(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0103997
(43) 공개일자 2010년09월29일

(51) Int. Cl.
G01N 33/50 (2006.01) *G01N 33/559* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0022118
(22) 출원일자 2009년03월16일
심사청구일자 2009년03월16일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
하상수
경기도 남양주시 도농동 부영그린타운아파트 210동 1201호
김예슬
경기도 수원시 장안구 정자1동 530-6호 한양연립 c동 9호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유수미

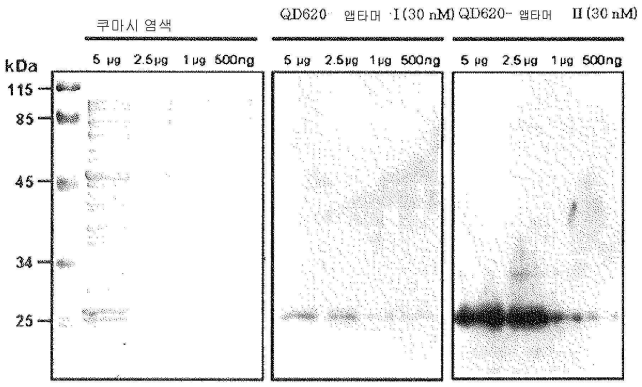
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 양자점-앱타머 접합체를 이용한 생분석 방법

(57) 요 약

본 발명은 양자점-앱타머 접합체(quantum dot-aptamer conjugate)를 이용하는 새로운 생화학적 분석 방법을 제공한다. 본 발명의 분석 방법은 DNA, RNA, 단백질, 펩티드 또는 소분자와 같은 타겟에 대해 특이적인 앱타머와 양자점의 접합체를 이용하여 타겟을 확인할 수 있도록 한다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

신선미

경기도 안양시 동안구 부흥동 관악현대아파트 121동 1002호

김민영

경기도 고양시 덕양구 행신동 햇빛마을 2405동 1702호

김지수

인천광역시 부평구 산곡3동 369-192 선포아파트 101동 1104호

김일현

경기도 고양시 일산구 일산2동 세인아파트 B동 104호

정동희

서울특별시 동대문구 회기동 106-5 호세고시텔 205호

특허청구의 범위

청구항 1

i) 양자점을 제조하는 단계,

ii) 확인하고자 하는 타겟에 대해 특이적으로 결합하는 앱타머를 제조하는 단계,

iii) 양자점-앱타머 접합체를 제조하는 단계,

iv) 타겟을 포함하는 혼합물을 젤 전기영동에 의해 분리하고 중합체 막으로 옮기는 단계,

v) iii) 단계에서 제조한 양자점-앱타머 접합체를 중합체 막에 첨가하여 혼성체화하는 단계, 및

vi) 이미징 분석에 의해 혼성체를 확인하는 단계

를 포함하는, 양자점-앱타머 접합체를 이용하는 생분석 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 타겟은 DNA, RNA, 단백질, 펩티드, 또는 소분자로부터 선택되는, 양자점-앱타머 접합체를 이용하는 생분석 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 타겟이 둘 이상이며, 각각의 타겟에 대한 양자점-앱타머 접합체를 제조하며, 각 접합체의 양자점은 서로 사이즈가 상이하도록 선택되어, 둘 이상의 타겟을 한번의 분석으로 확인할 수 있는, 양자점-앱타머 접합체를 이용하는 생분석 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 앱타머는 셀렉스(SELEX) 방법에 의해 선택되는, 양자점-앱타머 접합체를 이용하는 생분석 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 앱타머는 셀렉스(SELEX) 방법에 의해 선택되는, 양자점-앱타머 접합체를 이용하는 생분석 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 양자점과 앱타머의 접합체를 이용한 새로운 생분석 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 기존의 주요 생화학, 분자생물학적 분석 방법이었던 서던, 노던, 및 웨스턴 블롯팅을 대체할 수 있는, 양자점-앱타머 접합체(quantum dot-aptamer conjugate)를 이용한 분석 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 앱타머(aptamer)는 DNA, RNA, 소 분자, 펩티드, 및 단백질에 결합할 수 있는 비-천연 발생의 구조화된 올리고뉴클레오티드이다. 일반적으로, 앱타머는 셀렉스(SELEX)(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)로 불리는 인 비트로(in vitro) 선택 과정에 의해 생성된다. 세포 표면에 존재하는 단백질에 높은 친화성으로 특이적으로 결합하는 앱타머는 치료 안타고니스트, 아고니스트, 및 진단 제제로서 잠재적인 유용성을 가진다. 표적 단백질이 적절하게 접혀지기 위하여 세포막 또는 공-수용체(co-receptor)의 존재를 요구하는 경우, 정제된 가용성 단백질 표적으로 셀렉스 실험을 프로그램하는 것이 어렵거나 불가능하였다. 그러나, 셀렉스의 유용한 범위가 가용성 단백질의 비교적 간단한 정제된 형태에서 막 제제중의 단백질의 복잡한 혼합물 또는 살아 있는 세포의 표면상에서의 인 시추(in situ)의 단백질 혼합물로 확장된 최근의 진전은 이전에는 추적이 불가능하였던 타겟에 대한 앱타머를 발견하는 것이 가능하도록 한다. 또한, 복잡한 단백질 혼합물에 앱타머 선택

기술을 적용하는 것은 심지어 타겟에 대한 상세한 지식과 특성규명이 없이도 가능하다. 복잡한 타겟 셀렉스는 세포 분화의 수용체와 마커를 비롯한 다양한 세포-표면 단백질 뿐만 아니라 병원성 유기체에서 질병의 결정인자에 대한 강력하고 선택적인 앱타머의 분리를 가능하게 하였으며 따라서 광범위한 치료 및 진단적 유용성을 갖는다.

[0003] 한편, 양자점(quantum dot)(QD)은 반도체성 나노입자로서, 외부 빛 에너지에 의한 감쇠 효과가 적고, 높은 양자효율을 가지고 있어서 측정 감도를 향상시킬 수 있으며, 광안정성, 좁은 방출 밴드, 넓은 여기(excitation) 스펙트럼, 및 부위-특이적 타겟팅을 가능하게 하는 다양한 작용화에 대한 접근성을 비롯한, 그들의 독특한 광학적 이점으로 인하여 생물분자 라벨링을 위한 유용하고 선택적인 재료가 되어 왔다. 이들 양자점의 광-물리적 특성은 종래에 이용되던 형광적 유기 염료에 비하여 큰 이점을 제공한다.

[0004] 한편, 서던(Southern), 노던(Nothern), 및 웨스턴(Western) 블롯팅(blotting) 분석은 각각 특정 DNA, RNA 및 단백질의 검출 및 정량을 위한 생물학적 연구에서 가장 자주 이용되며 없어서는 안되는 방법들로서, 확인하고자 하는 대상에 대한 선택적인 결합을 하는 DNA, RNA 및 항체를 각각 이용하여 결합체의 형성을 확인한다.

[0005] 본 발명자들은 상기와 같은 그들의 독특한 광학적 이점으로 인하여 생물분자 라벨링을 위한 유용하고 선택적인 재료로서 주목받고 있는 양자점과 앱타머를 결합시킨 접합체를 이용하여, 기존의 서던, 노던, 및 웨스턴 블롯팅 분석 방법을 대체하여 보다 빠르고 효과적으로 생화학적 및 분자생물학적 분석을 가능하게 하는 새로운 분석방법을 개발하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 본 발명은 서던, 노던, 및 웨스턴 블롯팅 분석 방법을 대체할 수 있는 새로운 생분석 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 보다 구체적으로, 본 발명은 양자점-앱타머 접합체를 이용하는 새로운 생화학적 분석 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

[0007] 본 발명은 양자점-앱타머 접합체(quantum dot-aptamer conjugate)를 이용하는 새로운 생화학적 분석 방법을 제공한다. 본 발명의 분석 방법은 DNA, RNA, 단백질, 펩티드 또는 소분자와 같은 타겟에 대해 특이적으로 결합하는 앱타머와 양자점의 접합체를 이용하여 타겟을 확인할 수 있도록 한다.

[0008] 보다 구체적으로, 본 발명은

[0009] i) 양자점을 제조하는 단계,

[0010] ii) 확인하고자 하는 타겟에 대해 특이적으로 결합하는 앱타머를 제조하는 단계,

[0011] iii) 양자점-앱타머 접합체를 제조하는 단계,

[0012] iv) 타겟을 포함하는 혼합물을 젤 전기영동에 의해 분리하고 중합체 막으로 옮기는 단계,

[0013] v) iii) 단계에서 제조한 양자점-앱타머 접합체를 중합체 막에 첨가하여 혼성체화하는 단계, 및

[0014] vi) 이미징(imaging) 분석에 의해 혼성체를 확인하는 단계

[0015] 를 포함하는, 양자점-앱타머 접합체를 이용하는 생분석 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명 방법에 대한 상세한 설명에 앞서, 종래에 사용되던 분석 방법인 서던 블롯팅, 노던 블롯팅 및 웨스턴 블롯팅을 간단히 살펴보면, 먼저, 서던 블롯팅은 젤 전기영동에 의해 분리된 DNA 혼합물에서 특정 DNA의 존재 여부를 확인하기 위해, 젤에서 니트로셀룰로오스 막으로 옮긴 후, DNA 조각들의 위치가 보전된 니트로셀룰로오

스 막 위에 ^{32}P로 표지된 단일 가닥의 DNA 탐침과 혼성체화한다. 이 탐침은 상보적인 순서를 가진 DNA 조각과 혼성체화하게 되며, 그 다음에 자동방사선사진법에 의해 탐침의 염기 순서에 상보적인 염기 순서를 가진 DNA 조각의 위치를 확인할 수 있다.

[0017] 노던 블롯팅은 특정 염기 서열을 가지는 RNA의 존재를 확인하기 위한 서던 블롯팅의 응용법으로서, 젤 전기영동법으로 RNA 분자들을 분리한 후, 그들을 니트로셀룰로오스 막으로 옮긴 뒤에 상보적인 서열을 가진 탐침과 혼성체화함으로써 특정 RNA를 확인할 수 있다.

[0018] 웨스턴 블롯팅은 특이적 항체를 사용하여 특정한 단백질을 검출하는 면역분석법으로서, 단백질 혼합물을 젤 전기영동법으로 분리한 후, 니트로셀룰로오스 또는 폴리비닐리덴 다이플루오라이드(PVDF)와 같은 중합체 막으로 옮기고, 관심 단백질에 특이적인 항체를 중합체 막에다 첨가하여 관심 단백질과 반응하게 한다. 막 위에 형성된 단백질-항체 복합체는 이어서 첫 번째 항체에 특이한 방사선 표지를 가진 두 번째 항체로 막을 세척함으로써 첫 번째 항체와 복합체를 형성하게 한 후, 자동방사선사진법으로 그 위치를 확인함으로써 관심 단백질을 확인하게 된다.

[0019] 상기와 같은 세 가지 방법은 블롯팅을 하고 자동방사선사진법을 사용하는 등의 원리상의 공통점은 있으나, DNA, RNA, 또는 단백질의 분석을 위해, 각각, 방사선 표지를 가지고 있는 DNA, RNA, 또는 항체를 이용한다는 차이점이 있다. 이에 비하여, 본 발명은 DNA, RNA, 또는 단백질 등에의 선택적인 결합체의 형성을, 방사선 표지된 DNA, RNA 또는 항체를 대신해서, 양자점-앱타머 접합체를 이용한다는 점에서 상기 기존의 분석법과 구별된다.

[0020] 즉, 예를 들어, 특정 DNA의 확인을 위해, 그에 상보적인 서열을 가진 앱타머를 양자점에 접합시킨 후, 접합체를 중합체 막에 첨가하여 혼성체화하고, 이미징 시스템을 이용한 이미징 분석을 통해 확인하고자 하는 DNA의 위치를 알 수 있다. 더욱이, 특정 소분자에 대해서 선택적으로 결합하는 앱타머를 이용할 수 있으므로, 그 응용의 폭이 훨씬 광범위하다.

[0021] 또한, 특정 단백질을 확인하고자 하는 경우, 웨스턴 블롯팅은 두 가지의 항체를 필요로 하는 것에 비해서, 본 발명 방법은 그 특정 단백질에 선택적으로 결합하는 양자점-앱타머 접합체를 이용하고 양자점의 이미징 분석에 의해 단백질을 확인할 수 있으므로, 한 번의 복합체 형성으로 특정 단백질의 위치를 확인할 수 있다는 장점이 있다.

[0022] 항체는 그 생산이 용이하지 않은 경우가 많아 값이 비싸거나 구입 자체가 불가능한 경우가 많은 반면, 셀렉스라는 인비트로 선택 과정에 의해 거의 모든 단백질에 대해 선택적인 결합성을 가지는 앱타머를 만들 수 있으며, 이는 PCR이나 올리고뉴클레오티드 합성을 이용해 아주 쉽게 재생산할 수 있고, 이를 양자점에 접합 시키는 것은 그 비용과 응용력 측면에서 큰 이점을 가진다.

[0023] 또한, 양자점은 사이즈에 따라 방사 범위가 다르므로, 예를 들면 앱타머 A는 작은 사이즈의 양자점과 접합시키고, 앱타머 B는 큰 사이즈의 양자점과 접합시켜 두 가지의 양자점-앱타머 접합체를 준비한다면, 한 번에 두가지 단백질의 존재를 확인할 수 있다.

[0024] 따라서, 본 발명의 분석 방법은 종래의 서던 블롯팅, 노던 블롯팅, 및 웨스턴 블롯팅에 비하여 단시간에 저비용으로 효과적으로 타겟을 확인할 수 있도록 한다.

[0025] 본 발명 방법에 있어서, 제 1 단계의 양자점의 제조는 종래의 양자점 제조 방법에 따라 CdS, ZnS, PbS, CdTe 등과 같은 나노 물질을 합성한 후, SH, -OH, -COOH, $-NH_2$와 같은 작용기를 가지는 유기 물질로 코팅을 함으로써 이루어지거나, 또는 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 인비트로(Invitro) 등과 같은 화학 회사로부터 구입하여 사용할 수 있으며, 본 발명에 사용될 수 있는 양자점에는 특별한 제한은 없으며 당업자가 적절하게 선택하여 사용할 수 있다.

[0026] 본 발명 방법의 제 2 단계의 앱타머의 제조는 일반적인 앱타머의 제조 방법에 따라, 확인하고자 하는 타겟에 대해 선택적이고 높은 결합력을 가지는 올리고뉴클레오티드의 서열을 결정하여 합성한 후, 올리고뉴클레오티드의 5' 말단이나 3' 말단을 양자점 부분의 작용기에 공유적으로 결합할 수 있도록, -SH, -COOH, -OH 또는 $-NH_2$로 변

형을 시킴으로써 이루어질 수 있다.

[0027] 확인하고자 하는 타겟이 DNA, 또는 RNA일 경우, 타겟 서열에 상보적인 서열을 갖는 DNA 또는 RNA를 앱타머로서 이용할 수 있으며, 타겟이 단백질, 펩티드, 또는 소분자인 경우에는 인비트로 선택 방법인 셀렉스(SELEX)를 이용하여 타겟에 대해 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드를 선택하여 앱타머로 이용할 수 있다.

[0028] 셀렉스 방법은 다양한 형태의 선택된 기능을 수행하는 단일쇄 DNA 또는 RNA 올리고뉴클레오티드를 찾기 위한 인비트로 선택 방법으로서, 셀렉스 방법에 의해 소분자, 펩타이드, 단백질 등 다양한 형태의 타겟 분자에 대해 선택적으로 인식하는 리간드(앱타머)가 발견되었다. 셀렉스 방법에 의해, 약 10^{15} 개에 달하는 랜덤 집단의 서로 다른 서열을 갖는 올리고뉴클레오티드로부터 원하는 기능을 가진 앱타머를 찾을 수 있으며, 이때 각 올리고뉴클레오티드는 고유한 삼차원 구조를 가지며, 원하는 기능(예를 들어, 타겟 분자에 대한 선택적 인식)을 가지는 올리고뉴클레오티드에 대한 반복적인 선택, 그리고 전통적인 분자생물학적인 방법에 의해 선택된 올리고뉴클레오티드의 서열을 증폭하게 된다. 이러한 반복적인 선택과 증폭 과정을 거치면서, 궁극적으로, 원하는 분자나 그 화학 과정에 대한 전이 상태(transition states)에 대해 선택적인 결합성을 가지는 올리고뉴클레오티드가 그 집단의 대부분을 차지하게 된다. 그리고 이러한 과정의 마지막에 얻어진 각 앱타머의 서열을 확인하게 된다. 이러한 셀렉스를 자동화한 키트 또한 구매가능하다(예를 들어, 바이오멕 2000 피펫팅 로봇(Biomek 2000 pipetting robot),Beckman Coulter(USA)).

[0029] 앱타머는 양자점과의 커플링을 위하여 3' 말단 또는 5' 말단의 변형이 필요하며, 이러한 변형을 위해서는 고체상(solid-phase) 올리고뉴클레오티드 합성 방법이나 종래의 분자생물학 방법을 사용할 수 있다. 간단히 요약하면, 먼저, 5' 말단이 변형된 뉴클레오시드 단위체를, 분자생물학적 방법을 위해서는 모노포스페이트 형태로, 그리고 3' 말단이나 5'말단이 변형된 고체상 합성을 위해서는 보호된 포스포아미데이트 형태로 합성한다. 이와 같은 뉴클레오시드 단위체는 시그마-알드리치, 트리링크 바이오테크놀로지스(Trilink Biotechnologies)와 같은 회사로부터 구매가능하다.

[0030] 이어서, 5' 말단이 변형된 뉴클레오시드 단위체(모노포스페이트 형태)의 경우, 일반적인 전사 조건에서 올리고뉴클레오티드가 제조되며, 단, 다른 정상적인 트라이포스페이트(즉, RNA 합성의 경우, ATP, CTP, GTP, 및 UTP)에 비해 50 내지 100배 정도 많은 양의 5' 말단 변형 뉴클레오시드 단위체(모노포스페이트 형태)를 섞어준다. 이는 이러한 조건에서 5' 말단 변형 뉴클레오시드 단위체가 RNA 중간에 들어가게 되면, 트라이포스페이트가 아니라 모노포스페이트이기 때문에 더 이상의 연장 반응이 일어나지 않기 때문이다. 얻어진 혼합물 중에서 가장 긴 RNA를 분리해 내면 5' 말단이 변형된 앱타머를 분리할 수 있다.

[0031] 3' 말단 또는 5' 말단이 변형된 보호된 포스포아미데이트 형태의 경우, 고체상 올리고뉴클레오티드 합성 방법에 의해 3' 말단 또는 5' 말단이 변형된 앱타머를 얻을 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 타겟은 그 존재를 확인하고자 하는 임의의 DNA, RNA, 단백질, 펩티드, 또는 소분자(small molecule)(예를 들어, 항생제, 호르몬, 단당류, 코카인 등) 등일 수 있으며, 그에 대한 앱타머의 확보만 가능하다면 타겟에 대한 제한은 없다. 당업계의 현재 기술 수준에서 셀렉스 등에 의해 DNA, RNA 뿐만 아니라 거의 모든 단백질과 펩티드 및 소분자에 대해 선택적인 결합성을 가지는 앱타머의 제조가 가능하므로, 사실상 본 발명의 타겟에는 제한이 없다.

[0033] 본 발명 방법의 제 3 단계의 양자점과 앱타머의 접합은 일반적인 커플링 방법을 이용하여 이루어질 수 있다. 즉, -COOH와 -OH, -SH 또는 $-NH_2$ 사이의 커플링은, EDC(1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)카르보다이이미드) 또는 DCC(다이사이클로헥실카르보다이이미드)와 같은 커플링 제제를 이용한 에스테르 또는 아마이드 결합의 형성을 통해, 그리고 -SH와 -SH 사이의 커플링은 두 개의 티올기 사이의 디설파이드 결합의 형성으로 얻을 수 있다. 일반적인 방법을 간단히 요약하면, 티올 표면을 가진 양자점과 티올화된 올리고뉴클레오티드를 섞은 수용액을 헬륨 하에서 하루 정도 교반시킨 후, 용액의 NaCl 농도를 0.24 M로, 그리고 포스페이트 버퍼의 농도를 0.1

M 정도로 바꾼 후, 그 혼합물을, 0.2 M NaCl, 0.1 M 포스페이트 버퍼(pH 7.4), 0.01% 소듐 아지드 용액에 대하여 투석하면 티올화된 앱타머와 티올 표면을 가진 양자점을 커플링시킬 수 있다. 반응하지 않은 양자점을 제외한 화학물질들은 막 여과 등의 방법으로 쉽게 제거할 수 있다.

[0034] 본 발명 방법의 제 4 단계인 타겟을 포함하는 혼합물을 젤 전기영동에 의해 분리하고 중합체 막으로 옮기는 단계는 DNA, RNA, 또는 단백질 등을 분리하고 니트로셀룰로오스 등의 중합체 막으로 옮기는 당기술 분야의 일반적인 방법에 의해 당업자가 용이하게 실시할 수 있다. 이러한 젤 전기영동 등의 기술은 예를 들어 참고 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press] 등에서 찾을 수 있다.

[0035] 본 발명 방법의 제 5 단계인, 3 단계에서 제조한 양자점-앱타머 접합체를 중합체 막에 첨가하여 혼성체화하는 단계는 일반적인 서던 블롯팅, 노던 블롯팅, 웨스턴 블롯팅 등에서 중합체 막에 있는 타겟 분자를 확인하기 위하여 DAN 탐침 또는 항체 등을 중합체 막에 첨가하여 혼성체화하는 과정과 동일하며, 예를 들어, 양자점-앱타머 접합체를 함유한 용액에 중합체 막을 일정 시간 동안 접촉시켜 접합체와 타겟 사이의 혼성체화가 일어나도록 하는 방법 등을 이용할 수 있으며, 본 기술 분야의 당업자에 의해 용이하게 이루어질 수 있다.

[0036] 본 발명 방법의 제 6 단계인, 이미징 분석에 의해 혼성체를 확인하는 단계는 양자점의 이미징 분석에 사용되는 종래의 이미징 시스템을 이용하여 이루어질 수 있으며, 이러한 이미징 시스템의 예로는 LAS-3000 이미징 시스템(Fuji Film), Macro-이미징 시스템(Lightools Research, USA)등이 있다.

[0037] 또한, 본 발명의 방법은 확인하고자 하는 타겟이 두 가지 이상일 경우, 각각의 타겟에 대한 앱타머에 접합되는 양자점의 크기를 상이하게 함으로써 한 번의 분석으로 둘 이상의 타겟을 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명의 분석 방법에 의해 한 번의 분석으로 확인할 수 있는 타겟의 수는 특별히 제한되지 않는다.

효 과

[0038] 본 발명의 양자점-앱타머 접합체를 이용한 생분석 방법은 DNA, RNA, 단백질, 펩티드뿐만 아니라 소분자에 대한 확인도 가능하게 하며, 특정 단백질을 확인하고자 할 경우 두 가지 항체를 이용하여야 하는 번거로움 없이 양자점-앱타머 접합체만의 이용으로 단백질의 확인이 가능하며, 또한 방사 범위가 상이한 둘 이상의 양자점을 이용하여 한 번의 분석으로 두 가지 이상의 타겟을 확인할 수 있어, 그 효율 및 응용 범위에 있어서 종래의 분석 방법에 비하여 월등하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

[0040] 실시예 1. 양자점의 제조

[0041] 양자점 나노 물질을 제조하기 위하여, 4 mL의 물과 200 mL의 n-헵탄, 14.0 g의 소듐 비스(2-에틸헥실)설포석시네이트(AOT)를 섞어 AOT/n-헵탄의 유중수 마이크로에멀젼을 준비한 후, 120 mL과 80 mL로 나누었다. 0.48 mL의 1.0 M 중금속염 용액(시그마-알드리치로부터 구입가능한 아연, 카드뮴, 갈륨, 이리듐, 납 또는 수은 AA-등급 표준 용액)을 상기에서 준비한 120 mL에 더하고, 0.32 mL의 1.0 M Na_2S 용액을 상기에서 준비한 80 mL에 더하고, 두 용액을 섞었다. 헬륨 하에서 1시간 동안 교반하였다.

[0042] 상기와 같이 양자점 나노 물질을 얻은 후, 문헌(Bioconj. Chem. 2007, 18, 829-835)을 참조하여, 0.66 mL의 0.32 M 시스타민(cystamine)과 0.34 mL의 0.32 M 2-설파닐에탄 설폰산과 섞은 후 하루 동안 헬륨 하에서 교반을 시키고, 용매를 진공하에서 제거한 후, 피리딘, n-헵탄, 아세톤, 메탄올로 세척하여 티올 표면을 가진 양자점을 준비하였다. 그리고 5 microM의 티올화된 양자점과 45 microM의 1-에틸-3-(3-다이메틸아미노프로필)카르보다이이미드(EDC), 9 microM의 폴리(에틸렌 글리콜) (DAPEG)을 50 mM의 보레이트 버퍼(pH 8.5) 용액에 섞은 후, 2시

간 동안 교반한 후, 막 여과 방법으로 반응이 일어나지 않은 EDC와 DAPEG을 제거하여 DAPEG-중합체 코팅 양자점(DAPEG-PC-QD)을 준비하였다.

[0043] 실시예 2. 앱타머의 제조

[0044] 앱타머는 문헌(Nucleic Acids Research, 2003, 31, e110)을 참고하여, 히스티딘 태그(His-tag)에 선택적으로 결합하지만, 결합력이 서로 상이한 앱타머 I과 II를 준비하였다. 5' 말단이 $-(CH_2)_5COOH$로 변형된 구아닌 모노포스페이트(Mod-GMP)를 준비한 후, 전사 반응을 위해 다른 정상 뉴클레오티드의 양보다 100 배 정도 과량으로 더한 후, 일반적인 전사 방법으로 5' 말단이 변형된 앱타머를 준비하였다.

[0045] 실시예 3. 양자점과 앱타머의 커플링

[0046] 1.5 nmol의 DAPEG-PC-QD와 13.5 nmol의 EDC, 그리고 13.5 nmol의 앱타머를 50 mM의 보레이트 버퍼(pH 8.5) 용액에 섞은 후, 2시간 동안 교반한 후, 막 여과 방법으로 반응이 일어나지 않은 EDC와 DAPEG을 제거하고 n-헵탄, 아세톤, 메탄올로 세척하여 양자점-앱타머 접합체를 준비하였다.

[0047] 실시예 4. 양자점-앱타머 접합체를 이용한 타겟의 확인

[0048] 얻어진 양자점-앱타머 접합체와 His-태그를 가지는 단백질과의 특이성과 선택성을 알아보기 위해, 한 종류의 His-태그를 가진 단백질을 가지는 이. 콜리(E. coli)를 배양하였다(J. Cell Biol. 2003, 163, 71-81 참조).

[0049] 배양한 세포를 일반적인 분자생물학 방법, 즉, 세포 용해, 반복적인 원심분리, 재현탁, 및 1 mM 페닐메탄설포닐 플루오라이드를 가진 차가운 포스페이트-완충된 염수(PBS)에서의 초음파처리에 의해 얻어진 총 용해물을 12% SDS-PAGE로 분리하였다. 젤에 존재하는 단백질을 세미너리 일렉트로블롯터(seminary electroblotter)(Trans-Blot SD)를 이용하여 폴리비닐리덴 다이플루오라이드 (PVDF) 막으로 옮기고, 이 중합체 막을 블로킹 버퍼(blocking buffer) (10 mM Tris-HCl(pH 7.0)중의 5% 스킴 밀크, 0.15 M NaCl, 및 0.1% Tween 20 용액)와 상온에서 1시간 동안 항온처리 하고, 중합체 막을 10 mM Tris-HCl(pH 7.0), 0.15 M NaCl, 및 0.1% Tween 20 용액으로 세척한 후, 얻어진 중합체 막을 양자점-앱타머 접합체와 10 mM Tris-HCl(pH 7.0)중의 5% 소혈청 알부민, 0.15 M NaCl, 및 0.1% Tween 20 용액 조건에서 섞은 후 상온에서 30분간 부드럽게 흔들어준다. 그 후, 중합체 막을 10 mM Tris-HCl(pH 7.0), 0.15 M NaCl, 및 0.1% Tween 20 용액으로 세척하였다. 그리고 이미징은 LAS-3000 이미징 시스템(후지필름)을 이용하여 2초간 노출시킨 후 사진을 찍었다. 그 결과가 도 1에 나타나 있다.

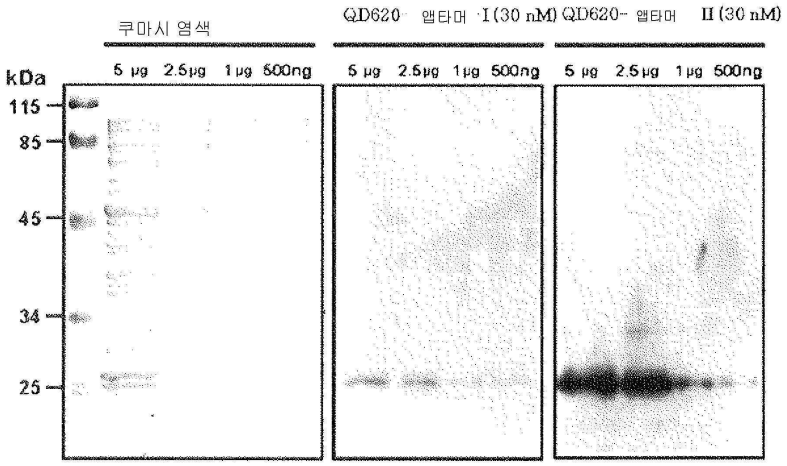
[0050] 도 1의 좌측은 세포 용해물의 SDS-PAGE 후 쿠마시 블루(Coomassie blue)로 염색한 사진이며, 중간의 사진은 양자점-앱타머 I 접합체로 혼성체화하여 영상화하여 얻은 사진이며, 우측의 사진은 양자점-앱타머 II 접합체로 혼성체화하여 영상화하여 얻은 사진이다. 앱타머 I을 포함하는 접합체 및 앱타머 II를 포함하는 접합체 둘 모두 500 ng의 적은 양의 His-태그를 가진 단백질도 확인할 수 있음을, 그리고 앱타머 II가 앱타머 I에 비하여 히스티딘 태그에 대해 결합력이 강함을 도 1에서 잘 확인할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 양자점-앱타머 접합체를 이용한 본 발명 분석 방법에 의한 분석 결과를 보여주는 사진이다.

도면

도면1


쿠마시 염색
QD620 앱타머 I (30 nM)
QD620- 앱타머 II (30 nM)
kDa
115
85
45
34
25
5 μg 2.5μg 1 μg 500ng
5 μg 2.5μg 1 μg 500ng
5 μg 2.5μg 1 μg 500ng