(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0172319
(43) 공개일자 2024년12월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6853 (2018.01) *C12Q 1/682* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6853 (2018.05)
C12Q 1/682 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2023-0069588
(22) 출원일자 2023년05월30일
심사청구일자 2023년05월30일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)
(72) 발명자
김은정
인천광역시 연수구 송도문화로84번길 24, 207동 3505호(송도동, 송도 에듀포레 푸르지오)
한주은
인천광역시 미추홀구 매소홀로475번길 18, 17동 405호(학익동, 신동아아파트3차)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

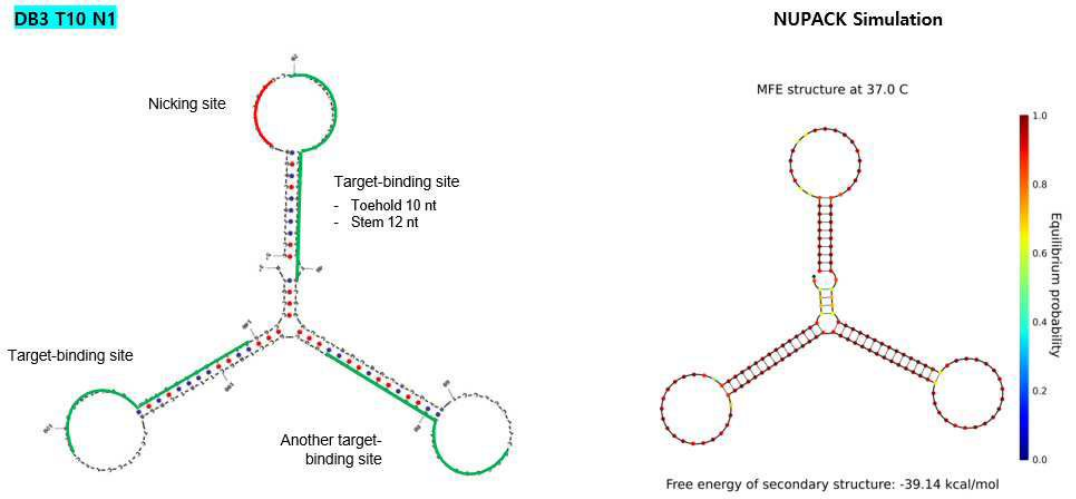
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **구조가 변환된 덤벨형 템플릿 및 이를 이용한 회전환 반응**

(57) 요 약

본 발명은 구조가 변환된 덤벨형 템플릿 및 이를 이용한 등온 증폭 반응에 관한 것이다. 본 발명의 덤벨형 핵산 템플릿은 하나 이상의 암(arm) 구조를 갖고, 절단 효소 인식 분위가 존재하여, 다중의 표적 유전자를 특이적, 효율적으로 검출할 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12Q 2525/301 (2013.01)
C12Q 2531/125 (2013.01)
C12Q 2563/107 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711191943
과제번호 2022R1C1C1005390 (1711155028)
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)-우수신진연구
연구과제명 바이러스 감염병의 신속 대응을 위한 다가성 디자이너 핵산 나노구조체의 원천기술 개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
연구기간 2022.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415185893
과제번호 20009121 (1415172714)
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원
연구사업명 바이오산업기술개발-맞춤형진단치료제품
연구과제명 엑소좀 내 핵산 및 단백질 마커 다중검출을 통한 복막섬유증 조기진단 시스템 개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 인솔주식회사
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

암(arm) 구조의 유전자 서열이 적어도 하나 이상 포함된 핵산 템플릿으로서,

상기 암(arm) 구조의 유전자 서열은 줄기(stem) 서열 및 루프(loop) 서열로 이루어지고,

상기 암(arm) 구조의 유전자 서열 상에 토홀드(toehold) 부위 및 절단효소 인식 부위가 위치하는, 덤벨(dumbbell)형의 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 반응용 핵산 템플릿.

청구항 2

제1 항에 있어서,

상기 절단효소 인식 부위는 루프 서열 상에 위치하는 것인, 핵산 템플릿.

청구항 3

제1 항에 있어서,

상기 절단효소 인식 부위는

토홀드 부위와 1 내지 15nt 떨어진 서열, 또는 토홀드 부위가 위치하지 않는 루프의 서열 상에 위치하는 것인, 핵산 템플릿.

청구항 4

제1 항에 있어서,

상기 템플릿은 100 내지 150nt의 길이를 갖는, 핵산 템플릿.

청구항 5

제1 항에 있어서,

상기 줄기(stem) 서열은 10 내지 30bp의 길이를 갖는, 핵산 템플릿.

청구항 6

제1 항에 있어서,

상기 루프(loop) 서열은 15 내지 45bp의 길이를 갖는, 핵산 템플릿.

청구항 7

제1 항에 있어서,

둘 또는 셋의 암(arm) 구조 유전자 서열을 포함하는, 핵산 템플릿.

청구항 8

제1 항에 있어서,

상기 토홀드 부위는 10 내지 30 bp의 길이를 갖는, 핵산 템플릿.

청구항 9

제1 항에 있어서,

상기 절단효소 인식 부위는 10 내지 30 bp의 길이를 갖는, 핵산 템플릿.

청구항 10

제1 항에 있어서,

상기 템플릿은 서열번호 2 내지 9로 표시되는 유전자 서열 중 어느 하나의 유전자 서열로 이루어진 것인, 핵산 템플릿.

청구항 11

제1 항 내지 제10 항 중 어느 한 항의 핵산 템플릿을 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 반응용 조성물.

청구항 12

제1 항의 핵산 템플릿을 이용한 표적 유전자의 검출 방법으로서,

a) 제1 항의 핵산 템플릿, 프라이머 및 절단효소를 포함하는 조성물에 검체를 투입하는 단계; 및

b) 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 반응을 수행하는 단계;를 포함하는, 표적 유전자의 검출 방법.

청구항 13

제12 항에 있어서,

상기 b) 단계는, 검체 내 표적 유전자가 존재하는 경우에 i) 표적 유전자 및 프라이머가 핵산 템플릿에 결합하는 단계; 및 ii) 유전자 중합효소가 결합하여, 덤벨형의 핵산 템플렛이 풀어지며 회전환 증폭 반응이 진행되는 단계;가 진행되는, 표적 유전자의 검출 방법.

청구항 14

제12 항에 있어서,

상기 b) 단계 이후, c) 상기 b) 단계에 따른 산물에 결합가능한 형광물질을 투입하고, 형광이 나타나는 경우, 표적 물질이 존재하는 것으로 판단하는 단계;를 포함하는, 표적 유전자의 검출 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 구조가 변환된 덤벨형 템플릿 및 이를 이용한 등온 증폭 반응에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 본 발명은 하나 이상의 암(arm) 구조를 갖고, 절단 효소의 위치가 특정되어 등온 증폭반응이 효율을 향상시킬 수 있는 덤벨형의 핵산 템플릿에 관한 것으로, 본 발명의 핵산 템플릿을 이용하여 등온 증폭반응을 수행하는 경우, 다중의 표적 유전자를 효율적으로 검출할 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 인구 증가와 고령화로 인해, 보다 정밀하게 질병을 진단하고 그에 따른 치료전략을 수립하는 필요성이 점차 증대되고 있으며, 이를 위한 바이오마커 등의 진단 기술로 핵산 증폭 기술(Nucleic acid amplification technology)이 이용되고 있으며, 그 중, 가장 널리 활용되고 있는 중합 효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)은 특정 표적 유전물질을 단시간에 대량으로 증폭할 수 있어 전염병, 유전 질환 등을 검출하고 진단하기 위해 사용되고 있다. 다만, 이러한 장점에도 불구하고 일반적인 PCR은 반응 온도(95℃-55℃-70℃)를 수십 회 이상 조절함으로써 표적핵산을 증폭하기 때문에 온도조절장치(thermocycler)와 같은 고가의 장비를 필요로 한다.

[0003] 상기와 같은 문제점의 대안으로 제시되고 있는 등온 증폭법은 온도를 변화시킬 필요 없이 등온에서 표적 핵산의 증폭이 이뤄지기에, 온도조절장치와 같은 고가의 장비가 불요하고, 이러한 장점 때문에 일반적인 PCR로는 구현이 어려운 현장진단에서도 활용될 수 있다. 등온 증폭법 중, 회전환 증폭(Rolling circle amplification, RCA) 기술이 최근에 각광받고 있는데, 회전환 증폭 기술은 실온(37℃)의 등온조건에서도 수행될 수 있어 현장진단 등에 활용되기 용이하고, 표적핵산이 하나의 긴 단일가닥 DNA로 생성됨으로써 1000배 이상 증폭된 신호를 얻을 수 있어 배경신호(background)에 의한 혼선이 있는 경우에도 고감도로 표적핵산을 검출할 수 있다. 또한 PCR 반응

과 달리 용액 상태뿐만 아니라 유리, microwell plates, bead, 세포 등의 표면에 고정된 상태로 증폭 가능하기 때문에 기존의 PCR로 이루어지는 바이러스 박테리아의 DNA, RNA를 진단하는 감염성 질환의 진단뿐 아니라 FISH, Immunoassay기반 실험의 신호를 증폭하거나, 세포내 단백질, 유전체 검출이 가능하여 진단 및 바이오 센싱 분야, 유전체학, 프로테오믹스 분야까지 광범위하게 응용될 수 있다.

[0004] 등온의 회전환 증폭(rolling circle amplification; RCA) 기술은 DNA 및 RNA 중합효소를 이용하여 긴 가닥의 ssDNA 또는 ssRNA를 간단하고 효율적으로 생성하는 등온 증폭 기술 중에 하나이다. RCA 기술은 진단 영역뿐만 아니라 클로닝 및 시퀀싱에도 널리 사용되어져 왔으며, 최근에는 DNA 자가조립, 나노구조체 형성을 통해 약물전달, 전자회로 제조, 바이오센싱 및 바이오이미징 등 생체 내 다양한 생물학적, 나노의학적 응용연구를 위한 도구로 사용되어져 왔다.

[0005] 특히 RCA 기술에서는 원형 주형(circular template)에 혼성화된 프라이머(또는 표적 유전자)에 뉴클레오타이드를 지속적으로 추가하여 길이가 수십에서 수천에 이르며 주형 DNA에 상보적인 서열을 가진 긴 DNA 또는 RNA 가닥을 생성한다. 따라서 주형 DNA의 맞춤설계(염기서열 또는 구조)를 통해 원하는 염기서열을 가진 DNA(예. DNA 압타머)를 제작하거나 제한효소의 작용 서열을 포함하도록 하여 증폭 효율을 높이고, 외부 특정 자극에 의해 구조변화를 일으킴으로써 선택적인 증폭반응을 유도하는 등 다양한 응용연구를 수행할 수 있다.

[0006] 기존 구조 변화를 일으키는 덤벨(dumbbell) template의 경우 1개의 stem, 2개 loop 서열을 가지며 한쪽 loop에 toehold 부위를 제공하여 표적 유전자에 의한 toehold-mediated strand displacement 기작을 통해 원형의 주형을 이루고 RCA를 개시하는 원리이다. RCA 증폭 효율을 조절하기 위해 toehold의 길이를 조절하는 방법이 사용된다.

[0007] 따라서 기존 덤벨 template이 갖는 RCA 증폭 효율을 획기적으로 개선하고, 제한효소를 이용한 추가 변형 RCA (예. NickRCA)에 적용하기 위해 새로운 형태의 덤벨 template 설계가 요구된다. 특히 NickRCA의 경우 DNA 중합효소와 nicking 효소 간의 경쟁반응으로 인해 NickRCA 반응 저해효과를 가지므로 새로운 덤벨 template 디자인을 통해 NickRCA 효율을 증가시킬 수 있는 방법이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 표적 유전자의 다중 검출이 가능(multi-primed RCA 가능)한, 다중 암(arm) 구조를 갖는 핵산 템플릿을 제공하고자 한다.

[0009] 본 발명은 또한, 등온 증폭 반응 시 기존의 덤벨 템플릿 보다 향상된 형광신호를 얻을 수 있고, 등온 증폭 반응 시 유전자 중합효소와 절단효소의 경쟁반응을 줄여, 증폭 효율을 높일 수 있는 핵산 템플릿을 제공하고자 한다.

[0010] 또한, 라이게이션(ligation) 과정 없이 타겟유전자 간의 혼성화 및 RCA를 바로 유도하여, 원-스텝(one-step)으로 등온 증폭 반응을 진행할 수 있는, 핵산 템플릿을 제공하고자 한다.

[0011] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해 고안된 것으로서, 암(arm) 구조의 유전자 서열을 적어도 하나 이상 포함하고, 상기 암(arm) 구조의 유전자 서열(이하, 암(arm)이라 한다.)은 줄기(stem) 서열 및 루프(loop) 서열로 이루어진 것이며, 상기 암(arm) 구조의 유전자 서열 상에 토홀드(toehold) 부위 및 절단효소 인식 부위가 위치하는, 덤벨(dumbbell)형의 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 반응용 핵산 템플릿을 제공한다.

[0013] 본 발명의 상기 절단효소 인식 부위는 루프 서열 상에 존재할 수 있으며, 토홀드 부위와 1 내지 15nt 떨어진 서열 상 또는 별도의 루프 상에 위치할 수 있다.

[0014] 본 발명의 템플릿은 100 내지 150nt의 길이를 갖고, 상기 줄기(stem) 서열은 10 내지 30bp의 길이로 이루어질 수 있다.

[0015] 본 발명의 상기 루프(loop) 서열은 15 내지 45bp의 길이로 이루어질 수 있으며, 본 발명의 상기 핵산 템플릿은 2 또는 3개의 암(arm) 구조를 갖는 유전자 서열(이하, 암(arm))로 이루어진 것이 바람직하다.

[0016] 본 발명의 상기 토홀드 부위는 10 내지 30 bp의 길이를 가질 수 있으며, 상기 절단효소 인식 부위는 10 내지 30 bp의 길이로 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 핵산 템플릿은 서열번호 2 내지 9로 표시되는 유전자 서열 중 어느 하나의 유전자 서열로 이루어진 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명은 또한, 상기 어느 하나의 핵산 템플릿을 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 반응용 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한, 상기의 핵산 템플릿을 이용한 표적 유전자의 검출 방법으로서, a) 제1 항의 핵산 템플릿, 프라이머 및 절단효소를 포함하는 조성물에 검체를 투입하는 단계; 및 b) 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 반응을 수행하는 단계;를 포함하는, 표적 유전자의 검출 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 표적 유전자 검출 방법 중 상기 b) 단계는, 검체 내 표적 유전자가 존재하는 경우에 i) 표적 유전자 및 프라이머가 핵산 템플릿에 결합하는 단계; 및 ii) 유전자 중합효소가 결합하여, 덤벨형의 핵산 템플렛이 풀어지며 회전환 증폭 반응이 진행되는 단계;를 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 상기 b) 단계 이후, c) 상기 b) 단계에 따른 산물에 결합가능한 형광물질을 투입하고, 형광이 나타나는 경우, 표적 물질이 존재하는 것으로 판단하는 단계;가 더 포함될 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명은 기존 덤벨 템플릿(single arm dumbbell template (DB 1)) 대비 세 개의 암구조를 갖는 템플릿(triple arm dumbbell template (DB3))을 이용하는 바, 한 개 내지 세 개 이상의 표적 유전자가 결합할 수 있는 부위를 가질 수 있어, 표적 유전자의 다중 검출이 가능하다(multi-primed RCA 가능).

[0023] 본 발명의 핵산 템플릿은 또한, 기존의 덤벨 템플릿(DB1, (약 56 nt)) 대비 암(arm) 구조가 다수 개 이므로, 길이가 더 길어(약147 nt), 이중 가닥을 형성하는 줄기(stem) 부위가 하나의 템플릿(template)당 약 3개가 존재하기 때문에 RCA를 통해 얻어지는 DNA 산물에 SYBR Green 형광 염색 시 염료가 더 높은 효율로 끼어 들어갈 수 있다. 따라서 더 높은 형광신호를 얻을 수 있으며, 이로써 향상된 RCA 증폭 효율을 기대할 수 있다.

[0024] 본 발명의 핵산 템플릿은 프라이머 없이 self-ligation이 가능한 형태이며, 본 발명의 핵산 템플릿(template)은 다른 RCA reagent (enzyme, dNTP, reaction buffer, etc.)와 함께 master mix에 포함될 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명의 핵산 템플릿은 다른 RCA에서 template과 표적 유전자간 혼성화 및 라이게이션(ligation) 과정을 거친 후 RCA 반응을 하는 이른바 투 스텝(two-step) 반응을 거치는 것 대비 본 발명의 핵산 템플릿을 이용할 경우 라이게이션(ligation) 과정 없이 타겟유전자 간의 혼성화 및 RCA를 바로 유도할 수 있다는 이점이 있다. 즉, 본 발명은 원-스텝(one-step)으로 반응을 일으킬 수 있어, 불필요한 공정을 축소시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 덤벨형 구조를 갖는 템플릿의 설계도이며, 도 1의 템플릿은 하나의 암(arm), 하나의 줄기(stem), 두 개의 루프(loop) 구조로 이루어진다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 템플릿 설계도이며, 두 개의 암(arm), 두 개의 줄기(stem), 두 개의 루프(loop) 구조로 이루어진다.

도 3 내지 도 6는 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 템플릿 설계도이며, 세 개의 암(arm), 세 개의 줄기(stem), 세 개의 루프(loop) 구조로 이루어진다. 도 3은 토홀드(toehold) 부위가 10nt, 도 4는 11nt, 도 5는 12nt, 도 6은 13nt의 길이를 가지며, 각각은 세 개의 서로 다른 표적 유전자가 결합할 수 있으며, 줄기(stem) 유전자 서열의 길이를 서로 다르게 설계되었다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 설계되어, 하나의 암(arm), 하나의 줄기(stem), 두 개의 루프(loop) 구조로 이루어진 핵산 템플릿의 구조를 나타내며, 절단 효소 인식부위는 루프(loop) 서열 상에, 표적 유전자 결합 부위(Target binding site)는 루프(loop) 서열의 일부 및 줄기(stem) 서열의 일부를 포함하는 연결된 서열 상에 위치하는 것을 알 수 있다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 템플릿 설계도이며, 세 개의 암(arm), 세 개의 줄기(stem), 세 개의 루프(loop) 구조로 이루어진다. 도 8에서 절단 효소는 어느 하나의 루프(loop) 서열 상에 위치할 수 있다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 전기 영동(15% dPAGE)의 결과이다. 해당 실시예에서는 본 발명의 암 구조를 갖는 핵산 템플릿을 형성하기 위해 제작된 선형의 템플릿(template)의 양 끝 말단을 T4 DNA를 이용하여 라이게이션(ligation (primer-free self ligation))한 후, 라이게이션(ligation)되지 않은 프리-선형 템플릿(free linear template)를 제거하기 위해 exonuclease I/III를 처리하였다. 도 9의 Denatured PAGE 결과를 통해 라이게이션(ligation)이 잘 이뤄지고, 최종적으로 엑소뉴클레아제(exonuclease)에 의해 분해되지 않는 덤벨(dumbbell) 형태의 핵산 템플릿(template)이 제작된 것을 확인할 수 있다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 전기 영동(10% nPAGE)의 결과이다. 본 실시예에서는 각 템플릿(template)에 대해 타겟유전자(miR-21)과 혼성화 후 native PAGE를 통해 혼성화 여부를 분석하였다. 도 10을 참조하면, 모든 템플릿(template)에서 표적 유전자와 혼성화(hybridization)가 일어나는 것을 확인할 수 있으며, 특히 DB3 템플릿(template)에서 토홀드(toehold) 부위가 길어질 수록 표적 유전자와의 혼성화가 잘 일어나는 것을 확인할 수 있다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 제작된 핵산 템플릿(DB3 T13 N1)을 이용하여 서로 다른 온도에서 회전환 증폭(RCA) 반응을 수행한 결과로서, 도 11을 참조하면 RCA 반응 온도가 50℃일 때 표적 유전자 유무에 대한 형광신호 차이가 가장 뚜렷한 것을 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명의 DB3 핵산 템플릿을 이용한 RCA 실험에서 최적반응 온도는 약 40 내지 60℃, 바람직하게는 50℃이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작되어, 서로 다른 토홀드(toehold) 부위 길이를 갖는 핵산 템플릿(DB3 T13 N1, DB1 T10 N1, DB2 T10 N1)을 이용하여 회전환 증폭(RCA) 반응을 수행한 결과로서, 도 12를 참조하면, DB3 T13 N1의 경우 DB1 T10 N1, DB2 T10 N1 대비 더 높은 증폭 효율을 갖는 것을 볼 수 있다. 즉, DB3 핵산 템플릿에서 토홀드(toehold) 길이가 길어질 수록 RCA 증폭 효율이 증가함을 알 수 있다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따라 제작되어, 절단 효소 인식 부위를 포함/불포함하는 두 핵산 템플릿을 이용하여 회전환 증폭(RCA) 반응을 수행한 결과로서, DB1 T10 N1의 경우 절단 효소 인식 부위가 존재하는 핵산 템플릿(Nt template)에서 형광이 더 낮고, DB3 T13 N1의 경우 Nt template에서 형광이 더 크다는 것을 확인할 수 있다. 즉, 절단 효소 인식 부위가 존재하는 핵산 템플릿(Nt template)은 트리플-암(triple-arm) 덤벨 핵산 템플릿(dumbbell template)의 장점을 살리기에 더 적합하다는 것을 알 수 있다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작된 핵산 템플릿을 이용하여, Nick RCA를 수행한 결과로서, 절단 효소(Nicking enzyme)을 이용하여 Nick RCA 반응을 일으켰을 경우, 기존 RCA 대비 형광이 지수함수적으로 증가하는 것을 확인할 수 있다. 도 14의 내용을 참조하면, DB1 T10 N1 (Nt) 템플릿의 경우 표적 핵산이 존재하지 않는 경우에도 빠른 시간 내에 지수함수적 증폭이 일어나, 비특이적 반응(nonspecific reaction)이 일어나는 것을 확인할 수 있다. 반면, DB3 T10 N2 (Nt) 템플릿의 경우 DB1 T10 N1 (Nt) 템플릿과 같은 비특이적 반응을 확인하기 어렵다. 즉, 본 발명에 따라 DB3을 이용하는 경우, DB1에 비해 RCA 혹은 Nick RCA 효율 모두 증가시킬 뿐만 아니라 Nick RCA에서 관찰되는 비특이적 반응을 줄이는데 효과적임을 알 수 있다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작된 핵산 템플릿(DB1 T10 N1, DB3 T13 N1)을 이용하여 서로 다른 온도에서 회전환 증폭(RCA) 반응을 수행한 후, 각각의 산물을 분석하기 위해 10% nPAGE 분석한 결과로서, DB3의 경우 DB1에 비해 NickRCA 반응에서 표적 유전자 유무에 따른 DNA 산물의 양 차이가 뚜렷한 것을 확인할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 후술되어 있는 실시 예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 게시되는 실시 예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 게시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다. 명세서 전체에 걸쳐 동일 참조 부호는 동일 구성 요소를 지칭한다.

[0028] 다른 정의가 없다면, 본 명세서에서 사용되는 모든 용어(기술 및 과학적 용어를 포함)는 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 공통적으로 이해될 수 있는 의미로 사용될 수 있을 것이다. 또 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 용어들은 명백하게 특별히 정의되어 있지 않는 한 이상적으로 또는 과도하게 해석되지 않는다. 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예들을 설명하기 위한 것이며 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다.

[0029] 본 발명자들은 본 발명자들은 회전환 증폭 방법을 통해 다양한 표적 유전자를 효율적으로 검출할 수 있는 핵산

템플릿(주형 템플릿)을 개발하기 위해 연구 노력한 결과, 다수 개의 암(arm) 구조(또는 형태)를 갖도록 제작한 템플릿을 이용하여, 회전환 증폭을 수행하는 경우 다수의 표적핵산을 높은 효율로 검출할 수 있음을 확인하였는바, 이로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0030] 이에, 본 발명은 줄기(stem) 서열 및 루프(loop) 서열로 이루어지는 적어도 하나 이상의 암(arm); 및 상기 암(arm) 서열 상에 토홀드(toehold) 부위 및 절단효소 인식 부위;를 포함하는, 덤벨(dumbbell)형의 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 반응용 핵산 템플릿 및 이를 이용한 회전환 증폭 반응을 제공한다.

[0031] 본 발명에 있어서 사용되는 용어 "표적 유전자"는 검출하고자 하는 모든 종류의 유전자를 의미하며, 서로 다른 종 (species), 아종(subspecies), 또는 변종(variant) 유래의 유전자 염기서열 또는 동일 종 내 유전자 돌연변이를 포함한다. 이는 genomic DNA와 mitochondrial DNA, viral DNA를 포함하는 모든 종류의 DNA 또는 mRNA, ribosomal RNA, non coding RNA, tRNA, viral RNA 등을 포함하는 모든 종류의 RNA를 특징으로 할 수 있으나 이에 국한되지 않으며, 이에 한정되는 것은 아니나, 염기서열의 변이를 포함하는 돌연변이 염기서열인 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 돌연변이는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP), 삽입 (insertion), 결실(deletion), 점 돌연변이(point mutation), 융합 돌연변이(fusion mutation), 전좌 (translocation), 역위(inversion) 및 LOH(loss of heterozygosity)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명에 있어서 사용되는 용어 "표적 유전자"는 뉴클레오티드 폴리머를 지칭하며, 달리 한정되지 않는다면 자연적으로 발생한 뉴클레오티드와 유사한 방식(예컨대, 혼성화)으로 작용할 수 있는 천연 뉴클레오티드의 공지된 유사체(analog)를 포함한다. 본 발명의 표적 유전자는, 예를 들어 유전체 DNA; 상보 DNA(cDNA)(이는 보통 전령 RNA(mRNA)의 역전사 또는 증폭으로 얻어지는 mRNA의 DNA 표현임); 합성으로 또는 증폭으로 생성된 DNA 분자; 및 mRNA를 포함한 임의의 형태의 DNA 또는 RNA를 포함하며, 단일 가닥 분자뿐만 아니라 이중 또는 삼중 가닥 핵산을 포함한다. 이 중 또는 삼중 가닥 핵산에서 핵산 가닥은 동연(coextensive)일 필요는 없다(즉, 이중 가닥 핵산은 양 가닥의 전 체 길이를 따라 이중 가닥일 필요는 없다).

[0033] 본 발명의 "표적 유전자"는 또한 메틸화 및/또는 캡핑과 같은 것에 의한 이의 임의의 화학적 개질을 포함한다. 핵산 개질은 개별적인 핵산 염기 또는 핵산 전체에 추가적인 전하, 분극률, 수소 결합, 정전기 상호작용, 및 기능성을 포함하는 화학기의 첨가를 포함할 수 있다. 이러한 개질은 2' 위치 당 개질, 5 위치 피리미딘 개질, 8 위치 퓨린개질, 시토신 환외(exocyclic) 아민에서의 개질, 5-브로모-우라실의 치환, 주쇄 개질, 이소염기 이소시티딘 및 이소구 아니딘과 같은 특이 염기쌍 조합 등과 같은 염기 개질을 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명의 "표적 유전자"는 고상 매개 화학적 합성(solid phase-mediated chemical synthesis)과 같은 완전한 화학적 합성 과정으로부터, 핵산을 생성하는 임의의 종으로부터 분리를 통해서와 같은 생물학적 공급원으로부터, 또는 DNA 복제, PCR 증폭, 역전사와 같은 분자 생물학 도구에 의한 핵산의 취급과 관련된 과정으로부터, 또는 이들 과정의 결합으로부터 유도될 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서 사용되는 용어, "핵산 템플릿"은 회전환 증폭을 위해 표적 서열에 상보적으로 설계된 템플릿(프로브)로서, 원형화 뉴클레오타이드 프로브(Circularizing oligonucleotide probes)라고도 불리우며, 원형의 루프(loop) 서열;과 각 루프 서열에서 뻗어져 나와 이중 가닥으로 형성되며, 각각이 서로 연결된 줄기(stem) 서열;로 이루어진다. 하나의 루프 서열과 해당 루프서열에서 뻗어져 나온 줄기(stem) 서열을 포함하여 암(arm) 구조라 하며, 하나의 암(arm) 구조(형태)의 유전자 서열에는 하나의 루프 서열과 하나의 줄기 서열이 존재하는 것이 일반적이나, 구조상 예외적으로 두 개의 루프 서열을 잇기 위하여 하나의 줄기(stem) 서열만이 존재할 수 있다 (도 1 참조). 본 발명에서, 루프 서열과 줄기 서열이 연결된 위치, 즉 루프 서열의 일부와 줄기 서열의 일부를 포함하는 위치의 유전자 서열은 표적 유전자(또는 프라이머)에 특이적인 서열로 구성될 수 있다. 상기 표적 유전자에 특이적인 서열 중 루프 서열에 해당하는 부분은, 토홀드(toehold) 부위라 한다. 본 발명의 핵산 템플릿은 회전환 증폭 과정에서 연결효소(Ligase)의 도움을 통해 환형화될 수 있다.

[0036] 본 발명의 핵산 템플릿은 하나 이상의 암(arm), 바람직하게는 2개 또는 3개의 암(arm) 구조를 가질 수 있다 (도 2 내지 도 6 참조). 가장 바람직하게는 3개의 암(arm) 구조를 갖는다.

[0037] 본 발명의 핵산 템플릿은 또한, 절단 효소((Nicking enzyme) 인식 부위를 루프 서열 내 포함한다. NickRCA는 템플릿(template)에 특정 절단 효소에 대한 절단 부위(nicking site)를 포함하고 있으며, RCA를 통해 생성된 상보적인 염기서열 중에 일부가 절단(nicking) 효소에 의해 잘리게 되고 절단된 부위(nicked site)를 형성하며, 이때 형성된 절단된 부위(nicked site) 말단의 3' OH를 DNA 중합효소가 새롭게 인식하여 중합반응을 개시하며 하

나의 템플릿(template)에서 여러 중합효소가 작용하여 연쇄적인 증폭반응을 유도할 수 있다.

[0038] 따라서, 절단 효소를 이용한 일반적인 NickRCA의 경우, DNA 중합효소와 절단 효소가 하나의 템플릿(template)에 대해 서로 경쟁반응을 하며 DNA 중합과 절단(nicking)을 동시에 수행하며, 이러한 경쟁반응으로 인해 NickRCA의 증폭효율의 저해를 가져올 수 있다. 그러나, 본원 발명의 핵산 템플릿은 (원형의 template DNA의 사이즈가 클 경우(DB3 > DB1), 두 효소간 물리적인 거리를 늘릴 수 있음) 두 개 또는 세 개 이상의 암(arm) 구조를 갖고, 100 내지 150nt (바람직하게는 120 내지 150nt, 더욱 바람직하게는 147nt) 크기로 이루어지므로, DNA 중합효소와 절단효소, 두 효소의 경쟁반응을 저해할 수 있어, 이로 인해 NickRCA 효율을 높일 수 있다.

[0039] 본 발명에서 제공되는 핵산 템플릿의 염기서열의 길이는 다음과 같다.

[0040] 본 발명의 토홀드(toehold) 부위는 10 내지 30bp의 길이로 이루어지며, 바람직하게는 10~13 bp 또는 20~30 bp의 길이를 갖는다. 본 발명의 프라이머 또는 표적 유전자가 결합하는 템플릿 상 위치는 토홀드(toehold) 및 줄기(stem) 부위를 포함한다. 이는, 표적(target) 유전자의 길이에 따라 전체 염기서열이 전체 하이브리드(fully hybrid)되거나, 부분적으로 하이브리드(partially hybrid) 될 수 있다.

[0041] 본 발명의 상기 줄기(stem) 서열은 10 내지 30bp의 길이로 이루어지며, 바람직하게는 12~15 bp 또는 20~30 bp의 길이를 갖는다.

[0042] 본 발명의 루프(loop) 서열은 15 내지 45bp의 길이로 이루어지며, 바람직하게는 16~26 bp 또는 10~45 bp의 길이를 갖는다.

[0043] 본 발명의 절단효소 인식 부위는 10 내지 30 bp의 길이를 갖는다. 본 발명의 절단 효소 인식 부위(Nicking site)는 루프(Loop) 염기서열에 포함되며, 토홀드(toehold) 염기서열과 1~10 nt 염기서열을 두고 위치하거나, 토홀드(toehold) 염기서열이 존재하는 루프(loop)와 다른 루프(loop)의 염기서열에 포함될 수 있다.

[0044] 본 발명에 있어서 상기 핵산 템플릿은 표지자 부위를 포함할 수 있고, 상기 표지자 부위에는 형광물질 및 DNA를 포함하는 형광 프로브가 결합할 수 있으며, 상기 형광 프로브에 포함되는 형광물질은 형광공여체 또는 형광수용체일 수 있다.

[0045] 상기 형광물질은 이에 제한되는 것은 아니지만, 상기 형광물질은 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 350, 캐스케이드 블루(Cascade Blue), 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 405, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 430, 니트로벤즈옥사디아졸(nitrobenzoxadiazole, NBD), 플루오레세인(fluorescein), 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 488, 오레곤 그린(Oregon Green) 488, 보디피(BODIPY) 493/503, 로다민 그린(Rhodamine Green), 보디피(BODIPY) FL, 오레곤 그린(Oregon Green) 514, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 514, 에오신(Eosin), 로다민(Rhodamine) 6G, 보디피(BODIPY) R6G, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 532, 보디피(BODIPY) 530/550, 보디피(BODIPY) TMR, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 555, 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine, TMR), 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 546, 보디피(BODIPY) 558/568, QSY 7, QSY 9, 보디피(BODIPY) 564/570, 리사민 로다민 B(Lissamine rhodamine B), 로다민 레드(Rhodamine Red), 보디피(BODIPY) 576/589, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 568, X-로다민(X-rhodamine), 보디피(BODIPY) 581/591, 보디피(BODIPY) TR, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 594, 텍사스 레드(Texas Red), 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 610-X, 보디피(BODIPY) 630/650, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 633, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 635, 보디피(BODIPY) 650/665, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 647, QSY 21, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 660, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 680, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 700, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 750, 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 790 및 아토(ATTO)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명에 기재된 핵산 템플릿을 표현하는 용어는 다음 표 1과 같이 이해될 수 있다.

표 1

[0047]

DB# T# N#	내용
DB#	덤벨 템플릿(Dumbbell template)# = 1, 2, 3 등(etc), 암(arm)의 수에 따름
T#	토홀드(toehold)부위# = 토홀드 부위 염기(base) 수에 따름
N#	절단 효소 인식 부위(Nicking site)# = 절단 효소 인식부위 수에 따름

[0048] 또한, 본 발명에서 암(arm) 수에 따른 핵산 템플릿은 다음 표 2와 같이 설계될 수 있다. 표 2에 제시된 내용에

제한되는 것은 아니다.

표 2

[0049]

암(arm)의 수	줄기(stem) 및 루프(loop) 서열
한 개(Single arm template)	한 개의 줄기 서열 및 두 개의 루프 서열
두 개(Dual arm template)	두 개의 줄기 서열 및 두 개의 루프 서열
세 개(Triple arm template)	세 개의 줄기 서열 및 세 개의 루프 서열

[0050] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

실 시 예 1

[0052] **핵산 템플릿의 제작**

[0053] 본 실시예에서는 선형의 템플릿을 제작한 후, 양 끝 말단을 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation(primer-free self ligation)하였으며, Ligation 후 ligation되지 않은 잔류하는 선형의 템플릿을 제거하기 위해 exonuclease I/III를 처리하여, 덤벨형의 핵산 템플릿을 제작하였다. 상세하게 5' 인산화된 선형의 템플릿 DNA (4 μM)을 1X T4 DNA ligation 완충액 (50 mM Tris-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 10 mM DTT, pH 7.5)에서 70℃에서 10분 동안 가열하고 25℃로 천천히 냉각하여 어닐링하였다. 2 μL의 T4 DNA ligase(16 U/μL)를 첨가하여 5' 인산기와 3' 하이드록실기 사이에 형성된 nick 부위를 연결하는 ligation 반응을 25℃에서 2시간 동안 수행한 후 65℃에서 10분간 가열하여 T4 DNA ligase를 비활성화하였다. 이후 ligation되지 않은 선형 템플릿 DNA를 제거하기 위해 ligation한 템플릿 DNA를 1X exonuclease 반응 완충액(10 mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10 mM MgCl2, 1 mM DTT, pH 7)에서 37℃에서 1시간 동안 Exonuclease I/III를 처리하고, 이후 80℃에서 15분간 가열하여 비활성화한 후 제작된 덤벨형의 템플릿을 -20℃에 보관하여 이후 RCA 반응에 사용하였다.

[0055] 본 발명에서 이용된 유전자 서열은 다음 표 3과 같다.

표 3

[0056]

명칭	서열 (5' →3')	서열번호
miR-21 (target)	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	1
DB1 T10 N1	/5Phos/AAGCTATTGTAATACCTCAGCCTAGCTTATCAGAGCCCCC*TCAACATCAG*TCTGAT	2
DB2 T10 N1	/5Phos/TAGCTTATCAGAGCCTCAGCCTCAACATCAGTCTGATAAGCTATAGCTTATCAGATCC TAATAC*TCAACATCAG*TCTGATAAGCTA	3
DB3 T10 N1	/5Phos/GCTTATCAGAGCCTCAGCC*TCAACATCAG*TCTGATAAGCTACGGGCCTAGCAGCACGT ATCCTCCTTCCGCCAATATT TACGTGCTGCTAGGCGCCTAGCTTATCAGATCCTCCTTC*TCAACATCAG*TCTGATAAGCTAGGCC CGTA	4
DB3 T11 N1	/5Phos/GCTTATCAGCGCCTCAGCCTCAACATCAGTCTGATAAGCTACGGGCCTAGCAGCACGT CTCCTCCTTCCGCCAATATTTACGTGCTGCTAGGCGCCTAGCTTATCAGCTCCTCCTTCTCAACA TCAGTCTGATAAGCTAGGCCCGTA	5
DB3 T12 N1	/5Phos/GCTTATCACCGCCTCAGCCTCAACATCAGTCTGATAAGCTACGGGCCTAGCAGCACGC CTCCTCCTTCCGCCAATATTTACGTGCTGCTAGGCGCCTAGCTTATCACCTCCTCCTTCTCAACA TCAGTCTGATAAGCTAGGCCCGTA	6
DB3 T13 N1	/5Phos/GCTTATCCCCGCCTCAGCCTCAACATCAGTCTGATAAGCTACGGGCCTAGCAGCACCC CTCCTCCTTCCGCCAATATTTACGTGCTGCTAGGCGCCTAGCTTATCCCCTCCTCCTTCTCAACA TCAGTCTGATAAGCTAGGCCCGTA	7
DB1 T10 N1 (Nt)	/5Phos/AAGCTATTGTAATACCGACTCCTAGCTTATCAGAGCCCCC*TCAACATCAG*TCTGAT	8
DB3 T13 N1 (Nt)	/5Phos/GCTTATCCCCGCCTCAGCCTCAACATCAGTCTGATAAGCTACGGGCCTAGCAGCACCC CTCCTCCTTCCGCCAATATTTACGTGCTGCTAGGCGCCTAGCTTATCCCCTCCTCCTTCTCAACA TCAGTCTGATAAGCTAGGCCCGTA	9

[0057] 본 실시예에 따라 제작된 덤벨형 핵산 템플릿은 15% dPAGE (denaturing PAGE) 분석을 통해 확인하였으며, 7 M urea, 40% acrylamide/bis solution (29:1), 10% ammonium sulfate (APS), tetramethylethylenediamine (TEMED) 및 1X TBE 완충액(100 mM Tris, 90 mM Boric acid, 1 mM EDTA)을 이용하여 15% urea-polyacrylamide 젤을 제작하였다. 선형의 템플릿을 비롯하여 ligation한 템플릿, exonuclease I/III 처리한 덤벨 템플릿을 1X TBE-urea 샘플 완충액에서 70℃에서 5분 동안 가열하여 변성시킨 후 0.5X TBE에서 15% dPAGE로 분석하였다. 이후 1X SYBR gold nucleic acid stain으로 25℃에서 30분 동안 염색하였다. 염색한 젤 이미지는 ChemiDoc MP 젤 영상 시스템(Bio-Rad Laboratories)을 통해 얻었고, ImageJ 소프트웨어를 사용하여 이미지를 처리하였다. 처리한 젤 이미지 결과는 도 9에 표시된 바와 같다. 도 9를 참조하면, 밴드 위치를 통해 ligation이 잘 이뤄졌으며, 최종적으로 exonuclease에 의해 분해되지 않는 덤벨(dumbbell) 형태의 템플릿(template)이 제작된 것을 확인할 수 있다.

실 시 예 2

[0059] **제작된 핵산 템플릿의 표적 유전자와의 혼성화 여부 확인**

[0060] 덤벨형의 핵산 템플릿은 표적 유전자와 상보적인 결합을 할 수 있도록 설계되어 있으므로 표적 유전자와 혼성화가 일어날 수 있다. 제작된 핵산 템플릿과 표적 유전자와의 혼성화는 10% nPAGE (native PAGE)를 통해 확인하였다. 덤벨 템플릿(200 mM)과 표적 유전자(200 mM)를 1X 등온 증폭 반응 완충액(20 mM Tris-HCl, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 50 mM KCl, 2 mM $MgSO_4$, 0.1% Tween 20, pH 8.8)에서 반응 후 80℃에서 55℃로 온도를 천천히 낮춰 어닐링하였다. 이후 nPAGE 분석을 위해 30% acrylamide/bis solution (29:1), 10% APS, TEMED 및 1X TBE 완충액을 이용하여 10% 천연 polyacrylamide 젤을 제작하였다. 0.5X TBE에서 10% nPAGE로 분석한 후 1X SYBR gold nucleic acid stain으로 25℃에서 30분 동안 염색하였다. 염색한 젤 이미지는 ChemiDoc MP 젤 영상시스템을 통해 얻었고, 얻은 젤 이미지는 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 처리하였다.

[0061] 각 덤벨 템플릿에 대해 표적 유전자(miR-21)와 혼성화 후 native PAGE를 통해 혼성화 여부를 분석하였으며, 그 결과는 도 10에 나타난 바와 같다. Native PAGE는 핵산 본래의 이차구조 형성 여부를 분석하는데 사용하며, denaturing PAGE는 열적, 화학적으로 변성된 핵산 그 자체를 분석하는데 쓰인다. 따라서 native PAGE에서 새롭게 관찰되는 밴드의 형성 유무를 통해 덤벨 템플릿과 표적 유전자와의 혼성화 여부를 결정할 수 있다.

[0062] 도 10에 도시된 바와 같이, 모든 덤벨 템플릿(template)에서 표적 유전자(target)와 혼성화(hybridization)가 일어나는 것을 확인했으며, 특히 트리플-암(triple-arm)을 갖는 덤벨 템플릿(DB3 template)에서 토홀드(toehold) 부위가 길어질 수록 표적 유전자와의 혼성화가 잘 일어나는 것을 확인할 수 있다. 즉, 토홀드(toehold) 부위는 10 내지 30bp인 것이 바람직하다.

실 시 예 3

[0064] **제작된 트리플-암 템플릿을 이용한 RCA 반응의 최적온도 확인**

[0065] 표적 유전자와 혼성화를 가장 잘 이룬 DB3 T13 N1 템플릿을 이용하여 Bst 2.0 DNA 중합효소를 이용한 RCA 반응의 최적온도를 확인하였다. RCA 반응을 효과적으로 유도하기 위해 덤벨 템플릿과 표적 유전자, DNA 중합효소는 RCA mater mix 제조의 가장 마지막 단계에 첨가하였다. RCA mater mix는 1X 등온 반응 완충액에 $MgSO_4$ (6 mM), dNTP (1 mM), SYBR Green (2.5X)를 이용하여 먼저 제작하고, 이후 DB3 T13 N1 (200 nM)과 Bst 2.0 DNA 중합효소 (0.08 U/μL)를 추가하여 18 μL의 mix를 제조한 후 2 μL의 표적 유전자(miR-21, 5 nM)를 넣어 20 μL의 최종 부피를 맞추었다. 대조군으로 2 μL의 Tris-HCl 완충액(20 mM)을 사용하였다. 반응 혼합물은 모두 ice 상에서 제작하였으며, RCA 반응은 50 내지 65℃에서 60분 동안 반응하고 80℃에서 20분 동안 가열하여 Bst 2.0 DNA 중합효소를 비활성화하고 반응을 종결하였다. QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™)을 이용하여 60분 동안 1분 간격으로 실시간 형광 신호를 측정하였다. 각 시간 별 해당 시료의 형광 측정값(fluorescence intensity, FI)에서 초기 형광 측정값(initial FI or FI_0)를 빼는 방식을 통해 순 신호 변화(net signal changes)를 얻었다. 2-3회의 독립적인 실험 반복을 통해 얻은 평균 형광 강도(FI)를 사용하여 실험군 간의 상대적 형광 변화를 비교하고, 30분 및 60분에서 측정된 값을 이용하여 반응 조건 별 형광 신호 변

화를 분석하였다.

[0066] 본 실시예에서는 Bst 2.0 DNA 중합효소를 이용하여 본 발명의 템플릿 이용 시RCA 반응의 최적온도를 확인하고자, 50 내지 65℃(비활성화온도: 80 ℃)에서 본원 발명의 템플릿 DB3 T13 N1을 이용하여 RCA반응을 수행하였으며, 기본적인 반응 조건은 다음 표 4와 같다.

표 4

[0067]

시약	농도
DB3 T13 N1 템플릿	200 nM
표적 유전자(Target)	0 or 5 nM
dNTP	1 mM
$MgSO_4$	6 mM
SYBR Green	2.5X
등온 반응 완충액(Isothermal reaction buffer)	1X
Bst2.0 DNA 중합효소	0.08 U/μL

[0068] 본 실시예에 따른 결과는 도 11과 같으며, 해당 결과는 실험 반복횟수(n) 2-3회 반복하여 나온 결과의 평균이다. 도 11을 참조하면, RCA 반응 온도가 50 ℃일 때 표적 유전자 유무에 대한 형광신호 차이가 가장 뚜렷한 것을 볼 수 있으므로 DB3 템플릿을 이용한 RCA 실험에서 최적반응 온도는 약 40 내지 60℃, 바람직하게는 약 50 ℃임을 알 수 있다.

[0069]

실 시 예 4

[0070] **토홀드(toehold) 부위 길이에 따른 RCA 효율 확인**

[0071] 서로 다른 암(arm)을 가진 덤벨 템플릿(DB1, DB2, DB3 템플릿)을 이용하여 토홀드 부위 길이에 따른 RCA 효율을 비교하였다. RCA 반응을 효과적으로 유도하기 위해 덤벨 템플릿과 표적 유전자, DNA 중합효소는 RCA mater mix 제조의 가장 마지막 단계에 첨가하였다. RCA mater mix는 1X 등온 반응 완충액에 $MgSO_4$ (6 mM), dNTP (1 mM), SYBR Green (2.5X)를 이용하여 먼저 제작하고, 이후 덤벨 템플릿(200 nM)과 Bst 2.0 DNA 중합효소 (0.08 U/μL)를 추가하여 18 μL의 mix를 제조한 후 2 μL의 표적 유전자(miR-21, 5 nM)를 넣어 20 μL의 최종 부피를 맞추었다. 대조군으로 2 μL의 Tris-HCl 완충액(20 mM)을 사용하였다. 반응 혼합물은 모두 ice 상에서 제작하였으며, RCA 반응은 50℃에서 60분 동안 반응하고 80℃에서 20분 동안 가열하여 Bst 2.0 DNA 중합효소를 비활성화하고 반응을 종결하였다. QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System을 이용하여 60분 동안 1분 간격으로 실시간 형광 신호를 측정하였다. 각 시간 별 해당 시료의 형광 측정값(FI)에서 초기 형광 측정값(FI_0)를 빼는 방식을 통해 순 신호 변화(net signal changes)를 얻었다. 2-3회의 독립적인 실험 반복을 통해 얻은 평균 형광 강도(FI)를 사용하여 실험군 간의 상대적 형광 변화를 비교하고, 30분 및 60분에서 측정된 값을 이용하여 반응 조건 별 형광 신호 변화를 분석하였다.

[0072] 본 실시예에서는 토홀드 부위 길이에 따른 RCA 효율을 비교하고자 본 발명의 템플릿 이용하여 각 길이(10 내지 13bp)에서의 RCA 반응 결과를 확인하였으며, 본 실시예에서 반응온도는 50 ℃(비활성화온도: 80 ℃)로 하였다. 본 실시예에서의 구체적인 반응 조건은 다음 표 5와 같다.

표 5

[0074]

시약	농도
덤벨 템플릿	200 nM
표적 유전자(Target)	0 또는 5 nM
dNTP	1 mM
$MgSO_4$	6 mM
SYBR Green	2.5X
등온 반응 완충액(Isothermal reaction buffer)	1X

Bst2.0 DNA 중합효소	0.08 U/μL

[0075] 본 실시예에 따른 결과는 도 12와 같으며, 해당 결과는 실험 반복횟수(n) 2-3회 반복하여 나온 결과의 평균이다. 도 12를 참조하면, DB3 템플릿에서 토홀드 부위 길이가 길어질 수록 RCA 증폭 효율이 증가하였다. 특히, DB3 T13 N1의 경우 DB1 T10 N1, DB2 T10 N1 대비 더 높은 증폭 효율을 갖는 것을 확인할 수 있다. 즉, DB3의 템플릿의 경우 DB1 또는 DB2 템플릿 보다, 토홀드 부위의 길이가 약 10 내지 30 bp, 바람직하게는 13 bp인 경우에 RCA 증폭 효율이 더욱 향상된다.

실 시 예 5

[0077] **절단 효소 인식 부위 포함여부에 따른 RCA 효율의 비교**

[0078] 덤벨 템플릿에서 절단 효소 인식 부위 포함 여부에 따른 RCA 효율을 비교 분석하기 위해 DB1 및 DB3 템플릿에 대해 절단 효소 인식 부위를 포함하는 덤벨 템플릿(Nt 표시됨)과 절단 효소 인식 부위를 포함하지 않는 덤벨 템플릿으로 각각 RCA를 진행하였다. RCA 반응을 효과적으로 유도하기 위해 덤벨 템플릿과 표적 유전자, DNA 중합효소는 RCA mater mix 제조의 가장 마지막 단계에 첨가하였다. RCA mater mix는 1X 등온 반응 완충액에 $MgSO_4$ (6 mM), dNTP (1 mM), SYBR Green (2.5X)를 이용하여 먼저 제작하고, 이후 덤벨 템플릿(200 nM)과 Bst 2.0 DNA 중합효소 (0.08 U/μL)를 추가하여 18 μL의 mix를 제조한 후 2 μL의 표적 유전자(miR-21, 5 nM)를 넣어 20 μL의 최종 부피를 맞추었다. 대조군으로 2 μL의 Tris-HCl 완충액(20 mM)을 사용하였다. 반응 혼합물은 모두 ice 상에서 제작하였으며, RCA 반응은 50℃에서 60분 동안 반응하고 80℃에서 20분 동안 가열하여 Bst 2.0 DNA 중합효소를 비활성화하고 반응을 종결하였다. QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System을 이용하여 60분 동안 1분 간격으로 실시간 형광 신호를 측정하였다. 각 시간 별 해당 시료의 형광 측정값(FI)에서 초기 형광 측정값(FI_0)를 빼는 방식을 통해 순 신호 변화(net signal changes)를 얻었다. 2회의 독립적인 실험 반복을 통해 얻은 평균 형광 강도(FI)를 사용하여 실험군 간의 상대적 형광 변화를 비교하고, 30분 및 60분에서 측정된 값을 이용하여 반응 조건 별 형광 신호 변화를 분석하였다.

[0079] 본 발명의 덤벨 템플릿에서 절단 효소 인식부위 존재 여부에 따른 RCA 효율을 비교하고자, 절단 효소 인식부위가 존재하는 템플릿 (Nt 표시됨)과 절단 효소 인식부위가 없는 템플릿으로 각각 RCA를 진행하였다. 본 실시예에서 반응온도는 50℃(비활성화온도: 80℃)로 하였으며, 본 실시예에서의 구체적인 반응 조건은 다음 표 6과 같다.

표 6

[0080]

시약	농도
덤벨 템플릿	0.2 uM
표적 유전자(Target)	0 또는 5 nM
dNTP	1 mM
$MgSO_4$	6 mM
SYBR Green	2.5X
등온 반응 완충액(Isothermal reaction buffer)	1X
Bst2.0 DNA 중합효소	0.08 U/μL

[0081] 본 실시예에 따른 결과는 도 13과 같으며, DB1 T10 N1의 경우 Nt template (ver.3)이 형광이 더 낮고, DB3 T13 N1의 경우 Nt template이 형광이 더 큰 것을 확인할 수 있다. 즉, Nt 템플릿(절단 효소 인식분위가 존재하는 템플릿)이 트리플-암 덤벨형 템플릿(triple-arm dumbbell template)의 장점을 살리기에 더 적합하다는 것을 알 수 있다.

실 시 예 6

[0083] **절단 효소를 이용한 Nick RCA 효율 확인**

[0084] Nicking 효소를 이용한 Nick RCA와 Nicking 효소를 이용하지 않는 RCA의 효율을 비교하기 위해 Nt 템플릿을 이용하고 RCA master mix에 Nt.BstNBI 효소를 추가하였다. RCA mater mix는 1X 등온 반응 완충액에 $MgSO_4$ (6 mM), dNTP (1 mM), SYBR Green (2.5X), Bst 2.0 DNA 중합효소 (0.24 U/μL)를 추가하여 제조하였다. Master mix에 Nt.BstNBI (0.0375 U/μL)와 대조군으로 nuclease-free water를 넣은 혼합액(18 μL)을 50℃에서 3분간 사전 배양(pre-incubation)하였다. 이후 혼합액과 표적 유전자(miR-21, 5 nM)를 넣어 20 μL의 최종 부피를 맞추었다. 대조군으로 2 μL의 Tris-HCl 완충액(20 mM)을 사용하였다. 반응 혼합물은 모두 ice 상에서 제작하였으며, RCA 반응은 50℃에서 60분 동안 반응하고 80℃에서 20분 동안 가열하여 Bst 2.0 DNA 중합효소 및 Nt.BstNBI 절단효소를 비활성화하고 반응을 종결하였다. QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System을 이용하여 60분 동안 1분 간격으로 실시간 형광 신호를 측정하였다. 각 시간 별 해당 시료의 형광 측정값(FI)에서 초기 형광 측정값(FI_0)를 빼는 방식을 통해 순 신호 변화(net signal changes)를 얻었다. 2회의 독립적인 실험 반복을 통해 얻은 평균 형광 강도(FI)를 사용하여 실험군 간의 상대적 형광 변화를 비교하였다.

[0085] 본 실시예에서는 절단 효소의 존재 여부에 따라 표적물질의 검출 효율을 확인하였다. 본 실시예에서 반응온도는 50 ℃(비활성화온도: 80 ℃)로 하였으며, 본 실시예에서의 구체적인 반응 조건은 다음 표 7과 같다.

표 7

[0086]

시약	농도
덤벨 템플릿	200 nM
표적 유전자(Target)	0 또는 5 nM
dNTP	0.32 mM
$MgSO_4$	6 mM
SYBR Green	2.5X
등온 반응 완충액(Isothermal reaction buffer)	1X
Bst2.0 DNA 중합효소	0.24 U/μL
Nt.BstNBI 절단효소	0.0375 U/μL

[0087] 본 실시예에 따른 결과는 도 14과 같으며, 절단 효소(nicking enzyme)을 이용하여 Nick RCA 반응을 일으켰을 경우, 기존 RCA 대비 형광이 지수함수적으로 증가하는 것을 확인할 수 있다. 그러나 DB1 T10 N1 (Nt) 템플릿의 경우, 비특이적인 반응도 함께 지수함수적으로 증가하였다. 이에 반해 DB3 T13 N1 (Nt) template의 경우, 표적(target) 유전자에 의해 빠르게 신호가 증가하며, 비특이적인 반응은 DB1 대비 상대적으로 덜 한 것을 볼 수 있다. 기존 RCA 역시 이전 결과와 유사하게 DB3가 DB1에 비해 높은 RCA 효율을 보이는 것을 확인할 수 있다.

[0088] 즉, 본 실시예에 따르면, 세개의 암(arm) 구조를 갖는 본원 발명의 템플릿(DB3)를 이용하는 경우, 절단 효소 존재에 따라 RCA 효율을 극대화하고 비특이적인 반응을 줄여 특이적으로 표적물질의 검출이 가능하다는 것을 알 수 있다.

실 시 예 7

[0090] **절단 효소를 이용한 Nick RCA 효율 확인**

[0091] 본 실시예에서는 각 DB1, DB3 템플릿에 대해 표적 유전자 유무에 따라, 또는 절단 효소(nicking enzyme) 유무에 따라 RCA, Nick RCA를 각각 일으켰으며, 얻어진 각각의 DNA 산물 분석을 위해 10% native PAGE 분석을 이용하였다.

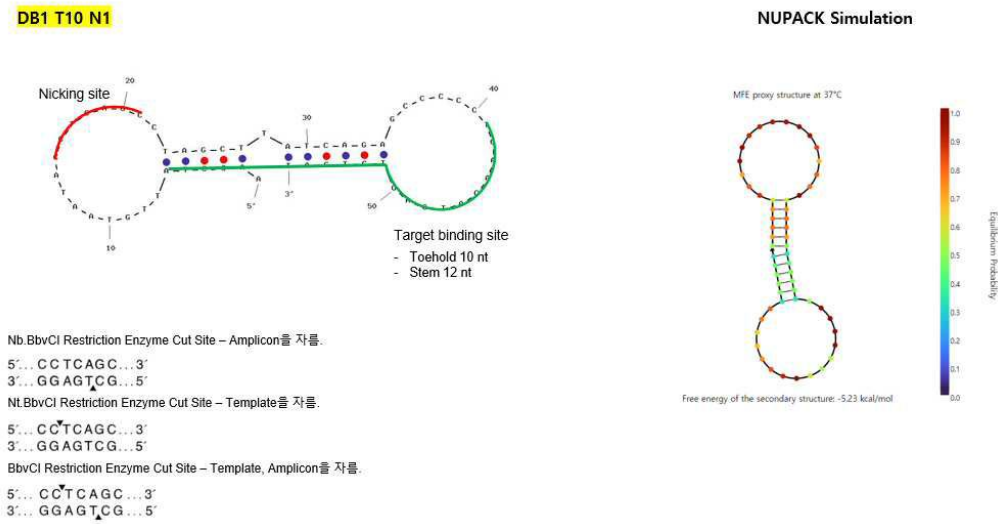
[0092] 도 15의 젤 이미지에서 볼 수 있듯이 Nick RCA의 DNA 산물에서 DNA strand에 대한 nicking이 효과적으로 일어난 것을 볼 수 있으며(여러 사이즈의 DNA 절편 확인), DB1의 경우 표적 유전자의 부존재(non-target) 조건에서도 Nick RCA가 일어난 것을 볼 수 있다. 반면, DB3의 경우 DB1에 비해 Nick RCA 반응에서 표적 유전자 유무에 따른 DNA 산물의 양 차이가 뚜렷한 것을 볼 수 있다. 즉, 본원 발명의 세개의 암(arm) 구조를 갖는 본원 발명의 템플릿(DB3)를 이용하는 경우, 표적물질의 검출 효율이 높다는 것을 확인할 수 있다.

[0094] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명

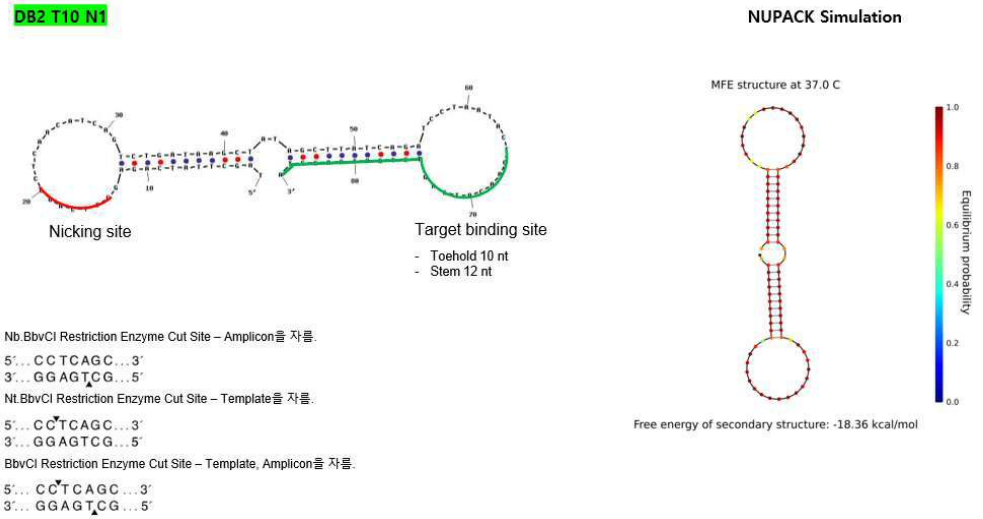
의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

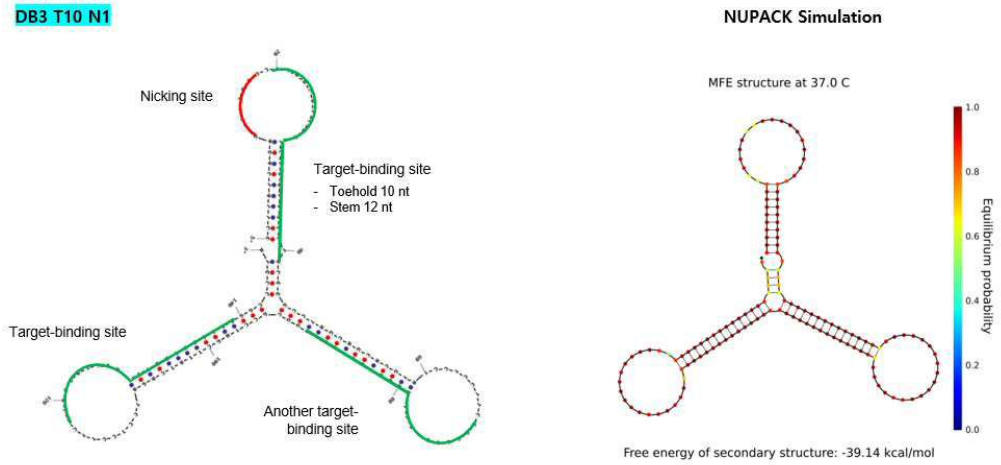
도면1



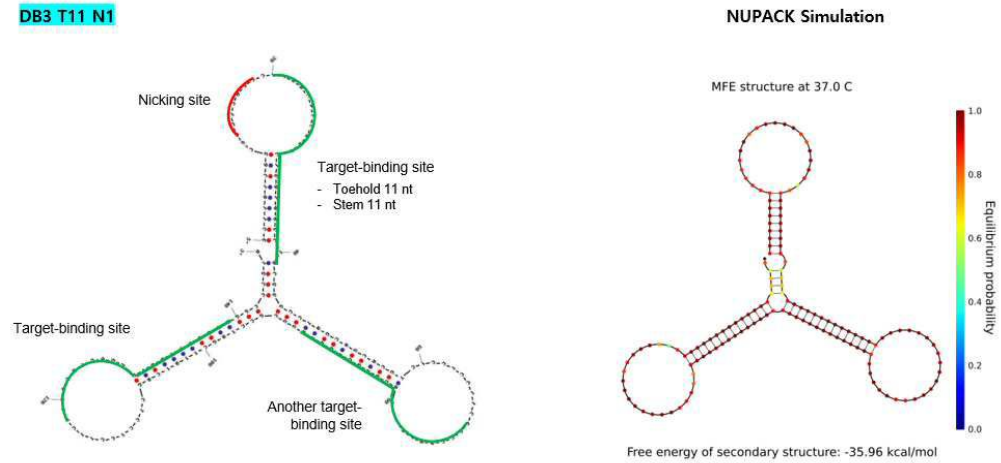
도면2



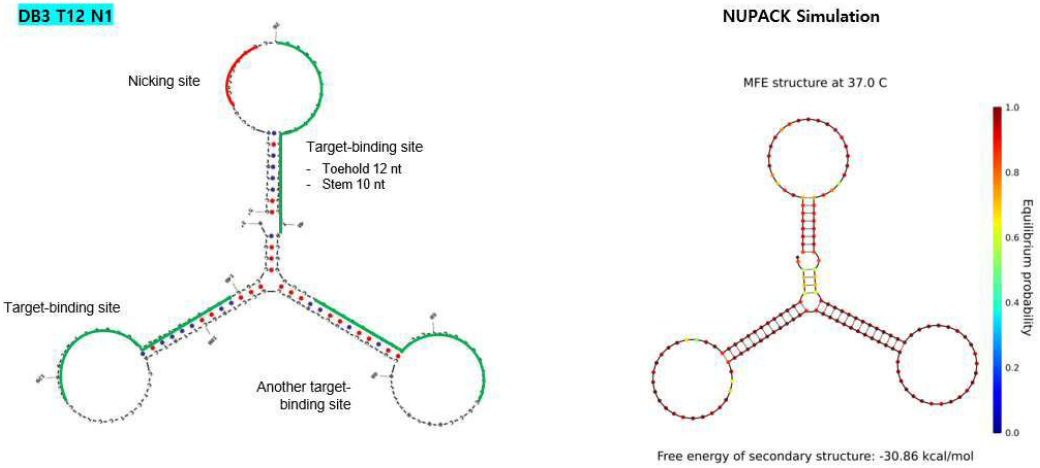
도면3


DB3 T10 N1
Nicking site
Target-binding site
- Toehold 10 nt
- Stem 12 nt
Target-binding site
Another target-binding site
NUPACK Simulation
MFE structure at 37.0 C
Equilibrium probability
Free energy of secondary structure: -39.14 kcal/mol

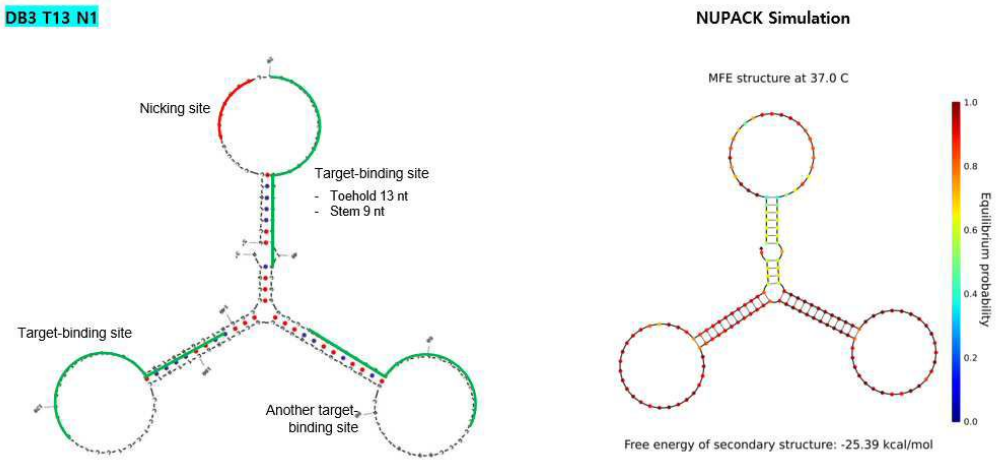
도면4


DB3 T11 N1
Nicking site
Target-binding site
- Toehold 11 nt
- Stem 11 nt
Target-binding site
Another target-binding site
NUPACK Simulation
MFE structure at 37.0 C
Equilibrium probability
Free energy of secondary structure: -35.96 kcal/mol

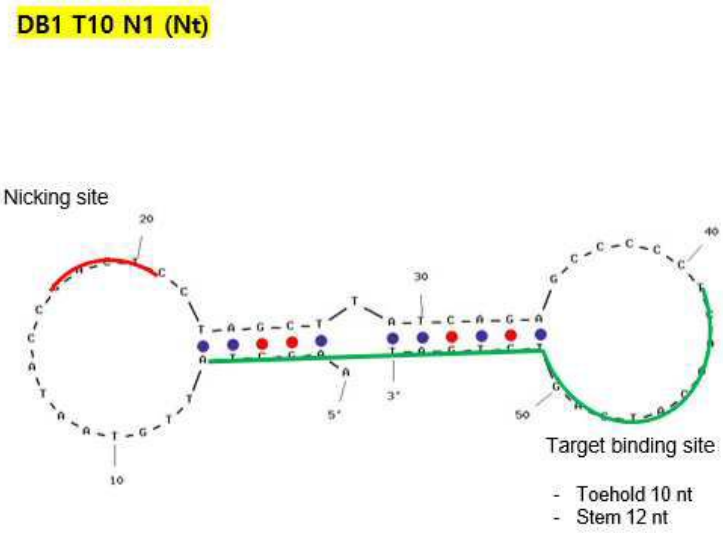
도면5


DB3 T12 N1
Nicking site
Target-binding site
- Toehold 12 nt
- Stem 10 nt
Target-binding site
Another target-binding site
NUPACK Simulation
MFE structure at 37.0 C
Equilibrium probability
Free energy of secondary structure: -30.86 kcal/mol

도면6



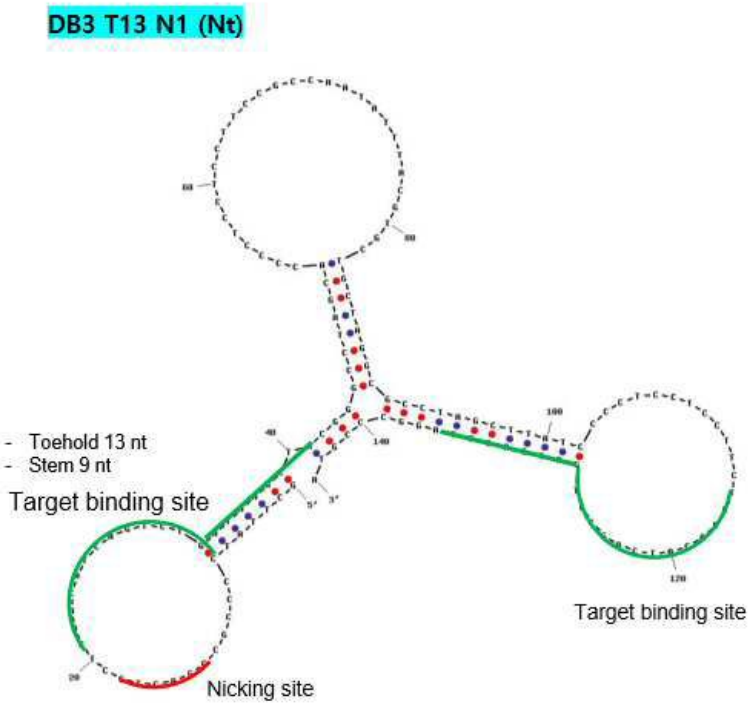
도면7



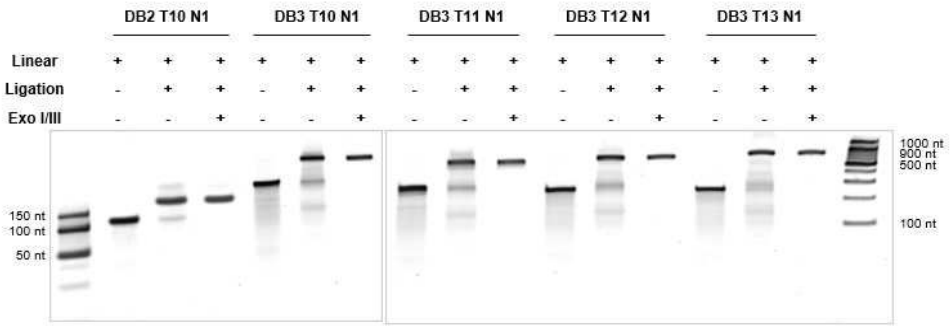
Nt.BstNBI Restriction Enzyme Cut Site – Amplicon을 자름.

5′...GAGTCNNNNN...3′
3′...CTCAGNNNNN...5′

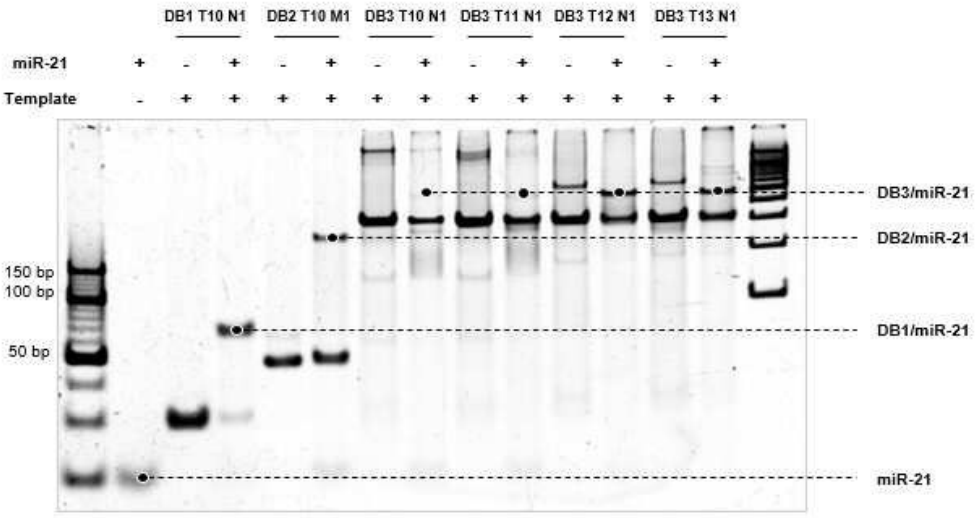
도면8


DB3 T13 N1 (Nt)
- Toehold 13 nt
- Stem 9 nt
Target binding site
Target binding site
Nicking site

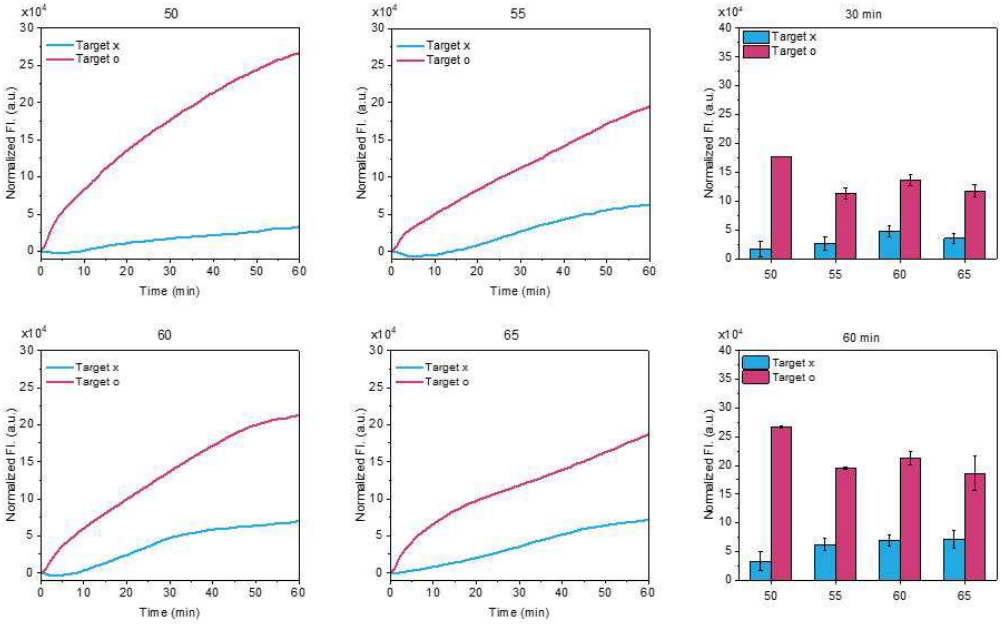
도면9


DB2 T10 N1
DB3 T10 N1
DB3 T11 N1
DB3 T12 N1
DB3 T13 N1
Linear
Ligation
Exo I/III
150 nt
100 nt
50 nt
1000 nt
900 nt
500 nt
100 nt

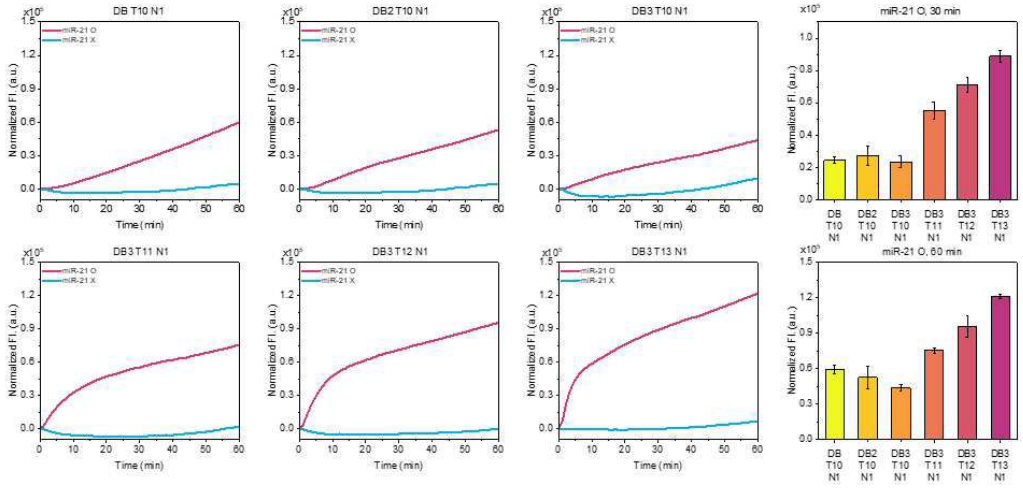
도면10


DB1 T10 N1
DB2 T10 M1
DB3 T10 N1
DB3 T11 N1
DB3 T12 N1
DB3 T13 N1
miR-21
Template
150 bp
100 bp
50 bp
DB3/miR-21
DB2/miR-21
DB1/miR-21
miR-21

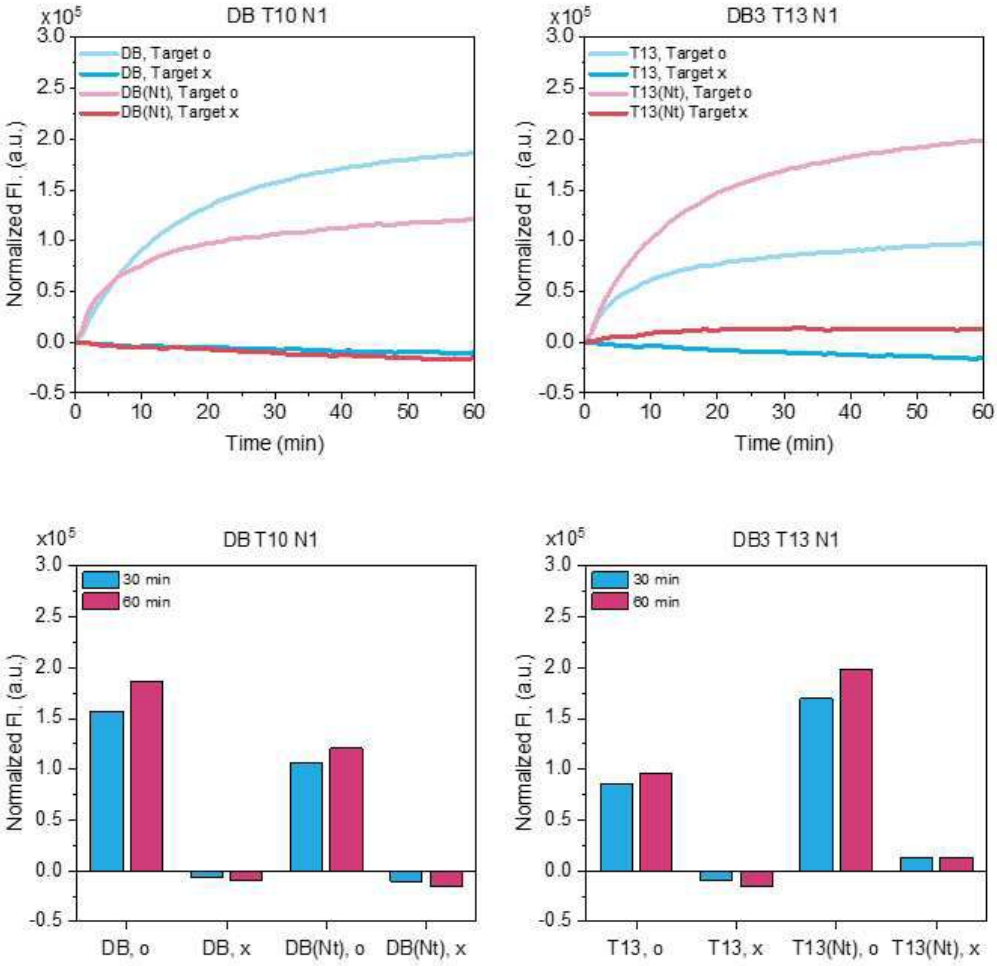
도면11


50
55
30 min
60
65
60 min
Target x
Target o
Normalized FI. (a.u.)
Time (min)

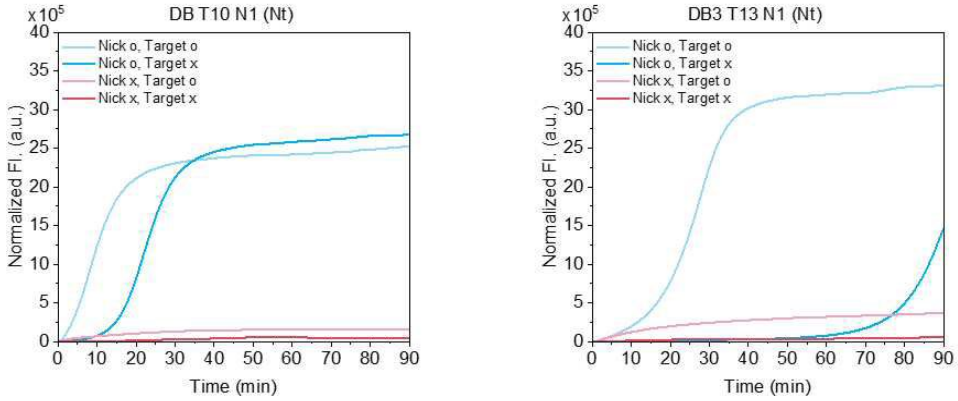
도면12


DB T10 N1
DB2 T10 N1
DB3 T10 N1
miR-21 O, 30 min
DB3 T11 N1
DB3 T12 N1
DB3 T13 N1
miR-21 O, 60 min
Normalized FI. (a.u.)
Time (min)

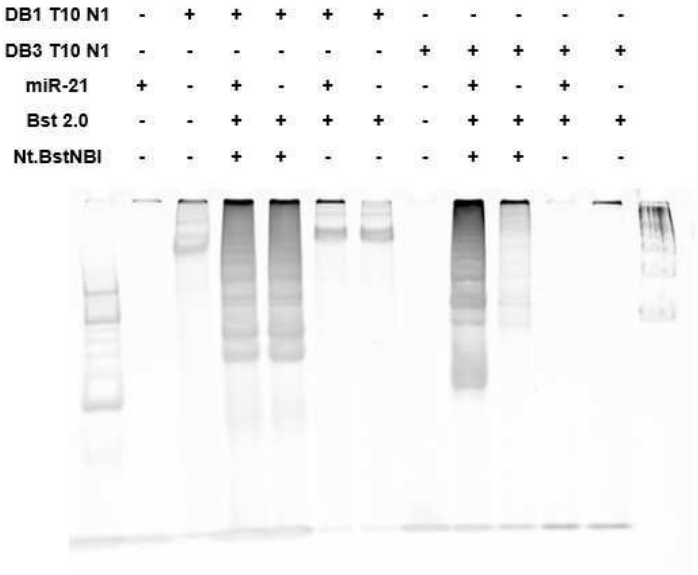
도면13


DB T10 N1
DB, Target o
DB, Target x
DB(Nt), Target o
DB(Nt), Target x
DB3 T13 N1
T13, Target o
T13, Target x
T13(Nt), Target o
T13(Nt) Target x
Normalized FI. (a.u.)
Time (min)
30 min
60 min
DB, o
DB, x
DB(Nt), o
DB(Nt), x
T13, o
T13, x
T13(Nt), o
T13(Nt), x

도면14


DB T10 N1 (Nt)
x10^5
Normalized FI. (a.u.)
Time (min)
Nick o, Target o
Nick o, Target x
Nick x, Target o
Nick x, Target x
DB3 T13 N1 (Nt)
x10^5
Normalized FI. (a.u.)
Time (min)
Nick o, Target o
Nick o, Target x
Nick x, Target o
Nick x, Target x

도면15


DB1 T10 N1 - + + + + + - - - - -
DB3 T10 N1 - - - - - - + + + + +
miR-21 + - + - + - - + - + -
Bst 2.0 - - + + + + - + + + +
Nt.BstNBI - - + + - - - + + - -

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.