

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2019-0041314 (43) 공개일자 2019년04월22일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/70 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)	
(52) CPC특허분류 C12Q 1/701 (2013.01) C12Q 2563/107 (2013.01)	(72) 발명자 임채승 경기도 안양시 동안구 귀인로 294, 302동 804호 (평촌동, 꿈마을건영아파트)	
(21) 출원번호 10-2017-0132745	곽승연 경기도 남양주시 호평로 149, 1905동 202호 (호평동, 호평마을중흥에스클래스아파트)	
(22) 출원일자 2017년10월12일 심사청구일자 2017년10월12일	(74) 대리인 특허법인 무한	

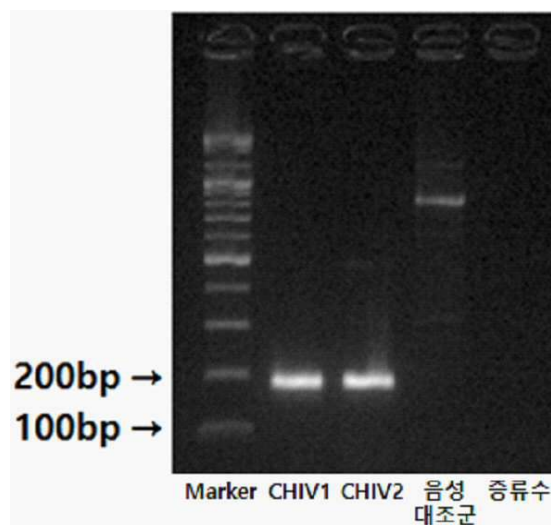
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 치쿤균야 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 세트; 및 서열번호 3 및 4의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 세트;를 포함하는, 치쿤균야 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트가 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2565/101 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017000456

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 ERC 나노-생체유체 검사 연구단

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 세트; 및

서열번호 3 및 4의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 세트;를 포함하는, 치쿤군야 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 상기 치쿤군야 바이러스의 TF(transframe fusion protein) 유전자에 특이적으로 결합하는, 치쿤군야 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 각 프로브의 5' 말단에 형광단이 표지되고,

상기 각 프로브의 3' 말단에 소광체가 표지된, 치쿤군야 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 형광단은 플루오레세인(fluorescein), 6-카르복시플루오레세인(FAM, 6-carboxyfluorescein), 헥사클로로-6-카르복시플루오레세인(HEX, hexachloro-6-carboxyfluorescein), 테트라클로로-6-카르복시플루오레세인(TET, tetrachloro-6-carboxyfluorescein), 2-클로로-7-페닐-1,4-디클로로-6-카르복시플루오레세인(VIC, 2-chloro-7-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein), 2,7-디메톡시-4,5-디클로로-6-카르복시플루오레세인(JOE, 2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein), 5-((2-아미노에틸)아미노)나프탈렌-1-술폰산(5-((2-aminoethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid), 쿠마린(coumarin) 및 쿠마린 유도체, 시아닌-5(Cy5, Cyanine-5), 루시퍼 옐로우(lucifer yellow), 텍사스 레드(texas red), 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine), 야키마 옐로우(YG, Yakima Yellow), 및 칼 플루오르 레드 610(CFR, Cal Fluor Red 610)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 치쿤군야 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 소광체는 테트라메틸로다민(TAMRA, tetramethylrhodamine), 4-(4-디메틸아미노페닐아조)벤조산(4-(4-dimethylaminophenylazo)benzoic acid), 4-디메틸아미노페닐아조페닐-4-말레이미드(4-dimethylaminophenylazophenyl-4-maleimide), 카르복시테트라메틸로다민(carboxytetramethylrhodamine) 및 BHQ 염료(BHQ dyes)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, 치쿤군야 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 올리고뉴클레오타이드 세트를 포함하는, 치쿤군야 바이러스 검출용 조성물.

청구항 7

제6항의 조성물을 포함하는, 치쿤군야 바이러스 검출용 키트.

청구항 8

- (a) 대상으로부터 수득한 생물학적 시료 내 핵산을 추출하는 단계;
- (b) 제6항의 조성물과 상기 핵산을 혼합하는 단계; 및
- (c) 상기 핵산을 증폭하여 치쿤군야 바이러스 감염 여부를 확인하는 단계;를 포함하는, 치쿤군야 바이러스 감염 진단을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 치쿤군야 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 치쿤군야(Chikungunta)는 치쿤군야 바이러스에 감염된 매개 모기로부터 사람에게 전염되는 바이러스성 질환이다. 치쿤군야는 고열과 심한 관절 통증을 유발하며 근육통, 두통, 메스꺼움, 피로, 발진 등 다른 증상을 수반하기도 한다. 치쿤군야에 의한 관절 통증은 때때로 신체를 쇠약하게 하고, 고통의 지속 기간은 다양하다. 대부분의 환자들은 관절 통증에서 완전히 회복하지만 수개월 내지 수년 동안 지속되는 경우도 있다.
- [0004] 치쿤군야와 뎅기열은 몇 가지 임상 징후가 동일하여 뎅기열이 흔하게 발병하는 지역에서는 치쿤군야를 뎅기열로 오진하는 경우가 발생할 수도 있다. 치쿤군야는 아프리카, 아시아, 인도 아대륙(인도, 파키스탄, 방글라데시 등이 위치한 지역)에서 발생하며, 최근 수십 년 사이에 치쿤군야 매개 모기가 유럽, 아메리카까지 확산되었다. 2007년 이탈리아 북동부에서 처음으로 국소적인 치쿤군야 발병이 보고된 바 있으며, 그 이후로 프랑스, 크로아티아 등지에서도 확인되었다.
- [0005] 치쿤군야는 그 특성이 파괴적인데다 때로는 장기간 몸을 자유롭게 움직이지 못하게 할 수도 있어 사회적으로도 큰 영향을 끼친다. 아프리카 언어 중 하나인 마콘테어에서 유래된 치쿤군야(Chikungunya)라는 명칭은 '고통스러워 몸을 구부린다' 라는 의미로, 치쿤군야가 일으키는 관절 통증 때문에 몸을 앞으로 구부리는 환자의 모습을 지칭한다.
- [0006] 치쿤군야 바이러스 감염 여부를 확인하는 방법으로는 혈액으로부터 바이러스 유전자를 검출하고, 혈청으로부터 특이적인 IgM 항체를 검출하는 방법이 주로 이용된다. 이들 중 항체를 이용하는 방법은 ELISA를 이용하는 것이 보편적이다.
- [0007] ELISA는 환자의 시료에서 IgM 항체 검사를 실시하여 발색 유무에 따라 진단이 가능한 방법이다. 치쿤군야 바이러스와 뎅기 바이러스 감염은 매우 유사한 증상을 보이나, 각 바이러스마다 치료법이 상이하고 다른 바이러스 치료제를 환자에게 사용하는 경우 치명적인 위험을 초래할 수 있으므로, 정확하고 신속하게 치쿤군야 바이러스 감염 여부만을 진단할 수 있는 방법이 필요하다.
- [0008] 기존의 바이러스 배양을 통한 검사 방법은 2주 이상의 기간이 소요되어 효율성 면에서 한계가 존재하였다. 최근에는 분자진단 검사법으로서 중합효소 연쇄반응(PCR, polymerase chain reaction)을 이용하여 치쿤군야 바이러스를 진단하는 방법에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있으나, 유사한 증상을 가진 다른 바이러스에 대한 교차반응 없이 높은 정확도로 검출할 수 있는 진단 방법에 대해서는 아직까지 연구가 미흡한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 신속하면서도 이중 바이러스에 대한 교차반응 없이 정확하게 치쿤균야 바이러스만을 검출할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 세트를 제공하는 것이다.
- [0011] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 세트; 및 서열번호 3 및 4의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 세트;를 포함하는, 치쿤균야 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트가 제공된다.
- [0014] 일 측에 따르면, 상기 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 상기 치쿤균야 바이러스의 TF(transframe fusion protein) 유전자에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0015] 일 측에 따르면, 상기 각 프로브의 5' 말단에 형광단이 표지되고, 상기 각 프로브의 3' 말단에 소광체가 표지될 수 있다.
- [0016] 일 측에 따르면, 상기 형광단은 플루오레세인(fluorescein), 6-카르복시플루오레세인(FAM, 6-carboxyfluorescein), 헥사클로로-6-카르복시플루오레세인(HEX, hexachloro-6-carboxyfluorescein), 테트라클로로-6-카르복시플루오레세인(TET, tetrachloro-6-carboxyfluorescein), 2-클로로-7-페닐-1,4-디클로로-6-카르복시플루오레세인(VIC, 2-chloro-7-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein), 2,7-디메톡시-4,5-디클로로-6-카르복시플루오레세인(JOE, 2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein), 5-((2-아미노에틸)아미노)나프탈렌-1-술폰산(5-((2-aminoethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid), 쿠마린(coumarin) 및 쿠마린 유도체, 시아닌-5(Cy5, Cyanine-5), 루시퍼 옐로우(lucifer yellow), 텍사스 레드(texas red), 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine), 야키마 옐로우(YG, Yakima Yellow), 및 칼 플루오르 레드 610(CFR, Cal Fluor Red 610)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0017] 일 측에 따르면, 상기 소광체는 테트라메틸로다민(TAMRA, tetramethylrhodamine), 4-(4-디메틸아미노페닐아조)벤조산(4-(4-dimethylaminophenylazo)benzoic acid), 4-디메틸아미노페닐아조페닐-4-말레이미드(4-dimethylaminophenylazophenyl-4-maleimide), 카르복시테트라메틸로다민(carboxytetramethylrhodamine) 및 BHQ 염료(BHQ dyes)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 올리고뉴클레오타이드 세트를 포함하는, 치쿤균야 바이러스 검출용 조성물이 제공된다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 조성물을 포함하는, 치쿤균야 바이러스 검출용 키트가 제공된다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예에 따르면, (a) 대상으로부터 수득한 생물학적 시료 내 핵산을 추출하는 단계; (b) 상기 조성물과 상기 핵산을 혼합하는 단계; 및 (c) 상기 핵산을 증폭하여 치쿤균야 바이러스 감염 여부를 확인하는 단계;를 포함하는, 치쿤균야 바이러스 감염 진단을 위한 정보 제공 방법이 제공된다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 세트는 치쿤균야 바이러스의 특정 유전자에 특이적으로 결합하여 다른 바이러스에 대한 교차반응 없이 정확하면서도 신속하게 치쿤균야 바이러스를 검출할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의

구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 올리고뉴클레오타이드 세트의 치쿤군야 바이러스 유전자에 대한 PCR 증폭 밴드를 나타내는 전기영동 결과이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 올리고뉴클레오타이드 세트의 치쿤군야 바이러스에 대한 타겟 유전자별 검출 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 올리고뉴클레오타이드 세트의 치쿤군야 바이러스 타입에 대한 검출 민감도를 측정한 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 올리고뉴클레오타이드 세트의 치쿤군야 바이러스에 대한 농도별 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0027] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0028] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0029] 또한, 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제1 올리고뉴클레오타이드 세트; 및 서열번호 3 및 4의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 제2 올리고뉴클레오타이드 세트;를 포함하는, 치쿤군야 바이러스 검출용 올리고뉴클레오타이드 세트가 제공된다.
- [0032] 본 명세서에서 사용된 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 혼성화되어 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 상기 프라이머는 적절한 완충액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(DNA 중합효소 또는 역전사 효소) 및 상이한 4가지 dNTP(deoxynucleoside triphosphate)의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.
- [0033] 이 때, 상기 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드 세트는 치쿤군야 바이러스의 TF(transframe fusion protein) 유전자에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 TF 단백질은 viron 구조를 안정화시키는 기능을 수행하는 단백질로, 상기 제1 및 제2 올리고뉴클레오타이드가 TF 단백질 암호화 유전자를 표적으로 함으로써 치쿤군야 바이러스에 대한 우수한 검출 민감도를 나타낼 수 있다.
- [0034] 구체적으로, 상기 제1 올리고뉴클레오타이드 세트를 구성하는 프라이머 쌍은 치쿤군야 바이러스 전체 유전자의 7281번째부터 7453번째까지의 염기서열(172bp)에 상응할 수 있고, 프로브는 7392번째부터 7417번째까지의 염기

서열(26bp)에 상응할 수 있다.

- [0035] 또한, 상기 제2 올리고뉴클레오타이드 세트를 구성하는 프라이머 쌍은 치쿤군야 바이러스 전체 유전자의 7975번째부터 8152번째까지의 염기서열(177bp)에 상응할 수 있고, 프로브는 8093번째부터 8116번째까지의 염기서열(24bp)에 상응할 수 있다.
- [0036] 본 명세서에서 사용된 용어 "바이러스 유전자"는 바이러스 게놈 자체뿐만 아니라 이로부터 유래되는 모든 RNA 또는 DNA(예컨대, cDNA)를 포함하는 개념을 의미할 수 있다.
- [0037] 상기 프라이머는 치쿤군야 바이러스의 특정 단백질 유전자에 특이적인 프라이머로, 바람직하게는 10개 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 정방향(forward) 및 역방향(reverse) 핵산으로 구성될 수 있다. 상기 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다.
- [0038] 또한, 상기 프라이머 핵산 서열은 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지의 예로는, 효소(예: 호스레디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타아제), 방사성 동위원소(예: ³²P), 형광성 분자, 화학그룹(예: 바이오틴) 등을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 본 명세서에서 사용된 용어 "프로브"는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 수개 내지 수백 개의 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미한다. 상기 프로브는 표지(labeling)되어 있어 이를 통해 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 상기 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단일가닥(single stranded) DNA 프로브, 이중가닥(double stranded) DNA 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다.
- [0040] 상기 각 프로브의 5' 말단에 형광단(fluorophore)이 표지되고, 상기 각 프로브의 3' 말단에 소광체(quencher)가 표시될 수 있다. 이에 따라, 프로브가 시료에 존재하는 5'-UTR에 결합된 상태에서는 형광단 및 소광체 간의 상호 간섭현상에 의해 발색이 제한되고, 증폭 과정에서 프로브가 분해되면서 5' 말단에 표지된 형광단은 소실되는 반면 3' 말단에 표지된 소광체가 발색반응을 하게 된다. 이와 같은 발색반응에 의해 시료로부터 치쿤군야 바이러스의 유무를 판단할 수 있게 된다.
- [0041] 상기 5' 말단에 표지될 수 있는 형광단은 플루오레세인(fluorescein), 6-카르복시플루오레세인(FAM, 6-carboxyfluorescein), 헥사클로로-6-카르복시플루오레세인(HEX, hexachloro-6-carboxyfluorescein), 테트라클로로-6-카르복시플루오레세인(TET, tetrachloro-6-carboxyfluorescein), 2-클로로-7-페닐-1,4-디클로로-6-카르복시플루오레세인(VIC, 2-chloro-7-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein), 2,7-디메톡시-4,5-디클로로-6-카르복시플루오레세인(JOE, 2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein), 5-((2-아미노에틸)아미노)나프탈렌-1-술폰산(5-((2-aminoethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid), 쿠마린(coumarin) 및 쿠마린 유도체, 시아닌-5(Cy5, Cyanine-5), 루시퍼 옐로우(lucifer yellow), 텍사스 레드(texas red), 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine), 야키마 옐로우(YG, Yakima Yellow), 및 칼 플루오르 레드 610(CFR, Cal Fluor Red 610)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 FAM일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 또한, 상기 3' 말단에 표지될 수 있는 소광체는 테트라메틸로다민(TAMRA, tetramethylrhodamine), 4-(4-디메틸아미노페닐아조)벤조산(4-(4-dimethylaminophenylazo)benzoic acid), 4-디메틸아미노페닐아조페닐-4-말레이미드(4-dimethylaminophenylazophenyl-4-maleimide), 카르복시테트라메틸로다민(carboxytetramethylrhodamine) 및 BHQ 염료(BHQ dyes)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 이처럼 형광물질이 표지된 프로브를 사용하여 실시간 RT-PCR을 수행하고 그로부터 증폭된 산물을 검출하는 경우에 증폭된 산물의 증가를 실시간으로 모니터링할 수 있으므로 DNA 및 RNA를 정확하게 정량할 수 있다. 또한, 이러한 방법은 전기영동이 필요 없어 신속하고 간편하게 해석할 수 있으며 오염의 위험을 감소시킬 수 있다.
- [0044] 상기 프라이머 및 프로브를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 세트는 치쿤군야 바이러스의 상이한 유전자를 타겟팅하고 증폭함으로써, 기존의 프라이머 및 프로브에 비해 검출 민감도를 향상시킬 수 있다. 이 때, 검출 민감도 향상은 치쿤군야 바이러스 외 다른 바이러스에 대한 비특이적 검출 감소를 의미한다.
- [0045] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 올리고뉴클레오타이드 세트를 포함하는, 치쿤군야 바이러스 검출용 조성물 및 이를 포함하는 키트가 제공된다.
- [0046] 상기 조성물 또는 키트가 RT-PCR에 사용되는 경우, 선택적으로 RT-PCR을 수행하기 위한 증폭반응 혼합물을 추가

로 포함할 수 있다. RT-PCR을 수행하기 위한 증폭반응 혼합물이란 증폭반응을 수행하기에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, RNase H 활성을 갖는 역전사 효소, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), Mg^{2+} 와 같은 DNA 중합효소 조인자, dNTP(dATP, dCTP, dGTP, 및 dTTP) 등을 포함할 수 있다.

[0047] 상기 조성물 및 키트는 다양한 폴리뉴클레오티드 분자, 역전사 효소, 다양한 완충액 및 시약, DNA 중합효소의 활성을 억제하는 저해제를 포함할 수 있다. 또한, 상기 조성물 및 키트는 음성 및 양성 대조군 반응을 수행하는데 필요한 시약 또는 혼성화 반응에 필요한 완충액과 같은 시약을 포함할 수 있다. 특정 반응에서 이용되는 시약의 최적량은 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 키트는 분리된 패키지 또는 컴파트먼트에 상술한 성분들을 포함할 수 있다.

[0048] 상기 조성물 및 키트에 포함되는 구체적인 프라이머 및 프로브의 종류, 염기서열, 타겟 유전자 등에 관해서는 전술한 것과 같다.

[0049] 본 발명의 일 실시예에 따르면, (a) 대상으로부터 수득한 생물학적 시료 내 핵산을 추출하는 단계; (b) 상기 조성물과 상기 핵산을 혼합하는 단계; 및 (c) 상기 핵산을 증폭하여 치쿤군야 바이러스 감염 여부를 확인하는 단계;를 포함하는, 치쿤군야 바이러스 감염 진단을 위한 정보 제공 방법이 제공된다.

[0050] 상기 (a) 단계에서 상기 생물학적 시료는 치쿤군야 바이러스의 감염 여부를 확인하기 위해 대상으로부터 채취한 시료를 의미하며, 혈액, 혈청, 침, 가래와 같은 시료를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 상기 (b) 단계에서 상기 핵산은 RNA를 의미할 수 있으며, 조성물에 관해서는 전술한 것과 같다. 증폭반응에 사용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 하고, 이에 따라 상기 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 수행될 수 있다.

[0052] 상기 (c) 단계에서는 각각의 올리고뉴클레오티드 세트와 핵산을 이용하여 다중 실시간 RT-PCR을 수행할 수 있다. 다중 실시간 RT-PCR을 수행함에 있어 상기 프라이머 및 프로브가 주형 RNA에 혼성화되기에 적합한 조건이 채용될 수 있다. 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이러한 절차는 프로토콜 수립을 위해, 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시될 수 있다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 올리고뉴클레오티드의 길이 및 GC 함량, 표적 뉴클레오티드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다.

[0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0056] 실시예 1: 분석 시료 준비

[0057] 치쿤군야 바이러스를 배양 중이던 액체배지(RPMI 1640, Gibco) 5mL를 추출하여 15mL 튜브에 넣고 3,000rpm에서 10분 동안 원심분리를 실시하였다. 원심분리 완료 후, 펠렛은 버리고 상층액만 수확하여 PCR의 RNA 주형(template)으로 사용하였다.

[0059] 실시예 2: 프라이머 및 프로브 제작

[0060] 치쿤군야 바이러스 검출을 위한 타겟 유전자로 TF(transframe fusion protein) 유전자를 선정하였다.

[0061] 각각의 타겟 유전자의 전체 서열 비교를 통해 다른 바이러스와 유전자 상동성이 없는 부위를 선택함으로써 프라이머 및 프로브를 디자인하였고, 구체적인 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

[0062] 이 때 2종류의 타겟 유전자에 대한 프로브의 5' 말단에는 형광단으로 FAM을 표지하고, 3' 말단에는 소광체로 BHQ-1(Black Hole Quencher 1)을 표지하였다.

표 1

타겟 유전자	종류	서열 번호	서열 (5' → 3')	위치 (길이)	크기 (bp)
TF 단백질	primer_F	1	GATAGAAGACGAGCGCTG	7281(18)	174
	primer_R	2	GAAGCTCAGAGGACCCG	7437(17)	
	probe	5	GTGGTAATGTCCATGGCCACC	7392(26)	
TF 단백질	primer_F	3	GACCATCGATAACGCGGACC	7975(20)	177
	primer_R	4	TACTCAGGAGGCCGGTTC	8135(18)	
	probe	6	AAACCGGAGGGGTACTACAAC	8093(24)	

실시예 3: 치쿤군야 바이러스 검출

상기 실시예 1에 따라 제조된 치쿤군야 바이러스의 RNA에 대해 상기 실시예 2의 프라이머 및 프로브의 작동 여부를 확인하기 위해 DiaStar™ OneStep Multiplex qRT-PCR kit(SRQ11-K100, Solgent)을 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. PCR 반응을 위한 구체적인 성분 및 조건은 각각 하기 표 2 및 표 3에 나타내었다.

표 2

성분	부피 (μl)
5X Reaction buffer	5
Enzyme buffer	2
primer_F (10pmol)	1
primer_R (10pmol)	1
probe (10pmol)	1
template RNA	5
증류수	10
전체	25

표 3

단계	온도(℃)	시간	횟수(cycle)
reverse transcription	50	30min	-
pre-denaturation	95	15min	-
denaturation	95	30sec	35
annealing	60	40sec	
elongation	72	30sec	

치쿤군야 바이러스 검출 결과를 확인하기 위해 2개의 올리고뉴클레오타이드 세트(프라이머 및 프로브)를 모두 혼합한 상태에서 치쿤군야 바이러스 주형 RNA를 첨가하여 실시간 RT-PCR을 수행하였고, PCR 증폭 산물을 아가로스 겔에 전기영동하여 나타난 밴드를 확인하였다(도 1). 또한, PT-PCR에 따른 증폭 결과는 하기 표 4 및 도 2에 나타내었다. 하기 표 4 및 도 1에서 CHIV1은 서열번호 1 및 2의 프라이머와 서열번호 5의 프로브에 의해 증폭되는 TF 단백질 유전자를 의미하고, CHIV2는 서열번호 3 및 4의 프라이머와 서열번호 6의 프로브에 의해 증폭되는 TF 단백질 유전자를 의미한다. 음성 대조군으로는 인간 혈장에서 추출한 RNA를 사용하였다.

표 4

샘플	Ct	RFU
CHIV1	23.93	407
CHIV2	24.51	1159
음성 대조군	N/A	206
증류수	N/A	145

상기 표 4 및 도 2를 참고하면, 상기 실시예 2에 따른 올리고뉴클레오타이드 세트가 치쿤군야 바이러스의 TF 단백질에 특이적으로 결합하며, 이들은 모두 치쿤군야 바이러스만을 특이적으로 검출하는 것을 확인할 수 있다.

실시예 4: 검출 한계 측정

상기 실시예 2의 프라이머 및 프로브의 검출 민감도를 확인하기 위해, 상기 실시예 1에 따라 제조된 주형 RNA 시료를 10^9 내지 10^0 카피수의 농도로 단계 희석하여 각 혈청형별 RT-PCR을 수행하였다. RNA 시료의 농도를 제외하고 구체적인 실험 조건은 상기 실시예 3과 동일하게 수행하였다.

검출 민감도의 비교를 위해, 대조군으로 대한민국 공개특허공보 제10-2011-0118176호(이하, "비교예"라고 함)에 기재된 올리고뉴클레오타이드 세트(프라이머 및 프로브)를 사용하였다. 실험 결과는 하기 표 5 및 도 3에 나타내었다.

표 5

Log10 희석	Ct 값	
	실시예 2	비교예
1.00E+7	18.28	14.53
1.00E+6	20.93	16.31
1.00E+5	23.88	19.08
1.00E+4	26.59	22.13
1.00E+3	29.48	25.37
1.00E+2	32.16	28.79
1.00E+1	35.18	32.81
1.00E+0	37.10	N/A

상기 표 5 및 도 3의 결과를 참고하면, 상기 실시예 2의 올리고뉴클레오타이드 세트는 치쿤군야 바이러스를 1.00×10^0 까지 검출할 수 있는 반면, 비교예의 올리고뉴클레오타이드 세트는 1.00×10^1 까지 검출할 수 있었다. 따라서, 상기 실시예 2의 올리고뉴클레오타이드 세트가 비교예의 그것에 비해 10배 높은 검출 민감도를 나타내어 보다 우수한 검출 효율성을 나타냄을 알 수 있다.

실시예 5: 전기영동 분석

상기 실시예 4에서 증폭한 PCR 산물을 3% 아가로스 겔에 전기영동하고, 나타난 밴드를 확인하였다. 도 4는 실시예 4의 PCR 산물에 대한 전기영동 결과를 나타낸 것이다.

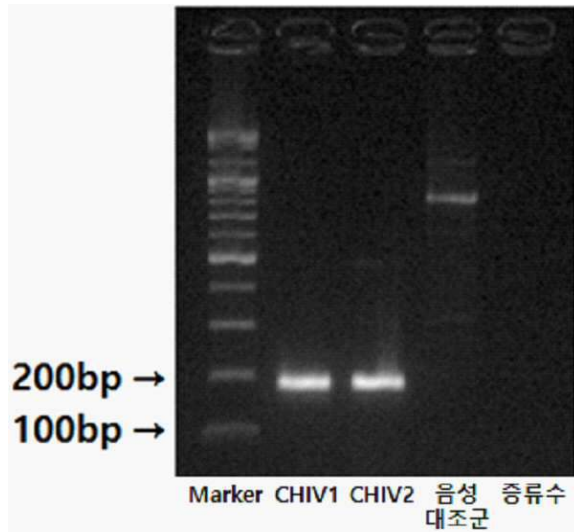
도 4를 참고하면, 실시예 2의 올리고뉴클레오타이드 세트가 비교예의 그것에 비해 선명한 밴드를 나타내어 더 낮은 농도까지 치쿤군야 바이러스를 검출할 수 있으며, 치쿤군야 바이러스 외 다른 바이러스에 대한 비특이적 반응 또한 현저하게 감소하여 검출 민감도가 우수하다는 것을 확인할 수 있다.

[0091] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

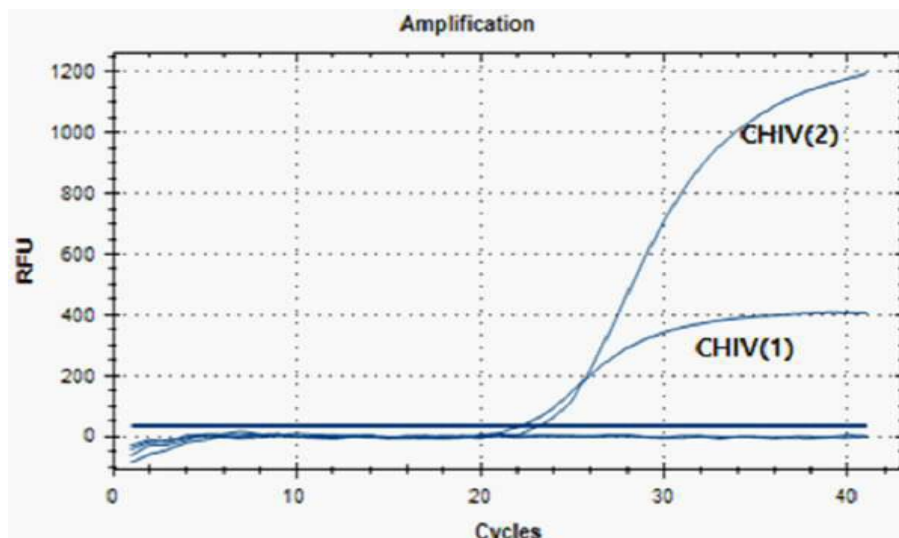
[0092] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

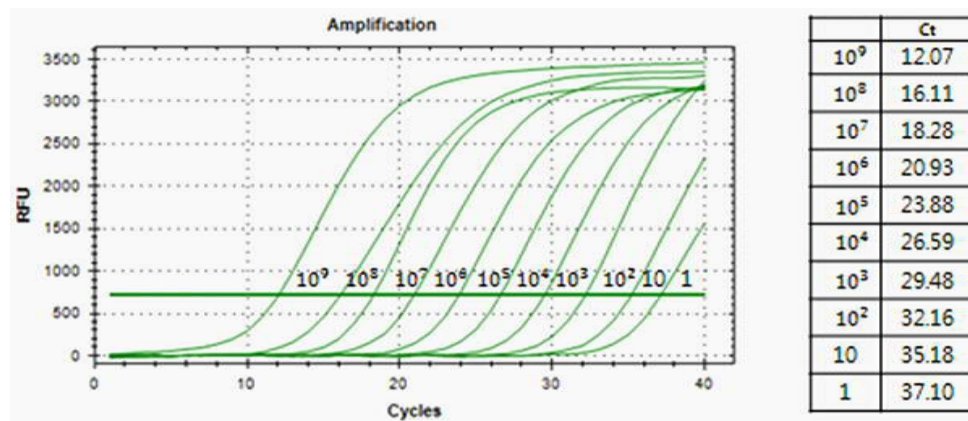
도면1



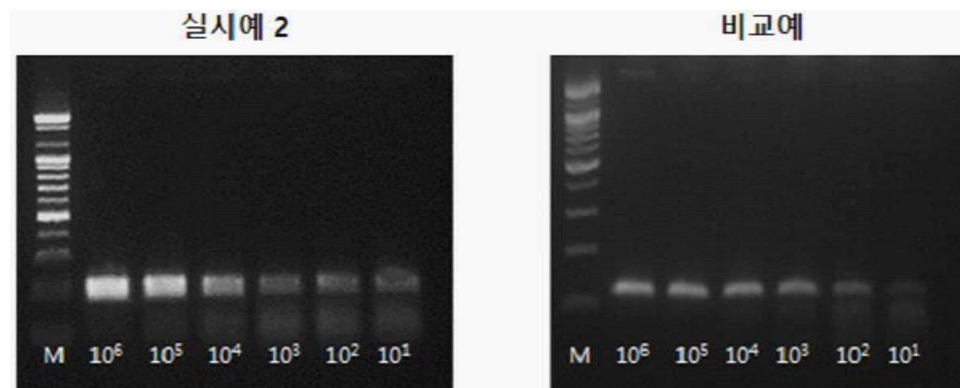
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY
- <120> OLIGONUCLEOTIDE SET FOR DETECTION OF CHIKUNGUNYA VIRUS AND USES THEREOF
- <130> APC-2017-0308
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 18
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Chikungunya TF protein specific forward primer
- <400> 1
- gatagaagac gagcgctg
- <210> 2
- <211> 17

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Chikungunya TF protein specific reverse primer	
<400>	2	
	gaagctcaga ggacccg	17
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Chikungunya TF protein specific forward primer	
<400>	3	
	gaccatcgat aacgcggacc	20
<210>	4	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Chikungunya TF protein specific reverse primer	
<400>	4	
	tactcaggag gccggttc	18
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Chikungunya TF protein specific probe	
<400>	5	
	gtggtaatgt ccatggccac c	21
<210>	6	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Chikungunya TF protein specific probe	
<400>	6	
	aaaccggagg ggtactacaa ct	22