



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0141182
(43) 공개일자 2024년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/12 (2006.01) C12Q 1/6816 (2018.01)
C12Q 1/6844 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/1247 (2013.01)
C12Q 1/6816 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2024-7027554
(22) 출원일자(국제) 2023년01월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년08월16일
(86) 국제출원번호 PCT/NL2023/050024
(87) 국제공개번호 WO 2023/140731
국제공개일자 2023년07월27일
(30) 우선권주장
22152542.1 2022년01월20일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
바게닝젠 유니버시티
네덜란드, 엔엘-6708 피비 바게닝젠, 드로브달세
스티그 4
(72) 발명자
스틴스, 아이코 유르
네덜란드, 6701 디더블유 바헤닝헌, 베르스트라트
34
스타알스, 레이몬드 후베르 요제프
네덜란드, 6711 엔지 에테, 더 할테 349
판 데르 오스트, 존
네덜란드, 6871 에이치지 랭쿰, 브람 스트리플란
드베흐 116
(74) 대리인
김영철, 최우성, 김 순 영

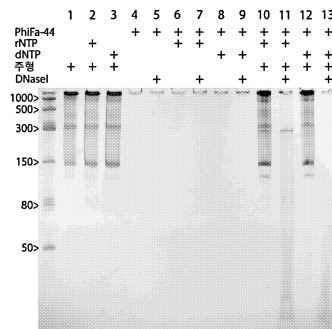
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 열안정성 RNA 중합효소

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 단백질, 및 시험관내 전사 방법에서의 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이 단백질을 인코딩하는 핵산 분자 및 이 단백질을 발현하는 숙주 세포에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6844 (2018.05)

명세서

청구범위

청구항 1

리보핵산 뉴클레오타이드(rNTPs) 및 적합한 완충제의 존재 하에 서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 단백질과 함께 주형 핵산 분자를 인큐베이션하는 단계; 및

30℃ 내지 80℃의 온도에서 전사 반응을 수행함으로써 상기 주형 핵산 분자의 적어도 일부를 RNA 분자로 전사시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 주형 핵산 분자는 데옥시리보핵산(DNA) 주형 분자인, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 완충제는 25 내지 200 mM의 NaCl을 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 전사 반응은 45℃ 내지 75℃의 온도에서 수행되는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 주형 핵산 분자는 사전 증폭 반응에 의해 생성된, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 전사된 RNA 분자는 클러스터링된 규칙적인 간격의 짧은 회문식 반복(CRISPR) - CRISPR 관련(Cas) 단백질 기반 핵산 검출 시스템과 함께 추가로 인큐베이션되는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 CRISPR-Cas 핵산 검출 시스템은

- a) 유형 III Cas 단백질 및 표적 RNA 분자에 결합하는 적어도 하나의 CRISPR RNA(crRNA)를 포함하는 효과기 복합체;
- b) 사이클릭 올리고아데닐레이트(cOA)의 수준을 직접적으로 또는 간접적으로 측정하기 위한 수단을 포함하는, 방법.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 사전 증폭 반응, 전사 반응, 및 핵산 검출 시스템과의 인큐베이션은 모두 원 포트 반응(one pot reaction)으로 수행되는, 방법.

청구항 9

서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 단백질.

청구항 10

제9항에 있어서, 적합한 태그를 포함하는 단백질.

청구항 11

제9항 또는 제10항의 단백질을 인코딩하는 핵산 분자.

청구항 12

제11항에 있어서, 적합한 숙주 세포에서 상기 단백질의 발현을 위해 코돈 최적화되는 핵산 분자.

청구항 13

제9항 또는 제10항의 단백질을 발현하는 숙주 세포.

청구항 14

주형 핵산 분자의 적어도 일부를 RNA 분자로 전사하는 전사 반응을 수행하기 위한 제9항 또는 제10항의 단백질의 용도.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 전사 반응은 30℃ 내지 80℃의 온도, 바람직하게는 45℃ 내지 75℃의 온도에서 수행되는, 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 열안정성 RNA 중합효소, 및 이의 시험관내 전사 및 진단 방법에서의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 시험관내 전사(IVT: *in vitro* transcription) 반응은 일반적으로 프로모터, 리보뉴클레오타이드 삼인산, DTT 및 마그네슘 이온을 포함하는 완충 시스템, 적절한 리보핵산(RNA) 중합효소를 포함하는 주형 핵산 분자를 필요로 한다. 상기 RNA 중합효소는 종종 SP6, T3 및 T7과 같은 단일 서브유닛 박테리오파지 유래 RNA 중합효소로부터 선택된다. 전사는 RNA 중합효소가 그의 프로모터 서열에 결합함으로써 시작되고, 이어서 주형 가닥이 활성 부위에 공급되고, RNA 전사물(transcript)이 생성되고, 전사 반응이 종료된다.

[0003] IVT에 사용되는 것 외에도, RNA 중합효소는 특히 진단 목적으로 핵산 증폭 방법에 자주 사용된다. 예를 들어, 핵산 서열 기반 증폭(NASBA; US5654142A호) 및 전사 매개 증폭(TMA; WO1991001384A1호)은 등온 조건 하에 RNA 중합효소 및 역전사 효소가 연속적으로 서로의 주형을 생성하는 교대 사이클을 포함한다. 증폭 후, 상보적 올리고뉴클레오타이드 프로브의 혼성화는 예를 들어 정량적 실시간 PCR이라고도 불리는 정량적 PCR에 사용되는 바와 같이 검출 가능한 표지를 통한 검출을 허용할 수 있다. 또한 특정 클러스터링된 규칙적인 간격의 짧은 회문 반복(CRISPR: clustered regularly interspaced short palindromic repeat) - CRISPR 관련(Cas) 단백질 기반 핵산 검출 시스템은 RNA 중간체를 사용한다(문헌[Steens et al., 2021. Nature Comm 12: 1-12]).

[0004] 반응 속도를 향상시키기 위해 반응 온도를 증가시킬 수 있다면 유리할 것이다. 예를 들어, 등온 증폭의 반응 온도를 높이면 2차 구조를 갖는 RNA의 증폭이 가능할 수도 있다. 그러나 야생형 박테리오파지 유래 RNA 중합효소보다 더 높은 열안정성을 나타내는 RNA 중합효소 변이체의 확인에도 불구하고(문헌[Boulain et al., 2013. Protein Eng Des Sel. 26(11): 725-734]), 65℃에서 5분 초과 인큐베이션 후에도 활성을 유지하는 RNA 중합효소는 현재 상업적으로 이용 가능하지 않다.

[0005] 따라서 더 높은 반응 온도에서 안정성과 활성이 개선된 RNA 중합효소가 필요하다.

발명의 내용

[0006] 본 발명은 리보핵산 뉴클레오타이드(rNTPs) 및 적합한 완충제의 존재 하에 서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 단백질과 함께 주형 핵산 분자를 인큐베이션하는 단계; 및 30℃ 내지 80℃의 온도에서 전사 반응을 수행함으로써 상기 주형 핵산 분자의 적어도 일부를 RNA 분자로 전사시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 상기 주형 핵산 분자는 바람직하게는 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA 주형 분자인 디옥시리보핵산(DNA) 주형 분자이다. 상기 완충제는 바람직하게는 25 내지 200 mM의 NaCl을 포함한다. 상기 전사 반응은 바람직하게는 45℃ 내지 75℃의 온도에서 수행된다. 주형 핵산 분자는 사전 증폭 반응을 포함하는 임의의 수단에 의해 생성되었을 수 있다.

[0007] 전사된 RNA 분자는 클러스터링된 규칙적인 간격의 짧은 회문식 반복(CRISPR) - CRISPR 관련(Cas) 단백질 기반 핵산 검출 시스템과 함께 추가로 인큐베이션될 수 있다. 상기 CRISPR-Cas 핵산 검출 시스템은 바람직하게는 a)

유형 III Cas 단백질 및 표적 RNA 분자에 결합하는 적어도 하나의 CRISPR RNA(crRNA)를 포함하는 효과기 복합체; b) 사이클릭 올리고아데닐레이트(cOA:cyclic oligoadenylate)의 수준을 직접적으로 또는 간접적으로 결정하기 위한 수단을 포함한다. 본 발명의 바람직한 방법에서, 사전 증폭 반응, 전사 반응, 및 핵산 검출 시스템과의 인큐베이션은 모두 원 포트 반응(one pot reaction)으로 수행된다.

[0008] 본 발명은 서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 단백질을 추가로 제공한다. 상기 단백질은 바람직하게는 적합한 태그를 포함한다.

[0009] 본 발명은 추가로 본 발명의 단백질을 인코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 상기 핵산 분자는 바람직하게는 적합한 숙주 세포에서 상기 단백질의 발현을 위해 코돈 최적화된다.

[0010] 본 발명은 본 발명의 단백질을 발현하는 숙주 세포를 추가로 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한 주형 핵산 분자의 적어도 일부를 RNA 분자로 전사하는 전사 반응을 수행하기 위한 본 발명의 단백질의 용도를 제공한다. 상기 전사 반응은 바람직하게는 30℃ 내지 80℃의 온도, 바람직하게는 45℃ 내지 75℃의 온도에서 수행된다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1. IVT에 대한 phiFa_44 기질 특이성. 사용된 마커는 NEB 저범위 ssRNA(NEB #N0364S)이다.

도 2. 다양한 NaCl 농도 및 온도 하의 phiPa_44 IVT 성능의 분석. A: 주형 단독, DNase 없음. B: 주형 단독, DNase 있음. C: phiFa 단독, DNase 있음.

도 3. SARS-COV-2 원 포트 반응.

도 4. 단일 가닥(ss) DNA 주형 A 및 B를 사용한 시험관내 전사 반응. "+"는 phiFa 단백질의 존재를 나타내고 "-"는 phiFa 단백질의 부재를 나타낸다.

도 5. 5' 형광 표지 (Cy3) 단일 가닥 DNA(50개의 뉴클레오티드)를 주형으로 사용하는 시험관 내 phiFa-44 RNA 전사 검정. 하나의 반응에는 RNase H 처리가 수행되었다. 모든 생성물은 천연 4 내지 20%(w/v) 폴리아크릴아미드 겔에서 분석되었다. 핵산을 선택적으로 시각화하기 위해 형광 젤 스캐닝이 사용되었다. Cy3 필터는 Cy3-표지된 반응 생성물(왼쪽)만 보여주는 반면, SYBR Gold 염색 및 Cy2 필터를 사용한 후속 시각화는 모든 핵산을 보여준다(오른쪽).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 4.1 정의

[0014] 본원에서 사용되는 용어 "phiFa_44"는 서열번호 1을 갖는 단백질을 지칭한다. 상기 단백질은 이탈리아 시칠리아의 에트나 산 주변에서 분리된 박테리오파지 phiFa(GenBank: MH673672.2; Taxonomy ID: 1400796)에서 유래한다(문헌[Severinov et al., 2014. Bacteriophage 4: e29399, DOI: 10.4161/bact.29399]).

[0015] 본원에서 phiFa_44와 관련하여 사용되는 용어 "RNA 중합효소"는 DNA 주형으로부터 RNA의 상보 가닥의 합성을 촉매하는 DNA 의존성 RNA 중합효소를 지칭한다.

[0016] 본원에서 사용되는 용어 "프로모터"는 DNA 의존성 RNA 중합효소와 같은 RNA 중합효소를 포함하는 전사 개시 기구가 결합하여 전사를 개시하는 유전자의 5' 말단에 있는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 상기 프로모터는 종종 유전자의 시작 코돈의 5 내지 100 bp 상류에 위치한다.

[0017] 본원에서 사용되는 용어 "클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문 반복(CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)"은 원핵 미생물의 게놈에서의 DNA의 하나 이상의 특수화된 영역을 지칭한다. 이들 영역은, 침입 요소와의 이전 만남으로부터 유래되는, 유사한 길이의 고유한 스페이스 서열에 의해 분리된 스페이스 서열, 전형적으로 약 25 내지 약 38 bp의 직접적인 DNA 반복(문헌[Grissa et al., 2007. BMC Bioinformatics 8: 172])에 의해 산재된 뉴클레오티드 반복의 존재를 특징으로 한다. 이들은 다음 감염 시 이들 침입자를 빠르게 공격하는 메모리로서 기능한다. 게놈 영역은 CRISPR 유전자와 부근에 위치하는 CRISPR 관련(Cas)-효과기 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 유전자를 포함한다.

[0018] 본원에서 사용되는 용어 "CRISPR RNA 또는 crRNA"는 스페이스 서열 및 적어도 5' 반복-유래 말단을 포함하는 CRISPR-유래 RNA 분자를 지칭한다. 상기 crRNA는 바람직하게는 적어도 30개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는

적어도 34개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 적어도 40개의 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 적어도 46개의 뉴클레오타이드 길이를 갖는다. 상기 crRNA는 바람직하게는 1000개 미만의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 200개 미만의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 100개 미만의 뉴클레오타이드이다. 상기 crRNA 분자는 리보핵산 뉴클레오타이드 유사체, 예를 들어 이노신, 우리딘, 크산틴, 히포크산틴, 2,6-디아미노푸린(2,6-diaminopurine), 및 6,8-디아미노푸린계 리보뉴클레오타이드(6,8-diaminopurine-based ribonucleotides) 및 데옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotides)를 포함할 수 있다.

[0019] 본원에서 사용되는 용어 "CRISPR-관련(Cas) 효과기 단백질"은 crRNA와 관련된 단백질을 지칭한다. CRISPR/Cas 시스템은 현재 2개의 클래스로 분류된다. 클래스 1 시스템은 다중 서브유닛 Cas 복합체를 사용하는 반면, 클래스 2 시스템은 활성을 매개하기 위해 단일 Cas 단백질을 사용한다. 클래스 I, 유형 III CRISPR-Cas 시스템은 특히 RNA 서열을 표적화하도록 진화하였다. 이러한 시스템의 고유한 단백질은 클래스 1의 Cas3, 유형 I 시스템, 클래스 2의 Cas9, 유형 II 시스템, 클래스 1의 Cas10, 유형 III 시스템, 클래스 2의 Cas12, 유형 V 시스템 및 클래스 2의 Cas13, 유형 VI 시스템이다.

[0020] 본원에서 사용되는 용어 "효과기 복합체(effector complex)"는, (리보)뉴클레아제 활성을 갖고 crRNA의 스페이서 서열에 대한 상보적 서열을 포함하는 침입 핵산 서열을 절단 및 불활성화할 수 있는 CRISPR-Cas 리보핵산 단백질 복합체를 지칭한다. 상기 복합체는 적어도 하나의 crRNA 및 적어도 하나의 Cas 효과기 단백질을 포함한다.

[0021] 본원에서 사용되는 용어 "역전사"는 RNA 주형으로부터 상보적 DNA(cDNA)의 생성을 지칭한다. 레트로바이러스 및 부 레트로트랜스포존은 역전사효소라고 불리는 효소를 코딩하여 그의 농을 복제한다. 레트로바이러스 역전사효소는 RNA 의존성 DNA 중합효소 활성, 리보뉴클레아제 H(RNase H) 및 DNA 의존성 DNA 중합효소 활성이라는 세 가지 순차적 생화학적 활성을 갖는다. RNA 역전사에 자주 사용되는 효소는 물론인 뮤린 백혈병 바이러스 역전사효소 및 조류 골수아세포종 바이러스 역전사효소와 열안정성 변이체를 포함한 이들의 변이체이다.

[0022] 본원에 사용되는 용어 "등온 증폭"은 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 필요한 열 순환 없이 핵산 분자의 기하급수적 증폭을 지칭한다. 가닥 치환 활성을 갖는 중합효소는 일반적으로 등온 방법에 사용된다. 바람직한 단일 튜브 등온 반응은 핵산 서열 기반 증폭(NASBA: nucleic acid sequence-based amplification), 루프 매개 등온 증폭(LAMP: loop-mediated isothermal amplification), 헬리카제-의존성 증폭(HDA: helicase-dependent amplification), 재조합효소 중합효소 증폭(RPA: recombinase polymerase amplification) 반응 및 닉킹 효소 증폭 반응(NEAR: nicking enzyme amplification reaction)을 포함한다. 바람직한 단일 튜브 등온 반응은 루프 매개 등온 증폭(LAMP)이다.

[0023] 본원에서 사용되는 용어 "유형 V 효과기 단백질"은 비-표적 데옥시리보핵산 분자인 경우 절단에 필요한 특정 뉴클레아제 도메인을 특징으로 하는 클래스 2 효과기 단백질을 지칭한다. 현재까지 알려진 적어도 13개의 하위 유형이 있다: V-A, V-B 내지 V-M. 유형 V Cas 단백질은 프란시셀라 노비시다(*Francisella novicida*), 아시다미노코커스(*Acidaminococcus*) sp., 라크노스피라세아에(*Lachnospiraceae*) sp., 프레보텔라(*Prevotella*) sp. 및 일부 고세균과 같은 유기체로부터 분리될 수 있다. 전체 가이드 길이는 바람직하게는 42 내지 44개의 뉴클레오타이드이다. Cas12 유형 V 효과기 단백질에 대한 gRNA는 바람직하게는 gRNA에서 PAM(Protospacer Adjacent Motif)으로서 디뉴클레오타이드 TT, 더욱 바람직하게는 5'-TTN 모티프를 포함한다. 예시적인 유형 V 효과기 단백질은 Cpf1(유형 V-A) 및 C2c1(유형 V-B)이다. Cas12 및 Cas14는 프로토타입(prototype) 유형 V 효과기 단백질이다.

[0024] 본원에서 사용되는 용어 "유형 VI 효과기 단백질"은 비특이적 RNase 활성을 갖는 클래스 2 효과기 단백질을 지칭한다. 현재까지 알려진 4개의 하위 유형이 있다: 하위 유형 VI-A, VI-B, VI-C 및 VI-D. 유형 VI Cas 단백질은 랩토트리치아 부칼리스(*Leptotrichia buccalis*), 랩토트리치아 샤히이(*Leptotrichia shahii*), 루미노코커스 플라베파시엔스(*Ruminococcus flavefaciens*), 베르게이엘라 조오헬쿰(*Bergeyella zoohelcum*), 프레보텔라 부카에(*Prevotella buccae*) 및 리스테리아 실리게리(*Listeria seeligeri*)와 같은 유기체로부터 분리될 수 있다. 전체 가이드 길이는 바람직하게는 52 내지 66개의 뉴클레오타이드이다. 유형 VI 효과기 단백질에 대한 PAM 모티프는 당업자에게 공지된 바와 같이 가변적이며, LshCas13a의 경우 3' non-G, 5' non-C 및 3' NAN 또는 NNA(BzCas13b), 또는 none(RfCas13d)를 포함할 수 있다. Cas13은 프로토타입 유형 VI 효과기 단백질이다.

[0025] 본원에서 사용되는 용어 "유형 III Cas 단백질"은 적어도 Cas10 단백질을 포함하는 RNA 표적화, 다중 서브유닛 CRISPR 관련 복합체를 지칭한다.

[0026] 본원에서 사용되는 용어 "유형 IIIA Cas 단백질"은 표적 RNA 분자에 결합 시 비특이적 DNase 활성을 갖는 RNA 표적화 유형 III CRISPR/Cas 단백질 복합체를 지칭한다. 유형 IIIA Cas 단백질은 예를 들어, 스타필로코커스 테

트로필루스(*Staphylococcus thermophilus*), 테르무스 테르모필루스(*Thermus thermophilus*) 및 스타필로코커스 에피데미스(*Staphylococcus epidermis*)로부터의 유형 IIIA Csm 단백질을 포함한다.

- [0027] 본원에서 사용되는 용어 "유형 III-B Cas 단백질"은 테르무스(*Thermus*) 종으로부터의 유형 III-B Cas 단백질을 제외하고 비특이적 DNase 활성을 또한 갖는 RNA 표적화 유형 III CRISPR-Cas 단백질 복합체를 지칭한다. 상기 유형 III-B Cas 복합체는 6 내지 7개의 개별 단백질로 구성된다. 유형 III-B Cas 단백질은 예를 들어 피로코커스 푸리오서스(*Pyrococcus furiosus*), 테르무스 테르모필루스 및 솔폴로부스 솔파타리쿠스(*Sulfolobus solfataricus*)로부터의 유형 III-B Cmr 복합체를 포함한다.
- [0028] 본원에서 사용되는 용어 "켄칭된(quenched), 켄처(quencher) 및 켄칭(quenching)"은 주어진 물질의 신호 강도, 바람직하게는 형광 강도를 감소시키는 과정을 지칭한다. 형광 켄칭은 형광 분자로부터 방출된 빛을 흡수하는 물리화학적 과정이다. 형광 켄칭은 형광단 및 켄처 분자가 단일 가닥 핵산 분자의 말단에 부착되고 서로 가까운 핵산 진단의 지표로 사용될 수 있다. 핵산 분자가 그 표적에 혼성화되거나 뉴클레아제에 의해 절단됨에 따라 형광단-켄처 복합체가 분리되어 형광단이 빛을 생성할 수 있도록 한다.
- [0029] 본원에서 사용되는 용어 "다크 켄처(dark quencher)"는 형광단으로부터 여기 에너지를 흡수하고 그 에너지를 열로 소산시키는 켄처를 지칭한다. 따라서 다크 켄처는 자체적으로 빛을 방출하지 않는다. 다크 켄처는 형광 분자와 함께 분자 생물학에서 사용된다.
- [0030] 본원에서 사용되는 용어 "사이클릭 올리고아데닐레이트(cOA:cyclic oligoadenylate)"는 3 내지 6개의 아데노신 일인산(AMP: adenosine mono phosphate) 분자를 포함하는 고리 구조를 지칭한다. cOA의 형성은 유형 III CRISPR/Cas 효소가 시스템의 일부인 Cas10의 사이클라제 도메인에 의해 촉매된다.
- [0031] 본원에서 사용되는 용어 "PPi" 또는 피로포스페이트는 피로인산의 염 또는 에스테르를 지칭한다. 대안적인 명칭은 디포스페이트 및 디폴리포스페이트이다.
- [0032] 본원에서 사용되는 용어 "무기 피로포스파타제" 또는 무기 디포스파타제는, 피로인산염의 하나의 이온의 2개의 인산염 이온으로의 전환을 촉매하는 효소를 지칭한다. 그 효소는 효소 클래스 EC 3.6.1.1이다.
- [0033] 본원에서 사용되는 용어 "cOA 의존성 효소가 단백질"은 활성이 cOA의 양에 따라 달라지는 단백질을 지칭한다. 예는 고등 진핵생물 및 원핵생물, 뉴클레오티드 결합(HEPN: Higher Eukaryotes and Prokaryotes, Nucleotide binding) 활성 부위를 사용하여 RNA를 비특이적으로 분해하는 엔도리보뉴클레아제와 같은 리보뉴클레아제이다. 이러한 뉴클레아제는 CRISPR 관련 로스만 폴드(CARF) 도메인을 사용하여 하나 이상의 cOA 분자의 결합에 의해 활성화된다. 이러한 비특이적 효소가 엔도리보뉴클레아제의 예는 피로코커스 푸리오서스(*Pyrococcus furiosus*)의 Cas 보조 단백질 Csx1 및 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)의 Csm6이다.
- [0034] 본원에서 사용되는 용어 "비천연적 발생 단백질"은 천연 상태의 단백질과 다른 아미노산 서열 및/또는 번역 후 변형 패턴을 갖는 단백질을 지칭한다. 예를 들어, 비천연적 발생 단백질은 단백질의 N-말단, C-말단 및/또는 N-말단과 C-말단 사이에서 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입을 가질 수 있다. "비-천연적 발생" 단백질은 천연적 발생 아미노산 서열과 다르지만 천연적 발생 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다. 어떤 경우에는 비천연적 발생 단백질은 N 말단 메티오닌을 함유할 수 있거나, 상이한(예를 들어 박테리아) 세포에 의해 생성된 경우에는 하나 이상의 번역 후 변형(예를 들어 글리코실화, 인산화 등)이 결합될 수 있다. 또한, 비천연적 발생 단백질은 유전공학에 의해 하나 이상의 특정 태그를 포함하는 태그된 단백질이다. 상기 태그는, 예를 들어 문헌 [Chatterjee, 2006 (Chatterjee, 2006. Cur Opin Biotech 17, 353-358)]에 제시된 바와 같이, c-myc 도메인, 혈구응집소 태그, 말토스-결합 단백질, 글루타티온-S-트랜스퍼라제, FLAG 태그 펩티드, 비오틴 수용체 펩티드, 스트렙타비딘-결합 펩티드 및 칼모둘린-결합 펩티드를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.
- [0035] 본원에서 사용되는 용어 "비천연 발생 핵산"은 (1) 천연 상태의 핵산과 상이한 뉴클레오티드의 서열; (2) 하나 이상의 비천연 발생 뉴클레오티드 단량체; 및/또는 (3) 추가된 표지 또는 기타 모이어티와 같은 하나 이상의 기타 변형을 함유하는 핵산을 지칭한다.
- [0036] 용어 "비천연 발생 조성물"은 (1) 예를 들어, 상이한 위치, 상이한 세포 또는 상이한 세포 구획에 있기 때문에 천연적으로 결합되지 않는 성분들의 조합; (2) 자연에서 발견되지 않는 상대적 농도를 갖는 성분들의 조합; (3) 일반적으로 자연의 성분들 중 하나와 관련된 것이 결합된 성분들의 조합; (4) 자연에서 발견되지 않는 형태인, 예를 들어 건조, 동결 건조, 결정성, 수성인 성분들의 조합; 및/또는 (5) 자연에 존재하지 않는 성분을 함유하는 조합을 포함하는 조성물을 지칭한다. 예를 들어, 제제는 자연적으로 발생하지 않는 완충제, 세제, 염료, 용

매 또는 방부제를 포함할 수 있다. 조성물은 임의의 형태, 예를 들어 수성 또는 동결건조된 것일 수 있고, 임의의 상태, 예를 들어 냉동 또는 수성 형태일 수 있다.

[0037] 본원에서 사용되는 용어 "프라이머"는 주형 핵산 분자에 어닐링하고 역전사를 포함하는 전사 또는 상기 주형 핵산 분자의 복제를 증합효소에 의해 프라이밍하는 것에 효과적인, 올리고뉴클레오타이드, 바람직하게는 길이가 15 내지 50개의 뉴클레오타이드인 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 또는 이들의 조합 또는 변이체를 포함할 수 있다. 상기 변이체는 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 포스포트리에스테르(phosphotriester), 포스포로티오에이트 2-알킬화(phosphorothioate 2-alkylated) 및 포스포라미데이트 유사체(phosphoramidate analogues)와 같은 합성 올리고뉴클레오타이드 유사체, 2'-플루오로(2'-fluoro), 0-메틸(0-methyl) 또는 메톡시에틸(methoxyethyl)과 같은 뉴클레오사이드 당 고리의 2'-위치에 변형이 있는 유사체, 펩티드 핵산, 가교된 핵산 및/또는 잠겨진(locked) 핵산 분자를 포함한다.

[0038] 4.2 *phiFa_44* 단백질

[0039] 4.2.1 현재, 65° C에서 5분 초과 동안 활성을 유지하는 DNA 의존성 RNA 중합효소는 상업적으로 이용 가능하지 않다. 열안정성 DNA 의존성 RNA 중합효소를 찾기 위해 *테르무스 테르모필루스(Thermus thermophilus)*와 같은 호열성 세균을 감염시킬 수 있는 박테리오파지를 분석했다. 박테리오파지 *phiFa*(GenBank: MH673672.2; Taxonomy ID: 1400796)가 후보 파지로서 확인되었다. *phiFa*는 긴 비수축성 꼬리를 가진 시포비리대(Siphoviridae) 파지에 속하는 아직 분류되지 않은 오시마바이러스(Oshimavirus)이다. *phiFa*는 "RNA 중합효소"(GenBank: QKE11339.1; SEQ ID NO:1)인 것으로 예측되는 가상의 단백질 "*phiFa_44*"를 인코딩한다.

[0040] BlastP 검색에서는 대장균(*Escherichia coli*)로부터의 가상 단백질인 WP_164703602.1이 *phiFa_44* 단백질 길이의 약 90%에 걸쳐 56.79%라는 비교적 높은 동일성 일치율을 갖는 것으로 확인되었다. 그러나 면밀히 조사해 보면 WP_164703602.1은 대장균(*E. coli*) 게놈에 대해 정렬이 불가능하므로 서열분석에서 오염물질인 것으로 보인다. 또한 인코딩 서열은 별도의 콘티그로서 데이터베이스에 업로드된다. WP_164703602.1의 실제 기원은 알려져 있지 않다. *phiFa_44*와 박테리오파지 유래 RNA 중합효소 SP6, T3 및 T7 사이에는 상동성이 발견되지 않았다.

[0041] 하나의 추가 정렬 서열은 플랜크토미세테스(*Planctomycetes*) 박테리아(MBI5851759.1)의 가상 단백질이었으며, 이는 *phiFa_44* 단백질 길이의 56%에 걸쳐 약 30%의 점수를 얻었다. 최종 정렬 서열은 다시 대장균으로부터의 가상 단백질(WP_206306715.1)이었으며, 이는 *phiFa_44* 단백질 길이의 단지 10%에 걸쳐 약 47%의 점수를 얻었다.

[0042] Pfam 데이터베이스 검색(Mistry et al., 2021. Nucleic Acids Res 49: D412-D419)은 *phiFa_44* 아미노산 서열을 사용하여 257개의 아미노산 잔기 길이에 대해 단지 0.019의 점수로 단지 하나의 결과만을 확인했다. 이 점수는 중요하지 않다. 확인된 하나의 결과(RdRP; PF05183)는 진핵생물 RNA 의존성 RNA 중합효소 계열에 속한다. 이 단백질은 dsRNA 주형을 증폭시키는 것으로 생각되는 전사 후 유전자 침묵에 관여한다.

[0043] Teubingen 툴킷(toolkit.tuebingen.mpg.de/에서 이용 가능)의 HHpred 도구를 사용한 검색에서는 서열 유사성이 매우 낮은(각각 25.8% 및 17.5%) 두 서열, 5FSW_C 및 2J7N_B를 식별했다. 확인된 두 단백질 모두 RNA 의존성 RNA 중합효소인 것으로 예측된다. 서열 유사성이 훨씬 낮은 서열(<8%)은 다중-서브유닛 DNA 의존성 RNA 중합효소로서 확인되었다.

[0044] 중요하지 않은 점수 유형인 RNA 의존성 RNA 중합효소와 다중 서브유닛 RNA 중합효소는 *phiFa_44*의 맥락에서 가능성이 있는 것으로 간주되지 않는다.

[0045] *phiFa_44* 단백질에 대한 더 많은 통찰력을 얻기 위해 *인 실리코(in silico)* 구조 분석이 수행되었다. 초기 결과는 QDE1 RNA 의존성 RNA 중합효소와 일부 유사성을 보여 주었으며, 이 유사성은 단지 207개의 아미노산 잔기의 영역에 걸쳐 최대 22%의 서열 동일성이었다. 그러나 이 도메인은 마그네슘(Mg) 결합 도메인과 유사하다. 예측된 3D 구조(데이터는 표시되지 않음)는 이러한 유사성을 확인하였고 Mg 결합을 담당할 수 있는 *phiFa_44*에서의 잔기로서 아미노 잔기 D366, D368 및 D370을 가리킨다.

[0046] 박테리오파지 유래 RNA 중합효소 SP6, T3 및 T7과 같은 알려진 RNA 중합효소와의 유의미한 서열 유사성이 없다는 점을 고려하여, 잠재적인 열 안정성 RNA 중합효소로서 *phiFa_44*를 추구하지 않기로 결정했다. 그러나 수행된 하나의 최종 IVT 실험(실시예 1 참조)은 낮은 서열 동일성에도 불구하고 *phiFa_44*가 열-안정적인 RNA 중합효소로서 기능할 수 있음을 시사했다.

[0047] 4.2.2 본 발명에 따른 서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 단백질은 적합한 발현 시스템으로부터 발현 및 정제될 수 있다.

- [0048] 이중 단백질 생성을 위해 일반적으로 사용되는 발현 시스템은 대장균, 바실러스 종, 배칼로바이러스(*Bacillus* spp.), 효모, 진균, 사상성 진균 또는 효모, 예를 들어 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 및 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 진핵 세포, 예를 들어 중국 햄스터 난소 세포(CHO: Chinese hamster ovary cell), 인간 배아 신장(HEK: human embryonic kidney) 세포 및 PER.C6® 세포(Thermo Fisher Scientific, 미국 매사추세츠주 소재) 및 식물을 포함한다. 이중 시스템에서의 재조합 단백질의 발현 효율은 다양한 요인, 전사 수준과 번역 수준 둘 모두에 따라 결정된다.
- [0049] 본 발명에 따른 서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 단백질은 바람직하게는 원핵 세포, 바람직하게는 대장균에서 생성된다. 상기 단백질은 바람직하게는 관심 원핵 세포, 바람직하게는 대장균에서 단백질의 발현 클로닝에 의해 생성된다. 상기 발현 작제물(construct), 바람직하게는 DNA는 바람직하게는 당업자에게 공지된 바와 같이, 중합 효소, 제한 효소 및 리가제의 사용을 포함한 재조합 기술에 의해 생성된다. 대안적으로, 상기 발현 작제물은, 당업자에게 공지된 바와 같이, 인공 유전자 합성에 의해, 예를 들어 부분적으로 또는 완전히 중첩하는 올리고뉴클레오타이드의 합성에 의해, 또는 유기 화학 및 재조합 기술의 조합에 의해 제공된다.
- [0050] 대안으로서 또는 추가로, 본 발명에 따른 서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 단백질은 호열성 유기체에서 본 발명에 따른 서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 태그된 단백질의 발현, 및 태그에 기초한 상기 단백질의 분리에 의해 호열성 유기체로부터 분리될 수 있다.
- [0051] 상기 발현 작제물은 바람직하게는 관심 원핵 세포, 바람직하게는 대장균에서 본 발명에 따른 서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 단백질의 발현을 향상시키기 위해 코돈 최적화된다. 추가 최적화는 잠재(cryptic) 스플라이스 부위의 제거, 잠재 폴리A 꼬리의 제거 및/또는 mRNA의 불리한 접합을 초래하는 서열의 제거를 포함한다. 또한, 발현 작제물은 바람직하게는 본 발명에 따른 서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 단백질을 세포 밖으로 원핵생물의 주변세포질로 분비하기 위한 단백질 이출(export) 신호를 인코딩하여, 본 발명에 따른 서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 단백질의 효율적인 정제를 가능하게 한다.
- [0052] 본 발명에 따른 서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 단백질의 정제 방법은 당업계에 알려져 있으며, 일반적으로 오염 물질을 제거하기 위한 친화성 크로마토그래피 및 이온 교환 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피에 기초한다. 오염물질 외에도, 분해 생성물 및 응집체와 같은 생성물 자체의 바람직하지 않은 과생물을 제거해야 할 수도 있다. 적절한 정제 공정 단계는 문헌[Berthold and Walter, 1994 (Berthold and Walter, 1994, *Biologicals* 22: 135- 150)]에 제공되어 있다.
- [0053] 대안으로서 또는 추가로, 본 발명에 따른 서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 재조합 단백질은 상기 단백질이 태그에 특이적인 컬럼에 부착되도록 하여 불순물로부터 분리되도록, 유전 공학에 의해 하나 이상의 특정 태그로 태그될 수 있다. 이어서, 정제된 단백질은 분리 시약으로 친화성 컬럼으로부터 교환된다. 이 방법은 재조합 단백질을 정제하기 위해 점점 더 많이 적용되고 있다. 히스티딘 태그와 같은 기존의 단백질 태그는 다른 불순물로부터 단백질을 분리하기 위해 태그를 특이적으로 포획하는 친화성 컬럼(예를 들어 히스티딘 태그용 Ni-IDA 컬럼)과 함께 사용될 수 있다. 그 다음, 단백질은 특정 태그에 따라 분리 시약을 사용하여(예를 들어 히스티딘 태그의 경우 이미다졸) 컬럼으로부터 교환된다. 이 방법은 전통적인 정제 방법에 비해 더 특이적이다.
- [0054] 적합한 추가 태그는, 문헌[Chatterjee, 2006 (Chatterjee, 2006, *Cur Opin Biotech* 17, 353-358)]에 제시된 바와 같은 c-myc 도메인, 헤마글루티닌 태그, 말토스-결합 단백질, 글루타티온-S-트랜스퍼라제, FLAG 태그 펩티드, 비오틴 수용체 펩티드, 스트렙타비딘-결합 펩티드 및 칼모둘린-결합 펩티드를 포함한다. 이들 태그를 사용하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 본 발명에 따른 서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 단백질을 정제하는데 사용될 수 있다.
- [0055] 대장균에서 단백질을 발현시키는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 본 발명에 따른 서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성을 갖는 단백질의 발현 및 정제에 사용될 수 있다.
- [0056] 4.3 핵산 주형을 전사하는 방법
- [0057] 본 발명은 촉매 활성의 약화시키는 손실 없이 승온에서 시험관내 전사 반응이 수행될 수 있게 하는 열안정성 DNA 의존성 RNA 중합효소를 제공한다. 상기 상승된 온도는 특정 활성을 증가시킬 수 있고 생성된 RNA 분자로부터 2차 구조를 완화하는 데 도움이 될 수 있다. 또한, 열안정성 RNA 중합효소의 이용 가능성은 LAMP 증폭과 같은 고온 증폭 및 RNA 가닥 합성, 특히 유형 III CRISPR-Cas 시스템과 관련된 검출 시스템과 관련된 핵산 검출 전략을 위한 원 포트 반응을 가능하게 한다.

- [0058] 본 발명에 따른 상기 열안정성 RNA 중합효소는 서열번호 1과 적어도 50%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 60%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 70%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 80%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 90%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 91%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 92%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 93%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 94%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 95%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 96%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 97%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 98%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 99%의 서열 동일성, 바람직하게는 적어도 99.5%의 서열 동일성을 갖는다. 서열번호 1과 적어도 99.5%의 서열 동일성은 상기 열안정성 RNA 중합효소와 서열번호 1 사이에 하나의 아미노산 잔기가 다를 수 있음을 의미한다.
- [0059] 적합한 주형 핵산 분자는 데옥시핵산 뉴클레오타이드이거나 이를 포함하고, 단일 가닥(ss) DNA 분자, 이중 가닥(ds) DNA 분자, 또는 하이브리드 ss-ds 분자를 포함한다. 본 발명에 따른 열안정성 RNA 중합효소는 일반적으로 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA 분자를 RNA 분자로 전사할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 일반적으로 낮은 전사 활성은 특정 프로모터 영역을 필요로 하지 않는 것으로 보인다. 도 1에 도시된 바와 같이, phiFA_44와 같은 열안정성 RNA 중합효소에 의한 ds DNA 주형의 전사의 시작은 무작위로 발생하여 RNA 생성물의 래더(ladder)를 초래하는 것으로 보인다.
- [0060] phiFA_44와 같은 본 발명에 따른 열안정성 RNA 중합효소는 특히 단일 가닥 DNA 분자를 RNA 분자로 특이적으로 전사하며, 이에 의해 주형 가닥은 컨센서스 서열 GGGGCGG, 바람직하게는 AGGGGCGG, 더욱 바람직하게는 TAGGGGCGG, 더욱 바람직하게는 TAGGGGCGGM, 더욱 바람직하게는 TAGGGGCGGTA를 포함하며, 이는 phiFa_44 프로모터 서열로서 기능할 수 있으며, 상기에서 M은 C 또는 A를 나타낸다. 컨센서스 서열 GGGGCGG를 포함하는 서열 CAGGGGCGGCAA는 도 4에 도시된 IVT 반응에 사용된 ssDNA 주형 A에 존재한다. 상기 서열 CAGGGGCGGCAA는 프로모터 서열로서 기능하여 도 4에 도시된 바와 같이 약 70개의 뉴클레오타이드의 RNA 전사물을 생성할 수 있다. 관련 서열은 별도의 전사 시작 부위로부터 전사를 유도하여 도 1에서 약 300 nt의 더 정의된 RNA 생성물을 생성할 수 있다.
- [0061] 본 발명에 따른 열안정성 RNA 중합효소를 포함하는 시험관내 전사 반응은 pH를 거의 일정한 값으로 유지하기 위해 적합한 완충제에서 수행된다. 상기 완충제는 인산염, 붕산염, N-사이클로헥실-2-아미노에탄설폰산(CHES: N-cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid), 트리스(하이드록시메틸)아미노메탄(Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane), 2-(N-모르폴리노)에탄설폰산(MES: 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid), 글리신(glycine) 및/또는 [트리스(하이드록시메틸)메틸아미노]프로판설폰산(TAPS: [tris(hydroxymethyl)methylamino]propanesulfonic acid)을 포함할 수 있다. RNA 중합효소에 대한 바람직한 반응 pH는 6 내지 10, 바람직하게는 7 내지 9, 예컨대 7.2, 7.5, 7.8, 8.0, 8.1, 8.5, 8.6 또는 8.8이다.
- [0062] 전사 반응을 위한 바람직한 완충제는 트리스, 바람직하게는 10 내지 100 mM 트리스이거나 이를 포함한다. 상기 트리스는 바람직하게는 아세테이트 및/또는 염화수소와 같은 산의 첨가에 의해 원하는 pH로 설정된다.
- [0063] 전사 반응에 적합한 완충제는 Mg^{2+} 또는 Mn^{2+} 와 같은 하나 이상의 2가 금속 이온을 추가로 포함할 수 있다. 2가 금속 이온은 염화마그네슘, 황산마그네슘 및/또는 아세트산마그네슘과 같은 염으로서 제공될 수 있다. 상기 농도는 바람직하게는 0.5 내지 20 mM, 예를 들어 1 내지 10 mM, 바람직하게는 약 2 mM, 약 3 mM, 약 5 mM 또는 약 7 mM이다.
- [0064] 상기 완충제는 2 내지 10% DMSO 또는 2 내지 10% 글리세롤과 같은 주형 핵산 분자의 전사를 향상시키는 것으로 당업계에 공지된 바와 같이 염화칼륨과 같은 칼륨 이온, 황산암모늄과 같은 다른 염 및/또는 베타인(betaine), 에틸렌 글리콜, 1,2-프로판디올 및/또는 스퍼미딘(spermidine)을 포함할 수 있다(문헌[Cheng et al., 1994. Proc Natl Acad Sci 91: 5695-5699]).
- [0065] 바람직하게는, 효소 활성을 안정화시키기 위해 젤라틴, 알부민, 베타-메르캅토에탄올, 디티오프레이톨(DTT: dithiothreitol) 및/또는 트리스(2-카르복시에틸)포스핀(TCEP: tris(2-carboxyethyl)phosphine) 중 하나 이상과 같은 환원제, 및/또는 TWEEN 20 또는 Triton-X 100과 같은 순한 세제를 포함하는 추가 성분이 반응 완충제에 포함된다.
- [0066] 상기 전사 반응은 핵염기 및 트리포스페이트기에 결합된 리보스 당기를 포함하는 리보뉴클레오타이드(NTP)의 존재 하에 수행된다. 상기 핵염기에는 아데닌, 구아닌, 시토신, 우라실 및 이들의 변형이 포함된다. 리보뉴클레오타이드라는 용어는 형광 분자와 같은 리보뉴클레오타이드 유사체, 예를 들어 1,3-디아자-2-옥소페노티아진-리보스-5'-트리포스페이트(tCTP: 1,3-diaza-2-oxophenothiazine-ribose-5'-triphosphate) 및/또는 이노신(inosine), 크산

토신(xanthosine), N4-하이드록시시토신(N4-hydroxycytosine), N4-메톡시시토신(N4-methoxycytosine)과 같은 기타 유사체 및 6H, 8H-3,4-디하이드로피리미도[4,5-c][1,2]옥사진-7-온(6H, 8H-3,4-dihydropyrimido[4,5-c][1,2]oxazin-7-one)에 대한 언급을 포함한다(문헌[Suzuki et al., 2005. Nucleic Acids Symp Series 49: 97-98]).

[0067] 상기 전사 반응은 30℃ 내지 80℃, 바람직하게는 45℃ 내지 75℃, 예를 들어 55℃, 60℃ 및 65℃를 포함하여 50℃ 내지 70℃의 온도에서 수행된다.

[0068] 상기 전사 반응은 바람직하게는 10 내지 50 mM, 바람직하게는 20 mM, 트리스-HCl pH 8.8, 100 내지 1000 나노 M(nM), 바람직하게는 약 500 nM의 본 발명에 따른 열안정성 RNA 중합효소, 1 내지 5 mM, 바람직하게는 약 2.5 mM, NTP 믹스(NEB #N0466S), 1 내지 10 mM, 바람직하게는 약 2 mM, MgCl₂, 10 내지 250 mM, 바람직하게는 약 50 mM, NaCl 및 DNA 주형, 바람직하게는 1 내지 100 ng, 예컨대 약 25 ng의 총 부피 20 microL에서의 dsDNA 주형의 존재 하에 45℃ 내지 75℃, 예컨대 55℃, 60℃ 및 65℃를 포함하여 50℃ 내지 70℃의 온도에서 수행된다.

[0069] 상기 IVT 반응은 DNA 주형, 바람직하게는 상기 이중 가닥 DNA 주형을 전사하는 데 적합한 시간 동안 수행된다. 상기 시간은 바람직하게는 0.01 내지 1시간, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 0.5시간, 더욱 바람직하게는 0.2 내지 0.4시간이다.

[0070] 4.4 진단 검정

[0071] 4.4.1 본 발명의 방법은 특히 인간 헬스케어 및 수의학 진단에 사용될 수 있는 특정 핵산 서열을 검출할 수 있게 한다. 이러한 목적을 위해, DNA 및/또는 RNA를 포함한 핵산 물질은 바람직하게는 샘플로부터 분리된다. 이를 위해, 상기 핵산 물질은 예를 들어 물리적 방법과 화학적 방법의 조합을 사용하여 정제될 수 있다. 바람직하게는, 핵산 단리를 위한 상업적으로 입수 가능한 시스템, 예를 들어 NucliSENS® easyMAG® 또는 NucliSENS® miniMAG® 핵산 추출 시스템(bioMérieux, 프랑스 마흐쉴-레두발르 소재), 또는 MagNA Pure 96 시스템(Roche Diagnostics, 네덜란드 알메르 소재)이 사용된다.

[0072] 상기 샘플은 생물학적 체액, 예컨대 타액, 상부 호흡기 검체, 예컨대 비인두 면봉, 하부 호흡기 검체, 예컨대 가래, 비인두 분비물, 구인두 분비물, 땀, 소변, 대변 또는 혈액을 포함할 수 있다. 용어 "혈액"은, 예를 들어 원심분리에 의해, 적혈구 및 백혈구를 제거함으로써 제조된 혈장, 및 혈전을 형성하고, 예를 들어 원심분리기를 사용하여, 상기 혈전을 제거함으로써 제조된 혈청을 포함한다. 생물학적 유체, 특히 면봉으로부터 핵산 물질을 분리하기 위한 방법 및 조성물은 바람직하게는, 유기 용매 및 카오트로픽 염(chaotropic salt)을 사용하지 않으면서 수성 용매를 사용한다.

[0073] 이를 위해, RNA는, Trizol(Invitrogen, 캘리포니아주 칼스배드 소재), RNAqueous®(Applied Biosystems/Ambion, 텍사스주 오스틴 소재), Qiazol®(Qiagen, 네덜란드 펜로 소재), Agilent Total RNA Isolation 키트(Agilent, 캘리포니아주 산타 클라라 소재), RNA-Bee®(Tel-Test, 텍사스주 프렌즈우드 소재), RNeasy 미니 키트(Qiagen, 네덜란드 펜로 소재), 및 Maxwell™ 16 Total RNA Purification 키트(Promega; 위스콘신주 매디슨 소재)와 같은 적합한 상업적인 RNA 분리 키트를 포함하지만 이에 제한되지는 않는 당업계에 공지된 임의의 기술에 의해 샘플로부터 분리될 수 있다.

[0074] 분리된 RNA는 바람직하게는 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 RNA 의존적 DNA 중합효소의 도움으로 단일 또는 이중 가닥 상보적 DNA(cDNA)로 역전사된다. 역전사는 무작위 헥사머 또는 노나머와 같은 범용 프라이머에 의해 또는 바이러스 특이적 또는 심지어 유전자 특이적 프라이머와 같은 하나 이상의 특이적 프라이머에 의해 프라이밍될 수 있다.

[0075] 게놈 DNA를 포함한 DNA는 Quick-DNA Viral 키트(Zymo Research, 캘리포니아주 어바인 소재), NucleoSpin Dx Virus(Macherey-Nagel, 독일 뒤렌 소재), QIAamp DNA Blood Mini 키트(Qiagen, 네덜란드 펜로 소재), 및 EasyPure® Viral DNA/RNA 키트(Transgen Biotech, 중국 베이징 소재)와 같은 적합한 상업용 DNA 분리 키트를 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 알려진 임의의 기술에 의해 샘플로부터 분리될 수 있다.

[0076] 4.4.2 생성된 RNA, DNA 또는 cDNA는 본 발명에 따른 진단 CRISPR/Cas 효과기 단백질 기반 검정에 직접 사용될 수 있지만, 바람직하게는 검출 수준을 증가시키기 위해 검출 전에 증폭된다. 증폭은, 예를 들어 리가제 연쇄 반응(LCR: ligase chain reaction), 등온 리보핵산 증폭 시스템, 예를 들어 핵산 서열-기반 증폭(NASBA: nucleic acid sequence-based amplification) 및 RNA의 절단-기반 신호 증폭(문헌[Zhao et al., 2013. Nature Comm 4: 1493]), 전사 매개 증폭, 가닥 치환 증폭 및 중합 효소 연쇄 반응(PCR: polymerase chain reaction)을 포함한다.

임의의 적합한 증폭 시스템에 의해 수행될 수 있다.

- [0077] 바람직한 증폭 반응은 단일 튜브 등은 반응, 예를 들어 NASBA, 루프 매개 등은 증폭(LAMP: loop-mediated isothermal amplification), 헬리카제-의존성 증폭(HDA: helicase-dependent amplification), 롤링 서클 증폭(RCA: rolling circle amplification), 다중 치환 증폭(MDA: multiple displacement amplification), 재조합 효소 중합효소 증폭(RPA: recombinase polymerase amplification) 반응 및 절단 효소 증폭 반응(NEAR: nicking enzyme amplification reaction)이다. 바람직한 단일 튜브 등은 반응은 루프 매개 등은 증폭(LAMP) 또는 재조합 효소 중합효소 증폭(RPA) 반응이다.
- [0078] LAMP는 일반적으로 주형 가닥의 개별 표적 서열을 인식하는 6개의 프라이머를 사용한다. 이 프라이머 중 4개는 새로운 DNA 가닥을 합성하도록 설계된 "내부 프라이머"(LF, LB, FIP 및 BIP)이다. 외부 프라이머(F3 및 B3)는 주형 가닥에 어닐링하여 또한 새로운 DNA를 생성한다. 이 프라이머에는 가닥 치환을 돕고 새로 형성된 DNA 가닥을 방출하는 DNA 중합효소가 동반된다. 이러한 증폭은 60 내지 65℃의 등은 조건에서 1시간 이내에, 예를 들어 20분 이내에 발생된다.
- [0079] RPA 공정(TwistDx Ltd., Cambridge, UK)은 재조합효소, 단일 가닥 DNA 결합 단백질(SSB) 및 가닥 치환 중합효소를 사용하며, 바람직하게는 역전사효소, 더욱 바람직하게는 역전사효소 및 DNA 의존성 RNA 중합효소, 예컨대 T7 중합효소로 보충된다. 이러한 증폭은 37 내지 42℃의 등은 조건에서 1시간 이내에 발생된다.
- [0080] 4.4.3 본 발명에 따른 열안정성 RNA 중합효소는 NASBA, RNA의 절단 기반 신호 증폭(Zhao et al., 2013. Nature Comm 4: 1493), 전사 매개 증폭, 또는 RPA와 같은 증폭 반응에서 DNA 의존성 RNA 중합효소를 대체할 수 있으며, 이에 따라 상기 증폭 반응에 더 높은 온도를 허용한다.
- [0081] 4.5 CRISPR/Cas 기반 검출 시스템
- [0082] 4.5.1 본 발명에 따른 열안정성 RNA 중합효소는 CRISPR 관련 효과기 단백질(Cas) 및 표적 핵산 분자에 결합하는 적어도 하나의 CRISPR RNA(crRNA)를 포함하는 클러스터링된 규칙적인 간격의 짧은 회문식 반복(CRISPR) 핵산 검출 시스템에 추가로 사용될 수 있다.
- [0083] 상기 CRISPR/Cas 기반 검출 시스템은 바람직하게는 본 발명에 따른 CRISPR 기반 핵산 시스템 또는 "바이오센서"를 포함하는 감지 장치로서 제공된다. CRISPR 기반 핵산 시스템이 crRNA에 상보적인 핵산 분자와 상호작용할 때 생성되는 신호, 예를 들어 비색, 형광분석, 형광 또는 생물발광 신호는 변환기에 결합되어 신호의 정량화를 허용할 수 있다. 신호는 직접 시각화되거나 대안으로 또는 추가로 적합한 변환기에 의해 전류 또는 전압과 같은 측정 가능한 전기 매개변수로 변환될 수 있다.
- [0084] 4.5.2 crRNA가 표적 서열에 결합하면 Cas 효과기 단백질이 활성화된다. 상기 Cas 효과기 단백질의 활성화는 예를 들어 Cas12, Cas13 및 Cas14에 의해 매개되는 리포터 분자의 부수적인 절단 및/또는 예를 들어 Cas10의 사이클라제 도메인에 의해 촉매되는 사이클릭 올리고아데닐레이트(cOA)의 생성에 의해 검출될 수 있다.
- [0085] Crispr/Cas 클래스 1 시스템은 다중 단백질 효과기 복합체를 활용하며(문헌[Koonin et al., 2017. Curr Opin Microbiol 37: 67-78]) 유형 I 시스템, 유형 III(예: Cas10) 및 유형 IV 시스템을 포함한다. Crispr/Cas 클래스 2 시스템은 단일 단백질 효과기를 활용하며 Cas9와 같은 유형 II CRISPR 시스템, Cas12(cpf1이라고도 함) 및 Cas 14와 같은 유형 V 시스템(문헌[Harrington et al., 2019, Science 362: 839-842]), 및 Cas13과 같은 유형 VI 시스템(문헌[Makarova et al., 2017. Cell 168: 328-328])을 포함한다.
- [0086] 4.5.3 crRNA가 표적 핵산 서열에 결합하면 유형 V 또는 유형 VI CRISPR/Cas 효과기 단백질의 부수적인 트랜스-작용 뉴클레아제 활성이 활성화된다. 이러한 부수적인 트랜스 작용 뉴클레아제 활성을 통해 단일 가닥 "리포터" 분자를 사용하여 유형 V 또는 유형 VI CRISPR/Cas 효과기 단백질의 활성화 점수를 매길 수 있다.
- [0087] 활성화된 유형 V 또는 유형 VI Cas에 대한 리포터는 바람직하게는 활성화된 유형 V 또는 유형 VI Cas에 의한 절단이 검출될 수 있는 적어도 9개의 뉴클레오타이드의 단일 가닥 핵산 분자이다. 상기 단일 가닥 핵산 분자는 바람직하게는 9 내지 50개의 뉴클레오타이드, 더 바람직하게는 10 내지 25개의 뉴클레오타이드 또는 심지어 11 내지 20개의 뉴클레오타이드, 예를 들어 12개의 뉴클레오타이드, 13개의 뉴클레오타이드, 14개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 15개의 뉴클레오타이드, 16개의 뉴클레오타이드, 17개의 뉴클레오타이드, 18개의 뉴클레오타이드 또는 19개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 상기 리포터의 최적 길이는 약 12개의 뉴클레오타이드이다.
- [0088] 상기 리포터는 활성화된 Cas12 또는 Cas14 효과기 단백질의 검출을 위한 단일 가닥 DNA, 또는 활성화된 Cas13 효과기 단백질의 검출을 위한 단일 가닥 RNA를 포함한다. 상기 리포터는 이노신, 우리딘, 크산틴, 히포크산틴,

2,6-디아미노푸린 (2,6-diaminopurine) 및 6,8-디아미노푸린 기반 리보뉴클레오타이드(6,8-diaminopurine-based ribonucleotides) 및 데옥시리보뉴클레오타이드와 같은 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다.

[0089] 리포터 절단의 검출은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 검출은 질량 분석법, 예를 들어 양성 전자분무 이온화 모드에서 직렬 질량 분석법(LC-MS/MS)과 결합된 초고성능 액체 크로마토그래피(UHPLC: ultra-high performance liquid chromatography)에 의해 직접적으로 수행될 수 있다. 상기 LC-MS/MS 분석은 예를 들어, 삼중-사중극자 질량 분석기에 결합된 고급 UHPLC 크로마토그래피 시스템을 사용하여 수행될 수 있다. 검출은 액체-액체 상 분리(LLPS: liquid-liquid phase separation; 문헌[Spiegelstra et al., 2018. BioRxiv, CSHL(doi.org/10.1101/471482)])에 의해, 또는 당업자에게 알려진 비색, 형광, 형광 또는 생물발광 검출 방법에 의해 추가로 수행될 수 있다.

[0090] 적절한 리포터는 하나의 말단에는 형광 라벨이 태그되고, 다른 말단에는 켄처로 태그된 단일 가닥 RNA(Cas13) 또는 DNA(Cas12 및 Cas14) 분자이다. 켄처에 대한 리포터의 근접은 이의 형광의 검출을 방지한다. 유형 V 또는 유형 VI CRISPR/Cas 효과기 단백질의 부수적인 트랜스-작용 뉴클레아제 활성화 후 기질의 절단은 리포터-켄처 근접성을 파괴하고 따라서 레이저로 여기한 후 검출될 수 있는 형광의 미켄칭된(unquenched) 방출을 허용한다.

[0091] 바람직한 형광 표지는 Atto425(ATTO-TEC GmbH, 독일 지겐 소재), Atto 647N(ATTO-TEC GmbH, 독일 지겐 소재), YakimaYellow(Epoch Biosciences Inc, 미국 워싱턴주 보셀 소재), Cal610(BioSearch Technologies, 미국 캘리포니아주 페달루마 소재), Cal635(BioSearch Technologies, 미국 캘리포니아주 페달루마 소재), FAM(Thermo Fisher Scientific Inc., 미국 매사추세츠주 월섬 소재), TET(Thermo Fisher Scientific Inc., 미국 매사추세츠주 월섬 소재), HEX(Thermo Fisher Scientific Inc., 미국 매사추세츠주 월섬 소재), Cy5, Cy5.5, Cy3, Cy3.5, Cy7과 같은 시아닌 염료(Thermo Fisher Scientific Inc., 미국 매사추세츠주 월섬 소재), 알렉사 염료(Thermo Fisher Scientific Inc., 미국 매사추세츠주 월섬 소재), Tamra(Thermo Fisher Scientific Inc., 미국 매사추세츠주 월섬 소재), ROX(Thermo Fisher Scientific Inc., 미국 매사추세츠주 월섬 소재), JOE(Thermo Fisher Scientific Inc., 미국 매사추세츠주 월섬 소재), 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC, Thermo Fisher Scientific Inc., 미국 매사추세츠주 월섬 소재), Yakima Yellow®(YY; Epoch Biosciences, 워싱턴주 보셀 소재) 및 테트라메틸로다민(TRITC, Thermo Fisher Scientific Inc., 미국 매사추세츠주 월섬 소재)로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, 상기 기질은 검출 가능한 표지, 바람직하게는 형광 표지를 사용하여 5' 말단에 표지된다.

[0092] 켄처, 예를 들어 테트라메틸로다민 TAMRA, 디하이드로사이클로피롤로인돌 트리펩티드 마이너 그루브 바인더(minor groove binder)는 당업계에 공지되어 있다. 바람직한 켄처는 Black Hole Quencher®-1(BHQ1) 및 BHQ2(Biosearch Technologies, 미국 캘리포니아주 페달루마 소재)를 포함한다. BHQ1 다크 켄처는 480 nm 내지 580 nm에서 강한 흡수를 가지며, 이는 FAM, TET, CAL Fluor® Gold 540, JOE, HEX, CAL Fluor Orange 560, 및 Quasar® 570 염료와 같은, 이 범위에서 형광을 발하는 형광단의 켄칭을 제공한다. BHQ2 다크 켄처는 599 nm 내지 670 nm에서 강한 흡수를 가지며, 이는 Quasar® 570, TAMRA, CAL Fluor® Red 590, CAL Fluor Red 610, ROX, CAL Fluor Red 635, Pulsar® 650, Quasar 670 및 Quasar 705 염료와 같은, 이 범위에서 형광을 발하는 형광단의 켄칭을 제공한다. BHQ1 및 BHQ2는 FRET 및 정적 켄칭 메커니즘 둘 모두에 의해 형광을 켄칭할 수 있다.

[0093] 추가로 바람직한 리포터는 측면 유동 검정 분석(LFA: lateral flow assay)에서 검출을 허용한다. LFA의 원리는 반응 생성물, 본 경우에는 반응하지 않은 리포터가 제어 라인이라고 하는 제1 지점에 고정되는 한편, 절단된 리포터는 시험 라인이라고 하는 제2 지점에 고정된다는 것이다. LFA는 전형적으로 니트로셀룰로오스 멤브레인, 샘플 패드, 접합(conjugate) 패드, 심지 또는 흡수 패드 및 지지 패드로 구성된다(문헌[Jauset-Rubio et al., 2016. Sci Rep 6: 37732]). 니트로셀룰로오스 막은 반응 및 검출 모두에 사용될 수 있는 지지체를 촉진하기 때문에 가장 일반적으로 사용되며, 포획 생체분자, 예를 들어 항체가 니트로셀룰로오스 상에 침착되어 정전기적 상호작용, 수소결합 및/또는 소수성 상호작용의 조합을 통해 시험 및 제어 라인을 형성한다(문헌[Jauset-Rubio et al., 2016. Sci Rep 6: 37732]).

[0094] 4.5.4 대안으로서, crRNA가 표적 핵산 서열에 결합하면 Cas 10과 같은 유형 III 효과기 시스템의 사이클라제 도메인이 활성화된다. Cas10 기반 리보핵산 검출 시스템은 바람직하게는, 피코코커스 푸리오르스, 솔폴로부스 솔파타리쿠스 또는 테르무스 테르모필루스와 같은 호열성 유기체로부터 유래된다. 이 시스템의 경우, 표적 DNA 분자는 예를 들어 본 발명에 따른 열안정성 RNA 중합효소에 의해 표적 RNA 분자로 전사되어야 하며, 이에 따라

상기 전사 반응에 더 높은 온도가 허용된다. 추가 이점은 증폭, 전사 및 검출의 세 단계가 모두 상승된 온도, 예를 들어 약 65℃에서 사용될 수 있어 모든 단계가 원 포트 반응에 적합하다는 것이다.

- [0095] 호열성 유기체로부터의 CRISPR/Cas 기반 리보핵산 검출 시스템의 추가 이점은, 검출이 상승된 온도, 예를 들어 40℃ 내지 80℃, 바람직하게는 50℃ 내지 70℃, 예를 들어 55℃ 내지 65℃ 바람직하게는 약 65℃에서 수행될 수 있다는 것이다. 이 온도에서의 배양은 더 낮은 온도에서의 배양에 비해 cOA 합성 반응을 가속화할 수 있다. 또한, 상기 상승된 온도는 샘플 내에 존재하는 DNase 또는 RNase 또는 프로테아제와 같은 뉴클레아제를 불활성화할 수 있다.
- [0096] 또한, 호열성 유기체로부터의 CRISPR/Cas 기반 리보핵산 검출 시스템의 이점은, 중온성 유기체로부터의 CRISPR/Cas 기반 리보핵산 검출 시스템에 비해, 더 오랜 기간 동안 저장될 수 있는 것과 같은, 증가된 안정성을 상기 시스템에 제공할 수 있다는 것이다.
- [0097] 최근 결과는 cOA의 존재가 Csm6 또는 Csx1 패밀리 구성원에 의한 RNase 활성의 큰 증가를 유도함을 나타낸다. 이들 단백질은 종종 유형 III 유전자좌에서 인코딩되지만, 리보핵산 단백질 복합체와 직접적으로 연관되지는 않는다. 대신에, 침입자 RNA 전사물의 인식은 Cas7에 의한 표적화된 RNA 분해, 클래스 I, 유형 IIIA Cas10에 의한 비특이적 DNA 분해뿐만 아니라 Csm6 또는 Csx1의 활성화를 유도하는 cOA 생성을 유도할 수 있으며, 이에 따라 근처의 다른 단일 가닥 RNA 분자의 부수적인 절단을 유발할 수 있다.
- [0098] 4.5.5 cOA의 수준을 직접적으로 측정하는 방법은 바람직하게는, 피로인산염 또는 PPi의 수준을 측정하는 방법을 포함한다. 피로인산염의 형성은 Cas10과 같은 CRISPR/Cas 관련 단백질에 의한 ATP로부터의 cOA 형성과 연결된다. 3 내지 6개의 AMP 단위로 구성된 cOA의 형성은 3 내지 6개의 PPi 분자를 동시에 형성한다.
- [0099] 4.5.6 대안으로서, 본 발명에 따른 검출 시스템은 무기 피로포스파타제(inorganic pyrophosphatase)를 포함할 수 있으며, 이는 PPi의 분해 및 각각의 PPi 분자에 대한 2개의 무기 인산염 분자의 형성을 유도한다. 따라서, 무기 인산염의 수준을 측정함으로써, 검출 가능한 분자의 수는 1개의 cOA 분자에서 6 내지 12개의 Pi 분자로 증폭된다.
- [0100] 바람직한 무기 피로포스파타제는 상기 유형 III CRISPR/Cas 기반 RNA 검출 시스템과 동일하거나 유사한 온도에서 활성인 효소이다. 또한, 상기 무기 피로포스파타제는, 동일하거나 유사한 pH 및 동일하거나 유사한 염 농도를 비롯한, 상기 유형 III CRISPR/Cas 기반 RNA 검출 시스템과 동일하거나 유사한 조건 하에서 활성인 것이 바람직하다. 예를 들어, 상기 유형 III CRISPR/Cas 기반 RNA 검출 시스템이 50℃에서 최적의 활성을 갖는다면, 상기 무기 피로포스파타제는 이 온도에서 활성인 것이 바람직하다. 바람직하게는, 50℃에서의 상기 무기 피로포스파타제의 활성은, 본질적으로 모든 PPi 분자가 무기 인산염 분자로 분해되는 정도이다. 상기 분해는 바람직하게는 즉각적이다. 유사하게, 선택된 pH 및 염 농도에서의 상기 무기 피로포스파타제의 활성은, 본질적으로 모든 PPi 분자가 무기 인산염 분자로 분해되는 정도이다. 상기 분해는 바람직하게는 즉각적이다.
- [0101] 바람직한 무기 피로포스파타제는 피로코커스 푸리오서스(*Pyrococcus furiosus*), 숄폴로부스 솔파타리쿠스(*Sulfolobus solfataricus*) 및 테르무스 테르모필루스(*Thermus thermophilus*)와 같은 호열성 유기체로부터 유래하여, 동시적인 등온 검출을 허용한다. 이러한 방식으로, Pi의 수준을 측정함으로써 cOA의 수준을 직접적으로 측정할 수 있다.
- [0102] 4.5.7 PPi 및 Pi는 비색-, 형광분석-, 형광- 또는 생물발광-기반 분석을 포함한 당업계에 알려진 방법을 사용하여 검출될 수 있다.
- [0103] PPi의 수준을 측정하는 적절한 방법은 형광분석 및/또는 비색 피로인산염(PPi) 분석 키트(fluorometric and/or colorimetric pyrophosphate(PPi) Assay Kit) (Biovision Inc., 캘리포니아주 밀피타스 소재); 형광 EnzChek® 피로인산염 검출 키트(fluorescent EnzChek® Pyrophosphate Detection Kit) (ThermoFisher Scientific; 매사추세츠주 윌섬 소재); 형광분석 피로인산염 분석 키트(fluorometric Pyrophosphate Assay Kit) (SigmaAldrich, 미주리주 세인트루이스 소재); 및 발광 PPiLight™ 분석(luminescent PPiLight™ assay) (Lonza Group A.G., 스위스 바젤 소재)을 포함한다.
- [0104] 무기 인산염 또는 Pi의 수준을 측정하는 적절한 방법은 비색 PiColorLock™ 분석(colorimetric PiColorLock™ assay) (Expedeon, 영국 캠브리지 소재); 비색 말라카이트 그린 인산염 분석 키트(colorimetric Malachite Green Phosphate Assay Kit) (SigmaAldrich, 미주리주 세인트루이스 소재); 형광 인산염 센서(fluorescent Phosphate Sensor) (ThermoFisher Scientific; 매사추세츠주 윌섬 소재); ADP를 ATP로 전환한 후의 발광 관독(미국 특허출원 US20140273036A호); 형광 화학센서(문헌[Meng et al., 2015. RSC Advances 5: 53189-53197]);

및 유로폼 이온과 조합된 광발광 그래핀 양자점(문헌[Bai et al., 2013. Chemistry 19: 3822-3826])을 포함한다.

- [0105] 사이클릭 올리고아데닐레이트(cOA)의 수준을 직접적으로 측정하기 위한 방법 및 수단은 바람직하게는 적어도 하나의 기질, 및 필요한 경우, PPi 또는 Pi에 대한 표시된 검출 방법 중 적어도 하나를 허용하는 효소를 포함한다.
- [0106] 바람직한 방법은 말라카이트 그린 인산염 분석 키트와 같은 비색 방법이며, 이는 cOA 수준의 직접적인 측정으로서 PPi 또는 Pi 수준의 빠른 측정을 허용한다.
- [0107] 4.5.8 cOA의 수준을 간접적으로 측정하는 방법은 바람직하게는, CRISPR 보조 뉴클레아제 1(Can1: CRISPR ancillary nuclease 1) 또는 Can2와 같은 cOA-의존성 비특이적 효과기 뉴클레아제의 활성을 측정하는 방법, 및 바람직하게는, Csx1과 같은 cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제의 활성을 측정하는 방법을 포함한다. 이를 위해, 본 발명에 따른 검출 시스템은 바람직하게는, Csx1과 같은 cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제를 포함한다.
- [0108] 상기 cOA-의존성 비특이적 효과기 뉴클레아제, 바람직하게는 엔도리보뉴클레아제는 바람직하게는, 유형 III CRISPR/Cas 기반 RNA 검출 시스템과 동일하거나 유사한 온도에서 활성인 효소이다. 또한, 상기 cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제는, 동일하거나 유사한 pH 및 동일하거나 유사한 염 농도를 비롯한, 유형 III CRISPR/Cas 기반 RNA 검출 시스템과 동일하거나 유사한 조건 하에서 활성인 것이 바람직하다. 예를 들어, 유형 III CRISPR/Cas 기반 RNA 검출 시스템이 65°C에서 최적의 활성을 갖는다면, 상기 cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제는 이 온도에서 활성인 것이 바람직하다. 바람직하게는, 65°C에서의 cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제의 활성은, 상기 cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제의 cOA-유도된 활성이 상기 cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제의 기질의 반응 생성물의 검출 가능한 양의 생성을 초래하는 정도이다. 유사하게, 선택된 pH 및 염 농도에서의 cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제의 활성은, 상기 cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제의 cOA-유도된 활성이 상기 cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제의 기질의 반응 생성물의 검출 가능한 양의 생성을 초래하는 정도이다.
- [0109] cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제에 대한 기질은 바람직하게는, 절단이 검출될 수 있는 RNA 분자이다. 검출은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 검출은 질량 분석법, 예를 들어 양성 전자분무 이온화 모드에서 직렬 질량 분석법(LC-MS/MS)과 결합된 초고성능 액체 크로마토그래피(UHPLC: ultra-high performance liquid chromatography)에 의해 직접적으로 수행될 수 있다. 상기 LC-MS/MS 분석은 예를 들어, 삼중-사중극자 질량 분석기에 결합된 고급 UHPLC 크로마토그래피 시스템을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0110] 검출은 액체-액체 상 분리(LLPS: liquid-liquid phase separation; 문헌[Spiegelstra et al., 2018. BioRxiv, CSHL(doi.org/10.1101/471482)])에 의해 추가로 수행될 수 있다.
- [0111] cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제에 대한 바람직한 기질은, 일 말단에 형광 리포터 분자가 태그되고 다른 말단에 켄처가 태그된 RNA 분자이다. 켄처에 대한 리포터의 근접은 이의 형광의 검출을 방지한다. 상기 cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제의 활성화에 의한 기질의 절단은, 상기 리포터-켄처 근접을 깨뜨리며, 따라서 레이저를 사용한 여기 후에 검출될 수 있는, 형광의 켄칭되지 않은 방출을 허용한다. 따라서, 상기 cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제의 활성의 증가는, 상기 기질의 절단 및 상기 형광 리포터를 켄칭하는 켄처의 제거로 인해 형광의 비례적 증가를 유발한다.
- [0112] 상기 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제의 활성화와 별도로, 또는 이에 추가하여, 표적 인식 수준의 측정은, 상기 뉴클레아제에 대한 적절한 기질을 사용하여, 유형 IIIA CRISPR/Cas 효과기 복합체 내에 존재하는 비특이적 효과기 DNase 활성의 활성화를 측정함으로써 수행될 수도 있다. 상기 적절한 기질은 바람직하게는, 일 말단에 형광 표지가 태그되고 다른 말단에 켄처가 태그된 DNA 분자이다. 적합한 형광 표지 및 켄처의 예가 위에 제공되어 있다. 켄처에 대한 리포터의 근접은 이의 형광의 검출을 방지한다. 상기 cOA-의존성 비특이적 효과기 DNase의 활성화에 의한 기질의 절단은, 상기 리포터-켄처 근접을 깨뜨리며, 따라서 레이저를 사용한 여기 후에 검출될 수 있는 형광의 억제되지 않은 방출을 허용한다. 따라서, 상기 cOA-의존성 비특이적 효과기 DNase의 활성의 증가는, 상기 기질의 절단 및 상기 형광 리포터를 켄칭하는 켄처의 제거로 인해 형광의 비례적 증가를 유발한다. 상기 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제의 활성화와 상기 비특이적 효과기 DNase의 활성화 둘 모두의 사용은, 2개의 독립적인 리보핵산 단백질 복합체가 사용되고, 그 중 하나가 상기 비특이적 효과기 DNase를 특이적으로 활성화하는 반면 다른 하나는 cOA 수준의 간접적인 또는 직접적인 측정을 특이적으로 허용하는

경우, 단일 분석에서의 2개의 독립적인 표적 RNA 분자의 존재 또는 부재의 측정을 허용한다. 당업자는, 이를 위해, 상기 cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제 및 상기 비특이적 효과기 DNase의 활성화에 의해 기질 상에 존재하는 형광 표지들이, cOA의 수준을 측정하기 위한 척도로서의 각각의 활성의 수준의 측정을 허용할 만큼 충분히 상이해야 한다는 것을 이해할 것이다.

[0113] 적합한 상업적인 기질은 RNaseAlert® 실험실 시험 키트 v2(RNaseAlert® Lab Test Kit v2) (ThermoFisher Scientific; 매사추세츠주 월섬 소재)에 의해 제공된다.

[0114] 바람직한 cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제는 피로코커스 푸리오르스, 술폴로부스 술파타리쿠스 및 테르무스 테르모필루스와 같은 호열성 유기체로부터 유래하여, 상기 cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제의 활성의 동시적인 등은 검출을 허용한다.

[0115] 사이클릭 올리고아데닐레이트(cOA)의 수준을 간접적으로 측정하기 위한 방법 및 수단은 바람직하게는, cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제 및 상기 cOA-의존성 비특이적 효과기 엔도리보뉴클레아제의 기질을 포함한다.

[0116] 명확성 및 간결한 설명을 위해, 특징은 동일하거나 별도의 실시형태의 일부로서 본원에서 설명되지만, 본 발명의 범위는 설명된 특징의 전부 또는 일부의 조합을 갖는 실시형태를 포함할 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0117] 5. 실시예

[0118] 실시예 1

[0119] 물질 및 방법

[0120] 단백질 정제

[0121] 관심 단백질 뉴클레오티드 서열은 대장균(표 1 참조)에 대해 코돈 최적화되고 N-말단에 Strep-태그를 함유하는 바이시스트론 발현 플라스미드(문헌[Nieuwkoop et al., 2019. Microbiol Biotechnol 12: 173-179])에 위치되었다. 발현 플라스미드를 대장균 균주 B121(DE3)로 형질전환시키고 약 0.6의 OD600에 도달할 때까지 원하는 배양 부피(2 내지 12 L)로 37°C에서 성장시켰다. 그 다음, 배양물을 얼음 위에 1시간 동안 위치시킨 후, IPTG를 최종 농도 0.5 mM이 되도록 첨가하였다. 그 다음, 배양물을 20°C에서 약 16시간 동안(하룻밤) 인큐베이션하였다. 세포를 수확하고 초음파 처리에 의해 완충제 A(100 mM 트리스-HCl, 150 mM NaCl, pH 8)에 용해시킨 다음, 30,000 g에서 45분 동안 원심분리(spin down)시켰다. 정화된 용해물을 여과하고(0.45 microM) StrepTrap FPLC 컬럼을 사용하여 정제했다. 관심 단백질은 완충제 B(100 mM 트리스-HCl, 150 mM NaCl 및 2.5 mM 테스티오비오틴, pH 8.0)를 사용하여 용출되었다. 이어서, 결합 및 세척 완충제로서 완충제 C(100 mM 트리스-HCl, 125 mM NaCl, pH 8)를 사용하여 해파린 정제 단계를 수행했다. 후속적인 구배 용출을 완충제 D(100 mM 트리스-HCl, 1M NaCl, pH 8)를 사용하여 수행했다. 마지막으로, 크기 배제 크로마토그래피는 완충제 A에서 Superdex 200 증가 10/300 GL 컬럼(Cytiva, 매사추세츠주 말버러 소재Marlborough, MA)을 사용하여 수행되었다.

[0122] IVT 검정

[0123] IVT 검정은 총 부피 20 microL에서 1X 등은 증폭 완충제(NEB #B0537S), 250 nM phiFa_44, 1.875mM rNTP/dNTP, 80 ng dsDNA 주형의 기본 조성을 사용하여 수행되었다. 이들 반응을 65°C에서 1시간 동안 인큐베이션한 후 95°C에서 10분 동안 인큐베이션했다. 그 후, 2.3 microL의 DNaseI 완충제 및 1 microL의 DNaseI 효소(각각 NEB #B0303, #M0303)를 첨가하고 반응물을 37°C에서 30분 동안 인큐베이션했다. 반응 혼합물을 10% UREA-PAGE 겔로 분해하고 SybrGold(Thermo #S11494)로 염색했다.

[0124] 온도 및 NaCl 농도 최적 분석

[0125] IVT 검정은 20 mM 트리스-HCl pH 8.8, 500 nM phiFa_44, 2.5 mM rNTP 믹스(NEB #N0466S), 2 mM MgCl, 50 mM NaCl 및 25 ng의 dsDNA 주형의 기본 조성을 총 부피 20 microL로 사용하여 수행되었다. 최적의 NaCl 농도를 결정하기 위해, 반응 혼합물은 동일하였고 NaCl 농도만 변경되었다. 반응물을 65°C에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 반응물을 Zymo RNA clean & concentrator 키트(Zymo #R1017)로 세정했다. 후속 DNase 처리는 총 반응 부피 20 microL(NEB #M0303S)에서 37°C에서 1시간 동안 수행되었다. 반응 혼합물을 10% UREA-PAGE 겔로 분해하고 SybrGold(Thermo #S11494)로 염색했다.

[0126] ScopeDx 검정

- [0127] ScopeDx 검정 혼합물은 1X Warmstart LAMP 마스터믹스(NEB #E1700), 프라이머(FIP/BIP 1.6 microM, F3/B30.2 microM, LoopF/LoopB 0.4 microM), E-gene crRNA를 갖는 62.5 nM의 재구성된 TtCmr46 복합체(Steens et al., 2021. Nature Comm 12: 1-12), 1 microM TtHB144(Steens et al., 2021. Nature Comm 12: 1-12), 250 nM rNTP 믹스(NEB #N0466), 500nM RNaseAlert V2(Thermo #4479769) 및 175 nM phiFa_44로 이루어진다. 다양한 양의 Twist SARS-CoV-2 합성 게놈 MN908947.3을 반응 혼합물에 첨가하고 65℃에서 인큐베이션하는 한편, FAM 채널에서 시점 측정을 수행했다.
- [0128] 결과
- [0129] 시험관내 전사 검정
- [0130] dsDNA가 적합한 주형인지 결정하기 위해, phiFa 파지 게놈의 스트레치가 합성 유전자로서 주문되었다. phiFa-45 유전자간 영역의 말단과 phiFa_44 유전자의 시작을 포함하는 영역이 선택되었다(표 1 참조). 시험관내 전사 검정은 도 1에 표시된 바와 같이 수행되었으며, 중합효소가 rNTP 또는 dNTP를 기질로서 사용하는지 여부와 DNA 또는 RNA가 생성되는지 여부를 결정하도록 설계되었다.
- [0131] 이러한 결과로부터, 본 발명자들은 활용된 주형이 rNTP 기질과 함께 사용되어 RNA 생성물을 생성하는 dsDNA라고 결론 내렸다(도 1의 레인 10 내지 13 참조).
- [0132] 온도 및 NaCl 농도 최적 분석
- [0133] 다양한 NaCl 농도 및 온도를 사용하여 수행된 IVT 검정은 최적 NaCl 농도가 25 내지 200 mM이고 최적 온도 범위가 45 내지 75℃임을 보여준다.
- [0134] 원-포트 ScopeDx
- [0135] ScopeDx 1.0 도구에서, 문헌[Steens et al., 2021. Nature Comm 12: 1-12]에 기술된 바와 같이, 본 발명자들은 LAMP 사전 증폭(65℃)을 CRISPR 판독(65℃)과 연결할 수 있었다. 그러나, 사용된 상업적 Hi-T7 RNA 중합효소와 65℃에서의 연장된 배양의 비사용성으로 인해, 프로토콜에 단계를 추가해야 했다. 먼저, LAMP 사전 증폭을 65℃에서 약 30분 동안 수행한 다음, Hi-T7+CRISPR 혼합물을 반응에 첨가하고 65℃에서 추가로 10 내지 20분 동안 인큐베이션했다. 이러한 방식으로 제한된 활성 기간을 가진 Hi-T7 RNA 중합효소는 사전 증폭에 의해 생성된 dsDNA를 RNA로 전사할 수 있었고, 이는 이어서 CRISPR 시스템에 의해 검출될 수 있다.
- [0136] phiFa_44는 65℃에서 DNA를 RNA로 전사할 수 있기 때문에, 원 포트 1단계 검정인 ScopeDx 2.0에서 이를 시험하기로 결정했다. 검정은 합성 SARS-CoV-2 RNA 게놈에 대해 65℃에서 단일 단계로 수행되었다(도 2). 이 새로운 검정으로, 25분 이내에 200개의 카피의 검출 한계에 도달하였으며, 이는 시간 대 신호(time-to-signal)에서의 큰 개선을 보여준다. 또한, 이제 1단계 프로토콜이라는 사실은 단계 사이에 튜브를 열어야 할 경우 발생할 수 있는 오염 위험을 크게 줄이고 높은 처리량과 자동화 능력을 향상시킨다.
- [0137] 인 실리코 구조 분석
- [0138] phiFa_44 단백질에 대한 더 많은 통찰력을 얻기 위해 인 실리코 구조 분석이 수행되었다. 초기 결과는 QDE1 중합효소 유사 효소와 유사성을 보여준다. QDE1의 이량체화 거동은 phiFa_44의 작동 방식과 유사할 수 있다. 현재로서는 아미노산 정렬(도 4 참조)에 기초하여 마그네슘 결합 도메인이 확인될 수 있다. 예측된 3D 구조는 이러한 유사성을 확인하고 Mg 결합을 담당하는 phiFa_44에서의 잔기로서 D366, D368 및 D370을 가리킨다.
- [0139] 실시예 2
- [0140] 물질 및 방법
- [0141] IVT 검정
- [0142] 시험관내 전사(IVT) 검정은 총 부피 20 microL에서 1X 등은 증폭 완충제(NEB #B0537S), 250 nanoM phiFa-44, 1.875 mM rNTP/dNTP, 80 ng 이중 가닥(ds) DNA 주형 또는 100 nM(최종 농도) 단일 가닥(ss) DNA 올리고의 기본 조성을 사용하여 수행되었다. 이들 반응을 65℃에서 1시간 동안 인큐베이션한 후 95℃에서 10분 동안 인큐베이션했다. 각각 총 2.3 및 1 microL의 DNaseI 완충제 및 DNaseI 효소(NEB #B0303, #M0303)를 첨가하고 반응물을 37℃에서 30분 동안 인큐베이션했다. 반응 혼합물을 10% UREA-PAGE 겔로 분해하고 SybrGold(Thermo #S11494)로 염색했다.
- [0143] ssDNA 주형 A는 5'-GCGCTCCAAAAGCAGGGCGGCAAGTCCAGTCT

- [0144] CCAGACTTGCCGCCGAGTGCTGCTGCTACAGCCCTAATTATACCACAAACGCC 3'이었다.
- [0145] ssDNA 주형 B는 5'-GGCGTTTGTGGTATAATTAGGGCTGTAGCAAGC
- [0146] AGGTACACTCGCGGCAAGTCTGGAGACTGGACTTGCCGCCCTGCTTTTGGAGCGC 3'.
- [0147] dsDNA 주형은 어닐링된 ssDNA 주형 A와 ssDNA 주형 B로 구성되었다.
- [0148] 결과
- [0149] phiFa IVT ssDNA 주형
- [0150] IVT 반응은 90 nt 길이의 ssDNA 주형을 사용하여 수행되었으며, 주형 B는 주형 A에 상보적이다(도 4 참조). phiFa 게놈의 이 영역은 잠재적인 관심 모티프를 포함했기 때문에 선택되었다. 결과로부터 ssDNA 주형 A는 약 75 내지 80 nt의 명확한 ssRNA 전사물을 생성한 반면, ssDNA 주형 B는 명확한 전사물을 제공하지 않았음을 분명히 알 수 있다. 이 결과는 ssDNA 주형 A가 phiFa44 중합효소가 선호하는 관심 모티프를 포함함을 나타낸다.
- [0151] 파지 phiFa가 유전자를 어떻게 발현하는지에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 전형적으로 파지는 숙주 RNA 중합효소를 사용하여 이를 발현하지만, 파지 phiFa는 자체 RNA 중합효소를 인코딩하므로 (적어도) 일부의 유전자가 이 특정 중합효소(phiFa_44 유전자에 의해 인코딩됨)에 의해 발현된다고 가정하는 것이 합리적이다.
- [0152] 실시예 3
- [0153] 물질 및 방법
- [0154] 시험관내 RNA 전사 검정
- [0155] phiFa-44는 50 mM NaCl, 100 mM 트리스-HCl pH 8.0에서 정제 (His)6-태그되었고, 단일 가닥 DNA 주형(50 nt; 서열번호 12)은 Cy3 형광 염료로 표지된 5'로 주문되었다. ssDNA 주형은 "ZR Small-RNA PAGE Recovery 키트"(ZymoResearch, R1070)를 사용하여 변성 PAGE로부터 정제되었다. 시험관내 RNA 전사 검정은 phiFa-44 반응 완충제(35 mM NaCl, 20 mM 트리스-HCl pH 8.8, 2 mM MgCl₂ 및 25 mM rNTP)에서 수행되었으며, Milli-Q가 최종 부피 20 μ l로 보충되었다. 필요한 경우, ssDNA 주형 및 phiFa-44를 반응 혼합물에 각각 62 μ M 및 1 μ M의 최종 농도로 첨가했다.
- [0156] 모든 반응물을 65°C에서 2시간 동안 인큐베이션한 후 'RNA clean & Concentrator 키트'(ZymoResearch, R1017)를 사용하여 RNA/DNA를 정리했다. 선택된 정제 샘플에 RNase H(NEB, 5U/ μ l)를 첨가한 후, 모든 반응물을 37°C에서 30분 동안 인큐베이션했다. 반응 생성물을 분석하기 위해, 2X RNA 로딩 염료(200 mM 트리스-HCl pH 8.0, 30% 글리세롤, 900 mM NaCl)를 모든 인큐베이션 샘플에 첨가한 후, 네이티브 4 $\rightarrow$ 20%(w/v) 구배 폴리아크릴아미드 겔에 로딩하였다. 겔은 형광 겔 스캐닝(GE Amersham Typhoon)을 사용하여 시각화되었다. Cy3 필터(560 내지 580 nm)를 사용하여 Cy3 표지 반응 생성물을 시각화한 반면, SYBR Gold로 염색하고 Cy2 필터(515 내지 535 nm)를 적용하는 것은 겔에 존재하는 모든 핵산을 보여주었다.
- [0157] 결과
- [0158] 도 5에 도시된 바와 같이 phiFa-44 및 ssDNA를 주형으로서 사용한 시험관내 전사는 ssDNA 주형 밴드의 이동에 의해 표시되는 상보적 RNA의 형성을 초래한다. MgCl₂을 첨가하지 않고 인큐베이션을 수행하지 않은 경우(음성 대조군) 이동은 관찰되지 않았다. 유사하게, RNA:DNA 이중체에서 RNA를 절단하는 효소인 RNase H의 첨가는 ssDNA 주형 밴드의 이동을 폐지시켰다.

[0159] 이러한 결과는 phiFa-44가 단일 가닥 주형 DNA를 RNA로 전사할 수 있음을 보여준다.

서열번호	명칭	서열
1	QKE1133 9.1 [테르무스 과지 phiFa]	MNKTENVKKLIEEKTAELAVRPVYTGRIDEEGQWTFPSLHERYQDK VLVVPAPPEEGEPVQTI GEYEFVGGNSNRIVYIHRSI IKQWLEVAGG DSHWGAADVLRPGKLASHNAVFSWEGYQLEESDEGLLATMDERDWK VLEAYDLDPVRLVQVTVFDLEQGVSAKGLRKLPGERPVVFPN SWKKFGNLRQTQFMSILTDDVHYNPRASVNLQELTYVQEAQAQWVF DALDEEIERI INLKTSFWLT TGYLTRLGFSFAWNSTLTALKESLCG ELKKLLRRIKLSGKYGLRAKSTSSHLLRDGELLLPAYAKKHVKVGD FVTVSRNPALPSQGWAKYRVTFIDGNMVVFPQGDYAWSAILGGDH DGDDAVVFYRAPVEGYELPDDTLDLQAIKPVARKLDANTVEARIQR WQNEVSVNIGQFDLAARRLLAANKLHREEAKLLSVAIQTAISLKKR VARLEDQSWWPRVAELLEESKKLAGTTWVDMIRDGREPVGAPDWVL TIYQKVHEAIKKVQKLEPRLWLTEAKVREFAKGATVPASCEALIQY REKLLKAKAIAVQNEGDGTVARLNKELKEFIHVEAPKHLGLIDEED WKQFSRWAIGNTHISEWVFWCHPAILEELYDRFGKQTIKAIALGGT PNLAESEVIELEDQELIDRVFEVEGVKYALLDETGYLKAGRLKVTK VRKSVVEFEYA
2	대장균 조화 phifa_44	ATGAACAAAACCGAGTTAGTTAAGAACTCATAGAGGAAAAACTG CAGAACTCGCTGTACGTCTCTTTATACCGGGAGGATCGATGAGGA GGGGCAGTGGACTCCTACTCGCTGCACGAACGTTATCAGGATAAG GTTCTGTAGTAGCTGCACCTGAAGAAGGGGAGCCGGTTCAGACCA TCGGTGAGTATGAGTTTGTGGGGGGAACCGAACAGGATCGTTTA TATCCATCGTTCGATCATCAACAATGGCTGGAGGTTGCAGGGGGT GACAGCCACTGGGGGCGAGCAGTAGTACTGCGTCCGGGTAACTCG CTAGCCATAACGCAGTTTTTTCGTGGGAGGTTATCAGTTAGAGGA ATCGGATGAGGGTCTGCTGGCAACTATGGACGAACGTGATTGAAA GTACTGCTGGAGGCTTATGATCTGGATCCTGAAGTACGTCTCGTTC AGGTTACTGTTTTTCGATCTGGAGCAGGGTGTAGCGCAAAAGGTAC TCTGCGTAAAGTTCTCCCTGGGAGCGTCTGTAGTTTTTCCTAAC TCGTGGAAAAAATTTGGTAACCTCCGTACTCAATTTATGAGCATCC TGACCACTGACGTTCACTATAACCCCGTGCTAGCGTTAACCTACA AGAGCTCACCTATTATGTTTCAGGAGGCTCCCGCTCAGTGGGTTTTT GACGCTCTGGATGAAGAGATCGAACGTATCATAACTGAAACCA GCCCTTGGCTGACTACTGTTATCTGACCCGTCTCGGTTTCAGCCC TGCTTGGAACCTCGACCTCACCGCTCTCAAGGAAAGCCTGTGCGGT GAACTGAAGAACTACTGCGTCGTATAAACTGTGCGGTAAATATG GTCTGCGTGCAAAATCGACTTCGAGCCACCTCCTGCGTGATGGTGA ATTACTGTTACCTGCATACGCAAAAAACACGTTAAGGTTGGTGAT TTCGTTACTGTTTCGCGTAACCTGCACTACCTTCGAGGGGTGGG CAAAATATCGTGTAACCTGGGTTTATAGATGGTAACATGGTAGTTTT TCCTCAGGGGGATTATGCATGGAGCGCTATCCTGGGTGGTGATCAT GATGGTGACGACGAGTTGTATTTTATCGTGCTCCGGTTGAAGGTT ATGAACCTCCCGGACGACACTCTGGATCTGCAGGCAATAAAACCGT AGCACGTAACTCGACGCAACACCGTAGAGGCAAGGATACAACGT TGGCAAAACGAGGTAAGCGTTAACATCGGTCAAGTTCGATCTGGCTG CTAGGCGTCTCCTAGCAGCAACAAGCTGCATCGTGAGGAGGCAAA ACTACTGTGCGTAGCAATACAGACTGCAATCAGCCTCAAAAAACGT GTAGCTCGTCTAGAAGATCAGAGCTGGTGGCCGCTGTAGCTGAGC TGCTCGAAGAGAGCAAAAACTCGCTGGTACCCTTGGGTTGATAT

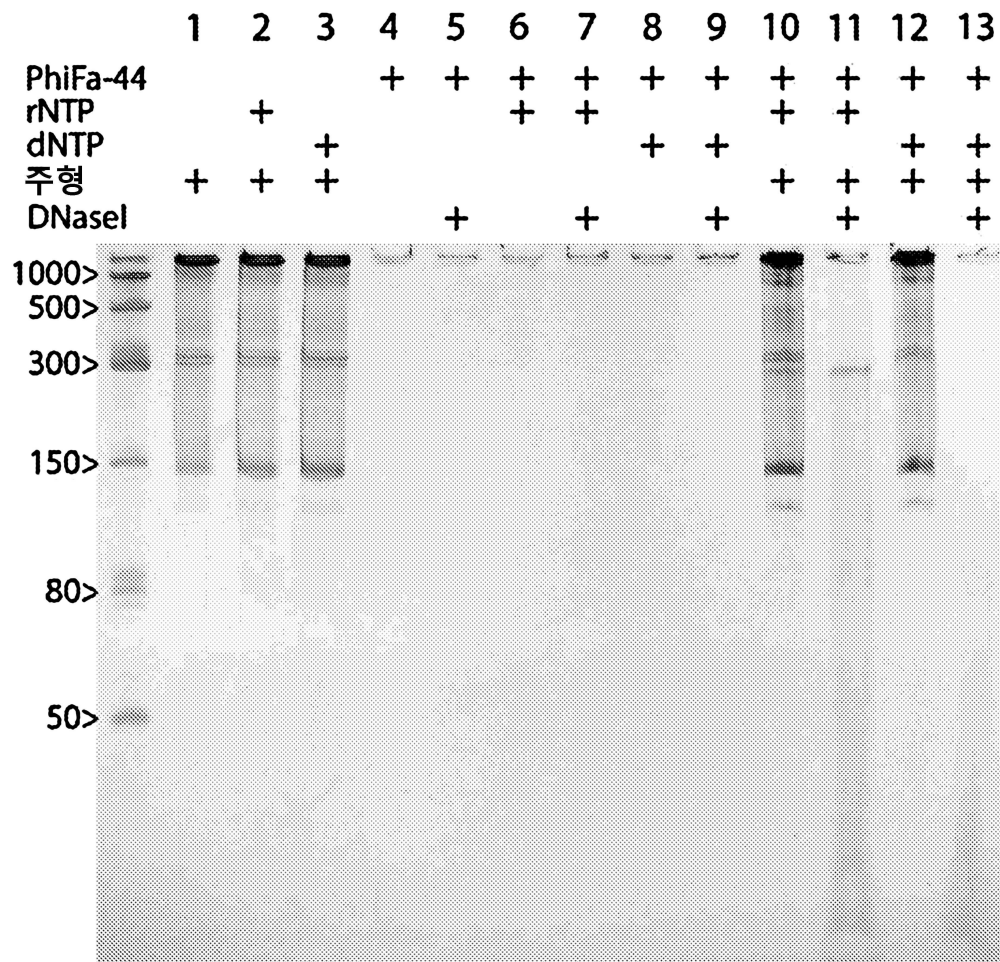
[0160]

		GATACGTGATGGTCGTGAGCCGGTAGGGGCACCCGACTGGGTCTC ACCATCTATCAGAAAGTTCATGAAGCAATCAAGAAAGTTCAGAAGC TGGAACCCCGTCTGTGGCTCACTGAAGCAAAAGTACGTGAATTCGC AAAGGGGGCAACTGTACCTGCAAGCTGCGAGGCTCTAATCCAGTAT CGTGAAAAACTCCTGAAAGCTAAAGCAATCGCAGTTCAGAACGAGG ATGGTGATACTGTTGCACGTTTAAACAAGAACTGAAGGAGTTTAT CCACGTAGAGGCACCGAAACATCTGCTGGGGATAGATGAAGAAGAT TGGAAACAGTTTAGCAGGTGGGCAATCGGGAACACCCATATCAGCG AATGGGTTTTTTGGTGCCACCCGCTATCCTAGAAGAACTGTATGA TCGTTTTCGGGAACAAACCATCAAAGCTATCGCACTGGGTGGGACT CCGAACCTAGCAGAAAGCGAGGTAATCGAGCTGGAAGATCAGGAAC TAATAGATCGTGTATTTGAAGTTGAAGGTGTAAATATGCTCTGTT AGATGAAACCGGTTATCTCAAGGCAGGCGCTGAAAGTTACTAAG GTTTCGTAAATCGGTTGTAGAATTGAATATGCTTGA
3	phiFa 파지 주형	AATTCTAATACGACTCACTATAGTatccgggtgggccagccagcgta ccgtcctcgaggctgtggattgcgcggttcccgcccgagccgcg catctagtctcctccgcccaccaccctctgcaaggaagaggtggcg aagagacgaagagaggtgaaagagagaagaggcgaaggccgggtgt cccgcccggtctgccttacggtgccacgcaccccgctcgcgca aggctccgcgaggagcgccgccccttcgggcttacggccttgcgct tcgggggaccccggtggtggcagggtccgcccagcgccggcgcg agaggacacccgggtcaaggaggtcaaatgaacaagaccgaact tgtcaaaaagttgattgaagagaagacggcgagttggctgttagg ccgggtgtacacgggtcgaatcgacgaagaaggtcagtggaactccga cttctctg
4	주형	ctgtggacgtgacttcatcgacgtactggaagatgtcaaaaattg aggcgtttgtgtataattagggctgtagcaagcaggtacactcgg cggcaagtctggagactggacttgccgcccctgcttttggagcgcc gggtggttttggcgcggtttatgtttcgccatgggggagccac ccggctttatcctccccgactggaggctagatgcagcttcgcaag attgcgcccgaacccaacttcttcgcctccttgaggagaacttca gcgcggaactggaagacatggacgtctgcccactcaggaggttgg atgaacatccgagatgcccccaagctgttctcgagctttcgggc tttcgaccccagctacgtgggtgagggtgagagcatcggaagcgg aagctctgagaggtgaagcatggcgaggttactggatttagcaag gtcttctcggtcggcaagacgtggagaaccaccgcacatcaagtct tcagctacgtaccgtctagaccgcgttaagggtggggagggggcag tctctccccacccactgttacctggaggtgaacgtgcgagtgcg ttgcgtaaggcggtgtacgtacggcgaactccatgcggcgggga gtgttcaagggtgatttctggccttggttcttccgctgtgaggtg agagatggcgatttttgagctgaacgctgggtccgaccttcgcttc cccaccaggaagga
5	LAMP E- 유전자 F3	AGCTGATGAGTACGAAGTT
6	LAMP E- 유전자 B3	TTCAGATTTTAAACACGAGAGT
7	LAMP E- 유전자 FIP	ACCACGAAAGCAAGAAAAAGAAGTATTCGTTTCGGAAGAGACAG

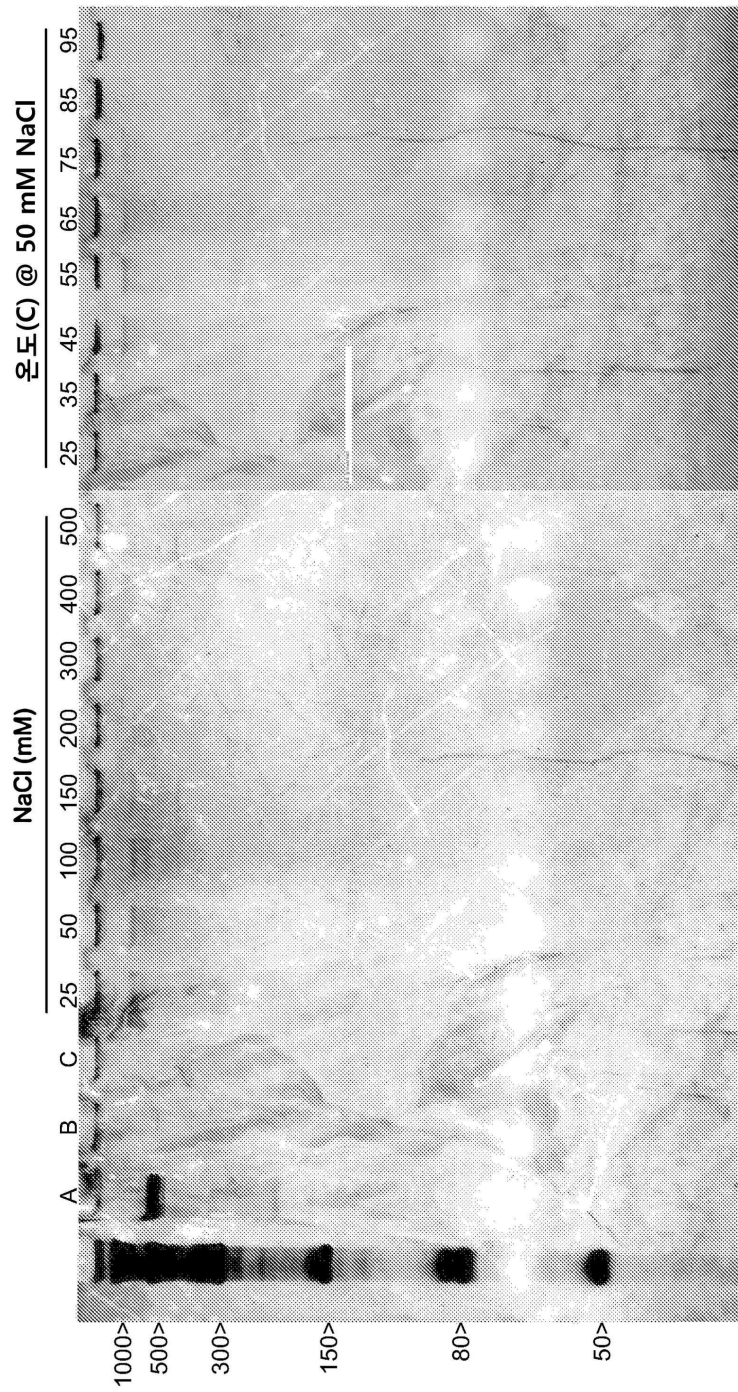
8	LAMP E- 유전자 BIP	TTGCTAGTTACTAGCCATCCTTAGGTTTTACAAGACTCACGT
9	LAMP E- 유전자 루프	CTGCGCTTCGATTGTGTGCGT
10	LAMP E- 유전자 F3	AGCTGATGAGTACGAAGTT
11	E-유전자 crRNA	AUUGCACACAAUAUUGCAGCAGUACGCACACAAUCGAAGCGCAGA
12	주형	5' Cy3- CGATGGCCGTAGATAAGGCGCCCGGGACGACCACGTCAAGGCGCA GTTC

도면

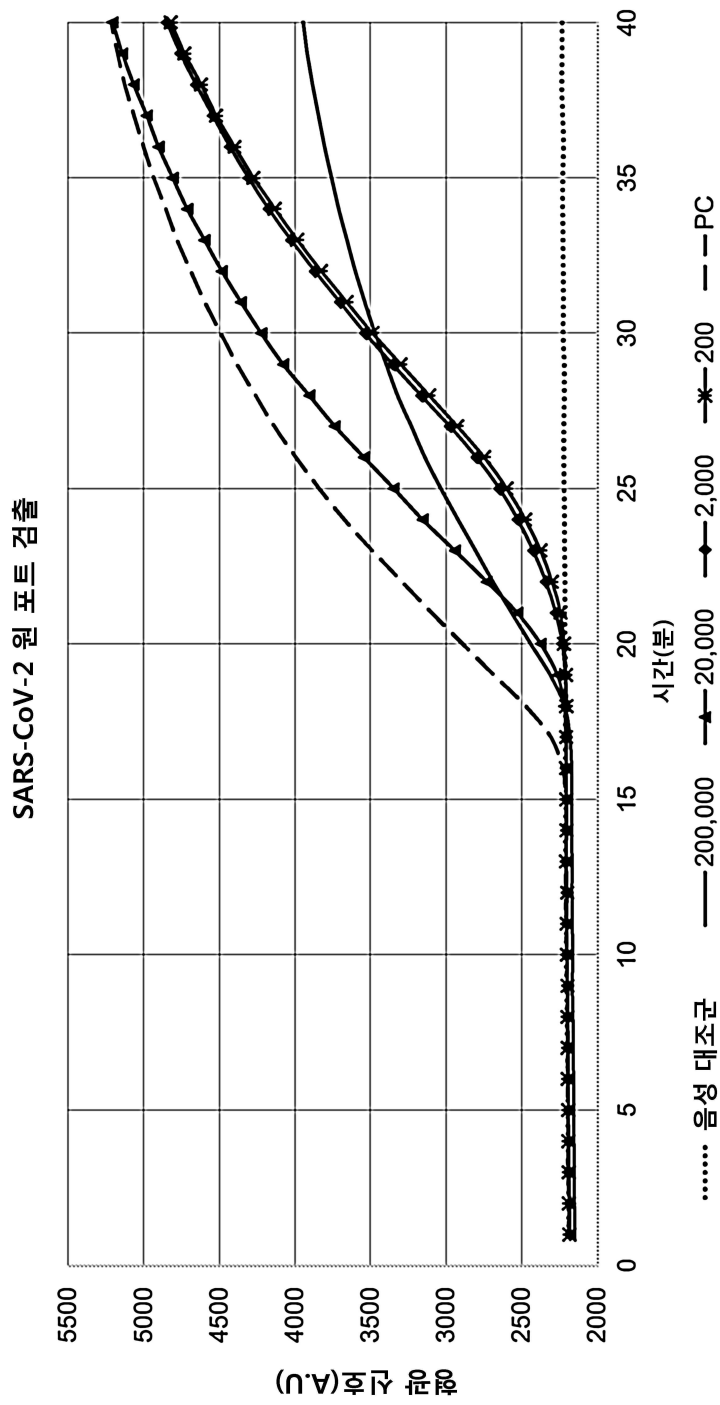
도면1



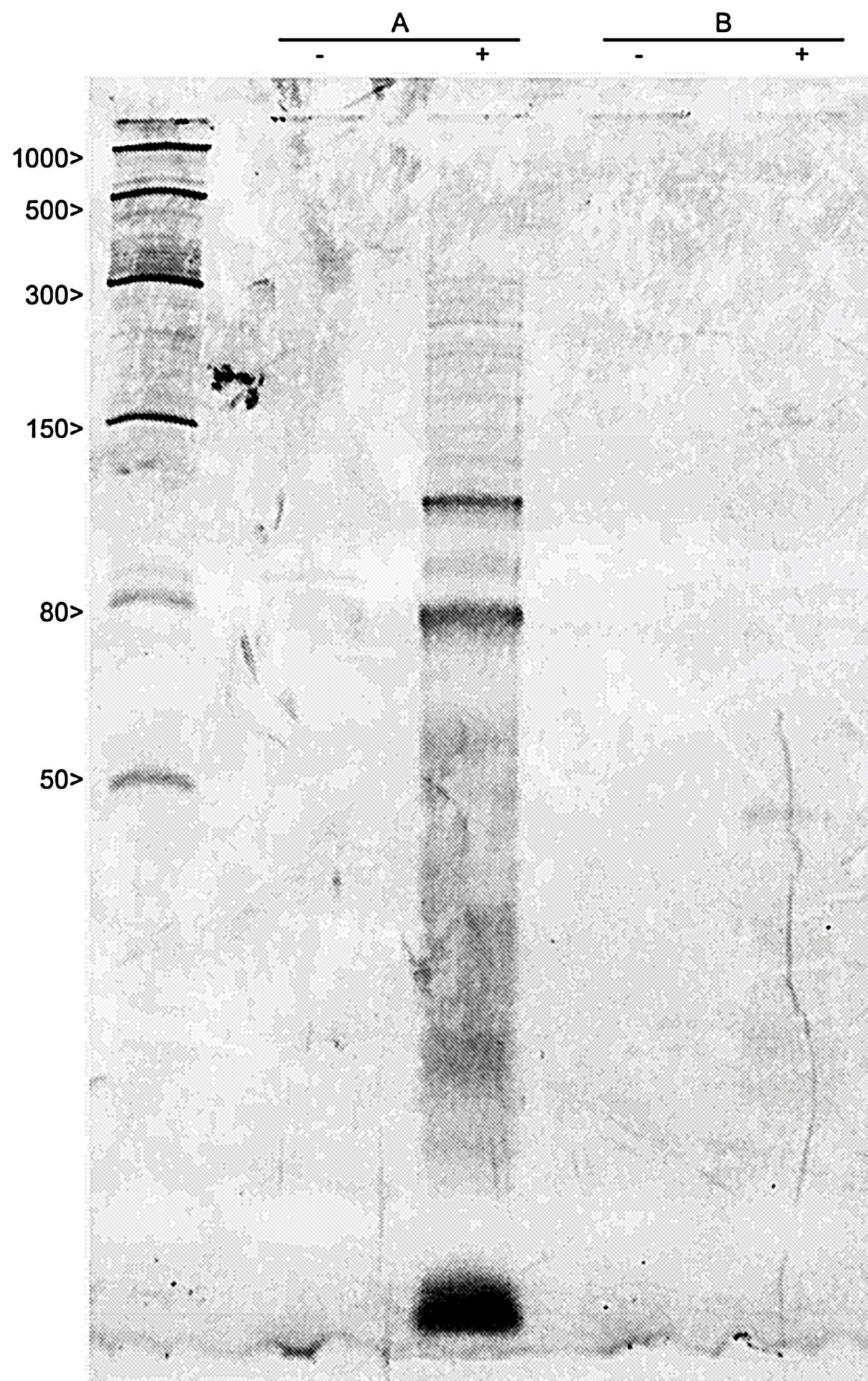
도면2



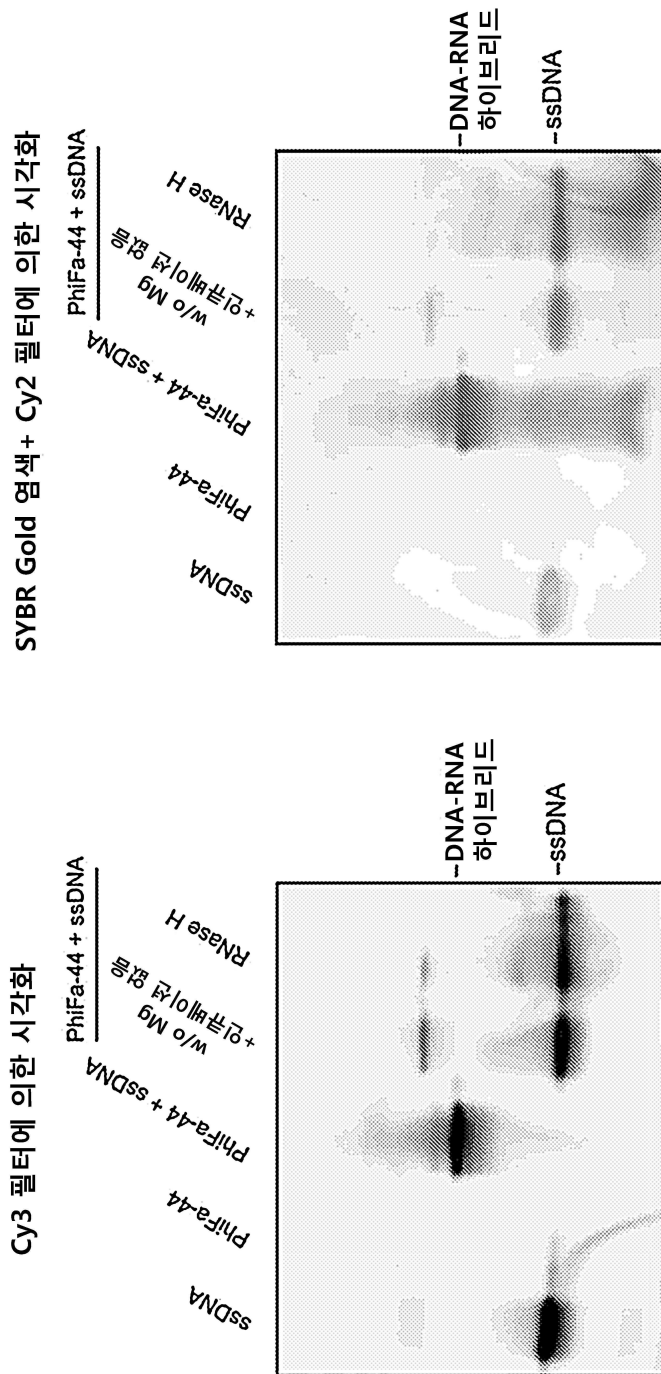
도면3



도면4



도면5



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.