

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025년 1월 9일 (09.01.2025)



(10) 국제공개번호
WO 2025/009802 A1

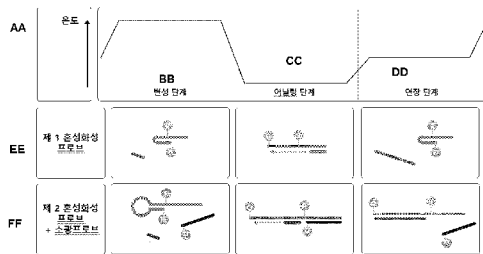
- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/6851 (2018.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2024/008885
- (22) 국제출원일: 2024년 6월 26일 (26.06.2024)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2023-0085510 2023년 7월 3일 (03.07.2023) KR
- (71) 출원인: (주)진매트릭스 (GENEMATRIX INC.) [KR/KR]; 13488 경기도 성남시 분당구 대왕판교로 700, 7층, 8층 (삼평동, 코리아바이오파크 B동), Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김수옥 (KIM, Soo-Ok); 13105 경기도 성남시 분당구 판교대장로5길 30, 1202동 304호(대장동,

더샵판교포레스트 12단지), Gyeonggi-do (KR). 김석준 (KIM, Suk Joon); 13532 경기도 성남시 분당구 판교역로 98, 704-902 (백현동, 백현마을7단지아파트), Gyeonggi-do (KR). 홍선표 (HONG, Sun Pyo); 06715 서울특별시 서초구 방배로 14, 5-505호 (방배동, 임광아파트), Seoul (KR). 조애리 (CHO, Ae Ri); 13509 경기도 성남시 분당구 판교로743번길 7 (야탑동, 목련마을SK아파트) 603동 402호, Gyeonggi-do (KR). 구자현 (GU, Ja Hyun); 21319 인천광역시 부평구 부평북로 431(삼산동, 삼산주공미레타운아파트) 104동 205호, Incheon (KR). 양승민 (YANG, Seung Min); 12816 경기도 광주시 도척면 도척윗로 427-25, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 구현서 (KOO, Hyun Seo); 06641 서울특별시 서초구 사임당로 18길 31-11, Seoul (KR).

(54) Title: PCR METHOD FOR DETECTING AT LEAST TWO MULTI-TARGET NUCLEIC ACIDS WITH SINGLE SIGNAL

(54) 발명의 명칭: 단일 신호로 2가지 이상의 다중 표적핵산을 검출하기 위한 PCR 방법



AA ... Temperature
BB ... Denaturation step
CC ... Annealing step
DD ... Extension step
EE ... First hybridization probe
FF ... Second hybridization probe + quenching probe

(57) Abstract: The present invention discloses a PCR method for real-time detection of two target nucleic acids with a single signal. The method of the present invention detects a signal for each target nucleic acid in an annealing step and an extension step among the three steps of PCR including denaturation, annealing step, and extension steps. That is, among the two target nucleic acids, a signal for a first target nucleic acid is detected in an annealing step, and a signal for a second target nucleic acid is detected in an extension step. Each detected signal provides qualitative and/or quantitative information about each of the two target nucleic acids. At this time, the detection signal is the same single signal for both of the two target nucleic acids, which can be detected in one detection channel.



WO 2025/009802 A1

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 단일 신호로 2 가지 표적핵산의 실시간 검출을 위한 PCR 방법을 개시한다. 본 발명의 방법은 PCR 의 3 단계인 변성 단계(Denaturation), 어닐링 단계(Annealing) 및 연장 단계(Extension) 중 어닐링 단계 및 연장 단계에서 각각의 표적핵산에 대한 신호를 검출한다. 즉 2 가지 표적핵산 중 어닐링 단계에서 제1의 표적핵산에 대한 신호를 검출하고, 연장 단계에서는 제2의 표적핵산에 대한 신호를 검출한다. 검출된 각각의 신호는 2 가지 표적핵산 각각에 대한 정성적 및/또는 정량적 정보를 제공한다. 이때 검출 신호는 2 가지 표적핵산 모두에 대해 동일한 단일 신호이며, 이는 하나의 검출 채널에서 검출될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 단일 신호로 2가지 이상의 다중 표적 핵산을 검출하기 위한 PCR 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 단일 신호로 2가지 이상의 표적 핵산을 검출하기 위한 다중검출 PCR 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 표적 핵산(DNA)을 DNA 중합효소에 의해 $10^6 \sim 10^{10}$ 배로 증폭하는 분자생물학적 기술로 1983년 Mullis 등에 의해 개발되어 의학을 포함한 생명과학 전 분야에서 유전자 검출이나 유전자 분리, 획득 등을 위해 필수적으로 사용되고 있다.
- [3] 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR 또는 quantitative PCR)은 기존 PCR 증폭 후 전기영동으로 증폭 산물을 분석하는 기술과 달리, 표적 핵산을 증폭과 동시에 검출하는 기술로, 표적 핵산의 초기 농도를 정확하게 알 수 있어 더욱 정확한 정량적 분석을 가능하게 하고, 또한 반응 튜브가 밀폐된 상태에서 증폭과 검출이 이루어지므로 오염의 가능성이 낮아 검출의 정확성과 신뢰성이 높다.
- [4] 실시간 중합효소연쇄반응은 PCR 증폭과 동시에 증폭 산물을 검출하기 위하여, 브롬화 에티딴(ethidium bromide), 사이버그린I(SYBR Green I), 에바그린(EvaGreen) 등 인터칼레이터를 사용하거나, 택맨 프로브(TaqMan probe)(미국 특허 제5,210,015호 및 제5,538,848호) 등의 가수분해성 프로브를 사용하거나, 분자 비콘(Molecular beacon)(Tyagi et al, Nature Biotechnology v14 MARCH 1996), 하이비콘(HyBeacon) (French DJ et al, Mol Cell Probes, 15(6):363-374, 2001), 공여체 및 수용체로 각각 표지된 2개의 혼성화 프로브(Bernad et al, 147-148 Clin Chem 2000; 46) 등의 혼성화성 프로브(hybridization probes)를 사용하거나, 또는 선라이즈 프라이머(Sunrise primer)(미국 특허 제6,117,635호), 스콜피온 프라이머(Scorpion primer)(미국 특허 제6,326,145호) TSG 프라이머(WO 제2011/078441호) 등의 표지된 프라이머를 사용한다. 인터칼레이터는 모든 DNA 이중가닥에 끼어들어가는 성질을 가지므로 특이성을 높이거나 표적 핵산의 다중 검출을 위해서는 PCR 증폭 후 용해 곡선 분석(melting curve analysis)이 요구되지만, 프로브나 표지된 프라이머 방식의 경우에는 프로브가 표적 핵산과 서열 특이적으로 결합하여 신호가 발생하기 때문에 특이성이 높을 뿐만 아니라 표적 핵산의 다중 검출을 위한 용해 곡선 분석이 반드시 요구되지는 않는다.
- [5] 프로브 방식의 실시간 중합효소연쇄반응을 이용한 표적 핵산의 다중 검출은 하나의 시료 내 다양한 유전자를 높은 정확성으로 동시에 검출할 수 있지만, 표적 핵산의 수 만큼 서로 다른 신호 분자로 표지된 복합 프로브를 사용하여야 하고 그러한 복합 프로브에서 발생하는 신호를 구별하여 탐지할 수 있어야 한다.

- [6] 일반적으로 실시간 중합효소연쇄반응에서 신호 분자는 형광 분자를 사용하는 데, 사용 가능한 형광 분자의 종류가 과장의 중첩으로 제한되기 때문에 즉 하나의 형광 검출 채널에서는 하나의 단일 형광 신호만 검출할 수 있기 때문에 하나의 반응 튜브에서 동시 검출이 가능한 표적핵산의 수는 4~7가지로 제한되게 된다.
- [7] 이러한 한계점을 극복하기 위하여 하나의 검출 채널에서 2가지 이상의 표적핵산을 검출하고자 시도되어 왔다.
- [8] 용해 곡선 분석(Melting curve analysis)은 단일 형광 분자로 표지화된 프라이머나 혼성화성 프로브를 사용하여 PCR 반응 후 온도를 높이거나 온도를 낮추면서 형광의 변화를 측정하여 2가지 이상의 표적핵산을 검출하는 분석법이다. 프라이머나 프로브는 GC 함량이나 길이를 조절함으로써 표적핵산과 고유의 용해온도를 가지도록 설계되어 표적핵산에 따라 특유의 용해 곡선 프로파일이 얻어진다.
- [9] 그런데 이러한 용해 곡선 분석은 표적핵산에 따라 고유의 용해온도를 가지도록 프로브를 설계해야 하고, PCR 반응 종료 후에야 온도 변화를 통해 복수의 표적핵산 검출이 가능하다.
- [10] 이에 반해 명칭이 "멀티플렉스 PCR 수행 방법"인 국제공개 WO 2018/050824는 PCR의 3단계인 변성, 혼성화 및/또는 연장 단계마다 하나의 단일 형광 신호가 검출 대상 표적핵산에 따라 서로 다른 강도로 발생하도록 가수분해성 프로브를 구성하여 단일 신호로 최대 3가지 표적핵산의 실시간 검출이 가능한 PCR 방법을 개시하고 있다. 그러나 이 방법은 표적핵산에 대한 정확한 정량을 위해서는 각 단계에 따른 신호 강도의 가감 등 데이터의 가공이 필요하다.
- [11] 본 발명도 신호 강도의 가감 등 데이터의 가공이 필요하지 않은, 단일 검출 채널에서도 2가지 이상의 표적핵산의 실시간 검출이 가능한 다중 검출 PCR 방법을 개시한다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 본 발명의 목적은 단일 검출 채널에서 2가지 이상의 표적핵산의 실시간 검출을 위한 PCR 방법을 제공하는 데 있다.
- [13] 본 발명의 다른 목적이나 구체적인 목적은 이하에서 제시될 것이다.

과제 해결 수단

- [14] 본 발명의 단일 검출 채널에서 2가지 이상의 표적핵산의 실시간 검출을 위한 PCR 방법은 PCR의 3단계인 변성 단계(Denaturation), 어닐링 단계(Annealing) 및 연장 단계(Extension) 중 어닐링 단계 및 연장 단계에서 각각의 표적핵산에 대한 신호를 검출한다. 즉 2가지 표적핵산 중 어닐링 단계에서 제1의 표적핵산에 대한 신호를 검출하고, 연장 단계에서는 제2의 표적핵산에 대한 신호를 검출한다. 검출된 각각의 신호는 2가지 표적핵산 각각에 대한 정성적 및/또는 정량적 정보를

제공한다. 이때 검출 신호는 2가지 표적핵산 모두에 대해 동일한 단일 신호이며, 이는 하나의 검출 채널에서 검출될 수 있다.

- [15] 이러한 본 발명의 방법은 표적핵산과 결합할 경우 신호물질과 소광물질이 분리되어 신호가 발생하는 구조를 가지는 제1 및 제2의 혼성화성 프로브와 1가지의 소광 프로브(quencher probe)를 사용함에 의하여 가능하다. 제1 및 제2의 혼성화성 프로브는 그것의 표적핵산과의 용해온도가 제1 혼성화성 프로브는 어닐링 단계의 온도와 연장 단계의 온도 사이에 있고 또 나머지 제2 혼성화성 프로브는 연장 단계의 온도와 변성 단계의 온도 사이에 있다. 소광 프로브는 연장 단계의 온도와 변성 단계의 온도 사이의 용해온도를 가지는 제2 혼성화성 프로브를 소광시킬 수 있다. 소광 프로브의 제2 혼성화성 프로브와의 용해온도는 어닐링 단계의 온도와 연장 단계의 온도 사이에 있다. 그럼으로써 어닐링 단계에서는 제1 혼성화성 프로브에 의해서만 신호가 발생하고, 연장 단계에서는 소광 프로브가 분리됨으로써 제2 혼성화성 프로브에 의해서만 신호가 발생하게 된다.
- [16] 이렇게 단일 신호를 사용하여 단일 검출 채널에서 2가지 표적핵산을 PCR 과정 중 실시간 검출을 가능하게 하는 본 발명의 PCR 방법은, 구체적으로는 하기 (a) 내지 (c) 단계를 포함한다:
- [17] (a) 검출 대상 시료에 아래의 (i) ~ (iv)를 포함하는 PCR 반응을 위한 혼합물을 준비하는 단계
- [18] (i) 제1의 표적핵산을 증폭시키기 위한 정방향 및 역방향 프라이머쌍 여기서, 상기 프라이머 쌍 중 하나는 상기 제1의 표적핵산과 비상보적인 무작위 핵산 서열, 제한효소 인지서열 및 제1의 표적핵산과 상보적인 핵산 서열을 순차적으로 포함하며,
- [19] 제2의 표적핵산을 증폭시키기 위한 정방향 및 역방향 프라이머쌍 여기서, 상기 프라이머 쌍 중 하나는 상기 제2의 표적핵산과 비상보적인 무작위 핵산 서열, 제한효소 인지서열 및 제2의 표적핵산과 상보적인 핵산 서열을 순차적으로 포함;
- [20] (ii) 2개 이상의 표적핵산 중 제1의 표적핵산에 의존하여 생성되는 제1의 인공 표적핵산에 특이적인 상보적 서열을 가지는, 제1의 혼성화성 프로브로서, 이 혼성화성 프로브는 상기 인공 표적핵산이 해당 프로브에 결합하지 않은 경우 신호물질과 소광물질이 서로 인접하여 신호가 발생하지 않는 구조를 가지고, 제1의 혼성화성 프로브의 그와 상보적인 인공 표적핵산으로부터 해리되는 용해온도는 PCR 반응의 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 중 어닐링 단계의 온도와 연장 단계의 온도 사이에 있어 어닐링 단계에서는 그것(제1의 혼성화성 프로브)의 그와 상보적인 서열과 결합함으로써 신호물질과 소광물질이 이격되어 신호가 발생하지만, 연장 단계에서는 그것(제1의 혼성화성 프로브)의 그와 상보적인 서열로부터 해리됨으로써 신호물질과 소광물질이 인접하여 신호가 소멸될 수 있는 구조를 가진 프로브;
- [21] (iii) 2개 이상의 표적핵산 중 제2의 표적핵산에 의존하여 생성되는 제2의 인공 표적핵산에 특이적인 상보적 서열을 갖는 제2의 혼성화성 프로브로서, 이 혼성

화성 프로브는 제2의 인공 표적핵산이 해당 프로브와 결합하지 않은 경우 신호 물질과 소광물질이 서로 인접하여 신호가 발생하지 않는 구조를 가지고, 또 상기 신호물질이 결합된 서열에서 말단 방향으로 연장된 단일가닥 서열을 가지며, 또 그것(제2의 혼성화성 프로브)의 그와 상보적인 제2의 인공 표적핵산으로부터 해리되는 용해온도는 PCR 반응의 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 중 연장 단계의 온도와 변성 단계의 온도 사이에 있어 어닐링 단계와 연장 단계에서는 상기 제2의 혼성화성 프로브가 그와 상보적인 제2의 인공 표적핵산과 결합 상태를 유지할 수 있는 프로브; 및

- [22] (iv) 상기 제2의 혼성화성 프로브의 상기 연장된 단일가닥 서열에 상보적으로 결합하여 상기 제2의 혼성화성 프로브의 신호물질을 소광시킬 수 있는 소광 물질을 가진 소광 프로브로서, 이 소광 프로브는 상기 제2의 혼성화성 프로브와 그것(제2의 혼성화성 프로브)의 말단 방향으로 연장된 단일가닥 서열과 상보적으로 결합할 경우 이 프로브의 소광물질은 상기 제2의 혼성화성 프로브의 신호물질과 인접하여 상기 제2의 혼성화성 프로브의 신호물질을 소광시킬 수 있는 구조를 가지고, 또 이 소광 프로브가 그와 상보적인 서열로부터 해리되는 용해온도는 PCR 반응의 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 중 어닐링 단계의 온도와 연장 단계의 온도 사이에 있어 어닐링 단계에서는 상기 제2의 혼성화성 프로브와 결합함으로써 제2의 혼성화성 프로브의 신호를 소광시킬 수 있지만, 연장 단계에서는 상기 소광 프로브가 그와 상보적인 서열로부터 해리됨으로써 제2의 혼성화성 프로브에서 신호가 발생되도록 할 수 있는 프로브;
- [23] (b) 상기 (a) 단계의 혼합물을 단일 반응 용기에 넣고 상대적 고온의 변성, 상대적 저온의 혼성화 및 상대적 중온의 연장 단계의 PCR 반응을 2 사이클 이상 수행하는 단계; 및
- [24] (c) 상기 PCR의 반응의 수행과 동시에, 상기 어닐링 단계에서 상기 제1의 혼성화성 프로브에서 발생하는 신호를 측정하여 상기 제1의 표적핵산을 검출하고, 또 상기 연장 단계에서 상기 제2의 혼성화성 프로브에서 발생하는 신호를 측정하여 상기 제2의 표적핵산을 검출하는 단계.
- [25] 본 명세서에서, 표적핵산은 문맥에 따라 시료 중의 실제 표적핵산이나 또는 그 실제 표적핵산에 의존하여 생성되는 인공 표적핵산을 의미하지만, 특별히 명시적 언급이 없을 경우 표적핵산은 시료 중의 실제 표적핵산을 의미한다.
- [26] 본 발명의 PCR 방법에서, 도 1에 도시된 바의 3가지의 프로브 즉, 제1 및 제2의 혼성화성 프로브(hybridization probes)와 1가지의 소광 프로브(quencher probe)가 사용된다.
- [27] 제1 및 제2의 혼성화성 프로브는 모두 신호물질(R)과 소광물질(Q)을 가지고 있고, 그 신호물질과 소광물질은, 혼성화성 프로브가 표적핵산(target nucleic acid)과 결합하지 않을 경우 서로 인접하여 신호가 발생하지 않지만, 혼성화성 프로브가 표적핵산과 결합할 경우 신호물질과 소광물질이 이격되어 신호가 발생하는

구조를 가진다. 그 구조에는 무작위 코일 구조 또는 스템-루프(stem-loop) 구조가 포함될 수 있다. 그 중 스템-루프 구조를 가지는 혼성화 프로브는 루프 영역에 표적핵산과 특이적으로 결합하는 상보적인 서열이 존재하게 된다.

- [28] 혼성화성 프로브 중 제2의 혼성화성 프로브는 그 신호물질이 결합한 위치에서 말단 방향(즉 스템 루프 구조에서 루프 구조의 반대 방향)으로 연장된 단일가닥 서열(Extended single strand, ESS)을 가진다.
- [29] 소광 프로브는 상기 제2의 혼성화성 프로브의 신호를 소광시키기 위하여 소광 물질을 가진 프로브로서, 상기 제2의 혼성화성 프로브의 연장된 단일가닥 서열(ESS)에 상보적인 서열을 가져 이에 특이적으로 결합할 수 있는 구성을 가진다. 소광 프로브에서 소광물질은 소광 프로브가 제2의 혼성화성 프로브의 연장된 단일가닥 서열(ESS)에 상보적으로 결합할 경우, 그 소광 프로브의 소광물질이 제2의 혼성화성 프로브의 신호물질과 인접하여 그 신호물질을 소광시킬 수 있는 위치에 존재하게 된다. 그 소광 프로브의 소광물질은, 제2의 혼성화성 프로브에서 신호물질이 3' 말단보다 5' 말단과 가까이 위치한다면(이 경우 제2의 혼성화성 프로브의 소광물질은 3' 말단이나 3' 말단과 가까이 위치함), 소광 프로브의 3' 말단이나 3' 말단과 가까이 위치하게 될 것이고, 제2의 혼성화성 프로브에서 신호물질이 5' 말단보다 3' 말단과 가까이 위치한다면 소광 프로브의 5' 말단이나 5' 말단과 가까이 위치하게 될 것이다. 여기서 신호물질이나 소광물질이 5' 말단이나 3' 말단과 가까이 위치한다는 것은 그 신호물질이나 소광물질이 5' 말단이나 3' 말단 가까이 서열 내(intra-sequence)에 존재한다는 것이다.
- [30] 제1의 혼성화성 프로브에서 그것의 표적핵산과의 융해온도는, PCR 반응의 3단계인 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 중 어닐링 단계의 온도와 연장 단계의 온도 사이의 온도를 가진다. 예컨대 변성 단계가 92~98°C에서 수행되고, 어닐링 단계가 50~60°C에서 수행되며, 연장 단계가 70~80°C에서 수행될 경우 상기 융해온도는 65°C 전후가 될 것이다.
- [31] 제1의 혼성화성 프로브가 이러한 융해온도를 가질 경우 어닐링 단계에서는 그 제1의 혼성화성 프로브가 표적핵산과 결합함으로써 신호물질과 소광물질이 이격되어 신호가 발생하지만, 연장 단계에서는 제1의 혼성화성 프로브가 표적핵산과 해리되어 원래의 스템-루프 구조를 취함으로써 신호물질과 소광물질이 인접하게 되어 신호가 소멸되게 된다.
- [32] 이에 반하여 제2의 혼성화성 프로브에서는 그것의 표적핵산과의 융해온도가 PCR 반응의 3단계인 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 중 연장 단계의 온도와 변성 단계의 온도 사이의 온도를 가진다. 따라서 어닐링 단계와 연장 단계 모두에서 제2의 혼성화성 프로브는 표적핵산과 결합한 상태를 유지하게 되며, 다만 소광 프로브의 작용에 의하여 어닐링 단계에서는 신호가 발생하지 않고 연장 단계에서만 신호가 발생하게 된다.
- [33] 소광 프로브는 그것의 제2의 혼성화성 프로브와의 융해온도가 PCR 반응의 3단계인 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연

장 단계 중 어닐링 단계의 온도와 연장 단계의 온도 사이에 있게 되며, 따라서 전술한 바와 같이, 소광 프로브는 어닐링 단계에서는 제2의 혼성화성 프로브와 결합 상태를 유지하여 제2의 혼성화성 프로브의 신호를 소광시키지만, 연장 단계에서는 해리됨으로써 제2의 혼성화성 프로브에서 신호가 발생하도록 한다.

[34] 또한 본 발명의 상기 방법은 상기 (i)의 상기 제1 또는 제2의 표적핵산과 비상보적인 무작위 핵산 서열, 제한효소 인지서열 및 제1 또는 제2의 표적핵산과 상보적인 핵산 서열을 순차적으로 포함하는 제1 또는 제2의 표적핵산을 증폭시키기 위한 프라이머 대신에

[35] 표적핵산을 증폭하기 위한 표적핵산에 상보적인 정방향 및 역방향 프라이머쌍을 사용하며, 이 경우 인공 표적핵산 생산은 표적핵산에 대한 상보적 프로브 서열과 함께 인위적 임의의 태그 서열을 가진 PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)를 사용하여 인위적 임의의 서열만으로 된 인위적 임의의 서열의 5'태그인 PTO 단편을 발생시키고 이 PTO 단편이 인공 표적핵산이 되는 것을 특징으로 한다.

[36] 전술한 바의 본 발명의 PCR 방법의 개념도가 도 2에 도시되어 있다.

[37] 이와 같이 본 발명에서는 3가지 프로브를 사용하면 PCR 과정 중 단일 신호를 사용하더라도 2가지 표적핵산에 대한 신호를 각각 어닐링 단계 및 연장 단계에서 검출함으로써 그 2가지 표적핵산의 검출이 가능한데, 이 경우 어닐링 단계 및 연장 단계의 검출 신호는 서로 간섭 없이 얻어지게 된다. 즉 어닐링 단계에서 얻어지는 검출 신호는 2가지 표적핵산 중 오로지 제1 표적핵산에 대한 검출 신호가 되고, 연장 단계에서 얻어지는 검출 신호는 2가지 표적핵산 중 오로지 제2 표적핵산에 대한 검출 신호가 된다. 따라서 이들 검출 신호는 동일한 단일 신호를 사용하여 얻어진 것으로 서로 간 가감 등의 데이터 가공의 필요가 없으므로, 신호 강도와 PCR 사이클 수로 구성되는 PCR 결과 그래프에서 2가지 표적핵산의 검출 여부(정성 정보)와 검출 정도(정량 정보)를 손쉽게 확인할 수 있게 된다. 이는 본 발명의 방법 수행자로 하여금 PCR 결과 그래프에서 표적핵산의 검출 여부를 곧바로 확인할 수 있어 매우 편리할 뿐만 아니라, 형광 물질의 종류를 달리한 다중 실시간 PCR 방법에 있어서는 하나의 반응 튜브에서 동시 검출이 가능한 핵산의 종류를 2배까지 높일 수 있다. 예컨대 다중 실시간 PCR 방법에서 5가지 형광 물질을 사용할 경우 하나의 형광 물질로 2가지 표적핵산의 검출이 가능하므로 10가지 표적핵산의 동시 검출이 가능하게 된다.

[38] 본 발명에서, 상기 3가지 프로브는 그것의 상보적 표적핵산(소광 프로브는 제2의 혼성화성 프로브) 등과의 용해온도를 고려하여 그 서열이 설계되어야 하는데, 이러한 용해온도를 고려한 서열의 설계는 GC 함량, 서열 길이 또는 이들을 함께 조절하여 이루어질 수 있다. 이러한 용해온도를 고려한 프로브 서열의 설계에는 당업계에 공지된 문헌[Unit Evol. Genet. 2005; 5:1-9]; 문헌[Afr. Jo. Biotechnol. 2003; 2:91-95], 문헌[Methods Mol. Biol. 1993; 15:31-40], 문헌[PCR Methods Appl. 1993; 3:S30-S37], 문헌[Nucleic Acids Res. 1994; 22:2760-2768] 등 다양한 문헌

을 참조하고, Visual OMP™ 소프트웨어 (DNA Software, Inc, Ann Arbor, Mich), Oli2go™ 소프트웨어(Nucleic Acids Res. 2018 Jul 2; 46(Web Server issue): W252-W256) 등 시판되는 프로그램의 활용이 바람직할 수 있다.

- [39] 본 발명에서, 제2의 혼성화성 프로브는 그것의 표적핵산과의 용해온도가 상대적 중온의 연장 단계 및 상대적 고온의 변성 단계 사이에 있어, 연장 단계에서 표적핵산과 결합된 상태에 있게 되어, 연장 반응(중합 반응)이 진행될 경우 폴리머라아제에 의해(즉 Taq 폴리머라아제 등의 뉴클레아제 활성화에 의해) 택맨(TaqMan) 프로브 등 가수분해성 프로브와 같이 가수분해될 수 있다. 제2의 혼성화성 프로브가 연장 단계에서 표적핵산과 결합된 상태에 있다가 가수분해될 경우 그 가수분해에 의해 가수분해성 프로브처럼 신호가 발생하며 그 발생한 신호는 PCR 반응의 다음 사이클의 어닐링 단계에서 제1 혼성화성 프로브의 신호와 함께 검출되게 되므로, 제1 혼성화성 프로브의 신호가 제1 표적핵산에 대한 검출 정보(즉 정성적·정량적 정보)를 정확히 반영하지 못하게 되는 문제점이 발생하게 된다.
- [40] 따라서 본 발명에서, 제2의 혼성화성 프로브가 상보적으로 인식하여 특이적으로 결합하는 표적핵산은 실제 검출하고자 하는 시료 중의 검출 대상인 표적핵산(즉 실제 표적핵산 또는 제2의 실제 표적핵산)이어서는 안되고, 그러한 실제 표적핵산에 의존하여 생성되는 인공 표적핵산이어야 한다.
- [41] 이러한 인공 표적핵산은 실제 표적핵산에 정량적으로 의존하여 생성되어 그 실제 표적핵산의 정성적 분석뿐만 아니라 정량적 분석까지 가능하게 하는 것이 바람직한데, 이렇게 실제 표적핵산에 의존하는 인공 표적핵산의 생성 기술은 당업계에 다양한 기술이 공지되어 있다. 그러한 인공 표적핵산의 생성 기술로서 예컨대 명칭이 "절단된 상보적인 태그 절편을 이용한 표적핵산 서열 검출 방법 및 그 조성물(METHOD FOR DETECTING TARGET NUCLEIC ACID SEQUENCE USING CLEAVED COMPLEMENTARY TAG FRAGMENT AND COMPOSITION THEREOF)"인 국제 공개특허 WO 2017188669가 개시하는 C-TAG(Cleavable Tag) 기술, 명칭이 "PTO 절단 및 연장-의존적 시그널링 올리고뉴클레오타이드 혼성화를 이용한 타겟 핵산서열의 검출(DETECTION OF TARGET NUCLEIC ACID SEQUENCE BY PTO CLEAVAGE AND EXTENSION-DEPENDENT SIGNALING OLIGONUCLEOTIDE HYBRIDIZATION ASSAY)"인 국제 공개특허 WO 2013115442가 개시하는 PCE-SH(PTO Cleavage and Extension-Dependent Signaling Oligonucleotide Hybridization) 기술 등을 들 수 있다.
- [42] C-TAG 기술은 인위적 임의의 서열로 이루어진 서열이 제한효소로 절단될 수 있는 서열과 함께 도입된 프라이머를 사용하여 표적핵산을 증폭하고 그 표적핵산의 증폭과 함께 그 제한효소의 작용에 의하여 상기 인위적 임의의 서열에 상보적인 태그(C-TAG)가 발생되면, 그 태그를 혼성화성 프로브 등으로 검출하여 표적핵산을 검출하는 기술이다. 이때 표적핵산이 존재하지 않을 경우 제한효소가 작용하지 않게 되므로 태그는 발생하지 않게 되며, 표적핵산 존재할 경우에는 그

에 정량적으로 비례하여 태그가 발생하므로 태그 검출을 통하여 표적핵산의 정성적, 정량적 검출이 가능해진다. 태그는 그 자체를 혼성화성 프로브로 검출하거나, 태그가 그 서열 길이가 혼성화성 프로브보다 짧을 경우 혼성화성 프로브에 대해 프라이머로서 작용하도록 하여 표적핵산처럼 연장 반응에 의해 연장되도록 함으로써 혼성화성 프로브의 신호를 커짐(signal-off)에서 켜짐(signal-on)으로 전환시켜 검출할 수 있다. 전술한 바의 C-TAG 기술 구체적인 작용 방식은 국제 공개특허 WO 2017188669를 참조할 수 있다. 이 문헌은 본 명세서에서 인용되는 모든 문헌과 함께 본 명세서의 일부로서 간주된다. 이들 C-TAG 기술의 작용 방식 개념도는 도 3에 도시되어 있다.

[43] PCE-SH 기술은 표적핵산을 증폭시, 3'말단이 HEG (hexaethylene glycol), 인산기(phosphate group) 등으로 블로킹(blocking)되어 있으면서 표적핵산에 대한 상보적 프로브 서열과 함께 인위적 임의의 태그 서열을 가진 PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)를 사용하여 그 표적핵산의 증폭과 함께, 분할된 이중가닥(bifurcated duplex)이 있을 경우 엔도뉴클레아제 활성화에 의해 단일가닥의 5' 태그를 발생시키는 Taq 폴리머라아제의 작용에 의하여(Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 May 25; 96(11): 6143-6148), 인위적 임의의 서열만으로 구성된 PTO 단편(즉 인위적 임의 서열의 5' 태그)을 발생시키고, 이 PTO 단편이 CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)에 대해 프라이머로 작용하여 표적핵산의 연장 반응 시 함께 연장되도록 함으로써 신규 연장 서열이 생기면 그 신규 연장 서열을 혼성화성 프로브 등으로 검출하여 표적핵산을 검출하는 기술이다. 여기서도 표적핵산이 존재하지 않을 경우 PTO 단편이 발생하지 않아 신규 연장 서열이 발생하지 않으며, 표적핵산이 존재할 경우에는 그 표적핵산의 양에 비례하여 신규 연장 서열이 발생하므로 그 신규 연장 서열을 검출하게 되면 표적핵산의 정성적, 정량적 검출이 가능해진다. 또 이 경우에 있어서도 PTO 단편을 혼성화성 프로브에 대해 프라이머로 작용하도록 하여 표적핵산처럼 연장 반응에 의하여 연장되도록 함으로써 혼성화성 프로브의 신호를 커짐(signal-off)에서 켜짐(signal-on)으로 전환시켜 검출할 수 있다. 이러한 PCE-SH 기술의 구체적인 작용 방식에 대해서는 국제 공개특허 WO 2013115442를 참조할 수 있다.

[44] 또한 인공 표적핵산을 생성시키는 기술은 전술한 바의 C-TAG 기술이나 PCE-SH 기술 이외에도 PTOCE(Probing & Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension) 기술(국제 공개특허 WO 2012096523), PCE-NH(PTO Cleavage and Extension-Dependent Non-Hybridization) 기술(국제출원 제PCT/KR2013/012312호) 등을 예시할 수 있으며, 이들 PTOCE 기술이나 PCE-NH 등은 PCE-SH 기술과 유사하게 모두 표적핵산에 대한 상보적 프로브 서열과 함께 인위적 임의의 태그 서열을 가진 PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)를 사용하여 인위적 임의의 서열만으로 된 PTO 단편(즉 인위적 임의 서열의 5' 태그)을 발생시키고 이 단편이 CTO(Capturing and Templating Oligonucleotide)를 주형으로 연장되어 신규 서열이 발생되도록 하여 그 신규 서열을 검출하는 단계를 포함한다. 인위적 임의의

서열만으로 구성된 PTO 단편에서 연장된 신규 서열이 인공 표적핵산이 되며, 이 인공 표적핵산은 시료의 실제 표적핵산에 의존하여 정성적, 정량적으로 생성된다.

- [45] 본 발명에서 인공 표적핵산은 시료 중 표적핵산이 존재할 경우에만 생성되거나 시료 중 표적핵산이 존재할 경우에만 그 존재량에 비례하여 생성되는, 신규로 합성되는 서열의 핵산으로, 상기 C-TAG 기술에 있어서는 상기 태그나 그 태그가 혼성화성 프로브에 대해 프라이머로 작용할 경우 혼성화성 프로브를 주형으로 하여 그 태그에서 연장되어 신규로 생성된 서열을 말하며, 상기 PCE-SH 기술에 있어서는 CTO나 혼성화성 프로브를 주형으로 하여 프라이머로 작용하는 PTO 단편에서 연장되어 신규로 합성된 서열을 말한다.
- [46] 본 발명에서, 상기 제2의 혼성화성 프로브는 전술한 바와 같이 실제 표적핵산에 의존하여 생성되는 인공 표적핵산을 검출하여야 하지만, 제1의 혼성화성 프로브는 그것의 표적핵산과의 용해온도가 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 사이에 있어 연장 단계에서 표적핵산과 해리된 상태에 있게 되어 연장 반응시 분해될 염려가 없으므로, 상기 제1의 혼성화성 프로브가 검출하는 핵산은 시료 중의 실제 표적핵산이든 그 실제 표적핵산에 의존하여 생성되는 인공 표적핵산이든 무방하다.
- [47] 본 발명에서, 프로브는 표적핵산(시료 중의 실제 표적핵산이나 인공 표적핵산)을 검출하기 위한 올리고뉴클오티드(Oligonucleotide)로서, 표적핵산에 대해 상보적인 염기서열을 포함하고 있어 표적핵산과 특이적인 결합 능력을 가지는 핵산이나 핵산 유사체를 의미한다. 프로브는 표적핵산과 특이적인 결합 능력을 가지는 한 DNA 뿐만 아니라 RNA일 수 있으며(본 발명의 프로브가 RNA일 경우 상기 서열번호의 염기서열에서 "T"는 "U"로 읽힌다), 또한 뉴클레아제나 열에 안정한 PNA(Peptide Nucleic Acid), LNA(Locked Nucleic Acid), HNA(Hexitol Nucleic Acids), ANA(Altritol Nucleic Acids), MNA(Mannitol Nucleic Acids) 등의 핵산 유사체일 수도 있다. 프로브는 또한 표적핵산과 특이적인 결합 능력을 가지는 한 자연적 뉴클레오티드(natural nucleotide) 뿐만 아니라 변형된 뉴클레오티드(modified nucleotide)를 포함할 수 있다. 이러한 변형된 뉴클레오티드는 그 당, 그 포스페이트 및/또는 그 염기에서 변형된 것일 수 있다. 이러한 당, 포스페이트 및/또는 염기에서 변형된 뉴클레오티드는 당업계에 그 제조방법을 포함하여 구체적으로 공지되어 있다. 예컨대 당에서 변형된 뉴클레오티드는, 그 당의 하이드록실기(OH group)가 할로젠기, 지방족기, 에테르기, 아민기 등으로 수식된 것, 당인 리보스 또는 디옥시 리보오스 자체가 이를 대신할 수 있는 당 유사체 α -아노머 당(α -anomeric sugars), 아라비노스(arabinose), 자일로스(xyloses) 또는 릭소오스(lyxoses)와 같은 에피머 당(epimeric sugars), 피라노오스 당(pyranose sugars), 퓨라노오스 당(furanose sugars) 등으로 치환된 것을 들 수 있다. 또한 예컨대 포스페이트에서의 변형은 포스페이트가 P(O)S(thioate), P(S)S(dithioate), P(O)NR₂(amidate), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂(formacetal)로의 변형된 것 등을

들수 있다. 여기서 상기 R 또는 R'는 H 또는 치환되거나 치환되지 않은 알킬 등이며, 포스페이트에서 변형될 경우 그 연결기는 -O-, -N-, -S- 또는 -C-가 되어, 이러한 연결기를 통해 인접 뉴클레오티드가 서로 결합하게 된다.

[48] 프로브에서 표적핵산과의 상보적인 서열은 그것이 표적핵산과 특이적 결합 능력을 부여하는 한 100% 상보적인 필요는 없으며, 적어도 약 80%, 바람직하게는 적어도 약 85%, 보다 바람직하게는 적어도 약 90%, 95% 또는 99%이어도 무방하다.

[49] 본 발명에서, 혼성화성 프로브는 표적핵산과 상보적 서열을 가짐과 함께 표적핵산이 해당 프로브에 결합하지 않은 경우 신호물질과 소광물질이 서로 인접하여 신호가 발생하지 않는 구조를 가지는 프로브를 말한다. 혼성화성 프로브는 스템 루프 구조일 수 있다. 이 경우 루프 영역에 표적핵산과 상보적 서열이 위치하고 스템 영역 내(intra-stem) 또는 그 말단에 신호물질과 소광물질이 위치한다. 혼성화성 프로브는 그것이 표적핵산과 결합할 경우 신호물질과 소광물질이 이격됨으로써 신호를 발생시킨다. 일반적으로 신호물질로 형광물질을 사용하므로 이러한 신호는 형광신호이다. 신호물질과 소광물질을 올리고뉴클레오티드인 프로브에 표지화키는 방법이나 그러한 프로브를 제조하는 방법은 고체상 1단계 화학적 표지화 방법(Direct chemical labeling via solid-phase synthesis), 고체상 2단계 화학적 표지화 방법(Two-step chemical labeling via solid-phase synthesis) 등을 포함하여 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있고, 또한 문헌[Chem. Soc. Rev., 2020, 49, 8749-8773], 문헌[ACS Cent. Sci., 2017, 3, 701-707], 문헌[Curr. Opin. Biotechnol., 2015, 31, 42-49], 문헌[Annual Review of Physiology, ed. D. Julius, 2017, vol. 79, pp. 93-117] 등 다양한 문헌이 공지되어 있다. 표지화 방법과 관련하여 구체적인 것은 이들 문헌을 참조할 수 있다.

[50] 본 발명에서 제1 혼성화성 프로브는 분자 비콘(molecular beacon)일 수 있다.

[51] 본 발명에서, 분석 대상 시료는 검출하고자 하는 표적핵산을 포함하거나 포함하고 있을 것으로 의심되어 검출의 필요성을 가지는 임의의 혼합물 또는 용액일 수 있다. 시료는 인체 또는 동물로부터 얻어진 생체시료뿐만 아니라 그러한 생체시료를 가공하여 표적핵산의 농도를 높인 가공시료일 수 있고, 나아가 표적핵산이 포함되어 있거나 있을 것으로 여겨지는 물, 식품, 산업폐수 등, 환경오염인자, 독성인자, 식품 가공 기기로부터 얻어진 유기물 시료 등 검사가 필요한 시료일 수도 있다. 이러한 시료는 적정 희석제, 완충용액을 포함할 수 있으며, 세균이나 바이러스 존재 여부를 검출하고자 할 때에는 배지나 배지 성분이 포함되어 있는 세균 배양물, 바이러스 배양물일 수도 있다.

[52] 또 본 발명에서, 분석 대상 시료는 바람직하게는 인체 또는 동물로부터 얻어진 생체시료 또는 그 가공시료일 수 있다. 생체시료는 전혈, 혈청, 혈장, 체대혈, 소변, 분변, 타액, 코점액, 정액, 양수, 세척액(기관지 폐포, 위, 복강, 귀 등), 림프액, 객담, 조직, 세포 등 검출하고자 하는 표적핵산을 포함하거나 포함하고 있을 것으로 의심되어 검출의 필요성을 가지는 인체 또는 동물로부터 얻어진 것일 수 있

다. 가공시료는 예컨대 혈장, 혈청, 생체시료를 핵산 추출 키트를 이용하여 핵산(DNA 및/또는 RNA) 농도를 높인 시료, 조직 추출물, 조직에서 얻어진 세포, 세포 용해물, 세포 배양물, 세균 배양물, 바이러스 배양물 등일 수 있다.

[53] 또 본 발명에서, 표적핵산은 검출 대상 핵산으로 그 존재 및/또는 존재량이 검출되거나 측정됨으로써 질병의 진단이나 예후, 생물학적 지표의 확인뿐만 아니라 그것의 기능이나 성질 등의 연구에 이용 등, 어떤 유용함을 가져올 수 있는 임의의 핵산을 의미한다. 표적핵산은 프로브(즉 제1 또는 제2 혼성화성 프로브)가 결합하는 서열 즉 프로브에 상보적인 서열을 포함하는 단일가닥 DNA, 또는 그 단일가닥 DNA가 결합된 이중가닥 DNA를 의미한다. 이 단일가닥 또는 이중가닥 DNA는 시료, 특히 생체 시료 중의 게놈 DNA이거나, mRNA, rRNA, 마이크로 RNA 등 RNA에서 역전사에 의해 생성된 cDNA이거나, 실제 표적핵산에 의존하여 생성되는, 인위적 임의의 서열로 구성된, 전술한 바의 인공 표적핵산일 수 있다.

[54] 실제 표적핵산은 병원성 세균 등 원핵세포의 핵산, 사람 등으로부터 유래 또는 분리된 진핵세포 핵산, 병원성 바이러스의 핵산, 또는 비로이드 핵산일 수 있다. 여기서 병원성 세균에는 반코마이신이나 카바페넴 등의 항생제 내성 장내세균, 폐렴이나 패혈증을 일으킬 수 있는 아시네토박터 바우마니(*Acinetobacter baumannii*), 백일해를 일으킬 수 있는 보르데텔라 퍼투스시균(*Bordetella pertussis*), 폐렴을 일으킬 수 있는 클렙시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumoniae*) 등이 포함되며, 또 병원성 바이러스에는 위장관 질환 원인체 바이러스(Rotavirus A, Astrovirus, Adenovirus F40, Adenovirus F41, Norovirus GI, Norovirus GII 등), 인유두종 바이러스, 호흡기 질환 원인체(Influenza A/H1N1, Influenza A/H3N2, Influenza A/H1N1/2009pdm, Influenza B, Parainfluenza 1, Parainfluenza 3, Respiratory syncytial virus A, Respiratory syncytial virus B, Human metapneumovirus, Adenovirus) 등이 포함된다.

[55] 본 발명에 있어서, 프라이머는 표적핵산의 합성 개시를 유도할 수 있는 올리고뉴클레오티드로서, 각 표적핵산에 대해 정방향 프라이머와 역방향 프라이머로 구성된다. 프라이머는 표적핵산(시료 중의 실제 표적핵산 또는 그에 의존하여 생성되는 인공 표적핵산)에 특이적으로 결합하고 PCR 반응의 연장 반응에서 표적핵산과 결합을 유지할 정도의 융해온도를 가지도록 설계된다. 연장 반응은 일반적으로 연장 단계에서 이루어지지만 반드시 그래야 되는 것은 아니다. 제1의 혼성화성 프로브는 시료 중 실제 표적핵산 및 인공 표적핵산 중 어느 하나에 결합하여 그것을 검출할 수 있으면 무방한데, 제1의 혼성화성 프로브가 인공 표적핵산을 검출할 경우 그 인공 표적핵산이 제1의 혼성화성 프로브보다 길이 짧을 경우 제1 혼성화성 프로브와 상보적으로 결합한 어닐링 단계에서 프라이머로 작용하여 제1의 혼성화성 프로브의 신호물질과 소광물질을 이격시키면서 연장될 수 있다. 어떤 표적핵산에 대한 연장 반응이 어닐링 단계에서 일어난다면 그 표적핵산에 대한 정방향, 역방향 프라이머는 그 융해온도가 적어도 어닐링

단계의 온도 이상의 온도가 되도록 설계되고, 어떤 표적핵산에 대한 연장 반응이 연장 단계에서 일어난다면 그 표적핵산에 대한 정방향, 역방향 프라이머는 그 용해온도는 적어도 연장 단계의 온도 이상의 온도가 되도록 설계된다. 이러한 설계는 통상 프라이머의 서열을 표적핵산과 상보적으로 하면서 그 길이를 조절하여 이루어질 수 있다. 이러한 프라이머 설계에는 문헌[PCR Methods Appl. 1993 Dec;3(3):S30-7], 문헌[Biomolecular Detection and Quantification 14 (2017) 19-28] 등을 참조하거나 시판되는 소프트웨어(예컨대 Visual OMP, Invitrogen OligoPerfect Designer) 등을 활용할 수 있다.

- [56] 프라이머는 다양한 길이를 가질 수 있으나, 통상은 10~50개 뉴클레오티드 길이를 가지며, 프라이머의 합성 개시 유도 기능에 영향이 없는 한 프로브와 유사하게 프라이머의 일부 서열은 PNA(Peptide Nucleic Acid), LNA(Locked Nucleic Acid), HNA(Hexitol Nucleic Acids), ANA(Altritol Nucleic Acids), MNA(Mannitol Nucleic Acids) 등의 핵산 유사체일 수 있고, 또 자연적 뉴클레오티드(natural nucleotide) 뿐만 아니라 변형된 뉴클레오티드(modified nucleotide)를 포함할 수도 있다.
- [57] 본 발명에서 있어서, 상기 (a) 단계의 PCR 반응을 위한 혼합물에는 전술한 바의 프라이머 세트와 상기 3가지 프로브가 포함되는 이외에, 4가지 NTP, DNA 폴리머라아제를 포함하며, 또한 기타 인자로서 pH 안정화제인 Tris-HCl, 효소 활성을 촉진하기 위한 보조 인자인 MgCl₂나 MgSO₄ 또는 (NH₄)₂SO₄, 효소 안정화를 위한 인자인 BSA(Bovine Serum Albumin)나 젤라틴이나 글리세롤 또는 PEG 6000, 프라이머의 표적핵산에의 결합을 촉진하는 인자인 KCl, 비특이적 증폭을 억제하기 위한 비이온성 계면활성제인 Tween 20이나 Triton X-100, DNA 중합효소의 핵산에의 비특이적 결합을 감소시키기 위한 스퍼미딘(spermidine), 프라이머의 표적핵산과의 어닐링을 촉진하기 위한 인자인 우레아(urea)나 DMSO(dimethylsulfoxide) 또는 DMF(dimethylformamid), 베타인(Betain), DNA 폴리머라아제의 응집을 방지하기 위한 인자인 SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)나 Triton X-100 등을 추가로 포함할 수도 있다.
- [58] 본 발명에서 DNA 폴리머라아제는 열안정성 폴리머라아제를 사용하는데, 이러한 열안정성 폴리머라아제는 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermus antranikianii*, *Thermus caldophilus*, *Thermus chliarophilus*, *Thermus flavus*, *Thermus igniterrae*, *Thermus lacteus*, *Thermus oshimai*, *Thermus ruber*, *Thermus rubens*, *Thermus scotoductus*, *Thermus silvanus*, *Thermus species Z05*, *Thermus species sps 17*, *Thermus thermophilus*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosiphon africanus*, *Thermococcus litoralis*, *Thermococcus barossi*, *Thermococcus gorgonarius*, *Thermotoga maritima*, *Thermotoga neapolitana*, *Thermosiphon africanus*, *Pyrococcus woesei*, *Pyrococcus horikoshii*, *Pyrococcus abyssi*, *Pyrodictium occultum*, *Aquifex pyrophilus* 및 *Aquifex aeolicus* 등 다양한 박테리아 종으로부터 직접 분리하여 사

용하거나 유전자 재조합 기술에 의해 제조하여 사용하거나 분리 또는 제조되어 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있다.

- [59] DNA 폴리머라아제는 변형된 것을 사용하여도 무방하다. 변형된 폴리머라아제는 일부 서열이 인위적으로 변형되거나 자연적으로 변형된(돌연변이된) 것을 포함한다. 이러한 변형된 폴리머라아제로서는 G46E E678G CS5 DNA 폴리머라아제, G46E L329A E678G CS5 DNA 폴리머라아제, G46E L329A D640G S671F CS5 DNA 폴리머라아제, G46E L329A D640G S671F E678G CS5 DNA 폴리머라아제, G46E E678G CS6 DNA 폴리머라아제, Z05 DNA 폴리머라아제, ΔZ05 폴리머라아제, ΔZ05-Gold 폴리머라아제, ΔZ05R 폴리머라아제, E615G Taq DNA 폴리머라아제, E678G TMA-25 폴리머라아제, E678G TMA-30 폴리머라아제 등이 예시될 수 있다.
- [60] DNA 폴리머라아제는 바람직하게는 5'→3' 엑소뉴클라아제 (exonuclease) 활성이 제거된 DNA 폴리머라아제이다. 상용화된 이러한 폴리머라아제로는 AptaTaq exo DNA Polymerase (Roche, 스위스), Top DNA Polymerase (바이오니아, 한국), Vent® (exo-) DNA Polymerase (NEB, 미국), Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB, 미국), 그리고, KlenTaq-1 DNA polymerase(Taq polymerase에서의 Klenow fragment의 유사체) 등을 사용할 수 있다.
- [61] 본 발명에서 PCR 반응은 3단계인 변성 단계, 어닐링 단계 및 연장 단계를 2 사이클 이상, 통상 15 내지 50 사이클을 반복적으로 수행하여 주형 핵산을 증폭시키는데, 이러한 3단계 사이클 수행 전에 초기 변성 단계(Initial Denaturation)가 포함될 수 있다. 이 초기 변성 단계는 DNA 폴리머라아제를 활성화시키고 주형 DNA를 변성시키기 위하여 수행된다. 이러한 초기 변성 단계는 주형 DNA의 GC 함량 등을 고려하여 30초 내지 20분 범위 내에서 수행될 수 있다.
- [62] 또한 상기 3단계 반응 후에는 연장 단계(Final elongation step)가 포함될 수 있다. 이 연장 단계는 DNA 폴리머라아제가 그 마지막 연장 반응을 마무리하기 위한 것으로 통상 상기 3단계의 연장 단계와 같은 온도에서 1~20분 정도 수행된다.
- [63] PCR 반응과 관련하여 더 구체적인 것은 미국 특허 번호 제4,683,195호, 제4,683,202호, 문헌[PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis et al, eds, 1990], 문헌[BioTechniques 69: 317?325 (October 2020)], 문헌[Front Microbiol. 2017 Feb 2;8:108], 문헌[J Invest Dermatol. 2013 Mar; 133(3): e6] 등을 참조할 수 있다.
- [64] 또 본 발명에서, 신호는 형광 신호, 발광 신호, 비색 신호 등 특별한 제한없이 사용될 수 있으나, 형광 신호를 사용하는 것이 바람직하다.
- [65] 본 발명에서, 형광 신호를 사용할 경우 그 신호를 발생시키기 위한 형광 물질은 당업계에 공지된 것들 중에서 임의의 것을 PCR 기기의 각 검출 채널의 검출 파장 등을 고려하여 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 공지된 형광 물질로서는 예컨대 Cy2™(506), YO-PRO™-1(509), YOYO™-1(509), Calcein(517), FITC(518), FluorX™(519), Alexa™(520), Rhodamine 110(520), Oregon Green™

500(522), Oregon Green™ 488(524), RiboGreen™(525), Rhodamine Green™(527), Rhodamine 123(529), Magnesium Green™(531), Calcium Green™(533), TO-PRO™-1(533), TOTO1(533), JOE(548), BODIPY530/550(550), Dil(565), BODIPY TMR(568), BODIPY558/568(568), BODIPY564/570(570), Cy3™(570), Alexa™ 546(570), TRITC(572), Magnesium Orange™(575), Phycoerythrin R&B(575), Rhodamine Phalloidin(575), Calcium Orange™(576), Pyronin Y(580), Rhodamine B(580), TAMRA(582), Rhodamine Red™(590), Cy35™(596), ROX(608), Calcium Crimson™(615), Alexa™ 594(615), TexRed(615), Nile Red(628), YO-PRO™-3(631), YOYO™-3(631), R-phycoerythrin(642), C-Phycoerythrin(648), TO-PRO™-3(660), TOTO3(660), DiD DilC(5)(665), Cy5™(670), Thiadiazocyanine(671), Cy55(694), HEX(556), TET(536), Bioscience Blue(447), CAL Fluor Gold 540(544), CAL Fluor Orange 560(559), CAL Fluor Red 590(591), CAL Fluor Red 610(610), CAL Fluor Red 635(637), FAM(520), Fluorescein(520), Fluorescein-C3(520), Pulsar 650(566), Quasar 570(667), Quasar 670(705) 및 Quasar 705(610) 등을 들 수 있다. 괄호 안의 숫자는 나노미터 단위의 최대 방출 파장이다.

- [66] 소광 물질은 그것이 형광 물질과 인접하여 있을 때 형광 물질에 의하여 방출된 형광을 흡수하고 발열시켜 소멸시키는 물질로서 이러한 소광 물질도 당업계에 많은 것들이 공지되어 있는데, 그러한 공지된 것들 중에서 사용된 형광 물질의 방출 파장을 고려하여 적절한 흡수 파장을 가진 것을 선택하여 사용할 수 있다. 공지된 소광 물질로서는 Dabcyl(453), QSY 35(475), BHQ-0(495), Eclipse(530), BHQ-1(534), QSY 7(560), QSY 9(562), BHQ-2(579), ElleQuencher(630), Iowa Black(651), QSY 21(661), BHQ-3(672) 등을 들 수 있다. 괄호 안의 숫자는 나노미터 단위의 최대 흡수 파장이다.
- [67] 형광 물질과 소광 물질의 적합한 쌍(pair)과 관련하여 불필요한 잡음 신호없이 정확한 검출을 위해서 소광 효율(Quenching efficiency)을 고려할 필요가 있는데, Cy5/BHQ-2, Cy5/BHQ-1, TexRed/BHQ-2, TexRed/QSY 7, TexRed/BHQ-1, TexRed/Dabcyl, Cy3/BHQ2, Cy3/QSY 7, Cy3/BHQ-1, Cy3/Dabcyl, TET/BHQ-2, TET/QSY 7, TET/TAMRA, TET/BHQ-1, FAM/BHQ-2, FAM/QSY 7, FAM/TAMRA, FAM/BHQ-1, FAM/Dabcyl 등이 소광 효율이 높다고 알려져 있어(*Nucliec Acids Res.* 30, e122, 2002), 이들 쌍 중에서 선택하여 사용하는 것이 바람직할 수 있다.
- [68] 신호물질과 소광물질에 대해 그리고 이들 적합한 쌍(pair)의 선택에 대해 당업계에 많은 문헌이 공지되어 있으며, 그러한 공지된 문헌을 참조할 수 있다. 그러한 문헌으로서는 문헌[*Methods Mol Biol.* 335, 17-29, 2006], 문헌[*Biotechniques* 31, 1106-1121, 2001], 문헌[*J. Am Chem. Soc.* 124, 6950-6956, 2002], 문헌[*Chem. Eur. J.* 9, 3466-3471, 2003], 문헌[*Nucliec Acids Res.* 30, e122, 2002], 문헌[*J. Phys. Chem.* 100, 5541-5553, 1996] 등을 들 수 있다.
- [69] 본 발명에서, 단일 신호는 하나의 검출 채널을 통하여 검출되는 신호를 말한다. 따라서 신호 발생 물질이 2가지가 사용되더라도 그 2가지 물질에 의하여 발

생되는 신호가 하나의 검출 채널에서 검출된다면 그것은 단일 신호이다. 예컨대 신호 물질로 형광 물질인 Cy2™(506) 1가지만을 사용한다면 그것에 발생하는 형광 신호는 당연히 단일 신호이지만, 신호 물질로 형광 물질인 Alexa™(520) 및 Rhodamine 110(520) 2가지를 사용하는 경우에도 그것의 검출 파장이 동일하여 하나의 형광 검출 채널에서 검출된다면 이 2가지 형광 물질에 의한 신호도 단일 신호가 된다.

[70] 본 발명에서, 신호 검출은 PCR 반응의 어닐링 단계 및 연장 단계에서 이루어진다. 어닐링 단계에서는 제1 표적핵산(시료 중의 실제 표적핵산 또는 그 실제 표적핵산에 의존하여 생성되는 인공 표적핵산)에 특이적으로 결합하여 신호물질과 소광물질을 이격시킴으로써 신호를 발생시키는 제1 혼성화성 프로브의 신호를 검출하여 제1 표적핵산을 검출하게 되고, 연장 단계에서는 제2 표적핵산(이는 인공 표적핵산임)에 특이적으로 결합하여 신호물질과 소광물질을 이격시킴으로써 신호를 발생시키는 제2 혼성화성 프로브의 신호를 검출하여 제2 표적핵산을 검출하게 된다. 연장 단계에서 제2 혼성화성 프로브의 신호는 소광 프로브가 해리됨으로써 발생한다. 신호 검출은 통상 각 단계의 종료 시점에서 PCR 기기에 구비된 광원(lamp, laser, LED)이 빛을 시료에 조사하고 시료에서 방출된 빛을 검출 채널에서 검출함으로써 이루어진다.

[71] 신호 검출은 증폭 반응의 일부 사이클이나 모든 사이클에서 이루어질 수 있으나 모든 사이클에서 이루어지는 것이 바람직하다. 모든 사이클에서 이루어지는 경우 제1 표적핵산 및/또는 제2 표적핵산에 대한 검출 결과는, 신호 강도와 PCR 사이클 수로 구성되는 PCR 결과 그래프로 도출된다. PCR 결과 그래프는 2가지 표적핵산에 대해 2가지 증폭 곡선(amplification curve)이 나타난 하나의 그래프로 도출되거나, 2가지 표적핵산에 대해 각각 증폭 곡선이 나타난 각각의 그래프로 도출될 수 있다. PCR 결과 그래프는 검출하고자 하는 표적핵산이 존재할 경우 충분한 사이클의 증폭 반응을 수행하면, 초기 단계(Initiation phase), 지수 단계(Exponential phase) 및 정점 지속 단계(Plateau phase) 양상으로 나타나게 되며, 이를 통해 2가지 표적핵산의 검출 정보(정성 및/또는 정량 정보)가 손쉽게 도출될 수 있다.

[72] 본 발명에 있어서, 제1 및 제2 혼성화성 프로브는 표적핵산에 상보적으로 결합하여 신호물질과 소광물질이 이격됨으로써 신호가 발생하지만, 이때 표적핵산이 인공 표적핵산인 경우 그 인공 표적핵산이 그 혼성화성 프로브에 비해 길이가 짧으면 각 제1 및 제2 혼성화성 프로브에 대해 프라이머로 작용하여 연장됨으로써 그 혼성화성 프로브의 신호물질과 소광물질이 이격시켜 작용할 수도 있다. 이때 연장 반응은, 제1 혼성화성 프로브가 상대적 저온의 어닐링 단계에서는 표적핵산과 결합하여 신호가 발생하지만 상대적 중온의 연장 단계에서는 해리되어 신호가 소멸하고, 제2 혼성화성 프로브는 상대적 저온의 어닐링 단계에서는 표적핵산과 결합하지만 소광 프로브에 의해 신호 소멸되었다가 상대적 중온의 연장 단계에서 소광 프로브가 해리됨으로써 소멸되었던 신호가 나타난다는 점에

서, 어닐링 단계에서 이루어지도록 하는 것이 바람직하다. 일반적으로 Taq DNA 폴리머라아제는 연장 단계의 통상적인 온도인 72~75°C에서 가장 최적의 활성을 나타낸다고 알려져 있지만, 어닐링 단계의 통상적인 온도인 50-65°C에서 충분한 속도로 연장 반응이 일어날 정도의 활성을 보유한다고 알려져 있다. 만일 인공 표적핵산이 프라이머로 작용하여 어닐링 단계에서 연장 반응이 이루어질 경우 연장 반응이 충분히 이루어지도록 적절한 시간 동안(통상 30초 내지 2분) 어닐링 단계를 유지하는 것이 바람직하다.

- [73] 본 발명에 있어서, 제1 혼성화성 프로브가 상대적 저온의 어닐링 단계에서 검출하는 제1 표적핵산은 시료 중의 실제 표적핵산이거나 그 표적핵산에 의존하여 생성되는 인공 표적핵산이거나 무방하지만, 제2 혼성화성 프로브가 상대적 중온의 연장 단계에서 검출하는 제2 표적핵산은 인공 표적핵산이어야 한다. 제2 혼성화성 프로브가 결합하여 검출하는 핵산이 시료 중의 실제 표적핵산일 경우 전술한 바와 같이 그 혼성화성 프로브가 택맨 프로브와 같이 DNA 폴리머라아제의 엑소뉴클레아제 활성에 의해 분해되어 버릴 수 있다.
- [74] 전술한 바를 종합할 때, 본 발명에서 제1 혼성화성 프로브와 제2 혼성화성 프로브가 검출하는 핵산과 그것의 검출 단계 그리고 실제 표적핵산 등의 연장 반응이 이루어지는 단계는 다음과 같이 정리될 수 있다:
- [75] (1) 검출되는 제1 표적핵산이 인공 표적핵산이 아닌 시료 중의 실제 표적핵산일 경우
- [76] 제1 실제 표적핵산은 연장 단계에서 연장 반응이 이루어지고, 다음 사이클의 어닐링 단계에서 제1 표적핵산에 상보적으로 결합하는 제1 혼성화성 프로브에 의해 검출됨.
- [77] 이때 검출되는 제2 표적핵산은 시료 중의 실제 제2 표적핵산에 의존적으로 생성되는 인공 표적핵산이며, 이 인공 표적핵산은 연장 단계에서 시료 중의 실제 제2 표적핵산이 연장되면서 그 실제 제2 표적핵산에 의존하여 생성되어, 다음 사이클의 어닐링 단계에서 제2 혼성화 프로브와 결합하지만 소광 프로브가 그 제2 혼성화 프로브에 함께 결합함으로써 신호가 소광되어 검출되지 않았다가 다음 단계인 연장 단계에서 온도가 상승함에 따라 소광 프로브가 해리됨으로써 검출됨.
- [78] (2) 검출되는 제1 표적핵산이 시료 중의 실제 표적핵산에 의존하여 생성되는 인공 표적핵산일 경우
- [79] 제1 실제 표적핵산은 연장 단계에서 연장 반응이 이루어지고 이 연장 반응시 그 제1 실제 표적핵산에 의존하여 인공 표적핵산이 생성되어, 다음 사이클의 어닐링 단계에서 제1 표적핵산에 상보적으로 결합하는 제1 혼성화성 프로브에 의해 검출됨.
- [80] 제2 표적핵산 검출은 상기 (1)의 경우와 동일함.

- [81] 이 경우 제1 및 제2 인공 표적핵산이 각각 혼성화성 프로브보다 길이가 짧은 경우 각각 혼성화성 프로브를 주형으로 한 프라이머로 작용할 수 있으며, 프라이머로 작용할 경우 그 프라이머의 연장 반응은 어닐링 단계에서 이루어짐.
- [82]
- [83] 다른 측면에 있어서, 본 발명은 전술한 바의 혼성화성 프로브와 소광 프로브를 함께 사용하여 표적핵산을 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [84] 본 발명의 방법은 구체적으로 (a) 표적핵산과 혼성화성 프로브 그리고 소광 프로브를 혼합하여 표적핵산과 혼성화성 프로브 및 소광 프로브의 결합을 유도하는 단계, (b) 온도를 상승시켜 소광 프로브의 해리를 유도하여 혼성화성 프로브로부터 신호가 발생하도록 하는 단계, 및 (c) 그 신호를 검출하는 단계를 포함한다.
- [85] 여기서 상기 혼성화성 프로브는 표적핵산에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프로브로서, 이 혼성화성 프로브는 표적핵산이 해당 프로브에 결합하지 않은 경우 신호물질과 소광물질이 서로 인접하여 신호가 발생하지 않는 구조를 가지고, 또 상기 신호물질이 결합된 서열에서 말단 방향으로 연장된 단일가닥 서열을 가지며,
- [86] 상기 소광 프로브는 상기 혼성화성 프로브의 상기 연장된 단일가닥 서열에 상보적으로 결합하여 상기 혼성화성 프로브의 신호물질을 소광시킬 수 있는 소광 물질을 가진 프로브로서, 이 소광 프로브는 상기 혼성화성 프로브와 그것(제2의 혼성화성 프로브)의 말단 방향으로 연장된 단일가닥 서열과 상보적으로 결합할 경우 이 프로브의 소광물질은 상기 혼성화성 프로브의 신호물질과 인접하여 상기 혼성화성 프로브의 신호물질을 소광시킬 수 있는 구조를 가지며,
- [87] 상기 혼성화성 프로브의 그와 상보적인 표적핵산으로부터 해리되는 용해온도가 상기 소광 프로브의 그와 상보적인 혼성화성 프로브로부터 해리되는 용해온도보다 높도록 혼성화 프로브와 소광 프로브가 설계된다.
- [88] 따라서 혼성화성 프로브는 그것의 표적핵산과 결합할 경우 신호물질과 소광물질이 이격되지만 소광 프로브에 의해 신호가 발생하지 않다가 온도가 상승하여 소광 프로브가 해리되면 소광 프로브에 의한 소광 효과가 소멸하여 혼성화성 프로브로부터 신호가 발생하게 된다.
- [89] 상기 혼성화성 프로브와 소광 프로브 이외에, 추가로 1가지 이상의 혼성화성 프로브 및 소광 프로브를, 사용되는 소광 프로브들의 각각 혼성화성 프로브와의 용해온도를 모두 달리하여 사용하면 2가지 이상의 표적핵산 검출도 가능할 수 있다. 이 추가의 혼성화성 프로브 및 소광 프로브에 있어서도 당연히 그 혼성화성 프로브의 그와 상보적인 표적핵산으로부터 해리되는 용해온도가 소광 프로브의 그와 상보적인 혼성화성 프로브로부터 해리되는 용해온도보다 높도록 혼성화 프로브와 소광 프로브가 설계된다. 이러한 추가의 1가지 이상 혼성화성 프로브 및 소광 프로브를 사용하는 것은 PCR 종료 후 2가지의 다중의 표적핵산에 대해 용해 곡선 분석에 유용할 수 있다.
- [90] 본 발명의 방법에서, 표적핵산은 시료 중의 실제 표적핵산 또는 그에 의존하여 생성되는 인공 표적핵산일 수 있다.

- [91] 본 발명의 방법에서, 혼성화성 프로브와 소광 프로브에 대해서는 상기 본 발명의 단일 신호로 2가지 표적핵산의 실시간 검출을 위한 PCR 방법과 관련하여 제2 혼성화성 프로브와 소광 프로브에 대해서 설명한 바가 그대로 준용될 수 있다.
- [92] 한편 본 발명의 방법은 표적핵산의 실시간 검출을 위한 PCR 방법에 적용될 수도 있다. 이 방법은 전술한 바의 단일 신호로 2가지 표적핵산의 실시간 검출을 위한 PCR 방법에서 제1 혼성화성 프로브를 사용하지 않고, 제2 혼성화성 프로브와 소광 프로브만 사용하는 경우와 같다. 표적핵산의 실시간 검출을 위한 PCR 방법에 적용될 경우 검출되는 표적핵산은 한 가지이며, 표적핵산은 이미 전술한 바의 이유에서 시료 중 실제 표적핵산에 의존하여 생성되는 인공 표적핵산인 것이 바람직하다.
- [93] 구체적으로 이러한 본 발명의 PCR 방법은 아래의 (a) 내지 (c) 단계를 포함하여 구성된다.
- [94] (a) 검출 대상 시료에 아래의 (i) ~ (iii)를 혼합하는 단계
- [95] (i) 표적핵산을 증폭시키기 위한 한 세트의 정방향 및 역방향 프라이머;
- [96] (ii) 표적핵산에 의존하여 생성되는 인공 표적핵산에 특이적인 상보적 서열을 갖는 혼성화성 프로브로서, 이 혼성화성 프로브는 표적핵산이 해당 프로브에 결합하지 않은 경우 신호물질과 소광물질이 서로 인접하여 신호가 발생하지 않는 구조를 가지고, 또 상기 신호물질이 결합된 서열에서 말단 방향으로 연장된 단일가닥 서열을 가지며, 또 그것(혼성화성 프로브)의 그와 상보적인 인공 표적핵산으로부터 해리되는 용해온도는 PCR 반응의 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 중 연장 단계의 온도와 변성 단계의 온도 사이에 있어 어닐링 단계와 연장 단계에서는 상기 혼성화성 프로브가 그와 상보적인 인공 표적핵산과 결합 상태를 유지할 수 있는 프로브; 및
- [97] (iii) 상기 혼성화성 프로브의 상기 연장된 단일가닥 서열에 상보적으로 결합하여 상기 혼성화성 프로브의 신호물질을 소광시킬 수 있는 소광 물질을 가진 소광 프로브로서, 이 소광 프로브는 상기 혼성화성 프로브와 그것(혼성화성 프로브)의 말단 방향으로 연장된 단일가닥 서열과 상보적으로 결합할 경우 이 프로브의 소광물질은 상기 혼성화성 프로브의 신호물질과 인접하여 상기 혼성화성 프로브의 신호물질을 소광시킬 수 있는 구조를 가지고 또 이 소광 프로브가 그와 상보적인 서열로부터 해리되는 용해온도는 PCR 반응의 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 중 어닐링 단계의 온도와 연장 단계의 온도 사이에 있어 어닐링 단계에서는 상기 혼성화성 프로브와 결합함으로써 혼성화성 프로브의 신호를 소광시킬 수 있지만, 연장 단계에서는 상기 소광 프로브가 그와 상보적인 서열로부터 해리됨으로써 혼성화성 프로브에서 신호가 발생되도록 할 수 있는 프로브;
- [98] (b) 상기 (a) 단계의 혼합물을 단일 반응 용기에 넣고 상대적 고온의 변성, 상대적 저온의 혼성화 및 상대적 중온의 연장 단계의 PCR 반응을 2 cycle 이상 수행하는 단계; 및

- [99] (c) 상기 PCR의 반응의 수행과 동시에, 상기 연장 단계에서 상기 혼성화성 프로브에서 발생하는 신호를 측정하여 표적핵산을 검출하는 단계.
- [100] 상기 본 발명의 방법에 대해서는 본 발명의 단일 신호로 2가지 표적핵산의 실시간 검출을 위한 PCR 방법에서 설명한 바가 그대로 준용될 수 있다.
- [101] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 아래의 (a) 혼성화성 프로브와 (b) 소광 프로브 세트에 관한 것이다.
- [102] (a) 표적핵산에 특이적인 상보적 서열을 가진 혼성화성 프로브로서, 이 혼성화성 프로브는 표적핵산이 해당 프로브에 결합하지 않은 경우 신호물질과 소광물질이 서로 인접하여 신호가 발생하지 않는 구조를 가지고, 또 상기 신호물질이 결합된 서열에서 말단 방향으로 연장된 단일가닥 서열을 가지는 프로브; 및
- [103] (b) 상기 혼성화성 프로브의 상기 연장된 단일가닥 서열에 상보적으로 결합하여 상기 혼성화성 프로브의 신호물질을 소광시킬 수 있는 소광 물질을 가진 소광 프로브로서, 이 소광 프로브는 상기 혼성화성 프로브의 말단 방향으로 연장된 단일가닥 서열과 상보적으로 결합할 경우 이 프로브의 소광물질은 상기 혼성화성 프로브의 신호물질과 인접하여 상기 혼성화성 프로브의 신호물질을 소광시킬 수 있는 구조를 가지는 프로브,
- [104] 여기서 상기 혼성화성 프로브의 그와 상보적인 표적핵산으로부터 해리되는 용해온도가 상기 소광 프로브의 그와 상보적인 혼성화성 프로브부터 해리되는 용해온도보다 높도록 혼성화 프로브와 소광 프로브가 설계된다.
- [105] 본 발명의 프로브 세트에 대해서도 상기 본 발명의 단일 신호로 2가지 표적핵산의 실시간 검출을 위한 PCR 방법과 관련하여 제2 혼성화성 프로브와 소광 프로브에 대해서 설명한 바가 그대로 준용될 수 있다.
- [106] 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 PCR 수행 중 단일 신호로 2가지 이상의 표적핵산의 실시간 검출을 위한 키트에 관한 것이다.
- [107] 본 발명의 키트는 아래의 (i)의 프라이머 세트와 (ii) ~ (iv)의 프로브를 포함한다.
- [108] (i) 2가지 표적핵산 각각을 증폭시키기 위한 한 세트의 정방향 및 역방향 프라이머;
- [109] (ii) (ii-a) 2가지 표적핵산 중 제1의 표적핵산에 특이적인 상보적 서열을 가지거나, (ii-b) 그 제1의 표적핵산에 의존하여 생성되는 제1의 인공 표적핵산에 특이적인 상보적 서열을 가지는, 제1의 혼성화성 프로브로서, 이 혼성화성 프로브는 표적핵산이 해당 프로브에 결합하지 않은 경우 신호물질과 소광물질이 서로 인접하여 신호가 발생하지 않는 구조를 가지고, 그것(제1의 혼성화성 프로브)의 그와 상보적인 표적핵산이나 인공 표적핵산으로부터 해리되는 용해온도는 PCR 반응의 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 중 어닐링 단계의 온도와 연장 단계의 온도 사이에 있어 어닐링 단계에서는 그것(제1의 혼성화성 프로브)의 그와 상보적인 서열과 결합함으로써 신호물질과 소광물질이 이격되어 신호가 발생하지만, 연장 단계에서는 그것(제1의 혼성화성

프로브)의 그와 상보적인 서열로부터 해리됨으로써 신호물질과 소광물질이 인접하여 신호가 소멸될 수 있는 구조를 가진 프로브;

[110] (iii) 2개 이상의 표적핵산 중 제2의 표적핵산에 의존하여 생성되는 제2의 인공 표적핵산에 특이적인 상보적 서열을 갖는 제2의 혼성화성 프로브로서, 이 혼성화성 프로브는 표적핵산이 해당 프로브에 결합하지 않은 경우 신호물질과 소광물질이 서로 인접하여 신호가 발생하지 않는 구조를 가지고, 또 상기 신호물질이 결합된 서열에서 말단 방향으로 연장된 단일가닥 서열을 가지며, 또 그것(제2의 혼성화성 프로브)의 그와 상보적인 제2의 인공 표적핵산으로부터 해리되는 용해온도는 PCR 반응의 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 중 연장 단계의 온도와 변성 단계의 온도 사이에 있어 어닐링 단계와 연장 단계에서는 상기 제2의 혼성화성 프로브가 그와 상보적인 제2의 인공 표적핵산과 결합 상태를 유지할 수 있는 프로브; 및

[111] (iv) 상기 제2의 혼성화성 프로브의 상기 연장된 단일가닥 서열에 상보적으로 결합하여 상기 제2의 혼성화성 프로브의 신호물질을 소광시킬 수 있는 소광물질을 가진 소광 프로브로서, 이 소광 프로브는 상기 제2의 혼성화성 프로브와 그것(제2의 혼성화성 프로브)의 말단 방향으로 연장된 단일가닥 서열과 상보적으로 결합할 경우 이 프로브의 소광물질은 상기 제2의 혼성화성 프로브의 신호물질과 인접하여 상기 제2의 혼성화성 프로브의 신호물질을 소광시킬 수 있는 구조를 가지고, 또 이 소광 프로브가 그와 상보적인 서열로부터 해리되는 용해온도는 PCR 반응의 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 중 어닐링 단계의 온도와 연장 단계의 온도 사이에 있어 어닐링 단계에서는 상기 제2의 혼성화성 프로브와 결합함으로써 제2의 혼성화성 프로브의 신호를 소광시킬 수 있지만, 연장 단계에서는 상기 소광 프로브가 그와 상보적인 서열로부터 해리됨으로써 제2의 혼성화성 프로브에서 신호가 발생되도록 할 수 있는 프로브.

[112] 본 발명의 키트는 상기 프라이머 세트와 상기 3가지 프로브를 포함하는 이외에, 4가지 NTP, DNA 폴리머라아제를 추가로 포함할 수 있고, 또한 기타 인자로서 pH 안정화제인 Tris-HCl, 효소 활성을 촉진하기 위한 보조 인자인 MgCl₂ 나 MgSO₄ 또는 (NH₄)₂SO₄, 효소 안정화를 위한 인자인 BSA(Bovine Serum Albumin)나 젤라틴이나 글리세롤 또는 PEG 6000, 프라이머의 표적핵산에의 결합을 촉진하는 인자인 KCl, 비특이적 증폭을 억제하기 위한 비이온성 계면활성제인 Tween 20이나 Triton X-100, DNA 중합효소의 핵산에의 비특이적 결합을 감소시키기 위한 스퍼미딘(spermidine), 프라이머의 표적핵산과의 어닐링을 촉진하기 위한 인자인 우레아(urea)나 DMSO(dimethylsulfoxide) 또는 DMF(dimethylformamid), 베타인(Betain), DNA 폴리머라아제의 응집을 방지하기 위한 인자인 SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)나 Triton X-100 등을 추가로 포함할 수도 있다.

- [113] 또 본 발명의 키트는 키트 사용에 대한 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 이 설명서에는 전술한 바의 본 발명의 단일 신호로 2가지 표적핵산의 실시간 검출을 위한 PCR 방법이 교시될 수 있다.

발명의 효과

- [114] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 단일 신호로 2가지 이상의 표적핵산을 검출하기 위한 PCR 방법을 제공할 수 있다.

- [115] 본 발명의 방법은 PCR 과정 중 단일 신호를 사용하더라도 2가지 표적핵산에 대한 신호를 서로 간섭 없이 각각 어닐링 단계 및 연장 단계에서 검출할 수 있다. 본 발명의 방법에 따른 이들 검출 신호는 동일한 단일 신호를 사용하여 얻어진 것으로 서로 간 가감 등의 데이터 가공의 필요가 없고, 따라서 신호 강도와 PCR 사이클 수로 구성되는 PCR 결과 그래프에서 2가지 표적핵산의 검출 여부(정성 정보)와 검출 정도(정량 정보)를 곧바로 손쉽게 확인할 수 있는 효과를 제공한다

도면의 간단한 설명

- [116] 도 1은 본 발명에 따른 3가지의 프로브인 제 1 및 제 2의 혼성화성 프로브와 1가지의 소광 프로브의 구조를 도시한 것이다.

- [117] 도 2는 본 발명의 단일 신호로 2가지 표적핵산의 실시간 검출을 위한 PCR 방법에 대한 개념도이다.

- [118] 도 3은 인공 표적핵산을 생성하는 C-TAG(Cleavable Tag) 기술의 개념도이다.

- [119] 도 4는 제2 혼성화성 프로브(DaO)의 경우 어닐링 단계 및 연장 단계에서 신호가 발생하지만 소광 프로브(QO)를 함께 사용하면 연장 단계에서만 신호가 발생함을 보여주는 실험 결과이다.

- [120] 도 5는 제2 혼성화성 프로브(DaO)의 그 표적핵산과의 용해온도와 소광 프로브(QO)의 제2 혼성화성 프로브(DaO)와의 용해온도의 확인 결과이다.

- [121] 도 6은 본 발명의 방법에 따라 단일 신호로 PCR 수행 중 표적핵산 H3 및 09pdm의 실시간 검출이 가능함을 보여주는 결과이다.

- [122] 도 7은 본 발명의 방법에 따라 다중 형광 채널구성에서 형광 채널과 검출 온도를 통해 다중 표적핵산에 대한 개별 분석이 가능함을 SARS-CoV-2와 Flu A/H3N2의 실시간 검출을 통해 보여주는 결과이다.

- [123] 도 8은 본 발명의 방법에 따라 다중 형광 채널 구성에서 형광 채널과 검출 온도를 통해 다중 표적핵산에 대한 개별 분석이 가능함을 FluA/H1N1pdm과 Flu B의 실시간 검출을 통해 보여주는 결과이다.

- [124] 도 9는 본 발명의 방법에 따라 다중 형광 채널 구성에서 형광 채널과 검출 온도를 통해 다중 표적핵산에 대한 개별 분석이 가능함을 아데노바이러스 (ADV)와 표적핵산이 포함되지 않은 대조구 (NC)의 실시간 검출을 통해 보여주는 결과이다.

- [125]

발명의 실시를 위한 형태

- [126] 이하 본 발명을 실시예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [127] <실시예> PCR를 통해 단일 신호로 2가지 표적핵산의 실시간 검출
- [128] 정의
- [129] 본 실시예에서 cTAG 프라이머는 상기 C-TAG 기술에 적용되는 프라이머로, 표적핵산에 의존하여 인공 표적핵산을 생성하는 것을 가능하게 하는 프라이머를 말한다. 또 본 실시예에서 DaO((Dual-annealing oligonucleotide) 프로브는 본 발명에 따른 제2 혼성화성 프로브를 말하는데, 이 프로브는 표적핵산과의 상보적인 결합을 가능하게 하는 서열과 또 소광 프로브와 상보적인 결합을 가능하게 하는 서열을 가진다. 또 본 실시예에서 QO(Queching oligonucleotide) 프로브는 본 발명에 따른 소광 프로브로서 이 프로브는 상기 DaO와 상보적으로 결합하여 DaO의 신호를 소광시킬 수 있는 구조를 가진다.
- [130] <실시예 1> QO 프로브에 의한 형광 신호 억제 확인
- [131] QO 프로브 용해온도보다 낮은 온도에서 DaO 프로브가 표적핵산과 결합하고 여기에 QO 프로브가 결합함으로써, DaO 프로브의 신호가 QO에 의하여 소광됨을 확인하기 위하여 본 실험을 진행하였다. 본 실시예에서 호흡기 질환의 원인체인 아데노바이러스의 펜톤 DNA를 실제의 표적핵산으로 사용하였으며 그 실제 표적핵산으로부터 C-TAG 기술에 의해 생성되는 인공 표적핵산을 DaO 프로브를 사용하여 검출하였다.
- [132] DaO 프로브(DaO #1)는 5' 말단에 소광분자(BHQ-2)가, 그리고 내부 부분에 형광 신호 분자(Cy5)가 표지되었고, QO 프로브(QO #1)는 3' 말단에 소광 분자(BHQ-2)로 표지되어 있다. 그리고 정방향 프라이머(프라이머 1)는 C-TAG 기술 구현을 위해 인공 표적핵산 서열을 생성하도록 5' 말단과 제한효소 인식 부위 사이에 인위적인 임의 서열이 포함되어 있다. 인공 표적핵산은 이에 상보적인 서열로 이는 실제 표적핵산이 시료 중에 존재할 경우에만 생성되게 된다.
- [133] 사용된 프라이머 및 프로브 서열은 다음과 같다.
- [134] 프라이머 1: 5'-GCATCTCCGTGAGCCAGA **CCAGG**
CACCGTCAGTGAAAACGTTCC-3'(서열번호 1)
- [135] 프라이머 2: 5'-ATGCCAGGGCCTTGTA AAC-3'(서열번호 2)
- [136] DaO #1:
- [137] 5'-[BHQ2]CGCCGCGAGTCCCTTCCGCCGTGAGCCAGAC
GCGGCG[T(Cy5)]GACCTGCGTCGACCGCCGG[C3 spacer]-3'(서열번호 3)
- [138] QO #1: 5'-CCGGCGGTCGACGCAGGTC[BHQ2]-3'(서열번호 4)
- [139] 상기 프라이머 1의 굵고 기울어진 서열은 제한효소 PspGI의 인지서열을 의미하며, 밑줄은 이로 인해 생성되는 인공 표적핵산의 상보적인 서열이다. DaO와 QO에서 괄호는 소광 분자, 형광 신호 분자 혹은 C3 spacer가 위치한 염기서열의 위치를 의미한다. C3 spacer는 3개의 carbon으로 이루어진 aliphatic linker를 의미한다. 증폭물로부터 생성되는 C-TAG 서열은 다음과 같다.

- [140] C-TAG 서열 1: 5'-TCTGGCTCACGGAGATGC-3'(서열번호 5)
- [141] 생성된 C-TAG 서열은 프로브 혹은 DAO에 혼성화 및 연장되며 연장된 서열은 다음과 같다.
- [142] C-TAG 연장서열 1: TCTGGCTCACGGAGATGCGACGTCGCGGCG (서열번호 6)
- [143] DaO #1의 표적핵산(C-TAG 연장서열 1)과의 용해온도는 78°C로 설계되어 있고, QO #1의 DaO #1와의 용해온도는 70°C로 설계되어 있다.
- [144] 각 0.3 μM 의 정방향, 역방향 프라이머와 0.1 μM 의 DaO #1를 QO #1없이 혹은 0.3 μM 의 QO #1를 포함하여, *PspGI* (NEB, USA) 5U, PCR 버퍼(PCR buffer, 1x), MgCl_2 2.5 mM, dNTP 200 μM , Solg™ h-Taq DNA polymerase (Solgent, Korea) 1.6 U, 및 아데노바이러스의 주형 DNA 100 pg/ul와 함께 혼합한 총 20 μl 의 반응액을 CFX96 Real-time PCR (Bio-Rad, USA)를 이용하여 실시간 PCR 반응을 수행하였다. 상기 반응액이 들어있는 튜브를 55°C에서 5분 인큐베이션 한 후, 95°C에서 15분 동안 변성시키고, 95°C에서 변성(denaturation) 단계 30초, 60°C에서 혼성화(annealing) 단계 30초, 75°C에서 연장(extension) 단계 30초의 사이클을 40회 반복하여 수행하였다. 형광 신호는 매 사이클마다 60°C의 어닐링 단계와 75°C의 연장 단계에서 검출하였다.
- [145] 결과를 도 4에 나타내었는데, 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, QO 미포함 조건에서는 60°C의 어닐링 단계와 75°C의 연장 단계 2개 구간에서 검출되는 형광 신호가 QO 포함 조건에서는 75°C의 연장 단계 1개 구간에서만 검출됨을 확인할 수 있다.
- [146] 프라이머 1의 서열 중, 표적핵산이 존재할 경우에만 작용하게 되는 *PspGI*에 의하여 발생하는 5'말단의 인위적인 임의 서열인 5'-GCATCTCCGTGAGCCAGA-3'(서열번호 7)에 상보적인 서열이 C-TAG 서열이 DaO 프로브 서열 중 상기 임의 서열과 동일한 서열의 위치에 상보적으로 결합하여 DaO 프로브에 대해 프라이머로 작용하여 60°C의 어닐링 단계에서 연장됨으로써 DaO 프로브의 소광 분자와 형광 신호 분자를 서로 떨어지게 한다. 연장된 C-TAG 서열은 78°C의 해리온도를 가지도록 설계되어 75°C의 연장 단계에서도 결합이 유지되어 소광 분자와 형광 신호 분자를 떨어져 있게 한다.
- [147] 한편 QO 프로브는 60°C의 어닐링 단계에서 DaO 프로브 서열 중 3' 말단의 QO 상보 서열에 결합하여 QO의 3'말단의 소광 분자에 의하여 DaO 프로브의 내부 형광 신호 분자의 신호 발생을 억제한다. QO 프로브는 70°C의 해리온도를 가지도록 설계되어 75°C의 연장 단계에서 DaO에서 분리되어 QO의 소광 분자에 의한 형광 신호 억제 효과를 상실한다.
- [148] 그러므로 도 4의 결과는 QO 프로브가 존재하지 않을 경우 60°C의 어닐링 단계와 75°C의 연장 단계 모두에서 DaO 프로브가 그 상보적 서열과 결합한 상태이기 때문에 그것의 소광 분자와 형광 신호 분자가 서로 떨어져 있어 형광 신호가 검출되지만, QO 프로브가 존재할 경우에는 이것이 60°C의 어닐링 단계에서는 DaO

프로브에 상보적으로 결합하여 QO 프로브의 소광 분자와 DaO 프로브의 형광 신호 분자가 서로 인접함으로써 신호가 발생하지 않지만, 75°C의 연장 단계에서는 QO 프로브가 DaO 프로브로부터 용해되어 분리됨으로써 DaO 프로브의 신호가 발생하는 것으로 볼 수 있다.

- [149] 한편 실제 표적핵산인 아데노바이러스 주형 DNA 미첨가 조건 (NC)에서는 2개 조건 모두 형광 신호가 검출되지 않는다(도 9 참조).
- [150] <실시예 2> DaO 프로브와 QO 프로브의 용해 온도 확인
- [151] 상기 실시예 1의 DaO 프로브(DaO #1)와 QO 프로브(QO #1)의 용융 온도에 따른 형광 신호의 변화를 용해 피크(Melting Peak) 분석을 통해 확인하였다. 상기 실시예 1과 같은 조건으로 사이클을 40회 수행하고 마지막 40회에 10분 동안 증폭 산물을 연장반응을 시킨 후, 얻어진 증폭 산물에 대해 온도를 55°C부터 90°C까지 5초당 0.5°C씩 상승시키며 온도 변화에 따른 형광 신호의 변화를 관찰하였다.
- [152] 결과를 도 5에 나타내었는데, 도 5의 용해 피크 분석 결과에서 확인되듯이, QO 미포함 조건은 DaO의 그 상보적 서열과의 분리에 해당하는 양의 방향의 피크만 관찰되지만(즉 형광 신호의 감소만이 확인되지만), QO 포함 조건은 DaO의 그 상보적 서열과의 분리에 해당하는 양의 방향의 피크 이외에, QO의 그 상보적 서열과의 분리를 반영하는 음의 방향의 피크가 동시에 관찰되었다. 이렇게 관찰된 용융 피크로부터 DaO의 그 상보적 서열과의 용융 온도는 78°C, QO의 그 상보적 서열과의 용융 온도는 70°C임을 확인할 수 있다.
- [153] 표적핵산이 포함되지 않은 조건에서는 QO 포함, 미포함 조건 모두 형광 신호의 증가나 감소에 따른 피크가 확인되지 않았다.
- [154] <실시예 3> 단일 형광 채널 내 2개 표적핵산에 대한 분석
- [155] 단일 형광 채널을 사용하여 하나의 반응 튜브 내에서 서로 다른 2개의 표적핵산 검출이 가능함을 증명하기 위해 본 실험을 진행하였다.
- [156] 본 실시예는 호흡기 질환의 원인체인 인플루엔자 A형 바이러스 H3N2 아형과 09pdm 아형의 RNA를 대상으로 실시하였으며 하기된 검출 과정에는 C-TAG 기술이 적용된 PCR이 진행되었다.
- [157] Taq DNA 중합효소를 사용하여 정방향 및 역방향 프라이머의 연장을 진행하였으며 제한효소를 통해 증폭산물로부터 C-TAG 프로브 혹은 DaO와 상보적인 DNA 절편(C-TAG)을 생성하였다. 생성된 DNA 절편은 C-TAG 프로브/DaO 서열 내의 상보적인 결합부위에 혼성화되며 중합효소에 의해 연장되어 C-TAG 프로브/DaO의 구조를 변화시킨다. 이때 QO의 용해온도 이하에서는 QO에 의해 DaO의 소광이 이루어지고 용해온도 이후에서 형광신호가 검출되게 된다.
- [158] 프라이머 정보 및 증폭과정에서 생성되는 표적 서열 정보는 다음과 같다.
- [159] 프라이머 3: 5'- ACACATCGACCCGTACGATG **CCAGG**
CCGACAGTCCTCACCGAATCC -3'(서열번호 8)
- [160] 프라이머 4: 5'- GCTGTAAGCTTTGCTGCGTT -3'(서열번호 9)

- [161] 프라이머 5: 5'- GTGCCTCAGGAACGCTCG CCAGG
AGCAAGAAGTTCAAGCCGGA -3'(서열번호 10)
- [162] 프라이머 6: 5'- CCCGGCTCTACTAGTGTC CA -3'(서열번호 11)
- [163] C-TAG 프로브 1: 5'- ATAATTAAGAA[T(FAM)]ACACATCGACCCGTACGATG
[BHQ1] -3'(서열번호 12)
- [164] DaO #2:
- [165] 5'-[BHQ1]CGCCGCGGGTGCCTCAGGAACGCTCGCGCGG
CG[T(FAM)]TAGACGACGGCCGACCCTGC[C3 spacer]-3'(서열번호 13)
- [166] QO #2: 5'-GCAGGGTTCGGCCGTCGTCTA[BHQ1]-3'(서열번호 14)
- [167] 상기 프라이머 3, 5의 굵고 기울어진 서열은 제한효소 PspGI의 인지서열을 의미하며, 밑줄은 이로 인해 생성되는 인공 표적핵산의 상보적인 서열이다. 프로브, DaO 및 QO에서 괄호는 형광리포터, 형광소광체 혹은 C3 spacer가 위치한 염기서열의 위치를 의미한다. C3 spacer는 3개의 Carbon으로 이루어진 aliphatic linker를 의미한다. 증폭물로부터 생성되는 C-TAG 서열은 다음과 같다.
- [168] C-TAG 서열 2 5'-CATCGTACGGGTCGATGTGT-3'(서열번호 15)
- [169] C-TAG 서열 3: 5'-CGAGCGTTCCTGAGGCAC-3'(서열번호 16)
- [170] 생성된 C-TAG 서열은 프로브 혹은 DAO에 혼성화 및 연장되어 인공 표적핵산을 생성하며 연장된 서열은 다음과 같다.
- [171] C-TAG 연장서열 2: 5'-CATCGTACGGGTCGATGTGTATTCTTAATTAT-3'(서열번호 17)
- [172] C-TAG 연장서열 3: 5'-CGAGCGTTCCTGAGGCACCCGCGGCG-3'(서열번호 18)
- [173] C-TAG 프로브 1의 용해온도는 66°C로 설계되어 있고, DaO #2의 표적핵산(C-TAG에 의해 생성되는 인공 표적핵산임)과의 용해온도는 77°C로 설계되어 있고, QO #2의 DaO #2와의 용해온도는 68°C로 설계되어 있다.
- [174] 프라이머 3과 4는 H3N2 유전자 서열과 반응하고, 프라이머 5과 6는 09pdm 유전자 서열과 반응하며 프라이머 3과 4의 H3N2 유전자 증폭 과정에서 생성되는 C-TAG 서열 2은 프로브 1과, 프라이머 5과 6의 09pdm 유전자 증폭 과정에서 생성되는 C-TAG 서열 3은 DaO #2와 반응한다. QO #2는 DaO #2의 QO 결합 부위와 반응한다.
- [175] 각 0.15 μ M의 상기 프라이머 1, 2, 3, 4와 0.1 μ M의 C-TAG 프로브 1과 DaO #2, 0.3 μ M의 QO #2를 포함하여, PspGI (NEB, USA) 5U, PCR 버퍼(PCR buffer, 1x), MgCl₂ 2.5 mM, dNTP 200 μ M, DTT 0.1mM, RNase Inhibitor 1U, SuperiorScript III(Enzymomics, Korea)를 주형 없이 또는 H3 혹은 09pdm 주형 RNA 단독으로 100 pg/ul 혹은 H3와 09pdm 각 100pg/ul씩 혼합한 주형 RNA와 함께 혼합한 총 20 μ l의 반응액을 CFX96 Real-time PCR (Bio-Rad, USA)를 이용하여 실시간 PCR 반응을 수행하였다. 상기 반응액이 들어있는 튜브를 55°C에서 30분 역전사 반응을 진행한 후 95°C에서 15분동안 변성시키고, 95°C에서 30초의 변성 단계, 60°C에서 30

초의 어닐링 단계, 75°C에서 30초의 연장 단계로 이루어지는 사이클을 45회 반복하여 수행하였다. 형광 신호는 매 사이클마다 60°C와 75°C도에서 검출하였다.

- [176] 결과를 도 6에 나타내었는데, 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이 H3 주형 단독 조건에서는 60°C에서만 증폭 곡선이 확인되며 75°C에서는 형광 신호가 확인되지 않는다. 09pdm 주형 단독 조건에서는 60°C에서는 증폭곡선이 확인되지 않으며 75°C에서만 증폭곡선이 확인된다. H3와 09pdm의 혼합 조건에서는 60°C에서는 H3의 증폭곡선이, 75°C에서는 09pdm의 증폭 곡선이 확인된다. H3와 09pdm의 혼합 조건에서 각 온도에서 확인되는 PCR 결과 그래프는 같은 농도의 주형이 투입된 H3 혹은 09pdm 단독 조건에서 검출되는 PCR 결과 그래프와 동일한 양상으로 확인되어, 2가지 표적핵산 검출에서 각 표적핵산에 대한 검출 결과가 서로 간섭됨이 없이 단일 형광 검출 채널에 의해 얻어짐을 확인할 수 있다.

[177]

[178] <실시예 4> 다중 형광 채널 내 다중 표적핵산에 대한 분석

- [179] 다중 형광 채널을 사용하여 하나의 반응 튜브 내에서 형광 채널과 검출 온도를 통해 다중 표적핵산에 대한 개별 분석이 가능함을 증명하기 위해 본 실험을 진행하였다.

- [180] 본 실시예는 호흡기 질환의 원인체인 SARS-CoV-2, Influenza A virus/H3N2, Influenza A virus/09pdm, Influenza B virus 및 Adenovirus의 핵산을 대상으로 실시하였으며 하기된 검출 과정에는 C-TAG 기술이 적용된 PCR이 진행되었다.

- [181] Taq DNA 중합효소를 사용하여 정방향 및 역방향 프라이머의 연장을 진행하였으며 제한효소를 통해 증폭산물로부터 C-TAG 프로브 혹은 DaO와 상보적인 DNA 절편(C-TAG)을 생성하였다. 생성된 DNA 절편은 C-TAG 프로브/DaO 서열 내의 상보적인 결합 부위에 혼성화되며 중합효소에 의해 연장되어 C-Tag 프로브/DaO의 구조를 변화시킨다. 이때 QO의 용해온도 이하에서는 QO에 의해 DaO의 소광이 이루어지고 용해온도 이후에서 형광신호가 검출되게 된다.

- [182] 프라이머 정보 및 증폭과정에서 생성되는 표적 서열 정보는 다음과 같다.

- [183] 프라이머 7: 5'-**ACACATCGACCCGCGATGCCAGG**

ACCCGCAATCCTGCTAACAA-3'(서열번호 19)

- [184] 프라이머 8: 5'-ACGAGAAGAGGCTTGACTGC-3'(서열번호 20)

- [185] 프라이머 9: 5'-**GTGCCTCAGGAACGCTCGCCAGG**

AATAGAGCTCGCACCGTAGC-3'(서열번호 21)

- [186] 프라이머 10: 5'-AACATGTTGTGCCAACCACC-3'(서열번호 22)

- [187] 프라이머 11: 5'-**CGCACGCGAAGCGTCTCCAGG**

CGCAGCAAAGCTTACAGCAA-3'(서열번호 23)

- [188] 프라이머 12: 5'-AAACTCCAGGGTGCCTGATG-3'(서열번호 24)

- [189] 프라이머 13: 5'-**GACGACGCTGGCCACCCAGG**

CAACCGCAAATGCAGACACA-3'(서열번호 25)

- [190] 프라이머 14: 5'-ACCCAAATGCAATGGGGCTA-3'(서열번호 26)

- [191] 프라이머 15: 5'-GCGACCCTGCGACGAGCCAGG
ACGCCAGAATGCAACTGAGA-3'(서열번호 27)
- [192] 프라이머 16: 5'-TTCTGGATCAACCGCCCTTC-3'(서열번호 28)
- [193] 프라이머 17: 5'-CTGGCGTGCACGGGTCCCAGG
AGACATCAAGGCCAAGACGG-3'(서열번호 29)
- [194] 프라이머 18: 5'-TGTCTGCAATCCCTGGGTTC-3'(서열번호 30)
- [195] 프라이머 19: 5'-CTGGCAGCGCAGGCAGCCAGG
CTGCTCTCACAGATCACGGG-3'(서열번호 31)
- [196] 프라이머 20: 5'-CCCAGGGCCTTGTAACGTA-3'(서열번호 32)
- [197] C-TAG 프로브 2: 5'-ATAATTAAGAA[T(FAM)]ACACA
TCGACCCGTACGATG[BHQ1]-3'(서열번호 33)
- [198] C-TAG 프로브 3: 5'-ATTATTATAA[T(HEX)]CGCACGCGAAGCGTCT
[BHQ1]-3'(서열번호 34)
- [199] C-TAG 프로브 4: 5'-CTATTATTA[T(Cy5)]GCGACCCTGCGACGAG
[BHQ2]-3'(서열번호 35)
- [200] DaO #3:
- [201] 5'-[BHQ1]CGCCGCGTGGTGCCTCAGGAACGCTCG
CGCGGCG[T(FAM)]TAGACGACGGCCGACCCTGC[C3 spacer]-3'(서열번호 36)
- [202] DaO #4:
- [203] 5'-[BHQ1]CGCGGGCAGGACGACGCTGGCCACCGCCGCG[T(HEX)]TAGAC
GACGGCCGACCCTGC[C3 spacer]-3'(서열번호 37)
- [204] DaO #5:
- [205] 5'-[BHQ2]GGCCGCGACCTGGCGTGCACGGGTCCGCGGCC[T(CalRed610)]
JGTGTGTGACGACTCGGCTGCG[C3 spacer]-3'(서열번호 38)
- [206] DaO #6:
- [207] 5'-[BHQ2]CCCGGCCTCCTGGCAGCGCAGGCAGGGCCGGC[T(Cy5)]TCGAG
GGCTGGAACACGGTG[C3 spacer]-3'(서열번호 39)
- [208] QO #3: 5'-GCAGGGTCGGCCGTCGTCTA[BHQ1]-3'(서열번호 40)
- [209] QO #4: 5'-GGTCGGTCGGGTCACCCA[BHQ1]-3'(서열번호 41)
- [210] QO #5: 5'-CGCAGCCGAGTCGTCACACAC[BHQ2]-3'(서열번호 42)
- [211] QO #6: 5'-CACCGTGTTCCAGCCCTCGA[BHQ2]-3'(서열번호 43)
- [212] 상기 프라이머의 굵고 기울어진 서열은 제한효소 PspGI의 인지서열을 의미하며, 밑줄은 이로 인해 생성되는 인공 표적핵산의 상보적인 서열이다. DaO와 QO에서 괄호는 소광 분자, 형광 신호 분자 혹은 C3 spacer가 위치한 염기서열의 위치를 의미하며, C3 spacer는 3개의 Carbon으로 이루어진 aliphatic linker를 의미한다. 증폭물로부터 생성되는 C-TAG 서열은 다음과 같다.
- [213] C-TAG 서열 4: 5'-CATCGTACGGGTCGATGTGT-3'(서열번호 44)
- [214] C-TAG 서열 5: 5'-CGAGCGTTCCTGAGGCAC-3'(서열번호 45)

- [215] C-TAG 서열 6: 5'-AGACGCTTCGCGTGCG-3'(서열번호 46)
- [216] C-TAG 서열 7: 5'-GGTGGCCAGCGTCGTC-3'(서열번호 47)
- [217] C-TAG 서열 8: 5'-CTCGTCGCAGGGTCGC-3'(서열번호 48)
- [218] C-TAG 서열 9: 5'-GACCCGTGCACGCCAG-3'(서열번호 49)
- [219] C-TAG 서열 10: 5'-CTGCCTGCGCTGCCAG-3'(서열번호 50)
- [220] 생성된 C-TAG 서열은 프로브 혹은 DAO에 혼성화 및 연장되며 연장된 서열은 다음과 같다.
- [221] C-TAG 연장서열 4: 5'-CATCGTACGGGTCGATGTGTATTCTTAATTAT-3'(서열번호 51)
- [222] C-TAG 연장서열 5: 5'-CGAGCGTTCCTGAGGCACCCGCGGGCG-3'(서열번호 52)
- [223] C-TAG 연장서열 6: 5'-AGACGCTTCGCGTGCGATTATAATAAT-3'(서열번호 53)
- [224] C-TAG 연장서열 7: 5'-GGTGGCCAGCGTCGTCCTGCCCGCG-3'(서열번호 54)
- [225] C-TAG 연장서열 8: 5'-CTCGTCGCAGGGTCGCATAATAATAG-3'(서열번호 55)
- [226] C-TAG 연장서열 9: 5'-GACCCGTGCACGCCAGGTCGCGGCC-3'(서열번호 56)
- [227] C-TAG 연장서열 10: 5'-CTGCCTGCGCTGCCAGGAGGCCGGG-3'(서열번호 57)
- [228] 프라이머 7과 8, 9와 10은 각각 SARS-CoV-2의 N, RDRP 유전자와, 프라이머 11과 12, 13과 14는 각각 Influenza A virus의 H3N2형, H1N1pdm형의 HA 유전자와, 프라이머 15과 16는 Influenza A virus의 NP 유전자와, 프라이머 17과 18는 Influenza B virus의 NP 유전자와, 19과 20는 Adenovirus의 펜톤 유전자와 반응한다. 상기 프라이머 7~20에 의한 SARS-CoV-2 N, RDRP, H3N2, H1N1pdm, Flu A, Flu B, ADV 유전자 증폭 과정에서 생성되는 C-TAG 서열 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10은 각각 C-TAG 프로브 2, DaO #3, C-TAG 프로브 3, DaO #4, C-TAG 프로브 4, DaO #5, DaO #6와 반응하여 cTAG 연장서열 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10을 형성한다. QO #3, 4, 5, 6은 각각 DaO #3, 4, 5, 6의 QO 결합 부위와 반응한다.
- [229] C-TAG 프로브 2~5의 용해온도는 66~67°C로 설계되어 있고, DaO #3~6의 각각의 표적핵산(C-TAG에 의해 생성되는 인공 표적핵산임)과의 용해온도는 77~78°C로 설계되어 있고, QO #3~6의 각각의 결합부위를 포함하는 DaO와의 용해온도는 68~70°C로 설계되어 있다.
- [230] 각 0.15 μ M의 상기 프라이머 7~20과 각 0.1 μ M의 C-TAG 프로브 2~4와 DaO #3~6, 각 0.3 μ M의 QO #3~6를 포함하여, *PspGI* (NEB, USA) 5U, PCR 버퍼(PCR buffer, 1x), MgCl₂ 2.5 mM, dNTP 200 μ M, DTT 0.1mM, RNase Inhibitor 1U, SuperiorScript III(Enzymomics, Korea)를 주형 없이 또는 SARS-CoV-2, Influenza A virus/H3N2, Influenza A virus/H1N1pdm, Influenza B virus 및 Adenovirus 핵산을 10⁶ copies/ul 농도로 첨가한 총 20 μ l의 반응액을 CFX96 Real-time PCR (Bio-

Rad, USA)를 이용하여 실시간 PCR 반응을 수행하였다. 상기 반응액이 들어있는 튜브를 55°C에서 30분 역전사 반응을 진행한 후 95°C에서 15분 동안 변성시키고, 95°C에서 30초의 변성 단계, 60°C에서 30초의 어닐링 단계, 75°C에서 30초의 연장 단계로 이루어지는 사이클을 45회 반복하여 수행하였다. 형광 신호는 매 사이클마다 60°C와 75°C도에서 검출하였다.

- [231] 결과를 도 7에 나타내었는데, 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이 SARS-CoV-2 주형 반응 조건에서는 60°C, 75°C의 FAM 채널에서만 C-TAG 프로브 2, DaO #3에 의한 증폭 곡선만이 확인되며 다른 채널의 형광 신호는 확인되지 않는다. H3N2 주형 반응 조건에서는 60°C에서 HEX 채널, 75°C에서 CalRed 610 에서만 C-TAG 프로브 3, DaO #4에 의한 증폭 곡선만이 확인되며 다른 채널의 형광 신호는 확인되지 않는다.
- [232] H1N1pdm 주형 반응 조건에서는 75°C에서 HEX와 CalRed 610 에서만 C-TAG 프로브 4, DaO #4에 의한 증폭 곡선만이 확인되며 60°C 구간 및 75°C의 다른 형광 채널의 형광 신호는 확인되지 않는다. Flu B 주형 반응 조건에서는 60°C에서 Cy5 에서 C-TAG 프로브 5에 의한 증폭 곡선만이 확인되며 60°C의 다른 채널 및 75°C 구간의 형광 신호는 확인되지 않는다 (도 8).
- [233] ADV 주형 반응 조건에서는 75°C에서 Cy5에서 DaO #5에 의한 증폭 곡선만이 확인되며 60°C 구간 및 75°C의 다른 형광 채널의 형광 신호는 확인되지 않는다. 주형 없이 반응시킨 조건에서는 60, 75°C의 모든 형광 채널에서 증폭 곡선이 확인되지 않는다 (도 9).
- [234] 각 조건에서 주형에 대한 C-TAG 프로브 혹은 DaO 프로브에 의한 형광신호만 검출되며 다른 신호는 검출되지 아니하므로 다중 형광 채널에서 형광 채널과 검출 온도 구간을 통해 각 타깃을 개별적으로 검출할 수 있음을 확인할 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 하기 (a) 내지 (c) 단계를 포함하는 단일 검출 채널에서 2가지 이상의 표적 핵산의 실시간 검출을 위한 PCR 방법:
- (a) 검출 대상 시료에 아래의 (i) ~ (iv)를 포함하는 PCR 반응을 위한 혼합물을 준비하는 단계
- (i) 제1의 표적핵산을 증폭시키기 위한 정방향 및 역방향 프라이머쌍 여기서, 상기 프라이머 쌍 중 하나는 상기 제1의 표적핵산과 비상보적인 무작위 핵산 서열, 제한효소 인지서열 및 제1의 표적핵산과 상보적인 핵산 서열을 순차적으로 포함하며,
제2의 표적핵산을 증폭시키기 위한 정방향 및 역방향 프라이머쌍 여기서, 상기 프라이머 쌍 중 하나는 상기 제2의 표적핵산과 비상보적인 무작위 핵산 서열, 제한효소 인지서열 및 제2의 표적핵산과 상보적인 핵산 서열을 순차적으로 포함;
- (ii) 2개 이상의 표적핵산 중 제1의 표적핵산에 의존하여 생성되는 제1의 인공 표적핵산에 특이적인 상보적 서열을 가지는, 제1의 혼성화성 프로브로서, 이 혼성화성 프로브는 상기 인공 표적핵산이 해당 프로브에 결합하지 않은 경우 신호물질과 소광물질이 서로 인접하여 신호가 발생하지 않는 구조를 가지고, 제1의 혼성화성 프로브의 그와 상보적인 인공 표적핵산으로부터 해리되는 용해온도는 PCR 반응의 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 중 어닐링 단계의 온도와 연장 단계의 온도 사이에 있어 어닐링 단계에서는 그것(제1의 혼성화성 프로브)의 그와 상보적인 서열과 결합함으로써 신호물질과 소광물질이 이격되어 신호가 발생하지만, 연장 단계에서는 그것(제1의 혼성화성 프로브)의 그와 상보적인 서열로부터 해리됨으로써 신호물질과 소광물질이 인접하여 신호가 소멸될 수 있는 구조를 가진 프로브;
- (iii) 2개 이상의 표적핵산 중 제2의 표적핵산에 의존하여 생성되는 제2의 인공 표적핵산에 특이적인 상보적 서열을 갖는 제2의 혼성화성 프로브로서, 이 혼성화성 프로브는 제2의 인공 표적핵산이 해당 프로브와 결합하지 않은 경우 신호물질과 소광물질이 서로 인접하여 신호가 발생하지 않는 구조를 가지고, 또 상기 신호물질이 결합된 서열에서 말단 방향으로 연장된 단일가닥 서열을 가지며, 또 그것(제2의 혼성화성 프로브)의 그와 상보적인 제2의 인공 표적핵산으로부터 해리되는 용해온도는 PCR 반응의 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 중 연장 단계의 온도와 변성 단계의 온도 사이에 있어 어닐링 단계와 연장 단계에서는 상기 제2의 혼성화성 프로브가 그와 상보적인 제2의 인공 표적핵산과 결합 상태를 유지할 수 있는 프로브; 및

(iv) 상기 제2의 혼성화성 프로브의 상기 연장된 단일가닥 서열에 상보적으로 결합하여 상기 제2의 혼성화성 프로브의 신호물질을 소광시킬 수 있는 소광 물질을 가진 소광 프로브로서, 이 소광 프로브는 상기 제2의 혼성화성 프로브와 그것(제2의 혼성화성 프로브)의 말단 방향으로 연장된 단일가닥 서열과 상보적으로 결합할 경우 이 프로브의 소광물질은 상기 제2의 혼성화성 프로브의 신호물질과 인접하여 상기 제2의 혼성화성 프로브의 신호물질을 소광시킬 수 있는 구조를 가지고, 또 이 소광 프로브가 그와 상보적인 서열로부터 해리되는 용해온도는 PCR 반응의 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 중 어닐링 단계의 온도와 연장 단계의 온도 사이에 있어 어닐링 단계에서는 상기 제2의 혼성화성 프로브와 결합함으로써 제2의 혼성화성 프로브의 신호를 소광시킬 수 있지만, 연장 단계에서는 상기 소광 프로브가 그와 상보적인 서열로부터 해리됨으로써 제2의 혼성화성 프로브에서 신호가 발생되도록 할 수 있는 프로브;

(b) 상기 (a) 단계의 혼합물을 단일 반응 용기에 넣고 상대적 고온의 변성, 상대적 저온의 혼성화 및 상대적 중온의 연장 단계의 PCR 반응을 2 사이클 이상 수행하는 단계; 및

(c) 상기 PCR의 반응의 수행과 동시에, 상기 어닐링 단계에서 상기 제1의 혼성화성 프로브에서 발생하는 신호를 측정하여 상기 제1의 표적핵산을 검출하고, 또 상기 연장 단계에서 상기 제2의 혼성화성 프로브에서 발생하는 신호를 측정하여 상기 제2의 표적핵산을 검출하는 단계.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 제1 혼성화성 프로브 또는 제2의 혼성화성 프로브는 스템-루프(stem-loop) 구조를 가져 루프 영역에 상기 인공 표적핵산과 특이적으로 결합하는 상보적인 서열이 존재하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 변성 단계는 92~98°C에서 수행되고, 상기 어닐링 단계는 50~65°C에서 수행되며, 상기 연장 단계는 70~85°C에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 제1 인공 표적핵산 또는 제2 인공 표적 핵산은 각각 제1 표적핵산 또는 제2 표적핵산에 정량적으로 의존하여 생성되는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 인공 표적핵산의 생성은 상기 표적 서열과 비상보적인 무작위 핵산 서열과 제한효소 인지서열 및 표적서열과 상보적인 핵산 서열을 순차적으로 포함하는 구조를 갖는 프라이머로부터 신장된 증폭산물에 포함된 상기 무작위 핵산 서열의 상보 서열이, 제한효소에 의한

상기 증폭산물의 절단 과정에서 상기 무작위 서열의 상보적 태그 절편으로 방출되는 과정에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 6]

제1항에 있어서,

상기 (ii-b)의 제1 혼성화성 프로브와 상기 (iii)의 제2 혼성화성 프로브는 각 제1의 표적핵산과 제2의 표적핵산에 의존하여 생성되는 각 제1의 인공 표적핵산과 제2의 인공 표적핵산에 특이적인 상보적 서열을 가지고, 상기 제1의 인공 표적핵산과 상기 제2의 인공 표적핵산은 각각 상기 제1 혼성화성 프로브와 상기 제2 혼성화성 프로브에 대해 프라이머로 작용하여 어닐링 단계에서 연장됨으로써 상기 제1 혼성화성 프로브와 상기 제2 혼성화성 프로브의 각 신호물질과 소광물질을 이격시키는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 7]

제1항에 있어서,

상기 방법은 상기 (i)의 상기 제1 또는 제2의 표적핵산과 비상보적인 무작위 핵산 서열, 제한효소 인지서열 및 제1 또는 제2의 표적핵산과 상보적인 핵산 서열을 순차적으로 포함하는 제1 또는 제2의 표적핵산을 증폭시키기 위한 프라이머 대신에 표적핵산을 증폭하기 위한 표적핵산에 상보적인 정방향 및 역방향 프라이머쌍을 사용하며, 이 경우 인공 표적핵산 생산은 표적핵산에 대한 상보적 프로브 서열과 함께 인위적 임의의 태그 서열을 가진 PTO(Probing and Tagging Oligonucleotide)를 사용하여 인위적 임의의 서열만으로 된 인위적 임의 서열의 5'태그인 PTO 단편을 발생시키고 이 PTO 단편이 인공 표적핵산이 되는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 8]

제1항에 있어서,

상기 제1 표적핵산 또는 상기 제2 표적핵산은 단일가닥 DNA, 이중가닥 DNA 또는 RNA에서 역전사에 의해 생성된 cDNA인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 9]

제1항에 있어서, 상기 인공 표적핵산은 표적핵산에 의존하여 일차적으로 생성된 핵산이 프로브에 혼성화된 후 연장된 서열인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 10]

아래의 (i)의 프라이머 세트와 (ii) ~ (iv)의 프로브를 포함하는 PCR 수행 중 단일 신호로 2가지 표적핵산의 실시간 검출을 위한 키트.

(i) 제1의 표적핵산을 증폭시키기 위한 정방향 및 역방향 프라이머쌍 여기서, 상기 프라이머 쌍 중 하나는 상기 제1의 표적핵산과 비상보적인 무작위 핵산 서열, 제한효소 인지서열 및 제1의 표적핵산과 상보적인 핵산 서열을 순차적으로 포함하며,

제2의 표적핵산을 증폭시키기 위한 정방향 및 역방향 프라이머쌍 여기서, 상기 프라이머 쌍 중 하나는 상기 제2의 표적핵산과 비상보적인 무작위

핵산 서열, 제한효소 인지서열 및 제2의 표적핵산과 상보적인 핵산 서열을 순차적으로 포함;

(ii) 2가지 표적핵산 중 제1의 표적핵산에 의존하여 생성되는 제1의 인공 표적핵산에 특이적인 상보적 서열을 가지는, 제1의 혼성화성 프로브로서, 상기 인공 표적핵산은 표적핵산에 의존하여 일차적으로 생성된 핵산이 프로브에 혼성화된 후 연장된 서열인 경우도 포함하며, 이 혼성화성 프로브는 상기 제1의 인공 표적핵산이 해당 프로브와 결합하지 않은 경우 신호물질과 소광물질이 서로 인접하여 신호가 발생하지 않는 구조를 가지고, 그것(제1의 혼성화성 프로브)의 그와 상보적인 인공 표적핵산으로부터 해리되는 용해온도는 PCR 반응의 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 중 어닐링 단계의 온도와 연장 단계의 온도 사이에 있어 어닐링 단계에서는 그것(제1의 혼성화성 프로브)의 그와 상보적인 서열과 결합함으로써 신호물질과 소광물질이 이격되어 신호가 발생하지만, 연장 단계에서는 그것(제1의 혼성화성 프로브)의 그와 상보적인 서열로부터 해리됨으로써 신호물질과 소광물질이 인접하여 신호가 소멸될 수 있는 구조를 가진 프로브;

(iii) 2개 이상의 표적핵산 중 제2의 표적핵산에 의존하여 생성되는 제2의 인공 표적핵산에 특이적인 상보적 서열을 갖는 제2의 혼성화성 프로브로서, 상기 인공 표적핵산은 표적핵산에 의존하여 일차적으로 생성된 핵산이 프로브에 혼성화된 후 연장된 서열인 경우도 포함하며, 이 혼성화성 프로브는 인공 표적핵산이 해당 프로브에 결합하지 않은 경우 신호물질과 소광물질이 서로 인접하여 신호가 발생하지 않는 구조를 가지고, 또 상기 신호물질이 결합된 서열에서 말단 방향으로 연장된 단일가닥 서열을 가지며, 또 그것(제2의 혼성화성 프로브)의 그와 상보적인 제2의 인공 표적핵산으로부터 해리되는 용해온도는 PCR 반응의 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 중 연장 단계의 온도와 변성 단계의 온도 사이에 있어 어닐링 단계와 연장 단계에서는 상기 제2의 혼성화성 프로브가 그와 상보적인 제2의 인공 표적핵산과 결합 상태를 유지할 수 있는 프로브; 및

(iv) 상기 제2의 혼성화성 프로브의 상기 연장된 단일가닥 서열에 상보적으로 결합하여 상기 제2의 혼성화성 프로브의 신호물질을 소광시킬 수 있는 소광 물질을 가진 소광 프로브로서, 이 소광 프로브는 상기 제2의 혼성화성 프로브와 그것(제2의 혼성화성 프로브)의 말단 방향으로 연장된 단일가닥 서열과 상보적으로 결합할 경우 이 프로브의 소광물질은 상기 제2의 혼성화성 프로브의 신호물질과 인접하여 상기 제2의 혼성화성 프로브의 신호물질을 소광시킬 수 있는 구조를 가지고, 또 이 소광 프로브가 그와 상보적인 서열로부터 해리되는 용해온도는 PCR 반응의 상대적 고온의 변성 단계, 상대적 저온의 어닐링 단계 및 상대적 중온의 연장 단계 중 어

닐링 단계의 온도와 연장 단계의 온도 사이에 있어 어닐링 단계에서는 상기 제2의 혼성화성 프로브와 결합함으로써 제2의 혼성화성 프로브의 신호를 소광시킬 수 있지만, 연장 단계에서는 상기 소광 프로브가 그와 상보적인 서열로부터 해리됨으로써 제2의 혼성화성 프로브에서 신호가 발생되도록 할 수 있는 프로브.

[청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 키트는 상기 프라이머 세트와 상기 3가지 프로브를 포함하는 이외에, 4가지 NTP, DNA 폴리머라아제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

[청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 키트는 pH 안정화제인 Tris-HCl, 효소 활성을 촉진하기 위한 보조 인자인 $MgCl_2$ 나 $MgSO_4$ 또는 $(NH_4)_2SO_4$, 효소 안정화를 위한 인자인 BSA(Bovine Serum Albumin)나 젤라틴이나 글리세롤 또는 PEG 6000, 프라이머의 표적핵산에의 결합을 촉진하는 인자인 KCl, 비특이적 증폭을 억제하기 위한 비이온성 계면활성제인 Tween 20이나 Triton X-100, DNA 중합효소의 핵산에의 비특이적 결합을 감소시키기 위한 스퍼미딘(spermidine), 프라이머의 표적핵산과의 어닐링을 촉진하기 위한 인자인 우레아(urea)나 DMSO(dimethylsulfoxide) 또는 DMF(dimethylformamid), 베타인(betain), 및 DNA 폴리머라아제의 응집을 방지하기 위한 인자인 SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)나 Triton X-100 중 하나 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

[청구항 13] 제10항에 있어서,
상기 키트는 상기 (i)의 제1 또는 제2의 표적핵산과 비상보적인 무작위 핵산 서열, 제한효소 인지서열 및 제1 또는 제2의 표적핵산과 상보적인 핵산 서열을 순차적으로 포함하는 제1 또는 제2의 표적핵산을 증폭시키기 위한 프라이머 대신에 제1 또는 제2의 표적핵산을 증폭하기 위한 표적핵산에 상보적인 정방향 및 역방향 프라이머쌍을 포함하며,
이 경우 상기 키트는 프로빙 엔드 태깅 올리고뉴클레오타이드(Probing and Tagging Oligonucleotide: PTO)를 추가로 포함하며; 여기서, 상기 PTO는 (i) 상기 타겟 핵산서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 3'-타겟팅 부위; 및 (ii) 상기 타겟 핵산서열에 비-상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 5'-태깅 부위를 포함하며; 상기 PTO의 3'-타겟팅 부위는 상기 타겟 핵산서열에 혼성화 되고, 상기 PTO의 5'-태깅 부위는 상기 타겟 핵산서열에 혼성화 되지 않으며;
상기 PTO로부터 방출된 단편이 인공 표적핵산이 되는 것을 특징으로 하는 키트.

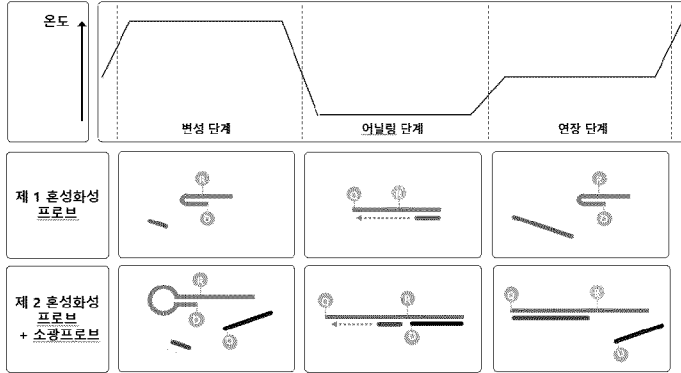
[청구항 14] 제10항에 있어서,
상기 신호물질은 형광물질이고,

상기 형광물질은 FAM(6-Carboxyfluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-X-Rhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), Cy3(Cyanine-3) 및 Cy5(Cyanine-5) 중 어느 하나의 형광물질이고,
 상기 소광물질은 BHQ1[2-[N-(2-hydroxyethyl)-4-[[2-methoxy-5-methyl-4-[(4-methyl-2-nitrophenyl)diazenyl]phenyl]diazenyl]anilino]ethanol],
 BHQ2(4-[[4-[2-[2,5-Dimethoxy-4-[2-(4-nitrophenyl)diazenyl]phenyl]-diazenyl]phenyl]methylamino]-butanoic acid) 및 답실(Dabcyl;N-[4-(4'-dimethylamino)phenylazo]benzoic acid) 중 하나인 것을 특징으로 하는 키트.

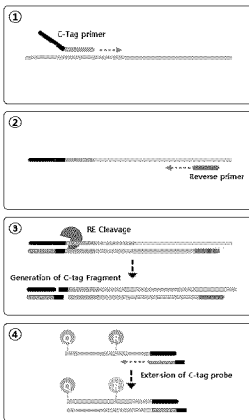
[도1]



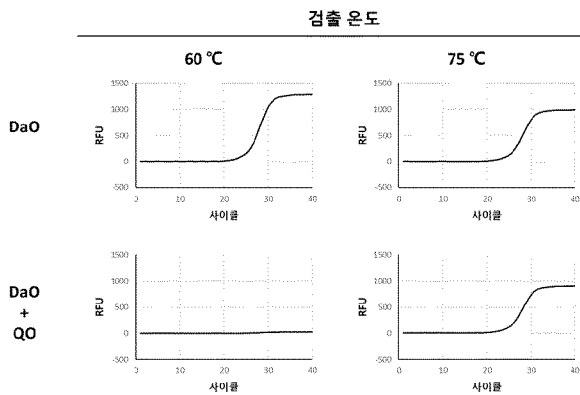
[도2]



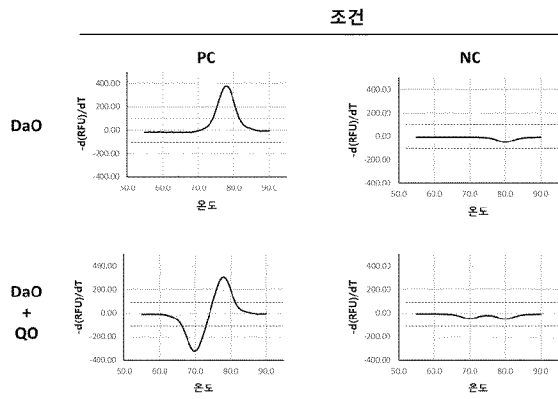
[도3]



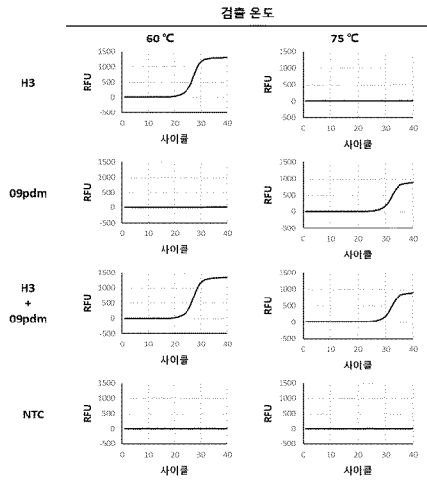
[도4]



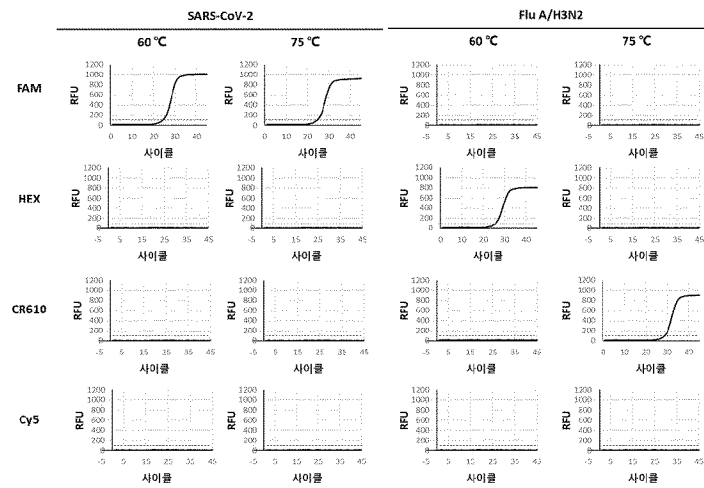
[도5]



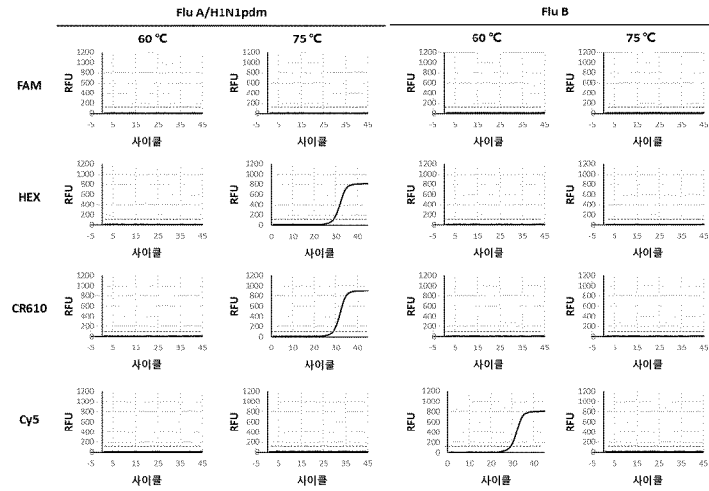
[도6]



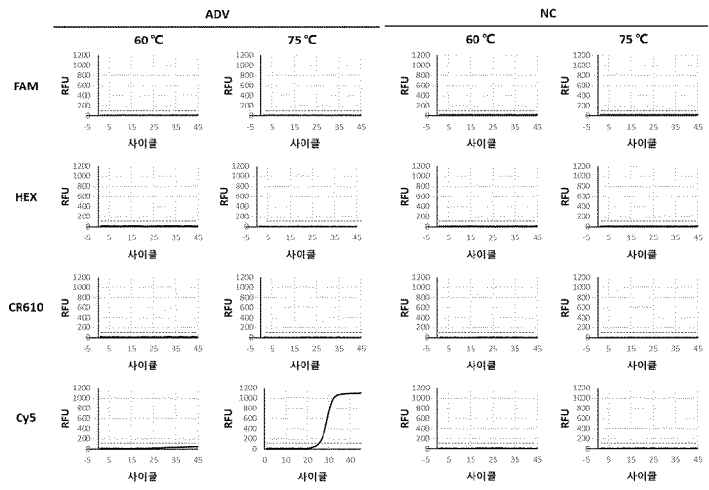
[도7]



[도8]



[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/008885

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q 1/6851(2018.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q 1/6851(2018.01); C12N 15/09(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); C12Q 1/686(2018.01); C12Q 1/689(2018.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 실시간 중합효소연쇄반응(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR), 핵산(nucleic acid), 단일 신호(single signal), 혼성화 프로브(hybridization probe), 소광 프로브(quenching probe), 어닐링 단계(annealing step), 연장 단계(extension step)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ARTIKA, I Made et al. Real-time polymerase chain reaction: current techniques, applications, and role in COVID-19 diagnosis. Genes. 16 December 2022 (publication date), vol. 13, article no. 2387, inner pp. 1-21. See abstract; inner pages 2, 6, 12 and 13; and figures 1 and 5.	1-14
A	TABARA, Kentaro et al. Fluorophore-PNA-Quencher/Quencher-DNA probe for miRNA detection. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 14 September 2021 (online publication date), vol. 51, article no. 128359, inner pp. 1-5. See abstract; inner page 2; and figure 1.	1-14
A	KIRK, Brian W. et al. Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease. Nucleic Acids Research. 01 August 2002 (publication date), vol. 30, no. 15, pp. 3295-3311. See pages 3299 and 3300; and figure 2.	1-14
A	JP 2007-515956 A (BIOTROVE, INC.) 21 June 2007 (2007-06-21) See paragraphs [0005] and [0006].	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 September 2024		Date of mailing of the international search report 02 October 2024
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/008885

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 109576352 A (JIANGSU MICRO-TEST MEDICINE TECHNOLOGY CO., LTD.) 05 April 2019 (2019-04-05) See paragraphs [0008]-[0013].	1-14
PX	KR 10-2651224 B1 (GENEMATRIX INC.) 26 March 2024 (2024-03-26) See claims 1-7, 10-13, 15-17 and 24-28. 'This document is a published earlier application that serves as a basis for claiming priority of the present international application.'	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/008885

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/008885

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2007-515956	A	21 June 2007	EP 1608952 A2	28 December 2005
				EP 1692314 A1	23 August 2006
				EP 1924681 A2	28 May 2008
				JP 2009-509144 A	05 March 2009
				US 2011-0003699 A1	06 January 2011
				US 2012-0245038 A1	27 September 2012
				US 2014-0179566 A1	26 June 2014
				WO 2004-074818 A2	02 September 2004
				WO 2005-059178 A1	30 June 2005
				WO 2007-035642 A2	29 March 2007
<hr/>					
CN	109576352	A	05 April 2019	CN 109576352 B	15 March 2022
<hr/>					
KR	10-2651224	B1	26 March 2024	None	
<hr/>					

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6851(2018.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6851(2018.01); C12N 15/09(2006.01); C12Q 1/68(2006.01); C12Q 1/686(2018.01); C12Q 1/689(2018.01)		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 실시간 중합효소연쇄반응(real-time polymerase chain reaction, real-time PCR), 핵산(nucleic acid), 단일 신호(single signal), 혼성화 프로브(hybridization probe), 소광 프로브(quenching probe), 어닐링 단계(annealing step), 연장 단계(extension step)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	ARTIKA, IMADE 등, "Real-time polymerase chain reaction: current techniques, applications, and role in COVID-19 diagnosis", Genes, 2022년 12월 16일(공개일), 13권, 기사번호 2387, 내부 페이지 1-21 요약; 내부 페이지 2, 6, 12, 13; 및 그림 1, 5	1-14
A	TABARA, KENTARO 등, "Fluorophore-PNA-Quencher/Quencher-DNA probe for miRNA detection", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2021년 9월 14일(온라인 공개일), 51권, 기사번호 128359, 내부 페이지 1-5 요약; 내부 페이지 2; 및 그림 1	1-14
A	KIRK, BRIAN W. 등, "Single nucleotide polymorphism seeking long term association with complex disease", Nucleic Acids Research, 2002년 8월 1일(공개일), 30권, 15호, 페이지 3295-3311 페이지 3299, 3300; 및 그림 2	1-14
A	JP 2007-515956 A (BIOTROVE, INC.) 2007.06.21 단락 [0005], [0006]	1-14
A	CN 109576352 A (JIANGSU MICRO-TEST MEDICINE TECHNOLOGY CO., LTD.) 2019.04.05 단락 [0008]-[0013]	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2024년09월30일 (30.09.2024)	2024년10월02일 (02.10.2024)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	KR 10-2651224 B1 ((주)진매트릭스) 2024.03.26 청구항 1-7, 10-13, 15-17, 24-28 · 위 문헌은 본 국제출원의 우선권주장의 기초가 되는 선출원의 공개된 공보임	1-14

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

- 1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
 - 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부

- 2. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다

- 3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
JP 2007-515956 A	2007/06/21	EP 1608952 A2	2005/12/28
		EP 1692314 A1	2006/08/23
		EP 1924681 A2	2008/05/28
		JP 2009-509144 A	2009/03/05
		US 2011-0003699 A1	2011/01/06
		US 2012-0245038 A1	2012/09/27
		US 2014-0179566 A1	2014/06/26
		WO 2004-074818 A2	2004/09/02
		WO 2005-059178 A1	2005/06/30
		WO 2007-035642 A2	2007/03/29
-----	-----	-----	-----
CN 109576352 A	2019/04/05	CN 109576352 B	2022/03/15
-----	-----	-----	-----
KR 10-2651224 B1	2024/03/26	없음	
-----	-----	-----	-----