



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0167240
(43) 공개일자 2023년12월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6897 (2018.01) C12Q 1/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6897 (2018.05)
C12Q 1/70 (2022.05)
(21) 출원번호 10-2022-0066757
(22) 출원일자 2022년05월31일
심사청구일자 2022년05월31일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김동명
대전광역시 서구 둔산로 223, 7동 303호 (둔산동, 청솔아파트)
이경호
대전광역시 유성구 대정로 28번 안길 80 트리움 아파트2단지 202동 1002호
(74) 대리인
특허법인한얼

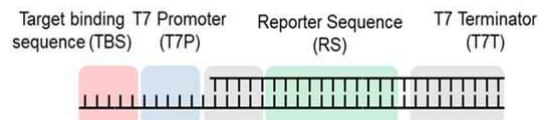
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 타겟 핵산 검출용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

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

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

C12Q 2521/101 (2013.01)

C12Q 2565/20 (2019.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

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

명세서

청구범위

청구항 1

센서 DNA를 포함하는 타겟 핵산 검출용 조성물로,
상기 센서 DNA는
(5') 타겟 핵산 서열 결합 영역 - 프로모터 - 리포터 유전자 (3')
의 구조를 포함하고,
상기 타겟 핵산 서열 결합 영역은 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 단일가닥 DNA(ssDNA)이고,
상기 프로모터는 단일가닥 DNA인, 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 단일가닥 DNA는 4nt 이상의 길이인 것인, 조성물.

청구항 3

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

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 리포터 유전자는 sfGFP, NLuc 및 FLuc로 구성된 군에서 선택되는 단백질; 또는 aptamer (aptamer)를 코딩하는 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 T7 프로모터인, 조성물.

청구항 6

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

청구항 7

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

청구항 8

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

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 뉴클레오티드는 dNTP인 것인, 조성물.

청구항 10

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

청구항 11

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

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

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 시료는 생물로부터 분리된 것인, 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 타겟 핵산은 바이러스의 DNA인 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

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

배경 기술

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

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

[0005] 등온 증폭 방법의 일 예로 LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification) 반응이 있다. LAMP 반응은 표적이 되는 DNA 가닥에서 6 개의 부분을 선택하여 조합한 4 개의 프라이머(primer)로부터 프라이머 결합부위에 루프구조(stem-loop DNA)를 만들어 사슬치환반응을 통해 DNA를 증폭하는 반응으로, 60~65 ℃ 등온에서 표적 ssDNA와 결합하여 증폭할 수 있다 (Nucleic Acids Res. 2000 Jun 15; 28(12): e63). 그러나, LAMP 반응은 짧은 표적에는 작용할 수 없고, 몇 백 개의 염기로 이루어진 핵산만 검출할 수 있다는 한계가 있다. 또한, PCR이나 등온증폭법을 통해 증폭된 핵산의 검출은 SYBR Green과 같은 이중 가닥 DNA 결합염료를 사용하거나, TaqMan기술과 같이 형광염료가 표지된 프로브 서열을 사용하는 등의 방법으로 제한된다. 한편, 타겟 핵산 자체를 증폭하는 방식 대신

타겟 핵산을 매개로 전사 및 번역 반응을 진행시킨 후 이를 통하여 증폭된 전사 혹은 번역 산물을 검출하는 개념의 방법을 개발할 경우, 그 검출 방법이 제한적인 기존의 방법들과 달리 전사 혹은 번역 산물의 생물학적 활성을 통하여 다양한 방법으로 검출이 가능하다. 예를 들어 타겟 핵산에 의해 효소 단백질이 생산되도록 전사 및 번역 반응을 유도할 수 있게 되면 효소에 의한 전환에 의해 색깔이나 형광을 나타내는 기질들을 사용하여 그 검출이 가능하고, 녹색형광단백질 (green fluorescence protein, GFP) 등과 같이 단백질이 스스로 방출하는 형광에 의한 분석도 가능하다. 따라서, 기존에 사용되고 있는 바와 같이 PCR 혹은 등온증폭 방법 등을 통해 증폭된 타겟핵산을 검출하는 방식이 아니라 타겟 핵산을 인식하여 이로부터 활성을 가지는 단백질을 발현 할 수 있는 기술이 개발된다면 핵산 검출을 보다 용이하고 정밀하게 수행할 수 있을 것이다.

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

발명의 내용

해결하려는 과제

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

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

과제의 해결 수단

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

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

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

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

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

[0017] 구체적으로, 본 발명의 센서 DNA는 다음과 같은 구조를 포함하는 것일 수 있다:

[0018] (5') 타겟 핵산 서열 결합 영역 - 프로모터 - 리포터 유전자(3')

[0019] 본 발명의 센서 DNA에서, 상기 타겟 핵산 서열 결합 영역은 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 단일가닥 DNA(ssDNA) 일 수 있다. 구체적으로 상기 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 단일가닥 DNA는, 타겟 핵산 서열의 전부 또는 일부와 상보적인 염기서열을 포함할 수 있다. 구체적으로 상기 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 단일가닥 DNA는 4개 이상의 염기를 포함하는 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 단일가닥 DNA는 12개 이상의 염기를 포함할 수 있다. 일 예로 타겟 핵산 서열에 어닐링할 수 있는 단일가닥 DNA가 4개 내지 11개의 염기로 구성되는 경우, 타겟 핵산 서열은 프로모터 서열을 포함할 수 있다. 그러나

타겟 핵산 서열 존재 하에서만 선택적으로 리포터 핵산 혹은 리포터 단백질을 발현할 수 있다면, 단일가닥 DNA의 길이는 이에 특별히 제한되지는 않는다.

[0020] 본 발명의 센서 DNA에서, 프로모터는 단일가닥으로 구성된 것일 수 있다.

[0021] 일 구현예로, 본 발명의 센서 DNA에 포함되는 프로모터 영역 하단의 리포터 유전자는, 이중가닥 형태 일 수 있다.

[0022] 보다 구체적으로 본 발명의 센서 DNA는 다음 구조를 포함하는 것일 수 있다:

[0023] (5') 타겟 핵산 서열 결합 영역 - T7 프로모터 - 리포터 유전자(3')

[0024] 본 발명의 "T7 프로모터"는 T7 박테리오파지 유래의 프로모터로, 본 발명의 센서 DNA에 포함되는 T7 프로모터 서열은 5'-TAATACGACTCACTATA-3' 또는 이와 상보적인 서열일 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않고, 여타의 프로모터 서열 및 이들과 상보적인 서열, 또는 1 이상의 염기가 부가, 결실 또는 치환되어 동일한 기능을 가지는 서열을 사용할 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 구현예에서, 센서 DNA는 T7 프로모터가 단일가닥으로 구성되어 T7 RNA 폴리머라제에 의해 전사가 개시되지 않으므로 타겟 핵산이 존재하지 않는 환경에서는 리포터 핵산 혹은 리포터 단백질이 발현되지 않는 구조이나, 타겟 핵산이 존재하는 경우 타겟 핵산 서열 결합 영역에 타겟 핵산이 결합한 후, 신장반응을 통해 하단의 T7 프로모터를 이중나선화 함으로써 T7 프로모터 영역 하단의 리포터 핵산 또는 단백질이 발현되는 구조를 가질 수 있다.

[0026] 보다 구체적으로, 본 발명의 센서 DNA는 도 11에 개시된 구조를 포함하는 것일 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에서 센서 DNA의 일부는 단일 가닥으로, 일부는 이중가닥으로 존재하는바, 센서 DNA를 제조하기 위해서는 우라실-특이적 절단 반응을 이용하거나, 제한효소 및 리가아제를 사용할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 "리포터 핵산"이란 센서 DNA로부터 복제 혹은 전사되며, 그의 생성 또는 합성을 용이하게 확인할 수 있는 신호를 발생하는 DNA 혹은 RNA서열이다.

[0030] 구체적으로, 상기 리포터 핵산은 압타머(aptamer)일 수 있다. 일 예로 상기 압타머에는 표지물질이 부착되어 있을 수 있고, 예를 들어 상기 표지물질은 형광물질, 방사성 동위원소, 발광소자, 효소 또는 나노입자 일 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.

[0032] 구체적으로, 상기 리포터 핵산은 말라카이트 그린 (malachite green) 염료와 결합하여 형광을 발생하는 말라카이트 그린 압타머(malachite green aptamer), (5Z)-5-[(3,5-Difluoro-4-hydroxyphenyl)methylene]-3,5-dihydro-2,3-dimethyl-4H-Imidazol-4-one, (Z)-4-(3,5-Difluoro-4-hydroxybenzylidene)-1,2-dimethyl-1H-imidazol-5(4H)-one (DFHBI)와 결합하여 형광을 발생하는 브로콜리 압타머(Broccoli aptamer) 혹은 스피나치 압타머(Spinach aptamer), 망고(mango) 압타머, 및 BFR(Blue Fluorescent RNA) 압타머로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 전술한 구현예 중 어느 하나의 구현예로, 본 발명의 리포터 유전자는 리포터 단백질을 코딩할 수 있다. 본 발명에서, "리포터 단백질"이란 센서 DNA로부터 복제 혹은 전사되며 그의 생성 또는 합성을 용이하게 확인할 수 있는 신호를 발생하는 표지 단백질이다. 상기 신호는 발광(luminescence), 형광(fluorescence), 인광(phosphorescence), 발색, 전자의 이동 등 다양한 형태일 수 있다.

[0034] 구체적으로, 상기 리포터 단백질은 sfGFP(superfolder green fluorescence protein), GFP(Green fluorescent protein), YFP(Yellow fluorescent protein), RFP(Red fluorescent protein), mCherry 형광 단백질, 락타마아제(lactamase), 갈락토시다아제(galactosidase), HRP(Horseradish peroxidase), 글루코스 옥시다아제(glucose oxidase), 및 루시페라아제(Luciferase) 중 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기의 단백질 중 형광단백질들은 무세포 합성 반응액 내에 축적된 형광단백질의 형광을 측정하여 생성 또는 합성을 확인할 수 있다. 효소들의 경우 각 효소에 해당하는 기질을 이용하여 산물의 생성 수준을 측정하여 리포터 단백질의 합성을 확인하게 된다.

- [0035] 구체적으로 상기 리포터 단백질은 형광 단백질 또는 루시페라아제 일 수 있으며, 보다 구체적으로는 sfGFP, 반딧불이 루시페라아제(FLuc), 심해 새우 루시페라아제(NLuc)일 수 있다.
- [0036] 그러나 전술한 예시에 제한되지 않고, 그의 생성 또는 합성을 용이하게 확인할 수 있는 신호를 발생하는 단백질이나, 핵산 서열은 제한없이 포함된다.
- [0038] 본 발명에서 "타겟 핵산"이란 검출하고자 하는 핵산을 의미한다. 타겟 핵산 서열은 DNA 또는 RNA 일 수 있고, ssDNA, RNA 뿐만 아니라 dsDNA 서열 역시 포함될 수 있다. dsDNA의 경우 상보적 가닥의 스위칭을 통해 사용할 수 있으며, 예를 들어 ssDNA를 분리하여 사용하거나, ssDNA가 노출되게 하여 사용할 수 있다.
- [0039] 타겟 핵산 서열의 길이는 본 발명의 센서 DNA가 타겟 핵산 서열의 존재 하에서만 선택적으로 리포터 유전자를 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지 않으나, 일 예로 12nt 이상일 수 있다. 타겟 핵산 서열이 T7 프로모터 서열을 포함하는 경우 T7 프로모터 서열을 제외한 길이는 4nt 이상일 수 있다. 그러나 이에 제한되지 않는다.
- [0041] 본 발명의 조성물은 핵산 및 단백질 합성에 필요한 임의의 구성을 추가로 더 포함할 수 있다. 구체적으로는, 무세포(cell-free) 복제, 무세포 전사 및 무세포 단백질 합성 중 1 이상의 반응에 필요한 구성일 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 "무세포 복제/전사/단백질 합성"이란 세포 내에서 수행되던 복제/전사/단백질 합성을 시험관(in vitro) 등의 생체 외에서 행하는 것을 의미한다. 예를 들어, 무세포 단백질 합성은, 단백질 생산에 필요한 구성 요소들, 즉 세포 내 단백질 합성기구와 이의 인자들 만을 세포에서 추출하여 세포 외부에서 세포의 생리적 조절 기작이 배제된 상태로 단백질의 합성 과정만을 인위적으로 반복시켜 단기간에 목적 단백질을 생산하는 것을 의미한다. 이때, 무세포 단백질 합성에 요구되는 단백질 생합성 기구 즉, 리보솜, 개시인자, 신장인자, 종결인자, 아미노아실티알렌에이(aminoacyl tRNA) 합성효소, RNA 중합효소 등은 세포 추출액에 포함된 것을 이용하거나 별개로 추가하거나, 유전자 재조합 기술에 의해 별도로 생산하여 사용할 수 있다. 이와 마찬가지로, 무세포 복제 역시 핵산의 복제에 필요한 구성 요소들을 세포에서 추출하여 핵산의 복제를 세포 외부에서 수행하는 것을 의미한다.
- [0043] 일 구현 예로, 본 발명의 조성물은 대장균 조추출물(crude extract)에 포함된 구성을 포함할 수 있다. 일 구현 예로, 본 발명의 조성물은 DNA 수선기작(repair)에 필요한 임의의 구성을 포함할 수 있다. 일 구현예로, 본 발명의 조성물은 DNA 중합효소 I (Pol I)등의 DNA 중합효소를 포함할 수 있다. 일 구현 예로, 본 발명의 조성물은 NTP 혹은 dNTP를 포함할 수 있다. 일 구현예로, 본 발명의 조성물은 T7 RNA polymerase를 포함할 수 있다. 그러나 본 발명의 조성물에 포함되는 구성은 타겟 핵산 서열 존재 하에서만 선택적으로 리포터 유전자를 복제/전사하거나 발현하도록 하는 것이면 특별히 제한되지 않는다.
- [0044] 본 발명의 일 구현예에서는 T7 프로모터의 단일가닥 상단에 타겟 서열과 어닐링하는 ssDNA 형태의 타겟 결합 영역, 하단에 리포터 핵산 서열(압타머) 혹은 단백질 코딩 서열이 연결된 센서 DNA의 구조를 고안하였으며, 대장균 조추출물의 존재 하에, 상기 센서 DNA가 타겟서열 존재하에서만 선택적으로 리포터 핵산 또는 리포터 단백질을 발현할 수 있음을 확인하여, 타겟 핵산의 검출에 사용될 수 있음을 확인하였다. 또한, DNA 수선에 필요한 DNA PolI 및 dNTP가 이미 포함되어 있는 조추출물 대신 정제된 단백질 합성 기구들을 사용하는 PURE시스템에서 센서 DNA를 발현하는 경우, DNA Pol I 및 dNTP이 별도로 첨가된 구성요소 존재 하에서, 상기 센서 DNA가 타겟 서열 존재하에서만 선택적으로 리포터 단백질을 합성할 수 있음을 확인하여, 타겟 핵산의 검출에 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0046] 본 발명의 다른 하나의 양태는 본 발명의 타겟 핵산 검출용 조성물에 시료를 첨가하는 단계; 및 무세포 핵산 복제, 전사 및 단백질 합성 중 1 이상의 반응을 수행하여 리포터 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 타겟 핵산 검출 방법을 제공한다.
- [0047] 상기 타겟 핵산 검출용 조성물, 리포터 유전자 및 무세포 단백질 합성 반응에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0048] 상기 리포터 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계에서는 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있다. 일 예로 상기 리포터 단백질이 형광 단백질이거나, 리포터 핵산이 형광표지된 압타머일 경우 형광을 측정함으로써 리포터 유전자의 발현을 확인할 수 있다.

- [0050] 본 발명에서 상기 시료는 검출하고자 하는 타겟 핵산을 포함하거나, 또는 포함하지 않는 것으로서, 본 발명의 타겟 핵산 검출 방법이 적용되는 대상 시료를 의미한다.
- [0051] 일 구현 예로, 상기 시료는 사료, 식품 또는 화학물질로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상에서 유래된 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 일 구현 예로, 상기 시료는 생물로부터 분리된 것일 수 있다. 일 구현 예로, 상기 생물은 식물 또는 동물을 모두 포함한다.
- [0054] 본 발명의 타겟 핵산 검출 방법의 일 구현 예로, 상기 타겟 핵산은 바이러스의 핵산 서열일 수 있다. 이때, 상기 시료는 바이러스 감염에 의심되는 개체로부터 분리된 것일 수 있다.
- [0055] 일 예로, 상기 타겟 핵산은 DNA 또는 RNA 바이러스 유래의 핵산일 수 있다. 예를 들어, 상기 타겟 핵산은 ssDNA 또는 dsDNA 바이러스 유래의 핵산일 수 있다.
- [0056] 상기 바이러스는 본 발명의 타겟 핵산 검출 방법을 통해 그 유전체를 검출할 수 있는 것이면 제한되지 않는다. 예를 들어, 파코바바이러스 (예를 들어, 인유두종 바이러스(HPV), 폴리오마바이러스), 헤파드나바이러스(예를 들어, B형 간염 바이러스(HBV)); 헤르페스 바이러스(예를 들어, 단순포진 바이러스(HSV), 수두 대상 포진 바이러스(VZV), 엡스타인-바르 바이러스(EBV), 거대세포 바이러스(CMV), 헤르페스 림프친화성 바이러스, 장미색 비강진, 카포시 육종-연관 헤르페스 바이러스); 아데노바이러스(예를 들어, 앳아데노바이러스(atadenovirus), 아비아데노바이러스, 이타아데노바이러스, 마스트아데노바이러스, 시아데노바이러스); 폭스바이러스(예를 들어, 두창, 백시니아 바이러스, 우두바이러스, 원두증바이러스, orf 바이러스, 가성우두, 소 구진성 구내염 바이러스; 타나포스 바이러스, 야마 원숭이 종양 바이러스; 연속종 바이러스(MCV)); 파코바이러스(예를 들어, 아데노-연관 바이러스(AAV), 파코바이러스 B19, 인간 보카바이러스, 부파바이러스, 인간 parv4 G1); 제미니바이러스과(Geminiviridae); 나노바이러스과(Nanoviridae); 피코드나바이러스과 등을 포함할 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

- [0058] 본 발명의 타겟 핵산 검출용 조성물을 사용하는 경우 간편하게 시료 내 핵산을 검출할 수 있으므로 분자 진단을 비롯한 다양한 분야에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0060] 도 1A는 우라실을 포함하는 PCR 산물 및 USER 반응을 통해 센서 DNA를 제조하는 과정을 나타낸다. 도 1B는 제한 효소를 사용하여 센서 DNA를 제조하는 과정을 나타낸다.
- 도 2는 본 발명의 센서 DNA 구조의 타겟 결합 영역이 상보적인 ssDNA와 결합하여 무세포 전사 반응 (in vitro transcription)에 의해 Broccoli 형광 압타머를 생성하는 것을 확인한 결과이다.
- 도 3은 본 발명의 센서 DNA 구조가 일부 상보적인 서열과 어닐링하여 리포터 단백질을 발현하는지 확인한 결과이다. 센서 DNA와 결합하는 타겟 서열들은 T7P (OO/OO)의 형태로 표시되어 있으며 이때 앞의 숫자는 타겟 서열을 구성하는 뉴클레오타이드 중 타겟 결합 영역과 어닐링되는 뉴클레오타이드의 숫자를 의미하는 것이며, 뒤의 숫자는 타겟 서열을 구성하는 뉴클레오타이드 중 단일가닥 T7 프로모터와 어닐링되는 뉴클레오타이드의 숫자를 의미한다.
- 도 4는 단백질 합성에 필요한 조건을 변경하여 센서 DNA가 리포터 단백질을 발현하는지 확인한 결과이다. 도 4A는 타겟 서열과 결합한 센서 DNA로부터의 무세포 전사 반응결과를 나타내며, 도 4B의 실험은 정제된 단백질 합성 기구들로 구성된 PURE시스템을 사용하여 타겟 서열과 결합한 센서 DNA로부터의 sfGFP단백질을 합성한 결과를 나타낸다. 도 4A의 왼쪽 세 개 lane은 센서 DNA의 타겟 결합 영역 및 T7 프로모터 서열과 겹쳐서 어닐링 되는 타겟 서열을 사용한 결과이고, 오른쪽 세 개 lane은 타겟 결합 영역과만 어닐링되는 타겟 서열을 사용한 결과이

다.

도 5는 T7 프로모터 상단과 상보적인 부분을 가진 타겟 서열이 센서 DNA와 완전히 어닐링되지 않고 5' 또는 3' 플랩을 가지는 경우 대장균 조추출물을 이용한 무세포 단백질 합성 시스템(도 5A) 또는 Pol I 과 dNTP가 첨가된 PURE 시스템(도 5B)에서 타겟 서열 검출 여부를 확인한 것이다.

도 6은 리포터 단백질을 sfGFP로 사용한 경우 대장균 조추출물 기반 무세포 단백질 합성 시스템 또는 Pol I 과 dNTP가 추가된 PURE 시스템에서 10 nM의 타겟 ssDNA의 존재하에 Signal 대비 Noise (S/N)를 측정된 것이다.

도 7은 다양한 농도의 타겟 ssDNA를 사용하여 이들이 센서 DNA의 타겟 결합 부위와 어닐링함으로써 발현된 단백질의 측정 결과이다. 도 7A 및 도 7B는 양성 대조군인 원래 이중가닥(도 7A) 또는 타겟 서열과 센서 DNA의 어닐링을 통해 발현된 (도 7B) sfGFP의 Signal 대비 Noise (S/N) 값을 DNA 농도에 따라 확인한 것이다. 도 7C 및 도 7D는 대장균 조추출물 기반 무세포 단백질 합성 시스템에서 발현된 sfGFP, FLuc 및 NLuc의 총 단백질 발현 수준과 가용성 단백질 발현 수준 (도 7C) 및 측정된 형광 (sfGFP) 및 발광 (FLuc, NLuc) Signal 대비 Noise (S/N) 값(도 7D)이다. 도 7E 및 도 7F는 NLuc를 리포터 단백질로 사용하여 다양한 농도의 양성 대조군인 원래 이중가닥 (도 7E) 또는 타겟 서열(도 7F) 존재하에 발광(luminescence)을 측정하여 Signal 대비 Noise (S/N) 값을 DNA 농도에 따라 나타낸 것이다.

도 8은 NLuc를 리포터 단백질로 사용하여 Parvovirus B19 (PV)의 염기서열을 검출한 것으로 PV 게놈의 1934-1983의 염기서열 중 일부 서열들을 타겟 서열로 사용하였다. 다.

도 9는 NLuc를 리포터 단백질로 사용하여 Parvovirus (PV) B19의 DNA를 검출한 결과이다. 이때 센서 DNA의 타겟 결합 영역은 PV 게놈의 1958-1971 염기서열과 상보적인 14개의 염기서열로 구성되도록 설계되었다.

도 10은 본 발명의 일 구현예에 의한 핵산 검출 방법을 도시한 것이다.

도 11은 본 발명의 일 구현예에서 센서 DNA가 포함하는 구조를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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

실시예 1. 재료 및 제조 방법

1-1. 재료

ATP, GTP, UTP, CTP, 크레아틴 포스페이트(creatine phosphate), 크레아틴 키나아제(creatine kinase), 및 E. coli MRE600 total tRNA mixture는 Roche Applied Science (Indianapolis, IN, USA)에서 구입하여 사용하였다. L-[U-14C]leucine (11.9 GBq/mmol)는 Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden)에서 구입하였다. 올리고뉴클레오타이드는 Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA)를 통해 합성하였다. High-fidelity VELOCITY DNA 폴리머라제 및 Phusion U Hot Start DNA 폴리머라제는 각각 Bioline (London, UK) 및 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. E. coli 폴리머라제 I, 우라실-특이적 절단 시약(uracil-specific excision reagent: USER), XbaI 제한효소는 New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)에서 구입하였다. T4 DNA 리가아제는 솔젠티즈(Daejeon, Korea)에서 구매하였다. 다른 시약은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)에서 구입하여 추가적인 정제 없이 사용하였다. Nano-Glo 루시퍼라제 어세이 키트 및 PCR clean-up 키트는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. 대장균 조추출물 (S12 추출물)은 BL21Star(DE3)로부터 공지 방법을 통해 수득했다.

1-2. 센서 DNA 제조

sfGFP, FLuc 및 NLuc의 뉴클레오타이드 서열은 C 말단에 6 × 히스티딘 태그와 함께 pK7 플라스미드의 NdeI 및 SalI 제한효소 부위에 클로닝하여, 각각 pK7-sfGFP, pK7-FLuc, pK7-NLuc 플라스미드를 제작하였다.

sfGFP, FLuc, NLuc의 아미노산 서열 및 염기서열 정보는 서열번호 2 내지 7에 나타내었다.

무세포 단백질 합성반응의 주형으로 사용하기 위해 각각 클로닝된 유전자는 하기 표에 기재된 프라이머를 사용

해 PCR 반응으로 증폭하였다.

표 1

[0071]

센서 DNA 제작에 사용된 합성 올리고뉴클레오티드

Oligomers	Sequence (5' -> 3')
T7P-Broccoli	GAGCCACACTCTACTCGACAGATACGAATATCTGGACCCGACCGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTA
T7P-700up-Forward	TAGTCCTGTCGGGTTTCGC
RBS-Reverse	CATATGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATTATTC
T7T-Reverse	CAAAAACCCCTCAAGACCCG
5'UTR-Forward	GACCACAACGGTTTCCCTCTAG
12up-T7P-6U-Forward	CACTGCUCAAAGUAAUACGACUACTAUAGGGUGACCACAACGGTTTCCCTCTAG
PV14up-T7P-6U-Forward	GCAGCCUGACATGUAAUACGACUACTAUAGGGUGACCACAACGGTTTCCCTCTAG
PV24up-T7P-8U-Forward	ACTGUAAGAUGCAGCCUGACAUGTAAUACGACUACTAUAGGGUGACCACAACGGTTTCCCTCTAG
NLuc-NdeI-Forward	AAAAACATATGGTGTTCACCTTAGAA
NLuc-SalI-Reverse	AAAAAGTCGACTTAATGATGGTGATGGTGATGAGA
5'-UTR-XbaI	GGGAGACCACAACGGTTTCCCT
/5'-Phos/ 12up-T7P-5'UTR-XbaI	/5'Phos/CTAGAGGGAAACCGTTGTGGTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACTTTGAGCAGTG

[0072]

말단에 타겟 결합 영역을 가지는 센서 DNA는 도 1에 설명된 바와 같이 i) 우라실이 포함된 프라이머를 사용하여 USER반응에 의해 우라실 포함 부분을 제거하는 방법, 혹은 ii) 합성 올리고뉴클레오티드를 사용하여 타겟 결합 영역과 단일가닥 T7 프로모터 서열 부분이 포함된 올리고뉴클레오티드를 화학적으로 합성하고, 리포터 핵산 혹은 단백질을 입력하는 서열을 PCR 등을 통해 별도로 준비한 후 이 둘을 제한효소 및 리가아제로 처리하여 연결하는 방법을 사용하였다.

[0073]

1) USER반응에 의한 센서 DNA의 제조

[0074]

PCR 진행 과정 중에 각 유전자에 타겟 핵산을 인식하는 타겟 서열 결합 영역 서열을 가했다. 단일가닥으로 구성된 타겟 결합 영역 서열을 가지는 센서 DNA 를 제작하기 위해, PCR의 정방향 프라이머(Forward primer)는 우라실-포함 올리고머를 이용하여 제작하였고(표1), PCR 산물을 USER 반응으로 처리하여 프라이머 부분을 제거하였다. 첫 번째 PCR 반응은 다음을 포함하는 100 μ L 반응 혼합물에서 수행되었다: pK7-sfGFP, pK7-FLuc 또는 pK7-NLuc 2nM; 5'-UTR-정방향 및 GTB-역방향 프라이머 0.5 μ M; dNTP 1mM; 1X Velocity DNA 중합효소 반응 버퍼 90 μ L 및 Velocity DNA 중합효소 2 유닛. 두 번째 PCR 반응을 위해 겔-추출된 DNA 주형은 우라실-포함 정방향 올리고머/GTB-역방향 올리고머 쌍으로 증폭되어 우라실-포함 DNA 주형가닥을 생성하였다. PCR 반응은 다음 구성을 포함하는 100 μ L 반응 혼합물에서 수행되었다: 선형 DNA 주형 2 nM, 올리고머 0.5 μ M, dNTP 1mM, 1X Phusion U 반응 버퍼 및 2 U of Phusion U Hot Start DNA 중합효소.

[0075]

USER 반응은 37 $^{\circ}$ C 에서 다음을 포함하는 반응 혼합물 100 μ L 하에 수행되었다: 우라실-포함 PCR 산물 160 nM, 1 X CutSmart 버퍼, 및 USER 효소 10 U. 3시간 인큐베이션 후, 반응 혼합물을 PCR 클린업 컬럼에 통과시켜 절단된 뉴클레오티드를 제거하였다. 다음으로 Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 를 사용하여 용출된 센서 DNA의 농도를 측정하였다.

[0076]

2) 제한효소 및 리가아제를 사용하는 센서 DNA의 제조

[0077]

타겟 결합 영역, T7 프로모터와 일부 5'-UTR부분으로 구성된 5' 말단 인산화된 하단 서열의 올리고뉴클레오티드 (/5'-Phos/12up-T7P-5'UTR-XbaI)와 일부 5'-UTR과 상보적인 서열을 갖는 상단 서열의 올리고뉴클레오티드(5'-UTR-XbaI)을 결합시킨 첫번째 DNA 단편과 XbaI 제한효소 처리 한 리포터 단백질 서열을 갖는 두번째 DNA 단편을 리가아제를 이용하여 결합시켰다.

[0078]

첫번째 DNA 단편은 상단 서열과 하단 서열 올리고뉴클레오티드의 상보적 결합과 동시에 XbaI 제한효소 서열의 sticky end를 갖도록 설계하였고, 다음을 포함하는 100 μ L 반응 혼합물을 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 상온에서 20 분간 식히어 제작하였다: 상단 서열의 올리고뉴클레오티드와 하단 서열의 올리고뉴클레오티드 45 μ M; 1x 어닐링 버퍼(100 mM Potassium Acetate; 30 mM HEPES, pH 7.5).

[0079]

두번째 DNA 단편은 다음을 포함하는 100 μ L의 반응 혼합물에서 PCR 반응이 수행되었다. 5'-UTR 정방향 프라이머와 GTB-역방향 프라이머 0.5 μ M; dNTP 1mM; 1X Velocity DNA 중합효소 반응 버퍼; Velocity DNA 중합효소

2 유닛. 제작된 10 μ g의 PCR 산물을 20 유닛의 XbaI 제한효소와 37도에서 1시간 반응 시킨 후, PCR 클리닝 컬럼에 통과시켜 두번째 DNA 단편을 정제 및 생성하였다. Ligation 반응은 다음을 포함한 20 μ L 반응액에서 1 시간 동안 상온에서 수행되었다: 120 μ M의 첫번째 DNA 단편; 6 μ M의 두번째 DNA 단편; 400 유닛 T4 DNA 리가아제; 1x T4 DNA 리가아제 버퍼.

[0080] 겔-추출방법을 통하여 첫번째 DNA 단편과 두번째 DNA 단편이 결합된 센서 DNA를 추출하였고, Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)를 사용하여 용출된 센서 DNA의 농도를 측정하였다.

[0082] 1-3. TASR 분석

[0083] 센서 DNA 10 nM을 포함하는 어닐링 버퍼 3 μ L에 타겟 핵산을 첨가하였다. 혼합물은 5분간 90°C로 가열하였고, 상온으로 다시 냉각하여 타겟 핵산이 센서 DNA의 타겟 결합 영역인 anti-target sequence에 어닐링 되도록 하였다. 타겟이 어닐링 된 센서 DNA를 다음의 구성을 포함하는 TASR 분석의 premix solution 12 μ L과 혼합하였다:

[0084] HEPES-KOH (pH 8.2) 57 mM, ATP 1.2 mM, CTP, GTP, 및 UTP 각각 0.85 mM, DL-dithiothreitol 2 mM, *E. coli* 전체 tRNA 혼합물 (MRE600 균주 유래) 0.17 mg/mL, cAMP 0.64 mM, 포타슘 글루타메이트(potassium glutamate) 90 mM, 암모늄 아세테이트(ammonium acetate) 80 mM, 마그네슘 아세테이트 (magnesium acetate) 12 mM, l-5-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid (folinic acid) 34 μ g/mL, 20종 아미노산 각각 1.5 mM, PEG-8000 2% (w/v), 크레아틴 포스페이트(creatine phosphate: CP) 67 mM, 크레아틴 키나아제(creatine kinase) 3.2 μ g/mL, 및 *E. coli* 균주 BL21(DE3) 유래 S12 추출물 26% (v/v).

[0085] 위의 반응 혼합물은 30°C에서 3시간 동안 유지한 후 1-4에 기술된 바와 같이 TASR 분석으로 발생한 신호를 측정하였다. 한편, TASR 반응과정에서 합성되는 단백질의 정량을 위해서는 위의 반응액에 L-[U-¹⁴C]leucine (12.136 GBq/mmol) 10 μ M를 반응 혼합물에 첨가하였다. 그리고 liquid scintillation counter (Wallac 1410, PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 사용해 공지 방법으로 trichloroacetic acid-precipitated radioactivity를 측정하였다.

[0087] 1-4. TASR 신호분석

[0088] sfGFP를 리포터로 사용한 센서 DNA를 이용하여, TASR 분석에서, 완료된 분석 반응의 10 μ L 샘플을 190 μ L의 PBS 버퍼와 혼합하고 96웰 마이크로플레이트로 옮겨 형광 강도를 측정하였다.

[0089] FLuc를 리포터로 사용한 실험에서, 완료된 분석 반응의 10 μ L 샘플을 90 μ L의 발광(luminescence) 버퍼 (20 mM의 Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM의 마그네슘 카보네이트(magnesium carbonate), 2.7 mM의 마그네슘 설페이트 (magnesium sulfate), 0.1 mM의 EDTA, 33 mM의 DL-dithiothreitol, 270 μ M의 코엔자임 A(coenzyme A), 530 μ M의 ATP, 470 μ M의 D-루시페린(D-luciferin)) 와 혼합하고 25°C에서 5분 인큐베이션 후 발광 강도를 측정하였다.

[0090] TASR 분석에 의해 합성된 NLuc의 발광을 측정하기 위해, 모든 분석 구성은 상온으로 평형화 하고 Nano-Glo® Luciferase Assay Substrate를 50 부피의 Nano-Glo® Luciferase Assay Buffer로 희석하였다. 96웰 백색 폴리 스티렌 마이크로플레이트에서 완료된 분석 반응의 10 μ L 샘플을 PBS 버퍼 40 μ L로 희석하였고 동일 부피의 2x 어세이 버퍼로 보충하였다. 25°C에서 5분 인큐베이션 후 발광 강도는 CLARIO Star microplate reader를 이용해 측정하였다.

[0092] TASR분석을 위한 타겟 서열로 사용한 DNA 올리고머의 명칭 및 해당하는 서열 정보는 하기 표와 같다.

표 2

[0093] TASR분석에 사용된 타겟 DNA서열

Oligomers	Sequences (5'→ 3')	Tm (°C)	GC (%)
T7P(00/17)	TAATACGACTCACTATAGG	44.5	33.3
T7P(02/17)	AGTAATACGACTCACTATAG	47.9	34.8

T7P(04/17)	<u>AAAGTAATACGACTCACTATAG</u>	49.2	38.1
T7P(06/17)	<u>TCAAAGTAATACGACTCACTATAG</u>	49.5	33.3
T7P(04/17)	<u>AAAGTAATACGACTCACTATA</u>	45.4	28.6
T7P(04/15)	<u>AAAGTAATACGACTCACTA</u>	44.6	31.6
T7P(04/11)	<u>AAAGTAATACGACTC</u>	37.3	33.3
T7P(08/06)	<u>GCTCAAAGTAATACG</u>	39.9	40.0
T7P(11/03)	<u>ACTGCTCAAAGTAA</u>	38.8	35.7
T7P(12/00)	<u>CACTGCTCAAAG</u>	36.7	50.0
5'-10nts- T7P(12/00)	CGTTCTAGTACACTGCTCAAAG	-	-
T7P(12/00)-3'- 10nts	CACTGCTCAAAGGCTACCATGG	-	-
5'-10nts- T7P(12/00)-3'- 10nts	CGTTCTAGTACACTGCTCAAAGGCTACCATGG	-	-
PV-T7P(05/17)	<u>ACATGTAATACGACTCACTATA</u>	48.1	31.8
PV-T7P(12/00)	<u>AGCCCTGACATG</u>	41.8	58.3
PV-T7P(14/00)	<u>GCAGCCCTGACATG</u>	49.9	64.4
PV-T7P(17/00)	<u>GATGCAGCCCTGACATG</u>	53.6	58.8
PV-T7P(24/00)	<u>ACTGTAAGATGCAGCCCTGACATG</u>	59.1	50.0
PV(1934-1983)- 50nts	TAAAGTTAAACTTTACTGTAAGATGCAGCCCTGACATGGGGTTACTAACA'	-	-
* Underlined sequence indicates the T7 promoter region(밑줄 부분은 T7 프로모터 영역을 나타냄)			

실시예 2. 무세포 단백질 합성을 이용한 핵산 검출

2-1. 외래 핵산에 반응한 리포터 단백질의 합성

핵산을 검출할 수 있는 번역 신호 생성을 위한 개념을 증명하기 위해 비주형 가닥 (non-template strand) T7 프로모터서열에 의해 개시되는 무세포 단백질 합성 시스템을 고안하였다.

센서 DNA를 도 1A 또는 도 1B의 방법에 의해 제조하였다. 형광 압타머인 Broccoli 압타머를 리포터 유전자로 사용하여 제조된 센서 DNA를 직접 in vitro transcription의 주형으로 사용하였을 경우, 예상과 같이, 유의미한 수준의 전사가 일어나지 않음을 확인하였다. 그러나, T7 프로모터 서열의 비주형 가닥이 코딩된 올리고뉴클레오타이드와 센서 DNA를 어닐링한 후 in vitro transcription반응을 수행한 경우 현저히 향상된 형광값을 얻을 수 있었다 (도 2A).

sfGFP의 유전자를 리포터 유전자로 사용하여 제조된 센서 DNA를 직접 무세포 단백질 합성을 위한 주형으로 사용하였을 때, 예상한 바와 같이, 유의미한 수준의 sfGFP를 생성하지 못했다(도 3A, 도 3B).

그러나 sfGFP 생산량은 센서 DNA를 T7 프로모터 서열의 비주형 가닥이 코딩된 올리고뉴클레오타이드와 어닐링함으로써 현저하게 향상되었다(도 3A). 주형가닥의 T7 프로모터 서열과 정확히 상보적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드를 (T7P (00/17)로 표시) 모델 타겟으로 사용한 초기 실험에서, sfGFP는 전체 서열이 이중나선으로 구성된 DNA로부터 sfGFP를 발현한 양성 대조군 반응에 비하여 약 58.7 % 수율로 생성되었다. 더욱이, sfGFP 합성의 수율은 센서 DNA의 T7 프로모터 부분에 더하여 그 5'-상단의 염기서열과도 추가적으로 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드가 공급되었을 때 더욱 증가했으며 (도 3A), 이는 대부분 타겟-타겟 결합 부위 복합체의 안정화에 의한 것일 가능성이 높다.

도 3A에 나타낸 바와 같이, 추가적인 뉴클레오타이드의 수가 증가하는 올리고뉴클레오타이드를 조사하였을 때, 타겟과 타겟 결합 영역 서열 사이에 4개 이상의 추가적인 염기쌍이 형성되는 경우 sfGFP 합성 수율은 양성 대조군 반응과 거의 유사하였다. 이러한 조건에서 20nM 올리고뉴클레오타이드에 반응한 신호 대비 노이즈 비율은 2.4×10^2 수준으로 높았다.

이 결과는 T7 폴리머라제 및 T7 프로모터에 의한 전사 기작이 외래 첨가된 핵산을 인식함으로써 활성화되고, 이를 통하여 신호를 생성할 수 있을 만큼 충분한 양의 리포터 단백질이 무세포 단백질 합성 시스템에서 생성된다

는 사실을 뒷받침한다.

[0104] **2-2. T7 프로모터 상단(upstream) 서열을 이용한 센서 DNA에 의한 타겟 인식**

[0105] 상기 실시예의 결과로부터 외래 핵산에 의해 무세포 전사 및 번역 반응이 조절될 수 있음을 인식하였다. 그러나 위의 결과는 T7 프로모터의 비주형 서열을 모델 타겟으로 실시하여 얻어진 것으로, 실제 다양한 병원성 핵산 검출에 이를 적용하려면, 고정된 T7 프로모터 서열이 아닌 다양한 서열들을 인식하고 이로부터 전사와 번역이 이루어질 수 있도록 센서 DNA의 타겟 결합영역에 의한 타겟 서열의 인식은 프로모터 서열과 별도의 위치에서 이루어질 수 있도록 프로그래밍이 가능하여야 한다. 이는 타겟 인식은 프로모터 영역 밖 (구체적으로는, 프로모터 하단(downstream)에 코딩되는 리포터 단백질 발현에 영향을 주지 않기 위해, 프로모터 상단(upstream) 서열) 에서 발생해야 한다는 것을 의미한다.

[0106] 동족(cognate) T7 RNA 폴리머라제가 전사반응을 시작하기 위해서는 T7 프로모터가 적어도 부분적으로 이중가닥이어야 한다는 사실이 알려져 있다. 또한 앞의 실시 예에서 도 3A에 나타낸 바와 같이, TASR분석에서 리포터 단백질은 무세포 전사 및 번역의 순차적 반응을 통하여 생성되므로 리포터 단백질이 생성되기 위해서는 무세포 전사 반응이 선행적으로 개시되어야 한다. 센서 DNA의 T7 프로모터 주형가닥과 다양한 길이로 어닐링되는 올리고뉴클레오티드를 첨가한 후 in vitro transcription 반응을 수행한 결과, 전사가 일어나기 위해서는 타겟-센서 듀플렉스는 적어도 센서 DNA 주형가닥 프로모터의 적어도 처음 15개 뉴클레오티드를 포함해야 한다는 것을 확인하였다 (도 2B).

[0107] 그러나, 타겟-어닐링된 센서 DNA의 작용은 대장균 조추출물 기반 무세포 단백질 합성 반응물에서 상이하였다. 타겟-프로브 어닐링 영역이 T7 프로모터 상단에서 점차적으로 제거되었을 때, 놀랍게도 T7 프로모터 주형가닥 서열과는 전혀 어닐링하지 않고 그 5'- 상단의 서열과 어닐링하는 올리고뉴클레오티드를 사용한 경우에도 sfGFP가 유의미하게 합성되는 것을 확인하였다 (T7P (12/00), 도 3B).

[0108] 이러한 결과는 세포 추출물에 의한 정확한 DNA 합성경로를 특정할 수 없더라도, 세포 추출물은 T7 프로모터와 그 상단 서열이 단일가닥화 되어 전사적으로 비활성된 TASR 센서 DNA의 T7 프로모터 서열 상단에 상보적인 서열의 DNA가 어닐링될 경우 어닐링된 DNA를 프라이머로 사용하여 그 하단으로 신장시킴으로써 T7 프로모터 부분을 이중가닥화 하는 능력을 유지하고 있고, 이를 통해 프로모터 하단의 리포터 유전자의 전사 및 번역을 가능하게 한다는 것을 나타낸다. 또한 이 결과는 센서 DNA의 T7 프로모터 상단을 목적하는 타겟 서열과 어닐링할 수 있는 서열로 프로그래밍함으로써 다양한 서열의 타겟 핵산을 무세포 전사 및 번역반응을 통해 감지할 수 있다는 것을 의미한다.

[0110] **2-3. TASR 시스템에 대장균 조추출물(crude extract) 및 dNTP의 적용**

[0111] TASR 분석을 위한 반응 혼합물은 대부분의 세포 효소를 포함하는 대장균 조추출물을 사용하여 구성되었다. 따라서 T7 프로모터 상단에 어닐링된 타겟 DNA는 E. coli DNA중합효소의 작용에 의해 T7 프로모터 영역까지 신장되었을 것으로 추측하였다.

[0112] 특히, E. coli의 DNA 복구 효소인 DNA 중합효소 I (Pol I)은 타겟 DNA의 신장을 담당하는 것으로 추측된다. 이는 조추출물 기반 무세포 단백질 합성 시스템 대신 PURE시스템을 사용하여 수행한 결과를 통해 확인되었다. 본원에서 사용한 무세포 단백질 시스템과 다르게 PURE 시스템은 36종의 정제된 효소 및 70S 리보솜을 혼합하여 구성한 시스템으로, 번역에 필요한 효소들의 재조합 단백질을 별도로 제조하여 혼합함으로써 구성되며, 따라서 여타의 세포 유래 효소를 포함하지 않는다(Nature Biotechnology. 2001; 19: 751-755). 이에, 무세포 전사 반응액에 RNA중합효소/NTP 및 DNA 중합효소/dNTP를 첨가하여 이들이 전사반응의 진행에 미치는 영향을 조사하였다.

[0113] PURE시스템을 사용할 경우, 조추출물을 사용한 무세포 합성 시스템을 사용한 결과와 달리 T7P(12/00)에 의해 어닐링된 센서 DNA는 전사를 통한 mRNA 합성을 유도할 수 없었으나, 반응 용액에 Pol I 및 dNTP를 보충했을 때 mRNA를 생성할 수 있었다 (도 4A). 도 4A의 왼쪽 결과로부터, 타겟 서열의 일부가 T7프로모터와 어닐링이 될 경우에는 RNA중합효소/NTP의 첨가만으로도 상당한 수준의 전사 반응이 일어나지만, 도4A의 오른쪽 결과에서 보는 것처럼, 타겟 결합 영역만이 어닐링 될 경우에는 RNA중합효소/NTP에 더하여 DNA중합효소/dNTP가 추가적으로 가해진 경우에만 전사가 일어남을 알 수 있었다. 이는, T7 프로모터 상단에 어닐링된 타겟 서열이 DNA 중합효소에

의해 연장되어 하단의 T7 프로모터 부분도 이중나선화 되기 때문으로, 전사가 일어나기 위해서는 최소한 T7 프로모터의 5'부분의 일부가 이중나선을 이루고 있어야 함을 의미한다.

- [0114] 센서 DNA의 타겟 결합 영역에 어닐링된 타겟의 Pol I 매개된 신장은 PURE시스템으로부터 합성되는 sfGFP의 형광 측정을 통하여 재확인 되었다. PURE 시스템 (RNA중합효소와 NTP가 포함되어 제공됨)에 DNA중합효소/dNTP를 첨가한 후 sfGFP의 합성을 분석한 결과를 도 4B에 나타내었다.
- [0115] PURE 반응 혼합물에서는 올리고뉴클레오타이드 T7P(12/00)와 어닐링된 센서 DNA는 sfGFP 형광을 생성하지 못한 반면, Pol I 및 dNTP를 보충하여 준 결과 sfGFP 생성 수준은 전체 이중가닥 DNA를 이용한 대조군과 유사한 수준으로 상승하였다 (도 4 B). 도4A의 무세포 전사반응의 결과와 마찬가지로, 타겟 서열이 센서 DNA의 T7 프로모터 일부와 겹치는 경우에는 DNA중합효소/dNTP의 추가적인 첨가 없이도 sfGFP단백질이 생성되나, 타겟 서열이 센서 DNA의 타겟 결합 영역과만 어닐링 되는 경우에는 sfGFP의 합성은 DNA중합효소/dNTP가 추가될 경우에만 일어났다.
- [0116] 마지막으로, 대장균 조추출물을 이용한 무세포 단백질 합성 조건에서 DNA중합효소/dNTP 첨가한 결과를 도 4C에 나타내었다. PURE시스템을 사용한 경우와 달리 별도의 DNA중합효소 및 dNTP를 첨가하지 않아도 리포터 단백질인 sfGFP가 발현됨을 알 수 있으며, 이는 대장균 조추출물에 이미 Pol I 및 dNTP가 포함되어 있기 때문이다. 그러나, 추가적인 Pol I 및 dNTP의 첨가를 통해, 조추출물(crude extract)을 이용한 반응물에서의 sfGFP 생성도 어느 정도 향상시켰다. 이 경우, 형광 강도는 T7P(12/00)-어닐링된 센서 DNA 주형에 3U/mL의 Pol I과 0.25mM dNTP를 보충한 경우 원래 대비 50% 상승한 반면 Pol I만을 보충한 경우는 약간 증가하였다(도 4C).
- [0117] 따라서, dNTP의 보충이 무세포 단백질 합성에서의 DNA 중합효소에 의한 DNA 듀플렉스 형성에 중요한 요소임을 확인하였다.
- [0118] 또한, 대장균 조추출물 기반 무세포 단백질 합성 시스템의 사용은 검출 할 핵산의 타겟 서열을 결정하는 자유도 (degree of freedom)를 증가시켰다.
- [0120] DNA Pol I을 포함한 대부분의 DNA 폴리머라제는 프라이머 서열의 3' 말단이 주형가닥과 완전히 상보적으로 일치하는 경우에만 프라이머의 신장을 매개할 수 있으며, 3' 말단이 주형가닥과 상보적이지 않아 플랩을 형성하는 경우 이를 신장할 수 없다. 본 발명의 방법을 병원체로부터 추출된 핵산 등에 적용하고자 하는 경우 센서 DNA의 타겟 결합 영역은 분석하고자하는 핵산의 다양한 부위를 타겟팅 할 수 있어야 할 것이다. 분석하고자 하는 핵산의 중간 부위를 타겟팅하게 될 경우 타겟 핵산과 센서 DNA의 결합은 필연적으로 5'-플랩 및 3'-플랩 구조를 형성하게 된다. 따라서, 5'-플랩 혹은 3'-플랩을 형성하는 타겟과의 결합을 통해서도 무세포 전사 및 번역 반응이 진행될 수 있는 지를 조사하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0121] 도 5A의 결과에서 보이는 것처럼 Pol I 및 dNTP가 첨가된 PURE시스템을 사용하여 TASR분석을 수행할 경우, 표2의 [5'-10nts-T7P(12/00)] 서열을 타겟 서열로 사용함으로써, 센서 DNA의 타겟 결합 영역 서열과 타겟 서열의 어닐링이 5' 플랩을 형성할 경우 양 말단에 플랩을 형성하지 않는 대조군과 대등한 수준으로 sfGFP가 발현되나, 표2의 [T7P(12/00)-3'-10nts]서열을 타겟 서열로 사용함으로써 센서 DNA와 타겟 서열이 3' 플랩을 형성하며 어닐링되는 경우에는 유의미한 수준의 sfGFP발현이 이루어지지 않았다. 이를 요약하면, PURE시스템을 사용한 경우 5' flap의 존재는 sfGFP발현에 큰 영향을 미치지 않으나 3' flap서열이 존재할 경우 리포터 단백질인 sfGFP가 전혀 발현되지 않음을 알 수 있었고, 이는 3' flap서열로 인해 Pol I에 의한 타겟 서열의 신장이 이루어지지 않았기 때문이다.
- [0122] 이와는 대조적으로, 대장균 조추출물 기반 무세포 단백질 합성 시스템을 이용한 TASR분석에서는 플랩을 형성하지 않는 타겟 서열과 5' 플랩을 형성하는 타겟 서열뿐만 아니라 3' 플랩 서열이 존재하는 경우에도 3' 플랩 서열 없이 완전히 어닐링된 대조군과 비교하여 70%가량의 sfGFP형광이 관찰되었다. 이는 조추출물에 존재하는 nuclease활성에 의해 flap부분이 삭제되어 상단에 어닐링된 타겟 서열의 신장이 이루어졌기 때문이다. 또한, 표2의 [5'-10nts-T7P(12/00)-3'-10nts] 서열을 타겟 서열로 사용함으로써 센서 DNA와의 어닐링 시 5'- 및 3'-플랩이 동시에 형성되는 경우에도 대장균 조추출물을 사용한 TASR 분석에서 센서 DNA를 활성화할 수 있었다(도 5B).
- [0123] 이러한 결과는 PURE 시스템에 없는, 3'-플랩을 처리하는 뉴클레아제 활성이 조추출물에 포함되어 있음을 나타낸다.

[0125] **2-4. TASR 시스템에 리포터 단백질 나노루시페라제(nanoluciferase: NLuc)의 적용**

[0126] 위의 결과에서 기술한 바와 같이, DNA 폴리머라제와 dNTP가 첨가된 PURE시스템과 조추출물 기반 무세포 단백질 합성 시스템은 모두 센서 DNA의 프로브 부분과 완전히 어닐링되는 타겟 서열에 의해 무세포 전사 및 번역 반응을 일으킬 수 있음을 알 수 있었다. 그러나, PURE시스템의 경우 DNA 폴리머라제와 dNTP가 추가 되더라도 조추출물을 사용한 반응과 비교할 때 시그널 대비 노이즈 비율이 상당히 낮았다 (도 6: 54.0 vs 235.8). 이는 PURE 시스템의 단백질 생산성이 대장균 조추출물 기반의 무세포 단백질 합성 시스템에 비하여 상대적으로 낮기 때문인 것으로 추정하였다.

[0127] 구체적으로 sfGFP를 코딩하는 동일한 주형 DNA가 발현되었을 때, 추출물 기반 무세포 단백질 시스템에 의해 합성된 sfGFP 대비 PURE 시스템에서는 30%만 생성 가능하였다 (도 5). 또한, PURE 시스템은 3'-플랩을 처리하는 기작이 없으므로 센서 DNA와의 어닐링 시 3'-플랩을 형성하는 타겟 서열은 PURE 기반 TASR 분석에서는 검출되지 않았다. 이는 PURE시스템을 이용하여 병원체 등의 핵산 서열을 TASR분석을 통해 검출하고자 할 경우 센서 DNA는 분석하고자 하는 핵산의 3' 말단 부위만을 타겟팅 할 수 밖에 없고 타겟 핵산의 중간 부위를 타겟팅 할 경우 3'-플랩이 형성되므로 TASR분석은 불가능하다는 것을 의미한다. 따라서, 핵산 검출의 민감도를 높이고, 검출하고자 하는 핵산 타겟의 타겟팅 부위를 자유롭게 선정하여 분석하기 위해서는 조추출물 기반 무세포 단백질 시스템을 채택하는 것이 바람직하다고 결론내렸다.

[0128] 대장균 조추출물 기반 무세포 단백질 합성 시스템을 이용하는 TASR분석의 특성을 구체적으로 파악하는 실험을 수행하였다. 우선, TASR 분석의 핵산 검출의 민감도 수준을 확인하기 위해 측정 가능한 DNA 농도를 테스트하였다. 조추출물 기반 무세포 단백질 시스템에서 sfGFP를 코딩하는 주형 DNA 농도를 감소시키면서 발현시킨 결과, DNA 농도가 500fM으로 낮아질 때까지 형광 신호가 감지되었다(도 7A).

[0129] 주형 DNA를 올리고뉴클레오타이드 T7P(12/00)를 검출하는 센서 DNA로 변경하고, 여기에 T7P(12/00) 서열의 올리고뉴클레오타이드를 다양한 농도로 첨가하여 반응시킨 결과, 500pM 이상의 올리고뉴클레오타이드가 타겟 DNA로 사용될 경우 검출 가능한 신호가 생성되었다 (도 7B).

[0130] TASR 분석의 민감도를 더욱 증가시키기 위해, 센서 DNA에 의해 코딩되는 리포터 단백질을 sfGFP를 NLuc로 변경하였다. NLuc는 심해 새우(deep sea shrimp) 루시페라제의 조작된 형태이다.

[0131] 일반적으로 사용되는 루시페라제는 반딧불이 루시페라제(firefly luciferase: FLuc)이나, 본원에서 사용된 대장균 추출물 기반 무세포 단백질 합성을 위해서는 FLuc에 비해 NLuc이 사용하기에 적합하였다. 예를 들어 주형 DNA 10 pM를 사용한 동일한 반응 조건에서, NLuc는 FLuc에 비하여 각각 20배 이상 더 높은 발현량 및 가용성 수율을 나타냈다(도 7C). 또한, 무세포 합성된 NLuc는 FLuc 대비 시그널 대비 노이즈 비율이 1.5×10^3 배 이상 높았다(도 7D). 리포터 단백질로서 비교된 세 가지의 단백질들 중 NLuc가 가장 높은 발현량과 가용성 및 S/N값을 보임이 확인되었는바, 이러한 결과를 기반으로 NLuc를 TASR 분석의 리포터 효소로 사용하였다.

[0132] NLuc를 코딩하는 주형 DNA 농도를 감소시키면서 조추출물 기반 무세포 단백질 반응을 수행하였다. DNA 농도가 500 aM 수준으로 감소할 때까지 식별가능한 발광 신호가 검출되었다 (도 7E). 이는 도 7A의 sfGFP 발현 결과와 비교할 때, 1,000배 이상의 높은 민감도로 NLuc가 검출될 수 있음을 나타내는 것이다.

[0133] T7P (12/00)를 타겟 서열로 사용하여 센서 DNA와 어닐링하였을 때, sfGFP 실험에서와 마찬가지로 전체 서열이 이중 나선으로 구성된 대조군에 비하여 신호의 강도가 낮기는 했지만, 타겟 서열의 농도가 5fM이 될 때까지 유의미한 수준의 발광 신호를 나타냈다(도 7F).

[0135] **2-5. TASR 분석을 통한 Parvovirus B19 서열의 검출**

[0136] 앞선 실시예를 통해 개발한 TASR 분석을 합성된 바이러스 DNA서열의 검출에 적용하였다.

[0137] 단일가닥 DNA 인간 바이러스인 Parvovirus B19 서열을 검출하기 위한 실험을 수행하였다. 도 8은 NLuc를 리포터 단백질로 사용하여 Parvovirus B19 (PV)의 염기서열을 검출한 것으로 PV 게놈의 1934-1983의 염기서열 중 일부 서열들을 타겟 서열로 사용하였다. PV 게놈 1934-1983 서열 중 3'- 말단의 24개 염기서열 [PV-T7P(24/00)]에 상보적이 되도록 센서 DNA의 타겟 결합 영역을 설계한 후 여기에 PV 게놈 1934-1983 3'-말단의 24개 [PV-T7P(24/00)], 17개 [PV-T7P(17/00)], 14개 [PV-T7P(14/00)], 12개 [PV-T7P(12/00)] 서열을 타겟 서열로 선정하여 TASR분석을 수행하였다. 또한 PV 게놈 1934-1983 서열의 3'- 말단 5개 염기에 더하여 17개 염기의 T7 프로모

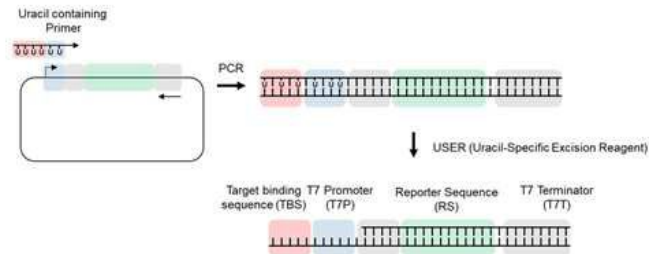
터 서열과도 어닐링을 하는 타겟 [PV-T7P(05/17)]에 대하여도 조사하였다. 센서 DNA와 결합하는 어떠한 타겟 서열도 가해지지 않은 결과를 음성 대조군으로 사용하여 S/N값을 측정하였다. 결과에서 보는 바와 같이, T7 프로 모터 서열 상단의 타겟 결합 영역에 12개 이상의 염기로 상보적으로 결합하는 모든 타겟 서열로부터 유의미한 S/N값의 증가를 관찰할 수 있었다. 사용된 타겟 서열 길이의 증가를 통해 어닐링의 T_m값을 증가시킬 경우 보다 안정적인 어닐링을 통해 발광신호가 증가할 것으로 예상하였으나, T_m값에 따른 발광신호의 변화는 크지 않은 것으로 나타났다. 즉, 12개 염기와의 어닐링을 통해 41.8 °C의 T_m값을 가지는 경우에 비하여 24개 염기와의 어닐링을 통해 59.1 °C로 T_m값이 증가된 경우에도 S/N값의 변화는 크게 나타나지 않았다. 더 높은 T_m 값을 가진 타겟 서열의 어닐링 시 예상되는 발광 신호 증가는 T_m 값이 59.1 °C로 증가하더라도 관찰되지 않았다. (도 8). 이는 12개 이상의 염기서열로 구성된 타겟 서열을 사용할 경우 센서 DNA와의 어닐링이 안정적으로 유지될 수 있음을 의미한다.

- [0139] 다음으로, 합성된 PV B19 서열의 1958 ~ 1971에 해당하는 14개 염기로 구성된 타겟 서열에 대해 상보적인 타겟 서열 결합 영역을 갖는 센서 DNA를 이용해 PV B19 DNA (1934 ~ 1983, PV-50nts)를 테스트하여 결과를 도 9에 나타내었다. 센서 DNA의 타겟 결합 영역은 PV 게놈의 1958~1971 염기서열과 상보적인 14개의 염기서열로 구성되도록 설계되었으며, PV 게놈의 1934~1983 염기서열을 타겟서열로 사용하였으므로 센서 DNA와 타겟 PV 서열의 어닐링은 타겟 서열의 5'과 3' 말단에 각각 24개 및 12개 염기 길이의 flap을 형성하게 된다.
- [0140] 앞선 실시 예와 마찬가지로 TASR 분석은 가해진 PV B19서열의 용량의존적으로 발광 수준이 증가하는 결과를 나타냈다.
- [0141] PV 50nts의 농도를 변화시키며 수행한 실험 결과, 타겟 서열의 농도가 10fM이 될 때까지 음성 대조군에 비하여 통계적으로 유의미하게 증가된 발광수준을 확인하였다.
- [0142] 즉, 앞선 도 8의 결과와 마찬가지로, 대장균 조추출물 기반의 무세포 단백질 합성 시스템에서는 5', 3' flap이 존재하는 상태에서도 그렇지 않은 경우에 비해 대등한 민감도로 타겟을 검출할 수 있음을 알 수 있으며, 이는 검출하고자 하는 핵산의 타겟 부위를 자유롭게 설정할 수 있음을 의미한다.
- [0144] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

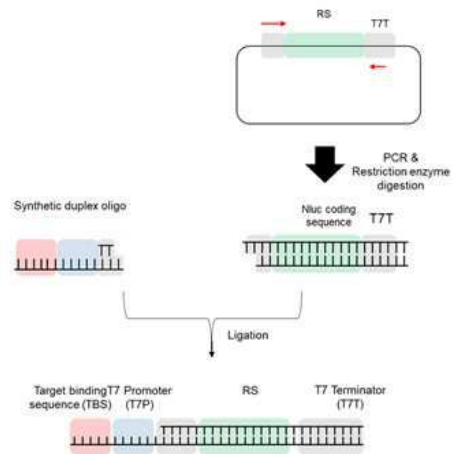
도면

도면1

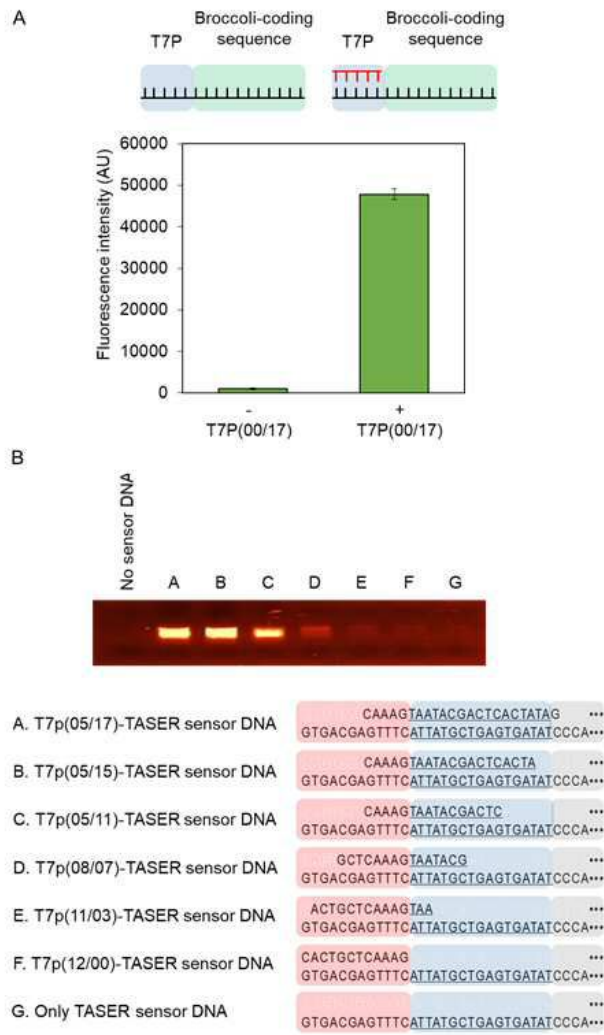
A



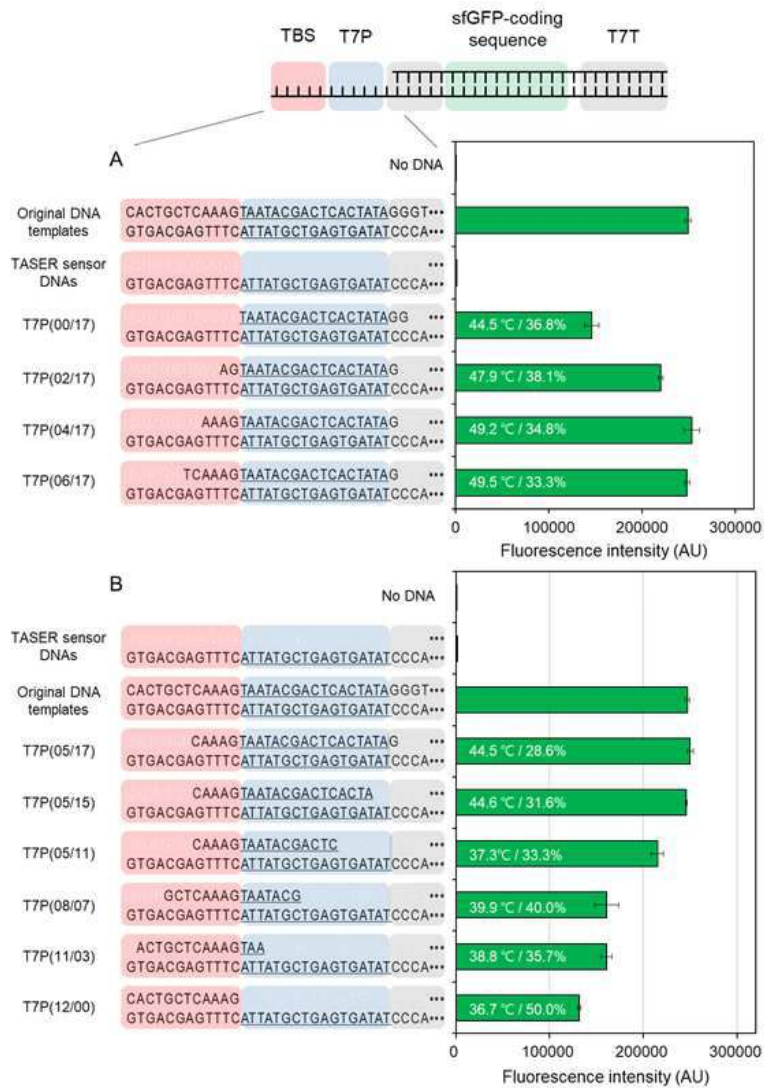
B



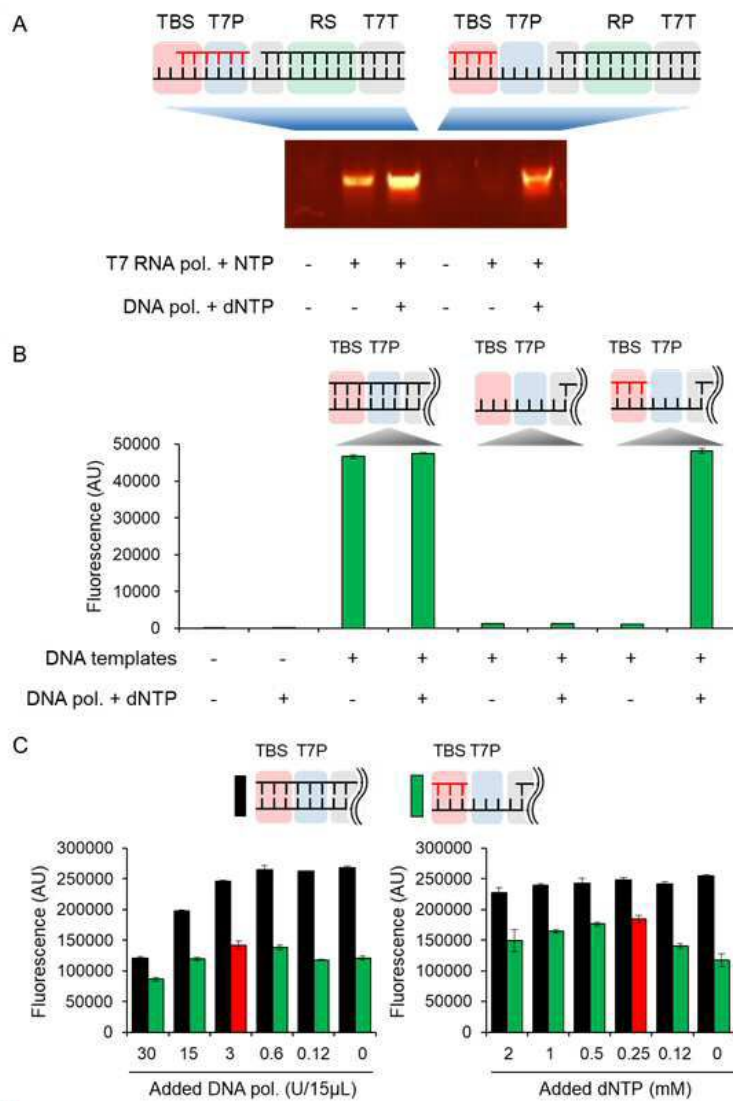
도면2



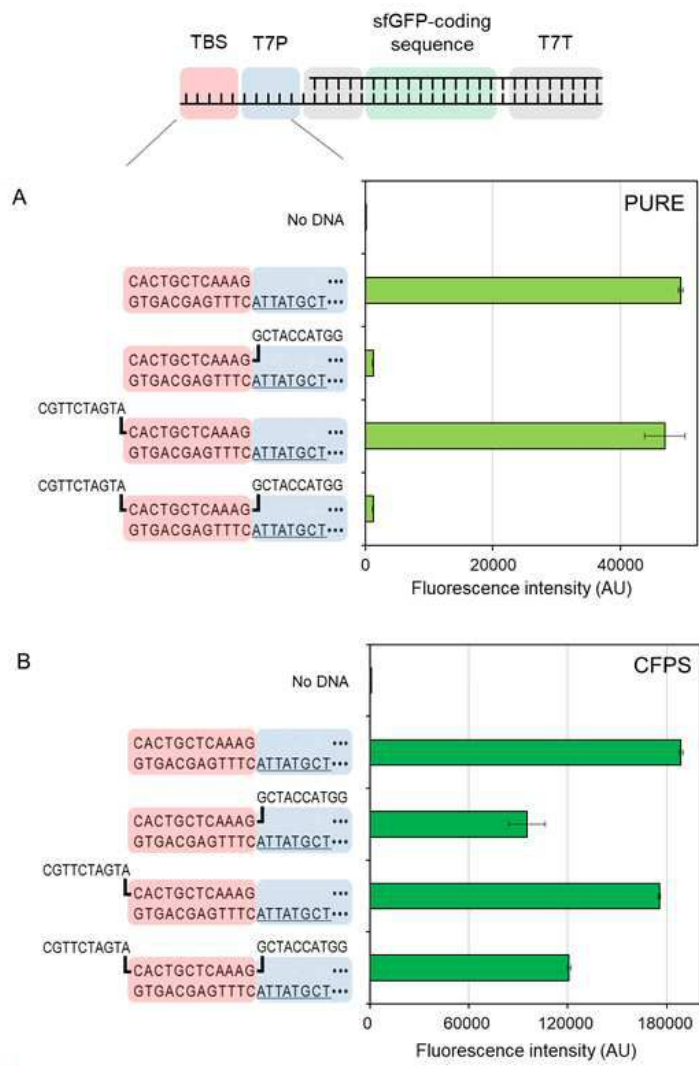
도면3



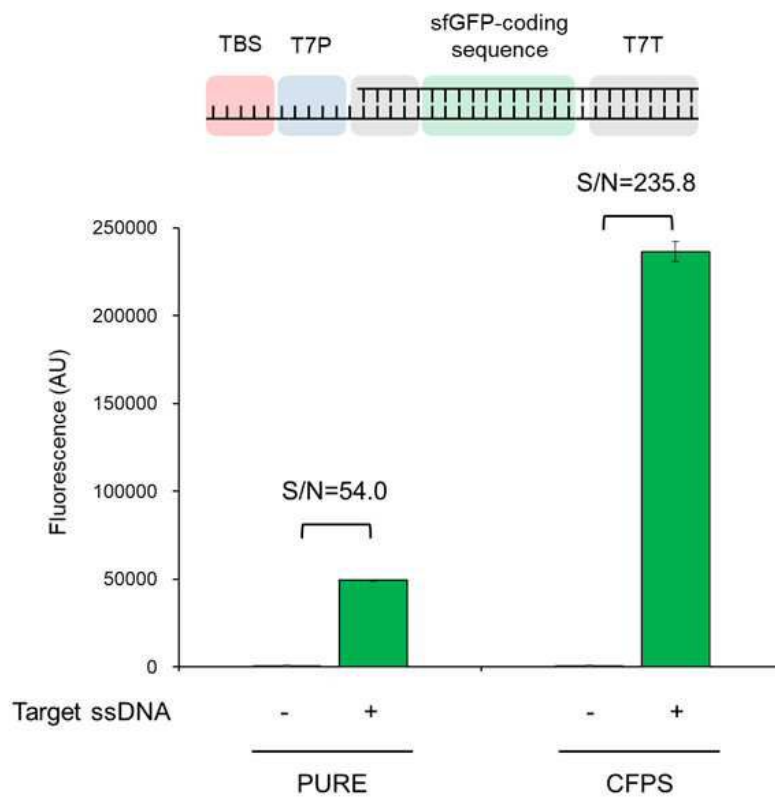
도면4



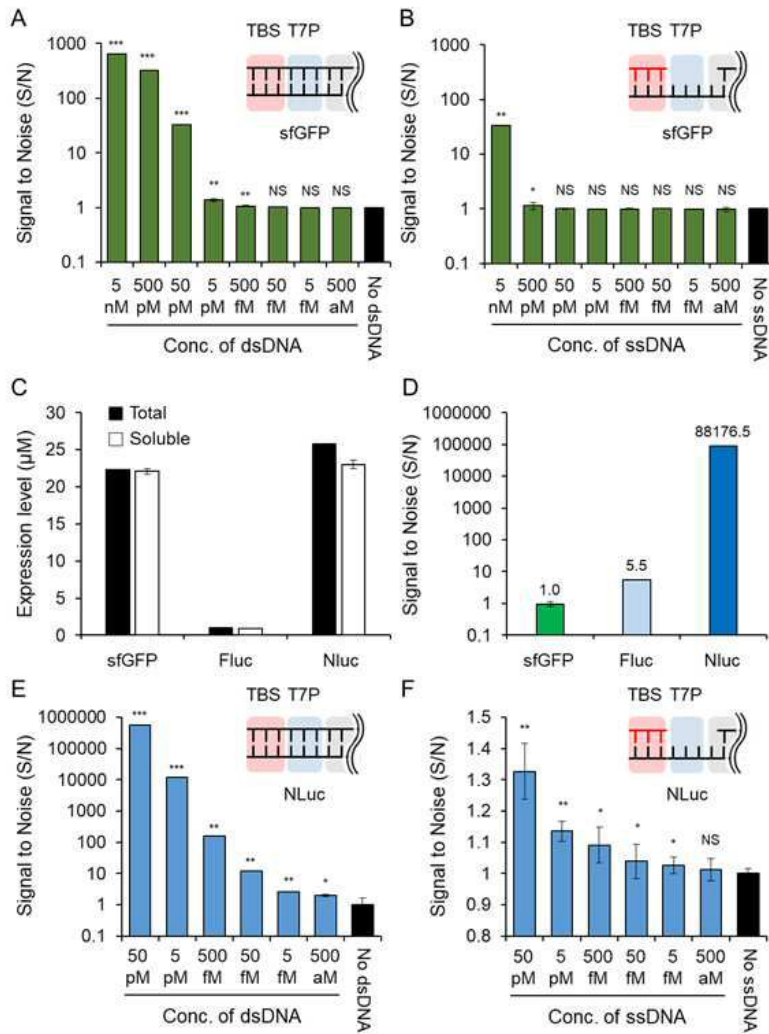
도면5



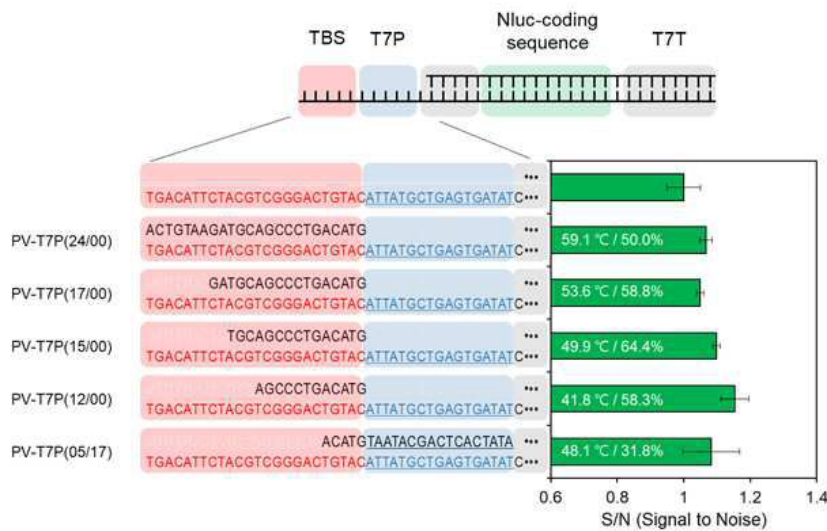
도면6



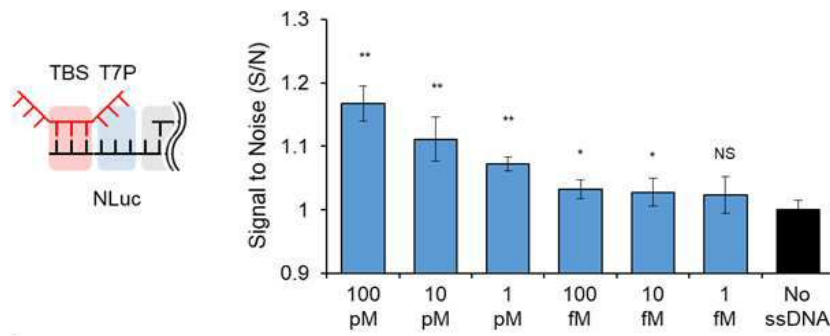
도면7



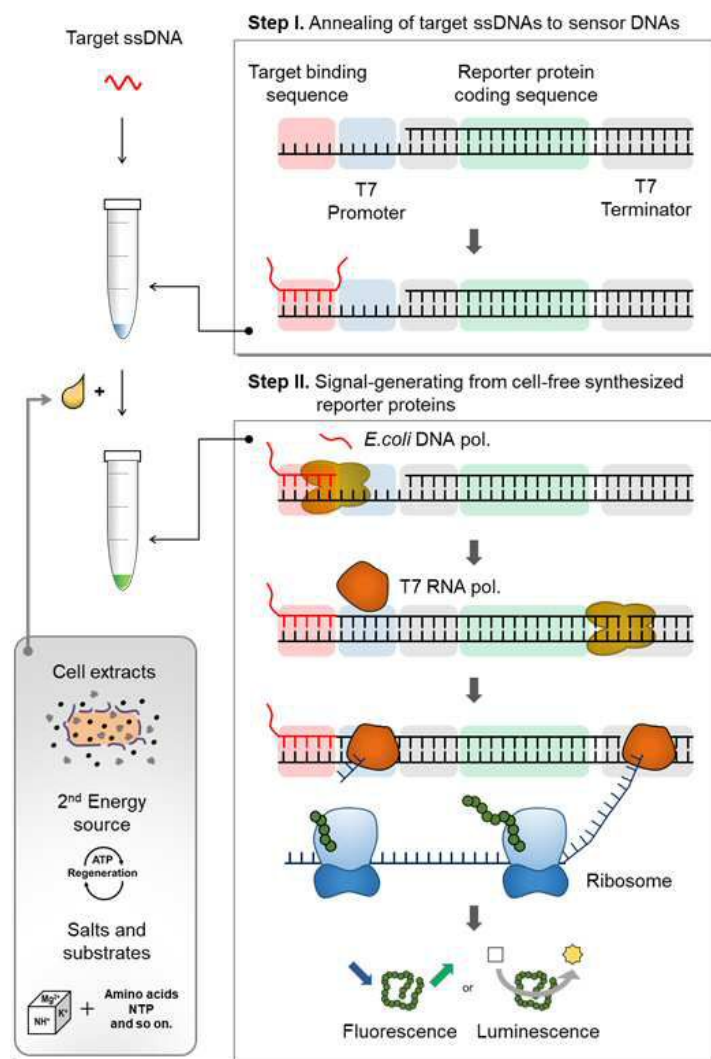
도면8



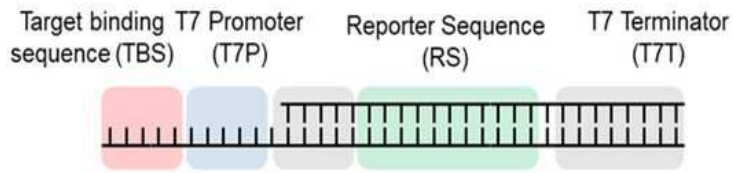
도면9



도면10



도면11



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Composition for detecting target nucleic acid and use thereof

<130> KPA200705-KR

<160> 38

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T7 Promoter

<400> 1

taatacgact cactata

17

<210> 2

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> superfolderGFP (sfGFP) Amino acid sequence

<400> 2

Met Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val

1 5 10 15

Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Arg Gly Glu

20 25 30

Gly Glu Gly Asp Ala Thr Ile Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys

35 40 45

Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu

50 55 60

Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Arg

65 70 75 80

His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg

85 90 95

Thr Ile Ser Phe Lys Asp Asp Gly Lys Tyr Lys Thr Arg Ala Val Val

100 105 110

Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Thr

115 120 125

Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn

130 135 140

Phe Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly

145 150 155 160

Ile Lys Ala Asn Phe Thr Val Arg His Asn Val Glu Asp Gly Ser Val

165 170 175

Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro

180 185 190

Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Thr Val Leu Ser

195 200 205

Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu His Glu Tyr Val

210 215 220

Asn Ala Ala Gly Ile Thr Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly

225 230 235 240

Ser His His His His His His

245

<210> 3

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> superfolderGFP (sfGFP) Nucleotide sequence

<400> 3

atgagcaaag gtgaagaact gtttaccggc gttgtgccga ttctggtgga actggatggc

60

gatgtgaacg gtcacaaatt cagcgtgcgt ggtgaagggtg aaggcgatgc cacgattggc 120

aaactgacgc tgaattttat ctgcaccacc ggcaaacctgc cgggtgccgtg gccgacgctg 180

gtgaccaccc tgacctatgg cggttcagtgt tttagtcgct atccggatca catgaaacgt 240

cacgatttct ttaaattctgc aatgccggaa ggctatgtgc aggaacgtac gattagcttt 300

aaagatgatg gcaaatataa aacgcgcgcc gttgtgaaat ttgaaggcga taccctggtg 360

aaccgcattg aactgaaagg cacggatttt aaagaagatg gcaatatacct gggccataaa 420

ctggaatata acitaaatag ccataatgtt tatattacgg cggataaaca gaaaaatggc 480

atcaaagcga attttaccgt tcgccataac gttgaagatg gcagtgtgca gctggcagat 540

cattatcagc agaatacccc gattggtgat ggtccggtgc tgctgccgga taatcattat 600

ctgagcacgc agaccgttct gtctaaagat ccgaacgaaa aacgggacca catggttctg 660

cacgaatatg tgaatgcggc aggtattacg tggagccatc cgcagttcga aaaagtggt 720

tctcatcacc atcaccatca ctaa 744

<210> 4

<211> 560

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Firefly luciferase (FLuc)Amino acid sequence

<400> 4

Met Val Thr Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe Tyr

1 5 10 15
Pro Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met Lys

20 25 30
Arg Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His Ile

35 40 45
Glu Val Asp Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr Phe Glu Met Ser Val Arg Leu

50 55 60
Ala Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu Asn Thr Asn His Arg Ile Val

65 70 75 80

Val Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Leu Gly Ala
85 90 95

Leu Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro Ala Asn Asp Ile Tyr Asn Glu

100 105 110
 Arg Glu Leu Leu Asn Ser Met Gly Ile Ser Gln Pro Thr Val Val Phe
 115 120 125
 Val Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile Leu Asn Val Gln Lys Lys Leu
 130 135 140
 Pro Ile Ile Gln Lys Ile Ile Ile Met Asp Ser Lys Thr Asp Tyr Gln

 145 150 155 160
 Gly Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val Thr Ser His Leu Pro Pro Gly
 165 170 175
 Phe Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys Thr
 180 185 190
 Ile Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly
 195 200 205
 Val Ala Leu Pro His Arg Thr Ala Cys Val Arg Phe Ser His Ala Arg
 210 215 220

 Asp Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu Ser
 225 230 235 240
 Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr
 245 250 255
 Leu Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu Glu
 260 265 270
 Leu Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu Leu
 275 280 285
 Val Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr Leu Ile Asp Lys

 290 295 300
 Tyr Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro Leu
 305 310 315 320
 Ser Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe His Leu Pro Gly
 325 330 335
 Ile Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu Ile
 340 345 350
 Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val Pro

355 Phe Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu Gly
 370 375 380
 Val Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met Ser
 385 390 395 400
 Gly Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys Asp
 405 410 415
 Gly Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu His
 420 425 430
 Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr
 435 440 445
 Gln Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro Asn
 450 455 460
 Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Asp Ala Gly Glu
 465 470 475 480
 Leu Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr Glu
 485 490 495
 Lys Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys Lys
 500 505 510
 Leu Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr
 515 520 525
 Gly Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala Lys
 530 535 540
 Lys Gly Gly Lys Ile Ala Val Gly Gly Ser His His His His His His
 545 550 555 560
 <210> 5
 <211> 1683
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Firefly luciferase (Fluc) Nucleotide sequence
 <400> 5

atggtcaccg acgccaataa cataaagaaa ggccccggcg cattctatcc gctggaagat 60
ggaaccgctg gagagcaact gcataaggct atgaagagat acgccctggt tcttgaaca 120
attgctttta cagatgcaca tatcgagggtg gacatcactt acgctgagta cttcgaaatg 180
tccgttcggt tggcagaagc tatgaaacga tatgggctga atacaaatca cagaatcgtc 240
glatgcagtg aaaactctct tcaattcttt atgccggtgt tgggcgcgtt atttatcgga 300
gttgcagttg cggccgcgaa cgacatttat aatgaacgtg aattgctcaa cagtatgggc 360
atttcgcagc ctaccgtggt gttcgtttcc aaaaaggggt tgcaaaaaat ttggaacgtg 420

caaaaaagc tccaatcat ccaaaaaatt attatcatgg attctaaaac ggattaccag 480
ggatttcagt cgatgtacac gtctgtcaca tctcatctac ctcccgttt taatgaatac 540
gattttgtgc cagagtcctt cgataggac aagacaattg cactgatcat gaactcctct 600
ggatctactg gtctgcctaa aggtgtcgtc ctgcctcata gaactgcctg cgtgagattc 660
tcgcatgcc a gagatcctat ttttggcaat caaatcattc cggatactgc gattttaagt 720
gttgttccat tccatcacgg ttttggatg ttactacac tcggatattt gatatgtgga 780
tttcgagtcg tcttaatgta tagatttgaa gaagagctgt ttctgaggag ccttcaggat 840

tacaagattc aaagtgcgt gctggtgcc accctattct ccttcttcgc caaagcact 900
ctgattgaca aatacgattt atctaattta cagcaaattg cttctggtgg cgctccctc 960
tctaaggaag tcggggaagc ggttgccaag aggttccatc tgccaggtat caggcaagga 1020
tatgggctca ctgagactac atcagctatt ctgattacac ccgaggggga tgataaacg 1080
ggcgcggtcg gtaaagttgt tccatttttt gaagcgaagg ttgtggatct ggataccggg 1140
aaaacgctgg gcgttaatca aagaggcgaa ctgtgtgtga gaggtcctat gattatgtcc 1200
ggttatgtaa acaatccgga agcgaccaac gccttgattg acaaggatgg atggctacat 1260

tctggagaca tagcttactg ggacgaagac gaacacttct tcatcgttga ccgcctgaag 1320
tctctgatta agtacaaagg ctatcagggtg gctcccgctg aattggaatc catcttgctc 1380
caacacccca acatcttcga cgcagggtgc gcaggctctc ccgacgatga cgccggtgaa 1440
cttcccgccg ccgttgttgt tttggagcac ggaaagacga tgacggaaaa agagatcgtg 1500
gattacgtcg ccagtcaagt aacaaccgcg aaaaagttgc gcggaggagt tgtgtttgtg 1560
gacgaagtac cgaaaggtct taccggaaaa ctgcacgcaa gaaaaatcag agagatcctc 1620
ataaaggcca agaagggcgg aaagatcgcc gtgggggggt ctcacacca tcaccatcac 1680

taa 1683

<210> 6

<211> 221

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanoluciferase (NLuc) Amino acid sequence

<400> 6

Met Val Phe Thr Leu Glu Asp Phe Val Gly Asp Trp Arg Gln Thr Ala

1 5 10 15

Gly Tyr Asn Leu Asp Gln Val Leu Glu Gln Gly Gly Val Ser Ser Leu

20 25 30

Phe Gln Asn Leu Gly Val Ser Val Thr Pro Ile Gln Arg Ile Val Leu

35 40 45

Ser Gly Glu Asn Gly Leu Lys Ile Asp Ile His Val Ile Ile Pro Tyr

50 55 60

Glu Gly Leu Ser Gly Asp Gln Met Gly Gln Ile Glu Lys Ile Phe Lys

65 70 75 80

Val Val Tyr Pro Val Asp Asp His His Phe Lys Val Ile Leu His Tyr

85 90 95

Gly Thr Leu Val Ile Asp Gly Val Thr Pro Asn Met Ile Asp Tyr Phe

100 105 110

Gly Arg Pro Tyr Glu Gly Ile Ala Val Phe Asp Gly Lys Lys Ile Thr

115 120 125

Val Thr Gly Thr Leu Trp Asn Gly Asn Lys Ile Ile Asp Glu Arg Leu

130 135 140

Ile Asn Pro Asp Gly Ser Leu Leu Phe Arg Val Thr Ile Asn Gly Val

145 150 155 160

Thr Gly Trp Arg Leu Cys Glu Arg Ile Leu Ala Asn Ser His Gly Phe

165 170 175

Pro Pro Glu Val Glu Glu Gln Ala Ala Gly Thr Leu Pro Met Ser Cys

180 185 190

Ala Gln Glu Ser Gly Met Asp Arg His Pro Ala Ala Cys Ala Ser Ala

195 200 205

Arg Ile Asn Val Gly Gly Ser His His His His His His

210 215 220

<210> 7

<211> 666

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nanoluciferase (NLuc) Nucleotide sequence

<400> 7

atggtgttca ccttagaaga ctttgtcggg gactggcgcc agaccgccgg ttacaacctg 60

gaccaagtcc tggagcaggg tggggtttca tctctgttcc agaacctggg tgtagtgtg 120

accccgatcc agcgcatgtg actgtccggc gaaaacggcc tgaagatcga tattcacgtg 180

atcatcccggt atgaaggcct gtctggagac caaatgggtc agatcgagaa aatcttcaaa 240

gttgtttacc cgggtggatga ccaccacttt aaagttatcc tgcactacgg cactctggtc 300

atcgacggcg tgactccgaa catgatcgac tacttcggcc gtccgtacga aggtattgct 360

gtttttgatg gtaagaagat caccgttact ggcaccctgt ggaacggtaa taaaatcatc 420

gacgaacgcc tgattaacce ggacgggtcc ctgctgttcc gtgtgacct taacggcggt 480

accggctggc gtctgtgcga acgtatcctg gcaaacagcc acggttttcc gccggaagtt 540

gaagaacaag cggctggcac tctccctatg tcttgcgcgc aggagtccgg catggaccgc 600

caccggcgag cctgcgcttc cgcacgcatt aacgttgggtg gttctcatca ccatcaccat 660

cattaa 666

<210> 8

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T7P-Broccoli

<400> 8

gagccacac tctactcgac agatacgaat atctggaccc gaccgtctcc cctatagtga 60

gtcgtatta 69

<210>

> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> T7P-700up-Forward

<400> 9

tagtcctgtc gggtttcgc	19
<210> 10	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> RBS-Reverse	
<400> 10	
catatgtata tctccttctt aaagttaaac aaaattatTT c	41
<210> 11	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> T7T-Reverse	
<400> 11	
caaaaaaccc ctcaagaccc g	21
<210> 12	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 5'UTR-Forward	
<400> 12	
gaccacaacg gtttcctct ag	22
<210> 13	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 12up-T7P-6U-Forward	
<400> 13	
cactgcuaa aguaauacga cucactauag ggugaccaca acggtttccc tctag	55
<210> 14	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PV14up-T7P-6U-Forward	

<

400> 14
gcagcccuga catguaauac gacucactau agggugacca caacggtttc cctctag 57

<210> 15
<211> 67
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PV24up-T7P-8U-Forward
<400> 15
actguaagau gcagcccuga caugtaauac gacucactau agggugacca caacggtttc 60
cctctag 67

<210> 16
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> NLuc-NdeI-Forward
<400> 16
aaaaaacata tgggtgttcac cttagaa 27

<210> 17
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> NLuc-SalI-Reverse
<400> 17
aaaaaagtcg acttaatgat ggtgatggtg atgaga 36

<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> 5'-UTR-Xba1
<400> 18
gggagaccac aacggtttcc ct 22

<210> 19
<211> 55

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> /5'-Phos/ 12up-T7P-5'UTR-Xba1

<400> 19
 ctagaggga accgttgtgg tctccctata gtgagtcgta ttactttgag cagtg 55

<210> 20
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7P(00/17)
 <400> 20
 taatacgact cactatagg 19

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7P(02/17)
 <400> 21
 agtaatacga ctactatag 20

<210> 22
 <211> 22
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7P(04/17)
 <400> 22
 aaagtaatac gactcactat ag 22

<210> 23
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7P(06/17)
 <400> 23
 tcaaagtaat acgactcact atag 24

<210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7P(04/17)
 <400> 24
 aaagtaatac gactcactat a 21

<210> 25
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7 Promoter
 <400> 25
 aaagtaatac gactcacta 19

<210> 26
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7P(04/11)
 <400> 26
 aaagtaatac gactc 15

<210> 27
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7P(08/06)
 <400> 27
 gctcaaagta atacg 15

<210> 28
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> T7P(11/03)

<400>	28	
actgctcaaa gtaa		14
<210>	29	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	T7P(12/00)	
<400>	29	
cactgctcaa ag		12
<210>	30	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	5'-10nts-T7P(12/00)	
<400>	30	
cgttctagta cactgctcaa ag		22
<210>	31	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	T7P(12/00)-3'-10nts	
<400>	31	
cactgctcaa aggtacat gg		22
<210>	32	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	5'-10nts-T7P(12/00)-3'-10nts	
<400>	32	
cgttctagta cactgctcaa aggtacat gg		32
<210>	33	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> PV-T7P(05/17)

<400> 33

acatgtaata cgactcacta ta 22

<210> 34

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PV-T7P(12/00)

<400> 34

agccctgaca tg 12

<210> 35

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PV-T7P(14/00)

<400> 35

gcagccctga catg 14

<210> 36

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PV-T7P(17/00)

<400> 36

gatgcagccc tgacatg 17

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PV-T7P(24/00)

<400> 37

actgtaagat gcagccctga catg 24

<210> 38

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PV(1934-1983)-50nts

<400> 38

taaagttaa cttactgta agatgcagcc ctgacatggg gttactaaca

50