(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018 년 3 월 15 일 (15.03.2018)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2018/048205 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/009783

(22) 국제출원일: 2017 년 9 월 6 일 (06.09.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0114621 2016 년 9 월 6 일 (06.09.2016) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 **(EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).

(72) 발명자: 이혁진 **(LEE, Hyukjin)**; 04194 서울시 마포구 백범로 205, 104동 504호, Seoul (KR). 최보람 **(CHOI, Boram)**; 18132 경기도 오산시 운암로 122, 105동 1401호, Gyeonggi-do (KR). 김지수 **(KIM, Jisu)**; 63122 제주도 제주시 문송길 37-2, 101호, Jeju-do (KR). 정일영 **(JUNG, Il Young)**; 30130 세종시 나리로 38, 705동 2202호, Sejong (KR).

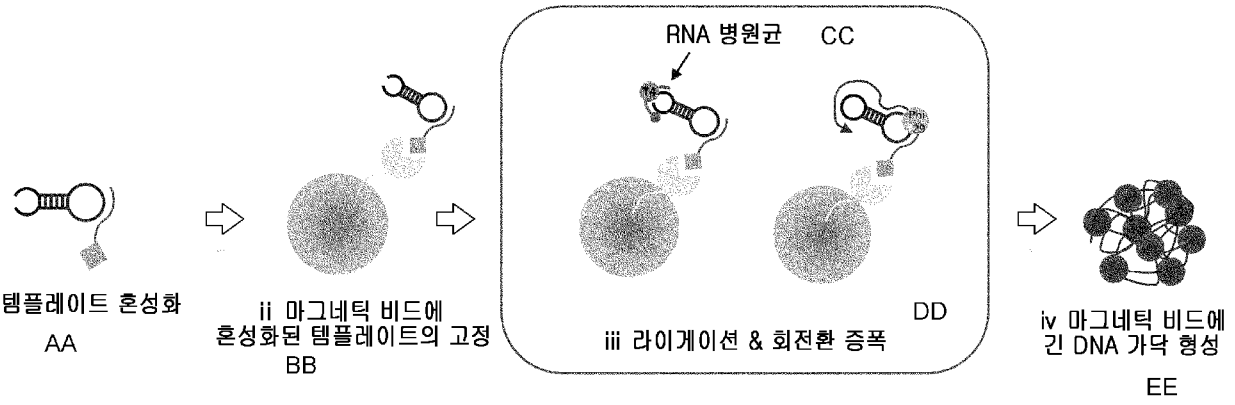
(74) 대리인: 안소영 **(AHN, So Young)**; 06632 서울시 서초구 서초대로 344, 4층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

(54) **Title:** METHOD FOR MOLECULAR DIAGNOSIS BASED ON ROLLING CIRCLE AMPLIFICATION

(54) **발명의 명칭:** 회전환 증폭 기반 분자 진단 방법



AA ... Template hybridization
BB ... Fixation of hybridized template to magnetic bead
CC ... RNA pathogen
DD ... Ligation and rolling circle amplification
EE ... Formation of long DNA strand on magnetic bead

(57) **Abstract:** The present invention relates to a bead for target gene detection based on rolling circle amplification, a method for producing same, a composition and a kit for target gene detection using same, and a method for target gene detection using same. The present invention allows rapid and simple gene detection, thereby enabling affordable and rapid diagnosis of a disease, such as a viral or bacterial infection or a cancer.

(57) **요약서:** 본 발명은 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, 이의 제조방법, 이를 이용한 표적 유전자 검출용 조성물, 키트 및 이를 이용한 표적 유전자 검출 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 빠르고 간편하게 유전자를 검출하여 바이러스, 세균성감염, 암과 같은 질환을 저렴한 가격으로 빠르게 진단할 수 있다.

WO 2018/048205 A1

[다음 쪽 계속]

FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 회전환 증폭 기반 분자 진단 방법

기술분야

[1] 본 발명은 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, 이의 제조방법, 이를 이용한 표적 유전자 검출용 조성물, 키트 및 이를 이용한 표적 유전자 검출 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 지금까지 유전자를 검출하는 기술은 PCR 방법을 기초로 하는 방법들이 주로 보고되어 왔다. PCR 공정은 변성(denaturation), 결합(annealing), 신장(elongation)으로 이루어지는 3 단계를 거치게 된다. 첫 번째 단계인 변성 단계에서는 두 가닥의 DNA가 가열되어서 분리된다. 분리된 각각의 DNA는 주형(template)으로서 역할을 하게 된다. 두 번째 단계인 결합 단계에서는 프라이머(primer)들이 주형 DNA에 결합을 하게 된다. 결합 단계에서의 온도는 반응의 정확성을 결정하는 중요한 요소인데 만약 온도를 너무 높게 하면 시발체가 주형 DNA에 너무 약하게 결합되어서 증폭된 DNA의 산물이 매우 적어진다. 또 만약 온도를 너무 낮게 하면 시발체가 비특이적으로 결합하기 때문에 원하지 않는 DNA가 증폭될 수 있다. 세 번째 단계인 신장 단계에서는 열에 강한 DNA 중합 효소가 주형 DNA에서 새로운 DNA를 만들게 된다. 일반적으로 PCR 공정의 대상이 되는 DNA나 RNA와 같은 물질(이하, '표적 물질'이라 함)은 표적 물질을 포함하는 시료에 대한 전처리를 통해 분리, 정제된다. 일반적으로 시료에 대한 전처리는 시료를 실리카 비드와 같은 포획 수단으로 흘려서 표적 물질을 포획 수단에 흡착시키고, 포획 수단으로 세척 버퍼액을 흘려서 표적 물질을 제외한 성분을 포획 수단으로부터 제거한 후, 용리 버퍼액을 포획 수단으로 흘려서 포획 수단에 흡착된 표적 물질을 분리함으로써 이루어지고 있다.

[3] 위와 같은 PCR 기반 시스템은 위 살핀 바와 같이 여러 단계의 반응이 필요하고 다양한 온도 조건 설정 및 유지가 필요하기 때문에 개발도상국 등의 제한된 리소스를 가진 환경에서 사용이 어려운 문제점이 있다. 즉, 값비싼 비용이 필요하고 잘 교육된 분석가에 의한 실험이 필요하기 때문에 PCR을 이용한 분석에는 제한 사항이 많이 있다. 또한 이를 대체하기 위해 ELISA와 같은 기술들이 사용될 수 있으나 긴 분석 과정과 제한된 항원 검출에 있어서 PCR과 유사한 단점을 가진다.

[4] 이러한 배경 하에 증진된 감도 및 산업적 적용가능성을 가진 새로운 진단 플랫폼에 대한 연구 개발이 이루어지고 있다. 예를 들어, 최근에는 회전환 증폭(Rolling circle amplification; 이하 RCA라고도 함)이 다양한 연구 분야에서 이용되고 있다. 회전환 증폭은 단일가닥 환형 DNA를 주형으로 하고, 여기에

상보적인 프라이머를 사용하여 등온에서 중합반응을 수행하여, 주형 DNA가 연속적으로 합성되도록 하는 것이다. 등온, 상온 조건에서 프로브와 annealing 후 무한 회전 증폭을 하게 되며 일차 함수 스케일로 증폭하기 때문에, 번거로운 thermal cycling 및 값비싼 장비가 필요한 PCR의 단점을 극복할 수 있다는 장점이 있다. 그런데 회전환 증폭을 비롯하여 등온 과정으로 수행되는 다양한 신규 분석 방법들은 비용 절감 및 대중이 사용할 수 있는 상업적 기기로의 개발 측면에서 여전히 많은 연구 개발이 필요한 실정이다.

[5] 더욱이, 질병에 초기 대처 및 질병의 진행, 확산을 막기 위해서는 질병을 일으키는 인자에 대한 감염 여부를 신속하고 정확하게 진단하는 것이 필요하다. 감염 후 증상이 나타나기 전에 질환을 진단할 수 있다면 질환의 진행을 효과적으로 예방하여 큰 피해를 막을 수 있다. 이에 따라, 검출 비용과 시간을 절감하면서도 간편하고 정확하게 표적 유전자를 육안으로도 확인할 수 있는 새로운 방법의 개발이 요구되고 있다.

[6] [선행기술문헌]

[7] [특허문헌]

[8] 대한민국 공개공보 제2016-0034305호

[9] [비특허문헌]

[10] 이혁진 등, Advanved Materials. Volume.27, Issue.23, 35133517 (2015. 6. 17.)

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명은 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 DNA 템플레이트;

[12] 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 상기 DNA 템플레이트에 상보적으로 혼성하는 프로브; 및

[13] 상기 표지자와 결합하는 결합제를 포함하는 비드;를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 제공한다.

[14] 본 발명은 또한 상기 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드의 제조방법을 제공한다.

[15] 본 발명은 또한 상기 표적 유전자 검출용 비드, DNA 중합효소, 반응 완충용액 및 dNTPs를 포함하는 표적 유전자 검출용 조성물을 제공한다.

[16] 본 발명은 또한 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, DNA 중합효소, 반응 완충용액 및 dNTPs를 포함하는 표적 유전자 검출용 조성물을 포함하는 표적 유전자 검출용 키트를 제공한다.

[17] 본 발명은 또한 상기 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 이용하는 표적 유전자 검출 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

[18] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, 이의 제조 방법, 이를 포함하는 조성물, 키트 및 이들을 이용한 검출 방법을 제공한다. 이하에서는 각각의 발명에 대하여 상세히 살펴본다.

[19] 본 발명에서 용어 "템플레이트"란 덤벨 형태의 한쪽 원형 부위에 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위(D), 반대쪽 원형 부위에 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위(P)를 가지며, 가운데 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위(S)를 가지는 덤벨 형태를 가지는 뉴클레오티드를 지칭한다.

[20] 본 발명에서 용어 "표적 유전자"는 공지 또는 추정 유전자 산물을 코딩하는 임의의 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 표적 유전자는 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, 헬리케이즈 등에 의해)로 만들어진 dsDNA, A-, B-, 또는 Z-DNA, 삼중-가닥 DNA, RNA, ssRNA, dsRNA, 섞인 ssRNA 및 dsRNA, ssRNA(예컨대, 융해, 변성, 헬리케이즈 등을 통해)로 만들어진 dsRNA, 메신저 RNA(mRNA), 리보솜 RNA(rRNA), 전달 RNA(tRNA), 촉매 RNA, snRNA, 마이크로RNA, 또는 단백질 핵산(PNA)일 수 있다.

[21] 본 발명에서 용어 "상보적으로 결합하는 결합 부위" 또는 "상보적인 결합 부위"는 뉴클레오티드 서열 간에 상보적 염기쌍을 형성할 수 있는 부위를 지칭한다.

[22] 본 발명에서 용어 "비드(Bead)"는 구형의 기재를 가진 물질로 나노입자, 마이크로입자, 나노비드 또는 마이크로 비드를 포함한다. 비드는 2 μm 내지 7 μm의 직경을 가질 수 있으며, 구체적으로 상기 입자 또는 비드의 직경은 4 μm 내지 5 μm이다. 비드는 수지 비드, 자기 비드, 금속 미립자 등을 포함한다.

[23] 본 발명에서 용어 "프로브"는 뉴클레오티드 서열과 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수십 개 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미한다. 표지자와 결합되어 있을 수 있으며, 어떤 서열의 프로브라도 템플레이트 내 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위에 결합 가능하다면 모두 본원 발명의 범주에 포함된다.

[24] 본 발명에서 용어 "표지자"는 프로브와 유전자 산물과의 교잡을 방해하지 않고 유전자 표지, 바람직하게 비드에 결합하기 위한 결합제와 쌍을 이루기 위해 사용할 수 있는 것이라면 한정되지 않고 당업계에 공지된 다양한 물질을 사용할 수 있다.

[25] 본 발명에서 용어 "결합제"는 유전자 산물과의 교잡을 방해하지 않고 표지자를 인지하여 결합하는 물질로 바람직하게 비드에 결합이 용이하고 표지자와 높은

결합능을 가지는 것이라면 한정되지 않고 당업계에 공지된 다양한 물질을 사용할 수 있다.

[26] 본 발명에서 용어 "회전환 증폭"이란 단일가닥 환형 DNA를 주형으로 하고, 여기에 상보적인 프로브를 사용하여 등온에서 중합반응을 수행하여, 주형 DNA가 연속적으로 합성되도록 하는 것을 지칭한다.

[27] 본 발명에서 용어 "시료"란 조직, 세포, 혈액, 혈청 또는 혈장과 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[28] 본 발명에서 용어 "검출", "탐지" 또는 "진단"이란 표적 유전자의 유무, 이에 따른 병리 상태의 존재 또는 특징에 대한 확인을 지칭한다.

[29] 본 발명은 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 DNA 템플레이트;

[30] 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 상기 DNA 템플레이트에 상보적으로 혼성하는 프로브; 및

[31] 상기 표지자와 결합하는 결합제를 포함하는 비드;를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 제공한다.

[32] 본 발명에 따른 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드는 표적 유전자 존재 시 회전환 증폭이 진행되면서 DNA hydrogel을 형성하여 hydrophilic한 성질을 통해 물 분자를 포획하여 건조되지 않는 특성을 가진다. 이러한 특성을 이용하여 예컨대 육안으로 부피 변화의 확인, DNA 가닥의 응집 확인, 염색이나 형광에 의한 색깔 변화 확인, 점도 변화 확인, 비드의 뭉침 정도 변화 확인, 비드의 침강정도 변화 확인으로 표적 유전자의 빠른 검출이 가능하다.

[33] 이러한 본 발명에 따른 표적 유전자의 빠른 검출에 대해서는 도 1에 모식도로 나타내었다. 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드는 템플레이트와 프로브의 혼성화 후 비드에 고정시켜 제조된다. 이러한 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드는 표적 유전자 존재 시 라이게이션과 동시에 회전환 증폭이 수행되면서 긴 DNA 가닥을 형성하면서 엉김으로써 hydrogel을 형성하게 된다.

[34] 본 발명에 따른 덤벨 형태의 템플레이트의 모식도는 도 2에 나타내었다. 본 발명에 따르면, 상기 템플레이트는 표적 유전자, 예컨대 동물, 식물, 바이러스, 세균, 병원균으로부터 유래되는 유전자의 길이, 유전 질환에 수반되는 돌연변이된 유전자의 길이, 프라이머의 길이 등을 고려하여 다양하게 길이와 서열을 디자인할 수 있다. 예를 들어, 상기 템플레이트의 길이는 40 내지 160 머(mer)일 수 있다. 상기 템플레이트의 길이가 너무 짧으면 템플레이트 자체가 불안정해지며 너무 길면 RCA 효율이 감소 할 수 있다.

[35] 본 발명에 따른 상기 템플레이트는 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위(D)를 포함한다. 위 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위는

템플레이트의 양 말단에 분리되어 형성된다. 예를 들어, 템플레이트는 5 내지 50 mer, 바람직하게 15 내지 25 mer 길이의 결합부위를 포함할 수 있다. 본 발명의 검출하고자 하는 표적 유전자는 동물, 식물, 세균, 바이러스, 진균 등에 존재하거나 이로부터 유래되는 것으로 바람직하게는 mRNA, dsDNA, 및 cDNA를 포함한 유전자 물질, 유전 질환에 수반되는 돌연변이된 유전자에 존재하거나 이로부터 유래되는 것일 수 있다.

[36] 상기 검출하고자 하는 표적 유전자는 예를 들어 병원균 유전자일 수 있다. 상기 표적 유전자로는 핵산 서열을 아는 모든 병원균을 대상으로 할 수 있다. 예컨대, 상기 병원균은 조류독감, 지카 바이러스, 대장균, 사스(SARS), 용혈성 요독 증후군(hemolytic uremic syndrome) 및 혈변(bloddy diarrhea)(*Escherichia* coli O157:H7), 결핵(*Mycobacterium tuberculosis*), 탄저병(*Bacillus* anthracis), 폐렴(*Streptococcus pneumonia*), 말라리아(Plasmodium), 살모넬라(Salmonella), 간염(Hepatitis A,B,C,D 및 E virus), 야토병균(*Francisella* tularensis), 페스트균(*Yersinia* pestis), 에르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia* enterocolitica), 출혈열(*Ebola* virus), 메르스 코로나 바이러스(MERS-Cov virus), 폐렴상구균, 장내구균, 포도상구균, 열대열원충, 및 결핵 또는 말라리아 박테리아와 같은 항생제 저항을 가지는 균주로 구성된 그룹으로부터 선택되는 어느 하나 일 수 있다.

[37] 본 발명에 따른 상기 템플레이트는 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위(P)를 포함한다. 위 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위는 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위 사이에 형성된다. 예를 들어, 템플레이트는 5 내지 50 mer, 바람직하게는 10 내지 25 mer 길이의 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위를 포함할 수 있다. 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위는 표적 유전자 검출을 방해하지 않고 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 프로브와 상보적으로 결합할 수 있는 것이라면 어떠한 것이라도 사용가능하다.

[38] 본 발명에 따른 상기 템플레이트는 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위(S)를 포함한다. 위 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위는 덤벨 형태 양 말단, 즉 원형 형태를 가지는 한쪽 말단의 템플레이트는 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위와 반대 쪽 말단의 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위를 포함할 수 있도록 서열 내에서 상보적 결합을 통해 덤벨 형태를 형성한다. 예를 들어, 템플레이트는 총 40 내지 160 mer 길이를 가지며, 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위(S)는 총 10 내지 80 mer 길이를 가지며, 바람직하게는 덤벨 형태를 형성하기 위한 15 내지 40 mer 길이의 상보적인 결합 부위(자기조립 결합부위)를 포함할 수 있다.

[39] 하기 표 1은 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 및 덤벨 형태를 형성하기 위한

템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 DNA 템플레이트의 서열을 예시적으로 나타낸다(굵은 글씨: 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 연한 회색 바탕: 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위, 진한 회색 바탕: 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위).

[40] [표1]

병원균 종류	서열번호	템플레이트 서열 (5' → 3')	서열번호	병원균의 표적 유전자 서열
ZIKA virus	1	5'-phosphate- **CGC CAT CTG GAC TGC** CGA CAA GAC GTG CAG CCC GTA CCT CAC TTA GCA TGC TAG TAT CGA TCC ACC TTA TTC ACG GGC TGC ACG TCT TGT CGG **GTC CAC** -3' (진한 글씨: 서열번호 9, 연한 회색 바탕: 서열번호 10 및 11, 진한 회색 바탕: 서열번호 12)	5	5'- CA GUC CAG AUG GCG GUG GAC -phosphate-3'
E.coli Ampicillin resistant	2	5'-phosphate- **AAT ACT CAT** GCT TAT GGT TCC TGC TGA GCG TTC ACC CTT AGC ATG CTA GTA TCG ACG TCT TTA TCC TCG CTC AGC AGG AAC CAT AAG **CCG GAA ATG TTG** -3' (진한 글씨: 서열번호 13, 연한 회색 바탕: 서열번호 14 및 15, 진한 회색 바탕: 서열번호 16)	6	5'- AUG AGU AUU CAA CAU UUC CG –phosphate-3'
MERS-CoV	3	5'-phosphate- **AGG GCA CAT CTC CGA** ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT **ATA CCC** -3' (진한 글씨: 서열번호 17, 연한 회색 바탕: 서열번호 18 및 19, 진한 회색 바탕: 서열번호 20)	7	5'- CGG AGA UGU GCC CUG GGU AU - phosphate-3'
Ebola	4	5'-phosphate- **GA CGC ACG CG** A ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG A GT ACT TCG ATT **AAC GAG AAA TCG CAC** -3' (진한 글씨: 서열번호 21, 연한 회색 바탕: 서열번호 22 및 23, 진한 회색 바탕: 서열번호 24)	8	5'- CGC GUG CGU CGU GCG AUU UCU CGU U - phosphate-3'

[41] 본 발명에 따른 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드는 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 상기 DNA 템플레이트에 상보적으로 혼성하는 프로브를 포함한다.

[42] 위 프로브 서열은 템플레이트의 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위에 결합하고 표적 유전자 검출에 방해가 되지 않는 서열이라면 어떠한 서열이라도 사용가능하다. 예를 들어, 본 발명의 일실시예에 따르면 서열번호 25의 서열을 사용한다.

[43] 상기 표지자 및 비드의 결합제는 한 쌍의 상이하고 상보적인 분자들로, 예를 들어 표지자로 바람직하게 비오틴을 사용할 수 있으며, 결합제, 바람직하게 비드 표면에 결합하는 결합제로 스트렙타비딘, 아비딘, 뉴트라비딘, 캡타비딘, 폴리스트렙타비딘 또는 비오틴과 결합 가능한 임의의 다른 단백질을 사용할 수 있다.

[44] 본 발명에 따른 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드는 상기 표지자와 결합하는 결합제를 포함하는 비드를 포함한다.

[45] 상기 비드는 표적 유전자 존재에 따라 회전환 증폭이 진행될 때 DNA 가닥의 엉김을 도울 수도 있다. 이에 따라 DNA hydrogel 형성을 도움으로써 육안 상 부피 변화, RCA 반응에 따른 응집 여부 또는 형광 변화 확인 등에 도움을 줄 수 있다. 상기 비드는 표지자와 결합하는 결합제가 비드 표면에 결합되어 있어 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 상기 DNA 템플레이트에 상보적으로 혼성하는 프로브를 통해 템플레이트와 혼성화된다. 상기 비드는 구형의 기재를 가진 물질로 나노입자, 마이크로입자, 나노비드 또는 마이크로 비드를 포함하며, 바람직하게 자기 비드(magnetic bead)이다.

[46] 본 발명은 또한 상기 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드의 제조방법을 제공한다.

[47] 구체적으로, (a) 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 DNA 템플레이트를 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 상기 DNA 템플레이트에 상보적으로 혼성하는 프로브와 혼성화하는 단계;

[48] (b) 상기 (a) 단계에서 프로브와 혼성화된 템플레이트를 표지자와 결합하는 결합제를 포함하는 비드에 고정화하는 단계를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드의 제조방법을 제공한다.

[49] 상기 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, DNA 중합효소, 반응 완충용액 및 데옥시뉴클레오티드(dNTPs)를 포함하는 표적 유전자 검출용 조성물을 제공한다.

[50] 본 발명에 따른 상기 DNA 중합효소는 대장균 DNA 중합효소 I, 클레나우 단편, phi29 DNA 중합효소, vent DNA 중합효소, T4, T7 DNA 중합효소, Taq 중합효소 및 Splint R 중합효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[51] 본 발명에 따른, 상기 완충용액(버퍼)은 NEB(New England Biolab) 완충용액 계열, 예를 들면 NEB 완충용액 4, Bst DNA 폴중합효소 완충용액, T4 DNA 리가아제 완충용액, T7 DNA 리가아제 완충용액, Splint R 리가아제 완충용액 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[52] 본 발명에 따른 표적 유전자 검출용 조성물은 증폭된 유전자 산물의 육안 식별을 돕기 위하여 염색시약, 형광 시약을 더 포함할 수 있으며, 예를 들어 겔 레드(Gel-red), 트리판 블루 다이(trypane blue dye), 에반스 블루 다이(Evans Blue

dye), 헤마톡실린-에오신 염색(hematoxylin-eosin stain), 크리스탈 바이올릿(crystal violet) 또는 메틸렌 블루(methylene blue)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[53] 본 발명은 또한 상기 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, DNA 중합효소, 반응 완충용액 및 dNTPs를 포함하는 표적 유전자 검출용 조성물을 포함하는 표적 유전자 검출용 키트를 제공한다.

[54] 본 발명에 따른 표적 유전자 검출용 키트는 비드가 표적 유전자 존재 시 회전환 증폭이 진행되면서 DNA hydrogel을 형성하여 hydrophilic한 성질을 통해 물 분자를 포획하여 건조되지 않는 특성을 가진다. 이러한 특성을 이용하여 예컨대 육안으로 부피 변화의 확인, DNA 가닥의 응집 확인, 염색이나 형광에 의한 색깔 변화 확인, 점도 변화 확인, 비드의 뭉침 정도 변화 확인, 비드의 침강 정도 변화 확인으로 표적 유전자의 빠른 검출이 가능하다.

[55] 본 발명에 따른 표적 유전자 검출용 키트는 회전환 증폭 수행을 위해 필요한 필수적 요소들을 포함하는 키트일 수 있다.

[56] 바람직하게 본 발명에 따른 표적 유전자 검출용 키트는 상기 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 모세관 튜브에 모세관 현상을 이용하여 패킹함으로써 모세관 튜브 내에서 이용할 수 있다. 보다 구체적으로, 제조된 검출용 비드는 모세관 현상을 이용해 모세관 튜브 안에 패킹하고 모세관에서 검출용 비드가 빠져나오지 않도록 모세관의 하부를 막은 후 모세관 내에서 회전환 증폭 반응을 통해 검출을 수행할 수 있다.

[57] 이러한 본원 발명에 따른 모세관 튜브를 이용한 키트에서의 검출 반응에 대해서는 도 3에 모식도로 기재하였다.

[58] 즉 모세관 내에서 회전환 증폭이 진행되면 표적 유전자 존재 시 hydrophilic한 DNA hydrogel이 형성되어 물 분자를 포획하여 건조되지 않는 특성을 가짐으로써 부피가 줄어들지 않고 유지되는 현상을 나타낸다. 이에 따라 육안으로 부피 변화의 확인, DNA 가닥의 응집 확인, 염색이나 형광에 의한 색깔 변화 확인, 점도 변화 확인, 비드의 뭉침 정도 변화 확인, 비드의 침강 정도 변화 확인 등으로 표적 유전자의 검출이 가능하다. 이를 위해 이러한 키트는 표적 유전자의 유무를 보다 더 확실히 확인하기 위하여 염색 시약 또는 형광 시약을 추가로 더 포함할 수도 있다.

[59] 본 발명은 또한 상기 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 이용하는 표적 유전자 검출 방법을 제공한다.

[60] 구체적으로, (a) 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 DNA 템플레이트; 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 상기 DNA 템플레이트에 상보적으로 혼성하는 프로브; 및 상기 표지자와 결합하는 결합제를 포함하는 비드;를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자

검출용 비드, DNA 중합효소, 반응 완충용액 및 데옥시뉴클레오티드(dNTPs)를 포함하는 표적 유전자 검출용 조성물과 시료를 반응시키는 단계; 및

[61] (b) 상기 시료와의 반응에 따라 회전환 증폭을 수행하여 유전자 증폭을 확인하는 단계;를 포함하는 표적 유전자 검출 방법을 제공한다.

[62] 상기 (a) 단계의 반응은 모세관 튜브에서 수행될 수 있으며, 이에 따라 상기 (b) 단계에서 육안으로 부피 변화의 확인, DNA 가닥의 응집 확인, 염색이나 형광에 의한 색깔 변화 확인, 점도 변화 확인, 비드의 뭉침 정도 변화 확인, 비드의 침강 정도 변화 확인 등을 통해 표적 유전자 유무를 확인할 수 있다.

[63] 위 표적 유전자 검출 방법은 온도 변화를 위한 장치 등이 없어도 항온 상태에서 반응을 통해 빠르고간편하게 표적 유전자를 검출할 수 있다.

발명의 효과

[64] 본 발명의 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드는 빠르고간편하게유전자를검출하여바이러스,세균성감염,암과 같은 질환을 저렴한 가격으로 진단할 수 있게 하는 장점을 가진다.

도면의 간단한 설명

[65] 도 1은 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드가 표적 유전자 존재 시 비드에서 긴 DNA 가닥을 형성하는 과정의 모식도를 나타낸다.

[66] 도 2는 본 발명에 따른 덤벨 형태의 템플레이트의 모식도를 나타낸다.

[67] 도 3은 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 포함하는 모세관 튜브를 이용한 표적 유전자 검출의 모식도를 나타낸다.

[68] 도 4는 본 발명에 따른 표적 유전자 회전환 증폭 기반 분자 진단 방법의 분석을 위한 템플레이트 제조, 비드의 제조, 회전환 증폭 반응을 위한 용액의 제조, 패킹 및 진단 방법의 전체 모식도를 나타낸다.

[69] 도 5는 비오틴화된 프로브와 템플레이트 간 혼성화의 모식도를 나타낸다.

[70] 도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 암피실린 저항성을 가진 E.Coli 유전자에 대하여 결합 가능한 템플레이트와 비오틴화된 프로브의 혼성화를 전기영동을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

[71] 도 7은 비드 표면에서 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트의 고정화를 통한 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드의 제조 과정의 모식도를 나타낸다.

[72] 도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 암피실린 저항성을 가진 E.Coli 병원균에 대하여 결합 가능한 템플레이트와 비오틴화된 프로브가 비드에 고정되었음을 보여주는 전기영동 결과를 나타낸다.

[73] 도 9는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드가 표적 유전자 존재 시 라이게이션 및 증폭을 통해 긴 DNA 가닥을 형성하는 것을 나타낸다.

[74] 도 10은 본 발명의 일실시예에 따른 암피실린 저항성을 가진 E.Coli 유전자에 대하여 결합 가능한 템플레이트를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 이용하여 암피실린 저항성을 가진 E.Coli를 검출한 결과를 나타낸다.

[75] 도 11은 본 발명의 일실시예에 따른 지카 바이러스에 대하여 결합 가능한 템플레이트를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 이용하여 지카 바이러스를 검출한 결과를 나타낸다.

[76] 도 12는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 모세관 현상을 통해 모세관에 패킹하고 이를 육안으로 관찰하는 모식도를 나타낸다.

[77] 도 13은 본 발명의 일실시예에 따른 암피실린 저항성을 가진 E.Coli 유전자에 대하여 결합 가능한 템플레이트를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드가 패킹된 모세관을 이용하여 암피실린 저항성을 가진 E.Coli의 존재 유무를 육안으로 확인한 결과를 나타낸다.

[78] 도 14는 표적 유전자 검출용 비드가 패킹된 모세관에서 회전환 증폭을 통해 긴 가닥의 DNA 산물(long tandem RCA product)를 형성하고 이렇게 생성된 DNA 산물은 물리적 얽힘(physical entanglement)에 의해 서로 엉기는데, 이에 따라 해당 모세관을 뒤집으면 중력에 의해 비드를 포함한 증폭 혼합물이 떨어지는 정도가 다르게 되고 증폭이 일어나면 엉김에 의해 증폭 혼합물이 흐르지 않게 되어 육안으로 증폭 여부를 확인 할 수 있음을 보여주는 모식도이다.

[79] 도 15는 본 발명의 일실시예에 따른 암피실린 저항성을 가진 E. Coli 유전자에 대하여 결합 가능한 템플레이트를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드가 패킹된 모세관을 이용하여 해당 유전자의 존재 유무를 형광을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[80] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 도면을 참조하여 실시예에 대해 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니며 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 또한, 도면들에 있어서, 구성요소의 폭, 길이, 두께 등은 편의를 위하여 과장되어 표현될 수도 있다.

[81] 본 발명에 따른 표적 유전자 검출을 위한 i) 템플레이트 혼성화, ii) 비드 표면에 템플레이트의 혼성화를 통한 고정, iii) 마그네틱 비드 용액 및 RCA 반응을 위한 용액 혼합, iv) 모세관 튜브로의 패킹 및 v) 검출의 전반적 모식도는 도 4에 나타내었으며, 이하 이에 대해 상세히 살펴본다.

[82] **<실시예 1> 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트(Template)의 제조**

[83] **(1) 지카 바이러스 템플레이트 제조 및 혼성화**

[84] 지카바이러스 유전자 서열을 바탕으로 지카 바이러스에 특이적인 템플레이트(Template_Zika virus), 즉, 지카 바이러스에 특이적으로 결합하는 템플레이트(Template_Zika virus, 서열번호 1)를 제조하였다 (표 1 참조). Template_Zika virus는 표적 유전자(지카 바이러스의 병원균 유전자)와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 즉 병원균의 상보적 부위(Pathogen complementary site, 서열번호 9, 20 mer, 진한 글씨), 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위, 즉, 템플레이트 내 상보적인 영역(서열번호 10 및 서열번호 11, 21 mer X 2 = 총 42 mer, 연한 회색 바탕), 및 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위(서열번호 12, 17 mer, 진한 회색 바탕)으로 구성된다.

[85] 200 ul 튜브 안에 10 uM 비오틴화 프로브 [서열번호 25(5'-Biotin-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AGG GAC GTC GAT ACT AGC ATG CTA-3'), Bioneer] 2 ul, 10X PBS 0.7 ul 및 상기 제조된 4 uM Zika annealed template(Template_Zika virus) 5 ul (mBiotech)를 각각 첨가하여 총 7.7 ul 혼합용액을 제조하였다. 제조된 7.7 ul 혼합용액을 3분간 빠르게 냉각하고, 안정하게 혼성화된 템플레이트를 얻었다.

[86] **(2) E.coli 템플레이트 제조 및 혼성화**

[87] 암피실린(Ampicillin) 저항성을 가진 E.Coli 유전자 서열을 바탕으로 암피실린 저항성을 가진 E.Coli에 특이적인 템플레이트(Template_Ampicillin resistant E.coli), 즉, 암피실린 저항성을 가진 E.Coli에 특이적으로 결합하는 템플레이트(Template_Ampicillin resistant E.coli, 서열번호 2)를 제조하였다. Template_Ampicillin resistant E.coli는 다음과 같이 표적 유전자(E.coli의 병원균 유전자)와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 즉 병원균의 상보적 부위(Pathogen complementary site, 서열번호 13, 23 mer, 굵은 글씨), 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위, 즉, 템플레이트 내 상보적인 영역(서열번호 14 및 서열번호 15, 총 47 mer, 연한 회색 바탕), 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위(서열번호 16, 17 mer, 진한 회색 바탕)으로 구성된다.

[88] 200 ul 튜브 안에 10 uM 비오틴화 프로브 [서열번호 25(5'-Biotin-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AGG GAC GTC GAT ACT AGC ATG CTA-3'), Bioneer] 2 ul, 10X PBS 0.7 ul 및 상기 제조된 4 uM E.coli annealed template(Template_Ampicillin resistant E.coli) 5 ul (mBiotech)를 각각 첨가하여 총 7.7 ul 혼합용액을 제조하였다. 제조된 7.7 ul 혼합용액을 3분간 빠르게 냉각하고, 안정하게 혼성화된 템플레이트를 얻었다.

[89] **(3) 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트(Template)의 제조**

[90] 표지자가 결합된(예를 들어 비오틴) 프로브와 혼성화된 템플레이트(Template)의 제조 과정의 모식도는 도 5에 나타내었다. 앞서 언급된 바와 같이, 제조된 템플레이트와 표지자가 결합된(예를 들어 비오틴) 프로브가

튜브 내에서 혼합되었을 때 템플레이트의 프라이머 상보적 결합 부위와 표지자가 결합된 프로브 서열이 혼성화된다.

[91] 위와 같은 비오틴화된 프로브와 템플레이트의 혼성화를 전기영동을 통해서 확인하였다. DNA Ladder(Quick-Load® LMW Ladder/Biolabs, Ladd)를 기준으로 하여 상기 (2)에서 제조된 템플레이트(Template_Ampicillin resistant E.coli, Temp), 비오틴화된 프로브(Prim), 또는 템플레이트 및 비오틴화된 프로브의 혼합물(Hybri)을 각각 0.8 pmole 씩 로딩하여 전기영동한 결과를 도 6에 나타내었다.

[92] 도 6에서 확인되는 바와 같이, 템플레이트(Template)와 비오틴화된 프로브의 혼성화가 확인되었다.

[93] <실시예 2> 비드 표면에서 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트의 고정화를 통한 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드의 제조

[94] **(1) 비드 표면에서 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트의 고정화**

[95] 상기 실시예 1에서 제조된 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트를 마그네틱 비드에 고정하여, 마그네틱 비드 상에 템플레이트를 고정화하였다. 위 고정화 단계의 모식도는 도 7에 나타내었다. 도 7에 나타낸 바와 같이, 결합제(예를 들어 스트렙타비딘) 비드는 Vortexing 후 원심분리를 하여 상등액을 버리고, 상기 실시예 1에서 제조된 프로브와 혼성화된 템플레이트를 혼합하여 15 분 정도 상온에서 유지함으로써 비드 상에 템플레이트를 고정화한다.

[96] 구체적으로, 200 ul 튜브 안에 마그네틱 비드 현탁액 (Takara) 5 ul 넣고, 1X PBS 5 ul로 세척해주고 세척한 마그네틱 비드 현탁액을 원심분리한 후, 상등액을 취하여 제거하였으며, 이 과정을 3회 반복하였다. 그리고 나서, 혼성화된 템플레이트 용액 7.7 ul를 첨가하였고(상기 실시예 1의 (1), 1의 (2)를 별도로 각각 제조함), 상온에서 15분 동안 배양해준 후, 마지막으로 두 번 이상 1X PBS로 세척해줌으로써, 마그네틱 비드 상에 템플레이트를 고정화함으로써 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드를 제조하였다.

[97] **(2) 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드의 제조 확인**

[98] 상기 (1)에서 제조된 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드의 고정화를 전기영동을 통해서 확인하였다. DNA Ladder(Quick-Load® LMW Ladder/Biolabs, Ladd, 1 lane)를 기준으로 하여, 비오틴화된 프로브(2 lane), 템플레이트(3 lane), 상기 실시예 1의 (2)에서 제조된 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트(4 lane) 및 상기 실시예 2의 (1)에서 비드 표면에 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트(Template_Ampicillin resistant E.coli)가 고정된 마이크로 비드(5 lane)을 각각 0.8 pmole 씩 로딩하여 전기영동한 결과를 도 8에 나타내었다.

[99] 도 8에서 확인되는 바와 같이, 비드 표면에서 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트의 고정화에 의해 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트의 밴드가 사라지는 것이 확인되었다. 이로부터 회전환 증폭 기반 표적 유전자

검출용 비드가 제조되었음이 확인되었다.

[100] **<실시예 3> 비드 표면에서 표적 유전자의 증폭 확인**

[101] 상기 실시예 2에서 제조된 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드를 이용하여 표적 유전자를 검출하였다. 위 검출 단계의 모식도는 도 9에 나타내었다. 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드를 표적 유전자와 상보적 결합함으로써 효소인 T4 리가아제에 의해 닫힌 형태(closed form) 아령 모양의 템플레이트가 형성되는 동시에 Phi 29 중합효소에 의해 회전환 증폭이 발생함으로써 긴 가닥의 DNA strands 증폭 산물이 형성된다.

[102] 상기와 같은 검출을 위하여 구체적으로 10 uM E.coli RNA 병원균 1 ul (서열번호 6, Bioneer), 10X T4 리가아제 반응 완충용액 (Biolabs) 1 ul, 10X phi 29 중합효소 반응 버퍼 (Biolabs) 1 ul, 2.5 mM dNTP 0.5 ul (Epicentre), T4 리가아제 2.5 ul (Biolabs), phi 29 중합효소 (10 unit/ul) 2.5 ul (Biolabs), 피로포스파타아제(pyrophosphatase) 0.5 ul (Biolabs), 100 mM DTT 0.4 ul (Epicentre) 및 DEPC 0.6 ul가 혼합된 총 10 ul 올인원(all in one) 혼합 용액을 제조하였다. 상기 혼합 용액을 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드가 들어 있는 튜브 안에 첨가하였다. 그리고 나서, 25 ℃에서 15 분 동안 라이게이션과 RCA(Rolling circle amplification) 반응을 동시에 진행시켰다.

[103] 또한, 10 uM 지카 바이러스 RNA 병원균 1 ul (서열번호 5, Bioneer)에 대해서도 위와 동일하게 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드를 이용하여 라이게이션과 RCA(Rolling circle amplification) 반응을 동시에 진행시켰다.

[104] 위에서 수행된 RCA 반응에 따른 긴 DNA 가닥 형성을 전기영동을 통해서 확인하였다. DNA Ladder(Quick-Load® LMW Ladder/Biolabs, Ladd)를 기준으로 하여, 시료를 0.8 pmole 씩 로딩하여 전기영동을 수행하였다.

[105] 그 결과를 도 10 및 도 11에 나타내었다.

[106] 도 10은 암피실린 저항성 E.coli에 대한 검출 결과를 나타낸다. 도 10에서 확인되는 바와 같이, 증폭을 통한 긴 DNA 가닥 형성 및 엉킴에 의해 gel well에 반응물이 걸림으로써 표적 유전자가 검출되는 것이 확인(SP)되었고, 시간 경과에 따라 생성된 산물이 커짐이 확인되었다. 또한, 비표적 템플레이트가 고정된 비드(NC)에서는 표적 유전자가 존재해도 증폭이 이루어지지 않음이 확인되어, 본원발명의 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드를 이용하여 표적 유전자의 검출이 이루어짐이 확인되었다.

[107] 이러한 결과는 도 11에 나타낸 바와 같이, 지카 바이러스 검출에서도 동일하게 확인되었다. 도 11에서 확인되는 바와 같이, 지카 바이러스 존재에 따라 증폭을 통한 긴 DNA 가닥 형성 및 엉킴에 의해 gel well에 반응물이 걸림으로써 표적 유전자가 검출되는 것이 확인되었다.

[108] **<실시예 4> 모세관 튜브에 마그네틱 비드 패킹 및 이를 이용한 표적 유전자의 육안 상 검출 확인**

[109] 상기 실시예 3에서 튜브 내 혼합 용액과 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용

비드(암피실린 저항성 E.coli 검출용)의 혼합물을 모세관 현상을 이용하여 모세관 튜브 상에 패킹하였으며, 25 ℃에서 15 분 동안 라이게이션과 RCA(Rolling circle amplification) 반응을 동시에 진행시킨 후, 모세관 튜브를 거꾸로 뒤집어 주었다. 그리고 나서, 대조군과 샘플군에 있는 자성 비드들의 응집에 따라 표적 유전자의 검출을 육안으로 확인하였다. 참고를 위하여, 위 과정에 대한 모식도는 도 12에 나타내었다.

[110] 위 제조된 마그네틱 비드 용액이 패킹된 모세관 튜브를 이용하여 육안 상으로 표적 유전자의 유무를 확인하였으며, 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[111] 도 13은 암피실린 저항성 E.coli에 대한 검출 결과를 나타낸다. 도 13에서 확인되는 바와 같이, 회전환 증폭에 의해 형성된 hydrophilic한 긴 가닥 DNA 가닥들이 물 분자를 포획하여 건조되지 않으며 부피가 유지(SP)되는 반면, 회전환 증폭이 진행 되지 않으면 긴 가닥 DNA 가닥들이 형성되지 않아 쉽게 건조되어 부피가 감소(NC)하는 것이 확인되었다. 즉, 부피 변화를 육안 상으로 확인함으로써 표적 유전자를 검출하였다.

[112] 또한 위와 유사한 방법으로 도 14 및 도 15에서와 같이 DNA 가닥의 엉김을 통한 응집 및 형광 변화를 확인함으로써 표적 유전자를 검출하였다.

[113] 도 14는 표적 유전자 검출용 비드가 패킹된 모세관에서 회전환 증폭을 통해 긴 가닥의 DNA 산물 (long tandem RCA product)를 형성하고 이렇게 생성된 DNA 산물은 물리적 얽힘(physical entanglement)에 의해 서로 엉기는데, 이에 따라 해당 모세관을 뒤집으면 중력에 의해 비드를 포함한 증폭 혼합물이 떨어지는 정도가 다르게 되고 증폭이 일어나면 엉김에 의해 증폭 혼합물이 흐르지 않게 되어 육안으로 증폭 여부를 확인 할 수 있음을 모식도로 기재하였다.

[114] 도 15는 본 발명의 일실시예에 따른 암피실린 저항성을 가진 E.Coli 유전자에 대하여 결합 가능한 템플레이트를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드가 패킹된 모세관에서 해당 유전자의 존재 유무를 형광을 통해 확인한 결과이다. 병원균 유전자 존재 하에 회전환 증폭이 일어난 결과 긴 가닥의 DNA가 생성되고, 이의 존재를 SYBR dye (예컨대, SYBR gold)를 이용하여 형광으로 확인하였다(SP-샘플(Sample), NC-대조군(Negative control)).

청구범위

[청구항 1] 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 DNA 템플레이트;
비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 프로브로 상기 템플레이트에 상보적으로 혼성하는 프로브; 및
상기 표지자와 결합하는 결합제를 포함하는 비드;를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위는 5 내지 50 mer 길이를 가지는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 표적 유전자는 동물, 식물, 세균, 바이러스 및 진균으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 어느 하나에 존재하거나 이로부터 유래된 것인 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위는 5 내지 50 mer 길이를 가지는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위는 총 10 내지 80 mer 길이를 가지는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 비드의 결합제에 결합되는 표지자는 비오틴인 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드.

[청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 표지자와 결합하는 결합제는 스트렙타비딘, 아비딘, 뉴트라비딘, 캡타비딘 및 폴리스트렙타비딘으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 어느 하나인 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드.

[청구항 8] (a) 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 DNA 템플레이트를 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 프로브와 혼성화하는 단계;
(b) 상기 (a) 단계에서 프로브와 혼성화된 템플레이트를 표지자와 결합하는 결합제를 포함하는 비드에 고정화하는 단계를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드의 제조방법.

[청구항 9] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 회전환 증폭(Rolling Circle

Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, DNA 중합효소, 반응 완충용액 및 데옥시뉴클레오티드(dNTPs)를 포함하는 표적 유전자 검출용 조성물.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 DNA 중합효소는 phi29 DNA 중합효소인 표적 유전자 검출용 조성물.

[청구항 11] 제9항에 따른 표적 유전자 검출용 조성물을 포함하는 표적 유전자 검출용 키트.

[청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 표적 유전자 검출용 키트는 모세관 튜브 형태를 가지는 것인 표적 유전자 검출용 키트.

[청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 표적 유전자 검출용 키트는 상기 모세관 튜브에 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, DNA 중합효소, 반응 완충용액 및 데옥시뉴클레오티드(dNTPs)가 포함되는 것인 표적 유전자 검출용 키트.

[청구항 14] (a) 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 DNA 템플레이트; 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 상기 DNA 템플레이트에 상보적으로 혼성하는 프로브; 및 상기 표지자와 결합하는 결합제를 포함하는 비드;를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, DNA 중합효소, 반응 완충용액 및 데옥시뉴클레오티드(dNTPs)를 포함하는 표적 유전자 검출용 조성물과 시료를 반응시키는 단계; 및

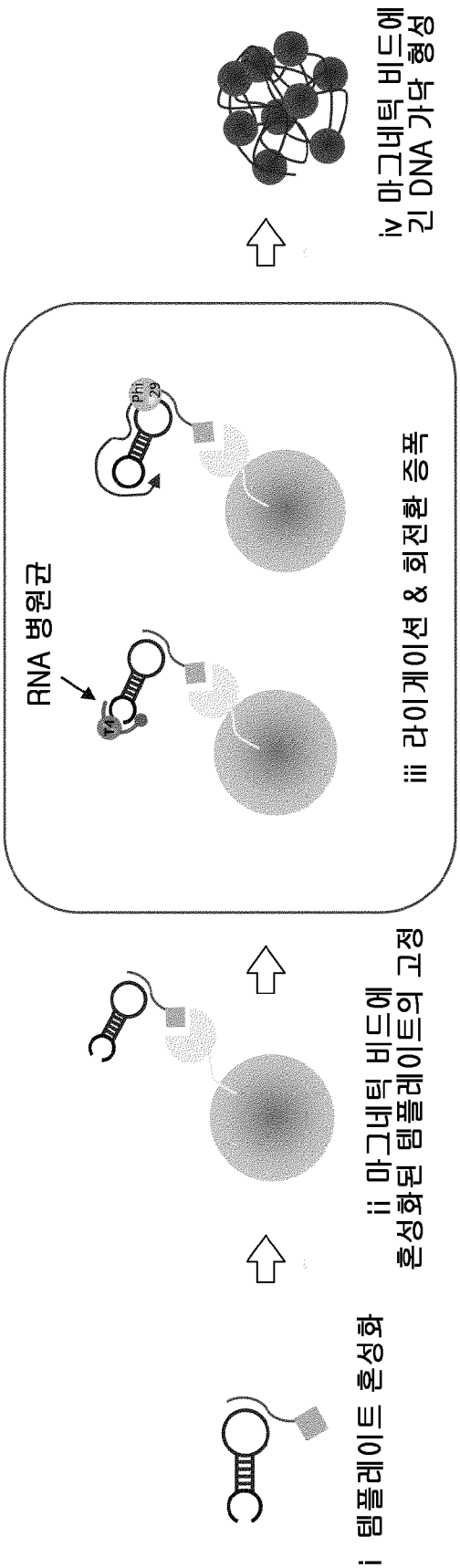
(b) 상기 시료와의 반응에 따라 회전환 증폭을 수행하여 유전자 증폭을 확인하는 단계;를 포함하는 표적 유전자 검출 방법.

[청구항 15] 제14항에 있어서, 상기 (b) 단계의 유전자 증폭을 확인하는 단계는 육안으로 수행되는 것인 표적 유전자 검출 방법.

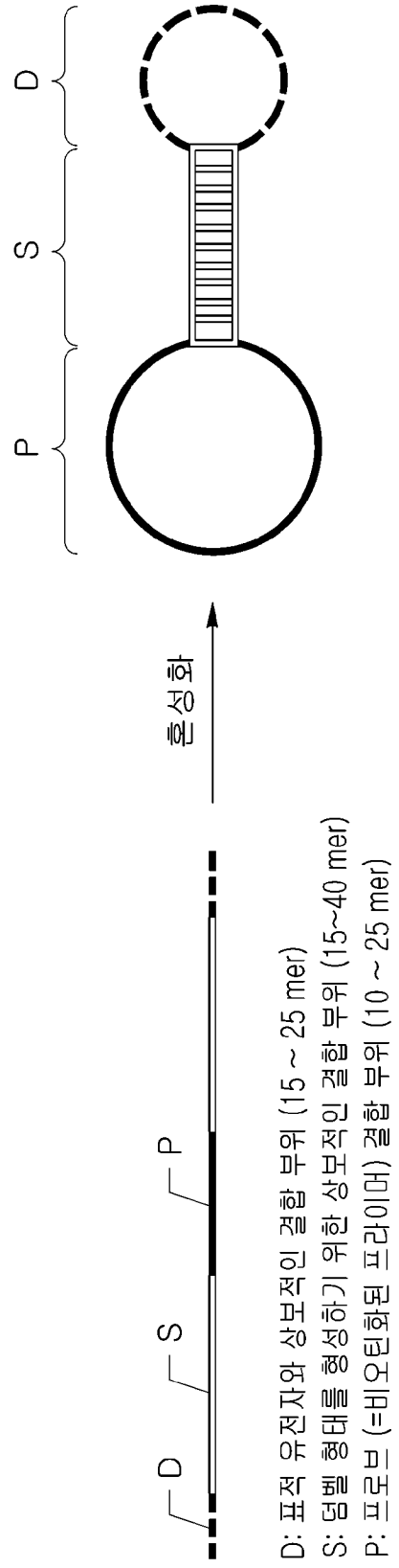
[청구항 16] 제14항에 있어서, 상기 (a) 단계의 표적 유전자 검출용 조성물과 시료를 반응시키는 단계는 모세관 튜브에서 수행되는 것인 표적 유전자 검출 방법.

[청구항 17] 제14항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 회전환 증폭을 수행하여 유전자 증폭을 확인하는 단계는 시료의 부피 변화, 점도 변화, 비드의 뭉침 정도 변화 및 비드의 침강 정도 변화로부터 선택되는 어느 하나 이상의 확인을 통해 표적 유전자의 존재 유무를 판단하는 것인 표적 유전자 검출 방법.

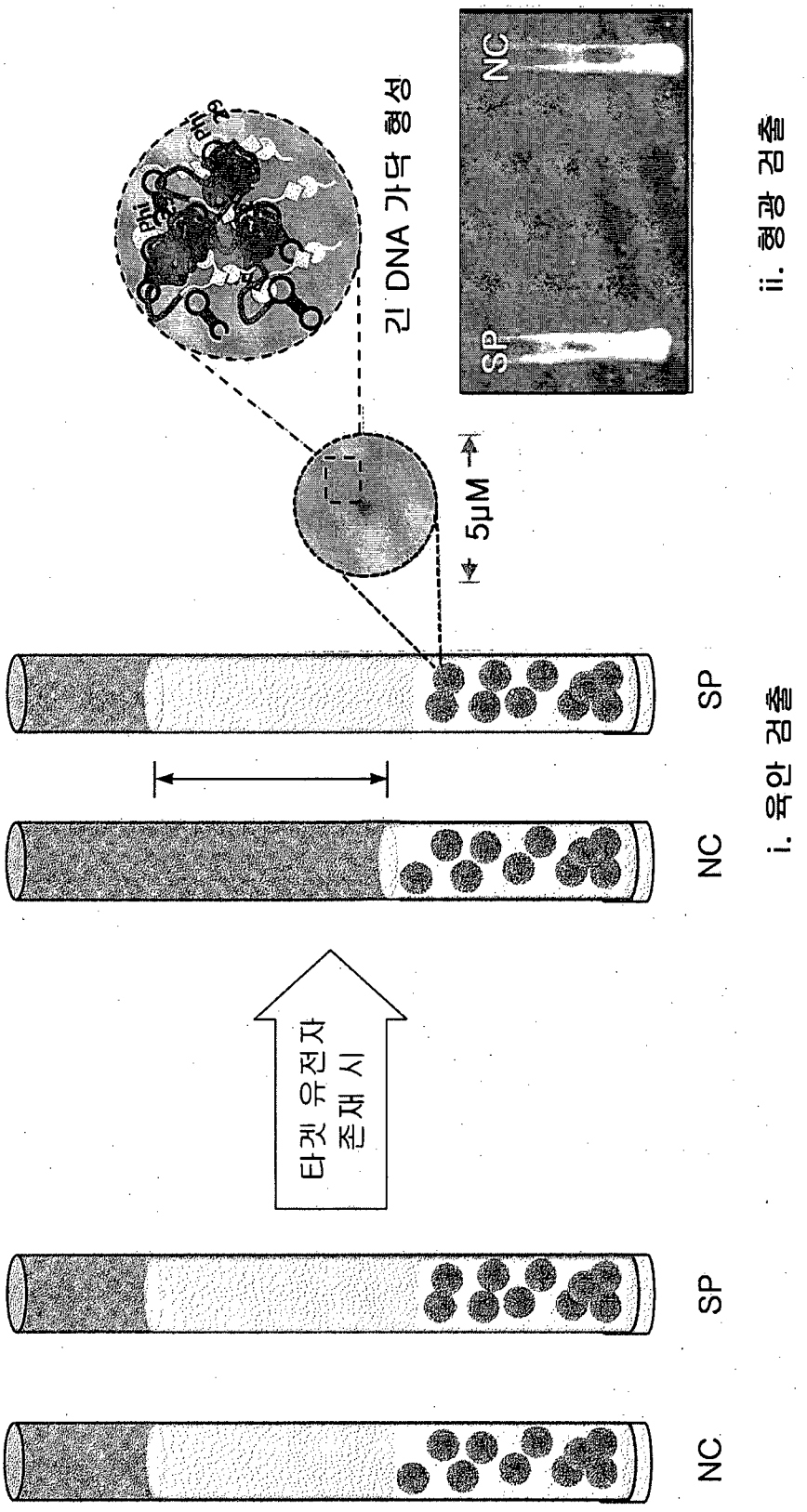
[도1]


i 템플레이트 혼성화
ii 마그네틱 비드에
혼성화된 템플레이트의 고정
iii 라이게이션 & 회전환 증폭
RNA 병원균
phi 29
iv 마그네틱 비드에
긴 DNA 가닥 형성

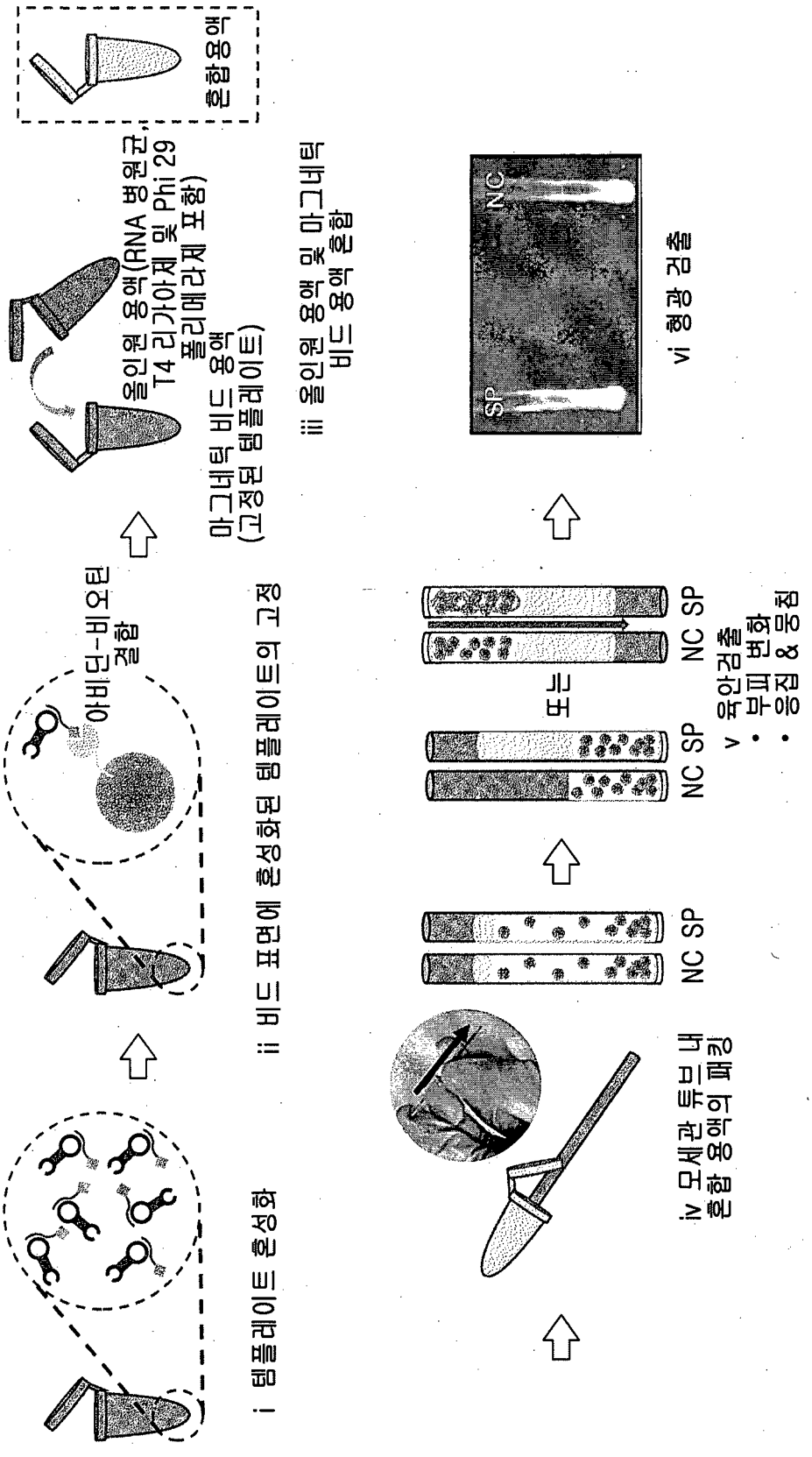
[도2]


D
S
P
혼성화
D
S
P
D: 표적 유전자와 상보적인 결합 부위 (15 ~ 25 mer)
S: 덤벨 형태를 형성하기 위한 상보적인 결합 부위 (15~40 mer)
P: 프로브 (=비오틴화된 프라이머) 결합 부위 (10 ~ 25 mer)

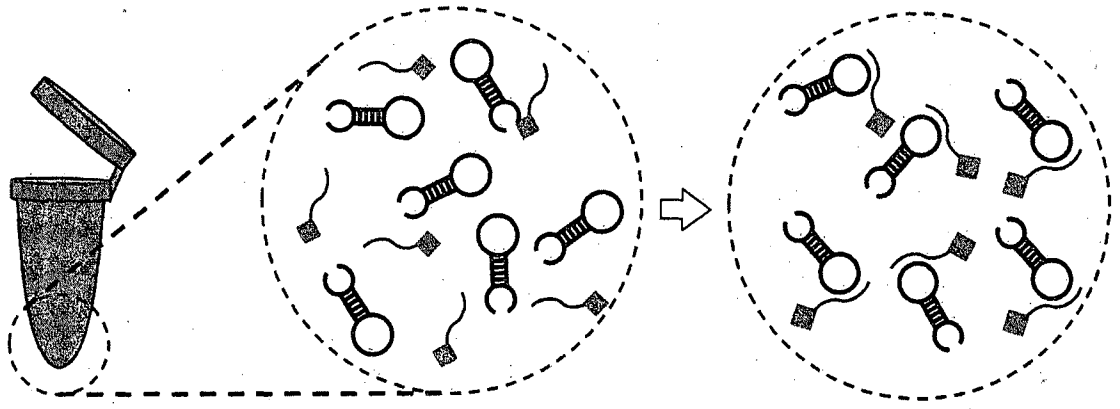
[도3]



[도4]

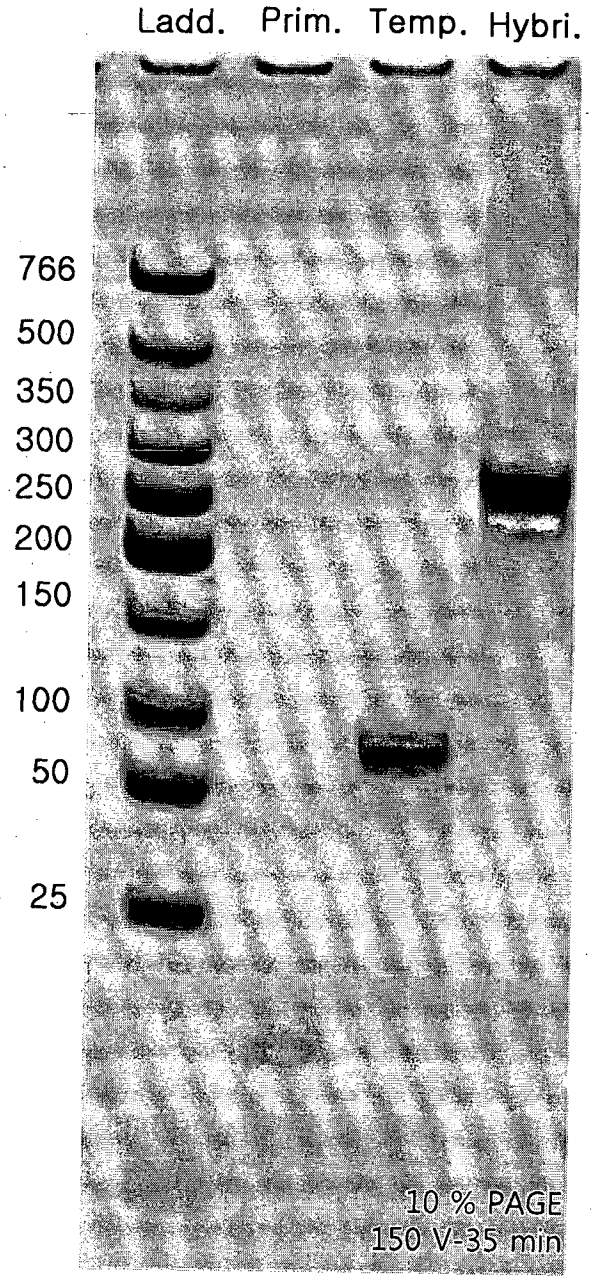

i 템플레이트 흡성화
ii 비드 표면에 흡성화된 템플레이트의 고정
아비딘-비오틴 결합
마그네틱 비드 용액 (고정된 템플레이트)
올인원 용액(RNA 변원균, T4 리가아제 및 Phi 29 폴리메라제 포함)
혼합용액
iii 올인원 용액 및 마그네틱 비드용액 혼합
iv 모세관 튜브 내 혼합 용액의 퍼짐
NC SP
또는
NC SP
v 육안검출 • 무피변화 • 응집&몽침
NC SP
vi 형광 검출

[도5]

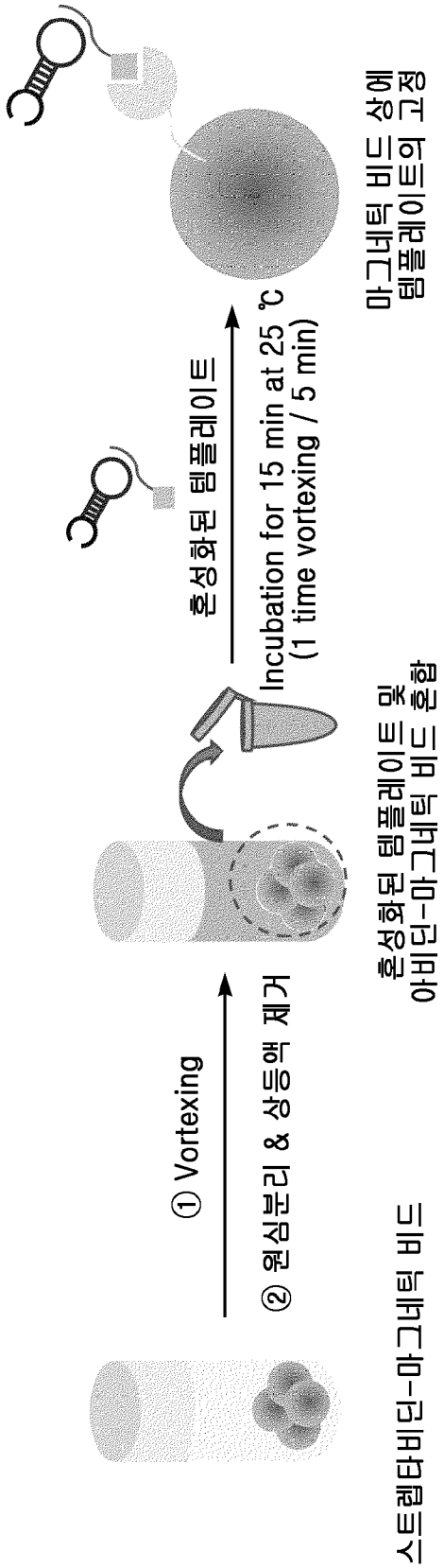


템플레이트 혼성화

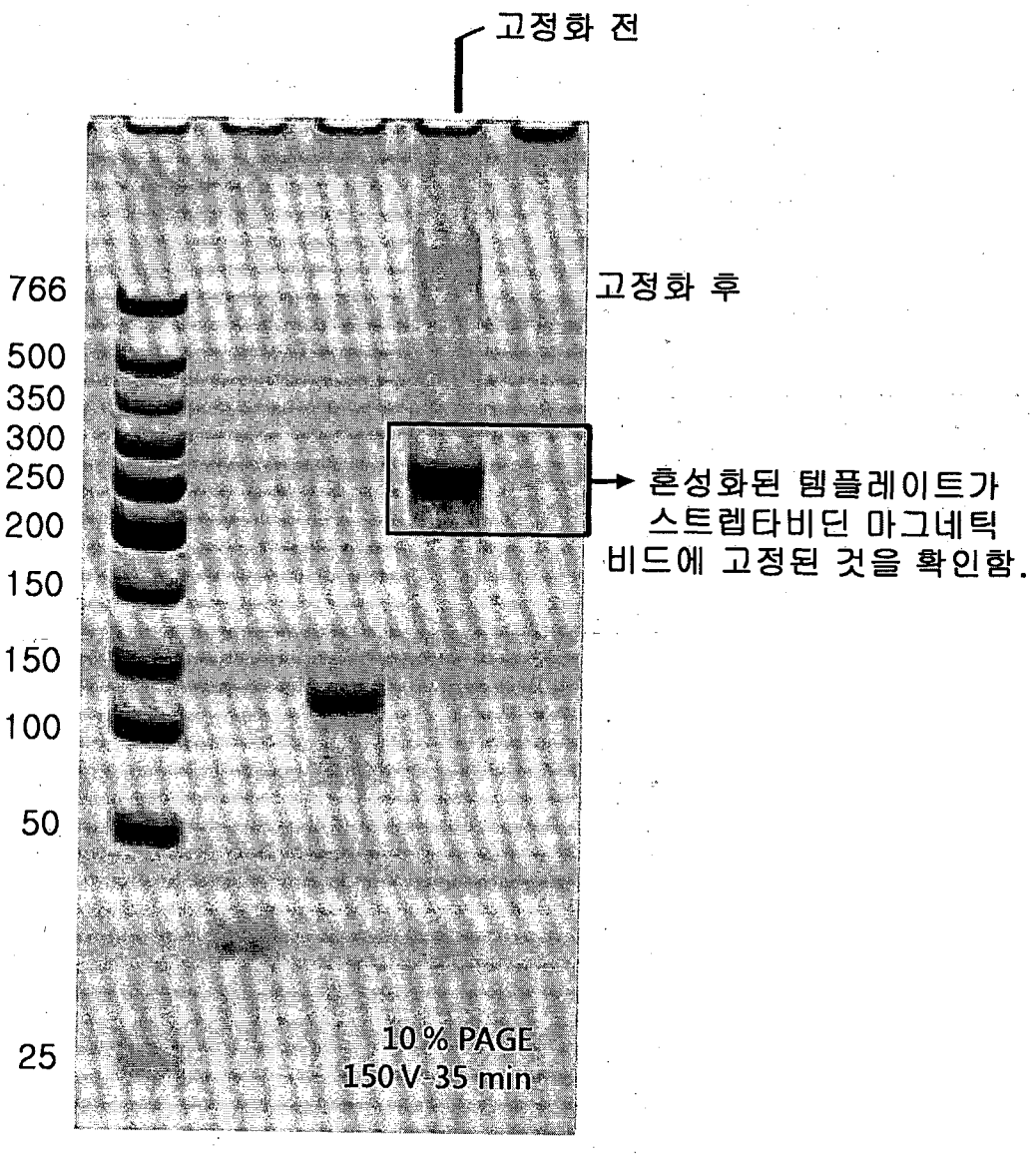
[도6]



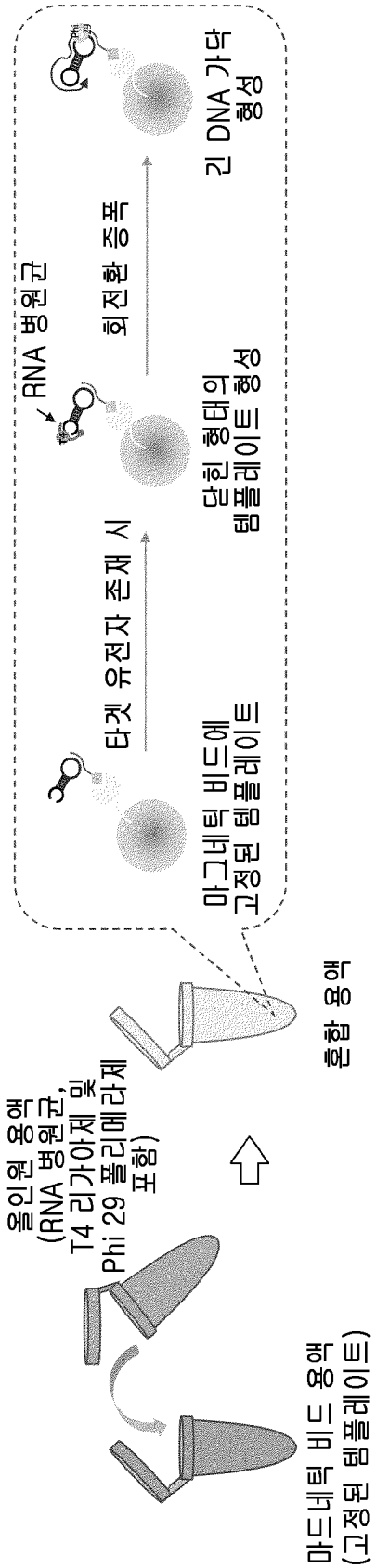
[도7]


스트렙타비딘-마그네틱 비드
① Vortexing
② 원심분리 & 상등액 제거
혼성화된 템플레이트 및
아비딘-마그네틱 비드 혼합
Incubation for 15 min at 25 ℃
(1 time vortexing / 5 min)
혼성화된 템플레이트
마그네틱 비드 상에
템플레이트의 고정

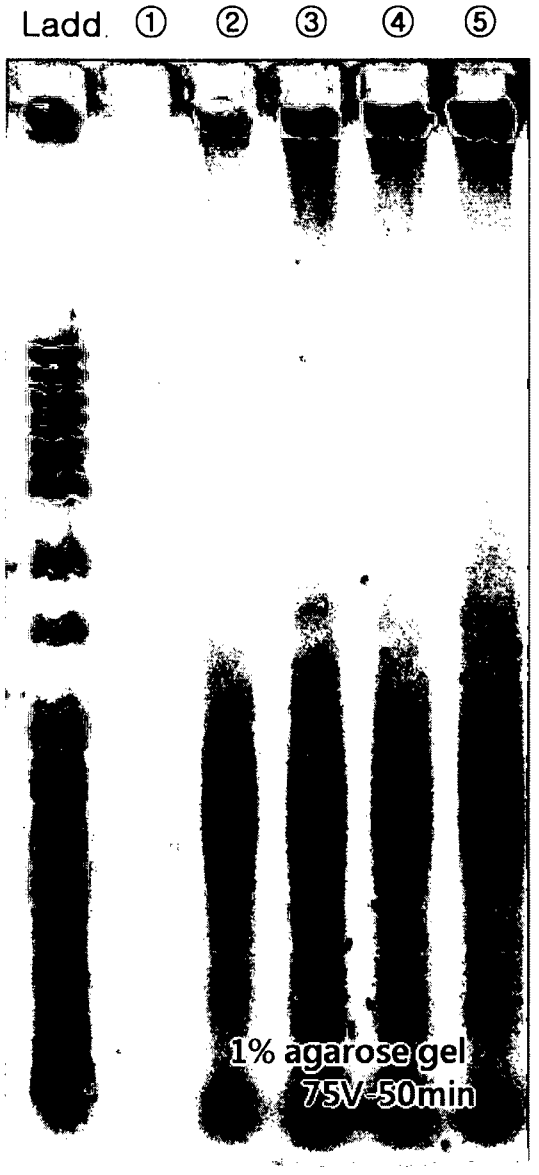
[도8]


고정화 전
766
500
350
300
250
200
150
150
100
50
25
고정화 후
혼성화된 템플레이트가
스트렙타비딘 마그네틱
비드에 고정된 것을 확인함.
10 % PAGE
150 V-35 min

[도9]


마그네틱 비드에
고정된 템플레이트
타겟 유전자 존재 시
닫힌 형태의
템플레이트 형성
RNA 벙원균
회전환 증폭
긴 DNA 가닥
형성
혼합 용액
올인원 용액
(RNA 벙원균,
T4 리가아제 및
Phi 29 폴리메라제
포함)
마드네틱 비드 용액
(고정된 템플레이트)

[도10]



①: NC

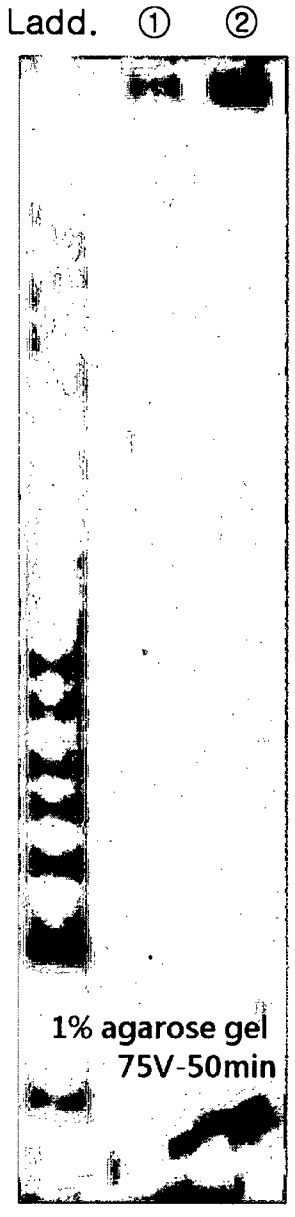
②: SP1 (E.coli; 15min)

③: SP2 (E.coli; 30min)

④: SP3 (E.coli; 45min)

⑤: SP3 (E.coli; 60min)

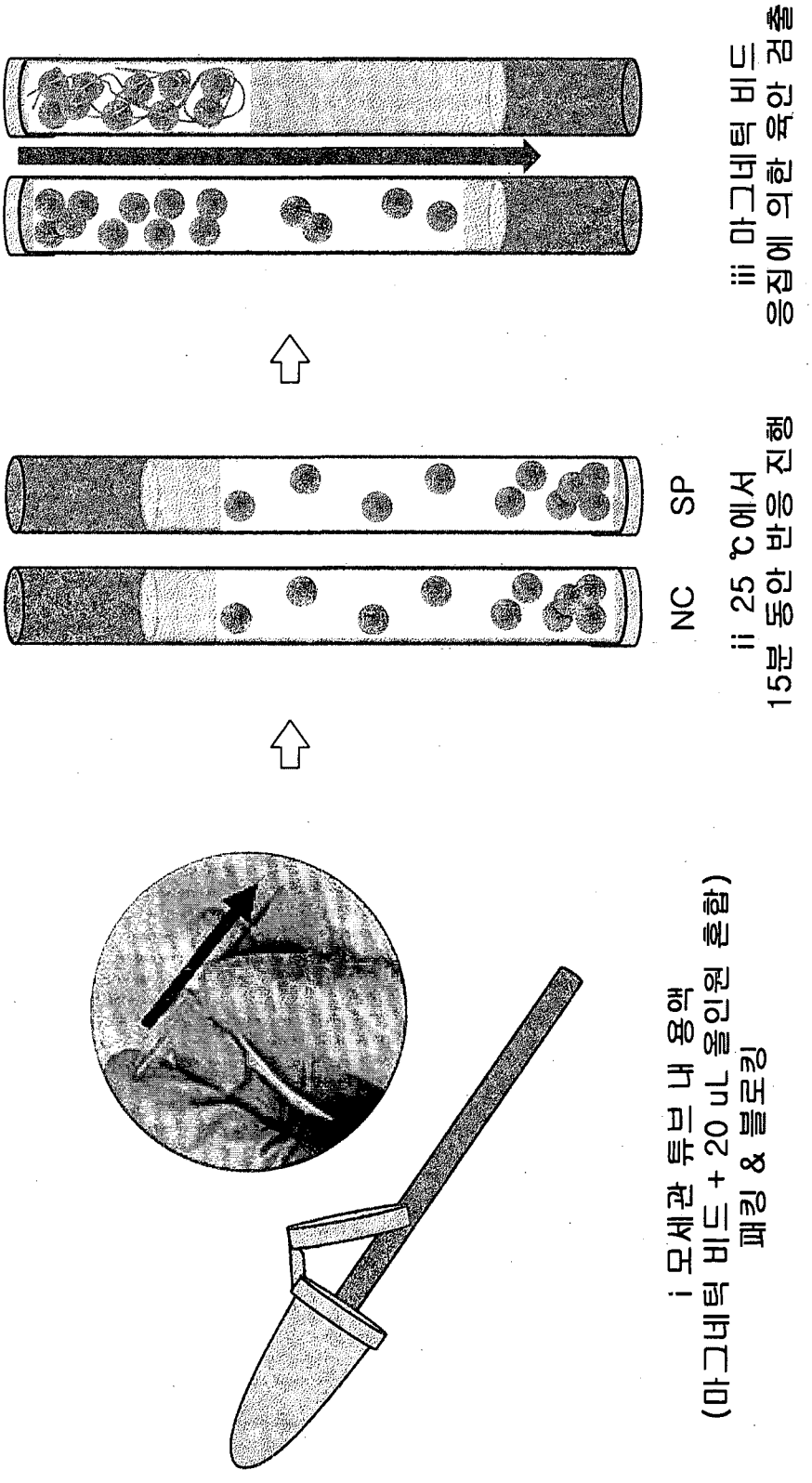
[도11]



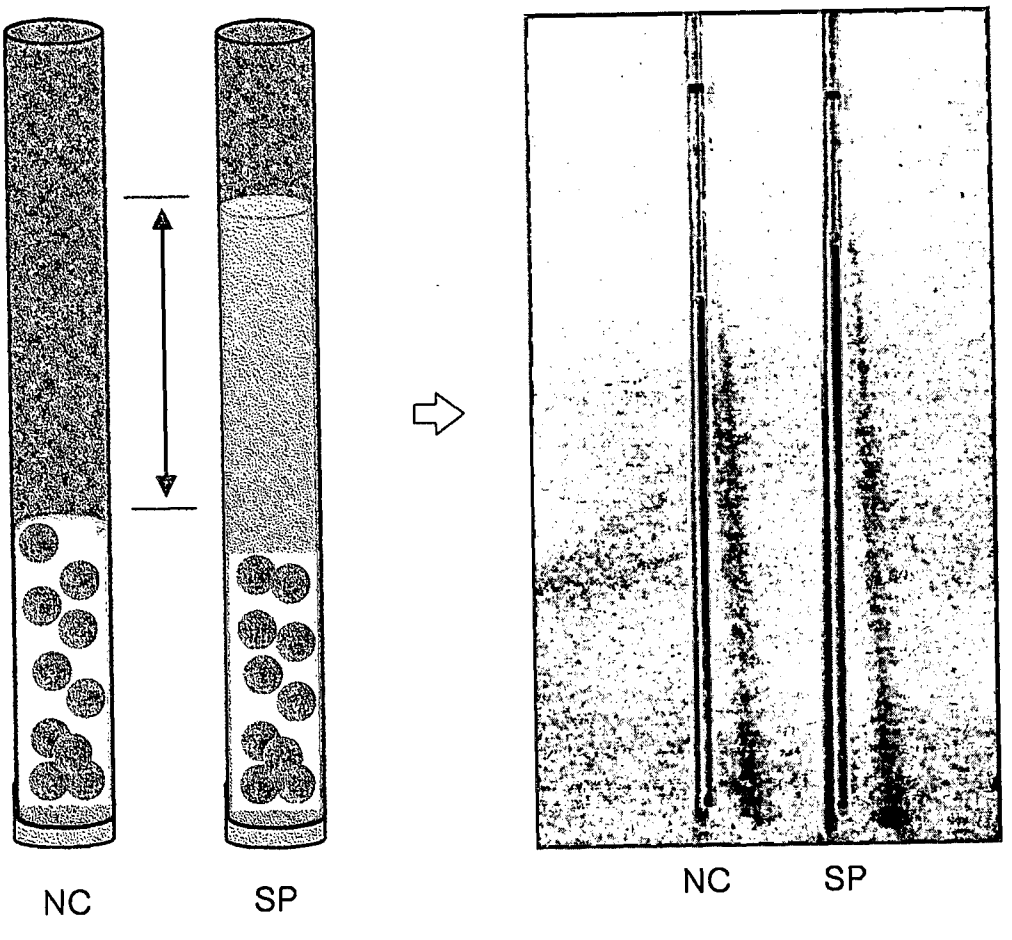
①: NC

②: SP (지카 바이러스)

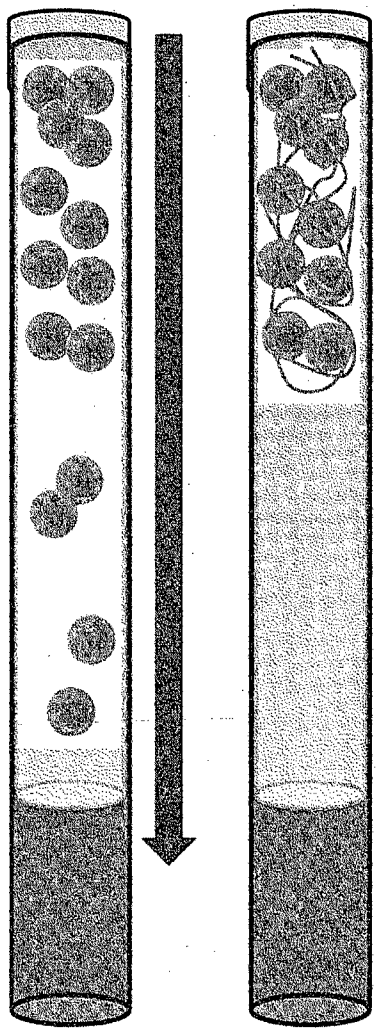
[도12]


i 모세관 튜브 내 용액
(마그네틱 비드 + 20 uL 올인원 혼합)
패킹 & 블로킹
ii 25 ℃에서
15분 동안 반응 진행
NC
SP
iii 마그네틱 비드
응집에 의한 육안 검출

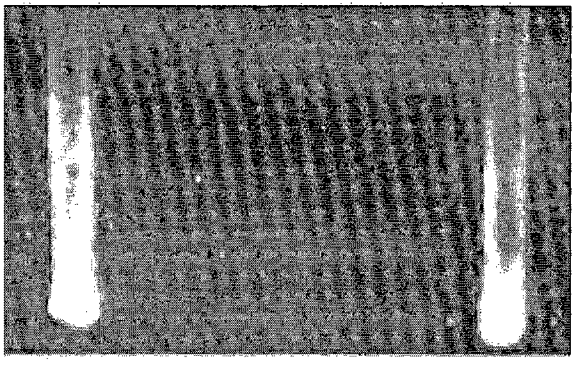
[도13]



[도14]



[도15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/009783

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q 1/68; B01L 3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: rolling circle amplification, bead, dumbbell, DNA template, biotin, streptavidin, capillary

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GERASIMOVA, Y. V. et al., "Enzyme-assisted Target Recycling (EATR) for Nucleic Acid Detection", Chemical Society Reviews, 2014, vol. 43, pages 6405-6438 See page 6417; and figures 14, 15.	1-17
Y	KR 10-2016-0052400 A (EWHA UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION et al.) 12 May 2016 See abstract; claims 1-15; and paragraphs [0043]-[0189].	1-17
Y	ZUCCARO, L. et al., "Rolling Circle Amplification-based Detection of Human Topoisomerase I Activity on Magnetic Beads", Analytical Biochemistry, 2014, vol. 451, pages 42-44 See abstract, figure 1.	1-17
Y	SCHOPF, E. et al., "Sensitive and Selective Viral DNA Detection Assay via Microbead-based Rolling Circle Amplification", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2008, vol. 18, pages 5871-5874 See abstract, diagram 1.	1-17
Y	KUHN, H. et al., "High-purity Preparation of a Large DNA Dumbbell", Antisense & Nucleic Acid Drug Development, 2001, vol. 11, pages 149-153 See abstract, figure 1.	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
13 NOVEMBER 2017 (13.11.2017)	**14 NOVEMBER 2017 (14.11.2017)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2017/009783

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2016-0052400 A	12/05/2016	AU 2015-340134 A1	11/05/2017
		CN 107002006 A	01/08/2017
		EP 3214164 A1	06/09/2017
		WO 2016-068663 A1	06/05/2016

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/009783

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12Q 1/68; B01L 3/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 회전환 증폭, 비드, 덤벨, DNA 템플레이트, 비오틴, 스트렙타비딘, 모세관

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	GERASIMOVA, Y. V. 등, 'Enzyme-assisted target recycling (EATR) for nucleic acid detection' Chemical Society Reviews, 2014년, 43권, 페이지 6405-6438 페이지 6417; 및 도면 14, 15 참조.	1-17
Y	KR 10-2016-0052400 A (이화여자대학교 산학협력단 등) 2016.05.12 요약; 청구항 1-15; 및 단락 [0043]-[0189] 참조.	1-17
Y	ZUCCARO, L. 등, 'Rolling circle amplification-based detection of human topoisomerase I activity on magnetic beads' Analytical Biochemistry, 2014년, 451권, 페이지 42-44 초록, 도면 1 참조.	1-17
Y	SCHOPF, E. 등, 'Sensitive and selective viral DNA detection assay via microbead-based rolling circle amplification', Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2008. 18권, 페이지 5871-5874 초록, 도식 1 참조.	1-17
Y	KUHN, H. 등, 'High-purity preparation of a large DNA dumbbell', Antisense & Nucleic Acid Drug Development. 2001. 11권, 페이지 149-153 초록, 도면 1 참조.	1-17

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2017년 11월 13일 (13.11.2017)	2017년 11월 14일 (14.11.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
감유림
전화번호 +82-42-481-3516

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2017/009783

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0052400 A	2016/05/12	AU 2015-340134 A1	2017/05/11
		CN 107002006 A	2017/08/01
		EP 3214164 A1	2017/09/06
		WO 2016-068663 A1	2016/05/06