



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월11일
(11) 등록번호 10-2189683
(24) 등록일자 2020년12월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01) C12Q 1/6813 (2018.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/701 (2013.01)
C12Q 1/6813 (2018.05)
- (21) 출원번호 10-2019-0058709
- (22) 출원일자 2019년05월20일
심사청구일자 2019년05월20일
- (65) 공개번호 10-2020-0133476
- (43) 공개일자 2020년11월30일
- (56) 선행기술조사문헌
Huh 등, Ann Lab Med., Vol. 27, No. 6, 페이지 494-498 (2017.11.)*
Lee 등, Nanoscale., Vol. 2, 페이지 188-197 (2009.10.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
노영훈
서울특별시 용산구 이촌로 310, 102동 2203호(이촌동, 래미안 첼리투스)
남재은
서울특별시 도봉구 해동로 195, 112동 1103호(쌍문동, 삼익세라믹아파트)
김영민
서울특별시 강서구 강서로 266, 132동 701호(화곡동, 우장산아이파크이편한세상아파트)
- (74) 대리인
특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 15 항

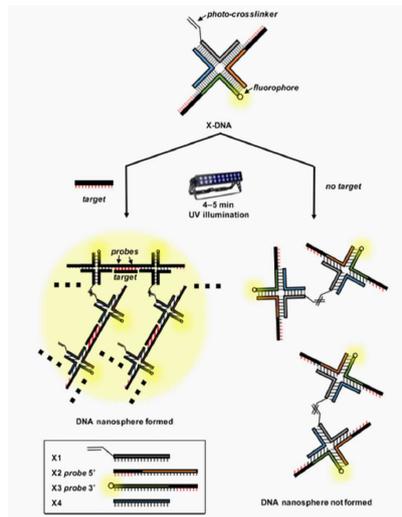
심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 고위험군 바이러스 검출용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 메르스 코로나바이러스 검출용 조성물, 이를 포함하는 키트 및 이의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

C12Q 2537/143 (2013.01)

C12Q 2563/107 (2013.01)

C12Q 2565/601 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/16 (2013.01)

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

제1핵산나노구조체; 및

상기 제1 핵산나노구조체의 핵산과 상보적인 핵산서열을 포함하는 제2핵산나노구조체를 포함하는, 메르스 코로나바이러스(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 검출용 조성물로서,

상기 제1 핵산나노구조체는 서열번호 5 내지 8의 핵산으로 이루어지고,

상기 제2 핵산나노구조체는 서열번호 9 내지 12의 핵산으로 이루어진 것인,

메르스 코로나바이러스 검출용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 핵산나노구조체는 분지 형태인 것인, 메르스 코로나바이러스 검출용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제1 핵산나노구조체; 및

상기 제2 핵산나노구조체는 검출 표지로 표지된 것인, 메르스 코로나바이러스 검출용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 검출표지는 형광물질, 비오틴, 포스페이트, 퀀텀닷(quantum dot), 은, 금 및 폴리스티렌으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 검출 표지로 표지된 것인, 메르스 코로나바이러스 검출용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제1 핵산나노구조체; 및

상기 제2 핵산나노구조체는 형광물질로 표지된 것인, 메르스 코로나바이러스 검출용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 제2 핵산나노구조체는 상기 제1 핵산나노구조체의 형광과 다른 색의 형광물질로 표지된 것인, 메르스 코로나바이러스 검출용 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 형광물질은 플루오레신(fluorescein), FAM(carboxyfluorescein), 로다민, 텍사스 레드(Texas Red), 테트라메틸로다민, 카르복시로다민, 카르복시로다민 6G, 카르복시로돌, 카르복시로다민 110, 캐스케이드 블루

(Cascade Blue), 캐스케이트 옐로우(Cascade Yellow), 코마린, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy-크롬, 피코에리트린, PerCP(페리딘 클로로필-a 단백질), PerCP-Cy5.5, JOE(6-카르복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오레신), NED, ROX(5-(및-6)-카르복시-X-로다민), HEX, 루시퍼 옐로우(Lucifer Yellow), 마리나 블루(Marina Blue), 오레곤 그린(Oregon Green) 488, 오레곤 그린(Oregon Green) 500, 오레곤 그린(Oregon Green) 514, 알렉사 플로어(Alexa Fluor, 상표명) 350, 알렉사 플로어 430, 알렉사 플로어 488, 알렉사 플로어 532, 알렉사 플로어 546, 알렉사 플로어 568, 알렉사 플로어 594, 알렉사 플로어 633, 알렉사 플로어 647, 알렉사 플로어 660, 알렉사 플로어 680, 7-아미노-4-메틸코마린-3-아세트산, 보디피(BODIPY, 상표명) FL, 보디피 FL-Br₂, 보디피 530/550, 보디피 558/568, 보디피 564/570, 보디피 576/589, 보디피 581/591, 보디피 630/650, 보디피 650/665, 보디피 R6G, 보디피 TMR 및 보디피 TR로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인, 메르스 코로나바이러스 검출용 조성물.

청구항 9

제1항 및 제3항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 메르스 코로나바이러스 검출용 키트.

청구항 10

제1항 및 제3항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 메르스 코로나바이러스 감염 진단용 키트.

청구항 11

a) 제1 핵산나노구조체; 및

상기 제1 핵산나노구조체의 핵산과 상보적인 핵산서열을 포함하는 제2핵산나노구조체를 시료에 가하여 반응시키는 단계; 및

b) 상기 a) 단계에서의 반응물을 검출하는 단계를 포함하는, 메르스 코로나바이러스 검출 방법으로서,

상기 제1 핵산나노구조체는 서열번호 5 내지 8의 핵산으로 이루어지고,

상기 제2 핵산나노구조체는 서열번호 9 내지 12의 핵산으로 이루어진 것인,

메르스 코로나바이러스 검출 방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 제1 핵산나노구조체; 및

상기 제2 핵산나노구조체는 형광물질로 표지된 것으로서,

상기 b) 단계는 반응물에서 나타나는 형광을 검출하는 것인, 메르스 코로나바이러스 검출 방법.

청구항 14

a) 제1 핵산나노구조체; 및

상기 제1 핵산 나노구조체의 핵산과 상보적인 핵산서열을 포함하는 제2핵산나노구조체를 대상 환자 시료에 가하여 반응시키는 단계; 및

b) 상기 a) 단계에서의 반응물을 검출하는 단계를 포함하는, 메르스 감염 진단에 정보를 제공하는 방법으로서,

상기 제1 핵산나노구조체는 서열번호 5 내지 8의 핵산으로 이루어지고,

상기 제2 핵산나노구조체는 서열번호 9 내지 12의 핵산으로 이루어진 것인,

메르스 감염 진단에 정보를 제공하는 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 제1 핵산나노구조체; 및

상기 제2 핵산나노구조체는 형광물질로 표지된 것으로서,

상기 b) 단계는 반응물에서 나타나는 형광을 검출하는 것인, 메르스 감염 진단에 정보를 제공하는 방법.

청구항 17

a) 검체 시료에 메르스 감염 치료제 후보물질을 처리하는 단계;

b) 상기 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후의 검체 시료를 제1 핵산나노구조체 및 제2핵산나노구조체와 반응시키는 단계; 및

c) 상기 b) 단계에서의 반응물을 검출하는 단계를 포함하는, 메르스 감염 치료제의 스크리닝 방법으로서,

상기 제1 핵산나노구조체는 서열번호 5 내지 8의 핵산으로 이루어지고,

상기 제2 핵산나노구조체는 서열번호 9 내지 12의 핵산으로 이루어진 것인,

메르스 감염 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 18

삭제

청구항 19

제17항에 있어서,

상기 제1 핵산나노구조체; 및

상기 제2 핵산나노구조체는 형광물질로 표지된 것으로서,

상기 b) 단계는 반응물에서 나타나는 형광을 검출하는 것인, 메르스 감염 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 메르스 코로나바이러스 검출용 조성물, 이를 포함하는 키트 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 중동 호흡기 증후군(메르스)은 급성 호흡 곤란으로 진행될 수 있는 중증 폐 질환과 관련된 치명적인 바이러스성 질병이다. 이러한 치명적인 질병의 병원체는 2012년에 신종 인간 코로나바이러스로 확인되었고 그 후 메르스 코로나바이러스(MERS-CoV)로 명명되었다.

[0003] 메르스 코로나 바이러스(MERS-CoV)는 10개의 오픈 리딩 프레임(*ORFs*)과 돌기(*S*), 외피(*E*), 세포막(*M*) 및 핵단백질체(*N*)의 유전자로부터 비구조 및 구조 단백질을 암호화하는 약 30,000개 염기의 양성 단일 가닥 RNA 유전체를 가지고 있다. 메르스 코로나 바이러스는 본래 박쥐에서부터 (단봉)낙타 그리고 마침내 인간에 까지 이르는 인수 공통감염증으로 빠르게 인식되었다. 인수공통감염 또는 인간과 인간 간의 전염 기작이 아직 정확하게 확립되지는 않았지만, 밀접한 접촉을 통한 호흡기 분비물에 의해 전염되는 것으로 추정되고 있다.

[0004] 한편, 바이러스 RNA 유전자 검출 기반 체외진단 기술은 실시간 역전사 중합효소연쇄효소 반응(Real time reverse transcription polymerase chain reaction, Real time RT-PCR)을 이용한 분석법이 주로 이용되고 있다. Real time RT-PCR 기반의 분자진단 시스템은 혈액 및 객담에 존재하는 바이러스 RNA를 매우 민감하고 정확하게 검출

할 수 있다는 장점이 있으나, PCR 기반의 바이러스 RNA 검출방법은 증합효소 반응을 위한 시간과 정밀한 온도조절 장치가 필요하여 검출 및 진단의 신속성 및 정확성이 떨어지는 한계가 있다.

[0005] 또한, Loop-mediated isothermal amplification(LAMP), Nucleic acid sequence-based amplification(NASBA), Rolling circle amplification(RCA), Helicase dependent amplification(HDA) 등의 방법들이 새로 적용되고 있으나, 여전히 증합효소 반응을 위해 긴 반응시간이 소요된다는 점에서 한계가 있다.

[0006] 현재의 고위험성 바이러스 체외진단 시스템은 신뢰도의 향상을 위해 두 가지 이상의 유전자 검출이 필요하다. 대표적인 고위험성 호흡기바이러스 중 하나인 메르스 코로나바이러스(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)의 경우, 세계보건기구(WHO; World Health Organization)가 제안한 체외진단기준에 의하면 먼저 메르스 코로나바이러스의 유전자 *upE*, *ORF1a*, *ORF1b*, *N*중 *upE*를 포함한 2가지 이상의 특이적 유전자를 유전자를 Real time RT-PCR 기반의 유전자 분자진단 방법으로 정량 분석하여 둘 다 양성으로 확인 시 감염 여부를 최종적으로 확진한다(Laboratory testing for Middle East respiratory syndrome coronavirus: Interim guidance, WHO, 2015). 이에 따라, 고위험성 바이러스 체외진단의 경우 보통의 바이러스와는 달리 검출 및 감염 진단에 더 많은 시간이 소요되고 있다.

[0007] 이와 같은 기존 검출 시스템의 한계점을 개선하기 위하여 보다 신속하고 효과적인 바이러스 검출 방법의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 미국등록특허 제7799903호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 메르스 코로나바이러스 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 메르스 코로나바이러스 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 메르스 코로나바이러스 검출 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 메르스 코로나바이러스 감염 진단에 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 메르스 감염 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 제1핵산나노구조체; 및 상기 제1 핵산나노구조체의 핵산과 상보적인 핵산서열을 포함하는 제2핵산나노구조체를 포함하는, 메르스 코로나바이러스(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 바이러스 검출용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 상기 제1 핵산나노구조체는 서열번호 5 내지 8의 핵산으로 이루어지고, 상기 제2 핵산나노구조체는 서열번호 9 내지 12의 핵산으로 이루어진 것일 수 있다.

[0015] 구체적으로, 상기 서열번호 5 내지 8의 핵산으로 이루어진 제1 핵산나노구조체 및 서열번호 9 내지 12의 핵산으로 이루어진 제2 핵산나노구조체는 서로 결합되어 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 본 발명에서, “핵산나노구조체”는 DNA, RNA 등의 핵산으로 이루어진 나노구조체로서, 상보적인 핵산끼리 서열 특이적인 상호작용을 함으로써 조립된 나노단위 구조체를 말한다. 구체적으로, 상기 핵산나노구조체는 분지 형태일 수 있다.

[0017] 본 발명 일 실시예에서는 하나의 표적에 대해 X1, X2, X3 및 X4로 명명된 각각의 단일가닥 DNA가 조립되어 분지형 핵산나노구조체가 형성되도록 하였으며(도 1), 상기 분지형 핵산나노구조체가 표적이 존재할 경우 핵산나노입자를 형성하여 메르스 코로나바이러스가 검출될 수 있도록 하는 것을 확인하였다.

- [0018] 상기 제1 핵산나노구조체 및 상기 제2 핵산나노구조체는 검출 표지로 표시된 것일 수 있다.
- [0019] 상기 검출 표지는 형광물질, 비오틴, 포스페이트, 퀀텀닷(quantum dot), 은, 금 및 폴리스티렌으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 검출 표지는 본 발명의 핵산에 결합하여 메르스 코로나바이러스를 구분하거나 검출해낼 수 있는 수단이면 제한없이 적용될 수 있다.
- [0020] 또한 구체적으로, 상기 제1 핵산나노구조체; 및 상기 제2 핵산나노구조체는 형광물질로 표시된 것일 수 있다.
- [0021] 더욱 구체적으로, 상기 제2 핵산나노구조체는 상기 제1 핵산나노구조체의 형광과 다른 색의 형광물질로 표시된 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 "형광물질"이란, 특정한 파장의 빛을 흡수하여 검출 가능한 영역의 빛을 방출하는 물질을 통칭하여 의미한다. 상기 검출 가능한 영역이라 함은 육안 또는 다양한 계측기기를 사용하여 방출되는 빛의 수준을 정량할 수 있는 영역을 말한다.
- [0023] 더욱 구체적으로, 상기 형광물질은 상기 핵산나노구조체에 포함되거나 핵산나노구조체를 구성하는 단일가닥 DNA 들 중 하나 이상의 단일가닥 DNA결합되어 핵산나노구조체가 형광을 나타낼 수 있도록 하는 물질들을 말한다.
- [0024] 상기 형광은 플루오레신(fluorescein), FAM(carboxyfluorescein), 로다민, 텍사스 레드(Texas Red), 테트라메틸로다민, 카르복시로다민, 카르복시로다민 6G, 카르복시로돌, 카르복시로다민 110, 캐스케이드 블루(Cascade Blue), 캐스케이드 옐로우(Cascade Yellow), 코마린, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy-크롬, 피코에리트린, PerCP(페리디닌 클로로필-a 단백질), PerCP-Cy5.5, JOE(6-카르복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오레신), NED, ROX(5-(및-6)-카르복시-X-로다민), HEX, 루시퍼 옐로우(Lucifer Yellow), 마리나 블루(Marina Blue), 오레곤 그린(Oregon Green) 488, 오레곤 그린(Oregon Green) 500, 오레곤 그린(Oregon Green) 514, 알렉사 플로우어(Alexa Fluor, 상표명) 350, 알렉사 플로우어 430, 알렉사 플로우어 488, 알렉사 플로우어 532, 알렉사 플로우어 546, 알렉사 플로우어 568, 알렉사 플로우어 594, 알렉사 플로우어 633, 알렉사 플로우어 647, 알렉사 플로우어 660, 알렉사 플로우어 680, 7-아미노-4-메틸코마린-3-아세트산, 보디피(BODIPY, 상표명) FL, 보디피 FL-Br₂, 보디피 530/550, 보디피 558/568, 보디피 564/570, 보디피 576/589, 보디피 581/591, 보디피 630/650, 보디피 650/665, 보디피 R6G, 보디피 TMR 및 보디피 TR로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명 일 실시예에서는 대표적인 예로 로다민 및 FAM(carboxyfluorescein)을 핵산나노구조체를 구성하는 단일가닥 DNA에 결합시킨 후 표적 존재시 이를 검출하여 나타나는 형광을 확인하였다.
- [0026] 또한, 본 발명 일 실시예에서는 형광 표지가 결합된 MERS-특이적 핵산나노구조체가 표적 *upE* 또는 *ORF1a*가 존재할 경우 UV 조사 시 각각의 표시된 형광을 발하는 것을 확인하였으며, 표적이 존재하지 않는 경우 형광이 나타나지 않음을 확인하였다(도 7). 나아가, *upE* 및 *ORF1a* 두 표적이 동시에 존재하는 경우 각각의 형광이 중합된 색상의 형광이 나타나는 것을 확인하였는 바(도 9), 본 발명의 검출용 조성물은 1종의 표적이 존재할 경우, 다중 표적이 존재할 경우 모두에 대해 검출이 가능함을 확인하였다.
- [0027] 특히, 증폭 단계를 포함하는 '증폭 시간'을 더욱 필요로 하는 기존 PCR 기반 시스템과 달리, UV 조사만으로도 검출이 가능하여 즉각적인 바이러스 검출이 가능하다.
- [0028] 나아가, 각각의 표적에 대해 10 aM의 매우 낮은 농도까지도 검출이 가능한 바, 본 발명이 검출용 조성물이 메르스 코로나바이러스검출에 대한 민감도가 매우 높음을 확인하였다(도 12).
- [0029] 본 발명의 다른 측면은 상기 메르스 코로나바이러스 검출용 조성물을 포함하는 메르스 코로나바이러스 검출용 키트에 관한 것이다.
- [0030] 상기 검출용 키트는 용액, 동결건조 분말, 냉동 용액, 또는 스트립 형태를 가질 수 있으며, 각각의 형태는 당업계에서 통상적인 방법으로 제제화할 수 있다. 또한 키트를 사용하기 위한 설명서를 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 일 측면은 상기 메르스 코로나바이러스 검출용 조성물을 포함하는 메르스 코로나바이러스 감염 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명 일 실시예에서는 메르스 코로나바이러스 검출에 대한 민감도가 매우 높음을 확인하였으며(도 12), 나아가 폐 손상과 관련된 MERS와 유사한 증상을 유발 할 수 있는 다른 코로나 바이러스 뿐만 아니라 다른 호흡기 감염 유발 바이러스인 인플루엔자 바이러스, DNA 바이러스가 혼재되어 있더라도 교차 반응이 없음을 확인하였는바

(도 13), 메르스 코로나바이러스 감염 진단용도로 활용될 수 있다.

- [0033] 상기 진단용 키트는 용액, 동결건조 분말, 냉동 용액, 또는 스트립 형태를 가질 수 있으며, 각각의 형태는 당업계에서 통상적인 방법으로 제제화할 수 있다. 또한 키트를 사용하기 위한 설명서를 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 또 다른 일 측면은 a) 제1핵산나노구조체; 및 상기 제1 핵산나노구조체의 핵산과 상보적인 핵산서열을 포함하는 제2핵산나노구조체를 시료에 가하여 반응시키는 단계; 및 b) 상기 a) 단계에서의 반응물을 검출하는 단계를 포함하는, 메르스 코로나바이러스 검출 방법에 관한 것이다.
- [0035] 구체적으로, 상기 제1 핵산나노구조체는 서열번호 5 내지 8의 핵산으로 이루어지고, 상기 제2 핵산나노구조체는 서열번호 9 내지 12의 핵산으로 이루어진 것일 수 있다.
- [0036] 또한 구체적으로, 상기 서열번호 5 내지 8의 핵산으로 이루어진 제 1 핵산나노구조체 및 서열번호 9 내지 12의 핵산으로 이루어진 제 2 핵산나노구조체는 서로 결합되어 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 구체적으로, 상기 시료는 미생물 배양배지(media), 혈액, 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 타액, 객담, 림프액, 뇌척수액, 세포간액 또는 노인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 액체, 토양, 공기, 식품, 폐기물로부터 채취된 것일 수 있다.
- [0038] 또한 구체적으로, 상기 제1 핵산나노구조체; 및 상기 제2 핵산나노구조체는 형광물질로 표지된 것으로서, 상기 b) 단계는 반응물에서 나타나는 형광을 검출하는 것일 수 있으며, 더욱 구체적으로, 제1 핵산나노구조체는 제2 핵산나노구조체의 형광과 다른 색의 형광물질로 표지된 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명 일 실시예에서는 표적이 존재하는 경우 서열번호 5 내지 8의 핵산으로 이루어진 제1 핵산나노구조체가 표적과 반응하여 형광을 나타내었으며, 서열번호 9 내지 12의 핵산으로 이루어진 제 2 핵산나노구조체 역시 표적이 존재하는 경우 표적과 반응하여 형광을 나타냄을 확인하였다(도 7).
- [0040] 또한, 본 발명 일 실시예에서는 서열번호 5 내지 8의 핵산으로 이루어진 제 1 핵산나노구조체의 표적 및 서열번호 9 내지 12의 핵산으로 이루어진 제 2 핵산나노구조체의 표적이 동시에 존재하는 경우, 표적이 모두 존재함에 따라 동시 반응하여 각각의 형광이 중첩된 색상의 형광을 나타냄을 확인하였는 바(도 9), 본 발명의 검출방법은 단일 표적 및 다중 표적 모두에 대해 적용될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 또 다른 일 측면은 a) 제1핵산나노구조체; 및 상기 제1 핵산 나노구조체의 핵산과 상보적인 핵산서열을 포함하는 제2핵산나노구조체를 대상 환자 시료에 가하여 반응시키는 단계; 및 b) 상기 a) 단계에서의 반응물을 검출하는 단계를 포함하는, 메르스 감염 진단에 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0042] 구체적으로, 상기 제1 핵산나노구조체는 서열번호 5 내지 8의 핵산으로 이루어지고, 상기 제2 핵산나노구조체는 서열번호 9 내지 12의 핵산으로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 제 1 핵산나노구조체 및 제 2 핵산나노구조체는 서로 결합되어 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 구체적으로, 상기 대상 환자 시료는 혈액, 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 타액, 객담, 림프액, 뇌척수액, 세포간액 또는 노인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 또한 구체적으로, 상기 제1 핵산나노구조체 및 제 2 핵산나노구조체는 형광물질로 표지된 것으로서, 상기 b) 단계는 반응물에서 나타나는 형광을 검출하는 것인 메르스 감염 진단에 정보를 제공하는 방법일 수 있다.
- [0045] 본 발명 일 실시예에서는 메르스 코로나바이러스 검출에 대한 민감도가 매우 높음을 확인하였으며(도 12), 나아가 폐 손상과 관련된 MERS와 유사한 증상을 유발 할 수 있는 다른 코로나 바이러스 뿐만 아니라 다른 호흡기 감염 유발 바이러스인 인플루엔자 바이러스, DNA 바이러스가 혼재되어 있더라도 교차 반응이 없음을 확인하였는바(도 13), 메르스 감염 진단에 정보를 제공하는 방법으로 활용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 일 측면은 a) 검체 시료에 메르스 감염 치료제 후보물질을 처리하는 단계; b) 상기 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후의 검체 시료를 제 1 핵산나노구조체 및 제 2 핵산나노구조체와 반응시키는 단계; 및 c) 상기 b) 단계에서의 반응물을 검출하는 단계를 포함하는, 메르스 감염 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0047] 구체적으로, 상기 제1 핵산나노구조체는 서열번호 5 내지 8의 핵산으로 이루어지고, 상기 제2 핵산나노구조체는 서열번호 9 내지 12의 핵산으로 이루어진 것일 수 있다. 더욱 구체적으로 서열번호 5 내지 8의 핵산으로 이루어진 제 1 핵산나노구조체 및 서열번호 9 내지 12의 핵산으로 이루어진 제 2 핵산나노구조체는 서로 결합되어 포

함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 또한 구체적으로, 상기 제1 핵산나노구조체; 및 상기 제2 핵산나노구조체는 형광물질로 표지된 것으로서, 상기 b) 단계는 반응물에서 나타나는 형광을 검출하는 것인, 메르스 감염 치료제의 스크리닝 방법일 수 있다.

[0049] 본 발명에서, “검체 시료”란 미생물 배양배지(media), 혈액, 조직, 세포, 전혈, 혈장, 혈청, 타액, 객담, 림프액, 뇌척수액, 세포간액 또는 노인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 액체, 토양, 공기, 식품, 폐기물로부터 채취된 것일 수 있다.

[0050] 본 발명의 구성물을 이용하여 메르스 코로나바이러스의 존재 여부 및 이에 대한 감염 여부를 확인할 수 있는 바, 메르스 감염 치료제 후보물질을 처리한 시료에 대하여 메르스 코로나바이러스가 검출되는지 여부 및 검출량을 확인함으로써 메르스 코로나바이러스에 대한 억제 효과를 확인하여 메르스 감염 치료제를 스크리닝 할 수 있다.

발명의 효과

[0051] 본 발명의 검출용 조성물 및 검출 시스템은 MERS 바이러스 검출에 있어서 표적 각각에 대해 한 번에 검출 가능할 수 있도록 하여 MERS 감염 진단이 신속히 이루어질 수 있도록 하였다. 특히, 높은 민감도 및 특이성을 나타내는 바, MERS의 검출 및 진단에 대한 활용 가능성이 매우 높다.

[0052] 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

[0053] 도 1은 MERS-특이적 핵산나노구조체의 모식도를 나타낸 것이다(A: *upE*-X-DNA, B: *ORF1a*-X-DNA; ΔG 값과 Tm은 시계 방향이다.).

도 2는 MERS-특이적 핵산나노구조체를 구성하는 PEGA 결합된 단일가닥 DNA의 합성방법을 나타낸 것이다.

도 3은 제조된 PEGA-결합 생성물을 HPLC 정제한 결과를 나타낸 것이다(A: 260nm에서의 검출피크, B: PEGA 결합 생성물의 겔 전기 영동 결과).

도 4는 푸리에 변환 적외선 분광법(FT-IR)을 사용하여 PEGA-ssDNA의 존재를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 조립된 *upE*-특이적 핵산나노구조체 및 *ORF1a*-특이적 핵산나노구조체를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 표적 존재 여부에 따른 핵산나노구조체의 나노스피어 형태가 되는 핵산나노입자 형성 여부에 관한 모식도를 나타낸 것이다.

도 7은 표적 존재시 UV 조사 후, 나노스피어 형태의 핵산나노입자가 광 중합되어 형광을 나타냄을 확인한 결과를 나타낸 것이다(UV 조사 전: Before, UV 조사 후: After).

도 8은 다중 표적 동시 검출의 경우 핵산나노구조체들의 연결 형태를 모식도로 나타낸 것이다.

도 9는 *upE* 및 *ORF1a* 다중 표적 존재시 *upE* 및 *ORF1a*를 모두 동시에 검출한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 MERS-특이적 표적의 존재 하에서 광중합 된 핵산나노입자의 형태를 확인한 결과를 나타낸 것이다(A: 명-시야 광학 현미경, B: 주사전자현미경).

도 11은 MERS-특이적 표적의 존재 하에서 광중합 된 핵산나노입자의 크기를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 *upE* 및 *ORF1a* 표적 각각에 대해 검출한계를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 검출 시스템이 교차 반응이 없음을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0055] **제조예 1. 재료**

[0056] 단일-가닥 DNA(ssDNA) 올리고뉴클레오티드는 Integrated DNA Technologies(Coralvillae, Iowa, USA)에서 구입

하였다. 3500Da 분자량을 가진 PEGA succinimidyl carboxymethyl ester는 Jenkem Technology(Beijing, china)에서 구입했다. 일/이 염기성 인산 칼륨(Monobasic/dibasic potassium phosphates), 트리메틸아민(trimethylamine) 및 빙초산(acetic acid glacial)은 덕산 순수 화학(서울, 한국)에서 구입하였다.

[0057] **제조예 2. 프로브 결합(probe-conjugated) DNA 설계**

[0058] 2-1. MERS 특이적 프로브 서열의 설계

[0059] MERS-CoV 게놈(GenBank accession number: KT029139) 내의 upstream of E(upE) 및 open reading frame 1a(ORF1a) 서열을 특이적으로 탐침하는 프로브를 설계하였으며, 프로브 서열 및 각 프로브 서열의 용해 온도(T_m)는 아래 표 1에 나타난 바와 같다.

표 1

| 서열번호 | 프로브 종류 | 서열 | T_m ($^{\circ}C$) |
|------|----------|---------------------|-----------------------|
| 1 | upE 5' | 5'-ATTATGTGAAGAG-3' | 42.3 |
| 2 | upE 3' | 5'-CGAGCTCGGGGCG-3' | 66.7 |
| 3 | ORF1a 5' | 5'-GCCAATTGCAA-3' | 48.4 |
| 4 | ORF1a 3' | 5'-AGTGGGGCAA-3' | 52.4 |

[0062] 2-2. 프로브 결합(probe-conjugated) DNA 설계

[0063] MERS 특이적 upE 및 ORF1a 서열은 핵산나노구조체(X-DNA)로 구성된 DNA 올리고 뉴클레오티드의 서열과 결합시켰다. 구체적으로, X-DNA의 각 구성 요소는 X1, X2, X3 및 X4 가닥으로 설계하였다. MERS-특이적 RNA 서열을 표적으로 할 수 있는 X-DNA를 구축하기 위해 사용된 각 X1, X2, X3 및 X4 의 올리고 뉴클레오티드의 서열은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

| 서열번호 | X-DNA 종류 | 서열 |
|------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| 5 | upE-X-DNA | X1 5'-CGACCGATGAATAGCGGTCAGATCCGTACCTACTCG-3' |
| 6 | | X2 (upE 5') 5'-ATTATGTGAAGAGTTTTTCGAGTAGGTACGGATCTGCGAGTAGGTACGGATCTGCGAGTAGGTACGGATCTG-3' |
| 7 | | X3 (upE 3') 5'-CGAGTCGTTTCGCAATACGGCTGTACGTATGGTCTCGTTTTTCGAGCTCGGGGCG-3' |
| 8 | | X4 5'-CGAGACCATACGTACAGCACCCTATTCATCGGTCG-3' |
| 9 | ORF1a-X-DNA | X1 (ORF1a 3') 5'-CGACCGATGAATAGCGGTCAGATCCGTACCTACTCGTTTTTAGTGGGGCAA-3' |
| 10 | | X2 5'-ATTATGTGAAGAGTTTTTCGAGTAGGTACGGATCTG-3' |
| 11 | | X3 5'-CGAGTCGTTTCGCAATACGGCTGTACGTATGGTCTCG-3' |
| 12 | | X4 (ORF1a 5') 5'-GCCAATTTGCAATTTTTTCGAGACCATACGTACAGCACCCTATTCATCGGTCG-3' |

[0065] X-DNA는 반대쪽 끝에 단일 가닥으로 돌출되어 있는 두 개의 upE 또는 두 개의 ORF1a 탐침을 가지고 있으며, 표적 혼성화 시, 이러한 MERS-특이적 핵산나노구조체 단위체는 5'에서 3'까지의 적절한 방향으로 두 결합 가능한 끝이 일치하는 표적과 함께 호모-이합체가 형성되도록 하였다.

[0066] DNA 서열을 고안하여 원하는 형태의 X-DNA를 조립하기 위해서는 용융 온도(T_m), 깃스 자유 에너지(ΔG) 및 각 DNA 서열의 2차 구조를 고려하여 MERS 특이적 X-DNA를 구성하는 4개의 가닥이 분지형 구조가 형성되도록 하였다(도 1).

[0067] 구체적으로, 핵산나노구조체인 X-DNA의 조립을 위해, 500 nM의 단일가닥 DNA(ssDNA)인 X1-X4 가닥(PEGA-ssDNA, fluorescent tagged ssDNA with 3' probe end, 36-mer ssDNA and ssDNA with 5' probe end)을 총 100 μ L 부피의 뉴클레아제가 없는 증류수에서 혼합되도록 하였다. 이후, Roh, Y. H., Lee, J. B., Tan, S. J., Kim, B., Park, H., Rice, E. J., & Luo, D. (2010), Photocrosslinked DNA nanospheres for drug delivery. *Macromol Rapid Commun*, 31(13), 1207-1211 문헌에 기재된 프로토콜에 따라 열 순환기(Bio-Rad Laboratories)

를 사용하여 X-DNA를 조립하였다.

[0068] **제조예 3. 광 반응성 단일가닥 DNA(ssDNA)의 제조**

[0069] 3-1. PEGA-결합 ssDNA(PEGA-ssDNA)의 합성

[0070] 광 반응성을 나타내기 위하여 MERS-특이적 분지형 DNA 나노 구조(X-DNA)의 한 개의 가지에 해당하는 단일가닥 DNA(ssDNA)를 폴리에틸렌 글라이콜(polyethylene glycol, PEGA)과 결합시켰다. 구체적으로, Roh, Y. H., Lee, J. B., Tan, S. J., Kim, B., Park, H., Rice, E. J., & Luo, D. (2010), Photocrosslinked DNA nanospheres for drug delivery. *Macromol Rapid Commun*, 31(13), 1207-1211 문헌에 기초하여 PEGA 숙시니미딜 카르복시메틸 에스테르(PEGA succinimidyl carboxymethyl ester)와 아민이 결합된 ssDNA(NH₂-ssDNA)를 0.1M의 인산염 버퍼에서 혼합 및 배양하여 PEGA-결합 ssDNA(PEGA-ssDNA)를 합성하였다.

[0071] 3-2. PEGA-ssDNA(X-DNA)의 정제

[0072] HPLC 정제를 통해 상기 3-1에서 제조된 PEGA-결합 생성물로부터 반응하지 않은 NH₂-ssDNA를 제외하고 PEGA-ssDNA 접합체를 수득하였다. 구체적으로, 진공 탈기 장치, 4개 용매 펌프, 자동-시료 주입기, UV-Vis(multi-wavelength ultraviolet-visual) 검출기 및 자동 분획 수집기를 갖춘 YL9100 HPLC 시스템(Younglin Instrument, Anyang, South Korea)의 Hypersil GOLD™ C18 컬럼 (Thermo Fisher)을 이용하였으며, 0.1M의 트리메틸암모늄 아세테이트(triethylammonium acetate, TEAA, pH 7.01) 중 5-30% 의 아세토나이트릴(acetonitrile)의 경사를 통해 1.25 mL · min⁻¹의 유속으로 14분 이내에 50° C 온도 조건에서 수행하였다.

[0073] 그 결과, 도 3A에 나타난 바와 같이 260nm에서 검출된 3개의 주요 피크를 나타냄을 확인하였다.

[0074] 또한, PEGA-ssDNA 결합체의 분리를 확인하기 위하여, HPLC 정제 전후의 PEGA 결합 생성물의 겔 전기 영동을 수행하였으며, HPLC 정제 후 NH₂-ssDNA가 제거되고 PEGA-ssDNA 접합체만 분리되었음을 확인하였다(도 3B).

[0075] 나아가, X1 및 X3 상에서의 PEGA의 접합을 추가로 확인하기 위해, 푸리에 변환 적외선 분광법(FT-IR)을 사용하여 PEGA-ssDNA의 존재를 확인하였다. 구체적으로, PEGA-ssDNA의 결합을 확인하기 위해서, 파장의 4000~1000cm⁻¹의 Cary 670 FT-IR 분광계(Agilent Technologies, Santa Clara, California, California, California)를 이용하였으며, PEGA의 NHS 그룹과 NH₂-ssDNA의 아민 그룹 사이에 형성된 아마이드 결합의 특징적인 피크는 오직 PEGA-ssDNA의 ~1550 cm⁻¹에서만 관찰되고, ssDNA 또는 NH₂-ssDNA에서는 이러한 피크가 관찰되지 않음을 확인하였다. 또한, ~2900 cm⁻¹ and ~1100 cm⁻¹에서 관찰되는 피크는 PEGA의 폴리에틸렌 부분 때문에 눈에 띄게 증가 된 C-H 및 C-O 결합을 각각 나타낸다(도 4).

[0076] 3-3. 형광 표지된 ssDNA(X-DNA)의 제조

[0077] 표적에 대한 검출을 용이하도록 하기 위하여 형광 표지를 하였다. 구체적으로, *ORF1a* 표적으로부터 *upE*를 구별하기 위해, 밝은 적색을 나타내는 로다민(rhodamine, Texas Red®)과, 밝은 녹색을 나타내는 fluorescein(FAM®)을 이용하였으며, 흡수 및 방출 파장은 각각 적색 형광체의 경우 596nm 및 613nm이고, 녹색 형광체의 경우 495nm 및 520nm이다.

[0078] **제조예 4. X-DNA(핵산나노구조체)의 조립**

[0079] MERS 표적 탐침 기능을 갖는 분지된 핵산나노구조체인 X-DNA의 조립을 위하여, 상기 제조한 광 반응성 및 형광 표지가 결합된 X-DNA를 같은 몰량을 혼합하여 자가조립되도록 하였다. 구체적으로, *upE*-특이적 X-DNA, PEGA-접합 X1 가닥, 5' 말단에 *upE* 탐침을 갖는 X2 가닥, 3' 말단에 또 다른 *upE* 탐침이 있는 적색 형광-표지를 단 X3 가닥 및 마지막으로 유리된 X4 가닥을 각각 500nM씩 총 100 μL 부피의 뉴클레아제가 없는 물에서 완전히 혼합하였다. 이후, 상기 각 X-DNA 가닥들의 모든 2차 구조를 충분히 용융 시킬 수 있도록 95° C에서 10초에서 30초 두었으며, Roh, Y. H., Lee, J. B., Tan, S. J., Kim, B., Park, H., Rice, E. J., & Luo, D. (2010), Photocrosslinked DNA nanospheres for drug delivery. *Macromol Rapid Commun*, 31(13), 1207-1211 문헌에 기초한 프로토콜에 따라 X-DNA 조립을 수행하였다.

[0080] 이후, X-DNA의 합성을 확인하기 위해 500 nM의 X-DNA 4 μl를 6× loading 염료(New England Biolabs) 0.8 μl와 혼합하고 70분동안 80V에서 1× TBE 버퍼(89mM Tris, 89mM boric acid, EDTA)에 GelRed®(Hayward)로 로딩하여 2%(w/v) 아가로즈 겔에서 분리했다. 겔 이미지는 GelDoc® XR 시스템과 ImageLab 소프트웨어(bio-Rad

Laboratories)을 통해 확인하였으며, ImageJ 소프트웨어 (National Institutes of Health, USA)를 이용하였다. *ORF1a*-특이적 X-DNA의 조립 역시 동일한 방식으로 수행하였다.

[0081] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 *upE*-특이적 X-DNA(*upE*-특이적 핵산나노구조체) 조립 및 *ORF1a*-특이적 X-DNA(*ORF1a*-특이적 핵산나노구조체)가 각각 조립된 것을 확인하였다.

[0082] **실험예 1. 단일 표적 검출의 핵산나노입자 형성**

[0083] 한 쪽 말단에 광 반응성 물질 및 형광 표지가 결합되어 있고, 반대 쪽에는 *upE* 또는 *ORF1a* 탐침 부분으로 형성된 MERS-특이적 핵산나노구조체는 표적 *upE* 또는 *ORF1a*가 존재할 경우 광이 유발되면서 나노스피어 형태의 핵산나노입자가 형성됨을 확인하였다. 구체적으로, 등물량의 각 X-DNA 단위체를 15 mM MgCl₂ 및 10 mM Tris 버퍼 (pH 8)을 함유한 용액에서 MERS-특이적인 표적 RNA인 *upE*와 *ORF1a*의 RNA와 혼합하였다. 상기 혼합물을 열 순환기를 사용하여 30° C에서 10분 동안 반응시켰다. 이후, 상기 용액을 0.05%(w/v)의 Irgacure®광-개시제(Ciba Specialty Chemicals, Tarrytown, New York, USA)와 혼합하고, XL-1000 UV 가교 결합제(Spectronics Corporation, Westbury, New York, USA)를 사용하여 4-5분 동안 265nm 또는 365nm UV 빛 (8 mW×cm⁻²)으로 X-DNA 이합체 용액을 광-중합 하였다.

[0084] 도 6에 도식화 된 바와 같이, MERS 표적 서열은 MERS-특이적 X DNA 단량체의 2개의 탐침 부위와 일치하고, 각 X DNA 단량체의 탐침의 돌출부 사이에 걸쳐지며 이합체가 형성된다. 그리고, 365nm UV 조사 후 4-5분 내에, X-DNA의 PEGA-결합 말단에서 아크릴레이트 그룹의 이중 결합이 반응성 전자 라디칼을 갖는 두 개의 단일 결합으로 분열되어, 나노스피어 형태가 되는 핵산나노입자의 광-유도 중합 및 응집이 가능해진다. 그러나, MERS 표적의 부존재 시 X-DNA는 이합체를 형성할 수 없고, 따라서 집합체를 형성 할 수 없다.

[0085] 상기와 같은 MERS-특이적 핵산나노구조체의 나노스피어 형태의 핵산나노입자로의 광-중합 반응을 확인하기 위하여, 표적이 존재할 경우 및 표적이 존재하지 않을 경우의 핵산나노입자의 형성을 확인하였으며, UV 조사 전후로 형광 현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0086] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 표적 존재시 *upE*에 대해서는 빨간색 형광, *ORF1a*에 대해서는 녹색 형광을 나타내며, UV 조사 전에는, 광-가교가 아직 형성되지 않았기 때문에 형광이 관찰되지 않았다. 그러나, *upE* 및 *ORF1a*의 각각의 MERS 표적의 존재 하에서 UV 조사 후, 나노스피어 형태의 핵산나노입자가 관찰되어 *upE*- 및 *ORF1a*- 표적 X-DNA의 성공적인 광 중합이 나타남을 확인하였다. 또한, 표적이 존재하지 않을 경우, X-DNA가 이합체를 형성할 수 없기 때문에 형광이 나타나지 않았다(도 7 내UV 조사 전: Before, UV 조사 후: After).

[0087] **실험예 2. 다중 표적 동시 검출의 핵산나노입자 형성**

[0088] X-DNA의 다중 표적-유도 광-중합화를 통해 MERS-CoV의 *upE* 및 *ORF1a* 두 표적의 동시 검출이 가능함을 확인하였다. 이러한 다중 표적 검출은 *upE* 및 *ORF1a*의 스크리닝에 필요한 수 많은 단계를 1개의 단계로 감소시키기 때문에 더 빠른 MERS-CoV 검출이 가능하도록 한다.

[0089] 도 8에 도식화 된 바와 같이, 각 *upE*- 및 *ORF1a*- 특이적 X-DNA(핵산나노구조체)의 빨간 및 녹색 형광 표지는 두 개의 광-가교적 말단과 단일-가닥 돌출부를 표적으로 하는 *upE*- 및 *ORF1a*- X-DNA에 의해 연결되었다. 여분의 X-DNA는 “backbone X-DNA”로서 *upE* 및 *ORF1a* 특이적 X-DNA가 결합할 수 있으며, 이러한 단일-표적 *upE*- 또는 *ORF1a*-특이적 X-DNA는 각각에 일치되는 표적의 존재 시 각각 backbone X-DNA와 함께 이합체를 형성할 수 있다. 나아가, 두 표적이 모두 존재 시, backbone X-DNA는 양쪽의 두 개의 X-DNA와 원래 삼량체를 형성할 수 있으며, 표적이 존재하는만큼 이러한 중합이 반복적으로 추가됨으로써 분리된 단일 표적 시스템이 연결되도록 하였다.

[0090] 상기와 같은 다중 검출을 확인하기 위하여, 두 표적이 모두 존재하는 경우의 삼량체 형태의 핵산나노입자로의 광-중합 반응을 확인하였으며, UV 조사 전후로 형광 현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0091] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 다중 표적 존재시 삼량체 형태의 backbone X-DNA와 함께 *upE* 및 *ORF1a* 특이적 X-DNA의 광-유도 중합화는 노란색을 띤 나노스피어 형태의 핵산나노입자가 형성된 것을 확인하였다. 상기 노란색 형광은 각 MERS-특이적 핵산나노구조체의 적색과 녹색 형광이 합쳐지면서 나타나며, 이러한 고유한 형광 색상 코드를 사용하여, *upE* 및 *ORF1a* 모두의 존재를 즉시 검출 할 수 있다.

[0092] **실험예 3. 표적 존재시 핵산나노입자의 특성 분석**

[0093] 명-시야 광학현미경과 주사전자현미경(SEM)을 사용하여 MERS-특이적 표적의 존재 하에서 광 중합 된 핵산나노입자의 형태를 확인하였다.

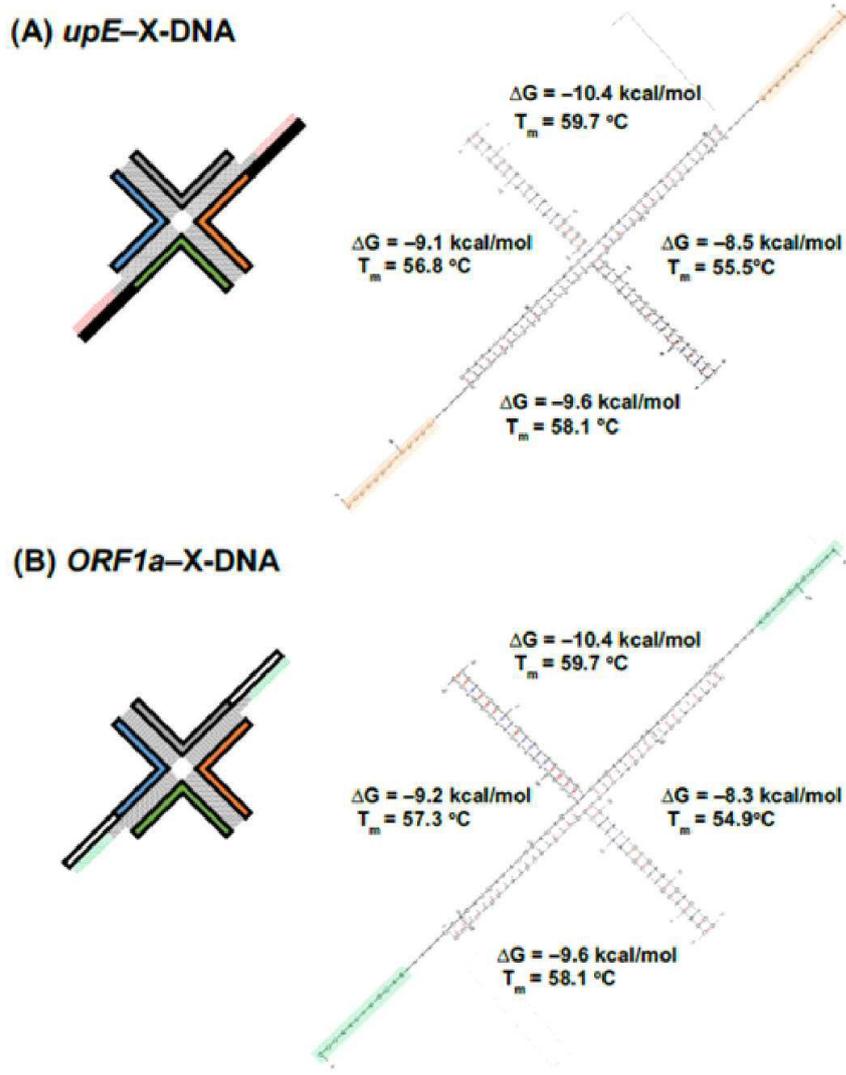
- [0094] 구체적으로, 명-시야 광학 현미경 관찰의 경우, 핵산나노입자 샘플 5 μL 을 현미경 유리 위에 놓은 다음 커버 유리($22 \times 22 \text{ mm}^2$)로 덮었다. 이후 헬륨/네온 레이저(Carl Zeiss MicroImaging)가 장착된 LSM 880 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 실온에서 관찰하였으며, Metamorph 소프트웨어로 이미지를 수집하였다. 수집되었다.
- [0095] 또한, 주사전자현미경 관찰의 경우, 핵산나노입자 1 μM 샘플 10 μL 을 실리콘 웨이퍼 위에 놓고 실온에서 2시간 동안 공기 중에서 건조시켰다. Pt/CfH 회전 코팅 한 후, JSM-7001F 전계 방출 SEM(JEOL Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하여 2 kV의 전압에서 나노스피어의 표면을 관찰하였다.
- [0096] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 핵산나노입자는 구형에 가까운 형태임을 확인하였다.
- [0097] 또한, MERS-특이적 표적의 존재 하에서 광 중합 된 핵산나노입자의 크기 분포는 동적 광 산란(Dynamic Light Scattering, DLS)을 이용하여 분석하였다. 구체적으로, ELS-2000ZS 입자 크기 분석기 (Otsuka Electronics Co., Inc., Osaka, Japan)를 사용하여 실온에서 측정하였으며, 핵산나노입자의 유체 역학적 지름은 회 측정의 평균으로 계산하였다.
- [0098] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 *upE*-표적의 핵산나노입자는 $137.8 \pm 38.6 \text{ nm}$, *ORF1a*-표적의 핵산나노입자는 $144.3 \pm 39.2 \text{ nm}$ 로 측정되었다.
- [0099] **실험예 4. 검출한계 확인**
- [0100] 표적 존재시의 중합 반응에 기반한 본 발명의 검출 시스템의 민감도를 확인하였다. 검출 한계(LoD)는 연속적으로 희석 된 농도의 *upE* 및 *ORF1a* 표적을 사용하여 MERS-특이적 핵산나노구조체의 핵산나노입자 형성을 분석하였다. 표적은 각각 pico-molar(pM: $1 \times 10^{-12} \text{ M}$) 에서 femto-molar(fM: $1 \times 10^{-15} \text{ M}$)에서 마지막으로 atto-molar(aM: $1 \times 10^{-18} \text{ M}$) 범위에서 확인하였다.
- [0101] 구체적으로, 여러 반복된 이미지의 $220 \times 220 \mu\text{m}^2$ 마다 형성된 핵산나노입자의 개수를 세었다. 10 및 1pM의 표적 농도에서, 단위 이미지 크기 당 평균 10개의 핵산나노입자가 형성되었으며, 10^2 fM , 10 및 1fM의 표적 농도에서, 평균 약 4개의 핵산나노입자가 형성되었다. 또한, 10^2 및 10 aM의 표적 농도에서, 평균 약 2개의 핵산나노입자가 형성되었으며, 1 aM의 표적 농도에서는 이미지 내에 형성된 핵산나노입자가 나타나지 않았다(도 12).
- [0102] 상기와 같은 결과는 본 발명의 검출 시스템이 *upE* 및 *ORF1a* 표적 각각 모두에 대해 10 aM의 매우 낮은 농도까지도 검출이 가능한 바, MERS 검출에 대한 민감도가 매우 높음을 나타내는 것이다.
- [0103] **실험예 5. 특이도(Specificity) 확인**
- [0104] 표적 존재시의 중합 반응에 기반한 본 발명의 검출 시스템의 표적에 대한 특이도를 확인하였다. 폐 손상과 관련된 MERS와 유사한 증상을 유발 할 수 있는 다른 코로나 바이러스 및 다른 호흡기 감염-유발 바이러스와의 교차 반응이 나타나는지 여부를 확인하였다.
- [0105] 구체적으로, 인간 코로나 바이러스로서, 계통학적으로 MERS-CoV와 베타 코어로서 동속으로 분류되는 인간 코로나 바이러스(hCoV) OC43와 함께, 알파 코어임에도 불구하고 중간 교차 반응이 없음을 확인하기 위하여 인간 코로나 바이러스 NL63 및 229E를 대상으로 하였다. 또한, MERS-CoV와 유사하게 상부 또는 하부 호흡기 감염을 유발하고 공기를 통해 퍼지는 다른 RNA 바이러스가 유사한 증상으로 인해 구별하기 까다로운 인플루엔자 바이러스를 대상으로 하였으며, 아데노바이러스 및 보카바이러스 같이 호흡기 감염을 유발한다고 알려져 있는 DNA 바이러스와 MERS-CoV 검출 시스템과의 교차 반응성을 확인하였다.
- [0106] 상기 바이러스와 관련된 표적 핵산들은 시판 중인 검출 키트 (Kogene Biotech, Seoul, South Korea)에 포함된 양성 대조군으로부터 획득하였으며, 상기 인간 코로나 바이러스, 인플루엔자 바이러스, DNA 바이러스의 존재시 MERS 특이적 X-DNA를 UV에 조사하면 핵산나노입자가 형성되지 않음을 확인하였다(도 13).
- [0107] 이러한 결과는 본 발명의 MERS-CoV 검출 시스템은 MERS-CoV의 표적 RNA 서열에만 높은 특이성을 나타냄을 보여 주는 것이다.
- [0108] 상기와 같이 본 발명의 검출용 조성물 및 검출 시스템은 MERS 바이러스 검출에 있어서 표적 각각에 대해 한 번에 검출 가능할 수 있도록 하여 MERS 감염 진단이 신속히 이루어질 수 있도록 하였다. 특히, 높은 민감도 및 특이성을 나타내는 바, MERS의 검출 및 진단에 대한 활용 가능성이 매우 높다.
- [0109] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명

의 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 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

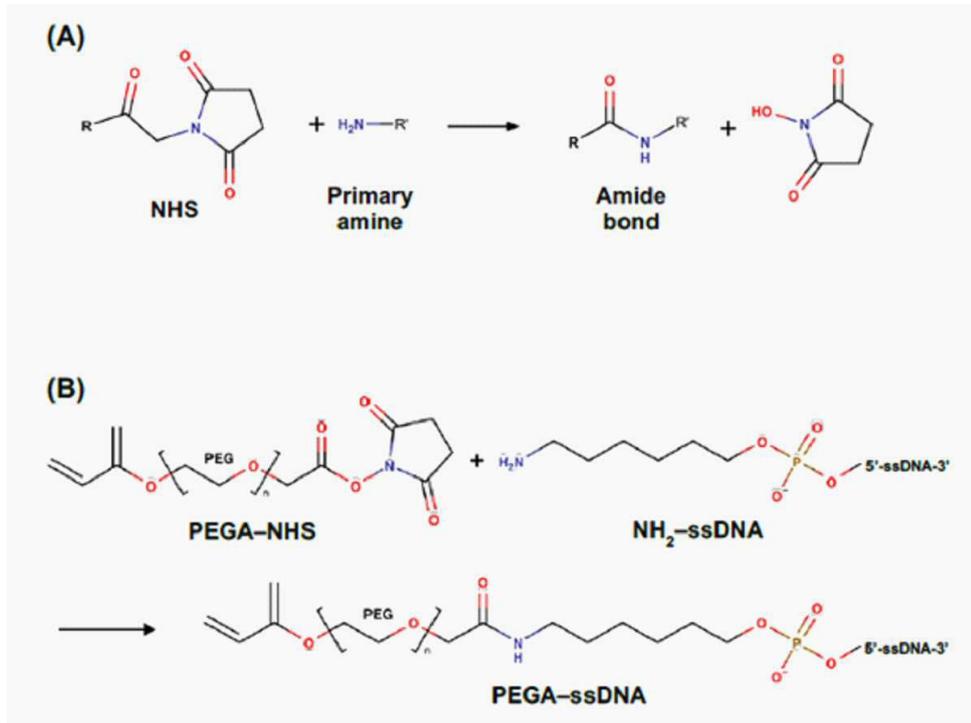
[0110] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

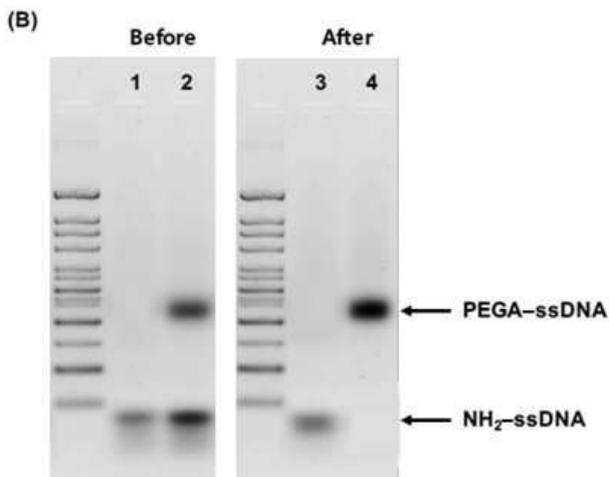
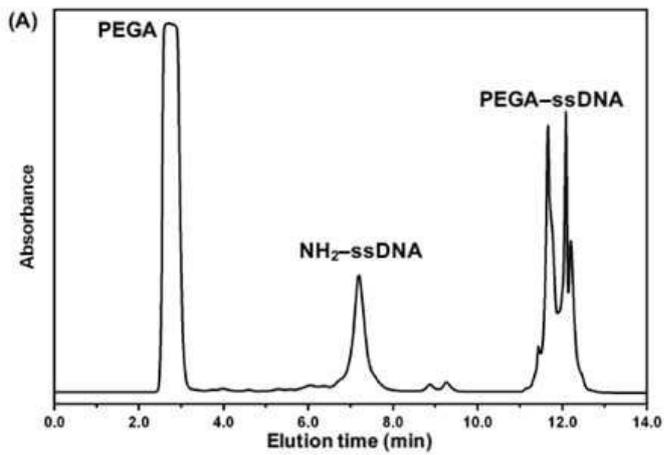
도면1



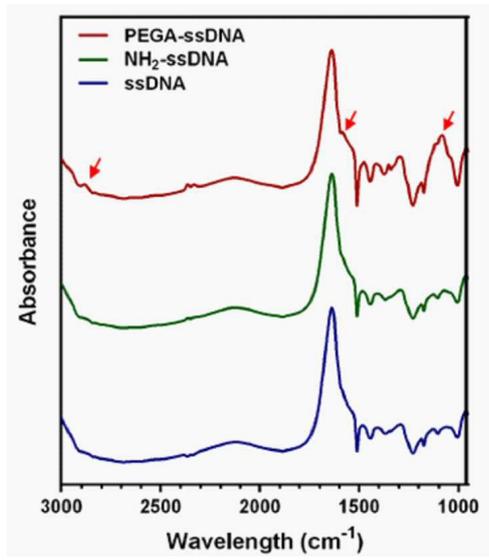
도면2



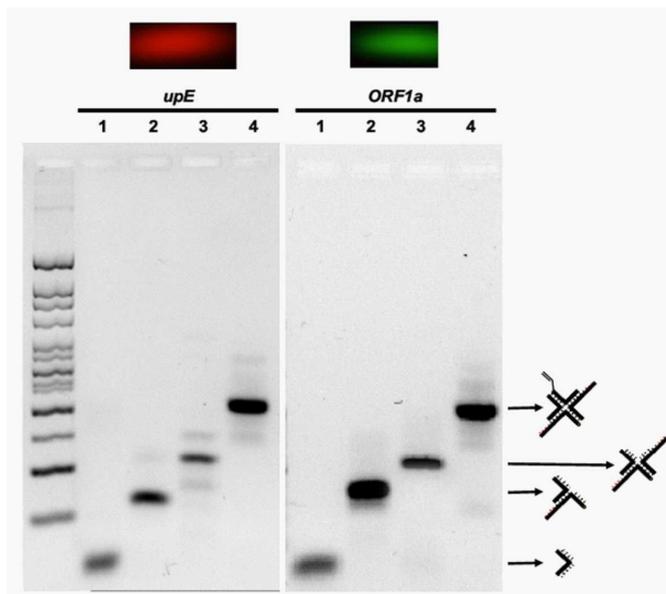
도면3



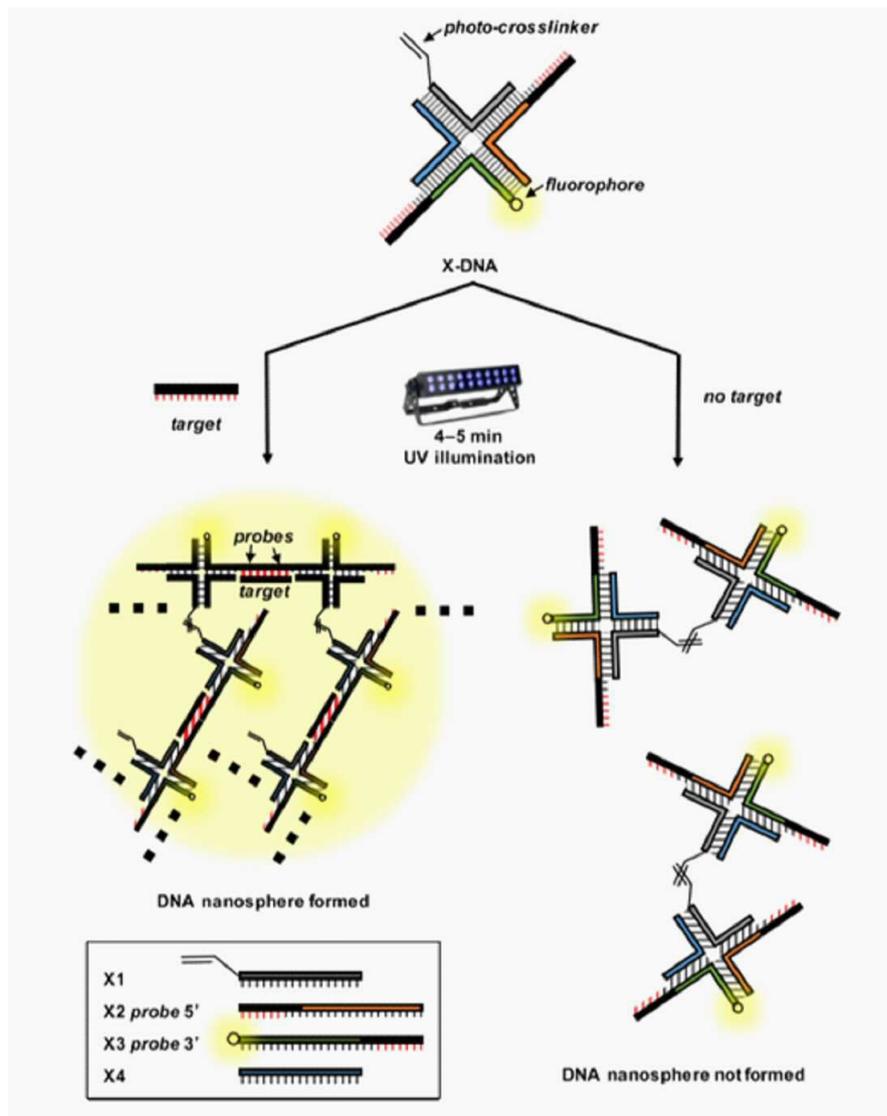
도면4



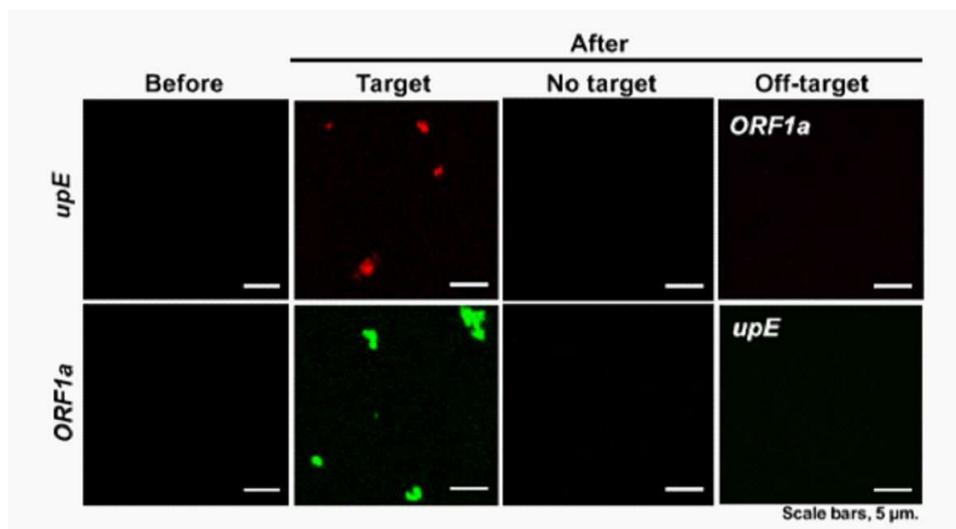
도면5



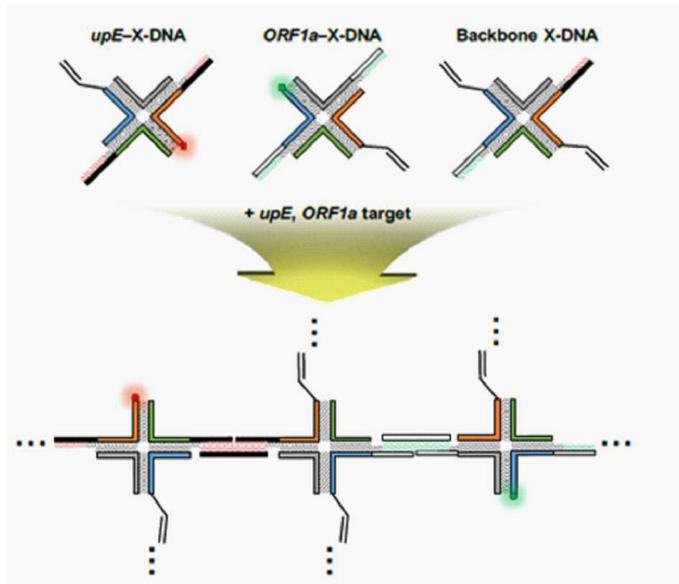
도면6



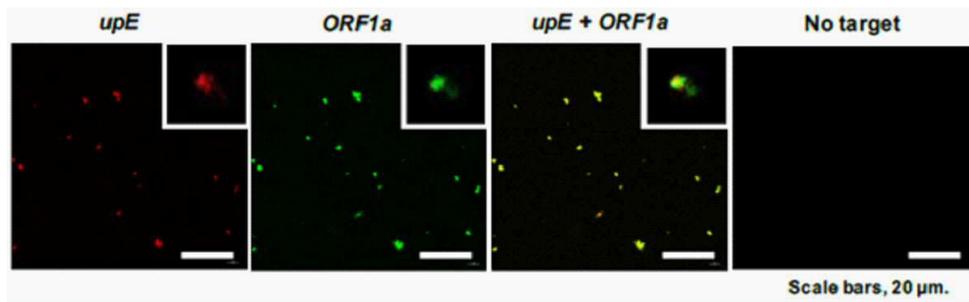
도면7



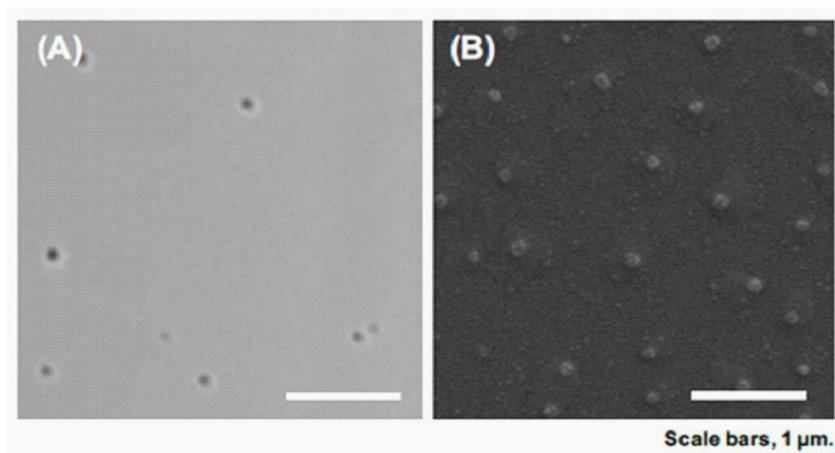
도면8



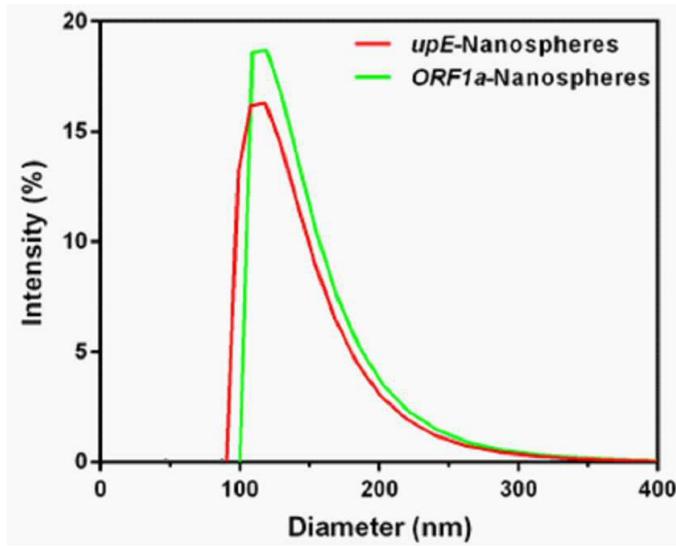
도면9



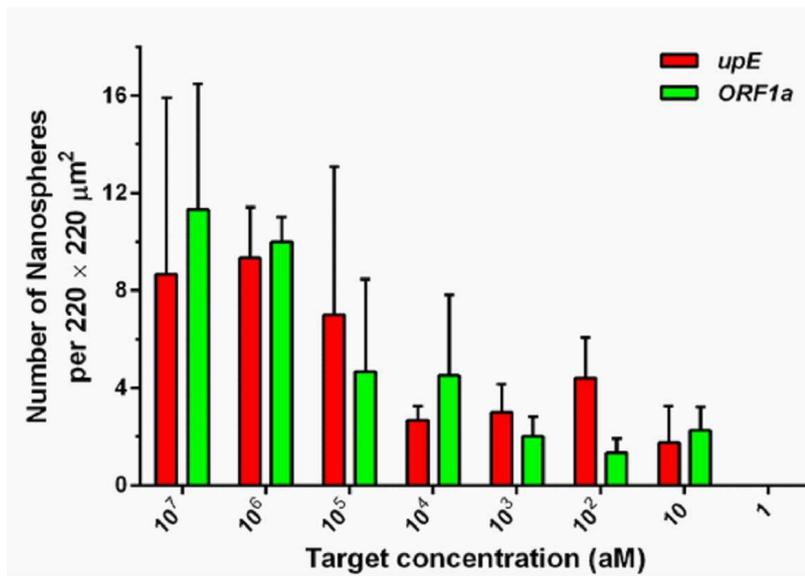
도면10



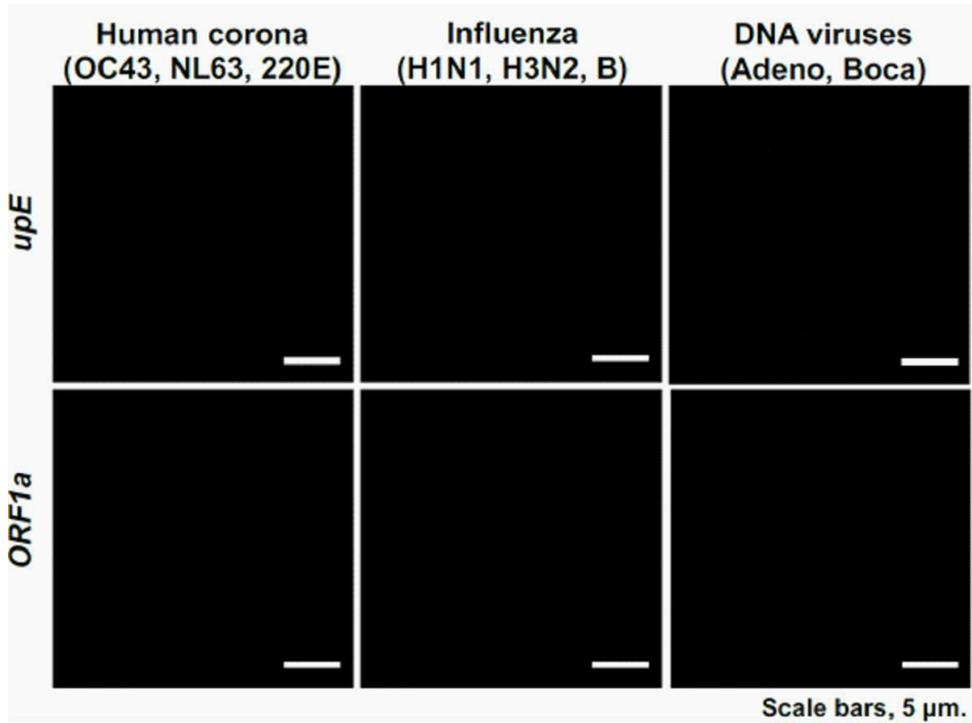
도면11



도면12



도면13



서열목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> COMPOSITION FOR DETECTING HIGH RISK VIRUS AND USE THEREOF

<130> 19PP30094

<160> 12

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> upE 5' probe

<400> 1

attatgtgaa gag

13

<210> 2

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> upE 3' probe

<400> 2

| | |
|-------------------------------------------------------------------|----|
| cgagctcggg gcg | 13 |
| <210> 3 | |
| <211> 12 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> ORF1a 5' probe | |
| <400> 3 | |
| gccaatttgc aa | 12 |
| <210> 4 | |
| <211> 11 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> ORF1a 3' probe | |
| <400> 4 | |
| agtgggggca a | 11 |
| <210> 5 | |
| <211> 36 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> upE-X-DNA X1 | |
| <400> 5 | |
| cgaccgatga atagcgggtca gatccgtacc tactcg | 36 |
| <210> 6 | |
| <211> 72 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> upE-X-DNA X2 | |
| <400> 6 | |
| attatgtgaa gagtttttcg agtaggtacg gatctgcgag taggtacgga tctgcgagta | 60 |
| ggtacggatc tg | 72 |
| <210> 7 | |
| <211> 54 | |
| <212> DNA | |

<213> Artificial Sequence
 <220><223> upE-X-DNA X3
 <400> 7
 cgagtcgttc gcaatacggc tgtacgtatg gtctcgtttt tcgagctcgg ggcg 54
 <210> 8
 <211> 36
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> upE-X-DNA X4
 <400> 8
 cgagaccata cgtacagcac cgctattcat cggtcg 36
 <210> 9
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ORF1a-X-DNA X1
 <400> 9
 cgaccgatga atagcggcca gatccgtacc tactcgtttt tagtgggggc aa 52
 <210> 10
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ORF1a-X-DNA X2
 <400> 10
 attatgtgaa gagtttttcg agtaggtacg gatctg 36
 <210> 11
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> ORF1a-X-DNA X3
 <400> 11
 cgagtcgttc gcaatacggc tgtacgtatg gtctcg 36
 <210> 12

<211> 53

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ORF1a-X-DNA X4

<400> 12

gccaatttgc aatTTTTga gaccatacgt acagcaccgc tattcatcgg tcg

53