



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0142832  
(43) 공개일자 2022년10월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/70 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C12Q 1/70 (2022.05)

(21) 출원번호 10-2021-0049347

(22) 출원일자 2021년04월15일

심사청구일자 2021년04월15일

(71) 출원인  
프로지니어 주식회사

서울특별시 구로구 디지털로31길 12, 10층1002호(구로동, 태평양물산)

(72) 발명자  
엄승호

서울특별시 서초구 반포대로21길 67, 501동 403호(서초동, 래미안서초5차아파트)

오성

서울특별시 금천구 범안로 1212, 103동 1711호(독산동, e편한세상독산더타워)

안소연

서울특별시 양천구 목동동로 189, C동 1604호(신정동, 삼성쉐르빌1)

(74) 대리인

이처영, 장제환

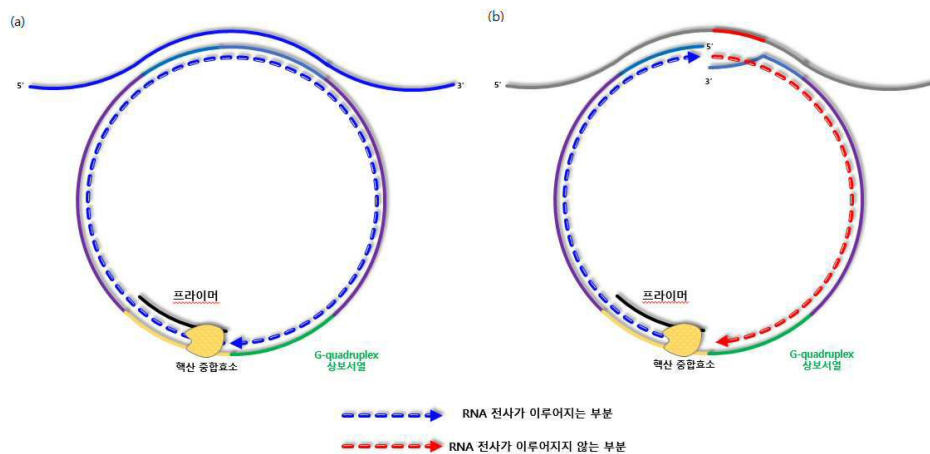
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 G-사중체화 서열 기반의 표적 핵산 검출용 핵산 템플릿 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 G-사중체화 서열 기반의 표적 핵산 검출용 핵산 템플릿 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 표적 핵산의 검출용 핵산 템플릿 및 이를 이용한 표적핵산의 검출 또는 진단방법은 별도의 PCR 기계 또는 복잡한 온도 조절 절차 없이도 상온에서 반응 효소의 첨가 및 반응으로 간단하고 빠르게 높은 특이도로 표적핵산을 검출할 수 있다. 또한, 원형 고리에 형성 의한 회전환 증폭 또는 회전환 전사 방법을 이용하기 때문에, 신호가 증폭되어 높은 검출 민감도를 가지며, 표적핵산의 존재 시에 시각적으로 겔을 형성하기 때문에, 형광 분자와 같은 값비싼 신호물질 또는 전기영동과 같은 별도의 신호 검출 절차 없이도 표적핵산을 즉각적으로 검출할 수 있어, 감염질환, 암진단, 유전질환 및 맞춤 진단 등 다양한 분야에 유용하다.

대표도 - 도4



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

G-사중체화 서열에 상보적인 서열; 및 표적핵산에 상보적인 제1 상보서열 및 제2 상보서열을 포함하고, 상기 제1 상보서열 및 제2 상보서열은 각각 상기 핵산 템플릿의 3' 말단 및 5' 말단에 존재하는 표적핵산의 검출용 핵산 템플릿.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 핵산 템플릿은 표적핵산과 상보적으로 결합하여 핵산 템플릿의 5'말단과 3'말단 사이에 nick을 포함하는 원형 핵산 템플릿을 형성하는 것을 특징으로 하는 핵산 템플릿.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 G-사중체화 서열에 상보적인 서열의 상류(5' 방향)에 프로모터 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 템플릿.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 5' 말단에서 3'말단으로 표적핵산에 상보적인 제1 상보서열; 프로모터 서열; G-사중체화 서열에 상보적인 서열; 및 표적핵산에 상보적인 제2 상보서열을 차례로 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 템플릿.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 핵산 템플릿은 80 내지 200 bp의 길이를 갖는 것을 특징으로 하는 핵산 템플릿.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, Poly T 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 템플릿.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, 상기 표적핵산은 SARS-CoV-2 바이러스 유래의 핵산인 것을 특징으로 하는 핵산 템플릿.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 핵산 템플릿은 서열번호 7로 표시되는 제1 상보서열; 서열번호 8로 표시되는 제2 상보서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 핵산 템플릿.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 핵산 템플릿을 포함하는 표적핵산의 검출용 조성물.

**청구항 10**

제9항에 있어서, 프라이머, 라이게이스(ligase) 및 핵산 중합효소 중 어느 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 표적핵산의 검출용 조성물.

**청구항 11**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 핵산 템플릿을 포함하는 감염성 질환의 진단용 키트.

**청구항 12**

제11항에 있어서, 프라이머, 라이게이스(ligase) 및 핵산 중합효소 중 어느 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 진단용 키트.

**청구항 13**

제11항에 있어서, 상기 감염성 질환은 SARS-CoV-2 바이러스 감염증(COVID-19)인 것을 특징으로 하는 진단용 키트.

**청구항 14**

- (a) 시료에 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 핵산 템플릿, 라이게이스(ligase)를 첨가하여 반응시키는 단계;
- (b) 단계의 반응물에 프라이머 및 핵산 중합효소를 첨가하여 핵산을 합성하는 단계; 및
- (c) 핵산 겔의 형성 여부를 기반으로 표적핵산의 유무를 확인하는 단계를 포함하는 표적핵산의 검출방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 (a) 단계는 표적핵산이 존재하는 경우, 상기 핵산템플릿이 표적핵산과 결합하여 핵산 템플릿의 5' 말단과 3' 말단 사이에 Nick(nick)을 포함하는 원형 핵산 템플릿을 형성하는 것을 특징으로 하는 표적핵산의 검출방법.

**청구항 16**

제14항에 있어서, 상기(a) 단계는 라이게이스에 의해 상기 원형 핵산 템플릿의 Nick이 연결되는 것을 특징으로 하는 표적핵산의 검출방법.

**청구항 17**

제14항에 있어서, 상기 (b) 단계는 표적핵산이 존재하는 경우, G-사중체화 서열을 포함하는 서열이 합성되는 것을 특징으로 하는 표적핵산의 검출방법.

**청구항 18**

- (a) 대상으로부터 분리된 샘플에 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 핵산 템플릿, 라이게이스(ligase) 를 첨가하여 반응시키는 단계; 및
- (b) 상기 (a) 단계의 반응물에 프라이머 및 핵산 중합효소를 첨가하여 핵산을 합성하는 단계; 및
- (c) 겔의 형성여부를 확인하는 단계를 포함하는 질병의 진단을 위한 정보제공방법.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 상기 질병은 COVID-19인 것을 특징으로 하는 정보제공방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001]

본 발명은 G-사중체화 서열 기반의 표적 핵산 검출용 핵산 템플릿 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 G-사중체화 서열에 상보적인 서열; 및 표적핵산에 상보적인 제1 상보서열 및 제2 상보서열을 포함하고, 상기 제1 상보서열 및 제2 상보서열은 각각 상기 핵산 템플릿의 3' 말단 및 5' 말단에 존재하는 표적핵산의 검출용 핵산 템플릿, 이를 포함하는 핵산 검출용 조성물 또는 진단키트, 및 이를 이용한 COVID-19와 같은 질환의 진단방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003]

특정한 핵산(DNA 또는 RNA 등)을 검출하는 방법은 과학연구 분야에서 기본적으로 중요한 기술이다. 특정한 핵산을 검출하고 동정할 수 있게 됨으로써, 시료에 존재하는 특정 유전자의 존재, 유전자의 변형, 특정 병원체 유래의 핵산과 같은 유전적, 생물학적 마커의 존재 여부를 확인하여, 대상의 건강 상태, 특정 질병의 예측, 진단, 예후 예측, 특정 약물에 대한 반응성 예측 등이 가능하게 되었다. 이와 같은 분자 진단은 DNA 또는 RNA 등 질병의 근본을 진단하는 것으로 감염질환, 암진단, 유전질환 및 맞춤 진단 등 다양한 분야에서 사용되고 있다. 대표적인 분자진단 기술로는 단시간 내에 DNA를 증폭시키는 PCR 기술이 있다 (Saiki, R., et. al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239, 487-91. 1998). 그러나, 일반적인 PCR 기술은 변성-> 혼성화 (primer 결합) -> 핵산 합성의 기본 3단계가 필수적으로 수반되어 일반적으로는 기계에 의해 수행되며, 증폭된 DNA를 확인하기 위해서 전기 영동 방법을 사용하여야 한다. 이러한 전기 영동을 수행하기 위해서는 아가로즈 젤 (Agarose gel)을 만들고 DNA를 EtBr 등으로 염색하여 확인해야 하는 번거로움이 있어왔다. 또한, 최근에 사용되고 있는 real-time PCR 방법은 형광을 사용하기 때문에 전기 영동이 불필요하나, 고가의 사용 기기와 고가의 형광시약을 사용해야 한다 (Higuchi, R., et. al., Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. Nature Biotechnology 11, 1026 - 1030, 1993)는 문제점이 있다. 최근에 현장 진단 개념의 PCR 제품인 Cepheid사의 GeneXprt system과 시약이 개발되어 판매되고 있으나, 장비와 시약이 매우 고가이므로 일반적인 검사에서 사용하는 데는 어려움이 있다 (Helb, D., et. al., Rapid Detection of Mycobacterium tuberculosis and Rifampin Resistance by Use of On-Demand, Near-Patient Technology. J. Clin. Microbiol. 48, 229-237, 2010). 다른 방법으로, PCR 후에 젤 전기 영동 대신에 멤브레인을 사용하여 확인하는 핵산 측면 흐름 어세이 (Nucleic Acid Lateral Flow Assay)가 있다 (Aveyard, J., et. al., One step visual detection of PCR products with gold nanoparticles and a nucleic acid lateral flow (NALF) device. Chem. Commun., 41, 4251-4253, 2007). 그러나, 젤 전기 영동 기술에 비해 복잡하여 실험실에서 제조하여 사용하기는 불가능하며, 멤브 레인에 부착된 프로브의 시퀀스는 PCR 증폭 산물에 따라서 특이적으로 결합할 수 있도록 사용하여야 하는 기술의 한계 때문에 범용으로 사용하는 데는 한계점이 있다. 특히, 이와 같은 PCR 기반의 연기서열분석법은 특정 오류에 극히 취약하고 데이터 해석과정에서 문제가 생겨 자주 심각한 오진이 있어, 혈액 속 특정 핵산 바이오마커를 이와 상보적인 서열을 만났을 때 변화를 형광, 전위차, 색변화 등으로 표현하고자 하는 연구들이 진행되고 있으나, 하지만 이 연구들의 경우는 대부분 한 번에 하나의 바이오마커를 검출해 내기 때문에 다중의 바이오마커들이 관여하는 대부분의 질병들을 효과적으로 진단하는데 어려움이 있다.

- [0005] 한편, 코로나바이러스(coronavirus)는 RNA 바이러스의 한 종류로 유전정보가 리보핵산(RNA)으로 구성된 바이러스이다. 코로나바이러스는 사람과 동물의 호흡기와 소화기계 감염을 유발한다. 주로, 점막전염, 비말전파 등으로 쉽게 감염되며, 사람은 일반적으로 경미한 호흡기 감염을 일으키지만 드물게 치명적인 감염을 일으키기도 한다. 코로나바이러스 감염증 중 중증 급성 호흡기 증후군-코로나바이러스(SARS-CoV)는 2003년 4월 중국으로부터 유행하여, 사망률 9.6%를 기록하며 많은 사람이 사망했고, 2015년에는 중동 호흡기 증후군-코로나바이러스(MERS-CoV)는 중동으로부터 유행하여 전세계로 퍼지면서, 사망률 약 36%의 높은 사망률을 나타내었고, 2019년 12월 중국으로부터 유행한 중증 급성 호흡기 증후군-코로나바이러스-2(SARS-CoV-2)는 현재 진행 중이다.
- [0006] 중증 급성 호흡기 증후군-코로나바이러스-2(SARS-CoV-2)는 중국 우한에서 출현하여 전세계로 빠르게 확산되었으며 WHO는 해당 바이러스에 감염된 질환을 COVID-19로 명명하였다. 최근 보고에 따르면, 일반적인 증상으로 발열(98.6%), 피로감(69.6%), 마른 기침(59.4%), 림프구감소증(70.3%), 프로트롬빈 시간의 연장(58%), 및 젖산 탈수소효소의 증진(39.9%)이 있다(Wang, D., et al., JAMA, 2020). 상기 SARS-CoV-2는 기침과 재채기로 생성된 호흡기 비말을 통한 사람과 사람의 접촉 또는 기침 또는 재채기를 하는 사람들에 의해 오염된 물체 표면을 통해 주로 전염되는 것으로 보고되었고(CDC, C.f.d.c.a.p., How COVID-19 Spreads. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), 2020), 심지어 무증상 감염이 가능한 것으로 보고된 바 있다(Yu, P., et al., J Infect Dis, 2020; Hoeh1, S., et al., N Engl J Med, 2020; Bendix, A., Science alert, 2020).
- [0007] SARS-CoV-2의 사례가 전세계적으로 급증하면서, WHO는 2020년 1월 30일 '국제적 공중보건 비상사태'(PHEIC)를 선포했으며, 코로나바이러스 감염 확진자가 전 세계에서 속출하자 WHO는 3월 11일 홍콩독감(1968), 신종플루(2009)에 이어 사상 세 번째로 코로나19에 대해 팬데믹(세계적 대유행)을 선포했다. 2020년 11월 12일을 기준으로 전세계적으로 약 5천2백만명의 환자가 발생하고, 약 130만명이 사망했으며, 매일 수만명의 확진환자가 추가되어, 지속적인 감염환자가 증가하는 추세에 있다. 한국에서도, 약28000명의 환자가 확진되었으며, 487명의 사망자가 보고되었다(COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU) 및 중앙재난안전대책본부).
- [0008] 현재까지 백신과 같은 의료적인 COVID-19의 예방 대책이 없으며, 코로나 바이러스의 전파를 막기 위해 개인적/사회적 차원에서, 마스크 착용, 손씻기, 사회적 거리두기 등을 적극적으로 수행하고 있어, 다소 감염의 확산이 감소되는 추세에 있었으나, 교회를 비롯한 다양한 지역에서 감염되는 사례가 발생하고 있고, 그 경로가 불명확하여, 현재 국내를 기준으로 다시 100명 이상의 확진자가 매일 발생하고 있어, 코로나 바이러스의 진단에 대한 수요는 줄어들지 않고 있다. 따라서, 아직까지도 코로나 바이러스의 진단의 공급은 수요에 비해 현저히 부족한 상황이기 때문에, 2019 신종 코로나바이러스 검사실 진단 지침 (Guidelines for the Laboratory Diagnosis of 2019 novel coronavirus in Korea)은 일반인은 COVID-19의 진단검사를 받을 수 없으며, 특정 4가지 적응증에 해당하는 경우에만 실시할 수 있는 것으로 규정한다(대한진단검사의학회 신종 코로나바이러스 대책위원회, 질병관리본부 감염병분석센터, 2020). 따라서, COVID-19의 진단 수요를 충족할 수 있는 저렴하면서도 간단/신속하게 높은 정확도로 COVID-19를 진단할 수 있는 기술의 개발이 필요하다.
- [0010] 이러한 배경기술 아래에서, 본 발명자들은 복잡한 반응 절차 없이, 상온에서 수행이 가능하면서도, 저렴한 비용으로 신속/정확하게 표적핵산의 검출이 가능한 방법을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 표적 유전자에 상보적인 서열, G-사중체화 서열에 상보적인 서열을 포함하는 표적핵산의 검출용 핵산 템플릿 및 이를 이용한 검출 프로토콜을 설계하였다. 상기 핵산 템플릿 및 검출 프로토콜을 이용하여, SARS-CoV-2 바이러스 유래의 표적핵산을 검출한 결과, 표적핵산이 존재하는 경우, 상기 핵산 템플릿이 특이적으로 결합하여 원형 템플릿을 형성하고, 이를 주형으로 회전환 증폭 또는 회전환 전사를 통해 핵산을 합성하는 경우, G-사중체화 구조를 통해 핵산 겔 (gel)이 형성되며, SARS 바이러스 유래의 유사 서열에는 핵산 겔이 형성되지 않아 별도의 검출절차 또는 신호물질 없이도 높은 특이도 및 민감도로 표적핵산의 검출 및 COVID-19의 감염여부의 진단이 가능함을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0013] 본 발명의 목적은 G-사중체화 서열에 상보적인 서열을 포함하는 표적핵산 검출용 핵산 템플릿 및 이의 용도를 제공하는데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은, 상기 핵산 템플릿을 포함하는 표적핵산의 바이러스 감염증의 진단용 조성물을 제공하는데 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 핵산 템플릿 또는 조성물을 포함하는 바이러스 감염 여부 진단용 키트를 제공하는데 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 핵산 템플릿을 이용한 표적핵산의 검출방법을 제공하는데 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 핵산 템플릿을 이용한 질병의 진단방법을 제공하는데 있다.

**과제의 해결 수단**

- [0019] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 G-사중체화 서열에 상보적인 서열; 및 표적핵산에 상보적인 제1 상보 서열 및 제2 상보서열을 포함하고,
- [0020] 상기 제1 상보서열 및 제2 상보서열은 각각 상기 핵산 템플릿의 3' 말단 및 5' 말단에 존재하는 표적핵산의 검출용 핵산 템플릿을 제공한다.
- [0021] 본 발명은 또한, 상기 핵산 템플릿을 포함하는 표적핵산의 검출용 조성물 또는 키트를 제공한다.
- [0022] 본 발명은 또한, 상기 핵산 템플릿을 포함하는 감염성 질환의 진단용 조성물 또는 키트를 제공한다.
- [0023] 본 발명은 또한,
- [0024] (a) 시료에 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 핵산 템플릿, 라이게이스(ligase)를 첨가하여 반응시키는 단계;
- [0025] (b) 단계의 반응물에 프라이머 및 핵산 중합효소를 첨가하여 핵산을 합성하는 단계; 및
- [0026] (c) 핵산 겔의 형성 여부를 기반으로 표적핵산의 유무를 확인하는 단계를 포함하는 표적핵산의 검출 방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명은 또한,
- [0028] (a) 대상으로부터 분리된 샘플에 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 핵산 템플릿, 라이게이스(ligase)를 첨가하여 반응시키는 단계; 및
- [0029] (b) 상기 (a) 단계의 반응물에 프라이머 및 핵산 중합효소를 첨가하여 핵산을 합성하는 단계; 및
- [0030] (c) 겔의 형성여부를 확인하는 단계를 포함하는 질병의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

**발명의 효과**

- [0032] 본 발명의 표적핵산의 검출용 핵산 템플릿 및 이를 이용한 표적핵산의 검출 또는 진단방법은 별도의 PCR 기계 또는 복잡한 온도 조절 절차 없이도 상온에서 반응 효소의 첨가 및 반응으로 간단하고 빠르게 높은 특이도로 표적핵산을 검출 할 수 있다. 또한, 원형 고리에 형성 의한 회전환 증폭 또는 회전환 전사 방법을 이용하기 때문에, 신호가 증폭되어 높은 검출 민감도를 가지며, 표적핵산의 존재 시에 시각적으로 겔을 형성하기 때문에, 형광 분자와 같은 값비싼 신호물질 또는 전기영동과 같은 별도의 신호 검출 절차 없이도 표적핵산을 즉각적으로 검출할 수 있어, 감염질환, 암진단, 유전질환 및 맞춤 진단 등 다양한 분야에 유용하다.

**도면의 간단한 설명**

- [0034] 도 1은 본 발명의 표적 핵산 검출용 핵산 템플릿의 구조 및 이를 사용한 표적 핵산의 검출 프로토콜을 개략적으로

로 설명한 것이다.

도 2는 본 발명의 표적 핵산 검출용 핵산 템플릿과 표적 핵산이 결합하여 Nick(nick)을 형성하는 것을 개략적으로 나타낸 것이다. 표적 핵산 검출용 핵산 템플릿에서 파란색은 제1 상보서열(5'말단) 및 제2 상보서열(3'말단), 보라색은 Poly T 서열, 노란색은 T7 프로모터 또는 프라이머 결합 부위, 초록색은 G-사중체화 서열에 상보적인 서열을 나타낸다.

도 2a는 표적핵산이 존재하는 경우, 제1 상보서열 및 제2 상보서열이 결합하여 Nick을 형성하는 것을 나타낸 것이다.

도 2b는 표적핵산과 상보적이지 않은 부분을 포함하는 핵산과 결합하는 경우에 Nick을 형성할 수 없음을 나타낸 것이다.

도 3은 Nick을 형성한 표적 핵산 검출용 핵산 템플릿의 결찰 과정을 개략적으로 나타낸 것이다. 도 3a는 표적핵산이 존재하는 경우에 형성된 Nick이 라이게이즈의 첨가 및 반응을 통해 결찰될 수 있음을 나타낸 것이며, 도 3b는 상보적이지 않은 부분을 포함하는 핵산과 결합하여 Nick을 형성하지 않는 경우 라이게이즈에 의해 결찰될 수 없음을 나타낸 것이다.

도 4는 결찰에 의해 완전한 원형 템플릿이 형성된 뒤, 핵산중합효소를 통해 회전환 증폭(RCA) 또는 회전환 전사(RCT)를 수행하는 과정을 개략적으로 나타낸 것이다. 증폭 또는 전사의 시작점으로 프라이머가 함께 첨가되며, 표적핵산이 존재하는 경우에만 회전환 증폭 또는 회전

환 전사가 성공적으로 수행되며(도 4a), 표적핵산이 존재하지 않거나, 상보적이지 않은 서열을 포함하는 핵산과 결합하는 경우, 3'말단에서 복제 또는 전사가 종료되며 G-사중체화 서열은 합성되지 않는다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에서 표적 핵산 검출용 핵산 템플릿을 사용하여 유사한 서열을 갖는 SARS-CoV-1 바이러스와 구분하여, 표적핵산인 SARS-CoV-2 바이러스를 검출하는 과정을 개략적으로 나타낸 것이다.

도 6은 대조군 핵산(SARS-CoV-1), 표적 핵산(SARS-CoV-2), 핵산 템플릿, T7 프라이머에 대해 1% 아가로스겔을 이용하여 전기영동을 진행한 결과이며, 각 lane에 로딩 된 샘플은 다음과 같다. Lane 1은 100bp dsDNA ladder(프로메가), lane 2는 40bp 크기의 합성 된 대조군 ssRNA(SARS-CoV-1) 핵산(IDT), lane 3은 40bp 크기의 합성 된 표적 ssRNA (SARS-CoV-2) 핵산(IDT), lane 4는 124bp 크기의 합성 된 ssDNA 핵산 템플릿(IDT), lane 5는 22bp 크기의 합성 된 T7 프라이머(IDT) 이다.

도 7은 대조군 핵산(SARS-CoV-1)과 표적 핵산(SARS-CoV-2)을 핵산 템플릿과 반응(라이게이즈를 이용한 결찰) 후 1% 아가로스겔을 이용하여 전기영동을 진행한 결과이며, 각 lane에 로딩 된 샘플은 다음과 같다. Lane 1은 100bp dsDNA ladder(프로메가), lane 2는 40bp 크기의 ssRNA 대조군 핵산(SARS-CoV-1)과 핵산 템플릿을 이용하여 라이게이즈를 이용한 결찰 반응을 진행한 샘플, lane 3은 40bp 크기의 ssRNA 표적 핵산(SARS-CoV-2)과 핵산 템플릿을 이용하여 라이게이즈를 이용한 결찰 반응을 진행한 샘플, lane 4는 핵산 템플릿만을 사용하여 라이게이즈 결찰 반응을 진행한 샘플이다. 표적 핵산이 존재하는 경우 라이게이즈 결찰 반응에 의해 원형의 핵산 템플릿이 형성되어 전기영동 결과에서 밴드의 위치가 대조군과는 다르게 확인 됨을 알 수 있다.

도 8은 T7 폴리머레이즈(NEB)로 각 샘플을 회전환 증폭(RCA) 또는 회전환 전사(RCT) 과정 후 1% 아가로스겔을 이용하여 전기영동을 진행한 결과이며, 각 lane에 로딩 된 샘플은 다음과 같다. Lane 1은 100bp dsDNA ladder(프로메가), lane2는 대조군 핵산(SARS-CoV-1)과 핵산 템플릿의 결찰 반응 후 회전환 증폭(RCA)을 진행한 샘플, lane 3은 표적 핵산(SARS-CoV-2)과 핵산 템플릿의 결찰 반응 후 회전환 증폭(RCA)을 진행한 샘플, lane 4는 표적 핵산 없이 핵산 템플릿만을 이용하여 결찰 반응 후 회전환 증폭(RCA)을 진행한 샘플, lane 5는 표적 핵산(SARS-CoV-2)과 핵산 템플릿의 결찰 반응 없이 회전환 증폭(RNA)만 진행 한 샘플이다. 표적 핵산(SARS-CoV-2)이 존재하고 핵산 템플릿과 결합 후 라이게이즈에 의해 결찰 반응이 이루어져야 원형의 핵산 템플릿이 생성되어 회전환 증폭(RCA) 시 긴 가닥의 RNA(도 8 예시에서는 약 300~2000bp 길이)가 형성됨을 lane 3의 결과로 알 수 있다. 표적 핵산이 존재하지 않거나, 표적 핵산이 존재하더라도 라이게이즈에 의해 결찰 반응이 없을 경우(lane 2,4,5)에는 lane 3과 다르게 긴 가닥의 RNA가 형성되지 않는다.

도 9는 표적 핵산(SARS-CoV-2)과 핵산 템플릿의 결찰 반응 후 T7 폴리머레이즈(NEB)를 이용하여 회전환 증폭(RCA) 또는 회전환 전사(RCT)를 진행한 샘플을 촬영한 것이다. 겔의 형태로 존재하여 틱 내부로 흡입이 되지 않는 것을 볼 수 있다.

도 10은 회전환 증폭(RCA) 또는 회전환 전사(RCT) 샘플에 대해 SYBR2(Invitrogen)으로 염색 후

fluorobox(Vivilber)에서 UV 촬영을 한 결과이다. 10a는 촬영 사진의 색상 필터를 회색으로 처리한 것이며, 10b는 밝기의 세기를 나타낼 수 있는 rainbow 색상 필터를 사용하였다. 각각의 a,b,c는 다음과 같다. a는 대조군 핵산(SARS-CoV-1)과 핵산 템플릿을 이용하여 결찰 반응 후 T7 폴리머레이즈를 이용하여 회전환 증폭(RCA) 한 샘플이며, b는 표적 핵산(SARS-CoV-2)와 핵산 템플릿을 이용하여 결찰 반응 후 T7 폴리머레이즈를 이용하여 회전환 증폭(RCA) 한 샘플이다. c는 표적 핵산 없이 핵산 템플릿만을 이용하여 결찰 반응 후 T7 폴리머레이즈를 이용하여 회전환 증폭(RCA)을 진행한 샘플이다. a, b, c에서 표적 핵산이 있는 경우에만 원형의 템플릿에 의해 G-사중체 서열에 의한 gel이 형성되며, gel로 인해 전사된 RNA가 밀집하게 되어 SYBR2로 염색 후 UV 상에서 빛이 강하게 보인다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0035] 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 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0037] 본 발명자들은 G-사중합체(G-quadruplex) 모티프 서열(G-사중체화 서열에 상보적인 서열)을 포함하는 핵산을 템플릿으로 사용하는 회전환 전사(Rolling circle transcription: RCT)를 기반의 하이드로겔화 핵산의 생산 시스템을 발명하고, 특허출원한 바 있다(대한민국 특허출원 제10-2019-0136416호). 상기 하이드로겔화 핵산의 생산 시스템으로 합성된 하이드로겔화 핵산은 G-사중합체 구조를 형성하여 하이드로겔화되기 때문에, RNA의 안정성을 현저히 높일 수 있으며, 이로부터 펩타이드 또는 단백질을 생산할 수 있는 플랫폼 기술로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0039] 본 발명자들은 G-사중체화 서열 포함 템플릿 및 핵산 하이드로겔 기반의 새로운 용도를 창출하기 위해, 예의 노력한 결과, 표적 유전자에 상보적인 서열, G-사중체화 서열에 상보적인 서열을 포함하는 표적핵산의 검출용 핵산 템플릿 및 이를 이용한 표적핵산의 검출 프로토콜을 새롭게 설계하고, 상기 핵산 템플릿을 통해 시험관내 등 온 반응을 통해 별도의 검출절차 또는 신호물질 없이도 높은 특이도 및 민감도로 표적핵산의 검출이 가능함을 확인하였다.
- [0040] 특히, 본 발명의 일 실시예에서는 매우 유사한 서열을 갖는 SARS 바이러스의 RdRP 유전자 서열과 SARS-CoV-2의 RdRP 유전자 서열을 구분하여, 표적핵산인 SARS-CoV-2의 RdRP 유전자의 특이적 검출이 가능함을 확인하여, 본 발명의 핵산 템플릿이 SARS-CoV-2와 같은 감염성 질환의 진단에 사용될 수 있는 새로운 플랫폼이 될 수 있음을 확인하였으며, 나아가, SNP와 같은 각종 돌연변이, 핵산 바이오마커 등의 검출을 통해, 진단, 맞춤형 치료 등의 다양한 분야에 사용될 수 있는 새로운 용도를 창출하였다.
- [0042] 따라서, 본 발명은 G-사중체화 서열에 상보적인 서열; 및 표적핵산에 상보적인 제1 상보서열 및 제2 상보서열을 포함하고,
- [0043] 상기 제1 상보서열 및 제2 상보서열은 각각 상기 핵산 템플릿의 3' 말단 및 5' 말단에 존재하는 표적핵산의 검출용 핵산 템플릿에 관한 것이다.
- [0044] 본 발명의 용어 "G-사중체(G-quadruplex)"는 구아노신 잔기의 비율이 높은 DNA 염기서열에서 나타나는 G-사중가닥(G-tetraplex)이 2개 이상 수직적으로 쌓여 형성하는 구조를 의미하며, 여기에서, G-사중가닥은 구아노신이 풍부한 4개의 DNA 가닥이 서로 짝을 이루어 수소결합 형태로 4중 가닥을 형성하는 입방체 모양의 독특한 DNA 구조를 의미하며, 4개의 구아닌 염기가 후그스틴 수소결합(Hoogsteen hydrogen bonding)으로 밀집되어 형성된 사각형 구조를 말한다. G-사중가닥은 다양한 생화학적 조건에서 매우 안정적이며 사중 가닥 내의 방향성은 다양하다. 특히, G 사중가닥의 중앙에 있는 양이온(주로 K+)은 G-사중체의 구조를 더욱 안정되게 유지하는 데 기여한다. G-사중체는 텔로미어 영역 및 프로모터 영역에서, 다양한 생물학적 기능을 하는 것으로 알려져 있다 (Henderson E, et al., Telomeric DNA oligonucleotides form novel intramolecular structures containing guanine-guanine base pairs., Cell(December 1987)). 본 발명에서 "G-사중체"는 "G-사중합체"와 동일한 의미에서 호환적으로 사용될 수 있다.

- [0045] G-사중체는 구아닌이 풍부한 서열 부위에서 주로 형성된다(Murat P, Balasubramanian S (April 2014)). 그러나, 모든 구아닌 풍부 서열 부위에서 G-사중체가 형성되는 것은 아니다. G-사중체 형성 능력의 예측방법은 이전의 보고를 통해 보고된 바 있다(Todd AK, Johnston M, Neidle S (2005)). 예를 들어, Todd AK, Johnston M 등은  $d(G_3+N_1-7G_3+N_1-7G_3+)$ (여기서, 아랫 첨자는 각 염기의 개수 범위, N은 임의의 염기, d는 1이상의 정수로서, 괄호 안의 염기서열의 반복을 의미함)은 G-사중체를 형성하는 일반적인 패턴으로 보고한 바 있다. 본 발명에 있어서, G-사중체는 3개이상의 연속적인 구아닌 및 1 내지 7개의 임의의 서열이 1번 이상 반복되는 서열에 의해 형성되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 용어 "G-사중체화 서열(G-quadruplex sequence)"은 G-사중체를 형성할 수 있는 서열을 의미하며, 상기 G-사중체화 서열을 포함하는 핵산 가닥이 G-사중체를 형성할 수 있도록 한다. 본 발명의 핵산 템플릿을 주형으로 전사된 핵산 가닥에 포함된 G-사중체화 서열이 G-사중체를 형성하여, 하이드로겔화 된다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 상기 G-사중체화 서열은 3개이상의 연속적인 구아닌 및 1 내지 7개의 임의의 서열이 1번 이상 반복되는 핵산서열인 것을 특징으로 할 수 있으며, 가장 바람직하게는 5'-TAGGGTTAGGGT-3'(서열번호 5)인 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명에 있어서, G-사중체화 서열을 구성하는 핵산이 RNA인 경우 티민(T)의 위치에 우라실(U)이 위치할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 용어, "G-사중체화 서열에 상보적인 서열"은 상기 G-사중체화 서열에 상보적인 서열로, 이를 주형으로 증폭 또는 전사되는 경우, G-사중체를 형성할 수 있도록 하는 모든 서열을 의미한다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 바람직하게는 G-사중체화 서열에 상보적인 서열은 3개이상의 연속적인 구아닌 및 1 내지 7개의 임의의 서열이 1번 이상 반복되는 핵산서열에 상보적인 것을 특징으로 할 수 있으며, 가장 바람직하게는 5'-ACCCTAACCTA-3'(서열번호 6)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 일 실시예에서는 표적핵산이 존재하는 경우에, 본 발명의 핵산 템플릿을 주형으로 합성된 핵산이 G-사중체화 서열(5'-UAGGGUAGGGU-3')을 포함하고, G-사중체를 형성할 수 있도록 설계하였다.
- [0051] 본 명세서에서 언급되는 용어 "상보적(complementary)"은 어떤 특정한 혼성화(hybridization) 또는 어닐링 조건 하에서 상술한 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 수 있을 정도의 상보성을 갖는 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다.
- [0052] 본 명세서에서 사용되는 용어 "혼성화(hybridization)"는 2개의 단일 가닥 핵산이 상보적인 염기 서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다. 본 명세서에서 상기 혼성화는 '상보적으로 결합' 등과 동일한 의미에서 상호 호환적으로 사용될 수 있다. 염기 서열들의 페어링은 왓슨-크릭 모델에 따라, A/T(U) 및 G/C로 페어링되는 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다. 혼성화는 단일 가닥 핵산 서열 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하여도 일어날 수 있다. 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 반응 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 조절될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 용어, '제1 상보서열' 및 '제2 상보서열'은 표적핵산에 상보적인 서열을 의미한다. 제1 상보서열 및 제2 상보서열에서 사용된 '제1' 및 '제2'는 본 발명의 핵산템플릿의 5'말단 또는 3' 말단에 위치하는 표적핵산에 상보적인 서열을 구분하기 위해 편의상 사용된 것이며, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다. 본 명세서에서, 제1 상보서열과 제2 상보서열은 특별한 언급이 없는 한 제1 상보서열은 핵산 템플릿의 5'말단에 위치한 표적핵산에 상보적인 서열을, 제2 상보서열은 핵산 템플릿의 3'말단에 위치한 표적핵산에 상보적인 서열을 지칭하는데 사용된다.
- [0054] 본 발명에 있어서, 상기 제1 상보서열 및 제2 상보서열은 표적핵산의 상이한 부위에 상보적인 것이 바람직하다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 제1 상보서열 및 제2 상보서열은 바람직하게는 표적핵산의 서열에 상보적으로 결합되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 제1 상보서열 및 제2 상보서열은 표적핵산의 서열에 상보적으로 결합하여 닉(nick)을 형성하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 제1 상보서열은 닉(nick) 형성 부위로부터 표적핵산의 5'말단 방향으로 표적핵산과 상보적으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0058] 본 발명에 있어서, 상기 제2 상보서열은 닉(nick) 형성 부위로부터 표적 핵산의 3' 말단 방향으로 표적핵산과 상보적으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0059] 본 발명에 있어서, 상기 제1 상보서열 및 제2 상보서열은 표적핵산의 길이에 따라 적절한 길이로 설계 될 수 있다. 상기 제1 상보서열 및 제2 상보서열은 각각 15bp 이상의 길이를 갖는 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0060] 본 발명에 있어서, 표적핵산과 상보적으로 결합하여 닉을 형성하기 위해, 상기 제1 상보서열 및 제2 상보서열은 표적핵산의 연속적인 서열에 상보적으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0061] 예를 들어, 도 2에 도시된 것과 같이, 본 발명에 있어서, 상기 핵산 템플릿의 3' 말단 및 5' 말단에 존재하는 제1 상보서열과 제2 상보서열은 각각 표적핵산의 상보적인 부분과 혼성화될 수 있으며, 핵산 템플릿의 5' 말단 및 3' 말단 사이에 닉(nick)을 포함한다.
- [0062] 예를 들어, 본 발명의 일 실시예에서와 같이, SARS-CoV-2 바이러스의 RdRP 유전자(서열번호 1)를 표적 핵산으로 하는 경우, 제1 상보서열 및 제2 상보서열은 각각 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 서열일 수 있으나, 이에 제한 되는 것은 아니다.
- [0063] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 템플릿은 표적핵산과 상보적으로 결합하여 핵산 템플릿의 5' 말단 과 3' 말단 사이에 닉(nick)을 포함하는 원형 핵산 템플릿을 형성하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0064] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 템플릿은 표적핵산이 존재하지 않는 경우, 닉(nick)을 포함하는 원형 핵산 템플릿을 형성할 수 없는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0065] 본 발명에 있어서, 닉(nick)을 포함하는 원형 핵산 템플릿의 닉은 라이게이즈(ligase)에 의해 결찰(ligation)되어 완전한 원형 핵산 템플릿이 될 수 있으며, 이를 주형으로 복제 또는 전사를 수행하는 경우, 복제 및 전사가 종료되지 않고 순환적으로 반복되어, 회전환 전사(Rolling Circle Transcription; RCT) 또는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification; RCA)이 수행될 수 있다.
- [0066]
- [0067] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 핵산 템플릿이 프로모터 서열을 더 포함하도록 하여, 핵산 템플릿을 주형으로 하는 전사가 가능하도록 하였으며, 표적핵산이 존재하는 경우 상기 핵산 템플릿은 닉(nick)을 포함하는 원형 핵산 템플릿을 형성하고, 라이게이즈를 처리하여 닉을 연결함으로써 회전환 전사가 수행될 수 있도록 하였다. 반면, 표적핵산이 존재하지 않는 경우, 상기 핵산 템플릿은 닉(nick)을 포함하는 원형 핵산 템플릿을 형성하지 못하고, 이를 주형으로 전사 또는 복제를 수행하는 경우 5' 말단에서 전사 또는 복제가 중단된다. 도 4에 도시된 것과 같이, 핵산 템플릿을 주형로 하는 핵산 합성의 시작점이 G-사중체화 서열에 상보적인 서열의 상류(5' 방향)에 존재하는 경우, 5' 말단에서 합성되지 않아 G-사중체화 서열은 합성되지 않고 핵산 겔이 형성되지 않는다.
- [0068] 본 발명의 일 실시예에서와 같이, 본 발명의 핵산 템플릿을 주형으로 하는 전사를 통해 핵산을 합성하는 경우, 프로모터 서열이 필요할 수 있다.
- [0069] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 템플릿은 프로모터 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0070] 본 발명에 있어서, 제1항에 있어서, 상기 G-사중체화 서열에 상보적인 서열의 상류(5' 방향)에 프로모터 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0071] 본 발명의 용어, "프로모터"는 전사 개시를 조절할 수 있는 유전자 부위를 의미한다.
- [0072] 본 발명에 있어서, 상기 프로모터는 통상에 기술자에 의해 적합한 프로모터가 선택되어 사용될 수 있다. 상기 프로모터는 예를 들어, T7 프로모터, T5 프로모터, T3 프로모터, lac 프로모터, tac과 trc 프로모터, cspA 프로모터, lacUV5 프로모터, Ltet0-1 프로모터, phoA 프로모터, araBAD 프로모터, trp 프로모터, tetA 프로모터, Ptac 프로모터 및 SP6 프로모터 등이 있으며, 바람직하게는 상기 예에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0073] 본 발명의 일 실시예에서와 같이, 본 발명에 있어서, 상기 핵산 템플릿은 5' 말단에서 3' 말단으로 표적핵산에 상보적인 제1 상보서열; 프로모터 서열; G-사중체화 서열에 상보적인 서열; 및 표적핵산에 상보적인 제2 상보서열을 차례로 포함하는 것이 가장 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0074] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 템플릿은 프로모터 서열을 포함하지 않을 수 있다.

- [0075] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 템플릿이 프로모터 서열을 포함하지 않는 경우, 프라이머 결합 부위를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0076] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머 결합 부위는 G-사중체화 서열의 상류(5'방향)에 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0077] 본 발명에 있어서, 상기 프로모터 서열을 포함하지 않는 핵산 템플릿은 이를 주형으로 하는 복제(또는 증폭) 기반의 핵산 합성을 수행하여 표적핵산을 검출하는 데 사용될 수 있다. 이 경우, 핵산 합성(복제, 증폭)의 시작점은 G-사중체화 서열의 상류인 것이 바람직하며, 상기 핵산 합성의 시작점은 통상의 기술자의 프라이머 설계 또는 프라이머 결합 부위의 설계에 의해 용이하게 조절될 수 있다.
- [0078] 본 발명의 핵산 템플릿은 너을 포함하는 원형 핵산 템플릿을 형성하기에 충분한 길이로 제작될 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 핵산 템플릿은 바람직하게는 적어도 80 bp 이상, 더욱 바람직하게는 80bp 내지 200bp인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0079] 본 발명의 일 실시예에서는 원형 핵산 템플릿을 형성하기 위한 충분한 유연성을 부여하기 위해, 제1 상보서열과 프로모터 서열 사이 및 G-사중체화 서열에 상보적인 서열과 제2 상보서열에 Poly T 서열을 추가하였다.
- [0080] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 템플릿은 Poly T 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0081] 본 발명에 있어서, 상기 Poly T 서열이 포함되는 위치는 5'말단 또는 3' 말단을 제외하고 제한 없이 포함될 수 있다.
- [0082] 본 발명에 있어서 상기 Poly T 서열은 30 bp 내지 150 bp의 티민(Thymine, T) 반복서열인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0083] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 템플릿의 각 요소(제1 상보서열, 프로모터 서열, G-사중체화 서열에 상보적인 서열, Poly T, 제2 상보서열 등)은 하나의 선형 핵산 템플릿 상에서 연결되어 존재할 수 있다.
- [0084] 본 발명의 용어 "연결"은 핵산 또는 특정기능을 가지는 핵산 가닥(제1 상보서열, 프로모터 서열, G-사중체화 서열에 상보적인 서열, Poly T, 제2 상보서열 등)이 서로 작동 가능하게 연결된 것을 의미하며, 상기 "작동가능하게 연결된"은 서로 기능적 관계로 배치된 2종의 성분을 지칭한다. 각각의 연결된 서열은 각 성분의 상류 및/또는 하류에 위치할 수 있다. 상기 연결은 제한 부위에서의 접합(ligation)에 의해 달성될 수 있다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우에, 통상적인 실시예 따라 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커가 사용된다. 그러나, 각각의 요소(제1 상보서열, 프로모터 서열, G-사중체화 서열에 상보적인 서열, Poly T, 제2 상보서열 등)는 작동가능하게 연결되기 위해 인접할 필요는 없다.
- [0086] 본 발명의 용어, "표적핵산"은 본 발명의 핵산 템플릿을 사용하여 특정 시료, 또는 개체로부터 분리된 샘플 등에 존재하는 지 여부를 검출하기 위한 대상(목적)을 의미한다.
- [0087] 본 발명에 있어서, 상기 표적핵산은 DNA, RNA, PNA, LNA 등일 수 있으며, 바람직하게는 DNA 또는 RNA일 수 있다.
- [0088] 본 발명에 있어서, 상기 표적핵산은 이중가닥 또는 단일가닥 형태일 수 있으며, 단일가닥인 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0089] 본 발명에 있어서, 상기 표적핵산은 본 발명의 핵산 템플릿의 사용 목적에 맞게 제한 없이 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 표적핵산은 샘플에 포함된 단순한 올리고핵산일 수 있으며, 그 목적에 따라, 유전적 바이오마커, SNP, 결실 등과 같은 특정 유전자의 돌연변이, 감염원 유래의 유전자 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0090] 본 발명에 있어서, 상기 표적핵산은 감염원 유래의 유전자인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0091] 본 발명에 있어서, 상기 감염원은 바이러스인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0092] 본 발명에 있어서, 상기 바이러스는 RNA를 유전물질로 포함하는 바이러스일 수 있으며, 예를 들어, SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, MERS 바이러스, 인플루엔자 바이러스, HIV, HCV 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0094] 본 발명은 다른 관점에서 상기 핵산 템플릿의 표적 핵산 검출용도에 관한 것이다.
- [0095] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 핵산 템플릿의 질환의 진단용도에 관한 것이다.
- [0097] 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명의 핵산 템플릿을 포함하는 표적핵산의 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0098] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 프라이머, 라이게이즈(ligase) 및 핵산 중합효소 중 어느 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0099] 본 발명의 용어, "프라이머(primer)"는 본 발명의 핵산 템플릿을 주형으로 전사 또는 복제를 수행하여 핵산을 합성하기 위해 3' 말단을 제공하는 짧은 핵산 가닥을 의미한다.
- [0100] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 템플릿이 프로모터 서열을 포함하는 경우, 상기 프라이머는 프로모터 서열에 상보적인 서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0101] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 템플릿이 프로모터 서열을 포함하지 않는 경우, 상기 프라이머는 핵산 템플릿의 G-사중체화 서열에 상보적인 서열의 상류(5'말단) 부분에 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0102] 본 발명의 용어, "라이게이즈(ligase)"는 핵산의 포스포디에스테르 결합(phosphodiester bond) 형성을 촉매하여 핵산을 연결/결찰하는 효소이다. 본 발명에 있어서, 상기 라이게이즈는 다양한 생물에서 유래한 라이게이즈 또는 이의 변형체 일 수 있으며, 바람직하게는 E.coli, T4 박테리오파지, 포유류 등에서 유래한 것 일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 splint R ligase를 사용하였으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 라이게이즈는 예를 들어 템플릿을 구성하는 핵산의 종류에 따라 PBCV-1 DNA ligase, T4 DNA ligase 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0103] 본 발명의 용어, 상기 "핵산 중합효소"는 주형으로 읽히는 핵산 가닥을 따라서, 주형 가닥의 서열에 상보적인 핵산 단량체(DNA 또는 RNA)의 합성을 촉매하는 효소이다.
- [0104] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 중합효소는 합성되는 핵산의 종류, 사용된 프로모터의 종류 등에 따라 선택되어 사용될 수 있다.
- [0105] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 템플릿이 프로모터 서열을 포함하는 경우 핵산 중합효소는 RNA 중합효소인 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 RNA 중합효소는 본 발명의 핵산 템플릿을 주형으로 하는 RNA의 합성(전사)을 위해 사용될 수 있다.
- [0106] 본 발명에 있어서, 상기 RNA 중합효소는 예를 들어, RNA 중합효소 I 내지 III, T7 RNA 중합효소, 또는 알파-아만니틴(Alpha-amanitin)으로 구성된 군에서 선택되는 것일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 T7 RNA 중합효소를 사용하였으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0108] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 템플릿이 프로모터 서열을 포함하지 않는 경우, 핵산 중합효소는 DNA 중합효소 인 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 DNA 중합효소는 본 발명의 핵산 템플릿을 주형으로 하는 DNA의 합성(복제/증폭)을 위해 사용될 수 있다.
- [0109] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 중합효소는 DNA 중합효소 III인 것이 바람직하나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0110] 본 발명에 있어서, DNA 중합효소를 포함하는 경우, 마그네슘과 같은 조효소(coenzyme)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0112] 본 발명의 표적핵산 검출용 핵산 템플릿 또는 표적핵산 검출용 조성물은 특정한 질병의 진단, 예측, 예후 및 특정 약물의 반응성과 같은 다양한 의료분야에 사용될 수 있다.
- [0113] 특히 본 발명의 일 실시예에서는 계통적 유전적으로 유사한 SARS 바이러스와 SARS-CoV-2의 유전자 서열을 구분하여 특이적으로 SARS-CoV-2 RdRP 유전자를 검출할 수 있고, 따라서 SARS-CoV-2 감염증(COVID-19)의 진단이 가능함을 입증하였다.
- [0114] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 본 발명의 핵산 템플릿 또는 본 발명의 핵산 검출용 조성물을 포함하는

감염성 질환의 진단용 키트에 관한 것이다.

- [0115] 본 발명에 있어서, 상기 진단용 키트는 프라이머, 라이게이즈(ligase) 및 핵산 중합효소 중 어느 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0116] 본 발명의 용어 “감염성 질환(infection)”은 각종 세균, 스피로헤타, 리케차, 바이러스, 진균, 기생충과 같은 외부 병원체에 의해 세포, 조직, 기관 등이 감염되어 발병하는 질환을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 진단용 키트는 핵산을 포함하는 병원체에 의한 감염성 질환이라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 바람직하게는 바이러스에 의한 감염성 질환인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0117] 본 발명에 있어서, 상기 감염성 질환은 예를 들어, SARS-CoV-1, SARS-CoV-2, MERS 바이러스, 인플루엔자 바이러스, HIV, HCV, 등에 의한 바이러스 감염증일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0118] 본 발명에 있어서, 상기 감염성 질환은 SARS-CoV-2 감염증(COVID-19)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0120] 본 발명의 일 실시예에서, 검출 샘플에 본 발명의 핵산 템플릿 및 라이게이즈를 첨가하여 반응시키는 단계; RNA 중합효소를 첨가하여 진사하는 단계를 포함하는 핵산 검출 프로토콜을 설계하였으며, SARS-CoV-2의 RdRP 유전자를 표적으로 하여 각 단계에서 반응 생성물을 확인한 결과, 예상과 같이, 표적핵산이 존재하는 경우에만 핵산 템플릿과 표적핵산이 상보적으로 결합하여 니클을 포함하는 원형 핵산 템플릿을 형성하고, 니클이 라이게이즈에 의해 연결되어, RCT가 성공적으로 수행됨으로써 핵산 겐이 형성됨을 확인하였다.
- [0121] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서,
- [0122] (a) 시료에 본 발명의 핵산 템플릿, 및 라이게이즈(ligase)를 첨가하여 반응시키는 단계;
- [0123] (b) 단계의 반응물에 프라이머 및 핵산 중합효소를 첨가하여 핵산을 합성하는 단계; 및
- [0124] (c) 핵산 겐의 형성 여부를 기반으로 표적핵산의 유무를 확인하는 단계를 포함하는 표적핵산의 검출 방법에 관한 것이다.
- [0125] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 시료에 표적핵산이 존재하는 경우, 본 발명의 핵산 템플릿의 5' 말단 및 3' 말단에 존재하는 표적핵산과 상보적인 서열이 표적핵산과 혼성화되어, 니클(nick)을 포함하는 원형 핵산 템플릿을 형성하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0126] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 표적핵산이 존재하지 않는 경우, 원형 핵산 템플릿이 형성되지 않는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0127] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계는 표적핵산과 서열이 일부 상이한 유사서열이 존재하는 경우, 일부 상보적 부분이 혼성화 되더라도, 상보적이지 않은 부분은 혼성화되지 않아, 니클(nick)을 형성하지 않는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0128] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계에서, 표적핵산이 존재하여 니클을 포함하는 원형 핵산 템플릿이 형성된 경우, ligase에 의해 핵산 템플릿의 3' 말단 및 5' 말단이 연결되어 완전한 원형 핵산 템플릿이 형성되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0129] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계에서, 표적핵산이 존재하지 않는 경우, 니클 부위가 존재하지 않아 ligase에 의한 5' 말단 및 3' 말단의 연결이 수행되지 않아 완전한 원형 핵산 템플릿이 형성되지 않는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0130] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계에서 합성되는 핵산은 DNA 또는 RNA인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0131] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 시료에 표적핵산이 존재하는 경우, 본 발명의 핵산 템플릿을 주형으로 회전환 전사(Rolling Circle Transcription; RCT) 또는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification; RCA)이 수행되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0132] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 표적핵산이 존재하는 경우, G-사중체화 서열을 포함하는 서열이 합성되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0133] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계는 시료에 표적 핵산이 존재하는 경우 핵산 겐이 형성되는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0134] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계는 핵산 겔이 생성되는 경우, 시료에 표적핵산이 존재하는 것으로 결정되고, 핵산 겔이 생성되지 않는 경우, 시료에 표적핵산이 존재하지 않는 것으로 결정되는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0136] 본 발명의 “시료”란, 본 발명의 방법을 통해 표적핵산의 존재 여부를 확인하고자 하는 대상 샘플을 의미한다.
- [0137] 본 발명의 “핵산 겔”이란, 핵산 서열간의 수소결합, 공유결합, 소수성 상호작용 등의 다양한 상호작용을 통해 겔을 형성한 핵산을 의미하며, 본 발명에서는 특히, G-사중체화 서열이 수소결합 형태로 4중 가닥을 형성하는 입방체 모양의 독특한 구조를 형성하여 겔을 형성하는 것을 특징으로 한다. 본 발명자들은 상기한 RNA 합성방법 및 합성 RNA의 문제를 해결하기 위해, G-사중체(G-quadruplex) 모티프 서열을 포함하는 핵산을 템플릿으로 사용하는 회전환 전사(Rolling circle transcription: RCT)를 기반의 하이드로겔화 핵산의 생산 시스템을 발명하고, 특허출원한 바 있다(대한민국 특허출원 제10-2019-0136416호). 본 발명에서, 상기 '핵산 겔'은 '하이드로겔화 핵산' 또는 '핵산 하이드로겔'과 동일한 의미에서 상호 호환적으로 사용된다.
- [0138] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계 및 (b) 단계는 동시 또는 순차적으로 수행될 수 있으며, 동시에 수행되는 경우 시료에 본 발명의 핵산 템플릿, 라이게이즈, 프라이머 및 핵산 중합효소를 첨가하여 반응시켜 수행할 수 있다.
- [0140] 본 발명의 표적핵산의 검출방법은 바이오마커, 감염원 유래의 유전자등의 검출을 통해 진단과 같은 의료분야에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0141] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서,
- [0142] (a) 대상으로부터 분리된 샘플에 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 핵산 템플릿, 라이게이즈(ligase)를 첨가하여 반응시키는 단계; 및
- [0143] (b) 상기 (a) 단계의 반응물에 프라이머 및 핵산 중합효소를 첨가하여 핵산을 합성하는 단계; 및
- [0144] (c) 겔의 형성여부를 확인하는 단계를 포함하는 질병의 진단을 위한 정보제공방법에 관한 것이다.
- [0145] 본 발명의 정보제공방법에 있어서, 각 단계는 표적핵산의 검출방법에서 상응하는 각 단계와 동일한 특징을 공유할 수 있다.
- [0146] 본 발명의 용어 "대상"은 질병을 앓고 있는지 여부의 진단 대상을 의미한다. 상기 대상은 동물뿐 아니라, 세포, 조직, 기관과 같은 모든 대상을 의미한다. 바람직하게는 상기 대상은 인간이다.
- [0147] 본 발명은 바람직하게는 인간의 코로나바이러스 감염 특히, COVID-19의 진단을 위한 정보를 제공하는데 사용될 수 있으며, 본 발명의 핵산 템플릿, 조성물, 키트, 또는 방법을 사용하여 코로나바이러스 이외의 바이러스 또는 세균의 RNA를 검출하여 감염여부를 진단하는 데 사용될 수 있음은 통상의 기술자에게 자명하다 할 것이다.
- [0148] 본 발명에 있어서, 상기 샘플은 진단 대상으로부터 유래한 핵산 또는 유전자를 포함하는 샘플이면 모두 이용가능하며, 상기 핵산 또는 유전자는 DNA 또는 RNA일 수 있으며, 대상으로부터 유래한다는 의미는 혈액, 조직샘플, 대변, 소변 및 객담 등 환자로부터 분리된 환자의 신체 또는 분비물의 전체 또는 이의 일부를 의미한다. 상기 환자로부터 분리된 환자의 신체 또는 분비물 전체 또는 이의 일부는 환자의 신체로 다시 돌려주지 않는 것이 바람직하다.
- [0150] **실시예**
- [0151] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0153] 실시예 1: 표적핵산 검출용 핵산 템플릿의 설계

- [0154] 표적핵산 검출이 가능한 G-사중체 서열 기반의 핵산 템플릿을 개발하기 위해, 표적핵산과 상보적인 제1 상보서열, G-사중체화 서열, 표적핵산과 상보적인 제2 상보서열을 포함하는 핵산 템플릿을 설계하였다(도 1). Poly T 서열은 핵산 템플릿이 원형 고리를 형성하기에 충분한 유연성을 부여하기 위해 프로모터 서열의 5' 방향 및 G-사중체화 서열에 상보적인 서열의 3' 방향에 각각 추가될 수 있다. Poly T 서열을 추가하는 경우, 30 ~ 150 bp 길이의 Poly T 서열이 추가되는 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0155] 본 발명의 핵산 템플릿을 이용한 표적핵산의 검출 프로토콜은 기본적으로 i) 샘플과 핵산 템플릿, ligase 및 프라이머를 첨가하여 반응시키는 단계, 및 ii) 핵산을 합성하는 단계를 포함하며, 각 단계 중 일부는 동시에 수행될 수 있다(도 1 하단).
- [0157] 실시예 2: 표적핵산 검출 메커니즘
- [0158] i) 샘플과 핵산 템플릿, ligase 및 프라이머를 첨가하여 반응시키는 단계에서,
- [0159] 표적핵산이 샘플에 존재하는 경우, 본 발명의 핵산 템플릿의 5' 말단 및 3' 말단에 존재하는 표적핵산과 상보적인 서열이 표적핵산과 혼성화되어, 닉(nick)을 포함하는 원형 핵산 템플릿을 형성한다(도 2a).
- [0160] 표적핵산이 존재하지 않는 경우, 원형 핵산 템플릿이 형성되지 않으며, 표적핵산과 일부 서열이 상이한 유사서열이 존재하는 경우, 일부 상보적 부분이 혼성화 되더라도, 상보적이지 않은 부분은 혼성화되지 않아, 닉(nick)을 형성하지 않는다(도 2b).
- [0161] 표적핵산이 존재하여 닉을 포함하는 원형 핵산 템플릿이 형성된 경우, ligase에 의해 핵산 템플릿의 3' 말단 및 5' 말단이 연결되어 완전한 원형 핵산 템플릿이 형성된다(도 3a).
- [0162] 반면, 표적핵산이 존재하지 않거나 유사한 핵산 서열이 존재하더라도, 닉 부위가 존재하지 않아 ligase에 의한 5' 말단 및 3' 말단의 연결이 수행되지 않아 완전한 원형 핵산 템플릿이 형성되지 않는다(도 3b).
- [0164] ii) 핵산을 합성하는 단계에서,
- [0165] 핵산 중합효소를 첨가하여 반응시킴으로써, 본 발명의 핵산 템플릿을 주형으로 회전환 전사(Rolling Circle Transcription; RCT) 또는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification; RCA)이 수행된다. 상기 RCT 또는 RCA를 통한 합성 결과물의 겔 형성여부를 통해 시각적으로 표적핵산이 시료에 존재하는지 여부를 검출 가능하다.
- [0167] 회전환 전사(Rolling Circle Transcription; RCT)를 사용하여 핵산을 합성하는 경우, 핵산 템플릿에 포함된 프로모터 서열에서 전사가 시작되며, 프라이머 서열은 프로모터 서열의 일부 또는 전부와 상보적인 서열을 포함한다. 이 때, 핵산 템플릿의 G-사중체화 서열에 상보적인 서열은 프로모터 서열의 하류(3' 방향)에 위치한다.
- [0168] 표적핵산이 존재하는 경우, 상기 ligase 반응시 완전한 원형 고리가 형성되어, 회전환 전사(Rolling Circle Transcription; RCT)에 의한 RNA의 지속적인 합성이 가능하다. 회전환 전사가 완전하게 수행되는 경우, 합성된 RNA는 G-사중체화 서열을 포함하며 G-사중체화 서열은 G-사중체 구조를 형성하여 하이드로겔화(hydrogelation)된다(도 4a). 표적핵산이 존재하지 않는 경우, 완전한 원형 핵산 템플릿이 형성되지 않으며, 전사가 시작되는 경우 5' 말단에서 전사가 종료되어, 회전환 전사(Rolling Circle Transcription; RCT)가 완전히 수행되지 않고, 전사 생성물은 G-사중체화 서열을 포함하지 않아 겔을 형성하지 않는다(도 4b).
- [0170] 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification; RCA)을 사용하여 핵산을 합성하는 경우, 핵산 템플릿은 프로모터 서열을 포함하지 않을 수 있다. 이 때, 프라이머 서열은 G-사중체화 서열에 상보적인 서열의 상류(5' 방향)에 결합하도록 설계하여, 표적핵산이 존재하는 경우, 완전한 원형 핵산 템플릿을 주형으로 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification; RCA)이 수행되며, 합성된 핵산이 G-사중체화 서열에 의해 하이드로겔화 되는 반면, 표적핵산이 존재하지 않는 경우, 완전한 원형 핵산 템플릿이 형성되지 않으며(도 4a), 복제가 시작되는 경우 5' 말단에서 합성이 종료되어, 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification; RCA)이 완전히 수행되지 않고, 생성물은 G-사중체화 서열을 포함하지 않아 겔을 형성하지 않는다(도 4b).

[0172] 실시예 3: 핵산 템플릿을 이용한 SARS-CoV-2 유전자의 특이적 검출

[0174] 실시예 3-1: SARS-CoV-2 유전자의 검출을 위한 핵산 템플릿 제조

[0175] 설계된 핵산 템플릿 및 검출 프로토콜의 검증을 위해, 최근 가장 진단 수요가 높고 관심도가 높은 SARS-CoV-2의 RdRP 유전자(유전자 번호: NC\_045512.2, 14093~14132, 사이즈: 40bp)를 표적핵산으로 선정하였으며, 특이적으로 SARS-CoV-2 유전자의 검출이 가능한지 확인하기 위해 양성 대조군으로 SARS-CoV-2와 가장 유사한 유전자를 갖는 SARS 바이러스(SARS-CoV-1) 유래의 RdRP 유전자(유전자 번호: NC\_004718.3, 14023~14062, 사이즈: 40bp)를 선정하였다(도 5). 각 표적핵산(RNA 올리고머), T7 프라이머 및 핵산 템플릿은 인공 합성하였으며(integrated DNA technology), 1% 아가로즈겔 전기영동을 통해 크기를 확인하였다(도 6). Lane 1은 100bp dsDNA ladder(프로메가), lane 2는 40bp 크기의 ssRNA 대조군 핵산(SARS-CoV-1)이며, lane 3은 40bp 크기의 ssRNA 표적 핵산(SARS-CoV-2)이다. Lane 4는 124bp 크기의 ssDNA 핵산 템플릿, lane 5는 22bp 크기의 ssDNA T7 프라이머이다. 22bp 크기의 ssDNA T7 프라이머(lane 5)가 40bp 크기의 ssRNA (lane 2,3)보다 밴드위치가 높은 이유는 아가로즈겔의 전기영동 상에서 ssRNA의 속도가 ssDNA 보다 높기 때문이다.

표 1

	핵산 서열(5' -> 3')	서열번호
[0177] 표적핵산(SARS-CoV-2)	AUUUCGGGUAUUUCAUACAA/ACCACGCCAGGUAGUGGAGU	1
대조군(SARS-CoV-1)	AUUUCGGGUAUUUCGUACAA/GUAGCACCAGGCUGCGGAGU	2
핵산 템플릿	TTGTATGAAATCACCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATCCCTATAGT GAGTCGTATTA <b>ACCCTAACCC</b> TATTT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACTACCTGGCGTGGT	3
T7 프라이머	TAATACGACTCACTATAGGGAT	4

[0178] \* 핵산 템플릿 서열의 밑줄은 표적핵산과 상보적인 부분(제1 및 제2 상보서열)을 의미함.\* 표적핵산 및 대조군의 '/'는 핵산템플릿의 제1 및 제2 상보서열이 결합하여 닉(nick)을 형성하는 위치를 의미함

[0179] \* 볼드체는 G-사중체화 서열에 상보적인 서열을 의미하며, 이탤릭체는 프로모터 서열을 의미함

표 2

[0181] SARS-CoV-2의 RdRP 유전자 검출용 핵산 템플릿 구성

	핵산 서열(5' -> 3')	서열번호
G-사중체화 서열	TAGGGTTAGGGT	5
G-사중체화 서열에 상보적인 서열	ACCCTAACCCTA	6
제1 상보서열	TTGTATGAAATCACCC	7
제2 상보서열	ACTACCTGGCGTGGT	8
T7 프로모터 서열	ATCCCTATAGTGAGTCGTATTA	9

[0182] \* G-사중체화 서열에서, T는 U로 치환 가능함

[0183] 실시예 3-2: 표적핵산 특이적인 원형 핵산 템플릿의 형성 확인

[0184] SARS-CoV-2 RdRP ssRNA 및 대조군(SARS 바이러스 RdRP ssRNA) 샘플에 실시예 3-1에서 제조한 핵산 템플릿, T7 프라이머 및 Splint R ligase를 혼합하고, 상온에서 약 60분간 반응시켰다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 1% 아가로즈겔 전기영동을 통해 분석하였다.

[0185] 도 7에 도시된 것과 같이, 표적핵산인 SARS-CoV-2의 RdRP 유전자와 반응하였을 때(Lane 3: SARS-CoV-2), 핵산

템플릿의 5'말단과 3'말단이 라이게이즈(ligase)에 의해 결찰(ligation)되어 원형의 템플릿이 형성되어, 대조군 (Lane 2: SARS-CoV-1 및 Lane 4: D.W)의 전기영동 밴드보다 size가 높은곳에서 밴드가 관찰되었다. 이는 예상과 같이, 표적핵산인 SARS-CoV-2의 RdRP 유전자를 함유하는 샘플에서만 반응이 진행되어, 완전한 원형 고리 형태의 핵산 템플릿이 형성되며, 유사한 서열을 갖는 SARS 바이러스 유전자 또는 음성 대조군(D.W)의 경우에는 완전한 원형 고리 형태의 핵산 템플릿이 형성되지 않음을 의미한다.

[0187] 실시예 3-3: 표적핵산 특이적 검출 능력 확인

[0188] 실시예 3-2에서 반응시킨 혼합물에, T7 RNA 중합효소(New England BioLabs)를 첨가하고, 37°C에서 약 2시간 인큐베이션하여 RNA합성을 수행하였다. 완전한 원형 고리 형태의 핵산 템플릿이 형성된 경우, 회전환 전사(RCT)가 수행되어 전사체의 증폭이 발생한다.

[0189] RNA 합성이 수행된 용액을 1% 아가로즈겔 전기영동을 통해 분석하였다. 도 8에 도시된 것과 같이, SARS-CoV-2의 RdRP RNA를 함유하는 샘플(lane 3)의 경우에만, 500 내지 2000 bp 수준의 큰 크기를 갖는 넓은 범위의 밴드가 나타났으며, 라이게이즈를 첨가하지 않은 Lane 5의 경우에는 회전환 전사가 수행되지 않아, 낮은 크기의 밴드만이 관찰되었다. 이는 본 발명의 핵산 템플릿이 표적핵산 특이적으로 회전환 전사가 수행되어, 증폭되며 G-사중체화 서열에 의해 G-사중합체를 구성하여 큰 크기에 복합체 형태를 나타냄을 의미한다.

[0191] 실시예 3-4: 표적핵산 특이적 핵산 하이드로겔 형성 확인

[0192] 실시예 3-3에서와 같이 핵산 템플, ligase 및 프라이머의 혼합반응물에서 전사를 수행하여 RNA를 합성하고, 하이드로겔이 형성되는지 여부를 시각적으로 확인하였다.

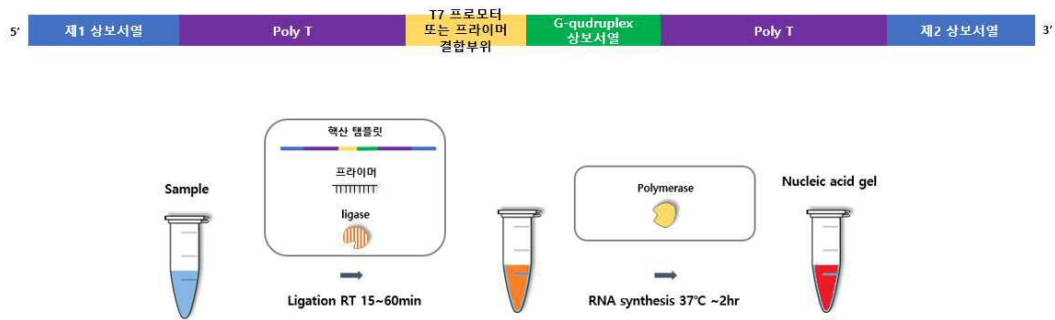
[0193] 도 9에 도시된 것과 같이, SARS-CoV-2의 RdRP RNA 샘플에서 하이드로겔 형태의 RNA 전사체가 형성되는 것을 확인하였으며, 이를 PEG(Polyethylene glycol)와 반응시킨 후 백색광 및 청색광에서 gel doc로 확인한 결과, SARS-CoV-2의 RdRP RNA 샘플에서는 겔이 관찰된 반면(백색광: 밝은 흰색), 청색광: 빨간색), SARS 바이러스의 RdRP RNA 샘플 및 음성 대조군(D.W)에서는 관찰되지 않았다(도 10).

[0194] 따라서, 본 발명의 핵산 템플릿을 활용한 표적핵산의 검출 프로토콜이 표적핵산에 매우 특이적으로 겔을 형성하고, 별도의 신호분자 또는 절차 없이도 시각적인 표적핵산의 검출이 가능함을 의미한다.

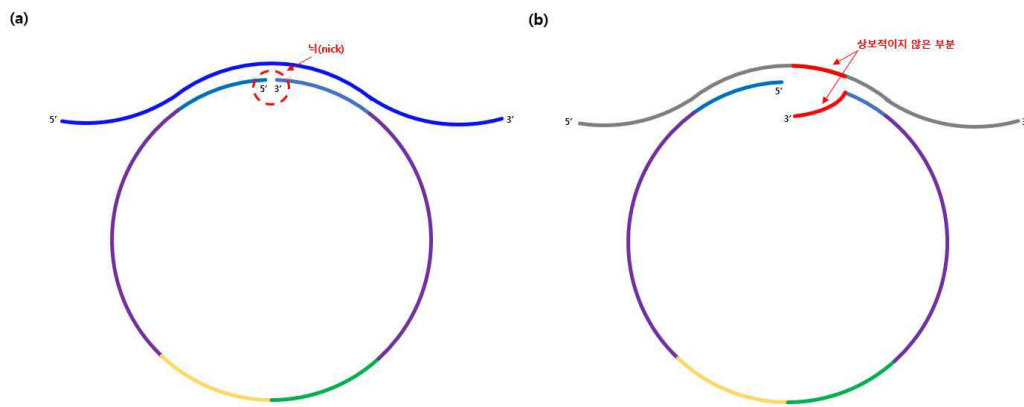
[0196] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

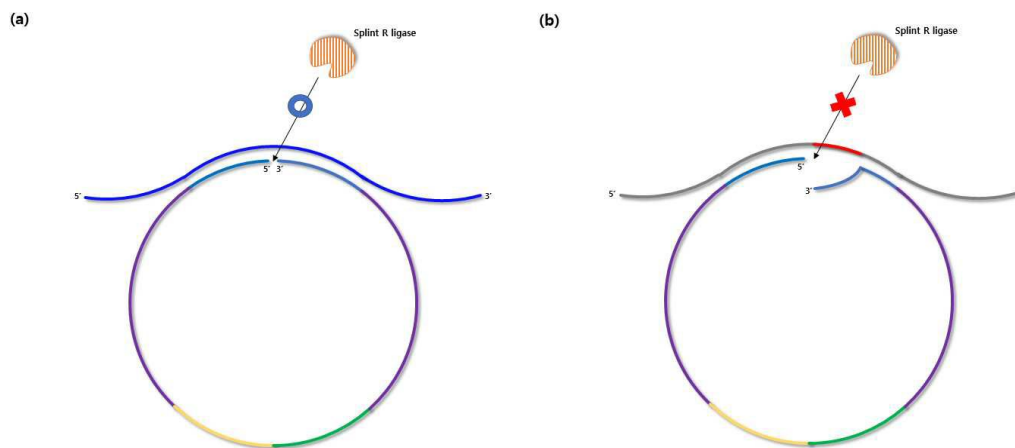
도면1



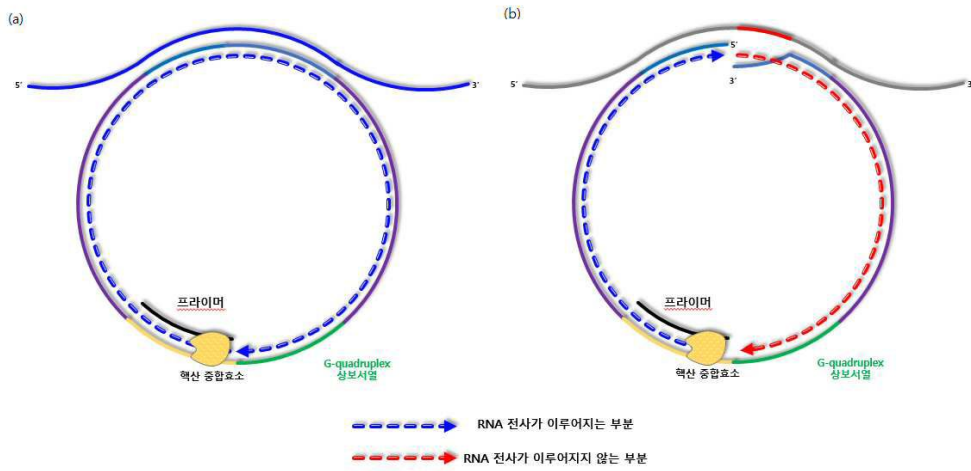
도면2



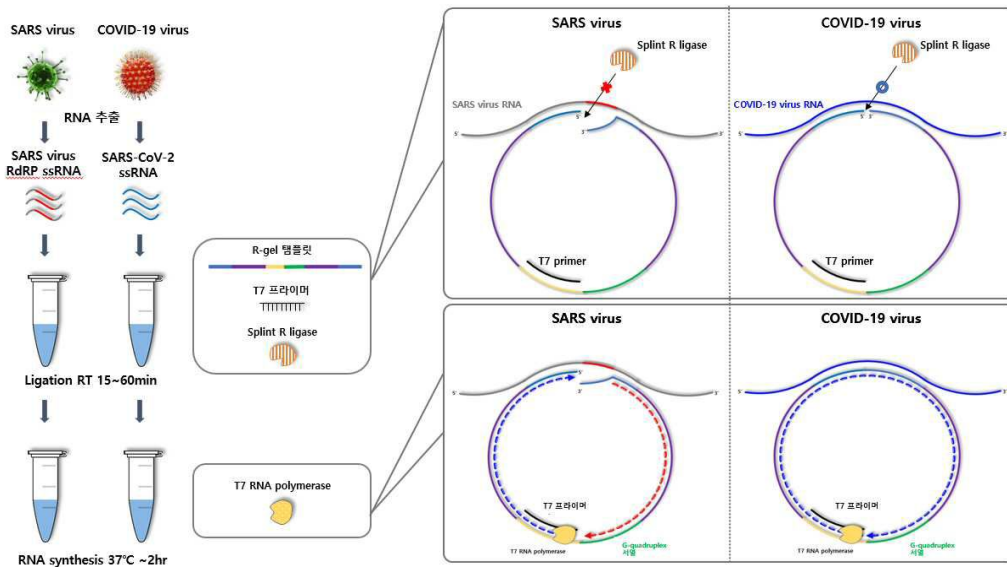
도면3



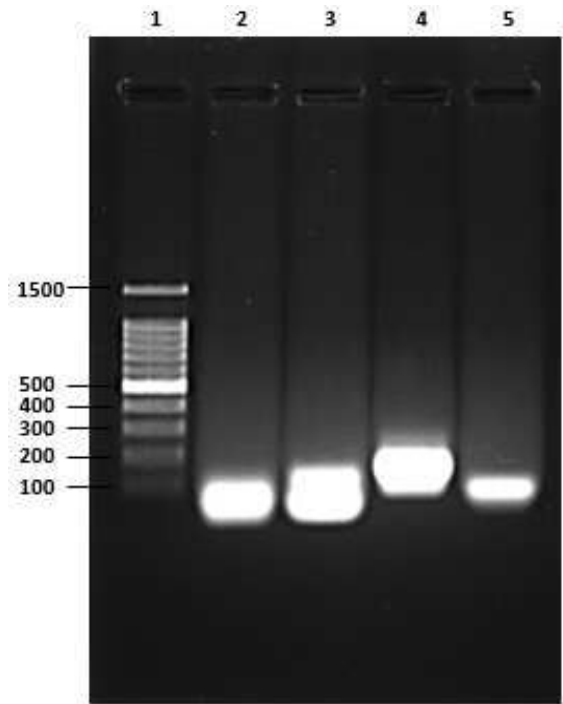
도면4



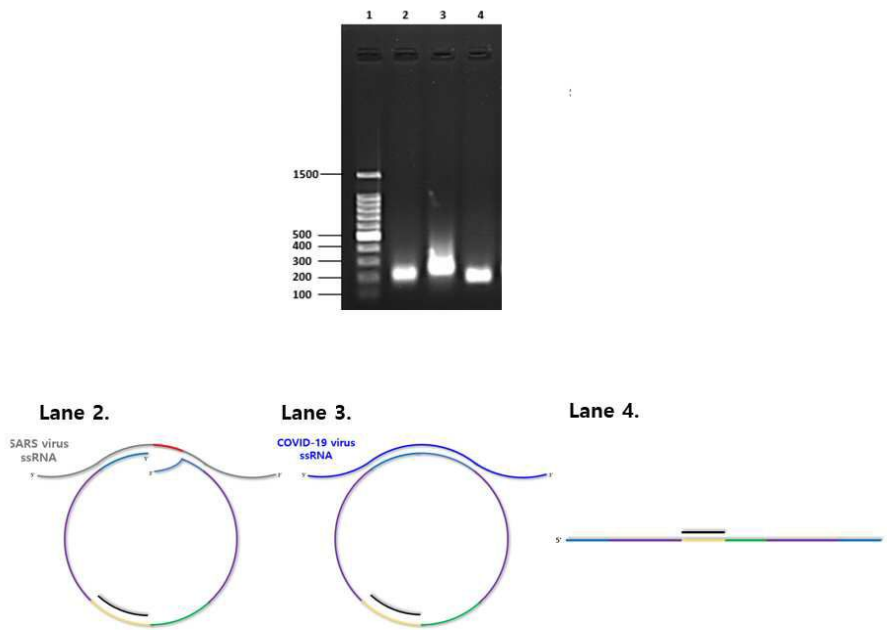
도면5



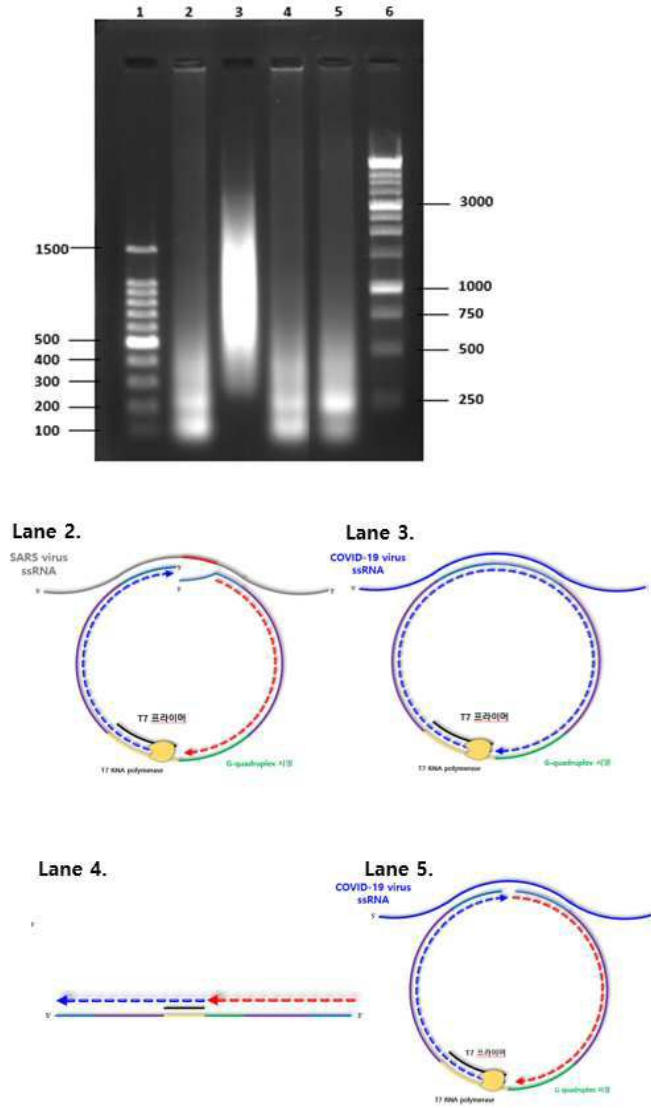
도면6



도면7



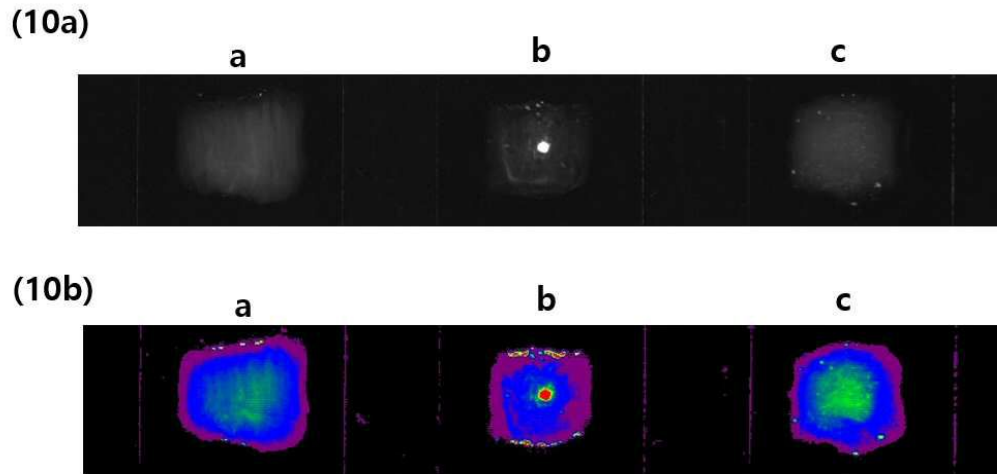
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> Progeneer Inc.
- <120> Nucleic Acid Template for Detection of Target Nucleic Acid Based on G-quadruplex Sequence and Use Thereof
- <130> P20-B303
- <160> 9
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 40
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Target Nucleic acid(SARS-CoV-2 RdRP)
- <400> 1
- auuucgguga uucauacaa accacgccag guaguggagu 40
- <210> 2
- <211> 40
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223>
- > SARS-CoV-1 RdRP
- <400> 2
- auuucgguga uuucguacaa guagcaccag gcugcggagu 40
- <210> 3
- <211> 124

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid Template

<400> 3

ttgtatgaaa tcaccttttt tttttttttt tttttttttt tttttatccc tatagtgagt 60

cgtattaacc ctaacctat tttttttttt tttttttttt ttttttttta ctacctggcg 120

tggt 124

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T7 primer

<400> 4

taatacgact cactataggg at 22

<210> 5

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G-Quadruplex sequence

<400> 5

tagggtagg gt 12

<210> 6

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementary sequence of G-Quadruplex sequence

<400> 6

accctaacc ta 12

<210> 7

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> the first complementary sequence

<400> 7  
ttgtatgaaa tcacc 15  
<210> 8  
<211> 15  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> the second complementary sequence  
<400> 8  
actacctggc gtggt 15  
<210> 9  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> T7 promoter  
  
<400> 9  
atccctatag tgagtcgtat ta 22