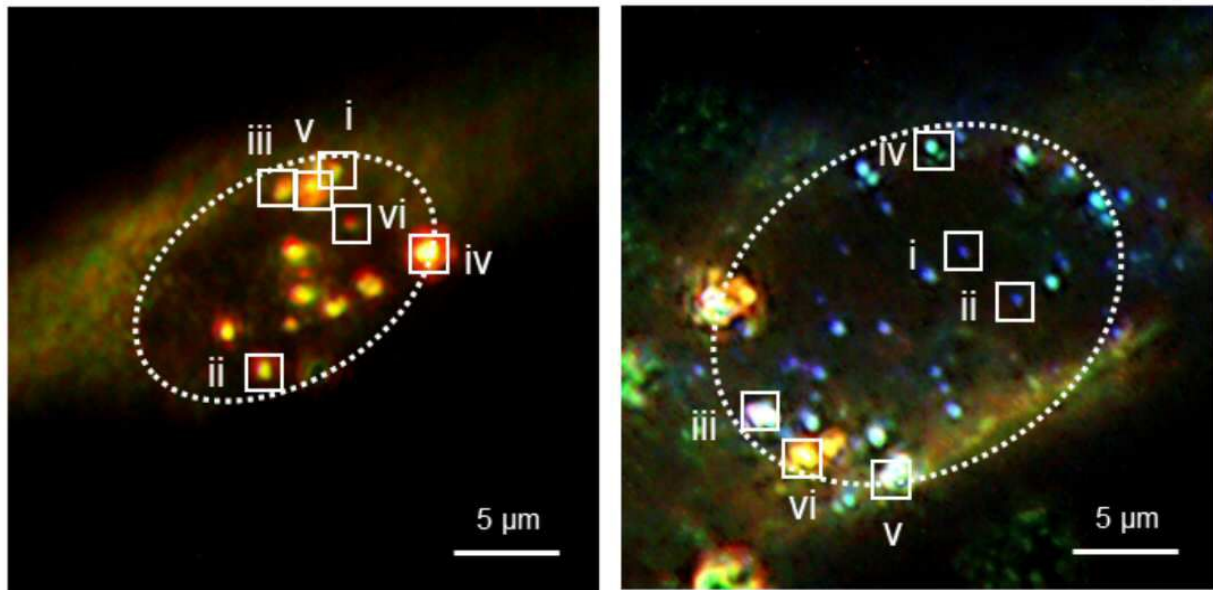
도면9



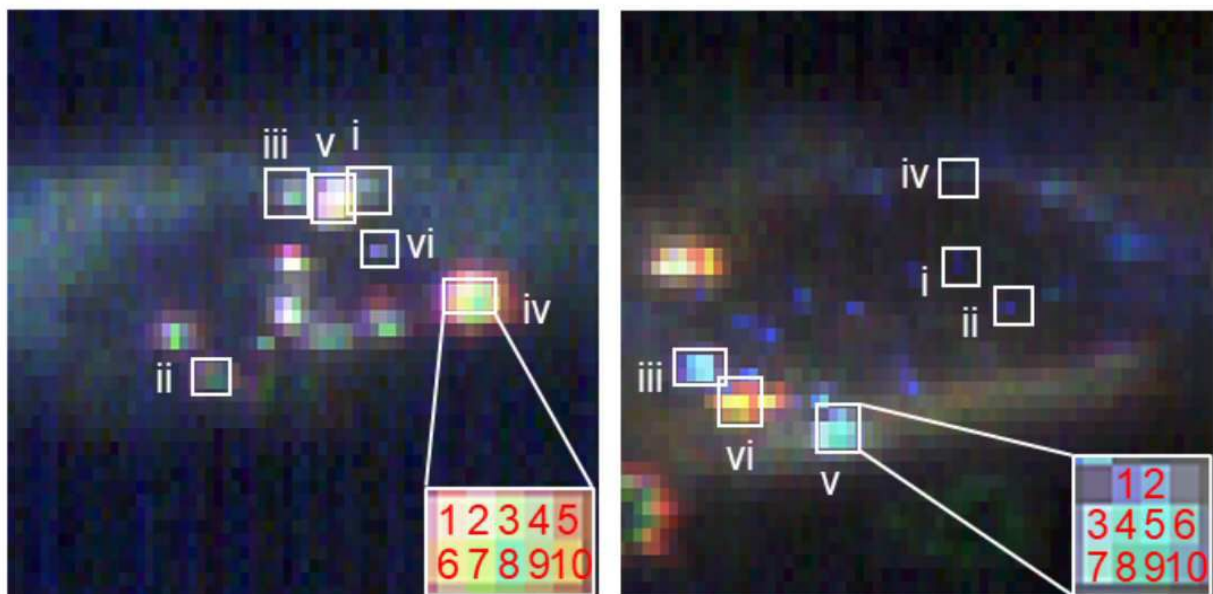
도면10a



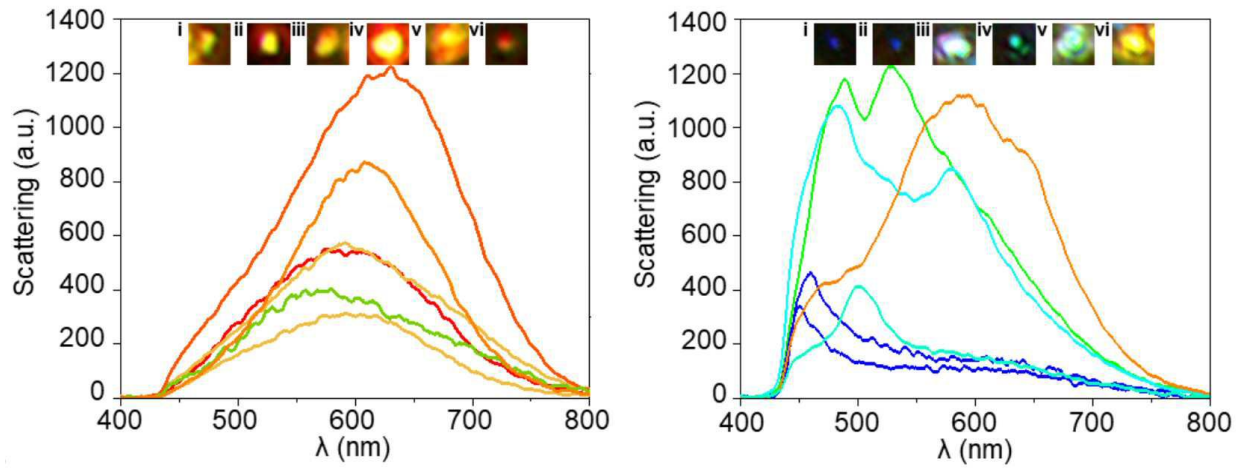
도면10b



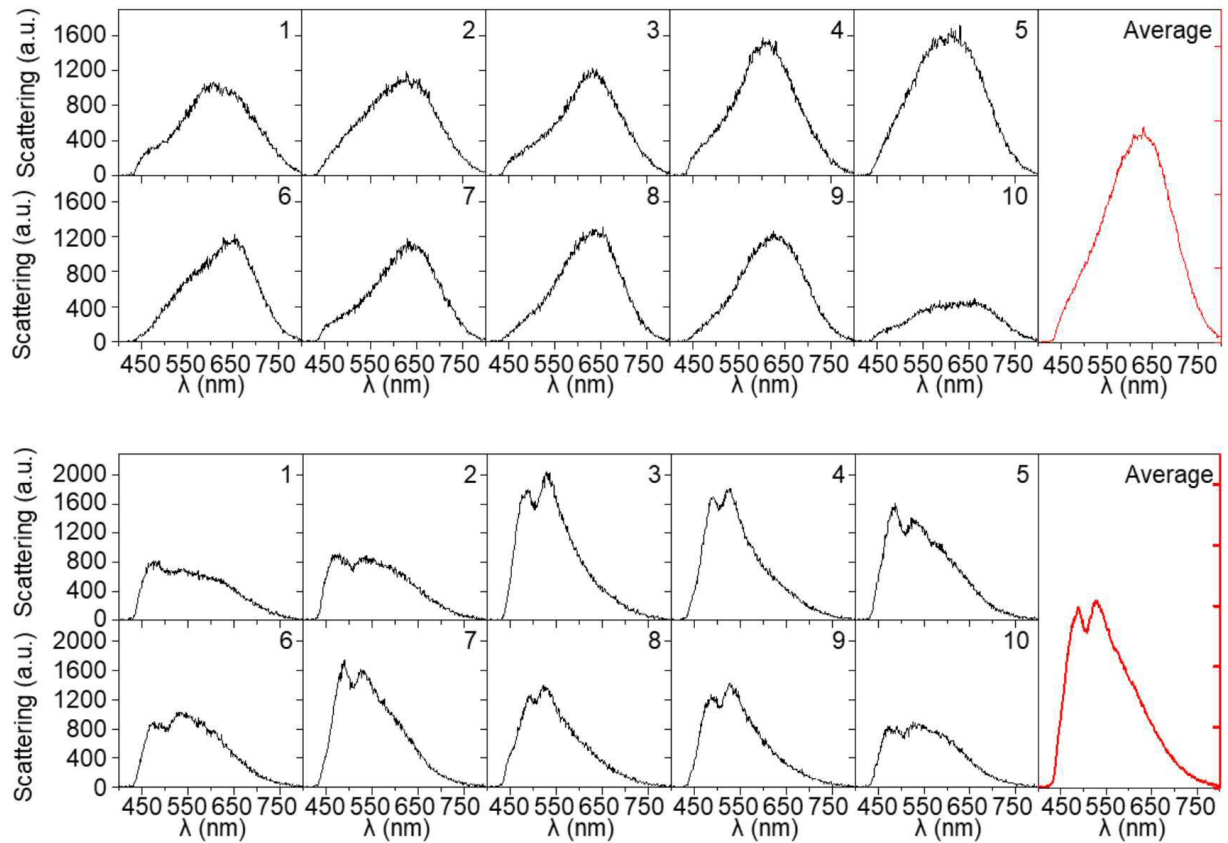
도면10c



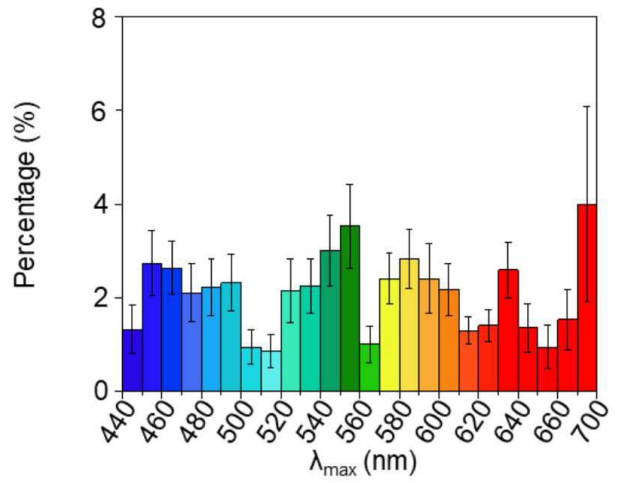
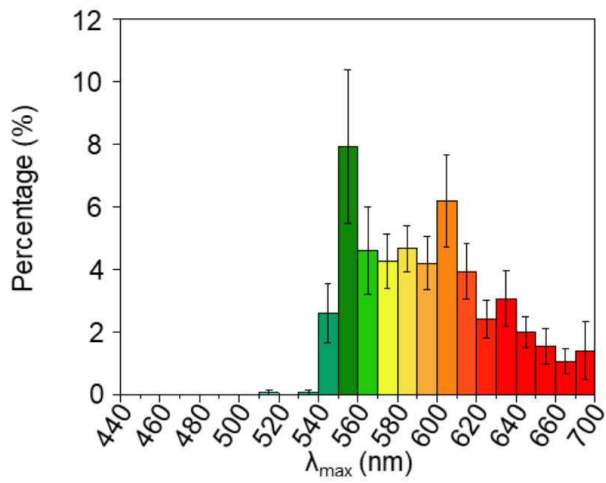
도면10d



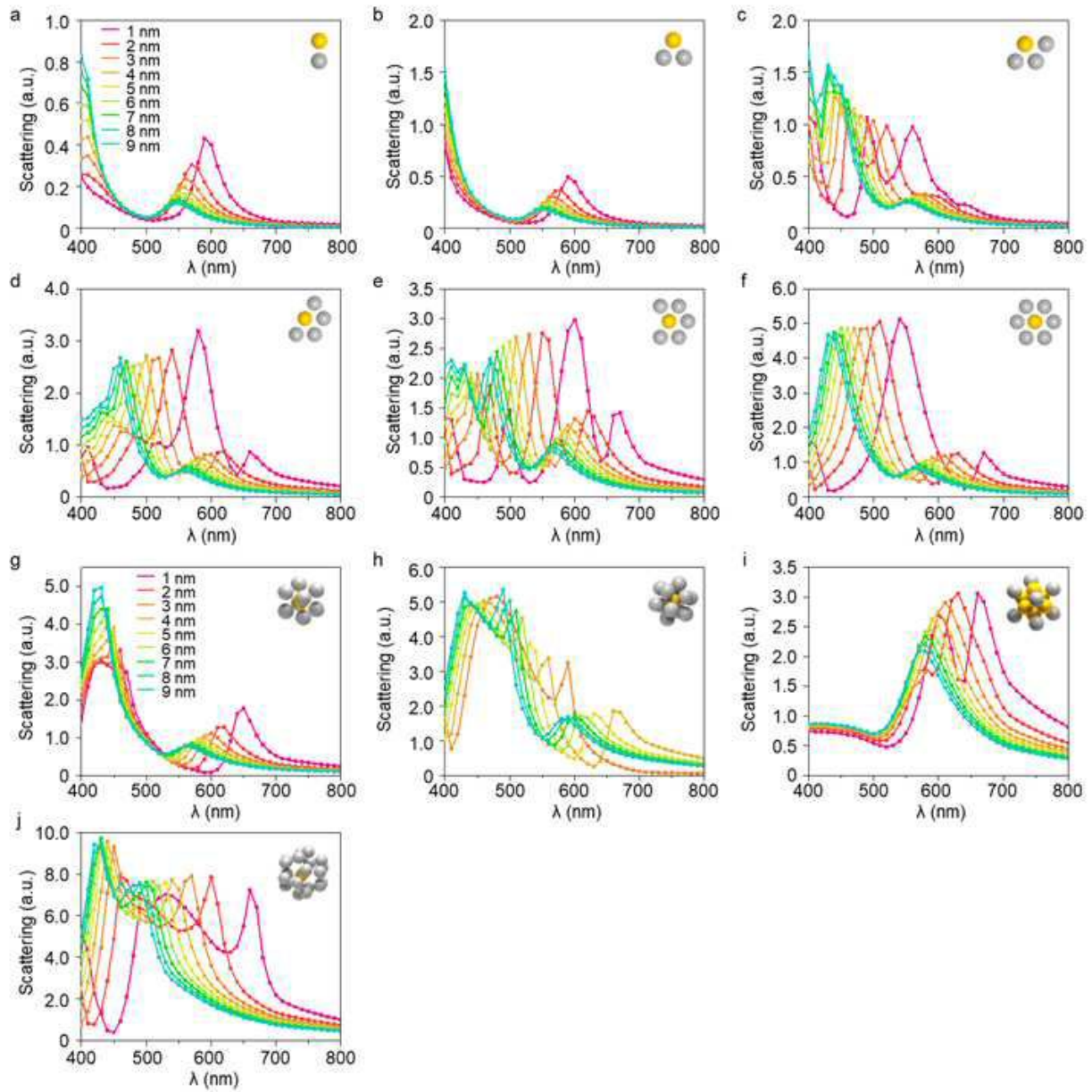
도면10e



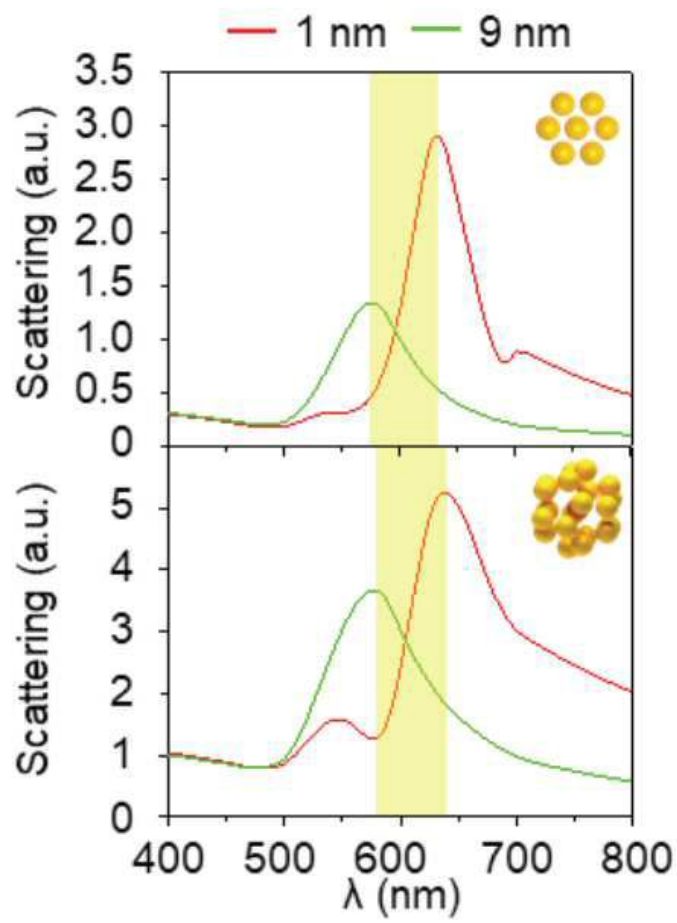
도면10f



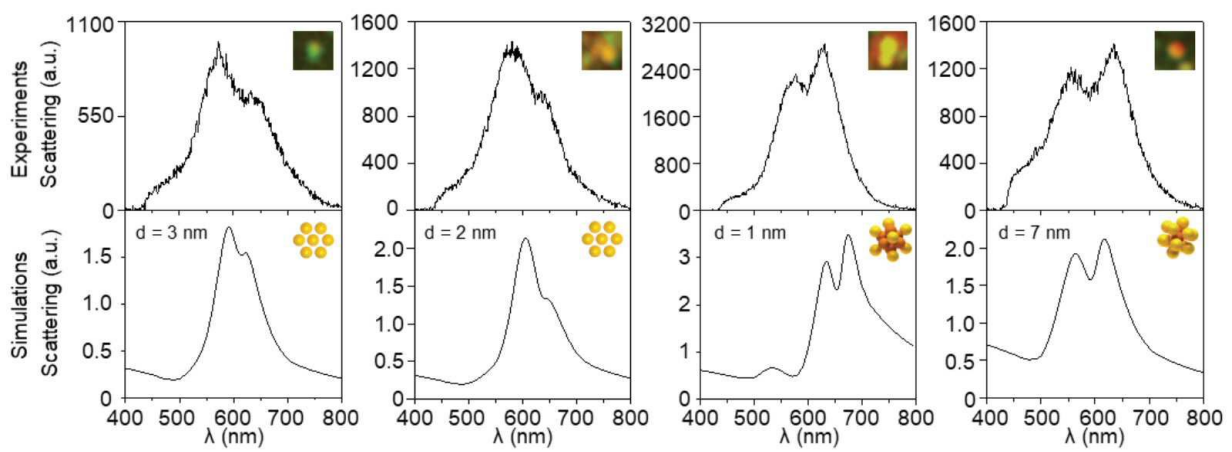
도면11



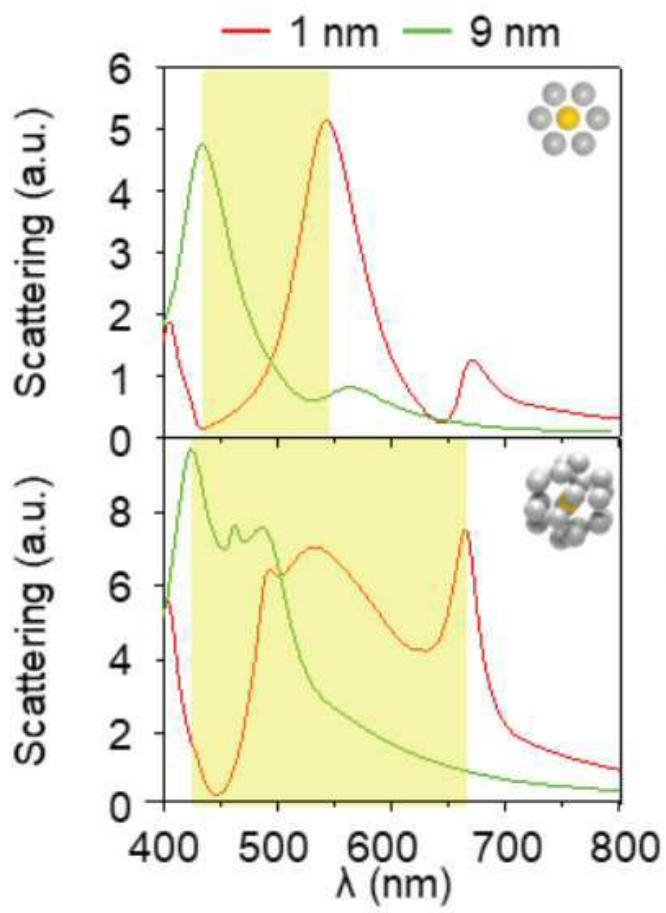
도면12



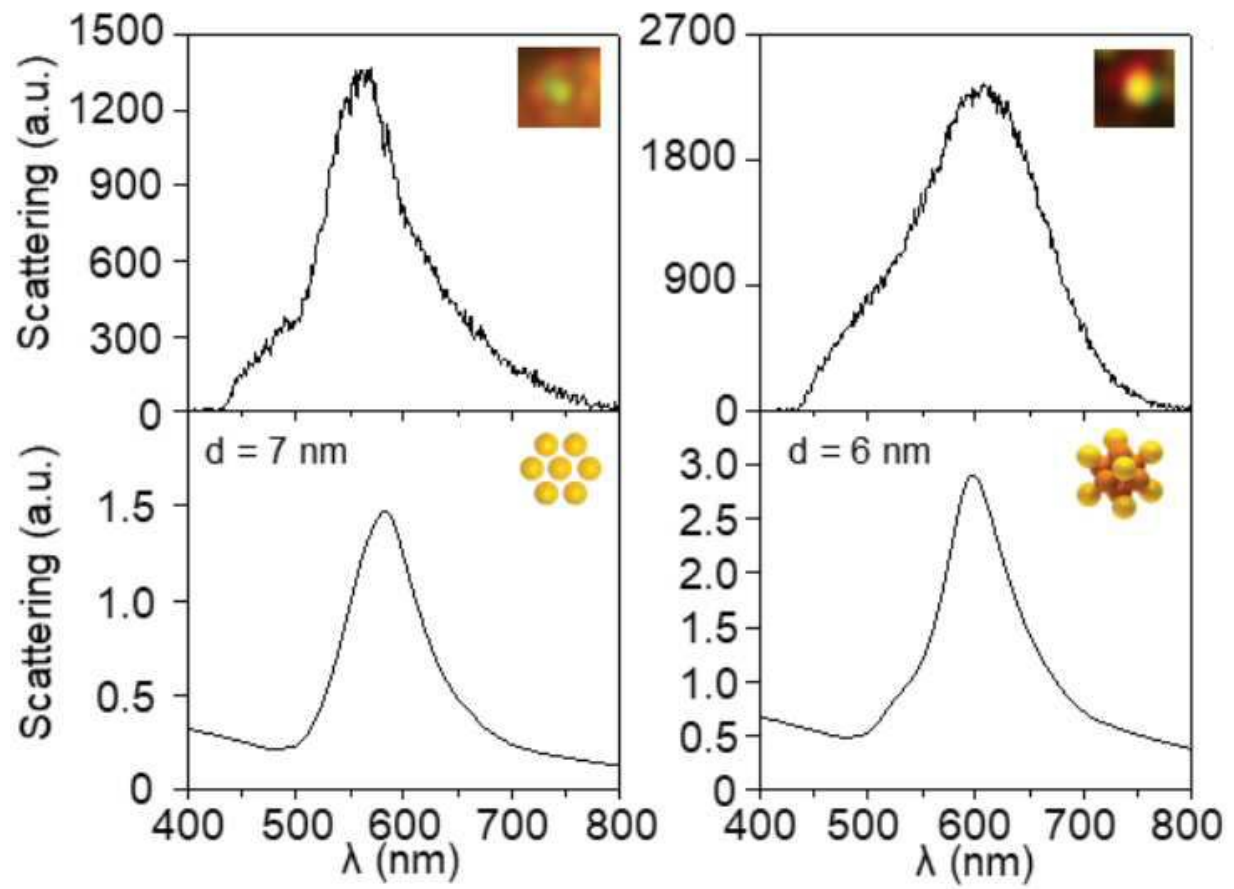
도면13



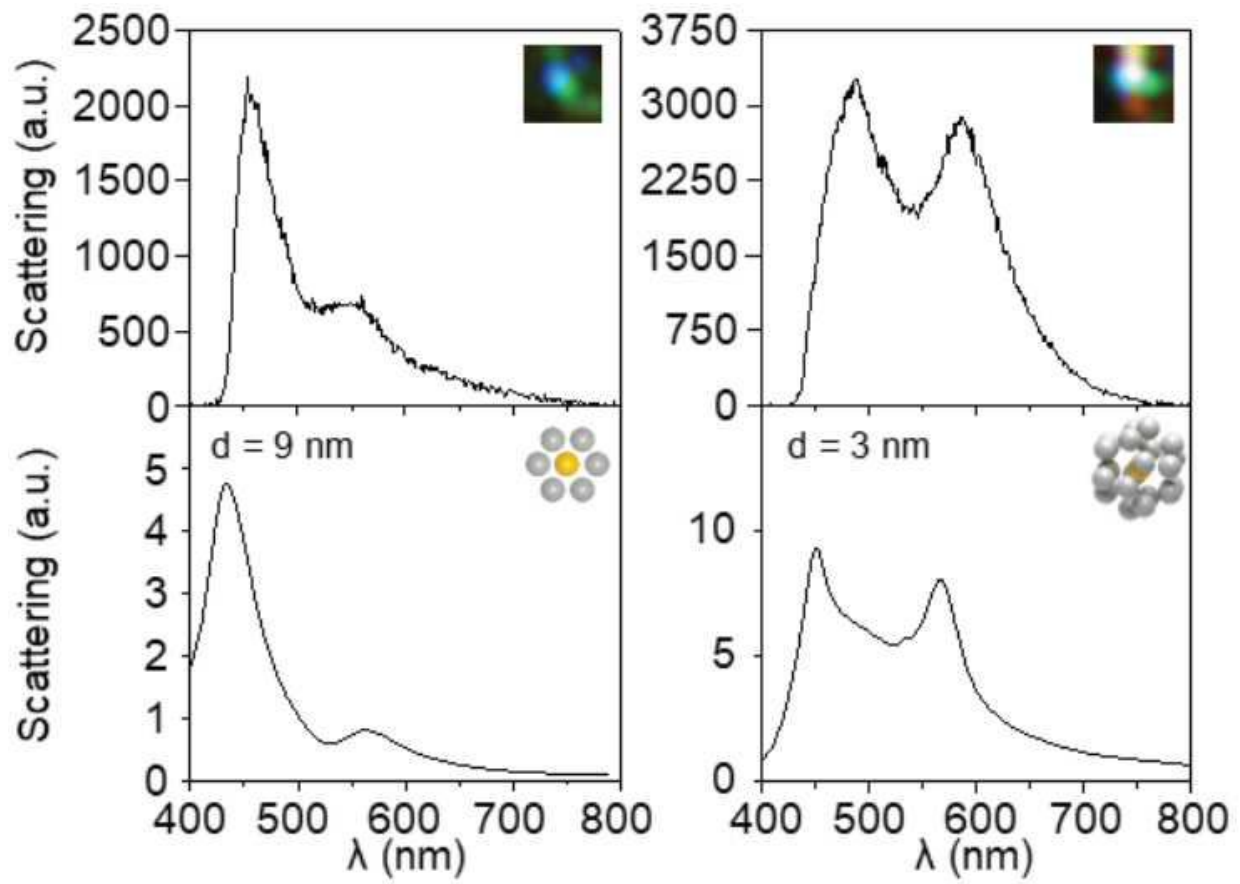
도면14



도면15



도면16



도면17

