

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)**(11) 공개번호** 10-2024-0139907
(43) 공개일자 2024년09월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6827 (2018.01) *C12Q 1/6886* (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6827 (2018.05)*C12Q 1/6886* (2022.01)

(21) 출원번호 10-2023-0034161

(22) 출원일자 2023년03월15일

심사청구일자 2023년03월15일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

나성수

서울특별시 영등포구 당산로42길 13, 106동 802호(당산동5가, 당산동1차 효성아파트)

류준석

서울특별시 서대문구 충정로6안길 13, 301호(미근동)

(74) 대리인

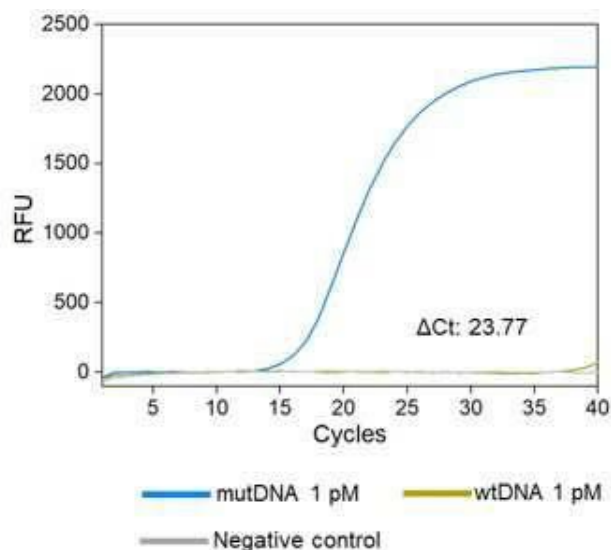
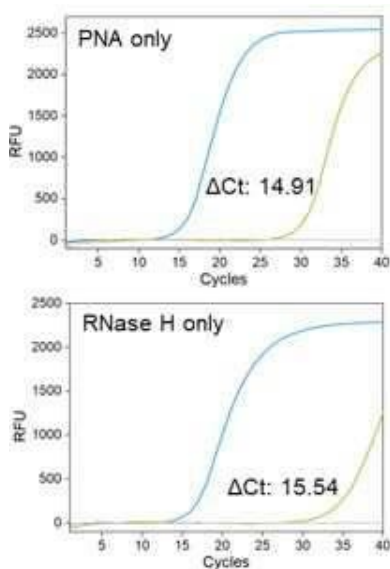
박상열, 최내윤

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물 및 이를 이용한 단일 염기 서열 변이 검출방법

(57) 요약

단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물 및 이를 이용한 단일 염기 서열 변이 검출 방법이 제공된다. 상기 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물은 KRAS 단일 염기 서열 변이 검출용 PNA; RNA 포워드 프라이머(RNA forward primer, R-FP); 및 리버스 프라이머(reverse primer); 를 포함할 수 있다.

대표도

(52) CPC특허분류

C12Q 2525/107 (2013.01)

C12Q 2531/113 (2013.01)

C12Q 2563/107 (2013.01)

C12Q 2600/156 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711167889
과제번호	2016R1A5A1010148
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	대형연구사업운영비지원사업
연구과제명	나노-생체유체 검사 연구단
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

KRAS 단일 염기 서열 변이 검출용 PNA;

RNA 포워드 프라이머(RNA forward primer, R-FP); 및

리버스 프라이머(reverse primer);를 포함하는 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 KRAS 단일 염기 서열 변이 검출용 PNA는 서열번호 1 내지 서열번호 6 중 하나 이상인, 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 리버스 프라이머는 서열번호 7 내지 서열번호 12인, 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 RNA 포워드 프라이머는 형광(Fluorescent) 분자 및 감광(Quencher) 분자를 포함하는, 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 형광 분자와 감광 분자의 거리가 DNA 염기 갯수를 기준으로 5mer 내지 30mer인, 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 형광 분자와 감광 분자의 거리가 DNA 염기 갯수를 기준으로 20mer 내지 30mer인, 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 형광 분자는 FAM인, 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 감광 분자는 BHQ1인, 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

RNase 효소 추가로 포함하는, 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 RNase 효소는 RNase H2 효소인, 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물.

청구항 11

제1항의 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물을 이용한 단일 염기 서열 변이 검출 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물을 이용하여 핵산을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭된 핵산의 농도를 분석하여 단일 염기 서열 변이 유무를 결정하는 단계를 포함하는, 단일 염기 서열 변이 검출 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 단일 염기 서열 변이는 KRAS 유전자에서 발생하는 것인, 단일 염기 서열 변이 검출 방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 단일 염기 서열 변이는 KRAS 유전자의 exon 2, exon3 또는 exon 4에서 하나 이상 발생하는 것인, 단일 염기 서열 변이 검출 방법.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 증폭된 핵산의 농도는 형광 신호를 통해 파악되는 것인, 단일 염기 서열 변이 검출 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 형광 신호를 통해 단일 염기 서열 변이 유무, 변이된 염기의 종류, 변이의 정도 중 하나 이상에 대하여 분석가능한 것인, 단일 염기 서열 변이 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 단일 염기 서열 변이 검출용 조성물, 및 이를 이용한 단일 염기 서열 변이 검출 방법에 관련된 것으로, 보다 상세하게는, KRAS 단일 염기 서열 변이 검출용 PNA; RNA 포워드 프라이머; 및 리버스 프라이머;를 포함하는 조성물에 관련된 것이다.

배경 기술

[0002] 암을 진단하기 위한 방법 중 하나는 암 환자의 혈액 내 있는 다양한 정보들을 바탕으로 진단하는 것이다. 대표적으로 혈중 순환 암 DNA(circulating tumor DNA)의 염기 서열을 분석하여 해당 혈액의 암 환자가 어떤 종류의 암을 가지고 있는지, 어떤 변이를 일으켰는지에 대한 정보를 파악할 수 있다. 혈중 순환 암 DNA의 변이 중에서도 단일 염기 서열 변이(single nucleotide sequence mutation)는 흔한 변이이나, 정확하게 검출하기 어려운 과제이다.

[0003] 단일 염기 서열 변이란 이중 핵산의 염기서열 중에서 단 하나의 염기만 다른 종류의 염기쪽으로 변이되는 것을 말한다. 예를 들면, Guanine이라는 염기가 Cytosine, Adenine, Thymine 등 다른 염기로 바뀌는 것을 의미한다.

[0004] 이런 단일 염기 서열 변이(single nucleotide sequence mutation)가 가장 흔히 발현되는 염기 부분은 KRAS(Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) Exon 2, codon 34~38 구역이다. 그 중에서도 가장 많이 발현되는 구역은 KRAS Exon2, codon 35의 Guanine 이 다른 염기로 변이되는 것이다. 이 부분에서 발생할 수 있는 각각의 변이를 의학 약어로 KRAS G12D(G>A), G12V(G>T), G12A(G>C)라고 표현한다.

[0005] 단일 염기 서열 변이 검출이 어려운 이유는 DNA를 검출하기 위한 방법이 해당 검출 DNA에 맞게 염기서열을 설계하는데 있다. 예를 들어 5'TGATCACAT~3'을 검출하기 위해 각각의 위치의 염기와 상보 결합하는 염기를 다음과 같이 설계한다. 3'ACTAGTGTA-5' 위와 같이 특정 DNA를 검출하기 위해 상보결합을 이용하는 것이 필수여야 다른 종류의 DNA의 검출을 배제할 수 있다. 그러나, 다른 종류의 DNA가 단일 염기서열만 다르다면 기존의 설계된 DNA 염기는 전혀 쓸모가 없어진다. DNA의 결합력에서 단일 염기서열로 인한 결합력의 차이는 거의 없기 때문이다.

[0006] 이러한 문제점을 해결하기 위해, 검출해야 하는 DNA만을 복제하고, 단일 염기 서열 변이가 있는 DNA는 복제하지 못하게 하는 선택적 증폭 방법이 개발되었다. DNA를 증폭하기 위해서는 기존에 연구되던 PCR(polymerase chain reaction)이 대표적인 기술을 사용할 수 있으나, PCR만을 사용하면 단일 염기 서열 변이된 DNA도 같이 복제되어 구별하지 못하는 한계가 있다.

[0007] 현재 암을 검사하기 위해서 대략 30개의 서로 다른 위치에 대한 핵산 변이를 동시에 검사해야 한다. 하지만 PCR은 한 시료에서 하나의 검사만 하기 때문에 비효율적이다. 이를 대체할만한 차세대 염기 분석법 (Next generation sequencing)이 있고, 이는 민감도가 뛰어나고 모든 염기를 관찰하기에 암검사에 최적화된 기술이지만 모든 유전자 핵산을 검사하기 때문에 한 샘플을 검사하기 위해서 최소 24시간 이상이 소요되며 국내 상급 종합 병원에서만 가능하기에 현재 암검사의 수요를 맞출 수 없는 실정이다.

[0008] 또한 NGS는 장비의 가격이 최소 1억에서 10억까지 있는데 암을 검사하는 장비이기 때문에 병원의 신뢰성을 위해서 가장 우수한 성능의 장비만을 갖추고 있고 이 때문에 암 검사 비용이 기하급수적으로 높아질 수 밖에 없다. 따라서 PCR 기법을 개선하여 검사 비용과 시간을 낮출 수 있으면서도 암 검사에 적합한 민감하고 선택적 진단이 가능한 기술이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 출원이 해결하고자 하는 일 기술적 과제는, KRAS 변이를 높은 민감도로 검출할 수 있는 단일 염기 서열 변이 검출용 조성물 및 이를 이용한 단일 염기 서열 변이 검출방법을 제공하는 데 있다.
- [0010] 본 출원이 해결하고자 하는 다른 기술적 과제는, 혈액에서 암을 용이하게 진단할 수 있는 고신뢰성의 단일 염기 서열 변이 검출용 조성물 및 이를 이용한 단일 염기 서열 변이 검출방법을 제공하는 데 있다.
- [0011] 본 출원이 해결하고자 하는 또 다른 기술적 과제는, 단일 염기 서열 변이 유무, 변이된 염기의 종류, 변이의 정도 중 하나 이상에 대하여 분석가능한, 단일 염기 서열 변이 검출용 조성물 및 이를 이용한 단일 염기 서열 변이 검출방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 출원은 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물을 제공한다.
- [0013] 일 실시예에 따르면, 상기 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물은, KRAS 단일 염기 서열 변이 검출용 PNA; RNA 포워드 프라이머(RNA forward primer, R-FP); 및 리버스 프라이머(reverse primer);를 포함할 수 있다.
- [0014] 일 실시예에 따르면, 상기 KRAS 단일 염기 서열 변이 검출용 PNA는 서열번호 1 내지 서열번호 6 중 하나 이상일 수 있다.
- [0015] 일 실시예에 따르면, 상기 리버스 프라이머는 서열번호 7 내지 서열번호 12일 수 있다.
- [0016] 일 실시예에 따르면, 상기 RNA 포워드 프라이머는 형광(Fluorescent) 분자 및 감광(Quencher) 분자를 포함할 수 있다.
- [0017] 일 실시예에 따르면, 상기 형광 분자와 감광 분자의 거리가 DNA 염기 갯수를 기준으로 5mer 내지 30mer일 수 있다.
- [0018] 일 실시예에 따르면, 상기 형광 분자와 감광 분자의 거리가 DNA 염기 갯수를 기준으로 20mer 내지 30mer일 수 있다.
- [0019] 일 실시예에 따르면, 상기 형광 분자는 FAM일 수 있다.
- [0020] 일 실시예에 따르면, 상기 감광 분자는 BHQ1일 수 있다.
- [0021] 일 실시예에 따르면, 상기 조성물은 RNase 효소를 추가로 포함할 수 있다
- [0022] 일 실시예에 따르면, 상기 RNase 효소는 RNase H2 효소일 수 있다.
- [0023] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 출원은 단일 염기 서열 변이 검출 방법을 제공한다.
- [0024] 일 실시예에 따르면, 상기 단일 염기 서열 변이 검출 방법은, 상술된 실시예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물을 이용할 수 있다.
- [0025] 일 실시예에 따르면, 상기 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물을 이용하여 핵산을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭된 핵산의 농도를 분석하여 단일 염기 서열 변이 유무를 결정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0026] 일 실시예에 따르면, 상기 단일 염기 서열 변이는 KRAS 유전자에서 발생하는 것일 수 있다.
- [0027] 일 실시예에 따르면, 상기 단일 염기 서열 변이는 KRAS 유전자의 exon 2, exon3 또는 exon 4에서 하나 이상 발생하는 것일 수 있다.
- [0028] 일 실시예에 따르면, 상기 증폭된 핵산의 농도는 형광 신호를 통해 파악되는 것일 수 있다.
- [0029] 일 실시예에 따르면, 상기 형광 신호를 통해 단일 염기 서열 변이 유무, 변이된 염기의 종류, 변이의 정도 중 하나 이상에 대하여 분석가능한 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명에 따른 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물을 이용하여 혈중 내 존재하는 혈중 순환 암 DNA

와 이들의 변이가 존재하는 환경에서 단일 염기 서열 변이를 검출할 수 있다.

- [0031] 구체적으로, 형광 및 감광 분자를 이용한 형광 검지법을 통해 단일 염기 서열 변이 유무, 변이된 염기의 종류, 변이의 정도를 검출할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따른 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물 내 포함되는 RNA 포워드 프라이머는 다중 검출을 위해서 형광 및 감광 분자를 프라이머 핵산에 추가하여 하나의 용액에서 다수의 변이를 동시에 관찰할 수 있다.
- [0033] 구체적으로, KRAS 유전자의 Exon 2, 3, 4에서 발생하는 단일 염기 서열 변이에 대해 한 번의 PCR 실험으로 단시간 내에 다양한 변이들에 대하여 검사할 수 있다.
- [0034] 이에 따라, 기존 암 진단을 위한 경제적, 시간적 부담이 경감될 수 있고, 용이하게 혈액에서 암을 진단하는 기술이 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1은 본 출원의 실시예에 따른 방법에서 타겟 DNA 복제 과정을 설명하기 위한 도면이다.
- 도 2는 본 출원의 실시예에 따른 방법을 이용한 KRAS Q61L의 PCR 증폭 결과를 도시한 것이다.
- 도 3은 본 출원의 실시예에 따른 방법에서 이용한 KRAS G12D의 PCR 증폭 후 결과를 도시한 것이다.
- 도 4는 본 출원의 실시예에 따른 조성물 내 RNA 포워드 프라이머에서 태깅된 형광 분자(F)와 감광 분자(Q)의 거리에 따른 KRAS G12D의 증폭 실험한 결과를 도시한 것이다.
- 도 5A는 RNA forward primer DNA 디자인에 따른 실시간 qPCR 그래프이고, 도 5B는 실시간 형광 값에서 대조군과 비교한 상대적 ΔCt 값을 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 이하, 첨부된 도면들을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명할 것이다. 그러나 본 발명의 기술적 사상은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 실시예는 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.
- [0037] 본 명세서에서, 어떤 구성요소가 다른 구성요소 상에 있다고 언급되는 경우에 그것은 다른 구성요소 상에 직접 형성될 수 있거나 또는 그들 사이에 제3의 구성요소가 개재될 수도 있다는 것을 의미한다.
- [0038] 또한, 본 명세서의 다양한 실시예들에서 제1, 제2, 제3 등의 용어가 다양한 구성요소들을 기술하기 위해서 사용되었지만, 이들 구성요소들이 이 같은 용어들에 의해서 한정되어서는 안 된다. 이들 용어들은 단지 어느 구성요소를 다른 구성요소와 구별시키기 위해서 사용되었을 뿐이다. 따라서, 어느 한 실시예에 제1 구성요소로 언급된 것이 다른 실시예에서는 제2 구성요소로 언급될 수도 있다. 여기에 설명되고 예시되는 각 실시예는 그것의 상보적인 실시예도 포함한다. 또한, 본 명세서에서 '및/또는'은 전후에 나열한 구성요소들 중 적어도 하나를 포함하는 의미로 사용되었다.
- [0039] 명세서에서 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한 복수의 표현을 포함한다. 또한, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 구성요소 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징이나 숫자, 단계, 구성요소 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 배제하는 것으로 이해되어서는 안 된다. 또한, 본 명세서에서 "연결"은 복수의 구성요소를 간접적으로 연결하는 것, 및 직접적으로 연결하는 것을 모두 포함하는 의미로 사용된다.
- [0040] 또한, 하기에서 본 발명을 설명함에 있어 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명은 생략할 것이다.
- [0042] 본 발명의 일 양태는 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물을 제공한다.
- [0043] 구체적으로, KRAS 단일 염기 서열 변이 검출용 PNA; RNA 포워드 프라이머(RNA forward primer, R-FP); 및 리버스 프라이머(reverse primer);를 포함하는 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물을 제공한다.
- [0044] 종래 핵산 증폭 방법인 PCR 기법의 민감도는 용액에 한 가닥의 핵산만 있어도 증폭이 될만큼 뛰어나다. 하지만

프라이머 핵산과 결합만 한다면 프라이머 핵산 사이의 염기서열이 어떻게 변했는지 상관없이 상보적인 핵산을 생산하기 때문에 단일 염기에 변이가 일어남을 감지하지 못한다. 만약 프라이머 핵산과 결합하는 부위에서 단일 염기 서열 변이가 있다 할지라도 핵산과 핵산의 결합이기 때문에 완전 상보결합과의 큰 차이가 나지 않아서 마찬가지로 동일한 증폭이 일어난다. 따라서 기존의 중합효소 연쇄반응은 단일 염기 서열 변이를 검출하기에 적절하지 않은 한계가 있어왔다.

[0045] 또한 펩타이드 클램핑 기법을 이용한 단일 염기 서열 변이 검출의 경우, 펩타이드 핵산의 길이가 10개에서 15개 사이로 디자인되는데 이 염기서열 사이에서 일어난 단일 염기의 변이를 감지할 수는 있으나 정확히 어디에서 어떤 변이가 발생했는지는 전혀 알 수 있는 방법이 없다. 따라서 암 치료 및 모니터링 그리고 항암치료를 위해서는 암 검사를 통해 암 변이의 발현을 의학적인 치료를 결정할 만큼 정확한 정보를 제공해야 한다.

[0046] 종래 리보뉴클리에이즈를 활용한 중합효소 연쇄반응 기법은 단일 염기를 검출하기에 적절한 기법이지만 리보뉴클리에이즈의 절단 효율에 따라 결과는 민감하게 반응한다. 따라서, 민감한 단일 염기 서열 변이 검출을 위해 보다 효과적인 방법이 필요하다.

[0048] PNA는 DNA와 유사하지만 핵산 구조 중 백본(backbone)의 구조가 인산(phosphate)이 아닌 펩타이드로 이루어진 구조체이다. DNA는 인산 구조체를 백본으로 가지기 때문에 음전하를 띠 수밖에 없지만 펩타이드 구조체로 구성된 PNA는 극성이 없다.

[0049] 따라서, DNA와 DNA가 상보 결합을 하더라도, 서로의 backbone charge 때문에 결합력이 강하지 않은 반면, PNA와 DNA가 상보 결합하면 PNA에서는 음전하로 인한 반발력이 없어서 DNA와 DNA의 결합에 비해 강한 결합력을 가질 수 있다.

[0050] 또한, PNA와 DNA에서 발생하는 결합에서의 단일 염기 서열 비대응(single mis-match)는 완전 대응(full match) 결합과 비교하여 결합력의 차이가 크게 나타날 수 있다. 이 결합력의 차이는 녹는점(melting temperature)으로 측정될 수 있으며, 단일 염기 서열 비대응 결합(비상보 결합)과 완전 대응 상보 결합 사이에서, 약 15° C 정도의 온도차이가 발생할 수 있다. 반면, DNA와 DNA사이에서의 단일 염기 비대응으로 인한 온도 차이는 약 1° C 미만에 불과하다.

[0051] 위와 같은 차이로 PNA를 이용하여, 단일 염기 서열 변이(single nucleotide mutation)를 검출할 수 있으나, 실질적으로 단일 염기 서열 변이가 없는 야생형 DNA와 단일 염기 서열 변이가 있는 타겟 DNA를 구별하기 위한 선별성은 1:1000에 불과하다. 또한, PNA의 염기 서열의 구조나 길이 또는 타겟 DNA에 결합하는 부분에 따라 조건들이 까다롭기 때문에 PNA 하나만으로는 단일 염기 서열 변이를 모두 검출하기가 어려운 한계가 있다.

[0052] 본 발명의 일 실시예에 따른_단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물은 KRAS 단일 염기 서열 변이 검출을 위해 아래의 서열번호 1 내지 서열번호 6(서열확인 부탁드립니다.) 중 하나 이상의 PNA를 포함할 수 있다.

[0053] 서열번호 1 : GAG CTG GTG GCG

[0054] 서열번호 2 : TCC TGG CGT AGG

[0055] 서열번호 3 : ACA CAG CAG GTC

[0056] 서열번호 4 : CAG GTC AAG AGG

[0057] 서열번호 5 : AGG AAA TAA ATG TGA TTG

[0058] 서열번호 6 : ACA TCA GCA AAG AC

[0059] 상기 서열을 갖는 PNA를 통해 단일 염기 변이를 다중으로 검출할 수 있다.

[0061] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물은 리버스 프라이머를 포함할 수 있으며, 상기 리버스 프라이머는 서열번호 7 내지 서열번호 12일 수 있다.

[0062] 서열번호 7 : GTC CAC AAA ATG ATT CTG AAT TAG C

[0063] 서열번호 8 : CCA CAA AAT GAT TCT GAA TTA GCT G

- [0064] 서열번호 9 : AGA AAG CCC TCC CCA GTC C
- [0065] 서열번호 10 : CAG TCC TCA TGT ACT GGT CC
- [0066] 서열번호 11 : CAC CCT GTC TTG TCT TTG CT
- [0067] 서열번호 12 : TCG AAC TAA TGT ATA GAA GGC A
- [0068] 상기 서열을 갖는 리버스 프라이머를 통해 단일 염기 변이를 다중으로 검출할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 일 실시예에 따른 조성물은 RNA 포워드 프라이머를 포함할 수 있으며, 상기 RNA 포워드 프라이머는 형광(Fluorescent) 분자 및 감광(Quencher) 분자를 포함할 수 있다.
- [0070] 구체적으로, 상기 형광 분자와 감광 분자의 거리가 DNA 염기 갯수를 기준으로 5mer 내지 30mer일 수 있으며, 보다 구체적으로, 상기 형광 분자와 감광 분자의 거리가 DNA 염기 갯수를 기준으로 20mer 내지 30mer일 수 있으며, 상기 형광 분자는 FAM일 수 있으며, 상기 감광 분자는 BHQ1일 수 있다.
- [0071] 상기 범위 내에서 RNase의 효율이 우수할 수 있다.
- [0073] 본 발명의 일 실시예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물은 RNase 효소를 추가로 포함할 수 있으며, 구체적으로 상기 RNase 효소는 RNase H2 효소일 수 있다.
- [0074] RNase H2는 RNA-DNA 염기간 상보 결합이 발생하면 RNase H2가 RNA염기 앞에 있는 chain을 끊어주는 기능을 수행할 수 있다. RNA-DNA 염기간 상보 결합이 맞지 않으면, 즉 RNA 및 DNA가 비상보 결합을 하는 경우 RNase H2는 작동하지 않는다. 프라이머 DNA의 서열에 RNA 염기 하나를 섞어 넣고, 3' 말단에는 증폭이 되지 않도록 억제제를 설계하고, 프라이머 DNA가 타겟 DNA와 결합할 때 RNase H2가 RNA를 잘라주면, 3'에서 중합효소 연쇄반응으로 증폭이 일어나지만 비타겟 DNA와 결합했을 때는 RNA-DNA 결합이 상보결합이 아니기 때문에, RNase H2가 작동하지 못하고, 기존 3'에 있던 억제제로 인해 핵산 증폭이 발생되지 않는다. 이와 같이, RNase H2를 이용한 방법 또한 1:1000정도의 수준의 선택성을 가질 수 있다.
- [0075] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상술된 PNA 및 RNase H2를 동시에 이용하여, 단일 염기 서열 변이가 효과적으로 검출될 수 있다.
- [0077] 도 1은 본 출원의 일 실시예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법에서 타겟 DNA 복제 과정을 설명하기 위한 도면이다.
- [0078] 도 1을 참조하면, 기준 염기 서열(CCACCA)과 다른 염기 서열 변이(CCATCA)를 갖는 타겟 DNA가 준비될 수 있다. 다시 말하면, 상기 타겟 DNA는 상기 샘플 내에서 검출하고자 하는 객체일 수 있다.
- [0079] 본 발명의 일 실시예에 따른 PNA는, 상기 기준 염기 서열(CCACCA)을 갖는 상기 타겟 DNA와 상보 결합하는 염기 서열(GGTGGT)를 가지므로, 상기 염기 서열 변이(CCATCA)와 비상보 결합하는 염기 서열(GGTGGT)를 가질 수 있다.
- [0080] 상기 PNA가 상기 타겟 DNA에 결합할 수 있다. 하지만, 상기 PNA와 상기 타겟 DNA는 T와 G가 만나기 때문에 mismatch가 있는 상황으로 비상보 결합할 수 있다. 상기 R-FP(RNA forward primer)에 의해, 상기 PNA가 상기 타겟 DNA로부터 쉽게 분리되고, 상기 R-FP가 상기 타겟 DNA와 결합할 수 있다. 즉, 상기 타겟 DNA와 상기 PNA는 비상보 결합되어 용이하게 서로 분리되고, 상기 타겟 DNA의 상기 염기 서열 변이(CCATCA)와 상보 결합하는 염기 서열(GGTAGT)을 갖는 상기 R-FP가 상기 타겟 DNA와 상보 결합할 수 있다. 다시 말하면, 상기 R-FP와 상기 타겟 DNA가 결합하면, T와 rA(RNA adenine)이 결합하여 RNA-DNA 상보 결합될 수 있다. 이 경우, 상기 RNase H2가 상기 RNA-DNA 상보 결합을 인식하여 상기 기준 R-FP의 rA 부분을 잘라주고, 이로 인해 중합효소가 이후 부분부터 복제하여 상기 타겟 DNA가 복제될 수 있다.
- [0082] 본 발명의 다른 양태는, 본 발명의 일 양태에 따른 조성물을 이용한 단일 염기 서열 변이 검출 방법을 제공할 수 있다.
- [0083] 구체적으로, 상기 단일 염기 서열 변이 검출용 프라이머 조성물을 이용하여 핵산을 증폭하는 단계; 및 상기 증

폭된 핵산의 농도를 분석하여 단일 염기 서열 변이 유무를 결정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0084] 본 발명의 일 실시예에 따른 방법에서 상기 단일 염기 서열 변이는 KRAS 유전자에서 발생하는 것일 수 있고, 구체적으로 KRAS 유전자의 exon 2, exon3 또는 exon 4에서 하나 이상 발생하는 것일 수 있다.

[0085] 구체적으로, 상기 KRAS 유전자의 단일 염기 서열 변이 검출을 위하여 각 exon 상의 target DNA, 핵산 변이에 대한 RNA 포워드 프라이머, 리버스 프라이머, PNA 세트는 아래 [표 1](KRAS 단일 염기 서열 변이 다중 검출을 위한 DNA 세트)과 같다.

표 1

target	핵산 변이	RNA forward primer	reverse primer	PNA
exon 2 KRAS G12S	c.34G>A	AACT TGT GGT AGT TGG AGC T rA G TGG A/3SpC3/	GTC CAC AAA ATG ATT CTG AAT TAG C (서열번호 7)	GAG CTG GTG GCG (서열번호 1)
exon 2 KRAS G12R	c.34G>C	AACT TGT GGT AGT TGG AGC T rCG TGG A/3SpC3/		
exon 2 KRAS G12C	c.34G>T	AACT TGT GGT AGT TGG AGC T U G TGG A/3SpC3/		
exon 2 KRAS G12D	c.35G>A	ACT TGT GGT AGT TGG AGC TG rATGG CC /3SpC3/		
exon 2 KRAS G12A	c.35G>C	ACT TGT GGT AGT TGG AGC TG rUTGG CC /3SpC3/		
exon 2 KRAS G12V	c.35G>T	ACT TGT GGT AGT TGG AGC TG rCTGG CC /3SpC3/		
exon 2 KRAS G13S	c.37G>A	T TGT GGT AGT TGG AGC TGG T rAGCGT C /3SpC3/	CCA CAA AAT GAT TCT GAA TTA GCT G (서열번호 8)	TCC TGG CGT AGG (서열번호 2)
exon 2 KRAS G13R	c.37G>C	T TGT GGT AGT TGG AGC TGG T rCGCGT C /3SpC3/		
exon 2 KRAS G13C	c.37G>T	T TGT GGT AGT TGG AGC TGG T UG CGT C /3SpC3/		
exon 2 KRAS G13D	c.38G>A	TGT GGT AGT TGG AGC TGG TGrACGT A T /3SpC3/		
exon 2 KRAS G13A	c.38G>C	TGT GGT AGT TGG AGC TGG TGrCCGT A T /3SpC3/		
exon 2 KRAS G13V	c.38G>T	TGT GGT AGT TGG AGC TGG TGUCGT A T /3SpC3/		
exon 3 KRAS A59S	c.175G>T	T CTT G GAT ATT CTC GAC ACA U CA G GA/3SpC3/	AGA AAG CCC TCC CCA GTC C (서열번호 9)	AC ACA G CA G GTC (서열번호 3)
exon 3 KRAS A59T	c.175G>A	T CTT G GAT ATT CTC GAC ACA rACA G GA/3SpC3/		
exon 3 KRAS A59E	c.176C>A	CTT G GAT ATT CTC GAC ACA GrA AGGT A/3SpC3/		
exon 3 KRAS A59G	c.176C>G	CTT G GAT ATT CTC GAC ACA GrGAGGT A/3SpC3/		

exon 3 KRAS G60D	c.179G>A	GAT ATT CTC GAC ACA GCA GrATCAA C/3SpC3/	CAG TCC TCA TGT ACT GGT CC (서열번호 10)	CAG GTC AAG AGG (서열번호 4)
exon 3 KRAS G60A	c.179G>C	GAT ATT CTC GAC ACA GCA GrCTCAA C/3SpC3/		
exon 3 KRAS G60V	c.179G>T	GAT ATT CTC GAC ACA GCA GUTCAA C/3SpC3/		
exon 3 KRAS G60G	c.180T>A	AT ATT CTC GAC ACA GCA GG rACAA G C/3SpC3/		
exon 3 KRAS G60G	c.180T>C	AT ATT CTC GAC ACA GCA GG rCCAA G C/3SpC3/		
exon 3 KRAS G60G	c.180T>G	AT ATT CTC GAC ACA GCA GG rGCAA G C/3SpC3/		
exon 3 KRAS Q61E	c.181C>G	T ATT CTC GAC ACA GCA GGTTrGAAG A C /3SpC3/		
exon 3 KRAS Q61K	c.181C>A	T ATT CTC GAC ACA GCA GGTTrA AAG A C /3SpC3/		
exon 3 KRAS Q61L	c.182A>T	CTC GAC ACA GCA GGT C rU AGAGT/3SpC3/		
exon 3 KRAS Q61R	c.182A>G	CTC GAC ACA GCA GGT C rC AGAGT/3SpC3/		
exon 3 KRAS Q61P	c.182A>C	CTC GAC ACA GCA GGT C rG AGAGT/3SpC3/		
exon 3 KRAS Q61H	c.183A>T	TT CTC GAC ACA GCA GGTCA U GAGG C /3SpC3/		
exon 3 KRAS Q61H	c.183A>C	TT CTC GAC ACA GCA GGTCA rCGAGG C /3SpC3/		
exon 4 KRAS K117E	c.349A>G	TAT GGT CCT AGT AGG AAA T rGAA TG A/3SpC3/	CAC CCT GTC TTG TCT TTG CT (서열번호 11)	AGG AAA T AAATGT GAT TTG (서열번호 5)
exon 4 KRAS K117R	c.350A>G	AT GGT CCT AGT AGG AAA T ArGA TG TC/3SpC3/		
exon 4 KRAS K117N	c.351A>C	AT GGT CCT AGT AGG AAA T AArCTG TGC/3SpC3/		
exon 4 KRAS K117N	c.351A>T	AT GGT CCT AGT AGG AAA T AAUTG TGC/3SpC3/		
exon 4 KRAS A146P	c.436G>C	T CCT TTT ATT GAA ACA TCA rCCA AA T /3SpC3/	TCG AAC TAA TGT ATA GAA GGC A (서열번호 12)	ACA TCA GCA AAGAC (서열번호 6)
exon 4 KRAS A146T	c.436G>A	T CCT TTT ATT GAA ACA TCA rA CA AA T /3SpC3/		
exon 4 KRAS A146G	c.437C>G	CCT TTT ATT GAA ACA TCA GrGAAAG T /3SpC3/		
exon 4 KRAS A146V	c.437C>T	CCT TTT ATT GAA ACA TCA GUAAAG T /3SpC3/		
exon 4 KRAS A146A	c.438A>G	CCT TTT ATT GAA ACA TCA GC rGAAGA T/3SpC3/		
exon 4 KRAS A146A	c.438A>C	CCT TTT ATT GAA ACA TCA GC rCAAGA T/3SpC3/		
exon 4 KRAS A146A	c.438A>T	CCT TTT ATT GAA ACA TCA GC UAAGA T/3SpC3/		

[0088] 상기 [표 1]에서 rA, rG, U, rC는 RNA 염기서열이고, 3SpC3는 탄소 고리 3개의 spacer이다.

[0090] 본 발명의 일 실시예에 따른 방법에서 상기 증폭된 핵산의 농도는 형광 신호를 통해 파악되는 것일 수 있으며, 상기 형광 신호를 통해 단일 염기 서열 변이 유무, 변이된 염기의 종류, 변이의 정도 중 하나 이상에 대하여 분석가능한 것일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따른 방법에서 상기 증폭된 핵산의 농도는 형광 신호를 통해 파악되는 것일 수 있으며, 상기 형광 신호를 통해 단일 염기 서열 변이 유무, 변이된 염기의 종류, 변이의 정도 중 하나 이상에 대하여 분석가능한 것일 수 있다.

- [0092] 이하, 본 출원의 실시예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법의 구체적인 실험 예 및 특성 평가 결과가 설명된다.
- [0093] **실험재료, 실험방법 및 조건**
- [0094] 1. 실험 재료
- [0095] 본 실시예에서 사용된 모든 DNA는 IDT (Integrated DNA Technology)에서 제작되었다. RNase H II는 IDT에서 구입하였고, SYBR Green I 10000X, RNase/DNase free pure water는 thermofisher에서 구입하였다. PCR 증폭에 사용된 IQ supermix는 Biorad에서 구입하였다. PCR 분석은 CFX96에서 수행되었고, CFX maestro software에서 실험값이 분석되었다.
- [0097] 2. 실험 방법 및 조건 (아래의 PNA에 관한 정보 추가부탁드립니다)
- [0098] 1 μ L의 RNA forward primer DNA (2 μ M), 1 μ L의 reverse primer DNA (2 μ M), 2 μ L의 target DNA (1 pM), 1 μ L의 PNA(2 μ M), 1 μ L의 SYBR Green I 20X, 1 μ L의 RNase H II dilution (2.6 U/ μ L), 4 μ L의 RNase/DNase free pure water, 10 μ L의 IQ supermix를 섞어서 총 20 μ L를 제작하였다.
- [0099] 이후, CFX96/Dx real-time System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 PCR 증폭을 실시하였고, 온도 구배는 다음과 같이 설정하였다. preconditioning으로 95° C 3분, step 1에서 95° C 10초, step 2에서 65° C 30초 진행하고 다시 step 1로 돌아가는 cycle을 설정하여 총 40 cycle을 시행하였다. 실험이 끝나면 그 결과를 CFX Maestro software를 사용하여 분석하였다.
- [0100] 또한, 전기영동 실험 진행을 위해, 전기영동 장비로 WSE-1710 Submerge-Mini (ATTO, Daejeon, Korea)를 사용하였다. TBE buffer에 agarose gel 6%농도로 주조하여 gel을 만들었고, 전기 영동 장치에서 150 V, 20분동안 전압을 가해준 뒤, Gel Doc(Gel Doc XR+ Gel Documentation System, BIORAD, Laboratories, Hercules, CA, USA)로 촬영하였다.
- [0101] 타겟 DNA가 존재하는 혈장샘플은 혈장(citrated plasma)에 타겟 DNA를 인위적을 넣어서 준비하였다. 그리고, Qiagen circulating nucleic acid kit를 사용하여 혈장에서 다시 타겟 DNA를 추출한 뒤에 PNA + RNase H2 검출 기법에 활용하였다.
- [0103] **실시예**
- [0104] 1. KRAS Q61L 상 단일 염기 서열 변이 검출
- [0105] PNA 클램핑 기법과 리보뉴클리에이즈 단일 염기 서열 변이 인식 기법을 융합하여 KRAS Q61L변이를 중합효소 연쇄반응으로 검사하였다.
- [0106] 암 변이 염기중에 한 가지 KRAS Q61L 변이는 단일 염기 서열 변이로써 PNA 클램핑 기법과 리보뉴클리에이즈를 사용하여 변이가 없는 DNA와 변이가 있는 DNA를 구별하는지 여부에 대하여 실험하였다.
- [0107] 도 2는 KRAS Q61L 단일 염기 서열 변이에 대하여 PNA클램핑 기법이나 리보뉴클리에이즈를 사용했을 때, 그리고 같이 사용했을 때의 PCR증폭 결과를 나타내는 것이다. 증폭 결과, PNA 클램핑 기법 및 리보뉴클리에이즈를 융합한 경우가 각각을 따로 이용하여 증폭했을 때에 비해 신뢰도가 높은 단일 염기 서열 변이 구별 성능을 보여주었다.
- [0108] 또한, 변이가 없는 군(wild type)의 Δ Ct 값 또는 RFU 값의 상승이 PNA 클램핑 기법이나 리보뉴클리에이즈를 사용했을 때 증폭이 저지되었음을 알 수 있다.
- [0109] KRAS Q61L에서 동일 위치의 염기가 다른 세 가지의 염기로 바뀌는 KRAS Q61R, KRAS Q61P 변이도 발생할 수 있다. 각 변이들은 같은 원래의 염기가 다른 세 가지의 염기로 바뀌는 것이다. 본 발명의 일 실시예에 따른 방법을 이용하면, 단일 염기 서열 변이가 없는 군과 변이를 구별할 수 있을 뿐만 아니라, 같은 위치에서 서로 다른 변이로 각각 바뀌더라도 어떤 변이가 얼마큼 있는지 한 샘플을 분석하면서 서로 다른 형광 신호를 받아서 동시에 구별할 수 있는 장점이 있다.

[0111] 2. KRAS G12D의 증폭 실험 결과

[0112] molecular beacon의 형광/감광 원리를 활용하여 RNA 포워드 프라이머 DNA에 형광 분자와 감광 (quencher)를 추가하였다. RNase H 가 상보적인 DNA와 결합한 RNA 염기를 자르면 PCR 증폭이 이뤄지는데, RNA를 기준으로 좌우로 형광, 감광 분자의 거리가 멀어짐으로써 증폭이 일어난다는 신호를 받는 원리를 이용한 것이다.

[0113] 도 3은 KRAS G12D의 mutant DNA (푸른색), 대조군 실험 (회색) 증폭 결과를 각각 나타낸 것이다.

[0114] 실험 결과, RNase H의 RNA 염기 절단 효율이 주변에 어떤 화학기가 달려있는지에 따라 영향을 받는 것을 발견하였다. 이로써 i) 형광 감광이 가장 잘 발생하는 거리에서 설계한 RNA 포워드 프라이머 DNA와 ii) 형광 감광 효율은 조금 낮아도 RNase H의 기능에 영향을 미치지 않는 두 가지의 설계 조건을 최적화하는 것이 필요함을 알 수 있었다.

[0115] 도 4는 RNA 포워드 프라이머 DNA에 형광(F), 감광(Q) 분자를 태깅한 것을 활용하여 형광 분자와 감광 분자의 위치에 따른 KRAS G12D의 증폭 실험한 결과를 나타낸 것이다.

[0116] 위 실험을 통해서 RNA를 기준으로 RNA 포워드 프라이머 DNA에서 어느 위치에 형광, 감광 분자를 위치시켜야 하는지는 타겟 DNA가 들어가서 증폭할 때 RFU 값이 상승하는 ΔCt 값을 형광/감광이 없는 실험과 비교할 수 있었다.

[0118] 3. 형광-감광 분자의 거리 조절

[0119] RNA 포워드 프라이머 DNA의 염기에서 형광(Fluorescent) 분자와 감광(Quencher) 분자간의 거리를 조절하여 다음과 같이 설계하여 실험을 진행했다.

[0120] 거리는 DNA의 염기 숫자로 계산했고 본 실시예에서는 7, 12, 17, 22, 26 의 거리를 두어 설계하였다. (도 5B참고)

[0121] 대조군(Ref.)은 이전과 같이 형광이나 감광분자가 없는 군으로써 가장 RNase H 효소의 효율이 좋은 세트를 비교군으로 설정하였다.

[0122] 도 5A의 증폭 cycle 별 실시간 형광값을 도시한 결과를 보면, 형광과 감광 분자간의 거리가 멀어질수록 더욱 대조군과 비슷해지는 것을 관찰할 수 있었다. 형광, 감광 분자가 가까이에 있으면, RNase H 효소가 DNA와 잘 결합하지 못해서 절단하는 효율이 감소한 것이라 추측된다. RFU 값 500을 기준으로 각각의 실험군의 Cycle 수를 상대값으로 비교한 것을 도 5B에 나타내었다. 이를 통해 길이 26mer의 길이에서 가장 좋은 효소 효율을 나타냄을 확인하였다.

[0123] 본 실시예에서 사용된 RNA forward primer DNA 염기서열은 아래 [표 2](형광-감광 분자의 거리 및 R-fP서열)와 같다. 이들은 FAM 형광과 BHQ1 감광 분자가 같은 서열 내에서 거리만 차이를 두고 있다.

표 2

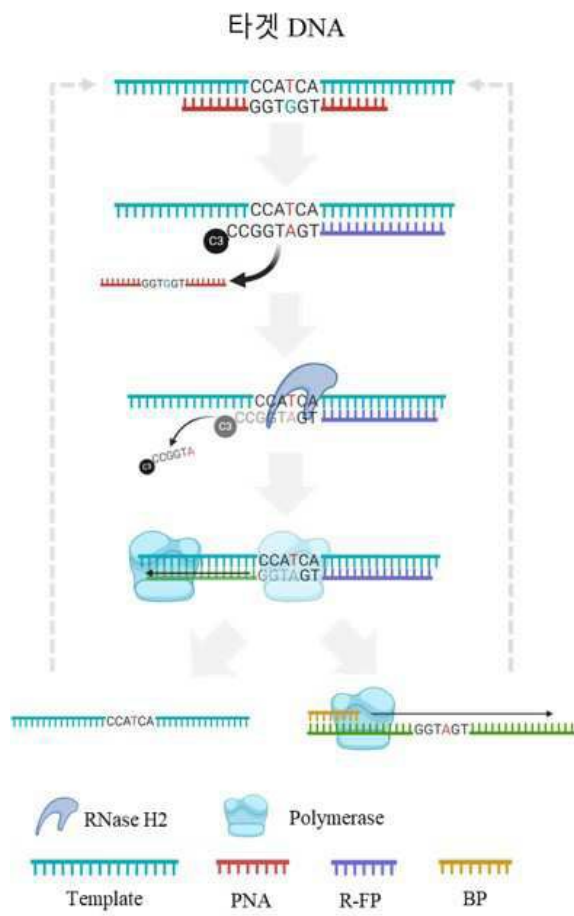
[0124]

거리	RNA 포워드 프라이머
대조군	AACT TGT GGT AGT TGG AGC T rA G TGG A /3SpC3/
26	/FAM/ AACT TGT GGT AGT TGG AGC T rA G TGG A /BHQ1/ /3SpC3/
22	AACT /FAM/ TGT GGT AGT TGG AGC T rA G TGG A /BHQ1/ /3SpC3/
17	AACT TGT GG /FAM/ T AGT TGG AGC T rA G TGG A /BHQ1/ /3SpC3/
12	AACT TGT GGT AGT T /FAM/ GG AGC T rA G TGG A /BHQ1/ /3SpC3/
7	AACT TGT GGT AGT TGG AGC /FAM/ T rA G TGG A /BHQ1/ /3SpC3/

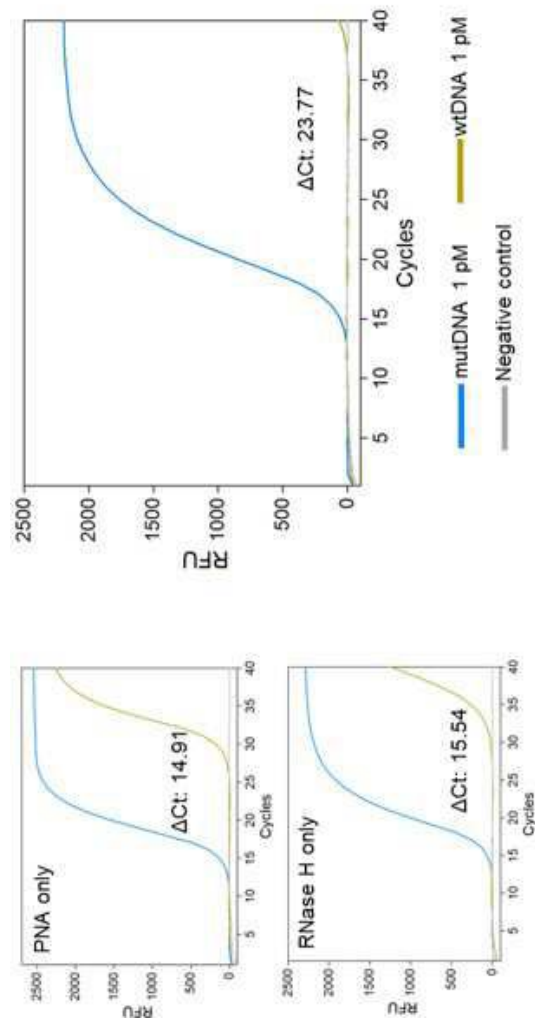
[0126] 이상, 본 발명을 바람직한 실시예를 사용하여 상세히 설명하였으나, 본 발명의 범위는 특정 실시예에 한정되는 것은 아니며, 첨부된 특허청구범위에 의하여 해석되어야 할 것이다. 또한, 이 기술분야에서 통상의 지식을 습득한 자라면, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않으면서도 많은 수정과 변형이 가능함을 이해하여야 할 것이다.

도면

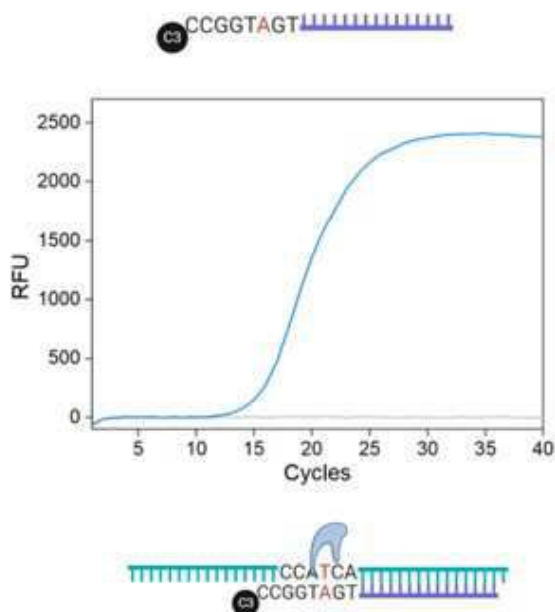
도면1



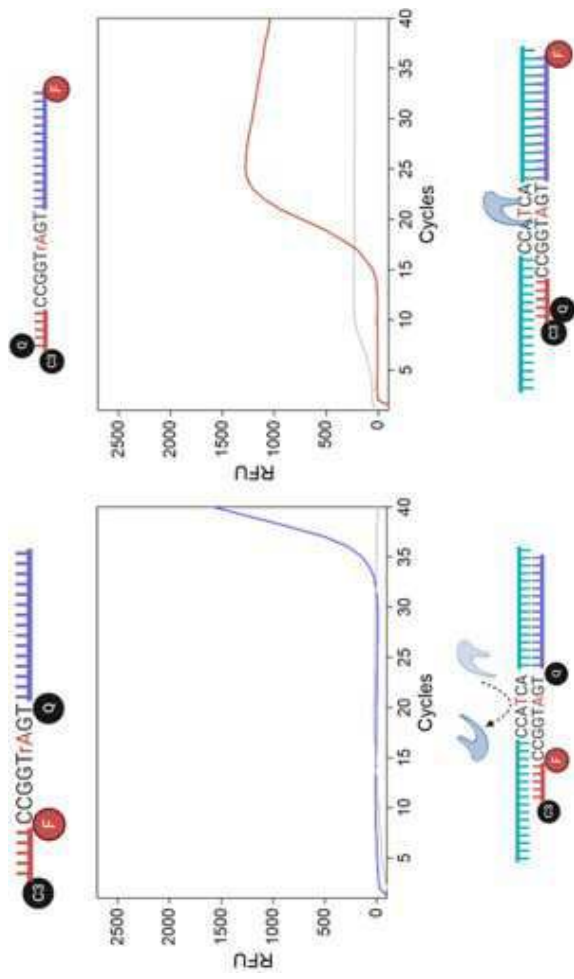
도면2



도면3



도면4



도면5

