(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0013613
(43) 공개일자 2023년01월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01) *C12Q 1/24* (2017.01)
G01N 1/40 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/70 (2022.05)
C12Q 1/24 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0069797
(22) 출원일자 2022년06월08일
심사청구일자 2022년06월08일
(30) 우선권주장
1020210094474 2021년07월19일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이하나
서울특별시 강남구 선릉로 120, 7동 302호(대치동, 개포1,2차우성아파트)
(74) 대리인
특허법인이룸리온

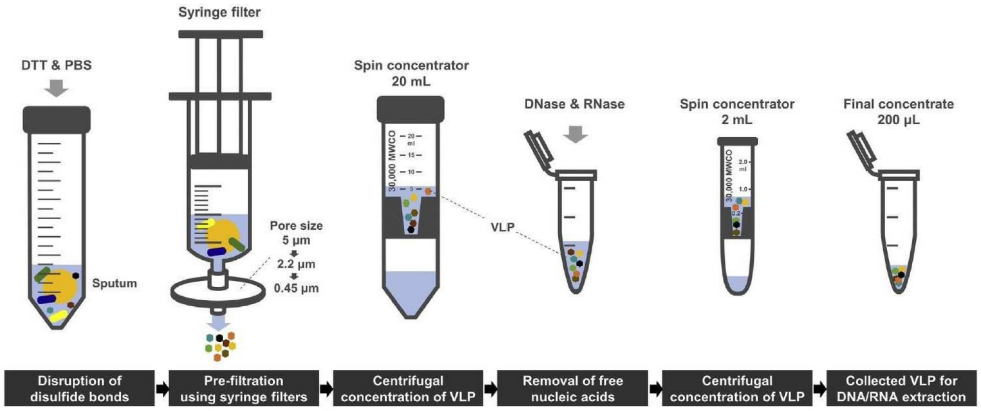
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **초미세여과 장치를 이용한 동물 시료 내 바이러스 입자 농축 방법**

(57) 요 약

본 발명은 초미세여과 장치를 이용한 생물학적 시료 내 바이러스 입자 농축 방법에 따르면, 다공성 막을 포함하는 초미세여과 장치를 사용하여 절차가 간이하고, 이로 인하여 시료의 냉동 과정이 불필요하기 때문에 데이터의 손실이 발생할 가능성이 현저히 낮아 정확도가 우수할 뿐만 아니라, 미량의 생물 유래 시료만으로도 바이러스를 농축 및 추출해낼 수 있으므로, 생물학적 시료의 바이롬(virome) 분석 방법으로 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
G01N 1/4077 (2013.01)
B01L 2200/0652 (2013.01)
B01L 2200/10 (2013.01)
G01N 2001/4088 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 단계를 포함하는 바이러스 입자 농축 방법:

(S1) 분리된 동물 시료를 전처리하는 단계; 및

(S2) 초미세여과 장치(ultrafiltration device)를 이용하여 상기 (S1) 단계의 시료를 여과하는 농축 단계.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 시료는 호흡기 유래 시료, 혈액, 전혈, 혈장, 타액, 조직, 세포, 기관, 골수, 미세침흡인 검체, 중심부 바늘 생검 검체, 진공흡입생검 검체, 소변 및 분변으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것인 바이러스 입자 농축 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 호흡기 유래 시료는 객담, 기관지폐포세척액, 기관지흡인물, 인후도찰물, 비인후도찰물, 인후흡인물, 비인후흡인물, 및 비강흡인물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것인 바이러스 입자 농축 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (S1) 단계의 전처리는 사전 필터 과정이 포함되는 것인 바이러스 입자 농축 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (S1) 단계의 전처리는 시료의 냉동 과정이 불필요한 것인 바이러스 입자 농축 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 바이러스 입자 농축 방법은 (S2) 단계 후 바이러스 농축액에 핵산분해효소를 처리하는 단계를 더 포함하는 것인 바이러스 입자 농축 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 바이러스 입자 농축 방법은 (S2) 단계 후 바이러스 농축액을 초미세여과 장치를 이용하여 여과하는 농축

단계를 더 포함하는 것인 바이러스 입자 농축 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 농축 단계는 시료의 양이 200㎕ 이하가 될 때까지 진행되는 것인 바이러스 입자 농축 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 초미세여과 장치는 구멍의 분자량 컷오프(molecular weight cut-off)가 3 내지 100kDa인 다공성 막을 포함하는 것인 바이러스 입자 농축 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 초미세여과 장치의 시료 적재 용량은 10㎕ 내지 100㎖인 것인 바이러스 입자 농축 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 (S1) 단계의 여과는 10분 내지 120분 동안 수행되는 것인 바이러스 입자 농축 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 바이러스는 박테리오파지 및 진핵생물 바이러스로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인 바이러스 입자 농축 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 박테리오파지는 *스트렙토코커스(Streptococcus)* 파지, *클렙시엘라(Klebsiella)* 파지, *에쉬리키아(Escherichia)* 파지, *아시네토박터(Acinetobacter)* 파지, 방선균(*Actinomyces*) 파지, *어그리개티박터(Aggregatibacter)* 파지, *바실러스(Bacillus)* 파지, *버크홀데리아(Burkholderia)* 파지, 장내세균(*Enterobacteria*) 파지, *골도니아(Gordonia)* 파지, *헤모필루스(Haemophilus)* 파지, *락토바실러스(Lactobacillus)* 파지, *프로피오니박테리움(Propionibacterium)* 파지, *슈드모나스(Pseudomonas)* 파지, *살모넬라(Salmonella)* 파지, *쉬겔라(Shigella)* 파지, *스타필로코커스(Staphylococcus)* 파지, *스테노트로포모나스(Stenotrophomonas)* 파지, *써머스(Thermus)* 파지, 및 *비브리오(Vibrio)* 파지로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것인 바이러스 입자 농축 방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 진핵생물 바이러스는 단순포진바이러스(Herpes simplex virus, HSV), 거대세포바이러스(Cytomegalovirus, CMV), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus, EBV), 유두종바이러스(Papillomavirus), 헤르페스바이러(Herpesvirus), 소 α-헤르페스바이러스(Bovine α-herpesvirus), 감귤류 엑소콜티스 비로이드(Citrus exocortis viroid), 말 α-헤르페스바이러스(Equid α-herpesvirus), Jaagsiekte 양 레트로바이러 (Jaagsiekte sheep Retrovirus), MERS-관련 코로나바이러스(MERS-related coronavirus), 파보바이러스(Parvovirus), 돼지 변 관련 서큘러 바이러스(Porcine stool associated circular virus), 셈리키삼림열바이러스(Semliki forest virus), 담배 잎맥 제거 바이러스(Tobacco vein clearing virus), 토크테노바이러스(Torque teno virus), 백점병 바이러스(White spot syndrome virus), 뎅기열-관련 바이러스(dengue-related virus), 및 HIV-관련 바이러스(HIV-related virus)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것인 바이러스 입자 농축 방법.

청구항 15

하기 단계를 추가로 포함하는 바이러스 검출 방법:

(S3) 제1항의 방법에 의해 바이러스 입자를 농축하는 단계; 및

(S4) 상기 (S3) 단계의 바이러스 농축액으로부터 바이러스 핵산을 추출하는 단계.

청구항 16

구멍의 분자량 컷오프가 3 내지 100kDa인 다공성 막을 구비하는 초미세여과 장치를 포함하는 동물 시료 내의 바이러스 입자 농축용 장치.

청구항 17

구멍의 분자량 컷오프가 3 내지 100kDa인 다공성 막을 구비하는 초미세여과 장치 및 설명서를 포함하는 동물 시료 내의 바이러스 입자 농축용 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 초미세여과 장치를 이용한 동물 시료 내 바이러스 입자 농축 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 마이크로바이옴(microbiome)이란 인체에 서식하는 모든 미생물의 유전체를 통칭하는 것으로, 특정 환경에 존재하는 미생물 군집을 의미하는 마이크로바이오타 (Microbiota)와 한 개체의 모든 유전 정보를 의미하는 유전체(Genome)의 합성어, 또는 미생물 (Microbe)와 생태계 (Biome)의 합성어로도 해석된다. 마이크로바이옴은 인간 체중의 1~3%를 차지하면서도 중요한 면역작용에 관여하며, 약물에 대한 반응을 조절하고, 신진 대사에 큰 영향을 주는 기능적 단위로 알려져, '제2의 장기 (forgotten organ)'라고 불리기도 한다.

[0003] 마이크로바이옴에 포함되는 미생물이란 세균, 고세균, 바이러스, 곰팡이 등이 있으며, 세균 마이크로바이옴(박테리옴, bacteriome)에 대한 연구 개발이 활발히 이루어지고 있다. 반면, 바이러스가 생체에 미치는 영향이 세균보다 크다는 연구 결과들이 보고되고 있음에도 불구하고, 작은 크기, 적은 생물량 등의 이유로 이를 회수하고 농축하는 것이 까다롭다는 등 분석 기술의 어려움으로 인하여 바이러스에 대한 연구 개발이 상대적으로 지체되고 있다.

[0004] 동물 시료로부터 바이러스 입자를 회수 및 농축하는 전통적 실험법으로 CsCl 밀도구배 원심분리법(cesium chloride density gradient centrifugation)이 사용되고 있으나, 고도의 숙련된 기술을 필요로 하므로 병원의 임상병리사 등이 수행하기에 어려워 보편화 될 수 없는 한계점이 있다. 또한 실험에 소요되는 시간이 3일 이상으로 길어서 시료를 단시간에 대량 분석하기 불가능하여 경제성이 낮다.

[0005] 또 다른 기술인 접선유동여과법(tangential-flow filtration)은 kDa 다공성 막(kDa pore membrane)을 이용한

여과법에 기반한 것인데, 여과를 위해 유동 실험 장치를 사용하므로 기본적인 장치 운용에 큰 부피의 시료 양이 필요하고, 이는 혈액이나 소변 등 다량의 시료에는 적용 가능하나 타액이나 객담 등의 미량 시료는 적용이 불가능하다는 한계점이 있다.

[0006] 상술한 바와 같이 시료로부터 바이러스를 회수 및 농축하기 위한 종래의 기술들은 시료 부피, 소요 시간, 실험자의 숙련도 요구 등의 한계로 인해 연구실 수준에서만 사용되고, 병원용 키트나 상용제품 등으로 보편화되지 못하는 문제로 인하여 미량의 시료만으로도 바이러스 입자를 간편하고 효과적으로 회수하는 방법의 개발이 필요한 실정이나, 이를 만족하는 바이러스 마이크로바이옴(바이롬, virome) 분석 기술은 보고된 바가 없다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 절차가 간편하여 동물 유래 시료에 포함된 바이러스 입자를 오염 없이 간편하게 농축할 수 있는 방법에 대한 연구를 수행하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-1834828호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 초미세여과를 이용하여 동물 시료 내의 바이러스를 효과적으로 농축시킬 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 (S1) 분리된 동물 시료를 채취하여 전처리하는 단계 및 (S2) 초미세여과 장치(ultrafiltration device)를 이용하여 상기 (S1) 단계의 시료를 여과하는 농축 단계를 포함하는 바이러스 입자 농축 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 (S3) 제1항의 방법에 의해 바이러스 입자를 농축하는 단계 및 (S4) 상기 (S3) 단계의 바이러스 농축액으로부터 바이러스 핵산을 추출하는 단계를 추가적으로 포함하는 바이러스 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 구멍의 분자량 컷오프가 3 내지 100kDa인 다공성 막을 구비하는 초미세여과 장치를 포함하는 동물 시료 내의 바이러스 입자 농축용 장치를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 구멍의 분자량 컷오프가 3 내지 100kDa인 다공성 막을 구비하는 초미세여과 장치 및 설명서를 포함하는 시료 내의 바이러스 입자 농축용 키트를 제공하는 것이다.

[0014] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 바이러스 입자 농축방법을 제공한다:

[0017] (S1) 분리된 동물 시료를 채취하여 전처리하는 단계; 및

[0018] (S2) 초미세여과 장치(ultrafiltration device)를 이용하여 상기 (S1) 단계의 시료를 여과하는 농축 단계.

[0019] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 시료는 호흡기 유래 시료, 혈액, 전혈, 혈장, 타액, 조직, 세포, 기관, 골수, 미세침흡인 검체, 중심부 바늘 생검 검체, 진공흡입생검 검체, 소변 및 분변으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0020] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 호흡기 유래 시료는 객담, 기관지폐포세척액, 기관지흡인물, 인후도찰물, 비인후도찰물, 인후흡인물, 비인후흡인물, 및 비강흡인물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에

한정되지 않는다.

[0021] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 (S1) 단계의 전처리는 사전 필터 과정이 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0022] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 (S1) 단계의 전처리는 시료의 냉동 과정이 불필요할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 바이러스 입자 농축 방법은 (S2) 단계 후 바이러스 농축액에 핵산분해효소를 처리하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 바이러스 입자 농축 방법은 (S2) 단계 후 바이러스 농축액을 초미세여과 장치를 이용하여 여과하는 농축 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 농축 단계는 시료의 양이 200㎕ 이하가 될 때까지 진행될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 초미세여과 장치는 구멍의 분자량 컷오프(molecular weight cut-off)가 3 내지 100kDa인 다공성 막을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0027] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 초미세여과 장치의 시료 적재 용량은 10㎕ 내지 100㎖일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0028] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 (S1) 단계의 여과는 10분 내지 120분 동안 수행될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0029] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 바이러스는 박테리오파지 및 진핵생물 바이러스로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0030] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 박테리오파지는 *스트렙토코커스(Streptococcus)* 파지, *클렙시엘라(Klebsiella)* 파지, *에쉬리키아(Escherichia)* 파지, *아시네토박터(Acinetobacter)* 파지, 방선균(*Actinomyces*) 파지, *어그리개티박터(Aggregatibacter)* 파지, *바실러스(Bacillus)* 파지, *버크홀데리아(Burkholderia)* 파지, 장내세균(*Enterobacteria*) 파지, *골도니아(Gordonia)* 파지, *헤모필루스(Haemophilus)* 파지, *락토바실러스(Lactobacillus)* 파지, *프로피오니박테리움(Propionibacterium)* 파지, *슈드모나스(Pseudomonas)* 파지, *살모넬라(Salmonella)* 파지, *쉬겔라(Shigella)* 파지, *스타필로코커스(Staphylococcus)* 파지, *스테노트로포모나스(Stenotrophomonas)* 파지, *써머스(Thermus)* 파지, 및 *비브리오(Vibrio)* 파지로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0031] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 진핵생물 바이러스는 단순포진바이러스(Herpes simplex virus, HSV), 거대세포바이러스(Cytomegalovirus, CMV), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus, EBV), 유두종바이러스(Papillomavirus), 헤르페스바이러 (Herpesvirus), 소 α-헤르페스바이러스(Bovine α-herpesvirus), 감귤류 엑소콜티스 비로이드(Citrus exocortis viroid), 말 α-헤르페스바이러스(Equid α-herpesvirus), Jaagsiekte 양 레트로바이러 (Jaagsiekte sheep Retrovirus), MERS-관련 코로나바이러스(MERS-related coronavirus), 파보바이러스(Parvovirus), 돼지 변 관련 서큘러 바이러스(Porcine stool associated circular virus), 셈리키삼림열바이러스(Semliki forest virus), 담배 잎맥 제거 바이러스(Tobacco vein clearing virus), 토크테노바이러스(Torque teno virus), 백점병 바이러스(White spot syndrome virus), 뎅기열-관련 바이러스(dengue-related virus), 및 HIV-관련 바이러스(HIV-related virus)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0032] 본 발명은 하기 단계를 추가로 포함하는 바이러스 검출 방법을 제공한다:

[0033] (S3) 제1항의 방법에 의해 바이러스 입자를 농축하는 단계; 및

[0034] (S4) 상기 (S3) 단계의 바이러스 농축액으로부터 바이러스 핵산을 추출하는 단계.

[0035] 본 발명은 구멍의 분자량 컷오프가 3 내지 100kDa인 다공성 막을 구비하는 초미세여과 장치를 포함하는 동물 시료 내의 바이러스 입자 농축용 장치를 제공한다.

[0036] 본 발명은 구멍의 분자량 컷오프가 3 내지 100kDa인 다공성 막을 구비하는 초미세여과 장치 및 설명서를 포함하는 동물 시료 내의 바이러스 입자 농축용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0038] 초미세여과 장치를 이용한 동물 시료 내 바이러스 입자 농축 방법에 따르면, 다공성 막을 포함하는 초미세여과 장치를 사용하여 절차가 간이하고, 이로 인하여 시료의 냉동 과정이 불필요하기 때문에 데이터의 손실이 발생할 가능성이 현저히 낮아 정확도가 우수할 뿐만 아니라, 미량의 시료만으로도 바이러스를 농축 및 추출해낼 수 있으므로, 동물 시료의 바이롬(virome) 분석 방법으로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 객담 시료로부터 바이러스-유사 입자(virus-like particles, VLP)를 수집 및 농축한 과정을 나타낸 대략도이다(DTT: Dithiothreitol, MWCO: 분자량 컷오프).

도 2는 식중독 증상 소아의 개인별 바이러스 구성을 나타낸 그래프이다.

도 3은 환자 시료별 바이롬 시퀀싱 데이터의 통계분석 결과를 정리한 표이다.

도 4는 정상인, 비중증 천식 환자, 및 중증 천식 환자 그룹의 객담 내 바이롬의 β-다양성(β-diversity) 주성분 분석(principal coordinates analysis) 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 환자 시료별 진핵 바이러스 조성을 정리한 표이다.

도 6은 환자 시료별 전체 바이러스 조성을 나타낸 그래프이다.

도 7은 그룹별 바이롬의 평균 조성을 나타낸 그래프이다.

도 8은 환자(16M-CAU001)의 객담 시료에서 CMV 바이러스로 확인된 시퀀싱 리드를 바이러스 유전체 서열(NC_006273)에 대해 맵핑한 것을 나타낸다.

도 9는 환자(16M-CAU003)의 객담 시료에서 EBV 바이러스로 확인된 시퀀싱 리드를 바이러스 유전체 서열(NC_007605)에 대해 매핑한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 10은 환자 시료별 파지(phage) 조성을 정리한 표이다.

도 11은 동일한 조건에서 전체 시료 중 특정 바이러스-양성 시료의 비율을 그룹별로 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 본 발명은 초미세여과 장치를 이용한 동물 시료 내 바이러스 입자 농축 방법에 관한 것으로, 절차가 간편하여 시료의 냉동 및 해동 과정이 불필요하므로 이로 인하여 발생할 수 있는 데이터 오류의 위험이 낮을 뿐만 아니라, 다공성 막을 포함하는 초미세여과 장치를 사용하여 모든 종류의 바이러스에 적용될 수 있으며, 미량의 시료로부터 바이러스 입자 농축이 가능하여 바이러스 마이크로바이옴(바이롬, virome) 분석이 가능하다.

[0042] 이하, 본 발명에 대해 구체적으로 설명한다.

[0044] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 바이러스 입자 농축 방법을 제공한다:

[0045] (S1) 분리된 동물 시료를 채취하여 전처리하는 단계; 및

[0046] (S2) 초미세여과 장치(ultrafiltration device)를 이용하여 상기 (S1) 단계의 시료를 여과하는 농축 단계.

[0047] 본 발명에 있어서 "바이러스 입자 농축"이란, 시료 중 바이러스의 농도를 증가시키는 것을 의미하는 것으로서, 시료에 존재하는 바이러스의 회수 및 검출 등의 목적을 위해 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 바이러스 입자 농축방법은 종래의 바이러스 농축 기술(CsCl 밀도구배 원심분리법, 접선유동유과법 등) 대비 사용이 간편하고 경제적이며, 보다 미량의 시료로부터 단시간에 바이러스를 농축시키는 것을 특징으로 한다.

[0048] 본 발명에 있어서 "초미세여과(ultrafiltration)"란 다수의 미세한 구멍이 있는 막(membrane)을 통해 시료를 여과시킴으로써 극히 미세한 입자(분자)를 분리하는 기술을 의미하며, 한외여과, 한외거르기, 초여과 등으로도

지칭된다. 분자량이 막의 분자량 컷오프(molecular weight cut-off, MWCO)보다 높은 성분은 막을 통과하지 못해 걸러지고, 저분자량 성분은 막을 통과하므로, 적절한 분자량 컷오프를 가진 막을 선택하여 원하는 성분만을 분리 또는 농축할 수 있다. 본 발명에 따른 바이러스 입자 농축방법은 바람직하게는 시료를 초미세여과 장치에 적재한 후 원심분리함으로써 초미세여과하는 것을 특징으로 한다.

[0049] 본 발명에 따른 “초미세여과 장치(ultrafiltration device)”는 형태나 크기 등에 제한이 없고, 시료를 적재하여 초미세여과를 수행할 수 있는 것이라면 제한 없이 포함될 수 있으나, 목적하는 바이러스 이외의 물질을 걸러내기 위해 다공성 막을 포함하는 것을 특징으로 한다. 구체적인 실시예에서 본 발명자들은 적절한 MWCO의 다공성 막이 장착된 초미세여과 장치(Vivaspin사 제품)을 사용하였다.

[0050] 본 발명에 따른 초미세여과 장치는 구멍의 분자량 컷오프(molecular weight cut-off)가 3 내지 100kDa인 다공성 막을 포함할 수 있다. 다공성 막의 구멍의 분자량 컷오프에는 제한이 없으나, 바람직하게는 3 내지 100kDa, 10 내지 100kDa, 20 내지 100kDa, 30 내지 100kDa, 40 내지 100kDa, 50 내지 100kDa, 60 내지 100kDa, 70 내지 100kDa, 80 내지 100kDa, 90 내지 100kDa, 3 내지 90kDa, 3 내지 80kDa, 3 내지 70kDa, 3 내지 60kDa, 3 내지 50kDa, 3 내지 40kDa, 3 내지 30kDa, 3 내지 20kDa, 3 내지 10kDa, 3 내지 5kDa, 10 내지 90kDa, 20 내지 80kDa, 20 내지 70kDa, 20 내지 60kDa , 20 내지 50kDa , 20 내지 40kDa , 25 내지 35kDa , 30 내지 80kDa, 30 내지 70kDa, 30 내지 60kDa, 30 내지 50kDa, 30 내지 40kDa, 40 내지 80kDa, 40 내지 70kDa, 40 내지 60kDa, 또는 40 내지 50kDa 일 수 있다. 그러나 상기 다공성 막의 분자량 컷오프는 검출하고자 하는 바이러스의 종류에 따라 당업자가 적절히 선택할 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명에 따른 초미세여과 장치의 시료 적재 용량에는 제한이 없으나, 바람직하게는 10㎕ 내지 100㎖, 10㎕ 내지 90㎖, 10㎕ 내지 80㎖, 10㎕ 내지 70㎖, 10㎕ 내지 60㎖, 10㎕ 내지 50㎖, 10㎕ 내지 40㎖, 10㎕ 내지 30㎖, 10㎕ 내지 20㎖, 10㎕ 내지 10㎖, 10㎕ 내지 5㎖, 10㎕ 내지 3㎖, 10㎕ 내지 2㎖, 10㎕ 내지 1㎖, 10㎕ 내지 900㎕, 10㎕ 내지 800㎕, 10㎕ 내지 700㎕, 10㎕ 내지 600㎕, 10㎕ 내지 500㎕, 10㎕ 내지 400㎕, 10㎕ 내지 300㎕, 10㎕ 내지 250㎕, 10㎕ 내지 200㎕, 10㎕ 내지 150㎕, 10㎕ 내지 100㎕, 10㎕ 내지 90㎕, 10㎕ 내지 80㎕, 10㎕ 내지 70㎕, 10㎕ 내지 60㎕, 10㎕ 내지 50㎕, 10㎕ 내지 40㎕, 또는 10㎕ 내지 30㎕ 일 수 있다. 본 발명의 초미세여과 장치의 시료 적재 용량은 10㎕ 내지 100㎖이나 상기 초미세여과 장치에 적재되는 시료 용량은 바이러스를 회수 또는 검출하고자 하는 시료의 종류에 따라 당업자가 적절히 선택할 수 있다.

[0052] 또한, 상기 다공성 막의 종류(재질)에는 제한이 없고, 바이러스나 세균 등 미생물 정제에 사용되는 재질이라면 제한 없이 포함될 수 있으나, 바람직하게는 폴리에테르술폰(polyethersulfone), 폴리아크릴로나이트릴(polyacrylonitrile), 폴리비닐리덴 플로라이드(Polyvinylidene fluoride), 또는 CSL 등으로 제조된 것일 수 있다.

[0053] 본 발명에 있어서, 상기 “동물 시료"는 동물로부터 수집되거나 채취된 시료라면 제한이 없으나 호흡기 유래 시료, 혈액, 전혈, 혈장, 조직, 세포, 기관, 골수, 미세침흡인 검체, 중심부 바늘 생검 검체, 진공흡입생검 검체, 소변 및 분변으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 또한, 상기 시료는 동물로부터 분리된 그 자체, 전처리를 거친 것, 또는 배양 과정을 거친 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0054] 상기 "동물"이란 인간을 포함한 모든 포유류를 포함하는 총칭으로, 예를 들어, 소, 염소, 양을 포함하는 반추동물, 사자, 호랑이 고양이 등의 고양이과 동물, 개, 늑대, 여우 등 펠리스(Felis)속의 동물 등이 있을 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 따라서, 본 발명의 바이러스 농축 방법은 고양이, 강아지, 쥐, 토끼, 거북이, 새 등 반려동물, 외래동물 및 야생동물 등 수의학적으로 진단되는 모든 동물에 적용될 수 있으므로 반려 동물 시장에 이바지 할 수 있다.

[0055] 바람직하게는, 상기 시료는 “호흡기 유래 시료”로서, 호흡에 관여하는 기관으로부터 유래된 것이라면 제한 없이 포함될 수 있다. 예컨대, 상기 호흡기 유래 시료는 객담, 기관지폐포세척액, 기관지흡인물, 인후도찰물, 비인후도찰물, 인후흡인물, 비인후흡인물, 및 비강흡인물로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0056] 본 발명에 있어서, 상기 (S2) 단계의 여과가 수행되는 시간에는 제한이 없으나, 바람직하게는 10분 내지 120분, 10분 내지 110분, 10분 내지 100분, 10분 내지 90분, 10분 내지 80분, 10분 내지 70분, 10분 내지 60분, 10분 내지 50분, 10분 내지 40분, 10분 내지 30분, 10분 내지 20분, 20분 내지 120분, 30분 내지 120분, 40분 내지 120분, 50분 내지 120분, 60분 내지 120분, 70분 내지 120분, 80분 내지 120분, 90분 내지 120분, 100분 내지 120분, 110분 내지 120분, 20분 내지 110분, 30분 내지 100분, 40분 내지 90분, 40분 내지 80분, 40분 내지 70

분, 또는 50분 내지 70분 동안 수행될 수 있다. 그러나 상기 초미세여과 수행 시간은 당업자가 검출하고자 하는 바이러스의 종류, 시료의 종류, 및 시료의 용량 등에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[0057] 또한, 상기 여과는 원심분리(centrifugation)를 통해 수행되며, 상기 원심분리의 속도에는 제한이 없으나, 바람직하게는 1,000g 내지 30,000g, 1,000g 내지 25,000g, 1,000g 내지 20,000g, 1,000g 내지 15,000g, 1,000g 내지 10,000g, 3,000g 내지 30,000g, 5,000g 내지 30,000g, 10,000g 내지 30,000g, 3,000g 내지 20,000g, 5,000g 내지 15,000g, 또는 8,000g 내지 12,000g 일 수 있다. 그러나 원심분리의 속도는 당업자가 농축하고자 하는 바이러스의 종류, 시료의 종류, 및 시료의 용량 등을 고려하여 적절히 선택할 수 있다.

[0058] 본 발명에 있어서, 상기 "바이러스 (virus)"의 종류에는 제한이 없다. 즉, 본 발명에 따른 바이러스 입자 농축 방법은 목적에 따라 구멍의 분자량 컷오프가 3 내지 100kDa인 다공성 막을 적절히 선택할 수 있으므로, 검출 또는 농축이 가능한 바이러스 종류에 제한이 없다. 바람직하게는, 상기 바이러스는 박테리오파지 및 진핵생물 바이러스로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 바이러스는 호흡기 바이러스 (respiratory virus) 일 수 있다.

[0059] 본 발명에 있어서 상기 "박테리오파지(bacteriophage)" 또는 "파지 (phage)"는 세균, 즉 원핵세포(prokaryote)를 숙주세포로 하는 바이러스를 의미한다. 따라서 본 발명에 의해 농축 및 검출될 수 있는 바이러스는 세균을 감염시킬 수 있는 것이라면 모두 해당되며, 구체적인 예로는 *스트렙토코커스(Streptococcus)* 파지, *클렙시엘라(Klebsiella)* 파지, *에쉬리키아(Escherichia)* 파지, *아시네토박터(Acinetobacter)* 파지, 방선균(*Actinomyces*) 파지, *어그리개티박터(Aggregatibacter)* 파지, *바실러스(Bacillus)* 파지, *버크홀데리아(Burkholderia)* 파지, 장내세균(*Enterobacteria*) 파지, *골도니아(Gordonia)* 파지, *헤모필루스(Haemophilus)* 파지, *락토바실러스(Lactobacillus)* 파지, *프로피오니박테리움(Propionibacterium)* 파지, *슈드모나스(Pseudomonas)* 파지, *살모넬라(Salmonella)* 파지, *쉬겔라(Shigella)* 파지, *스타필로코커스(Staphylococcus)* 파지, *스테노트로포모나스(Stenotrophomonas)* 파지, *써머스(Thermus)* 파지, 및 *비브리오(Vibrio)* 파지 등이 있다.

[0060] 본 발명에 있어서 상기 "진핵생물 바이러스 (eukaryotic virus)"는 진핵세포를 숙주세포로 하는 바이러스를 의미한다. 따라서 본 발명에 의해 농축 및 검출될 수 있는 바이러스는 진핵세포를 감염시킬 수 있는 것이라면 모두 해당되며, 구체적인 예로는 단순포진바이러스(Herpes simplex virus, HSV), 거대세포바이러스(Cytomegalovirus, CMV), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus, EBV), 유두종바이러스(Papillomavirus), 헤르페스바이러스(Herpesvirus), 소 α-헤르페스바이러스(Bovine α-herpesvirus), 감귤류 엑소콜티스 비로이드(Citrus exocortis viroid), 말 α-헤르페스바이러스(Equid α-herpesvirus), Jaagsiekte 양 레트로바이러스(Jaagsiekte sheep Retrovirus), MERS-관련 코로나바이러스(MERS-related coronavirus), 파보바이러스(Parvovirus), 돼지 변 관련 서큘러 바이러스(Porcine stool associated circular virus), 셈리키삼림열바이러스(Semliki forest virus), 담배 잎맥 제거 바이러스(Tobacco vein clearing virus), 토크테노바이러스(Torque teno virus), 백점병 바이러 (White spot syndrome virus), 뎅기열-관련 바이러스(dengue-related virus), 및 HIV-관련 바이러스(HIV-related virus) 등이 있다.

[0061] 본 발명의 "전처리"는 동물 시료를 농축 단계에 적합하도록 세포, 곰팡이, 세균 등을 제거하거나, 냉동 또는 해동 등의 과정을 포함하는 것이다. 상기 세포를 제거하는 방법에는 제한이 없다. 본 발명의 (S1) 단계의 전처리는 사전 필터 과정이 포함되었다. 예를 들어, 필터 주사기를 이용한 여과, 원심분리, 및 멸균제 등의 방법 또는 장치 등을 사용할 수 있다. 또한, 전처리는 균질화(homogenization), 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등이 포함될 수 있고, 상기 시약은 예를 들어 점성제거제, 멸균등장액, 또는 dithiothreitol 등과 같은 바이러스 성숙(viral maturation) 억제제일 수 있다.

[0062] 또한, 본 발명에 따른 바이러스 입자 농축방법은 상기 바이러스 입자 농축액에 핵산분해효소를 처리하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 핵산분해효소 처리 단계는 상기 (S1) 단계 전 또는 후에 수행될 수 있고, 바람직하게는 상기 (S1) 단계 후에 수행될 수 있다. 상기 핵산분해효소는 DNase 또는 RNase 일 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 당업자는 공지되거나 상용화된 핵산분해효소를 목적에 맞게 제한 없이 선택할 수 있다. 이는 핵산분해효소에 의한 바이러스 핵산의 손상을 방지하기 위함이다. 상기 핵산분해효소 불활성화 단계는 바이러스 농축액에 핵산분해효소가 변성 혹은 불활성화되는 온도를 가함으로써 이루어진다. 상기 핵산분해효소가 불활성화되는 온도는 핵산분해효소의 종류에 따라 당업자가 당업계의 기술상식을 기초로 적절히 선택할 수 있으며, 구체적으로는 60 내지 100℃, 70 내지 100℃, 80 내지 100℃, 90 내지 100℃ 또는 75 내지 90℃에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며, 당업자는 선택한 핵산분해효소의 공지된 최적온도를 기초로 적절한 온도를 선택할 수 있

다. 또한, 상기 핵산분해효소의 처리 시간에는 제한이 없으나, 바람직하게는 5분 내지 60분, 10분 내지 60분, 20분 내지 60분, 30분 내지 60분, 40분 내지 60분, 50분 내지 60분, 5분 내지 50분, 5분 내지 40분, 5분 내지 30분, 5분 내지 20분, 또는 5분 내지 10분일 수 있다. 그러나 당업자는 선택한 핵산분해효소의 최적 처리 시간, 시료의 종류, 및 시료의 용량 등을 고려하여 적절한 처리 시간을 선택할 수 있다.

[0063] 또한, 본 발명에 따른 바이러스 입자 농축방법은 (S2) 단계 후 바이러스 농축액을 초미세여과 장치를 이용하여 여과하는 농축 단계를 더 포함할 수 있다. 또한, 당업자는 초미세여과 장치를 이용한 농축 단계 이후에도, 필요에 따라 추가적인 농축 단계를 수행할 수 있다. 상기 추가 농축 단계는 상술한 제 1 초미세여과 장치의 특성을 모두 동일하게 가질 수 있다.

[0064] 본 발명에 따른 상기 농축 단계는 시료의 양이 200㎕ 이하가 될 때까지 진행될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 바이러스 입자 농축방법은 바람직하게는 추가적인 초미세여과 단계를 거칠수록, 초미세여과된 시료의 전체 부피가 감소하면서 바이러스 입자는 더욱 농축되는 것일 수 있다. 초미세여과를 마친 바이러스 입자 농축액의 부피는 초미세여과 전의 시료 부피 대비 1 내지 90%, 1 내지 85%, 1 내지 80%, 1 내지 75%, 1 내지 70%, 1 내지 65%, 1 내지 60%, 1 내지 55%, 1 내지 50%, 1 내지 45%, 1 내지 40%, 1 내지 35%, 1 내지 30%, 1 내지 25%, 1 내지 20%, 1 내지 15%, 또는 1 내지 10% 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 즉, 본 발명에 따른 바이러스 입자 농축방법에 따라 시료의 바이러스 입자를 농축한 경우, 시료 내의 바이러스 입자의 농도는 초미세여과를 수행하기 전에 비해 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10% 또는 그 이상, 예를 들어, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 또는 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 이상 높은, 및/또는 0.5배, 1.1배, 1.2배, 1.4배, 1.6배, 1.8배, 2배, 4배, 6배, 8배, 10배 또는 그 이상 증가할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0065] 또한, 상기 추가 농축 단계의 여과 수행 시간에는 제한이 없으나, 바람직하게는 1분 내지 30분, 1분 내지 25분, 1분 내지 20분, 1분 내지 15분, 1분 내지 10분, 5분 내지 30분, 10분 내지 30분, 15분 내지 30분, 또는 20분 내지 30분 동안 수행될 수 있다. 그러나 당업자는 농축하고자 하는 바이러스의 종류, 시료의 종류, 및 시료의 용량 등을 고려하여 추가 초미세여과 수행 시간을 적절히 선택할 수 있다.

[0067] 본 발명은 또한, 하기 단계를 추가로 포함하는 바이러스 검출 방법을 제공한다:

[0068] (S3) 제1항의 방법에 의해 바이러스 입자를 농축하는 단계; 및

[0069] (S4) 상기 (S3) 단계의 바이러스 농축액으로부터 바이러스 핵산을 추출하는 단계.

[0070] 당업자는 당업계에 공지된 바이러스 추출 방법을 이용하여 본 발명에 따른 바이러스 입자 농축액으로부터 바이러스 성분을 추출할 수 있다. 바람직하게는, 상기 바이러스 성분은 바이러스의 핵산일 수 있다. 시료로부터 바이러스 핵산을 추출하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자는 필요에 따라 적절한 방법을 선택할 수 있다.

[0071] 또한, 본 발명에 따른 바이러스 검출 방법은 상기 (S4) 단계 후 바이러스 핵산을 시퀀싱하는 단계를 더 포함할 수 있다. 즉, 당업자는 본 발명에 따른 바이러스 입자 농축 방법 및 검출 방법에 따라 확보한 바이러스 핵산 성분에 대해 시퀀싱 분석을 수행함으로써 시료 내에 존재하는 바이러스의 종류를 확인할 수 있다. 시퀀싱 분석을 수행하기 위한 바이러스 유전체 (genome) 참조 서열은 NCBI (National Center for Biotechnical Information), RefSeq (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/) 등에서 확인할 수 있다.

[0072] 본 발명은 또한, 구멍의 분자량 컷오프가 3 내지 100kDa인 다공성 막을 구비하는 초미세여과 장치를 포함하는 동물 시료 내의 바이러스 입자 농축용 장치를 제공한다. 바람직하게는, 상기 장치는 본 발명에 따른 바이러스 입자 농축 방법 및 바이러스 검출 방법에 사용되는 것을 특징으로 한다. 상기 장치의 형태, 및 재질에는 제한이 없으며, 상술한 초미세여과 장치의 특성을 모두 동일하게 가질 수 있다.

[0073] 바람직하게는, 상기 호흡기 유래 시료 담지용 용기의 최대 호흡기 유래 시료 적재 가능 용량은 1㎖ 내지 100㎖, 5㎖ 내지 100㎖, 10㎖ 내지 100㎖, 20㎖ 내지 100㎖, 30㎖ 내지 100㎖, 40㎖ 내지 100㎖, 50㎖ 내지 100㎖, 60㎖ 내지 100㎖, 70㎖ 내지 100㎖, 80㎖ 내지 100㎖, 1㎖ 내지 90㎖, 1mL 내지 80㎖, 1㎖ 내지 70㎖, 1㎖ 내지 60㎖, 1㎖ 내지 50㎖, 1㎖ 내지 40㎖, 1㎖ 내지 30㎖, 1㎖ 내지 20㎖, 1㎖ 내지 10㎖, 1㎖ 내지 5㎖, 10㎕ 내지 1㎖, 10㎕ 내지 900㎕, 10㎕ 내지 800㎕, 10㎕ 내지 700㎕, 10㎕ 내지 600㎕, 10㎕ 내지 500㎕, 10㎕ 내지 400㎕, 10㎕ 내지 300㎕, 10㎕ 내지 200㎕, 또는 10㎕ 내지 100㎕ 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0074] 또한, 호흡기 유래 시료는 점성이 높은 경우가 많음을 고려하여, 상기 바이러스 입자 농축용 초미세여과 장치는

초미세여과를 수행하기 전 호흡기 유래 시료의 점성을 제거하기 위한 사전 여과 필터를 더 포함할 수 있다.

[0075] 본 발명은 또한, 구멍의 분자량 컷오프가 3 내지 100kDa인 다공성 막을 구비하는 초미세여과 장치 및 설명서를 포함하는 동물 시료 내의 바이러스 입자 농축용 키트를 제공한다. 본 발명에 따른 키트는 상기 다공성 막 외에, 상기 다공성 막을 장착하기 위한 초미세여과 장치, 호흡기 유래 시료 담지용 용기, 실린지, 사전 필터를 위한 멸균 필터 주사기, 원심분리기, 핵산분해효소, 및 핵산 추출 용액 등 바이러스 입자 농축 및 검출을 위해 필요한 당업계에 공지된 물질 또는 물건을 제한 없이 포함할 수 있다. 또한, 상기 키트는 본 발명에 따른 바이러스 입자 농축방법이 기재된 설명서를 더 포함할 수 있다.

[0076] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.

[0077] 본 발명의 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본 발명의 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “약”, “실질적으로” 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.

[0078] 본 발명의 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 “이들의 조합”의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.

[0080] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0082] **[실시예]**

[0083] **실시예 1. 전처리 단계**

[0084] 동물 시료를 초미세여과 장치를 사용한 농축 과정에 용이한 상태로 만들기 위하여, 멸균 등장액을 추가하고, vortex를 사용하여 고르게 현탁하였다. 또한, 찌꺼기 등을 제거하기 위하여 원심분리하고, 상층액을 채취하여 새 멸균 튜브에 이동시켰다. 그 후, 해당 시료를 구멍(pore)의 직경이 5㎛, 2.2㎛ 및 0.45㎛인 시린지 필터기(syringe filters)를 차례로 사용하여 순차적으로 3회 여과하여 세포, 곰팡이, 세균등을 제거하는 전처리 과정을 수행하였다.

[0086] **실시예 2. 농축 단계**

[0087] 본 발명에 따른 바이러스 입자의 농축 과정 모식도에 따라(도 1), 실시예 1의 전처리된 시료를 분자량 컷오프(MWCO)가 30kDa인 다수의 구멍을 가진 폴리에테르설폰 멤브레인(polyethersulfone membrane)이 장착된 20㎖ 용량의 초미세여과 장치(Vivaspin®20, Sartorius Steim Biotech)에 옮긴 후, 원심분리를 통해 여과하여 시료의 부피가 6㎖ 이하가 되도록 1차 농축하였다.

[0088] 1차 농축된 시료를 멸균 튜브에 옮긴 후, 2㎕의 DNase I(Qiagen)를 넣어 25℃에서 30분 동안 처리하였고, 2㎕의 RNase A(Qiagen)을 넣어 37℃에서 30분 동안 처리하여 유리 핵산을 제거하였으며, 효소 활성을 중단시키기 위하여 추가적으로 80℃에서 15분 동안 처리하였다.

[0089] DNase 및 RNase처리가 끝난 시료를 20㎖ 용량의 30,000Da pore size Vivaspin®20 초미세여과 장치에 옮겨 30분 동안 10,000g에서 원심분리로 여과하였으며, 이때 시료 부피가 200㎕ 이하로 줄어들도록 2차 농축하였다.

[0091] **실시예 3. 바이러스 추출 단계**

[0092] QIAamp MinElute Virus Spin Kit(Qiagen)을 사용하여 최종 농축액으로부터 바이러스 핵산을 추출하였다. cDNA의 첫 번째 가닥은 SuperScript Ⅲ First-Strand Synthesis System(Invitrogen Inc., 미국) 및 V-N 랜덤 프라이머(random primer) (5'-GTTTCCCAGTCACGATCNNNNNN-3')를 이용하여 합성하였다. 구체적으로, 추출한 RNA로부터 cDNA를 생산하기 위하여, 50℃에서 50분 반응 후 85℃ 5분 조건 하에서 SuperScript Ⅲ Firt-Strand Synthesis(Invitroen Inc.)와 V-N random primer(5′ -GTTTCCCAGTCACGATCNNNNNN-3′)를 사용하여 역전사 반응을 진행하였다. 또한, First strand cDNA로부터 second strand cDNA를 합성하기 위하여, 37℃ 1시간동안 진행시킨 후 65℃ 5분의 조건에서 Large Klenow Fragment(Invirtogen Inc.)와 V-N random primer(5′ -GTTTCCCAGTCACGATCNNNNNN-3′)를 사용하였다. 핵산 증폭을 위하여, 95℃ 5분, 30회(95℃ 30초, 55℃ 45초, 94℃ 30초) 및 72℃ 3분의 조건으로 V primer(5′ -GTTTCCCAGTCACGATC-3′)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 이 때, 시퀀싱을 위한 충분한 DNA를 확보하기 위해, 합성된 cDNA를 주형으로하여 PCR을 수행하였으며, 확보한 바이롬 앰플리콘(virome amplicon), 즉, 증폭산물은 MiSeq(Illumina) 장비를 사용하여 shotgun metagenome sequencing을 수행하였고, 생물정보학적으로 분석하여 시료별 바이러스의 구성을 파악하였다.

[0094] **실험예 1. 식중독 환자 분변의 바이러스 마이크로바이옴 분석**

[0095] 실시예 1 내지 3 바이러스 농축 방법을 적용하여 바이러스성 식중독 환자의 분변 바이러스 마이크로바이옴(바이롬) 분석을 수행하였다. 구체적으로, 식중독 증상을 보이는 소아 12명의 분변 중 일부를 PCR 검사를 위해 멸균 용기에 채집하였고, 나머지는 바이롬 분석을 위해 -86℃에 냉장 보관하였다.

[0096] 초미세여과를 통한 농축 단계에 앞서, 전처리를 위하여 냉동 분변 100㎎에 4℃의 멸균 등장액 10㎖를 추가한 뒤, vortex를 사용하여 고르게 현탁하였다. 그 후, 분변 찌꺼기를 제거하기 위하여 4000rpm에서 30분 동안 원심분리하였고, 상층액을 채취하여 새 멸균 튜브에 옮겨 실시예 1에 따라 사전 필터하였다. 그 후, 전처리 과정이 완료된 시료를 100,000Da pore size의 Vivaspin®20에 옮겨 실시예 2 및 실시예 3에 따라 시료 내 바이러스를 농축하였다. 농축된 바이러스에 대하여 시퀀싱 결과에 따른 통계를 산출하였고(표 1), 식중독 증상을 나타낸 소아의 개인별 바이러스 구성을 그래프로 나타내었다(도 2).

표 1

[0098]

Sample	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
PCR 진단 결과	-	-	-	-	Astro	-	Noro	-	Rota	Noro	-	Noro
바이롬 동정 결과	Noro	Noro	Noro	Noro	Astro Noro	Noro	Noro	Noro	Rota Noro	Noro	Noro	Noro
Raw reads	209619	480062	603580	439209	333866	297324	425337	375754	559419	396721	417690	493480
Viral reads	657	2254	2326	4534	39008	4957	193531	58270	4489	2682	3983	185001
Viral read ration	0.3%	0.5%	0.4%	1.0%	11.7%	1.7%	45.5%	15.5%	0.8%	0.7%	1.0%	38.5%

[0100] 그 결과, 각 시료별로 평균 420,000 reads가 산출되었고, 전체 reads 중 평균 42,000 reads가 바이러스 염기서열인 것으로 나타났으며, 이는 평균 9.7%에 해당하였다. 또한, 식중독 증상을 나타내는 소아의 개인별 바이러스 구성을 확인한 결과, 동일 시기 수집된 12명의 소아에게서 모두 노로 바이러스가 우점 병원균임이 확인되었

으며, 그 외에 로타 바이러스 및 아스트로 바이러스에 의한 복합 감염이 있는 경우도 확인되었다.

[0102] 이와 같은 결과에 따르면, 본 발명에 따른 바이러스 농축 방법은 적은 양의 시료로부터 바이러스의 구성을 정확하게 확인할 수 있을 뿐만 아니라, 절차적으로도 매우 간이하며, 고도하게 전문적인 기술을 필요로 하지 않으므로 신속하게 바이러스의 구성에 대한 결과를 얻을 수 있었다는 점에서, 바이러스 검출 및 분석 방법으로 효과가 매우 우수한 것으로 확인되었다.

[0104] **실험예 2. 천식 환자 호흡기 유래 시료의 바이러스 마이크로바이옴 분석**

[0105] 본 발명의 바이러스 농축 방법을 적용하여 천식 환자의 호흡기 유래 시료 바이러스 마이크로바이옴(바이옴) 분석을 수행하였다. 본 연구는 모든 환자로부터 사전에 동의하에서, 서울대학교 병원 기관 심의 위원회의 승인을 받았으며(IRB No.: 1607-148-778), Helsinki 선언에 따라 수행하였다. 구체적으로, 정상인 그룹, 비중증 천식 환자 그룹 및 중증 천식 환자 그룹으로 나누어 각각의 환자를 모집하였다. 이 때, 기침, 가래, 호흡 곤란, 쌕쌕거림 등과 같은 만성 호흡기 증상이 있거나, 기도 가역성(airway reversibility), 또는 기도-과민반응(airway hyper-responsiveness)이 존재하는 경우 천식으로 진단하였다. 기도 가역성은 단기-작용 β2 작용제(short-acting β2 agonist)를 흡입하고 15분 후 측정된 FEV_1 수치가 12% 초과 및 20mL 이상 증가한 경우로 정의하였다. 기도-과민반응은 기관지 자극 테스트에서 16mg/mL 미만의 methacholine이 FEV_1 수치를 20% 감소시킨 경우 양성인 것으로 정의하였다. 중증 천식은 천식 조절 설문지(Asthma Control Qestionnaire, ACQ) 점수가 1.50보다 높거나, 1,000㎍ 이상의 fluticasone에 해당하는 용량의 코르티코스테로이드를 매일 흡입하였음에도 불구하고 FEV_1 수치가 40% 내지 80%으로 예측되는 경우로 정의하였다. 모든 환자가 비흡연자 또는 과거 흡연자(연간 20갑 미만)에 해당했다. 지난 3개월간 항생제 치료를 받았거나 급성 악화를 경험한적 있는 개인은 연구에서 제외했다. 등록된 환자의 폐기능 검사, 피부 검사, 혈청 중 총 IgE, 천식 조절 선문지 점수, 및 말초혈액세포(peripheral blood cell) 수를 포함한 기준 특성(baseline characteristics)을 조사하였다. 천식의 악화는 [American Thoracic Society/European Respiratory Society Statement]에 따라, (1) 3일 연속 코르티코스테로이드의 전신 사용, (2) 천식 전문 응급실 방문 또는 입원, 및 (3) 개인 최고 기준 특성에 비해 FEV_1 수치가 20% 넘게 변화하는 경우 중 한 개 이상에 해당하는 경우로 정의하였다

[0106] 상기의 기준에 따라, 12명의 정상인, 15명의 비중증 천식 환자, 및 15명의 중증 천식 환자를 모집하였고, 총 42명의 유도객담 시료를 수집하였다. 유도객담 시료의 점성을 제거하기 위하여 5㎖의 객담에 동량의 멸균 등장액을 혼합하고 100mL의 디티오트레이톨(dithiothreitol, DTT)를 첨가하여 25℃에서 1시간동안 200rpm으로 진탕하였으며, 이외에는 실시예 1과 동일한 방법을 적용하여 전처리하였다. 그 후, 전처리된 시료를 20㎖의 30,000Da pore size의 Vivaspin®20에 옮겨 실시예 2 및 실시예 3를 수행하였다.

[0107] 시퀀싱 결과에 따른 통계를 산출하기 위하여, 시퀀싱 로우 리드(raw reads)는 퀄리티-필터링, 짝-말단 병합(pair-end merging), 길이-필터링, 및 인간 시퀀스 필터링의 순서로 처리되었다. 결과적으로 생성된 비인간 리드는 NCBI(National Center for Biotechnical Information)의 바이러스 유전체(Viral Genomes)(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/)에서 다운로드한 서열로 구성된 인-하우스 바이러스 데이터베이스 및 RefSeq (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/)의 비메타게놈(nonmetagenomic) 바이러스 서열에 대해 BLASTn을 수행하여 확인하였다(e-값 컷오프: 10^{-10}; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM5blastn&PAGE_TYPE5BlastSearch&LINK_LOC5blasthome). 확인된 바이러스 서열 중, 정렬 길이 범위(alignment length coverage)가 50% 이상인 서열만을 검증된 바이러스 서열로 선별하여 이후의 분석을 수행했다. 또한, 정렬 범위가 90% 미만인 경우, 분류군의 명칭 끝에 “유사”라는 용어를 추가하여 식별이 모호함을 표시하였다(예를 들어, “중동 호흡기 증후군(Middle East respiratory syndrome)-관련 코로나바이러스-유사”). 마지막으로, 거대세포바이러스(cytomegalovirus, CMV) 또는 EBV로 확인된 바이러스 리드의 정확성을 확인하기 위해, 개체 시료의 시퀀싱 리드를 추출한 후 CLC Genomics Workbench(Qiagen)을 이용해 참조 유전체에 매핑(mapping) 하였다.

[0109] 그 결과, 데이터 처리 파이프라인의 단계별 시료의 시퀀싱 리드 통계는 도 3의 표에 나타냈다. 평균적으로 시료

당 약 40×10^6개의 로우 리드가 생성되었고(표 2), 데이터 처리 후, 시료당 약 13×10^6개의 길이-필터링된 리드가 확보되었다. 길이-필터링된 리드는 인간 유전체 맵핑을 통해 필터링하여 시료당 약 0.4×10^6개의 비인간 리드를 확보하였으며, 인-하우스 바이러스 데이터베이스에 대해 BLAST를 수행했다. 평균적으로, BLAST는 시료당 8400개 리드를 바이러스 시퀀스로 확인하였다. 이어서 상기 확인된 바이러스 리드에 대해 서열 정열 범위를 사용한 필터링을 수행하였으며(임계값: 50% 이상), 그 결과 최종 식별된 바이러스 리드를 확보하였다. 식별된 바이러스 리드의 수는 시료별로 상이하였고(30 내지 5300개의 서열), 구체적으로, 길이-필터링된 리드는 인간(96.853%), 바이러스(0.063%), 및 기타(박테리아 및 미지(unknown, 3.083%)로 나타났다. 확인된 바이러스 리드(식별된 바이러스 리드)의 비율은 대조군, 비중증 천식환자, 및 중증 천식 환자가 각각 0.051%(0.004%), 0.072%(0.006%), 및 0.064%(0.004%)으로 나타나, 그룹 간에 유의미한 차이는 없는 것으로 확인되었다.

표 2

[0111]

리드 수 (Number of reads)	대조군 (평균; n=12)	비중증 천식 (평균; n=15)	중증 천식 (평균; n=15)
로우 리드 (raw reads)	40,329,874	40,658,010	40,101,714
퀄리티-필터링 리드 (Quality-filtered reads)	34,115,597	34,035,614	32,831,945
짝-말단 리드 (Pair-end reads)	14,182,197	14,323,577	13,269,595
길이-필터링 리드 (Length-filtered reads)	13,794,395	13,626,956	12,742,862
인간 리드 (Human reads)	13,302,901	13,263,632	12,353,993
비인간 리드 (Nonhuman reads)	491,494	363,324	388,869
확인된 바이러스 리드 (Identified viral reads)*	6,897	9,675	8,283
식별된 바이러스 리드 (Verified viral reads)♣	524	808	473
* BALST 분석 결과 바이러스 서열로 확인된 비인간 리드 ♣ 확인된 바이러스 리드(identified viral reads) 중 서열 정렬 범위(sequence alignment coverage)(50% 이상)에 기초하여 진정한 바이러스 서열로 식별된 것			

[0113] 또한, 도 4에 나타낸 바와 같이, 정상인, 비중증 천식, 및 중증 천식 그룹의 바이롬 구조는 β-다양성 분석에 기반하여 명확하게 구별되었다($P<0.05$).

[0114] 환자 시료별 바이롬 조성은 도 5 및 도 6과 같이 확인되었으며, 그룹별 평균은 도 7과 같이 확인되었다. 구체적으로, 전체 시료 내의 모든 바이러스 중에서 원핵생물의 바이러스가 62.0±4.5%로 가장 높았고, 다음으로 헤르페스바이러스가 35.7±4.2%로 가장 높은 것으로 확인되었다. 정상인의 바이러스 중 헤르페스바이러스가 차지하는 비율은 13.4±5.2%였고, 천식 환자에서는 44.6±4.6%으로 나타났다. 헤르페스바이러스 그룹별로 분석했을 때, α, β, 및 γ 서브패밀리의 헤르페스 심플렉스 바이러스 1(herpes simplex virus 1)(HSV-1; 3.1 ± 1.0%), CMV(24.5 ± 3.3%), 및 EBV(16.9 ± 3.5%)가 천식 환자에 존재하는 헤르페스바이러스 중에서 다수를 차지하는 것으로 나타났다. *Betapapillomavirus*와 같은 기타 진핵생물 바이러스 또한 본 발명에 따른 바이러스 농축 방법을 통해 검출되었으며, 다만 환자 그룹별 유의미한 차이는 보이지 않았다. CMV 및 EBV 식별의 정확도를 확인하기 위해, 환자 시료로부터 확인된 바이러스 리드를 추출하여 참조 바이러스 유전체 서열에 정렬하였다(도 8 및 도 9). 그 결과, CMV 유래인 것으로 확인된 리드는 CMV 유전체에만 매핑되고 EBV 유전체에는 맵핑되지 않았으며, 반대의 경우도 마찬가지였다.

[0115] 환자 샘플별 파지(phage)의 조성은 도 10에 정리하였다. 정상인에서 검출된 바이롬 중 대다수가 박테리오파지(bacteriophage)였으나, 천식 그룹일수록 감소하는 경향을 보였으며, 그룹별 구체적인 박테리오파지 비율은 정상인의 경우 86.4±5.3%, 경증천식 환자의 경우 70.3±4.5% 및 중증천식 환자의 경우 34.1±5.8%인 것으로 조사

되었다. 시료에서 확인된 20가지 박테리오파지 중, *Streptococcus* 파지가 전체 시료에서 평균 25.9±5.0%를 차지하는 가장 풍부한 바이러스로 확인되었다 (도 7). *Streptococcus* 파지의 풍부도는 정상인 70.0±7.2%에 비해 천식 환자 그룹(경증천식 환자는 11.1±3.2% 및 중증천식 환자는 5.5±2.7%)에서 유의하게 낮은 것으로 나타났다(도 10). 반면, *Klebsiella* 파지 및 *Escherichia* 파지는 정상인에 비해 천식 환자 그룹에서 더 증가되어 있었으며, *Klebsiella* 파지는 비중증 그룹에서, *Escherichia* 파지는 중증 그룹에서 각각 가장 풍부한 박테리오파지인 것으로 나타났다.

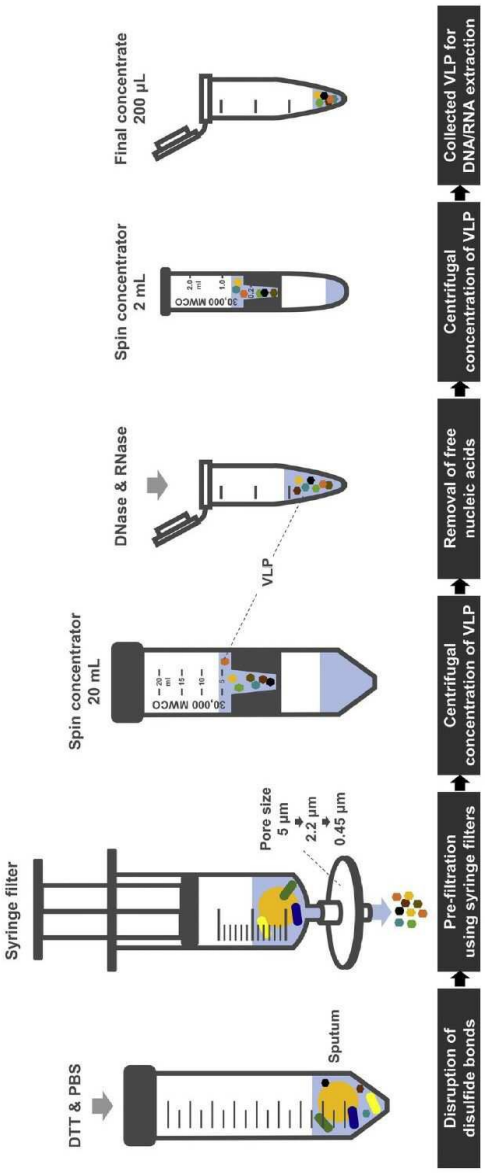
[0116] 집단별로 특징적인 바이러스의 발생율 (occurrence rate)을 갖는지 알아보기 위해, 전체 시료 대비 바이러스가 검출된 시료의 비율을 그룹별로 계산하였다. 그 결과, 정상인의 객담 시료 중 58%에서 인간 β 헤르페스바이러스 및 인간 γ 헤르페스바이러스가 검출되었으며 각각 CMV 및 EBV가 주로 검출되었다(도 11). 천식환자에서는 더 높은 비율로 바이러스가 검출된 반면(비중증, 60 내지 87%; 중증, 93 내지 100%), *Streptococcus* 파지는 정상인 시료에서 100% 검출되었고, 중증 환자에서는 낮은 비율로 검출되었다(비중증, 60%; 중증, 47%). 이와 같은 결과에 따르면, 미량의 객담으로부터 본 발명의 바이러스 농축방법을 통해 원인이 되는 바이러스를 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 바이러스 유전체 서열에 대한 맵핑을 통해 확인한 높은 바이러스 유전체 맵핑 범위(coverage) 및 깊이(depth)가 우수한 것으로 확인되었다.

[0118] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 농축방법을 통해 소량의 객담 및 분변 시료의 바이러스를 농축 및 추출하여 시퀀싱 분석을 수행한 결과, 본 발명에 따른 농축방법을 통해 시료 내의 바이러스 입자가 바이러스 핵산을 추출 및 검출하기에 적합할 정도로 농축되었으며, 바이러스 입자를 정확하게 추출할 수 있었다. 뿐만 아니라, 다양한 종류의 바이러스 입자의 구성을 확인할 수 있었고, 이를 토대로 정밀한 통계가 가능하였다. 따라서, 본 발명에 따른 바이러스 입자 농축방법은 비교적 간편하고 경제적으로 소량의 시료에 존재하는 바이러스 입자를 농축할 수 있음이 확인된 바, 의료 및 바이러스 연구 등 다양한 분야에서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

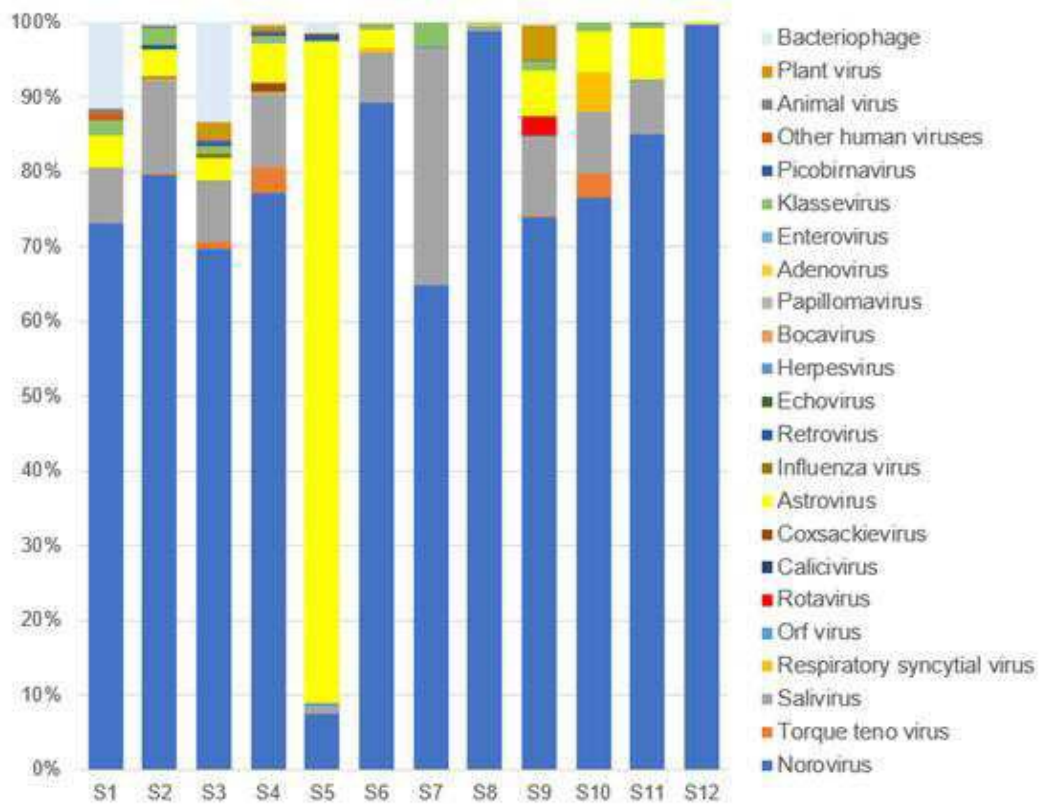
[0120] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

도면1


Disruption of disulfide bonds
DTT & PBS
Sputum
Pre-filtration using syringe filters
Syringe filter
Pore size
5 µm
2.2 µm
0.45 µm
Centrifugal concentration of VLP
Spin concentrator 20 mL
30,000 MWCO
VLP
Removal of free nucleic acids
DNase & RNase
Centrifugal concentration of VLP
Spin concentrator 2 mL
30,000 MWCO
Collected VLP for DNA/RNA extraction
Final concentrate 200 µL

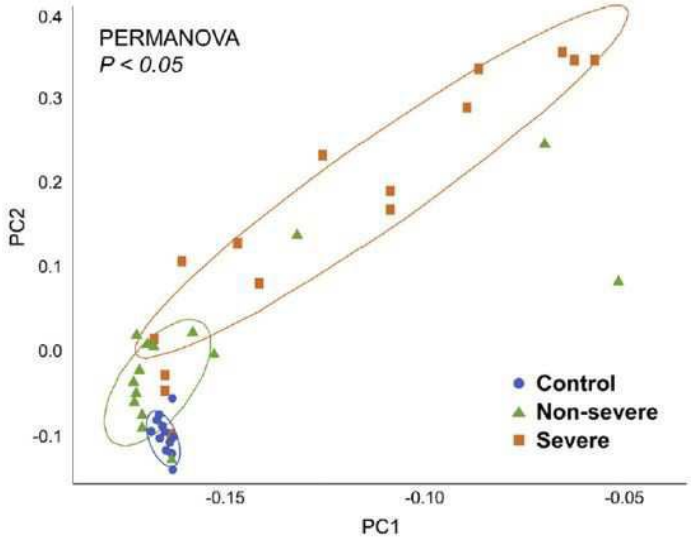
도면2


100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
S1
S2
S3
S4
S5
S6
S7
S8
S9
S10
S11
S12
Bacteriophage
Plant virus
Animal virus
Other human viruses
Picobirnavirus
Klassevirus
Enterovirus
Adenovirus
Papillomavirus
Bocavirus
Herpesvirus
Echovirus
Retrovirus
Influenza virus
Astrovirus
Coxsackievirus
Calicivirus
Rotavirus
Orf virus
Respiratory syncytial virus
Salivirus
Torque teno virus
Norovirus

도면3

Sample	Raw reads	Quality-filtered reads	Paired-end reads	Length-filtered reads	Human reads	Nonhuman reads	Identified viral reads	Verified viral reads
Control								
16M_SNU014	39,819,534	34,030,610	14,039,369	12,859,275	12,837,007	22,268	1,850	144
18M_SNU008	44,371,644	38,130,202	15,902,534	14,973,490	14,942,839	30,651	1,511	131
16M_SNU018	33,810,330	27,903,796	8,894,356	13,785,119	10,714,488	3,070,631	7,595	140
18M_SNU004	42,260,022	35,970,550	14,907,826	13,915,823	13,835,083	80,740	10,235	2,823
18M_SNU005	38,985,146	33,457,122	14,492,292	13,697,157	13,665,528	31,629	13,201	2,076
18M_SNU009	40,287,950	33,457,722	13,768,316	12,951,331	12,883,771	67,560	3,410	410
18M_SNU003	44,166,114	37,652,678	16,307,434	15,424,907	15,288,905	136,002	6,842	82
18M_SNU006	41,246,774	34,779,390	15,070,707	14,259,314	14,197,986	61,328	2,355	338
18M_SNU001	37,584,890	31,847,584	14,222,213	13,624,298	12,625,705	998,593	7,812	102
18M_SNU007	38,707,282	32,641,728	12,875,740	12,110,418	11,051,472	1,058,946	21,531	49
16M_SNU026	42,007,568	34,892,118	14,461,532	13,363,937	13,325,849	38,088	3,213	58
18M_SNU002	40,711,234	34,623,660	15,244,045	14,567,669	14,266,176	301,493	3,211	31
Average	40,329,874	34,115,597	14,182,197	13,794,395	13,302,901	491,494	6,897	532
Nonsevere asthma								
16M_SNU044	39,358,588	33,473,518	13,443,913	13,707,267	13,110,724	596,543	452	73
18M_SNU011	35,778,215	30,523,412	14,326,862	13,326,833	13,037,162	289,671	14,231	169
18M_SNU013	46,844,758	37,845,028	17,121,002	13,778,891	13,587,212	191,679	10,293	167
16M_CAU011	41,364,812	34,479,066	13,609,143	13,570,239	13,506,689	63,550	2,011	52
18M_SNU020	41,965,970	38,790,194	17,679,986	17,480,339	17,248,304	232,035	13,228	338
18M_SNU019	34,392,844	29,405,991	11,593,046	11,458,320	11,293,468	164,852	1,233	73
16M_CAU009	38,409,766	32,911,468	12,145,683	12,078,373	9,482,598	2,595,775	30,341	5,343
16M_CAU012	39,861,756	34,096,000	14,081,076	13,129,092	13,036,742	92,350	17,036	893
16M_CAU005	38,995,884	21,640,968	9,145,654	8,754,840	8,562,912	191,928	1,899	274
16M_SNU063	37,231,238	36,513,561	15,901,163	15,321,120	15,029,310	291,810	7,322	832
16M_CAU008	44,499,362	37,466,308	15,476,105	15,408,942	15,227,169	181,773	8,932	235
18M_SNU014	45,559,082	33,417,314	14,851,706	13,158,033	13,012,397	145,636	32,881	2,773
18M_SNU015	45,408,538	39,207,128	18,806,294	17,799,588	17,740,222	59,366	1,843	215
16M_SNU001	39,905,494	33,614,906	14,225,330	13,408,964	13,323,283	85,681	2,503	269
18M_SNU021	40,293,843	37,149,342	12,446,692	12,023,503	11,756,293	267,210	922	420
Average	40,658,010	34,035,614	14,323,577	13,626,956	13,263,632	363,324	9,675	808
Severe asthma								
16M_SNU040	33,491,992	24,940,301	9,320,196	9,102,341	9,100,020	2,321	809	626
18M_CBU003	38,576,268	27,233,522	12,087,731	11,627,095	11,610,392	16,703	4,930	258
18M_SNU016	40,141,644	35,682,630	9,677,098	9,669,500	9,657,098	12,402	754	76
18M_KBU002	41,854,960	35,477,674	13,469,794	12,698,590	11,698,400	1,000,190	24,320	231
18M_BSN002	42,845,824	31,149,636	17,807,871	17,117,709	17,002,912	114,797	3,021	212
16M_CBU002	44,566,153	39,216,730	14,165,342	13,847,372	12,732,966	1,114,406	6,183	852
16M_HYU001	39,994,356	33,652,390	15,900,374	14,948,372	14,809,495	138,877	432	139
16M_CAU001	41,797,344	34,319,568	15,731,682	12,717,747	11,948,430	769,317	16,912	1,432
16M_HYU002	45,876,206	28,302,168	13,319,800	13,305,019	13,083,720	221,299	20,341	1,380
16M_CAU021	41,797,344	36,412,878	12,222,058	12,111,553	10,113,620	1,997,933	11,754	1,231
18M_HRU006	40,131,530	30,317,204	13,612,715	13,460,491	13,210,293	250,198	25,932	143
18M_BSN001	31,523,566	42,304,112	14,127,967	14,059,293	14,004,127	55,166	3,021	154
16M_SNU066	41,591,582	35,465,774	11,601,220	11,174,815	11,112,301	62,514	1,309	129
18M_CAU003	44,426,550	31,411,572	14,895,556	14,210,228	14,203,002	7,226	504	123
16M_SNU041	32,910,391	26,593,012	11,104,521	11,092,811	11,023,118	69,693	4,021	102
Average	40,101,714	32,831,945	13,269,595	12,742,862	12,353,993	388,869	8,283	473

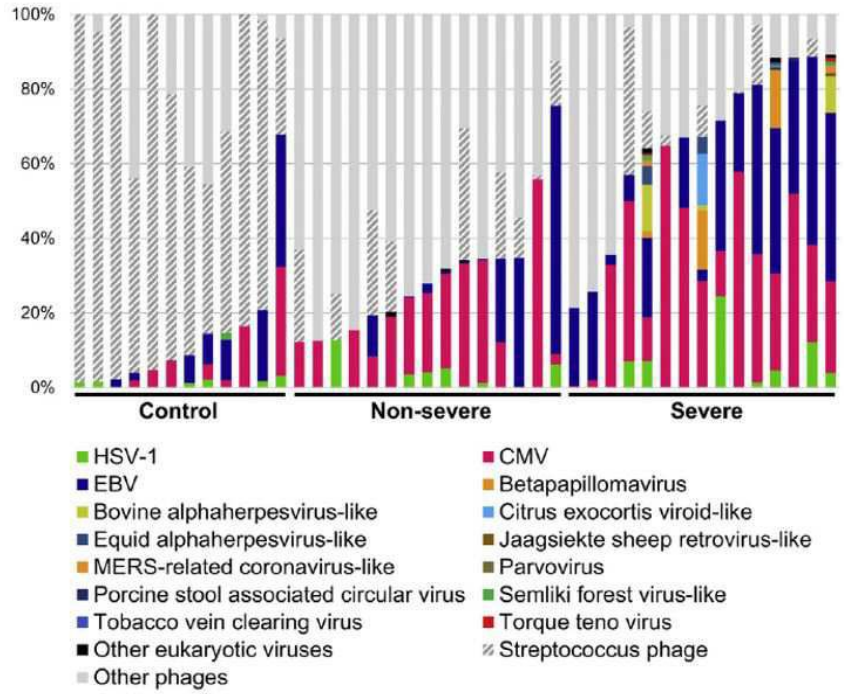
도면4



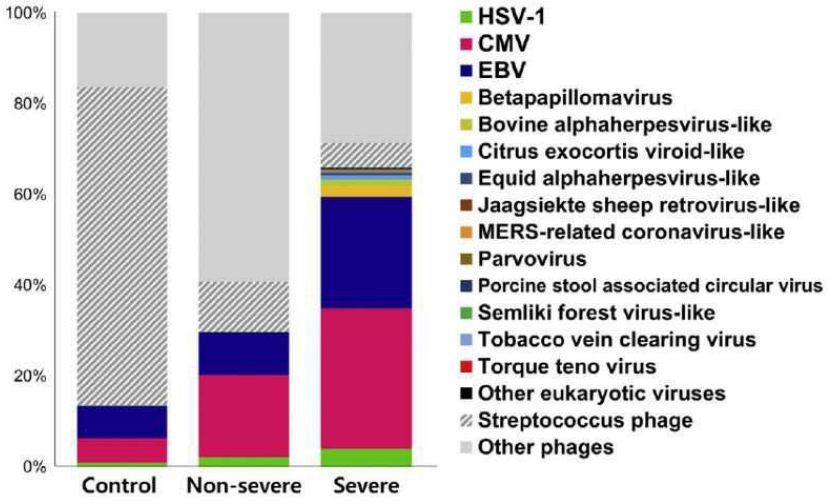
도면5

Sample	HSV-1	CMV	EBV	*Beta-papillomavirus*	Bovine α-herpesvirus-like	Citrus exocortis viroid-like	Equid α-herpesvirus-like	Jaagsiekte sheep retrovirus-like	MERS-related coronavirus-like	Parvovirus	Porcine stool associated circular virus	Semliki forest virus-like	Tobacco vein clearing virus	Torque teno virus	Other eukaryotic viruses
Control															
16M_SNU014	1.39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU008	1.53	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16M_SNU018	0.00	0.00	2.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU004	0.00	1.84	2.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU005	0.00	4.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU009	0.00	7.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.24
18M_SNU003	1.23	0.00	7.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU006	2.07	4.14	7.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.30	0.00	0.00
18M_SNU001	0.00	1.96	10.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.96	0.00	0.00	0.00
18M_SNU007	0.00	16.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16M_SNU026	1.72	0.00	18.97	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU002	3.23	29.03	35.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Average	0.93	5.42	7.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.16	0.02	0.00	0.02
Nonsevere asthma															
16M_SNU044	0.00	12.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU011	0.00	12.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU013	12.57	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16M_CAU011	0.00	15.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU020	0.00	8.28	10.95	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU019	0.00	18.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.35
16M_CAU009	3.44	20.68	0.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16M_CAU012	4.14	21.16	2.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16M_CAU005	5.07	25.36	0.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.72
16M_SNU063	0.24	32.97	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.60
16M_CAU008	1.28	32.77	0.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU014	0.00	12.23	22.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU015	0.00	0.00	34.74	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16M_SNU001	0.00	55.76	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU021	6.19	2.86	66.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Average	2.20	18.08	9.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.18
Severe asthma															
16M_SNU040	0.00	0.32	21.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_CBU003	0.00	1.94	23.64	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU016	0.00	32.89	2.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_KBU002	6.96	43.04	6.96	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_BSN002	7.08	11.79	21.23	1.89	12.26	0.00	5.19	0.00	1.42	0.00	0.00	1.42	0.00	0.47	1.42
16M_CBU002	0.00	64.79	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16M_HYU001	0.00	48.20	18.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16M_CAU001	0.21	28.35	3.00	15.92	1.33	13.83	4.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16M_HYU002	24.49	12.10	34.93	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16M_CAU021	0.00	57.84	21.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_HRU006	1.40	34.27	45.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_BSN001	4.55	25.97	38.96	14.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.65	0.00	0.65	0.65	0.65	0.00	1.30
16M_SNU066	0.00	51.94	35.66	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.78	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_CAU003	12.20	26.02	50.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16M_SNU041	3.92	24.51	45.10	0.00	9.80	0.00	0.00	0.98	1.96	0.00	0.00	0.98	0.00	0.98	0.98
Average	4.05	30.93	24.59	2.18	1.56	0.92	0.65	0.07	0.27	0.00	0.09	0.20	0.04	0.10	0.25

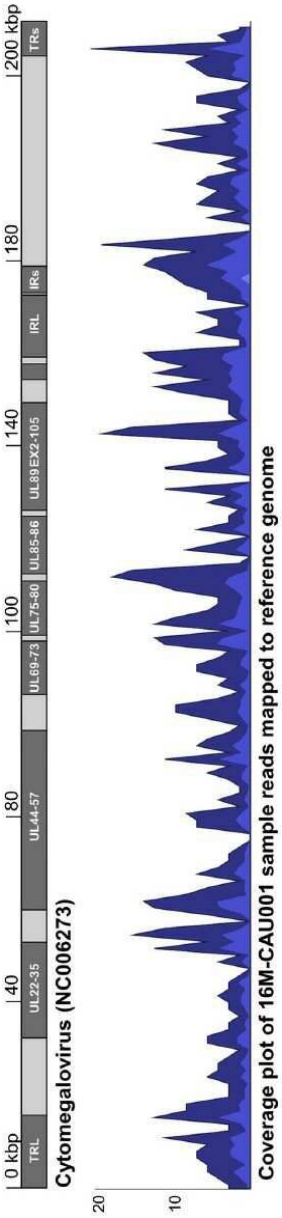
도면6


100%
80%
60%
40%
20%
0%
Control
Non-severe
Severe
HSV-1
CMV
EBV
Betapapillomavirus
Bovine alphaherpesvirus-like
Citrus exocortis viroid-like
Equid alphaherpesvirus-like
Jaagsiekte sheep retrovirus-like
MERS-related coronavirus-like
Parvovirus
Porcine stool associated circular virus
Semliki forest virus-like
Tobacco vein clearing virus
Torque teno virus
Other eukaryotic viruses
Streptococcus phage
Other phages

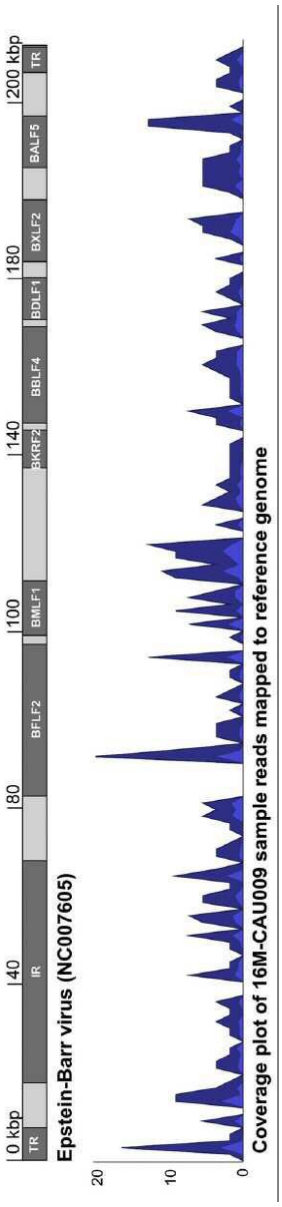
도면7


100%
80%
60%
40%
20%
0%
Control
Non-severe
Severe
HSV-1
CMV
EBV
Betapapillomavirus
Bovine alphaherpesvirus-like
Citrus exocortis viroid-like
Equid alphaherpesvirus-like
Jaagsiekte sheep retrovirus-like
MERS-related coronavirus-like
Parvovirus
Porcine stool associated circular virus
Semliki forest virus-like
Tobacco vein clearing virus
Torque teno virus
Other eukaryotic viruses
Streptococcus phage
Other phages

도면8


0 kbp
40
80
100
140
180
200 kbp
TRL
UL22-35
UL44-57
UL69-73
UL75-80
UL85-86
UL89EX2-105
IRL
IRs
TRs
Cytomegalovirus (NC006273)
20
10
Coverage plot of 16M-CAU001 sample reads mapped to reference genome

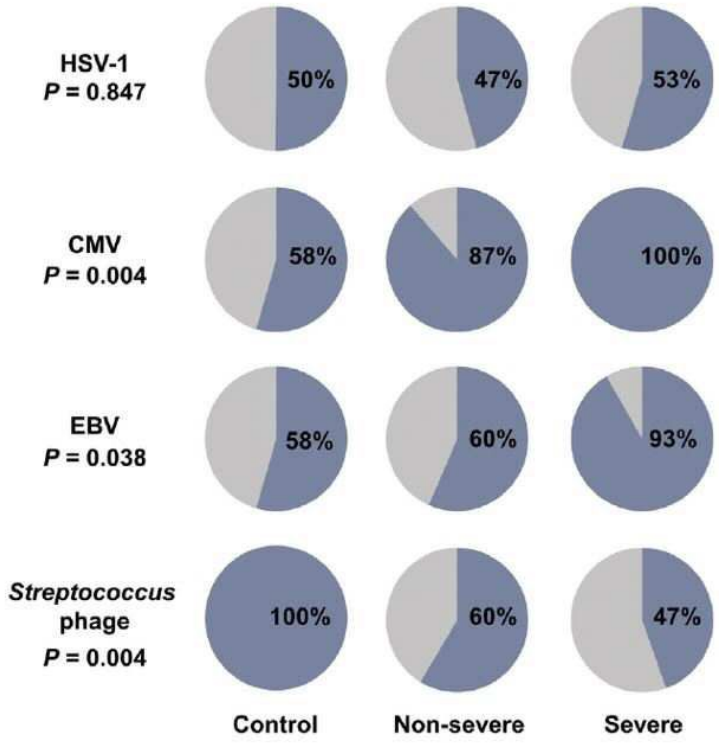
도면9


0 kbp
200 kbp
TR
IR
BFLF2
BMLF1
BKRF2
BBLF4
BDLF1
BXLF2
BALF5
TR
Epstein-Barr virus (NC007605)
20
10
0
Coverage plot of 16M-CAU009 sample reads mapped to reference genome

도면10

Sample	Streptococcus phage	Klebsiella phage	Escherichia phage	Acinetobacter phage	Actinomyces phage	Aggregatibacter phage	Bacillus phage	Burkholderia phage	Enterobacteria phage	Gordonia phage	Haemophilus phage	Lactobacillus phage	Propionibacterium phage	Pseudomonas phage	Other phages
Control															
16M_SNU014	98.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU008	93.89	0.00	0.00	0.00	1.53	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.05
16M_SNU018	97.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU004	52.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.00	0.00	0.00	0.00	39.99
18M_SNU005	95.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU009	71.29	0.00	0.00	0.00	7.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	14.36
18M_SNU003	50.62	0.00	0.00	4.94	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	35.80
18M_SNU006	39.94	0.00	0.00	0.00	45.56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU001	53.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	31.37
18M_SNU007	83.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16M_SNU026	77.59	0.00	0.00	0.00	1.72	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU002	25.81	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	6.45	0.00	0.00	0.00	0.00
Average	70.04	0.00	0.00	0.41	4.66	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.87	0.00	0.00	0.00	10.38
Nonsevere asthma															
16M_SNU044	24.66	45.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.74	0.00	6.85	8.22
18M_SNU011	0.00	37.87	49.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU013	12.57	54.49	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.60	10.78	0.60	8.38
16M_CAU011	0.00	84.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU020	28.40	1.48	48.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.66
18M_SNU019	18.92	21.62	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	22.97	0.00	16.22
16M_CAU009	0.00	75.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
16M_CAU012	0.00	72.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16M_CAU005	0.00	28.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.36	0.00	0.00	0.00	39.49
16M_SNU063	35.24	24.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.39	0.00	0.00	3.94
16M_CAU008	0.00	65.53	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU014	23.23	30.27	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.69	0.69	0.00	10.57
18M_SNU015	10.80	45.54	0.00	0.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.47	0.00	0.00	7.98
16M_SNU001	1.12	20.45	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.74	0.00	13.38	8.55
18M_SNU021	11.90	12.38	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.24	0.00	0.00	0.00
Average	11.12	41.30	6.53	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02	0.52	2.30	1.39	7.07
Severe asthma															
16M_SNU040	0.00	0.00	78.43	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16
18M_CBU003	0.00	0.00	74.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_SNU016	0.00	0.00	64.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_KBU002	39.57	0.00	0.00	0.00	3.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_BSN002	9.91	0.00	15.57	0.47	3.30	0.47	0.00	0.00	0.47	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.66
16M_CBU002	2.82	0.00	32.39	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16M_HYU001	0.00	0.00	24.46	0.00	0.00	0.00	0.00	8.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16M_CAU001	8.52	0.00	21.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.86
16M_HYU002	0.00	0.00	28.48	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
16M_CAU021	0.24	0.00	20.88	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_HRU006	16.08	0.00	0.00	0.00	1.40	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.40
18M_BSN001	0.00	0.00	7.79	0.00	1.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.60
16M_SNU066	0.00	0.00	11.63	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
18M_CAU003	4.88	0.00	0.00	0.00	2.44	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	4.07
16M_SNU041	0.00	0.00	0.00	0.98	3.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.88
Average	5.47	0.00	25.33	0.10	1.06	0.03	0.00	0.58	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.51

도면11



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> A method of concentrating virus particles in a Animal sample using an ultra-fine filtration device

<130> MP21-106P1

<150> KR 10-2021-0094474

<151> 2021-07-19

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> V-N random primer

<400> 1

gtttcccagt cacgatcnnn nnn 23

<210> 2

<211> 17

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> V primer

<400> 2

gtttcccagt cacgatc 17