



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월29일
(11) 등록번호 10-1322882
(24) 등록일자 2013년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/115 (2010.01) C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0043230

(22) 출원일자 2012년04월25일

심사청구일자 2012년04월25일

(56) 선행기술조사문헌

US20030143573 A1

KR1020100093502 A

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

구만복

서울특별시 동대문구 천장산로9가길 25-3

박지웅

서울특별시 송파구 송파2동 삼익아파트 201동 102호

(74) 대리인

이처영

전체 청구항 수 : 총 17 항

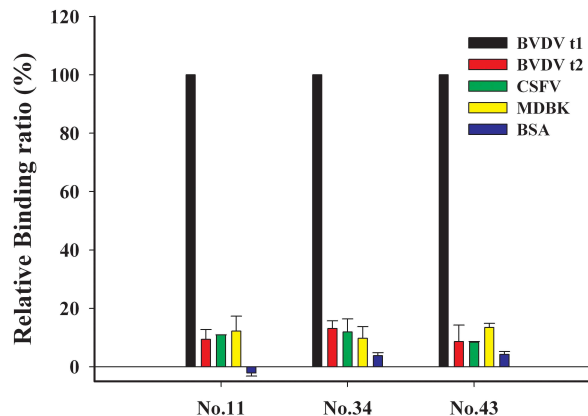
심사관 : 조영균

(54) 발명의 명칭 소바이러스성 설사 바이러스에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도

(57) 요약

본 발명은 소바이러스성 설사 바이러스에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 종래 항체 기반의 분석보다 더 민감하고 일관성있게 소바이러스 설사증 진단을 가능하게 하는 소바이러스 설사 바이러스 타입 1에 특이적인 핵산 앵타머와, 이를 이용한 소바이러스성 설사 바이러스의 검출 및 소바이러스성 설사증 진단 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1에 특이적으로 결합하는 앵타머는 기존에 사용되고 있는 항체 기반 분석보다 더 민감하고 일관성 있게 관련 질환을 진단할 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 또한 DNA 앵타머는 항체에 비해 생산비용이 적고 표면에 고정화하기가 쉬우므로 바이오센서 칩 제작에 유리하다. 이러한 BVDV type 1 결합 특이적 DNA 앵타머를 이용하여 소 바이러스 성 설사증을 진단할 수 있는 바이오센서를 개발함으로써 보다 정확한 진단을 기대할 수 있다. 아울러, 본 발명에 따른 검출방법은 이미 앵타머가 결합한 타겟에 2차적으로 추가적으로 결합 할 수 있는 2차 앵타머를 적용한 방법으로서, 이를 신호 증강 기술에 이용하여 보다 민감하게 BVDVtype 1의 진단이 가능하게 된 바 유용하다.

대표도 - 도13



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 110031032HD120

부처명 농림수산식품부

연구사업명 첨단 생산 기술 개발 사업

연구과제명 압타머를 이용한 가축질병 진단용 바이오센서 개발

주관기관 서울대학교

연구기간 2011.07.01 ~ 2012.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 내지 10 중 어느 하나의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1 (Bovine Viral Diarrhea Virus type 1) 에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머;

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

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머는 서열번호 3, 5 및 8 중 어느 하나의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 핵산 앵타머.

청구항 3

제1항의 핵산 앵타머를 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1 함유 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1의 검출방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1은 혈청, 혈액, 소변, 물, 눈물, 땀, 타액, 림프, 뇌척수액, 토양, 공기, 식품, 폐기물, 동물 장내 및 동물 조직 중 어느 하나 이상에서 채취된 시료로부터 검출되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머가 고정된 고체상에 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1 함유 시료를 접촉시키고, 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머를 첨가하여 반응시킨 다음, 상기 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머의 결합여부를 분석하여 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1을 검출하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 형광물질, 양자점, 방사능 표지, 금 나노입자, 효소, 효소 기질 및 전기화학적 작용기 (electrochemical functional group)으로 구성된 군에서 선택된 표지물질을 상기 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머에 결합시켜, 상기 표지물질 또는 상기 표지물질의 반응을 검출함으로써 상기 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머의 결합여부를 분석하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항의 핵산 앵타머를 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1 함유 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 소바이러스성 설사증의 진단 방법.

청구항 8

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 소바이러스성 설사 바이러스의 검출용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머가 고정된 고체상 및 상기 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머를 2차 반응을 위한 앵타머로서 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 소바이러스성 설사증의 진단용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머가 고정된 고체상 및 상기 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 소바이러스성 설사 바이러스의 검출용 또는 소바이러스성 설사증 진단용 키트.

청구항 13

제12항에 있어서, 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머가 고정된 고체상 및 상기 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머를 검출시약으로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 14

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 소바이러스성 설사 바이러스의 검출용 또는 소바이러스성 설사증 진단용 센서.

청구항 15

제1항의 핵산 앵타머를 이용하는 것을 특징으로 하는 소바이러스성 설사 바이러스의 분리방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 핵산 앵타머가 고정된 비드가 충전된 컬럼에 시료를 통과시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제1항의 핵산 앵타머를 포함하는 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1의 분리용 조성물.

명세서

기술분야

본 발명은 소바이러스성 설사 바이러스에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도에 관한 것으로,

[0001]

보다 상세하게는 종래 항체 기반의 분석보다 더 민감하고 일관성있게 소바이러스 설사증 진단을 가능하게 하는 소바이러스 설사 바이러스 타입 1에 특이적인 핵산 앵타머와, 이를 이용한 소바이러스성 설사 바이러스의 검출 및 소바이러스성 설사증 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 소 바이러스성 설사증은 소화관 점막의 궤양과 설사, 호흡기 병변 등을 유발하고, 심하면 폐사까지 유발하는 질병이다. 이러한 소 바이러스성 설사증을 유발하는 소 바이러스성 설사 바이러스 타입 1 (Bovine Viral Diarrhea Virus type 1)은 축산 산업에서 주요 위협요소 중 하나이다. 임신한 소가 감염되는 경우, 태아 감염이 고빈도로 일어나고, 사산이나 선천 이상 등 다양한 장애가 발행하는데, 태령 초기에 감염된 태아는 평생 바이러스를 계속 보존하고 새로운 감염원이 되는 지속 감염우가 태어나는 경우가 있다. 소 바이러스성 설사증의 전염 경로로는 지속 감염우로부터의 감염도 중요시되고 있어, 소 바이러스성 설사증의 효과적인 방역을 위해서는 신속하고 확실한 검사법에 의한 소의 혈청, 조직 등으로부터의 바이러스의 분리 또는 검출이 요청된다. 이에 종래 목적 동물의 조직으로부터 소 바이러스성 설사 바이러스가 존재하는지 검출하기 위하여 소 설사 바이러스 에티토프에 특이적인 항체를 사용하는 방법 (US 2003/0143573) 등이 보고되었다.

[0003] 그러나, 진단을 위하여 항체를 사용하는 방법은 이를 확보하기 위하여 검출하고자 하는 타겟물질(항원)을 동물의 몸에 주입하여 생체의 면역시스템을 통해 만들어야 하고 추후 정제 과정을 거쳐야 하기 때문에 시간이 많이 들고 비용이 많이 소요되는 문제점이 있었다. 또한, 항원으로 사용할 수 있는 타겟물질이 제한적이어서 독성물질이나 바이러스에 대한 항체 제작에 어려움이 있었다. 아울러, 항체는 크기가 주로 100 KDa 이상의 매우 큰 단백질이어서 전기 화학 기반 등의 바이오 센서 응용 시 신호 검출 부분에 있어 제약이 있을 수 있고, 열 안정성이 DNA 나 다른 화학물질에 비해 현저히 떨어져서 진단에 적용하는데 한계가 있었다. 이에 이러한 항체의 한계성을 해결하기 위하여, 항체의 문제점을 개선하기 위한 새로운 감지물질로서 다양한 타겟물질에 높은 친화도를 보이는 핵산 구조체인 앵타머에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다. 앵타머는 특정 타겟에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA 또는 RNA의 구조체이다. 앵타머는 타겟에 대한 친화도가 높고 열 안정성이 우수하며 in vitro에서 합성이 가능하기 때문에 비용면에서도 기존의 센서 분야에서 이용되는 감지물질들 보다도 우위에 있다. 또한 타겟 물질에 제약이 없어 단백질, 아미노산 같은 생분자나 환경호르몬이나 항생제 같은 작은 유기화학 물질, 박테리아 등의 다양한 타겟에 대한 앵타머를 합성할 수 있다. 이렇게 표적 물질과 특이적으로 결합하는 앵타머의 특성으로 인해 최근 들어 앵타머를 개발하여 신약개발, 약물전달 시스템 그리고 바이오센서 등의 연구에 적용하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다.

[0004] 그러나, 종래 소 바이러스성 설사 바이러스를 타겟으로 하는 앵타머는 보고되고 있지 않으며, 종래의 방법에서는 타겟물질을 자성 비드나 컬럼과 같은 특정 분리용 물질에 고정시키는 방식을 많이 사용해 왔는데 고정화 수율이 낮을 수 있다는 점, 고정화 수율 자체를 분석하는데 많은 비용과 시간이 소모되고 있다는 점, 고정화에 사용되는 분리용 물질에 DNA 가 직접 결합할 가능성, 타겟에 결합한 DNA를 다시 분리 해내는 과정에서 DNA pool 손실이 생길 수 있다는 점 등이 문제점으로 남아 있다. 이에 비고정화 방식을 통한 앵타머 개발 기술을 위한 많은 연구가 있어 왔으나 종래의 비고정화 방식의 앵타머 개발 기술은 고가의 장비 필요성, 장치 사용의 복잡성, 숙련된 인력의 필요성 등의 문제점을 가지고 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 소 바이러스성 설사증을 보다 정확하게 신속하게 진단하기 위하여 소 바이러스성 설사 바이러스 타입 1에 특이적인 핵산 앵타머를 제조하고자 예의 노력한 결과, 다른 유사물질 (BVDV type 2, MBCK cell, Bovine Serum albumin 등)에 결합하지 않으면서 특이적으로 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1에만 결합함을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0006] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 소바이러스성 설사증을 보다 신속하고 정확하게 진단할 수 있도록 소바이러스성 설사 바이러스를 검출할 수 있는 핵산 앵타머 및 그 용도를 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 10 중 어느 하나의 염기서열로 표시되는 것을 특징으로 하는, 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1 (Bovine Viral Diarrhea Virus type 1) 에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머를 제공한다:
- [0009] 여기서, 상기 핵산 앵타머가 RNA인 경우에는 상기 핵산서열에서 T는 U임을 특징으로 함.
- [0010] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1 함유 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1의 검출방법을 제공한다.
- [0011] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1 함유 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 소바이러스성 설사증의 진단방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 포함하는 소바이러스성 설사 바이러스의 검출용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 포함하는 소바이러스성 설사증의 진단용 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 포함하는 소바이러스성 설사 바이러스의 검출용 또는 소바이러스성 설사증 진단용 센서를 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 포함하는 소바이러스성 설사 바이러스의 검출용 또는 소바이러스성 설사증 진단용 키트를 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 이용하는 것을 특징으로 하는 소바이러스성 설사 바이러스의 분리방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, 상기 핵산 앵타머를 포함하는 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1의 분리용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명에 따른 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1에 특이적으로 결합하는 앵타머는 기존에 사용되고 있는 항체 기반 분석보다 더 민감하고 일관성 있게 관련 질환을 진단할 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 또한 DNA 앵타머는 항체에 비해 생산비용이 적고 표면에 고정화하기가 쉬우므로 바이오센서 칩 제작에 유리하다. 이러한 BVDV type 1 결합 특이적 DNA 앵타머를 이용하여 소 바이러스 성 설사증을 진단할 수 있는 바이오센서를 개발함으로써 보다 정확한 진단을 기대할 수 있다. 아울러, 본 발명에 따른 검출방법은 이미 앵타머가 결합한 타겟에 2차적으로 추가적으로 결합 할 수 있는 2차 앵타머를 적용한 방법으로서, 이를 신호 증강 기술에 이용하여 보다 민감하게 BVDVtype 1의 진단이 가능하게 된 바 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 그래핀 옥사이드를 이용하여 BVDV type 1 특이적 앵타머를 분리하는 원리를 설명하는 개략도이다.
- 도 2는 BVDV type 1 특이적 앵타머 분리를 위한 선별과정에서 각각의 선별 라운드에서 타겟 물질인 BVDV type 1에 결합한 단일가닥 DNA의 퍼센트를 제시하는 그래프이다.
- 도 3 내지 도 12는 본 발명에 따른 BVDV type 1 특이적 앵타머 10종의 염기서열을 웹서버 기반의 m-fold 프로그램을 이용하여 분석한 앵타머 2차 구조 모식도이다.
- 도 13은 본 발명에 따른 BVDV type 1 특이적 앵타머인 앵타머 11 (서열번호 5), 앵타머 34 (서열번호 3) 및 앵타머 43 (서열번호 8)의 BVDV type 1 (BVDV t1) 및 유사물질들 (BVDV type 2, CSFV, MDVK, BSA)에 대한 결합

특이성 분석 결과이다.

도 14는 본 발명에 따른 BVDV type 1 특이적 앵타머인 앵타머 11 (서열번호 5), 앵타머 34 (서열번호 3) 및 앵타머 43 (서열번호 8)의 BVDV type 1에 대한 친화도를 제시하는 그래프이다.

도 15는 본 발명에 따른 샌드위치 방식을 적용한 검출방법의 모식도이다.

도 16은 본 발명에 따른 BVDV type 1 특이적 앵타머 중 Kd가 가장 낮은 앵타머 11 (서열번호 5)를 고정하고, Kd가 가장 높은 앵타머 43 (서열번호 8)을 2차 반응시켰을 때의 결합력 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 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 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0021] 본 발명의 상세한 설명 등에서 사용되는 주요 용어의 정의는 다음과 같다.

[0022] 본원에서 "핵산 앵타머"란, 높은 친화성으로 타겟물질을 특이적으로 인지할 수 있는 작은 단일가닥 올리고핵산을 말한다.

[0023] 본원에서 "시료"란, 소바이러스성 설사 바이러스를 함유하거나 함유하고 있는 것으로 추정되어 분석이 행해질 조성을 의미하며, 액체, 토양, 공기, 식품, 폐기물, 동물 장내 및 동물 조직 중 어느 하나 이상에서 채취된 시료로부터 검출되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이때, 액체는 혈청, 혈액, 소변, 물, 눈물, 땀, 타액, 림프 및 뇌척수액 등임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 물은 강수(江水), 해수(海水), 호수(湖水) 및 우수(雨水) 등을 포함하고, 폐기물은 하수, 폐수 등을 포함하며, 상기 동물은 소를 포함한다. 또한, 상기 동물 조직으로는 점막, 피부, 외피, 털, 비늘, 안구, 혀, 뺨, 발굽, 부리, 주둥이, 발, 손, 입, 유두, 귀, 코 등의 조직을 포함한다.

[0024] 본 발명은 일 관점에서, 서열번호 1 내지 10 중 어느 하나의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는, 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1 (Bovine Viral Diarrhea Virus type 1)에 특이적으로 결합할 수 있는 핵산 앵타머에 관한 것이다.

[0025] 앵타머 13:

[0026] 5'-CGTACGGAATTCGCTAGCTTGGGTATAACGTTCTGAGTCAGAACGCCGGGATCCGAGCTCCACGTG-3' (서열번호 1)

[0027] 앵타머 38:

[0028] 5'-CGTACGGAATTCGCTAGCACGGCGGGTCGCCCCACTTTGGGCCGACTGGGATCCGAGCTCCACGTG-3' (서열번호 2)

[0029] 앵타머 34:

[0030] 5'-CGTACGGAATTCGCTAGCCGCTCGGGGCGCTGCACGTAGGGTGGGGTGGGATCCGAGCTCCACGTG-3' (서열번호 3)

[0031] 앵타머 17:

[0032] 5'-CGTACGGAATTCGCTAGCGTGGGGCAGTTGCTTGATGATCTGTAGCGCGGATCCGAGCTCCACGTG-3' (서열번호 4)

[0033] 앵타머 11:

[0034] 5'-CGTACGGAATTCGCTAGCTGCGCATCCACAAATGTATTGTCGGGGGATGGATCCGAGCTCCACGTG-3' (서열번호 5)

[0035] 앵타머 39:

[0036] 5'-CGTACGGAATTCGCTAGCCGGGCTAGTCAGGAGGTTCTGTGGTGCTGGATCCGAGCTCCACGTG-3' (서열번호 6)

[0037] 앵타머 8:

[0038] 5'-CGTACGGAATTCGCTAGCGAGGGCGCCAAACAGGGTGTCTGGCGTTGGGATCCGAGCTCCACGTG-3' (서열번호 7)

[0039] 앵타머 43:

- [0040] 5'-CGTACGGAATTCGCTAGCTGCGGACTCGCGATGCTACTTCTGATGATAGGATCCGAGCTCCACGTG-3' (서열번호 8)
- [0041] 앵타머 27:
- [0042] 5'-CGTACGGAATTCGCTAGCTAAGGGTAGCACAGGTCACCTCGCCACTGTGGATCCGAGCTCCACGTG-3' (서열번호 9)
- [0043] 앵타머 40:
- [0044] 5'-CGTACGGAATTCGCTAGCCGAACGTTGCGGTGTGGAAGTTTCGCGAGCAGGATCCGAGCTCCACGTG-3' (서열번호 10)
- [0045] 핵산 앵타머는 단일가닥 DNA 또는 RNA로서 제공되는 것으로서, 본 발명에서 상기 핵산이 RNA인 경우에는 상기 핵산서열에서 T는 U로 표시되며, 이러한 서열이 본 발명의 범위에 포함됨은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 자명한 사항이라 할 것이다.
- [0046] 본 발명의 핵산 앵타머는 일반적으로 합성된 것일 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 즉, 본 발명에 있어서, 상기 핵산 앵타머는 화학적 또는 효소학적으로 합성된 것일 수 있다.
- [0047] 이에 본 발명에 따른 핵산 앵타머는 화학적 변형을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 화학적 변형은 상기 핵산 앵타머에 포함되는 적어도 1종의 뉴클레오타이드의 당 잔기 (예: 리보스 또는 디옥시리보스)가 수식된 것일 수 있다. 즉, 당 잔기의 2' 위치의 히드록실기가 수소원자, 불소원자, -O-알킬기, -O-아실기, 및 아미노기 중 어느 하나로 치환되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 이에 제한되지 않고 핵산 앵타머의 안정성 또는 소바이러스성 설사 바이러스에 대한 결합능 등을 높이기 위하여 -Br, -Cl, -R, -R'OR, -SH, -SR, -N₃ 및 -CN (R=alkyl, aryl, alkylene) 중 어느 하나로도 치환될 수 있다. 또한, 뉴클라아제 및 가수분해에 대하여 내성하도록 적어도 1종의 뉴클레오타이드의 포스페이트 백본이 phosphorothioate form, phosphorodithioate form, alkylphosphonate form, phosphoramidate form 및 boranophosphate form 중 어느 하나로 치환될 수 있다. 또한, 상기 화학적 변형은 상기 핵산 앵타머에 포함되는 적어도 1종의 뉴클레오타이드가 LNA (locked nucleic acid), UNA(unlocked nucleic acid), Morpholino, PNA (peptide nucleic acid) 중 어느 하나로 치환된 것임을 특징으로 할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일 실시예에서는 그래핀 옥사이드를 이용하여 비고정화 방식으로 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1에 특이적인 핵산 앵타머를 분리하였다. 본 발명의 핵산 앵타머 선별 방법은 주요 타겟에 의해 배좌변위가 일어나지 않으면 그래핀에 흡착된 DNA가 떨어져 나올 수 있는 방법은 없기 때문에 오직 주요 타겟물질에만 의하여 DNA가 그래핀으로부터 떨어져 나오는 점을 이용한다.
- [0049] 즉, 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에서는 일반적인 SELEX(Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment)를 변형한 Graphene Oxide 기반의 SELEX process를 이용하여 BVDV 개체에 선택적인 DNA 앵타머를 개발하였다. 이를 위하여 먼저 양 끝의 PCR증폭을 위한 프라이머 결합 부위(각각 18mer) 및 중간 30 개의 염기의 염기를 가진 66 mer의 DNA pool을 합성하였으며, 이 DNA pool을 BVDV type 1 유사물질 (BVDV type 2, CSFV : Classical Swine Fever Virus, MDBK: Mardin-Darby Bovine Kidney cell, BSA : Bovine Serum albumin)과 함께 버퍼용액에 넣고 혼합하여 결합 반응을 시킨 후 그래핀을 이용해 BVDV type 1 유사물질에 결합한 DNA를 제거한다. 이 제거에는 단일 가닥 DNA가 pi-stacking을 통해 그래핀 표면에 강력하게 흡착되는 특성을 활용한다.
- [0050] 그 다음, 원심분리를 하여 그래핀과 그래핀에 흡착된 단일가닥 DNA를 분리시키고 상등액을 버리고 이 그래핀에 BVDV type 1을 결합시켜 그래핀에 흡착된 DNA에 배좌변위를 유발시켜 그래핀으로부터 떼어내어 에탄올 침전법으로 타겟에 결합한 DNA를 확보한다. BVDV type 1에만 결합하는 특이적인 DNA의 양을 증폭하기 위해 PCR을 수행하고 PCR 반응물을 정제한 후 고농도의 urea가 들어있는 폴리아크릴아마이드 젤로 전기영동을 하여 이중 가닥 DNA인 PCR 결과물을 두 개의 단일 가닥 DNA로 분리한다.
- [0051] 원래의 단일 가닥 DNA 밴드를 gel extraction한 후 다시 에탄올 침전법으로 분리된 단일 가닥 DNA를 확보한다. 이 때 확보된 DNA pool은 다시 처음과 같이 BVDV type 1 유사물질과 혼합한 후 유사물질에 결합하는 DNA는 버리고 유사물질에 결합하지 않는 DNA가 흡착되어 있는 그래핀에 BVDV type 1을 반응시키는 일련의 과정을 반복하여 BVDV type 1에 결합하는 DNA pool을 얻은 후 DNA pool을 pDrive Cloning Vector를 이용하여 cloning 하고 얻어진 콜로니에서부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행한다. 최종적으로 얻어진 DNA pool을 pDrive Cloning Vector를 이용하여 cloning 하고 얻어진 콜로니에서부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행한 결과 표 1과 같이, 서로 다른 10 종의 BVDV type 1 결합 특이적인 핵산 구조체를 확보하였다.
- [0052] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 핵산 앵타머를 이용한 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1의 검출방법에 관한

것이다. 상기 소바이러스성 설사 바이러스는 혈청, 혈액, 소변, 물, 눈물, 땀, 타액, 림프, 뇌척수액, 토양, 공기, 식품, 폐기물, 동물 장내 및 동물 조직 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 동물은 소를 포함한다. 또한, 상기 동물 조직으로는 점막, 피부, 외피, 털, 비늘, 안구, 혀, 뺨, 발굽, 부리, 주둥이, 발, 손, 입, 유두, 귀, 코 등의 조직을 포함한다.

[0053] 본 발명의 다른 실시예에서는 표면자기공명장치 (SPR)을 이용하여 본 발명에 따른 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1 (BVDV type 1) 특이적 앵타머의 결합능과 BVDV type 1 농도에 따른 결합력의 크기를 비교하였다. 그 결과, BVDV type 1 (BVDV t1)에는 매우 높은 결합력을 보이는 반면, BVDV type 2 (BVDV t2)을 비롯한 유사물질들 (CSFV, MDVK, BSA)에 대해서는 잘 결합하지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 본 발명에 따른 BVDV type 1 특이적 핵산 앵타머가 BVDV type 1 바이러스 특이적 검출이 가능함을 제시하며, 아울러 보다 정확한 소바이러스성 설사증의 진단을 가능하게 함을 의미한다. 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1 특이적 핵산 앵타머를 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1 함유 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 소바이러스성 설사증의 진단 방법에 관한 것이다. 이때, 소바이러스성 설사병의 진단은 인간을 제외한 동물, 특히 소의 소바이러스성 설사증의 진단을 위한 것임을 특징으로 할 수 있다.

[0054] 아울러, 본 발명에 따른 BVDV type 1 특이적 핵산 앵타머는 각각을 제1 앵타머 및 제2 앵타머로 하는 샌드위치 결합 방식을 이용하여 BVDV type 1의 검출 또는 소바이러스성 설사증 진단에 이용될 수 있다. 본 발명의 다른 실시예에서는, 샌드위치 결합 방식을 이용하여 BVDV type 1의 검출능을 비교한 경우, 서열번호 5의 앵타머 11을 제1 앵타머로서 고체상에 고정시키고 타겟물질인 BVDV type 1을 가한 후 서열번호 8의 앵타머 43을 제2 앵타머로 2차 반응시키는 2차 반응시키는 샌드위치 결합을 수행하는 경우 가장 민감하게 BVDV type 1을 검출할 수 있는 것으로 나타났다. 즉, 본 발명의 검출방법은 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머가 고정된 고체상에 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1 함유 시료를 접촉시키고, 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머를 첨가하여 반응시킨 다음, 상기 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 핵산 앵타머의 결합여부를 분석하여 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1을 검출하는 것을 특징으로 할 수 있다. 이때, 제2 앵타머의 결합여부는 그 결합여부를 확인할 수 있는 것이면 어떤 형태의 신호처리 기법도 적용될 수 있는데, 예로 제2 앵타머에 표지물질 결합시켜 표지물질 자체 또는 그 반응을 검출함으로써 결합여부를 확인할 수 있다. 표지물질은 제2 앵타머에 간접적 또는 직접적인 방법으로 부착될 수 있으며, 표지물질로는 이로 제한되는 것은 아니나, 형광물질, 양자점, 방사능 표지, 금 나노입자, 효소, 효소 기질, 및 전기화학적 작용기 (electrochemical functional group) 등이 사용될 수 있고, 이때, 형광물질의 종류는 특별히 한정되지 않으나, 예를 들면 Cy3 또는 Cy5와 같은 형광색소나, 루시페라아제(luciferase), GFP와 같은 형광 단백질과 같은 공지의 형광물질이 사용될 수 있다. 아울러, 상기 표지물질 또는 그 반응의 검출은 일반적으로 알려진 표지물질 또는 그 반응의 분석방법에 의하여 이루어질 수 있다. 예컨대 형광물질을 표지물질로서 사용한 경우 타겟물질의 존재 시 발광 또는 색변화가 발생하는바, 이를 측정함으로써 타겟물질을 검출할 수 있다. 예시적으로 형광염료를 탐지할 수 있는 이미지 스캐너 등을 통하여 반응을 일으킨 웰을 스캔하여 타겟물질의 검출여부를 확인할 수 있고, 이미지를 소프트웨어를 통해 진하기 정도를 측정함으로써 검출량을 측정할 수 있다.

[0055] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1에 특이적으로 결합하는 앵타머를 함유하는 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1 검출용 또는 소바이러스성 설사증 진단용 조성물에 관한 것이다. 아울러, 상기 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1에 특이적으로 결합하는 앵타머는 칩 등 기관에 고정되어 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1 검출용 또는 소바이러스성 진단용 센서의 형태로 제공될 수 있다.

[0056] 상기 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1에 특이적으로 결합하는 핵산 앵타머를 함유하는 검출 또는 진단 센서 시스템은, 키트(kit)의 형태로 제공될 수 있다. 소바이러스성 설사 바이러스 검출용 또는 소바이러스성 설사증 진단용 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.

[0057] 본 발명에 따른 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1에 특이적으로 결합하는 앵타머는 또한, 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1만을 특이적으로 검출하는바, 이를 포함하여 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1의 분리용 조성

물을 제공할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에게 자명한 것이다.

[0058] 본 발명은 또 다른 관점에서, 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용한 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1의 분리방법에 관한 것이다. 본 발명의 한 양태에 따르면, 바람직하게는 상기 앵타머가 고정된 비드를 컬럼에 충전하고 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1가 포함된 시료를 통과시켜 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1를 분리할 수 있다.

[0059] 실시예

[0060] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명한 것이다.

실시예 1

[0061] 앵타머의 분리

[0062] 66mer DNA pool로서 양 끝에 PCR을 위한 프라이머 영역이 있고 중앙에 30개의 임의의 염기서열을 가진 DNA pool을 합성하였다.

[0063] 5'-CGTACGGAATTCGCTAGC-N30-GGATCCGAGCTCCACGTG-3' (서열번호 11)

[0064] (N: A, T, G 또는 C를 의미함)

[0065] 먼저, 상기 DNA pool을 타겟물질인 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1(BVDV type 1)의 유사물질인 BVDV type 2, CSFV (Classical Swine Fever Virus), MDBK (Mardin-Darby Bovine Kidney cell), BSA (Bovine Serum albumin)과 함께 버퍼용액(pH 7.4, Tris 20 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 2 mM)에 넣고 혼합하여 30 분간 상온에서 반응시켰다. 그 후, 상기 유사물질들과 결합한 DNA는 버리고 결합하지 않은 DNA만을 얻어내기 위하여, 상기 혼합액과 그래핀 용액을 2시간 동안 반응시켰다. 이 때에 유사물질과 결합하지 않은 단일가닥 DNA는 그래핀의 표면에 pi-stacking을 통해 강력하게 흡착하게 된다. 이처럼 유사물질에 결합하지 않고 그래핀에 흡착되어 있는 DNA가 추후에 BVDV type 1의 앵타머 후보군이 된다.

[0066] 원심분리를 통해 그래핀을 분리해 낸 후 상등액을 버리고 분리한 그래핀을 동일한 버퍼 용액을 이용하여 3회 세척하였다. 세척된 그래핀에 타겟물질인 BVDV type 1을 넣고 2시간 동안 반응 시켰다. 이때, 타겟물질은 그래핀 표면에 흡착된 DNA와 반응하여 DNA의 배좌변위를 유발시키고 배좌변위가 일어난 DNA는 그래핀으로부터 떨어져 나오게 된다.

[0067] 그 다음, 상기 그래핀으로부터 떨어져 나온 DNA를 에탄올 침전 법을 통해 타겟에 결합한 단일 가닥 DNA를 확보한 다음, 확보된 BVDV type 1에 결합하는 DNA의 양을 분광광도계를 이용하여 측정하였다.

[0068] BVDV type 1 결합 특이적인 DNA를 증폭시키기 위해 이미 알고 있는 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 생산물은 두 가닥의 DNA 이므로 이를 단일가닥으로 분리하기 위한 과정을 위해서 하나의 프라이머에는 플루오레세인(fluorescein)을 고정하였다.

[0069] 정방향 프라이머: 5' FP-fluorescein-CGTACGGAATTCGCTAGC-3' (서열번호 12)

[0070] 역방향 프라이머: 5' RP-CACGTGGAGCTCGGATCC-3' (서열번호 13)

[0071] PCR 반응물은 정제 키트 (Purification kit)를 이용하여 정제한 후 이중 가닥의 DNA를 단일가닥으로 만들기 위해 폴리아크릴아마이드젤 전기영동을 실시하였다. 10 %의 폴리아크릴아마이드 겔에는 6 M의 urea, 20 %의 포름아마이드가 포함되어 있어 전기영동 후에는 두 개의 밴드가 생기는데, 이는 전기영동 과정에서 두 가닥의 DNA가 변성되어 플루오레세인(fluorescein)이 붙어있는 DNA 가닥은 위에, 붙어있지 않은 DNA 가닥은 아래에 각각 위치하게 된다.

[0072] 플루오레세인 (Fluorescein)이 붙어 있는 DNA 밴드를 잘라내어 gel extraction을 실시한 후 다시 에탄올 침전법으로 분리된 DNA를 확보하였다. 이 때 확보된 DNA pool은 다시 처음과 같이, BVDV type 1의 유사물질들과 반응시키는 일련의 과정을 반복하였다. 이러한 과정의 모식도를 도 1에 나타내었고, 일련의 과정을 한 번의

selection 이라 하면 총 5번의 선별 (selection) 과정을 거쳐 앵타머 개발을 진행했다. 이렇게 매회 진행되는 선별 과정에서 유사물질에 결합할 수 있는 DNA를 제거하였기 때문에 앵타머의 선택성이 높으며, 매회 과정에서 타겟물질에 의해 배좌변위를 일으켜 DNA를 취했기 때문에 높은 친화력을 가진 앵타머를 얻을 수 있었다.

[0073] 도 2에서 각각의 selection round에서 타겟 물질인 BVDV type 1에 결합한 단일가닥 DNA의 퍼센트를 제시하였다.

[0074] 최종적으로 얻어진 DNA pool을 pDrive Cloning Vector (Qiagen사, 네덜란드)를 이용하여 cloning 하고 얻어진 콜로니에서부터 DNA를 추출하여 염기분석을 시행한 결과 서로 다른 10 종의 BVDV type 1 결합 특이적인 핵산 구조체를 확보하고, DNA 염기서열을 분석하여 그 결과를 표 1에 제시하였다.

[0075] 또한 이 10 종의 앵타머의 2차 구조를 m-fold 프로그램을 이용하여 예측한 결과를 도 3 내지 도 12에 나타내었다.

표 1

서열번호	앵타머	염기서열 (5'-3')
1	13	CGTACGGAATTCGCTAGCTTGGGTATAACGTTCTGAGTCAGAACGCCGGATCCGAGCTCCACGTG
2	38	CGTACGGAATTCGCTAGCACGGCGGGTCGCCGACTTTGGGCCGACTGGGATCCGAGCTCCACGTG
3	34	CGTACGGAATTCGCTAGCCGCTCGGGGCGCTGCACGTAGGGTGGGGTGGGATCCGAGCTCCACGTG
4	17	CGTACGGAATTCGCTAGCGTGGGGCAGTTGCTTGATGATCTGTAGCGGGATCCGAGCTCCACGTG
5	11	CGTACGGAATTCGCTAGCTGCGCATCCACAAATGTATTGTGGGGGATGGATCCGAGCTCCACGTG
6	39	CGTACGGAATTCGCTAGCCGGGTCTAGTCAGGAGGTTCTGTGGTGCTGGATCCGAGCTCCACGTG
7	8	CGTACGGAATTCGCTAGCGAGGGCGCCAAACAGGGTGTCTGGCGTTGGGATCCGAGCTCCACGTG
8	43	CGTACGGAATTCGCTAGCTGCGGACTCGCGATGCTACTTCTGATGATAGGATCCGAGCTCCACGTG
9	27	CGTACGGAATTCGCTAGCTAAGGGTAGCACAGGTCACCTCGCCACTGTGGATCCGAGCTCCACGTG
10	40	CGTACGGAATTCGCTAGCCGAACGTTGCGGTGTGGAAGTTTCGCGAGCAGGATCCGAGCTCCACGTG

실시예 2

[0077] 소바이러스성 설사 바이러스 결합 특이성 분석

[0078] 실시예 1에서 분리된 10종의 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1 (BVDV type 1) 특이적 앵타머가 다른 유사물질, 즉, BVDV type 1 의 가장 좋은 대조군으로서 BVDV type 2, 동일 family에 속하는 Classical Swine Fever Virus, BVDV type 1의 culturing에 사용되는 MBDK cell, Bovine Serum albumin에 대한 특이성을 보이지 않고 BVDV type 1 특이적으로 작용하는지 확인하기 위하여 다음의 실험을 수행하였다.

[0079] SPR (Surface Plasmon Resonance) 분석을 수행하기 위하여, 먼저 50 mM의 3,3'-dithiodipropionic acid로 금 칩의 표면에 COOH 기를 만든 다음, EDC/NHS를 이용하여 Self Assembly Monolayer를 형성시켰다. 그 위에 스트렙타비딘을 고정시키고 바이오틴이 붙어있는 실시예 1의 각각의 앵타머를 고정 시켰다. 여기에 동일한 양의 BVDV type 1과 유사물질들 (BVDV type 2, Classical Swine Fever Virus, MBDK cell, Bovine Serum albumin)을 버퍼용액(20 mM Tris-Cl buffer, pH 7.6 contained 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂ and 0.02% Tween 20)안에서 각각 30 분간 반응시킨 후, 같은 버퍼용액으로 결합하지 않은 물질을 씻어냈다.

[0080] 그 후, Autolab springle (SPR single channel, Eco chemie사, 네덜란드)를 이용하여 SPR 결과를 분석한 결과, 상기 10종의 앵타머 모두 BVDV type 1에 대하여 높은 특이성을 나타내었으나, 그 중 가장 BVDV type 1 특이성이 높은 것으로 관찰된 3 종의 앵타머인 앵타머 11 (서열번호 5), 앵타머 34 (서열번호 3), 앵타머 43 (서열번호 8)에 대하여 그 친화도를 도 13과 같이 제시하였다. 도 13에 나타난 바와 같이, 앵타머 11 (서열번호 5), 앵타머 34 (서열번호 3) 및 앵타머 43 (서열번호 8) 모두 BVDV type 1 (BVDV t1)에는 매우 높은 결합력을 보이는

반면, BVDV type 2 (BVDV t2)을 비롯한 유사물질들 (CSFV, MDVK, BSA)에 대해서는 잘 결합하지 않는 것으로 나타났다.

[0081] 이러한 결과는 본 발명에 따른 BVDV type 1 특이적 핵산 앵타머가 BVDV type 1 바이러스 특이적 검출이 가능함을 제시하며, 아울러 보다 정확한 소바이러스성 설사증의 진단을 가능하게 함을 의미한다.

실시예 3

[0082] 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1에 대한 해리 상수 (K_d)의 측정

[0083] 실시예 1에서 제작한 10 종의 BVDV type 1 결합 특이적인 앵타머 중에서 특이성 가장 높은 앵타머 No.11, 34, 43의 BVDV type 1에 대한 binding assay를 실시하였다.

[0084] 실시예 2와 동일한 방법으로 앵타머를 고정시킨 후 서로 다른 농도의 BVDV type 1을 버퍼용액(20 mM Tris-Cl buffer, pH 7.6 contained 100 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$ and 0.02% Tween 20)에서 30 분간 반응시켰다. 해리상수를 구하기 위해서 각각의 반응 정도는 비선형 회귀법과 단일 부위 포화형 리간드 결합법으로 Sigmaplot 10.0을 이용하여 plotting 되었고, 여기에 $y=B_{max} \cdot X/K_d + X$ 식이 이용되었다(y는 포화도 (saturation), B_{max} 는 최대 결합 위치, K_d 는 해리상수, X는 결합하지 않은 타겟).

[0085] 그 결과, 앵타머의 K_d 값이 도출되었고, 이에 대한 분석 데이터를 도 14에 제시하였다. 도 14는 3종의 앵타머 모두 BVDV type 1에 대하여 강한 친화도를 보임을 제시한다.

실시예 4

[0086] 샌드위치 결합 법을 통한 소바이러스성 설사 바이러스의 검출

[0087] 샌드위치 결합 방식 (도 15)을 이용하여 소바이러스성 설사 바이러스 타입 1을 검출하기 위한 최적의 조성, 즉 최적의 제1 앵타머 (고체상에 고정되는 앵타머) 및 제2 앵타머 (제1 앵타머에 결합한 타겟물질에 결합하며, 표지 물질 등으로 표지되는 앵타머)를 찾기 위하여 다음의 실험을 수행하였다.

[0088] 먼저, 상기 실시예 2 및 3에서 가장 강한 친화도를 보이는 것으로 확인된 3종의 앵타머를 대상으로 하여 실시예 2와 동일한 방법으로 금 칩 상에 3종의 앵타머(앵타머 11 (서열번호 5), 앵타머 34 (서열번호 3) 및 앵타머 43 (서열번호 8)) 중 하나의 앵타머를 고정시킨 후, BVDV type 1을 결합시킨 후 다시 여기에 추가적으로 3종의 앵타머 중 어느 하나를 결합시켜 보았다. 총 9개의 조합의 서열을 테스트하여 그 결과를 비교하였다.

[0089] 그 결과, K_d 가 가장 낮은 앵타머 11 (서열번호 5)를 고정하고, K_d 가 가장 높은 앵타머 43 (서열번호 8)을 2차 반응시켰을 때 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었으며, 이는 도 16과 같다. 즉, 서열번호 5의 앵타머 11을 제1 앵타머로서 고체상에 고정시키고 타겟물질인 BVDV type 1을 가한 후 서열번호 8의 앵타머 43을 제2 앵타머로 2차 반응시키는 샌드위치 결합을 수행하는 경우 가장 민감하게 BVDV type 1을 검출할 수 있는 것으로 나타났다.

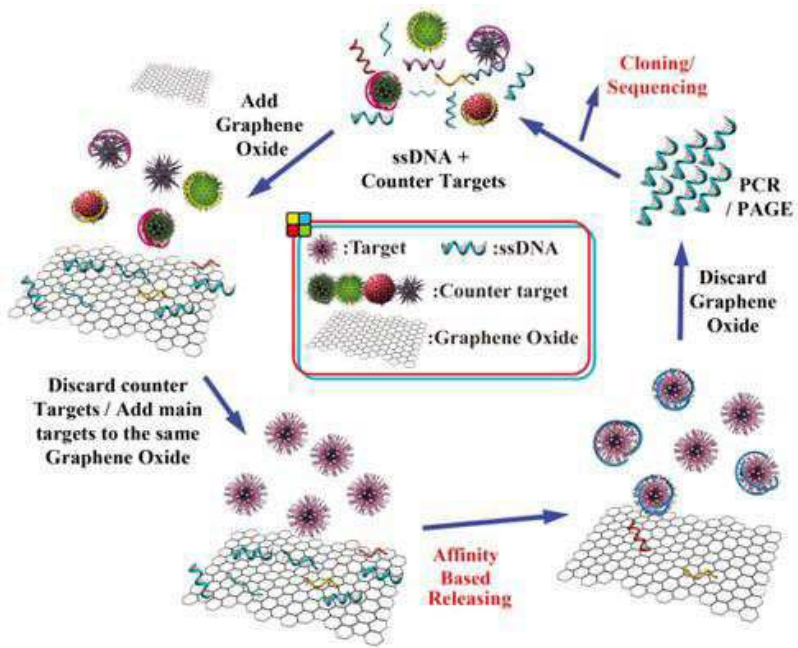
[0090] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

부호의 설명

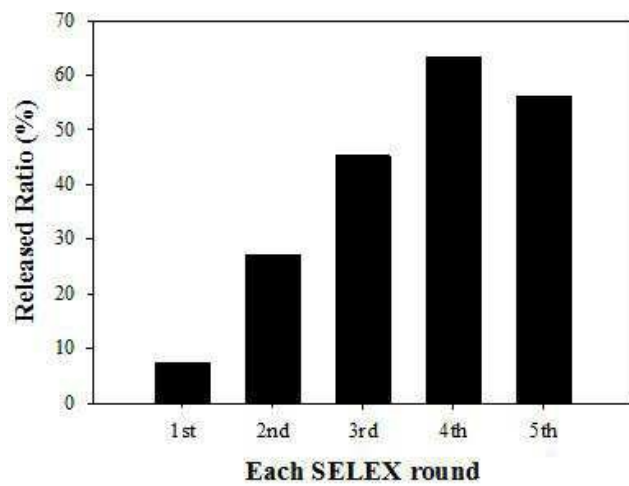
[0091] 부호 없음

도면

도면1



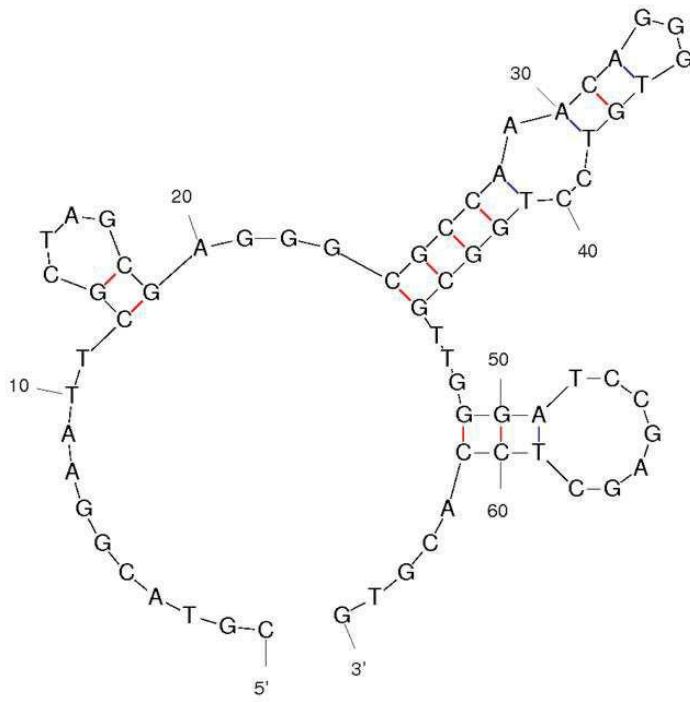
도면2



도면3

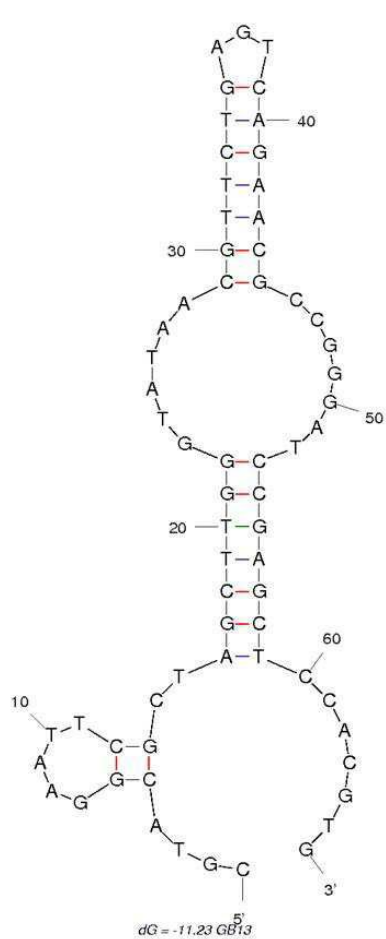
Output of 3d_graph (R)
mfold v3.6.0

Created Mon Feb 27 02:49:07 2012

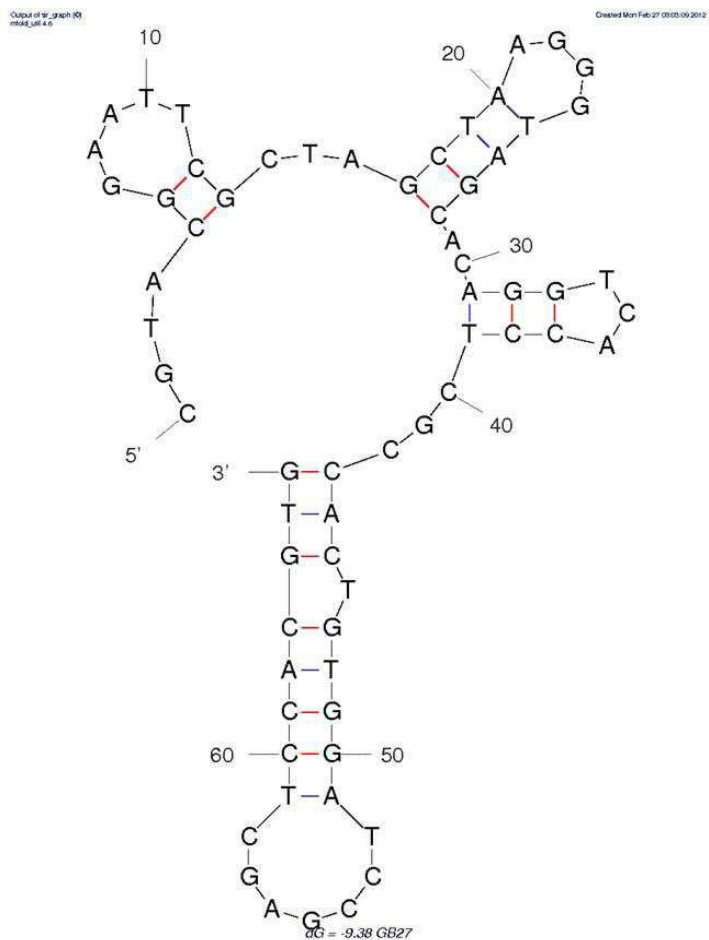


dG = -9.75 GB8

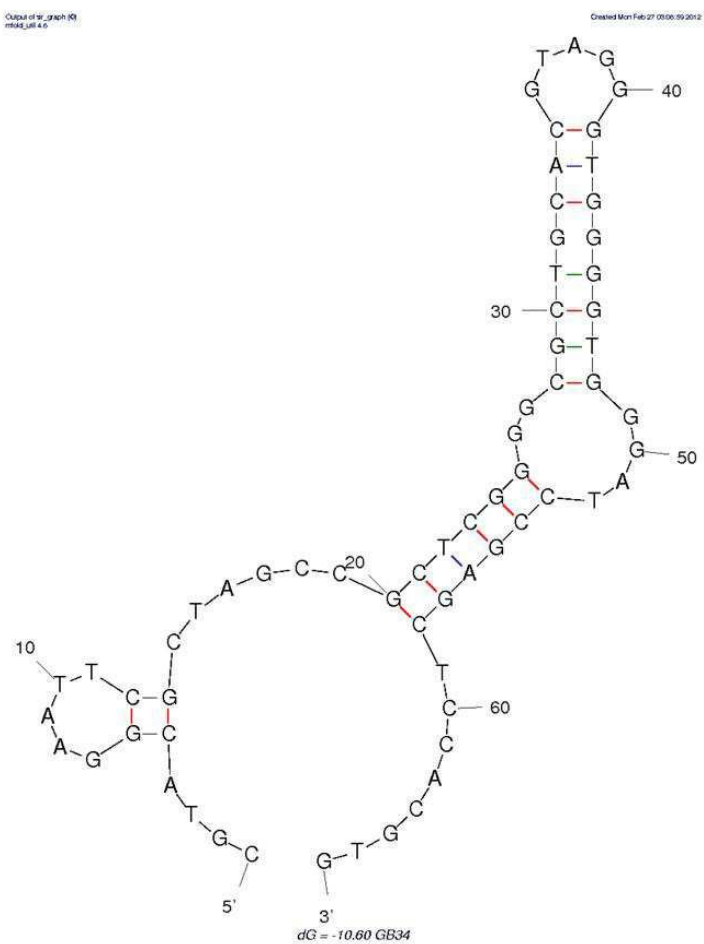
도면5



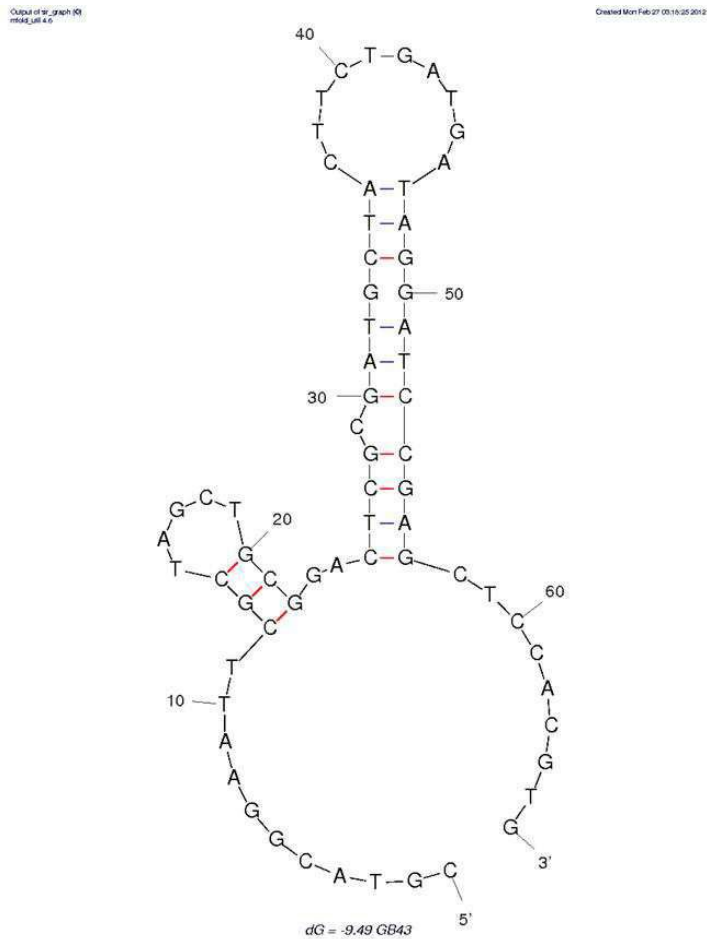
도면7



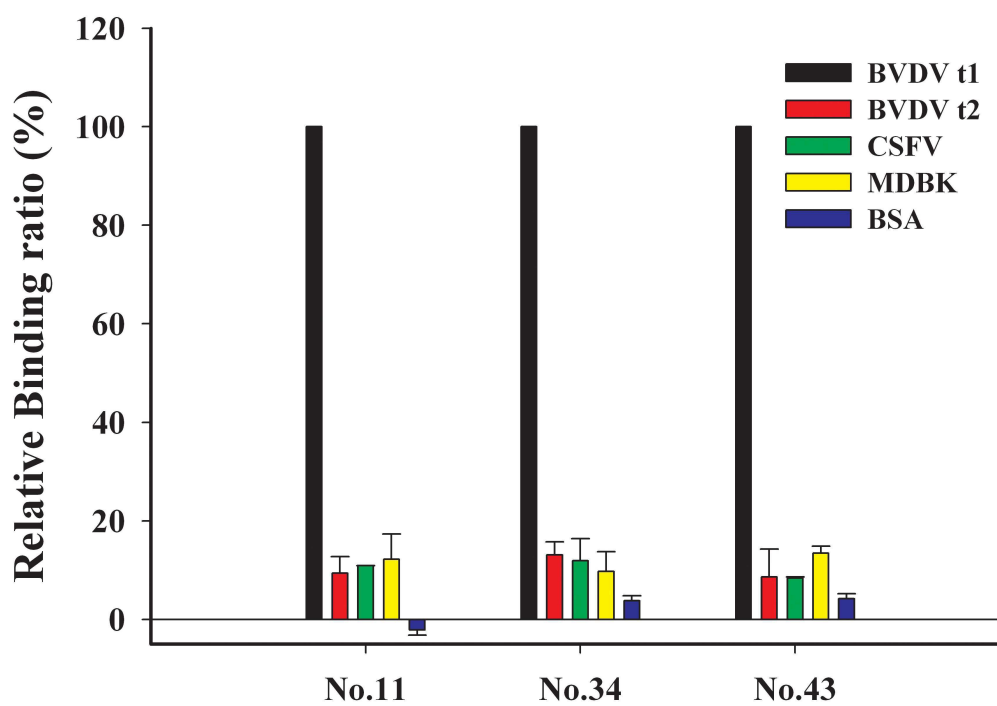
도면8



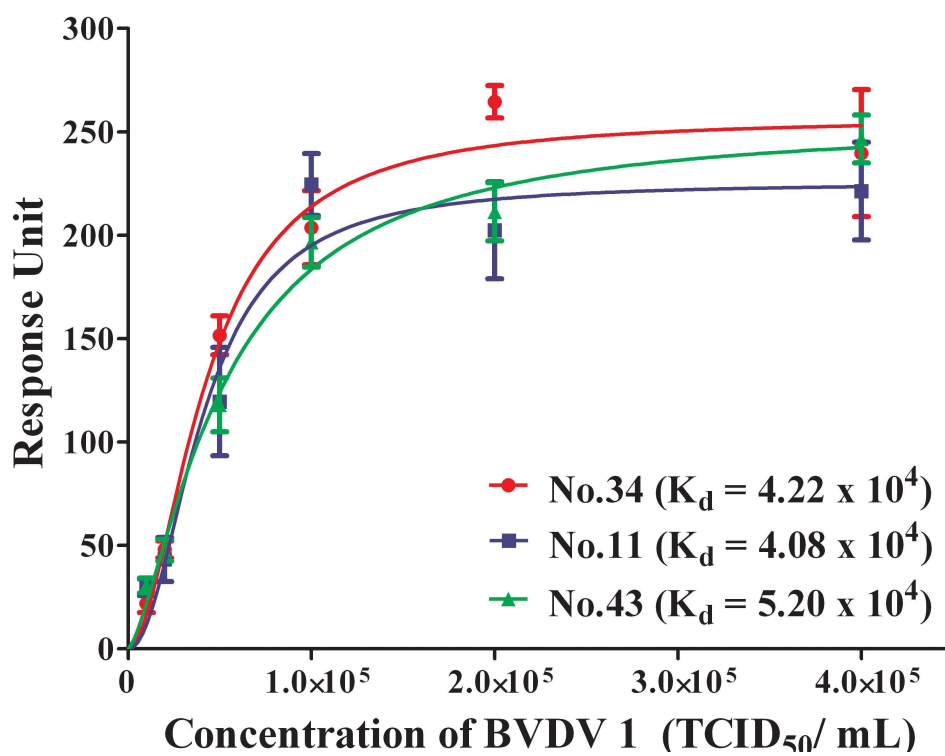
도면12



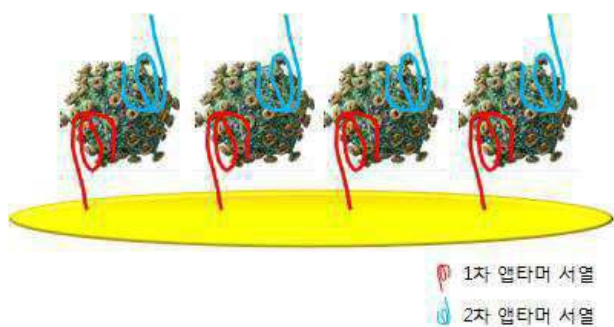
도면13



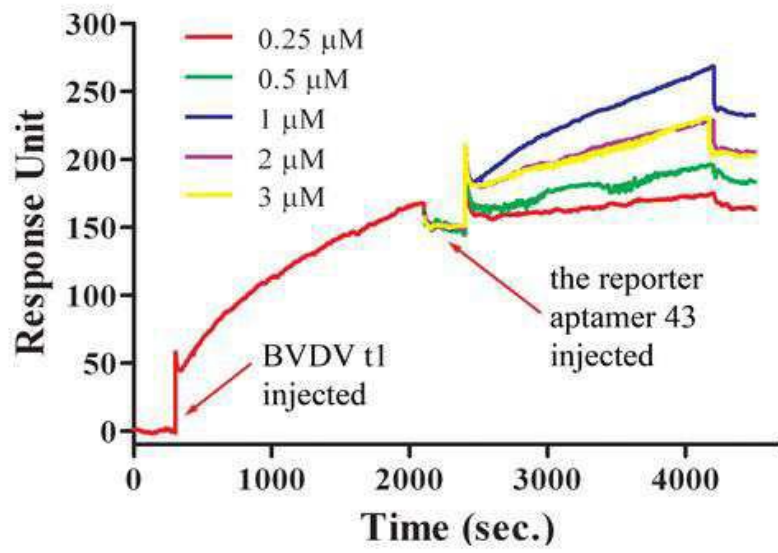
도면14



도면15



도면16



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)