



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0073071
(43) 공개일자 2023년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6825 (2018.01) C12Q 1/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6825 (2018.05)
C12Q 1/70 (2022.05)
(21) 출원번호 10-2022-0065162
(22) 출원일자 2022년05월27일
심사청구일자 2022년05월27일
(30) 우선권주장
1020210159837 2021년11월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
정효일
서울특별시 서초구 잠원로14길 3, 201동 401호(잠원동, 롯데캐슬밸럭시)
허웅
서울특별시 성동구 독서당로 377, 107동 305호(응봉동, 금호현대아파트)
이경연
경기도 안양시 만안구 예술공원로64번길 28, 304호(안양동, 신라아파트)
(74) 대리인
특허법인이름리온

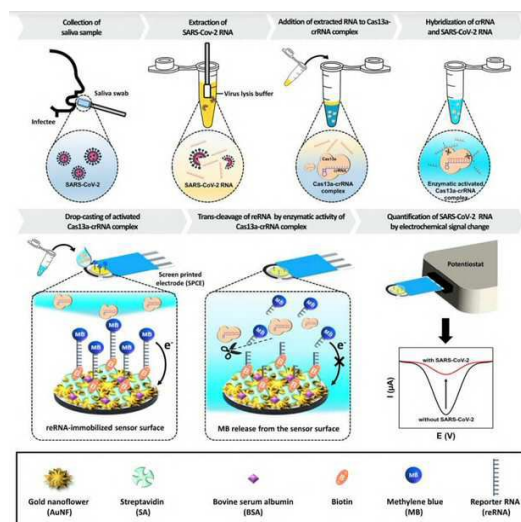
전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 표적 RNA 검출용 전기화학적 바이오센서

(57) 요약

본 발명은 표적 RNA 검출용 전기화학적 바이오센서에 관한 것으로, 본 발명은 CRISPR/Cas13a 트랜스-절단 반응을 통해 핵산 증폭 반응 없이도 극소량의 표적 RNA를 높은 민감도로 검출할 수 있어, 테스트 시간을 최소화하면서도 높은 정확도로 표적 RNA를 검출할 수 있어, COVID-19과 같이 확산 속도가 빠른 RNA 기반 전염병의 현장 진단 테스트에 유용하게 활용될 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2310/20 (2017.05)
C12Q 2563/113 (2013.01)
C12Q 2563/155 (2013.01)
C12Q 2565/607 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711139115
과제번호	KMDF_PR_20210527_0008-02
부처명	다부처
과제관리(전문)기관명	(재단)범부처전주기의료기기연구개발사업단
연구사업명	범부처전주기의료기기연구개발사업(R&D)(과기정통부, 복지부, 산업부)
연구과제명	(참여1)호흡기 바이러스 검출을 위한 RT-RPA 및 CRISPR 기술 기반 신속 원스텝 분자 진단 시스템 개발 및 상용화
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545025753
과제번호	320035033HD030
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	작물바이러스및병해충대응산업화기술개발
연구과제명	다중 바이러스의 현장 검출을 위한 미세유체 칩 기반 전기화학 센서 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711166410
과제번호	2020R1A5A1018052
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	나노-광 융합 바이오의료 진단 연구센터
기 여 율	1/3
과제수행기관명	중앙대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

몰리브덴 이황화물 (molybdenum disulfide, MoS₂), 그래핀 (Graphene) 및 키토산(chitosan, CHT)을 포함하는 나노복합체(NC); 및 꽃 형상의 금 나노구조체(AuNF);가 증착된 전극에 리포터 RNA (reRNA)가 고정되어 있는, 표적 RNA 검출용 바이오센서.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 바이오센서는 Cas13a-crRNA-표적 RNA 복합체와 반응하여 전류가 감소되는 것을 특징으로 하는, 표적 RNA 검출용 바이오센서.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 바이오센서는 블로킹 제제 (blocking agent)가 코팅되어 있는 것을 특징으로 하는, 표적 RNA 검출용 바이오센서.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 블로킹 제제는 BSA, 스킴 밀크(SKIM MILK), SALMON SPERM DNA 또는 머캅토헥산올 (mercaptohexanol, MCH)인 것을 특징으로 하는, 표적 RNA 검출용 바이오센서.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 리포터 RNA는 스트렙타비딘-바이오틴(Streptavidin-biotin), 아비딘-바이오틴(avidin-biotin) 또는 티올-금(thiol-gold) 결합을 통해 상기 나노복합체 및 나노구조체가 증착된 전극에 고정되는 것을 특징으로 하는, 표적 RNA 검출용 바이오센서.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 나노복합체는 몰리브덴 이황화물, 그래핀, 키토산을 1 : 0.3 - 0.7 : 0.05 - 0.3의 부피 비로 포함하는 것을 특징으로 하는, 표적 RNA 검출용 바이오센서.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 리포터 RNA는 산화환원 분자가 태깅된 것을 특징으로 하는, 표적 RNA 검출용 바이오센서.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 산화환원 분자는 메틸렌 블루, 톨루이딘 블루 또는 페로신인 것을 특징으로 하는, 표적 RNA 검출용 바이오센서.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 전극은 탄소 전극인 것을 특징으로 하는, 표적 RNA 검출용 바이오센서.

청구항 10

다음 단계를 포함하는 제1항의 바이오센서 제조방법:

- (a) 전극에 몰리브덴 이황화물(molybdenum disulfide, MoS₂), 그래핀(Graphene) 및 키토산(chitosan)을 포함하는 나노복합체; 및 꽃 형상의 금 나노구조체를 순차적으로 증착시키는 단계; 및
- (b) 상기 나노복합체 및 나노구조체가 증착된 전극에 산화환원 분자가 태킹된 리포터 RNA (reRNA)를 고정시키는 단계.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 (a) 단계는 나노복합체 및 나노구조체가 순차적으로 증착된 탄소 전극에 전극에 3-머캅토프로피온산 (3-mercaptopropionic acid, MPA)을 처리하는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 (a) 단계는 0.05 내지 0.5 M의 3-머캅토프로피온산을 10분 내지 1시간 동안 처리하는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 (a) 단계는 3-머캅토프로피온산이 처리된 탄소 전극을 블로킹 제제로 코팅시키는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 블로킹 제제는 BSA, 스킴 밀크(SKIM MILK), SALMON SPERM DNA 또는 머캅토헥산을(mercaptohexanol, MCH)인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 15

제10항에 있어서, 상기 (a) 단계는 나노복합체 및 나노구조체가 순차적으로 증착된 탄소 전극에 스트렙타비딘, 아비딘 또는 바이오틴 코팅하는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 (b) 단계는, 상기 (a) 단계의 탄소 전극 표면의 금 또는 전극 표면에 코팅된 스트렙타비딘, 아비딘 또는 바이오틴과 상호작용 하도록, 각각 바이오틴, 스트렙타비딘 또는 티올 기가 결합된 리포터 RNA (reRNA)와 반응시켜 고정시키는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 (a) 단계는 1 내지 20 mg/ml의 스트렙타비딘을 첨가하여 코팅시키는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 18

제10항에 있어서, 상기 (b) 단계는 50 내지 500 µg/ml의 리포터 RNA로 2시간 내지 6시간 동안 반응시키는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 19

다음 단계를 포함하는 제1항의 바이오센서를 이용한 표적 RNA 검출방법:

- (a) 제1항의 바이오센서에 Cas13a-crRNA-RNA 혼합 시료를 처리하는 단계; 및
- (b) 상기 바이오센서의 감소된 전류량을 측정하는 단계.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 표적 RNA는 SARS-CoV-2 RNA 이고,

상기 crRNA는 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는 ORF gene의 crRNA 및/또는 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는 S gene인 것을 특징으로 하는, 표적 RNA 검출방법.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 Cas13a-crRNA-RNA 혼합 시료는 Cas13a와 crRNA가 1 : 0.1 - 0.001의 질량비로 혼합되어 있는 혼합물에 RNA 시료가 추가로 혼합되어 있는 것을 특징으로 하는, 표적 RNA 검출방법.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 (a) 단계는 상기 바이오센서에 Cas13a-crRNA-RNA 혼합 시료를 처리하여 1 내지 2 시간 동안 반응시키는 것을 특징으로 하는, 표적 RNA 검출방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 RNA 시료는 전혈, 혈장, 혈청, 뇨, 타액, 콧물, 상기도 점액, 하기도 점액, 분뇨, 림프액, 양수 및 조직으로 구성된 군에서 선택되는 생체 시료에 포함되어 있거나, 상기 생체 시료로부터 분리되는 것을 특징으로 하는, 표적 RNA 검출방법.

청구항 24

제1항의 바이오센서, Cas13a, 표적 RNA 특이적 crRNA를 포함하는, 표적 RNA 검출용 키트.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 표적 RNA는 SARS-CoV-2 RNA 이고,

상기 crRNA는 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는 ORF gene의 crRNA 및/또는 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는 S gene인 것을 특징으로 하는, 표적 RNA 검출용 키트.

몰리브덴 이황화물 (molybdenum disulfide, MoS₂), 그래핀 (Graphene) 및 키토산(chitosan, CHT)을 포함하는 나노복합체(NC); 및 꽃 형상의 금 나노구조체(AuNF);가 증착된 전극에 리포터 RNA (reRNA)가 고정되어 있는, 표적 RNA 검출용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 표적 RNA 검출용 전기화학적 바이오센서에 관한 것으로, 더 상세하게는 핵산 증폭 반응없이 CRISPR/Cas13a 트랜스-절단 반응을 통해 SARS-CoV-2와 같은 RNA를 높은 민감도로 검출할 수 있는, 표적 RNA검출용 전기화학적 바이오센서에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV-2)로 인한 COVID-19 대유행은 전세계 인구의 건강과 경제를 심각하게 위협하였다. 세계보건기구(WHO)에 따르면 2021년 8월 2일까지 COVID-19으로 인해 2억 500만 명이 감염되었고 400만 명이 사망하였다. 바이러스는 직접적인 접촉, 공기, 매개체, 비말과 같은 다양한 경로를 통해 사람에서 사람으로 전파되어 빠른 속도로 확산되었는데, SARS-CoV-2의 감염 재생산 지수(reproduction number) $R_0 = 3.1$ 로, 다른 코로나바이러스인 중동호흡기증후군 코로나바이러스(MERS-CoV) ($R_0 = 0.6$), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 (SARS-CoV) ($R_0 = 0.7$) 및 인플루엔자 바이러스($R_0 = 1.3$) 보다 매우 높은 전염성을 보인다. 이와 같은 대유행 상황은 바이러스 감염의 신속한 진단을 통해 COVID-19 의심 사례를 선별하고 추가 전파를 억제하기 위하여 감염된 환자를 격리함으로써 관리할 수 있다.

[0004] 한편, 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응(RT-PCR) 기술은 현재 SARS-CoV-2 RNA를 높은 감도와 특이도로 검출하기 위한 표준 기술이나, 훈련된 인력이 필요하고 샘플 준비 및 유전자 증폭을 포함하는 긴 테스트 시간 (약 3-4 시간)이 필요하므로 현장 진단 테스트(POCT)에서 RT-PCR의 적용 가능성은 제한적이다. 신속한 현장 진단을 위해서는 테스트 시간을 최소화하는 것이 관건인데, 면역 검출 방법은 신속하게 테스트 결과를 얻을 수 있는 잠재력으로 인해 SARS-CoV-2 모니터링 방식의 대안으로 등장하였으나, 낮은 정확도 및 낮은 민감도로 인한 위음성은 SARS-CoV-2의 확산을 오히려 악화시킬 수 있다 (Cui, et al., 2020; Huang, et al., 2021).

[0005] 특정 뉴클레오타이드 서열을 표적으로 하는 CRISPR(Clustered regular interspaced short palindromic repeats)/CRISPR 관련(Cas) 단백질 시스템은 매우 효과적인 검출 및 신속한 모니터링 전략으로 각광받고 있다. 바이오센서에 적용되는 CRISPR 시스템 중 Cas13a 및 Cas12a의 트랜스-절단 활성은 형광 염료 및 소광제-태그 리포터 분자로 기능화된 비특이적 단일 가닥 RNA 및 DNA에 이용될 수 있다. 예를 들어, Gootenberg, et al. 은 Zika 바이러스 RNA를 검출하기 위해 핵산 증폭 기술인 RPA(recombinase polymerase amplification)와 통합된 CRISPR 기술을 적용한 형광 신호 분석을 통해 바이러스 RNA를 1.0×10^{-1} fg/ml까지 검출할 수 있었다 (Gootenberg, et al., 2017; Broughton, et al., 2020; Wang, et al., 2020). 그러나, CRISPR 기반 광학 검출 전략이 제공하는 뛰어난 검출 한계와 특이성에도 불구하고, 부피가 크고 값비싼 광학 장치는 현장 진단 테스트 응용 분야에서 해당 기술 활용을 제한할 수 있다. 한편, 전기화학적 측정 기술은 높은 민감도, 특이성, 소형화, 휴대성 및 비용 효율성으로 인해 적은 양의 표적 유전자를 정량화할 수 있는 대체 방법으로 사용될 수 있다. 전기화학적 검출의 이러한 장점은 CRISPR/Cas12a 시스템과 결합된 전기화학 바이오센서를 개발하여 핵산 증폭 과정 없이 2.8×10^6 fg/ml 및 6.0×10^2 fg/ml 농도 수준에서 각각 인유두종바이러스(HPV) 및 파보바이러스를 검출하는 데 활용되었다 (Zhang, et al., 2020; Dai, et al., 2019). 해당 방식은 사전 증폭 단계가 생략되어

감지 절차가 더 간단하다는 장점이 있으나, 이 바이오센서는 specific high sensitivity enzymatic reporter unlocking (SHERLOCK) 및 DNA endonuclease targeted CRISPR trans reporter (DETECTR)와 같은 기존의 CRISPR/Cas 기반 센싱 방법에 비해 바이러스 감염의 조기 검출에 필수적인 낮은 농도의 바이러스 RNA를 모니터링하는 데 상대적으로 낮은 성능을 보인다 (Kellner, et al., 2019; Chen, et al., 2018).

- [0006] 이에 본 발명자들은 기존의 SARS-CoV-2 검출 방법 및 CRISPR/Cas 기반의 한계를 극복하기 위하여 예의 노력한 결과, 높은 전도성 나노구조물이 증착된 전극과 CRISPR/Cas13a 시스템의 트랜스-절단(trans-cleavage) 활성을 결합한 전기화학적 바이오센서를 개발할 수 있었으며, 상기 바이오센서를 이용하는 경우, 사전 증폭 단계를 생략함에도 극소량의 SARS-CoV-2 RNA를 추적하는 센서 성능에 의한 고감도 분석 성능으로 COVID-19을 효과적으로 검출할 수 있으며, 이는 다양한 표적 RNA를 핵산 증폭 과정없이 높은 정확도와 민감도로 검출할 수 있는 표적 RNA 모니터링 플랫폼을 활용할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Cui, et al., 2020. Biosensors and bioelectronics 165, 112349.
 (비특허문헌 0002) Huang, et al., 2021. Biosensors and Bioelectronics 171, 112685.
 (비특허문헌 0003) Gootenberg, J.S. et al., 2017. Science 356(6336), 438-442.
 (비특허문헌 0004) Broughton, J.P. et al., 2020. Nature biotechnology 38(7), 870-874.
 (비특허문헌 0005) Wang, M., Zhang, R., Li, J., 2020. Biosensors and Bioelectronics 112430.
 (비특허문헌 0006) Zhang, D. et al., 2020. ACS sensors 5(2), 557-562.
 (비특허문헌 0007) Dai, Y. et al., 2019. Angewandte Chemie 131(48), 17560-17566.
 (비특허문헌 0008) Kellner, M.J. et al., 2019. Nature protocols 14(10), 2986-3012.
 (비특허문헌 0009) Chen, J.S. et al., 2018. Science 360(6387), 436-439.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 핵산 증폭 반응 없이 극소량의 표적 RNA를 검출할 수 있는 고감도 분석 성능을 가지는 바이오센서, 바이오센서 제조방법, 표적 RNA 검출방법 및 표적 RNA 검출용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 몰리브덴 이황화물 (molybdenum disulfide, MoS₂), 그래핀 (Graphene) 및 키토산 (chitosan, CHT)을 포함하는 나노복합체(NC); 및 꽃 형상의 금 나노구조체(AuNF);가 증착된 전극에 리포터 RNA (reRNA)가 고정되어 있는, 표적 RNA 검출용 바이오센서를 제공한다.
- [0011] 본 발명에 있어서, 상기 바이오센서는 Cas13a-crRNA-표적 RNA 복합체와 반응하여 전류가 감소되는 것을 특징으로 한다.
- [0012] 본 발명에 있어서, 상기 바이오센서는 블로킹 제제 (blocking agent)가 코팅되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [0013] 본 발명에 있어서, 상기 블로킹 제제는 BSA, 스킴 밀크(SKIM MILK), SALMON SPERM DNA 또는 머캅토헥산올 (mercaptohexanol, MCH)인 것을 특징으로 한다.
- [0014] 본 발명에 있어서, 상기 리포터 RNA는 스트렙타비딘-바이오틴(Streptavidin-biotin), 아비딘-바이오틴(avidin-biotin) 또는 티올-금(thiol-gold) 결합을 통해 상기 나노복합체 및 나노구조체가 증착된 전극에 고정되는 것을 특징으로 한다.

- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 나노복합체는 몰리브덴 이황화물, 그래핀, 키토산을 1 : 0.3 - 0.7 : 0.05 - 0.3의 부피비로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 상기 리포터 RNA는 산화환원 분자가 태깅된 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명에 있어서, 상기 산화환원 분자는 메틸렌 블루, 톨루이딘 블루 또는 페로신인 것을 특징으로 한다.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 전극은 탄소 전극인 것을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 상기 바이오센서 제조방법을 제공한다:
- [0020] (a) 전극에 몰리브덴 이황화물(molybdenum disulfide, MoS₂), 그래핀(Graphene) 및 키토산(chitosan)을 포함하는 나노복합체 및 꽃 형상의 금 나노구조체를 순차적으로 증착시키는 단계; 및
- [0021] (b) 상기 나노복합체 및 나노구조체가 증착된 전극에 산화환원 분자가 태깅된 리포터 RNA (reRNA)를 고정시키는 단계.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 나노복합체 및 나노구조체가 순차적으로 증착된 탄소 전극에 전극에 3-머캅토프로피온산 (3-mercaptopropionic acid, MPA)을 처리하는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 0.05 내지 0.5 M의 3-머캅토프로피온산을 10분 내지 1시간 동안 처리하는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 3-머캅토프로피온산이 처리된 탄소 전극을 블로킹 제제로 코팅시키는 것을 특징으로 한다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 블로킹 제제는 BSA, 스킵 밀크(SKIM MILK), SALMON SPERM DNA 또는 머캅토흥산올 (mercaptohexanol, MCH)인 것을 특징으로 한다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 나노복합체 및 나노구조체가 순차적으로 증착된 탄소 전극에 스트렙타비딘, 아비딘 또는 바이오틴 코팅하는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는, 상기 (a) 단계의 탄소 전극 표면의 금 또는 전극 표면에 코팅된 스트렙타비딘, 아비딘 또는 바이오틴과 상호작용하도록, 각각 바이오틴, 스트렙타비딘 또는 티올 기가 결합된 리포터 RNA (reRNA)와 반응시켜 고정시키는 것을 특징으로 한다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 1 내지 20 mg/ml의 스트렙타비딘을 첨가하여 코팅시키는 것을 특징으로 한다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 50 내지 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 리포터 RNA로 2시간 내지 6시간 동안 반응시키는 것을 특징으로 한다.
- [0030] 본 발명은 또한, 다음 단계를 포함하는 상기 바이오센서를 이용한 표적 RNA 검출방법을 제공한다:
- [0031] (a) 상기 바이오센서에 Cas13a-crRNA-RNA 혼합 시료를 처리하는 단계; 및
- [0032] (b) 상기 바이오센서의 감소된 전류량을 측정하는 단계.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 표적 RNA는 SARS-CoV-2 RNA 이고,
- [0034] 상기 crRNA는 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는 ORF gene의 crRNA 및/또는 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는 S gene인 것을 특징으로 한다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 Cas13a-crRNA-RNA 혼합 시료는 Cas13a와 crRNA가 1 : 0.1 - 0.001의 질량비로 혼합되어 있는 혼합물에 RNA 시료가 추가로 혼합되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 상기 바이오센서에 Cas13a-crRNA-RNA 혼합 시료를 처리하여 1 내지 2시간 동안 반응시키는 것을 특징으로 한다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 RNA 시료는 전혈, 혈장, 혈청, 뇨, 타액, 콧물, 상기도 점액, 하기도 점액, 분뇨, 림프액, 양수 및 조직으로 구성된 군에서 선택되는 생체 시료에 포함되어 있거나, 상기 생체 시료로부터 분리되는 것을 특징으로 한다.
- [0038] 본 발명은 또한, 상기 바이오센서, Cas13a, 표적 RNA 특이적 crRNA를 포함하는, 표적 RNA 검출용 키트를 제공한

다.

[0039] 본 발명에 있어서, 상기 표적 RNA는 SARS-CoV-2 RNA 이고,

[0040] 상기 crRNA는 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는 ORF gene의 crRNA 및/또는 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는 S gene인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0041] 본 발명은 CRISPR/Cas13a 트랜스-절단 반응을 통해 핵산 증폭 반응 없이도 극소량의 표적 RNA를 높은 민감도로 검출할 수 있어, 테스트 시간을 최소화하면서도 높은 정확도로 표적 RNA를 검출할 수 있어, 확산 속도가 빠른 RNA 기반 전염병의 현장 진단 테스트에 유용하게 활용될 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 SARS-CoV-2 검출을 위해 CRISPR/Cas13a와 함께 사용되는 전기화학적 바이오센싱 전략의 개략도를 나타낸다. lysis buffer를 사용하여 감염된 환자로부터 채취한 타액에서 바이러스 RNA를 추출하고 Cas13a-crRNA 복합체 함유 용액과 혼합한다. 이 복합체는 SARS-CoV-2 RNA와 결합하여 효소 활성을 유발한다. 활성화된 Cas13a-crRNA 복합체는 이후 전극에 고정된 reRNA를 절단하기 위해 센서 표면에 로드된다. SARS-CoV-2의 존재는 전류 변화 분석을 통해 정량화할 수 있다.

도 2에서 a)는 SARS-CoV-2 RNA 검출을 위한 전기화학적 바이오센서 제작을 위한 개략도이다. (i) AuNF/NC/SPCE, (ii) SA/AuNF/NC/SPCE, (iii) BSA/SA/AuNF/NC/SPCE, (iv) reRNA/BSA/SA/AuNF/NC/SPCE, (v) cleaved reRNA/BSA/SA/AuNF/NC/SPCE에 대한 b) CV 및 c) EIS에 의해 바이오센싱 표면의 다양한 변형 단계가 특성화되었다. d)는 단계 (iv) 및 (v)에 대해 DPV에 의해 얻은 전류 변화의 표현한 것이다.

도 3은 AuNF/NC/SPCE, SA/AuNF/NC/SPCE, 및 BSA/SA/AuNF/NC/SPCE의 원자력 현미경 (AFM) 현미경 사진(a) 및 단면 프로파일(b), BSA/SA/AuNF/NC/SPCE, reRNA/BSA/SA/AuNF/NC/SPCE, 및 절단된 reRNA/BSA/SA/AuNF/NC/SPCE의 공초점 현미경 이미지(c)를 나타낸다.

도 4는 Cas13a-crRNA 복합체의 형성에서 다양한 농도의 Cas13a에서 crRNA의 비율(a) 및 활성화된 Cas13a-crRNA 복합체에 의한 SARS-CoV-2 RNA의 트랜스-절단 성능(b)을 결정하기 위해 수행된 겔 전기영동 결과와, Cas13a-crRNA 기반 형광 분석의 개략도(c)를 나타낸다. 형광 강도는 고정된 농도의 S 유전자 (d) 및 ORF 유전자 (e)에서 다양한 농도의 Cas13a-crRNA 복합체로 조사되었다.

도 5는 다양한 농도의 Cas13a에 의한 crRNA_ORF gene(a) 및 crRNA_S gene(b)의 포획 효율을 확인한 결과이다.

도6은 3-머캅토프로피온산(3-mercaptopropionic acid, MPA)의 인큐베이션 시간을 확인한 결과이다.

도 7은 전극 표면에 코팅된 streptavidin (SA) 농도를 확인한 결과이다.

도 8은 상이한 농도(a)와 시간(b)에서 reRNA의 고정화(immobilization)를 확인한 결과이다.

도 9는 trans-cleavage 활성화에 적합한 시간을 평가한 것이다.

도 10에서 a)는 0.1M KCl 용액을 포함하는 pH 7.4의 0.1M PBS에서 다양한 농도의 ORF 유전자 [a: 1.0×10^{-1} , b: 1.0×10^0 , c: 1.0×10^1 , d: 1.0×10^2 , e: 1.0×10^3 , f: 1.0×10^4 , 및 g: 1.0×10^5 fg/ml]가 존재할 때 reRNA/BSA/SA/AuNF/NC/SPCE의 DPV 반응, b)는 상기 센서의 상응하는 보정 곡선을 나타내며, c)는 0.1M KCl 용액을 포함하는 pH 7.4의 0.1M PBS에서 다양한 농도의 S 유전자 [a: 1.0×10^{-1} , b: 1.0×10^0 , c: 1.0×10^1 , d: 1.0×10^2 , e: 1.0×10^3 , f: 1.0×10^4 , 및 g: 1.0×10^5 fg/ml]가 존재할 때 reRNA/BSA/SA/AuNF/NC/SPCE의 DPV 반응, d)는 상기 센서의 상응하는 보정 곡선을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서

사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [0046] 본 발명에서는 핵산 증폭 단계 없이 극도로 낮은 농도의 SARS-CoV-2 RNA를 정량화할 수 있는 전기화학적 바이오센서를 개발하였다. 상기 바이오센서의 전극은 나노복합체(nanocomposite, NC) 및 꽃 형상의 금 나노구조체(flower-shaped gold nanostructure, AuNF)로 개질되어 전극의 전도성을 높이고, 작업 전극의 표면 대 부피 비율(surface-to-volume ratio)을 증가시켰으며, 각 말단에 메틸렌 블루(MB) 및 바이오틴(biotin)이 태그된 리포터 RNA(reRNA) 분자를 스트렙타비딘(streptavidin, SA)이 코팅된 전극에 고정하였다.
- [0047] 본 발명에 따른 개질된 전극을 활용한 Cas13a 매개로한 리포터 RNA의 트랜스-절단(trans-cleavage) 기반 SARS-CoV-2 검출을 위한 센싱 전략은 도 1에 나타난 바와 같다. 먼저, 면봉으로 타액을 채취하고, 용해 버퍼(lysis buffer)를 이용하여 바이러스 RNA를 추출한 후, 추출된 바이러스 RNA를 Cas13a-crRNA 복합체 용액에 로딩한다. 이 복합체는 proto spacer-flanking site (PFS)를 통해 표적 바이러스 RNA 표적 부위에 상보적으로 결합하는 crRNA 서열을 기반으로 SARS-CoV-2 RNA의 특정 서열을 인식할 수 있다 (Bruch, et al., 2021. Biosensors and Bioelectronics 177, 112887). SARS-CoV-2 RNA의 특정 영역에 결합하여 Cas13a-crRNA 복합체가 활성화되면 비특이적 single-stranded RNA(ssRNA)의 비특이적 절단이 유발된다 (van Dongen, et al., 2020. Biosensors and Bioelectronics 166, 112445; Zuo et al., 2017. Nature Biomedical Engineering 1(6), 1-2). Cas13a-crRNA-SARS-CoV-2 RNA 삼원 복합체는 이후 센서 표면에 도입되고 센서에 고정된 리포터 RNA가 짧은 단편으로 부수적으로 절단되면서 바이오센싱 표면에서 메틸렌 블루(methylen blue, MB)가 방출된다. 이는 결과적으로 산화 환원 프로브에서 전극 표면으로의 전자 이동을 제거하여 피크 전류를 감소시킨다. 마지막으로 SARS-CoV-2 RNA는 감소된 피크 전류를 변환하여 정량화된다. 개발된 바이오센서는 SARS-CoV-2의 ORF 및 S 유전자를 각각 4.4×10^{-2} fg/ml 및 8.1×10^{-2} fg/ml의 낮은 수준에서 감지할 수 있었다. 소량의 SARS-CoV-2 RNA를 추적하는 센서 성능은 사전 증폭 단계를 생략함에도 고감도 분석 성능으로 COVID-19 진단을 위한 모니터링 플랫폼으로서 엄청난 가능성을 보여주었다.
- [0049] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 몰리브덴 이황화물(molybdenum disulfide, MoS₂), 그래핀(Graphene) 및 키토산(chitosan, CHT)을 포함하는 나노복합체(NC); 및 꽃 형상의 금 나노구조체(AuNF);가 증착된 전극에 리포터 RNA(reRNA)가 고정되어 있는, 표적 RNA 검출용 바이오센서에 관한 것이다.
- [0050] 본 발명에 있어서, 상기 바이오센서는 Cas13a-crRNA-표적 RNA 복합체와 반응하여 전류가 감소되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 상기 바이오센서는 블로킹 제제(blocking agent)가 코팅되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 블로킹 제제는 BSA, 스킴 밀크(SKIM MILK), SALMON SPERM DNA 또는 머캅토헥산올(mercaptohexanol, MCH)인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0053] 본 발명에 있어서, 상기 리포터 RNA는 스트렙타비딘-바이오틴(Streptavidin-biotin), 아비딘-바이오틴(avidin-biotin) 또는 티올-금(thiol-gold) 결합을 통해 상기 나노복합체 및 나노구조체가 증착된 전극에 고정되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 즉, 상기 리포터 RNA와 전극에는 각각 본 기술분야에서 상호 결합하는 화합물 쌍은 제한없이 적용할 수 있다.
- [0054] 본 발명에 있어서, 상기 리포터 RNA가 상기 전극에 고정되기 위하여, 리포터 RNA는 스트렙타비딘, 아비딘, 바이오틴 또는 티올과 결합되어 있을 수 있다.
- [0055] 일 양태로서, 상기 나노복합체 및 나노구조체가 증착된 전극은 상기 리포터 RNA에 결합된 스트렙타비딘 또는 아비딘과 결합되도록 바이오틴이 결합되어 있을 수 있다.
- [0056] 또 다른 양태로서, 상기 나노복합체 및 나노구조체가 증착된 전극은 상기 리포터 RNA에 결합된 바이오틴과 결합되도록 스트렙타비딘 또는 아비딘이 결합되어 있을 수 있다.
- [0057] 또 다른 양태로서, 상기 리포터 RNA에 티올기가 결합되어 있는 경우 상기 리포터 RNA는 전극에 증착된 금과 결합할 수 있다.

- [0058] 본 발명에 있어서, 상기 나노복합체는 몰리브덴 이황화물, 그래핀, 키토산을 바람직하게는 1 : 0.3 - 0.7 : 0.05 - 0.3, 더 바람직하게는 1 : 0.4 - 0.6 : 0.08 - 0.15, 가장 바람직하게는 약 1 : 0.5 : 0.1의 부피비로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0059] 본 발명에 있어서, 상기 몰리브덴 이황화물은 몰리브덴 이황화물 나노시트(molybdenum disulfide nanosheets, MoS₂ NS)의 형태로, 상기 그래핀은 그래핀 나노플레이트렛(Graphene nanoplatelets, GNP) 형태로 나노복합체에 포함되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0060] 본 발명에 있어서, 상기 나노시트는 전극의 전도도를 증가시키도록 기능할 수 있으며, 상기 나노플레이트렛은 전극의 전도도 증가 및 생체 적합성을 증가시키기 위해 기능할 수 있다.
- [0061] 본 발명에 있어서, 상기 금 나노구조체는 바이오센서에서 생체적합성 및 전도도를 증가시키고자, 꽃 형상의 금 나노구조체(AuNF)를 사용하는 것이 바람직하며(Sensors and Actuators: B. Chemical 357 (2022) 13 참조), 이는 일반적인 금 나노구조체 (AuNP) 보다 표면적이 넓어 전극 표면에 리포터를 더 많이 고정시켜서 더 넓은 범위의 신호 측정이 가능한 장점이 있다.
- [0063] 본 발명에 있어서, 상기 리포터 RNA는 산화환원 분자가 태깅된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0064] 본 발명에 있어서, 상기 산화환원 분자는 메틸렌 블루, 톨루이딘 블루 또는 페로신인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0065] 본 발명에 있어서, 상기 전극은 탄소 전극인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0066] 본 발명에 있어서, 상기 리포터 RNA는 Cas13a-crRNA-표적 RNA 복합체와 반응하여 절단됨으로써 전극 표면에서 산화환원 분자, 예컨대, 메틸렌 블루 분자의 탈출을 유도하고, 결과적으로 전류를 감소시키는 것인바, 절단되어 전극 표면에서 전류를 감소시키는 화합물은 제한없이 사용가능하다.
- [0068] 다른 관점에서, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 상기 바이오센서 제조방법에 관한 것이다:
- [0069] (a) 전극에 몰리브덴 이황화물(molybdenum disulfide, MoS₂), 그래핀(Graphene) 및 키토산(chitosan)을 포함하는 나노복합체 및 꽃 형상의 금 나노구조체를 순차적으로 증착시키는 단계; 및
- [0070] (b) 상기 나노복합체 및 나노구조체가 증착된 전극에 산화환원 분자가 태깅된 리포터 RNA (reRNA)를 고정시키는 단계.
- [0071] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 나노복합체 및 나노구조체가 순차적으로 증착된 탄소 전극에 전극에 3-머캅토프로피온산 (3-mercaptopropionic acid, MPA)을 처리하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0072] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 0.05 내지 0.5 M의 3-머캅토프로피온산을 10분 내지 1시간 동안 처리하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0073] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 3-머캅토프로피온산이 처리된 탄소 전극을 블로킹 제제로 코팅시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0074] 본 발명에 있어서, 상기 블로킹 제제는 BSA, 스킴 밀크(SKIM MILK), SALMON SPERM DNA 또는 머캅토헥산올(mercaptohexanol, MCH)인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0075] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 나노복합체 및 나노구조체가 순차적으로 증착된 탄소 전극에 스트렙타비딘, 아비딘 또는 바이오틴 코팅하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0076] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는, 상기 (a) 단계의 탄소 전극 표면의 금 또는 전극 표면에 코팅된 스트렙타비딘, 아비딘 또는 바이오틴과 상호작용 하도록, 각각 바이오틴, 스트렙타비딘 또는 티올 기가 결합된 리포터 RNA (reRNA)와 반응시켜 고정시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0077] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 1 내지 20 mg/ml의 스트렙타비딘을 첨가하여 코팅시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0078] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 50 내지 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 리포터 RNA로 2시간 내지 6시간 동안 반응시키는 것을

특징으로 할 수 있다.

- [0079] 본 발명에 있어서, 상기 전극은 탄소 전극일 수 있다.
- [0081] 본 발명의 바람직한 양태로서, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 상기 바이오센서 제조방법을 제공할 수 있다:
- [0082] (a) 탄소 전극에 몰리브덴 이황화물 나노시트(molybdenum disulfide nanosheets, MoS₂ NS), 그래핀 나노플레이트렛(Graphene nanoplatelets, GNP) 및 키토산(chitosan, CHT)을 포함하는 나노복합체(NC); 및 꽃 형상의 금 나노구조체(AuNF)를 순차적으로 증착시키는 단계;
- [0083] (b) 상기 나노복합체 및 꽃 형상의 금 나노구조체가 증착된 탄소 전극에 3-머캅토프로피온산 (3-mercaptopropionic acid, MPA)을 처리하는 단계;
- [0084] (c) 상기 3-머캅토프로피온산이 처리된 탄소 전극에 스트렙타비딘 및 BSA를 순차적으로 코팅시키는 단계; 및
- [0085] (d) 상기 스트렙타비딘 및 BSA가 코팅된 탄소 전극에 바이오틴화된 리포터 RNA (reRNA)를 반응시켜, 바이오틴화된 리포터 RNA를 전극에 고정시키는 단계.
- [0086] 본 발명에 있어서, 상기 몰리브덴 이황화물은 몰리브덴 이황화물 나노시트(molybdenum disulfide nanosheets, MoS₂ NS)의 형태로, 상기 그래핀은 그래핀 나노플레이트렛(Graphene nanoplatelets, GNP) 형태로 나노복합체에 포함되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0087] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 바람직하게는 0.05 내지 0.5 M, 더 바람직하게는 0.08 내지 0.2M, 가장 바람직하게는 약 0.1M의 3-머캅토프로피온산을 바람직하게는 10분 내지 1시간, 바람직하게는 20분 내지 40분, 가장 바람직하게는 약 30분 동안 처리하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0088] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계는 바람직하게는 1 내지 20 mg/ml, 더 바람직하게는 5 내지 15 mg/ml, 가장 바람직하게는 10 mg/ml의 스트렙타비딘을 첨가하여 코팅시키는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0089] 본 발명에 있어서, 상기 (d) 단계는 바람직하게는 10 내지 500 μ g/ml, 더 바람직하게는 50 내지 200 μ g/ml, 가장 바람직하게는 약 100 μ g/ml의 리포터 RNA로, 바람직하게는 2시간 내지 6시간, 더 바람직하게는 3 시간 내지 5시간, 가장 바람직하게는 약 4시간 동안 반응시키는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0091] 또 다른 관점에서, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 상기 바이오센서를 이용한 표적 RNA 검출방법에 관한 것이다:
- [0092] (a) 상기 바이오센서에 Cas13a-crRNA-RNA 혼합 시료를 처리하는 단계; 및
- [0093] (b) 상기 바이오센서의 감소된 전류량을 측정하는 단계.
- [0094] 본 발명에 있어서, 상기 표적 RNA는 SARS-CoV-2 RNA 이고, 상기 crRNA는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열로 표시되는 ORF gene의 crRNA 및/또는 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열로 표시되는 S gene인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0095] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 상기 바이오센서에 Cas13a-crRNA-RNA혼합 시료를 처리하여 바람직하게는 30분 내지 3시간, 더 바람직하게는 1 내지 2시간, 가장 바람직하게는 약 1시간 30분 동안 반응시키는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0096] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 Cas13a-crRNA-RNA 혼합 시료는 Cas13a와 crRNA가 1 : 0.1 - 0.001의 질량 비로 혼합되어 있는 혼합물에 검사하고자 하는 RNA 시료를 추가로 혼합하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0097] 이 경우, Cas13a, crRNA, RNA 시료가 혼합되는 순서는 임의로 변경하여 진행될 수 있고, 특정 순서에 한정되지는 않는다.
- [0098] 본 발명에 상기 RNA 시료는 전혈, 혈장, 혈청, 뇨, 타액, 콧물, 상기도 점액, 하기도 점액, 분뇨, 림프액, 양수 및 조직으로 구성된 군에서 선택되는 생체 시료에 포함되어 있거나, 상기 생체 시료로부터 분리되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.

- [0099] 본 발명에 있어서, 상기 RNA 시료는 세포, 미생물 또는 바이러스를 용해 버퍼로 용해시켜 추출된 RNA 시료일 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0100] 본 발명에 있어서, 상기 RNA 시료 중 표적 RNA는 crRNA에 혼성화되어 Cas13a-crRNA-표적 RNA의 삼중 복합체를 형성하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0101] 본 발명에 있어서, 상기 표적 RNA 검출방법은 (c) 표적 RNA를 포함하지 않는 대조군을 처리하는 경우와 비교하여 상기 바이오센서의 전류량이 10% 이상 감소하는 경우, 상기 생체 시료는 표적 RNA 양성 시료인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0102] 본 발명에 있어서, 상기 바이오센서는 약 1.0×10^{-1} fg/ml의 표적 RNA를 검출하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0104] 본 발명은 또한 다른 관점에서, 상기 바이오센서, Cas13a, 표적 RNA 특이적 crRNA를 포함하는 표적 RNA 검출용 키트에 관한 것이다.
- [0105] 본 발명에 있어서, 상기 표적 RNA는 SARS-CoV-2 RNA 이고, 상기 crRNA는 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는 ORF gene의 crRNA 및/또는 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는 S gene인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0106] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 Cas13a과 표적 RNA 특이적 crRNA는 혼합물 형태로 포함할 수 있으며, 표적 RNA 검출을 위한 지침서를 추가로 포함할 수 있다.
- [0107] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 생체 시료로부터 RNA 시료를 추출하기 위한 용해 버퍼를 추가로 포함할 수 있다.
- [0108] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 인체로부터 생체 시료를 분리하기 위한 스틱이나 면봉을 추가로 포함할 수 있으며, 생체 시료를 임시로 보관하기 위한 튜브, 예컨대 에펜드르프 튜브 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0110] SARS-CoV-2 감염자의 급속한 확산을 억제하기 위하여, 면역 검출 방법의 낮은 정확도와 RT-PCR의 긴 검사 시간 등의 기존 방법의 단점을 극복할 수 있는 현장진단 (POC) 기반 검출 방법이 필요하다. 본 발명에서는 전기화학적 바이오센서를 Cas13a의 트랜스-절단(trans-cleavage) 활성과 함께 활용하여 핵산 증폭 단계 없이 SARS-CoV-2 RNA의 민감한 정량화가 가능하도록 하였다. 전극 표면에 나노복합체와 AuNF를 순차적으로 증착하여 전도성을 향상시키고 표면적을 확대하여 감지 성능을 향상시켰으며, 센서의 신호를 최대로 강화하기 위하여 겔 전기영동 및 형광 강도 측정을 통하여 SARS-CoV-2 RNA의 포획으로부터 복합체 형성 및 트랜스-절단(trans-cleavage) 활성을 위한 적절한 Cas13a 및 crRNA의 비율을 결정하여 센서의 신호 강화를 최대화할 수 있는 최적의 Cas13a-crRNA 농도를 선별하였다. 본 발명의 전기화학적 센싱 플랫폼은 각각 4.4×10^{-2} fg/ml 및 8.1×10^{-2} fg의 LOD로 1.0×10^{-1} 내지 1.0×10^5 fg/ml의 넓은 선형 동적 범위에서 ORF 및 S 유전자를 감지할 수 있었다. CRISPR/Cas13a를 이용한 전기화학 센서로 SARS-CoV-2 RNA의 fg/ml 이하의 농도에서의 정량화는 최초로 달성된 것이다.
- [0111] 또한, 관찰된 리커버리 값 (96.54 - 101.21%)은 본 발명에 따른 센서의 타액 매트릭스에서의 우수한 적응성을 나타내며 RNA 정제 없이 타액 샘플을 직접 사용할 수 있는 가능성을 제공한다. 본 발명에 따른 바이오센서는 사전 증폭 단계 없이 매우 민감한 분석 성능으로 COVID-19 진단을 위한 모니터링 플랫폼으로 이용할 수 있으며, 병원성 질병의 신속하고 정확한 스크리닝을 위한 다양한 핵산의 현장 검출에 사용할 수 있다.
- [0113] 실시예
- [0115] 이하, 실시 예를 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 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0117] 실시예 1. 실험 방법

[0118] 1-1. 실험 재료 및 장치

[0119] Graphene nanoplatelets (GNPs), chitosan (CHT), gold(III) chloride trihydrate, sodium chloride, 3-mercaptopropionic acid (MPA), 1-ethyl-3-(3-(dimethylamino) propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), ethyl alcohol, 및 bovine serum albumin (BSA) 는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구매하였다. Tris-Borate-EDTA (TBE) buffer (10×), agarose, 및 UltraPure™1 M Tris-HCl Buffer 는 ThermoFisher (USA)에서 구매하였다. Molybdenum disulfide nanosheets (MoS₂ NSs) 는 Graphene Supermarket (USA) 구매하였다. DNA ladder solutions (25/100 base, 25/100 bp, 및 1143 kb) 및 LoadingSTAR reagent 는 DyneBio (South Korea) 에서 구매하였다. CRISPR/Cas13a protein 은 MCLAB (USA)에서 구매하였다. RNA Cleanup Kit와 HiScribe™T7 High Yield RNA Synthesis Kit는 각각 Monarch®145 (USA) 및 New England BioLabs (England)에서 구매하였으며, 본 발명에서 사용한 DNA and RNA oligonucleotides (표 1)는 BIONEER (South Korea)에서 합성하고 정제하였다.

표 1

[0121]

Name	Sequence (5' -> 3')	Seq ID NO.
reRNA	/Methylene blue/AAUGGCAAUGGCA/3Bio/	1
ssRNA	/Cy5/AAUGGCAAUGGCA/3Bio/	2
crRNA_ORF gene	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACCCAACCUCUUCUGUAAUUUUUAAACUAAU	3
crRNA_S gene	GAUUUAGACUACCCCAAAAACGAAGGGGACUAAAACGCAGCACCAGCUGUCCAACCUGAAGAAG	4
ORF gene	UGAGUGUAAUGUGAAAACUACCGAAGUUGUAGGAGACAUUAUACUAAACAGCAAAUAAUAGUUUAAAAA UUACAGAAGAGGUUGGCCACACAGAUCAAUGGCUGCUUAUGUAGACAAUUCUAGUCUUAUUAAGAAA CCUAAUGAAUUAUCUAG	5
S gene	UAACAUCACUAGGUUUCAAACUUUACUUGCUUACAUAGAAGUUAUUUGACUCCUGGUGAUUUCUUCUACAG GUUGGACAGCUGGUGCUGCAGCUUAUUUAGUGGGUUAUCUUAACCUAGGACUUUUCUAAUUAAAAUAAU GAAAAUGGAACCAUUAACAGAUAGCUGUAGACUGUGC	6

[0123] 일회용 screen-printed carbon electrodes(SPCE; C110)는 스페인 Dropsens Inc.에서 구입하였다. 전기화학적 실험은 CHI-650E 전기화학적 분석기 (CH Instruments, USA)를 사용하여 수행하였다. 젤 전기영동은 Mupid-exU 시스템 (Takara, Japan)을 사용하여 수행하였고, 후속 분석은 MiniBIS UV-transilluminator (DNR BioImaging Sytems, Israel)를 사용하여 수행하였다. 또한, 총 RNA 순도 및 농도는 Nanodrop 2000 분광광도계 (Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 결정하였다. AFM (Atomic Force Microscopy) 이미징 및 표면 거칠기 분석은 NX-10 장치 (Park Systems, South Korea)를 사용하여 수행되었다. 공초점 현미경 이미지 분석은 LSM 700 (Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 수행하였다. 형광강도는 Nanodrop 3300 fluorospectrometer (Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 측정하였다.

[0125] 1-2. AuNF/NC/SPCE 의 제작

[0126] SPCE는 0.5M H₂SO₄ 용액에서 0.1 - 0.7V 범위에 걸쳐 순환 전압전류법(CV) 기술로 세척하여 균일한 전압전류를 얻을 수 있었다. NC는 MoS₂ NS, GNP 및 CHT를 각각 10:5:1 부피(용량) 비율로 혼합하여 준비하였다 (Kashefi-Kheyraadi, et al., Biosensors and Bioelectronics 169, 112622. 2020 참조). 그 다음, 일정 양(fixed amount)의 NC 용액을 작업 전극(working electrode)의 표면에 드롭 캐스팅하였다. NC 증착 후, AuNF는 0.2V에서 600초 동안 수행된 전류 측정 기술(amperometric technique)을 포함하는 이전에 보고된 방법을 사용하여 10mM HAuCl₄ 용액에서 형성되었다

[0128] 1-3. 바이오센싱 표면 개질

[0129] 센싱 표면(sensing surface)은 다음과 같이 준비되었다. 먼저, AuNF/NC/SPCE를 0.1M MPA로 30 분간 처리하여 전극 표면에 카르복실기의 층을 형성할 수 있도록 하였다. SA의 아민기와 전극 표면의 카르복실기 사이에 아마이드 결합을 유도하기 위하여 0.1M 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) (pH 4.7)상의 0.5mg/ml SA와 EDC/NHS (각각 0.2M 및 0.05M)로 구성된 혼합용액 7 μ l를 23℃에서 2시간 동안 암실에서 인큐베이션하였다. 나머지 활성 부위의 비특이적 흡착을 불활성화하고자 7 μ l의 0.01% BSA 용액을 23℃에서 10분 동안 전극 표면에 처리하였다. 마지막으로 reRNA(40 μ g/ml), RNase inhibitor(4U/ μ l) 및 TRIS-HCl 완충액(40mM)을 포함하는 reRNA 혼합물을 전극에 첨가하여 SA-biotin 결합을 통해 reRNA를 고정하였다. 각 개질 단계에서 결합되지 않은 물질은 탈이온수와 0.1M phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) 으로 행구어 제거하였다.

[0131] 1-4. 겔 전기영동

[0132] Cas13a-crRNA 복합체의 형성에 적합한 Cas13a:crRNA 비율을 2% 아가로스 전기영동으로 조사하였다. Cas13a-crRNA 혼합물을 아가로스 겔에 첨가하기 전 crRNA를 LoadingSTAR 로 염색하고 37℃에서 30 분 동안 Cas13a 와 함께 인큐베이션하였다. 전기영동은 45V에서 20 분 동안 1 x TBE 버퍼(pH 8.1)에서 수행되었다. ImageJ 소프트웨어를 사용하여 라인의 강도를 조사하고 Cas13a에 의한 crRNA 의 캡처 효율을 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Capture efficiency} = \frac{\text{Initial intensity of crRNA} - \text{Intensity of unbound cas13a-crRNA complex}}{\text{Initial intensity of crRNA}} \times 100$$

[0133]

[0134] Cas13a-crRNA 복합체에 의한 SARS-CoV-2 RNA의 겔 결과를 분석하여 trans-cleavage 활성을 조사하였다. SARS-CoV-2 RNA 와 crRNA를 염색하고 이어서 Cas13a와 혼합하였다. 37℃에서 30 분 동안 인큐베이션한 후, 혼합물을 겔에 로딩하고 45V에서 20 분 동안 1 x TBE 완충액(pH 8.1)을 이용하여 전개시켰다. 두 전기영동 결과의 이미지는 MiniBIS UV-transilluminator 로 시각화되었다.

[0136] 1-5. Cas13a-crRNA 기반 형광 분석

[0137] 형광 강도는 1ng/ml의 SARS-CoV-2 RNA, 10 μ g/ml의 각 말단의 끝이 형광단(6-카르복시플루오레세인; FAM) 및 소광제(Iowa Black)로 표지된 10 μ g/ml의 ssDNA와 각각 다른 농도의 Cas13a 및 crRNA 혼합물을 37℃에서 30 분 동안 인큐베이션한 후 측정하였다. 형광 신호는 NanoDrop 3300 fluorospectrometer를 이용하여 측정하였다.

[0139] 1-6. 전기화학 측정

[0140] 바이오센싱 표면은 0.1 Vs⁻¹의 스캔 속도에서 CV 및 0.10 M KCl을 포함하는 5.0 \times 10⁻³ M에서 전기화학적 임피던스 분광법(EIS)으로 특성화되었다. Nyquist 플롯은 10kHz와 0.1Hz 사이의 다양한 주파수 범위에서 개방 회로 전위(open-circuit potential) 및 0.005V의 AC 전위에서 기록되었다. DPV는 -0.5 ~ -0.1V 범위에서 SARS-CoV-2 RNA를 정량화하는 데 사용되었으며, 전압전류(voltammograms)는 0.025V의 펄스 진폭 및 0.05 Vs⁻¹의 스캔 속도에서 측정되었다.

[0142] 실시예 2. 센싱 표면 특성화

[0143] 바이오센서의 제조 단계는 도 2a와 같다. 전극 개질 초기에 MoS₂NS, GNP 및 CHT로 구성된 나노복합체(NC)가 센서의 전자 전달을 향상시키기 위하여 전극(bare electrode)에 적용되었다 (L. Kashefi-Kheyrabadi et al, Biosensors and Bioelectronics 169 (2020) 112622 참조).

[0144] 전극 전도도를 증가시키기 위하여 AuNF가 전착(electrodeposit) 되었다(Wang, et al., 2011. Biosensors and Bioelectronics 30(1), 151-157). 다음으로, reRNA를 고정화하고 활성화된 센서 표면을 블로킹하기 위하여 각각 SA 및 BSA를 순차적으로 코팅하였다. Biotin과 MB로 표지된 reRNA는 SA-biotin 결합에 의해 전극에 고정되었다. 마지막으로 SARS-CoV-2 RNA를 포획한 후 활성화된 Cas13a-crRNA 복합체를 센서에 추가하여 산화 환원 분자

(예컨대, 메틸렌 블루)의 방출을 유도하였다. 결과적으로 전류 신호가 감소하였다

[0145] 센서 표면에 대한 다양한 개질 단계는 CV 및 EIS로 특성화되었다 (도 2b 및 2c). AuNF/NC/SPCE는 높은 배경 전류 (high background current)와 함께 두 개의 산화환원 피크를 나타내어 개선된 센서 표면의 높은 전도도를 보여주었다 (도 2b, 곡선 (i)). 표면에 SA 고정화 후 관찰된 더 낮은 페러데이 피크 전류와 더 현저한 피크 전위 분리는 음전하를 띤 reRNA가 센서 표면에 축적되어 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 산화환원 프로브와 센싱 표면 사이의 전자 이동이 방해받을 것을 나타낸다 (도 2b, 곡선 (ii)). 비특이적 흡착을 방지하기 위해 BSA로 표면을 후속적으로 블로킹하자 피크 전류가 더욱 완화되었다 (도 2b, 곡선 (iii)). 센싱 표면에서 SA-biotin 결합을 통해 reRNA를 고정하면 전류 감소와 유사한 경향이 확인되었다 (도 2b, 곡선 (iv)). 그러나 표면에 Cas13a-crRNA-target RNA가 로딩되고 reRNA가 절단되면 전극으로 전자 전달을 방해하는 물질의 분해로 인해 전류가 약간 증가되었다 (도 2b, 곡선 (v)). 바이오 센싱 표면의 특성화는 EIS로도 검증되었다 (도 2c). 고주파수에서 AuNF/NC/SPCE에서 반원 (semicircle)은 관찰되지 않아, 전극에서 전자 전달 저항은 무시할 수 있음을 알 수 있었다 (도 2c, 곡선 (i)). 전극 표면에 SA와 BSA가 순차적으로 고정된 결과, 표면에 형성된 층이 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 산화환원 분자를 반발하여 전자 전달 저항이 증가하였다. (도 2c, 곡선 (ii) 및 (iii)). 전극 표면에 reRNA를 고정함으로써 음전하를 위한 스택이 표면에 분포되도록 하였다. 전자 전달 저항의 증가는 음으로 대전된 표면에 대한 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 산화환원 분자의 현저한 반발에 기인하였다 (도 2c, 곡선 (iv)). 마지막으로, 활성화된 Cas13a-crRNA 복합체로 센싱 표면을 처리하여 바이오센싱 표면으로 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 산화환원 분자의 접근과 관련된 장애를 완화하여 계면 전자 전달 저항을 감소시켰다 (도 2c, 곡선 (v)). CV와 EIS의 결과는 서로 일치하여 바이오센싱을 위한 표면 제작이 만족스럽게 수행되었음을 보여주었으며, 또한 reRNA에 대한 trans-cleavage 효과에 의한 전류 변화도 DPV 신호를 통해 특성화되었다 (도 2d). reRNA의 절단은 전극 표면에서 MB 분자의 탈출을 유도하고 결과적으로 전류를 감소시켰다.

[0147] 다른 개질 단계로 인한 거칠기 변화 (roughness changes)도 AFM 측정을 통해 정의되었다. 전기화학적 결과와 함께 AFM 결과가 각 개질 단계에서 비교되었다. 도 3a의 (a)와 (b)는 BSA 블로킹까지 각 개질 단계에서 얻은 AFM 현미경 사진의 측정 결과와 그에 따른 단면 설명을 나타낸다. AuNF/NC/SPCE는 128.3 ± 12.5 nm의 평균 거칠기 (Rq)와 같은 거칠기 (rough topography)로 확인되었다. AuNF/NC/SPCE에 대한 SA의 고정화는 관찰된 Rq를 370.5 ± 17.4 nm로 증가시켰으며, 이는 균일하게 형성된 AuNF 구조에 SA 층이 성공적으로 형성되었음을 나타낸다. 표면 블로킹 후 BSA/SA/AuNF/NC/SPCE의 Rq 값은 SA/AuNF/NC/SPCE 보다 낮은 206.1 ± 13.2 nm였는데, 이는 BSA에 의해 고정화된 SA 사이의 간격이 채워졌기 때문일 수 있다. reRNA/BSA/SA/AuNF/NC/SPCE 및 절단된 reRNA/BSA/SA/AuNF/NC/SPCE에 대한 AFM 측정이 또한 수행되었으나, reRNA(10nt)의 작은 크기와 AFM 측정의 비접촉 모드에서 분해능으로 인해 거칠기의 큰 변화가 관찰되지 않았다 (데이터 미도시) (Marrese, et al., 2017. J. Funct. Biomater, 8(1), 7). 따라서, 시아닌(Cy5)(형광 염료) 태그가 붙은 reRNA를 사용한 이미지 분석을 통해 reRNA 고정화 및 trans-cleavage 활성을 검증하였다. BSA/SA/AuNF/NC/SPCE에 reRNA가 고정화되어 센서 표면에서 형광 신호가 유도되었다 (도 3c, 왼쪽 및 중간). 대조적으로, 표적 RNA와 결합한 활성화된 Cas13a-crRNA 복합체 처리 후 형광 신호는 Cas13a의 trans-cleavage 효과로 인해 감소하였다 (도 3c, 우측). 이와 같은 결과는 reRNA의 실제로 고정화 (genuine immobilization) 되었으며 Cas13a에 의해 reRNA가 절단됨을 확인시켜 주었으며, 또한, AFM 및 형광 결과는 전극 표면의 각 개질 단계의 전기화학적 결과와 일치하였다.

[0149] 실시예 3. SARS-CoV-2 RNA의 trans-cleavage 에 대한 Cas13a:crRNA 비율의 영향

[0150] CRISPR 기반 센싱의 메커니즘에 따르면 ssRNA에 대한 절단 기능은 SARS-CoV-2 RNA와 Cas13a-crRNA 복합체의 조합에 의해 활성화된다 (Wang, et al., 2020, Biosensors and Bioelectronics 112430). 이 CRISPR 기반 센싱 메커니즘을 전기화학적 측정에 적용하려면 높은 trans-cleaving 활성을 이끌어낼 수 있는 Cas13a-crRNA 복합체를 형성하기 위하여 Cas13a와 crRNA 간의 비율을 결정하는 것이 필수적이다. 복합체의 형성을 조사하기 위해 SARS-CoV-2의 ORF 및 S 서열의 특정 영역과 혼성화하는 crRNA와 Cas13a 단백질의 혼합물을 인큐베이션 한 후 겔 전기영동을 수행하였다 (도 4a). 이전에 보고된 SARS-CoV-2 서열을 표적 서열로 사용하였다 (Zhang, et al., 2020, A protocol for detection of COVID-19 using CRISPR diagnostics). 다양한 농도의 Cas13a 단백질 (0.5 - 2.0 mg/ml 범위의 2배 희석 및 0 mg/ml 대조군)을 단일 농도의 crRNA (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)와 혼합하고 혼합 용액을 겔에 첨가

하여 전기영동 결과에서 더 약한 밴드(the lower band) 강도를 조사하였다. 더 약한 신호 강도는 crRNA와 Cas13a의 더 효과적인 결합을 나타낸다. Cas13a에 대한 crRNA의 포획 효율을 정량화하기 위하여 image J 소프트웨어 분석을 통하여 crRNA의 초기 강도에서 결합되지 않은 Cas13a-crRNA의 강도를 빼고 이를 crRNA의 초기 강도로 나누어 주었다 (도 5). ORF 유전자를 표적으로 하는 crRNA(ORF gene_crRNA)는 Cas13a의 농도가 0.5 mg/ml 이상에서 완전히 포획된 것을 확인하였으나, S 유전자를 표적으로 하는 crRNA(S gene_crRNA)는 2 mg/ml에서만 100% 포획 효율을 달성하였다. 따라서 40 µg/ml의 crRNA 당 2mg/ml의 Cas13a가 SARS-CoV-2 RNA의 이러한 두 서열을 표적화하기 위한 비율로 선택되었다. 이후, 겔 전기영동을 이용하여 SARS-CoV-2 RNA 절단 반응의 여부를 평가하였다 (도 4b). 각 SARS-CoV-2 유전자를 Cas13a-crRNA 복합체 용액과 혼합하고 1시간 동안 배양하였다. 전기영동 결과에서 Cas13-crRNA 용액에 SARS-CoV-2 RNA를 첨가한 경우 구배(gradation)이 관찰되었는데, 이는 Cas13a의 trans-cleavage 활성이 바이러스 RNA의 특정 부위 절단 (cis-cleavage) 후 SARS-CoV-2 RNA의 나머지 단편을 절단함을 나타낸다. 마지막으로, Cas13a의 효소 기능을 최대화하기 위한 Cas13a-crRNA 복합체의 농도는 6-FAM 및 Iowa black 소광제(quencher) 태그가 붙은 ssRNA를 적용한 SHERLOCK의 방법을 사용하여 조사되었다 (도 4c)(de Puig, et al., 2021. Science Advances 7(32), eabh2944 ; Fozouni, et al., 2021. 2021. Cell 184(2), 323-333. e329). Cas13a의 RNase 활성은 ssRNA를 절단하여 소광제와 형광 염료 사이의 거리를 증가시켜 형광 신호를 유도한다. S 유전자, ORF 유전자 및 ssRNA의 양을 고정시키고, 다양한 농도의 Cas13a와 crRNA를 혼합한 후, 37 °C에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 두 유전자 모두에서 형광 신호는 두 유전자에서 5 mg/ml Cas13a 및 10 µg/ml crRNA까지 점진적으로 증가한 후 포화되었다(도 4d, e). 따라서 Cas13a 및 crRNA의 적절한 농도는 각각 0.5 mg/ml 및 10 µg/ml로 추정되었다.

[0152] 실시예 4. 검출 조건 최적화

[0153] 개발된 센서의 최적 성능을 달성하기 위한 MPA 처리 시간, streptavidin 농도, reRNA 농도, reRNA 고정 (immobilization) 시간 및 trans-cleavage 시간과 같은 실험 매개변수를 조사하였다. SA의 코팅된 수를 최대화하기 위한 0.1M MPA의 인큐베이션 시간을 CV로 분석하였다. MPA 처리 후 더 낮은 피크 전류는 자기 조립 단층의 형성에 의해 전자 전달이 중단되었음을 나타낸다 (도 6a). 양극 피크 전류는 인큐베이션 시간 30분까지 감소했지만 MPA 처리 30분 후에는 피크 전류의 유의한 감소가 없었다 (도 6b). 따라서 MPA의 인큐베이션 시간은 30분으로 결정되었다. 또한, reRNA 고정화의 수를 증가시키기 위해 SA의 농도를 조사하였다. 도 7a는 2시간 동안 SA 코팅 전과 후의 전극 표면의 순환 전압전류도를 보여준다. 전자 전달의 방해 때문에 SA 코팅 후에 전류가 감소하는 유사한 경향이 관찰되었다. SA의 0.5mg/ml 이상에서 양극 피크 전류의 감소가 측정되지 않았기 때문에 SA 농도는 0.5mg/ml로 선택되었다(도 7b). reRNA의 배양 시간과 농도를 평가하기 위해 DPV를 활용하여 MB의 환원 신호를 측정하여 최적의 조건을 탐색하였다. 2시간 동안 다른 농도의 reRNA를 추가하고 신호를 비교하여 BSA/SA/AuNF/NC/SPCE 표면에 고정화를 위한 적절한 reRNA 농도를 분석하였다. 도 8a는 reRNA 농도가 증가함에 따라 DPV 신호가 급격히 증가하고 100 µg/ml에서 안정화됨을 보여준다. 이것은 아마도 reRNA에 의한 BSA/SA/AuNF/NC/SPCE 상의 reRNA의 완전한 고정 때문일 것이다. 따라서 100 µg/ml의 reRNA 농도가 센서 제작에 적합한 것으로 판단하였다. 순차적으로 reRNA 고정화 시간(0.25-8시간)을 연속적으로 분석하였다 (도 8b). 환원 전류는 고정 시간이 진행됨에 따라 증가하였고 4시간을 초과하여 안정화되었다. 결과적으로, 전극 표면에 reRNA 고정을 위한 적절한 시간으로 4시간을 적용하였다. 또한 최적의 분석 성능을 가진 바이오센서를 나타내는 trans-cleavage 시간을 조사하였다 (도 9). reRNA/BSA/SA/AuNF/NC/SPCE를 다양한 인큐베이션 시간(0.25~4시간) 동안 1.0×10^6 fg/ml의 S 유전자가 포함된 활성화된 Cas13a-crRNA 복합 용액에 담구어 주었다. ΔI 는 반응 시간이 증가함에 따라 증가하고 1.5시간에서 포화되었다. 따라서 SARS-CoV-2 검출에 최적화된 시간으로 1.5시간의 trans-cleavage 시간을 선택하였다.

[0155] 실시예 5. 전기화학 센서의 분석 성능

[0156] 최적화된 실험 조건에서 0.1M KCl이 포함된 0.1M PBS에서 SARS-CoV-2의 연속 희석 ORF 및 S 유전자에 대해 DPV 실험을 수행하여 설계된 센서의 분석 성능을 평가하였다. 도 10a, 10c에서 볼 수 있듯이 DPV에 의해 얻어진 패러데이 피크 전류는 ORF 및 S 유전자의 농도가 감소함에 따라 점차적으로 감소하였다. Cas13a-crRNA 복합체로부터의 trans-cleavage 활성에 의한 MB가 표지된 reRNA의 절단으로 인해 환원 전류가 감소하였다. ORF 및 S 유전자의 보정 플롯은 $1.0 \times 10^{-1} \sim 1.0 \times 10^5$ fg/ml 범위에서 얻어졌습니다(도 10b, 10d). 전류 변화는 각 유전자

농도의 대수와 선형적으로 관련되었으며 $\Delta I\% = 7.250 \times \log C_{\text{ORF gene}} X + 29.591$ 및 $\Delta I\% = 2.386 \times \log C_{\text{S gene}} X + 24.227$ ($R^2=0.995$)의 상관 관계로 매핑되었다. 구축된 센서의 검출한계(LOD)는 블랭크 시료의 전류 변화와 3개의 표준편차의 합과 관련하여, ORF의 4.4×10^{-2} fg/ml 및 S 유전자의 8.1×10^{-2} fg/ml로 추정되었다. 모든 실험은 상이한 농도에서 3회 수행되었다. 최적 조건에서 도출된 센서의 LOD 값이 보고된 타액 내 SARS-CoV-2 RNA 농도(1.0×10^3 fg/ml ~ 1.0×10^7 fg/ml)보다 낮음을 고려하여, 바이러스 RNA의 신속한 검출을 위해 trans-cleavage 시간을 30분으로 줄여 블랭크 값과 타액의 최소 RNA 농도, 1.0×10^3 fg/ml를 사용하여 추가 실험을 수행하였다(Bar-On, et al., 2020. elife 9, e57309.; Zhu, et al., 2020. Journal of Infection 81(3), e48-e50). S 유전자와 ORF 유전자의 $\Delta I\%$ 의 블랭크 값은 각각 17.06%와 19.22%였으며, 1.0×10^6 fg/ml의 농도에서 67.91%와 32.51%를 얻었는데(데이터 미도시), 이는 바이오센서가 단기간에 SARS-CoV-2 스크리닝에 활용될 수 있음을 시사한다. 다른 핵산 증폭 기반 검출 방법에 비해, 본 발명에 의해 확립된 센서는 유전자 증폭 기술 없이도 적은 양의 SARS-CoV-2 유전자와 넓은 선형 범위를 감지하는 놀라운 능력을 보여주었다.

[0157] 또한, 분석 내 및 분석 간 변동을 평가하여 바이오센서의 재현성을 조사하였다. 최적의 조건에서 1.0×10^3 fg/ml의 ORF 및 S 유전자를 사용하여 상대 표준 편차(RSD)를 4회 평가하였다. 내부 및 내부 분석의 RSD는 각각 ORF 유전자의 경우 3.14% ($n = 4$) 및 2.52% ($n = 4$), S 유전자의 경우 2.47% ($n = 4$) 및 1.74% ($n = 4$)로 추정되었다. 이와 같은 결과로부터 본 발명의 신뢰할 수 있는 재현성을 확인할 수 있었다.

[0159] 실시예 6. 인공 타액 스파이크 SARS-CoV-2 RNA를 이용한 현장검출 적용성 시험

[0160] 타액 샘플에서 SARS-CoV-2 RNA 검출을 위한 바이오센서의 적용이 가능한지 감지 정확도가 검증되었다. 환자의 타액에서 SARS-CoV-2 RNA의 양은 1.0×10^4 내지 1.0×10^8 copies/ml로 보고되었다. 이 카피수 범위는 1.0×10^3 내지 1.0×10^7 fg/ml로 변환될 수 있다. SARS-CoV-2 RNA의 이 농도 범위와 관련하여, SARS-CoV-2 RNA를 인공 타액을 사용하여 최소 및 중간 수준(1.0×10^3 fg/ml 및 1.0×10^5 fg/ml)으로 연속 희석하고 개발된 바이오 센서로 최적의 조건에서 정량화하였다. 표 2에서 볼 수 있듯이 ORF와 S 유전자 농도에 따른 리커버리(recovery)는 각각 109.42 - 111.33%, 96.54 - 101.21% 범위로 허용 범위 내에서 나타났다. 스파이크된 샘플의 리커버리는 바이오센서를 이용하여 검출된 SARS-CoV-2 RNA의 양을 인공 타액 샘플에 첨가된 양으로 나누어 계산하였다. 상기 결과는 SARS-CoV-2 RNA 검출을 위해 구축된 바이오센싱 시스템이 높은 정확도로 타액 샘플 매트릭스에 적용할 수 있음을 보여준다.

표 2

SARS-CoV-2 gene	Spiked concentration (fg/ml)	Detected concentration (fg/ml)	Recovery (%)
ORF gene	1.00×10^3	$1.09 \pm 0.30 \times 10^3$	109.42
	1.00×10^5	$1.11 \pm 0.13 \times 10^5$	111.33
S gene	1.00×10^3	$0.97 \pm 0.12 \times 10^3$	96.54
	1.00×10^5	$1.01 \pm 0.17 \times 10^5$	101.21

[0164] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

부호의 설명

[0166]

NC: nanocomposite

SPCE: screen-printed carbon electrodes

GNP: Graphene nanoplatelets

CHT: chitosan

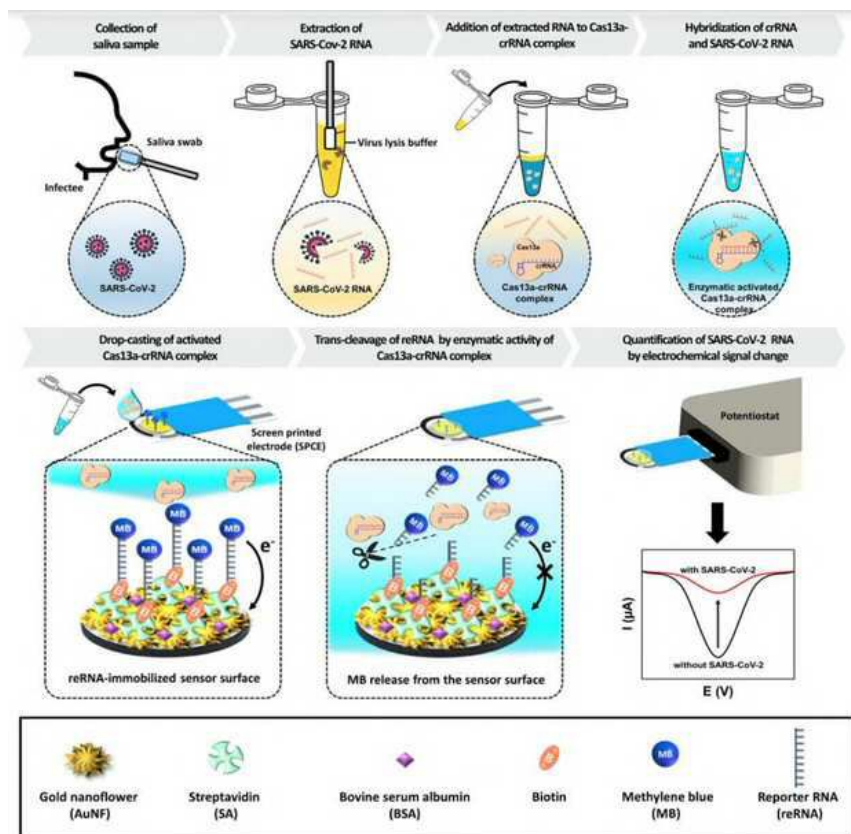
MoS₂ NSs: Molybdenum disulfide nanosheets

AuNF: flower-shaped gold nanostructure

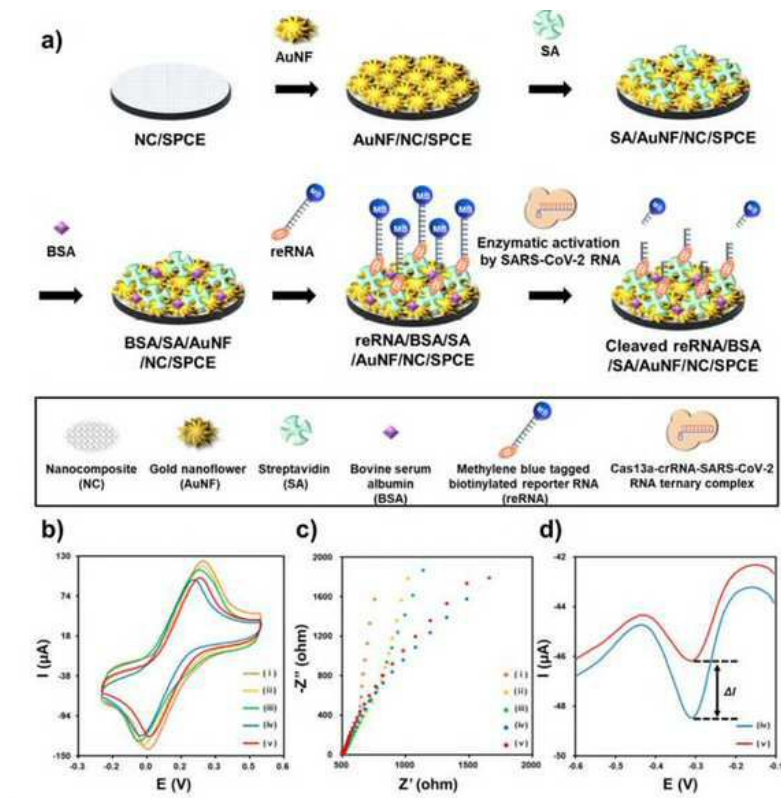
MPA: 3-mercaptopropionic acid

도면

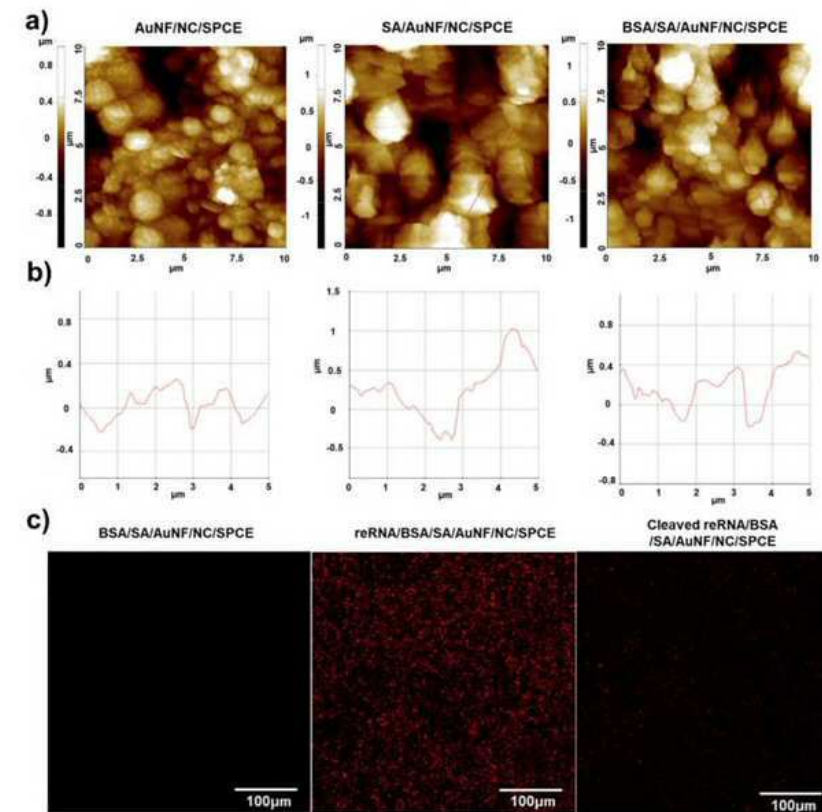
도면1



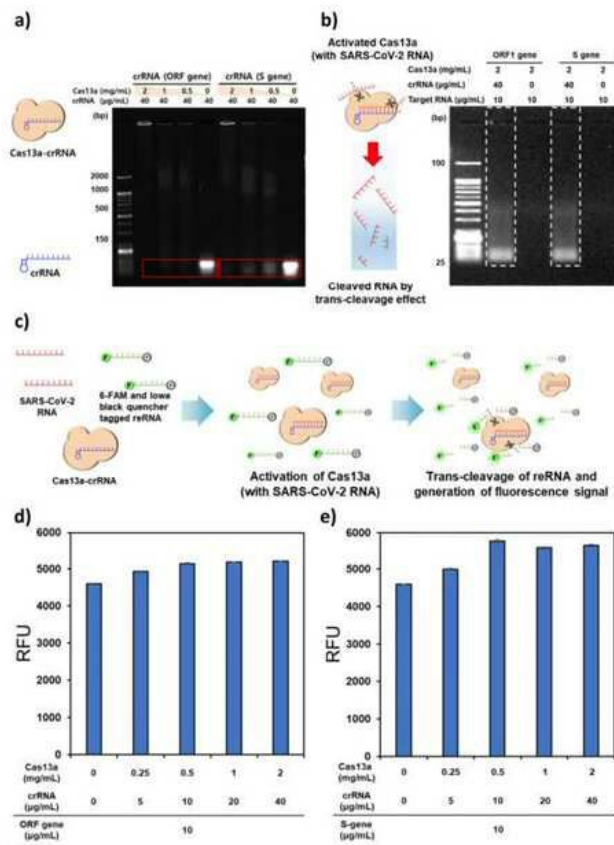
도면2



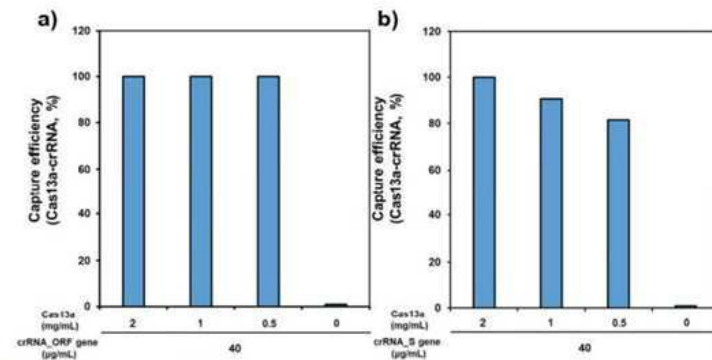
도면3



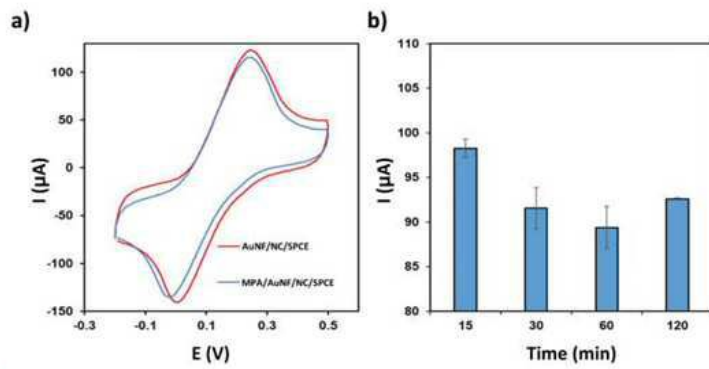
도면4



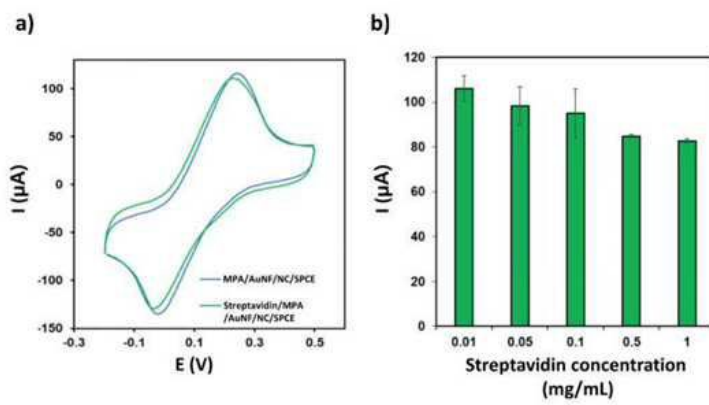
도면5



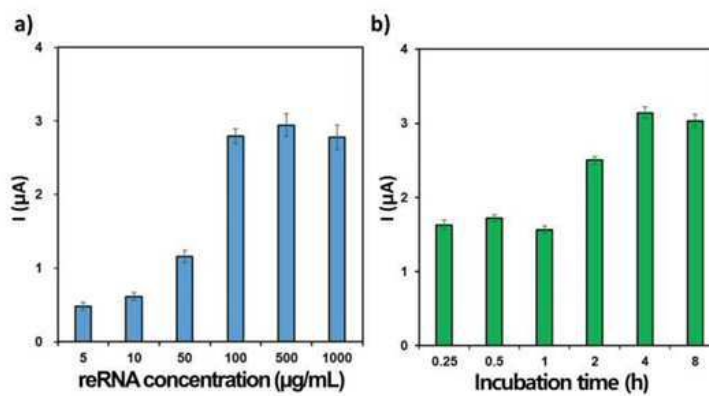
도면6



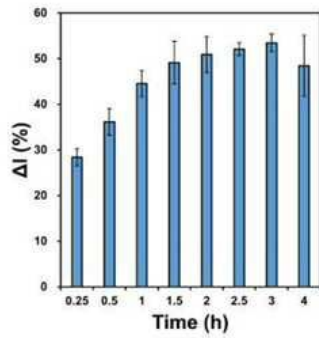
도면7



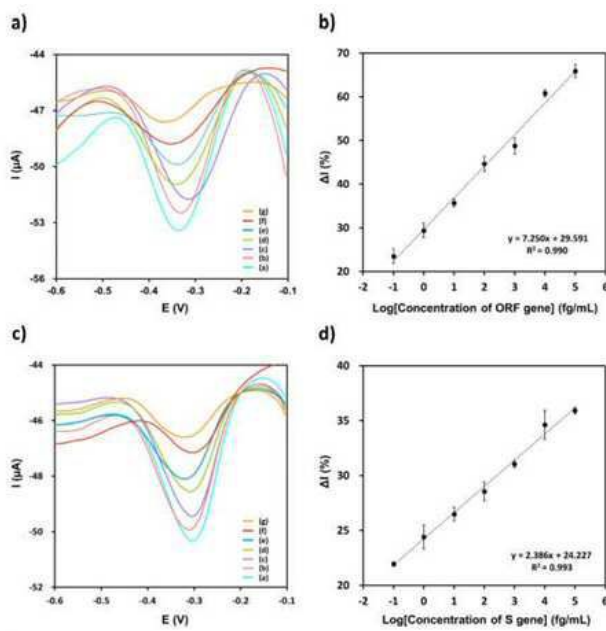
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Electrochemical biosensor for detecting target RNA
- <130> 1070392
- <150> KR 1020210159837
- <151> 2021-11-18
- <160> 8
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 13
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223>	reRNA	
<400>	1	
aauggcaaug gca		13
<210>	2	
<211>	13	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	ssRNA	
<400>	2	
aauggcaaug gca		13
<210>	3	
<211>	64	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	crRNA_ORF gene	
<400>	3	
gauuuagacu accccaaaaa cgaaggggac uaaaacccaa ccucuucugu aauuuuuuaa		60
cuau		64
<210>	4	
<211>	64	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	crRNA_S gene	
<400>	4	
gauuuagacu accccaaaaa cgaaggggac uaaaacgcag caccagcugu ccaaccugaa		60
gaag		64
<210>	5	
<211>	159	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	SARS-CoV-2 ORF gene	
<400>	5	
ugaguguaau gugaaaaa cgaaguugu aggagacauu auacuuaaac cagcaaaaua		60

