



(11) 공개번호 10-2017-0042077

(43) 공개일자 2017년04월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01) G01N 21/552 (2014.01)
G01N 33/569 (2017.01)

- (52) CPC특허분류
C12Q 1/701 (2013.01)
G01N 21/553 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0141544

(22) 출원일자 2015년10월08일

심사청구일자 2015년10월08일

- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)

한국과학기술연구원

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

- (72) 발명자

구만복

서울특별시 동대문구 천장산로9가길 25-3 (이문동)

뉴엔 반 투안

서울특별시 성북구 인촌로 7다길 16, B102호 (안암동1가)

(뒷면에 계속)

- (74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 18 항

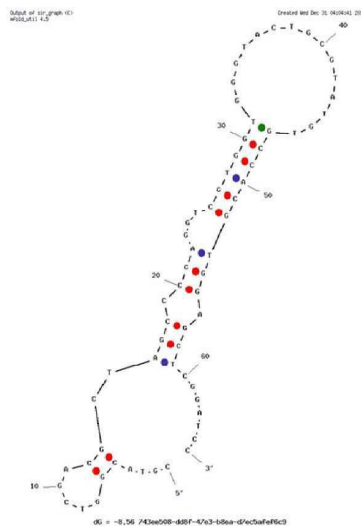
- (54) 발명의 명칭 조류독감바이러스에 특이적으로 결합할 수 있는 애포머 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 조류독감바이러스에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 특이적으로 결합하는 멀티플 핵산 앵타머, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

본 발명의 핵산 앵타머 및 이를 이용한 바이오센서는 높은 민감도와 정확성으로 조류독감바이러스를 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 고병원성과 저병원성의 조류독감바이러스를 구별할 수 있어 유용하다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

G01N 33/56983 (2013.01)

C12Q 2525/205 (2013.01)

C12Q 2565/628 (2013.01)

(72) 발명자

서호빈

서울특별시 성북구 인촌로24길 32, 605호 (안암동 5가, 철보빌딩)

송창선

경기도 안양시 동안구 관평로 68, 706동 802호 (평촌동, 꿈마을한신아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2E25722

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국과학기술연구원

연구사업명 Open Research Program

연구과제명 AI 상시 모니터링 및 현장 정밀 확진 센서 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국과학기술연구원

연구기간 2015.01.01 ~ 2015.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 18 중 어느 하나의 염기서열을 가지는, 조류독감바이러스에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머:

여기서, 상기 핵산 앵타머가 RNA인 경우에는 상기 핵산서열에서 T는 U임을 특징으로 함.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조류독감바이러스는 H5N1, H5N2 및 H5N8로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 핵산 앵타머.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 핵산 앵타머는 서열번호 1, 3, 6, 7, 8 및 15로 구성된 군에서 선택되고, H5N1, H5N2 및 H5N8에 모두 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 핵산 앵타머.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 핵산 앵타머는 서열번호 5, 11 및 13으로 구성된 군에서 선택되고, H5N1 및 H5N8에 모두 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 핵산 앵타머.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 핵산 앵타머는 서열번호 14로 표시되고, H5N1 및 H5N2에 모두 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 핵산 앵타머.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 핵산 앵타머는 서열번호 4 또는 16으로 표시되고, H5N1에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 핵산 앵타머.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 핵산 앵타머는 서열번호 17로 표시되고, H5N8에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 하는 핵산 앵타머.

청구항 8

제1항의 핵산 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 조류독감바이러스의 검출방법.

청구항 9

제1항의 핵산 앵타머 2종류 이상과 샌드위치 방식을 이용하여, 시료 중 조류독감바이러스를 검출하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 샌드위치 방식은 조류독감바이러스의 서로 다른 부위에 결합하는 것을 특징으로 하는 조류독감바이러스를 검출하는 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 핵산 앵타머는 서열번호 1 및 서열번호 9로 표시되거나, 서열번호 3 및 서열번호 7로 표시되는 핵산 앵타머인 것을 특징으로 하는 조류독감바이러스를 검출하는 방법.

청구항 12

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 시료는 물, 토양, 폐기물, 식품, 동식물 장내 및 동식물 조직, 동식물 분변 중 어느 하나 이상에서 채취된 것임을 특징으로 하는 검출방법.

청구항 13

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 검출은 표면 플라스몬 공명(Surface Plasmon Resonance, SPR) 장비로 검출하는 것을 특징으로 하는 검출방법.

청구항 14

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 조류독감바이러스 검출용 조성물.

청구항 15

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 조류독감바이러스 검출용 센서.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 센서는 고병원성 조류독감바이러스 및 저병원성 조류독감바이러스를 구별할 수 있는 것을 특징으로 하는 조류독감바이러스 검출용 센서.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 고병원성 조류독감바이러스는 H5N1 또는 H5N8이고, 저병원성 조류독감바이러스는 H5N2인 것을 특징으로 하는 조류독감바이러스 검출용 센서.

청구항 18

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 조류독감바이러스 검출용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 조류독감바이러스에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 특이적으로 결합하는 멀티플 핵산 앵타머, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 핵산 앵타머 및 이를 이용한 바이오센서는 높은 민감도와 정확성으로 조류독감 바이러스를 검출할 수 있어, 조류독감의 검출에 유용하다.

배경 기술

[0003] 조류독감 바이러스의 감염이나 호흡기 질환을 발병시키는 고병원성 H5N1바이러스는 닭, 오리, 칠면조 및 야생조류 등에 감염되는 급성 바이러스성 질병으로 병원성이 없는 것으로부터 치사율이 100%인 고병원성까지 다양하게 있으며 고병원성 조류독감(가금 인플루엔자 바이러스)는 국내에서 제1종 법정 전염병으로 OIE(국제 수역사무국)에서는 요주의 전염병으로 분류하고 있다. 병원체인 조류독감 바이러스는 인수 공통바이러스로 병원성에 따라 고병원성, 저병원성, 약병원성, 비병원성으로 구별되고 혈청형(HA단백 15종, NA단백 9종)에 따라 135종으로 분류되고 최근 사람에게 전파된 조류독감 바이러스는 H5N1와 H9N2이다. 주로 비, 공기, 물등에 의해 전파되거나 주 전파용인은 바이러스에 오염된 분변으로 사람의 손, 발, 사료 차, 기구, 장비등에 분변이 묻어 간접적으로 전파된다.

[0004] 기존 바이오센서 분야에서 이용되는 다양한 감지물질 중 민감도 면에서 우위에 있는 것이 항체를 이용한 타겟물질의 검출이다. 이는 검출하고자하는 타겟물질(항원)을 동물의 몸에 주입하여 생체의 면역시스템을 통해 만들어지는 항체를 확보한 후 정제 과정을 거치기 때문에 시간이 많이 들고 고비용이라는 점이 첫 번째 문제점이라 할 수 있다. 또한 타겟물질에 있어 제약이 거의 없는 앵타머에 비해 항원으로 사용할 수 있는 타겟물질이 제한적이어서 독성물질과 같은 저분자 화학물질들에 대한 항체의 제작에 어려움이 있다. 일반적으로 항체는 그 크기가 100K Da 이상인 매우 큰 단백질이기 때문에 전기화학 기반 등의 바이오센서로 응용 시에 신호 검출 부분에 있어 제약이 있고, 열 안정성이 DNA나 다른 화학물질에 비해 현저히 떨어지는 문제가 있다. 그러므로 기존의 혈중 바이오마커의 진단에 있어 항체를 이용한 기술은 비용과 시간 면에서 효율적이지 않고, 적용범위가 다양하지 않으며 바이오센서로 응용하는 데에 있어 제한적인 문제점들이 있다. 이러한 문제점들을 개선하기 위한 새로운 감지물질로서 다양한 타겟물질에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 핵산 구조체인 앵타머를 이용하는 연구가 많이 이루어지고 있다.

[0005] 앵타머(aptamer)는 10^{12-14} 정도의 다양성을 가지는 랜덤 핵산 라이브러리로부터 얻어지는 특정 타겟에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA 또는 RNA 분자 구조체를 말한다. 또한, 앵타머는 센서 분야에서 이용되는 기존의 감지물질인 항체와는 달리 핵산구조체 이므로 열 안정성이 우수하며, 시험관내(in vitro)에서 합성되기 때문에, 동물이나 세포가 따로 필요하지 않아 생산 비용 면에서도 경제적이며, 타겟 물질에 제약이 없어 바이러스, 단백질, 아미노산 같은 생분자 물질부터 환경호르몬, 항생제, 잔류 의약품 등의 저분자 유기화학 물질, 박테리아, 바이러스 등의 다양한 타겟에 대한 앵타머를 합성할 수 있다. 따라서 다양한 타겟 물질에 대한 앵타머가 만들어지고 있으며, 표적 물질과 특이성과 강한 친화도를 가지고 결합하는 앵타머의 특성으로 인해 최근 들어 앵타머를 신약 개발, 약물 전달 시스템 그리고 바이오센서 등에 응용하는 많은 연구가 이루어지고 있다.

[0006] 앵타머 개발 방법에 있어서 가장 중요한 요소는 타겟에 결합한 DNA(혹은 RNA)와 결합하지 않은 DNA를 구별하는 것인데 이를 위하여 일반적으로 타겟을 고정하거나 DNA 랜덤 라이브러리를 고정하여 DNA를 구별하는 연구를 진행해왔다. 그러나 이러한 고정화 방식의 가장 큰 어려움은 고정화 수율이 낮을 수 있다는 점이고 고정화 수율 자체를 분석하는데 많은 비용과 시간이 소모되고 있다는 점이다. 또한 고정화에 사용되는 분리용 물질(자성 비드, 컬럼 등)에 DNA가 직접 결합할 가능성을 완전히 배제할 수 없다는 점과 분리용 물질에 고정된 타겟에 결합한 DNA를 다시 분리 해내는 과정에서 나타날 수 있는 DNA 풀 손실의 가능성 등은 고정화 방식의 한계이자 문제점으로 남아 있다. 특히 DNA 라이브러리를 고정하는 방식에서 발생할 수 있는 낮은 DNA 고정율 문제는 앵타머 개발 과정에서 피해야 하는 가장 중요한 손실인 DNA 풀의 손실과 직결되어 큰 한계점이 된다. 그 외에도 고정화 자체가 어려운 중금속 이온 등은 고정화 방식으로는 앵타머를 개발하기가 어려워 고정화 방식에는 타겟 선정에도 제약이 있을 수 있다. 그러나 비고정화 방식의 앵타머 개발 기술을 이용하게 되면 위에서 열거한 모든 한계를 극복할 수 있으며 타겟의 결합부위가 제한적이지 않기 때문에 앵타머 개발에 필요한 선별 과정 반복 횟수를

줄일 수 있는 장점도 가지고 있다. 그렇기 때문에 비고정화 방식으로 앵타머를 개발할 수 있는 기술 발명을 위해 종래에 미세전자기계 시스템(MEMS), 모세관 전기이동 시스템(Capillary Electrophoresis) 기술 등이 활용되었으나 고가의 장비, 장치 사용의 복잡성, 숙련된 인력의 필요성 등은 여전히 문제점으로 남아있다. 한편, 그래핀은 2차원 구조의 탄소 구조체로서 열안정성, 전기적 특성 및 강도가 매우 우수하며 단일가닥 DNA의 염기 부분과 π -스태킹을 통해 결합하기 때문에 이러한 특성들을 응용한 광범위한 연구가 실시되고 있다.

[0007] 샌드위치 타입의 바이오센서의 경우 하나의 타겟물질에 대하여 서로 다른 부위에 결합하는 두개의 다른 리셉터 물질이 필요하다. 샌드위치 타입의 바이오센서는 센서의 민감도 향상을 시킬 수 있는 수단이 형광물질, 양자점, 방사능 표지, 금 나노입자, 효소, 효소 기질, 및 전기화학적 작용기 (electrochemical functional group)로 표지 함으로써 다양하여 광범위하게 사용된다. 따라서 앵타머를 사용한 샌드위치 타입의 바이오 센서는 하나의 타겟물질의 다른 부위에 결합하는 2중 이상의 듀얼 앵타머가 반드시 필요하다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 핵산 구조체인 DNA 앵타머를 개발하였다. 또한 상기 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 특이적으로 결합 가능한 듀얼 DNA 앵타머를 포함하는 조성물과 이를 이용한 샌드위치 타입의 바이오 센서를 활용하여 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8을 효과적으로 검출할 수 있는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 조류독감바이러스에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머를 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 핵산 앵타머를 이용한 조류독감바이러스의 검출방법을 제공하는데 있다.
- [0012] 본 발명의 또다른 목적은 상기 핵산 앵타머를 포함하는 조류독감바이러스 검출용 조성물, 검출용 센서 및 검출용 키트를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 18 중 어느 하나의 염기서열을 가지는, 조류독감바이러스에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머를 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 조류독감바이러스의 검출방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머 2종류 이상과 샌드위치 방식을 이용하며, 시료 중 조류독감바이러스를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, 핵산 앵타머를 포함하는 조류독감바이러스 검출용 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명은 또한, 핵산 앵타머를 포함하는 조류독감바이러스 검출용 센서를 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한, 핵산 앵타머를 포함하는 조류독감바이러스 검출용 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 조류독감바이러스 검출용 핵산 앵타머, 이를 포함하는 조류독감바이러스의 검출방법, 검출용 조성물, 검출용 센서 및 검출용 키트는 높은 정확도와 민감성으로 시료 중 조류독감바이러스를 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 고병원성과 저병원성의 조류독감바이러스를 구별할 수 있어 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0023]

도 1은 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머 제조 과정의 모식도이다.

도 2는 각 selection round 에서부터 얻어진 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 결합하는 ssDNA 의 양이 증가함을 보여주는 그래프이다.

도 3은 본 발명에 따른 서열번호 1의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에 따른 서열번호 2의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 서열번호 3의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명에 따른 서열번호 4의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명에 따른 서열번호 5의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명에 따른 서열번호 6의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명에 따른 서열번호 7의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명에 따른 서열번호 8의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명에 따른 서열번호 9의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명에 따른 서열번호 10의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명에 따른 서열번호 11의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명에 따른 서열번호 12의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명에 따른 서열번호 13의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명에 따른 서열번호 14의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 17은 본 발명에 따른 서열번호 15의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 18은 본 발명에 따른 서열번호 16의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 19는 본 발명에 따른 서열번호 17의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 20은 본 발명에 따른 서열번호 18의 핵산 앵타머의 2차 구조를 나타낸 것이다.

도 21은 본 발명에 따른 DNA 앵타머 서열번호 1 내지 서열번호 18을 이용한 다양한 검출시료의 자기공명장치인 SPR(Surface Plasmon Resonance) 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 22는 본 발명에 따른 핵산 앵타머를 2종 사용하여 조류독감바이러스를 검출한 측정 결과이다.

도 23은 본 발명에 따른 핵산 앵타머를 포함하는 바이오센서의 개념도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024]

다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0026]

본 발명에서는, 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 특이적으로 결합 가능한 핵산 앵타머를 선별하기 위하여 GO SELEX 프로세스를 수행하였다. 그 결과 서열번호 1 내지 18로 표시되는 핵산 앵타머가 상기 조류독감바이러스에 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다.

[0027]

즉, 본 발명의 일 실시예에서는, 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 GO SELEX 프로세스를 이용하여 선별하였다. 본 발명에 사용된 GO SELEX 프로세스는 임의적으로 합성된 DNA 또는 RNA의 집합에서 특정 분자에 대해 높은 결합력을 지니는 DNA 또는 RNA를 선별하여 증폭시킴으로써 해당 분자의 DNA 결합 서열을 알아내는 방법(J.W. Park, R.Tatavarty, D.W.Kim, H.T.Jung and M.B.Gu (2012), Immobilization-free screening of aptamers assisted by graphene oxide, Chemical Communications, 48,15,2071-2073)을 말한다.

- [0028] 본 발명의 용어 "GO SELEX 프로세스"란 임의적으로 합성된 DNA 또는 RNA의 집합에서 특정 분자에 대해 높은 결합력을 지니는 DNA 또는 RNA를 선별하여 증폭시킴으로써 해당 분자의 DNA 결합 서열을 알아내는 방법을 말한다.
- [0029] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1 내지 18 중 어느 하나의 염기서열을 가지는, 조류독감바이러스에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 앵타머가 RNA인 경우에는 상기 핵산서열에서 T는 U임을 특징으로 할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 조류독감바이러스는 H5N1, H5N2 및 H5N8로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 앵타머는 서열번호 1, 3, 6, 7, 8 및 15로 구성된 군에서 선택되고, H5N1, H5N2 및 H5N8에 모두 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 앵타머는 서열번호 5, 11 및 13으로 구성된 군에서 선택되고, H5N1 및 H5N8에 모두 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0034] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 앵타머는 서열번호 14로 표시되고, H5N1 및 H5N2에 모두 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 앵타머는 서열번호 4 또는 16으로 표시되고, H5N1에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 상기 핵산 앵타머는 서열번호 17로 표시되고, H5N8에 특이적으로 결합하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 핵산 앵타머가 특이적으로 결합하는 조류독감바이러스를 정리하면 하기의 표 1과 같다.

표 1

[0039] 조류독감바이러스 종류 및 특이적 앵타머 서열의 조합

서열번호	앵타머 서열	결합하는 조류독감바이러스
서열번호 1, 3, 6, 7, 8, 15	IF1, IF4, IF9, IF10, IF12, IF21	H5N1, H5N2, H5N8
서열번호 5, 11, 13	IF7, IF15, IF19	H5N1, H5N8
서열번호 14	IF20	H5N2, H5N8
서열번호 4, 16	IF6, IF22	H5N1
서열번호 17	IF23	H5N8

- [0040] 본 발명의 앵타머는 또한 이 기술분야에서의 자체 공지 방법에 의해 화학 합성할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 앵타머는, 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 대한 결합성, 안정성 등을 높이기 위해, 각 뉴클레오타이드의 당 잔기(예, 리보오스나 디옥시리보스)가 수식된 것이어도 좋다. 당잔기에서 수식되는 부위로서는, 예컨대 당잔기의 2'부위, 3'부위 및/또는 4'부위의 산소원자를 다른 원자로 치환한 것 등을 들 수 있다. 수식의 종류로서는, 예컨대 플루오로화, O-알킬화(예, O-메틸화, O-에틸화), O-알릴화, S-알킬화(예, S-메틸화, S-에틸화), S-알릴화, 아미노화(예, -NH)를 들 수 있다. 이러한 당잔기의 변형은, 자체 공지 방법에 의해 행할 수 있다(예컨대 Sproat *et al.*, (1991) *Nucle. Acid. Res.* 19, 733-738; Cotton *et al.*, (1991) *Nucl. Acid. Res.* 19, 2629-2635; Hobbs *et al.*, (1973) *Biochemistry* 12, 5138-5145 참조).
- [0042] 본 발명의 앵타머는 또한 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 대한 결합성 등을 높이기 위해, 핵산염기(예, 푸린, 피리미딘)가 변형(예, 화학적 치환)된 것이어도 좋다. 이러한 변형으로서, 예컨대 5부위 피리미딘 변형, 6 및/또는 8부위 푸린 변형, 환외(環外) 아민에서의 변형, 4-티오우리딘으로의 치환, 5-브로모 또는 5-요오드-우리실로의 치환을 들 수 있다.
- [0043] 또한, 뉴클레아제 및 가수분해에 대하여 내성을 갖도록, 본 발명의 앵타머에 포함되는 인산기가 변형되어 있어도 좋다. 예컨대 P(O)O기가, P(O)S(티오에이트), P(S)S(디티오에이트), P(O)NR₂(아미테이트), P(O)R, R(O)OR', CO 또는 CH₂(포름아세탈) 또는 3'-아민(-NH-CH₂-CH₂-)으로 치환되어 있어도 좋다 [여기서 각각의 R 또는 R'은 독

립적으로, H이거나, 또는 치환되어 있거나, 또는 치환되어 있지 않은 알킬(예, 메틸, 에틸)이다]. 연결기로서는, -O-, -N- 또는 -S-가 예시되고, 이들의 연결기를 통하여 인접하는 뉴클레오타이드에 결합할 수 있다.

[0045] 본 발명에서의 변형은 또한, 컵핑과 같은 3' 및 5'의 변형을 포함하여도 좋다.

[0046] 변형은 또한, 폴리에틸렌글리콜, 아미노산, 펩티드, inverted dT, 핵산, 뉴클레오타이드, 미리스토일(Myristoyl), 리소콜릭-올레일(Lithocolic-oleyl), 도코사닐(Docosanyl), 라우로일(Lauroyl), 스테아로일(Stearoyl), 팔미토일(Palmitoyl), 올레오일(Oleoyl), 리놀레오일(Linoleoyl), 그 외 지질, 스테로이드, 콜레스테롤, 카페인, 비타민, 색소, 형광물질, 향암제, 독소, 효소, 방사성 물질, 비오틴 등을 말단에 부가함으로써 행해질 수 있다. 이러한 변형에 대해서는, 예컨대 미국특허 제5,660,985호, 미국특허 제5,756,703호를 참조한다.

[0047] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 제조방법을 제공한다:

[0048] a) 양끝에 PCR용 프라이머 영역을 포함하고 중앙에 30 내지 50개의 임의의 염기를 가지는 단일가닥 핵산 풀(pool)과 타겟물질 또는 카운터 타겟물질을 완충용액에서 혼합하여 상온에서 결합을 유도하는 단계;

[0049] b) 상기 혼합액과 그래핀을 반응시켜 타겟물질과 결합한 또는 카운터 타겟물질에 결합하지 않는 단일가닥 핵산을 제거하는 단계

[0050] c) 상기 단계에서 얻은 타겟물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥 핵산에 대해 상기 PCR용 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하여 증폭시키는 제3단계

[0051] d) 상기 타겟물질에 특이적으로 결합하는 단일가닥 핵산에 대해 타겟물질과 카운터 타겟물질을 이용하여 그래핀 기반 선별(selection) 및 카운터 선별(counter selection)하는 과정을 반복 수행하는 단계

[0052] e) 상기 그래핀 기반 카운터 선별 단계에서 카운터 타겟물질에 결합하는 타겟 비특이적인 단일가닥 핵산을 제거하고, 그래핀에 결합된 타겟 특이적인 단일가닥 핵산에 대해 타겟에 의한 배좌 변위(Conformational change)를 유발시켜 그래핀으로부터 타겟 특이적인 앵타머를 분리하는 단계.

[0053] 본 발명의 방법에서, 상기 d) 단계에서 프라이머 쌍 중 하나에 플루오레세인(fluorescein)이 붙여진 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 후, 전기영동을 통해 기 변성된 단일가닥 DNA를 분리하는 단계를 더 포함하는 것 특징으로 한다.

[0055] 본 발명은 또한, 본 발명의 핵산 앵타머를 포함하는 조류독감바이러스 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0056] 본 발명의 조류독감바이러스 검출용 조성물은 조류독감바이러스를 검출하기 위한 것으로, 조류 분변의 조류독감 바이러스에 따라 조류독감 감염의 진단을 판별할 수 있다. 따라서, 조류독감바이러스의 검출을 위해 본 발명의 핵산 앵타머를 이용하여 어떠한 형태로도 사용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 핵산 앵타머를 자성비드에 고정화시켜 조류독감바이러스를 결합시키게 되면 결합된 DNA 앵타머- 조류독감바이러스 복합체(complex)를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 조류독감바이러스를 분리함으로써 조류독감바이러스만을 선택적으로 검출할 수 있게 된다.

[0057] 본 발명의 조성물을 이용하는 조류독감바이러스의 제거방법의 한 예를 들면, 상기 핵산 앵타머가 고정화된 자성 비드를 컬럼(column)에 채운 후 조류독감바이러스를 포함하는 시료를 통과시켜 조류독감바이러스만을 선택적으로 제거할 수 있다.

[0058] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 핵산 앵타머를 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 조류독감바이러스의 검출방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명에서는 금칩 기반의 SPR(surface plasmon resonance) 분석으로 조류독감바이러스를 검출할 수 있다. 즉, 이것을 위하여 금칩(bare gold chip)의 표면을 개질하여 각각의 핵산 앵타머를 칩 위에 고정시킨 후 그 위에 타겟물질을 농도 별로 반응시키고, 그 결합력을 확인하며 특이적 결합능 분석을 위해 다른 카운터 타겟물질에 대한 결합력을 테스트 할 수 있다.

[0059] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머 2종류 이상과 샌드위치 방식을 이용하여, 시료 중 조류독감바이러스를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0060] 본 발명에 있어서, 상기 샌드위치 방식은 조류독감바이러스의 서로 다른 부위에 2종류 이상의 핵산 앵타머가 결

합하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [0061] 본 발명에 있어서, 상기 2종류 이상의 핵산 앵타머는 서열번호 1 및 서열번호 9로 표시되거나, 서열번호 3 및 서열번호 7로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명에 있어서, 상기 조류독감바이러스는 물, 토양, 식품, 폐기물, 동식물 장내 및 동식물 조직, 동식물 분변 중 어느 하나 이상에서 채취된 시료로부터 검출되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이때, 상기 물은 강수(江水), 해수(海水), 호수(湖水) 및 우수(雨水) 등을 포함하고, 폐기물은 하수, 폐수 등을 포함하며, 상기 동식물은 인체를 포함한다.
- [0064] 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 서열번호 1 내지 18로 표시되는 핵산 앵타머에 대하여 조류독감바이러스에 따른 금집 기반의 SPR(surface plasmon resonance) 분석을 수행한 결과, 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8 특이적인 결합능을 확인하였다.
- [0065] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서 상기 핵산 앵타머를 포함하는 조류독감바이러스 검출용 센서에 관한 것이다.
- [0066] 본 발명에 있어서, 상기 센서는 고병원성 조류독감바이러스 및 저병원성 조류독감바이러스를 구별할 수 있는 것을 특징으로 할 수 있고, 고병원성 조류독감바이러스는 바람직하게는 H5N1 또는 H5N8인 것을 특징으로 할 수 있고, 저병원성 조류독감바이러스는 H5N2인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 센서는 상기 핵산 앵타머를 이용하는 형태면 모두 이용가능하나, 바람직하게는 샘플 투입부, 샘플 이동부 및 검출부로 구성된 스트립 센서일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0068] 본 발명은 또한 상기 핵산 앵타머를 포함하는 조류독감바이러스 검출용 키트에 관한 것이다.
- [0069] 본 발명의 조류독감바이러스 검출용 키트는 병, 통(tub), 작은 봉지(sachet), 봉투(envelope), 튜브, 앰플(ampoule) 등과 같은 형태를 취할 수 있으며 이들은 부분적으로 또는 전체적으로 플라스틱, 유리, 종이, 호일, 왁스 등으로부터 형성될 수 있다. 용기는, 처음에는 용기의 일부이거나 또는 기계적, 접착성, 또는 기타 수단에 의해 용기에 부착될 수 있는, 완전히 또는 부분적으로 분리가 가능한 마개를 장착할 수 있다. 용기는 또한 주사바늘에 의해 내용물에 접근할 수 있는, 스톱퍼가 장착될 수 있다. 상기 키트는 외부 패키지를 포함할 수 있으며, 외부 패키지는 구성 요소들의 사용에 관한 사용설명서를 포함할 수 있다.
- [0071] 본 발명에 따른 조류독감바이러스에 특이적으로 결합하는 앵타머는 또한, 조류독감바이러스만을 특이적으로 검출하는바, 이를 포함하여 조류독감바이러스의 검출 또는 제거용 조성물을 제공할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에게 자명한 것이다.
- [0072] 본 발명은 또 다른 관점에서, 조류독감바이러스에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용한 조류독감바이러스의 제거방법에 관한 것이다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 바람직하게는 상기 앵타머가 고정된 비드를 컬럼에 충전하고 조류독감바이러스가 포함된 시료를 통과시켜 조류독감바이러스를 제거할 수 있다.
- [0074] [실시예]
- [0076] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명한 것이다.
- [0077] **실시예 1: 임의의 염기서열을 가지는 DNA pool 합성**
- [0078] 66mer DNA pool로서 양 끝에 PCR을 위한 프라이머 영역(primer region)이 있고 중앙에 임의의 염기를 가진 DNA pool을 아래와 같은 방법으로 합성하였다. 본 발명에 사용된 DNA pool은 Genotech Inc. Korea에 화학적으로 합성을 의뢰하였다.
- [0079] CGTACGGTCGACGCTAGC-random region- GGATCCGAGCTCCACGTG

[0080] 서열번호 19: CGTACGGTCGACGCTAGC

[0081] 서열번호 20: GGATCCGAGCTCCACGTG

[0083] **실시예 2: 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8 에 특이 DNA 앵타머의 선별**

[0084] 상기 실시예 1에서 합성된 랜덤 DNA pool을 카운터 타겟 [바이러스 H1N2, H2N1, H3N8, H4N6, H6, H7N8, H9N2, H10N4, H11, H12N5]와 버퍼용액(140 mM NaCl, 16.0 mM Na₂HPO₄, 2.00 mM KH₂PO₄, 3.75 mM KCl, 10.0 mM LiCl, 1.00 mM EDTA2Na, pH 7.4)에 넣고 혼합하여 30분간 상온에서 반응시킨 후 카운터 타겟과 결합하지 않은 DNA를 확보하기 위해 위의 혼합액과 그래핀 옥사이드 용액을 30분간 상온에서 반응시켰다. 이때 카운터 타겟과 결합하지 않은 단일가닥 DNA는 그래핀의 표면에 π -스태킹을 통해 강력하게 흡착하게 된다. 원심분리를 통해 카운터 타겟과 결합한 DNA를 제거하였다. 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 특이적으로 결합하는 DNA를 확보하기 위해 그래핀만 있는 위 튜브에 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8를 첨가한 후, 30분간 상온에서 반응시킴으로서, 배좌 변위(Conformational change)를 유발시켜 그래핀으로부터 타겟 특이적인 앵타머를 분리한 후 에탄올 침전법으로 타겟 특이적DNA를 확보하였다. 이렇게 얻어진 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 특이적으로 결합하는 DNA의 양을 측정하였다.

[0085] 도 2에 개시된 바와 같이, 각 선별단계 (selection round) 에서 얻어진 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 결합하는 DNA의 양이 증가하고 있음을 확인하였다.

[0087] **실시예 3: 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 결합 가능한 DNA 앵타머 pool의 제조**

[0088] 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8와 결합 특이적인 DNA의 양을 늘리기 위해 이미 알고 있는 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0089] PCR 생산물은 두 가닥의 DNA이므로 이를 단일가닥으로 분리하기 위한 과정을 위하여, 아래와 같이 하나의 프라이머에는 플루오레세인(fluorescein)을 고정하였다.

[0090] forward (APTFf) 5-fluorescein- CGTACGGTCGACGCTAGC-3':

[0091] reverse (APTR) 5- GGATCCGAGCTCCACGTG-3':

[0092] PCR 반응물을 정제키트(purification kit)를 이용하여 정제한 후 이중가닥의 DNA를 단일가닥으로 만들기 위해 폴리아크릴아마이드젤 전기영동을 실시하였다. 10%의 폴리아크릴아마이드 겔에는 6M의 요소(urea), 20%의 포름아마이드(formamide)가 포함되어 있어 전기영동 후에는 두 개의 밴드가 생기는데, 이는 전기영동 과정에서 두 가닥의 DNA가 변성되어 플루오레세인이 붙어있는 DNA 가닥은 위에, 붙어있지 않은 DNA 가닥은 아래에 각각 위치하게 된다. 플루오레세인이 붙어 있는 DNA 밴드를 잘라내어 겔 추출(gel extraction)을 실시한 후 다시 에탄올 침전법으로 분리된 DNA를 확보하였다. 이 때 확보된 DNA pool은 다시 처음의 카운터 타겟 [바이러스 H1N2, H2N1, H3N8, H4N6, H6, H7N8, H9N2, H10N4, H11, H12N5]이 녹아있는 버퍼용액과 혼합하여 새로운 선별과정을 시작한다. 이러한 과정의 모식도를 도 1에 나타내었고, 일련의 과정(GO-SELEX process)을 한 번의 선별(selection)이라 하면 총 7번의 선별과정을 거쳐 최종적으로 60% 이상이 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 결합하는 DNA pool을 얻었다. 최종적으로 얻어진 DNA pool을 Quiagen cloning kit를 이용하여 클로닝(cloning)하고 얻어진 콜로니에서부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행할 결과, 서로 다른 18종의 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 특이적으로 결합하는 핵산 구조체를 확보하였다.

[0094] **실시예 4: 18종의 DNA 앵타머의 염기서열 분석 및 특이성 분석**

[0095] 서로 다른 18종의 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 DNA의 염기서열을 분석한 결과를 하기 표 2에 제시하였다. 또한, 이 18종의 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8 앵타머의 2차 구조를 m-fold 프로그램을 이용하여 예측한 결과를 도 3-도 20에 나타내었다.

표 2

[0096] 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 서로 다른 18종의 핵산 앵타

머의 염기서열

서열번호	애타머	염기서열 (5'-3')
1	IF1	CGTACGGTCGACGCTAGCCCCAGGTCGTGGTGGGTACTGCGTATGTGCCACGTGGAGCTCGGATCC
2	IF3	CGTACGGTCGACGCTAGCACGTTGACTGGGTAGTGTATTATCGTAACCCACGTGGAGCTCGGATCC
3	IF4	GGTCGACGCTAGCCCCAGGCGGTGCGAGCTACTGCCATTGCACCACGTGGAGCTCGGATCC
4	IF6	CGTACGGTCGACGCTAGCCGAAGGTTGGAGTAGGCTAAATTGGGTGTGCACGTGGAGCTCGGATCC
5	IF7	CGTACGGTCGACGCTAGCACACATACGTGTGTCTGAGTTGTGGTGGGCACGTGGAGCTCGGATCC
6	IF9	CGTACGGTCGACGCTAGCAGTGGCAGGTAGTATCTGCGGCCATGGTCCACGTGGAGCTCGGATCC
7	IF10	CGTACGGTCGACGCTAGCTAACGGTGTGGCCCGGGGTACAGCGCACTCACGTGGAGCTCGGATCC
8	IF11	CGTACGGTCGACGCTAGCGGTGAGGGGCCCCAGATGTGCATGACTGGTCACGTGGAGCTCGGATCC
9	IF12	CGTACGGTCGACGCTAGCTACAAGTTGGAGGGGTTAAATGTCTGCCGCCACGTGGAGCTCGGATCC
10	IF14	CGTACGGTCGACGCTAGCATGCCAGTGCAGTAGGAGCCGGTTGGTGTGCACGTGGAGCTCGGATCC
11	IF15	CGTACGGTCGACGCTAGCAGGTGTGGGTGTCTTCTGGTCGACTGTGATGCACGTGGAGCTCGGATCC
12	IF18	CTACGGTCGACGCTAGCCTGACTGGCCTGCCAAGGGGCTAGCTCTGTTCACGTGGAGCTCGGATCC
13	IF19	CGTACGGTCGACGCTAGCGGGCTCTGTATTTCTGTGCAGCTTGGGGGCCACGTGGAGCTCGGATCC
14	IF20	CGTACGGTCGACGCTAGCAGGGGTAGCGCTACAGAGGGGAACATAGGTACGTGGAGCTCGGATCC
15	IF21	CGTACGGTCGACGCTAGCGGCATCGTTGGTTAACCTCATCACGCGGGCCACGTGGAGCTCGGATCC
16	IF22	CGTACGGTCGACGCTAGCTAAATGGGCGTGGGAATGACTCTACGGGGCCACGTGGAGCTCGGATCC
17	IF23	CGTACTGTGACGCTAGCGCCAAAGTGGGTGGCGGTGGGTATGCTCCACGTGGAGCTCGGATCC
18	IF24	CGTACGGTCGACGCTAGCTCTATCGTGCATTCTACTACCTACTTCCGGCACGTGGAGCTCGGATCC

[0097] 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 강하게 결합하는 18 종의 애타머들이 다른 바이러스에는 결합하지 않고 오직 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8 에만 특이적으로 결합함을 보여주는 실험은 금침에 애타머를 고정시켜서 SPR (Surface Plasmon Resonance) 장치를 이용하여 수행하였다. 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8은 조류독감 바이러스의 아형중의 하나이므로 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8 애타머가 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8 에만 특이적으로 결합하는 것을 보여주기 위한 가장 좋은 대조군으로서 또 다른 조류독감바이러스의 아형 (바이러스 H1N2, H2N1, H3N8, H4N6, H6, H7N8, H9N2, H10N4, H11, H12N5)가 사용되었다. 먼저 50 mM의 3,3'-디티오디프로피온산으로 금침의 표면에 카르복실기(-COOH)를 만든 다음 EDC/NHS를 이용하여 자기조립 단분자층(Self Assembly Monolayer)을 형성시켰다. 그 위에 스트렙타비딘을 고정시키고 바이오틴이 붙어있는 각각의 애타머를 고정시켰다. 여기에 2×10^6 (virusparticle/ml)의 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8 와 바이러스 H1N2, H2N1, H3N8, H4N6, H6, H7N8, H9N2, H10N4, H11, H12N5 를 버퍼용액(140 mM NaCl, 16.0 mM Na2HPO4, 2.00 mM KH2PO4, 3.75 mM KCl, 10.0 mM LiCl, 1.00 mM EDTA2Na, pH 7.4)안에서 각각 30 분간 반응시킨 후 같은 버퍼용액으로 결합하지 않은 바이러스를 씻어냈다.

[0098] 도 21에 개시된 바와 같이, SPR 결과를 최종적으로 분석한 결과, 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8 애타머가 다른 바이러스들보다 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8에 월등하게 잘 결합하는 것을 확인할 수 있었다.

[0100] 실시예 5: 듀얼 핵산 애타머의 특이성 분석

[0101] 먼저 50 mM의 3,3'-디티오디프로피온산으로 금침의 표면에 카르복실기(-COOH)를 만든 다음 EDC/NHS를 이용하여 자기조립 단분자층(Self Assembly Monolayer)을 형성시켰다. 그 위에 스트렙타비딘을 고정시키고 바이오틴이 붙어있는 각각의 애타머를 고정시켰다. 여기에 2×10^6 (virusparticle/ml)의 조류독감바이러스 H5N1, H5N2, H5N8를 버퍼용액(140 mM NaCl, 16.0 mM Na2HPO4, 2.00 mM KH2PO4, 3.75 mM KCl, 10.0 mM LiCl, 1.00 mM EDTA2Na, pH 7.4)안에서 각각 40 분간 반응시킨 후, 같은 버퍼용액으로 결합하지 않은 바이러스를 씻어냈다. 그 뒤, 퀴텀닷, 마이크로 비드 입자와 결합한 각각의 애타머를 하기 표 3의 조합으로 처리하여 40분간 반응시킨 후, 같은 버퍼용액으로 결합하지 않은 퀴텀닷, 마이크로 비드 나노입자와 결합한 애타머를 씻어낸후, SPR 신호를 측정하였다.

표 3

[0103]

조류독감바이러스에 특이적으로 결합하는 듀얼 핵산 애포머 조합

1 st Chip Aptamer	2 nd NP Aptamer	1 st Chip Aptamer	2 nd NP Aptamer	1 st Chip Aptamer	2 nd NP Aptamer
IF1	IF1	IF4	IF1	IF10	IF1
IF1	IF4	IF4	IF4	IF10	IF4
IF1	IF10	IF4	IF10	IF10	IF10
IF1	IF12	IF4	IF12	IF10	IF12
IF1	IF21	IF4	IF21	IF10	IF21
IF1	IF22	IF4	IF22	IF10	IF22
IF12	IF1	IF21	IF1	IF22	IF1
IF12	IF4	IF21	IF4	IF22	IF4
IF12	IF10	IF21	IF10	IF22	IF10
IF12	IF12	IF21	IF12	IF22	IF12
IF12	IF21	IF21	IF21	IF22	IF21
IF12	IF22	IF21	IF22	IF22	IF22
IF15	IF1				

[0104]

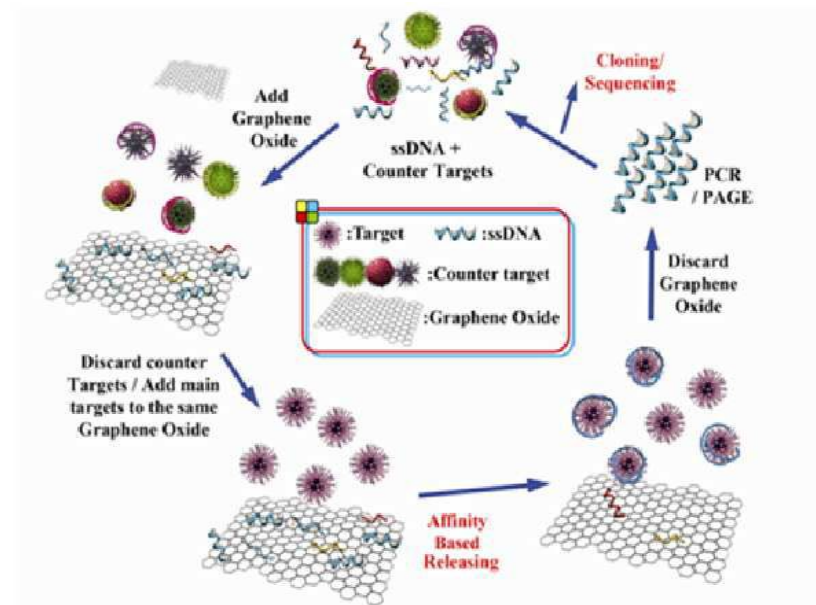
도 22에 개시된 바와 같이, 서열번호 3 및 서열번호 16의 핵산 애포머를 포함하는 조합 또는 서열번호 7 및 서열번호 16의 핵산 애포머를 포함하는 듀얼 애포머의 경우, 조류독감바이러스와 높은 특이성으로 결합하는 것을 확인할 수 있었다.

[0106]

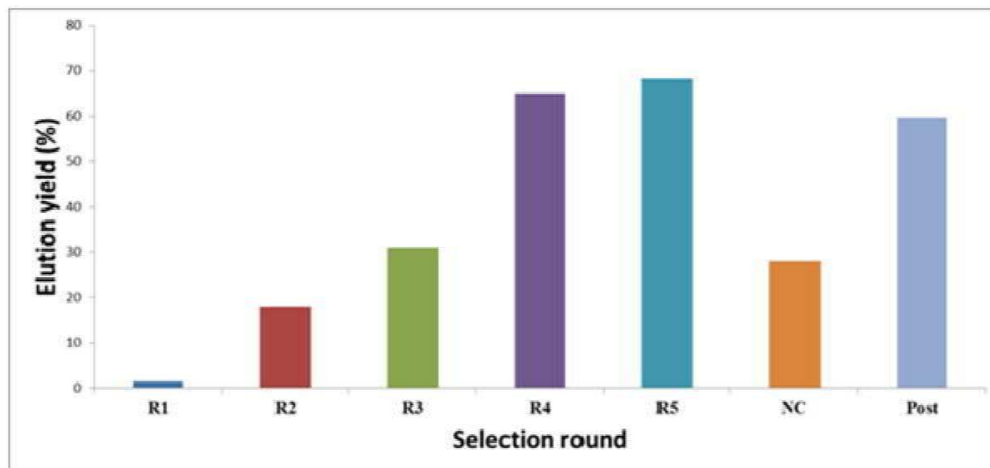
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

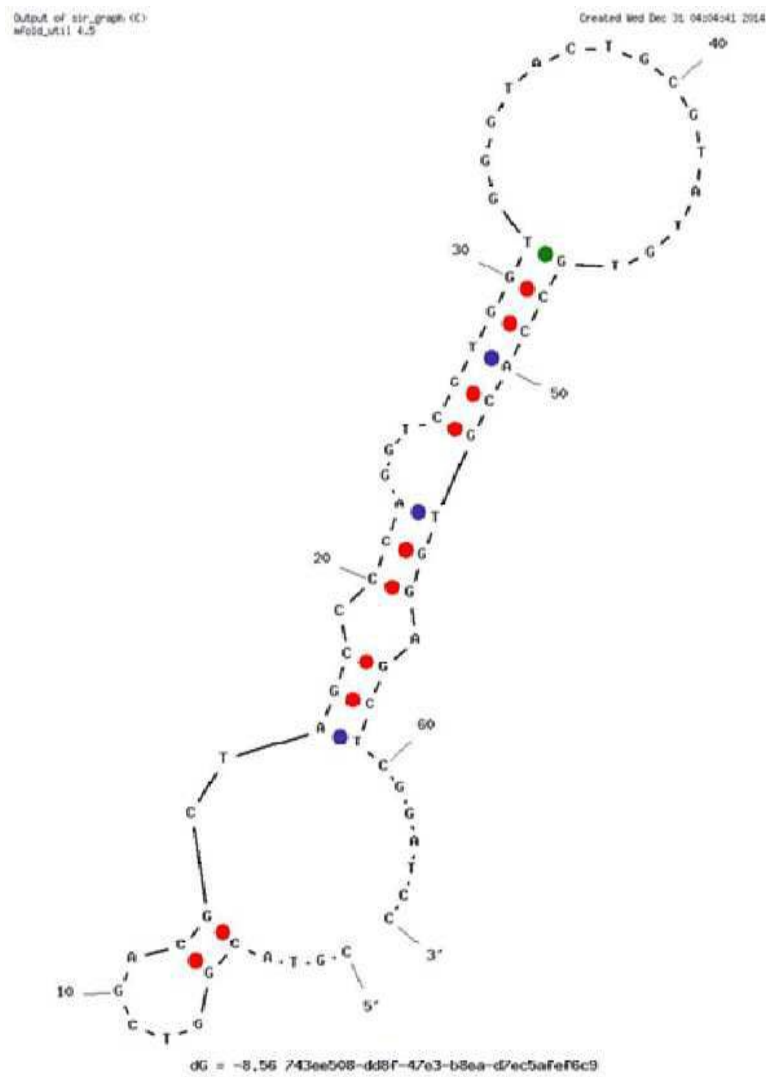
도면1



도면2



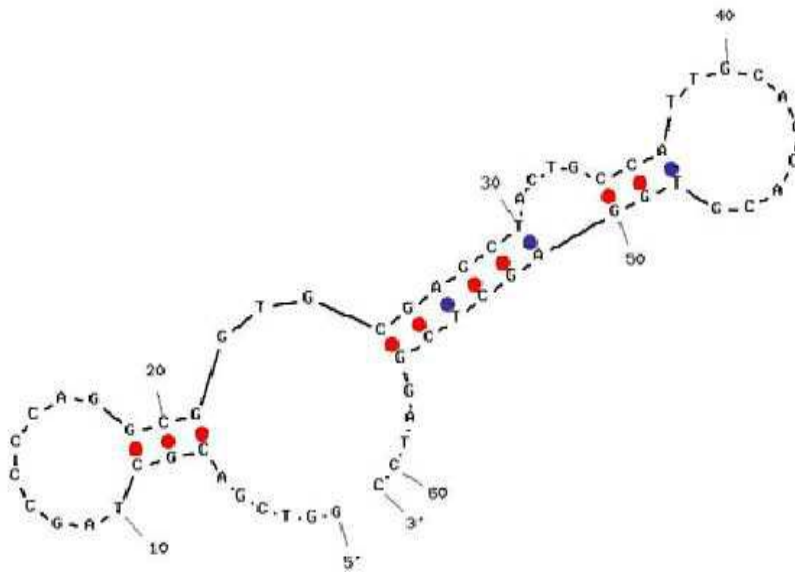
도면3



도면5

Output of `sir_graph (C)`
wfold_util 4.5

Created Wed Dec 31 04:10:08 2014

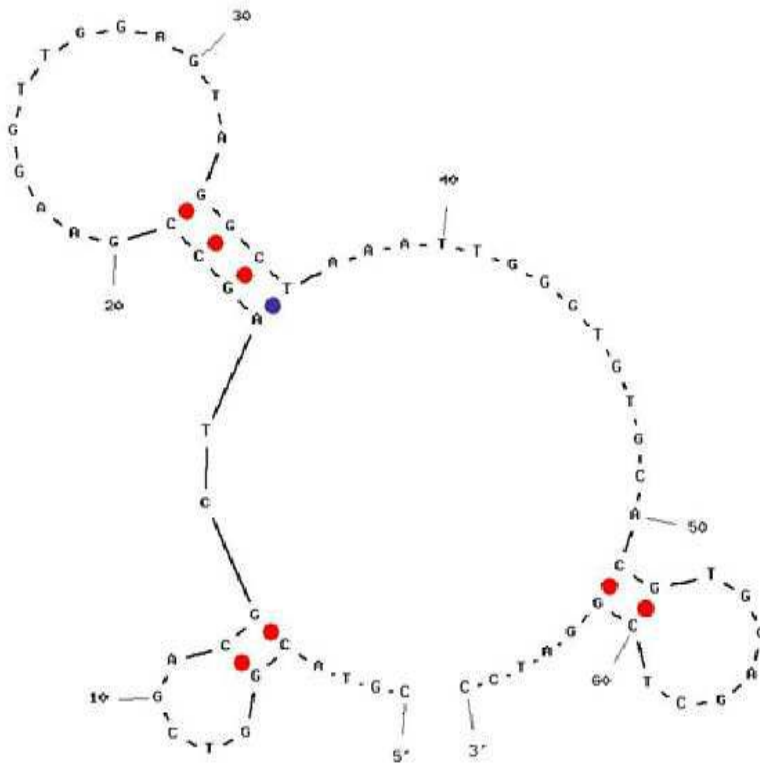


```
d6 = -10,301 1ef75f5f-3d23-4372-9db7-4ea6d176d230
```

도면6

Output of str_graph (C)
mfold_v3.5.2

Created Wed Dec 31 04:11:32 2014

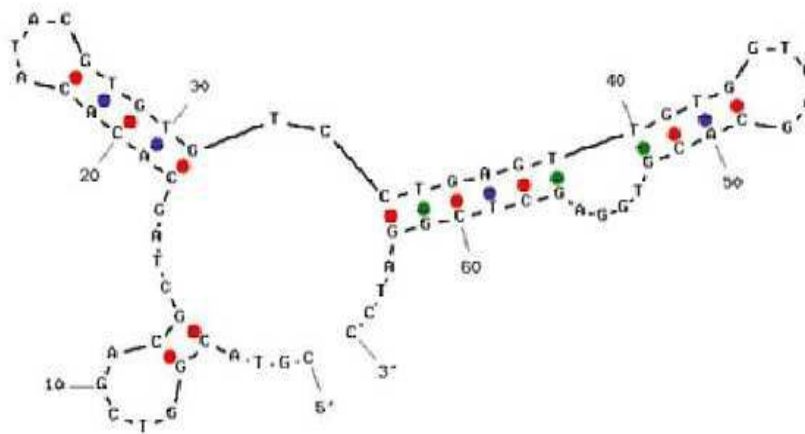


dG = -6.262 da9e435a-a891-43fa-9685-26755b420b0d

도면7

Output of sin_graph (C)
mfold_v3.11 4.5

Created Wed Dec 31 04:12:53 2014

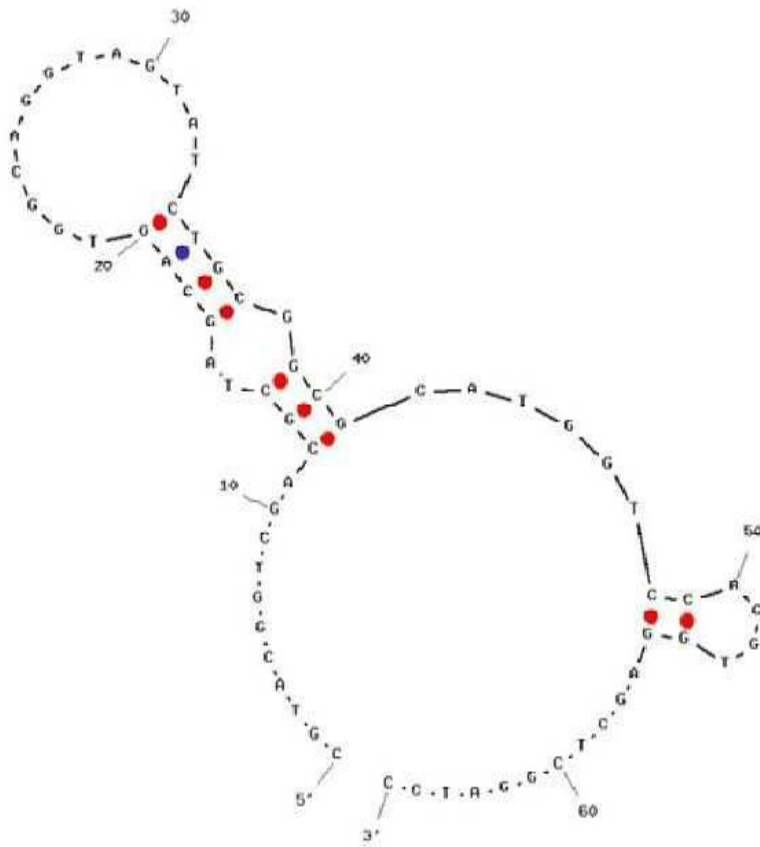


dG = -10.543 9bc0e4d1-a6bf-42e6-b1e5-8390953a32f6

도면8

Output of siRNA (C)
mfold, v3.5

Created Wed Dec 31 09:14:23 2014

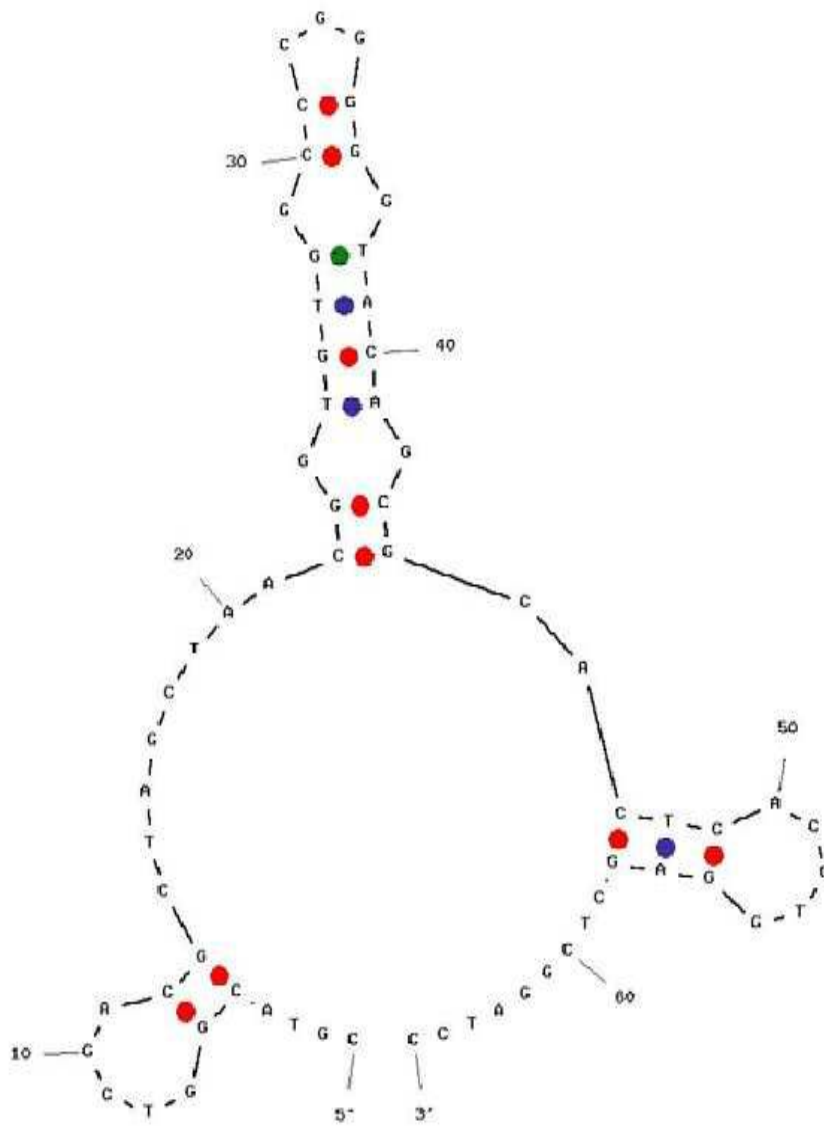


dG = -7.744 81d606b9-0193-4c7c-92e3-d421760da547

도면9

Output of sir_graph (C)
MF010_U111 4.3

Created Wed Dec 31 04:15:38 2014

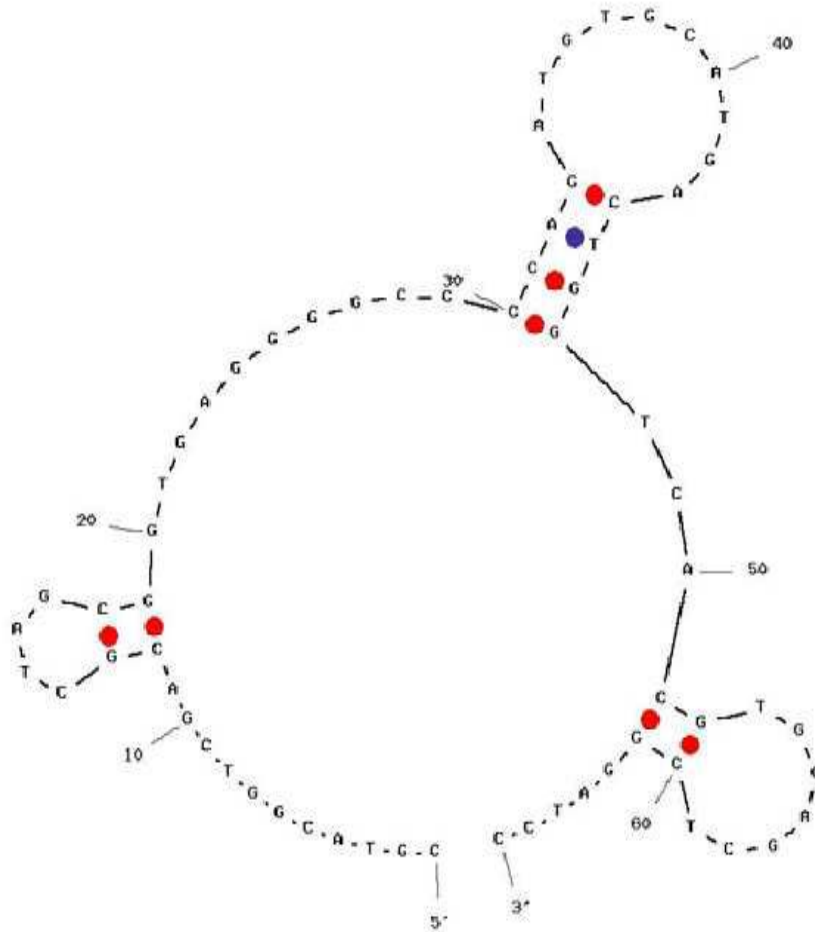


dG = -10.702 1789a460-d610-4181-98c5-185a86a23758

도면10

Output of sir_graph (C)
mfold_v3.1 4.3

Created Wed Dec 31 05:38:37 2014

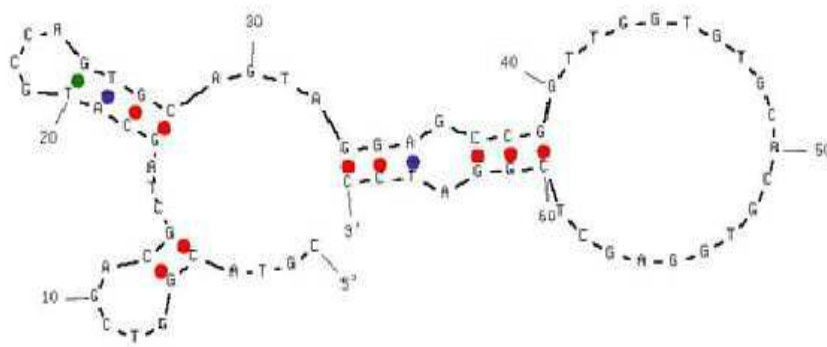


dG = -5.913 82fd668f-b01f-4b26-a6c0-73a7444f1c33

도면12

Output of win_graph (C)
MF010_U111 4.3

Created Wed Dec 31 09:48:15 2014

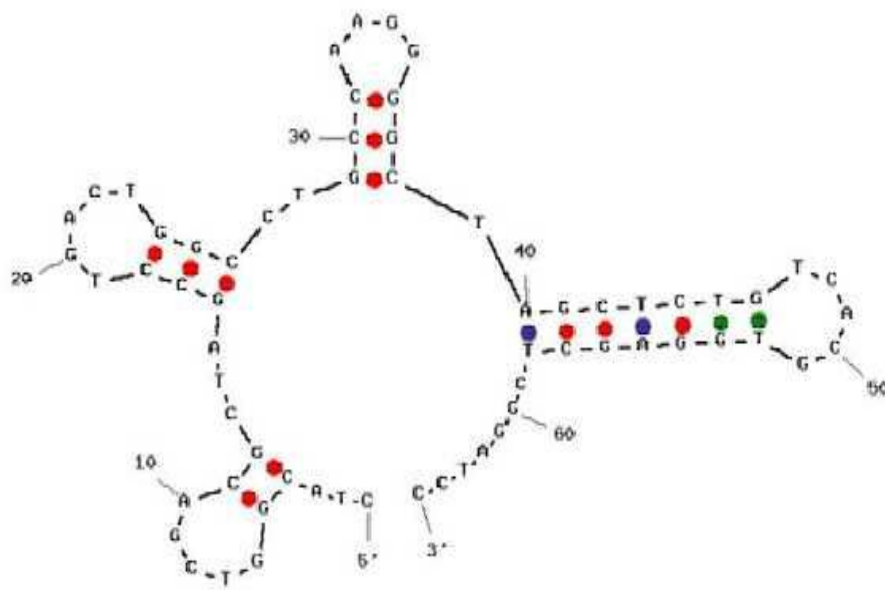


dG = -8.656 6ea92697-0250-4aa0-88a2-bcdf5a36a8c8

도면14

Output of str_graph (C)
wFoldUtil 4.5

Created Wed Dec 31 04:15:40 2014

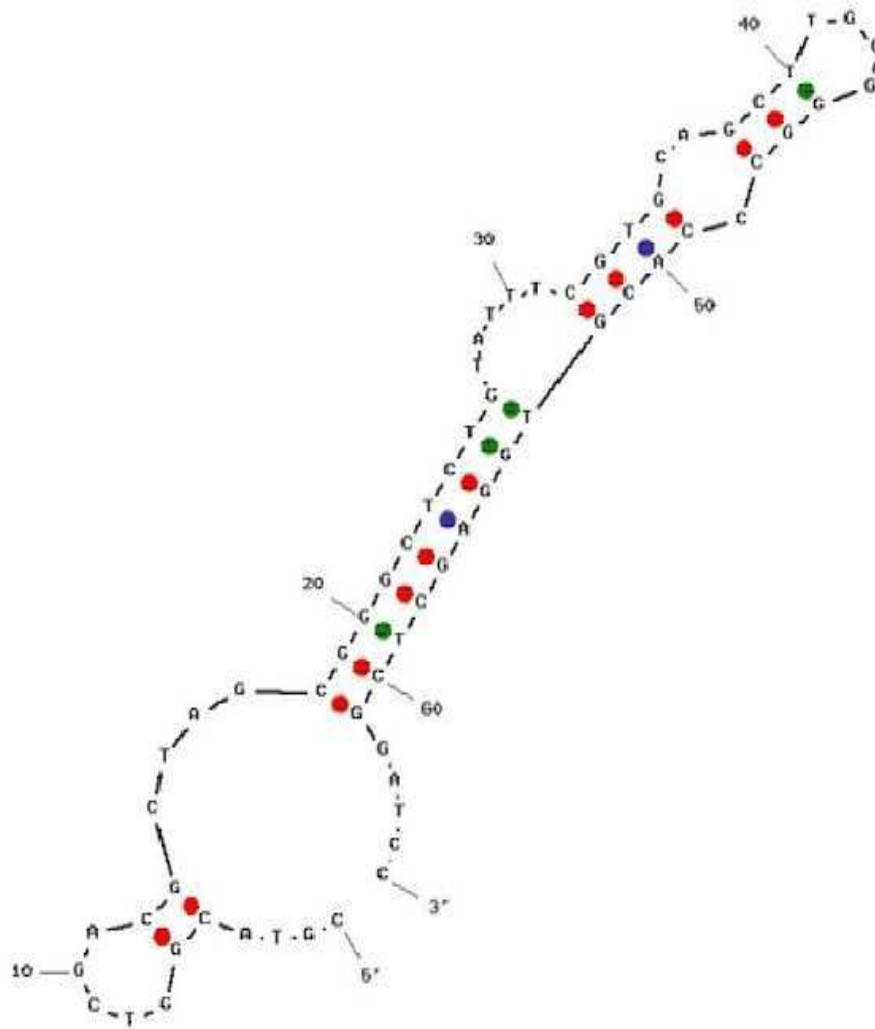


dG = -12.099 9ea2be3f-60d8-4392-baa9-0c547a65a279

도면15

Output of sir_graph (C)
Wfold_v112 4.3

Created And Dec 31 04:29:29 2014

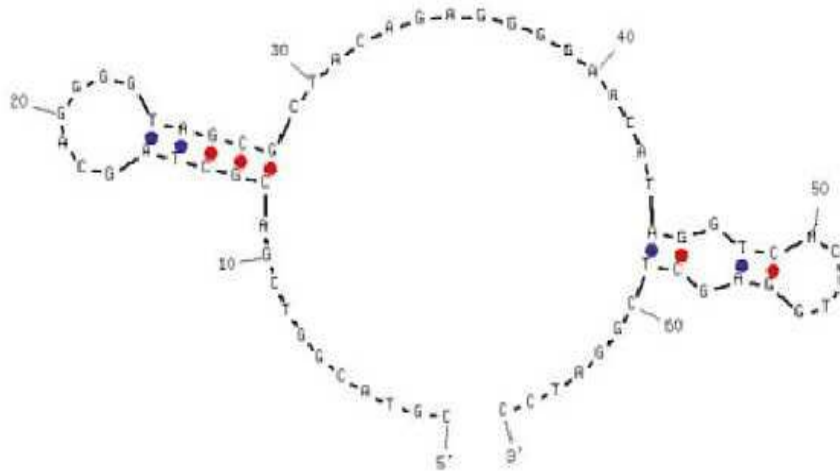


dG = -10.366 5d037ca6-0691-493b-82ae-4e4eade88f5

도면16

Output of mfold v3.6.2
mfold v3.6.2

Created Wed Dec 31 04:19:50 2014

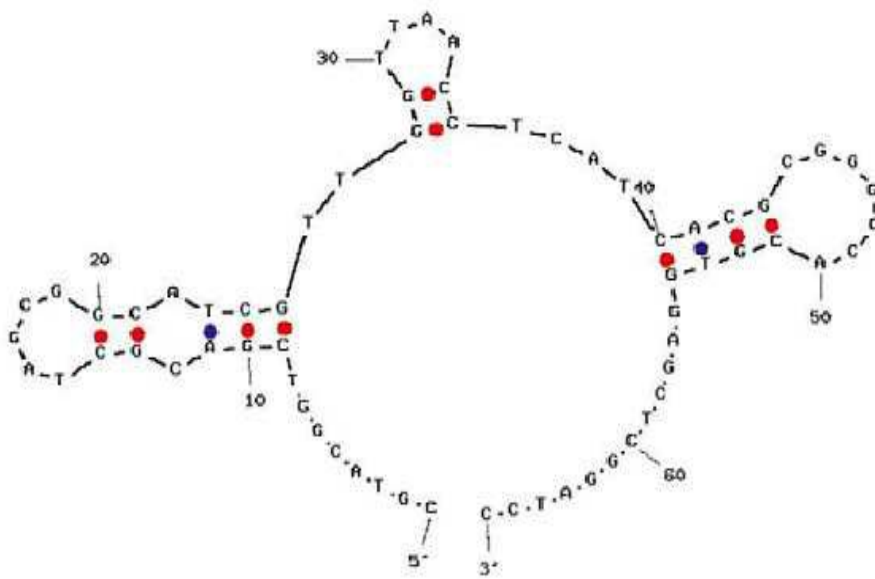


dG = -7.243 1630446d-5fb8-4ac4-a5e9-54965fa25e45

도면17

Output of `sir_graph` (C)
wfold_util 4.5

Created Fri Apr 3 03:04:21 2015

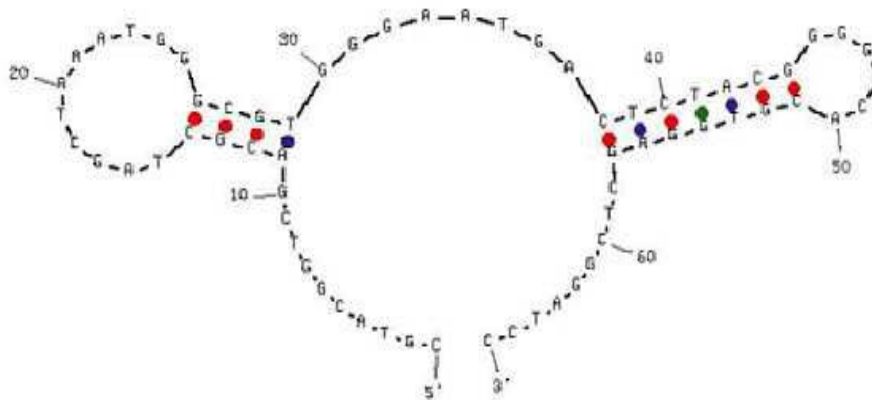


dG = -8.086 f86ba5ba-5bce-451e-b34e-0b9bdebcefc5

도면18

Output of sir_graph (C)
mfold_v3.1.1 4.5

Created Fri Apr 3 03:06:04 2015

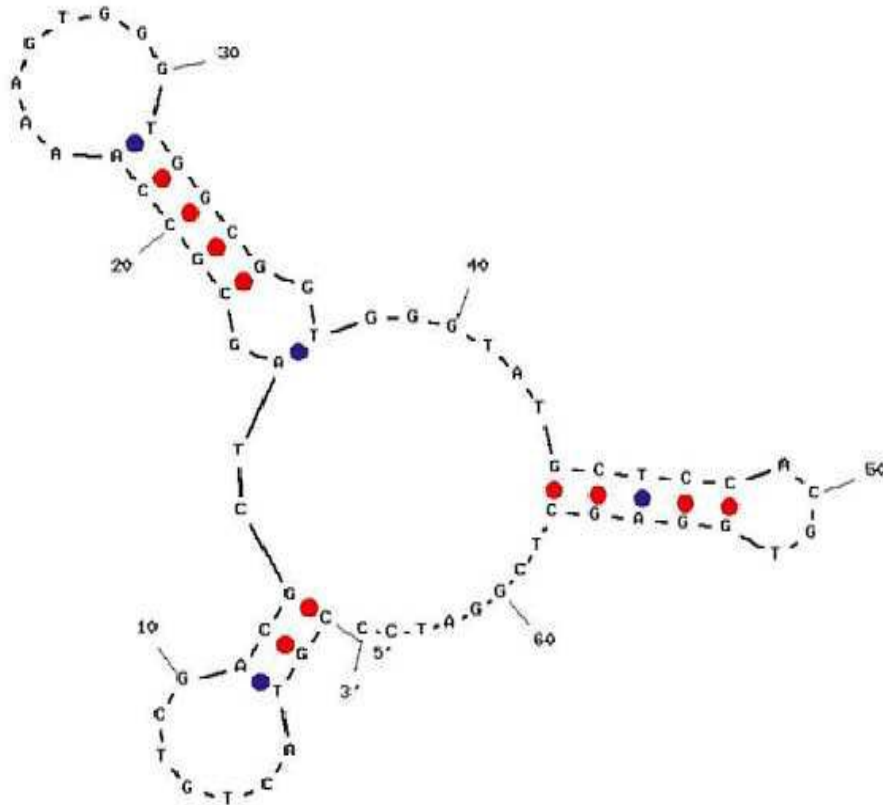


dG = -9.304 9a8e2843-9f08-4bc2-a109-a3bb963711b7

도면19

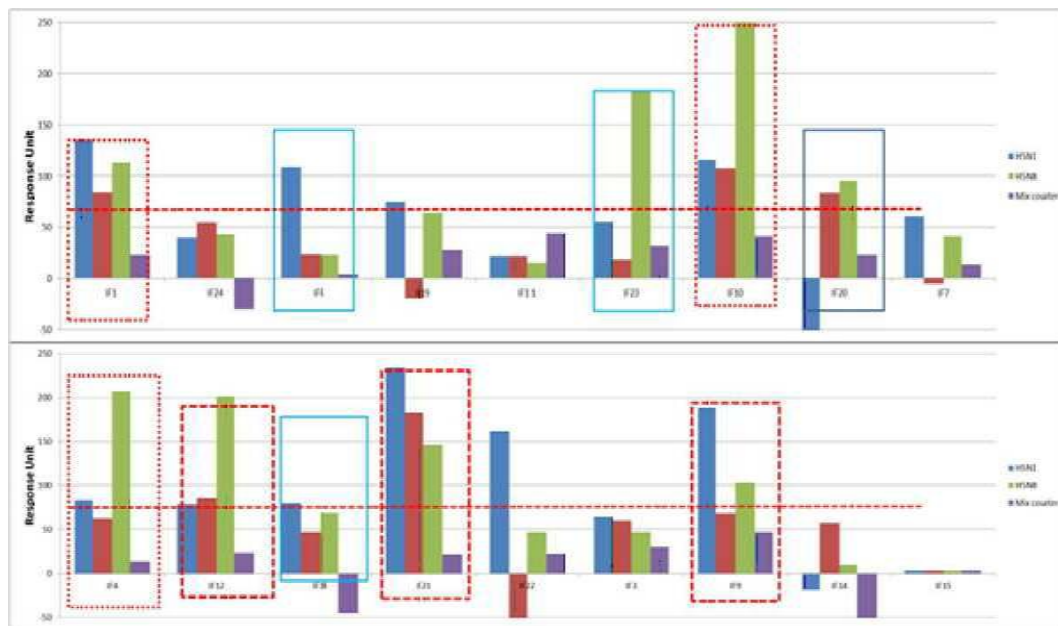
Output of sir_graph (C)
mfold_v3.1.1 4.5

Created Fri Apr 3 03:07:00 2015

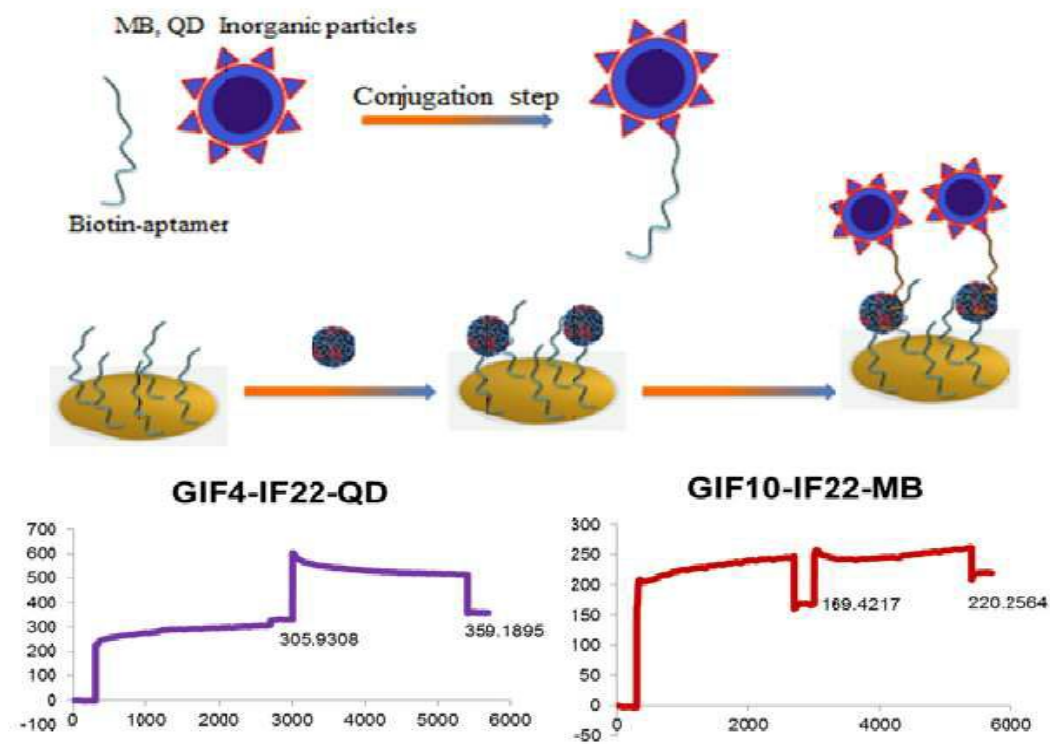


dG = -14.338 451f8a55-6139-4db0-9d67-2d68f30f24f2

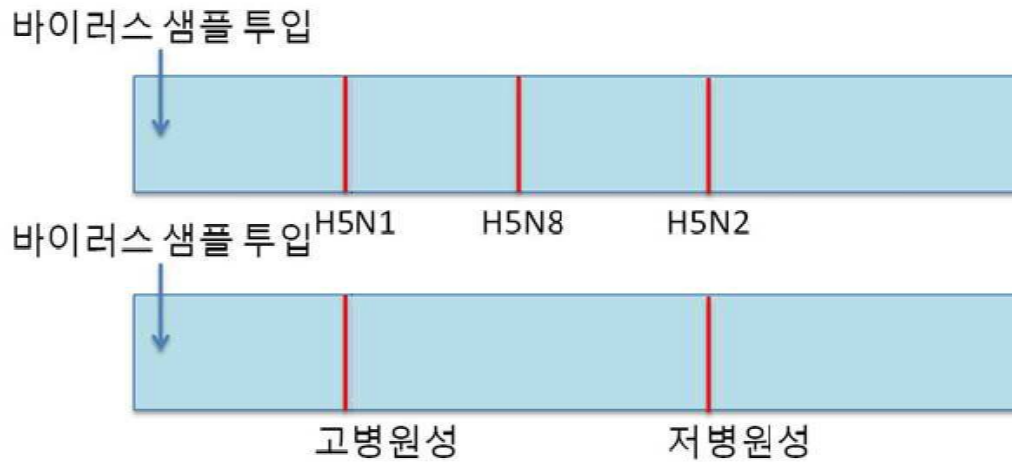
도면21



도면22



도면23



서열 목록

<110>	Korea University Research and Business Foundation	
<120>	Nucleic Acid Aptamer Capable of Specifically Binding to AI Virus and Uses Thereof	
<130>	P15-B160	
<160>	20	
<170>	Kopatent In 2.0	
<210>	1	
<211>	66	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IF1	
<400>	1	
	cgtagcgtcg acgctagccc caggtcgtgg tgggtactgc gtatgtgcca cgtggagctc	60
	ggatcc	66
<210>	2	
<211>	66	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IF3	
<400>	2	
	cgtagcgtcg acgctagcac gttgactggg tagtgtttat cgtaaccca cgtggagctc	60
	ggatcc	66

<210> 3
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IF4
 <400> 3
 ggtcgacgct agccccaggc ggtgcgagct actgccattg caccacgtgg agctcggatc 60
 c 61
 <210> 4
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IF6
 <400> 4
 cgtacggtcg acgctagccg aaggttggag taggctaaat tgggtgtgca cgtggagctc 60
 ggatcc 66
 <210> 5
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IF7
 <400> 5
 cgtacggtcg acgctagcac acatacgtgt gtcctgagtt gtgggtggca cgtggagctc 60
 ggatcc 66
 <210> 6
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IF9
 <400> 6
 cgtacggtcg acgctagcag tggcaggtag tatctgcggc gcatggtcca cgtggagctc 60
 ggatcc 66
 <210> 7

<211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IF10
 <400> 7
 cgtacggtcg acgctagcta acggtgtggc ccgggggtac agcgactca cgtggagctc 60
 ggatcc 66

<210> 8
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IF11
 <400> 8
 cgtacggtcg acgctagcgg tgagggggccc cagatgtgca tgacttgtca cgtggagctc 60
 ggatcc 66

<210> 9
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IF12
 <400> 9
 cgtacggtcg acgctagcta caagttggag gggttaaatg tctgcccca cgtggagctc 60
 ggatcc 66

<210> 10
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IF14
 <400> 10
 cgtacggtcg acgctagcat gccagtgcag taggagccgg ttggtgtgca cgtggagctc 60
 ggatcc 66

<210> 11
 <211> 66

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IF15
 <400> 11
 cgtacggtcg acgctagcag gtgtgggttg ttctggtcga ctgtgatgca cgtggagctc 60
 ggatcc 66

<210> 12
 <211> 65
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IF18
 <400> 12
 ctacggtcga cgctagcctg actggcctgc caaggggcta gctctgtcac gtggagctcg 60
 gatcc 65

<210> 13
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IF19
 <400> 13
 cgtacggtcg acgctagcgg gctctgtatt tcgtgcagct tgggggccca cgtggagctc 60
 ggatcc 66

<210> 14
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IF20
 <400> 14
 cgtacggtcg acgctagcag gggtagcgct acagagggga acataggtca cgtggagctc 60
 ggatcc 66

<210> 15
 <211> 66
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IF21

<400> 15

cgtacggtcg acgctagcgg catcgttggg taacctcacc acgcgggcca cgtggagctc 60
ggatcc 66

<210> 16

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IF22

<400> 16

cgtacggtcg acgctagcta aatgggcgtg ggaatgactc tacggggcca cgtggagctc 60
ggatcc 66

<210> 17

<211> 65

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IF23

<400> 17

cgtactgtcg acgctagcgc caaaagtggg tggcgggtggg tatgctccac gtggagctcg 60
gatcc 65

<210> 18

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IF24

<400> 18

cgtacggtcg acgctagctc tatcgtgcat tctactacct acttccggca cgtggagctc 60
ggatcc 66

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 19

cgtacggtcg acgctagc

18

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><223> Backward primer

<400> 20

ggatccgagc tccacgtg

18