



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년02월14일
(11) 등록번호 10-1706324
(24) 등록일자 2017년02월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/701 (2013.01)
C12Q 2525/113 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0012824

(22) 출원일자 2015년01월27일

심사청구일자 2015년01월27일

(65) 공개번호 10-2016-0092331

(43) 공개일자 2016년08월04일

(56) 선행기술조사문헌

CN102286639 A

WO2007105565 A1

(73) 특허권자

한국생명공학연구원

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

(72) 발명자

정주연

대전광역시 유성구 과학로 125

임은경

대전광역시 유성구 과학로 125

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

전체 청구항 수 : 총 8 항

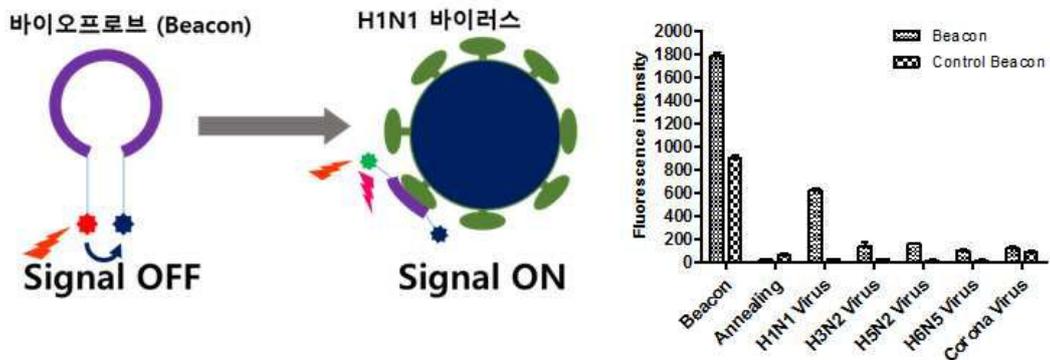
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1 검출용 바이오프로브

(57) 요약

본 발명은 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1을 검출할 수 있는 바이오프로브에 관한 것이다. 본 발명은 바이러스 증폭을 위한 별도의 전처리를 요구하지 않고 실온에서도 수행할 수 있어 신속하고 간편한 검출이 가능하다. 또한 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1만을 선택적으로 검출할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Q 2527/101 (2013.01)

C12Q 2563/107 (2013.01)

C12Q 2565/1015 (2013.01)

(72) 발명자

국경혜

대전광역시 유성구 과학로 125

정봉현

대전광역시 유성구 과학로 125

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 GFM0171411

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 글로벌프론티어연구개발사업

연구과제명 약물저항성 바이오 유해물질 신속 검출을 위한 바이오 콘텐츠 설계 및 활용기술 개발

기 여 율 40/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2014.09.01 ~ 2022.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NPC0311412

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래유망융합기술 파이오니아사업

연구과제명 원자현미경 적용을 위한 바이오콘텐츠 발굴, 생산 및 활용기술개발

기 여 율 30/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2013.09.17 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM1121521

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 기초기술연구회

연구사업명 바이오메디컬융합기술개발사업

연구과제명 나노바이오메디컬 융복합 기술개발사업

기 여 율 30/100

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2011.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 기재되는 펩타이드; 상기 펩타이드의 일 말단에 결합된, 퀘칭 소제가 태그된 서열번호 2로 기재되는 올리고뉴클레오타이드; 상기 펩타이드의 다른 말단에 결합된, 형광 소제가 태그된 서열번호 3으로 기재되는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1 검출용 바이오프로브.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 바이오프로브에서 서열번호 2로 기재되는 올리고뉴클레오타이드와 서열번호 3으로 기재되는 올리고뉴클레오타이드가 어닐링(annealing)되어 형광 신호가 억제된 바이오프로브.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 퀘칭 소제는 BHQ2이고, 상기 형광 소제는 cy3인 바이오프로브.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 바이오프로브에서 서열번호 1로 기재되는 펩타이드: 퀘칭 소제가 태그된 서열번호 2로 기재되는 올리고뉴클레오타이드: 형광 소제가 태그된 서열번호 3으로 기재되는 올리고뉴클레오타이드의 중량비는 4:4:2인 바이오프로브.

청구항 5

- a) 제2항의 바이오프로브와 시료를 접촉하는 단계;
- b) 상기 바이오프로브로부터 발생하는 형광 강도를 측정하는 단계; 및
- c) 상기 측정된 형광 강도가 시료와 접촉하기 이전보다 증가한 경우 시료 내 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1의 존재를 확인하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1의 검출 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 a) 단계는 실온에서 수행되는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 a) 단계는 10분 내지 30분 동안 수행되는 방법.

청구항 8

제1항의 바이오프로브 또는 제2항의 바이오프로브를 포함하는, 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1 검출용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1을 검출할 수 있는 바이오프로브에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 핵산을 증폭하기 위한 전처리를 요구하지 않아 신속하고 편리한 검출이 가능하고, 아형 H1N1만을 특이적으로 검출할 수 있는 바이오프로브에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인플루엔자(influenza, 독감)는 인플루엔자 바이러스(Influenza virus)에 의해 사람 및 동물(조류, 돼지, 개, 말 등)의 호흡기를 통해 전파되는 호흡기성 질병이다. 사람 인플루엔자(Human influenza)의 경우 매년 전 세계 10-20% 인구에서 발생하며, 전염성이 높아 매년 세계적 규모로 유행하는 경향이 있다. 인플루엔자의 증상은 고

열, 두통, 근육통, 인후의 염증, 통증, 기침 등의 호흡기질환을 수반하며 심한 경우 노약자, 만성질환보유자 등의 사망을 유발할 수 있다.

[0003] 인플루엔자 A 바이러스는 인플루엔자 바이러스 중에서 가장 전염성이 강하고 독력이 강하다. 숙주가 조류, 포유류 등 매우 다양하며, 중간 전염 역시 발생할 수 있어 많은 아형 및 변이주가 존재한다. 그 중 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1은 돼지에서 유래한 인플루엔자 바이러스가 변이를 일으켜 발생한 것으로서 신종플루의 원인균이다. 2009년 신종플루가 대유행했을 때 전세계적으로 18500여명의 사망자가 발생하였으며, 전염병에 대한 공포로 국가 간 교역이 감소하고 경제가 위축되고 휴교령이 내려지는 등 유무형의 막대한 손실이 발생하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1을 특이적으로 검출할 수 있는 바이오프로브를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0005] 이에, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 펩타이드; 상기 펩타이드의 일 말단에 결합된, 퀘칭 소제가 태그된 서열번호 2로 기재되는 올리고뉴클레오타이드; 상기 펩타이드의 다른 말단에 결합된, 형광 소제가 태그된 서열번호 3으로 기재되는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는, 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1 검출용 바이오프로브를 제공한다.

[0006] 또한 본 발명은 상기 바이오프로브에서 서열번호 2로 기재되는 올리고뉴클레오타이드와 서열번호 3으로 기재되는 올리고뉴클레오타이드가 어닐링(annealing)되어 형광 신호가 억제된 바이오프로브를 제공한다.

[0007] 본 발명에 있어서, 상기 서열번호 1로 기재되는 펩타이드는 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1의 헤마글루티닌, 즉 H1에 특이적으로 결합한다. 따라서 다른 바이러스에는 결합하지 않으며, 인플루엔자 A 바이러스 중에서도 다른 아형에는 결합하지 않아서, 아형 H1N1만을 검출할 수 있다.

[0008] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 퀘칭 소제는 바람직하게는 BHQ2, 상기 형광 소제는 cy3가 될 수 있다. 다른 예로서, 본 발명에 사용될 수 있는 퀘칭 소제의 예로는 Dabcyl, BHQ-1, QYS-7, BHQ-2, BHQ-3가 있으며, 형광 소제의 예로는 Cascade Blue, Pacific Blue, Oregon Green, Bodipy FL-X, Fluorescein, 5,6 FAM, Oregon green, TET, Bodipy R6-X, JOE, HEX, Cy3, Rhodamine REd-X, TAMRA, Cy3.5, ROX, Texas Red-X, Bodipy TR-X, Light Cycler, Bodipy 630/650-X, Cy5, Cy5.5가 있다. 그러나 퀘칭 소제와 형광 소제의 종류는 이에 제한되지 않으며, 퀘칭 소제에 의하여 형광 소제가 소광될 수 있는 소재이면 본 발명에 적용될 수 있다.

[0009] 본 발명에 있어서, 상기 바이오프로브는 서열번호 1로 기재되는 펩타이드, 퀘칭 소제가 태그된 서열번호 2로 기재되는 올리고뉴클레오타이드, 및 형광 소제가 태그된 서열번호 3으로 기재되는 올리고뉴클레오타이드가 4:4:2의 중량비로 포함된 것일 수 있다. 그러나 각 구성의 중량비는 이에 제한되지 않으며, 퀘칭 소제에 의하여 형광 소제가 소광될 수 있는 중량비라면 본 발명에 적용될 수 있다.

[0010] 본 발명은 a) 상기 어닐링된 바이오프로브와 시료를 접촉하는 단계;

[0011] b) 상기 바이오프로브로부터 발생하는 형광 강도를 측정하는 단계; 및

[0012] c) 상기 측정된 형광 강도가 시료와 접촉하기 전보다 증가한 경우 시료 내 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1의 존재를 확인하는 단계를 포함하는, 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1의 검출 방법을 제공한다.

[0013] 상기 방법에 있어서 상기 a) 단계는 실온에서 수행될 수 있다. 그러나 상기 바이오프로브가 변성되지 않는 한 수행 온도는 이에 제한되지 않는다. 또한 상기 단계는 5분 내지 1시간, 바람직하게는 10분 내지 30분, 보다 바람직하게는 10분 동안 수행될 수 있다. 그러나 접촉 시간은 이에 제한되지 않는다.

[0014] 본 발명은 상기 바이오프로브 또는 상기 어닐링된 바이오프로브를 포함하는 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1 검출용 키트를 제공한다. 상기 키트는 상기 키트는 사용 지침(instruction) 및 기타 검출에 필요한 도구 또는 장비를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 바이러스 증폭을 위한 별도의 전처리를 요구하지 않고 실온에서도 수행할 수 있어 신속하고 간편한 검출이 가능하다. 또한 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1만을 선택적으로 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 바이오프로브의 제조과정을 나타낸 도이다.
 도 2의 좌측 도는 본 발명의 바이오프로브가 제조되고(1단계), 어닐링시 FRET 현상을 이용하여 형광 신호를 억제하며(2단계), 타겟 바이러스 표면 단백질과 결합했을 때 형광 신호가 발생하는(3단계) 과정의 모식도이다. 도 2의 우측 도는 본 발명의 바이오프로브가 어닐링시 형광 신호가 효과적으로 억제되며, 인플루엔자 A 바이러스 H1N1에 특이적으로 높은 형광 감도가 나타남을 보여주는 그래프이다.
 도 3은 퀀칭 소재(BHQ2)가 태그된 올리고뉴클레오타이드의 양을 변화시켜 바이오프로브를 제조하였을 때 어닐링 전후 형광 신호를 나타낸 도이다.
 도 4는 퀀칭 소재(BHQ2)가 태그된 올리고뉴클레오타이드의 양을 각각 다양한 농도로 사용하여 바이오프로브를 제조하였을 때 어닐링 전후 형광 신호를 나타낸 도이다.
 도 5는 본 발명의 바이오프로브를 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1, H3N2, H3N2, H5N2, H6N5, 또는 코로나바이러스와 반응시켰을 경우 형광 신호를 나타낸 도이다.
 도 6은 본 발명의 바이오프로브와 바이러스의 반응 시간을 변화시켰을 때 형광 신호를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0018] 실시예 1. 바이오프로브 제조

[0019] 1-1. 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1의 표면의 H1 단백질에 특이적으로 결합하는 펩타이드의 준비

[0020] 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1의 표면의 H1 단백질에 특이적으로 결합하는 펩타이드(서열번호 1: ARLSPTMVHPNGAQP)를 ㈜ 펩톤으로부터 구입하여 준비하였다. 상기 펩타이드를 0.56 mM 처리했을 때 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1, H5N2, H6N5 각각의 표면의 HA 단백질에 대한 친화도(affinity)를 SPR(Surface Plasmon Resonance) 방법으로 검출하였다. 친화도의 단위는 RU(Response Unit)로 나타내었고, 하기 표에서 확인할 수 있다.

[0021] [표 1]

	H1N1 Target peptide
H1N1 virus	62.4
H5N2 virus	14.5
H6N5 virus	25.2

[0022] [0023] 상기 표에서 서열번호 1의 펩타이드가 H1N1 바이러스에 특이적으로 높은 친화도를 나타냄을 알 수 있다.

[0024] 1-2. 바이오프로브 제조

[0025] 상기 펩타이드의 한쪽 말단은 Fmoc(Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride)으로, 다른 한쪽 말단은 NH₂로 보호되어 있다. NH₂ 쪽 말단에 퀀칭 소재(BHQ2)가 태그된 올리고뉴클레오타이드(서열번호 2: TTTTGGGGG)를 Sulfo-SMCC를 크로스 링커(cross linker)로 하여 결합시켰다. 그리고 다른 쪽 말단에서 Fmoc을 제거한 후, 형광 소재(cy3)가 태그된 올리고뉴클레오타이드(서열번호 3: CCCCCAAA)를 Sulfo-SMCC를 크로스 링커로 하여 결합하여 바이오프로브를 제조하였다.

[0026] 상기 제조과정을 도 1에 나타내었다.

[0027] 1-3. 어닐링을 통한 바이오프로브의 형광 신호 억제

[0028] 합성된 바이오프로브가 비특이적 형광 신호를 발생시키는 것을 억제하기 위하여 어닐링(annealing)을 수행하였

다. 즉, 상기 바이오프로브를 95 ℃의 온도에서 2-5분간 둔 후, 서서히 상온으로 온도를 낮춤으로써 상기 바이오프로브의 서열번호 2 및 3 간의 수소결합을 유도하여 바이오프로브가 헤어핀 구조가 되도록 하였다.

[0029] 헤어핀 구조를 이룬 바이오프로브는 양 말단에 존재하는 형광 소재와 퀘칭 소재간의 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 현상에 의하여 형광 신호가 억제되었다.

[0030] 바이오프로브가 제조되고(1단계), 어닐링시 FRET 현상을 이용하여 형광 신호를 억제하며(2단계), 타겟 바이러스 표면 단백질과 결합했을 때 형광 신호가 발생하는(3단계) 과정의 모식도를 도 2의 좌측 도에 나타내었다.

[0031] **1-4. 형광 소재와 퀘칭 소재의 비율에 따른 형광 신호 억제 정도 확인**

[0032] 본 발명의 바이오프로브에서 형광 소재와 퀘칭 소재의 비율을 결정하기 위하여 하기 실험을 수행하였다.

[0033] 구체적으로, 1-2의 바이오프로브 제조시, 형광 소재(cy3)가 태그된 올리고뉴클레오타이드의 양을 100 pmol로 고정하고, 퀘칭 소재(BHQ2)가 태그된 올리고뉴클레오타이드의 양을 변화시켜가면서(각각 100, 150, 200, 250, 300 pmol) 바이오프로브를 제조하였다.

[0034] 각 바이오프로브를 1-3과 마찬가지로 어닐링하여, 어닐링 전 및 후의 형광 신호를 비교하였다.

[0035] 결과는 도 3에 나타내었다. 도 3에서 시험된 퀘칭 소재(BHQ2)가 태그된 올리고뉴클레오타이드의 양과 관계없이 형광 신호가 효과적으로 억제됨을 알 수 있다.

[0036] **1-5. 어닐링 전후의 형광신호 비교**

[0037] 퀘칭 소재(BHQ2)가 태그된 올리고뉴클레오타이드를 다양한 농도로 사용하여 1-2의 방법으로 제조한 바이오프로브를 1-3의 방법으로 어닐링한 경우, 어닐링 전후의 형광 신호를 비교하였다.

[0038] 결과는 도 4에 나타내었다. 도 4에서 퀘칭 소재(BHQ2)가 태그된 올리고뉴클레오타이드가 모든 농도에서 어닐링 후 형광 신호가 모두 효과적으로 억제되며, 4 nmol 사용되었을 때 형광 신호가 가장 효과적으로 억제됨을 알 수 있다.

[0039] **실시예 2. 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1의 검출**

[0040] 퀘칭 소재(BHQ2)가 태그된 올리고뉴클레오타이드(서열번호 2)를 4 nmol, 형광 소재(cy3)가 태그된 올리고뉴클레오타이드(서열번호 3)를 2 nmol, 및 서열번호 1의 펩타이드를 4 nmol 사용하여 실시예 1-2의 방법대로 바이오프로브를 제조하고 1-3의 방법대로 어닐링한 후, 상온에 바로 꺼내어 2 내지 3시간 두었다. 그 후 바이러스 역가 1×10^4 의 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1, 인플루엔자 A 바이러스 아형 H3N2, H3N2, H5N2, H6N5, 또는 코로나 바이러스(Corona virus) 각각에 상기 어닐링된 바이오프로브를 100 μ L의 양으로 처리하고 실온에서 10분간 반응시켰다. 서열번호 1의 펩타이드 대신 scrambled control(서열번호 4: CDDYYYGFGCNKFCRPR)을 사용한 것 외에 다른 모든 것을 동일하게 하여 컨트롤 프로브(control probe)을 준비하였고, 동일한 방법으로 각 바이러스와 반응시켰다.

[0041] 그 후 530 nm의 파장으로 여기(excitation)시켜 형광 신호 변화를 측정하였다. 결과는 도 5에 나타내었다. 도 5에서 본 발명의 바이오프로브(도면상에서 'Beacon'으로 표시)는 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1과 반응시켰을 때 높은 형광 강도를 나타내었으나, 같은 인플루엔자 A 바이러스 중에서도 아형 H3N2, H5N2, H6N5와 반응시켰을 때는 매우 낮은 형광 강도를 나타내었으며, 코로나 바이러스와 반응시켰을 때는 형광 신호가 억제된 상태가 유지되었다. 한편 컨트롤 프로브(도면상에서 'Control Beacon'으로 표시)는 반응시킨 바이러스 3종 모두에 대하여 형광 강도가 낮게 나타났다.

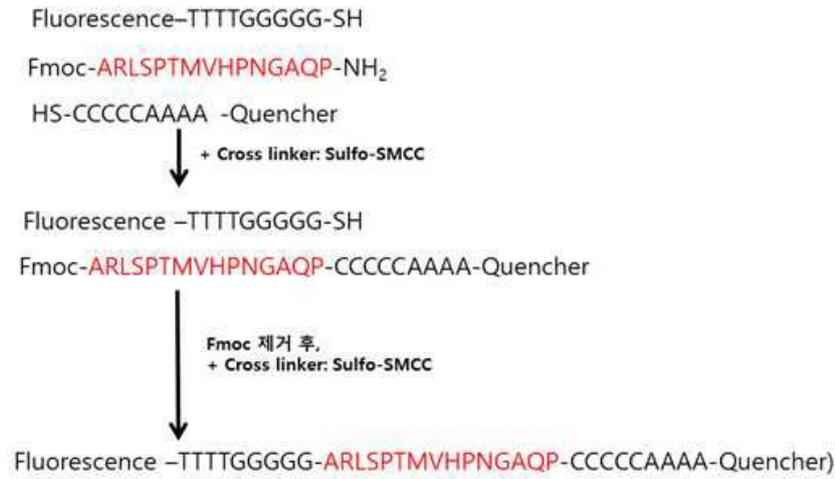
[0042] **실시예 3. 바이러스와의 반응 시간에 따른 검출능 확인**

[0043] 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 본 발명의 바이오프로브를 제조하여 어닐링한 후, 다른 모든 조건 및 방법은 실시예 2와 동일하게 하되 바이오프로브와 각 바이러스의 반응 시간을 10분, 20분, 30분으로 각각 변화시켜 가면서 이에 따른 검출능을 확인하였다.

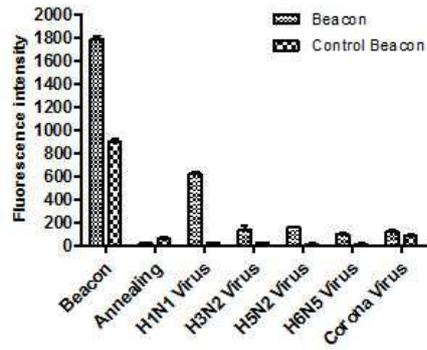
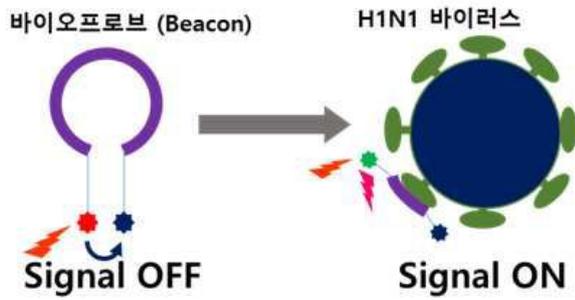
[0044] 결과는 도 6에 나타내었다. 도 6에서 본 발명의 바이오프로브가 신속하게 (30분 이내) 인플루엔자 A 바이러스 아형 H1N1에 대하여 높은 형광 강도를 나타내었고, 특히 10분간 반응시킨 경우에도 높은 형광 강도가 나타남을 확인하였다.

도면

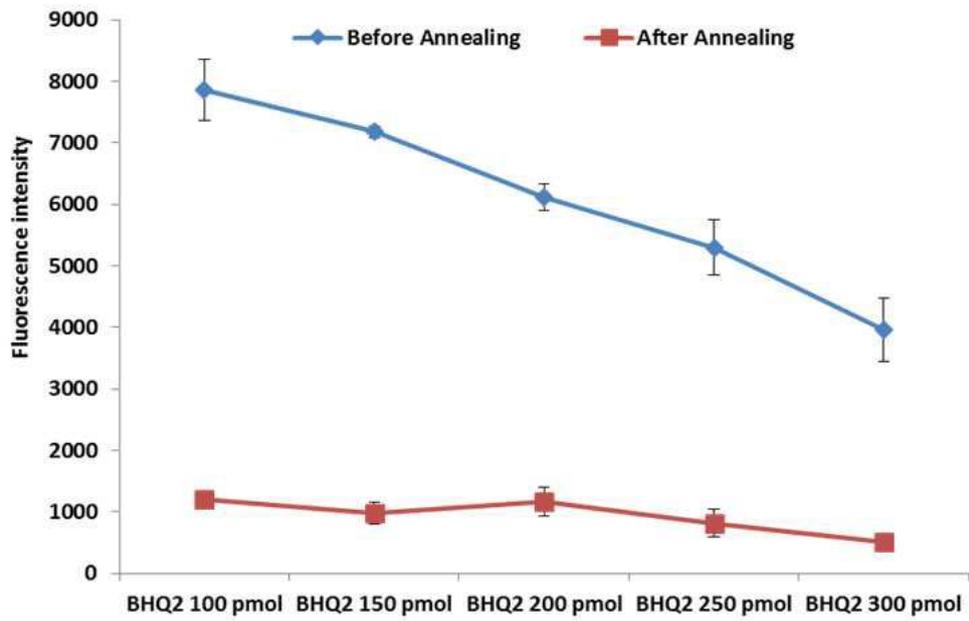
도면1



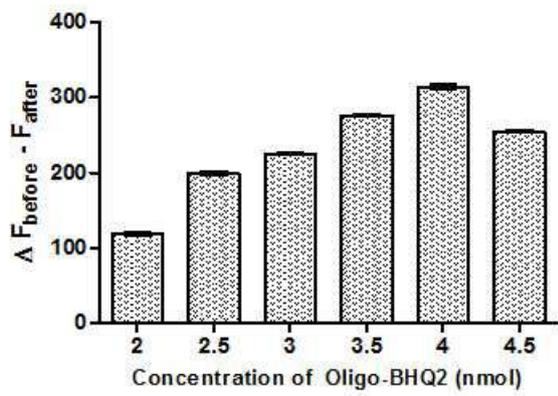
도면2



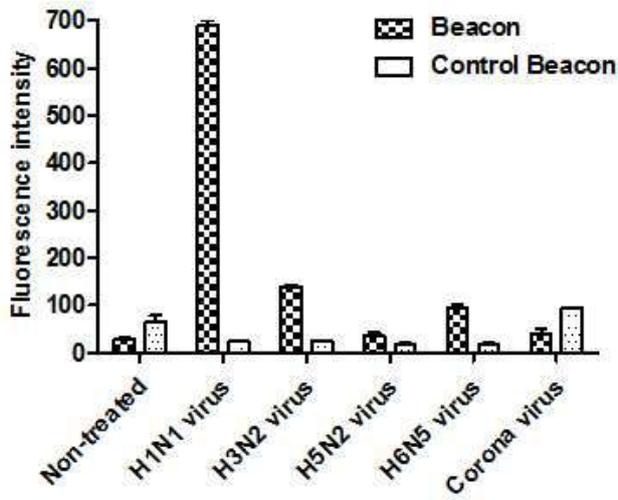
도면3



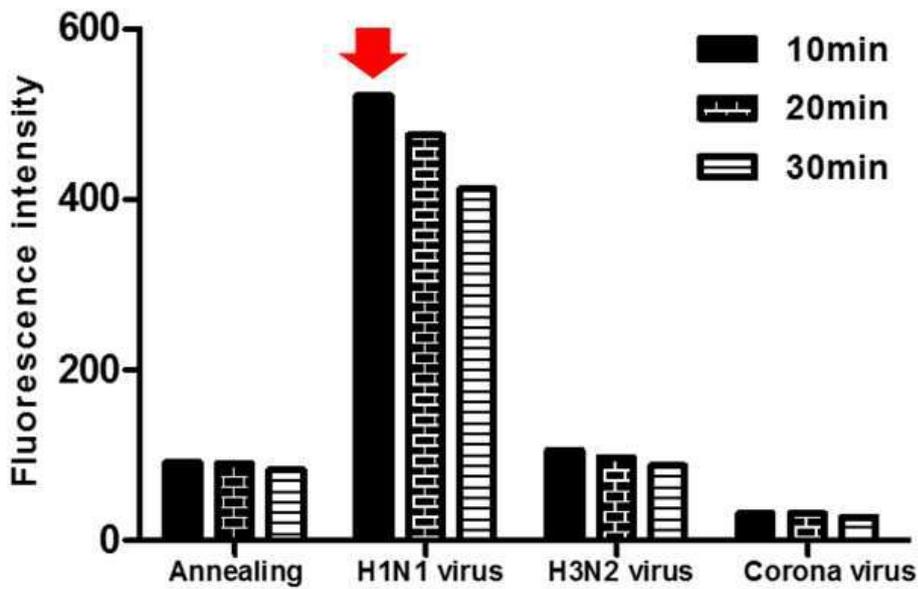
도면4



도면5



도면6



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> A bioprobe for the detection of influenza A virus subtype H1N1
- <130> P14-138-KRI
- <160> 4
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 15
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> H1 protein specific binding peptide of Influenza A virus subtype
H1N1 surface

<400> 1

Ala Arg Leu Ser Pro Thr Met Val His Pro Asn Gly Ala Gln Pro

1 5 10 15

<210> 2

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Quenching material tagged oligonucleotide

<400> 2

tttttggggg 10

<210> 3

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fluorescent material tagged oligonucleotide

<400> 3

cccccaaaa 9

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Scrambled control peptide

<400> 4

Cys Asp Asp Tyr Tyr Tyr Gly Phe Gly Cys Asn Lys Phe Cys Arg Pro

1 5 10 15

Arg