



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월04일  
(11) 등록번호 10-2141312  
(24) 등록일자 2020년07월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6876 (2018.01) C12Q 1/686 (2018.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/6876 (2018.05)  
C12Q 1/686 (2018.05)  
(21) 출원번호 10-2019-0090404  
(22) 출원일자 2019년07월25일  
심사청구일자 2019년07월25일  
(30) 우선권주장  
1020190046388 2019년04월19일 대한민국(KR)  
(56) 선행기술조사문헌  
US20070077582 A1\*  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
주식회사 제노헬릭스  
전라북도 전주시 덕진구 안전로 152, 202호(중동)  
(72) 발명자  
양성욱  
서울특별시 송파구 양재대로 1218 올림픽선수기자  
촌아파트257-506  
조석근  
경기도 고양시 덕양구 화신로 106 햇빛마을24단지  
아파트 2402동1104호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
김권석

전체 청구항 수 : 총 14 항

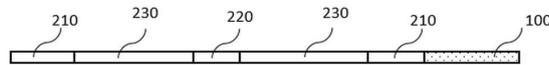
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 짧은 RNA-primed 제노 센서 모듈 증폭 기반 짧은 RNA 탐지 기법

(57) 요약

본 발명은 일단에 타겟 짧은 RNA와 상보적인 서열을 갖는 뉴클레오티드를 포함하는 제 1 센싱 영역; 및 상기 제 1 센싱 영역에 결합되는 PCR 가능 영역을 포함하고, 상기 타겟 짧은 RNA를 프라이머로 하여 DNA 중합효소에 의하여 상기 PCR 가능 영역과 상보적인 복제 영역을 합성하며, 상기 PCR 가능 영역 및 상기 복제 영역을 증폭시키는 짧은 RNA의 탐지 센서가 제공될 수 있다.

대표도 - 도1b



(52) CPC특허분류

C12Q 2525/113 (2013.01)

C12Q 2525/204 (2013.01)

C12Q 2531/113 (2013.01)

C12Q 2563/185 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

(72) 발명자

**샤 프라틱**

서울특별시 서대문구 연세로 50 연세대학교 예비승  
하우스A601호

**나그다 리디 니틴**

서울특별시 서대문구 연세로 50, 연세대학교 예비  
승하우스A601호

(56) 선행기술조사문헌

US9752180 B2

KR1020120097793 A\*

NUCLEIC ACIDS RES, Vol.34, No.2, pp.451-461

WO2016134258 A1

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

일단에 타겟 짧은 RNA와 상보적인 서열을 갖는 뉴클레오티드를 포함하는 제 1 센싱 영역; 및 상기 제 1 센싱 영역에 결합되고 DNA로 구성되는 PCR 가능 영역을 포함하며, 상기 제 1 센싱 영역은 적어도 하나 이상의 아민 변형부 및 단일 스트랜드를 절단하는 뉴클레아제에 효율적으로 절단되도록 하는 적어도 하나 이상의 뉴클레오티드 치환부를 포함하는 센서를 제공하는 단계;

상기 센서의 상기 제 1 센싱 영역에 피검 샘플 내의 상기 타겟 짧은 RNA가 결합되는 단계;

상기 결합된 타겟 짧은 RNA를 프라이머로 하여 상기 PCR 가능 영역을 복제하여 DNA로 구성되는 복제 영역을 합성함으로써, 상기 센서에 상보적인 더블 스트랜드를 형성하는 단계;

상기 샘플 내에 뉴클레아제를 추가하는 단계;

상기 뉴클레아제가 상기 샘플 내의 상기 더블 스트랜드를 형성하지 아니한 상기 제 1 센싱 영역의 상기 뉴클레오티드 치환부 및 상기 더블 스트랜드를 형성하지 아니한 비특이적 짧은 RNA를 인식하여, 상기 더블 스트랜드를 형성하지 아니한 상기 제 1 센싱 영역을 포함하는 탐지 센서 및 비특이적 짧은 RNA를 절단하는 단계;

상기 절단된 탐지 센서 및 비특이적 짧은 RNA를 제거하는 단계; 및

상기 센서 및 상기 더블 스트랜드의 프라이머 결합 영역에 특이적인 프라이머 세트를 이용하여 PCR 가능 영역 및 복제 영역을 PCR 증폭하는 단계를 포함하는 짧은 RNA의 탐지 방법.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 제 1 센싱 영역에 상기 타겟 짧은 RNA가 결합되는 단계는 45 °C 내지 70 °C 에서 수행되는 짧은 RNA의 탐지 방법.

#### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 센서에 상보적인 더블 스트랜드를 형성하는 단계는 PCR 가능 영역 및 상기 PCR 가능 영역에 대응하는 상기 복제 영역에 DNA-DNA 더블 스트랜드가 형성되는 것인 짧은 RNA의 탐지 방법.

#### 청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 뉴클레오티드 치환부는 상기 제 1 센싱 영역을 절단하는 뉴클레아제에 민감도가 높은 뉴클레오티드를 포함하는 것인 짧은 RNA의 탐지 방법.

#### 청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 아민 변형부는 상기 제 1 센싱 영역이 다른 탐지 센서의 제 1 센싱 영역과의 비특이적 자가-이합체(self-dimer)를 형성함으로써 진행되는 PCR 증폭을 방지하는 것인 짧은 RNA의 탐지 방법.

#### 청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 뉴클레오티드 치환부는 ANA 뉴클레오티드 또는 RNA 뉴클레오티드를 포함하는 짧은 RNA의 탐지 방법.

**청구항 7**

제 6 항에 있어서,

상기 ANA 뉴클레오티드를 포함하는 상기 뉴클레오티드 치환부는 상기 짧은 RNA의 탐지 센서의 염기서열의 5' 말단으로부터 88번째 및 138번째의 서열에 위치하는 짧은 RNA의 탐지 방법.

**청구항 8**

제 6 항에 있어서,

상기 RNA 뉴클레오티드를 포함하는 상기 뉴클레오티드 치환부는 상기 짧은 RNA의 탐지 센서의 염기서열의 5' 말단으로부터 24번째, 25번째, 26번째, 93번째, 94번째, 95번째. 및 140번째의 서열에 위치하는 짧은 RNA의 탐지 방법.

**청구항 9**

제 1 항에 있어서,

상기 PCR 가능 영역은 바코드 영역을 포함하는 짧은 RNA의 탐지 방법.

**청구항 10**

제 9 항에 있어서,

상기 바코드 영역은 상기 제 1 센싱 영역이 탐지하는 상기 타겟 짧은 RNA에 관련된 정보를 포함하는 짧은 RNA의 탐지 방법.

**청구항 11**

제 9 항에 있어서,

상기 바코드 영역은 9 개 내외의 염기서열로 이루어진 짧은 RNA의 탐지 방법.

**청구항 12**

제 1 항에 있어서,

상기 PCR 가능 영역은 상기 PCR 가능 영역의 양쪽 말단 중 적어도 하나 이상에 프라이머 결합 영역을 포함하며, 상기 PCR 증폭하는 단계는 상기 프라이머 결합 영역에 상기 샘플 내의 프라이머들이 결합되어 상기 PCR 가능 영역과 상기 PCR 가능 영역을 이용하여 복제된 상기 복제 영역을 PCR 증폭하는 것인 짧은 RNA의 탐지 방법.

**청구항 13**

제 1 항에 있어서,

상기 타겟 짧은 RNA는 마이크로 RNA 및 짧은 간섭 RNA를 포함하는 짧은 RNA의 탐지 방법.

**청구항 14**

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항의 방법에 의하여 제조되는 짧은 RNA 탐지 센서.

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 짧은 RNA 탐지 기술에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 짧은 RNA의 탐지를 위한 방법 및 센서에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 짧은 RNA(small RNA)는 마이크로 RNA (micro RNA, miRNA) 및 짧은 간섭 RNA (small interfering RNA, siRNA), 피위 간섭 RNA (Piwi-interacting RNA, piRNA) 를 포함하며, 이러한 짧은 RNA는 상보적으로 결합할 수 있는 messenger RNA에 결합하여 이들을 절단하거나 (Cleavage), 단백질로 번역(translation)을 저해하는 기작을 통하여 유전자 발현을 조절한다. 짧은 RNA는 세포의 발생과 분화 및 세포 예정사, 면역반응 등 다양한 생물학적 과정에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 세포에서 특정 짧은 RNA의 발현 정도의 차이는 암을 포함한 다양한 질병과 연관되어 있는 것으로 알려져 있다. 따라서, 특정 짧은 RNA를 고효율로 탐지하는 것은 의 생명 연구 및 질병진단 분야에서 중요한 부분으로 부각되고 있다.

[0003] 현존하는 탐지 기법들은 주로 짧은 RNA들의 5' 과 3' 지역에 DNA로 구성된 Adaptor를 연결하거나, poly(A) tail RNA를 Adaptor로 연결한 후, 역전사효소를 사용하여 cDNA로 전환한 다음 이를 PCR(polymerase chain reaction) 증폭하는 기법에 기반하고 있다. 상기 검출 방법들은 역전사과정에서 타겟의 인지 효율성이 떨어지며, 짧은 RNA는 길이가 짧기 때문에 증폭에 있어서 비특이적 결합 및 증폭에 의하여 부정확한 결과를 초래하는 경우가 많다. 또한, 이러한 핵산 증폭 반응을 이용하는 검출 방법은 일반적으로 핵산 증폭 후 증폭된 핵산의 염기서열을 바로 분석하지 못하고, 염기서열을 분석하기 위해 별도의 염기서열 분석용 라이브러리 제작을 필요로 한다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0004] 따라서, 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는, 역전사효소활성을 위한 5' 과 3' 지역에 DNA로 구성된 어댑터(Adaptor)를 연결하거나, 폴리A 테일 RNA를 어댑터의 연결 없이, 타겟 짧은 RNA를 인지할 수 있는 짧은 RNA의 탐지를 위한 방법을 제공하는 것이다.

[0005] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는, 타겟의 탐지능의 극대화 및 비특이적인 증폭을 제거하고 증폭된 결과물을 직접적인 염기서열 분석을 할 수 있는 짧은 RNA의 탐지 센서를 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0006] 상기 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 짧은 RNA의 탐지 센서는 일단에 타겟 짧은 RNA와 상보적인 서열을 갖는 뉴클레오티드를 포함하는 제 1 센싱 영역; 및 상기 제 1 센싱 영역에 결합되는 PCR 가능 영역을 포함하고, 상기 타겟 짧은 RNA를 프라이머로 하여 DNA 중합효소에 의하여 상기 PCR 가능 영역과 상보적인 복제 영역을 합성하며, 상기 PCR 가능 영역 및 상기 복제 영역을 증폭시킬 수 있다.

[0007] 상기 제 1 센싱 영역은 상기 제 1 센싱 영역이 다른 탐지 센서의 제 1 센싱 영역과의 비특이적 자가-이합체 (self-dimer)를 형성함으로써 생성되는 스트랜드의 PCR 증폭을 억제하는 적어도 하나 이상의 아민 변형부; 및 상기 제 1 센싱 영역을 절단하는 뉴클레아제와 결합하는 적어도 하나 이상의 뉴클레오티드 치환부를 포함할 수 있다.

- [0008] 일 실시예에서, 상기 뉴클레오티드 치환부는 상기 제 1 센싱 영역의 뉴클레오티드 대신 치환된 ANA 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 뉴클레오티드 치환부는 상기 짧은 RNA의 탐지 센서의 염기서열의 5' 말단으로부터 88번째 및 138번째의 서열에 위치할 수 있다.
- [0009] 상기 뉴클레오티드 치환부는 상기 짧은 RNA의 탐지 센서의 염기서열의 DNA 뉴클레오티드 대신 치환된 RNA 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0010] 일 실시예에서, 상기 PCR 가능 영역의 3' 말단이 상기 제 1 센싱 영역에 결합되고, 상기 PCR 가능 영역의 5' 말단이 상기 센서의 타단을 구성할 수 있다.
- [0011] 상기 PCR 가능 영역은 바코드 영역을 포함할 수 있고, 상기 바코드 영역은 상기 제 1 센싱 영역이 탐지하는 상기 타겟 짧은 RNA에 관련된 정보를 포함할 수 있으며, 상기 바코드 영역은 9 개의 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [0012] 상기 PCR 가능 영역은 양쪽 말단 중 적어도 하나 이상에 상기 PCR 가능 영역을 PCR 증폭 가능하게 하는 프라이머 결합 영역을 포함할 수 있다.
- [0013] 상기 PCR 가능 영역은 상기 PCR 가능 영역의 자가 증폭을 억제하기 위한 적어도 하나 이상의 아민 변형부를 포함할 수 있다.
- [0014] 일 실시예에서, 타겟 짧은 RNA는 마이크로 RNA 및 짧은 간접 RNA 를 포함할 수 있다.
- [0015] 상기 다른 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일 실시예에 따른 짧은 RNA의 탐지 방법은, 일단에 타겟 짧은 RNA와 상보적인 서열을 갖는 뉴클레오티드를 포함하는 제 1 센싱 영역; 및 상기 제 1 센싱 영역에 결합되는 PCR 가능 영역을 포함하며, 상기 제 1 센싱 영역은 적어도 하나 이상의 아민 변형부 및 적어도 하나 이상의 뉴클레오티드 치환부를 포함하고, 상기 PCR 가능 영역은 프라이머 결합 영역, 바코드 영역, 및 잔여 뉴클레오티드 영역을 포함하는 센서를 제공하는 단계; 상기 센서의 상기 제 1 센싱 영역에 피검 샘플 내의 상기 타겟 짧은 RNA가 결합되는 단계; 상기 결합된 타겟 짧은 RNA를 프라이머로 하여 상기 PCR 가능 영역을 복제하여 복제 영역을 합성함으로써, 상기 센서에 상보적인 키메라 스트랜드를 형성하는 단계; 상기 샘플 내에 뉴클레아제를 추가하는 단계; 상기 뉴클레아제가 상기 샘플 내의 상기 키메라 스트랜드를 형성하지 아니한 상기 제 1 센싱 영역의 상기 뉴클레오티드 치환부 및 상기 키메라 스트랜드를 형성하지 아니한 짧은 RNA와 결합하여 상기 키메라 스트랜드를 형성하지 아니한 상기 제 1 센싱 영역을 포함하는 탐지 센서 및 비특이적 짧은 RNA를 절단하는 단계; 상기 절단된 탐지 센서 및 비특이적 짧은 RNA를 제거하는 단계; 및 상기 센서 및 상기 키메라 스트랜드의 프라이머 결합 영역에 특이적인 프라이머 세트를 이용하여 PCR 가능 영역 및 복제 영역을 PCR 증폭하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0016] 상기 아민 변형부는 상기 제 1 센싱 영역이 다른 탐지 센서의 제 1 센싱 영역과의 자가-이합체(self-dimer)를 형성함으로써 생성되는 스트랜드의 PCR 증폭을 억제하는 것을 방지할 수 있다.
- [0017] 상기 뉴클레오티드 치환부는 상기 제 1 센싱 영역을 절단하는 뉴클레아제에 민감도가 높은 뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, ANA 뉴클레오티드 또는 RNA 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0018] 상기 ANA 뉴클레오티드를 포함하는 상기 뉴클레오티드 치환부는 상기 짧은 RNA의 탐지 센서의 염기서열의 5' 말단으로부터 88번째 및 138번째의 서열에 위치할 수 있다.
- [0019] 상기 RNA 뉴클레오티드를 포함하는 상기 뉴클레오티드 치환부는 상기 짧은 RNA의 탐지 센서의 염기서열의 5' 말단으로부터 24번째, 25번째, 26번째, 93번째, 94번째, 95번째, 및 140번째의 서열에 위치할 수 있다.
- [0020] 일 실시예에서, 상기 타겟 짧은 RNA는 마이크로 RNA 및 짧은 간접 RNA를 포함할 수 있고, 상기 바코드 영역은 9 개의 염기서열로 이루어질 수 있다.

**발명의 효과**

- [0021] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 타겟 짧은 RNA와 상보적인 서열을 갖는 일부 영역을 프라이머로 이용함으로써 폴리A 테일의 합성이 불필요하고, 별도의 어댑터를 추가할 필요가 없는 높은 정확도 및 증폭율을 갖는 짧은 RNA의 탐지 방법을 제공할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명의 다른 실시예에 따르면, DNA로만 구성된 PCR 가능 영역만을 증폭함으로써 일반적인 PCR 합성 장치를 통하여 증폭이 가능하며, 상기 PCR 가능 영역은 타겟 짧은 RNA와 대응되는 정보를 포함하는 바코드 영역을 포함함으로써 별도의 라이브러리 제작 없이 증폭 결과물(amplicon)의 시퀀싱이 가능한 짧은 RNA의 탐지 센서를

제공할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0023] 도 1a 및 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 짧은 RNA의 탐지 센서의 구성을 개략적으로 설명하는 것이다.  
 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 짧은 RNA의 탐지 센서를 이용하여 짧은 RNA를 증폭하는 방법을 설명하는 것이다.  
 도 3a 내지 도 3d는 본 발명의 일 실시예에 따른 센서와 상기 센서의 타겟 짧은 RNA의 염기서열을 나타내는 것이다.  
 도 4a 및 도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 센서들을 이용한 일반적인 PCR 결과를 2% 아가로스젤로 전기영동한 이미지들이다.  
 도 5a 및 도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른 센서들을 이용한 디지털 PCR 결과 및 탐지된 짧은 RNA의 양을 나타내는 그래프이다.  
 도 6a 및 도 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른 센서들의 타겟 짧은 RNA에 대한 정확도를 디지털 PCR로 측정된 결과들이다.  
 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 짧은 RNA의 탐지 센서인 SenR210 DNA센서 및 도 3a 내지 도 3d를 참조하여 일부 뉴클레오티드를 ANA로 변형시킨 짧은 RNA의 탐지 센서(ANA modification)에 대한 S1 뉴클레아제의 분해능을 나타내는 젤 전기영동 이미지이다.  
 도 8은 본 발명의 다른 실시예에 따른 센서 SenR210rna의 염기서열을 나타내는 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0024] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다.
- [0025] 본 발명의 실시예들은 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위하여 제공되는 것이며, 하기 실시예는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 오히려, 이들 실시예는 본 발명을 더욱 충실하고 완전하게 하고, 당업자에게 본 발명의 사상을 완전하게 전달하기 위하여 제공되는 것이다.
- [0026] 또한, 이하의 도면에서 각 층의 두께나 크기는 설명의 편의 및 명확성을 위해 과장된 것이며, 도면상에서 동일 부호는 동일한 요소를 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "및/또는"는 해당 열거된 항목 중 어느 하나 및 하나 이상의 조합을 포함한다.
- [0027] 본 명세서에서 사용된 용어는 특정 실시예를 설명하기 위하여 사용되며, 본 발명을 제한하기 위한 것이 아니다. 본 명세서에서 사용되는 경우 "포함한다(comprise)" 및/또는 "포함하는(comprising)"은 언급한 형상들, 숫자, 단계, 동작, 부재, 요소 및/또는 이들 그룹의 존재를 특정하는 것이며, 하나 이상의 다른 형상, 숫자, 동작, 부재, 요소 및/또는 그룹들의 존재 또는 부가를 배제하는 것이 아니다.
- [0028] 도 1a 및 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 짧은 RNA의 탐지 센서의 구성을 개략적으로 설명하는 것이다.
- [0029] 도 1a를 참조하면, 짧은 RNA의 탐지 센서(1000)는 짧은 RNA와 결합 가능한 제 1 센싱 영역(100) 및 증폭이 가능한 PCR 가능 영역(200)을 포함한다. 제 1 센싱 영역(100)은 센서(1000)를 통하여 탐지하고자 하는 짧은 RNA인 타겟 짧은 RNA와 상보적인 서열을 갖는 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 뉴클레오티드는 제 1 센싱 영역(100)의 일단에 포함될 수 있다. 또한, 상기 뉴클레오티드는 DNA 뉴클레오티드, XNA 뉴클레오티드, ANA 뉴클레오티드, HNA 뉴클레오티드, INA 뉴클레오티드, 및 LNA 뉴클레오티드 중 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0030] 상기 짧은 RNA는 200 뉴클레오타이드 미만의 길이를 갖는 비 암호화 RNA 분자일 수 있다. 예를 들면, 짧은 RNA는 마이크로 RNA(micro RNA, miRNA) 및 짧은 간섭 RNA(small intefering RNA, siRNA)일 수 있으나, 이에 한정되지 않고 비 암호화 RNA 이고 단백질을 만드는 과정을 조절하는 짧은 RNA이면 어느 것이든 무방하다.
- [0031] 일 실시예에서, 제 1 센싱 영역(100)은 3' 말단에 아민 변형부(미도시)를 더 포함할 수 있다. 아민 변형부는 센서(1000)를 이용하는 합성 및 센서(1000)의 증폭 과정 중 발생할 수 있는 비특이적인 센서의 증폭을 완벽하게

제거할 수 있다. 예를 들어, 피검 샘플 내에 센서(1000)와 결합되지 아니한 타겟 짧은 RNA가 없는 경우, 센서(1000)가 자가 증폭하는 것을 아민 변형부가 방지할 수 있다. 아민 변형부는 제 1 센싱 영역(100)을 구성하는 타겟 짧은 RNA와 상보적인 서열을 갖는 뉴클레오티드들 중 아민이 변형된 일부 뉴클레오티드일 수 있으며, 상기 아민이 변형된 일부 뉴클레오티드는 적어도 하나 이상일 수 있다.

[0032] 일 실시예에서, 아민 변형부는 제 1 센싱 영역(100)에 적어도 하나 이상 포함될 수 있다. 상기 아민 변형부는 제 1 센싱 영역(100)의 3' 말단에 포함될 수 있고, 제 1 센싱 영역(100)의 3' 말단을 포함하는 복수 개의 영역에 위치할 수 있다. 상기 아민 변형부를 포함하는 제 1 센싱 영역(100)은 타겟 짧은 RNA를 인지하여 결합하며, 만일 다른 짧은 RNA의 탐지 센서(1000')의 제 1 센싱 영역(100')을 타겟 짧은 RNA로 인지하더라도 다른 짧은 RNA의 탐지 센서(1000')의 아민 변형부에 의하여 비특이적인 자가-이합체(self-dimer)의 형성으로 인한 PCR 증폭이 진행되지 아니할 수 있다. 따라서, 상기 아민 변형부를 갖는 본 발명의 일 실시예에 따른 짧은 RNA의 탐지 센서는 타겟 짧은 RNA의 탐지 및 증폭 감도를 향상시킬 수 있다.

[0033] 일 실시예에서, 제 1 센싱 영역(100)은 제 1 센싱 영역(100)의 뉴클레오티드들이 적어도 하나 이상의 다른 종류의 뉴클레오티드 유사체로 치환된 뉴클레오티드 치환부를 포함할 수 있다. 상기 뉴클레오티드 유사체는 뉴클레오티드 서열 중 특정 서열의 위치에서 치환될 수 있으며, 상기 치환 위치는 탐지 센서의 타겟 RNA에 따라 변경될 수도 있고, 타겟 RNA와 무관하게 고정적일 수도 있다. 상기 치환된 뉴클레오티드 유사체는 이후 타겟 짧은 RNA와 결합하지 아니한 센서를 제거하기 위하여 이용될 수 있다.

[0034] PCR 가능 영역(200)은 제 1 센싱 영역(100)에 결합될 수 있으며 증합효소 연쇄 반응(이하, PCR)을 이용하여 증폭이 가능하다. 일 실시예에서, PCR 가능 영역의 일단은 제 1 센싱 영역(100)과 결합할 수 있으며, DNA 뉴클레오티드로 구성될 수 있다. 또한, PCR 가능 영역(200)은 제 1 센싱 영역(100)이 결합되는 타겟 짧은 RNA를 나타내는 정보를 더 포함할 수 있으며, 이는 도 1b를 참조하여 후술하기로 한다.

[0035] 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 짧은 RNA의 탐지 센서의 구성을 상세하게 설명하는 것이다. 도 1b를 참조하면, 도 1a를 참조하여 설명한 바와 같이, 짧은 RNA의 탐지 센서(1000)는 제 1 센싱 영역(100) 및 PCR 가능 영역(200)을 포함하며, 제 1 센싱 영역(100)은 도 1a를 참조하여 설명한 바와 같다.

[0036] PCR 가능 영역(200)은 프라이머 결합 영역(210), 바코드 영역(220), 및 잔여 뉴클레오티드 영역(230)을 포함할 수 있다. 프라이머 결합 영역(210)은 PCR 가능 영역(200)의 양쪽 말단 중 하나에 위치할 수 있으며, PCR 가능 영역(200)은 DNA 뉴클레오티드로 형성되기 때문에, 프라이머 결합 영역(210)에 프라이머가 결합하여 DNA 더블 스트랜드를 합성될 수 있다. 일 실시예에서, 프라이머 결합 영역(210)의 염기서열은 센서가 탐침 또는 검출하고자 하는 타겟 짧은 RNA의 종류를 변경하여 센싱하는 것과 관계없이 일정할 수 있다. 그러므로, 타겟 물질의 종류와 관계없이 특정 프라이머를 이용하여 센서의 증폭이 가능할 수 있다.

[0037] 바코드 영역(220)은 제 1 센싱 영역(100)이 결합하는 타겟 짧은 RNA와 관련된 정보를 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 상기 정보는 상기 타겟 짧은 RNA가 발현하는 단백질을 나타내는 정보, 상기 타겟 짧은 RNA와 관련된 질병을 나타내는 정보, 및 상기 타겟 짧은 RNA의 염기서열을 나타내는 정보 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. 바코드 영역(220)이 상기 타겟 짧은 RNA와 관련된 정보를 포함하기 때문에, 센서(1000)는 PCR 가능 영역(200)만을 증폭하더라도 제 1 센싱 영역(100)에서 센싱한 타겟 짧은 RNA가 무엇인지 판별할 수 있게 되며, 별도의 라이브러리를 제작하지 아니하고서도 시퀀싱이 가능할 수 있다. 잔여 뉴클레오티드 영역(230)은 바코드 영역(220)의 양 측에 위치할 수 있고, 필요에 따라 추가 센싱부(미도시) 또는 형광부(미도시)를 더 포함할 수 있다.

[0038] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 짧은 RNA의 탐지 센서를 이용하여 짧은 RNA를 탐지하는 방법을 설명하는 것이다.

[0039] 도 2를 참조하면, 타겟 짧은 RNA를 포함하는 피검 샘플 내에 센서(1000)를 제공할 수 있다(a 단계). 센서(1000)는 일단에 타겟 짧은 RNA와 상보적인 서열을 갖는 뉴클레오티드를 포함하는 제 1 센싱 영역(100); 및 제 1 센싱 영역(100)에 결합되는 PCR 가능 영역(200)을 포함할 수 있다. 상기 피검 샘플 내의 상기 타겟 짧은 RNA는 상기 센서의 제 1 센싱 영역(100)에 결합될 수 있다(b 단계).

[0040] 센서(1000)는 상기 결합된 타겟 짧은 RNA를 프라이머(300)로 하여 센서(1000)의 PCR 가능 영역(200)을 합성하여 cDNA를 제조할 수 있다(c 단계). 이 경우, 센서(1000)에 상보적인 스트랜드(2000)는 프라이머로 이용된 타겟 짧은 RNA(300) 및 PCR 가능 영역(200)에 대응되어 합성된 복제 영역(400)을 포함하는 키메라(chimera) 형태일 수 있다. 복제 영역(400)은 DNA 뉴클레오티드로 구성되기 때문에, 별도의 RNA로부터의 cDNA 합성 단계 없이

일반적인 PCR을 수행할 수 있다.

- [0041] 일 실시예에서, 제 1 센싱 영역(100)이 상기 결합된 타겟 짧은 RNA를 프라이머(300)로 인식하여 프라이밍 결합하는 단계는 45℃ 내지 70℃ 에서 수행될 수 있으며, 바람직하게는 50℃ 내지 65℃ 에서 수행될 수 있다. 상기 단계의 온도 조건이 70℃를 초과하는 경우에는 타겟 짧은 RNA가 제 1 센싱 영역(100)에 결합되지 아니할 수 있다. 상기 프라이밍 결합하는 단계가 45℃ 미만에서 수행되는 경우에는 타겟 짧은 RNA와 결합하지 아니한 센서(1000)의 제 1 센싱 영역(100) 사이의 자가-이중합(self-dimer)이 형성되어 비특이적인 스트랜드들이 PCR 증폭되어 원하는 결과를 얻지 못할 수 있다. 제 1 센싱 영역(100)은 뉴클레오티드 치환부를 갖기 때문에, 상기 45℃ 내지 70℃ 에서 타겟 짧은 RNA를 프라이머로 인식하여 결합하는 것이 가능하다.
- [0042] 복제 영역(400)이 합성된 후, 피검 샘플 내에는 센서(1000), 상보적인 스트랜드(2000), 타겟 짧은 RNA(300), 및 비특이적인 짧은 RNA가 포함될 수 있다. 일 실시예에서, 비특이적인 짧은 RNA(300)와 결합하지 아니한 단일 가닥의 센서(1000)는 이들에 선택적인 뉴클레아제를 이용하여 제거될 수 있다. 이와 같이, 증폭 대상이 아닌 RNA 및 센서를 증폭 단계 이전에 제거함으로써 타겟 짧은 RNA에 대한 정확한 탐지를 가능하게 한다. 일 실시예에서, 상기 뉴클레아제는 15 분 내지 40분 동안 피검 샘플 내에 포함되어 상기 증폭 대상이 아닌 RNA 및 타겟 짧은 RNA와 결합되지 아니한 센서들을 제거할 수 있다.
- [0043] 이러한 제거는 제 1 센싱 영역(100)의 상기 치환된 뉴클레오티드 유사체가 상기 뉴클레아제와 결합하여 수행될 수 있다. 상기 뉴클레오티드 유사체는 아라비노핵산(Arabino Nucleic Acid, ANA), 잠긴 핵산(Locked Nucleic Acid, LNA), 헥시톨 핵산(Hexitol Nucleic Acid, HNA), 글리콜 핵산(Glycol Nucleic Acid, GNA), 펩타이드 핵산(Peptide Nucleic Acid, PNA) 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 아라비노 핵산(ANA)을 포함할 수 있다.
- [0044] 상기 아라비노 핵산(ANA)은 뉴클레아제에 높은 민감도를 갖는다. 그러므로, 일 실시예에서, 짧은 RNA의 탐지 센서(1000)의 상기 아라비노 핵산(ANA)이 노출되어 있는 경우, 뉴클레아제에 의하여 탐지 센서(1000)의 스트랜드가 절단될 수 있다. 예를 들면, 제 1 센싱 영역(100)이 타겟 짧은 RNA와 결합하여 PCR 가능 영역(200)과 상보적인 복제 영역(400)을 생성하면, 샘플 시료 내에는 결합에 참여하지 아니한 비특이적 짧은 RNA 및 결합되지 아니한 짧은 RNA의 탐지 센서가 타겟 짧은 RNA를 센싱하여 결합된 탐지 센서와 함께 포함될 수 있다. 이 때, 뉴클레아제를 샘플 시료 내에 첨가하면, 상기 결합되지 아니한 짧은 RNA의 탐지 센서 중 노출된 상기 아라비노 핵산(ANA)에 상기 뉴클레아제가 결합하여 상기 결합되지 아니한 짧은 RNA의 탐지 센서를 선택적으로 절단할 수 있다.
- [0045] 이와 같이, 상기 뉴클레오티드 유사체인 치환된 ANA에 의하여 타겟 짧은 RNA와 결합된 탐지 센서를 제외한 결합되지 아니한 탐지 센서(non-bound miRNA sensor) 및 비특이적 짧은 RNA(background miRNA)를 시료 내에서 제거한 후 PCR 증폭이 가능하므로, 피코몰은 물론 아토몰 정도의 적은 양의 샘플로부터도 정확한 짧은 RNA 탐지 결과를 제공할 수 있다.
- [0046] 이후, 프라이머 결합 영역(210)에 특이적인 프라이머(P1, P2)를 이용하여 센서(1000) 및 키메라 형태의 센서(1000)에 상보적인 스트랜드(2000)에 대하여 PCR를 수행할 수 있다(d 단계). DNA의 증폭은 센서(1000) 및 상보적인 스트랜드(2000)에 전체 영역에 대하여 수행되지 아니하며, 센서(1000) 중 PCR 가능 영역(200)과 상보적인 스트랜드(2000) 중 타겟 짧은 RNA(300)를 제외한 복제 영역(400)에 대하여만 수행될 수 있다. 즉, 타겟 짧은 RNA(300) 및 타겟 짧은 RNA와 상보적인 염기 서열을 갖는 제 1 센싱 영역(100)은 PCR 기법에 의하여 증폭되지 아니한다. 일 실시예에서, 제 1 센싱 영역(100)은 3' 말단에 아민 변형부를 포함하므로, 비특이적인 센서의 증폭을 방지할 수 있다.
- [0047] 증폭 결과물(e)은 센서의 PCR 가능 영역(200)으로 이루어진 단일 가닥 스트랜드와 PCR 가능 영역(200)에 의하여 합성된 복제 영역(400)으로 이루어진 단일 가닥 스트랜드 일 수 있다. 일 실시예에서, 증폭 중간체 및 결과물은 타겟 짧은 RNA를 포함하지 아니하므로 별도의 단계없이 PCR 기법으로 증폭이 가능하며, 추가적인 라이브러리 제작없이 시퀀싱 장비를 이용하여 염기서열을 해독할 수 있다. 다른 실시예에서는, 디지털 PCR을 통하여 타겟 짧은 RNA가 피검 샘플 내에 몇 카피 존재하는지 정량적인 분석을 수행할 수 있다.
- [0048] 또한, PCR 가능 영역(200) 내의 바코드 영역(220)에 의하여 타겟 짧은 RNA 별로 증폭 결과물을 구분할 수 있으므로, 별도의 단계를 거치지 않고 바로 HRM 분석도 수행할 수 있다. 일 실시예에서, 센서(1000)의 PCR 가능 영역(200)을 변경하면 나노포어 시퀀싱 기법에도 적용할 수 있으며, 이 밖에도 추가적인 단계 없이 다양한 DNA 분석 및 시퀀싱 기법을 이용하여 빠르고 간편하게 타겟 짧은 RNA를 시퀀싱 할 수 있다.

- [0049] 도 3a 내지 도 3d는 본 발명의 일 실시예에 따른 센서와 상기 센서의 타겟 짧은 RNA의 염기서열을 나타내는 것이다. 도 3a 및 도 3b는 타겟 짧은 RNA 210 및 타겟 짧은 RNA 21을 센싱하여 증폭하기 위한 센서 senR210 및 senR21의 염기서열을 나타내며, 도 3c 및 도 3d는 상기 타겟 짧은 RNA 210(miR-210) 및 타겟 짧은 RNA 21(miR-21)의 염기서열을 나타낸다.
- [0050] 도 3a 및 도 3b를 참조하면, 센서 senR210 및 senR21은 염기서열의 5' 말단으로부터 각각 88번째 및 138번째의 시토신(C)을 아리비노 핵산(이하, ANA)로 치환하여 제작할 수 있으며, 3' 말단으로부터 3번째 시토신(C)도 ANA로 치환하여 제작할 수 있다. 일부 시토신을 ANA로 치환함으로써 비특이적인 결합 또는 타겟 짧은 RNA와 결합하지 아니한 단일 가닥의 짧은 RNA의 탐지 센서(1000)를 뉴클레아제가 빠르고 정확하게 인지하여 분해할 수 있거나, 탐지 센서(1000)의 타겟 짧은 RNA에 대한 특이성을 증가시킬 수 있다. 일 실시예에서, 염기서열의 3' 말단으로부터 3번째 시토신을 ANA로 치환하는 것은 센서(1000)가 타겟 짧은 RNA(300)을 인지할 때의 특이성을 증가시켜줄 수 있다.
- [0051] 또한, 센서 senR210 및 senR21의 염기서열의 5' 말단으로부터 각각 88번째 및 138번째의 시토신을 ANA로 치환하는 것은 타겟 짧은 RNA(300)와 결합하지 못한 센서(1000)를 효소로 제거하는 과정에서 효율성을 증가시킬 수 있다. XNA중에서 ANA는 S1 뉴클레아제에 매우 민감하다. 그러므로, 치환된 ANA의 민감성에 의하여 S1 뉴클레아제는 타겟 짧은 RNA(300)를 인지하지 못한 센서(1000)의 모듈을 중간에 절단시킬 수 있으므로 타겟 짧은 RNA(300)와 결합하지 못한 센서(1000)를 효율적으로 제거시켜 센서(1000)가 자가 증폭되거나 비특이적인 증폭이 되는 것을 방지할 수 있다. 또한, 치환된 ANA에 의하여 타겟 짧은 RNA와 결합하지 못한 단일 가닥의 탐지 센서가 효과적으로 제거됨으로써, 이후의 PCR 증폭 단계에서 타겟 짧은 RNA와 관련없는 노이즈가 함께 증폭되는 것을 방지할 수 있으므로 정확하게 타겟 짧은 RNA를 탐지할 수 있다.
- [0052] 도 4a 및 도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 센서들을 이용한 일반적인 PCR 결과를 나타내는 이미지들이다. 도 1a, 도 1b, 도 3a 내지 도 3d를 참조하여 설명한 본 발명의 일 실시예에 따른 짧은 RNA의 탐지 센서(Sen R210, Sen R21)를 이용하여, 도 2에서 나타난 바와 같은 증폭 방법으로 PCR 가능 영역(200) 및 복제 영역(400)을 증폭하여 증폭 결과물을 다음과 같이 확인하였다.
- [0053] 도 3a 및 도 3b를 참조하여 설명한 센서인 Sen R210 및 Sen R21의 농도를 각각 50 pmol로 고정하고, 타겟 짧은 RNA(miR-210, miR-21)을 각각의 튜브에 넣은 후, DNA 중합효소(therminator DNA polymerase)를 이용하여 cDNA를 약 10분간 합성한다. cDNA의 합성 후 단일 가닥의 DNA 및 RNA를 분해하는 뉴클레아제를 처리한다. 이후, PCR 가능 영역(200)의 프라이머 결합 영역(210)에 특이적인 프라이머 세트들을 이용하여 증폭을 수행할 수 있다. 도 4a를 참조하면, 2 번 및 4 번 레인에서만 증폭 결과물(amplicon)을 확인할 수 있고, 이는 Sen R210 및 Sen R21 센서가 각각의 타겟 짧은 RNA인 miR-210 및 miR-21 만을 특이적으로 증폭시킴을 나타낸다.
- [0054] 또한, 짧은 RNA의 탐지 센서인 Sen R210 센서를 5 pmol로 고정하고 타겟 짧은 RNA인 miR-210의 농도를 1, 5 pmol을 넣어준 후 상술한 내용과 동일한 조건으로 실험을 수행하였다. 도 4b를 참조하면, 1 번 및 2 번 레인에서만 증폭된 결과물(amplicon)을 확인할 수 있고, 이는 SenR210 센서가 타겟 짧은 RNA(miR-210)의 농도에 따라서 작동한다는 것을 나타낸다. 또한, Sensor의 정확한 결합을 확인하기 위하여 센서의 타겟 짧은 RNA가 아닌 다른 짧은 RNA(miR-21)을 피검 샘플에 같이 주입한 결과(3 번 레인)증폭 결과물을 확인할 수 없었으며, 이는 본 발명의 일 실시예에 따른 센서인 SenR210 센서가 염기서열 특이적으로 정확하게 동작하는 것을 나타낸다.
- [0055] 도 5a 및 도 5b는 본 발명의 일 실시예에 따른 센서들을 이용한 디지털 PCR 결과 및 탐지된 짧은 RNA의 양을 나타내는 그래프이다.
- [0056] 타겟 짧은 RNA의 양에 따른 센서의 민감도 및 정확도를 살펴보기 위하여 다음과 같이 실험을 수행하였다. 먼저 50 amol 농도의 센서 Sen S210와 0, 2, 4, 8, 16, 32 amol 농도의 이 실험의 타겟 짧은 RNA인 miR-210을 튜브에 넣고 전체 양이 10  $\mu$ m 가 되도록 증류수를 넣어준다. 또한, 2  $\mu$ l 의 reaction Buffer (200 mM Tris-HCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1% Triton® X-100, (pH 8.8 @ 25° C))를 넣어준 후 95 °C에서 30초간 가열한 후 52 °C 에서 10분간 인큐베이션한다.
- [0057] 이후, 52 °C 인큐베이션을 홀딩한 상태로 2 유닛의 therminator DNA 중합효소 혼합물을 넣어주고 spin down 후에 52 °C에서 2분, 72 °C에서 2분 인큐베이션을 수행한다. PCR을 37 °C 로 내린 후 S1 뉴클레아제 혼합물 (74 mM sodium acetate (pH 4.5 at 25 ° C), 555 mM NaCl and 3.7 mM ZnSO<sub>4</sub>, 200 unit S1 nuclease) 를 넣어주고 45분간 인큐베이션을 더 수행한다. 이후, PCR 블럭을 70 °C로 올린 후 뉴클레아제를 20 분간 열 비활성화 시킨 후 피검 샘플을 뉴클레오티드 제거 키트를 이용하여 reaction sample을 nucleotide removal kit을 이용하여 정

제한다. 상기 일루션을 수행한 샘플을 1/2000 희석하여 디지털 PCR을 수행한다.

[0058] 이후, 본 발명의 일 실시예에 따른 센서 Sen R210를 50 amol 로 고정한 후, 타겟 짧은 RNA인 miR-210을 각각 0, 2, 4, 8, 16, 32 amol 넣고(3번 내지 7번 레인), 비교군으로 miR-21을 32 amol(2번 레인) 넣거나 짧은 RNA를 넣지 않고(1번 레인), DNA 중합효소인 therminator DNA polymerase를 이용하여 cDNA를 합성한다. 이후, 단일 가닥 특이적 뉴클레아제를 추가하여 결합되지 아니한 센서의 단일 가닥을 제거한 후 디지털 PCR을 수행하였다. 도 5a를 참조하면, 타겟 miR-210을 4 amol 이상 넣어주었을 때부터 센서 Sen R210이 타겟 짧은 RNA를 탐지하는 것을 확인할 수 있다. 또한, 타겟이 아닌 짧은 RNA인 miR-21을 32 amol 넣어준 2번 레인은 RNA를 넣지 아니한 샘플인 1번 레인과 비슷한 형광값을 갖는 것을 확인할 수 있다. 이는 본 발명의 일 실시예에 따른 센서(1000)는 amol 수준에서도 특이적으로 타겟 짧은 RNA에만 정확하게 동작하는 것을 알 수 있다.

[0059] 도 5b를 참조하면, 그래프의 y축은 전체 액적(droplet)에 대한 형광값을 계산한 것이며, 이는 마이크로리터 당 탐지된 miR-210의 카피수를 의미한다. 그래프에 따르면, 타겟 짧은 RNA인 miR-210의 피검 샘플 내에서의 농도에 따라 형광값이 증가함을 알 수 있으며, 0 내지 32 amol의 miR-210을 피검 샘플 내에 넣었을 때 1 마이크로리터 당 각각 26, 28, 88, 206, 395의 miR-210 카피가 존재함을 하기 표 1과 같이 확인하였다.

표 1

Sample	copy/ul	copy/20ul	PoissonConf		Positive	Negative	Droplets No.
			Max	Min			
NTC	2	40	3	1	23	13,267	13,290
miR-21 32 amol	15	304	17	13	215	16,575	16,790
miR-210 0 amol	17	336	19	15	235	16,300	16,535
miR-210 2 amol	26	512	28	23	329	14,976	15,305
miR-210 4 amol	28	562	31	25	348	14,416	14,764
miR-210 8 amol	88	1,760	94	83	1,088	13,946	15,034
miR-210 16 amol	206	4,120	214	198	2,709	14,150	16,859
miR-210 32 amol	395	7,900	407	384	4,718	11,811	16,529

[0060] 디지털 PCR은 20 μl의 시료를 약 1 nL 용량의 작은 액적으로 만들어 타겟 유전자 발현의 카피 넘버를 측정할 수 있는 장비이며, 현존하는 유전자 발현 탐지 기술로는 생체 시료에서 amol 단위의 유전자 물질의 탐지가 불가능하다. 이와 같이, 본 발명의 일 실시예에 따른 증폭 센서 및 방법은 단일 세포; 핵, 미토콘드리아, 염색체, ER과 같은 단일 세포 소기관; 또는 혈액 한 방울 내에 포함된 타겟 짧은 RNA의 농도를 탐지할 수 있다.

[0062] 도 6a 및 도 6b는 본 발명의 일 실시예에 따른 센서들의 타겟 짧은 RNA에 대한 정확도를 측정된 결과들이다.

[0063] 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 센서의 타겟 짧은 RNA 탐지의 정확도를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다. 먼저 50 amol 농도의 타겟 소형 RNA가 miR-210인 센서 Sen R210 및 다양한 종류의 짧은 RNA인 miR-16, miR-18a, miR-141, miR-145, miR-200, miR-210을 각각 32 amol PCR 튜브에 넣어준 후 10 μl에 맞추어서 증류수를 넣어준다. 또한, 2 μl의 reaction Buffer (200 mM Tris-HCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1% Triton® X-100, (pH 8.8 @ 25 °C))를 넣어준 후 95 °C에서 30초간 가열한 후 52 °C에서 10분간 인큐베이션한다. 이후, 52 °C 인큐베이션을 훌륭한 상태로 2 유닛의 therminator DNA 중합효소 혼합물을 넣고 spin down 후에 52 °C에서 2분, 72 °C에서 2분 인큐베이션을 수행한다. PCR을 37 °C로 내린 후 S1 뉴클레아제 혼합물 (74 mM sodium acetate (pH 4.5 at 25 °C), 555 mM NaCl and 3.7 mM ZnSO<sub>4</sub>, 200 unit S1 nuclease)를 넣어주고 45분간 인큐베이션을 더 수행한다. 이후, PCR 블럭을 70 °C로 올린 후 뉴클레아제를 20분간 열 비활성화 시킨 후 피검 샘플을 뉴클레오티드 제거 키트를 이용하여 reaction sample을 nucleotide removal kit을 이용하여 정제한다. 상기 일루션을 수행한 샘플을 1/2000 희석하여 디지털 PCR을 수행한다.

[0064] 이후, 본 발명의 일 실시예에 따른 센서 Sen R210을 50 amol로 고정한 후, A09 레인에는 짧은 RNA를 전혀 넣지 아니하고 B09 내지 H09 레인에는 miR-9, miR-16, miR-18a, miR-141, miR-145, miR-200, miR-210을 각각 32 amol 넣은 후, therminator DNA polymerase를 이용하여 cDNA를 합성한다. 이후, 단일 가닥 특이적 뉴클레아제를 이용하여 타겟 짧은 RNA와 결합하지 아니한 단일 가닥의 DNA와 단일가닥 DNA와 결합되지 아니한 RNA를 분해한다.

[0065] 도 6a를 참조하면, 센서 Sen R210은 타겟 짧은 RNA인 miR-210이 포함된 H09 레인에서만 정확하게 RNA를 탐지하는 것을 확인할 수 있었다. 나머지 짧은 RNA가 없거나 타겟 짧은 RNA가 아닌 6 종류의 염기서열이 다른 miRNA

가 존재하는 레인에서는 센서 Sen R210는 전혀 동작하지 않는 것을 확인할 수 있으므로, 본 발명의 일 실시예에 따른 센서의 타겟 짧은 RNA에 대한 특이적 동작을 확인할 수 있다.

[0066] 도 6b를 참조하면, 그래프의 y축은 전체 액적에 대한 형광값을 계산한 것이며, 이는 마이크로리터 당 탐지된 miRNA의 카피수를 의미한다. 그래프에 따르면, 타겟 짧은 RNA인 miR-210 를 피검 샘플 안에 넣었을 때만 형광값이 증가됨을 알 수 있고, 나머지 miR-9, miR-16, miR-141, miR-145, miR-200 RNA 를 넣었을 때에는 형광값이 증가하지 않음을, 즉, 센서 Sen R210가 전혀 작동하지 않음을 확인할 수 있었다.

[0067] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 짧은 RNA의 탐지 센서인 SenR210 DNA센서 및 도 3a 내지 도 3d를 참조하여 일부 뉴클레오티드를 ANA로 변형시킨 짧은 RNA의 탐지 센서(ANA modification)에 대한 S1 뉴클레아제의 분해능을 나타내는 젤 전기영동 이미지이다.

[0068] 상기 SenR210 DNA 센서와 ANA modification 센서는 시료에 S1 뉴클레아제를 첨가하여 10, 20, 및 30분동안 37 °C 에서 배양한 후 젤을 걸어서 결과를 확인하였다. 도 7을 참조하면, ANA modification된 센서는 DNA 센서에 비해서 S1 nuclease에 의해서 빠르게 분해됨을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 일 실시예에 따른 짧은 RNA 탐지를 위한 센서는 비특이적인 증폭을 제거하기 위하여 센서의 일부 뉴클레오티드를 ANA로 치환하는 것이 바람직할 것이다.

[0069] 도 8은 본 발명의 다른 실시예에 따른 센서 SenR210rna의 염기서열을 나타내는 것이다. 도 8은 타겟 짧은 RNA 210을 센싱하여 증폭하기 위한 센서 senR210rna의 염기서열을 나타낸다.

[0070] 도 8을 참조하면, 센서 senR210rna는 도3a를 참조하여 설명한 짧은 RNA의 탐지 센서의 5' 말단으로부터 24, 25, 26, 93, 94, 95, 140번째의 DNA를 RNA로 치환하여 제작할 수 있다. 상기 DNA들이 RNA로 치환된 센서는 모듈 증폭을 위한 프라이머와 결합하지만, RNA이기 때문에 taq polymerase에 의해서 증폭되지 않는다. 따라서, 타겟 짧은 RNA인 microRNA210을 프라이머로 이용하여 일부 DNA들이 RNA로 치환된 센서인 SenR210 rna를 템플릿으로 합성된 DNA 복제 영역(도 2의 400)만이 특이적으로 증폭될 수 있다. 또한, 상기 RNA로의 치환 중 senR210 rna의 140번째 DNA를 RNA로 치환한 것은 센서의 비특이적 결합으로 인한 비정상적 PCR 증폭을 방지하기 위함이다.

[0071] 또한, 센서 senR210rna 의 뉴클레오티드 치환부는 RNA 뉴클레오티드로 치환된 것 뿐만 아니라, ANA 뉴클레오티드로 치환된 뉴클레오티드 치환부를 더 포함할 수 있다. 상기 ANA 뉴클레오티드는 도 1 내지 도 7을 참조하여 설명한 바와 같이, 타겟 짧은 RNA와 결합되지 아니한 단일 가닥의 탐지 센서에서 뉴클레아제에 노출되어 상기 단일 가닥의 탐지 센서는 제거될 수 있다.

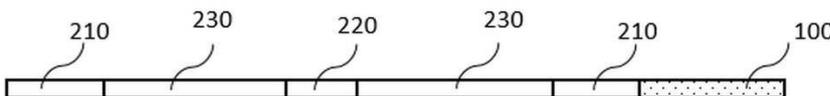
[0072] 이상에서 설명한 본 발명은 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 한정되지 않으며, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러가지 치환, 변형 및 변경이 가능하다는 것은, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 명백할 것이다.

**도면**

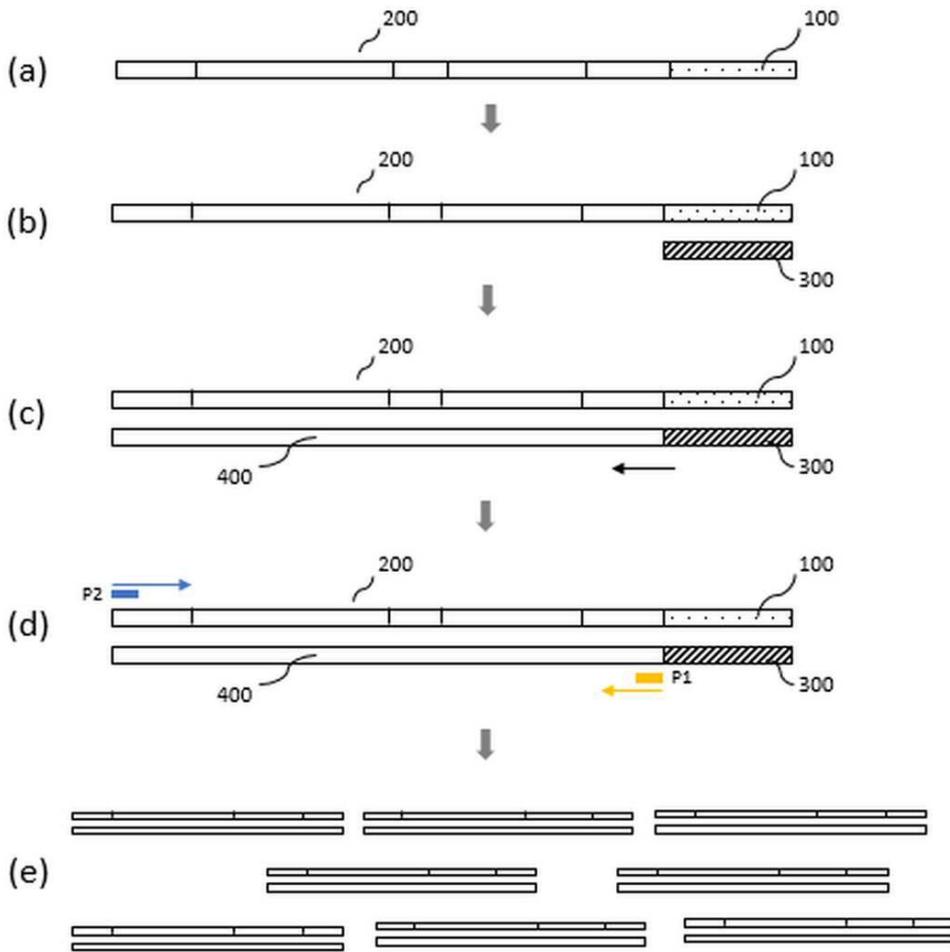
**도면1a**



**도면1b**



도면2



도면3a

```

>SenR210
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGA
ACTCCAGTCACATCACGATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTGT CAG CCG CTG TCA CAC GCA CAG-amine (index 2)
    Ana modification                                     Ana modification
    
```

도면3b

```

>SenR21
AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTTTCAGAGTTCTACAGTCCGACGATCTGGAATTCTCGGGTGCCAAGGA
ACTCCAGTCACCTGATATCTCGTATGCCGTCTTCTGCTTGT CAA CAT CAG TCT GAT AAG CTA-amine (index 1)
    Ana modification                                     Ana modification
    
```

도면3c

```

>hsa-miR-210-3p
CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA
    
```

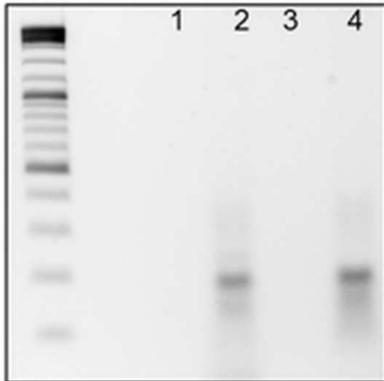
도면3d

>hsa-miR-21-5p

UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA

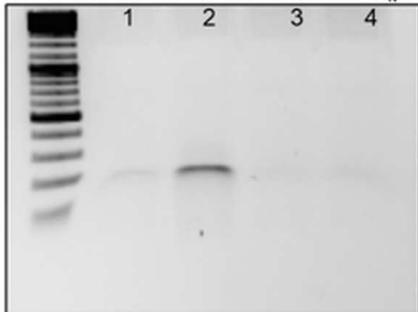
도면4a

SenR210	50	50	0	0	(pmol)
miR-210	0	50	0	0	(pmol)
SenR21	0	0	50	50	(pmol)
miR-21	0	0	0	50	(pmol)

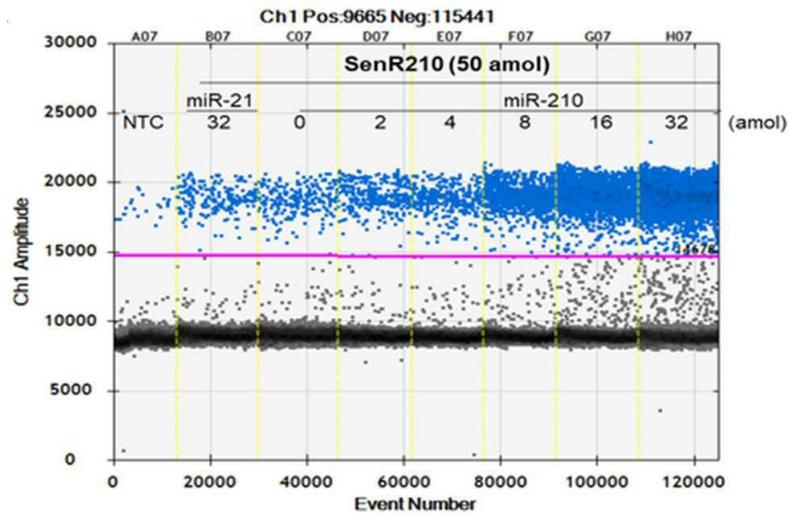


도면4b

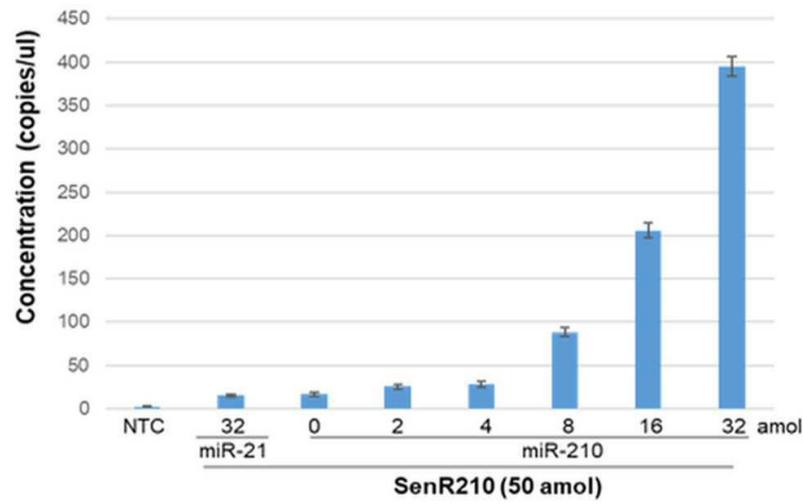
SenR210	5	5	5	5	(pmol)
miR-210	1	5	0	0	(pmol)
miR-21	0	0	5	0	(pmol)



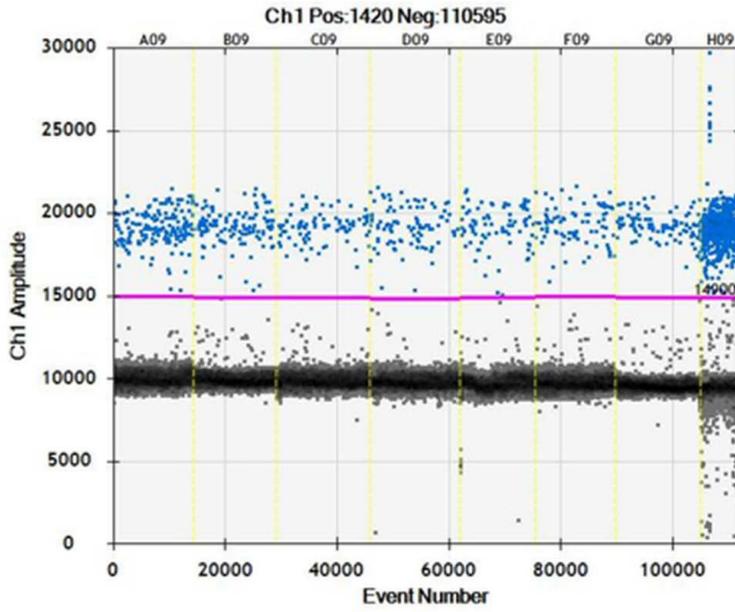
도면5a



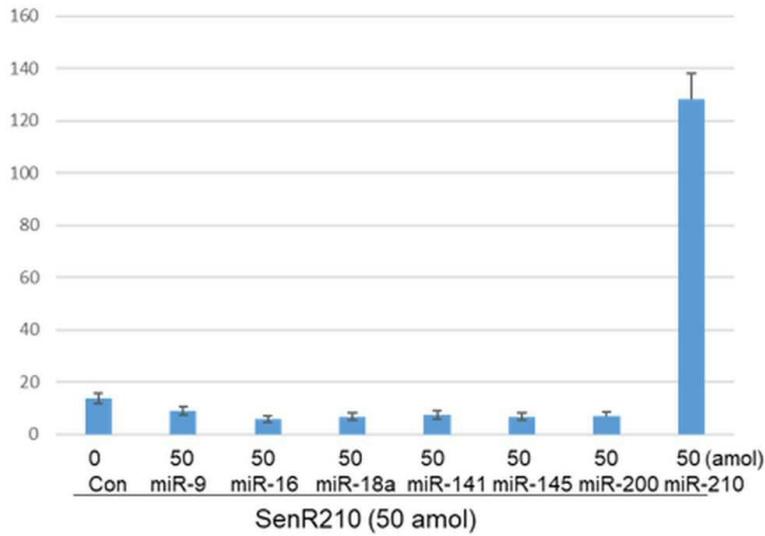
도면5b



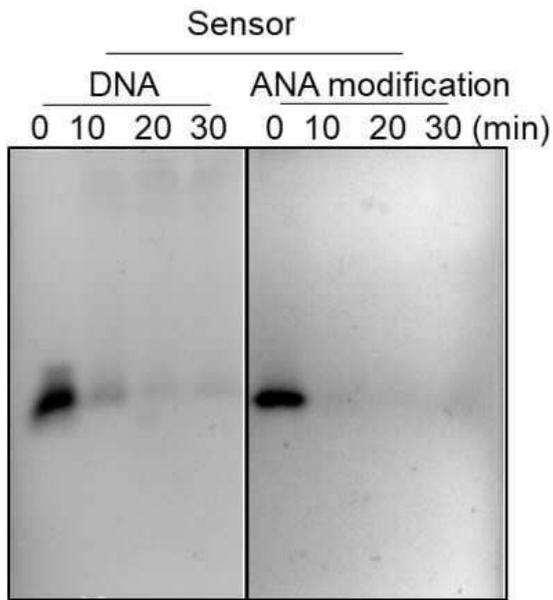
도면6a



도면6b



도면7



도면8

