



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년01월08일
(11) 등록번호 10-2063864
(24) 등록일자 2020년01월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/682 (2018.01) C12Q 1/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/682 (2018.05)
C12Q 1/701 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0056176
(22) 출원일자 2018년05월16일
심사청구일자 2018년05월16일
(65) 공개번호 10-2019-0131380
(43) 공개일자 2019년11월26일
(56) 선행기술조사문헌
JP2010535528 A*
Chem Soc Rev. 45(7):1901-1918 (2016.04.07.)*
JP2013255516 A
JP2016520314 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
사회복지법인 삼성생명공익재단
서울특별시 용산구 이태원로55길 48 (한남동)
(72) 발명자
강민희
서울특별시 강남구 일원로 81 (일원동)
정두련
서울특별시 강남구 일원로 81 (일원동)
이규성
서울특별시 강남구 일원로 81 (일원동)
(74) 대리인
리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 9 항

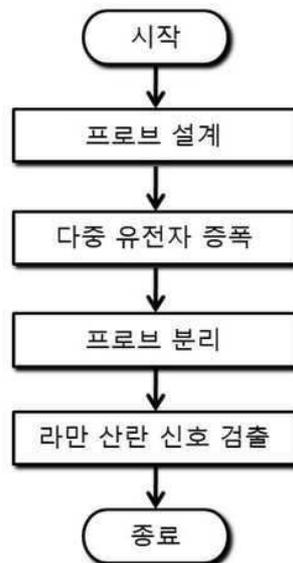
심사관 : 유성진

(54) 발명의 명칭 표면-증강 라만 산란 기반의 감염 질환 진단용 마커 검출 방법

(57) 요약

표면-증강 라만 산란 기반의 감염 질환 진단용 마커의 검출방법에 관한 것으로, 상기 방법에 의하면 분석 소요시간이 감소하였을 뿐만 아니라 여러 가지 마커를 한번에 검출할 수 있는바 진단의 정확성을 높일 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- C12Q 2537/143 (2013.01)
- C12Q 2563/107 (2013.01)
- C12Q 2563/143 (2013.01)
- C12Q 2565/632 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3A9B6919189
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 바이오의료기술개발사업
 연구과제명 유전체 기반 현장현시 다중진단을 위한 통합 시스템 개발
 기여율 8/10
 주관기관 삼성서울병원
 연구기간 2017.04.01 ~ 2021.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C3229
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 보건산업진흥원
 연구사업명 임상연구인프라조성
 연구과제명 인체삽입형 의료기기 핵심 인프라 연계를 통한 병원기반 전주기 연구 플랫폼 구축
 기여율 2/10
 주관기관 삼성서울병원
 연구기간 2017.11.01 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

감염 질환 마커에 특이적으로 결합하고, 3' 말단에 비오틴이 결합된 2 이상의 프로브를 시료에 첨가하여 2 이상의 마커 및 프로브의 혼성화 반응을 수행하는 단계;

상기 혼성화된 마커 및 프로브를 증폭하는 단계;

스트렙타비딘이 접합된 자성 비드와 상기 증폭된 마커 및 프로브 혼성체를 15분 동안 2회 반응시켜 분리하는 단계; 및

단일 광원에서 표면-증강 라만 산란(surface-enhanced Raman scattering, SERS) 신호를 측정하여 상기 2개 이상의 마커를 확인하여 다중 진단하는 단계;를 포함하는 표면-증강 라만 산란 기반의 감염 질환 진단용 마커의 검출 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 감염 질환은 중동호흡기증후군, 중증급성호흡기증후군, 지카 바이러스, 에볼라 바이러스, 조류인플루엔자 및 뎅기열로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 시료는 조직 추출물, 세포 용해물, 전혈, 혈장, 혈청, 침, 안구액, 뇌척수액, 땀, 뇨, 젖, 복수액, 활액 및 복막액으로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 프로브는 5' 말단에 형광물질(fluorophore) 또는 라만 활성 물질이 결합된 것인 방법.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 형광물질은 FAM(5'-Fluorescein phosphoramidite), TAMRA(5'-TAMRA phosphoramidite), VIC(2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein), Cy5(2-[5-[1,3-Dihydro-1-[3-(4-methoxytriphenylmethoxy)propyl]-3,3-dimethyl-2H-indol-2-ylidene]-1,3-pentadien-1-yl]-1-[3-[N,N-diisopropylamino(2-cyanoethoxy)phosphinoxy]propyl]-3,3-dimethyl-3H-indolium), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein, Succinimidyl Ester), HEX([6-carboxy-2',4,4',5',7,7'-hexachlorofluorescein]), 및 ROX(Rhodamine X, Rhodamine 101)로 구성된 군에서 선택되는 것인 방법.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 라만 활성 물질은 4-MBA(4-mercaptobenzoic acid), MMC(2,7-mercapto-4-methylcoumarin), MMTAA(2-mercapto-4-methyl-5-thiazoleacetic acid), TFMBA(2,3,5,6-Tetrafluoro-4-mercaptobenzoic acid), 및 MGITC(malachite Green Isothiocyanate)로 구성된 군에서 선택된 것인 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

청구항 1에 있어서, 혼성화된 마커 및 프로브의 증폭은 0 내지 30 사이클 동안 수행되는 것인 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 프로브의 분리는 자성 비드(Magnetic Bead)를 이용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서,

상기 프로브는 서열번호 10의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 프로브;

서열번호 11의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 프로브; 및

서열번호 12의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 프로브를 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 표면-증강 라만 산란을 기반으로 한 감염 질환 진단용 마커의 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 지구 온난화, 기후 변화 등으로 인한 신종 바이러스가 지속적으로 발생하고 있다. 중동호흡기증후군(Middle East Respiratory Syndrome; MERS), 중증급성호흡기증후군(Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS), 지카 바이러스(ZIKA Virus), 에볼라 바이러스(Ebola Virus), 조류인플루엔자(Avian Influenza), 뎅기열(Dengue fever) 등 제 3, 4군 급성 감염병 및 매개체 전파 감염병 전파사례가 증가하고 있으며, 교통의 발달, 국경의 무력화로 유동인구가 많아져 공항, 항만 등을 통한 파급 효과가 커 경제·사회적으로 심각한 손실을 초래하였다.

[0003] 상기와 같은 감염질환은 고열, 오한, 두통, 기침 등 비슷한 임상증상이 나타나며, 현재의 치료방법은 경험적 항생제 투여로 항생제 내성을 유발할 수 있어 조기진단과 질환의 감별진단이 필수적이다.

[0004] 현재, 감염질환의 진단은 면역검사와 분자진단검사 기술을 기반으로 사용되고 있으나, 감염병 진단의 핵심 속성 요소인 정확성과 사용 용이성을 함께 충족시키지 못하고 있어 공백 기술을 개선할 수 있는 신기술의 도입이 시급하다. 한편, 감염질환을 진단하기 위한 전통방식의 rT-PCR(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 이외에 실시간으로 유전자 발현에 대한 정성과 정량을 확인할 수 있는 Real-time PCR 방식이 사용되고 있다. Real-time PCR은 전문적인 대형장비가 필요하며, 기계의 채널수 제한으로 인해 최대 5개의 Fluorophore Dye를 확인할 수 있다. 다만, 비슷한 임상증상을 나타내어 정확한 감별진단이 필요한 감염질환의 다중진단을 위한 진단 방법으로는 한계점을 지니는 문제점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 감염 질환 마커에 특이적으로 결합하는 프로브를 시료에 첨가하여 마커 및 프로브의 혼성화 반응을 수행하는 단계; 상기 혼성화된 마커 및 프로브를 증폭하는 단계; 증폭된 마커 및 프로브 혼성체로부터 프로브를 분리하는 단계; 및 표면-증강 라만 산란(surface-enhanced Raman scattering, SERS) 신호를 측정하여 상기 마커를 확인하는 단계;를 포함하는 표면-증강 라만 산란 기반의 감염 질환 진단용 마커의 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 일 양상은 감염 질환 마커에 특이적으로 결합하는 프로브를 시료에 접촉시켜 상기 마커와 혼성화 하는 단계; 상기 혼성화된 마커 및 프로브를 증폭하는 단계; 증폭된 마커 및 프로브 혼성체로부터 프로브를 분리하는 단계; 및 표면-증강 라만 산란(surface-enhanced Raman scattering, SERS) 신호를 측정하여 상기 마커를 확인하는 단계;를 포함하는 표면-증강 라만 산란 기반의 감염 질환 진단용 마커의 검출 방법을 제공한다.

[0007] 일 구체예에 따른 방법은 감염 질환 마커에 특이적으로 결합하는 프로브를 시료에 접촉시켜 상기 마커와 혼성화 하는 단계를 포함한다.

[0008] 본 명세서 내 용어, "혼성화"는 상보적인 단일가닥 핵산들이 이중 가닥 핵산을 형성하는 것을 의미한다. 혼성화는 2개의 핵산 가닥 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match; 정합) 일어나거나 또는 일부 부정합(mismatch)

염기가 존재하여도 일어날 수 있다. 혼성화에 필요한 상보성 정도는 혼성화 조건에 따라 달라질 수 있다.

- [0009] 본 명세서 내 용어, "라만 산란"은 빛이 어떤 매질을 통과할 때 빛의 파장을 변화시켜 빛의 일부가 진행 방향에서 이탈해 다른 방향으로 진행하는 현상을 의미한다.
- [0010] 본 명세서 내 용어 "라만 분광법"은 시료에 단파장의 레이저를 조사하여 산란된 빛을 검출하여 분자 수준의 정보를 얻어내는 유용한 분광법으로, 기존의 적외선(Infrared) 분광법에서 얻을 수 있는 정보와 서로 상보적인 화학구조 정보를 얻을 수 있는 방법으로 생화학/화학/소재 분야에 광범위하게 사용되고 있으며, 적외선 분광법에 비해 시료 측정이 매우 간단하다. 라만 분광법은 분자들의 진동 상태(vibrational state)에 대한 정보를 제공한다. 대부분의 경우, 흡수된 광선(radiation)이 동일한 파장에서 재-방사(re-radiated)되는데, 이를 레일리 산란(Rayleigh scattering) 또는 탄성 산란(elastic scattering)의 과정이라고 한다. 이때, 재-방사된 광선간의 에너지 차이는 이들 간의 파장에서의 이동(shift)으로 나타나고 이러한 차이의 정도는 파수(파장의 역수)의 단위로 측정되어 라만 쉬프트(Raman shift, RS)로 표현된다. 만일 투사 광선이 단파장이고 레이저를 그 소스로 이용하는 경우, 주파수 상에 차이를 가지는 산란된 광선(빛)은 레일리 산란된 광선(빛)과 좀더 용이하게 구별될 수 있다. 즉, 라만 쉬프트는 분자의 진동 주파수에 해당한다. 따라서, 라만 분광법은 적외선 분광법과 같이 분자의 진동 형태, 회전상태에 대한 정보를 얻기 위해 사용되지만 적외선 분광법에서와는 다른 메커니즘과 선택 규칙에 근거하며 측정방법도 다르다.
- [0011] 상기 감염 질환은 중증호흡기중후군, 중증급성호흡기중후군, 지카 바이러스, 에볼라 바이러스, 조류인플루엔자 또는 뎅기열일 수 있다. 상기 시료는 개체의 생물학적 시료로부터 취득될 수 있으며, 예를 들어, 조직 추출물, 세포 용해물, 전혈, 혈장, 혈청, 침, 안구액, 뇌척수액, 땀, 뇨, 젖, 복수액, 활액 또는 복막액일 수 있다.
- [0012] 상기 개체는 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.
- [0013] 상기 프로브는 표적 유전자(감염 질환 특이 유전자)의 검출을 위한 것으로서, 5' 말단에 형광물질(fluorophore) 또는 라만 활성 물질이 결합된 것일 수 있다. 상기 형광물질 또는 라만 활성 물질은 특정 라만 스펙트럼을 보여주기 때문에 SERS에서 검출하고자 하는 표적 물질을 보다 효과적으로 분석할 수 있다.
- [0014] 상기 형광물질로는 예를 들어, FAM(5'-Fluorescein phosphoramidite), TAMRA(5'-TAMRA phosphoramidite), VIC(2' -chloro-7' 'phenyl-1,4-dichloro-6-carboxy-fluorescein), Cy5(2-[5-[1,3-Dihydro-1-[3-(4-methoxytriphenylmethoxy)propyl]-3,3-dimethyl-2H-indol-2-ylidene]-1,3-pentadien-1-yl]-1-[3-[N,N-diisopropylamino(2-cyanoethoxy)phosphinoxy]propyl]-3,3-dimethyl-3H-indolium), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein, Succinimidyl Ester), HEX([6 - carboxy - 2',4,4',5',7,7' - hexachlorofluorescein]) 또는 ROX(Rhodamine X, Rhodamine 101)일 수 있고, 상기 라만 활성 물질은 4-MBA(4-mercaptobenzoic acid), MMC(2,7-mercapto-4-methylcoumarin), MMTAA(2-mercapto-4-methyl-5-thiazoleacetic acid), TFMBA(2,3,5,6-Tetrafluoro-4-mercaptobenzoic acid), 또는 MGITC(malachite Green Isothiocyanate) 일 수 있다. 상기 프로브는 3' 말단에 비오틴이 결합된 것일 수 있다.
- [0015] 일 구체예에 따른 방법은 상기 혼성화된 마커 및 프로브를 증폭하는 단계를 포함한다. 혼성화된 마커 및 프로브의 증폭은 0 내지 30 사이클 동안 수행될 수 있다. 예를 들어, 0 내지 30 사이클, 0 내지 25 사이클, 0 내지 20 사이클, 5 내지 30 사이클, 5 내지 25 사이클, 10 내지 25 사이클, 또는 10 내지 20 사이클일 수 있다. 기존 분자 진단 방법에 의하면 혼성화된 마커 및 프로브의 증폭을 30 내지 40 사이클 동안 수행하고, 증폭된 유전자 산물을 아가로스 겔 전기영동으로 확인한다. 이러한 전기영동을 수행하기 위해서는 아가로스 겔을 만들고 증폭된 유전자를 염색하여 확인해야 하는 번거로움이 있다. 이를 극복하기 위한 방법으로서 실시간 PCR 방법이 있는데, 이 방법은 형광을 사용하기 때문에 전기영동을 할 필요는 없으나, 고가의 사용 기기와 형광시약을 필요로 하며 기계의 채널 수에 제한이 있기 때문에 현실적으로 5개 이상의 다중 진단을 실현하기에 어려운 한계점을 가지고 있다. 즉, 상기 두 가지 방법은 혼성화된 마커 및 프로브의 증폭을 30 내지 40 사이클 이상 수행한 후에야 정확한 결과값을 도출할 수 있다는 문제점이 있다. 따라서, 일 양상에 따른 방법은 낮은 PCR 사이클에서 SERS 분석 기술을 도입함으로써 분석 시간과 시료 사용량을 절감할 수 있는 이점이 있다. 또한, 단분자 수준의 물질까지 검출이 가능하며 고감도로 측정할 수 있다는 이점이 있다.
- [0016] 일 구체예에 따른 방법은 증폭된 마커 및 프로브 혼성체로부터 프로브를 분리하는 단계를 포함한다. 프로브의 분리는 자성 비드(Magnetic Bead)를 이용하여 수행될 수 있다.
- [0017] 상기 자성 비드는 스트렙타비딘(streptavidin), 아비딘(avidin) 또는 BSA(bovine seru, albumin)이 접합된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 프로브는 3'에 비오틴(biotin)이 결합되어 있는바, 스트렙타비딘(streptavidin

n)이 접합된 자성 비드(Magnetic bead)를 이용하여 마커 및 프로브 혼성체로부터 프로브를 분리할 수 있다. 스트렙타비딘은 소분자 비오틴에 대하여 대단히 높은 결합 친화력($K_d \sim 10^{-10} \sim 10^{-14}$ M)을 갖는 호모 테트라머로서, 스트렙타비딘과 비오틴 간의 이러한 매우 강하고 특이적인 상호작용에 의해 마커 및 프로브 혼성체로부터 프로브를 분리할 수 있다.

[0018] 상기 자성 비드는 수십 나노미터에서 수 마이크로미터의 직경을 가지는 비드 형태의 자성 물질을 의미한다. 이때, 상기 자성 물질은 Fe, Co, Mn, Ni, Gd, Mo 또는 이들의 산화물 등일 수 있다. 상기 자성 비드는 직경 0.1 μ m 내지 1 μ m일 수 있다. 예를 들어, 상기 자성 비드의 직경은 0.1 μ m 내지 1 μ m, 0.2 μ m 내지 0.8 μ m, 0.2 μ m 내지 0.6 μ m, 0.3 μ m 내지 0.6 μ m, 0.4 μ m 내지 0.6 μ m, 또는 0.3 μ m 내지 0.5 μ m일 수 있다. 상기 자성 비드로는 자성을 가질 수 있는 미세 입자라면 당업자에게 자명한 범위 내에서 다양한 입자를 사용할 수 있음은 물론이며, 상업적으로 수득할 수 있는 자성 비드를 사용할 수 있다.

[0019] 일 실시예에서는 프로브의 3'에 도입된 비오틴과 스트렙타비딘의 결합에 의한 프로브 분리 최적화를 위하여 스트렙타비딘이 접합된 자성 비드(Magnetic bead)와 제작된 프로브의 반응 시간 및 반응 횟수를 조절하여 최적화된 조건을 찾아냈다. 최적화 조건으로는 도 5에 나타난 바와 같이, 프로브를 분리하지 않는 경우, 및 프로브를 분리한 경우(15분 1회, 15분 2회, 30분 1회 및 30분 1회)로 설정하였으며, 프로브를 분리하지 않는 경우에서 형광 세기가 가장 높게 나타났고, 분리 시간 및 횟수에 따라 형광 세기가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 비오틴과 스트렙타비딘의 결합에 의해 마커 및 프로브 혼성체로부터 프로브가 분리될수록 형광의 세기가 감소하는 것으로 보아 상기 조건 중 15분 2회에서 최단 시간으로 높은 분리 효율을 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0020] 일 구체예에 따른 방법은 표면-증강 라만 산란(surface-enhanced Raman scattering, SERS) 신호를 측정하여 상기 마커를 확인하는 단계를 포함한다. 상기 단계에서는, 프로브의 5' 말단에 결합된 형광물질 또는 라만 활성 물질만을 분리하여 라만 신호를 측정한다. 조사되는 빛의 파장은 400 cm^{-1} 내지 800 cm^{-1} 영역일 수 있다. 예를 들어, 상기 빛의 파장은 400 cm^{-1} 내지 800 cm^{-1} , 420 cm^{-1} 내지 800 cm^{-1} , 450 cm^{-1} 내지 800 cm^{-1} , 480 cm^{-1} 내지 790 cm^{-1} , 또는 488 cm^{-1} 내지 785 cm^{-1} 일 수 있다. 또한, 상기 빛의 파장은 514nm 파장을 갖는 Ar⁺ 레이저, 633nm 파장을 갖는 He-Ne 레이저 또는 785nm 파장을 갖는 다이오드 레이저일 수 있다. 구체적으로, 라만 신호는 785 nm에서 3.7 mW 레이저 출력을 이용하여 400~1800 cm^{-1} 영역에서 익스텐디드 스캔을 통해 10초 동안 스펙트럼을 수집한 후, 단일 광원으로 각각의 표적 유전자 검출용 프로브에 5'에 결합된 형광물질 또는 라만 활성 물질의 라만 신호를 획득함으로써, 표적 물질 즉 감염 질환의 마커를 검출할 수 있다.

[0021] 즉, 라만 신호로부터 특정 피크가 관찰되면 개체가 감염 질환의 마커를 가지고 있는 것으로 판단할 수 있으며 예를 들어, 중동호흡기증후군, 중증급성호흡기중후군, 지카 바이러스, 에볼라 바이러스, 조류인플루엔자 또는 Dengue열이 발병한 것으로 판단할 수 있다.

[0022] 상기와 같은 방법을 통하여 표적 물질을 검출할 수 있으며, 정량적인 검출도 가능하다.

발명의 효과

[0023] 종래의 실시간 중합효소연쇄반응(real time PCR)은 기계의 채널 수 제한으로 인해 최대 5개의 형광 물질 염료 (fluorophore dye)만을 검출할 수 있는 반면, 일 양상에 따른 검출 방법은 단일 광원에서 여러 가지 마커를 한번에 검출할 수 있는바 다중 진단이 용이하다. 또한, 라만 산란은 형광에 비해 1천 배 이상 좁은 대역폭을 가지고, 표면-증강 라만 산란을 이용하여 형광보다 높은 민감도를 얻을 수 있으므로 저가의 소형 라만 장비를 이용하여 현장 진단에도 용이하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 일 구체예에 따른 시스템의 흐름을 나타낸 모식도이다.
 도 2는 일 구체예에 따른 MERS-CoV(중동호흡기증후군 코로나바이러스, Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) 타겟 유전자에 대하여 프라이머 및 프로브의 결합을 나타낸 그림이다.
 도 3은 일 구체예에 따른 진단방법을 도시한 그림이다.
 도 4는 타겟 유전자 및 프로브의 PCR 증폭 산물을 아가로스 젤에 로딩한 후, 전기영동을 통해 확인한 사진이다.

도 5는 일 구체예에 프로브의 분리 효율을 도시한 그래프이다.

도 6은 일 구체예에 따른 MERS-CoV(중동호흡기증후군 코로나바이러스, Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus) 타겟 유전자의 표면-증강 라만산란 분석신호를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0026] **[실시예]**

[0027] **실시예 1. 중동호흡기 증후군 코로나바이러스 타겟 유전자 ORF1a, ORF1b 프로브의 및 upE RNA 주형 및 프라이머, 프로브의 설계**

[0028] MERS-CoV(중동호흡기증후군 코로나바이러스, Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus)의 타겟 유전자를 검출하기 위하여, 상기 MERS-CoV의 선별 검사용 유전자인 upstream of envelope gene(upE) 및 확진 검사용 유전자인 open reading frame(ORF1a 및 ORF1b)에 대한 cDNA, 정방향 및 역방향 프라이머, 및 프로브를 제작하였다. 구체적으로, (DNA 주형, 정방향 및 역방향 프라이머, 및 라만 신호 측정용 비오틴이 라벨된 특정(biotin labeled specific) 프로브를 제작하였다.

[0029] **1-1. 타겟 유전자의 설계**

[0030] 타겟 유전자의 염기서열을 T7 프로모터가 삽입되어 있는 pBIC-A 벡터에 클로닝하여 RNA를 합성하고, 합성된 RNA로부터 상보성 cDNA를 제작하였다. 구체적으로, pBIC-A 벡터의 제한효소(BamH1, Xho1) 자리를 이용하여 선형 fragment로 절단한 후, fragment를 정제하였다. 이후, fragment를 주형으로 하여 T7 polymerase를 처리하여 RNA를 합성하고, 합성된 RNA로부터 역방향 프라이머를 이용하여 상보성 cDNA를 합성하였다.

표 1

[0031]

	서열번호	염기서열
ORF1a	1	TATGTGATAAATCTTACAAGCCACTAAATTTACTTTGTGGAAGTACTGTTTGTGAGACTATCCCACACAGTTGTGCCACTCTTATTTGTGACTATGGCCTTCGTTATGTTGGTTAAACACAAACACACCTTTTGGACACTTTCTTGTGCCTGTGGCTATTTGTTGACTTATGCAAACATAGTCTACGAGCCCACTACTCCCATTTTCGTCAGCGCTGATTGCAGTTGCAAAATGGCTTGCCCCCACTAATGCTTATATGCGCACTACACATACTGATATTGGTGTCTACATTAGTATGTCACCTGTATTAGTCATGTTAGTGAAGAGATTGTACAACCCATCACTTTCTAACTTTGCGTTAGCATTGTGCAGTGGTGAATGTGGTTGTACACTTATAGCATTGGAGAAGCCTCAAGCCCCATTGCCTATCTGGTTTTTGTCACTACACTCACTAGTGATTATACGATTACAGTC
ORF1b	2	TGCTTATGCACCAACATATGTTAGTGTGATGACAAGTATAAGACGAGTGATGAGCTTTGCGTGAATCTTAATTTACCCGCAATATGTTCCATACTCTCGTGTATTTCCAGGATGGGCTTTAAACTCGATGCAACAGTTCCTGGATATCCTAAGCTTTTCTATTACTCGTGAAGAGGCTGTAAGGCAAGTTCGAAGCTGGATAGGCTTCGATGTTGAGGGTGTCTATGCTCCCGTAATGCATGTGGCACCAATGTGCCTCTACAATTAGGATTTCAACTGGTGTGAACCTTGTGTTTCAGCCAGTTGGTGTGTAGACACTGAGTGGGGTAACATGTTAAACGGGCATTGTGTCACGTCCTCCACCAGGTAACAGTAAAGCACCTCGTGCCTCTTATGCATAAAGGGGCTGCGTGGCCTATTGTTAGACGACGTATAGTGCAAATGTTGTCAGACACTTTAGACAAATTTGCTGATTA
upE	3	ATGGTATGGTCCCTGTAATACACACAAACCATTATTTATTAGAACTTCGATCAGCGTTCAGCTGTTCTCGTGTGTTTTTATTTGCACTCTTCCACTTATATAGAGTGCCTTATATTAGCCGTTTTAGTAAGATTAGCTAGTTTCTGTAAGTACTTCTCCTTAAACGGCAATGTTTCCACTGTTTTTCGTCCTGCAACGCGGATTAGTTCCTTTCACATAATCGCCCCGAGCTCGCTTATCGTTAAGCAGCTCTGCCTACTATGGGTCCCGTGTAGAGGCTAATCCATTAGTCTCTCTTTGGACATATGGA AACGAACATATGTTACCCTTTGTCCAAGAACGAATAGGGTTGTTTCATAGTAAACTTTTTTCATTTTTACCGTAGTATGTGC TATAACTCTTGGTGTGTATGGCTTTCCTTACGGCTACTAGATTATGTGTGCAATGTATGACAGGCTTCAATACCCTGT

[0032] **1-2. 정방향 및 역방향 프라이머, 및 라만 신호 측정용 비오틴이 라벨된 특정(biotin labeled specific) 프로브의 제작**

[0033] 형광 및 비오틴 라벨은 통상의 방법에 따라 제작 의뢰(바이오마니아 및 마크로젠)하여 제작하였으며, 프로브의 3'에 비오틴을 도입하였다. 타겟 유전자에 대한 정방향 및 역방향 프라이머, 및 프로브를 하기 표 2 및 표 3에 나타냈다.

표 2

[0034]

유전자	서열번호	염기서열
ORF1a	F	4 CCACTACTCCCATTTTCGTCAG
	R	5 CAATATCAGTATGTGTAGTGCCG

ORF1b	F	6	TTCGATGTTGAGGGTGCTCAT
	R	7	TCACACCAGTTGAAAATCCTAATTG
upE	F	8	GCAACGCGCGATTCAAGTT
	R	9	GCCTCTACACGGGACCCATA

표 3

[0035]

유전자	서열번호	프로브
ORF1a	10	6-carboxy-N,N,N,N'-tetramethylrhodamine (TAMRA) -CAAATTGGCTTGCCCCACTAATGCTTAT-[biotin]
ORF1b	11	9-[2-(ethoxycarbonyl)phenyl]-3,6-bis(ethylamino)-2,7-dimethyl, chloride (R6G) -CCGTAATGCATGTGGCACCAATGT- [biotin]
upE	12	6-carboxyfluorescein(FAM) - CTCTCACATAATGCCCCGAGCTCG-[biotin]

[0036]

1-3. 타겟 유전자 및 프로브의 증폭

[0037]

상기 실시예 1-1에서 제작한 타겟 유전자의 cDNA와 실시예 1-2에서 제작한 프로브를 중합효소 연쇄반응(PCR)을 이용하여 증폭시켰다. 구체적으로, PCR Premix (AcuuPower[®] HotStat PCR PreMix, BIONEER)을 이용하여, 1 μl (100 ng/μl) cDNA와 제작된 정방향 및 역방향 프라이머를 각각 0.5 μl (100 pmole/μl)를 PCR tube에 믹스하고 하기 표 4의 PCR 반응 조건을 이용하여 증폭시켰다. 상기 반응 산물은 2% 아가로스 젤에 로딩하고, 전기영동을 통해 확인하였다.

표 4

[0038]

Pre-denaturation	94°C/5min	1 cycle
Denaturation	94°C/30sec	35 cycle
Annealing	55°C/30sec	
Extension	72°C/1min	
Final extension	72°C/5min	1 cycle
Storage	4°C	

[0039]

도 4는 타겟 유전자 및 프로브의 PCR 증폭 산물을 아가로스 젤에 로딩한 후, 전기영동을 통해 확인한 것이다.

[0040]

도 4에 나타난 바와 같이, 타겟 유전자 Orf1a, Orf1b, 및 upE 유전자는 각각 90bp, 82bp, 및 92bp의 크기를 갖는 것을 확인할 수 있었다.

[0041]

실시예 2. 프로브 분리 최적화 조건 및 효율 확인

[0042]

실시예 1에서 제작된 프로브는 3'에 비오틴(biotin)이 도입되어 있어, 스트렙타비딘(streptavidin)이 접합된 자성 비드(Magnetic bead)를 이용하여 분리할 수 있다. 프로브의 3'에 도입된 비오틴과 스트렙타비딘의 결합에 의한 프로브 분리 최적화를 위하여 스트렙타비딘이 접합된 자성 비드(Magnetic bead)와 상기 실시예 1에서 제작된 프로브의 반응 시간 및 반응 횟수를 조절하여 최적화된 조건을 찾아내었다. 구체적으로, 상기 증폭된 마커 및 프로브 혼성체로부터 프로브를 분리하는 방법은 다음과 같다. 먼저, 200μl 자성 비드를 6 x saline-cosium citrate(SSC) 버퍼로 세척한 후 중합효소연쇄반응 산물과 함께 혼합하여 상온에서 반응시켰다. 이후, 자석을 이용하여 상기 자성 비드를 결합한 후 상등액(supernatant)으로부터 20μl의 프로브 샘플을 분리하였다. 이후, 획득한 샘플의 형광 신호를 측정함으로써 분리 효율을 평가하였다.

[0043]

도 5는 상기 실시예 1에서 제작된 프로브의 분리 효율을 도시한 그래프이다.

[0044]

도 5에 나타난 바와 같이, 프로브를 분리하지 않는 경우, 형광 세기가 가장 높게 나타났고, 분리 시간과 횟수에 따라 형광 세기가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 상기 5가지 조건 중 15분 동안 2회의 반응을 수행하였을 때, 형광 신호가 최소화 되는 것을 확인할 수 있었다.

[0045]

실시예 3. 타겟 유전자의 표면-중간 라만산란 분석신호

[0046]

실시예 1에서 제작한 cDNA, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 프로브를 활용한 PCR 프로세스를 진행한 샘플에서 스트렙타비딘이 접합된 자성 입자(Magnetic bead)를 이용하여 5'말단에 도입된 형광물질(fluorophore)만을

분리하여 라만 신호를 측정하였다.

[0047] 라만 산란 신호는 785 nm에서 3.7 mW 레이저 출력을 이용하여 400~1800 cm^{-1} 영역에서 익스텐디드 스캔을 통해 10초 동안 스펙트럼을 수집하였다. 단일 광원으로 각각의 표적 유전자 검출용 프로브에 5'에 도입된 형광물질의 라만 신호를 획득하였으며, 각각의 스펙트럼의 특이 라만 피크부터 표적 유전자의 검출을 존재 유무를 확인할 수 있었다.

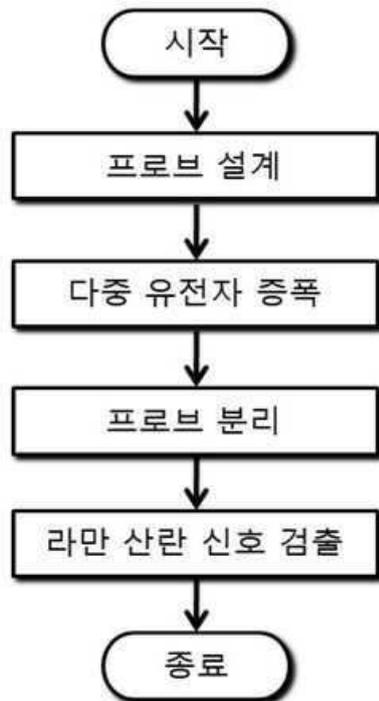
[0048] 도 6은 실시예 1에서 제작한 코로나바이러스 타겟 유전자의 표면-증강 라만 산란 분석 신호를 나타낸 그래프이다.

[0049] 도 6에 나타난 바와 같이, TAMRA 특이 라만 피크 502 cm^{-1} , R6G 특이 라만 피크 775 cm^{-1} , 1309 cm^{-1} , 1363 cm^{-1} , 및 FAM의 854 cm^{-1} , 1614 cm^{-1} , 1727 cm^{-1} 로부터 각각의 표적유전자의 유무(* 표시)를 확인 할 수 있었다. 즉, 일양상에 따른 방법에 의하면 검출용 프로브에 도입된 형광물질에 따라 단일 광원에서 다중 진단이 가능하다.

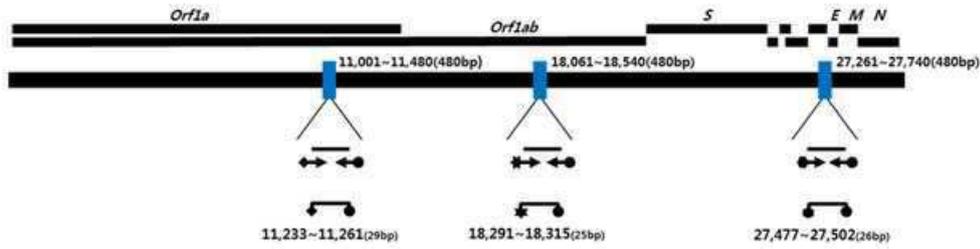
[0050] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

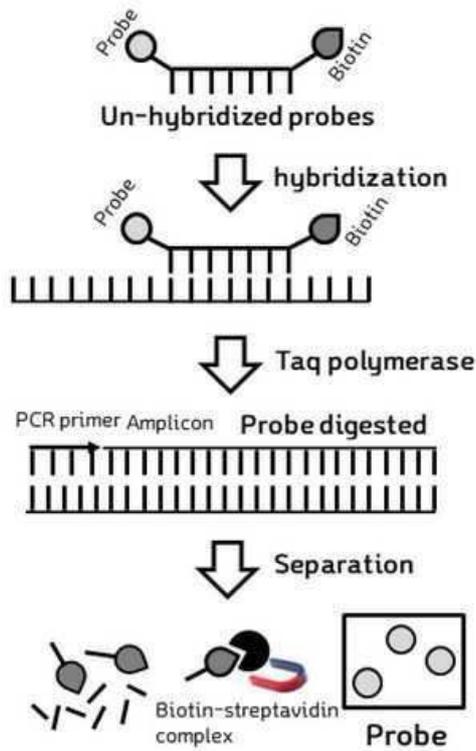
도면1



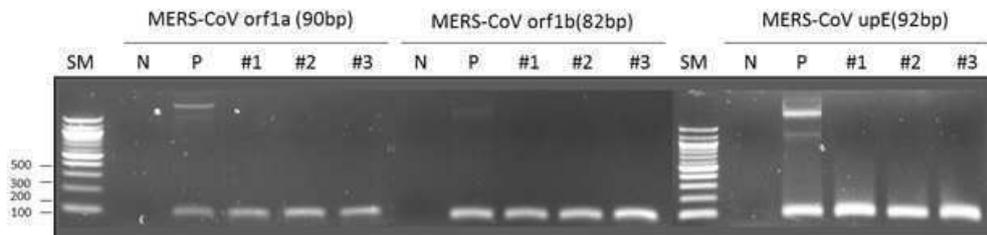
도면2



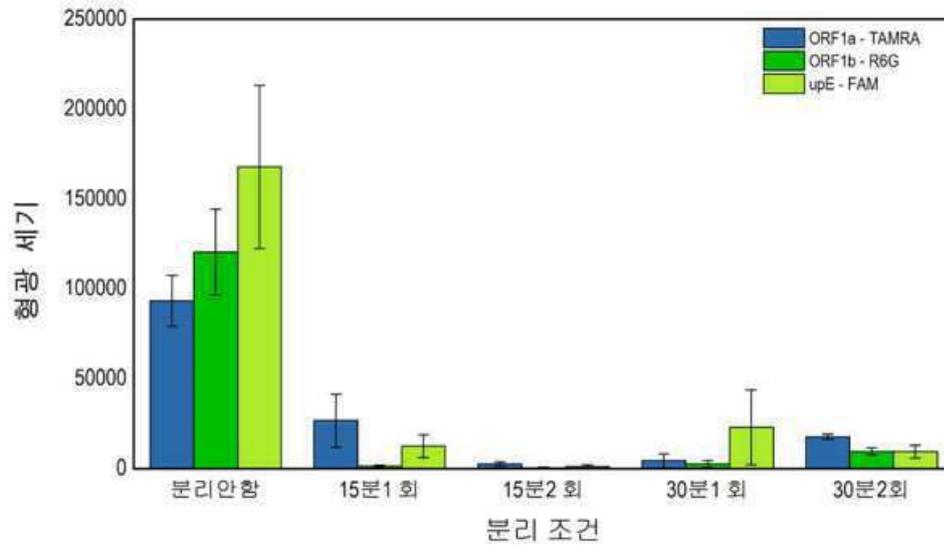
도면3



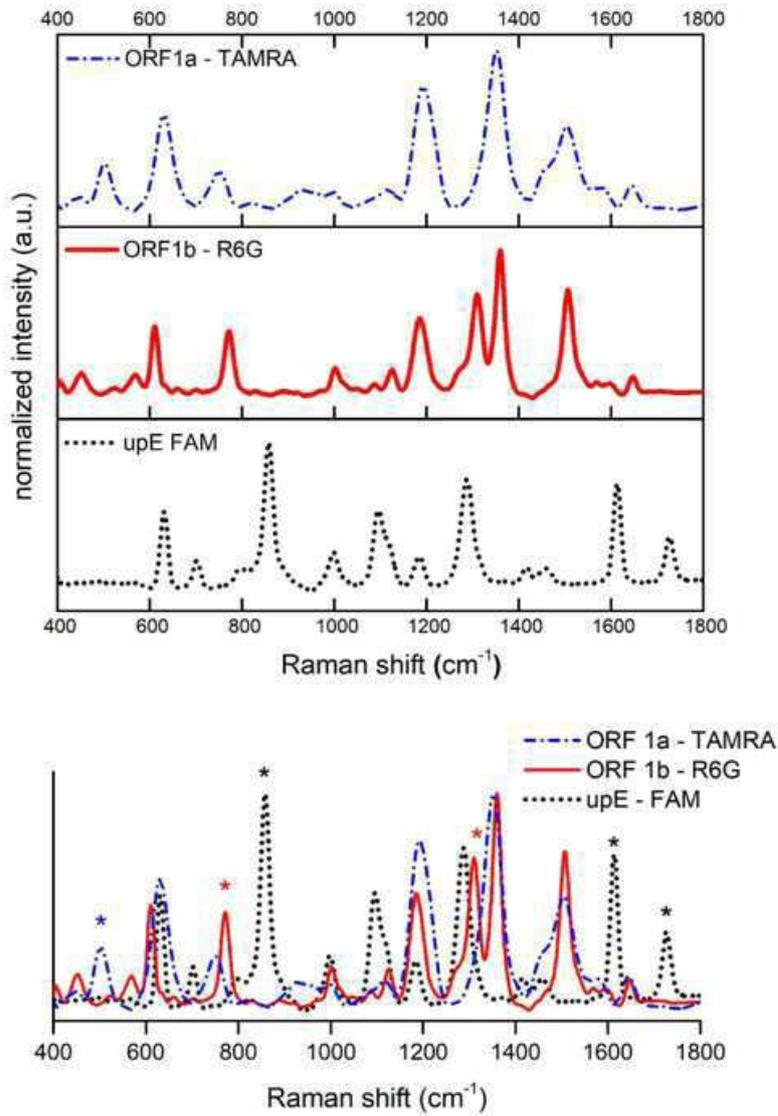
도면4



도면5



도면6



서열목록

- <110> Samsung Life Public Welfare Foundation
- <120> Method for detecting a diagnostic marker for infectious disease based on surface-enhanced Raman scattering
- <130> PN121443
- <160> 12
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 480
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA of ORF1a

<400> 1

```
tatgtgataa tcttacaagc cactaaattt actttgtgga actacttggt tgagactatt      60
ccccacagt tgttccact cttatttgg actatggcct tcgttatggt gttggttaaa      120

cacaaacaca cctttttgac acttttcttg ttgcctgtgg ctatttggtt gacttatgca      180
aacaatagct acgagccacc tactccatt tcgtcagcgc tgattgcagt tgcaaattgg      240
cttgccccc ctaatgetta tatgcgcact acacatactg atattgggtg ctacattagt      300
atgtcacttg tattagtcac tgtagtgaag agattgtaca acccatcact ttctaacttt      360
gcgttagcat tgtgcagtgg tgtaatgtgg ttgtacactt atagcattgg agaagcctca      420
agccccattg cctatctggt ttttgtcact acactcacta gtgattatac gattacagtc      480
480
```

<210> 2

<211> 480

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA of ORF1b

<400> 2

```
tgcttatgca ccaacatag ttagtgttga tgacaagtat aagacgagtg atgagctttg      60
cgtgaatcct aatttaccg caaatgtccc atactctcgt gttatttcca ggatgggctt      120
taaaactgat gcaacagttc ctggatatcc taagcttttc attactcgtg aagaggctgt      180
aaggcaagtt cgaagctgga taggcttcca tgttgagggt gctcatgctt cccgtaatgc      240
atgtggcacc aatgtgcctc tacaattagg attttcaact ggtgtgaact ttgttgttca      300
gccagttggt gttgtagaca ctgagtgggg taacatgta acgggcattg ctgcacgtcc      360

tccaccaggt gaacagttta agcacctcgt gcctcttatg cataaggggg ctgcgtggcc      420
tattgttaga cgacgtatag tgcaaatggt gtcagacact ttagacaaat tgtctgatta      480
480
```

<210> 3

<211> 480

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cDNA of upE

<400> 3
atggtatggt ccctgtaata cacaccaaac cattatttat tagaaacttc gatcagcgtt 60
gcagctgttc tcgttgTTTT tatttgcaact cttccactta tatagagtgc acttatatta 120
gccgttttag taagattagc ctagtttctg taactgactt ctccttaaac ggcaatgttt 180

ccactgtttt cgtgctgca acgcgcgatt cagttcctct tcacataatc gccccgagct 240
cgcttatcgt ttaagcagct ctgcgctact atgggtcccg tgtagaggct aatccattag 300
tctctctttg gacatatgga aaacgaacta tgttaccctt tgtccaagaa cgaatagggt 360
tgttcatagt aaactttttc atttttaccg tagtatgtgc tataacactc ttggtgtgta 420
tggttttctt tacggctact agattatgtg tgcaatgtat gacagccttc aataccctgt 480
480

<210> 4
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220><223> Forward primer of ORF1a
<400> 4
ccactactcc catttegtca g 21

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Reverse primer of ORF1a
<400> 5
caatatcagt atgtgtagtg cgc 23

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Forward primer of ORF1b
<400> 6
ttcgatgttg aggggtgetca t 21

<210> 7

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer of ORF1b
 <400> 7
 tcacaccagt tgaaaatcct aattg 25
 <210> 8
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer of upE
 <400> 8
 gcaacgcgcg attcagtt 18
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer of upE
 <400> 9
 gcctctacac gggaccata 20
 <210> 10
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Probe of ORF1a
 <400> 10
 caaattggct tgccccact aatgcttat 29
 <210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Probe of ORF1b
 <400> 11
 cccgtaatgc atgtggcacc aatgt 25

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Probe of upE

<400> 12

ctttcacat aatgccccg agctcg

26