



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0052677  
(43) 공개일자 2024년04월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6816 (2018.01) C12Q 1/28 (2006.01)  
C12Q 1/6811 (2018.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/6816 (2018.05)  
C12Q 1/28 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2023-0135804  
(22) 출원일자 2023년10월12일  
심사청구일자 2023년10월12일  
(30) 우선권주장  
1020220132471 2022년10월14일 대한민국(KR)

- (71) 출원인  
고려대학교 산학협력단  
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)  
(72) 발명자  
정철희  
서울특별시 성북구 돌곶이로8길 22 (석관동, 래미안아트리지)  
신현  
경기도 안양시 만안구 소곡로 162 (안양동, 수리산파크원)  
(74) 대리인  
특허법인(유)남아이피그룹, 특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 12 항

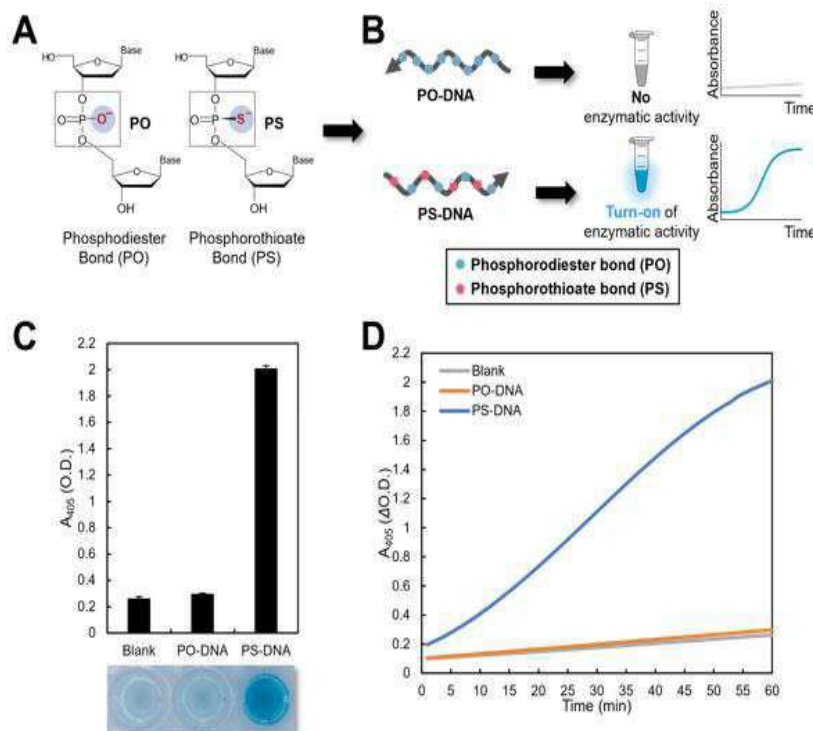
(54) 발명의 명칭 비색 검출을 위한 황 함유 프로브 및 핵산 내 황 도입을 통한 효소 활성 가속화 방법

### (57) 요약

본 발명은 비색 검출을 위한 황 함유 프로브 및 핵산 내 황 도입을 통한 효소 활성 가속화 방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 비색 검출용 황 함유 프로브로서, 상기 프로브는 핵염기가 연속적으로 연결된 DNA 올리고뉴클레오타이드의 형태를 가지며, 상기 핵염기의 연속적인 연결은 아데닌(A), 구아닌(G), 시토신(C) 및 티민(T) 중

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



에서 선택되는 어느 하나 이상이 무작위적으로 연결되어 있고, 상기 DNA 올리고뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드 포스페이트 백본이 하나 이상의 포스포로티오에이트로 변형되어(phosphorothioate modification) 하나 이상의 황(sulfur) 원자를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는 비색 검출용 황 함유 프로브, 상기 프로브를 함유한 비색 검출용 조성물, 비색 검출용 키트 및 비색 검출 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 (1) 검출 대상의 타겟 유전자를 선정하는 단계; (2) 상기 타겟 유전자의 핵산서열에 대한 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열을 디자인하는 단계; 및 (3) 상기 상보적인 올리고뉴클레오타이드에서 뉴클레오타이드 포스페이트 백본을 하나 이상의 포스포로티오에이트로 변형시키는 단계를 포함하며, 상기 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 30mer의 길이를 가지며, 포스포로티오에이트 변형은 양쪽 옆에 존재하는 핵염기가 적어도 하나는 아데닌(A)인 영역에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 비색 반응 매개의 효소 활성 증진 효과를 갖는 비색 검출용 황 함유 프로브의 제조방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

**C12Q 1/6811** (2018.05)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12Q 2326/00 (2013.01)

C12Q 2521/345 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415187028

과제번호 20009356

부처명 산업통상자원부

과제관리(전문)기관명 한국산업기술기획평가원

연구사업명 바이오산업기술개발

연구과제명 디지털 PCR 대체 nest PCR 기반 기술 개발 및 저가형 현장형 위해요소 분자진단 시스템 개발

기 여 율 4/10

과제수행기관명 압티지엠제이주식회사

연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711168711

과제번호 2022M3A9B608267012

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발

연구과제명 (공동2) 하이브리드 인공지능기반 바이오회로 시험 및 최적화 기술개발

기 여 율 3/10

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2022.04.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711180905

과제번호 2021R1C1C1004147

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 정확한 단일염기변이 구분 프로브를 이용한 살아있는 세포 식별 및 분리 기술 개발

기 여 율 3/10

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

비색 검출용 황 함유 프로브로서,

상기 프로브는 핵염기가 연속적으로 연결된 DNA 올리고뉴클레오타이드의 형태를 가지며,

상기 핵염기의 연속적인 연결은 아데닌(A), 구아닌(G), 시토신(C) 및 티민(T) 중에서 선택되는 어느 하나 이상이 무작위적으로 연결되어 있고,

상기 DNA 올리고뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드 포스페이트 백본이 하나 이상의 포스포로티오에이트로 변형되어 (phosphorothioate modification) 하나 이상의 황(sulfur) 원자를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는, 비색 검출용 황 함유 프로브.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 비색 검출용 황 함유 프로브는 10개 내지 30개의 핵염기가 연속적으로 연결된 DNA 올리고뉴클레오타이드의 형태를 갖는 것을 특징으로 하는, 비색 검출용 황 함유 프로브.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 비색 검출용 황 함유 프로브는 비색 반응 매개의 효소 활성을 증진시키는 것을 특징으로 하는, 비색 검출용 황 함유 프로브.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

DNA 올리고뉴클레오타이드의 포스페이트 백본을 포스포로티오에이트로 변형시킬 경우, 상기 변형의 양쪽 옆에 존재하는 핵염기는 적어도 하나가 아데닌(A)인 것을 특징으로 하는, 비색 검출용 황 함유 프로브.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 하나 이상의 황(sulfur) 원자를 포함하는 DNA 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥 DNA 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는, 비색 검출용 황 함유 프로브.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 비색 검출용 황 함유 프로브를 포함하는, 비색 검출용 조성물.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 조성물은 비색계 시약을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 비색 검출용 조성물.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 비색계 시약은 ABTS(2,2'-아지노-bis(3-에틸벤조사이아졸린-6-설폰산), OPD(o-페닐렌다이아민 다이하이드로클로라이드), DAB(다이아미노벤지딘), AEC(3-아미노-9-에틸카보졸), TMB(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘),

AmplexRed, 및 Homovanilic acid로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상; 및 1종 이상의 과산화물인 것을 특징으로 하는, 비색 검출용 조성물.

#### 청구항 9

제6항에 있어서,

상기 조성물에는 헤민(hemin)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 비색 검출용 조성물.

#### 청구항 10

제6항의 비색 검출용 조성물을 포함하는 비색 검출용 키트.

#### 청구항 11

제1항의 비색 검출용 황 함유 프로브를 이용한 비색 검출 방법.

#### 청구항 12

(1) 검출 대상의 타겟 유전자를 선정하는 단계;

(2) 상기 타겟 유전자의 핵산서열에 대한 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열을 디자인하는 단계; 및

(3) 상기 상보적인 올리고뉴클레오타이드에서 뉴클레오타이드 포스페이트 백본을 하나 이상의 포스포로티오에이트로 변형시키는 단계를 포함하며,

상기 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 30mer의 길이를 가지며, 포스포로티오에이트 변형은 양쪽 옆에 존재하는 핵염기가 적어도 하나는 아데닌(A)인 영역에서 이루어지는 것을 특징으로 하는,

비색 반응 매개의 효소 활성 증진 효과를 갖는 비색 검출용 황 함유 프로브의 제조방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 비색 검출을 위한 황 함유 프로브 및 핵산 내 황 도입을 통한 효소 활성 가속화 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] SARS-CoV-2 바이러스로 인해 COVID-19 전염병은 전 세계적으로 계속 확산되고 있으며, 아직도 완전히 통제되지 않고 있다. 팬데믹에 대응하여 바이러스를 탐지하는 다양한 방법 중에서 대표적인 방법이 형광 표지 프로브를 사용한 정량적 PCR과 같은 형광 기반 검출이다. 이 방법은 매우 민감하고 구체적이지만 몇 가지 제한 사항이 있다. 값비싼 장비와 숙련된 인력이 필요하며 탐지 프로세스에 시간이 많이 걸린다. 이러한 한계는 특히 감염성 질병의 확산 및 예방의 중요성이 강조되는 현재의 팬데믹 상황에서 큰 제약이 되고 있어 현장 진단을 위한 보다 신속하고 사용자 친화적이며 비용 효율적으로 수행할 수 있는 새로운 방법의 개발이 필요하다.

[0003] 반면, 비색 진단 방법은 고가의 장비나 검출을 위한 숙련된 인원 없이 검출 결과를 해석할 수 있고, 진단 비용 효율적으로 형광 분석에 비해 반복적이고 대량의 집단 스크리닝에 적합한 장점이 있다. 뿐만 아니라 다루기 쉽고 간단하고 신속하게 결과를 확인할 수 있어 현장기반핵산진단에 응용하기가 적합하다.

[0004] 그러나 이러한 비색 진단에 사용되는 DNAzyme은 특정 화학반응을 수행할 수 있는 DNA 올리고뉴클레오타이드의 일종으로, 특히 G-quadruplex/hemin DNAzyme 시스템에 사용될 때 퍼옥시다제의 활성을 모방하는 능력이 있는 것으로 알려져 있다. 이 시스템은 비색 신호를 생성할 수 있는 진단 방법에 사용된다. G-quadruplex는 Hoogsteen 염기쌍에 의해 서로 결합되어 G-4중체의 스택을 형성하는 구아닌이 풍부한 4개의 올리고뉴클레오타이드 가닥으로 형성된 구조를 갖는다. 이 구조에 hemin이 첨가되면 과산화수소 매개의 산화가 일어날 수 있으며, 이는 ABTS, 루미놀, OPD, TMB 등과 같은 기질의 산화로 이어져 비색진단이 가능하다. 그러나 이 방법은 비색 진단을 위해 G-quadruplex 구조가 필요하다는 한계가 있으며, G-quadruplex 구조를 이용한 서열 특이적 프로브의 설계가 어려울 뿐만 아니라 비특이적 증폭으로부터 위양성(false positive)의 구별이 불가능하다는 문제점이 있다.

[0005] 따라서 이러한 문제점을 개선할 수 있으며 보다 편리하고 효과적인 새로운 비색 진단 방법의 개발이 필요하다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-2218758

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0007] 이에 본 발명자들은 서열의 제한을 받지 않는 새로운 개념의 DNAzyme으로 종래 비색 진단이 갖는 단점을 개선할 수 있도록, 핵산에 존재하지 않지만 효소 활성화에 영향을 주는 황 원자를 포스포로티오에이트 결합(PS)을 통해 핵산에 도입한 새로운 비색 검출용 프로브를 고안하였고, 이를 이용할 경우, 효소 활성을 가속화시켜 보다 신속하고 정확하게 비색 진단이 가능하다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 그러므로 본 발명의 목적은, 비색 검출용 황 함유 프로브로서, 상기 프로브는 핵염기가 연속적으로 연결된 DNA 올리고뉴클레오타이드의 형태를 가지며, 상기 핵염기의 연속적인 연결은 아데닌(A), 구아닌(G), 시토신(C) 및 티민(T) 중에서 선택되는 어느 하나 이상이 무작위적으로 연결되어 있고, 상기 DNA 올리고뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드 포스페이트 백본이 하나 이상의 포스포로티오에이트로 변형되어(phosphorothioate modification) 하나 이상의 황(sulfur) 원자를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는, 비색 검출용 황 함유 프로브를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 비색 검출용 황 함유 프로브를 포함하는, 비색 검출용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 비색 검출용 조성물을 포함하는 비색 검출용 키트를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 비색 검출용 황 함유 프로브를 이용한 비색 검출 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은, (1) 검출 대상의 타겟 유전자를 선정하는 단계; (2) 상기 타겟 유전자의 핵산서열에 대한 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열을 디자인하는 단계; 및 (3) 상기 상보적인 올리고뉴클레오타이드에서 뉴클레오타이드 포스페이트 백본을 하나 이상의 포스포로티오에이트로 변형시키는 단계를 포함하며, 상기 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 30mer의 길이를 가지며, 포스포로티오에이트 변형은 양쪽 옆에 존재하는 핵염기가 적어도 하나는 아데닌(A)인 영역에서 이루어지는 것을 특징으로 하는, 비색 반응 매개의 효소 활성 증진 효과를 갖는 비색 검출용 황 함유 프로브의 제조방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0013] 따라서 본 발명은, 비색 검출용 황 함유 프로브로서, 상기 프로브는 핵염기가 연속적으로 연결된 DNA 올리고뉴클레오타이드의 형태를 가지며, 상기 핵염기의 연속적인 연결은 아데닌(A), 구아닌(G), 시토신(C) 및 티민(T) 중에서 선택되는 어느 하나 이상이 무작위적으로 연결되어 있고, 상기 DNA 올리고뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드 포스페이트 백본이 하나 이상의 포스포로티오에이트로 변형되어(phosphorothioate modification) 하나 이상의 황(sulfur) 원자를 포함하고 있는 것을 특징으로 하는, 비색 검출용 황 함유 프로브를 제공한다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 비색 검출용 황 함유 프로브는 10개 내지 30개의 핵염기가 연속적으로 연결된 DNA 올리고뉴클레오타이드의 형태를 갖는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 비색 검출용 황 함유 프로브는 비색 반응 매개의 효소 활성을 증진시키는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, DNA 올리고뉴클레오타이드의 포스페이트 백본을 포스포로티오에이트로 변형시킬 경우, 상기 변형의 양쪽 옆에 존재하는 핵염기는 적어도 하나가 아데닌(A)인 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 하나 이상의 황(sulfur) 원자를 포함하는 DNA 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥 DNA 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0018] 또한 본 발명은 본 발명의 비색 검출용 황 함유 프로브를 포함하는, 비색 검출용 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 비색계 시약을 더 포함하는 것일 수 있다.

- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 비색계 시약은 ABTS(2,2'-아지노-bis(3-에틸벤조싸이아졸린-6-설폰산), OPD(o-페닐렌디아민 다이하이드로클로라이드), DAB(다이아미노벤지딘), AEC(3-아미노-9-에틸카보졸), TMB(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘), AmplexRed, 및 Homovanilic acid로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상; 및 1종 이상의 과산화물일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물에는 헤민(hemin)을 더 포함할 수 있다.
- [0022] 또한 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물에는 과산화수소( $H_2O_2$ )를 더 포함할 수 있다.
- [0023] 또한 본 발명은 본 발명의 비색 검출용 조성물을 포함하는 비색 검출용 키트를 제공한다.
- [0024] 또한 본 발명은 본 발명의 비색 검출용 황 함유 프로브를 이용한 비색 검출 방법을 제공한다.
- [0025] 나아가 본 발명은, (1) 검출 대상의 타겟 유전자를 선정하는 단계; (2) 상기 타겟 유전자의 핵산서열에 대한 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열을 디자인하는 단계; 및 (3) 상기 상보적인 올리고뉴클레오타이드에서 뉴클레오타이드 포스페이트 백본을 하나 이상의 포스포로티오에이트로 변형시키는 단계를 포함하며, 상기 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 30mer의 길이를 가지며, 포스포로티오에이트 변형은 양쪽 옆에 존재하는 핵염기가 적어도 하나는 아데닌(A)인 영역에서 이루어지는 것을 특징으로 하는, 비색 반응 매개의 효소 활성 증진 효과를 갖는 비색 검출용 황 함유 프로브의 제조방법을 제공한다.

### 발명의 효과

- [0026] 본 발명은 황을 핵산에 도입하여 서열의 제한을 갖는 비색 진단의 문제점을 해결할 수 있도록 하였다. 즉, 본 발명에 따른 핵산에 존재하지 않는 원소인 황을 도입하여 퍼옥시다제 활성을 보이는 새로운 개념의 DNAzyme은 DNA형태에 따라 검출 양성 및 음성의 결과를 확인할 수 있어 비색 진단 기술 응용성을 확장할 수 있는 효과를 갖는다. 또한, 구조가 필수적으로 필요한 기존 DNAzyme과 다르게 비색을 위한 특이적인 구조 및 추가적인 변형 없이도 다양한 시퀀스에 폭넓게 적용할 수 있는 범용성이 높은 효과를 가지며, 또한 핵산 내로 황(sulfur) 도입이 쉬운 포스포로티오에이트 변형(phosphorothioate modification)을 이용함으로써 가격이 저렴하고 도입이 쉬운 장점이 있다. 또한, 모노머 형태에 포함된 황은 비색 활성이 없는 반면 충분한 길이의 황 변형 단일 가닥의 DNA(sulfur modified single stranded DNA)는 hemin과 상호작용하여 과산화효소 유사 활성을 발생시킬 수 있으며, 상보적인 서열을 혼성화시키는 경우 반응에 참여하는 염기들이 수소결합으로 기질과의 반응이 제한되어 비색이 소광되는 효과를 확인할 수 있으므로, 종래 방법에 비해 간편하고 신속하며 정확하게 비색 검출 및 진단이 가능한 효과를 갖는다.

### 도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 핵산에 황을 도입한 효과를 확인한 것으로, A) PO 결합(phosphodiester bond)과 PS 결합(phosphorothioate bond)된 뉴클레오타이드 간의 연결 구조를 각각 나타낸 것이고, B) PS 변형 여부에 따른 효소 활성의 차이에 대한 모식도를 나타낸 것으로, PS 변형이 ssDNA에 도입될 경우, 효소 활성의 증가를 확인한 것이며, C) PO-DNA 및 PS-DNA 존재 하에서 비색 분석결과를 405 nm에서 흡광도 측정으로 확인한 것이며, D) 405 nm에서 관찰된 실시간 흡광도 데이터를 나타낸 것으로, blank는 핵산이 포함되지 않은 군을 나타낸 것이다.
- 도 2는 비색 분석의 최적 조건을 확인한 것으로, A) hemin 농도별 1시간 상온에서 반응 후, 405nm에서의 흡광도 스펙트럼을 나타낸 것이고(가장 왼쪽), 1시간 동안의 실시간 흡광도 곡선을 나타낸 것이며(가운데 및 오른쪽), B)  $H_2O_2$  농도별 비색 분석 결과를 나타낸 것으로, 1시간 상온에서 반응 후, 405nm에서의 흡광도 스펙트럼을 나타낸 것이고(가장 왼쪽), 1시간 동안의 실시간 흡광도 곡선을 나타낸 것이다(가운데, 오른쪽).
- 도 3은 PS 결합의 유효성을 검증한 것으로, A) 무작위 선택된 동일 서열에 도입된 PS 결합 수에 따른 흡광도를 분석한 결과이고, B) 동일 길이의 연속적인 뉴클레오타이드( $A_{20}$ ,  $T_{20}$ ,  $C_{20}$ ,  $G_{20}$ )에서 단일 PS 유무에 따른 흡광도 분석결과이며, C) 동일 길이의 연속적인 뉴클레오타이드( $A_{20}$ ,  $T_{20}$ ,  $C_{20}$ )에서 서열에 삽입된 PS의 개수에 따른 흡광도 분석결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 도 3의 실험군들에 대한 흡광도 분석 결과를 나타낸 것으로, A)는 도 3A 실험군들에 대한 실시간 흡광도 분석 결과를 나타낸 것이고, B)는 도 3B 실험군들에 대한 실시간 흡광도 곡선을 나타낸 것이며, C)~E)는 도 3C에 해당하는 실시간 흡광도 곡선을 나타낸 것이고, F)~I) 도 3에 해당하는 실시간 흡광도 곡선을 나타낸 것이다.

도 5는 PS 위치에 따른 PW17 G-quadruplex의 흡광도 분석결과를 나타낸 것으로, A) PW17 G-quadruplex 서열에서 PS 위치가 서로 다른 16개의 서로 다른 서열에 대한 흡광도 측정 결과이고, B) 흡광도 검출 후 웰 플레이트 사진을 나타낸 것이며, C)~D) 도 5A에 해당하는 실시간 흡광도 곡선을 나타낸 것이다.

도 6은 PS의 유무에 따라 동일 염기로 구성된 연속염기의 길이가 상이한 서열에서의 효소 활성 차이를 비교한 것으로, A), B), C) 및 D)는 각각 A, T, C, G 염기 종류에 대한 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 PS에 가까운 근위 핵염기 구성에 따른 효소 활성을 비교 분석한 것으로, A) 근위 핵염기와 PS와의 상호작용을 통한 효소 활성 조절에 대한 평가로서, TTTN\*NTTTTTTTTN\*NTTTT 로부터 파생되고 무작위로 나열된 20개의 염기로 구성된 총 16개의 시퀀스 라이브러리를 생성하였고, "N"은 염기 A, T, G 및 C를 나타낸 것이며, 혼합물은 80 pmole DNA로 준비하였다. B) 총 16개 시퀀스 라이브러리를 효소 활성 결과에 따라 순위로 나타낸 것이며, C) 및 D)는 0 PS 서열을 기반으로 생성한 3개의 다른 서열에 대한 효소 활성을 확인한 것으로, 2 PS\_H는 2 PS\_L보다 효소 활성 효율이 높은 것을 확인한 것이다.

도 8에서 A) 및 B)는 도 7A에 해당하는 실시간 흡광도 곡선과 웰 플레이트 사진을 나타낸 것이고, C) 도 7C에 해당하는 실시간 흡광도 곡선을 나타낸 것이다.

도 9는 H-OSD 프로브를 이용한 서열 특이적 비색 검출 결과를 나타낸 것으로, A) DNA 형성에 따른 효소 활성의 차이를 모식도로 나타낸 것이고, B) dsDNA 및 ssDNA에서 PS 수에 따른 흡광도 측정 결과를 나타낸 것이며, C) 발판 매개 가닥 변위 반응으로부터 흡광도 신호의 생성 메커니즘을 나타낸 것이고, D) 효소 신호 전달 시스템을 사용하여 1시간 상온에서 반응시킨 플레이트로부터 405 nm에서의 흡광도 강도 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 효소 신호 전달 시스템을 이용한 서열 특이적 비색 진단에 있어서, 최적의 최종  $MgSO_4$  농도를 확인한 것으로, 도 9D의 시료들을 사용하여 분석하였으며, A) 1시간 실온에서 반응 후, 405nm에서 측정된 흡광도 스펙트럼을 나타낸 것이고, B) 검출 후 웰 플레이트의 사진을 나타낸 것이며, C) 1시간 동안 실시간 흡광도 곡선을 나타낸 것이다.

도 11은 A) 도 9B에 해당하는 실시간 흡광도 곡선을 나타낸 것으로 ssDNA 혼합물은 20 pmole DNA(PO 및 PS)로 제조하여 사용하였고, dsDNA 혼합물은 20 pmole DNA(PO 및 PS)를 24 pmole 보체 DNA(©PO-DNA)와 어닐링하여 제조하여 사용하였으며, PO-dsDNA와 PS-dsDNA는 흡광도 분석 이전에 혼성화하여 수행하였다. B) 도 9D에 해당하는 실시간 흡광도 곡선을 나타낸 것이다.

도 12는 효소 신호 전달 시스템을 이용한 서열 특이적 비색 진단의 특이성을 분석한 것으로, 발판 매개 가닥 치환 반응은 도 9D와 동일한 방법으로 수행하였고, 60 pmole의 비표적 DNA를 반응에 사용하였다. A) 1시간 실온에서 반응시킨 플레이트를 405 nm에서의 측정된 흡광도 결과를 나타낸 것이고, B) 405 nm에서 측정된 실시간 흡광도 분석결과이며, C) 효소 신호 전달 시스템 검출 후, 웰 플레이트의 사진을 나타낸 것이다.

도 13은 H-OSD 프로브에 도입된 PS 수가 효소 활성이 미치는 영향을 분석한 것으로, 발판 매개 가닥 치환 반응은 도 9D와 동일한 방법으로 진행하였으나, 이 반응에는 표적 DNA를 포함하지 않고 수행하였다. A) 1시간 실온에서 반응시킨 플레이트를 405 nm에서의 측정된 흡광도 결과를 나타낸 것이고, B) 405 nm에서 측정된 실시간 흡광도 분석결과이며, C) 효소 신호 전달 시스템 검출 후, 웰 플레이트의 사진을 나타낸 것이다.

도 14는 OSD 프로브를 이용한 서열 특이적 비색 검출 결과를 나타낸 것으로, 도 14에서 A는 DNA 형성에 따른 효소 활성의 차이를 모식도로 나타낸 것이고, B는 서로 다른 PS 개수를 포함하는 OSD 프로브를 이용한 흡광도 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명에 따른 OSD 프로브에 대한 효소 신호 전달 시스템을 이용한 서열 특이적 비색 진단에 있어서, 최적의 최종  $MgSO_4$  농도를 확인한 것으로, A) 1시간 실온에서 반응 후, 405nm에서 측정된 흡광도 스펙트럼을 나타낸 것이고, B) 검출 후 웰 플레이트의 사진을 나타낸 것이며, C) 1시간 동안 실시간 흡광도 곡선을 나타낸 것이다.

도 16은 타겟 서열 유무 및 PS 개수에 따른 본 발명의 OSD 프로브에 대한 실시간 흡광도 곡선을 나타낸 것이다.

도 17은 본 발명에 따른 OSD 프로브에 대한 효소 신호 전달 시스템을 이용한 서열 특이적 비색 진단의 특이성을 분석한 것으로, 발판 매개 가닥 치환 반응을 수행하였고, 60 pmole의 비표적 DNA를 반응에 사용한 결과로서, A) 1시간 실온에서 반응시킨 플레이트를 405 nm에서의 측정된 흡광도 결과를 나타낸 것이고, B) 405 nm에서 측정된 실시간 흡광도 분석결과이며, C) 효소 신호 전달 시스템 검출 후, 웰 플레이트의 사진을 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0028] 본 발명은 핵산 기반 비색 검출을 위한 황 함유 프로브 및 핵산 내 황 도입을 통한 효소 활성 가속화 방법에 관한 것이다.
- [0029] 본 발명은 종래 비색 분석의 문제점을 개선하고 효소 활성을 가속화시켜 신속하고 정확하게 비색 검출을 가능하게 할 수 있는 새로운 비색 검출용 황 함유 프로브를 제공한다는 점에 특징이 있다.
- [0030] 구체적으로 본 발명에 따른 비색 검출용 황 함유 프로브는 핵염기가 연속적으로 연결된 DNA 올리고뉴클레오타이드의 형태를 가지며, 상기 핵염기의 연속적인 연결은 아데닌(A), 구아닌(G), 시토신(C) 및 티민(T) 중에서 선택되는 어느 하나 이상이 무작위적으로 연결되어 있고, 상기 DNA 올리고뉴클레오타이드 중 뉴클레오타이드 포스페이트 백본이 하나 이상의 포스포로티오에이트로 변형되어(phosphorothioate modification) 하나 이상의 황(sulfur) 원자를 포함하고 있는 것을 특징으로 한다.
- [0031] 본 발명의 비색 검출용 황 함유 프로브는 종래 비색 진단에 사용되는 G-quadruplex과 달리 서열의 제한을 받지 않는 새로운 개념의 DNAzyme으로서, G-quadruplex와 같은 특정 구조를 이루는 서열이 필요하지 않고, 비색 반응 매개의 효소 활성을 가속화시킬 수 있는 특징을 갖는다.
- [0032] 본 발명의 상기 비색 검출용 황 함유 프로브는 10개 내지 30개의 핵염기가 연속적으로 연결된 DNA 올리고뉴클레오타이드의 형태일 수 있으며, 바람직하게는 20개의 핵염기가 연속적으로 연결된 DNA 올리고뉴클레오타이드의 형태일 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명의 비색 검출용 황 함유 프로브는 DNA 올리고뉴클레오타이드의 포스페이트 백본을 포스포로티오에이트로 변형시켜(PS: phosphorothioate modification) 원래 핵산에는 존재하지 않는 황 원소가 도입되어 있는 특징을 가지며, 이때 PS의 양쪽 옆에 존재하는 핵염기는 적어도 하나가 아데닌(A)일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일실시예에서는, 본 발명의 비색 검출용 황 함유 프로브에 대하여, 황 원자가 비색 반응에 영향을 미치는지 확인하였는데, 황 원자가 도입된 프로브에서 흡광도의 신호 반응이 뚜렷하게 관찰되는 것으로 나타났고, 반면 황 원자가 도입되지 않은 프로브에서는 흡광도의 신호 반응이 관찰되지 않았다.
- [0035] 또한 본 발명의 다른 일실시예에서는, 포스페이트 백본이 포스포로티오에이트로 변형된 PS의 수가 비색 반응의 효소 활성에 영향을 주는지를 분석하였다. 그 결과, PS의 수가 증가할수록 효소 활성이 증가하는 것으로 나타났으며 PS의 수가 효소 활성에 영향을 준다는 것을 확인하였다.
- [0036] 다른 일실시예에서는 프로브의 길이가 효소 활성에 영향을 줄 수 있는지를 분석하였으며, 그 결과, 단량체인 dNTP와  $\alpha$ -thio-dNTP는 프로브를 구성하는 뉴클레오타이드의 종류에 관계없이 효소 활성이 관찰되지 않았다. 따라서 프로브 DNA의 길이가 효소 활성에 영향을 줄 수 있음을 알 수 있었는데, 이는 DNA와 hemin의 결합 정도는 길이에 따라 달라질 수 있고, DNA와 hemin이 결합할 수 있어야만 PS와 핵염기가 상호작용하여 비색 반응을 나타낼 수 있음을 알 수 있었다.
- [0037] 따라서 효과적인 비색 검출을 위한 본 발명의 프로브는 10개 내지 30개의 핵염기가 연속적으로 연결된 DNA 올리고뉴클레오타이드일 수 있고, 바람직하게는 20개의 핵염기가 연속적으로 연결된 DNA 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0038] 이 외에도 본 발명의 비색 검출용 황 함유 프로브는 PS의 인접 위치에 존재하는 핵염기의 종류에 따라 효소 활성이 달라지는 특징을 갖는데, 본 발명의 실시예의 실험결과, 아데닌(A)과 아데닌(A) 염기 사이에 PS가 위치하는 경우, 효소 활성 효율이 다른 염기의 조합군에 비해 가장 우수한 것으로 나타났고, 다음으로 PS가 위치한 양쪽의 핵염기 중 어느 하나가 아데닌(A)인 경우, 효소 활성이 우수한 것으로 나타났다. 한편, T 또는 C와 같은 피리미딘 염기들 사이에 PS가 위치하게 되면 효소 활성 비율이 상대적으로 낮게 나타났다.
- [0039] 그러므로 우수한 비색 검출 효과를 도출하기 위해서는, DNA 올리고뉴클레오타이드의 포스페이트 백본을 포스포로티오에이트로 변형시킬 경우, 상기 변형의 양쪽 옆에 존재하는 핵염기는 적어도 하나가 아데닌(A)이 되도록 하는 것이 중요하다. 바람직하게, PS의 위치는 A\*A, A\*G, G\*A, C\*A, A\*C, A\*T, T\*A의 순서로 우선하여 선택할 수 있으며, 가장 바람직하게는 A\*A에 PS가 위치되도록 할 수 있다. 상기 \*표시는 PS의 위치를 나타낸 것이다.
- [0040] 또한 본 발명의 비색 검출용 황 함유 프로브는 DNA 형태에 따라 효소 활성의 차이를 갖는 특징이 있다. 즉, 단일가닥 DNA의 형태를 갖는 프로브의 경우, 효소 활성이 강하게 나타나지만 이중가닥 DNA의 형태를 갖는 프로브는 효소 활성이 감소하여 비색 반응이 나타나지 않는 특징이 있다.

- [0041] 그러므로 본 발명의 비색 검출용 황 함유 프로브는 단일가닥 DNA의 형태를 갖는다.
- [0042] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 비색 검출용 황 함유 프로브를 포함하는, 비색 검출용 조성물을 제공한다.
- [0043] 본 발명에서 제공하는 상기 비색 검출용 황 함유 프로브는 새로운 DNAzyme로 작용할 수 있으며, 용어 “DNAzyme” 통상적으로 효소활성을 가지는 핵산분자를 의미하며, 예를 들어 과산화효소 활성을 갖는 것일 수 있다. 또한, Deoxyribozymes, DNA enzymes, DNAzymes, catalytic DNA, DNA 기반 효소 등을 포함하는 용어일 수 있고, Ribonuclease, RNA ligase일 수도 있고, DNA phosphorylation, DNA adenylation, DNA deglycosylation, porphyrin metalation, thymine dimer photoreversion, DNA cleavage 등의 화학반응을 가능하게 하는 것일 수도 있다.
- [0044] 여기서 DNAzyme은 본 발명의 비색 검출용 황 함유 프로브 서열을 포함할 수 있다.
- [0045] 상기 본 발명의 비색 검출용 조성물은 비색계 시약을 포함할 수 있는데, 비색계 시약은 이에 제한되지는 않으나, ABTS(2,2'-아지노-bis(3-에틸벤조싸이아졸린-6-설폰산), OPD(o-페닐렌디아민 다이하이드로클로라이드), DAB(다이아미노벤지딘), AEC(3-아미노-9-에틸카보졸), TMB(3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘), AmplexRed, 및 Homovanilic acid로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상; 및 1종 이상의 과산화물을 포함할 수 있다. 상기 과산화물로는 예를 들어, 과산화수소( $H_2O_2$ )일 수 있다.
- [0046] 또한 상기 조성물에는 DNAzyme 코팩터(cofactor)로서 헤민(hemin)을 포함할 수 있다.
- [0047] 이 외에도 본 발명의 비색 검출용 조성물은 당업계에서 비색 검출에 사용되는 부가적인 시약 및 성분들을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [0048] 또한, 본 발명은 본 발명의 비색 검출용 조성물을 포함하는 비색 검출용 키트를 제공할 수 있으며, 본 발명의 비색 검출용 황 함유 프로브를 이용한 비색 검출 방법을 제공할 수 있다.
- [0049] 나아가 본 발명은, 비색 반응 매개의 효소 활성 증진 효과를 갖는 비색 검출용 황 함유 프로브의 제조방법을 제공할 수 있는데, 상기 방법은 (1) 검출 대상의 타겟 유전자를 선정하는 단계; (2) 상기 타겟 유전자의 핵산서열에 대한 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열을 디자인하는 단계; 및 (3) 상기 상보적인 올리고뉴클레오타이드에서 뉴클레오타이드 포스페이트 백본을 하나 이상의 포스포로티오에이트로 변형시키는 단계를 포함하며, 상기 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 10 내지 30mer의 길이를 가지며, 포스포로티오에이트 변형은 양쪽 옆에 존재하는 핵염기가 적어도 하나는 아데닌(A)인 영역에서 이루어지는 것을 특징으로 한다.
- [0050] 본 발명의 방법으로 제조된 비색 검출용 황 함유 프로브는 비색 반응 매개의 효소 활성을 가속화시켜 신속하고 정확하게 비색 반응 분석을 통해 타겟 핵산을 검출할 수 있다.
- [0051] 예를 들어, 본 발명의 프로브를 사용할 경우, 검출 대상의 핵산이 시료에 존재하는 경우, 비색 반응에 의해 흡광도 값이 증가하여 비색 신호가 나타나는 반면, 검출 대상의 핵산이 시료에 존재하지 않는 경우, 비색 신호가 나타나지 않는다.
- [0052] 또한, 본 발명에 따른 상기 프로브는 헤어핀 구조를 형성한 황 함유 프로브일 수 있으며, 상기 황 함유 프로브의 5' 또는 3' 말단에 단일 가닥 toehold 서열 10 mer와 그 뒤로 이중 가닥 stem 구조 20 bp로 서로 상보적인 서열이 혼성화되어 있고, 연속된 T 10 mer로 구성된 loop 구조로 설계된 형태를 가질 수 있다.
- [0053] 본 발명의 프로브는 단일 주형 가닥인 표적 핵산에 포함된 타겟 결합 사이트(target-binding site)에 상보적인 서열을 포함하고 있으며, 프로브는 발판(toehold) 서열부터 표적 핵산에 결합하며 프로브 구조가 branch migration이 일어나 결과적으로 원래의 혼성화되어 있던 상보적인 서열을 밀어내는 발판 매개 단일가닥 치환 반응(toehold-mediated strand displacement reaction)이 발생된다.
- [0054] 이 경우, toehold를 포함한 서열 일부가 표적 핵산에 상보적으로 결합하며 혼성화 과정을 통해 새로운 이중체 구조를 형성하게 되며, 또한, 프로브의 상보적으로 결합하고 있던 기존 서열은 단일 가닥 형태로 자유롭게 방출된다. 방출된 단일 가닥은 PS를 포함할 수 있으며, PS를 포함하는 경우 앞선 본 발명의 실험 결과와 동일하게 효소 활성이 강하게 나타나는 것을 확인하였다.
- [0055] 그러므로 본 발명의 프로브는 분자 내 혼성화(intramolecular hybridization)를 통해 프로브를 구성하는 H-OSD로 적용할 수 있을 뿐만 아니라, 분자 간 혼성화를 통해 프로브를 구성하는 OSD의 적용 및 활용도 가능하다.

[0056] OSD는 두 개의 서로 상보적인 가닥으로 구성되어 분자 간 혼성화(inter-molecular hybridization)를 통해 DNA 이중체를 형성할 수 있다. DNA 이중체는 단일가닥 치환(strand displacement)에 의해 방출되는 output 가닥과 substrate 가닥으로 나누어진다. substrate 가닥은 output 가닥과 다르게 추가적으로 단일 가닥의 발판서열(toehold sequence)를 포함하고 있다.

[0057] 상보적인 표적 핵산이 공급되는 경우 발판 서열과 표적 핵산이 부분적으로 결합하면서 output 가닥을 branch migration 시키며 이후엔 완전히 방출시킨다. 이때, 단일 가닥으로 상태가 변환된 output 가닥이 PS를 포함하고 있는 경우 효소 활성을 강하게 나타낼 수 있다.

[0059] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0061] <재료준비 및 실험방법>

[0062] 재료 및 시약

[0063] 본 실험에 사용한 모든 올리고뉴클레오타이드는 Bioneer(대한민국, 대전) 및 Integrated DNA Technologies, Inc.(Coralville, IA, 미국)에서 합성한 것을 사용하였다. 또한, 본 실험에 사용한 모든 DNA의 서열은 하기 표 1에 나타내었다. 구연산, 구연산나트륨 삼염기 이수화물(sodium citrate tribasic dihydrate), ABTS(2,2'-Azino-bis-(3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산) 이암모늄염), 헤민 및 DMSO(디메틸 설펡사이드)는 시그마 사에서 구입한 것을 사용하였다. 또한 27%(w/w) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 ThermoFisher Scientific, Inc.(Waltham, MA, USA)에서 구입한 것으로 사용하였고, 10X 등은 증폭 완충액과 디옥시 뉴클레오타이드(dNTP) 용액 세트(100mM)는 New England Biolabs, Inc.(Beverly, MA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 96웰 투명 플레이트는 Corning(Corning, NY, U.S.A.)에서 준비한 것을 사용하였으며, α-thio-dATP, α-thio-dGTP, α-thio-dCTP는 TriLink BioTechnologies(San Diego, CA, USA)에서 구입한 것을 사용하였고, dTTPαS(α-thio-dTTP)는 Jena Bioscience GmbH(독일 예나)에서 구입하여 사용하였다. NaOH 및 HCl은 iNtRON Biotechnology, Inc.(대한민국 성남)에서 구입한 것을 사용하였고, 2mM Hemin 스톡 용액은 DMSO를 이용하여 만들었으며, -20° C에서 보관하였다.

## 표 1

[0064] 하기 표에서 \* 표기는 phosphorothioate bond(PS) 변형을 나타낸 것이다.

| A. Sulfur incorporation into random selected sequence according to the number of PS   |                                      |
|---------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| ID                                                                                    | Sequence (5'→ 3')                    |
| PO-DNA_1                                                                              | ATA CAA AAC ATT CCC ACC AA           |
| PS-DNA (1 PS)_1                                                                       | ATA CAA AAC A*TT CCC ACC AA          |
| PS-DNA (2 PS)_1                                                                       | ATA CA*A AAC ATT CCC* ACC AA         |
| PS-DNA (4 PS)_1                                                                       | ATA C*AA AA*C ATT* CCC A*CC AA       |
| PS-DNA (8 PS)_1                                                                       | ATA* CA*A A*AC* AT*T C*CC* AC*C AA   |
| B. Effects of PS modification number, base type, and DNA length on enzymatic activity |                                      |
| ID                                                                                    | Sequence (5'→ 3')                    |
| A <sub>10</sub> (PO)                                                                  | AAA AAA AAA A                        |
| A <sub>10</sub> (1 PS)                                                                | AAA AA*A AAA A                       |
| A <sub>20</sub> (PO)                                                                  | AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA           |
| A <sub>20</sub> (1 PS)                                                                | AAA AAA AAA A*AA AAA AAA AA          |
| A <sub>20</sub> (2 PS)                                                                | AAA AAA* AAA AAA AA*A AAA AA         |
| A <sub>20</sub> (4 PS)                                                                | AAA A*AA AA*A AAA* AAA A*AA AA       |
| A <sub>20</sub> (8 PS)                                                                | AAA* AA*A A*AA* AA*A A*AA* AA*A AA   |
| A <sub>30</sub> (PO)                                                                  | AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA  |
| A <sub>30</sub> (1 PS)                                                                | AAA AAA AAA AAA AAA* AAA AAA AAA AAA |
| T <sub>10</sub> (PO)                                                                  | TTT TTT TTT T                        |
| T <sub>10</sub> (1 PS)                                                                | TTT TT*T TTT T                       |

|                                                                                                       |                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| T <sub>20</sub> (PO)                                                                                  | TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT           |
| T <sub>20</sub> (1 PS)                                                                                | TTT TTT TTT T*TT TTT TTT TT          |
| T <sub>20</sub> (2 PS)                                                                                | TTT TTT* TTT TTT TT*T TTT TT         |
| T <sub>20</sub> (4 PS)                                                                                | TTT T*TT TT*T TTT* TTT T*TT TT       |
| T <sub>20</sub> (8 PS)                                                                                | TTT* TT*T T*TT* TT*T T*TT* TT*T TT   |
| T <sub>30</sub> (PO)                                                                                  | TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT  |
| T <sub>30</sub> (1 PS)                                                                                | TTT TTT TTT TTT TTT* TTT TTT TTT TTT |
| C <sub>10</sub> (PO)                                                                                  | CCC CCC CCC C                        |
| C <sub>10</sub> (1 PS)                                                                                | CCC CC*C CCC C                       |
| C <sub>20</sub> (PO)                                                                                  | CCC CCC CCC CCC CCC CCC CC           |
| C <sub>20</sub> (1 PS)                                                                                | CCC CCC CCC C*CC CCC CCC CC          |
| C <sub>20</sub> (2 PS)                                                                                | CCC CCC* CCC CCC CC*C CCC CC         |
| C <sub>20</sub> (4 PS)                                                                                | CCC C*CC CC*C CCC* CCC C*CC CC       |
| C <sub>20</sub> (8 PS)                                                                                | CCC* CC*C C*CC* CC*C C*CC* CC*C CC   |
| C <sub>30</sub> (PO)                                                                                  | CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC  |
| C <sub>30</sub> (1 PS)                                                                                | CCC CCC CCC CCC CCC* CCC CCC CCC CCC |
| G <sub>10</sub> (PO)                                                                                  | GGG GGG GGG G                        |
| G <sub>10</sub> (1 PS)                                                                                | GGG GG*G GGG G                       |
| G <sub>20</sub> (PO)                                                                                  | GGG GGG GGG GGG GGG GGG GG           |
| G <sub>20</sub> (1 PS)                                                                                | GGG GGG GGG G*GG GGG GGG GG          |
| <b>C. PW17 G-quadruplex</b>                                                                           |                                      |
| <b>ID</b>                                                                                             | <b>Sequence (5'-&gt; 3')</b>         |
| PW17                                                                                                  | GGG TAG GGC GGG TTG GG               |
| PW17(PS)_1                                                                                            | G*GG TAG GGC GGG TTG GG              |
| PW17(PS)_2                                                                                            | GG*G TAG GGC GGG TTG GG              |
| PW17(PS)_3                                                                                            | GGG* TAG GGC GGG TTG GG              |
| PW17(PS)_4                                                                                            | GGG T*AG GGC GGG TTG GG              |
| PW17(PS)_5                                                                                            | GGG TA*G GGC GGG TTG GG              |
| PW17(PS)_6                                                                                            | GGG TAG* GGC GGG TTG GG              |
| PW17(PS)_7                                                                                            | GGG TAG G*GC GGG TTG GG              |
| PW17(PS)_8                                                                                            | GGG TAG GG*C GGG TTG GG              |
| PW17(PS)_9                                                                                            | GGG TAG GGC* GGG TTG GG              |
| PW17(PS)_10                                                                                           | GGG TAG GGC G*GG TTG GG              |
| PW17(PS)_11                                                                                           | GGG TAG GGC GG*G TTG GG              |
| PW17(PS)_12                                                                                           | GGG TAG GGC GGG* TTG GG              |
| PW17(PS)_13                                                                                           | GGG TAG GGC GGG T*TG GG              |
| PW17(PS)_14                                                                                           | GGG TAG GGC GGG TT*G GG              |
| PW17(PS)_15                                                                                           | GGG TAG GGC GGG TTG* GG              |
| PW17(PS)_16                                                                                           | GGG TAG GGC GGG TTG G*G              |
| <b>D. Enzymatic activity according to the influence of proximal base compositions close to the PS</b> |                                      |
| <b>ID</b>                                                                                             | <b>Sequence (5'-&gt; 3')</b>         |
| TC*CT                                                                                                 | TTT C*CT TTT TTT TC*C TTT TT         |
| TT*TT                                                                                                 | TTT T*TT TTT TTT TT*T TTT TT         |
| TA*AT                                                                                                 | TTT A*AT TTT TTT TA*A TTT TT         |
| TG*GT                                                                                                 | TTT G*GT TTT TTT TG*G TTT TT         |
| TA*GT                                                                                                 | TTT A*GT TTT TTT TA*G TTT TT         |
| TG*AT                                                                                                 | TTT G*AT TTT TTT TG*A TTT TT         |
| TA*TT                                                                                                 | TTT A*TT TTT TTT TA*T TTT TT         |
| TT*AT                                                                                                 | TTT T*AT TTT TTT TT*A TTT TT         |
| TA*CT                                                                                                 | TTT A*CT TTT TTT TA*C TTT TT         |
| TC*AT                                                                                                 | TTT C*AT TTT TTT TC*A TTT TT         |
| TG*TT                                                                                                 | TTT G*TT TTT TTT TG*T TTT TT         |
| TT*GT                                                                                                 | TTT T*GT TTT TTT TT*G TTT TT         |
| TG*CT                                                                                                 | TTT G*CT TTT TTT TG*C TTT TT         |

|                                                                                        |                                                                                               |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| TC*GT                                                                                  | TTT C*GT TTT TTT TC*G TTT TT                                                                  |
| TT*CT                                                                                  | TTT T*CT TTT TTT TT*C TTT TT                                                                  |
| TC*TC                                                                                  | TTT C*TT TTT TTT TC*T TTT TT                                                                  |
| <b>E. Enzyme activity according to the controlled PS position in the same sequence</b> |                                                                                               |
| <b>ID</b>                                                                              | <b>Sequence (5'→ 3')</b>                                                                      |
| 0 PS                                                                                   | GGA AGA CCT TAA ATT CCC TCG                                                                   |
| 2 PS_L                                                                                 | GGA AGA CC*T TAA ATT* CCC TCG                                                                 |
| 2 PS_M                                                                                 | GGA* AGA CCT TAA ATT* CCC TCG                                                                 |
| 2 PS_H                                                                                 | GGA* AGA CCT TAA* ATT CCC TCG                                                                 |
| <b>F. Enzyme activity according to DNA formation</b>                                   |                                                                                               |
| <b>ID</b>                                                                              | <b>Sequence (5'→ 3')</b>                                                                      |
| PO-DNA_2                                                                               | GGA AGA CCT TAA ATT CCC TCG                                                                   |
| PS-DNA (4 PS)_2                                                                        | GG*A AG*A CCT T*AA* ATT CCC TCG                                                               |
| PS-DNA (6 PS)_2                                                                        | GG*A A*G*A CCT T*A*A* ATT CCC TCG                                                             |
| PS-DNA (8 PS)_2                                                                        | GG*A* A*G*A C*CT T*A*A* ATT CCC TCG                                                           |
| ©PO-DNA                                                                                | CGA GGG AAT TTA AGG TCT TCC                                                                   |
| <b>G. Sequence-specific colorimetric diagnosis using H-OSD probe</b>                   |                                                                                               |
| <b>ID</b>                                                                              | <b>Sequence (5'→ 3')</b>                                                                      |
| Target DNA                                                                             | TTT TTG GAA GAC CTT AAA TTC CCT CGA GGA CAA GGC GTT CCA ATT ATT TTT                           |
| H-OSD (PO)                                                                             | GCC TTG TCC TCG AGG GAA TTT AAG GTC TTC CTT TTT TTT TTG GAA GAC CTT AAA<br>TTC CCT CG         |
| H-OSD (4 PS)                                                                           | GCC TTG TCC TCG AGG GAA TTT AAG GTC TTC CTT TTT TTT TTG G*AA G*AC CTT*<br>AA*A TTC CCT CG     |
| H-OSD (6 PS)                                                                           | GCC TTG TCC TCG AGG GAA TTT AAG GTC TTC CTT TTT TTT TTG G*AA* G*AC CTT*<br>A*A*A TTC CCT CG   |
| H-OSD (8 PS)                                                                           | GCC TTG TCC TCG AGG GAA TTT AAG GTC TTC CTT TTT TTT TTG G*A*A* G*AC*<br>CTT* A*A*A TTC CCT CG |
| <b>H. Sequence-specific colorimetric diagnosis using OSD probe</b>                     |                                                                                               |
| <b>ID</b>                                                                              | <b>Sequence (5'→ 3')</b>                                                                      |
| Target DNA                                                                             | TTT TTA TCA CGT AGT CGC AAC AGT TCA AGA AAT TCT TTT T                                         |
| Toehold region                                                                         | GAA TTT CTT GAA CTG TTG CGA CTA CGT GAT                                                       |
| Release region(PO)                                                                     | CGC AAC AGT TCA AGA AAT TC                                                                    |
| Release region(2PS)                                                                    | CGC A*AC AGT TCA AGA* AAT TC                                                                  |
| Non-target DNA                                                                         | TTT TTC AAA CTG TCA CTA AGA AAT CTG CTG CTG AGT TTT T                                         |

[0066] 모노뉴클레오타이드 및 DNA 준비

[0067] 모든 DNA 혼합물은 1X 등온증폭 완충액(20mM Tris-HCl, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50mM KCl, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Tween® 20, pH 8.8)으로 준비하였다. ssDNA 혼합물은 40 pmole DNA로 제조하였고, 모노뉴클레오타이드 혼합물은 40 pmole의 dNTP 또는 α-thio-dNTP로 제조하였다. 달리 명시하지 않는 한 모든 핵산은 40 pmole의 농도로 사용하였다. DNA 혼합물을 95° C에서 5분 동안 반응 후, 0.1° C/s의 속도로 25° C까지 천천히 냉각시켰고, 이후 DNA 혼합물은 사용하기 최소 5분 전에 25° C의 온도가 되도록 유지하였다.

[0069] PW17 G-quadruplex 분석

[0070] G-quadruplex 분석물질은 1X 등온증폭 완충액(20mM Tris-HCl, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50mM KCl, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Tween® 20, pH 8.8)을 이용하여 준비하였다. PW17 혼합물은 40 pmole DNA(PO 또는 1 PS)과 반응시켜 준비하였고, 분석물은 95° C에서 5분 동안 반응시킨 후, 0.1° C/s의 속도로 25° C까지 천천히 냉각하고 실온에서 5분 동안 반응시켰다.

[0072] 흡광도 측정 및 영상 획득

[0073] 분석 시료의 총 부피는 122.5 μL가 되도록 하였다. 75 μM hemin 1.5 μL, 0.025%(w/v) ABTS(2,2'-아지노-비스-

(3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산)디아모늄 염)을 함유한 100mM 구연산염 버퍼 완충액 100  $\mu$ L(25° C, pH 4.0) 및 1  $\mu$ L의 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 20  $\mu$ L의 DNA 혼합물에 첨가하였다. 이후 120  $\mu$ L의 최종 샘플 용액을 96-웰 투명 플레이트로 옮기고 24-25° C에서 1시간 동안 반응시켰다. 그런 뒤, 반응 혼합물에 대한 405 nm에서의 흡수 강도를 Tecan Spark® M10 다중 모드 마이크로플레이트 판독기(스위스 Mannedorf)를 사용하여 총 60회 동안 1분마다 기록하였다. 또한 영상은 분석 샘플을 96-well 투명 플레이트(Corning cat. No. 9017)에 로딩한 후, EOS-7D(Canon, Japan)를 이용하여 촬영함으로써 획득하였다.

[0075] 효소성 프로브 준비

[0076] 프로브 용액은 1X 등온증폭 완충액(20mM Tris-HCl, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50mM KCl, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Tween® 20, pH 8.8) 및 6mM MgSO<sub>4</sub>(최종 8mM)에서 25  $\mu$ M 헤어핀 프로브 가닥을 어닐링하여 준비하였다. 이후 프로브 용액을 95° C에서 5분간 반응시키고 0.1° C/s의 속도로 25° C까지 천천히 냉각시킨 후, 실온에서 1시간 동안 반응시켰으며, 상기 프로브는 실험에 사용 전 4° C에 보관하였다.

[0078] 효소성 프로브 준비 - OSD

[0079] 프로브 용액은 1X 등온증폭 완충액(20mM Tris-HCl, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50mM KCl, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Tween® 20, pH 8.8) 및 6mM MgSO<sub>4</sub>(최종 8mM)에서 25  $\mu$ M 발출 가닥과 30  $\mu$ M 발판 가닥을 어닐링하여 준비하였다. 이후 프로브 용액을 95° C에서 5분간 반응시키고 0.1° C/s의 속도로 25° C까지 천천히 냉각시킨 후, 실온에서 1시간 동안 반응시켰으며, 상기 프로브는 실험에 사용 전 4° C에 보관하였다.

[0081] H-OSD 및 OSD 프로브를 이용한 서열 특이적 비색 분석

[0082] 1X 등온증폭 완충액(20mM Tris-HCl, 10mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50mM KCl, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1% Tween® 20, pH 8.8), 6mM MgSO<sub>4</sub>(최종 8mM), 60pmole 의 타겟 DNA 및 1.6  $\mu$ L의 프로브 용액을 첨가하여 발판 매개 가닥 치환 반응(toehold-mediated strand displacement reaction)을 시작하였으며, 반응은 25° C에서 1시간 동안 수행하였다. 이후 1.5  $\mu$ L의 75  $\mu$ M hemin, 0.025%(w/v) ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-술폰산)디아모늄염)을 함유하는 100  $\mu$ L의 100mM 구연산염 완충액(pH 4.0) 및 1  $\mu$ L의 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 20  $\mu$ L의 반응 생성물에 첨가하고 혼합하였다. 120  $\mu$ L의 최종 샘플 용액을 96웰 투명 플레이트에 옮기고 1시간 동안 24° C에서 유지시킨 후, 반응 혼합물에 대한 405 nm에서의 흡수 강도를 Tecan Spark® M10 다중 모드 마이크로플레이트 판독기(스위스 Mannedorf)를 사용하여 총 60회 동안 1분마다 기록하였고, 96-well 투명 플레이트(Corning cat. No. 9017)에 로딩된 분석 샘플들은 EOS-7D(Canon, Japan)를 이용하여 영상 촬영하였다.

[0084] <실시예 1>

[0085] 단일 가닥 DNA(ssDNA)로 황 원자의 도입

[0086] 핵산에는 원래 존재하지 않는 황 원자를 PS(phosphorothioate bond) 변형을 통해 핵산에 도입할 경우, 황 원자가 비색 반응에 영향을 미치는지를 분석하였다(도 1A). 이때 황 원자는 다양한 형태의 핵산에 포함될 수 있다.

[0087] 그 결과, PS가 ssDNA에 도입한 경우, 효소 활성이 확인되었으며 효소 활성이 활성화되어 높은 흡광도(O.D.)의 신호 반응이 관찰되었다. 반면, PO(phosphodiester bond)가 도입된 ssDNA에서는 흡광도 신호 반응이 거의 관찰되지 않았다(도 1B).

[0088] 따라서 본 발명자들은 단일 가닥의 DNA 백본에 황 원자의 도입시켜 변형을 유도할 경우, G-quadruplex와 같은 특정 구조를 이루는 서열이 없더라도 간단하고 편리하게 효소 활성을 활성화시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0090] 또한, 황을 핵산 내로 도입하는 인공적인 결합 변형인 PS 결합(phosphorothioate bond)을 특정 서열에 도입하여

효소 활성의 효과를 관찰하였다. 이때 특정 서열로는 SARS-CoV-2 바이러스의 N 유전자 내의 20mer 올리고뉴클레오타이드(PO-DNA: 5'-ATACAAAACATTCCCACCAA-3')를 선택하였고, 또한, 동일 특정 서열에 대해 PS 결합 변형을 유도한 DNA(PS-DNA: 5'-ATAC\*AAAA\*CATT\*CCCA\*CCAA-3')를 준비하였으며, 이때 PS가 서열 내에서 고르게 분포되도록 설계하였고, 별표(\*)는 황 도입부위를 나타낸 것이다. 또한, PS-DNA 존재 시 색상 변화를 최대화하기 위해 hemin과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도는 최적화시킨 농도를 사용하였고(도 2), 구연산염 완충액과 ABTS 농도는 설정된 대로 사용하였다. 각 PO-DNA와 PS-DNA는 헤민, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ABTS가 포함된 반응 완충액과 혼합하였고, 이후 흡광도 세기를 측정하여 색상 변화를 실시간으로 모니터링하였다.

[0091] 그 결과, 몇 분 후에 PO-DNA와 PS-DNA 사이에 서로 다른 흡광 신호 반응 결과가 나타나기 시작했으며, 흡광도는 PS-DNA가 있는 경우 약 2.0까지 크게 증가하는 것으로 나타난 반면, PO-DNA 처리 군에서는 음성 대조군(Blank)과 유사한 흡광 값을 나타내었다(도 1C, 1D).

[0092] 이러한 비색 분석결과를 통해 본 발명자들은 황 원자를 PS로 변형시킨 DNA를 비색 검출을 위한 프로브로 사용할 경우, 효소 활성을 가속화시켜 보다 신속하고 정확하게 비색 진단 결과를 도출할 수 있음을 알 수 있었다.

## [0094] <실시예 2>

### [0095] PS 변형(PS modification)이 효소활성에 미치는 영향분석

[0096] 본 발명자들은 PS의 수에 따라 효소 활성이 어떻게 변화하는지 확인하기 위해, 다양한 PS 수(0, 1, 2, 4, 8)를 핵산 내에 도입시켜 실험을 수행하였다.

[0097] 그 결과, PS의 수가 증가함에 따라 효소 활성이 증가하는 것으로 나타났다(도 3A 및 도 4A). 이는 핵산에 포함된 PS의 수가 증가할수록 효소 활성이 증가한다는 것을 의미하며, 이러한 결과는 PS가 효소 활성 발생에 긍정적으로 기여하며, PS의 수가 효소 활성에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

[0099] 다음으로, 본 발명자들은 PS와 nucleobases 간의 상관관계를 분석하였다. 이를 위해 각각의 A, C, G, T 뉴클레오타이드에 대해 20개의 연속된 뉴클레오타이드를 갖는 서열을 준비하고 PS를 도입한 경우와 도입하지 않은 경우에 대해 실험을 수행하였다. 참고로, A<sub>20</sub>은 20개의 아데닌(A) 염기가 연속적으로 이루어진 뉴클레오타이드를 말한다.

[0100] 그 결과, PS가 존재하는 경우, A<sub>20</sub>과 G<sub>20</sub>의 뉴클레오타이드에서는 흡광도 값이 증가하는 것으로 나타난 반면, C<sub>20</sub>과 T<sub>20</sub>의 뉴클레오타이드에서는 흡광도 값이 크게 변하지 않는 것으로 나타났다. 또한, 다른 종류의 뉴클레오타이드와 달리 G<sub>20</sub>의 경우, PS가 있거나 없는 경우 모두 블랭크에 비해 효소 활성이 증가한 것으로 나타났는데(도 3B 및 도 4B), 이는 G-quadruplex 구조가 PS 없이도 부분적으로 형성될 수 있어 상대적으로 효소 활성이 증가하였기 때문인 것으로 보이며, PS가 도입되었을 때 효소 활성이 PO에 비해 감소하는 경향을 나타낸 것은 PS 첨가가 분자간 G-quadruplex 형성 시 구조적 불안정성을 증가시켜 효소 활성을 감소시킨 것으로 보인다. 또한 표준 및 잘 알려진 G-quadruplex 구조에서 PS의 효과를 추가로 확인했지만 유의미한 효과는 확인되지 않았다(도 5). 반면에, A<sub>20</sub>의 효과는 극적이지는 않지만 흡광도 값이 약간 증가하는 것으로 관찰되었는데, A<sub>20</sub>은 G<sub>20</sub>과 달리 특정 구조를 형성하지 않아 ssDNA만으로 효소 활성이 나타났다. 이를 통해 퓨린 염기가 피리미딘 염기보다 효소 활성에 더 효율적으로 관여한다는 것을 알 수 있었다.

[0102] 또한, 본 발명자들은 PS의 수를 증가시킬 경우, 효소 활성이 증가하는지를 확인하였는데, 이때 G<sub>20</sub> 서열은 자기 조립 특성(예: 분자간 G-quadruplex)으로 인해 이 분석에서는 사용하지 않았다. C<sub>20</sub>과 T<sub>20</sub>의 경우, PS 수를 8까지 증가시켰음에도 불구하고 효소 활성이 증가하지 않았으며, 반면, A<sub>20</sub>의 경우 PS 수가 증가할수록 효소 활성이 증가하는 것으로 나타났다(도 3C, 도 4C~4E). 이러한 결과를 통해 PS가 핵염기 중에서 특히 아데닌에 보다 효과적인 영향을 미친다는 것을 알 수 있으며, PS의 양도 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다.

[0104] 또한, 본 발명자들은 4개의 DNA 뉴클레오타이드 A, C, G 및 T 각각에 대해 뉴클레오타이드의 길이가 효소 활성에 영

향을 미치는지 조사하기 위해, 단량체 뉴클레오타이드와 단일가닥 올리고뉴클레오타이드를 사용하였다. 단량체 뉴클레오타이드로는 dNTP와  $\alpha$ -thio-dNTP를 사용하였다. dNTP의 일반적인 형태는  $\alpha$ -인산염에 산소 원자를 포함하는 원래 형태인 반면,  $\alpha$ -thio-dNTP는  $\alpha$ -인산염에 비가교 산소 원자 대신 황 원자를 도입시킨 것을 말한다. 단일 올리고뉴클레오타이드는 A/C/T의 경우 10 mer, 20 mer, 30 mer가 되도록 각 염기가 연속적으로 반복되어 형성된 반복 서열을 사용하였고, G의 경우 10 mer, 20 mer의 반복 서열을 사용하였다. 또한 각 DNA 서열의 중간에 PS를 도입하여 PS를 포함하는 단일 올리고뉴클레오타이드를 준비하여 사용하였다.

[0105] 그 결과, 단량체인 dNTP와  $\alpha$ -thio-dNTP의 경우, 뉴클레오타이드의 종류에 관계없이 효소 활성이 관찰되지 않았다. 또한, A(아데닌)의 길이가 증가함에 따라 효소 활성은 증가하는 것으로 나타났는데, 이는 DNA 길이가 DNA와 hemin의 결합에 긍정적인 영향을 미치는 것으로 보여진다. 이러한 결과를 통해 DNA와 hemin의 결합 정도는 길이에 따라 달라지며, DNA와 hemin이 결합할 수 있어야만 PS와 핵염기가 상호작용할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 즉, 황 원자가 도입된 단량체의 경우 황 원자가 도입이 되었더라도 단량체는 DNA와 hemin이 결합할 수 없게 되므로 효소 활성을 나타낼 수 있다. 또한, ssDNA는  $\pi$ - $\pi$  스택킹 상호작용을 통해 hemin의 포르피린 고리와 결합할 수 있으며, 길이가 길어질수록 DNA와 hemin이 보다 안정적으로 결합할 수 있어 높은 효소 활성을 유도할 수 있음을 알 수 있었다(도 6 및 도 4F~4I).

### [0107] <실시예 3>

#### [0108] PS의 인접 위치에서 근접 뉴클레오타이드 조합이 효소 활성에 미치는 영향 분석

[0109] 상기 실시예들의 실험을 통해 DNA와 hemin이  $\pi$ - $\pi$  스택킹 상호작용을 형성하고, PS의 영향으로 효소 활성이 촉진된다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, DNA의 길이와 DNA를 구성하는 핵염기의 타입에 따라 효소 활성이 달라지는 것을 확인할 수 있었다. 이에 본 발명자들은 다양한 핵염기 조합에 대한 효소 활성을 평가하기 위해 T(티민)를 뉴클레오타이드 백본으로 선택하였다. 전자 밀도가 낮은 연속적인 T 서열을 기반으로 한 분석은 PS에 인접한 핵염기의 다양한 조합에 대한 효소 활성을 보다 명확하게 확인할 수 있기 때문이다. T는 주로 G-quadruplex 구조에서 스페이서 역할을 하며 실제 효율 향상에는 크게 기여하지 않는다. 그러나 T 비율이 높은 서열에서는 전체 효소 활성이 약할 수 있다. 따라서 T 기반의 뉴클레오타이드 서열에서 4번째~5번째의 핵염기와 14번째~15번째의 핵염기 조합을 반복하여 포함하도록 하였고, 4번째 및 5번째의 핵염기 사이와 14번째 및 15번째의 핵염기 사이에 하나의 PS를 각각 포함하여 길이가 20nt인 16개의 서로 다른 T 기반 서열을 준비하여 사용하였다(하기 표 2 참조).

표 2

| Ranking list of base combination |                         |    |
|----------------------------------|-------------------------|----|
| TA*AT                            | TTTA*ATTTTTTTTAA*ATTTTT | 1  |
| TA*GT                            | TTTA*GTTTTTTTAA*GTTTTT  | 2  |
| TG*AT                            | TTTG*ATTTTTTTTG*ATTTTT  | 3  |
| TC*AT                            | TTTC*GTTTTTTTTC*GTTTTT  | 4  |
| TA*CT                            | TTTA*GTTTTTTTAA*GTTTTT  | 5  |
| TA*TT                            | TTTA*TTTTTTTTTA*TTTTTT  | 6  |
| TC*GT                            | TTTC*GTTTTTTTTC*GTTTTT  | 7  |
| TT*AT                            | TTTT*ATTTTTTTTTT*ATTTTT | 8  |
| TG*GT                            | TTTG*GTTTTTTTGT*GTTTTT  | 9  |
| TC*CT                            | TTTC*CTTTTTTTTTC*CTTTTT | 10 |
| TT*GT                            | TTTT*GTTTTTTTTTT*GTTTTT | 11 |
| TG*TT                            | TTTG*TTTTTTTTTG*TTTTTT  | 12 |
| TT*CT                            | TTTT*CTTTTTTTTTT*CTTTTT | 13 |
| TG*CT                            | TTTG*CTTTTTTTTGT*CTTTTT | 14 |
| TT*TT                            | TTTT*TTTTTTTTTTT*TTTTTT | 15 |
| TC*TT                            | TTTC*TTTTTTTTTTC*TTTTTT | 16 |

[0110]

[0111] 그 결과, PS에 인접한 염기 조합의 유형과 PS 양쪽에 있는 염기의 순서에 따라 효소 활성이 달라지는 것으로 나타났다으며, 효소 활성 효율에 따른 서열 순위는 상기 표 2 및 도 7A에 나타내었다. 구체적으로 16개 서열 중에서 AA가 가장 높은 효율을 나타내었고, AA를 구성하는 A 염기는 G-quadruplex의 효소 활성을 향상시키는 핵심 염기임을 알 수 있었다. 이를 통해 본 발명자들은 핵염기 중에서 A가 PS가 삽입되어 효소 활성을 나타내기 위한 위치에서 우선적인 염기로 사용할 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 순위 목록에서는 AN 또는 NA가 높은 순위를 차지하고 있어 A를 포함하는 헤테로 조합도 AA 다음으로 사용할 수 있는 우선 순위의 염기임을 알 수 있었다. 이와는 대조적으로, GG는 A와 같은 퓨린 염기임에도 불구하고 상대적으로 낮은 순위를 보였고, AG 및 GA와 같은 조합을 제외하면 GX(X = T, C, G) 또는 X\*G는 순위가 더 낮은 것으로 나타났다. 이는 G가 A보다 환원 잠재력이 낮기 때문인 것으로 보인다. 퓨린 염기는 효소 활성에 참여할 수 있는 전자의 수가 더 많고, 퓨린과 피리미딘 염기의 조합도 상대적으로 좋은 효율을 나타낼 수 있음을 확인하였다. 피리미딘만으로 구성된 서열은 순위 목록의 맨 아래에서 확인되어 효소 활성이 낮은 것으로 나타났는데, T 또는 C와 같은 피리미딘 염기는 일반적으로 퓨린에 비해 전자 밀도가 낮기 때문에 효소 활성이 더 낮은 것을 알 수 있었다(도 7A 및 도 8A~8B).

[0113] 나아가 본 발명자들은 도 1에 사용된 서열 대신 2차 구조를 형성하지 않는 50% GC 함량을 갖는 무작위 DNA 서열을 선택하여 사용하였다. 앞서 실시예에서 단 하나의 PS가 도입된 경우에도 무작위 서열은 상당한 효소 활성을 보였다(도 3A). 본 실험에서는 충분한 효율성을 구별하기 위해 2개의 PS를 도입한 것을 사용하였는데, 상기 표 2의 염기 조합 순위에 따라 가장 높은 효율을 나타내는 조합을 선택하여 PS를 도입하였고, 동일한 서열 내에서 낮은 효율을 나타내는 조합의 위치를 선택하여 PS를 도입하여, 하기 표 3의 저효율(L)과 고효율(H)로 지정된 두 개의 서열을 실험에 사용하였다.

표 3

| Sequence (5' → 3') |                                |                        |
|--------------------|--------------------------------|------------------------|
| 0 PS               | GGAAGACCTTAAATTCCCTCG          |                        |
| 2 PS_L             | GGAAGACC*TTAAATT*CCCTCG<br>① ② | ① CC*TT ↓<br>② TT*CC ↓ |
| 2 PS_H             | GGA*AGACCTTAA*ATTCCCTCG<br>① ② | ① GA*AG ↑<br>② AA*AT ↑ |

Expected efficiency

[0114]

[0115] 분석 결과, 도 7A 및 7B의 결과와 유사하게 PS 양쪽에 있는 염기가 AA 조합인 경우, 효소 활성이 우수한 것으로 나타났다(도 7C~7D 및 도 8C). 이를 통해 효과적인 비색 검출을 위해서는, PS의 위치를 PS 양쪽에 있는 염기가 적어도 하나 이상의 아데닌(A)이 있는 부위가 되도록 도입시키는 것이 유리하다는 것을 알 수 있었다.

#### [0117] <실시예 4>

#### [0118] 효소 신호전달 시스템(enzymogenic signaling system)을 이용한 서열 특이적 비색 분석

[0119] ssDNA에 PS를 도입시키면 효소 활성이 강력하게 향상됨을 상기 실시예의 결과를 통해 확인할 수 있었다. 이러한 과정은 다음과 같은 단계에 의해 진행되는데, 첫째, hemin이 적절한 길이의 ssDNA에 결합하고, 둘째, PS는 hemin 결합 염기 근처의 전자 밀도를 증가시키며, 셋째, 염기의 전자 밀도가 높아져 hemin과 상호작용하여 효소 활성이 가속화된다. 여기서 hemin의 효소 활성을 촉진하는데 직접적인 역할을 하는 것이 바로 염기이다.

[0120] 이에 본 발명자들은 ssDNA와 dsDNA의 핵산 형태의 차이에 대한 효소 활성을 비교하기 위해, ssDNA에 상보적인 서열을 결합시켜 dsDNA를 형성하여 사용하였다.

[0121] 그 결과, PS-ssDNA 형태일 때는 효소 활성이 강하지만, 상보적인 ssDNA가 결합하여 dsDNA를 형성하면 효소 활성이 감소되는 것으로 나타났고, 또한 특정 표적 DNA 또는 RNA가 dsDNA 내에서 상호작용하여 PS-ssDNA 부분을 방출하면 효소 활성이 다시 향상되는 것으로 나타났다(도 9). 이러한 메커니즘을 활용하면 표적 DNA나 RNA에 의해

활성화될 수 있는 효소 생성 시스템을 구축할 수 있다.

[0122] 또한 본 발명자들은 이러한 내용의 검증을 위해, 상기 표 2에서 사용한 서열에 대한 상보적인 서열을 준비하고 적절한 DNA 혼성화 조건을 거친 후 효소 활성을 평가하였다.

[0123] 그 결과, 흡광도 분석에서 PS를 함유한 dsDNA에서는 효소 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 한편, PS 수가 증가함에 따라 dsDNA의 효소 활성 억제 효율이 감소하는 것으로 나타났는데(도 9A, 9B), 이러한 원인은 dsDNA 내의 분자간 DNA 혼성화에서 DNA end breathing과 PS의 영향으로 인해 전체 DNA 혼성화의 불안정성이 증가하여 잠재적으로 두 ssDNA 가닥 모두에서 염기가 노출되기 때문일 수 있다. 이렇게 증가된 불안정성은 hemin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 ABTS가 노출된 염기와 상호 작용할 수 있기 때문에 원하지 않는 효소 활성의 가능성을 높였을 수 있다.

[0125] 나아가 분자간 DNA 혼성화로 인한 신호 누출 가능성을 완화하기 위해 효소 발생 신호 전달 시스템용 프로브는 H-OSD(분자내 DNA 혼성화)라고 불리는 헤어핀 형식으로 설계하였다. 이 구성에서는 다중 PS 분자가 도입되는 경우에도 이중 영역의 안정성과 충분한 효소 활성을 보장하기 위해 적절한 길이의 헤어핀 줄기를 선택하여 사용하였다. H-OSD 프로브는 5'말단에 10nt 발판(toehold)이 있는 21bp 헤어핀 줄기로 구성되며 이는 루프 서열까지 표적 서열에 상보적이다. 발판(toehold) 영역은 표적 서열과 혼성화되어 PS를 함유하는 가닥이 열리고 효소 활성이 활성화된다. 반대로 표적 서열이 없으면 효소 활성은 비활성 상태로 유지된다. 이 상태에서는 헤어핀 구조가 유지되며 루프서열은 노출 시에도 배경 증가를 방지하기 위해 T로만 구성된다(도 9C, 9D). 최적의 흡광도 구배를 달성하고 표적 존재 또는 부재에 대한 DNA 불안정성으로 인한 신호 누출 위험을 방지하기 위해 추가 조건을 최적화하였다(도 10). 또한, 비표적 서열이 존재하는 경우에도 헤어핀은 닫힌 채로 유지되었으며, 도입된 비표적의 신호만 검출되었다(도 11 및 도 12). 또한 H-OSD 프로브의 PS 분자 수를 최대 8개까지 증가시켜 백그라운드 제어 기능을 평가하였는데, 분자 내 DNA 혼성화는 더 안정적이며, PS 첨가로 인한 증가된 dsDNA 불안정성에 영향을 덜 받는 것으로 나타났다(도 13).

## [0127] <실시예 5>

### [0128] 효소 신호전달 시스템(enzymogenic signaling system)을 이용한 서열 특이적 비색 분석

[0129] 나아가 본 발명자들은 실시예 4와 또 다른 방식으로 조성한 프로브를 준비하였다. 실시예 4에서는 분자내 혼성화를 통한 헤어핀 형태의 H-OSD를 활용하여 서열 특이적 비색 검출에 활용하였는데, 이와는 또 달리, 실시예 5에서는 분자간 DNA 혼성화를 통해 구성한 프로브에 PS 변형을 이용한 황 원자를 도입하는 경우 PS를 포함한 단일 가닥의 방출로 인한 효소 활성의 활성화 향상효과를 분석하였다.

[0130] 분자간 DNA 혼성화를 통한 신호 누출 가능성을 완화하는 목적으로 앞서 언급된 DNA end breathing과 PS의 영향으로 인한 전체 분자간 혼성화의 불안정성을 낮추기 위하여 DNA 이중체를 형성하는 부분의 말단에 GC clamping을 추가하여 DNA 구조 안정성을 높이도록 하였다. 이로써 효소 발생 신호 전달 시스템용 프로브인 OSD(분자간 DNA 혼성화)라 불리는 hemi-duplex 형식의 프로브를 설계하였다. GC clamping region외에 PS의 개수의 증가에도 안정성을 보장하기 위해 적절한 길이의stem 구조를 포함시켰다. OSD는 5' 말단 또는 3' 말단 방향으로 10nt의 발판(toehold) 영역을 포함시킬 수 있다. 20bp의 substrate 가닥과 효소활성에 작용하는 20nt의 output 가닥을 적절한 DNA 혼성화 조건을 거친 후 활용하였다. 프로브는 실시예 4와 동일한 방식으로 작동하며 표적 서열이 있는 경우 toehold-mediated strand displacement 반응을 통해 PS를 포함한 output 가닥이 방출되며 효소 활성이 발생한다(도 14A, 14B, 도 16). 반면, 표적 서열이 없는 경우 효소 활성은 비활성 상태가 유지된다. 프로브의 DNA 불안정성의 증가로 인한 신호 누출의 가능성을 낮추기 위하여 반응 조건을 추가로 최적화하였다(도 15). 또한, 비표적 서열이 존재하는 경우 프로브는 PS를 포함한 output 가닥을 방출시키는 반응을 하지 않으며 구조가 안정적으로 유지되며 백그라운드 신호만 검출되었다(도 17). 이러한 결과를 통해, 본 발명에 따른 분자 간 혼성화로 구성되는 OSD의 경우 GC clamping 등 DNA 구조 안정성을 높이는 요소를 고려하여 프로브로서 활용 가능성이 우수하다는 것을 확인하였다.

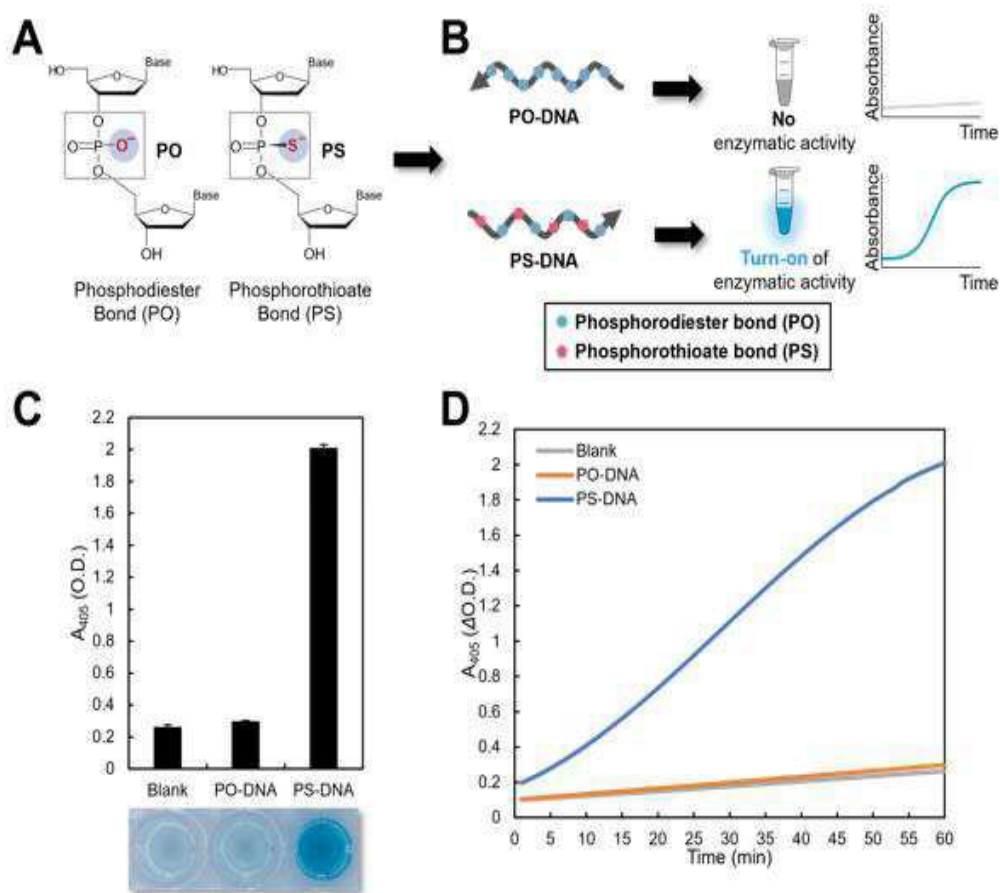
[0132] 이상의 결과를 통해 본 발명자들은 포스포로티오에이트 결합(PS) 변형을 이용하여 황 원자를 핵산에 도입할 경우, 효소 활성을 크게 향상시킬 수 있음을 알 수 있었고, 이는 PS에 의해 변형된 핵염기 내의 전자 밀도가 hemin과의 상호작용을 통해 효소 활성의 가속화를 촉진한다는 것을 알 수 있었다.

[0133] 그러므로 본 발명에서 개발한 비색 검출용 황 원자가 핵산 내로 도입된 새로운 프로브는 서열 의존적 제한 없이 효소 활성을 증가시킬 수 있으므로, 이를 활용한 효소 발생 신호 전달 시스템은 H-OSD를 사용하여 서열별 비색 검출에 유용하게 활용할 수 있다.

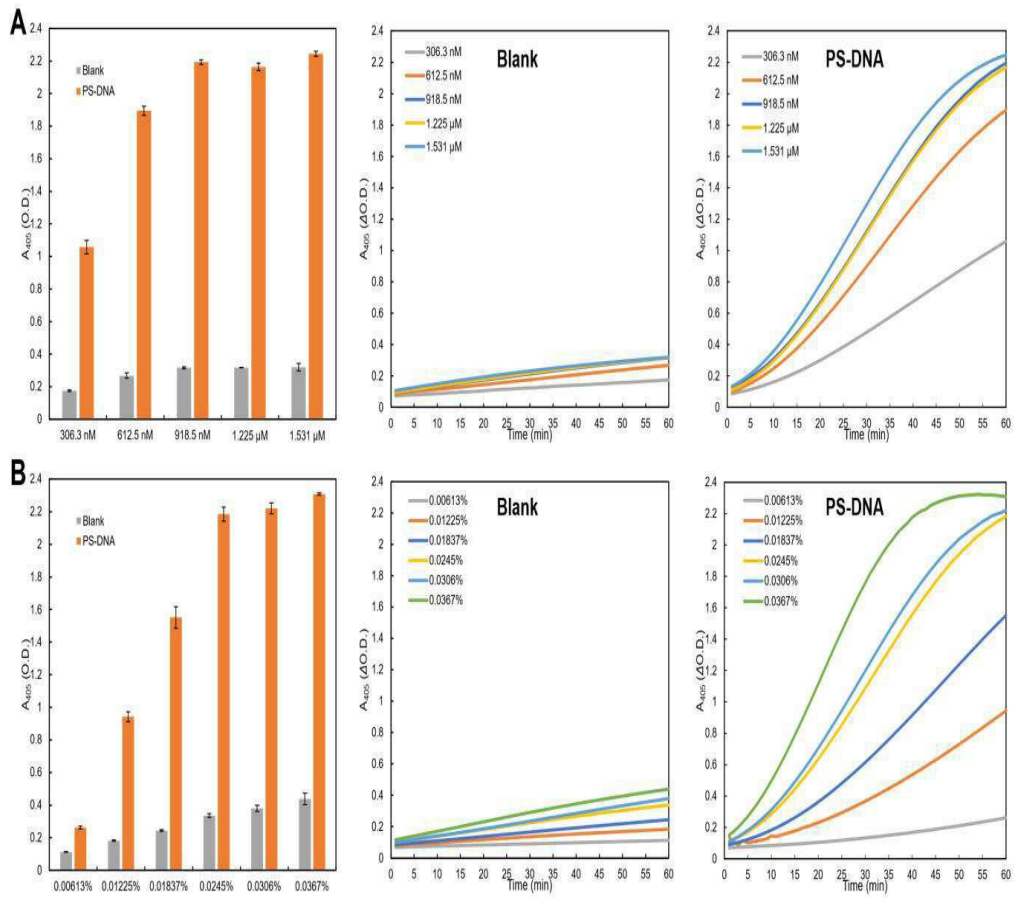
[0135] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

## 도면

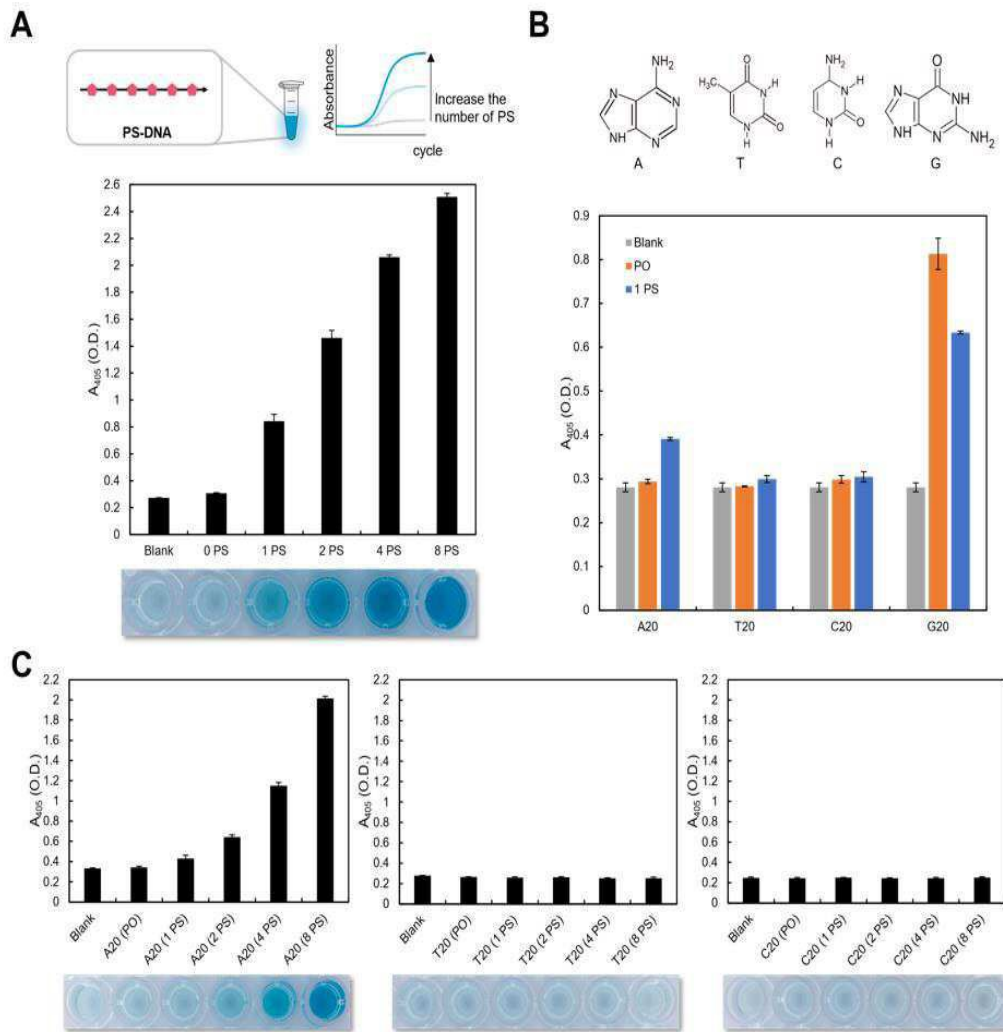
### 도면1



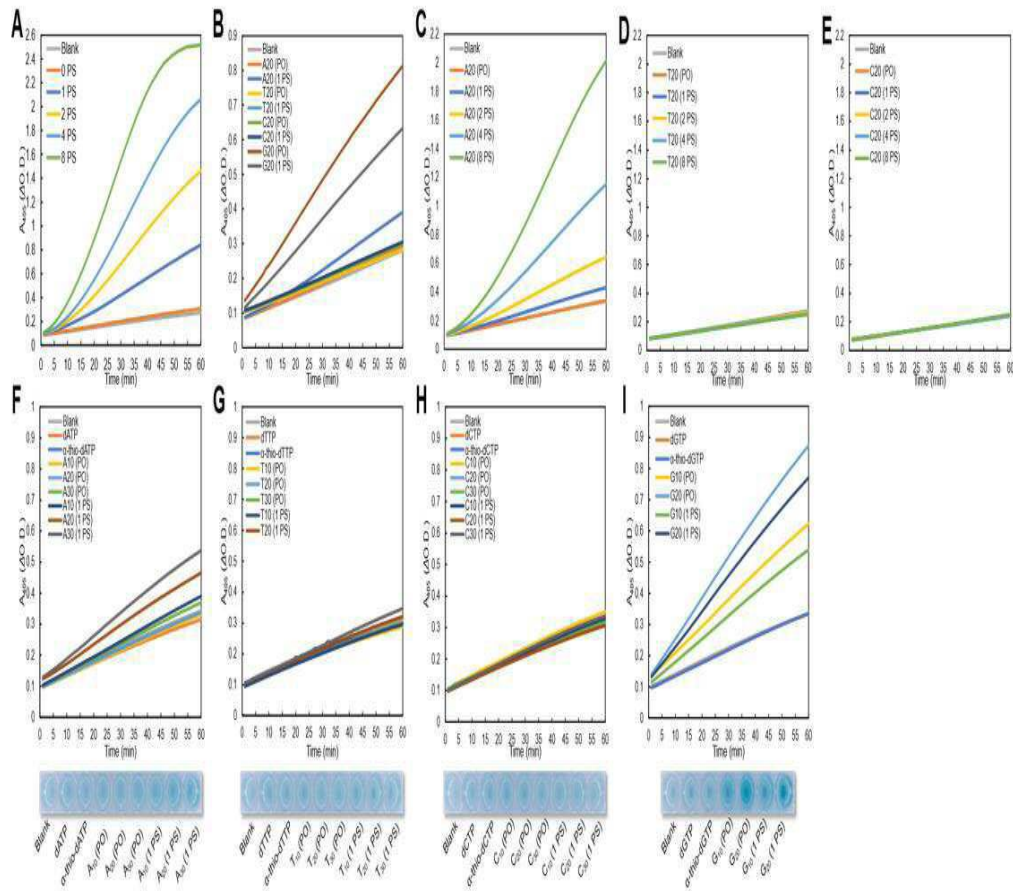
도면2



도면3

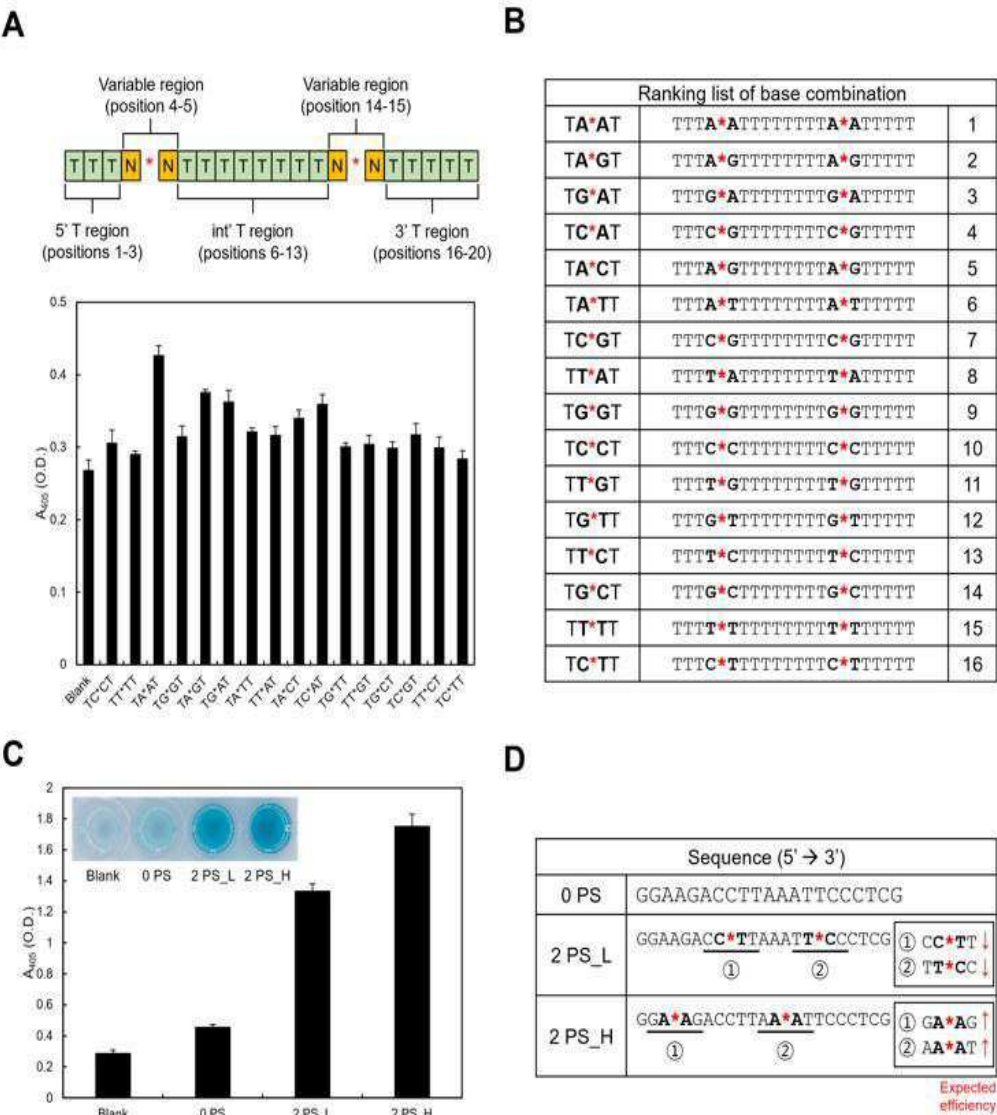


도면4

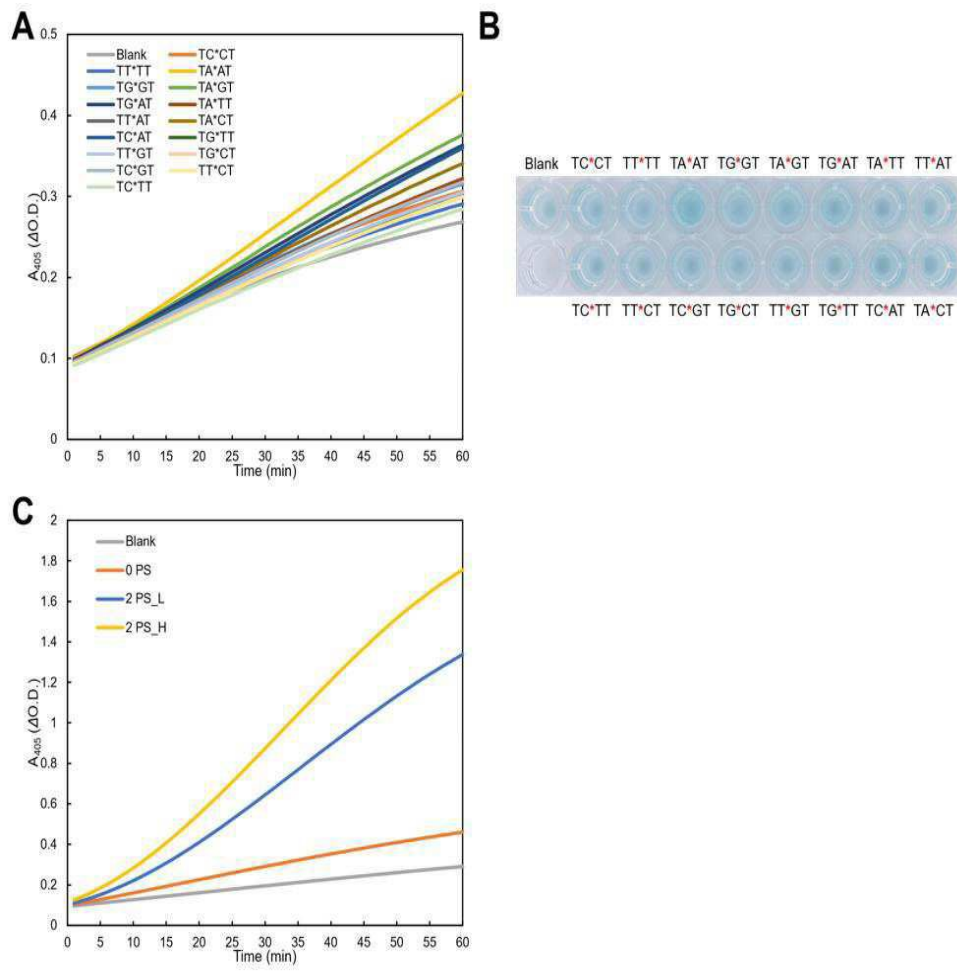




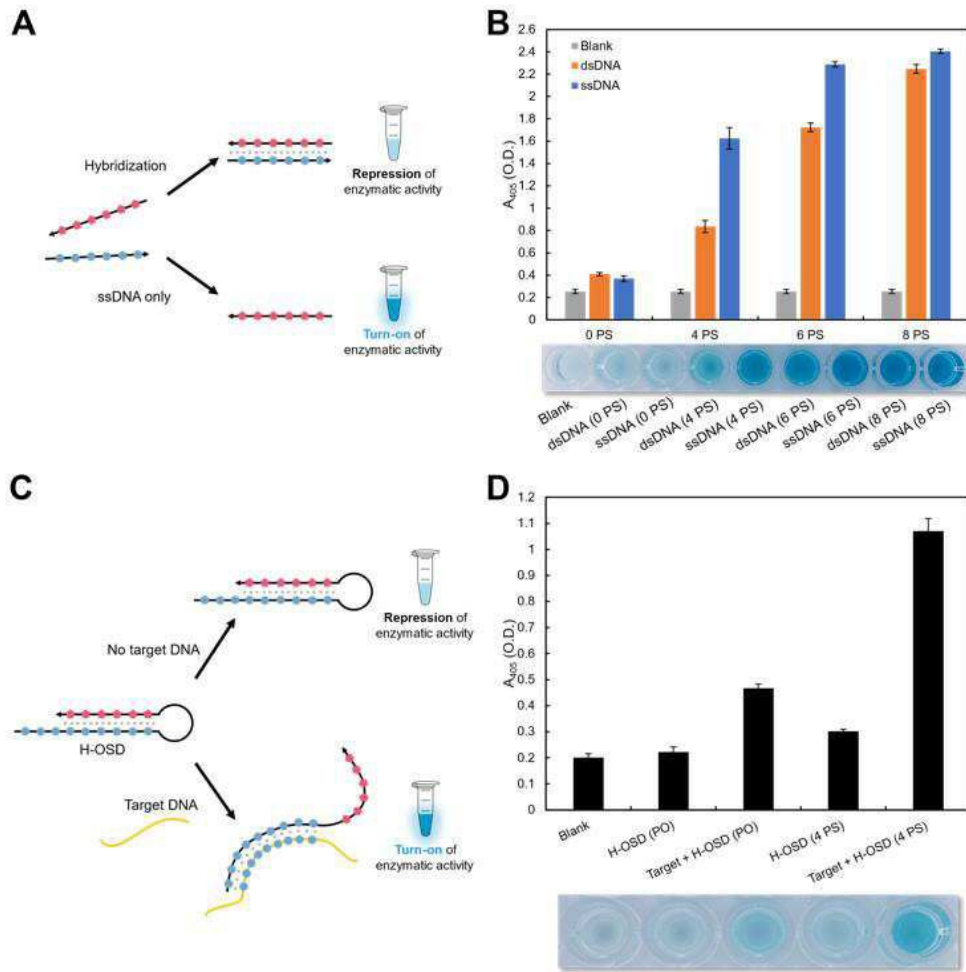
도면7



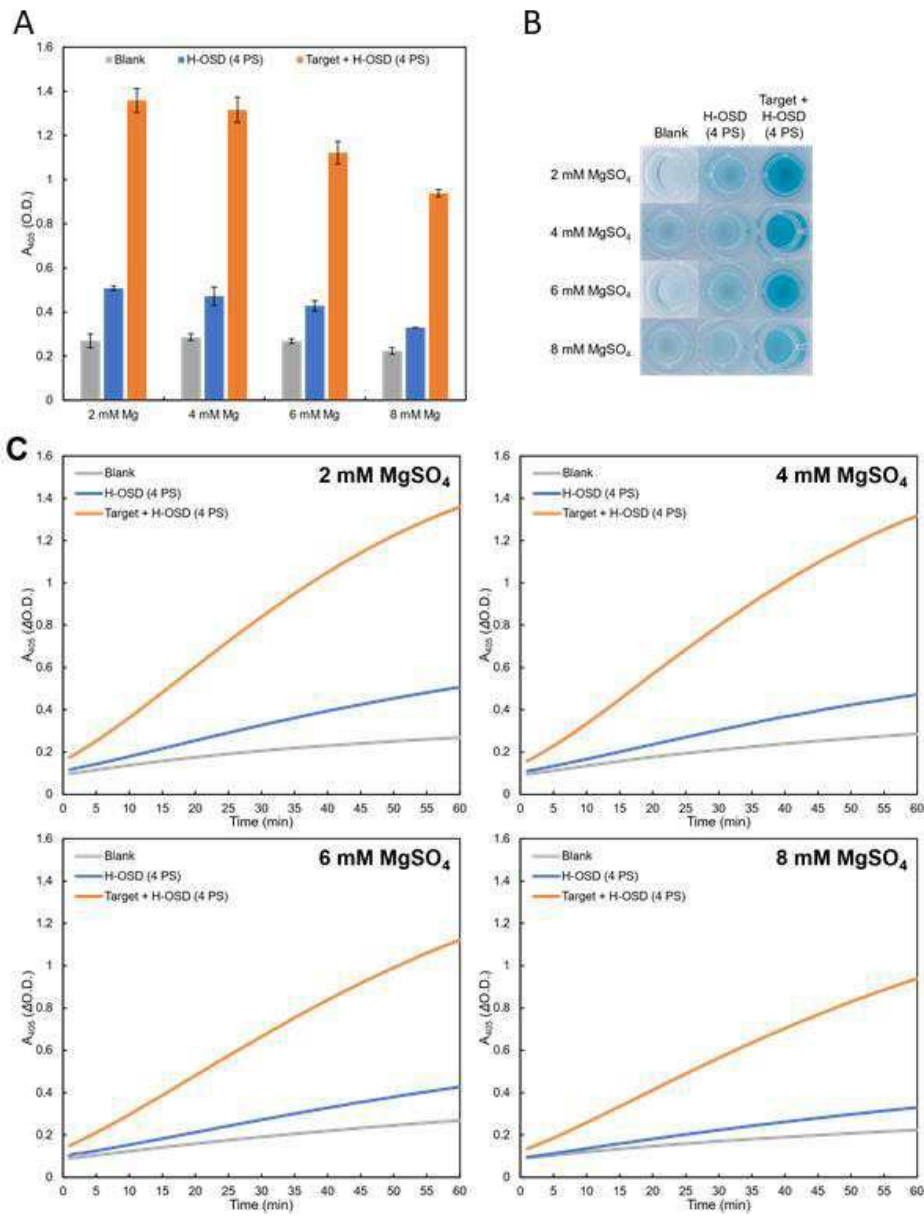
도면8



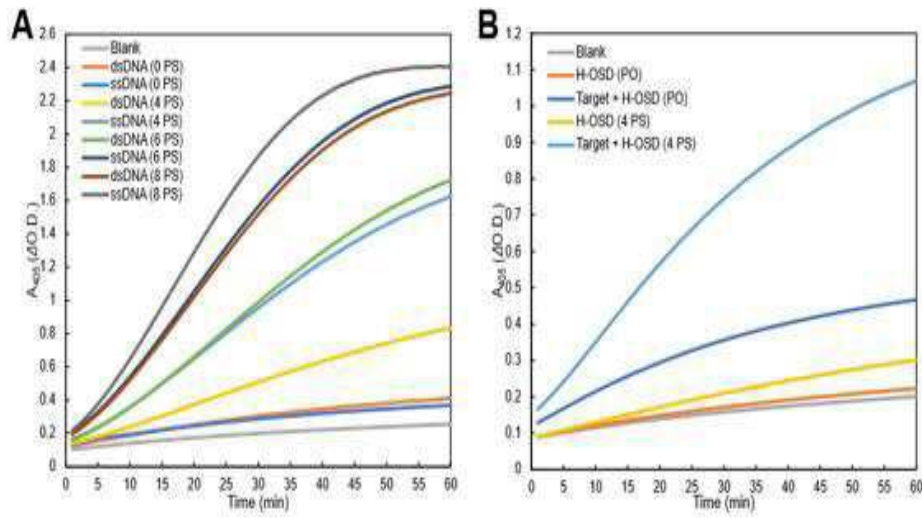
도면9



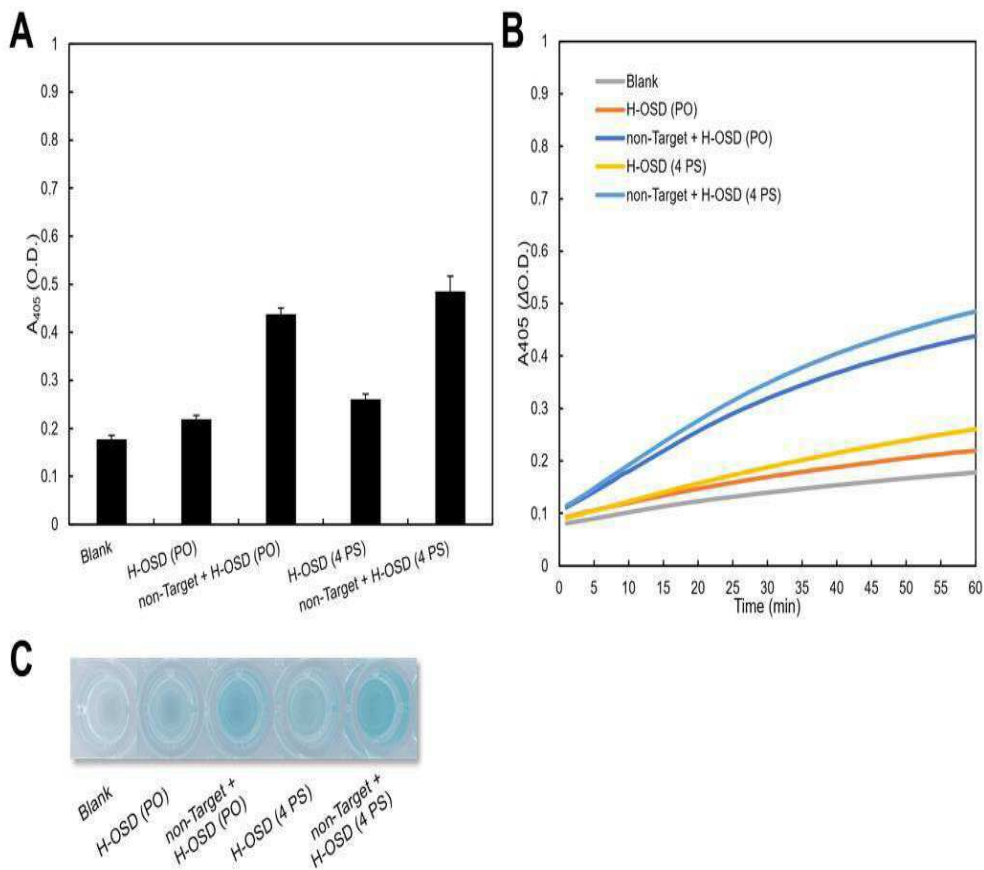
도면10



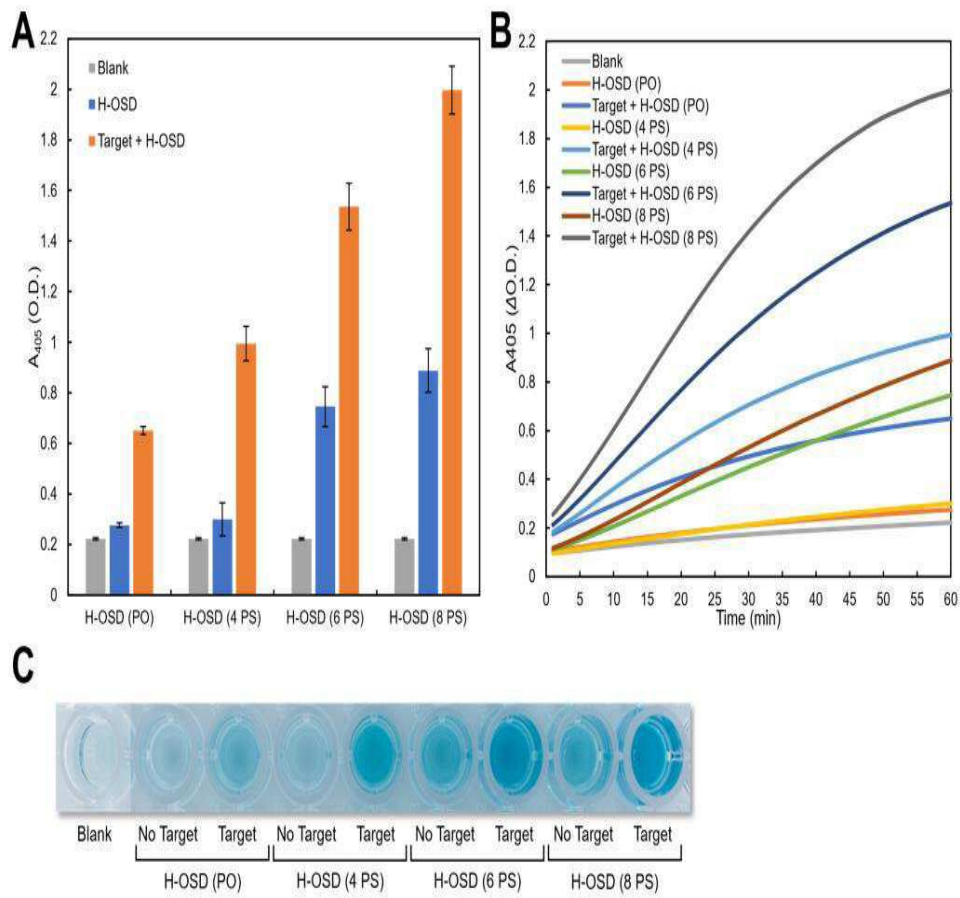
도면11



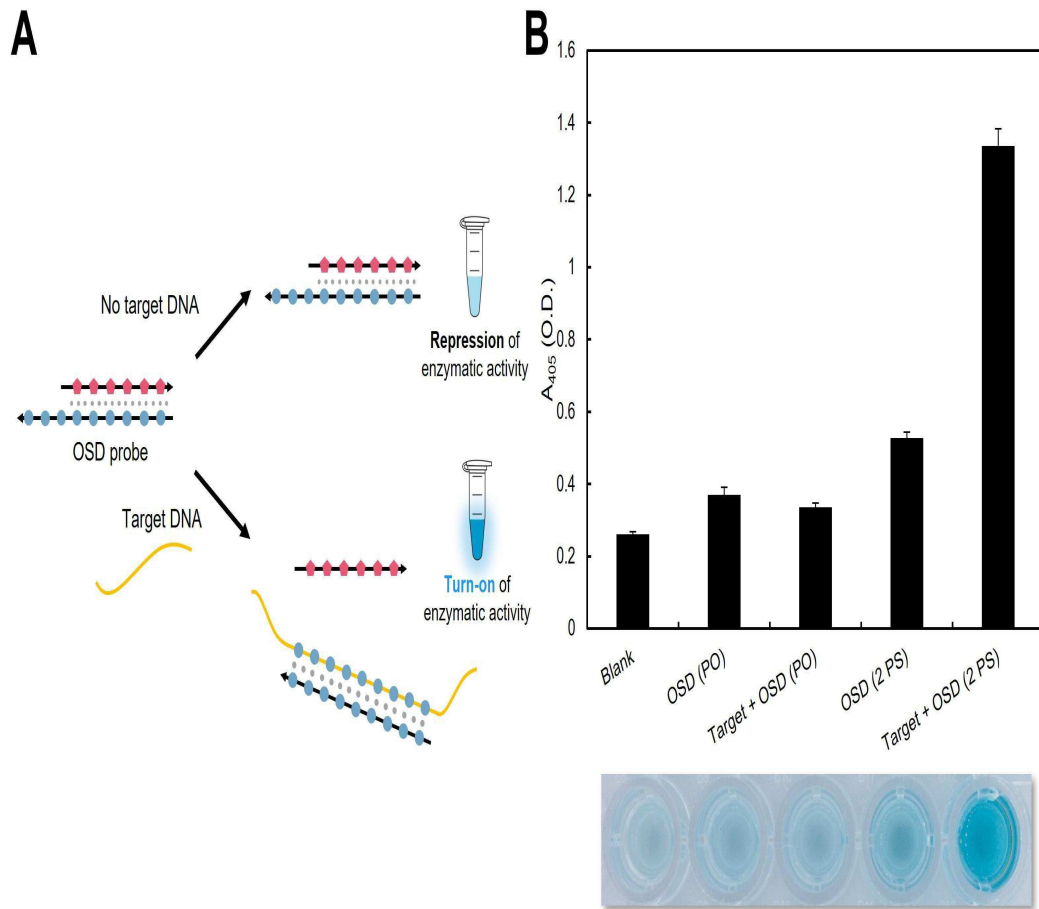
도면12



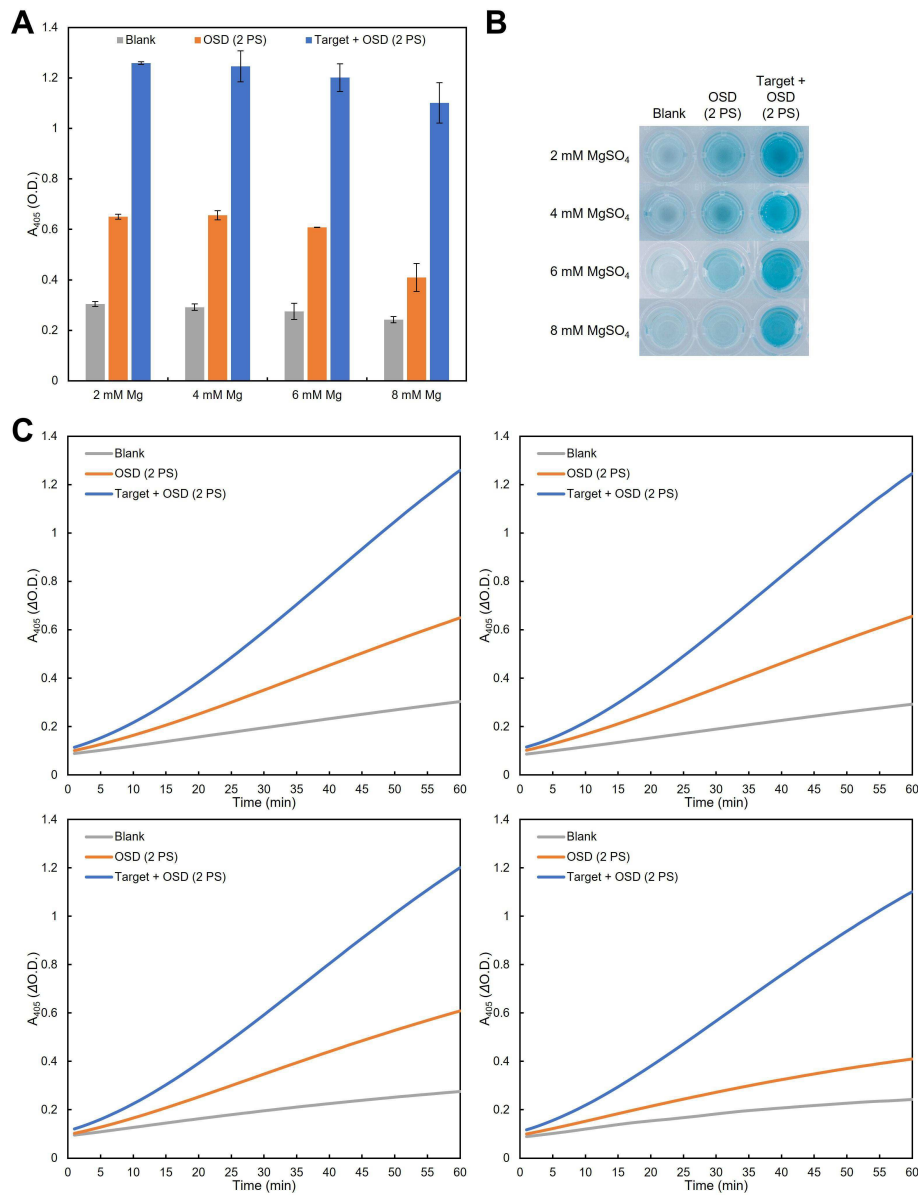
도면13



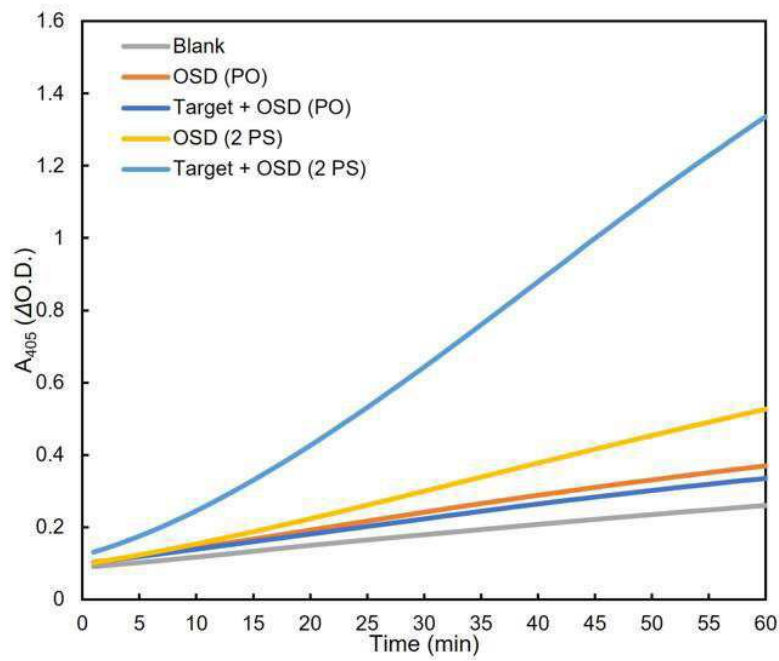
도면14



도면15



도면16



도면17

