



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0101228

(43) 공개일자 2015년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0022673

(22) 출원일자 2014년02월26일

심사청구일자 2014년02월26일

(71) 출원인

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(72) 발명자

이형빈

인천광역시 서구 가정로 387, 116동 1101호 (신현동, 신현이편한세상하늘채)

이상원

서울특별시 서초구 동광로11길 68, 201호 (방배동, 이수빌)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김보민

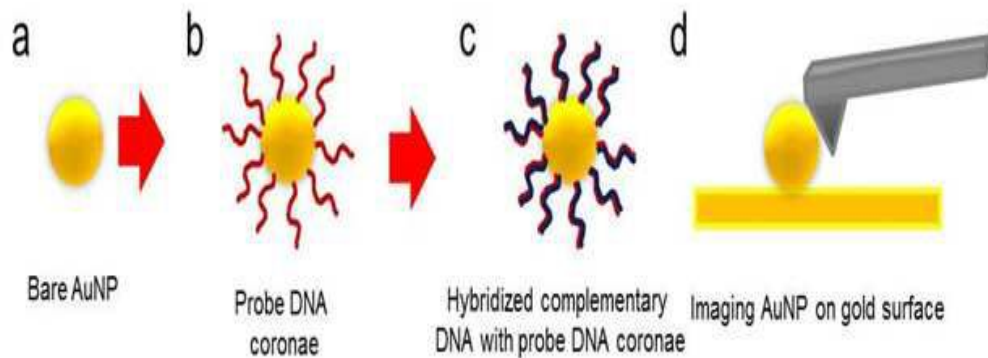
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **캘빈 프루브 현미경을 이용한 나노입자 기반의 고감도 다중 유전자 돌연변이 검지방법**

(57) 요약

본 발명은 캘빈 프루브 현미경을 이용한 나노입자 기반의 고감도 다중 유전자 변이 검지방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 프루브 DNA를 나노입자에 고정화 시킨 후 검지DNA와 혼성화(hybridization)시킨 합성물을 기관 위에 뿌리고 캘빈 프루브 현미경으로 측정된 표면전하(surface potential)로 유전자의 변이 여부를 나노 수준에서 식별하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이원석

인천광역시 부평구 청안로 8, 101동 1405호 (청천동, 인향아파트)

이규도

경기도 화성시 봉담읍 독정길 41

남기환

강원도 원주시 흥업면 세동길 13, 101동 904호 (현대아파트)

윤대성

경기도 성남시 분당구 야탑로 162, 101동 1101호 (야탑동, 진흥더블파크)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465014169

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 암 조기진단을 위한 순환종양세포 특이 생체분자의 검출기법 개발 및 약물 반응성 규명

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교원주산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2014.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 9991005831

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원(교육부)

연구과제명 켈빈프루브현미경을 이용한 단분자해상도 약물스크리닝/나노바이오에세이 기술개발

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교(원주캠퍼스)

연구기간 2013.05.01 ~ 2014.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 금 나노입자에 탐침(probe)으로서 DNA(deoxyrebonucleic acid) 단일가닥을 고정화시키는 단계;
(b) 표적 DNA 단일가닥을 처리하여 탐침 DNA 단일가닥과 표적 DNA 단일가닥의 결합을 유도하는 혼성화 단계; 및
(c) 켈빈 프루브 현미경(Kelvin probe force microscope, KPFM)을 이용하여 표면 전하를 측정함으로써 표적 DNA 단일가닥 및 탐침 DNA 단일가닥 간 결합 친화도(binding affinity)를 정량하는 단계를 포함하고,

상기 표적 DNA 단일가닥 및 탐침 DNA 단일가닥 간 결합 친화도를 정상 DNA 단일가닥 및 탐침 DNA 단일가닥 간 결합 친화도와 비교하여, 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 탐침 DNA 단일가닥은 정상 DNA 단일가닥과 상보적으로 결합하는 단일가닥인 것을 특징으로 하는 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출하는 방법.

청구항 3

상기 단계(a)에서, 금 나노입자에 고정화되는 탐침 DNA 단일가닥은 티올(thiol)기 개질된 탐침 DNA인 것을 특징으로 하는 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단계(a)에서, 금 나노입자에 고정화된 탐침 DNA 단일가닥을 금 기관 상에 적가하여 탐침 DNA 단일가닥이 금 기관 표면과 정전기 결합(electrostatic interaction)에 의해 흡수되는 것을 특징으로 하는 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 금 나노입자는 100nm 이하인 것을 특징으로 하는 표적 DNA상 유전자 변이를 검출하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

표적 DNA 단일가닥의 싱글 포인트(single point) 이상의 미스매치(mismatch)된 서열을 검출하는 것을 특징으로 하는 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

표적 DNA상 유전자 변이 정도를 정량적으로 검출하는 것을 특징으로 하는 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

측정된 표면전하 값으로 하기식을 이용하여 도출된 평형상수(K)가 110 ± 10 인 경우 싱글 포인트 미스매치(single point mismatch)로 판별하는 것을 특징으로 하는 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출하는 방법:

[DNA 혼성화반응의 반응식에 따른 평형상수(K) 산출식]



$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[dsDNA']}{[pDNA'][tDNA']} = \frac{\phi_{dsDNA'}}{\phi_{pDNA'} \cdot \phi_{tDNA'}} \\ = \frac{\Phi - (2\phi_{pDNA} - \Phi)}{(2\phi_{pDNA} - \Phi)^2} = \frac{\Phi - \phi_{pDNA'}}{\phi_{pDNA'}^2}$$

청구항 9

제1항에 있어서,

측정된 표면전하 값으로 하기식을 이용하여 도출된 평형상수(K)가 50 ± 10 인 있는 경우 2개의 염기서열 미스매치(mismatch)로 판별하는 것을 특징으로 하는 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출하는 방법:

[DNA 혼성화반응의 반응식에 따른 평형상수(K) 산출식]



$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[dsDNA']}{[pDNA'][tDNA']} = \frac{\phi_{dsDNA'}}{\phi_{pDNA'} \cdot \phi_{tDNA'}} \\ = \frac{\Phi - (2\phi_{pDNA} - \Phi)}{(2\phi_{pDNA} - \Phi)^2} = \frac{\Phi - \phi_{pDNA'}}{\phi_{pDNA'}^2}$$

청구항 10

제1항에 있어서,

측정된 표면전하 값으로 하기식을 이용하여 도출된 평형상수(K)가 7.5 ± 5 인 경우 3개의 염기서열 미스매치(mismatch)를 나타내는 것을 특징으로 하는 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출하는 방법:

[DNA 혼성화반응의 반응식에 따른 평형상수(K) 산출식]



$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[dsDNA']}{[pDNA'][tDNA']} = \frac{\phi_{dsDNA'}}{\phi_{pDNA'} \cdot \phi_{tDNA'}} \\ = \frac{\Phi - (2\phi_{pDNA} - \Phi)}{(2\phi_{pDNA} - \Phi)^2} = \frac{\Phi - \phi_{pDNA'}}{\phi_{pDNA'}^2}$$

청구항 11

제1항에 있어서,

측정된 표면전하 값으로 하기식을 이용하여 도출된 평형상수(K)가 1 ± 0.5 인 경우 4개의 염기서열 이상의 미스 매치(mismatch)를 나타내는 것을 특징으로 하는 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출하는 방법:

[DNA 혼성화반응의 반응식에 따른 평형상수(K) 산출식]



$$K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[dsDNA']}{[pDNA'][tDNA']} = \frac{\phi_{dsDNA'}}{\phi_{pDNA'} \cdot \phi_{tDNA'}} \\ = \frac{\Phi - (2\phi_{pDNA} - \Phi)}{(2\phi_{pDNA} - \Phi)^2} = \frac{\Phi - \phi_{pDNA'}}{\phi_{pDNA'}^2}$$

청구항 12

제1항에 따른 방법으로 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출함으로써, 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 암은 유방암, 자궁경부암, 자궁내막체암, 난소암, 위암, 식도암, 간암, 췌장암, 폐암, 대장암, 직장암, 결장암, 전립선암, 고환암, 방광암, 신장암, 골암, 결합조직암, 피부암, 뇌암, 갑상선암, 백혈병, 호지킨 질환, 림프종 및 다발성 골수종혈액암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 얇은 유방암인 것을 특징으로 하는, 암 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 켈빈 프루브 현미경을 이용한 나노입자 기반의 고감도 다중 유전자 변이 검지방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 금 나노입자에 탐침(probe)으로서 DNA(deoxyrebonucleic acid) 단일가닥을 고정화시키는 단계와 표적 DNA 단일가닥을 처리하여 탐침 DNA 단일가닥과 표적 DNA 단일가닥의 결합을 유도하는 혼성화 단계; 및 켈빈 프루브 현미경(Kelvin probe force microscope, KPFM)을 이용하여 표면 전하를 측정함으로써 표적 DNA 단일가닥 및 탐침 DNA 단일가닥 간 결합 친화도(binding affinity)를 정량하는 단계를 포함하고, 상기 표적 DNA 단일가닥 및 탐침 DNA 단일가닥 간 결합 친화도를 정상 DNA 단일가닥 및 탐침 DNA 단일가닥 간 결합 친화도와 비교하여, 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 유전체 검지는 친자확인 검사, 유전자 발현 개요, 약물 스크리닝 및 질병 예측 분야에 있어서 가장 주목받는 부분이다. 특히, 우리나라의 경우 급격한 고령화 사회로 진행됨에 따라 건강에 관한 관심이 점차 높아지고 있는 추세이다. 실제로 건강관리 및 검진을 위한 병원 이용자 수는 매년 기하급수적으로 증가하고 있다. 따라서 단순한 생명연장이 아닌 삶의 질의 향상을 위한 질병예측에 있어서 DNA 특정 서열 검출은 정밀진단을 위해 반드시 필요한 기술로 요구되어지고 있다.

[0003] 하나의 염기서열 변이까지 검출 가능한 DNA 분석을 위한 기존의 방법들은 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 바탕으로 하는 방법(Mun HY, et al. 2009. Gold Nanoparticle-Based Label-Free Detection of BRCA1 Mutations Utilizing DNA Ligation on DNA Microarray, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, Vol.9, 1019-1024)으로 형광표지를 하지 않는다고 하더라도 중합효소 연쇄반응이 선행되어야 하고, 점돌연변이를 검출하기 위한 결찰연쇄반응(ligation chain reaction, LCR) 등 여러 과정이 필요할 뿐만 아니라 각 반응에서 온도조절이 필요하다는 점에서 번거롭고 오랜 시간이 소요되어 비효율적이다.

[0004] 따라서 최근 간편한 방법으로 각광받고 있는 기술은 DNA의 상보적 결합을 전기적, 또는 전기화학적인 방법으로 검출하려는 것이다. 미국특허 제2006-0089825호는 생체분자의 상호작용을 알아내기 위해 핵산, 폴리펩타이드(polypeptide), 작은 분자 또는 항체항원 결합 등을 탐침(Probe)과 대상(Target)으로 하여 스캐닝 켈빈 마이크로 프로브 기술을 적용해 분자 간 상호결합에 따른 표면 지형학을 나타내는 접촉전위차 이미지와 접촉전위차 측정치의 변화를 통해 생체 분자의 상호작용을 검출하는 방법에 관한 발명으로 간단한 과정을 통해 빠른 시간 내에 결과를 얻을 수 있다는 장점이 있다. 하지만 탐침과 대상 사이의 상호작용에 따른 결합 유무 정도를 파악할 수 있을 뿐 결합친화도까지는 파악할 수 없기 때문에 세밀한 DNA변이 분석은 불가능하다.

[0005] 고감도의 생체분자 간의 결합을 전기적으로 검출하기 위해 켈빈 프루브 현미경을 이용한 기술을 제시해 주는 연구로 나노탐침을 사용해 10 nm 미만의 분해능, 50 nM의 민감도와 1,100 um/s 속도의 성능으로 3개의 염기서열 부정합까지 분석할 수 있는 방법이 있다.(Sinensky, & Belcher, Label-free and high-resolution protein/DNA nanoarray analysis using Kelvin probe force microscopy, Nature Nanotechnology 2, 653 - 659) 하지만 이 기술 역시 하나의 염기서열 변이까지는 파악할 수 없다는 점에서 완벽한 DNA변이 검출 방법이라 할 수 없다.

[0006] 현재까지 많은 연구진들에 의해 개발된 DNA 분석방법들은 중합효소 연쇄반응을 바탕으로 한 표지 방법으로 그 과정이 매우 복잡하고 재현성이 낮아 효율성이 떨어진다. 또한 효율성을 높이기 위한 DNA의 상보적 결합을 전기적, 또는 전기화학적인 방법으로 검출하려는 방법은 간단한 준비과정으로 신속하게 결과를 얻을 수 있는 반면 정확도가 다소 떨어지는 문제점을 갖고 있다. 따라서 상기의 문제점들을 모두 극복한 간편한 방법으로 하나의 염기서열 변이까지 확인할 수 있는 보다 정밀한 DNA 검출 방법이 요구되어진다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 미국공개특허 제2006-0089825호

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Mun, H. Y. & Park H. G. (2009). Gold Nanoparticle-Based Label-Free Detection of BRCA1 Mutations Utilizing DNA Ligation on DNA Microarray, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, Vol.9, 1019 - 1024

(비특허문헌 0002) Sinensky, A. K. & Belcher, A. M. (2007). Label-free and high-resolution protein/DNA nanoarray analysis using Kelvin probe force microscopy, Nature Nanotechnology 2, 653 - 659

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명에서는 유전자 변이를 검출하기 위하여 금 나노입자를 기반으로 켈빈 프루브 현미경(Kelvin probe force microscope, KPFM)을 이용하여 표면 전하를 측정함으로써 표적 DNA 단일가닥 및 탐침 DNA 단일가닥 간 결합 친화도(binding affinity)를 정량하고, 상기 표적 DNA 단일가닥 및 탐침 DNA 단일가닥 간 결합 친화도를 정상 DNA 단일가닥 및 탐침 DNA 단일가닥 간 결합 친화도와 비교하여, 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명에서는 상기 과제 해결을 위하여 (a) 금 나노입자에 탐침(probe)으로서 DNA(deoxyrebonucleic acid) 단일가닥을 고정화시키는 단계와 (b) 표적 DNA 단일가닥을 처리하여 탐침 DNA 단일가닥과 표적 DNA 단일가닥의 결합을 유도하는 혼성화 단계 및 (c) 켈빈 프루브 현미경(Kelvin probe force microscope, KPFM)을 이용하여 표면 전하를 측정함으로써 표적 DNA 단일가닥 및 탐침 DNA 단일가닥 간 결합 친화도(binding affinity)를 정량하는 단계를 포함하고, 상기 표적 DNA 단일가닥 및 탐침 DNA 단일가닥 간 결합 친화도를 정상 DNA 단일가닥 및 탐침 DNA 단일가닥 간 결합 친화도와 비교해 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출하는 방법을 제공함으로써, 형광 표지 없이 간단한 방법으로 금 나노입자를 이용해 켈빈 프루브 현미경의 감도를 높여 하나의 염기서열 변이까지 유전자 변이를 식별 할 수 있다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 다중 유전자 변이 검지방법은 금 나노입자를 분자 결합표면으로 이용하여 탐침과 접촉할 수 있는 결합점을 최소화 하여 보다 세밀한 생체분자 간 결합정도 파악을 가능하게하고, 이를 켈빈 프루브 현미경으로 측정하여 얻은 표면전하를 통계적으로 분석해 결합 친화도를 계산함으로써 하나의 염기서열 변이까지도 정량적으로 파악할 수 있는 유전자변이 검지방법이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 금 나노입자를 기반으로 켈빈 프루브 현미경을 이용한 유전자 변이 검지방법의 개략도이다.

도 2는 켈빈 프루브 현미경으로 측정된 이미지, 높이, 및 표면전하 결과를 나타낸 것으로서,

도 2a는 금 나노입자에 고정화된 탐침DNA를 켈빈 프루브 현미경으로 측정한 위상기하학 이미지이다.

도 2b는 금 나노입자에 고정화된 탐침DNA를 켈빈 프루브 현미경으로 측정한 표면전하(surface potential) 이미지이다.

도 2c는 탐침DNA가 고정화 되지 않은 금 나노입자, 탐침DNA가 고정화 되어 있는 금 나노입자, 고정화된 탐침DNA

와 완벽한 상보적 결합을 이루는 표적(정상)DNA가 혼성화된 금 나노입자, 고정화된 탐침DNA와 싱글 포인트 유전자 변이를 갖는 표적DNA가 혼성화된 금 나노입자, 고정화된 탐침DNA와 2개의 염기서열 변이를 갖는 표적DNA가 혼성화된 금 나노입자, 고정화된 탐침DNA와 3개의 염기서열 변이를 갖는 표적DNA가 혼성화된 금 나노입자, 고정화된 탐침DNA와 4개의 염기서열 변이를 갖는 표적DNA가 혼성화된 금 나노입자 고정화된 탐침DNA와 5개의 염기서열 변이를 갖는 표적DNA가 혼성화된 금 나노입자, 및 고정화된 탐침DNA와 비상보적인 표적DNA가 혼성화된 금 나노입자를 각각 켈빈 프루브 현미경으로 측정한 높이를 그래프로 도시한 것이다.

도 2d는 탐침DNA가 고정화 되지 않은 금 나노입자, 탐침DNA가 고정화 되어 있는 금 나노입자, 고정화된 탐침DNA와 완벽한 상보적 결합을 이루는 표적(정상)DNA가 혼성화된 금 나노입자, 고정화된 탐침DNA와 싱글 포인트 유전자 변이를 갖는 표적DNA가 혼성화된 금 나노입자, 고정화된 탐침DNA와 2개의 염기서열 변이를 갖는 표적DNA가 혼성화된 금 나노입자, 고정화된 탐침DNA와 3개의 염기서열 변이를 갖는 표적DNA가 혼성화된 금 나노입자, 고정화된 탐침DNA와 4개의 염기서열 변이를 갖는 표적DNA가 혼성화된 금 나노입자 고정화된 탐침DNA와 5개의 염기서열 변이를 갖는 표적DNA가 혼성화된 금 나노입자, 및 고정화된 탐침DNA와 비상보적인 표적DNA가 혼성화된 금 나노입자를 각각 켈빈 프루브 현미경으로 측정한 표면전하를 그래프로 도시한 것이다.

도 2e는 탐침DNA가 고정화 되어 있는 금 나노입자, 고정화된 탐침DNA와 완벽한 상보적 결합을 이루는 표적(정상)DNA가 혼성화된 금 나노입자, 하나에서 5개의 염기서열 변이를 갖는 표적DNA가 각각 혼성화된 금 나노입자들, 및 고정화된 탐침DNA와 비상보적인 표적DNA가 혼성화된 금 나노입자를 각각 켈빈 프루브 현미경으로 측정한 높이와 표면전하를 평균한 것을 그래프로 도시한 것이다.

도 3은 금 나노입자에 고정화된 탐침DNA와 표적DNA 간의 결합력에 따른 통계적 결과를 타나낸 것으로서,

도 3a는 금 나노입자에 고정화 되어 있는 탐침DNA와 표적DNA 간의 상호작용을 도시한 것이다. 표적DNA를 tDNA로, 반응 전 탐침DNA를 pDNA로 표기하였고 반응 후 결합하지 않은 탐침DNA를 pDNA'로, 표적DNA와 혼성화를 이룬 DNA를 dsDNA'로 표기하였다.

도 3b는 금 나노입자에 고정화된 탐침DNA와 완벽한 상보적 결합을 이루는 표적(정상)DNA, 금 나노입자에 고정화된 탐침DNA와 각각 하나에서 5개의 염기서열 변이를 갖는 표적DNA들, 금 나노입자에 고정화된 탐침DNA와 비상보적인 표적DNA에 대한 탐침DNA-표적DNA 혼성화 반응에 대한 각각의 평형상수(K)를 산출해 그래프로 도시한 것이다.

도 3c는 금 나노입자에 고정화된 탐침DNA와 완벽한 상보적 결합을 이루는 표적(정상)DNA, 금 나노입자에 고정화된 탐침DNA와 각각 하나에서 5개의 염기서열 변이를 갖는 표적DNA들, 금 나노입자에 고정화된 탐침DNA와 비상보적인 표적DNA에 대한 탐침DNA-표적DNA 혼성화 반응에 대한 각각의 평형상수(K)를 이용해 구한 깁스 자유에너지(Gibb's free energy)를 산출해 그래프로 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013]

이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0014]

본 발명은 (a) 금 나노입자에 탐침(probe)으로서 DNA(deoxyrebonucleic acid) 단일가닥을 고정화시키는 단계와 (b) 표적 DNA 단일가닥을 처리하여 탐침 DNA 단일가닥과 표적 DNA 단일가닥의 결합을 유도하는 혼성화 단계 및 (c) 켈빈 프루브 현미경(Kelvin probe force microscope, KPFM)을 이용하여 표면 전하를 측정함으로써 표적 DNA 단일가닥 및 탐침 DNA 단일가닥 간 결합 친화도(binding affinity)를 정량하는 단계를 포함하고, 상기 표적 DNA 단일가닥 및 탐침 DNA 단일가닥 간 결합 친화도를 정상 DNA 단일가닥 및 탐침 DNA 단일가닥 간 결합 친화도와 비교하여, 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출하는 방법을 제공한다.

[0015]

이어서, 상기에서 언급된 각 단계의 공정에 대하여 보다 상세하게 설명한다.

[0016]

본 발명에 따른 일 양태에서, 단계(a)에서 이용되는 탐침 DNA 단일가닥은 정상 DNA 단일가닥과 상보적으로 결합하는 단일가닥이다.

[0017]

본 발명에 따른 일 양태에서, 단계(a)에서 금 나노입자에 고정화되는 탐침 DNA 단일가닥은 티올(thiol)기 개질된 탐침 DNA일 수 있다.

[0018]

본 발명에 따른 일 양태에서, 단계(a)에서 금 나노입자에 고정화된 탐침 DNA 단일가닥을 금 기관 상에 적가하여

탐침 DNA 단일가닥이 금 기관 표면과 정전기 결합(electrostatic interaction)에 의해 흡수되는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명에 따른 일 양태에서, 금 나노입자는 100 nm이하인 것일 수 있다. 금 나노입자의 길이가 100 nm를 초과하는 경우 나노입자 특성이 소멸되어 생리활성물질이 결합된 입자를 제조하는 것이 불가능해질 수 있다.

[0020] 본 발명에 따른 일 양태에서, 표적 DNA 단일가닥의 싱글 포인트(single point) 이상의 미스매치(mismatch)된 서열을 검출할 수 있다.

[0021] 본 발명에 따른 일 양태에서, 표적 DNA상 유전자 변이 정도를 정량적으로 검출하는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명에 따른 일 양태에서, 측정된 표면전하 값으로 도출된 평형상수(K)가 110 ± 10 인 경우, 구체적으로 110 ± 5 인 경우, 보다 구체적으로 약 111인 경우, 보다 더 구체적으로 111.1063의 값인 경우 싱글 포인트 미스매치(single point mismatch)를 나타내는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 일 양태에서, 측정된 표면전하 값으로 도출된 평형상수(K)가 50 ± 10 인 경우, 구체적으로 50 ± 5 인 경우, 보다 구체적으로 약 51인 경우, 보다 더 구체적으로 51.2618의 값인 경우 2개의 염기서열 미스매치(mismatch)를 나타내는 것일 수 있다.

[0024] 본 발명에 따른 일 양태에서, 측정된 표면전하 값으로 도출된 평형상수(K)가 7.5 ± 5 인 경우, 구체적으로 7.5 ± 1 인 경우, 보다 구체적으로 약 7.6인 경우, 보다 더 구체적으로 7.6123인 경우 3개의 염기서열 미스매치(mismatch)를 나타내는 것일 수 있다.

[0025] 본 발명에 따른 일 양태에서, 측정된 표면전하 값으로 도출된 평형상수(K)가 1 ± 0.5 인 경우, 구체적으로 1 ± 0.2 인 경우, 보다 구체적으로 약 1인 경우, 보다 더 구체적으로 1.0313의 값인 경우 4개의 염기서열 이상의 미스매치(mismatch)를 나타내는 것일 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 일 양태에서, 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출함으로써, 암 진단에 필요한 정보를 제공할 수 있다.

[0027] 본 발명에 따른 일 양태에서, 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출함으로써 암 진단에 필요한 정보를 제공할 수 있는 암은 유방암, 자궁경부암, 자궁내막체암, 난소암, 위암, 식도암, 간암, 췌장암, 폐암, 대장암, 직장암, 결장암, 전립선암, 고환암, 방광암, 신장암, 골암, 결합조직암, 피부암, 뇌암, 갑상선암, 백혈병, 호지킨 질환, 림프종 및 다발성 골수종혈액암으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것 일 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 일 양태에서, 표적 DNA상 유전자 변이 유무를 검출함으로써 암 진단에 필요한 정보를 제공할 수 있는 암은 유방암일 수 있다.

[0029] 이하, 본 발명에 따르는 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예 등에 의해 제한되는 것은 아니다.

[실시예] 유방암과 관련된 BRCA1 유전자의 변이 검지

1. 실시방법

1-1. 금 나노입자에 탐침DNA 고정

[0033] 100 nm 금 나노입자를 준비하고, 고속 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)로 정제된 올리고뉴클레오티드(oligonucleotides)가 결합된 티올기(thiol group, -HS)를 이용해 BRCA1 유전자와 상보적으로 결합하는 DNA를 탐침DNA로서 준비된 100nm 금 나노입자에 고정화 시켰다.

1-2. 탐침DNA와 표적DNA의 혼성화

[0035] 금 나노입자에 고정화 되어 있는 탐침DNA와 같은 농도로 검지대상이 되는 BRCA1유전자를 표적DNA로 혼성화 시켰다.

[0036]

1-3. 켈빈 프루브 현미경을 이용한 측정

[0037]

1-2.의 금 나노입자 표면에서 혼성화된 탐침DNA와 표적DNA의 합성물을 피라나 용액(piranha solution)으로 세척된 금(Au)기판 위에 뿌린 뒤 켈빈 프루브 현미경으로 높이를 알 수 있는 지형학적 이미지와 높이 측정치 그리고 표면전하 이미지와 표면전하 측정치를 확인하였다.

[0038]

2. 켈빈 프루브 현미경을 이용한 측정결과

[0039]

표적DNA와의 혼성화 없이 금 나노입자에 고정화된 탐침DNA를 켈빈 프루브 현미경으로 측정해 얻은 위상기하학 이미지와 표면전하(surface potential) 이미지를 확인하였다 (도2a 및 도2b 참조).

[0040]

탐침DNA가 고정화 되어 있는 금 나노입자, 고정화된 탐침DNA와 완벽한 상보적 결합을 이루는 표적(정상)DNA가 혼성화된 금 나노입자, 하나에서 5개의 염기서열 변이를 갖는 표적DNA가 각각 혼성화된 금 나노입자들, 및 고정화된 탐침DNA와 비상보적인 표적DNA가 혼성화된 금 나노입자를 각각 상기의 1.방법으로 켈빈 프루브 현미경으로 측정한 높이와 표면전하를 확인하였고 (도2c 및 도2d 참조), 각각에 대해 측정된 높이와 표면전하로 그 평균값을 산출하였다(도2c 참조).

[0041]

3. 통계적 분석을 통해 표적 DNA 단일가닥 및 탐침 DNA 단일가닥 간 결합 친화도(binding affinity)를 정량하는 단계

[0042]

금 나노입자에 고정화된 탐침DNA와 완벽한 상보적 결합을 이루는 표적DNA(정상BRCA1 유전자), 각각 탐침DNA와 하나에서 5개의 염기서열 변이를 갖는 표적DNA(BRCA1 유전자), 금 나노입자에 고정화된 탐침DNA와 비상보적인 표적DNA의 결합력을 파악하기 위해 혼성화 반응식을 다음과 같이 설정하였다.



[0043]

[0044]

켈빈 프루브 현미경으로 측정한 표면전하 값(ϕ)은 혼성화 반응 후 남겨진 단일가닥 DNA(pDNA)와 혼성화를 이룬 이중가닥 DNA(dsDNA)의 전하값들이 섞인 값이고, 탐침DNA(pDNA)와 표적DNA(tDNA)를 같은 농도로 혼성화 시켰기 때문에 다음과 같은 공식이 각각 성립된다.

$$\phi = \phi_{pDNA} + \phi_{dsDNA}$$

$$\phi_{pDNA} = \phi_{tDNA}$$

[0045]

[0046]

따라서 상기의 공식들을 적용해 혼성화 반응에 대한 평형상수(K)를 다음과 같이 산출하였다.

$$\begin{aligned} K &= \frac{k_1}{k_2} = \frac{[dsDNA']}{[pDNA'][tDNA']} = \frac{\phi_{dsDNA'}}{\phi_{pDNA'} \cdot \phi_{tDNA'}} \\ &= \frac{\Phi - (2\phi_{pDNA} - \Phi)}{(2\phi_{pDNA} - \Phi)^2} = \frac{\Phi - \phi_{pDNA'}}{\phi_{pDNA'}^2} \end{aligned}$$

[0047]

[0048]

금 나노입자에 고정화된 탐침DNA와 완벽한 상보적 결합을 이루는 표적DNA(정상BRCA1 유전자), 각각 탐침DNA와 하나에서 5개의 염기서열 변이를 갖는 표적DNA(BRCA1 유전자), 및 금 나노입자에 고정화된 탐침DNA와 비상보적인 표적DNA의 혼성화 반응에 대해 산출된 각각의 평형상수(K) 정보를 로그 스케일로 도시화하여 평형상수가 미스매치(mismatch)된 염기서열 수에 따라 감소하는 것을 확인하였다. 도3b에서 알 수 있듯이 표적DNA(변이BRCA1 유전자)가 4개 이상의 염기서열 미스매치(mismatch)를 가질 경우 비상보적인 표적DNA와 마찬가지로 고정화된 탐

침DNA와 표적DNA의 혼성화 반응에 따른 평형상수의 값이 1.1 보다 작다. 이것은 표적DNA가 4개 이상의 염기서열 미스매치를 가지면 고정화된 탐침DNA와 표적DNA의 혼성화 반응에서 표적DNA가 3개 이하의 염기서열 미스매치를 가지는 경우 보다 역반응이 우세하다는 것을 나타내므로 다시 말해 이 경우 혼성화 반응이 완벽하게 일어나지 않는다는 것을 의미한다. 즉 탐침DNA와 표적DNA가 결합하는 결합표면으로 탐침과 접촉할 수 있는 결합점을 최소화하는 금 나노입자를 이용하면 보다 정밀한 생체분자 간 결합정도 표면전하로 측정 가능하게 된다. 따라서 이를 이용해 통계적 방법으로 탐침DNA와 표적DNA 간의 결합력을 정량적으로 도출할 수 있다. 이는 측정된 정밀한 표면전하 값으로 상기 반응식을 이용하여 도출된 평형상수가 DNA혼성화 반응식의 방향을 결정할 수 있을 뿐만 아니라 평형상수의 범위로 표적DNA에서 변이된 염기서열의 개수까지 파악할 수 있다 것을 입증한다 (도3b 참조).

또한 산출된 혼성화 반응의 평형상수를 적용해 하기의 식으로 깁스 자유에너지(Gibb' s free energy)를 결정할 수 있다.

$$\Delta G = RT \ln K \text{ (kJ/mol)}$$

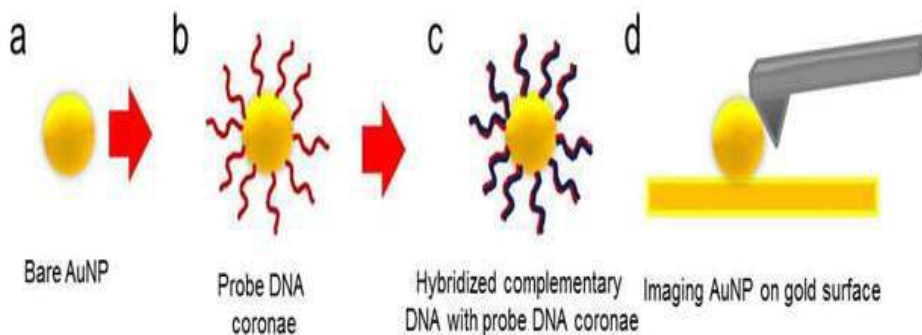
(R은 기체상수, R=8.314J/K · mol)

(T, temperature는 온도)

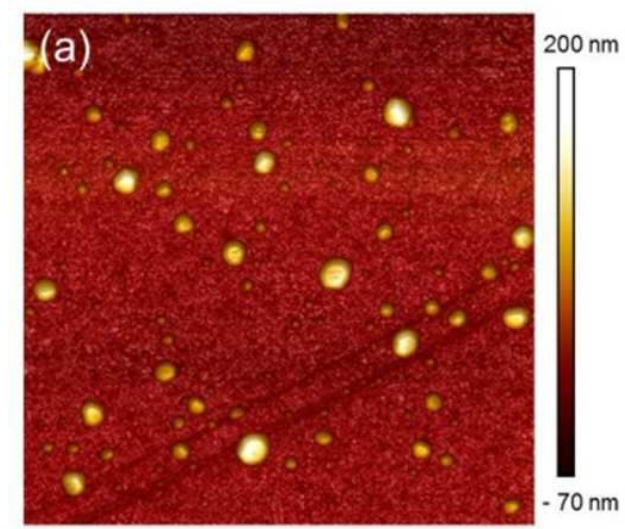
깁스자유에너지는 일정 온도와 압력 조건 하에서 계가 평형에 도달할 때 최소한의 화학퍼텐셜(chemical potential)로, 깁스자유에너지 분포는 화학반응의 방향뿐만 아니라 DNA혼성화에 대한 열역학적인 자유엔탈피를 식별해 줄 수 있다.

도면

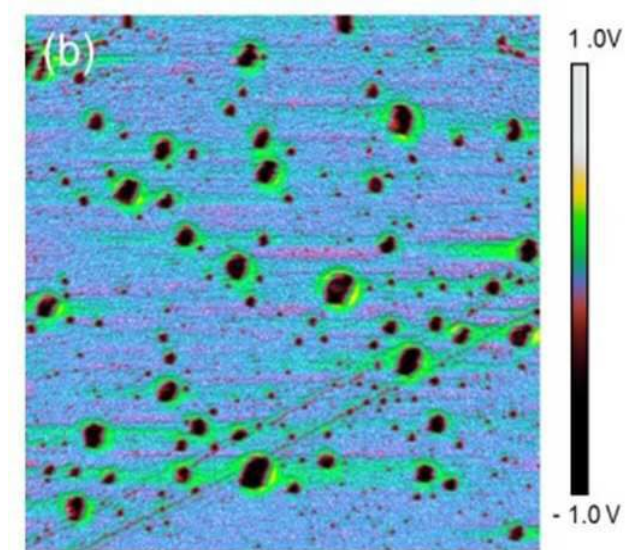
도면1



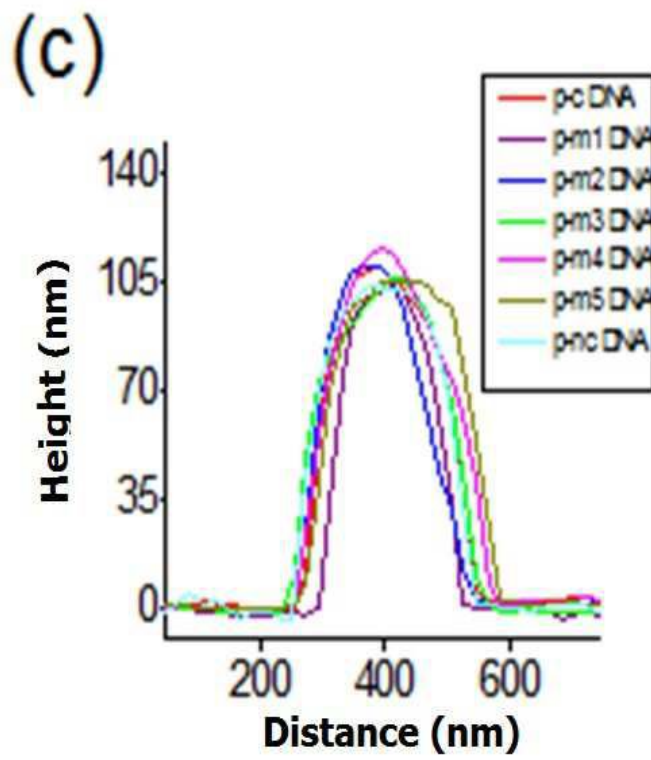
도면2a



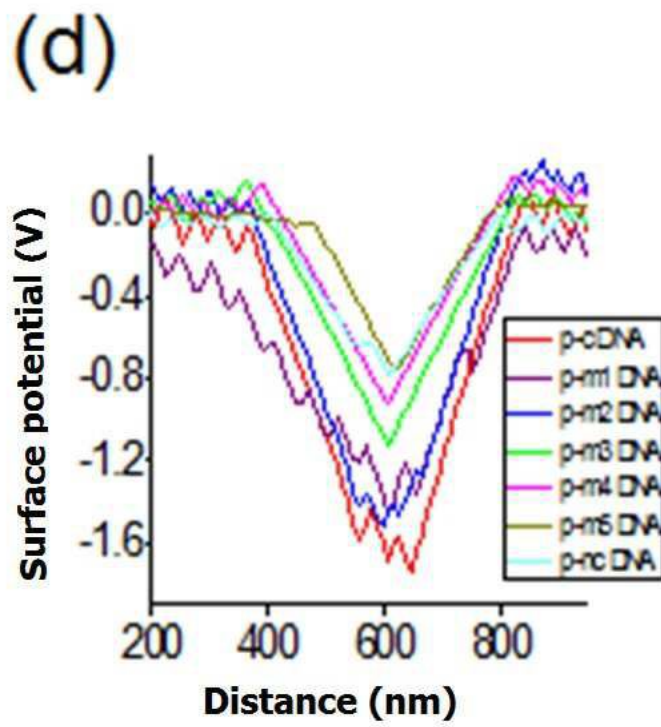
도면2b



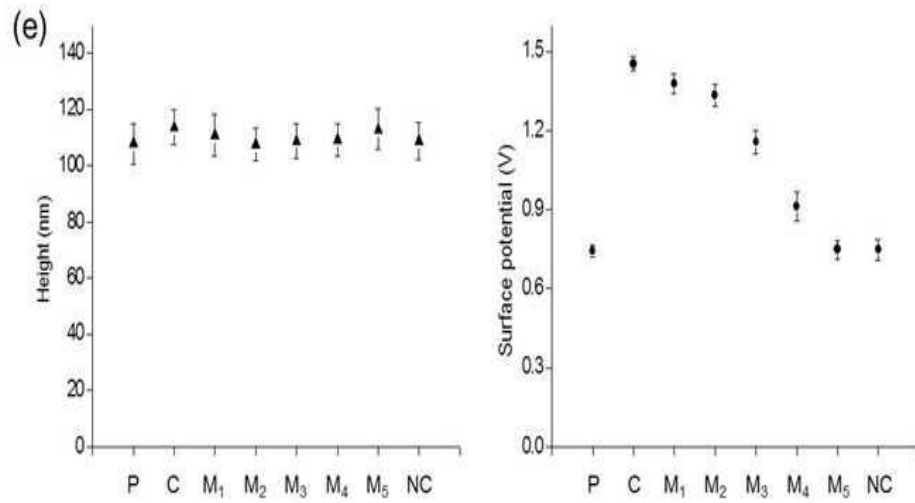
도면2c



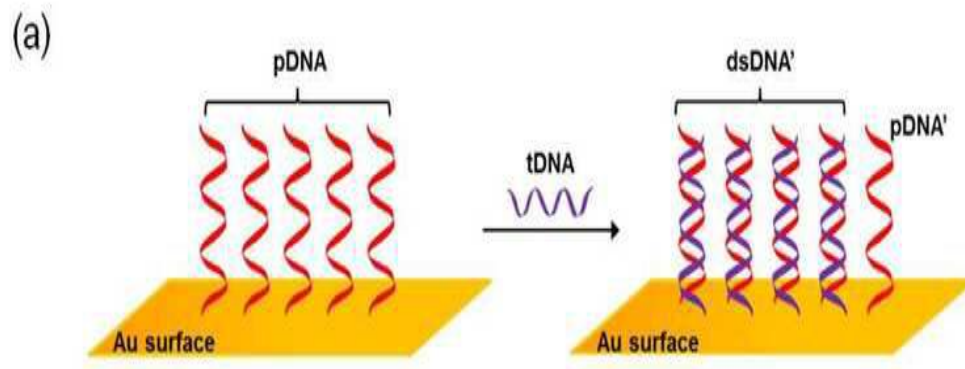
도면2d



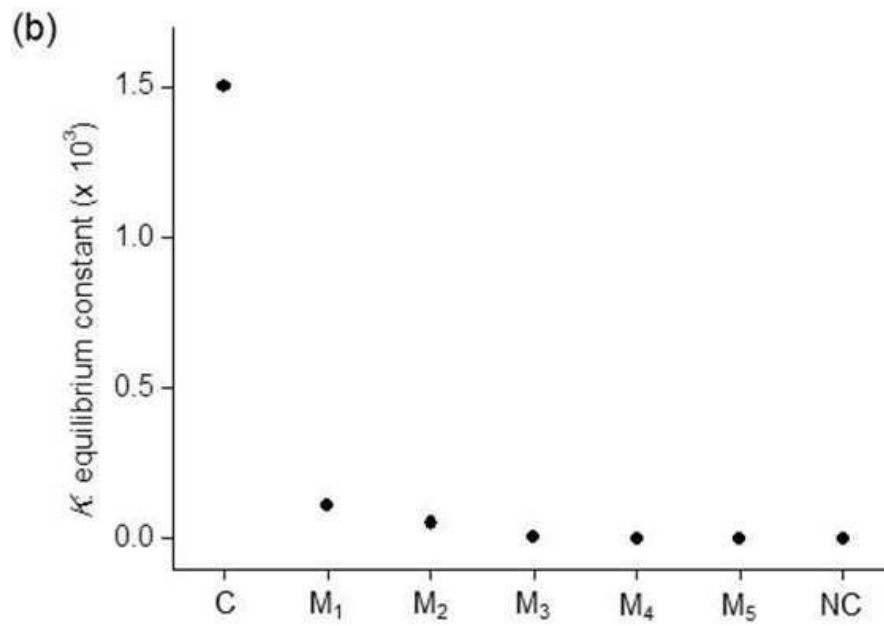
도면2e



도면3a



도면3b



도면3c

