



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년05월23일

(11) 등록번호 10-2400280

(24) 등록일자 2022년05월17일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/70 (2006.01) C12Q 1/686 (2018.01)
- (52) CPC특허분류  
C12Q 1/70 (2022.05)  
C12Q 1/686 (2018.05)
- (21) 출원번호 10-2020-0158923
- (22) 출원일자 2020년11월24일  
심사청구일자 2020년11월24일
- (56) 선행기술조사문헌  
Takahashi 등, SCIENTIFIC REPORTS, Vol. 8, No. 7770, 페이지 1-11 (2018.05.17.)\*  
Chen 등, Chem. Sci., Vol. 9, No. 42, 페이지 8110-8120 (2018.08.24.)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
인천대학교 산학협력단  
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
- (72) 발명자  
함승주  
서울특별시 서대문구 연세로 50(신촌동)  
김은정  
인천광역시 연수구 아카데미로 119(송도동)  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 9 항

심사관 : 김현태

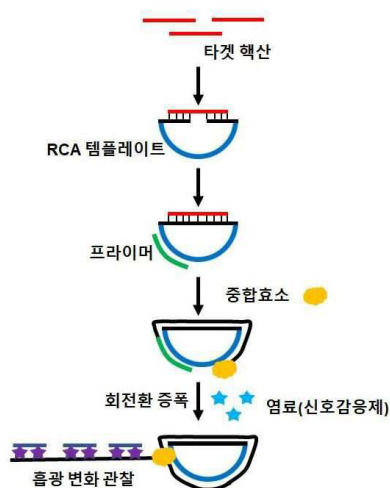
(54) 발명의 명칭 유전자 증폭 기술 기반 유전자 진단 시스템

### (57) 요약

본 발명은 타겟 핵산 검출용 키트에 관한 것이며, 상기 키트를 이용하여 시료에 존재하는 타겟 핵산 존재 여부를 확인 및 검출하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 유전체 기반이므로 선택도가 높고 온도 조절 장비 및 효소 없이 신호를 증폭할 수 있으므로 현장진단(point-of-care-testing, POCT)에 적합하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2525/107 (2013.01)

C12Q 2527/101 (2019.08)

C12Q 2531/125 (2013.01)

(72) 발명자

**기지선**

서울특별시 서대문구 연세로 50(신촌동)

**박채원**

서울특별시 서대문구 연세로 50(신촌동)

**이효**

서울특별시 서대문구 연세로 50(신촌동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415169820

과제번호 20012215

부처명 산업통상자원부

과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원

연구사업명 산업기술알키미스트프로젝트

연구과제명 InSitu(현장형) 바이러스 검출 및 분석 지능형 플랫폼

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2020.09.01 ~ 2027.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711104108

과제번호 2018M3A9E2022819

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 차세대의료기기플랫폼기술

연구과제명 HER2 과발현 엑소좀 분리/농축을 위한 초자성 미세유체 플랫폼 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

타겟 핵산의 전부 또는 일부 서열과 상보적으로 결합하는 양 쪽 말단 부위를 포함하며,

상기 양쪽 말단 부위는 타겟 핵산의 존재 시 클릭 화학 반응(Click Chemistry reaction)으로써 구리-촉매 알킨-아자이드 첨가 환화(copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition, CuAAC)에 의해 연결(ligation)되어 환형(circle)을 형성하는 RCA 템플레이트; 상기 RCA 템플레이트를 증폭시키기 위한 클릭 반응용액, DNA 중합효소, 중합 효소 활성화 용액, 데옥시리보뉴클레오타이드-5-트리포스페이트(dNTPs) 및 프라이머(primer);

상기 증폭에 의해 형성된 서열에 상보적으로 결합하는 PNA(Peptide Nucleic Acid), DNA(DeoxyriboNucleic Acid) 또는 나노입자; 및

상기 증폭에 의해 형성된 서열 및 상기 PNA, DNA 또는 나노입자의 상보적 결합 사이에 삽입되는 염료;를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 타겟 핵산 검출용 키트.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 DNA 중합효소는 phi29 DNA 중합효소인 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 타겟 핵산 검출용 키트.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 타겟 핵산의 전부 또는 일부 서열과 상보적으로 결합하는 부위는 70 내지 100 mer 길이를 가지는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 타겟 핵산 검출용 키트.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 타겟 핵산은 동물, 식물, 세균, 바이러스 및 진균으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나에 존재하거나 이로부터 유래된 것인 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 타겟 핵산 검출용 키트.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 바이러스는 조류 인플루엔자 바이러스, C형 간염 바이러스, 구제역 바이러스, 중동호흡기증후군 코로나바이러스, 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 및 파라믹소 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 타겟 핵산 검출용 키트.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 키트는 회전환 증폭에 이용되는 템플레이트 DNA, 반응 완충용액, 안정화제, 효소 반응제 및 소혈청 알부민으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 더 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 타겟 핵산 검출용 키트.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 염료는 DiSC2(5)(3,3' -Diethylthiadicarbocyanine, iodide)인 것인 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 타겟 핵산 검출용 키트.

#### 청구항 8

목적하는 개체로부터 수득한 시료의 타겟 핵산을 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 타겟 핵산 검출용 키트를 사용하여 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification)으로 증폭하는 단계; 및

상기 증폭된 타겟 핵산 용액의 색 변화 또는 파장을 분석하여 시료 내 타겟 핵산의 존재 여부를 판별하는 단계를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 타겟 핵산 검출방법.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 타겟 핵산은 조류 인플루엔자 바이러스, C형 간염 바이러스, 구제역 바이러스, 중동호흡기증후군 코로나바이러스, 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 및 파라믹소 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 타겟 핵산 검출방법.

#### 청구항 10

삭제

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 타겟 핵산 검출용 키트에 관한 것이며, 상기 키트를 이용하여 시료에 존재하는 타겟 핵산 존재 여부를 확인 및 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 유전체 기반이므로 선택도가 높고 온도 조절 장비 및 효소 없이 신호를 증폭할 수 있으므로 현장진단(point-of-care-testing, POCT)에 적합하다.

#### 배경 기술

[0003] 지금까지 유전자를 검출하는 기술은 PCR(polymerase chain reaction)을 기초로 하는 방법들이 주를 이루었다. PCR은 정성적(qualitative)과 정량적(quantitative) 방법으로 나눌 수 있다. 정성적 방법으로는 PCR, 네스티드 PCR, RT-PCR 및 멀티플렉스 PCR이며 정량적 방법은 cPCR 및 실시간 PCR이 해당된다. 이러한 PCR의 원리는 두 가닥의 DNA를 주형으로 특정 영역을 사이 두고 프라이머라는 짧은 DNA를 각 상보가닥에 결합하여 기질이 되는 4종류의 dNTP의 존재하에 DNA 중합효소의 작용으로 주형의 염기배열에 따라 새로운 DNA가 형성되는 과정이다. 원리는 크게 3단계 과정으로 DNA의 해리(denaturation), 프라이머와 주형 DNA의 결합(annealing) 및 신장(extension) 과정 등으로 구성되며 이러한 과정을 반복함으로써 목적하는 DNA단편을 대량으로 얻을 수 있다. 1회의 DNA 중합효소 반응으로 DNA가 2배로 되며 n회의 반응을 반복하면 이론적으로 2n 분자수의 DNA를 증폭할 수 있음이 PCR의 원리이다(비특허문헌 1). PCR 증폭에 영향을 미치는 인자로는 PCR과정의 각 단계별 반응 온도와 시간, PCR 반응 용액내의 구성성분의 조성 상태(주형 DNA의 순도, dNTP 농도, 마그네슘 농도, DNA 중합효소의 종류 및 농도, Mg 이온의 농도), PCR 주기의 수, 고안한 프라이머 상태 등에 따라 달라진다(비특허문헌 2).

[0004] 즉, PCR은 채취한 시료로부터 핵산을 추출하고 검출하고자 하는 타겟 핵산을 프라이머를 이용해 증폭시키는 일련의 과정이다. 이러한 PCR은 일반적인 PCR은 반응 온도를 수십 회 이상 조절함으로써 표적 유전물질을 증폭하고 검출하기 때문에 thermocycler(온도조절장치/유전자증폭기)가 필요한데, 이 장비는 고온과 저온 사이의 온도 전환을 수십 초 내에 안정적으로 구현해야 한다. 또한 신속한 진단에 대한 요구로 개발된 실시간 검출 모니터링이 가능한 실시간 PCR(Real-time PCR)은 더 고도의 기술을 요구하므로 경제적인 부담이 큰 단점을 가지고 있다. 그렇기 때문에 이 기술들에 대한 대안으로 떠오른 것이 등온 증폭법이다(비특허문헌 3).

[0005] 한편, 등온증폭법의 하나인 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification, RCA) 기반 핵산 검출 방법은 원형의 단일 가닥 DNA를 타겟 유전자의 프로브로 사용하며, DNA 가닥 치환활성(strand displacement activity)이 있는 phi29 DNA 중합효소가 30℃에서 상기 원형 DNA 프로브와 표적 유전자가 결합한 부위를 인식하여 DNA 중합반응을

시작하며, 원형 프로브의 구조상 3' 말단이 없으므로 phi29 DNA 중합효소가 원형 프로브를 따라 DNA 중합반응을 장시간 반복하여 수천 개의 염기서열을 지닌 긴 단일 가닥의 DNA를 합성한다(비특허문헌 3).

[0006] 그러나, 이러한 기존의 RCA 기반 핵산 검출 방법은 연결(ligation) 과정에서 효소를 사용하기 때문에 온도 등의 환경에 민감한 단점을 갖는다.

[0007] 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하고자, 온도 등의 환경에 민감하지 않고, 현장진단에서 빠르게 검출 가능한 회전환 증폭 기반 타겟 핵산 검출용 키트 및 검출 방법을 도출하였다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 1: 중합효소연쇄반응(PCR)을 이용한 연구 기법, 차대룡, 대한신장학회지 2000; 19: S28-S40.

(비특허문헌 0002) 2: 호흡기 바이러스 중합효소연쇄반응, 보건복지가족부, 신의료기술평가보고서, HTA-2008-006, 2008.

(비특허문헌 0003) 3: Isothermal amplification의 최근 연구 동향, 하태환, (사)한국바이오칩학회.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 타겟 핵산의 전부 또는 일부 서열과 상보적으로 결합하는 양 쪽 말단 부위를 포함하며, 상기 양쪽 말단 부위는 타겟 핵산의 존재 시 클릭 화학 반응(Click Chemistry reaction)에 의해 연결(ligation)되어 환형(circle)을 형성하는 RCA 템플레이트;

[0010] 상기 RCA 템플레이트를 증폭시키기 위한 클릭 반응용액, DNA 중합효소, 중합효소 활성화 용액, 테옥시리보뉴클레오타이드-5-트리포스페이트(dNTPs) 및 프라이머(primer);

[0011] 상기 증폭에 의해 형성된 서열에 상보적으로 결합하는 PNA(Peptide Nucleic Acid), DNA(DeoxyriboNucleic Acid) 또는 나노입자; 및

[0012] 상기 증폭에 의해 형성된 서열 및 상기 PNA, DNA 또는 나노입자의 상보적 결합 사이에 삽입되는 염료를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 타겟 핵산 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 목적하는 개체로부터 수득한 시료의 타겟 핵산을 제1항 내지 제8항의 어느 한 항에 따른 타겟 핵산 검출용 키트를 사용하여 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification)으로 증폭하는 단계; 및

[0014] 상기 증폭된 타겟 핵산 용액의 색 변화, 또는 과장을 분석하여 시료 내 타겟 핵산의 존재 여부를 판별하는 단계를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 타겟 핵산 검출방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0015] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 타겟 핵산의 전부 또는 일부 서열과 상보적으로 결합하는 양 쪽 말단 부위를 포함하며, 상기 양쪽 말단 부위는 타겟 핵산의 존재 시 클릭 화학 반응(Click Chemistry reaction)에 의해 연결(ligation)되어 환형(circle)을 형성하는 RCA 템플레이트;

[0016] 상기 RCA 템플레이트를 증폭시키기 위한 클릭 반응용액, DNA 중합효소, 중합효소 활성화 용액, 테옥시리보뉴클레오타이드-5-트리포스페이트(dNTPs) 및 프라이머(primer);

[0017] 상기 증폭에 의해 형성된 서열에 상보적으로 결합하는 PNA(Peptide Nucleic Acid), DNA(DeoxyriboNucleic Acid) 또는 나노입자; 및

[0018] 상기 증폭에 의해 형성된 서열 및 상기 PNA, DNA 또는 나노입자의 상보적 결합 사이에 삽입되는 염료를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 타겟 핵산 검출용 키트를 제공한다.

[0019] 본 발명에 있어서, “클릭 화학 반응(Click Chemistry reaction)”은 구리-촉매 알킨-아자이드 첨가 환화

(copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition, CuAAC)일 수 있다.

- [0020] 본 발명에 따른 상기 회전환 증폭의 연결 과정에서 이루어지는 상기 클릭 화학 반응은 효소가 필요하지 않은 반응이므로 온도 등의 환경에 민감하지 않으며 선택성이 높은 특징을 갖는다.
- [0021] 일 실시예에 있어서, 본 발명의 키트는 클릭 반응용액, DNA 중합효소, 중합효소 활성화 용액, 데옥시리보뉴클레오타이드-5-트리포스페이트(dNTPs) 및 프라이머(primer)를 포함하여 RCA 템플레이트를 증폭시킨다.
- [0022] 한 구체예에서, 상기 클릭 반응용액은 구리-촉매 알킨-아자이드 첨가 환화(CuAAC) 반응을 위한 용액으로서 Tris((1-benzyl-4-triazolyl)methyl)amine (THPTA), 아스코르브산 나트륨(sodium ascorbate) 및 황산구리( $\text{CuSO}_4$ )가 혼합된 형태의 용액일 수 있다.
- [0023] 한 구체예에서, 상기 DNA 중합효소는 당업계에서 일반적으로 사용되는 효소로서, RCA 템플레이트를 따라서 DNA의 합성하는 역할을 한다.
- [0024] 상기 DNA 중합효소는 대장균 DNA 중합효소 I, 클레나우 단편, vent DNA 중합효소, T4, T7 DNA 중합효소, Taq 중합효소, Bst DNA 중합효소 및 phi29 DNA 중합효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 것, 바람직하게는 phi29 DNA 중합효소일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 한 구체예에서, 상기 중합효소 활성화 용액은 아세트산 마그네슘, 아세트산 칼륨, Tween 20 및 DTT으로 구성되어 핵산과 상기 중합효소의 안정성을 높이기 위한 용액으로, 프로브간 결합과 중합효소의 활성을 돕는다.
- [0026] 한 구체예에서, 상기 데옥시리보뉴클레오타이드-5-트리포스페이트(dNTPs)는 DNA중합효소를 이용하여 DNA를 합성할 때 DNA가 되는 주원료이다.
- [0027] 한 구체예에서, 상기 프라이머는 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드로서 핵산 합성(또는 중합)의 기시점 이 되는 짧은 유전자 서열이며, 중합효소가 이미 존재하는 유전자 가닥에 새로운 뉴클레오타이드를 붙이는 역할을 한다.
- [0028] 일 실시예에 있어서, RCA 템플레이트가 증폭된 후 증폭에 의해 형성된 서열에 신호 프로브인 PNA(Peptide Nucleic Acid), DNA(DeoxyriboNucleic Acid) 또는 나노입자가 상보적으로 결합하고, 상기 증폭에 의해 형성된 서열과 상기 신호 프로브 결합 사이에 염료가 삽입될 수 있다.
- [0029] 한 구체예에서, RCA 템플레이트가 증폭된 후 증폭에 의해 형성된 서열에 상보적으로 PNA(Peptide Nucleic Acid)가 결합할 수 있다. 상기 PNA 외에도 DNA 또는 나노입자가 사용될 수 있다.
- [0030] 상기 나노입자(nano particle)는 당업계에서 일반적으로 사용되는 나노입자가 사용될 수 있고, 바람직하게는 금 나노입자가 사용될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 일 실시예에 있어서, 상기 증폭에 의해 형성된 서열과 PNA, DNA 또는 나노입자의 상보적 결합 사이에 염료가 처리될 수 있다. 염료의 색 변화(또는 흡광 변화)를 통해 증폭되는 핵산의 양의 증가 여부를 알 수 있다.
- [0032] 한 구체예에서, 상기 염료는 DiSC2(5)(3,3'-Diethylthiadicarbocyanine, iodide)일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명에 따른 회전환 증폭을 기반으로 한 색 변화(흡광 변화) 시스템에 대해서는 도 1에 나타내었다.
- [0034] 한편, 본 발명에 따른 RCA 템플레이트는 타겟 핵산의 전부 또는 일부 서열과 상보적으로 결합하는 부위를 포함한다. 상기 부위는 상기 RCA 플레이트 양 쪽 말단에 분리되어 형성된다. 예를 들어, 상기 RCA 템플레이트는 50 내지 200 mer, 바람직하게는 70 내지 100 mer 길이의 결합 부위를 포함할 수 있다.
- [0035] 이해를 돕기 위해, 하기 표 1은 타겟 핵산의 전부 또는 일부 서열과 상보적으로 결합하는 부위를 포함하는 상기 RCA 템플레이트의 서열을 예시적으로 나타낸다(밑줄 글씨: 타겟 핵산의 전부 또는 일부 서열과 상보적으로 결합하는 부위, **굵은 글씨**: PNA 신호 프로브 부위, 기울임 글씨: 프라이머 결합 부위).



[0036] [표 1]

병원균 종류	서열 번호	템플레이트 서열 (5' → 3')	서열 번호	병원균의 타겟 핵산 서열
인플루엔자 A 바이러스 (Influenza A virus)	1	[Azide] TTC TAA TAC TGG CCA TAC AGT CGT C TTT GTG GTT TCT ACT ATA TTT TGA GTA ACT GTT TCC TTC TTT TAC TTG CTG TGA TCA TAG GTG TTG T [Alkyne]	5	GAC GAC TGT ATG GCC AGT ATT AGA AAC AAC ACC TAT GAT CAC AGC AAG TA
C형 간염 바이러스 (Hepatitis C virus)	2	[Azide] CTC CGT GAA GGC TCG CAG TGC ACT G TTT GTG GTT TCT ACT ATA TTT TGA GTA ACT GTT TCC TTC TTT GAG GAG CCG AGT ACC TGG TCA TAG C [Alkyne]	6	CAG TGC ACT GCG AGC CTT CAC GGA GGC TAT GAC CAG GTA CTC GGC TCC TC
돼지유행성설사 바이러스 (Porcine epidemic diarrhea virus)	3	[Azide] TCA GTC TTT GCG CCT TCT TTA GCA A TTT GTG GTT TCT ACT ATA TTT TGA GTA ACT GTT TCC TTC TTT CTT TCT GAC ACC CAA ATT AGT GGG T [Alkyne]	7	TTG CTA AAG AAG GCG CAA AGA CTG AAC CCA CTA ATT TGG GTG TCA GAA AG
아프리카돼지열병 바이러스 (African Swine Fever Virus, ASFV)	4	[Azide] AGGAATA CCA ACC CAG TGG TCA TAT TTT GTG GTT TCT ACT ATA TTT TGA GTA ACT GTT TCC TTC TTT ATT ACC TTT GCT TTG AAG CCACGGG [Alkyne]	8	ATA TGA CCA CTG GGT TGG TATTCCT CCCGTGG CTT CAA AGC AAA GGT AAT

[0037]

[0038] 하기 표 2는 본 발명에 사용되는 프라이머 및 신호 프로브 서열을 예시적으로 나타내는 것으로, 서열번호 9의 프라이머 서열은 상기 서열번호 8의 타겟 핵산 서열을 기준으로 서열번호 4의 RCA 템플레이트 서열의 일부와 상보적인 서열을 갖는 서열이고, 서열번호 10의 신호 프로브 서열은 본 발명의 RCA 템플레이트 서열의 PNA 신호 프로브 부위와 동일한 서열을 갖는 서열이다.

[0039] [표 2]

서열 번호	프라이머 서열 (5' → 3')	서열 번호	신호 프로브 서열 (5' → 3')
9	GAA GGA AAC AGT TAC TCA	10	GTG GTT TCT ACT ATA

[0040]

[0041] 일 실시예에 따르면, 본 발명의 검출하고자 하는 타겟 핵산은 동물, 식물, 세균, 바이러스 및 진균 등에 존재하거나 이로부터 유래되는 것으로 바람직하게는 mRNA, dsDNA, 및 cDNA 를 포함한 유전자 물질, 유전 질환에 수반되는 돌연변이된 유전자에 존재하거나 이로부터 유래되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 상기 회전환 증폭 기반 타겟 핵산 검출용 키트는 회전환 증폭에 이용되는 템플레이트 DNA, 반응 완충용액, 안정화제, 효소 반응제 및 소혈청 알부민으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 더 사용할 수 있다.

[0043] 상기 완충용액(버퍼)은 NEB (New England Biolab) 완충용액 계열, 예를 들면 NEB 완충용액 4, Bst DNA 풀중합

효소 완충용액, T4 DNA 리가아제 완충용액, T7 DNA 리가아제 완충용액 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0044] 상기 안정화제, 효소 반응제 및/또는 소혈청알부민은 당업계에서 일반적으로 사용되는 것을 사용할 수 있다.
- [0045] 따라서, 본 발명은 목적하는 개체로부터 수득한 시료의 타겟 핵산을 상기 타겟 핵산 검출용 키트를 사용하여 회전 증폭(Rolling Circle Amplification)으로 증폭하는 단계; 및 상기 증폭된 타겟 핵산 용액의 색 변화 또는 파장(wavelength)을 분석하여 시료 내 타겟 핵산의 존재 여부를 판별하는 단계를 포함하는 회전 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 타겟 핵산 검출방법을 제공한다.
- [0046] 상기 색 변화는 증폭된 DNA와 신호 프로브 간 결합이 형성됨으로써 유도될 수 있다. 이는 신호 프로브 말단에 나노입자, 형광단 종류에 따라 달라 질 수 있으며, DNA와 신호 프로브 결합에 반응하는 염료(신호감응제) 등에 따라서도 달라 질 수 있다.
- [0047] 한 구체예에서, RCA 템플레이트, 클릭 반응용액, 중합효소(polymerase), 중합효소 활성화 용액, 테옥시리보뉴클레오타이드-5-트리포스페이트(dNTPs), 프라이머; 및 PNA, DNA 또는 나노입자; 및 염료로 구성된 타겟 핵산 검출 키트를 사용하여 회전 구조체가 제대로 형성되었는지 확인하고, 회전 증폭 과정을 거쳐 타겟 핵산 농도 변화에 따른 색 변화 또는 흡광세기의 변화를 관찰/측정한 결과, DNA와 상보적으로 결합하는 PNA 농도가 진해질수록 전환(shift)되는 정도도 많아지는 것을 확인하였다.
- [0048] 상기 검출하고자 하는 타겟 핵산은 예를 들어 병원균 유전자일 수 있다. 또한, 상기 타겟 핵산은 핵산 서열을 아는 모든 병원균을 대상으로 할 수 있다. 예컨대, 상기 병원균은 조류 인플루엔자 바이러스, C형 간염 바이러스, 구제역 바이러스, 중동호흡기증후군 코로나바이러스, 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 및 파라믹소바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0049] 본 발명에서 용어 “템플레이트”란 타겟 핵산의 전부 또는 일부 서열과 상보적으로 결합하는 양 쪽 말단 부위를 포함하며, 상기 양쪽 말단 부위는 타겟 핵산의 존재 시 클릭 화학 반응에 의해 연결되어 환형(circle)의 형태를 가지는 뉴클레오타이드를 지칭한다.
- [0050] 본 발명에서 용어 “타겟 핵산”은 공지 또는 추정 유전자 산물을 코딩하는 임의의 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 타겟 핵산은 동물, 식물, 세균, 바이러스, 진균 등으로부터 유래되는 유전자, 또는 유전 질환에 수반되는 돌연변이된 유전자 등일 수 있다. 본 발명에서 표적 유전자는 예컨대 핵산 서열 또는 분자는 단일 또는 이중 가닥일 수 있고 센스 또는 안티센스 가닥을 나타낼 수 있는 DNA 또는 RNA일 수 있다. 따라서 핵산 서열은 dsDNA, ssDNA, 혼합 ssDNA, 혼합 dsDNA, ssDNA(예컨대, 융해, 변성, 헬리케이스 등에 의해)로 만들어진 dsDNA, A-, B- 또는 Z-DNA, 삼중-가닥 DNA, RNA, ssRNA, dsRNA, 섞인 ssRNA 및 dsRNA, ssRNA(예컨대, 융해, 변성, 헬리케이스 등을 통해)로 만들어진 dsRNA, 메신저 RNA(mRNA), 리보솜 RNA(rRNA), 전달 RNA(tRNA), 측매 RNA, snRNA, 마이크로RNA, 또는 PNA일 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 용어 “상보적으로 결합하는 부위” 또는 “상보적으로 결합하는 양 쪽 말단 부위”는 뉴클레오타이드 서열 간에 상보적 염기쌍을 형성할 수 있는 부위를 지칭한다.
- [0052] 본 발명에서 용어 “회전 증폭”은 단일가닥 DNA를 주형으로 하고, 여기에 상보적인 서열을 사용하여 등온에서 중합반응을 수행하여, 주형 DNA가 연속적으로 합성되도록 하는 것을 지칭한다.
- [0053] 본 발명에서 용어 “시료”란 조직, 세포, 혈액, 혈청 또는 혈장과 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 본 발명에서 용어 “검출”, “탐지” 또는 “진단”이란 타겟 핵산의 존재 유무, 이에 따른 병리 상태의 존재 또는 특징에 대한 확인을 지칭한다.
- [0055] 본 발명에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0056] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.
- [0057] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 또한, 달리 지시된 바가 없으면, 핵산은 각각 왼쪽에서 오른쪽, 5'에서 3' 방향으로 쓰이고, 아미노산 서열은 왼쪽에서 오른쪽, 아미노에서 카복실 방향으로 쓰인다. 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.



## 발명의 효과

- [0059] 본 발명은 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 타겟 핵산 검출용 키트 및 타겟 핵산 검출 방법은 유전체 기반이므로 선택도가 높고 온도 조절 장비 및 효소 없이 신호를 증폭할 수 있으며 빠른 시간 내에 검출 가능하므로 현장진단(point-of-care-testing, POCT)에 적합한 장점을 가진다.
- [0060] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정된 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

## 도면의 간단한 설명

- [0062] 도 1은 본 발명의 RCA 방법을 기반으로 한 색 변화(흡광) 시스템을 보여준다.
- 도 2는 본 발명의 클릭 화학 반응(Click Chemistry reaction) 중에서 알킨-아자이드 첨가 환화 반응을 보여준다.
- 도 3은 본 발명에 따른 화학 반응으로 인한 회전환 구조체가 형성된 결과를 보여준다.
- 도 4는 RCA 템플레이트 농도에 따라 회전환 구조체 농도가 증가하고 있는 결과를 보여준다.
- 도 5는 PNA 반응을 통한 흡광 스펙트럼을 비교한 결과를 보여주는 것으로, 아가로스 겔(Agarose gel)을 이용하였다.
- 도 6은 PNA 반응을 통한 흡광 스펙트럼을 비교한 결과를 보여주는 것으로, PNA 농도를 2종류로 실험했을 때, PNA 농도가 전해질수록 전환(shift)되는 정도도 많아지는 것을 보여준다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0063] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 기술한다.
- [0065] [실시예]
- [0066] 실험예 1: 재료 준비
- [0067] -핵산 및 올리고뉴클레오타이드 준비
- [0068] 본 발명에서는 검출하고자 하는 병원균으로 아프리카돼지열병 바이러스를 선정하고, 아프리카돼지열병 바이러스 유전자의 일부 서열인 서열번호 8의 타겟 핵산을 준비하여 실험을 진행하였다. 상기 서열번호 8의 타겟 핵산은 DNA 구조체 기반이고, 바이오니아에서 제공한 것을 사용하였다.
- [0069] 본 발명에서 사용되는 DNA 올리고뉴클레오타이드 (RCA 템플레이트, 타겟, 프라이머, 신호 프로브)는 화학적으로 합성되어 HPLC 및 전기영동에 의해 정제되었다.
- [0071] -시약 준비
- [0072] 시약 330 mM Tris-acetate (37℃에서 pH 7.9), 100 mM의 아세트산 마그네슘(magnesium acetate), 660 mM의 아세트산 칼륨(potassium acetate), 1% Tween 20, 10 mM DTT 으로 구성된 중합 효소 활성화 용액은 핵산과 중합 효소의 안정성을 높이기 위한 시약이고, 그 역할은 프로브간 결합과 중합효소(polymerase) 활성을 돕는 것이다.
- [0073] 또한, 본 발명에 사용된 클릭 반응은 7mM THPTA, 10mM Sodium ascorbate, 1mM CuSO<sub>4</sub> 용액 조건 하에서 이루어진다.
- [0075] 실시예 1: 타겟 핵산 검출 키트 제작
- [0076] 타겟 핵산 검출 키트는 서열번호 4의 RCA 템플레이트, 클릭 반응용액, 중합효소, 중합효소 활성화 용액, 소혈청 알부민(Bovine Serum Albumin), 데옥시리보뉴클레오타이드-5-트리포스페이트, 서열번호 9의 프라이머, 서열번호 10의 신호 프로브 및 염료로 구성하였다. 상기 중합효소 활성화 용액은 핵산과 중합효소의 안정성을 높이기 위한 시약이고, 소혈청알부민은 중합반응에 도움을 주기 위한 시약이다.
- [0077] 또한, 상기 염료는 DiSC2(5)(3,3' -Diethylthiadicarbocyanine, iodide)를 사용하였다.
- [0078] 상기 서열번호 9의 프라이머는 상기 서열번호 4의 RCA 템플레이트 일부와 상보적인 서열로 이루어져 있으며, 상

기 서열번호 10의 신호 프로브는 RCA 템플레이트 서열의 PNA 신호 프로브 부위와 동일한 서열로 이루어져 있다.

#### [0080] 실시예 2: 회전환 형성 및 형성 확인

[0081] 회전환 증폭 진행에 앞서, 회전환 구조체가 올바르게 형성되었는지 확인하였다.

[0082] 먼저, RCA 템플레이트에 타겟 핵산 서열을 넣어주게 되면 RCA 템플레이트와 타겟 핵산 서열의 상보적인 부분으로 인해서 RCA 템플레이트의 말단이 가까워지게 된다. 이때 클릭 반응용액을 첨가해주면 클릭 화학 반응으로 인한 결합이 형성되면서 회전환이 형성된다.

[0083] 회전환이 형성된 후, 프라이머, 중합효소, 중합효소 활성화 용액 및 데옥시리보뉴클레오타이드-5-트리포스페이트를 첨가하면 RCA 반응이 일어난다.

[0084] 마지막으로 RCA로 인해 증폭된 증폭산물에 신호 프로브로서 PNA와 함께 염료를 넣어 색변화를 관찰한다.

[0085] 이후 회전환이 잘 형성되었는지 확인하기 위하여 전기영동을 실시하였다.

[0086] 전기영동을 확인하기 위해서 Urea가 포함된 denaturing polyacrylamide gel을 만든다. Urea 9.6g, 10X TBE buffer 2ml, Acrylamide/Bis-acrylamide 30% solution 6.67ml, TEMED 8ul, 30% APS solution 66ul를 넣고 굳혀서 겔을 만들 수 있다. 각 lane 별로 8ul의 시료를 로딩한 다음, 120V 전압을 40분동안 걸어주어 전기영동을 진행한다.

[0087] 즉, 전기영동 실험에서 밴드의 위치가 달라지는 양상을 통해 회전환 형성을 확인하는 것은 밴드가 겔(gel)의 아랫쪽에 존재할수록 염기쌍(base pair) 분포 수가 적은 것과, 이미 염기쌍의 분포를 알고 있는 ladder를 통해서 밴드의 대략적인 염기쌍 분포를 알 수 있는 것을 통해 가능하다. 이렇듯 밴드의 위치가 달라지는 양상을 확인하기 위하여 도 3과 같이 실험군 1 내지 10에 ladder를 처리하고 전기영동을 실시하였다.

[0088] 양성조건으로서 실험군 2 및 3에는 클릭 화학 반응이 아닌 리가아제(ligase) 효소를 이용하여 회전환을 형성시켰고, 음성조건으로서 실험군 6 내지 9를 비-타겟 및 랜덤-타겟으로 진행하였으며, 실험군 4 및 5에는 클릭 화학 반응을 진행하였다.

[0089] 결과적으로, 실험군 4 및 5를 통해서 양성 대조군(positive control) 보다는 농도가 적지만, 핵산외부가수분해 효소(exonuclease)를 처리하였을 때에도 템플레이트 밴드가 있는 것으로 보아 환(circle) 형태가 있는 것으로 판단된다.

[0090] 또한 음성(negative) 조건인 비-타겟(non-target) 및 랜덤-타겟(random-target)과 비교했을 때에도 밴드의 위치가 달라지는 양상으로 보아 환이 형성된 것으로 판단된다.

[0091] 클릭 화학 반응을 통해 회전환이 형성되는 것을 확인하기 위하여, RCA 템플레이트 용액에 타겟 핵산 서열 용액을 넣었다. 이때, RCA 템플레이트와 타겟 핵산 서열의 상보적인 부분으로 인해서 RCA 템플레이트의 말단이 가까워지게 된다. 따라서 동일한 부위의 클릭 반응용액을 첨가해주면 클릭 화학 반응으로 인한 결합이 형성되면서 회전환이 형성됨을 확인하였다.

[0092] 즉, 실험군 4 및 5과 같이, 클릭 화학 반응으로 인한 화학결합으로 인해 회전환이 잘 형성됨을 확인하였다(도 3).

#### [0094] 실시예 3: 회전환 증폭

[0095] 서열번호 8의 타겟 핵산과 서열번호 4의 RCA 템플레이트의 결합은 클릭 반응 용액 조건인 7mM THPTA, 10mM Sodium ascorbate, 1mM CuSO4 조건에서 상온에서 2시간 동안 이루어진다.

[0096] 타겟 핵산과 RCA 템플레이트가 결합을 하게 되면 화학적 반응으로 인해 RCA 템플레이트가 회전환 구조로 변형된다. 프라이머가 RCA 템플레이트에 결합을 하고, 중합효소가 이를 인식함으로써 RCA 템플레이트의 증폭이 발생하게 된다. 증폭된 DNA 구조체는 단일 DNA 가닥으로 되어 있으며, 서열번호 10의 신호 프로브와 상보적인 서열로 된 부분이 반복적으로 발생하게 된다.

#### [0098] 실시예 4: 타겟 핵산 농도 변화에 따른 색 변화 측정

[0099] 본 실험에서, 서열번호 8의 타겟 핵산 농도가 감소하게 되면 형성되는 회전환의 양이 감소하고, 이에 따라 같은 시간 안에 증폭이 되는 DNA 양이 감소하게 되며, 이는 색 변화 또는 흡광세기의 변화로 이어진다.

[0100] 색 변화 측정에 앞서, RCA 템플레이트의 농도를 조절하여 회전환이 가장 잘 형성되는 최적의 RCA 템플레이트 농

도를 확인하고자 했다.

[0101] 이를 위하여, 도 4와 같이 전기영동을 실시하였다.

[0102] 전기영동을 위하여 Urea가 포함된 denaturing polyacrylamide gel을 만들어 주고, Urea 9.6g, 10X TBE buffer 2ml, Acrylamide/Bis-acrylamide 30% solution 6.67ml, TEMED 8ul, 30% APS solution 66ul를 넣고 굳혀서 겔을 만든다. 각 lane 별로 8ul의 시료를 로딩한 다음, 120V 전압을 40분동안 걸어주어 전기영동을 진행하였다.

[0103] 먼저, RCA 템플레이트와 동일한 농도로 첨가되는 프라이머의 양을 함께 확인하고, 회전환의 재료가 되는 RCA 템플레이트의 농도를 조절하여 회전환이 가장 잘 형성되는 최적의 RCA 템플레이트 농도를 확인한다. 즉, RCA 템플레이트/프라이머의 농도를 증가시켜 최대한 많은 RCA 템플레이트의 RCA 반응 자체를 확인하고자 하였다.

[0104] 그 결과, 템플레이트/프라이머 농도에 따른 회전환 구조체의 농도가 증가하고 있는 것으로 확인되었다(도 4).

[0105] 아울러, 타겟 핵산 서열의 양을 조절하여 증폭 산물을 확인하기 위하여 전기영동을 실시하였다. 1g의 agarose와 증류수 100ml을 섞은 다음 고온을 가해서 녹인 후 틀에 넣고 굳혀, 1%의 아가로스 겔(agarose gel)을 만든다. 이후 100W로 20분동안 전기영동을 실시하였다.

[0106] 그 결과, 도 5에서 타겟 핵산 서열의 양이 증가할수록 Lane의 윗부분에 맺혀있는 핵산의 양이 점차 증가(점차 진해짐)하는 것을 확인할 수 있다. 따라서, RCA 템플레이트 농도에 따라 밴드의 세기가 달라지는 것을 통해 RCA 반응이 일어남을 확인하였다(도 5).

#### [0108] 실시예 5: PNA 반응을 통한 흡광 스펙트럼 비교

[0109] 본 실험에서는 타겟 핵산 서열에 의해 형성된 회전환으로부터 증폭된 증폭산물이 존재할 때 염료의 흡광 스펙트럼이 전환(shift)되는 것을 관찰하고자 한다.

[0110] 상기 실시예들로부터 형성된 회전환에서 RCA 반응이 일어나서 증폭된 증폭산물과 신호 프로브인 PNA를 섞고 1mM의 염료를 첨가한 후 10분 뒤 멀티리더기를 이용하여 흡광을 측정하여 스펙트럼을 관찰한다.

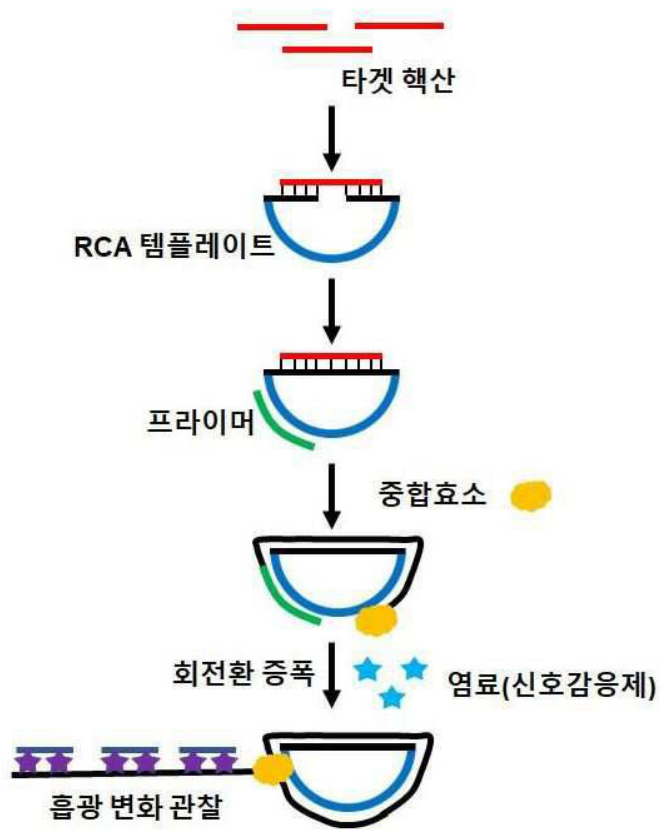
[0111] 그 결과, 20uM 농도의 PNA 2 uL 및 PNA 4 uL 를 가지고 실험을 진행하였을 때 전체 용액에 존재하는 PNA 농도가 진해질수록 전환되는 정도도 많아지는 것을 확인하였다(도 6).

[0113] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

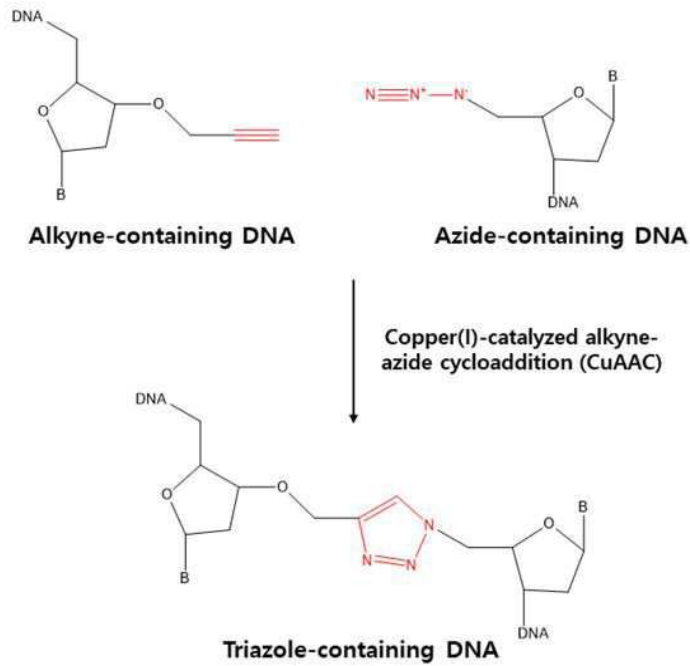
[0114] 또한, 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

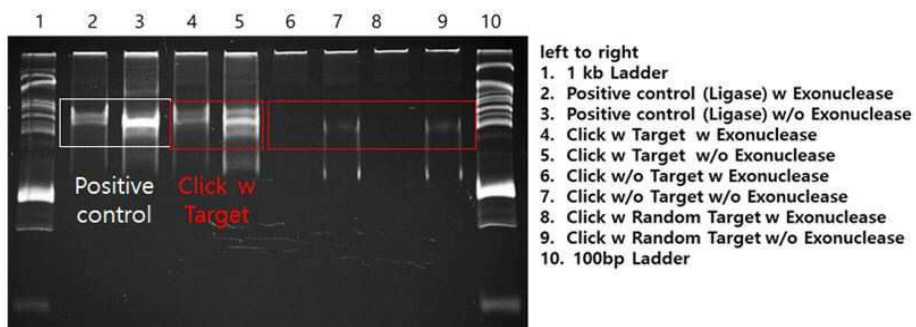
도면1



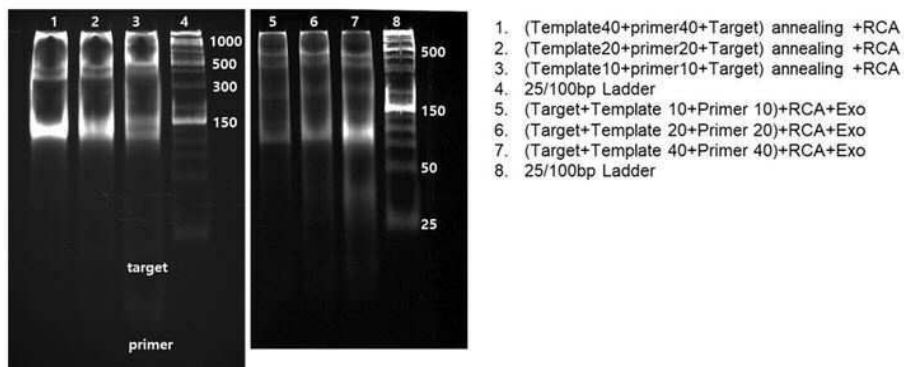
도면2



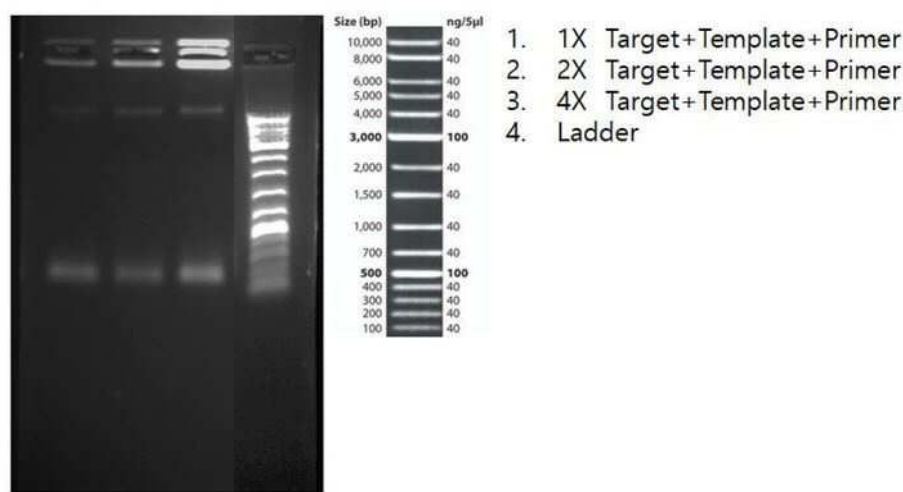
도면3



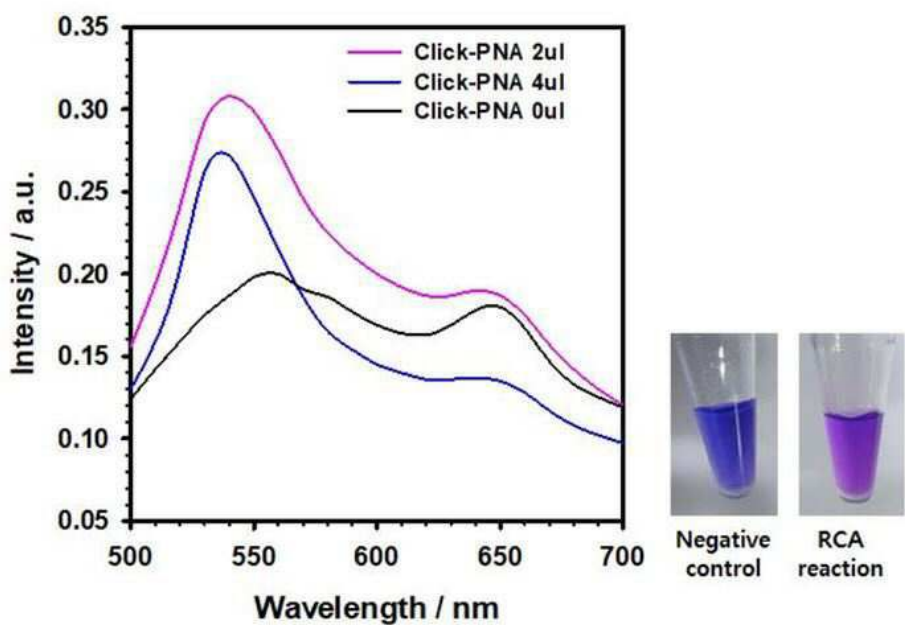
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> GENE DETECTION PLATFORM BASED ON GENE AMPLIFICATION TECHNOLOGY
- <130> P19U16C1510
- <160> 10
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 92
- <212> DNA
- <213> Influenza A virus



<400> 1  
 ttctaatact ggccatacag tcgtctttgt ggtttctact atattttgag taactgtttc 60  
 cttcttttac ttgctgtgat cataggtgtt gt 92

<210> 2  
 <211> 92  
 <212> DNA  
 <213> Hepatitis C virus

<400> 2  
 ctccgtgaag gctcgcagtg cactgtttgt ggtttctact atattttgag taactgtttc 60  
 cttctttgag gagccgagta cctggtcata gc 92

<210> 3  
 <211> 92  
 <212> DNA  
 <213> porcine epidemic diarrhea virus

<400> 3  
 tcagtctttg cgccttcttt agcaatttgt ggtttctact atattttgag taactgtttc 60  
 cttctttctt tctgacacce aaattagtgg gt 92

<210> 4  
 <211> 92  
 <212> DNA  
 <213> African swine fever virus

<400> 4  
 aggaatacca acccagtggc catattttgt ggtttctact atattttgag taactgtttc 60  
 cttctttatt acctttgctt tgaagccacg gg 92

<210> 5  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Unknown

<220><223> Target sequence for Influenza A virus  
 <220><221> gene  
 <222> (1)..(50)  
 <223> Target sequence for Influenza A virus  
 <400> 5

gacgactgta tggccagtat tagaaacaac acctatgatac acagcaagta 50

<210> 6

<211> 50

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Target sequence for Hepatitis C virus

<220><221> gene

<222> (1)..(50)

<223> Target sequence for Hepatitis C virus

<400> 6

cagtgactg cgagccttca cggaggctat gaccaggtac tcggctctc 50

<210> 7

<211> 50

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Target sequence for Porcine epidemic diarrhea virus

<220><221> gene

<222> (1)..(50)

<223> Target sequence for Porcine epidemic diarrhea virus

<400> 7

ttgctaaaga aggcgcaaag actgaaccga ctaatttggg tgtcagaaag 50

<210> 8

<211> 50

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Target sequence for African Swine Fever Virus

<220><221> gene

<222> (1)..(50)

<223> Target sequence for African Swine Fever Virus

<400> 8

atatgaccac tgggttggtat ttctctccgt ggtttcaaag caaaggtaat 50

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer sequence

<400> 9

gaaggaaaca gttactca 18

<210

> 10

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Signal probe sequence

<400> 10

gtggtttcta ctata 15