

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2018/194437 A2

2018년 10월 25일 (25.10.2018) WIPO | PCT

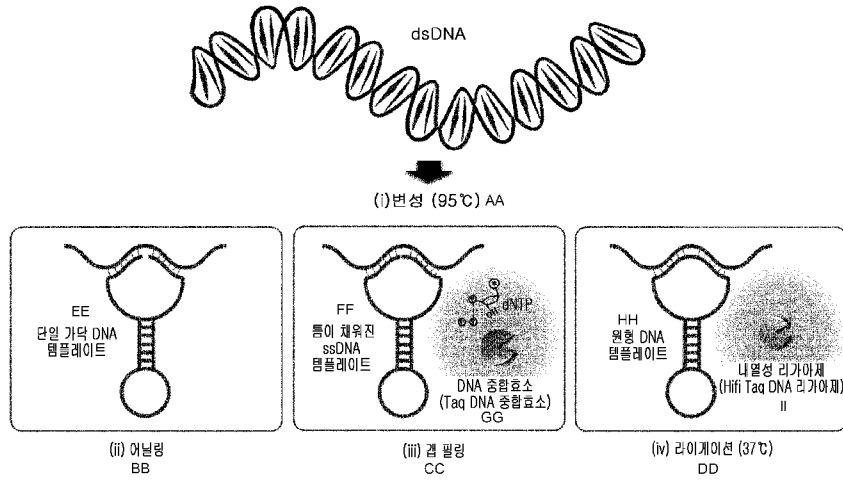
- (51) 국제특허분류: C12Q 1/6886 (2018.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/004700
- (22) 국제출원일: 2018년 4월 23일 (23.04.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2017-0051546 2017년 4월 21일 (21.04.2017) KR
- (71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWha UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 이혁진 (LEE, Hyukjin); 04194 서울시 마포구 백범로 205, 101동 506호, Seoul (KR). 김지수 (KIM, Ji-

Su); 63122 제주도 제주시 문송길 37-2, 101호, Jeju-do (KR). 최보람 (CHOI, Bo-Ram); 18132 경기도 오산시 운암로 122, 105동 1401호, Gyeonggi-do (KR). 김주영 (KIM, Joo-Yeong); 58617 전라남도 목포시 영산로535번길 6, 101동 1202호, Jeollanam-do (KR). 조주연 (CHO, Ju-Yeon); 16943 경기도 용인시 수지구 광교마을로 90, 4104동 501호, Gyeonggi-do (KR).

- (74) 대리인: 안소영 (AHN, So Young); 06224 서울시 강남구 논현로 416, 3층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

(54) Title: NUCLEIC ACID MOLECULE TEMPLATE FOR DETECTING TARGET POINT MUTATION GENE AND GENETIC ANALYSIS METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭: 표적 점 돌연변이 유전자 검출을 위한 핵산 분자 템플레이트 및 이를 이용한 유전자 검사방법



AA ... Degeneration
 BB ... Annealing
 CC ... Gap filling
 DD ... Ligation
 EE ... Single-stranded DNA template
 FF ... Gap-filled ssDNA template
 GG ... DNA polymerase (Taq DNA polymerase)
 HH ... Circular DNA template
 II ... Thermostable ligase (Hifi Taq DNA ligase)

(57) Abstract: The present invention relates to a template for detecting a target point mutation gene and a method for detecting a target point mutation gene using the same. A method for detecting a target point mutation gene using a template for detecting a point mutation according to the present invention has high sensitivity and specificity for a target point mutation gene and can increase the accuracy of detection, compared to a conventional method for detecting a target mutation gene.

(57) 요약서: 본 발명은 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트, 및 이를 이용한 표적 점 돌연변이 유전자를 검출하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 점 돌연변이 검출용 템플레이트를 이용한 표적 점 돌연변이 유전자의 검출방법은 표적 점 돌연변이 유전자에 높은 민감도 및 특이도를 가지며, 기존의 표적 돌연변이 유전자 검출방법에 비해 검출의 정확성을 높일 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2018/194437 A2

MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 표적 점 돌연변이 유전자 검출을 위한 핵산 분자 템플레이트 및 이를 이용한 유전자 검사방법

기술분야

- [1] 본 발명은 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트, 및 이를 이용한 표적 점 돌연변이 유전자의 검출방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 특정 질환에 특이적인 돌연변이를 검출하는 것은 질환의 진단 및 치료방침을 결정하는데 아주 유용하다. 이에 따라 표적 돌연변이를 유전학적 방법으로 검출하는 방법들이 개발되어 오고 있으며, 대표적인 방법으로 직접염기서열분석법 (direct sequencing), 대립유전자특이증폭법 (allele-specific PCR), 제한효소절편길이다형성 (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP), Taqman 소식자 (probe)법, ARMS (amplification refractory mutation system)-PCR, 변성 (denaturing) HPLC (dHPLC), 및 real-time PCR fall short 등이 있다.
- [3] 표적 돌연변이 검출방법에서 중요하게 요구되는 사항으로는 (1) 정상 DNA 속에서 낮은 비율로 존재하는 돌연변이 DNA를 검출할 수 있는 민감도 (sensitivity)와 (2) 정상 DNA를 돌연변이 DNA로 잘못 판정하는 위양성 (false positive) 비율을 최대한 낮출 수 있는 특이도 (specificity)를 갖추는 것이다.
- [4] 그러나, 기존에 사용되었던 상기 방법들은 민감도와 특이도에 있어서 만족할 만한 결과를 보여주지 못하였다. 직접염기서열분석법은 가장 특이도가 높아 위양성의 비율이 낮은 반면 20 ~ 30% 이상의 돌연변이 DNA가 존재할 경우에만 검출이 가능한 단점이 있다. 반면, 대립유전자특이증폭법이나 제한효소절편길이다형성, Taqman 소식자법 등은 민감도는 높으나 특이도가 낮아 위양성의 문제점을 가지고 있다.
- [5] 최근에는 점 돌연변이 유전자를 프로브와 결합하여 미스매치 (mismatch)에 따른 점 돌연변이 유전자를 검출하기 위한 방법이 시도되었다. 이러한 방법은 프로브와 유전자 간 결합 친화도 및 용해온도 차이를 이용하여 점 돌연변이의 유무를 진단한다. 그러나, 이러한 시도는 표적 유전자의 서열에 따라 민감도가 크게 달라지고, 미스매치를 무시하고 라이게이션이 일어나는 오류가 빈번하게 발생하여 특이도가 낮은 문제점을 갖고 있다.
- [6] 따라서, 민감도와 특이도가 높은 새로운 표적 점 돌연변이 유전자 검출방법이 지속적으로 요구되고 있는 실정이다.
- [7] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 신규한 표적 점 돌연변이 유전자 검출방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 표적 점 돌연변이에 상보적인 염기가 삭제된 틸을 포함하는 핵산 분자 템플레이트를 이용하는 신규한 검출방법을

개발하고, 이러한 검출방법이 표적 점 돌연변이에 높은 민감도 및 특이도를 가짐을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명의 하나의 목적은 표적 점 돌연변이가 일어난 염기에 상보적인 염기가 삭제된 틈(gap)을 포함하는 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트를 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은 상기 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트를 이용한 표적 점 돌연변이 유전자를 검출하는 방법을 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트를 포함하는 표적 점 돌연변이 검출용 키트를 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [11] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [12] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, 표적 점 돌연변이가 일어난 염기에 상보적인 염기가 삭제된 틈(gap)을 포함하는 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트를 제공한다.
- [13] 본 발명의 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트는 표적 점 돌연변이 유전자와 상보적으로 결합하는 유전자 결합부위, DNA 중합효소 결합부위 (LOOP) 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합부위를 포함하고, 상기 유전자 결합부위는 표적 점 돌연변이가 일어난 염기에 상보적인 염기가 삭제된 틈(gap)을 포함할 수 있다.
- [14] 구체적으로, 상기 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트의 선형 구조는 '제 1 표적 유전자 결합부위' - '(덤벨 형태를 형성하기 위한) 제 1 템플레이트 내 상보적인 결합 부위' - DNA 중합효소 결합부위 (LOOP) - '(덤벨 형태를 형성하기 위한) 제 2 템플레이트 내 상보적인 결합 부위' - '제 2 표적 유전자 결합부위'를 포함하는 구조일 수 있다. 즉, 상기 DNA 중합효소 결합부위의 일 말단에 결합된 제 1 템플레이트 내 상보적인 결합부위 - 제 1 표적 돌연변이 유전자 결합부위, 및 상기 DNA 중합효소 결합부위의 다른 말단에 결합된 제 2 템플레이트 내 상보적인 결합부위 - 제 2 표적 돌연변이 유전자 결합부위를 포함할 수 있다.
- [15] 본 발명에서 용어, “표적 유전자”는 최종적으로 검출하고자 하는 서열을 의미한다.
- [16] 본 발명에서 용어, “템플레이트”는 표적 유전자 서열에 실질적으로 상보적인 부위 또는 부위들을 포함하는 단일가닥 핵산 분자로서, “주형”과 호환적으로 사용된다.

- [17] 본 발명의 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트의 유전자 결합부위는 점 돌연변이가 일어난 염기에 상보적으로 결합하는 염기가 삭제되도록 디자인할 수 있다.
- [18] 본 발명에서 용어, “틈 (gap)”은 템플레이트를 구성하는 염기서열에서 표적 점 돌연변이에 상보적인 염기가 삭제된 부분을 지칭하는 것으로, 상기 틈은 1 nt (nucleotide)의 거리를 가질 수 있다.
- [19] 상기 틈의 위치는 표적 유전자 결합부위의 양 말단, 즉 제 1 표적 유전자 결합부위 및 제 2 표적 유전자 결합부위의 양 말단에 위치하며, 제 1 표적 유전자 결합부위 및 제 2 표적 유전자 결합부위의 서열 길이에 따라 결합부위 내에서 구체적인 위치가 조절될 수 있다. 예를 들어, 제 1 표적 유전자 결합부위 및 제 2 표적 유전자 결합부위의 서열 길이가 동일한 경우, 상기 틈은 유전자 결합부위의 중앙에 위치할 수 있다. 이와 달리, 제 1 표적 유전자 결합부위 및 제 2 표적 유전자 결합부위의 서열 길이가 상이한 경우, 상기 틈은 유전자 결합부위의 중앙에서 벗어난 곳에 위치할 수 있다.
- [20] 본 발명의 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트의 DNA 중합효소 결합부위(LOOP)는 중합효소가 결합하여 적합한 온도와 pH의 조건에서 DNA 증폭 산물이 생성될 수 있는 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 또한, 본 발명의 DNA 중합효소 결합부위(LOOP)는 본 발명에 따른 검출용 템플레이트와 표적 돌연변이 유전자가 혼성화됨으로써 루프를 형성할 수 있다.
- [21] 본 발명의 템플레이트는 표적 유전자 및 중합효소의 종류 등을 고려하여 길이와 서열을 다양하게 디자인할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 템플레이트의 길이는 70 내지 140 nt 일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서 상기 템플레이트의 길이가 너무 짧은 경우, 예컨대 70 nt 이하이면 템플레이트의 덤벨 구조 유지가 어렵고, 표적 유전자와의 결합이 불안정할 수 있다. 반대로, 상기 템플레이트의 길이가 너무 긴 경우, 예컨대 140 nt 이상이면 템플레이트의 2차 구조 형성 증가로 인한 템플레이트 및 표적 유전자의 상보적인 결합효율이 감소할 수 있다.
- [22] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 템플레이트는 20 내지 40 nt 길이의 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 유전자 결합부위, 18 내지 40 nt 길이의 DNA 중합효소와 결합하여 DNA 증폭산물생성에 개시점이 되는 DNA 중합효소 결합부위(LOOP), 및 40 내지 60 nt 길이의 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합부위를 포함하는 총 78 내지 140 nt 길이의 템플레이트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 유전자 결합부위는 제 1 표적 유전자 결합부위와 제 2 표적 유전자 결합부위를 각각 10 nt 씩 최소 20 nt 이상의 길이로 디자인할 수 있으며, 직접적으로 표적 유전자와 상보적인 결합을 하는 서열 이외에 스페어 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [23] 또한, 본 발명의 템플레이트는 두 개의 단일가닥 DNA 템플레이트로 나누어 디자인 할 수 있다. 즉, 두 개의 단일가닥 DNA 템플레이트로 나누어 디자인하는

경우, 제 1 표적 유전자 결합부위를 포함하는 제 1 템플레이트(strand 1) 및 제 2 표적 유전자 결합부위를 포함하는 제 2 템플레이트(strand 2)로 각각 분리하여 제작할 수 있으며, 상기 분리된 각 템플레이트의 길이는 35 내지 70 nt 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [24] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 제 1 표적 유전자 결합부위 및 제 2 표적 유전자 결합부위의 염기서열은 표적 유전자의 길이, 점 돌연변이가 일어난 염기의 위치 등을 고려하여 길이와 비율을 디자인할 수 있다. 구체적으로, 상기 유전자 결합부위는 20 내지 40 nt의 길이를 가질 수 있고, 상기 제 1 표적 유전자 결합부위(5' 말단) 및 제 2 표적 유전자 결합부위(3' 말단)의 염기서열 길이의 비율(제 1 표적 유전자 결합부위/제 2 표적 유전자 결합부위)은 0.3 내지 4.5 일 수 있으며, 이에 따라 표적 돌연변이 유전자에 대한 템플레이트의 선택성을 더욱 향상시킬 수 있다.
- [25] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 템플레이트의 구성 중 유전자 결합부위 및 DNA 중합효소 결합부위(LOOP)의 염기서열은 적절히 조절될 수 있으며, 프라이머 없이 DNA 중합효소 결합부위(LOOP)를 증폭의 개시점으로 이용하는 경우 상기 중합효소 결합부위의 최소 크기는 18 nt 이상일 수 있다. 또한, 상기 템플레이트의 유전자 결합부위 및 DNA 중합효소 결합부위의 염기서열 길이의 비율(유전자 결합부위/DNA 중합효소 결합부위)은 0.5 내지 2 일 수 있으며, 이에 따라 표적 돌연변이 유전자에 대한 템플레이트의 선택성을 더욱 향상시킬 수 있다.
- [26] 본 발명의 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트의 유전자 결합부위는 템플레이트 내 상보적인 결합부위와 연결되는 스페어 (spare) 서열을 포함할 수 있다. 상기 유전자 결합부위 내 스페어 서열은 표적 유전자에 결합하지 않는 비대칭성을 유지시키는 역할로써의 추가적인 서열로써, 제 1 표적 유전자 결합부위, 제 2 표적 유전자 결합부위 또는 이들 모두에 포함될 수 있으며, 스페어 서열을 포함함으로써 프라이머 없이 템플레이트의 증폭을 유발할 수 있다. 상기 스페어 서열의 길이는 1 내지 19 nt, 구체적으로 6 내지 19 nt 일 수 있으며, 스페어 서열의 길이를 조정함으로써 본 발명에 따른 템플레이트의 표적 점 돌연변이 유전자에 대한 검출 효율을 더욱 향상시킬 수 있다.
- [27] 본 발명의 일 구체예로서, 유전자 결합부위 내 스페어 서열이 존재하지 않는 경우, 구체적으로 제 2 표적 유전자 결합부위 (3' 말단) 내 스페어 서열이 존재하지 않는 경우 템플레이트의 증폭이 일어나지 않을 수 있다. 또한, 유전자 결합부위 내 스페어 서열을 포함하지 않음에 따라 템플레이트의 증폭이 일어나지 않는 경우, 템플레이트 내 DNA 중합효소 결합부위에 프라이머를 적용하여 증폭을 발생시킬 수 있으며, 이 경우 프라이머에 의해서만 증폭이 유발되어 템플레이트의 증폭 개시점을 조절할 수 있다.
- [28]
- [29] 본 발명은 다른 양태로서, 상기 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트를

- 이용한 표적 점 돌연변이 유전자를 검출하는 방법을 제공한다.
- [30] 본 발명의 검출방법은 구체적으로,
- [31] (a) 본 발명의 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트와 표적 돌연변이 유전자를 포함하는 시료를 혼성화시키는 단계;
- [32] (b) 표적 점 돌연변이에 상보적인 dNTP (deoxy nucleoside triphosphate)를 첨가하여 상기 템플레이트의 틈을 채우고 템플레이트의 말단을 이어주는(Ligation) 단계; 및
- [33] (c) 상기 (b) 단계의 라이게이션된 템플레이트를 이용하여 회전환 증폭(Rolling circle amplification; RCA)을 수행하는 단계를 포함할 수 있다.
- [34] 또한, 본 발명의 검출방법은 상기 (a) 내지 (c)의 과정동안 점 돌연변이 유전자 진단을 위한 열 램핑 (thermal ramping)을 수행할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 있어서, 단계 (a)는 95°C (3분)에서 4°C까지 온도를 감소시켜 검출용 템플레이트와 표적 돌연변이 유전자의 혼성화(Hybridization) 과정을 진행할 수 있다. 또한, 단계 (b)는 95°C (3분)에서 denaturing, 37°C (1시간)에서 gap filling 및 100°C (10분)에서 효소 불활성화 후 4°C까지 냉각하는 열 램핑 과정을 진행할 수 있으며, 이에 따라 템플레이트 또는 표적 유전자 간의 비특이적 결합을 없애고, 템플레이트 및 표적 유전자의 정확한 상보결합을 유도함으로써 본 검출방법의 정확도를 더욱 향상시킬 수 있다. 또한, 단계 (c)는 DNA 중합효소를 이용하여 15°C 내지 35°C에서 회전환 증폭(rolling circle amplification : RCA)을 수행할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 30°C에서 증폭반응을 수행하였으나, 이에 제한되지 않는다.
- [35] 본 발명에 따른 표적 점 돌연변이 유전자 검출방법에 대한 전체적인 모식도들도 1에 나타내었다.
- [36] 본 발명에 따른 표적 점 돌연변이 유전자 검출방법은 프로브 및 유전자간의 결합 친화도 및 용해온도 차이를 이용한 기존의 점 돌연변이 검출방법에 비해 높은 민감도 및 특이도를 나타내어, 높은 정확도로 빠른 시간 내에 표적 점 돌연변이 유전자를 검출할 수 있다.
- [37] 본 발명에서 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트의 특징 및 구조는 상술한 바와 같다.
- [38] 본 발명의 표적 점 돌연변이 유전자 검출방법은 (a) 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트와 표적 돌연변이 유전자를 포함하는 시료를 혼성화시키는 단계를 포함한다.
- [39] 본 발명에서 용어, “혼성화 (hybridization)”는 상보적인 단일가닥 핵산들이 이중-가닥 핵산을 형성하는 것을 의미한다. 혼성화는 2 개의 핵산 가닥 간의 상보성이 완전할 경우 (perfect match) 일어나거나 일부 미스매치 (mismatch) 염기가 존재하여도 일어날 수 있다. 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 반응 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 조절될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 95°C (3분)에서 4°C까지 온도를 감소시켜 혼성화 반응을

수행하였다.

- [40] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 템플레이트와 유전자의 혼성화는 돌연변이 유전자 및 야생형 유전자에서 동일한 상태의 결합 친화도를 나타낼 수 있다. 구체적으로, 상기 템플레이트는 점 돌연변이가 일어난 염기에 상보적인 염기가 삭제되어 있어, 점 돌연변이가 일어난 염기서열만이 상이한 돌연변이 유전자 및 야생형 유전자에 동일한 결합 친화도로 혼성화될 수 있다.
- [41] 상기 검출 대상이 되는 시료는 혈액, 타액, 소변 등의 생체 시료, 음식물, 또는 물 공급원일 수 있다. 또한, 다양한 시료용액에서 핵산 성분만을 추출한 용액을 이용할 수도 있다. 이 때 추출은 특정의 방법에 한정되지 않고, 페놀-클로로포름법 등의 액-액 추출법이나 담체를 이용하는 고액 추출법을 이용할 수 있다. 또한, 추출은 프로테이나제K/페놀 추출법, 프로테이나제K/페놀/클로로포름 추출법, 알칼리 용해법, 알칼리-SDS법 또는 용균효소법을 이용할 수 있다. 또한, 시판의 핵산추출 방법 QIAamp (QIAGEN사, 독일) 등을 이용하는 것도 가능하다. 예를 들어, 페놀, 페놀/클로로포름 혼합물을 이용할 수 있다.
- [42] 본 발명은 사용된 표적 유전자, 예컨대, 핵산 (예컨대, 서열 또는 분자 (예컨대, 표적 서열 및/또는 올리고뉴클레오티드))의 유형 또는 공급원에 의해 제한되지 않는다. 핵산 서열과 관련하여 사용될 때, 본 명세서에서 달리 나타내지 않는 한, 용어 "뉴클레오티드" 및 "염기"는 호환적으로 사용된다.
- [43] 본 발명의 검출하고자 하는 표적 돌연변이 유전자는 동물, 식물, 세균, 바이러스 또는 진균으로부터 얻을 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [44] 본 발명의 표적 점 돌연변이 유전자 검출방법을 이용하여 검출할 수 있는 돌연변이 유전자의 종류에는 제한이 없으며, 당업계에 알려진 다양한 돌연변이 유전자에 대하여 본 발명을 적용할 수 있다.
- [45] 본 발명으로 검출될 수 있는 돌연변이 유전자는 정상 유전자와 1 개의 염기가 치환, 결실 또는 부가된 점 돌연변이를 포함하는 유전자일 수 있다.
- [46] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 검출하고자 하는 표적 유전자는 암에서 나타나는 암 특이적인 돌연변이 유전자일 수 있다. 암 특이적인 돌연변이 유전자는 <http://www.mycancergenome.org>와 같은 웹사이트, 그 외 당업계에 알려진 임의의 암 특이적인 돌연변이 유전자일 수 있다. 예를 들어, 상기 돌연변이 유전자는 암을 유발하는 유전자인 발암성 돌연변이 유전자일 수 있으며, 구체적으로 급성 림프아세포성 백혈병 (Acute Lymphoblastic Leukemia), 급성 골수성 백혈병 (Acute Myeloid Leukemia), 만성 골수성 백혈병 (Molecular Profiling of Chronic Myeloid Leukemia), 역형성대세포림프종 (Anaplastic Large Cell Lymphoma), 기저세포암, 방광암, 유방암, 대장암, 위암, 폐암, 난소암, 흉선암, 갑상선암, 췌장암, 위장관 기질 종양 (Gastrointestinal Stromal Tumor; GIST), 교종 (Glioma), 수모세포종 (Medulloblastoma), 흑색종 (Melanoma), 골수이형성 증후군 (Myelodysplastic Syndromes), 신경아세포종 (Neuroblastoma),

횡문근육종 (Rhabdomyosarcoma)을 유발하는 유전자일 수 있다. 보다 구체적으로, 상기 암 특이적인 유전자는 급성 림프아세포성 백혈병의 CRLF2 또는 JAK2 유전자의 돌연변이, 급성 골수성 백혈병의 CFBF-MYH11, DEK-NUP214, DNMT3A, FLT3, IDH1, IDH2, KIT, MLL-MLLT3, PML-RARA, RBM15-MKL1, RPN1-EVI1, 또는 RUNX1-RUNX1T1 유전자의 돌연변이, 역형성대세포림프종의 ALK 유전자 돌연변이, 기저세포암의 SMO 유전자 돌연변이, 방광암의 TSC1 유전자 돌연변이, 유방암의 AKT1, AR, ERBB2, ESR1, FGFR1, FGFR2, PGR, PIK3CA, 또는 PTEN 유전자 돌연변이, 만성 골수성 백혈병의 BCR-ABL1 유전자의 돌연변이, 대장암의 AKT1, BRAF, KRAS, NRAS, PIK3CA, PTEN, 또는 SMAD4 유전자의 돌연변이, 위장관 기질 종양의 BRAF, KIT, 또는 PDGFRA 유전자의 돌연변이, 위암의 ERBB2 유전자의 돌연변이, 교종의 BRAF, IDH1, 또는 IDH2 유전자의 돌연변이, 염증성 근섬유아세포종의 ALK 유전자의 돌연변이, 폐암의 AKT1, ALK, BRAF, DDR2, EGFR, ERBB2, FGFR1, FGFR3, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, NTRK1, PIK3CA, PTEN, RET, RICTOR, 또는 ROS1 유전자의 돌연변이, 수모세포종의 SMO 유전자의 돌연변이, 흑색종의 BRAF, CTNNB1, GNA11, GNAQ, KIT, MAP2K1, NF1, 또는 NRAS 유전자의 돌연변이, 골수이형성 증후군의 ASXL1, BCOR, DNMT3A, ETV6, EZH2, NF1, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, TET2, TP53, U2AF1 또는 ZRSR2 유전자의 돌연변이, 신경아세포종의 ALK 유전자의 돌연변이, 난소암의 BRAF, KRAS, PIK3CA, 또는 PTEN 유전자의 돌연변이, 횡문근육종의 ALK 유전자 돌연변이, 흉선암의 KIT 유전자 돌연변이, 및 갑상선암의 BRAF, HRAS, KRAS, NRAS, 또는 RET 유전자의 돌연변이일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

- [47] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 폐암을 유발하는 EGFR 엑손 21의 점 돌연변이 유전자 (L858R 2819 T>G)를 표적으로 하여 본 발명에 따른 방법으로 돌연변이 유전자를 검출하였으며, 그 결과 높은 민감도 및 특이도로 빠른 시간 내에 검출할 수 있음을 확인하였다.
- [48] 본 발명의 다른 구체예로서, 상기 검출하고자 하는 표적 유전자는 병원균 유래 유전자일 수 있다. 상기 병원균은 핵산 서열을 아는 모든 병원균을 대상으로 할 수 있으며, 구체적으로 조류독감, 사스 (SARS), 대장균 O157:H7 (*Escherichia coli* O157:H7), 결핵 (*Mycobacterium tuberculosis*), 탄저병 (*Bacillus anthracis*), 폐렴 (*Streptococcus pneumonia*), 말라리아 (*Plasmodium*), 살모넬라 (*Salmonella*), 간염 (*Hepatitis A, B, C, D* 및 *E virus*), 야토병균 (*Francisella tularensis*), 페스트균 (*Yersinia pestis*), 에르시니아 엔테로콜리티카 (*Yersinia enterocolitica*) 또는 출혈열 (*Ebola virus*), 메르스 코로나 바이러스 (*MERS-Cov virus*) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [49] 본 발명의 표적 점 돌연변이 유전자 검출방법은 (b) 표적 점 돌연변이에 상보적인 dNTP를 첨가하여 템플레이트의 틈을 채우고 템플레이트의 말단을 이어주는 단계를 포함한다.

- [50] 본 발명에서 용어, “dNTP”는 단일가닥 표적 핵산을 이중가닥으로 중합하기 위한 디옥시 뉴클레오사이드 트리포스페이트 (deoxy nucleoside triphosphate)를 뜻하는 것으로, dATP (deoxy adenine triphosphate), dTTP (deoxy thymine triphosphate), dGTP (deoxy guanine triphosphate), dCTP (deoxy cytosine triphosphate)를 포함할 수 있다.
- [51] 상기 템플레이트의 틸을 채우고 말단을 이어주는 단계는 점 돌연변이에 상보적인 dNTP와 함께 핵산 중합효소 및 리가아제를 첨가하여 수행될 수 있다. 구체적으로, 상기 틸을 포함하는 템플레이트는 점 돌연변이에 상보적인 염기에 해당하는 dNTP를 첨가하는 경우에만 핵산 중합효소 및 리가아제에 의하여 틸이 채워진 닫힌 형태 (closed form)의 덤벨 형 (dumbbell shape) 템플레이트를 형성할 수 있으며, 템플레이트의 라이게이션에 의해 점 돌연변이 유전자 및 야생형 유전자 간의 결합 선택성을 더욱 높일 수 있다.
- [52] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 (b) 단계는 (i) dNTP 및 핵산 중합효소를 첨가하여 템플레이트의 틸을 채우는 단계 및 (ii) 상기 틸이 채워진 템플레이트에 리가아제를 첨가하여 3' 및 5'의 각 말단이 연결된 덤벨 형의 닫힌 템플레이트를 형성하는 단계로 순차적으로 또는 동시에 진행될 수 있다.
- [53] 상기 (b) 단계에 첨가되는 핵산 중합효소는 당업계에 공지된 모든 중합효소를 포함할 수 있다. 이에 제한되지 않으나, 상기 핵산 중합효소는 대장균 DNA 중합효소 I, 클레나우 단편, phi29 DNA 중합효소, vent DNA 중합효소, T4, T7 DNA 중합효소 또는 Taq 중합효소일 수 있으며, 본 발명의 일 구현예에서는 Taq 중합효소를 이용하여 템플레이트의 틸을 채우는 단계를 수행하였다.
- [54] 상기 (b) 단계에 첨가되는 리가아제는 당업계에 공지된 리가아제를 포함할 수 있으며, 예컨대 HIFI Taq DNA 리가아제, T4 DNA 리가아제, T7 DNA 리가아제 또는 Ampligase 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 구현예에서는 HIFI Taq 리가아제를 이용하여 덤벨 형의 닫힌 템플레이트를 형성하도록 라이게이션을 수행하였다.
- [55] 본 발명의 표적 점 돌연변이 유전자 검출방법에 있어 상기 (b) 단계는 (a) 혼성화 단계와 동시에 또는 순차적으로 수행될 수 있다.
- [56] 본 발명의 일 구현예에서는, EGFR의 엑손 21에 점 돌연변이가 일어난 점 돌연변이 유전자 (서열번호 1)의 경우, 점 돌연변이가 일어난 염기(G)에 상보적인 dNTP (dCTP)를 첨가하여 핵산 중합효소에 의해 템플레이트의 틸이 닫히게 되고, 이어서 리가아제에 의해 닫힌 형태의 템플레이트가 합성되게 된다. 이와 달리, 점 돌연변이가 일어나지 않는 야생형 유전자 (wild type; 서열번호 2)의 경우, 정상 유전자의 염기 (T)는 점 돌연변이가 일어난 염기에 상보적인 dNTP (dCTP)를 첨가하여도 핵산 중합효소에 의해 템플레이트의 틸이 채워지지 않아 리가아제에 의한 라이게이션이 진행되지 않는 것을 확인하였다.
- [57] 본 발명의 표적 점 돌연변이 유전자 검출방법은 (c) 상기 (b) 단계의 라이게이션된 템플레이트를 이용하여 회전환 증폭 (Rolling circle amplification;

RCA)을 수행하는 단계를 포함한다.

- [58] 상기 (c) 회전환 증폭은 핵산 중합효소를 첨가하여 수행될 수 있다. 상기 첨가되는 핵산 중합효소는 당업계에서 공지된 중합효소를 포함하며, 구체적으로 Phi 29 중합효소일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [59] 본 발명의 상기 회전환 증폭은 실온, 예컨대, 15°C 내지 35°C, 구체적으로 25°C 내지 35°C의 온도에서 수행될 수 있으며, 본 발명의 일 구현예에서는 30°C에서 수행되었으나, 이에 제한되지 않는다.
- [60] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 (c) 단계의 회전환 증폭은 닫힌 형태의 템플레이트를 형성하는 점 돌연변이 유전자의 경우, 첨가되는 핵산 중합효소에 의하여 회전환 증폭이 일어나, 야생형 유전자의 경우, 점 돌연변이에 상보적인 dNTP의 첨가에 의하여 라이게이션 되지 않아 회전환 증폭이 일어나지 않는다.
- [61] 본 발명의 일 구현예에서, EGFR의 엑손 21에 점 돌연변이가 일어난 서열번호 1로 표시되는 표적 유전자는 돌연변이가 일어난 G에 상보적인 dCTP를 첨가함으로써 닫힌 형태의 템플레이트가 형성되고, 이어서 회전환 증폭에 의해 증폭되었으나, 점 돌연변이가 일어나지 않는 정상 유전자의 염기인 T는 dCTP를 첨가하여도 라이게이션이 일어나지 않아 회전환 증폭 반응이 일어나지 않음을 확인하였다.
- [62] 본 발명의 상기 표적 점 돌연변이 유전자를 검출하는 방법 (d) 증폭산물을 확인하는 단계를 더 포함할 수 있으며, 증폭산물을 확인하기 위하여 당업계에서 일반적으로 사용되는 공지된 모든 방법이 적용될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서는, 상기 (c) 단계의 증폭산물을 아가로스 겔 또는 실시간 PCR 그래프를 통해 확인하였다.
- [63] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 (d) 증폭산물을 확인하는 단계를 통해 표적 유전자를 정성 또는 정량적으로 측정할 수 있다.
- [64]
- [65] 본 발명은 또 다른 양태로서, 본 발명의 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트를 포함하는 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 키트를 제공한다.
- [66] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 키트는 표적 유전자를 증폭시키기 위하여 표적 점 돌연변이에 상보적인 dNTP, 리가아제 및 핵산 중합효소를 포함하는 증폭용 조성물을 포함할 수 있다. 상기 증폭용 조성물은 핵산을 증폭하기 위해 필요한 성분들을 포함하는 혼합물을 의미하며, 핵산 중합효소 (폴리머라제), 그의 활성 또는 반응에 필요한 완충액, 4종류의 dNTP 중 어느 하나, 보조인자, 및/또는 기질을 포함할 수 있다. 상기 핵산 중합효소는 DNA 중합효소, RNA 중합효소, 역전사 효소(reverse transcriptase) 및 이들의 조합일 수 있다.
- [67] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 DNA 중합효소는 대장균 DNA 중합효소 I, 클레나우 단편, phi29 DNA 중합효소, vent DNA 중합효소, T4, T7 DNA 중합효소 또는 Taq 중합효소일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [68] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 키트는 점 돌연변이에 상보적인 dNTP, Taq

중합효소, Phi 29 중합효소 및 Hifi Taq 리가아제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [69] 또한, 상기 검출용 조성물은 증폭된 유전자 산물의 육안 식별을 돕기 위한 염색시약을 포함할 수 있다. 염색시약은 이에 제한되지 않으나, 예를 들어 겔 레드 (Gel-red), 스트렙타아비딘 비드 (Streptavidin bead), 트리판 블루 다이 (trypane blue dye), 에반스 블루 다이 (Evans Blue dye), 헤마톡실린-에오신 염색 (hematoxylin-eosin stain), 크리스탈 바이올렛 (crystal violet) 또는 메틸렌 블루 (methylene blue)일 수 있다.

발명의 효과

- [70] 본 발명의 표적 점 돌연변이에 상보적인 염기가 삭제된 틸을 포함하는 템플레이트를 이용한 표적 돌연변이 유전자의 검출방법은 표적 점 돌연변이 유전자에 높은 민감도 및 특이도를 가지며, 기존의 표적 돌연변이 유전자 검출방법에 비해 검출의 정확성을 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [71] 도 1은 본 발명의 표적 점 돌연변이 유전자 검출방법에 대한 전체적인 모식도를 나타낸 것이다.
- [72] 도 2는 EGFR 엑손 21의 점 돌연변이가 일어난 염기에 상보적인 염기가 삭제된 템플레이트를 나타낸 것이다.
- [73] 도 3은 본 발명의 템플레이트 변화 과정(a) 및 각 단계별 산물을 PAGE 겔을 이용하여 확인(b 및 c)한 도이다.
- [74] 도 4는 Gap filling 과정에서의 점 돌연변이 염기서열에 대해 dNTP를 이용한 선택적인 반응을 실시간 PCR(a) 및 아가로스 겔(b 및 c)을 이용하여 확인한 도이다.
- [75] 도 5는 본 발명에 따른 진단방법의 감도를 실시간 PCR을 이용하여 기존 Base pairing 기반 진단방법과 비교한 도이다.
- [76] 도 6은 본 발명의 검출방법에 따른 표적 유전자의 농도 별 증폭산물을 실시간 PCR을 이용하여 확인한 도이다.
- [77] 도 7은 템플레이트 내 상보적인 결합부위 및 DNA 중합효소 결합부위의 염기서열은 유지한 채 유전자 결합부위 내 3' 말단 측의 스페어 서열이 상이한 템플레이트를 나타낸 것이다.
- [78] 도 8은 유전자 결합부위 내 3' 말단 측의 스페어 서열이 상이한 템플레이트의 증폭산물을 아가로스 겔을 이용하여 확인한 도이다.
- [79] 도 9는 3' 말단 측의 스페어 서열이 존재하지 않는 템플레이트와 프라이머를 함께 적용하여 증폭산물을 아가로스 겔에서 확인한 도이다.
- [80] 도 10은 마그네틱 비즈를 이용하여 3' 말단 측의 스페어 서열 유무에 따른 증폭양상을 확인한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[81] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[82] 실시예 1. 템플레이트의 제조

[83] 폐암을 유발하는 것으로 알려진 EGFR 엑손 21의 점 돌연변이 유전자 (L858R 2819 T>G; 서열번호 1) 서열을 바탕으로 EGFR 엑손 21의 점 돌연변이에 특이적인 템플레이트를 제조하였으며, 템플레이트의 구체적인 서열은 하기 표와 같다.

[84] [표1]

	서열	서열번호
Strand 1	5'(C)GCC CAA AAT CAA GAA ATA TGA GCA GAG CGAAGTACTCG 3'	서열번호 3
Strand 2	5' GCGTAAGTT TA GCATGCTAGTATCGA GAAG TA AACTTACGCC GAGTACTTCG A CAG TTT GGC C 3'	서열번호 4

[85] 구체적으로, 상기 템플레이트는 표적 유전자 (EGFR 엑손 21의 점 돌연변이 유전자)와 상보적으로 결합하는 유전자 결합부위 (굵은 글씨), 즉 EGFR 엑손 21의 상보적 부위 (19 nt); 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합부위 (연한 회색 바탕), 즉 템플레이트 내 상보적인 영역 (22 nt × 2, 총 44 nt); 및 DNA 중합효소가 결합하는 DNA 중합효소 결합부위 (진한 회색 바탕; 19 nt)로 구성하였으며, 점 돌연변이가 일어난 염기 (T>G)에 상보적인 염기인 C를 strand 1에서 삭제되도록 제조하였다(도 2).

[86] 또한, 다양한 표적 유전자에 대한 본 발명에 따른 템플레이트를 제작하였으며, 구체적인 서열은 하기 표 2와 같다.

[87] [표2]

명칭	서열	서열번호
E.Coli Resistance (ssDNA)	AAT GT T GAA TAC TCA TGA GGC TAA AGA CTG AGG ACG GTC ATC CAG CAG TTT AGC ATG CTA GTA TCG ACG TTT CTG CTG GAT GAC CGT CCT CAG A AC GGA	서열번호 5
EGFR 19 (ssDNA)	CC CGG GAA TTT CCG AAT G GAA TCG AAG TAC TCA GCG TAA GTT TA G CA TGC TAG TAT CGA GAAG TA AAC TTA CGC TGA GTA CTT CGA TT C AC TCT TAA TT	서열번호 6
EGFR 21 point mutation (ssDNA)	C GC CCA AAA T CC GGG AAC GCA CTA ACA CTA GTC AAT CA C CCT TAG CAT GCT AGT ATC GAT CAA TGA TTG ACT AGT GTT AGT GCG CAG TT T GGC C	서열번호 7
GAPDH (Strand 1)	(C) CA TGA CAA CTT TGG TAT CG TC CAG AG CGAAGTACTCGG	서열번호 8
GAPDH (Strand 2)	CGCGTAAGTTTA GCATGCTAGTATCGA GAA TAAACTTACGCG CCGAGTACTTTCG CCA AGG TCA T	서열번호 9
New GAPDH (Strand 1)	(C) CA AAA TCA AGT GGG GCG ATG C CAG AG CGAAGTACTCGG	서열번호 10
New GAPDH (Strand 2)	CGCGTAAGTTTA CTCGCTAGTATC AC TGA TAAACTTACGCG CCGAGTACTTTCG CGA GAT CCC T	서열번호 11
ZIKA (ssDNA)	CGC CAT CTG GAC TG C CGA CAA GAC GTG CAG CCC GT A CCT CAC TTA GCA TGC TAG TAT CGA TCC ACC TTA TTC ACG GGC TGC ACG TCT TGT CGG GTC CAC	서열번호 12

[88] 실시예 2. 템플레이트를 이용한 회전환 증폭 및 표적 점 돌연변이 유전자 검출

[89] 본 발명의 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트를 이용하여 높은 정확도로 EGFR 엑손 21의 점 돌연변이 유전자를 검출할 수 있는지 확인하였다.

[90] 2.1. 템플레이트의 라이게이션 및 증폭

[91] 먼저, 상기 실시예 1에서 제조한 EGFR 엑손 21의 점 돌연변이 검출용 템플레이트 strand 1, 2 (10 µM) 1 µl (10 pmole) 및 EGFR 엑손 21의 점 돌연변이 유전자 (10 µM) 1 µl를 각각 첨가하고 상기 반응용액에 dCTP (2.5 mM) 0.5 µl, Taq 폴리머라아제 0.1 µl, Hifi Taq DNA 리가아제 1 µl, Hifi Taq DNA 버퍼 2 µl 및 DEPC 3.4 µl을 첨가한 후, 95°C (3분)에서 denaturing, 37°C (1시간)에서 gap filling 및 라이게이션 반응을 수행하였다. 그 다음, 100°C (10분)에서 효소를 불활성화 시킨 후 4°C까지 냉각하여 반응을 종료하였다.

[92] 다음으로, 상기 라이게이션 반응이 완료된 용액(1 µM) 1 µl에 Phi 29 폴리머라아제 2.5 µl / Phi 29 버퍼 1 µl / DEPC 5 µl / 10 mM dNTP 0.5 µl를 첨가(총 10 µl)하여 30°C에서 1시간 동안 회전환 증폭을 수행하였다.

[93] 2.2 증폭산물 확인 및 점 돌연변이 검출

[94] 상기 2.1.의 각 단계별 산물을 아가로스 겔을 이용하여 확인하였다.

[95] 구체적으로, 상기 2.1.의 gap filling 및 라이게이션 반응 산물을 10% PAGE를 통해 150 V에서 35분간 로딩하여 확인하였다. 또한, 상기 2.1.의 회전환 증폭 단계에서 수득한 증폭산물 2 µl, 1X TBE (Tris-borate-EDTA) 완충액 및 6X blue loading dye 2 µl를 첨가하여 상온에서 100 V로 30분간 로딩하였고, Gel Doc™ EZ

- (Biorad)을 이용하여 겔 이미지를 얻었으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다.
- [96] 도 3의 각 레인은 다음을 의미한다:
- [97] 도 3(a)의 L : DNA ladder, 1 : 30nt Mutation gene, 2 : 30nt Wild type, 3 : ssDNA 1 (S1), 4 : ssDNA 2 (S2), 5 : Hybridization (S1+S2), 6 : S1+S2+Mutation Hybridization, 7 : S1, S2, Mutation의 Ligated product, 8 : S1+S2+Wild type Hybridization, 9 : S1, S2, Wild type의 Ligated product
- [98] 도 3(b)의 1 : S1+S2+Mutation Hybridization, 2 : S1+S2+Mutation의 Gap filling process 후, 3 : S1+S2+Mutation의 Ligation, 4 : S1+S2+Wild type Hybridization, 5 : S1+S2+Wild type의 Gap filling process 후, 6 : S1+S2+Wild type의 Ligation
- [99] 도 3(c)의 1 : Negative control, 2 : Positive control, 3 : Mutation RCA, 4 : Wild type RCA
- [100] 도 3(a) 및 (b)에 나타난 바와 같이, 점 돌연변이 유전자(EGFR 엑손 21의 점 돌연변이; 서열번호 1)와 혼성화된 템플레이트는 첨가된 dNTP(dCTP)에 의해 템플레이트의 틈이 메워지고 라이게이션이 이루어지나, 이와 달리 야생형 유전자(서열번호 2)와 혼성화된 템플레이트는 라이게이션 되지 않음을 확인하였다.
- [101] 또한, 도 3(c)에 나타난 바와 같이, 점 돌연변이 유전자(EGFR 엑손 21의 점 돌연변이; 서열번호 1)와 혼성화된 템플레이트(3)는 라이게이션되어 회전환 증폭에 의해 빠른 시간 내에 높은 정확도로 증폭됨을 확인하였다. 이와 달리, 야생형 유전자(서열번호 2)를 본 발명의 템플레이트를 이용하여 증폭한 결과, 야생형 유전자에 혼성화되는 템플레이트(4)는 라이게이션 되지 않아 회전환 증폭이 되지 않음을 확인하였다.
- [102] 실시예 3. dNTP에 따른 증폭 유무 확인
- [103] 본 발명의 검출방법에 있어 첨가되는 dNTP에 따른 템플레이트의 증폭유무를 실시간 PCR 및 아가로스 겔을 이용하여 확인하였다.
- [104] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 제조한 템플레이트 strand 1, 2 (10 μ M) 1 μ l, EGFR 엑손 21의 점 돌연변이 유전자(서열번호 13) (10 μ M) 1 μ l, 10X Hifi Taq 버퍼 1 μ l, Hifi Taq DNA 리가아제 1 μ l, Taq 폴리머라아제 0.1 μ l, dNTP (2.5 mM) 0.5 μ l 및 DEPC 5.4 μ l을 혼합한 후, 95°C (3분)에서 denaturing, 37°C (1시간)에서 gap filling 및 라이게이션 반응을 수행하였다. 그 다음, 100°C (10분)에서 효소를 불활성화 시킨 후 4°C까지 냉각하여 반응을 종료하였다.
- [105] 다음으로, 상기 라이게이션 반응이 완료된 용액 (2 μ M) 0.5 μ l / Phi 29 폴리머라제 6.25 μ l / Phi 29 버퍼 2.5 μ l / SYBR green dye 1 μ l / DEPC 14.55 μ l / 25 mM dNTP 0.2 μ l를 첨가하고 30°C, 20 cycle (cycle/3분)로 설정한 실시간 PCR 장치 (BIORAD, CFX96)를 이용하여 RFU (Relative fluorescence unit)를 측정함으로써 증폭량을 확인하였으며, 그 결과를 도 4 (a)에 나타내었다.
- [106] 또한, 상기 라이게이션 반응이 완료된 용액(1 μ M) 1 μ l에 Phi 29 폴리머라제 2.5 μ l / Phi 29 버퍼 1 μ l / DEPC 5 μ l / 10 mM dNTP 0.5 μ l를 첨가(총 10 μ l)하여

30°C에서 1시간 동안 회전환 증폭을 수행하고, 실시예 2.2와 동일한 방법으로 각 단계별 산물을 아가로스 겔을 이용하여 확인하였으며, 그 결과를 도 4 (b) 및 (c)에 나타내었다.

[107] 도 4에 나타낸 바와 같이, EGFR 엑손 21의 점 돌연변이 유전자에 상보 염기서열인 dCTP를 첨가한 경우 템플레이트가 증폭되었으나, dATP, dTTP 및 dGTP를 첨가한 경우에는 증폭이 전혀 일어나지 않았으며, 이로부터 본 발명의 검출방법이 dNTP의 종류에 따라 높은 선택성으로 표적 점 돌연변이를 검출할 수 있음을 확인하였다.

[108] 실시예 4. 기존 Base pairing 진단방법과의 비교

[109] 본 발명에 따른 진단방법 및 기존의 Base pairing 기반 진단방법을 이용하여 EGFR 엑손 21 점 돌연변이 유전자(서열번호 13), EGFR 야생형 유전자(서열번호 14) 및 이들의 혼합물에 대한 감도를 비교하였다.

[110] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 제조한 템플레이트와 전체 매칭 DNA에 템플레이트(서열번호 4)를 실시예 3과 동일한 방법으로 실시간 PCR을 이용하여 확인하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[111] 도 5 (a) 및 (b)에 나타낸 바와 같이, 점 돌연변이에 상보적인 염기가 삭제된 템플레이트를 이용한 본 발명의 진단 방법은 기존 base pairing 기반 진단방법과 비교하여 유사한 정도의 감도를 나타냄을 확인하였다.

[112] 또한, 도 5 (c) 및 (d)에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 진단방법은 돌연변이 및 야생형 유전자가 혼합되어 있는 샘플에 대해 오직 돌연변이 유전자만을 특이적으로 검출하나, 기존 base pairing 기반 진단방법은 돌연변이 및 야생형 유전자 모두에 반응함을 확인하였다.

[113] 실시예 5. 검출한계 확인

[114] 실시간 PCR을 이용하여 본 발명의 방법에 따른 한계를 추가적으로 확인하였다. 구체적으로, 상기 2.1의 라이게이션 반응이 완료된 용액 (2 μ M) 0.5 μ l / Phi 29 폴리머라제 6.25 μ l / Phi 29 버퍼 2.5 μ l / SYBR green dye 1 μ l / DEPC 14.55 μ l / 25 mM dNTP 0.2 μ l를 첨가하고 30°C, 20 cycle (cycle/3분)로 설정한 실시간 PCR 장치 (BIORAD, CFX96)를 이용하여 RFU (Relative fluorescence unit)를 측정함으로써 증폭량을 확인하였으며, 그 결과를 도 6 (a)에 나타내었다.

[115] 도 6 (a)에 나타낸 바와 같이, 본 발명에 따른 표적 점 돌연변이 검출용 템플레이트를 이용하는 방법은 높은 선택성으로 표적 점 돌연변이를 검출할 수 있음을 확인하였다.

[116] 또한, 본 발명에 따른 EGFR 21 점 돌연변이 검출용 템플레이트의 검출 한계를 확인하기 위하여, 템플레이트를 최종 4 μ M로 고정하고 점 돌연변이 유전자의 농도 구간을 1 pmole 내지 40 pmole로 설정한 점을 제외하고, 상기와 동일한 방법으로 RFU를 측정하였으며, 그 결과를 도 6 (b) 및 (c)에 나타내었다.

[117] 도 6 (c)에 나타낸 바와 같이, 실시예 1에서 제조한 EGFR 21 점 돌연변이 검출용 템플레이트는 4 pmole의 최종 LOD (Limit of detection)까지 EGFR 21 점

돌연변이를 검출할 수 있음을 확인하였다.

[118] 실시예 6. 스페어 서열에 따른 템플레이트의 증폭 확인

[119] 유전자 결합부위 내 스페어 서열에 따른 템플레이트의 증폭 유무를 확인하였다.

[120] 구체적으로, 제 1 표적 유전자 결합부위(5' 말단) 및 제 2 표적 유전자 결합부위(3' 말단) 내 스페어 서열의 길이가 상이한 템플레이트를 도 7과 같이 제조하였으며, 각 템플레이트의 구체적인 서열은 하기 표 3과 같다 (굵은 글씨로 표시된 서열은 스페어 서열을 나타낸 것임).

[121] [표3]

3' 말단 스페어 서열 길이	서열	서열번호
0	5' GCC CAA AAT C ACG GA AAT CGAAGTACTCG GCGTAAGTT TA CCATGCTAGTATCGA GAAG TT AGATC TA AACTTACGCC GAGTACTTCG AGT TTG GCC 3'	서열번호 15
6	5' GCC CAA AAT CAA GA AAT AT GAG CGAAGTACTCG GCGTAAGTT TA CCATGCTAGTATCGA GAAG TT AGATC TA AACTTACGCC GAGTACTTCG CAG AG A CAG TTT GGC C 3'	서열번호 16
11	5' GCC CAA AAT CAA GA AAT CGAAGTACTCG GCGTAAGTT TA CCATGCTAGTATCGA GAAG TT AGATC TA AACTTACGCC GAGTACTTCG AT GAG CAG AG A CAG TTT GGC C 3'	서열번호 17
16	5' GCC CAA AAT CAA CGAAGTACTCG GCGTAAGTT TA CCATGCTAGTATCGA GAAG TT AGATC TA AACTTACGCC GAGTACTTCG GA AAT AT GAG CAG AG A CAG TTT GGC C 3'	서열번호 18
19	5' GCCCAAAT CGAAGTACTCG GCGTAAGTT TA CCATGCTAGTATCGA GAAG TT AGATC TA AACTTACGCC GAGTACTTCG CAA GA AAT AT GAG CAG AG A CAG TTT GGC C 3'	서열번호 19

[122] 상기 제조된 각 템플레이트에 대해 실시예 2.1과 동일한 방법으로 EGFR 엑손 21 점 돌연변이 유전자와의 혼성화 및 라이게이션 반응을 수행하고, 반응이 완료된 용액 (1 μ M) 1 μ l을 이용하여 30°C에서 30분 동안 회전환 증폭을 수행하였다.

[123] 다음으로, 상기 회전환 증폭이 완료된 산물을 실시예 2.2와 동일한 방법으로 PAGE 겔을 이용하여 증폭 정도를 확인하였으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[124] 도 8에 나타낸 바와 같이, 3' 말단 부분에 스페어 서열을 포함하는 템플레이트들은 회전환 증폭에 의해 빠른 시간 내에 증폭되었으나, 3' 말단 부분에 스페어 서열을 포함하지 않는 템플레이트는 증폭이 일어나지 않음을 확인하였다.

[125] 또한, 3' 말단 부분에 스페어 서열을 포함하지 않는 템플레이트에 프라이머(서열번호 20)를 적용하여 증폭 유무를 확인하였으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

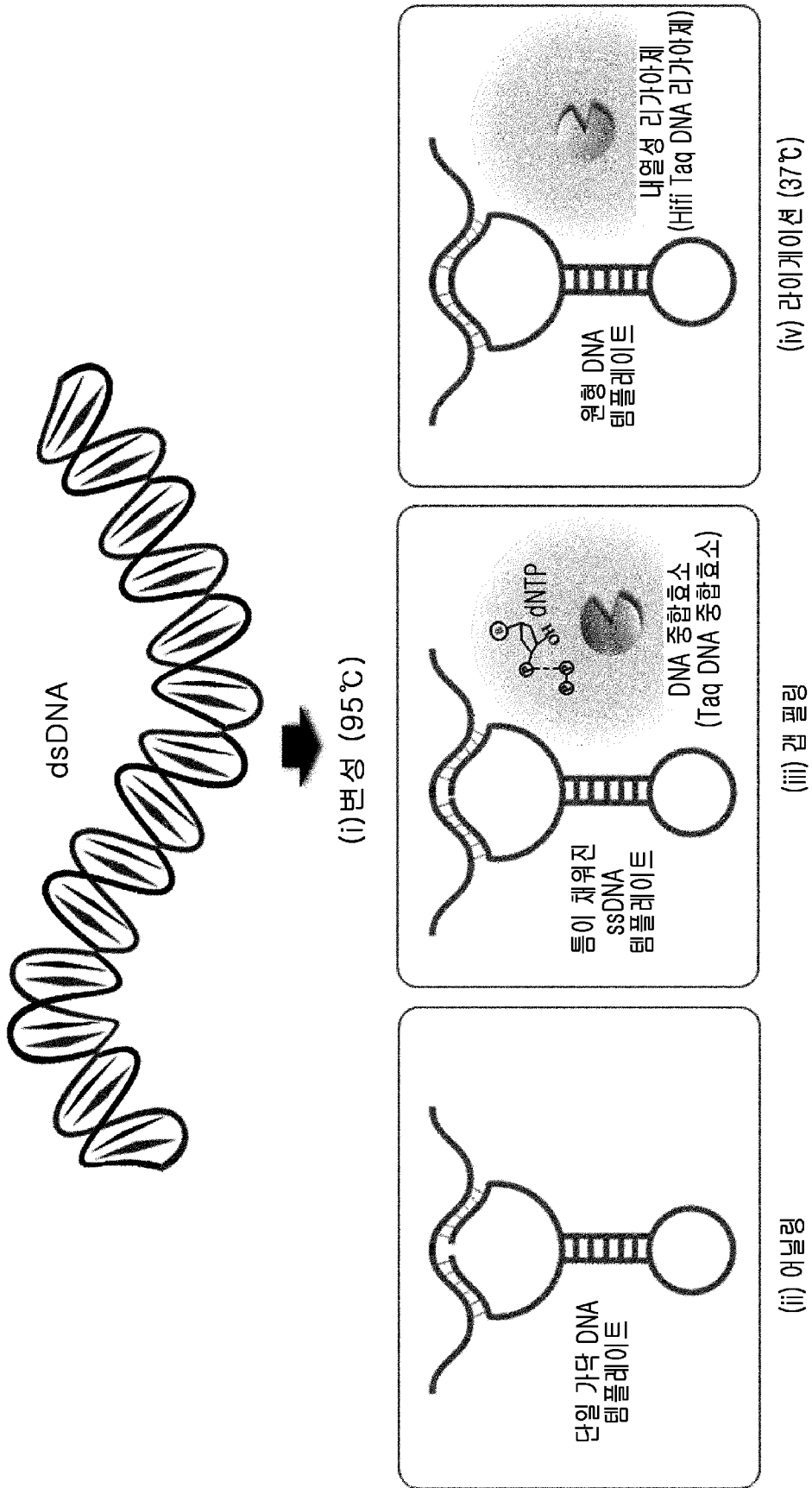
- [126] 도 9에 나타낸 바와 같이, 3' 말단 부분에 스페어 서열을 포함하지 않는 템플레이트의 경우 DNA 중합효소 결합부위에 프라이머를 적용하여 증폭시킬 수 있음을 확인하였다.
- [127] 또한, 프라이머와 결합된 마그네틱 비즈를 이용하여 3' 말단 스페어 서열 유무에 따른 증폭 양상을 확인하였다.
- [128] 구체적으로, 비오틴이 접합된 프라이머(서열번호 20)를 스트렙타아비딘(Streptavidin)으로 코팅된 표면에 결합시켜 마그네틱 비즈를 제조하고, 상기 프라이머와 상보적으로 결합하는 서열이 포함된 서열번호 15(3' 말단 스페어 서열이 없는 경우) 및 서열번호 19(3' 말단 스페어 서열이 있는 경우)의 템플레이트를 이용하여 3' 말단 스페어 서열 유무에 따른 증폭 양상을 확인하였다. 상기 제조한 마그네틱 비즈를 증폭반응 혼합 용액에 첨가한 점을 제외하고 실시예 2와 동일한 방법으로 증폭산물을 확인하였으며, 그 결과를 도 10에 나타내었다.
- [129] 도 10에 나타낸 바와 같이, 3' 스페어 서열이 없는 템플레이트(0 nt)의 경우 프라이머를 개시점으로 증폭이 일어나며 마그네틱 비즈 표면에 증폭산물이 고정되나, 3' 스페어 서열이 있는 템플레이트(19 nt)의 경우 증폭산물이 마그네틱비즈 표면에서 떨어지고 용액 상에 부유됨을 확인하였다.
- [130] 상기와 같은 결과들로부터 본 발명의 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트 및 이를 이용한 표적 점 돌연변이 유전자 검출방법은 표적 점 돌연변이 유전자에 높은 민감도 및 특이도를 나타내어 유전자 검출의 정확성을 높일 수 있음을 시사하는 것이다.
- [131] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 표적 점 돌연변이가 일어난 염기에 상보적인 염기가 삭제된 틈(gap)을 포함하는 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 템플레이트는 표적 점 돌연변이 유전자와 상보적으로 결합하는 유전자 결합부위, DNA 중합효소 결합부위, 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 것인, 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 틈의 거리는 1 nt (nucleotide)인 것인, 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 틈의 위치는 표적 유전자 결합 부위의 양 말단에 위치하는 것인, 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트.
- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 템플레이트의 길이는 70 내지 140 nt인, 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 템플레이트는 두 개의 단일가닥으로 구성되는 것인, 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트.
- [청구항 7] 제2항에 있어서, 상기 유전자 결합부위는 제 1 표적 유전자 결합부위 및 제 2 표적 유전자 결합부위로 구성되며, 제 1 표적 유전자 결합부위 및 제 2 표적 유전자 결합부위의 염기서열 길이의 비율은 0.3 내지 4.5 인, 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트.
- [청구항 8] 제2항에 있어서, 상기 유전자 결합부위 및 DNA 중합효소 결합부위의 염기서열 길이의 비율은 0.5 내지 2 인, 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트.
- [청구항 9] 제2항에 있어서, 상기 유전자 결합부위는 템플레이트 내 상보적인 결합부위와 연결되는 스페어 (spare) 서열을 포함하는 것인, 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트.
- [청구항 10] (a) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트와 표적 돌연변이 유전자를 포함하는 시료를 혼성화시키는 단계;
 (b) 표적 점 돌연변이에 상보적인 dNTP (deoxy nucleoside triphosphate)를 첨가하여 상기 템플레이트의 틈을 채우고 템플레이트의 말단을 이어주는 라이게이션 단계; 및
 (c) 상기 (b) 단계의 라이게이션된 템플레이트를 이용하여 회전환 증폭(Rolling circle amplification; RCA)을 수행하는 단계를 포함하는, 표적 점 돌연변이 유전자를 검출하는 방법.
- [청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 표적 점 돌연변이 유전자는 암 특이적인 유전자 또는 병원균 유래 유전자인 것인, 표적 점 돌연변이 유전자를 검출하는 방법.

- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 암 특이적인 유전자는 EGFR 엑손 21의 점 돌연변이 유전자인 것인, 표적 점 돌연변이 유전자를 검출하는 방법.
- [청구항 13] 제10항에 있어서, 상기 (b) 단계는 핵산 중합효소 및 리가아제를 이용하여 템플레이트의 틈을 채우고 템플레이트의 각 말단을 이어주는 것인, 표적 점 돌연변이 유전자를 검출하는 방법.
- [청구항 14] 제13항에 있어서, 상기 핵산 중합효소는 대장균 DNA 중합효소 I, 클레나우 단편, phi29 DNA 중합효소, vent DNA 중합효소, T4, T7 DNA 중합효소 또는 Taq 중합효소인 것인, 표적 점 돌연변이 유전자를 검출하는 방법.
- [청구항 15] 제13항에 있어서, 상기 리가아제는 HIFI Taq DNA 리가아제, T4 DNA 리가아제, T4 DNA 리가아제 또는 Ampligase 인 것인, 표적 점 돌연변이 유전자를 검출하는 방법.
- [청구항 16] 제10항에 있어서, 상기 표적 점 돌연변이 유전자를 검출하는 방법은 (d) 증폭산물을 확인하는 단계를 더 포함하는 것인, 표적 점 돌연변이 유전자를 검출하는 방법.
- [청구항 17] 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 표적 점 돌연변이 유전자 검출용 템플레이트를 포함하는 표적 점 돌연변이 검출용 키트.
- [청구항 18] 제17항에 있어서, 상기 키트는 dNTP, 리가아제 및 핵산 중합효소를 포함하는 것인, 표적 점 돌연변이 검출용 키트.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 핵산 중합효소는 대장균 DNA 중합효소 I, 클레나우 단편, phi29 DNA 중합효소, vent DNA 중합효소, T4, T7 DNA 중합효소 또는 Taq 중합효소인 것인, 표적 점 돌연변이 검출용 키트.
- [청구항 20] 제18항에 있어서, 상기 리가아제는 HIFI Taq DNA 리가아제, T4 DNA 리가아제, T4 DNA 리가아제 또는 Ampligase 인 것인, 표적 점 돌연변이 검출용 키트.

[도 1]

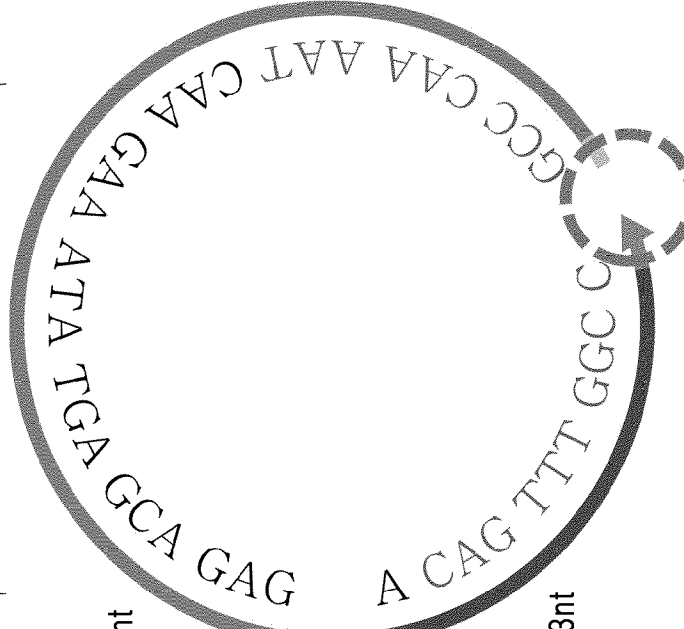


[도2]

EGFR 21 점 돌연변이 유전자 합성 30nt



덤벨모양 유지를 위한 랜덤(스페이서) 시퀀스



캡 페어링 & 라이게이션의 반응 부위

주형 1 38nt

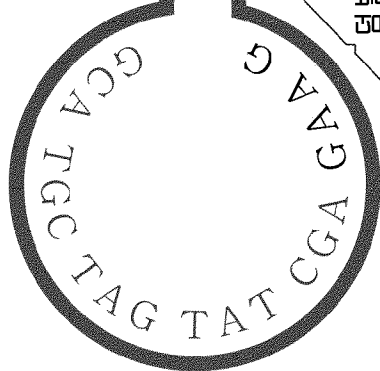
주형 2 63nt

LLG VVL GCG GC LCV LGV VGG
CGA GT ACG TCC CGC CGA GTA CTT CG
AAC TTA CGC CGA GTA CTT CG

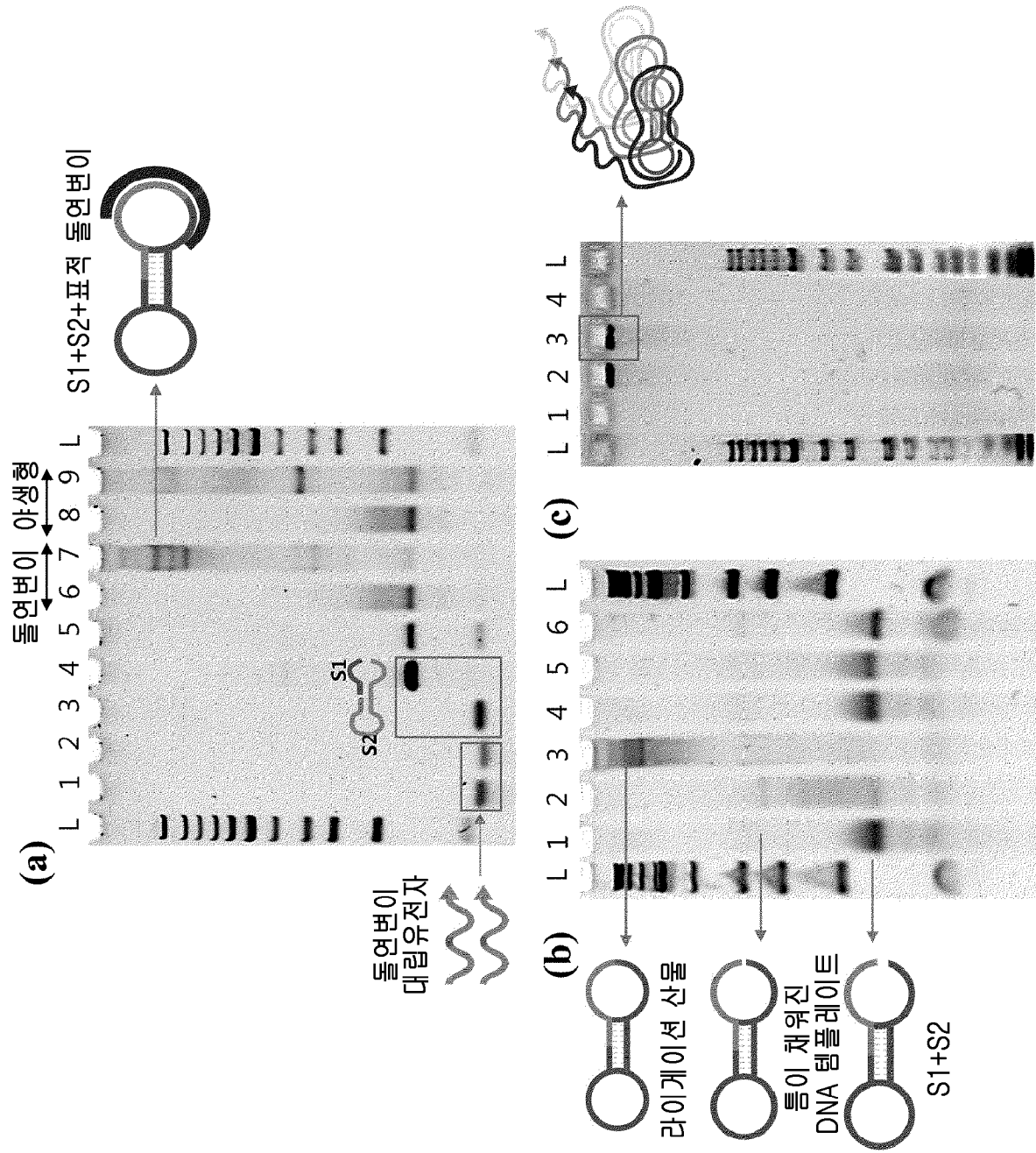
자기-어닐링 부위 : 22bp

덤벨모양 유지를 위한 랜덤 시퀀스

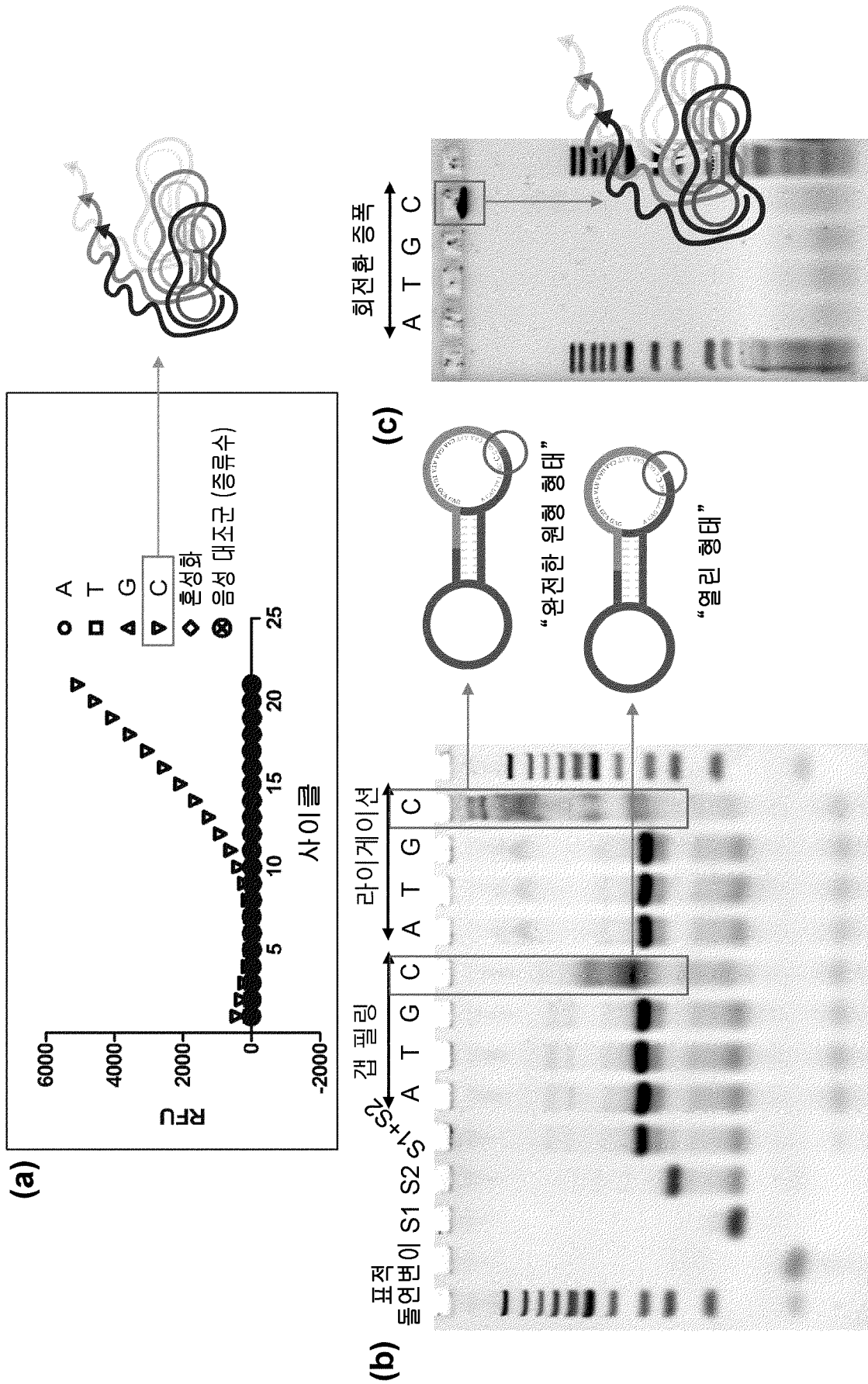
프라이머 및 DNA 증합 효소 부착 부위 19nt



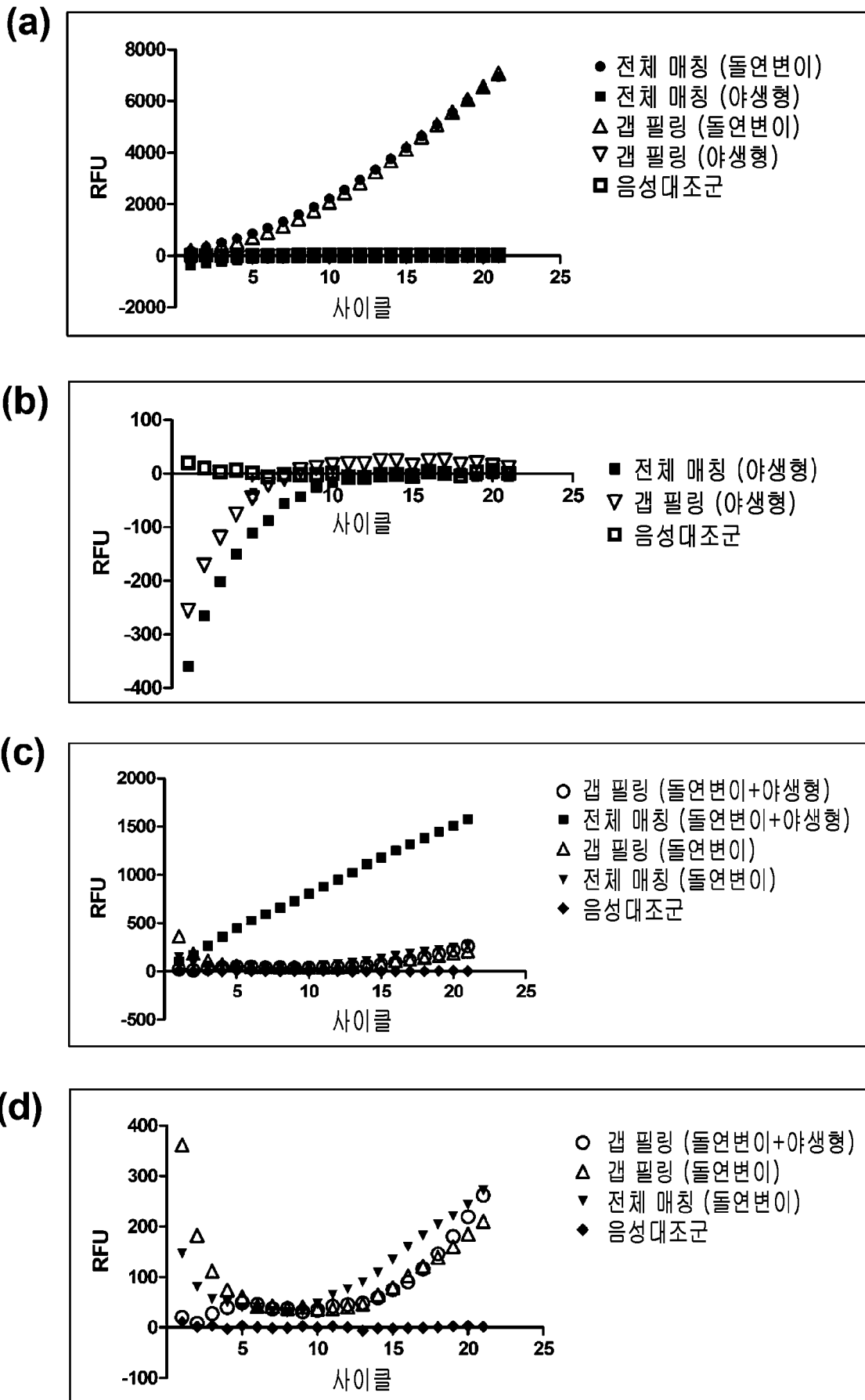
[도3]



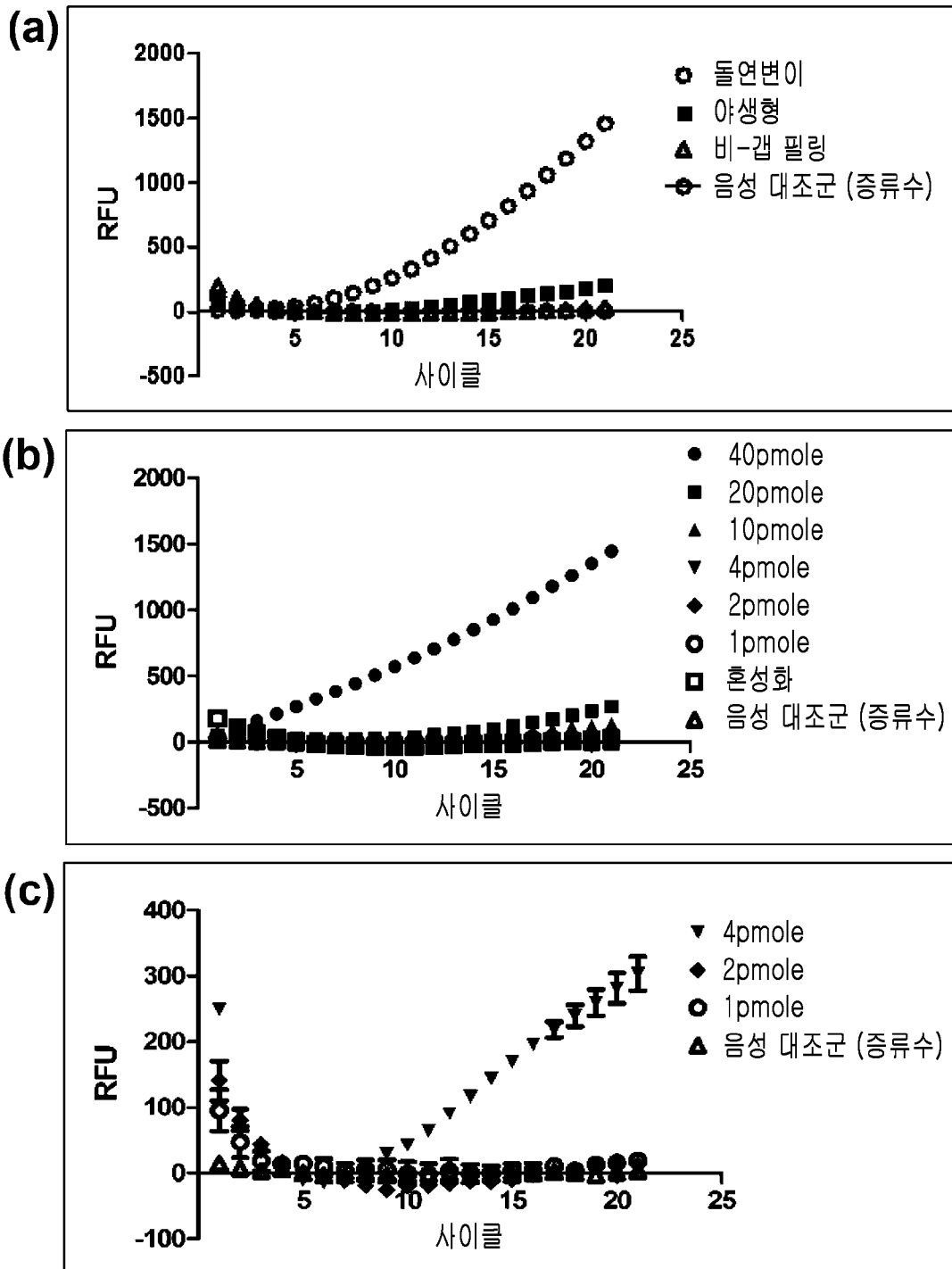
[도4]



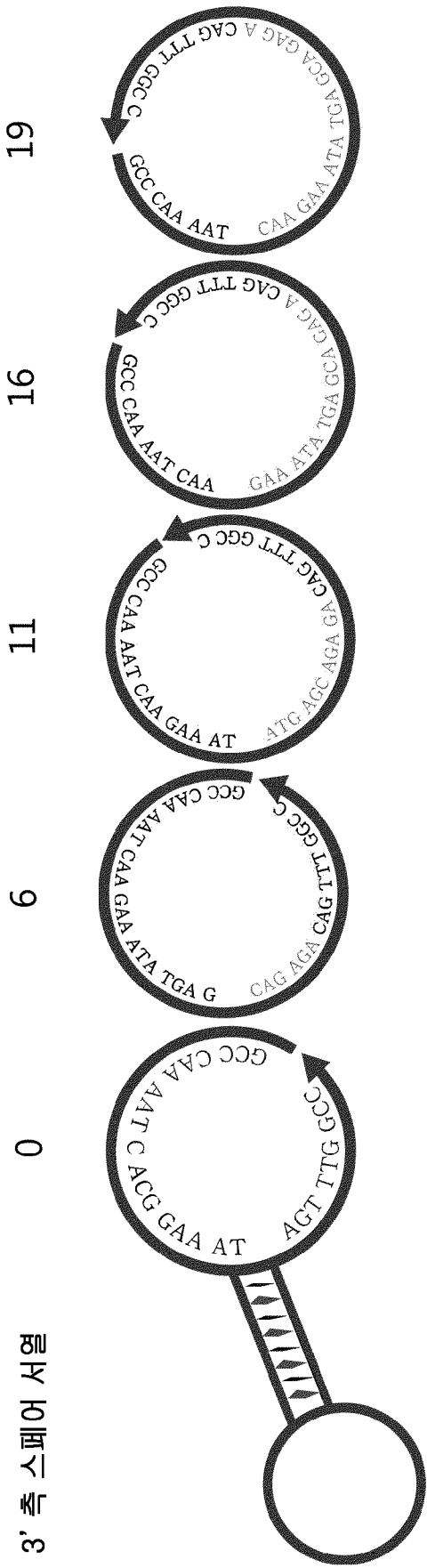
[도5]



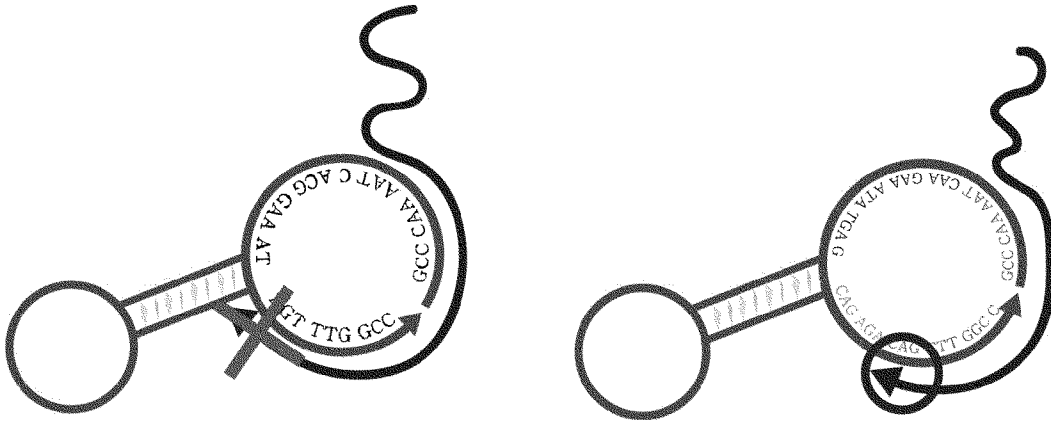
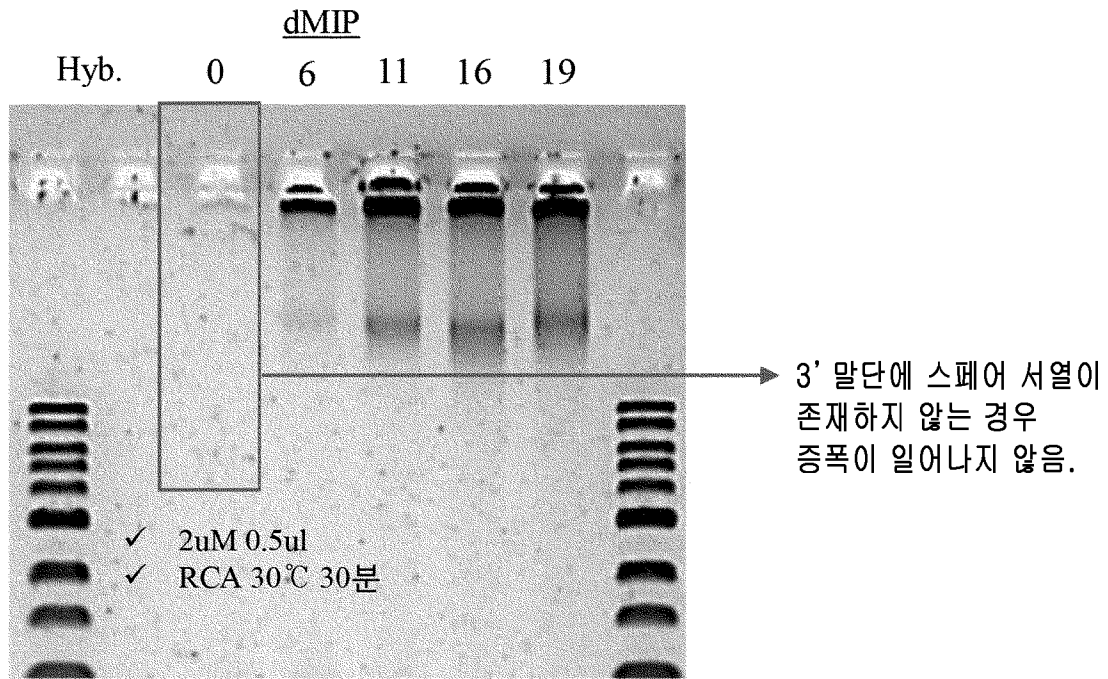
[도6]



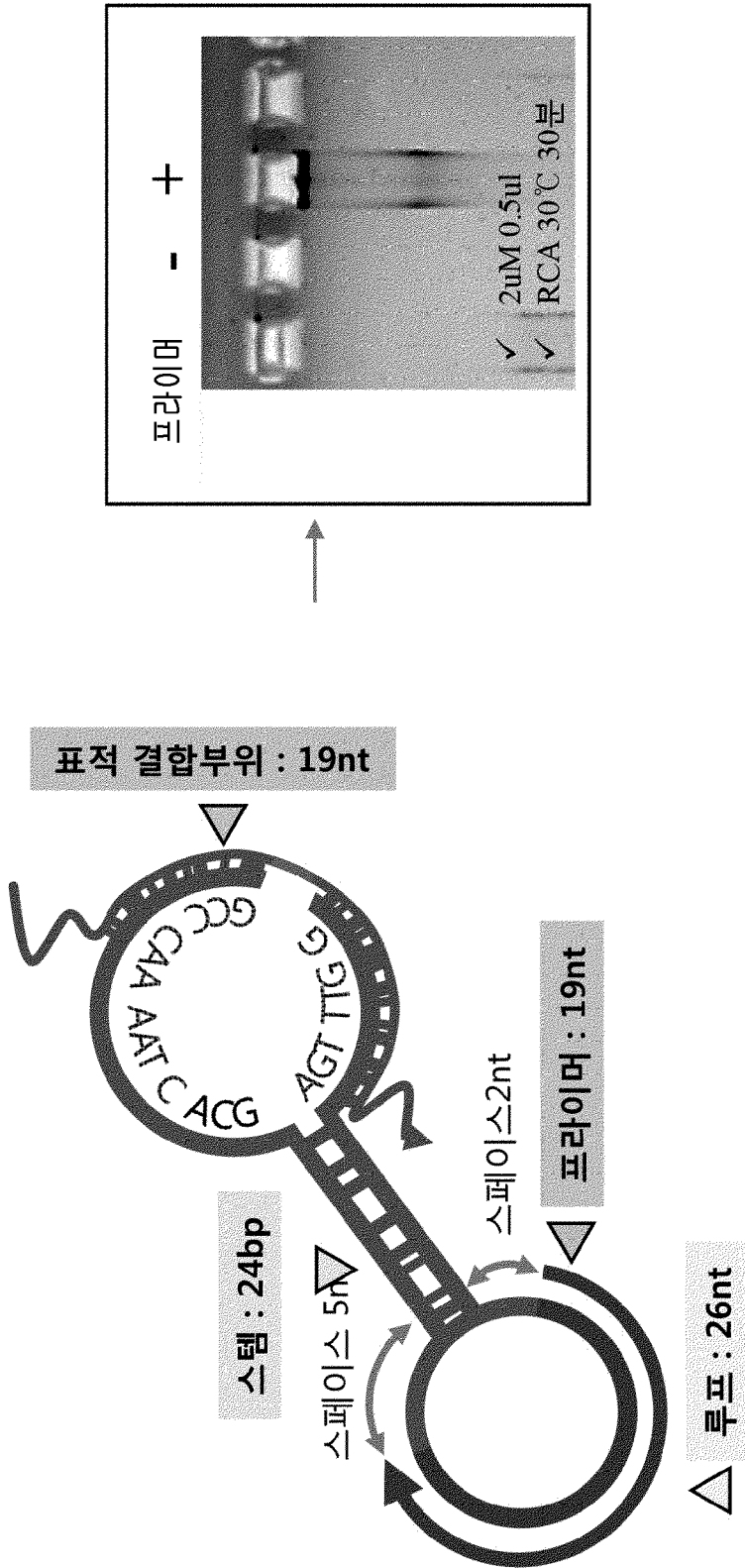
[도7]



[도8]



[도9]



[도10]

