



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0144608
(43) 공개일자 2022년10월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6844 (2018.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6844 (2018.05)
C12Q 1/6883 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0051131
(22) 출원일자 2021년04월20일
심사청구일자 2021년04월20일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
황상현
서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 103동 801호(대치동, 대치삼성아파트)
오홍범
서울특별시 성동구 성수일로8길 47, 106동 1502호(성수동2가, 성수동 롯데캐슬파크)
(74) 대리인
이명진

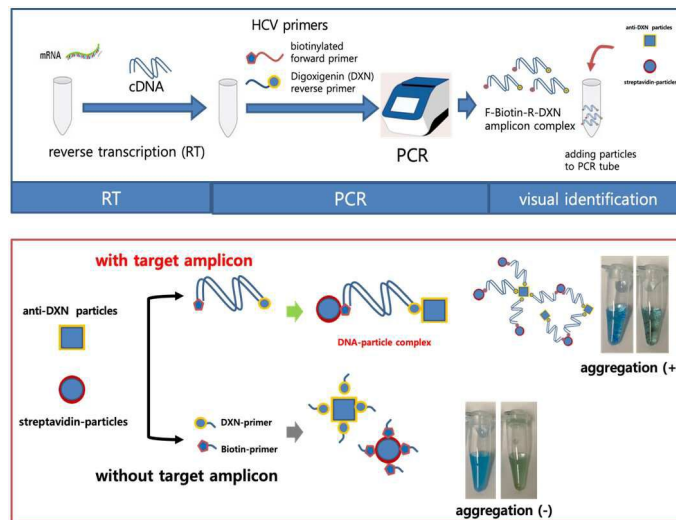
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 마이크로입자 기반 핵산 검출용 키트 및 핵산 증폭산물 검출 방법

(57) 요약

본 발명은 마이크로입자 기반 핵산 검출용 키트 및 핵산 증폭산물 검출 방법에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법은 표적 핵산을 증폭시킨 다음 마이크로입자의 첨가만으로 별도의 과정이나 장치 없이 마이크로입자에 포획된 핵산 증폭산물의 응집을 육안으로 검출할 수 있으며, 높은 민감도로 쉽고 빠르게 표적 핵산의 증폭산물을 검출할 수 있다. 이에 본 발명에 따른 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법은 C형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 결핵균, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스(SARS-CoV), 또는 SARS-CoV-2 등에 의한 감염성 질환을 신속하게 진단하는 데에 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 1/70 (2022.05)

C12Q 2563/143 (2013.01)

C12Q 2563/149 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119403
과제번호	2020R1A5A1018052
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	선도연구센터지원사업
연구과제명	나노-광 융합 바이오의료 진단 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	중앙대학교
연구기간	2020.07.01 ~ 2027.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는, 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법:

- (a) 피검체로부터 채취된 시료에서 RNA를 분리하여 cDNA를 합성하는 단계;
- (b) 비오틴(biotin), 디곡시게닌(digoxigenin), 항원, 표적분자 및 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 각각 표지된 정방향 프라이머(forward primer) 및 역방향 프라이머(reverse primer)로 구성되고, 검출하고자 하는 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트를 이용하여 상기 cDNA를 증폭시키는 단계;
- (c) 상기 증폭된 cDNA에 스트렙타비딘(streptavidin), 아비딘(avidin), 상기 프라이머에 결합된 항원에 항원-항체 반응을 통해 결합될 수 있는 항체, 상기 프라이머에 결합된 표적분자에 특이적으로 결합하는 앵타머(aptamer) 및 상기 프라이머에 결합된 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 코팅된 마이크로입자(microparticle)를 첨가하는 단계; 및
- (d) 상기 마이크로입자에 포획된 핵산 증폭산물의 응집을 검출하는 단계.

단, 상기 (c) 단계와 (d) 단계 사이에 원심분리 단계는 포함하지 않음.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 비오틴 및 디곡시게닌으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 각각 표지된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로 구성되는 것을 특징으로 하는, 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 마이크로입자는 스트렙타비딘 또는 항-디곡시게닌 항체로 코팅된 것을 특징으로 하는, 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 소변, 대변, 및 타액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 프라이머 세트는 핵산 증폭산물의 크기가 100 내지 200 bp가 되도록 제작된 것을 특징으로 하는, 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 증폭은 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 및 등은 증폭 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는, 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 등은 증폭 방법은 재조합 효소 중합 효소 증폭(recombinase polymerase amplification, RPA), 루프 매개 증폭(loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 및 헬리카제 의존 증폭(helicase-dependent amplification, HDA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계에서 마이크로입자의 직경은 0.25 내지 10 μm 인 것을 특징으로 하는, 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계에서 마이크로입자는 자성 비드(magnetic bead) 또는 폴리스티렌(polystyrene) 입자인 것을 특징으로 하는, 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 cDNA의 검출 한계 농도는 1 내지 15 IU/ml인 것을 특징으로 하는, 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법.

청구항 11

하기 단계를 포함하는, 감염성 질환의 진단을 위한 정보제공방법:

(a) 피검체로부터 채취된 시료에서 RNA를 분리하여 cDNA를 합성하는 단계;

(b) 비오틴(biotin), 디곡시게닌(digoxigenin), 항원, 표적분자 및 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 각각 표지된 정방향 프라이머(forward primer) 및 역방향 프라이머(reverse primer)로 구성되고, 검출하고자 하는 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트를 이용하여 상기 cDNA를 증폭시키는 단계;

(c) 상기 증폭된 cDNA에 스트렙타비딘(streptavidin), 아비딘(avidin), 상기 프라이머에 결합된 항원에 항원-항체 반응을 통해 결합될 수 있는 항체, 상기 프라이머에 결합된 표적분자에 특이적으로 결합하는 앵타머(aptamer) 및 상기 프라이머에 결합된 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 코팅된 마이크로입자(microparticle)를 첨가하는 단계; 및

(d) 상기 마이크로입자에 포획된 핵산 증폭산물의 응집을 검출하는 단계.

단, 상기 (c) 단계와 (d) 단계 사이에 원심분리 단계는 포함하지 않음.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 감염성 질환은 C형 간염, B형 간염, 인플루엔자, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 유도 에이즈(AIDS), 결핵, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스(SARS-CoV) 감염증, 및 코로나 바이러스 감염증-19(COVID-19)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 감염성 질환의 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 13

비오틴(biotin), 디곡시게닌(digoxigenin), 항원, 표적분자 및 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 각각 표지된 정방향 프라이머(forward primer) 및 역방향 프라이머(reverse primer)로 구성되고, 검출하고자 하는 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트; 및

스트렙타비딘(streptavidin), 아비딘(avidin), 상기 프라이머에 결합된 항원에 항원-항체 반응을 통해 결합될 수 있는 항체, 상기 프라이머에 결합된 표적분자에 특이적으로 결합하는 앵타머(aptamer) 및 상기 프라이머에 결합된 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 코팅된 마이크로입자(microparticle)를 포함하는, 마이크로입자 기반 핵산 검출용 키트로서,

상기 키트는 원심분리 없이 마이크로입자에 포획되는 핵산의 응집을 검출하기 위해 사용되는 것을 특징으로 하는, 키트.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 비오틴 및 디곡시게닌으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 각각 표지된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로 구성되는 것을 특징으로 하는, 마이크로입자 기반 핵산 검출용 키트.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 마이크로입자는 스트렙타비딘 또는 항-디곡시게닌 항체로 코팅된 것을 특징으로 하는, 마이크로입자 기반 핵산 검출용 키트.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 마이크로입자의 직경은 0.25 내지 10 μm 인 것을 특징으로 하는, 마이크로입자 기반 핵산 검출용 키트.

청구항 17

제13항에 있어서,

상기 마이크로입자는 자성 비드(magnetic bead) 또는 폴리스티렌(polystyrene) 입자인 것을 특징으로 하는, 마이크로입자 기반 핵산 검출용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 마이크로입자 기반 핵산 검출용 키트 및 핵산 증폭산물 검출 방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 최근 특정 염기서열의 DNA 단편을 신속하고 간단하게 증폭할 수 있는 중합효소연쇄반응(PCR) 및 실시간 PCR 기법이 보편화되어, 감염 여부의 검출/진단이 용이해졌다. PCR 기법은 목적 병원체의 핵산 염기 서열에 특이적으로 결합하는 핵산 단편 서열(프라이머)를 가하여 온도에 따른 변성(denaturation), 재결합(annealing) 및 중합(polymerization) 과정을 반복하여 미량의 병원체 핵산을 증폭시켜 그 존부를 검출할 수 있는 기술로, 진단하는데 사용되는 대표적인 기술이다.

[0004] 상기 PCR 기법은 임상 진단의 실용적 측면에서 세포진 검사(Pap smear)의 세포학적 검사와 달리 객관적인 대규모 검사가 가능하며, 측정원리상 세포검사나 액상 hybrid capture에 비해 검사비용, 실험 절차, 검출 감도(sensitivity) 및 특이도(specificity) 등에서 상대적 우위를 가지고 있는 것으로 확인되어 있다. 그러나, PCR 기법을 설계하고, 결과를 해석함에 주의가 요망되므로, 높은 기술력을 가진 운영자가 요구되며, PCR의 증폭물(amplicon)을 검출하기 위해서는 번거로운 과정을 거쳐야만 하며, PCR 장치의 가격이 매우 높아 제한된 장소에서만 사용이 가능하다는 단점이 있다. 현실적으로 전염성 질병이 창궐하면, 질병의 통제가 신속하게 이루어져야 하기 때문에, 질병 진단은 장소에 구애받지 않고 빠르고 간단하며 저렴하면서, 현장검사(POCT) 환경에 적합한 방법이어야만 한다.

[0005] 상술한 요구를 만족시키기 위해, 마이크로 유체공학, 마이크로 전자공학, 광학 시스템 및 칩 기반 검출 기술 개발이 이루어져 왔으나, 이들 중 대부분은 여전히 복잡한 제조공정이 필수적이며, 분석장치 등의 조건들을 만족하는 제한된 장소에서만 사용이 가능하다는 단점을 가지고 있다.

[0006] 일례로 인간 유두종 바이러스(HPV) DNA를 검출하기 위한 방법으로, 원심분리 기반의 분리형 시각 검출시스템(SPIN-DNA)이 개발된 바 있으나, 상기 SPIN-DNA는 비드로부터 DNA가 결합된 비드를 분리하기 위해 원심분리 장치가 필수적으로 구비되어야 한다는 문제점이 존재한다.

[0007] 따라서 분자 현장검사(molecular point of care testing, molecular POCT)의 개발에 대한 필요성이 대두되었다. 분자 현장검사(molecular point of care testing, molecular POCT)에 적용할 수 있는 진단 기술을 개발하기 위해서는, 우선 질병에 대한 즉각 대응이 가능하도록, 현장에서 즉각 병원체의 DNA, RNA를 검출하거나 세포의 DNA, RNA를 분석하여, 빨리 결과를 취득하도록 하여야 하므로, 별도의 측정장비나 지식없이 시각적 혹은 육안으로 검출되어야 하고, 30 분 미만의 짧은 시간 내에 결과를 얻을 수 있어야 하며, 세척 단계와 같은 부가적인 공정단계를 배제하여야 하며, 측정장치 혹은 계측기 없이 저렴하면서도 정확하고, 우수한 재현성이 요구됨에 따라 기존에 사용해오던 DNA 진단방법 발굴전략으로는 한계가 있다.

[0008] 이와 관련하여 이전 연구에서는 종이 기반의 증폭된 DNA용 단순 시각적 검출 시스템(Paper-based speedy separation of amplified DNA, PASS-DNA)을 사용하였으나, 이 검출 시스템은 DNA 결합되지 않은 마이크로 입자로부터 DNA 결합 마이크로 입자를 분리하기 위해 종지와 입자를 필요로 하였다.

[0009] 금속 나노입자를 기반으로 한 혼성화 테스트는 구현이 간단하고 프로브 사이의 플라즈몬(plasmon) 상호 작용으로 인해 발생하는 색상 변화를 통해 시각적으로 읽을 수 있어 진단 응용 분야에 매력적인 시스템이며, 측면 흐름 분석(lateral flow assay)을 위해 모세관 힘과 같은 작은 힘을 적용하는 것이 더 실현 가능한 접근 방식이다.

[0010] 한편, C 형 간염 바이러스(hepatitis C virus, HCV) 감염은 수혈 및 지역 특이적 전염(community-acquired)에 의해 발생되고, 신장 투석에 의해 약 70 % 정도가 감염되는 것으로 보고되었다. 일단 C형 간염 바이러스에 감염이 되면 약 20 % 정도가 5년 내에 간경화를 수반한 급성 간염을 일으키게 되고 간암으로 전이되는 것으로 알려져 있다. 이러한 높은 만성 감염률은 RNA 바이러스에서 보기 드문 일로서 C형 간염 바이러스가 높은 비율의 간암을 일으키는 매개체임을 보여주는 증거이다. 최근에는 모든 혈액에 대해서 C형 간염 바이러스 검사가 잘 이루어지고 있어 수혈로 인한 감염은 현저히 줄어들었지만, 지역 특이적 감염은 이에 대한 관리가 효과적으로 이루어지지 않아 그 감염률이 높으므로 전 세계적으로 중요한 문제로 대두되고 있으며, 약 7,100 만 명이 HCV에 영

향을 받는 것으로 추정된다.

- [0011] 실시간 중합 효소 연쇄 반응(PCR)에 의한 HCV 게놈의 분자 검출 및 정량화는 HCV 진단의 황금 표준을 나타내며 치료 요법 관리에 중요한 역할을 한다. 그러나 감염된 환자의 최대 약 80 %는 특히 저소득층 및 중간 소득층에서 감염 사실을 알지 못하는 것으로 추정된다. 이에, 저렴한 비용으로 현장 진단 및 치료와 연결할 수 있는 보편적인 접근을 통한 진단의 증가가 필수적인 실정이다.
- [0012] 따라서 중앙 집중식 실험실 검사의 지배적 모델은 인프라 및/또는 훈련된 운영자의 부족으로 인해 종종 사용할 수 없기 때문에 자원이 제한된 환경에서 만성 C 형 간염 환자를 치료하는 데 적합하지 않다. 적시 검출 및 진단은 HCV에 대한 감염 관리, 항 바이러스 치료 및 역학 연구에 중요하므로, 대안으로 저렴하고 현장 진료의 신속한 진단 테스트가 특히 유용하다.
- [0013] 이에, 본 발명자들은 C형 간염 바이러스 등과 같은 감염성 질환의 진단뿐만 아니라, 핵산 증폭 검사가 가능한 모든 질환에 대한 진단을 위하여 종이, 전기영동 또는 원심분리/컬럼, 형광과 같은 신호검출 등 다른 특별한 장치 없이 증폭된 DNA를 육안으로 신속히 검출할 수 있는 보다 간단한 방법을 개발하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0015] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1507914호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0016] 본 발명자들은 마이크로입자의 추가만으로 증폭된 DNA를 육안으로 시각화하고, 추가 원심 분리, 프로브 접합, 긴 배양 시간, 신호 생성 또는 희석 단계를 필요로 하지 않는 표적 DNA의 검출 방법을 개발하였는 바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [0017] 이에, 본 발명의 목적은 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법 및 마이크로입자 기반 핵산 검출용 키트를 제공하는 것이다.
- [0019] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0021] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법을 제공한다:
- [0022] (a) 피검체로부터 채취된 시료에서 RNA를 분리하여 cDNA를 합성하는 단계;
- [0023] (b) 비오틴(biotin), 디곡시게닌(digoxigenin), 항원, 표적분자 및 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 각각 표지된 정방향 프라이머(forward primer) 및 역방향 프라이머(reverse primer)로 구성되고, 검출하고자 하는 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트를 이용하여 상기 cDNA를 증폭시키는 단계;
- [0024] (c) 상기 증폭된 cDNA에 스트렙타비딘(streptavidin), 아비딘(avidin), 상기 프라이머에 결합된 항원에 항원-항체 반응을 통해 결합될 수 있는 항체, 상기 프라이머에 결합된 표적분자에 특이적으로 결합하는 앵타머(aptamer) 및 상기 프라이머에 결합된 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 코팅된 마이크로입자(microparticle)를 첨가하는 단계; 및

- [0025] (d) 상기 마이크로입자에 포획된 핵산 증폭산물의 응집을 검출하는 단계.
- [0026] 단, 상기 (c) 단계와 (d) 단계 사이에 원심분리 단계는 포함하지 않음.
- [0027] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 감염성 질환의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다:
- [0028] (a) 피검체로부터 채취된 시료에서 RNA를 분리하여 cDNA를 합성하는 단계;
- [0029] (b) 비오틴(biotin), 디곡시게닌(digoxigenin), 항원, 표적분자 및 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 각각 표지된 정방향 프라이머(forward primer) 및 역방향 프라이머(reverse primer)로 구성되고, 검출하고자 하는 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트를 이용하여 상기 cDNA를 증폭시키는 단계;
- [0030] (c) 상기 증폭된 cDNA에 스트렙타비딘(streptavidin), 아비딘(avidin), 상기 프라이머에 결합된 항원에 항원-항체 반응을 통해 결합될 수 있는 항체, 상기 프라이머에 결합된 표적분자에 특이적으로 결합하는 앵타머(aptamer) 및 상기 프라이머에 결합된 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 코팅된 마이크로입자(microparticle)를 첨가하는 단계; 및
- [0031] (d) 상기 마이크로입자에 포획된 핵산 증폭산물의 응집을 검출하는 단계.
- [0032] 단, 상기 (c) 단계와 (d) 단계 사이에 원심분리 단계는 포함하지 않음.
- [0033] 또한, 본 발명은 비오틴(biotin), 디곡시게닌(digoxigenin), 항원, 표적분자 및 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 각각 표지된 정방향 프라이머(forward primer) 및 역방향 프라이머(reverse primer)로 구성되고, 검출하고자 하는 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트; 및
- [0034] 스트렙타비딘(streptavidin), 아비딘(avidin), 상기 프라이머에 결합된 항원에 항원-항체 반응을 통해 결합될 수 있는 항체, 상기 프라이머에 결합된 표적분자에 특이적으로 결합하는 앵타머(aptamer) 및 상기 프라이머에 결합된 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 코팅된 마이크로입자(microparticle)를 포함하는, 마이크로입자 기반 핵산 검출용 키트로서,
- [0035] 상기 키트는 원심분리 없이 마이크로입자에 포획되는 핵산의 응집을 검출하기 위해 사용되는 것을 특징으로 하는, 키트를 제공한다.
- [0036] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 프라이머 세트는 비오틴 및 디곡시게닌으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 각각 표지된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로 구성될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 마이크로입자는 스트렙타비딘 또는 항-디곡시게닌 항체로 코팅된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 소변, 대변, 및 타액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (b) 단계에서 프라이머 세트는 핵산 증폭산물의 크기가 100 내지 200 bp가 되도록 제작된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (b) 단계에서 증폭은 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 및 등온 증폭 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법에 의해 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 등온 증폭 방법은 재조합 효소 중합 효소 증폭(recombinase polymerase amplification, RPA), 루프 매개 등온 증폭(loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 및 헬리카제 의존 증폭(helicase-dependent amplification, HDA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 마이크로입자의 직경은 0.25 내지 10 μm 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 마이크로입자는 자성 비드(magnetic bead) 또는 폴리스티렌(polystyrene) 입자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 cDNA의 검출 한계 농도는 1 내지 15 IU/ml일 수 있으나, 이에 제한되지 않

는다.

[0045] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 감염성 질환은 C형 간염, B형 간염, 인플루엔자, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 유도 에이즈(AIDS), 결핵, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스(SARS-CoV) 감염증, 및 코로나 바이러스 감염증-19(COVID-19)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0047] 본 발명에 따른 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법은 표적 핵산을 증폭시킨 다음 마이크로입자의 첨가만으로 원심분리, 추가적인 프로브, 배양 또는 희석 등의 별도의 과정이나 장치 없이 마이크로입자에 포획된 핵산 증폭산물의 응집을 육안으로 검출할 수 있으며, 높은 민감도로 쉽고 빠르게 표적 핵산의 증폭산물을 검출할 수 있다. 이에 본 발명에 따른 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법은 C형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(HIV), 결핵균, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스(SARS-CoV), 또는 SARS-CoV-2 등에 의한 감염성 질환을 신속하게 진단하는 데에 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 본 발명의 일 구현예에 따른 핵산 증폭산물 검출 방법으로서 증폭된 cDNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출 시스템의 원리를 도식화하여 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 구현예에 따른 증폭된 HCV cDNA의 존재 여부에 따라 스트렙타비딘 코팅된 마이크로입자 및 항-디곡시게닌 항체 코팅된 마이크로입자 첨가에 의한 응집 결과를 확인한 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 구현예에 따른 증폭된 cDNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출 시스템에서 응집을 통한 핵산 검출을 위한 최적화 조건 및 결과를 나타낸 도면이다.

도 4a 및 4b는 본 발명의 일 구현예에 따른 증폭된 HCV cDNA가 존재하는 경우(도 4a) 및 존재하지 않는 경우(도 4b)에 스트렙타비딘 코팅된 마이크로입자 및 항-디곡시게닌 항체 코팅된 마이크로입자 첨가에 의한 응집 결과를 400x 및 1000x 배율로 확대하여 확인한 도면이다.

도 5는 본 발명의 일 구현예에 따른 증폭된 cDNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출을 이용하여 스트렙타비딘 코팅된 마이크로입자 및 항-디곡시게닌 항체 코팅된 마이크로입자를 첨가한 후 HCV cDNA 농도에 따른 응집 결과를 확인한 도면이다.

도 6은 실제 임상 검체(HCV 양성 4, 5, 6; 음성, N4, N5, N6)로 전기영동한 결과(좌측 도면)와 본 발명의 일 구현예에 따른 증폭된 cDNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출을 이용하여 스트렙타비딘 코팅된 마이크로입자 및 항-디곡시게닌 항체 코팅된 마이크로입자를 첨가한 후 응집을 확인한 결과(우측 도면)를 비교한 도면이다.

도 7은 본 발명의 일 구현예에 따른 증폭된 cDNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출 시스템의 민감도를 기존 핵산 증폭 검출방법을 이용한 경우와 비교하여 확인한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법을 제공한다:

[0051] (a) 피검체로부터 채취된 시료에서 RNA를 분리하여 cDNA를 합성하는 단계;

[0052] (b) 비오틴(biotin), 디곡시게닌(digoxigenin), 항원, 표적분자 및 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 각각 표지된 정방향 프라이머(forward primer) 및 역방향 프라이머(reverse primer)로 구성되고, 검출하고자 하는 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트를 이용하여 상기 cDNA를 증폭시키는 단계;

[0053] (c) 상기 증폭된 cDNA에 스트렙타비딘(streptavidin), 아비딘(avidin), 상기 프라이머에 결합된 항원에 항원-항체 반응을 통해 결합될 수 있는 항체, 상기 프라이머에 결합된 표적분자에 특이적으로 결합하는 앵타머(aptamer) 및 상기 프라이머에 결합된 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 코팅된 마이크로입자(microparticle)를 첨가하는 단계; 및

- [0054] (d) 상기 마이크로입자에 포획된 핵산 증폭산물의 응집을 검출하는 단계.
- [0055] 단, 상기 (c) 단계와 (d) 단계 사이에 원심분리 단계는 포함하지 않음.
- [0056] 본 발명에 있어서, “프라이머”란 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3 hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이트 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 상기 프라이머는 검출하고자 하는 표적이 되는 폴리뉴클레오타이드와의 혼성화를 방해하지 않는 범위에서 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 다양하게 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 그리고 형광 또는 효소를 이용한 표지물질(labeling material)의 결합 등이 있다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머 세트는 비오틴 및 디곡시게닌으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 각각 표지된 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머로 구성될 수 있고, 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 프라이머 세트는 비오틴으로 표지된 정방향 프라이머 및 디곡시게닌으로 표지된 역방향 프라이머로 구성될 수 있으며, 핵산 증폭산물의 크기가 100 bp 내지 200 bp, 100 bp 내지 180 bp, 100 bp 내지 160 bp, 120 bp 내지 200 bp, 120 bp 내지 180 bp, 120 bp 내지 160 bp, 140 bp 내지 200 bp, 140 bp 내지 180 bp, 또는 140 bp 내지 160 bp 가 되도록 제작된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0058] 본 발명에 있어서, “마이크로입자(microparticle)”란 0.1 μm 내지 1000 μm 의 직경을 갖는 입자를 의미하며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 마이크로입자는 직경이 상기 마이크로입자의 직경이 0.1 μm 보다 작을 경우 육안으로 관찰하기 어려우며, 바람직하게는 0.1 μm 내지 10 μm , 0.1 μm 내지 7 μm , 0.1 μm 내지 5 μm , 0.1 μm 내지 3 μm , 0.1 μm 내지 1 μm , 0.2 μm 내지 10 μm , 0.2 μm 내지 7 μm , 0.2 μm 내지 5 μm , 0.2 μm 내지 3 μm , 0.2 μm 내지 1 μm , 0.25 μm 내지 1 μm , 0.25 μm 내지 0.3 μm , 1 μm 내지 10 μm , 또는 1 μm 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0059] 본 발명에 있어서, 상기 마이크로입자는 스트렙타비딘 또는 항-디곡시게닌 항체로 코팅된 자성 비드(magnetic bead) 또는 폴리스티렌(polystyrene) 입자일 수 있으며, 이때 상기 폴리스티렌 입자는 청색 폴리스티렌 입자일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 마이크로입자는 1 mg/ml 내지 20 mg/ml, 1 mg/ml 내지 17 mg/ml, 1 mg/ml 내지 15 mg/ml, 1 mg/ml 내지 12 mg/ml, 1 mg/ml 내지 10 mg/ml, 3 mg/ml 내지 20 mg/ml, 3 mg/ml 내지 15 mg/ml, 3 mg/ml 내지 12 mg/ml, 3 mg/ml 내지 10 mg/ml, 5 mg/ml 내지 20 mg/ml, 5 mg/ml 내지 15 mg/ml, 5 mg/ml 내지 12 mg/ml, 5 mg/ml 내지 10 mg/ml, 3 mg/ml 내지 7 mg/ml, 7 mg/ml 내지 12 mg/ml, 5 mg/ml, 또는 10 mg/ml의 농도로 첨가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0060] 본 발명에 있어서, “항체”란 항원에 특이적으로 결합하여 인식하는 면역글로불린 유전자 또는 이의 단편에서 유래하는 프레임워크 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 의미한다. 인식된 면역글로불린 유전자는 카파, 람다, 알파, 감마, 델타, 엡실론, 및 뮤 불변 영역 유전자를 비롯하여, 무수한 면역글로불린 가변 영역 유전자를 포함한다. 경쇄는 카파 또는 람다로 분류되었다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 델타, 또는 엡실론으로 분류되고, 결과적으로 각각 면역글로불린 부류 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE를 한정한다. 전형적으로, 항체의 항원-결합 영역은 결합 특이성 및 친화성에서 가장 핵심적이게 된다. 일부 실시형태에서, 항체 또는 항체의 단편은 인간, 마우스, 래트, 햄스터, 낙타 등을 포함한, 상이한 유기체에서 유래될 수 있다. 본 발명의 항체는 항체의 바람직한 기능(예를 들어, 당화, 발현, 항원 인식, 이펙터 기능, 항원 결합, 특이성 등)을 개선시키거나 또는 조정하기 위해 1 이상의 아미노산 위치에서 변형되거나 또는 돌연변이된 항체를 포함할 수도 있다.
- [0061] 예시적인 면역글로불린(항체) 구조 단위는 사량체를 포함한다. 각각의 사량체는 폴리펩티드 사슬의 2개의 동일한 쌍으로 구성되며, 각 쌍은 하나의 "경"쇄(약 25 kD) 및 하나의 "중"쇄(약 50-70 kD)를 갖는다. 각 사슬의 N 말단은 항원 인식을 주로 담당하는 약 100 내지 110개 또는 그 이상의 아미노산의 가변 영역을 한정한다. 용어 가변 경쇄(VL) 및 가변 중쇄(VH)는 각각 이들 경쇄 및 중쇄를 의미한다. Fc(즉, 단편 결정가능 영역)는 면역글로불린의 "베이스" 또는 "꼬리부"이고 전형적으로 항체의 부류에 의존적으로 2 또는 3개의 불변 도메인에 기여하는 2개 중쇄로 구성된다. 특이적 단백질과의 결합에 의해, Fc 영역은 각각의 항체가 소정 항원에 대한 적절한 면역 반응을 생성시키는 것을 보장한다. Fc 영역은 또한 다양한 세포 수용체, 예컨대 Fc 수용체, 및 다른 면역

분자, 예컨대 보체 단백질에 결합한다.

- [0062] 본 발명에 있어서, “시료”란 생물체로부터 유래하는 임의의 양의 물질을 의미하며 예컨대 상기 시료는 전혈, 혈청, 혈장, 소변, 대변, 및 타액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 있어서, 상기 시료는 피검체로부터 분리된 것일 수 있으며, 상기 피검체는 예컨대 인간 또는 비-인간인 영장류, 마우스, 래트, 토끼, 개, 고양이, 말, 및 소 등을 포함하는 포유 동물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0063] 본 발명에 있어서, “핵산”이란 하나 이상의 뉴클레오타이드, 즉, 리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 둘 다를 포함하는 분자를 의미한다. 상기 용어는 리보뉴클레오타이드 및 데옥시리보뉴클레오타이드의 중합체 및 단량체를 포함하며, 여기서, 리보뉴클레오타이드 및/또는 데옥시리보뉴클레오타이드는 중합체의 경우에 5' 내지 3' 결합을 통해 함께 결합한다. 리보뉴클레오타이드 및 데옥시리보뉴클레오타이드 중합체는 단일 또는 이중 가닥일 수 있다. 상기 핵산은 DNA, mRNA, mRNA로부터 역전사된 cDNA, 이 cDNA로부터 증폭된 DNA, 증폭된 DNA로부터 전사된 RNA 등을 모두 포함한다.
- [0064] 본 발명의 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법에 있어서, 상기 핵산의 종류에는 제한이 없으며, 예컨대 C형 간염 바이러스(hepatitis C virus, HCV), B형 간염 바이러스(hepatitis B virus, HBV), 인플루엔자(influenza) 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus, HIV), 결핵균(myco bacterium tuberculosis), 중증 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스(Severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV), 또는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스 2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 핵산을 포함할 수 있다.
- [0065] 본 발명에 있어서, “증폭”이란 주형으로서 하나 이상의 핵산 분자를 사용하여, 핵산 분자를 다수의 복사체로 작제하거나 상기 핵산 분자에 대해 상보적인 다수의 복사체를 작제하는 것을 의미한다.
- [0066] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계에서 증폭은 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 및 등은 증폭 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법에 의해 이루어질 수 있으며, 상기 등은 증폭 방법은 재조합 효소 중합 효소 증폭(recombinase polymerase amplification, RPA), 루프 매개 등은 증폭(loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 및 헬리카제 의존 증폭(helicase-dependent amplification, HD A)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 본 발명에 있어서, “검출”이란 핵산 증폭산물의 존재 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 핵산 증폭산물의 존재 수준(핵산 수)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 같은 맥락에서, 본 발명에서 상기 핵산 증폭산물의 존재 수준을 측정하는 것은 존재 여부를 측정하는 것(즉, 존재 유무를 측정하는 것), 또는 상기 핵산 증폭산물의 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다. 상기 측정은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 핵산 증폭산물 존재 여부 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험법들이 이에 포함된다. 각 방법 별로 구체적 핵산 증폭산물 수준 비교 방식은 당업계에 잘 알려져 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 핵산 증폭산물의 검출은 마이크로입자에 포획된 핵산 증폭산물의 응집에 의해 측정될 수 있다.
- [0068] 본 발명에 있어서, “응집”이란 2개 이상의 분산되어 있는 핵산이 마이크로입자에 포획(capture)됨으로써 모여 집합상태를 이루는 것을 의미한다.
- [0069] 본 발명에 있어서, “앰플리콘(amplicon)”이란 핵산 증폭 반응에서 표적 폴리뉴클레오타이드로부터 단일 또는 이중 가닥 형태로 증폭되는 표적 서열을 의미한다.
- [0070] 본 발명에 있어서, 상기 cDNA의 검출 한계 농도는 1 IU/ml 내지 15 IU/ml, 1 IU/ml 내지 13 IU/ml, 1 IU/ml 내지 10 IU/ml, 3 IU/ml 내지 15 IU/ml, 3 IU/ml 내지 13 IU/ml, 3 IU/ml 내지 10 IU/ml, 5 IU/ml 내지 15 IU/ml, 5 IU/ml 내지 13 IU/ml, 5 IU/ml 내지 10 IU/ml, 7 IU/ml 내지 15 IU/ml, 7 IU/ml 내지 13 IU/ml, 또는 7 IU/ml 내지 10 IU/ml일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 본 발명에 따른 핵산 증폭산물 검출 방법을 통해 농도가 15 IU/ml 미만으로 낮은 경우에도 cDNA의 증폭산물을 검출할 수 있다.
- [0071] 본 발명에 있어서, 상기 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법은 민감도가 90 % 이상일 수 있으며, 예컨대 90 % 내지 100 %, 90 % 내지 98 %, 90 % 내지 96 %, 90 % 내지 94 %, 90 % 내지 92 %, 92 % 내지 95 %, 92 % 내지 97 %, 92 % 내지 100 %, 95 % 내지 97 %, 95 % 내지 100 %, 97 % 내지 100 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 또는 100 %일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0072] 본 발명에 따른 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출 방법으로서, RNA를 추출 후 역전사를 통해 cDNA를 합성하고 이를 증폭시킨 다음 증폭된 cDNA에 마이크로입자를 처리하여 응집을 통해 시각적으로 증폭된 cDNA를 검출하는 마이크로입자 기반 시각적 검출 시스템을 “STAT-DNA” 라고 칭할 수 있다.
- [0073] 또한, 본 발명은 비오틴(biotin), 디곡시게닌(digoxigenin), 항원, 표적분자 및 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 각각 표지된 정방향 프라이머(forward primer) 및 역방향 프라이머(reverse primer)로 구성되고, 검출하고자 하는 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트; 및
- [0074] 스트렙타비딘(streptavidin), 아비딘(avidin), 상기 프라이머에 결합된 항원에 항원-항체 반응을 통해 결합될 수 있는 항체, 상기 프라이머에 결합된 표적분자에 특이적으로 결합하는 앵타머(aptamer) 및 상기 프라이머에 결합된 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 코팅된 마이크로입자(microparticle)를 포함하는, 마이크로입자 기반 핵산 검출용 키트로서,
- [0075] 상기 키트는 원심분리 없이 마이크로입자에 포획되는 핵산의 응집을 검출하기 위해 사용되는 것을 특징으로 하는, 키트를 제공한다.
- [0076] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 컨테이너, 지시서(instruction); 및 본 발명에 따른 상기 프라이머 세트 및 마이크로입자를 포함할 수 있다. 상기 컨테이너는 본 발명에 따른 상기 프라이머 세트 및 마이크로입자를 포장하는 역할을 할 수 있고, 보관 및 고정하는 역할을 할 수도 있다. 상기 컨테이너의 재질은 예컨대, 플라스틱, 유리병 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 지시서에는 예를 들어, 키트의 특성, 구성 또는 사용방법 등이 기재되어 있을 수 있다.
- [0077] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 상기 프라이머 세트 및 마이크로입자 외에 당해 기술분야에 공지된 PCR 또는 등온 핵산 증폭에 통상적으로 사용되는 물질을 더 포함할 수 있으며, 예컨대 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 또는 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0078] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 질병의 진단 또는 발병 예측을 위한 정보제공방법을 제공한다:
- [0079] (a) 피검체로부터 채취된 시료에서 RNA를 분리하여 cDNA를 합성하는 단계;
- [0080] (b) 비오틴(biotin), 디곡시게닌(digoxigenin), 항원, 표적분자 및 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 각각 표지된 정방향 프라이머(forward primer) 및 역방향 프라이머(reverse primer)로 구성되고, 검출하고자 하는 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트를 이용하여 상기 cDNA를 증폭시키는 단계;
- [0081] (c) 상기 증폭된 cDNA에 스트렙타비딘(streptavidin), 아비딘(avidin), 상기 프라이머에 결합된 항원에 항원-항체 반응을 통해 결합될 수 있는 항체, 상기 프라이머에 결합된 표적분자에 특이적으로 결합하는 앵타머(aptamer) 및 상기 프라이머에 결합된 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나로 코팅된 마이크로입자(microparticle)를 첨가하는 단계; 및
- [0082] (d) 상기 마이크로입자에 포획된 핵산 증폭산물의 응집을 검출하는 단계.
- [0083] 단, 상기 (c) 단계와 (d) 단계 사이에 원심분리 단계는 포함하지 않음.
- [0084] 본 발명에 있어서, 상기 질병은 핵산 증폭 검사가 가능한 질병이라면 그 종류에 제한이 없으며, 감염성 질환 또는 암 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 질병은 감염성 질환일 수 있다.
- [0085] 본 발명에 있어서, “감염성 질환”이란 병원성 미생물이 사람이나 동물, 식물의 조직, 체액, 표면에 정착하여 증식함으로써 발생하는 질환을 의미하며, 감염 경로, 전염성 여부에 따라 여러 종류로 구분될 수 있다. 상기 감염은 바이러스성 감염, 진균 감염, 세균 감염, 원충 감염 및 기생충 감염을 포함한다. 본 발명에 있어서, 상기 감염성 질환은 C형 간염, B형 간염, 인플루엔자, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 유도 에이즈(AIDS), 결핵, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스(SARS-CoV) 감염증, 및 코로나 바이러스 감염증-19(중증 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스 2 감염증)(SARS-CoV-2; COVID-19)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0086] 본 발명의 일 실험예에서는 본 발명에 따른 핵산 증폭산물 검출 방법을 이용하여 HCV의 cDNA를 증폭시킨 후 항-디곡시게닌 항체 코팅된 마이크로입자 및 스트렙타비딘 코팅된 마이크로입자를 첨가하였을 때 cDNA 증폭산물이 존재하는 경우 상기 마이크로입자에 의해 응집이 발생하는 것을 육안으로 확인하였다. 이때 상기 마이크로입자의 농도는 앵플리콘 응집의 명확한 시각화를 생성하도록 최적화되었으며, 마이크로입자의 최적 농도는 10 mg/ml

의 스트렙타비딘 자성 비드 2 μ l 및 5 mg/ml의 항-디곡시게닌 알파 입자 1 μ l 로 결정되었다(실험예 1 참조).

[0087] 본 발명의 다른 실험예에서는 본 발명에 따른 핵산 증폭산물 검출 방법의 재현 가능성 및 검출 한계(LOD)를 10^1 , 10^2 , 10^3 및 10^4 IU/ml 농도의 HCV cDNA를 이용하여 확인한 결과, 10^1 IU/ml 정도에서도 응집이 선명하게 보이는 것이 관찰되어, 15 IU/ml 미만의 낮은 농도의 검출 한계를 가진 분석이 권장되었다(실험예 2 참조).

[0088] 본 발명의 또 다른 실험예에서는, 본 발명에 따른 핵산 증폭산물 검출 방법을 이용하는 경우 높은 민감도로 핵산 증폭산물을 검출할 수 있음을 확인하였다(실험예 3 참조).

[0090] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0092] [실시예]

[0093] 실시예 1. 증폭된 DNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출 방법: 바이오센서의 구축

[0094] 본 발명에 따른 증폭된 DNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출 시스템(STAT-DNA)의 원리는 도 1에 나타내었다. 최종 최적화된 프로토콜은 다음과 같은 단계로 진행되었다.

[0095] 정방향/역방향 프라이머로 증폭된 핵산은 각각 5' 및 3' 말단에서 비오틴(biotin) 및 디곡시게닌(digoxigenin)과 같은 다른 분자로 표지하였다. 비오틴화된(biotinylated) 정방향 프라이머 및 디곡시게닌으로 표지된 역방향 프라이머로 RT-PCR을 통해 증폭 후, 2 μ l의 스트렙타비딘(streptavidin) 코팅된 자성 비드 현탁액(1 μ m 크기, 10 mg/ml Dynabead MyOne Streptavidin C1, Life Technologies, Grand Island, NY, 미국) 및 1 μ l의 항-디곡시게닌 폴리스티렌(polystyrene) 입자(250-350 nm 크기의 항-디곡시게닌 알파 공여체 비드, PerkinElmer, Waltham, MA, 미국, pH 7.2의 PBS에서 5 mg/ml)를 증폭된 DNA를 포함하는 PCR 튜브에 추가한 다음 시각적 응집을 생성하고 60 μ l LISS(Low Ionic Strength Solution) 완충액(BLISS, Ortho-Clinical Diagnostics)을 추가하여 양성(+) 결과와 음성(-) 결과를 명확하게 구분하였다.

[0096] 입자 응집은 증폭된 HCV cDNA의 존재 하에 상기 비드를 첨가한 후 몇 초 이내에 시각화되었다. 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 표적이 없는 상태에서 입자의 응집은 음성 결과를 나타내었으며, 스트렙타비딘 코팅된 자성 비드(Dynabeads) 대신 스트렙타비딘 코팅된 청색 폴리스티렌 입자(0.3-0.39 μ m, SPHERO, Spherotech, Lake Forest, IL, 미국)와 같은 다른 마이크로 입자로 동일한 실험을 추가로 수행하였을 때, 증폭된 HCV cDNA의 존재 여부에 따라 비드 첨가에 의한 응집 양성 및 음성 결과를 육안으로 명확하게 관찰할 수 있었다.

[0097] 응집으로 인한 혼탁물은 시각적으로 또는 스마트폰과 같은 다른 광학 기기로 관찰되었으며, 양성 결과 및 음성 결과를 객관적으로 구분하기 위해 스마트폰을 사용하였다.

[0098] HCV 앰플리콘(amplicon)의 직접적인 시각적 검출이 최적화되었고, HCV RNA 검출 및 정량화를 위해 분석 감도 및 검출 시스템의 비교가 기존 실시간 PCR 테스트, Roche cobas 6800 시스템의 cobas HCV 테스트(Roche Molecular Diagnostics International, Rotkreuz, 스위스)와 비교하여 평가되었다.

[0099] [최적화]

[0100] 입자 농도 최적화를 위해 0.5 μ l 내지 2 μ l 범위의 다양한 입자 농도로 분석을 수행하였으며, 모든 실험은 세 번 이상 수행하였다.

[0102] 실시예 2. HCV RNA 추출 후 cDNA 합성 및 RT-PCR

[0103] 2-1. 샘플 수집

[0104] 2018년 5월부터 2020년 10월까지 서울 아산 병원에서 HCV에 감염된 환자로부터 혈청 샘플을 채취하였다. Roche cobas 6800 시스템(Roche Molecular Diagnostics)으로 일상적인 HCV RNA 테스트 후 남은 또는 잔류 혈청 샘플을 각각 분취하여 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였으며, 실험은 서울 아산 병원 윤리 심사위원회의 승인을 받았다(IRB No. 2017-1742).

[0106] **2-2. RNA 추출**

[0107] 제조업체의 지침에 따라 QIAamp MinElute Viurs Spin Kit(Qiagen, Germantown, MD)를 사용하여 임상 샘플로부터 50 μ l의 HCV RNA를 추출하였다. 그런 다음 상기 핵산은 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

[0109] **2-3. cDNA 합성**

[0110] HCV cDNA 합성은 제조업체의 프로토콜에 따라 Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche, Mannheim, 독일)를 사용하여 수행하였다.

[0111] 즉, 5 μ l의 분리된 RNA 샘플을 0.5 μ l의 Transcriptor Reverse Transcriptase(Roche), 2 μ l의 랜덤 6량체 (20 pmol), 2 μ l의 데옥시뉴클레오타이드(deoxynucleotide) 혼합물, 0.5 μ l의 Protector RNase inhibitor, 6 μ l의 뉴클레아제(nuclease)가 없는 물(Roche), 및 상기 물질들의 5x 반응 혼합물 4 μ l를 함유하는 20 μ l의 역전사(reverse transcription, RT) 반응 혼합물과 혼합하였다. 그런 다음 샘플을 cDNA 합성 프로토콜을 사용하여 FX 열 순환기(Bio-Rad, California, USA)에서 배양하였다(25 $^{\circ}$ C에서 10 분 동안, 그 다음 55 $^{\circ}$ C에서 30 분 동안, 그런 다음 85 $^{\circ}$ C에서 5 분 동안). cDNA 샘플은 PCR 분석까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

[0113] **2-4. RT-PCR**

[0114] HCV mRNA의 단순 시각적 검출을 위한 역전사-중합효소연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)의 프라이머는 HCV의 5'-비번역 영역(5'-UTR)(Chen, 2016 # 637)에 대해 특이적으로 특별히 설계된 한 쌍의 프라이머를 사용하여 변형되었으며, HCV 앰플리콘의 생성된 산물의 길이는 157 bp였다.

[0115] 이때, 사용한 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

Primer	Sequence	Location	PCR target size
Forward primer	5' -biotin-TGCACGGTCTACGAGAC-3' (서열번호 1)	322-339 [†]	157 Bp
Reverse primer	5' -Dig_N/CGACCGGGTCCTTTCTTGAT-3' (서열번호 2)	182-203	

[0117] 정방향 프라이머는 5' 말단에서 비오틴화되었고 역방향 프라이머는 5' 말단에서 디곡시게닌으로 표시되었다. 이들은 각각 스트렙타비딘-표지된(streptavidin-labeled) 자성 비드(Dynabead MyOne Streptavidin C1) 및 항-디곡시게닌 항체 코팅된 폴리스티렌 입자(항-디곡시게닌 알파 공여체 비드, PerkinElmer)로 포획하기 위해 준비되었다.

[0118] RT-PCR 분석은 QIAGEN Taq PCR Master Mix Kit(Qiagen)를 사용하여 사용 설명서에 따라 수행하였다. 즉, 5 μ l의 HCV cDNA를 12.5 μ l의 QIAGEN Taq PCR Master Mix(Qiagen)를 포함하는 25 μ l의 반응 부피에서 증폭시켰다; 10 μ mol/L의 비오틴화된 정방향 프라이머 1 μ l; 10 μ mol/L의 디곡시게닌 표지된 역방향 프라이머 1 μ l 및 증류수(distilled water, DW). 다음 조건에서 Applied Biosystems 7500 기기[AB Sciex, Foster City, CA (이전 Applied Biosystems)]를 이용하여 열 순환을 수행하였다: 94 $^{\circ}$ C, 5 분; 95 $^{\circ}$ C에서 30초 동안, 56 $^{\circ}$ C에서 30초 동안, 72 $^{\circ}$ C에서 30초 동안, 및 72 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 최종 연장(40 cycle). 그런 다음, 2 % 아가로스(agarose) 겔 전기 영동을 사용하여 HCV PCR 산물을 검출하였다.

[0120] **[실험예]**

[0121] **실험예 1. 분석 최적화: 앰플리콘 포획 및 비앰플리콘 자성 비드의 이동성 차이 확인**

[0122] 마이크로입자(항-디곡시게닌 항체 코팅된 마이크로입자, 스트렙타비딘 코팅된 마이크로입자)의 농도는 앰플리콘 응집의 명확한 시각화를 생성하도록 최적화되었으며, 마이크로입자의 최적 농도는 2 μ l의 스트렙타비딘 자성

비드(S-b)/청색 폴리스티렌 입자(Blue-b)) 10 mg/ml 및 1 μ l의 항-디곡시게닌 알파 입자(alpha-b) 5 mg/ml로 결정되었다. 이러한 마이크로입자의 농도 및 함량에서 응집을 통한 핵산 검출을 위한 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에서는 tapping의 방법을 실험자마다 차이가 있을 수 있어 mixer(HulaMixer Sample Mixer, Thermo Fisher Scientific)를 10초 정도 사용하여 재현성을 높인 예시를 보여주고 있는데, mixer의 조건을 최적화하여 음성과 응집이 일어난 양성 검체간 구별이 되도록 하였다.

[0123] 마이크로입자에 대한 접합과 같은 여러 최적화를 피하기 위하여 본 발명에서 재현 가능성을 위해 상업적으로 이용 가능한 항체가 코팅 또는 접합된 마이크로입자를 선택하였다. 시판되는 여러 항-디곡시게닌 입자 중에서, 디곡시게닌 표지된 역방향 프라이머를 포획하기 위해 항-디곡시게닌 폴리스티렌 입자(250-350 nm 크기의 항-디곡시게닌 알파 공여체 비드, PerkinElmer, Waltham, MA, 미국, pH 7.2의 PBS에서 5 mg/ml)를 선택하였다.

[0124] 기존 보고된 연구인 lateral flow 형태의 분자진단기술에서는 강렬한 적색선을 생성하기 위한 포획 시약의 최소량은 스트렙타비딘 코팅된 마이크로입자 및 항-디곡시게닌 항체 코팅된 마이크로입자 모두에 대해 20 μ g을 사용한 반면 본 발명에서는 5-10 μ g 정도로 적은 양을 사용할 수 있었다. 또한 기존 lateral flow 형태의 분자진단기술에 필요한 측면 흐름 딥스틱(dipstick), 멤브레인 페이퍼, 선(line) 조제(dispensing)를 위한 조제 시스템은 본 발명에서 필요하지 않았으며, 단백질 차단제, 안정제, 멤브레인에서 포획 시약의 고정 필요하지 않았다. 기존 lateral flow 형태의 기술을 적용한 검출 과정에는 가열을 포함한 추가 혼성화 단계 등 추가 단계가 필요하지만 본 발명에서는 이러한 추가 과정이 필요없었다.

[0125] 기존 측면 흐름 방법(lateral flow)에 기반한 DNA 센서의 안정성 또는 저장 수명은 제한되었으며, 원심 미세 유체 플랫폼, 형광 스캐닝 또는 UV 광원을 포함한 복합 설정 및 검출 메커니즘이 요구되었지만 본 발명에서는 전혀 필요하지 않았다.

[0126] 스마트폰 기반의 PCR 애플리곤 시각적 검출은 전력, 모터 구동 또는 원심력의 도움 없이 수행되었다.

[0127] 먼저, 표적 애플리곤을 포획하는 '양성' 자성 비드와 표적 애플리곤을 포획하지 않는 '음성' 자성 비드 사이의 입자 응집 차이를 몇 분 내에 관찰하였다.

[0128] PCR 반응 튜브에 마이크로입자를 추가한 후, 입자 응집을 스마트폰뿐만 아니라 시각적으로 모니터링하였다. 이 직접적인 육안 관찰은 스마트폰으로 확인되었으며, 도 2에 나타난 바와 같이 양성 샘플은 특징적인 응집 및 침전을 나타내었고, 음성 대조군은 응집 및 침전 없이 흐려진 용액으로 유지되었다. 또한, 입자 응집을 400x 및 1000x 배율로 확대하여 관찰한 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이 표적 애플리곤 존재 하에 스트렙타비딘 코팅된 자성 비드 및 항-디곡시게닌 항체 코팅된 알파 공여체 비드 첨가 시 응집이 형성되는 것을 확인하였으며, 표적 애플리곤이 존재하지 않는 경우 도 4b에 나타난 바와 같이 응집이 형성되지 않는 것을 확인하였다.

[0130] 실험예 2. 재현 가능성 및 검출 한계

[0131] 본 발명에 따른 방법의 정밀도 및 검출 한계(LOD)는 HCV cDNA를 10^1 , 10^2 , 10^3 및 10^4 IU/ml 농도로 연속 희석하여 결정되었다. 본 발명에 따른 증폭된 cDNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출 바이오센서의 재현 가능한 결과는 연속 희석 샘플로 5일 동안 두 번의 실험을 수행하여 얻었다. 상기 바이오센서의 검출 한계는 기존의 연속 희석된 PCR 애플리곤의 아가로스 겔 방법으로 얻은 결과와 비교함으로써 결정되었다.

[0132] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 증폭된 cDNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출 바이오센서를 이용하여 스트렙타비딘 코팅된 청색 폴리스티렌 입자(A)/자성 비드(B) 및 항-디곡시게닌 항체 코팅된 알파 공여체 비드를 첨가한 후 증폭된 cDNA의 응집을 확인하였을 때, NTC(no template control)에서는 응집이 발생하지 않은 반면, $\sim 10^1$ IU/ml 정도에서도 응집이 선명하게 보이는 것이 관찰되었다. 상기 바이오센서는 기존 PCR 또는 실시간 PCR과 비슷하였고, 15 IU/ml 미만의 낮은 HCV RNA 검출 한계를 가진 분석이 권장되었다.

[0134] 실험예 3. 민감도, 분석 특이성

[0135] 본 기술의 분석 특이성을 평가하기 위해, HCV 바이러스 이외 다른 여러 바이러스 균주의 핵산을 사용하였다.

[0136] 본 발명에 따른 증폭된 HCV 핵산 진단용 마이크로입자 기반 시각적 검출 바이오센서는 다음 8 가지 바이러스의 핵산을 검출하지 않았다; 인간리노바이러스(human rhinovirus, HRV), 인플루엔자(influenza) A, B, 노로바이러스

스(norovirus), 인간 마타페누모바이러스(matapenumovirus), 파라인플루엔자타입3(parainfluenza virus type 3, PIV3), CoV-229E, 아데노바이러스(adenovirus). DNA 바이오센서 결과는 실시간 PCR 결과와 일치하였다. 비교에 사용된 각 바이러스와 실시간 PCR 결과 (CT(Cycle Threshold))값은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

연구검체번호	날짜	비교에 이용한 바이러스	CT 값
AMC-0001	190403	HRV	33.59
AMC-0002	190403	Flu B	30.16
AMC-0003	190403	Flu A(H3)	32.08
AMC-0015	190408	Norovirus	23.95
AMC-0021	190411	hMPV	23.17
AMC-0022	190411	PIV 3	18.08
AMC-0033	190418	CoV-229E	19.87
AMC-0058		ADV	20.03

이와 같이, 본 발명에 따른 증폭된 cDNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출 바이오센서는 분석 특이성을 가지는 것을 알 수 있었다.

또한, 본 발명에 따른 바이오센서의 민감도를 확인하기 위해, 실제 임상 검체(HCV 양성 4, 5, 6; 음성 N4, N5, N6)로 전기영동한 결과와 본 발명에 따른 방법으로 스트렙타비딘 코팅된 마이크로입자(S-b) 및 항-디곡시게닌 항체 코팅된 알파 공여체 비드(alpha-b)를 첨가하였을 때의 응집 결과를 비교한 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 HCV 양성(4, 5, 6) 검체에서 응집이 일어나는 것을 관찰하였다.

이에 더하여, 기존 핵산 증폭 검출방법과 비교했을 때, 도 7에 나타낸 바와 같이 기존 핵산 증폭 검출방법을 이용한 경우 PCR 40회 사이클에서의 전기영동 결과에서는 밴드가 관찰되지 않고(도 7의 상단 도면 내 화살표), 45회 사이클에서의 전기영동 결과에서만 밴드가 관찰되는 것을 확인한 반면, 본 발명에 따른 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출방법을 이용한 경우 PCR 40회 사이클 수행시에도 선명한 응집(양성) 반응을 나타내는 것을 확인하였다(도 7의 하단 도면).

따라서, 상기 결과로부터 본 발명에 따른 마이크로입자 기반 핵산 증폭산물 검출방법을 이용할 경우, 높은 민감도로 표적 핵산의 증폭산물을 검출할 수 있음을 확인하였다.

실험예 4. 임상 샘플과의 비교

본 발명에 따른 증폭된 cDNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출 바이오센서는 Roche Cobas 6800 HCV 테스트(Roche HPV; Roche Molecular Diagnostics, Pleasanton, CA, 미국)의 결과와 비교되었다. 54개의 냉동 샘플 중 32개는 Roche HCV 키트와 비교하여 상기 바이오센서에 의해 HCV에 대해 양성으로 확인되었고 22개는 음성으로 확인되었다. 모두 100% 기준 결과와 일치하였다.

실험예 5. 시각적 검출 시스템의 장점

본 발명에 따른 증폭된 cDNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출 바이오센서는 특히 측면 흐름 기반 검출과 비교하여 DNA 센서 중에서 가장 간단한 시각적 검출 시스템 중 하나였다. 이는 또한 임상 등급 HCV real-time PCR에 비교하여 견고하고 민감하였다. 본 발명에 따른 증폭된 cDNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출 바이오센서는 기존 실시간 PCR에 비교하여 고감도로 여러 번의 배양, 흡착/용리 및 세척 단계 없이 몇 분 안에 HCV 앰플리콘을 검출할 수 있었다.

HCV 감염으로 진단받은 사람의 수를 개선하는 것은 바이러스성 감염을 제거하는 데 중요하며, HCV 스크리닝 및 진단을 위해 POC를 포함한 기존 HCV 검사에 대한 대안이 시급히 필요하다.

본 발명에 따른 증폭된 cDNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출 바이오센서를 통해 증폭된 DNA를 식별할 때 몇 가지 장점이 있는데, 상기 시스템은 특별한 정교한 기기, 고정화 기술, 표면 플라즈몬(plasmon) 공명과 같은 변환 기술(Qiu, 2020 # 688), 전기 화학적 변환(Abad-Valle, 2005 # 689), 및 표면 강화 Raman 산란(SERS) 기반

바이오센서(Wang, 2019 # 686)를 필요로 하지 않았다. 또한, 마이크로입자만 눈에 띄기 때문에 색상이나 신호 발생 과정이 필요하지 않았으며, 시각화가 생성되는 PCR 반응 튜브로 인해 구동력이나 미세 유체 작동이 필요하지 않았다. 이전 연구에서 PASS-DNA(Yang, 2019 # 608)의 주요 한계는 검출을 위한 분리막의 필요성이었다.

[0150] 금 나노입자(AuNP)는 표면 플라즈몬 공명(SPR)과 같은 특성을 가지며 가시적인 색상과 스펙트럼 변화를 겪는다(Ghasemi, 2018 # 699). 따라서, pH, 이온 강도, 촉매 DNA 회로 또는 전하 의존적 방식에 의해 유도된 가교, 비가교 또는 변형되지 않은 전하 기반 응집에 기반한 금 나노입자 응집은 핵산 검출을 위한 비색 분석에 널리 사용되어왔다(Ghasemi, 2018 # 699; Mohammed, 2019 # 697; Ravan, 2020 # 698; Shawky, 2017 # 696). 그러나 콜로이드 용액이 적색에서 청색으로 변색되기 위해서는 금 나노입자의 응집을 유도하기 위한 정교한 노력이 필요하다.

[0151] 일반적으로, 특히 실시간 PCR 형식에서 프로브 기반 검출과 같은 추가 특정 검출 설계를 고려하지 않는 한, 프라이머-다이머(primer-dimer)는 문제가 되는 거짓 양성을 생성할 수 있다. 그러나 본 발명에 따른 증폭된 cDNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출 바이오센서는 프라이머-다이머와 같은 매우 짧은 서열로 입자가 닫힐 수 없기 때문에 프라이머-다이머에 의한 영향을 최소화한다.

[0152] 자성 나노입자 기반 포획은 우수한 분산, 저렴한 비용, 간편한 분리, 버퍼 시스템의 정제 및 신호 검출로 인해 DNA 센서에 널리 사용되어 왔다(Tang, 2020 # 701). 그러나 그들의 신호 검출에는 형광, 전기 화학 또는 화학 발광을 위한 추가 신호 개발 프로세스가 요구되었다(Zhuang, 2019 # 702; Cortina, 2016 # 704; Ali, 2016 # 703).

[0153] 본 발명에 따른 증폭된 cDNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출 방법에서는 자성으로 제어 가능한 응집, 정제 및 분리를 위해 자성 나노입자의 특성을 사용하지 않았다. 자성 입자의 역할은 그들이 응집될 때 육안으로만 볼 수 있다. 이는 상기 방법에서 스트렙타비딘 코팅된 청색 입자의 역할과 동일하다.

[0154] 분자 검출에 있어 단순하고 저렴하며 복잡한 기기가 필요하지 않기 때문에 자원이 제한된 환경에서 분자 POC 용 DNA 바이오센서 개발이 촉진되었으며(Sayad, 2018 # 681), 측면 유동 면역분석법(lateral flow immunoassay, LFIA)은 이러한 요구를 충족한다. HCV를 검출하기 위해 PCR과 LFIA를 결합한 여러 연구가 발표되었으나(Zhuang, 2019 # 702), LFIA에 의해 증폭된 DNA의 검출은 다소 복잡한 설정이며 포획 올리고(oligo)(Liu, # 532; Gao, # 534; Abad-Valle, 2005 # 689) 또는 항체(Rosa, #533), 및 정교한 검출 프로브 또는 서열 디자인(Kalogianni, 2006 # 679)과 같은 센서의 표면에 대한 기술이 필요하다. 또한, 타겟과의 혼성화를 위해서는 가열 공정도 필요하다(Kalogianni, 2006 # 679). 포획된 DNA를 검출하기 위해서는 형광 스캐닝(Dou, 2014 # 682) 또는 청색광 조명 하에 시각적 RT-LAMP-CRISPR 검출(Wang, 2021 # 690)을 포함한 신호 검출 단계를 필요로 한다.

[0155] 마이크로입자에 대한 접합과 같은 여러 최적화를 피하거나 최적화 중에 예상치 못한 가변성을 제거하기 위하여, 상업적으로 이용 가능한 항체가 코팅 또는 접합된 마이크로입자를 비오틴 또는 디곡시게닌 표지된 프라이머를 포획하기 위해 선택하여 준비하였다. 시판되는 여러 항-디곡시게닌 입자 중에서 PerkinElmer 알파 공여체 입자는 스트렙타비딘 코팅된 마이크로입자와 함께 DNA 앰플리콘의 응집을 성공적으로 생성하였다. 항-디곡시게닌 알파 공여체 입자는 250-350 nm 크기의 항-디곡시게닌 라텍스(latex) 기반 입자였으며(Yu, 2015 # 683), 원래 동질(세척 없음) 비드 기반 샌드위치 면역 분석에 사용되었다.

[0156] 스마트폰 기반 PCR 앰플리콘의 시각적 검출은 전력, 모터 구동 또는 원심력의 도움 없이 처음으로 달성되었다(Gou, 2018 # 685). 본 발명에 따른 증폭된 cDNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출 바이오센서는 스마트폰 기반 검출에서도 검출되며, 이는 육안으로 응집을 시각화하는 것보다 더 식별 가능하고 정량적이었다. 또한 Sample-in-answer-out 기능이 있는 완전히 통합된 마이크로입자 기반 NAT가 저렴하고 사용자 친화적이며 빠르고 강력하고 자원 제한 설정에서 POCT의 구현을 상당히 개선할 것으로 예상되었다.

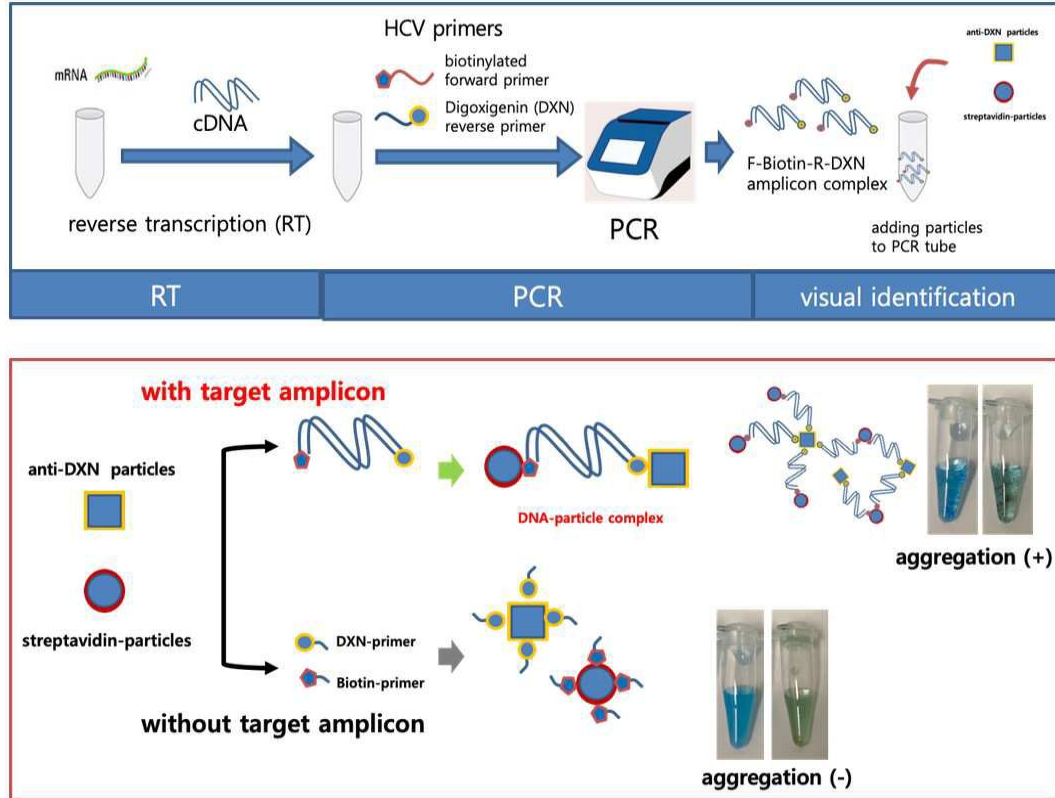
[0157] 개념 증명을 위해, 핵산 증폭을 위한 기존의 2 단계 PCR을 사용하였다. 그러나 RT-qPCR의 시간 소모적인 장애를 극복하기 위해 등은 DNA 증폭 기술이 개발되어 현장에서 감염성 사망의 분자 진단을 제공하였다. 등은 증폭 방법(예: 재조합 효소 증폭 효소 증폭(recombinase polymerase amplification, RPA) 및 루프 매개 등은 증폭(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 및 헬리카제 의존 증폭(helicase-dependent amplification, HDA)도 본 발명에 따른 증폭된 cDNA의 마이크로입자 기반 시각적 검출 시스템과 호환된다.

[0159] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해

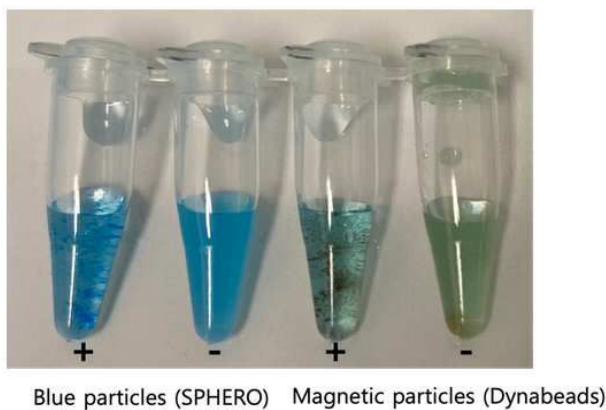
할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

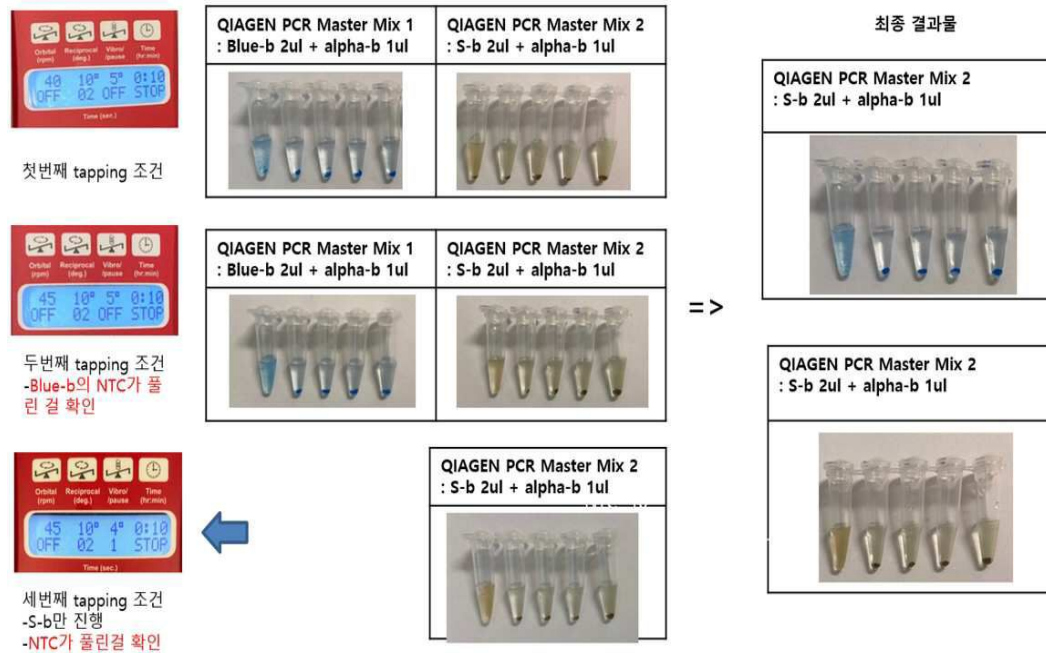
도면1



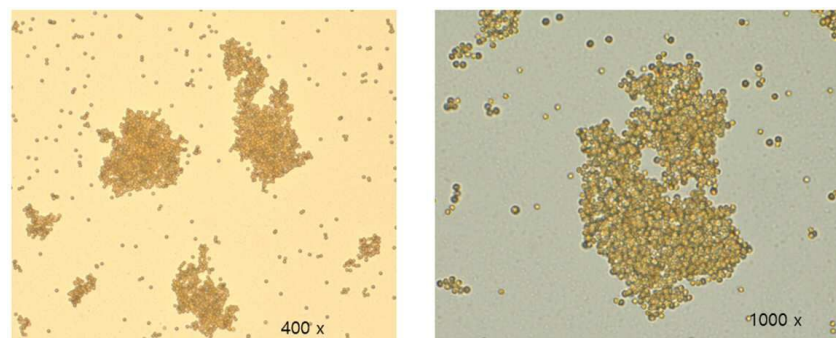
도면2



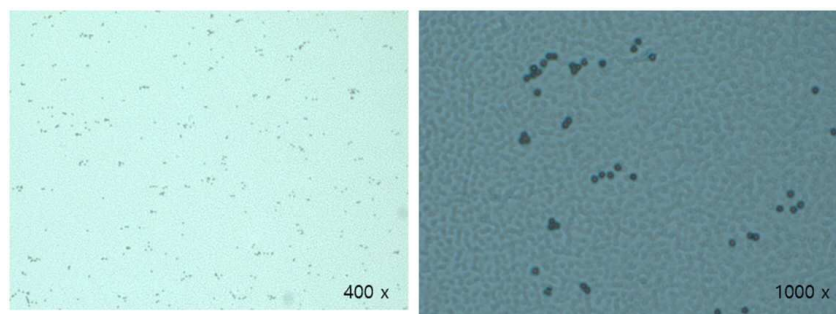
도면3



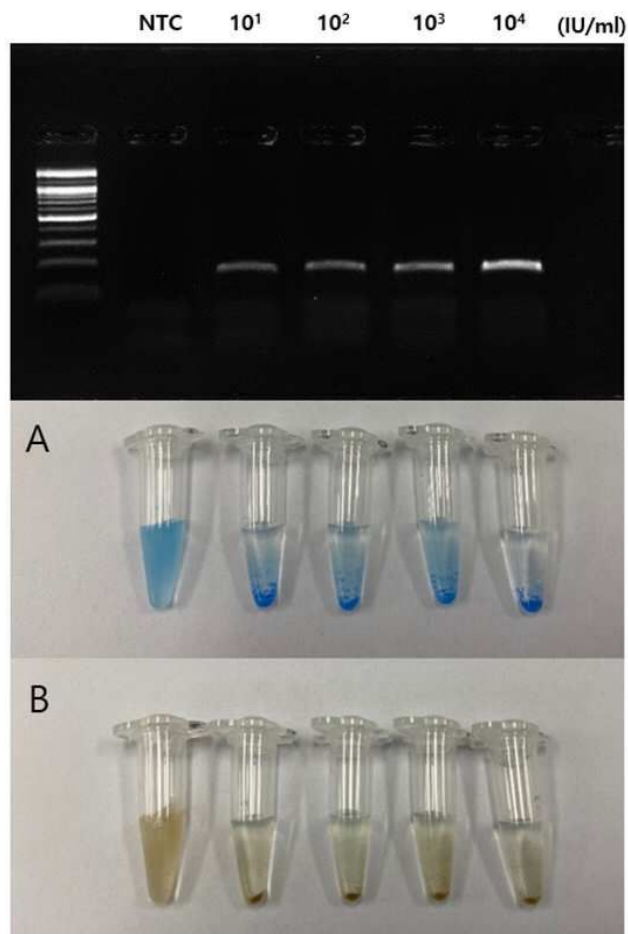
도면4a



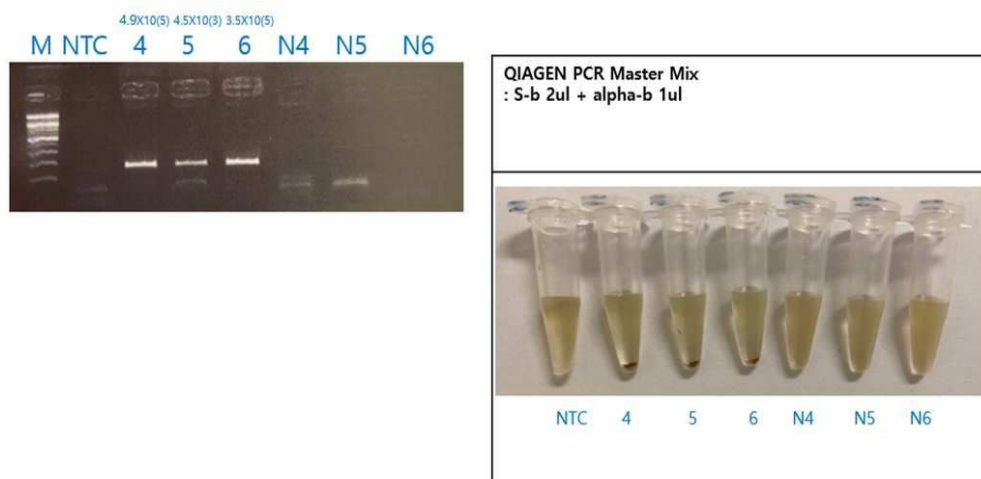
도면4b



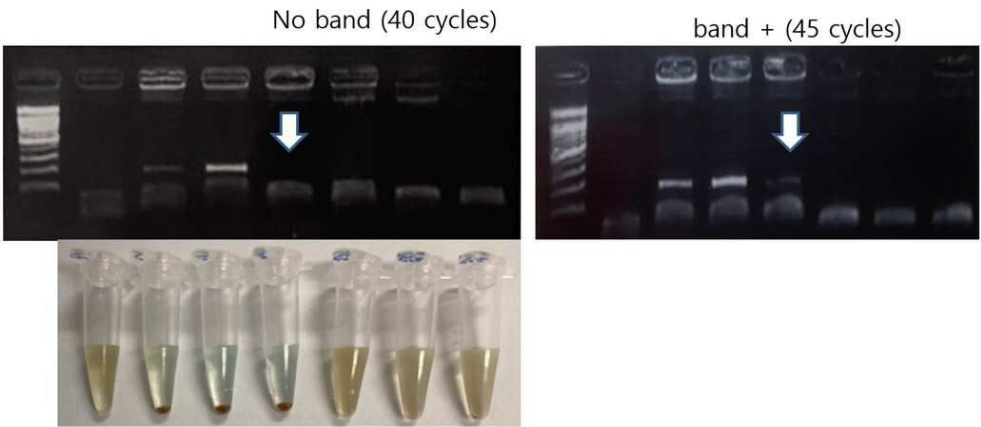
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110>	THE ASAN FOUNDATION	
	University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation	
<120>	Microparticle-based detecting kit for nucleic acid and Method for detecting nucleic acid amplification product	
<130>	MP20-224	
<160>	2	
<170>	KoPatent In 3.0	
<210>	1	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HCV forward primer	
<400>	1	
	tgcacggtct acgagac	17
<210>	2	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HCV reverse primer	
<400>	2	
	cgaccgggtc ctttcttga t	21