(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0104503
(43) 공개일자 2023년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01) *C12Q 1/6825* (2018.01)
G01N 27/327 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/70 (2022.05)
C12Q 1/6825 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2022-0094666
(22) 출원일자 2022년07월29일
심사청구일자 2022년07월29일
(30) 우선권주장
1020210194434 2021년12월31일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
한양대학교 에리카산학협력단
경기도 안산시 상록구 한양대학로 55
(72) 발명자
김영근
서울특별시 강남구 압구정로61길 37 한양아파트 72동 1109호
이주헌
서울특별시 송파구 오금로35길 17 현대아파트 43동, 702호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최훈식

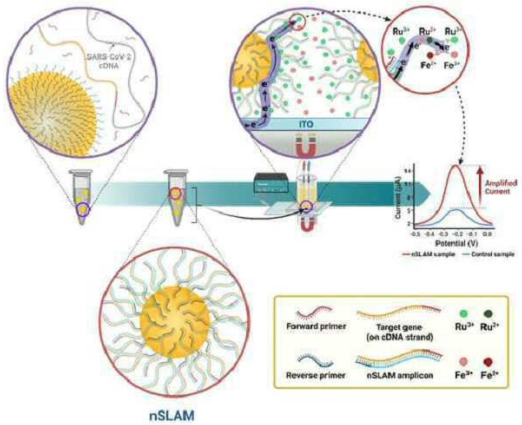
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **코로나 바이러스 검출용 키트 및 코로나 바이러스 검출 방법**

(57) 요 약

본 발명은 일측에 개구부를 구비하고, 코로나 바이러스를 포함하는 시료가 구비되는 반응기; 상기 반응기 내에 구비되는 하나 이상의 자성나노입자부; 상기 반응기의 개구부를 덮도록 구비되는 도전성기판; 및 상기 반응기로 자기장을 인가하는 자기장인가부;를 포함하고, 상기 자성나노입자부는 산화철로 이루어진 코어부와, 상기 코어부를 감싸도록 구비되는 금으로 이루어진 쉘부로 이루어지는 자성나노입자와, 상기 자성나노입자의 쉘부에 부착되는 프라이머를 포함하는 것인, 자성나노입자를 이용한 코로나 바이러스 검출용 키트 및 이를 이용한 검출 방법을 포함한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G01N 27/3275 (2013.01)
C12Q 2531/113 (2013.01)
C12Q 2563/143 (2013.01)
C12Q 2563/155 (2013.01)
C12Q 2565/607 (2013.01)
(72) 발명자
박범철
서울특별시 성동구 마장로 137 텐즈힐
박현수
서울특별시 성북구 종암로 14길 19-4, 502호
소정욱
서울특별시 동작구 장승배기로4길 9 상도더샵아파트 122동 103호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711091868
과제번호 2019R1A2C3006587
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 금속 및 금속산화물 기반 항암 면역치료용 복합스캐폴드 개발
기 여 율 70/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2019.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711107482
과제번호 2020R1C1C1012122
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 장 유도 단방향 정렬 나노바이오 물질 3차원 구조 및 그의 바이오 압전 시스템
기 여 율 15/100
과제수행기관명 한양대학교(ERICA캠퍼스)
연구기간 2020.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711138805
과제번호 2020R1A4A1016840
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 공항 탐지초파리 개발을 위한 바이오센서 기초연구실
기 여 율 10/100
과제수행기관명 한양대학교
연구기간 2020.07.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345330511
과제번호 5199990214171
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 BK21플러스사업(R&D)
연구과제명 바이오나노인텔리전스 교육연구단
기 여 율 5/100
과제수행기관명 한양대학교(ERICA캠퍼스)
연구기간 2020.09.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

코로나 바이러스를 검출하는 키트로,

자성나노입자와, 상기 자성나노입자의 표면에 부착되는 프라이머를 포함하고,

상기 프라이머는 상기 코로나 바이러스와 중합 효소 연쇄반응을 통하여 증폭산물을 형성하고, 상기 증폭산물이 형성되어 포집된 자성나노입자는 반복적인 전위 인가에 의하여 전기화학적신호가 증폭되어 상기 코로나 바이러스를 검출하는,

코로나 바이러스 검출용 키트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 전기화학적신호는 직류 또는 교류 전원을 인가하여 전류값의 변화를 측정하는 것인,

코로나 바이러스 검출용 키트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 프라이머는 서열번호 1 내지 서열번호 6 중 어느 하나 이상을 포함하는 프라이머인 것인,

코로나 바이러스 검출용 키트.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 코로나 바이러스는 HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS-CoV, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, MERS-CoV, COVID-19(SARS-CoV-2) 중 어느 하나 이상인,

코로나 바이러스 검출용 키트.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 자성나노입자는 산화철로 이루어진 코어부와, 상기 코어부를 감싸도록 구비되는 금으로 이루어진 쉘부로 이루어지는 자성나노입자를 포함하고,

상기 프라이머는 5'-말단에 티올기(thiol) 및 아미노기(amino) 중 어느 하나를 갖는 화합물로 개질된 것인,

코로나 바이러스 검출용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 자성나노입자의 평균 직경은 제1 길이로 구비되고, 상기 쉘부의 평균 두께는 제2 길이로 구비되며, 상기 제2 길이는 상기 제1 길이에 대하여 0.09배 내지 0.15배로 구비되는,

코로나 바이러스 검출용 키트.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 자성나노입자의 평균 직경은 제1 길이로 구비되고, 상기 쉘부의 평균 두께는 제2 길이로 구비되며, 상기 제1 길이는 170nm 내지 300nm이고, 상기 제2 길이는 15nm 내지 40nm인 것인,

코로나 바이러스 검출용 키트.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 자성나노입자는,

산화철로 이루어진 코어부를 제조하고,

상기 코어부의 표면에 실리콘을 포함하는 버퍼부를 구비시키고,

상기 버퍼부의 외면에 아미노기(-NH_2) 및 티올기(-SH) 중 어느 하나 이상으로 관능화시킨 후, 금을 포함하는 쉘부를 형성시켜 자성나노입자를 제조하는,

코로나 바이러스 검출용 키트.

청구항 9

제1항에 있어서,

일측에 개구부를 구비한 반응기;

상기 반응기의 개구부를 덮도록 구비되는 도전성기판;

상기 반응기 내에 구비되는 제1 전극과, 제2 전극;

상기 반응기로 자기장을 인가하는 자기장인가부; 및

상기 도전성기판과 상기 제1 및 제2 전극을 3-전극 모듈로 이용하여 전기화학적신호를 측정하는 전기화학적 신호 측정부를 더 포함하는,

코로나 바이러스 검출용 키트.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 자성나노입자와 상기 자성나노입자의 표면에 형성된 증폭산물은 상기 반응기 내에 구비되고,

상기 제1 전극은 기준전극(reference electrode)을 포함하고, 상기 도전성기판은 작업전극(working electrode)을 포함하고, 상기 제2 전극은 상기 기준전극, 및 상기 작업전극으로부터 발생하는 전자 밸런스를 조절하는 카운터전극(counter electrode)을 포함하는 3-전극 모듈로 수행되고,

상기 제1 또는 제2 전극은 금(Au), 코발트(Co), 백금(Pt), 은(Ag), 탄소나노튜브(carbon nanotube), 그래핀

(graphene), 및 탄소(Carbon) 중 어느 하나 이상으로 이루어지고,

상기 도전성 기판은 산화인듐주석(ITO: indium tin oxide), ZnO, SnO_2, In_2O_3, $CdSnO_4$, 탄소나노튜브를 포함하는 탄소기판 소재, 불소가 첨가된 주석 산화물(FTO: fluorine-doped tin oxide) 및 알루미늄이 첨가된 아연 산화물(AZO: aluminumdoped zinc oxide) 중 어느 하나 이상을 포함하는,

코로나 바이러스 검출용 키트.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 전기화학적 신호 측정부는 펄스 전압전류계(differential pulse voltammetry, DPV), 양극 벗김 전압전류계(anodic stripping voltammetry, ASV), 대시간 전류계 (chronoamperometry, CA), 순환 전압전류계(cyclic voltammetry), 네모파 전압전류계(square wave voltammetry, SWV), 및 임피던스계(impedance) 중 어느 하나 이상을 포함하는,

코로나 바이러스 검출용 키트.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 자기장인가부는 상기 도전성기판을 사이에 두고, 상기 반응기 내로 1회 이상 가역적으로 자기장을 인가하고,

상기 자기장인가부에 의하여 상기 자성나노입자를 상기 반응기의 개구부측으로 이동시키되, 상기 자성나노입자의 이동시키는 정도를 제어하는,

코로나 바이러스 검출용 키트.

청구항 13

표면에 프라이머가 부착된 자성나노입자를 준비하는 단계;

상기 표면에 프라이머가 부착된 자성나노입자를 코로나 바이러스를 포함하는 시료 중에 첨가하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하여 표면에 증폭산물을 갖는 자성나노입자를 얻는 단계;

상기 표면에 증폭산물을 갖는 자성나노입자를 개구부가 구비된 반응기 중에 넣고, 상기 개구부를 도전성기판으로 덮고, 상기 도전성기판의 일측에서 상기 반응기 내로 제1 조건으로 자기장을 인가하는 단계;

상기 반응기 중으로 루세늄(Ru), 철(Fe), 은(Ag), 구리(Cu), 니켈(Ni), 카드뮴(Cd) 및 아연(Zn) 중 어느 하나 이상을 포함하는 금속이온을 투입한 후 제2 조건으로 자기장을 인가하는 단계; 및

상기 반응기 내에는 제1 및 제2 전극을 구비시키고, 상기 제1 및 제2 전극과, 상기 도전성 기판을 함께 이용하여 전기화학적 신호를 측정하는 단계를 포함하는,

코로나 바이러스 검출 방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 표면에 프라이머가 부착된 자성나노입자를 준비하는 단계는,

산화철로 이루어진 코어부를 제조하고,

상기 코어부의 표면에 실리콘을 포함하는 버퍼부를 구비시켜 예비나노입자를 제조하고,

상기 버퍼부의 외면에 아미노기(-NH_2) 및 티올기(-SH) 중 어느 하나 이상으로 관능화시킨 후, 금을 포함하는 쉘부를 형성시켜 자성나노입자를 제조하고,

상기 자성나노입자와 5'-말단에 티올기(thiol) 및 아미노기(-NH_2) 중 어느 하나를 갖는 화합물로 개질된 프라이머를 혼합하고, 염에이징(salt aging)을 수행하는 것을 포함하는,

코로나 바이러스 검출 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 염에이징은 상기 자성나노입자와 상기 프라이머를 교반기에 넣고 혼합한 후, 제1 용액과 제2 용액을 5:1 내지 30:1의 부피비로 상기 교반기 중에 복수회 첨가하고, 초음파처리 하는 것을 포함하고,

상기 제1 용액은 염화나트륨용액, 인산완충생리식염수, 및 초순수를 혼합하여 구비되고, 상기 제2 용액은 인산완충생리식염수, 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate) 및 초순수를 혼합하여 구비되는,

코로나 바이러스 검출 방법.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 프라이머는 서열번호 1 내지 서열번호 6 중 어느 하나 이상을 포함하는 프라이머인 것인,

코로나 바이러스 검출 방법.

청구항 17

제13항에 있어서,

상기 코로나 바이러스는 HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS-CoV, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, MERS-CoV, COVID-19(SARS-CoV-2) 중 어느 하나 이상인,

코로나 바이러스 검출 방법.

청구항 18

제13항에 있어서,

상기 전기화학적 신호를 측정하는 단계에서,

상기 제1 전극은 기준전극(reference electrode)을 포함하고, 상기 도전성기판은 작업전극(working electrode)을 포함하고, 상기 제2 전극은 상기 기준전극, 및 상기 작업 전극으로부터 발생하는 전자 밸런스를 조절하는 카운터전극(counter electrode)을 포함하는 3-전극 모듈로 수행되고,

상기 제1 또는 제2 전극은 금(Au), 코발트(Co), 백금(Pt), 은(Ag), 탄소나노튜브(carbon nanotube), 그래핀(graphene), 및 탄소(Carbon) 중 어느 하나 이상으로 이루어지고,

상기 도전성 기판은 산화인듐주석(ITO: indium tin oxide), ZnO, SnO_2, In_2O_3, $CdSnO_4$, 탄소나노튜브를 포함하는 탄소기판 소재, 불소가 첨가된 주석 산화물(FTO: fluorine-doped tin oxide) 및 알루미늄이 첨가된 아연 산화물(AZO: aluminumdoped zinc oxide) 중 어느 하나 이상을 포함하는,

코로나 바이러스 검출 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 전기화학적 신호 측정은 펄스 전압전류계(differential pulse voltammetry, DPV), 양극 벗김 전압전류계(anodic stripping voltammetry, ASV), 대시간 전류계 (chronoamperometry, CA), 순환 전압전류계(cyclic voltammetry), 네모파 전압전류계(square wave voltammetry, SWV), 및 임피던스계(impedance) 중 어느 하나 이상을 포함하는,

코로나 바이러스 검출 방법.

청구항 20

제19항에 있어서,

상기 제1 전극은 Ag/AgCl을 포함하는 기준전극이고, 상기 제2 전극은 Pt를 포함하는 카운터전극이고, 상기 도전성기판은 ITO를 포함하는 작업전극으로, 3-전극 모듈로 수행되고,

상기 전기화학적 신호 측정은 펄스 전압전류계(differential pulse voltammetry, DPV)을 포함하는,

코로나 바이러스 검출 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 코로나 바이러스 검출용 키트 및 코로나 바이러스 검출 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 낮은 농도의 코로나 바이러스를 높은 민감도로 짧은 시간 안에 효과적으로 검출할 수 있는 코로나 바이러스 검출용 키트 및 코로나 바이러스 검출 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 분자진단은 DNA 또는 RNA 등 질병의 근본을 진단하는 것으로 감염질환, 암진단, 유전질환 및 맞춤진단 등 다양한 분야에서 사용되고 있다. 대표적인 분자진단 기술로는 단시간 내에 DNA를 증폭시키는 PCR(polymerase chain reaction) 기술이 있다.

[0003] PCR기반 분자진단기술의 경우 진단의 높은 정확도를 가지고 있어 특정암과 특정 바이러스 감염병에 대해 장점을 가지고 있어서 표준기술(Gold Standard)로써 사용되고 있다. 이중, 가격이 비싸지만, 정확도가 가장 높으므로 실시간 PCR(Real-time PCR)을 주로 사용하고 더 저렴한 일반 PCR(Conventional PCR)도 다수 사용되어 왔다.

[0004] 코로나 바이러스는 단일가닥 RNA를 게놈으로 가지는 코로나바이러스과에 속하는 바이러스들을 지칭하며 조류뿐만 아니라 사람을 포함한 다양한 포유류에서도 발견된다. 코로나바이러스는 그 종이 다양하고, 바이러스의 특성과 숙주에 따라서 호흡기와 소화기 감염병을 모두 유발하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 사람에서는 2003년 전 세계적으로 문제시되었던 중증급성호흡기증후군(Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS)과 2015년 중동호흡기증후군 (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus, MERS)의 원인 바이러스로서 문제된 바 있고, 최근 중국 우한에서 발생하여 전 세계적으로 유행하고 있는 신종 코로나바이러스 감염증-19(Coronavirus Disease-19, COVID-19)의 병원체인 SARS-CoV-2 로서 코로나바이러스가 주목받고 있다.

[0006] 코로나 바이러스 감염증은 높은 확산율을 보이고, 발병 초기의 무증상 상태에서도 전염력이 높으므로 집단 감염을 일으킬 가능성이 크다. 현재 전 세계에서 치료제와 백신을 개발하고 있으나 치료책이 확립되지 않았으므로, 최선의 대책은 조기에 감염자를 발견하여 집단 감염을 예방하는 것이다.

[0007] 따라서 다수의 검사 대상에 대해 신속하고 정확하게 코로나바이러스 감염 여부를 진단할 수 있는 기술 중 하나

로, PCR 기술이 이용되어 왔다. 반면, 이와 같은 PCR 기술은 높은 정확도를 유지하기 위해서는 충분한 중합 효소 연쇄반응을 유도해야 하고, 이에 고가의 장비와 비용, 많은 시간이 소요되는 단점이 있다. 또한, 짧은 수명과 낮은 농도(1fM 이하)의 염기 서열을 검지하기 위해서는 많은 어려움이 따른다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-1506048 (2015.03.19.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 낮은 농도의 코로나 바이러스를 높은 민감도로 빠른 시간 안에 효율적으로 검출할 수 있는 코로나 바이러스 검출용 키트 및 코로나 바이러스 검출 방법을 제공하기 위한 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 신규한 자성나노입자를 이용하여, PCR 사이클 횟수를 감소시켜 진단의 소요 시간을 획기적으로 단축시켜 효율을 높일 수 있는 코로나 바이러스 검출용 키트 및 코로나 바이러스 검출 방법을 제공하기 위함이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일측면에 따르면, 본 발명의 실시예들은 코로나 바이러스 검출용 키트 및 코로나 바이러스 검출 방법을 포함한다.

[0012] 본 발명의 일 실시예는, 코로나 바이러스를 검출하는 키트로, 자성나노입자와, 상기 자성나노입자의 표면에 부착되는 프라이머를 포함하고, 상기 프라이머는 상기 코로나 바이러스와 중합 효소 연쇄반응을 통하여 증폭산물을 형성하고, 상기 증폭산물이 형성되어 포집된 자성나노입자는 반복적인 전위 인가에 의하여 전기화학적신호가 증폭되어 상기 코로나 바이러스를 검출하는 코로나 바이러스 검출용 키트를 포함한다.

[0013] 일 실시예에 있어서, 상기 전기화학적신호는 직류 또는 교류 전원을 인가하여 전류값의 변화를 측정할 수 있다.

[0014] 일 실시예에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 1 내지 서열번호 6 중 어느 하나 이상을 포함하는 프라이머일 수 있다.

[0015] 일 실시예에 있어서, 상기 코로나 바이러스는 HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS-CoV, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, MERS-CoV, COVID-19(SARS-CoV-2) 중 어느 하나 이상일 수 있다.

[0016] 일 실시예에 있어서, 상기 자성나노입자는 산화철로 이루어진 코어부와, 상기 코어부를 감싸도록 구비되는 금으로 이루어진 쉘부로 이루어지는 자성나노입자를 포함하고, 상기 프라이머는 5'-말단에 티올기(thiol) 및 아미노기(amino) 중 어느 하나를 갖는 화합물로 개질될 수 있다.

[0017] 일 실시예에 있어서, 상기 자성나노입자의 평균 직경은 제1 길이로 구비되고, 상기 쉘부의 평균 두께는 제2 길이로 구비되며, 상기 제2 길이는 상기 제1 길이에 대하여 0.09배 내지 0.15배로 구비될 수 있다.

[0018] 일 실시예에 있어서, 상기 자성나노입자의 평균 직경은 제1 길이로 구비되고, 상기 쉘부의 평균 두께는 제2 길이로 구비되며, 상기 제1 길이는 170nm 내지 300nm이고, 상기 제2 길이는 15nm 내지 40nm일 수 있다.

[0019] 일 실시예에 있어서, 상기 자성나노입자는, 산화철로 이루어진 코어부를 제조하고, 상기 코어부의 표면에 실리콘을 포함하는 버퍼부를 구비시키고, 상기 버퍼부의 외면에 아미노기($-NH_2$) 및 티올기(-SH) 중 어느 하나 이상으로 관능화시킨 후, 금을 포함하는 쉘부를 형성시켜 자성나노입자를 제조할 수 있다.

[0020] 일 실시예에 있어서, 일측에 개구부를 구비한 반응기; 상기 반응기의 개구부를 덮도록 구비되는 도전성기판; 상기 반응기 내에 구비되는 제1 전극과, 제2 전극; 상기 반응기로 자기장을 인가하는 자기장인가부; 및 상기 도전성기판과 상기 제1 및 제2 전극을 3-전극 모듈로 이용하여 전기화학적신호를 측정하는 전기화학적 신호 측정부를 더 포함할 수 있다.

[0021] 일 실시예에 있어서, 상기 자성나노입자와 상기 자성나노입자의 표면에 형성된 증폭산물은 상기 반응기 내에 구비되고, 상기 제1 전극은 기준전극(reference electrode)을 포함하고, 상기 도전성기판은 작업전극(working electrode)을 포함하고, 상기 제2 전극은 상기 기준전극, 및 상기 작업전극으로부터 발생하는 전자 밸런스를 조절하는 카운터전극(counter electrode)을 포함하는 3-전극 모듈로 수행되고, 상기 제1 또는 제2 전극은 금(Au), 코발트(Co), 백금(Pt), 은(Ag), 탄소나노튜브(carbon nanotube), 그래핀(graphene), 및 탄소(Carbon) 중 어느 하나 이상으로 이루어지고, 상기 도전성 기판은 산화인듐주석(ITO: indium tin oxide), ZnO, SnO_2, In_2O_3, $CdSnO_4$, 탄소나노튜브를 포함하는 탄소기판 소재, 불소가 첨가된 주석 산화물(FTO: fluorine-doped tin oxide) 및 알루미늄이 첨가된 아연 산화물(AZO: aluminumdoped zinc oxide) 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0022] 일 실시예에 있어서, 상기 전기화학적 신호 측정부는 펄스 전압전류계(differential pulse voltammetry, DPV), 양극 벗김 전압전류계(anodic stripping voltammetry, ASV), 대시간 전류계 (chronoamperometry, CA), 순환 전압전류계(cyclic voltammetry), 네모파 전압전류계(square wave voltammetry, SWV), 및 임피던스계(impedance) 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0023] 일 실시예에 있어서, 상기 자기장 인가부는 상기 도전성기판을 사이에 두고, 상기 반응기 내로 1회 이상 가역적으로 자기장을 인가하고, 상기 자기장 인가부에 의하여 상기 자성나노입자를 상기 반응기의 개구부측으로 이동시키되, 상기 자성나노입자의 이동시키는 정도를 제어할 수 있다.

[0024] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명의 실시예는 표면에 프라이머가 부착된 자성나노입자를 준비하는 단계; 상기 표면에 프라이머가 부착된 자성나노입자를 코로나 바이러스를 포함하는 시료 중에 첨가하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하여 표면에 증폭산물을 갖는 자성나노입자를 얻는 단계; 상기 표면에 증폭산물을 갖는 자성나노입자를 개구부가 구비된 반응기 중에 넣고, 상기 개구부를 도전성기판으로 덮고, 상기 도전성기판의 일측에서 상기 반응기 내로 제1 조건으로 자기장을 인가하는 단계; 상기 반응기 중으로 루세늄(Ru), 철(Fe), 은(Ag), 구리(Cu), 니켈(Ni), 카드뮴(Cd) 및 아연(Zn) 중 어느 하나 이상을 포함하는 금속이온을 투입한 후 제2 조건으로 자기장을 인가하는 단계; 및 상기 반응기 내에는 제1 및 제2 전극을 구비시키고, 상기 제1 및 제2 전극과, 상기 도전성 기판을 함께 이용하여 전기화학적 신호를 측정하는 단계를 포함하는 코로나 바이러스 검출 방법을 포함할 수 있다.

[0025] 일 실시예에 있어서, 상기 표면에 프라이머가 부착된 자성나노입자를 준비하는 단계는, 산화철로 이루어진 코어부를 제조하고, 상기 코어부의 표면에 실리콘을 포함하는 버퍼부를 구비시켜 예비나노입자를 제조하고, 상기 버퍼부의 외면에 아미노기(-NH_2) 및 티올기(-SH) 중 어느 하나 이상으로 관능화시킨 후, 금을 포함하는 쉘부를 형성시켜 자성나노입자를 제조하고, 상기 자성나노입자와 5'-말단에 티올기(thiol) 또는 아미노기(-NH_2)를 갖는 화합물로 개질된 프라이머를 혼합하고, 염에이징(salt aging)을 수행할 수 있다.

[0026] 일 실시예에 있어서, 상기 염에이징은 상기 자성나노입자와 상기 프라이머를 교반기에 넣고 혼합한 후, 제1 용액과 제2 용액을 5:1 내지 30:1의 부피비로 상기 교반기 중에 복수회 첨가하고, 초음파처리 하는 것을 포함하고, 상기 제1 용액은 염화나트륨용액, 인산완충생리식염수, 및 초순수를 혼합하여 구비되고, 상기 제2 용액은 인산완충생리식염수, 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate) 및 초순수를 혼합하여 구비될 수 있다.

[0027] 일 실시예에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 1 내지 서열번호 6 중 어느 하나 이상을 포함하는 프라이머인 것일 수 있다.

[0028] 일 실시예에 있어서, 상기 코로나 바이러스는 HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS-CoV, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, MERS-CoV, COVID-19(SARS-CoV-2) 중 어느 하나 이상일 수 있다.

[0029] 일 실시예에 있어서, 상기 전기화학적 신호를 측정하는 단계에서, 상기 제1 전극은 기준전극(reference electrode)을 포함하고, 상기 도전성기판은 작업전극(working electrode)을 포함하고, 상기 제2 전극은 상기 기준전극, 및 상기 작업 전극으로부터 발생하는 전자 밸런스를 조절하는 카운터전극(counter electrode)을 포함하는 3-전극 모듈로 수행되고, 상기 제1 또는 제2 전극은 금(Au), 코발트(Co), 백금(Pt), 은(Ag), 탄소나노튜브(carbon nanotube), 그래핀(graphene), 및 탄소(Carbon) 중 어느 하나 이상으로 이루어지고, 상기 도전성 기판은 산화인듐주석(ITO: indium tin oxide), ZnO, SnO_2, In_2O_3, $CdSnO_4$, 탄소나노튜브를 포함하는 탄소기판 소재, 불소가 첨가된 주석 산화물(FTO: fluorine-doped tin oxide) 및 알루미늄이 첨가된 아연 산화물(AZO: aluminumdoped zinc oxide) 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0030] 일 실시예에 있어서, 상기 전기화학적 신호 측정은 펄스 전압전류계(differential pulse voltammetry, DPV), 양극 벗김 전압전류계(anodic stripping voltammetry, ASV), 대시간 전류계 (chronoamperometry, CA), 순환 전압전류계(cyclic voltammetry), 네모파 전압전류계(square wave voltammetry, SWV), 및 임피던스계(impedance) 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0031] 일 실시예에 있어서, 상기 제1 전극은 Ag/AgCl을 포함하는 기준전극이고, 상기 제2 전극은 Pt를 포함하는 카운터전극이고, 상기 도전성기판은 ITO를 포함하는 작업전극으로, 3-전극 모듈로 수행되고, 상기 전기화학적 신호 측정은 펄스 전압전류계(differential pulse voltammetry, DPV)을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0032] 본 발명에 따르면 자성나노입자의 형태 등을 다양하게 제어할 수 있어, 코로나 바이러스를 높은 민감도로 검출할 수 있는 코로나 바이러스 검출용 키트 및 코로나 바이러스 검출 방법을 제공할 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명에 따르면 PCR의 횟수를 감소시키고, 높은 정확도로 신속하게 코로나 바이러스를 검출할 수 있는 코로나 바이러스 검출용 키트 및 코로나 바이러스 검출 방법을 제공할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명에 따르면 프라이머를 변형하여 이용함으로써, 낮은 농도의 코로나 바이러스에 대해서도 효율적으로 검출할 수 있는 코로나 바이러스 검출용 키트 및 코로나 바이러스 검출 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 의한 코로나 바이러스 검출용 키트를 이용하여 코로나 바이러스를 검출하는 전체 과정을 모식적으로 나타낸 도면이다.

도 2은 본 발명의 코로나 바이러스 검출용 키트를 개략적으로 도시한 도면이다.

도 3은 본 발명의 자성나노입자를 도시한 도면이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 표면에 프라이머가 부착된 자성나노입자를 제조하는 방법을 개략적으로 나타낸 도면이다.

도 5는 제조예 3의 자성나노입자의 모식도와 TEM 이미지이다.

도 6는 제조예 3의 자성나노입자의 SEM 이미지이다.

도 7은 제조예 3의 자성나노입자와, 제조예 1에 따른 산화철 나노입자(코어)의 크기를 나타낸 그래프이다.

도 8은 제조예 3의 자성나노입자의 자기장 특성을 확인한 결과이다.

도 9는 본 발명에서 사용한 COVID-19 바이러스의 N, E, 및 RdRP 서열에 대한 정보를 나타내는 도면이다.

도 10 및 11은 FDA에서 긴급 승인한 RT-PCR 기반의 COVID-19 진단 키트에 대한 자료이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 의하여 nSLAM을 수행하는 과정을 나타낸 모식도이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예를 이용하여 코로나 바이러스를 검출 가능한 최소 농도를 확인하기 위한 실험 결과이다.

도 14는 PCR 과정 중 최적의 어닐링 온도를 찾기 위한 실험 결과이다.

도 15 및 16은 본 발명의 일 실시예를 이용하여 코로나 바이러스를 검출 가능한 최소 PCR 사이클을 확인하기 위한 실험 결과이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에 의하여 리버스 프라이머를 사용하는 효율을 확인하기 위한 실험 결과이다.

도 18 및 19는 본 발명의 일 실시예가 SARS-CoV-2 바이러스에 선택성이 있다는 것을 확인하기 위한 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 기타 실시예들의 구체적인 사항들은 상세한 설명 및 도면들에 포함되어 있다.

[0037] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시

예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 이하의 설명에서 달리 명시되지 않는 한, 본 발명에 성분, 반응 조건, 성분의 함량을 표현하는 모든 숫자, 값 및/또는 표현은, 이러한 숫자들이 본질적으로 다른 것들 중에서 이러한 값을 얻는 데 발생하는 측정의 다양한 불확실성이 반영된 근사치들이므로, 모든 경우 "약"이라는 용어에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 기재에서 수치범위가 개시되는 경우, 이러한 범위는 연속적이며, 달리 지적되지 않는 한 이러한 범위의 최소값으로부터 최대값이 포함된 상기 최대값까지의 모든 값을 포함한다. 더 나아가, 이러한 범위가 정수를 지칭하는 경우, 달리 지적되지 않는 한 최소값으로부터 최대값이 포함된 상기 최대값까지를 포함하는 모든 정수가 포함된다

[0038] 또한, 본 발명에서 범위가 변수에 대해 기재되는 경우, 상기 변수는 상기 범위의 기재된 종료점들을 포함하는 기재된 범위 내의 모든 값들을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, "5 내지 10"의 범위는 5, 6, 7, 8, 9, 및 10의 값들뿐만 아니라 6 내지 10, 7 내지 10, 6 내지 9, 7 내지 9 등의 임의의 하위 범위를 포함하고, 5.5, 6.5, 7.5, 5.5 내지 8.5 및 6.5 내지 9 등과 같은 기재된 범위의 범주에 타당한 정수들 사이의 임의의 값도 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, "10% 내지 30%"의 범위는 10%, 11%, 12%, 13% 등의 값들과 30%까지를 포함하는 모든 정수들 뿐만 아니라 10% 내지 15%, 12% 내지 18%, 20% 내지 30% 등의 임의의 하위 범위를 포함하고, 10.5%, 15.5%, 25.5% 등과 같이 기재된 범위의 범주 내의 타당한 정수들 사이의 임의의 값도 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0039] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 의한 코로나 바이러스 검출용 키트를 이용하여 코로나 바이러스를 검출하는 전체 과정을 모식적으로 나타낸 도면이다.

[0040] 도 2는 본 발명의 코로나 바이러스 검출용 키트를 개략적으로 도시한 도면이다. 도 3은 본 발명의 자성나노입자를 도시한 도면이다. 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 표면에 프라이머가 부착된 자성나노입자를 제조하는 방법을 개략적으로 나타낸 도면이다.

[0041] 도 2 내지 도 4를 참조하면, 본 발명의 실시예는 코로나 바이러스를 검출하는 키트로, 자성나노입자와, 상기 자성나노입자의 표면에 부착되는 프라이머를 포함하고, 상기 프라이머는 상기 코로나 바이러스와 중합 효소 연쇄반응을 통하여 증폭산물을 형성하고, 상기 증폭산물이 형성된 자성나노입자는 반복적인 전위 인가에 의하여 전기화학적신호가 증폭되어 상기 코로나 바이러스를 검출하는 코로나 바이러스 검출용 키트를 포함한다. 상기 전기화학적신호는 직류 또는 교류 전원을 인가하여 전류값의 변화를 측정할 수 있다. 상기 자성나노입자(100)는 산화철로 이루어진 코어부와, 상기 코어부를 감싸도록 금으로 이루어진 쉘부를 포함할 수 있다.

[0042] 예컨대, 본 실시예에 따른 코로나 바이러스 검출용 키트는, 전기화학적신호에 의하여 상기 코로나 바이러스를 검출할 수 있는데, 상기 전기화학적신호는 1차로 측정되는 초기 신호와, 이어서 반복적으로 전위를 인가하여 얻어지는 측정 신호가 점차 증가한다. 즉, 초기 신호가 너무 낮아 측정이 용이하지 않은 경우에도, 반복적으로 측정 신호를 상승시킴으로써, 높은 민감도로 코로나 바이러스를 측정할 수 있다.

[0043] 본 발명에서 용어 "표적핵산(target nucleic acid)", "단일 표적 염기서열" 및 "특정 단일 염기서열"이란 본 발명에 따른 방법에 의해 증폭해야 할 핵산 분자를 의미한다. 핵산의 종류에는 데옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotide, DNA), 리보뉴클레오타이드(ribonucleotide, RNA) 및 이들 혼합물 또는 결합물일 수 있다. 이를 구성하는 염기는 천연에 존재하는 뉴클레오타이드, 예를 들어 구아닌(guanine, G), 아데닌(adenine, A), 티민(thymine, T), 사이토신(cytosine, C), 우라실(uracil, U) 이지만, 그 이외의 천연 및 인공의 수식 염기를 함유할 수 있다. 용어 "수식 염기"란, 구아닌, 아데닌, 티민, 사이토신, 우라실인 5개의 뉴클레오티타이드가 화학적 수식(modification)을 받은 염기를 의미한다. 본 발명에 있어서, 표적핵산, 단일 표적 염기서열 및 특정 단일 염기서열은, 증폭할 때에는 단일 사슬일 필요가 있으나, 이중 사슬이나 고차 구조를 형성하고 있는 핵산이어도 열변성, 알칼리 변성 처리 등에 의해 단일 사슬로 변환한 후에 사용할 수 있다. 본 발명의 표적핵산, 단일 표적 염기서열 및 특정 단일 염기서열에는 이러한 변성 처리를 부가한 양태도 포함된다. 또한, RNA를 주형으로 하여 역전사 반응에 의해 제조되는 cDNA도 포함된다.

[0044] 본 발명에서 용어 "시료(sample)"이란 검출 대상이 되는 표적핵산, 단일 표적 염기서열 및 특정 단일 염기서열을 포함하는 것으로 생각되는 혼합물을 의미한다. 샘플은 사람을 포함하는 생체 (예를 들어 혈액, 타액, 체액, 체조직 등), 환경 (예를 들어, 토양, 해수, 환경수 (온천수, 욕조수, 냉각탑수 등)), 혹은 인공물 또는 자연물 (예를 들어, 빵 등의 가공 식품, 요구르트 등의 발효 식품, 혹은 쌀이나 밀 등의 재배 식물, 미생물, 바이러스)에서 유래하는 것으로, 통상은 핵산 추출 조작을 거친 것을 사용할 수 있다. 필요에 따라 핵산 정제 과정을 추가할 수 있다.

[0045] 본 실시예에 따른 코로나 바이러스 검출용 키트는 일측에 개구부를 구비한 반응기; 상기 반응기의 개구부를 덮도록 구비되는 도전성기판; 상기 반응기 내에 구비되는 제1 전극과, 제2 전극; 상기 반응기로 자기장을 인가하는 자기장인가부; 및 상기 도전성기판과 상기 제1 및 제2 전극을 3-전극 모듈로 이용하여 전기화학적신호를 측정하는 전기화학적 신호 측정부를 더 포함할 수 있다.

[0046] 상기 자성나노입자는 산화철로 이루어진 코어부와, 금으로 이루어진 쉘부를 포함하는 입자형태를 의미하고, 자성나노입자부는 상기 자성나노입자의 표면에 프라이머가 부착된 형태를 의미한다. 또한, 증폭산물은 중합 효소 연쇄반응을 수행한 후 얻어진 결과물을 의미하며, 상기 증폭산물은 상기 자성나노입자부의 프라이머에서 수행되어 자성나노입자의 표면에 포집되어 구비될 수 있다.

[0047] 상기 자성나노입자부는 PCR 증폭반응을 수행한 후, 상기 반응기 내에 구비될 수 있다. 상기 반응기의 하부측에는 개구부, 예컨대 하나 이상의 홀(hole)이 구비될 수 있는데, 상기 개구부는 도전성기판에 의하여 가로막혀져, 상기 반응기 내부에 구비된 자성나노입자부가 외측으로 배출되지 않도록 할 수 있다. 상기 도전성기판의 외측에는 자기장인가부가 구비되고, 상기 자기장인가부에 의하여 상기 자성나노입자부를 상기 반응기의 개구부측으로 이동시킬 수 있으며, 이동시키는 정도를 제어함으로써 코로나 바이러스 검출의 효율을 향상시킬 수 있다.

[0048] 통상, PCR 기술을 이용하여 핵산, 코로나 바이러스 등을 검출하기 과정에서, 높은 정확도를 유지하기 위해서는 충분한 중합 효소 연쇄반응을 유도해야 하고, 이에 고가의 장비와 비용, 많은 시간이 소요되는 단점이 있다. 또한, 증폭산물의 수명이 짧고, 시료 중 포함된 농도가 낮은 경우(대략, 1fM 이하)의 염기 서열을 검지하기 위해서는 많은 어려움이 따른다. 따라서, 직접적인 영향을 미치는 전극과 표적 염기 서열의 상호작용을 유도하기 위해서 연구되는 마이크로 전극(micro electrode)을 포함한 나노 구조체는 효율이 낮다는 문제가 있다.

[0049] 또한, 종래 PCR 기술과 함께 사용된 기능성 금속 나노입자 기반 형광 혹은 전기 신호 검지 기술의 경우, 중합 효소 연쇄반응 이후에 입자에 대한 후처리 공정이 수반되며, 입자가 특이적으로 표적 염기 서열과 반응하기 위한 환경을 조성하는 과정에서 검지 효율이 저하될 뿐만 아니라 검지 오류를 초래할 확률이 높아 문제되어 왔다.

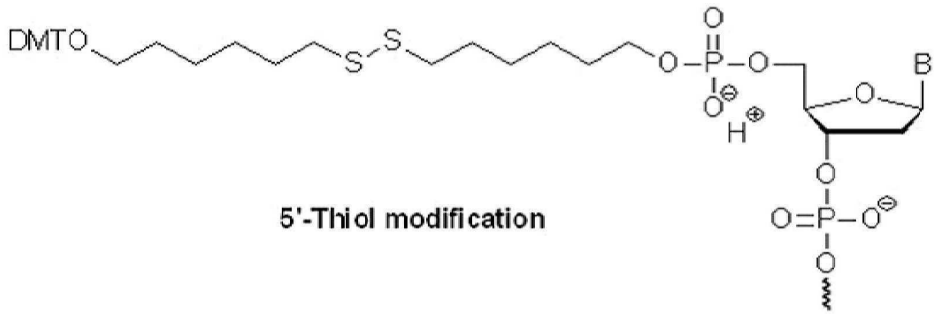
[0050] 본 발명의 실시예는, 자성나노입자를 합성한 후, 코로나 바이러스에 관련된 단일 표적 염기 서열에 대한 증폭반응 개시 역할을 하는 염기서열인 리버스 프라이머(reverse primer) 또는 포워드 프라이머(forward primer)에 티올기를 이용하여 상기 자성나노입자의 표면에 부착함으로써, 수용액 내에서 분산이 가능하므로 공정효율을 향상시킬 수 있다. 또한, 염기 서열에 루세늄 이온이 흡착되게 하여 0.25V에서 점진적으로 증가하는 전류피크를 측정하여 표적 염기 서열의 농도 aM 및 그 이하의 농도 범위의 영역에서도 측정 가능한 초고 민감도 질병 검지 시스템을 제공할 수 있다.

[0051] 또한, 본 실시예에 따른 코로나 바이러스 검출용 키트는 PCR에서 반복적인 사이클을 획기적으로 줄임에도 향상된 정확도를 갖고, PCR 과정을 10분 이내로 줄일 수 있으며, 이로 인해 검출 단계에 걸리는 시간을 현저히 단축할 수 있다.

[0052] 상기 코로나 바이러스는 HCoV-229E, HCoV-OC43, SARS-CoV, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, MERS-CoV, COVID-19(SARS-CoV-2) 중 어느 하나 이상일 수 있다.

[0053] 상기 프라이머는 서열번호 7 내지 서열번호 12 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 프라이머는 하기 화학식 1을 이용하여 상기 리버스 프라이머의 5'-말단에 티올(thiol)기를 갖는 하기 화학식 1로 개질하여 이용될 수 있다. 상기 리버스 프라이머의 5' 말단은 티올기 외에 아미노(amino)기로 개질될 수도 있다.

[0054] [화학식 1]



[0055]

[0056] 구체적으로, 상기 프라이머는 5' 말단에 프라이머에 티올(thiol) 관능기를 갖는 화합물인 Thiol modifier C6 S-

S(O-Dimethoxytrityl-hexyl-dithiohexyl-phosphate)를 이용하여 개질하여 이용될 수 있으며, 보다 구체적으로는 Thiol modifier C6 S-S에 아데닌 염기서열(A)를 5개 내지 30개로 이루어진 스페이서(spacer)을 추가로 더 부착하여 이용할 수 있다. 상기 스페이서는 상기 자성나노입자에 표면에 부착된 프라이머가, 중합 효소 연쇄반응을 수행할 때, 이웃하는 프라이머 사이의 공간적인 간섭을 방지할 수 있으며, 상기 프라이머의 이동성을 향상시켜 중합 효소 연쇄반응의 효율성을 향상시킬 수 있다. 반면, 상기 아데닌 염기서열은 5개 내지 30개일 수 있는데, 5개 미만이면 스페이서의 기능을 충분히 하지 못하고, 30개를 초과하면 상기 자성나노입자의 크기에 비하여 스페이서가 너무 길게 구비되어 문제가 될 수 있다.

[0057] 상기 자성나노입자(100)의 평균 직경은, 도 3을 참조하면 제1 길이(a)로 구비되고, 상기 쉘부의 평균 두께는 제2 길이(b)로 구비되며, 상기 제2 길이(b)는 상기 제1 길이(a)에 대하여 0.09배 내지 0.15배로 구비될 수 있다. 구체적으로, 상기 제2 길이(b)는 상기 제1 길이(a)에 대하여 약 0.1배 내지 0.15배, 또는 약 0.5배 내지 0.15배, 약 0.7배 내지 0.15배, 약 0.09배 내지 0.15배, 약 0.09배 내지 0.12배로 구비될 수 있다. 상기 제2 길이(b)가 제1 길이(a)에 대해서 0.09배 미만이면, 쉘부의 두께를 균일하게 형성하기 어렵고, 또한 쉘부에 부착되는 프라이머 및 PCR 증폭산물을 효율적으로 제어하기 어렵고, 0.15배 초과이면 자기장 인가 시 입자의 이동을 제어하기 어렵고, 전기화학적 신호를 효과적으로 검출하기 어려워 문제된다.

[0058] 또한, 상기 제1 길이(a)가 170nm 내지 300nm인 경우, 상기 제2 길이(b)는 15nm 내지 40nm일 수 있다. 상기 제1 길이(a)가 170nm 미만인 경우, 상기 자성나노입자는 상기 시료 내에서 엉김 또는 뭉침 현상이 발생하여 문제되고, 300nm 초과인 경우에는 자기장을 가하여 상기 자성나노입자의 이동을 제어하기 어려워 문제된다. 또한, 상기 제2 길이(b)가 15nm 미만인 경우, 균일한 두께의 쉘부를 형성하기 어렵고, 40nm 초과인 경우에는 자기장 또는 전류에 의한 자성나노입자의 이동의 민감성이 저하되어 문제된다. 구체적으로, 상기 제1 길이는 약 200nm 내지 300nm, 또는 약 210nm 내지 300nm, 또는 약 220nm 내지 300nm, 또는 약 200nm 내지 280nm, 또는 약 200nm 내지 260nm일 수 있다. 또한, 상기 제2 길이(b)는 약 20nm 내지 40nm, 또는 약 20nm 내지 35nm, 또는 약 20nm 내지 30nm일 수 있다.

[0059] 상기 자성나노입자부는, 산화철로 이루어진 코어부를 제조하고, 상기 코어부의 표면에 실리콘을 포함하는 버퍼부를 구비시키고, 상기 버퍼부의 외면에 아미노기(-NH_2) 또는 티올기(-SH) 관능화시킨 후, 금을 포함하는 쉘부를 형성시켜 자성나노입자를 제조하고, 상기 자성나노입자와 상기 개질된 프라이머를 혼합하여 제조될 수 있다.

[0060] 상기 코어부는 염화철 용액을 철 전구체로 이용하고, 환원제 및 용매의 기능을 하는 글리콜(glycol) 등을 이용한 폴리올 반응에 의하여 산화철로 이루어진 코어부를 제조할 수 있다. 쉘부는 염화금산($HAuCl_4$) 용액을 금 전구체로 이용하여 금 나노입자를 우선 제조하고, 상기 금 나노입자를 상기 코어부의 표면에 부착시킨 후 금을 성장시켜 제조될 수 있다. 이때, 상기 금 나노입자를 안정적으로 부착시키기 위하여 실리카 전구체를 이용하여 상기 코어부의 표면에 실리카를 포함하는 버퍼부를 형성시킨 후, 상기 버퍼부를 통하여 상기 코어부에 부착될 수 있다. 이어서, 상기 쉘부는 개질된 프라이머가 결합될 수 있으며, 상기 개질된 프라이머는 리버스 프라이머(reverse primer) 및 포워드 프라이머(forward primer) 중 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0061] 이와 같이, 자성나노입자 표면에 개질된 프라이머가 결합된 자성나노입자부에서, PCR 반응이 진행되면, 상기 자성나노입자 표면에는 상기 표적핵산의 길이만큼 증폭된 염기서열이 이중가닥으로 존재하게 된다. 이어서, PCR 반응에 의하여 증폭산물을 갖는 자성나노입자부를 상기 반응기 내에 구비시킨 후, 상기 자기장인가부에 의하여 상기 도전성기판을 사이에 두고, 상기 반응기 내로 1회 이상 가역적으로 자기장을 인가할 수 있다. 상기 자기장의 인가에 의하여 상기 자성나노입자부는 상기 반응기의 개구부측으로 이동하며, 상기 개구부를 통하여 상기 도전성기판 상에 인접하게 구비될 수 있다.

[0062] 상기 반응기 내에 구비되는 제1 전극과, 제2 전극 및 상기 제1 전극, 제2 전극 및 도전성기판을 포함한 포함하는 3-전극 모듈을 이용하여 전기화학신호를 측정하는 전기화학적 신호 측정부를 더 포함할 수 있다.

[0063] 상기 제1 전극은 기준전극(reference electrode)을 포함하고, 상기 도전성기판은 작업전극(working electrode)을 포함하고, 상기 제2 전극은 상기 기준전극, 및 상기 작업 전극으로부터 발생하는 전자 밸런스를 조절하는 카운터전극(counter electrode)을 포함하는 3-전극 모듈로 수행될 수 있다.

[0064] 상기 제1 또는 제2 전극은 금(Au), 코발트(Co), 백금(Pt), 은(Ag), 탄소나노튜브(carbon nanotube), 그래핀(graphene), 및 탄소(Carbon) 중 어느 하나 이상으로 이루어지고, 상기 도전성 기판은 산화인듐주석(ITO: indium tin oxide), ZnO, SnO_2, In_2O_3, $CdSnO_4$, 탄소나노튜브를 포함하는 탄소기판 소재, 불소가 첨가된 주석 산화물(FTO: fluorine-doped tin oxide) 및 알루미늄이 첨가된 아연 산화물(AZO: aluminum doped zinc oxide) 중

어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0065] 또한, 상기 제1 및 제2 전극과, 상기 도전성 기판을 이용하여, 전기화학적 신호 측정부에서는 전기화학적 신호를 측정할 수 있다. 예컨대, 상기 전기화학적 신호 측정부는 펄스 전압전류계(differential pulse voltammetry, DPV), 양극 벗김 전압전류계(anodic stripping voltammetry, ASV), 대시간 전류계 (chronoamperometry, CA), 순환 전압전류계(cyclic voltammetry), 네모파 전압전류계(square wave voltammetry, SWV), 및 임피던스계(impedance) 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0066] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 시료는 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 복수, 양수, 정액, 누액, 뇌척수액, 골수, 흉수, 활액, 림프, 뇨, 조직 생검 및 세포로 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0067] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명은 전술한 코로나 바이러스 검출용 키트를 이용하여 코로나 바이러스를 검출하는 방법을 포함한다.

[0068] 코로나 바이러스를 검출하는 방법은 표면에 프라이머가 부착된 자성나노입자를 준비하는 단계; 상기 표면에 프라이머가 부착된 자성나노입자를 코로나 바이러스를 포함하는 시료 중에 첨가하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하여 표면에 증폭산물을 갖는 자성나노입자를 얻는 단계; 상기 표면에 증폭산물을 갖는 자성나노입자를 개구부가 구비된 반응기 중에 넣고, 상기 개구부를 도전성기판으로 덮고, 상기 도전성기판의 일측에서 상기 반응기 내로 제1 조건으로 자기장을 인가하는 단계; 상기 반응기 중으로 루세늄(Ru), 철(Fe), 은(Ag), 구리(Cu), 니켈(Ni), 카드뮴(Cd) 및 아연(Zn) 중 어느 하나 이상을 포함하는 금속이온을 투입한 후 제2 조건으로 자기장을 인가하는 단계; 및 상기 반응기 내에는 제1 및 제2 전극을 구비시키고, 상기 제1 및 제2 전극과, 상기 도전성 기판을 함께 이용하여 전기화학적 신호를 측정하는 단계를 포함한다.

[0069] 상기 표면에 프라이머가 부착된 자성나노입자를 준비하는 단계는, 산화철로 이루어진 코어부를 제조하고, 상기 코어부의 표면에 실리콘을 포함하는 버퍼부를 구비시켜 예비나노입자를 제조하고, 상기 버퍼부의 외면에 아미노기($-NH_2$) 및 티올기 중 어느 하나 이상로 관능화시킨 후, 금을 포함하는 쉘부를 형성시켜 자성나노입자를 제조하는 것을 포함하고, 상기 자성나노입자와 프라이머를 혼합하고, 염에이징(salt aging)을 수행하는 것을 포함할 수 있다.

[0070] 상기 자성나노입자부는 상기 자성나노입자를 제조한 후, 표면에 프라이머를 부착하여 형성할 수 있다.

[0071] 상기 자성나노입자를 제조하는 것은, 염화철용액을 철 전구체로 이용하고, 환원제 및 용매의 기능을 하는 글리콜(glycol) 등을 이용한 폴리올 반응에 의하여 산화철로 이루어진 코어부를 제조한다. 이어서, 상기 코어부의 표면에 실리카 전구체를 이용하여 실리카를 포함하는 버퍼부를 형성시킨 후, 금 나노입자를 시드(seed)로 부착시킨 후, 금을 성장시켜 쉘부를 제조할 수 있다. 코어부에서 버퍼부까지 형성된 형태인 예비나노입자의 표면에는 금 나노입자를 부착시킬 수 있는데, 이때, 아민기 및 티올기 중 어느 하나를 이용하여 관능화시킨 후 부착시킬 수 있다.

[0072] 구체적으로, 아민기 또는 티올기를 포함하는 용액 중에 상기 예비나노입자를 함침시킨 후, 60℃ 내지 90℃의 온도에서 2시간 내지 10시간 동안 초음파처리하고, 초음파처리가 완료된 후 물을 이용하여 세척하고, 세척이 완료된 예비나노입자는 물 중에 분산시켜 예비나노입자 분산물을 제조하고, 상기 예비나노입자 분산물을 금 나노입자를 혼합한 후, 염화금산($HAuCl_4$) 용액을 첨가하여 쉘부를 형성시켜 자성나노입자로 제조하는 것을 포함할 수 있다. 이때, 상기 금 나노입자는 평균직경이 0.5nm 내지 5nm의 입자형태로 미리 준비하여 시드(seed)로 이용할 수 있다.

[0073] 상기 초음파처리는 60℃ 내지 90℃의 온도에서 2시간 내지 10시간 동안 수행함으로써, 상기 아민기 및 티올기 중 어느 하나를 상기 예비나노입자의 표면에 균일하게 부착시킬 수 있으며, 이어지는 금 나노입자를 부착시키는 과정에서의 공정효율을 향상시킬 수 있다. 또한, 시드로 이용되는 금 나노입자는 평균직경이 0.5nm 내지 5nm일 수 있는데, 0.5nm 미만이면 금 나노입자가 상기 예비나노입자의 표면 일부에서 뭉치거나 엉김 등의 현상이 발생되어 문제되고, 5nm 초과이면 쉘부의 두께를 제어하기 어려워 문제된다. 구체적으로, 상기 금 나노입자는 약 1nm 내지 5nm, 또는 약 0.5nm 내지 4nm, 또는 약 0.5nm 내지 3nm일 수 있다.

[0074] 상기 프라이머는 단일 티올기 및 단일 아미노기 중 어느 하나로 개질된 프라이머를 포함할 수 있다. 상기 프라이머에서, 특정 단일 염기 서열의 3' 말단과 반응할 수 있는 5' 말단은 이중 티올(-SH)기 및 아미노기 중 어느 하나가 이중으로 결합되어 있으므로, 상기 티올기 또는 아미노기의 이중 결합을 단일 결합으로 가공할 수 있다.

[0075] 상기 개질된 프라이머는 상기 자성나노입자와 혼합하여 상기 자성나노입자 표면에서 결합될 수 있다. 이때, 상

기 개질된 프라이머의 염기 서열의 비특이적 부착과 엉김 현상 등이 발생되는 것을 방지하기 위하여 염에이징(salt aging)를 수행할 수 있다.

[0076] 상기 염에이징은 상기 자성나노입자와 상기 개질된 프라이머를 교반기에 넣고 혼합한 후, 제1 용액과 제2 용액을 5:1 내지 30:1의 부피비로 상기 교반기 중에 복수회 첨가하고, 초음파처리 하는 것을 포함할 수 있다. 상기 제1 용액은 염화나트륨용액, 인산완충생리식염수, 및 초순수를 혼합하여 구비되고, 상기 제2 용액은 인산완충생리식염수, 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate) 및 초순수를 혼합하여 구비될 수 있다.

[0077] 구체적으로, 상기 염에이징은 순차적으로 1차 에이징과 2차 에이징을 포함할 수 있다. 상기 1차 에이징은 2시간 내지 6시간 동안 수행될 수 있으며, 매 1시간 마다 상기 제1 및 제2 용액을 첨가하여 초음파처리할 수 있다. 상기 2차 에이징은 4시간 내지 12시간 동안 수행될 수 있으며, 상기 1차 에이징에서 사용된 제1 및 제2 용액에 대해서 각각 부피비로 1.5배 내지 3배를 이용하고, 매 2시간 간격으로 상기 제1 및 제2 용액을 첨가하여 초음파처리할 수 있다. 상기 염에이징은 조건을 달리하여 1차 에이징 및 2차 에이징으로 수행함으로써, 공정효율을 향상시킬 수 있다.

[0078] 또한 상기 프라이머는 티올기 외에 아미노기가 부착된 형태로 개질될 수 있다. 이때 5' 말단에 아미노기로 개질된 리버스 프라이머는 pH를 조절하여 양성자를 얻은 후 음전하를 띄는 금 표면과 정전기적으로 상호 결합하여 상기 자성나노입자의 표면에 결합할 수 있다.

[0079] 상기 제1 및 제2 조건으로 자기장을 인가함으로써, 상기 자성나노입자부의 적어도 일부가 상기 반응기의 개구부 측으로 전달되어 상기 도전성 기판과 접촉할 수 있다. 상기 제1 조건은 1분 내지 10분간 0.1T 내지 1T의 조건을 포함하고, 상기 제2 조건은 12분 내지 30분간 0.1T 내지 1T의 조건을 포함할 수 있다.

[0080] 상기 제1 조건은 자성나노입자부를 1차적으로 도전성기판에 부착되도록 하기 위한 것이고, 상기 제2 조건은 루세늄(Ru), 철(Fe), 은(Ag), 구리(Cu), 니켈(Ni), 카드뮴(Cd) 및 아연(Zn) 중 어느 하나 이상을 포함하는 금속이온을 투입한 후, 상기 금속이온이 흡착된 자성나노입자부를 상기 도전성 기판 상으로 이동시키기 위한 것이다. 별법으로, 상기 금속이온 대신, 메틸렌블루 또는 니트로기를 포함하는 화합물을 투입할 수 있다.

[0081] 상기 전기화학적 신호를 측정하는 단계에서, 상기 제1 전극은 기준전극(reference electrode)을 포함하고, 상기 도전성기판은 작업전극(working electrode)을 포함하고, 상기 제2 전극은 상기 기준전극, 및 상기 작업 전극으로부터 발생하는 전자 밸런스를 조절하는 카운터전극(counter electrode)을 포함하는 3-전극 모듈로 수행될 수 있다.

[0082] 상기 제1 또는 제2 전극은 금(Au), 코발트(Co), 백금(Pt), 은(Ag), 탄소나노튜브(carbon nanotube), 그래핀(graphene), 및 탄소(Carbon) 중 어느 하나 이상으로 이루어지고, 상기 도전성 기판은 산화인듐주석(ITO: indium tin oxide), ZnO, SnO_2, In_2O_3, $CdSnO_4$, 탄소나노튜브를 포함하는 탄소기판 소재, 불소가 첨가된 주석 산화물(FTO: fluorine-doped tin oxide) 및 알루미늄이 첨가된 아연 산화물(AZO: aluminumdoped zinc oxide) 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0083] 상기 전기화학적 신호 측정은 펄스 전압전류계(differential pulse voltammetry, DPV), 양극 벗김 전압전류계(anodic stripping voltammetry, ASV), 대시간 전류계 (chronoamperometry, CA), 순환 전압전류계(cyclic voltammetry), 네모파 전압전류계(square wave voltammetry, SWV), 및 임피던스계(impedance) 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0084] 구체적으로, 상기 제1 전극은 Ag/AgCl을 포함하는 기준 전극이고, 상기 제2 전극은 Pt를 포함하는 카운터 전극이고, 상기 도전성기판은 ITO를 포함하는 작업전극으로, 3-전극 모듈로 수행되고, 상기 전기화학적 신호 측정은 펄스 전압전류계(differential pulse voltammetry, DPV)을 포함할 수 있다.

[0085] 상기 전기화학적 신호 측정에 의하여 초기 전류 신호와 최종 전류 신호를 측정할 수 있는데, 초기 전류 신호는 1차 전류 신호를 의미하고, 최종 전류 신호는 전류 신호가 거의 변화하지 않은 상태로 상기 초기 전류 신호보다 높은 값을 나타낸다.

[0086] 상기 자성나노입자부의 표면에서 증폭밀도가 높고, 또한 증폭된 자성나노입자부의 개수가 많을수록 금속이온과의 흡착량이 증가되게 된다. 예컨대, 짧은 염기 서열이 부착된 자성나노입자부 대비 긴 염기 쌍을 이루는 자성나노입자부의 농도가 낮은 경우, 초기 전류량 대비 최대 전류와의 차이가 커진다. 구체적으로, 초기 전류 신호는 짧은 염기 서열이 부착된 자성나노입자부 와, 긴 염기 쌍을 이루는 자성나노입자부가 무작위 배열로 배치된 형태에서 전류를 인가하여 신호를 측정하기 때문으로, 도전성기판의 표면에는 긴 염기 쌍을 이루는 자성나노입

자부의 농도가 낮게 존재하고 따라서 흡착된 금속이온에 의한 전기신호의 정도가 약하게 나타난다. 반면, 전류를 반복적으로 인가함에 따라, 긴 염기 쌍을 이루는 자성나노입자부는 도전성기판의 표면에 인접하게 정렬되고, 상대적으로 짧은 염기 서열이 부착된 자성나노입자부는 상기 긴 염기 쌍을 이루는 자성나노입자부에게 자리를 내주게 되어 상기 도전성기판에서 멀어지게 되는 재배열 현상이 발생할 수 있다. 이와 같은 전류 인가를 반복적으로 수행함에 따라, 전류 신호는 어느정도 일정한 상태로 유지되는 최종 전류 신호에 도달하게 되고, 상기 초기 전류 신호와 최종 전류 신호의 차이에 의하여 표적핵산을 효과적으로 검출할 수 있다.

[0087] 본 발명의 실시예에 따른 자성나노입자를 이용한 표적핵산 검출용 키트 및 검출 방법으로는 상기 시료 중 표적핵산의 농도는 aM 이하인 경우에도 검출할 수 있다.

[0088] 추가로 이러한 초고 민감도 질병 검지 시스템은 다가오는 미래에 등장할 다양한 질병에 대한 신속정확한 진단검사 기술 개발의 핵심적인 역할을 할 수 있다. 본 발명에서는 검증하기 위한 질병 모델로 COVID-19의 감염병을 본 발명의 일 실시예의 검출 방법을 적용하여 가능성을 확인할 수 있었다. 현재까지 분자진단(Molecular-based assay), 항체진단(Serology-based immunoassay), 항원진단(Antigen-based assay) 등 다양한 COVID-19 진단 기술들이 개발되었고, 그 중 정확도민감도특이도가 매우 높고 감염 초기에 검출 가능하여 분자진단 기술이 COVID-19 감염병 진단의 표준기술(gold standard)로 간주하고 있다. 이러한 분자진단 기술에 본 발명의 검출 방법을 접목시킬 수 있으며, 이는 기존의 분자진단 기술의 장점들을 한층 더 끌어올림과 동시에 높은 초고 민감도를 갖는 진단 방법을 제공할 수 있다. 이를 바탕으로 PCR에서 반복적인 사이클 횟수를 획기적으로 줄이면서 높은 정확도를 가지고 신속하게 질병을 진단할 수 있는 신속진단 시스템을 구축할 수 있다. 본 발명에 의하면 자성나노입자 표면에 프라이머를 부착한 자성나노입자부를 사용함으로써 PCR 과정을 10분 이내로 줄일 수 있으며, 이로 인해 검출 시간을 현저히 단축하여 긴박한 COVID-19 감염병의 현장 실시간 진단시스템으로써 활용될 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 또한, 자성나노입자의 자기적 특성을 이용한 수집 및 DPV를 이용한 전기화학 시그널 검출로 인해 기존 분자진단의 검출한계인 fM~pM 수준을 뛰어넘어 aM 및 그 이하의 농도 범위까지 검출할 수 있다. 또한 본 발명의 검출 방법은 COVID-19 모델에 대한 효과를 토대로 미래 질병(예, 다양한 암, 바이러스유발질병)의 진단검사 기술 개발로 확대되어 나아갈 것으로 기대할 수 있다.

[0089] 이하 본 발명의 제조예 및 실시예를 기재한다. 그러나, 하기 실시예들은 본 발명의 바람직한 일 실시예일뿐 본 발명의 권리 범위가 하기 실시예들에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0090] [제조예 1] (산화철 나노입자의 제조)

[0091] 산화철 나노입자는 폴리올 방법을 통하여 합성하였다. 철 이온 전구체로 $FeCl_3.6H_2O$(iron chloride hexahydrate)를 이용하였고, 환원제 및 용매의 역할을 동시에 하는 에틸렌 글리콜(ethylene glycol)과, 가수분해를 보조하는 NaOAc(sodium acetate), H_2O를 각각 이용하였다. 에틸렌 글리콜 50 mL가 담긴 3구 플라스크에 $FeCl_3.6H_2O$는 2 mmol, NaOAc 6 mmol, H_2O 150 mmol을 넣고, 기계적으로 교반(mechanical stirring)하면서 15분 동안 200℃까지 빠르게 가열하였다. 200℃에서 3시간 30분 동안 반응시간을 유지하고, 이어서 상온으로 냉각시킨 후 에탄올을 이용하여 여러 번 세척해서 H_2O에 분산시켜 산화철 나노입자를 제조하였다.

[0092] [제조예 2] (금 나노입자의 제조)

[0093] 금 나노입자는 금 이온 전구체로 $HAuCl_4.3H_2O$(gold chloride trihydrate)를 이용하였고, 환원제로 $NaBH_4$(sodium borohydride), 안정화제로 시트르산 삼나트륨(trisodium citrate), 용매로 H_2O는 용매로 각각 사용하여 반응을 수행하였다. 우선 H_2O 50mL에 $HAuCl_4.3H_2O$ 0.25 mM, 시트르산 삼나트륨 0.25 mM으로 농도를 맞춘 후, 이후에 차가운 H_2O 1.5 mL ($NaBH_4$, 0.1 M)을 첨가하였다. 이때, 온도는 상온을 유지하면서, 마그네틱 바를 이용하여 자기적 스터어링 반응 내내 수행하였다.

[0094] [제조예 3] (자성나노입자 제조)

[0095] 제조예 1에서 제조된 산화철 나노입자를 이용하여 암모니아 촉매하의 TEOS 가수분해 반응을 이용한 스토버(Stφber) 방법을 이용하여 산화철 나노입자의 표면에 실리카를 형성하였다. 용매로는 에탄올과 H_2O을 이용하였고, 안전화제로는 PVP(polyvinylpyrrolidone), 촉매로는 NH_4OH(ammonium hydroxide solution), 실리카 전구체로는 TEOS(tetraethyl orthosilicate)를 각각 이용하였다. 반응기 중에 에탄올 50 mL, H_2O 7.5mL, NH_4OH 2.5mL, PVP 400mg을 투입하여 혼합하였다. 이어서, 제조예 1에서 제조된 산화철 나노입자 25mg을 첨가하였다. 산화철 나노

입자가 섞인 균일한 혼합 용액에 TEOS 0.050mL을 넣어준 뒤, 상온에서 1시간 30분 동안 셰이킹(shaking)을 수행하였다. 반응이 완료된 후 에탄올을 이용해서 여러 번 세척한 후 제조된 예비자성나노입자(표면에 실리카가 형성된 자성나노입자) 에탄올 10 mL에 분산시켰다.

[0096] 제조예 2에서 제조된 금 나노입자를 예비자성나노입자에 부착하기 위하여 APTES(3-Aminopropyl)triethoxysilane)를 아민기(-NH_2)의 전구체로 이용하고, 2-프로판올을 용매로 사용하였다. 예비자성나노입자가 분산된 에탄올 4mL을 2-프로판올 10 mL에 용매 치환하고, APTES를 0.050mL을 넣어 셰이킹을 수행하였다. 이어서, 80℃에서 4시간 동안 초음파처리(sonication)하여 반응을 수행하였다. 반응이 완료된 후, 제조된 아민기가 표면에 기능화된 예비자성나노입자를 H_2O을 이용해서 세척하고 H_2O 5mL에 분산시켰다. 아민기가 표면에 기능화된 예비자성입자가 분산된 H_2O 5mL과 금 나노입자를 30 mL를 함께 혼합한 후, 16시간 동안 셰이킹을 수행하였다. 이어서, PVP 1 wt%로 녹아있는 H_2O를 안정화제로 균일하게 셰이킹을 진행하여 표면에 금 나노입자가 부착된 예비자성나노입자를 제조하였고, H_2O를 이용해서 세척하고 H_2O 20mL에 분산시켰다. 여기서, 상기 금 나노입자는 예비자성나노입자와 상기 아민기를 통하여 결합되어 있다.

[0097] 금 나노입자 성장 용액은 $HAuCl_4.3H_2O$ 45mg과 K_2CO_3 (potassium carbonate) 50mg을 물 500mL에 녹인 후 16시간 동안 숙성시킨 후 금 나노입자 성장 용액으로 사용하였다. 아민기가 표면에 기능화된 예비자성입자 1mg을 PVP (polyninylpyrrolidone, 55,000 kDa) 1 wt% 2mL에 분산시킨 후, 금 나노입자 성장 용액 80mL, BSPP (Bis(p-sulfonatophenyl)phenylphosphine dihydrate dipotassium salt) 1mg/mL 3mL과 혼합하였다. 이어서, 포름알데히드 37 wt% 2 mL을 주입하고 2시간 셰이킹을 수행하여, 코어부는 산화철입자, 쉘부는 금으로 이루어진 자성나노입자를 제조하였다. 제조된 자성나노입자는 H_2O를 이용해서 세척하고 H_2O 20mL에 분산시켰다. 도 5는 제조예 3의 자성나노입자의 모식도와 TEM 이미지이다. 도 6는 제조예 3의 자성나노입자의 SEM 이미지이다. 도 7은 제조예 3의 자성나노입자와, 제조예 1에 따른 산화철 나노입자(코어)의 크기를 나타낸 그래프이다. 도 8은 제조예 3의 자성나노입자의 자기장 특성을 확인한 결과이다.

[0098] 도 5 내지 도 7을 참조하면, 산화철 나노입자의 직경은 대략 191.8 nm 정도이고, 표면에 금이 형상된 자성나노입자의 직경은 대략 237 nm임을 확인할 수 있었으며, 입자크기도 고르게 형성됨을 확인할 수 있었다. 도 8을 참조하면, 필드 (field)가 0일 때의 잔류 자기(remanence)는 0을 나타냄을 확인할 수 있었고, 보자력(coercivity)은 0으로 작게 측정되어 증폭해야 하는 것으로 뭉침이 발생하지 않음을 확인할 수 있었다. 또한, 최대 자기장은 대략 16으로 높은 값을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0099] [제조예 4] (개질된 프라이머가 결합된 자성나노입자 제조)

[0100] 위에서 제조한 자성나노입자에 코로나 바이러스 증폭을 위한 프라이머를 부착하여 자성나노입자를 기능화하였다.

[0101] 우선 5' 말단에 2중 티올기가 있는 리버스 프라이머 및 포워드 프라이머를 단일 티올기로 가공하였다.

[0102] 모노나트륨 인산염(sodium phosphate monobasic) 0.907g(0.0756M)과 다이소듐포스페이트(sodium phosphate dibasic) 3.285g(0.2314M)을 초순수(UPW, Ultrapure water) 100mL에 첨가하여 0.307M의 인산완충생리식염수(PBS, phosphate buffer solution)을 제조하였다. 1,4-다이티올트레이톨(DTT, 1,4-dithiolthreitol) 0.143g($0.927x10^{-3}$ moles)을 2M NaOH 150㎕ 와 함께 0.307M의 PBS 5 mL에 넣어 0.18M DTT 용액 5.150 mL을 제작하였다. 단일 티올(thiol) 상태로 염기 서열을 가공하기 위해 100㎕M의 티올화된 프라이머 용액 120㎕L(12nmole)와 앞서 제작한 DTT 용액 150㎕L를 알루미늄 호일로 감싸진 마이크로 튜브에 주입한 후 1시간 동안 기계적으로 교반하였다.

[0103] NAP-5 column을 준비하고 10 mL의 UPW를 차례대로 3 mL, 3 mL, 3 mL, 1 mL씩 NAP-5 column 내부로 주입하여 평형 반응을 진행하였다. 1시간 동안 기계적 스터어링을 가한 용액을 NAP-5 column에 주입하고 column 내 용액 부피가 500 ㎕L가 되게끔 UPW를 추가로 주입하였다. 용액이 모두 투과한 후 마이크로 튜브를 칼럼(column) 하단에 배치하였다. 추가로 UPW 500 ㎕L를 주입하여 마이크로 튜브에 500 ㎕L의 결과물이 완전히 흘러나올 때까지 받아주었다. 받아준 용액의 3 ㎕L를 다른 마이크로 튜브에서 UPW 297 ㎕L와 혼합 후, 이 혼합 용액을 300 ㎕L 석영셀(quartz cuvette)에 옮겨서 UV-Vis 분광광도법으로 흡광도(OD, Optical Density) 값을 측정하였다. 200~400 nm 파장대에서 총 3번 측정하여 260 nm 파장에서의 흡광도(A260)의 평균값을 찾고, 몰농도(Molarity, M)를 계산하였다. 몰농도 계산은 아래의 식 1에 의해 계산되었다.

[0104] [식 1]

[0105] $$M = \frac{A_{260}}{Extinction\ Coefficient \times Path\ Length(1\,cm)} \times Dilution\ Factor(100)$$

[0106] 계산된 몰농도로부터 프라이머 4 nmole을 추출하는데 필요한 양을 계산한 후, 해당 양만큼의 혼합 용액을 여러 개의 마이크로 튜브 각각에 분배하였다. 그 후 각 튜브에 용액의 부피가 500 μL가 되도록 UPW로 채웠다.

[0107] 제조예 3에서 준비한 자성나노입자 10 μg을 마이크로 튜브에 옮긴 뒤 튜브 하단에 네오디움 자석(약 3000 내지 5000Gauss)을 두고 자성나노입자를 15분 동안 수집하였다. 그 후 상층액을 제거하고 수집된 자성나노입자를 UPW 250 μL에 분산시켰다.

[0108] 코니칼 튜브(Conical tube)에서 UPW 10 mL에 소듐 도데실 설페이트(SDS, sodium dodecyl sulfate) 100 mg을 넣고 볼텍싱시켜 1% (w/v) SDS 용액을 제작하였다. 위에서 제조한 4 nmol의 단일 티올기를 갖는 프라이머 500 μL와 세척된 자성나노입자 250 μL, 및 1% SDS용액 7.57 μL를 혼합하여 쉐이커에 장착하고, 1 시간 동안 쉐이킹하면서 10 분마다 30 초씩 초음파 처리하였다. 쉐이킹을 1 시간 동안 수행한 후, 초음파 처리 없이 추가로 15 시간 동안 쉐이킹하였다.

[0109] 그 후 프라이머 염기 서열의 비특이적 부착 및 엉김 현상을 제거하기 위하여 염-에이징(salt-aging)을 진행하였다. 염-에이징 용액(3.322 M NaCl)은 5 M NaCl 용액 6.644 mL를 UPW 3.356 mL와 혼합하여 제작하였다. PBS(0.1 M, pH 7.4) 500 μL를 SDS 10 mg과 함께 UPW 9.5 mL에 첨가하고 혼합하여 PBS.SDS 용액(5 mM PB, 0.1% SDS, pH 7.2)을 제작하였다. PBS.SDS 용액 84.18 μL를 튜브에 넣고 30분 동안 쉐이킹한 후, 여기에 PBS.SDS 용액 1.69 μL와 염-에이징 용액 15.21 μL를 첨가하고 30 초 동안 볼텍싱 및 30 초 동안 초음파 처리한 후 2시간 동안 쉐이킹하였다. 여기에 PBS.SDS 용액 1.69 μL와 염-에이징 용액 15.21 μL를 첨가하고 볼텍싱, 초음파 처리 및 쉐이킹 과정을 4 번 반복하였다. 여기에 다시 PBS.SDS 용액 3.38 μL와 염-에이징 용액 30.42 μL를 첨가하고 30 초 동안 볼텍싱 및 30 초 동안 초음파 처리한 후 1 시간 쉐이킹을 하였다. 여기에 PBS.SDS 용액 3.38 μL와 염-에이징 용액 30.42 μL를 첨가하고 볼텍싱, 초음파 처리 및 쉐이킹 과정을 3 번 반복하였다. 이 전체 과정은 총 8 시간 동안 진행되었고, PBS.SDS 용액 16.9 μL 및 염-에이징 용액 152.1 μL가 첨가되었다. 이 후 8 시간 동안 더 쉐이킹하여 염-에이징이 충분히 진행되도록 하였다. 최종 용액은 pH 7.2, 0.5 M NaCl, 0.5 mM PBS, 0.0175% SDS로 구성되었다.

[0110] 염-에이징이 끝난 후 프라이머가 부착된 자성나노입자만 추출하기 위해 워싱 과정을 진행하였다. 1 분 간 초음파 처리한 후 시험관의 하단에 자석을 두고 18 분 동안 자성나노입자를 가라앉혔다. 이 후 상층액을 제거하고 UPW 1 mL를 첨가한 후 볼텍싱 및 초음파 처리를 각각 30 초 동안 수행한 후 다시 자석을 이용하여 18분 동안 자성나노입자를 수집하였다. 이 워싱 과정을 총 3번 반복한 후, 용액에 UPW 10 μL를 첨가하고 0.2 mL PCR 튜브에 옮겼다. DynaMag PCR Magnetic Separator로 18분 동안 프라이머가 부착된 자성나노입자를 수집한 후, 상층액을 제거하고 UPW 5 μL를 첨가한 뒤 30초 동안 초음파 처리하였다.

[0111] [실시예 1]

[0112] **1. 코로나 바이러스에 특이적 염기서열을 갖는 자성나노입자**

[0113] 리버스 프라이머가 또는 포워드 프라이머 부착된 자성나노입자 5 μL, 100 μM 포워드 프라이머 또는 리버스 프라이머 단일 서열 10 μL, 타겟 단일 서열(COVID-19 cDNA, 상보적 DNA) 2 μL, 10X High Fidelty PCR Buffer 10μL, 10 mM dNTP 혼합물 1μL, 50 mM $MgSO_4$ 2 μL, 플래티넘 Taq DNA 중합효소 High Fidelty(5 U/μL) 0.2 μL, 및 UPW 24.8 μL를 PCR 튜브에 넣고, 1분 동안 피펫팅(pipetting)하여 모든 용액을 균일하게 혼합하였다. 이후 중합 효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 35회 반복한 후, 최종적으로 증폭된 산물이 부착된 자성나노입자를 3회 세척하고 UPW 5 μL에 분산시켰다.

[0114] 여기서, PCR의 설정은 각각의 DNA 서열의 크기에 따라 다르게 설정되었다. DNA 서열은 COVID-19 바이러스의 특정 마커인 N(Nucleocapsid protein), E(Envelope protein), 및 RdRP(RNA-dependent RNA Polymerase)의 서열을 사용하였고, 각각의 크기는 67mer, 113mer, 및 100mer였다. 각각의 DNA 서열의 단일 염기서열은, 5'-TTACAAACATTGGCCGCAAATTGCACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAGCGTTCTTCGGAATGTCGCGC-3'(N), 5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGTACTTCTTTTTCTTGCTTTCGTGGTATTCTTGCTAGTTACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCGATTGTGTGCGTAC TGCTGCAATAT-3' (E), 5'-

GTGAAATGGTCATGTGTGGCGGTTCACTATATGTTAAACCAGGTGGAACCTCATCAGGAGATGCCACAACTGCTTATGCTAATAGTGTTTTTAACATTTGT-3' (RdRP)이다.

[0115] 포워드 프라이머가 부착된 자성나노입자를 사용하는 경우에는 그와 상보적인 리워드 프라이머 및 타겟 단일 서열을 사용하고 나머지 조건을 동일하게 적용하였다.

[0116] 또한 이 DNA 서열에 대한 정보는 하기의 표 1 및 도 9에 나타냈다.

표 1

[0117]

유전자	프라이머 이름	기관	유전자 위치**	프라이머 종류	서열(5' →3')
N2	2019-nCoV_N2-R	CDC*(U.S)	29230-29213	포워드 프라이머	GCG CGA CAT TCC GAA GAA
				개질된 포워드 프라이머***	5' Thiol C6 S-S-A15- GCG CGA CAT TCC GAA GAA
	2019-nCoV_N2-F		29164-29183	리버스 프라이머	TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA
				개질된 리버스 프라이머***	5' Thiol C6 S-S-A15-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA
E	E_Sarbeco_R2	Charite (Germany)	26381-26360	포워드 프라이머	ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A
				개질된 포워드 프라이머***	5' Thiol C6 S-S-A15- ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A
	E_Sarbeco_F1		26269-26294	리버스 프라이머	ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT
				개질된 리버스 프라이머***	5' Thiol C6 S-S-A15-ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT
RdRP	RdRP_SARSr-R1		15530-15505	포워드 프라이머	CAR ATG TTA AAS ACA CTA TTA GCA TA
				개질된 포워드 프라이머***	5' Thiol C6 S-S-A15- CAR ATG TTA AAS ACA CTA TTA GCA TA
	RdRP_SARSr-F2		15431-15452	리버스 프라이머	GTG ARA TGG TCA TGT GTG GCG G
				개질된 리버스 프라이머***	5' Thiol C6 S-S-A15- GTG ARA TGG TCA TGT GTG GCG G

[0118] 상기 표 1에서 *CDC는 질병 통제 및 예방센터(Center for Disease Control and Prevention)이고, **는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나 바이러스 2인 Wuhan-Hu-1의 전체 유전자에서 분리한 특정 뉴클레오티드 서열이다. ***는 리버스 프라이머 또는 포워드 프라이머의 5' 말단을 개질하고 개질된 5' 말단에 AAAAAAAAAAAAAAA(A_{15} 스페이서, A는 아데닌)를 부착하여 티올로 개질된 C6 S-S 세트로 변형된 개질 리버스 프라이머 또는 포워드 프라이머이다. 또한 표에서 SARS-CoV-2 RNA를 역전사하여 생성된 cDNA(상보적 DNA)는 PCR 증폭의 주형으로 작용한다. 따라서 역전사하는 RNA에 따라 주형 cDNA와 혼성화하는 프라이머는 리버스 프라이머 또는 포워드 프라이머이고, 여기에서 cDNA 가닥에 상보적인 DNA 가닥과 혼성화되는 프라이머는 포워드 프라이머 또는 리버스 프라이머이다.

[0119] 상기의 선택된 타겟 염기 서열(N, E, RdRP)은 FDA에서 긴급 승인한 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, 역전사 후- 중합효소연쇄반응)기반 COVID-19 진단 키트에 대한 자료(도 10 및 11)를 기반으로 한 것이다. 도 10 및 11에서 a)는 한계 검출(LoD, Limit of Detection)이고, b)는 사이클 임계값(Ct, Cycle Threshold)이다. 이 도면에서 ORF는 open reading frame; RdRP는 RNA-dependent RNA polymerase; S는 스파이크; E는 envelope; N은 누클레오캡시드의 약어이다.

[0120] 자성나노입자에 개질된 프라이머를 부착하기 전과 후의 크기를 비교하여 표 2에 나타냈다. 각 샘플에 대하여 5번씩 실험한 후 직경을 Dynamic Light Scattering (DLS)로 측정하였다.

표 2

[0121]

자성나노입자 종류	유체역학적 직경(d.nm)	다분산 지수(PDI)
기능화된 자성나노입자 1	290.3	0.096
기능화된 자성나노입자 2	277.4	0.264
기능화된 자성나노입자 3	289.4	0.253
기능화된 자성나노입자 4	300	0.152
기능화된 자성나노입자 5	294.1	0.279
평균 값	**290.2±8.3**	**0.209±0.080**
자성나노입자 1	233	0.141

자성나노입자2	245.5	0.002
자성나노입자3	215.6	0.260
자성나노입자4	272	0.291
자성나노입자5	255.6	0.046
평균 값	**244.3±21.5**	**0.148±0.127**

[0122] 여기에서 개질된 프라이머는 리버스 프라이머에 또는 포워드 프라이머 금과의 결합을 위해 5' 말단에 티올기를 부착시키고, 자성나노입자 표면과의 거리를 확보하여 타겟 단일 서열이 잘 결합하도록 하기 위하여 A서열을 15mer(A_{15} 스페이서) 부착한 것이다. 여기에서 5' 말단의 티올기는 자성나노입자 표면의 금과 환원반응을 통해 자유 티올기의 강한 결합을 형성하고, 개질된 프라이머를 자성나노입자 표면에 결합시킨다. 개질된 프라이머는 COVID-19 cDNA의 특정 서열에 상보적으로 결합하여 nSLAM 반응으로 5' 말단에서 3' 말단으로 중합된다.

[0123] 도 9는 COVID-19 검지를 위한 nSLAM용 프라이머 세트와 COVID-19 바이오마커의 유전자 위치, 및 자성나노입자 표면에 부착된 프라이머와 COVID-19 cDNA의 결합 양상을 나타낸다. 사용되는 프라이머 세트의 출처는 각각 2019-nCoV_N2(미국 CDC), E_Sarbeco(독일 Charite), 그리고 RdRP_SARSr(독일 Charite)이다.

[0124] **2. 개질된 리버스 프라이머가 부착된 자성나노입자(기능화된 자성나노입자)를 이용한 nSLAM 메커니즘**

[0125] 기능화된 자성나노입자의 나노입자 표면 포집화 증폭 (nanoparticle surface localized amplification, nSLAM) 첫 사이클은 타겟 DNA가 자성나노입자 표면의 리버스 프라이머와 상보적으로 결합한다. 이 후 타겟 DNA를 주형 가닥으로 하여 DNA 중합효소와 dNTP를 매개로 주형 가닥의 3' 말단까지 중합된다.

[0126] nSLAM의 두 번째 사이클에서는 주형 가닥이 자성나노입자 표면에서 분리되고, 자성나노입자의 표면에는 주형 가닥과 상보적인 단일 DNA 가닥이 남는다. 여기에 특정 서열의 포워드 프라이머가 상보적으로 결합하고, 자성나노입자 표면의 단일 DNA 가닥을 주형으로 하여 DNA 중합효소와 dNTP를 매개로 다시 끝까지 중합된다.

[0127] nSLAM의 세 번째 사이클에서는 포워드 프라이머를 시작으로 중합된 새로운 단일 DNA 가닥이 자성나노입자 표면에서 분리되고 주변의 자유 리버스 프라이머와 결합하여 다시 중합된다. 자성나노입자에 남아있는 중합된 단일 DNA 가닥도 주변의 자유 포워드 프라이머와 결합하여 다시 중합된다.

[0128] 이 과정이 반복되어 nSLAM cycle이 거듭될수록 동시에 중합되는 DNA 가닥이 많아지고, 자성나노입자의 표면에 포집된 이중가닥 DNA가 증가한다. 또한 타겟 DNA의 이중 가닥과 단일가닥이 동시에 존재하여 복합적 DNA 형태로 존재한다.

[0129] 도 12는 SARS-CoV-2(이하, COVID-19)을 이용하여 기능화된 자성나노입자 기반의 nSLAM 반응 메커니즘을 단계별로 도시하였다. 도 12의 1, 2 단계는 nSLAM의 첫번째 사이클이고 SARS-CoV-2의 cDNA가 자성나노입자의 개질된 리버스 프라이머와 상보적으로 결합한 후 DNA 중합되는 모습이다. 도 12의 3 내지 5 단계는 nSLAM의 두 번째 사이클이고, 주형 가닥이 분리된 후 자성나노입자에 부착된 단일 DNA에 포워드 프라이머가 결합하여 다시 중합되는 모습이다. 도 12의 6 내지 7단계는 nSLAM 세 번째 사이클이고, 포워드 프라이머에서 중합된 단일 가닥이 분리되어 주변의 리버스 프라이머와 결합하고 자성나노입자에 남아있는 단일 가닥은 주변의 새로운 포워드 프라이머와 결합하여 다시 중합이 진행되는 모습이다.

[0130] 이때, 7 단계의 주황색, 빨간색으로 이루어진 DNA 가닥은 타겟 DNA 서열과 동일한 가닥이며, 이를 주형으로 증폭된 이중 가닥은 타겟 DNA 서열의 이중 가닥과 동일하게 된다. 반면 남색, 하늘색, 회색으로 이루어진 긴 단일 가닥을 주형으로 중합된 DNA는 부분적으로 이중 가닥을 가진 복합적 DNA 형태를 지닌다. 따라서 8단계에서 대부분의 증폭 산물들은 타겟 DNA 서열의 이중 가닥 형태이지만 소수의 산물들은 긴 단일 가닥 위에 특정 부위에만 이중 가닥으로 존재하는 형태를 가지고 있다.

[0131] [실시예 2]

[0132] **1. nSLAM 증폭 산물들을 포함하는 자성나노입자의 전기 화학적 검지**

[0133] 타겟 DNA 서열과 특이적 증폭을 하는 개질된 리버스 프라이머가 부착된 자성나노입자의 표면은 nSLAM 수행 후 타겟 DNA 서열만큼 긴 이중 나선이 부착되게 된다. 따라서 이 이중 나선들이 부착된 자성나노입자의 크기는 타겟 DNA 서열의 길이만큼 커지게 되고, 타겟 DNA 서열이 N2, E 및 RdRP인 경우에 각각 약 82mer, 128mer 및 115mer의 크기를 형성한다.

[0134] 이렇게 크게 형성된 자성나노입자를 포함하는 nSLAM 증폭산물을 각각 5 μL씩 준비하였다.

[0135] 10Ω/sq, 0.7T의 ITO 기판(20mm x 30mm)을 아세톤, 에탄올, 및 물로 3회 세척고, 전기화학적 검지 용기(cell)의 하단에 밀착시켜 고정하였다. 전기화학적 검지 용기의 하단에 있는 원형 구멍에 nSLAM 증폭산물 5 μL를 주입하고 ITO 기판과 접촉하는 상태로 두었다. 원형 구멍의 하부에서 2분간 자기장을 인가하여 nSLAM 증폭산물 내에 있는 모든 자성나노입자를 기판에 모집한 후, 전기촉매 쌍 이온 용액(Electrocatalytic Reporter Pair Solution)인 50 μM의 $Ru(NH_3)_6Cl$ 및 4 mM의 $K_3Fe(CN)_6$를 포함하는 PBS 1 mL를 검지 용기에 주입하고 곧바로 인가된 자기장을 제거하였다. 그 상태에서 용액 안에 있는 이온들과 ITO 기판 하단에 가라앉은 자성나노입자 표면의 DNA가 반응할 때까지 18분 동안 유지하였다.

[0136] 18분 후 포텐시오 스탯(potentiostat, EM-stat3/Palmsense)을 이용하여 기준 전극(튜브 형태의 Ag/AgCl 기준 전극), 대 전극(와이어 형태의 Pt 대 전극), 및 작업 전극(ITO 기판)을 연결하여 3 전극을 설정하였다. EM-stat3 기기를 Differential Pulse Voltammetry (DPV) 모드로 전환한 후, 펄스 높이 50 mV, 펄스 폭 0.05 s, 스텝 높이(step height) 5 mV, 스텝 폭(step width) 0.1 s로 설정하고 0 ~ -0.5 V 전압을 인가하여 각각의 용액에 발생하는 전류값의 피크를 측정하였다.

[0137] 3 전극 시스템을 연결하여 DPV로 전압을 인가하면 전극을 시작으로 ITO 기판, 자성나노입자 표면, 및 증폭된 DNA 이중가닥을 순차적으로 통과하여 용액 속 루테늄 이온까지 전자가 전달되고 이온을 환원시킨다. 환원된 루테늄 이온은 주변의 철 이온에게 전자를 전달하여 다시 산화되고 이러한 전자전달 과정이 반복되면서 산화환원 전류가 발생한다. 전류 신호는 피크가 존재하는 볼츠만 곡선(boltzmann curve) 형태를 가진다. DNA 이중 가닥의 수가 많고 길이가 길수록 음전하를 띠는 DNA가 더 많은 루테늄 양이온을 끌어들일 수 있고, 증폭된 DNA 산물들이 표면에 부착된 자성나노입자는 개질된 리버스 프라이머만 부착된 자성나노입자보다 전자의 이동이 활발하게 되어 현저히 높은 전류값이 측정된다(측정되는 전류 신호의 피크가 현저히 높다). 이러한 전류신호 높이 차이를 이용해 SARS-CoV-2 유전물질의 존재 유무를 확인할 수 있고, 이는 곧 COVID-19의 감염 여부를 진단할 수 있다.

[0138] [실시예 3]

[0139] 본 발명의 진단 키트를 이용하여 COVID-19의 감염 여부를 진단하는데 필요한 최소한의 타겟 DNA의 농도를 알아보기 위한 실험을 수행하였다.

[0140] 우선 COVID-19 cDNA에 대한 검출 한계(LoD, Limit of Detection) 측정을 수행하였다. 검출 한계는 센서에서 특정 대상에 대한 검출이 가능하다고 판별되는 대상의 최소 농도이다. 이를 위해 COVID-19 cDNA의 농도를 각각 10^{-25} M, 10^{-22} M, 10^{-19} M, 10^{-16} M, 10^{-13} M, 및 10^{-10} M로 설정하고 각 농도에서 nSLAM를 진행하였다. nSLAM 증폭산물을 검지 용기에 넣고 DPV 전기화학 검출을 통해 시그널 한계점을 넘기는 최소 농도를 확인하였다.

[0141] 우선 nSLAM에 사용할 cDNA를 준비하였다. cDNA는 RNA를 역전사하여 제조하였고, RNA의 양은 제조하고자 하는 cDNA의 양을 기반으로 환산하여 투입하였다. 동일한 양의 RNA가 포함된 여러 샘플들을 역전사하여 생성되는 cDNA의 양을 통계를 낸 후 표 3에 정리하였다. 결과적으로 7개의 cDNA의 샘플에 대하여 평균적인 환산 수치는 약 5.08배인 것으로 확인되었다.

표 3

[0142]

RNA 샘플	RNA 농도 ** (ng/μL)	사용 부피 (μL)	cDNA 샘플	cDNA 농도 *** (ng/μL)	cDNA 용액의 전체 부피(μL)	cDNA의 총량(μg)	전환 인자†(RNA에서 cDNA로)	평균 전환 인자
RNA 1	53.3	46.9(2.5μg RNA)	cDNA_1	242.2	59.4	14.39	5.76	5.08(±0.41)
RNA 2	58.2	42.9(2.5μg RNA)	cDNA_2	218.8	55.4	12.12	4.85	
RNA 3	57.3	43.6(2.5μg RNA)	cDNA_3-1	231.5	56.1	12.99	5.20	
			cDNA_3-2	226.1	56.1	12.68	5.07	
			cDNA_3-3	228.4	56.1	12.81	5.12	
RNA 4	57.7	43.3(2.5μg RNA)	cDNA_4-1	196.9	55.8	10.99	4.40	
			cDNA_4-2	231.5	55.8	12.92	5.17	

[0143] 표 3의 색인은 다음과 같다. *은 국가 병원체자원은행으로부터 수득한 준임상 RNA 샘플(NCCP#43327)이고, SARS-

CoV-2 바이러스는 감염된 환자로부터 획득하였으며, RNA는 수득 전에 NCCP에 의해 추출되고 정제되었다. **는 식 2와 UV-Vis 흡광도 측정 값에 의하여 계산된 RNA 농도이다.

[0144] [식 2]

$$\text{Concentration (ng/μL)} = \text{Absorbance at } \lambda_{max}/\text{Pathlength (1 cm)} \times \text{Conversion factor (40 ng/μL)} \times \text{Dilution factor (100X)}$$ (각 샘플당 n=3)

[0145]

[0146] ***는 식 3와 UV-Vis 흡광도 측정 값에 의하여 계산된 cDNA 농도이다.

[0147] [식 3]

$$\text{Concentration (ng/μL)} = \text{Absorbance at } \lambda_{max}/\text{Pathlength (1 cm)} \times \text{Conversion factor (33 ng/μL)} \times \text{Dilution factor (100X)}$$ (각 샘플당 n=3)

[0148]

[0149] †는 SARS-CoV-2 RNA 1μg으로부터 생성된 cDNA(μg)의 양을 전환 인자(conversion factor)에 따라 표시한 것이다.

[0150] 질병관리청 국가병원체 자원은행(NCCP)에서 COVID-19 유전물질인 SARS-CoV-2 Wild-Type RNA 샘플을 분양받고, 실제 환자로부터 추출된 반임상(semi-clinical) 샘플을 확보하여 RT-PCR에 대한 Superscript III First-Strand Synthesis System(Invitrogen) 역전사 키트를 이용하여 이 RNA와 상보적인 서열을 갖는 단일 가닥 cDNA를 합성하였다. SARS-CoV-2 RNA 2.5 μg, 랜덤 헥사머(Random Hexamer, 50 ng/μL) 0.5 μL, 10 nM의 dNTP 믹스 1 μL를 PCR 튜브에 첨가 후 UPW로 10 μL까지 채웠다. 이 후 65℃에서 5분 동안 인큐베이션하고 얼음에 1 분 동안 냉각시켰다. 10X RT 버퍼 2 μL, 25 mM의 $MgCl_2$ 4 μL, 0.1 M의 DTT 2 μL, 40 U/μL의 RNaseOUT 1 μL, 및 200 U/μL의 SuperScript III 역전사 효소 1 μL를 튜브에 더 첨가한 후, 순차적으로 25℃에서 10 분, 50℃에서 50 분 동안 인큐베이션하였다. 마지막으로 85℃에서 5 분 동안 인큐베이션한 후, 얼음에 5 분 동안 냉각시켰다. 이것에 2 U/μL의 E.coli RNase H 1 μL를 넣고 37℃에서 20 분 동안 인큐베이션하고, 이렇게 제조된 cDNA를 4℃에 보관하였다.

[0151] 위의 제조예에서 제조된 기능화된 자성나노입자를 21개의 PCR 튜브에 5 μL씩 넣었다. 이 중 18개의 튜브에 UPW 24.8 μL, 10X High Fidelity PCR 버퍼 5 μL, 10 mM dNTP 믹스 1 μL, 50 mM $MgSO_4$ 2 μL, 플래티넘 Taq DNA 중합효소 High Fidelity (5 U/μL) 0.2 μL, 및 포워드 프라이머 10 μL를 각각 첨가한 후, 튜브들을 3 개씩 묶어서(총 6 개 묶음) 각 묶음 마다 위에서 언급한 각기 다른 농도의 cDNA를 2 μL씩 첨가하였다. 이들을 충분히 섞은 후 18 개의 튜브에 대해 nSLAM 증폭을 진행하였다. 초기 변성(initial denaturation, 95℃)은 30 초 동안 1 회 수행하였고, 변성(denaturation, 94℃) 15 초, 접합(annealing, 53℃) 30 초, 및 신장(extension, 68℃) 1 분으로 하여 nSLAM 사이클은 35 회 수행한 후, 4℃에서 종결(termination) 시켰다. nSLAM 과정 중에 입자들의 균일한 분산을 유지하기 위해 18 번째 nSLAM 사이클의 신장이 55 초를 경과하는 시점에서 튜브들을 꺼내서 30 초 동안 초음파 처리한 후 다시 nSLAM을 진행시켰다.

[0152] nSLAM 완료 후 nSLAM 증폭 산물을 추출하기 위해 세척 과정을 진행하였다. 21 개 튜브를 DynaMag PCR 자기 분리기에 넣고 18 분 동안 입자를 수집하였다. 상층액을 제거한 뒤 UPW를 20 μL씩 넣고 30 초 동안 초음파 처리하고, 다시 자기 분리기에 넣어 18 분 동안 입자를 수집하였다. 이 세척 과정을 3 번 반복하고, 마지막에 UPW 5 μL에 분산시켰다.

[0153] 위에서 nSLAM을 수행한 18개의 튜브는 nSLAM을 수행하지 않은 3개의 튜브와 전기 화학 신호를 비교하여 증폭 여부를 확인하였다. 전기화학 신호 검출 방법은 실시예 2에서와 동일한 방법으로 수행하였고, 용액마다 12회 측정하였다. 역치값(threshold)은 하기의 식 4를 이용하여 계산하였다.

[0154] [식 4]

[0155] 역치값(threshold) = (control sample 평균 신호) + (3 x control sample 신호 표준편차)

[0156] COVID-19 염기서열의 RdRP(RNA-dependent RNA Polymerase) 구간을 대상으로 측정한 결과를 이용하여 시그모이드 곡선(Sigmoid fitting)을 도출하여 분석하였다. 그 결과 cDNA의 농도가 0.455 x 10^{-18} M (0.274 copies/μL) 이상에서 시그널이 역치값을 넘는 것을 확인하였고, 이를 COVID-19 RNA 1 copy 당 cDNA 5.08 copy가 만들어지는 것을 고려하여 농도를 환산하면 RNA 0.054 copies/μL에 해당하였다. 이는 기존의 분자진단키트들의 검출 한계인 1~2 copies/μL RNA(1 aM 수준)보다 현저히 적은 값이었고, 기존의 진단키트와 비교되는 매우 적은 양으로도 코로나 바이러스를 진단할 수 있는 것을 의미한다.

[0157] 도 13은 COVID-19 유전물질의 RdRP 염기서열을 대상으로 nSLAM를 진행하였을 때, COVID-19 RNA의 농도의 따른 DPV 전기화학 시그널의 변화를 나타내는 결과이다.

[0158] RNA 각 농도에서 nSLAM을 35회 수행한 증폭 산물의 DPV를 측정한 결과이다. 검출 한계는 RNA 0.054 copies/μL로 확인되었다.

[0159] 또한 nSLAM 중 접합(annealing) 단계의 온도 설정은 최적의 온도를 찾기 위하여 여러 온도에서 실험한 후 설정되었다. 본 실험은 각 온도에 대하여 PCR 수행 후 유전자들을 전기영동하여 확인하였고, 전기영동 결과는 도 14에 도시하였다.

[0160] 실제 nSLAM 과정은 우선적으로 샘플들을 30초간 95도에서 예열한 후 본격적인 사이클에 돌입하게 되며, 한 사이클은 95도에서 15초 동안 변성(Denaturation 단계), 53도에서 30초 동안 접합(Annealing 단계), 그리고 68도에서 1 분 동안 신장(Elongation 단계)로 이루어져 있다. 여기서 프라이머가 주형 가닥에 결합하는 접합 단계에서 증폭 산물들이 가장 많이 만들어질 수 있는 최적의 온도를 찾기 위해 PCR 과정은 3 개의 온도 구간에서 실험 진행하였다. 접합 온도(T_a) 는 프라이머들의 녹는점(Melting Temperature, T_m) 을 고려해서 T_m 보다 낮게 온도 구간을 설정하였으며, 모든 프라이머들의 녹는점은 50℃ 후반 ~ 60℃ 중반인 것으로 확인되었다. 그러므로 설정한 T_a 온도 구간은 그보다 낮은 53℃, 56℃, 및 59℃로 설정해서 진행하였다.

[0161] 실제 nSLAM 과 다르게 자성나노입자에 부착한 리버스 프라이머가 아닌 단순 5' 말단을 가공한 개질된 리버스 프라이머를 사용하였다. N2, E, RdRP 타겟에 대해 각 프라이머 세트를 사용하였고, 각 프라이머 세트에 대해 T_a를 53℃, 56℃, 및 59℃로 다르게 설정하여 단순 PCR를 진행 (각각 35 cycle 진행)하였다.

[0162] 이 후 1.8% 아가로스 겔에 증폭 산물들을 로딩한 후 180V 힘으로 80 분 동안 전기영동을 진행하였다. 도 14에서 왼쪽 50 bp DNA ladder 와 비교했을 때 각 타겟마다 만들어지는 밴드의 위치는 예상하고 있는 증폭산물의 크기와 부합하며, T_a끼리 비교했을 때 모든 타겟에 대해서 53℃에서 가장 밝고 강력한 밴드를 형성하였고, 이는 가장 많은 증폭 산물들이 합성된 것을 의미하였다.

[0163] 이를 토대로 실제 nSLAM 과정에서 접합 온도를 53℃로 설정해서 진행하였다.

[0164] [실시예 4]

[0165] 본 발명의 진단 키트를 이용하여 COVID-19의 감염 여부를 진단하는데 필요한 최소한의 nSLAM 사이클 횟수를 알아보기 위한 실험을 수행하였다.

[0166] 우선 제조예에서 제조된 기능화된 자성나노입자 5 μL를 27개의 PCR 튜브에 각각 넣었다. 튜브 3 개를 제외하고, 나머지 24 개의 튜브에 UPW 24.8 μL, 10X High Fidelity PCR 버퍼 5 μL, 10 mM dNTP 믹스 1 μL, 50 mM $MgSO_4$ 2 μL, 플래티넘 Taq DNA 중합효소 High Fidelity (5 U/μL) 0.2 μL, 100 μM 포워드 프라이머 10 μL, 및 1 fM 농도의 SARS-CoV-2 cDNA를 2 μL씩 첨가하였다. cDNA의 제조 방법은 위에 실시예 3과 동일하게 수행하였다. 24 개 튜브를 3개씩 묶어서 (총 8개 묶음) 묶음 마다 서로 다른 횟수의 nSLAM 사이클을 진행하였다. nSLAM 사이클 횟수는 각각 3회, 5회, 10회, 15회, 20회, 25회, 30회, 및 35회로 설정하였다. 용액을 충분히 섞은 후 24 개의 튜브에 대하여 초기 변성(initial denaturation, 95℃)은 30 초에서 1 회 수행하였고, 변성(denaturation, 94℃) 15 초, 접합(annealing, 53℃) 30 초, 신장(extension, 68℃) 1 분으로 하여 설정된 횟수의 PCR을 수행한 후, 4℃에서 종결(termination) 시켰다. nSLAM 과정 중에 입자들의 균일한 분산을 유지하기 위해 총 nSLAM 사이클 횟수가 5 회인 샘플은 3 번째 사이클에서, 10 회인 샘플은 5 번째 사이클에서, 15 회인 샘플은 8 번째 사이클에서, 20 회인 샘플은 10 번째 사이클에서, 25 회인 샘플은 13 번째 사이클에서, 30 회

인 샘플은 15 번째 사이클에서, 35 회인 샘플은 18 번째 사이클에서 신장 단계의 55 초 경과 시점에서 튜브를 꺼내 30 초 동안 초음파 처리한 후 다시 nSLAM을 진행시켰다.

[0167] nSLAM 과정 후 세척은 다른 실시예와 동일하게 진행하였다.

[0168] 여기서, COVID-19 cDNA 위에 증폭된 타겟 서열은 RdRP(RNA-dependent RNA Polymerase) 서열이고, nSLAM에 사용되는 리버스 프라이머와 포워드 프라이머는 표 1에 기재된 것과 동일하게 사용하였다.

[0169] 27 개의 튜브(control sample 3 개 포함)에 대한 전기화학 검지 과정 역시 다른 실시예와 동일하게 수행하였다.

[0170] RdRP 염기서열 이용하여 측정한 결과, nSLAM 사이클 3회부터 임계값을 넘는 것을 확인하였다.

[0171] 이와 동일한 실험을 N2(Nucleocapsid protein) 및 E(Envelope protein) 염기서열에 대하여도 수행하였다. 타겟 유전자를 하나로만 설정할 경우 염기서열 다양성에 취약해지고 오진의 확률이 높기 때문에 세계보건기구(WHO)에서 COVID-19 분자진단의 타겟 유전자를 둘 또는 세 종류로 설정할 것을 권고한다. 그 중 하나는 스크리닝 분석(screening assay)이고, 나머지는 확증적 분석(confirmatory assay)이며, COVID-19에만 특이적으로 존재하는 서열을 적어도 하나 이상 설정하여야 한다. 세 개의 타겟으로 설정 시, 세 유전자 모두 검출되는 경우에만 양성 판정으로 진단할 수 있기 때문에 신뢰도가 높아진다. 본 실험에서 E 유전자는 COVID-19이 속한 베타-코로나바이러스(beta-coronavirus) 과에 보존되는 유전자로 스크리닝 분석으로 설정하였고, RdRP와 N2 유전자는 COVID-19에만 특이적으로 존재하는 서열들이므로 확증적 분석으로로 사용하였다.

[0172] 여기서, COVID-19 cDNA의 타겟 서열이 N2인 경우 2019-nCoV_N2 프라이머 세트(CDC, U.S)를 사용하였고, 표적 단일 서열은 67mer로 구성된 5' GCGCGACATTCCGAAGAACGCTGAAGCGCTGGGGGCAAATTGTGCAATTTGCGGCCAATGTTTGTAA-3'였다. 자성나노입자에 부착하는 리버스 프라이머는 5' 말단이 가공된 개질된 리버스 프라이머를 사용하였고, 5'-AAAAAAAAAAAAAAATTACAAACATTGGCCGCAAA-3' 염기 서열을 가졌다. nSLAM 시 수용액 내에서 타겟 단일 서열의 상보적 단일 서열과 반응하는 포워드 프라이머는 5'-GCGCGACATTCCGAAGAA-3'으로 구성되었다.

[0173] cDNA의 타겟 서열이 E인 경우 RdRP_SARSr 프라이머 세트(Charitι, Germany)를 사용하였고, 표적 단일 서열은 113mer로 구성된 5' ATATTGCAGCAGTACGCACACAATCGAAGCGCAGTAAGGATGGCTAGTGTAACTAGCAAGAATACCACGAAAGCAAGAAAAAGAAGTACGCTATTAACTATTAACGTACCTGT-3' 이었다. 자성나노입자에 부착하는 리버스 프라이머는 5' 말단이 가공된 개질된 리버스 프라이머를 사용하였고, 5-AAAAAAAAAAAAAAAAACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3' 염기 서열을 가졌다. nSLAM 시 수용액 내에서 타겟 단일 서열의 상보적 단일 서열과 반응하는 포워드 프라이머는 5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3'으로 구성되었다.

[0174] N2와 E 타겟의 경우 nSLAM 사이클 횟수는 3 회, 5 회, 10 회, 15 회, 25 회, 35 회로 단순화해서 진행하였고, 기능화된 자성나노입자를 42개의 PCR 튜브(N2 유전자의 개질된 리버스 프라이머가 부착된 자성나노입자 21 개, E 유전자의 개질된 리버스 프라이머가 부착된 자성나노입자 21 개)에 각각 5 μL 씩 넣었다. N2 검지용 튜브와 E 검지용 튜브를 3 개씩 제외하고, 나머지 36 개의 튜브에는 RdRP 타겟을 대상으로 수행한 nSLAM과 동일하게 시약을 첨가하였다. N2 검지용 튜브와 E 검지용 튜브 18개씩을 각각 3 튜브씩 그룹을 짓고(N2 검지용 튜브 그룹 6세트, E 검지용 튜브 그룹 6세트) 세트마다 nSLAM 사이클 횟수를 달리하여 수행하였다. N2 검지용 튜브 그룹 및 E 검지용 튜브 그룹의 각 6 세트들에 대한 nSLAM 사이클은 3 회, 5 회, 10 회, 15 회, 25 회, 35 회로 설정하였다. 튜브의 용액들을 충분히 섞은 후 nSLAM 증폭을 진행하였다. 초기 변성(initial denaturation, 95℃)은 30 초 동안 1 회 수행하였고, 변성(denaturation, 94℃) 15 초, 접합(annealing, 53℃) 30 초, 신장(extension, 68℃) 1 분으로 nSLAM 사이클을 3~35 회 수행한 후, 4℃에서 종결(termination)시켰다. nSLAM 과정 중에 입자들의 균일한 분산을 유지하기 위해 총 nSLAM 사이클 횟수가 5 회인 샘플은 3 번째 사이클에서, 10 회인 샘플은 5 번째 사이클에서, 15 회인 샘플은 8 번째 사이클에서, 25 회인 샘플은 13 번째 사이클에서, 35 회인 샘플은 18 번째 사이클에서 신장(extension) 중 55 초 경과 시점에서 튜브를 꺼내 30 초 동안 초음파 처리하고 다시 nSLAM을 진행시켰다.

[0175] nSLAM 과정 후 세척 과정 및 용액에 대한 전기 화학 검지 과정은 다른 실시예와 동일하게 수행하였다.

[0176] 측정 결과 N2 타겟의 경우 nSLAM 사이클 3.9 회부터, E 타겟의 경우 3.4 회부터 임계값을 넘겼다.

[0177] 이를 통해 모든 검출대상(N2, E, RdRP 염기서열)에 대해 검출 가능한 최소 nSLAM 사이클 횟수가 4 회인 것으로 확인하였다. 기존의 분자진단의 경우 PCR 사이클을 평균 35 회 내지 40 회로 설정하고 대략 3 시간정도의 시간이 소요되어 진단의 대부분의 시간이 PCR 단계에서 소비되었다. 이와 비교하여 본 발명은 nSLAM 사이클을 4 회

로 단축시킬 수 있고, 소요 시간도 약 7.5 분 정도로 현저하게 감소시킬 수 있어 바이러스 유래 전염병이 발생하는 실제 현장에서 요구되는 현장 신속 진단을 가능하게 해줄 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

[0178] 도 15 및 16는 본 실험예에서 COVID-19 유전물질의 N2, E, RdRP 염기서열을 대상으로 PCR를 진행하였을 때, 타겟 서열의 COVID-19 cDNA의 농도를 일정하게 유지한 상태에서 nSLAM 사이클 횟수에 따른 DPV 전기화학 시그널의 변화를 나타내는 도면이다.

[0179] 도 15a는 RdRP 염기서열을 대상으로 1 fM cDNA 농도에서 각각의 nSLAM 사이클을 진행한 후 전기화학 시그널의 평균 피크 전류 값들을 나타내고, 검출 가능한 최소 nSLAM 사이클 횟수는 3 회(약 75 분 소요)로 확인되었다.

[0180] 도 15b는 E 염기서열을 대상으로 1 fM cDNA 농도에서 각 nSLAM 사이클을 진행한 후 전기화학 시그널의 평균 피크 전류 값들을 나타내고, 검출 가능한 최소 nSLAM 사이클 횟수는 3.4 회(약 6.3 분 소요)로 확인되었다.

[0181] 도 15c는 N2 염기서열을 대상으로 1 fM cDNA 농도에서 각 nSLAM 사이클을 진행한 후 전기화학 시그널의 평균 피크 전류 값들을 나타내고, 검출 가능한 최소 nSLAM 사이클 횟수는 3.9 회(약 7.3 분 소요)로 확인되었다.

[0182] 도 16는 N2, E, RdRP 염기서열을 대상으로 1 fM cDNA 농도에서 각 nSLAM 사이클을 진행한 후 전기화학 측정 값들을 비선형 회귀(non-linear regression) 처리한 후 임계값 인근의 데이터 들을 비교해서 보여주는 도면이다. 각 타겟에 대한 임계값은 개별적으로 표시하였고, 모든 타겟에 대해 검출이 가능한 최소 nSLAM 사이클 횟수는 4 회(약 7.5 분 소요)로 확인되었다.

[0183] [비교예 1]

[0184] 자성나노입자의 표면에 리버스 프라이머의 서열을 부착하는 것에 대한 효율을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 자성나노입자의 표면에 리버스 프라이머의 서열이 아닌 포워드 프라이머의 서열을 부착하여 nSLAM을 수행하고 전류 신호의 차이를 비교하였다. 검출 대상은 RdRP 유전자 서열로 설정하였다.

[0185] 먼저 분자진단 nSLAM에 사용할 cDNA는 위의 실시예와 동일한 과정으로 준비하였다. 자성나노입자는 제조예에서 제조된 개질된 리버스 프라이머가 부착된 자성나노입자와 개질된 포워드 프라이머가 부착된 자성나노입자를 준비하였다.

[0186] 포워드 프라이머는 자성나노입자 표면에 부착하기 위하여 5' 말단을 가공하여 개질된 포워드 프라이머를 제조하였다. 포워드 프라이머의 가공은 RdRP_SARSr 포워드 프라이머의 5' 말단에 제조예와 같은 방법으로 A15 스페이서와 티올기를 부착하였고, 5'-AAAAAAAAAAAAAAACARATGTTAAASACACTATTAGCATA-3' 서열의 단일 가닥을 준비하였다. 이 단일 서열을 제조예와 같은 방법으로 자성나노입자 표면에 부착하였다. 추가적으로 nSLAM 반응을 함께 진행시킬 개질되지 않은 포워드 프라이머와 리버스 프라이머도 준비하였고, 리버스 프라이머의 염기 서열은 5'-GTGARATGGTCATGTGTGGCGG-3'(RdRP_SARSr 리버스 프라이머)였다.

[0187] 개질된 포워드 프라이머가 부착된 자성나노입자와 개질된 리버스 프라이머가 부착된 자성나노입자의 전기화학 신호를 비교하기 위하여, cDNA를 10^{-25} M, 10^{-19} M, 10^{-16} M, 10^{-10} M 농도로 희석해서 준비한다.

[0188] 개질된 리버스 프라이머가 부착된 자성나노입자를 15 개의 PCR 튜브에 5 μL씩 넣었다. PCR 튜브 세 개를 제외한 12 개의 튜브에 UPW 24.8 μL, 10X High Fidelity PCR 버퍼 5 μL, 10 mM dNTP 믹스 1 μL, 50 mM $MgSO_4$ 2 μL, 플래티넘 Taq DNA 중합효소 High Fidelity (5 U/μL) 0.2 μL, 100 μM 포워드 프라이머(5'-CARATGTTAAASACACTATTAGCATA-3') 10 μL를 각각 첨가하고, 12 개의 튜브들을 3개씩 그룹 지어(총 4세트) 각 그룹 마다 서로 다른 농도의 cDNA를 2 μL씩 첨가한다. 용액을 충분히 섞은 후 12 개의 튜브에 nSLAM 증폭을 진행하였다. 초기 변성(95℃)은 30 초에서 1 회 수행하고, 변성(94℃) 15 초, 접합(53℃) 30 초, 신장(68℃) 1 분으로 nSLAM 사이클을 35 회 수행한 후, 4℃에서 종결시켰다. nSLAM 과정 중에 입자들의 균일한 분산을 유지하기 위해 nSLAM 사이클 진행 중 18 번째 사이클의 신장 중 55 초 경과 시점에서 튜브들을 꺼내서 30 초 동안 초음파 처리한 후 다시 nSLAM을 진행시켰다.

[0189] nSLAM 완료 후 nSLAM 증폭 산물을 추출하기 위한 세척 과정 및 전기화학 신호 검출 과정은 위의 실시예와 동일한 방법으로 진행하였다.

[0190] 개질된 포워드 프라이머가 부착된 자성나노입자를 15 개의 PCR 튜브에 5 μL씩 넣었다. PCR 튜브 세 개를 제외한 12 개의 튜브에 UPW 24.8 μL, 10X High Fidelity PCR 버퍼 5 μL, 10 mM dNTP 믹스 1 μL, 50 mM $MgSO_4$ 2 μL, 플래티넘 Taq DNA 중합효소 High Fidelity (5 U/μL) 0.2 μL, 100 μM 리버스 프라이머(5'-

GTGARATGGTCATGTGTGGCGG-3') 10 μL를 각각 첨가한 후 12 개의 튜브들을 3 개씩 그룹지어(총 4 개 세트) 각 그룹 마다 서로 다른 농도의 cDNA(10^{-25} M, 10^{-19} M, 10^{-16} M, 10^{-10} M)를 2 μL씩 첨가한다. 용액을 충분히 섞은 후 12 개의 튜브에 대해서 nSLAM 증폭을 진행하였고, nSLAM 설정, nSLAM 후 세척과정, 전기화학 신호 측정 및 데이터 정리는 리버스 프라이머와 동일한 방법으로 진행하였다.

[0191] 위의 두 실험 결과는 전체적으로 개질된 리버스 프라이머가 부착된 자성나노입자들의 전류 평균값이 더 높게 확인되었고, cDNA 농도가 증가할수록 신호 차이가 더 크게 나타난다. 또한 개질된 리버스 프라이머가 부착된 자성나노입자들의 전류 신호 평균값들은 10^{-19} M cDNA 이상 농도 구간에 대하여 임계값을 넘겼으나, 개질된 포워드 프라이머가 부착된 자성나노입자의 경우 임계값이 리버스 프라이머보다 높고 전류 평균값이 전체적으로 더 낮아 10^{-19} M cDNA 이하 농도에서는 임계값을 넘기지 못한다. 즉, 동일한 타겟 유전물질 농도에 대해서 개질된 리버스 프라이머가 부착된 자성나노입자를 사용했을 때 전기화학 신호 전류값이 더 높고 임계값을 넘기는 cDNA 농도 구간이 더 넓기 때문에 개질된 포워드 프라이머가 부착된 자성나노입자를 사용했을 때 보다 더욱 낮은 농도까지 검출이 가능함을 의미한다. 이를 통해 개질된 리버스 프라이머가 부착된 나노입자를 이용하여 nSLAM을 수행하였을 때 검출 시스템의 민감도를 더욱 향상시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있다.

[0192] 도 17는 상기의 실험을 진행 후 전기화학 측정을 통해 얻는 평균 peak 전류 값들을 나타내고 있다. 오차 막대(Error bar)는 각 샘플에 대한 전류 값의 표준편차(standard deviation)를 나타내고 있다. 파란색 점선과 주황색 점선은 각각 개질된 리버스 프라이머가 부착된 자성나노입자의 대조 샘플(control sample)과 개질된 포워드 프라이머가 부착된 자성나노입자의 대조 샘플들의 평균 피크 전류 값들을 기반으로 계산한 임계값들이다. 전체적으로 리버스 프라이머의 nSLAM 샘플들의 전류값들이 더 높고 최적 맞춤선의 기울기가 더 크며, 측정 cDNA 농도 구간에서 모두 임계값을 넘는다.

[0193] [비교예 2]

[0194] 본 발명의 일 실시예를 이용하여 코로나 바이러스를 진단하는 경우 다른 유전물질이 영향을 미칠 수 있는지 확인하기 위하여 COVID-19에 대한 특이도(Specificity)을 실험하였다.

[0195] 음성 대조 타겟은 COVID-19과 같은 베타 바이러스 과에 속한 MERS-CoV와 HCoV-OC43을 선정하였다. 두 타겟 모두 국가병원체자원은행(NCCP)에서부터 분양 받았다. 모든 타겟들은 실제 감염자에서 채취한 준임상(semi-clinical) 샘플들이며, 각 타겟에 대해 N2, E, RdRP 유전자의 개질된 리버스 프라이머가 부착된 자성나노입자들을 가지고 nSLAM 과정을 진행한다. 각 RNA 유전물질의 cDNA를 합성은 실시예와 동일한 과정으로 제조하였다. 제조예에서 제조한 N2, E 및 RdRP 유전자의 개질된 리버스 프라이머가 부착된 자성나노입자를 36 개(각 12개씩)의 PCR 튜브에 5 μL씩 넣었다. N2 검지용 튜브 3 개와 E 검지용 튜브 3 개, RdRP 검지용 튜브 3 개를 제외하고, 나머지 27 개 튜브에 실시예와 동일한 방식으로 PCR 시약을 첨가하였다, 다만 각각의 N2, E 및 RdRP 샘플 9 개 중 3 개는 SARS-CoV-2 (COVID-19) cDNA, 3 개는 MERS-CoV cDNA, 나머지 3 개는 HCoV-OC43 cDNA를 주입하였다.

[0196] PCR 시약이 첨가된 27 개 샘플들에 대하여 실시예와 동일하게 nSLAM을 수행하였다. 초기 변성(95℃)은 30 초에서 1 회 수행하고, 변성(94℃) 15 초, 접합(53℃) 30 초, 신장(68℃) 1 분으로 nSLAM 사이클을 35회 수행한 후, 4℃에서 종결시켰다. nSLAM 과정 중에 입자들의 균일한 분산을 유지하기 위해 nSLAM 18 번째 사이클의 신장 중 55 초 경과 시점에서 튜브들을 꺼내서 30 초 동안 초음파 처리한 후 다시 nSLAM을 진행시켰다.

[0197] nSLAM 완료 후 nSLAM 증폭 산물을 추출하기 위한 세척 과정 및 전기화학 신호 특정은 실시예와 동일하게 수행하였다.

[0198] 측정 결과, 모든 염기서열 타겟에 대해 COVID-19 Wild-Type RNA(이하, SARS-CoV-2 RNA) 타겟만 특이적으로 임계값을 넘겼으며, MERS-CoV와 HCOV-OC43에 대해서는 모든 증폭 염기서열의 신호가 임계값을 넘기지 못했다. 이것으로 본 발명을 이용한 COVID-19 분자진단 시스템은 COVID-19 유전물질에 대해서만 특이적으로 유전자 증폭을 일으키는 것을 확인할 수 있다.

[0199] 도 18는 위 실험에 대한 결과로, COVID-19 모델에 대한 특이도 (Specificity)를 보여주고 있다. 점선들은 각 유전자 염기서열 (N2, E, RdRP 염기서열)의 개질된 리버스 프라이머가 부착된 자성나노입자로 nSLAM을 수행하지 않은 샘플(control sample)의 전기화학신호를 이용하여 계산한 임계값을 나타내고 있다. 모든 유전자 염기서열의 종류에 대해서 SARS-CoV-2 타겟을 주입한 샘플에서만 임계값을 넘기는 전류값이 측정된다.

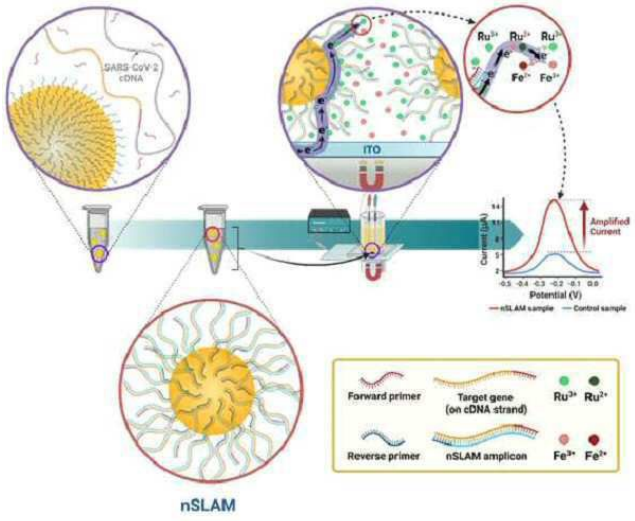
[0200] 도 19는 SARS-CoV-2 이외에 다른 유전자에 교차반응이 있는지 확인하기 위하여 PCR을 수행한 후 전기영동한 이미지이다. SARS-CoV-2외에 다른 유전물질에 대하여는 밴드가 거의 형성되지 않았고, 전기화학 신호 측정 결과와

마찬가지로 다른 유전물질에 대한 교차 반응이 일어나지 않는 것을 확인할 수 있다.

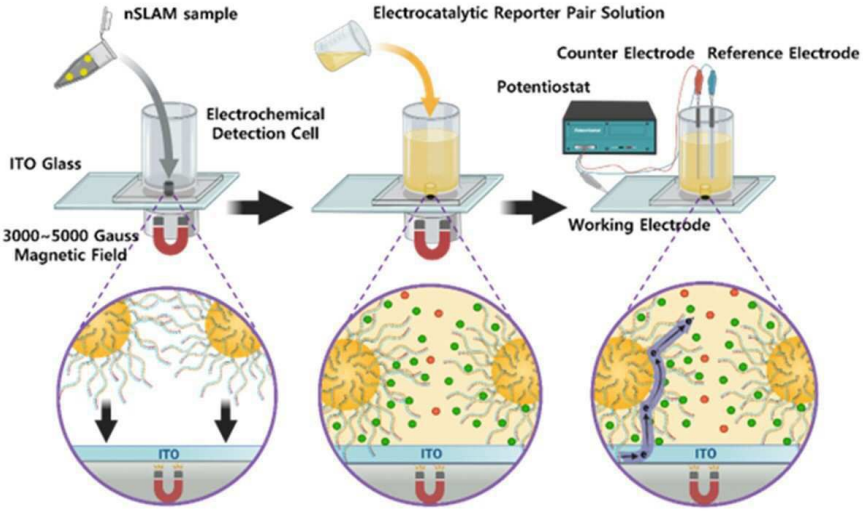
[0201] 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

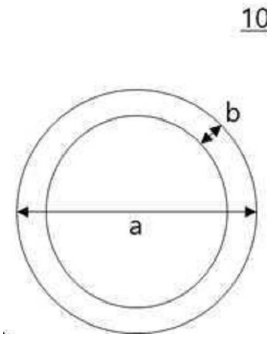
도면1



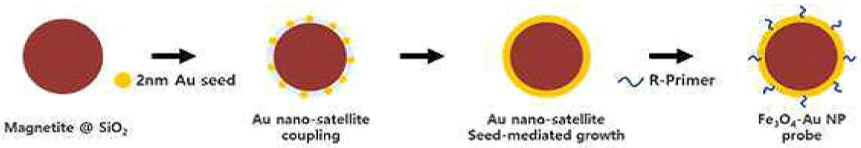
도면2



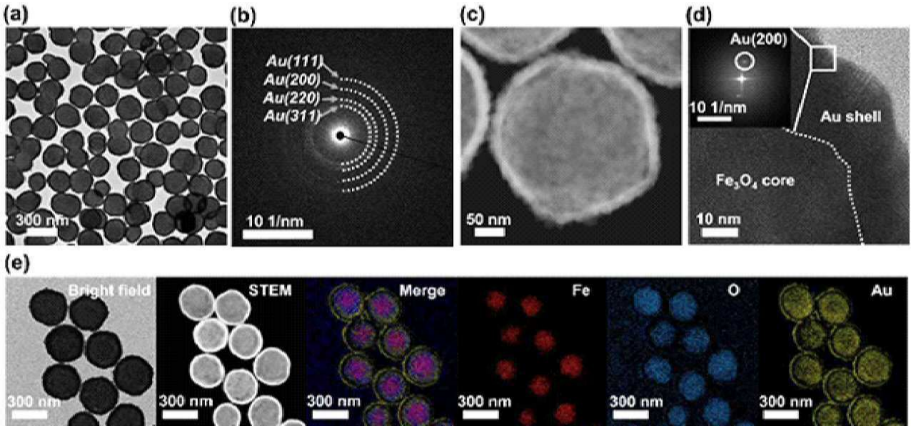
도면3


100
b
a

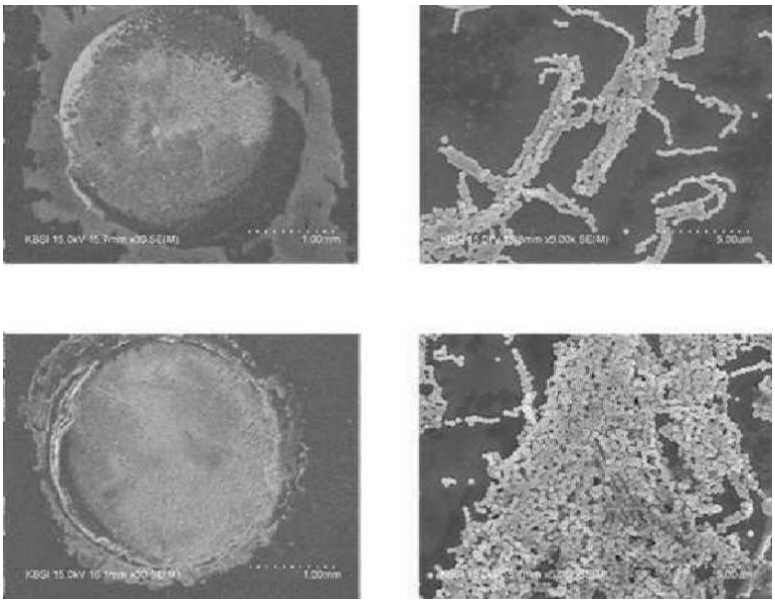
도면4


2nm Au seed
R-Primer
Magnetite @ SiO2
Au nano-satellite coupling
Au nano-satellite Seed-mediated growth
Fe3O4-Au NP probe

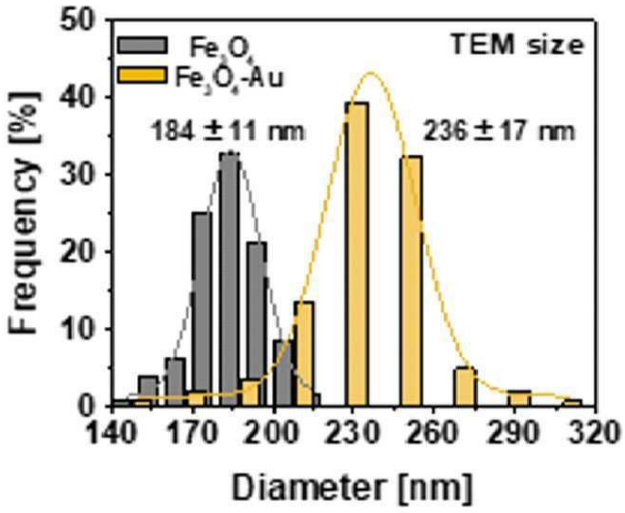
도면5


(a)
(b)
(c)
(d)
Au(111)
Au(200)
Au(220)
Au(311)
10 1/nm
300 nm
50 nm
Au(200)
10 1/nm
Au shell
Fe3O4 core
10 nm
(e)
Bright field
STEM
Merge
Fe
O
Au
300 nm

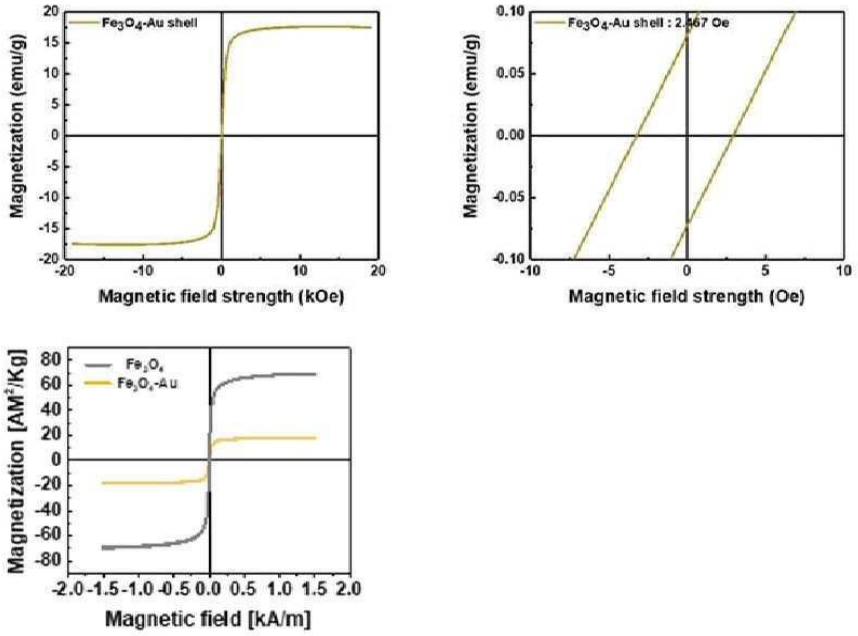
도면6



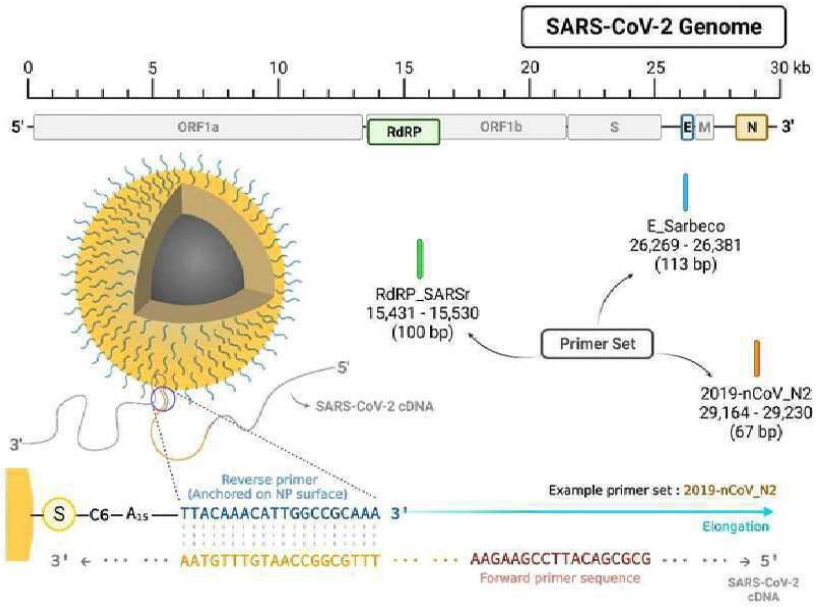
도면7


50
40
30
20
10
0
Frequency [%]
Fe_3O_4
Fe_3O_4-Au
TEM size
184 ± 11 nm
236 ± 17 nm
140
170
200
230
260
290
320
Diameter [nm]

도면8


Fe3O4-Au shell
Magnetization (emu/g)
Magnetic field strength (kOe)
Fe3O4-Au shell : 2,467 Oe
Magnetization (emu/g)
Magnetic field strength (Oe)
Fe3O4
Fe3O4-Au
Magnetization [AM²/Kg]
Magnetic field [kA/m]

도면9


SARS-CoV-2 Genome
0
5
10
15
20
25
30 kb
5'
ORF1a
RdRP
ORF1b
S
E
M
N
3'
E_Sarbeco
26,269 - 26,381
(113 bp)
RdRP_SARSr
15,431 - 15,530
(100 bp)
Primer Set
2019-nCoV_N2
29,164 - 29,230
(67 bp)
5'
SARS-CoV-2 cDNA
3'
Reverse primer
(Anchored on NP surface)
S
C6
A35
TTACAAACATTGGCCGCAAA 3'
Example primer set : 2019-nCoV_N2
Elongation
3'
AATGTTTGTAACCGGCGTTT
AAGAAGCCTTACAGCGCG
5'
Forward primer sequence
SARS-CoV-2 cDNA

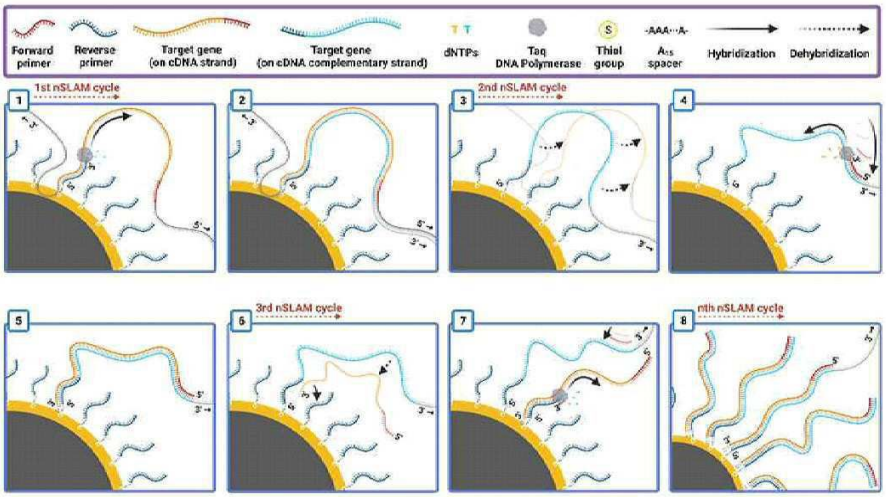
도면10

Producer	Product	Amplification Approach	LoD[1] (copies/uL)	Ct[2] Value	Runtime (min)
LetsGetChecked, Inc.	LetsGetChecked Coronavirus (COVID-19) Test	(multiplex) real-time transcription mediated amplification	~0.007	-	-
PerkinElmer, Inc.	PerkinElmer New Coronavirus Nucleic Acid Detection Kit	Real-time RT-PCR/pooling	ORF[3]1ab: 0.009 N[3]: 0.05	≤42	120
Roche Molecular Systems, Inc.	cobas SARS-CoV-Nucleic acid test for use on the cobas Liat System	(multiplex) Real-time RT-PCR	0.012	-	20
Texas Department of State Health Services, Laboratory Services Section	DSHS SARS-CoV-2 Assay	Real-time RT-PCR	0.02	≤35	-
Quest Diagnostics Infectious Disease, Inc.	Quest Diagnostics RC SARS-CoV-2 Assay	Real-time RT-PCR/pooling (H only)	ORF[3]/1a: 0.025 E[3]: 0.032	-	-
Abbott Molecular, Inc.	Alinity m SARS-CoV-2 assay	(multiplex) Real-time RT-PCR	0.05	-	<117
RTA Laboratories Biological Products Pharmaceutical and Machinery Industry	Diagnovital SARS-CoV-2 Real-Time PCR Kit	(multiplex) Real-time RT-PCR	0.038	≤35	-
Becton, Dickinson & Company (BD)	BioGX SARS-CoV-2 Reagents for BD Max System	(multiplex) Real-time RT-PCR	0.04	-	180
Thermo Fisher Scientific Inc.	TaqPath COVID-19 Pooling Kit	(multiplex) Real-time RT-PCR	0.05	-	-
Verily Life Sciences	Verily COVID-19 RT-PCR Kit	(multiplex) Real-time RT-PCR	0.06	≤37	-
Poplar Healthcare	Poplar SARS-CoV-2 TMA Pooling Assay	(multiplex) Real-time RT-PCR/pooling	~0.07	-	210
RCA Laboratory Services	GENETWORx Covid-19 Nasal Swab Test	Transcription mediated amplification/Dual kinetic assay	~0.072	-	180
Viracor Eurofins Clinical Diagnostics	Viracor SARS-CoV-2 assay DTC	Real-time RT-PCR	0.073	≤38	1440
Life Technologies Corporation	TaqPath COVID-19 MS2 Combo Kit 2.0	(multiplex) Real-time RT-PCR	0.075	-	-
Laboratory Corporation of America (LabCorp)	Pixel by LabCorp COVID-19 Test Home Collection Kit	(single/multiplex) Real-time RT-PCR/pooling	0.08	-	-
DiaCarta, Inc.	QuantiVirus SARS-CoV-2 Test Kit	(multiplex) single-step real-time RT-PCR	0.1	<40	120
Pro-Lab Diagnostics	Pro-Amp RT SARS-CoV-2 Test	RT-isothermal nucleic acid amplification	0.125	-	60
Color Health, Inc.	Color SARS-CoV-2 RT-LAMP Diagnostic Assay (DTC)	Isothermal nucleic acid amplification (LAMP)	0.75	-	-
Lucira Health, Inc.	Lucira CHECK-IT COVID-19 Test Kit	RT-LAMP	0.9	-	30
SEASUN BIOMATERIALS, Inc.	AQ-TOP COVID-19 Rapid Detection Kit PLUS	(singleplex) RT-LAMP	1	≤30	45

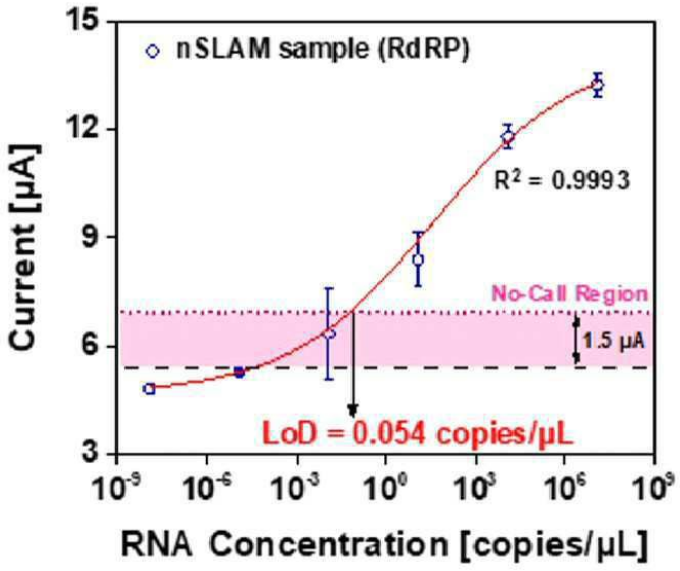
도면11

Producer	Product	Amplification Approach	LoD[a] (copies/μL)	Ct[b] Value	Runtime (min)
Visby Medical, Inc.	Visby Medical COVID-19	Real-time RT-PCR	1.112	-	30
Helix OpCo LLC (dba Helix)	Helix COVID-19 NGS Test	Amplicon-based next generation sequencing	1.125	-	>80
Exact Sciences Laboratories	SARS-CoV-2 (N gene detection) Test	(biplex) Real-time RT-PCR	1.2	8≤Ct≤40	-
Omnipathology Solutions Medical Corporation	Omni COVID-19 Assay by RT-PCR	(multiplex) Real-time RT-PCR	1.23	≤40	-
Applied DNA Sciences, Inc.	Linea COVID-19 Assay Kit	Real-time RT-PCR	1.25	≤40	60
Cue Health Inc.	Cue COVID-19 Test	Isothermal nucleic acid amplification	1.3	-	25
ResearchDx, Inc., DBA Pacific Diagnostics	PacificDx Covid-19	Real-time RT-PCR	1.6	≤40	-
Biomeme, Inc.	Biomeme SARS-CoV-2 Real-Time RT-PCR Test	(multiplex) Real-time RT-PCR	1.8	≤40	80
GK Pharmaceuticals Contract Manufacturing Operations	GK ACCU-RIGHT SARS-CoV-2 RT-PCR KIT	Real-time RT-PCR	2	<40	-
Vela Operations Singapore Pte Ltd.	VireKey SARS-CoV-2 RT-PCR Test	(multiplex) Real-Time RT-PCR	2.25	10<Ct<40	240
Gravity Diagnostics, LLC	Gravity Diagnostics COVID-19 Assay	(biplex) Real-time RT-PCR	2.4	<35	-
GenaMatrix, Inc.	NeoPlex COVID-19 Detection Kit	(multiplex) Real-time RT-PCR	2.5	≤40	180
TNS Co., Ltd (Bio TNS)	COVID-19 RT-PCR Peptide Nucleic Acid (PNA) kit	Real-time RT-PCR	2.524	≤40	-
SeionCell Research Laboratories	SeionCell SARS-CoV-2 Coronavirus Real-time RT-PCR (RT-qPCR) Detection Kit	Real-time RT-PCR	3.16	<40	75
BillionToOne, Inc.	qSanger-COVID-19 Assay	Sanger sequencing-based test	3.2	-	-
KogeneBiotech Co., Ltd.	PowerChek 2019-nCoV Real-time PCR Kit	(multiplex) Real-time RT-PCR	4	≤37	360
Seegene, Inc.	Allplex 2019-nCoV Assay	(multiplex) Real-time RT-PCR	4.167	≤40	240
Co-Diagnostics, Inc.	Logix Smart Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) kit	(multiplex) Single-step real-time RT-PCR	4.29	≤45	63–90
Luminex Molecular Diagnostics, Inc.	NxTAG CoV Extended Panel Assay	(multiplex) Real-time RT-PCR	5	-	-
Gencurix, Inc.	GenePro SARS-CoV-2 Test	(multiplex) Real-time RT-PCR	5.55	<31	110
INNO Diagnostics Reference Laboratory, Ponce Medical School	PMRF-INNO SARS-CoV-2 RT-PCR Test (Authorized by HHS/OASH)	Real-time RT-PCR	6	≤40	-

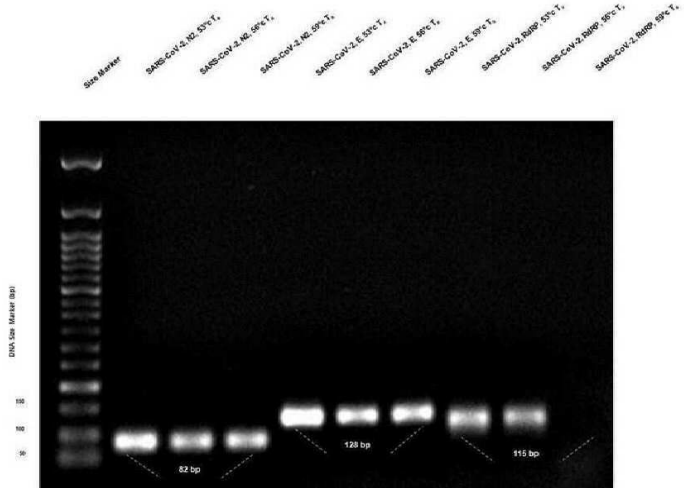
도면12



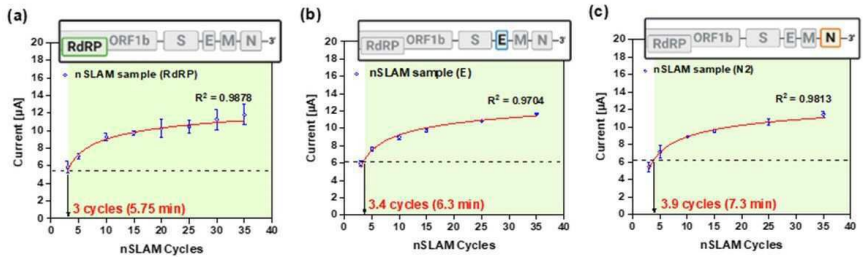
도면13



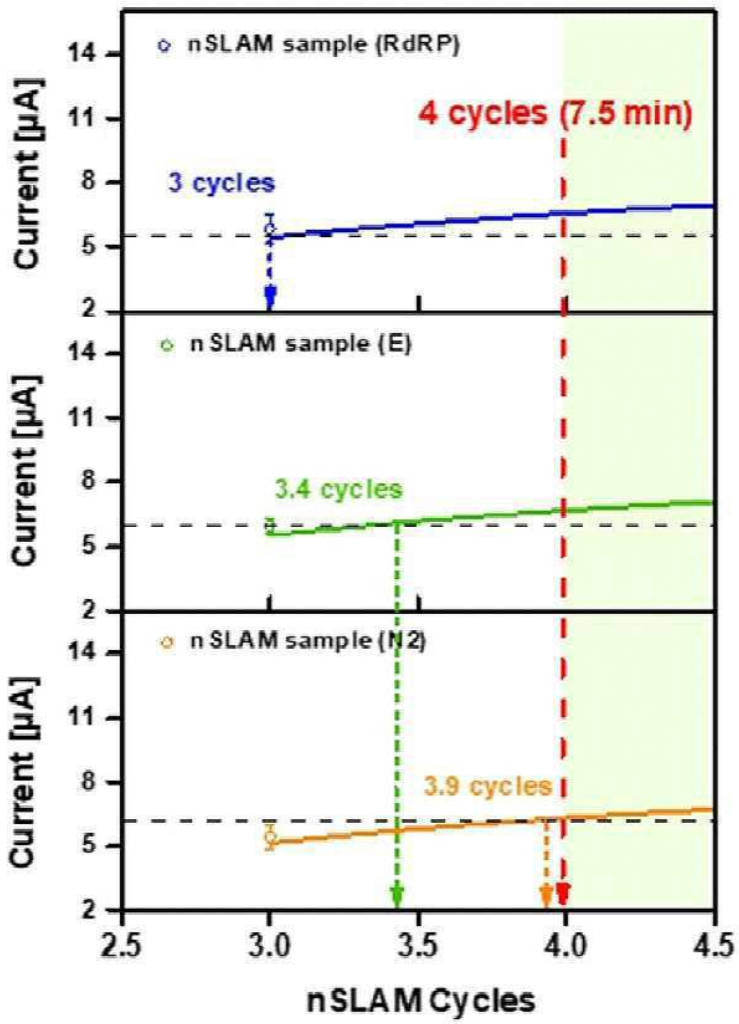
도면14



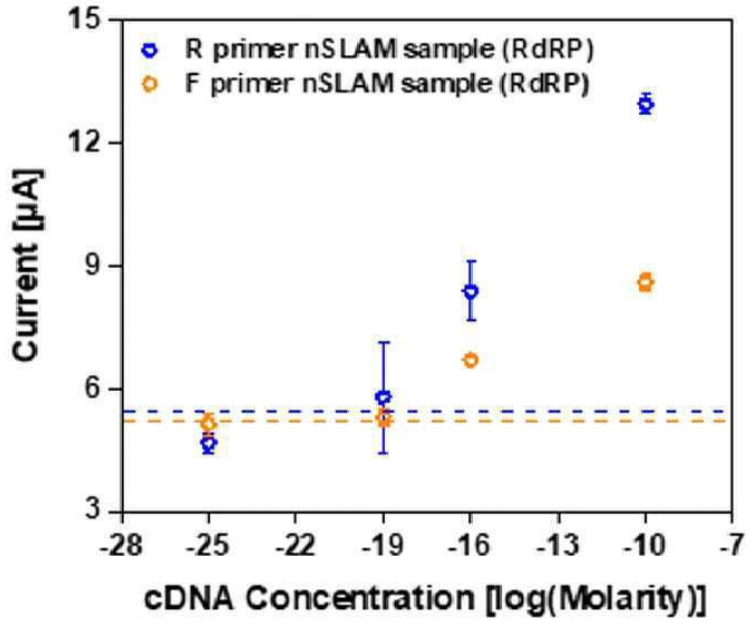
도면15



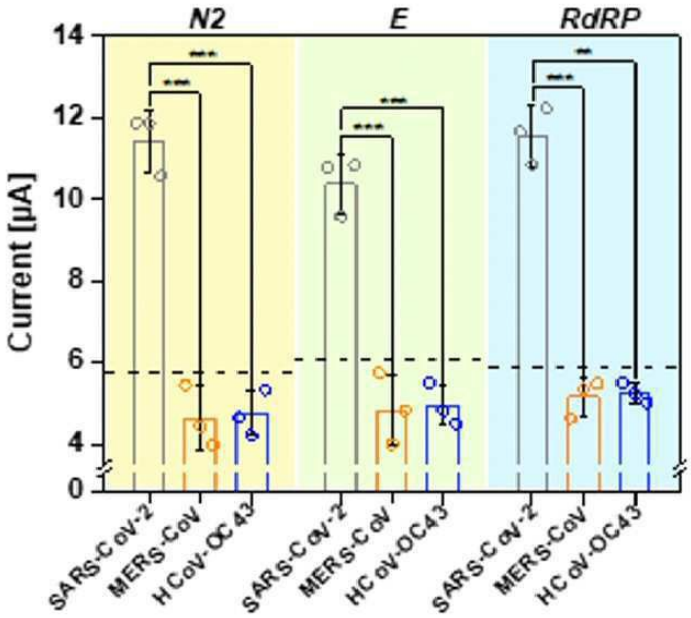
도면16


nSLAM sample (RdRP)
4 cycles (7.5 min)
3 cycles
nSLAM sample (E)
3.4 cycles
nSLAM sample (N2)
3.9 cycles
Current [μA]
nSLAM Cycles
2.5
3.0
3.5
4.0
4.5
2
5
8
11
14

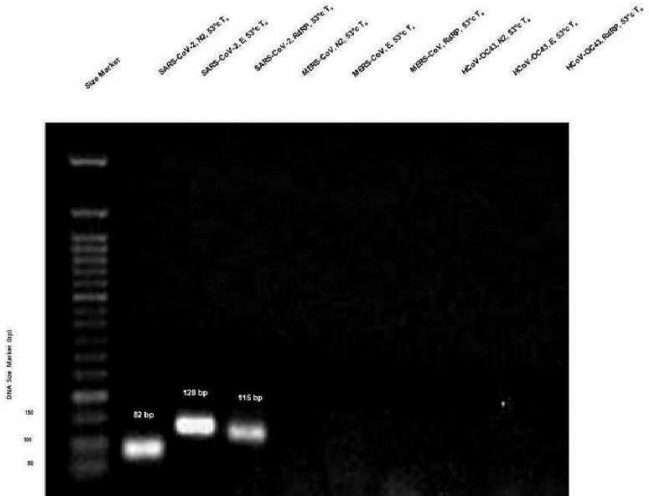
도면17


R primer nSLAM sample (RdRP)
F primer nSLAM sample (RdRP)
Current [μA]
cDNA Concentration [log(Molarity)]
15
12
9
6
3
-28
-25
-22
-19
-16
-13
-10
-7

도면18


N2
E
RdRP
Current [μA]
14
12
10
8
6
4
0
SARS-CoV-2
MERS-CoV
HCoV-OC43

도면19


Size Marker
SARS-CoV-2 N2, 57°C T.
SARS-CoV-2 E, 57°C T.
SARS-CoV-2 RdRP, 57°C T.
MERS-CoV N2, 57°C T.
MERS-CoV E, 57°C T.
MERS-CoV RdRP, 57°C T.
HCoV-OC43 N2, 57°C T.
HCoV-OC43 E, 57°C T.
HCoV-OC43 RdRP, 57°C T.
DNA Size Marker (bp)
150
100
80
82 bp
128 bp
115 bp

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.