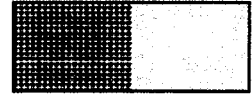


DOCUMENT MADE AVAILABLE UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

International application number:	PCT/KR2017/010737
International filing date:	27 September 2017 (27.09.2017)
Document type:	Certified copy of priority document
Document details:	Country/Office: KR
	Number: 10-2016-0123710
	Filing date: 27 September 2016 (27.09.2016)
Date of receipt at the International Bureau:	19 October 2017 (19.10.2017)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a),(b) or (b-bis)



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

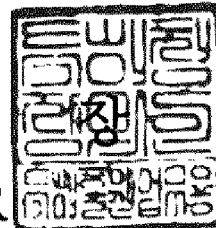
출원 번호 : 10-2016-0123710
Application Number

출원 년 월 일 : 2016년 09월 27일
Filing Date SEP 27, 2016

출원인 : 주식회사 누리바이오
Applicant(s) NuriBio Co., Ltd.

2017 년 10 월 18 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】 특허출원서

【출원구분】 특허출원

【출원인】

【명칭】 주식회사 누리바이오

【특허고객번호】 1-2015-041443-5

【대리인】

【성명】 정성종

【대리인번호】 9-2006-000773-3

【포괄위임등록번호】 2015-061186-6

【대리인】

【성명】 신명용

【대리인번호】 9-2005-000111-3

【포괄위임등록번호】 2015-061185-9

【발명의 국문명칭】 소형 RNA를 실시간 검출하는 방법

【발명의 영문명칭】 Detecting method for small RNA in real time

【발명자】

【성명】 남영현

【성명의 영문표기】 NAM, Young Hyeon

【주민등록번호】 740315-1XXXXXX

【우편번호】 16243

【주소】 경기도 수원시 팔달구 세지로 339번길19 202호

【국적】 KR

【출원언어】 국어

【취지】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 정성종 (서명 또는 인)

대리인 신명용 (서명 또는 인)

【수수료】

【출원료】 0 면 46,000 원

【가산출원료】 23 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】 0 항 0 원

【합계】 46,000 원

【감면사유】 소기업(70%감면)[1]

【감면후 수수료】 13,800 원

【첨부서류】 1.중소기업기본법 제2조의 규정에 따른 소기업에 해당함을 증명하는 서류_1통

【발명의 설명】

【발명의 명칭】

소형 RNA를 실시간 검출하는 방법{Detecting method for small RNA in real time}

【기술분야】

【0001】 본 발명은 소형 RNA 또는 소형 RNA와 연관된 단백질을 실시간 검출하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 R_1-X-R_2 의 구조를 가지며, 탐지하고 하는 소형 RNA(small RNA)의 전체 또는 일부 염기서열과 상보적 결합이 가능한 염기서열로 구성된 핵산 프로브를 사용하여 소형 RNA 또는 소형 RNA와 연관된 단백질을 탐지하는 방법에 관한 것이다.

【발명의 배경이 되는 기술】

【0002】 마이크로 RNA(micro RNA, miRNA)는 세포에 존재하는 소형 RNA(small RNA) 중 하나로, 세포의 발생과 분화 및 세포 예정사와 같은 생물학적 과정에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 세포에서 특정 miRNA의 발현 정도의 차이는 암을 포함한 다양한 질병과 연관되어 있다. 그러므로, 특정 마이크로 RNA(miRNA)를 탐지하는 것은 근래에 과학연구 분야에서 중요한 부분으로 부각되고 있다. 구체적으로, 특정 miRNA나 이와 연관된 단백질을 탐지하고 동정함으로써 유전적, 생물학적 마커로 활용되어 사람의 건강상태를 나타내는 지표로 활용이 가능하다. 상기 탐지와 동정을 통하여 간단하게 말초혈액, 호르몬, 척수액을 활용한

키트와 체외에서(*in vitro*) 이용할 수 있는 진단키트의 개발이 가능하게 되었다. 이러한 키트는 치매질환(알츠하이머, 파킨슨 등)과 당뇨, 암 등의 검사에 적용할 수 있다. 그러나, miRNA는 약 22개의 뉴클레오타이드(nucleotide)로 매우 짧기 때문에 검출 및 탐지가 어려워 유효한 바이오 마커로의 사용에 제한점을 가지고 있다.

【0003】 일반적으로 miRNA의 검출은 핵산 증폭방법에 기반으로 하고 있으며, 이런 방법의 예로는 PCR(polymerase chain reaction), NASBA(nucleic acid sequence based amplification) 등이 있다. 이러한 핵산 증폭반응을 이용한 종래의 검출방법은 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에게는 공지된 것이라 할 것이다. 이런 검출방법은 보통 핵산 증폭 후에 증폭된 핵산을 검출할 수 있는 전기영동 또는 프로브 또는 블로팅 기술의 이용과 같은 노동집약적인 처리과정이 필요하다.

【0004】 가장 널리 공지된 miRNA 검출을 위한 실시간 탐지는 RT-PCR, qRCR 등을 통해 이루어진다. 이러한 방법들은 표적 물질과 혼성화되지 않은 경우 형광이 소멸되는 이차 구조를 형성하는 형광 혼성화 프로브(florescent hybridization probe)에 기초한다. 각 측정시점에서 각각의 증폭산물에 프로브(probe)가 혼성화되면서 펼쳐지거나, 증폭산물과 혼성화 상태에서 형광광도가 증가한다. 이 경우, 1개의 프로브에 대하여 1개의 증폭자 비율로 증폭자가 검출된다. 주어진 사이클에서 하나의 증폭자는 프로브의 혼성화에 의해 검출되는 하나의 프로브(예, molecular beacon, Taqman probe, MGB probe 등)를 나타낸다. 또한, 실시간 검출

방법 중에 분자비콘(molecular beacon)을 이용하여 증폭과 동시에 NASBA 산물을 검출하는 방법도 알려져 있다.

【0005】 그러나 상기 서술한 기술은 몇몇의 단점이 있다.

【0006】 첫째, 상기 기술들은 miRNA의 분석을 위한 프로브(probe)와 프라이머(primer)가 동일한 표적 핵산에 위치하지 못하며, 프로브(probe)와 프라이머(primer) 사이에 공간을 요구한다. 이런 특성은 소형 RNA 또는 DNA의 분석, 또는 iso 형태의 RNA 또는 DNA의 분석에 제한적이며, 분석을 위해 추가적인 과정을 필요로 한다. 예로서 taq-man probe와 MGB probe의 경우 5'말단에 공여체 발색단이 표지되며, DNA 폴리머라아제(DNA polymerase)가 프라이머(primer)를 신장시키는 과정에서 프로브와 마주치게 되면 폴리머라아제(polymerase)의 엑소뉴클레아제(exonuclease) 활성이 5'말단에서 시작하여 순차적으로 프로브(probe)를 분해하게 된다. 이때 프라이머(primer)와 프로브(probe)의 간격은 최소 7~10개의 뉴클레오티드(nucleotide)인 상황에서 클리베이지(cleavage)가 가능하다. 또한 프라이머(primer)와 3'말단의 소광체 사이의 간격은 최소 2~4개의 뉴클레오티드(nucleotide)를 요구한다. 이러한 제한적 사항은 짧은 RNA 또는 DNA의 분석에 제한적 요소로 작용된다.

【0007】 둘째, 상기 기술들은 프로브(probe)가 공여자의 형광광도를 소진시키는 이차 구조를 형성해야 하므로, 비콘(beacon)의 용해온도가 정교하게 조절되어야 한다. 이러한 조절은 NASBA나 RCA와 같이 일정한 온도에서 반응시키는 경우에는 적용하기 곤란하다. 또한 상기 비콘(beacon)은 표적과 결합하지 않을 때에는

헤어핀 구조를 유지하고, 표적과 결합하는 반응온도에서는 펼쳐지도록 고안해야만 한다. 이것은 프로브의 고안을 매우 어렵게 하며, 또한 반응온도에서 비콘 (beacon)이 펴질 때 프로브가 종종 배경 형광을 방출하기 때문에 노이즈에 대한 신호와 관련된 문제를 유발한다.

【0008】 셋째, 형광신호는 전적으로 표적에 증폭된 수량의 결과에만 의존한다. miRNA의 경우 말초혈액에서 확보가 가능한 것은 극소량으로 검출속도는 형광 프로브 자체의 탐지 한계에 의해 부득이 제한되며 충분히 탐지가능한 양의 증폭자가 생성되기까지 많은 시간이 요구된다.

【0009】 이에 본 발명자들은 상기와 같은 단점을 극복하는 동시에 miRNA, siRNA와 같은 소형 RNA(small RNA)를 신속하고 정확하게 탐지하는 방법을 개발하고자 연구하던 중, R_1-X-R_2 의 구조를 가지며, 탐지하고 하는 소형 RNA(small RNA)의 전체 또는 일부 염기서열과 상보적 결합이 가능한 염기서열로 구성된 핵산 프로브를 개발하고, 이의 핵산 프로브를 사용하여 소형 RNA(small RNA) 또는 소형 RNA(small RNA)와 혼성화시킨 후 프로브 내부를 절단시약으로 절단시켜 분리된 프로브 단편의 양을 측정함으로써 극소량의 시료로부터 소형 RNA(small RNA)을 신속하고 정확하게 탐지할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

【0010】 본 발명의 하나의 목적은 소형 RNA(small RNA)를 실시간 검출하는 방법을 제공하는데 있다.

【0011】 본 발명의 다른 하나의 목적은 실시간 증폭 반응과 연계하여 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질을 탐지하는 방법을 제공하는데 있다.

【과제의 해결 수단】

【0012】 하나의 양태로서, 본 발명은 a) 생물학적 시료로부터 주형 핵산을 획득하는 단계; b) 상기 a) 단계에서 획득한 주형 핵산과 R_1-X-R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브를 혼성화시키는 단계; c) 상기 a) 단계에서 획득한 주형 핵산과 상보적인 염기서열을 가지는 프라이머 세트로부터의 신장반응에 의해 주형 핵산-프로브 복합체를 증폭시키는 단계; 및 d) 상기 증폭된 주형 핵산-프로브 복합체에 절단시약을 처리하여 프로브 단편을 주형 핵산으로부터 분리시킨 다음, 분리된 프로브 단편의 양을 측정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 소형 RNA(small RNA)를 실시간 검출하는 방법을 제공한다.

【0013】 본 발명에 따른 소형 RNA(small RNA)를 탐지하는 방법을 각 단계에 따라 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

【0014】 a) 생물학적 시료로부터 주형 핵산을 획득하는 단계이다.

【0015】 본 발명에 있어서, 상기 주형 핵산은 생물학적 시료로부터 탐지하고자 하는 소형 RNA(small RNA)를 포함하는 RNA이거나, 생물학적 시료로부터 획득한 RNA를 역전사 증합효소로 증폭하여 얻은 cDNA 형태의 DNA를 말한다. 상기 소형

RNA(small RNA)는 생체의 생명현상을 유지해야 하거나 조절이 필요한 상황에서 이를 위한 단백질을 만들기 위해 발현하는 것이다.

【0016】 상기 생물학적 시료는 개체로부터 얻은 각종 유형의 시료, 구체적으로 고체 조직 시료, 액체 조직 시료, 생물학적 액체, 기관지 흡입액, 세포 및 세포 단편을 이용할 수 있다. 생물학적 시료의 구체적인 예로는 수술과정에서 개체로부터 제거한 고체 조직 시료, 병리학적 표본, 보존된 시료 또는 생검 표본, 조직 배양액 또는 이들로부터 유래된 세포 및 이들의 자손과 이들의 급원으로부터 제조된 절편 또는 도말이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

【0017】 b) 주형 핵산과 핵산 프로브를 혼성화 시키는 단계이다.

【0018】 본 발명에서 사용하는 핵산 프로브는 R_1-X-R_2 의 구조를 가지며, 주형 핵산에서 탐지하고자 하는 소형 RNA(small RNA)의 전체 또는 일부 염기서열과 상보적 결합이 가능한 염기서열로 구성된 것을 특징으로 한다.

【0019】 이때, 상기 핵산 프로브의 X는 탐지하고자 하는 소형 RNA(small RNA)의 3'말단에서 5'말단 사이의 염기서열과 상보적 결합이 가능한 염기서열로 구성된 것이 바람직하다.

【0020】 상기 R_1 과 R_2 는 1 내지 20개, 바람직하게는 1 내지 15개의 염기서열로 구성된 DNA 또는 RNA, 바람직하게는 DNA이다. 상기 X는 1 내지 10개, 바람직하게는 1 내지 6개, 보다 더 바람직하게는 4개의 염기서열로 구성되어 있으며, 절단 시약에 의해 절단될 수 있는 RNA 또는 DNA, 바람직하게는 RNA이다. 또한, 상기 R_1 ,

R₂ 및 X는 비특이적인 절단을 막기 위해 전체적으로 메틸화되어 있거나 부분적으로 메틸화되어 있을 수 있다.

【0021】 본 발명의 핵산 프로브는 프로브의 양 말단 또는 내부에 하나 또는 그 이상의 탐지 가능한 마커에 의해 표지될 수 있다. 상기 탐지 가능한 마커는 프로브에 공유 결합 또는 비공유 결합에 의해 결합된 형광물질, 또는 형광쌍(형광물질과 소광물질)을 사용할 수 있다.

【0022】 상기 형광물질은 Cy3, Cy5, Cy5.5, Bodipy, Alexa 488, Alexa 532, Alexa 546, Alexa 568, Alexa 594, Alexa 660, 로다민(Rhodamine), TAMRA, FAM, FITC, Fluor X, ROX, Texas Red, Orange green 488X, Orange green 514X, HEX, TET, JOE, Oyster 556, Oyster 645, Bodipy 630/650, Bodipy 650/665, Calfluor Orange 546, Calfluor red 610, Quasar 670 및 비오틴으로 이루어지는 군으로부터 하나 이상일 수 있고, 상기 소광물질은 DDQ-1, Dabcyl, Eclipse, 6-TAMRA, BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3, Iowa Black RQ-Sp, QSY-7, QSY-2 및 MGBNFQ로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으며, 특별히 이로 한정되는 것은 아니다.

【0023】 본 발명에서 탐지 가능한 마커로 형광쌍을 사용하는 경우, 형광물질과 소광물질이 핵산 프로브의 양 말단 또는 내부에 1 내지 20개, 바람직하게는 1 내지 7개, 보다 바람직하게는 2 내지 6개, 보다 더 바람직하게는 4개의 염기쌍 거리로 떨어진 위치에 부착된 형태인 것이 좋다.

【0024】 본 발명에 따른 핵산 프로브는 R_1-X-R_2 의 구조를 가지며 별도의 반응 과정 없이 소형 RNA(small RNA)와 혼성화될 수 있다. 또한 본 발명에 따른 핵산 프로브는 주형 핵산을 증폭시키기 위해 사용하는 프라이머의 서열 또는 상보적인 서열과 중복되어도 프로브와 소형 RNA(small RNA)와 혼성화 및 절단이 가능하다. 이는 프로브의 디자인을 편리하게 하며, 소형 RNA(small RNA)를 보다 정확하게 탐지하는 것을 가능하게 한다. 상기 핵산 프로브는 절단시약에 의해서만 절단되므로 종래 DNA 중합효소에 의해 분해되는 프로브에 비해 탐지하고자 하는 핵산의 양을 보다 정확하게 측정할 수 있는 이점이 있다.

【0025】 본 발명에 있어서, 주형 핵산과 핵산 프로브의 혼성화는 주형 핵산-프로브 복합체를 형성하기 위한 것으로, 주형 핵산과 핵산 프로브를 혼합하여 이루어질 수 있다.

【0026】 c) 주형 핵산-프로브 복합체를 증폭시키는 단계이다.

【0027】 구체적으로, 주형 핵산과 상보적인 염기서열을 가지는 프라이머 세트를 사용하여 신장반응을 통해 b) 단계의 주형 핵산-프로브 복합체를 증폭시키는 단계이다.

【0028】 본 발명에 있어서, 상기 프라이머 세트는 주형 핵산의 서열에 상보적이며, 15 내지 30개의 염기를 가지는 순방향 프라이머와 역방향 프라이머로 이루어진 것이 바람직하다.

【0029】 본 발명에서 순방향 프라이머와 상보적인 주형 핵산의 서열은 본 발명의 핵산 프로브와 상보적인 주형 핵산 서열과 1 내지 18개 염기가 중복되거나 본 발명의 핵산 프로브와 상보적인 주형 핵산 서열과 서열의 간격을 나타내지 않는 것을 특징으로 한다.

【0030】 본 발명에 있어서, 주형 핵산-프로브 복합체의 증폭은 본 발명의 핵산 프로브와 주형 핵산이 어닐링 될 수 있고, 사용되는 효소의 활성을 실질적으로 억제하지 않는 등온온도에서 수행되는 것이 바람직하다. 본 발명에서 증폭반응이 수행되는 온도는 30 내지 75℃, 바람직하게는 37 내지 70℃, 보다 바람직하게는 50 내지 65℃에서 이루어질 수 있다.

【0031】 상기 주형 핵산-프로브 복합체의 증폭반응은 중합효소 연쇄반응 (polymerase chain reaction), 회전환 증폭(rolling circle amplification), 핵산 가득 전치 증폭(strand displacement amplification) 및 핵산서열기반 증폭 (nucleic acid sequence based amplification)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 방법으로 이루어질 수 있다.

【0032】 본 발명에 있어서, 상기 주형 핵산-프로브 복합체의 증폭반응은 본 발명의 프라이머 세트 이외에 증폭이 필요한 시약, 예컨대, 적당량의 DNA 중합효소 (예를 들어, *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Phyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 얻은 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합효소 조인자(Mg^{2+}),

완충용액, dNTPs(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP) 및 물(dH₂O)를 포함할 수 있다. 상기 완충용액은 이에 제한되지는 않으나 적당량의 트리톤 X-100(Triton X-100), 디메틸 설펍사이드(dimethylsulfoxide, DMSO), Tween20, nonidet P40, PEG 6000, 포름아마이드 및 소혈청 알부민(BSA) 등을 추가로 사용하여 이루어질 수 있다.

【0033】 d) 절단시약을 사용하여 주형 핵산-프로브 복합체로부터 프로브 단편을 분리시킨 다음, 분리된 프로브 단편의 양을 측정하는 단계이다.

【0034】 본 발명에 있어서, 상기 절단시약은 효소를 매개로 하며, 상기 핵산 프로브의 X 부위만을 특이적으로 절단할 수 있는 것이라면 어느 것이나 사용 가능하다. 예를 들어 디옥시리보핵산 가수분해효소(deoxyribonuclease, DNase), 리보핵산가수분해효소(ribonuclease, RNase), 헬리카제(helicase), 엑소뉴클리아제, 및 엔도 뉴클리아제 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나, 바람직하게는 리보핵산 가수분해효소(ribonuclease, RNase)를 사용할 수 있다.

【0035】 본 발명에 있어서, 프로브 단편의 양 측정은 다양한 검출방법을 사용하여 수행될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따라 분리된 프로브의 단편은 실시간 또는 반응이 종료된 후에 측정되는 것이 바람직하며, 형광광도의 변화 또는 화학발광의 측정으로 이루어질 수 있다.

【0036】 상기 형광광도의 변화 또는 화학발광의 측정은 당업계에 공지된 형광 표지자 검출이 가능한 모든 측정 장치를 이용할 수 있으며, 예를 들어 트라이어드 멀티모드 디렉터(TRIAD Multimode Detector), 활락/빅터 형광(Wallac/Victor

fluorescence) 또는 퍼킨-엘머 LB50B 형광분광광도계(Perkin-Elmer LB50B luminescence spectrometer) 등을 이용하여 이루어질 수 있으며, 이에 한정하지 않는다.

【0037】상기와 같은 분리된 프로브의 양 측정과 탐지방법은 프로브 또는 반응액 내로 유입된 표지 또는 탐지 마커의 형태에 따라 달라질 수 있다.

【0038】본 발명에 따른 소형 RNA(small RNA)의 탐지방법은 Taqman 프로브, MGB 프로브 등을 사용하는 종래 방법과는 달리 R_1-X-R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브와 상기 핵산 프로브의 염기서열과 염기의 간격 차이가 없는 프라이머를 사용하므로, 탐지하고자 하는 소형 RNA(small RNA)를 정확하게 증폭하는 것이 가능하다. 또한, 주형 핵산을 증폭하는 동시에 DNA 중합효소에 의해 분해된 프로브의 양을 측정하는 종래 기술에 비해 극소량의 시료로부터 소형 RNA(small RNA)을 정확하게 탐지할 수 있는 장점이 있다.

【0039】다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 핵산 프로브를 이용하여 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질 분자를 탐지하는 방법을 제공한다.

【0040】구체적으로, 본 발명은 a) R_1-X-R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브와 상보적인 염기서열을 가지는 핵산이 부착되어 있는 항체를 제조하는 단계; b) 생물학적 시료로부터 수득한 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질과 상기 a) 단계에서 제조한 항체를 결합시켜 단백질-항체 복합체를 형성시키는 단계; c) 상기 복합체에 R_1-X-R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브를 혼성화시켜 단백질-항체-프로브 복합체를 형

성시키는 단계; 및 d) 상기 단백질-항체-프로브 복합체에 절단시약을 처리하여 프로브 단편을 항체로부터 분리시킨 다음, 분리된 프로브 단편의 양을 측정하여 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질을 검출하는 단계;를 포함하는 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질 분자를 탐지하는 방법을 제공한다.

【0041】 본 발명에 따른 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질 분자를 탐지하는 방법을 각 단계에 따라 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

【0042】 a) R_1 -X- R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브와 상보적인 염기서열을 가지는 핵산이 부착되어 있는 항체를 제조하는 단계이다.

【0043】 본 발명에 있어서, 상기 R_1 -X- R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브의 구조, 특징 등은 상술한 바와 같으므로 이하에서는 생략한다.

【0044】 본 발명에 있어서, 상기 R_1 -X- R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브와 상보적인 서열을 가지는 핵산은 R_1 -X- R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브의 염기서열을 주형으로 하여 당업계에서 통상적으로 사용되는 증폭반응을 통해 합성된 것이다.

【0045】 본 발명에 있어서, 상기 R_1 -X- R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브와 상보적인 서열을 가지는 핵산이 부착되어 있는 항체는 R_1 -X- R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브와 상보적인 서열을 가지는 핵산이 항체의 Fc 영역에 연결고리(linker)로 연결되어 이루어진 구조를 가진다. 상기 연결고리는 통상적으로 1 내지 10개의 염기서열로 구성된 DNA이다.

【0046】 상기 R_1-X-R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브와 상보적인 서열을 가지는 핵산과 항체를 연결시키는 방법은 통상적으로 2가지 방법이 사용될 수 있다. 첫 번째 방법은, 숙시니미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로hexan-1-카르복실레이트 (Succinimidyl-4-(N-Maleimidomethyl)Cyclohexane-1-Carboxylate; SMMCC), 술포숙시니미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로hexan-1-카르복실레이트 (Sulfo Succinimidyl-4-(N-Maleimidomethyl)Cyclohexane-1-Carboxylate; Sulfo-SMCC), n-숙시니미딜-3-(2-피리딜티오)프로피오네이트 (n-Succinimidyl-3-(2-Pyridylthio)Propionate; SPDP), N-숙시니미딜-6-(3'-(2-피리딜디티오)-프로피온아미도)헥사노에이트 (N-Succinimidyl-6-(3'-(2-pyridyldithio)-propionamido)hexanoate; NHS-Ic-SPDP), 또는 술포숙시니미딜-3-(2-피리딜티오)프로피오네이트 (SulfoSuccinimidyl-6-(3'-(2-pyridyldithio)-propionamido)hexanoate; Sulfo-NHS-Ic-SPDP) 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나의 시약을 사용하여 5'-말단이 티올(thiol)로 변형된 DNA를 항체의 유리 아미노 그룹들에 연결시키는 것이다. 상기 시약들은 그들 간격을 띄우는 그룹(spacer)의 길이와 물에 대한 용해도 정도가 다르다. 만약 필요하다면, 추가적인 조작을 위하여 DNA를 방출시키는 티올화(thiolation) 시약으로 연결 부위를 절단할 수 있다.

【0047】 두 번째 방법은, 사량체(tetrameric) 단백질인 스트렙아비딘(streptavidin)에 의해서 항체-DNA 사이의 연결 부위를 제공함에 의해서, 상기 단백질은 비오틴(biotin)과 충분히 비가역적인 결합을 형성하는 것이다. 항체의 유리

아미노 그룹들은 비오틴-n-하이드록시숙시니미드(biotin-nhydroxysuccinimide)와 반응하여 비오틴으로 표지된다. DNA의 비오틴화는 5'-비오틴 포스포아마다이트(5'-biotin phoshporamidite)의 사용 또는 5'-말단의 아미노기 표지 뒤에, 비오틴-n-하이드록시숙시니미드와 반응시켜 이루어질 수 있다. DNA, 스트랩아비딘 및 항체의 결합(conjugate)은 1 몰당량의 항체를 DNA-스트랩아비딘 결합체에 첨가하여 제조될 수 있다.

【0048】 상기한 방법에 따라 핵산이 결합된 항체는 4℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 항체-핵산 결합체를 슈퍼덱스(Superdex) 200 겔 컬럼으로 정제함으로써 항체-핵산 결합체를 수득할 수 있다.

【0049】 본 발명에 따라 제조된 항체는 검출하고자 하는 특정 단백질만을 특이적으로 인식함과 동시에 본 발명의 핵산 프로브가 혼성화될 수 있으므로 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질 분자를 검출하는데 용이하게 사용될 수 있다.

【0050】 b) 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질과 상기 a) 단계에서 제조한 항체를 결합시켜 단백질-항체 복합체를 형성시키는 단계이다.

【0051】 본 발명에 있어서, 상기 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질은 항체, 리간드, 천연화합물, 추출물, 합성 펩타이드 및 신약 후보물질 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

【0052】 본 발명에 있어서, 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질과 항체의 결합은 표적 단백질과 상기 a) 단계에서 제조한 항체를 혼합하여 이루어질 수

있다.

【0053】 c) 단백질-항체 복합체에 R_1-X-R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브를 혼성화시켜 단백질-항체-프로브 복합체를 형성시키는 단계이다.

【0054】 본 발명에 있어서, 단백질-항체 복합체와 핵산 프로브의 혼성화는 단백질-항체 복합체에 핵산 프로브를 첨가하여 이루어질 수 있다.

【0055】 d) 단백질-항체-프로브 복합체에 절단시약을 처리하여 프로브 단편을 항체로부터 분리시킨 다음, 분리된 프로브 단편의 양을 측정하여 표적 단백질 분자를 검출하는 단계이다.

【0056】 본 발명에 있어서, 상기 절단시약은 효소를 매개로 하며, 상기 핵산 프로브의 X 부위만을 특이적으로 절단할 수 있는 것이라면 어느 것이나 사용 가능하다. 예를 들어 디옥시리보핵산 가수분해효소(deoxyribonuclease, DNase), 리보핵산가수분해효소(ribonuclease, RNase), 헬리카제(helicase), 엑소뉴클리아제, 및 엔도 뉴클리아제 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나, 바람직하게는 리보핵산 가수분해효소(ribonuclease, RNase)를 사용할 수 있다.

【0057】 본 발명에 있어서, 프로브 단편의 양 측정은 다양한 검출방법을 사용하여 수행될 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따라 분리된 프로브의 단편은 실 시간 또는 반응이 종료된 후에 측정되는 것이 바람직하며, 형광광도의 변화 또는 화학발광의 측정으로 이루어질 수 있다.

【0058】 상기 형광광도의 변화 또는 화학발관의 측정은 당업계에 공지된 형광 표지자 검출이 가능한 모든 측정 장치를 이용할 수 있으며, 예를 들어 트라이애드 멀티모드 디렉터(TRIAD Multimode Detector), 활락/빅터 형광(Wallac/Victor fluorescence) 또는 퍼킨-엘머 LB50B 형광분광광도계(Perkin-Elmer LB50B luminescence spectrometer) 등을 이용하여 이루어질 수 있으며, 이에 한정하지 아니한다.

【0059】 상기와 같은 분리된 프로브의 양 측정과 탐지방법은 프로브 또는 반응액 내로 유입된 표지 또는 탐지 마커의 형태에 따라 달라질 수 있다.

【0060】 본 발명에 따른 표적 단백질을 탐지하는 방법은 R_1-X-R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브와 상보적인 서열을 가지는 핵산이 결합된 항체와 R_1-X-R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브를 사용함으로써 검출하고자 하는 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질을 탐지하는 속도와 정확도를 향상시킬 수 있는 이점이 있다.

【발명의 효과】

【0061】 본 발명에 따른 R_1-X-R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브는 별도의 반응과정 없이 소형 RNA(small RNA)와 혼성화될 수 있으며, 주형 핵산을 증폭시키기 위해 사용하는 프라이머의 서열 또는 상보적인 서열이 중복되어도 형광물질의 발광, 주형 핵산과의 부착 효율 등의 저하를 방지할 수 있다. 또한, 상기 핵산 프로브는 절단시약에 의해서만 절단되므로 종래 DNA 중합효소에 의해 분해되는 프로브에 비해 탐지하고자 하는 핵산의 양을 보다 정확하게 측정할 수 있는 이점이 있다.

【0062】 따라서, 본 발명의 R_1-X-R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브를 사용하여 소형 RNA(small RNA) 또는 상기 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질을 탐지하는 방법은 소형 RNA(small RNA) 또는 상기 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질을 신속하고 정확하게 탐지할 수 있으므로, 다양한 질병의 진단 및 예후 진단에 유용하게 이용될 수 있다.

【도면의 간단한 설명】

【0063】 도 1은 본 발명의 형광물질로 표지된 핵산 프로브를 이용하여 소형 RNA(small RNA)를 탐지하는 방법을 나타낸 모식도이다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

【0064】 이하, 실시예 등을 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예 등은 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예 등에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

【0065】 제조예 1: miRNA를 탐지용 핵산 프로브 제작

【0066】 miRNA를 역전사 중합효소 연쇄반응 신장된 cDNA로 만들어 준 다음, 상기 cDNA를 주형으로 퍼셉티브 바이오시스템 엑스페디트(perceptive biosystem expedite) 핵산 합성 시스템을 사용하여 1번부터 9번 염기, 및 14번부터 15번 염기는 데옥시리보뉴클레오티드(DNA)이고, 10과 13번 사이의 4개 염기는 리보뉴클레오티드(RNA)인 miRNA 탐지용 프로브를 합성하였다. 상기 프로브의 1번부터 9번

염기, 및 14번부터 15번 염기는 데옥시리보뉴클레오티드(DNA)이고, 10과 13번 사이의 4개 염기는 리보뉴클레오티드(RNA)로서, 소문자로 표시하였다.

【0067】 상기 miRNA 탐지용 프로브가 합성되는 동안, FAM(fluorescein succinimidyl ester) 및 TAMRA(tetramethylrhodamine succinimidyl ester)을 프로브의 9번째 염기와 14번째 염기에 삽입시켰다. 그 다음, 상기 프로브를 1M의 테트라부틸암모늄 플로라이드(tetrabutylammonium fluoride) 용액에 하룻밤 동안 처리하여 RNA에 결합된 시알일(sialyl) 보호 그룹들을 제거한 후 동일한 부피의 1M의 TEAA(triethylammonium acetate)를 상기 용액에 첨가하였다. 그 다음 올리고뉴클레오티드를 세파덱스(Sephadex) G-25 컬럼(Pharmacia 사)을 이용해 상기 뉴클레오티드를 증류수를 사용하여 탈염(desalting)하였다. 이후, 분획별로 수집하여 최종적인 시료를 변성용(7 M의 요소 첨가) 20% 폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동을 한 다음, 겔에서 적절한 올리고뉴클레오티드 밴드를 잘라내고 S&S ELUTRAP 전기-분리 시스템(Electro-Separation System)(Schleicher & Schuell)을 사용하여 전기적으로 프로브를 용출시켜 수득하였다.

【0068】 제조예 2: miRNA 탐지용 프라이머 세트

【0069】 miRNA를 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 cDNA로 만들어 준 다음, 상기 cDNA를 주형으로 퍼셉티브 바이오시스템 엑스페디트(perceptive biosystem expedite) 핵산 합성 시스템을 사용하여 miRNA 탐지용 프라이머 세트를 제작하였다.

【0070】 실시예 1: 본 발명에 따른 핵산 프로브를 이용한 miRNA의 탐지 측정

【0071】 도 1에서 보는 바와 같이, 상기 제조예 1에서 제조한 miRNA 탐지용 프로브 10 pmol과 5 unit의 내열성 RNase H의 존재하에, miRNA를 역전사 중합효소 연쇄반응을 통해 합성시킨 cDNA, 상기 제조예 2에서 제조한 miRNA 탐지용 프라이머 세트, 50 μ l Taq 중합효소 완충액, 0.2 mM dNTP 및 2.5 unit의 Taq 중합효소를 사용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 수행하였다.

【0072】 그 결과, 합성된 cDNA의 양이 증가함에 따라 비례적으로 형광광도가 증가함을 알 수 있었다.

【0073】 즉, 특정 miRNA를 탐지하는데 있어 본 발명의 핵산 프로브를 이용한 miRNA의 탐지방법이 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

【청구범위】

【청구항 1】

생물학적 시료로부터 소형 RNA(small RNA)을 탐지하는 방법으로서,

a) 생물학적 시료로부터 주형 핵산을 획득하는 단계; b) 상기 a) 단계에서 획득한 주형 핵산과 R_1 -X- R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브를 혼성화시키는 단계; c) 상기 주형 핵산과 상보적인 염기서열을 가지는 프라이머 세트로부터의 신장반응에 의해 주형 핵산-프로브 복합체를 증폭시키는 단계; 및 d) 상기 증폭된 주형 핵산-프로브 복합체에 절단시약을 처리하여 프로브 단편을 주형 핵산으로부터 분리시킨 다음, 분리된 프로브 단편의 양을 측정하는 단계;를 포함하며,

상기 프로브의 R_1 과 R_2 는 1 내지 20개의 염기서열로 구성되는 DNA 또는 RNA이고, X는 1 내지 10개의 염기서열로 구성되며, 절단시약에 의해 절단될 수 있는 RNA 또는 DNA인 것을 특징으로 하는 소형 RNA(small RNA)를 실시간 검출하는 방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서,

상기 핵산 프로브는 X의 양 말단 또는 내부에 형광 물질(fluorescent dye)과 소광 물질(quencher)이 0 내지 20개의 염기쌍의 거리로 떨어진 위치에 부착된 것임을 특징으로 하는 소형 RNA(small RNA)를 실시간 검출하는 방법.

【청구항 3】

제1항에 있어서,

상기 a) 단계의 R_1 -X- R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브는 R_1 과 R_2 가 DNA이고, X가 RNA인 것을 특징으로 하는 소형 RNA(small RNA)를 실시간 검출하는 방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서,

상기 c) 단계의 절단시약은 옥시리보핵산 가수분해효소(deoxyribonuclease, DNase), 리보핵산가수분해효소(ribonuclease, RNase), 헬리카제(helicase), 엑소뉴클리아제, 및 엔도 뉴클리아제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나인 것을 특징으로 하는 소형 RNA(small RNA)를 실시간 검출하는 방법.

【청구항 5】

a) R_1 -X- R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브로서, 상기 프로브의 R_1 과 R_2 는 1 내지 20개의 염기서열로 구성되는 DNA 또는 RNA이고, X는 1 내지 10개의 염기서열로 구성되며, 절단시약에 의해 절단될 수 있는 RNA 또는 DNA인 것을 특징으로 하는 핵산 프로브와 상보적인 염기서열을 가지는 핵산이 부착되어 있는 항체를 제조하는

단계; b) 생물학적 시료로부터 수득한 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질과 상기 a) 단계에서 제조한 항체를 결합시켜 단백질-항체 복합체를 형성시키는 단계; c) 상기 복합체에 상기 R_1-X-R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브를 혼성화시켜 단백질-항체-프로브 복합체를 형성시키는 단계; 및 d) 상기 단백질-항체-프로브 복합체에 절단시약을 처리하여 프로브 단편을 항체로부터 분리시킨 다음, 분리된 프로브 단편의 양을 측정하여 표적 단백질 분자를 검출하는 단계;를 포함하는 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질 분자를 탐지하는 방법.

【요약서】

【요약】

본 발명은 소형 RNA(small RNA) 또는 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질을 탐지하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 a) 생물학적 시료로부터 주형 핵산을 획득하는 단계; b) 상기 a) 단계에서 획득한 주형 핵산과 R_1 -X- R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브를 혼성화시키는 단계; c) 상기 주형 핵산과 상보적인 염기서열을 가지는 프라이머 세트로부터의 신장반응에 의해 주형 핵산-프로브 복합체를 증폭시키는 단계; 및 d) 상기 증폭된 주형 핵산-프로브 복합체에 절단시약을 처리하여 프로브 단편을 주형 핵산으로부터 분리시킨 다음, 분리된 프로브 단편의 양을 측정하는 단계;를 포함하는 소형 RNA(small RNA)를 탐지하는 방법, 및 상기 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질을 탐지하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 R_1 -X- R_2 의 구조를 갖는 핵산 프로브를 사용하여 소형 RNA(small RNA) 또는 상기 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질을 탐지하는 방법은 소형 RNA(small RNA) 또는 상기 소형 RNA(small RNA)와 연관된 단백질을 신속하고 정확하게 탐지할 수 있으므로, 다양한 질병의 진단 및 예후 진단에 유용하게 이용될 수 있다.

【대표도】

도 1

【도면】

【도 1】

