(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0176884
(43) 공개일자 2024년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01) *C12Q 1/6869* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/701 (2013.01)
C12Q 1/6869 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2023-0077297
(22) 출원일자 2023년06월16일
심사청구일자 2024년04월03일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
송진원
서울특별시 서초구 서초중앙로 220, 102동 1901호
박경민
서울특별시 동대문구 안암로16길 18, 306호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

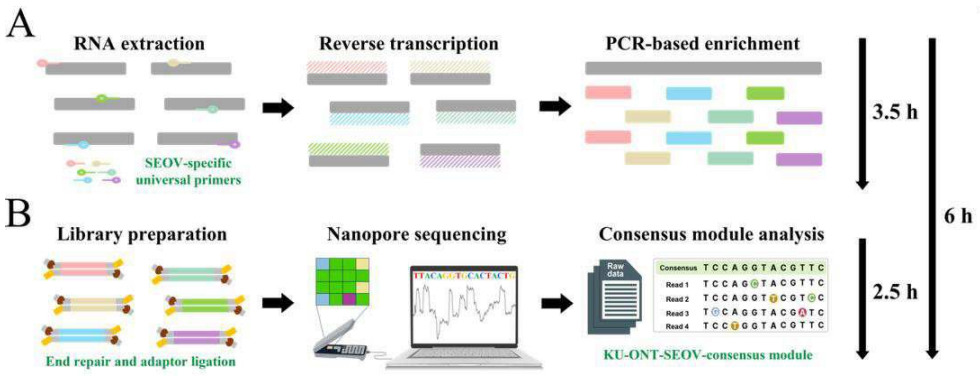
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **단일 단계 역전사-중합효소연쇄반응 기반 나노포어 염기서열분석법을 이용한 서울바이러스 감염 진단법**

(57) 요 약

단일 단계 역전사-중합효소연쇄반응 기반 나노포어 염기서열분석법을 이용한 서울바이러스 감염 진단법에 관한것으로서, 본 발명은 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV)의 현장 진단을 위하여, SEOV의 서열로부터, 단일 단계 RT-PCR 프라이머 서열을 제작하였으며, 단일 단계 RT-PCR로 증폭된 엠플리콘(amplicon) 기반의 나노포어 시퀀싱으로, 현장에서 SEOV의 신속한 감염 진단이 가능한 것을 확인하였다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

노주영

서울특별시 강동구 천호대로 1240, 3동 1403호

김원근

강원도 춘천시 지석로 97, 103동 101호

김기진

부산광역시 금정구 오륜대로 46, B동 201호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711175904
과제번호	IBS-R801-D9-2022-a03
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	기초과학연구원
연구사업명	한국바이러스기초연구소 운영사업
연구과제명	매개체 전파 바이러스의 환경 감시 연구
기 여 율	35/100
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2025.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711188904
과제번호	2023R1A2C2006105
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구
연구과제명	3세대염기서열분석법 기반 한타바이러스 대응 고해상도 능동감시 체계 구축
기 여 율	35/100
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2023.03.01 ~ 2026.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2220210466
과제번호	202103550002
부처명	해양수산과학부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	빅데이터 기반 해양 바이러스 제어 및 마린바이오틱스 개발
연구과제명	해양환경 내 감염성 바이러스 빅데이터 기반 진단, 치료 및 제어기술 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2021.04.01 ~ 2026.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍; 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 쌍; 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 쌍; 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 쌍; 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 쌍; 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머 쌍; 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머 쌍; 서열번호 15 및 서열번호 16의 프라이머 쌍; 서열번호 17 및 서열번호 18의 프라이머 쌍; 서열번호 19 및 서열번호 20의 프라이머 쌍; 서열번호 21 및 서열번호 22의 프라이머 쌍; 서열번호 23 및 서열번호 24의 프라이머 쌍; 및 서열번호 25 및 서열번호 26의 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 선택된 프라이머 쌍을 포함하는, 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV) 검출용 프라이머 세트.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 서울 오르토한타바이러스는, RNA 바이러스인 것인, 프라이머 세트.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 RNA는 작은(small, S) 분절, 중간(medium, M) 분절 및 큰(large, L) 분절로 이루어진 것인, 프라이머 세트.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 S 분절은, 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍; 또는 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 쌍;으로 증폭되는 것인, 프라이머 세트.

청구항 5

제 3항에 있어서,

상기 M 분절은, 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 쌍; 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 쌍; 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 쌍; 및 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 선택된 프라이머 쌍으로 증폭되는 것인, 프라이머 세트.

청구항 6

제 3항에 있어서,

상기 L 분절은 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머 쌍; 서열번호 15 및 서열번호 16의 프라이머 쌍; 서열번호 17 및 서열번호 18의 프라이머 쌍; 서열번호 19 및 서열번호 20의 프라이머 쌍; 서열번호 21 및 서열번호 22의 프라이머 쌍; 서열번호 23 및 서열번호 24의 프라이머 쌍; 및 서열번호 25 및 서열번호 26의 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 선택된 프라이머 쌍으로 증폭되는 것인, 프라이머 세트.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는, 단일 단계 역전사 중합효소 연쇄반응(one-step revers transcription polymerase chain reaction, One-step RT-PCR)에 이용되는 것인, 프라이머 세트.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 단일 단계 역전사 중합효소 연쇄반응의 증폭 산물은, 나노포어 시퀀싱(nanopore sequencing)으로 서열분석되는 것인, 프라이머 세트.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV)는 신증후군 출혈열(Hantavirus hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)을 유발하는 것인, 프라이머 세트.

청구항 10

제 1항의 프라이머 세트를 포함하는 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV) 검출용 조성물.

청구항 11

제 10항의 조성물을 포함하는 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV) 검출용 키트.

청구항 12

개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

상기 생물학적 시료에서, RNA(viral RNA)를 추출하는 단계;

상기 추출된 RNA를 제 10항의 키트로 상보적 DNA(complementary DNA, cDNA)로 합성하여 증폭하는 단계; 및

상기 증폭된 cDNA를 나노포어 시퀀싱(nanopore sequencing)으로 서열 분석하는 단계;를 포함하는 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV) 감염 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 cDNA로 합성하여 증폭하는 단계는, 단일 단계 역전사 중합효소 연쇄반응(one-step revers transcription polymerase chain reaction, One-step RT-PCR)로 증폭되는 것인, 방법.

청구항 14

제 12항에 있어서,

상기 생물학적 시료는, 혈액, 혈장, 혈청, 뇨, 눈물, 객담, 비분비물, 기관지 분비물, 기관지 세척액, 폐분비물, 및 폐포 세척액으로 이루어진 군에서 선택된 시료인 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 단일 단계 역전사-중합효소연쇄반응 기반 나노포어 염기서열분석법을 이용한 서울바이러스 감염 진단법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV)는 Bunyavirales 목 Hantaviridae과에 속하는 바이러스로, 서울바이러스로도 불리며, 작은(small, S) 분절, 중간(medium, M) 분절 및 큰(Large, L) 분절로 이루어진 게놈(genome) 세그먼트 1을 가지는 단일 가닥 음성 RNA 바이러스이다. 3개의 RNA 분절은 S 분절은 뉴클레오캡시드(nucleocapsid, N) 단백질을, M 분절은 2개의 표면 당단백질인 Gn 및 Gc를, L 분절은 RNA 의존성 RNA 폴리머레이즈(polymerase)를 암호화한다. SEOV는 전세계적으로 사망률이 1%미만인 신장 증후군을 동반한 출혈열(hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)를 유발하는 인수공통전염병의 원인 바이러스로서, 1차 숙주로는 갈색쥐(Rattus norvegicus) 및 검은쥐(R. rattus)가 포함되고, 인간은 우연한 숙주(accidental hosts)로 간주된다. SEOV의 감염원은 에어로졸화된 오염 물질의 흡입을 통해 감염되거나, 감염된 설치류에 물려서 발생하게

된다.

[0003] 한편, 전장-유전체 염기서열분석(Whole-genome sequencing) 기술은 진화와 역학 및 병원성을 이해하는데 중요한 바이러스 집단 전체의 게놈 역학을 조사할 수 있는 유망한 플랫폼을 제공한다. 3세대 시퀀서인 Oxford MinION 시스템은 옥스퍼드 나노포어 기술(Oxford Nanopore Technologies)로서, 손바닥 크기의 휴대용 장치로 현장이나, 병원에서 현장 진료 검사(point-of-care testing)를 위한 실시간 바이러스 시퀀싱이 가능한 기술이다. 나노포어 시퀀싱기술은, 야외 환경에서 풍토 국가에서 수집한 광견병 바이러스의 계통발생적 다양성과 지리적 분포의 확인에도 이용되었다. 또한, 나노포어 시스템을 사용한 게놈 기반 진단은 에볼라 바이러스(Ebola virus, EBOV), 지카 바이러스(zika virus, ZIKV), 중증급성호흡기증후군 코로나바이러스 2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-Cov 2), 치쿤구니아 바이러스(Chikungunya virus) 및 C형 간염 바이러스(hepatitis C virus)의 임상 진단에서도 활용되었다. 그러나, 아직까지 SEOV의 감염 진단에서, 나노포어 기반의 진단 방법에 대한 연구는 미비한 실정이다.

[0004] 이에, 본 발명자들은, 나노포어 기반의 염기서열분석으로, 정확한 감염원과 변종에서의 유전적 다양성을 식별하고, SEOV의 전체 게놈 염기서열을 수득할 수 있는지 확인하였으며, SEOV 나노포어 시퀀싱 기반의 감염 진단 방법을 확립하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍; 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 쌍; 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 쌍; 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 쌍; 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 쌍; 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머 쌍; 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머 쌍; 서열번호 15 및 서열번호 16의 프라이머 쌍; 서열번호 17 및 서열번호 18의 프라이머 쌍; 서열번호 19 및 서열번호 20의 프라이머 쌍; 서열번호 21 및 서열번호 22의 프라이머 쌍; 서열번호 23 및 서열번호 24의 프라이머 쌍; 및 서열번호 25 및 서열번호 26의 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 선택된 프라이머 쌍을 포함하는, 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV) 검출용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기의 프라이머 세트를 포함하는 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV) 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기의 조성물을 포함하는 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV) 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[0009] 상기 생물학적 시료에서, RNA를 추출하는 단계;

[0010] 상기 추출된 RNA를 제 10항의 키트로 상보적 DNA(complementary DNA, cDNA)로 합성하여 증폭하는 단계; 및

[0011] 상기 증폭된 cDNA를 나노포어 시퀀싱(nanopore sequencing)으로 서열 분석하는 단계;를 포함하는 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV) 감염 진단을 위한 정보제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍; 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 쌍; 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 쌍; 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 쌍; 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 쌍; 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머 쌍; 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머 쌍; 서열번호 15 및 서열번호 16의 프라이머 쌍; 서열번호 17 및 서열번호 18의 프라이머 쌍; 서열번호 19 및 서열번호 20의 프라이머 쌍; 서열번호 21 및 서열번호 22의 프라이머 쌍; 서열번호 23 및 서열번호 24의 프라이머 쌍; 및 서열번호 25 및 서열번호 26의 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 선택된 프라이머 쌍을 포함하는, 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV) 검출용 프라이머 세트를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기의 프라이머 세트를 포함하는 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV) 검출용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기의 조성물을 포함하는 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV) 검출용 키

트를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[0016] 상기 생물학적 시료에서, RNA를 추출하는 단계;

[0017] 상기 추출된 RNA를 제 10항의 키트로 상보적 DNA(complementary DNA, cDNA)로 합성하여 증폭하는 단계; 및

[0018] 상기 증폭된 cDNA를 나노포어 시퀀싱(nanopore sequencing)으로 서열 분석하는 단계;를 포함하는 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV) 감염 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV)의 현장 진단을 위하여, SEOV의 서열로부터, 단일 단계 RT-PCR 프라이머 서열을 제작하였으며, 단일 단계 RT-PCR로 증폭된 엠플리콘(amplicon) 기반의 나노포어 시퀀싱으로, 현장에서 SEOV의 신속한 감염 진단이 가능한 것을 확인하여, 바이러스 감염 현장 진단 분야에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명의 서울오르토한타바이러스 RNA 증폭용 프라이머 세트의 증폭 영역 및 증폭 결과를 나타낸 도이다(A: 프라이머 세트의 RNA 분절 증폭 영역, B: 단일 단계 RT-PCR 결과, C: 각 프라이머 세트의 증폭 효율 정량화).

도 2는 본 발명의 단일 단계 RT-PCR 기반 나노포어 시퀀싱으로 서울오르토한타바이러스의 전장 유전체 분석 및 경과 시간을 도식화한 도이다(A: 단일 단계 RT-PCR 과정 및 경과 시간, B: 나노포어 시퀀싱 과정 및 경과 시간).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 상세히 설명한다. 이하의 설명에 있어, 당업자에게 주지 저명한 기술에 대해서는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다.

[0022] 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0023] 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍; 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 쌍; 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 쌍; 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 쌍; 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 쌍; 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머 쌍; 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머 쌍; 서열번호 15 및 서열번호 16의 프라이머 쌍; 서열번호 17 및 서열번호 18의 프라이머 쌍; 서열번호 19 및 서열번호 20의 프라이머 쌍; 서열번호 21 및 서열번호 22의 프라이머 쌍; 서열번호 23 및 서열번호 24의 프라이머 쌍; 및 서열번호 25 및 서열번호 26의 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 선택된 프라이머 쌍을 포함하는, 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV) 검출용 프라이머 세트를 제공한다.

[0024] 본 발명의 "서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV)"는 서울바이러스라고 불리며, 오르토한타바이러스의 일종이다. SEOV는 설치류가 매개하여, 신증후군 출혈열(Hantavirus hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)를 유발하는 4종의 바이러스 중 하나로 알려져 있다. 자연 숙주로는 시궁쥐속의 설치류가 보균하고 있으며, 시궁쥐에게서 가장 흔하지만, 곰쥐에게서도 종종 발견된다. 쥐는 SEOV에 감염되어 있어도, 별다른 증상이 발생하지 않지만, 감염된 쥐의 체액(혈액, 타액, 오줌 등)이 사람에게 옮으면 출혈열이 발생하게 된다. 현재까지는 사람 대 사람으로 감염이 보고된 사례는 없으며, 쥐에서 감염된 경우만이 존재한다.

[0025] 본 발명에서 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 핵산의 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 핵산 주형의 가닥 복사를 위한 시작 지점

으로 기능하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.

[0026] 상기 프라이머 설계 시, 프라이머의 A, G, C, T 함량비, 프라이머 결합체(dimer) 형성 방지, 같은 염기 서열의 3회 이상 반복금지 등 여러 가지 제약이 따르며, 그 외에 단독 PCR 반응조건에 있어서 주형(template) DNA의 양, 프라이머의 농도, dNTP의 농도, Mg^{2+}의 농도, 반응온도, 반응시간 등의 조건이 적정해야 한다.

[0027] 상기의 프라이머는 기본 성질을 변화시키지 않은 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 즉 핵산 서열이 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형될 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 뉴클레오타이드의 하나 이상의 동족체로의 치환 및 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트 또는 카바메이트 등의 하전되지 않은 연결체나 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등의 하전된 연결체로의 뉴클레오타이드의 변형이 가능하다. 또한 핵산은 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그날 펩타이드, 폴리 L 리신 등의 단백질, 아크리딘 또는 프소랄렌 등의 삽입제, 금속, 방사성 금속, 철 산화성 금속 등의 킬레이트화제 및 알킬화제 등의 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기를 가질 수 있다.

[0028] 또한 본 발명의 프라이머 서열은 검출 가능한 시그널을 직접적 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 상기 프라이머는 분광학, 광화학, 생화학, 면역화학 또는 화학적 수단을 이용하여 검출될 수 있는 표지를 포함할 수 있다. 유용한 표지는 ^{32}P, 형광 염료, 전자 밀집 시약, 효소(일반적으로 ELISA 에 이용되는 것), 바이오틴 또는 합텐 및 항혈청 또는 단일클론성 항체가 이용 가능한 단백질을 포함한다.

[0029] 본 발명의 프라이머는 적절한 서열의 클로닝 및 제한효소 분해 및 나랭(Narang)등의 포스포트리에스테르 방법(1979, Meth, Enzymol. 68:90-99), 보카지(Beaucage)등의 디에틸포스포라미다이트 방법(1981, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862), 및 미국 특허 제 4458066호의 고형물 지지 방법과 같은 직접적인 화학적 합성법을 포함하는 임의의 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0030] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 서울 오르토한타바이러스는, RNA 바이러스인 것일 수 있고, 상기 RNA는 작은(small, S) 분절, 중간(medium, M) 분절 및 큰(large, L) 분절로 이루어진 것일 수 있다.

[0031] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 S 분절은, 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 쌍; 또는 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 쌍;으로 증폭되는 것일 수 있다.

[0032] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 M 분절은, 서열번호 5 및 서열번호 6의 프라이머 쌍; 서열번호 7 및 서열번호 8의 프라이머 쌍; 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머 쌍; 및 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 선택된 프라이머 쌍으로 증폭되는 것일 수 있다.

[0033] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 L 분절은 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머 쌍; 서열번호 15 및 서열번호 16의 프라이머 쌍; 서열번호 17 및 서열번호 18의 프라이머 쌍; 서열번호 19 및 서열번호 20의 프라이머 쌍; 서열번호 21 및 서열번호 22의 프라이머 쌍; 서열번호 23 및 서열번호 24의 프라이머 쌍; 및 서열번호 25 및 서열번호 26의 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 선택된 프라이머 쌍으로 증폭되는 것일 수 있다.

[0034] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 프라이머 세트는, 단일 단계 역전사 중합효소 연쇄반응(one-step revers transcription polymerase chain reaction, One-step RT-PCR)에 이용되는 것일 수 있다.

[0035] 본 발명의 "단일 단계 역전사 중합효소 연쇄반응(one-step revers transcription polymerase chain reaction, One-step RT-PCR)"은 역전사 중합효소 연쇄반응의 일종으로서, RNA의 상보적 DNA(complementary DNA, cDNA)를 합성한 후, 합성된 cDNA를 증폭하는 반응을 RT-PCR이라고 한다. 또한, RT-PCR에서, cDNA의 합성과 PCR 증폭까지의 전체 반응을 단일 튜브에서 진행되는 반응을 단일 단계 RT-PCR이라고 하며, 단일 단계 RT-PCR은 모든 효소반응을 포함하여, 실험적 변동을 최소활 할 수 있고, cDNA 산물을 PCR 반응에서 피펫팅하는 과정까지 생략하게 되어, 오염을 최소화하고 노동집약적인 분석 방법이다.

[0036] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 단일 단계 역전사 중합효소 연쇄반응의 증폭 산물은, 나노포어 시퀀싱(nanopore sequencing)으로 서열분석 되는 것일 수 있다.

[0037] 본 발명의 "나노포어 시퀀싱(nanopore sequencing)"은 DNA 또는 RNA와 같은 핵산의 염기서열을 결정하는 데 사용되는 3게대 염기서열 분석법으로서, 나노 크기의 작은 구멍에 단일가닥의 DNA 또는 RNA 시료를 통과시킬 때, 염기마다 다른 전류의 흐름 차이를 측정하여, 염기서열을 결정하는 분석 방법이다. 기존 2세대 염기서열 분석법

에서 필수적인 시료의 PCR 증폭과정 없이 단일 분자를 이용하여 염기서열을 분석할 수 있으며, 염기서열을 측정하기 위해 시료를 화학적으로 변형하지 않고 라이브러리 제작이 비교적 단순하며, 2세대 염기서열 분석법에 비해 저렴하고, 이동성이 용이하여 다양한 생물학적 연구, 현장 진단 방법에 활용되고 있다.

[0038] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV)는 신증후군 출혈열(Hantavirus hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)을 유발하는 것일 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 상기의 프라이머 세트를 포함하는 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV) 검출용 조성물을 제공한다.

[0041] 본 발명의 검출용 조성물은 SEOV에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있으며, 상기 조성물은 반응 증폭 혼합물을 더 포함할 수 있다. 반응 증폭 혼합물은 증폭 반응을 수행하기에 필요한 시약, 열 안정성 DNA 중합 효소, 데옥시뉴클레오티드, 뉴클레아제가 없는 멸균수 및 2가 금속 양이온을 함유하는 용액 등을 지칭하며, 바람직하게는 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드, DNA 중합효소를 포함할 수 있다. 상기 프로브의 말단에는 형광 물질 등의 리포터를 표지(labeling)할 수 있다.

[0043] 또한, 본 발명은 상기의 조성물을 포함하는 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV) 검출용 키트를 제공한다.

[0045] 또한, 본 발명은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계;

[0046] 상기 생물학적 시료에서, RNA를 추출하는 단계;

[0047] 상기 추출된 RNA를 제 10항의 키트로 상보적 DNA(complementary DNA, cDNA)로 합성하여 증폭하는 단계; 및

[0048] 상기 증폭된 cDNA를 나노포어 시퀀싱(nanopore sequencing)으로 서열 분석하는 단계;를 포함하는 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV) 감염 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

[0049] 상기 “증폭 반응”은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미하며, 재조합-중합효소 증폭법(Recombinase polymerase amplification, RPA), 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)으로, 역전사-중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediatedamplification; TMA) (WO88/10315), 자가유지염기서열복제(self sustained sequence replication) (WO90/06995), 타깃 폴리뉴클레오티드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CP-PCR), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-PCR), 핵산염기서열 기반 증폭 (nucleic acid sequence based amplification; NASBA), 가닥 치환 증폭 (strand displacement amplification) 및 고리-중재 항온성 증폭 (loop-mediated isothermal amplification; LAMP) 등의 증폭 방법일 수 있으며, 이에 한정되지는 않는다.

[0050] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 cDNA로 합성하여 증폭하는 단계는, 단일 단계 역전사 중합효소 연쇄반응(one-step revers transcription polymerase chain reaction, One-step RT-PCR)로 증폭되는 것일 수 있다.

[0051] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 생물학적 시료는, 혈액, 혈장, 혈청, 뇨, 눈물, 객담, 비분비물, 기관지 분비물, 기관지 세척액, 폐분비물, 및 폐포 세척액으로 이루어진 군에서 선택된 시료인 것일 수 있다.

[0053] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0055] **<실시예 1> 서울바이러스 RNA 나노포어 시퀀싱을 위한 준비**

[0056] **<1-1> 서울바이러스 RNA의 준비**

[0057] 본 발명의 나노포어 시퀀싱 기반, 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV)의 감염 진단을 위하여, SEOV의 RNA를 준비하였다. 구체적으로, SEOV 80-39 균주를 Vero E6 세포주(ATCC, DR-L2785)에 접종하였다. 세포는 5% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 1% HEPES 버퍼, 1% L-글루타민 및 0.1%의 젠타마이신(gentamicin)을 포함하는 Dulbecco's modi*?*ed Eagle's medium(DMEM)에서 37℃, 5% CO2 조건으로 배양하였으며, 2주 간격으로 세포를 강화화였다. SEOV 입자를 제조하기 위하여, 상등액을 수집하고, 총 RNA(total RNA)는 TRI Reagent LS Solution을 이용하여, BSL-2(biosafety level-2) 실험실에서 추출하였다.

[0059] **<1-2> 서울바이러스 RNA의 정량적 PCR**

[0060] cDNA는 OSM55(5'-TAG TAG TAG ACT CC-3') 및 High Capacity RNA-to-cDNA 키트(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여, 상기 실시예 1-1에서 추출한 RNA 1 μg을 이용하여 합성하였다. 정량적 PCR(quantitative PCR, qPCR)은 QuantStudio 5 Flex Real-Time PCR 시스템(Applied Biosystems) 및 SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems)를 사용하여 수행하였다. 반응 혼합물은 5μL SYBR Green PCR Master Mix, 0.5μL의 순방향 및 역방향 프라이머(각각 5nM) 및 4μL의 희석된 cDNA(1:1,000 비율)로 혼합하여, 최종 적으로 10 μL의 부피로 준비하였다. qPCR을 위한, SEOV 특이적 프라이머 서열은 SEOV-S719F(순방향): 5'-TGG CAC TAG CAA AAG ACT GG-3' 및 SEOV-S814R(역방향): 5'-CAG ATA AAC TCC CAG CAA TAG GA-3'을 이용하였다. PCR 조건으로는 95°C에서 10분 동안 초기 변성후, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분의 조건으로 45주기(cycle) 수행하였다. 바이러스 RNA의 카피 수는 선형 회귀 곡선의 공식을 사용하여 계산하였다.

[0062] **<1-3> 서울바이러스 진단을 위한 단일 단계 RT-PCR 프라이머 설계**

[0063] 2023.05.23.일까지 NCBI(National Center for Biotechnology Information) GenBank에서 공개된 모든 SEOV의 전장 유전체 중, S(small) 분절 79개, M(medium) 분절 62개 및 L(large) 분절 22개의 염기서열을 범용 프라이머 설계를 위하여 다운로드하였다. 그 후 SEOV 삼중 게놈의 바이러스 서열은 Lasergene(ver 5; DNASTAR Inc., Madison, WI, USA)의 Clustal W 알고리즘을 사용하여 정렬하였다. 그 후 정렬에서 보존된 영역을 [앰플리콘 길이 약 0.8-1.5kb 및 앰플리콘 > 70bp 사이의 중첩]의 기준으로 선별하여, 프라이머 후보로 선택하였다.

[0065] **<1-4> 단일 단계 RT-PCR**

[0066] 본 발명의 SEOV의 RNA를 증폭하기 위하여, 단일 단계 RT-PCR(one-step RT-PCR)을 수행하였다. 구체적으로, Superscript™ IV One-step RT-PCR System(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하였으며, 12.5 μl 2X Platinum SuperFi RT-PCR 마스터 믹스, 8.75 μl 뉴클레아제가 없는 물(Nuclease-free water), 0.25μl Super Script IV RT 믹스 및 상기 실시예 1-3에서 선택된 프라이머 세트를 각각 12.5 nM 혼합하여, 단일 단계 RT-PCR을 수행하였다. 그 후 cDNA의 합성은 50℃에서 30분, 94℃에서 2분동안 수행하였다. 그 후 94℃에서 30초, 45℃에서 30초, 72℃에서 15분의 조건으로, 45 사이클(cycle) 반응시켜, PCR 산물을 수득하였다. PCR 산물의 농도는 nanodrop(Invitrogen)을 사용하여 측정하였으며, 복제물(앰플리콘, amplicon)은 나노포어 시퀀싱의 라이브러리 준비를 위하여, 단일 혼합물(single mixture)로 풀링(pooled)하였다.

[0068] **<1-5> 라이브러리 준비 및 나노포어 시퀀싱**

[0069] 상기 실시예 1-4에서 풀링된 엠플리콘로 라이브러리를 제조하였으며, Ligation Sequencing Kit V14(SQK-LSK114; ONT, London, UK)를 사용하여, 1시간 이내로 라이브러리를 준비하였다. 그 후 라이브러리에 어댑터(adapter)를 연결하고, FLO-MIN114(R10.4) 플로우 셀(flow cell, ONT)을 로드하였다. 그 후 로우데이터(raw data)에서 총 30,000개의 리드(read)가 생성될 때까지, 라이브러리를 local laptop (Apple MacBook Pro, 2021)을 사용하여, 휴대용 MK1B (ONT) 장치로, 시퀀싱하였다.

[0071] **<1-6> 생물정보학 분석**

[0072] 로우 신호 데이터(raw signal data)는 Guppy(v3.0.3)에 의하여, 실시간으로 호출되고, 어뎁터의 염기서열을 편집하였다. 데이터의 신뢰도를 증가시키기 위하여, Q-score가 8 이상인 리드가 후속 분석에 이용되었으며, 필터링된 리드는 Porechop(v.9.0)을 사용하여 단일 FASTQ에 통합시켰다. 잔여 프라이머 및 키메라 서열을 제거하기 위하여 20 bp 내지 2 kb 범위에서 필터링을 수행하였으며, 컨센서스 시퀀스(consensus sequences)는 KU-ONT-SEOV-컨센서스 모듈을 사용하여 추출하였다. 상기 모듈은 판독값을 SEOV80-39 균주의 참조 게놈 서열의 각 세그먼트에 매핑하였으며, 게놈 정렬의 변형은 Medaka를 사용하여 호출한 후, 변형 품질(variant quality) 및 시퀀싱 깊이(sequencing depth)를 기반으로 bcftool을 이용하여 필터링하였다. 게놈 폴리싱은 오류 리드가, 정렬에서 사소한 변이(minor variants)일 때, 단일 중합체부위에서 기계적 인델 오류(mechanical indel error)를 제거하기 위해 수행되었다. 컨센서스 시퀀스는 참조 게놈 시퀀스(reference genomic sequence)를 기반으로, 호출된 변이체에서, 커버리지(coverage) 깊이가 충분하지 않은 위치는 제외되고 bedtools를 사용하여 'N'으로 표시하였다.

[0074] **<실시예 2> SEOV용 범용 프라이머 선택**

[0075] 참조 게놈(reference genome)의 정렬을 기반으로, SEOV의 S, M 및 L 분적의 전체 길이 게놈 서열에대한 13개의 범용 프라이머 쌍(SEOV ONT 프라이머 세트)을 선택하였다(도 1A 및 표 1). 모든 프라이머 쌍의 특이성은 SEOV 80-39 RNA의 Sanger 시퀀싱을 사용하여 검증하였다(도 1B). 프라이머는 SEOV 3분절의 게놈 중 다른 위치에는 결합하지 않았으며, SEOV 게놈의 앰플리콘 간의 증폭 편향을 확인하였다(도 1C).

표 1

[0076]

복제물 코드	프라이머	서열번호	염기서열(5`-3`)	산물 크기(bp)
S1	SEOV_ONT_S1F	1	TAG TAG TAG ACT CCC TAA ARA G	974
	SEOV_ONT_S1R	2	CCA GCA AAC ACC CAT ATT GA	
S2	SEOV_ONT_S2F	3	CAA GGT GCA CTT GCA GGR ATG GAG CC	917
	SEOV_ONT_S2R	4	TAG TAG TAT GCT CCC TAA AAA GAC	
M1	SEOV_ONT_M1F	5	TAG TAG TAG ACT CCG CAA G	1017
	SEOV_ONT_M1R	6	GTT GAT GAG TAT GAT GGR ATR CCT GC	
M2	SEOV_ONT_M2F	7	TAC CAG ATT TCA GGG CAG ATA GAG GC	1405
	SEOV_ONT_MFR	8	CAT ACT CAT AAT CTT TCT CAA AAT GRC	
M3	SEOV_ONT_M3F	9	ACA GAR ACT GCA ATT CAG GCA C	1187
	SEOV_ONT_M3R	10	TGG AGC CCT ACT TTA CAA GG	
M4	SEOV_ONT_M4F	11	CCT TGT AAA GTA GGG CTC CA	1008
	SEOV_ONT_M4R	12	TAG TAG TAT GCT CCG C	
L1	SEOV_ONT_L1F	13	TAG TAG TAG ACT CCG GAA G	1227
	SEOV_ONT_L1R	14	ATT TTC TCK AGG TTC ATG TTG AC	
L2	SEOV_ONT_L2F	15	GCC TGC ATT CAA TTT TTA AAC CTC	1150
	SEOV_ONT_L2R	16	ATA CCR CTT GCA CCA ACT GTA GA	
L3	SEOV_ONT_L3F	17	GTG CAA TCT TTG AYA ACC TAA GGT ATC	1106
	SEOV_ONT_L3R	18	GTG AAT CGC CTG AAT TTH GCT G	
L4	SEOV_ONT_L4F	19	CAG AAG GCA CAA GCT AGR ATT GT	1352
	SEOV_ONT_L4R	20	TCR TGC TGA AAT GTC TCA CCR G	
L5	SEOV_ONT_L5F	21	AGT AAG GTT GAG AGA TTA TAT GGG AC	1269
	SEOV_ONT_L5R	22	CTT CAA ACC ATA ATG CAT GGA ACC	
L6	SEOV_ONT_L6F	23	GTT ATG TAT TGA RGT TTG GAG GTG GGC	868
	SEOV_ONT_L6R	24	CAC GAT TCA TTA TTA ATG AAT AAG CAG C	
L7	SEOV_ONT_L7F	25	CAT ACT ATC CGT GAT GTT CG	913
	SEOV_ONT_L7R	26	TAG TAG TAT GCT CCG GAA RAT G	

[0078] **<실시예 3> SEOV의 전장 유전체 시퀀싱**

[0079] SEOV의 전장 유전체 시퀀싱을 위하여, 단일 단계 RT-PCR 기반 나노포어 시퀀싱의 과정 및 시간은 도 2에 나타내었다. SEOV는 최소 1개 이상의 바이러스 카피(copy)가 포함된 샘플에서 수득하였으며, 각 분적의 평균 깊이

(depth)가 1200 x 이상인 경우, SEOV의 3개 분절의 초기 적용률은 S 분절은 98.41%, M 분절은 99.23% 및 L 분절은 99.57% 였다(표 2). 전장 유전체 키퀀싱을 위하여, 3` 말단 및 5` 말단의 서열을, Hantaviridae 과의 보존 영역으로 대체하였으며, KU-ONT-SEOV-consensus 모듈을 사용한 MinION 시퀀싱의 정확도는, Sanger 방법에 의해 생성된 SEOV의 전장 유전체 서열과 비교하여, 99.75 내지 100%범위의 상동성을 확인하였다.

표 2

SEOV RNA copy number (copies/μL)	Raw data size (no. of total reads)	Reads mapped to reference sequence (%)[a]	Segment	Average depth[b]	Coverage rate (%)		Accuracy (%)[e]
					Initial[c]	Polished[d]	
10^4 to10^5	67.2 Mb (29,306)	28,692 (97.9)	S	1,396.52	98.42	100	100
			M	2,068.61	99.23	100	100
			L	2,689.96	99.57	100	99.97
10^3 to10^4	47.3 Mb (29,760)	29,196 (98.1)	S	1,357.42	98.42	100	100
			M	1,424.74	99.23	100	100
			L	1,760.08	99.57	100	99.97
10^2 to10^3	52.7 Mb (28,958)	28,376 (98.0)	S	1,229.83	98.42	100	100
			M	1,513.11	99.23	100	100
			L	2,523.28	99.57	100	99.97
10 to10^2	66.5 Mb (29,234)	28,517 (97.5)	S	1,507.81	98.42	100	100
			M	1,935.45	99.23	100	100
			L	2,888.58	99.57	100	99.95
1 to 10	62.8 Mb (29,626)	29,231 (98.7)	S	1,461.45	98.42	100	100
			M	1,671.79	99.23	100	100
			L	2,851.83	99.57	100	99.95
0 to 1	84.6 Mb (29,527)	28,802 (97.5)	S	2,181.32	98.42	100	100
			M	2,415.84	99.23	100	99.75
			L	1,970.87	99.57	100	99.92

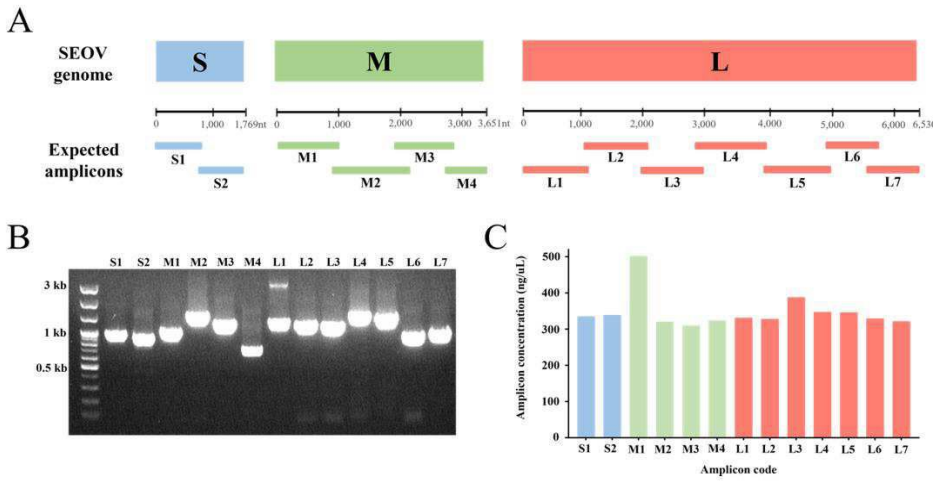
[a] Viral reads mapped to a reference sequence were calculated using the SEOV 80-39 strain generated from Sanger sequencing.
[b] Sequencing depth was calculated by the following formula (average read length × number of reads matching the reference/reference genome size).
[c] Initial coverage rate was calculated from raw data of consensus sequences using the KU-ONT-SEOV consensus module.
[d] The modified coverage rate was calculated from consensus sequences that were polished using both 3' and 5' termini sequence determination.
[e] The accuracy of SEOV genomic sequences from nanopore sequencing was compared to SEOV 80-39 strain generated from Sanger sequencing in this study.

[0080]

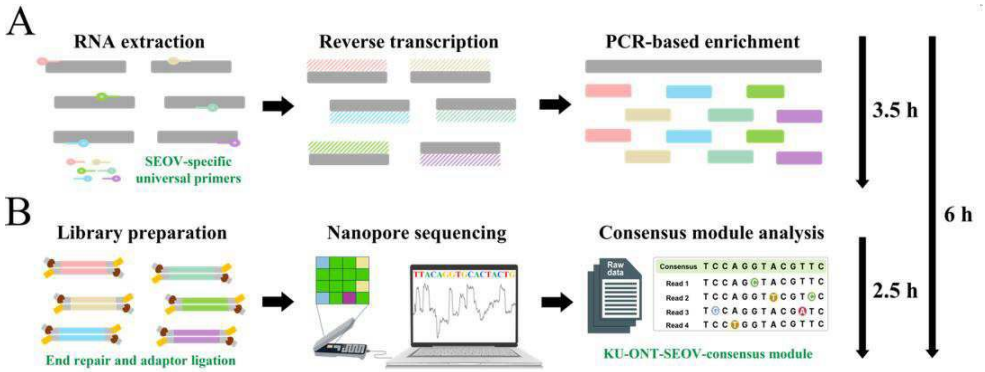
[0082] 따라서, 본 발명은 서울 오르토한타바이러스(Seoul orthohantavirus, SEOV)의 현장 진단을 위하여, SEOV의 서열로부터, 단일 단계 RT-PCR 프라이머 서열을 제작하였으며, 단일 단계 RT-PCR로 증폭된 엠플리콘(amplicon) 기반의 나노포어 시퀀싱으로, 현장에서 SEOV의 신속한 감염 진단이 가능한 것을 확인하였다.

도면

도면1


A
SEOV genome
S
M
L
Expected amplicons
S1
S2
M1
M2
M3
M4
L1
L2
L3
L4
L5
L6
L7
B
3 kb
1 kb
0.5 kb
C
Amplicon concentration (ng/uL)
Amplicon code

도면2


A
RNA extraction
Reverse transcription
PCR-based enrichment
SEOV-specific universal primers
3.5 h
B
Library preparation
Nanopore sequencing
Consensus module analysis
End repair and adaptor ligation
KU-ONT-SEOV-consensus module
2.5 h
6 h

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.