(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021 년 7 월 15 일 (15.07.2021)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2021/141369 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/6813 (2018.01) *B01L 3/00* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/000103

(22) 국제출원일: 2021 년 1 월 6 일 (06.01.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2020-0002259 2020 년 1 월 7 일 (07.01.2020) KR

(71) 출원인: 서강대학교산학협력단 (**SOGANG UNIVERSITY RESEARCH & BUSINESS DEVELOPMENT FOUNDATION**) [KR/KR]; 04107 서울시 마포구 백범로 35, Seoul (KR). 숙명여자대학교산학협력단 (**SOOKMYUNG WOMEN'S UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 04310 서울시 용산구 청파로47길 100, Seoul (KR).

(72) 발명자: 조규봉 (**JO, Kyubong**); 04107 서울시 마포구 백범로 35 서강대학교, Seoul (KR). 임광일 (**LIM, Kwang Il**); 04310 서울시 용산구 청파로47길 100 숙명여자대학교, Seoul (KR). 김시원 (**KIM, Si Won**); 07053 서울시 동작구 국사봉2다길 16-4, Seoul (KR). 장윤하 (**JANG, Yoon-Ha**); 04314 서울시 용산구 원효로93길 18-39 501호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 윤대웅 (**YOON, Dae Woong**); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922 603호, 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, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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).

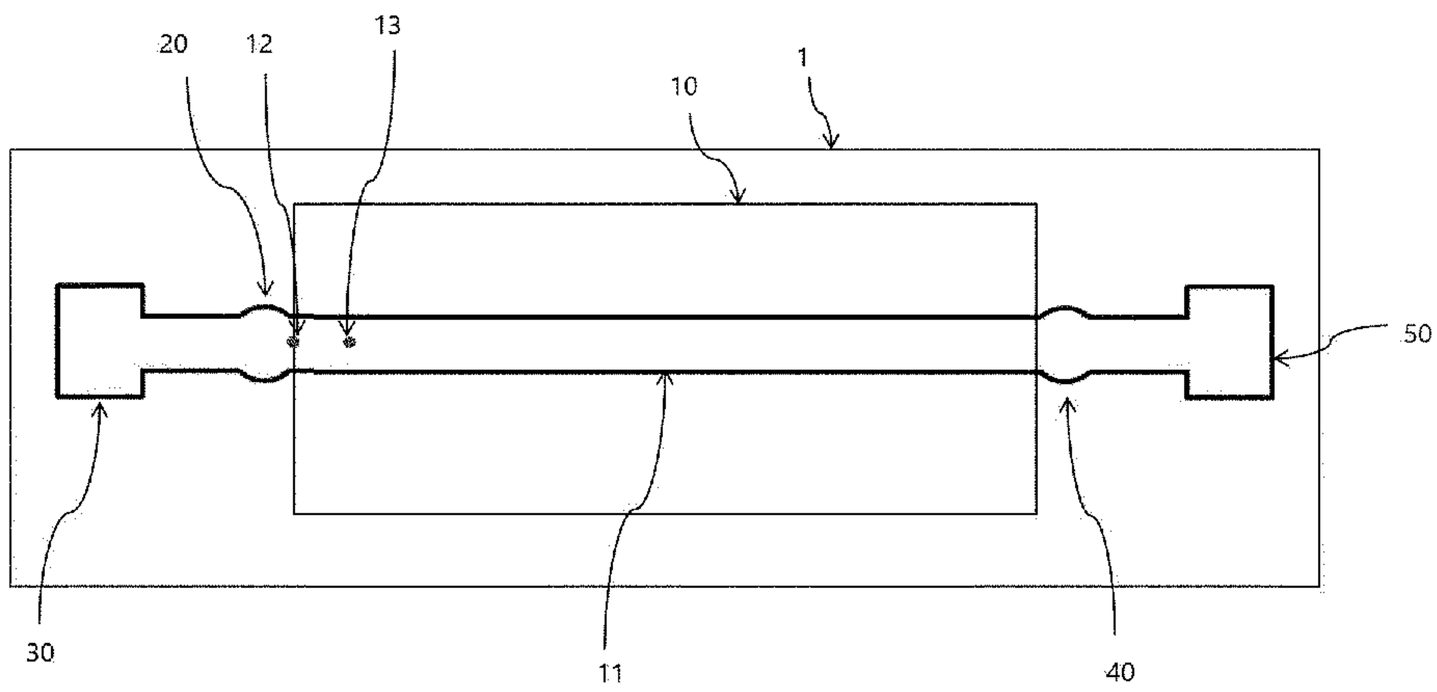
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title:** SINGLE-STRANDED DNA PROBE-BASED RNA DETECTION METHOD

(54) 발명의 명칭: 단일 가닥 DNA 탐침 기반 RNA 검출 방법



(57) **Abstract:** The present invention relates to a method for detection of viral and cellular RNA by using a single DNA molecule visualization method. The method of the present invention can advantageously detect viral and cellular RNA at a single DNA molecular level within a short time by visualizing a marker dsDNA in which a viral or cellular RNA fragment to be detected is hybridized.

(57) 요약서: 본 발명은 단일 DNA 분자 시각화 방법을 이용한 바이러스 및 세포 RNA 검출방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 검출 대상 바이러스 또는 세포 RNA 단편이 혼성화된 표지 dsDNA 를 시각화함으로써, 단시간 내에 단일 DNA 분자 수준에서 바이러스 및 세포 RNA의 검출이 가능한 장점이 있다.

WO 2021/141369 A1

명세서

발명의 명칭: 단일 가닥 DNA 탐침 기반 RNA 검출 방법

기술분야

[1] 본 특허출원은 2020년 01월 07일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제10-2020-0002259호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[2] 본 발명은 단일 DNA 분자 시각화 방법을 이용한 RNA 검출방법에 관한 것이다.

배경기술

[3] 바이러스는 세균보다 크기가 작은 전염성 병원체로, 유전물질인 DNA 또는 RNA와 그 유전물질을 둘러싸고 있는 단백질로 구성된다. 바이러스는 숙주의 종류에 따라서 식물 바이러스, 동물 바이러스 및 세균 바이러스 (파지)로 구분할 수 있는데, 대부분의 경우 핵산의 종류에 따라 DNA 바이러스 아문과 RNA 바이러스 아문으로 나뉘며, 이들은 다시 강, 목, 과로 세분화된다.

[4] 최근 빈번하게 나타나고 있는 바이러스 감염은 전 세계적으로 중대한 사회적 · 경제적 위기를 가져왔다. 예를 들어, 인플루엔자바이러스(H1N1), 호흡기증후군 코로나바이러스(SARS-CoV) 등 많은 경우, 바이러스가 전염성 질환을 유발하였다.

[5] 특히, 2015년 우리나라를 덮쳤던 메르스 바이러스(MERS-CoV)는 많은 희생자와 함께 사회적인 공포 및 막대한 사회 · 경제적 손실을 야기하였으며, 2016년 지카 바이러스는 임산부들에게 공포의 대상이 되었다. 2019년에도 일본에서 200만명 이상의 독감 환자가 발생하여 수십 명의 사망자가 발생함으로써 많은 사회적 문제를 일으키고 있다.

[6] 바이러스 감염은 많은 경우 효과적인 치료제가 개발되지 못했고, 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 대표적 치료제인 타미플루(Tamiflu)의 경우 예상하지 못했던 심각한 부작용이 보고되고 있다. 바이러스 백신개발 또한 일반적으로 어렵고 가능하더라도 많은 시간이 걸린다.

[7] 따라서 심각한 질환을 유발하는 바이러스 감염이 발생하였을 때 감염 빈도와 확산 속도를 늦추기 위해 바이러스 검출과 감염 조기 진단 및 감염 환자의 격리는 필수적이다. 특히, 호흡기 감염의 경우 현장에서 신속하게 원인 바이러스 유무를 판별하여 환자를 격리, 치료하는 것이 가능하다면 감염의 확신을 방지할 수 있다.

[8] 바이러스 검출 방법으로는 효소 결합 면역 흡수 검정법 (ELISA), 효소 면역 검정법 (EIA) 및 면역 형광 검정법 (IFA) 등의 면역학적 검출방법과 RT-PCR에 의한 바이러스 핵산 (DNA, RNA) 검출방법 등이 사용되고 있으나, 이러한 방법은 바이러스 검출에 과도한 시간이 소요되거나, 고가의 거대 장비가 필요하거나,

불만족스러운 특이도 및 민감도 등의 문제가 있다.

[9] 한편, 단일 DNA 분자의 시각화는 유전체 지도에서 유전체 구조의 분석이나 생화학 분석에 활용될 수 있다. 1 kb보다 작은 DNA는 일반적으로 중합효소연쇄반응 (PCR)에 의해 DNA를 증폭한 다음 전기영동을 이용하여 분석이 가능하다. 그러나, 이러한 PCR을 이용한 분석 방법은 온도가 제어되는 증폭 사이클이 필요하기 때문에 많은 시간이 소요된다는 점 및 젤 전기영동을 통한 결과 확인은 소비되는 시간이 크다는 점 등의 문제가 있다.

[10] 따라서, 저비용으로 단시간 내에 효율적으로 바이러스를 검출하는 새로운 방법의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명자들은 단일 분자 수준에서 RNA를 조기에 검출할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 검출 대상 RNA가 혼성화된 표지 dsDNA를 제조하였으며, 이를 일 측에 경사면을 갖는 채널을 포함하는 마이크로채널을 이용하여 시각화 하는 경우, 단시간 내에 단일 DNA 분자 수준에서 RNA를 검출할 수 있음을 규명하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

[12] 따라서, 본 발명의 목적은 표지 (marker) DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 다른 목적은 표지 DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물의 제조방법에 의해 제조된 바이러스 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 표지 DNA를 포함하는 RNA 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 표지 DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물을 마이크로채널 (microchannel)에 주입하는 단계를 포함하는 RNA 검출방법을 제공하는 것이다.

기술적 해결방법

[16] 본 발명자들은 단일 분자 수준에서 RNA를 조기에 검출하기 위해, 검출 대상 RNA가 혼성화된 표지 dsDNA를 제조하였으며, 이를 한쪽에 경사면을 갖는 채널을 포함하는 마이크로채널을 이용하여 시각화 하는 경우, 단시간 내에 단일 DNA 분자 수준에서 RNA를 검출할 수 있음을 확인하였다.

[17] 본 발명은 표지 (marker) DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물의 제조방법, 이에 의해 제조된 RNA 검출용 조성물, 이를 포함하는 RNA 검출용 키트 및 이를 이용한 RNA 검출방법에 관한 것이다.

[18] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[19] 본 발명의 일 양태는 하기의 단계를 포함하는 표지 (marker) DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물의 제조방법에 관한 것이다:

[20] 검출 대상 RNA 서열이 혼성화된 환형 단일가닥 DNA (ssDNA)를 제조하는

탐침 (probe) DNA 제조 단계;

[21] 검출 대상 RNA 서열에 상보적인 프라이머를 이용하여 환형 단일가닥 DNA로부터 환형 이중가닥 DNA (dsDNA)를 제조하는 환형 dsDNA 제조 단계; 및

[22] 환형 이중가닥 DNA를 절단하여 선형 이중가닥 DNA를 제조하는 표지 DNA 제조 단계.

[23] 본 발명에 있어서 검출 대상 RNA는 바이러스 RNA, 세포 내 발현되는 miRNA, 다양한 암 특이적인 mRNA들을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[24] 본 발명에 있어서 바이러스는 RNA 바이러스인 것일 수 있으며, 예를 들어, 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV), 인플루엔자 A 바이러스일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[25] 본 발명에 있어서 상보적인 프라이머는 핵산인 것일 수 있으며, 예를 들어, RNA인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[26] 본 발명에 있어서 상보적인 프라이머는 RNA 바이러스 유전체로부터 유래된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[27] 본 발명에 있어서 탐침 DNA 제조 단계는 하기의 단계를 포함하는 것일 수 있다:

[28] 검출 대상 RNA 서열을 파지미드 (phagemid)에 삽입하여 재조합 파지미드를 제조하는 재조합 파지미드 제조 단계;

[29] 재조합 파지미드를 보조파지 (helper phage)와 함께 대장균 내에 도입하여 배양하는 배양 단계; 및

[30] 배양 결과물로부터 환형 단일가닥 DNA를 추출하는 추출 단계.

[31] 본 발명에 있어서 탐침 DNA 제조 단계는 추출 단계에서 존재하는 대장균 유전체, 보조파지 유전체 및 기타 DNA를 제거하기 위하여 환형 단일가닥 DNA를 정제하는 정제 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[32] 본 발명에서 "탐침 DNA"는 단일 분자 시각화를 위한 표지 (marker) DNA를 제조하기 위하여 시각화 대상 유전자 서열이 혼성화될 DNA를 말하는 것으로서, 올리고뉴클레오티드, cDNA 또는 본 발명에 따른 환형 단일가닥 DNA(ssDNA)를 포함할 수 있다.

[33] 본 발명에서 "시각화 대상 유전자"는 검출하고자 하는 대상 바이러스 또는 발현을 여부를 판별하고자 하는 대상 세포에서 추출한 DNA 또는 RNA를 말하는 것으로, 상기 시각화 대상 유전자의 상당 부분은 탐침 DNA와 상보적인 서열을 갖고 있어 이들의 결합에 의해 역전사 반응을 통한 표지(marker) DNA로의 혼성화가 가능하다.

[34] 본 발명에서 "파지미드"는 f1 복제 기점 (origin of replication)을 갖는 플라스미드를 의미하며, 파지미드의 DNA는 단일가닥 환형 상태로 바이러스 입자에 들어가며 위치-지정 돌연변이(site-directed mutagenesis)를 통해 특정 제한효소 사이트 더하고 이를 활용 외부 유전자를 도입할 수 있다.

[35] 본 발명에서 "f1 복제 기점"은 f1 파지(f1 phage)에서 유래된 복제 개시점을 의미한다.

[36] 본 발명에서 "보조파지"는 단독으로 감염성이나 자기 증식능을 가지지 않고 불완전 파지 (결손이 있는 파지)의 증식을 도와주는 파지를 의미하며, 같은 종 2개의 파지 중 1개는 정상 파지이지만 다른 1개는 파지의 기능 일부를 결실하고 있는 경우에 양자가 동일 세포 내에 혼합 감염하면 후자는 전자의 산물을 이용하여 생육할 수 있다.

[37] 한편, 재조합 파지미드가 보조파지와 동시에 존재하는 경우 상기 보조파지는 재조합 파지미드를 단일가닥 DNA 형태로 우선적으로 증폭시키기 때문에, 대장균으로부터 추출되는 자손 파지는 유전체로 파지미드를 가질 수 있다. 따라서, 배양 결과물 내 이러한 파지로부터 유전체를 추출하여 환형 단일가닥 DNA (탐침 DNA)를 얻을 수 있다.

[38] 본 발명에 있어서 환형 표지 이중가닥 DNA 제조 단계의 프라이머는 검출 대상 RNA의 절편화, 예를 들어, 대상 바이러스 유전체 및/또는 세포 유래 RNA의 절편화를 통해 생성되는 것일 수 있다.

[39] 본 발명에 있어서 탐침 DNA는 프라이머(들)와 상보적인 서열을 포함하도록 설계되었다.

[40] 본 발명에 있어서 상기 프라이머를 이용하여 역전사효소를 사용한 반응을 통해 환형 단일가닥 DNA로부터 환형 이중가닥 DNA로의 혼성화가 가능하다.

[41] 따라서, 본 발명은 검출 대상 RNA의 제한이 없으며, 예를 들어, 바이러스의 유전체상 어떤 부분도 검출 대상으로 할 수 있으며, 마찬가지로 세포 유래 miRNA 및 mRNA 검출을 위한 서열 역시 해당 RNA 서열의 전체 또는 일부 어떤 부분으로 결정할 수 있으므로, 제작 가능한 탐침 DNA의 경우 역시 무한하다.

[42] 본 발명에 있어서 환형 표지 dsDNA는 G/AATTC 서열을 가질 수 있으므로, 제한효소 EcoRI를 이용하여 환형 dsDNA를 절단하여 선형 이중가닥 표지 DNA를 제조할 수 있다.

[43] 본 발명의 다른 일 양태는 표지(marker) DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물에 관한 것이다.

[44] 본 발명에 있어서 표지 DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물은 상기 제조방법에 의해 제조된 것일 수 있다.

[45] 본 발명에 있어서 표지 DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물은 필요에 따라 프라이머 (primer), dNTPs 및 rNTPs, 표지 시약 (labeling agent), 역전사 효소, DNA 중합효소, 완충용액, 화학형광물질(chemifluorescent) 및/또는 화학발광물질 (chemiiluminescent) 등이 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[46] 본 발명의 또 다른 일 양태는 상기 RNA 검출용 조성물을 포함하는 바이러스 검출용 키트에 관한 것이다.

[47] 본 발명에 있어서 키트는 바이러스 RNA, 세포 내 발현되는 miRNA, 다양한 암 특이적인 mRNA들을 검출할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[48] 본 발명에 있어서 키트는 바이러스를 신뢰성 있게 검출할 수 있도록, 특정 바이러스 종에 특이적인 유전자를 타겟으로 설계된 탐침 DNA를 포함할 수 있다.

[49] 본 발명에 있어서 바이러스는 RNA 바이러스인 것일 수 있으며, 예를 들어, 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV), 인플루엔자 A 바이러스일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[50] 본 발명에 있어서 키트는 단일 분자 수준에서 분석을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[51] 본 발명의 키트는 별도로 PCR 분석 등을 수행할 필요 없이 시료로부터 바로 현미경 등을 통해 검출 대상 RNA의 검출이 가능하다.

[52] 본 발명의 또 다른 일 양태는 상기 RNA 검출용 조성물을 이용한 RNA 검출방법에 관한 것이다.

[53] 본 발명에 있어서 RNA 검출방법은 표지 DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물을 시료에 접촉시키는 접촉 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[54] 본 발명에 있어서 RNA는 바이러스 RNA, 세포 내 발현되는 miRNA, 다양한 암 특이적인 mRNA들을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[55] 본 발명에 있어서 바이러스는 RNA 바이러스인 것일 수 있으며, 예를 들어, 인간 면역 결핍 바이러스 (HIV), 인플루엔자 A 바이러스일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[56] 본 발명에 있어서 RNA 검출방법은 상기 RNA 검출용 조성물을 마이크로채널 (microchannel)에 주입하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[57] 본 발명에 있어서 마이크로채널은 하나 이상의 채널로 이루어진 시료 부착부; 상기 시료 부착부의 일 측에 연결된 입구부; 시료를 주입하기 위하여 상기 입구부에 연결된 주입부; 및 상기 시료 부착부의 다른 일 측에 연결된 출구부;를 구비하고, 상기 채널은 입구부 측의 상부 연결점으로부터 하부 연결점을 향하여 경사면을 갖고, 상기 채널 내의 하부 표면은 양전하를 띠고, 상기 하나 이상의 채널은 출구부에서 서로 연통되어 시료를 회수하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[58] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예에 따른 마이크로채널에 대하여 구체적으로 설명한다.

[59] 도 5는 본 발명의 실시예에 따른 시료 부착부가 1개 포함된 마이크로채널을 도식화한 평면도이다.

[60] 상기 도면을 참조하면, 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로채널 (1)은, 시료 부착부 (10), 입구부 (20), 주입부 (30) 및 출구부 (40)를 포함하여 구성될 수 있다.

[61] 본 발명에 있어서 시료 부착부 (10)는 적어도 1개 이상의 채널 (11)로 이루어지도록 구성될 수 있다.

[62] 본 발명에 있어서 채널이 적어도 2개 이상의 채널로 이루어지는 경우, 각각의 채널은 병렬로 연결되도록 구성된 것일 수 있다.

[63] 본 발명에 있어서 채널 (11)는 시료가 통과하기 위한 통로로, 입구부 (20)측의 상부 연결점 (12)으로부터 하부 연결점 (13)을 향하여 경사면을 가지도록 구성될

수 있다.

[64] 본 발명에 있어서 상부 연결점의 높이는 1 내지 50 um, 1 내지 40 um, 1 내지 30 um, 10 내지 50 um, 10 내지 40 um, 10 내지 30 um, 20 내지 50 um, 20 내지 40 um, 20 내지 30 um, 25 내지 50 um, 25 내지 40 um, 25 내지 30 um, 예를 들어, 27 um일 수 있다. 상기 범위에서 사용되는 경우 분자들이 시료부착부에 더 고르게 분포되는 효과가 있다.

[65] 본 발명에 있어서 채널 내의 하부 표면은 양전하를 띠도록 구성될 수 있다. 채널 내의 하부 표면이 양전하를 띰으로써, 음전하를 띠는 DNA 및/또는 RNA가 채널의 하부 표면에 부착되어 검출될 수 있다.

[66] 본 발명에 있어서 채널의 재질은 당업계에서 채널을 제조하기 위하여 이용되는 어떠한 재질도 포함할 수 있다.

[67] 본 발명에 있어서 입구부 (20)는 시료를 채널 내로 주입하기 위한 주입부가 포함되는 구성으로, 상기 시료 부착부 (10)의 일 측에 연결되도록 구성될 수 있다.

[68] 본 발명에 있어서 주입부 (30)는 시료를 주입하기 위한 구성으로, 입구부(20)에 연결되도록 구성될 수 있다.

[69] 본 발명에 있어서 출구부 (40)는 시료를 회수하기 위한 배출구로, 상기 시료 부착부의 다른 일 측에 연결되도록 구성될 수 있다. 특히, 시료 부착부가 2개 이상의 채널로 이루어진 구성에서, 각각의 채널에 연결된 각각의 출구부들은 서로 연통되어 시료를 회수할 수 있다.

[70] 본 발명에 있어서 시료는 당업계에서 단일 분자 분석이 필요한 시료라면 어떠한 시료도 포함할 수 있다. 구체적으로는, 상기 시료는 상기 표지 DNA를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[71] 본 발명에 있어서 표지 DNA는 상기 마이크로채널의 채널 내 양전하를 띠는 하부 표면에 부착될 수 있으므로, 현미경을 사용하여 부착된 표지 DNA를 촬영하여 RNA를 검출할 수 있다.

[72] 본 발명의 RNA 검출방법에 있어서 RNA 검출용 조성물과 관련된 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략한다.

발명의 효과

[73] 본 발명은 단일 DNA 분자 시각화 방법을 이용한 바이러스 및 세포 RNA 검출방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법은 검출 대상 바이러스 또는 세포 RNA 단편이 혼성화된 표지 dsDNA를 시각화함으로써, 단시간 내에 단일 DNA 분자 수준에서 바이러스 및 세포 RNA의 검출이 가능한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[74] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 합성된 환형 단일가닥 DNA (ssDNA) 탐침을 생산하고 정제한 (high purity로 표시) 결과이다.

[75] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 합성된 선형 이중가닥(dsDNA) 표지의 합성여부를 확인한 결과이다.

[76] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 M13mp18 ssDNA를 사용하여 합성된 dsDNA 를 확인한 결과이다.

[77] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 M13mp18 ssDNA를 사용하여 합성한 dsDNA와 원형 ssDNA의 형태를 비교하고 합성된 dsDNA를 선형화한 결과이다.

[78] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 채널이 1개 포함된 마이크로채널을 도식화한 평면도이다.

[79] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로채널의 모식도이다.

[80] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 채널의 입구 부분의 경사에 대한 주사 전자 현미경 (scanning electron microscope, SEM) 사진이다.

[81] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 경사 (기울기)가 없는 입구 부분을 포함하는 채널 (비교예)과 경사가 있는 입구 부분을 포함하는 채널 (실시예)을 비교한 그림이다 (Scale bar = 40 μm).

[82] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 합성된 dsDNA의 양을 시각화 대상 농도에 따라 나타낸 그림이다.

[83] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 마이크로채널을 이용하여 측정한 dsDNA 분자 개수를 시각화 대상 DNA 농도에 대하여 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[84] 검출 대상 RNA 서열이 혼성화된 환형 단일가닥 DNA를 제조하는 탐침 DNA 제조 단계; 검출 대상 RNA 서열에 상보적인 프라이머를 이용하여 환형 단일가닥 DNA로부터 환형 표지 이중가닥 DNA를 제조하는 환형 표지 이중가닥 DNA 제조 단계; 및 환형 표지 이중가닥 DNA를 절단하여 선형 표지 이중가닥 DNA를 제조하는 선형 표지 이중가닥 DNA 제조 단계;를 포함하는 표지(marker) DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물의 제조방법.

발명의 실시를 위한 형태

[85] 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.

[86]

[87] **시험물질 및 시약**

[88] λ phage DNA(48.5 kbp), M13mp18 단일가닥 (single-stranded) DNA (7.2 kb), 및 효소들은 New England Biolabs (Ipswich, MA)에서 구매하였다. DNA 프라이머는 Cosmogenetech (Seoul, Korea)에서 구매하였고, Top 폴리머라제는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 구매하였다. 50% 메탄올 내 N-trimethoxymethyl silyl propyl-N,N,N-trimethylammonium chloride는 Gelest (Morrisville, PA)에서 구매하였으며, 다른 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구매하였다. 감광성 수지인 SU-8 2015 및 SU-8 2005는 MicroChem 제품을 구입하였다.

Polydimethyl-siloxane (Sylgard 184, PDMS)의 경우 K1 Solution (Seoul, Korea)에서 구입하였다.

[89]

[90] **형광 현미경 이미지**

[91] 역방향 광학 현미경 (Olympus IX70, Japan)으로 측정하였다. 100 X 대물렌즈 (Olympus UPlanSApo oil immersion objective) 및 LED (SOLA SM IIlight engine, Lumencor, Beaverton, OR)를 사용하였고, 여기 (excitation) 및 방출(emission) 빛은 형광필터세트 (Semrock, Rochester, NY)로 통과하였다. 형광 이미지는 Prime sCMOS 카메라 (Photometrics, Tucson, AZ)를 사용하여 얻었고, Micro-manager 소프트웨어를 이용하여 16-bit TIFF 형식으로 저장하였다. 이미지 프로세싱을 위하여, ImageJ 프로그램을 사용하였다.

[92]

[93] **제조예 1. 탐침 (probe) DNA의 제조**

[94] HIV-1 유전체의 일부와 상보적인 염기 서열을 포함한 탐침 DNA 제조를 위해 파지미드를 백본 (backbone)으로 이용하였다. HIV-1 유전체를 포함하는 플라스미드 DNA의 일부를 제한 (restriction)하고, 파지미드에 f1 복제 기점의 방향을 고려하여 결찰 (ligation)하였다. 그 결과 pBluescript II SK+ (Addgene, Watertown, MA) 파지미드에 HIV-1 유전체 전체 5kb 중 2.3kb가 포함된 5.3kb의 DNA가 제작되었다. 그 다음, 제작된 HIV-1 유전체 일부를 포함하는 이중 가닥의 파지미드를 환형 단일가닥 형태로 전환하였다. 구체적으로, 형질전환을 통해 해당 파지미드를 XL1 Blue MRF'(Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 대장균 내에 도입 후, 테트라사이클린 (tetracycline, 5μg/mL)과 암피실린 (ampicillin, 60μg/mL)이 포함된 LB 플레이트에 도포하였다. 테트라사이클린 처리는 보조파지에 의해 감염될 수 있는 F-pilli를 발현하는 대장균만 선별하기 위함이고, 암피실린 저항성 유전자를 포함하는 파지미드가 정상적으로 도입된 대장균을 선별하기 위에 암피실린이 사용되었다. 15시간 정도 후 생성된 대장균 콜로니 2개를 위와 동일한 농도의 테트라사이클린 및 암피실린을 포함하는 2xYT 30mL에 넣고 37℃에서 2시간 30분 동안 쉐어커 (shaker)에서 배양한 후, 보조파지 (2.05×10^8 PFU)를 넣어주었다. 보조파지에 의해 대장균이 감염되도록 1시간 30분의 배양 이후에 카나마이신 (kanamycin, 30μg/mL)을 처리하여 감염되지 않은 대장균은 제거하고 밤새 배양을 통해 대장균 내에서 만들어지는 파지 (progeny phage) 양을 증가시켰다. 보조파지의 도움을 받아 파지미드는 환형 단일가닥 형태로 증폭되고 보조파지로부터 만들어지는 단백질에 싸여 파지 입자 형태로 미디아 상에 방출된다. 해당 대장균 배양액을 상온에서 20분동안 원심분리 (10,000g)하여 대장균과 배지를 분리한 후, 배지에 존재하는 파지들을 농축시키기 위해 25% PEG과 2.5M NaCl이 혼합된 용액을 6mL (0.2 volume) 넣고, 4℃ 냉장고에 2시간 이상 인큐베이션시켰다. 그 다음, 4℃에서 20분동안 원심분리 (12,000g)하여 상층액은 버리고 침전된 파지만 수득하였다. DNA clean

& concentrator 키트 (Zymo research, Irvine, US)를 이용해 파지로부터 환형 단일가닥 DNA를 추출하였다. 추출한 DNA는 겔 전기 영동을 통해 확인되며, 순도를 높이기 위해 단일 가닥의 파지미드 DNA band를 잘라 Zymoclean Gel RNA Recovery 키트 (Zymo research)를 이용해 정제하여, 그 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1에서 확인할 수 있듯이, 높은 순도의 환형 단일가닥 DNA(ssDNA)를 얻을 수 있었다.

[95]

[96] **제조예 2. 표지 (marker) DNA의 제조**

[97] 상기 제조예 1의 방법과 동일하게 만들어진 6 kb 크기의 HIV-1 탐침 DNA (HIV-1 유전체 중 3 kb의 상보가닥을 포함함)를 이용하여 선형의 이중가닥 DNA를 제조하였다.

[98] 먼저, 탐침 DNA에 붙어 프라이머로서 작용하는 HIV-1 RNA를 준비하였다. HIV-1에서 Quick-RNA Viral 키트 (Zymo)를 이용해 RNA를 추출하였고, 전체 35 uL 중 2 uL가 AmbionTM RNaseIII (Thermo Fisher Scientific) 0.5 uL에 의해 처리되었다. 단일 가닥을 자르기 위해 NaCl 농도를 효소와 함께 제공되는 기존 10X RNaseIII Reaction 버퍼 보다 10배 낮춘 버퍼를 만들어, 전체 부피 5 uL에 0.5 uL 넣어주었다. 이렇게 RNaseIII에 의해 조각난 바이러스 유래 RNA 용액 5uL는 탐침 DNA 125ng, M-MuLV Reverse transcriptase 0.3uL, 10x reaction buffer 2uL, 10x DTT 2uL, dNTP (10mM) 1uL, RNase Inhibitor, Murine (NEB) 0.2uL 와 함께 전체 20uL 용액으로 만들어, 42℃에서 1시간 동안 역전사 반응을 수행하였다. 합성되어 만들어진 DNA는 환형 이중가닥 형태이므로 단일 분자 이미징을 위해 특정 위치 한 곳만 자르는 제한 효소 EcoRI (NEB) 0.5 uL를 처리하여 선형으로 만들었다. 도 2에서 확인할 수 있듯이, 현미경으로 관찰할 수 있는 선형 이중가닥 DNA(dsDNA)가 합성되었음을 확인하였다.

[99] 같은 방식으로 환형 M13mp18 ssDNA에 기반하여 선형 dsDNA를 합성하고, 하기 실험에서 단일 분자 검출 시스템 성능 분석에 적용하였다.

[100]

[101] **실험예 1. M13mp18 모델을 이용한 성능 확인**

[102] **1-1. 선형 이중가닥 DNA (Double-stranded DNA, dsDNA)의 생성**

[103] 표 1의 M13mp18 표적 올리고머 4 fmol 용액과 이를 2배씩 희석한 2 fmol, 1 fmol 및 0.5 fmol의 올리고머 용액을 준비하였다. 그 다음, 상기 각각의 올리고머 (4 fmol, 2 fmol, 1 fmol 및 0.5 fmol) 용액 1 uL에 원형의 M13mp18 ssDNA (5 amoL) 1uL, 10x Top 폴리머라제 버퍼 2uL, 10uM dNTPs 1.5uL, Top 폴리머라제(Bioneer) 0.5uL 및 증류수 14 uL를 넣고, 95℃에서 6분, 60℃에서 6분, 72℃에서 15분 동안 이중가닥 DNA 생성 효소 반응을 진행하였다. 반응이 끝난 각각의 용액 15uL에 3.1 NEB 버퍼 2uL, PstI0.5uL 및 증류수 2.5uL를 넣고, 37℃에서 15분 동안 제한효소 반응, 80℃에서 20분 동안 제한효소 불활성화 반응을 수행하여 선형의 dsDNA를 제조하였다.

[104] [표1]

서열번호	명명	서열목록 (5' -> 3')	비고
1	M13mp18 targeting oligomer	GGAAACCGAGGAAACGCAATAATA ACGGAATACCC	

[105] **1-2. dsDNA의 생성여부 확인**

[106] 원형의 M13mp18 ssDNA (5 amol) 15uL와 상기 제조한 M13mp18 dsDNA (5 amol)에 각각 3.1 NEB 버퍼 2uL, PstI0.5uL 및 증류수 2.5uL를 넣고, 37℃에서 15분, 80℃에서 20분 동안 제한효소 반응과 제한효소 불활성화 반응을 수행하여 single-cut 선형 dsDNA가 생성되는지 확인하였다. 또한, 원형의 M13mp18 ssDNA (5 amol) 15 uL와 상기 제조한 M13mp18 dsDNA (5 amol)에 각각 3.1 NEB 버퍼 2 uL, PstI0.5uL, BglII 0.5 uL 및 증류수 2 uL를 넣고, 37℃에서 15분, 80℃에서 20분 동안 반응시켜 double-cut 선형 dsDNA가 생성되는지 확인하였다. 제조한 DNA를 모두 0.7 % 아가로오즈젤에서 30분 전기 영동하여, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[107] 도 3에서 확인할 수 있듯이, 폴리머라제 반응 후 (dsDNA double cut)에만 예상된 크기의 조각이 나온 것으로부터 M13mp18 dsDNA로 생성을 확인하였다.

[108]

[109] **1-3. ssDNA 탐침 및 합성된 dsDNA 표지의 형태 확인**

[110] M13mp18 ssDNA와 상기에서 제조한 선형 M13mp18 dsDNA를 20배 희석하고, 50 nM YOYO-1 (0.5 % BME) 와 1:1 로 섞고, 양전하 표면 위에 도포 후 현미경으로 관찰하여, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[111] 도 4에서 확인할 수 있듯이, ssDNA일 때는 점의 형태인 DNA가 dsDNA로의 변화 및 제한효소에 의한 선형화 후에는 선의 형태로 관찰되었다.

[112] 상기 내용을 종합해보면, 본 발명의 탐침 DNA를 이용하는 경우 장시간의 유전자 증폭 없이도 단일 분자 수준의 이미징 만으로 다양한 바이러스 및 세포 RNA를 검출할 수 있을 것으로 기대된다.

[113]

[114] **제조예 3. 마이크로채널 (Microchannel)의 제조**

[115] **3-1. 기울기 (경사)가 있는 채널 입구의 제조**

[116] 실리콘 웨이퍼 (silicon wafer) 상에 음성 감광액 (Negative photoresist)인 SU-8 2015를 얹고, 스핀 코터 (spin coater)에서 1,500 rpm, 90초 회전하였다. 잘 코팅된 웨이퍼를 핫플레이트 (hot plate) 위에서 95℃, 5분간 소프트 베이크 (soft bake)하였다. 그리고 마스크 얼라이너 (mask aligner)에 첫번째 패턴을 고정하였다. 마스크 및 웨이퍼의 위치를 잘 맞추고 40초간 UV (350-450 nm)에 노출시켰다. 노출이 끝난 후 핫플레이트에서 95℃, 6분간 익스포져 베이크 (exposure bake)를 하고, SU-8 디벨로퍼 (developer)에 7분간 담갔다. 아이소프로필 알코올로 깨끗하게 세척하고 증류수로 세척하여 첫번째 패턴을 새겼다. 두번째

패턴을 새기기 위하여, 공기 압축기로 물기를 제거하고 물기를 제거한 실리콘 웨이퍼 상에 또 다른 음성 감광액인 SU-8 2005를 얹었다. 스핀 코터에서 4000rpm, 30초 회전하였다. 잘 코팅된 웨이퍼를 핫플레이트 위에서 95℃, 3분간 소프트 베이크한 후, 마스크 얼라이너에 두번째 패턴을 고정하였다. 마스크 및 웨이퍼의 위치를 잘 맞추고 30초간 UV (350-450 nm)를 노출시켰다. 노출이 끝난 후 핫플레이트에서 95℃, 3분간 익스포져 베이크를 하고, SU-8 디벨로퍼에 7분간 담갔다. 아이소프로필 알코올로 깨끗하게 세척하고 증류수로로 세척하였다. 공기 압축기로 물기를 제거하고 핫플레이트 위에서 150℃, 1시간 동안 올려놓고 하드 베이크 (hard bake)하여 마이크로채널의 입구 부분의 경사를 제조하였다. 상기 입구 부분의 경사에 대한 주사 전자 현미경 (SEM) 사진은 도 7에 나타내었다.

[117]

[118] **3-2. 채널(Channel)의 제조**

[119] SYLGARD®184 실리콘 엘라스토머 베이스 30g 및 SYLGARD®184 실리콘 엘라스토머 경화제 3g을 넣어 섞고, 상기에서 제조한 2종류의 패턴을 오버레이(overlay)한 웨이퍼 상에 부은 후, 65℃ 오븐에 밤새 넣어두어 채널을 제조하였다. 제조된 채널은 공기 플라즈마 생성기 (Femto Science Cute Basic, Korea)에서 100W, 30초 동안 처리하여 표면이 친수성 (hydrophilic)화되도록 하였다. 친수성화 된 채널은 물에 보관하였고, 사용 전에 대기 건조하여 물기를 제거해주었다. 물기가 제거된 채널에 2mm 구멍을 뚫어서 시료 주입부로 사용하였다.

[120]

[121] **3-3. 양전하 표면의 제조**

[122] 22 x 22 mm 커버글라스를 테플론 랙 (Teflon rack)에 끼우고 테플론 테이프로 고정하였다. 글라스가 들어있는 테플론 랙을 비커에 넣고, 후드 안에서 3시간 동안 피라냐 용액 (H_2SO_4:H_2O_2=7:3)으로 반응시켰다. 반응이 끝난 피라냐 용액은 버리고 증류수로 pH 7이 될 때까지 세척한 후, 소니케이터 (sonicator)에서 30분 동안 세척하였다. 폴리프로필렌 보틀 (bottle)에 증류수 250mL 및 N-Trimethoxysilylpropyl-N,N,N-trimethylammonium chloride (SIT8415.0, Gelest) 350uL를 넣은 후, 세척한 커버글라스를 끼운 테플론 랙을 넣고 진탕 배양기(shaking incubator)에서 반응 (65℃, 100rpm, 12시간 이상)시켰다. 반응이 끝난 표면을 99% 에탄올로 3회 세척하고 에탄올에 보관하였다.

[123]

[124] **비교예. 경사 없는 채널 입구를 포함하는 마이크로채널의 제조**

[125] 상기 제조예 3-1 단계를 제외하고, 상기 제조예 3과 동일한 방법을 이용하여, 기울기 (경사)가 없는 채널 입구를 포함하는 마이크로채널을 제조하였다.

[126]

[127] **실험예 2. 마이크로채널의 입구 각도에 따른 시료 검출 효과 비교**

[128] λ DNA (NEB)를 10 pg/ul로 희석한 후, 50 nM YOYO-1 (5 % BME)과 1:1로 섞어 2 ul를 상기 마이크로채널 주입부에 흘려주었다. 상기 현미경으로 관찰하여, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[129] 도 8에서 확인할 수 있듯이, 비교예 (위쪽)는 입구 부분에 DNA가 뭉쳐서 구별하기가 어려웠으나, 실시예 (아래쪽)는 입구 부분에 DNA가 뭉치지 않고 넓게 퍼져있기 때문에 단일 DNA 분자를 구분/측정하기 수월함을 확인하였다.

[130]

[131] **실험예 3. 시각화 대상 유전자의 농도에 따른 정량성 확인**

[132] 시각화 대상 DNA의 용액 농도를 78 fmol/uL부터 2배씩 희석하여 각각 39 fmol/uL, 19.5 fmol/uL, 9.75 fmol/uL 및 4.875 fmol/uL의 DNA 용액을 제조하였다 (M13mp18 ssDNA 농도는 78 fmol/uL로 고정). 그 다음, 50 nM YOYO-1 (5 % BME)과 1:1 로 섞어 2 ul 를 상기 마이크로채널 주입부에 흘려주었다. 상기 현미경으로 관찰하였다. 현미경으로 좁은 채널을 모두 측정하고 Image J에서 분석하였다. Image J에서 연동하는 JAVA Plugins 중 'Mol Length'를 이용하여 DNA 길이 정보를 얻고 분석하여, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[133] 도 9에서 확인할 수 있듯이, 시각화 대상 DNA의 농도가 증가함에 따라 반응 전에는 나타나지 않던 밴드가 나타나고 점점 진해지는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는, 시각화 대상 DNA의 농도에 따라 생성되는 dsDNA의 양이 증가하는 것을 의미한다.

[134] 다음으로, λDNA 용액을 16 fg/uL, 8 fg/uL, 4 fg/uL, 2 fg/uL, 1 fg/uL, 0.5 fg/uL 농도로 희석하였다. 그 다음, 50 nM YOYO-1 (5 % BME) 와 1:1 로 섞어 2 ul 를 상기 마이크로채널 주입부에 흘려주었다. 상기 현미경으로 관찰하였다. 현미경으로 좁은 채널을 모두 측정하고 Image J에서 분석하였다. Image J에서 연동하는 JAVA Plugins 중 'Mol Length'를 이용하여 DNA 길이 정보를 얻고 분석하여, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[135] 도 10에서 확인할 수 있듯이, 0.5 fmol/uL 농도에서도 시각화 대상 유전자를 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[136] [부호의 설명]

[137] 1: 마이크로채널 10: 시료 부착부

[138] 11: 채널 12: 상부 연결점

[139] 13: 하부 연결점 20: 입구부

[140] 30: 주입부 40: 출구부

산업상 이용가능성

[141] 본 발명은 단일 DNA 분자 시각화 방법을 이용한 RNA 검출방법에 관한 것이다.

청구범위

[청구항 1] 다음의 단계를 포함하는 표지(marker) DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물의 제조방법:
검출 대상 RNA 서열이 혼성화된 환형 단일가닥 DNA를 제조하는 탐침 DNA 제조 단계;
검출 대상 RNA 서열에 상보적인 프라이머를 이용하여 환형 단일가닥 DNA로부터 환형 표지 이중가닥 DNA를 제조하는 환형 표지 이중가닥 DNA 제조 단계; 및
환형 표지 이중가닥 DNA를 절단하여 선형 표지 이중가닥 DNA를 제조하는 선형 표지 이중가닥 DNA 제조 단계.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 탐침 DNA 제조 단계는,
검출 대상 RNA 서열을 파지미드 (phagemid)에 삽입하여 재조합 파지미드를 제조하는 재조합 파지미드 제조 단계;
재조합 파지미드를 보조파지 (helper phage)와 함께 대장균 내에 도입하여 배양하는 배양 단계; 및
배양 결과물로부터 환형 단일가닥 DNA를 추출하는 추출 단계;
를 포함하는 것인, 표지 DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물의 제조방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 검출 대상 RNA는 바이러스 유래 또는 세포 유래인것인, 표지 DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물의 제조방법.

[청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 바이러스는 RNA 바이러스인 것인, 표지 DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물의 제조방법.

[청구항 5] 표지 (marker) DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물.

[청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 표지 DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물은 제1항의 제조방법에 의해 제조된 것인, RNA 검출용 조성물.

[청구항 7] 표지 (marker) DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물을 포함하는 RNA 검출용 키트.

[청구항 8] 표지 (marker) DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물을 시료에 접촉시키는 단계를 포함하는 RNA 검출방법.

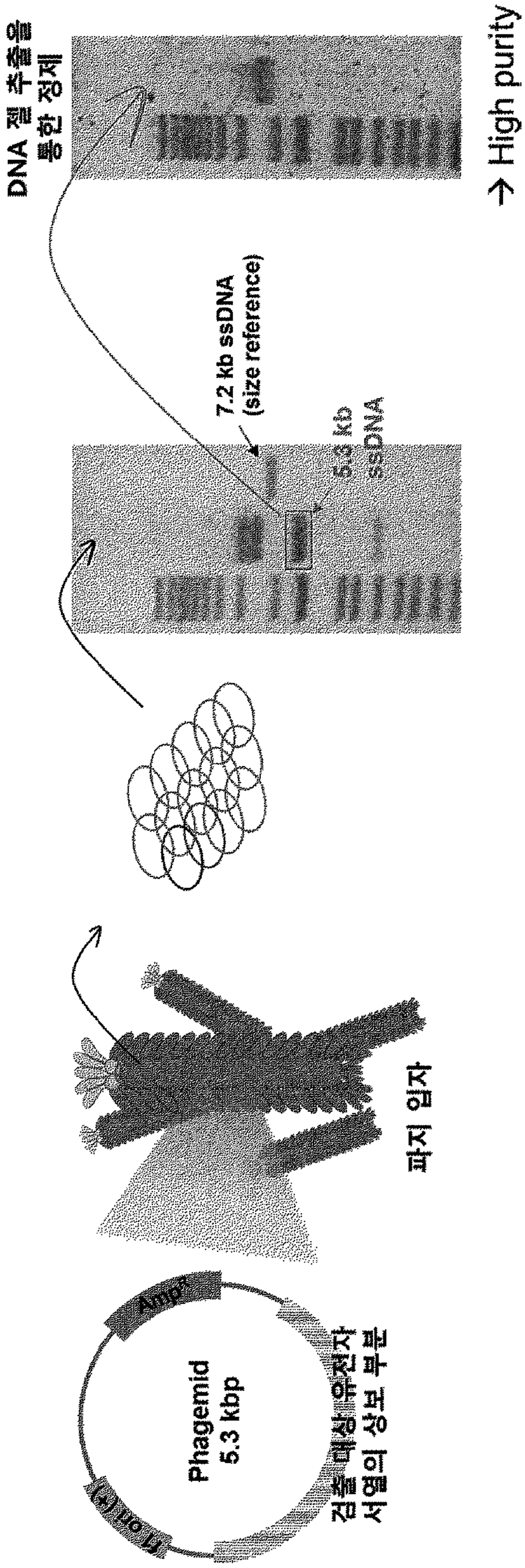
[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 RNA 검출방법은 표지 DNA를 포함하는 RNA 검출용 조성물을 마이크로채널 (microchannel)에 주입하는 단계를 포함하는 것인, RNA 검출방법.

[청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 마이크로채널은,
적어도 1개 이상의 채널로 이루어진 시료 부착부;
시료 부착부의 일 측에 연결된 입구부;
시료를 주입하기 위하여 상기 입구부에 연결된 주입부; 및
상기 시료 부착부의 다른 일 측에 연결된 출구부를 구비하고,

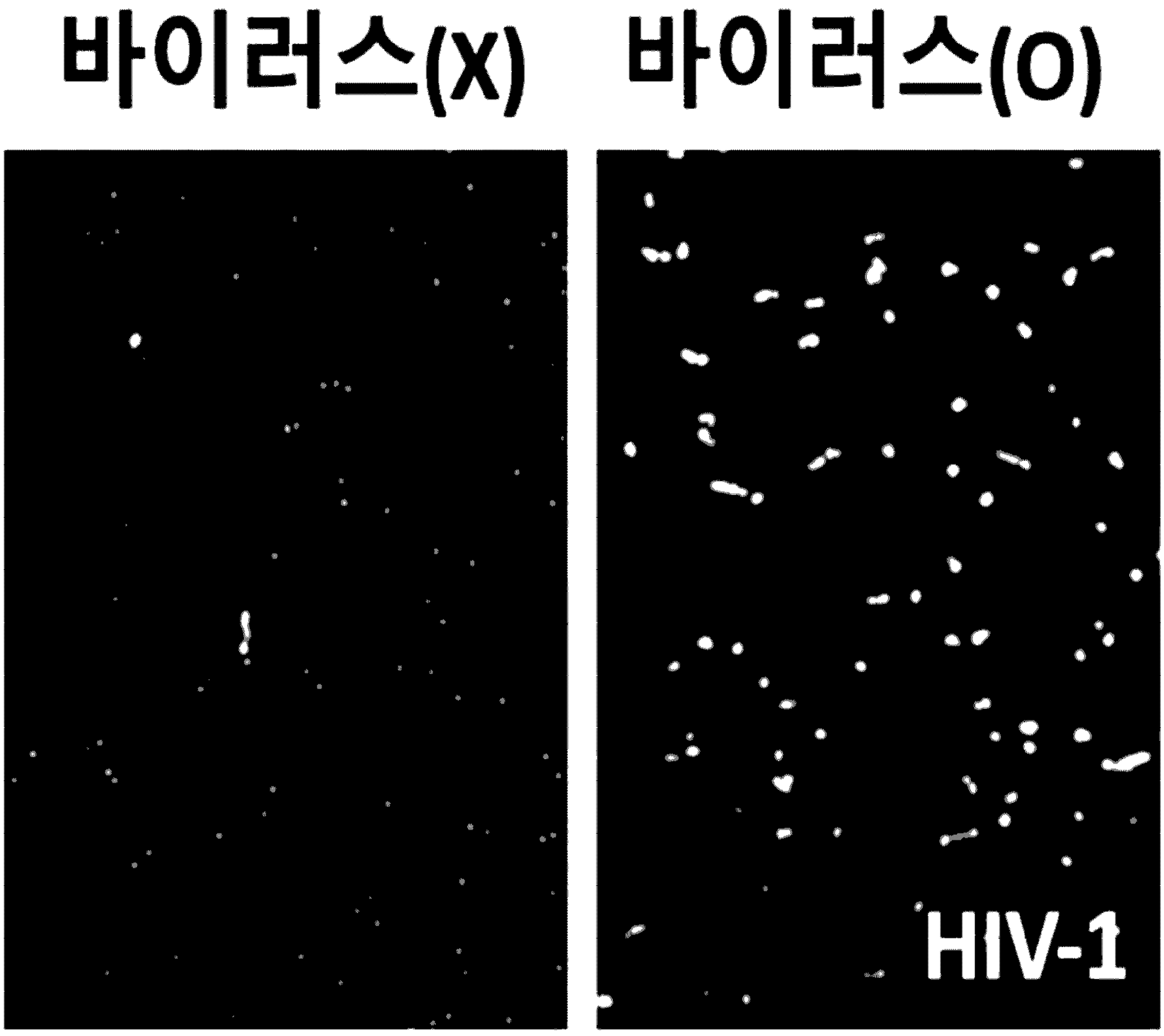
상기 채널은 입구부 측의 상부 연결점으로부터 하부 연결점을 향하여 경사면을 갖고,
상기 채널 내의 하부 표면은 양전하를 띠고,
상기 하나 이상의 채널은 출구부에서 서로 연통되어 시료를 회수하는 것을 특징으로 하는, 방법.

[청구항 11] 제9항에 있어서, 상기 채널의 상부 연결점의 높이는 1 내지 50 um인, 방법.

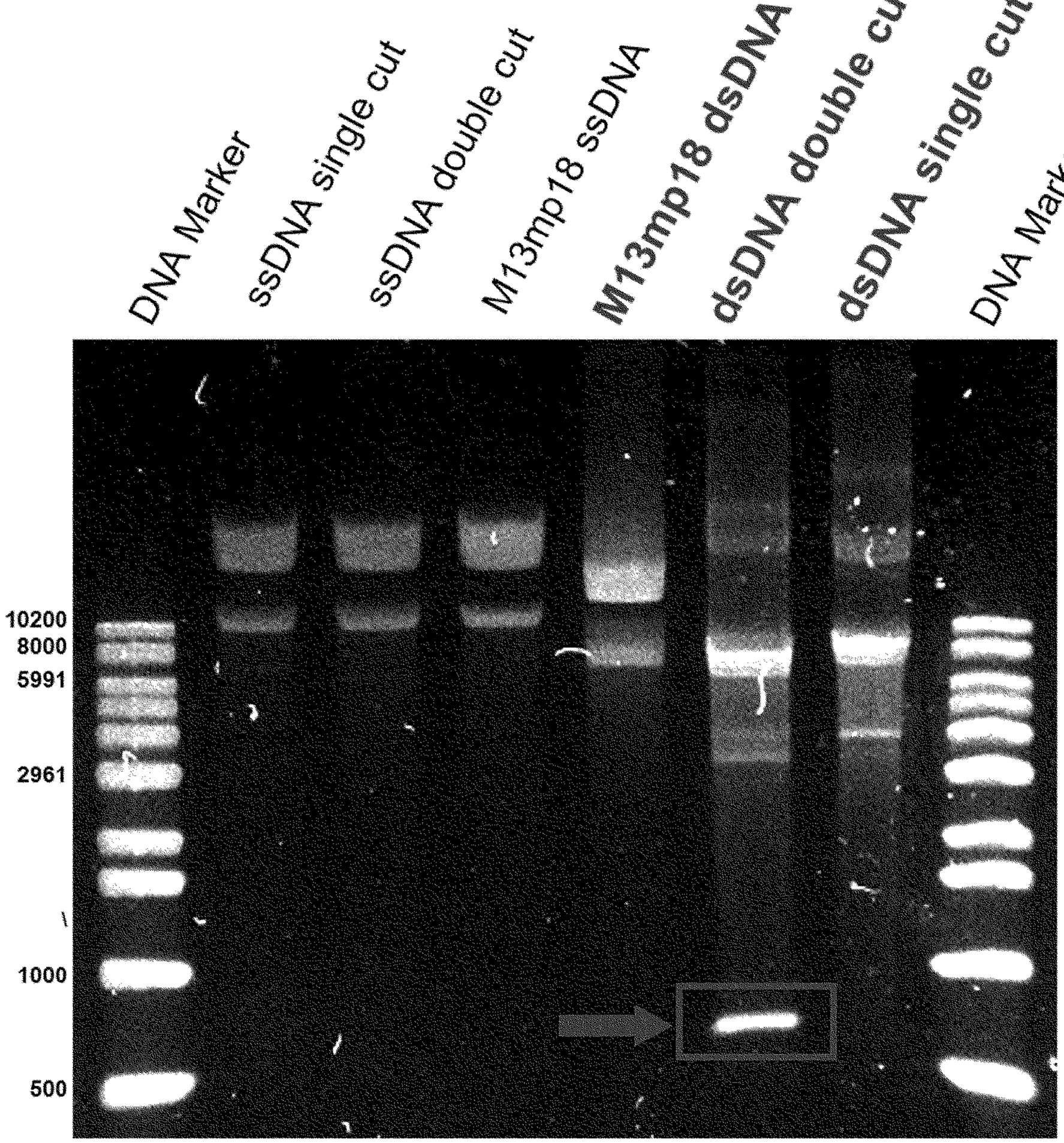
[도1]


DNA 젤 추출을 통한 정제
→ High purity
7.2 kb ssDNA (size reference)
5.3 kb ssDNA
파지 입자
Amp^R
Phagemid 5.3 kbp
f1 ori
ori
박테리아 내 플라스미드 복제
성형이 상보 DNA 합성

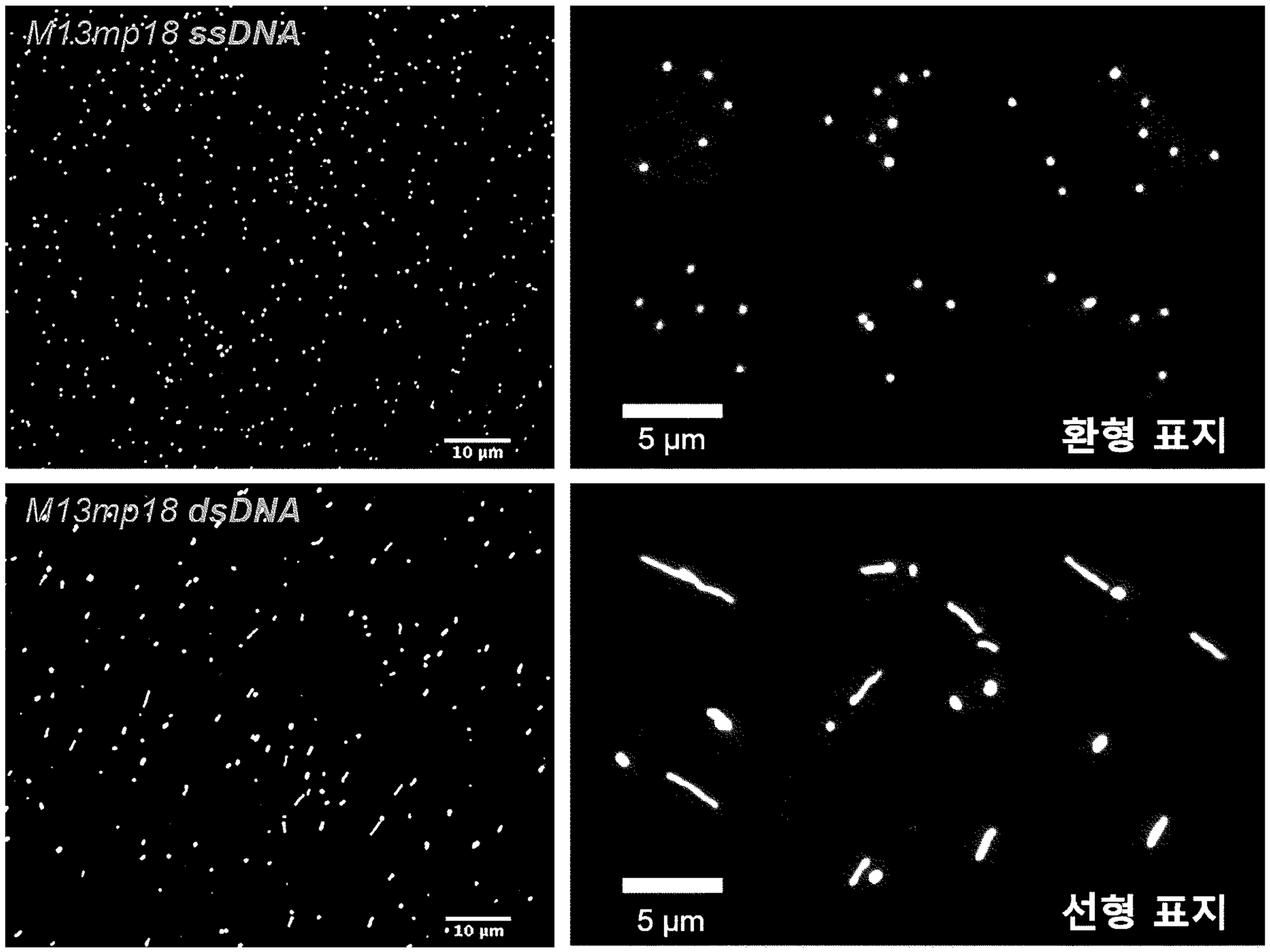
[도2]



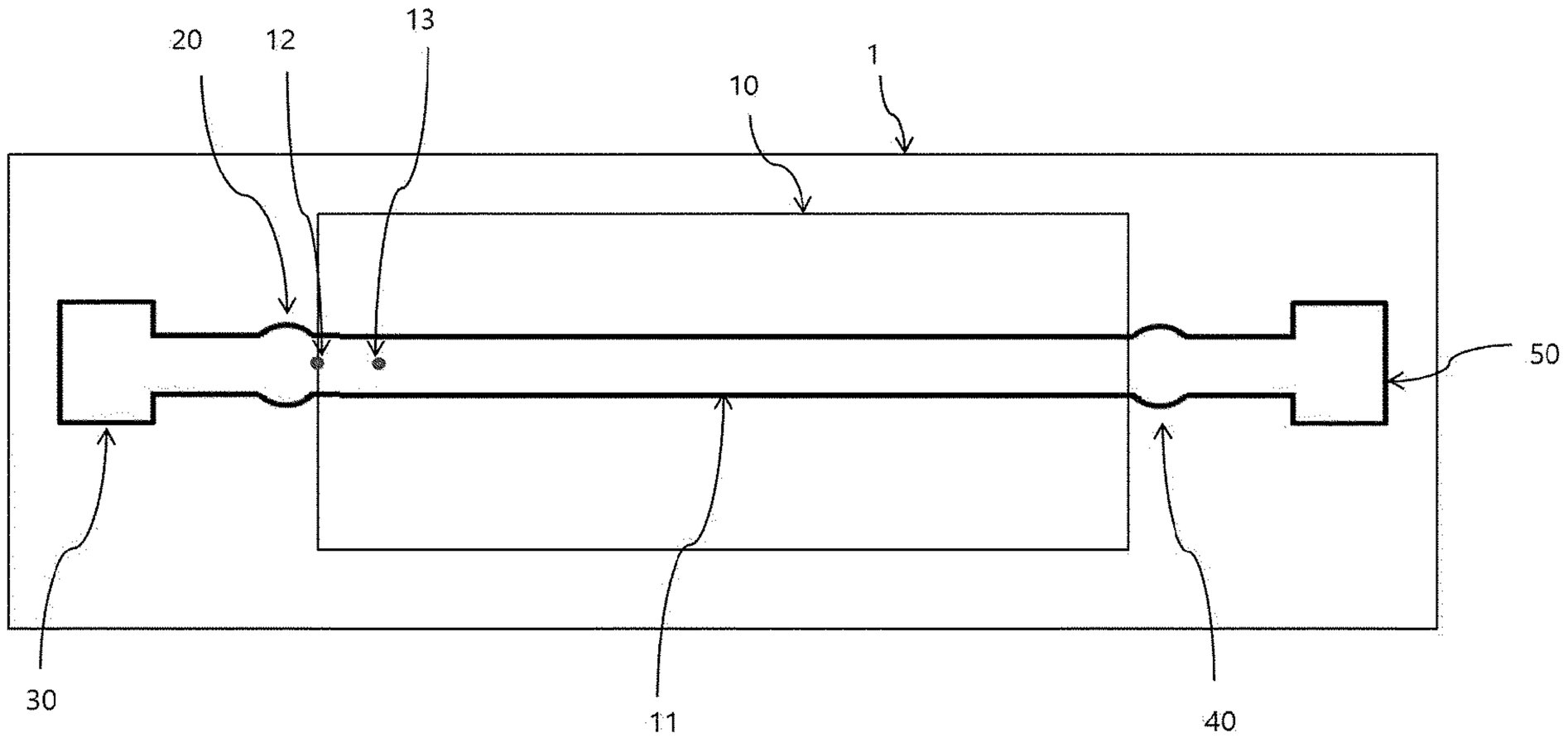
[도3]


DNA Marker
ssDNA single cut
ssDNA double cut
M13mp18 ssDNA
M13mp18 dsDNA
dsDNA double cut
dsDNA single cut
DNA Marker
10200
8000
5991
2961
1000
500

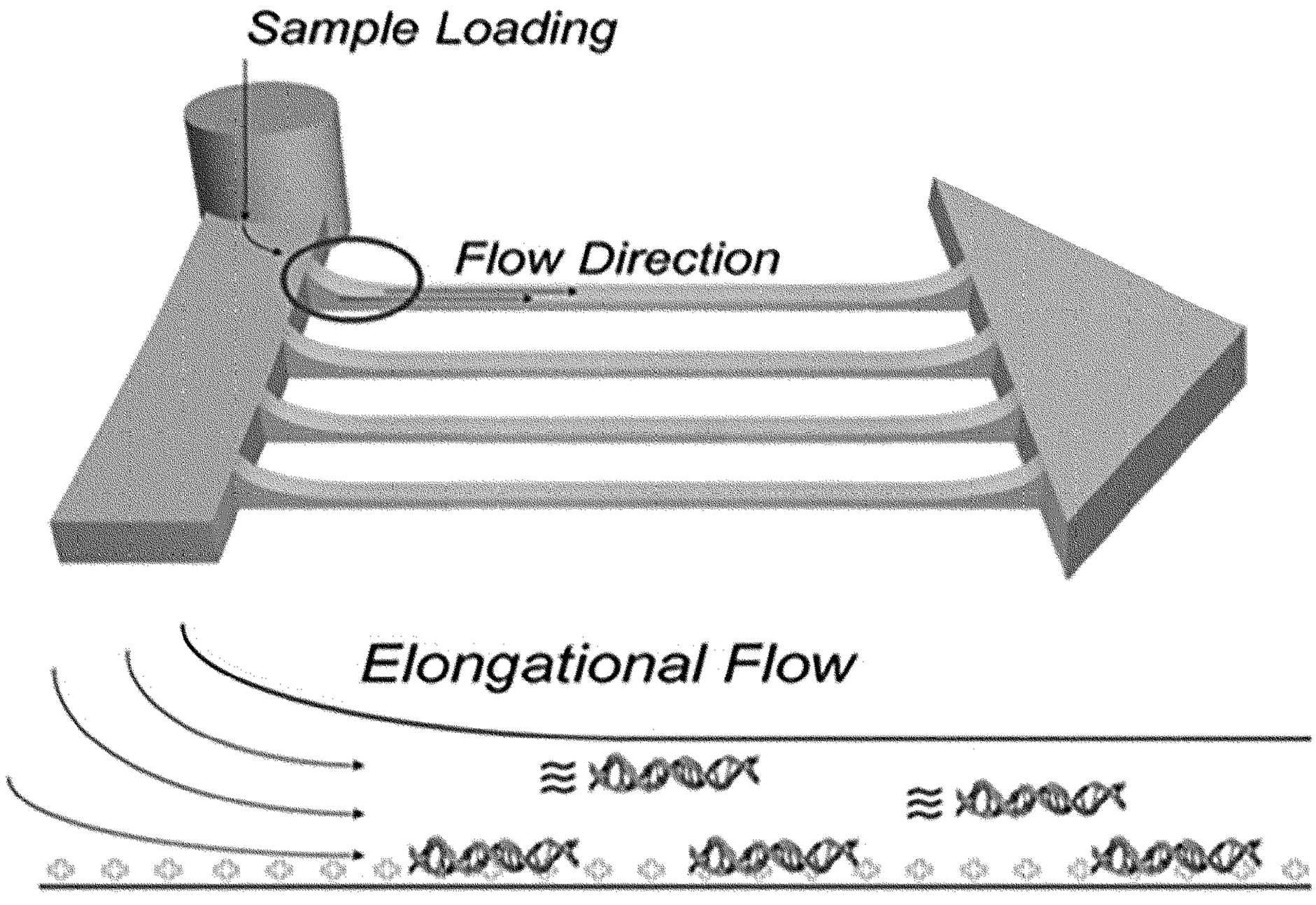
[도4]


M13mp18 ssDNA
10 μm
5 μm
환형 표지
M13mp18 dsDNA
10 μm
5 μm
선형 표지

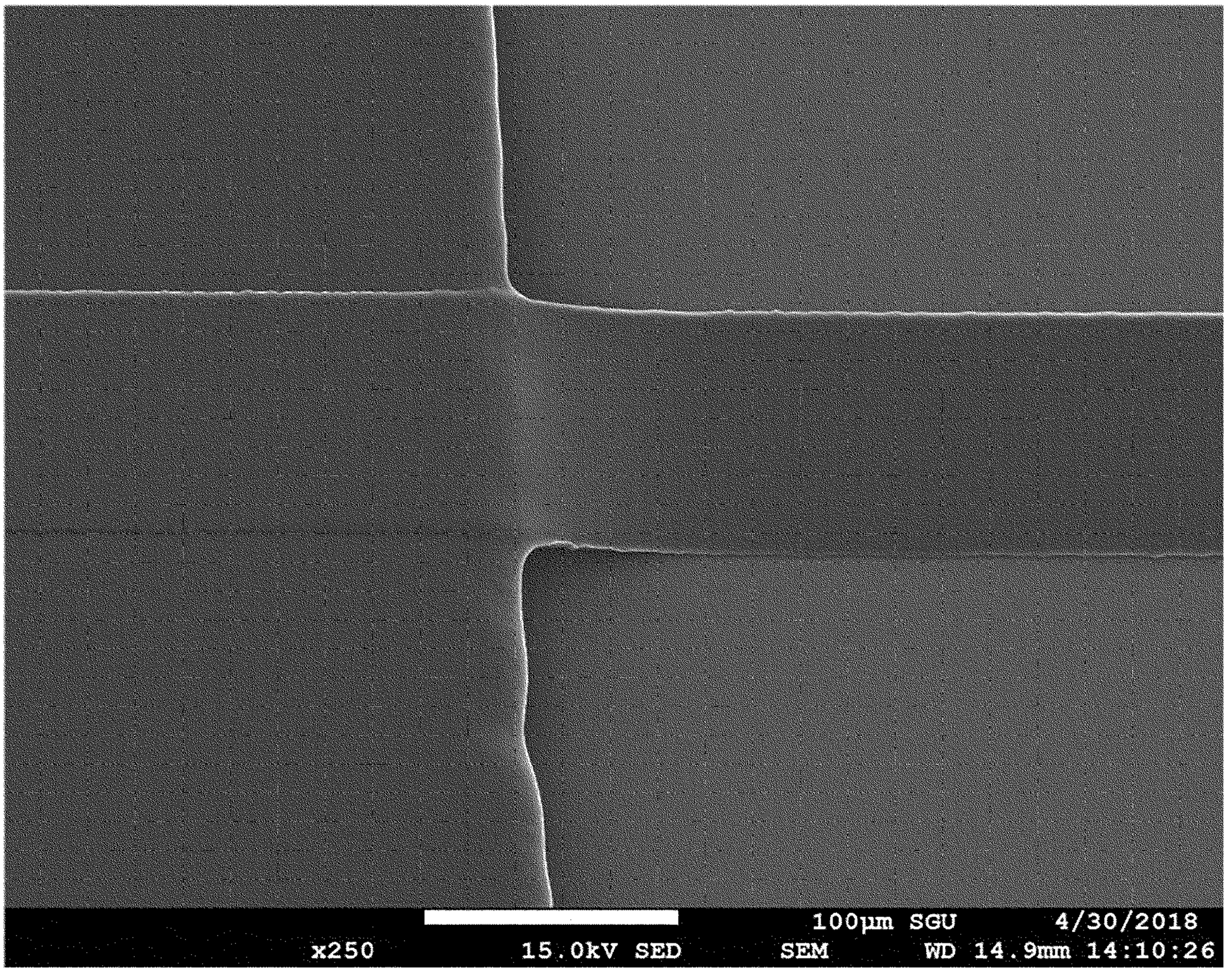
[도5]


20
12
13
10
1
50
30
11
40

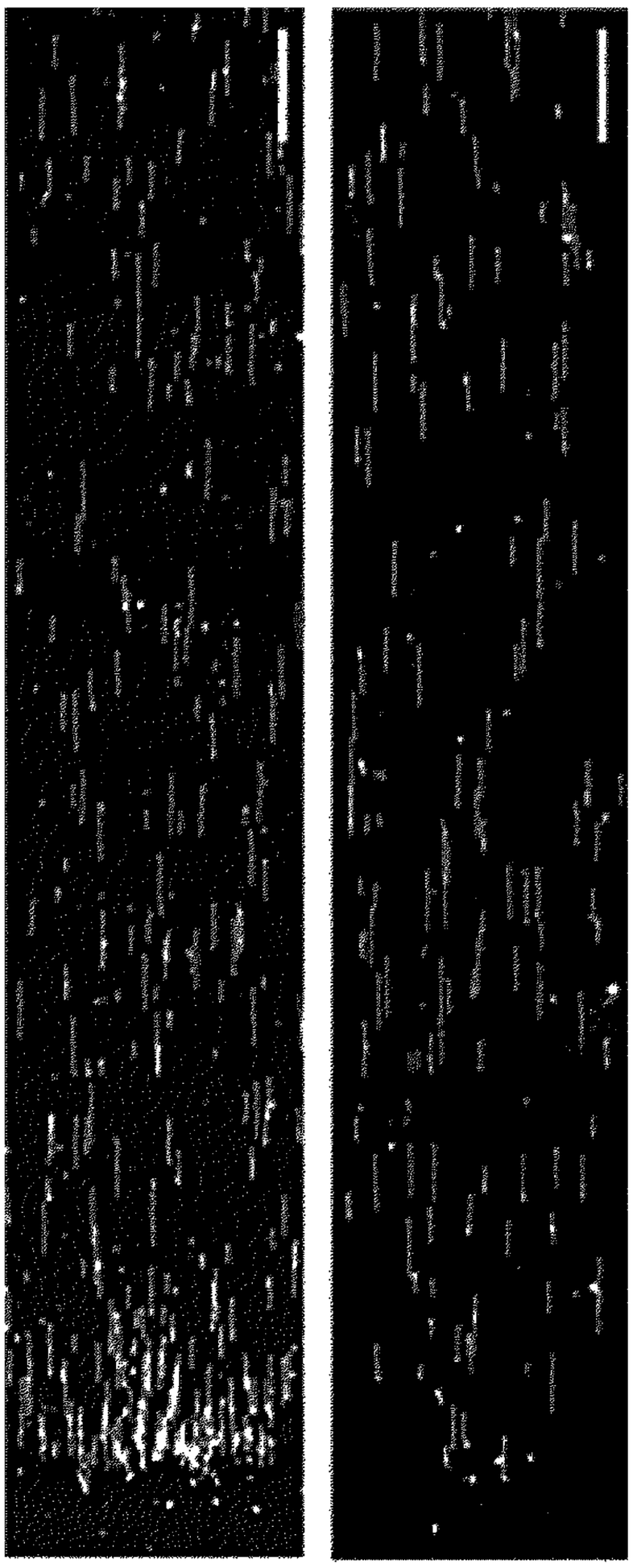
[도6]

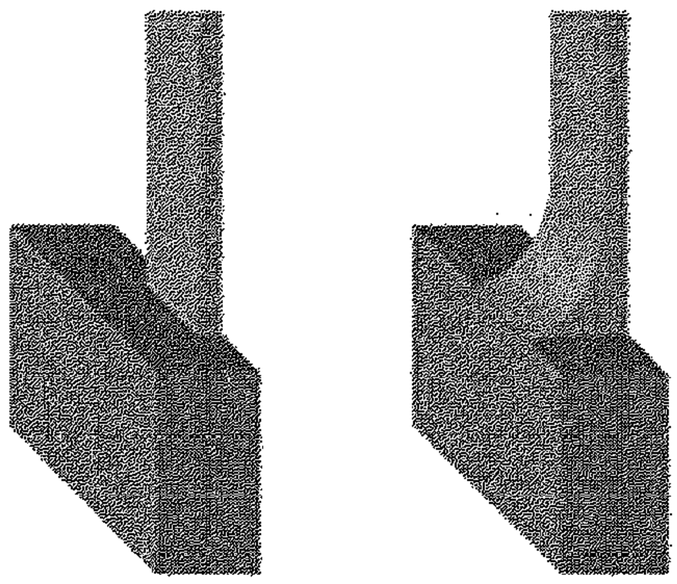

Sample Loading
Flow Direction
Elongational Flow

[도7]

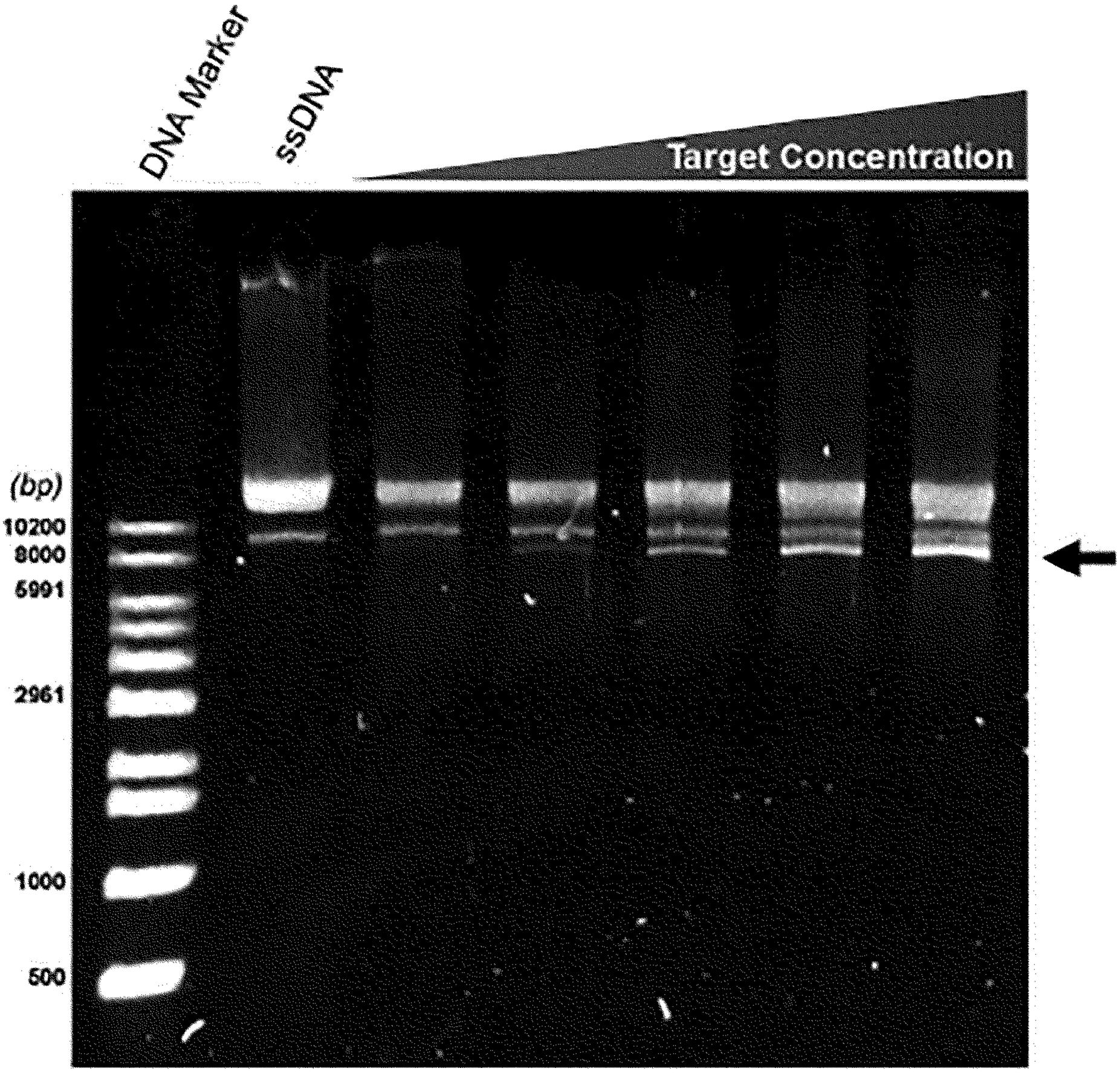

100µm SGU 4/30/2018
x250 15.0kV SED SEM WD 14.9mm 14:10:26

[도8]

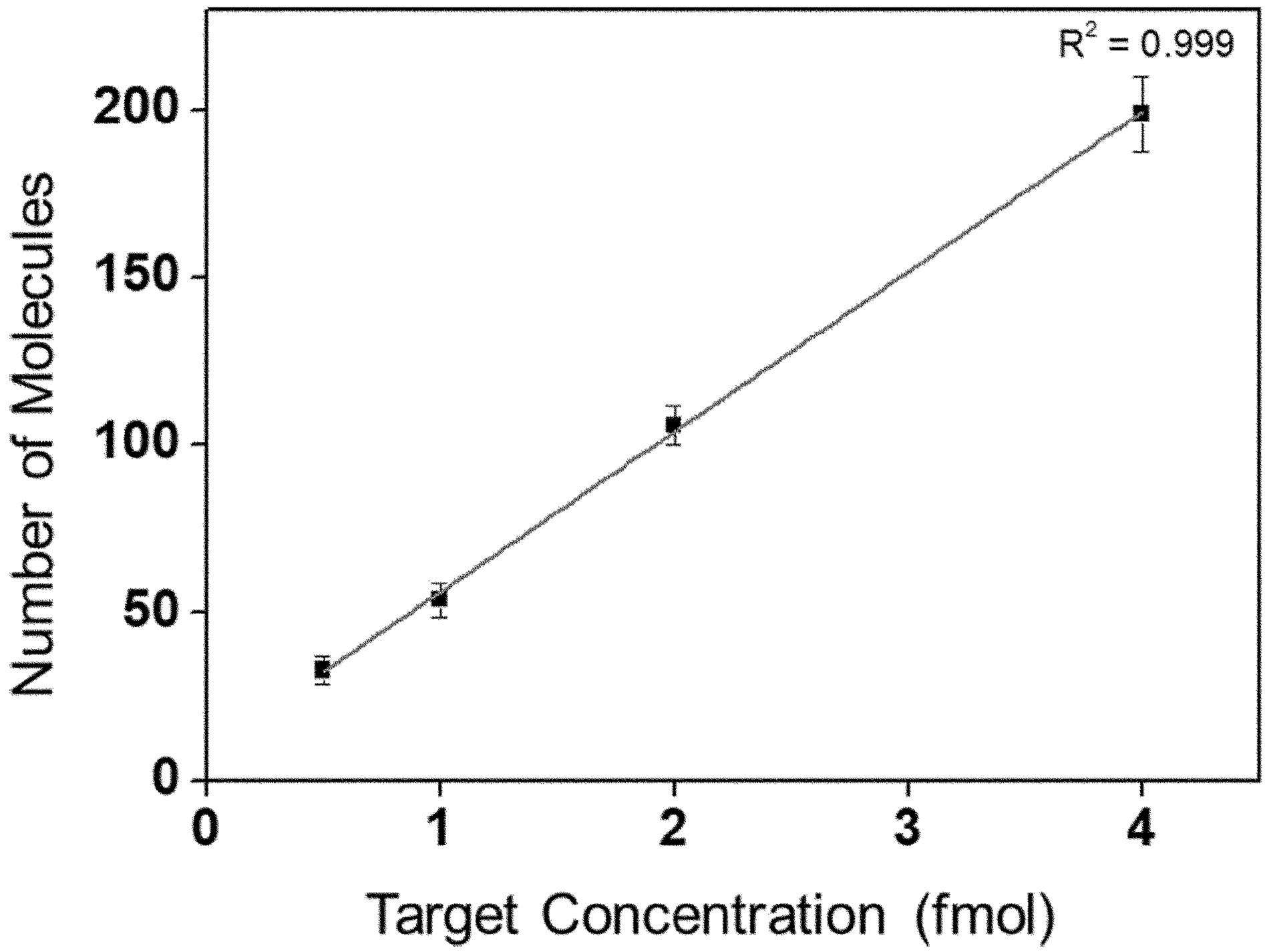




[도9]


DNA Marker
ssDNA
Target Concentration
(bp)
10200
8000
6991
2961
1000
500

[도10]


R² = 0.999
200
150
100
50
0
Number of Molecules
0
1
2
3
4
Target Concentration (fmol)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/000103

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6813(2018.01)i; **B01L 3/00**(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/6813(2018.01); C12Q 1/04(2006.01); C12Q 1/48(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); C12Q 1/6816(2018.01); C12Q 1/6876(2018.01); G01N 33/53(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 환형 단일가닥 DNA(circular single strand DNA), 탐침(probe), 혼성화(hybridization), 환형 이중가닥 DNA(circular doble strand DNA), 절단(cleavage), 표지 DNA(marker DNA), RNA 검출(RNA detection), 키트(kit), 마이크로채널(microchannel)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2018-183065 A (HIROSHIMA UNIVERSITY) 22 November 2018 (2018-11-22) See claims 1 and 10, and paragraphs [0034], [0041] and [0044].	5,7-11
A		1-4,6
A	KR 10-2004-0011602 A (WELGENE INC.) 11 February 2004 (2004-02-11) See entire document.	1-11
A	JP 2012-080871 A (NATIONAL AGRICULTURE & FOOD RESEARCH ORGANIZATION) 26 April 2012 (2012-04-26) See entire document.	1-11
A	JP 2019-201581 A (TOSOH CORPORATION) 28 November 2019 (2019-11-28) See entire document.	1-11

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 April 2021	**20 April 2021**
Name and mailing address of the ISA/KR **Korean Intellectual Property Office** **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208** Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/000103

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GUAN, Z. et al. Label-free and sensitive fluorescent detection of sequence-specific single-strand dna based on s1 nuclease cleavage effects. PLOS ONE. October 2014, vol. 9, no. 10, thesis no. e108401 (pp. 1-6). See entire document.	1-11
A	JP 2003-035709 A (FUJI PHOTO FILM CO. LTD.) 07 February 2003 (2003-02-07) See entire document.	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2021/000103

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2021/000103

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2018-183065 A	22 November 2018	None	
KR 10-2004-0011602 A	11 February 2004	CN 1678758 A	05 October 2005
		EP 1543167 A2	22 June 2005
		JP 2006-503558 A	02 February 2006
		KR 10-0468317 B1	27 January 2005
		US 2004-0038280 A1	26 February 2004
		US 7297520 B2	20 November 2007
		WO 2004-013277 A2	12 February 2004
		WO 2004-013277 A3	03 June 2004
JP 2012-080871 A	26 April 2012	None	
JP 2019-201581 A	28 November 2019	None	
JP 2003-035709 A	07 February 2003	None	

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호

PCT/KR2021/000103

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/6813(2018.01)i; **B01L 3/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/6813(2018.01); C12Q 1/04(2006.01); C12Q 1/48(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); C12Q 1/6816(2018.01); C12Q 1/6876(2018.01); G01N 33/53(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 환형 단일가닥 DNA(circular single strand DNA), 탐침(probe), 혼성화(hybridization), 환형 이중가닥 DNA(circular doble strand DNA), 절단(cleavage), 표지 DNA(marker DNA), RNA 검출(RNA detection), 키트(kit), 마이크로채널(microchannel)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JP 2018-183065 A (HIROSHIMA UNIVERSITY) 2018.11.22 청구항 1, 10, 단락 [0034], [0041], [0044]	5,7-11
A		1-4,6
A	KR 10-2004-0011602 A (주식회사 웰진) 2004.02.11 전체 문헌	1-11
A	JP 2012-080871 A (NATIONAL AGRICULTURE & FOOD RESEARCH ORGANIZATION) 2012.04.26 전체 문헌	1-11
A	JP 2019-201581 A (TOSOH CORPORATION) 2019.11.28 전체 문헌	1-11
A	GUAN, Z. 등, "Label-free and sensitive fluorescent detection of sequence-specific single-strand dna based on s1 nuclease clavage effects", PLOS ONE, 2014.10, 제9권, 제10호, 논문번호 : e108401 (페이지 1-6) 전체 문헌	1-11

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2021년04월20일(20.04.2021)	**2021년04월20일(20.04.2021)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

정다원

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2021/000103

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	JP 2003-035709 A (FUJI PHOTO FILM CO. LTD.) 2003.02.07 전체 문헌	1-11

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2021/000103

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2018-183065 A	2018/11/22	없음	
KR 10-2004-0011602 A	2004/02/11	CN 1678758 A	2005/10/05
		EP 1543167 A2	2005/06/22
		JP 2006-503558 A	2006/02/02
		KR 10-0468317 B1	2005/01/27
		US 2004-0038280 A1	2004/02/26
		US 7297520 B2	2007/11/20
		WO 2004-013277 A2	2004/02/12
		WO 2004-013277 A3	2004/06/03
JP 2012-080871 A	2012/04/26	없음	
JP 2019-201581 A	2019/11/28	없음	
JP 2003-035709 A	2003/02/07	없음	