



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0165609
(43) 공개일자 2023년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6837 (2018.01) C12Q 1/6839 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6837 (2018.05)
C12Q 1/6839 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2022-0065598
(22) 출원일자 2022년05월27일
심사청구일자 2022년05월27일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
함승주
서울특별시 서대문구 연세로 50
김은정
인천광역시 연수구 송도문화로84번길 24 (송도동, 송도 에듀포레 푸르지오) 207동 3505호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

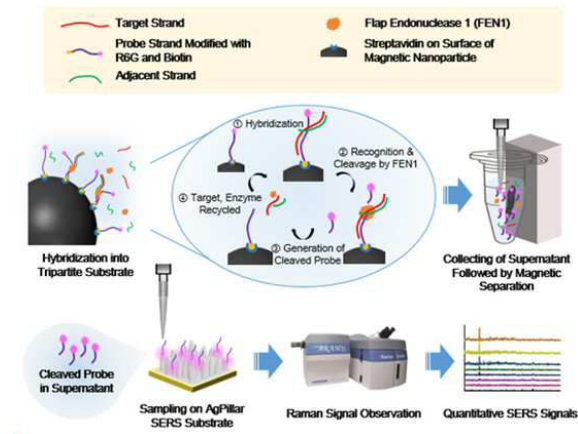
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 플랩 엔도뉴클레아제 1(FEN1)을 이용한 핵산 검출 시스템

(57) 요약

본 발명은 플랩 엔도뉴클레아제 1(FEN1)를 이용하여 원하는 타겟 핵산을 검출하는 시스템에 관한 것으로, 본 발명의 시스템을 이용할 경우 신속하고, 민감도 및 특이도가 높으며 타겟 변경이 쉬운 보편적인 검사 플랫폼을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2521/301 (2013.01)

C12Q 2563/107 (2013.01)

C12Q 2563/131 (2013.01)

C12Q 2563/143 (2013.01)

C12Q 2563/155 (2013.01)

(72) 발명자

염민주

세종특별자치시 조치원읍 섭골길 59

송대섭

경기도 용인시 수지구 성북1로 164번길 13

박주원

서울특별시 마포구 망원로7길 31-14, 303호(망원동)

김진영

서울특별시 서대문구 수색로 100, 105동 803호(북가좌동, DMC 래미안 e편한세상)

박채원

서울특별시 성북구 삼선교로 12-6, 1층(삼선동1가)

임종우

서울특별시 서대문구 독립문공원길 17, 101동 1001호(현저동, 독립문극동아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711132841
 과제번호 2018M3A9E2022819
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 바이오·의료기술개발(R&D)
 연구과제명 HER2 과발현 엑소좀 분리/농축을 위한 초자성 미세유체 플랫폼 개발
 기 여 율 40/100
 과제수행기관명 연세대학교
 연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1485018004
 과제번호 ARQ202101038001
 부처명 환경부
 과제관리(전문)기관명 한국환경산업기술원
 연구사업명 생물학적위해인자관리기술개발사업(R&D)
 연구과제명 유해인자 DB구축 및 IoT기반 공기포집-농축-전처리-상시진단 연계기술개발
 기 여 율 20/100
 과제수행기관명 연세대학교 산학협력단
 연구기간 2021.04.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711130474
 과제번호 2017M3A7B4041798
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 나노·소재기술개발(R&D)
 연구과제명 방수(aqueous humor) 액체생검을 이용한 뇌질환 바이오마커 탐색과 생체감응형 패턴

화 하이드로겔모듈 개발을 통한 마커 센싱 시스템 구축

기 여 율 20/100
 과제수행기관명 연세대학교
 연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711155028
 과제번호 2022R1C1C1005390
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 우수신진연구
 연구과제명 바이러스 감염병의 신속 대응을 위한 다가성 디자이너 핵산 나노구조체의 원천기술

개발

기 여 율 15/100
 과제수행기관명 인천대학교 산학협력단
 연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711149376
 과제번호 2019K1A3A1A61091813
 부처명 과학기술정보통신부
 과제관리(전문)기관명 한국연구재단
 연구사업명 전략형국제공동연구사업(R&D)
 연구과제명 아프리카 돼지 열병 백신백신 개발 및 진단키트 효능평가
 기 여 율 5/100
 과제수행기관명 서울대학교
 연구기간 2021.12.31 ~ 2022.12.30

명세서

청구범위

청구항 1

플랩 엔도뉴클레아제 1(FEN1);

검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하는 프로브; 및

검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하는 인접 가닥을 포함하고,

상기 프로브는 5'-말단이 표지자로 수식되고 3'-말단은 나노입자에 컨쥬게이션 되며,

타겟 핵산의 존재 시 상기 프로브, 상기 인접 가닥 및 검출하고자 하는 타겟 핵산은 혼성화되어 삼중 복합체를 형성하는 것인,

타겟 핵산 검출용 키트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 결합 부분은 20 이상 25 이하 b.p인,

타겟 핵산 검출용 키트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 플랩 부분은 10 이상 20 이하 b.p인,

타겟 핵산 검출용 키트.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 표지자는 형광 염료, 라만 염료, 및 방사성 동위원소로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인,

타겟 핵산 검출용 키트.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 프로브는 상기 나노입자에 비오틴-아비딘 또는 비오틴-스트렙타비딘 상호결합 반응에 의해 컨쥬게이션 되는 것인,

타겟 핵산 검출용 키트.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 나노입자는 자성 나노입자(magnetic nanoparticle)인,

타겟 핵산 검출용 키트.

청구항 7

제1항에 있어서,
FEN1이 상기 삼중 복합체 구조를 인식하고 프로브의 5'-말단을 절단하는 것인,
타겟 핵산 검출용 키트.

청구항 8

제1항에 있어서,
5'-말단이 상이한 표지자로 각각 수식된 2 이상의 프로브를 포함하는,
타겟 핵산 검출용 키트.

청구항 9

제1항에 있어서
상기 타겟 핵산은 vRNA를 역전사 처리한 것인
타겟 핵산 검출용 키트.

청구항 10

플랩 엔도뉴클레아제 1(FEN1);
검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하는 프로브; 및
검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하는 인접 가닥을 포함하고,
상기 프로브는 5'-말단이 표지자로 수식되고 3'-말단은 나노입자에 컨쥬게이션 되며,
타겟 핵산의 존재 시 상기 프로브, 상기 인접 가닥 및 검출하고자 하는 타겟 핵산은 혼성화되어 삼중 복합체를 형성하는 것인,
타겟 핵산 검출용 조성물.

청구항 11

(a) 대상체의 샘플로부터 추출된 핵산을, 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하고, 5'-말단이 표지자로 수식되며 3'-말단은 나노입자에 컨쥬게이션 되는 프로브; 및
검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하는 인접 가닥과 혼합하는 단계;
(b) 단계 (a)의 혼합물과 FEN1을 반응시키는 단계;
(c) 상기 혼합물에서 상층액을 분리하는 단계; 및
(d) 단계 (c)의 상층액에서 프로브의 표지를 검출하는 단계를 포함하는,
타겟 핵산의 검출 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,
상기 단계 (b)는 37.5℃ 이상 95℃ 이하에서 수행되는 것인,
타겟 핵산의 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 5'-, 3'- 이중 플랩 구조에 특이적으로 결합하는 FEN1 효소를 이용하여 타겟 핵산을 특이적으로 검출할 수 있는 시스템에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 인플루엔자 또는 COVID-19 등 다양한 바이러스의 유행으로 인해 전세계적으로 매 해 사회적, 경제적 손실이 발생하고 있다. 이러한 바이러스들로 인한 질환의 검사를 위해 실시간 RT-PCR(real time reverse transcription-PCR)이나 면역분석법 기반의 검사(Immunoassay based test)가 진행될 수 있다. 실시간 RT-PCR에 의한 검사의 경우 특이도와 민감도가 높고, 한 튜브 내에서 cDNA 합성과 실시간 PCR 반응이 동시에 진행된다는 장점이 있으나, 특이적 반응을 기대할 경우 Taq Probe 처리를 필요로 하고, 비싸고 정교한 온도 조절이 필요하며 비교적 긴 검사시간(2-8시간)이 소요된다는 단점이 있다. 이에 반해, 면역분석법 기반 검사를 수행하는 경우 30분 이내에 신속하게 진행 가능하며 휴대성 및 편리성이 우수하다는 장점이 있는 반면, 특이도가 낮아 위양성 확률이 높으며, 민감도가 낮아 위음성 확률이 높으며 표적이 한정적이라는 단점이 존재한다. 따라서, 비교적 신속하고, 민감도 및 특이도가 높으며 타겟 변경이 쉬운 보편적인 검사 플랫폼의 필요성이 대두되고 있는 실정이다.

[0003] 이에 본 발명자들은, 서열을 인식하거나 Ag-Ab와 같이 특정한 친화도를 인식하는 것이 아닌 플랩 연결 지점(flap junction)이 튼튼한 이중 플랩 구조를 인식하는 시스템을 고안해냈고, FEN1을 이용하여 원하는 핵산을 검출해내는 보편적인 핵산 검출 시스템에 관한 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 플랩 엔도뉴클레아제 1(FEN1)을 이용하여 원하는 타겟 핵산을 검출하는 키트, 조성물 및 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 FEN1을 이용하여 구조 특이적으로 플랩 구조를 갖는 핵산 기질을 절단하고, 상기 기질에서 절단된 프로브의 표지를 검출하여 타겟 핵산을 확인하는 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명은 플랩 엔도뉴클레아제 1(FEN1); 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하는 프로브; 및 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하는 인접 가닥을 포함하고,

[0007] 상기 프로브는 5'-말단이 표지자로 수식되고 3'-말단은 나노입자에 컨쥬게이션 되며,

[0008] 타겟 핵산의 존재 시 상기 프로브, 상기 인접 가닥 및 검출하고자 하는 타겟 핵산은 혼성화되어 삼중 복합체를 형성하는 것인, 타겟 핵산 검출용 키트를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 플랩 엔도뉴클레아제 1(FEN1); 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하는 프로브; 및 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하는 인접 가닥을 포함하고,

[0010] 상기 프로브는 5'-말단이 표지자로 수식되고 3'-말단은 나노입자에 컨쥬게이션 되며,

[0011] 타겟 핵산의 존재 시 상기 프로브, 상기 인접 가닥 및 검출하고자 하는 타겟 핵산은 혼성화되어 삼중 복합체를 형성하는 것인, 타겟 핵산 검출용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명은,

[0013] (a) 대상체의 샘플로부터 추출된 핵산을,

- [0014] 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하고, 5'-말단이 표지자로 수식되며 3'-말단은 나노입자에 컨쥬게이션 되는 프로브; 및
- [0015] 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하는 인접 가닥과 혼합하는 단계;
- [0016] (b) 단계 (a)의 혼합물과 FEN1을 반응시키는 단계;
- [0017] (c) 상기 혼합물에서 상층액을 분리하는 단계; 및
- [0018] (d) 단계 (c)의 상층액에서 프로브의 표지를 검출하는 단계를 포함하는,
- [0019] 타겟 핵산의 검출 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명의 타겟 핵산 검출 시스템은 특정 서열을 인식하거나 항원-항체와 같은 특정 친화성을 이용하는 것이 아닌 이중 플랩 구조를 인식하는 시스템으로써, 타겟 서열에 따라 자유롭게 프로브와 인접서열을 설계할 수 있어 보편성을 가지며, 신속하고, 민감도 및 특이도가 높으며, 타겟 변경이 쉽고, 멀티플렉싱이 가능한 장점을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 구조 특이적 효소 핵산 센서(structure specific enzymatic nucleic acid sensor; SENSE)의 전반적인 과정을 도시한 것이다.
- 도 2는 FEN1에 의한 삼중 복합체의 절단을 PAGE 분석에 의해 확인한 것이다. 도 2A는 FEN1의 존재 및 타겟의 양에 따른 분석이며, 도 2B는 반응 시간 및 온도에 따른 분석이다.
- 도 3은 FEN1의 자성 나노입자에 부착된 삼중 복합체에 대한 효소 활성을 확인한 것이다. 도 3A는 형광 신호를, 도 3B는 라만 신호를 나타낸 것이다.
- 도 4A는 순차적으로 희석된 타겟 서열을 포함하는 다양한 샘플에 대해 617cm^{-1} 에서의 SERS 스펙트럼을 나타낸 것이다. 도 4B는 도 4A의 라만 스펙트럼에 대응하는 정규화 강도를 나타낸 것이다. 도 4C는 보정 곡선을 통해 타겟의 양과 피크의 강도 사이의 선형 비율을 확인한 것이다. 도 4D는 타겟의 미스매치 정도에 따른 라만 스펙트럼을 나타낸 것이다. 도 4E는 도 4D에 대응하는 정규화 강도를 나타낸 것이다.
- 도 5A는 타겟, 1-mm 타겟, 타겟과 1-mm를 모두 포함한 타겟을 두 종류의 프로브가 부착된 자성 나노입자에 각각 처리했을 때의 라만 스펙트럼을 나타낸 것이다. 도 5B는 R6G 피크에 대한 각 샘플의 강도를, 도 5C는 Cy3.5의 피크에 대한 각 샘플의 강도를 나타낸 것이다.
- 도 6A는 H9N2 vRNA 카피 수에 따른 라만 스펙트럼을 나타낸 것이며, 도 6B는 도 6A의 특정 피크에 대한 강도를 나타낸 것이다. 도 6C는 SENSE에 의한 타겟 검출의 선형 분석이다. 도 6D는 RT-qPCR의 Ct 값 사이의 관계를 나타낸 것이다. 도 6E는 H9N2 vRNA 검출에서 FNAD 및 RT-PCR의 회귀 분석의 적합 곡선을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0023] 따라서, 본 발명은 플랩 엔도뉴클레아제 1(FEN1); 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하는 프로브; 및 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하는 인접 가닥을 포함하고,
- [0024] 상기 프로브는 5'-말단이 표지자로 수식되고 3'-말단은 나노입자에 컨쥬게이션 되며,
- [0025] 타겟 핵산의 존재 시 상기 프로브, 상기 인접 가닥 및 검출하고자 하는 타겟 핵산은 혼성화되어 삼중 복합체를 형성하는 것인, 타겟 핵산 검출용 키트를 제공한다.
- [0026] 본 발명에서, "타겟 핵산"은 사용자가 검출하기를 원하는 임의의 유전 물질을 지칭한다. 상기 타겟 핵산은 임의의 대상체의 샘플로부터 추출한 것일 수 있다. 타겟 핵산은 대상체 유래의 유전 물질이거나, 대상체에 존재할

수 있으나 대상체가 아닌 외래의 생물(예컨대, 바이러스, 박테리아 등)로부터 유래한 유전물질 일 수 있다. 상기 타겟 핵산은 RNA 또는 DNA일 수 있다. 본 명세서에서 "타겟 핵산"은 "타겟(T)", "타겟 서열" 또는 "타겟 가닥"으로도 표현되며, 이들은 상호교환적인 사용이 가능하다.

- [0027] 본 발명에서, 상기 타겟 핵산은 바이러스 유래일 수 있다. 예를 들어, 타겟 핵산이 단일 가닥의 바이러스 RNA인 경우, 역전사를 통해 cDNA로 변형하여 본 발명의 타겟 핵산 검출 시스템에 적용할 수 있다. 또한, 타겟 핵산이 이중 가닥의 바이러스 RNA 또는 DNA인 경우, 헬리케이스를 처리하여 단일 가닥으로 변형하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명에서, "대상체"는 타겟 핵산 검출에 필요한 샘플을 제공하고, 궁극적으로 검출하고자 하는 타겟 핵산 존재 여부 확인의 대상이 되는 개체를 의미한다. 개체는 제한 없이 인간, 유인원, 원숭이, 소, 말, 개, 고양이, 기니아 피그, 토끼, 마우스, 래트, 닭, 곤충 등을 포함한다. 본 발명의 대상체는 특정 질병에 대한 환자일 수도 있고, 정상 개체일 수도 있다.
- [0029] 본 발명에서, 대상체의 "샘플(시료)"은 대상체로부터 얻은 생물학적 샘플을 의미하며, 대상체의 임의의 체액 또는 조직과 같은 샘플일 수 있다. 상기 체액은 예를 들어 혈액, 타액, 소변, 비강 점액 또는 림프액을 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 타겟 핵산 검출용 키트는 플랩 엔도뉴클레아제 1(FEN1), 프로브 및 인접 가닥을 포함한다. "플랩 엔도뉴클레아제 1" 또는 "FEN1"은 DNA의 5'-플랩 구조 분해활성을 가진 내열성 효소이다. DNA의 복제 과정 중 지연 가닥에서는 오카자키 조각들이 생성되며, 이 조각들은 DNA 합성을 위한 출발점이 되는 RNA의 가닥인 프라이머(primer)를 포함한다. 이러한 과정에서 작용하는 FEN1은 DNA 수선 과정에서 5' 말단의 돌출된 "플랩"을 제거하고, 지연 가닥의 DNA 합성에서 오카자키 절편의 5' 말단을 처리한다. 또한, FEN1은 2가 금속 이온 의존성 포스포디에스테라제(divalent metal ion-dependent phosphodiesterase) 활성을 사용하여 서열에 관계없이 5' 플랩을 제거할 수 있다.
- [0031] 본 발명에서, "프로브"는 타겟 핵산을 검출하기 위한 검출 수단을 일컫는다. "프로브"는 "프로브 핵산" "프로브 서열" 또는 "프로브 가닥"으로도 표현되며, 이들은 상호교환적인 사용이 가능하다.
- [0032] 본 발명에서, "인접 가닥"은 상기 프로브와 인접한 서열을 갖는 핵산으로, (타겟 핵산을 검출하기 위해 프로브, 타겟 핵산과 혼성화할 수 있는 서열)을 일컫는다. "인접 가닥"은 "인접 핵산" 또는 "인접 서열"로도 표현되며, 이들은 상호교환적인 사용이 가능하다.
- [0033] 본 발명에서, "서열 상동성(%)"은 핵산 서열의 전체 길이를 구성하는 뉴클레오타이드 수 대비 둘 이상의 정렬된 핵산 서열의 동일한 뉴클레오타이드의 일치 수를 나타낸다.
- [0034] 또한, 본 발명에서 "결합 부분"이란 프로브 또는 인접 가닥 중 타겟 핵산과 상보적으로 결합하는 서열의 부분을 지칭하며, "플랩 부분"이란 프로브 또는 인접 가닥 중 타겟 핵산과 결합하지 않는 서열의 부분을 지칭한다.
- [0035] 상기 프로브는 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 프로브는 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 90% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 10% 이하인 플랩 부분을 포함할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 프로브는 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 95% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 5% 이하인 플랩 부분을 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 프로브의 결합 부분은 20 이상 25 이하 b.p의 서열일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 프로브의 플랩 부분은 10 이상 20 이하 b.p의 서열일 수 있다.
- [0038] 상기 인접 가닥은 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 인접 가닥은 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 90% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 10% 이하인 플랩 부분을 포함할 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 인접 가닥은 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 95% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 5% 이하인 플랩 부분을 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 인접 가닥의 결합 부분은 20 이상 25 이하 b.p의 서열일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 인접 가닥의 플랩 부분은 10 이상 20 이하 b.p의 서열일 수 있다.

- [0041] 본 발명에서, 상기 프로브는 5'-말단이 표지자로 수식된 것일 수 있다. 상기 표지자는 흡광, 형광, 발광, 방사성, 촉매 활성 등 측정 가능한 신호를 발생시킬 수 있는 물질을 포함하며, 시약, 예를 들어 폴리뉴클레오타이드 프로브 또는 항체에 직접 또는 간접적으로 접합되거나 융합되고, 이와 접합되거나 융합된 시약의 검출을 용이하게 하는 모든 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 상기 표지자는 방사성 동위원소, 형광 염료, 라만 염료, 효소, 항체, 또는 링커 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 표지자는 형광 염료, 라만 염료, 또는 방사성 동위원소일 수 있다.
- [0042] 본 발명에서, 형광 염료는 시아닌 계열, 로다민 계열, 옥사진 계열, 알렉사 계열, 플루오레세인 계열, 쿠마린 계열, 아크리딘 계열, 피렌 계열, 에리트로신 계열 및 에오신 계열로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 구체적으로, fluorescein, FITC, Alexa Fluor 488, GFP, CFSE, CFDA-SE, DyLight 488, PE, PI, PerCP, PerCP-Cy5.5, Cy3.5, Cy3, PE-Alexa Fluor 700, PE-Cy5 (TRI-COLOR), PE-Cy5.5, PE-Alexa Fluor 750, PE-Cy7, APC, APC-Cy7, APC-eFluor 780, Alexa Fluor 700, Cy5, Draq-5, Pacific Orange, Amine Aqua, Pacific Blue, DAPI, Alexa Fluor 405, eFluor 450, eFluor 605 Nanocrystals, eFluor 625 Nanocrystals 또는 eFluor 650 Nanocrystals일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명에서, "라만 염료", "라만 분자" 또는 "라만 활성 분자"는 라만 신호와 형광 신호를 동시에 갖거나 라만 신호를 가질 수 있으며, 특정 파수에서 강도가 강한 특징적인 피크를 나타낸다. 상기 라만 활성 분자는 표면 증강 라만 활성 분자, 표면증강 공명 라만 활성 분자, 하이퍼 라만 활성 분자, 또는 코히런트 반 스토크스 라만 활성 분자를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 라만 활성 분자는 시아닌, 로다민, 플루오레세인, 또는 벤젠고리 형태의 라만 활성 분자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명에서, 상기 방사성 동위원소는 ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{125}I , ^{131}I , ^3H , ^{177}Lu 및 ^{68}Ga 로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 상기 표지자는 그 자체로 검출 가능할 수 있다. 또한 효소 표지자의 경우에는 검출 가능한 생성물을 생성하는 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매할 수도 있다.
- [0046] 본 발명에서, 상기 프로브의 3'-말단은 나노입자에 컨쥬게이션 될 수 있다. 상기 나노입자는 타겟 핵산을 검출하기 위한 포획 나노입자일 수 있다. 구체적으로, 상기 나노입자는 자성 나노입자(magnetic nanoparticle), 금(Au) 나노입자, 은(Ag) 나노입자, 백금(Pt) 나노입자, 양자점(Quantum dot), 상방전환 나노입자(upconversion nanoparticle, UCNP) 그래핀(graphene)-나노입자 복합체, 색 염색 나노입자(color dyed particles) 및 라텍스(latex) 나노입자로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는, 상기 나노입자는 자성 나노입자일 수 있으며, 이는 평균입경이 10nm 내지 100 μm 범위의 크기를 갖는 자성을 띄는 물질을 포함한다.
- [0047] 상기 프로브의 3'-말단은 비오틴, 아비딘 또는 스트렙타비딘으로 수식될 수 있다. 또한, 상기 나노입자는 표면에 비오틴, 아비딘 또는 스트렙타비딘 층을 더 포함할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, 상기 프로브는 상기 나노입자에 비오틴-아비딘 또는 비오틴-스트렙타비딘 상호결합 반응에 의해 컨쥬게이션 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 본 발명에 따른 핵산의 혼성화와 FEN1 활성에 방해가 없는 결합이라면 제한 없이 사용될 수 있을 것이다. 예컨대, 본 발명에서 상기 프로브와 상기 나노입자는 이황화결합 또는 EDC/NHC 결합에 의해 컨쥬게이션 될 수 있다.
- [0048] 본 발명에서, 상기 나노입자에 컨쥬게이션된 프로브는 상기 인접 가닥 및 검출하고자 하는 타겟 핵산과 혼성화되어 이중 플랩 구조를 갖는 삼중 복합체를 형성할 수 있다. 본 발명의 일 구현예에서, FEN1은 상기 삼중 복합체 구조를 인식하고 프로브의 5'-말단(즉, 플랩)을 절단한다. 절단된 프로브는 5'-말단에 수식된 표지자를 통해 타겟 핵산의 검출에 이용될 수 있다. 본 발명에서 상기 "삼중 복합체"는 FEN1의 기질로 사용되므로 "삼중 기질"로도 지칭된다.
- [0049] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 타겟 핵산 검출용 키트는 5'-말단이 상이한 표지자로 각각 수식된 2 이상의 프로브를 포함할 수 있다. 이 경우 2 이상의 타겟 핵산을 동시에 검출할 수 있다. 상기 2 이상의 프로브의 5'-말단은 상이한 표지자로 각각 수식될 수 있다. 예를 들어, 상기 표지자는 서로 다른 종류의 라만 염료 및 형광 염료로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 상이한 파장을 방출하는 표지자를 사용할 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명의 일 측면은, 플랩 엔도뉴클레아제 1(FEN1); 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상

100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하는 프로브; 및 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하는 인접 가닥을 포함하고,

- [0052] 상기 프로브는 5'-말단이 표지자로 수식되고 3'-말단은 나노입자에 컨쥬게이션 되며,
- [0053] 타겟 핵산의 존재 시 상기 프로브, 상기 인접 가닥 및 검출하고자 하는 타겟 핵산은 혼성화되어 삼중 복합체를 형성하는 것인, 타겟 핵산 검출용 조성물을 제공한다.
- [0054] 상기에서 타겟 핵산 검출용 키트와 관련하여 기술한 모든 내용이 타겟 핵산의 검출용 조성물에 그대로 적용 또는 준용될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 일 측면은,
- [0057] (a) 대상체의 샘플로부터 추출된 핵산을, 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하고, 5'-말단이 표지자로 수식되며 3'-말단은 나노입자에 컨쥬게이션 되는 프로브; 및
- [0058] 검출하고자 하는 타겟 핵산과 서열상동성 85% 이상 100% 이하인 결합 부분과, 서열상동성 0% 이상 15% 이하인 플랩 부분을 포함하는 인접 가닥과 혼합하는 단계;
- [0059] (b) 단계 (a)의 혼합물과 FEN1을 반응시키는 단계;
- [0060] (c) 상기 혼합물에서 상층액을 분리하는 단계; 및
- [0061] (d) 단계 (c)의 상층액에서 프로브의 표지를 검출하는 단계를 포함하는,
- [0062] 타겟 핵산의 검출 방법을 제공한다.
- [0063] 상기에서 타겟 핵산 검출용 키트와 관련하여 기술한 모든 내용이 타겟 핵산의 검출 방법에 그대로 적용 또는 준용될 수 있다.
- [0064] 먼저, 대상체의 샘플로부터 핵산을 추출한다. 이때, 추출한 임의의 핵산은 사용자가 검출하고자 하는 타겟 핵산을 포함할 수도 있고, 타겟 핵산을 포함하지 않을 수도 있다.
- [0065] 상기 대상체의 샘플로부터 추출한 임의의 핵산을 프로브 및 인접가닥과 혼합시켜 삼중 복합체를 형성한다. 추출한 핵산이 검출하고자 하는 타겟 핵산을 포함하는 경우, 타겟 핵산과 인접 가닥 및 프로브가 혼성화되어 삼중 복합체를 형성한다.
- [0066] 형성된 삼중 복합체는 FEN1의 기질로 작용할 수 있으며, FEN1은 상기 삼중 복합체를 인식하고 프로브의 5'-말단을 절단한다. 따라서, 단계 (b) 이후의 혼합물은 절단된 프로브를 포함한다.
- [0067] 이와 달리, 추출한 핵산이 검출하고자 하는 타겟 핵산을 포함하지 않는 경우, 추출한 핵산은 프로브 및 인접 가닥과의 결합 부분을 포함하고 있지 않으므로 혼성화되지 않는다. 따라서, 삼중 복합체가 형성되지 않으며, FEN1에 의해 절단되지 않는다. 이 경우에 단계 (b) 이후의 혼합물은 절단된 프로브를 포함하지 않으며, 이후의 단계 (d)에서 검출 결과가 나타나지 않는다.
- [0068] 이어서, 상기 혼합물에서 상층액을 분리한다. 혼합물에서 절단된 프로브를 포함하는 상층액을 분리할 수 있는 모든 가능한 방법이 사용될 수 있으며, 예를 들어 여과, 원심 분리, 자성 분리 또는 포획 크로마토그래피에 의해 상층액을 분리할 수 있다. 분리된 상층액을 제외한 나머지 혼합물에 포함된 타겟 서열과 FEN1 효소는 방출될 수 있으며, 효소 절단 활성을 위한 또 다른 기질의 형성을 위해 재사용될 수 있다.
- [0069] 단계 (c)의 상층액에서 프로브의 표지를 검출한다. 상기 상층액에서 절단된 프로브를 포집하고, 상기 프로브의 5'-말단에 수식된 표지를 검출한다. 상기 검출 방법은 수식된 표지자에 따라 달라질 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나 본 발명의 일 구현예에서, 상기 검출 방법은 라만 분광법일 수 있다. 본 발명에서, "라만 분광법"은 라만 효과를 이용하여, 특정 분자에 레이저를 쏘았을 때 그 분자의 전자의 에너지준위의 차이만큼 에너지를 흡수하는 사건을 통해 분자의 종류를 알아내는 방법으로, 상기 라만 분광법은 표면 증강 라만 분광법 (surface enhanced Raman spectroscopy, SERS), 표면증강 공명 라만 분광법 (surface enhanced resonance Raman spectroscopy: SERRS), 하이퍼 라만 분광법(Hyper Raman Scattering), 또는 코히런트 반 스토크스 라만 분광법

(Coherent Anti-Stokes Raman Scattering: CARS)일 수 있다.

[0070] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 단계 (b)는 37.5℃ 이상 95℃ 이하에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 FEN1은 내열성 효소이므로, 핵산 가닥들의 결합 안정성을 보장하는 어떠한 온도에서도 수행 가능하다.

[0072] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0074] [실시예]

[0075] 실시예 1: 구조 특이적 효소 핵산 센서(structure specific enzymatic nucleic acid sensor; SENSE)의 전반적인 과정 (도 1)

[0076] 타겟 DNA 분자는 3'-말단에서 1-bp 미스매치가 있는 인접 가닥 및 자성 나노입자(MNP-P) 표면에 고정되어 있는 라만 염료로 표지된 프로브 가닥과 상보적 결합을 형성하여 이중 플랩이 있는 삼중 복합체를 형성한다. 플랩 엔도뉴클레아제 1(FEN1)은 말단에 형광 라만 염료로 기능화된 5'-플랩을 절단하기 위해 이 특정 이중 플랩 구조를 특이적으로 인식한다. 타겟 가닥과 효소는 방출되어 효소 절단 활성을 위한 또 다른 기질을 형성하기 위해 재사용될 수 있다. 자성 나노입자의 풀다운(pull-down)은 절단된 프로브를 포함하는 상층액의 수집으로 이어지며, 이는 이어서 SERS 기판에 도입된다. 일정 시간 동안 인큐베이션한 후 기판을 라만 분광기로 분석한다.

[0077] 본 실시예에서 사용한 올리고뉴클레오타이드의 서열은 표 1과 같다.

표 1

Target (T)	GGT GAC AAG ATT GGT CTT GTC TTT AGC CAT TCC ATG AGA GCC TCA AGA T
Probe (P)	[R6G] - CAG CAG CAG CAG CAG AGA CAA GAC CAA TCT TGT CAC CAA AAA AAA A - [biotin]
Plain probe (P ₀)	CAG CAG CAG CAG CAG AGA CAA GAC CAA TCT TGT CAC CAA AAA AAA A
Adjacent (A)	ATC TTG AGG CTC TCA TGG AAT GGC TAA C
1-bp mismatch (1-mm)	GGT GAC AAG ATT GGT CTT GTC GTT AGC CAT TCC ATG AGA GCC TCA AGA T
1-mm probe (P-1mm)	[Cy3.5] - CAG CAG CAG CAG CAG CGA CAA GAC CAA TCT TGT CAC CAA AAA AAA A - [biotin]
1-mm adjacent (A-1mm)	ATC TTG AGG CTC TCA TGG AAT GGC TAA A
2-bp mismatch (2-mm)	GGT GAC AAG ATT GGT CTT GTC GGT AGC CAT TCC ATG AGA GCC TCA AGA T
3-bp mismatch (3-mm)	GGT GAC AAG ATT GGT CTT GTA GGT AGC CAT TCC ATG AGA GCC TCA AGA T
4-bp mismatch (4-mm)	GGT GAC AAG ATT GGT CTT GTA GGG AGC CAT TCC ATG AGA GCC TCA AGA T
5-bp mismatch (5-mm)	GGT GAC AAG ATT GGT CTT GGA GGG AGC CAT TCC ATG AGA GCC TCA AGA T
Scramble Sequence (Scra)	AAA GGG TCC ATG CCG TAA TGA ACT TCT GCT AGT TAC TGT ATT GCG ACT G

[0078]

[0080] 실시예 2: 삼중 기질(Tripartite Substrates)에 대한 FEN1의 활성 확인

[0081] 삼중 기질 구조에 대한 FEN1의 절단 활성을 확인하기 위해, PAGE 분석을 수행하였다. 반응을 위해 필요한 가닥을 첨가하고 90℃에서 5분 동안 인큐베이션하고 상보적인 가닥을 삼중 효소 기질로 혼성화하기 위해 실온으로 냉각시켰다. 그 다음, 샘플을 다양한 온도(실온, 37℃, 55℃) 및 다양한 반응 시간(30분, 60분, 120분) 동안 인큐베이션 하였다. 생성된 샘플을 로드하여 전기영동한 후, 형광 이미지 분석기를 사용하여 이미지를 얻었다 (도 2A, 2B). 도 2의 (+) 또는 (-) 표시는 각 레인의 샘플에 해당 성분의 존재 여부를 의미하며, 도 2A의 iii 레인에서 ix 레인으로 갈수록 타겟 서열이 순차적 희석되었다.

[0082] 도 2A의 ii 밴드의 경우, 이중 플랩 구조가 형성되었음에도 불구하고 절단 반응을 일으키지 않았다. 또한, 샘플에서 타겟 가닥의 양이 적을수록, 밴드의 강도(절단된 5'-플랩을 나타냄)가 약해지는 것이 관찰되었다. 따라서

FEN1의 효소 활성을 위해서는 타겟 가닥과 효소의 존재가 모두 필요하며, 절단된 5'-플랩의 양은 FEN1의 존재 및 삼중 기질 형성에 필요한 충분한 양의 타겟 가닥에 의존한다는 것을 확인하였다. 또한, FEN1 활성화에 대한 다양한 반응 시간 및 온도의 영향은 도 2B의 PAGE 분석에 의해 확인되었다. 절단된 5'-플랩을 나타내는 밴드는 반응 시간과 온도가 증가함에 따라 대체로 더 큰 강도로 나타남을 확인할 수 있다.

[0083] 다음으로, 자성 나노입자 표면에 부착된 삼중 복합 기질에 대한 FEN1 효소 활성 가능성을 확인하였다. 5'-말단에 로다민6G(R6G) 및 3'-말단에 9A-비오틴으로 기능화된 프로브 가닥이 사용되었다. 프로브 가닥은 스트랩타비딘-비오틴 친화력에 의해 자성 나노입자의 표면에 부착되었다. 타겟, 인접 서열 및 FEN1을 MNP-P(프로브 서열로 장식된 자성 나노입자)에 첨가하고 인큐베이션하여 형광 및 라만 신호를 얻었다 (도 3A, 3B).

[0085] 실시예 3: SENSE의 민감도 및 특이도 분석

[0086] 순차적 희석된 타겟 가닥을 포함하는 다양한 샘플에서 형광 및 라만 신호를 얻었다. 도 4A와 4B는 617cm^{-1} 에서 SERS 스펙트럼과 대응하는 정규화 강도(corresponding normalized intensity, cnt)를 보여주며, 이는 프로브 가닥의 5'-말단에서 기능화된 R6G의 특징적인 피크 파수이다. 보정 곡선 $I_{\text{nor}}=0.001088N^T+0.003987(R^2=0.9671)$ 은 도 4C에 나타난 대로 정규화된 피크의 강도-타겟의 양에 대한 플롯의 초기 선형 비율에 적합했다. 또한, SENSE의 검출 한계는 평균 음성 대조군에 표준 편차의 3배를 더한 LOD를 계산하여 $2.59 \times (10)^{-18} \text{mol}$ (즉, 2.59amol)로 추정되었다. 검출 특이성은 각각 미스매치 정도에 따라 다른 6가지 상이한 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 결정하였다 (correct 타겟: P.C, 1-bp mismatch: 1-mm, 2-bp mismatch: 2-mm, 3-bp mismatch: 3-mm, 4-bp mismatch: 4-mm, 5-bp mismatch: 5-mm, 무작위 서열: Scr, no target strand added: N.C.). 도 4D 및 4E에 도시된 바와 같이, 플랩 접합 영역에서 단일 미스매치(1-mm)의 존재는 음성 대조군의 것과 유사한 평균 신호 강도를 보였다. 이는 2, 3, 4, 5bp 미스매치(2-mm, 3-mm, 4-mm, 5-mm) 및 무작위 서열에서도 마찬가지였다. 결과는 완전한 이중 플랩 구조 기질에서 FEN1 활성화의 특이성을 나타냈으며, 이는 또한 SENSE에 의해 생성된 위양성 신호의 특이성과 낮은 빈도를 입증했다.

[0088] 실시예 4: SENSE의 멀티플렉싱 기능 및 반응 특이성

[0089] SENSE를 적용한 다중 타겟 검출을 테스트하기 위하여, 스트랩타비딘 자성 나노입자(SA-MNP)를 P(프로브) 및 P-1mm(1bp 미스매치 프로브) 두 유형의 비오틴 기능화 프로브 가닥에 도입하여 두 프로브가 장식된 자성 나노입자(MNP-P-Both)를 생성했다. 이 프로브는 타겟 및 1-mm 타겟에 완전히 상보적이고, 각각의 5' 말단은 R6G와 Cy3.5로 기능화되었다. FEN1의 미스매치가 없는 완전한 이중 플랩 삼중 기질에 대한 강한 의존성으로 인해, 다른 타겟 조건을 구현하면 다른 라만 스펙트럼이 생성된다. 각 조건에 대한 결과 스펙트럼은 도 5A에 도시하였다. MNP-P-Both에서 타겟을 처리하면 R6G 말단이 있는 프로브 가닥에 올리고뉴클레오타이드가 혼성화되고 R6G 라만 신호만 발현된다. 1-mm의 반응은 동등한 반응 메커니즘에서만 Cy3.5 신호로 이어진다. 따라서 R6G(617cm^{-1} , 1180cm^{-1})의 특징적인 피크는 타겟이 포함된 조건에서만 나타나며, 마찬가지로 Cy3.5(720cm^{-1} , 940cm^{-1})에 대한 라만 신호는 1-mm 타겟이 포함된 조건에서만 나타난다 (도 5B, 5C). 타겟과 1-mm 타겟을 모두 포함하면 라만 강도가 두 염료 모두에서 약간 약화되었으며, 이는 반응에 사용될 수 있는 고정된 프로브의 수가 제한되기 때문이라고 생각된다. 상기 테스트를 통해, 다중 타겟 검출은 단일 염기 수준까지 타겟을 식별하는 높은 특이도로 가능한 것으로 입증되었다.

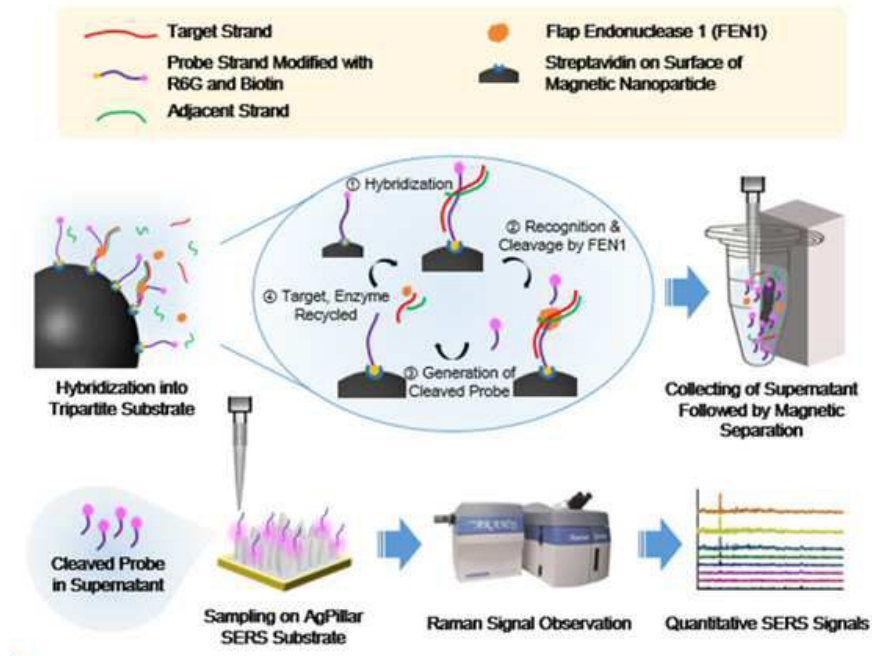
[0091] 실시예 5: 바이러스 샘플에 SENSE의 적용

[0092] SENSE를 임상 적용하기 위해 실제 바이러스 샘플을 테스트하였다. 다양한 농도의 H9N2 전체 바이러스 스톱 용액에서 RT-qPCR을 통해 바이러스 vRNA를 추출하고 정량화했다. 그런 다음 FEN1에 의해 적절하게 인식되고 촉매되기 위해 cDNA로 역전사되었다. 도 6A 및 6B는 원본 vRNA의 양에 따라, 다양한 실제 바이러스 샘플에서 SENSE에 의해 획득된 라만 스펙트럼 및 피크 강도를 보여준다. vRNA 카피 수의 정규화된 라만 강도와 로그는 $I_{\text{nor}}=0.0003767\log(N_{\text{copy}})+0.001826(R^2=0.9170)$ 곡선과 선형 상관관계를 나타냈다 (도 6C). RT-qPCR의 Ct 값과 vRNA 카피 수의 로그 사이의 결정 계수는 1에 매우 가깝고 ($R^2=0.9999$, 도 6D), SENSE 결과는 실제 바이러스에

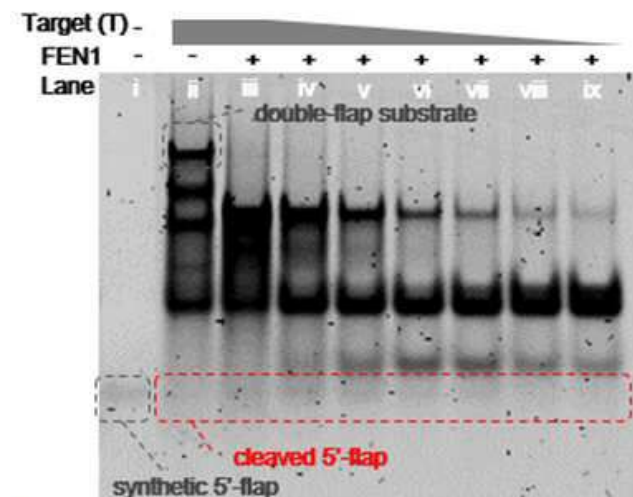
서 유래한 cDNA 검출에 대해 우수한 신뢰도($R^2=0.9170$, 도 6E)를 나타냈다.

도면

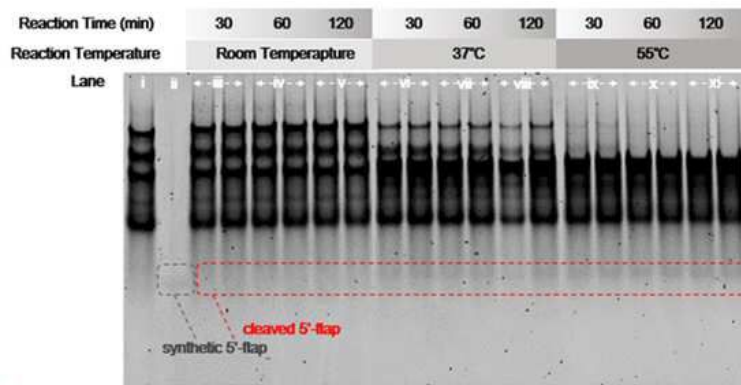
도면1



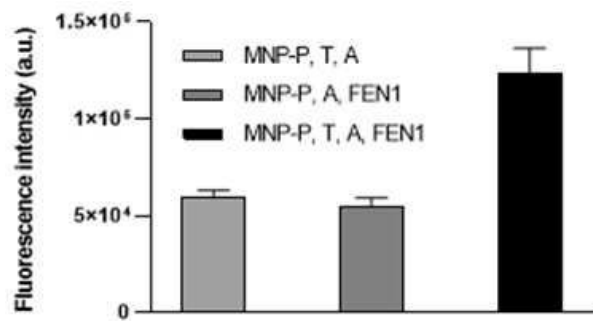
도면2a



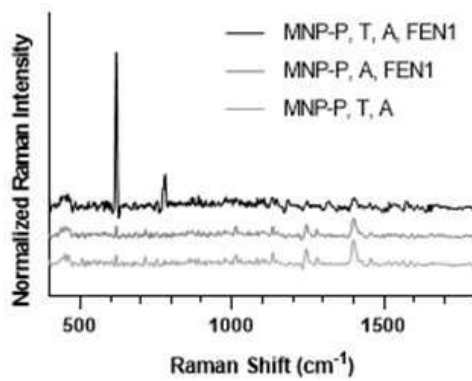
도면2b



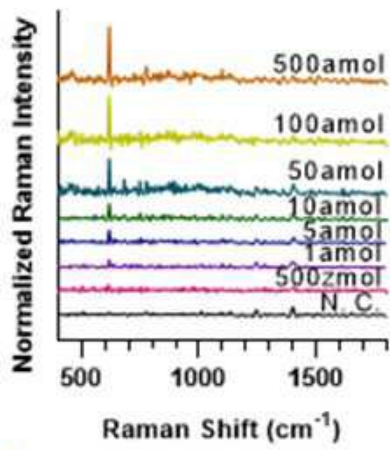
도면3a



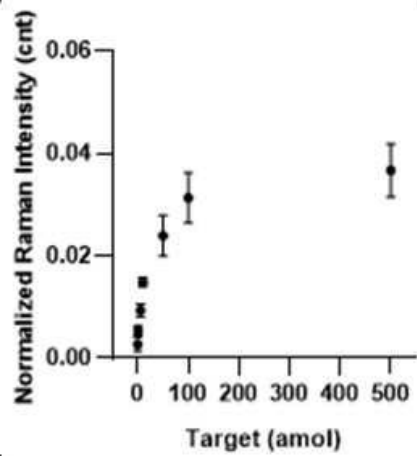
도면3b



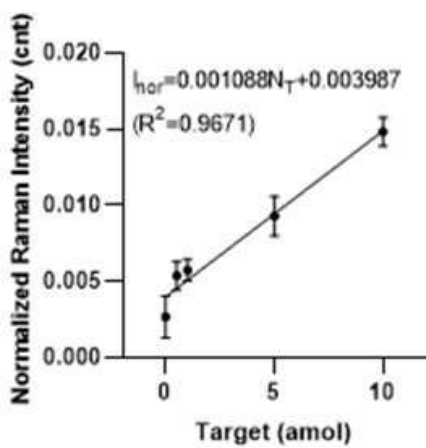
도면4a



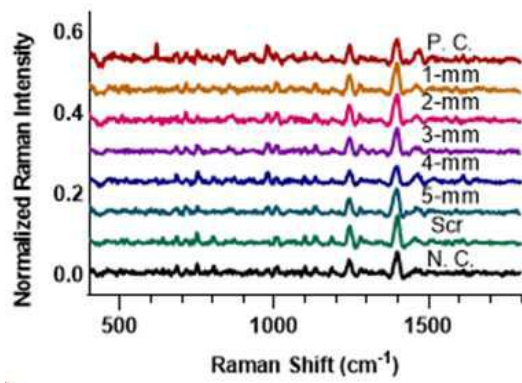
도면4b



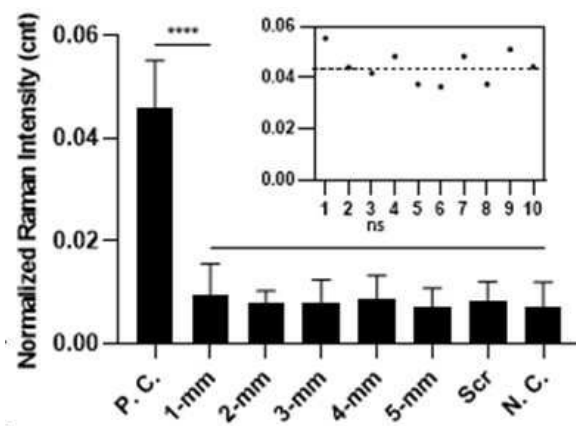
도면4c



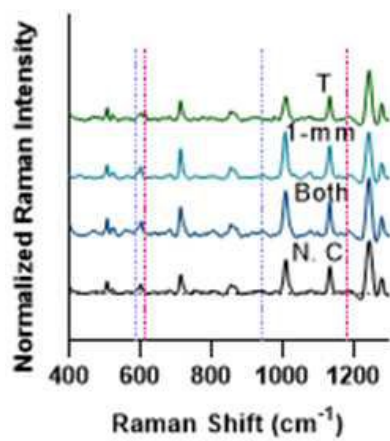
도면4d



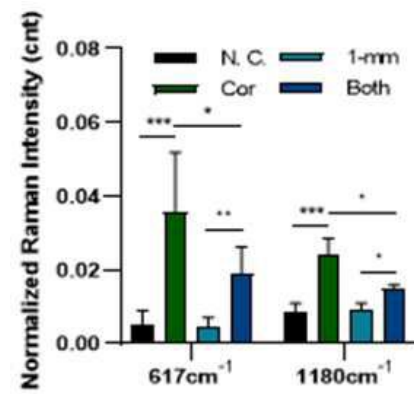
도면4e



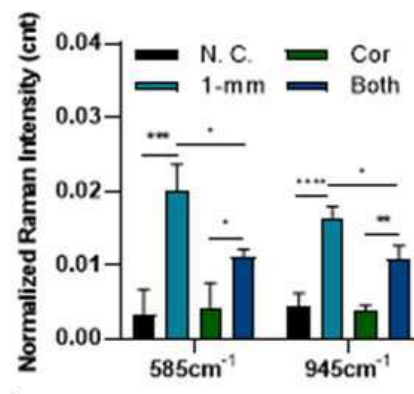
도면5a



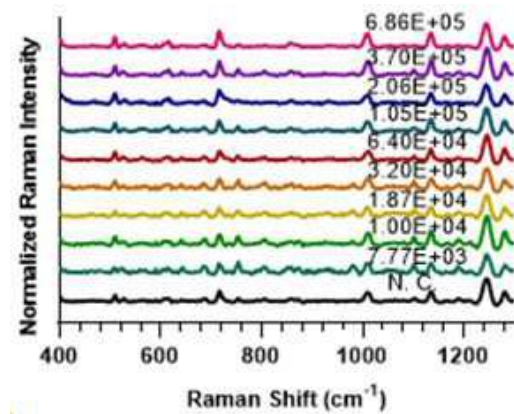
도면5b



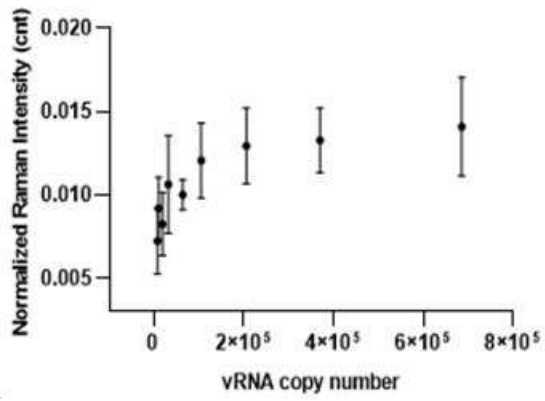
도면5c



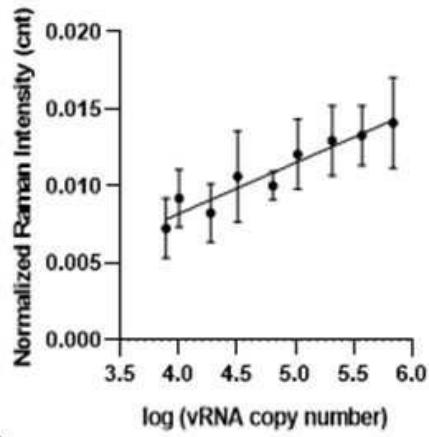
도면6a



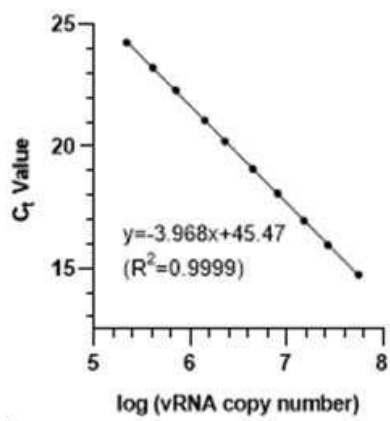
도면6b



도면6c



도면6d



도면6e

