(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0052521
(43) 공개일자 2022년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/543 (2006.01) *C12N 15/115* (2010.01)
G01N 21/31 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/54346 (2013.01)
C12N 15/115 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0136563
(22) 출원일자 2020년10월21일
심사청구일자 2020년10월21일

(71) 출원인
한국기술교육대학교 산학협력단
충청남도 천안시 동남구 병천면 충절로 1600 (한국기술교육대학교내)
(72) 발명자
박승경
경기도 용인시 수지로 탄천산로 6, 203동 304호
지샨 (아흐마드) 칸
충청남도 천안시 동남구 병천면 충절로 1600
이마드 바라캇
충청남도 천안시 동남구 병천면 충절로 1600
(74) 대리인
특허법인(유한) 대아

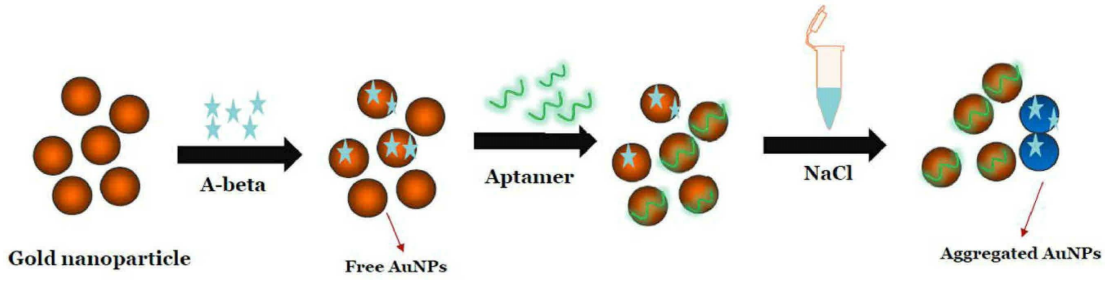
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **베타 아밀로이드 검출용 바이오마커 및 이를 이용한 베타 아밀로이드 농도의 확인방법**

(57) 요 약

본 발명은 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커 및 이를 이용한 베타 아밀로이드 농도의 확인방법에 관한 것으로, 피검시료 내의 베타 아밀로이드 농도를 쉽고 빠르게 확인함으로써 알츠하이머병 진단에 활용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
G01N 21/314 (2013.01)
G01N 2333/4709 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

금 나노입자;

압타머; 및

계면활성제;를 포함하는,

베타 아밀로이드 검출용 바이오마커.

청구항 2

금 나노입자; 압타머; 및 계면활성제;를 포함하고,

상기 베타 아밀로이드는 상기 금 나노입자에 특이적으로 결합하며,

상기 계면활성제는 상기 금 나노입자를 응집하게 하는 것을 특징으로 하는,

베타 아밀로이드 검출용 바이오마커.

청구항 3

금 나노입자; 압타머; 및 계면활성제;를 포함하고,

상기 압타머는 상기 금 나노입자에 특이적으로 결합하는 DNA 압타머로서, 상기 계면활성제로부터 금 나노입자를 보호하여 금 나노입자가 응집되지 않도록 하는 것을 특징으로 하는,

베타 아밀로이드 검출용 바이오마커.

청구항 4

금 나노입자에 베타 아밀로이드를 포함하는 피검시료를 첨가하는 단계(1단계);

1단계의 용액에 압타머를 첨가하는 단계(2단계);

2단계의 용액에 계면활성제를 첨가하는 단계(3단계); 및

3단계의 용액의 흡광도를 측정하여 베타 아밀로이드의 농도를 확인하는 단계(4단계);를 포함하는 것을 특징으로 하는,

베타 아밀로이드 농도의 확인방법.

청구항 5

금 나노입자에 베타 아밀로이드를 포함하는 피검시료를 첨가하는 단계(1단계);

1단계의 용액에 압타머를 첨가하는 단계(2단계);

2단계의 용액에 계면활성제를 첨가하는 단계(3단계); 및

3단계의 용액의 흡광도를 측정하여 베타 아밀로이드의 농도를 확인하는 단계(4단계);를 포함하고,

상기 계면활성제의 농도는 0.05 내지 0.15 몰 이고,

상기 압타머의 농도는 1 내지 4 μg/ml 인 것을 특징으로 하는,

베타 아밀로이드 농도의 확인방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커 및 이를 이용한 베타 아밀로이드 농도의 확인방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 금 나노입자, 압타머 및 계면활성제를 포함하는 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커와 이를 이용한 베타 아밀로이드 농도의 확인방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 노화에 의해 발생하는 대표적 질병 중의 하나인 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 또는 치매 관련 신경계 질환은 신경세포의 퇴화와 이로 인한 인지, 기억능력의 상실을 가져오는 질환으로서, 가족력에 의한 유전적인 경우와 65세 이상 노인에서 주로 발생하는 퇴행성 뇌질환으로 나눌 수 있다. 상기 질환은 사회의 노령화에 따라 급속하게 증가하는 추세로서, 조기진단, 예방 및 치료에 대한 필요성이 시급한 실정이다. 하지만, 신경 세포 퇴화와 기억 및 인지 능력의 상실에 대한 정확한 원인이 밝혀지지 않아 확실한 진단의 기준도 제시되지 않고 있다. 다만, 사망한 환자의 사후 뇌조직 연구에 의하면 신경세포 주변에 비정상적인 노인성 플라그(senile plague)의 형성이 다량 검출되는 현상이 대표적 특징으로 알려져 있다. 특히, 상기 노인성 플라그는 베타 아밀로이드(β-Amyloid)라는 펩타이드의 비정상적인 축적이 원인으로 알려지면서 알츠하이머병 또는 치매 관련 신경계 질환의 연구 분야에서 가장 핵심적인 목표물질로 간주되어 주목을 받고 있으며, 이러한 질병의 진단, 예방 및 치료의 연구에 새로운 화두로 떠오르고 있다.

[0004] 현재 사용되는 알츠하이머병 바이오마커로는 뇌척수액의 베타-아밀로이드 농도 측정과 아밀로이드 양전자 단층촬영(positron emission tomography)이 있다. 하지만 이들 바이오마커는 비싼 가격과 침습성 등의 한계로 인해 활용도가 크게 떨어지는 문제가 제기되고 있다.

[0005] 이에 본 발명자들은 알츠하이머병의 중요 지표인 베타 아밀로이드를 쉽고 빠르게 확인할 수 있는 바이오마커를 개발하였고, 이를 이용하여 피검시료 내 베타 아밀로이드의 농도를 확인할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국 등록특허공보 제10-1003124호 (2010.12.21. 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은, 알츠하이머병의 진단을 위해 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커를 제공하는데 있다.

[0009] 또한, 본 발명은 알츠하이머병의 진단을 위해 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커를 이용하여 시료 내의 베타 아밀로이드 농도를 쉽고 빠르게 확인할 수 있는 베타 아밀로이드 농도 확인방법을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제(들)로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제(들)는 이하의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 일 측면에 따르면, 본 발명은 금 나노입자, 압타머 및 계면활성제를 포함하는, 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은, 금 나노입자, 압타머 및 계면활성제를 포함하고, 상기 베타 아밀로이드는 상기 금 나노입자에 특이적으로 결합하며, 상기 계면활성제는 상기 금 나노입자를 응집하게 하는, 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은, 금 나노입자, 압타머 및 계면활성제를 포함하고, 상기 압타머는 상기 금 나노입자에 특이적으로 결합하는 DNA 압타머로서, 상기 계면활성제로부터 금 나노입자를 보호하여 금 나노입자가 응집되지 않도록 하는, 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커를 제공한다.

[0016] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명은 금 나노입자에 베타 아밀로이드를 포함하는 피검시료를 첨가하는 단계(1단계); 1단계의 용액에 압타머를 첨가하는 단계(2단계); 2단계의 용액에 계면활성제를 첨가하는 단계(3단계); 및 3단계의 용액의 흡광도를 측정하여 베타 아밀로이드의 농도를 확인하는 단계(4단계);를 포함하는, 베타 아밀로이드 농도의 확인방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 금 나노입자에 베타 아밀로이드를 포함하는 피검시료를 첨가하는 단계(1단계); 1단계의 용액에 압타머를 첨가하는 단계(2단계); 2단계의 용액에 계면활성제를 첨가하는 단계(3단계); 및 3단계의 용액의 흡광도를 측정하여 베타 아밀로이드의 농도를 확인하는 단계(4단계);를 포함하고, 상기 계면활성제의 농도는 0.05 내지 0.15 몰 이고, 상기 압타머의 농도는 1 내지 4 μg/ml인, 베타 아밀로이드 농도의 확인방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커 및 이를 이용한 베타 아밀로이드 농도의 확인방법에 따르면, 피검시료 내의 베타 아밀로이드 농도를 쉽고 빠르게 확인하여 알츠하이머병을 진단에 활용할 수 있는 효과가 있다.

[0020] 또한, 본 발명의 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커 및 이를 이용한 베타 아밀로이드 농도의 확인방법에 따르면, 피검시료 내의 베타 아밀로이드 농도를 원심분리 없이도 높은 민감도로 확인할 수 있는 효과가 있다.

[0021] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1는 본 발명의 일 실시예에 따른 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커의 사용방법을 단계별로 도식화 한 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 베타 아밀로이드 농도 확인방법의 공정흐름도이다.

도 3는 본 발명의 일 실시예에 따른 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커에 포함되는 염화나트륨의 최적 농도를 확인하기 위해 염화나트륨 용액의 농도에 따른 시료의 흡광도를 나타낸 그래프이다.

도 4은 본 발명의 일 실시예에 따른 일 실시예에 따른 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커에 포함되는 압타머의 최적 농도를 확인하기 위해 압타머의 농도에 따른 시료의 흡광도를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 베타아밀로이드의 농도에 따른 시료의 흡광도를 나타낸 검정곡선(standard curve) 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명에 따른 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

[0025] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것을 달성하는 방법은 첨부된 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다.

[0026] 그러나 본 발명은 이하에 개시되는 실시예들에 의해 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0027] 또한, 본 발명을 설명함에 있어 관련된 공지 기술 등이 본 발명의 요지를 흐리게 할 수 있다고 판단되는 경우 그에 관한 자세한 설명은 생략하기로 한다.

[0028] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0030] **베타 아밀로이드 검출용 바이오마커**

[0031] 본 발명의 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커는, 금 나노입자, 압타머 및 계면활성제를 포함한다.

[0032] 베타 아밀로이드는 알츠하이머병의 중요지표로서 본 발명에 따른 바이오마커를 사용하여 베타 아밀로이드가 검출되면 이를 알츠하이머병의 진단에 활용할 수 있다.

[0033] 금 나노입자는 입자의 크기가 1 ~ 100 nm 인 것으로, 본 발명의 기술분야에서 알려진 통상의 것을 사용할 수 있다.

[0034] 계면활성제는 상기 금 나노입자를 응집하게 하는 물질로서, 본 발명의 기술분야에서 알려진 양전하를 갖는 계면활성제 물질을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 hexadecyltrimethylammounium bromide(CTAB) 또는 염화나트륨(NaCl)을 사용할 수 있다.

[0035] 피검시료 내의 베타 아밀로이드는 상기 금 나노입자에 특이적으로 결합할 수 있다. 따라서 금 나노입자에 피검시료를 첨가하여 접촉하게 하면, 피검시료 내의 베타 아밀로이드가 금 나노입자에 결합하게 된다. 그러나, 베타 아밀로이드는 계면활성제로부터 금 나노입자를 보호하지 못하여, 베타 아밀로이드-금 나노입자 결합체에 계면활성제를 첨가하면 상기 베타 아밀로이드-금 나노입자 결합체는 응집하게 된다.

[0036] 압타머는 상기 금 나노입자에 특이적으로 결합하는 DNA 압타머로서, ARS-3(Arsenic-Binding Aptamer)를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 계면활성제로부터 금 나노입자를 보호하여 금 나노입자가 응집되지 않도록 할 수 있다. 따라서, 압타머와 금 나노입자의 결합체에 계면활성제를 첨가하면, 압타머가 금 나노입자를 보호하여 상기 압타머와 금 나노입자의 결합체는 응집되지 않는다.

[0037] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커의 이용방법을 도식화한 것이다. 베타 아밀로이드를 포함하는 피검시료를 과량의 금 나노입자에 첨가하면, 피검시료에 포함되어 있는 베타 아밀로이드는 양전하 값을 가지므로 음전하를 띄는 금 나노입자 표면과 정전기력에 의한 결합을 형성한다. 이 때, 베타 아밀로이드가 결합하지 않은 금 나노입자가 존재하게 되므로, 이에 압타머를 첨가하면 압타머는 강한 양전하 값을 가지므로 베타 아밀로이드가 결합하지 않은 금 나노입자에 정전기적 결합을 형성한다. 베타 아밀로이드-금 나노입자 결합체와 압타머-금 나노입자의 결합체가 공존하는 시료에 계면활성제를 첨가하면, 베타 아밀로이드-금 나노입자 결합체는 응집하게 되고, 압타머-금 나노입자의 결합체는 압타머가 DNA 크기와 전하값으로 인해 나노입자 응집을 방해하므로 응집되지 않는다. 따라서, 응집된 베타 아밀로이드-금 나노입자 결합체에 의하여 시료의 색이 푸른색 계열로 변하고 흡광도 비(OD 650/520: 붉은색 650 nm 영역의 흡광도와 초록색 520 nm 영역의 흡광도의 비)가 높아진다. 즉, 베타 아밀로이드의 농도 증가에 따라 높은 흡광도 비(OD 650/520)를 나타내게 된다.

[0039] **베타 아밀로이드 농도의 확인방법**

[0040] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 베타 아밀로이드 농도 확인방법의 공정흐름도를 나타낸 것이다.

[0041] 도 2을 참조하면, 우선 금 나노입자에 베타 아밀로이드를 포함하는 피검시료를 첨가한다(S100).

[0042] 상기 피검시료는 혈액, 뇌 척수액, 콧물, 타액 등의 생체유체를 사용하여 제조할 수 있다. 피검시료는 사용할 베타 아밀로이드 농도에 따른 흡광도의 검정곡선의 베타 아밀로이드 농도 내에 포함되도록 제조하는 것이 바람직하다.

[0043] 베타 아밀로이드는 알츠하이머병의 중요지표로서 본 발명에 따른 바이오마커를 사용하여 베타 아밀로이드가 검

출되면 이를 알츠하이머병의 진단에 활용할 수 있다.

[0044] 금 나노입자는 입자의 크기가 1 ~ 100 nm 인 것으로, 본 발명의 기술분야에서 알려진 통상의 것을 사용할 수 있다.

[0045] 피검시료 내의 베타 아밀로이드는 상기 금 나노입자에 특이적으로 결합할 수 있다. 양전하 값을 갖는 베타 아밀로이드는 음전하를 띄는 금 나노입자 표면과 정전기력에 의한 결합을 형성한다. 따라서 금 나노입자에 피검시료를 첨가하여 접촉하게 하면, 피검시료 내의 베타 아밀로이드가 금 나노입자에 결합하여 베타 아밀로이드-금 나노입자 결합체를 형성한다.

[0047] 다음, 상기 S100 에서 얻은 용액에 압타머를 첨가한다(S200).

[0048] 압타머는 상기 금 나노입자에 특이적으로 결합하는 DNA 압타머로서, ARS-3(Arsenic-Binding Aptamer)을 사용하는 것이 바람직하다.

[0049] ARS-3 압타머는 강한 양전하 값을 가지므로 상기 S100 에서 얻은 용액에 압타머를 첨가하면, S100에서 베타 아밀로이드에 결합하지 않고 남아 있는 과량의 금 나노입자에 압타머가 정전기적 결합을 하여 압타머-금 나노입자 결합체를 형성한다.

[0051] 다음, 상기 S200 에서 얻은 용액에 계면활성제를 첨가한다(S300).

[0052] 계면활성제는 상기 금 나노입자를 응집하게 할 수 있는 물질로서, 본 발명의 기술분야에서 알려진 통상의 것을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 hexadecyltrimethylammounium bromide(CTAB) 또는 염화나트륨(NaCl)을 사용할 수 있다.

[0053] 베타 아밀로이드는 계면활성제로부터 금 나노입자를 보호하지 못하여, 베타 아밀로이드-금 나노입자의 결합체에 계면활성제를 첨가하면 상기 베타 아밀로이드-금 나노입자의 결합체는 응집하게 된다.

[0054] 반면, 압타머는 DNA 크기와 전하값으로 인해 계면활성제에 의한 나노입자의 응집을 방해하므로, 압타머-금 나노입자의 결합체에 계면활성제를 첨가하면 상기 압타머-금 나노입자의 결합체는 응집되지 않는다. 따라서, 시료의 농도에 따라 압타머와 계면활성제의 경쟁반응이 달라지게 되고 그에 따른 금 나노입자의 응집상태가 변화하므로, 이를 이용하여 피검시료 내 베타 아밀로이드의 농도를 측정할 수 있다.

[0056] 다음, 상기 S300 에서 얻은 용액의 흡광도를 측정하여 베타 아밀로이드의 농도를 확인한다(S400).

[0057] 금 나노입자는 용액 내에서 균일하게 분산되어 있을 경우 붉은 색을 띄지만, 금 나노입자가 응집하게 되면 용액은 짙은 푸른색 계열로 변하게 된다. 이러한 발색 변화를 정량화 하면 금 나노입자의 응집 정도를 알 수 있게 된다. 주요 발색의 정량화를 위해서는 색깔에 따른 파장 영역을 파악하고, 각 파장별 흡광도를 분석하여 주요 발색 영역을 파악할 수 있다.

[0058] 이하 본 발명의 실시예에서는 주요 발색 영역을 붉은색(650 nm) 부터 초록색(520 nm)으로 설정하고, 이 두 파장대의 흡광도 비(OD 650/520)의 변화를 정량분석에 사용하였다. 표기된 흡광도 비가 낮을수록 용액은 붉은색에 가깝고, 높을수록 푸른색에 가깝게 된다.

[0059] 상기 베타 아밀로이드-금 나노입자 결합체와 압타머-금 나노입자 결합체의 계면활성제에 대한 응집도의 차이를 이용하여 피검시료 내의 베타 아밀로이드 농도를 확인할 수 있다. 즉, 베타 아밀로이드의 농도가 증가할수록 베타 아밀로이드-금 나노입자 결합체의 응집도가 높아져서 피검시료의 흡광도 비(OD 650/520)가 높아진다.

[0060] 흡광도는 마이크로 플레이트 리더 등의 통상의 흡광도 측정기를 이용할 수 있고, 특정 파장대에서 시료의 흡광도를 측정하고 흡광도비를 구한 후, 검정곡선과 비교하여 해당하는 베타 아밀로이드 농도를 확인할 수 있다.

[0062] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0064] **실시예**

[0065] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0067] 실험 재료

[0068] 금 나노입자: 제조에 필요한 유리기구들은 오염방지를 위해 질산과 염산을 1:3 비율로 혼합한 Aqua regia 용액으로 세척 후 건조한다. 38.8 mM trisodium citrate (Sigma-aldrich) 500 ul를 끓고 있는 1 mM $HAuCl_4$ (Sigma aldrich) 10 ml에 혼합하고, 10분 동안 잘 저으면서 끓인다. 이후 가열을 중지하고 15분 동안 용액의 색이 붉은색으로 변하도록 잘 교반한다. 혼합액을 실온으로 냉각 후 0.45um 필터를 이용하여 걸러주고, 걸러진 용액은 4℃에서 보관하여 제조하였다.

[0069] 압타머: ARS-3 압터머를 사용하였고, 알려진 시퀀스에 따라 외부업체에서 합성 후 구매하여 사용되었으며 (Bioneer, South Korea), 시퀀스는 서열번호 1로 나타내었고, 다음과 같다.

[0070] 5'- GGTAATACGACTCACTATAGGGAGATACCAGCTTATTCAATTTAAGAACAACCAACGTCGCTCCGGGTACTTCTTCATCAGATAGTAAGCAATCT -3'

[0071] 계면활성제: 계면활성제는 Sigma Aldrich 에서 구입한 NaCl을 사용하였다.

[0072] 피검시료의 준비: 베타 아밀로이드는 Genscript (Piscataway, New Jersey, United States)에서 구입한 $A\beta_{1-40}$를 사용하였고, 베타 아밀로이드가 대상농도 영역(0.95 pM-7.6 nM) 이 되도록 준비하였다.

[0074] 실험 방법

[0075] 상기와 같이 제조된 금 나노입자 70 ul의 시료에 상기 베타 아밀로이드(0.95 pM-7.6 nM) 10ul를 첨가하고, 10분간 실온에서 배양하였다(1단계). ARS-3는 50 mM HEPES buffer-pH 7.2 버퍼를 이용하여 2 nM 용액으로 희석하고, 1단계 용액에 ARS-3를 10 ul 첨가하고 실온에서 10분간 배양하였다(2단계). 2단계 용액에 염화나트륨(NaCl) 10ul을 첨가하고 혼합하였다(3단계). 최종 혼합된 시료는 마이크로 플레이트 리더(SpectraMax, USA)를 이용하여 650 nm와 520 nm 의 흡광도를 측정(4단계)하고, 흡광도 비(OD 650/520)를 구하였다.

[0077] 계면활성제의 최적농도 확인

[0078] 계면활성제의 최적농도 확인을 위하여, 실시예 1 내지 7를 아래 표 1과 같은 농도로 하고, 상기 실험방법으로 수행하였다.

표 1

[0080]

	베타 아밀로이드 농도 (nM)	계면활성제(NaCl)의 농도 (M)	압타머(ARS-3)의 농도 (μg/ml)
실시예 1	0	0.0	0
실시예 2	0	0.025	0
실시예 3	0	0.05	0
실시예 4	0	0.075	0
실시예 5	0	0.1	0
실시예 6	0	0.125	0
실시예 7	0	0.15	0

[0082] 도 3은 실시예 1 내지 7의 염화나트륨 용액의 농도 변화에 따른 시료의 흡광도를 나타낸 것이다. 도 3에서 확인

할 수 있듯이, 염화나트륨 0.025 몰 이후부터 흡광도 비가 급격히 증가하여 금 나노입자가 응집되므로, 계면활성제의 농도는 0.05 내지 0.15 몰이 바람직한 범위 임을 알 수 있고, 염화나트륨 0.075 몰 농도에서 최대 흡광도 비에 도달하여 금 나노입자가 가장 효율적으로 응집됨을 확인하였다. 따라서, 계면활성제는 2 μg/ml 농도가 본 발명에 따른 바이오마커의 최적 농도임을 알 수 있다.

[0084] 압타머의 최적농도 확인

[0085] 압타머의 최적농도 확인을 위하여, 실시예 8 내지 13을 아래 표 2와 같은 농도로 하고, 상기 실험방법과 같은 방법으로 수행하였다.

표 2

[0087]

	베타 아밀로이드 농도 (nM)	계면활성제(NaCl)의 농도 (M)	압타머(ARS-3)의 농도 (μg/ml)
실시예 8	0	0.075	0
실시예 9	0	0.075	0.25
실시예 10	0	0.075	0.5
실시예 11	0	0.075	1
실시예 12	0	0.075	2
실시예 13	0	0.075	4

[0089] 도 4는 실시예 8 내지 13의 압타머의 농도 변화에 따른 시료의 흡광도 비를 나타낸 것이다. 도 4에서 확인할 수 있듯이, ARS-3의 농도는 1 내지 4 μg/ml에서 흡광도가 낮아지므로 압타머의 농도는 1 내지 4 μg/ml이 바람직한 범위임을 알 수 있고, 압타머 2 μg/ml 농도에서 최저 흡광도에 도달하여 금 나노입자의 응집이 가장 효율적으로 저해됨을 확인하였다. 따라서, 압타머는 2 μg/ml 농도가 본 발명에 따른 바이오마커의 최적 농도임을 알 수 있다.

[0091] 검정곡선(standard curve) 작성

[0092] 베타 아밀로이드의 농도 변화에 따른 시료의 흡광도 비에 대한 검정곡선(standard curve) 작성을 위하여, 실시예 14 내지 22를 아래 표 3과 같은 농도로 하고, 상기 실험방법과 같은 방법으로 수행하였다.

표 3

[0094]

	베타 아밀로이드 농도 (nM)	계면활성제(NaCl)의 농도 (M)	압타머(ARS-3)의 농도 (μg/ml)
실시예 14	0	0.075	2
실시예 15	0.095	0.075	2
실시예 16	1.9	0.075	2
실시예 17	2.85	0.075	2
실시예 18	3.8	0.075	2
실시예 19	4.75	0.075	2
실시예 20	5.7	0.075	2
실시예 21	6.65	0.075	2
실시예 22	7.6	0.075	2

[0096] 도 5는 실시예 14 내지 22의 베타 아밀로이드의 농도 변화에 따른 시료의 흡광도로 작성한 검정곡선(standard curve) 이다. 따라서, 베타 아밀로이드를 포함하는 피검시료를 본 발명의 베타 아밀로이드 농도의 확인방법에

따라 흡광도를 측정하고 흡광도 비(OD 650/520)를 구하여 검정곡선에서 이에 해당하는 베타 아밀로이드 농도를 확인할 수 있다.

[0098] 지금까지 본 발명에 따른 베타 아밀로이드 검출용 바이오마커 및 베타 아밀로이드 농도의 확인방법에 관한 구체적인 실시예에 관하여 설명하였으나, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않는 한도 내에서는 여러 가지 실시 변형이 가능함은 자명하다.

[0099] 그러므로 본 발명의 범위는 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 안 되며, 후술하는 특허청구범위뿐만 아니라 이 특허청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 한다.

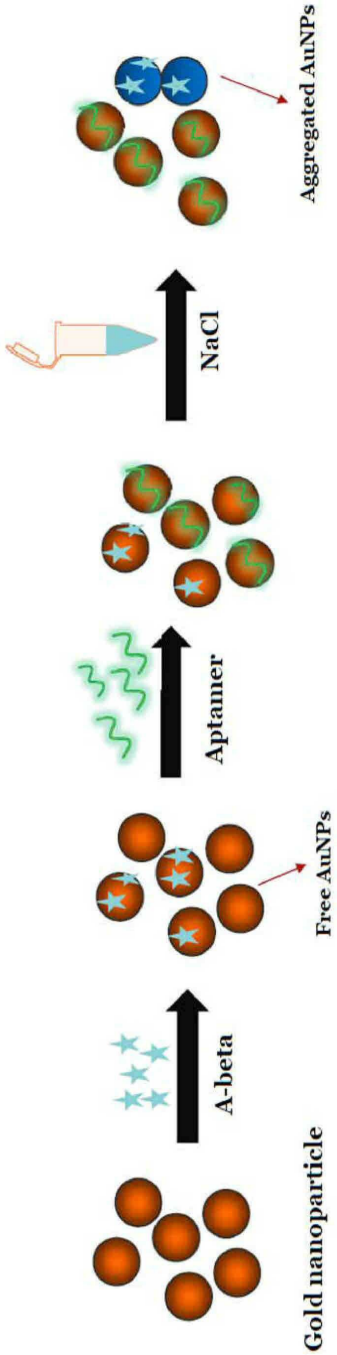
[0100] 즉, 전술된 실시예는 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적인 것이 아닌 것으로 이해되어야 하며, 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술될 특허청구범위에 의하여 나타내어지고, 그 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0102] <서열목록의 설명>

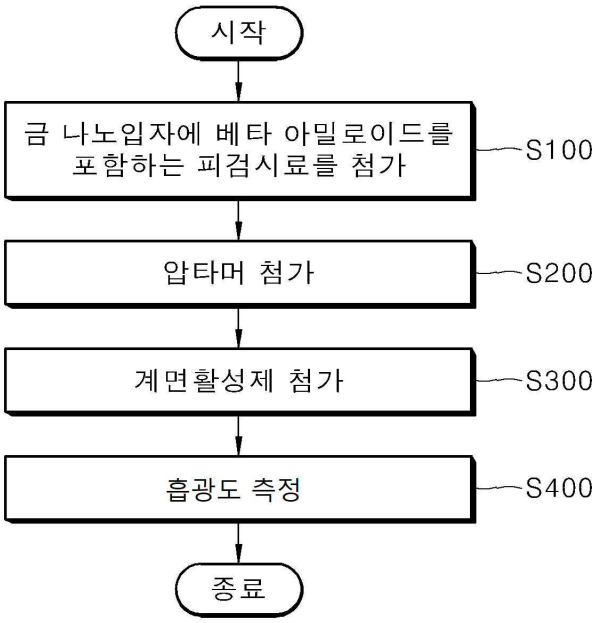
[0103] 서열번호 1은 본 발명의 일 실시예로 사용된 ARS-3 압터머의 염기서열이다.

도면

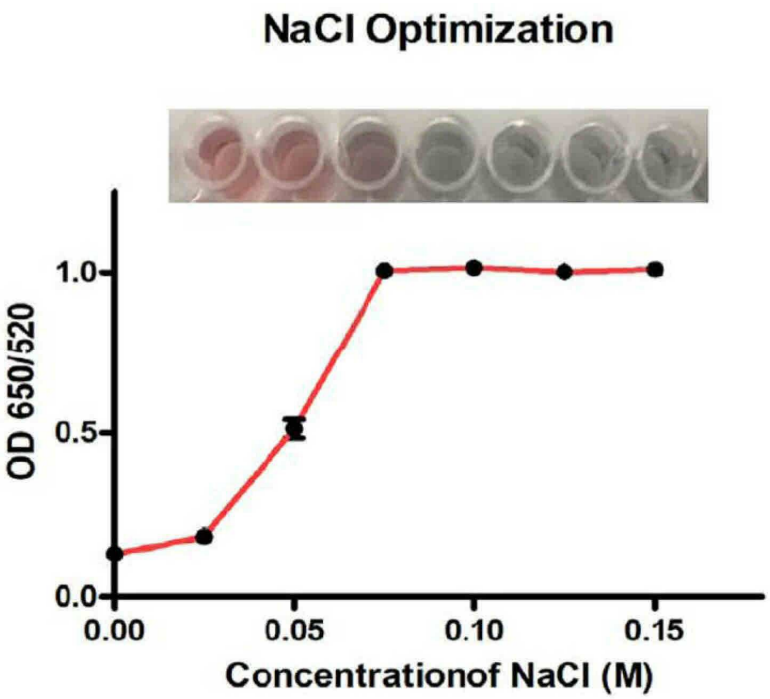
도면1


Gold nanoparticle
A-beta
Free AuNPs
Aptamer
NaCl
Aggregated AuNPs

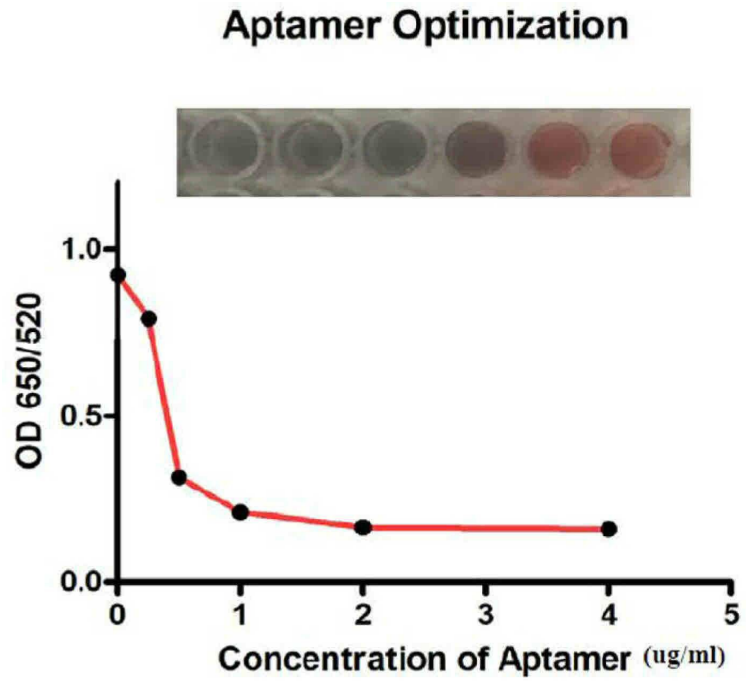
도면2


시작
금 나노입자에 베타 아밀로이드를 포함하는 피검시료를 첨가
S100
압타머 첨가
S200
계면활성제 첨가
S300
흡광도 측정
S400
종료

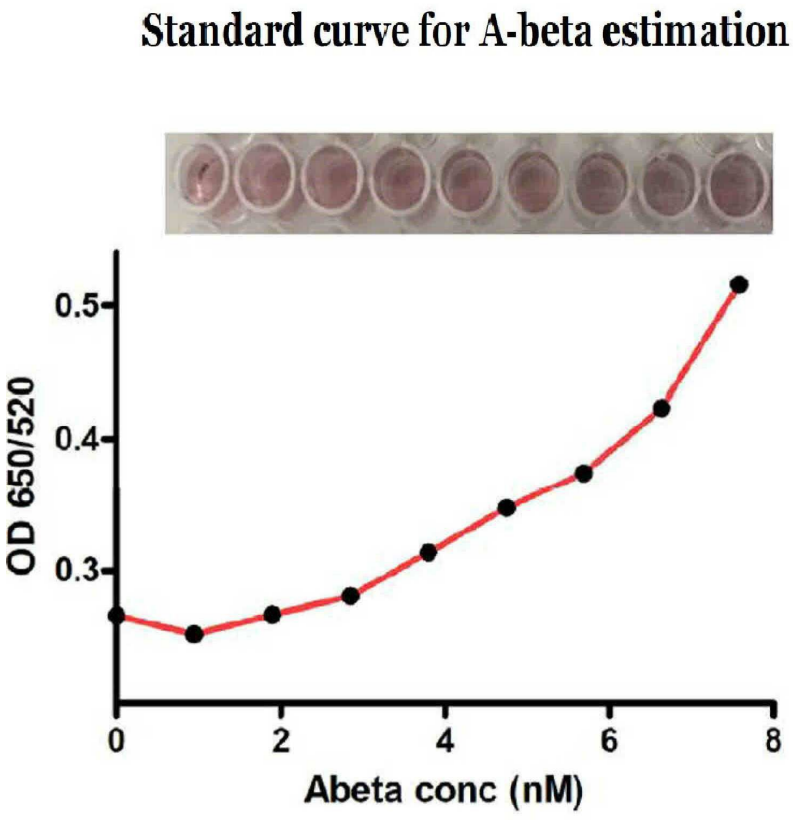
도면3


NaCl Optimization
OD 650/520
1.0
0.5
0.0
0.00
0.05
0.10
0.15
Concentrationof NaCl (M)

도면4


Aptamer Optimization
OD 650/520
1.0
0.5
0.0
0
1
2
3
4
5
Concentration of Aptamer (ug/ml)

도면5


Standard curve for A-beta estimation
OD 650/520
0.5
0.4
0.3
0
2
4
6
8
Abeta conc (nM)

서 열 목 록

<110> PARK, Seungkyung

KHAN, Zeeshan A.

BARAKAT, Emad

<120> BIOMARKER FOR DETECTING AMYLOID BETA AND IDENTIFYING METHOD FOR CONCENTRATION OF AMYLOID BETA USING THE SAME

<130> LNP200097

<160> 1

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ARS-3 aptamer

<400> 1

ggtaatacga ctcactatag ggagatacca gcttattcaa tttaagaaca accaacgtcg 60

ctccgggtac ttcttcatca gatagtaagc aatct 95