



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0137718
(43) 공개일자 2019년12월11일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/686 (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12Q 1/686 (2018.05)
C12Q 2521/101 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2019-0064750</p> <p>(22) 출원일자 2019년05월31일
심사청구일자 2019년05월31일</p> <p>(30) 우선권주장
1020180063569 2018년06월01일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
신세현
서울특별시 서초구 방배로 270, 바동406호</p> <p>나원휘
서울특별시 광진구 광나루로56길 29, 14동 401호
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
정은열</p> |
|--|---|

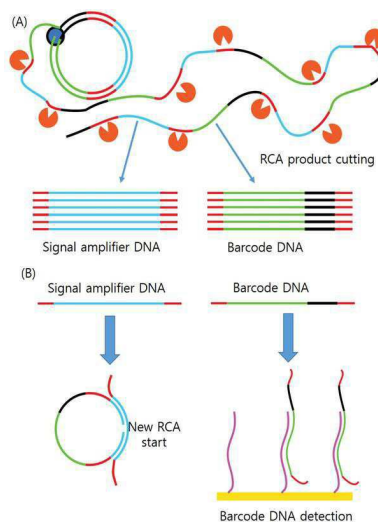
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 회전환 증폭을 이용한 표적핵산 검출 방법 및 표적핵산 검출용 조성물

(57) 요약

본 발명은 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification, RCA) 기반의 표적핵산(target nucleic acid) 검출 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 표적핵산(표적핵산 서열을 포함하는 핵산)이 존재할 경우, 표적핵산과 템플레이트가 환형 주형을 형성하여, 증폭반응을 수행하되, 증폭반응 중, 제한효소를 첨가하여 새로운 RCA 반응을 추가로 유도하여 반응 속도 및 민감도 증가효과를 가지는 표적핵산 검출 방법 및 상기 방법 구현을 위한 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification, RCA)용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 표적핵산 검출 방법은 표적핵산의 종류에 따라 미리 정의된 바코드 서열을 검출하여 표적핵산의 존재 유무를 서열분석 없이 동시에 다중으로 검출할 수 있으며, CRISPR과 같은 고가의 효소를 사용하지 않기 때문에 저렴할 뿐만 아니라, 바코드 서열을 검출할 수 있는 방법으로 다양한 기존의 핵산 검출 시스템을 사용할 수 있어, 유전자 변이의 검출에 유용하다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12Q 2521/501 (2013.01)
C12Q 2531/107 (2013.01)
C12Q 2531/125 (2013.01)
C12Q 2563/185 (2013.01)
C12Q 2565/1015 (2013.01)

오예은

경기도 고양시 일산동구 무궁화로93번길 14-17,
301호

(72) 발명자

이호윤

서울특별시 성북구 안암로9나길 14, 3동 332호

김황수

서울특별시 동대문구 왕산로19바길 29, 403호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A5A1010148
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터지원사업
연구과제명 나노-생체유체 검사 연구단
기 여 율 60/100
주관기관 고려대학교
연구기간 2016.06.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015M3A9D7031015
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오·의료기술개발사업
연구과제명 액체생검기반 맞춤형 암 진단 및 치료 기술 개발
기 여 율 40/100
주관기관 고려대학교
연구기간 2015.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification, RCA)을 이용한 표적핵산 검출 방법:

(a) 검체 시료로부터 제조된 단일 가닥 핵산을 준비하는 단계;

(b) i) 양 말단에 배치되어 표적핵산 서열과 상보적으로 결합하는 표적핵산 결합 영역;

ii) 프라이머 결합 영역;

iii) 제한효소 결합 영역; 및

iv) 바코드 생성 영역;

을 포함하는 선형 템플레이트와 상기 단일 가닥 핵산을 결합시킨 후 라이게이션을 수행하여 환형 템플레이트-표적핵산 결합체를 형성하는 단계;

(c) 상기 프라이머 결합 영역에 결합하는 프라이머 및 상기 제한효소 결합 영역의 서열과 동일한 서열을 가지는 절단용 핵산의 존재하에 회전환 증폭을 수행하여 단일가닥의 증폭산물을 생성하되, 제한효소(restriction enzyme)를 처리하여 상기 단일가닥의 증폭산물과 상기 절단용 핵산이 상보적으로 결합된 영역을 절단하여 상기 바코드 생성 영역과 상보적인 서열을 갖는 바코드를 포함하는 제1 증폭산물 및 상기 표적핵산 서열을 포함하는 제2 증폭산물을 수득하는 단계; 및

(d) 상기 제1 증폭산물의 바코드를 검출하여 상기 표적핵산 서열의 존재 여부를 판별하는 단계,

여기서, 상기 단일 가닥 핵산이 상기 표적핵산 서열을 포함하는 경우에 상기 환형 템플레이트-표적핵산 결합체가 형성되고, 상기 바코드가 제조되는 것을 특징으로 함.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 바코드는 표적핵산 별로 미리 정의된 임의의 염기서열이며, 표적 핵산과 상보적으로 결합하지 않는 것을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제2 증폭산물이 상기 (a) 단계의 단일 가닥 핵산으로 제공되는 것을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 표적핵산은 하나 이상인 것을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 하나 이상의 표적핵산 별로 서로 다른 템플레이트의 바코드 생성 영역이 증폭되어 제조된 바코드를 이용하여 검출하는 것을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 템플레이트의 표적핵산 결합영역은 표적 핵산의 검출하고자 하는 지점이 리가아제에 의해 연결되도록 설계되는 것을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 단일 가닥 핵산은 비대칭 PCR(polymerase chain reaction)로 제조되는 것을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 단일 가닥 핵산은 검체 시료로부터 추출한 이중 가닥 DNA(deoxyribonucleic acid)를 변성(denature)시킨 다음, 한쪽 단일 가닥에만 상보적으로 결합하는 블로커 DNA를 결합시켜 단일 가닥 핵산으로 제조하는 것을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 바코드를 검출하는 방법은 상기 바코드에 상보적인 프로브를 포함하는 표면 측정형 센서를 이용하는 것을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 표면 측정형 센서는 형광, 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance, SPR), 퀴즈 크리스탈 마이크로밸런스(Quartz Crystal Microbalance, QCM) 및 캔틸레버로 구성된 군에서 선택되는 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 바코드에 상보적인 프로브는 올리고뉴클레오타이드, LNA(Locked nucleic acid), PNA(Peptide nucleic acid) 및 이들의 혼합으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 표면 측정형 센서가 형광을 이용할 경우, 상기 바코드에 상보적인 프로브는 양 말단에 리포터(reporter)와 소광자(quencher)가 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 리포터는 플루오레신(fluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine), FITC, 오레곤 그린(Oregon green), 알렉사 플루오로(Alexa Fluor), FAM, JOE, ROX, HEX, 텍사스 레드(Texas Red), TET, TRITC, TAMRA, 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 써아디카르보시아닌(thiadicarbocyanine) 염료로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 형광물질임을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 소광자는 답실(Dabcyl), 탐라(TAMRA), 이클립스(Eclipse), DDQ, QSY, 블랙베리 퀀처(Blackberry Quencher), 블랙홀 퀀처(Black Hole Quencher), Qx1, 아이오와 블랙(Iowa black) FQ, 아이오와 블랙 RQ 및 IRDye QC-1으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상임을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 템플레이트는 스페이서 영역 및 형광 프로브 결합영역을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 상기 템플레이트의 제한효소 결합영역이 하나 이상인 것을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 상기 절단용 핵산은 5 ‘말단 및 3’ 말단에 상기 템플레이와 결합하지 않는 임의의 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 상기 절단용 핵산은 5 ‘말단 및 3’ 말단에 핵산중합이 억제되는 작용기 또는 염기를 추가로 포

합하는 것을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 핵산중합이 억제되는 작용기 또는 염기는 아민기(amine group), 인산기(phosphate group), 알킬기(alkyl group), 알케인-다이올(alkane-diol), 포스포로사이오에이트(phosphorothioate), 바이오틴(biotin), 비염기성 링커(non-nucleotide linker), C3-18 스페이서(C3-18 spacer), 디-데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트(di-deoxynucleotide triphosphate, ddNTP), 역방향 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트(inverted deoxynucleotide triphosphate, inverted dNTP) 및 역방향 디-데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트(inverted di-deoxynucleotide triphosphate, inverted ddNTP)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 표적핵산 검출 방법.

청구항 20

(a) i) 양 말단에 배치되어 표적핵산 서열과 상보적으로 결합하는 표적핵산 결합 영역;

ii) 프라이머 결합 영역;

iii) 제한효소 결합 영역; 및

iv) 바코드 생성 영역;

을 포함하는 선형 템플레이트;

(b) 상기 프라이머 결합 영역에 결합하는 프라이머;

(c) 상기 제한효소 결합 영역의 서열과 동일한 서열을 가지는 절단용 핵산;

(d) 제한효소(restriction enzyme); 및

(e) 리가아제(ligase);

를 포함하는 표적핵산 검출을 위한 회전환 증폭용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification, RCA) 기반의 표적핵산(target nucleic acid) 검출 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 표적핵산이 존재할 경우, 표적핵산과 템플레이트가 환형 주형을 형성하여 증폭반응을 수행하되, 증폭반응 중 제한효소를 첨가하여 새로운 RCA 반응을 추가로 유도하여 반응 속도 및 민감도 증가효과를 가지는 표적핵산 검출 방법 및 상기 방법 구현을 위한 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification, RCA)용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 기존의 핵산 기반 암 진단에서 검출에 가장 어려움을 겪는 영역은 점변이(point mutation) 형태로 발생하는 유전자 돌연변이이다. 이를 검출하기 위한 방법으로는 NGS(Next Generation Sequencing), ddPCR(Droplet Digital PCR) 등의 기술이 사용되고 있는데 NGS의 경우 한 번에 여러 영역을 대량으로 확인이 가능하지만 낮은 빈도의 점변이 유전자를 검출 하는데 있어 오류와 실제 데이터를 구분하는데 어려움이 있다(Buck MJ et al., Cancer Prev Res (Phila). 2012, Vol.5(7) pp. 887-900). 따라서 특정 지점에 점변이가 나타난 경우, 해당 부분에 맞는 프라이머와 프로브를 제작하여 ddPCR로 재확인 하는 과정이 필요하다. 또한 NGS의 경우 수일의 검사 시간이 필요하게 되고, 분석비용 또한 상당히 높다는 한계점을 지니고 있다. ddPCR은 NGS와는 달리 다중 검출이 어려워 하나의 시약 반응 튜브에서 하나의 변이만이 확인 가능하다. 따라서 수많은 주요 점변이 유전자를 전부 검사하기에는 많은 시약 소모로 인한 높은 비용이 발생한다는 한계점이 있다.

[0003] 또한 일반적인 DNA 상보결합을 이용한 검출 방법들은 점변이와 같은 미세한 차이는 구분하기 어렵기 때문에 정상 유전자와 돌연변이 유전자를 구분하지 못하고 같은 신호로 인식 하는 경우가 많다는 한계점이 있다.

[0004] 최근 상기 서술한 문제점을 해결하기 위해 CRISPR cas9과 같은 효소를 사용하는 방식의 점변이 유전자 검출 방법 또한 개발되고 있다(Zhang F et al., Science. 2017, Vol.28;356(6336). pp. 438-442). CRISPR cas9은 위와

같은 장비 없어 효소의 작용으로 특정 돌연변이 유전자를 검출 할 수 있는 기술이나, 인식할 수 있는 돌연변이 염기서열의 제한이 있다는 것이 가장 큰 한계점이고, 진단 목적으로 사용하기에 가격이 너무 비싸다는 단점이 있다. 또한 CRISPR을 이용하기 위해서는 RNA 조각을 같이 사용하게 되는데 RNA는 안정성이 떨어져서 연구실 환경 수준에서만 적용이 가능하다는 한계점 또한 존재한다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 다양한 종류의 표적핵산을 동시에 검출할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 회전환 증폭시, i) 양 말단에 배치되어 표적핵산 서열과 상보적으로 결합하는 표적핵산 결합 영역; ii) 프라이머 결합 영역; iii) 제한효소 결합 영역; 및 iv) 바코드 생성 영역;을 포함하는 선형 템플레이트와 제한효소를 이용하여 표적핵산(표적핵산 서열을 포함하는 핵산)의 존재유무에 따라 미리 정의된 바코드 영역의 증폭산물(amplicon)을 생성하여 검출할 경우, 다양한 종류의 표적핵산을 동시에 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 높은 민감도와 정확도로 표적핵산을 검출할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 고민감도(sensitivity)의 표적핵산 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 고민감도의 표적핵산 검출을 위한 회전환 증폭용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 검체 시료로부터 제조된 단일 가닥 핵산을 준비하는 단계; (b) i) 양 말단에 배치되어 표적핵산 서열과 상보적으로 결합하는 표적핵산 결합 영역; ii) 프라이머 결합 영역; iii) 제한효소 결합 영역; 및 iv) 바코드 생성 영역;을 포함하는 선형 템플레이트와 상기 단일 가닥 핵산을 결합시킨 후 라이게이션을 수행하여 환형 템플레이트-표적핵산 결합체를 형성하는 단계; (c) 상기 프라이머 결합 영역에 결합하는 프라이머 및 상기 제한효소 결합 영역의 서열과 동일한 서열을 가지는 절단용 핵산의 존재하에 회전환 증폭을 수행하여 단일가닥의 증폭산물을 생성하되, 제한효소(restriction enzyme)를 처리하여 상기 단일가닥의 증폭산물과 상기 절단용 핵산이 상보적으로 결합된 영역을 절단하여 상기 바코드 생성 영역과 상보적인 서열을 갖는 바코드를 포함하는 제1 증폭산물 및 상기 표적핵산 서열을 포함하는 제2 증폭산물을 수득하는 단계; 및 (d) 상기 제1 증폭산물의 바코드를 검출하여 상기 표적핵산 서열의 존재 여부를 판별하는 단계를 포함하고, 상기 단일 가닥 핵산이 상기 표적핵산 서열을 포함하는 경우에 상기 환형 템플레이트-표적핵산 결합체가 형성되고, 상기 바코드가 제조되는 것을 특징으로 하는, 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification, RCA)을 이용한 표적핵산 검출 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, (a) i) 양 말단에 배치되어 표적핵산 서열과 상보적으로 결합하는 표적핵산 결합 영역; ii) 프라이머 결합 영역; iii) 제한효소 결합 영역; 및 iv) 바코드 생성 영역;을 포함하는 선형 템플레이트; (b) 상기 프라이머 결합 영역에 결합하는 프라이머; (c) 상기 제한효소 결합 영역의 서열과 동일한 서열을 가지는 절단용 핵산; (d) 제한효소(restriction enzyme); 및 (e) 리가아제(ligase);를 포함하는 표적핵산 검출을 위한 회전환 증폭용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 표적핵산 검출 방법은 표적핵산의 종류에 따라 미리 정의된 바코드 서열을 검출하여 표적핵산의 존재 유무를 서열분석 없이 동시에 다중으로 검출할 수 있으며, CRISPR과 같은 고가의 효소를 사용하지 않기 때문에 저렴할 뿐만 아니라, 바코드 서열을 검출할 수 있는 방법으로 다양한 기존의 핵산 검출 시스템을 사용할 수 있어, 유전자 변이의 검출에 유용하다. 또한 본 발명에 따른 표적핵산 검출을 위한 RCA 증폭용 조성물은 각 표적핵산 별로 준비된 템플레이트를 이용하여 다중 표적을 한 번의 반응으로 동시에 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 염기 단위의 변이를 높은 민감도로 검출할 수 있어 다양한 분자 진단에 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 본 발명의 표적핵산 서열 유무에 따른 바코드 서열의 생성 기작을 형광 검출법으로 확인하는 방법을 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명의 방법에 필요한 효소 및 DNA의 구조를 나타낸 개략도이다.
- 도 3은 본 발명의 방법에 따라 회전환 증폭이 일어나는 단계를 나타낸 모사도이다.
- 도 4의 (A)는 본 발명의 방법에 따른 RCA 증폭 반응에서 제한효소의 작용에 따라 생성되는 생산 산물을 나타낸 모사도이며, (B)는 상기 생성산물의 역할을 나타낸 모사도이다.
- 도 5의 (A)는 본 발명의 일 실시예에 따른 야생형과 돌연변이 PIK3CA E545K 돌연변이 검출 결과를 형광 신호 검출로 확인한 결과이며, (B)는 상기 결과를 전기영동으로 확인한 결과이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예(실시예 1)에 따른 야생형과 돌연변이 PIK3CA 유전자의 RCA 증폭산물의 제한효소 처리결과를 전기영동으로 확인한 것이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예(실시예 2)에 따른 야생형과 돌연변이 PIK3CA 유전자의 RCA 증폭산물의 제한효소 처리결과를 전기영동으로 확인한 것이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 바코드 증폭산물을 표면플라즈몬공명(Surface plasmon resonance)센서를 이용하여 검출한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0017] 본 발명에서는 회전환 증폭반응에서 특별히 설계한 템플레이트를 이용하여 제한효소가 포함된 회전환 증폭반응을 통해 표적핵산을 검출할 수 있는 지를 확인하고자 하였다.
- [0018] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 i) 양 말단에 존재하는 표적핵산과 상보적으로 결합하는 표적핵산 결합 영역; ii) 프라이머 결합영역; iii) 제한효소 결합 영역; 및 iv) 바코드 영역;을 포함하는 템플레이트를 단일 가닥 표적 핵산과 결합시킨 다음, 라이게이션을 수행하여 환형 템플레이트를 제작한 다음, 회전환 증폭반응을 수행하면서, 제한효소를 처리하여 증폭된 바코드 영역이 따로 분리되도록 한 다음, 바코드 영역을 검출하여 다양한 종류의 표적핵산을 동시에 검출할 수 있음을 확인하였다(도 1 내지 도 4).
- [0020] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 (a) 검체 시료로부터 제조된 단일 가닥 핵산을 준비하는 단계; (b) i) 양 말단에 배치되어 표적핵산 서열과 상보적으로 결합하는 표적핵산 결합 영역; ii) 프라이머 결합 영역; iii) 제한효소 결합 영역; 및 iv) 바코드 생성 영역;을 포함하는 선형 템플레이트와 상기 단일 가닥 핵산을 결합시킨 후 라이게이션을 수행하여 환형 템플레이트-표적핵산 결합체를 형성하는 단계; (c) 상기 프라이머 결합 영역에 결합하는 프라이머 및 상기 제한효소 결합 영역의 서열과 동일한 서열을 가지는 절단용 핵산의 존재하에 회전환 증폭을 수행하여 단일가닥의 증폭산물을 생성하되, 제한효소(restriction enzyme)를 처리하여 상기 단일가닥의 증폭산물과 상기 절단용 핵산이 상보적으로 결합된 영역을 절단하여 상기 바코드 생성 영역과 상보적인 서열을 갖는 바코드를 포함하는 제1 증폭산물 및 상기 표적핵산 서열을 포함하는 제2 증폭산물을 수득하는 단계; 및 (d) 상기 제1 증폭산물의 바코드를 검출하여 상기 표적핵산 서열의 존재 여부를 판별하는 단계를 포함하고, 상기 단일 가닥 핵산이 상기 표적핵산 서열을 포함하는 경우에 상기 환형 템플레이트-표적핵산 결합체가 형성되고, 상기 바코드가 제조되는 것을 특징으로 하는, 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification, RCA)을 이용한 표적핵산 검출 방법에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명에서 용어 “표적핵산”은 검출하고자 하는 모든 종류의 핵산을 의미하며, 서로 다른 종(species), 아종(subspecies), 또는 변종(variant) 유래의 유전자 염기서열 또는 동일 종 내 유전자 돌연변이를 포함한다. 이는 genomic DNA와 mitochondrial DNA, viral DNA를 포함하는 모든 종류의 DNA 또는 mRNA, ribosomal RNA, non-

coding RNA, tRNA, viral RNA 등을 포함하는 모든 종류의 RNA를 특징으로 할 수 있으나 이에 국한되지 않는다.

[0022] 본 발명에서 표적핵산은 이에 한정되는 것은 아니나, 염기서열의 변이를 포함하는 돌연변이 염기서열인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 돌연변이는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP), 삽입(insertion), 결실(deletion), 점 돌연변이(point mutation), 융합 돌연변이(fusion mutation), 전좌(translocation), 역위(inversion) 및 LOH(loss of heterozygosity)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명에서 용어 "뉴클레오타이드"는 핵산 염기(핵염기)가 당 모이어티에 연결된 글리코실아민 화합물을 의미한다. "뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드 포스페이트를 의미한다. 뉴클레오타이드는 표 1에 기재된 것과 같이, 그의 뉴클레오타이드에 상응하는 알파벳 문자(문자 명칭)를 사용하여 표시될 수 있다. 예컨대, A는 아데노신(아데닌 핵염기를 함유하는 뉴클레오타이드)을 지칭하고, C는 시티딘을 지칭하고, G는 구아노신을 지칭하고, U는 우리딘을 지칭하고, T는 티미딘(5-메틸 우리딘)을 지칭한다. W는 A 또는 T/U를 지칭하고, S는 G 또는 C를 지칭한다. N은 랜덤한 뉴클레오타이드를 표시하고, dNTP는 데옥시리보뉴클레오타이드 트리포스페이트를 의미한다. N은 A, C, G, 또는 T/U 중 어떤 것도 될 수 있다.

표 1

기호 문자	기호 문자에 의해 표시된 뉴클레오타이드
G	G
A	A
T	T
C	C
U	U
R	G 또는 A
Y	T/U 또는 C
M	A 또는 C
K	G 또는 T/U
S	G 또는 C
W	A 또는 T/U
H	A 또는 C 또는 T/U
B	G 또는 T/U 또는 C
V	G 또는 C 또는 A
D	G 또는 A 또는 T/U
N	G 또는 A 또는 T/U 또는 C

[0024]

[0025] 본 발명에서 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 뉴클레오타이드의 올리고머를 의미한다. 본원에 사용된 용어 "핵산"은 뉴클레오타이드의 중합체를 의미한다. 본원에 사용된 용어 "서열"은 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산의 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 명세서를 통틀어, 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산이 문자의 서열에 의해 표시될 때마다, 뉴클레오타이드는 좌에서 우로 5'→3' 순서이다. 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산은 DNA, RNA, 또는 그의 유사체(예컨대, 포스포로티오에이트 유사체)일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산은 개질된 염기 및/또는 골격(예컨대, 개질된 포스페이트 연결부 또는 개질된 당 모이어티)도 또한 포함할 수 있다. 핵산에 안정성 및/또는 다른 이점을 부여하는 합성 골격의 비-제한적 예는 포스포로티오에이트 연결부, 펩티드 핵산, 잠금 핵산, 자일로스핵산, 또는 그의 유사체를 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명에서 용어 "핵산"은 뉴클레오타이드 폴리머를 지칭하며, 달리 한정되지 않는다면 자연적으로 발생한 뉴클레오타이드와 유사한 방식(예컨대, 혼성화)으로 작용할 수 있는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체(analog)를 포함한다.

[0027] 용어 핵산은, 예를 들어 유전체 DNA; 상보 DNA(cDNA)(이는 보통 전령 RNA(mRNA)의 역전사 또는 증폭으로 얻어지

는 mRNA의 DNA 표현임); 합성으로 또는 증폭으로 생성된 DNA 분자; 및 mRNA를 포함한 임의의 형태의 DNA 또는 RNA를 포함한다.

- [0028] 용어 핵산은 단일 가닥 분자뿐만 아니라 이중 또는 삼중 가닥 핵산을 포함한다. 이중 또는 삼중 가닥 핵산에서, 핵산 가닥은 동연(coextensive)일 필요는 없다(즉, 이중 가닥 핵산은 양 가닥의 전체 길이를 따라 이중 가닥일 필요는 없다).
- [0029] 용어 핵산은 또한 메틸화 및/또는 캡핑과 같은 것에 의한 이의 임의의 화학적 개질을 포함한다. 핵산 개질은 개별적인 핵산 염기 또는 핵산 전체에 추가적인 전하, 분극물, 수소 결합, 정전기 상호작용, 및 기능성을 포함하는 화학기의 첨가를 포함할 수 있다. 이러한 개질은 2' 위치 당 개질, 5 위치 피리미딘 개질, 8 위치 퓨린개질, 시토신 환외(exocyclic) 아민에서의 개질, 5-브로모-우라실의 치환, 주쇄 개질, 이소염기 이소시티딘 및 이소구아니딘과 같은 특이 염기 쌍 조합 등과 같은 염기 개질을 포함할 수 있다.
- [0030] 핵산(들)은 고상 매개 화학적 합성(solid phase-mediated chemical synthesis)과 같은 완전한 화학적 합성 과정에서부터, 핵산을 생성하는 임의의 종으로부터 분리를 통해서와 같은 생물학적 공급원으로부터, 또는 DNA 복제, PCR 증폭, 역전사와 같은 분자 생물학 도구에 의한 핵산의 취급과 관련된 과정으로부터, 또는 이들 과정의 결합으로부터 유도될 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 용어 “상보”는 2개의 뉴클레오타이드 사이의 정확한 쌍형성에 대한 능력을 지칭한다. 즉, 핵산의 주어진 위치에서 뉴클레오타이드가 다른 핵산의 뉴클레오타이드와 수소 결합을 할 수 있다면, 2개의 핵산은 그 위치에서 서로 상보적인 것으로 여겨진다. 뉴클레오타이드의 일부만이 결합하여 2개의 단일 가닥 핵산 분자 사이의 상보성은 “부분적”일 수 있거나, 또는 전체 상보성이 단일 가닥 분자 사이에 존재할 때 상보성은 완전할 수 있다. 핵산 가닥 사이의 상보성의 정도는 핵산 가닥 사이의 혼성화의 효율 및 강도에 상당한 영향을 미친다.
- [0032] 본 발명에서 용어 “프라이머”는 핵산 합성 반응을 프라이밍하기 위한 표적 핵산 서열(예컨대, 증폭될 DNA 주형)에 혼성화되는 짧은 선형 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머는 RNA 올리고뉴클레오타이드, DNA 올리고뉴클레오타이드, 또는 키메라 서열일 수 있다. 프라이머는 천연, 합성, 또는 개질된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 프라이머 길이의 상한 및 하한 둘 모두는 실험적으로 결정된다. 프라이머 길이의 하한은 핵산 증폭 반응 조건에서 표적 핵산과의 혼성화 후 안정한 듀플렉스를 형성하는데 필요한 최소 길이이다. 매우 짧은 프라이머(흔히 3 개 뉴클레오타이드 미만 길이)는 이러한 혼성화 조건 하에서 표적 핵산과의 열역학적으로 안정한 듀플렉스를 형성하지 않는다. 상한은 표적 핵산에서 미리 결정된 핵산 서열 이외의 영역에서 듀플렉스 형성을 가질 수 있는 가능성에 의해 보통 결정된다. 일반적으로, 적합한 프라이머 길이는 약 3 개 뉴클레오타이드 길이 내지 약 40 개 뉴클레오타이드 길이의 범위에 있다.
- [0033] 본 발명에서 용어 “회전환 증폭(Rolling Circle Amplification, RCA)”은 롤링 서클 메커니즘을 통한 원형 핵산 주형(예컨대, 단일 가닥 DNA 환)을 증폭하는 핵산 증폭 반응을 의미한다. 회전환 증폭 반응은 원형의, 흔히 단일 가닥인 핵산 주형에 대한 프라이머의 혼성화에 의해 개시된다. 그 다음, 핵산 폴리머라제는 원형 핵산 주형 주위로 계속하여 진행함으로써 원형 핵산 주형에 혼성화된 프라이머를 확장하여 핵산 주형의 서열을 반복하여 복제한다(롤링 서클 메커니즘). 회전환 증폭은 원형 핵산 주형 서열의 탠덤(tandem) 반복 유닛을 포함하는 콘카테머를 통상적으로 생성한다. 회전환 증폭은 선형 증폭 동역학을 나타내는 선형 RCA(LRCA)(예컨대, 단일 특이적 프라이머를 사용한 RCA)일 수 있거나, 또는 지수형 증폭 동역학을 나타내는 지수형 RCA(ERCA)일 수 있다. 회전환 증폭은 또한, 과분지된 콘카테머를 생성하도록 복수의 프라이머를 사용하여 수행될 수도 있다(복수회 프라이밍된 롤링 서클 증폭 또는 MPRCA). 예컨대, 이중 프라이밍된 RCA에서, 하나의 프라이머는 선형 RCA에서와 같이 원형 핵산 주형에 상보적일 수 있는 반면, 다른 프라이머는 RCA 생성물의 탠덤 반복 유닛 핵산 서열에 상보적일 수 있다. 결과적으로, 이중 프라이밍된 RCA는 양 프라이머 모두가 관련된 복수-혼성화, 프라이머-확장, 및 가닥-분리 현상의 분기화 캐스케이드를 특징으로 하는 지수형(기하적) 증폭 동역학을 갖는 연쇄 반응이 진행될 수 있다. 이것은 콘카테머형의 이중 가닥 핵산 증폭 생성물의 구분된 세트를 흔히 생성한다. 회전환 증폭은 Phi29 DNA 폴리머라제와 같은 적합한 핵산 폴리머라제를 사용하여 등은 조건 하에서 시험관 내에서 수행될 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 용어 “프로브”는 하나 이상 유형의 화학 결합을 통하여, 일반적으로 상보적 염기 쌍형성을 통하여, 보통 수소 결합 형성을 통하여 상보적인 서열의 표적 핵산에 결합하고 따라서 이중나선(duplex) 구조를 형성할 수 있는 핵산이다. 프로브는 “프로브 결합 부위”에 결합 또는 혼성화한다. 특히, 일단 프로브가 프로브의 상보적인 표적에 혼성화하면 프로브의 검출을 용이하게 하도록 프로브는 검출가능한 표지로 표지될 수 있다. 그러나 대안적으로, 프로브는 표지화되지 않을 수 있지만, 표지화된 리간드와의 특이적 결합에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출될 수 있다. 프로브는 크기가 상당히 다양할 수 있다. 일반적으로 프로브는 길이가 적어도

7 내지 15개 뉴클레오티드이다. 다른 프로브는 길이가 적어도 20, 30 또는 40개 뉴클레오티드이다. 또 다른 프로브는 다소 더 길며, 길이가 적어도 50, 60, 70, 80, 또는 90개 뉴클레오티드이다. 또 다른 프로브는 더욱 더 길며, 길이가 적어도 100, 150, 200개 또는 그 이상의 뉴클레오티드이다. 프로브는 또한 상기 값(예컨대, 길이가 15~20개 뉴클레오티드)의 임의의 값으로 한정된 임의의 범위 내에 있는 임의의 길이의 것일 수 있다.

- [0035] 본 발명에서 용어 “혼성화”는 상보적 염기서열을 가진 단일가닥 핵산들 간 수소결합에 의해 이중가닥 핵산이 형성되는 것을 의미하며, 어닐링(annealing)과 유사한 의미로 사용된다. 다만 조금 더 넓은 의미에서, 혼성화는 두 개의 단일가닥 간 염기서열이 완전히 상보적인 경우(perfect match)와 더불어 예외적으로 일부의 염기서열이 상보적이지 않은 경우(mismatch)까지 포함한다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 템플레이트는 단일 가닥 선형(linear) 핵산인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 템플레이트의 표적핵산 결합영역은 템플레이트 양 말단에 존재하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 바코드는 표적핵산 별로 미리 정의된 임의의 염기서열이며, 표적 핵산과 상보적으로 결합하지 않는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 제2 증폭산물이 상기 (a) 단계의 단일 가닥 핵산으로 제공되는 것을 특징으로 할 수 있다. 즉, 상기 (c) 단계에서 수득한 상기 제2 증폭산물이 상기 표적핵산 서열을 포함하는 단일 가닥 핵산으로 작용하여 상기 (b) 내지 (d) 단계를 반복 수행함으로써, 상기 (c) 단계에서 절단된 표적핵산 서열 함유 DNA가 새로운 템플레이트 DNA에 결합하여 새로운 RCA를 수행하는 것을 특징으로 할 수 있다. 즉, 본 발명에서는 회전환 증폭에 의해 하나의 긴 증폭 산물이 형성되는 것이 아니라, 제한효소의 작용에 따라, 표적핵산 서열을 포함하는 증폭 산물(제2 증폭산물) 및 바코드 영역을 포함하는 증폭산물(제1 증폭산물)이 각각 생성되며, 제한효소에 의해 절단된 표적핵산을 포함하는 증폭산물은 또 다른 템플레이트에 결합하여 새로운 회전환 증폭 반응을 유도하게 되어 신호를 증폭할 뿐만 아니라, 민감도를 향상시키게 되는 것이다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 표적핵산은 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 하나 이상의 표적핵산 별로 서로 다른 템플레이트의 바코드 생성 영역이 증폭되어 제조된 바코드를 이용하여 검출하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0042] 즉, 본 발명에서는 검출하고자 하는 표적핵산이 예를 들어 PIK3CA의 점 돌연변이, EGFR의 점 돌연변이, p53의 점 돌연변이 및 BRCA1/2의 점 돌연변이일 경우, 각각의 검출하고자 하는 점 돌연변이 별로, 서로 다른 바코드 생성 영역을 설계하여 동시에 검출할 수 있다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 템플레이트의 표적핵산 결합영역은 표적 핵산의 검출하고자 하는 지점이 리가아제에 의해 연결되도록 설계되는 것을 특징으로 할 수 있다. 즉, 본 발명에서 검출하고자 하는 점 돌연변이가 PIK3CA 단백질의 545번째 글루탐산이 라이신으로 변경되는 점 돌연변이일 경우, 이는 PIK3CA 유전자의 1633번째 위치의 염기 G가 A로 변이되어 생성되는 돌연변이이다. 이럴 경우, 1633번째 염기의 5' upstream 10~20번째 염기까지가 첫 번째 표적핵산 결합영역에 결합하고, 3' downstream 10~20번째 염기까지가 두 번째 표적핵산 결합영역에 결합하여 라이게이션이 발생하면, 환형 템플레이트-표적핵산 결합체를 형성하게 되는 것이다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 단일 가닥 핵산은 검체 시료로부터 추출한 핵산으로부터 단일 가닥 핵산을 제조할 수 있는 어떤 공지의 방법이든 사용하여 제조할 수 있으며, 바람직하게는 비대칭 PCR(polymerase chain reaction)로 제작하는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 (a) 단계의 단일 가닥 핵산은 검체 시료로부터 추출한 이중 가닥 DNA(deoxyribonucleic acid)를 변성(denature)시킨 다음, 한쪽 단일 가닥에만 상보적으로 결합하는 블로커 DNA를 결합시켜 단일 가닥 핵산으로 제조하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0046] 본 발명에서 있어서, 상기 (c) 단계에서 수득한 제1 증폭산물의 바코드를(바코드 생성영역의 증폭에 따라 생성된 바코드)를 검출하는 방법은 바코드에 상보적인 프로브를 포함하는 표면 측정형 센서를 이용하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 따라서 본 발명에서 바코드에 상보적인 프로브에서 바코드에 상보적인 서열은 본 발명의 템플레이트의 바코드 생성영역과 동일한 서열임은 당업자에게 자명한 것이다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 상기 표면 측정형 센서는 형광, 표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance, SPR), 쿼

츠 크리스탈 마이크로밸런스(Quartz Crystal Microbalance, QCM) 및 캔틸레버로 구성된 군에서 선택되는 방법을 이용하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 바코드 영역에 상보적인 프로브는 올리고뉴클레오타이드, LNA(Locked nucleic acid), PNA(Peptide nucleic acid) 및 이들의 혼합으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] PNA (Peptide nucleic acid, 펩티드핵산)는 핵산 염기가 당-인산 골격이 아닌 펩티드 골격에 연결된 유사 DNA로 1991년에 Nielsen 등에 의해 처음으로 합성되었다. PNA는 LNA(Locked nucleic acid) 또는 MNA(Morpholino nucleic acid)와 같이 유전자 인식물질의 하나로 인공적으로 합성하며, 기본 골격이 폴리아미드(polyamide)로 구성되어 있다.
- [0050] PNA는 친화도(affinity)와 선택성(selectivity)이 매우 우수하며, 핵산 분해효소에 대한 안정성이 높아 현존하는 제한효소(restriction enzyme)로 분해되지 않는다. 또한, 열/화학적으로 물성 및 안정성이 높아 장기 보관이 용이한 장점이 있다.
- [0051] PNA는 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization) 반응을 통해 이중가닥을 형성한다. 길이가 같은 경우 PNA/DNA 이중가닥은 DNA/DNA 이중가닥보다, PNA/RNA 이중가닥은 DNA/RNA 이중가닥보다 안정하다. 또한, PNA는 단일 염기 부정합(single base mismatch) 때문에 이중 가닥이 불안정해지는 정도가 크기 때문에 SNP(single nucleotide polymorphism)를 검출하는 능력이 천연핵산보다 더 뛰어나다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 표면 측정형 센서가 형광을 이용할 경우, 상기 바코드에 상보적인 프로브는 양 말단에 리포터(reporter)와 소광자(quencher)가 연결되어 있는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 상기 프로브는 리포터와 소광자 간 거리가 가까울 때에는 신호 발생이 억제되다가 리포터와 소광자 간 거리가 멀어지면서 신호 세기가 증가한다. 일반적으로 상기 프로브가 상보적 염기서열과 혼성화하였을 때 리포터와 소광자 간 거리가 가장 멀어지므로 신호 발생 또는 신호 세기 증가를 통해 특정 염기서열을 검출할 수 있다.
- [0054] 본 발명에 있어서, 상기 리포터는 플루오레신(fluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine), FITC, 오레곤 그린(Oregon green), 알렉사 플루오로(Alexa Fluor), FAM, JOE, ROX, HEX, 텍사스 레드(Texas Red), TET, TRITC, TAMRA, 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 씨아디카르보시아닌(thiadicarbocyanine) 염료로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 형광물질임을 특징으로 할 수 있다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 소광자는 답실(Dabcyl), 탐라(TAMRA), 이클립스(Eclipse), DDQ, QSY, 블랙베리 퀀처(Blackberry Quencher), 블랙홀 퀀처(Black Hole Quencher), Qx1, 아이오와 블랙(Iowa black) FQ, 아이오와 블랙 RQ 및 IRDye QC-1으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상임을 특징으로 할 수 있다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 (b) 단계의 라이게이션은 T7 DNA 리가아제(ligase)를 사용하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계의 회전환 증폭에서 DNA 증합에 phi29 DNA 증합효소를 사용하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명에 있어서, 상기 템플레이트는 스페이서 영역 및 형광 프로브 결합영역을 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0059] 본 발명에 있어서, 상기 템플레이트의 제한효소 결합영역은 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0060] 본 발명에 있어서, 상기 절단용 핵산은 5 ‘말단 및 3’ 말단에 상기 템플레이트와 결합하지 않는 임의의 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명에서 RCA로 생성되는 단일가닥 증폭산물의 제한효소 결합영역 서열이 템플레이트의 제한효소 결합영역과 상보적이므로, 템플레이트의 제한효소 결합 영역의 서열과 동일한 서열을 가지는 상기 절단용 핵산이 RCA로 생성되는 단일가닥 증폭산물의 제한효소 결합영역에 결합하여 이중 가닥을 형성하게 되고, 이를 제한효소가 절단하게 되며, 이때 절단된 가닥이 프라이머로서 작동하여 추가적인 증합 반응을 유도할 수 없도록, 5 ‘말단 및 3’ 말단에 템플레이트와 결합하지 않는 임의의 서열을 추가로 포함하는 것이다.
- [0061] 본 발명에 있어서, 상기 절단용 핵산은 5 ‘말단 및 3’ 말단에 핵산중합이 억제되는 작용기 또는 염기를 추가로

포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0062] 본 발명에 있어서, 상기 핵산중합이 억제되는 작용기 또는 염기는 아민기(amine group), 인산기(phosphate group), 알킬기(alkyl group), 알케인-다이올(alkane-diol), 포스포로사이오에이트(phosphorothioate), 바이오틴(biotin), 비염기성 링커(non-nucleotide linker), C3-18 스페이서(C3-18 spacer), 디-데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트(di-deoxynucleotide triphosphate, ddNTP), 역방향 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트(inverted deoxynucleotide triphosphate, inverted dNTP) 및 역방향 디-데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트(inverted di-deoxynucleotide triphosphate, inverted ddNTP)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 본 발명은 다른 관점에서, (a) i) 양 말단에 배치되어 표적핵산 서열과 상보적으로 결합하는 표적핵산 결합 영역; ii) 프라이머 결합 영역; iii) 제한효소 결합 영역; 및 iv) 바코드 생성 영역;을 포함하는 선형 템플레이트; (b) 상기 프라이머 결합 영역에 결합하는 프라이머; (c) 상기 제한효소 결합 영역의 서열과 동일한 서열을 가지는 절단용 핵산; (d) 제한효소(restriction enzyme); 및 (e) 리가아제(ligase);를 포함하는 표적핵산 검출을 위한 회전환 증폭용 조성물에 관한 것이다.

[0066] 본 발명에서 용어 "시료"는 다양한 시료를 포함하며, 바람직하게는, 본 발명의 방법을 이용하여 생물시료(biological sample)를 분석한다. 보다 바람직하게는, 바이러스 종(species)과 혼합된 시료이거나 상기 바이러스에 감염된 개체(예컨대, 인간, 포유류 및 어류 등)의 시료일 수 있으며, 식물, 동물, 인간, 균류, 박테리아 및 바이러스 기원의 생물시료가 분석될 수 있다. 포유류 또는 인간 기원의 시료를 분석하는 경우, 상기 시료는 특정 조직 또는 기관으로부터 유래될 수 있다. 조직의 대표적인 예로는, 결합, 피부, 근육 또는 신경 조직이 포함된다. 기관의 대표적인 예로는, 눈, 뇌, 폐, 간, 비장, 골수, 흉선, 심장, 림프, 혈액, 뼈, 연골, 췌장, 신장, 담낭, 위, 소장, 고환, 난소, 자궁, 직장, 신경계, 선 및 내부 혈관이 포함된다. 분석되는 생물시료는 생물학적 근원으로부터 나온 어떠한 세포, 조직, 유체액(fluid), 또는 본 발명에 의하여 잘 분석될 수 있는 어떠한 다른 매질(media)도 포함하며, 이는 인간, 동물, 인간 또는 동물의 소비를 위하여 제조된 음식으로부터 얻은 시료가 포함된다. 또한, 분석되는 생물시료는 체액 시료를 포함하며, 이는 혈액, 혈청, 혈장, 림프, 모유, 소변, 분변, 안구 유액, 타액, 정액, 뇌 추출물(예컨대, 뇌 분쇄물), 척수액, 충수, 비장 및 편도선 조직 추출물이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0068] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 조성물을 포함하는 표적핵산 검출용 키트에 관한 것이다.

[0069] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 버퍼(buffer), DNA 중합효소(DNA polymerase), DNA 중합효소 조인자(DNA polymerase cofactor) 및 데옥시리보뉴클레오타이드-5-트리포스페이트(dNTP)와 같은 표적핵산 증폭 반응(예컨대, 중합효소연쇄반응)을 실시하는데 필요한 시약을 선택적으로 포함할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 또한 다양한 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 분자, 역전사효소(reverse transcriptase), 다양한 버퍼 및 시약, 및 DNA 중합효소 활성을 억제하는 항체를 포함할 수 있다. 또한, 상기 키트의 특정 반응에서 사용되는 시약의 최적량은, 본 명세서에 개시사항을 습득한 당업자에 의해서 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 장비는 앞서 언급된 구성 성분들을 포함하는 별도의 포장 또는 컴파트먼트(compartment)로 제작될 수 있다.

[0070] 하나의 실시예에서, 상기 키트는 샘플을 담는 구획된 캐리어 수단, 시약을 포함하는 용기, 대리표적과 프라이머를 포함하는 용기 및 상기 증폭 산물을 검출하기 위한 프로브를 포함하는 용기를 포함할 수 있다.

[0071] 상기 캐리어 수단은 병, 튜브와 같은 하나 이상의 용기를 함유하기에 적합하고, 각 용기는 본 발명의 방법에 사용되는 독립적 구성요소들을 함유한다. 본 발명의 명세서에서, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 자는 용기 중의 필요한 제제를 손쉽게 분배할 수 있다.

[0073] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식

을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0075] 실시예 1. RCA 기반 표적핵산 검출 방법 효능 확인

[0076] 1.1 템플레이트, 프라이머, 비콘 제작

[0077] PIK3CA 유전자의 E545K 점 돌연변이를 본원 발명의 방법을 통해 검출할 수 있는지를 확인하기 위하여, E545K 점 돌연변이 유전자 주변 50개의 염기를 타겟 유전자로 설정하여 하기 표와 같이 템플레이트, 프라이머 및 증폭산물 검출용 비콘을 제작하였다.

표 2

[0078] 실시예에서 제작한 핵산 서열

서열번호	이름	서열
1	Template	5'-T AGT GAT TTC A(1) CCC C(2)GC ATG CTA GTA TCG ACG TCC C(3) CAA CAT CAG TCA GCT GCT GAT AAG CT(4) GAA AGC AAC AAG GAT AGG GG (5) CC CCC(6) T CTC CTG CT(7)-3'
2	Wild type	5'-CGA GAT CCT CTC TCT GAA ATC ACT GAG CAG GAG AAA GAT TTT CTA TGG AG -3'
3	Mutant	5'-CGA GAT CCT CTC TCT GAA ATC ACT AAG CAG GAG AAA GAT TTT CTA TGG AG-3'
4	primer	5'-G GGA CGT CGA TAC TAG CAT GC-3'
5	절단용 DNA	5'-FAM-GCG CGT CAA CAT CAG TCA GCT GCT GAT AAG CTA CGC GC-Dabcyl-3'

[0080] Template의 서열 구조는 하기와 같다.

[0081] 5 ' phosphate ~ (1): 첫 번째 타겟 결합영역으로, 첫 번째 염기서열 T가 서열번호 3의 Mutant의 굵은 글씨로 표시한 A 서열과 상보적으로 결합하게 됨

[0082] (1) ~ (2): 스페이서

[0083] (2) ~ (3): 프라이머 결합영역

[0084] (3) ~ (4): 형광 프로브 결합영역

[0085] (4) ~ (5): 바코드 생성 영역

[0086] (5) ~ (6): 스페이서

[0087] (6) ~ (7): 두 번째 타겟 결합영역

[0089] 1.2 RCA 증폭에 따른 돌연변이/야생형 구분

[0090] 실시예 1.1에서 제작한 템플레이트에 서열번호 2 또는 3의 타겟 핵산 및 서열번호 4의 프라이머를 주입한 다음, 하기 표 3과 같은 용량으로 RCA를 수행하고 그 결과를 전기영동 및 beacon을 사용한 형광신호 검출로 확인하였다.

[0091] 그 결과, 도 5에 개시된 바와 같이 돌연변이의 경우에만 RCA가 진행되어 매우 긴 크기의 RCA 증폭산물이 생성되고, 형광신호가 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

표 3

E545K New RCA			
Component	Con	Vol	(Each Component *1.1*9)
4μM Template _ E545K	4	2.5	24.75
100μM target(MU/WT)	100	1.25	Respectively
Phi29 polymerase buffer	10	5	49.50
100mM DTT	100	1.25	12.38
25mM dNTP	25	5	49.50
50mM ATP	50	1.25	12.38
10mg/ml BSA	10	1.25	12.38
10μM starting primer	10	1.25	12.38
10μM beacon	100	1.25	12.38
500U/μl T7 ligase	3000U/μl	1	Respectively
10U/μl Phi 29 polymerase	10	5	Respectively
0.1U/μl Pyrophosphatase	0.1	1.25	Respectively
BstZ171-HF enzyme	20	1	Respectively
10x NEB buffer	10	5	49.50
D.W	0	16.75	165.83
TOTAL		50	

[0092]

[0094]

1.3 RCA 증폭 산물에 대한 제한효소 작동 여부 확인

[0095]

실시에 1.2에서 생산한 RCA 증폭산물에 절단용 DNA(서열번호 5)를 주입한 다음, 반응시켜 전기영동을 수행하였다. RCA 증폭산물의 5' -CAG//CTG-3' 서열을 제한효소가 인식하여 절단하게 된다.

[0096]

그 결과, 도 6에 개시된 바와 같이 제한효소에 의해 절단된 DNA 조각이 생성되는 것을 확인하였다.

[0098]

실시에 2. RCA 기반 표적핵산 검출 방법 효능 확인 (2중 절단)

[0099]

2.1 템플레이트, 프라이머, 절단용 DNA 제작

[0100]

PIK3CA 유전자의 E545K 점 돌연변이를 본원 발명의 방법을 통해 검출할 수 있는 지를 확인하기 위하여, E545K 점 돌연변이 유전자 주변 50개의 염기를 타겟 유전자로 설정하여 하기 표와 같이 템플레이트, 프라이머를 제작하였다.

표 4

[0101]

실시예에서 제작한 핵산 서열

서열번호	이름	서열
6	Template	5'-AGT GAT TTC A(1) CCCCC(2) AT GTA GTA GTA TCG ACG TCC C(3) CCCCC(4) GTA TAC(5) CCCCC(6) GTT TCC TCA TAT CCA GTT TC(7) CCCCC(8) GTA TAC(9) CCCCC(10) T CTC CTG CTT(11)-3'
2	Wild type	5'-CGA GAT CCT CTC TCT GAA ATC ACT GAG CAG GAG AAA GAT TTT CTA TGG AG -3'
3	Mutant	5'-CGA GAT CCT CTC TCT GAA ATC ACT AAG CAG GAG AAA GAT TTT CTA TGG AG-3'
7	primer	5'-G GGA CGT CGA TAC TAC TAC AT-3'
8	절단용 DNA	5' -CCC GTA TAC CCC GGG-dabcyl-3'

[0102]

Template의 서열 구조는 하기와 같다.

[0103]

Template의 서열 구조는 하기와 같다.

[0104]

5 ' phosphate ~ (1): 첫 번째 타겟 결합영역으로, 첫 번째 염기서열 T가 서열번호 3의 Mutant의 굵은 글씨로 표시한 A 서열과 상보적으로 결합하게 됨

- [0105] (1) ~ (2): 스페이서
- [0106] (2) ~ (3): 프라이머 결합영역
- [0107] (3) ~ (4): 스페이서
- [0108] (4) ~ (5): 제한효소 인식영역
- [0109] (5) ~ (6): 스페이서
- [0110] (6) ~ (7): 바코드 생성 영역
- [0111] (7) ~ (8): 스페이서
- [0112] (8) ~ (9): 제한효소 인식영역
- [0113] (9) ~ (10): 스페이서
- [0114] (10) ~ (11): 두 번째 타겟 결합영역

[0116] **2.2 RCA 증폭 산물에 대한 제한효소 작동 여부 확인**

[0117] 실시예 2.1에서 제작한 템플레이트(서열번호 6)에 서열번호 2 또는 3의 타겟 핵산 및 서열번호 7의 프라이머를 주입한 다음, 하기 표 5와 같은 용량으로 RCA를 수행하여 생산한 RCA 증폭산물에 절단용 DNA(서열번호 8)를 주입한 다음, 반응시켜 전기영동을 수행하였다. RCA 증폭산물의 5' -CAG//CTG-3' 서열을 제한효소가 인식하여 절단하게 된다.

[0118] 그 결과, 도 7에 개시된 바와 같이 제한효소에 의해 절단된 DNA 조각이 생성되는 것을 확인하였다.

표 5

Component	Initial Concentration		Volume [μ L]
Template _ E545K	5	μ M	2.5
Starting primer	10	μ M	1.25
Molecular Beacon (opt.)	10	μ M	0
Bstz17i_Oligo	100	μ M	5
Target DNA (diff. conc.)	100	μ M	1.25
Phi29 polymerase buffer	10	X	5
CutSmart buffer	10	X	5
DTT	100	mM	1.25
dNTP	25	mM	5
ATP	50	mM	1.25
BSA in PBS	10	mg/mL	1
Pyrophosphatase	0.1	U/ μ L	1.25
SplintR ligase	2.5	U/ μ L	1
Phi 29 polymerase	10	U/ μ L	5
Bstz17i	20	U/ μ L	4
D.W	0		10.25
TOTAL Vol.			50

[0120] **2.3 SPR 센서를 이용한 바코드 증폭산물 확인**

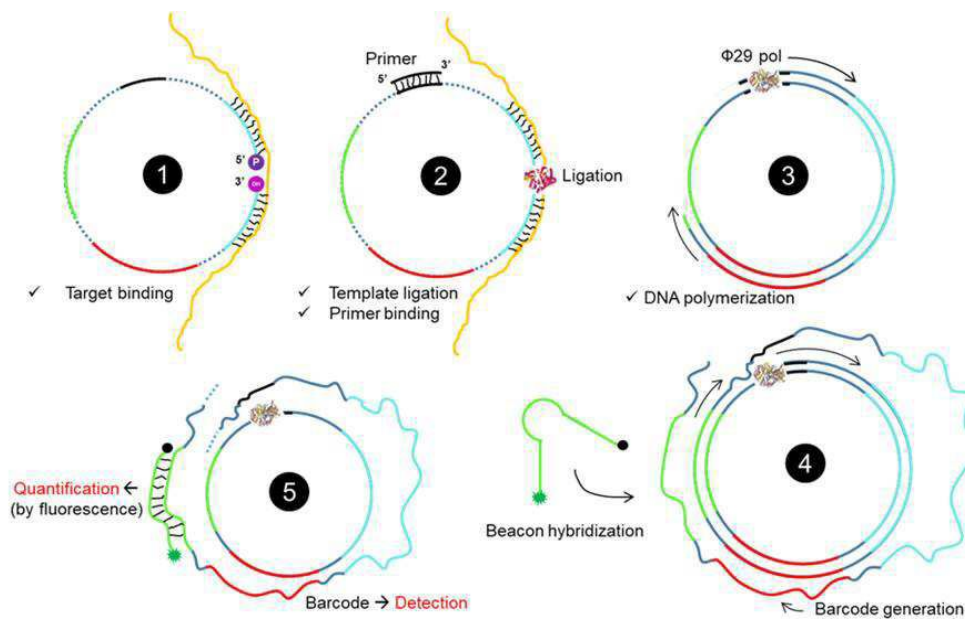
[0121] 실시예 2.1에 따른 템플레이트를 이용하여 생산한 RCA 증폭산물의 바코드로서의 기능을 확인하기 위하여 SPR 센서를 이용한 검증실험을 수행하였으며 그 결과를 하기 도 8에 나타내었다. 구체적으로, 도 8의 좌측 상단에 붉은색 박스로 표시된 부분은 생성된 바코드 DNA로 예상되는 부분이며, 이렇게 생성된 RCA 증폭산물을 SPR 센서를 이용하여 분석하였다. 도 8의 하단은 바코드의 구분 원리를 나타낸 것으로, 생성된 RCA 증폭산물을 1번 바코드(#1 Encoded DNA)라고 지칭할 때, 이에 상보적인 프루브 링커(#1 Encoded DNA linker)와, 1번 바코드에 상보적이지 않은 프루브 링커인 #2 Encoded DNA linker를 SPR 센서의 각기 다른 분석 채널 표면에 미리 고정해둔 후, 두 분석 채널에 RCA 증폭산물을 주입하여 SPR 검출 신호를 비교하였다.

[0122] 측정 결과, 도 8의 우측 상단에 개시된 그래프와 같이, RCA 증폭산물과 상보적인 프로브 링커가 고정된 채널에서는 검출신호가 강하게 나타난 반면, RCA 증폭 산물과 상보적이지 않은 프로브 링커가 고정된 채널에서는 검출신호가 나타나지 않음을 확인하였다. 이러한 결과를 통해, 본 발명에 따른 RCA 반응에 의해 증폭산물이 잘 생성됨을 확인할 수 있었다.

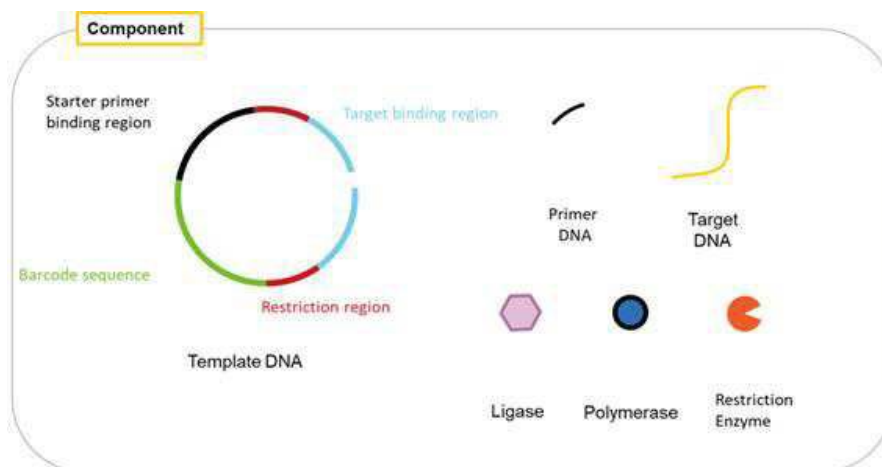
[0124] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

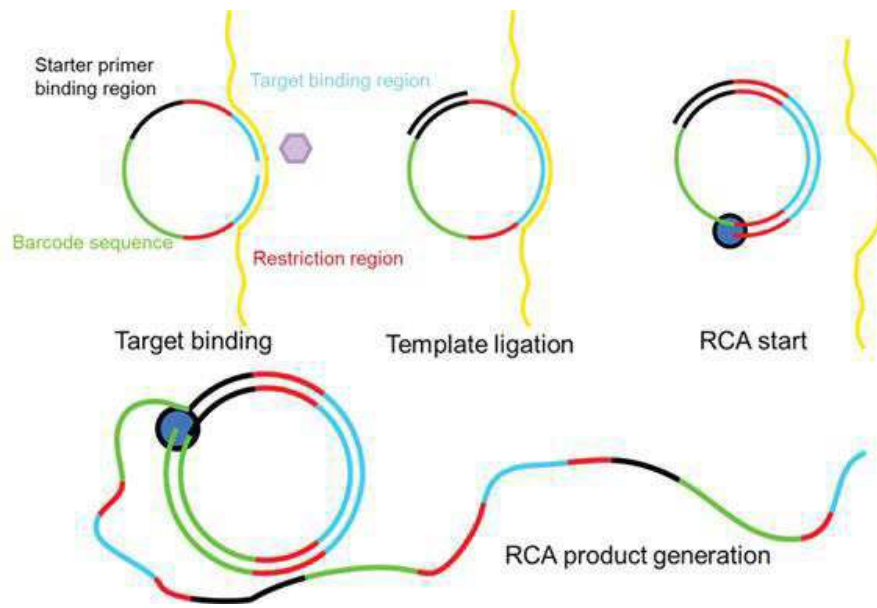
도면1



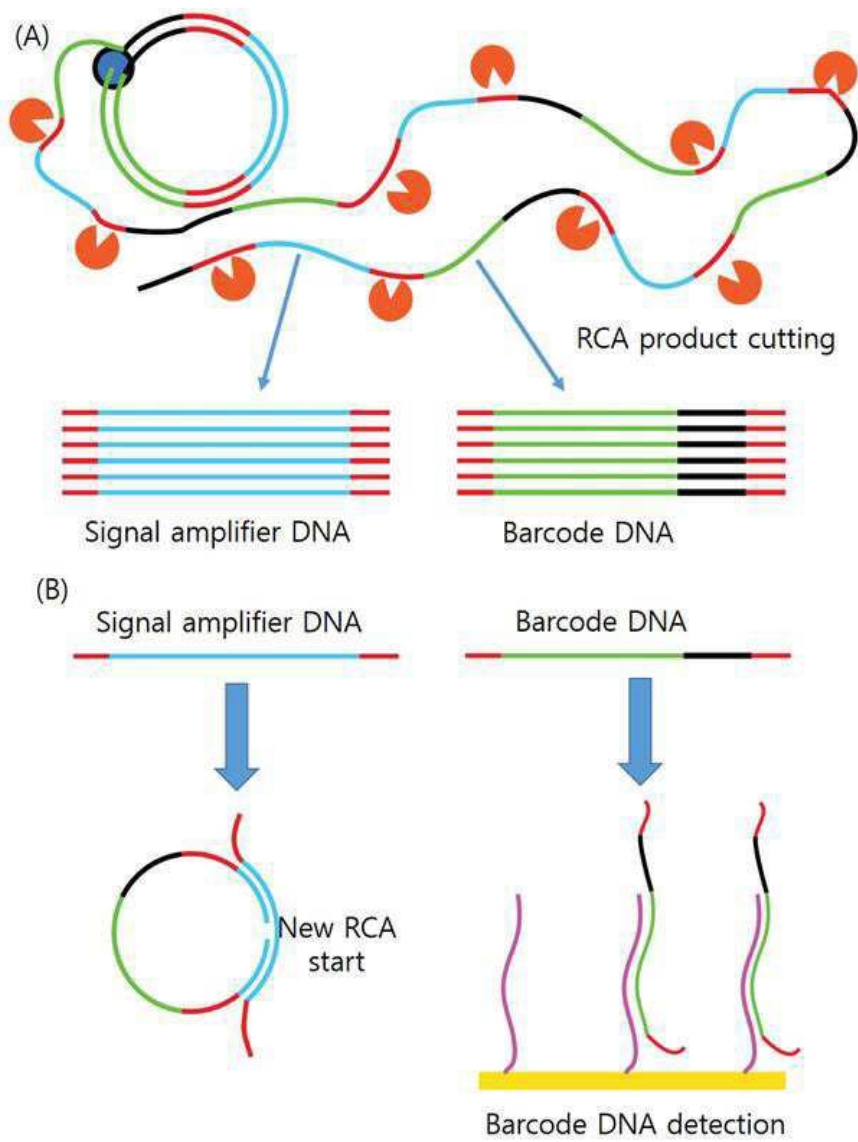
도면2



도면3

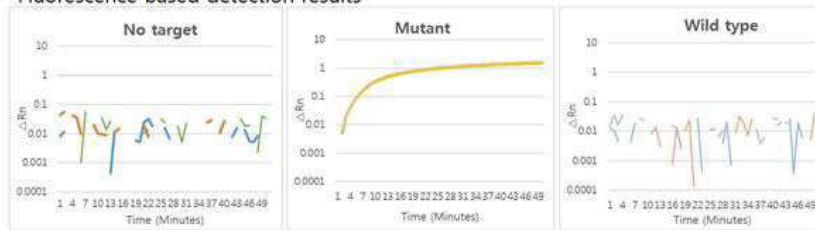


도면4

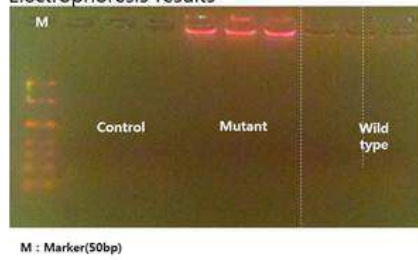


도면5

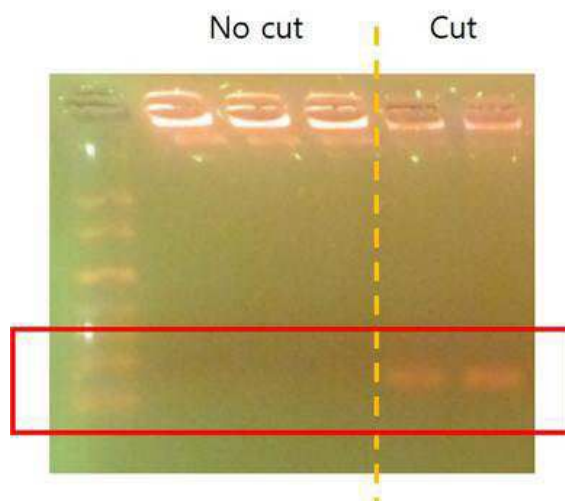
(A) Fluorescence based detection results



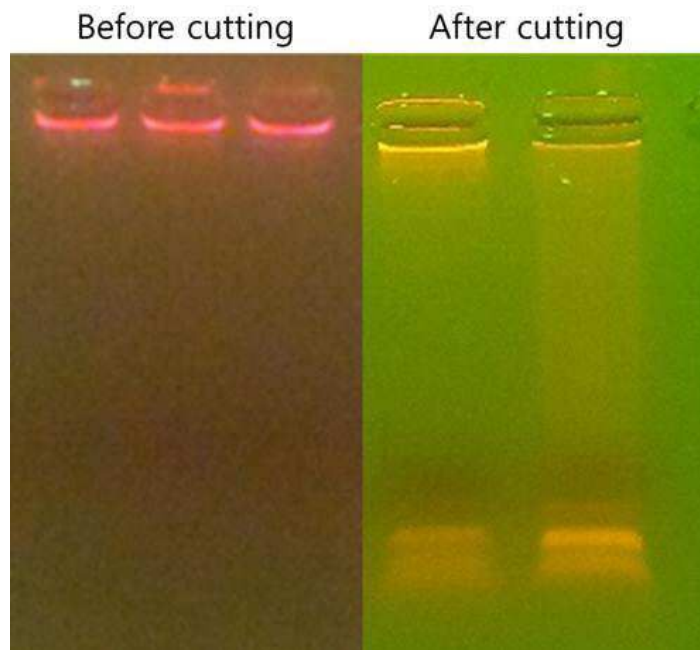
(B) Electrophoresis results



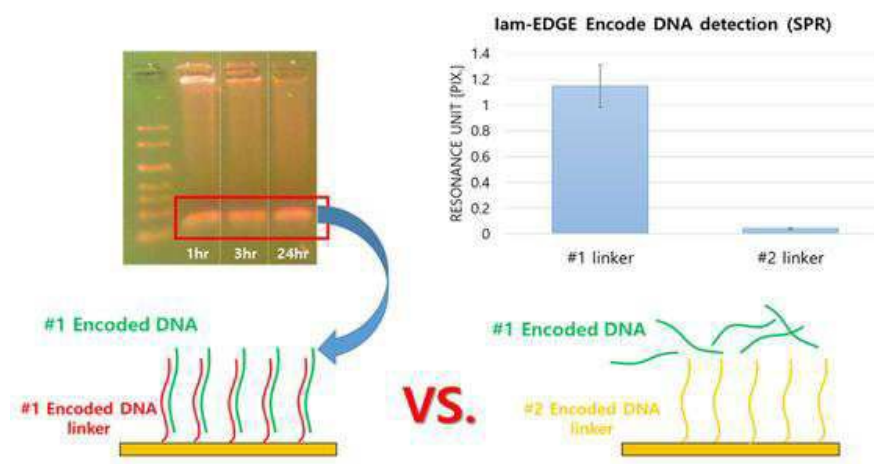
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Method for Detecting Target Nucleic Acid Using Rolling Circle Amplification and Composition for Detecting Target Nucleic Acid
- <130> JKP-1261
- <150> KR 10-2018-0063569
- <151> 2018-06-01
- <160> 8
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 96
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Template_1
 <400> 1
 tagtgatttc accccgcatg ctagtatcga cgtccccaac atcagtcagc tgctgataag 60
 ctgaaagcaa caaggatagg ggccccctct cctgct 96

<210> 2
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Wild type
 <400> 2
 cgagatcctc tctctgaaat cactgagcag gagaaagatt ttctatggag 50

<210> 3
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mutant
 <400> 3
 cgagatcctc tctctgaaat cactaagcag gagaaagatt ttctatggag 50

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 gggacgtcga tactagcatg c 21

<210> 5
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> cutting DNA

<400>	5	
gcgcgtcaac atcagtcagc tgctgataag ctacgcgc		38
<210>	6	
<211>	98	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Template_2	
<400>	6	
agtgatttca ccccatgta gtagtatcga cgtccccccc cgtatacccc cgttttctc		60
atatccagtt tcccccgta tccccccctc tcttgctt		98
<210>	7	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	7	
gggacgtcga tactactaca t		21
<210>	8	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	cutting DNA	
<400>	8	
cccgtatacc ccggg		15