(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0067806
(43) 공개일자 2024년05월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6853 (2018.01) *C12Q 1/6876* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6853 (2018.05)
C12Q 1/6876 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2023-0148031
(22) 출원일자 2023년10월31일
심사청구일자 2023년10월31일
(30) 우선권주장
1020220148730 2022년11월09일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
정철희
서울특별시 성북구 돌곶이로8길 22 (석관동, 래미안아트리치)
사공하림
서울특별시 구로구 경인로 584 (신도림동, 신도림 팰러티움)
(74) 대리인
특허법인(유)남아이피그룹, 특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 12 항

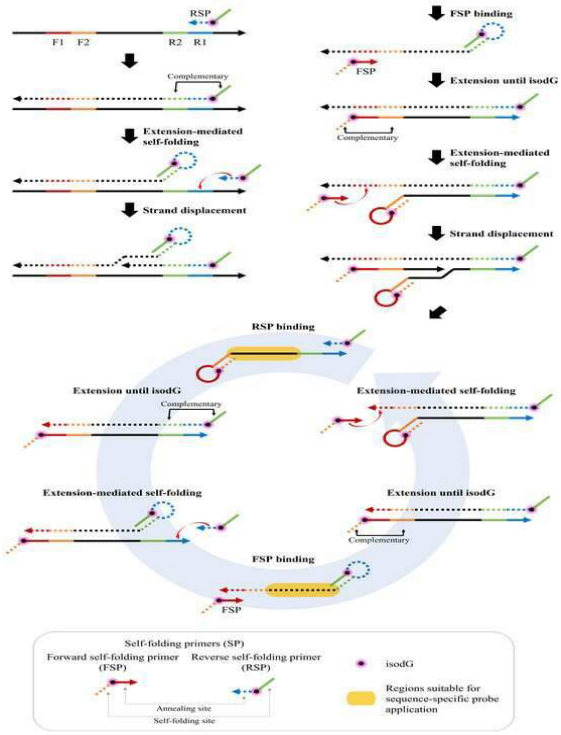
(54) 발명의 명칭 **연장 매개 자가 접힘을 이용한 새로운 핵산 등온 증폭 방법**

(57) 요 약

본 발명은 연장 매개 자가 접힘을 이용한 새로운 핵산 등온 증폭 방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트로서, 상기 프라이머 세트는 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 한 쌍의 프라이머로 이루어진 것이며, 각 프라이머의 3' 영역은 검출 대상의 표적서열과 상보적인 15~25개의

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



염기서열로 이루어진 결합부위(annealing site)를 포함하고, 각 프라이머의 5‘ 영역은 접힘 구조(hairpin structure)를 형성할 수 있도록 증폭 반응산물의 핵산 서열과 상보적인 10~25개의 염기서열로 이루어진 자가 접힘부위(self-folding site)를 포함하며, 상기 결합부위 및 자가 접힘부위 사이에는 비자연적인 염기인 isodG가 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 함유한 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 키트, 상기 프라이머 세트를 이용한 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 등온 증폭방법 및 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 검출방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
C12Q 2525/301 (2013.01)
C12Q 2527/101 (2019.08)
C12Q 2533/101 (2019.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711168711
과제번호 2022M3A9B6082670
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발
연구과제명 (공동2) 하이브리드 인공지능기반 바이오회로 시험 및 최적화 기술개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 고려대학교 산학협력단
연구기간 2022.04.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415180246
과제번호 20009356
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원
연구사업명 바이오산업기술개발
연구과제명 디지털 PCR 대체 nest PCR 기반 기술 개발 및 저가형 현장형 위해요소 분자진단 시스템 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 압티지엠제이주식회사
연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트로서,

상기 프라이머 세트는 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 한 쌍의 프라이머로 이루어진 것이며,

각 프라이머의 3’ 영역은 검출 대상의 표적서열과 상보적인 15~25개의 염기서열로 이루어진 결합부위(annealing site)를 포함하고,

각 프라이머의 5‘ 영역은 접힘 구조(hairpin structure)를 형성할 수 있도록 증폭 반응산물의 핵산 서열과 상보적인 10~25개의 염기서열로 이루어진 자가 접힘부위(self-folding site)를 포함하며,

상기 결합부위 및 자가 접힘부위 사이에는 비자연적인 염기인 isodG가 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는,

연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 비자연적인 염기는 1개의 isodG가 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 자가 접힘부위는 접힘 구조(hairpin structure)를 안정하게 형성할 수 있도록 증폭 반응산물의 핵산 서열과 상보적인 12~21개의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트.

청구항 4

제1항의 프라이머 세트를 포함하는 표적 핵산 검출을 위한, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 표적 핵산은 바이러스 또는 병원성 미생물 유래인 것을 특징으로 하는, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 키트.

청구항 6

검출 대상의 표적 핵산 및 제1항의 프라이머 세트를 포함하는 반응 혼합물을 등온에서 증폭시키는 단계를 포함하는,

연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 등온 증폭방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

등온 증폭에 의해 단일 가닥 DNA(ssDNA) 형태의 반응 산물을 생성하는 것을 특징으로 하는, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 등온 증폭방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 등온에서 증폭은 60~65℃에서 수행하는 것을 특징으로 하는, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 등온 증폭방법.

청구항 9

제1항의 프라이머 세트를 이용하여 생물학적 시료에 함유된 특정 표적 핵산을 등온 증폭시키는 단계를 포함하는,

연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 검출방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

등온 증폭에 의해 단일 가닥 DNA(ssDNA) 형태의 표적 핵산 반응산물을 생성하는 것을 특징으로 하는, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 검출방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 등온 증폭은 60~65℃에서 수행하는 것을 특징으로 하는, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 검출방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 표적 핵산은 바이러스 또는 병원성 미생물 유래인 것을 특징으로 하는, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 검출방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 연장 매개 자가 접힘을 이용한 새로운 핵산 등온 증폭 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 핵산 증폭은 핵산의 특성을 이용하여 미량의 핵산 표적을 기하급수적으로 증폭하는 방법을 일컫는다. 핵산을 증폭하는 방법 중 가장 널리 사용되는 방법은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, 이하 PCR)이다. PCR은 변성 (Denaturation), 결합(Annealing), 연장(Extension) 단계의 반복을 거치는데, 이 과정은 온도를 조절함으로써 가능하다. PCR은 수 카피의 핵산 표적을 검출할 만큼이나 민감하지만, 정밀한 온도 조절이 가능한 열순환 기기(Thermocycler)가 필요한 점에서 한계점이 있다.

[0003] 이러한 문제점을 개선하기 위한 방법으로 열순환 기기 없이도 일정한 온도에서 증폭이 가능한 등온 증폭(Isothermal amplification) 기술이 개발되었다. 이는 가닥 치환 활성(Strand displacement activity)이 있는 중합효소(Polymerase)를 사용함으로써 가능하며, 대표적인 등온 증폭 방법으로는 고리매개등온증폭 (Loop-mediated isothermal amplification, 이하 LAMP)가 있고, 이는 수십 카피의 핵산 표적을 수십 분 내에 검출 가능한 특징이 있다. 하지만 LAMP는 4~6개의 프라이머를 사용함으로써 프라이머 디자인이 복잡하다는 단점이 있다. 이 중 inner 프라이머와 loop 프라이머는 표적 인식 서열을 2개씩 포함하므로 약 40 nt의 긴 길이를 가진다. 프라이머의 긴 길이로 인하여 프라이머 간 이합체(Dimer) 형성과 같은 비특이적인 증폭물이 형성되기 쉬어 위양성 결과를 초래할 수 있다. 또한, LAMP 증폭물은 loop 서열을 제외하고 대부분 이중 가닥(Double-stranded DNA, 이하 dsDNA)이므로, LAMP 기반의 대부분의 진단방법은 탁도 변화, 색상 변화, intercalating dye를 사용한 형광 검출과 같은 비특이적 검출 방식을 취한다.

[0004] 이러한 종래 문제점을 해결하기 위해 분자비콘(Molecular beacon, 이하 MB) 또는 가닥치환프로브(One-step strand displacement probe, 이하 OSD)와 같은 표적 서열 특이적 프로브(Sequence-specific probe, 이하 프로

브)가 개발되었으며 이를 사용할 경우, 표적 증폭물만을 특이적으로 검출할 수 있다. 하지만 단일 가닥(Single-stranded DNA, 이하 ssDNA) 부위가 loop 서열에만 한정적이므로, 프로브를 디자인하고 적용하는 것 또한 제한적이다.

[0005] 따라서 이러한 문제점을 해결할 수 있는 새로운 핵산 등온 증폭 방법의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2022-0118316

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 기존 LAMP의 단점인 프라이머 디자인 복잡성과 프로브 디자인의 제한성을 해결하며, 등온 증폭으로 표적 특이적인 검출을 수행할 수 있는 기술을 개발하기 위해 연구하던 중, 새로운 연장 매개 자가 접힘을 이용한 새로운 핵산 등온 증폭 방법을 개발하였으며, 이를 'Extension-mediated self-folding Isothermal amplification Technology(이하 ExIT)'로 명명하였다. 상기 개발된 본 발명의 방법은 자가 접힘 프라이머(Self-folding primer; SP)만을 사용하여 증폭이 가능하고, 자가 접힘 프라이머에 도입된 비자연적 염기로 단일 가닥(Single-stranded DNA, 이하 ssDNA) 증폭물의 생성이 가능함을 확인하였고, 표적 특이적 검출이 가능하며 비특이적 검체가 혼입된 경우에도 표적 증폭물을 정확히 구별할 수 있어 검출 정확도가 높을 뿐만 아니라 낮은 농도의 표적 검출도 가능함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0008] 그러므로 본 발명의 목적은, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트로서, 상기 프라이머 세트는 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 한 쌍의 프라이머로 이루어진 것이며, 각 프라이머의 3' 영역은 검출 대상의 표적서열과 상보적인 15~25개의 염기서열로 이루어진 결합부위(annealing site)를 포함하고, 각 프라이머의 5 ' 영역은 접힘 구조(hairpin structure)를 형성할 수 있도록 증폭 반응산물의 핵산 서열과 상보적인 10~25개의 염기서열로 이루어진 자가 접힘부위(self-folding site)를 포함하며, 상기 결합부위 및 자가 접힘부위 사이에는 비자연적인 염기인 isodG가 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 본 발명의 프라이머 세트를 포함하는 표적 핵산 검출을 위한, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 검출 대상의 표적 핵산 및 상기 본 발명의 프라이머 세트를 포함하는 반응 혼합물을 등온에서 증폭시키는 단계를 포함하는, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 등온 증폭방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 생물학적 시료에 함유된 특정 표적 핵산을 등온 증폭시키는 단계를 포함하는, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 검출방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 따라서 본 발명은, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트로서, 상기 프라이머 세트는 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 한 쌍의 프라이머로 이루어진 것이며, 각 프라이머의 3' 영역은 검출 대상의 표적서열과 상보적인 15~25개의 염기서열로 이루어진 결합부위(annealing site)를 포함하고, 각 프라이머의 5 ' 영역은 접힘 구조(hairpin structure)를 형성할 수 있도록 증폭 반응산물의 핵산 서열과 상보적인 10~25개의 염기서열로 이루어진 자가 접힘부위(self-folding site)를 포함하며, 상기 결합부위 및 자가 접힘부위 사이에는 비자연적인 염기인 isodG가 삽입되어 있는 것을 특징으로 하는, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 제공한다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 비자연적인 염기는 1개의 isodG가 삽입되어 있는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 자가 접힘부위는 접힘 구조(hairpin structure)를 안정하게 형성할 수 있도록 증폭 반응산물의 핵산 서열과 상보적인 12~21개의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0015] 또한 본 발명은 본 발명의 프라이머 세트를 포함하는 표적 핵산 검출을 위한, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 키트를 제공한다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 표적 핵산은 바이러스 또는 병원성 미생물 유래인 것일 수 있다.

[0017] 또한 본 발명은 검출 대상의 표적 핵산 및 상기 본 발명의 프라이머 세트를 포함하는 반응 혼합물을 등온에서 증폭시키는 단계를 포함하는, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 등온 증폭 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 등온 증폭에 의해 단일 가닥 DNA(ssDNA) 형태의 반응 산물을 생성하는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 등온에서 증폭은 60~65℃에서 수행하는 것일 수 있다.

[0020] 나아가 본 발명은 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 생물학적 시료에 함유된 특정 표적 핵산을 등온 증폭시키는 단계를 포함하는, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 검출방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 등온 증폭에 의해 단일 가닥 DNA(ssDNA) 형태의 표적 핵산 반응산물을 생성할 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 등온 증폭은 60~65℃에서 수행하는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 표적 핵산은 바이러스 또는 병원성 미생물 유래인 것일 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명은 기존의 고리매개등온증폭(LAMP)의 문제점을 개선할 수 있는 새로운 등온 증폭을 위한 프라이머 세트를 고안하였고, 이를 이용한 새로운 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭방법(ExIT)을 개발한 기술로서, 본 발명에서 제공하는 방법은 기존 방법과 다르게 단 한쌍의 프라이머를 사용함으로써 프라이머 디자인의 복잡성을 해결할 수 있고 지수 증폭을 구현할 수 있으며, 연장 이후 자가 접힘을 유도함으로써 다량의 단일 가닥 증폭물(ssDNA)을 생성할 수 있는 효과를 갖는다. 따라서 본 발명의 자가 접힘 프라이머쌍을 이용한 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭방법은 타겟 핵산을 정확하고 민감하게 검출할 수 있으며, 높은 재현성과 정밀도로 낮은 농도의 표적 검출이 가능하며 정량분석이 가능하다. 이러한 본 발명의 방법은 다양한 등온 증폭방법에 적용할 수 있어 위양성 위험을 낮춘 진단 방법에도 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명에서 제공하는 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭방법(ExIT; Extension-mediated self-folding Isothermal amplification Technology)에 대한 전체적인 작동 기전을 모식도로 나타낸 것이다.

도 2는 표적 인식 서열 간격에 따른 자가 접힘 기전에 대한 비교를 모식도로 나타낸 것이다.

도 3은 자가 접힘 프라이머가 인식하는 표적 서열간 간격 유무에 따른 접힘 효율 차이를 나타내는 모식도이다.

도 4는 자가 접힘 프라이머에 대한 최적 증폭 조건으로 각 프라이머의 자가 접힘 부위의 길이에 따른 자가 접힘 효율을 서로 다른 온도 조건에서 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 RSP(역방향 자가 접힘 프라이머)의 접힘 부위 길이에 따른 실시간 형광곡선을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 FSP(정방향 자가 접힘 프라이머)의 접힘 부위 길이에 따른 실시간 형광곡선을 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일실시예에서 선정한 4개의 후보 프라이머 세트에 대한 분석 한계를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 isodG 유무의 자가 접힘 프라이머를 이용한 반응 증폭물 형성 기전의 비교를 모식도로 나타낸 것이다.

도 9는 isodG 유무의 자가 접힘 프라이머를 이용하여 타겟 핵산(SARS-CoV-2 N 유전자)의 검출 민감도를 분석한 결과를 나타낸 것으로, A는 isodG가 없는 프라이머를 사용한 결과이고, B는 isodG가 삽입된 프라이머를 사용한

결과이다.

도 10은 검출 시간과 SARS-CoV-2 농도(9×10^{1}~ 9×10^{4} copies) 로그 사이의 관계를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 자가 접힘 프라이머를 이용한 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭 방법을 통해 타겟 핵산(SARS-CoV-2 N 유전자)의 검출 특이도 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명은 등온에서 보조적인 효소 또는 추가적인 프라이머 없이 타겟 핵산을 증폭할 수 있는 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트 및 상기 프라이머 세트를 이용한 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭 방법을 제공함에 특징이 있다.

[0027] 본 발명에서 제공하는 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트는, 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 한 쌍의 프라이머로 이루어진 것으로, 각 프라이머의 3’ 영역은 검출 대상의 표적서열과 상보적인 15~25개의 염기서열로 이루어진 결합부위(annealing site)를 포함하고, 각 프라이머의 5 ‘ 영역은 접힘 구조(hairpin structure)를 형성할 수 있도록 증폭 반응산물의 핵산 서열과 상보적인 10~25개의 염기서열로 이루어진 자가 접힘부위(self-folding site)를 포함하며, 상기 결합부위 및 자가 접힘부위 사이에는 비자연적인 염기인 isodG가 삽입되어 있는 것을 특징으로 한다.

[0028] 보다 구체적으로, 본 발명의 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트는 종래 4~6개의 프라이머가 요구되는 등온 증폭과 달리, 단 한 쌍의 프라이머 만으로 등온 증폭이 가능하다.

[0029] 또한, 본 발명의 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머는 자가 접힘 구조를 형성할 수 있는 특징이 있다.

[0030] 기존 LAMP의 inner 프라이머는 2개의 표적 서열을 인식하며, 이 서열 간 간격은 약 20 ~ 40 nt이다. Inner 프라이머가 연장된 뒤, 헤어핀을 형성하여 다시 표적 인식 서열을 노출하기 위해서는 outer 프라이머의 연장으로 인한 가닥 치환 활성이 필요하다. 하지만 본 발명에서는 이러한 표적 인식 서열 간격을 삭제하여 outer 프라이머의 도움 없이 접힘 구조를 형성하여 표적 인식 서열을 열 수 있도록 디자인하였다.

[0031] 즉, 본 발명에서 디자인한 프라이머 세트의 각 프라이머의 3’ 영역은 검출 대상의 표적 서열과 상보적인 염기서열로 이루어져 있으며, 이를 결합부위(annealing site)로 명명하였다.

[0032] 이때 상기 표적 서열과 상보적인 염기서열, 즉 결합부위는 15~25개의 염기서열이 되도록 디자인 할 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명의 프라이머 세트의 5 ‘ 영역은 접힘 구조(hairpin structure)를 형성할 수 있도록 증폭 반응산물의 핵산 서열과 상보적인 염기서열로 이루어져 있으며, 이를 접힘 부위(Self-folding site), 또는 자가 접힘 부위로 명명하였다.

[0034] 구체적으로 상기 접힘 부위는 프라이머의 결합부위를 통해 타겟 표적 서열과 상보적으로 결합 후, 등온 증폭으로 증폭된 반응산물의 핵산 서열과 상보적인 염기서열로 이루어진 것으로, 상기 증폭된 반응산물의 핵산 서열은 결합부위의 바로 옆에 위치하고 있는 염기서열일 수 있고, 이러한 접힘 부위는 10~25개의 염기서열이 되도록 디자인 할 수 있으며, 바람직하게는 12~21개의 염기서열이 되도록 디자인할 수 있다.

[0035] 특히 본 발명의 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머를 디자인함에 있어서, 각 프라이머의 접힘 부위의 길이는 프라이머 연장반응 후, 접힘 구조를 유지하는데 영향을 줄 수 있다.

[0036] 따라서 상기 접힘 부위의 길이는 10~25개의 염기서열, 바람직하게는 12~21개의 염기서열로 이루어진 길이가 되도록 디자인하는 것이 중요한데, 이는 접힘 부위의 길이가 너무 짧으면 접힘 구조의 유지가 어려운 문제가 있고, 너무 길면 프라이머간 이합체가 형성될 확률이 높아지는 문제가 있다.

[0037] 따라서 상기 접힘 부위의 길이는 상기 기재된 길이를 갖도록 하는 것이 중요하다.

[0038] 나아가 본 발명의 프라이머 세트, 즉 상기 결합 부위 및 접힘 부위를 포함하는 정방향 및 역방향 프라이머는, 상기 결합부위 및 자가 접힘부위 사이에 비자연적인 염기인 isodG가 삽입되어 있다.

[0039] 특히 본 발명에서 제공하는 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트는 결합부위 및 자가 접힘부위 사이에 비자연적인 염기인 isodG를 삽입시켜 중합효소에 의한 반응 진행이 isodG에서 멈추기 때문에 반응 증폭물을 단일 가닥 DNA(ssDNA) 형태로 얻을 수 있다. 이렇게 ssDNA 형태의 증폭물이 반복적으로 생성되는 사이클링 과정

을 통해 ssDNA 형태의 표적 핵산을 수득할 수 있다.

[0040] 종래 LAMP의 경우에는 중간 생성물(Intermediated product)을 통해 증폭이 이뤄지는데, 중간 생성물의 3 ‘ 부분이 연장되어 dsDNA 증폭물을 형성하는 과정 중에 loop 부분에도 inner 프라이머 및 loop 프라이머가 결합하여 새로운 반응 증폭물이 형성하게 되는 문제점이 있으며, 이 과정이 반복되면 대부분 dsDNA로 이루어진 복잡한 반응 산물이 형성되어 정확한 분석이 어려운 문제점이 있다.

[0041] 한편, 본 발명은 이러한 문제점을 해결할 수 있는 방법으로 isodG을 프라이머 내로 삽입하였고, isodG 위치에서 증폭반응이 중단되게 함으로써 목적하지 않는 반응 산물이 생성되지 않도록 하였다. 또한 본 발명에서 상기 비자연적인 염기의 삽입은 1개의 isodG가 결합 부위와 접힘 부위 사이에 삽입될 수 있다.

[0042] 본 발명의 프라이머(SP)의 결합 부위와 접힘 부위 사이에 isodG를 삽입함으로써 ssDNA 형태의 반응산물을 얻을 수 있다. 만일 프라이머 내에 isodG가 포함되지 않은 경우, SP의 말단까지 증폭되어 최종적으로 이중 가닥 증폭물이 형성된다. 이중 가닥은 구조적으로 안정하여 자가 접힘으로 인한 헤어핀 구조 형성이 어렵고, 프로브가 결합할 수 없다. 그러나 isodG를 결합 부위와 접힘 부위 사이에 삽입함으로써, 중합효소는 결합 부위까지만 연장될 수 있고, 이로 인해 단일 가닥으로 남아있는 접힘 부위로 인하여, 안정적으로 접힘 구조를 형성할 수 있게 된다. 또한 반응 증폭물이 모두 단일 가닥으로 형성되기에 프로브 디자인 및 사용이 용이하다. 또한 본 발명에서 상기 비자연적인 염기의 삽입은 1개의 isodG가 결합 부위와 접힘 부위 사이에 삽입될 수 있다.

[0043] 본 발명에서 상기 isodG는 이소구아노신으로, 일반적으로 RNA 또는 DNA에 도입되는 구아닌 뉴클레오 염기에 대한 이성질체 뉴클레오 염기를 의미한다.

[0044] 본 발명에서 제공하는 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머는 표적 서열에 결합한 뒤, 연장 반응에 의해 접힘 구조를 형성하게 되고, 접힘 구조의 형성으로 인해 결합 부위가 노출되어 새로운 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머의 접근과 연장을 유도할 수 있다.

[0045] 본 발명의 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머를 이용한 등온 증폭 기전의 과정에 대해서는 도 1에 모식도로 나타내었다.

[0046] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 포함하는 표적 핵산 검출을 위한, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 키트를 제공할 수 있다.

[0047] 본 발명에서 상기 ‘표적 핵산’은 증폭하고자 하는 임의의 핵산일 수 있고, 상기 핵산은 RNA 또는 DNA일 수 있다. 또한, 상기 표적 핵산은 바이러스 또는 병원성 미생물 유래일 수 있고, 이 경우 상기 프라이머 세트는 상기 바이러스 또는 병원성 미생물을 검출하는데 이용될 수 있다.

[0048] 본 발명의 일실시예에서는 SARS-CoV-2 바이러스의 유전자를 표적 핵산으로 하였다.

[0049] 상기 본 발명의 키트는 등온 증폭 반응에 사용될 수 있으며, "등온 증폭(isothermal amplification)"은 기존의 중합효소 연쇄반응(PCR)이 변성, 어닐링 및 연장 반응단계가 각각 다른 온도 조건하에서 수행되는 것과 달리, 한 온도 조건하에서 핵산 증폭반응을 수행하기 때문에 별도의 특수한 기기가 필요하지 않은 증폭 방법을 의미한다.

[0050] 상기 키트에는 본 발명의 프라이머 세트 이외에도 증폭반응을 위한 DNA 중합효소, 반응완충액, dNTP 및 $MgCl_2$ 등이 포함될 수 있다.

[0051] 또한 본 발명의 프라이머에는 검출의 편의성을 높이기 위해, 검출용 표지를 추가 구성할 수 있다. 검출용 표지는 프라이머에 연결, 결합, 또는 부착시켜 통상적인 방식으로 증폭산물의 밀도, 농도, 양 등을 확인할 수 있는 화합물, 생체 분자 또는 생체 분자 유사체 등일 수 있으며, FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670, TYE563 및 NED 등이 사용될 수 있다.

[0052] 또한, 본 발명은 검출 대상의 표적 핵산 및 본 발명의 프라이머 세트를 포함하는 반응 혼합물을 등온에서 증폭시키는 단계를 포함하는, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 등온 증폭방법을 제공할 수 있다.

[0053] 본 발명자들은 앞서 기술한 본 발명에서 고안한 프라이머 세트를 이용한 등온 증폭방법을 ‘연장 매개 자가 접힘 등온 증폭방법(ExIT: Extension-mediated self-folding Isothermal amplification Technology)’으로 명명하였다.

[0054] 본 발명에 따른 상기 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭방법은, 기존의 등온 증폭방법과 달리, 본 발명에서 고안한 상기 기술된 단 한 쌍의 프라이머만을 이용하여 표적 핵산을 등온에서 지수 증폭할 수 있는 방법이다.

[0055] 본 발명에 따른 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 등온 증폭방법은 다음의 방법으로 수행할 수 있다.

[0056] 구체적으로 본 발명에 따른 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 등온 증폭방법은 다음과 같은 원리로 작동한다(도 1 참조).역방향 프라이머의 결합부위가 검출 대상의 핵산 서열 중 이와 상보적인 표적 서열에 결합을 하여 연장이 일어난다. 연장된 서열은 프라이머의 접힘 부위와 상보적인 서열을 포함하므로 자가 접힘이 일어나며, 검출 대상 내 표적 서열이 다시 노출되어 새로운 프라이어와 결합이 가능하게 된다. 새로운 역방향 프라이머가 표적 서열에 새로이 결합하며, 중합효소의 가닥 치환 활성으로 첫 번째 역방향 프라이머로 인해 생성된 염기 가닥이 검출 대상에서 분리된다. 분리된 ssDNA에는 정방향 프라이머의 결합부위와 상보적인 서열을 포함하므로, 정방향 프라이머가 이에 결합하여 연장이 일어난다. 이때, 증폭 반응물 내에는 isodG와 상보적으로 반응할 수 있는 요소가 포함되지 않기에, 중합효소는 isodG에서 연장을 멈춘다. 이후 역방향 프라이머와 동일하게 자가 접힘이 일어나 가닥 치환 활성으로 ssDNA가 분리된다. 정방향 프라이머로 생성된 ssDNA는 사이클링 단계로 진입하며, 앞서 설명된 ‘연장, 자가 접힘, 비자연적 염기에서의 연장반응 중단, 가닥 치환 활성으로 분리’의 과정을 반복적으로 진행하게 된다. 이렇게 ssDNA 증폭물이 반복적으로 생성되어 표적 핵산을 다량 수득할 수 있으며, 검출용 표지(probe)로 이를 인식하여 검출이 이루어진다.

[0057] 또한, 상기 반응을 위한 반응 혼합물은 증폭 반응의 주형이 되는 표적 핵산 및 상기 표적 핵산을 토대로 디자인된 본원발명의 프라이머 세트를 혼합하여 준비하는데, 상기 프라이머 세트는 열처리를 통해 변성시킨 후, 냉각시킨 프라이머 세트를 상기 표적 핵산에 첨가하여 혼합물을 제조한다. 이후 상기 혼합물에 DNA 중합효소 및 버퍼가 포함된 효소 반응용액을 첨가하고 등온 증폭온도에서 등온 증폭반응을 수행한다.

[0058] 상기 등온 증폭온도는 60~65℃일 수 있다.

[0059] 또한 본 발명에 따른 상기 등온 증폭반응은 단일 가닥 DNA(ssDNA) 형태의 반응 산물을 생성한다.

[0060] 본 발명의 등온 증폭방법을 수행하게 되면, 종래 등온 증폭방법과 달리 이중 가닥 DNA 형태가 아닌 단일 가닥 DNA 형태의 반응 산물을 얻을 수 있는 특징이 있는데, 이는 앞서 기술한 바와 같이, 본 발명의 프라이머에 삽입한 isodG에 의한 것이다.

[0061] 나아가 본 발명은 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 생물학적 시료에 함유된 특정 표적 핵산을 등온 증폭시키는 단계를 포함하는, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 검출방법을 제공할 수 있다.

[0062] 상기 본 발명의 표적 핵산의 검출방법은 상기 기술된 본 발명의 등온 증폭방법과 동일한 과정으로 수행될 수 있다.

[0063] 본 발명의 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 표적 핵산의 검출방법은 등온 증폭에 의해 단일 가닥 DNA(ssDNA) 형태의 표적 핵산 반응산물의 분석을 통해 표적 핵산을 검출할 수 있다.

[0064] 또한 상기 등온 증폭은 60~65℃에서 수행할 수 있으며, 상기 표적 핵산은 바이러스 또는 병원성 미생물 유래일 수 있고, 본 발명의 일실시예에서는 SARS-CoV-2 바이러스의 유전자를 표적 핵산으로 하여 본 발명의 방법을 통해 SARS-CoV-2 바이러스의 유전자를 정확하게 검출할 수 있음을 확인하였다.

[0065] 본 발명의 일실시예에 따르면, SARS-CoV-2 RNA 바이러스 N 유전자의 검출을 위해, 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트로서, 정방향 프라이머(5 ‘-CCACGTTCCCGAisodGTTGGCATGGAAGTCACACCT-3’) 및 역방향 프라이머(5 ‘-TGACGCATACAAisodGGCTCTGTTGGTGGGAATGTT-3’)를 디자인하였고, 이를 이용하여 등온 증폭반응을 수행한 결과, 90 카피수의 매우 낮은 표적 핵산도 신속하고 정확하게 검출할 수 있음을 확인하였고, 표적 핵산만을 높은 특이도로 검출할 수 있음을 확인하였다.

[0066] 이처럼 본 발명의 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭용 프라이머 세트를 이용한 등온 증폭방법 및 표적 핵산 검출방법은, 단 한 쌍의 프라이머만을 이용하여 일정온도에서 반응을 수행하는 원-스텝(one-step) 핵산 및 신호 프로브 등온증폭 방법으로, 특별한 열변환 장치를 필요로 하지 않으며, 신속하고 간편하게 표적 핵산을 지수 증폭할 수 있고, 연장반응 이후 자가 접힘을 유도함으로써 다량의 단일 가닥 증폭물(ssDNA)을 생성할 수 있다. 또한 표적 핵산을 정확하고 민감하게 검출할 수 있으며, 높은 재현성과 정밀도로 낮은 농도의 표적 핵산 검출이 가능

하며 정량분석이 가능하다.

[0068] 본 발명의 이해를 돕기 위해 하기 실시 예를 제시한다. 그러나 이는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시 예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0070] **<준비예 및 실험방법>**

[0071] 시약준비

[0072] 모든 DNA 시료들은 Integrated DNA Technology(Skokie, IL, USA)에 의뢰하여 합성한 것을 사용하였다(하기 표 1 참조). ORF, E 및 N 유전자를 함유한 SARS-CoV-2 RNA는 ATCC(Manassas, VA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 발현 플라스미드 SARS-CoV-2 N 유전자 cDNA 클론(Native Sequence)은 ORIGENE(미국 메릴랜드주 록빌)사로부터 구입하여 사용하였다. 인간 코로나바이러스 OC43, 229E 및 NL63은 한국병원성바이러스은행(서울)에서 구입하여 사용하였다. WarmStart® 램프키트(DNA 및 RNA), Monarch® PCR 및 DNA Cleanup 키트, Monarch® DNA Gel Extraction 키트, Monarch® Total RNA Miniprep 키트, RNA 시료 정제 비드를 포함하는 NEBNext® rRNA Depletion 키트 v2(인간/마우스/쥐), 데옥시뉴클레오티드(dNTP) 용액 믹스는 New England Biolabs(Ipswich, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. Platinum™ SuperFi™ II DNA 중합효소, ROX 참조 염료 및 HotStart-IT 결합 단백질은 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 모든 실험은 DNA 및 RNA 분해 방지를 위해 UltraPureTM 증류수(Thermo Fisher Scientific) 및 TE(pH 8.0)를 사용하여 수행하였다. 본 실험에 사용한 올리고뉴클레오티드의 서열들은 하가ㅣ 표 1에 나타내었다.

표 1

polyT inserted ssDNA template	
polyT-0	CGC GCA TTG GCA TGG AAG TCA CAC CTT CGG GAA CGT GGT TGA CCT ACA CAG GTG CCA TCA AAT TGGATG ACA AAG ATC CAA ATT TCA AAG ATC AAG TCA TTT TGC TGA ATA AGC ATA TTG ACG CAT ACA AAA CATTCC CAC CAA CAG AGC CTA AAA AGG ACA AAA AGA AGA AGG CTG ATG AAA CTC AAG CCT TAC CGCAG-C3 spacer
polyT-5	CGC GCA TTG GCA TGG AAG TCA CAC CTT CGG GAA CGT GGT TGA CCT ACA CAG GTG CCA TCA AAT TGG ATG ACA AAG ATC CAA ATT TCA AAG ATC AAG TCA TTT TGC TGA ATA AGC ATA TTG ACG CAT ACA ATTT TTT AAC ATT CCC ACC AAC AGA GCC TAA AAA GGA CAA AAA GAA GAA GGC TGA TGA AAC TCA AGC CTT AC-C3 spacer
polyT-10	CGC GCA TTG GCA TGG AAG TCA CAC CTT CGG GAA CGT GGT TGA CCT ACA CAG GTG CCA TCA AAT TGG ATG ACA AAG ATC CAA ATT TCA AAG ATC AAG TCA TTT TGC TGA ATA AGC ATA TTG ACG CAT ACA ATTT TTT TTT TTA ACA TTC CCA CCA ACA GAG CCT AAA AAG GAC AAA AAG AAG AAG GCT GAT GAA ACT CAA GC-C3 spacer
polyT-20	CGC GCA TTG GCA TGG AAG TCA CAC CTT CGG GAA CGT GGT TGA CCT ACA CAG GTG CCA TCA AAT TGG ATG ACA AAG ATC CAA ATT TCA AAG ATC AAG TCA TTT TGC TGA ATA AGC ATA TTG ACG CAT ACA ATTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT AAC ATT CCC ACC AAC AGA GCC TAA AAA GGA CAA AAA GAA GAA GGC TGA TG-C3 spacer

dsDNA template sequence	
dsDNA template (168-1184, 996 bp)	CAC TCA ACA TGG CAA GGA AGA CCT TAA ATT CCC TCG AGG ACA AGG CGT TCC AAT TAA CAC CAA TAG CAG TCC AGA TGA CCA AAT TGG CTA CTA CCG AAG AGC TAC CAG ACG AAT TCG TGG TGG TGA CGG TAA AAT GAA AGA TCT CAG TCC AAG ATG GTA TTT CTA CTA CCT AGG AAC TGG GCC AGA AGC TGG ACT TCC CTA TGG TGC TAA CAA AGA CGG CAT CAT ATG GGT TGC AAC TGA GGG AGC CTT GAA TAC ACC AAA AGA TCA CAT TGG CAC CCG CAA TCC TGC TAA CAA TGC TGC AAT CGT GCT ACA ACT TCC TCA AGG AAC AAC ATT GCC AAA AGG CTT CTA CGC AGA AGG GAG CAG AGG CGG CAG TCA AGC CTC TTC TCG TTC CTC ATC ACG TAG TCG CAA CAG TTC AAG AAA TTC AAC TCC AGG CAG CAG TAG GGG AAC TTC TCC TGC TAG AAT GGC TGG CAA TGG CGG TGA TGC TGC TCT TGC TTT GCT GCT GCT TGA CAG ATT GAA CCA GCT TGA GAG CAA AAT GTC TGG TAA AGG CCA ACA ACA ACA AGG CCA AAC TGT CAC TAA GAA ATC TGC TGC TGA GGC TTC TAA GAA GCC TCG GCA AAA ACG TAC TGC CAC TAA AGC ATA CAA TGT AAC ACA AGC TTT CGG CAG ACG TGG TCC AGA ACA AAC CCA AGG AAA TTT TGG GGA CCA GGA ACT AAT CAG ACA AGG AAC TGA TTA CAA ACA TTG GCC GCA AAT TGC ACA ATT TGC CCC CAG CGC TTC AGC GTT CTT CGG AAT GTC GCG CAT TGG CAT GGA AGT CAC ACC TTC GGG AAC GTG GTT GAC CTA CAC AGG TGC CAT CAA ATT GGA TGA CAA AGA TCC AAA TTT CAA AGA TCA AGT CAT TTT GCT GAA TAA GCA TAT TGA CGC ATA CAA AAC ATT CCC ACC AAC AGA GCC TAA AAA GGA CAA AAA GAA GAA GGC TGA TGA AAC TCA AGC CTT ACC GCA GAG ACA GAA GAA

[0073]

Self-folding primers*	
FSP (0 - 21 nt)	GTA+ GGT+ CAA+ CCA+ CGT+ TCC+ CGA+ TTG GCA TGG AAG TCA CAC CT
RSP (0 - 21 nt)	TAA+ GCA+ TAT+ TGA+ CGC+ ATA+ CAA+ GCT CTG TTG GTG GGA ATG TT
FSP without isodG	CCA CGT TCC CGA TT GGC ATG GAA GTC ACA CCT
RSP without isodG	TGA CGC ATA CAA GC TCT GTT GGT GGG AAT GTT
FSP	CCA CGT TCC CGA -isodG-TT GGC ATG GAA GTC ACA CCT
RSP	TGA CGC ATA CAA -isodG-GC TCT GTT GGT GGG AAT GTT
Probes	
MB (FSP)	6-FAM-TC AGC AAA ATG ACT TGA TCT TTG AAA TTT CAT TTT GCT GA-DABCYL
MB (RSP)	6-FAM-TC AGC AAA ATG AAA TTT CAA AGA TCA AGT CAT TTT GCT GA-DABCYL
MB complementary sequence (FSP)	AAA TTT CAA AGA TCA AGT CAT TTT GCT GA
MB complementary sequence (RSP)	TCA GCA AAA TGA CTT GAT CTT TGA AAT TT

*The colors of oligonucleotide sequences correspond to those of the domains depicted in Figure 1. The red and blue colors indicate the annealing site of forward self-folding primer (FSP) and reverse self-folding primer (RSP), respectively. The orange and green colors represent the self-folding site of FSP and RSP, respectively.

[0074]

[0076] ExIT의 타당성 및 최적화 분석

[0077] (1) 자가 접힘 프라이머 디자인

[0078] 자가 접힘 프라이머(SP)는 NCBI 참조 서열 데이터베이스(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_045512.2)에서 최근 이용 가능한 SARSCoV-2의 전체 서열을 기반으로 선택 및 설계하였다. 역방향 SP(RSP)에 대한 어닐링 사이트는 역방향 프라이머를 선택하여 사용하였고, NCBI Primer BLAST(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)를 사용하여 순방향 SP(FSP)에 대한 어닐링 사이트를 설계하였다.

[0080] (2) 검출 부위(사이트) 간 거리에 따른 자가 접힘 효율 분석

[0081] 검출 부위에서 자가 접힘 효율의 검증을 위해, 검출 부위 사이에 다양한 수의 poly T 분자가 포함된 합성 ssDNA 주형을 사용하였다. 실험은 1.6μM RSP(21nt), 50nM MB(RSP), 1X WarmStart LAMP Mater Mix, 1X ROX 참조 염료와 poly T (0, 5, 10, 20 nt)가 포함된 ssDNA 주형 1 x 10^9 카피를 함유한 최종 25μL 용액을 이용하였으며, 62° C에서 120분 동안 진행하였다. 실험 전, 1X WarmStart LAMP Master Mix에 들어 있는 500nM의 MB(FSP) 또는 MB(RSP)는 5분 동안 95° C까지 가열한 후 천천히 20° C까지 냉각시켜 사용하였다.

[0083] (3) 증폭 효율이 가장 높은 프라이머 세트 선택

[0084] SARS-CoV-2 N 유전자의 cDNA 클론을 증폭하여 dsDNA 주형을 수득하였다. 제조업체의 지침에 따라 앰플리콘을 추출 및 정제하였으며, 정제된 산물은 Denovix dsDNA High Sensitivity Fluorescent Assay kit(Denovix, DE, USA)를 사용하여 DS-11 FX+ 분광광도계를 이용하여 측정하였고, -20℃에 보관하였다. 표적 dsDNA는 사용 5분 전에 95° C에서 가열하였다.

[0085] SP 길이의 최적 조건을 확인하기 위해, 반응 혼합물에는 1x10^9 카피수의 dsDNA 주형, 50nM MB(RSP 또는 FSP),

1X WarmStart LAMP Mater Mix, 1X ROX 참조 염료 및 다양한 길이의 자가 접힘 사이트를 갖는 SP(0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 또는 21nt)를 포함하도록 하였고, 증폭은 60, 62 및 64 ° C에서 수행하였다. 음성 대조군으로는 dsDNA 주형을 첨가하지 않은 군을 사용하였다.

[0086] 가장 우수한 자가 접힘(self-folding) 효율을 갖는 프라이머 세트를 확인하기 위해, 각 온도별로 선택된 프라이머를 이용하여 증폭을 수행하였다. 가장 우수한 프라이머 세트의 선별을 위한 실험은 1.6 μM FSP(12, 15 또는 21 nt), 1.6 μM RSP(12 또는 21 nt), 1X ROX 참조 염료, 50 nM MB(RSP) 및 0~9 × 10^2 카피수의 SARS-CoV-2 RNA(ATCC, VR-3276SD)를 함유한 1X WarmStart LAMP 마스터 믹스를 포함하는 총 부피 25ul의 반응용액을 이용하여 60, 62 및 64 ° C에서 반응을 수행하였다.

[0088] ExIT의 민감도 분석

[0089] ExIT의 민감도는 1X WarmStart LAMP Master Mix에 함유된 다양한 농도의 표적 RNA(0~9x10^4 카피의 SARS-CoV-2 RNA), 1.6μM FSP, 1.6 μM RSP, 1X ROX 참조 염료, 50nM MB(RSP)를 포함하는 최종부피 25μL 용액을 이용하여 수행하였다. 준비된 반응 용액을 StepOnePlusTM Real-Time PCR System을 이용하여 60℃에서 90분 동안 반응시켜 분석하였다.

[0091] ExIT의 검출 특이도 분석

[0092] 인간 총 RNA는 HEK 세포로부터 수득하였고, Monarch® Total RNA Miniprep Kit를 사용하여 정제하였으며, 제조사의 프로토콜에 따라 RNA 샘플 정제 비드가 포함된 NEBNext® rRNA Depletion Kit v2(인간/마우스/쥐)를 사용하여 수행하였다. 최종 생성물은 Denovix RNA Quantification Assay(Denovix, DE, USA)를 이용하여 DS-11 FX+ 분광광도계를 이용하여 측정하였고, 사용 전 -80℃에 보관하였다.

[0093] SARS-CoV-2 N 유전자에 특이적인 ExIT의 수행은 SARS-CoV-2 N의 부재 또는 존재 하에 다양한 주형(NTC, 인간 총 RNA, 인간 코로나바이러스 229E, 인간 코로나바이러스 OC43 및 인간 코로나바이러스 NL63)을 사용하여 수행하였다. 이후 상기 기술한 방법에 따라 샘플을 분석하였다. SARS-CoV-2 및 인간 코로나바이러스(OC43, 229E, NL63)의 농도는 9 × 10^4 copies/μL이었고, HEK 세포에서 얻은 총 인간 RNA는 1 ng이었다.

[0095] **<실시예 1>**

[0096] **프라이머 디자인**

[0097] <1-1> 자가 접힘 프라이머(SP) 디자인

[0098] 본 발명자들은 하기 표 2와 같이 자가접힘 프라이머를 디자인하였다. 역방향 SP(이하 RSP)의 결합 부위는 Park, M. *et al*. (*Exp Mol Med* 52, 963-977 (2020))에서 N 유전자를 표적으로 하는 역방향 프라이머를 사용하였다. 정방향 SP(이하 FSP)의 결합 부위는 앞서 선정된 역방향 프라이머의 결합 부위와 동일 수준의 Tm을 갖는 곳으로 NCBI Primer-Blast Tool 프로그램을 이용하여 선정하였다. SP의 결합 부위 서열은 하기 표 2의 5열에 나타내었다.

[0099] 또한, 결합 부위에서 연장되어 만들어지는 생성물과 상보적인 서열을 결합 부위의 5 ‘ 말단에 연결하여 접힘 부위로 선정하였으며, 접힘 부위의 길이 최적화를 위하여, 3 nt 간격으로 다양한 길이로 디자인 하였으며, SP의 접힘 부위 서열은 표 2의 3열에 나타내었다.

표 2

자가 접힘 프라이머 서열

이름	방향	SP 서열 (5' → 3') 접힘 부위 (Self-folding site)	Modification	결합 부위 (Annealing site)
(1) FSP (0~21 nt)	정방향	GTA+GGT+CAA+CCA+CGT+TCC+CGA	-	TTGGCATGGAAGTCACACCT
(2) RSP (0~21 nt)	역방향	TAA+GCA+TAT+TGA+CGC+ATA+CAA	-	GCTCTGTTGGTGGGAATGTT
(3) FSP without isodG	정방향	CCACGTTCCCGA	-	TTGGCATGGAAGTCACACCT
(4) RSP without isodG	역방향	TGACGCATACAA	-	GCTCTGTTGGTGGGAATGTT
(5) FSP	정방향	CCACGTTCCCGA	isodG	TTGGCATGGAAGTCACACCT
(6) RSP	역방향	TGACGCATACAA	isodG	GCTCTGTTGGTGGGAATGTT

[0100]

[0102] <1-2> isodG가 삽입된 SP의 디자인(iSP)

[0103] 실험으로 SP의 최적 접힘 부위 길이를 선정하였으며, 해당 서열은 상기 표 2의 3행 및 4행에 나타내었다. 또한 본 발명자들은 선정한 접힘 부위와 결합 부위의 사이에 isodG를 삽입하였으며, isodG가 삽입된 SP (이하 iSP) 서열은 상기 표 2의 5, 6행에 나타내었다.

[0105] **<실시예 2>**

[0106] **검출 성능이 우수한 등온 증폭 반응용 자가 접힘 프라이머의 조건 확립**

[0107] <2-1> 표적 인식 서열 간격 삭제에 따른 자가 접힘 효율 확인

[0108] LAMP의 경우 표적 인식 서열 간의 간격이 약 20 nt이다. Inner primer가 F2c에 결합하여 F1c까지 연장되면, 그 거리가 60 nt에 달하여 스스로 이중결합을 풀고 hairpin을 이루기 힘들다. 또한 결합 부위(F2c)가 노출되어 있지 않기에, outer primer의 가닥 치환 활성의 도움을 받아야 hairpin을 형성하며 중간 생성물을 위한 단계로 이어질 수 있다. 이 때문에 inner primer 세트와 outer primer 세트까지 최소 4개의 프라이머가 필요하다. 이에 본 발명자들은 표적 인식 서열 사이의 간격이 삭제된다면, R1과 R2 사이의 거리도 좁아지며, RSP 내부의 R2와 RSP가 연장되며 생성된 R2c가 만나 접힘 구조를 이룰 확률이 올라갈 수 있고, 한번 자가 접힘이 발생하면, 결합 부위(R1)가 다시 노출되기에 outer primer 없이 다음 단계로 이어질 수 있다고 판단하여, 이를 확인하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다. 표적 서열 사이에 polyT를 0, 5, 10, 20 nt 삽입하여 ssDNA 주형을 만들었으며, LAMP의 inner primer와 길이가 비슷한 RSP (21 nt)를 사용하여 선형 증폭 효율 정도를 비교하였는데, 앞서 기술한 검출 부위(사이트) 간 거리에 따른 자가 접힘 효율 분석 방법으로 실험을 수행하였다. 표적 인식 서열 간격에 따른 자가 접힘 기전에 대한 비교 모식도는 도 2에 나타내었다.

[0110] 분석 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 표적 인식 서열 간의 거리가 줄어들수록 형광 시그널이 빠르게 나타났다. 특히, poly T가 0 nt인 것을 사용하였을 때, 형광 신호가 가장 빠르게 나타났는데, 이는 표적 인식 서열 간격이 삭제된 경우에 해당되는 군임을 알 수 있었다. 이를 통해 본 발명자들은 표적 인식 서열간의 간격이 삭제되면 자가 접힘으로 인한 선형 증폭 효율을 향상시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0112] <2-2> 증폭 효율이 가장 높은 자가 접힘 프라이머의 길이 및 증폭 조건 확립

[0113] 본 발명자들은 다음의 2가지 요인을 고려하여 최적의 증폭 조건을 조사하였다. 첫째, 각 프라이머의 자가 접힘 부위의 길이에 따른 자가 접힘 효율을 분석하였다. 이는 프라이머 연장 후 접힘 구조를 유지하는 능력에 영향을 미친다. 만약 SP의 접힘 부위 길이가 너무 짧다면 접힘 구조를 유지하기 힘들 수 있고, 반면 너무 길다면 프라이머간 이합체 형성 확률이 높아질 수 있기 때문이다. 따라서 증폭에 적절한 프라이머의 길이를 조사하였다. 둘

째로는, 온도에 따른 각 프라이머 길이별 자가 접힘 효율을 분석하였다. 접힘 구조의 Tm보다 높은 온도에서 증폭이 진행된다면, 접힘 구조가 유지되지 않고 풀리게 될 수 있어, 모든 접힘 부위 길이에 따른 적정 온도를 조사하였다. 구체적으로 분석은 상기 기술된 증폭 효율이 가장 높은 프라이머 세트 선택 방법으로 수행하였다.

[0115] 그 결과, 도 4 내지 도 6에 나타낸 바와 같이, RSP의 경우, 자가 접힘 부위의 길이가 12 nt와 21 nt인 경우, 60℃에서 가장 검출 시간이 빠른 것으로 나타났고, 62℃ 및 64℃에서는 21 nt가 가장 검출 시간이 빠른 것으로 나타났다. FSP의 경우에는 60℃에서 12 nt, 62℃에서 15 nt, 64℃에서 21 nt가 가장 빠른 검출 시간을 나타내었다. 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 검출 시간이 가장 빠른 자가 접힘 부위의 길이를 갖는 프라이머 후보를 선택하였고, 선택된 후보 프라이머는 동일 온도끼리 조합하여 SARS-CoV-2 RNA의 검출 민감도 및 증폭 효율 확인에 사용하였다. 상기 선택된 후보 프라이머들은 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

선택 후보 프라이머 및 검출 한계 비교

[0116]

선택 후보 세트	SP 길이 및 온도	검출 시간 (분)								
		0 카피			90 카피		평균 (편차)	900 카피			평균 (편차)
1	FSP(12 nt)+RSP(12 nt) at 60℃	-	-	- 55.0	38.3	34.1	42.5 (11.05)	36.6	36.0	36.0	36.2 (0.34)
2	FSP(12 nt)+RSP(21 nt) at 60℃	-	-	- 49.0	-	-	-	41.0	40.5	41.2	40.9 (0.36)
3	FSP(15 nt)+RSP(21 nt) at 62℃	-	-	- 39.0	-	40.3	-	40.1	38.0	45.6	41.2 (3.92)
4	FSP(21 nt)+RSP(21 nt) at 64℃	-	-	- -	43.0	39.4	-	37.3	45.0	46.9	43.1 (5.08)

[0117] 상기 4개의 후보 세트 프라이머들을 이용하여 SARS-CoV-2 RNA의 검출 민감도 및 검출 한계를 분석한 결과, 상기 표 3 및 도 7에 나타낸 바와 같이, SARS-CoV-2 RNA가 900 카피로 존재할 때는 모든 후보에서 형광 신호가 검출되었다. 특히 후보 1은 36.2분으로 가장 빠른 검출시간을 나타냈고, 가장 작은 편차를 보였다. 그러나 SARS-CoV-2 RNA가 90 카피로 감소시킨 경우, 후보 1에서만 균일한 증폭이 확인되었다. 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 상기 표 3의 4개의 후보 프라이머 세트 중에서, 후보 1의 프라이머 세트가 가장 우수한 검출 성능을 보인다는 것을 알 수 있었고, 하기 실험에서는 후보 1의 프라이머 세트를 이용하였다.

[0119] **<실시예 3>**

[0120] **본 발명의 isodG가 삽입된 자가 접힘 프라이머를 이용한 SARS-CoV-2 RNA 바이러스 N 유전자의 검출 성능 분석**

[0121] <3-1> 검출 민감도 분석

[0122] 본 발명자들은 본 발명의 자가 접힘 프라이머(SP)의 민감도와 재현성 개선을 위해 자가 접힘 프라이머 내부에 isodG를 삽입하여 ssDNA 증폭물을 형성하는 cycling pathway를 유도해 보기로 하였다. isodG가 없는 SP의 경우, SP의 말단까지 중합효소가 작동하며 LAMP와 비슷한 형태의 중간 생성물을 형성하게 되고, 이 중간 생성물의 연장이 지속되거나, loop 부분에 또 다른 SP가 결합하면 다양한 형태의 dsDNA 증폭물이 형성될 수 있으며, 이 경우 프로브를 도입할 ssDNA 증폭물이 충분히 생성되지 않기에 민감도와 재현성이 떨어지게 된다. 한편, 본 발명에서 고안한 isodG가 도입된 SP를 사용하게 되면, 중합효소는 isodG에서 연장을 멈추며 증폭물은 ssDNA 형태로 남아있게 되고, 중간생성물 또한 ssDNA로 유지될 수 있다. isodG가 있는 SP의 반복적인 결합 및 연장으로, cycling pathway에 진입하게 되며 다량의 ssDNA 증폭물이 형성할 수 있게 된다. 이 경우에는 ssDNA 증폭물을 활용한 프로브 디자인 및 도입이 용이하여, 민감도와 재현성까지 우수해질 수 있다. 상기 기술된 바와 같이, isodG 유무에 따른 반응 증폭물 형성 기전에 대한 비교 모식도는 도 8에 나타내었다.

[0124] 이에 본 발명자들은 isodG 유무의 자가 접힘 프라이머를 사용하여, SARS-CoV-2 RNA 바이러스 N 유전자 검출 민감도를 분석하였는데, 이를 위해 상기 기술된 ExIT의 민감도 분석 방법을 수행하였다. 구체적으로, 상기 표 3의 후보세트 1에 대해 isodG가 삽입된 세트 및 isodG가 삽입되지 않은 세트를 이용하여 비교 분석하였다.

[0125] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, isodG가 없는 SP로 SARS-CoV-2 RNA의 민감도를 확인한 결과, 900 카피의 RNA까지 균일하게 신호가 검출되었으나, 90 카피 이하에서는 일부 샘플의 신호가 검출되지 않아 편차가 상승하는 것으로 나타났다. 또한 앞선 SP 조합 선정을 위한 후보 1의 실험 결과와 종합한다면, 900 카피 이하에서 일관적인 재현성이 나타나지 않는 것을 확인할 수 있다. 이는 isodG가 없는 SP의 경우, 무작위로 생성된 dsDNA 증폭물로 인해 프로브의 인식율이 낮아졌기 때문이다(도 9A).

[0126] 반면, isodG가 포함된 SP로 SARS-CoV-2 RNA의 민감도를 확인한 결과, 90 카피의 RNA까지 균일하게 신호가 검출되었다(도 9B). 나아가 isodG가 포함된 SP로 민감도를 측정한 결과 중, 균일한 신호를 나타낸 특정 농도 범위(90 카피 ~ 9만 카피 RNA)의 로그값에 대하여 검출시간 간의 관계를 조사하였다. 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이 상관관계 지수 (R2)가 0.9372로 매우 선형을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 자가 접힘 프라이머 내로 isodG를 삽입한 경우, 안정적으로 ssDNA 증폭물을 생성할 수 있음을 알 수 있었고, 검출 재현성이 상승함과 동시에 민감도까지 향상되는 결과를 확인할 수 있었다.

[0128] <3-2> 검출 특이도 분석

[0129] 다음으로 본 발명자들은 본 발명에서 고안한 ExIT에 대한 검출 특이도를 확인하기 위해 다양한 코로나바이러스와 human total RNA를 이용하여 분석하였다. 먼저 SARS-CoV-2와 동일한 Coronaviridae과(family)인 human coronavirus OC43, 229E, NL63을 선정하였다. 이 중 OC43의 경우 SARS-CoV-2와 동일한 Betacoronavirus 속(genus)에 해당된다. 또한 실제 환자의 질병진단을 위해 사용될 경우를 위하여, human total RNA를 비교군에 포함하였다. ExIT의 특이도는 표적인 SARS-CoV-2 RNA의 유무에 따라 확인하였으며, 실험방법은 상기 기술된 ExIT의 검출 특이도 분석 방법으로 수행하였다.

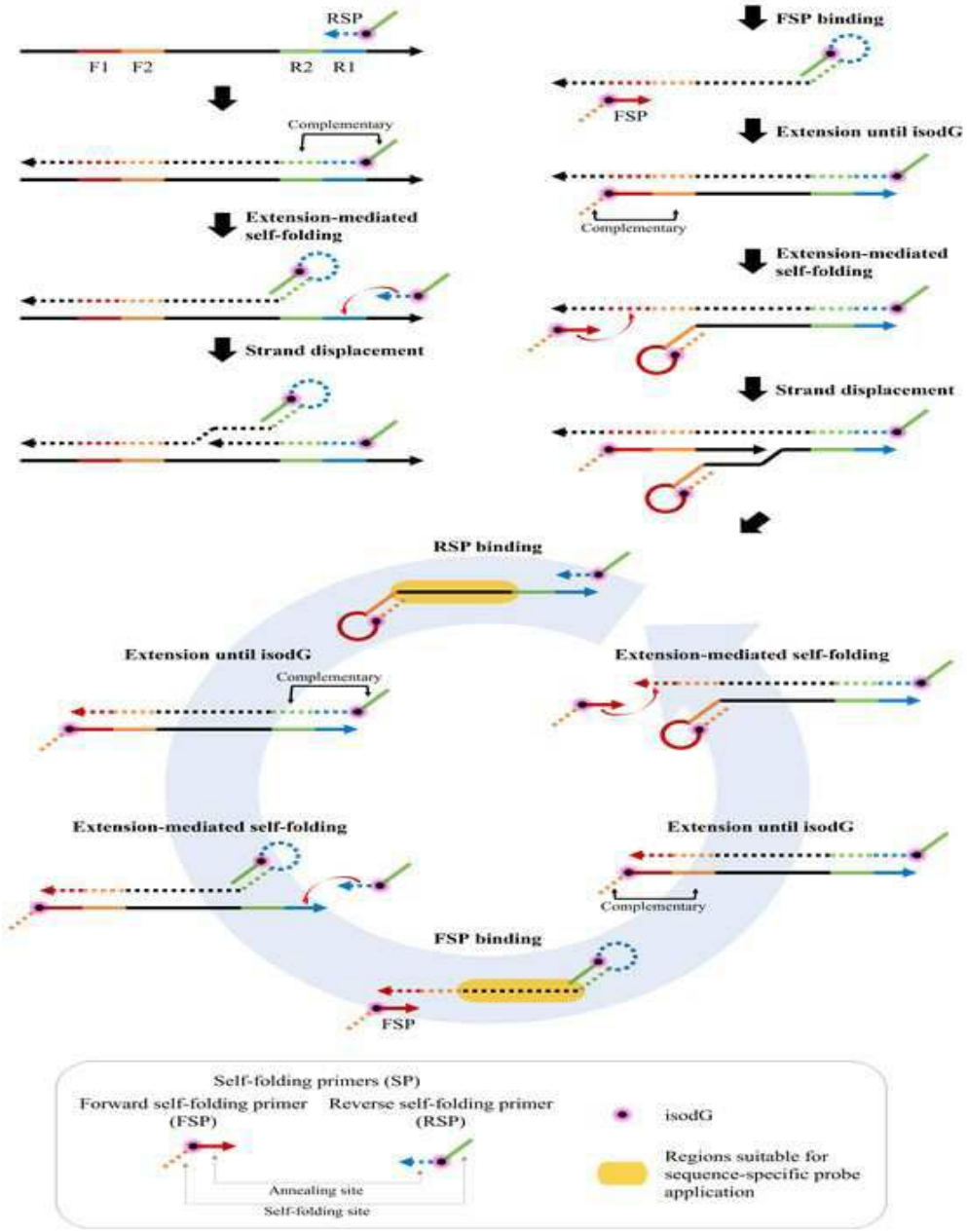
[0131] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 자가 접힘 프라이머를 이용한 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭 방법(ExIT: Extension-mediated self-folding Isothermal amplification Technology)을 수행한 경우, SARS-CoV-2 RNA가 없는 실험군에서는 어떠한 신호도 나타나지 않았다. 이는 비특이적인 검체와 본 발명의 자가 접힘 프라이머 간에 의도되지 않은 반응이 일어났더라도, 검출에는 전혀 영향을 끼치지 않았음을 의미하며, 비특이적인 검체가 존재하여도 표적인 SARS-CoV-2의 검출에는 전혀 영향을 주지 못하며, 표적 핵산인 SARS-CoV-2의 유전자를 높은 특이도로 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0133] 이상의 결과들을 통해 본 발명자들은 본 발명에서 개발한 자가 접힘 프라이머를 사용하여 연장 매개 자가 접힘 등온 증폭을 수행할 경우, 단 한쌍의 프라이머만을 사용하여 등온에서 지수 증폭이 가능한 효과가 있으며, ssDNA 반응산물을 형성하게 되므로 서열 특이적 타겟 유전자(핵산)의 검출이 가능할 뿐만 아니라 높은 민감도 및 특이성으로 정확한 검출이 가능한 효과가 있다.

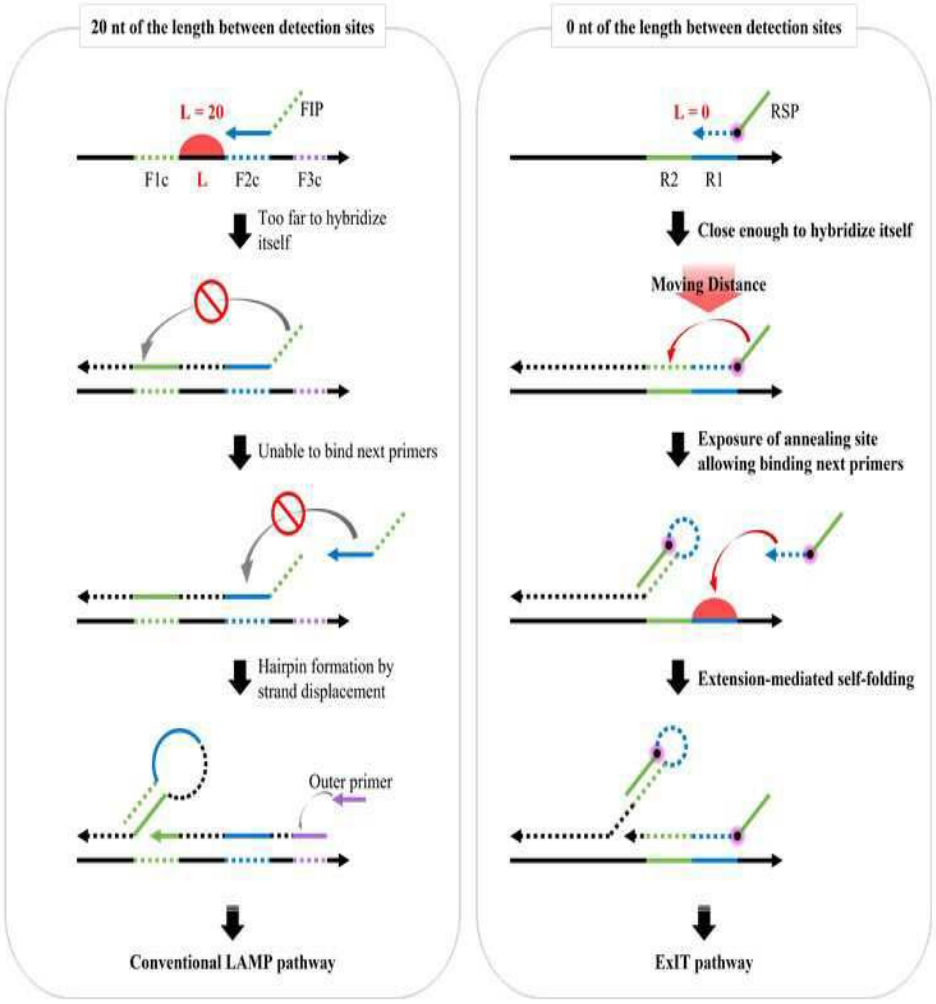
[0135] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

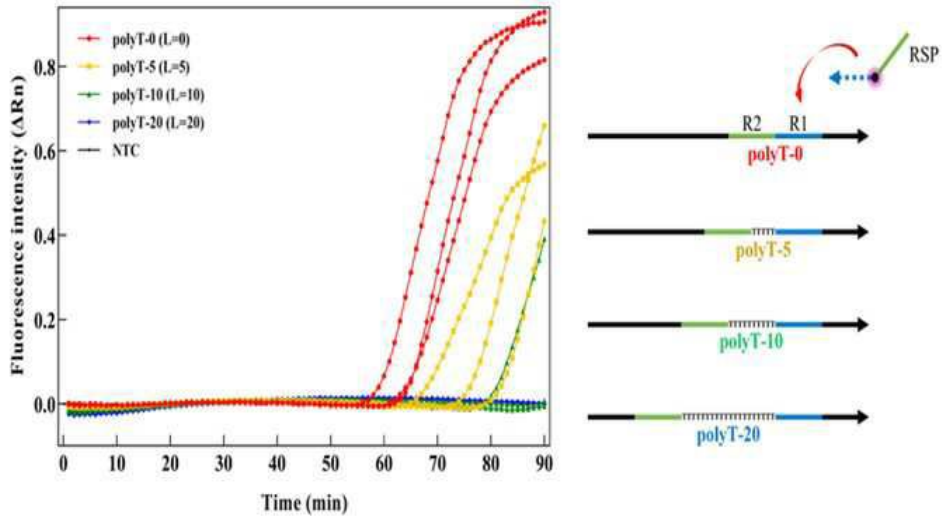
도면1


RSP
F1 F2
R2 R1
Complementary
Extension-mediated self-folding
Strand displacement
FSP binding
FSP
Extension until isodG
Complementary
Extension-mediated self-folding
Strand displacement
RSP binding
Extension until isodG
Complementary
Extension-mediated self-folding
Extension-mediated self-folding
Extension until isodG
Complementary
FSP binding
FSP
Self-folding primers (SP)
Forward self-folding primer (FSP)
Reverse self-folding primer (RSP)
Annealing site
Self-folding site
isodG
Regions suitable for sequence-specific probe application

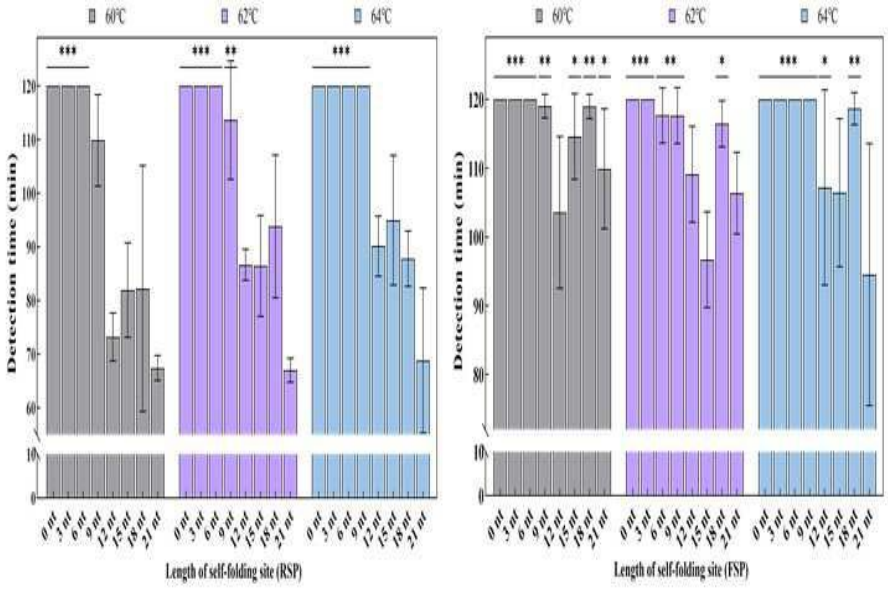
도면2


20 nt of the length between detection sites
L = 20
FIP
F1c
L
F2c
F3c
Too far to hybridize itself
Unable to bind next primers
Hairpin formation by strand displacement
Outer primer
Conventional LAMP pathway
0 nt of the length between detection sites
L = 0
RSP
R2
R1
Close enough to hybridize itself
Moving Distance
Exposure of annealing site allowing binding next primers
Extension-mediated self-folding
ExIT pathway

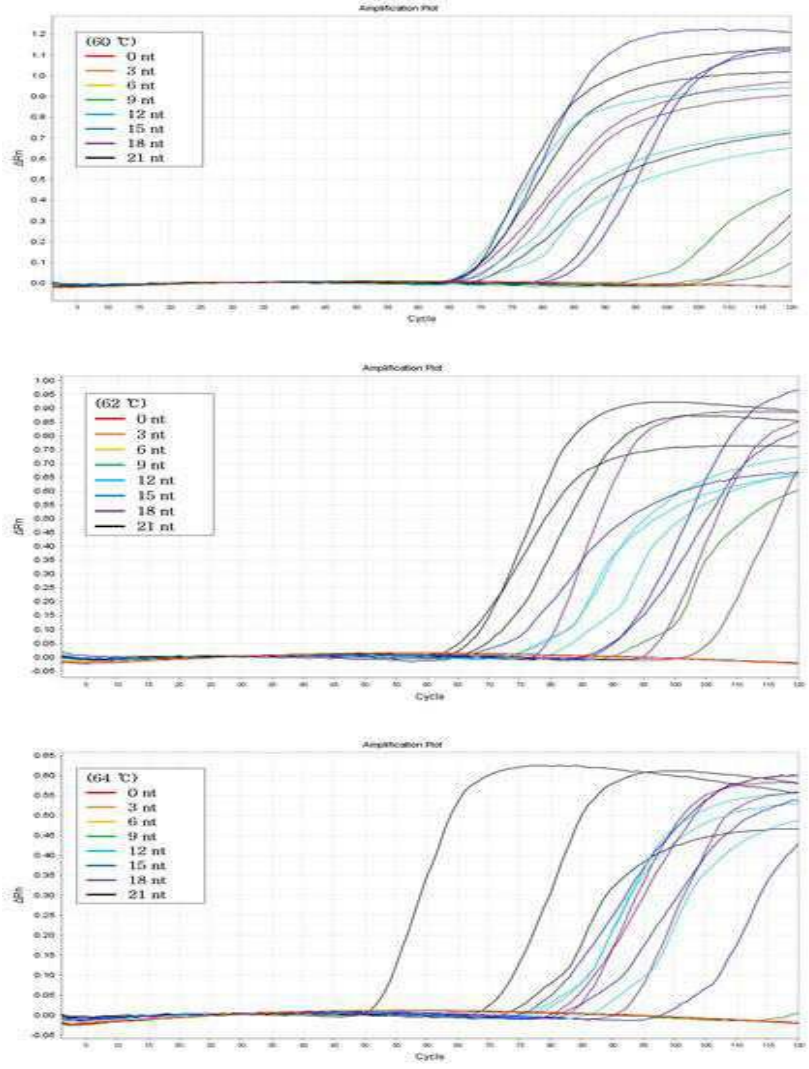
도면3


polyT-0 (L=0)
polyT-5 (L=5)
polyT-10 (L=10)
polyT-20 (L=20)
NTC
Fluorescence intensity (ΔRn)
Time (min)
RSP
R2
R1
polyT-0
polyT-5
polyT-10
polyT-20

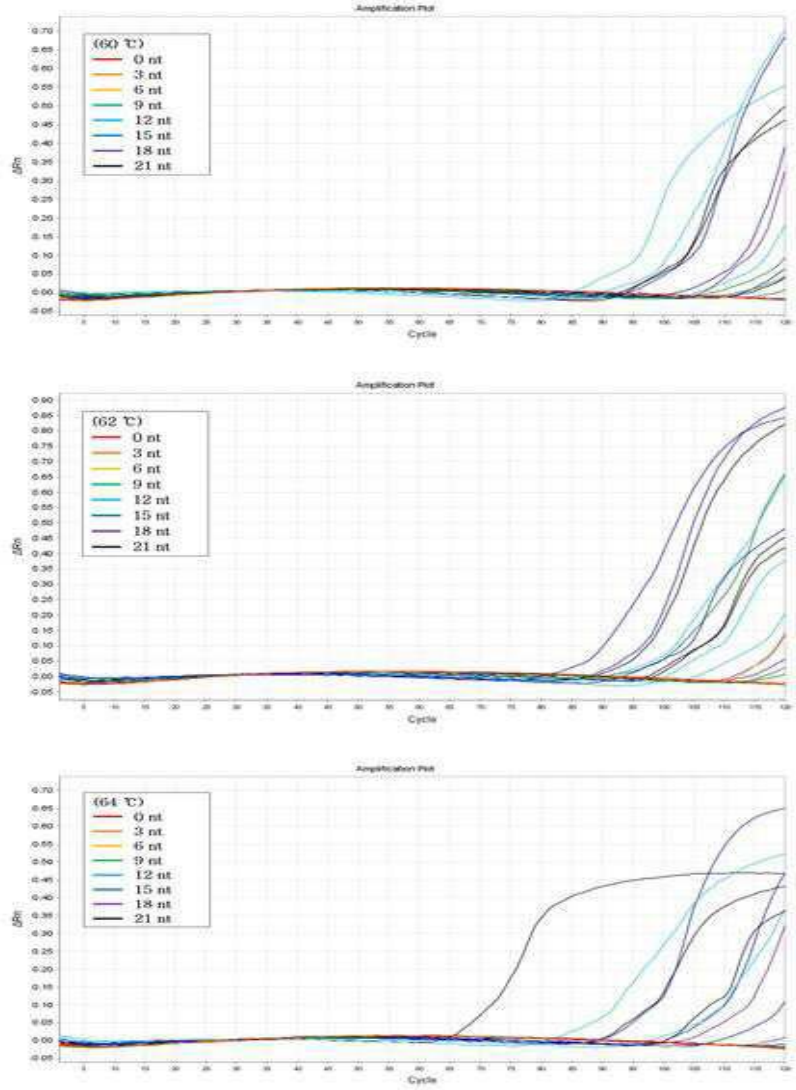
도면4


60℃
62℃
64℃
Detection time (min)
Length of self-folding site (RSP)
Length of self-folding site (FSP)

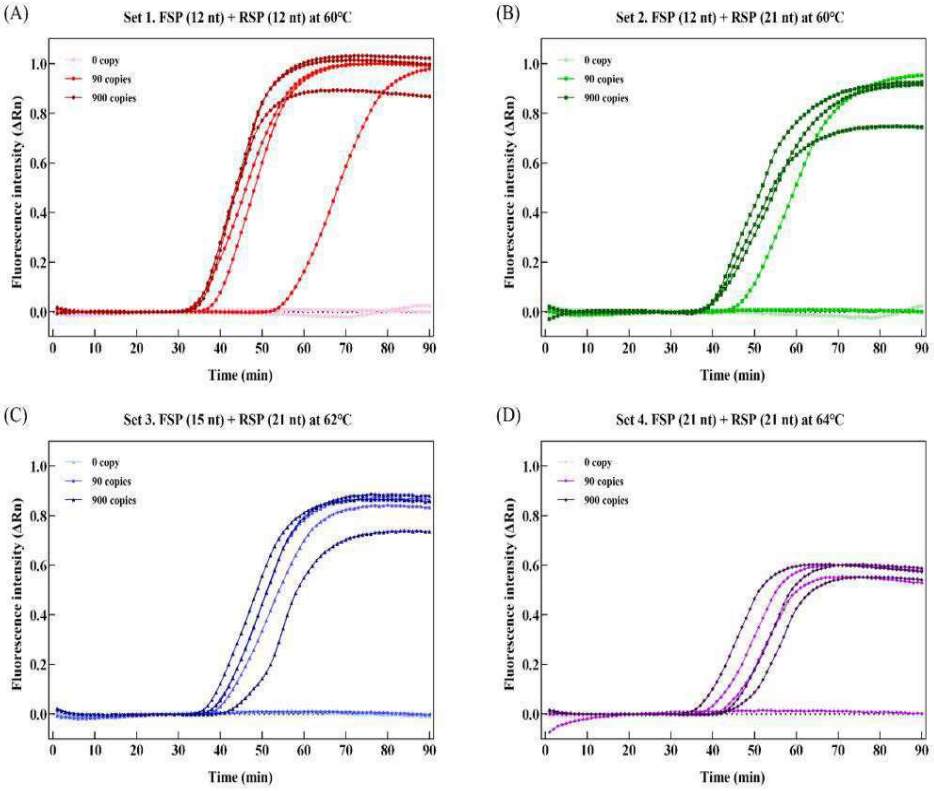
도면5


Amplification Plot
(60 ℃)
(62 ℃)
(64 ℃)
0 nt
3 nt
6 nt
9 nt
12 nt
15 nt
18 nt
21 nt
ΔRn
Cycle

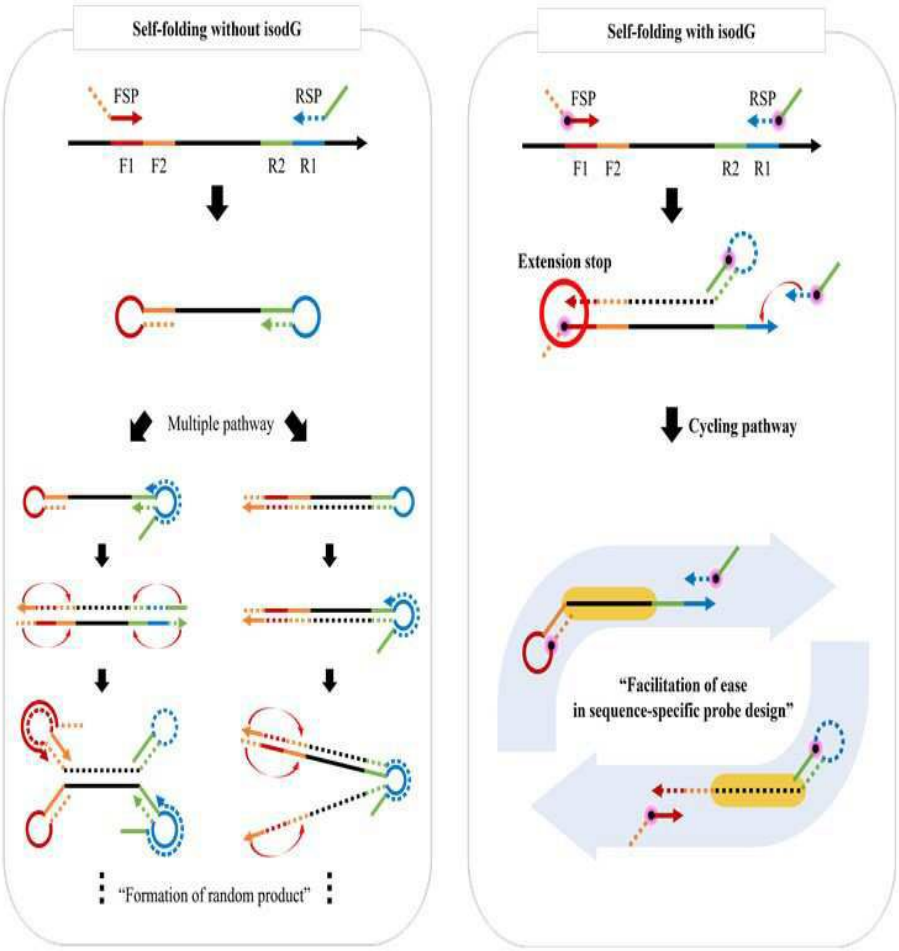
도면6


Amplification Plot
(60 ℃)
0 nt
3 nt
6 nt
9 nt
12 nt
15 nt
18 nt
21 nt
ΔRn
Cycle
Amplification Plot
(62 ℃)
0 nt
3 nt
6 nt
9 nt
12 nt
15 nt
18 nt
21 nt
ΔRn
Cycle
Amplification Plot
(64 ℃)
0 nt
3 nt
6 nt
9 nt
12 nt
15 nt
18 nt
21 nt
ΔRn
Cycle

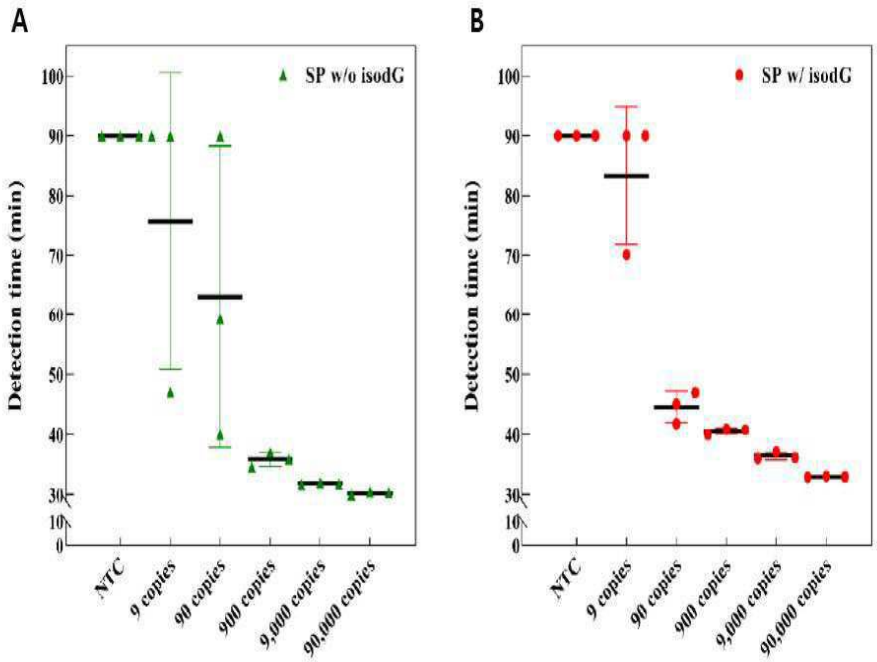
도면7


(A)
Set 1. FSP (12 nt) + RSP (12 nt) at 60°C
0 copy
90 copies
900 copies
Fluorescence intensity (ΔRn)
Time (min)
(B)
Set 2. FSP (12 nt) + RSP (21 nt) at 60°C
0 copy
90 copies
900 copies
Fluorescence intensity (ΔRn)
Time (min)
(C)
Set 3. FSP (15 nt) + RSP (21 nt) at 62°C
0 copy
90 copies
900 copies
Fluorescence intensity (ΔRn)
Time (min)
(D)
Set 4. FSP (21 nt) + RSP (21 nt) at 64°C
0 copy
90 copies
900 copies
Fluorescence intensity (ΔRn)
Time (min)

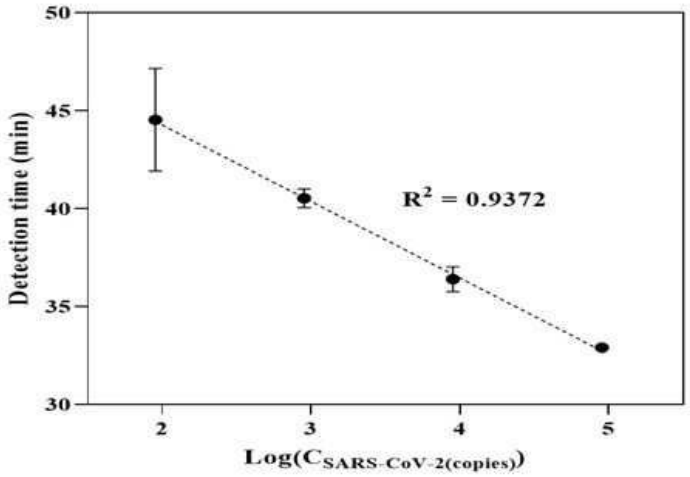
도면8


Self-folding without isodG
FSP
RSP
F1 F2
R2 R1
Multiple pathway
"Formation of random product"
Self-folding with isodG
FSP
RSP
F1 F2
R2 R1
Extension stop
Cycling pathway
"Facilitation of ease
in sequence-specific probe design"

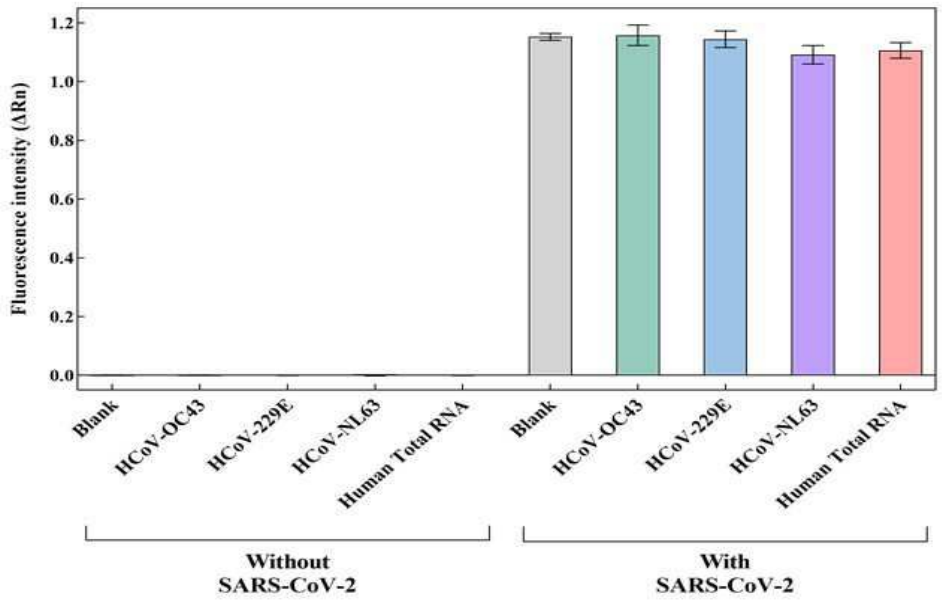
도면9


A
SP w/o isodG
Detection time (min)
100
90
80
70
60
50
40
30
10
0
NTC
9 copies
90 copies
900 copies
9,000 copies
90,000 copies
B
SP w/ isodG
Detection time (min)
100
90
80
70
60
50
40
30
10
0
NTC
9 copies
90 copies
900 copies
9,000 copies
90,000 copies

도면10


50
45
40
35
30
Detection time (min)
R^2 = 0.9372
2
3
4
5
Log($C_{SARS-CoV-2(copies)}$)

도면11


1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Fluorescence intensity (ΔRn)
Blank
HCoV-OC43
HCoV-229E
HCoV-NL63
Human Total RNA
Blank
HCoV-OC43
HCoV-229E
HCoV-NL63
Human Total RNA
Without SARS-CoV-2
With SARS-CoV-2