(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0139145
(43) 공개일자 2024년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6844 (2018.01) *C12Q 1/6825* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6844 (2018.05)
C12Q 1/6825 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2023-0031960
(22) 출원일자 2023년03월10일
심사청구일자 2023년03월10일

(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)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박상열, 최내윤

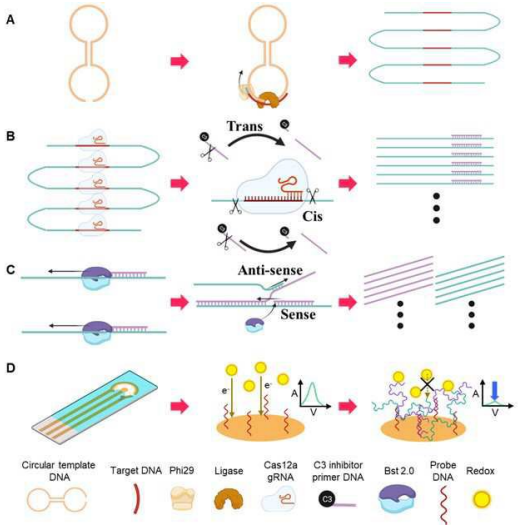
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **핵산 증폭 방법, 핵산 검출 방법, 및 증폭된 핵산을 검출하는 전기화학적 센서**

(57) 요 약

핵산 증폭 방법, 핵산 검출 방법 및 이를 이용한 전기화학적 센서가 제공된다. 구체적으로, 복수개의 타겟 DNA를 포함하는 제1 단일 가닥 DNA가 합성되는 제1 핵산 증폭 단계; CRISPR Cas 12a를 이용하여 상기 제1 단일 가닥을 절단하는 프라이머 DNA 형성 단계; 상기 프라이머 DNA를 제1 단일 가닥에 결합시켜 제2 단일 가닥 DNA를 합성하는 제2 핵산 증폭 단계;를 포함하는 핵산 증폭 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2521/101 (2013.01)
C12Q 2521/301 (2013.01)
C12Q 2531/125 (2013.01)
C12Q 2563/113 (2013.01)
(72) 발명자
박현준
서울특별시 중랑구 동일로139나길 37 (중화동)
박진성
경기도 남양주시 다산지금로123번길 17, 7204동 603호(다산동, 다산신안인스빌퍼스트포레)

박찬호
서울특별시 동대문구 회기로 14, 608호 (제기동, 어진재)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

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

명 세 서

청구범위

청구항 1

복수개의 타겟 DNA를 포함하는 제1 단일 가닥 DNA가 합성되는 제1 핵산 증폭 단계;

CRISPR Cas 12a를 이용하여 상기 제1 단일 가닥 DNA를 절단하는 프라이머 DNA 형성 단계;

상기 프라이머 DNA를 제1 단일 가닥 DNA에 결합시켜 제2 단일 가닥 DNA를 합성하는 제2 핵산 증폭 단계;를 포함하는 핵산 증폭 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1 핵산 증폭단계는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification, RCA)을 이용한 것인, 핵산 증폭 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 방법에서 사용되는 효소는 phi29 중합효소, Bst 중합효소 중 하나 이상인, 핵산 증폭 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제1 단일 가닥 DNA에 CRISPR Cas 12a가 결합되는 것인, 핵산 증폭 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 절단은 트랜스 절단 및 시스 절단인, 핵산 증폭 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 트랜스 절단은 DNA 폴리머라제 억제제를 제거하는 것인, 핵산 증폭 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 시스 절단은 센스 및 안티센스 방향성 증폭을 위한 프라이머 DNA 단편을 생성하는 것인, 핵산 증폭 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 제2 핵산 증폭 단계는 하이퍼브랜치형 회전환 증폭(Hyperbranched Rolling Circle Amplification, HRCA)을 이용한 것인, 핵산 증폭 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 제2 핵산 증폭 단계는 상기 제1 단일 가닥 DNA에 상기 프라이머 DNA를 결합하여 제2 단일 가닥 DNA를 생성하는 것을 포함하는, 핵산 증폭 방법.

청구항 10

제1항의 증폭된 상기 제2 단일 가닥 DNA를 전기화학센서 표면에 부착하여 프로브 DNA와 결합하는 단계를 포함하는. 핵산 검출 방법.

청구항 11

회전환 증폭을 이용한 제1 핵산 증폭 단계; 및

하이퍼브랜치형 회전환 증폭을 이용한 제2 핵산 증폭 단계;를 통해 증폭된 핵산을 검출하는, 전기화학적 센서.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 핵산 증폭은 CRISPR CAS 12a를 이용한 것인, 전기화학적 센서.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 전기화학적 센서의 검출한계(the limit of detection, LOD)는 1 내지 100 aM인, 전기화학적 센서.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 전기화학적 센서의 검출 선택성은 0.0001 내지 0.1 %인, 전기화학적 센서.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 핵산 증폭 방법, 핵산 검출 방법 및 증폭된 핵산을 검출하는 전기화학적 센서에 관련된 것으로, 보다 상세하게는 합성되는 제1 핵산 증폭 단계; 프라이머 DNA 형성 단계; 및 제2 핵산 증폭단계를 포함하는 핵산 증폭 방법, 핵산 검출 방법 및 상기 방법으로 증폭된 핵산을 검출하는 전기화학적 센서에 관련된 것이다.

배 경 기 술

[0002] 순환 전압전류법(Cyclic Voltammetry, CV)는 전기적 활성 화학종 (전기 자극에 반응하는 종)의 산화 환원 반응을 이용하여 전압과 전류를 측정하는 기술이며, 하는 강력하고 널리 사용되는 전기화학 기술이다. 관련하여 질병이나 장애를 진단하기 위한 CV 기반 검사 방법이 개발되고 있다.

[0003] 전기화학적 센서는 핵산 검출에 널리 사용되고 있으나 민감도와 특이도가 낮은한계가 있다. 배선이나 전극 등 전자 부품을 저비용으로 제조하는 방법으로 스크린 인쇄법이 널리 채택되고 있으며, 이 중 스크린 인쇄 전극(Screen Printed Electode, SPE)은 휴대가 가능하며 적절한 표면 기능화시 다양한 물질을 감지할 수 있어, 특히 타겟 DNA(target DNA)와 상보적인 염기서열을 갖는 프로브 DNA(probe DNA) 단편을 전극 표면에 고정화하여 핵산을 특이적으로 간편하게 검출할 수 있는 데 사용할 수 있다.

[0004] 그러나 DNA는 소분자이므로 DNA에 대한 검출 감도는 낮은 농도에서 급격히 감소하기 때문에 타겟 DNA 검출시 특이적 효소를 사용하여 보다 용이하게 증폭 및 검출할 수 있다. 이 때, 민감성이 높고 특이적인 검출을 위해 사용되는 효소와 프라이머 DNA(증폭 물질)를 설계하는 것이 중요하다. 이를 위해 효과적인 DNA 증폭 방법이 필요하다.

[0005] 크리스퍼(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, CRISPR) 유전자 가위 기반의 검출 기술은 현장 진단에 활용될 수 있는 가장 혁신적인 유전자 분석 기술로서, 최근 5년간 CRISPR/Cas 시스템은 자체의 민감도, 특이도, 유연함, 단순함 등의 특징으로 인해 핵산을 검출할 수 있는 강력한 진단 도구 중 하나이다.

[0006] 이 중 Cas12는 프로토스페이서의 인식에 따른 표적 유전자 절단 외에도 표적이 아닌 주변의 단일가닥 DNA(single stranded, ssDNA)의 부수적 절단을 유발한다. Cas12는 부수적으로 단일 가닥 DNA를 분해하는데, 표적 이중 가닥 DNA에 결합을 하면 1초에 대략 1250회의 부수적 절단을 일으키기 때문에, 핵산 검출 및 신호 증폭을 동시에 할 수 있는 효소로서 주목받고 있다.

[0007] 핵산 증폭 방법과 관련하여 종래 PCR(Polymerase Chain Reaction), LAMP(Loop-Mediated Isothermal Amplification) 등의 기술이 알려져 있고, 비교적 낮은 온도에서 효율적인 핵산 증폭을 위해 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification, RCA)을 사용하는 것이 알려져 있다. RCA는 짧은 핵산 프라이머가 원형 주형 및 특수 핵산 중합효소를 사용하여 긴 단일 가닥 핵산을 형성하도록 증폭되는 등온 효소 과정이다.

[0008] 하이퍼브랜치형 회전환 증폭(Hyperbranched Rolling Circle Amplification, HRCA)는 기존 RCA의 느린 증폭 속도를 극복하기 위해 개발되었으나, 타겟 DNA 없이 위양성(false positive)이 증폭된다는 한계가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 출원이 해결하고자 하는 일 기술적 과제는, 핵산 검출에 대한 민감도 및 특이도가 높은 전기화학 센서를 제공하기 위해 효과적인 핵산 증폭 방법을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 출원이 해결하고자 하는 또 다른 기술적 과제는, 증폭된 DNA를 이용한 핵산 검출 방법을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 출원이 해결하고자 하는 또 다른 기술적 과제는, 검출 민감성이 높고, 검출 선택성이 우수한 전기화학적 센서를 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 출원은 핵산 증폭 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 상기 핵산 증폭 방법은 복수개의 타겟 DNA를 포함하는 제1 단일 가닥 DNA가 합성되는 제1 핵산 증폭 단계; CRISPR Cas 12a를 이용하여 상기 제1 단일 가닥 DNA를 절단하는 프라이머 DNA 형성 단계; 상기 프라이머 DNA를 제1 단일 가닥 DNA에 결합시켜 제2 단일 가닥 DNA를 합성하는 제2 핵산 증폭 단계; 를 포함할 수 있다.

[0014] 일 실시예에 따르면, 상기 제1 핵산 증폭단계는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification, RCA)을 이용한 것일 수 있다.

[0015] 일 실시예에 따르면, 상기 방법에서 사용되는 효소는 phi29 중합효소, Bst 중합효소 중 하나 이상일 수 있다.

[0016] 일 실시예에 따르면, 상기 제1 단일 가닥 DNA에 CRISPR Cas 12a가 결합되는 것일 수 있다.

[0017] 일 실시예에 따르면, 상기 절단은 CRISPR CAS 12a에 의한 것일 수 있다.

[0018] 일 실시예에 따르면, 상기 절단은 트랜스 절단 및 시스 절단일 수 있다.

[0019] 일 실시예에 따르면, 상기 제2 핵산 증폭 단계는 하이퍼브랜치형 회전환 증폭(Hyperbranched Rolling Circle Amplification, HRCA)을 이용한 것일 수 있다.

[0020] 일 실시예에 따르면, 상기 제2 핵산 증폭 단계는 상기 제1 단일 가닥 DNA에 상기 프라이머 DNA를 결합하여 제2 단일 가닥 DNA를 생성하는 것을 포함할 수 있다.

[0021] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 출원은 핵산 검출 방법을 제공한다.

[0022] 일 실시예에 따르면, 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 증폭 방법을 통해 증폭된 DNA를 전기화학센서 표면에 부착하여 프로브 DNA와 결합하는 단계를 포함할 수 있다.

[0023] 상기 기술적 과제를 해결하기 위해, 본 출원은 전기화학적 센서를 제공한다.

[0024] 일 실시예에 따르면, 회전환 증폭을 이용한 제1 핵산 증폭 단계; 및

[0025] 하이퍼브랜치형 회전환 증폭을 이용한 제2 핵산 증폭 단계;를 통해 증폭된 핵산을 검출할 수 있다.

[0026] 일 실시예에 따르면, 상기 핵산 증폭은 CRISPR Cas 12a를 이용한 것일 수 있다.

[0027] 일 실시예에 따르면, 상기 전기화학적 센서의 검출한계(the limit of detection, LOD)는 1 내지 100 aM일 수 있다.

[0028] 일 실시예에 따르면, 상기 전기화학적 센서의 검출 선택성은 0.0001 내지 0.1 %일 수 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에 따른 핵산 증폭 방법은 기존 RCA와 HRCA의 단점을 보완하고 높은 LOD 확보하며 위양성 문제를 극복할 수 있다. 구체적으로, CRISPR Cas12a의 트랜스 및 시스 절단 메커니즘을 핵산 증폭 과정에 직접 적용하여 HRCA의 위양성 문제를 보완하고, 핵산 증폭을 극대화하는 방법을 제공할 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명에 따른 핵산 검출 방법은 단일 염기 서열 변이를 검출할 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명에 따른 증폭된 핵산은 전기화학적 센서를 통해 선택성이 높고, 높은 감도로 검출된 바, 단일 염기 변이 센싱 효율이 향상된 전기화학적 센서를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 본 출원의 실시예에 따른 핵산 증폭 방법 및 핵산 검출 방법을 설명하기 위한 순서도이다.

도 2는 본 출원의 실시예에 따른 핵산 증폭 방법에서 CRISPR Cas12a 의존 HRCA의 산물을 확인하기 위한 전기영동(A) 및 형광 분광법(B) 결과이다.

도 3은 본 출원의 실시예에 따른 핵산 증폭 방법에서 트랜스 및 시스 절단(B)을 확인하기 위한 전기영동(A) 형광 분광법(C) 결과이다.

도 4는 본 출원의 실시예에 따른 핵산 증폭 방법에서 CRISPR Cas12a 및 guide RNA 검증을 위한 전기영동 결과이다.

도 5는 본 출원의 실시예에 따른 핵산 증폭 방법에서 phi29 및 Bst 중합 효소의 사용에 따른 전기영동(A) 및 형광 분광법(B) 결과이다.

도 6은 본 출원의 실시예에 따른 핵산 증폭 방법에서 사용된 CRISPR Cas12a 의존 HCRA의 최적화 조건에 관한 도면이다. : (A) phi29와 Bst 2.0의 반응 시간 비율, (B) 원형 템플릿 DNA 농도, (C) RCA에 사용되는 프라이머 DNA 농도, (D) CRISPR Cas 12a 농도

도 7은 본 출원의 실시예에 따른 핵산 증폭 방법에서 사용된 CRISPR Cas12a 의존 HCRA 산물 및 RT-PCR을 사용한 종래의 RCA 산물의 녹는점 분석에 관한 것이다.

도 8은 본 출원의 실시예에 따른 핵산 증폭 방법에서 RCA 프라이머 DNA를 투입하는 타이밍에 따른 CRISPR Cas12a 의존 HCRA에 대한 형광 분광법 결과(A-C) 및 각 A-C의 525nm에서의 RFU 값의 비율에 대한 막대 그래프이

다.

도 9는 C3 억제제 bRCA 프라이머의 길이에 따른 CRISPR Cas12a 의존 HRCA의 최적화 실험(A) 및 C3 억제제 bRCA 프라이머 DNA의 최적 농도를 확인하기 위한 형광 분광법 결과(B)를 나타낸 도면이다.

도 10은 중합효소 반응 완충액과 phi 29 및 Bst 2.0 중합효소의 반응 최적 온도에 관한 도면이다.

도 11은 CRISPR Cas12a의 반응 시간(a) 및 전극에서의 DNA 혼성화 시간에 따른 정규화된 전류값(b)이다.

도 12는 기존 RCA(A 및 B), HRCA(C 및 D) 및 CRISPR Cas12a 의존 HRCA(E 및 F)의 525nm에서 형광 분광법 및 평균 RFU 강도를 나타낸 것이다.

도 13는 본 출원의 실시예에 따른 핵산 증폭 방법을 이용한 전기화학 센서의 성능을 검증하기 위한 실험에 관한 것이다. : (A) 순환 전압전류법에 따른 CV 곡선, (B) 전기화학 임피던스 분광법의 EIS 곡선, 및 (C) 검출 한계 실험을 위한 다양한 농도 및 (D) 선택성 실험을 위한 다양한 유형의 타겟 DNA에 따라 CRISPR Cas12a 의존 HRCA를 사용하여 검출하기 위한 DPV 곡선의 정규화된 전류(제어 전류를 0으로 빼기)는 그래프이다.

도 14는 본 출원의 실시예에 따른 핵산 증폭 방법을 이용한 전기화학적 센서에서 노출된 프로브 DNA 고정 전극과 타겟 DNA 0M, 타겟 DNA 1pM 검출 테스트 전극의 DPV 신호 (전류값)에 관한 것이다.

도 15는 본 출원의 실시예에 따른 핵산 검출 방법에서 검출 한계를 파악하기 위해 대조군(목표 0M)과 양성 그룹의 전류값 차이를 계산하고 선형으로 도시하였다.

도 16는 본 출원의 실시예에 따른 핵산 증폭 방법을 이용한 전기화학적 센서의 전극에서 RCA 및 CRISPR 산물의 검출값을 나타내는 막대 그래프이다.

도 17는 본 출원의 실시예에 따른 핵산 증폭 방법에서 정제, 혈장을 첨가한 (plasma spiked) 및 음성 대조군 (0M) 검출을 위한 정규화된 값의 막대 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 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.

[0034] 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. 또한, 도면들에 있어서, 막 및 영역들의 두께는 기술적 내용의 효과적인 설명을 위해 과장된 것이다.

[0035] 또한, 본 명세서의 다양한 실시예 들에서 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 제 1 구성요소로 언급된 것이 다른 실시예에서는 제 2 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.

[0036] 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 구성 요소를 간접적으로 연결하는 것, 및 직접적으로 연결하는 것을 모두 포함하는 의미로 사용된다.

[0037] 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.

[0039] 본 발명의 일 양태는 핵산 증폭 방법을 제공한다.

[0040] 구체적으로, 복수개의 타겟 DNA를 포함하는 제1 단일 가닥 DNA가 합성되는 제1 핵산 증폭 단계;

[0041] CRISPR Cas 12a를 이용하여 상기 제1 단일 가닥 DNA를 절단하는 프라이머 DNA 형성 단계;

[0042] 상기 프라이머 DNA를 제1 단일 가닥 DNA에 결합시켜 제2 단일 가닥 DNA를 합성하는 제2 핵산 증폭 단계;를 포함하는 핵산 증폭 방법을 제공한다.

[0044] 도 1을 참고하여 각 단계를 설명하면 다음과 같다.

[0045] 제1 핵산 증폭 단계

[0046] 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 증폭 방법 중 제1 핵산 증폭 단계는 회전환 증폭(Rolling Circle Amplification, RCA)을 이용한 것일 수 있다.

[0047] 도 1A는 제1 핵산 증폭 단계이며, 원형의 주형 DNA(Circular template DNA)에 타겟 DNA가 결합하여 원형 또는 아령 모양을 형성한다. 중합효소(ligase)가 원형 주형 DNA의 5' 및 3' 말단을 연결하고, phi29 중합효소(polymerase)가 원을 돌면서 RCA 반응을 사용하여 타겟 DNA가 1차 증폭되며 제1 단일 가닥 DNA를 합성하는 과정이다.

[0049] 프라이머 DNA 형성 단계

[0050] 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 증폭 방법 중 제1 단일 가닥 DNA를 절단하여 프라이머 DNA를 형성하는 단계는 CRISPR Cas 12a를 이용한 것일 수 있고, 상기 절단은 트랜스 절단 및 시스 절단일 수 있다.

[0051] CRISPR Cas12a의 트랜스 절단은 HRCA를 활성화하기 위해 중합효소 억제제를 제거하고, 시스 절단은 센스 및 안티센스 방향성 증폭을 위한 제1 단일 가닥 DNA 단편화를 생성할 수 있다.

[0052] 구체적으로, 도 1B를 참고하면, 제1 단일 가닥 DNA에 guide RNA 와 CRISPR Cas12a가 결합하고 나면 CRISPR Cas12a의 트랜스 절단 및 시스 절단이 발생한다. 이 때, 타겟 DNA가 아닌 단일 변이 염기만 다른 DNA가 증폭되었다면, CRISPR Cas12a는 결합하지 않는다.

[0053] 트랜스 절단은 CRISPR Cas12a 주변에 존재하는 단일 가닥 DNA를 절단하여 C3 억제제 프라이머 DNA를 생성하고, 시스 절단은 제1 핵산 증폭 단계에서 증폭된 제1 단일 가닥 DNA를 절단한다(self-trimming).

[0054] 상기 C3 억제제 프라이머 DNA는 3말단이 탄소 3개의 연속된 구조가 붙어 있어서 더 이상 중합효소가 합성하지 못하는 특징을 가진다. 따라서, C3 구조가 DNA의 3말단에 붙어 있으면 DNA 증폭이 되지 못한다. 그러나 CRISPR Cas 12a에 의해 C3 억제제 프라이머 DNA를 무작위로 자를 경우, C3는 제거되고 새로운 3말단이 노출되어 다음 DNA 증폭에 활용될 수 있다.

[0055] 기존의 CRIPSR Cas12a의 활용 방법은 단순히 DNA 증폭법 이후, CRISPR Cas12a의 기능 중 트랜스 절단만을 주로 활용하였으나, 본 발명은 CRISPR Cas12a의 트랜스 절단 및 시스 절단 모두 DNA 증폭과정에 직접적으로 활용한 것을 특징으로 한다.

[0056] 즉, CRISPR Cas12a의 트랜스 절단을 통해 주변 C3 억제제 프라이머 DNA를 절단하고 시스 절단을 통해 RCA 산물을 절단하여 C3가 제거되고 새로운 3말단이 노출된 프라이머 DNA가 형성된다.

[0058] 제2 핵산 증폭 단계

[0059] 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 증폭 방법 중 제2 핵산 증폭 단계는 하이퍼브랜치형 회전환 증폭(Hyperbranched Rolling Circle Amplification, HRCA)을 이용한 것일 수 있다. 상기 제2 핵산 증폭 단계는 상기 제1 단일 가닥 DNA에 상기 프라이머 DNA를 결합하여 제2 단일 가닥 DNA를 생성하는 것을 포함할 수 있다.

[0060] 일 실시예에서 사용되는 효소는 phi29 중합효소, Bst 중합효소 중 하나 이상일 수있다.

[0061] 도 1C는 Bst 중합효소에 의해 증폭된 제1 단일 가닥 DNA에 C3 제거된 프라이머 DNA를 결합시키는 HRCA을 진행하여 제2 단일 가닥 DNA를 생성하는 제2 핵산 증폭 단계이다.

[0062] RCA 또는 HRCA의 경우, 증폭 시작 전에 중합을 한다. 이 때, 중합 과정에서 타겟 DNA가 아닌 다른 DNA가 결합할 수 없기 때문에 타겟 DNA만이 원형 DNA의 중합을 유도할 수 있다. 그러나 타겟 DNA와 유사한 단일 염기만 다를

경우에는 그 결합력이 흡사하여 타겟이 아니어도 보다 낮은 효율로 중합될 가능성이 있다.

[0063] 특히, HRCA의 경우 프라이머 DNA가 최소 2개 이상 개입되기 때문에 프라이머 DNA와 중합되지 않은 원형 DNA까지 타겟 DNA가 없어도 원치 않는 증폭이 발생할 수 있다. 이 로 인해 타겟 DNA가 없어도 증폭되는 위양성 (false positive)가 생겨난다.

[0064] 또한, Bst 중합효소는 원래 루프 매개 등온 증폭(LAMP)에 사용된 것으로, Bst 중합효소의 DNA 합성 속도는 빠르지만 프라이머 DNA가 자가 혼성화되어 있어도 위양성이 발생할 수 있다.

[0065] 종래의 HCRA는 긴 길이의 이중가닥의 DNA가 형성되는데 반해, 본 발명은 CRISPR Cas 12a의 시스 절단으로 긴 단일가닥을 일정 패턴으로 절단함으로써 짧은 가닥의 DNA가 형성되며, Bst 중합효소의 특성으로 이중가닥이 분리되면서 추가 합성을 하기 때문에 결과적으로 수많은 단일가닥의 DNA들이 증폭될 수 있다.

[0066] 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 증폭 방법은 CRISPR Cas12a의 두 가지 절단 메커니즘을 HRCA에 적용하여 HRCA 방법의 단점을 보완하고 DNA 증폭을 극대화할 수 있다.

[0068] 본 발명의 다른 양태는 핵산 검출 방법을 제공한다.

[0069] 도 1D는 제2 단일 가닥 DNA를 전기화학적 센서 표면에 부착된 프로브 DNA와 결합시키는 핵산 검출 단계로, 증폭된 수많은 단일 가닥의 DNA들을 전기화학적 센서 표면에 부착된 프로브 DNA와 결합하여 전극 표면에서 검출될 수 있다. 전극에서 표면 전위를 전해질 (FeCN)을 통해 측정한다. 만약 증폭된 DNA가 표면에서 검출되면 전극 표면의 저항이 증가하여 전해질의 환원도가 낮아지므로, 낮아진 환원도/신호를 검출하여 단일 염기 변이를 검출할 수 있다.

[0071] 본 발명의 또 다른 양태는 전기화학적 센서를 제공한다.

[0072] 본 발명의 일 실시예에 따른 전기화학적 센서는 회전환 증폭을 이용한 제1 핵산 증폭 단계; 및 하이퍼브랜치형 회전환 증폭을 이용한 제2 핵산 증폭 단계;를 통해 증폭된 핵산을 검출할 수 있다.

[0073] 본 발명은 CRISPR 유전자 가위를 핵산 증폭법에 직접적으로 응용하여 새로운 형태의 핵산 증폭 기법을 개발하였고(CRISPR Cas12a 의존 HRCA), 이를 전기화학적 센서에 적용하였다.

[0074] 전기화학적 센서에서는 감지되는 타겟 DNA 신호가 중요하며, 이러한 신호를 감지하는 다양한 방법이 있다.

[0075] 본 발명의 일 실시예에서는 산화환원 반응에 의해 생성된 전자이동을 이용할 수 있다. 두 종류의 중합효소와 CRISPR 효소를 이용한 전기화학적 센싱 기술과 DNA 증폭법을 이용하여 고감도로 검출할 수 있다. 증폭된 DNA는 전기화학적 센서 표면의 프로브 DNA에 결합된다. 결과적으로 센서는 전극 표면의 커버리지 변화를 통해 산화 환원 반응의 전기 신호 감소를 감지할 수 있다.

[0076] 구체적으로, RCA 증폭 중 타겟 DNA가 원형 DNA의 3말단과 5말단을 이어주면서 결합하면, 중합 효소가 원형 DNA의 3말단과 5말단을 연결하여 원형 DNA를 완전한 원의 형태로 만들어준다. 이후 phi29 중합효소가 원형 DNA를 돌면서 염기를 계속 복사하여 긴 단일 가닥 DNA 증폭물을 생성할 수 있다(제1 핵산 증폭).

[0077] 이후 RCA로 인한 증폭물에 프라이머 DNA가 결합하여 또 다른 방향으로의 증폭을 유도하는 HRCA를 통해 제2 핵산 증폭이 발생하며, 본 발명의 일 실시예에서는 증폭된 DNA를 검출하기 위한 전기화학적 센서를 제공할 수 있다.

[0078] 구체적으로, 전기화학적 센서는 금 전극으로 구성될 수 있고, 금 전극 표면에는 증폭한 단일 가닥 DNA이 결합되는 프로브 DNA가 부착될 수 있다.

[0079] 전기화학적 센서에서는 전해질 FeCN의 환원도를 측정하는데, 전극 표면에 DNA가 많이 생기면 DNA가 가지고 있는 전기적 음성도에 의한 반발력에 의해 FeCN 전해질의 환원도가 낮아지게 된다.

[0080] 일 실시예에서 상기 핵산 증폭은 CRISPR Cas 12a를 이용한 것일 수 있다.

[0081] 일 실시예에서 상기 전기화학적 센서의 검출한계(the limit of detection, LOD)는 1 내지 100 aM일 수 있다. 해당 범위 내에서 증폭된 DNA 및 단일 염기 변이를 효율적으로 검출할 수 있다.

[0082] 제2 핵산 증폭 단계에서 HRCA는 이중 가닥 DNA를 생성하지만, Bst 중합효소에 의한 등온 증폭을 통해 단일 가닥

DNA가 생성될 수 있으며, 도 1D와 같이 HRCA 산물은 CV를 사용하여 검출될 수 있다.

[0083] 일 실시예에서 CV 측정은 다음과 같이 수행될 수 있다.: [Fe(CN)6]3-/4-산화 환원 반응에 의한 환원 시, HRCA DNA는 프로브 DNA에 결합하였고, 산화 환원 반응에 의한 표면 환원량의 감소는 ssDNA가 금 전극의 표면을 덮고 있기 때문에 DPV를 이용하여 측정할 수 있다. 이 때, 증폭된 단일 가닥 DNA의 양은 전기화학적 신호의 값과 연결되고, 시스 및 트랜스 절단을 통한 이중 증폭이기 때문에 본 발명의 일 실시예에 따른 전기화학적 센서는 민감한 검출 한계를 보일 수 있다.

[0084] 일 실시예에서 상기 전기화학적 센서의 검출 선택성은 0.0001 내지 0.1 %일 수 있다. 해당 범위 내에서 증폭된 DNA 및 단일 염기 변이를 효율적으로 검출할 수 있다.

[0085] 본 발명은 CRISPR Cas 12a를 HCRA를 이용한 핵산 증폭에 직접 활용하고, CRISPR Cas12a의 트랜스 절단 및 시스 절단을 이용하여 종래 RCA/HRCA의 단점을 보완하고 효율적으로 증폭시킴으로써, 본 발명의 일 실시예에 따른 핵산 증폭 방법을 이용한 전기화학적 센서의 민감도, 특이도를 개선할 수 있다.

[0087] 이하, 본 출원의 실시예에 따른 단일 염기 서열 변이 검출 방법의 구체적인 실험 예 및 특성 평가 결과가 설명된다.

[0089] **재료, 실험기구 및 분석방법**

[0090] 1. 재료

[0091] phi29 중합효소 반응 버퍼 10X, phi29 중합효소, SYBR쩨 Safe 핵산 젤 스테인(10,000X) 및 RNase-free 물은 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.

[0092] EnGen® Lba Cas12a(Cpf1), NEBuffer 2.1 10X, Bst 2.0 중합효소, 등온 반응 완충액 10X, 리가아제, 리가아제 반응 완충액 10X 및 dNTP(각각 10mM)는 New England Biolabs(Ipswich, MA, USA)에서 구입하였다.

[0093] 모든 DNA는 Integrated DNA Technologies에 의해 합성되었다. 가이드 RNA(gRNA)는 Bioneer(대전, 한국)에서 설계하였다.

[0094] Agarose gel과 TBE buffer 10X는 Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 스크린 인쇄된 금 전극(220AT)은 일회용 전극으로 만들어진 것으로 Metrohm(서울, 한국)에서 구입하였다. 해당 전극 재사용시 감도 성능이 저하되고, 현장에는 KRAS 타겟 ctDNA가 거의 존재하지 않으므로, LOD 농도 근처에ㅓ의 감도와 정확도가 중요하다. 따라서 본 실험에서는 해당 센서를 재사용하지 않았다.

[0096] 2. 실험기구

[0097] HRCA 과정은 이중가닥 DNA를 대량으로 생산하기 때문에 SYBR쩨 green을 이용하여 검출하였다. SYBR쩨 그린의 형광은 SpectraMax I3(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 사용하여 500-600 nm에서 측정하였다.

[0098] HRCA 산물을 확인하기 위해 겔 전기영동을 수행하였다. 겔은 1X TBE 용액 및 2% 아가로스 겔을 사용하여 제조하였다. 용액을 마이크로웨이브 오븐에서 가열하고 금형에서 응고시켰다. Loading star 6X(2μL)와 DNA 용액(20μL)을 젤에 로딩하고 150V를 20분 동안 적용하였다.

[0099] 겔 사진을 캡쳐하기 위해 Gel Doc을 사용하였다. 가열 블록(HB-R48, DAIHAN Scientific, Kangwon, Korea)을 사용하여 등온 조건에서 용액을 배양하였다.

[0100] 용융 곡선은 CFX 96 실시간 PCR 시스템(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 얻었다.

[0101] CV, 차동 펄스 전압전류법(DPV) 및 전기화학적 임피던스 분광법(EIS)을 포함한 모든 전기화학적 측정은 CompactStat(Ivium Technologies B.V., Eindhoven, Netherlands)를 사용하여 수행하였다.

[0102] 형광 이미지는 Olympus BX53 형광 현미경(Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 획득하였다.

[0104] 3. 분석방법

[0105] 1) Cas12a 의존 HRCA 분석

[0106] Padlock DNA(1μM, 0.5μL), ligase buffer 10x(0.5μL), 여러 농도의 타겟 DNA(0.5μL) 및 RNase-free water(3.375μL)를 혼합하였다. 용액을 95 ° C에서 가열하고 0.1 ° C/10초에서 25 ° C로 어닐링하였다. 그런 다음 500kU 리가제(0.125μL)를 변성된 샘플에 첨가하였다. 용액을 30℃에서 1시간 동안 인큐베이션하고 65℃에서 10분 동안 비활성화시켰다. 반응 버퍼 10X(5μL), phi29 중합효소 U(1.5μL), 100mM MgSO4(3μL), 10μM RCA 프라이머(5μL), 10mM dNTP(10μL) 및 RNase-free water (20.5 μL)를 5 μL 변성 용액에 첨가하고 35 ° C에서 1.5시간 동안 배양하였다.

[0107] Cas12a는 NEBuffer 2.1을 사용하여 100배 희석시켰다. 희석된 Cas12a(6μL) 및 gRNA(18μL)를 25° C에서 10분 동안 미리 혼합하였다. Cas12a 및 gRNA 복합체(24μL), 1μM C3 억제제 HRCA 프라이머 DNA(C3 억제제 프라이머 DNA)(5μL) 및 Bst 2.0 중합효소(16U, 2μL)를 RCA 샘플에 첨가하였다. Cas12a 절단 반응을 37℃에서 30분 동안 수행하였다. 용액을 50℃에서 30분 동안 배양하였다. phi29 또는 Bst 2.0의 중합 시간은 최적화 실험을 통해 조절하였다. 실시간 qPCR을 위해 25μL 용액을 피펫팅하였다. 열 사이클은 60 ° C에서 1분 동안 실행되었고 순환 프로세스는 55 ° C에서 1분 동안 수행되었으며 플레이트는 10초 동안 판독되었다.

[0109] 2) CRISPR Cas12a 분석

[0110] Cas12a(100배 희석, 6μL) 및 gRNA(18μL)를 37° C에서 10분 동안 배양하였다. 그런 다음 이중 가닥 DNA(100nM) 및 리포터 DNA(1μM)를 준비하였다. Cas12a 및 gRNA 복합체를 첨가하고 샘플을 PCR을 위해 배양하여 30초 이내에 형광 강도를 측정하였다.

[0112] 3) 전기화학적 분석(CV, EIS 및 DPV)

[0113] CV 측정은 다음 조건을 사용하여 수행하였다: -0.2 ~ 0.6V 사이의 전위 범위, 0.6V의 E 시작, 10mV의 E 단계 및 100mV/s의 스캔 속도.

[0114] EIS 측정은 0.1Hz와 100kHz 사이의 주파수 범위, 0.007V의 전위 진폭, 0.18V의 E 시작, 100μA의 전류 범위 및 5초의 평형 시간과 같은 매개변수로 수행하였다.

[0115] DPV 측정의 매개변수는 다음과 같다: 전위 범위 -0.5~0.2V, 평형 시간 5초, 펄스 시간 10ms, 펄스 진폭 50mV, 스캔 속도 50mV/s, E 단계 10mV.

[0116] 모든 전기화학적 측정은 5.0mM RE 용액을 포함하는 0.1M KCl에서 수행하였다.

[0118] 4) 본 실험에서 사용한 핵산 list

표 1

[0119]

Name	Sequences (5' - 3')
Circular template DNA	(Phosphorylation) - TCAGCTCCAACTACCCCACAACCCGTCGGGCGTGAAAATGAGAGAAAAAGTACCGACGGG TTACTCTATATTCTACTCTTGCCTACGCCA
RCA primer DNA	CATTTTCA
Guide RNA	UAAUUUCUACUAAGUGUAGAUACGCCAUCAGCUCCAACUAC
C3 억제제 primer DNA (8 bp)	TGAGAGAA - C3
C3 억제제 primer DNA (12 bp)	AATGAGAGAAAA - C3
C3 억제제 primer DNA (16 bp)	AAAATGAGAGAAAAAG - C3
C3 억제제 primer DNA (20 bp)	TGAAAATGAGAGAAAAAGTA - C3
C3 억제제 primer DNA (24 bp)	CGTGAAAATGAGAGAAAAAGTACC - C3
C3 억제제 primer DNA (28 bp)	GGCGTGAAAATGAGAGAAAAAGTACCGA - C3

KRAS G12D target DNA	GTAGTTGGAGCTGATGGCGTAGGCAAGAGT
KRAS wild type DNA	GTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGT
EGFR mutant DNA 1	ATTCCCGTCGCTATCAAAACATCTCCGAAA
EGFR mutant DNA 2	ATTCCCGTCGCTATCAAGACATCTCCGAAA
NRAS mutant DNA	CAGGTTCTTGCTGGTGTGAAATGACTGAGT
BRAF mutant DNA	TCTAGCTACAGAGAAATCTCGATGGAGTGG
Reporter DNA	FAM - TTATT - BHQ1
Probe DNA	Thiol - GAATATAGAGTAACCCGTCGG
Fluorescent - thiol DNA	Thiol - ACCTAAGCAATG/Int.CY5/AGA

[0121] **실시예**

[0122] 1. CRISPR Cas12a 의존 HRCA 검증

[0123] CRISPR Cas12a의 트랜스 및 시스 절단 메커니즘을 확인하기 위해 전기영동 및 형광 분광법을 사용하였다.

[0124] 구체적으로, 증폭된 DNA의 양을 확인하기 위해 형광 분광법을 적용하였다. CRISPR Cas12a 의존 HRCA의 합성 순서는 합성, RCA(1차 증폭), CRISPR Cas12a 트랜스 절단 및 시스 절단, Bst 중합(2차 증폭)으로 이루어졌다. 각각의 과정을 전기영동과 형광분광법을 이용하여 검증하였으며, 도 2에 나타내었다.

[0125] 도 2A의 전기영동 결과에서 Lane 1과 Lane 2에서는 Lane 2가 중합만 되었기 때문에 동일한 라인으로 나타났다. Lane 3은 RCA 산물이며, RCA 산물의 큰 분자 크기로 인해 밴드는 젤의 상단에만 표시되었다. CRISPR Cas12a 산물의 경우, Lane 4에서 쪼개지면서 밴드가 약하게 나타났다. 마지막으로 HRCA는 Lane 3과 비교하여도 밴드의 밝기를 최대화하였다. DNA를 직접 분자 크기로 관찰하기 위해 전기영동을 이용하였지만, RCA 산물과 같은 큰 분자를 구별하기 어려웠다.

[0126] 도 2B의 형광 분광법에서 Bst 중합(2차 증폭)단계가 가장 밝은 밴드를 나타냈고,형광값이 가장 높았다. 정량적으로, 형광강도 값이 RCA(1차 증폭) 공정에 비해 유의하게 높았다. CRISPR Cas12a를 첨가했을 때 형광값이 약간 증가하였다. SYBR쩨 녹색 형광 염료는 DNA-RNA 혼성화 과정에서 킬레이트된 반면, gRNA는 CRISPR Cas 과정에서 결합되었다. 이는 음성 실험에서도 음성 신호를 증가시키는 요인이 되므로 형광법을 이용한 검출한계(LOD)는 타당하지 않은 것일 수 있다.

[0127] 따라서 본 실시예에서는 CRISPR Cas12a 의존 HRCA를 통한 ssDNA 검출의 LOD를 향상시키기 위해 전극을 이용한 민감한 검출을 수행하였다.

[0129] 2. CRISPR Cas12a의 트랜스 및 시스 절단

[0130] 본 실시예에서는 CRISPR Cas12a에 의한 트랜스 절단 및 시스 절단을 순차적으로 검증하였다. 이중 가닥 DNA와 형광 소광제 리포터 ssDNA를 인식하는 gRNA 복합 CRISPR Cas12a를 사용하여 트랜스 절단을 수행하였다.

[0131] 도 3A에 도시된 바와 같이, RCA 산물의 절단이 시스 절단임을 확인하였다. 도 3A의 Lane 1과 2는 각각 RCA 양성 및 RCA 음성 증폭 결과이다. Lane 3은 RCA 양성 산물에 CRISPR Cas12a와 복합체를 형성한 gRNA를 첨가한 후 절단한 결과이다.

[0132] 도 3B와 3C는 real-time qPCR을 기반으로 시간에 따른 트랜스 절단을 통해 형광과 퀀처(quencher)가 분리되어 형광값이 증가함을 확인하였다. RCA 산물이 CRISPR Cas12a에 의해 절단되었기 때문에 Lane 2(RCA)의 강도는 Lane 4(CRISPR 절단 후)로 감소하였다. CRISPR Cas12a는 RCA 산물을 더 작은 분자로 분리하였다. Lane 4에서 절단된 작은 분자는 빨간색 상자에 표시되는데. 이것은 시스 절단에 의한 RCA 단편의 생성에 대한 증거이다. 앞서 언급한 두 가지 실험을 통해 CRISPR Cas12a에 의한 트랜스 절단 및 시스 절단이 성공적임을 확인하였다.

[0133] CRISPR Cas12a 및 gRNA의 사용을 검증하였다. 도 4은 전기영동 이미지를 보여준다. RCA 제품은 모든 Lane에 적용되었다. Lane 1은 CRISPR Cas12a 및 gRNA에 대한 양성 대조군이다. Lane 2, 3 및 4는 CRISPR Cas12a 또는 gRNA의 부재에 대한 음성 대조군이다. 번짐 밴드는 CRISPR Cas12a로 인한 시스 절단의 증거인 Lane 1에 표시된다. 이 실험을 통해 CRISPR Cas12a 및 gRNA 복합체가 RCA 산물을 RCA 단편으로 절단한다는 것을 확인하였다.

[0135] 3. 중합효소, 프라이머 DNA 및 CRISPR Cas12a의 최적화

[0136] - 중합효소 사용 시간 최적화

[0137] DNA 증폭 성능을 극대화하기 위해서는 중합효소를 최적화해야 한다. Phi 29 중합효소는 기존의 RCA에 사용되어 왔지만 phi 29는 적당한 증폭 속도를 가지고 있으므로, 탐지 시간을 늘려야 한다. 한편, Bst 중합효소는 증폭 속도가 빠르기 때문에 LAMP에 Bst 중합효소가 사용되어 왔으나, 오 검출 문제가 쉽게 발생하기 쉽다.

[0138] Phi29 중합효소는 초기에 위양성이 없는 긴 RCA 산물을 생성하고, 그런 다음 중합효소는 위양성으로 단시간에 RCA 제품을 증폭한다.

[0139] 본 실시예에서는 위양성 신호를 최소화하는 phi29중합효소와 DNA 증폭을 최대화하는 Bst 중합효소를 모두 사용하였다. 두 효소 모두 장점을 극대화하기 위해 각각의 역할에 따라 증폭을 위한 시간 비율을 조절하였다.

[0140] 도 5는 각 phi29 및 Bst 중합 효소의 적용을 나타낸다. phi29 중합효소만 사용한 경우 양성 대조군(파란색)은 중간 값을 나타내었다. Bst 중합효소만 사용한 경우 양성 대조군(파란색)은 높은 값을 나타내었다. 그러나 음성 대조군(회색)도 HRCA를 수행할 때 원치 않는 DNA 산물이 많이 형성되었기 때문에 높은 값을 나타내었다. 이로 인해 위양성 증폭이 발생함을 알 수 있다.

[0141] 도 6에 도시된 바와 같이, HRCA의 신호는 phi29 중합효소의 사용 시간 비율에 따라 증가하였다. 더 긴 RCA 제품이 더 긴 DNA HRCA를 생성하기 때문이다. 우리의 방법은 CRISPR Cas12a에 의한 시스 절단을 사용하기 때문에 RCA 조각은 원래 RCA 제품보다 짧다. 이것은 HRCA의 합성 효율을 유지하기 위해 phi29 중합효소로 가능한 한 많은 제품을 합성하는 데 중요하다.

[0142] Bst 중합효소로 짧은 시간 동안 증폭되었지만 RCA 단편은 이중 가닥 DNA로 변경되었고(도 7), 동일한 길이의 ssDNA가 연속적으로 생성되었다. Bst polymerase는 phi29보다 합성 속도가 1,000배 빠르기 때문에 상대적으로 짧은 시간 증폭 후에도 HRCA 신호가 충분히 높았다. 따라서 중합효소를 처리하는 시간은 phi29에 대해 더 길고 Bst에 대해 더 짧게 설정하는 것을 고려할 수 있다.

[0143] - 원형 템플릿 DNA 농도 최적화

[0144] 고정된 농도의 타겟 DNA를 적용하여 원형 주형 DNA, 프라이머 DNA 및 CRISPR Cas12a의 농도를 최적화하는 최적화 실험을 수행했다. 원형 주형 DNA는 구조적으로 아령 모양이고, 음성 대조군의 형광값을 증가시키는 이중 가닥 절편을 가진다. 도 6B에 표시된 대로 원형 템플릿 DNA 농도에 따라 양성 및 음성 대조군의 525 nm 형광 강도 비율을 얻었다. 그 결과, 100 nM 원형 템플릿 DNA가 최적의 농도임을 보여주었다.

[0145] - RCA 프라이머 DNA 농도를 최적화

[0146] 도 6C에서 RCA 프라이머 DNA 농도를 최적화하였다. RCA 효율을 높이기 위해 추가 RCA 프라이머 DNA를 사용했다. 이 프라이머는 원형 주형 DNA의 루프 부분에 결합하여 이론적으로 RCA를 향상시킨다. 그러나 RCA 프라이머는 원치 않는 DNA 증폭 가능성도 있으므로, RCA 프라이머 DNA 농도는 1μM으로 고정하였다.

[0147] - RCA 프라이머 투입 순서 최적화

[0148] RCA 프라이머 DNA를 언제 사용하였는지에 따른 RCA 프라이머 최적화 실험을 수행하였다. 비교를 위해 RCA 프라이머를 첨가하지 않은 실험을 진행하였다. 도 8 A-C에 표시된 대로 형광 분광법을 사용하여 양성 및 음성 대조군의 525 nm 형광 강도 비율을 얻었다. 그 결과 RCA 수행 전에 RCA 프라이머를 추가해야 함을 고려할 수 있다.

[0149] - C3 억제제 프라이머 DNA 길이 및 농도 최적화

[0150] C3 억제제 프라이머 DNA를 DNA 길이와 농도에 대해 최적화하였다. CRISPR Cas12a는 트랜스 절단 후 C3 억제제를 제거하지만 프라이머 DNA의 길이는 동시에 짧아진다. 따라서, 단축된 DNA의 길이는 랜덤하기 때문에 충분한 길이의 프라이머 DNA가 확보되어야 한다.

[0151] 반면, 더 긴 C3 억제제 프라이머 DNA는 RCA 제품에 결합할 수 있으며 CRISPR Cas12a에 의해 절단되지 않는다. 따라서, 프라이머 DNA의 적절한 길이를 결정하는 것이 필요하다. 도 10A를 참고하면 20 mer의 길이는 전기 영동 및 형광 분광법에 의해 결정되었다.

[0152] 한편, C3 억제제 프라이머 DNA의 농도가 너무 높으면 절단되지 않은 C3 억제제 primer DNA가 RCA 산물에 결합하

여 HRCA 증폭 효율이 저하된다. 도 9B에 나타낸 바와 같이, C3 억제제 프라이머 DNA의 최적 농도는 형광 분광법을 사용하여 100nM인 것으로 결정되었다.

[0153] 마찬가지로 CRISPR Cas12a의 농도는 두 가지 측면에서 필수적이다. 이는 CRISPR Cas12a의 농도가 C3 억제제 프라이머 DNA의 활성화와 RCA 단편의 평균 길이를 결정하기 때문이다. 본 실시예에서 CRISPR Cas12a의 농도는 형광 분광법을 사용하여 600 nM으로 설정되었다(도 6D).

[0154] 도 10에 나타낸 바와 같이, 중합효소 완충액 조건, phi29 중합효소 반응 온도 및 Bst 2.0 반응 온도를 사용하여 추가 최적화를 수행하였다.

[0155] 마지막으로 도 11에 나타낸 바와 같이, 전기 화학 센서에서 증폭된 DNA 검출 시간과 CRISPR Cas12a 반응 시간을 최적화하였고, 30분으로 설정되었다.

[0157] 4. 순환전압전류법(Cyclic Voltagmmetry)을 이용한 KRAS G12D의 기존 방법 및 고감도 검출과의 비교.

[0158] 본 실시예에서는 KRAS DNA 염기서열을 타겟 DNA로 설정하였다. KRAS 유전자는 암 환자를 진단하거나 모니터링하는 중요한 바이오마커로 알려져 있다. KRAS 변이 유전자는 세포의 성장 인자 신호 감소를 불활성화하는 것과 관련이 있다. 그럼에도 불구하고 KRAS 돌연변이는 단일 염기 다형성(SNP) 또는 변이체(SNV)라고 불리는 단일 점 돌연변이로 발현되었다. 단일 점 돌연변이 KRAS 유전자의 검출은 환자의 생존을 결정할 수 있다. 따라서 KRAS SNP의 민감하고 선택적인 검출이 필요하다.

[0159] 빠른 검사를 위해 DNA 증폭 또는 기존 방법(RCA, HRCA)과 본 발명의 핵산 증폭 방법을 비교하기 위해 형광 분광법을 선택했다(도 12). 정량화된 검출을 위해 순환 전압 전류법에 적용하였다.

[0160] HRCA 산물의 검출을 검증하기 위해 CV 및 EIS 곡선 특성을 결정하였다. 도 13A에서 CV 곡선은 노출된 프로브 DNA 고정 전극을 나타낸다. 0 M 및 100 pM 타겟 DNA HRCA 산물은 CRISPR Cas12a-의존성 HRCA에 의해 검출되었다. [Fe(CN)6]3-/4- 환원이 일어났고 산화 피크는 각각 0.17과 0.3 V에서 나타났다. 고정된 프로브 전극은 맨 전극에 비해 양극 및 음극에서 피크 전류 감소를 보여 전극에 프로브 DNA의 고정화를 나타낸다.

[0161] DNA 백본에서 다수의 음전하를 띤 인산기가 존재하면 음전하를 띤 산화환원 분자가 표면으로 확산되는 것을 억제한다. 따라서 프로브 DNA 고정화 전극은 음으로 하전된 DNA와 페리시안화물 이온의 정전기 반발로 인해 [Fe(CN)6]3-/4-산화환원 결합의 피크 전위에서 이동을 나타낸다. 프로브 DNA 고정화시 [Fe(CN)6]3-/4- 피크가 감소하였고 검출된 0 M 타겟 DNA는 프로브 DNA 고정화 전극과 유사한 피크를 보였다.

[0162] 그러나 100pM 타겟 DNA 샘플을 가진 CRISPR Cas12a 의존적 HRCA 산물이 첨가되었을 때 [Fe(CN)6]3-/4- 피크가 급격히 감소하였다. 이는 프로브 DNA가 CRISPR Cas12a 의존적 HRCA 산물로부터 긴 ssDNA를 포획하고 전극 표면이 DNA로 차단되었기 때문이다. 따라서 [Fe(CN)6]3-/4- 환원이 억제됨을 알 수 있다.

[0163] EIS 곡선(도 13B)은 그림 5B에 표시된 절차를 비교하기 위해 준비되었다. 프로브 DNA의 표면 변형 및 HRCA 산물의 검출도 검증되었다. 각 EIS 곡선은 반원형 곡선의 반경을 계산하기 위해 Nyquist 플롯으로 피팅되었다. Randle 회로는 반원형 곡선에 맞게 선택됩니다. R1, C1, R2 및 W1은 각각 솔루션 저항, 이중층 커패시턴스, 전하 이동 저항 및 Warburg 임피던스를 나타낸다. 반원 그래프의 지름을 구하여 전극의 임피던스를 분석하였다. DNA 혼성화 후 산화 환원 피크의 감소는 금 표면의 [Fe(CN)6]3-/4- 환원에 대한 장벽으로 작용하는 HRCA 산물의 존재 때문이었다. 프로브 고정화(867.7Ω) 및 0M 타겟 DNA(1090Ω)의 검출은 전극에서 작은 저항을 초래하였다(Bare, 498Ω). 그러나 100pM 타겟 DNA(1937Ω) 샘플을 포함하는 CRISPR Cas12a 의존적 HRCA 제품은 전극에서 상당한 임피던스를 나타내었다. 이 현상은 ssDNA가 프로브 DNA에 포획되어 전극을 덮어 [Fe(CN)6]3-/4- 환원을 억제함을 나타낸다.

[0164] CV와 EIS 결과를 확인한 후 DPV를 이용하여 농도에 따른 타겟 DNA를 검출하여 검출한계를 얻었다. 도 14은 노출된 프로브 DNA 고정 전극과 타겟 DNA 0M, 타겟 DNA 1pM 검출 테스트 전극의 DPV 신호를 보여준다. 앞서 언급한 바와 같이 HRCA 산물이 장벽으로 작용하여 [Fe(CN)6]3-/4-의 환원이 방해되어 probe DNA가 고정화되어 타겟 DNA가 검출되었을 때 DPV의 신호가 감소하였다. 타겟 DNA의 농도를 1pM에서 1aM으로 낮추어 전위에서의 DPV 값을 증가시켰다. 검출 한계를 파악하기 위해 대조군(목표 0M)과 양성 그룹의 차이를 계산하고 선형 피팅에 피팅하였다(도 15). 도 13C는 DPV 및 선형 맞춤 그래프를 보여준다. 선형 피팅 방정식은 I=48.0718 log C+41.62018이었다(I 및 C는 각각 타겟 DNA의 평균 정규화 전류 및 농도임).

[0165] 조정된 R^2 값은 0.9992였다. DPV를 사용하여 표준 편차와 평균을 비교한 결과 LOD는 10 aM였다. RCA를 CRISPR(HRCA 없음)로, RCA를 HRCA로 탐지하였다(도 16). HRCA가 없는 검출 한계는 100fM이므로 HRCA에 의해 LOD가 10,000배 향상되었다. 선형 적합의 절편을 계산하였고, 선형 적합 방정식의 3개의 표준편차를 사용하여 LOD는 5.95 aM인 것으로 밝혀졌다.

[0166] 실제 샘플에 대한 민감한 성능을 확인하기 위해 DNA 스파이크 플라즈마 샘플에서 검출을 수행하였다. 1fM의 타겟 DNA를 구연산 처리된 혈장에 넣었다. 샘플을 Qiagen circulating Qiagen Circulating 핵산 정제 키트로 정제하였다. 이후 동일한 방법으로 검출 과정을 진행하여 그 결과를 도 17에 나타내었다. 정제된 시료를 가지고도 13C와 일치함을 확인하였다. 스파이크된 DNA 혈장도 직접 검출했지만, 혈장의 점도와 잔해물에 의한 비특이적 결합 효과로 인해 정규화된 전류 값이 약간 감소하였다.

[0167] 또한, KRAS(kirsten rat sarcomaviral oncogene homolog) G12D 맞춤형 검출, KRAS 야생형 DNA, 표피 성장 인자 수용체(EGFR), 신경모세포종 쥐 육종 바이러스 종양유전자 동족체(NRAS) 및 v-raf 쥐 육종 바이러스 종양유전자를 검증하기 위해 동족체 B1(BRAF) ctDNA도 분석하였다. 도 13D와 같이 KRAS G12D만 감지되었다. 도 13C에 표시된 KRAS 야생형 DNA의 값을 기반으로 단일 점 돌연변이로 선택성을 0.01%로 계산하였다. 상기 실험을 바탕으로 CRISPR Cas12a 의존적 HRCA가 다양한 암 ctDNA 중에서 타겟 DNA를 식별하는 데에도 사용될 수 있다.

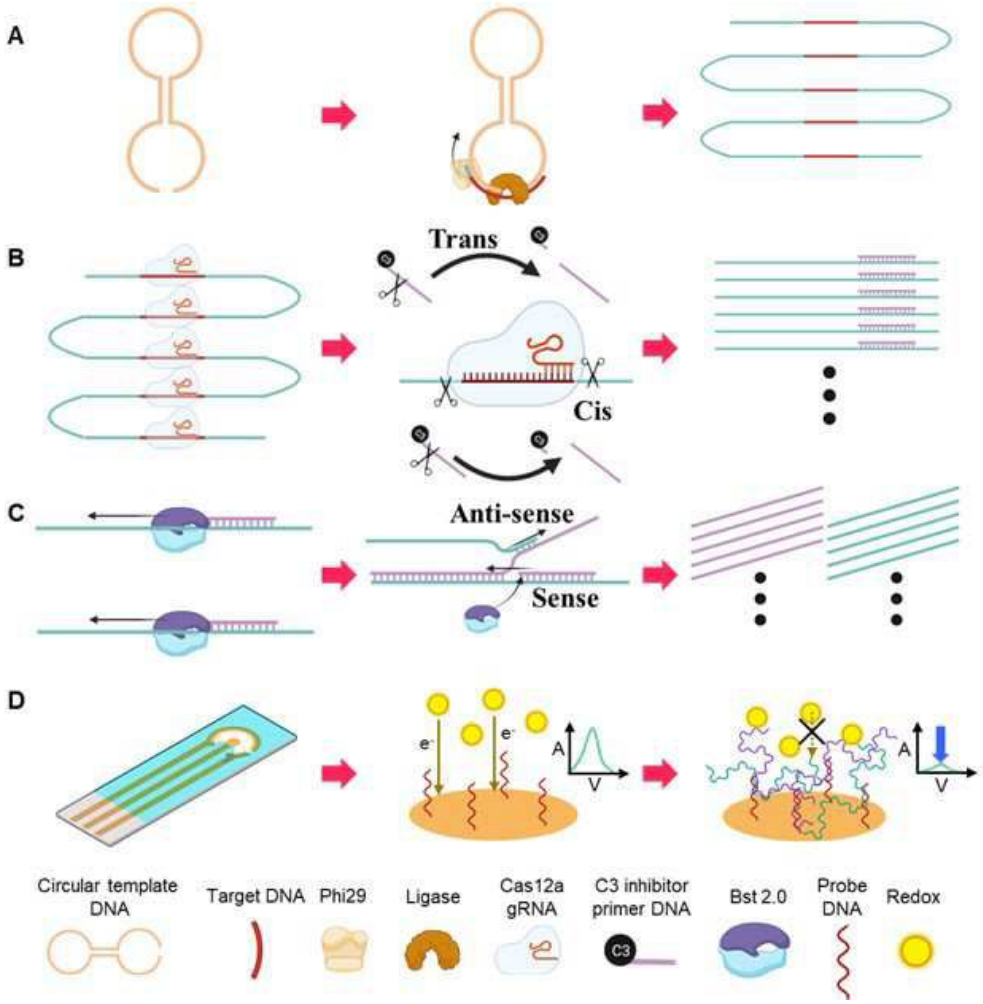
[0169] CRISPR Cas는 핵산 검출 및 증폭을 위한 기능성 효소로 많은 연구에 사용되어 왔으나 지금까지 CRISPR Cas12a는 검출 도구인 형광 소광제 리포터에 대한 트랜스 절단에만 국한되었다. 따라서 본 발명의 일 실시예에서는 CRISPR Cas12a의 트랜스 절단 및 시스 절단을 모두 활용하였으며, 핵산 증폭 과정에 최초로 CRISPR Cas12a를 도입하여 기존 HRCA의 단점을 보완하였다.

[0170] 또한, DNA 증폭을 최대화하기 위해 phi29 및 Bst 중합효소를 사용하여 위양성 문제로부터 안전한 이중 증폭을 생성하였다. 또한 기존의 RCA, HRCA와 비교하여 LOD가 낮은 이유를 분석하였다. 마지막으로 우리는 DPV를 사용하여 단일 가닥 HRCA 제품을 민감하게 감지하고 단일 지점 돌연변이 DNA를 식별하는 데 성공했다.

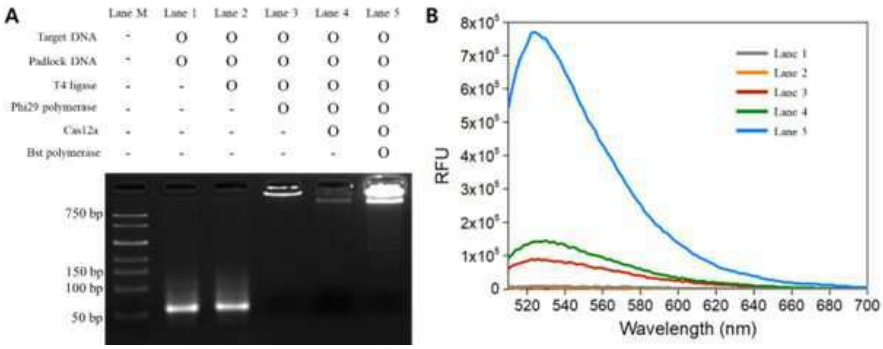
[0172] 이상, 본 발명을 바람직한 실시예를 사용하여 상세히 설명하였으나, 본 발명의 범위는 특정 실시예에 한정되는 것은 아니며, 첨부된 특허청구범위에 의하여 해석되어야 할 것이다. 또한, 이 기술분야에서 통상의 지식을 습득한 자라면, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않으면서도 많은 수정과 변형이 가능함을 이해하여야 할 것이다.

도면

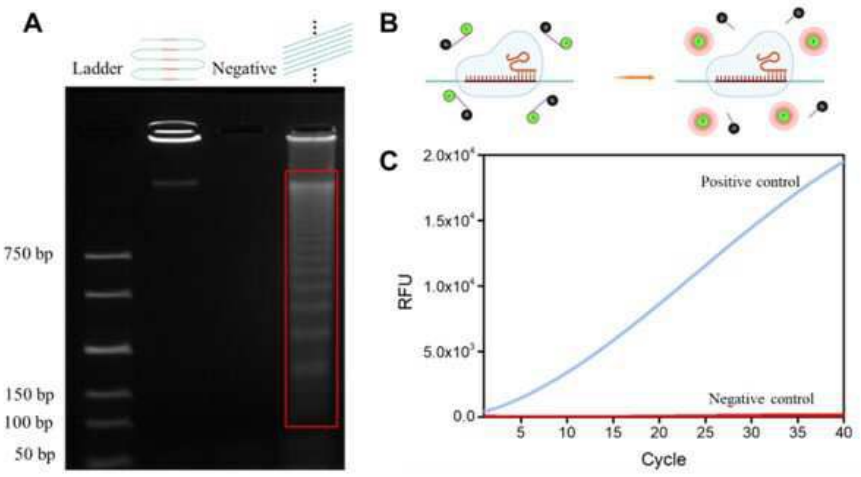
도면1


A
B
Trans
Cis
C
Anti-sense
Sense
D
e⁻
e⁻
A
V
A
V
Circular template DNA
Target DNA
Phi29
Ligase
Cas12a gRNA
C3 inhibitor primer DNA
C3
Bst 2.0
Probe DNA
Redox

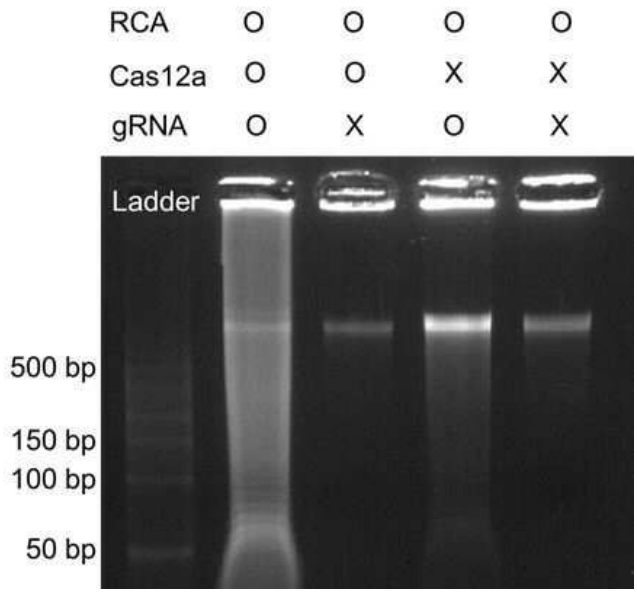
도면2


A
Lane M
Lane 1
Lane 2
Lane 3
Lane 4
Lane 5
Target DNA
Padlock DNA
T4 ligase
Phi29 polymerase
Cas12a
Bst polymerase
750 bp
150 bp
100 bp
50 bp
B
RFU
Wavelength (nm)
Lane 1
Lane 2
Lane 3
Lane 4
Lane 5

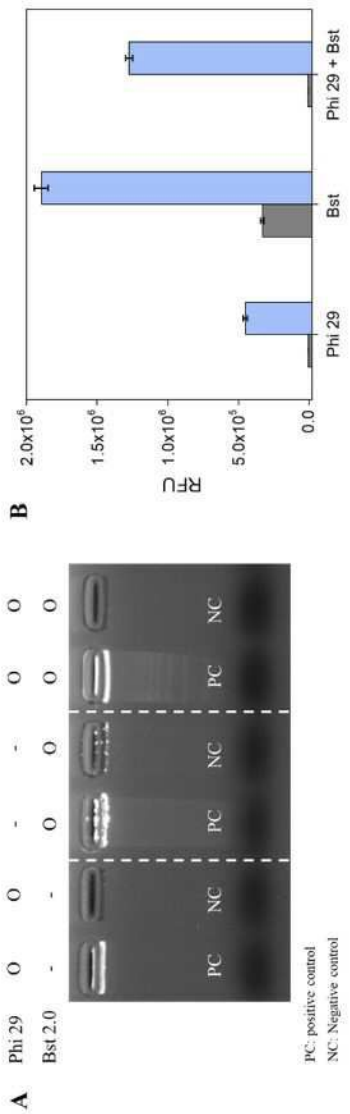
도면3


A
Ladder
Negative
750 bp
150 bp
100 bp
50 bp
B
C
2.0x10⁴
1.5x10⁴
1.0x10⁴
5.0x10³
0.0
RFU
Positive control
Negative control
5
10
15
20
25
30
35
40
Cycle

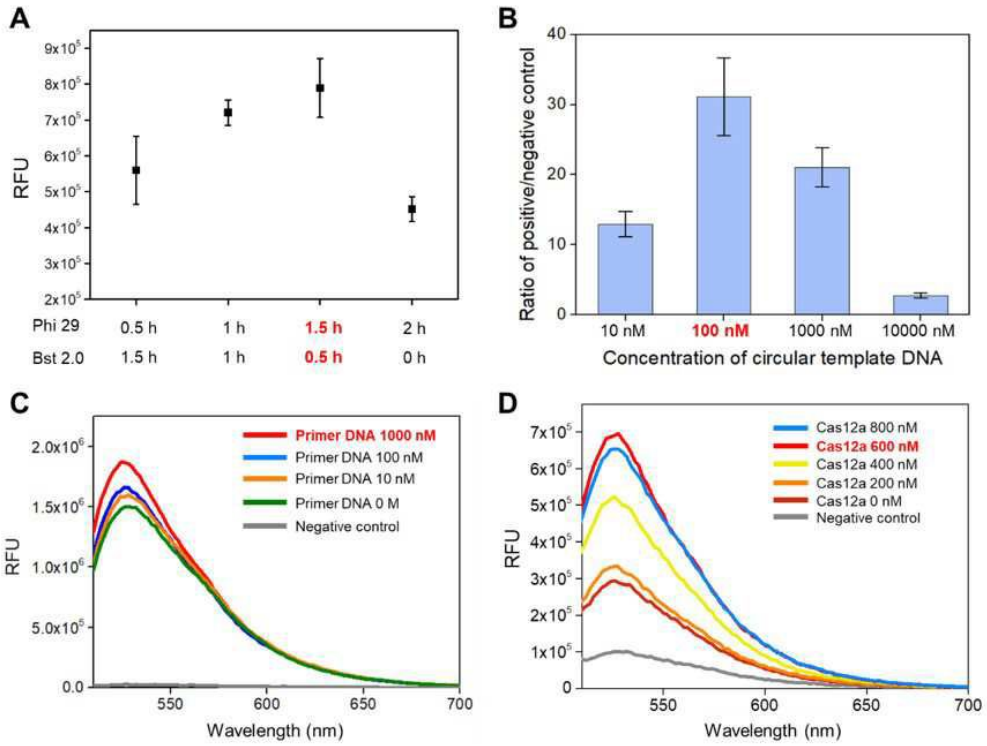
도면4


RCA O O O O
Cas12a O O X X
gRNA O X O X
Ladder
500 bp
150 bp
100 bp
50 bp

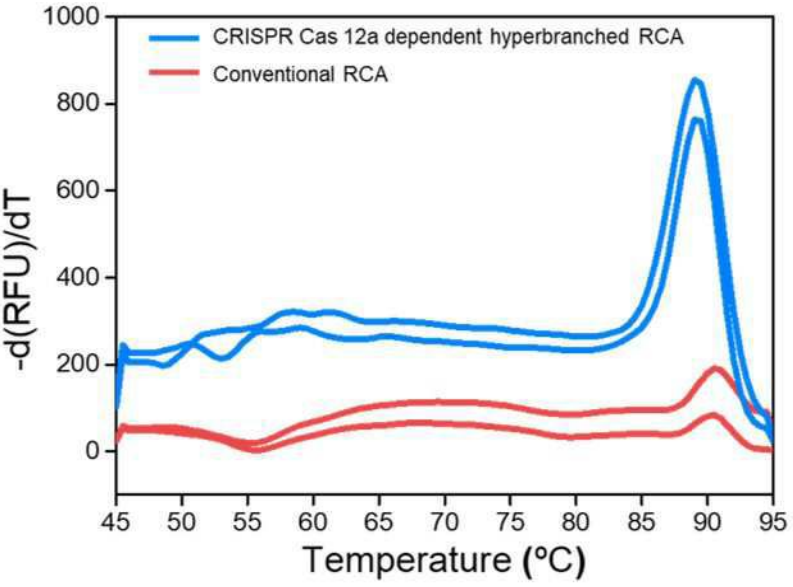
도면5


A
Phi 29
Bst 2.0
PC
NC
PC
NC
PC
NC
PC: positive control
NC: Negative control
B
RFU
2.0x10^6
1.5x10^6
1.0x10^6
5.0x10^5
0.0
Phi 29
Bst
Phi 29 + Bst

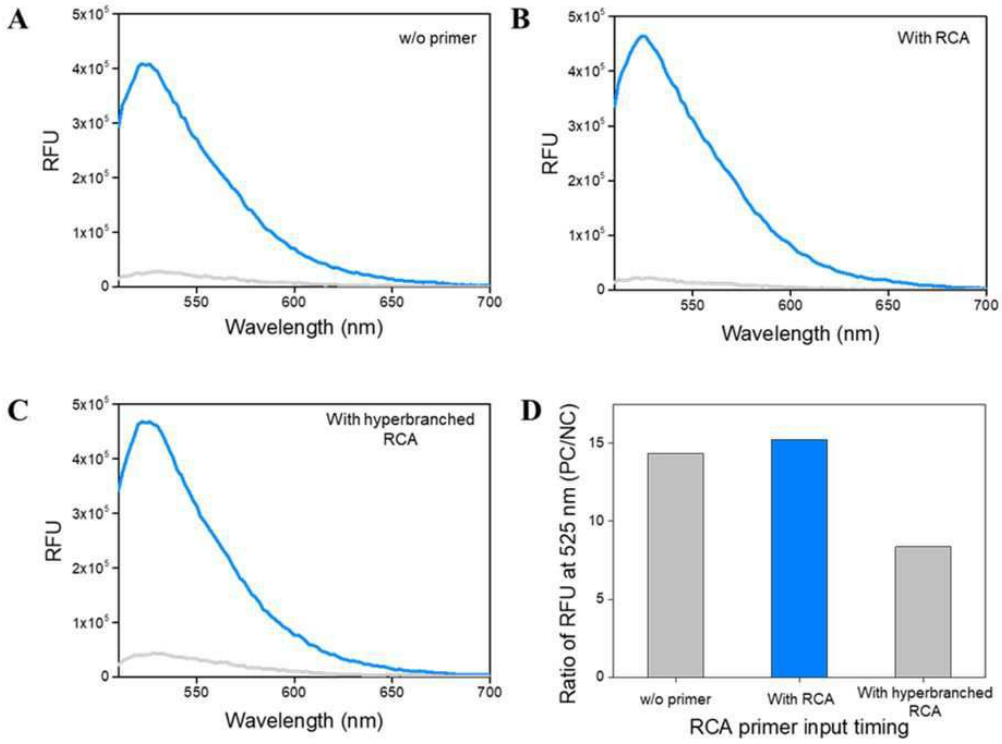
도면6


A
RFU
Phi 29
Bst 2.0
0.5 h
1.5 h
1 h
1 h
1.5 h
0.5 h
2 h
0 h
B
Ratio of positive/negative control
10 nM
100 nM
1000 nM
10000 nM
Concentration of circular template DNA
C
RFU
Primer DNA 1000 nM
Primer DNA 100 nM
Primer DNA 10 nM
Primer DNA 0 M
Negative control
Wavelength (nm)
D
RFU
Cas12a 800 nM
Cas12a 600 nM
Cas12a 400 nM
Cas12a 200 nM
Cas12a 0 nM
Negative control
Wavelength (nm)

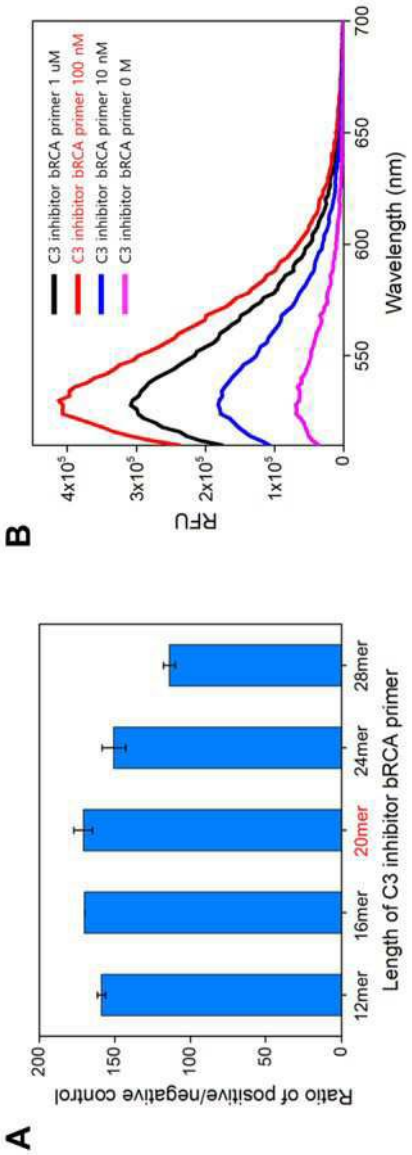
도면7


CRISPR Cas 12a dependent hyperbranched RCA
Conventional RCA
-d(RFU)/dT
Temperature (°C)

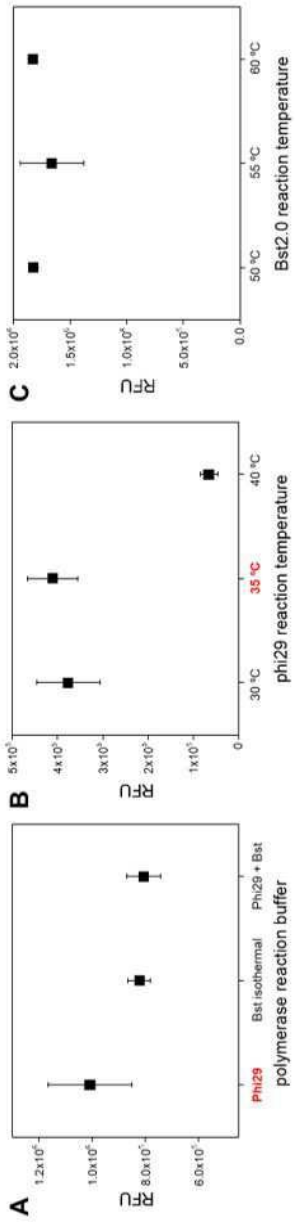
도면8


A
w/o primer
RFU
Wavelength (nm)
B
With RCA
RFU
Wavelength (nm)
C
With hyperbranched RCA
RFU
Wavelength (nm)
D
Ratio of RFU at 525 nm (PC/NC)
w/o primer
With RCA
With hyperbranched RCA
RCA primer input timing

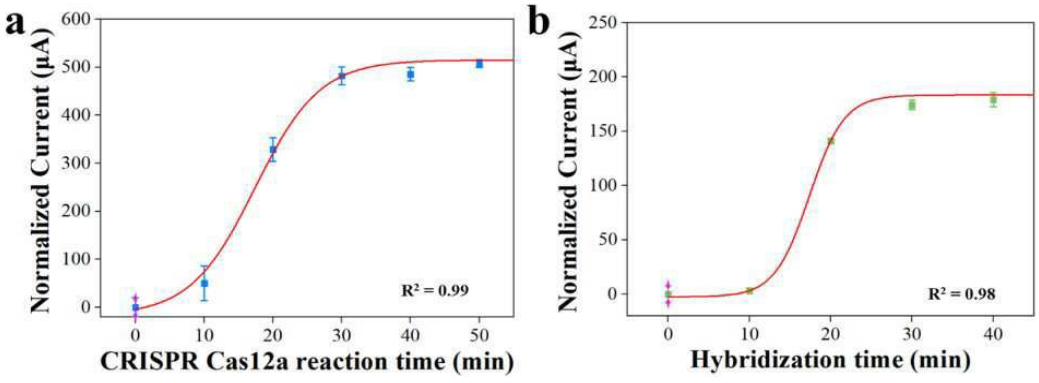
도면9


A
Ratio of positive/negative control
200
150
100
50
0
12mer
16mer
20mer
24mer
28mer
Length of C3 inhibitor bRCA primer
B
RFU
4x10^5
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
550
600
650
700
Wavelength (nm)
C3 inhibitor bRCA primer 1 uM
C3 inhibitor bRCA primer 100 nM
C3 inhibitor bRCA primer 10 nM
C3 inhibitor bRCA primer 0 M

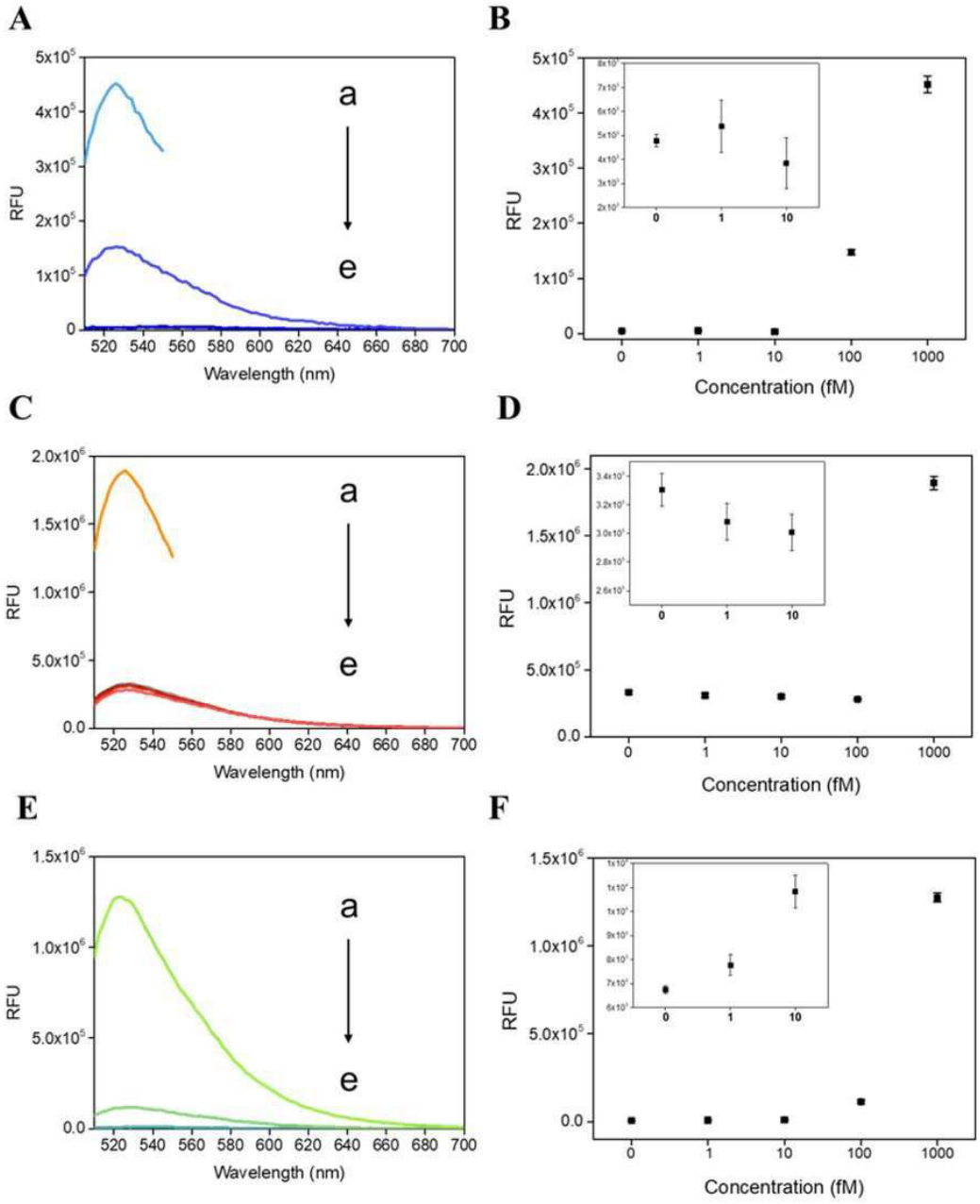
도면10


A
RFU
1.2x10⁶
1.0x10⁶
8.0x10⁵
6.0x10⁵
Phi29
Bst isothermal
Phi29 + Bst
polymerase reaction buffer
B
RFU
5x10³
4x10³
3x10³
2x10³
1x10³
0
30 °C
35 °C
40 °C
phi29 reaction temperature
C
RFU
2.0x10⁶
1.5x10⁶
1.0x10⁶
5.0x10⁵
0.0
50 °C
55 °C
60 °C
Bst2.0 reaction temperature

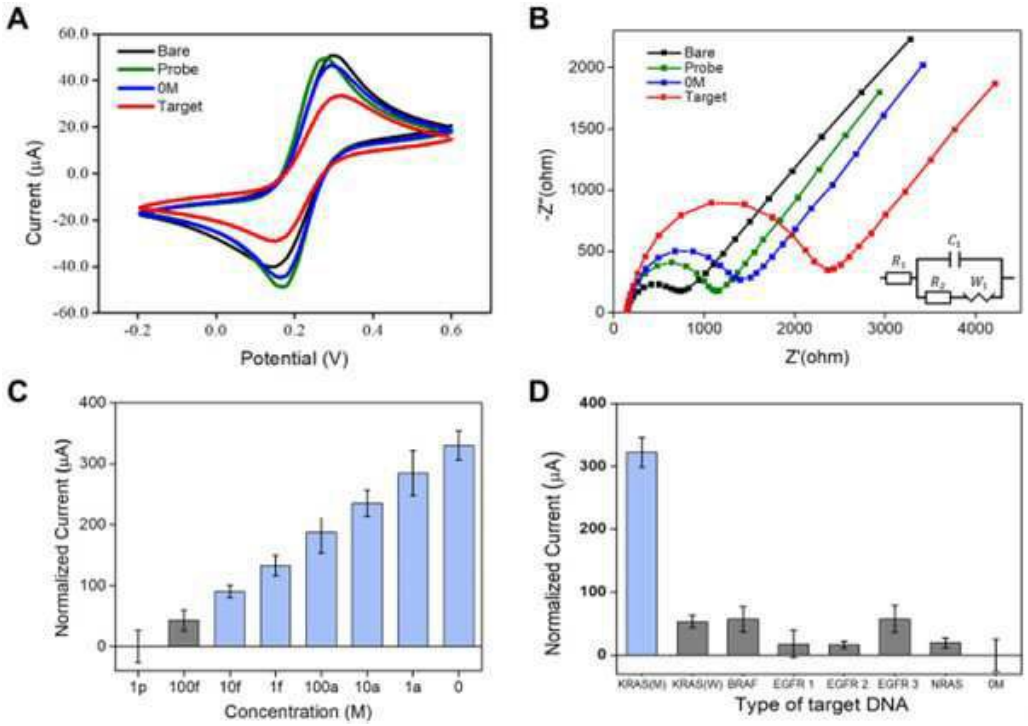
도면11


a
Normalized Current (μA)
600
500
400
300
200
100
0
R² = 0.99
0
10
20
30
40
50
CRISPR Cas12a reaction time (min)
b
Normalized Current (μA)
250
200
150
100
50
0
R² = 0.98
0
10
20
30
40
Hybridization time (min)

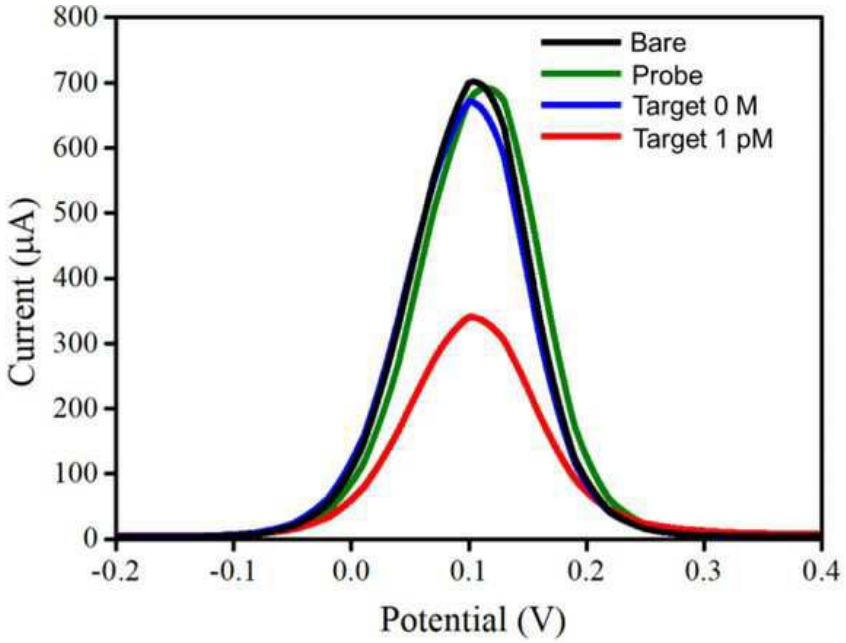
도면12


A
B
C
D
E
F
RFU
Wavelength (nm)
Concentration (fM)
a
e
520 540 560 580 600 620 640 660 680 700
0 1 10 100 1000

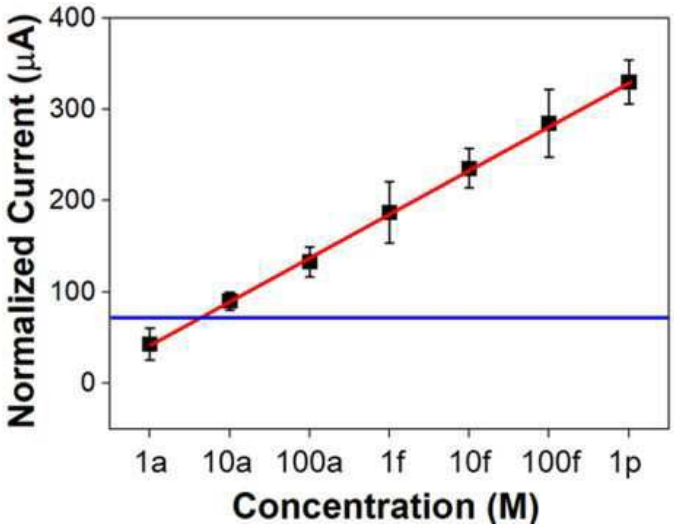
도면13


A
Bare
Probe
0M
Target
Current (μA)
Potential (V)
B
Bare
Probe
0M
Target
-Z''(ohm)
Z'(ohm)
C
Normalized Current (μA)
1p
100f
10f
1f
100a
10a
1a
0
Concentration (M)
D
Normalized Current (μA)
KRAS(M)
KRAS(W)
BRAF
EGFR 1
EGFR 2
EGFR 3
NRAS
0M
Type of target DNA

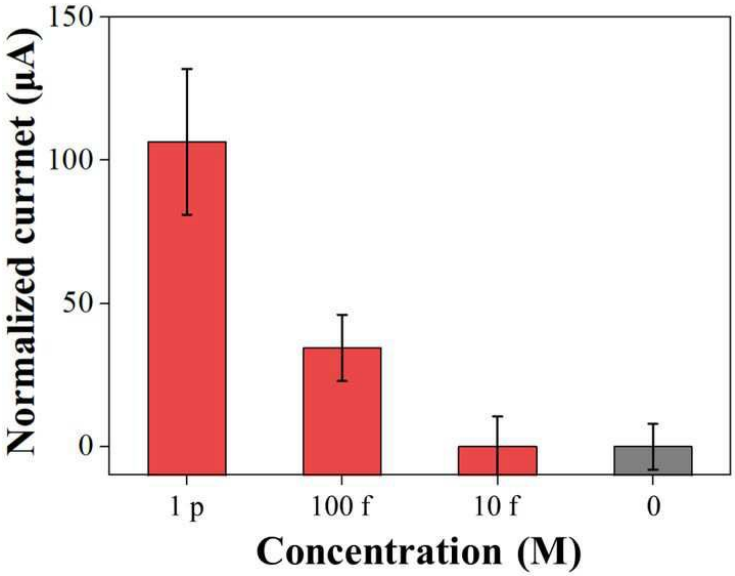
도면14


Bare
Probe
Target 0 M
Target 1 pM
Current (μA)
Potential (V)

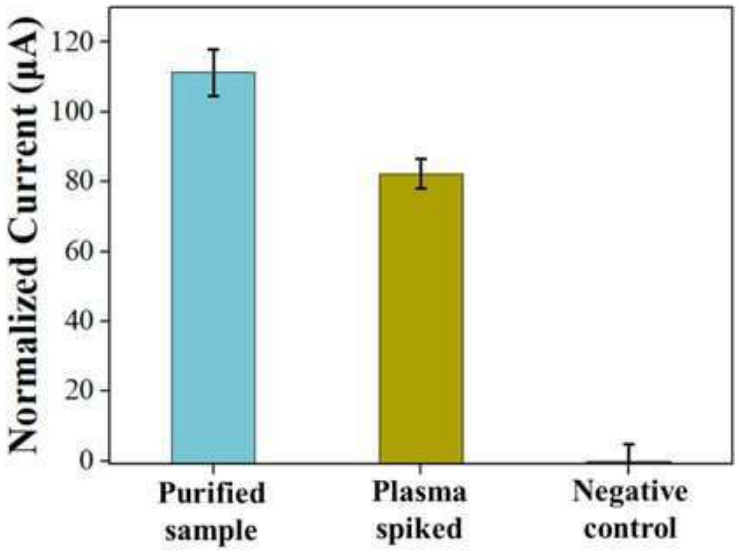
도면15


Normalized Current (μA)
400
300
200
100
0
1a
10a
100a
1f
10f
100f
1p
Concentration (M)

도면16


Normalized currnet (μA)
150
100
50
0
1 p
100 f
10 f
0
Concentration (M)

도면17


Normalized Current (μA)
120
100
80
60
40
20
0
Purified sample
Plasma spiked
Negative control