



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0085854

(43) 공개일자 2025년06월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6897 (2018.01) *C12Q 1/6825* (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6897 (2018.05)*C12Q 1/6825* (2018.05)

(21) 출원번호 10-2023-0173757

(22) 출원일자 2023년12월04일

심사청구일자 2023년12월04일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김동명

대전광역시 서구 둔산로 223, 7동 303호 (둔산동, 청솔아파트)

박유진

대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 공과대학 1호관 457호

(74) 대리인

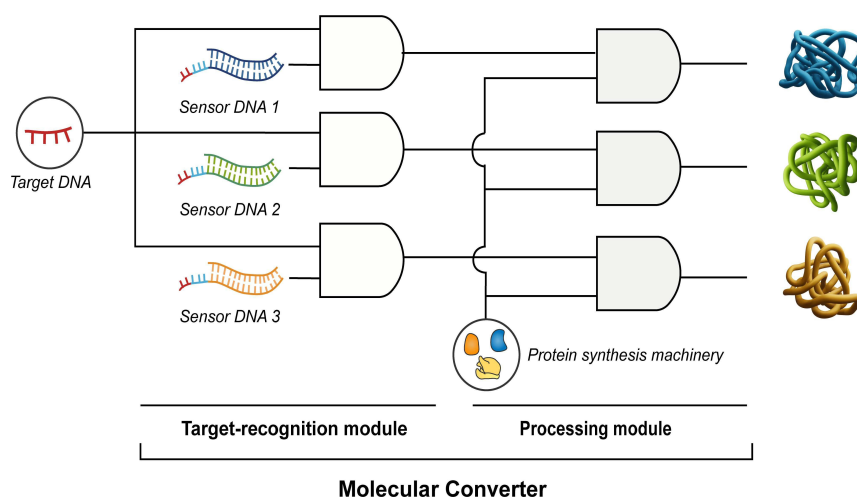
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 타겟 핵산 검출용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 타겟 핵산 서열 검출용 조성물 및 이를 이용한 핵산 검출 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도16

(52) CPC특허분류

C12Q 2521/101 (2013.01)

C12Q 2521/301 (2013.01)

C12Q 2531/113 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711111736
과제번호	2020R1A2C2013114
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	범용 현장진단 · 분석을 위한 분자컨버터 기술의 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

(i) 센서 DNA, (ii) 플랩 프로브 및 (iii) FEN(flap endonuclease)를 포함하는 타겟 핵산 검출용 조성물로,

상기 (i) 센서 DNA는

트리거 핵산 서열 결합 영역 - 프로모터 - 리포터 유전자

의 구조를 포함하고,

상기 트리거 핵산 서열 결합 영역 및 프로모터는 단일가닥 DNA이고, 리포터 유전자는 이중가닥 DNA이며,

상기 (ii) 플랩 프로브는

i) 트리거 핵산 서열 및 ii) 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 서열을 포함하며,

상기 플랩 프로브는 타겟 핵산 서열 존재 시, 상기 ii) 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 서열이 타겟 핵산 서열과 어닐링(annealing)되고, 프로브 서열과 타겟 핵산 서열은 비상보적 플랩(flap) 구조를 형성하여, FEN(Flap endonuclease)에 의해 상기 i) 트리거 핵산 서열이 절단되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (ii) 플랩 프로브는

5' - (트리거 핵산 서열) - (타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 서열) - 3'

의 구조를 가지며,

3' 말단에 플랩 분해를 억제하는 변형을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 타겟 핵산 서열은 DNA 또는 RNA인 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 리포터 유전자는 형광 단백질, 루시페라아제(luciferase), 갈락토시다아제 및 인버타아제로 구성된 군에서 선택되는 단백질; 또는 aptamer(aptamer)를 코딩하는 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 T7 프로모터인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 무세포 복제, 전사 및 합성 중 1 이상을 수행하는 데 필요한 구성을 더 포함하는 것인, 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조성물은 DNA 중합효소 및 뉴클레오티드를 포함하는 것인, 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 DNA 중합효소는 DNA 중합효소 I(Pol I)인 것인, 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 뉴클레오티드는 dNTP인 것인, 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 조성물은 대장균 조추출물(crude extract)을 더 포함하는 것인, 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 조성물에 시료를 첨가하는 단계; 및

무세포 복제, 전사 및 단백질 합성 중 1 이상의 반응을 수행하여 리포터 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 타겟 핵산 검출 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 시료는 생물로부터 분리된 것인, 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 타겟 핵산은 바이러스 또는 미생물의 RNA 또는 DNA인 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 타겟 핵산 검출용 조성물 및 이를 이용한 핵산 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 현대 분자 진단의 기초는 핵산의 세밀한 검출에 기반한다. 현재 핵산 테스트방법의 대부분은 in vitro 환경에서의 생물학적 성분의 사용을 포함한다. 예컨대 가장 널리 사용되는 기술 중 하나인 PCR (polymerase chain reaction) 기반 테스트는 호열성 미생물의 DNA 중합효소를 사용한 표적 핵산의 증폭에 의존한다. 다만 일반적인 PCR 반응은 반응 온도를 수십 회 이상 조절하여 표적 유전물질을 증폭하기 때문에 고온과 저온을 짧은 시간 안에 안정적으로 구현할 수 있는 고가의 장비를 필요로 한다는 단점이 있다.

[0004] PCR의 대안으로, 등온 증폭(isothermal amplification) 방법이 연구되어 왔다. 등온 증폭법은 반응 온도를 변화시킬 필요 없이, 단일 온도(상온 또는 65 °C 이하의 고온)에서 표적 유전물질의 증폭이 가능하므로 고가의 온도 조절장치를 필요로 하지 않으며 이 같은 장점으로 인해 일반적 PCR에서는 구현이 어려운 현장진단에 용이하게

적용될 수 있다.

[0005] 등은 증폭 방법의 일 예로 LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification) 반응이 있다. LAMP 반응은 표적이 되는 DNA 가닥에서 6 개의 부분을 선택하여 조합한 4 개의 프라이머(primer)로부터 프라이머 결합부위에 루프구조(stem-loop DNA)를 만들어 사슬치환반응을 통해 DNA를 증폭하는 반응으로, 60~65 °C 등온에서 표적 ssDNA와 결합하여 증폭할 수 있다 (Nucleic Acids Res. 2000 Jun 15; 28(12): e63). 그러나, LAMP 반응은 짧은 표적에는 작용할 수 없고, 몇 백 개의 염기로 이루어진 핵산만 검출할 수 있다는 한계가 있다. 또한, PCR이나 등온증폭법을 통해 증폭된 핵산의 검출은 SYBR Green과 같은 이중 가닥 DNA 결합염료를 사용하거나, TaqMan기술과 같이 형광염료가 표지된 프로브 서열을 사용하는 등의 방법으로 제한된다. 한편, 타겟 핵산 자체를 증폭하는 방식 대신 타겟 핵산을 매개로 전사 및 번역 반응을 진행시킨 후 이를 통하여 증폭된 전사 혹은 번역 산물을 검출하는 개념의 방법을 개발할 경우, 그 검출 방법이 제한적인 기존의 방법들과 달리 전사 혹은 번역 산물의 생물학적 활성을 통하여 다양한 방법으로 검출이 가능하다. 예를 들어 타겟 핵산에 의해 효소 단백질이 생산되도록 전사 및 번역 반응을 유도할 수 있게 되면 효소에 의한 전환에 의해 색깔이나 형광을 나타내는 기질들을 사용하여 그 검출이 가능하고, 녹색형광단백질 (green fluorescence protein, GFP)등과 같이 단백질이 스스로 방출하는 형광에 의한 분석도 가능하다. 따라서, 기존에 사용되고 있는 바와 같이 PCR 혹은 등온증폭 방법 등을 통해 증폭된 타겟핵산을 검출하는 방식이 아니라 타겟 핵산을 인식하여 이로부터 활성을 가지는 단백질을 발현 할 수 있는 기술이 개발된다면 핵산 검출을 보다 용이하고 정밀하게 수행할 수 있을 것이다.

[0006] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 새로운 핵산 검출 방법을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 프로모터의 단일가닥 상단에 타겟 서열과 어닐링하는 타겟 결합 영역, 하단에 리포터 핵산 혹은 리포터 단백질 코딩 서열이 연결된 구조를 개발하여, 이를 이용하면 타겟 핵산이 있는 경우에만 리포터 핵산 혹은 리포터 단백질의 발현을 통한 신호발생이 가능한 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 센서 DNA를 포함하는 타겟 핵산 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물에 시료를 첨가하는 단계; 및 무세포 복제, 전사 및 단백질 합성 중 1 이상의 반응을 수행하여 리포터 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 타겟 핵산 검출 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시 형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0012] 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험 만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0014] 본 발명의 하나의 양태는 센서 DNA를 포함하는 타겟 핵산 검출용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명에서 "센서 DNA(sensor DNA)"는 타겟 핵산을 인식할 수 있는 타겟 결합 영역, 프로모터 및 상기 프로모터 하단에 연결된 리포터 유전자를 포함하고, 타겟 핵산 존재 하에서만 선택적으로 리포터 유전자의 발현이 가능한 핵산 구조체를 의미한다. 본 발명의 "센서 DNA"는 용어 "TASR (target-assisted synthesis of reporters)"또는 "TASER (Target-assisted synthesis of enzyme reporters)"와 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0016] 리포터 유전자가 단백질이 아닌 브로콜리 압타머(Broccoli aptamer), 스피나치 압타머(Spinach aptamer)등과 같은 리포터 핵산을 코딩하고 있는 경우에도 용어 TASR, TASER를 상호교환적으로 사용할 수 있다.

- [0017] 구체적으로, 본 발명의 센서 DNA는 다음과 같은 구조를 포함하는 것일 수 있다:
- [0018] 타겟 핵산 서열 결합 영역 - 프로모터 - 리포터 유전자
- [0019] 본 발명의 센서 DNA에서, 상기 타겟 핵산 서열 결합 영역은 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 단일가닥 DNA(ssDNA) 일 수 있다. 구체적으로 상기 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 단일가닥 DNA는, 타겟 핵산 서열의 전부 또는 일부와 상보적인 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0020] 구체적으로 상기 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 단일가닥 DNA는 4개 이상의 염기를 포함하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 단일가닥 DNA는 12개 이상의 염기를 포함할 수 있다. 일 예로 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 단일가닥 DNA가 4개 내지 11개의 염기로 구성되는 경우, 타겟 핵산 서열은 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 그러나 타겟 핵산 서열 존재 하에서만 선택적으로 리포터 핵산 혹은 리포터 단백질을 발현할 수 있다면, 단일가닥 DNA의 길이는 이에 특별히 제한되지는 않는다.
- [0021] 본 발명의 센서 DNA에서, 프로모터는 단일가닥으로 구성된 것일 수 있다.
- [0022] 일 구현예로, 본 발명의 센서 DNA에 포함되는 프로모터 영역 하단의 리포터 유전자는, 이중가닥 형태 일 수 있다.
- [0023] 보다 구체적으로 본 발명의 센서 DNA는 다음 구조 또는 이에 상보적인 서열을 포함하는 것일 수 있다:
- [0024] (5') 타겟 핵산 서열 결합 영역 - T7 프로모터 - 리포터 유전자(3')
- [0025] 일 구현예에서, 본 발명의 센서 DNA에 포함되는 단일 가닥 영역은 상기 구조에서 안티센스 (-) 가닥일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 "T7 프로모터" 는 T7 박테리오파지 유래의 프로모터로, 본 발명의 센서 DNA에 포함되는 T7 프로모터 서열은 5'-TAATACGACTCACTATA-3' 또는 이와 상보적인 서열일 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않고, 여타의 프로모터 서열 및 이들과 상보적인 서열, 또는 1 이상의 염기가 부가, 결실 또는 치환되어 동일한 기능을 가지는 서열을 사용할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일 구현예에서, 센서 DNA는 T7 프로모터가 단일가닥으로 구성되어 폴리머라제에 의해 전사가 개시되지 않으므로 타겟 핵산이 존재하지 않는 환경에서는 리포터 핵산 혹은 리포터 단백질이 발현되지 않는 구조이나, 타겟 핵산이 존재하는 경우 타겟 핵산 서열 결합 영역에 타겟 핵산이 결합한 후, 신장반응을 통해 하단의 T7 프로모터를 이중나선화 함으로써 T7 프로모터 영역 하단의 리포터 핵산 또는 단백질이 발현되는 구조를 가질 수 있다.
- [0028] 보다 구체적으로, 본 발명의 센서 DNA는 도 17A에 개시된 구조를 포함하는 것일 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에서 센서 DNA의 일부는 단일 가닥으로, 일부는 이중가닥으로 존재하는바, 센서 DNA를 제조하기 위해서는 우라실-특이적 절단 반응을 이용하거나, 제한효소 및 리가아제를 사용할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 다른 하나의 양태는 (i) 센서 DNA, (ii) 플랩 프로브 및 (iii) FEN (flap endonuclease) 를 포함하는 타겟 핵산 검출용 조성물이다.
- [0032] 일 구현예로, 상기 (i) 센서 DNA는
- [0033] 트리거 핵산 서열 결합 영역 - 프로모터 - 리포터 유전자
- [0034] 의 구조를 포함하고,
- [0035] 상기 트리거 핵산 서열 결합 영역 및 프로모터는 단일가닥 DNA이고, 리포터 유전자는 이중가닥 DNA이며,
- [0036] 상기 (ii) 플랩 프로브는
- [0037] i) 트리거 핵산 서열 및 ii) 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 서열을 포함하며,
- [0038] 상기 플랩 프로브는 타겟 핵산 서열 존재 시, 상기 ii) 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 서열이 타겟 핵산 서열과 어닐링(annealing)되고, 프로브 핵산 서열과 타겟 핵산 서열은 비상보적 플랩(flap) 구조를 형성하여, FEN에 의해 i) 트리거 핵산 서열이 절단되는 것을 특징으로 한다.

- [0039] 즉, 검출하고자 하는 핵산 서열(타겟 핵산 서열)이 존재할 경우 플랩 프로브에 포함된 트리거 핵산 서열이 FEN에 의해 절단되어 센서 DNA에 결합함으로써 센서 DNA에 포함된 리포터 유전자의 발현이 가능하게 되는 구조를 갖는다.
- [0040] 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 서열은 타겟 핵산 서열의 전부 또는 일부와 상보적인 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0041] 일 구현예로, 상기 플랩 프로브는 5' 위치에 상기 i)의 구조를, 그 하단(downstream)에 ii)의 구조를 갖는 것일 수 있다.
- [0042] 전술한 구현예 중 어느 하나의 구현예에서, 상기 플랩 프로브는 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 서열의 하단에 플랩의 분해를 방지하는 변형을 포함할 수 있다. 전술한 구현예 중 어느 하나의 구현예에서, 상기 플랩 프로브는 3'말단에 플랩의 분해를 방지하는 변형을 포함할 수 있다.
- [0043] 상기 플랩의 분해를 방지하는 변형은, 타겟 핵산이 존재하지 않아도 플랩 프로브의 플랩 부분이 센서 DNA의 트리거 핵산 서열과 결합한 후 3'말단이 뉴클리아제에 의해 제거된 후 신장됨으로써 리포터 유전자가 발현되는 비특이적 반응을 방지하기 위한 변형일 수 있다.
- [0044] 일 예로 상기 변형은 플랩 프로브 서열의 3'말단 염기를 화학적으로 수식하거나 변형하는 것을 포함할 수 있고, 그 예로, 2'-O-메톡시-에틸(2'-O-methoxy-ethyl, 2'MOE), 및/또는 포스포로티오에이트(phosphorothioate(pt))로의 수식을 포함할 수 있다.
- [0045] 전술한 구현예 중 어느 하나의 구현예에서, 상기 플랩 프로브는 5' - (트리거 핵산 서열) - (타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 서열) - 3'의 구조를 가지며, 3' 말단에 플랩 분해를 억제하는 변형을 포함하는 것일 수 있다.
- [0046] 전술한 구현예 중 어느 하나의 구현예에서, 상기 타겟 핵산 검출용 조성물은 타겟 핵산에 결합할 수 있는 프로브를 추가로 포함할 수 있다. 추가로 포함되는 프로브는 침습 프로브(invasive probe)라고 지칭될 수 있으며, 침습 프로브가 타겟 핵산에 결합하는 영역은 플랩 프로브가 타겟 핵산에 결합하는 영역과 인접함으로써 플랩 프로브-타겟 핵산 서열-침습 프로브의 구조가 뉴클레아제에 의해 인식되어 절단되도록 하는 구조를 형성하도록 할 수 있다.
- [0047] 전술한 구현예 중 어느 하나의 구현예에서, 상기 타겟 핵산 검출용 조성물은 도 17B에 개시된 바와 같은 센서 DNA, 침습 프로브, 플랩 프로브; 및 FEN을 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 FEN (flap endonuclease)는 플랩 절단 활성을 갖는 효소로, 이중 가닥 DNA와 단일 가닥 DNA 사이의 접합부에서 플랩 서열을 인식하고 절단하는 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 효소와 RNA-올리고뉴클레오타이드의 플랩 서열을 인식하고 절단하는 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 효소를 포함한다. 상기 FEN은 예를 들어 *Pyrococcus furiosus* 유래 FEN1 또는 *Thermus thermophilus* (Tth) 유래 DNA 폴리머라아제일 수 있다.
- [0049] 일 구현예로, 타겟 핵산이 DNA 서열일 경우 상기 FEN은 *Pyrococcus furiosus* 유래 FEN1일 수 있다.
- [0050] 일 구현예로, 타겟 핵산이 RNA 서열일 경우 상기 FEN은 *Thermus thermophilus* (Tth) 유래 DNA 폴리머라아제일 수 있다.
- [0051] 본 발명의 일 구체예에서는 새롭게 고안한 TASER 센서 DNA가 타겟 핵산 결합 영역을 포함하도록 제작할 경우, 타겟 서열이 변경될 때마다 새롭게 단일 가닥을 노출시킨 구조를 포함하는 센서 DNA를 제작해야 하는 번거로움이 있음을 확인하고, 이를 해결하기 위해 단일 가닥으로 노출되는 서열을 트리거 핵산 서열에 상보적인 서열로 고정하고, 프로브의 타겟 핵산 결합 서열만 타겟 핵산에 따라 바꾸어 줌으로써, 다 종의 타겟 핵산 검출을 공통된 하나의 센서 DNA만으로 실행할 수 있도록 디자인하였다. 즉, 도 17B 및 도 17C 와 같이 타겟 핵산 서열의 존재 하에 프로브서열이 플랩 구조를 형성하고, FEN1에 의해 절단되어 공통의 트리거 DNA를 생성하며 이것이 센서 DNA에 결합함으로써 센서 DNA에 포함된 리포터 유전자가 발현되도록 제작하였다.
- [0052] 본 발명의 다른 일 구체예에서는 타겟 핵산 서열의 존재 하에 상기 FEN1에 의해 절단된 트리거 핵산 서열을 PCR로 증폭하여 센서 DNA와 반응시킴으로써 민감도 높은 검출이 가능하도록 하였다.
- [0053] 본 발명의 또 다른 일 구체예에서는 FEN에 의한 절단 반응 없이도 플랩 프로브와 센서 DNA가 결합함으로써 배경 신호가 생성되는 것을 방지하기 위하여, (5')-트리거 핵산 서열- 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 서열-(3')의 구조를 갖는 플랩 프로브의 3'말단에 포스포로티오에이트 (phosphorothioate) 결합과 2'MOE 변형을 통해

3' 플랩의 분해를 방지함으로써, 타겟 핵산 특이적인 검출이 가능하도록 하였다.

- [0055] 본 발명에서 "리포터 유전자" 또는 "리포터 핵산"이란 센서 DNA로부터 복제 혹은 전사되며, 그의 생성 또는 합성을 용이하게 확인할 수 있는 신호를 발생하는 DNA 혹은 RNA서열이다.
- [0056] 구체적으로, 상기 리포터 핵산은 aptamer(aptamer)일 수 있다. 일 예로 상기 aptamer에는 표지물질이 부착되어 있을 수 있고, 예를 들어 상기 표지물질은 형광물질, 방사성 동위원소, 발광소자, 효소 또는 나노입자 일 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 구체적으로, 상기 리포터 핵산은 말라카이트 그린 (malachite green) 염료와 결합하여 형광을 발생하는 말라카이트 그린 aptamer(malachite green aptamer), (5Z)-5-[(3,5-Difluoro-4-hydroxyphenyl)methylene]-3,5-dihydro-2,3-dimethyl-4H-Imidazol-4-one, (Z)-4-(3,5-Difluoro-4-hydroxybenzylidene)-1,2-dimethyl-1H-imidazol-5(4H)-one (DFHBI)와 결합하여 형광을 발생하는 브로콜리 aptamer(Broccoli aptamer) 혹은 스피나치 aptamer(Spinach aptamer), 망고(mango) aptamer, 및 BFR(Blue Fluorescent RNA) aptamer로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 전술한 구현예 중 어느 하나의 구현예로, 본 발명의 리포터 유전자는 리포터 단백질을 코딩할 수 있다. 본 발명에서, "리포터 단백질"이란 센서 DNA로부터 복제 혹은 전사되며 그의 생성 또는 합성을 용이하게 확인할 수 있는 신호를 발생하는 표지 단백질이다. 상기 신호는 발광(luminescence), 형광(fluorescence), 인광(phosphorescence), 발색, 전자의 이동 등 다양한 형태일 수 있다.
- [0059] 구체적으로, 상기 리포터 단백질은 sfGFP(superfolder green fluorescence protein), GFP(Green fluorescent protein), YFP(Yellow fluorescent protein), RFP(Red fluorescent protein), mCherry 형광 단백질, 인버타아제(invertase), 락타마아제(lactamase), 갈락토시다아제(galactosidase), HRP(Horseradish peroxidase), 글루코스 옥시다아제(glucose oxidase), 및 루시페라아제(Luciferase) 중 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기의 단백질 중 형광단백질들은 무세포 합성 반응액 내에 축적된 형광단백질의 형광을 측정하여 생성 또는 합성을 확인할 수 있다. 효소들의 경우 각 효소에 해당하는 기질을 이용하여 산물의 생성 수준을 측정하여 리포터 단백질의 합성을 확인하게 된다.
- [0060] 일 예로, 상기 리포터 단백질은 형광 단백질 또는 루시페라아제 일 수 있으며, 일 예로 sfGFP, 반딧불이 루시페라아제(FLuc), 심해 새우 루시페라아제(NLuc)일 수 있다.
- [0061] 다른 일 예로, 상기 리포터 단백질은 항원 단백질일 수 있다. 상기 항원 단백질은 상업적으로 입수 가능한 키트에 의해 검출될 수 있는 것일 수 있으며, 그 예로, 개 디스토펙스 바이러스 (canine distemper virus)의 뉴클레오캡시드 단백질 (CDV Ag, GenBank accession number: AAC26990.1)일 수 있다.
- [0062] 그러나 전술한 예시에 제한되지 않고, 그의 생성 또는 합성을 용이하게 확인할 수 있는 신호를 발생하는 단백질이나, 핵산 서열은 제한없이 포함된다.
- [0064] 본 발명에서 "타겟 핵산"이란 검출하고자 하는 핵산을 의미한다. 타겟 핵산 서열은 DNA 또는 RNA 일 수 있고, ssDNA, RNA 뿐만 아니라 dsDNA 서열 역시 포함될 수 있다. dsDNA의 경우 상보적 가닥의 스위칭을 통해 사용할 수 있으며, 예를 들어 ssDNA를 분리하여 사용하거나, ssDNA가 노출되게 하여 사용할 수 있다.
- [0065] 타겟 핵산 서열의 길이는 본 발명의 센서 DNA가 타겟 핵산 서열의 존재 하에서만 선택적으로 리포터 유전자를 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지 않는다. 일 예로 센서 DNA가 타겟 핵산 결합 영역을 직접 포함하는 경우 타겟 핵산 서열의 길이는 12nt 이상, 예를 들어 15nt 이상일 수 있다. 센서 DNA가 타겟 핵산 결합 영역을 직접 포함하고 타겟 핵산 서열이 T7 프로모터 서열을 포함하는 경우 T7 프로모터 서열을 제외한 길이는 4nt 이상일 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 다른 일 예로 본 발명에서 제공하는 조성물이 플랩 프로브를 포함하고, 센서 DNA가 검출 대상이 되는 타겟 핵산에 결합하는 영역을 직접 포함하지 않고 트리거 핵산 서열을 포함하는 경우, 트리거 핵산 서열의 길이는 12nt 이상, 예를 들어 15nt 이상일 수 있다. 그러나 이에 반드시 제한되는 것은 아니다.

- [0069] 본 발명의 조성물은 핵산 및 단백질 합성에 필요한 임의의 구성을 추가로 더 포함할 수 있다. 구체적으로는, 무세포(cell-free) 복제, 무세포 전사 및 무세포 단백질 합성 중 1 이상의 반응에 필요한 구성일 수 있다.
- [0070] 본 발명에서 "무세포 복제/전사/단백질 합성"이란 세포 내에서 수행되던 복제/전사/단백질 합성을 시험관(in vitro) 등의 생체 외에서 행하는 것을 의미한다. 예를 들어, 무세포 단백질 합성은, 단백질 생산에 필요한 구성 요소들, 즉 세포 내 단백질 합성기구와 이의 인자들 만을 세포에서 추출하여 세포 외부에서 세포의 생리적 조절 기작이 배제된 상태로 단백질의 합성 과정만을 인위적으로 반복시켜 단기간에 목적 단백질을 생산하는 것을 의미한다. 이때, 무세포 단백질 합성에 요구되는 단백질 생합성 기구 즉, 리보솜, 개시인자, 신장인자, 종결인자, 아미노아실티알엔에이(aminoacyl tRNA) 합성효소, RNA 중합효소 등은 세포 추출액에 포함된 것을 이용하거나 별개로 추가하거나, 유전자 재조합 기술에 의해 별도로 생산하여 사용할 수 있다. 이와 마찬가지로, 무세포 복제 역시 핵산의 복제에 필요한 구성 요소들을 세포에서 추출하여 핵산의 복제를 세포 외부에서 수행하는 것을 의미한다.
- [0071] 일 구현 예로, 본 발명의 조성물은 대장균 조추출물(crude extract)에 포함된 구성을 포함할 수 있다. 일 구현 예로, 본 발명의 조성물은 DNA 수선기작(repair)에 필요한 임의의 구성을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 본 발명의 조성물은 DNA 중합효소 I (Pol I)등의 DNA 중합효소를 포함할 수 있다. 그 예로 E.coli 유래 DNA 중합효소 I 일 수 있다. 일 구현 예로, 본 발명의 조성물은 NTP 혹은 dNTP를 포함할 수 있다. 일 구현예로, 본 발명의 조성물은 T7 RNA polymerase를 포함할 수 있다. 그러나 본 발명의 조성물에 포함되는 구성은 타겟 핵산 서열 존재 하에서만 선택적으로 리포터 유전자를 복제/전사하거나 발현하도록 하는 것이면 특별히 제한되지 않는다.
- [0072] 본 발명의 일 구현예에서는 T7 프로모터의 단일가닥 상단에 타겟 서열과 어닐링하는 ssDNA 형태의 타겟 결합 영역, 하단에 리포터 핵산 서열(압타머) 혹은 단백질 코딩 서열이 연결된 센서 DNA의 구조를 고안하였으며, 대장균 조추출물의 존재 하에, 상기 센서 DNA가 타겟 서열 존재 하에서만 선택적으로 리포터 핵산 또는 리포터 단백질을 발현할 수 있음을 확인하여, 타겟 핵산의 검출에 사용될 수 있음을 확인하였다. 또한, DNA 수선에 필요한 DNA PolI 및 dNTP가 이미 포함되어 있는 조추출물 대신 정제된 단백질 합성 기구들을 사용하는 PURE시스템에서 센서 DNA를 발현하는 경우, DNA Pol I 및 dNTP이 별도로 첨가된 구성요소 존재 하에서, 상기 센서 DNA가 타겟 서열 존재 하에서만 선택적으로 리포터 단백질을 합성할 수 있음을 확인하여, 타겟 핵산의 검출에 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0074] 본 발명의 다른 하나의 양태는 본 발명의 타겟 핵산 검출용 조성물에 시료를 첨가하는 단계; 및 무세포 핵산 복제, 전사 및 단백질 합성 중 1 이상의 반응을 수행하여 리포터 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 타겟 핵산 검출 방법을 제공한다.
- [0075] 상기 타겟 핵산 검출용 조성물, 리포터 유전자 및 무세포 단백질 합성 반응에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0076] 상기 방법에 있어서 (i) 센서 DNA, (ii) 플랩 프로브 및 (iii) FEN (flap endonuclease) 를 포함하는 타겟 핵산 검출용 조성물을 사용하는 경우, 플랩 프로브와 시료를 FEN 존재 하에 반응시키는 단계; 및 반응물에 존재하는 핵산을 PCR 증폭하는 단계; 및 증폭된 PCR 산물을 센서 DNA와 반응시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0077] 상기 리포터 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계에서는 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있다. 일 예로 상기 리포터 단백질이 형광 단백질이거나, 리포터 핵산이 형광표지된 압타머일 경우 형광을 측정함으로써 리포터 유전자의 발현을 확인할 수 있다.
- [0079] 본 발명에서 상기 시료는 검출하고자 하는 타겟 핵산을 포함하거나, 또는 포함하지 않는 것으로서, 본 발명의 타겟 핵산 검출 방법이 적용되는 대상 시료를 의미한다.
- [0080] 일 구현 예로, 상기 시료는 사료, 식품 또는 화학물질로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상에서 유래된 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0081] 일 구현 예로, 상기 시료는 생물로부터 분리된 것일 수 있다. 일 구현 예로, 상기 생물은 식물 또는 동물을 모두 포함한다.

[0083] 본 발명의 타겟 핵산 검출 방법의 일 구현 예로, 상기 타겟 핵산은 바이러스의 핵산 서열일 수 있다. 이때, 상기 시료는 바이러스 감염에 의심되는 개체로부터 분리된 것일 수 있다.

[0084] 일 예로, 상기 타겟 핵산은 DNA 또는 RNA 바이러스 유래의 핵산일 수 있다.

[0085] 예를 들어, 상기 타겟 핵산은 ssDNA 또는 dsDNA 바이러스 유래의 핵산일 수 있다.

[0086] 상기 바이러스는 본 발명의 타겟 핵산 검출 방법을 통해 그 유전체를 검출할 수 있는 것이면 제한되지 않는다. 예를 들어, 파보바이러스 (예를 들어, 개 파보바이러스 (Canine parvovirus, CPV), 고양이 파보바이러스 (feline parvovirus, FPV), 인유두종 바이러스(HPV), 폴리오마바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 파보바이러스 B19, 인간 보카바이러스, 부파바이러스, 인간 parv4 G1), 헤파드나바이러스(예를 들어, B형 간염 바이러스(HBV)); 헤르페스 바이러스(예를 들어, 단순포진 바이러스(HSV), 수두 대상 포진 바이러스(VZV), 엡스타인-바르 바이러스(EBV), 거대세포 바이러스(CMV), 헤르페스 림프친화성 바이러스, 장미색 비강진, 카포시 육종-연관 헤르페스 바이러스); 아데노바이러스(예를 들어, 옛아데노바이러스(atadenovirus), 아비아데노바이러스, 이타아데노바이러스, 마스트아데노바이러스, 시아데노바이러스); 폭스바이러스(예를 들어, 두창, 백시니아 바이러스, 우두바이러스, 원두증바이러스, orf 바이러스, 가성우두, 소 구진성 구내염 바이러스; 타나폭스 바이러스, 야바원숭이 종양 바이러스; 연속종 바이러스(MCV)); 모빌리바이러스(Morbillivirus: 예를 들어 개 디스탬퍼병 바이러스 (canine distemper virus)), 제미니바이러스과(Geminiviridae); 나노바이러스과(Nanoviridae); 피코드나바이러스과 등을 포함할 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않는다.

[0088] 본 발명의 타겟 핵산 검출 방법의 다른 일 구현 예로, 상기 타겟 핵산은 RNA 바이러스 유래의 RNA 핵산일 수 있다.

[0089] 본 발명의 타겟 핵산 검출 방법의 다른 일 구현 예로, 상기 타겟 핵산은 미생물의 16S rRNA 서열일 수 있다. 그 예로, *E. coli*, *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*), *Francisella tularensis*(*F. tularensis*), *Yersinia pestis*(*Y. pestis*), *Burkholderia pseudomallei*(*B. pseudomallei*) 및 *Brucella abortus* (*B. abortus*))를 들 수 있으나, 이러한 예시에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0091] 본 발명의 타겟 핵산 검출용 조성물을 사용하는 경우 간편하게 시료 내 핵산을 검출할 수 있으므로 분자 진단을 비롯한 다양한 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0093] 도 1은 전사 불가능한 DNA 주형의 제조에 관한 것이다. 도 1A는 우라실 함유 정방향 프라이머를 이용한 PCR을 통해 DNA 주형을 제조하고, 단일 가닥의 TBS와 프로모터를 노출시키기 위해 USER (Uracil-Specific Excision Reagent) 처리한 것을 나타낸다. 도 1B는 우라실 세그먼트의 제거를 5'-말단 야키마-옐로우(Yakima-Yellow, YY) 염료 표지된 정방향 프라이머로부터의 형광을 측정하여 확인한 결과이다. 그래프의 예러 바는 3회의 독립적 실험의 표준 편차를 나타낸다.

도 2는 올리고뉴클레오타이드에 의해 촉발되는 리포터 단백질 합성에 관한 것이다. 도 2A는 TASER 분석의 개략도를 나타낸 것이다. 도 2B는 단일가닥 T7 프로모터를 포함하는 센서 DNA가 우라실 포함 프라이머를 이용한 PCR 반응 후 USER 처리를 통해 제조되고, 센서 DNA 단독으로 무세포 단백질 합성 반응물과 인큐베이션하면 이중가닥 T7 프로모터의 부재로 인해 단백질이 생성되지 않는 것을 보여준다. 다양한 DNA 주형으로부터 합성된 sfGFP의 양이 측정되었다. 각 서열은 위에서부터 차례로: DNA 없음, dTTP를 이용한 PCR 결과, 우라실 포함 정방향 프라이머를 사용한 PCR 결과, T7 프로모터 및 업스트림 서열의 (-) 가닥을 노출시킨 USER처리 후의 PCR 결과이다. 도 2C는 단일가닥 T7 프로모터에 상보적인 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드와 어닐링한 뒤 센서 DNA가 전사 가능하게 되어 코딩된 단백질의 무세포 합성을 지시하는 것을 나타낸다. T7 프로모터 업스트림의 이중가닥 확장(extension)이 sfGFP 합성 효율을 크게 향상시켰다. 그래프의 원(circle)은 신호 대 배경 비율 (signal to

backgrounds ratios, S/B) 을 나타내며, 에러 바는 3회의 독립적 실험의 표준 편차를 나타낸다. T7P, T7 프로모터; T7RNAP, T7 RNA 폴리머라제.

도 3은 TASER 센서 DNA로부터 in vitro 전사(IVT)된 RNA의 아가로스 겔 평가 결과이다. IVT 반응 후 1 μ L 분취량(aliquot) 을 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동하였다. RNA 밴드는 SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain을 이용해 시각화하였다. IVT 반응은 각각 다음을 포함하였다: (A) 완전한 이중가닥의 PCR 생성물; (B-F) 각각의 표시된 타겟 DNA와 하이브리드된 센서 DNA; (G) 센서 DNA.

도 4는 T7 프로모터의 업스트림 서열에 대한 타겟 DNA의 어닐링을 통한 TASER 분석에서 센서 DNA의 활성화를 확인한 결과이다. 도 4A는 업스트림 서열과 T7 프로모터의 다양한 영역을 커버하는 올리고뉴클레오타이드에 어닐링된 센서 DNA를 사용한 TASER 분석에 의한 sfGFP 합성을 확인한 것이다. 도 4B는 TASER 분석의 개략도로, 표적 서열이 T7 프로모터의 TBS(타겟 핵산 결합 서열) 업스트림에 어닐링할 때, 분석 혼합물에 사용된 S12 추출물의 PolI 활성에 의해 뉴클레오타이드 중합이 구동되어 주형을 따라 시작된다. 이에 따라 센서 DNA는 코딩된 신호 생성 효소의 이어지는 전사 및 번역이 가능하게 된다. 도 4C는 S12추출물에 PolI 및 dNTP를 보충한 경우의 효과를 확인한 것이다. 도 4D는 T7UP(06/18) 및 T7UP(15/00) 올리고뉴클레오타이드로 어닐링된 센서 DNA의 전사체의 아가로스 겔 전기영동 분석결과이다. PolI 및 dNTP를 보충한 경우의 효과를 조사하였다. 0.7M 포름알데히드를 포함하는 1.5% 아가로스 겔이 사용되었고 RNA 밴드는 SYBR Gold Nucleic Acid stain으로 염색되었다. 도 4E는 T7UP(15/00) 어닐링된 센서 DNA의 발현 효율을 PURE 시스템으로 평가한 것이다. 에러 바는 3회의 독립적 실험의 표준 편차를 나타낸다.

도 5는 TASER 분석에서 리포터 단백질 합성에 대한 PolI 및 dNTP 보충의 효과를 확인한 결과이다. 도 5A는 다양한 농도의 정제된 PolI을 0.25mM dNTP를 포함하는 TASER 분석 혼합물에 첨가한 결과이다. 도 5B는 PolI 농도를 0.2 U/ μ L 로 고정하고 추가 dNTP의 영향을 TASER 분석으로 확인한 것이다. 에러 바는 3회의 독립적 실험의 표준 편차를 나타낸다.

도 6은 여러 가지 신호 판독 방법을 이용한 TASER 분석 결과를 나타낸다. 도 6A는 β -갈락토시다제를 리포터 단백질로 사용하여 CPRG와 같은 기질의 색상 변화를 통해 타겟 DNA의 신호를 검출한 결과이다. 도 6B는 NLuc를 코딩하는 센서 DNA를 사용하여 발광을 통해 타겟 DNA를 감지한 결과이다. 도 6C 는 인버타제 (invertase)를 코딩하는 센서 DNA를 사용하여 수크로스 가수분해에 의해 생성된 포도당을 개인 혈당 측정기 (personal glucose meter, PGM)으로 판독하여 타겟 DNA를 용이하게 검출할 수 있음을 확인한 결과이다. 도 6D는 CDV의 뉴클레오펙시드 단백질을 코딩하는 센서 DNA를 이용하여 상업적으로 판매되는 CDV 항원 키트에 의해 타겟 DNA를 검출할 수 있음을 확인한 결과이다. 도 6E는 sfGFP를 코딩하는 센서 DNA가 형광 측정에 의해 타겟 DNA를 검출할 수 있음을 확인한 결과이다. 분석은 타겟 DNA로 500 nM T7UP(15/00) 서열이 존재 (+) 또는 부재(-) 하는 경우에 대해 수행되었다. 에러 바는 3회의 독립적 실험의 표준 편차를 나타낸다.

도 7은 다양한 리포터 단백질을 사용한 TASER 분석의 감도를 비교한 결과이다. 다양한 T7UP(15/00)의 다양한 장치를 이용하여 측정하였다. 도 7A는 β -갈락토시다제를 코딩하는 센서 DNA를 사용한 TASER 분석을 통해 CPRG와 같은 기질의 색상 변화를 통해 타겟 DNA의 신호를 검출한 결과이다. 도 7B는 NLuc를 코딩하는 센서 DNA를 사용한 TASER 분석에서 생성된 발광 강도이다. 도 7C는 인버타제를 코딩하는 센서 DNA를 사용한 TASER 분석 이후 수크로스 가수분해로 생성된 포도당을 PGM으로 측정하여 정량한 결과이다. Image J 소프트웨어를 사용하여 밴드 강도를 정량화하였다. 도 7D는 TASER 반응을 통해 표적 DNA에 의해 생성된 CDV 항원을 측면 유동 면역분석 키트를 사용하여 분석한 결과이다. Image J 소프트웨어를 사용하여 밴드 강도를 정량화하였다. 도 7E는 sfGFP를 코딩하는 센서 DNA를 사용한 TASER 분석의 형광 강도를 나타낸다. 그래프 내의 원은 S/B 비율을 나타내며, 에러 바는 3회의 독립적 실험의 표준 편차를 나타낸다. p-값이 0.005 미만인 데이터는 통계적으로 유의미한 것으로 간주되었다 (*p-값<0.05, **p-값<0.01, ***p-값<0.005).

도 8은 FENI에 의해 매개되는 절단을 위한 CPV2a DNA 서열을 타겟팅하는 플랩 프로브(flap probe) 및 침습 프로브(invasive probe) 디자인이다.

도 9는 FRET 분석을 통해 FENI 매개 트리거 DNA 생성을 확인한 결과이다. IA (Invasive amplification)에 사용되는 침습 프로브는 5'말단이 FAM (6-carboxyfluorescein) 으로 표지되고 타겟 DNA(CPV2a, 1 μ M) 와의 접합부(junction)에 BHQ (Black Hole Quencher)로 표지되었다. FENI 매개 IA 반응 이후 BHQ로부터 방출된 FAM 형광을 정량화하여 기질 DNA로부터 절단된 플랩 서열이 방출된 것을 추적하였다. 에러 바는 3회의 독립적 실험의 표준 편차를 나타낸다.

도 10은 바이러스 핵산 서열을 검출하기 위한 TASER 분석과 IA의 통합을 나타낸 것이다. 도 10A는 CPV2a ssDNA에 대한 IA-TASER 분석이다. 먼저 센서 DNA의 TBS를 표적으로 하는 트리거 DNA가 생성되고, 트리거 DNA는 센서 DNA에 의해 코딩되는 리포터 단백질을 발현하기 위해 TASER 분석에 사용된다. 1.6 U/ μ L FENI의 존재 및 부재 시 모두 10 nM의 합성 CPV2a ssDNA를 타겟 DNA로 사용한 IA-TASER 분석 결과를 나타내었다. 여기서는 sfGFP를 코딩하는 센서DNA가 사용되었다. 도 10B는 IA-TASER를 활용하여 FVPV(4408A) 대비 CPV2a(4408C)의 구별되는 검출을 확인한 결과이다. 에러 바는 3회의 독립적 실험의 표준 편차를 나타낸다.

도 11은 IA-TASER 분석에서 배경 신호(background signal)를 제거하는 것을 나타낸 도면이다. 도 11A는 원래 TASER분석과 비교하여 IA-TASER 분석이 타겟 DNA가 없을 때의 배경 신호가 증가하여 민감도에 영향을 미친 것을 확인한 결과이다. 도 11B는 절단되지 않은 플랩 프로브의 트리거 서열이 센서 DNA에 어닐링되고 그 결과 3' 플랩이 분해되어, Pol I에 의해 표적 DNA 서열과 FENI이 없어도 트리거 서열이 신장되었을 것이라는 추측을 도시킨 것이다. 도 11C는 타겟 서열과 무관한 신호의 생성을 줄이기 위해 플랩 프로브의 3'말단에 변형을 도입한 결과이다. 특히 플랩 프로브의 말단 5개 뉴클레오타이드에 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 결합을 도입하면 배경 신호가 크게 감소한 결과를 확인할 수 있다. 또한 동일한 폴리뉴클레오타이드에 2'-O-methoxy-ethyl (2'MOE)를 도입함으로써 배경 신호를 효과적으로 감소시킬 수 있었으므로 이 두 가지 수정 사항을 결합하여 더 큰 효과가 나타났다. 10nM 타겟 DNA 서열에 대해 평가한 결과 상기 변형을 함께 도입하면 S/B 비율은 2에서 22로 향상되었다. 에러 바는 3회의 독립적 실험의 표준 편차를 나타낸다.

도 12는 다양한 조건에서의 IA-TASER 분석의 최적화 결과이다. 도 12A는 65°C에서 10nM 단일가닥 DNA (ssDNA), 100nM 플랩 프로브 및 100nM 침습 프로브와 다양한 농도의 FENI을 반응시켰을 때의 결과를 나타낸 것이다. 도 12B는 10nM 단일가닥 DNA (ssDNA), 100nM 플랩 프로브 및 100nM 침습 프로브와 1.6 U/ μ L FENI을 다양한 온도에서 반응시켰을 때의 결과를 나타낸 것이다. 도 12C는 65°C에서 100nM 플랩 프로브와 1.6 U/ μ L FENI과 다양한 농도의 침습 프로브를 반응 시켰을 때의 결과이다. 도 12D는 65°C에서 100nM 침습 프로브, 1.6 U/ μ L FENI와 다양한 농도의 플랩 프로브를 반응시켰을 때의 결과이다. 각 실험은 ssDNA의 유/무(+/-) 조건에서 수행되었다. 그래프 내의 원은 S/B 비율을 나타낸다. 에러 바는 3회의 독립적 실험의 표준 편차를 나타낸다.

도 13은 IA-TASER 분석 시간을 다양하게 하여 합성된 sfGFP의 형광 신호를 측정된 결과이다. 그래프의 원은 S/B 비율을 나타낸다. 에러 바는 3회의 독립적 실험의 표준 편차를 나타낸다.

도 14는 sfGFP, NLuc 및 인버타제를 코딩하는 센서 DNA를 사용한 IA-TASER 분석이다. 도 14A는 CPV2a DNA 검출을 위한 IA-TASER 분석 과정을 도시킨 것이다. IA 반응에 의해 타겟 단일가닥 CPV2a DNA로부터 트리거 DNA가 생성된다. 생성된 트리거 DNA는 그리고 나서 TASER 분석에서 sfGFP, NLuc 및 인버타제와 같은 리포터 단백질의 발현을 개시한다. 도 14B는 IA-TASER 과정에서 생성된 NLuc의 발광 강도를 측정된 것이다. 도 14C는 IA-TASER 공정에 의해 생성된 sfGFP의 형광 강도를 측정된 것이다. 도 14D는 센서 DNA에 의해 인코딩된 인버타제에 의해 가수분해된 수크로스로부터 생성된 포도당을 PGM 측정된 결과이다. 그래프의 원은 S/B 비율이며 에러 바는 3회의 독립적 실험의 표준 편차를 나타낸다.

도 15는 LOD 결정을 위한 표준 곡선이다. 도 15A는 sfGFP를 코딩하는 센서 DNA를 활용한 실험, 도 15B는 NLuc를 코딩하는 센서 DNA를 사용한 실험에서 얻은 표준 곡선이다. LOD는 $3\sigma/s$ 공식을 사용하여 계산되었으며, 여기서 σ 는 블랭크 대조군의 표준 편차이고 s는 표준 곡선의 기울기이다. 에러 바는 3회의 독립적 실험의 표준 편차를 나타낸다.

도 16은 본 발명의 TASER 원리를 도시킨 것이다.

도 17A는 TASER 센서 DNA를, 도 17B는 IA-TASER에 사용되는 프로브 및 센서 DNA의 구조를 도시킨 것이고, 도 17C는 IA-TASER의 작동 원리를 도시킨 것이다.

도 18은 ssDNA 또는 RNA를 타겟으로 하는 플랩 엔도뉴클레아제에 의한 DNA 생성 효율을 나타낸 것이다. 도 18A는 1 μ M ssRNA 또는 RNA를 타겟팅하는 IA 반응에 있어서 FEN1 또는 Tth DNA 중합효소 (Tth DNAP)를 사용한 전기영동 분석 결과이다. 60 °C에서 2시간동안 반응이 수행되었고, SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain을 이용해 시각화하였다. 도 18b는 FRET 분석에서 FEN1 또는 Tth DNAP 매개된 트리거 DNA 생성의 검증 결과이다. FAM 신호는 10분 간격으로 3시간 동안 60 °C에서 측정되었다.

도 19는 16S rRNA를 타겟팅하는 IA-TASER 분석의 LOD (limit of Detection) 확인 결과이다. 도 19A는 타겟 RNA 농도와 형광신호 간에 비례(linear relationship)하는 관계를 확인한 것이다. 도 19B는 발광 신호와 타겟 RNA 농도의 로그값 사이의 비례 관계를 확인한 것이다. LOD는 $3\sigma/s$ 공식에 따라 결정되었다. 에러 바는 3회의 독립

적 실험의 표준 편차를 나타낸다.

도 20은 BWA(생물 무기, biological warfare agents)의 멀티플렉스 검출결과이다. 6종의 병원성 균주의 rRNA에 대해 IA-TASER 분석이 수행되었다. 각각의 타겟 rRNA는 100nM 농도로 존재하였다. 히트맵 데이터 분석에 Origin2023b가 사용되었다.

도 21은 스캐램블 RNA 혼합물을 이용한 IA 프로브 세트의 타겟 특이성 및 효율 검증 결과이다. 도 21A는 각각 동족 타겟 RNA를 표적으로 삼도록 설계된 프로브 세트를 사용하여 IA-TASER 분석한 결과이다. 스캐램블 RNA 혼합물은 6개 병원성 균주의 16S rRNA로 구성되었다. 기호 (-)는 사용된 프로브에 대해 타겟 16S rRNA만을 제외한 5종의 RNA 혼합물이 존재함을 나타내고, (+)는 타겟 16S rRNA(6종)를 포함하는 것을 나타낸다. 도 21B의 신호/배경 비율은 프로브에 대한 타겟 RNA가 있을 때 관찰되는 신호의 비율을 타겟 RNA가 없을 때와 비교하여 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0094] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0096] 실시예 1. TASER 및 IA-TASER 개발

[0097] 재료

[0098] ATP, GTP, UTP, CTP, 크레아틴 포스페이트(creatine phosphate), 크레아틴 키나아제(creatine kinase), 및 E. coli MRE600 total tRNA mixture는 Roche Applied Science (Indianapolis, IN, USA)에서 구입하여 사용하였다. 타겟 DNA 올리고뉴클레오티드(<100 뉴클레오티드) 및 PCR 프라이머는 Integrated DNA Technologies (Coraville, Iowa, USA)에 의해 합성되었다. High-fidelity VELOCITY DNA 폴리머라제 및 Phusion U Hot Start DNA 폴리머라제는 각각 Bioline (London, UK) 및 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. E. coli 폴리머라제 I, 우라실-특이적 절단 시약(uracil-specific excision reagent: USER), XbaI 제한효소는 New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)에서 구입하였다. T4 DNA 리가아제는 솔젠티(주) (Daejeon, Korea)에서 구매하였다. 다른 시약은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하여 추가적인 정제 없이 사용하였다. Nano-Glo 루시페라제 어세이 키트, RiboMAX large scale RNA production system-T7 및 PCR clean-up 키트는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. RNeasy RNA 정제 키트는 Qiagen (Hilden, Germany)에서 구입하였다. 96-웰 마이크로플레이트는 SPL Life Sciences (Pocheon, Korea)에서 구입하였다. BL21Star (DE3) 균주는 Invitrogen (Waltham, MA, USA)에서 수득하였다.

[0100] 센서 DNA 와 타겟 DNA의 제조

[0101] 센서 DNA는 타겟 핵산 서열을 인식하고 신호-생성 단백질의 합성을 촉진할 수 있도록 디자인되었다. 센서 DNA가 코딩하는 단백질로 다음 단백질을 사용하였다: sfGFP(superfolder green fluorescence protein), 박테리아 인버타아제(bacterial invertase: EC 3.2.1.26), E. coli 유래 β-갈락토시다아제 (β-gal; EC 3.2.1.23), 개 디스탬퍼병 바이러스 (canine distemper virus)의 뉴클레오캡시드 단백질 (CDV Ag, GenBank accession number: AAC26990.1), 및 NLuc. 센서 DNA의 리포터 유전자는 T7 프로모터의 조절을 받도록 디자인하였다. 즉 센서 DNA에서 T7 프로모터를 포함하는 업스트림 서열이 단일가닥이고 센서 DNA의 단백질 코딩 영역만이 이중가닥이기 때문에 그 자체로는 단백질 발현이 불가능하다. 타겟 결합 영역(Target binding site, TBS)은 T7 프로모터의 센스 가닥의 업스트림에 위치하도록 고안되었다. 이러한 설계에 따라 센서 DNA의 TBS에 대한 결합과 타겟 DNA 서열의 이어지는 신장(extension)을 통해 전사 가능 이중 가닥 프로모터의 생성을 가능하게 한다. 도 1A에 센서 DNA의 제작을 도시하였다.

[0102] NdeI 및 SalI 제한효소를 이용하여 T7 프로모터가 삭제된 후 pK7 플라스미드에 리포터 유전자가 클로닝되었다(각각 pK7/dT7P-sfGFP, pK7/dT7P-invertase, pK7/dT7P-βgal, pK7/dT7P-CDV 및 pK7/dT7P-NLuc로 명명됨). 이 유전자들(dT7P-sfGFP, dT7P-invertase, dT7P-βgal, dT7P-CDV Ag, dT7P-NLuc)은 타겟 결합 영역 및 T7 프로모터의 (+) 가닥에 인접하는(flanking) 정방향 프라이머를 사용한 PCR을 이용해 증폭되었다. 타겟 결합 영역의 (-) 가닥과 T7 프로모터를 노출시키기 위한 후속 우라실 특이적 절제 반응(USER)을 위해 dUTP를 사용하여 정방

향 프라이머를 합성하였다. 사용된 프라이머 서열은 하기 표와 같다.

표 1

[0104]	이름	서열 (5' to 3') ^[a]
	T7T-R	CAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTA
	T715UP-F	TCGATCCTGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGTGACCACAACGGTTCCCTCTAG
	T715UP7U-F	TCGAUCCUGCGAAATUAAUACGACUACTAUAGGGUGACCACAACGGTTCCCTCTAG
	YY-T715UP7U-F	/5'YakimaYellow/TCGAUCCUGCGAAATUAAUACGACUACTAUAGGGUGACCACAACGGTTCCCTCTAG
	T716UP8U-F	TCGAUCCUGCGAAAUAAUACGACUACTAUAGGGUGACCACAACGGTTCCCTCTAG

[0105] [a] 밑줄 친 서열은 T7 프로모터의 안티센스 가닥을 나타냄

[0107] PCR 산물 160nm을 USER 혼합물에 넣고 37℃ 에서 2시간 동안 배양한 후 PCR clean-up kit(Promega)로 정제하여 센서 DNA로 사용하였다.

[0108] TASER 및 IA-TASER(Invasive amplification-TASER) 분석을 위한 타겟 DNA를 합성하고 PAGE 정제하였다. 개 파보바이러스 타입 2a (CPV2a, enBank accession number: NC_001539.1) 의 검출을 검증하기 위해, CPV2a의 부분 서열을 합성하였다. 분석의 서열 특이성을 테스트하기 위해, 고양이 파보바이러스 (feline parvovirus, FPV) 의 부분 서열도 합성되었다. 서열 정보는 다음과 같다.

표 2

[0109]	이름	서열 (5' to 3') ^[a]	길이(nt)
	CPV2a (4408C)	CAAGAATTGTAACCTACTCAGATTTTGGTGGAAGGTAAATTAG TATTTAAAGCTAAACTAAGAGCCTCTCATACTTGAATCCAATTC AACAAATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGT	130
	FPV(4408A)	CAAGAATTGTAACCTACTCAGATTTTGGTGGAAGGTAAATTAG TATTTAAAGCTAAACTAAGAGCATCTCATACTTGAATCCAATTC AACAAATGAGTATTAATGTAGATAACCAATTTAACTATGT	130
	CPV/FPV-침습 프로브(CPV/FPV-Invasive probe)	CTCATTTGTTGAATTGGATTCCAAGTATGAGAC	33
	FAM 및 BHQ로 변형된 CPV/FPV-플랩 프로브 (CPV/FPV-Flap probe modified with FAM and BHQ)	/56-FAM/TCGATCCTGCGAAATGGCTC/iBHQ-1dT/TAGTTTA GCTTTAAATA	38
	변형되지 않은 CPV/FPV-플랩 프로브(CPV/FPV-Flap probe without modification)	TCGATCCTGCGAAATGGCTCTTAGTTTAGCTTTAAATA	38
	포스포로티오에이트 결합으로 변형된 CPV/FPV-플랩 프로브(CPV/FPV-Flap probe modified with phosphorothioate bonds)	TCGATCCTGCGAAATGGCTCTTAGTTTAGCTTT*A*A*A*T*A	38
	2'MOE로 변형된 CPV/FPV-플랩 프로브(CPV/FPV- Flap probe modified with 2'MOE)	TCGATCCTGCGAAATGGCTCTTAGTTTAGCTTTAAATA	38
	2'MOE 및 포스포로티오에이트 결합으로 변형된 CPV/FPV-플랩 프로브 (CPV/FPV-Flap probe modified with phosphorothioate bonds and 2'MOE)	TCGATCCTGCGAAATGGCTCTTAGTTTAGCTTT*A*A*A*T*A	38
	CPV2a	TTTGATTGTAAACCATGTAGACTAACACATACATGGCAAACAAAT AGAGCATTTGGGCTTACCACCATTTCTAAATCTTTGCCTCAATCT GAAGGAGCTACTAACTTTGGTGATATAGGAGTTCAACAAGATAAA AGACGTGGTGTAACCTCAAATGGGAAATACAACTATATTACTGAA GCTACTATTATGAGACCAGC	200
	CPV2a-침습 프로브(CPV2a-Invasive probe)	ATCTTGTTGAACCTCTATATCACCAGGTTAGTAA	35
	2'MOE 및 포스포로티오에이트 결합으로 변형된 CPV2a-플랩 프로브 (CPV2a-Flap probe modified with phosphorothioate bonds and 2'MOE)	TCGATCCTGCGAAATGGCTCTTAGATT*G*A*G*G*C	33

[0110] [a] 밑줄 친 서열은 CPV2a와 FPV DNA 간의 SNP를 나타냄. 이탤릭체는 트리거 DNA의 서열을 나타냄. *는 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 결합. 볼드체는 2'-O-메톡시-에틸(2'-O-methoxy-ethyl (2'MOE)) 변형된 염기

를 나타냄.

[0113] TASER 분석

[0114] 어닐링 용액 (30 mM HEPES, pH 7.5 및 100 mM 칼륨 아세테이트(potassium acetate))에 5 μ L의 타겟 핵산, 센서 DNA (sfGFP 인코딩할 경우 30 Nm, NLuc, 인버타제 또는 β -gal를 인코딩할 경우 10 nM; CPV Ag를 인코딩할 경우 2.5 nM) 및 뉴클레아제가 없는 물 (최대 10 μ L)를 첨가하였다. 타겟 핵산이 센서 DNA의 TBS에 어닐링하도록, 혼합물은 5분 동안 95 $^{\circ}$ C 로 가열된 다음 실온으로 냉각되었다. 어닐링한 다음 3 μ L의 용액은 버리고, 다음의 구성을 포함하는 프리믹스 용액 12 μ L과 혼합하였다:

[0115] 57 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 1.2 mM ATP, 각 0.85 mM의 CTP, GTP 및 UTP, 2 mM DL-dithiothreitol, 0.17 mg/mL의 E.coli 전체 tRNA 혼합물 (MRE600 균주 유래), 0.64 mM cAMP, 90 mM 포타슘 글루타메이트(potassium glutamate), 80 mM 암모늄 아세테이트(ammonium acetate), 12 mM 마그네슘 아세테이트(magnesium acetate), 34 μ g/mL 폴리닌산 (folinic acid: l-5- formyl-5,6,7,8- tetrahydrofolic acid), 각 1.5 mM의 20종 아미노산, 67 mM 크레아틴 포스페이트(creatine phosphate), 3.2 μ g/mL 크레아틴 키나아제(creatine kinase), 0.2 U/ μ L E. coli DNA 중합효소 I, 0.25 mM dNTPs, 및 26% (v/v)의 E.coli BL21Star(DE3) S12 유래 추출물.

[0116] 혼합물을 30 $^{\circ}$ C에서 0.5시간 인큐베이션한 후 무세포 합성 단백질의 활성을 측정하기 위해 용액의 분취량(aliquot)을 회수하였다.

[0118] IA-TASER 분석

[0119] IA-TASER 분석을 위해 다음 구성요소를 포함하는 반응 혼합물에서 IA 반응이 수행되었다:

[0120] 5 μ L의 타겟 바이러스 ssDNA, 1 μ M 플랩 프로브 (마지막 5개의 3'-말단 뉴클레오티드에 포스포로티오에이트 연결 및 2'-O-메톡시에틸(2'MOE) 염기 변형이 있음), 각 100 nM의 침습 프로브(invasive probes), 센서 DNA (sfGFP를 인코딩할 경우 30 nM; NLuc, β -gal 또는 인버타제를 코딩할 경우 10 nM; CPV Ag를 인코딩할 경우 2.5 nM), 1.6 U/ μ L FENI (Enzynomic 사, Cat# M025S, 서열번호 1), 및 뉴클레아제가 없는 물 (최대 10 μ L). 플랩 프로브의 플랩 영역은 센서 DNA의 타겟 결합 영역과 상보적인 T7UP(15/00) 올리고뉴클레오티드를 가진다. 반응 혼합물은 65 $^{\circ}$ C 온도에서 2시간 동안 인큐베이션되었다. IA 반응 후, 용액 3 μ L을 버리고 TASER 분석에서 사용한 12 μ L의 프리믹스 용액과 혼합하였다.

[0122] TASER 신호 분석

[0123] sfGFP를 리포터로 사용한 TASER 또는 IA-TASER 분석에서, 완료된 분석 반응 샘플 10 μ L을 PBS 완충액 190 μ L와 혼합하고 형광 강도 측정을 위해 96웰 마이크로플레이트에 옮겼다. NLuc를 리포터 효소로 사용한 실험에서, 완료된 분석 반응 샘플 10 μ L을 PBS 완충액 40 μ L로 희석하고 동일한 부피의 2 X 분석 완충액과 혼합하였다. 실온에서 5분 후, CLARIOstar 마이크로플레이트 판독기로 발광 강도를 측정했다. β -gal을 코딩하는 센서 DNA는 핵산의 비색 측정(colorimetric measurement)에 사용되었다. 분석 샘플 10 μ L을 96웰 투명 플레이트에서 90 μ L의 300 μ M 클로로페놀 레드- β -D-갈락토피라노사이드(chlorophenol red- β -D-galactopyranoside, CPRG)와 함께 실온에서 30분 동안 배양하여 보라색을 발색하고 흡광도를 분광광도계를 사용하여 575 nm에서 측정하였다. 개인용 혈당 측정기(PGM)를 측정 장치로 사용한 실험에서는, TASER 분석은 박테리아 인버타제를 코딩하는 센서 DNA를 사용하여 수행되었다. 완료된 분석 반응의 15 μ L 샘플을 동일한 부피의 2 X 수크로스 (200 mM 수크로스 및 50 mM KH₂PO₄, pH 6.0) 완충액과 혼합하였다. 혼합 용액을 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 배양한 후 95 $^{\circ}$ C에서 잠시 가열하여 가수분해 반응을 종결시켰다. 13,000 x g에서 5분 동안 원심분리하여 혼합물을 정화한 후 상층액 5 μ L를 스트립에 점적하여 PGM(Accu-Check Inform II, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)을 사용하여 포도당 역가를 측정하였다. LFIA(Lateral Flow Immunoassay) 키트 (BIONOTE, Hwaseong, Korea)를 이용한 타겟 핵산 검출을 위해, Rapid CDV Ag kit를 사용하였다. 이 경우 DV 항원 단백질의 단백질 코딩 서열을 TASER 분석용 센서 DNA로 사용하였다. 1시간 동안 배양한 후, 완성된 분석 반응물 15 μ L를 45 μ L의 PBS 완충액으로 희석하고, 이중 50 μ L를 LFIA 키트에 로딩하였다. 결과의 통계적 분석을 위해 Image J. SPSS 버전 22.0 소프트웨어(SPSS,

Chicago, IL)를 사용하여 스트립의 타겟 밴드 강도를 이미지화하고 정량화하였다. p-값이 0.005보다 작은 데이터는 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다(*p-값<0.05, **p-값<0.01, ***p-값<0.005).

실험 결과

sfGFP 합성을 시작하기 위해 T7 프로모터의 (+) 가닥을 모델 타겟 DNA로 사용하여 TASER 분석 개념을 증명하기 위한 테스트를 수행하였다. 완전한 이중가닥 sfGFP DNA 서열은 특정 프라이머 (T715UP-F 및 T7T-R)를 사용하여 pK7/dT7-sfGFP 플라스미드의 PCR 증폭을 통해 획득하였다. 정방향 프라이머는 15개 뉴클레오타이드 업스트림 서열과 그 뒤에 이어지는 T7 프로모터의 (+) 가닥을 특징으로 한다. 또한 dUTP (T715UP7U-F)를 사용하여 정방향 프라이머를 합성하고, 생성된 우라실 함유 PCR 산물을 우라실 특이적 절단 시약(USER)으로 처리하여 T7 프로모터의 (-) 서열을 노출시키는 센서 DNA를 제작하였다(도 1A 및 1B).

우라실 함유 프라이머를 사용하여 생성된 PCR 산물은 sfGFP 생산에서 dTTP로 얻은 것과 유사한 효율성을 보인다. 반면, 우라실 함유 프라이머 PCR 산물을 USER 처리하여 얻은 센서 DNA는 단백질 합성이 불가능했다. 이는 USER 처리가 T7 프로모터 영역을 단일 가닥으로 렌더링하고 T7 RNA 중합효소가 이중 가닥 T7 프로모터를 엄격히 필요로 하기 때문이다. 그러나 도 2C에서 볼 수 있듯이 센서 DNA에 노출된 (-) T7 프로모터 서열이 T7 프로모터의 (+) 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 T7UP(00/18)와 어닐링되었을 때 센서 DNA에 의한 sfGFP의 무세포 합성이 성공적으로 작동되었다. 올리고뉴클레오타이드 T7UP(00/18)로 어닐링된 센서 DNA는 손상되지 않은 이중 가닥 PCR 산물을 사용하는 대조 반응에 비해 약 48% 수율로 sfGFP를 생산하였다.

또한, T7 프로모터(+) 가닥의 5'말단이 점진적으로 확장되어 센서 DNA와 추가 염기쌍을 형성함에 따라 더 높은 수준의 sfGFP 생산이 달성되었다. 표 3에 나열된 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 T7 프로모터 업스트림의 추가 염기쌍 수에 비례하여 sfGFP의 생산이 증가하였다.

표 3

이름 Name	서열 Sequence (5' to 3') ^[a]	길이(nucleotides)
T7UP(00/18) ^[b]	TAATACGACTCACTATAG	18
T7UP(02/18)	ATTAATACGACTCACTATAG	20
T7UP(04/18)	AAATTAATACGACTCACTATAG	22
T7UP(06/18)	CGAAATTAATACGACTCACTATAG	24
T7UP(04/13)	AAATTAATACGACTCAC	17
T7UP(07/10)	GCGAAATTAATACGACT	17
T7UP(13/04)	GATCCTGCGAAATTAAT	17
T7UP(15/00)	TCGATCCTGCGAAAT	15

[a] 밑줄 친 T7 서열은 센서 DNA의 (-) T7 프로모터 서열에 어닐링되는 뉴클레오타이드를 나타냄.

[b] 괄호 안의 숫자는 센서 DNA의 T7 프로모터 (+) 가닥 주변의 염기 쌍 수를 나타냄. 예를 들어 (04/18)은 업스트림의 타겟 DNA 4개의 뉴클레오타이드 염기쌍과 T7 프로모터 (+) 가닥의 18개 뉴클레오타이드 염기쌍을 나타냄.

타겟과 센서 DNA 사이에 6개 이상의 추가 염기쌍이 형성되는 경우, 완전한 이중 가닥 DNA 수율의 80%에 도달하였다(도 2C). 이러한 생산 향상은 염기쌍 수의 증가로 인한 타겟-프로브 복합체의 안정화에 기인할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 T7UP(06/18) 50nM이 타겟 DNA로 사용되었을 때 신호 대 배경 비(signal-to-background ratio, S/B)가 2.0×10^2 까지 향상되었다. 이러한 결과로부터 외인성으로 첨가된 올리고 뉴클레오타이드가 센서 DNA에 의해 코딩된 리포터 단백질의 발현을 효과적으로 활성화할 수 있음을 확인하였다.

[0137] **다양한 타겟 서열에 의한 변환기 활성화**

[0138] 상기 실험의 유망한 발견에도 불구하고, T7 프로모터의 가닥은 관심 있는 핵산 서열의 검출을 위한 타겟 인식 성분으로 사용되기 용이하지 않다. TASER 분석의 아이디어를 실현하려면 센서 DNA의 TBS가 프로모터 서열의 상류에 별도로 위치해야 한다. 그러나 T7 프로모터에 의해 전사가 이루어지기 위해서는 적어도 부분적인 이중 가닥을 요구하기 때문에, TBS에서 타겟을 어닐링하면 센서 DNA의 전사가 촉발되지 않을 것이라고 예측되었다. 이는 정제된 T7 RNA 폴리머라아제를 사용한 *in vitro* 전사 (IVT) 실험을 통해 추가로 입증되었다. 전사에 필요한 이중 가닥 T7 프로모터의 최소 길이를 결정하기 위해 다양한 길이의 T7 프로모터 가닥에 결합하도록 설계된 올리고뉴클레오티드가 센서 DNA에 공급되도록 한 IVT 실험을 수행하였다.

[0139] 이중 가닥 영역이 T7 프로모터 서열에서 상류 영역으로 점차 이동함에 따라 전사 수준은 현저하게 감소했으며, 이중 가닥 영역이 T7 프로모터의 5'-말단에 7개 미만의 뉴클레오티드를 포함하는 경우 전사체가 거의 검출되지 않았다. 올리고뉴클레오티드가 T7 프로모터 서열의 13개 이상의 뉴클레오티드와 어닐링된 경우에만 유의한 전사량이 관찰되었다 (도 3).

[0140] 그러나 위의 IVT 실험과 상반되게, *E.coli* 추출물(S12 추출물)을 사용한 TASER 분석 중 리포터 단백질 생산에는 T7 프로모터 영역의 이중 가닥 형성이 필요하지 않았다. IVT 실험에 사용된 것과 동일한 올리고 뉴클레오티드 세트와 센서 DNA를 어닐링하고 TASER 분석을 위한 반응 혼합물로 옮겼을 때, T7 프로모터 서열을 포함하지 않는 올리고뉴클레오티드 (T7UP(15/00), 도 4A) 에 어닐링된 센서 DNA에서도 상당한 양의 sfGFP 가 생성되었다. TASER 분석에 사용된 S12 추출물에는 대부분의 세포 효소가 포함되어 있기 때문에 S12 추출물의 DNA 중합효소 I(Pol I)에 의해 상류 서열에 어닐링된 올리고 뉴클레오티드가 T7 프로모터 영역으로 신장되어 센서 DNA를 전사 가능하게 만들 것으로 추측하였다 (도 4B). 이러한 추측을 증명하고자 S12 추출물에 정제된 Pol I(도 5A) 및 dNTP (도 5B)를 추가로 보충하여 sfGFP 생성을 TASER 분석하였다. 최적화된 조건(0.2 U/ μ L Pol I 및 0.25 mM dNTP 가 보충된 S12추출물)에서 T7UP(15/00)에 어닐링된 센서 DNA에 의해 생성된 형광 강도는 Pol I 및 dNTP 를 보충하지 않고 수행된 반응의 약 180%에 도달하였다 (도 4C). 이와 일치하게 T7UP(15/00)에 어닐링된 센서 DNA는 Pol I 및 dNTP이 보충되었을 때 IVT 반응에서 성공적으로 전사되었다(도 4D)

[0141] 또한 PURExpress *In Vitro* 단백질 합성 키트(PURE 시스템, NEB)를 사용하여 Pol I 매개 신장이 센서 DNA의 성공적인 발현을 담당하는지 확인하였다. 추출물 기반 무세포 시스템과 달리 PURE 시스템은 번역에 필요한 정제된 구성 요소로 구성되어 있으므로 다른 세포 효소가 없다. 정제된 T7 RNA 폴리머라아제를 사용한 IVT 반응과 유사하게, 올리고 뉴클레오티드 T7UP(15/00)에 어닐링된 센서 DNA는 PURE 반응 혼합물에서 sfGFP 형광을 생성하지 못했다. 그러나 Pol I 및 dNTP이 보충되었을 때, PURE 시스템에서 완전한 이중가닥 DNA를 사용하는 대조 반응과 유사한 수준에서 sfGFP 합성이 촉진되었다 (도 4E).

[0142] 이를 종합하면, 센서 DNA의 T7 프로모터 가닥의 업스트림 서열이 다양한 타겟 서열의 TASER 분석을 위해 유연하게 프로그래밍될 수 있는 효과적인 TBS로 사용될 수 있다.

[0144] **무세포 형질 도입 활성을 통한 핵산 측정 단백질의 유연성**

[0145] 기존의 핵산 테스트 방법과 비교하여 TASER 분석은 신호 측정 방식에 더 큰 유연성을 제공한다. 예를 들어, 다양한 리포터 단백질을 코딩하는 센서 DNA를 사용하여 TASER 분석을 사용하여 T7UP(15/00) DNA의 검출을 테스트했을 때 색상, 발광, 전기 신호, 밴드 강도 및 형광(도 6) 과 같이 다양한 물리적 특성에 따라 타겟 핵산을 검출할 수 있었다. 검출 감도는 사용된 검출 방법에 따라 나노몰 (nM) 에서 피코몰 (pM) 범위에 이르기까지 다양하였다.

[0146] 예를 들어, CDV의 뉴클레오택시드 단백질을 코딩하는 센서 DNA를 사용할 때 상업적으로 입수 가능한 개 홍역 바이러스(CDV) 항원 테스트 키트의 스트립에서 가시적으로 밴드를 검출하려면 5nM 이상의 CDV의 뉴클레오택시드 단백질을 코딩하는 유발 DNA가 필요한 반면, TASER 분석에서는 NLuc 인코딩 센서 DNA를 사용하여 5pM 농도의 유발 DNA만으로도 동일한 타겟 DNA를 검출할 수 있다 (도 7).

[0148] **범용 타겟의 민감한 탐지를 위한 IA 단계 도입**

[0149] 앞선 실시예에서 센서 DNA를 제작하기 위해서는 단일 가닥 TBS 및 T7 프로모터를 노출시키기 위한 PCR 제품의 USER 처리를 포함한 여러 단계가 포함되며 각 타겟 핵산 서열에 대해 이러한 절차를 반복해야 하므로, 센서 DNA

준비의 복잡성을 극복하기 위해 IA 기술을 TASER 분석에 통합하였다.

[0150] IA는 이중 가닥 DNA와 단일 가닥 DNA 사이의 접합부에서 플랩 서열을 인식하고 절단하는 FENI과 같은 엔도뉴클레아제의 사용을 포함한다. FENI의 독특한 활성을 활용하여, TASER 분석을 활성화하기 위한 트리거 DNA를 제작하였다.

[0151] 도 8에 도시된 바와 같이, IA는 FENI이 플랩 서열을 절단하기 위한 특정 기질 구조를 형성하기 위해 타겟 핵산에 대한 업스트림 및 다운 스트림 올리고뉴클레오타이드(각각 침습 프로브 및 플랩 프로브라고 함)의 인접 결합을 필요로 한다. 센서 DNA를 활성화하기 위해 범용 트리거 DNA 역할을 하는 공통 서열을 가진 플랩 프로브를 사용하면 다른 타겟 핵산에 대해 센서 DNA를 재설계할 필요 없이 동일한 TASER 혼합물을 사용할 수 있다는 이점을 갖는다. 또한, TASER 분석은 증폭된 양의 IA 생성 유발 DNA를 사용하여 수행되므로 IA와 TASER 반응을 결합하면 핵산 검출의 민감도가 향상될 것으로 예측하였다.

[0152] 6-카르복시플루오레세인으로 표지된 플랩을 사용할 때 IA 반응이 성공적으로 일어나는 것을 확인한 후(도 9), 화학적으로 합성된 CPV2a DNA 서열(4341-4470, 표 2참조)을 타겟 핵산으로 사용하여 개 파보바이러스(CPV2a)를 검출하기 위한 IA-TASER 분석을 수행하였다. 예상대로 IA 반응은 TASER 반응을 성공적으로 개시한 플랩 서열의 짧은 가닥 DNA를 생성하였다(도 10A). 또한, CPV2a와 보존 영역(conserved region)에서 하나의 뉴클레오타이드만이 상이한(A4408C) 고양이 파보바이러스(FPV)를 사용하여 분석의 특이성을 확인하였다. IA-TASER 분석에서 형광 신호는 절단 부위에서 프로브와 완전히 겹쳐지는 CPV2a 타겟 DNA에서만 검출되었고, FPV DNA에서는 신호가 검출되지 않았다(도 10B).

[0154] 그러나 IA-TASER 분석에서 표준 TASER 분석보다 25배 더 높은 배경 신호(background signal)가 확인되었다. 이 배경 신호의 원인은 손상되지 않은(intact) 플랩 프로브가 센서 DNA에 어닐링되어 발생한 것이었다. 하이브리드된 플랩 프로브의 3' 말단 부분이 Pol I의 엑소뉴클레아제 활성에 의해 제거되어 TBS와 완전한 이중가닥을 이룬 타겟 결합 서열이 신장될 수 있었기 때문에, 타겟 서열이 없는 경우에도 리포터 단백질이 합성될 수 있었다(도 11B). 이에 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 결합과 2'MOE 변형을 결합하면 구조 특이적 엔도뉴클레아제에 의한 플랩 프로브의 결합이나 절단에 영향을 주지 않고 3' 플랩 서열의 3' 말단의 분해를 방지하여 배경 신호를 효과적으로 제거할 수 있음을 확인하였다(도 11C). 이어서 엔도뉴클레아제 농도, 반응 온도, 프로브 농도 및 반응 시간을 포함하여 타겟 DNA로부터 효과적으로 트리거 DNA를 생성할 수 있는 IA-TASER 분석 조건을 최적화하였다(도 12 및 도 13). sfGFP에 의해 생성된 형광 신호는 50 pM의 타겟 DNA가 있는 경우 시간이 지남에 따라 지속적으로 증가하였으나, S/B를 기준으로 2시간 IA 반응 시간이 최적인 것으로 결정되었다. 마지막으로, NLuc 인코딩 센서 DNA의 측정 장치로 발광 분광계를 사용하면 IA-TASER 분석을 통해 타겟 핵산의 펩토몰 수준을 감지할 수 있었다. 이에 비해 sfGFP와 인버타제를 리포터 단백질로 사용한 분석은 피코 몰 범위의 검출 한계를 나타내었다(도 14). 도 15는 1 pM ~ 1 fM, 10 pM ~ 100 fM의 타겟 DNA 농도의 로그와 발광 및 형광으로 측정된 리포터 단백질 신호 사이의 강력한 선형 관계를 보여준다. LOD는 각각 1.6 fM 및 2.0 pM에서 결정되었다.

[0157] 실시예 2. IA-TASER를 이용한 타겟 핵산 검출

[0158] 재료 및 방법

[0159] 센서 DNA는 위 실시예 1에서 전술한 대로 단일 가닥 T7 프로모터의 상류에 위치한 트리거 결합 부위(TBS)에 트리거 DNA를 어닐링하여 암호화된 단백질의 합성을 시작하도록 활성화되도록 설계되었다. Tth DNA 중합효소(서열 번호 2)는 ELPIS Biotech(대전, 한국)에서 구입하였다.

[0160] 표적 RNA 준비

[0161] 병원성 표적 RNA는 시험관내 전사(IVT) 반응에 의해 준비되었다. T7 프로모터 하에서 BWA의 16S rRNA를 코딩하는 화학적으로 합성된 이중 가닥 DNA 단편(표 4)을 TOPcloner PCR Cloning 키트(Enzymomics, Korea)를 사용하여 pTOP 벡터에 클로닝한 후 T7 프로모터용 정방향 프라이머 및 각 16S rDNA 서열의 3'-말단 서열에 대한 역방향 프라이머를 사용하여 PCR 증폭시켰다. 증폭된 PCR 산물은 PCR clean-up 키트로 정제하고 RiboMAX 대규모 RNA 생산 시스템-T7(Promega)을 사용하여 전사반응을 수행하였다. IVT 반응 후 전사물을 DNase 1(1 µg/1 Unit)로

37℃에서 30분 동안 처리한 후 RNeasy mini Kit(Qiagen)를 사용하여 정제하였다. 전사체의 농도는 UV-Vis 분광광도계를 사용하여 280 nm에서 측정하였다.

표 4

사용된 프라이머 정보

Name	Sequence (5' to 3') ^[a]
T716UP8U-F	TCGAUCCUGCGAAAUGUAAUACGACUACTAUAGGGUGACCACAACGGTTTCCCTCTAG
T7T-R	CAAAAAACCCCTCAAGACCCGTTTA
<i>E. coli</i> -V4_Invasive	GACTCAAGCTTGCCAGTATCAA
<i>E. coli</i> -V4_Flap w.F/Q	/56-FAM/TCGATCCTGCGAAATGATGCAG/iBHQ-1dT/TCCAGGTT
T7P	TAATACGACTCACTATAGG
<i>B. anthracis</i> -R	CACCCCAATCATCTGTCCCA
<i>F. tularensis</i> -R	CACCCCAGTCATGAATCACT
<i>Y. pestis</i> -R	CACCCCAGTCATGAATCACAAAGT
<i>B. pseudomallei</i> -R	CACCCCAGTCATGAATCCTACC
<i>B. abortus</i> -R	CACCCCAGTCGCTGA

표 5

IVT 주형을 위한 타겟 RNA를 코딩하는 DNA 주형 서열

Name	Sequence (5' to 3') ^[a]
<i>E. coli</i> H157:07_16sV4	TAATACGACTCACTATAGGGCGCAGCAGGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGTAGAA
<i>E. coli</i> H157:07	TAATACGACTCACTATAGGAAATTGAAGAGTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTGACGAGTGCGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGGAGGGGGATAAC TACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGAT GGGATTAGCTAGTAGGTGGGTAACGGCTACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGA GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTATGA AGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAAG AAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCA GGCGGTTTGTTAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGG GTAGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGGCCCTGGAGCAAGACTGACG CTCAGGTGCCAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCACTTGGAGGTTGTGCC TTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTTAAACTCAAAATGAATTGACGGG GGCCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAATTTCCAG AGATGGATTGGTGCCCTTCGGGAACTGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCG CAACGAGCGCAACCCCTTATCTTTTGTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAACCTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTG GGTAGCGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGTACACACGTGCTACAATGGCGCATCAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGA GCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTGCTAGTCCGATGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGGA TCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAGAAGTAGGTAGC TTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACCTTGTGATTGATGACTGGGGTG
<i>B. anthracis</i>	TAATACGACTCACTATAGGGATGAACGCTGGCGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGA AGTTAGCGGGGACGGGTGAGTAACACGTGGTAACTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATA ATATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCTCGCATTAGCTAGTTGGTGA GGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTA AAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACG TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTG ATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAACCTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATTCATGTGTA GCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTG GGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTG AAGTTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGCCGAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAACGCGGTG GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAACCTTAGAGATAGGGCTTCTCCTT CGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACGCTT GATCTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATC ATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAA ACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAA TACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACACCAGAGAGTTTGAACACCCGAAGTCGGTGGGTAACCTTTTGGAGCCA GCCGCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTG

<i>F. tularensis</i>	TAATACGACTCACTATAGGATTGAACGCTGGTGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGCTTAGGATGCTGACGAG TGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTGTCCATTTGAGGGGGATACCAGTTGGAACGACTGTTAATACCGCATAATATCTG TGGATTAAAGGTGGCTTTCGGGCTGTGCGAGATGGATGAGCCTGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAGGGCCACCAAGGCT ACGATCCATAGCTGATTTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA TATTGGACAATGGGGCAACCCGTGATCCAGCAATGCCATGTGTGAAGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCACTTTAGTTGGGGAGG AAAGCCTCAAGGTTAATAGCCTTGGGGGAGGACGTTACCCAAAGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGGTAATAC GGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGTCTGTAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTAAAGCCAGGGCTCAA CCTTGGAACTGCATTTGATACTGGCAAACTAGAGTACGGTAGAGGAATGGGAATTTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC AGAAGGAACACCAATGGCGAAGGCAACATTCTGGACCGATACTGACACTGAGGGACGAAAGCGTGGGGATCAACAGGATTAGATA CCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTACTAGCTGTTGGAGTCCGGTGTAAAGGCTCTAGTGGCGCAGCTAACGCGATAAGTAC TCCGCTGGGGACTACGGCCGCAAGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCTG ATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAATTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACGCAGTGACAGGT GCTGCGAGCGTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGATAGTTACCATATT AAGTTGGGTACTCTATTGAGACTGCCGCTGACAAGGCGGAGGAAGGTGGGGACGACGCTCAAGTCAATCATGGCCCTACGACAGGG CTACACAGTGTCTACAATGGGTATTACAGAGGGCTGCGAAGGTGCGAGCTGGAGCGAACTCAAAAAGGTACTCTTAGTCCGGATT GCAGTCTGCAACTCGACTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGAATACTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTGA CACACGCGCCGTACACCATGGGAGTGGGTGCTCCAGAAGTAGATAGCTTAACGAATGGGCGTTTACCACGGAGTGATTATGAC TGGGGTG
<i>Y. pestis</i>	TAATACGACTCACTATAGGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGCAGCGGGAAGTAGTTTACTACTTTG CCGGCGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGGATCTGCCTGATGGAGGGGGATAACTACTGGAACCGGTAGCTAATACCGCAT GACCTCGCAAGAGCAAAGTGGGGGACCTTAGGGCTCACGCCATCGGATGAACCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGG CTCACCTAGCGCAGCATCCCTAGCTGGTGTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACAGCGTCCAGACTCCTACGGGAGGC AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTT TCAGCGAGGAGGAAGGGGTGAGTTTAATACGCTCAATCATTGACGTTACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAG CCGCGGTAATACGAGGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGAGCGGTTGTGTTAAGTCAGATGTGAAT CCCCGCGCTTAACGTGGGAAGTGCATTTGAACTGGCAAGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAA TGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGC GTTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAAATGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGG TTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCACAGAATTGGCAGAGATGCTAAAGTGCCCTTCGGGAAGTGT GAGACAGGTGCTGCATGGTGTGCTCAGCTCGTGTGTGAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATCCTTTGTT GCCAGACGTAATGGTGGGAATCAAGGGAGACTGCCGCTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCAAGTCATATGGCCCT TACGAGTAGGGCTACACACGTGTACAATGGCAGATACAAAGTGAAGCGAACTCGCGAGAGCCAGCGGACCACATAAAGTCTGTG TAGTCCGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCC CGGCGCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGTGCAAAAAGAAGTAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCAC TTTGTGATTCATGACTGGGGTG
<i>B. pseudomallei</i>	TAATACGACTCACTATAGGATTGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACCGGCAGCAGGGCTTCGGCCTGGTGGCG AGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACATGTCTGTAGTGGGGGATAGCCGCGCAAGCCGGATTAATACCGCATACGATC TAAGGATGAAAGCGGGGGACCTTCGGGCTCGCGCTATAGGGTTGGCCGATGGCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTACC AAGGCGACGATCAGTAGTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT GGGGAATTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCACTTTTGTCC GGAAAGAAATCATTCTGGCTAATACCCGAGTGGATGACGGTACCGGAAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG TAATACGTAGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCAGGCGGTTGCTAAGACCGATGTGAAATCCCGG GCTCAACCTGGGAAGTGCATTGGTGACTGGCAGGCTAGAGTATGGCAGAGGGGGTAGAATTCACGCTGTAGCAGTGAATGCGTA GAGATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCTGGGCCAATACTGACGCTCATGCAGGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGAT TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGTTGTTGGGGATTCAATTCCTTAGTAACGTAGCTAACCGGTGAAGT TGACCGCTGGGGAGTACGGTGCAGATTAACTCAAAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAAGCGGTGGATGATGTGGATTAAAT CGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTTGACATGGTGGGAAGCCCGATGAGAGTTGGGCGTGTGCAAGAGAACCGGCGCAC AGGTGCTGCATGGTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTTGTGTGTAC GCAAGAGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGC TTCACACGTCATACAATGGTTCGGAACAGAGGGTCCCAACCCGCGAGGGGGAGCCAAATCCAGAAAAACCGATCGTAGTCCGGATTG CACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTAC ACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGGGTTTTACCAGAAGTGGCTAGTCTAACCGCAAGGAGGACGGTACCACGGTAGGATTAT GACTGGGGTG

<i>B. abortus</i>	TAATACGACTCACTATAGGAACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGT GAGTAACGCGTGGGAACGTACCATTTGCTACGGAATAACTCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGCCCTTCGGGGGAAAGAT TTATCGGCAATGATCGGCGCCGCTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGTAAGGCTCACCAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGA GGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACACGCGCCAGACTCCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCC TGATCCAGCCATGCCGCTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGCTCTTTCACCGGTGAAGATAATGACGGTAACCGGAGAAG AAGCCCGGGTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCGATTCTTACGGCGTAAAGCGCACGTA GGCGGACTTTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCCCGGAACGTCCTTTGATACTGGAAGTCTTGAGTATGGTAGAGGTG AGTGGAATCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACCATTAAGTACG CTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGGTGT TTACACTTCGTGGCGCAGCTAACGCATTAAACATTCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAGCTCAAAGGAATTGACGGGG GCCCCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGCCCTTGACATCCCGGTCGCGGTTAGTG GAGACACTATCCTTCAGTTAGGCTGGACCGGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTC CCGCAACGAGCGCAACCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGCCGGTGATAAGCCGAGAGGAAGG TGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTACGGGCTGGGTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCGAGCAGCAGCG AGTGTGAGCTAATCTCAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCG GATCAGCATGCCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGTTTACCCGAAGGCGCTG TGCTAACCGCAAGGAGGAGGCGACACGCTAGGGTCAGCGACTGGGGTG
-------------------	---

[0164] [a] 밑줄 친 문자는 T7 프로모터 서열을 의미함.

[0166] IA 분석

[0167] IA에 사용하기 위한 표적 ssDNA와 RNA는 각각 화학적으로 합성되거나 시험관 내 전사에 의해 준비되었다. 1 μM 타겟 핵산, 형광(FAM) 및 소광제(BHQ1)의 내부 변형이 있는 1 μM 플랩 프로브, 각각 100nM의 침습성 프로브, 0.25U/μL Tth DNA 폴리머라제 또는 1.6U/μL FEN1(서열번호 1)을 사용하여 뉴클레아제가 없는 물(최대 10 μL)에서 IA 반응을 수행하였다. 겔 전기영동 분석을 위해 16% 변성(8 M UREA) 폴리아크릴아미드 겔을 사용하여 분석하였다. FRET 분석을 위해 Real-time PCR 시스템(CFX Opus 96, Biorad)을 사용하여 절단된 플랩 프로브에서 방출된 형광의 실시간 형광을 측정했다.

[0168] IA-TASER 분석

[0169] 앞선 실시예 1과 유사하게, 7.5 μL의 타겟 RNA, 포스포로티오에이트 결합 및 3' 말단의 5개 뉴클레오티드에 2'-O-메톡시에틸(2'MOE) 염기 변형을 갖는 1 μM 플랩 프로브, 각각 100 nM의 침습 프로브, 2.5 U/μL Tth DNA 중합효소 및 뉴클레아제가 없는 물(최대 15 μL)을 포함한 혼합물에서 반응이 수행되었다. 상기 반응물은 60℃에서 1시간 동안 인큐베이션 되었으며, 완성된 IA 반응 혼합물 7.5 μL를 버리고 어닐링 완충액(10mM HEPES, pH 7.5 및 100mM 칼륨 아세테이트)에서 동일한 부피의 10mM 센서 DNA와 혼합하였다. IA 반응 중에 생성된 트리거 DNA가 센서 DNA의 TBS에 어닐링되도록 혼합물을 95° C에서 5분 동안 가열한 후 실온으로 냉각시켰다.

[0170] TASER 분석을 위해 이 혼합물에서 3 μL 용액을 버리고 다음 성분을 포함하는 12 μL의 TASER 분석 용액과 혼합하였다: 57 mM HEPES-KOH (pH 7.5), 1.2 mM ATP, 각각 0.85 mM의 CTP, GTP 및 UTP, 2 mM DL-디티오테이트(dithiothreitol), 0.17 mg/mL *E. coli* 전체 tRNA 혼합물(MRE600 균주), 0.64 mM cAMP, 90 mM 칼륨 글루타메이트(potassium glutamate), 80 mM 암모늄 아세테이트(ammonium acetate), 12 mM 마그네슘 아세테이트(magnesium acetate), 34 μg/mL 엽산 (1-5-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid), 각각 1.5mM의 20종 아미노산, 67mM 크레아틴 인산염, (creatine phosphate) 3.2 μg/mL 크레아틴 키나제, 0.2U/μL *E. coli* DNA 중합효소 I, 0.25 mM dNTPs 및 *E. coli* 균주 BL21Star(DE3)로부터 제조된 S12추출물 26%(v/v) (Park and Kim, 2021).

[0171] IA-TASER 분석을 이용한 BWA의 16S rRNA 다중 검출

[0172] *E.coli* O157:H7 과 시험관 내 5종의 잠재적 BWA인 *Bacillus anthracis*(*B. anthracis*) , *Francisella tularensis*(*F. tularensis*) , *Yersinia pestis*(*Y. pestis*) , *Burkholderia pseudomallei*(*B. pseudomallei*) 및 *Brucella abortus* (*B. abortus*) (Dennis et al. 2001; Inglesby et al. 2000; Inglesby et al. 1999; Pappas et al. 2006; Wiersinga et al. 2018)을 혼합하여 실험하였으며 각 rRNA의 농도는 100nM로 조정되었다. 각 타겟 16S rRNA에 특이적인 플랩 프로브와 침습성 프로브를 사용하여 혼합물에 대해 IA-TASER 분석을 수행하였다. 생물학적 매트릭스에서 16S rRNA를 시뮬레이션하는 실험에서 16S rRNA 혼합물은 10 μg/mL 첨가되었다. 이 혼합물의 16S rRNA는 RNeasy Mini Kit(Qiagen)을 사용하여 정제한 후 IA-TASER 분석으로 분석되었다.

[0173] 사용된 프로브 서열

[0174] IA 프로브 올리고뉴클레오타이드 서열을 아래 표 6에 표시하였다.

표 6

[0175]

Target pathogen	Region in 16S rRNA	Flap probe ^[a]	Invasive probe
<i>E. coli</i> H157:07	660C	TCGATCCTGCGAAATGAGACTCAAGC*T*T*G*C*C	GAATTCTACCCCCCTCTACA
	637C	TCGATCCTGCGAAATGATGCAGTTCCTC*A*G*G*T*T	GAATCAAGCTTGCCAGTATCAA
	1006C	TCGATCCTGCGAAATGTTCTGTGGATGTC*A*A*G*A*C	CACCAATCCATCTCTGGAAAA
	1120T	TCGATCCTGCGAAAGATAAGGGTTG*C*G*C*T*C	GACCGCTGGCAACAAAT
<i>B. anthracis</i>	195C	TCGATCCTGCGAAATGAAGCCGCTTTCAATT*T*C*G*A*A	GTCCATCCATAAGTGACAGCCA
	477C	TCGATCCTGCGAAATGTTAGGTACCGTCAA*G*G*T*G*C	GTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGA
	576C	TCGATCCTGCGAAATGAAACCACC*T*G*C*G*C	GGGCTTTCACATCAGACTTAAA
	1020A	TCGATCCTGCGAAATCCCGAAGGAGAAGC*C*C*T*A*T	CACCACCTGTCACTCTGCA
	1308C	TCGATCCTGCGAAATGCGAGTTGCAGCTAC*A*A*T*C*C	TAGCGATTCCAGCTTCATGTAGA
<i>F. tularensis</i>	119C	TCGATCCTGCGAAATGTATCCCCCTCAAATGGA*C*A*G*A*T	CGGTATTAAACAGTCGTTTCCAACCTGA
	347C	TCGATCCTGCGAAATGTTGCCCTTATGTTCCAA*T*A*T*T*C	ATGGCATTGTGGATCAGGA
	419C	TCGATCCTGCGAAATGGCTTTCTCCCAAC*T*A*A*A*G	CCCCAAGGCTATTAACTTGA
	542C	TCGATCCTGCGAAATGACCTTTAC*G*C*C*A	CTGACTTAACAAACCACCTACAA
	816C	TCGATCCTGCGAAATGAGCCTTTACACCGAC*T*C*C*A*A	CGTTAGCTGCCCACTAA
	1022C	TCGATCCTGCGAAATGTGCAGCACCTGT*C*A*C*T*G	CGAGCTGACGACAGCCA
	1087A	TCGATCCTGCGAAATCAATAGGGGTTG*C*G*C*T*C	GAGTACCCAACCTAATGATGGTAACTAA
	1236C	TCGATCCTGCGAAATGCTCGCACCT*T*C*G*C*A	ACCTTTTGTAGTTTCGCTCCAA
	1259C	TCGATCCTGCGAAATGTACCTTTTGTAGTTTCG*C*T*C*C*A	AGACTGCAATCCGACTAAGAA
	1330A	TCGATCCTGCGAAATATTCTGACCTGCGATTA*C*T*A*G*C	GGGAACGTATTACCCGAGA
<i>Y. pestis</i>	288A	TCGATCCTGCGAAATACTAGCTAATCCCA*T*C*T*G*G	TGAGCCATTACCCACCA
	448C	TCGATCCTGCGAAATGAGCGTATTAAATC*A*A*C*C*C	CTGCGAGTAACGTCAATGATTA
	450A	TCGATCCTGCGAAATGAGCGTATTAACT*C*A*A*C*C	CTGCGAGTAACGTCAATGAA
	591C	TCGATCCTGCGAAATGCGGGATTTC*A*C*A*T*C	GCAGTTCACGTTAAGCA
	1220A	TCGATCCTGCGAAATGCCATTGTAGC*A*C*G*T*G	GAGTTCGCTTCACTTTGTATCA
	1250C	TCGATCCTGCGAAATGGCTCTCGCG*A*G*T*T*C	GACTTTATGTGGTCCGCTA
<i>B. pseudomallei</i>	273C	TCGATCCTGCGAAATGTCTCTCAGACCAG*C*T*A*C*T	CCCAGTGTGGCTGGTCA
	413C	TCGATCCTGCGAAATGGACAAAAGTGCTTTACA*A*C*C*C*G	GGGTATTAGCCAGAATGATTCTTTCCA
	562C	TCGATCCTGCGAAATGCAAAACCGC*C*T*G*C*G	GGGGATTTCACATCGGTCTTAA
	569C	TCGATCCTGCGAAATGGTCTTAGCAA*A*C*C*G*C	CCCGGGGATTTCACATCA
	1103C	TCGATCCTGCGAAATGCGTAGCAACTAAGGA*C*A*A*G*G	GCAGTCTCCTTAGAGTGCTCTTA
	1197C	TCGATCCTGCGAAATGACGTGTGAAGC*C*CT*A*C*C	CCTCTGTTCGACCATTTGTATA
	1224C	TCGATCCTGCGAAATGGCGACCTCT*G*T*T*C*C	CCCCTCGCGGTTA
<i>B. abortus</i>	1428C	TCGATCCTGCGAAATGACCGTCTCC*T*T*G*C*G	AGTCATGAATCCTACCGTGGTA
	171C	TCGATCCTGCGAAATGATCATTTGCCGATAAATCTT*T*C*C*C*C	AATCCAACGCGGGCCA
	383C	TCGATCCTGCGAAATGTAAAGAGCTTTACAACC*C*T*A*G*G	GGTTACCGTCATTATCTTACCGA
	506C	TCGATCCTGCGAAATGTCCGCCTAC*G*T*G*C*G	GGGATTTCACCCCTGACTTAAAAA
	551C	TCGATCCTGCGAAATGGCAGTTCCG*G*G*G*T*T	CCATACTCAAGACTTCCAGTATCAAAA
	747C	TCGATCCTGCGAAATGGCTAACATTATCGTTT*A*C*G*G*C	CGAAGTGTAACACCCGACA
	889C	TCGATCCTGCGAAATGCGCGTTGCTTCGAAT*T*A*A*A*C	TCAAGGGCTGGTAAGGTTCTA
<i>B. abortus</i>	1204C	TCGATCCTGCGAAATGGAGATTAGCTCACA*C*T*C*G*C	CAATCCGAAGTGAATGGCTTTTA

[0176] [a] *는 포스포로티오에이트 결합, 볼드체는 2'MOE 결합을 의미함.

[0178] 결과

[0179] RNA 검출

[0180] 프로브가 RNA에 혼성화될 때 플랩 프로브의 FEN1 매개 절단 효과가 감소하는 문제(도 18A)를 해결하기 위해, RNA-올리고뉴클레오타이드 하이브리드에 *Thermus thermophilus* (Tth) 의 DNA 중합효소가 RNA 하이브리드 구조에서 플랩 서열을 제거하는 능력이 있는 점 (Eis et al. 2001)에 착안하여 Tth DNA 중합효소를 적용하였다. 동일한 프로브 세트에 실험하였을 때 RNA 혼성화된 플랩 프로브로부터의 플랩 서열 절단을 나타내는 FRET 신호는 FEN1 과 비교하여 Tth DNA 중합효소에 의해 매개될 때 대략 3.5배 향상되었다 (도 18B).

[0181] 이 결과를 토대로 RNA를 타겟 서열로 하는 TASER 분석에 있어서 트리거 DNA를 생성하기 위해 Tth DNA 중합효소를 적용하였다.

[0182] IA-TASER 분석을 사용한 미생물 16S rRNA 검출

[0183] sfGFP를 코딩하는 센서 DNA와, 다양한 농도의 *E. coli* O157:H7 16S rRNA를 IA-TASER 분석에 사용하였다. 도 19A에 나타난 바와 같이, 검출 한계(LOD: limit of detection)는 2nM 정도였다. 센서 DNA가 NLuc를 코딩하는 DNA로 변경되는 경우, 감지 감도가 크게 향상되어 2.8pM의 LOD를 달성하였다(도 19B).

[0184] BWA의 16S rRNA의 다중 검출

[0185] *E. coli* O157:H7 rRNA 를 사용한 검증 후, 더 넓은 스펙트럼의 병원성 16S rRNA를 검출하기 위해 5개의 잠재적 BWA (생물 무기, biological warfare agents) (*Bacillus anthracis* (*B. anthracis*), *Francisella tularensis*(*F. tularensis*), *Yersinia pestis*(*Y. pestis*), *Burkholderia pseudomallei*(*B. pseudomallei*) 및 *Brucella abortus* (*B. abortus*))를 포함하여 분석을 확장 적용하였다.

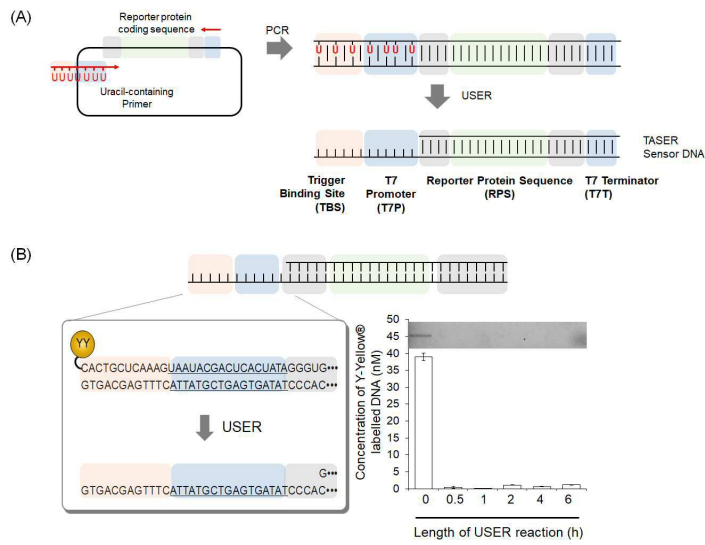
[0186] 6개 병원성 균주의 16S rRNA를 분석하기 위해 표 6의 프로브 세트를 테스트하였다. 도 20A에 나타난 바와 같이, 특정 16S rRNA가 적절한 프로브 세트와 일치할 때 주목할만한 신호가 주로 관찰되었으며, 그 결과 히트 맵에 뚜렷한 대각선 패턴이 나타났다. 반대로, 16S rRNA가 상응하지 않는 프로브와 결합되면 생성된 신호는 최소화되어 16S rRNA 중 없이 수행된 분석에서 볼 수 있는 배경 신호와 사실상 구별할 수 없었다. 추가로, 관련 없는 RNA 서열과 스캐램블된 혼합물에서, 선택적 타겟 16S rRNA에 대한 TASER의 특이적인 검출능을 테스트하였다.

[0187] 이를 위해 6종의 16S rRNA를 동일한 농도(100nM)로 혼합하고 지정된 병원체를 타겟으로 하는 개별 프로브 세트를 제공한 후 IA-TASER 분석으로 분석하였다. 그림 도 21A에서 볼 수 있듯이 IA-TASER 분석은 모든 타겟에 대해 6.0보다 높은 S/B 값으로 타겟 16S rRNA를 적절하게 식별하는 동시에 표적 16S rRNA가 제외되었을 때 배경 신호(background signal) 수준의 신호만이 확인되었다(그림 21B). 이로부터 IA-TASER 분석을 통해 타겟 16S rRNA를 다른 계통의 16S rRNA와 명확하게 구별할 수 있음을 확인하였다.

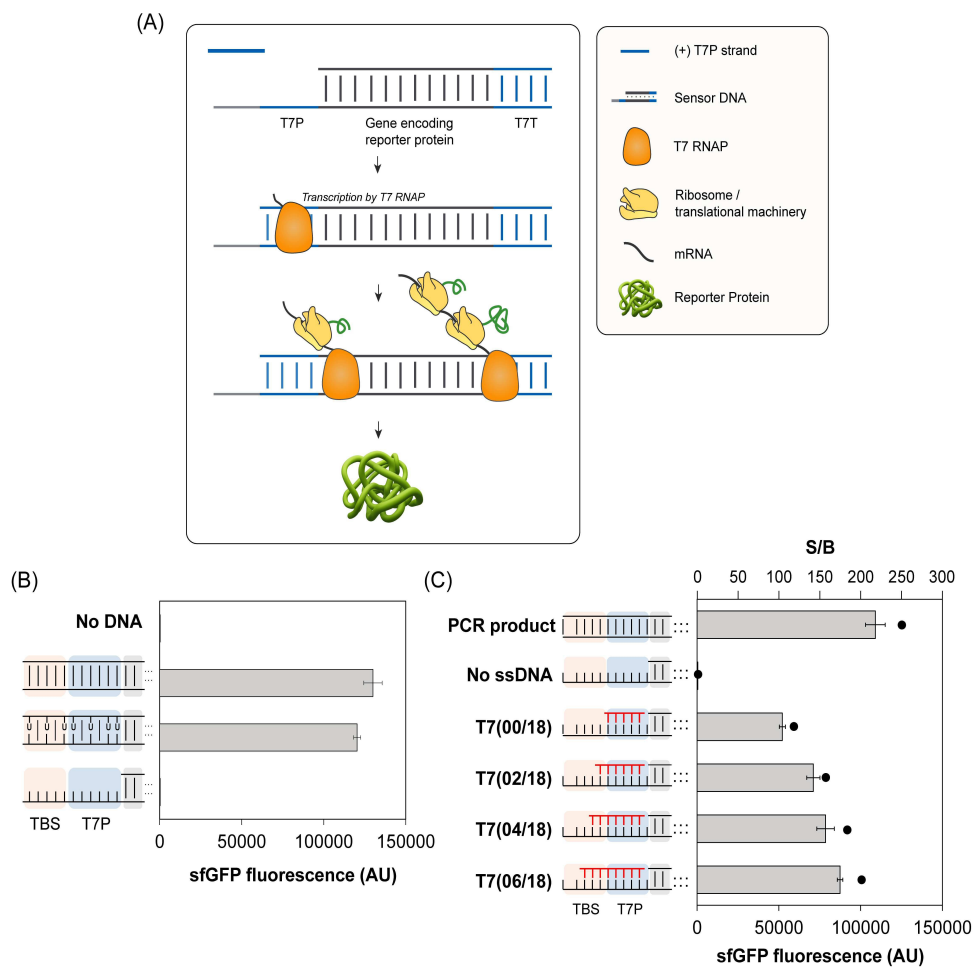
[0189] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

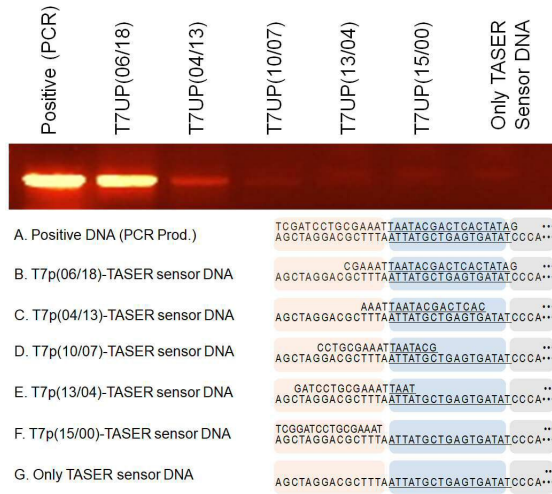
도면1



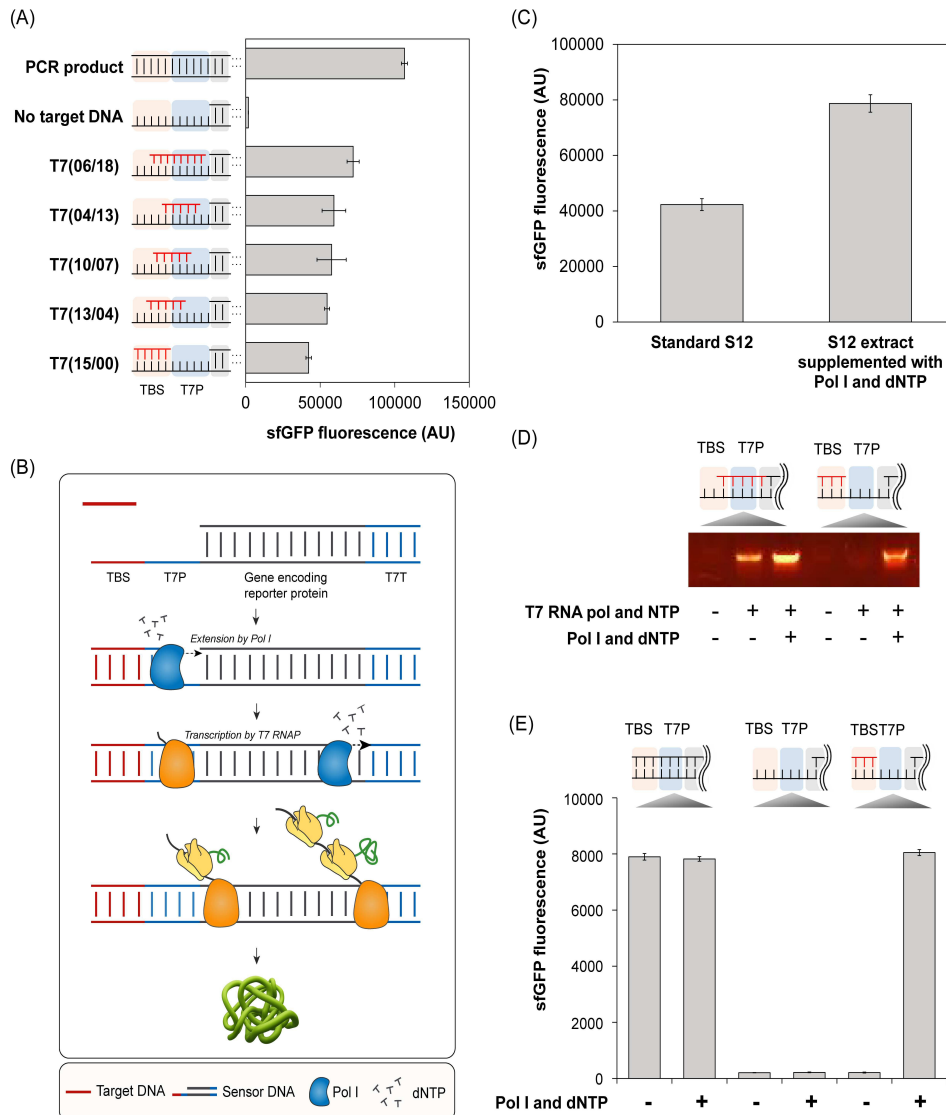
도면2



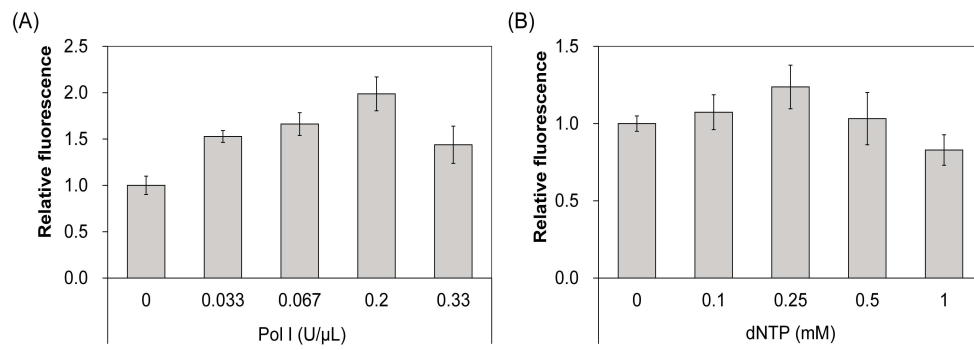
도면3



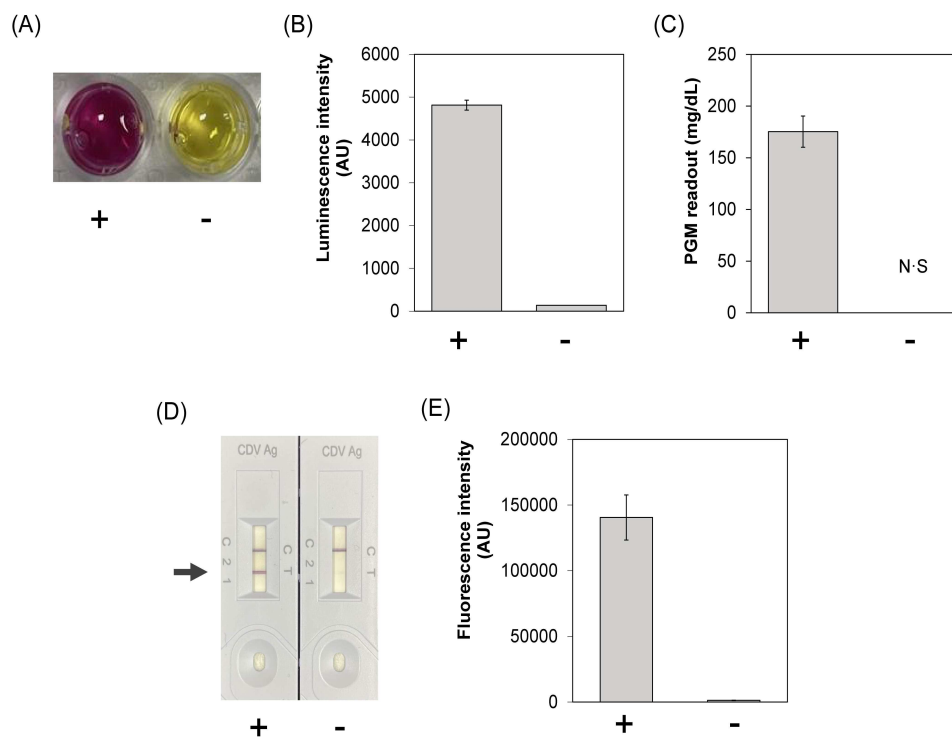
도면4



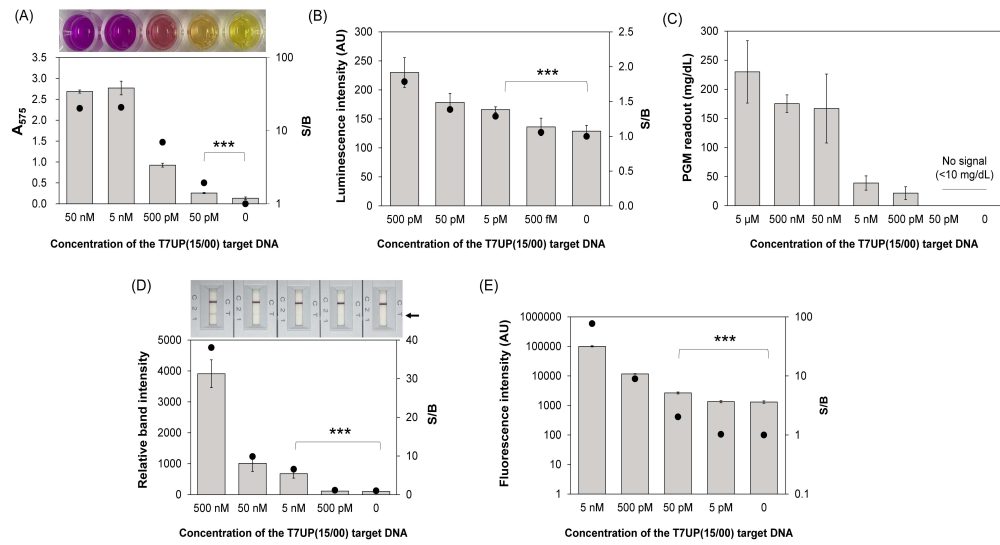
도면5



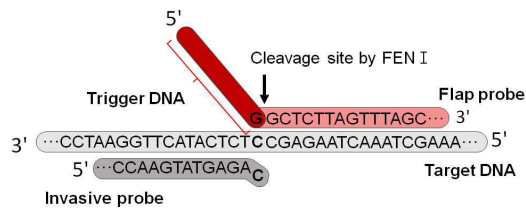
도면6



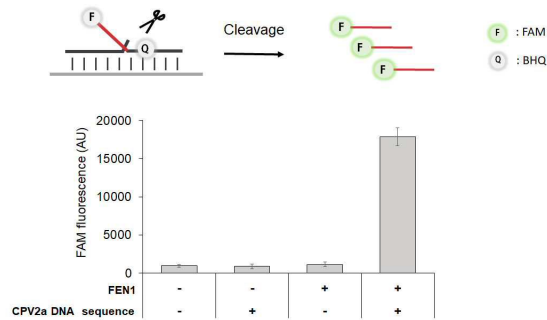
도면7



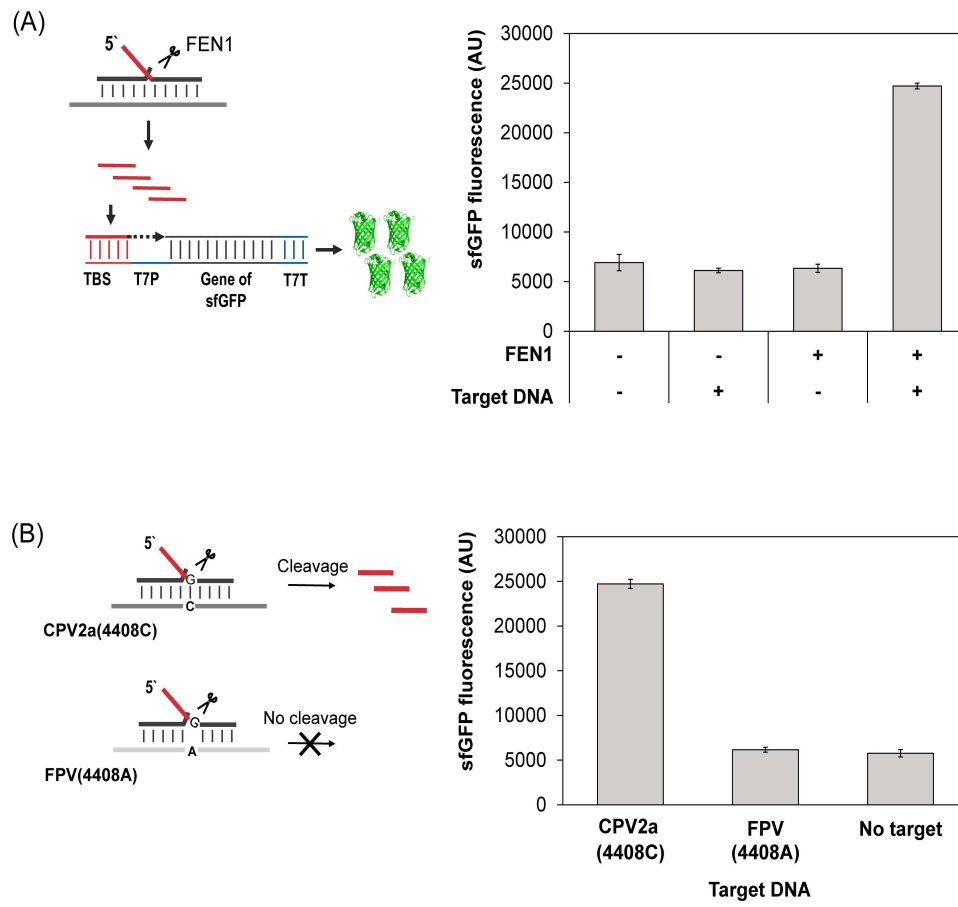
도면8



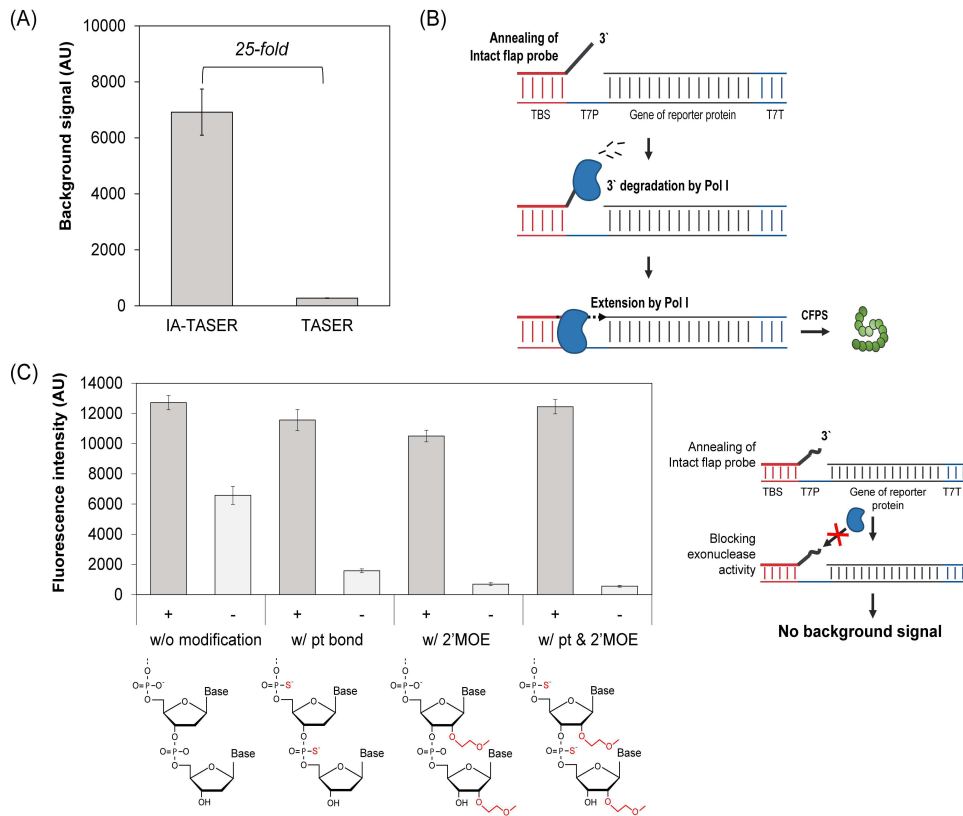
도면9



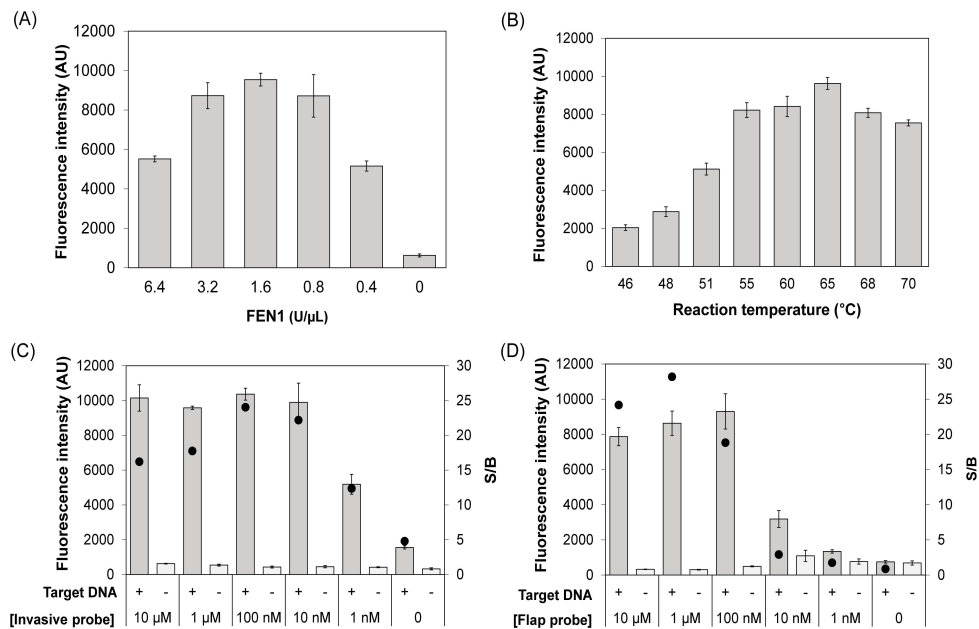
도면10



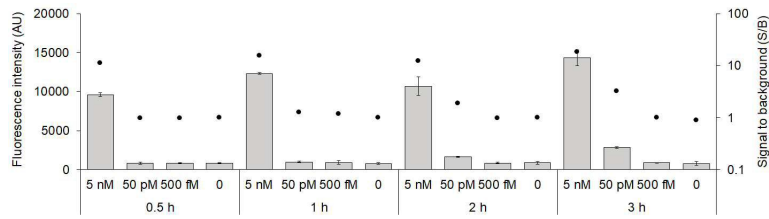
도면11



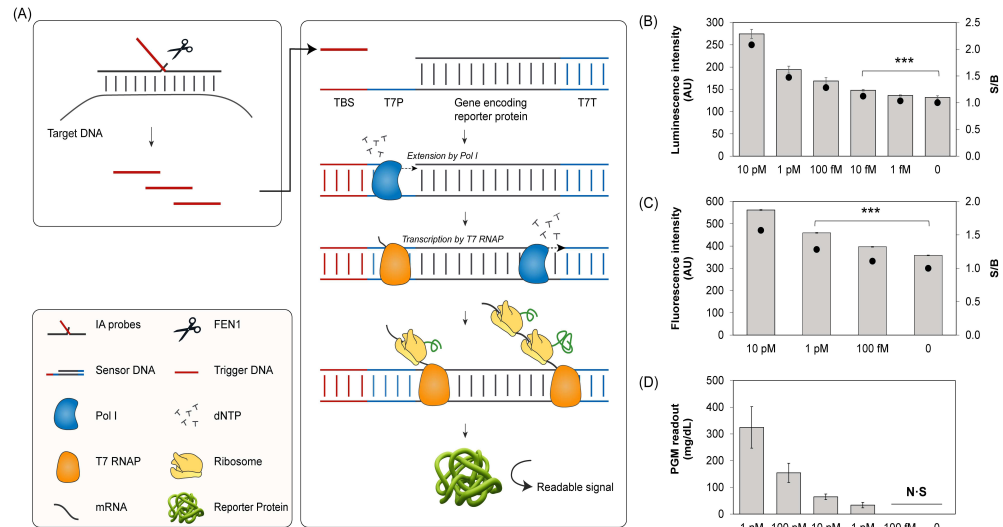
도면12



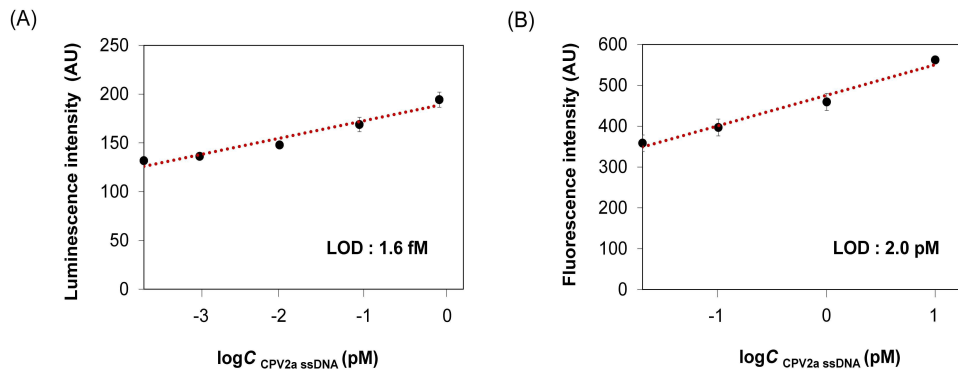
도면13



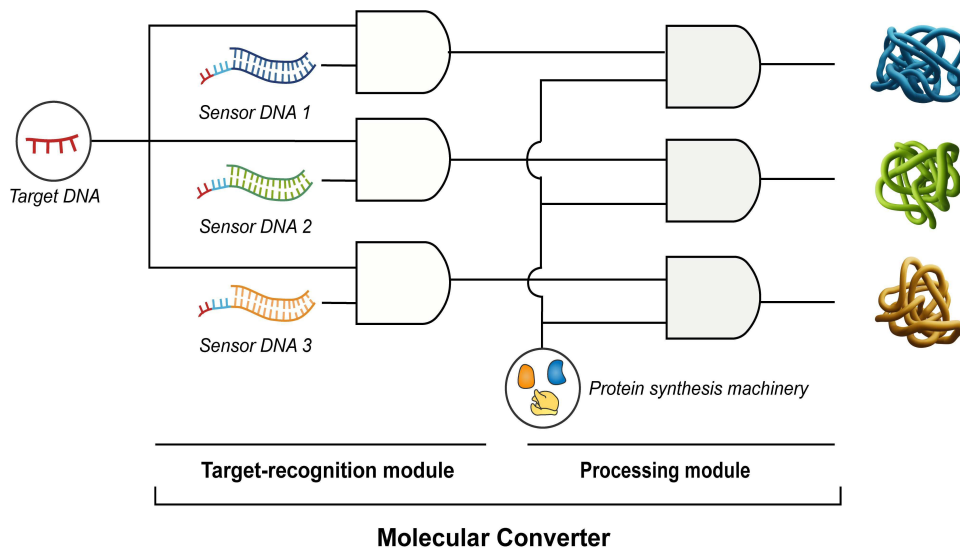
도면14



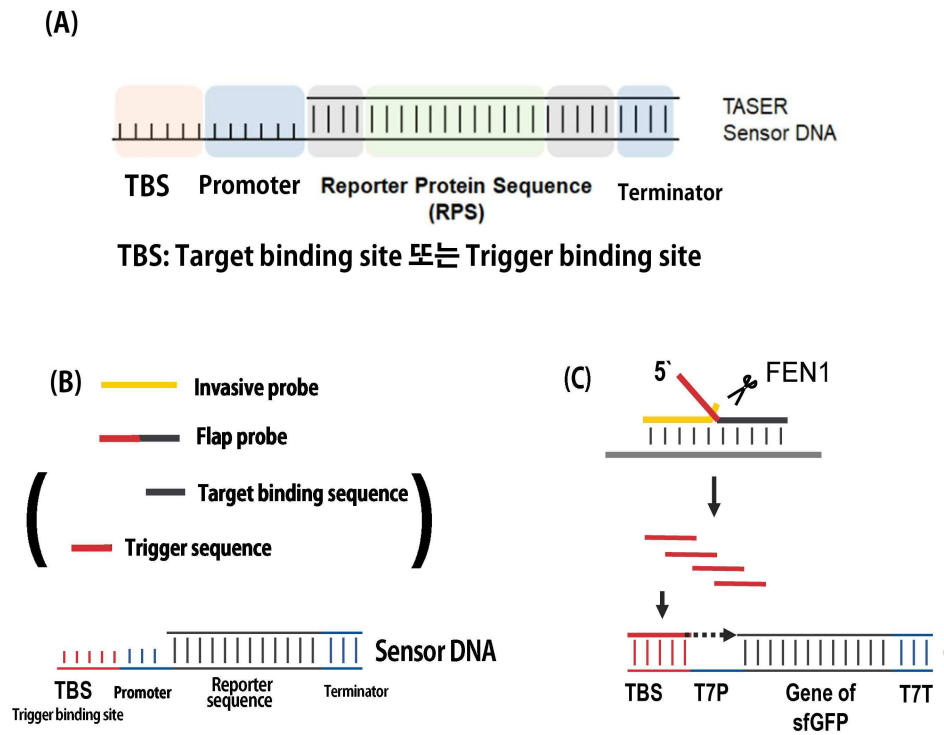
도면15



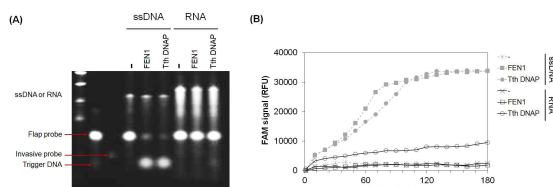
도면16



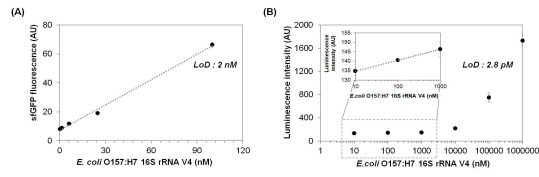
도면17



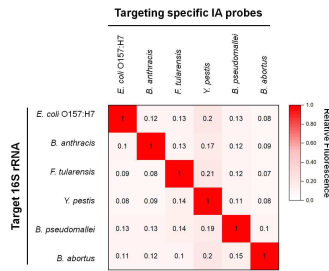
도면18



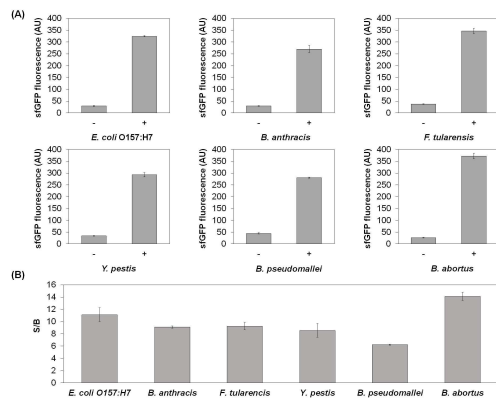
도면19



도면20



도면21



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.