



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0100675
(43) 공개일자 2019년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01) C12Q 1/6818 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/701 (2013.01)
C12Q 1/6818 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2018-0020526
(22) 출원일자 2018년02월21일
심사청구일자 2018년02월21일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
임채승
경기도 안양시 동안구 귀인로 294, 302동 804호 (평촌동, 꿈마을건영아파트)
장웅식
서울특별시 동작구 여의대방로 28, 102동 108호 (신대방동, 현대아파트)
곽승연
경기도 남양주시 호평로 149, 1905동 202호 (호평동, 호평마을중흥에스클래스아파트)
(74) 대리인
특허법인 무한

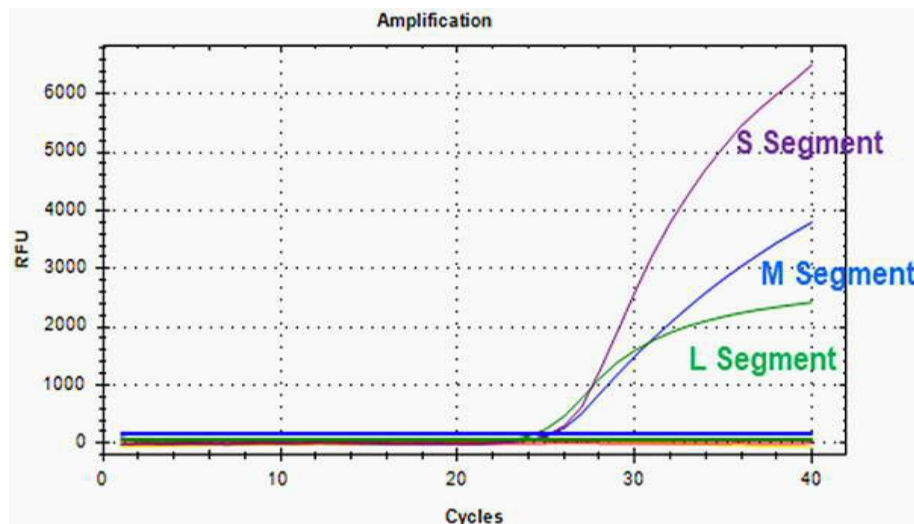
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 SFTS 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 세트; 서열번호 4 및 5의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 세트; 및 서열번호 7 및 8의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제3 올리고뉴클레오타이드 세트;를 포함하는, SFTS 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트가 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2565/101 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 세트;

서열번호 4 및 5의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 세트; 및

서열번호 7 및 8의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제3 올리고뉴클레오타이드 세트; 중 하나 이상을 포함하는, SFTS 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 상기 SFTS 바이러스의 L 분절(L segment)에 특이적으로 결합하는, SFTS 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 상기 SFTS 바이러스의 M 분절(M segment)에 특이적으로 결합하는, SFTS 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제3 올리고뉴클레오타이드 세트는 상기 SFTS 바이러스의 S 분절(S segment)에 특이적으로 결합하는, SFTS 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 각 프로브의 5' 말단에 형광단이 표시되고,

상기 각 프로브의 3' 말단에 소광체가 표시된, SFTS 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 형광단은 플루오레세인(fluorescein), 6-카르복시플루오레세인(FAM, 6-carboxyfluorescein), 헥사클로로-6-카르복시플루오레세인(HEX, hexachloro-6-carboxyfluorescein), 테트라클로로-6-카르복시플루오레세인(TET, tetrachloro-6-carboxyfluorescein), 2-클로로-7-페닐-1,4-디클로로-6-카르복시플루오레세인(VIC, 2-chloro-7-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein), 2,7-디메톡시-4,5-디클로로-6-카르복시플루오레세인(JOE, 2,7-

dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein), 5-((2-아미노에틸)아미노)나프탈렌-1-술폰산(5-((2-aminoethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid), 쿠마린(coumarin) 및 쿠마린 유도체, 시아닌-5(Cy5, Cyanine-5), 루시퍼 옐로우(lucifer yellow), 텍사스 레드(texas red), 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine), 야키마 옐로우(YG, Yakima Yellow), 및 칼 플루오르 레드 610(CFR, Cal Fluor Red 610)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, SFTS 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 소광체는 테트라메틸로다민(TAMRA, tetramethylrhodamine), 4-(4-디메틸아미노페닐아조)벤조산(4-(4-dimethylaminophenylazo)benzoic acid), 4-디메틸아미노페닐아조페닐-4-말레이미드(4-dimethylaminophenylazophenyl-4-maleimide), 카르복시테트라메틸로다민(carboxytetramethylrhodamine) 및 BHQ 염료(BHQ dyes)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, SFTS 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오타이드 세트를 포함하는, SFTS 바이러스 검출용 조성물.

청구항 9

제8항의 조성물을 포함하는, SFTS 바이러스 검출용 키트.

청구항 10

- (a) 대상으로부터 수득한 생물학적 시료 내 핵산을 추출하는 단계;
- (b) 제8항의 조성물과 상기 핵산을 혼합하는 단계; 및
- (c) 상기 핵산을 증폭하여 SFTS 바이러스 감염 여부를 확인하는 단계;를 포함하는, SFTS 바이러스 감염 진단을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 SFTS 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 중증열성혈소판감소증후군(SFTS, Severe fever with thrombocytopenia syndrome)은 2009-2010년에 중국 중동부 지역과 북부지역 6개성(Liaoning, Shandong, Henan, Hubei, Anhui, Jiangsu)에 걸쳐 원인을 알 수 없는 고열과 혈소판감소를 주증상으로 한 환자들이 나타나, 이들에 대한 조사 결과가 2011년 New England Journal of Medicine(NEJM)에 보고됨으로써 세상에 처음 알려졌다.

[0004] Haemaphysalis longicornis 진드기에 의해 감염되는 SFTSV 바이러스는 심한 열이 나고 심한 경우 발열, 호흡기 또는 위장관 증상, 혈소판 감소증, 백혈구 감소증 및 출혈을 특징으로 약 6-30 %의 사망률을 나타내고 있다.

[0005] Bunyaviridae 계통의 SFTS 바이러스는 직경 약 90-100nm 정도의 크기로 구형이거나 비정형으로 나타난다. 유전자 구조는 크기에 따라 크게 3개의 주요 분절에 대해 각각 L 분절(6368bp, RNA-dependent RNA polymerase,

RdRp), M 분절(3378bp, two envelop glycoprotein, Gn+Gc), S 분절(1743bp, Nucleocapsid protein and nonstructural S protein)로 이루어져 있다.

- [0006] SFTS의 임상 특징은 비특이적이며 인간 과립구 아나플라스마증(*Anaplasma phagocytophilum*에 의한 HGA), 신장 증후군을 동반한 출혈열 및 렙토스피라증을 동반하는 것으로 알려져 있고 사람 간의 전송 사례도 보고되었다. 따라서, SFTS의 조기 진단을 제공하기 위해 신뢰할 수 있는 SFTSV 탐지 도구가 시급히 필요한 실정이다.
- [0007] 현재 바이러스의 검출은 바이러스 감염 후 바이러스가 혈중에 분포하게 되는 단계(viremia)에서 검출 및 분리가 가능하며, 뒤이어 수일 이내 특이 항체 IgM, IgG가 형성되는 것으로 알려져 이에 대한 효소면역흡착분석(ELISA), 면역형광분석(IFA) 등의 검사법을 사용한 진단이 가능하다.
- [0008] 최근에는 분자진단 검사법으로서 중합효소 연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction)을 이용하여 SFTS 바이러스를 진단하는 방법에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으나, 유사한 증상을 가진 다른 바이러스를 동시에 교차반응 없이 높은 정확성을 가지고 검출할 수 있는 진단 방법에 대해서는 아직 연구가 부족한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 신속하면서도 이중 바이러스에 대한 교차반응 없이 정확하게 SFTS 바이러스만을 검출할 수 있는 올리고뉴클레오티드 세트를 제공하는 것이다.
- [0011] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제1 올리고뉴클레오티드 세트; 서열번호 4 및 5의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제2 올리고뉴클레오티드 세트; 및 서열번호 7 및 8의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제3 올리고뉴클레오티드 세트를 포함하는, SFTS 바이러스 검출용 올리고뉴클레오티드 세트가 제공된다.
- [0014] 일 측에 따르면, 상기 제1 올리고뉴클레오티드 세트는 상기 SFTS 바이러스의 L 분절(L segment)에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0015] 일 측에 따르면, 상기 제2 올리고뉴클레오티드 세트는 상기 SFTS 바이러스의 M 분절(M segment)에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0016] 일 측에 따르면, 상기 제3 올리고뉴클레오티드 세트는 상기 SFTS 바이러스의 S 분절(S segment)에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0017] 일 측에 따르면, 상기 각 프로브의 5' 말단에 형광단이 표지되고, 상기 각 프로브의 3' 말단에 소광체가 표지될 수 있다.
- [0018] 일 측에 따르면, 상기 형광단은 플루오레세인(fluorescein), 6-카르복시플루오레세인(FAM, 6-carboxyfluorescein), 헥사클로로-6-카르복시플루오레세인(HEX, hexachloro-6-carboxyfluorescein), 테트라클로로-6-카르복시플루오레세인(TET, tetrachloro-6-carboxyfluorescein), 2-클로로-7-페닐-1,4-디클로로-6-카르복시플루오레세인(VIC, 2-chloro-7-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein), 2,7-디메톡시-4,5-디클로로-6-카르복시플루오레세인(JOE, 2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein), 5-((2-아미노에틸)아미노)나프탈렌-1-술폰산(5-((2-aminoethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid), 쿠마린(coumarin) 및 쿠마린 유도체, 시아닌-5(Cy5, Cyanine-5), 루시퍼 옐로우(lucifer yellow), 텍사스 레드(texas red), 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine), 야키마 옐로우(YG, Yakima Yellow), 및 칼 플루오르 레드 610(CFR, Cal Fluor Red 610)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0019] 일 측에 따르면, 상기 소광체는 테트라메틸로다민(TAMRA, tetramethylrhodamine), 4-(4-디메틸아미노페닐아조)

벤조산(4-(4-dimethylaminophenylazo)benzoic acid), 4-디메틸아미노페닐아조페닐-4-말레이미드(4-dimethylaminophenylazophenyl-4-maleimide), 카복시테트라메틸로다민(carboxytetramethylrhodamine) 및 BHQ 염료(BHQ dyes)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 올리고뉴클레오타이드 세트를 포함하는, SFTS 바이러스 검출용 조성물이 제공된다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 조성물을 포함하는, SFTS 바이러스 검출용 키트가 제공된다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에 따르면, (a) 대상으로부터 수득한 생물학적 시료 내 핵산을 추출하는 단계; (b) 상기 조성물과 상기 핵산을 혼합하는 단계; 및 (c) 상기 핵산을 증폭하여 SFTS 바이러스 감염 여부를 확인하는 단계;를 포함하는, SFTS 바이러스 감염 진단을 위한 정보 제공 방법이 제공된다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 세트는 SFTS 바이러스의 특정 유전자에 특이적으로 결합하여 다른 바이러스에 대한 교차반응 없이 정확하면서도 신속하게 SFTS 바이러스를 검출할 수 있다.

[0025] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 올리고뉴클레오타이드 세트의 SFTS 바이러스에 대한 multiplex PCR 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 올리고뉴클레오타이드 세트의 SFTS 바이러스 L 분절에 대한 검출 민감도를 측정한 결과이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 올리고뉴클레오타이드 세트의 SFTS 바이러스 M 분절에 대한 검출 민감도를 측정한 결과이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 올리고뉴클레오타이드 세트의 SFTS 바이러스 S 분절에 대한 검출 민감도를 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0029] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0030] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0031] 또한, 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 3의 염기서열

로 이루어진 프로브를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 세트; 서열번호 4 및 5의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 세트; 및 서열번호 7 및 8의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제3 올리고뉴클레오타이드 세트;를 포함하는, SFTS 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트가 제공된다.

- [0033] 본 명세서에서 사용된 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 혼성화되어 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 상기 프라이머는 적절한 완충액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(DNA 중합효소 또는 역전사 효소) 및 상이한 4가지 dNTP(deoxynucleoside triphosphate)의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.
- [0034] 이 때, 상기 제1, 제2 및 제3 올리고뉴클레오타이드 세트는 각각 SFTS 바이러스의 L 분절(L segment), M 분절(M segment) 및 S 분절(S segment)에 특이적으로 결합할 수 있다. 구체적으로 제1 올리고뉴클레오타이드 세트는 SFTS 바이러스의 RNA 중합효소(RNA polymerase) 유전자에 특이적으로 결합하고, 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 SFTS 바이러스의 Gn 단백질(Gn protein)에 특이적으로 결합하며, 제3 올리고뉴클레오타이드 세트는 SFTS 바이러스의 핵단백질(Nucleoprotein)에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0035] 상기 올리고뉴클레오타이드 세트는 SFTS 바이러스의 상이한 분절에 각각 특이적으로 결합함으로써, SFTS에 대한 우수한 검출 특이도 및 검출 민감도를 나타낼 수 있다.
- [0036] 구체적으로, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트를 구성하는 프라이머 쌍은 SFTS 바이러스 전체 유전자의 5807번째부터 5974번째까지의 염기서열(168bp)에 상응할 수 있고, 프로브는 5918번째부터 5937번째까지의 염기서열(20bp)에 상응할 수 있다.
- [0037] 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트를 구성하는 프라이머 쌍은 SFTS 바이러스 전체 유전자의 560번째부터 722번째까지의 염기서열(163bp)에 상응할 수 있고, 프로브는 660번째부터 681번째까지의 염기서열(22bp)에 상응할 수 있다.
- [0038] 또한, 상기 제3 올리고뉴클레오타이드 세트를 구성하는 프라이머 쌍은 SFTS 바이러스 전체 유전자의 1089번째부터 1209번째까지의 염기서열(121bp)에 상응할 수 있고, 프로브는 1164번째부터 1185번째까지의 염기서열(22bp)에 상응할 수 있다.
- [0039] 본 명세서에서 사용된 용어 "바이러스 유전자"는 바이러스 게놈 자체뿐만 아니라 이로부터 유래되는 모든 RNA 또는 DNA(예컨대, cDNA)를 포함하는 개념을 의미할 수 있다.
- [0040] 상기 프라이머는 SFTS 바이러스의 특정 단백질 유전자에 특이적인 프라이머로, 바람직하게는 10개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 정방향(forward) 및 역방향(reverse) 핵산으로 구성될 수 있다. 상기 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다.
- [0041] 또한, 상기 프라이머 핵산 서열은 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지의 예로는, 효소(예: 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타아제), 방사성 동위원소(예: ^{32}P), 형광성 분자, 화학그룹(예: 바이오틴) 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 본 명세서에서 사용된 용어 "프로브"는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 수개 내지 수백 개의 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미한다. 상기 프로브는 표지(labeling)되어 있어 이를 통해 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 상기 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단일가닥(single stranded) DNA 프로브, 이중가닥(double stranded) DNA 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다.
- [0043] 상기 각 프로브의 5' 말단에 형광단(fluorophore)이 표지되고, 상기 각 프로브의 3' 말단에 소광체(quencher)가 표시될 수 있다. 이에 따라, 프로브가 시료에 존재하는 5'-UTR에 결합된 상태에서는 형광단 및 소광체 간의 상호 간섭현상에 의해 발색이 제한되고, 증폭 과정에서 프로브가 분해되면서 5' 말단에 표지된 형광단은 소실되는 반면 3' 말단에 표지된 소광체가 발색반응을 하게 된다. 이와 같은 발색반응에 의해 시료로부터 SFTS 바이러스의 유무를 판단할 수 있게 된다.
- [0044] 상기 5' 말단에 표지될 수 있는 형광단은 플루오레세인(fluorescein), 6-카르복시플루오레세인(FAM, 6-carboxyfluorescein), 헥사클로로-6-카르복시플루오레세인(HEX, hexachloro-6-carboxyfluorescein), 테트라클

로로-6-카르복시플루오레세인(TET, tetrachloro-6-carboxyfluorescein), 2-클로로-7-페닐-1,4-디클로로-6-카르복시플루오레세인(VIC, 2-chloro-7-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein), 2,7-디메톡시-4,5-디클로로-6-카르복시플루오레세인(JOE, 2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein), 5-((2-아미노에틸)아미노)나프탈렌-1-술폰산(5-((2-aminoethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid), 쿠마린(coumarin) 및 쿠마린 유도체, 시아닌-5(Cy5, Cyanine-5), 루시퍼 옐로우(lucifer yellow), 텍사스 레드(texas red), 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine), 야키마 옐로우(YG, Yakima Yellow), 및 칼 플루오르 레드 610(CFR, Cal Fluor Red 610)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 또한, 상기 3' 말단에 표지될 수 있는 소광체는 테트라메틸로다민(TAMRA, tetramethylrhodamine), 4-(4-디메틸아미노페닐아조)벤조산(4-(4-dimethylaminophenylazo)benzoic acid), 4-디메틸아미노페닐아조페닐-4-말레이미드(4-dimethylaminophenylazophenyl-4-maleimide), 카르복시테트라메틸로다민(carboxytetramethylrhodamine) 및 BHQ 염료(BHQ dyes)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 이처럼 형광물질이 표지된 프로브를 사용하여 실시간 RT-PCR을 수행하고 그로부터 증폭된 산물을 검출하는 경우에 증폭된 산물의 증가를 실시간으로 모니터링할 수 있으므로 DNA 및 RNA를 정확하게 정량할 수 있다. 또한, 이러한 방법은 전기영동이 필요 없어 신속하고 간편하게 해석할 수 있으며 오염의 위험을 감소시킬 수 있다.

[0047] 상기 프라이머 및 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 세트는 SFTS 바이러스의 상이한 유전자를 타겟팅하고 증폭함으로써, 기존의 프라이머 및 프로브에 비해 검출 민감도를 향상시킬 수 있다. 이 때, 검출 민감도 향상은 SFTS 바이러스 외 다른 바이러스에 대한 비특이적 검출 감소를 의미한다.

[0048] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 올리고뉴클레오타이드 세트를 포함하는, SFTS 바이러스 검출용 조성물 및 이를 포함하는 키트가 제공된다.

[0049] 상기 조성물 또는 키트가 RT-PCR에 사용되는 경우, 선택적으로 RT-PCR을 수행하기 위한 증폭반응 혼합물을 추가로 포함할 수 있다. RT-PCR을 수행하기 위한 증폭반응 혼합물이란 증폭반응을 수행하기에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, RNase H 활성을 갖는 역전사 효소, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), Mg^{2+} 와 같은 DNA 중합효소 조인자, dNTP(dATP, dCTP, dGTP, 및 dGTP) 등을 포함할 수 있다.

[0050] 상기 조성물 및 키트는 다양한 폴리뉴클레오타이드 분자, 역전사 효소, 다양한 완충액 및 시약, DNA 중합효소의 활성을 억제하는 저해제를 포함할 수 있다. 또한, 상기 조성물 및 키트는 음성 및 양성 대조군 반응을 수행하는데 필요한 시약 또는 혼성화 반응에 필요한 완충액과 같은 시약을 포함할 수 있다. 특정 반응에서 이용되는 시약의 최적량은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 키트는 분리된 패키지 또는 컴파트먼트에 상술한 성분들을 포함할 수 있다.

[0051] 상기 조성물 및 키트에 포함되는 구체적인 프라이머 및 프로브의 종류, 염기서열, 타겟 유전자 등에 관해서는 전술한 것과 같다.

[0052] 본 발명의 일 실시예에 따르면, (a) 대상으로부터 수득한 생물학적 시료 내 핵산을 추출하는 단계; (b) 상기 조성물과 상기 핵산을 혼합하는 단계; 및 (c) 상기 핵산을 증폭하여 SFTS 바이러스 감염 여부를 확인하는 단계;를 포함하는, SFTS 바이러스 감염 진단을 위한 정보 제공 방법이 제공된다.

[0053] 상기 (a) 단계에서 상기 생물학적 시료는 SFTS 바이러스의 감염 여부를 확인하기 위해 대상으로부터 채취한 시료를 의미하며, 혈청, 혈장, 말초혈 단핵세포, 말초혈 백혈구, 타액, 소변, 분변, 인두 면봉 스와브(throat swabs), 피부 상처 스와브(dermal lesion swabs), 뇌척수액(cerebrospinal fluids), 경부 도말 표본(cervical smears), 농축 샘플, 식품 기질(food matrices), 및 뇌, 비장 및 간을 포함하는 신체의 다양한 부분의 세포 또는 조직을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 상기 (b) 단계에서 상기 핵산은 RNA를 의미할 수 있으며, 조성물에 관해서는 전술한 것과 같다. 증폭반응에 사용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 하고, 이에 따라 상기 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 수행될 수 있다.

[0055] 상기 (c) 단계에서는 각각의 올리고뉴클레오타이드 세트와 핵산을 이용하여 PCR을 수행할 수 있다. 상기 PCR은 RT-PCR, 구체적으로 표적 핵산을 역전사하는 동시에 PCR에 의하여 증폭 하는 단일-단계(one-step) RT-PCR, 멀티

플렉스 PCR(multiplex PCR), 실시간 PCR(realtime PCR) 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0056] 다중 실시간 RT-PCR을 수행하는 경우, 상기 프라이머 및 프로브가 주형 RNA에 혼성화되기에 적합한 조건이 채용될 수 있다. 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이러한 절차는 프로토콜 수립을 위해, 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시될 수 있다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 올리고뉴클레오타이드의 길이 및 GC 함량, 표적 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다.

[0058] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 실시예 1: 분석 시료 준비

[0061] SFTS 바이러스를 배양 중이던 액체배지(RPMI 1640, Gibco) 5ml를 추출하여 15ml 튜브에 넣고 3,000rpm에서 10분 동안 원심분리를 실시하였다. 원심분리 완료 후, 펠렛은 버리고 상층액만 수확하여 PCR의 RNA 주형(template)으로 사용하였다.

[0063] 실시예 2: 프라이머 및 프로브 제작

[0064] SFTS 바이러스 검출을 위한 타겟 유전자로 L 분절 내 RNA 중합효소, M 분절 내 Gn 단백질, 및 S 분절 내 핵단백질을 선정하였다.

[0065] 각각의 타겟 유전자의 전체 서열 비교를 통해 다른 바이러스와 유전자 상동성이 없는 부위를 선택함으로써 프라이머 및 프로브를 디자인하였고, 구체적인 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

[0066] L, M S 분절 타겟 유전자에 대한 3개의 프로브의 5' 말단에는 형광단으로 각각FAM, HEX, CY5를 표지하고, 3' 말단에는 소광제로 각각 BHQ-1(Black Hole Quencher 1), BHQ-1, BHQ-3를 표지하였다.

표 1

[0068]

타겟 유전자	종류	서열 번호	서열 (5' → 3')	위치 (길이)	크기 (bp)
L 분절	primer_F	1	GGGCTGATGAGGTCAAAGCT	5807(20)	168
	primer_R	2	AGGTGCCCCATCAAAGATGG	5955(20)	
	probe	3	GCTGTGGAGCTCTCAGAGGG	5918(20)	
M 분절	primer_F	4	AGCCTATGACACCCATCCCT	560(20)	163
	primer_R	5	GAGTGGCCAACATCCATCCA	703(20)	
	probe	6	CCAGTGTGAGGGTGAGAGTCTA	660(22)	
S 분절	primer_F	7	ACAGCAGCATGAAGAGGGTC	1089(20)	121
	primer_R	8	CCCTGATGGAGGCCTACTCT	1190(20)	
	probe	9	GGCAAGATGCCTTCACCAAGAC	1164(22)	

[0070] 또한, 상기 올리고뉴클레오타이드 세트에 대한 대조군으로 한국등록특허 제10-1786311호(비교예 1), 제10-1764321호(비교예 2), 및 제10-1728420호(비교예 3)에 개시된 올리고뉴클레오타이드 세트를 사용하였다. 구체적인 서열은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

대조군	타겟 유전자	종류	서열 번호	서열 (5' → 3')
비교예 1	S 분절 FRP	primer_F	10	CCTTCAGGTTTCATGACAGCTGG
		primer_R	11	ACCAGGCTCTCAATCACTCCTGT
		probe	12	AGCACATGTCCAAGTGGGAAGGTCT
	M 분절 FRP	primer_F	13	GTCATCATCATATTTTGTTCCTGATGC
		primer_R	14	GGGCACCCAGACTGGCAGTC
		probe	15	TCCAGGTGTACATCAGTGAGGAGATGTCG
비교예 2	NIER-S1 FRP	primer_F	16	GCTGAAGGAGACAGGTGGAG
		primer_R	17	CCTGATGCCCTTGACGATCTT
		probe	18	ATCATTGTCTTTGCCCTGAC
	NIER-S2 FRP	primer_F	19	CAGGATTGCAGTGGAGTTTG
		primer_R	20	GCAGGATCAAGGCCTTCATAG
		probe	21	CAGCAGCTCAATTGACTGA
비교예 3	NP-1 FRP	primer_F	22	ATCGTCAAGGCATCAGGGAA
		primer_R	23	TTCAGCCACTTCACCCGAA
	NP-2 FRP	primer_F	24	CATCATTGTCTTTGCCCTGA
		primer_R	25	AGAAGACAGAGTTCACAGCA

실시예 3: SFTS 바이러스 검출

상기 실시예 1에 따라 제조된 SFTS 바이러스의 RNA에 대해 상기 실시예 2의 프라이머 및 프로브의 작동 여부를 확인하기 위해 DiaStar™ OneStep Multiplex qRT-PCR kit(SRQ11-K100, Solgent)을 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 구체적인 성분 및 조건은 각각 하기 표 3 및 표 4에 나타내었다.

표 3

성분	부피 (μl)
5X Reaction buffer	5
Enzyme buffer	2
primer_F (10pmol)	1
primer_R (10pmol)	1
probe (5pmol)	1
template RNA	5
증류수	10
전체	25

표 4

단계	온도(℃)	시간	횟수(cycle)
reverse transcription	50	30min	-
pre-denaturation	95	15min	-
denaturation	95	30sec	40
annealing	55.7	40sec	
elongation	72	30sec	

SFTS 바이러스 검출 결과를 확인하기 위해 3개의 올리고뉴클레오타이드 세트(프라이머 및 프로브)를 모두 혼합한

상태에서 SFTS 바이러스 주형 RNA를 첨가하여 실시간 RT-PCR을 수행하였고, 증폭 결과를 하기 표 5 및 도 1에 나타내었다. 음성 대조군으로는 인간 혈장에서 추출한 RNA를 사용하였다.

표 5

샘플	Ct	RFU
L 분절 RNA 중합효소	22.70	2337
M 분절 Gn 단백질	25.20	3431
S 분절 핵단백질	25.11	5984
음성 대조군	N/A	N/A
증류수	N/A	N/A

상기 표 5 및 도 1을 참고하면, 상기 실시예 2에 따른 올리고뉴클레오타이드 세트가 SFTS 바이러스의 각 분절 내 단백질에 특이적으로 결합하며, 이들은 모두 SFTS 바이러스만을 특이적으로 검출하는 것을 확인할 수 있다.

실시예 4: 검출 민감도 측정

상기 실시예 2의 프라이머 및 프로브의 검출 민감도를 확인하기 위해, 상기 실시예 1에 따라 제조된 주형 RNA 시료를 10^8 내지 10^0 카피수의 농도로 단계 희석하여 각 혈청형별 RT-PCR을 수행하였다. RNA 시료의 농도를 제외하고 구체적인 실험 조건은 상기 실시예 3과 동일하게 수행하였고, 그 결과를 하기 표 6 및 도 2 내지 4에 나타내었다.

표 6

Copies/ μ l	Ct 값		
	SFTS L FRP	SFTS M FRP	SFTS S FRP
10^8	12.21	12.35	13.01
10^7	15.38	15.75	16.31
10^6	18.90	18.58	19.91
10^5	20.78	21.73	23.35
10^4	24.21	25.35	26.91
10^3	27.61	28.94	31.27
10^2	31.18	32.05	33.34
10^1	35.21	35.13	36.07
10^0	39.01	38.07	38.45

상기 표 6 및 도 2 내지 4를 참고하면, 상기 실시예 2의 올리고뉴클레오타이드 세트는 L/M/S 분절 모두에 대해 1 copy에서 증폭이 확인되어, 매우 우수한 민감도를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

추가적으로, 임상검체의 희석 농도에 따른 상기 실시예 2 및 비교예 1~3의 올리고뉴클레오타이드 세트의 검출 한계를 확인하였고, 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

[0096]

SFTS 양성 검체 수	실시예 2						비교예 1				비교예 2				비교예 3	
	SFTS L FRP		SFTS M FRP		SFTS S FRP		S 분절 FRP		M 분절 FRP		NIER-S1 FRP		NIER-S2 FRP		NP-1 FRP	NP-2 FRP
	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	Ct	RFU	전기 영 동 결과	전기 영 동 결과
원액	27.0 7	2434	27.2 5	6879	26.4 8	6879	26.2 5	6879	26.4 9	1398 2	N/A	N/A	24.8 9	2081 8	○	○
10 ⁻¹	28.8 4	2252	30.6 7	5732	29.7 1	5732	24.7 7	5732	29.6 6	1299 9	N/A	N/A	28.0 8	1652 2	○	○
10 ⁻²	33.4 7	894	34.6 2	3235	33.6 6	3235	32.9 5	3235	33.5 6	7238	N/A	N/A	32.0 1	7594	○	○
10 ⁻³	36.2 4	223	38.2 4	752	36.5 4	752	35.7	752	35.9 4	2776	N/A	N/A	35.4 2	2101	X	X
10 ⁻⁴	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	X	X
10 ⁻⁵	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	X	X

[0098]

상기 표 7을 참고하면, 실시예 2의 올리고뉴클레오타이드 세트의 검출 한계는 10⁻³으로 비교예 3에 비해 10배 가량 우수한 결과를 나타냈으며, 비교예 1의 올리고뉴클레오타이드 세트와 비교예 2의 NIER-S2 FRP와 유사한 결과를 나타내는 것을 알 수 있다. 다만, 비교예 2의 NIER-S1 FRP는 임상검체 원액에서도 증폭되지 않았다.

[0100]

실시예 5: 진단키트 성능 분석

[0101]

11개의 SFTS 임상 양성샘플을 대상으로 상기 실시예 2 및 비교예 1~3의 올리고뉴클레오타이드 세트의 효능을 비교 평가하였고, 그 결과를 하기 표 8에 나타내었다.

표 8

[0103]

SFTS 양성 검체 수	실시예 2						비교예 1				비교예 2				비교예 3			
	L FRP		M FRP		S FRP		S 분절 FRP		M 분절 FRP		NIER-S1 FRP		NIER-S2 FRP		NP-1 FRP		NP-2 FRP	
	Ct	판정	Ct	판정	Ct	판정	Ct	판정	Ct	판정	Ct	판정	Ct	판정	EP	판정	EP	판정
1	22.3 4	양성	27.6 3	양성	26.3	양성	19.4 1	양성	21.3 6	양성	N/A	음성	12.4 3	양성	○	양성	○	양성
2	18.0 7	양성	23.1 5	양성	21.8	양성	16.1 3	양성	17.6 4	양성	N/A	음성	11.1 7	양성	○	양성	○	양성
3	27.0 7	양성	26.3 1	양성	26.6 5	양성	27.9 9	양성	24.7 7	양성	N/A	음성	21.4 4	양성	X	음성	○	양성
4	31.7 4	양성	29.7 9	양성	29.4 3	양성	31.0 4	양성	28.2 8	양성	N/A	음성	21.6 3	양성	X	음성	X	음성
5	31.8 2	양성	31.4	양성	30.3 8	양성	31.8 7	양성	29.1 5	양성	N/A	음성	23.7 5	양성	X	음성	X	음성
6	36.4 8	양성	33.9 1	양성	32.3 2	양성	33.4 3	양성	31.2 3	양성	N/A	음성	23.2 5	양성	X	음성	X	음성
7	31.2 1	양성	28.7 2	양성	30.1	양성	27.4 3	양성	31.3 4	양성	21.6 1	양성	20.9 6	양성	○	양성	○	양성
8	35.3 9	양성	34.4	양성	34.3 2	양성	32.1 7	양성	35.0 4	양성	24.8	양성	22.5 9	양성	X	음성	○	양성
9	34.3 9	양성	32.7 9	양성	33.7 4	양성	31.3 3	양성	34.7 9	양성	23.3 1	양성	23.9	양성	X	음성	○	양성
10	23.0 8	양성	33.8	양성	27.0 3	양성	23.9 4	양성	23.6 7	양성	N/A	음성	18.7 6	양성	○	양성	○	양성

11	21.7 3	양성	31.2 5	양성	25.5 7	양성	21.4 8	양성	22.1 9	양성	N/A	음성	17.1 7	양성	○	양성	○	양성
----	-----------	----	-----------	----	-----------	----	-----------	----	-----------	----	-----	----	-----------	----	---	----	---	----

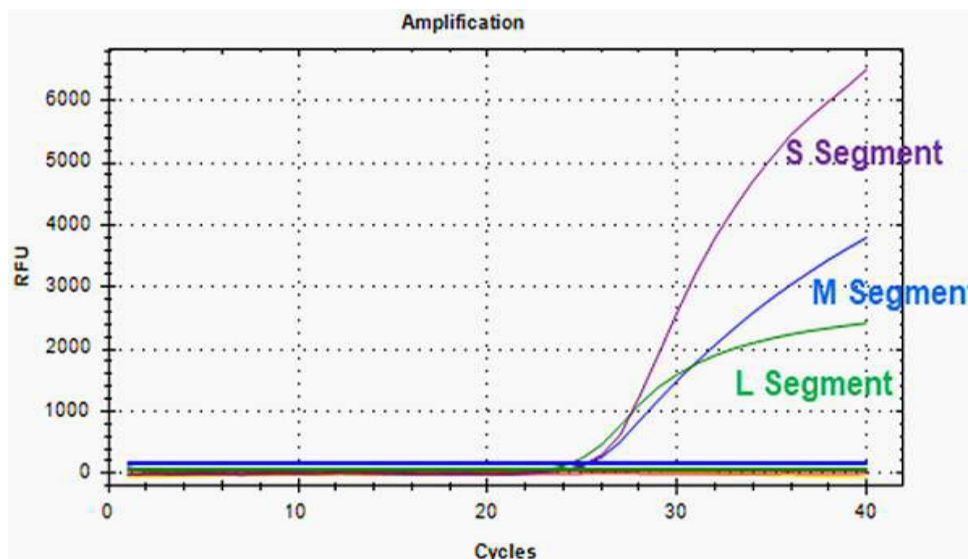
[0105] 상기 표 8을 참고하면, 비교예 2의 NIER-S1 FRP는 8개의 음성 결과를 나타내고, 비교예 3의 NP-1 FRP와 NP-2 FRP는 각각 6개와 3개의 음성 결과를 나타내나, 실시예 2 및 비교예 1의 올리고뉴클레오타이드 세트는 11개 임상 샘플 모두에서 증폭된 것을 확인할 수 있다. 특히, 실시예 2의 올리고뉴클레오타이드 세트는 multiplex로 진단이 가능하여 매우 우수한 진단 효율을 나타낼 것으로 예상할 수 있다.

[0107] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

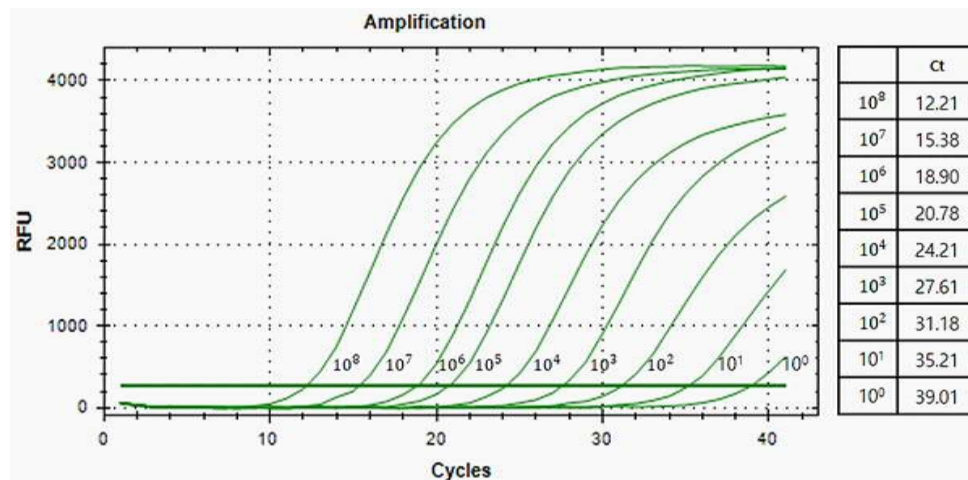
[0108] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

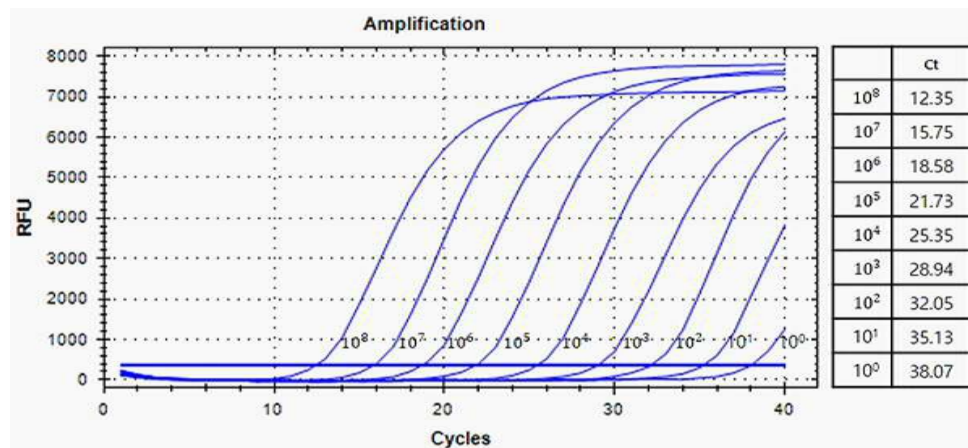
도면1



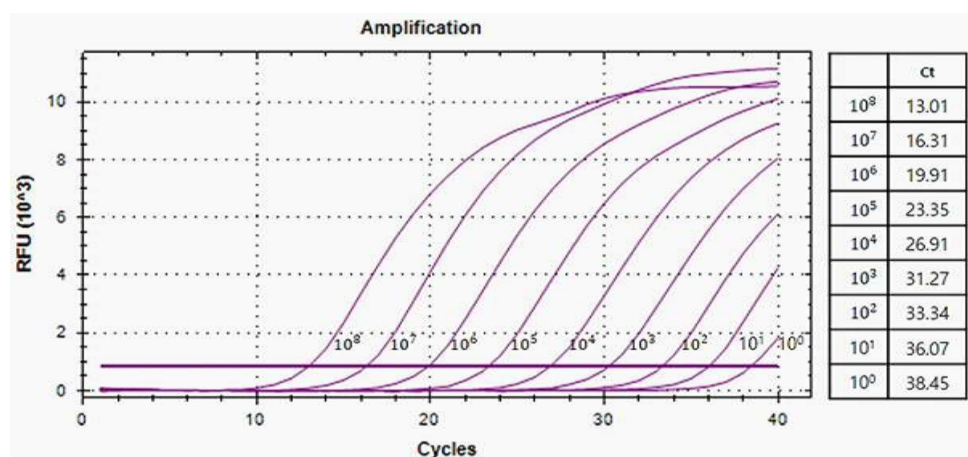
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> MUHANN

<120> OLIGONUCLEOTIDE SET FOR DETECTION OF SFTS VIRUS AND USES THEREOF

<130> APC-2016-0412

<160> 9
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for L segment
 <400> 1
 gggctgatga ggtcaaagct 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer for L segment
 <400> 2
 aggtgccccca tcaaagatgg 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Probe for L segment
 <400> 3
 gctgtggagc tctcagaggg 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer for M segment
 <400> 4
 agcctatgac acccatccct 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for M segment

<400> 5

gagtggccaa catccatcca 20

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Probe for M segment

<400> 6

ccagtgtgag ggtgagagtc ta 22

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer for S segment

<400> 7

acagcagcat gaagagggtc 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer for S segment

<400> 8

ccctgatgga ggcctactct 20

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Probe for S segment

<400> 9

ggcaagatgc cttaccaag ac 22