(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0066674
(43) 공개일자 2014년06월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/573 (2006.01) *C12Q 1/26* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0035617(분할)
(22) 출원일자 2014년03월26일
심사청구일자 2014년03월26일
(62) 원출원 특허 10-2012-0044853
원출원일자 2012년04월27일
심사청구일자 2012년04월27일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
최정우
서울 용산구 서빙고로 35, 103동 603호 (한강로3가, 용산시티파크1단지아파트)
안정희
서울 금천구 금하로15길 15
오병근
서울 마포구 모래내로9길 3, 106동 1506호 (성산동, 월드컵아이파크)
(74) 대리인
양부현

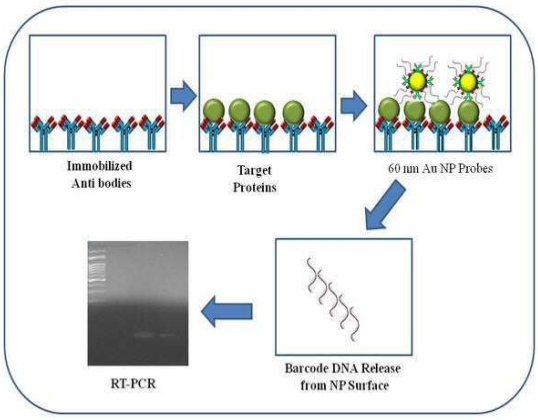
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **티로신 수산화효소 검출용 센서**

(57) 요 약

본 발명은 (a) 티로신 수산화효소에 대한 제1항체가 결합된 자성입자; 및 (b) 상기 티로신 수산화효소에 대한 제2항체 및 제1올리고뉴클레오타이드가 결합되어 있고 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 상보적인 서열을 갖는 바코드 DNA가 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 혼성화 되어 있는 금 나노입자를 포함하는 티로신 수산화효소 검출용 센서에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 본 발명은 티로신 수산화효소 검출용 센서는 최초의 신경전달-관련 효소 검출용 센서이이며, 0.2 ng/㎖ 미만의 티로신 수산화효소도 검출할 수 있는 고도의 민감성을 제공한다. 따라서, 본 발명의 티로신 수산화효소 검출용 센서는 신속하고 용이하게 티로신 수산화효소를 검출하여 파킨슨씨 질병과 같은 신경질환을 조기에 진단할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0004558
부처명	교육과학기술부
연구사업명	일반연구자 지원사업
연구과제명	신경 전달 물질을 검출하기 위한 나노 바코드 DNA 센서의 개발
기 여 율	80/100
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2012.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	201143008
부처명	지식경제부
연구사업명	전략기술인력산업
연구과제명	융합바이오 인력양성사업
기 여 율	20/100
주관기관	서강대학교 산학협력단
연구기간	2011.09.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

다음을 포함하는 티로신 수산화효소 검출용 센서:

(a) 티로신 수산화효소에 대한 제1항체가 결합된 자성입자; 및

(b) 상기 티로신 수산화효소에 대한 제2항체 및 제1올리고뉴클레오타이드가 결합되어 있고 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 상보적인 서열을 갖는 바코드 DNA가 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 혼성화 되어 있는 금 나노입자.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 제1올리고뉴클레오타이드는 티올기를 통하여 금 나노입자에 직접 결합하는 것을 특징으로 하는 센서.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 제1올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제1서열인 것을 특징으로 하는 센서.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 바코드 DNA의 서열은 서열목록 제2서열인 것을 특징으로 하는 센서.

청구항 5

다음의 단계를 포함하는 티로신 수산화효소 검출방법:

(a) (i) 티로신 수산화효소에 대한 제1항체가 결합된 자성입자 및 (ii) 상기 티로신 수산화효소에 대한 제2항체 및 제1올리고뉴클레오타이드가 결합되어 있고 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 상보적인 서열을 갖는 바코드 DNA가 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 혼성화 되어 있는 금 나노입자에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계;

(b) 상기 단계 (a)의 결과물에 자성을 인가(apply)하여 자성입자-티로신 수산화효소-금 나노입자 복합체를 분리하는 단계;

(c) 상기 복합체로부터 바코드 DNA-결합된 금 나노입자를 분리하는 단계;

(d) 상기 분리된 금 나노입자를 가열하여 바코드 DNA를 분리하는 단계; 및

(e) 상기 바코드 DNA을 유전자증폭 방법을 실시하여 분석하는 단계.

청구항 6

상기 제 5 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 자성입자-티로신 수산화효소-금 나노입자 복합체의 분리는 프로테아제(protease) K를 처리하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

상기 제 5 항에 있어서, 상기 단계 (d)의 유전자증폭 방법은 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 실시하는 것을

특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 유전자증폭 방법은 서열목록 제3서열 및 제4서열의 프라이머쌍을 이용하여 실시하여 티로신 수산화효소을 검출하는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 티로신 수산화효소 검출용 센서에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 티로신 수산화효소(Tyrosine Hydroxylase; TH)는 중추신경계 및 말초신경계에서 카테콜아민의 합성경로 중 첫 번째 효소이면서 속도조절효소이다.[1] 티로신 수산화효소는 흑색질, 복측피개영역, 시상하부, 후 신경구의 도파민성 뉴런 및 청반 및 외측피개의 비아드레날린성 뉴런 및 뇌간의 아드레날린성 뉴런에서 발현된다.[2] 장력부전 운동 및 탄도 운동과 관련된 심한 축성 저혈압 및 운동기능 감퇴증을 갖는 어린이에서 뇌척수액 신경전달물질 및 DNA 분석 후 티로신 수산화효소의 결핍으로 진단한다.[2] 혈청 내 티로신 수산화효소 농도는 매우 낮다(0.01-1 μM).[3] 따라서, 파킨슨씨 질환의 분자적 진단, 치료법의 구상 및 약물 효능의 평가에 있어 티로신 수산화효소의 정확한 확인이 요구된다.[4] 형광분석형광법, 크로마토그래피 및 RT-PCR 기술과 같은 단일의 세포로부터 티로신 수산화효소의 방출을 검출하기 위한 다양한 방법이 개발되었다.[5-7] 티로신 수산화효소의 방출은 신속하게 이뤄지므로 티로신 수산화효소의 방출을 검출하기 위해서는 고도의 공간적/시간적 해결이 요구된다.

[0003] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명자들은 저농도의 티로신 수산화효소를 검출할 수 있는 센서를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 티로신 수산화효소에 대한 항체가 결합된 자성입자 및 바코드 DNA와 상기 티로신 수산화효소에 대한 다른 에피토프를 갖는 항체가 결합한 금 나노입자를 이용하는 경우, 상기 자성입자 및 금 나노입자와 티로신 수산화효소가 복합체를 형성하고 상기 복합체의 바코드 DNA를 분리하여 유전자증폭 방법을 실시하여, 고도의 민감도를 갖는 티로신 수산화효소 검출용 센서를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0005] 따라서, 본 발명의 목적은 티로신 검출용 센서를 제공하는 데 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 신경전달-관련 물질의 검출방법을 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음을 포함하는 티로신 수산화효소 검출용 센서를 제공한다:

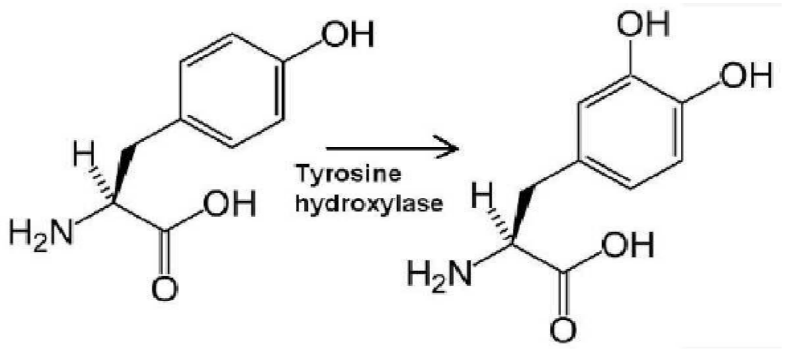
[0009] (a) 티로신 수산화효소에 대한 제1항체가 결합된 자성입자; 및

[0010] (b) 상기 티로신 수산화효소에 대한 제2항체 및 제1올리고뉴클레오타이드가 결합되어 있고 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 상보적인 서열을 갖는 바코드 DNA가 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 혼성화 되어 있는 금 나노입자.

[0011] 본 발명자들은 저농도의 티로신 수산화효소를 검출할 수 있는 센서를 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 티로신 수산화효소에 대한 항체가 결합된 자성입자 및 바코드 DNA와 상기 티로신 수산화효소에 대한 다른 에피토프를 갖는 항체가 결합한 금 나노입자를 이용하는 경우, 상기 자성입자 및 금 나노입자와 티로신 수산화효소가 복합체를 형성하고 상기 복합체의 바코드 DNA를 분리하여 유전자증폭 방법을 실시하여, 고도의 민감도를 갖는 티로신 수산화효소 검출용 센서를 개발하였다.

[0012] 본 발명의 티로신 수산화효소 검출용 센서는 (a) 티로신 수산화효소에 대한 제1항체가 결합된 자성입자; 및 (b) 상기 티로신 수산화효소에 대한 제2항체 및 제1올리고뉴클레오타이드가 결합되어 있고 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 상보적인 서열을 갖는 바코드 DNA가 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 혼성화 되어 있는 금 나노입자로 구성된다.

[0013] 본 명세서에서, 상기 티로신 수산화효소는 아미노산 L-티로신을 L-3,4-디히드록시페닐알라닌(L-3,4-dehydroxyphenylalanine; L-DOPA)로 전환하는 반응을 촉매한다. 상기 L-3,4-디히드록시페닐알라닌은 노르아드레날린(노르에피네프린) 및 아드레날린(에피네프린)의 전구체인 도파민의 전구체이며, 반응식은 다음과 같다:

[0014] 

[0015] 본 발명의 주요한 구성 중 하나는 티로신 수산화효소에 대한 제1항체가 결합된 자성입자이다. 상기 자성입자는 티로신 수산화효소과 특이적으로 결합하는 제1항체가 결합된 형태이다.

[0016] 본 발명에서 이용될 수 있는 항체는 티로신 수산화효소에 특이적으로 결합하는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다. 상기 항체는 완전한 항체 형태뿐만 아니라 항체 분자의 항원 결합 단편을 포함한다. 본 발명의 티로신 수산화효소에 대한 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519(1976)), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,56호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al, *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984; 및 Coligan , *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY, 1991에 상세하게 기재되어 있으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참조로서 삽입된다. 예를 들어, 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포의 제조는 불사멸화 세포주를 항체-생산 림프구와 융합시켜 이루어지며, 이 과정에 필요한 기술은 당업자에게 잘 알려져 있으며 용이하게 실시할 수 있다. 폴리클로날 항체는 시르투인 단백질 항원을 적합한 동물에게 주사하고, 이 동물로부터 항혈청을 수집한 다음, 공지의 친화성(affinity) 기술을 이용하여 항혈청으로부터 항체를 분리하여 얻을 수 있다.

[0017] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다. 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ε) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ1), 감마2(γ2), 감마3(γ3), 감마4(γ4), 알파1(α1) 및 알파2(α2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다 (Cellular and Molecular Immunology, Wonsiewicz, M. J., Ed., Chapter 45, pp. 41-50, W. B. Saunders Co. Philadelphia, PA(1991); Nisonoff, A., Introduction to Molecular Immunology, 2nd Ed., Chapter 4,pp. 45-65, sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1984)).

[0018] 항체 분자의 항원 결합 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), $F(ab')_2$ 및 Fv을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(C_{H1})을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 C_{H1} 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. $F(ab')_2$ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 PCT 국제 공개특허출원 WO 88/10649, WO 88/106630, WO 88/07085, WO 88/07086 및 WO 88/09344에 개시되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있고(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 $F(ab')_2$ 단편을 얻을 수 있다), 바람직하게는 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.

[0019] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 티로신 수산화효소에 대한 제1항체가 결합된 자성입자를 제조하기 위해, 자성입자와 항체를 결합하기 위한 반응을 실시한다.

[0020] 본 발명의 주요한 구성 중 하나는 상기 티로신 수산화효소에 대한 제2항체 및 제1올리고뉴클레오타이드가 결합되어 있고 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 상보적인 서열을 갖는 바코드 DNA가 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 혼성화 되어 있는 금 나노입자이다. 상기 제2항체는 제1항체와 티로신 수산화효소에 대하여 특이적으로 결합하며, 상기 제1항체 및 제2항체가 결합하는 티로신 수산화효소의 에피토프(epitope)는 상이하다.

[0021] 바람직하게는, 상기 제1올리고뉴클레오타이드는 티올기를 통하여 금 나노입자에 직접 결합한다.

[0022] 본 발명의 금 나노입자는 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 상보적인 서열을 갖는 바코드 DNA가 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 혼성화 되어 있다.

[0023] 상기 제1올리고뉴클레오타이드 및 바코드 DNA의 서열은 티로신 수산화효소의 핵산서열에 기초하여 디자인된 1-100개의 염기로 구성된 핵산서열로, 바람직하게는 상기 제1올리고뉴클레오타이드의 서열은 서열목록 제1서열이고, 바코드 DNA의 서열은 서열목록 제2서열이다. 상기 바코드 DNA는 제1올리고뉴클레오타이드와 상보적(complementary) 서열이다.

[0024] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 상기 언급된 서열 이외에 상기 뉴클레오타이드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 본 발명의 뉴클레오타이드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 핵산 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Smith and Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482(1981); Needleman and Wunsch, *J. Mol. Bio. 48:443(1970);* Pearson and Lipman, *Methods in Mol. Biol.* 24: 307-31(1988); Higgins and Sharp, *Gene* 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-3(1989); Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90(1988); Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NBCI (National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLSAT는 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.

[0025] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 제2항체, 제1올리고뉴클레오타이드 및 금 나노입자를 결합반응한 이후에 상기 제1올리고뉴클레오타이드와 바코드 DNA의 혼성화를 진행한다.

[0026] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 티로신 수산화효소 검출방법을 제공한다:

[0027] (a) (i) 티로신 수산화효소에 대한 제1항체가 결합된 자성입자 및 (ii) 상기 티로신 수산화효소에 대한 제2항체 및 제1올리고뉴클레오타이드가 결합되어 있고 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 상보적인 서열을 갖는 바코드 DNA가 상기 제1올리고뉴클레오타이드에 혼성화 되어 있는 금 나노입자에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계;

[0028] (b) 상기 단계 (a)의 결과물에 자성을 인가(apply)하여 자성입자-티로신 수산화효소-금 나노입자 복합체를 분리하는 단계;

[0029] (c) 상기 복합체로부터 바코드 DNA-결합된 금 나노입자를 분리하는 단계;

[0030] (d) 상기 분리된 금 나노입자를 가열하여 바코드 DNA를 분리하는 단계; 및

[0031] (e) 상기 바코드 DNA을 유전자증폭 방법을 실시하여 분석하는 단계.

[0032] 본 발명의 방법은 상기 티로신 수산화효소 검출용 센서를 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0033] 본 발명의 티로신 수사화효소 검출방법에 적용될 수 있는 시료는 세포생물학적 및 임상학적 시료를 모두 포함한다.

[0034] 본 발명의 상기 자성입자-티로신 수산화효소-금 나노입자 복합체로부터 바코드 DNA-결합된 금 나노입자를 분리하기 위해, 세린 프로테아제(Serine proteases, 예컨대, 프로테아제 K), 트레오닌 프로테아제(Threonine proteases), 시스테인 프로테아제(Cysteine proteases), 아스파테이트(Aspartate proteases), 메탈로프로테아제(Metalloproteases) 또는 글루탐산 프로테아제(Glutamic acid proteases)를 처리하여 실시할 수 있으며, 바람직하게는, 프로테아제(protease) K를 처리하여 실시한다.

[0035] 상기 바코드 DNA-결합된 금 나노입자의 바코드 DNA를 분석하기 위해 유전자 증폭 방법을 실시한다.

[0036] 본 발명이 유전자 증폭 방법으로 실시되는 경우, 바람직하게는 프라이머를 이용한 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다.

[0037] 본 명세서에 기재된 용어 “증폭 반응” 은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)(17, 18), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA)(19) (WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication)(20)(WO 90/06995), 타깃 폴리뉴클레오티드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CP-PCR)(미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-PCR)(미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification; NASBA)(미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호, 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification)(21, 22) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)(23)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭 방법들은 미국특허 제5,242,794, 5,494,810, 4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다.

[0038] PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 분

별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR 및 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)이 특정한 응용을 위해 개발되었다. PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. *PCR*. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있다.

[0039] 본 발명의 가장 바람직한 구현예에서, 증폭 과정은 미국특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호에 개시된 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다.

[0040] 본 발명의 방법에 따른 티로신 수산화효소을 확인하기 위해, 바람직하게는, 상기 유전자증폭 방법은 서열목록 제3서열 및 제4서열의 프라이머쌍을 이용하여 실시하여 티로신 수산화효소을 검출한다.

[0041] 상기 티로신 수산화효소는 파킨슨씨 질병의 주요한 마커로, 본 발명의 검출용 센서 또는 검출방법을 이용하는 경우, 파킨슨씨 질환을 조기에 진단할 수 있다.

발명의 효과

[0042] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0043] (a) 본 발명은 티로신 수산화효소 검출용 센서를 제공한다.

[0044] (b) 본 발명의 티로신 수산화효소 검출용 센서는 최초의 신경전달-관련 효소 검출용 센서이다.

[0045] (c) 본 발명의 티로신 수산화효소 검출용 센서는 0.2 ng/㎖ 미만의 티로신 수산화효소도 검출할 수 있는 고도의 민감성을 제공한다.

[0046] (d) 본 발명의 티로신 수산화효소 검출용 센서는 신속하고 용이하게 티로신 수산화효소를 검출하여 파킨슨씨 질병과 같은 신경질환을 조기에 진단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0047] 도 1은 표면 고정화 바이오-바코드 분석법의 과정을 도식화하여 보여준다.

도 2a 및 도 2b는 항-티로신 수산화효소 항체가 결합된 금 나노입자를 확인한 결과를 나타낸다. 도 2a는 항-티로신 수산화효소 항체가 결합된 금 나노입자의 SEM(Scanning Electron Microscopy) 이미지를 보여주고, 도 2b는 항-티로신 수산화효소 항체와 금 나노입자의 친화성을 보여준다.

도 3은 티로신 수산화효소 검출을 확인하기 위한 RT-PCR 산물의 아가로즈 젤 전기영동 이미지를 보여준다. 1열은 음성대조군, 2열은 0.156 ng/㎖, 3열은 0.312 ng/㎖, 4열은 0.625 ng/㎖, 5열은 1.25 ng/㎖, 6열은 2.5 ng/㎖, 7열은 5 ng/㎖, 8열은 10 ng/㎖, 9열은 알부민(비 특이적 단백질) 및 10열은 DNA 마커를 나타낸다. 모든 PCR 산물은 35 사이클로 PCR을 실시한 결과이며, 20 ㎕의 PCR 산물을 2% 아가로즈 젤에 전기영동하여 이티디움 브로마이드(Ethidium Bromide)로 가시화하였다.

도 4a 및 도 4b는 도파민성 세포에서 검출한 티로신 수산화효소의 RT-PCR 결과를 보여준다. 도 4a는 도파민성 세포의 세포질에서 발현하는 티로신 수산화효소를 나타내고, 도 4b는 바이오-바코드 분석법을 이용하여 도파민성 세포의 티로신 수산화효소를 검출한 결과를 보여준다. 1열은 음성대조군, 2열은 도파민성 세포의 결과이며, 3열은 DNA 마커를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0049] **실시예**

[0050] **실험 재료 및 방법**

[0051] *DNA 올리고뉴클레오타이드, 바코드 DNA 및 PCR 프라이머*

[0052] 티오-캡핑된 올리고 뉴클레오타이드 및 바코드 DNA의 서열은 각각 5'-TTT GGG GAA CAC CGT GGA GGG GCA TAG CAT CTC-$(A)_{10}$-$(CH_2)_3$-SH-3' 및 5'-GAG ATG CTA TGC CCC TCC ACG GTG TTC CCC -3'이다. 정방향(5'-GAT GGA TGC CTC ATT GGG G-3') 프라이머 및 역방향 프라이머(5'-GCA GCT CCA GGC CCC CCA GC-3')를 이용하여 바이오-바코드 DNA(합성의뢰; 바이오니어, 대한민국)를 증폭하였다.

[0053] *자성 프로브 준비*

[0054] 토실-활성형 자성 미세입자(Tosyl-activated magnetic microparticles, MyOne™ Dynabeads; 인비트로젠, 미국)을 래빗 폴리클로날 항체(abcam, 미국) 혼합물로 기능화 하였다. 간략하게, 10 ㎕ 티로신 수산화효소 폴리클로날 항체, 20 ㎕ 자성 미세입자, 84 ㎕ 3 M$(NH_4)_2SO_4$ 및 66 ㎕ 붕산염 버퍼를 0.2 ㎖ PCT 튜브에 조합하여 넣고 37℃에서 24시간 동안 1400 진동/분으로 반응하였다. 반응 후, 미세입자를 자성으로 분리하였다. 미세입자의 활성부위를 블로킹하기 위해 0.5% 소 혈청 알부민(Bovine Serum Albumin; BSA) 및 0.05% 트윈20을 포함하는 pH 7.4의 PBS(Phosphate Buffered Saline)을 블로킹 버퍼로 제조하여 250 ㎕을 미세입자에 첨가하고 37℃에서 24시간동안 반응하였다. 반응 후, 미세입자를 다시 자성으로 분리하여 자성-프로브 용액(0.1% 소 혈청 알부민, 0.05% 트윈20을 포함하는 pH 7.4 PBS) 1 ㎖로 2회 세척하였다.

[0055] *기능화된 금 프로브의 준비*

[0056] 당업계에 공지된 원-스텝 방법으로 항-티로신 수산화효소 항체 및 티올-캡핑된 올리고뉴클레오타이드를 금 나노입자에 결합하였다.[11] 항체- 및 티올-캡핑된 올리코뉴클레오타이드-결합 금 나노입자를 4 ㎖ PBS에 현탁하였다. 여기에 바이오-바코드 DNA 0.8 OD(Optical Density)를 첨가하여 4시간 동안 혼성화 하였다. 반응액을 4℃에서 원심분리(13,000×g, 30분)하고 완성된 티로신 수산화효소-나노입자-dsDNA 복합체를 NaCl(0.15 M)/PBS(0.01 M)에 현탁하여 4℃에 보관하였다. 항-티로신 수산화효소 및 DNA-결합 금 나노입자를 UV-가시 분광광도계를 이용하여 검출하였다. 금 나노입자 표면의 항체 활성은 ELISA(Enzyme-linked Immunosorbent Assay)를 이용하여 측정하였고 금 나노입자 상의 올리고뉴클레오타이드는 RT-PCR를 실시하여 검출하였다.

[0057] *티로신 수산화효소의 포획*

[0058] 자성 면역프로브/티로신 수산화효소/금 면역프로브의 샌드위치 면역분석법을 수행하고 DNA 바이오-바코드를 자성 분리 및 열 혼성화를 실시하였다. 공지된 방법을 수정하여 기질 유전자에 대한 RT-PCR에 의해 티로신 수산화효소를 검출하였다.11 수득한 RT-PCR 산물을 2% 아가로즈 젤 전기영동을 실시하여 분석하였다.

[0059] *세포 배양*

[0060] SH-SY5Y 세포를 10% 우태아혈청(Fetal Bovine Serum; FBS) 및 5% 항생제를 포함하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지에서 37℃의 5% CO_2 조건에서 배양하였다.

[0061] **결과 및 토론**

[0062] *항-티로신 수산화효소 항체의 결합*

[0063] 표적 항원을 인식하는 각 항체(폴리클로날)로 기능화된 60 ㎚ 금 나노입자 프로브를 바코드 분석에 이용하였다(도 1). 각 바코드 중 절반은 표적-리포팅 올리고뉴클레오타이드 프로브이고, 나머지 절반은 유니버설 서열이다. 금 프로브에 의해 인식되는 표적 항원의 에피토프와 상이한 에피토프에 대한 특이적인 모노클로날 항체를 자성 나노입자에 결합하고 표적 항원을 포획한다.[12] 표적-자성 나노입자 프로브 복합체는 자성 나노입자 프로브와 다른 영역에 결합하는 항체를 갖는 금 나노입자 프로브에 의해 샌드위치 형태가 된다(도 1). 이러한 복

합체를 자성으로 분리하고 세척한다. 디티오트레이톨(dithiothreitol)을 첨가하여 유도된 리간드 교환과정에 의해 바코드 가닥이 방출된다. 바이오-바코드 가닥을 RT-PCR법으로 확인한다. 금 나노입자 프로브는 항체 및 바코드 DNA 가닥(43 bp/입자)의 검출로 기능화된다. 금 나노입자 프로브를 0.8 OD의 농도로 저장하고 초과 바코드 DNA는 0.15 NaCl, 0.025% 트윈20, 0.1% BSA 및 10 mM 인산버퍼(pH 7.4) 용액으로 제거하였다.

[0064] 고정화된 금 콜로이드성 나노입자의 SEM(Scanning Electron Microscopy) 이미지를 도 2a에 나타내었다. 입자의 평균 직경은 약 60 nm이다. 1차원적 패턴으로 무작위 분포된 근접한 금 나노입자는 서로 자기-조립하였다.[13]

[0065] 티로신 수산화효소의 첨가 후, 고정화된 금 콜로이드성 나노입자의 UV-VIS(UltravioletVisible) 흡수 스펙트럼을 도 2b에 금 크기에 따라 나타내었다. 5 내지 100 nm 범위의 크기를 갖는 금 나노입자는 면역 후 결합 친화성이 증가하고 60 nm 금 나노입자가 최고의 친화성을 갖는 것을 보여준다. 50 및 60 nm의 직경을 갖는 금 나노입자로 제조한 결합체에 대한 결합 활성을 조사하였다. 항체 반응은 결합된 나노입자의 면역성을 결정하는 중요한 요소이다.

[0066] *바코드 프로브를 이용한 티로신 수산화효소의 검출*

[0067] DNA 바코드-기반 면역분석의 반응을 제한하는 많은 요소가 있다. 이러한 요소는 입자 또는 항체의 유형, 화학적 부착, 제거 및 세척 단계의 유효성 등을 포함한다. 이 가운데 면역프로브의 표적 분석물로의 면역학적 친화성이 가장 중요한 요소이다. 0.156 ng/㎖ 내지 10 ng/㎖ 범위의 모든 표적 농도는 음성 대조군(0 ng/㎖)과 용이하게 구별되었다. RT-PCR 상의 밴드 이미지는 농도 범위에 대해 표적 농도 및 진하기 간의 선형 관계를 보여준다.

[0068] 자성 나노입자 면역프로브를 0.156 ng/㎖ 티로신 수산화효소와 반응하였다. 반응 후, 시료에 프로테아제 K를 처리하고 DNA 용리 키트를 이용하여 바코드 DNA를 분리하였다. 최종적으로, RT-PCR을 위해 50 ㎕ DNA-프리 워터를 첨가하여 DNA를 용해하였다. 도 4는 RT-PCR 산물의 젤 전기영동 이미지를 나타낸다. 면역분석 시, 세척 단계가 적절히 수행되지 않은 경우 허위음성결과를 나타내게 된다.

[0069] *바코드 분석을 이용한 SH-SY-5Y 세포에서 티로신 수산화효소의 검출*

[0070] 신경세포 모델로부터 신경전달물질의 방출을 조사하기 위해, 티로신 수산화효소에 형광염료를 합성하였다. 면역형광 염색법으로 티로신 수산화효소의 표현형을 확인하였다(도 4a). 티로신 수산화효소의 발현은 SH-SY 5Y 세포의 세포질 부분에서 관찰되었다.

[0071] 도 4b에서 확인할 수 있듯이, SH-SY 5Y 세포 추출물에 RIPA(RadioImmunoPrecipitation Assay) 단백질 용해 버퍼를 처리하였다. SH-SY 5Y 세포에서 바이오-바코드 분석법을 이용하여 10 nM 티로신 수산화효소 농도에서도 검출되는 결과를 보여주었다. 면역 프로브가 도파민성 세포로부터 분비되는 티로신 수산화효소를 포획할 수 있는지 확인하고자 하였다. 이를 확인하기 위해, 면역프로브의 유용성을 입증하기 위한 간단한 접근법으로 종래의 RT-PCR을 이용하였다. 이는 비드 및 티로신 수산화효소의 비-특이적 상호작용 또는 미세비드의 블로킹 효과를 때문이다. 면역프로브의 다른 카테콜아민과의 -특이적 상호작용은 면역프로브의 특이성을 평가하는데 중요하다. 임상에의 적용 가능성을 조사하기 위해, 회복실험을 실시하였다. 1×10^{6} 세포/㎖의 SH-SY 5Y 세포로부터 유래한 추출물의 티로신 수산화효소의 회복은 94.6% 내지 102% 이다.

[0072] **결론**

[0073] 본 발명에서, 소량의 티로신 수산화효소를 검출하기 위해 면역흡착 바이오-바코드 분석에 항체 및 dsDNA를 갖는 금 나노입자의 이중-조작을 적용하였다. 이중-조작 금 나노입자를 UV-VIS 분광 광도계로 확인하고 항-도파민 및 올리고뉴클레오타이드를 결합하여 RT-PCR로 확인하였다. 이러한 실험은 조작된 금 나노입자가 우수한 안정성 및 반응성, 및 그 천연 대생물 활성을 유지하는 구체적인 증거를 제시한다, 조작된 금 나노입자를 사용하는 면역흡착 바이오-바코드 분석은 0.156 ng/㎖ 수준의 저농도의 티로신 수산화효소도 검출할 수 있는 고도의 민감성을 갖는다. 또한, 항체 및 올리고뉴클레오타이드의 분자비, 혼성화 온도 또는 실시간 PCR을 사용하여 최적화하면 민감도를 향상시킬 수 있다. 따라서, 면역흡착 바이오-바코드 분석법은 도파민성 세포 내의 티로

신 수산화효소를 검출하기 위한 고속대량 스크리닝 방법이다.

[0074] **참고문헌**

[0075] 1. J Mallet Tyrosine hydroxylase from cloning to neuropsychiatric disorderstes *Brain Res Bull.* 50, 381 (1999)

[0076] 2. S.C. Daubner, T. Le, S and S. Wang Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis, *Archives of Biochem. Biophy,* 508,1 (2011)

[0077] 3. E Oliverira, C. R. Pinheiro, A. P Santos-Silva, IH Trevensoli, Y Areu-Villaca, JF Nogueira Neta, AM Reis, M C F Passos, E G Moura and P C Lisbora, Nicotine exposure affects mothers and pops nutritional, biochemical and hormonal profiles during lactation in rats. *J. Endocrinology,* 205, 159 (2010)

[0078] 4. W Yeung, V CN Wong, K Chan, J. Hui, C Hung E Yau, C Ko, C lam , C. M. Mak, S. Siu and L Low expanding Phenotype and Clinical analysis of trosine hydroxylase defiency , *J Child Neurology* 26, 179 (2011)

[0079] 5.T Nagatsu and T Yamamoto, Flurescence Assay of tyrosine hydroxylase activity in tissues homegrnate, *Cellular and molecular life Science* 24, 1183 (1968)

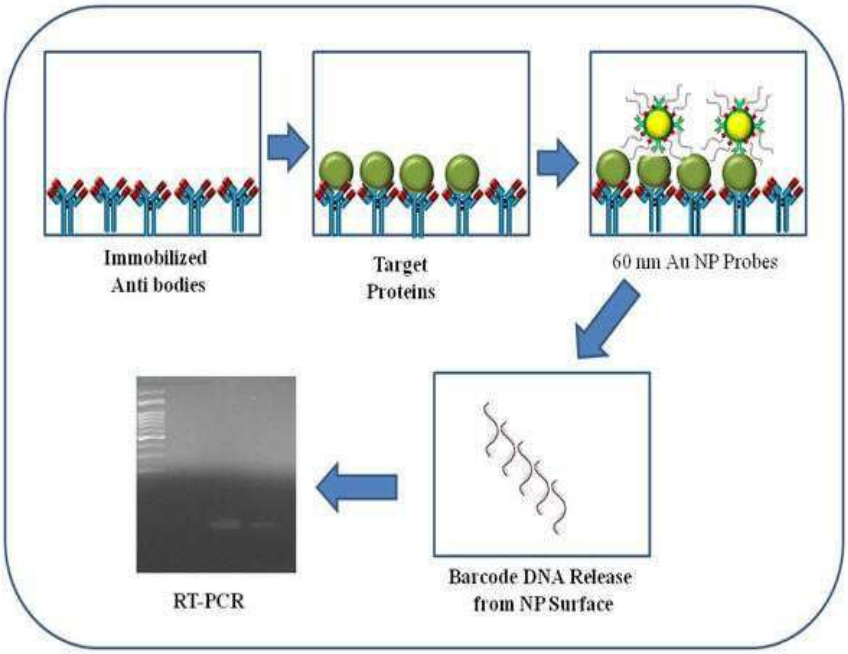
[0080] 6. T. Lloyd and M A Walega, Purification of tyrosine hydroxylase by high pressure liquid chromatography, *Analy.l biochem*, 116, 559 (1981)

[0081] 7. ST Lee, YL Suh, Y Ko, C Ki, K W Sung, H Kim, J Kim, S Kim, H Chueh, S H Lee, K H Yoo, H H Koo, measure of tyrosine hydroxylase transcripts in bone marrow using biopsied tissue instread of aspirates for neuroblastoma, *Pediatr Blood Cancer* 55, 273 (2010)

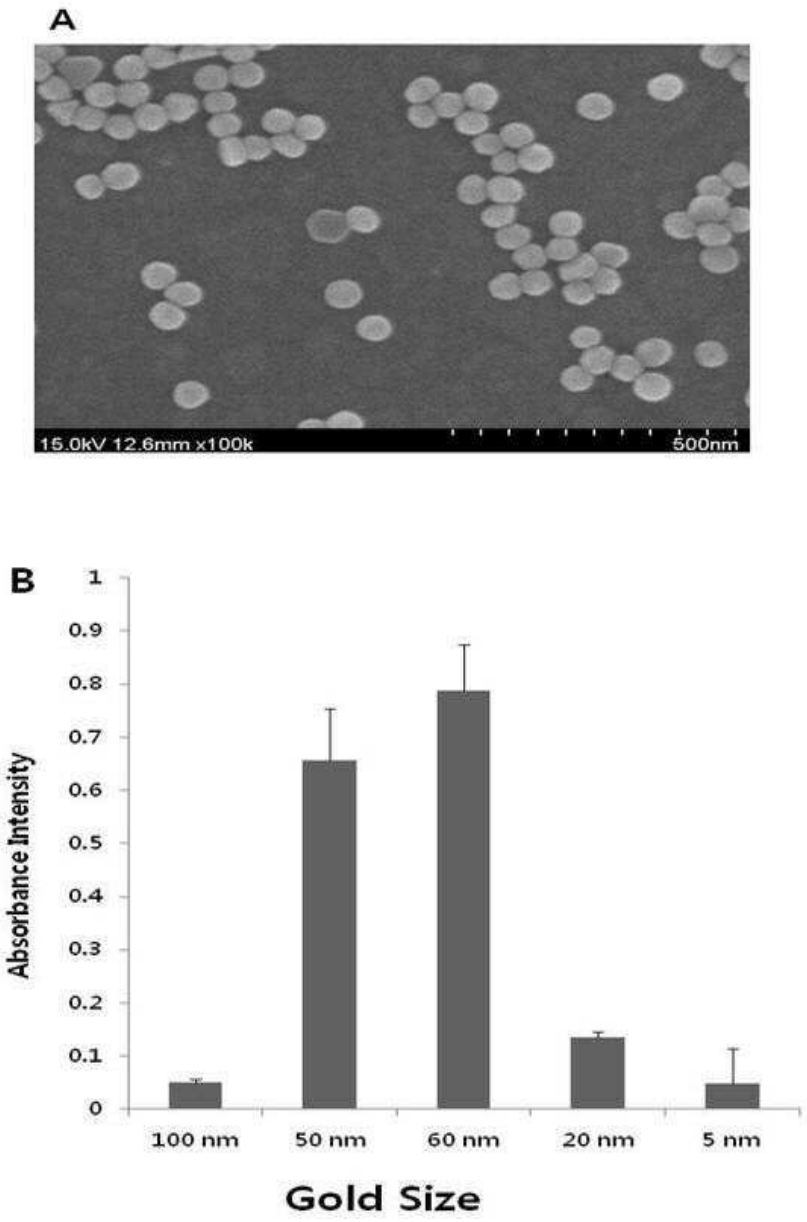
[0082] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

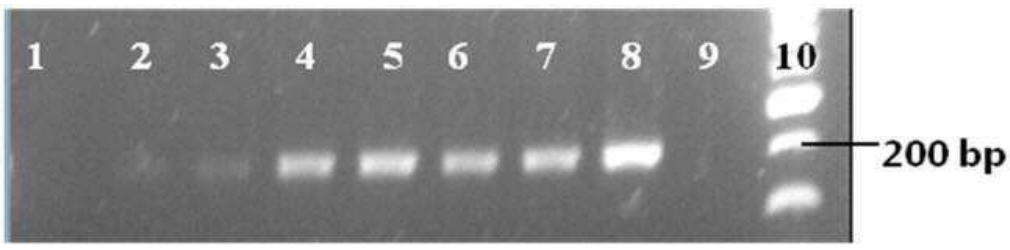
도면1


Immobilized
Anti bodies
Target
Proteins
60 nm Au NP Probes
Barcode DNA Release
from NP Surface
RT-PCR

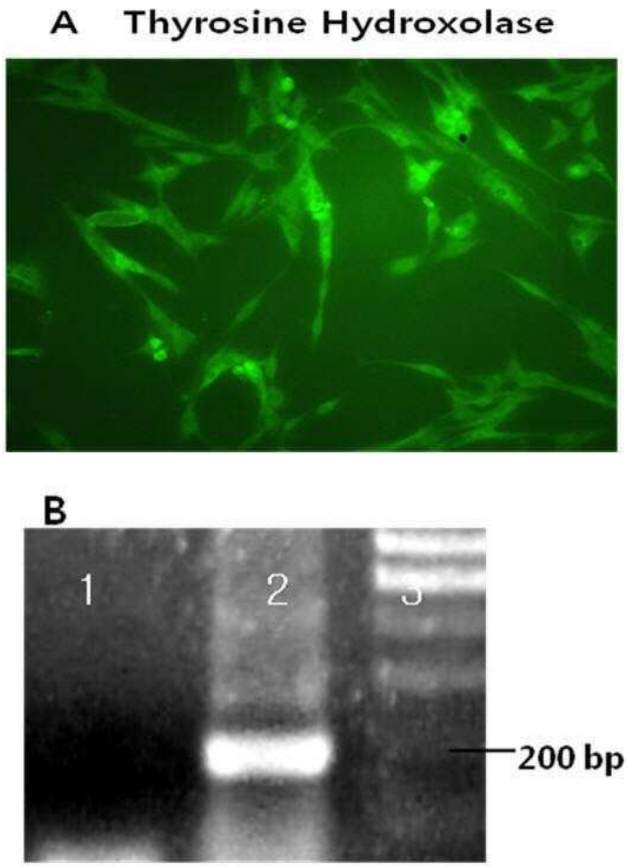
도면2


A
15.0kV 12.6mm x100k
500nm
B
Absorbance Intensity
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
100 nm
50 nm
60 nm
20 nm
5 nm
Gold Size

도면3


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
200 bp

도면4



서 열 목 록

<110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University

<120> Sensor for Detecting of Tyrosine Hydroxylase

<130> PN120176

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 43

<212> DNA

<213> 1 oligonucleotide

<400> 1

tttggggaac accgtggagg ggcatagcat ctcaaaaaaa aaa 43

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Barcod DNA

<400> 2

aaacccctg tggcacctcg tatcgta 27

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> forward primer

<400> 3

gatggatgcc tcattgggg 19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> reverse primer

<400> 4

gcagctccag gccccccagc 20