



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0106842

(43) 공개일자 2023년07월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6844 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6844 (2018.05)

C12Q 2521/107 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0002482

(22) 출원일자 2022년01월07일

심사청구일자 2022년01월07일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)

(72) 발명자

김은정

인천광역시 연수구 송도문화로84번길 24, 207동
3505호(송도동, 송도 에듀포레 푸르지오)

김다인

인천광역시 연수구 먼우금로 149(동춘동, 품림연
수3차아파트)

이지영

인천광역시 계양구 임학안로 29, 2동 410호(임학
동, 한일아파트)

(74) 대리인

특허법인이플리온

전체 청구항 수 : 총 27 항

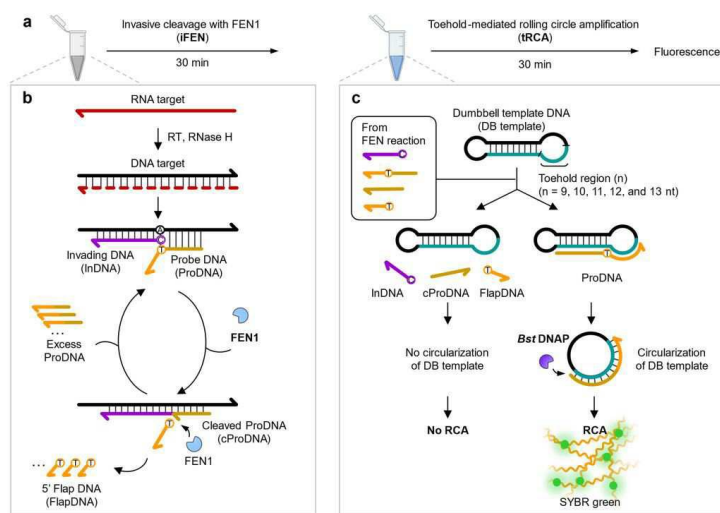
(54) 발명의 명칭 표적 핵산을 검출하기 위한 iFEN-tRCA 분석 방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 표적 핵산을 검출하기 위한 iFEN-tRCA 분석 방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 기존 분석 방법에 비해 실온에서 반응을 준비할 수 있어 편리하고, 2 단계의 반응을 통해 민감도 및 정확도가 개선된 분석 방법이다.

특히, 본 발명의 분석방법은 유방암 환자에서 HER2 표적 치료에 대한 적절한 모니터링 및 진단 도구로 제공될 수 있고, 나아가 새로운 질병 관련 염기서열에 적용할 수 있으므로 수많은 질병에 대한 바이오마커의 검출에 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2527/101 (2019.08)

C12Q 2527/107 (2019.08)

C12Q 2527/146 (2019.08)

C12Q 2563/107 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711128637
과제번호	2020R1F1A1066247
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기본연구지원사업
연구과제명	국가재난형 바이러스 감염의 신속 정확 검출을 위한 원스텝 다단계 등은 분자진단
기술 개발	
기 여 율	50/100
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415172714
과제번호	20009121
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	바이오산업기술개발-맞춤형진단치료제품
연구과제명	엑소좀 내 핵산 및 단백질 마커 다중검출을 통한 복막섬유증 조기진단 시스템 개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	인술주식회사
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

다음과 같은 단계를 순서로 포함하는, 표적 핵산을 검출하는 방법:

- (i) 표적 핵산을 InDNA 및 ProDNA와 혼성화하여 분기된 DNA 구조를 형성하는 단계;
- (ii) 상기 표적 핵산과 부분적으로 상보적 결합되어 있는 ProDNA를 FEN1으로 절단하는 단계;
- (iii) 덤벨 주형 DNA(DB template DNA), 형광물질 및 DNA 중합효소를 첨가하여 DNA 중합반응을 유도하는 단계; 및
- (iv) 형광 생성 유무에 따라 표적 핵산 유무를 판별하는 단계.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 (iv) 단계는 형광이 생성되지 않는 경우 표적 핵산이 존재하는 것으로 판별하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 표적 핵산은 단일 가닥 DNA인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 표적 핵산은 RNA이고, 상기 (i)단계는 역전사 반응을 통해 상기 RNA를 단일 가닥 DNA로 합성한 후 InDNA 및 ProDNA와 혼성화하여 분기된 DNA 구조를 형성하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 ProDNA는 표적 핵산과 1:2 ~ 1: 100,000의 몰비인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 DB template DNA는 ProDNA와 결합하는 toehold 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 toehold 영역은 5 ~ 15개의 뉴클레오티드(nt)로 이루어진 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 (i) 및/또는 (ii) 단계는 45 ~ 75℃ 중 임의의 등온 조건에서 반응시키는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 (iii) 단계는 45 ~ 75℃ 중 임의의 등온 조건에서 반응시키는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 InDNA의 용융 온도는 ProDNA의 용융 온도보다 10 ~ 25℃ 더 높은 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 InDNA는 3' 말단의 하나의 뉴클레오티드를 제외한 나머지 뉴클레오티드 서열과 표적 핵산과 완전히 상보적이고,

상기 ProDNA는 표적 핵산과 상보적인 cProDNA 및 표적 핵산과 상보적이지 않은 FlapDNA를 포함하고, 상기 cProDNA의 5' 말단은 상기 InDNA의 3' 말단의 하나의 뉴클레오티드에 의해 표적 핵산과 상보적 결합이 침입되어,

상기 InDNA, ProDNA 및 표적 핵산이 분지 구조를 형성하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 표적 핵산 검출 한계는 0.1 ~ 10pM인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 (i) 단계의 표적 핵산은 0.1pM ~ 100nM의 농도로 첨가하여 혼성화하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 형광물질은 SYBR green, SYBR green, SYBR Gold, EvaGreen, GelGreen, GelRed 및 berberine으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 DNA 중합효소는 Bst 2.0 DNA Polymerase, Phi29 DNA Polymerase, EquiPhi29 DNA Polymerase, Bst DNA Polymerase (large fragment), Bst 3.0 DNA Polymerase, Bsu DNA Polymerase (large fragment), DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment, Klenow Fragment (3' → 5' exo-), Vent DNA Polymerase, Vent (Exo-) DNA Polymerase, Deep Vent DNA Polymerase, 및 Deep Vent (Exo-) DNA Polymerase으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 16

InDNA, ProDNA, DB template DNA, 형광물질 및 DNA 중합효소를 포함하는, 표적 핵산 검출용 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 조성물은 완충액, dNTP, BSA, Recombinant albumin, DTT, $MgCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$, Mg_2SO_4 , KCl, Potassium acetate, Magnesium acetate, Triton X-100, Tween 20, SYBR Green, EvaGreen, GelGreen, GelRed, Rox, RNase H, single-stranded DNA binding protein (SSB), T4 gene 32 protein, pyrophosphatase 및 RNase inhibitor으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 표적 핵산은 RNA 및/또는 단일가닥 DNA인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 19

제16항에 있어서,

상기 ProDNA는 표적핵산과 1:2 ~ 1: 100,000의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 20

제16항에 있어서,

상기 DB template DNA는 ProDNA와 결합하는 toehold 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 21

제16항에 있어서,

상기 toehold 영역은 5 ~ 15개의 뉴클레오티드(nt)로 이루어진 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 22

제16항에 있어서,

상기 InDNA의 용융 온도는 ProDNA의 용융 온도보다 10 ~ 25℃ 더 높은 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 23

제16항에 있어서,

상기 InDNA는 3' 말단의 하나의 뉴클레오티드를 제외한 나머지 뉴클레오티드 서열과 표적 핵산과 완전히 상보적이고,

상기 ProDNA는 표적 핵산과 상보적인 cProDNA 및 표적 핵산과 상보적이지 않은 FlapDNA를 포함하고,

상기 cProDNA의 5' 말단은 상기 InDNA의 3' 말단의 하나의 뉴클레오티드에 의해 표적 핵산과 상보적 결합이 침입되어, 상기 InDNA, ProDNA 및 표적 핵산이 분지 구조를 형성하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 24

제16항에 있어서,

상기 표적 핵산 검출 한계는 0.1 ~ 10pM인 것을 특징으로 할 수 있는, 조성물.

청구항 25

제16항에 있어서,

상기 형광물질은 SYBR green, SYBR Gold, EvaGreen, GelGreen, GelRed 및 berberine으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 26

제16항에 있어서,

상기 DNA 중합효소는 Bst 2.0 DNA Polymerase, Phi29 DNA Polymerase, EquiPhi29 DNA Polymerase, Bst DNA Polymerase (large fragment), Bst 3.0 DNA Polymerase, Bsu DNA Polymerase (large fragment), DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment, Klenow Fragment (3' → 5' exo-), Vent DNA Polymerase, Vent (Exo-) DNA Polymerase, Deep Vent DNA Polymerase, 및 Deep Vent (Exo-) DNA Polymerase으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 27

제16항 내지 제26항의 조성물을 포함하는, 표적 핵산 검출용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 표적 핵산을 검출하기 위한 iFEN-tRCA 분석 방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 더 상세하게는 표적 핵산을 InDNA 및 ProDNA와 혼성화하여 분기된 DNA 구조를 형성하는 단계, 상기 ProDNA를 FEN1으로 절단하는 단계, 덤벨 주형 DNA(DB template DNA), 형광물질 및 DNA 중합효소를 첨가하여 DNA 중합반응을 유도하는 단계 및 형광 생성 유무에 따라 표적 핵산 유무를 판별하는 단계를 순서대로 포함하는 표적 핵산을 검출하는 방법, InDNA, ProDNA, DB template DNA, 형광물질 및 DNA 중합효소를 포함하는 표적 핵산 검출용 조성물 및 상기 조

성물을 포함하는 표적 핵산 검출용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 바이오마커(biomarker)는 일반적으로 단백질이나 DNA, RNA, 대사 물질 등을 이용해 신체의 변화를 알아 낼 수 있는 지표이다. 특히, 특정 질병에 대한 바이오마커는 질병을 조기에 진단하고 효과적으로 치료하기 위해 사용된다. 예컨대, 유방암 바이오마커로는 인간표피성장인자수용체 2(human epidermal growth factor receptor 2, HER2), 에스트로겐 수용체(estrogen receptor, ER) 및 프로게스테론 수용체(progesterone receptor, PR)등이 있다. HER-2는 1987년 Dr. Slamon이 Science지에 발표한 것으로서, HER-2 단백질이 과발현된 유방암환자가 정상인 환자에 비하여 무병생존기간이 짧고 재발율이 높다는 점이 보고되었다. 또한, 약 15-30% 유방암 환자의 ERBB2 발현이 고도로 증폭되며, HER2 매개 신호 전달 경로가 활성화된다고 알려져 있다.
- [0004] 임상 실습에서 일반적으로 유방암 조직에서의 HER2 단백질 또는 ERBB2 유전자의 과발현 및 증폭은 면역조직화학염색, 발색제자리부합법, 은제자리부합법 또는 형광제자리부합법으로 스크리닝된다. 면역조직화학(Immunohistochemistry, IHC) 염색의 경우 정량분석이 어렵고 낮은 감도와 위양성 결과로 결국 형광제자리부합법(Fluorescence in situ hybridization, FISH)를 이용한 HER2 발현 확인이 동시에 이뤄져야 하고, 발색제자리부합법(Chromogenic in situ hybridization, CISH)의 경우 아직 감도가 FISH 대비 충분하지 않고, 다중검출에 한계가 있다. FISH의 경우, 시간소모적인 반응이 요구되고, 형광을 이용하므로 감도는 개선되나 이미징하는 동안 형광의 세기가 줄어드는(bleaching) 단점이 있고, 세포를 면역조직화학적으로 충분히 분석하기 어려운 점이 있다(Molecules 2020, 25(8), 1864). 또한 이러한 스크리닝 방법은 침습적 절차에 의존한다는 문제점이 있다. 유방촬영술(mammography), 유방 초음파술(Breast Ultrasonography), 유방 MRI 등의 유방암 진단을 위한 영상 기술은 유방암 초기 단계의 진단 및 모니터링에 효과적이지 않고, 유방암 조직의 품질 및 항체 친화도와 RNA 분해 등과 같은 기타 요인이 진단 결과의 신뢰성에 영향을 미치는 문제점이 있다.
- [0005] 유전자 발현 프로파일링은 수천 개의 유전자의 활성 수준을 동시에 측정하는 방법으로, 질병의 예후 척도로 사용된다. 이는 같은 질병 단계에 있는 환자들이 치료에 매우 다르게 반응 할 수 있고 예후가 매우 다르기 때문에 유용하다. 또한, RNA 카피(copies)의 양이 작은 경우 표준 조직병리학적 및 면역조직화학적 분석으로는 원하는 결과를 도출할 수 없으나, 마이크로어레이, 역전사-실시간 중합효소 연쇄 반응(RT-qPCR) 및 RNA 시퀀싱을 사용한 유전자 발현 프로파일링은 더 나은 임상 결과를 제공할 수 있다. 다만, 유전자 발현 프로파일링은 일반적으로 비용이 많이 들고, 시간이 오래 걸리는 프로브 설계 및 데이터 분석과 같은 프로세스를 포함한다. 따라서, 데이터 분석을 위해 덜 복잡하면서도 각 표적 유전자를 정확, 신속, 민감하게 검출할 수 있는 효율적인 방법이 필요한 실정이다.
- [0006] 한편, 실시간 중합효소 연쇄반응(qPCR)은 열에 안정한 DNA 중합효소에 의해 템플릿 가닥을 기하급수적으로 증폭시키기 위해 정밀하게 조정된 열 순환이 필요하지만, 느리고 에너지 소모적인 열 순환에 의해 PCR 가용성이 제한된다. 따라서, 등은 증폭 접근법을 개발하기 위한 상당한 노력이 있었다. 등은 증폭 접근법은 높은 가닥치환 활성을 갖는 DNA 중합효소 및 엔도뉴클레아제를 비롯한 다양한 핵산 처리 효소를 사용하여 증폭 단계의 반복 주기를 이용한다. 예컨대, 가닥변위증폭(strand displacement amplification, SDA)는 가닥 해리 및 가닥 치환 DNA 중합효소와 특이적 제한 엔도뉴클레아제, 니킹효소증폭반응(nicking enzyme amplification reaction, NEAR)은 가닥 치환 DNA 중합효소와 니킹(nicking) 엔도뉴클레아제에 의존하므로 열 변성 단계가 필요하지 않다.
- [0007] 롤링원형증폭(Rolling Circle Amplification, RCA)은 qPCR에 비해 주기가 짧고, 강한 가닥 변위 및 교정 능력을 가진 DNA 중합효소를 사용하여 매우 적은 양의 표적 유전자로부터 DNA를 성공적으로 증폭시킬 수 있으며, 일정한 온도에서 원형 템플릿을 지속적으로 복제할 수 있다. RCA에서 사용되는 원형 템플릿은 표적에 특이적으로 반응하도록 설계할 수 있다는 장점이 있다. 다만, 기존의 RCA 과정에서는 선형 주형 DNA가 프라이머(또는 표적)로 어닐링되고, DNA 리가아제에 의해 효소적 반응을 통해 원형 주형 DNA가 형성되므로 과정이 복잡하고 시간이 오래 걸린다는 문제점이 있다.
- [0009] 따라서, 본 발명자들은 기존의 표적 핵산 검출 방법과 비교하여 선택성 및 민감성이 크게 향상되고 반응 시간이 단축된 차세대 표적 핵산 검출 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, 표적 특이적 2개의 프라이머(InDNA 및 ProDNA) 및 구조 특이적 엔도뉴클레아제(flap endonuclease 1, FEN1)를 이용한 침습적 절단(iFEN) 반응을 통해 등은 조건에서 효과적으로 긴 표적 핵산에 대하여 선택적으로 민감하게 신호를 증폭시킬 수 있으며, 덤벨 모양

의 주형(DB templates)을 사용하여 annealing, ligation 등의 추가 단계가 필요하지 않은 RCA반응을 통해 등은 조건에서 1시간 이내에 10pM 미만의 검출 한계를 제공할 수 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 표적 핵산을 검출하기 위한 iFEN-tRCA 분석 방법 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 다음과 같은 단계를 순서로 포함하는, 표적 핵산을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0014] (i) 표적 핵산을 InDNA 및 ProDNA와 혼성화하여 분기된 DNA 구조를 형성하는 단계,
- [0015] (ii) 상기 표적 핵산과 부분적으로 상보적 결합되어 있는 ProDNA를 FEN1으로 절단하는 단계,
- [0016] (iii) 덤벨 주형 DNA(DB template DNA), 형광물질 및 DNA 중합효소를 첨가하여 DNA 중합반응을 유도하는 단계 및
- [0017] (iv) 형광 생성 유무에 따라 표적 핵산 유무를 판별하는 단계.
- [0018] 본 발명에 있어서, 상기 (iv) 단계는 형광이 생성되지 않는 경우 표적 핵산이 존재하는 것으로 판별하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 표적 핵산은 단일 가닥 DNA인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 표적 핵산은 RNA이고, 상기 (i)단계는 역전사 반응을 통해 상기 RNA를 단일 가닥 DNA로 합성한 후 InDNA 및 ProDNA와 혼성화하여 분기된 DNA 구조를 형성하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 ProDNA는 표적 핵산과 1:2 ~ 1: 100,000의 몰비인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 DB template DNA는 ProDNA와 결합하는 toehold 영역을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0023] 본 발명에 있어서, 상기 toehold 영역은 5 ~ 15개의 뉴클레오티드(nt)로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 (i) 및/또는 (ii) 단계는 45 ~ 75℃ 중 임의의 등은 조건에서 반응시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 (iii) 단계는 45 ~ 75℃ 중 임의의 등은 조건에서 반응시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 InDNA의 용융 온도는 ProDNA의 용융 온도보다 10 ~ 25℃ 더 높은 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 InDNA는 3' 말단의 하나의 뉴클레오티드를 제외한 나머지 뉴클레오티드 서열과 표적 핵산과 완전히 상보적이고, 상기 ProDNA는 표적 핵산과 상보적인 cProDNA 및 표적 핵산과 상보적이지 않은 FlapDNA를 포함하고, 상기 cProDNA의 5' 말단은 상기 InDNA의 3' 말단의 하나의 뉴클레오티드에 의해 표적 핵산과 상보적 결합이 침습되어, 상기 InDNA, ProDNA 및 표적 핵산이 분지 구조를 형성하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 표적 핵산 검출 한계는 0.1 ~ 10pM인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0029] 본 발명에 있어서, 상기 (i)단계의 표적 핵산은 0.1pM ~ 100nM 농도로 첨가하여 혼성화하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 형광물질은 SYBR green, SYBR Gold, EvaGreen, GelGreen, GelRed 및 berberine으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 중합효소는 Bst 2.0 DNA Polymerase, Phi29 DNA Polymerase, EquiPhi29 DNA Polymerase, Bst DNA Polymerase (large fragment), Bst 3.0 DNA Polymerase, Bsu DNA Polymerase (large fragment), DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment, Klenow Fragment (3' → 5' exo-), Vent DNA Polymerase, Vent (Exo-) DNA Polymerase, Deep Vent DNA Polymerase, 및 Deep Vent (Exo-) DNA Polymerase으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 본 발명은 또한, InDNA, ProDNA, DB template DNA, 형광물질 및 DNA 중합효소를 포함하는 표적 핵산 검출용 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 완충액, dNTP, BSA, Recombinant albumin, DTT, MgCl₂, (NH₄)₂SO₄, Mg2SO₄, KCl, Potassium acetate, Magnesium acetate, Triton X-100, Tween 20, SYBR Green, EvaGreen, GelGreen, GelRed, Rox, RNase H, single-stranded DNA binding protein (SSB), T4 gene 32 protein, pyrophosphatase 및 RNase inhibitor으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 표적 핵산은 RNA 및/또는 단일가닥 DNA인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 ProDNA는 표적 핵산과 1:2 ~ 1: 100,000의 물비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 DB template DNA는 ProDNA와 결합하는 toehold 영역을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 toehold 영역은 5 ~ 15개의 뉴클레오티드(nt)로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 InDNA의 용융 온도는 ProDNA의 용융 온도보다 10 ~ 25℃ 더 높은 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 InDNA는 3' 말단의 하나의 뉴클레오티드를 제외한 나머지 뉴클레오티드 서열과 표적 핵산과 완전히 상보적이고, 상기 ProDNA는 표적 핵산과 상보적인 cProDNA 및 표적 핵산과 상보적이지 않은 FlapDNA를 포함하고, 상기 cProDNA의 5' 말단은 상기 InDNA의 3' 말단의 하나의 뉴클레오티드에 의해 표적 핵산과 상보적 결합이 침입되어, 상기 InDNA, ProDNA 및 표적 핵산이 분지 구조를 형성하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 표적 핵산 검출 한계는 0.1 ~ 10pM인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 형광물질은 SYBR green, SYBR Gold, EvaGreen, GelGreen, GelRed 및 berberine으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 중합효소는 Bst 2.0 DNA Polymerase, Phi29 DNA Polymerase, EquiPhi29 DNA Polymerase, Bst DNA Polymerase (large fragment), Bst 3.0 DNA Polymerase, Bsu DNA Polymerase (large fragment), DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment, Klenow Fragment (3' → 5' exo-), Vent DNA Polymerase, Vent (Exo-) DNA Polymerase, Deep Vent DNA Polymerase, 및 Deep Vent (Exo-) DNA Polymerase으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0045] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 포함하는, 표적 핵산 검출용 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0047] 본 발명의 iFEN-tRCA 분석 방법은 표적(target) 핵산을 신속하고 민감하게 선택적으로 검출할 수 있으며, 상기 표적 핵산은 엔도뉴클레아제-특이적 인식 서열이 필요하지 않으므로 모든 표적 핵산을 검출하는 데 본 발명에 따른 분석 방법을 적용할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0049]

도 1은 표적 RNA(RNA target)를 검출하기 위한 iFEN-tRCA 분석방법의 개략도에 관한 것이다. 표적 RNA를 검출하기 위한 iFEN-tRCA 분석방법은 침습성 플랩 엔도뉴클레아제 1-매개 절단(invasive flap endonuclease 1-mediated cleavage, 이하, 'iFEN'이라 한다.) 반응 및 toehold-mediated rolling circle amplification(이하, 'tRCA'이라 한다.) 반응의 두 단계로 진행된다(도 1a). 표적 특이적 2개의 프라이머(InDNA 및 ProDNA)를 사용하면 의도한 표적 DNA(DNA target) 서열에 대한 특이성이 증가하고, 2개의 프라이머가 독특한 분지 DNA 구조를 형성하면, iFEN 매개 절단이 발생하여 FlapDNA 및 cProDNA와 같은 절단 생성물이 형성된다(도 1b). 절단되지 않은 ProDNA는 덤벨 모양의 주형 (Dumbbell template, 이하, 'DB template'라 한다.) DNA에 자유롭게 결합하여 tRCA 기반 신호 증폭을 시작하며, 형광이 증가된다(도 1c). 따라서, 본 발명에 따른 iFEN-tRCA 분석방법에서, 총 형광 강도(fluorescence intensity, 이하 'FI'라 한다.)는 표적 RNA 농도에 반비례한다.

도 2는 도 1a의 FEN1에 의한 침습적 절단(iFEN) 반응에 관한 것이다. 도 2a는 1) 표적 RNA로부터 역전사효소(RT)로 합성한 단일 표적 DNA와 표적 특이적 2개의 프라이머(InDNA 및 ProDNA)의 혼성화, 2) FEN1에 의한 절단 및 3) FlapDNA와 cProDNA의 해리 주기를 통한 단일 표적 DNA에 대한 다중 ProDNA 절단의 개략도이다. 도 2b는 iFEN 제품의 20% 네이티브(상단) 및 변성(하단) PAGE 분석이고, 도 2c는 다양한 농도의 표적 DNA(0-1 μ M)에 대한 iFEN 반응으로 인한 형광 강도(FI) 변화이다. 표적 DNA 대비 과량의 FProDNA(상단) 또는 등몰의(equimolar) FProDNA(하단)를 반응 혼합물에 첨가하였다. FI 변화량은 $FI - FI_0$ 로 계산하며, FI는 FEN1가 존재할 때 iFEN 생성물들의 FI를, FI_0 는 FEN1가 존재하지 않을 때 iFEN 생성물들의 FI를 나타낸다. 각 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 표시된다. (**p < 0.001, **p < 0.01, t-Test 기반)

도 3은 도 1a의 DB template DNA를 사용한 tRCA 분석에 관한 것이다. 도 3a는 서로 다른 toehold 도메인(n = 9, 10, 11, 12 및 13 nt)을 포함하는 DB template 이 있는 tRCA 과정을 나타낸다. iFEN 반응에서 분해되지 않은 ProDNA는 DB template이 존재하는 상태에서 tRCA 과정을 통해 선택적으로 증폭될 수 있다. 도 3b는 ProDNA, cProDNA 및 FlapDNA를 포함한 다양한 DNA 가닥의 추가로 인해 서로 다른 DB template의 toehold 길이가 tRCA 효율성에 미치는 영향을 나타낸다. 완충액(buffer)은 대조군으로 사용되었다. 도 3c는 다양한 농도의 ProDNA(0 ~ 50 nM)에 따른 tRCA 반응의 실시간 형광 신호 변화를 나타내고, 도 3d는 ProDNA 투여량에 따른 형광 강도를 나타낸다. 각 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 표시된다. (**p < 0.001, two-way ANOVA 후 Tukey의 post-hoc test 기반)

도 4는 37° C에서 NUPACK에 의해 예측된 다양한 toehold 길이를 가진 DB template의 2차 구조와 자유 에너지 및 평형 염기쌍 확률(equilibrium base-pairing probabilities)에 관한 것이다. 주황색으로 표시된 부분은 ProDNA가 결합하는 서열이다.

도 5는 다양한 toehold 길이를 가진 DB template을 사용한 tRCA의 실시간 형광 분석에 관한 것이다. 도 5a는 DB9, 도 5b는 DB10, 도 5c는 DB11, 도 5d는 DB12, 도 5e DB13에 대한 형광 분석이다. ProDNA, cProDNA 및 FlapDNA를 포함한 다양한 DNA 가닥을 50nM의 농도로 반응시켰다. 대조군으로 RCA master mix에 DB template만 추가하여 반응시켰고, 대조군에서는 시간이 지남에 따라 눈에 띄는 배경 신호가 없음을 확인하였다. 각 데이터는 선과 음영으로 표시되며, 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 표시된다.

도 6은 60° C에서 NUPACK으로 시뮬레이션한 DB/ProDNA 복합체(도 6a 내지 6e), DB/FlapDNA 복합체(도 6f 내지 6j), DB/cProDNA 복합체(도 6k 내지 6o) 및 DB/ProDNA/FlapDNA/cProDNA 복합체(도 6p 내지 6t)의 ensemble pair fraction plots 관한 것이다. 또한, 도 6은 특정 종의 염기쌍(base-pairing)의 평형 분획(equilibrium fraction)을 나타낸다. 열의 각 점은 평형 상태에서 해당 염기가 짝을 이루지 않은 주어진 종의 가닥 비율을 나타낸다. 각 DNA 가닥의 농도는 200nM으로 설정하였다. DB/ProDNA 복합체가 가장 우세하였고, free DB, ProDNA, FlapDNA 및 cProDNA 복합체의 몇몇 2차 구조도 우세하였다.

도 7은 iFEN 및 tRCA 반응의 최적화에 관한 것이다. 도 7a는 50 ~ 60.4°C 범위의 다양한 온도에서 FEN1 및 고정 온도(50°C)에서 Bst2.0 DNAP와 반응한 후 표적 DNA(5nM)의 부재 또는 존재 하에서 생성된 RCA 생성물의 형광 강도를 나타낸다. 도 7b는 고정 온도(56.2°C)에서 FEN1 및 50에서 65°C로 증가하는 온도에서 Bst 2.0 DNA Polymerase와 반응한 후 표적 DNA(5 nM) 및/또는 FEN1의 부재 또는 존재에서 생성된 RCA 생성물의 형광 강도를 나타낸다. 각 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 표시된다.

도 8은 다양한 FEN1 반응 온도에서 5nM의 표적 DNA 유무에 따른 iFEN-tRCA의 실시간 형광 분석에 관한 것이다. 도 8a는 50° C, 도 8b는 52.1° C, 도 8c는 54.2° C, 도 8d는 56.2° C, 도 8e는 58.3° C, 도 8f는 60.4° C에서의 반응을 나타낸다. tRCA는 50° C에서 수행하였다. 각 데이터는 선과 음영으로 표시되며, 세 번의 독립적인

실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 표시된다.

도 9은 다양한 RCA 반응 온도에서 5 nM의 표적 DNA 유무에 따른 iFEN-tRCA의 실시간 형광 분석에 관한 것이다. 도 9a는 50° C, 도 9b는 55°C, 도 9c는 60°C 및 도 9d는 65°C에서의 반응을 나타낸다. 반응은 FEN1의 부재 또는 존재 하에 수행하였고, 56.2°C의 고정 온도에서 수행하였다. 각 데이터는 선과 음영으로 표시되며, 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 표시된다.

도 10는 iFEN 반응에서 ProDNA와 InDNA의 표적 DNA와의 혼성체화(hybridization) 비교에 관한 것이다. 도 10a는 형광 강도를 나타내고, 도 10b, 10c 및 10d는 5nM의 표적 DNA의 유무에 따른 iFEN-tRCA의 실시간 형광 강도 변화를 나타낸다. ProDNA 및 InDNA는 동결-해동(도 10b), 열 어닐링(도 10c), 간단한 혼합(도 10d)을 통해 표적 DNA에 결합된다. 도 10a에서 각 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 표시된다. 중요도(significance)는 two-way ANOVA에 이어 Turkey's post-hoc test를 기반으로 하였다. 도 10b, 10c 및 10d에서 각 데이터는 선과 음영으로 표시되며, 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 표시된다.

도 11은 iFEN-tRA 분석의 분석적 민감도와 특이도에 관한 것이다. 도 11a는 시간에 따른 FI 증폭 곡선을, 도 11b는 다양한 표적 DNA 농도에 따른 FI를 나타낸다. 도 11c는 0.5 nM 및 5nM 농도에서 단일 뉴클레오타이드 변화(mm1, mm2 및 mm3)가 없거나(pm) 있는 다양한 유형의 표적에 대한 형광 강도를 나타낸다. 일치하지 않는 뉴클레오타이드는 표적 서열에서 빨간색으로 표시하였다. ProDNA, InDNA 및 표적 DNA 혼성화의 개략도는 서열과 함께 표시하였다. 각 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 표시된다.

도 12는 합성 표적 RNA 또는 세포에서 분리된 RNA 추출물을 사용한 분석 성능에 관한 것이다. 도 12a는 일련의 RT, iFEN 및 tRCA 반응으로 구성된 전체 분석의 개략도를 나타낸다. 도 12b는 다양한 표적 RNA 농도에 따른 형광 반응을 나타낸다. ERBB2를 검출하기 위한 합성 표적 RNA를 RT 반응을 통해 cDNA로 전환하고 iFEN-tRCA 분석에 직접 사용하였다. 도 12c는 각각 ERBB2(표적) 및 PPP1R1B(비표적)에 대한 NRT 및 RT 시료(samples)를 포함한 다양한 시료에 대한 형광 반응을 나타낸다. NTC 샘플은 대조군으로도 사용하였다. 도 12d는 ERBB2 표적에 대한 NRT 및 RT 시료를 포함한 다양한 샘플의 형광 반응을 나타낸다. HCC1954 및 HCC1143 세포에서 분리된 총 RNA 추출물을 사용하여 각각 NRT 및 RT 시료를 얻었다. 각 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 표시된다. 도 12e는 qRT-PCR 분석에서 얻은 HCC1954 및 HCC1143 세포에서 GAPDH, β -액틴(ACTIN) 및 ERBB2 유전자의 역치 주기(Cycle threshold, Ct) 값을 나타낸다. 각 데이터는 세 번의 생물학적 복제를 위한 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 표시된다. (*p < 0.05, *p < 0.01, **p < 0.001, two-way ANOVA 후 Tukey의 post-hoc test 기반)

도 13은 RT 반응에서 얻은 cDNA의 PAGE 분석에 관한 것이다. 도 13a는 RT 반응 후 cDNA의 형성을 보여주는 20% Native PAGE 결과를 나타낸다: 레인 1, 표적 RNA; 레인 2, 역전사효소가 있는 RT 시료(sample); 레인 3, 역전사효소가 없는 NRT 시료(sample). 도 13b는 짧은 RT 프라이머를 사용할 때 낮은 RT 효율을 나타내는 20% 변성 PAGE 결과를 나타낸다: 레인 1, 표적 DNA; 레인 2, 역전사효소가 있는 RT 시료(sample); 레인 3, 역전사효소가 없는 NRT 시료(sample). 생성된 RNA-cDNA 이중체를 RNase H로 처리하여 RNA 가닥을 선택적으로 소화시켰다.

도 14는 다양한 농도의 합성 ERBB2 표적 RNA를 사용한 iFEN-tRCA 분석의 실시간 형광 분석에 관한 것이다. 각 데이터는 선과 음영으로 표시되며, 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 표시된다.

도 15는 5 nM의 ERBB2(양성) 및 PPP1R1B(음성) 표적 RNA를 사용한 iFEN-tRCA 분석의 실시간 형광 분석에 관한 것이다. 역전사효소가 없는 대조군(no reverse transcriptase control, NRT) 및 표적 RNA이 없는 대조군(no RNA target control, NTC) 시료(sample)들을 사용하였다. 각 데이터는 선과 음영으로 표시되며, 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 표시된다.

도 16은 HCC1954 및 HCC1143 세포에서 분리된 RNA 추출물을 사용한 iFEN-tRCA 분석의 실시간 형광 분석에 관한 것이다. 역전사효소가 없는 대조군(no reverse transcriptase control, NRT) 및 표적 RNA이 없는 대조군(no RNA target control, NTC) 시료(sample)들을 사용하였다. 각 데이터는 선과 음영으로 표시되며, 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 표시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0050]

- [0052] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0054] 본 발명은 (1) 표적 특이적 2개의 프라이머(InDNA(Invading DNA) 및 ProDNA(Probe DNA))를 표적 핵산과 혼성화시켜 분지 구조의 DNA를 형성하게 하여 FEN1으로 표적 핵산과 상보적으로 결합하지 않은 부분(FlapDNA)을 침습적 절단(iFEN)시키는 단계 및 (2) ProDNA와 상보적으로 결합하는 toehold 영역을 포함하는 덤벨 주형 DNA(DB template DNA)를 사용하여 형광 생성 여부에 따라 핵산 유무를 판별할 수 있는 RCA 단계를 포함하는 고도로 선택적이고 제어 가능한 등은 핵산 검출 방법을 완성하였다.
- [0056] 본 발명에 따른 표적 핵산 검출하기 위한 iFEN-tRCA 분석방법은 긴 표적 핵산을 검출하는데 있어서 기존 분석방법에 비해 다음과 같은 장점이 있다.
- [0057] 본 발명은 수십 내지 수천 bp 길이의 표적 핵산을 검출하는데 활용할 수 있다.
- [0058] 본 발명은 1시간 이내에 10 pM 미만의 유전자를 성공적으로 증폭시킬 수 있고, 단일 염기 수준까지 정교하게 선택적으로 검출할 수 있다.
- [0059] 본 발명에서 플랩 엔도뉴클레아제 1(Flap structure-specific endonuclease 1, 이하 'FEN1'이라 한다.) 반응은 서열이 아닌 기질의 구조에 의존하므로, 표적(target)에 엔도뉴클레아제-특이적 인식 서열(endonuclease-specific recognition sequence)이 필요하지 않다. 이에 따라, 본 발명의 분석방법을 사용하여 모든 표적 핵산 서열을 검출할 수 있다.
- [0060] 본 발명에서 사용되는 Flap structure-specific endonuclease 1(이하, 'FEN1'이라 한다)를 포함하는 일부 엔도뉴클레아제(예컨대, 이중 특이적 뉴클레아제(duplex specific nuclease), 제한 엔도뉴클레아제(restriction endonuclease))는 엑소뉴클레아제-기반(exonuclease-based) 프로브 분해와 달리 예측 가능한 서열을 가진 별개의 단편을 생성할 수 있다. 이에, 생성된 단편을 활용하여 본 발명에서 분자 진단 분석의 민감성을 향상시키는 연속신호증폭을 개발할 수 있다.
- [0061] 본 발명은 덤벨 모양의 주형(DB templates)을 사용하여 annealing, ligation 등의 추가 단계가 필요하지 않기 때문에 Rolling Circle Amplification(이하, 'RCA'이라 한다.) 단계가 간편하고, 신속하게 진행된다. 기존의 RCA 과정에서는 선형 주형 DNA가 프라이머(또는 표적)로 어닐링되고, DNA 리가아제에 의해 효소적으로 close되어 원형 주형 DNA를 형성한다. 한편, 본 발명에 따른 iFEN-tRCA 분석에서는 이미 봉인된 주형 DNA를 사용하므로 DNA 원형화를 위해 별도의 ligase를 이용한 ligation 단계가 필요 없다.
- [0062] 본 발명은 핵산의 등은 증폭을 기반으로 하며, 열안정성을 가진 FEN1 및 Bst 2.0 DNA Polymerase의 특성으로 인해 50 ~ 60℃의 온도 범위에서 수행된다. 기존의 분석방법에 비해 상대적으로 높은 온도에서 진행되므로, 실온의 bench에서 반응을 준비할 수 있어 편리하고, 효소로부터 억제제를 방출하기 위한 별도의 활성화 단계가 필요하지 않다.
- [0063] 본 발명은 특히, 두 가지 기본 효소(FEN1 및 Bs 2.0 DNAP) 반응에 대하여 iFEN-tRCA 분석의 검출 성능을 최대화하기 위해 다양한 조건에서 신중하게 설계하여 최적화시켰다. 본 발명에서 iFEN 및 tRCA 반응을 위한 각 master mix를 사용하여 빠른 신호 증폭을 위한 대상을 제외한 모든 필요한 구성 요소를 포함하는 사용이 간편하고 안정화된 제형을 제공할 수 있다.
- [0064] 본 발명은 qPCR 방법보다 시간이 적게 들고, 과정이 간단하여 효율적이다.
- [0065] 본 발명은 세척 단계나 효소 비활성화 단계가 없는 균질한(homogenous) 2단계 반응으로 이루어지며, 분석 시간이 2회의 배양 절차에 의해서만 제한된다.
- [0066] 본 발명은 생물학적 시료에서 상대적인 ERBB2 mRNA 발현을 평가할 수 있으며, 나아가 새로운 질병 관련 염기서열에 빠르게 적용할 수 있으므로, 수많은 질병에 대한 바이오마커의 검출이 가능하다. 따라서 새로운 바이오마커 발견 및 검출 시스템 발전을 통해 본 발명의 분석방법이 체외진단 도구에 상당한 발전을 가져올 수 있다.

- [0068] 따라서, 본 발명은 일관점에서 다음과 같은 단계를 순서로 포함하는, 표적 핵산을 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [0069] (i) 표적 핵산을 InDNA(Invading DNA) 및 ProDNA(Probe DNA)와 혼성화하여 분기된 DNA 구조를 형성하는 단계,
- [0070] (ii) 상기 표적 핵산과 부분적으로 상보적 결합되어 있는 ProDNA를 FEN1으로 절단하는 단계,
- [0071] (iii) 덤벨 주형 DNA(DB template DNA), 형광물질 및 DNA 중합효소를 첨가하여 DNA 중합반응을 유도하는 단계 및
- [0072] (iv) 형광 생성 유무에 따라 표적 핵산 유무를 판별하는 단계.
- [0073] 본 발명에 있어서, 상기 (iv) 단계는 형광이 생성되지 않는 경우 표적 핵산이 존재하는 것으로 판별하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0074] 본 발명에 있어서, 상기 표적 핵산은 단일 가닥 DNA인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0075] 본 발명에 있어서, 상기 표적 핵산은 RNA이고, 상기 (i) 단계는 역전사 반응을 통해 상기 RNA를 단일 가닥 DNA로 합성한 후 InDNA 및 ProDNA와 혼성화하여 분기된 DNA 구조를 형성하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0076] 본 발명에 있어서, 상기 ProDNA는 표적 핵산과 1:2 ~ 1:100,000, 바람직하게는 1:2 ~ 1:50,000, 더 바람직하게는 1:2 ~ 1:10,000의 몰비인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0077] 본 발명에 있어서, 상기 DB template DNA는 ProDNA와 결합하는 toehold 영역을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0078] 본 발명에 있어서, 상기 DB template DNA는 ProDNA와 결합하는 toehold 외에도 덤벨 형태를 형성하기 위하여 stem 및 두 개의 loop 부분에 추가적인 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0079] 본 발명에서, 상기 (ii) 단계에서 사용하는 ProDNA의 flap 부위 염기서열에 따라 toehold 길이가 달라질 수 있으므로, flap 부위가 길어질 경우 toehold 길이 역시 길어질 수 있다
- [0080] 본 발명에 있어서, 상기 toehold 영역은 5 내지 15개, 바람직하게는 7 내지 13개, 더 바람직하게는 9 내지 11개의 뉴클레오티드(nt)로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0081] 본 발명에 있어서, Toehold 길이가 5nt보다 짧을 경우, DB template의 stem 길이가 상대적으로 매우 길어 열역학적 안정성이 증가하므로 ProDNA에 의해 stem이 풀리지 않아 신호 발생이 거의 없을 수 있다.
- [0082] 본 발명에 있어서, 상기 stem 부분은 5 ~ 30 개의 뉴클레오티드(nt)로, 상기 loop 부분은 5 ~ 30개의 뉴클레오티드(nt)로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0083] 본 발명에 있어서, 상기 (i) 및 (ii) 단계의 반응 온도는 효소의 활성 온도 및/또는 DNA 혼성화 반응에 의존적인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0084] 본 발명에 있어서, 상기 (i) 및/또는 (ii) 단계는 45 ~ 75℃ 바람직하게 47.5 ~ 70℃, 더 바람직하게 50 ~ 65℃ 중 임의의 등은 조건에서 반응시키는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0085] 본 발명에 있어서, 상기 (iii) 단계의 반응 온도는 효소의 활성 온도 및/또는 DNA 혼성화 반응에 의존적인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0086] 본 발명에 있어서, 상기 (iii) 단계는 45 ~ 75℃, 바람직하게 47.5 ~ 70℃, 더 바람직하게 50 ~ 65℃ 중 임의의 등은 조건에서 반응시키는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0087] 본 발명에 있어서, 상기 InDNA의 용융 온도는 ProDNA의 용융 온도보다 10 ~ 25℃ 더 높은 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0088] 본 발명에 있어서, 상기 InDNA는 3' 말단의 하나의 뉴클레오티드를 제외한 나머지 뉴클레오티드 서열과 표적 핵산과 완전히 상보적이고, 상기 ProDNA는 표적 핵산과 상보적인 cProDNA 및 표적 핵산과 상보적이지 않은 FlapDNA를 포함하고, 상기 cProDNA의 5' 말단은 상기 InDNA의 3' 말단의 하나의 뉴클레오티드에 의해 표적 핵산과 상보적 결합이 침입되어, 상기 InDNA, ProDNA 및 표적 핵산이 분지 구조를 형성하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0089] 본 발명에 있어서, 상기 InDNA는 5 ~ 50개, 바람직하게는 5 ~ 30개의 뉴클레오티드(nt)로 이루어진 것을 특징으로

로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0090] 본 발명에 있어서, 상기 ProDNA는 15 ~ 40개, 바람직하게는 20 ~ 35개의 뉴클레오티드(nt)로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0091] 본 발명에 있어서, 상기 FlapDNA는 5 ~ 20개, 바람직하게는 5~ 15개의 뉴클레오티드(nt)로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0092] 본 발명에 있어서, 상기 cProDNA는 5 ~ 50개, 바람직하게는 5-30개의 뉴클레오티드(nt)로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0093] 본 발명에 있어서, 상기 표적 핵산 검출 한계는 0.1 ~ 10pM, 바람직하게는 1 ~ 10pM인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0094] 본 발명에 있어서, 상기 (i)단계의 표적 핵산은 0.1pM ~ 100nM, 바람직하게는 0.5pM ~ 100nM, 더 바람직하게는 1pM ~ 100nM농도로 첨가하여 혼성화하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0095] 본 발명에 있어서, 상기 형광물질은 SYBR green, SYBR Gold, EvaGreen, GelGreen, GelRed 및 berberine으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0096] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 중합효소는 strand displacement가 가능한 중합효소인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0097] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 중합효소는 Bst 2.0 DNA Polymerase, Phi29 DNA Polymerase, EquiPhi29 DNA Polymerase, Bst DNA Polymerase (large fragment), Bst 3.0 DNA Polymerase, Bsu DNA Polymerase (large fragment), DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment, Klenow Fragment (3' → 5' exo-), Vent DNA Polymerase, Vent (Exo-) DNA Polymerase, Deep Vent DNA Polymerase, 및 Deep Vent (Exo-) DNA Polymerase으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0099] 본 발명은 다른 관점에서 InDNA, ProDNA, DB template DNA, 형광물질 및 DNA 중합효소를 포함하는 표적 핵산 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0100] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 완충액, dNTP, BSA, Recombinant albumin, DTT, MgCl₂, (NH₄)₂SO₄, Mg₂SO₄, KCl, Potassium acetate, Magnesium acetate, Triton X-100, Tween 20, SYBR Green, EvaGreen, GelGreen, GelRed, Rox, RNase H, single-stranded DNA binding protein (SSB), T4 gene 32 protein, pyrophosphatase 및 RNase inhibitor으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0101] 본 발명에 있어서, 상기 표적 핵산은 RNA 및/또는 단일가닥 DNA인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0102] 본 발명에 있어서, 상기 ProDNA는 표적 핵산과 1:2 ~ 1: 100,000의 몰비로 포함되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0103] 본 발명에 있어서, 상기 DB template DNA는 ProDNA와 결합하는 toehold 영역을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0104] 본 발명에 있어서, 상기 toehold 영역은 5 ~ 15개의 뉴클레오티드(nt)로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0105] 본 발명에 있어서, 상기 InDNA의 용융 온도는 ProDNA의 용융 온도보다 10 ~ 25℃ 더 높은 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0106] 본 발명에 있어서, 상기 InDNA는 3' 말단의 하나의 뉴클레오티드를 제외한 나머지 뉴클레오티드 서열과 표적 핵산과 완전히 상보적이고, 상기 ProDNA는 표적 핵산과 상보적인 cProDNA 및 표적 핵산과 상보적이지 않은 FlapDNA를 포함하고, 상기 cProDNA의 5' 말단은 상기 InDNA의 3' 말단의 하나의 뉴클레오티드에 의해 표적 핵산과 상보적 결합이 침입되어, 상기 InDNA, ProDNA 및 표적 핵산이 분지 구조를 형성하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0107] 본 발명에 있어서, 상기 InDNA는 5 ~ 50개, 바람직하게는 5 ~ 30개의 뉴클레오티드(nt)로 이루어진 것을 특징으로

로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0108] 본 발명에 있어서, 상기 ProDNA는 15 ~ 40개, 바람직하게는 20 ~ 35개의 뉴클레오티드(nt)로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0109] 본 발명에 있어서, 상기 FlapDNA는 5 ~ 20개, 바람직하게는 5~ 15개의 뉴클레오티드(nt)로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0110] 본 발명에 있어서, 상기 cProDNA는 5 ~ 40개, 바람직하게는 5-30개의 뉴클레오티드(nt)로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0111] 본 발명에 있어서, 상기 표적 핵산 검출 한계는 0.1 ~ 10pM, 바람직하게는 1 ~ 10pM인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0112] 본 발명에 있어서, 상기 형광물질은 SYBR green, SYBR Gold, EvaGreen, GelGreen, GelRed 및 berberine으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다..
- [0113] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 중합효소는 strand displacement가 가능한 중합효소인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0114] 본 발명에 있어서, 상기 DNA 중합효소는 Bst 2.0 DNA Polymerase, Phi29 DNA Polymerase, EquiPhi29 DNA Polymerase, Bst DNA Polymerase (large fragment), Bst 3.0 DNA Polymerase, Bsu DNA Polymerase (large fragment), DNA Polymerase I Large (Klenow) Fragment, Klenow Fragment (3' → 5' exo-), Vent DNA Polymerase, Vent (Exo-) DNA Polymerase, Deep Vent DNA Polymerase, 및 Deep Vent (Exo-) DNA Polymerase으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0116] 본 발명은 또다른 관점에서 상기 조성물을 포함하는, 표적 핵산 검출용 키트에 관한 것이다.
- [0117] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 표적 핵산 특이적 프라이머, 주형 DNA, 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소으로 구성된 군에서 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 할 수 있다.
- [0118] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 버퍼, DNA 중합효소 보조인자 및 데옥시리보뉴클레오티드-5-트리포스페이트와 같은 표적 핵산 증폭 반응(예컨대, PCR 반응)을 실시하는데 필요한 시약을 선택적으로 포함할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 또한 다양한 폴리뉴클레오티드 분자, 역전사효소, 다양한 버퍼 및 시약, 및 DNA 중합효소 활성을 억제하는 항체를 포함할 수 있다. 또한, 상기 키트는 특정 반응에서 사용되는 시약의 최적량은, 본 명세서에 개시사항을 습득한 당업자에 의해서 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 장비는 앞서 언급된 구성 성분들을 포함하는 별도의 포장 또는 컴파트먼트(compartment)로 제작될 수 있다.
- [0120] 본 발명에서 용어 "핵산"은 뉴클레오타이드의 중합체를 의미한다. 예를 들어 유전체 DNA; 상보 DNA(cDNA)(이는 보통 전령 RNA(mRNA)의 역전사 또는 증폭으로 얻어지는 mRNA의 DNA 표현임); 합성으로 또는 증폭으로 생성된 DNA 분자; 및 mRNA를 포함한 임의의 형태의 DNA 또는 RNA를 포함한다.
- [0121] 상기 핵산은 단일 가닥 분자뿐만 아니라 이중 또는 삼중 가닥 핵산을 포함한다. 이중 또는 삼중 가닥 핵산에서, 핵산 가닥은 동연(coextensive)일 필요는 없다. 즉, 이중 가닥 핵산은 양 가닥의 전체 길이를 따라 이중 가닥일 필요는 없다.
- [0122] 또한, 상기 핵산은 메틸화 및/또는 캡핑과 같은 것에 의한 이의 임의의 화학적 개질을 포함한다. 핵산 개질은 개별적인 핵산 염기 또는 핵산 전체에 추가적인 전하, 분극률, 수소 결합, 정전기 상호작용, 및 기능성을 포함하는 화학기의 첨가를 포함할 수 있다. 이러한 개질은 2' 위치 당 개질, 5' 위치 피리미딘 개질, 8' 위치 퓨린개질, 시토신 환외(exocyclic) 아민에서의 개질, 5-브로모-우라실의 치환, 주쇄 개질, 이소염기 이소시티딘 및 이소구아니딘과 같은 특이 염기 쌍 조합 등과 같은 염기 개질을 포함할 수 있다.
- [0123] 본 발명에서 용어 "서열"은 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산의 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산은 DNA, RNA, 또는 그의 유사체(예컨대, 포스포로티오에이트 유사체)일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산은 개질된 염기 및/또는 골격(예컨대, 개질된 포스페이트 연결부 또는 개질된 당 모이어티)도 또한 포함할 수 있다. 핵산에 안정성 및/또는 다른 이점을 부여하는 합성 골격의 비-제한적 예시는 포스포로티오에이트 연결부, 펩타이드 핵산, 잠금 핵산, 자일로스핵산 또는 그의 유사체를 포함할 수 있다.

- [0124] 본 발명에서 용어 "표적 핵산"은 검출하고자 하는 모든 종류의 핵산을 의미하며, 서로 다른 종(species), 아종(subspecies), 또는 변종(variant) 유래의 염색체 염기서열 또는 동일 종 내 염색체 돌연변이를 포함한다. 이는 genomic DNA와 mitochondrial DNA, viral DNA를 포함하는 모든 종류의 DNA 또는 mRNA, ribosomal RNA, non-coding RNA, tRNA, viral RNA 등을 포함하는 모든 종류의 RNA를 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0125] 본 발명에서 용어 "프로브(Probe)"는 하나 이상 유형의 화학 결합을 통하여, 일반적으로 상보적 염기쌍 형성을 통하여, 보통 수소 결합 형성을 통하여 상보적인 서열의 표적 핵산에 결합하고 따라서 이중나선(duplex) 구조를 형성할 수 있는 핵산이다. 프로브는 "프로브 결합 부위"에 결합 또는 혼성화한다. 특히, 일단 프로브가 프로브의 상보적인 표적에 혼성화하면 프로브의 검출을 용이하게 하도록 프로브는 검출가능한 표지로 표지될 수 있다. 그러나 대안적으로, 프로브는 표지화되지 않을 수 있지만, 표지화된 리간드와의 특이적 결합에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출될 수 있다. 프로브는 크기가 상당히 다양할 수 있다. 일반적으로 프로브는 길이가 적어도 7 내지 15개 뉴클레오타이드다. 다른 프로브는 길이가 적어도 20, 30 또는 40개 뉴클레오타이드다. 또 다른 프로브는 다소 더 길며, 길이가 적어도 50, 60, 70, 80, 또는 90개 뉴클레오타이드다. 또 다른 프로브는 더욱 더 길며, 길이가 적어도 100, 150, 200개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드다. 프로브는 또한 상기 값(예컨대, 길이가 15~20개 뉴클레오타이드)의 임의의 값으로 한정된 임의의 범위 내에 있는 임의의 길이의 것일 수 있다.
- [0126] 본 발명에 있어서, 프로브 설계는 프로브 DNA가 표적 핵산의 인식 부위에 노출되어 등온에서 표적 핵산과 proDNA(probe DNA) 및 InDNA(invading DNA)세트의 혼성화를 가능하게 한다.
- [0127] 상기 프로브에 포함되어 있는 "표적 핵산에 결합 또는 연결되는 부위"는 핵산 서열 일부분과 상보적인 서열을 가져 표적 핵산과 혼성화 될 수 있는 서열을 의미한다. 예를 들어, 상기 "표적 핵산에 결합 또는 연결되는 부위"은 표적 핵산의 일부분과 90% 이상, 바람직하게는 95% 이상 상보적인 서열을 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 "표적 핵산에 결합 또는 연결되는 부위"는 표적 핵산에 따라 적절히 그 길이를 조절할 수 있고, 특정 길이로 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 표적 핵산이 miRNA인 경우, "표적 핵산에 결합 또는 연결되는 부위"는 22개 내외의 뉴클레오타이드로 구성될 수 있으나, mRNA인 경우, "표적 핵산에 결합 또는 연결되는 부위"는 그보다 짧거나 더 길 수 있다.
- [0128] 본 발명에 있어서, 상기 InDNA(Invading DNA)는 표적 핵산 서열 일부분과 상보적인 서열을 가지며 3' 말단의 단일 또는 그 이상의 염기서열이 표적 핵산과 ProDNA간 염기쌍에 침투하도록 설계된 핵산이다.
- [0129] 본 발명에서 용어 "혼성화"는 상보적 염기서열을 가진 단일가닥 핵산들 간 수소결합에 의해 이중가닥 핵산이 형성되는 것을 의미하며, 어닐링(annealing)과 유사한 의미로 사용된다. 다만 조금 더 넓은 의미에서, 혼성화는 두 개의 단일가닥 간 염기서열이 완전히 상보적인 경우(perfect match)와 더불어 예외적으로 일부의 염기서열이 상보적이지 않은 경우(mismatch)까지 포함한다.
- [0130] 본 발명에서 용어 "상보"는 2개의 뉴클레오타이드 사이의 정확한 쌍형성에 대한 능력을 지칭한다. 즉, 핵산의 주어진 위치에서 뉴클레오타이드가 다른 핵산의 뉴클레오타이드와 수소 결합을 할 수 있다면, 2개의 핵산은 그 위치에서 서로 상보적인 것으로 여겨진다. 뉴클레오타이드의 일부만이 결합하여 2개의 단일 가닥 핵산 분자 사이의 상보성은 "부분적"일 수 있거나, 또는 전체 상보성이 단일 가닥 분자 사이에 존재할 때 상보성은 완전할 수 있다. 핵산 가닥 사이의 상보성의 정도는 핵산 가닥 사이의 혼성화의 효율 및 강도에 상당한 영향을 미친다.
- [0132] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않은 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명한 것이다.
- [0134] (실시예)
- 실시예 1**
- [0135] 실험 재료 및 방법
- [0136] (실시예 1-1) 실험에 사용된 재료에 대한 정보
- [0137] 모든 DNA/RNA 올리고뉴클레오타이드는 Integrated DNA Technologies(미국 아이오와주)에서 구입하여 수정없이 사

용하였다(표 1). T4 DNA ligase, exonuclease I 및 III(Exo I 및 Exo III), flap endonuclease 1(FEN1), Bst 2.0 DNA 중합효소(Bst 2.0 DNAP), RNase H, RNase 억제제, 극도의 열안정성 단일 가닥 DNA 결합 단백질(ET SSB) 및 데옥시뉴클레오타이드(dNTP) 용액 믹스는 New England Biolabs(영국)에서 구입하였다. SYBRTM green I, SYBRTM gold nucleic acid stain, BlueJuice™ 겔 로딩 완충액(buffer), 10X TBE 완충액(1M Tris, 900mM 붕산, 10mM EDTA, pH 8.3), oligo(dT)20 프라이머, 고품질 cDNA 역전사 키트 및 PowerUp™ SYBR Green master mix는 Thermo Fisher Scientific(미국 매사추세츠)에서 구입하였다. miRNEASy 미니 키트는 Qiagen(미국)에서 구입하였다. Thermo Fisher Scientific에서 얻은 Nuclease-free deionized water(NF water)를 샘플 용액 준비에 사용하였다.

표 1

실험에 사용된 합성 올리고뉴클레오타이드 서열

Name		Sequence (5' to 3')	Modification
DNA target	DNA target	TCAGAATCCACAAAGACTCCCCAGTGCTGTTCTCTT CCAACGAGGCTGG	-
DNA target with one mismatch	DNA target mm1	TCAGAATCCACAAAGACTCCCCGTGCTGTTCTCTT CCAACGAGGCTGG	-
	DNA target mm2	TCAGAATCCACAAAGACTCCCCG [^] GTGCTGTTCTCTT CCAACGAGGCTGG	-
	DNA target mm3	TCAGAATCCACAAAGACTCCCCG [^] GTGCTGTTCTCTT CCAACGAGGCTGG	-
Invading DNA	InDNA	GCCTCGTTGGAAGAGGAACAGCACC	-
Probe DNA	ProDNA	CACTGATGTTAT [^] GGGGAGTCTTTGT	-
Fluorescently labelled probe DNA	FProDNA	CACTGATGTT*ATGGGGAGTCTTTGT	*Fluorescein dT modification / 3' Iowa Black FQ modification
Cleaved probe DNA	cProDNA	GGGGAGTCTTTGT	-
Flap DNA	Flap DNA	CACTGATGTTAT	-
Dumbbell template DNA with 9 nt toehold	DB9	CTTTGTCCCCCCCCACAAAGACTCCCCATA [^] ACATCA GTCAACAATATGGGGAGT	5' Phosphorylation
Dumbbell template DNA with 10 nt toehold	DB10	CTTTGTCCCCCCCCACAAAGACTCCCCATA [^] ACATCA GTCAACAACATGGGGAGT	5' Phosphorylation
Dumbbell template DNA with 11 nt toehold	DB11	CTTTGTCCCCCCCCACAAAGACTCCCCATA [^] ACATCA GTCAACAACCTGGGGAGT	5' Phosphorylation
Dumbbell template DNA with 12 nt toehold	DB12	CTTTGTCCCCCCCCACAAAGACTCCCCATA [^] ACATCA GTCAACAACCCGGGGAGT	5' Phosphorylation
Dumbbell template DNA with 13 nt toehold	DB13	CTTTGTCCCCCCCCACAAAGACTCCCCATA [^] ACATCA GTCAACAACCCCGGGAGT	5' Phosphorylation
ERBB2 RNA target	ERBB2 RNA target	CCAGCCUCGUUGAAGAGGAACAGCACUGGGGAGUCU UUGUGGAUUCUGA	-
Reverse transcription primer for ERBB2 RNA target	ERBB2 RT primer	TCAGAATCC	-
PPP1R1B RNA target	PPP1R1B RNA target	ACUCUAUCCUACCCUGUUUGUCUCUCCCCUCGC CUGCUAGGGCUGC	-
Reverse transcription primer for PPP1R1B RNA target	PPP1R1B RT primer	GCAGCCCT	-

표 1에서 DNA target의 InDNA에 대한 상보서열은 GTGCTGTTCTCTTCCAACGAGGC이고, ProDNA에 대한 상보 서열은 ACAAAGACTCCCC에 해당한다. 침입 서열의 하나의 뉴클레오타이드는 굵게 표시된다. 표적 DNA 서열과 비교하여 단일 뉴클레오타이드 변화(mm1, mm2 및 mm3)가 있는 표적 DNA 서열의 하나의 불일치가 굵게 표시된다. ^(^) 표시는 절단 부위(cleavage site)를 나타낸다.

또한, DB template의 stem 부분은 밑줄로 표시하였으며, 그 외 부분은 DB template의 두 개의 loop 염기서열에

해당하고, Toehold 부분은 기울임꼴로 표시하였다. 따라서, 밑줄로 표시되지 않은 부분 중 기울임꼴로 표시된 염기서열을 포함한 부분은 toehold 부위를 포함하는 loop 염기서열이다.

[0143] (실시예 1-2) FEN1을 이용한 침습적 절단(iFEN)을 기반으로 신호를 증폭하는 반응

[0144] FEN 1의 구조 특이적 절단 활성은 단일 가닥 5' flap DNA를 나타내는 분지형 DNA 구조를 인식하고 절단하는지 여부를 확인하기 위하여 조사하였다. 10 μ L의 최종 부피에서 다양한 양의 합성 표적 DNA를 InDNA(400nM), ProDNA(400nM) 및 FEN1(1.6U/ μ L)과 함께 1X ThermoPol[®] 반응 완충액(20mM Tris-HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 10mM KCl, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, pH 8.8)에서 다른 온도로 30분 동안 배양하였다. 이후, 반응을 얼음에 쿼칭(quench)하고 rolling circle amplification(RCA)을 통한 후속 신호 증폭에 직접 사용하였다. 생성된 생성물을 0.5X TBE 완충액의 20% 천연 및 변성 폴리아크릴아미드 겔에서 추가로 분해하고 실온에서 30분 동안 0.5X TBE의 1X SYBR gold nucleic acid stain으로 후염색(post-stained)을 하였다. 형광은 ChemiDoc XRS+ 겔 이미징 시스템(Bio-Rad Laboratories, 미국 캘리포니아)에 의해 검출하였다. 캡처한 이미지를 자르고 ImageJ 소프트웨어(미국 국립 보건원)를 사용하여 분석을 위해 대비 반전시켰다.

[0145] FEN1 보조 FlapDNA 누적 생성을 정량적으로 분석하기 위해 3' 말단에 Iowa black quencher가 있고 내부 티민 핵염기에 플루오레세인(fluorescein) (FAM) 염료가 있는 형광 표지된 ProDNA(FProDNA)를 사용하였다. 표적 DNA(0-1,000 nM)과 비교하여 과량의 FProDNA(400 nM)를 InDNA(400 nM) 및 FEN1(1.6 U/ μ L)으로 처리하고 56.2 ° C에서 30분 동안 배양하였다. 비교를 위해 표적 DNA에 대한 1:1 몰비의 FProDNA도 정확한 양의 InDNA 및 FEN1 과 반응시켰다. 실시간 형광 측정은 ThermoFisher Scientific의 QuantStudio[™] 5 Real-Time PCR 시스템을 사용하여 수행하였다. 30분에서의 상대 형광 강도 변화를 종말점(end-point) 형광 값으로 사용하였다. 형광 강도 (FI) 변화는 FI - FI₀으로 계산하며, FI는 FEN1의 존재 하에 시료(sample)의 형광 강도를 의미하고, FI₀은 FEN1의 부재 하에 시료의 형광 강도를 의미한다.

[0147] (실시예 1-3) 덩벨 모양의 주형 DNA(DB templates DNA) 제조

[0148] DB template DNA는 T4 DNA ligase를 사용한 효소적 ligation 반응에 의해 제조한다. 먼저 다양한 toehold 영역 (n = 9, 10, 11, 12 및 13 nt)이 있는 5' 인산화된 선형 주형 DNA(4 μ M)를 1X ligation 완충액(50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM ATP, 10mM DTT, pH 7.5)에서 70° C에서 10분 동안 가열하고 25° C로 천천히 냉각하여 어닐링하였다. 2 μ L의 T4 DNA ligase(16 U/ μ L)를 첨가하여 nick 부위를 화학적으로 연결하는 반응을 25°C에서 2 시간 동안 수행한 후 65°C에서 10분 동안 T4 DNA ligase 를 불활성화시켰다. 이후 잔류 단일 가닥 및 봉인되지 않은 주형 DNA를 분해하기 위하여 ligate된 주형 DNA를 1X exonuclease 반응 완충액(10mM Bis-Tris-Propane-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, pH 7)에서 37° C로 1시간 동안 Exo I 및 Exo III로 처리하였다. Exo I 및 III를 80 ° C에서 15분 동안 비활성화한 후, 생성된 DB templates(2 μ M)을 -20° C에서 저장하여 RCA 반응에 추가로 사용하였다. 준비된 DB templates를 0.5x TBE에서 15% native PAGE로 추가 분석한 후 1x SYBR gold nucleic acid stain으로 후 염색을 하였다. 겔 이미지는 ChemiDoc XRS+ 겔 영상 시스템을 통해 얻었고, ImageJ 소프트웨어를 사용하여 처리하였다.

[0150] (실시예 1-4) NUPACK 분석

[0151] 핵산 패키지(Nucleic acid package, NUPACK) 알고리즘을 사용하면 평형 상태에서 상호 작용하는 가닥 종류들의 임의의 수를 포함하는 시험관에서 핵산 서열의 열역학적 분석이 가능하다. 이 분석을 통해 각 가닥 종류의 주어진 농도에서 희석 용액에 있는 가능한 정렬된 복합체의 평형 염기쌍 정보를 예측할 수 있다(J Comput Chem 32: 170-173, 2011). 이를 위하여 먼저 각 DB template의 2차 구조와 37°C에서의 자유 에너지를 예측하였다. 그 후 DB template와 ProDNA의 혼성화 효율을 추정하기 위해, DB template 서열에 완전히 또는 부분적으로 상보적인 다양한 DNA 가닥 종류(ProDNA, Flap DNA 및 cProDNA)를 사용하여 DB template를 계산하였다. DB/ProDNA, DB/Flap DNA, DB/cProDNA 및 DB/ProDNA/Flap DNA/cProDNA 복합체를 포함하는 복합체를 공식화하기 위해 각 가닥의 초기 농도를 200nM으로 설정하고 NUPACK 프로그램을 고온(60 °C)에서 실행하였다.

[0153] (실시예 1-5) Toehold를 매개로 하는 RCA(tRCA) 반응

[0154] DB 주형 DNA는 상보적인 ProDNA가 완전히 풀리고 DB template에 혼성화되도록 하여 RCA 과정을 시작하는 다양한 toehold 서열($n = 9, 10, 11, 12$ 및 13 nt)을 갖도록 설계되었다. 일반적인 RCA 반응은 $1\times$ RCA 반응 완충액 (20mM Tris-HCl, 10mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50mM KCl, 2mM MgSO_4 , 0.1% Tween 20, pH 8.8)에서 DB templates(200 nM), ProDNA $2\text{ }\mu\text{L}$ (DB templates의 RCA 효율 스크리닝을 위한 50 nM 또는 RCA 민감도 평가를 위한 다양한 농도), dNTP mix(1mM), MgSO_4 (6mM), SYBR green($2.5\times$) 및 Bst 2.0 DNAP($80\text{mU}/\mu\text{L}$)로 구성된 $20\text{ }\mu\text{L}$ 의 반응 부피로 수행된다. 반응 혼합물을 얼음에서 제조하였다. RCA는 반응 혼합물을 60°C (toehold 효과를 스크리닝하기 위한 온도) 또는 50°C (최적화된 조건)에서 1 시간 동안 배양하기 시작하고 80°C 에서 20 분 동안 Bst 2.0 DNAP를 비활성화하여 종료하였다. 형광은 QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System을 사용하여 실시간으로 측정하였다. 배경 보정은 순신호 변화(net signal changes)를 얻기 위해 해당 시료(sample)의 형광 강도(FI)에서 초기 형광 측정값을 빼는 방식으로 하였다. 30 분에 3 개의 독립적인 실험 반복의 평균 형광 강도(FI)를 사용하여 실험군 간의 상대적 형광 변화를 비교하였다.

[0156] (실시예 1-6) 분석 성능의 최적화

[0157] 분석은 FEN1 보조 절단 반응과 RCA를 사용한 신호 증폭을 결합하여 수행하였으며 다양한 온도에서 최적화시켰다. $1\times$ ThermoPol® 반응 완충액(총 부피: $10\text{ }\mu\text{L}$)에 InDNA(400 nM), ProDNA(400 nM) 및 FEN1($1.6\text{ U}/\mu\text{L}$)을 포함하는 $1\times$ FEN master mix(master mix)에 $2\text{ }\mu\text{L}$ 의 표적 DNA를 첨가하였다. 온도($50, 52.1, 54.2, 56.2, 58.3, 60.4^\circ\text{C}$)에서 30 분 동안 반응시키고, 반응을 방지하기 위해 얼음과 함께 보관하였다. 그 후, $2.5\text{ }\mu\text{L}$ 의 FEN1 반응 혼합물을 $1\times$ RCA 반응 완충액에서 DB10 template(200nM), dNTP mix(1mM), MgSO_4 (6mM), SYBR green ($2.5\times$) 및 Bst 2.0 DNAP($80\text{mU}/\mu\text{L}$)으로 구성된 $1\times$ RCA master mix와 결합하였다. RCA 반응은 상기와 동일한 방법으로 진행하였으며, 반응 온도는 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 로 다양하였다.

[0158] 개발된 분석의 감도는 최적화된 반응 온도(FEN1 반응의 경우 56.2°C 및 RCA 반응의 경우 50°C)에서 25pM 에서 25nM 범위의 농도 범위의 표적 DNA를 사용하여 평가하였다. InDNA와 ProDNA의 접합부(DNA target mm1, mm2 및 mm3)에서 하나의 불일치 뉴클레오티드를 보유하는 다양한 표적 DNA에 대해 특이성 테스트를 수행하였다.

[0160] (실시예 1-7) 세포 배양 및 세포 펠렛(pellet) 준비

[0161] 인간 유방암 세포주 HCC1954(ATCC® CRL-2338™) 및 HCC1143(ATCC® CRL-2321™)은 American Type Culture Collection(ATCC, US)에서 구입하였다. 세포를 5% CO_2 와 함께 37°C 에서 10% (v/v)의 태아소혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 $100\text{U}/\text{mL}$ 의 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 RPMI 1640 배지(Gibco)에서 배양하였다. 세포 펠렛을 제조하기 위해, 두 세포를 100 mm 접시에 웰당 2×10^6 세포의 밀도로 시딩하고 37°C 에서 밤새 인큐베이션 한 후 채취(harvest)하였다. 준비된 세포 펠렛은 추가 사용을 위해 -80°C 에서 보관하였다.

[0163] (실시예 1-8) RNA 분리 및 cDNA 합성

[0164] 제조사의 지침에 따라 mirNeasy 키트(Qiagen)를 사용하여 세포에서 총 RNA를 분리하였다. 세포 펠릿을(pellets) QIAzol 용해 시약으로 용해시키고, 균질화를 위해 21 게이지 바늘을 통과시키고, 클로로포름(QIAzol 용해 시약: 클로로포름 = $5:1$ v/v)과 완전히 혼합하였다. RNA를 포함하는 수상을 4°C 에서 15 분 동안 $12,000g$ -force로 원심 분리하여 분리한 다음 RNeasy columns을 사용하여 정제하였다. RNA 농도 및 순도는 DS-11 FX+ 분광광도계(DeNovix Inc., 미국)를 사용하여 측정하였다. cDNA는 고용량 cDNA 역전사 키트(Applied Biosystems™)를 사용하여 합성하였다. 역전사(RT) 반응을 위해 RNA 시료(합성 표적 RNA $10\text{ }\mu\text{M}$ 또는 RNA 추출물 $50\text{ng}/\mu\text{L}$)을 dNTP mix(4mM), 프라이머($12\text{ }\mu\text{M}$ 의 유전자 특이적 프라이머 또는 $5\text{ }\mu\text{M}$ 의 oligo(dT)₂₀ 프라이머), MultiScribe™ 역전사효소($2.5\text{U}/\mu\text{L}$) 및 RNase 억제제($1\text{U}/\mu\text{L}$)를 포함하는 총 부피 $20\text{ }\mu\text{L}$ RT 반응 혼합물과 혼합하였다. RT 혼합물은 제조업체의 지침에 따라 배양하였다. RNA 추출물 및 표적 RNA의 RT 반응을 위해 Oligo(dT)₂₀ 프라이머(Invitrogen™) 및 특별히 설계된 프라이머(ERBB2 또는 PPP1R1B RT 프라이머)를 각각 도입하였다. 역전사효소가 없는 RT (NRT) 시료도 대조군으로 준비한 후 정량적 실시간 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR) 및 개발된 iFEN-tRCA

분석으로 분석하였다. 준비된 cDNA 샘플은 추가 사용을 위해 -20°C 에서 보관하였다.

(실시예 1-9) 실시간 중합효소 연쇄 반응(qRT-PCR)

qRT-PCR은 QuantStudio™ 5 Real-Time PCR 시스템을 사용하여 2.5ng의 cDNA 및 각 500nM의 정방향 및 역방향 프라이머를 입력한 PowerUp™ SYBR Green master mix (Applied Biosystems™)를 사용하여 수행하였다. 각 유전자(ERBB2, GAPDH 및 β -액틴)에 대해 설계된 프라이머 서열은 표 2와 같다. qRT-PCR 반응은 다음과 같다: 50°C 에서 2분, 95°C 에서 2분동안 인큐베이션 후 95°C 에서 15초 동안 변성, 60°C 에서 1분 동안 어닐링 및 연장을 40회 반복하였다. 용융 곡선은 이후에 모든 반응에서 기록되어 각 표적 유전자에 대해 단일 앰플리콘(amplicon)이 생성되었음을 확인하였다. QuantStudio™ Design & Analysis 소프트웨어 v1.5.2를 사용하여 역치 주기(cycles-to-threshold, Ct) 값을 얻었고 이 값을 상대적 유전자 발현을 평가하는 데 사용하였다.

표 2

실시예에서 사용된 qRT-PCR 프라이머 서열.

Gene name	Sequences (5' to 3')
ERBB2	Forward: CTCGTTGGAAGAGGAACAGC
	Reverse: CTGAATGGGTCGCTTTTGT
GAPDH	Forward: GCTCTCTGCTCCTCCTGTTC
	Reverse: TGAATCCGACCTTCACCTTC
β -actin	Forward: TCGGTTACACCTTTCTTGA
	Reverse: CACCTTCACCGTTCAGTTT

(실시예 1-10) 표적 RNA 또는 RNA 추출물을 사용한 iFEN-tRCA 분석의 성능 실험

본 발명의 분석의 검출 성능은 합성 RNA 표적에서 유래한 cDNA와 세포에서 분리한 RNA 추출물로 확인하였다. $0.5\mu\text{L}$ 의 RNase H($250\text{mU}/\mu\text{L}$)가 1x iFEN master mix에 추가로 포함되어 cDNA-RNA 하이브리드 가닥의 RNA 가닥을 분해하였다. 희석된 cDNA(RNA 표적의 경우 5 및 50nM , RNA 추출물의 경우 $10\text{ng}/\mu\text{L}$)를 FEN master mix에 첨가한 후, 혼합물을 56.2°C 에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후, RCA는 분석 성능의 최적화 및 평가 방법에 설명된 것과 동일한 절차로 준비된 1x RCA master mix로 50°C 에서 1시간 동안 수행하였다.

(실시예 1-11) 데이터 분석

데이터는 3개의 독립적인 실험에 대한 평균 $\pm$ 표준 편차(SD)로 표시된다. 데이터 분석 및 fitting은 OriginPro 2020b(OriginLab Corporation, 미국 매사추세츠)에서 수행하였다. 유의성(** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)은 one-way 또는 two-way ANOVA에 이어 Tukey의 post-hoc test에 의해 결정되었다.

실시예 2

표적 RNA 검출을 위한 iFEN-tRCA 분석방법

본 발명에 따른 표적 RNA 검출을 위한 iFEN-tRCA 분석방법은 2단계 메커니즘으로 구성된다(도 1): 1단계는 flap endonuclease 1을 이용한 침습적 절단(iFEN) 반응을 진행하는 단계이고, 2단계는 toehold 매개하여 rolling circle amplification(tRCA) 반응을 진행하는 단계이다.

1 단계에서는 표적 RNA에서 합성된 상보적 DNA(cDNA)가 침입 DNA(InDNA) 및 프로브 DNA(ProDNA)와 같은 2개의 DNA 가닥과 혼성화하여 3개 가닥의 교차점에서 1개의 뉴클레오타이드 중첩으로 분기된(branched) DNA 구조를 형성한다. 이 구조는 서열 의존적 방식으로 형성되며 구조 특이적 내핵분해(endonucleolytic) 절단 활성을 갖는

FEN1 효소에 매우 적합하다. FEN1에 의한 절단은 중첩된 뉴클레오티드 근처에서 발생하여 ProDNA에서 파생된 FlapDNA라고 하는 5' 단일 가닥 DNA 단편을 방출한다. 특히, InDNA와 ProDNA의 용융 온도와 표적에 비해 과량의 ProDNA를 포함한 반응 온도를 조정함으로써 본질적으로 실현되는 반응 동안 ProDNA의 혼성화, 절단 및 해리의 반복 주기를 유도함으로써 FlapDNA의 생성이 증가할 수 있다. 표적 DNA/ProDNA duplex의 용융 온도에 가까운 온도에서 절단 반응을 수행하면 절단된 ProDNA가 복합체에서 빠르게 해리된다. 용액의 free ProDNA 가닥은 표적 DNA보다 높은 농도로 인해 표적에 어닐링된다. 따라서, FlapDNA 축적은 절단된 ProDNA(cProDNA)와 free ProDNA의 빠른 교환에 의해 생성되어 상승된 온도에서 단일 표적 분자로부터 많은 ProDNA의 절단을 촉진한다.

[0180] DNA 세트(InDNA 및 ProDNA)는 다음 5가지 기준에 따라 설계하였다. 1) InDNA는 ProDNA의 표적 특정 영역보다 15-20℃ 더 높은 용융 온도를 가져야 한다. 예컨대, proDNA의 용융 온도가 53.6℃이고, InDNA의 용융 온도는 71℃인 경우이다. 2) InDNA는 3' 말단에 하나의 뉴클레오티드가 있어야 하며, 표적 DNA와 ProDNA 사이의 염기 쌍을 침습해야 한다. 3) ProDNA의 표적 특이적 서열은 시험할 반응 온도에 가까운 용융 온도를 가져야 한다(예컨대, 50-60° C). 4) ProDNA의 flap 서열은 비특이적 결합을 피하기 위해 표적 DNA(또는 cDNA)와 InDNA 모두에 상보적이어서는 안된다. 5) 생성된 FlapDNA가 다음 RCA 반응을 방해하지 않도록 하기 위해 ProDNA의 flap 서열은 12 ~ 15개의 뉴클레오티드(nt)사이여야 한다.

[0181] 2 단계에서는 나머지 절단되지 않은 ProDNA를 RCA 반응 혼합물에 주입하여 덤벨 모양의 주형 DNA(DB templates)를 풀고 혼성화시킨다. DB templates는 지정된 온도에서 ProDNA에 결합할 때 가닥 변위를 위한 toehold 고정 영역(n=9, 10, 11, 12 및 13 nt)을 포함한다. DB templates는 FEN 반응으로 인해 생성된 InDNA, cProDNA 및 FlapDNA와 같은 다른 가닥과 상호 작용하지 않는다. ProDNA와 DB templates의 혼성화는 주형 DNA의 원형화를 가능하게 하고, Bst 2.0 DNA 중합효소(DNAP)를 사용하여 RCA 과정을 시작하며, SYBR green dyes의 존재 하에 시간이 지남에 따라 형광이 증가한다. 표적 농도와 형광 신호는 역 관계인 것으로 확인하였다.

실시예 3

[0183] **FEN1을 이용한 침습적 절단(iFEN)을 기반으로 신호를 증폭하는 반응 결과**

[0184] FEN1을 이용한 침습적 절단(iFEN)을 기반으로 신호를 증폭하는 반응은 합성 표적 DNA를 사용하여 수행하였다. 표적 DNA를 InDNA, ProDNA 및 FEN1을 포함하는 1x master mix와 혼합하고 60° C에서 30분 동안 배양하였다. 생성물을 20% 천연 및 변성 폴리아크릴아미드 전기영동(PAGE)에 의해 분석하였다(도 2a 및 2b). 천연 폴리아크릴아미드 전기영동은 DNA의 2차 구조를 볼 수 있는데 반해 변성 전기영동에서는 변성된 DNA 가닥을 볼 수 있다. 따라서, 천연 전기영동에서는 표적 DNA가 InDNA 및 ProDNA와 혼성화를 잘 이루는지 여부, FEN1 효소에 의해 절단이 잘 이뤄지는지 여부를 확인할 수 있으며, 변성 전기영동에서는 ProDNA만 절단이 이뤄지고 InDNA는 절단되지 않는지 여부, DNA marker와 비교하여 ProDNA가 절단되어 예상한 크기의 FlapDNA가 형성되는지 여부 등을 분석할 수 있다.

[0185] 젤 이미지에서 볼 수 있듯이 InDNA와 ProDNA는 표적(레인 6)과 하이브리드 DNA 구조를 형성하여 FEN1(레인 8) 처리 시에만 작은 DNA 단편(약 12 nt)을 생성한다. 표적이 없는 비-혼성화, 단일 가닥 InDNA 및 ProDNA는 FEN1 매개 절단(레인 7)에 내성이 있다. 합성 FlapDNA는 ProDNA의 5'-말단에서 12개의 염기서열을 선택하여 얻은 DNA 단편과 크기를 비교하여 사용하였다. 예상대로, 생성된 DNA 단편(레인 8)의 크기는 합성 FlapDNA(레인 4)에 해당하며, 이는 중첩 염기쌍이 FEN1이 알려진 서열로 FlapDNA를 방출하는 절단 부위를 제공함을 나타낸다.

[0186] 과량의 ProDNA가 주어진 조건에서 FEN1의 침습적 절단 작용을 향상시킬 수 있는지 여부를 추가로 조사하였다. 3' 말단에 Iowa black quencher가 있고, 내부 티민 핵염기에 플루오레세인(FAM) 염료(dye)가 있는 형광 표지된 ProDNA(FProDNA)를 사용하였다. 따라서, 생성된 형광은 표적 DNA당 절단된 FProDNA의 양을 의미한다. 표적이 1:1 몰 비율로 ProDNA와 반응했을 때 최소한 100nM의 표적이 읽을 수 있는 신호에 도달하였다(도 2c). 한편, 과량의 ProDNA를 갖는 동일한 양의 표적 DNA는 매우 증가된 형광 신호를 나타내어, 표적 DNA 분자당 다수의 ProDNA가 절단되었음을 나타낸다.

[0187] 따라서, 표적 DNA가 InDNA 및 ProDNA와 결합한 후 FEN1 침습적 절단(iFEN)을 통해 단편(FlapDNA)을 형성하여 신호를 효과적으로 증폭시킬 수 있으며, 과량의 ProDNA를 이용하면 표적 DNA에 대한 신호 증폭을 크게 향상시킬 수 있음을 확인하였다.

실시예 4

[0189] Toehold 매개로 하는 tRCA 반응 결과

[0190] 남아있는 온전한 ProDNA를 우수한 선택성과 감도로 증폭하기 위해 맞춤 설계된 덤벨 모양의 주형 DNA(DB templates)를 사용하여 tRCA 기술을 사용하였다(도 3a). DB templates은 양쪽에 두 개의 루프가 있는 닫힌 스템-루프 구조를 나타낸다. 상대적으로 높은 용융 온도(IDT의 라이선스 UNAFold 소프트웨어를 사용하여 8mM Mg^{2+} 의 존재에서 $50\text{--}60^\circ\text{C}$ 예측)로 인해 실온에서 매우 안정적인 이중체(duplexes)를 나타낸다. 루프 서열 중 하나는 ProDNA의 혼성화 과정에서 가닥 변위를 위한 toehold 고정 도메인 역할을 한다. 침입한 ProDNA가 toehold 부위에 결합하면 가닥 이동에 의해 DB templates의 stem염기쌍을 치환하고 완전히 혼성화하여 원형의 template DNA를 만든다. 가닥 변위는 free DB templates의 Gibbs 자유 에너지와 DB templates-ProDNA 복합체 사이의 열역학적 균형에 의해 구동되며, 여기서 toehold 길이는 가닥 변위의 동역학을 조정하는 데 중요한 역할을 한다. 5가지 다른 toehold 길이($n = 9, 10, 11, 12, 13\text{nt}$, DB9, DB10, DB11, DB12 및 DB13)를 가진 DB templates을 설계하고, 이차 구조, 자유 에너지, 및 NUPACK 분석을 사용한 평형 확률을 예측하였다(도 4 및 표3). toehold 길이가 증가함에 따라 DB templates의 stem 서열이 감소하였고, 이로써 자유 에너지와 평형 확률이 감소하였다.

[0191] iFEN 반응 후에 남아있는 ProDNA, cProDNA 및 FlapDNA를 포함한 다양한 DNA 가닥을 제시할 때 다양한 toehold 길이가 tRCA의 효율성에 미치는 영향을 실험하였다(도 3b 및 도 5). 이 실험에서 InDNA를 사용한 실험은 tRCA를 유발할 수 있는 모티프가 포함되어 있지 않기 때문에 제외하였다. 특히 ProDNA는 다른 가닥 중에서 가장 효율적으로 tRCA를 유도했으며 toehold 길이가 증가함에 따라 상당한 양의 앰플리콘(amplicons)을 생성하였다. 한편, DB12 및 DB13 template을 추가하면 ProDNA가 반응에서 FlapDNA 및 cProDNA와 경쟁하는 것으로 나타나 DB11 template에 비해 형광 신호가 억제되었다. 다른 DB templates와 비교하여 tRCA 반응 온도(60°C)에서 DB12 및 DB13 template의 열역학적 안정성이 감소하여 FlapDNA 및 cProDNA보다 ProDNA의 가닥 변위가 더 어렵기 때문이라고 설명할 수 있다. DB templates 설계에서 toehold 길이의 역할이 매우 중요하다. NUPACK을 사용하여 60°C 에서 각 ProDNA, cProDNA 및 FlapDNA 가닥과 이 세 가닥의 혼합이 있는 모든 DB templates의 혼성화 반응을 시뮬레이션 하였다. 형성된 복합 종류들과 평형 농도에 대한 염기쌍 확률을 보여주는 ensemble pair fraction plots을 예측하였다(도 6 및 표4). 평형에서 가장 에너지적으로 유리한 결합은 DB templates-ProDNA 복합체로 밝혀졌으며 FlapDNA 또는 cProDNA와 혼성화된 DB templates 중에서 가장 낮은 자유 에너지를 나타낸다. 높은 RCA 수율, 낮은 배경 신호 및 구조적 안정성을 고려하여 추가 tRCA 연구를 위해 DB10 template을 선택하였다.

[0192] tRCA 분석의 분석감도를 평가하기 위해, 실시간 형광 검출을 통해 다양한 농도의 ProDNA에 대한 신호 증폭 곡선을 얻었다. tRCA 분석은 ProDNA(250pM 에서 50nM 범위)를 master mix와 간단히 혼합하고 60°C 에서 1시간 동안 실행하여 수행하였다. 30분의 증폭에서, 3 시그마(σ) 계산을 기반으로 하여 832pM 의 검출 한계로 형광 강도를 사용하여 양성 ProDNA 용량 의존성을 제공하는 용량 반응 곡선을 얻었다(도 3c 및 3d).

[0193] 따라서, 분석의 정확도와 관련하여 toehold 길이가 적정한 경우(9nt 내지 11nt , 특히 10nt)에만 효과적으로 tRCA를 유도할 수 있으며, toehold 길이가 너무 길어지는 경우(예컨대, $12, 13\text{nt}$) false positive가 증가함을 확인하였다. 또한, 절단된 ProDNA가 많을수록 형광 강도가 감소하여 표적 핵산이 존재함을 나타낸다는 것을 확인하였다.

표 3

[0195] 특정 DB templates 구조의 특성

DB	Free energy ^a (kcal/mol)	Probability ^b	Ensemble defect ^c (nt)	Normalized ensemble defect ^d (%)	Nucleotide (nt)
DB9	-10.47	0.129	4.9	8.8	56
DB10	-9.39	0.122	4.7	8.4	56
DB11	-8.31	0.118	4.9	8.7	56
DB12	-7.16	0.126	4.8	8.6	56
DB13	-4.82	0.079	7.5	13.4	56

[0196] 표 3에서 ^a특정 이차 구조의 자유 에너지, ^b이 구조가 형성될 확률, ^{c,d}특정 이차 구조와 관련하여 평형 상태에서 쌍을 잘못 이루는 뉴클레오티드의 평균 수와 백분율을 나타낸다. N 염기가 있는 가닥의 경우 0 또는 0%가 가장 좋다는 의미이고, N 또는 100%가 가장 좋지 않다는 의미이다.

표 4

[0198] ProDNA, FlapDNA 및 cProDNA와 복합된 DB templattess의 희석 용액에서 평형 농도 및 자유 에너지

Complex	DB9/ProDNA	DB10/ProDNA	DB11/ProDNA	DB12/ProDNA	DB13/ProDNA
Equilibrium concentration (nM)					
DB/ProDNA	190	190	200	200	200
ProDNA	15	8.7	4.7	2.8	1.1
DB	15	8.7	4.7	2.8	1.1
Free energy (kcal/mol)					
DB/ProDNA	-22.33	-22.41	-22.49	-22.45	-22.46
Complex	DB9/FlapDNA	DB10/FlapDNA	DB11/FlapDNA	DB12/FlapDNA	DB13/FlapDNA
Equilibrium concentration (nM)					
DB/FlapDNA	0.25	0.64	2.2	5.2	27
FlapDNA	200	200	200	190	170
DB	200	200	200	190	170
Free energy (kcal/mol)					
DB/FlapDNA	-14.03	-14.02	-14.10	-13.99	-13.99
Complex	DB9/cProDNA	DB10/cProDNA	DB11/cProDNA	DB12/cProDNA	DB13/cProDNA
Equilibrium concentration (nM)					
DB/cProDNA	0	0	0	0	0.63
cProDNA	200	200	200	200	200
DB	200	200	200	200	200
Free energy (kcal/mol)					
DB/cProDNA	-	-	-	-	-9.02
Complex	DB9/ProDNA /FlapDNA /cProDNA	DB10/ProDNA /FlapDNA /cProDNA	DB11/ProDNA /FlapDNA /cProDNA	DB12/ProDNA /FlapDNA /cProDNA	DB13/ProDNA /FlapDNA /cProDNA
Equilibrium concentration (nM)					
DB/ProDNA	190	190	200	200	200
ProDNA	15	8.7	4.8	2.9	1.2
FlapDNA	200	200	200	200	200
cProDNA	200	200	200	200	200
DB	14	8.7	4.7	2.8	1.0
Free energy (kcal/mol)					
DB/ProDNA	-22.33	-22.41	-22.49	-22.45	-22.46

[0199] 표 4에서 각 DNA 가닥의 농도는 200nM으로 설정하였다.

실시예 5

[0201] iFEN-tRCA 분석의 최적화 조건 확인

[0202] 전체 분석은 두 단계의 메커니즘에 의존한다. 1 단계의 iFEN 반응에 의해 과량의 ProDNA의 표적에 의한 절단이 수행된다. 절단되지 않은(undigested) ProDNA는 2 단계의 tRCA 과정에 의해 선택적으로 증폭되어 실시간으로 감지할 수 있는 충분한 SYBR green 형광 신호를 얻는다. 이 분석에 사용된 두 가지 효소 FEN1 및 Bst2.0 DNAP는 광범위한 반응 온도(50-70 ° C)에서 작동하는 열안정성 효소이다. 최종 분석의 최대 성능을 달성하기 위해 두 개의 개별 분석이 이 온도 범위에서 최적화되도록 하였다. 최종 iFEN-tRCA 분석은 표적 농도에 비례하는 형광 강도의 음의(negative) 변화를 제공한다. tRCA 반응 후 30분의 형광 강도를 신호 판독값으로 사용하였다.

- [0203] 우선, 표적이 있는 상태에서 ProDNA의 침습적 절단을 최대화하는 iFEN 반응의 최적 온도를 찾고자 하였다. iFEN 분석은 50~60.4℃ 범위의 다양한 온도에서 30분 동안 수행한 다음 tRCA를 50° C에서 1시간 동안 수행하였다(도 7a 및 도 8). 표적의 부재와 존재 사이의 가장 높은 신호 차이는 56.2° C에서 관찰되었으며, 이는 표적-cProDNA 복합체의 예상 용융 온도(10mM Mg²⁺ 존재 시 약 53.6° C)에 가깝다. 이 최적화된 온도는 모든 ProDNA가 소모될 때까지 순환 반응을 반복하여 cProDNA를 free ProDNA로 신속하게 교체할 수 있다. 더 높은 온도는 특정 양의 InDNA와 ProDNA의 해리를 촉진하여 더 적은 양의 ProDNA를 분해하여 표적과 tRCA 후 점진적인 형광 증가를 유도한다.
- [0204] 다음으로, 전체 분석에서 tRCA의 반응 온도를 스크리닝하였다. 이때 iFEN 반응은 56.2℃에서 진행하였고, 이후 tRCA는 다양한 온도(50, 55, 60, 65℃)에서 진행하였다. 표적과 FEN1이 모두 존재하는 경우에만 형광 반응이 현저히 감소하고, 다른 조건(표적 또는 FEN1이 있는 경우, 대상 및 FEN1 부재하는 경우)과 비교하여 50℃에서 가장 상당한 신호 변화가 나타났다(도 7b 및 도 9). 온도의 추가 증가는 음성 대조군에서 형광 신호의 점진적인 감소를 가져왔고, 이는 고온에서 DB templates의 열역학적 불안정성을 나타낸다.
- [0205] 또한, FEN1 반응 이전에 InDNA와 ProDNA를 표적과 혼성화하는 조건을 다양화하여 분석 성능의 향상 여부를 확인하였다. 동결 해동, 열 어닐링 및 단순 혼합하는 조건을 비교하였으나, 세가지 조건에서 유의미한 신호 변화가 없음을 확인하였다(도 10). 따라서, 분석의 성능을 향상시킬 수 있는 유의미한 혼성화 조건은 없었으므로, 본 발명의 iFEN 및 tRCA assay의 경우 반응 온도를 각각 56.2℃와 50℃로 설정하고, 모든 DNA 가닥을 동시에 혼합하여 반응 혼합물을 제조하는 방식으로 실험하였다.

실시예 6

[0207] 실시간 형광 검출을 통한 iFEN-tRCA 분석 평가

[0208] 순수 완충액에서 희석된 표적 DNA를 사용한 실시간 형광 검출을 통해 iFEN-tRCA 분석의 분석감도와 특이성을 결정하였다. 얻어진 용량-반응 곡선에서 형광 강도는 표적 농도가 증가함에 따라 감소하는 것으로 나타났으며, 검출 한계는 10pM 미만으로 제공하였다(도 11a 및 11b). 포화점은 25nM 이상으로 비교적 큰 동적 범위를 나타낸다. iFEN-tRCA 분석이 단일 tRCA 분석과 비교하여 분석감도에서 10^{2.9} 배로 향상되었음을 확인하였다. 이러한 검출 한계의 개선은 RCA의 효율성을 결정하는 제한된 농도의 프라이머를 극복한 FEN1 기반 ProDNA 재활용 및 표적 특이적 트리거 절단에 기인한다. iFEN-tRCA 분석의 특이성 테스트는 중첩 부위에서 단일 염기 변화가 있는 합성 표적 DNA를 사용하였다(도 11c). 0.5 및 5 nM 표적에서 완벽하게 일치하는 표적은 일치하지 않는 표적에 비해 가장 낮은 형광 반응을 보였다. 그러나 단일 염기가 티민 또는 시토신(표적 DNA mm1 및 mm3)으로 변경된 경우 비특이적 신호 감소가 관찰되어 FEN1이 분지된 DNA 구조의 접합부에서 단일 뉴클레오타이드 변화를 인식할 수 있음을 시사한다.

[0209] 즉, FEN1은 InDNA가 표적에 완전히 상보적인 경우에만 기질을 절단하는 것으로 보이지 않는다. 이는 FEN1이 비특이적으로 기질을 절단하는 특성을 보이는 것 같으나, InDNA의 3' 말단의 염기서열이 결합하지 않고 침투적인 경우에만 FEN1이 특이성을 가지고 침습적 절단을 하는 것을 나타낸다. 예컨대, 단일 뉴클레오타이드 변화 없는 표적(pm)의 경우 AT 염기쌍에, 단일 뉴클레오타이드 변화가 있는 mm1의 경우 TT 염기쌍에, mm3의 경우 CT 염기쌍에 각각 InDNA의 cytosine이 침투하여 절단된다. 이에 반해, mm2의 경우 GT 염기쌍에 InDNA의 cytosine이 결합하여 GC 염기쌍(G-T-C)이 형성되므로 절단되지 않는다. 따라서, iFEN 반응은 특이적 절단능을 가지며, iFEN-tRCA 반응 역시 표적 DNA에 대해 특이성을 가진다는 것을 확인하였다.

실시예 7

[0211] 세포에서 표적 RNA 및 RNA 추출물을 사용한 iFEN-tRCA 분석 평가

[0212] 분석 메커니즘이 표적 DNA와 잘 작동한다는 것을 입증되었으므로, 나아가, 표적 RNA를 사용하여 분석의 성능을 평가하였다. RNA 기질에 대한 FEN1의 제한된 선호도로 인해 역전사(RT)를 사용하여 표적 RNA에서 cDNA를 얻은 다음 RNase H를 추가하여 iFEN 반응을 통해 RNA-cDNA 이중체(duplexes)에서 RNA 가닥을 선택적으로 절단하였다(도 12a). 이에, 추가 변성 단계 없이 ProDNA 및 InDNA와의 성공적인 혼성화를 허용하고 표적 RNA가 유도할 수 있는 비특이적 tRCA 반응을 억제할 수 있다. 합성 표적 RNA를 설계하기 위해 위암 및 유방암과 자주 연관되는

ERBB2 및 PPP1R1B 유전자를 포함한 두 유전자 RNA 전사체의 3' 비번역 영역에서 50 nt 표적 인식 서열을 선택하였다. RT 반응 동안 상대적으로 짧은 RT 프라이머를 사용하기 때문에 RNA에서 cDNA로의 전환 효율이 100%가 아니라는 점도 주목할만하다(도 13). 합성 표적 RNA(50nt) 염기서열에서 역전사 후 생성된 cDNA에 InDNA 및 ProDNA가 결합하여 반응이 진행된다, 이때 InDNA 및 ProDNA가 결합하는 총 부위(full sequences)가 역전사를 통해 만들어질 수 있도록 하기 위해서는 역전사용 프라이머가 합성 RNA 3' 말단으로부터 9개 서열만 붙어야 한다. 따라서, 8~9개 정도의 서열을 가진 짧은 프라이머를 설계하여 사용하게 되면, melting temperature가 약 30 °C 정도로 RT 반응온도(37°C)보다 훨씬 낮아 표적 RNA에 대한 혼성화 효율이 떨어지게 되고, 이로 인해 RT 효율이 떨어질 수 밖에 없다. 레인2에서 DNA-cDNA 형성이 완벽이 이뤄지지 않은 것을 확인하였다(도 13a). 레인 2에서 형성된 cDNA의 양이 100% RT가 이뤄졌다면 합성되었을 것이라고 예상된 DNA양(레인1)에 비해 현저히 적은 양이 합성된 것을 확인하였다(도13b). 다만, 이는 제한적인 길이(50 nt)를 가진 합성 RNA 올리고머 사용으로 인해 짧은 프라이머(8~9 nt)를 설계한 결과이므로, 합성 RNA 올리고머 염기서열을 60~70 nt로 늘려 역전사용 프라이머를 18~24 nt로 설계할 경우 RT 효율이 100%에 도달할 수 있다.

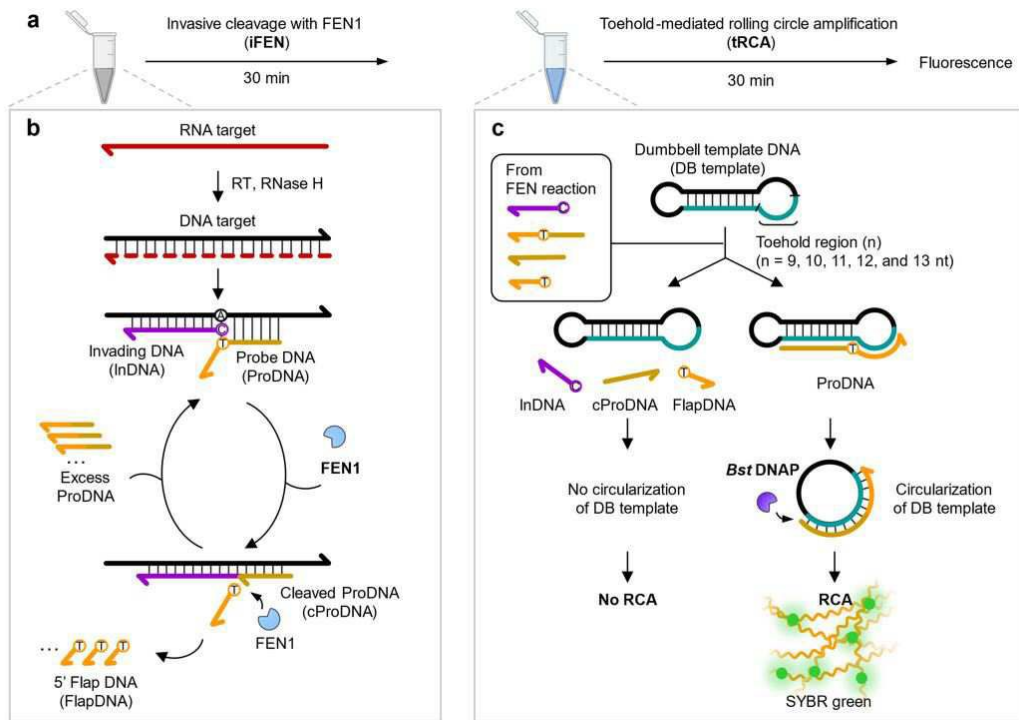
[0213] iFEN-tRCA 반응에서 얻은 RNA 용량-반응 반응 곡선(도 12b 및 도14)은 표적 DNA에 비해 검출한계가 약간 증가하여 RT 효율이 제한적임에도 불구하고 전사된 표적이 full 분석에서 사용할 수 있는 기능을 하고 있음을 알 수 있다. 표적 유전자의 특정 증폭을 보장하기 위해 ERBB2 및 PPP1R1B 유전자를 표적으로 하는 합성 RNA를 각각 양성 및 음성 대조군으로 사용하였다(도 12c 및 도 15). 역전사효소 대조군(NRT) 및 비표적 대조군(NTC)도 역전사효소 또는 DNA/RNA 오염물질에 의한 비특이성으로 인한 잠재적 증폭을 평가하기 위해 사용하였다. 분석 결과 ERBB2 RT 샘플에서만 신호 역제가 나타난 반면, NRT, NTC 및 대조군 유전자와 같은 대조군에서는 형광의 현저한 감소가 보이지 않았으며, 이는 표적 유전자의 고도로 특이적인 증폭을 나타낸다.

[0214] 마지막으로, 서로 다른 HER2 발현 수준을 나타내는 유방암 세포에서 분리된 총 RNA 추출물을 사용하여 관련 시료에서 본 발명의 iFEN-tRCA 분석을 수행하였다. HER2-양성 HCC1954 및 HER2-음성 HCC1143 인간 유방암 세포주를 모델로 선택하고 ERBB2 유전자 상태를 확인하였다. HCC1954 세포로부터 얻은 RT 시료의 형광 강도가 다른 RT 시료들보다 현저히 낮다는 것을 확인하였고, 표적 유전자 분자의 상향 조절을 올바르게 분류할 수 있었다(도 12d 및 S10). 또한, iFEN-tRCA 분석과 qRT-PCR 분석 사이의 ERBB2 상태의 상관 관계를 추가로 조사하였다. qRT-PCR 데이터는 HCC1143 세포의 ERBB2 유전자와 비교하여 HCC1954 세포의 ERBB2 유전자가 현저한 상향 조절되었음을 나타내며, 이는 본 발명에서 측정한 결과와 일치한다(도 5e). 2개의 하우스키핑 유전자(GAPDH 및 β -액틴)의 발현 수준도 내인성(endogenous) 대조군으로서 평가하였다.

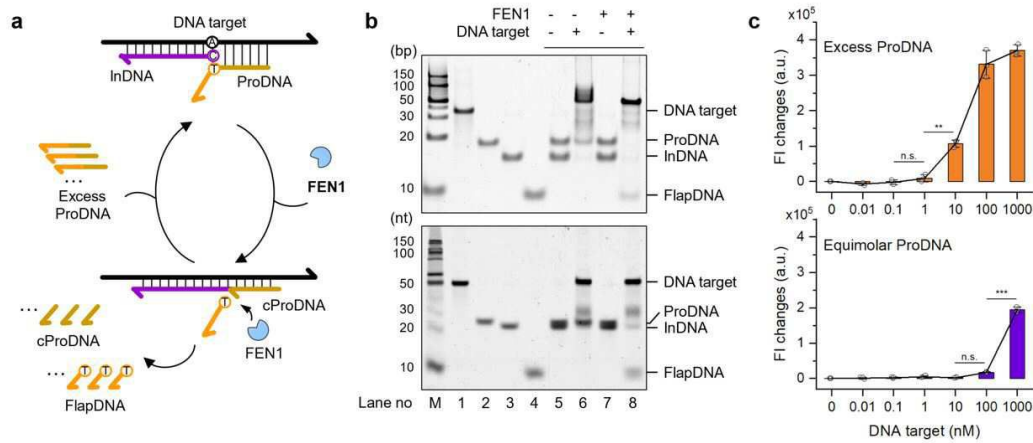
[0215] 즉, 본 발명의 iFEN-tRCA 분석을 통해 완충액 및 생물학적 매체에서 긴 RNA 표적을 1시간 이내에 검출할 수 있으므로 약 2-4시간이 소요되는 qRT-PCR에 비해 처리시간이 훨씬 짧고, ERBB2 상태를 평가할 수도 있다는 이점이 있다. 또한, 반응 역학 및 민감도를 향상시키기 위해 multiple-primed RCA, 과분지형(hyperbranched) RCA와 같은 다양한 RCA 분석을 적용하여 RCA의 선형 특성을 극복할 수 있다. RT, iFEN 및 tRCA 반응을 결합하고 동일한 조건에서 실행하여 올인원 시스템을 개발하면 다양한 진단 응용 프로그램의 탐지 분석에 유용하게 적용될 수 있다.

도면

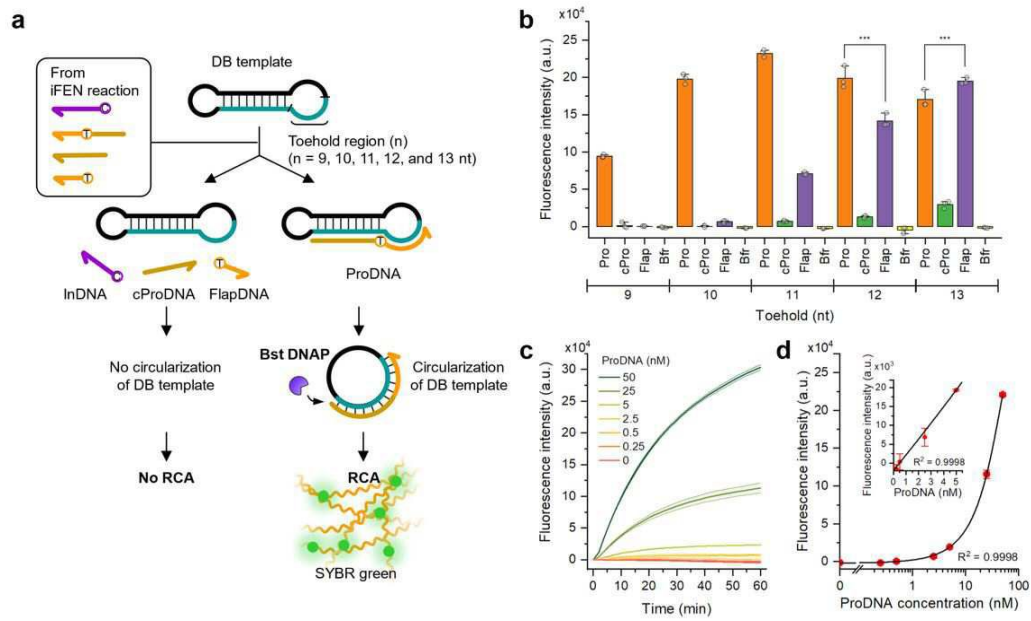
도면1



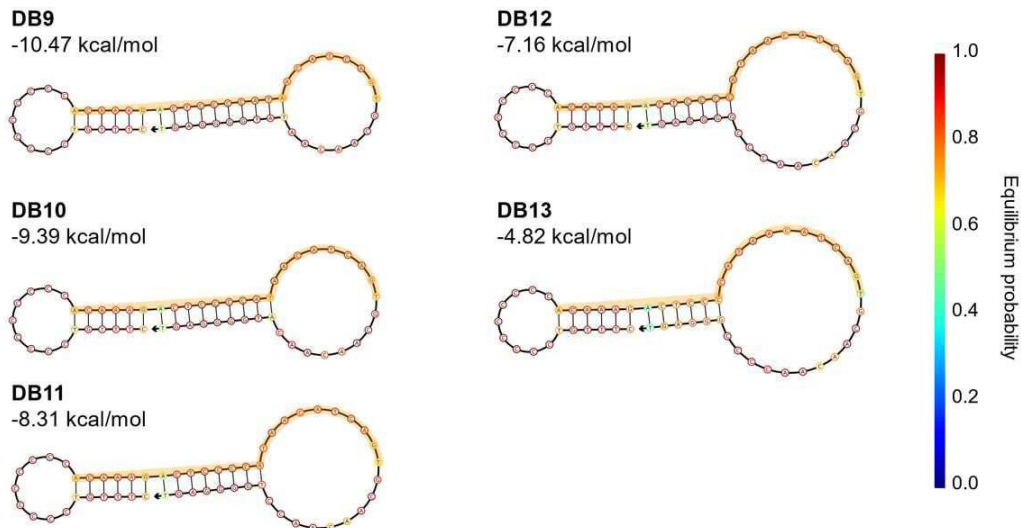
도면2



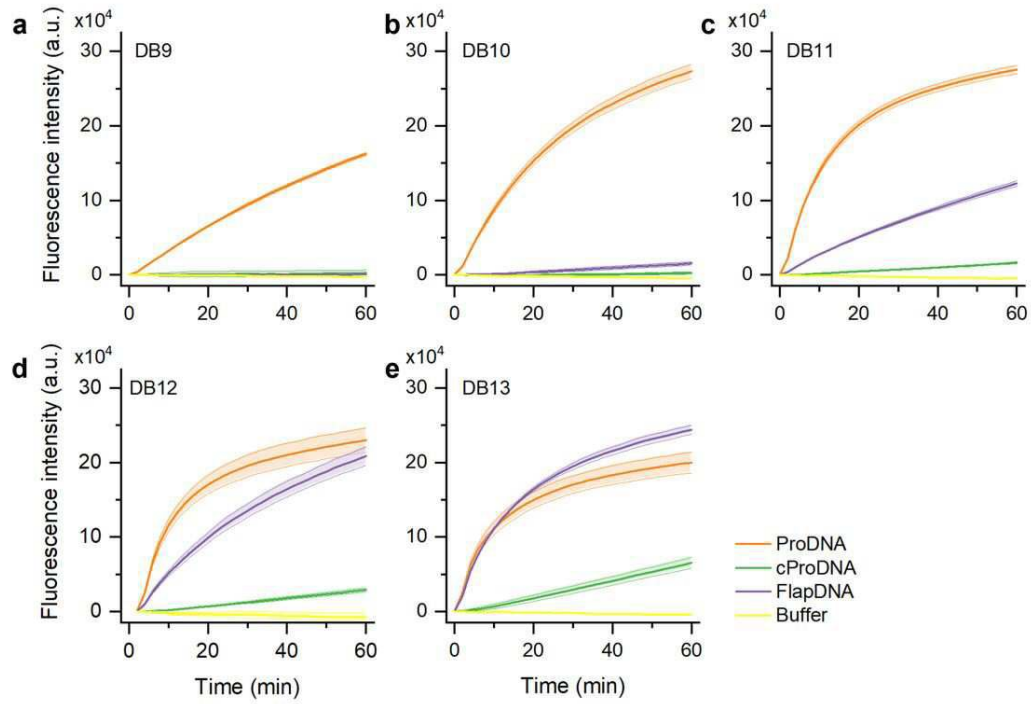
도면3



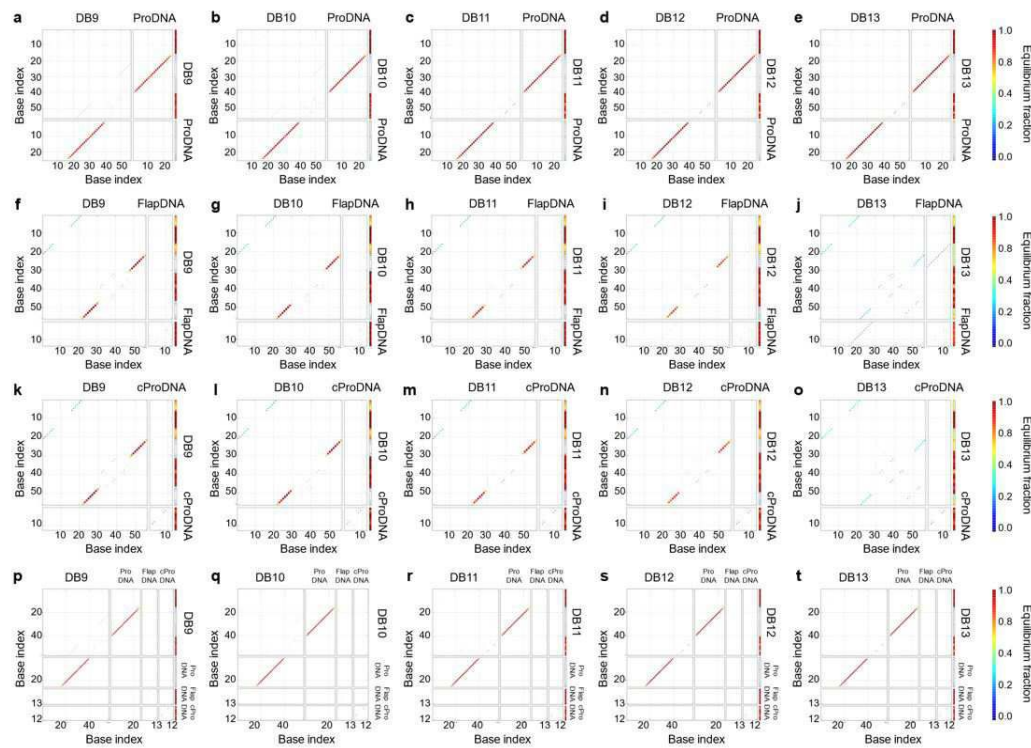
도면4



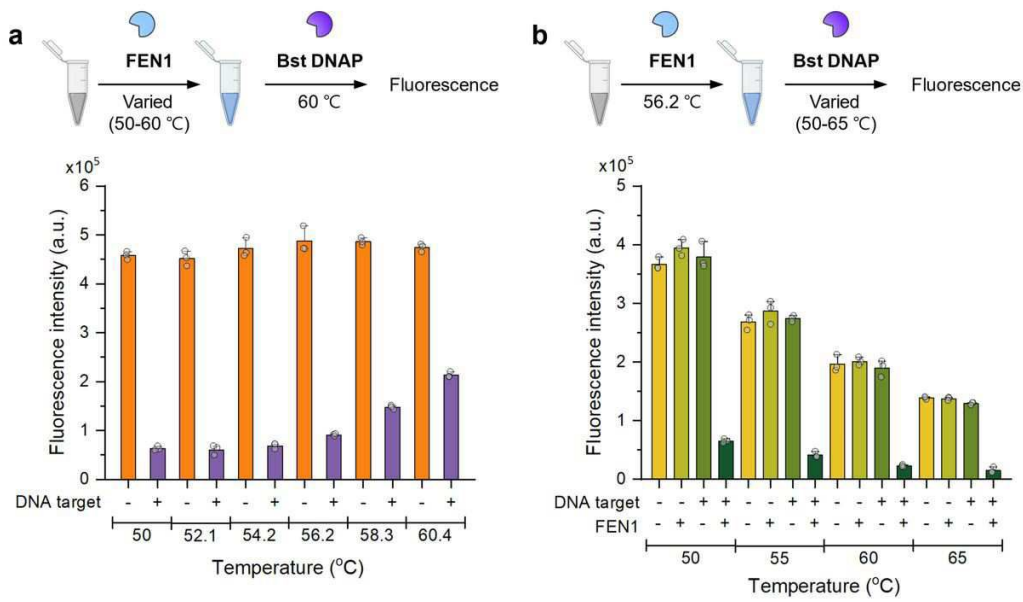
도면5



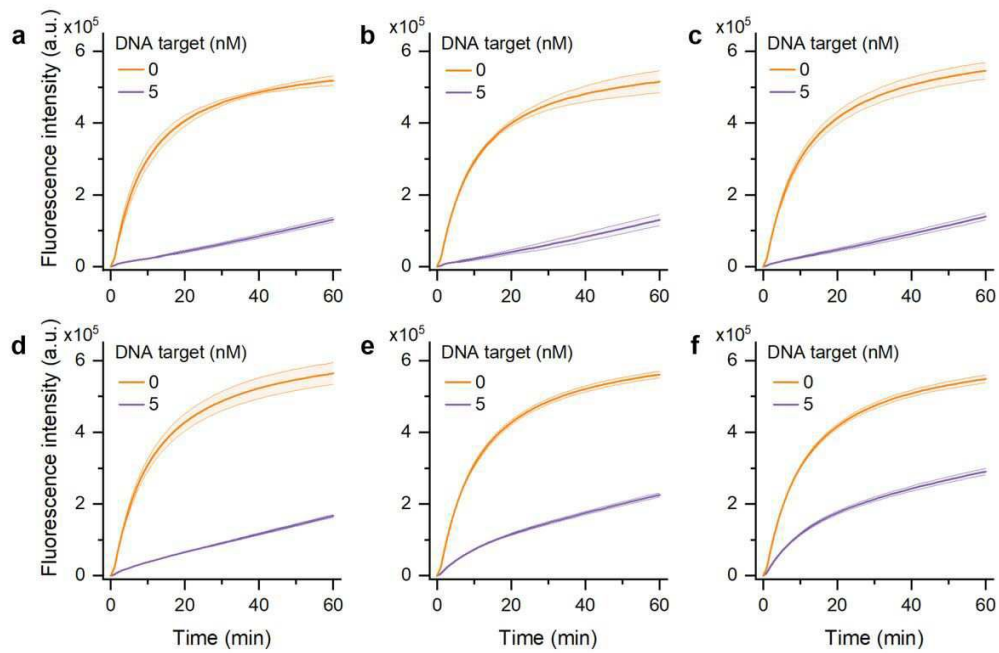
도면6



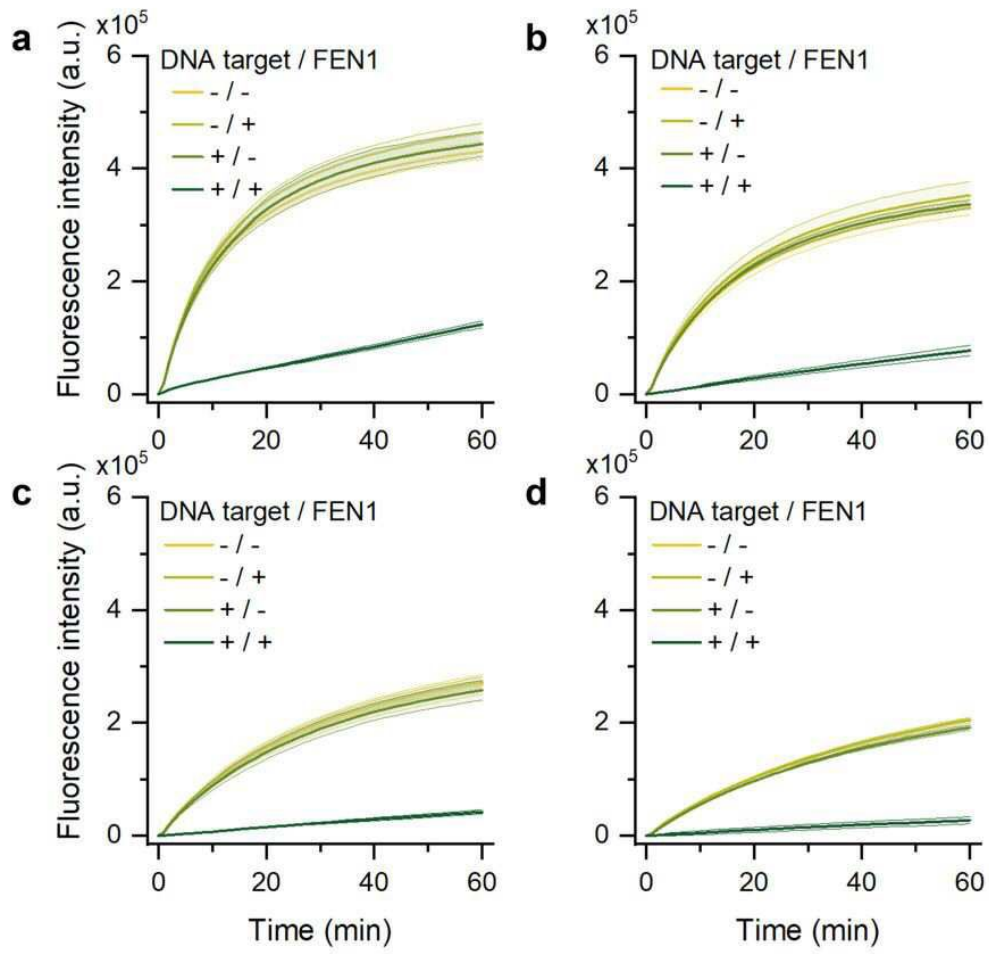
도면7



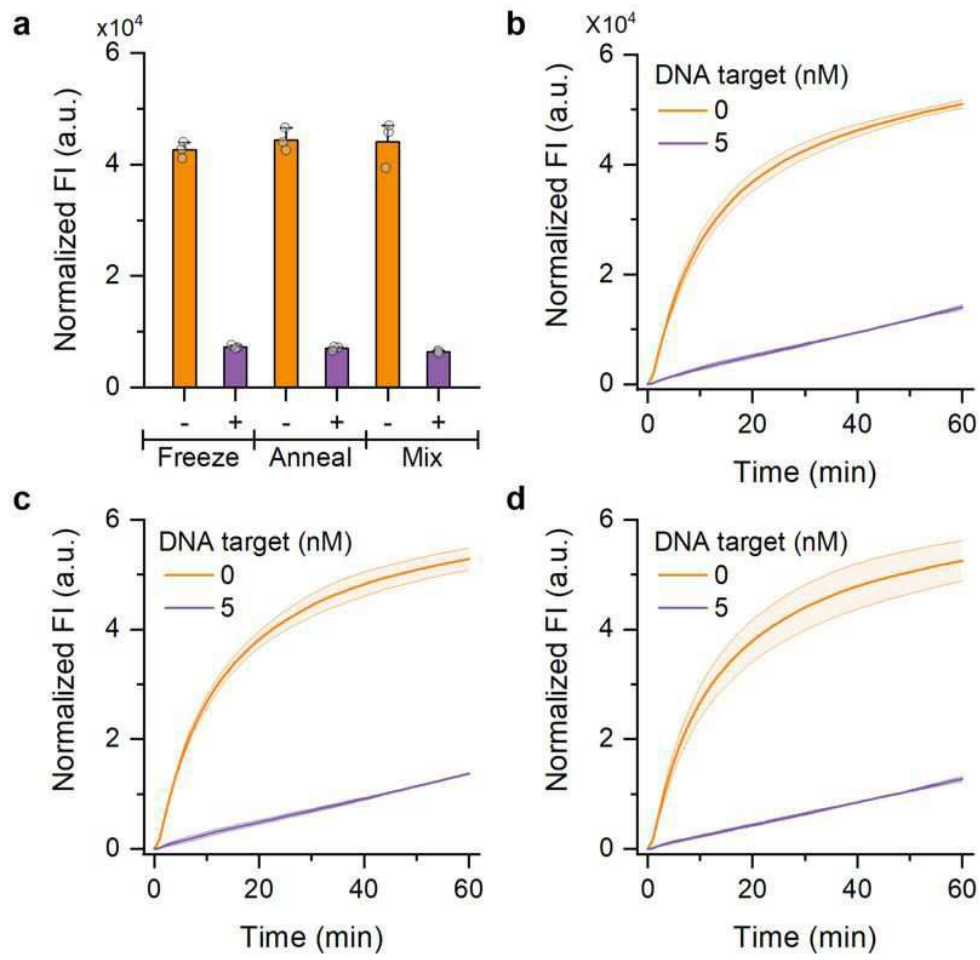
도면8



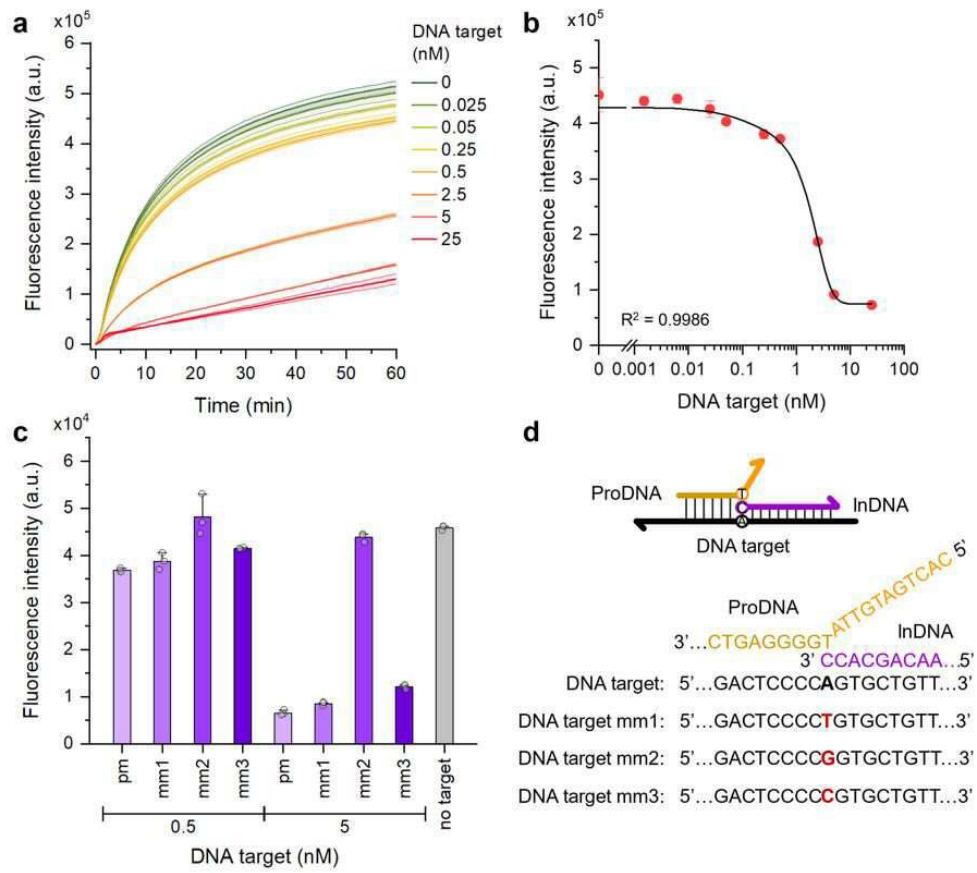
도면9



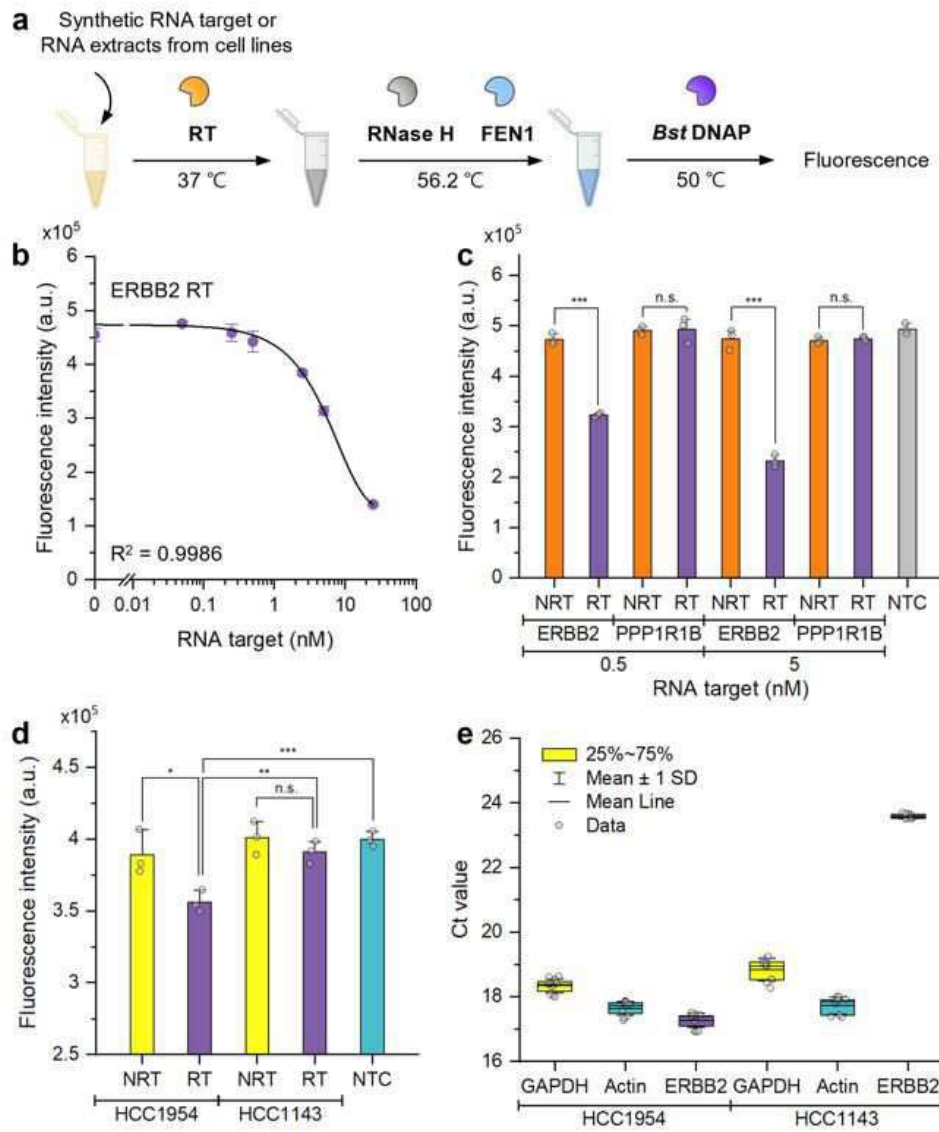
도면10



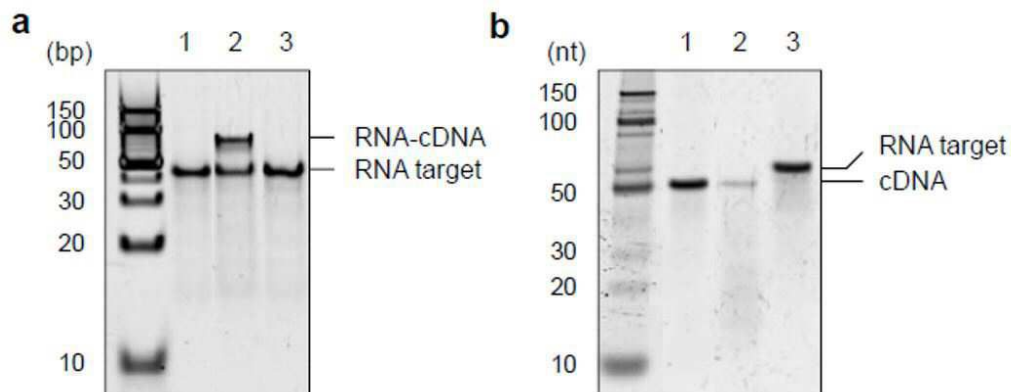
도면11



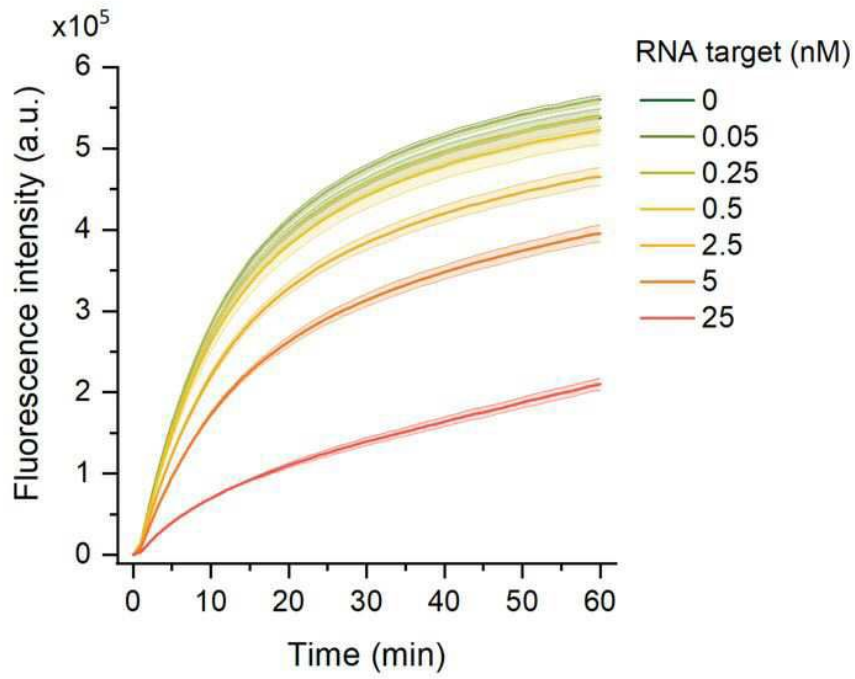
도면12



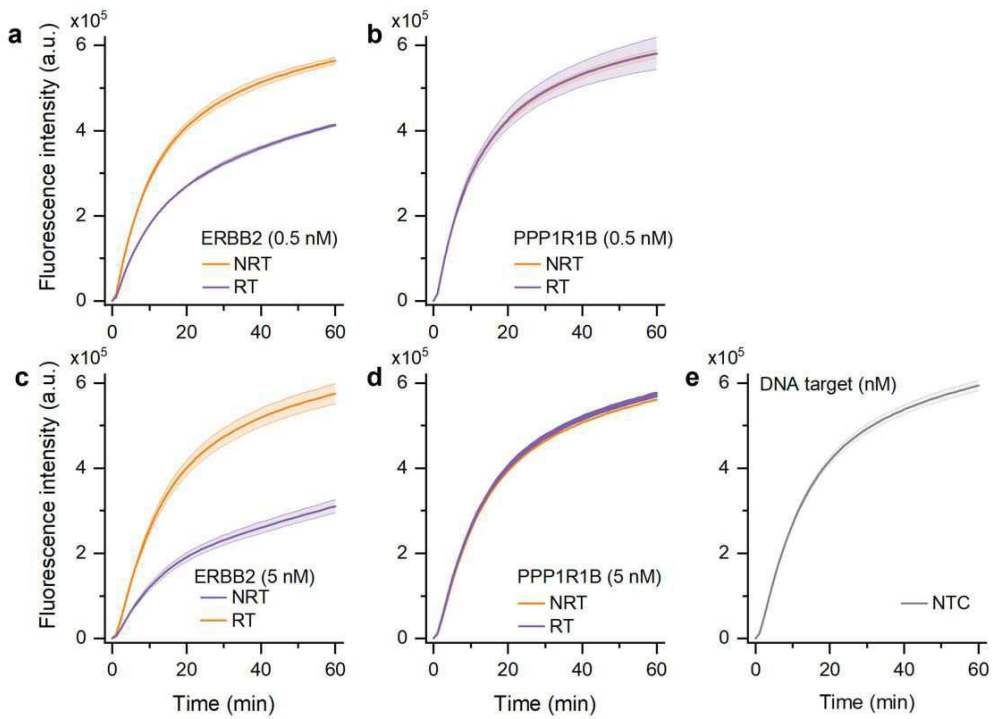
도면13



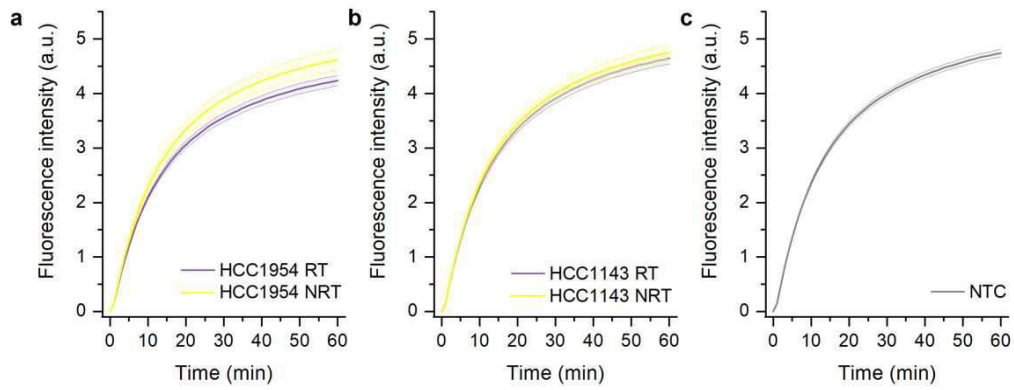
도면14



도면15



도면16



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> INCHEON NATIONAL UNIVERSITY RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION

<120> iFEN-tRCA analysis method for detecting target nucleic acid and
use thereof

<130> 1069624

<160> 24

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> DNA target

<400> 1

tcagaatcca caaagactcc ccagtgtgtg tcctcttcca acgaggctgg 50

<210> 2

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> DNA target mm1

<400> 2

tcagaatcca caaagactcc cctgtgtgtg tcctcttcca acgaggctgg 50

<210> 3

<211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> DNA target mm2
 <400> 3
 tcagaatcca caaagactcc ccggtgctgt tcctcttcca acgaggctgg 50
 <210> 4
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> DNA target mm3
 <400> 4
 tcagaatcca caaagactcc cccgtgctgt tcctcttcca acgaggctgg 50
 <210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> InDNA(Invading DNA)
 <400> 5
 gcctcgttgg aagaggaaca gcacc 25
 <210> 6
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> ProDNA(Probe DNA)
 <400> 6
 cactgatgtt atggggagtc tttgt 25
 <210> 7
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> FProDNA(Fluorescently labelled probe DNA)
 <400> 7
 cactgatgtt atggggagtc tttgt 25

<210> 8
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> cProDNA(Cleaved probe DNA)
 <400> 8
 ggggagtcctt tgt 13

<210> 9
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> Flap DNA
 <400> 9
 cactgatgtt at 12

<210> 10
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> DB9(Dumbbell template DNA with 9 nt toehold)
 <400> 10
 ctttgtcccc cccccacaaa gactcccat aacatcagtg caacaatatg gggagt 56

<210> 11
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> DB10(Dumbbell template DNA with 10 nt toehold)
 <400> 11
 ctttgtcccc cccccacaaa gactcccat aacatcagtg caacaacatg gggagt 56

<210> 12
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> DB11(Dumbbell template DNA with 11 nt toehold)

<400> 12
ctttgtcccc cccccacaaa gactcccat aacatcagt caacaacctg gggagt 56
<210> 13
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> DB12(Dumbbell template DNA with 12 nt toehold)
<400> 13
ctttgtcccc cccccacaaa gactcccat aacatcagt caacaaccg gggagt 56
<210> 14
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> DB13(Dumbbell template DNA with 13 nt toehold)
<400> 14
ctttgtcccc cccccacaaa gactcccat aacatcagt caacaacccc gggagt 56
<210> 15
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> ERBB2 RNA target
<400> 15
ccagccucgu uggaagagga acagcacugg ggagucuuug uggauucuga 50
<210> 16
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial
<220><223> ERBB2 RT primer
<400> 16
tcagaatcc 9
<210> 17
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial

<220><223> PPP1R1B RNA target

<400> 17

acucuauccu caccucguuu ugugcucuuc ccucgcgcug cuagggcguc 50

<210> 18

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> PPP1R1B RT primer

<400> 18

gcagccct 8

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> ERBB2 qRT-PCR primer F

<400> 19

ctcgttgga gaggaacagc 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> ERBB2 qRT-PCR primer R

<400> 20

ctgaatgggt cgcttttggt 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> GAPDH qRT-PCR primer F

<400> 21

gtctctctgct cctcctgttc 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> GAPDH qRT-PCR primer R

<400> 22

tgactccgac cttcaccttc 20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223>

> β -actin qRT-PCR primer F

<400> 23

tcggttacac cctttcttga 20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> β -actin qRT-PCR primer R

<400> 24

caccttcacc gttccagttt 20