

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0032128 (43) 공개일자 2013년04월01일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/115 (2010.01) C12Q 1/68 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0095849 (22) 출원일자 2011년09월22일 심사청구일자 2011년09월22일		(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 구만복 서울특별시 동대문구 천장산로9가길 25-3 (이문동) 이수진 서울특별시 성북구 안암로 145, 생명과학대학 녹지 543호 (안암동5가, 고려대학교) (뒷면에 계속) (74) 대리인 특허법인다나

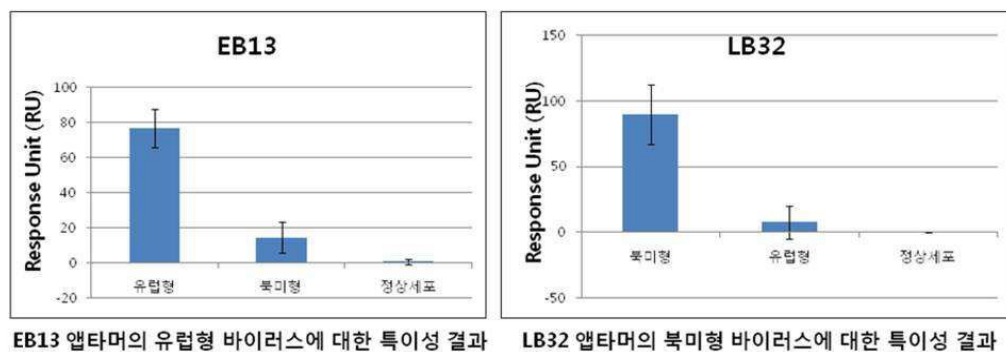
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 특이적인 DNA 앵타머

(57) 요약

본 발명은 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(PRRSV)에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머에 관한 것으로, 랜덤 DNA 라이브러리로부터 Flu-Mag-SELEX 방법을 통해 선별된 복미형 또는 유럽형 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 제공하는 효과가 있다. 상기 앵타머를 이용하여 돼지 생식기 호흡기 증후군을 효과적으로 진단할 수 있다.

대표도 - 도1



EB13 앵타머의 유럽형 바이러스에 대한 특이성 결과

LB32 앵타머의 복미형 바이러스에 대한 특이성 결과

(72) 발명자

권영섭

서울특별시 성북구 인촌로 110-29, 103호 (안암동 5가)

이지은

서울특별시 강서구 강서로26길 57, 광명빌라 302호 (화곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 110031031HD120

부처명 농림수산식품부

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 [협동]PRRSV, Influenza virus, BVDV 검출용 DNA 앵타머의 개발

주관기관 서울대학교 산학협력단

연구기간 2010.07.01 ~ 2011.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

서열목록 서열번호 1 내지 71에 기재된 염기서열 중 어느 하나를 포함하는 복미형 또는 유럽형 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(Porcine Reproductive & Respiratory Syndrome virus, PRRSV)에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머.

청구항 2

제1항의 DNA 앵타머를 포함하는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 검출용 조성물.

청구항 3

제1항의 DNA 앵타머를 포함하는 돼지 생식기 호흡기 증후군 진단용 조성물.

청구항 4

제1항의 DNA 앵타머가 고정화된 고상 담체.

청구항 5

제4항에 있어서,

고상 담체는 기관, 수지, 플레이트, 필터, 카트리지, 컬럼 또는 다공질체인 고상 담체.

청구항 6

제4항에 있어서,

기관은 니켈-PTFE(폴리테트라플루오로에틸렌) 기관, 유리 기관, 아파타이트(apatite) 기관, 실리콘 기관, 금 기관, 은 기관 또는 알루미늄 기관인 고상 담체.

청구항 7

제4항에 있어서,

고상 담체는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 검출용 담체인 고상 담체.

청구항 8

제4항에 있어서,

고상 담체는 돼지 생식기 호흡기 증후군 진단용 담체인 고상 담체.

청구항 9

제1항의 DNA 앵타머를 포함하는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 검출용 키트.

청구항 10

제1항의 DNA 앵타머를 포함하는 돼지 생식기 호흡기 증후군 진단용 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 랜덤 DNA 라이브러리로부터 선별된 복미형 또는 유럽형 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(PRRSV)에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(PRRS Virus 또는 PRRSV)는 외막을 갖고 있으며 직경 50 내지 60nm의 작은 구형 바이러스로 표면에는 작은 돌기들이 나와 있다. 유전자가 들어있는 부위는 직경 25 내지 35nm로 단쇄 RNA 유전자가 자리하고 있다. 외부환경에는 그다지 강하지 못해서 산도 5 이하 또는 7 이상에서 바이러스 감염 역가가 90%이상 감소되며, 37 °C에서 10 내지 24시간, 20 °C에서는 6일 정도 경과하면 감염 역가가 10배 이상 감소한다. 이 바이러스에 감염되었을 경우 혈청검사에 의해서만 감염을 알 수 있을 정도로 임상증상이나 경제적 손실이 전혀 없는 경우부터 농장생산의 20% 정도 손실을 입힐 정도로 심한 경우까지 정도는 다양하다.

[0003] 임상 증상은 번식장애와 호흡기 질환으로 분류되며 모돈에서의 번식장애, 자돈 및 육성돈에서의 호흡기 질환으로 구분된다. 보통 임신말기유산이 대부분이며 조산 태아 분만, 사산 및 미이라 자돈의 발생, 자돈의 이유 전 폐사율의 급증, 이유 후 폐사율의 증가, 발정회귀의 지연 등이며 이 증상들은 모돈과 그 모돈에서 태어난 자돈들에 집중적으로 발생한다.

[0004] PRRS 바이러스 감염에 의한 호흡기 질환은 전 일령에 나타날 수 있으며 일반적으로 빠른 복식호흡과 안검부종, 결막염, 재채기, 충혈 등이 관찰되며 짧은 기간의 체온상승이 있는 경우도 있고 드물게는 신경증상을 보일 수도 있다. 호흡기 질환의 특징은 PRRS 바이러스 단독 감염의 경우보다는 세균성, 바이러스성 병원체의 2차감염 및 복합감염이 대부분이며 그 경우 병원성이 훨씬 증폭된다. 이 밖에 귀, 복부, 외음부 등에 청색반점이 생기는 경우도 있다. 흔히 청색귀병(blue ear disease)라고 불린 이유도 여기에 있다.

[0005] 일반적으로 급성으로 심하게 진행되는 경우가 대부분이며 준임상형 감염이나 만성적으로 진행될 경우는 특징적인 임상증상을 거의 관찰할 수 없다. 만성적 감염은 이유자돈과 육성비육단계에서 주로 발생하며 PRRS 바이러스의 공격을 받은 폐에 세균 및 바이러스가 감염되어 폐렴을 일으킨다. 이에 따라 일당 증체량은 떨어지고 사료 요구율은 더 증가하며 일반적으로 간질성 폐렴 소견을 보인다. 그러므로 PRRSV의 발병을 차단하는 것이 매우 중요하며, 농가를 포함한 국가의 경제적, 물질적 손실을 줄이기 위해 조기에 정확하게 진단하는 것이 매우 중요한 일이다.

[0006] 기존의 PRRS 진단을 위해서는 우선, 농장 과거 병력과 현재 상태의 점검 및 임상 증상이 확인되어야 하고, 이후 주로 검사하는 방법인 ELISA 와 PCR을 통한 실험실적 검사의 확인으로 이어진다. ELISA는 바이러스에 의해 생성된 항체를 통해서 바이러스의 유무와 감염 정도를 간접적으로 확인하는 것이고, PCR은 조직 내 또는 혈액에의 바이러스의 유무를 유전자 증폭을 통해서 직접 확인하는 것이다.

[0007] ELISA는 항원이 코팅된 튜브, 플레이트 등에 검사 혈청을 넣어 항원-항체 결합을 유도한 후, 항체와 결합할 수 있는 효소 등의 시약을 넣어 주어 발색/발광 등의 정도를 확인함으로써 항체의 유무를 판별하는 것이다. 그러나 ELISA 검사는 바이러스 자체를 검출하는 것이 아니라 이에 의한 면역 반응의 결과체인 항체를 측정하는 것으로서, 현재 감염 상태의 유무를 판별할 수는 없다. 더욱이 바이러스에 대한 경험이 없는 돼지가 바이러스에 처음 감염되었을 때, 항체를 생성하기까지는 약 2주 이상의 시간이 필요한 것을 감안하면, ELISA 검사의 정확성을 무조건적으로 신뢰할 수 없다는 단점이 있다.

[0008] 바이러스를 직접적으로 확인할 수 있는 방법이 PCR이다. 이는 유전자 증폭을 통한 검사법으로서 바이러스의 존재를 확인할 수 있는 검사 방법이다. 그러나 유전자 증폭을 위해서는 통상적으로, 고가의 시약과 장비가 필요하다

며 즉, 현장에서의 신속한 진단이 어렵다는 의미를 내포한다.

[0009] 이러한 문제점들을 개선하기 위한 새로운 감지물질로서 다양한 타겟물질에 대해 특이적으로 높은 친화도를 보이는 핵산 구조체인 앵타머를 이용하는 연구가 많이 이루어지고 있다.

[0010] 앵타머(Aptamer)는 특정 타겟에 대해 높은 특이성과 친화도를 가지는 단일가닥 DNA 또는 RNA의 구조체를 말한다. 앵타머는 타겟에 대한 친화도가 높고 열 안정성이 우수하며 시험관 내(*in vitro*)에서 합성이 가능하기 때문에, 비용면에서도 기존의 센서 분야에서 이용되는 감지물질들 보다는 우위에 있다. 또한 타겟물질에 제약이 없어 단백질, 아미노산 같은 생분자나 환경호르몬이나 항생제 같은 작은 유기화학 물질, 박테리아 등의 다양한 타겟에 대한 앵타머를 합성할 수 있다. 이렇게 타겟물질과 특이적으로 결합하는 앵타머의 특성으로 인해 최근 들어 앵타머를 신약개발, 약물전달 시스템, 그리고 바이오센서 등의 연구에 이용하기 위해 많은 연구가 이루어지고 있다.

[0011] 본 발명은 PRRSV 입자에만 특이적으로 결합하는 핵산 구조체인 DNA 앵타머를 개발해냄으로써, 가축농가에 정신적, 물질적, 경제적 손실을 입히는 PRRSV를 보다 정확하고 신속하게 검출, 진단하는데 기여하기 위해 안출되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 1. 국내공개특허 제2011-0027871호 "돼지호흡기복합질병 원인체의 유전자 진단을 위한 프로브, 유전자칩, 유전자 진단키트 및 이를 이용한 진단방법", 주식회사 제노바이오텍

비특허문헌

[0013] (비특허문헌 0001) 1. R. Stoltenburg et al., Anal Bioanal Chem (2005) 383: pp.83-91

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 PRRS 바이러스의 복미형 또는 유럽형 균주에 각각 특이적으로 높은 친화도를 보이는 핵산 구조체인 DNA 앵타머를 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 PRRS 바이러스에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머에 의한 돼지 생식기 호흡기 증후군 진단 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열목록 서열번호 1 내지 71에 기재된 염기서열 중 어느 하나를 포함하는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(Porcine Reproductive & Respiratory Syndrome virus, PRRSV)에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머를 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한 본 발명의 DNA 앵타머를 포함하는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 검출용 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한 본 발명의 DNA 앵타머를 포함하는 돼지 생식기 호흡기 증후군 진단용 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한 본 발명의 DNA 앵타머가 고정화된 고상 담체를 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한 본 발명의 DNA 앵타머를 포함하는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 검출용 키트를 제공한다.

[0021] 본 발명은 또한 본 발명의 DNA 앵타머를 포함하는 돼지 생식기 호흡기 증후군 진단용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따르면 PRRSV 복미형 또는 유럽형 균주에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 이용함으로써 기존의 항체 기반, 유전자 증폭기법 분석에 비해 보다 민감하고 신속, 정확하게 샘플 중 PRRSV 복미형 또는 유럽형의 농도를 측정할 수 있다.

[0023] 또한, 상기 DNA 앵타머는 항체에 비해 생산비용이 적고 표면에 고정화하기가 쉬우므로 바이오센서 칩 제작에 유리하다. 따라서 이러한 PRRSV 복미형 또는 유럽형에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 이용하여 샘플 중 PRRSV 복미형 또는 유럽형 농도를 민감하고 정확하게 측정할 수 있는 바이오센서를 개발하여 돼지 생식기 호흡기 증후군 진단의 정확성을 증가시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1 및 2는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 복미형/유럽형에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머의 특이성을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0026] 본 발명은 서열목록 서열번호 1 내지 71에 기재된 염기서열 중 어느 하나를 포함하는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(Porcine Reproductive & Respiratory Syndrome virus, PRRSV)에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머에 관한 것이다.

[0027] 본 발명은 Flu-Mag SELEX 프로세스를 이용하여 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스(PRRSV)의 복미형 또는 유럽형에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 선별하는 것을 특징으로 한다.

[0028] 본 명세서에서 언급된 "Flu-Mag SELEX 프로세스"란 임의적으로 합성된 DNA 또는 RNA의 집합에서 특정 분자에 대해 높은 결합력을 지니는 DNA 또는 RNA를 선별하여 증폭시킴으로써 해당 분자의 DNA 결합 서열을 알아내는 방법을 말한다.

[0029] 상기 Flu-Mag SELEX 프로세스에 의한 복미형 또는 유럽형 PRRSV에 특이적으로 결합하는 앵타머의 선별과정을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

[0030] 1) 자성 비드(magnetic bead)에 PRRSV 고정

[0031] PRRSV의 아미노기(amino group)와 자성비드 표면의 토실기(tosyl group)는 공유결합을 형성하게 되는데, 이것을 위해 PRRSV와 자성비드를 완충용액에 넣고 반응시킨다. 반응 후 PRRSV가 결합된 자성비드는 자석을 이용해서 분리가 가능하며 같은 완충용액으로 비드를 세척하여 결합하지 않았거나 표면에 약하게 붙어있는 PRRSV를 제거한다.

[0032] 2) PRRSV에 특이적으로 결합하는 DNA 앵타머 개발

[0033] 표적물질 특이적인 앵타머를 개발하기 위한 방법으로는 일반적으로 SELEX(Systematic Evolution of Ligand by Exponential Enrichment) 방법이 널리 사용되고 있다. 본 발명에서는 일반적인 SELEX를 변형한 Flu-Mag-SELEX

프로세스를 이용하여 PRRSV 결합 특이적인 DNA 앵타머를 개발하였다. 본 발명에 이용된 FluMag-SELEX 프로세스는 DNA 증폭단계에서 형광 표지된 프라이머(fluorescence labelled primer)를 사용함으로써 이어지는 PAGE를 이용한 PCR 산물 분리(dsDNA→ssDNA)과정에서 형광을 띠는 밴드만 취하면 되는 이점을 이용하기 위한 변형이며, 타겟과 결합하는/결합하지 않는 DNA를 구별해내는 방법으로 자석(magnet)을 이용한 SELEX 방법이다. 기존의 다른 SELEX의 경우, 방사선 표지(radioactive label), 모세관 전기영동(capillary electrophoresis), 멤브레인 필터(membrane filter) 등을 이용했는데, 경비가 많이 들고 핸들링 하기가 어려운 단점이 있다. PCR 산물을 분리하기 위해서는 크로마토그래피, 어피니티 컬럼 등이 이용되었지만 가격이 비싸고, 효율이 떨어지는 문제가 있다(R. Stoltenburg, C. Reinemann, B. Strehlitz (2005) *Anal Bioanal Chem* 383: 83-91).

[0034] 이를 해소하기 위하여, 본 발명은 먼저 76개의 임의의 염기를 가진 DNA 풀을 합성하며, 이 DNA 풀을 PRRSV가 고정되어 있는 자성비드와 함께 완충용액에 넣고 혼합하여 결합 반응을 시킨 후 자석을 이용해 PRRSV와 결합하지 않은 DNA를 제거한다. 고온 처리를 하여 PRRSV와 결합한 DNA를 자성비드에서 분리시킨 다음 에탄올 침전법으로 용리된 DNA를 확보한다.

[0035] 상기 단일가닥 DNA 풀은 5' 말단 부분에는 서열번호 72에 기재된 프라이머 영역을, 3' 말단 부분에 서열번호 73에 기재된 프라이머 영역을 포함할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0036] 타겟물질은 북미형 또는 유럽형 PRRSV를 사용할 수 있다. 후술하는 카운터 선별 시 타겟물질이 북미형 PRRSV인 경우, 카운터 타겟물질은 유럽형 PRRSV를 사용하고, 타겟물질이 유럽형 PRRSV인 경우에는 카운터 타겟물질로 북미형 PRRSV를 사용할 수 있다.

[0037] PRRSV 결합 특이적인 DNA의 양을 증폭하기 위해 PCR을 수행하고 PRRSV 결합 특이적인 DNA의 양을 증폭하기 위해 PCR을 수행하고 PCR 반응물을 정제한 후, 고농도의 우레아가 들어있는 폴리아크릴아마이드 젤로 전기영동을 하여 이중 가닥 DNA인 PCR 결과물을 두 개의 단일가닥 DNA로 분리한다. 이 경우, PCR 생산물은 두 가닥의 DNA 이므로 이를 단일가닥으로 분리하기 위한 변성과정을 위해서 하나의 프라이머에는 형광 물질을 고정한다. 전기영동 과정에서 두 가닥의 DNA가 변성되어 형광 물질이 붙어있는 DNA 가닥은 위에, 붙어있지 않은 DNA 가닥은 아래에 각각 위치하게 된다. 형광 물질이 붙어 있는 DNA 밴드를 폴리아크릴아마이드 젤로부터 잘라내어 추출한 후 다시 에탄올 침전법으로 분리된 DNA를 확보한다.

[0038] 상기 PCR을 위한 프라이머 쌍은 서열번호 72 및 74에 기재된 것을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0039] 상기 형광 물질은 Cy5, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 658, 시아닌(Cyanine)-3, 시아닌-5, 플루오레세인(fluorescein), 보디피(bodipy), 텍사스 레드(Texas red), FITC(Fluorescein Isothiocyanate), 또는 로다민(rhodamine) 등을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0040] 원래의 단일가닥 DNA 밴드를 젤 추출(gel extraction)한 후 다시 에탄올 침전법으로 분리된 DNA를 확보한다.

[0041] 이때 확보된 DNA 풀은 다시 처음의 PRRSV가 고정되어 있는 자성비드 용액과 혼합하여 PRRSV와 반응시킨다. 이러한 일련의 과정을 반복하여 90% 이상이 PRRSV에 결합하는 DNA 풀을 얻은 후 DNA 풀을 TOPO 클로닝키트를 이용하여 클로닝(cloning)하고 얻어진 콜로니에서 DNA를 추출하여 염기분석을 시행한다.

[0042] 3) PRRSV 결합 특이적 DNA 앵타머 분석

[0043] PRRSV에 특이적으로 결합하는 앵타머의 다른 단백질에 대한 친화성과 PRRSV의 농도에 따른 결합력의 크기를 비교하기 위한 방법으로 표면자기공명장치(SPR)를 이용하였다. 이것을 위하여 금칩(bare gold chip)의 표면을 화학 처리하여 각각의 DNA 앵타머를 칩 위에 고정시킨 후 그 위에 PRRSV를 농도 별로 반응시키고, 특이성 분석을 위해 다른 PRRSV와 BSA에 대한 분석도 테스트한다.

[0044] 상기 DNA 앵타머는 Flu-Mag SELEX 프로세스에 의해 선별된 북미형 PRRSV 또는 유럽형 PRRSV 에 특이적으로 결합하는 어떠한 염기서열의 DNA 앵타머일 수 있으나, 바람직하게는, 서열번호 1 내지 서열번호 71에 기재된 염기서열 중 어느 하나를 가질 수 있다. 보다 바람직하게는, 유럽형 PRRSV 에 특이적으로 결합하는 앵타머는 서열번호 1 내지 38에 기재된 염기서열 중 어느 하나를 가지며, 북미형 PRRSV 에 특이적으로 결합하는 앵타머는 서열번호 39 내지 71에 기재된 염기서열 중 어느 하나를 가질 수 있다.

- [0045] 본 발명의 앵타머는 또한 이 기술분야에서의 자체 공지의 방법에 의해 화학 합성할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 앵타머는, 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 대한 결합성, 안정성 등을 높이기 위해, 각 뉴클레오타이드의 당 잔기(예, 리보오스나 디옥시리보스)가 수식된 것이어도 좋다. 당잔기에서 수식되는 부위로서는, 예컨대 당잔기의 2'부위, 3'부위 및/또는 4'부위의 산소원자를 다른 원자로 치환한 것 등을 들 수 있다. 수식의 종류로서는, 예컨대 플루오로화, O-알킬화(예, O-메틸화, O-에틸화), O-알릴화, S-알킬화(예, S-메틸화, S-에틸화), S-알릴화, 아미노화(예, -NH)를 들 수 있다. 이러한 당잔기의 변형은, 자체 공지의 방법에 의해 행할 수 있다(예컨대 Sproat *et al.*, (1991) *Nucle. Acid. Res.* 19, 733-738; Cotton *et al.*, (1991) *Nucl. Acid. Res.* 19, 2629-2635; Hobbs *et al.*, (1973) *Biochemistry* 12, 5138-5145 참조).
- [0047] 본 발명의 앵타머는 또한 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에 대한 결합성 등을 높이기 위해, 핵산염기(예, 푸린, 피리미딘)가 변형(예, 화학적 치환)된 것이어도 좋다. 이러한 변형으로서, 예컨대 5부위 피리미딘 변형, 6 및/또는 8부위 푸린 변형, 환외(環外) 아민에서의 변형, 4-티오우리딘으로의 치환, 5-브로모 또는 5-요오드-우리실으로의 치환을 들 수 있다.
- [0048] 또한 뉴클레아제 및 가수분해에 대하여 내성을 갖도록, 본 발명의 앵타머에 포함되는 인산기가 변형되어 있어도 좋다. 예컨대 P(0)0기가, P(0)S(티오에이트), P(S)S(디티오에이트), P(0)NR₂(아미데이트), P(0)R, R(0)OR', CO 또는 CH₂(포름아세탈) 또는 3'-아민(-NH-CH₂-CH₂-)으로 치환되어 있어도 좋다 [여기서 각각의 R 또는 R'은 독립적으로, H이거나, 또는 치환되어 있거나, 또는 치환되어 있지 않은 알킬(예, 메틸, 에틸)이다]. 연결기로서는, -O-, -N- 또는 -S-가 예시되고, 이들의 연결기를 통하여 인접하는 뉴클레오타이드에 결합할 수 있다.
- [0049] 본 발명에서의 변형은 또한, 컵핑과 같은 3' 및 5'의 변형을 포함하여도 좋다.
- [0050] 변형은 또한, 폴리에틸렌글리콜, 아미노산, 펩티드, inverted dT, 핵산, 뉴클레오시드, 미리스토일(Myristoyl), 리췌콜릭-올레일(Lithocolic-oleyl), 도코사닐(Docosanyl), 라우로일(Lauroyl), 스테아로일(Stearoyl), 팔미토일(Palmitoyl), 올레오일(Oleoyl), 리놀레오일(Linoleoyl), 그 외 지질, 스테로이드, 콜레스테롤, 카페인, 비타민, 색소, 형광물질, 향약제, 독소, 효소, 방사성 물질, 비오틴 등을 말단에 부가함으로써 행해질 수 있다. 이러한 변형에 대해서는, 예컨대 미국특허 제5,660,985호, 미국특허 제5,756,703호를 참조한다.
- [0051] 본 발명은 또한 본 발명의 DNA 앵타머를 포함하는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0052] 본 발명의 앵타머와 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 공유결합 또는 비공유결합을 통한 복합체 형성을 이용하여 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 검출할 수 있다. 상기 검출은 항체 대신에 본 발명의 앵타머를 이용하는 것 이외는, 면역학적 방법과 같은 방법에 의해 수행될 수 있다. 따라서, 항체 대신에 본 발명의 앵타머를 이용함으로써, 효소 면역 측정법(EIA)(예, 직접 경합 ELISA, 간접 경합 ELISA, 샌드위치 ELISA), 방사 면역 측정법(RIA), 형광 면역 측정법(FIA), 웨스턴 블롯(blot)법(예, 웨스턴 블롯법에서의 2차 항체 대신에 사용), 면역조직 화학적 염색법, 셀 소팅(cell sorting)법 등의 방법과 같은 방법에 의해, 검출 및 정량을 행할 수 있다.
- [0053] 본 발명은 또한 본 발명의 DNA 앵타머를 포함하는 돼지 생식기 호흡기 증후군 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0054] 상기 돼지 생식기 호흡기 증후군의 진단은 상기 앵타머와 가축의 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 객담 및 뇨 중에서 선택되는 시료와 접촉시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 시료는 가축, 바람직하게는 돼지에서 분리된 것으로, 최소 침습으로 확보가능한 시료 또는 분비체액, *in vitro* 세포배양액 성분 시료 등 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 포함하고 있을 수 있는 시료이면, 상기에 한정되지 않음은 자명하다. 보다 바람직하게는 혈액일 수 있다. 상기 돼지 생식기 호흡기 증후군의 중요한 바이오마커인 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 혈중농도를 정확하게 측정하는 것은 상기 질환을 진단하는데 매우 중요하다. 따라서 혈액 샘플 안의 여러 생체 물질 중에서 비특이적이며 적은 양의 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스에도 특이적으로 결합할 수 있는 본 발명의 DNA 앵타머를 포함하는 조성물을 이용하여 보다 신속하고 정확하게 돼지 생식기 호흡기 증후군을 진단하는 데에 사용할 수 있다.

- [0055] 상기 앵타머를 시료와 접촉시키는 경우, 시료 중 존재하는 바이오마커인 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스와 상기 앵타머간 특이적인 결합이 일어나게 된다. 따라서, 형광 등으로 앵타머를 표지하여 결합시킨 다음 시그널의 존재 여부를 확인함으로써, 돼지 생식기 호흡기 증후군을 검출할 수 있게 된다.
- [0056] 본 발명은 또한 본 발명의 DNA 앵타머가 고정화된 고상 담체에 관한 것이다.
- [0057] 상기 고상 담체로는 기판, 수지, 플레이트(예, 멀티웰 플레이트), 필터, 카트리지, 컬럼 또는 다공질재 등을 들 수 있다.
- [0058] 상기 기판은 DNA 칩이나 단백질 칩 등에 사용되고 있는 것 등일 수 있고, 예컨대 니켈-PTFE(폴리테트라플루오로에틸렌) 기판이나 유리 기판, 아파타이트(apatite) 기판, 실리콘 기판, 금, 은 또는 알루미늄 기판 등으로, 이들의 기판에 폴리머 등의 코팅한 것을 들 수 있다.
- [0059] 상기 수지는 아가로스(agarose) 입자, 실리카입자, 아크릴아미드와 N, N'-메틸렌비스아크릴아미드의 공중합체, 폴리스티렌 가교 디비닐벤젠입자, 텍스트란을 에피클로로하이드린으로 가교한 입자, 셀룰로오스파이버, 알릴텍스트란과 N, N'-메틸렌비스아크릴아미드의 가교폴리머, 단분산계 합성폴리머, 단분산계 친수성폴리머, 세파로오스(Sepharese) 또는 토요펠(Toyopearl) 등을 들 수 있고, 또한 이들의 수지에 각종 관능기를 결합시킨 수지를 사용할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 앵타머는 공지의 방법에 의해 고상 담체에 고정할 수 있다. 예컨대, 친화성 물질이 나 소정의 관능기를 본 발명의 앵타머에 도입하고, 계속해서 이 친화성 물질이나 소정의 관능기를 이용하여 고상 담체에 고정화하는 방법을 들 수 있다. 소정의 관능기는 커플링 반응에 제공하는 것이 가능한 관능기일 수 있고, 예컨대 아미노기, 티올기, 히드록실기, 카르복실기를 들 수 있다. 예를 들어, 상기 앵타머의 말단에 바이오틴을 결합시켜 복합체를 형성하고, 상기 칩 등의 기판 표면에 스트렙타비딘을 고정화시켜, 상기 바이오틴과 기판 표면에 고정화된 스트렙타비딘의 상호작용에 의하여 상기 앵타머를 기판 표면에 고정화시킬 수 있다.
- [0061] 상기 앵타머가 고정화된 고상 담체를 이용하여 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 검출하는 방법은, 예를 들어, 본 발명의 DNA 앵타머를 칩(chip)상에 형광물질, 발색물질 또는 항체 등과 함께 스팟팅 시킨 후 혈액샘플을 반응시킴으로써 검출 시료, 예를 들어, 혈액 중에 포함된 미량의 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 수준을 신속하게 측정할 수 있다. 또 다른 방법으로는 자성 비드에 상기 DNA 앵타머를 고정화시켜 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 결합시키게 되면 결합된 DNA 앵타머-돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 복합체를 자석을 이용하여 분리할 수 있게 되고, 이 복합체로부터 다시 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 분리함으로써 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스만을 선택적으로 검출할 수 있게 된다. 본 발명의 실시예에 기술된 방법 이외에도 본 발명의 DNA 앵타머와 연결자로 연결된 센서를 이용하여 혈액 중의 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스를 검출하는 방법 등을 사용할 수 있다.
- [0062] 상기 고상 담체를 이용한 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스의 검출은 돼지 생식기 호흡기 증후군을 진단하는데 유용하다.
- [0063] 본 발명은 또한 본 발명의 DNA 앵타머를 포함하는 돼지 생식기 호흡기 증후군 바이러스 검출용 또는 돼지 생식기 호흡기 증후군 진단용 키트의 형태로 제공될 수 있다.
- [0064] 상기 키트는 필요에 따라 완충용액 및 검출의 수행과 분석을 위한 용기들을 포함할 수 있는데, 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 분리할 수 있는 마개를 장착할 수 있다. 용기는 또한 주사 바늘에 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.
- [0065] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

- [0066] <실시예 1> PRRSV 북미형/유럽형에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 개발
- [0067] PRRSV의 두 가지 균주(북미형/유럽형)에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 Flu-Mag SELEX 프로세스를 이용하여 선별하였다. 앵타머의 선별과정은 R. Stoltenburg 등의 *Anal Bioanal Chem* (2005, 383: pp.83-91)에 기재된 방법을 변형하여 실시하였다.
- [0068] 또한, 북미형 PRRSV에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머를 선별할 경우, 타겟물질로 북미형 PRRSV를, 카운터 타겟물질로 유럽형 PRRSV를 사용하였고, 유럽형 PRRSV에 특이적인 앵타머 선별 시, 타겟물질은 유럽형 PRRSV을, 카운터 타겟물질은 북미형 PRRSV를 사용하였다.
- [0069] 보다 구체적인 북미형 또는 유럽형 PRRSV에 특이적인 앵타머 선별과정은 다음과 같다.
- [0070] (자성 비드에 북미형 또는 유럽형 PRRSV의 고정)
- [0071] 북미형 또는 유럽형 PRRSV(MA 104 세포(African rhesus monkey kidney cell line)에 북미형 또는 유럽형 PRRSV를 각각 감염시킨 후 배양하여, 초고속 원심분리를 통해 바이러스 fraction 만을 수집한 바이러스 파티클 샘플을 국립수의과학검역원으로부터 제공받음)의 아미노기(amino group)와 자성비드(M-280 Tosylactivated magnetic beads, invitrogen, US)의 토실기(tosyl group)는 공유결합을 형성하게 되는데, 이것을 위해 PRRSV와 자성비드를 완충용액(0.1 M borate buffer, pH 9.5)에 넣고 상온에서 16시간 반응시켰다. 각각의 북미형 또는 유럽형 PRRSV가 결합된 자성비드는 자석을 이용해서 분리가 가능하며, 동일한 완충용액으로 비드를 세척하여 결합하지 않은 북미형 PRRSV를 제거하였다. 북미형 또는 유럽형 PRRSV가 결합된 자성비드(PRRSV-자성비드)는 세척 후 0.1%의 BSA(Bovine Serum Albumin, Sigma Co.) 용액(pH 8.5)으로 37℃에서 1시간 반응시켜 PRRSV와 결합하지 않은 토실기(tosyl group)를 불활성화하였다. 활성을 가지고 있는 토실기가 남아있으면 분자간의 여러 가지 상호작용, 예컨대, 반데르발스 결합, 소수성 반응(hydrophobic interaction) 등으로 인해 비특이적 결합(nonspecific binding)이 일어날 수 있기 때문에 활성이 거의 없다고 알려진 BSA로 활성기를 차단(blocking)시켰다. 수 차례 세척 후 완충용액(0.1 M PBS, pH 7.4)에 자성비드를 혼합하여 4 ℃에서 보관하였다.
- [0072] (임의의 염기서열을 가지는 DNA 풀 합성)
- [0073] 76mer DNA 풀로서 양 끝에 PCR을 위한 프라이머 영역(primer region)이 있고 중앙에 40개의 임의의 염기를 가진 DNA 풀을 아래와 같은 방법으로 합성하였다. 본 발명에 사용된 DNA 풀은 Genotech Inc. Korea에 화학적으로 합성을 의뢰하였다.
- [0074] CGTACGGAATTCGCTAGC-N40-GGATCCGAGCTCCACGTG
- [0075] (서열번호 72: CGTACGGAATTCGCTAGC; 서열번호 73: GGATCCGAGCTCCACGTG)
- [0076] (PRRSV와 결합한 DNA 앵타머의 선별)
- [0077] 상기 단계에서 합성된 랜덤 DNA 풀을 북미형 또는 유럽형 PRRSV가 고정되어 있는 자성비드(PRRSV-자성비드)와 함께 완충용액(100mM NaCl, 2mM MgCl₂, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 및 0.02% Tween20이 포함된 20mM Tris-Cl 완충용액, pH 7.6)이 담긴 튜브에 넣고 혼합하여 30분간 상온에서 반응시킨 후 PRRSV와 결합하지 않은 DNA를 제거하기 위해 상기 혼합액이 들어있는 튜브를 자석에 고정시켜서 PRRSV와 결합하지 않은 DNA를 제거하고, 결합력이 약한 DNA를 제거하기 위하여 완충용액으로 5회 세척하였다. PRRSV와 결합한 DNA를 용리하기 위하여 튜브를 80℃에서 5분간 두어 DNA를 자성비드에서 부터 분리시킨 다음 에탄올 침전법으로 용리된 DNA를 확보하였다. 이렇게 얻어진 북미형 또는 유럽형 PRRSV에 결합하는 DNA의 양을 측정하였다.
- [0078] (북미형 또는 유럽형 PRRSV와 결합 가능한 DNA 앵타머 풀의 제조)
- [0079] PRRSV 결합 특이적인 DNA의 양을 늘리기 위해 이미 알고 있는 프라이머 영역을 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 생산물은 두 가닥의 DNA이므로 이를 단일가닥으로 분리하기 위한 과정을 위하여, 아래와 같이 하나의 프라이머에는 플루오레세인(fluorescein)을 고정하였다.

- [0080] 정방향 프라이머: 5'-fluorescein-CGTACGGAATTCGCTAGC-3': 서열번호 72)
- [0081] 역방향 프라이머: 5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAXCACGTGGAGCTCGGATCC-3': 서열번호 74: 여기서, X=C18 링커)
- [0082] PCR 반응물을 정제키트(purification kit)를 이용하여 정제한 후 이중가닥의 DNA를 단일가닥으로 만들기 위해 폴리아크릴아마이드젤 전기영동을 실시하였다. 10%의 폴리아크릴아마이드젤에는 6M 우레아, 20% 포름아마이드가 포함되어 있어 전기영동 후에는 두 개의 밴드가 생기는데, 이는 전기영동 과정에서 두 가닥의 DNA가 변성되어 플루오레세인이 붙어있는 DNA 가닥은 위에, 붙어있지 않은 DNA 가닥은 아래에 각각 위치하게 된다. 플루오레세인이 붙어있는 DNA 밴드를 잘라내어 젤 추출(gel extraction)을 실시한 후 다시 에탄올 침전법으로 분리된 DNA를 확보하였다. 이때 확보된 DNA 풀은 다시 처음의 북미형 또는 유럽형 PRRSV가 고정되어 있는 자성비드 용액과 혼합하여 북미형 또는 유럽형 PRRSV와 반응시켰다. 일련의 과정(Flu-Mag-SELEX process)을 한 번의 선별(selection)이라 하면 총 9번의 선별과정을 거쳐 최종적으로 97% 이상이 북미형 또는 유럽형 PRRSV에 결합하는 DNA 풀을 얻었다. 2번째와 9번째 선별 후에는 각각 BSA(Bovine Serum Albumin, Sigma Co.)와 북미형 또는 유럽형 PRRSV로 카운터 선별(count selection)을 실시하는데 있어 북미형 PRRSV 에 대한 앵타머의 개발에는 유럽형 PRRSV 를, 반대의 경우에는 북미형 PRRSV 를 사용함으로써 비특이적으로 결합하는 DNA를 차단하고 북미형 또는 유럽형 PRRSV에만 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 DNA 풀을 확보하였다. 최종적으로 얻어진 DNA 풀을 TOPO 클로닝 키트(Invitrogen)를 이용하여 클로닝(cloning)하고 얻어진 콜로니에서 DNA를 추출하여 염기분석을 시행한 결과, 북미형 PRRSV에 특이적으로 결합하는 서로 다른 33종, 유럽형 PRRSV 에 특이적으로 결합하는 서로 다른 38 종의 핵산 구조체(DNA 앵타머)를 확보하였다.
- [0083] 북미형과 유럽형 PRRSV에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 서로 다른 71종의 DNA의 염기서열을 분석한 결과를 하기 표 1 및 2에 제시하였다.

RRSV 유럽형에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 서로 다른 38종의 DNA 앵타머의 염기서열

서열 번호	애플머 번호	염기서열
1	E1	CGTACGGAATTCGCTAGCTGTGTACAAGGGTGTTGGGAGGGGATGTGGATAGGTGATGGATCCGAGCTCCACGTG
2	E2	CGTACGGAATTCGCTAGCTGATGGTGTGGCGGGGGGGCCTGGGGCGGGGCGGCCGATGGGATCCGAGCTCCACGTG
3	E3	CGTACGGAATTCGCTAGCTAGTGGTGGATGGGGGCAGGGGGGCGGGCGTTTGGCTGCATGGGATCCGAGCTCCACGTG
4	E4	CGTACGGAATTCGCTAGCGCTGAAGCGGGGGGGTGGTAGCTGTOCTGAOCCACTAGATACAGGATCCGAGCTCCACGTG
5	E5	CGTACGGAATTCGCTAGCGAGCAGATAGGGTGTGGGGAAAGATGAGAATCGGGTGGCGGGATCCGAGCTCCACGTG
6	E7	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGGTGGGCGGGGGGGGGCGCAAAGTAGCAOCTGTGTCCGATCCGAGCTCCACGTG
7	E8	CGTACGGAATTCGCTAGCTCTCGGTGGGGGGGGGGCATGAGATGATGCCCTCTTTAGAGGATCCGAGCTCCACGTG
8	E9	CGTACGGAATTCGCTAGCCATGGTGGGATGGATGGGTACGAGGTAGACATGCTGGGGATCCGAGCTCCACGTG
9	E11	CGTACGGAATTCGCTAGCTTAGGCGGGGACTGGTGGGACATAGGTAAATACGGGATCCGATCCGAGCTCCACGTG
10	E14	CGTACGGAATTCGCTAGCTGTGAGTGGGTGCGGTGCGTGATCTATTGGGAAGTAGTCAGGATCCGAGCTCCACGTG
11	E16	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGGTGGGGGGGGAGGCCGTCTAGGGACATGGATGCACGGGATCCGAGCTCCACGTG
12	E17	CGTACGGAATTCGCTAGCATACTAGGTGGGACTTATAGTGCCGGGTGGGATCCGAGCTCCACGTG
13	E21	CGTACGGAATTCGCTAGCGAACCTAATCGGCGGGTGGGACAAATACAGATATGGGGTCCGATCCGAGCTCCACGTG
14	E22	CGTACGGAATTCGCTAGCGCAAGGATGGTGGGTGGGGTGCTGGGGCTGTGTATACTGGGATCCGAGCTCCACGTG
15	E24	CGTACGGAATTCGCTAGCGACTATGGGGCCAGGGATGGGGACTAGGATAGTGGGGGGGATCCGAGCTCCACGTG
16	EB2	CGTACGGAATTCGCTAGCAGTGTGGGGGGTGGGTGGCGGGGTCGACAAATGGAGTATGGATCCGAGCTCCACGTG
17	EB3	CGTACGGAATTCGCTAGCTGAATGGCCTAGATGAGACCAGTGGTATACACCCGTAACCTGGATCCGAGCTCCACGTG
18	EB5	CGTACGGAATTCGCTAGCGTGGGTGGGTGGTGGGGTAGTTGTGGGTATCTGATGGTGAGGATCCGAGCTCCACGTG
19	EB6	CGTACGGAATTCGCTAGCACTAGGTGGGTCCGATGGTGGCTTGGCTGTGGTGGGTGGGATCCGAGCTCCACGTG
20	EB7	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGGCAGGGCTGGGGGGGGGGTGTAGAAAAGCTGATGATGGATCCGAGCTCCACGTG
21	EB8	CGTACGGAATTCGCTAGCATATGAGGGTGGGTGGGTGGGTGGTGGCTGGCTGGCTATCCGATCCGAGCTCCACGTG
22	EB10	CGTACGGAATTCGCTAGCCTACACGGCTCACCTATACATGACTGCCAATCGCTCTGGATCCGAGCTCCACGTG
23	EB12	CGTACGGAATTCGCTAGCACTACGGGGGGGGCAGCAGGCAGGTAATGGTGAGGGTGGGATCCGAGCTCCACGTG
24	EB13	CGTACGGAATTCGCTAGCTGACTGTGTAGGGTGGGTGGGGGGCTTCTCTCGGTGTACAGGATCCGAGCTCCACGTG
25	EB14	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGAAGGGGTGGGTGGGAGGTATATGTGTCAGCGCAAAATAGGATCCGAGCTCCACGTG
26	EB15	CGTACGGAATTCGCTAGCAGGGGAGGGGAAAAATGGGGGGGGTGATACATCGCTCGAGGATCCGAGCTCCACGTG
27	EB16	CGTACGGAATTCGCTAGCCAGGGATGGGTGTGGTGGGTATACGGAGTGTCTGTTGCATAGGATCCGAGCTCCACGTG
28	EB17	CGTACGGAATTCGCTAGCAATGGTTCGGGTGGGGGGGAAGTAGAGTGGTGGTGCGCCTGGATCCGAGCTCCACGTG
29	EB18	CGTACGGAATTCGCTAGCATATGAGGGTGGGTGGGTGGGTGAGTGTAGAAATACGGTCAGGATCCGAGCTCCACGTG
30	EB19	CGTACGGAATTCGCTAGCGCAGGGGGGGTGGGTAGGGAATAGCGGACTACTCTGTGGGATCCGAGCTCCACGTG
31	EB21	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGCGTGGCTGGGTGGGTGGTGGGGGATGACGGGGCCAGGATCCGAGCTCCACGTG
32	EB24	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGGGAGGTGGGGTGGGATAAACAGTCTCGCGGTACAGGATCCGAGCTCCACGTG
33	EB26	CGTACGGAATTCGCTAGCGGGTATAATGGTGTGGTTGGTGGGTGGGTGAAAAATGGGATGGGATCCGAGCTCCACGTG
34	EB28	CGTACGGAATTCGCTAGCATAGGGTGGGTGGGTGGCGGGCTGAATGCGATGTTCTCGGATCCGAGCTCCACGTG
35	EB29	CGTACGGAATTCGCTAGCATGGGTGGGTGGGTGGTGGTATATAGCATGTAGGTGTGGATCCGAGCTCCACGTG
36	EB30	CGTACGGAATTCGCTAGCTGGGTGGGCTGTGGGTGGGATAGACAGAAAATCGCACAGGATCCGAGCTCCACGTG
37	EB32	CGTACGGAATTCGCTAGCTGAGTGTGGGTGGGTGGGTGGGTGAGCTGTGCGTGTGTGTAGATCCGAGCTCCACGTG
38	EB33	CGTACGGAATTCGCTAGGCACAGAACATACCGTCCATGCCAACCATATATCACTACTCGGATCCGAGCTCCACGTG

표 2

RRSV 복미형에 높은 친화도를 가지고 특이적으로 결합하는 서로 다른 38종의 DNA 앵타머의 염기서열

서열 번호	앵타머 번호	염기서열
39	L3	CGTACGGAATTGCTAGCCGACGAGGCTACTTGACACCACTGAACCCCTCCTGTGAGGATCCGAGCTCCACGTG
40	L4	CGTACGGAATTGCTAGCTATGGGAAGACAACGGGTGTGCCGAGGTGGATGTGGAAC TGGGATCCGAGCTCCACGTG
41	L6	CGTACGGAATTGCTAGCGGCCAGTGTCCGTGTATATGTAGGTGCGCATCTACGATGGATCCGAGCTCCACGTG
42	L7	CGTACGGAATTGCTAGCTGATCAGGGTAGGGAATAGGGTGGGGAAAGGTGTGGTGGATCCGAGCTCCACGTG
43	L8	CGTACGGAATTGCTAGCCGGGGGTGCGTCACCATGTTGGGGATGGGGCGGGAGGTGGATCCGAGCTCCACGTG
44	L10	CGTACGGAATTGCTAGCTGATGGTGTGGGGTGTGCGATGTACTGGGGTGGGTAGGGATCCGAGCTCCACGTG
45	L11	CGTACGGAATTGCTAGCTAAGCGCATATACCCCTAACAGGCTGCATAGTGAACAATGGGATCCGAGCTCCACATC
46	L12	CGTACGGAATTGCTAGCCGGGGAGATAAGACGGATGATGGGGATATCTAGTGGGGCGAGGATCCGAGCTCCACGTG
47	L13	CGTACGGAATTGCTAGCATATCGTGGGAGAGGTGGGTGGGTGAGTTCACAAGGACGGAGGATCCGAGCTCCACGTG
48	L16	CGTACGGAATTGCTAGCTGAGGTGGGGTGTGCGGGCGGGTGGAAAAGGCGTCAGGGATCCGAGCTCCACGTG
49	L18	CGTACGGAATTGCTAGCAGGACTGTTGGGGTGGGTAGGGGATGACCGGCATCCGGGATCCGAGCTCCACGTG
50	L19	CGTACGGAATTGCTAGCGTGGGAGGAGGGGTGGGGAAGTGTATGTGGTAGGGTAATGGATCCGAGCTCCACGTG
51	L22	CGTACGGAATTGCTAGCACATGATGGGATGGTGGGAGCATGAGGGCTTGGTATGGGGGATCCGAGCTCCACGTG
52	L25	CGTACGGAATTGCTAGCAATGGGGTGGGGTGTCTCGAATGTGTGGGTAGGGGGATCCGAGCTCCACGTG
53	LB2	CGTACGGAATTGCTAGCTGGGTGGGAGGGGTGAGGAATGGTAATAGGATGGTAAGGGATCCGAGCTCCACGTG
54	LB3	CGTACGGAATTGCTAGCTACCATCATCCCAACATGCAGCAGCTGTGAGTGTGGATCCGAGCTCCACGTG
55	LB5	CGTACGGAATTGCTAGCATACATCATACATACCAACAGACGCTGACCGAAGGATGGATCCGAGCTCCACGTG
56	LB6	CGTACGGAATTGCTAGCGGGGGGTGTCACCTCTGTGTGTATATATGTATCGTCTGGATCCGAGCTCCACGTG
57	LB8	CGTACGGAATTGCTAGCCGGGTACACGGCTGGGAAGGTGTGTGCCCTGAAGTGTGGGATCCGAGCTCCACGTG
58	LB9	CGTACGGAATTGCTAGCCCATATAATATATATGACCAACCCAGCATACGTGAGTCCGGATCCGAGCTCCACGTG
59	LB12	CGTACGGAATTGCTAGCACACATCAACACACCATCGAGATATATATAGAAAGCCGGATCCGAGCTCCACGTG
60	LB20	CGTACGGAATTGCTAGCCAAATACCGCGCCGATCTACACCAACTCGTACTGACTCTGGATCCGAGCTCCACGTG
61	LB21	CGTACGGAATTGCTAGCATGCACACTACATATCGCACATATCGAACAAGACCCGGATCCGAGCTCCACGTG
62	LB22	CGTACGGAATTGCTAGCTGGGGAAAAATAGGGTGGGATGTGTGTATGTATGGGTATGGGATCCGAGCTCCACGTG
63	LB23	CGTACGGAATTGCTAGCCACCCCTACCGAGCAGCACATGCATCTAACCCACCCCTGGATCCGAGCTCCACGTG
64	LB24	CGTACGGAATTGCTAGCCACCACACAGTAATAGTATCACCCCCGCACAAGCCATGGATCCGAGCTCCACGTG
65	LB26	CGTACGGAATTGCTAGCGGTGTGTAATGGGTGATTATCAGGATGCCGGCGGATATGGATCCGAGCTCCACGTG
66	LB27	CGTACGGAATTGCTAGCCGAGAGTGTGCCATGCGTGTGCGGCCACACCATACCCGCCGGATCCGAGCTCCACGTG
67	LB29	CGTACGGAATTGCTAGCAGATAATCGGTCAACGCTGCAACCATCATATCTCTCTGGATCCGAGCTCCACGTG
68	LB30	CGTACGGAATTGCTAGCATCTGGGGTGAAGAATGGCAGGTAGGTCAACCAAGTATGGATCCGAGCTCCACGTG
69	LB32	CGTACGGAATTGCTAGCCATATCCCGTCTGCTGCGCTCAGACCCACACACCGCACCAGGATCCGAGCTCCACGTG
70	LB33	CGTACGGAATTGCTAGCTACGGGGAGGCGGGTGGGTGGAATGTGACCATGCGTGTGGGATCCGAGCTCCACGTG
71	LB35	CGTACGGAATTGCTAGCAAGGGTATGGGGTGGTATGGGTGGGTACGACATATGCTGGATCCGAGCTCCACGTG

[0085]

표 3

프라이머 영역

서열번호	프라이머	서열
72	정방향	5'-fluorescein-CGTACGGAATTCGCTAGC-3'
74	역방향	5'-AAAAAAAAAAAAAAAAXACGTTGGAGCTCGGATCC-3' (X=C18 링커)

[0086]

[0087]

<실험예 1> PRRSV 복미형/유럽형에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 특이성 분석

[0088]

상기 실시예 1에서 얻은 앵타머들이 유럽형과 복미형 PRRSV에만 특이적으로 결합하고 서로 다른 타입 또는 바이러스가 없는 세포에는 결합하지 않는지를 확인하였다. 이를 위하여 자기공명장치인 SPR(Surface Plasmon Resonance) 장치를 이용하였다.

[0089]

먼저, 50 mM의 3,3'-디티오디프로피온산(3,3'-dithiodipropionic acid)로 금칩(bare gold chip)의 표면에 COOH기를 만든 다음 EDC/NHS(N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimide(EDC/Sigma Co.), N-hydroxysuccinimid(NHS/Fluka))를 이용하여 자기조립 단분자막(Self Assembly Monolayer)을 형성시켰다. 그

위에 스트렙타비딘을 고정시키고 바이오틴이 붙어있는 EB13, LB32 앵타머를 0.5 μM 로 각각의 금칩에 코팅시켰다. 여기에 1×10^5 바이러스 파티클/mL의 유럽형, 북미형 바이러스 파티클 용액, 바이러스에 감염되지 않은 세포 용액을 완충용액(100mM NaCl, 2mM MgCl_2 , 5mM KCl, 1mM CaCl_2 , 및 0.02% Tween20이 포함된 20mM Tris-Cl 완충용액, pH 7.6,)안에서 각각 30분간 반응시킨 후 같은 완충용액으로 결합하지 않은 파티클을 씻어내었다. 같은 방법으로 3회 실시한 최종 SPR 결과를 분석하여 상기 앵타머들이 각각의 타겟물질에 월등하게 잘 결합하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과를 도 1에 제시하였다.

[0090]

<실험예 2> PRRSV 북미형/유럽형에 특이적으로 결합 가능한 DNA 앵타머의 특이성 및 결합력 분석

[0091]

PRRSV의 북미형과 유럽형의 균주에 각각 특이적으로 결합하는 서로 다른 71종의 앵타머 중에서 특이성 및 결합력이 가장 높은 EB13, LB32 앵타머에 대한 유럽형 북미형 균주와의 결합 분석(binding assay)을 실시하였다.

[0092]

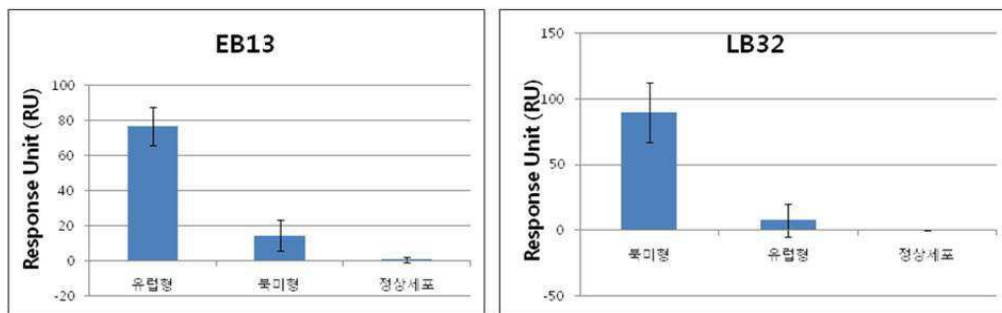
실시에 2에서와 같이 금칩(bare gold chip)에 0.5 μM 로 앵타머를 고정시킨 후 1×10^2 바이러스 파티클/mL로부터 1×10^4 바이러스 파티클/mL의 서로 다른 농도의 북미형과 유럽형 바이러스 파티클 용액을 완충용액(100mM NaCl, 2mM MgCl_2 , 5mM KCl, 1mM CaCl_2 , 및 0.02% Tween20이 포함된 20mM Tris-Cl 완충용액, pH 7.6)에서 30분간 반응시켰다. 해리상수를 구하기 위해서 각각의 반응 정도는 비선형 회귀법과 단일 부위 포화형 리간드 결합법으로 Sigmaplot 8.0을 이용하여 플롯팅 되었고, 여기에 $y = B_{\text{max}} * X / K_d + X$ 식이 이용되었다(y는 포화도, B_{max} 는 최대 결합 위치, K_d 는 해리상수, X는 결합하지 않은 바이러스 파티클).

[0093]

도 2에 나타난 바와 같이, LB32 앵타머의 K_d 값이 3.33×10^3 바이러스 파티클/mL, EB13 앵타머의 K_d 값이 2.43×10^3 바이러스 파티클/mL로서 각각의 타겟과 매우 강력하게 결합하는 것이 확인되었다.

도면

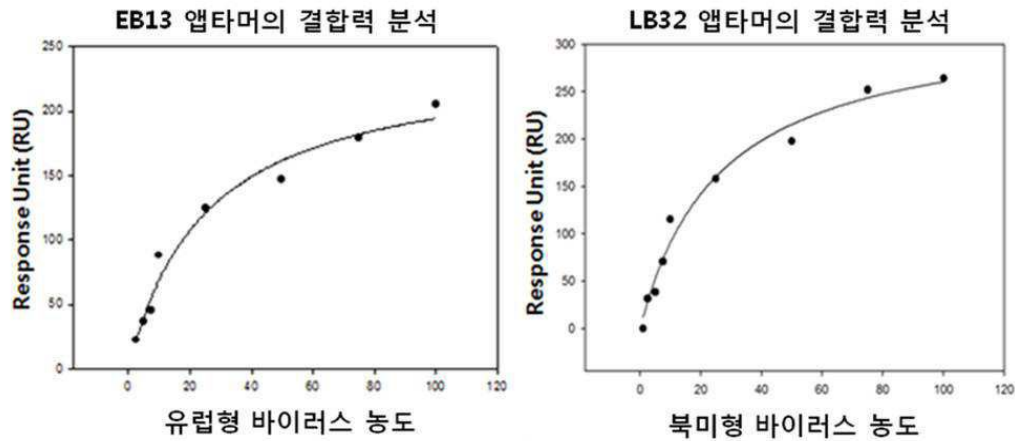
도면1



EB13 앵타머의 유럽형 바이러스에 대한 특이성 결과

LB32 앵타머의 북미형 바이러스에 대한 특이성 결과

도면2



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> DNA aptamers for Porcine Reproductive & Respiratory Syndrome(PRRS) virus
- <130> P110881
- <160> 74
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 76
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> European PRRSV specific DNA aptamer E1
- <400> 1
- cgtacggaat tcgctagctg tgtacaaggg tgggtggggag gggatgtgga taggtgatgg 60
- atccgagctc cacgtg 76
- <210> 2
- <211> 76
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> European PRRSV specific DNA aptamer E2
- <400> 2
- cgtacggaat tcgctagctg atggtgtggc gggggggggc tggggcgggc cgccgatggg 60
- atccgagctc cacgtg 76
- <210> 3

<211> 77
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> European PRRSV specific DNA aptamer E3
 <400> 3
 cgtacggaat tcgctagcta gtggtggatg ggggcagggg ggcgggcgtt ggctgcatgg 60
 gatccgagct ccacgtg 77
 <210> 4
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> European PRRSV specific DNA aptamer E4
 <400> 4
 cgtacggaat tcgctagccg tgaagggggg gggtgggtac tgcctgacc cactagatac 60
 aggatccgag ctccacgtg 79
 <210> 5
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> European PRRSV specific DNA aptamer E5
 <400> 5
 cgtacggaat tcgctagcag gcagataggt gctgggggaa gatgagaatg ggggtggcggg 60
 atccgagctc cacgtg 76
 <210> 6
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> European PRRSV specific DNA aptamer E7
 <400> 6
 cgtacggaat tcgctagcgg gggtgggcgg ggggggggcg caaagtagca cctgtgtcgg 60
 atccgagctc cacgtg 76
 <210> 7
 <211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer E8

<400> 7

cgtacggaat tcgctagctc tcgggtgggg gggggggcat gagatgatgc ctctttagag 60

gatccgagct ccacgtg 77

<210> 8

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer E9

<400> 8

cgtacggaat tcgctagcca tgggtgggat gggatgggta cgaggtagag catgctgggg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 9

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer E11

<400> 9

cgtacggaat tcgctagctt agggcgggac tgggtgggac ataggtaata cgggcatcgg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 10

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer E14

<400> 10

cgtacggaat tcgctagctg tgagtggggt gcggtgcgtg atctattggg aagtagtcag 60

gatccgagct ccacgtg 77

<210> 11

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer E16

<400> 11

cgtacggaat tcgctagctg gggtagggggg ggaggccgtc atggggacat gtagtcacgg 60

gatccgagct ccacgtg 77

<210> 12

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer E17

<400>

> 12

cgtacggaat tcgctagcat actagggtgg ggacttatag tgccgggtgg gatccgagct 60

ccacgtg 67

<210> 13

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer E21

<400> 13

cgtacggaat tcgctagcga actaactcgg gcgggtggga caatcaggat atggggtcgg 60

atccgagctc cagtg 76

<210> 14

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer E22

<400> 14

cgtacggaat tcgctagcgc aaggatggtg cggtaggggt gctggggctg gtataactgg 60

gatccgagct ccacgtg 77

<210> 15

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer E24

<400> 15

cgtacggaat tcgctagcga ctatggggcc agggatgggg gactaggata gtgggggggg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 16

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB2

<400> 16

cgtacggaat tcgctagcag tgtggggggg tgggtggccg gcgtcgacaa tggagtatgg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 17

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB3

<400> 17

cgtacggaat tcgctagctg aactggccta gatgagacca gtggtataca cccgtacctc 60

ggatccgagc tccacgtg 78

<210> 18

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB5

<400> 18

cgtacggaat tcgctagcgt gggtaggtgg tgggtagtt gtgggtatct gatggtgagg 60

atccgagctc cagg 75

<210> 19

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB6

<400>

> 19

cgtacggaat tcgctagcac tagggtgggt ccgatggtgc gttgcctgtg gttgggtggg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 20

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB7

<400> 20

cgtacggaat tcgctagcgg gggcagggtt gggggggggg ttagaaaaac tgtatgatgg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 21

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB8

<400> 21

cgtacggaat tcgctagcgt gtggtggctg tgggtgggtg gtgggtcgtg cggttatcgg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 22

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB10

<400> 22

cgtacggaat tcgctagcct acaccctca ccctatacat gactgccaat gcgctctgga 60

tccgagctcc acgtg 75

<210> 23

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB12

<400> 23

cgtagcgaat tcgctagcac tacggggggg ggcagcaggc aggtaatggt gaggggtggg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 24

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB13

<400> 24

cgtagcgaat tcgctagctg actgtgtagg gtgggtgggg ggcttctctc ggtgtacagg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 25

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB14

<400> 25

cgtagcgaat tcgctagctg gaaggggtgg gtgggaggtt atatgtcgac ggcaaaatag 60

ggatccgagc tccacgtg 78

<210> 26

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB15

<400> 26

cgtagcgaat tcgctagcac aggggagggg aaaatggggg gggtgtacat cgctcgagga 60

tccgagctcc acgtg 75

<210> 27

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB16

<400>	27	
cgtagcgaat tcgctagcca gggatgggtg tggtaggtat acggagtgtc tgttgcatag	60	
gatccgagct ccacgtg	77	
<210>	28	
<211>	76	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	European PRRSV specific DNA aptamer EB17	
<400>	28	
cgtagcgaat tcgctagcaa tgggtcgggt gggggggaag tagagtgtg gtgcgcctgg	60	
atccgagctc cacgtg	76	
<210>	29	
<211>	76	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	European PRRSV specific DNA aptamer EB18	
<400>	29	
cgtagcgaat tcgctagcat atgagggtgg gtgggtgtc aatgttagaa tacggtcagg	60	
atccgagctc cacgtg	76	
<210>	30	
<211>	76	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	European PRRSV specific DNA aptamer EB19	
<400>	30	
cgtagcgaat tcgctagcgc aggggggggtg gtagggaat agcgcgacta ctctgttggg	60	
atccgagctc cacgtg	76	
<210>	31	
<211>	76	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	European PRRSV specific DNA aptamer EB21	
<400>	31	

cgtagcgaat tcgctagctg gcgtggcctg ggtgggtggt ggggatgac ggggccagg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210> 32	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB24	
<400> 32	
cgtagcgaat tcgctagcct ggggagggtg ggtggggat aaacagtctc gcgtacagg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210> 33	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB26	
<400> 33	
cgtagcgaat tcgctagcgg gtataatggg ttggttgggt ggggtggaaa atgggatggg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210> 34	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB28	
<400> 34	
cgtagcgaat tcgctagcat aggggtgggtg ggtggcgggc tgaatgcgat gtgtcctggg	60
atccgagctc cacgg	75
<210> 35	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB29	
<400> 35	

cgtacggaat tcgctagcat gggtaggtgg gtggtagtga tatatggcat gtaggtgtgg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210> 36	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB30	
<400> 36	
cgtacggaat tcgctagctg gggtaggcct gtggtaggga tagacagaaa tgcgaccagg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210> 37	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB32	
<400> 37	
cgtacggaat tcgctagcag tgtgtggtgg gtggtagtgg tcagtctgcg tgtgtgtagg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210> 38	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> European PRRSV specific DNA aptamer EB33	
<400> 38	
cgtacggaat tcgctagcca cagaccatac cgtccatgcc aaccatatat cactactcgg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210> 39	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer L3	
<400> 39	
cgtacggaat tcgctagccc gacgaggcct acttgacacc actgaacccc tcctgtgagg	60

atccgagctc cacgtg	76
<210> 40	
<211> 78	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer L4	
<400> 40	
cgtacggaat tcgctagcta tgggaagaca acgggtgtgc cggaggtgga tgtggaactg	60
ggatccgagc tccacgtg	78
<210> 41	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer L6	
<400> 41	
cgtacggaat tcgctagcgg gccagtgctc gtgtatatgt aggtgcgcat tctacgatgg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210> 42	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer L7	
<400> 42	
cgtacggaat tcgctagctg atcaggggta gggaaatagg gtgggggaaa ggtgtggtgg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210> 43	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer L8	
<400> 43	
cgtacggaat tcgctagccg gggggtgcgt caccatgttg gggtggggg cgggaggtgg	60

atccgagctc cacgtg	76
<210> 44	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer L10	
<400> 44	
cgtacggaat tcgctagctg atggtcgttg ggggtgtcga tgtactgggg tgggtaggga	60
tccgagctcc acgtg	75
<210> 45	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer L11	
<400> 45	
cgtacggaat tcgctagcta agcgcatata ccctaacaa ggctgcatac tgaacaatgg	60
gatccgagct ccaatc	76
<210> 46	
<211> 77	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer L12	
<400> 46	
cgtacggaat tcgctagccg gggagataag acggatgatg gggatatcta gtggggcgag	60
gatccgagct ccacgtg	77
<210> 47	
<211> 77	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer L13	
<400> 47	
cgtacggaat tcgctagcat atcgtgggag aggtgggtgg gtgagttcac aaggacggag	60

gatccgagct ccacgtg	77
<210> 48	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer L16	
<400> 48	
cgtacggaat tcgctagctg aggtgggggt tgtgcgggcg gggttgaaa ggcgtcaggg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210> 49	
<211> 76	
<212>	
DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer L18	
<400> 49	
cgtacggaat tcgctagcag ggactgttgg ggtgggttag gggatgaccg gccatccggg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210> 50	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer L19	
<400> 50	
cgtacggaat tcgctagcgt ggggaggagg ggtggggaag tgtatgtggt agggtaatgg	60
atccgagctc cacgtg	76
<210> 51	
<211> 76	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer L22	
<400> 51	
cgtacggaat tcgctagcac atgatgggat ggtggggagc atgagggctt ggtatggggg	60
atccgagctc cacgtg	76

<210> 52
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer L25
 <400> 52
 cgtacggaat tcgctagcaa tgggggtggg gtgctgtctc gaatgtgtcg ggtagggggg 60

 atccgagctc cacgtg 76
 <210> 53
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB2
 <400> 53
 cgtacggaat tcgctagctg ggtgggaggg gtcaggaat ggtaatagga tgggtaaggg 60
 atccgagctc cacgtg 76
 <210> 54
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB3

 <400> 54
 cgtacggaat tcgctagcta ccacatccat cccaccatg cagcagctgt cagtcgtcgg 60
 atccgagctc cacgtg 76
 <210> 55
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB5
 <400> 55
 cgtacggaat tcgctagcat acatccatac taccaccaca gacgtgacc gaagcgatgg 60
 atccgagctc cacgtg 76
 <210> 56

<211> 76

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB6

<400> 56

cgtagcgaat tcgctagcgg gcgggggtgtc actctgtgtt gtatatatgt atcgctcctgg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 57

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB8

<400> 57

cgtagcgaat tcgctagccg gggtagacgg cctgggaagg gtgtgtgccc tgaagtgtgg 60

gatccgagct ccacgtg 77

<210> 58

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB9

<400> 58

cgtagcgaat tcgctagccc catataatat attgcaccaa cccagcatat gtcagtccgg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 59

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB12

<400> 59

cgtagcgaat tcgctagcac acatcaacac accacatcga gatatatata tagaagccgg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 60

<211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB20
 <400> 60
 cgtacggaat tcgctagcca ataaccgcgc ccgacttaca ccaactcgta ctgactctgg 60
 atccgagctc cacgtg 76
 <210> 61
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB21
 <400> 61
 cgtacggaat tcgctagcat gcacacacta catatcgac acatatcgaa caagacccgg 60
 atccgagctc cacgtg 76
 <210> 62
 <211> 76
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB22
 <400> 62
 cgtacggaat tcgctagctg ggggaaaata gggtaggatg tgtgtatgta tgggtatggg 60
 atccgagctc cacgtg 76
 <210> 63
 <211> 76
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB23
 <400> 63
 cgtacggaat tcgctagccc accctaccag cgagcacaca tgcatttaac ccaccctgg 60
 atccgagctc cacgtg 76
 <210> 64
 <211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB24

<400> 64

cgtacggaat tcgctagcca ccacacacga taatagtatc accccccgca caagccatgg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 65

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB26

<400> 65

cgtacggaat tcgctagcgg gtgtgtaatg ggtgattatc aggatgccgg cgcgatatgg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 66

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB27

<400> 66

cgtacggaat tcgctagccg gagagtgtgc catgcgtgtg ccgccacacc ataccgcccg 60

gatccgagct ccacgtg 77

<210> 67

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB29

<400> 67

cgtacggaat tcgctagcag ataatcggtc aagcctgca accatcatat actcctctgg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 68

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB30

<400> 68

cgtacggaat tcgctagcat ctgggggtga aagaatggca gggtaggtca ccaagtatgg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 69

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB32

<400> 69

cgtacggaat tcgctagcca tatccgcgtc gctgcgtca gaccaccac cacgcaccgg 60

atccgagctc cacgtg 76

<210> 70

<211> 77

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB33

<400> 70

cgtacggaat tcgctagcta cgggggaggc gggtgggtgg aaatgtgacc atggctgtgg 60

gatccgagct ccacgtg 77

<210> 71

<211> 77

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> North American PRRSV specific DNA aptamer LB35

<400> 71

cgtacggaat tcgctagcaa gggtatgggg tggatggtgg tgggtacga catatgcctg 60

gatccgagct ccacgtg 77

<210> 72

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for PCR amplification

<400> 72

cgtacggaat tcgctagc 18

<210> 73

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for PCR amplification

<400> 73

ggatccgagc tccacgtg 18

<210> 74

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reward primer for PCR amplification of PRRSV binding DNA

<400> 74

aaaaaaaaa aaaaaaaacc ccccccccc cccccccacg tggagctcgg atcc 54