

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

WO 2018/236128 A2

2018 년 12 월 27 일 (27.12.2018) WIPO | PCT

(51) 국제특허분류:
미분류

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/006914

(22) 국제출원일: 2018 년 6 월 19 일 (19.06.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0077476 2017 년 6 월 19 일 (19.06.2017) KR

(71) 출원인: 전남대학교 산학협력단 (INDUSTRY FOUNDATION OF CHONNAM NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 61186 광주광역시 북구 용봉로 77, Gwangju (KR).

(72) 발명자: 김두운 (KIM, Du Woon); 61031 광주광역시 북구 우치로537번길 10, 105동103호, Gwangju (KR). 김송학 (KIM, Song Hak); 61186 광주광역시 북구 용봉로 77 전남대학교 농업생명과학대학 3호관, Gwangju (KR).

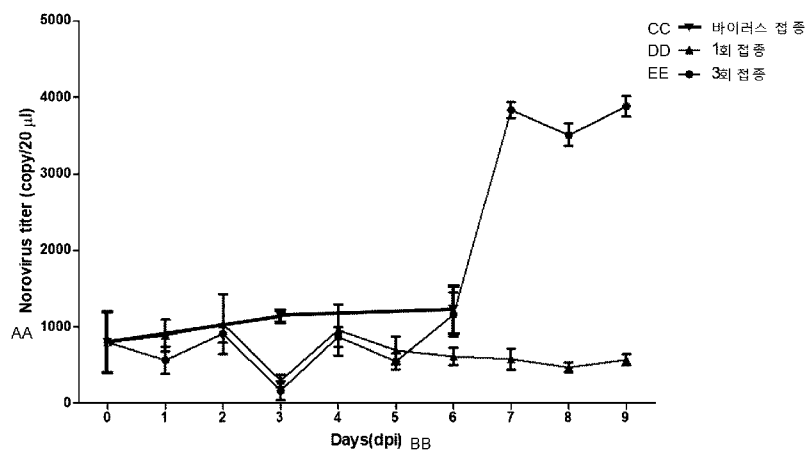
(74) 대리인: 윤대웅 (YOON, Dae Woong); 08793 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: INFECTIOUS NOROVIRUS SCREENING METHOD

(54) 발명의 명칭: 감염형 노로바이러스의 선별 방법



AA ... Norovirus titer (copy/20 µl)
BB ... Days (dpi)
CC ... Virus vaccination
DD ... Vaccinated once
EE ... Vaccinated three times

(57) Abstract: The present invention provides an infectious norovirus screening method. The present invention allows the relationship between norovirus infection and the occurrence of disease to be researched in the laboratory.

(57) 요약서: 본 발명은 감염형 노로바이러스의 선별 방법을 제공한다. 본 발명은 실험실 내에서의 노로바이러스 감염 및 질병 발생 간의 관련성에 대한 연구를 가능하게 한다.

[다음 쪽 계속]

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 감염형 노로바이러스의 선별 방법

기술분야

- [1] 본 특허출원은 2017년 06월 19일에 대한민국 특허청에 제출된 대한민국 특허출원 제 10-2017-0077476 호에 대하여 우선권을 주장하며, 상기 특허출원의 개시 사항은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.
- [2] 본 발명은 감염형 노로바이러스의 선별 방법에 관한 것이다.
- [3]

배경기술

- [4] 현재, 노로바이러스를 배양하기 위해 장내 박테리아를 이용한 B세포 및 줄기세포를 이용할 수 있지만, 여러 한계점이 존재하며, 여전히 노로바이러스의 배양 및 관련 연구에 어려움이 있다. 또한, 노로바이러스 감염동물 모델로는, 침팬지, 무궁돼지, 줄기세포를 이용하여 장이 인간화(Humanization)된 마우스 등이 있으나, 동물윤리, 비용적 문제, 공간적 문제, 실험의 복잡화 등의 단점이 존재한다. 반면, 제브라피시(*Danio rerio*)는 헤르페스 심플렉스 바이러스, 간염 C형 바이러스, 치큰건야 바이러스 등 인간 감염형 바이러스에도 높은 감수성을 가지며, 동물윤리면에서 비교적 까다롭지 않게 실험할 수 있고, 전체게놈분석이 완료된 최적의 동물모델이다.
- [5] 전사체 분석(Transcriptomic analysis) 및 단백질체 분석(Proteomic analysis) 기술은 빅데이터 분석을 통하여 목적 지향적 바이오마커를 확인하는데 유용한 기법이다. 제브라피시를 이용하여 노로바이러스를 감염하여 전사체 및 단백질체 변화를 분석하는 시도는 현재까지 보고된 바 없다.
- [6] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.
- [7]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명자들은 노로바이러스의 감염형 및 비감염형을 선별할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 제브라피시를 이용하여 노로바이러스를 배양하고 상기 노로바이러스의 전사체 및 단백질체 분석을 통해 노로바이러스의 감염력 여부에 따라 발현의 차이를 나타내는 유전자를 선별함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [9] 따라서, 본 발명의 목적은 감염형 노로바이러스의 선별 방법을 제공하는 데 있다.

[10] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

[11]

과제 해결 수단

[12] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 감염형 노로바이러스의 선별 방법을 제공한다:

[13] (a) 제브라피시(*Danio rerio*)에 노로바이러스를 투여하는 단계;

[14] (b) 상기 제브라피시로부터 분리된 시료의 *tfr1*(transferrin receptor 1b), *cftr*(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), *tfa*(transferrin-a), *ptpn20*(protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 20), *si:dkey176g4.4*, *si:ch211-89b14.1*, *hsp90aa1*(Heat shock protein HSP 90- α), *hspa8*(heat shock protein 8), *ifng1-2*(interferon gamma 1-2), *il1b*(interleukin 1 beta), *slc26a3*(solute carrier family 26 (anion exchanger) member 3), *slc16a6*(solute carrier family 16, member 6a), *crygs3*(crystalline gamma S3), *gstm*(glutathione S-transferase mu), *actn4*(actinin alpha 4) 및 *aldh1l1*(aldehyde dehydrogenase 1 family member L1)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 검출하는 단계; 및

[15] (c) 상기 발현 수준을 비감염형 노로바이러스와 비교하여 감염형 노로바이러스를 선별하는 단계.

[16] 본 발명의 방법을 단계별로 설명한다:

[17] 단계 (a): 노로바이러스의 투여

[18] 먼저, 제브라피시(*Danio rerio*)에 노로바이러스를 투여한다.

[19] 상기 노로바이러스는 칼리시비리대(Caliciviridae) 과(family)-노로바이러스(Norovirus) 속(genus)의 노로바이러스(Norwalk virus) 종(species)을 의미한다.

[20] 상기 노로바이러스는 유전형에 따라 감염형 노로바이러스 또는 비감염형 노로바이러스로 구분할 수 있다.

[21] 본 발명에서 선별하고자 하는 감염형 노로바이러스는 유전자형이 GI, GII, GIII, GIV 또는 GV인 노로바이러스이다.

[22] 구체적으로는, 상기 감염형 노로바이러스는 유전자형이 GI 또는 GII이다.

[23] 본 발명의 노로바이러스 검출 방법의 주요한 특징 중 하나는 제브라피시를 이용하는 것이다. 본 발명자는 이전 연구(특허출원 제2015-0065567호)에서 제브라피시에서 노로바이러스의 배양이 가능함을 확인하였다.

[24] 본 명세서에서 용어 “투여”는 노로바이러스의 투여량을 제브라피시에 주입하는 방법을 의미하며, 상기 방법은 예를 들어 비강, 국소적, 전신적, 흡입, 구강, 정맥내, 피하내, 혈관내, 동맥내, 종양내, 복강내, 뇌실내, 육아종내, 비강, 직장, 인두, 눈, 안구내 또는 근육내 주입이다.

[25] 구체적으로는, 상기 투여는 제브라피시의 복강내 투여이다.

- [26] 상기 투여는 1 내지 10회 반복투여 할 수 있다. 일반적으로 1회 투여보다는 2회 이상 반복투여하는 것이 바이러스 감염률을 높일 수 있다. 구체적으로는, 상기 투여는 1 내지 9회, 1 내지 8회, 1 내지 7회, 1 내지 6회, 1 내지 5회, 1 내지 4회, 2 내지 10회, 2 내지 9회, 2 내지 8회, 2 내지 7회, 2 내지 6회, 2 내지 5회 또는 2 내지 4회 반복투여 할 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 투여는 3회 반복투여이다.
- [27] 상기 반복투여는 1 내지 10일 간격으로 투여할 수 있다. 구체적으로는, 1 내지 9일, 1 내지 8일, 1 내지 7일, 1 내지 6일, 1 내지 5일, 1 내지 4일, 2 내지 10일, 2 내지 9일, 2 내지 8일, 2 내지 7일, 2 내지 6일, 2 내지 5일 또는 2 내지 4일 간격으로 반복투여 할 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 투여는 3일 간격의 반복투여이다.
- [28] 단계 (b): 발현 수준의 검출
- [29] 다음, 상기 제브라피시로부터 분리된 생물학적 시료의 tfr1, cftr, tfa, ptpn20, si:dkey176g4.4, si:ch211-89b14.1, hsp90aa1, hspa8, ifng1-2, il1b, slc26a3, slc16a6, crygs3, gstm, actn4 및 aldh111로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 검출한다.
- [30] 상기 나열된 본 발명에 따른 유전자 또는 단백질은 본 발명자에 의해 노로바이러스의 감염력 유무에 따라 발현수준의 차이가 있는 것으로 밝혀진 유전자 또는 단백질이다.
- [31] 본 명세서에 기재된 용어 "생물학적 시료"는 핵산을 포함한 생물의 모든 물질을 말하는 것이며, 본 발명에 핵산증폭 반응에 사용할 수 있는 생물학적 시료는 조직, 세포, 혈액, 림프, 골수 액, 분변, 안구 액, 정액, 뇌추출 액, 척수액, 관절 액, 복수, 양막 액 또는 세포조직액이 포함하나 이에 한정되지 않는다. 생물학적 시료로서 혈액은 전혈, 혈장, 또는 혈청을 포함한다.
- [32] 구체적으로는, 상기 생물학적 시료는 조직 또는 세포이다.
- [33] 상기 단계 (b)는 상기 노로바이러스의 감염에 의해 발현 수준이 상향 또는 하향되는 조절되는 제브라피시의 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 분석한다.
- [34] 구체적으로는, 상기 단계 (b)는 단계 (a)의 노로바이러스의 투여 후 6 내지 240시간 이후에 실시한다. 보다 구체적으로는, 상기 단계 (b)는 단계 (a)의 노로바이러스의 최종투여 후 6 내지 180시간, 6 내지 120시간, 6 내지 72시간, 6 내지 48시간, 6 내지 36시간, 12 내지 240시간, 12 내지 180시간, 12 내지 120시간, 12 내지 72시간, 12 내지 48시간 또는 12 내지 36시간 이후에 실시한다.
- [35] 본 발명에서 상기 유전자 또는 단백질의 발현 수준의 검출은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 실시할 수 있다.
- [36] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)의 유전자 발현 수준은 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(reversetranscription PCR), 실시간 PCR 또는 실시간 RT-PCR 등의 유전자 증폭반응에 의해 실시될 수 있다. 이 경우, 상기 tfr1, cftr, tfa, ptpn20, si:dkey176g4.4, si:ch211-89b14.1, hsp90aa1, hspa8, ifng1-2, il1b, slc26a3, slc16a6,

- crygs3, gstm, actn4 및 aldh1l1로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자에 상보적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 이용하여 실시된다.
- [37] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프라이머(primer)"는 핵산 증폭 반응시에 증폭되는 타겟 핵산 부위의 5'-말단 서열 또는 3'-말단 서열에 각각 상보적이며 적합한 온도에서 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소)하에서 주형-지시 핵산의 중합효소반응의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥의 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [38] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프로브(probe)"는 단일쇄 핵산 분자이며, 타겟이 되는 염기서열에 상보적인 서열을 포함한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 프로브의 이점, 즉 혼성화 특이성이 손상되지 않는 범위내에서 본 발명의 프로브를 변형할 수 있다. 예를 들어, 리포터(reporter) 형광물질 또는 형광억제물질(quencher)이 프로브 올리고뉴클레오타이드의 말단에 태깅(tagging) 될 수 있다.
- [39] 본 발명의 상기 단계 (b)의 유전자 발현 수준을 실시간 중합효소연쇄반응으로 측정하는 경우, 상기 프로브는 프라이머쌍에 의해 증폭되는 염기서열 내부의 일부 서열에 상보적으로 결합할 수 있는 프로브를 사용한다.
- [40] 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 본 발명의 실시간 중합효소연쇄반응(PCR)에 사용되는 프로브의 5'-말단 및 3'-말단에는 리포터-형광물질 또는 형광억제물질(quencher)이 태깅되어 있을 수 있다.
- [41] 본 발명의 방법에서 다양한 DNA 중합효소가 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있으며, 바람직하게는, DNA 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이다. 이는 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, 및 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)를 포함한다.
- [42] 한편, 유전자 증폭 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg²⁺와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 소망하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 요구된다. 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서 본 발명의 증폭과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.
- [43] 본 발명의 다른 바람직한 구현예에 의하면, 상기 키트는 완충액, DNA 중합효소, DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 더욱 포함한다.
- [44] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 단계 (b)의 유전자 또는 단백질 발현 수준은 항원-항체 반응 방식에 의해 실시될 수 있다. 이 경우, 상기 tfr1, cfr, tfa, ptpn20, si:dkey176g4.4, si:ch211-89b14.1, hsp90aa1, hspa8, ifng1-2, il1b, slc26a3,

- slc16a6, crygs3, gstm, actn4 및 aldh1l1로 구성된 군으로부터 선택되는 유전자 또는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머를 이용하여 실시된다.
- [45] 본 발명에서 용어, “항체”란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커(tfr1, cftr, tfa, ptpn20, si:dkey176g4.4, si:ch211-89b14.1, hsp90aa1, hspa8, ifng1-2, il1b, slc26a3, slc16a6, crygs3, gstm, actn4 또는 aldh1l1) 또는 상기 마커의 구성 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항원-항체 반응 방식은 면역분석 방식과 동일한 의미를 갖는다.
- [46] 상기 다클론 항체는 상기한 마커 단백질 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조 가능하다.
- [47] 상기 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method) 또는 파지 항체 라이브러리 기술을 이용하여 제조될 수 있다.
- [48] 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 scFv 등이 있다.
- [49] 본 발명의 방법을 항체 또는 앵타머를 이용하여 실시하는 경우, 본 발명은 통상적인 면역분석 방법에 따라 실시하여 노로바이러스를 검출하는데 이용될 수 있다.
- [50] 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 정량적 또는 정성적 면역분석 방법에 따라 실시하여 노로바이러스를 검출하는데 이용될 수 있다. 상기 면역분석 포맷은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 캡처-엘라이자, 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 상기 예에 의해 본 발명의 분석방법이 제한되는 것은 아니다.
- [51] 단계 (c): 감염형 노로바이러스의 선별
- [52] 다음, 상기 발현 수준을 비감염형 노로바이러스와 비교하여 감염형 노로바이러스를 선별한다.
- [53] 구체적으로는, 상기 단계 (b)의 tfr1, cftr, tfa, ptpn20, si:dkey176g4.4, si:ch211-89b14.1, hsp90aa1, hspa8, ifng1-2, il1b, slc26a3, slc16a6, crygs3 및 gstm로

구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 단백질이 상향조절되는 경우 감염형 노로바이러스로 선별한다.

[54] 구체적으로는, 상기 단계 (b)의 *actn4* 및 *aldh1l1*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 단백질이 하향조절되는 경우 감염형 노로바이러스로 선별한다.

[55] 본 명세서에서 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 언급하면서 사용되는 용어 “상향-조절”은 조사 대상의 시료(예컨대, 균질화된 제브라피시 조직)에서의 상기 유전자 또는 단백질의 발현 정도가 노로바이러스를 감염시키지 않거나, 감염력이 없는 노로바이러스를 접종한 조직의 유전자 또는 단백질 발현 정도와 비교하여 높은 경우를 의미한다.

[56] 본 발명의 노로바이러스 감염을 판정하는 데 있어서, 상기 상향-조절은 1.1배 이상, 1.3배 이상 또는 1.5배 이상 발현 양이 증가된 것을 의미한다.

[57] 본 명세서에서 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 언급하면서 사용되는 용어 “하향-조절”은 조사 대상의 시료(예컨대, 균질화된 제브라피시 조직)에서의 상기 유전자 또는 단백질의 발현 정도가 노로바이러스를 감염시키지 않거나, 감염력이 없는 노로바이러스를 접종한 조직의 유전자 또는 단백질 발현 정도와 비교하여 낮은 경우를 의미한다.

[58] 본 발명의 노로바이러스 감염을 판정하는 데 있어서, 상기 하향-조절은 0.9배 이하, 0.8배 이하 또는 0.5배 이하 발현 양이 감소된 것을 의미한다.

[59]

발명의 효과

[60] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[61] (a) 본 발명은 감염형 노로바이러스의 선별 방법을 제공한다.

[62] (b) 본 발명의 실험실 내에서의 노로바이러스 감염 및 질병 발생 간의 관련성에 대한 연구를 가능하게 한다.

[63]

도면의 간단한 설명

[64] 도 1은 제브라피시에 노로바이러스를 1회 또는 3회 감염시키고, 노로바이러스 농도를 확인한 결과이다.

[65] 도 2a 내지 2d는 전사체 및 단백질체 분석을 통해 분석된 유전자 및 단백질을 토대로 IPA(Ingenuity Pathway Analysis) 분석을 이용하여 유전자 및 단백질 변화를 도식하여 나타낸다. 도 2a는 면역에 관련이 있는 인자의 분석결과를 나타내고, 도 2b는 바이러스와 관련이 있는 인자의 분석 결과를 나타내며, 도 2c는 장관계 질환에 관련 있는 인자의 분석 결과를 나타낸다. 도 2d는 도 2a 내지 2c의 범례를 나타낸다.

[66] 도 3은 감염형 및 비감염형 노로바이러스를 투여한 제브라피시에서 *tfr1*, *citr*, *tfa*, *ptpn20*, *si:dkey176g4.4*, *si:ch211-89b14.1*, *hsp90aa1*, *hspa8*, *ifng1-2*, *il1b*, *slc26a3*,

slc16a6, crygs3, gstm, actn4 및 aldh1l1 발현을 실시간 PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

[67] 도 4는 다양한 유전자형의 노로바이러스를 투여한 제브라피시에서 tfr1, cftr, tfa, ptpn20, si:dkey176g4.4, si:ch211-89b14.1, hsp90aa1, hspa8, ifng1-2, il1b, slc26a3, slc16a6, crygs3, gstm, actn4 및 aldh1l1 발현을 실시간 PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

[68] 도 5는 인체감염형 노로바이러스, 마우스 노로바이러스(MNoV), 간염 A형 바이러스(HAV) 또는 바이러스성 출혈성 패혈증 바이러스(VHSV)를 tfr1, cftr, tfa, ptpn20, si:dkey176g4.4, si:ch211-89b14.1, hsp90aa1, hspa8, ifng1-2, il1b, slc26a3, slc16a6, crygs3, gstm, actn4 및 aldh1l1 발현을 실시간 PCR을 통해 확인한 결과를 나타낸다.

[69]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[70] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[71] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[72] 실시예 1: 제브라피시에서의 노로바이러스 배양

[73] 지역 수족관에서 구입한 제브라피시를 역삼투(Reverse Osmosis; RO) 시스템을 활용한 1L 수조에 각 5마리씩 적응 기간을 두었다. 15°C 수온에서 사육하였으며, 14시간의 빛, 10시간의 어둠 광주기로 사육하였다. 실험 진행 중에는 실험간 오차를 줄이기 위하여 먹이를 급이하지 않았고 총 10일 동안 제브라피시를 사육하였다. 물고기 마취에 사용되는 트리카인(Tricaine, Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt, sigma 구매) 400 mg과 1 M Tris 2.1 ml를 함께 증류수 97.9 ml에 용해시키고, pH 7로 적정한 마취용액을 제조하였다. 이 마취용액 4.2 ml을 100 ml의 역삼투 시스템의 물에 용해시켜 제브라피시를 마취하였다. 마취된 제브라피시를 미리 준비해둔 멸균 PBS(phosphate buffered saline) 또는 멸균 PBS에 희석한 노로바이러스(Genotype GII-4) 20 µl로 복강주사하였다. 노로바이러스는 멸균 PBS를 이용하여 농도 1×10^4 copy/ml의 농도가 되게 희석하여 사용하였다. 최초 노로바이러스 접종일로부터 3일에 2차 접종, 6일에 3차 접종을 실시하였다. 각 그룹당 5 마리씩 샘플링한 제브라피시를 액체질소에서 급속 냉각하여 준비된 1.5 ml 튜브에 멸균수 100 µl씩 각각 넣었다. 멸균된 해부용 가위를 이용하여 제브라피시를 작은 조직으로 절단하였고, 균질기를 이용하여 제브라피시를 균질화 하였다. 이 모든 작업은 얼음에서

시행하였다. 균질화된 제브라피시를 12,000rpm, 15분, 4°C에서 원심분리하여 상등액을 취하여 노로바이러스 RNA를 획득하였다. RNA 분리는 TRIzol(Invitrogen)을 이용하였고, 일반적인 RNA preparation protocol에 따라 실시하였다. 사육된 제브라피시를 액체질소로 급속냉각 하여, 막자사발로 분쇄한 후, 새로운 1.5 ml tube에 옮겨 담았다. Trizol 700 µl을 첨가하고 볼텍스(vortex) 한 후, 클로로포름 200 µl을 각 분주한 후 볼텍스하고 5분 동안 정치하였다. 12,000 x g, 15분, 4°C에서 원심분리하여, 상등액을 새로운 1.5 ml tube에 옮겨 담고, 동량의 이소프로판올 을 각 분주하여 볼텍스 한 후 10분 동안 정치하였다. 12,000 x g에서 10분, 4°C에서 원심분리하여 상등액을 제거하고, 75% 에탄올을 500 µl씩 분주하여 가볍게 볼텍스하였다. 7,500 x g, 5분, 4°C에서 원심분리 한 후, 상등액을 제거하고 50 µl의 RNase free water를 이용하여 RNA를 획득하였다. 획득한 RNA 10 µl는 랜덤 프라이머 1 µl와 함께 5X M_MLV RTase 반응 완충액 4 µl, 5X DTT 2 µl, dNTP 2 µl, RNase 억제제 0.5 µl, M_MLV RTase 1 µl를 함께 분주하여 65°C에서 10분, 37°C에서 1시간 72°C 5분 동안 반응시켜 준비하였다. PCR 프로브 프리믹스(TaKaRa) 10 µl, free water 7 µl, 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 프로브 각 0.5 µl를 각각 첨가하고 합성된 2 µl의 cDNA를 함께 반응하여 qRT-PCR을 실시하였다. PCR 조건은 95°C 30초, 45 cycle 95°C 5초, 55°C 10초, 72°C 20초이다. 노로바이러스 프라이머는 노로바이러스의 ORF2의 캡시드 (capsid) 단백질 VP1 유전자를 타겟으로 하였고, Forward: CAAGAGTCAATGTTTAGGTGGATGAG(서열목록 제1서열), Reverse: TCGACGCCATCTTCATTCAC(서열목록 제2서열) 및 프로브: FAM-TGGGAGGGCGATCGCAATCT-BHQ(서열목록 제3서열)의 서열을 이용하였다.

- [74] 도 1에서 제시한 바와 같이, 노로바이러스를 접종한 제브라피시에서 노로바이러스의 농도를 qRT-PCR을 이용하여 정량하였다. 노로바이러스를 1회, 2회, 3회 접종한 후 바이러스 농도를 측정된 녹색 선으로 표시하였다. 1회 노로바이러스 접종 시 795.1 copy/20 µl, 2회 노로바이러스 접종 시 1139.1 copy/20 µl, 3회 바이러스 접종 시 1226.1 copy/20 µl 의 농도가 확인되었다. 노로바이러스를 1회 접종한 제브라피시는 바이러스 농도가 감소하였으나, 노로바이러스를 3회 접종한 제브라피시는 바이러스 농도가 유의적으로 증가하였다. 이와 같은 결과는 제브라피시에서 노로바이러스가 증식됨을 나타내는 것이다.

[75]

[76] 실시예 2: 노로바이러스 감염성 및 비감염성 판정 바이오마커 후보 선별

- [77] 노로바이러스 감염성 및 비감염성 판정 바이오마커를 찾기 위해, 노로바이러스를 1회 제브라피시에 접종하고, 1일 후 제브라피시 전체 몸(whole body)에서 RNA를 수득하였다. RNA 수득은 실시예 1의 방법과 동일한 방법으로 수행하였고, 수득한 RNA를 이용하여 전사체 분석(Transcriptomic analysis)를

실시하였다. 또한, 노로바이러스를 제브라피시에 접종하고, 3일 후 제브라피시 전체 몸에서 단백질을 획득하였다. 용해 완충액 (Tris 10 mM, EDTA 2 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 10%, NP40 10%)를 제조하여 프로테이나아제 억제제 (Proteinase Inhibitor, 1:200 농도로 희석하여 사용), 포스파타아제 억제제 (Phosphatase Inhibitor, 1:100 농도로 희석하여 사용) 농도로 첨가한 후 1.5 ml 튜브에 각 분주하고, 제브라피시를 액체질소에서 급속 냉각하여 준비된 튜브에 넣었다 멸균된 해부용 가위를 이용하여 제브라피시를 작은 조각으로 절단하였고, 균질기를 이용하여 제브라피시를 균질화하였다. 이 모든 작업은 얼음에서 시행하였다. 균질화된 제브라피시 조직은 5분에 한번씩 볼텍싱하였고, 얼음에서 20분 동안 반응하였다. 이 후, 15,000 rpm, 13분, 4°C에서 원심분리를 실시하여 상등액을 수득하였다. 수득한 단백질을 이용하여 단백질체 분석(Proteomic analysis)을 실시하였다.

- [78] 단백질체 분석을 위하여, 제브라피시에서 수득된 단백질 30 µg을 25 mM ABC in 50% ACN 용액으로 세척하고 50 mM ABC 조건에서 trypsin gold (Promega, V5280)으로 펩타이드로 분해 후 Oasis SPE (Waters, 186001828BA)를 이용하여 탈염 하고 nanoUPLC-Synapt G2 si (Waters, USA) 장비를 이용하여 단백질 동정을 실시하였다. 단백질 혼합물 분석을 위하여 nano 초고성능 액체 크로마토그래피(Ultra Performance Liquid Chromatography, UPLC, ACQUITY UPLC I-Class/SYNAPT G2-Si HDMS, Waters)를 이용하여 아미노산 서열 분석을 수행하였으며, 분석조건을 아래 제시한 바와 같다.

- [79] nanoACQUITY BEH300 C18 (1.7 µm X 250 mm) 컬럼을 사용하였으며, 컬럼온도 40°C, 이동상 용매 A (0.1% formic acid in water), 용매 B (0.1% formic acid in Acetonitrile)을 사용하였다. 질량분석기는 ESI positive 모드에서 분석을 실시하였고, 분석 조건은 모세관 전압 3.0 kV, 콘 전압 30 V, 소스 온도 120°C, 스캔 시간은 0.5 초로 설정하였다. nanoUPLC 용매 구배는 다음 표 1과 같다.

- [80] [표1]

-	시간(분)	A(% v/v)	B(% v/v)
1	Initial	97.0	3.0
2	3	90.0	10.0
3	150	65.0	35.0
4	160	20.0	80.0
5	165	20.0	3.0
6	170	97.0	3.0
7	180	97.0	3.0

- [81] 전사체 분석을 위하여, 제브라피시에서 전체 RNA의 정제를 위해 RNeasy RNA

Purification Kit with DNase treatment (Qiagen) 제품을 이용하였고, 제시된 프로토콜을 이용하여 RNA를 수득하였다. mRNA 서열 libraries는 mRNA Seq Sample Prep Kit의 제시된 프로토콜대로 수행하였다(Illumina). Oligo-dT beads를 이용하여, 수득한 RNA에서 Poly(A)-mRNA 5 g을 획득하였다. mRNA 조각들은 Random primer 및 reverse transcriptase를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA는 QiaQuick PCR extraction kit (Qiagen)을 이용하여 정제하였다. cDNA의 말단 Blunt는 exonuclease를 이용하여 반응하였다. 얻어진 조각은 아가로스겔 전기영동과 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)을 이용하여 정제하였고, PCR을 이용하여 증폭하였다. Library 정성 및 정량은 Qubit (bioRad)와 BioAnalyzer 2100을 이용하여 테스트 하였고, qRT-PCR을 이용하여 정밀하게 정량하였다. Library 염기서열은 Illumina HiSeq2000를 이용하여 수행하였다.

- [82] 분석된 전사체 및 단백질을 토대로 IPA(Ingenuity Pathway Analysis) 분석을 하여 도식화한 도 2에서 제시한 바와 같이, 노로바이러스에 노출되었을 때 다양한 인자들을 확인했으며, 특히, 면역에 관련이 있는 인자 중 IFN γ 1-2, IL-1B (도 2a), 바이러스와 관련이 있는 인자 중 HSPA8, TFA(도 2b), 장관계 질환에 관련 있는 인자 중 CFTR, SLC26A3 (도 2c)을 특정하였다. 또한, 노로바이러스를 주입한 제브라피시의 전사체 분석 및 단백질을 분석에서 유의적인 차이를 보인 유전자 리스트 중, SLC26A6, HSP90AA1, si:ch211-89b14.1, si:dkey176g4.4, aldh1l1, TfR1, GSTM, PTPN20, ACTN4, CRYGS3를 바이오마커 후보로 특정하였다. 전사체분석 및 단백질을 분석 중 통계적으로 유의적인 차이(0.05<p)를 보이는 유전자를 분석하고, 이에 대한 GO분석을 통하여 장관계 노로바이러스에 연관된 (예를 들어, 바이러스 증폭 및 설사를 일으키는 유전자 등) 유전자를 선별하였다. 또한, 노로바이러스가 주입된 그룹과 그렇지 않은 그룹 간의 발현되는 유전자 값이 큰 경우, 그 유전자를 포함하였다.

[83]

[84] 실시예 3: 감염성 노로바이러스의 바이오마커 후보 확인

- [85] 도 2에 따라 특정한 바이오마커 후보를 특정하였다. 노로바이러스의 감염성 및 비감염성 바이오마커를 확인하고자, 노로바이러스 (1x10⁴ copy/ml)를 50°C, 70°C 및 90°C에서 10분 동안 가열하여 준비 (각각 NoV-50, NoV-70 및 NoV-90이라고 함)하였고, 또한, 노로바이러스 항체(ab92976)와 미리 반응하여 중화시킨 노로바이러스를 준비하여 각각 제브라피시에 1x10⁴ copy/ml 의 농도의 20 μ l를 접종하였다. 노로바이러스는 85°C 이상에서 1분 이상 가열하여야 감염성을 잃으므로, NoV-50 및 NoV-70은 감염형 노로바이러스이고, NoV-90은 비감염형 노로바이러스이다. 실시예 2의 방법으로 제브라피시 RNA를 cDNA로 합성한 후, 바이오마커 후보의 발현 정도는 하기 표 2의 프라이머 및 SYBR 그린 PCR 마스터믹스 키트(TaKaRa)를 사용하여 실시간 PCR을 통해 측정하였다.

[86] [표2]

유전자 이름	프라이머 서열	서열목록
si:ch211-89b.14.1	F: 5'-CTAAACGGCTGCGCTTGTAT-3'R: 5'-TCCTTCCTAATGCCAACGGT-3'	제4서열제5서열
si:dkey-176g4.4	F: 5'-CCCACAGCTAAAGAACGCAG-3'R: 5'-CCAGTCCCAATTCTTGTGCC-3'	제6서열제7서열
GSTM	F: 5'-CTGCTGTTGGAATACACCGG-3'R: 5'-TATGGCATTGCTCTGGACGA-3'	제8서열제9서열
crygs3	F: 5'-GGACAGAACTTTCAGGGACG-3'R: 5'-CCCCATTCTCGACTCGGATG-3'	제10서열제11서열
ptpn20	F: 5'-TGGAGAGCTGGTTTTGGGAA-3'R: 5'-AGCACAGGTTTCAGGAGGTAC-3'	제12서열제13서열
Actn4	F: 5'-AAGACTTTCACGGCCTGGT-3'R: 5'-GAAGTCCAGCGCTTTGTTGA-3'	제14서열제15서열
tfa	F: 5'-GTACCATTGGCCATGCAGAG-3'R: 5'-CAGCGTAGTAACTTGCGGTC-3'	제16서열제17서열
CFTR	F: 5'-TGGACAAGATCAGCACAGGT-3'R: 5'-GCCTGCAAAACACCCAGTAA-3'	제18서열제19서열
SLC26A3	F: 5'-GTTGTTCTGTCCTGGCCAAT-3'R: 5'-GATGTTAGCAAAGAAGATGGGTGA -3'	제20서열제21서열
SLC26A6	F: 5'-ATACCTGAGACAGCACGGACAT-3' R: 5'-TGGAGTCAATGGTGGTAACATC-3'	제22서열제23서열
IFNg1-2	F:5'-AGCGAAAGGCTTTGTTTGAG-3'R: 5'-GCCGTCTCTTGCGTTCTTTA-3'	제24서열제25서열
IL-1b	F:5'-ATCCAAACGGATACGACCAG-3'R: 5'-TCGGTGTCTTTCCTGTCCAT-3'	제26서열제27서열
aldh111	F: 5'-TCTCCGTGATGGTCAGATGCT-3'R:	제28서열제29서열

	5'-CTTCCCCGAGCTCCAGACT-3'	
TFR1	F: 5'-ATTCCCAGATTGGCCGTTCA-3'R: 5'-CTCCTCGTTCCCAAACCACA-3'	제30서열제31서열
HSPA8	F: 5'-AGAGATTGATTGGAGATGCC-3'R: 5'-TGTATTCAACCTGGACCTTG-3'	제32서열제33서열
HSP90aa1	F: 5'-GATGAAGAGGAGAAGAAGAAGC-3' R: 5'-TATGTGCTGGTGACGATACA-3'	제34서열제35서열

- [87] 도 3에서 제시한 바와 같이, 50°C에서 90°C로 가열된 노로바이러스를 접종한 그룹에서는 mRNA 발현양이 점진적으로 감소되었다(표 1). 90°C에서 가열처리한 노로바이러스와 노로바이러스 항체를 미리 반응하여 중화시킨 노로바이러스를 접종한 그룹에서는 유의한 차이를 보이지 않았고, Mock(멸균 PBS 접종 그룹)과 비슷한 수준을 나타냈다. 그러나, *ALDH1L1* 및 *ACTN4*를 제외한 모든 바이오마커 후보 mRNA 발현양이 감염형 노로바이러스(NoV, NoV-50 및 NoV-70)를 접종한 그룹에서 상향조절 되었다.

- [88] [표3]

mRNA	HuNoV	HuNoV_50	HuNoV_70	HuNoV_90	HuNoV_Ab
tfr1	4.426	4.069	2.428	-0.121	0.027
cftr	2.797	2.954	1.714	-0.157	-0.237
ptpn20	2.731	1.059	0.615	-0.875	-0.141
si:dkey176g4.4	2.142	1.643	1.536	0.159	-0.015
si:ch211-89b14.1	0.77	0.637	0.430	-0.605	0.066
hsp90aa1	5.104	4.464	2.823	0.134	0.115
hspa8	3.004	2.778	1.244	0.224	0.115
ifng1-2	10.579	10.448	7.110	0.136	0.322
il1b	10.346	11.011	7.521	0.050	-0.066
slc26a3	2.106	2.123	0.241	-0.211	-0.236
slc26a6	1.455	1.454	-0.001	-0.825	0.105
crygs3	2.140	1.664	0.796	-0.411	-0.116
gstn	1.663	1.238	0.538	0.120	0.239
actn4	-0.664	-0.364	-0.211	0.116	-0.127
aldh1l1	-3.370	-3.177	-0.689	-0.499	-0.083

- [89] 실시예 4: 노로바이러스 유전자형에 따른 바이오마커 후보 발현양 측정
- [90] 노로바이러스의 유전자형에 따라 바이오마커 후보 발현양을 측정하기 위하여 GI.4, GI.8, GII.2 및 GII.3 타입을 GII.4 타입과 비교하였다. mRNA 발현양 측정은 실시예 3과 동일한 방법으로 수행하였다.
- [91] 도 4에서 나타낸 바와 같이, *ALDH1L1*과 *ACTN4*를 제외한 모든 바이오마커 후보 mRNA 발현양은 가열처리되어 비감염형 상태가 된 노로바이러스를 접종한 그룹에 비하여 감염형 노로바이러스를 접종한 그룹에서 상향조절되었다(표 4). 특히, HSP90AA1 및 HSPA8의 발현양이 GII.4에서 가장 높게 측정되었다. 그러나, 다른 유전자형과 상당한 차이를 보이지는 않았다. 면역과 관련 있는 IFNg1-2와 IL-1B는 GII.3과 GII.4 type에서 가장 높게 관찰되었다. GII.4_90의 유전자 중 IL-1B 흰색 발현양은 PCR로 증폭이 되지 않음 (즉, 유전자 발현이 PCR을 이용하여 증폭하여도 현저히 적은 양)을 의미한다. 이러한 결과는 실시예 3에서 관찰한 바이오마커 후보들이, 노로바이러스의 다른 유전자형에서도 감염 및 비감염형을 확인할 수 있는 마커임을 의미한다.

[92] [표4]

-	GI.4	GI.4_ 90	GI.8	GI.8_ 90	GII.2	GII.2_ 90	GII.3	GII.3_ 90	GII.4	GII.4_ 90
tfr1	3.630	0.004	3.211	0.369	3.953	-0.425	3.718	-0.258	4.426	-0.121
cftr	3.195	0.065	2.674	0.079	1.621	0.372	2.899	0.079	2.797	-0.157
ptpn20	1.604	-0.294	2.192	-0.285	1.357	-0.288	1.544	0.040	2.731	-0.875
si:dkey17 6g4.4	2.067	-0.053	1.795	-0.016	1.671	0.055	1.784	0.183	2.142	0.159
si:ch211- 89b14.1	1.160	-1.07	0.968	0.209	0.972	0.052	0.956	0.246	0.774	-0.605
hsp90aa1	1.940	-0.349	1.041	-0.191	1.940	-0.162	1.850	-0.077	5.104	0.134
hsps8	1.940	-0.349	1.041	-0.191	1.940	-0.162	1.850	-0.077	3.004	0.224
ifng1-2	9.202	1.188	10.92 7	-0.481	8.884	2.969	11.55 2	-0.156	10.57 9	0.136
il1b	9.744	2.008	8.789	3.184	8.924	ND	8.220	0.286	10.34 6	0.050
slc26a3	2.265	0.190	1.645	0.548	1.352	-0.111	2.411	0.382	2.106	-0.211
slc26a6	1.102	-0.093	0.826	-0.283	0.957	-0.023	1.502	0.090	1.455	-0.825
crygs3	1.451	0.326	2.477	0.331	1.544	0.147	1.842	-0.163	2.140	-0.411
gstm	2.158	0.141	0.831	0.149	1.188	0.369	1.233	-0.293	1.663	0.120
actn4	-0.746	-0.023	-0.592	-0.043	-0.514	0.120	-0.417	-0.241	-0.664	0.116
aldh111	-3.192	-0.274	-3.313	0.092	-3.127	-0.215	-3.142	-0.083	-3.177	-0.499

[93] 실시예 5: 바이오마커의 특이성

[94] 발굴한 바이오마커가 노로바이러스 특이성을 가지고 있는지 확인하기 위하여 제브라피시에 민감성이 있는 바이러스성 출혈성 패혈 바이러스(viral haemorrhagic septicemia virus; VHSV), 식중독 바이러스인 A형 간염 바이러스(hepatitis A virus; HAV), 그리고 같은 칼리시바이러스과(*caliciviridae*)에 속하는 마우스 노로바이러스(murine norovirus; MNV)를 노로바이러스와 동일한 농도로 각각 20 μ l씩 제브라피시에 복강 주입하고, 발굴된 바이오마커를 확인하였다.

[95] 도 5에서 나타낸 바와 같이, 면역 관련 인자인 IFN γ 1-2와 IL-1 β 는 VHSV, 인체감염형 노로바이러스 및 마우스 노로바이러스에서 높게 측정되었으나, HAV에서는 측정되지 않았다(표 5). 또한, HSP90AA1과 HSPA8의 발현은 인체감염형 노로바이러스와 VHSV 감염시 높게 측정되었고, 마우스 노로바이러스 및 HAV에서는 낮게 측정되었다. 또한, HAV와 VHSV의 유전자 중 si:ch211-89b14.1의 흰색발현양은 PCR로 증폭이 되지 않음 (즉, 유전자 발현이 PCR을 이용하여 증폭하여도 현저히 적은 양)을 의미한다. 그러나, CFTR 및 TfR1의 발현은 유니크하게 노로바이러스 감염 그룹에서만 검출되었다. 이런 결과는, 모든 바이러스에 적합한 바이오마커가 아닌 노로바이러스 특이성을 가진 바이오마커임을 확인하였다.

[96] [표5]

-	HuNoV	MNoV	HAV	VHSV
tfr1	3.871	0.153	0.363	1.306
cftr	3.397	0.485	1.222	-1.700
ptpn20	2.368	1.834	2.605	2.637
si:dkey176g4.4	2.153	1.401	2.180	2.151
si:ch211-89b14.1	0.954	0.602	ND	ND
hsp90aa1	5.271	1.281	0.417	5.149
hspa8	3.350	2.082	1.395	2.557
ifng1-2	10.325	9.500	-0.661	10.809
il1b	10.295	9.252	0.289	10.411
slc26a3	2.004	0.978	1.643	1.464
slc26a6	1.674	1.157	1.163	1.273
crygs3	1.876	1.444	2.132	1.640
gstn	1.408	1.117	2.095	1.836
actn4	-0.961	-0.836	-1.806	-2.007
aldh1l1	-3.370	-2.808	0.967	0.597

[97] 이 상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[98]

서열목록 Free Text

[99] 서열목록 제1서열 내지 제3서열은 각각 VP1을 검출하기 위한 정방향 프라이머, 역방향 프라이머 및 프로브의 뉴클레오타이드 서열이다.

[100] 서열목록 제4서열 및 제5서열은 각각 si:ch211-89b.14.1을 검출하기 위한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.

[101] 서열목록 제6서열 및 제7서열은 각각 si:dkey-176g4.4를 검출하기 위한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.

[102] 서열목록 제8서열 및 제9서열은 각각 GSTM을 검출하기 위한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.

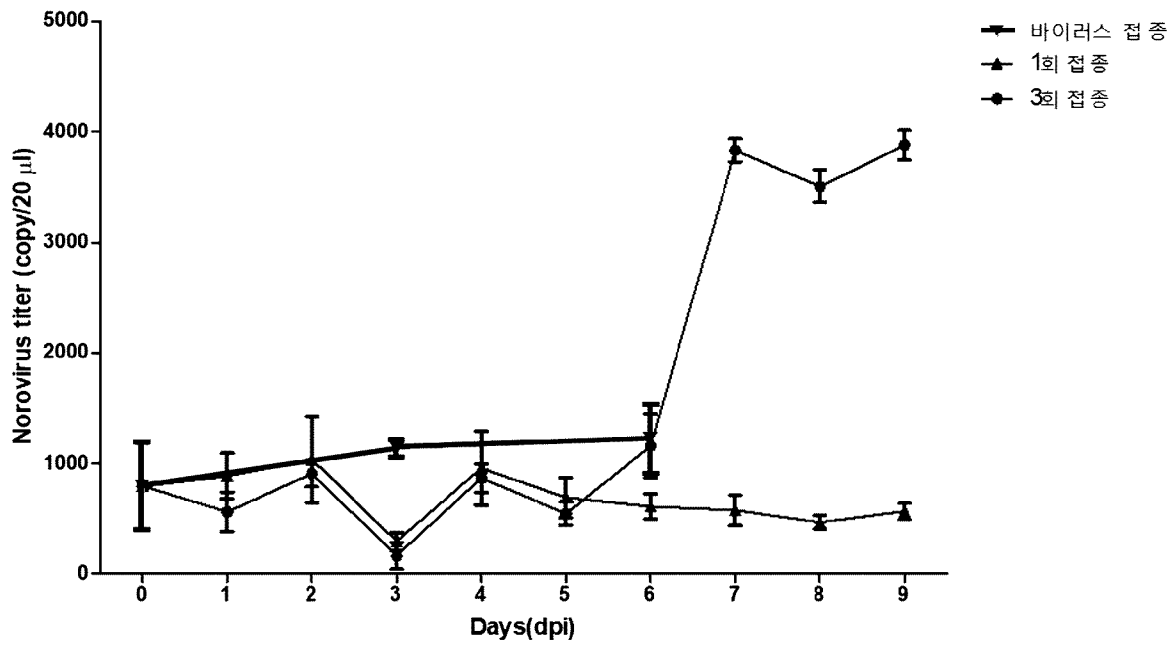
[103] 서열목록 제10서열 및 제11서열은 각각 crygs3를 검출하기 위한 정방향

- 프라이머 및 역방향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [104] 서열목록 제12서열 및 제13서열은 각각 *ptpn20*를 검출하기 위한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [105] 서열목록 제14서열 및 제15서열은 각각 *Actn4*를 검출하기 위한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [106] 서열목록 제16서열 및 제17서열은 각각 *tfa*를 검출하기 위한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [107] 서열목록 제18서열 및 제19서열은 각각 *CFTR*을 검출하기 위한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [108] 서열목록 제20서열 및 제21서열은 각각 *SLC26A3*를 검출하기 위한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [109] 서열목록 제22서열 및 제23서열은 각각 *SLC26A6*를 검출하기 위한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [110] 서열목록 제24서열 및 제25서열은 각각 *IFNg1-2*를 검출하기 위한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [111] 서열목록 제26서열 및 제27서열은 각각 *IL-1b*를 검출하기 위한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [112] 서열목록 제28서열 및 제29서열은 각각 *aldh1l1*을 검출하기 위한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [113] 서열목록 제30서열 및 제31서열은 각각 *TFR1*을 검출하기 위한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [114] 서열목록 제32서열 및 제33서열은 각각 *HSPA8*을 검출하기 위한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [115] 서열목록 제34서열 및 제35서열은 각각 *HSP90aa1*을 검출하기 위한 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.

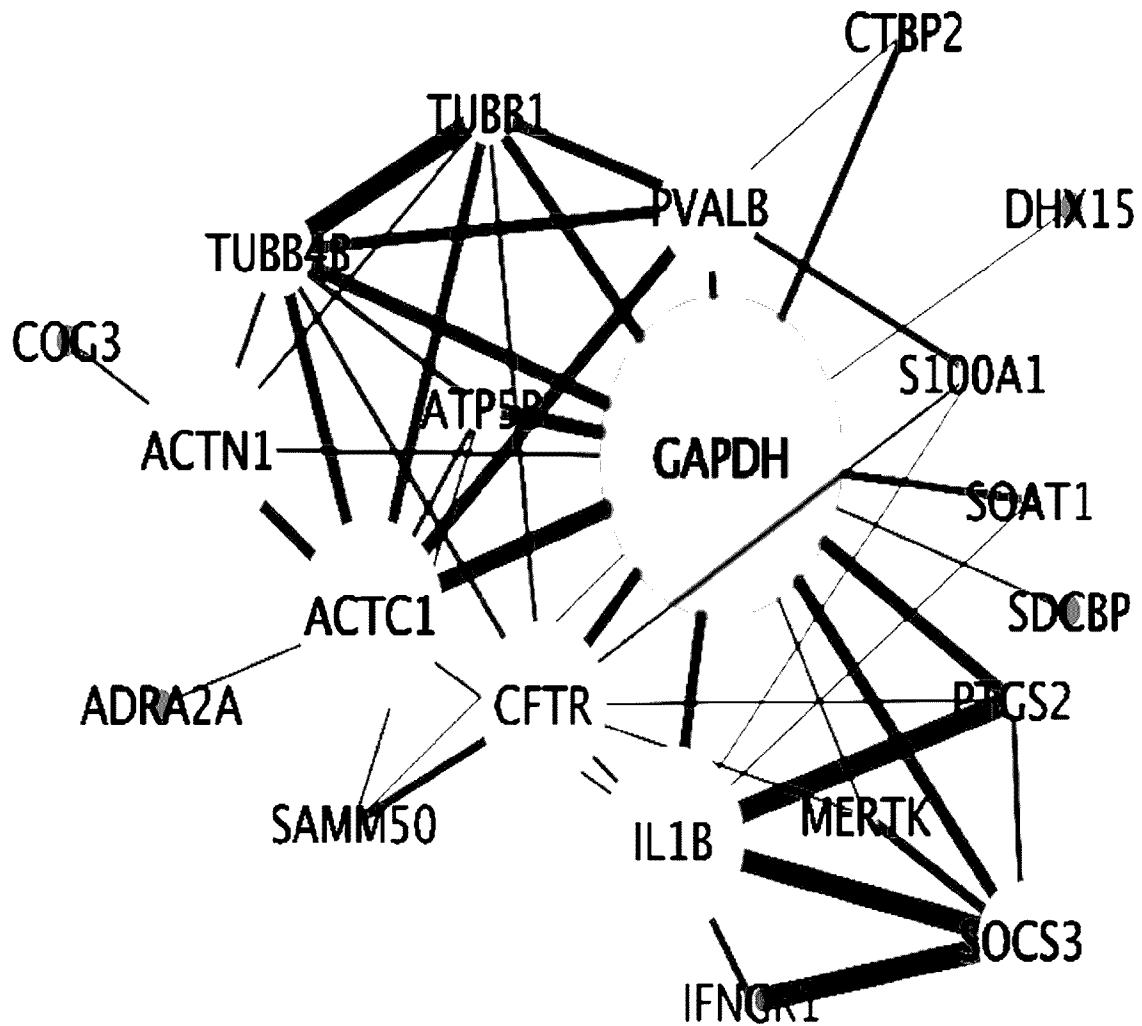
청구범위

- [청구항 1] 다음의 단계를 포함하는 감염형 노로바이러스의 선별 방법:
 (a) 제브라피시(*Danio rerio*)에 노로바이러스를 투여하는 단계;
 (b) 상기 제브라피시로부터 분리된 생물학적 시료의 *tfr1*, *cfr*, *tfa*, *ptpn20*, *si:dkey176g4.4*, *si:ch211-89b14.1*, *hsp90aa1*, *hspa8*, *ifng1-2*, *il1b*, *slc26a3*, *slc16a6*, *crygs3*, *gstm*, *actn4* 및 *aldh1l1*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 검출하는 단계; 및
 (c) 상기 발현 수준을 비감염형 노로바이러스와 비교하여 감염형 노로바이러스를 선별하는 단계.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 감염형 노로바이러스는 유전자형이 GI, GII, GIII, GIV 또는 GV인 노로바이러스인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 투여는 1 내지 10회의 반복 투여인 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 유전자 증폭 방식에 의해 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 5] 제 1 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 단계 (a)의 노로바이러스 투여 후 6 내지 240시간 이후에 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 6] 제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)는 *tfr1*, *cfr*, *tfa*, *ptpn20*, *si:dkey176g4.4*, *si:ch211-89b14.1*, *hsp90aa1*, *hspa8*, *ifng1-2*, *il1b*, *slc26a3*, *slc16a6*, *crygs3* 및 *gstm*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 단백질이 상향조절되는 경우 감염형 노로바이러스로 선별하는 것을 특징으로 하는 방법.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서, 상기 단계 (c)는 *actn4* 및 *aldh1l1*로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 단백질이 하향조절되는 경우 감염형 노로바이러스로 선별하는 것을 특징으로 하는 방법.

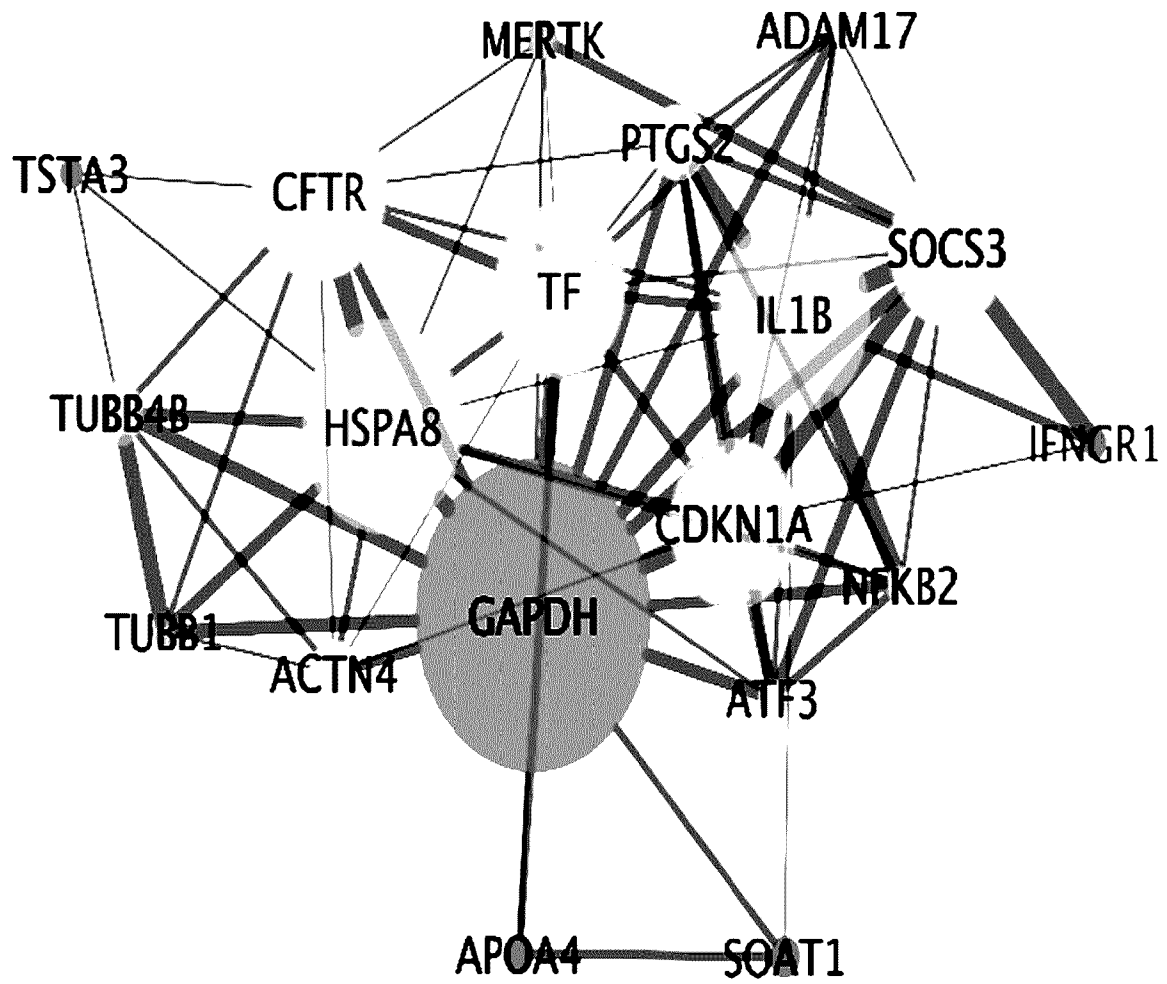
[도1]



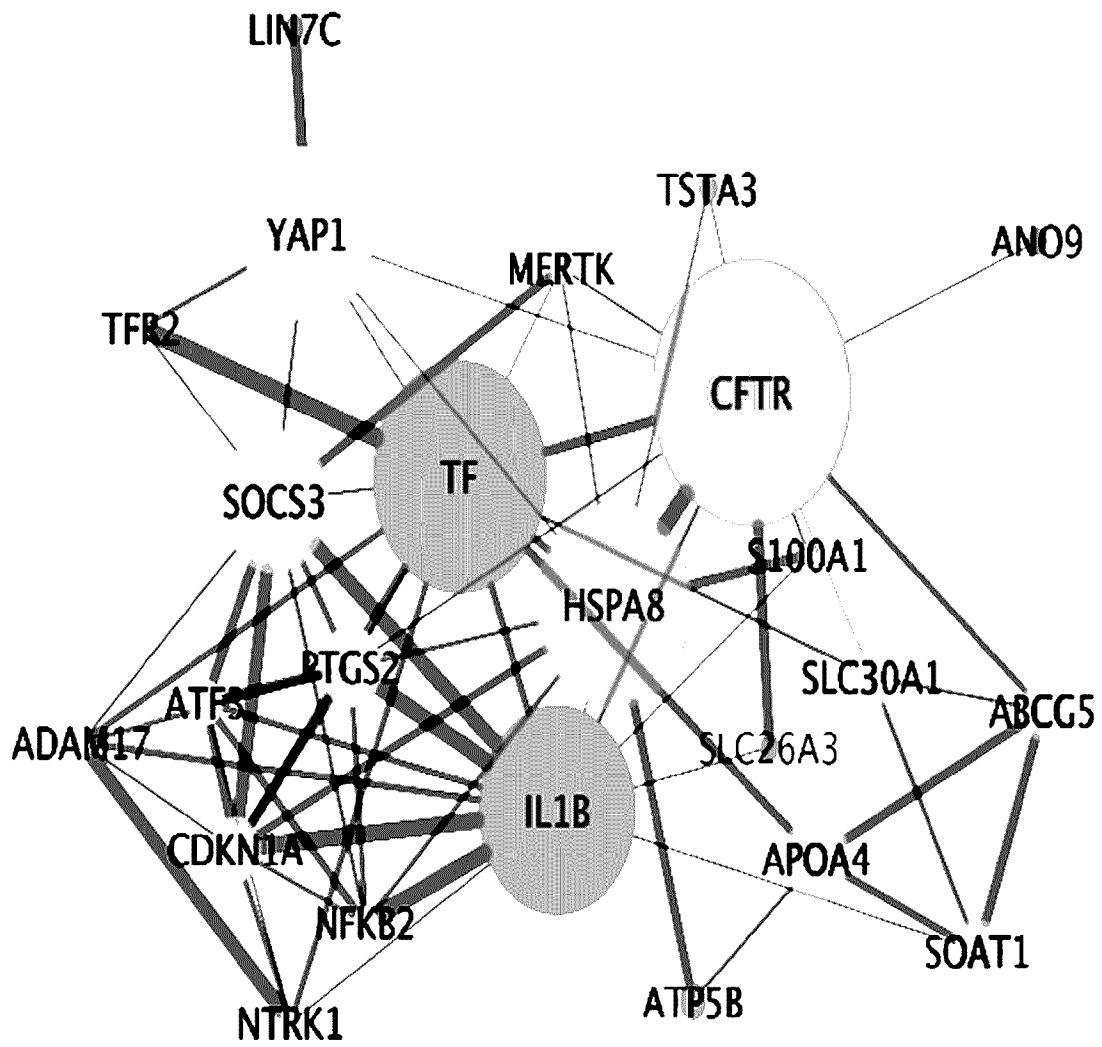
[도2a]



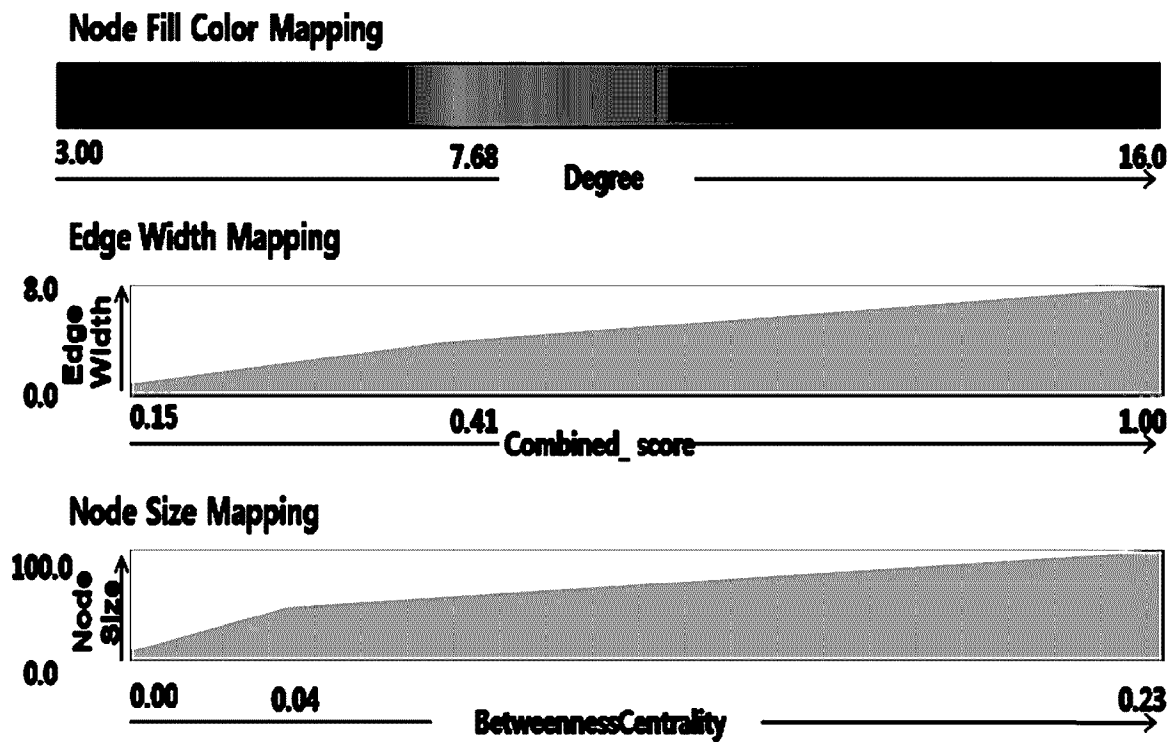
[도2b]



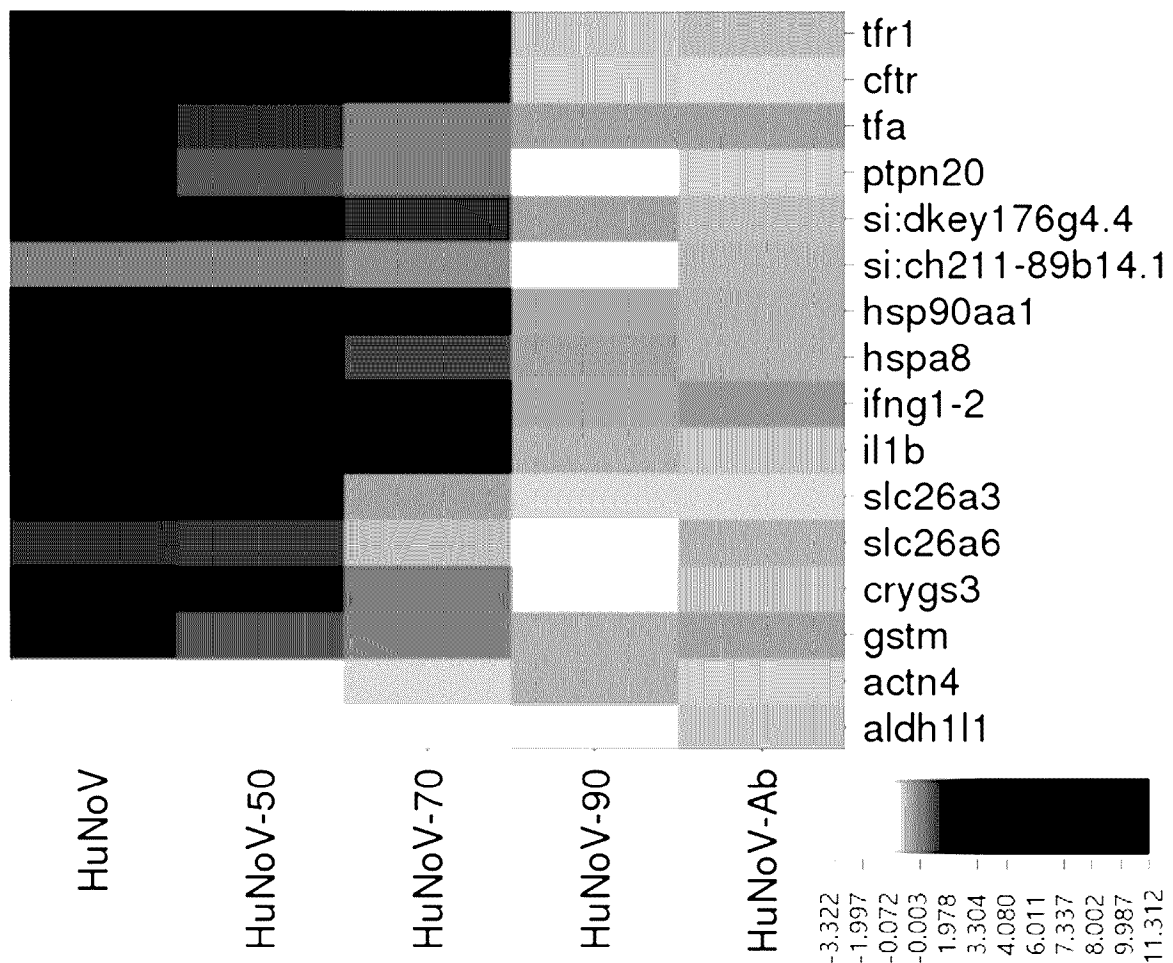
[도2c]



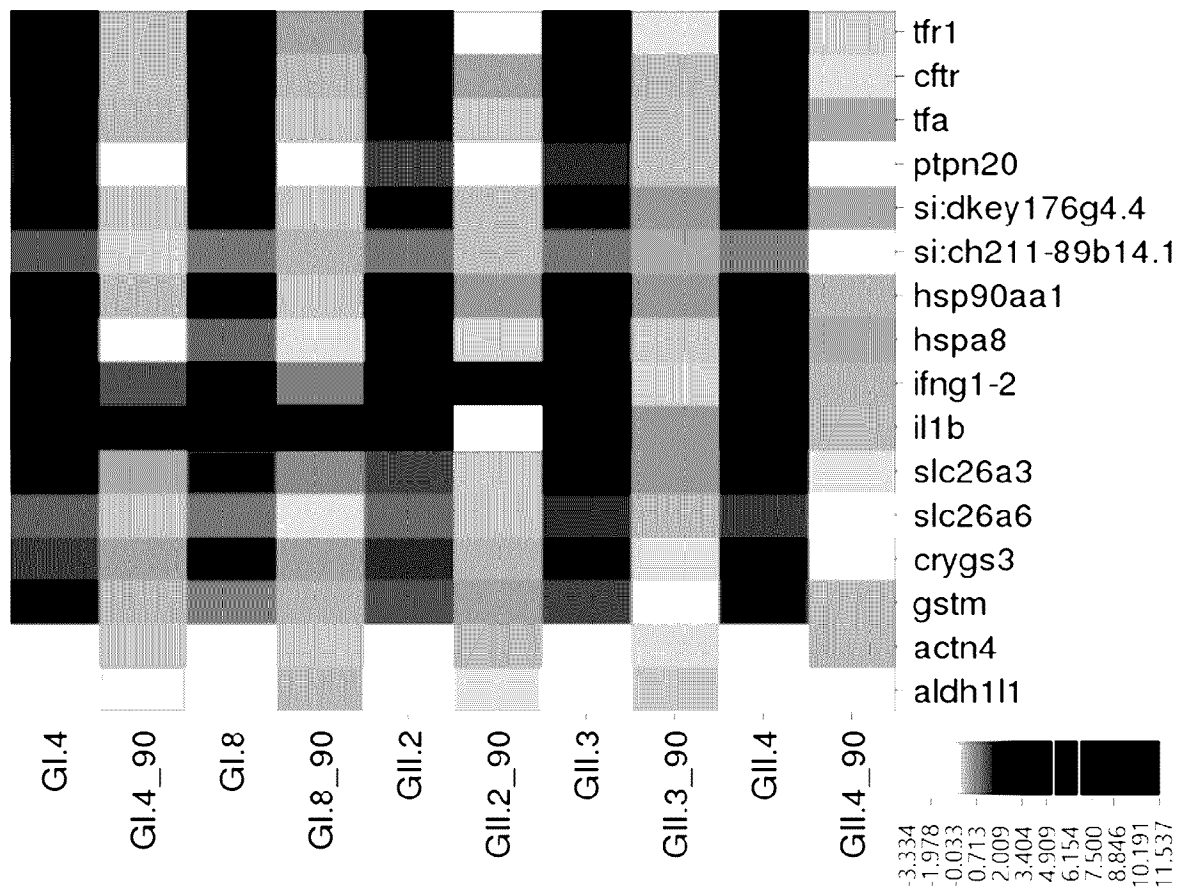
[도2d]

Network analysis legend

[도3]



[도4]



[도5]

