



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0056132
(43) 공개일자 2017년05월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G02B 21/36 (2006.01) G02B 21/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G02B 21/361 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0159320
(22) 출원일자 2015년11월13일
심사청구일자 2015년11월13일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
심상준
서울특별시 강남구 선릉로 221, 301동 803호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)
원홍안
서울특별시 성북구 안암동 5가 개운사2길 13-24
(74) 대리인
이처영, 장제환

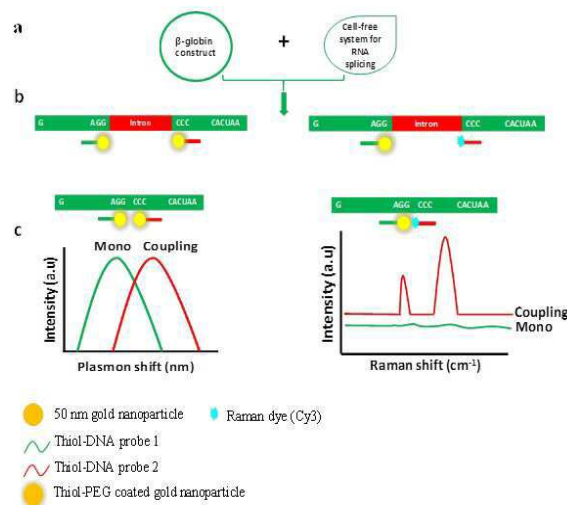
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 산란 강도, 국소 표면 플라즈몬 공명 및 표면 증강 라만 산란을 이용한 단일 분자에서의 RNA 스플라이싱을 검지하는 광학 현미경

(57) 요약

본 발명은 단일 분자에서의 RNA 스플라이싱을 검지하는 광학 현미경에 관한 것으로, 보다 상세하게는 산란 강도, 국소 표면 플라즈몬 공명 및 표면 증강 라만 산란을 검출함으로써, 단일 분자에서의 RNA 스플라이싱을 검지하는 광학 현미경에 관한 것이다. 본 발명에 따른 단일 입자에서의 RNA 스플라이싱을 검지할 수 있는 광학 현미경은 높은 감도, 시간 단축 및 저비용으로 인해, RNA 스플라이싱 스크리닝용 약물과 마이크로 RNA의 결합과 같은 여러 스플라이싱을 연구하는 플랫폼으로 유용하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 21/47 (2013.01)
G01N 21/554 (2013.01)
G01N 21/658 (2013.01)
G02B 21/08 (2013.01)
B82Y 20/00 (2013.01)
C12Q 2563/137 (2013.01)
C12Q 2563/155 (2013.01)
C12Q 2565/601 (2013.01)
C12Q 2565/628 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20100027955
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	선도연구센터지원사업
연구과제명	진단/치료용 고분자 소재 연구센터
기 여 율	1/10
주관기관	성균관대학교
연구기간	2014.09.01 ~ 2015.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2013R1A2A1A01015644
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	생물공정의 실시간 고속 모니터링을 위한 나노 플라즈몬 검지 플랫폼 기술 개발
기 여 율	6/10
주관기관	고려대학교
연구기간	2015.06.01 ~ 2016.05.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2014M1A8A1049278
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발사업
연구과제명	생물학적 이산화탄소 고속전환 유기 자원화 기술
기 여 율	3/10
주관기관	고려대학교
연구기간	2015.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음에 포함하는 단일분자에서 RNA 스플라이싱 검지용 광학 현미경:

- (a) 암시야 콘텐서;
- (b) 스펙트럼 그래프용 분광기;
- (c) 신호처리용 CCD 카메라;
- (d) 레일리 산란용 할로겐 또는 제논의 백색 광원;
- (e) 표면 증강 라만 산란(SERS) 신호 검출용 레이저 소스; 및
- (f) RNA 스플라이싱 분석용 반응 챔버.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 챔버는 전령 RNA 전구체 포획을 위한 비오틴-DNA 프로브가 수직 방향으로 고정된 스트렙타비딘 분자가 코팅되어 있는 것을 특징으로 하는 광학 현미경.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 챔버는 표면 증강 라만 산란(SERS) 신호 검출용 플라즈몬 나노입자-프로브 혼합물을 함유하는 것을 특징으로 하는 광학 현미경.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 플라즈몬 나노입자는 금, 은, 백금 및 구리 나노입자로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 광학 현미경.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 플라즈몬 나노입자는 안정제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 광학 현미경.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 플라즈몬 나노입자와 안정제는 티올기가 직접 결합하는 것을 특징으로 하는 광학 현미경.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 안정제는 티올폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌글리콜(PEG) 유도체, 티올올리고에틸렌글리콜, 세틸트리메틸암모늄브로마이드 및 폴리스티렌술폰산으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 광학 현미경.

청구항 8

제3항에 있어서, 상기 플라즈몬 프로브는 RNA 스플라이싱 후, 1~80nm의 공간 분리를 갖는 것을 특징으로 하는 광학 현미경.

청구항 9

제3항에 있어서, 상기 플라즈몬 프로브는 전령 RNA 전구체 분자의 수에 따라 2~100개 이상의 나노입자를 포함하는 것을 특징으로 하는 광학 현미경.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 RNA 스플라이싱 분석은 나노입자 결합 패턴을 포함하는 레일리 산란의 국소 표면 플라즈몬 공명 방법, 적어도 하나 이상의 나노입자와의 일차원 결합 패턴을 포함하는 산란 강도의 방법 및 전자기 표면 증강 패턴을 형성하는 표면 증강 라만 산란(SERS)-태그 프로브와 나노입자 결합의 표면 증강 라만 산란(SERS) 방법으로 구성된 군에서 선택되는 방법으로 수행하는 것을 특징으로 하는 광학 현미경.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 패턴은 전령 RNA 전구체 분자의 인트론 수에 따른 나노입자를 포함하는 프로브의 결합 패턴인 것을 특징으로 하는 광학 현미경.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 표면 증강 라만 산란(SERS)-태그 프로브는 라만 다이(Raman dye)가 태그된 것을 특징으로 하는 광학 현미경.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 라만 다이(Raman dye)는 시아닌-3(Cyanine-3), 시아닌-5(Cyanine-5), 시아닌-5.5(Cyanine-5.5), 시아닌 7(Cyanine 7), 4-아미노티오펜올(4-aminothiophenol), 4-메틸벤젠티올(4-methylbenzenethiol), 2-나프탈렌티올(2-naphthalenethiol), 로다민-5-(and-6)-이소티오시아네이트(rhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate), 테트라메틸로다민-5-이소티오시아네이트(tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate), 로다민 B 로다민 6G 닐 블루(rhodamine B Rhodamine 6G Nile blue), FAM 및 TAMRA으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 광학 현미경.

청구항 14

제10항에 있어서, 상기 레일리 산란의 국소 표면 플라즈몬 공명, 산란 강도 및 표면 증강 라만 산란(SERS)은 챔버의 고체상 또는 용액상에서 발생하는 것을 특징으로 하는 광학 현미경.

청구항 15

다음 단계를 포함하는 RNA 스플라이싱의 검출 및 모니터링 방법:

(a) 표적 유전자를 발현 벡터에 클로닝하고 세포, 조직 또는 인간을 제외한 생체 내로 벡터를 형질전환시켜, 재조합 표적 전령 RNA 전구체의 전사체를 생성하는 단계;

(b) 플라즈몬 프로브 또는 표면 증강 라만 산란(SERS)-태그 프로브를 상기 재조합 표적 전령 RNA 전구체의 전사체와 반응시키거나, 직접 세포, 조직 또는 인간을 제외한 생체 내로 도입시켜, 상기 플라즈몬 프로브 또는 표면 증강 라만 산란(SERS)-태그 프로브를 전령 RNA 전구체의 엑손/인트론 및 인트론/엑손의 경계에 부착시키는 단계; 및

(c) 제1항의 광학 현미경을 통해 산란 강도, 레일리 산란의 국소 표면 플라즈몬 공명 및 표면 증강 라만 산란을 측정하여, RNA 스플라이싱을 검출하는 단계.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 (b) 단계는 인-비트로(in vitro) 또는 인-비보(in vivo)에서 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 표면 증강 라만 산란(SERS)-태그 프로브는 라만 다이(Raman dye)가 태그된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 라만 다이(Raman dye)는 시아닌-3(Cyanine-3), 시아닌-5(Cyanine-5), 시아닌-5.5(Cyanine-5.5), 시아닌 7(Cyanine 7), 4-아미노티오펜올(4-aminothiophenol), 4-메틸벤젠티올(4-methylbenzenethiol), 2-나프탈렌티올(2-naphthalenethiol), 로다민-5-(and-6)-이소티오시아네이트(rhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate), 테트라메틸로다민-5-이소티오시아네이트(tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate), 로다민 B 로다민 6G 닐 블루(rhodamine B Rhodamine 6G Nile blue), FAM 및 TAMRA으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 플라즈몬 프로브는 RNA 분자에 병렬로 결합하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 프로브는 표적 유전자 전령 RNA 전구체 서열과 50~100%의 상동성을 갖는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제15항에 있어서, 상기 전령 RNA 전구체는 전령 RNA 전구체, 마이크로 RNA 전구체, hnRNA, rRNA, tRNA 및 viral RNA로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제15항에 있어서, 상기 RNA 스플라이싱은 엑손 옆에 적어도 하나 이상의 인트론을 함유하고 있는 전령 RNA 전구체 분자 또는 프리-마이크로 RNA에서 인트론이 제거되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 인트론의 제거는 스플라이세오솜(spliceosome)의 절단 메커니즘에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제15항에 있어서, 상기 세포는 원핵세포, 진핵세포, 정상세포 및 암세포로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제15항에 있어서, 상기 RNA 스플라이싱은 나노입자를 이용한 전령 RNA 전구체의 동력학 모니터링에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 나노입자는 금, 은, 백금 및 구리로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단일 분자에서의 RNA 스플라이싱을 검지하는 광학 현미경에 관한 것으로, 보다 상세하게는 산란 강도, 국소 표면 플라즈몬 공명 및 표면 증강 라만 산란을 검출함으로써, 단일 분자에서의 RNA 스플라이싱을 검지하는 광학 현미경에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] RNA 스플라이싱(splicing)은 스플라이스(splice) 부위라 불리는 보존 서열의 분열(cleavage)에 의해 초기 전령 RNA 전구체(pre-mRNA)의 전사체에서 인트론을 제거하는 분자 메커니즘으로, 라이보자임(ribozyme) 구조 및 단백질 번역을 위한 성숙 RNA의 다양성에 기여한다(Fica *et al.*, *Nature* 503:229, 2013). 이런 메커니즘은 암의 발병, 유전 질환 및 생물학적 진화에서 중요한 역할을 한다(Herbert *et al.*, *Nat. Genet.* 21:265, 1999). 인트론/엑손의 경계에서의 돌연변이는 일반적으로 RNA 스플라이싱을 손상시키고, mRNA의 다양성을 상실시켜 베타-탈라세미아(β -thalassemia)와 같은 질병의 원인이 된다(Srebrowet *et al.*, *J. Cell Sci.* 119:2635, 2006; Faial *et al.*, *Nat. Genet.* 47:105, 2015). 현재 RNA 스플라이싱은 젤-기반 방법(예: 노던 블롯) 및 프라이머 익스텐션(primer extension)에 의해 분석될 수 있으나, 시간, 노동력 및 소모품 비용 등의 한계가 있고 전령 RNA 전구체의 모니터링에는 사용할 수 없다(Vandenbroucke *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 29:e68, 2001).

[0004] 최근, 형광 프로브가 인트론 래리어트(lariat) RNA를 검출하기 위해 사용되고 있으나(Furukawa *et al.*, *Angew. Chem. Int Ed Engl.* 50:12020, 2011), 짧은 수명, 광-표백제 및 형광 공명 에너지 전달(FRET)에서 공명을 위한 좁은 거리범위 등의 한계를 가진다. DNA 나노기술 및 분자생물학에서는 동력학적 연구의 한계를 극복하기 위해 플라즈몬 물질의 플라즈몬 결합에서의 산란 강도를 연구하고 있다(Reinhard *et al.*, *Nano Lett.* 5:2246, 2005; Ross *et al.*, *Nat. Nanotechnol.* 10:453, 2015; Reinhard *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:2667, 2007; Anker *et al.*, *Nat. Mater.* 7:442, 2008; Nguyen *et al.*, *Biosens. Bioelectron.* 66:497, 2015). 금나노 입자(AuNPs) 표면의 자유전자들의 집단적인 진동과 결합된 파장은 플라즈몬 공명 주파수를 생성한다(Hutter *et al.*, *Adv. Mater.* 16:1685, 2004). 금나노 입자(AuNPs)는 자신의 기하학적 및 상대적 위치를 기반으로 한 산란, 흡수, 공명을 포함한 뛰어난 플라즈몬 특성을 갖는다(Sharma *et al.*, *Mater. Today* 15:16, 2012). 플라즈몬 결합은 산란 강도, 단일 입자가 결합 입자로 이동시 진동수를 연구하는 국소 표면 플라즈몬 공명(LSPR) 및

전자기 향상을 연구하는 전자기 표면 증강 라만 산란(SERS)으로 탐색할 수 있다(Sharma *et al.*, *Mater. Today* 15:16, 2012).

[0005] 표면 증강 라만 산란(SERS) 기술은 복잡한 생물 검체에서 구분되는 "지문"인 라만 스펙트럼을 검출하고 모니터링 할 수 있으므로, 단일분자 수준에서 생물학적 모니터링 및 진단을 위한 매우 민감하고 선택적인 기술이다 (Lee *et al.*, *Adv. Funct. Mater.* 24:2079-2084, 2014; Fabris *et al.*, *Adv. Funct. Mater.* 18:2518, 2008). 생물학적 모니터링에서 표면 증강 라만 산란(SERS) 기반 플랫폼은 텔로미어 신장, 메틸화 및 알츠하이머 병의 펩티드 집적 등의 진단 및 모니터링에 이용할 수 있다(Wang *et al.*, *Chem. Commun.* 51:10953, 2015; Chou *et al.*, *Nano Lett.* 8:1729, 2008).

[0006] 이에, 본 발명자들은 종래의 문제점을 개선하고 RNA 스플라이싱(splicing)을 모니터링할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 산란 강도, 국소 표면 플라즈몬 공명 및 표면 증강 라만 산란을 기반으로 광학 현미경을 통해 단일 입자에서의 RNA 스플라이싱을 검지할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 단일 분자에서 산란 강도, 국소 표면 플라즈몬 공명 및 표면 증강 라만 산란을 이용하여 RNA 스플라이싱을 검지하는 광학 현미경을 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은, 단일 분자에서 산란 강도, 국소 표면 플라즈몬 공명 및 표면 증강 라만 산란을 이용하여 RNA 스플라이싱의 검출 및 모니터링 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 암시야 콘텐서; (b) 스펙트럼그래프용 분광기; (c) 신호처리용 CCD 카메라; (d) 레일리 산란용 할로겐 또는 제논의 백색 광원; (e) 표면 증강 라만 산란(SERS) 신호 검출용 레이저 소스; 및 (f) RNA 스플라이싱 분석용 반응 챔버를 포함하는 단일분자에서 RNA 스플라이싱 검지용 광학 현미경을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, (a) 표적 유전자를 발현 벡터에 클로닝하고 세포, 조직 또는 인간을 제외한 생체 내로 벡터를 형질전환시켜, 재조합 표적 전령 RNA 전구체의 전사체를 생성하는 단계; (b) 플라즈몬 프로브 또는 표면 증강 라만 산란(SERS)-태그 프로브를 상기 재조합 표적 전령 RNA 전구체의 전사체와 반응시키거나, 직접 세포, 조직 또는 인간을 제외한 생체 내로 도입시켜, 상기 플라즈몬 프로브 또는 표면 증강 라만 산란(SERS)-태그 프로브를 전령 RNA 전구체의 엑손/인트론 및 인트론/엑손의 경계에 부착시키는 단계; 및 (c) 제1항의 광학 현미경을 통해 산란 강도, 레일리 산란의 국소 표면 플라즈몬 공명 및 표면 증강 라만 산란을 측정하여, RNA 스플라이싱을 검출하는 단계를 포함하는 RNA 스플라이싱의 검출 및 모니터링 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 단일 입자에서의 RNA 스플라이싱을 검지할 수 있는 광학 현미경은 높은 감도, 시간 단축 및 저비용으로 인해, RNA 스플라이싱, 스플라이싱 억제제의 스크리닝 및 RNA 나노기술과 같은 스플라이싱을 심도있게 연구하는 플랫폼으로 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 전령 RNA 전구체 스플라이싱 모니터링을 위한 광학 플랫폼에 대한 도식도이다. (a) 좌측의 재조합 인간 베타-글로빈과 우측의 RNA 스플라이싱 분석을 위한 스플라이세오솜(spliceosome) 복합체를 포함하는 세포-프리 시스템을 나타낸 것이다. (b) RNA 스플라이싱 전, 후의 엑손-인트론 경계에서 플라즈몬 프로브의 위치(좌측) 및 표면 증강 라만 산란(SERS) 프로브의 위치(우측)를 나타낸 것이다. (c) 플라즈몬 이동 및 라만 이동에서 단량체

와 결합체의 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 2는 RNA 스플라이싱 과정을 나타낸 것이다. (a) 프로브 결합, 인트론 루프 형성 및 인트론 제거로 인한 광 신호(좌에서 우로) 생성 과정을 나타낸 것이다. (b) 유도 정제된 베타-글로빈 RNA(좌), 금 나노입자들이 코팅된 프로브(1), 전령 RNA 전구체와 금 나노입자들이 코팅된 프로브의 복합체(2), mRNA와 금 나노입자들이 코팅된 프로브를 포함하는 RNA 스플라이싱(3). (c) RNA 스플라이싱 후 개별 결합 프로브의 TEM 이미지. (d) RNA 스플라이싱 전 전령 RNA 전구체와 금 나노입자들이 코팅된 프로브의 단일 복합체(좌) 및 RNA 스플라이싱 후 개별 결합 프로브(우)의 암시야 이미지.

도 3은 전령 RNA 전구체 스플라이싱의 광학 기반 분석을 나타낸 것이다. (a) RNA 스플라이싱 반응에 의한 플라즈몬 결합의 통합 강도를 85Hz에서 기록하였다. (b) 전령 RNA 전구체 스플라이싱에 의해 LSPR 청색편이가 발생하였으며, 스펙트럼 이동의 피크는 로렌츠 함수에 의해 계산되었다. (c) HeLa 세포 추출물(레드) 및 대장균 세포 추출물(블랙)의 mRNA 형성에 의한 Cy3의 표면 증강 라만 스펙트럼. (d) 스플라이싱 시간에 따른 스플라이싱된 인트론-2 농도를 실시간 PCR로 확인한 결과이다.

도 4는 표면 증강 라만 산란(SERS) 방법을 이용한 전령 RNA 전구체 스플라이싱의 실시간 동역학을 나타낸 것이다. (a) 전령 RNA 전구체 스플라이싱 측정을 위해 표면 증강 라만 산란(SERS) 스펙트럼은 10분간 15초 노출을 실시. (b) HeLa와 대장균의 세포 추출물에서 1120 cm^{-1} , 1383 cm^{-1} 및 1589 cm^{-1} 의 라만 피크 강도의 상대적 변화에 대해 시간별 측정.

도 5는 RNA 스플라이싱 억제에 대한 결과이다. (a) 산란 강도는 억제제의 존재 여부와 상관관계가 있으며, 화살표는 RNA 스플라이싱 버퍼(좌) 및 HeLa 세포 추출물(우)의 첨가를 나타낸다. (b) RNA 스플라이싱에 의해 생성되는 표면 증강 라만 산란(SERS) 스펙트럼의 중점을 나타낸 것이다. (c) RNA 스플라이싱 동안 실시간 플라즈몬 이동을 나타낸 것이다. (d) RNA 스플라이싱 동안 플라즈몬 이동을 시간에 따라 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다

[0019] 본 발명에서는 금나노 입자가 결합된 플라즈몬 및 표면 증강 라만 산란(SERS)-태그 기반의 광학 현미경으로 레일리(Rayleigh) 산란 및 표면 증강 라만 산란을 통하여 단일 전령 RNA 전구체 분자에서 RNA 스플라이싱을 확인하였다. 베타-글로빈 유전자의 전령 RNA 전구체의 엑손-2/인트론-2 및 인트론 -2/엑손-3의 경계 부위에 결합하는 플라즈몬 프로브를 이용하여, RNA 스플라이싱으로 인트론이 제거될 경우에 성숙 전령 RNA에 결합하는 플라즈몬 프로브의 재배열로 인한 표면 증강 라만 산란(SERS) 스펙트럼 및 산란 강도의 증폭을 플라즈몬 밴드로 확인하였다. 플라즈몬 프로브는 엑손 2 및 엑손 3 연결에 대응하는 29nm 부근에서 플라즈몬 이동이 나타났다. RNA 스플라이싱에서 표면 증강 라만 산란(SERS) 지문 및 산란 강도의 강한 증가가 나타나므로 명확한 전령 RNA 전구체 스플라이싱을 알 수 있다. RNA 스플라이싱의 일반적인 억제제인 바이플라보노이드 이소징제틴(isoginkgetin) 33 μM 에 의해 RNA 스플라이싱은 억제된다.

[0020] 본 발명의 플라즈몬 결합 및 표면 증강 라만 산란(SERS)의 검출 과정은 [도 1]에 나타냈으며, 구체적으로는 (i) 베타-글로빈 분자의 전령 RNA 전구체를 클로닝하여 대장균에서 전사시키고, (ii) 유도된 전령 RNA 전구체 분자는 RNA 정제 키트(Qiagen)로 정제하여 RNA 특이 프로브가 코팅된 챔버에 주입하고, (iii) 엑손/인트론 경계에 결합하는 특정 DNA 프로브인 플라즈몬 결합을 위한 2개의 플라즈몬(P)-프로브 및 표면 증강 라만 산란(SERS)를 위한 2개의 표면 증강 라만 산란(S)-프로브를 챔버에 추가하였다. 플라즈몬(P)-프로브 및 표면 증강 라만 산란(S)-프로브는 각각 금 나노입자들 및 라만 분자 시아닌-3(Cy3)로 캡핑하여, 엑손2/인트론3 경계에서 전령 RNA 전구체와 혼성화 하였다. (iv) 전령 RNA 전구체 분자와 플라즈몬(P)-프로브 및 표면 증강 라만 산란(S)-프로브의 혼성화 후, 과량의 프로브를 제거하기 위해 챔버를 세척하고, (v) 플라즈몬(P)-프로브 및 표면 증강 라만 산란(S)-프로브와 혼성화된 전령 RNA 전구체는 RNA 스플라이싱을 위해 HeLa 핵 추출물과 함께 반응시키고, (vi) 플라즈몬 이동, 산란 강도 및 표면 증강 라만 산란(SERS) 스펙트럼을 실시간으로 중점에서 수집하여, RNA 스플라이싱 모니터링을 위해 시간별로 측정하였다. 또한, 본 발명에서는 이소징제틴(isoginkgetin)에 의한 RNA 스플라이싱 억제 및 암 억제 효과 등의 RNA 스플라이싱 플랫폼을 조사하였다.

- [0021] 본 발명은 광학 기반의 방법을 이용하여 산란 강도, 국소 표면 플라즈몬 공명과 표면 증강 라만 산란을 설명할 수 있으므로, RNA 스플라이싱을 모니터링 및 검출할 수 있다. 분자적 방법과 비교하여 광학 기반의 방법은 스플라이싱의 동역학 연구, 스플라이싱 억제, 시스-트랜스 대체 스플라이싱 및 RNA 스플라이싱의 빠른 측정 등의 여러 가지 장점이 있다. 본 발명에서는 단일분자 수준에서 전령 RNA 전구체 스플라이싱 및 스플라이싱 동역학에 대한 이소징체인의 영향 등을 분석하였다. 따라서, 개별 전령 RNA 전구체 분자의 스플라이싱을 수행하는 능력, 높은 해상도 및 광학 기반의 방법 등은 약하게 안정화된 RNA 분자 및 그 수명에 대한 상대적 안정성을 입증할 수 있다. 종래의 방법으로는 모니터링 할 수 없었던, 전령 RNA 전구체 스플라이싱의 동역학을 직접 분석으로 10 분에서 모니터링 하였다. 산란 강도 및 표면 증강 라만 산란(SERS) 스펙트럼은 RNA 스플라이싱 모니터링의 성공을 나타내며, RNA 스플라이싱 억제제로 광학 기반 방법은 RNA 스플라이싱 억제에 사용할 수 있음을 확인하였다. 또한, 암, 분자면역학 및 분자 진화 연구에 중요한 선택적 스플라이싱(alternative splicing) 검출, 다중 엑손-인트론 전령 RNA 전구체의 RNA 스플라이싱 검출, RNA의 인트론으로부터 마이크로-RNA의 생성(마이크로 RNA의 성숙) 및 숙주 mRNA의 처리로부터 siRNA의 모니터링 등을 광학 기반 RNA 스플라이싱 모니터링을 통해 수행할 수 있다. RNA 스플라이싱은 번역 후 수준에서 유전자 조절에 중요하므로, 이 플랫폼을 이용한 RNA 스플라이싱 촉진 또는 억제는 약물 스크리닝에 유용한 현대분자생물학의 필수 요소이다.
- [0023] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (a) 암시야 콘덴서; (b) 스펙트럼 그래프용 분광기; (c) 신호처리용 CCD 카메라; (d) 레일리 산란용 할로겐 또는 제논의 백색 광원; (e) 표면 증강 라만 산란(SERS) 신호 검출용 레이저 소스; 및 (f) RNA 스플라이싱 분석용 반응 챔버를 포함하는 단일분자에서 RNA 스플라이싱 검지용 광학 현미경에 관한 것이다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 챔버는 전령 RNA 전구체 포획을 위한 비오틴-DNA 프로브가 수직 방향으로 고정된 스트렙타비딘 분자가 코팅되어 있는 것을 특징으로 하는 광학 현미경.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 챔버는 표면 증강 라만 산란(SERS) 신호 검출용 플라즈몬 나노입자-프로브 혼합물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 플라즈몬 나노입자는 직경 10~100nm의 금, 은, 백금 및 구리 나노입자로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 플라즈몬 나노입자는 안정제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 플라즈몬 나노입자와 안정제는 티올기가 직접 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다. 또한, 상기 안정제는 티올폴리에틸렌글리콜(PEG), 폴리에틸렌글리콜(PEG) 유도체, 티올올리고에틸렌글리콜, 세틸트리메틸암모늄브로마이드 및 폴리스티렌술폰산으로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 플라즈몬 프로브는 RNA 스플라이싱 후, 1~80nm의 공간 분리를 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 플라즈몬 프로브는 전령 RNA 전구체 분자의 수에 따라 2~100개 이상의 나노입자를 포함하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 RNA 스플라이싱 분석은 나노입자 결합 패턴을 포함하는 레일리 산란 방법으로 측정하는 것이 바람직하며, 적어도 하나 이상의 나노입자와의 일차원 결합 패턴을 포함하는 산란 강도의 방법으로 측정하는 것이 바람직하고, 전자기 표면 증강 패턴 형성을 포함하는 표면 증강 라만 산란(SERS)-태그와 나노입자 결합의 표면 증강 라만 산란(SERS) 방법으로 수행하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 패턴은 전령 RNA 전구체 분자의 인트론 수에 따른 나노입자를 포함하는 프로브의 결합 패턴인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 표면 증강 라만 산란(SERS)-태그 프로브는 라만 다이(Raman dye)가 태그된 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 라만 다이(Raman dye)는 시아닌-3(Cyanine-3), 시아닌-5(Cyanine-5), 시아닌-5.5(Cyanine-5.5), 시아닌 7(Cyanine 7), 4-아미노티오펜올(4-aminothiophenol), 4-메틸벤젠티올(4-methylbenzenethiol), 2-나프탈렌티올(2-naphthalenethiol), 로다민-5-(and-6)-이소티오시아네이트(rhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate), 테트라메틸로다민-5-이소티오시아네이트(tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate), 로다민 B 로다민 6G 닐 블루(rhodamine B Rhodamine 6G Nile blue), FAM 및 TAMRA으로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 레일리 산란의 국소 표면 플라즈몬 공명, 산란 강도 및 표면 증강 라만 산란(SERS)은 챔버의 고체상 또는 용액상에서 발생하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0034] 본 발명은 다른 관점에서, (a) 표적 유전자를 발현 벡터에 클로닝하고 세포, 조직 또는 인간을 제외한 생체 내로 벡터를 형질전환시켜, 재조합 표적 전령 RNA 전구체의 전사체를 생성하는 단계; (b) 플라즈몬 프로브 또는 표면 증강 라만 산란(SERS)-태그 프로브를 상기 재조합 표적 전령 RNA 전구체의 전사체와 반응시키거나, 직접 세포, 조직 또는 인간을 제외한 생체 내로 도입시켜, 상기 플라즈몬 프로브 또는 표면 증강 라만 산란(SERS)-태그 프로브를 전령 RNA 전구체의 엑손/인트론 및 인트론/엑손의 경계에 부착시키는 단계; 및 (c) 제1항의 광학 현미경을 통해 산란 강도, 레일리 산란의 국소 표면 플라즈몬 공명 및 표면 증강 라만 산란을 측정하여, RNA 스플라이싱을 검출하는 단계를 포함하는 RNA 스플라이싱의 검출 및 모니터링 방법에 관한 것이다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 인-비트로(in vitro) 또는 인-비보(in vivo)에서 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 표면 증강 라만 산란(SERS)-태그 프로브는 라만 다이(Raman dye)가 태그된 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 라만 다이(Raman dye)는 시아닌-3(Cyanine-3), 시아닌-5(Cyanine-5), 시아닌-5.5(Cyanine-5.5), 시아닌 7(Cyanine 7), 4-아미노티오펜올(4-aminothiophenol), 4-메틸벤젠티올(4-methylbenzenethiol), 2-나프탈렌티올(2-naphthalenethiol), 로다민-5-(and-6)-이소티오시아네이트(rhodamine-5-(and-6)-isothiocyanate), 테트라메틸로다민-5-이소티오시아네이트(tetramethylrhodamine-5-isothiocyanate), 로다민 B 로다민 6G 닐 블루(rhodamine B Rhodamine 6G Nile blue), FAM 및 TAMRA로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 플라즈몬 프로브는 RNA 분자에 병렬로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 플라즈몬 프로브는 표적 유전자 전령 RNA 전구체 서열과 50~100%의 상동성을 갖는 것이 바람직하며, 상기 전령 RNA 전구체는 전령 RNA 전구체, 마이크로 RNA 전구체, hnRNA, rRNA, tRNA 및 viral RNA 로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 RNA 스플라이싱은 엑손 옆에 적어도 하나 이상의 인트론을 함유하고 있는 전령 RNA 전구체 분자 또는 프리-마이크로 RNA에서 인트론이 제거되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 인트론의 제거는 스플라이세오솜(spliceosome)의 절단 메커니즘에 의해 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 세포는 원핵세포, 진핵세포, 정상세포 및 암세포로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 RNA 스플라이싱은 나노입자를 이용한 전령 RNA 전구체의 동력학 모니터링에 의해 수행되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 나노입자는 금, 은, 백금 및 구리로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] **[실시예]**
- [0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0046] **실시예 1: 베타-글로빈(β -globin) 프리-mRNA의 클로닝 및 전사**
- [0047] RNA 스플라이싱 연구를 위한 베타-글로빈 전령 RNA 전구체 생산을 위해, 인간 베타-글로빈(HBB) 유전자(GenBank: GQ370762.1)를 사용하였다. 3개의 엑손(1,142bp 엑손-1, 223bp 엑손 2, 129bp 엑손-3) 및 2개의 인트론(130bp 인트론-1, 2,850bp 인트론-2)을 포함하는 1,474bp의 인간 베타-글로빈(HBB, NCBI GQ370762.1) 유전자로부터 전령 RNA 전구체를 제조하였다.
- [0048] 엑손-2(222bp) - 인트론-2(851bp) - 엑손-3(126bp)를 포함하는 표적은 하기 프라이머를 사용하여 증폭하였다.
- [0049] 5'-AAAGTCGACGCTGCTGGTGGTCTACCC-3'(GTCGAC: SalI site) : 서열번호 1

- [0050] 5'-AAACTCGAGTTAGTGATACTGTGGGCCAGG-3'(CTCGAG: XhoI site) : 서열번호 2
- [0051] 엑손-2/인트론-2/엑손-3을 포함하는 인간 베타-글로빈 전령 RNA 전구체의 유전자 절편을 플라스미드 pET32b (+)(Novagen) 시스템을 이용하여 클로닝하고, *E.coli* BL21 (DE3) (Real Biotech)에서 1mM IPTG로 유도하여 전사시켰다. 유도된 베타-글로빈 전령 RNA 전구체는 분리하여, RNeasy Mini Kit(Qiagen)로 정제한 후 RNA 스플라이싱 연구에 사용하였다(도 1b, 좌측).
- [0052] 전령 RNA 전구체 스플라이싱(엑손-2/인트론-2/엑손-3)은 전령 RNA 전구체 스플라이싱 키트(Proteinone, USA)의 HeLa 핵 추출물의 스플라이세오솜(spliceosome)에 의한 일련의 촉매 반응으로 수행하였다.
- [0054] **실시예 2: 플라즈몬 및 SERS 프로브의 합성**
- [0055] 플라즈몬 결합은 표면 증강 라만 산란(SERS), 산란 강도 및 국소 표면 플라즈몬 공명(LSPR)을 위한 집적 광학 구성을 이용한 RNA 스플라이싱을 모니터링 하여 탐색하였다.
- [0056] 플라즈몬 결합 프로브-1(P1)과 프로브-2(P2)는 엑손-2/인트론-2 및 인트론-2/엑손-3 사이의 경계 부위에 대응한다.
- [0057] 5'-HS-(CH₂)₃CGTGGATCCTGAGAACTTCA-3'(P1): 서열번호 3
- [0058] 5'-CCTGGGCAACGTGCTGGTCTG(CH₂)₃-HS-3'(P2): 서열번호 4
- [0059] 티올-변형 프로브는 10 μ L의 10N DTT로 10분간 상온에서 반응시킨 후, 초과 DTT를 50 μ L의 에틸아세테이트로 3회 제거하여, 티올-변형 프로브로부터 티올-단편을 얻었다. 만들어진 프로브는 플라즈몬 프로브를 만들기 위해 50nm(0.05 mg/mL) 구연산-금나노 입자(AuNPs) 용액에서 즉시 반응시켰다(Kimling et al., *J. Phys. Chem. B* 110:15700, 2006). 1mL 구연산-금나노 입자 용액에 0.1M BSPP(bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine dipotassium 염, 시그마 - 알드리치)를 첨가하여 리간드를 교환하였다. 과량의 BSPP는 원심분리로 제거하고, 입자는 10 mM Tris(pH 8.0), 40 mM NaCl 버퍼로 점진적으로 세척하여 두 부분으로 분리하였다. 한 부분은 P1 및 P2 프로브와 10시간 반응시킨 후, poly(ethylene glycol):금 나노입자들의 비율이 1:1,000이 되도록 poly(ethylene glycol) methyl ether thiol CH₃O(CH₂CH₂O)_nCH₂CH₂SH(시그마 알드리치, USA) 을 첨가하였다.
- [0060] 표면 증강 라만 산란(SERS) 스펙트럼의 라만 지문을 위해서는, 변형 금나노 입자가 1:50(AuNP/probe)의 비율로 결합한 프로브-1(S1) 및 3' 말단에 Cy3가 결합한 프로브-2(S2)(서열번호 5, IDT DNA, USA)를 사용하였다.
- [0061] 5'-GTCTGGTCGTGCAACGGGTCC-Cy3-3'(S2): 서열번호 5
- [0062] 구체적으로, 엑손-2/인트론-2 및 인트론-2/엑손-3 사이의 경계 부위에 대응하는 플라즈몬 프로브는 50 nm 금나노 입자로 캡핑하여 결합비 1:50(AuNP:프로브)으로 하였으며, 표면 증강 라만 산란(SERS) 프로브는 3'-말단에 Cy3를 결합시켜 표면 증강 라만 산란(SERS)에 대한 라만 지문을 통한 RNA 스플라이싱용 프로브로 제작하였다. 이어서, 결합된 프로브는 티올-PEG, HS (CH₂)₁₁(OCH₂CH₂)₃OH (OEG3) 및 1 μ M BSA로 혼성화 버퍼(10 mM Tris, HCl, pH 8.0, 및 160 mM NaCl)와 RNA 스플라이싱 버퍼(RNA 스플라이 키트에 제공)에서 비활성화 시켰다.
- [0063] 다음으로, 스트렙타비딘이 코팅된 유리(SMS, Arrayit)로 반응챔버를 만들고, 100 μ M 비오틴 포획 프로브(5'-GCTGCTGGTGGTCTACCT-biotinylated-3': 서열번호 6)를 주입하여 2시간 동안 스트렙타비딘-비오틴 결합 반응을 시킨 후, 비특이적 반응을 최소화하기 위해 표면을 2mL 수퍼블록 버퍼(37516, Thermo Scientific)로 처리하였다. 그 다음, 10:1의 비율로 베타-글로빈 전령 RNA 전구체(200 μ L, 1 ng/ μ L)를 첨가하여, 10mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.1mM EDTA의 37 $^{\circ}$ C 챔버에서 1시간 동안 변형 프로브와 배양하고 포획하였다. 포획 효율은 형광 프로브(5'-Cy3-GACCCGTTGCACGAC-3': 서열번호 7)로 모니터링하였다.
- [0065] **실시예 3: 광학 구성 (Optical configuration)**
- [0066] 전령 RNA 전구체 단일분자의 RNA 스플라이싱은 산란 강도, 국소 표면 플라즈몬 공명 및 라만 산란의 집적 광학 구성으로 모니터링 하였다. 광학 구성은 암시아 콘텐츠로 엠파라이트 이클립스 니켈 U 현미경 (니콘)에서 설정한 다음, 라만 산란용 Monora500i와 산란 강도용 Monora320i 촬영 포트(Dongwoo Optron, 한국)를 통합하여, iXon EM+ CCD 카메라 (512 x 512 active pixel chip) (Andor, Oxford Instruments)와 연결하였다. 광원은 할로겐 또

는 제논의 백색 광원을 사용하고, 레이저는 785nm 및 632.5nm의 소스를 사용하였다.

[0068] **실시예 4: RNA Splicing**

[0069] 반응챔버는 처음 15분 동안 1 mg/ml 비오틴 포획 프로브(Integrated DNA Technology)를 반응시키고, 300 μ l의 T50 (50 mM NaCl/10반응챔버는 처음 15분 동안 1 mg/ml 비오틴 포획 프로브(Integrated DNA Technology)를 반응시키고, 300 μ l의 T50 (50 mM NaCl/10 mM Tris, pH가 8.0)으로 세척하였다. 다음으로, 챔버를 45분간 SuperBlock (37516, Thermo Scientific)으로 반응시켜, 300 μ l의 T50으로 다시 한번 세척한 후, 200 μ l의 전령 RNA 전구체 분자 용액(5ng/ μ l)으로 챔버를 반응시켰다. 그 결과, 전령 RNA 전구체 분자는 특정 포획 프로브가 코팅된 유리 표면에만 결합하고, 다른 mRNA 분자는 용액에 부유하였다. 변형된 유리 표면의 매우 높은 표면적으로 인해, 낮은 농도의 베타-글로빈 전령 RNA 전구체를 높은 비율로 농축 가능하다.

[0070] 베타-글로빈 전령 RNA 전구체 포획 장치는 온도 제어기(TC-324B, Warner Instruments)를 이용하여 40℃의 최적 어닐링 온도로 조절하여, 혼성화 용액(10 mM Tris. HCl, pH 8.0 및 160 mM NaCl)에서 플라즈몬 프로브와 표면 증강 라만 산란(SERS) 프로브를 반응시켰다. 챔버는 RNA 스플라이싱 버퍼(20 mM HEPES-Na (pH 7.9), 20% Glycerol, 42 mM (NH₄)₂SO₄, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA)로 평형화한 후, 인비트로 전령 RNA 전구체 스플라이싱을 위해 HeLa 세포 핵 추출물(P002-1, Protein One, 10 μ L, 5 ng/ μ L)이 포함된 RNA 스플라이싱 버퍼 190 μ l를 시간 0초 포인트에 챔버에 주입하였다. RNA 스플라이싱은 암시야 콘덴서로 업라이트 니콘 현미경 (이클립스의 Ni-U)을 사용하여 병렬로 모니터링 하였다. 데이터는 Shamrock 500i 분광기(Andor, Oxford Instruments)의 영상 포트에 Andor iXon EM+ CCD detector (512 x 512 pixel chip)가 장착된 100X Nikon 렌즈(N.A = 0.95)를 사용하여 기록하였다. RNA 스플라이싱은 플라즈몬 결합 모드에서 산란 강도, LSPR 및 라만 산란에 의해 검출된다.

[0072] 4-1: 젤 전기영동에 의한 RNA 스플라이싱 확인

[0073] RNA 스플라이싱은 20 nM 전령 RNA 전구체, 30% 핵 추출물, 20 mM 염화칼륨, 2.5 mM 염화 마그네슘, 10 mM 크레아틴 포스페이트, 0.5 mM DTT, 0.4 units/l RNasin, 40 mM Tris-HCl (pH 8), 0.5 mM ATP 및 1% (v/v) DMSO를 40℃에서 10분간 반응시켜 수행하였다. mRNA 스플라이싱 산물, 즉, 전령 RNA 전구체와 DNA 프로브의 결합 입자는 젤 전기영동에 의해 분리하였다.

[0074] 그 결과, 도 2b 우측의 1% 아가로즈 젤은 금나노 입자 기능화 DNA 프로브(lane 1), 스플라이세오솜(spliceosome) 첨가 전 스플라이싱 반응(lane 2), 스플라이세오솜(spliceosome) 첨가 후 스플라이싱 반응(lane 3)을 나타낸다. 스플라이싱 혼합물은 인트론-2가 제거되어 이량체 형성을 나타내는 중간 밴드를 포함하며, 2개의 프로브가 플라즈몬 결합한 형태인 스플라이싱 mRNA는 850bp의 인트론-2가 제거되어 전령 RNA 전구체 보다 길이가 짧아졌다. 이는 금나노 입자 기능화 DNA 프로브보다 느려지고 전령 RNA 전구체와 혼성화 된 금나노 입자 기능화 DNA 프로브보다 빨라졌다. 이량체 밴드는 전기용출 시스템(Elutrap electroelution system, Whatman)으로 분리하여 투과형 전자현미경(TEM)으로 관찰하였다(도 2c).

[0076] 4-2: 색상 변화에 의한 RNA 스플라이싱 확인

[0077] 개별 금나노 입자는 비편광 백색광을 사용하여, 반응 챔버 내 용액에서 발생한 개별 입자의 광산란을 암시야 현미경으로 관찰하였다(도 2d). 금나노 입자는 전령 RNA 전구체에서 인트론이 제거되고 엑손이 연결되어 프로브가 근접하게 되면, 그린의 개별 금 나노 입자(도 2d, 좌측)에서 레드의 결합 금나노 입자(도 2d, 우측)로 색상이 변한다. DNA 프로브는 정확한 이중 가닥을 형성하기 위해 전령 RNA 전구체의 엑손/인트론 경계에 결합하며, 스플라이세오솜(spliceosome) 결합 전령 RNA 전구체의 접근에 영향을 받지 않는다. pET32a (+) 벡터의 T7 폴리머라제 대조군의 전령 RNA 전구체 분자의 색상은 변화가 관찰되지 않아, RNA 스플라이싱에 의해 색상이 변하는 것을 알 수 있었다. 플라즈몬 프로브는 RNA 스플라이싱으로 거리가 감소하고 전령 RNA 전구체 분자의 금나노 입자의 구성이 완전히 비가역적일 때, 일반적으로 플라즈몬 결합을 생성하고 광학적 기록을 재생할 수 있다. 엑손-2(222bp) 및 엑손-3(126bp)가 인트론-2(851bp)로부터 분리되고, 엑손-2와 엑손-3이 연결되어, 2개의 프로브는 LSPR 및 SERS의 플라즈몬 부위의 증강으로 플라즈몬 결합 부위에 도달한다. HeLa 추출물 주입 포인트(point 0s to 360s)로부터 산란 강도가 서서히 증가하는 것은 점진적인 거리감소를 나타내며, 급격한 산란 강도의 증가는 스플라이싱 케적 상 2개의 프로브가 매우 근접해 있을 때 mRNA 형성을 위한 전령 RNA 전구체의 스플라이싱이

성공적인 것을 나타낸다(도 3).

[0079] 4-3: 국소 표면 플라즈몬 공명(LSRP) 및 SERS에 의한 RNA 스플라이싱 확인

[0080] RNA 스플라이싱의 결과는 국소 표면 플라즈몬 공명(LSRP)에서 플라즈몬 이동의 29nm 생성(도 3b) 및 SERS 스펙트럼(도 3c)을 서열번호 8/9 프라이머를 이용한 실시간 PCR로 확인하였다(도 3d).

[0081] 5'-cacagtctgcctagtagattac-3' (Forward) : 서열번호 8

[0082] 5'-ccctgatttgggtcaatatgtgtac-3' (Reverse): 서열번호 9

[0083] 금나노 입자는 단량체에서 이량체로 결합하여 산란 강도가 증가시키며, 전령 RNA 전구체의 스플라이싱과 연결된다. 결합 금나노 입자의 방향은 전령 RNA 전구체 스플라이싱의 움직임을 기반으로 반응 챔버 표면상에 표시되고, 인트론 단편이 용액내로 확산되면 실시간 PCR을 수행하였다.

[0084] 금나노 입자의 비특이적 부위는 5% HS (CH₂)₁₁(OCH₂CH₂)₃OH (OEG3) 및 1μM BSA로 차단하였다. 금 나노 입자는 SERS를 위한 플라즈몬 표면 및 플라즈몬 결합의 광학적 기록을 재생할 수 있다. 2개 이상의 결합체는 금나노 입자 표면에 비특이적 결합 차단에 의해 제거되며, 오직 하나의 프로브만 엑손/인트론 경계에 특이적으로 결합한다. 금나노 입자가 캡핑된 DNA 프로브의 밀도를 감소시키기 위해, 5% 이하의 금나노 입자로 캡핑될 때까지 반응 시간 및 분자 내 DNA 프로브의 농도를 조절하였다. RNA 스플라이싱 후, 2개의 금나노 입자의 결합은 안정화되어 연속적으로 시간 단위로 모니터링 된다. 용액 내 금나노 입자는 산란광의 편광으로 임의로 배향하고, 금나노 입자의 증가된 농도는 챔버내 RNA 스플라이싱 수율을 나타낸다. 상기 플랫폼은 스플라이세오솜(spliceosome)의 스플라이싱 부위 인식의 높은 민감도 및 특이성에 의한 것이다. RNA 스플라이싱은 대장균 추출물을 챔버로 주입하여 산란 강도를 관찰하였다.

[0086] 4-4: RNA 스플라이싱의 동력학

[0087] 전령 RNA 전구체 스플라이싱의 동력학은 10분 동안 측정하였다. 챔버 내로 프리-RNA 스플라이싱 키트 주입하면 2.5~7분 사이에 인트론이 제거되고 10분 후 완전히 제거된다. 종래의 방법에서는 3'-엑손 다음의 인트론이 15분에 제거된다(Zeng *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 20:8290, 2000; Aoufouchi *et al.*, *Cell.* 85:415, 1996). 이 결과는 RNA 스플라이싱 시간이 스플라이싱 개시부터 인트론의 스플라이싱까지의 스플라이세오솜(spliceosome) 조립을 포함한 전체 스플라이싱의 총 시간임을 나타낸다. 전령 RNA 전구체 스플라이싱에서 2.5분 지연은 RNA 스플라이싱의 오류를 수정하는 시간이다. 또한, 다양한 스플라이싱의 시간은 5'의 스플라이싱 부위나 인트론의 길이에 의존하며, 또는 인헨서 및 사일런스의 친화력에 의존한다(Wang *et al.*, *RNA* 14:802, 2008). 인트론 제거의 다양한 속도는 초기 스플라이싱 부위의 인식, 스플라이싱 부위의 페어링, 엑손의 적절한 이음 등의 진행 전에, 삽입 속도의 조절과 같은 스플라이세오솜(spliceosome) 조립의 단계에서의 속도 차이 때문이다. 다른 이유는, 스플라이싱 진행을 억제하기 위한 인트론 내의 세린/아르기닌(SR) 단백질의 결합 때문이다(Wang *et al.*, *RNA* 14:802, 2008). 표면 증강 라만 산란(SERS)-기반 분석에서, 전령 RNA 전구체 스플라이싱의 실시간 동력학은 RNA 스플라이싱 진행 동안 용액 내 표면 증강 라만 산란(SERS) 신호 측정에 의해 조사되며, 후속 시간에 따른 전령 RNA 전구체 스플라이싱 라만 스펙트럼 변화는 30 및 10초 간격 및 노출 시간에서 기록하였다. 표면 증강 라만 산란(SERS) 태그 분자(Cy3)의 라만 피크는 1589, 1383 및 1120 cm⁻¹ 기본 특징 피크에서 모니터링 되었다(도 4a). 전령 RNA 전구체 스플라이싱 과정 동안 시간별 스펙트럼 측정은 도 4b에 나타났다.

[0088] SERS 강도는 금나노 입자 표면에 도달하는 P1프로브 및 P2-Cy3 프로브의 라만 다이(dye)의 수에 비례하므로, 스플라이세오솜(spliceosome)의 상대적 활성을 반영하고 전령 RNA 전구체 스플라이싱의 효율을 나타낸다. 정규화된 표면 증강 라만 산란(SERS) 강도 변화는 전령 RNA 전구체 스플라이싱 효율의 직접적인 지표이다(도 4b). 도 4에 나타난 바와 같이, 스플라이세오솜 복합체를 함유하는 HeLa 추출물 주입 전 3분 동안은 모든 피크의 강도가 정상곡선을 나타냈다. RNA 스플라이싱을 위한 플라즈몬 결합 및 표면 증강 라만 산란(SERS) 기반 분석의 감도는 0.1 μg/μl에서 5 μg/μl 농도 범위의 전령 RNA 전구체 샘플의 플라즈몬 이동 및 SERS 강도 변화에 의해 측정된다. 그러나, 스플라이세오솜의 활성시 반응챔버에서 전령 RNA 전구체의 스플라이싱을 나타내는 초기 4~5분에 각 라만 피크의 상당한 증가가 관찰된다. 스플라이세오솜 0.1 μg/μl 농도에서 라만 신호증가는 10분 종점에서 정체가 도달한다. 플라즈몬 이동 및 정규화 표면 증강 라만 산란(SERS) 강도의 변화는 도 4c에 나타났다. 예상한 바와 같이, 라만 신호의 증가 속도는 전령 RNA 전구체의 농도와 비례하는데, 이는 전령 RNA 전구체의 농도가 높

아지면 전령 RNA 전구체의 스플라이싱 속도가 증가하기 때문이다. 검출은 위한 범위는 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 에서 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 설정하였으며, 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 보다 낮은 전령 RNA 전구체 스플라이싱은 주어진 검출 시간 내에 변화가 없었고, 음성 대조군인 대장균 추출물의 10분간 기록 역시 SERS 강도의 변화가 관찰되지 않았다. 이 결과는, RNA 형성의 자기조립 또는 반응 용액의 금나노 입자와 라만 다이(dye)의 자기 결합보다는 스플라이세오솜 활성 기반의 전령 RNA 전구체 스플라이싱 분석에서 라만 신호가 증가하는 것을 입증하였다.

[0090] 4-5: RNA 스플라이싱의 억제

[0091] 소분자는 스플라이세오솜 조립의 동력학, 전령 RNA 전구체의 변화 속도를 억제한다. 따라서, 인비보 및 인비트로에서 스플라이세오솜의 일반적인 mRNA 스플라이싱 억제제(33)인, 이소깅제틴(isoginkgetin, 5458-19-6, 칼 바이오캡)으로 전령 RNA 전구체 스플라이싱에 대한 억제를 추가로 연구하였다. 33 μM 이소깅제틴의 RNA 스플라이싱 억제제는 37°C에서 0~10분 동안 플라즈몬 결합 및 SERS 신호의 산란 강도를 이용하여 측정하였다. 단일 분자 수준에서 높은 시간 해상도의 전령 RNA 전구체 스플라이싱의 접근은 프로브 및 이소깅제틴을 통한 RNA 스플라이싱의 속도를 정량하여 나타냈다. 이러한 RNA 스플라이싱 결과는 산란 강도를 측정하는 것이 합리적이다. 두가지 대표적인 산란 현상인 산란 강도 및 라만 산란은 도 5a 및 도 5b에 나타났다. 매우 근접한 두 개의 플라즈몬 프로브로 RNA 스플라이싱의 변화를 반영할 수 있는 라만 산란 및 산란 강도는 산란 계적 강도 변화를 포함한다. 산란 강도(도 5a) 및 라만 산란(도 5b) 억제제의 존재와 부재의 RNA 스플라이싱을 비교하여 플라즈몬 결합의 평균 강도의 증가를 나타냈다. 따라서, RNA 스플라이싱 활성에 대한 산란 강도는, 스플라이싱 시간의 작용에서 억제제의 친화력(도 5c) 및 스플라이세오솜 복합체에 대한 억제제 활성으로 설명된다. 억제 진행 곡선(레드 곡선, 도 5c)으로부터 반응 시간의 작용에 대한 억제(%)는 억제제의 존재 유무(도 5d)에 따른 모든 시간의 mRNA 산물의 축적을 계속 측정하여 결정하였다. 이는, 이소깅제틴에 의한 스플라이세오솜의 자기 조립의 불안정화를 나타낸다. 따라서, $t_{1/2}$ 의 스플라이싱에서 관찰된 성장 억제제 농도의 증가는 엑손 - 인트론 경계 부위에 스플라이세오솜의 낮은 결합력에 의해 설명 된다.

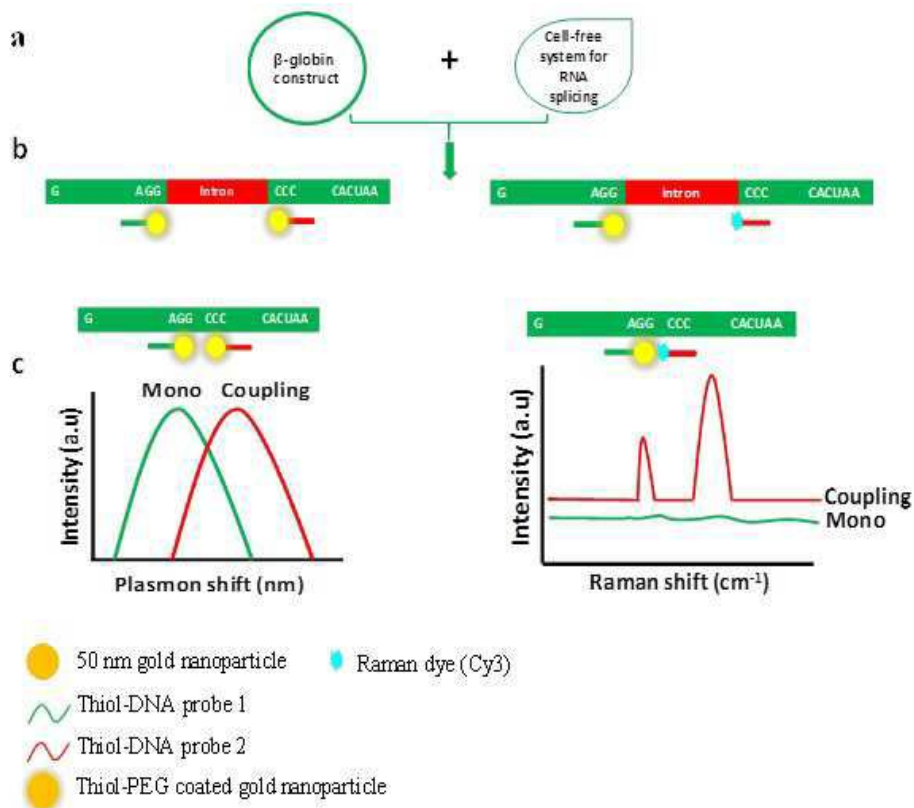
[0093] 실시예 5: 데이터 분석

[0094] 산란 강도, 플라즈몬 결합 및 라만 산란 기반 RNA 스플라이싱 모니터링을 위해, 소프트웨어 Solis T를 이용하여 Andor CCD 검출기로 데이터를 기록하였다. 모든 결합 쌍은 플라즈몬 이동 및 라만 이동을 나타내는 완만 또는 급진적으로 강도가 증가하는 것으로 나타낸다. 스플라이세오솜(spliceosome) 복합체 주입 후 모든 기록 과정은 0초로 세팅한 강도의 점진적인 하락을 포함한다. 단지 결합 쌍은 RNA 스플라이싱 후 이량체의 플라즈몬 이동과 플라즈몬 강도의 결합을 나타내는 분석을 포함한다. 레일리 산란과 라만 산란의 산란 및 스펙트럼 데이터는 OriginPro 프로그램(version 8.6)으로 그래프 하였다. 이러한 과정은 스플라이세오솜(spliceosome) 복합체의 첨가와 관찰 강도 증가 사이의 시간차에 의해 정의되는 스플라이싱 시간 결정을 OriginPro 프로그램으로 추가 분석하였다.

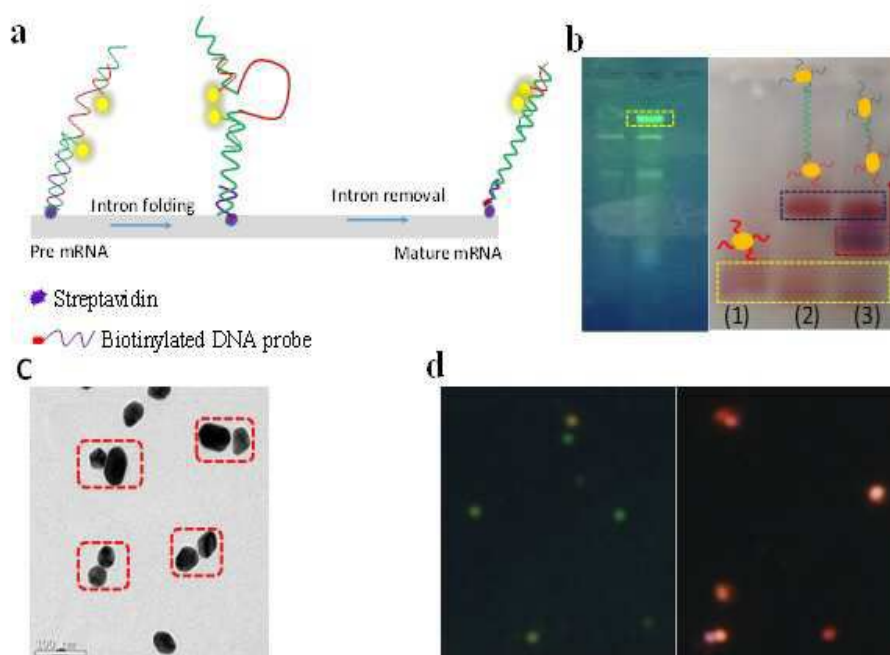
[0096] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

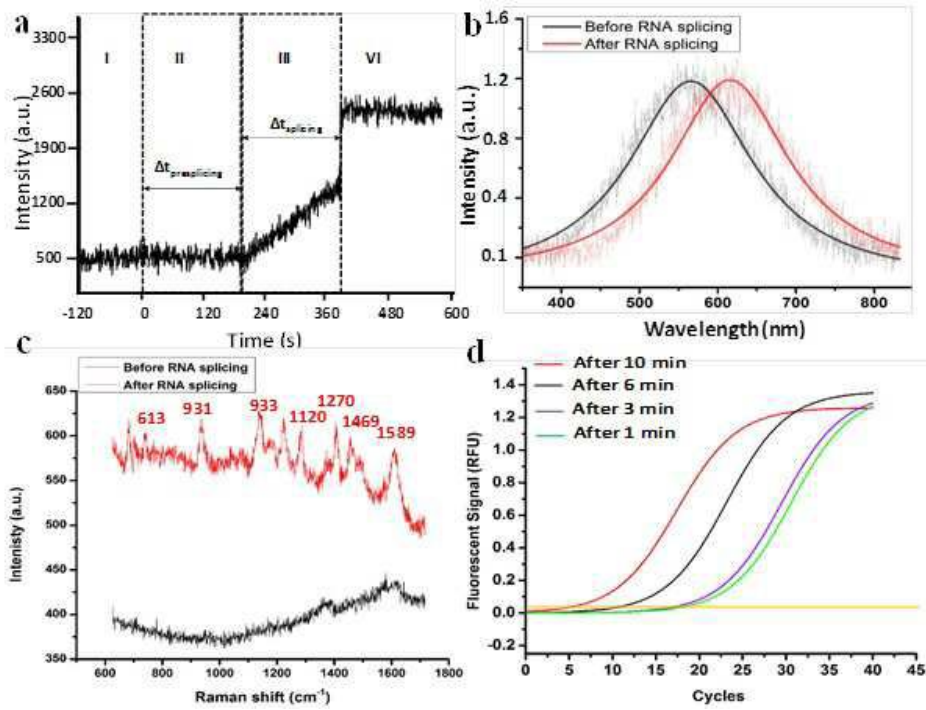
도면1



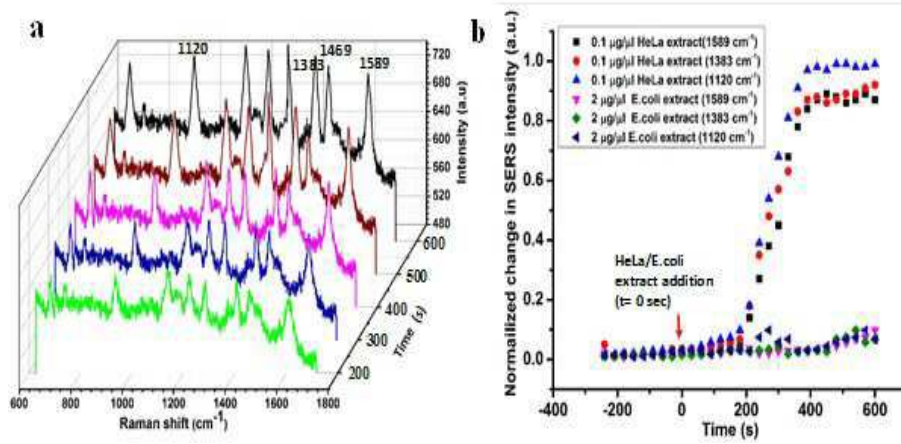
도면2



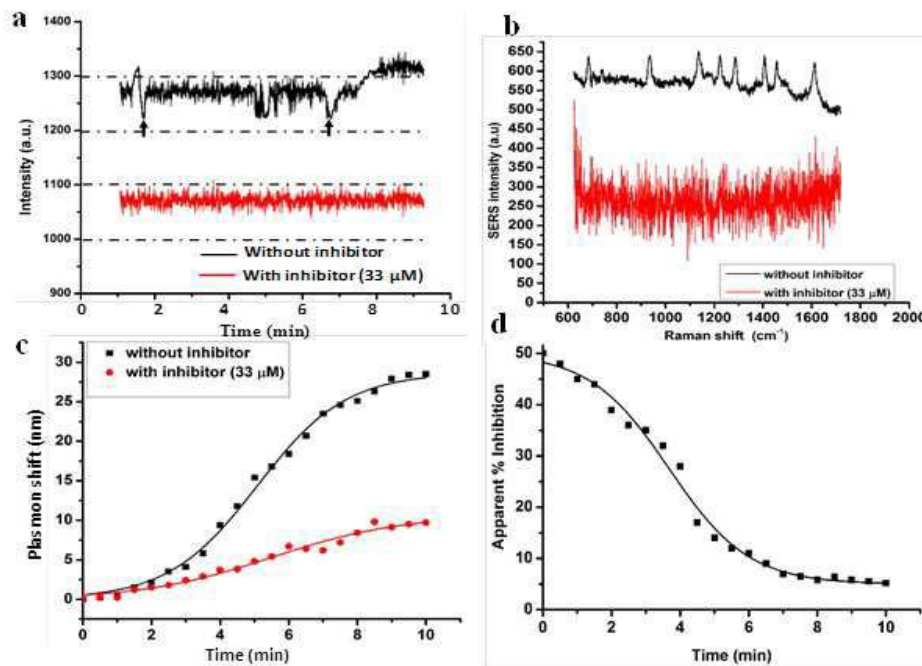
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
 - <120> Optical Microscopy for RNA Splicing on Single Molecules Using Scattering Intensity, Localized Surface Plasmon Resonance and Surface-Enhanced Raman Scattering
 - <130> P15-B304
 - <160> 9
 - <170> KoPatent In 3.0
 - <210> 1
 - <211> 27
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> P1
 - <400> 1
- aaagtcgacg ctgctgtgtgg tctaccc
- <210> 2
 - <211>
 - 31
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence

<220><223>	P2	
<400>	2	
aaactcgagt tagtgatact tgtgggccag g		31
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	P3	
<400>	3	
cgtggatcct gagaacttca		20
<210>	4	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	P4	
<400>	4	
cctgggcaac gtgctgtct g		21
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	P5	
<400>	5	
gtctggtcgt gcaacgggtc c		21
<210>	6	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	P6	
<400>	6	
gtgctggtg gtctaccct		19
<210>	7	
<211>	15	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> P7

<400> 7

gacccgttgc acgac

15

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P8

<400> 8

cacagtctgc ctagtacatt ac

22

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> P9

<400> 9

ccctgatttg gtcaatatgt gtac

24