(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0149479
(43) 공개일자 2024년10월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6806 (2018.01) *C12N 15/10* (2017.01)
C12Q 1/6883 (2018.01) *C12Q 1/70* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6806 (2018.05)
C12N 15/1068 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0044765
(22) 출원일자 2023년04월05일
심사청구일자 2023년04월05일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김원근
강원도 춘천시 지석로 97, 103동 101호(석사동, 현진에버빌1차)
송진원
서울특별시 서초구 서초중앙로 220, 102동 1901호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인본

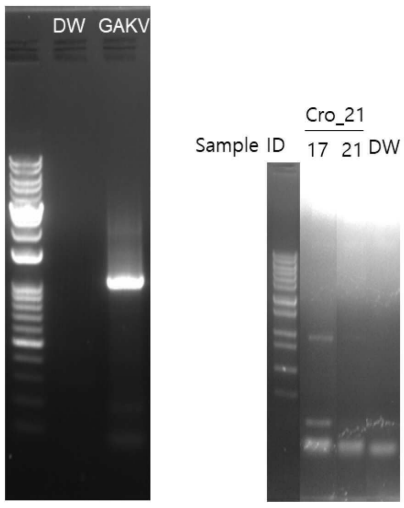
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **차세대 염기서열 분석법을 이용한 감악 바이러스 서열 라이브러리 제조 방법 및 전장 게놈 서열 확인 방법**

(57) 요 약

본 발명은 차세대 염기서열 분석법을 이용한 감악 바이러스 서열 라이브러리 제조 방법 및 전장 게놈 서열 확인 방법에 관한 것이다. 본 발명은 (a) 서로 다른 450~550 bp 길이의 감악 바이러스의 게놈 서열 단편들을 증폭하는 다수의 정방향 및 역방향 프라이머 쌍들로 이루어진 서로 다른 멀티플렉스 프라이머 세트들을 포함하는 멀티플렉스 프라이머 세트 풀을 제조하는 단계; 및 (b) 감악 바이러스 감염 시료에서 상기 제조된 프라이머 세트 풀을 이용하여 차세대 시퀀싱(next generation sequencing)을 사용하기 위한 시료 전처리(sample pre-processing) 과정으로서 멀티플렉스 중합 효소 연쇄반응(multiplex polymerase chain reaction, mPCR)을 실시하는 단계;를 포함하고, 상기 멀티플렉스 프라이머 세트 풀은 서열번호 1 내지 52로 이루어진 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍을 포함하는 것인, 감악 바이러스(Gamak virus)의 서열 라이브러리 제작 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
C12Q 1/70 (2022.05)
C12Q 2531/113 (2013.01)
C12Q 2535/122 (2019.08)
C12Q 2537/143 (2013.01)
C12Q 2600/16 (2013.01)
(72) 발명자
푸스파레니 사라
강원도 춘천시 삭주로 80번길 21, 202호
이성현
강원도 춘천시 후만로98번길 9, 412동 203호(후평동, 후평주공4단지아파트)
박경민
서울특별시 동대문구 안암로16길 18, 306호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345365801
과제번호	2021R1I1A2049607
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	신출현 인수공통 RNA 바이러스에 대한 원헬스 모니터링 및 능동 감시 기술 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2025.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525011800
과제번호	202104663
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	빅데이터기반해양바이러스제어및마린바이오틱스개발(R&D)
연구과제명	감염성 해양바이러스 핵산 기반 진단기술 및 감염 모델 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2021.04.01 ~ 2026.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 서로 다른 500~1200 bp 길이의 감악 바이러스의 게놈 서열 단편들을 증폭하는 다수의 정방향 및 역방향 프라이머 쌍들로 이루어진 서로 다른 멀티플렉스 프라이머 세트들을 포함하는 멀티플렉스 프라이머 세트 풀을 제조하는 단계; 및

(b) 감악 바이러스 감염 시료에서 상기 제조된 프라이머 세트 풀을 이용하여 차세대 시퀀싱(next generation sequencing)을 사용하기 위한 시료 전처리(sample pre-processing) 과정으로서 멀티플렉스 중합 효소 연쇄반응(multiplex polymerase chain reaction, mPCR)을 실시하는 단계;를 포함하고,

상기 멀티플렉스 프라이머 세트 풀은 서열번호 1 내지 40으로 이루어진 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍을 포함하는 것인, 감악 바이러스(Gamak virus)의 서열 라이브러리 제작 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

(a) 단계는, 상기 멀티플렉스 프라이머 세트에 의해 증폭되는 감악 바이러스 게놈 서열 단편들 중 5'에서 3' 방향으로 서로 인접하는 2개의 단편들은 중첩 서열(overlapping sequence)을 포함하고, 상기 중첩 서열은 30 내지 80 bp의 길이로 선행하는 단편의 3'-말단 및 후행하는 단편의 5'-말단에 공통적으로 존재하며, 상기 멀티플렉스 프라이머 세트 풀에 의해 증폭되는 모든 단편들을 5'에서 3' 방향으로 서로 중첩하는 경우 감악 바이러스의 전장 게놈 서열을 포함하는 것인, 감악 바이러스(Gamak virus)의 서열 라이브러리 제작 방법.

청구항 3

(a) 서로 다른 500~1200 bp 길이의 감악 바이러스의 게놈 서열 단편들을 증폭하는 다수의 정방향 및 역방향 프라이머 쌍들로 이루어진 서로 다른 멀티플렉스 프라이머 세트들을 포함하는 멀티플렉스 프라이머 세트 풀을 제조하는 단계;

(b) 감악 바이러스 감염 시료에서 상기 제조된 프라이머 세트 풀을 이용하여 차세대 시퀀싱(next generation sequencing)을 사용하기 위한 시료 전처리(sample pre-processing) 과정으로서 멀티플렉스 중합 효소 연쇄반응(multiplex polymerase chain reaction, mPCR)을 실시하는 단계; 및

(c) 상기 증폭된 mPCR 산물들을 포함하는 감악 바이러스 서열 라이브러리를 차세대 시퀀싱(next generation sequencing, NGS)으로 분석하는 단계를 포함하고,

상기 멀티플렉스 프라이머 세트 풀은 서열번호 1 내지 40으로 이루어진 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍을 포함하는 것인, 시료 내 감악 바이러스(Gamak virus)의 전장 게놈 서열 확인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

(a) 단계는, 상기 멀티플렉스 프라이머 세트에 의해 증폭되는 감악 바이러스 게놈 서열 단편들 중 5'에서 3' 방향으로 서로 인접하는 2개의 단편들은 중첩 서열(overlapping sequence)을 포함하고, 상기 중첩 서열은 30 내지 80 bp의 길이로 선행하는 단편의 3'-말단 및 후행하는 단편의 5'-말단에 공통적으로 존재하며, 상기 멀티플렉스 프라이머 세트 풀에 의해 증폭되는 모든 단편들을 5'에서 3' 방향으로 서로 중첩하는 경우 감악 바이러스의 전장 게놈 서열을 포함하는 것인, 시료 내 감악 바이러스(Gamak virus)의 전장 게놈 서열 확인 방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 시료는 혈액, 혈청, 객담, 소변 또는 생체 조직으로부터 얻는 것인, 시료 내 감악 바이러스(Gamak virus)

의 전장 게놈 서열 확인 방법.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 시료는 RNA 또는 cDNA인 것인, 시료 내 감악 바이러스(Gamak virus)의 전장 게놈 서열 확인 방법.

청구항 7

멀티플렉스 프라이머 세트 풀을 포함하는 시료 내 감악 바이러스 진단용 키트로서,

상기 멀티플렉스 프라이머 세트 풀은 서열번호 1 내지 서열번호 40으로 이루어진 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍을 포함하는 것인 키트.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 시료는 혈액, 혈청, 객담, 소변 또는 생체 조직으로부터 얻는 것인 키트.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 시료는 RNA 또는 cDNA인 것인 키트.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 키트는 PCR에 따라 실시되는 것인 키트.

청구항 11

멀티플렉스 프라이머 세트 풀을 포함하는 시료 내 감악 바이러스 유래 질환용 조성물로서,

상기 멀티플렉스 프라이머 세트 풀은 서열번호 1 내지 서열번호 40으로 이루어진 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍을 포함하는 것인 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 시료는 혈액, 혈청, 객담, 소변 또는 생체 조직으로부터 얻는 것인 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 감악 바이러스 유래 질환은 만성 신장 질환, 만성 폐 질환인 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 차세대 염기서열 분석법을 이용한 감악 바이러스 서열 라이브러리 제조 방법 및 전장 게놈 서열 확인 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 1970년대 후반부터 활발하게 연구되고 있는 염기서열 분석법을 이용하여 인간 질병의 원인을 밝혀내고, 그에 따라 치료 및 예방하는데 응용되고 있다. 염기서열 분석법은 크게 1세대와 차세대 염기서열 분석법(next

generation sequencing: NGS)으로 나뉜다. 1세대 염기서열 분석법은 1977년경에 개발된 Sanger sequencing으로, 유전자 증폭 반응 (Polymerase Chain Reaction) 과정 중 ddNTPs(di-deoxynucleotidetriphosphates)가 DNA strand의 합성을 중단시키는 chain-termination 원리를 응용하여 증폭된 DNA fragment를 모아 염기서열을 확인한다. 이와 같은 방법은 In vivo clone library를 이용하므로 정확도는 높지만, 시퀀싱 속도가 느리고 높은 비용과 많은 노동력이 요구되는 한계점이 있다. 이와 같은 문제점을 극복하기 위하여 차세대 염기서열 분석법이 개발되었다. 1990년대 시작된 인간 유전체 분석 프로젝트로부터 저비용, 고속, 대용량 분석 기술이 요구됨에 따라서 2006년과 2007년에 각각 Roche와 Illumina사에서 차세대 시퀀싱 장비를 개발하면서 차세대 염기서열 분석법에 대한 연구가 활성화되었다.

[0003] 차세대 염기서열 분석법(next generation sequencing: NGS)은 수백만에서 수천만 이상의 대량의 염기서열을 한 번에 획득하는 기술로서 유전체 연구, 미생물 다양성 연구 등 여러 분야에서 사용되고 있다.

[0004] 현재 일루미나(Illumina)사의 마이씩(Miseq), 하이씩(Hiseq), 넥스트씩(Nextseq)등의 차세대 염기서열 분석기와 퍼시픽바이오사이언스(Pacific bioscience)사의 시퀠(Sequel) 차세대 염기서열 분석기 및 라이프테크놀러지스(Life technologies)사의 아이온 피쥐엠(Ion PGM), 아이온 프로톤(Ion Proton)등 차세대 염기서열 분석기가 개발되어 사용되고 있다.

[0005] 이러한 차세대 염기서열 분석을 통해 염기서열정보를 획득하기 위해서는 유전체, 전사체 혹은 목표 유전자가 차세대 염기서열 분석기에 사용될 수 있도록 일련의 과정을 거쳐야 하는데 이러한 과정을 서열 라이브러리 준비(sequencing library preparation)라고 한다.

[0006] 바이러스 유전체 연구 분야에서 NGS는 전장 유전체 서열 확보, 바이러스 검출, 새로운 바이러스 발견, 환경에서의 viral metagenomics, 숙주와 바이러스 간의 관계를 분석하는데 이용된다. 첫 번째, NGS를 이용하여 전체 유전체 sequencing을 하여 viral genome의 다양성과 진화를 볼 수 있고 viral phylogenesis, 바이러스 분자 역학과 감시에 도입할 수 있다. 그리고 virulence factor와 drug-resistance gene들을 확인할 수 있어 바이러스 증식을 타겟으로 하는 치료약물과 숙주면역 저항을 볼 수 있다. 전체 유전체 sequencing 방법은 기존의 방법인 PCR을 통해 sequencing을 하는 것보다 가격과 시간을 단축을 할 수 있다. 두 번째로는 바이러스 병원체의 검출과 새로운 바이러스의 발견을 들 수 있다. 사람의 혈액 또는 동물의 조직, 식물과 같은 샘플에서 NGS를 이용하여 어떠한 바이러스 병원체가 감염되어 있는지를 확인할 수 있고 아직 밝혀지지 않은 새로운 바이러스도 발견할 수 있다. 예를 들어 사람의 혈액에서 암을 일으키는 바이러스를 확인할 수 있다. 이와 같은 방법을 이용해 진단에 사용할 수 있다. 세 번째는 환경 또는 사람에서의 viral metagenomics이다. 환경 내에 존재하는 식물, 배설물, 하수, 물과 같은 환경 샘플이나 사람의 혈액에서 NGS을 이용하여 시료에서 존재하는 virus 다양성과 population을 알 수 있다. 마지막으로, 차세대 염기서열 분석법을 통해 숙주와 바이러스 간의 관계 분석에 이용할 수 있다. 숙주로부터 채취한 시료에서 바이러스 유전자의 발현을 분석하거나 바이러스와 숙주의 transcriptome과 epigenome 분석을 통해 바이러스의 감염에 의한 숙주 전사체의 발현 조절을 확인할 수 있다. 이러한 상관관계에 대한 연구를 통해 숙주와 바이러스 사이의 면역 시스템 연구에 도움을 줄 수 있다.

[0007] 한편, 감악 바이러스(gamak virus)는 설치류, 예를 들면 땃쥐에서 유래하는 파라믹소 바이러스의 일종으로서, 대한민국 감악산에서 발견되었다. 인간에게 치명적인 질병을 일으키는 헨드라-니파 바이러스 유사 바이러스인 감악 바이러스는 현재 국내 감염 환자 보고 사례는 밝혀진 바 없으나, 과거 인간 폐 조직 유래 세포주에서 바이러스의 증식 및 내재 면역 유전자 활성화에 대한 연구를 통해 새로운 인수 공통 감염병으로서의 가능성이 제기된 바 있다

선행기술문헌

[0008] 등록특허 제10-2404104호

[0009] Lee SH, Kim K, Kim J, No JS, Park K, Budhathoki S, Lee SH, Lee J, Cho SH, Cho S, Lee GY, Hwang J, Kim HC, Klein TA, Uhm CS, Kim WK, Song JW. Discovery and Genetic Characterization of Novel Paramyxoviruses Related to the Genus Henipavirus in Crocidura Species in the Republic of Korea. Viruses. 2021 Oct 7;13(10):2020. doi: 10.3390/v13102020. PMID: 34696450; PMCID: PMC8537881.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 감악 바이러스(Gamak virus)의 서열 라이브러리 제작 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 또한, 시료 내 감악 바이러스(Gamak virus)의 전장 게놈 서열 확인 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명은 또한, 멀티플렉스 프라이머 세트 풀을 포함하는 시료 내 감악 바이러스 진단용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0013] 본 발명은 또한, 멀티플렉스 프라이머 세트 풀을 포함하는 시료 내 감악 바이러스 유래 질환용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0014] 본 개시의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 개시의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 개시의 실시 예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 개시의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타낸 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명은 (a) 서로 다른 500~1200 bp 길이의 감악 바이러스의 게놈 서열 단편들을 증폭하는 다수의 정방향 및 역방향 프라이머 쌍들로 이루어진 서로 다른 멀티플렉스 프라이머 세트들을 포함하는 멀티플렉스 프라이머 세트 풀을 제조하는 단계; 및 (b) 감악 바이러스 감염 시료에서 상기 제조된 프라이머 세트 풀을 이용하여 차세대 시퀀싱(next generation sequencing)을 사용하기 위한 시료 전처리(sample pre-processing) 과정으로서 멀티플렉스 중합 효소 연쇄반응(multiplex polymerase chain reaction, mPCR)을 실시하는 단계;를 포함하고, 상기 멀티플렉스 프라이머 세트 풀은 서열번호 1 내지 40으로 이루어진 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍을 포함하는 것인, 감악 바이러스(Gamak virus)의 서열 라이브러리 제작 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한,(a) 서로 다른 500~1200 bp 길이의 감악 바이러스의 게놈 서열 단편들을 증폭하는 다수의 정방향 및 역방향 프라이머 쌍들로 이루어진 서로 다른 멀티플렉스 프라이머 세트들을 포함하는 멀티플렉스 프라이머 세트 풀을 제조하는 단계; (b) 감악 바이러스 감염 시료에서 상기 제조된 프라이머 세트 풀을 이용하여 차세대 시퀀싱(next generation sequencing)을 사용하기 위한 시료 전처리(sample pre-processing) 과정으로서 멀티플렉스 중합 효소 연쇄반응(multiplex polymerase chain reaction, mPCR)을 실시하는 단계; 및 (c) 상기 증폭된 mPCR 산물들을 포함하는 감악 바이러스 서열 라이브러리를 차세대 시퀀싱(next generation sequencing, NGS)으로 분석하는 단계를 포함하고, 상기 멀티플렉스 프라이머 세트 풀은 서열번호 1 내지 40으로 이루어진 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍을 포함하는 것인, 시료 내 감악 바이러스(Gamak virus)의 전장 게놈 서열 확인 방법을 제공할 수 있다.

[0017] (a) 단계는, 상기 멀티플렉스 프라이머 세트에 의해 증폭되는 감악 바이러스 게놈 서열 단편들 중 5'에서 3' 방향으로 서로 인접하는 2개의 단편들은 중첩 서열(overlapping sequence)을 포함하고, 상기 중첩 서열은 30 내지 80, 바람직하게는 40 내지 60 bp의 길이로 선행하는 단편의 3'-말단 및 후행하는 단편의 5'-말단에 공통적으로 존재하며, 상기 멀티플렉스 프라이머 세트 풀에 의해 증폭되는 모든 단편들을 5'에서 3' 방향으로 서로 중첩하는 경우 감악 바이러스의 전장 게놈 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[0018] (a) 멀티플렉스 프라이머 세트 풀을 제조하는 단계

[0019] 본 발명자들은 레퍼런스 게놈 서열을 참조하여 감악 바이러스의 서열 라이브러리 또는 전장 게놈 서열을 검출하고 확인하기 위한 다수의 멀티플렉스 프라이머 세트(구체적으로는, 500~1200 bp , 바람직하게는 1000 bp 길이의 감악 바이러스 게놈 서열 단편들을 증폭하는 정방향 및 역방향 프라이머 쌍을 포함하는 세트)를 포함하는 멀티플렉스 프라이머 세트 풀을 고안/제조하여 감악 바이러스의 서열 라이브러리를 제조하고, 시료(예를 들어, 혈액, 혈청, 소변 등)로부터 얻어진 mRNA 또는 이로부터 제조된 cDNA를 템플레이트로 이용한 멀티플렉스 PCR(polymerase chain reaction)을 실시하고 차세대 시퀀싱(next generation sequencing, NGS)에 의해 확인하여 높은 정확도, 민감도 및 신뢰도를 가진 감악 바이러스의 확인 방법을 개발하였다

[0020] 본 발명은 감악 바이러스를 검출하고, 이의 단편 게놈 서열 확인이 아니라 전장 게놈 서열을 한번에 신속하게 획득할 수 있는 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 멀티플렉스 프라이머 세트 풀은 서로 다른 다수의 멀티플렉스 프라이머 세트들로 이루어지며, 상기 하나의 멀티플렉스 프라이머 세트는 목적 바이러스의 일부 게놈 서열을 증폭할 수 있는 정방향 및 역방향 프라

이며 쌍들을 포함한다. 구체적으로는, 상기 하나의 멀티플렉스 프라이머 세트 내 프라이머 쌍은 500 내지 1200, 바람직하게는 1000 bp 길이의 서열 단편을 증폭하도록 설계되고, 상기 증폭될 단편들에 있어서 5'에서 3' 방향으로 서로 인접하는 2개의 단편들은 중첩 서열(overlapping sequence)을 포함한다. 상기 중첩 서열은 상기 증폭될 단편의 올리고뉴클레오타이드 서열 중 일부에 대한 상보적인 서열을 의미하고, 이는 상기 인접하는 2 개의 단편들의 서열을 순차적으로 어셈블리할 수 있도록 디자인된다. 보다 구체적으로는, 상기 중첩 서열은 5'에서 3' 방향에서 첫 번째 증폭 단편의 3'-말단과 두 번째 증폭 단편의 5'-말단에 공통적으로 존재한다. 따라서, 상기 하나의 멀티플렉스 프라이머 세트에 의해 증폭되는 500 내지 1200, 바람직하게는 1000 bp 길이의 서열 단편들을 연결하는 경우 감악 바이러스의 일부 게놈 서열을 정확하고 신속하게 확보할 수 있다.

[0022] 본 발명의 멀티플랙스 프라이머 세트는 서로 다른 500 내지 1200, 바람직하게는 1000 bp 길이의 감악 바이러스 게놈 서열 단편들을 증폭하는 정방향 및 역방향 프라이머 쌍들을 포함한다.

[0023] 서로 다른 복수의 멀티플렉스 프라이머 세트를 포함하는 본 발명의 멀티플렉스 프라이머 세트 풀은 감악 바이러스의 전장 게놈 서열을 포괄하도록 설계/고안됨으로써, 개별 멀티플렉스 프라이머 세트에 의해 증폭되는 단편들을 모두 취합하여 5'에서 3' 방향으로 서로 중첩/연결시키는 경우 목적 바이러스의 전장 게놈 서열을 획득할 수 있다.

[0024] (b) 멀티플렉스 중합 효소 연쇄반응(multiplex polymerase chain reaction, mPCR)을 실시하는 단계

[0025] 본 발명은 제조된 멀티플렉스 프라이머 세트 풀을 이용하여 시료에서 멀티플렉스 중합효소 연쇄반응 (multiplex polymerase chain reaction, mPCR)을 실시한다. 본 단계는 감악 바이러스 감염 시료에서 상기 제조된 프라이머 세트 풀을 이용하여 차세대 시퀀싱(next generation sequencing)을 사용하기 위한 시료 전처리(sample pre-processing) 과정이다. 본 단계에 의해, 차세대 시퀀싱을 수행하기 위한 서열 라이브러리가 제조된다.

[0026] 본 발명의 어떤 구현예에서, 본 발명의 증폭은 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다.

[0027] 본 발명의 어떤 구현예에서, 본 발명의 프라이머 쌍은 유전자 증폭 반응(amplification reactions)에 이용된다. 본 명세서에 기재된 용어 "증폭 반응"은 타겟 게놈 서열(또는 핵산 분자)을 증폭하는 반응을 의미한다.

[0028] 유전자 증폭 반응으로서 PCR이 가장 널리 이용된다.

[0029] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프라이머(primer)"는 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산쇄(템플레이트, 주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 구체적으로는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다.

[0030] 프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 응용분야 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정된다. 상기 용어 "어닐링(annealing)" 또는 "프라이밍(priming)"은 템플레이트(예컨대, 게놈 서열 또는 핵산 분자)에 올리고디옥시뉴클레오타이드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 중합효소가 뉴클레오타이드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다. 본 발명의 방법을 프라이머를 이용하여 실시하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 분석 대상(예컨대, 감악 바이러스를 포함하는 시료)에서 감악 바이러스 및 이의 전장 게놈 서열을 동시에 검출/확인할 수 있다. 따라서, 본 발명은 시료 내 목적 바이러스에서 얻어진 총 RNA로부터 합성된 cDNA에 결합하는 프라이머 쌍을 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시한다. mRNA를 얻기 위하여, 시료에서 총 RNA를 분리한다. 총 RNA를 분리하는 것은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다. 예컨대, Trizol을 이용하여 용이하게 총 RNA를 분리할 수 있다. 이어, 분리된 mRNA로부터 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 증폭한다.

[0031] (c) 차세대 시퀀싱(next generation sequencing, NGS)으로 분석하는 단계

[0032] 본 단계는, 상기 증폭된 mPCR 산물들을 포함하는 감악 바이러스 서열 라이브러리를 차세대 시퀀싱(next generation sequencing, NGS)으로 분석하는 단계이다. 본 단계에 의해, 감악 바이러스의 전장 게놈 서열을 확인할 수 있다.

[0033] 구체적으로는, 증폭된 게놈 서열 단편의 증폭 산물(예컨대, 감악 바이러스의 증폭 단편들)을 적합한 방법으로 분석하여 목적 바이러스의 게놈 서열을 검출한다. 예를 들어, 상술한 증폭 반응 결과물을 젤 전기영동을 하고, 그 결과 형성되는 밴드를 관찰 및 분석하여 이의 존재 유무를 확인한 후, 차세대 시퀀싱(예컨대, NGS 장비)을 통해 목적 바이러스의 게놈 서열을 간편하고 신속하게 확인할 수 있다.

[0034] 본 발명은 또한, 멀티플렉스 프라이머 세트 풀을 포함하는 시료 내 감악 바이러스 진단용 키트로서, 상기 멀티플렉스 프라이머 세트 풀은 서열번호 1 내지 서열번호 40로 이루어진 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍을 포함하는 것인 키트를 제공할 수 있다.

[0035] 상기 키트는 PCR에 따라 실시되는 것일 수 있다.

[0036] 본 발명은 또한, 멀티플렉스 프라이머 세트 풀을 포함하는 시료 내 감악 바이러스 유래 질환용 조성물로서, 상기 멀티플렉스 프라이머 세트 풀은 서열번호 1 내지 서열번호 40로 이루어진 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍을 포함하는 것인 조성물을 제공한다.

[0037] 상기 시료는 혈액, 혈청, 객담, 소변 또는 생체 조직으로부터 얻는 것일 수 있다.

[0038] 상기 시료는 RNA 또는 cDNA일 수 있다.

[0039] 상기 감악 바이러스 유래 질환은 만성 신장 질환, 만성 폐 질환일 수 있다.

발명의 효과

[0040] 본 발명은 감악 바이러스(Gamak virus)의 서열 라이브러리 제작 방법을 제공할 수 있다.

[0041] 본 발명은 또한, 시료 내 감악 바이러스(Gamak virus)의 전장 게놈 서열 확인 방법을 제공할 수 있다.

[0042] 본 발명은 또한, 멀티플렉스 프라이머 세트 풀을 포함하는 시료 내 감악 바이러스 진단용 키트를 제공할 수 있다.

[0043] 본 발명은 또한, 멀티플렉스 프라이머 세트 풀을 포함하는 시료 내 감악 바이러스 유래 질환용 조성물을 제공할 수 있다.

[0044] 본 발명에 따르면, 감악 바이러스의 일부 게놈 서열을 증폭할 수 있는 정방향 및 역방향 프라이머 쌍들을 포함하는 멀티플렉스 프라이머 세트들을 이용하여, 감악 바이러스의 서열 라이브러리를 제조하고, 시료 내 감악 바이러스의 존재 유무를 쉽고 빠르게 확인할 수 있다.

[0045] 본 발명에 따르면, 감악 바이러스의 전장 게놈 서열을 높은 분포도(high-depth coverage)로 매우 정확하고 신속하게 얻을 수 있게 해주며, 이를 통해 감악 바이러스 유발 질환의 진단에 있어 보다 효과적으로 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 본 발명의 멀티플렉스 프라이머를 감악 바이러스에 사용하여 2차 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] **실시예**

[0050] 감악 바이러스 게놈 검출용 멀티플렉스 프라이머의 설계

[0051] 감악 바이러스를 동시에 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 세트를 제작하기 위해 검출 목표로 선정된 감악 바이러스 2종(NCBI Accession ID :)의 전체 유전자 염기서열을 대상으로 BioEdit Sequence Alignment Editor 프로그램 (Ver7.1.11, Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence

[0052] alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.)을 이용하여 유전자 염기서열 정렬하였다. 다음은 프라이머 제작에 대한 설명이다. 1 kb (± ¡¾ 100 bp) 크기의 증폭

산물을 위한 프라이머를 디자인하였으며, 염기서열 중 특이한 구조로 인해 증폭되지 않는 부위를 고려하여 50 bp 정도 프라이머 간 겹치는 부위를 선정하였다.

[0053] 표 1은 제작된 다중 프라이머에 대한 정보이다.

표 1

#	서열번호	Primer	Product length	Sequence (5' -> 3')	Length	start	stop	Tm	GC%
1	1	Forward	1000	CAA ACA AGG ATG ATT ATG GAA AC	23	1	23	49.991	34.8
	2	Reverse		CCA GTT CCA TGT AAG TTT TC	20	981	1000	49.012	40
2	3	Forward	923	CAA GCT GAC CTA TTA ACA GTC	21	949	969	51.07	42.9
	4	Reverse		CTT CAT CCT TGT GTT TAG CAC	21	1851	1871	52.05	42.9
3	5	Forward	1168	GCT AAC AAT CCA TTC ATG AAT G	22	1824	1845	49.909	36.4
	6	Reverse		CAT GGC TAA CAC ATC CAT T	19	2973	2991	50.48	42.1
4	7	Forward	1050	GGA GTA GTA AAT CAT GTG GAA G	22	2941	2962	50.765	40.9
	8	Reverse		CAA AAC TAG CAG CTT CAG G	19	3972	3990	51.881	47.4
5	9	Forward	1058	GAG ACA GGA GAA GAA AAC TC	20	3948	3967	50.553	45
	10	Reverse		CCT CCA TCC TAG CTA TTA AC	20	4986	5005	49.762	45
6	11	Forward	1053	CAA CAG TGT CAT CAC AAC AAT	21	4949	4969	51.33	38.1
	12	Reverse		CTG TTG TGT CTA TCA AGA CAT C	22	5980	6001	51.163	40.9
7	13	Forward	1033	CAA TTC CTC GAG ACT TCA AG	20	5951	5970	51.159	45
	14	Reverse		TTG CAA ATA GCA CGT GAT C	19	6965	6983	51.202	42.1
8	15	Forward	1054	TAA ACA CAG AAC CTC AGT CAG	21	6927	6947	52.312	42.9
	16	Reverse		CTT CAT CGC TGC TAT ATT CC	20	7961	7980	51.159	45
9	17	Forward	1028	GCA CTT CAT CGA TCA AAT GAG	21	7933	7953	52.154	42.9
	18	Reverse		CTT ATG AAA TCA CCA GCT TCT G	22	8939	8960	51.745	40.9
10	19	Forward	1095	GGT AAT CAA TTA GCG GGG AT	20	8905	8924	52.662	45
	20	Reverse		CTT TGA CGG GAA TAT ACC AG	20	9980	9999	50.766	45
11	21	Forward	1033	GAT CAA TGC ACT TGC AAC	18	9955	9972	50.078	44.4
	22	Reverse		GTT TTG ACC ACT CAA CCT C	19	10969	10987	51.765	47.4
12	23	Forward	1097	CTT CAT GGA ACC GAT ATC TG	20	10916	10935	50.811	45
	24	Reverse		CCA AAC GAA AGT GTG AAA AC	20	11993	12012	50.461	40
13	25	Forward	1049	GAA AAA CTT AGG TGC AAT GC	20	11945	11964	50.396	40
	26	Reverse		CCT TGT CTG ATC ATC ACT TC	20	12974	12993	50.952	45
14	27	Forward	1064	GAC AGA GTG TAC TCT AAC AGG	21	12942	12962	52.502	47.6
	28	Reverse		GGT ATA CTG AGT CCC ATT CTG	21	13985	14005	52.73	47.6
15	29	Forward	1051	GTA CAT GAA AGA CAA AGC CT	20	13950	13969	50.469	40
	30	Reverse		CAC CCT AAT ATT AGT CTC CAC	21	14980	15000	49.892	42.9
16	31	Forward	1077	GTT ATA GCC AAA AAT TGT GGA C	22	14924	14945	50.033	36.4
	32	Reverse		CTA ACC TAG GTT GTA TAC CC	20	15981	16000	49.37	45
17	33	Forward	1044	GGT TTA ATA AGG ACT GGT CTC	21	15952	15972	50.579	42.9
	34	Reverse		GTC AGG AGT TGT CCA ATT TG	20	16976	16995	51.946	45
18	35	Forward	1039	GTA CAC AAG CAT GGT ATT CAA G	22	16940	16961	51.949	40.9
	36	Reverse		GAT GTC GAA TTA ATT CCA ACC C	22	17957	17978	52.044	40.9
19	37	Forward	1051	GAC ATG ATT CCT ACA AAT GGT T	22	17914	17935	50.651	36.4
	38	Reverse		CCA ATA AAG TGG TGA TAG GG	20	18945	18964	50.789	45
20	39	Forward	599	GAA AGT CCA CAA GAT AAC AAC	21	18873	18893	49.205	38.1
	40	Reverse		GGA AAA TAT ATG AAT TGT ACT CTT G	25	19447	19471	47.153	28

[0054]

[0055] 세포주 및 야생 땃쥐류 조직 시료로부터 감악 바이러스 확인을 위한 다중 프라이머 중합 연쇄 반응

[0056] 시료 확보 및 RNA 추출

[0057] 감악 바이러스 부분 유전자 염기서열에 대한 PCR 스크리닝 결과를 통해 감악 바이러스 감염 양성인 야생 땃쥐류 조직 시료에 TriZol reagent (Invitrogen)을 처리하여 total RNA를 분리한다.

[0059] cDNA 합성

[0060] 이렇게 분리된 total RNA 1ug은 MultiScribe Reverse Transcriptase 100 unit, 1X RT buffer, 1X RT Random Primers (Applied biosystems)를 넣고 최종 볼륨 10ul로 준비한다. 이렇게 준비된 시료는 37℃에서 10분의 1 사이클, 42℃에서 50분, 94℃에서 3분간 반응하여 cDNA를 합성한다.

[0062] 1차 Multiplex PCR 반응 및 확인

[0063] 이렇게 만들어진 cDNA를 template 2.0ul를 이용하여 감악 바이러스 Multiplex PCR을 위하여 제작된 다중 프라이머 세트 (각각의 프라이머 농도 1pM) 1.0ul, 2X Uh buffer 12.5ul, Uh-Taq (2.5 Unit) 0.8ul, 그리고 Molecular grade water 25ul를 넣어 1차 PCR을 실시한다: 95℃에서 15분의 1 사이클, 95℃에서 20초, 50℃에서 40초, 및 72℃에서 1분의 40 사이클, 및 최종 연장(extension) 반응은 72℃에서 3 분 1 사이클로 반응한다. PCR 기기는 ABI veriti 96 well Thermal Cycler을 사용한다.상기 반응 조건에 따라 PCR을 통해 핵산을 증폭한 후 증폭산물을 1%의 아가로스 젤상에서 전기영동하여 표준 마커를 기준으로 하여 목표로 하는 검출 유전자의 증폭 유무를 확인한다. (1st PCR product). PCR 혼합물 조성 및 PCR 조건을 아래 표에 나타낸다.

표 2

[0064]

Template	2.0 μl
Primer mix (each 1 pmole)	1.0 μl
2X Uh-mix	12.5 μl
DW to	25.0 μl

표 3

[0065]

95℃	15 min	1 cycle
95℃	20 sec	25 cycle
50℃	40 sec	
72℃	1 min	
72℃	3 min	1 cycle
10℃	forever	

[0066] 2차 Multiplex PCR 반응 및 확인

[0067] 1차 Multiplex PCR로 만들어진 생성물의 2.0ul 를 사용하여 감악 바이러스 Multiplex PCR을 위하여 제작된 다중 프라이머 세트 (각각의 프라이머 농도 1pM) 1.0ul, 2X Uh buffer 12.5ul, Uh-Taq (2.5 Unit) 0.8ul, 그리고 Molecular-grade water 25ul를 넣어 2차 PCR을 실시한다: 95℃에서 15분의 1 사이클, 95℃에서 20초, 50℃에서 40초, 및 72℃에서 1분의 25 사이클, 및 최종 연장(extension) 반응은 72℃에서 3 분 1 사이클로 반응한다. 상기 반응조건에 따라 PCR을 통해 핵산을 증폭한 후 증폭산물을 1%의 아가로스 젤상에서 전기영동하여 표준 마커를 기준으로 하여 목표로 하는 검출 유전자의 증폭 유무를 확인한다. (2nd PCR product).

[0068] 도 1은 표 1의 멀티플렉스 프라이머를 사용한 실험 결과로서, 조직 샘플(tissue sample)에서 감악 바이러스에 대한 표적 다중 프라이머를 사용하여 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과물을 적당한 양으로 희석하여, 추가적으로 2차 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과 (2nd PCR product)를 보여준다.

[0070] 감악 바이러스 확인을 위한 차세대 염기서열 분석을 위한 시료 전처리 및 NGS 실행

[0071] 2차에 걸친 Multiplex PCR 생성물은 Oxford nanopore technologies 사에서 제공하는 Ligation sequencing kit를 이용하여 라이브러리 준비과정을 진행한다. 표 4는 감악 바이러스 감염 세포주 대상으로 진행한 NGS 결과이고, 표 5는 감악 바이러스 양성 야생 땃쥐류 조직을 대상으로 진행한 NGS 결과이다.

표 4

[0072]

Sample	Tissues	Ct value	Total reads	Mapped reads	Mapped reads / trimmed reads (%)	Consensus length	Depth of coverage (%)	Reference	Coverage rate (%)
Trial	Cell	-	186,565	176,981	94.9	18,450	4,351.53	18,460	99.9

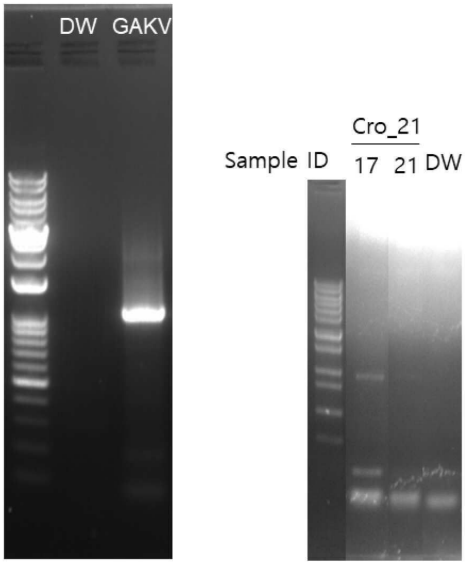
표 5

[0073]

Sample	Tissues	Ct value	Total reads	Mapped reads	Mapped reads / trimmed reads (%)	Consensus length	Depth of coverage (%)	Reference	Coverage rate (%)
Cro21_17	Kidney	19.6	2,649,408	2,382,077	89.9	17,999	46,280.80	18,460	97.5
Cro21_21	Kidney	24.3	726,608	624,562	86.0	16,587	9,363.98	18,460	89.9
NC	DW	34.7	9,982	3,593	36.0	12,740	87.25	18,460	69.0

도면

도면1



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.