



등록특허 10-2471067



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년11월25일

(11) 등록번호 10-2471067

(24) 등록일자 2022년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/70 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/701 (2013.01)

C12Q 2527/101 (2019.08)

(21) 출원번호 10-2021-0141373(분할)

(22) 출원일자 2021년10월21일

심사청구일자 2021년10월21일

(65) 공개번호 10-2021-0132628

(43) 공개일자 2021년11월04일

(62) 원출원 특허 10-2020-0084350

원출원일자 2020년07월08일

심사청구일자 2020년07월08일

(30) 우선권주장

1020200035901 2020년03월24일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170068400 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김형범

서울특별시 마포구 토정로18길 11, 107동 1702호
(현석동, 래미안웰스트림)

이민영

서울특별시 서초구 잠원로14길 23, 201동 1001호
(잠원동, 롯데캐슬갤럭시)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 19 항

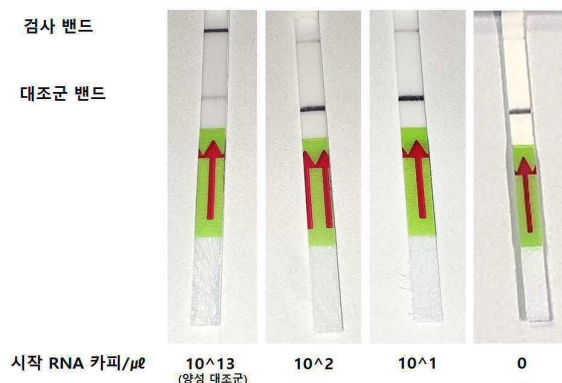
심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 신규한 가이드 RNA 및 이를 이용한 코로나바이러스감염증 2019를 진단하는 방법

(57) 요약

COVID-19 진단을 위한 신규한 가이드 RNA, 이를 포함하는 COVID-19 진단용 조성물, 키트, 및 이를 이용한 COVID-19 진단 방법을 제공한다. 이에 따르면, COVID-19를 높은 정확도 및 특이도로 빠르고 간편하게 진단하는데 이용할 수 있다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

장혜원

서울특별시 서대문구 성산로22길 2-1, 409호(창천동)

이재면

서울특별시 서초구 반포대로 275, 116동 2701호(반포동, 래미안퍼스티지아파트)

박필구

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 의과대학 신관 249호(신촌동)

황수진

서울특별시 중구 다산로24길 69, 202동 205호(신당동, 청구아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711109258

과제번호 2017R1A2B3004198

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 크리스퍼 유전자가위의 활성화에 영향을 미치는 인자 규명 및

대량산출(high-throughput)방법을 이용한 유전학 연구 기초 기술 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교

연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제1 영역을 포함하며, 상기 제1 영역은 SARS-CoV-2 바이러스의 Orflab 유전자에 특이적으로 결합하는 것인, SARS-CoV-2 바이러스 특이적 가이드 RNA.

청구항 2

삭제

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 제1 영역의 5' 말단으로부터 루프(loop) 구조를 형성하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 영역을 포함하는 것인 가이드 RNA.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 제2 영역은 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것인 가이드 RNA.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 제1 영역의 3' 말단으로부터 1 뉴클레오타이드 내지 50 뉴클레오타이드의 제3 영역을 포함하는 것인 가이드 RNA.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 제3 영역은 서열번호 6의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것인 가이드 RNA.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 가이드 RNA는 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것인 가이드 RNA.

청구항 8

청구항 1의 가이드 RNA를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

청구항 9

청구항 1의 가이드 RNA를 포함하는 COVID-19 진단용 조성물.

청구항 10

청구항 1의 가이드 RNA 및 검출용 프로브를 포함하는 COVID-19 진단용 키트.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 프로브는 단일가닥의 폴리뉴클레오타이드를 포함하고 검출가능한 표지로 표지된 것인 키트.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 검출가능한 표지는 화학적 표지, 효소 표지, 방사능 표지, 형광 표지, 발광 표지, 화학발광 표지, FRET(fluorescence resonance energy transfer) 표지, 금속 표지, 또는 이들의 조합인 것인 키트.

청구항 13

청구항 10에 있어서, Cas(clustered regularly interspaced palindromic repeats- associated: CRISPR associated) 폴리펩티드, 측방 유동 스트립(lateral flow strip), 또는 이들의 조합을 더 포함하는 것인 키트.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 Cas 폴리펩티드는 Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, Cas3, Cas5, Cas7, Cas8, Cas10, xCas9, SpCas9-NG, Cas9 틸내기효소(Cas9 nickase: Cas9 nickase), 불활성화 Cas9(Deactivated Cas9: dCas9), 및 불안정화 Cas9(destabilized Cas9: DD-Cas9)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 키트.

청구항 15

생물학적 시료 유래 핵산을 증폭시키는 단계;

핵산 증폭 산물에 Cas(clustered regularly interspaced palindromic repeats- associated: CRISPR associated) 폴리펩티드와 청구항 1의 가이드 RNA를 가하고 혼합물을 인큐베이션하는 단계;

혼합물에 검출용 프로브를 가하고 반응물을 인큐베이션하는 단계; 및

상기 프로브의 신호를 검출하여 SARS-CoV-2 바이러스를 검출하는 단계를 포함하는 COVID-19 진단에 필요한 정보를 제공하기 위해 SARS-CoV-2 바이러스를 검출하는 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 핵산을 증폭시키는 단계는 역전사효소(reverse transcriptase)의 존재 하에서 수행되는 것인 방법.

청구항 17

청구항 15에 있어서, 핵산을 증폭시키는 단계는 등온 증폭법 또는 중합효소 연쇄 반응법(polymerase chain reaction: PCR)을 이용하는 것인 방법.

청구항 18

청구항 17에 있어서, 등온 증폭법은 RPA(recombinase polymerase amplification), LAMP(loop-mediated isothermal amplification), SDA(strand displacement amplification), HDA(helicase-dependent amplification), NASBA(nucleic acid sequence-based amplification), 또는 이들의 조합인 것인 방법.

청구항 19

청구항 15에 있어서, SARS-CoV-2 바이러스를 검출하는 단계는 측방 유동(lateral flow) 검출, 형광 강도 측정, 화학발광 측정, 또는 이들의 조합에 의해 수행되는 것인 방법.

청구항 20

청구항 15에 있어서, SARS-CoV-2 바이러스를 검출하는 단계는 상기 반응물을 측방 유동 스트립(lateral flow strip)에 점적하는 단계를 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 신규한 가이드 RNA, 이를 포함하는 코로나바이러스감염증 2019(COVID-19) 진단용 조성물 및 키트, 및 이를 이용한 COVID-19 감염을 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 코로나바이러스감염증-2019(COVID-19)는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2)에 의해 감염되는 감염성 질환이다. 이 질환은 2019년에 중국 우한에서 처음 발생한 후 전세계적으로 확산된 호흡기 감염 질환이다. COVID-19를 진단하는 표준 방법은 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응(real-time reverse transcription polymerase chain reaction (rRT-PCR))이다. 이 진단 방

법은 비인두 면봉이나 가래 시료를 포함하여, 다양한 방법으로 수득된 호흡기 시료에 적용될 수 있다. 검사 결과는 대략 수시간에서 2일 이내에 얻을 수 있다.

[0003] 최근, 높은 검출 민감도와 특이도를 갖는 SHERLOCK(Cas13), DETECTR(Cas12a), 및 Cas14-DETECTR를 포함한, CRISPR-Cas 기반 DNA 검출 플랫폼이 개발되고 있다. 또한, CRISPR 진단기술을 이용한 SARS-CoV-2 검출 방법이 보고된 바 있다(MedRxiv "Rapid Detection of 2019 Novel Coronavirus SARS-CoV-2 Using a CRISPR-based DETECTR Lateral Flow Assay" James P Broughton et al., March 10, 2020).

[0004] 따라서, COVID-19 진단의 정확도 및 민감도를 향상시키기 위해, CRISPR-Cas 기반 DNA 검출 방법에 이용되는 신규한 가이드 RNA 및 이를 이용한 방법을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] COVID-19 진단을 위한 신규한 가이드 RNA를 제공한다.

[0006] COVID-19 진단을 위한 신규한 가이드 RNA를 포함한 조성물 및 키트를 제공한다.

[0007] 신규한 가이드 RNA를 이용하여 COVID-19를 진단하는 방법 및 이를 위해 SARS-CoV-2 바이러스를 검출하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 양상은 서열번호 3 또는 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제1 영역을 포함하는 SARS-CoV-2 바이러스 특이적 가이드 RNA를 제공한다.

[0009] 용어 "가이드(guide) RNA"는 유전체 편집을 통해 표적 핵산을 인식하여 표적 핵산을 절단, 삽입, 또는 연결시키는 폴리뉴클레오타이드를 말한다. 상기 가이드 RNA는 표적 핵산에 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 상기 가이드 RNA는 상기 표적 핵산에서 PAM의 5' 방향 또는 3' 방향으로 연속적인 2 내지 24 뉴클레오타이드(예, 20 nt 내외)(이하, 'nt'라 함)의 뉴클레오타이드 서열과 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 가이드 RNA의 길이는 10 nt 내지 100 nt, 10 nt 내지 90 nt, 10 nt 내지 80 nt, 10 nt 내지 70 nt, 10 nt 내지 60 nt, 10 nt 내지 50 nt, 15 nt 내지 50 nt, 20 nt 내지 50 nt, 25 nt 내지 50 nt, 30 nt 내지 50 nt, 35 nt 내지 50 nt, 40 nt 내지 50 nt, 또는 45 nt 내지 50 nt일 수 있다.

[0010] 상기 가이드 RNA는 표적 핵산 서열에 특이적인 crRNA(CRISPR RNA)를 포함할 수 있다. 상기 가이드 RNA는 루프(loop) 구조를 형성하는 crRNA 스캐폴드(scaffold) 또는 tracrRNA를 포함할 수 있다. 상기 가이드 RNA는 플라스미드 벡터 또는 바이러스 벡터에 함유된 것일 수 있다.

[0011] 상기 가이드 RNA는 RNA, DNA, PNA, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 가이드 RNA는 화학적으로 변형된 것일 수 있다.

[0012] SARS-CoV-2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) 바이러스는 RNA 게놈을 갖는 RNA 바이러스로서, 코로나바이러스과(Coronaviridae) 베타코로나바이러스(Betacoronavirus)에 속하는 바이러스이다. SARS-CoV-2 바이러스는 코로나바이러스감염증-2019(COVID-19)의 병원체로서, SARS-CoV-2 바이러스는 호흡기 상피세포에 침투하여 발열, 흉통, 호흡곤란, 근육통, 또는 심각한 폐렴을 야기할 수 있다. SARS-CoV-2 바이러스 RNA는 Orf1a, Orf1b, S(spike 단백질 코딩), E(envelope 단백질 코딩), M(membrane 단백질 코딩), 및 N(nucleocapsid 단백질 코딩)의 유전자를 포함한다.

[0013] SARS-CoV-2 바이러스 특이적 가이드 RNA는 SARS-CoV-2 바이러스의 바이러스 RNA 또는 이에 상보적인 DNA에 상보적으로 결합할 수 있다.

[0014] 상기 제1 영역은 crRNA일 수 있다. 상기 제1 영역은 SARS-CoV-2 바이러스의 Orf1ab 유전자 또는 S 유전자에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 제1 영역은 Orf1ab 유전자 또는 S 유전자에 상보적인 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.

[0015] 상기 제1 영역의 5' 말단으로부터 루프(loop) 구조를 형성하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 영역을 포함할 수 있다. 루프 구조를 형성하는 뉴클레오타이드 서열은 회문(palindromic) 서열일 수 있다. 상기 제2 영역은 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

- [0016] 상기 제1 영역의 3' 말단으로부터 1 nt 내지 50 nt, 1 nt 내지 45 nt, 1 nt 내지 40 nt, 1 nt 내지 35 nt, 1 nt 내지 30 nt, 1 nt 내지 25 nt, 1 nt 내지 20 nt, 1 nt 내지 15 nt, 1 nt 내지 10 nt, 1 nt 내지 9 nt, 2 nt 내지 15 nt, 3 nt 내지 15 nt, 4 nt 내지 15 nt, 5 nt 내지 15 nt, 6 nt 내지 15 nt, 7 nt 내지 15 nt, 8 nt 내지 15 nt, 또는 9 nt 내지 15 nt의 제3 영역을 포함할 수 있다. 상기 제3 영역은 CRISPR/Cas 폴리펩티드의 표적 부위 특이적 교정 효율을 향상시킬 수 있다. 상기 제3 영역은 우리딘-풍부(uridine-rich) 단일가닥 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 제3 영역은 연속하여 2 nt, 3 nt, 4 nt, 5 nt, 6 nt, 7 nt, 8 nt, 9 nt, 또는 10 nt 이상의 우리딘 올리고뉴클레오타이드(예, 5'-UUUU-3')을 하나 이상 포함할 수 있다. 상기 제3 영역은 서열번호 6의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0017] 상기 가이드 RNA는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0019] 다른 양상은 일 양상에 따른 가이드 RNA를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0020] 상기 가이드 RNA는 전술한 바와 같다.
- [0021] 상기 벡터는 바이러스성 벡터일 수 있다. 상기 바이러스성 벡터는 렌티바이러스 벡터 또는 아데노-관련 바이러스(adeno-associated viral: AAV)일 수 있다. 상기 벡터는 발현용 벡터일 수 있다. 상기 벡터는 구성적(constitutive) 또는 유도성(inducible) 발현 벡터일 수 있다. 상기 벡터는 패키징 신호, RRV(rev response element), WPRE(우드척(woodchuck) 간염 바이러스의 전사후 조절 요소(posttranscriptional regulatory element)), cPPT(central polypurine tract), 프로모터, 항생제 저항성 유전자, 오퍼레이터, 억제자, T2A 펩티드, 리포터 유전자, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 U6 폴리머라제 III 프로모터, 신장 인자 1α 프로모터, H1 프로모터, 사이토메갈로바이러스의 프로모터, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 항생제 저항성 유전자는 퓨로마이신 저항성 유전자, 블라스티시딘 저항성 유전자, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 상기 억제자는 테트라사이클린 오퍼레이터일 수 있다. 상기 리포터 유전자는 증강된(Enhanced) 녹색 형광 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다.
- [0023] 다른 양상은 일 양상에 따른 가이드 RNA를 포함하는 COVID-19 진단용 조성물을 제공한다.
- [0024] 상기 가이드 RNA는 전술한 바와 같다.
- [0025] 코로나바이러스감염증-2019(COVID-19)는 SARS-CoV-2 바이러스에 의한 호흡기 감염 질환을 말한다. COVID-19는 감염자의 비말(침방울)이 호흡기나 눈, 코, 또는 입의 점막으로 침투될 때 전염될 수 있다. COVID-19는 발열, 권태감, 기침, 호흡곤란, 폐렴, 가래, 인후통, 두통, 객혈과 오심, 또는 설사의 증상이 나타날 수 있다.
- [0027] 다른 양상은 일 양상에 따른 가이드 RNA 및 검출용 프로브를 포함하는 COVID-19 진단용 키트를 제공한다.
- [0028] 상기 가이드 RNA 및 COVID-19는 전술한 바와 같다.
- [0029] 상기 검출용 프로브는 CRISPR/ Cas 폴리펩티드의 작용에 의해 특이적으로 절단된 표적 핵산을 검출할 수 있다. 상기 프로브는 리포터(reporter)로도 불릴 수 있다. 상기 프로브는 단일가닥의 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0030] 상기 프로브는 검출가능한 표지로 표지된 것일 수 있다. 상기 검출가능한 표지는 프라이머의 말단 또는 내부에 결합될 수 있다. 상기 검출가능한 표지는 화학적 표지, 효소 표지, 방사능 표지, 형광 표지, 발광 표지, 화학발광 표지, FRET(fluorescence resonance energy transfer) 표지, 금속 표지, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 화학적 표지는 비오틴(biotin)일 수 있다. 상기 형광 표지는 6-카르복시플루오레신(6-carboxyfluorescein: FAM), 5-카르복시플루오레세인(5-Carboxyfluorescein: 5-FAM), 테트라클로로-6-카르복시플루오레신(trachloro-6-carboxyfluorescein, TET), 또는 6-카르복시-X-로다민(6-carboxy-Xrhodamine, ROX)일 수 있다. FRET과 같이 이중표지된(dual-labelled) 프로브를 표지하는 켄처(quencher)는 예를 들어, 6-카르복시-테트라메틸-로다민(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine: TAMRA), 덤실(DABCYL), 블랙홀 켄처(Black Hole Quencher: BHQ), 마이너 그루브 바인더 그룹(minor groove binder group: MGB)이다.
- [0031] 상기 키트는 Cas 폴리펩티드, 측방 유동 스트립(lateral flow strip), 또는 이들의 조합을 더 포함할 수 있다.
- [0032] 상기 Cas(clustered regularly interspaced palindromic repeats-associated: CRISPR associated) 폴리펩티드는 핵산 이중가닥을 절단하는 엔도뉴클레아제(endonuclease)일 수 있다. 상기 Cas 폴리펩티드는 RNA-가이드 DNA 엔도뉴클레아제(RNA guided DNA endonuclease)일 수 있다. 상기 Cas 폴리펩티드는 Cas 폴리펩티드 및 그의 기

능을 보유한 변이체를 포함한다. 상기 Cas 폴리펩티드는 스트렙토코커스 속(*Streptococcus* sp.), 캄필로박터 속(*Campylobacter* sp.), 레지오넬라 속(*Legionella* sp.), 네이세리아 속(*Neisseria* sp.), 파스테우렐라 속(*Pasteurella* sp.), 프란시셀라 속(*Francisella* sp.), 프레보텔라 속(*Prevotella* sp.), 라크노스피라세아에 속(*Lachnospiraceae* sp.)으로 이루어진 군으로부터 선택된 세균으로부터 유래된 뉴클레아제일 수 있다.

[0033] 상기 Cas 폴리펩티드는 Cas9, Cpf1(Cas12a), C2c1, C2c2, C2c3, Cas3, Cas5, Cas7, Cas8, Cas10, xCas9, SpCas9-NG, Cas9 틸내기효소(Cas9 nickase: Cas9 nickase), 불활성화 Cas9(Deactivated Cas9: dCas9), 및 불안정화 Cas9(destabilized Cas9: DD-Cas9)로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 상기 Cas 폴리펩티드는 Cpf1일 수 있다. 상기 Cpf1은 하나의 가이드 RNA에 의해 작동되는 엔도뉴클레아제일 수 있다. 상기 Cpf1은 tracrRNA가 필요없고, 표적 핵산을 절단하여 접착 말단(sticky end 또는 cohesive)을 생성할 수 있다. 상기 Cpf1은 캔디다투스 파세이박터(*Candidatus Paceibacter*), 라크노스피라세아에 속(*Lachnospiraceae* sp.) 속, 뷰티리비브리오 속(*Butyrivibrio* sp.), 페레그리니박테리아 속(*Peregrinibacteria* sp.), 액시도미노코쿠스 속(*Acidominococcus* sp.), 포르파이로모나스 속(*Porphyromonas* sp.), 프레보텔라 속(*Prevotella* sp.), 프란시셀라 속(*Francisella* sp.), 캔디다투스 메타노플라스마(*Candidatus Methanoplasma*), 또는 유박테리움 속(*Eubacterium* sp.)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유래일 수 있다. 상기 Cpf1은 *Lachnospiraceae bacterium* ND2006 유래 Cpf1(LbCpf1)일 수 있다.

[0034] 상기 측방 유동 스트립(lateral flow strip)은 측방 유동 분석법(lateral flow assay)에 사용되는 스트립을 말한다. 상기 측방 유동 분석법은 분석물을 스트립의 한쪽 끝에 점적하면, 모세관 현상에 의한 분석물의 이동 거리 차이에 의해 분석물을 분석하는 방법일 수 있다. 상기 측방 유동 분석법은 액체 시료 중의 표적 물질의 존재를 검출할 수 있다.

[0035] 상기 키트는 COVID-19 진단에 필요한 시료를 더 포함할 수 있다. 상기 키트는 음성대조군, 양성대조군, 역전사 효소, 중합효소, 적합한 완충용액, 발색 효소, 또는 발색 기질을 포함할 수 있다.

[0037] 다른 양상은 생물학적 시료 유래 핵산을 증폭시키는 단계;

[0038] 핵산 증폭 산물에 Cas 폴리펩티드와 일 양상에 따른 가이드 RNA를 가하고 혼합물을 인큐베이션하는 단계;

[0039] 혼합물에 검출용 프로브를 가하고 반응물을 인큐베이션하는 단계; 및

[0040] 상기 프로브의 신호를 검출하여 SARS-CoV-2 바이러스를 검출하는 단계를 포함하는 COVID-19 진단을 위해 SARS-CoV-2 바이러스를 검출하는 방법을 제공한다.

[0041] 상기 Cas 폴리펩티드, 가이드 RNA, 검출용 프로브, SARS-CoV-2 바이러스, 및 COVID-19는 전술한 바와 같다.

[0042] 상기 방법은 생물학적 시료 유래 핵산을 증폭시키는 단계를 포함한다.

[0043] 상기 생물학적 시료는 COVID-19에 걸렸거나 걸릴 것으로 의심되는 개체로부터 수득된 시료일 수 있다. 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 인간, 마우스, 래트, 소, 말, 돼지, 개, 양, 페럿(ferret), 햄스터, 원숭이, 유인원, 염소, 또는 고양이일 수 있다. 상기 개체는 알코올 사용 장애를 앓고 있거나 알코올 사용 장애에 걸린 것으로 의심되는 개체일 수 있다.

[0044] 상기 생물학적 시료는 비인두 면봉, 가래, 타액, 점막액, 눈물, 혈액, 혈장, 혈청, 골수액, 림프액, 누액, 양수, 소변, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 생물학적 시료는 핵산 시료를 포함한다. 생물학적 시료로부터 핵산을 분리 또는 정제하는 방법은 당업자에게 알려져 있는 방법일 수 있다.

[0045] 상기 핵산을 증폭시키는 단계는 역전사효소(reverse transcriptase)의 존재 하에서 수행될 수 있다. 역전사효소는 RNA를 주형으로 DNA를 생성할 수 있다. 역전사효소는 SARS-CoV-2 바이러스의 바이러스 RNA를 주형으로 이에 상보적인 DNA를 생성할 수 있다.

[0046] 상기 핵산을 증폭시키는 단계는 등온 증폭법 또는 중합효소 연쇄 반응법(polymerase chain reaction: PCR)을 이용할 수 있다. 상기 PCR은 실시간 PCR 또는 역전사 PCR일 수 있다.

[0047] 용어 "등온 증폭법(isothermal amplification)"은 일정한 반응온도 조건 하에서 핵산 주형을 증폭시키는 방법을 말한다. 상기 등온 증폭법은 RPA(recombinase polymerase amplification), LAMP(loop-mediated isothermal amplification), SDA(strand displacement amplification), HDA(helicase-dependent amplification), NASBA(nucleic acid sequence-based amplification), 또는 이들의 조합일 수 있다.

- [0048] 상기 방법은 핵산 증폭 산물에 Cas 폴리펩티드와 일 양상에 따른 가이드 RNA를 가하고 혼합물을 인큐베이션하는 단계를 포함한다.
- [0049] 상기 혼합물을 인큐베이션하는 단계는 표적 핵산, Cas 폴리펩티드, 및 가이드 RNA를 포함한 리보핵단백질(ribonucleoprotein: RNP) 복합체를 형성하는 것일 수 있다. RNP 복합체는 표적 핵산을 서열-특이적으로 변형시킬 수 있다. 상기 변형은 삽입, 절단, 삽입, 연결, 탈아미노화, 또는 이들의 조합일 수 있다. 상기 절단은 유전체 DNA의 이중가닥의 절단일 수 있다. 상기 절단은 평활 말단(blunt end) 또는 접착 말단(sticky end 또는 cohesive end)일 수 있다. 상기 변형은 표적 핵산의 절단 및 절단 부위에 외래 폴리뉴클레오티드의 삽입일 수 있다. 외래 폴리뉴클레오티드를 유전체의 절단 부위에 삽입하는 것은 상동성 의존적 방법에 의한 것일 수 있다. 상기 상동성 의존적 방법은 상동 재조합(homologous recombination) 또는 상동성-직접 수선(homology-directed repair: HDR)일 수 있다.
- [0050] 상기 방법은 혼합물에 검출용 프로브를 가하고 반응물을 인큐베이션하는 단계를 포함한다.
- [0051] 상기 반응물을 인큐베이션하는 단계에서, RNP 복합체에 의해 표적 핵산이 절단되면, 검출용 프로브도 절단될 수 있다. 상기 방법은 절단된 프로브를 검출하는 것일 수 있다.
- [0052] 상기 방법은 상기 프로브의 신호를 검출하여 SARS-CoV-2 바이러스를 검출하는 단계를 포함한다.
- [0053] SARS-CoV-2 바이러스를 검출하는 단계는 측방 유동(lateral flow) 검출, 형광 강도 측정, 화학발광 측정, 또는 이들의 조합에 의해 수행될 수 있다.
- [0054] SARS-CoV-2 바이러스를 검출하는 단계는 상기 반응물을 측방 유동 스트립(lateral flow strip)에 점적하는 단계를 포함할 수 있다. 측방 유동 스트립에 점적된 반응물은 모세관 현상에 의해 이동하여, 반응물 중의 절단된 프로브가 검출될 수 있다. 절단된 프로브는 생물학적 시료 중 SARS-CoV-2 바이러스의 존재를 의미할 수 있다.

발명의 효과

- [0055] COVID-19 진단을 위한 신규한 가이드 RNA, 이를 포함하는 COVID-19 진단용 조성물, 키트, 및 이를 이용한 COVID-19 진단 방법에 따르면, COVID-19를 높은 정확도 및 특이도로 빠르고 간편하게 진단하는데 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0056] 도 1a 및 도 1b는 각각 Orf1ab 유전자 및 S 유전자에 대한 crRNA를 사용한 측방 유동 검출 방법으로 수득된 이미지이다.
- 도 2a는 서열번호 2의 S 유전자에 대한 crRNA 및 형광 리포터를 사용하여 S 유전자 형질감염 렌티바이러스를 검출한 결과를 나타내는 그래프이고, 도 2b는 서열번호 1의 Orf1ab 유전자에 대한 crRNA 및 형광 리포터를 사용하여 SARS-CoV-2를 검출한 결과를 나타내는 그래프이다.

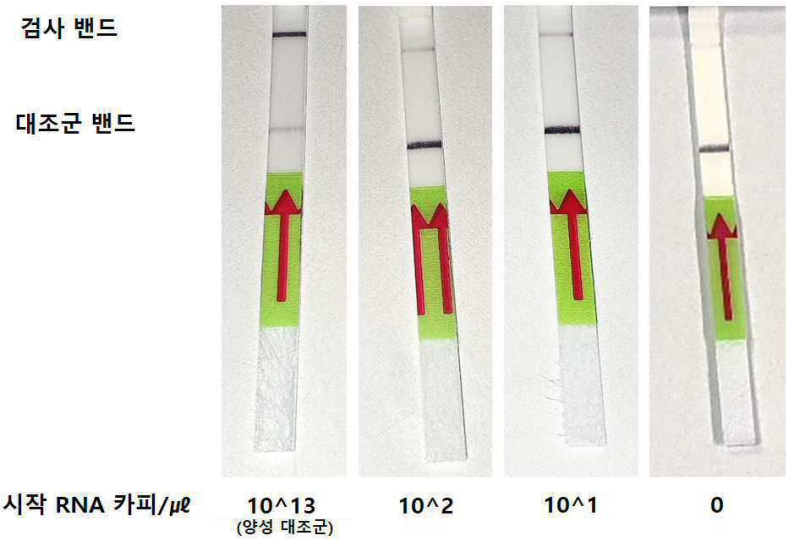
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0057] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0059] **실시예 1. SARS-CoV-2 바이러스의 검출**
- [0060] **1. 역전사-RPA 혼합물의 준비**
- [0061] RPA(recombinase polymerase amplification) 증폭을 위한 RPA 키트로 TwistAmp Basic(TwistDx)를 이용하였다.
- [0062] 각 반응 당, 6 μ l의 RPA 용액, 0.5 μ l의 RPA 정방향 프라이머, 0.5 μ l의 RPA 역방향 프라이머, 0.3 μ l의 역전사 효소, 0.16 μ l의 Rnase 저해제, 및 0.4 μ l의 Nuclease 불포함 정제수를 혼합하여 마스터 혼합물을 준비하였다.
- [0063] SARS-CoV-2 게놈 RNA를 질병관리본부로부터 입수하고, 이를 주형으로 사용하였다. 주형을 10^{13} 카피/ μ l(양성 대조군), 10^2 카피/ μ l, 및 10^1 카피/ μ l로 준비하고, 음성 대조군으로 주형을 포함하지 않는 혼합물을 사용하였다.
- [0064] 주형을 1.3 μ l의 부피로 마스터 혼합물에 가하였다.

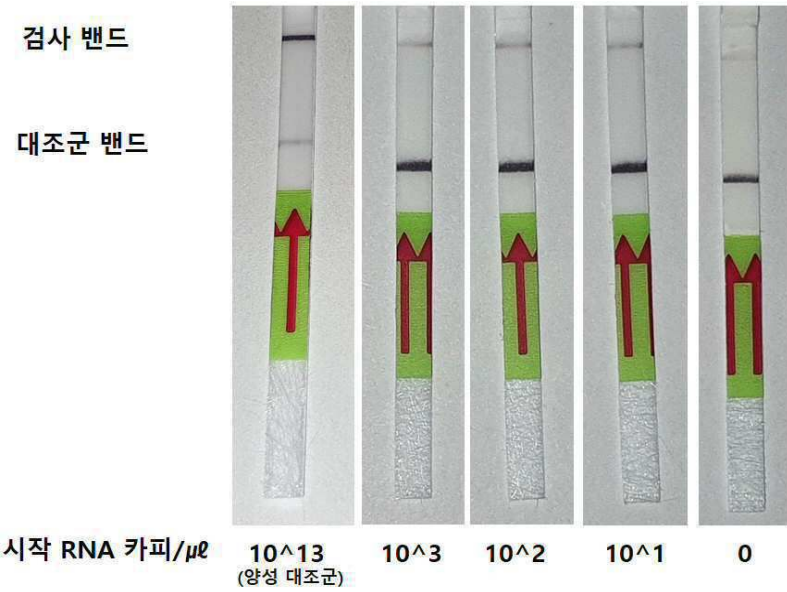
- [0065] 2.5 μ l의 280 mM MgOAC를 RT-RPA 혼합물에 가하자마자 RPA 반응이 시작되므로, MgOAC를 튜브 뚜껑에 분주한 후 뚜껑을 조심스럽게 닫고 회전시켜 RPA 반응이 동시에 시작되도록 하였다. 42℃에서 40분 내지 50분 동안 혼합물을 인큐베이션한 후, 다음 단계까지 얼음에서 보관하여었다.
- [0067] **2. LbCpf1 RNP 복합체의 생성**
- [0068] 각 반응 당, 31.5 μ l의 Nulcease 불포함 정제수, 4 μ l의 10X NEBuffer 2.1, 5 μ l의 2 μ M LbCpf1, 및 5 μ l의 1 μ M 가이드 RNA를 혼합하였다.
- [0069] 사용된 가이드 RNA를 포함한 올리고뉴클레오타이드 서열은 다음과 같다.
- [0070] Orf1ab 유전자에 대한 crRNA:
- [0072] *5'-AAUUUCUACUAAGUGUAGAUAAAAUUACAGAAGAGGUUGGUUUUUUUU-3' (서열번호 1)
- [0073] S 유전자에 대한 crRNA:
- [0074] 5'-AAUUUCUACUAAGUGUAGAUCAUAGAAGUUAUUUGACUCCUUUUUUUU-3' (서열번호 2)
- [0075] 서열번호 1 및 2에서, 굵은 글씨는 표적 유전자인 Orf1ab 또는 S 유전자에 특이적으로 혼성화되는 crRNA의 영역 이고(서열번호 3 및 4), 밑줄친 글씨는 crRNA의 스캐폴드(서열번호 5)이고, 이탤릭 글씨는 CRISPR-Cas12a의 표적 부위 교정 효율을 향상시키기 위해 추가된 영역(서열번호 6)이다(Su Bin Moon et al., Nature Communications (2018) 9:3651).
- [0076] 혼합물을 37℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 검출 리포터 5FAM-ssDNA-비오틴3를 최종 농도 1 μ M로 가하였다. 최종 복합체는 4℃에서 보관하였다.
- [0078] **3. 측방 유동(lateral flow) 검출**
- [0079] 측방 유동 검출을 위해 Milenia hybridetect(TwistDx)를 사용하였다.
- [0080] 실시예 1.1 및 1.2에 기재된 바와 같이 준비된, RT-RPA 시료, Orf1ab 유전자용 LbCpf1 RNP 복합체와 S 유전자용 LbCpf1 RNP를 사용하였다.
- [0081] 각 반응 당, 3.5 μ l의 RT-RPA 시료, 45.5 μ l의 LbCpf1 RNP, 및 45 μ l의 1X NEBuffer 2.1를 혼합하였다. 혼합물을 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다.
- [0082] 측방 유동 스트립을 실온에서 혼합물이 담긴 튜브에 가하고, 스트립의 밴드를 확인하였다. Orf1ab 검출 및 S 검출을 위한 스트립의 이미지를 각각 도 1a 및 도 1b에 나타내었다.
- [0083] 도 1a 및 도 1b에 나타난 바와 같이, Orf1ab 유전자와 S 유전자가 10¹ 카피까지 검출 가능하였다. 따라서, 실시예 1.1의 가이드 RNA는 매우 낮은 최소 검출 한계(limit of detection: LOD)를 갖는다는 것을 확인하였다.
- [0085] **4. 형광 검출**
- [0086] 실시예 1.2의 LbCpf1 RNP 복합체를 형광 리포터를 사용하여 검출가능한지 여부를 확인하였다.
- [0087] S 유전자가 도입된 렌티바이러스(가천대학교 송윤재 교수 제공) 및 SARS-CoV-2(고려대학교 박만성 교수 제공)의 바이러스 RNA를 준비하였다. 실시예 1.2 및 1.3에 기재된 방법을 이용하여, 서열번호 1(S 유전자 검출용) 및 서열번호 2(Orf1ab 유전자 검출용)의 crRNA를 사용하여 각각 S 유전자가 도입된 렌티바이러스 및 SARS-CoV-2의 바이러스 RNA를 검출하였다. 다만, 검출 리포터5FAM-ssDNA-비오틴3 대신에 형광 리포터 FAM-ssDNA-BHQ1을 사용하였다.
- [0088] 각 반응 당, 10 μ l의 RT-RPA 시료, 45 μ l의 LbCpf1 RNP, 및 50 μ l의 1x NEBuffer 2.1을 혼합하였다. 37℃에서 20분 동안 혼합물을 인큐베이션하고, 100 μ l의 혼합물을 96-웰 검정 플레이트로 옮겼다.
- [0089] 495nm 여기 파장 및 517nm 방출 파장에서 형광을 검출하였다. 검출된 형광 강도의 그래프를 도 2a 및 도 2b에 나타내었다.
- [0090] 도 2a 및 도 2b에 나타난 바와 같이, 형광 리포터를 이용한 경우, S 유전자에 대해서는 1 카피 및 Orf1ab 유전자에 대해서는 10¹ 카피까지 검출 가능하였다. 따라서, 서열번호 1 및 2의 가이드 RNA는 매우 낮은 최소 검출 한계를 가지고, COVID-19를 높은 정확도 및 특이도로 신속하게 진단하는데 이용할 수 있다는 것을 확인하였다.

도면

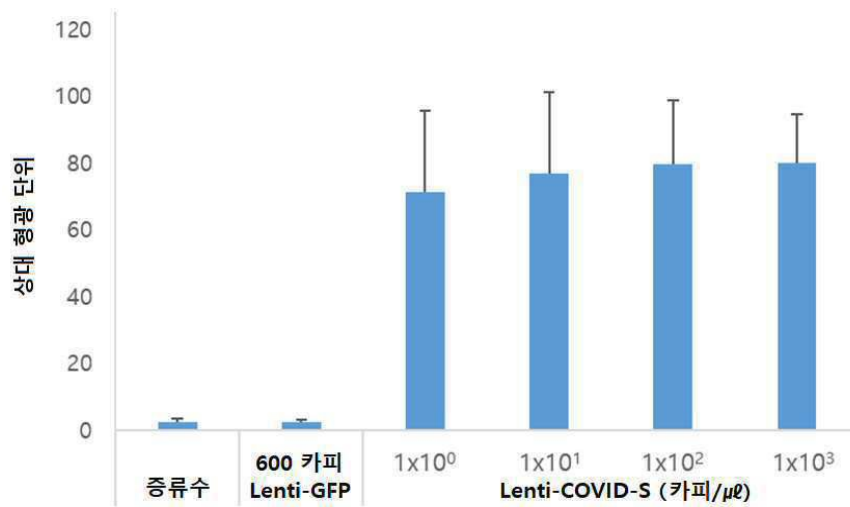
도면1a



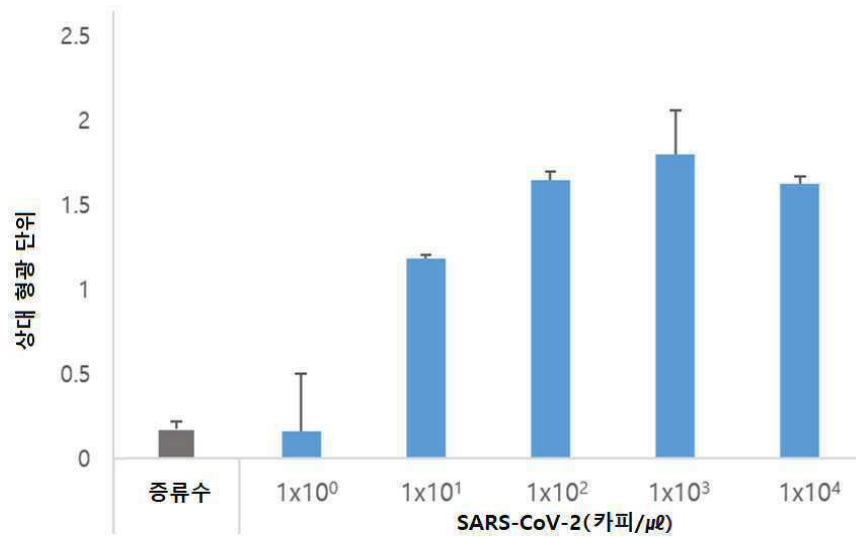
도면1b



도면2a



도면2b



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Novel guide RNA and method for diagnosing Coronavirus disease 2019
- <130> PN134116KR
- <150> KR 10-2020-0035901
- <151> 2020-03-24
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 49
- <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> guide RNA for Orflab gene of SARS-CoV-2 viral RNA

<400> 1

aaauucucacu aaguguagau aaaauuacag aagagguugg uuuuuuuuu 49

<210> 2

<211> 49

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crRNA for S gene of SARS-CoV-2 viral RNA

<400> 2

aaauucucacu aaguguagau cauagaaguu auuugacucc uuuuuuuuu 49

<210> 3

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crRNA for Orflab gene of SARS-CoV-2 viral RNA

<400> 3

aaaauuacag aagagguugg 20

<210> 4

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> crRNA for S gene of SARS-CoV-2 viral RNA

<400> 4

cauagaaguu auuugacucc 20

<210> 5

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> crRNA scaffold

<400> 5

aaauucucacu aaguguagau 20

<210> 6

<211> 9

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Domain of guide RNA

<400> 6

uuuuuuuuu

9