(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0027255
(43) 공개일자 2018년03월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6846 (2013.01)
C12Q 2521/101 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0114621
(22) 출원일자 2016년09월06일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
이혁진
서울특별시 마포구 백범로 205, 104동 504호 (신공덕동, 마포펜트라우스)
최보람
경기도 오산시 운암로 122, 105동 1401호 (부산동, 운암주공1단지아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 17 항

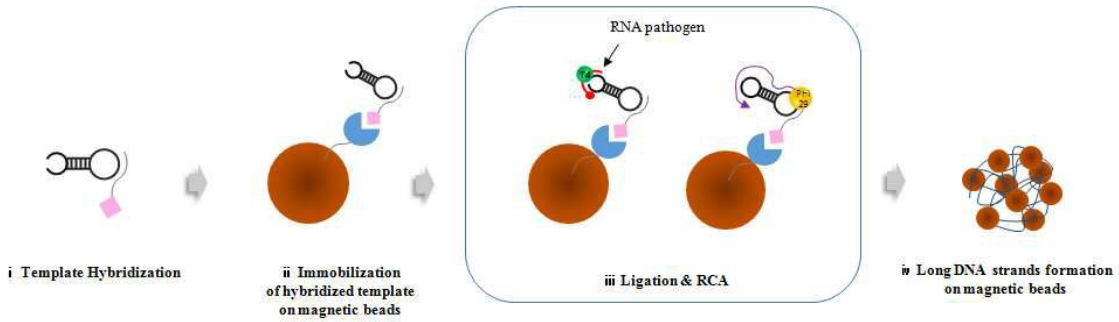
(54) 발명의 명칭 **회전환 증폭 기반 분자 진단 방법**

(57) 요 약

본 발명은 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, 이의 제조방법, 이를 이용한 표적 유전자 검출용 조성물, 키트 및 이를 이용한 표적 유전자 검출 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 빠르고 간편하게 유전자를 검출하여 바이러스, 세균성 감염, 암과 같은 질환을 저렴한 가격으로 빠르게 진단할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2525/204 (2013.01)
C12Q 2531/125 (2013.01)
C12Q 2563/149 (2013.01)
(72) 발명자
김지수
제주특별자치도 제주시 문송길 37-2, 101호 (연동, 명덕주택)
정일영
세종특별자치시 나리로 38, 705동 2202호 (한솔동, 첫마을아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015R1A1A1A05027352
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업(학술진흥)
연구과제명 핵산자기조립을 통한 새로운 페러다임의 표적 지향성 침묵 유전자 전달체 개발
기 여 율 30/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2015.09.01 ~ 2018.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012K1A1A2A01056092
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 국제협력사업
연구과제명 삼차원 DNA 구조체 기반 고효율 SiRNA 전달체 기술개발
기 여 율 35/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2012.12.01 ~ 2017.11.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014M3C1A3054153
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 나노 DNA 구조체 기반 분자물질 전달기술 개발 및 생체 내 거동 평가 연구
기 여 율 35/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2014.09.15 ~ 2020.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 DNA 템플레이트;

비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 프로브로 상기 템플레이트에 상보적으로 혼성하는 프로브; 및

상기 표지자와 결합하는 결합제를 포함하는 비드;를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위는 5 내지 50 mer 길이를 가지는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 표적 유전자는 동물, 식물, 세균, 바이러스 및 진균으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 어느 하나에 존재하거나 이로부터 유래된 것인 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위는 5 내지 50 mer 길이를 가지는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드.

청구항 5

제1항에 있어서, 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위는 총 10 내지 80 mer 길이를 가지는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 비드의 결합제에 결합되는 표지자는 비오틴인 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 표지자와 결합하는 결합제는 스트렙타비딘, 아비딘, 뉴트라비딘, 캡타비딘 및 폴리스트렙타비딘으로 구성된 그룹으로부터 선택되는 어느 하나인 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드.

청구항 8

(a) 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 DNA 템플레이트를 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 프로브와 혼성화 하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계에서 프로브와 혼성화된 템플레이트를 표지자와 결합하는 결합제를 포함하는 비드에 고정화하는 단계를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드의 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용

비드, DNA 중합효소, 반응 완충용액 및 데옥시뉴클레오티드(dNTPs)를 포함하는 표적 유전자 검출용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 DNA 중합효소는 phi29 DNA 중합효소인 포함하는 표적 유전자 검출용 조성물.

청구항 11

제9항에 따른 표적 유전자 검출용 조성물을 포함하는 표적 유전자 검출용 키트.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 표적 유전자 검출용 키트는 모세관 튜브 형태를 가지는 것인 표적 유전자 검출용 키트.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 표적 유전자 검출용 키트는 상기 모세관 튜브에 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, DNA 중합효소, 반응 완충용액 및 데옥시뉴클레오티드(dNTPs)가 포함되는 것인 표적 유전자 검출용 키트.

청구항 14

(a) 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 DNA 템플레이트; 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 상기 DNA 템플레이트에 상보적으로 혼성하는 프로브; 및 상기 표지자와 결합하는 결합제를 포함하는 비드;를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, DNA 중합효소, 반응 완충용액 및 데옥시뉴클레오티드(dNTPs)를 포함하는 표적 유전자 검출용 조성물과 시료를 반응시키는 단계; 및

(b) 상기 시료와의 반응에 따라 회전환 증폭을 수행하여 유전자 증폭을 확인하는 단계;를 포함하는 표적 유전자 검출 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 (b) 단계의 유전자 증폭을 확인하는 단계는 육안으로 수행되는 것인 표적 유전자 검출 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 (a) 단계의 표적 유전자 검출용 조성물과 시료를 반응시키는 단계는 모세관 튜브에서 수행되는 것인 표적 유전자 검출 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 회전환 증폭을 수행하여 유전자 증폭을 확인하는 단계는 시료의 부피 변화, 점도 변화, 비드의 뭉침 정도 변화 및 비드의 침강 정도 변화로부터 선택되는 어느 하나 이상의 확인을 통해 표적 유전자의 존재 유무를 판단하는 것인 표적 유전자 검출 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, 이의 제조방법, 이를 이용한 표적 유전자 검출용 조성물, 키트 및 이를 이용한 표적 유전자 검출 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 지금까지 유전자를 검출하는 기술은 PCR 방법을 기초로 하는 방법들이 주로 보고되어 왔다. PCR 공정은 변성(denaturation), 결합(annealing), 신장(elongation)으로 이루어지는 3 단계를 거치게 된다. 첫 번째 단계인 변성 단계에서는 두 가닥의 DNA가 가열되어서 분리된다. 분리된 각각의 DNA는 주형(template)으로서 역할을 하

게 된다. 두 번째 단계인 결합 단계에서는 프라이머(primer)들이 주형 DNA에 결합을 하게 된다. 결합 단계에서의 온도는 반응의 정확성을 결정하는 중요한 요소인데 만약 온도를 너무 높게 하면 시발체가 주형 DNA에 너무 약하게 결합되어서 증폭된 DNA의 산물이 매우 적어진다. 또 만약 온도를 너무 낮게 하면 시발체가 비특이적으로 결합하기 때문에 원하지 않는 DNA가 증폭될 수 있다. 세 번째 단계인 신장 단계에서는 열에 강한 DNA 중합 효소가 주형 DNA에서 새로운 DNA를 만들게 된다. 일반적으로 PCR 공정의 대상이 되는 DNA나 RNA와 같은 물질(이하, '표적 물질'이라 함)은 표적 물질을 포함하는 시료에 대한 전처리를 통해 분리, 정제된다. 일반적으로 시료에 대한 전처리는 시료를 실리카 비드와 같은 포획 수단으로 흘려서 표적 물질을 포획 수단에 흡착시키고, 포획 수단으로 세척버퍼액을 흘려서 표적 물질을 제외한 성분을 포획 수단으로부터 제거한 후, 용리 버퍼액을 포획 수단으로 흘려서 포획 수단에 흡착된 표적 물질을 분리함으로써 이루어지고 있다.

[0003] 위와 같은 PCR 기반 시스템은 위 살핀 바와 같이 여러 단계의 반응이 필요하고 다양한 온도 조건 설정 및 유지가 필요하기 때문에 개발도상국 등의 제한된 리소스를 가진 환경에서 사용이 어려운 문제점이 있다. 즉, 값비싼 비용이 필요하고 잘 교육된 분석가에 의한 실험이 필요하기 때문에 PCR을 이용한 분석에는 제한 사항이 많이 있다. 또한 이를 대체하기 위해 ELISA와 같은 기술들이 사용될 수 있으나 긴 분석 과정과 제한된 항원 검출에 있어서 PCR과 유사한 단점을 가진다.

[0004] 이러한 배경 하에 증진된 감도 및 산업적 적용가능성을 가진 새로운 진단 플랫폼에 대한 연구 개발이 이루어지고 있다. 예를 들어, 최근에는 회전환 증폭 (Rolling circle amplification; 이하 RCA라고도 함)이 다양한 연구 분야에서 이용되고 있다. 회전환 증폭은 단일가닥 환형 DNA를 주형으로 하고, 여기에 상보적인 프라이머를 사용하여 등온에서 중합반응을 수행하여, 주형 DNA가 연속적으로 합성되도록 하는 것이다. 등온, 상온 조건에서 프로브와 annealing 후 무한 회전 증폭을 하게 되며 일차 함수 스케일로 증폭하기 때문에, 번거로운 thermal cycling 및 값비싼 장비가 필요한 PCR의 단점을 극복할 수 있다는 장점이 있다. 그런데 회전환 증폭을 비롯하여 등온 과정으로 수행되는 다양한 신규 분석 방법들은 비용 절감 및 대중이 사용할 수 있는 상업적 기기로의 개발 측면에서 여전히 많은 연구 개발이 필요한 실정이다.

[0005] 더욱이, 질병에 초기 대처 및 질병의 진행, 확산을 막기 위해서는 질병을 일으키는 인자에 대한 감염 여부를 신속하고 정확하게 진단하는 것이 필요하다. 감염 후 증상이 나타나기 전에 질환을 진단할 수 있다면 질환의 진행을 효과적으로 예방하여 큰 피해를 막을 수 있다. 이에 따라, 검출 비용과 시간을 절감하면서도 간편하고 정확하게 표적 유전자를 육안으로도 확인할 수 있는 새로운 방법의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개공보 제2016-0034305호

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 이혁진 등, Advanved Materials. Volume.27, Issue.23, 3513-3517 (2015. 6. 17.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 DNA 템플레이트;

[0009] 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 상기 DNA 템플레이트에 상보적으로 혼성하는 프로브; 및

[0010] 상기 표지자와 결합하는 결합제를 포함하는 비드;를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한 상기 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드의 제조방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한 상기 표적 유전자 검출용 비드, DNA 중합효소, 반응 완충용액 및 dNTPs를 포함하는 표적 유전자 검출용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, DNA 중합효소, 반응 완충용액 및 dNTPs를 포함하는 표적 유전자 검출용 조성물을 포함하는 표적 유전자 검출용 키트를 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한 상기 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 이용하는 표적 유전자 검출 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, 이의 제조 방법, 이를 포함하는 조성물, 키트 및 이들을 이용한 검출 방법을 제공한다. 이하에서는 각각의 발명에 대하여 상세히 살펴본다.

[0016] 본 발명에서 용어 "템플레이트"란 덤벨 형태의 한쪽 원형 부위에 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위(D), 반대쪽 원형 부위에 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위(P)를 가지며 가운데 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위(S)를 가지는 덤벨 형태를 가지는 뉴클레오티드를 지칭한다.

[0017] 본 발명에서 용어 "표적 유전자"는 공지 또는 추정 유전자 산물을 코딩하는 임의의 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 표적 유전자는 동물, 식물, 세균, 바이러스,진균 등으로부터 유래되는 유전자, 또는 유전 질환에 수반되는 돌연변이된 유전자 등일 수 있다. 본 발명에서 표적 유전자는 예컨대 핵산 서열 또는 분자는 단일 또는 이중 가닥일 수 있고 센스 또는 안티센스 가닥을 나타낼 수 있는 DNA 또는 RNA일 수 있다. 따라서 핵산 서열은 dsDNA, ssDNA, 혼합 ssDNA, 혼합 dsDNA, ssDNA(예컨대, 융해, 변성, 헬리케이즈 등에 의해)로 만들어진 dsDNA, A-, B-, 또는 Z-DNA, 삼중-가닥 DNA, RNA, ssRNA, dsRNA, 섞인 ssRNA 및 dsRNA, ssRNA(예컨대, 융해, 변성, 헬리케이즈 등을 통해)로 만들어진 dsRNA, 메신저 RNA(mRNA), 리보솜 RNA(rRNA), 전달 RNA(tRNA), 촉매 RNA, snRNA, 마이크로RNA, 또는 단백질 핵산(PNA)일 수 있다.

[0018] 본 발명에서 용어 "상보적으로 결합하는 결합 부위" 또는 "상보적인 결합 부위"는 뉴클레오드 서열 간에 상보적 염기 쌍을 형성할 수 있는 부위를 지칭한다.

[0019] 본 발명에서 용어 "비드(Bead)"는 구형의 기재를 가진 물질로 나노입자, 마이크로입자, 나노비드 또는 마이크로비드를 포함한다. 비드는 2 μm 내지 7 μm의 직경을 가질 수 있으며, 구체적으로 상기 입자 또는 비드의 직경은 4 μm 내지 5 μm이다. 비드는 수지 비드, 자기 비드, 금속 미립자 등을 포함한다.

[0020] 본 발명에서 용어 "프로브"는 뉴클레오드 서열과 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수십 개 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미한다. 표지자와 결합되어 있을 수 있으며, 어떤 서열의 프로브라도 템플레이트 내 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위에 결합 가능하다면 모두 본원 발명의 범주에 포함된다.

[0021] 본 발명에서 용어 "표지자"는 프로브와 유전자 산물과의 교잡을 방해하지 않고 유전자 표지, 바람직하게 비드에 결합하기 위한 결합제와 쌍을 이루기 위해 사용할 수 있는 것이라면 한정되지 않고 당업계에 공지된 다양한 물질을 사용할 수 있다.

[0022] 본 발명에서 용어 "결합제"는 유전자 산물과의 교잡을 방해하지 않고 표지자를 인지하여 결합하는 물질로 바람직하게 비드에 결합이 용이하고 표지자와 높은 결합능을 가지는 것이라면 한정되지 않고 당업계에 공지된 다양한 물질을 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명에서 용어 "회전환 증폭"이란 단일가닥 환형 DNA를 주형으로 하고, 여기에 상보적인 프로브를 사용하여 등온에서 중합반응을 수행하여, 주형 DNA가 연속적으로 합성되도록 하는 것을 지칭한다.

[0024] 본 발명에서 용어 "시료"란 조직, 세포, 혈액, 혈청 또는 혈장과 같은 시료 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명에서 용어 "검출", "탐지" 또는 "진단"이란 표적 유전자의 유무, 이에 따른 병리 상태의 존재 또는 특징에 대한 확인을 지칭한다.

[0026] 본 발명은 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는

결합 부위 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 DNA 템플레이트;

[0027] 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 상기 DNA 템플레이트에 상보적으로 혼성하는 프로브; 및

[0028] 상기 표지자와 결합하는 결합제를 포함하는 비드;를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 제공한다.

[0029] 본 발명에 따른 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드는 표적 유전자 존재 시 회전환 증폭이 진행되면서 DNA hydrogel을 형성하여 hydrophilic한 성질을 통해 물 분자를 포획하여 건조되지 않는 특성을 가진다. 이러한 특성을 이용하여 예컨대 육안으로 부피 변화의 확인, DNA 가닥의 응집 확인, 염색이나 형광에 의한 색깔 변화 확인, 점도 변화 확인, 비드의 뭉침 정도 변화 확인, 비드의 침강정도 변화 확인으로 표적 유전자의 빠른 검출이 가능하다.

[0030] 이러한 본 발명에 따른 표적 유전자의 빠른 검출에 대해서는 도 1에 모식도로 나타내었다. 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드는 템플레이트와 프로브의 혼성화 후 비드에 고정시켜 제조된다. 이러한 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드는 표적 유전자 존재 시 라이게이션과 동시에 회전환 증폭이 수행되면서 긴 DNA 가닥을 형성하면서 엉김으로써 hydrogel을 형성하게 된다.

[0031] 본 발명에 따른 덤벨 형태의 템플레이트의 모식도는 도 2에 나타내었다. 본 발명에 따르면, 상기 템플레이트는 표적 유전자, 예컨대 동물, 식물, 바이러스, 세균, 병원균로부터 유래되는 유전자의 길이, 유전 질환에 수반되는 돌연변이된 유전자의 길이, 프라이머의 길이 등을 고려하여 다양하게 길이와 서열을 디자인할 수 있다. 예를 들어, 상기 템플레이트의 길이는 40 내지 160 머(mer)일 수 있다. 상기 템플레이트의 길이가 너무 짧으면 템플레이트 자체가 불안정해지며 너무 길면 RCA 효율이 감소 할 수 있다.

[0032] 본 발명에 따른 상기 템플레이트는 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위(D)를 포함한다. 위 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위는 템플레이트의 양 말단에 분리되어 형성된다. 예를 들어, 템플레이트는 5 내지 50 mer, 바람직하게 15 ~ 25 mer 길이의 결합부위를 포함할 수 있다. 본 발명의 검출하고자 하는 표적 유전자는 동물, 식물, 세균, 바이러스, 진균 등에 존재하거나 이로부터 유래되는 것으로 바람직하게는 mRNA, dsDNA, 및 cDNA 를 포함한 유전자 물질, 유전 질환에 수반되는 돌연변이된 유전자에 존재하거나 이로부터 유래되는 것일 수 있다.

[0033] 상기 검출하고자 하는 표적 유전자는 예를 들어 병원균 유전자일 수 있다. 상기 표적 유전자로는 핵산 서열을 아는 모든 병원균을 대상으로 할 수 있다. 예컨대, 상기 병원균은 조류독감, 지카 바이러스, 대장균, 사스(SARS), 용혈성 요독 증후군(hemolytic uremic syndrome) 및 혈변(bloddy diarrhea)(*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*), 출혈열(*Ebola* virus), 메르스 코로나 바이러스(MERS-Cov virus), 폐렴상구균, 장내구균, 포도상구균, 열대열원충, 및 결핵 또는 말라리아 박테리아와 같은 항생제 저항을 가지는 균주로 구성된 그룹으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 상기 템플레이트는 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위(P)를 포함한다. 위 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위는 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위 사이에 형성된다. 예를 들어, 템플레이트는 5 내지 50 mer, 바람직하게는 10 ~ 25 mer 길이의 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위를 포함할 수 있다. 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위는 표적 유전자 검출을 방해하지 않고 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 프로브와 상보적으로 결합할 수 있는 것이라면 어떠한 것이라도 사용가능하다.

[0035] 본 발명에 따른 상기 템플레이트는 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위(S)를 포함한다. 위 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위는 덤벨 형태 양 말단 즉 원형 형태를 가지는 한쪽 말단의 템플레이트는 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위와 반대 쪽 말단의 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위를 포함할 수 있도록 서열 내에서 상보적 결합을 통해 덤벨 형태를 형성한다. 예를 들어, 템플레이트는 총 40 내지 160 mer 길이를 가지며, 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위 (S) 는 총 10 내지 80 mer 길이를 가지며, 바람직하게는 덤벨 형태를 형성하기 위한 15~40 mer 길이의 상보적인 결합 부위(자기조립 결합부위)를 포함할 수 있다.

[0036] 하기 표 1은 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 DNA 템플레이트의 서열을 예시적으로 나타낸다(굵은 글씨: 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 연한 회색 바탕: 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위, 진한 회색 바탕: 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위).

[0037] [표 1]

병원균 종류	서열번호	템플레이트 서열 (5' → 3')	서열번호	병원균의 표적 유전자 서열
ZIKA virus	1	5'-phosphate- **CGC CAT CTG GAC TGC** CGA CAA GAC GTG CAG CCC GTA CCT CAC TTA GCA TGC TAG TAT CGA TCC ACC TTA TTC ACG GGC TGC ACG TCT TGT CGG **GTC CAC** -3' (진한 글씨: 서열번호 9, 연한 회색 바탕 : 서열번호 10 및 11, 진한 회색 바탕: 서열번호 12)	5	5'- CA GUC CAG AUG GCG GUG GAC -phosphate-3'
E.coli Ampicillin resistant	2	5'-phosphate- **AAT ACT CAT** GCT TAT GGT TCC TGC TGA GCG TTC ACC CTT AGC ATG CTA GTA TCG ACG TCT TTA TCC TCG CTC AGC AGG AAC CAT AAG CCG **GAA ATG TTG** -3' (진한 글씨: 서열번호 13, 연한 회색 바탕 : 서열번호 14 및 15, 진한 회색 바탕: 서열번호 16)	6	5'- AUG AGU AUU CAA CAU UUC CG - phosphate-3'
MERS-CoV	3	5'-phosphate- **AGG GCA CAT CTC CGA** ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG AGT ACT TCG ATT **ATA CCC** -3' (진한 글씨: 서열번호 17, 연한 회색 바탕 : 서열번호 18 및 19, 진한 회색 바탕: 서열번호 20)	7	5'- CGG AGA UGU GCC CUG GGU AU - phosphate-3'
Ebola	4	5'-phosphate- **GA CGC ACG CG** A ATC GAA GTA CTC AGC GTA AGT TTA GAG GTA GCA TGC TAG TAT CGA CGT ACG TAC CAA CTT ACG CTG A GT ACT TCG ATT **AAC GAG AAA TCG CAC** -3' (진한 글씨: 서열번호 21, 연한 회색 바탕 : 서열번호 22 및 23, 진한 회색 바탕: 서열번호 24)	8	5'- CGC GUG CGU CGU GCG AUU UCU CGU U - phosphate-3'

[0038]

[0039] 본 발명에 따른 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드는 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 상기 DNA 템플레이트에 상보적으로 혼성하는 프로브를 포함한다.

[0040] 위 프로브 서열은 템플레이트의 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 에 결합하고 표적 유전자 검출에 방해가 되지 않는 서열이라면 어떠한 서열이라도 사용가능하다. 예를 들어, 본 발명의 일실시예에 따르면 서열번호 25의 서열을 사용한다.

[0041] 상기 표지자 및 비드의 결합제는 한 쌍의 상이하고 상보적인 분자들로, 예를 들어 표지자로 바람직하게 비오틴을 사용할 수 있으며, 결합제, 바람직하게 비드 표면에 결합하는 결합제로 스트렙타비딘, 아비딘, 뉴트라비딘, 캡타비딘, 폴리스트렙타비딘 또는 비오틴과 결합가능한 임의의 다른 단백질을 사용할 수 있다.

[0042] 본 발명에 따른 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드는 상기 표지자와 결합하는 결합제를 포함하는 비드를 포함한다.

[0043] 상기 비드는 표적 유전자 존재에 따라 회전환 증폭이 진행될 때 DNA 가닥의 엉김을 도울 수도 있다. 이에 따라 DNA hydrogel 형성을 도움으로써 육안상 부피 변화, RCA 반응에 따른 응집 여부 또는 형광 변화 확인 등에 도움을 줄 수 있다. 상기 비드는 표지자와 결합하는 결합제가 비드 표면에 결합되어 있어 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 상기 DNA 템플레이트에 상보적으로 혼성하는 프로브를 통해 템플레이트와 혼성화된다. 상기 비드는 구형의 기재를 가진 물질로 나노입자, 마이크로입자, 나노비드 또는 마이크로 비드를 포함하며, 바람직하게 자기 비드(magnetic bead)이다.

[0044] 본 발명은 또한 상기 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드의 제조방법을 제공한다.

[0045] 구체적으로, (a) 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 DNA 템플레이트를 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 상기 DNA 템플레이트에 상보적으로 혼성하는 프로브와 혼성화하는 단계;

[0046] (b) 상기 (a) 단계에서 프로브와 혼성화된 템플레이트를 표지자와 결합하는 결합제를 포함하는 비드에 고정화하는 단계를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드의 제조방법을 제공한다.

[0047] 상기 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, DNA 중합효소, 반응 완충용액 및 데옥시뉴클레오티드(dNTPs)를 포함하는 표적 유전자 검출용 조성물을 제공한다.

[0048] 본 발명에 따른 상기 DNA 중합효소는 대장균 DNA 중합효소 I, 클레나우 단편, phi29 DNA 중합효소, vent DNA 중합효소, T4, T7 DNA 중합효소, 및 Taq 중합효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0049] 본 발명에 따른, 상기 완충용액(버퍼)은 NEB (New England Biolab) 완충용액 계열, 예를 들면 NEB 완충용액 4, Bst DNA 폴중합효소 완충용액, T4 DNA 리가아제 완충용액, T7 DNA 리가아제 완충용액 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명에 따른 표적 유전자 검출용 조성물은 증폭된 유전자 산물의 육안 식별을 돕기 위하여 염색시약, 형광시약을 더 포함할 수 있으며, 예를 들어 겔 레드(Gel-red), 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)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 본 발명은 또한 상기 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, DNA 중합효소, 반응 완충용액 및 dNTPs를 포함하는 표적 유전자 검출용 조성물을 포함하는 표적 유전자 검출용 키트를 제공한다.

[0052] 본 발명에 따른 표적 유전자 검출용 키트는 비드가 표적 유전자 존재 시 회전환 증폭이 진행되면서 DNA hydrogel을 형성하여 hydrophilic한 성질을 통해 물 분자를 포획하여 건조되지 않는 특성을 가진다. 이러한 특성을 이용하여 예컨대 육안으로 부피 변화의 확인, DNA 가닥의 응집 확인, 염색이나 형광에 의한 색깔 변화 확인, 점도 변화 확인, 비드의 뭉침 정도 변화 확인, 비드의 침강 정도 변화 확인으로 표적 유전자의 빠른 검출이 가능하다.

[0053] 본 발명에 따른 표적 유전자 검출용 키트는 회전환 증폭 수행을 위해 필요한 필수적 요소들을 포함하는 키트일 수 있다.

[0054] 바람직하게 본 발명에 따른 표적 유전자 검출용 키트는 상기 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 모세관 튜브에 모세관 현상을 이용하여 패킹함으로써 모세관 튜브 내에서 이용할 수 있다. 보다 구체적으로, 제조된 검출용 비드는 capillary phenomenon을 이용해 capillary tube안에 packing하고 모세관에서 검출용 비드가 빠져나오지 않도록 모세관의 하부를 막은 후 모세관 내에서 회전환 증폭 반응을

통해 검출을 수행할 수 있다.

[0055] 이러한 본원 발명에 따른 모세관 튜브를 이용한 키트에서의 검출 반응에 대해서는 도 3에 모식도로 기재하였다.

[0056] 즉 모세관 내에서 회전환 증폭이 진행되면 표적 유전자 존재시 hydrophilic한 DNA hydrogel이 형성되어 물 분자를 포획하여 건조되지 않는 특성을 가짐으로써 부피가 줄어들지 않고 유지되는 현상을 나타낸다. 이에 따라 육안으로 부피 변화의 확인, DNA 가닥의 응집 확인, 염색이나 형광에 의한 색깔 변화 확인, 점도 변화 확인, 비드의 뭉침 정도 변화 확인, 비드의 침강 정도 변화 확인 등으로 표적 유전자의 검출이 가능하다. 이를 위해 이러한 키트는 표적 유전자의 유무를 보다 더 확실히 확인하기 위하여 염색 시약 또는 형광 시약을 추가로 더 포함할 수도 있다.

[0057] 본 발명은 또한 상기 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 이용하는 표적 유전자 검출 방법을 제공한다.

[0058] 구체적으로, (a) 표적 유전자와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 및 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위를 포함하는 DNA 템플레이트; 비드의 결합제에 결합되는 표지자가 5'말단에 결합된 상기 DNA 템플레이트에 상보적으로 혼성하는 프로브; 및 상기 표지자와 결합하는 결합제를 포함하는 비드;를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드, DNA 중합효소, 반응 완충용액 및 데옥시뉴클레오티드(dNTPs)를 포함하는 표적 유전자 검출용 조성물과 시료를 반응시키는 단계; 및

[0059] (b) 상기 시료와의 반응에 따라 회전환 증폭을 수행하여 유전자 증폭을 확인하는 단계;를 포함하는 표적 유전자 검출 방법을 제공한다.

[0060] 상기 (a) 단계의 반응은 모세관 튜브에서 수행될 수 있으며, 이에 따라 상기 (b) 단계에서 육안으로 부피 변화의 확인, DNA 가닥의 응집 확인, 염색이나 형광에 의한 색깔 변화 확인, 점도 변화 확인, 비드의 뭉침 정도 변화 확인, 비드의 침강 정도 변화 확인 등을 통해 표적 유전자 유무를 확인할 수 있다.

[0061] 위 표적 유전자 검출 방법은 온도 변화를 위한 장치 등이 없어도 항온 상태에서 반응을 통해 빠르고간편하게 표적 유전자를 검출할 수 있다.

발명의 효과

[0062] 본 발명은 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드는 빠르고 간편하게 유전자를 검출하여 바이러스, 세균성 감염, 암과 같은 질환을 저렴한 가격으로 진단할 수 있게 하는 장점을 가진다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드가 표적 유전자 존재시 비드에서 긴 DNA 가닥을 형성하는 과정의 모식도를 나타낸다.

도 2는 본 발명에 따른 덤벨 형태의 템플레이트의 모식도를 나타낸다.

도 3은 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 포함하는 모세관 튜브를 이용한 표적 유전자 검출의 모식도를 나타낸다.

도 4는 본 발명에 따른 표적 유전자 회전환 증폭 기반 분자 진단 방법의 분석을 위한 템플리에트 제조, 비드의 제조, 회전환 증폭 반응을 위한 용액의 제조, 패킹 및 진단 방법의 전체 모식도를 나타낸다.

도 5는 비오틴화된 프로브와 템플레이트 간 혼성화의 모식도를 나타낸다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 Ampicillin 저항성을 가진 E.Coli 유전자에 대하여 결합 가능한 템플레이트와 비오틴화된 프로브의 혼성화를 전기영동을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

도 7은 비드 표면에서 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트의 고정화를 통한 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드의 제조 과정의 모식도를 나타낸다.

도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 Ampicillin 저항성을 가진 E.Coli pathogen에 대하여 결합 가능한 템플레이트와 비오틴화된 프로브가 비드에 고정되었음을 보여주는 전기 영동 결과를 나타낸다.

도 9는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드가 표적 유전자 존재시 라이

게이션 및 증폭을 통해 긴 DNA 가닥을 형성하는 것을 나타낸다.

도 10은 본 발명의 일실시예에 따른 Ampicillin 저항성을 가진 E.Coli 유전자에 대하여 결합 가능한 템플레이트를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 이용하여 Ampicillin 저항성을 가진 E.Coli를 검출한 결과를 나타낸다.

도 11은 본 발명의 일실시예에 따른 지카 바이러스에 대하여 결합 가능한 템플레이트를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 이용하여 지카 바이러스를 검출한 결과를 나타낸다.

도 12는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드를 모세관 현상을 통해 모세관에 패킹하고 이를 육안으로 관찰하는 모식도를 나타낸다.

도 13은 본 발명의 일실시예에 따른 Ampicillin 저항성을 가진 E.Coli 유전자에 대하여 결합 가능한 템플레이트를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드가 패킹된 모세관을 이용하여 Ampicillin 저항성을 가진 E.Coli의 존재 유무를 육안으로 확인한 결과를 나타낸다.

도 14는 표적 유전자 검출용 비드가 패킹된 모세관에서 회전환 증폭을 통해 long tandem RCA product (긴 가닥의 DNA 산물)를 형성하고 이렇게 생성된 DNA 산물은 physical entanglement에 의해 서로 엉기는데, 이에 따라 해당 모세관을 뒤집으면 중력에 의해 비드를 포함한 증폭 혼합물이 떨어지는 정도가 다르게 되고 증폭이 일어나면 엉김에 의해 증폭 혼합물이 흐르지 않게 되어 육안으로 증폭 여부를 확인 할 수 있음을 보여주는 모식도이다.

도 15는 본 발명의 일실시예에 따른 Ampicillin 저항성을 가진 E. Coli 유전자에 대하여 결합 가능한 템플레이트를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드가 패킹된 모세관을 이용하여 해당 유전자의 존재 유무를 형광을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 도면을 참조하여 실시예에 대해 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니며 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 또한, 도면들에 있어서, 구성요소의 폭, 길이, 두께 등은 편의를 위하여 과장되어 표현될 수도 있다.

[0065] 본 발명에 따른 표적 유전자 검출을 위한 i) 템플레이트 혼성화, ii) 비드 표면에 템플레이트의 혼성화를 통한 고정, iii) 마그네틱 비드 용액 및 RCA 반응을 위한 용액 혼합, iv) 모세관 튜브로의 패킹 및 v) 검출의 전반적 모식도는 도 4에 나타내었으며, 이하 이에 대해 상세히 살펴본다.

[0066] **<실시예 1> 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트(Template)의 제조**

[0067] **(1) 지카 바이러스 템플레이트 제조 및 혼성화**

[0068] 지카바이러스 유전자 서열을 바탕으로 지카 바이러스에 특이적인 템플레이트(Template_Zika virus), 즉, 지카 바이러스에 특이적으로 결합하는 템플레이트(Template_Zika virus, 서열번호 1)를 제조하였다 (표 1 참조). Template_Zika virus는 표적 유전자(지카 바이러스의 병원균 유전자)와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 즉 병원균의 상보적 부위(Pathogen complementary site, 서열번호 9, 20 mer, 진한 글씨), 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위, 즉, 템플레이트 내 상보적인 영역(서열번호 10 및 서열번호 11, 21 mer × 2 = 총 42 mer, 연한 회색 바탕), 및 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위 (서열번호 12, 17 mer, 진한 회색 바탕)으로 구성된다.

[0069] 200 ul 튜브 안에 10 uM 비오틴화 프로브 [서열번호 25(5'-Biotin-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AGG GAC GTC GAT ACT AGC ATG CTA-3'), Bioneer] 2 ul, 10X PBS 0.7 ul 및 상기 제조된 4 uM Zika annealed template(Template_Zika virus) 5 ul (mBiotech)를 각각 첨가하여 총 7.7 ul 혼합용액을 제조하였다. 제조된 7.7 ul 혼합용액을 3분간 Fast cooling하고, 안정하게 혼성화된 template를 얻었다.

[0070] **(2) E.coli 템플레이트 제조 및 혼성화**

[0071] Ampicillin 저항성을 가진 E.Coli 유전자 서열을 바탕으로 Ampicillin 저항성을 가진 E.Coli에 특이적인 템플레이트(Template_Ampicillin resistant E.coli), 즉, Ampicillin 저항성을 가진 E.Coli에 특이적으로 결합하는

템플레이트(Template_Ampicillin resistant E.coli, 서열번호 2)를 제조하였다. Template_Ampicillin resistant E.coli는 다음과 같이 표적 유전자(E.coli의 병원균 유전자)와 상보적으로 결합하는 결합 부위, 즉 병원균의 상보적 부위(Pathogen complementary site, 서열번호 13, 23 mer, 굵은 글씨), 덤벨 형태를 형성하기 위한 템플레이트 내 상보적인 결합 부위, 즉, 템플레이트 내 상보적인 영역(서열번호 14 및 서열번호 15, 총 47 mer, 연한 회색 바탕), 비드에 결합을 위한 프로브에 상보적으로 결합하는 결합 부위(서열번호 16, 17 mer, 진한 회색 바탕)으로 구성된다.

[0072] 200 ul tube 안에 10 uM 비오틴화 프로브 [서열번호 25(5'-Biotin-AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AGG GAC GTC GAT ACT AGC ATG CTA-3'), Bioneer] 2 ul, 10X PBS 0.7 ul 및 상기 제조된 4 uM E.coli annealed template(Template_Ampicillin resistant E.coli) 5 ul (mBiotech)를 각각 첨가하여 총 7.7 ul 혼합용액을 제조하였다. 제조된 7.7 ul 혼합용액을 3분간 Fast cooling하고, 안정하게 혼성화된 template를 얻었다.

[0073] **(3) 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트(Template)의 제조**

[0074] 표지자가 결합된(예를 들어 비오틴) 프로브와 혼성화된 템플레이트(Template)의 제조 과정의 모식도는 도 5에 나타내었다. 앞서 언급된 바와 같이, 제조된 템플레이트와 표지자가 결합된(예를 들어 비오틴) 프로브가 튜브 내에서 혼합되었을 때 템플레이트의 프라이머 상보적 결합 부위와 표지자가 결합된 프로브 서열이 혼성화된다.

[0075] 위와 같은 비오틴화된 프로브와 템플레이트의 혼성화를 전기영동을 통해서 확인하였다. DNA Ladder(Quick-Load® LMW Ladder/Biolabs, Ladd)를 기준으로 하여 상기 (2)에서 제조된 템플레이트(Template_Ampicillin resistant E.coli, Temp), 비오틴화된 프로브(Prim), 또는 템플레이트 및 비오틴화된 프로브의 혼합물(Hybri)을 각각 0.8 pmole 씩 로딩하여 전기영동한 결과를 도 6에 나타내었다.

[0076] 도 6에서 확인되는 바와 같이, 템플레이트(Template)와 비오틴화된 프로브의 혼성화가 확인되었다.

[0077] **<실시예 2> 비드 표면에서 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트의 고정화를 통한 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드의 제조**

[0078] **(1) 비드 표면에서 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트의 고정화**

[0079] 상기 실시예 1에서 제조된 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트를 마그네틱 비드에 고정하여, 마그네틱 비드 상에 템플레이트를 고정화하였다. 위 고정화 단계의 모식도는 도 7에 나타내었다. 도 7에 나타낸 바와 같이, 결합제 (예를 들어 스트렙타비딘)비드는 Vortexing 후 원심분리를 하여 상등액을 버리고, 상기 실시예 1에서 제조된 프로브와 혼성화된 템플레이트를 혼합하여 15 분 정도 상온에서 유지함으로써 비드 상에 템플레이트를 고정화한다.

[0080] 구체적으로, 200 ul tube 안에 magnetic beads 현탁액 (Takara) 5 ul 넣고, 1XPBS 5 ul 로 세척해주고 세척한 magnetic beads 현탁액을 centrifuge 한 후, 상등액을 취하여 제거하였으며, 이 과정을 3회 반복하였다. 그리고 나서, 혼성화된 template 용액 7.7 ul를 첨가하였고(상기 실시예 1의 (1), 1의 (2)를 별도로 각각 제조함), 상온에서 15분 동안 incubation 해준 후, 마지막으로 두 번 이상 1X PBS로 세척해줌으로써, 마그네틱 비드 상에 템플레이트를 고정화함으로써 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드를 제조하였다.

[0081] **(2) 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드의 제조 확인**

[0082] 상기 (1)에서 제조된 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드의 고정화를 전기영동을 통해서 확인하였다. DNA Ladder(Quick-Load㎛ LMW Ladder/Biolabs, Ladd, 1 lane)를 기준으로 하여, 비오틴화된 프로브 (2 lane), 템플레이트 (3 lane), 상기 실시예 1의 (2)에서 제조된 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트(4 lane) 및 상기 실시예 2의 (1)에서 비드 표면에 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트(Template_Ampicillin resistant E.coli)가 고정된 마이크로 비드 (5 lane)을 각각 0.8 pmole 씩 로딩하여 전기영동한 결과를 도 8에 나타내었다.

[0083] 도 8에서 확인되는 바와 같이, 비드 표면에서 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트의 고정화에 의해 비오틴화된 프로브와 혼성화된 템플레이트의 band가 사라지는 것이 확인되었다. 이로부터 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드가 제조되었음이 확인되었다.

[0084] **<실시예 3> 비드 표면에서 표적 유전자의 증폭 확인**

[0085] 상기 실시예 2에서 제조된 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드를 이용하여 표적 유전자를 검출하였다. 위 검출 단계의 모식도는 도 9에 나타내었다. 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드를 표적 유전자와 상보

적 결합함으로써 효소인 T4 ligase에 의해 닫힌 형태(closed form) 아령 모양의 template가 형성되는 동시에 Phi 29 polymerase에 의해 회전환 증폭이 발생함으로써 긴 가닥의 DNA strands 증폭 산물이 형성된다.

[0086] 상기와 같은 검출을 위하여 구체적으로 10 uM E.coli RNA pathogen 1 ㎕ (서열번호 6, Bioneer), 10X T4 ligase reaction buffer (Biolabs) 1 ㎕, 10X phi 29 polymerase reaction buffer (Biolabs) 1 ㎕, 2.5mM dNTP 0.5 ㎕ (Epicentre), T4 ligase 2.5 ㎕ (Biolabs), phi 29 polymerase (10 unit/㎕) 2.5 ㎕ (Biolabs), pyrophosphatase 0.5 ㎕ (Biolabs), 100mM DTT 0.4 ㎕ (Epicentre) 및 DEPC 0.6 ㎕ 가 혼합된 총 10 ㎕ all in one 혼합 용액을 제조하였다. 상기 혼합 용액을 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드가 들어 있는 tube 안에 첨가하였다. 그리고 나서, 25 ℃에서 15 분 동안 ligation과 RCA (Rolling circle amplification) 반응을 동시에 진행시켰다.

[0087] 또한, 10 uM Zika virus RNA pathogen 1 ㎕ (서열번호 5, Bioneer)에 대해서도 위와 동일하게 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드를 이용하여 ligation과 RCA (Rolling circle amplification) 반응을 동시에 진행시켰다.

[0088] 위에서 수행된 RCA 반응에 따른 긴 DNA 가닥 형성을 전기영동을 통해서 확인하였다. DNA Ladder(Quick-Load㏊ LMW Ladder/Biolabs, Ladd)를 기준으로 하여, 시료를 0.8pmole 씩 로딩하여 전기영동을 수행하였다.

[0089] 그 결과를 도 10 및 도 11에 나타내었다.

[0090] 도 10은 Ampicilin 저항성 E.coli에 대한 검출 결과를 나타낸다. 도 10에서 확인되는 바와 같이, 증폭을 통한 긴 DNA 가닥 형성 및 엉킴에 의해 gel well에 반응물이 걸림으로써 표적 유전자가 검출되는 것이 확인(SP)되었고, 시간 경과에 따라 생성된 산물이 커짐이 확인되었다. 또한, 비표적 템플레이트가 고정된 비드(NC)에서는 표적 유전자가 존재해도 증폭이 이루어지지 않음이 확인되어, 본원 발명의 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드를 이용하여 표적 유전자의 검출이 이루어짐이 확인되었다.

[0091] 이러한 결과는 도 11에 나타낸 바와 같이, Zika virus 검출에서도 동일하게 확인되었다. 도 11에서 확인되는 바와 같이, Zika virus 존재에 따라 증폭을 통한 긴 DNA 가닥 형성 및 엉킴에 의해 gel well에 반응물이 걸림으로써 표적 유전자가 검출되는 것이 확인되었다.

[0092] **<실시예 4> 모세관 튜브에 마그네틱 비드 패킹 및 이를 이용한 표적 유전자의 육안상 검출 확인**

[0093] 상기 실시예 3에서 튜브 내 혼합 용액과 회전환 증폭 기반 표적 유전자 검출용 비드(Ampicilin 저항성 E.coli 검출용)의 혼합물을 모세관 현상을 이용하여 모세관 튜브 상에 패킹하였으며, 25 ℃에서 15 분 동안 ligation과 RCA (Rolling circle amplification) 반응을 동시에 진행시킨 후, 모세관 튜브를 거꾸로 뒤집어 주었다. 그리고 나서, 대조군과 샘플군에 있는 자성 비드들의 응집에 따라 표적 유전자의 검출을 육안으로 확인하였다. 참고를 위하여, 위 과정에 대한 모식도는 도 12에 나타내었다.

[0094] 위 제조된 마그네틱 비드 용액이 패킹된 모세관 튜브를 이용하여 육안상으로 표적 유전자의 유무를 확인하였으며, 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0095] 도 13은 Ampicilin 저항성 E.coli에 대한 검출 결과를 나타낸다. 도 13에서 확인되는 바와 같이, 회전환 증폭에 의해 형성된 hydrophilic한 긴 가닥 DNA 가닥들이 물 분자를 포획하여 건조되지 않으며 부피가 유지(SP)되는 반면, 회전환 증폭이 진행 되지 않으면 긴 가닥 DNA 가닥들이 형성되지 않아 쉽게 건조되어 부피가 감소(NC)하는 것이 확인되었다. 즉, 부피 변화를 육안 상으로 확인함으로써 표적 유전자를 검출하였다.

[0096] 또한 위와 유사한 방법으로 도 14 및 도 15에서와 같이 DNA 가닥의 엉김을 통한 응집 및 형광 변화를 확인함으로써 표적 유전자를 검출하였다.

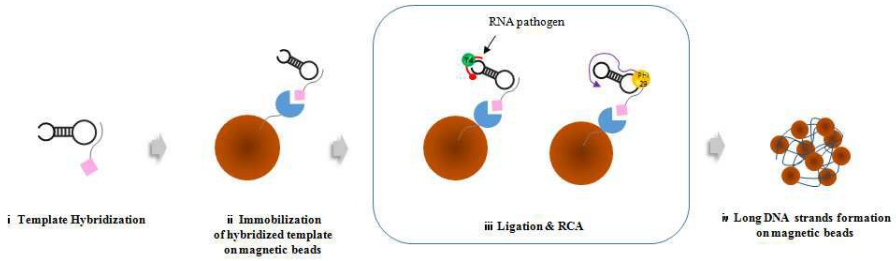
[0097] 도 14는 표적 유전자 검출용 비드가 패킹된 모세관에서 회전환 증폭을 통해 long tandem RCA product (긴 가닥의 DNA 산물)를 형성하고 이렇게 생성된 DNA 산물은 physical intanglement에 의해 서로 엉기는데, 이에 따라 해당 모세관을 뒤집으면 중력에 의해 비드를 포함한 증폭 혼합물이 떨어지는 정도가 다르게 되고 증폭이 일어나면 엉김에 의해 증폭 혼합물이 흐르지 않게 되어 육안으로 증폭 여부를 확인 할 수 있음을 모식도로 기재하였다.

[0098] 도 15는 본 발명의 일실시예에 따른 Ampicillin 저항성을 가진 E.Coli 유전자에 대하여 결합 가능한 템플레이트를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification) 기반 표적 유전자 검출용 비드가 패킹된 모세관에서 해당 유전자의 존재 유무를 형광을 통해 확인한 결과이다. Pathogen 유전자 존재 하에 회전환 증폭이 일어나고

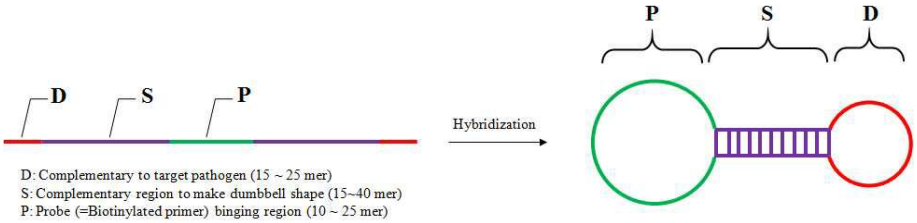
결과 긴 가닥의 DNA가 생성되고, 이의 존재를 SYBR dye (ex. SYBR gold)를 이용하여 형광으로 확인하였다(SP-Sample, NC-Negative control).

도면

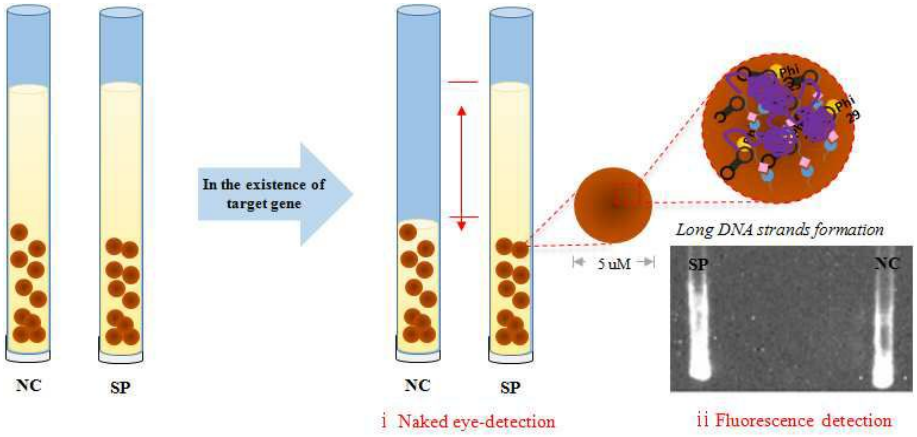
도면1



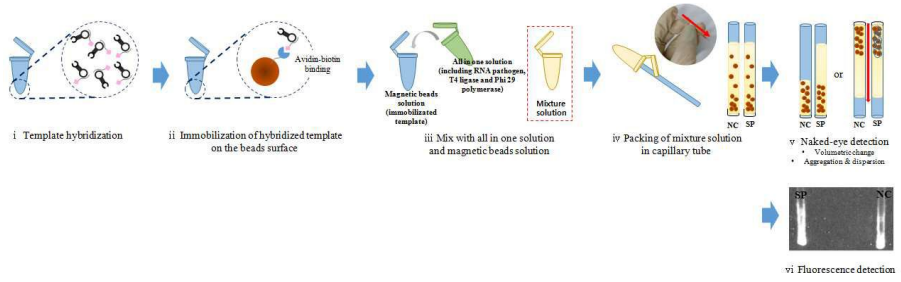
도면2



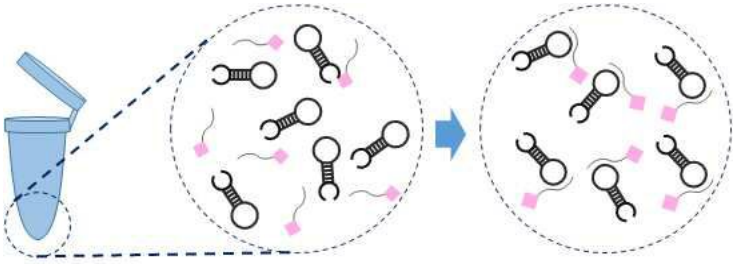
도면3



도면4

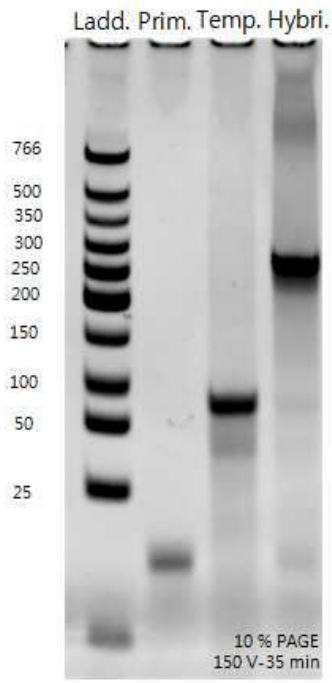


도면5

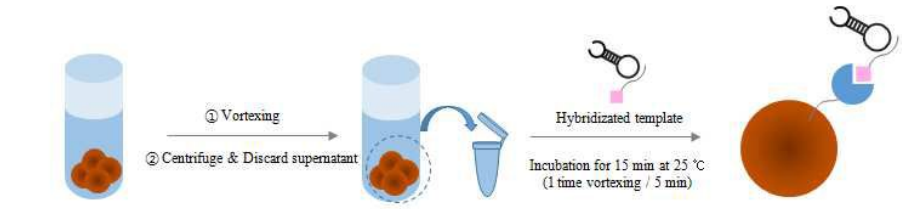


Template Hybridization

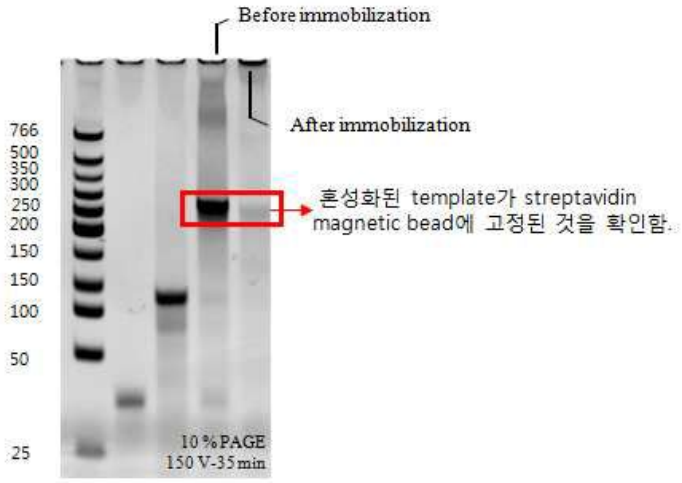
도면6



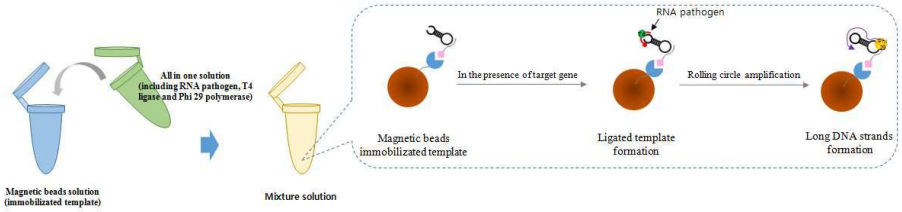
도면7



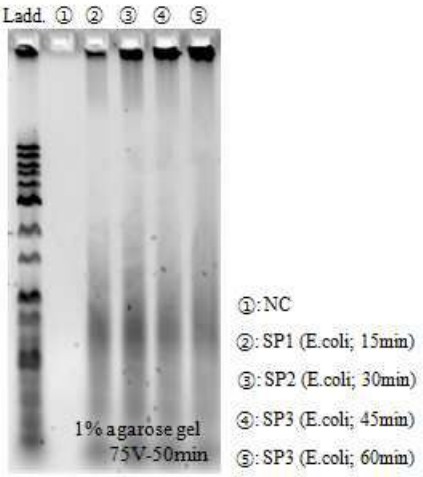
도면8


Before immobilization
After immobilization
혼성화된 template가 streptavidin magnetic bead에 고정된 것을 확인함.
766
500
350
300
250
200
150
150
100
50
25
10 % PAGE
150 V-35 min

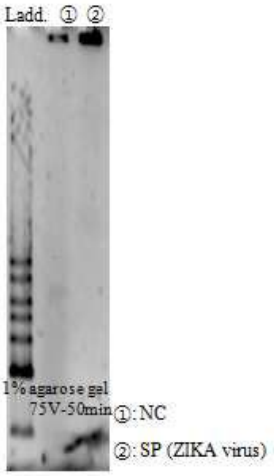
도면9


All in one solution (including RNA pathogen, T4 ligase and Phi 29 polymerase)
Magnetic beads solution (immobilized template)
Mixture solution
Magnetic beads immobilizated template
In the presence of target gene
RNA pathogen
Ligated template formation
Rolling circle amplification
Long DNA strands formation

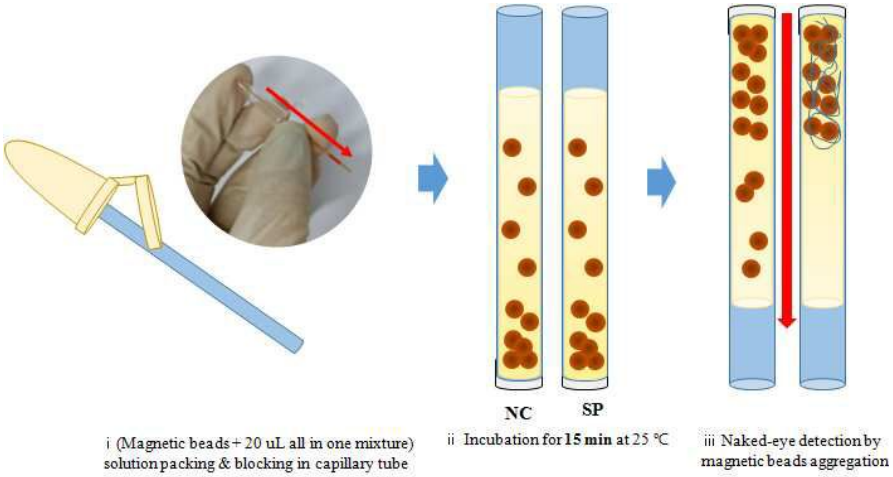
도면10


Ladd. ① ② ③ ④ ⑤
1% agarose gel
75V-50min
①:NC
②:SP1 (E.coli; 15min)
③:SP2 (E.coli; 30min)
④:SP3 (E.coli; 45min)
⑤:SP3 (E.coli; 60min)

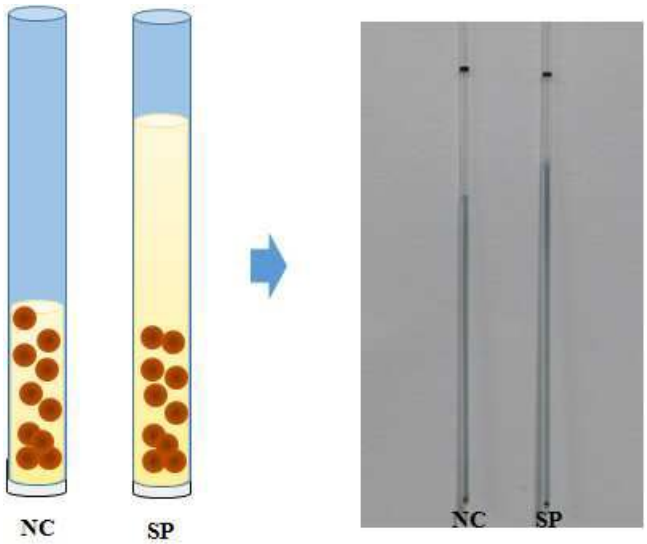
도면11



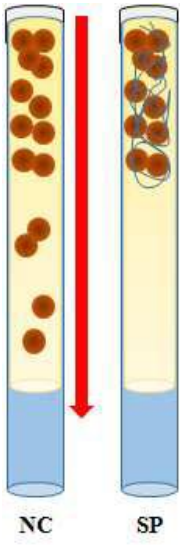
도면12



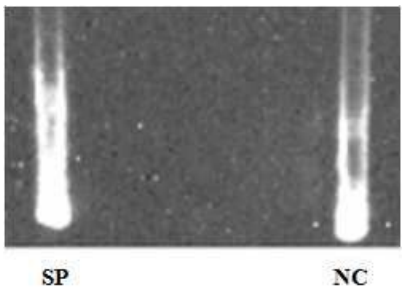
도면13



도면14



도면15



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> ROLLING CIRCLE AMPLIFICATION BASED MOLECULAR DIAGNOSTIC METHOD

<130> P16-079-EWHA

<160> 25

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZIKA virus Template

<400> 1

cgccatctgg actgccgaca agacgtgcag cccgtacctc acttagcatg ctagtatcga 60

tccaccttat tcacgggctg cacgtcttgt cgggtccac 99

<210> 2

<211> 99

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ampicillin resistant E.coli Template

<400> 2

aatactcatg cttatggttc ctgctgagcg ttcaccctta gcatgctagt atcgacgtct 60

ttatcctcgc tcagcaggaa ccataagccg gaaatgttg 99

<210> 3

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MERS-CoV Template

<400> 3

agggcacatc tccgaatcga agtactcagc gtaagtttag aggtagcatg ctagtatcga 60

cgtacgtacc aacttacgct gagtacttcg attataccc 99

<210> 4

<211> 104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ebola Template

<400> 4

gacgcacgcg aatcgaagta ctcagcgtaa gtttagaggt agcatgctag tatcgacgta 60

cgtaccaact tacgctgagt acttcgatta acgagaaatc gcac 104

<210> 5

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNA Pathogen of ZIKA virus

<400> 5

caguccagau ggcgguggac 20

<210> 6

<211> 20

<212

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNA Pathogen of Ampicillin resistant E.Coli

<400> 6

augaguauuc aacauuuccg 20

<210> 7

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNA Pathogen of MERS-CoV

<400> 7

cggagaugug cccuggguau 20

<210> 8

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RNA Pathogen of Ebola

<400

> 8

cgcgugcguc gugcgauuuc ucguu 25

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Binding site of ZIKA virus RNA pathogen

<400> 9

cgccatctgg actggtccac 20

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementary binding site in template

<400> 10

ccgacaagac gtgcagcccg t 21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementary binding site in template

<400> 11

acgggctgca cgtcttgtcg g 21

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Binding site of probe to bind to bead

<400> 12

tagcatgcta gtatcga 17

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Binding site of Ampicillin resistant E.coli RNA pathogen

<400> 13

aatactcatc ggaaatgttg 20

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementary binding site in template

<400> 14

gcttatggtt cctgctgagc g 21

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementary binding site in template

<400> 15

cgctcagcag gaaccataag c 21

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Binding site of probe to bind to bead

<400> 16

tagcatgcta gtatcgacgt 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Binding site of MERS-CoV RNA pathogen

<400> 17

agggcacatc tccgataccc 20

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementary binding site in template

<400> 18

aatcgaagta ctcagcgtaa g 21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementary binding site in template

<400> 19

cttacgctga gtacttcgat t 21

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Binding site of probe to bind to bead

<400> 20

tagcatgcta gtatcgacgt 20

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Binding site of Ebola RNA pathogen

<400> 21

gacgcacgcg aacgagaaat cgcac 25

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementary binding site in template

<400> 22

aatcgaagta ctcagcgtaa g 21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Complementary binding site in template

<400> 23

cttacgctga gtacttcgat t 21

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Binding site of probe to bind to bead

<400> 24

tagcatgcta gtatcgacgt 20

<210> 25

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Biotinated probe

<400> 25

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aagggacgtc gatactagca tgcta 45