	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0124138 (43) 공개일자 2012년11월13일
<hr/>		
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01) B82Y 15/00 (2011.01)	(71) 출원인 연세대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 (신촌동)	
(21) 출원번호 10-2011-0041846	(72) 발명자 이강택 서울특별시 양천구 목동서로 221, 목동굿모닝탑 1606호 (목동)	
(22) 출원일자 2011년05월03일 심사청구일자 2011년05월03일	주상우 서울특별시 서초구 방배본동 754번지 105-704호 (뚝섬에 계속)	
	(74) 대리인 김문재, 이종승, 권형중	

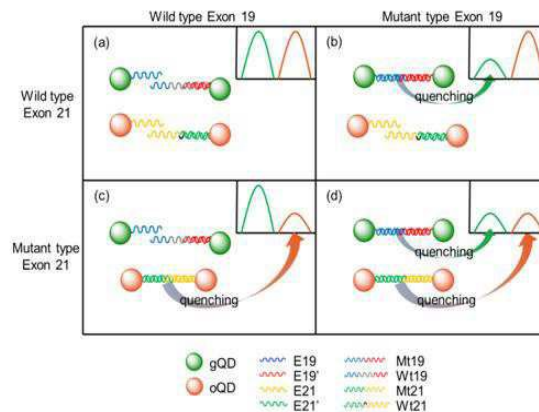
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 양자점의 광소멸 현상을 이용한 다중 표적 물질의 검출방법

(57) 요약

본 발명은 목적하는 핵산에 결합할 수 있는 프로브가 결합된 나노입자의 선택적 응집에 의한 광학 특성의 변화를 관찰하여 목적하는 핵산을 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 핵산을 검출하는 방법을 이용하면 뛰어난 민감도로 목적 핵산을 검출할 수 있고, 한 번의 실험으로 여러 가지 목적 핵산을 동시에 검출할 수 있어 경제적인 효과가 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이소영

서울특별시 서초구 방배본동 754번지 105-704호

윤경아

서울특별시 광진구 아차산로 549, 현대아파트
1012동 1202호 (광장동)

강대경

서울특별시 서대문구 신촌동 연세대학교 생활관
1학사 A동 508호

이호섭

서울특별시 서대문구 연희로10길 24, 305호 (연희
동, 뉴빌702)

최동철

서울특별시 광진구 독섬로52마길 56, 동아아파트
101동 1603호 (자양동)

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 5로 표시되는 올리고뉴클레오타이드에 결합할 수 있는 제 1 프로브 또는 서열번호 6으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드에 결합할 수 있는 제 2 프로브가 결합된 선택적 응집을 할 수 있는 나노입자를 포함하는 폐암 진단용 키트.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 나노입자는 Au, CdS, CdSe 및 PbS로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 폐암 진단용 키트.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 제 1 프로브는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 폐암 진단용 키트.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 제 2 프로브는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 폐암 진단용 키트.

청구항 5

(a) 목적하는 핵산에 결합할 수 있는 제 1 프로브 및 제 2 프로브를 준비하는 단계;

(b) 상기 제 1 프로브 또는 제 2 프로브를 선택적 응집(selective aggregation)을 할 수 있는 나노입자에 결합시키는 단계; 및

(c) 상기 제 1 프로브 또는 제 2 프로브가 결합된 상기 나노입자를 시료 핵산과 반응시켜서 광학 특성의 변화를 검출하는 단계를 포함하는, 목적하는 핵산을 검출하는 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 나노입자는 Au, CdS, CdSe 및 PbS로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 목적하는 핵산을 검출하는 방법.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 광학 특성의 변화는 발광 강도의 변화인 것을 특징으로 하는 목적하는 핵산을 검출하는 방법.

청구항 8

제 5항에 있어서,

상기 목적하는 핵산은 서열번호 5로 표시되는 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 목적하는 핵산을 검출하는 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 제 1 프로브는 서열번호 1이고 제 2 프로브는 서열번호 2로 표시되는 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 목적하는 핵산을 검출하는 방법.

청구항 10

제 5항에 있어서,

상기 목적하는 핵산은 서열번호 6으로 표시되는 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 목적하는 핵산을 검출하는 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 제 1 프로브는 서열번호 3이고 제 2 프로브는 서열번호 4로 표시되는 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 목적하는 핵산을 검출하는 방법.

청구항 12

제 5항에 있어서,

상기 (b) 단계 이후와 (c) 단계 이전에 시료 핵산을 희석시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 목적하는 핵산을 검출하는 방법.

청구항 13

제 5항에 있어서,

상기 목적하는 핵산의 농도가 전체 시료 핵산에 대하여 5중량% 이하인 것을 특징으로 하는 목적하는 핵산을 검출하는 방법.

청구항 14

(a) 목적하는 핵산에 결합할 수 있는 제 1 프로브 세트 및 제 2 프로브 세트를 준비하는 단계;

(b) 상기 제 1 프로브 세트를 선택적 응집을 할 수 있는 제 1 나노입자에 결합시키는 단계;

(c) 상기 제 2 프로브 세트를 선택적 응집을 할 수 있는 제 2 나노입자에 결합시키는 단계; 및

(d) 상기 제 1 프로브 세트가 결합된 제 1 나노입자 및 제 2 프로브 세트가 결합된 제 2 나노입자를 시료 핵

산과 반응시켜서 광학 특성의 변화를 검출하는 단계를 포함하는, 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하는 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서,

상기 선택적 응집을 할 수 있는 나노입자는 Au, CdS, CdSe 및 PbS로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하는 방법.

청구항 16

제 14항에 있어서,

상기 광학 특성의 변화는 발광 강도의 변화인 것을 특징으로 하는 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하는 방법.

청구항 17

제 14항에 있어서,

상기 목적하는 핵산은 서열번호 5로 표시되는 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하는 방법.

청구항 18

제 17항에 있어서,

상기 제 1 프로브 세트는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하는 방법.

청구항 19

제 14항에 있어서,

상기 목적하는 핵산은 서열번호 6으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하는 방법.

청구항 20

제 19항에 있어서,

상기 제 2 프로브 세트는 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하는 방법.

청구항 21

제 14항에 있어서,

상기 (c) 단계 이후와 (d) 단계 이전에 시료 핵산을 희석시키는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하는 방법.

청구항 22

제 14항에 있어서,

상기 목적하는 핵산의 농도가 전체 시료 핵산에 대하여 5중량% 이하인 것을 특징으로 하는 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하는 방법.

청구항 23

제 1 프로브 또는 제 2 프로브가 결합된 선택적 응집을 할 수 있는 나노입자를 포함하는 목적하는 핵산을 검출하기 위한 키트.

청구항 24

제 23항에 있어서,

상기 나노입자는 Au, CdS, CdSe 및 PbS로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 목적하는 핵산을 검출하기 위한 키트.

청구항 25

제 23항에 있어서,

상기 목적하는 핵산은 서열번호 5로 표시되는 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 목적하는 핵산을 검출하기 위한 키트.

청구항 26

제 25항에 있어서,

상기 제 1 프로브는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 목적하는 핵산을 검출하기 위한 키트.

청구항 27

제 23항에 있어서,

상기 목적하는 핵산은 서열번호 6으로 표시되는 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 목적하는 핵산을 검출하기 위한 키트.

청구항 28

제 27항에 있어서,

상기 제 2 프로브는 서열번호 3 또는 서열번호 4로 표시되는 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 목적하는 핵산을 검출하기 위한 키트.

청구항 29

선택적 응집을 할 수 있는 제 1 나노입자가 결합된 제 1 프로브 세트 및 선택적 응집을 할 수 있는 제 2 나노

입자가 결합된 제 2 프로브 세트를 포함하는, 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하기 위한 키트.

청구항 30

제 29항에 있어서,

상기 나노입자는 Au, CdS, CdSe 및 PbS로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하기 위한 키트.

청구항 31

제 29항에 있어서,

상기 목적하는 핵산은 서열번호 5로 표시되는 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하기 위한 키트.

청구항 32

제 31항에 있어서,

상기 제 1 프로브 세트는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하기 위한 키트.

청구항 33

제 29항에 있어서,

상기 목적하는 핵산은 서열번호 6으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하기 위한 키트.

청구항 34

제 33항에 있어서,

상기 제 2 프로브 세트는 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하기 위한 키트.

청구항 35

- (a) 목적하는 단백질을 선택적 응집을 할 수 있는 나노입자에 결합시키는 단계;
- (b) 상기 목적하는 단백질과 상호작용할 수 있는 후보 단백질을 선택적 응집을 할 수 있는 나노입자에 결합시키는 단계; 및
- (c) 상기 후보 단백질이 결합된 나노입자를 목적하는 단백질이 결합된 나노입자와 접촉시켜 광학 특성의 변화를 검출하는 단계를 포함하는, 목적하는 단백질과 상호작용할 수 있는 단백질을 스크리닝하는 방법.

청구항 36

- (a) 목적하는 화학물질을 선택적 응집을 할 수 있는 나노입자에 결합시키는 단계;
- (b) 상기 목적하는 화학물질과 상호작용할 수 있는 후보 화학물질을 선택적 응집을 할 수 있는 나노입자에 결

합시키는 단계; 및

(c) 상기 후보 화학물질이 결합된 나노입자를 목적하는 화학물질이 결합된 나노입자와 접촉시켜 광학 특성의 변화를 검출하는 단계를 포함하는, 목적하는 화학물질과 상호작용할 수 있는 화학물질을 스크리닝하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 목적하는 핵산에 결합할 수 있는 프로브가 결합된 나노입자의 선택적 응집에 의한 광학 특성의 변화를 관찰하여 목적하는 핵산을 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 유전공학의 비약적인 발달에 힘입어 환자 개개인의 유전적, 생물학적 정보를 토대로 한 맞춤 의학은 향후 더욱 발전할 것으로 기대되고 있다. 의학적 진단 및 맞춤 치료에 있어서 인간 게놈의 변이 정보는 질병의 위험성이나 의약 반응성 등과 밀접한 관련이 있기 때문에 매우 중요한 요소이다.

[0003] 예를 들면, 비소세포성 폐암 환자(non-small cell lung cancer, NSCLC)의 표피성장인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR)에서의 변이는 게피티닙(gefitinib), 이마티닙 메실레이트(imatinib mesylate) 및 에로티닙(erlotinib)과 같은 EGFR tyrosine kinase inhibitors (TKIs)의 임상 반응을 향상시키는 것으로 알려져 있다. EGFR의 엑손 18 내지 엑손 21에서의 체세포 돌연변이가운데, 엑손 19의 결실 및 엑손 21에서의 L858R 점 돌연변이는 가장 흔한 돌연변이 형태이고, 이 돌연변이는 TKIs에 대한 반응률을 향상시키는 것과 밀접하게 연관되어 있다(R. Dahse *et al.*, *Brit J Cancer* 2008, 99, 90-92). 엑손 18 내지 엑손 21의 직접적인 시퀀싱 방법이 EGFR의 변이 상태를 판단하는 데 가장 널리 활용되는 방법이지만, 이 방법은 시간과 비용이 많이 소요되고 민감도가 좋지 않은 단점이 있다.

[0004] 이러한 문제점을 극복하기 위하여, DNA를 검출하는데 빠르고 높은 민감도를 가지는 무기 나노입자가 이용되어 왔다. 대부분의 나노입자 기반의 DNA를 검출 방법들은 검출하고자 하는 물질이 존재하는 경우에 무기 입자들의 광학 특성의 변화를 검출하는 방법에 의존하고 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드로 개질된 금 나노입자(AuNPs)는 서스펜션의 색 변화를 통해 표적 DNA를 검출한다(J. J. Storhoff *et al.*, *J Am Chem Soc* 1998, 120, 1959-1964). 또 다른 예로, 양자점(QDs)은 광소멸 현상을 통해 DNA를 검출하기 위하여 널리 이용되어 왔다(L. Dyadyusha *et al.*, *Chem Commun* 2005, 3201-3203). 한편, 무기 나노입자를 이용하여 변이 DNA를 검출하는 방법에 관한 연구가 많이 이루어져 왔지만, 한 번의 실험으로 하나 이상의 변이 DNA를 검출하는 방법에 관하여는 연구가 미진하였다(P. C. Ray *et al.*, *J Phys Chem B* 2006, 110, 20745-20748).

[0005] 이에 본 발명자들은 한 번의 반응으로 서로 다른 변이 DNA를 동시에 검출할 수 있는 방법을 제공하고자 노력한 결과, 표적 핵산에 결합할 수 있는 하나 이상의 프로브를 결합시킨 나노입자의 선택적 응집에 의한 광소멸 및 FRET(Fluorescence resonance energy transfer) 현상을 이용하여 표적 핵산을 검출하는 방법을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 목적하는 핵산에 결합할 수 있는 둘 이상의 이중 프로브를 선택적 응집을 할 수 있는 나노입자에 결합시키고, 상기 나노입자를 목적하는 핵산과 반응시켜 광학 특성의 변화를 관찰함으로써 목적하는 핵산을 검출하는 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여 서열번호 5로 표시되는 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있는 제 1 프로브 또는 서열번호 6으로 표시되는 올리고뉴클레오티드에 결합할 수 있는 제 2 프로브가 결합된 선택적 응

집을 할 수 있는 나노입자를 포함하는 폐암 진단용 키트를 제공한다.

- [0008] 본 발명은 다른 구체예에서, (a) 목적하는 핵산에 결합할 수 있는 제 1 프로브 및 제 2 프로브를 준비하는 단계; (b) 상기 제 1 프로브 또는 제 2 프로브를 선택적 응집(selective aggregation)을 할 수 있는 나노입자에 결합시키는 단계; 및 (c) 상기 제 1 프로브 또는 제 2 프로브가 결합된 상기 나노입자를 상기 목적하는 핵산과 반응시켜서 광학 특성의 변화를 검출하는 단계를 포함하는, 목적하는 핵산을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0009] 본 발명은 또 다른 구체예에서, (a) 목적하는 핵산에 결합할 수 있는 제 1 프로브 세트 및 제 2 프로브 세트를 준비하는 단계; (b) 상기 제 1 프로브 세트를 선택적 응집을 할 수 있는 제 1 나노입자에 결합시키는 단계; (c) 상기 제 2 프로브 세트를 선택적 응집을 할 수 있는 제 2 나노입자에 결합시키는 단계; 및 (d) 상기 제 1 프로브 세트가 결합된 제 1 나노입자 및 제 2 프로브 세트가 결합된 제 2 나노입자를 상기 2개의 목적하는 핵산과 반응시켜서 광학 특성의 변화를 검출하는 단계를 포함하는, 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하는 방법을 제공한다.
- [0010] 본 발명은 또한, 제 1 프로브 또는 제 2 프로브가 결합된 선택적 응집을 할 수 있는 나노입자를 포함하는 목적하는 핵산을 검출하기 위한 키트를 제공한다.
- [0011] 본 발명은 또한, 선택적 응집을 할 수 있는 제 1 나노입자가 결합된 제 1 프로브 세트 및 선택적 응집을 할 수 있는 제 2 나노입자가 결합된 제 2 프로브세트를 포함하는, 2개의 목적하는 핵산을 동시에 검출하기 위한 키트를 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또 다른 구체예에서, (a) 목적하는 단백질을 선택적 응집을 할 수 있는 나노입자에 결합시키는 단계; (b) 상기 목적하는 단백질과 상호작용할 수 있는 후보 단백질을 선택적 응집을 할 수 있는 나노입자에 결합시키는 단계; 및 (c) 상기 후보 단백질이 결합된 나노입자를 목적하는 단백질이 결합된 나노입자와 접촉시켜 광학 특성의 변화를 검출하는 단계를 포함하는, 목적하는 단백질과 상호작용할 수 있는 단백질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, (a) 목적하는 화학물질을 선택적 응집을 할 수 있는 나노입자에 결합시키는 단계; (b) 상기 목적하는 화학물질과 상호작용할 수 있는 후보 화학물질을 선택적 응집을 할 수 있는 나노입자에 결합시키는 단계; 및 (c) 상기 후보 화학물질이 결합된 나노입자를 목적하는 화학물질이 결합된 나노입자와 접촉시켜 광학 특성의 변화를 검출하는 단계를 포함하는, 목적하는 화학물질과 상호작용할 수 있는 화학물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명에서, 서열번호 1 및 2의 프로브가 서열번호 5의 목적하는 핵산과 반응하는 경우, 서열번호 1의 1번째부터 8번째까지의 염기는 서열번호 5의 4번째부터 11번째까지의 염기와 결합하고, 서열번호 2의 6번째부터 14번째까지의 염기는 서열번호 5의 12번째부터 20번째까지의 염기와 결합한다.
- [0015] 또한, 서열번호 3 및 4의 프로브가 서열번호 6의 목적하는 핵산과 반응하는 경우, 서열번호 3의 1번째부터 5번째까지의 염기는 서열번호 6의 1번째부터 5번째까지의 염기와 결합하고, 서열번호 4의 1번째부터 15번째까지의 염기는 서열번호 6의 16번째부터 30번째까지의 염기와 결합한다.
- [0016] 본 발명에서는, 선택적 응집을 할 수 있는 나노입자에 목적하는 핵산에 결합할 수 있는 제 1 프로브 또는 제 2 프로브를 결합시키고, 프로브가 결합된 나노입자를 목적하는 핵산과 반응시킨 경우, 목적하는 핵산이 존재하면 프로브와 핵산간의 혼성화로 인하여 나노입자 간의 선택적 응집이 일어나는 현상을 이용하여 표적 핵산의 존재를 검출할 수 있게 되었다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 선택적 응집을 할 수 있는 나노입자는 Au, CdS, CdSe 및 PbS로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있고, 광학 특성의 변화는 발광 강도의 변화를 측정하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 시료 핵산에 증류수를 첨가하여 희석시키는 것을 특징으로 할 수 있고, 목적하는 핵산의 농도가 전체 시료 핵산에 대하여 5중량% 이하인 경우에도 목적하는 핵산을 검출할 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 사용된 용어 '선택적 응집'은 표적 물질과 탐지 물질이 결합할 경우, 나노입자 간의 거리가 줄어들며, 이에 따라 양자점의 응집이 일어나는 현상을 의미한다.
- [0020] 본 발명에서 사용된 용어 '시료 핵산'은 목적하는 핵산을 포함하고 있는 핵산으로서 피검체로부터 분리된 핵산 시료를 의미한다.
- [0021] 본 발명에서 사용된 용어 '목적하는 핵산'은 시료 내의 존재 여부를 탐지하고자 하는 대상이 되는 물질로서,

프로브와 특이적으로 결합할 수 있는 물질을 의미한다. '프로브'는 탐지 물질로서 상기 목적하는 핵산을 선택적으로 인식하여 결합할 수 있는 물질을 의미한다.

[0022] 본 발명에서는 목적하는 핵산과 프로브 간의 결합으로 나노입자의 선택적 응집을 유도하여 목적하는 핵산의 존재를 검출할 수 있었다. 핵산-프로브의 상호작용뿐만 아니라, 나노입자의 선택적 응집을 유도할 수 있는 단백질-단백질의 상호작용, 화학물질 간의 상호작용을 이용하여 목적 단백질, 목적 화학물질을 검출할 수 있는 당업자에게 자명하다고 할 것이다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 핵산을 검출하는 방법을 이용하면 뛰어난 민감도로 목적 핵산을 검출할 수 있고, 한 번의 실험으로 여러 가지 목적 핵산을 동시에 검출할 수 있어 경제적인 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 양자점의 광 소멸 현상을 이용한 EGFR 엑손 19 및 엑손 21의 변이 검출을 나타낸 것이다.
 도 2는 녹색/오렌지색 CdSe 양자점의 UV 하의 광 발광 스펙트럼을 나타낸 것이다.
 도 3은 표적 올리고뉴클레오타이드를 첨가한 후 서스펜션의 광 발광 스펙트럼을 나타낸 것이다.((a) Wt19, Wt21 DNA, (b)Wt19, Wt21 DNA, (c)Wt19, Wt21 DNA).
 도 4는 변이 DNA의 다양한 비율에 따른 PL 스펙트럼의 변화를 나타낸 것이다.
 도 5는 변이 DNA의 다양한 비율에 따른 최대 PL 강도의 변화를 나타낸 것이다.
 도 6은 PCR 산물을 첨가한 후 서스펜션의 광 발광 스펙트럼을 나타낸 것이다((a) 엑손 19-변이, 엑손 21-정상, (b) 엑손 19-정상, 엑손 21-변이, (c) 엑손 19-변이, 엑손21-변이).
 도7은 PCR 산물을 첨가한 후 서스펜션의 광 발광 스펙트럼을 나타낸 것이다((a) 엑손 19-변이, 엑손 21-정상, (b) 엑손 19-정상, 엑손 21-변이, (c) 엑손 19-변이, 엑손21-변이).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

[0026] 올리고뉴클레오타이드 프로브의 준비

[0027] 표적 올리고뉴클레오타이드 및 탐지 올리고뉴클레오타이드를 Bioneer 주식 회사 (대한민국, 대전)로부터 구입하였다. 올리고뉴클레오타이드의 서열과 엑손 19, 엑손 21의 돌연변이와 정상 DNAs의 약어는 표 1에 기재하였다.

표 1

유형	약어(Abbreviations)	서열(5'→3')
엑손 19 프로브 DNA	(p19)DNA	CGAAAGCCAACAAGG-NH2(서열번호 1)
	(p19')DNA	H2N-CTATCAARACATCTC(서열번호 2)

엑손 21 프로브 DNA	(p21)DNA	AACTGCTGGGTGCGG- NH2(서열번호 3)
	(p21')DNA	H2N-ATTTTGGGCGGGCCA(서열번호 4)
엑손 19 표적 DNA	(Mt 19)DNA	TTGGCTTTCGGAGATGTTTT(서열번호 5)
	(Wt 19)DNA	GTTGCTTCTCTTAATTCCTT
엑손 21 표적 DNA	(Mt 21)DNA	CAGTTTGGCCCGCCCAAAAT(서열번호 6)
	(Wt 21)DNA	CAGTTTGGCCAGCCCAAAAT
유형	약어(Abbreviations)	서열(5'→3')

[0029] 'Mt'는 표적 DNA(돌연변이 타입)을 의미하고, 'Wt'는 와일드 타입으로서 탐지 DNA에 짝을 이루지 못함(mismatch)를 의미함.

[0030] 'R'은 A 또는 G를 의미함.

실시예 2

[0031] **올리고뉴클레오타이드를 결합시킨 CdSe 양자점의 제조**

[0032] CdSe 양자점(QD)은 열분해법을 이용하여 합성하였다. Cadmium oxide를 원형 바닥 삼구 플라스크(round-bottom three-neck)에 올레인(oleic acid) 및 옥타데신(octadecene)을 함께 넣고, 환류(reflux)하며 가열하였다. 이때, 반응 시간과 온도의 조절을 통해 다양한 크기의 양자점을 합성할 수 있다. 녹색 발광 양자점을 합성하기 위해서는 용액을 280°C로 가열시킨 후, 셀레늄(Se) 파우더 및 TOPO를 옥타데신에 분산해 만들어둔 셀레늄 모액(stock solution)을 round-bottom three-neck 플라스크에 빠르게 주입하고 5초 뒤 반응을 종결시켰다. 오렌지색 발광 양자점을 합성하기 위해서는 용액의 온도가 220°C에 도달했을 때 녹색의 경우와 같은 셀레늄 모액(stock solution)을 원형 바닥 삼구 플라스크에 빠르게 주입하고 용액의 온도가 275°C에 도달했을 때 반응을 종결시켰다.

[0033] 합성한 양자점을 머캅타아세트산(mercaptoacetic acid, MAA)을 이용하여 수용액 상에 분산되도록 표면을 개질하였다. CdSe 양자점 서스펜션(QD suspension)을 클로로포름에 넣고 강하게 교반하면서 MAA, 메탄올, KOH이 섞인 MAA 용액을 첨가하였다. 그 다음, MAA용액을 넣은 직후에 물 10 mL를 첨가하였다. 2시간 뒤에 대부분의 양자점이 MAA로 개질 되어서 수용액 상에 존재하게 된다. MAA로 개질된 양자점 서스펜션(100 μL)에 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드(EDC)를 넣어서 MAA의 카르복시기에 반응성이 높은 EDC가 붙도록 하였다. EDC를 붙인 양자점 서스펜션(100 μL)에 아민기로 말단이 개질 되어있는 탐지 올리고뉴클레오타이드(100 μL, 100 pmol/μL)를 넣어서 탐지 올리고뉴클레오타이드로 개질된 양자점을 제작하였다. 그 후, 하루의 반응시간이 지난 후에, 투석을 통해 미반응 물질들을 제거하였다.

[0034] 녹색의 양자점(530nm emission wavelength)은 p19를 붙인 양자점과 p'19를 붙인 양자점 두 가지로 개질하였고, 이 때 이 p19와 p'19는 변이된 엑손 19 DNA와 상보적으로 결합하는 구조이다. 그리고 오렌지 색의 양자점(585nm)은 변이된 엑손 21 DNA와 상보적으로 결합하는 구조인 p21를 붙인 양자점과 p'21를 붙인 양자점 두 가지로 개질하였다.

실시예 3

[0035] **EGFR의 변이의 검출**

[0036] 엑손 19과 엑손 21에 대응하는 다른 표적 DNA가 섞여있는 표적 DNA 용액(1 μL, 1 μM)을 제조하였다. 이때, 제조한 표적 DNA용액은 엑손 19와 엑손 21 부분에 대응하는 서열로 이루어져있으며, 실험의 목적에 따라 변이가 있는 DNA와 정상인 DNA를 섞어서 사용하였다. 예를 들어 동시에 두 가지의 표적 DNA를 검출할 수 있는지 확인하기 위해서 Wt19 와 Wt21, Mt19 와 Wt21, Wt19 와 Mt21 또는 Mt19 와 Mt21을 이용하였다. 제조된 표적 DNA용액에 증류수를 첨가하고 각각의 올리고뉴클레오타이드로 개질된 양자점 서스펜션(p19-gQDs, p19'-gQDs,

p21-oQDs 및 p21'-oQDs)을 5 μ L씩 첨가하여 실험 용액의 총 부피를 100 μ L로 맞추어 주었다. 용액 내 DNA들이 혼성화되기를 기다리기 위해, 실온에서 5분이 경과한 다음 형광을 측정하였다.

[0037] 그 결과, 도 3에서 볼 수 있듯이 i) 변이된 엑손 19와 정상인 엑손 21; ii) 정상인 엑손 19와 변이된 엑손 21; iii) 엑손 19와 엑손 21이 둘 다 변이된 경우를 보면 형광의 강도가 변하는 것을 확인할 수 있었다. 엑손 19와 엑손 21 모두 정상인 경우와 비교하여 보면 변이된 엑손 19와 정상인 엑손 21을 넣은 경우, 녹색 양자점만 형광이 크게 감소한다(도 3a). 이것은 변이된 엑손 19와 녹색 양자점에 붙어있는 p19와 p'19 탐지 올리고뉴클레오티드가 서로 상보적이기 때문에 쉽게 혼성화하지만 정상인 엑손 21과는 오렌지색 양자점에 붙어있는 p21과 p'21 탐지 올리고뉴클레오티드는 맞지 않는 부분이 있기 때문이다. 반대로 정상인 엑손 19와 변이된 엑손 21을 넣은 경우에는, 오렌지색 양자점의 형광이 크게 감소하였다(도 3b). 그리고 엑손 19, 엑손 21 모두 변이된 DNA를 넣은 경우에는, 녹색과 오렌지 색의 양자점 모두에서 선택적 응집에 따른 형광의 감소가 일어났다(도 3c).

[0038] EGFR에 적은 양의 변이가 있을 때에도 이를 검출할 수 있는지에 관한 민감성 검사를 위해서, 변이된 DNA와 정상인 DNA를 각기 다른 비율로 섞어서 실험하였다. 예를 들어 Wt19 100%와 Wt21 99% 및 Mt21 1%와 같이, 적은 양의 변이 DNA를 검출할 수 있는지를 확인하기 위하여 변이와 정상 DNA를 혼합시킨 용액을 사용하였다. 이때, 변이:정상의 비율을 0:100, 5:95, 10:90, 50:50, 100:0으로 변화시키면서 실험하였다. 표적 DNA용액을 양자점 서스펜션에 넣을 때의 표적 DNA용액의 조성을 제외하고는 상기 실험방법과 동일하다.

[0039] 그 결과, 엑손 19와 엑손 21의 변이된 DNA의 비율이 늘어날수록 형광 강도는 더욱 감소하는 것을 확인하였다(도 4). 그리고 5%의 변이된 DNA만 있는 경우에도 형광강도 감소를 관찰할 수 있었다. 정상인 DNA를 넣은 경우를 최대 형광 강도 1로 기준을 정하여 표준화한 도 5의 그래프를 보면, 변이된 DNA의 농도에 따른 변화를 관찰할 수 있는데, 엑손 19와 엑손 21 모두 5%의 변이된 DNA만 있는 경우에도 형광 강도가 각각 6%이상 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 본 발명에 따른 방법을 이용하면 5%정도로 낮은 농도의 변이된 DNA가 존재하는 경우에도 두 가지의 표적 DNA를 동시에 검출할 수 있음을 의미한다.

실시예 4

[0040] **올리고뉴클레오티드가 결합된 양자점을 이용한 비소세포성 폐암환자의 EGFR의 변이 검출**

[0041] 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드가 결합된 양자점을 이용하여 비소세포성 폐암환자의 EGFR의 변이 검출하고자, 비소세포성 폐암환자의 DNA(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 PCR로 증폭한 후 얻어진 샘플을 이용하여 실험을 수행하였다. 그 결과, 엑손 19의 변이, 엑손 21의 변이 또는 두 부분 모두의 변이를 녹색 양자점의 소광, 혹은 오렌지 색 양자점의 소광, 또는 두가지색 모두의 소광을 통해서 관찰할 수 있었다(도 6).

실시예 5

[0042] **두 개의 올리고뉴클레오티드를 결합시킨 금 나노입자의 제조**

[0043] 금나노입자는 시트르산염(citrate)을 이용한 환원법으로 합성하였다. HAuCl₄·3H₂O 100mg을 물 1L에 넣고, 100°C로 가열하였다. 물이 끓기 시작하면 시트르산삼나트륨(Tri-sodium citrate) 300mg을 물 30mL에 녹인 용액을 HAuCl₄·3H₂O 용액에 넣고 계속 가열한다. 30분 정도 지난 후 용액이 붉은 색이 되면 가열을 멈추고 실온에서 용액을 냉각시켜서 합성하였다. 합성한 금 나노입자(1mL)에 티올기로 말단이 개질되어있는 서로 다른 염기 서열을 가지고 있는 두가지 종류의 탐지 올리고뉴클레오티드(36 μ L, 100 pmol/ μ L)를 각각 넣어서 두 종류의 탐지 올리고뉴클레오티드로 개질된 양자점을 제작하였다. 그 후, 하루의 반응시간이 지난 후에, 투석을 통해 미반응 물질들을 제거하였다.

[0044] 실시예 2와 같이 합성한 녹색의 양자점(530nm emission wavelength)은 p19를 붙인 양자점으로 개질하였고 오렌지 색의 양자점(585nm)은 변이된 엑손 21 DNA와 상보적으로 결합하는 구조인 p21를 붙인 양자점으로 개질하였다. 그리고 금 나노입자 표면에는 p'19와 p'21의 두가지 올리고뉴클레오티드를 붙여서 개질하였다. 이 경우에도 p19와 p'19는 변이된 엑손 19 DNA와 상보적으로 결합하는 구조이며 p21과 p'21은 변이된 엑손 21 DNA와

상보적으로 결합하는 구조이다.

이때, 탐지 올리고뉴클레오타이드는 표 1에 나타난 것과 동일한 DNA를 사용하였으며, 금 나노입자 표면에 탐지 올리고뉴클레오타이드를 결합시키기 위해 유리하도록 말단기를 티올기로 개질하였다(표 2).

표 2

유형	약어(Abbreviations)	서열(5'→3')
엑손 19 프로브 DNA	(p19)DNA	CGAAAGCCAACAAGG-NH ₂ (서열번호 1)
	(p19')DNA	SH-CTATCAARACATCTC(서열번호 2)
엑손 21 프로브 DNA	(p21)DNA	AACTGCTGGGTGCGG-NH ₂ (서열번호 3)
	(p21')DNA	SH-ATTTTGGGCGGGCCA(서열번호 4)
엑손 19 표적 DNA	(Mt 19)DNA	TTGGCTTTCGGAGATGTTT(서열번호 5)
	(Wt 19)DNA	GTTGCTTCTCTTAATTCCTT
엑손 21 표적 DNA	(Mt 21)DNA	CAGTTGGCCCGCCCAAAAT(서열번호 6)
	(Wt 21)DNA	CAGTTGGCCAGCCCAAAAT
유형	약어(Abbreviations)	서열(5'→3')

'Mt'는 표적 DNA(돌연변이 타입)에 상보적임을 의미하고, 'Wt'는 표적 DNA(와일드 타입)에 짝을 이루지 못함(mismatch)를 의미함.

'R'은 A 또는 G를 의미함.

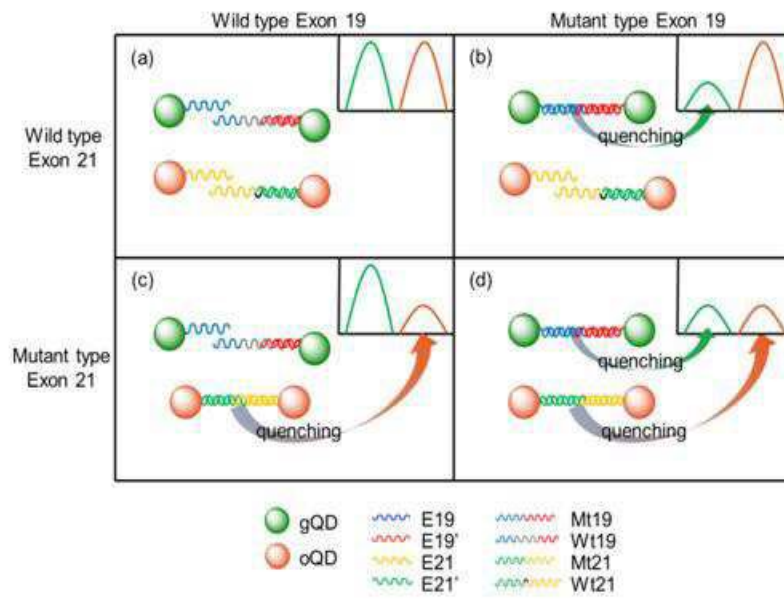
실시예 6

두 개의 올리고뉴클레오타이드가 결합된 금 나노입자를 이용한 비소세포성 폐암환자의 두 종류의 EGFR의 변이 동시 검출

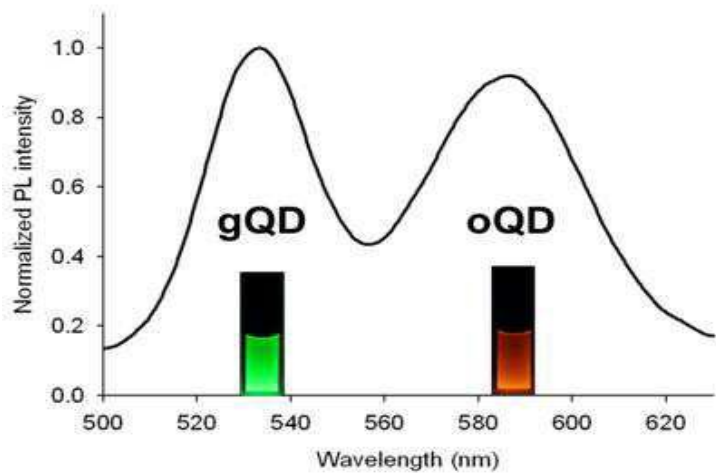
본 발명에 따른 방법을 이용하여 두 종류의 다른 표적 핵산을 검출하고자 하나의 나노입자에 두 종류의 다른 표적 물질을 결합시켜서 실험을 수행하였다. 두 개의 올리고뉴클레오타이드가 결합된 금 나노입자를 이용하여 비소세포성 폐암환자의 두 종류의 다른 EGFR의 변이(엑손 19와 엑손 21)를 검출하고자, 비소세포성 폐암환자의 DNA(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)를 PCR로 증폭한 후 얻어진 샘플을 이용하여 실험을 수행하였다. 두가지 올리고뉴클레오타이드로 개질된 금 나노입자(80 μL)와 엑손 19와 엑손 21에 대응하는 다른 표적 DNA가 섞여있는 표적 DNA 용액(10 μL, 10 μM)을 모두 섞었다. 그리고 각각의 올리고뉴클레오타이드로 개질된 양자점 서스펜션(5 μL, p19-gQDs, p21-oQDs)을 위의 용액에 첨가하였다. 이때, 제조한 표적 DNA용액은 엑손 19와 엑손 21부분에 대응하는 서열로 이루어져있으며, 실험의 목적에 따라 변이가 있는 DNA와 정상인 DNA를 섞어서 사용하였다. 예를 들어 동시에 두 가지의 표적 DNA를 검출할 수 있는지 확인하기 위해서 Wt19 와 Wt21, Mt19 와 Wt21, Wt19 와 Mt21 또는 Mt19 와 Mt21을 이용하였다. 용액 내 DNA들이 혼성화되기를 기다리기 위해, 실온에서 5분을 둔 다음 형광을 측정하였다. 그 결과, 엑손 19의 변이, 엑손 21의 변이 또는 두 부분 모두의 변이를 녹색 양자점의 FRET에 의한 소광, 혹은 오렌지 색 양자점의 FRET에 의한 소광, 또는 두 가지색 모두의 FRET에 의한 소광을 통해서 관찰할 수 있었다(도 7).

도면

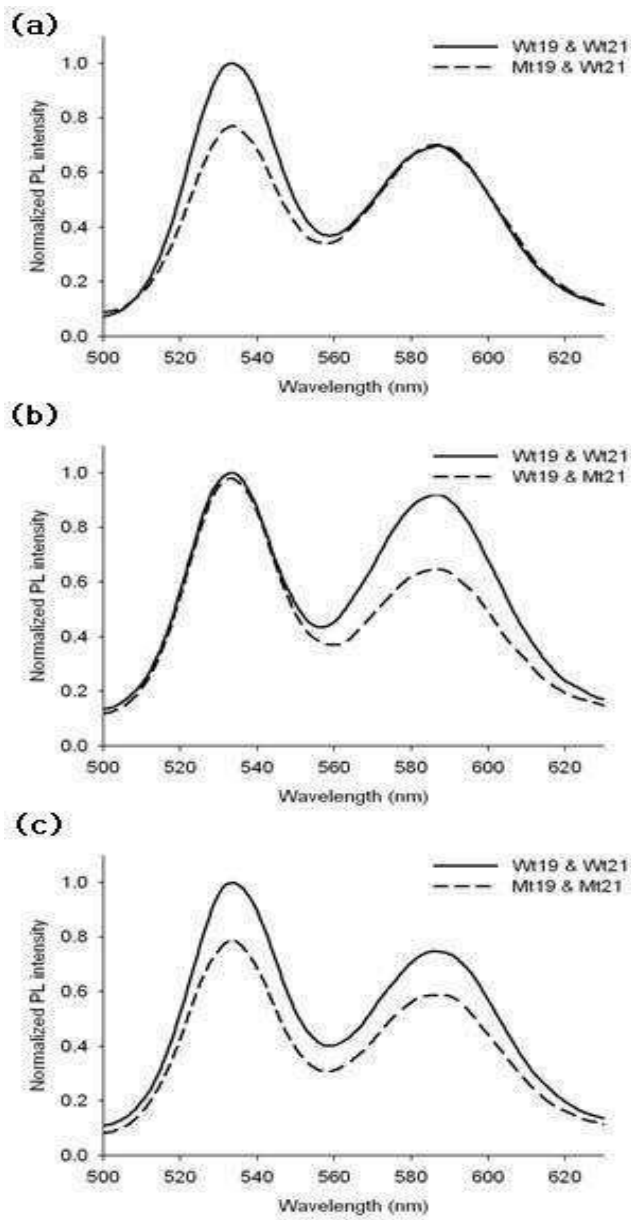
도면1



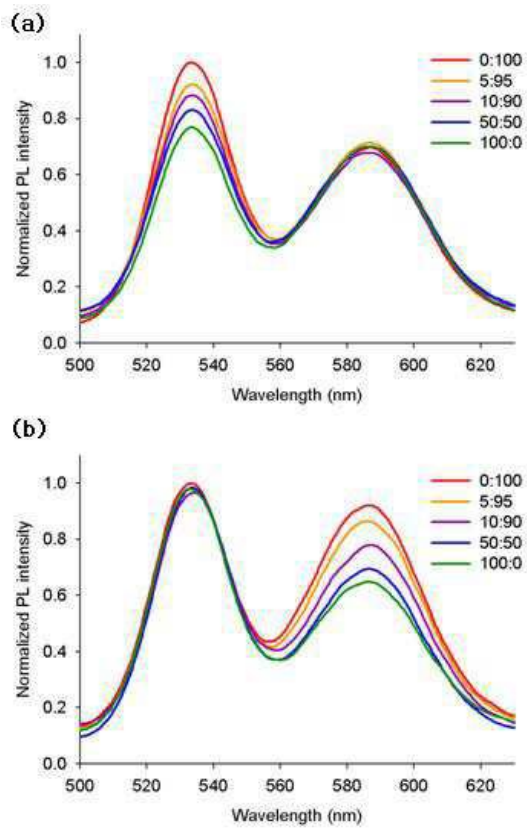
도면2



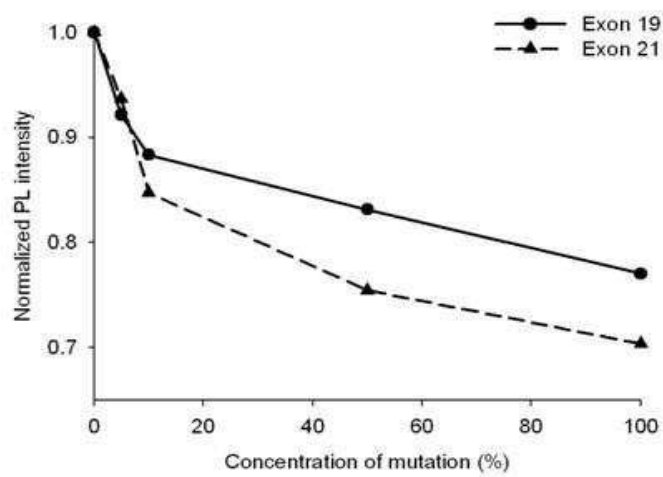
도면3



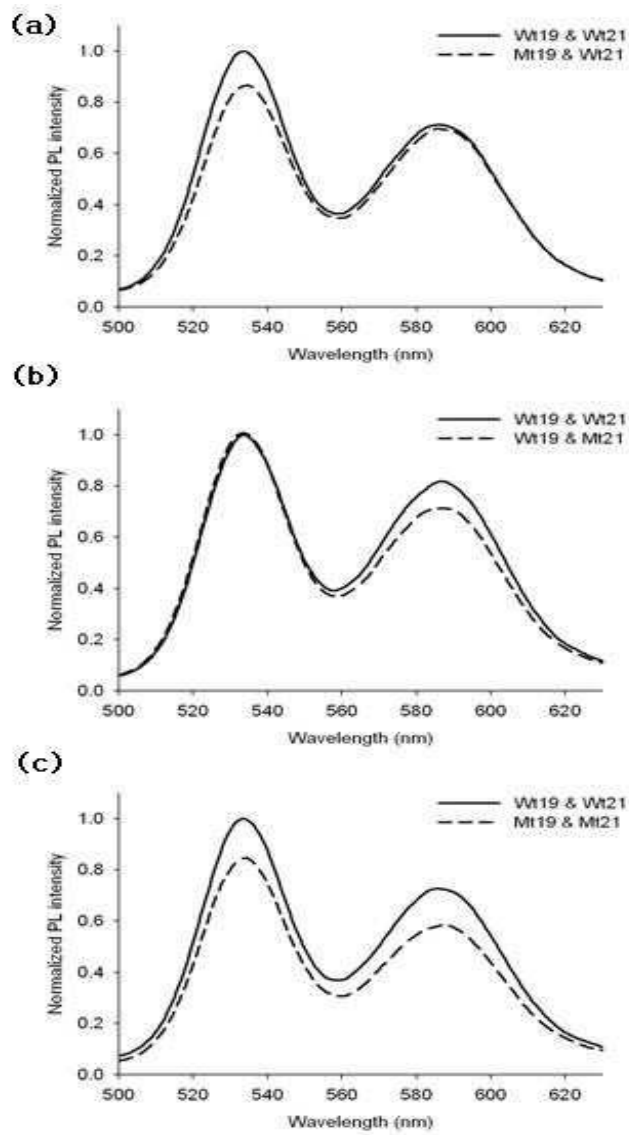
도면4



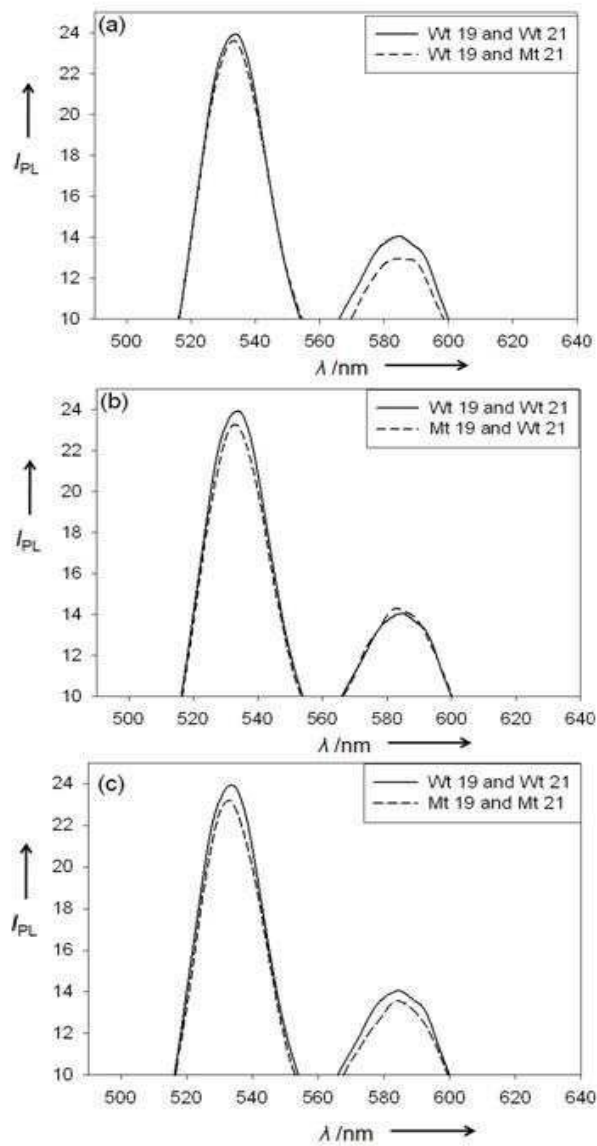
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> method of detecting multi-target materials using fluorescence quenching of quantum dots
- <130> IPDB40048
- <160> 6
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 15
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> (p19)DNA

<400>	1	
cgaaagccaa caagg		15
<210>	2	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>		
>	(p19')DNA	
<400>	2	
ctatcaarac atctc		15
<210>	3	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	(p21)DNA	
<400>	3	
aactgctggg tgcgg		15
<210>	4	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	(p21')DNA	
<400>	4	
at tt t t g g g c g g g c c a		15
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	(Mt 19)DNA	
<400>	5	
t t g g c t t t c g g a g a t g t t t t		20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> (Mt 21)DNA

<400> 6

cagtttggcc cgcccaaat

20