



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0139037

(43) 공개일자 2015년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*C12Q 1/68* (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0066500

(22) 출원일자 2014년05월30일

심사청구일자 2014년05월30일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

김석

경남 진주시 천수로 30, 106동 206호 (주악동, 한  
보은빛마을아파트)

(74) 대리인

손민

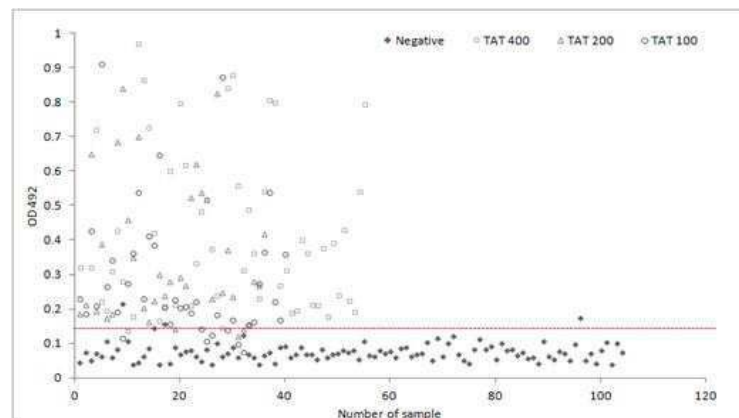
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **박테리오페리틴을 이용한 브루셀라 감염증 진단방법**

### (57) 요약

본 발명은 박테리오페리틴의 mRNA 수준 또는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 브루셀라 감염증 진단용 키트 및 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 브루셀라 감염증의 발병여부를 진단하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 브루셀라 감염증 진단용 조성물 또는 키트를 사용하면, 종래의 기술보다도 높은 수준의 특이도와 정확도로 브루셀라 감염증을 진단할 수 있으므로, 브루셀라 감염증의 효과적인 예방 또는 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

**대표도** - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013-0839

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 생명산업기술개발

연구과제명 고면역원성 숙주특이 항원을 이용한 브루셀라 진단법 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2013.08.10 ~ 2014.08.09

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

박테리오페리틴 유전자(서열번호 1)의 mRNA 수준 또는 단백질(서열번호 2) 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 브루셀라 감염증 진단용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 mRNA의 수준을 측정하는 제제는 상기 박테리오페리틴 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단백질의 수준을 측정하는 제제는 상기 박테리오페리틴 단백질에 특이적인 항체를 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 브루셀라 감염증 진단용 키트.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 키트는 RT-PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 단백질 칩 키트인 것인 키트.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

본 발명은 박테리오페리틴을 이용한 브루셀라 감염증 진단방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 박테리오페리틴의 mRNA 수준 또는 단백질의 수준을 측정하는 제제를 포함하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 브루셀라 감염증 진단용 키트 및 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 브루셀라 감염증의 발병 여부를 진단하는 방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002]

브루셀라 감염증은 대표적인 인수공통 전염병(인체;4군법정전염병, 가축;2종법정전염병)의 하나이며 국내는 물론 전 세계적으로 공중보건학적, 경제학적 심각한 문제를 야기한다고 알려져 있다. 최근 국내에서 본 감염증이 인체와 가축에서도 폭발적인 증가를 보이고 있어 국민적 관심사는 물론 이에 대한 대책이 시급한 실정이다.

[0003]

브루셀라 감염증을 유발하는 브루셀라균은 *Brucella abortus*(소), *B. melitensis*(양, 염소), *B. canis*(개), *B. ovis*(양), *B. suis*(돼지) 등이 알려져 있는데, 이들은 모두 모두 인체에 감염하여 심각한 질병을 초래할 수 있

고, 국내에서는 *Brucella abortus*가 높은 비율을 차지하는 것으로 알려져 있다. 상기 브루셀라 감염증이 발병되면, 인체에 감염될 경우 10% 미만의 치사율을 보이고, 지속적 발열, 두통, 식욕부진, 원기쇠약을 보이다가 심내막염, 뇌척수염, 관절염 등 중증 질병으로 진행하게 되며, 감염된 동물에서 보이는 증상은 특별한 외부 증상이 없이 암컷에서의 태반염, 자궁 내막염 등으로 인한 유산과 수컷에서 고환염, 기형정자 등으로 인한 불임을 유발한다고 알려져 있다. 상기 브루셀라균은 세포내에서 증식하며 발병을 일으키기 때문에 인체감염의 경우 짧게는 수주에서 길게는 수년간의 항생제 치료가 필요하며, 다량의 항생제 복용으로 인한 후유증 등으로 인하여 치료방법에 대한 개선이 시급한 실정이며, 완치로 판단되었어도 수년 이내에 재발되는 경우가 많아 지속적 관찰이 요구되고 있다. 그러나, 소에 브루셀라 감염증이 발병된 경우, 특별한 증상없이 장기간 동안 보균자로 유지하면서, 지속적으로 브루셀라균을 외부로 배출하므로, 조기진단에 어려움이 있을 뿐만 아니라 브루셀라균의 세포내 탐식기전 및 세포내 증식기전에 대한 연구결과가 많지 않아 상기 질환의 근절이 어렵다는 문제가 있다. 또한, 브루셀라균이 체내에 감염된 경우에도 면역원성이 낮아서 면역세포가 형성되기 어렵기 때문에 백신개발에 대한 연구도 성과가 미미한 실정이다.

[0004]

특히, 소에서 브루셀라 감염증이 발병된 경우, 소의 신체 각 부위(특히 간, 비장, 임파절, 혈액 등)에서 균이 높은 농도로 존재하게 되며, 우리나라의 식문화 특성상 육회, 간, 비장, 위 등을 날것으로 섭취하는 경향이 높아 브루셀라 균에 대하여 심각하게 노출되어 있고, 이에 대한 국가적 대책 마련이 시급한 실정이다. 이를 위하여, 브루셀라균을 검출하여 브루셀라 감염증의 발병여부를 확인하고 있으나, 지금까지 알려진 방법으로는 민감도가 낮아서 검출효율이 매우 낮기 때문에, 새로운 진단법의 개발이 요구되고 있으며, 이를 위한 연구도 활발히 진행되고 있다.

[0005]

예를 들어, 한국등록특허 제0260381호에는 브루셀라 아보투스 균주를 항원으로 하여 이를 감작시킨 라텍스비드를 이용한 브루셀라병 진단방법이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1270662호에는 브루셀라 아보투스의 26kDa 제조합 항원 단백질 및 LPS를 이용한 브루셀라 진단방법이 개시되어 있으며, 미국등록특허 제8,691,237호에는 소 브루셀라 단백질이 포함된 조성물을 이용한 브루셀라 진단방법이 개시되어 있으나, 이들 방법을 사용하여도 만족할만한 수준의 진단효율을 얻지 못하고 있는 실정이다.

[0006]

이러한 배경하에서, 본 발명자들은 브루셀라 감염증을 보다 효과적으로 진단할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 소의 브루셀라 감염증을 유발하는 원인균인 *Brucella abortus*에서 발현되는 박테리오페리틴의 항체를 이용한 ELISA 키트를 사용할 경우, 브루셀라 감염증을 효과적으로 진단할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007]

본 발명의 하나의 목적은 박테리오페리틴의 mRNA 수준 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 브루셀라 감염증 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008]

본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 브루셀라 감염증 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0009]

본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물 또는 키트를 이용하여 브루셀라 감염증의 발병여부를 진단하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0010]

본 발명자들은 브루셀라 감염증의 발병여부를 진단하는 방법을 개발하고자 다양한 연구를 수행하던중, 브루셀라 감염증의 발병원인인 브루셀라균에서 발현되는 박테리오페리틴에 주목하게 되었다. 상기 박테리오페리틴의 유전자를 클로닝하여 과발현 시킨 후, 이를 이용하여 ELISA 키트를 제작하고, 이를 이용하여 소의 혈청으로부터 박테리오페리틴을 검출함으로써, 소 브루셀라병의 발병여부를 진단할 수 있음을 확인하였다.

[0011]

따라서, 상기 박테리오페리틴을 소의 혈액으로부터 검출함으로써 브루셀라 감염증의 발병여부를 진단할 수 있음을 확인하였다.

- [0012] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 박테리오페리틴(bacterioferritin, bfr)의 mRNA 수준 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 브루셀라 감염증 진단용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 용어 "박테리오페리틴(bacterioferritin)"이란, 161개의 아미노산으로 구성되고, 이핵성 철 결합센터(binuclear iron centre)와 헴B(haem b)를 포함하는 다중체 단백질을 의미한다. 상기 박테리오페리틴은 페리틴과 유사한 3차 및 4차 구조를 갖는데, 기능적으로도 철이온의 흡수에 관여하는 것으로 알려져 있다. 상기 유전자의 구체적인 염기서열 또는 단백질의 아미노산 서열 정보는 NCBI에 공지되어 있다(GenBank: YP\_223430.1, ACU49688.1 등).
- [0014] 본 발명에 있어서, 상기 박테리오페리틴은 소의 브루셀라균(*Brucella abortus*)에서 발현된 박테리오페리틴이 될 수 있고, 바람직하게는 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되거나 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시된 것이 될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 용어 "브루셀라 감염증(brucellosis)"이란, 다양한 브루셀라균의 감염에 의하여 발병되는 전염병을 의미하는데, 인체에 감염될 경우 10% 미만의 치사율을 보이고, 지속적 발열, 두통, 식욕부진, 원기쇠약을 보이다가 심내막염, 뇌척수염, 관절염 등 중증 질병으로 진행하게 되며, 감염된 동물에서 보이는 증상은 특별한 외부 증상이 없이 암컷에서의 태반염, 자궁 내막염 등으로 인한 유산과 수컷에서 고환염, 기형정자 등으로 인한 불임을 유발한다고 알려져 있다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 상기 브루셀라 감염증은 소의 브루셀라균(*Brucella abortus*)에 의하여 소에서 발병되는 법정 전염병인 소 브루셀라 감염증(bovine brucellosis)을 의미하는 것으로 해석될 수 있으며, 이는 소의 브루셀라균에서 특이적으로 발현되는 박테리오페리틴을 마커로 사용하여 그의 감염여부를 진단할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 용어 "진단"이란, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 진단은 브루셀라 감염증의 발병 여부를 확인하는 것으로 해석될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 용어 "유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제"란, 시료에 포함된 표적 유전자의 발현여부를 확인하기 위하여, 상기 표적 유전자로부터 전사된 mRNA의 수준을 측정하는 방법에 사용되는 제제를 의미하는데, 바람직하게는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), DNA 칩 분석법 등의 방법에 사용되는 표적 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 프로브 또는 프라이머가 될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0019] 본 발명의 용어 "프라이머"란, 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다. 상기 프라이머는 DNA 합성의 시발점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징이 혼입될 수 있다. 또한 프라이머는 필요할 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역 화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지의 예로는, 효소(알칼린 포스파타아제), 방사선 동위원소(예 32P), 형광성 분자, 화학그룹(예 바이오틴) 등이 있다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머는 박테리오페리틴 유전자의 증폭에 사용될 수 있는 프라이머가 될 수 있고, 상기 각 유전자와 상보적으로 결합하여 PCR 방법으로 증폭시킬 수 있는 한, 상기 프라이머의 뉴클레오티드 서열은 제한되지 않는다.

- [0021] 본 발명의 용어 "프로브"란, 유전자 또는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하는데, 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 상기 프로브는 해당 염기서열의 5'과 3'말단에 각각 검출에 이용되는 표지를 포함할 수 있으며, 이러한 표지로는 형광단 또는 소광체가 각각 5'과 3' 말단에 표지될 수 있다. 이에 따라, 프로브에 형광단과 소광체가 서로 결합한 형태로 존재할 때에는 상호 간섭에 따라 발광이 억제되고, 중합효소 연쇄반응을 통하여 프로브가 분해가 이루어지면 프로브에 표지된 형광단과 소광체간의 간섭이 사라져 발광을 하게 된다. 이와 같은 반응으로 시료로부터 인플루엔자 바이러스의 유무를 판단할 수 있다. 상기 5'말단에 표지될 수 있는 형광단으로는 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 형광물질이 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들면 플루오레세인, 6-카르복시플루오레세인, 핵사크로로-6-카르복시플루오레세인, 테트라크로로-6-카르복시플루오레세인, VIC, JOE, 5-(2'-아미노에틸)아미노 나프탈렌-1-술폰산, 쿠마린 및 이의 유도체, 시아닌-5, 루시퍼 엘로우, 텍사스 레드, 테트라메틸로다민, 야키마 엘로우, 칼 플루오르레드 610 등이 사용될 수 있다. 상기 3' 말단에 표지될 수 있는 소광체 또한 당해 분야에서 통상적으로 사용이 되는 소광체는 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들면 테트라메틸로다민, 6-카르복시테트라메틸-로다민, BHQ-1, 2, 3, 4'-벤조산, 4-다이메틸아미노페닐 아조페닐-4'-말레이미드 등이 사용될 수 있다. 이처럼 형광물질이 표지된 프로브를 사용하여 실시간 중합효소 연쇄반응을 수행하고 증폭된 산물을 실시간으로 모니터링 할 수 있어 DNA 와 RNA의 정확한 정량이 가능하고, 또한 전기 영동이 필요 없이 신속하고 간편하며 정확한 진단이 가능하다는 이점을 갖는다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 프로브는 박테리오페리틴 유전자와 상보적으로 결합할 수 있는 프로브가 될 수 있고, 상기 각 유전자와 상보적으로 결합할 수 있는 한, 상기 프로브의 뉴클레오타이드 서열은 제한되지 않는다.
- [0023] 상기 프라이머 또는 프로브는 기본 성질을 변화시키지 않은 추가의 특징의 혼입이 가능하다. 즉, 본 발명에서 목적으로 하는 조류 인플루엔자 바이러스의 HA 유전자형 또는 NA 유전자형을 검출할 수 있는 효과를 나타내는 한, 당해 분야에 공지된 통상적인 수단을 이용하여 올리고 뉴클레오타이드 서열의 변형될 수 있는데, 이러한 변형의 비제한적인 예로는 메틸화, 캡핑, 뉴클레오타이드의 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예 메틸포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 가능하다. 또한 핵산은 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그널 펩티드, 폴리 L 리신등의 단백질, 아크리딘 또는 프소랄렌 등의 삽입제, 금속, 방사성 금속, 철 산화성 금속 등의 킬레이트화제 및 망칼리화제 등의 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기를 가질 수 있다.
- [0024] 본 발명의 용어 "단백질의 수준을 측정하는 제제"란, 시료에 포함된 표적 단백질의 수준을 측정하는 방법에 사용되는 제제를 의미하는데, 바람직하게는 웨스턴 블롯(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩 분석법(protein chip assay) 등의 방법에 사용되는 항체가 될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 용어 "항체"란, 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미하는데, 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있을 뿐만 아니라, 인간화 항체 등의 특수 항체를 포함할 수도 있다. 아울러, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 등이 될 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 항체는 박테리오페리틴 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 될 수 있고, 바람직하게는 상기 박테리오페리틴 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 그 일부가 될 수 있다.

- [0027] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 소 브루셀라 균(*Bruceella abortus*)의 박테리오페리틴 유전자를 클로닝하여 대장균에서 재조합 박테리오페리틴 단백질을 대량으로 생산한 다음, 이의 면역원성을 규명하기 위하여, 브루셀라 감염 소 혈청을 이용한 면역원성을 규명하고(도 1), 정제된 재조합 박테리오페리틴 단백질을 이용하여 제작한 ELISA 키트를 사용하여 브루셀라 감염증에 대한 진단에 사용될 수 있는지를 확인한 결과, 종래의 방법에 비하여 높은 민감도와 특이도를 나타냄을 확인하였다(도 2).
- [0028] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 브루셀라 감염증 진단용 조성물을 포함하는 브루셀라 감염증 진단용 키트를 제공한다.
- [0029] 본 발명의 키트는 브루셀라 감염증이 발병된 소에서 유래된 시료로부터 박테리오페리틴 유전자의 mRNA 수준 또는 박테리오페리틴 단백질의 수준을 측정하여 브루셀라 감염증의 발병여부를 진단하는데 사용될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 유전자의 mRNA 수준 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 측정하기 위한 프라이머, 프로브 또는 항체 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수도 있다.
- [0030] 본 발명의 용어 "시료"란, 소에서 분리되어 박테리오페리틴 유전자 또는 단백질의 발현수준을 측정하는 직접적인 대상을 의미하고, 바람직하게는 소의 혈액, 혈청, 혈장, 조직시료 등이 될 수 있다.
- [0031] 구체적인 일례로서, 본 발명의 박테리오페리틴 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하기 위한 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는, 상기 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조구로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [0032] 다른 일례로서, 본 발명의 키트는 음성 및 양성 대조군 반응을 수행하는데 필요한 시약 또는 혼성화 반응에 필요한 완충액과 같은 시약을 포함할 수 있다. 특정 반응에서 이용되는 시약의 최적량은 본 명세서의 내용을 파악한 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 키트는 분리된 패키지 또는 컴파트먼트에 상술한 성분들을 포함할 수 있다.
- [0033] 또 다른 일례로서, 본 발명의 키트는 DNA 칩 분석법을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 분석용 키트는, 서열번호 23 내지 33 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는 프로브가 부착되어 있는 기관과, 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기관은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다.
- [0034] 또 다른 일례로서, 본 발명의 키트는 박테리오페리틴 단백질의 수준을 측정하기 위한 ELISA 키트 또는 단백질 칩 분석용 키트가 될 수 있는데, 상기 키트는 특별히 이에 제한되지 않으나, 항체의 면역학적 검출을 위하여 기재, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기 기재는 특별히 이에 제한되지 않으나 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 96 웰 플레이트, 폴리스티렌 수지로 합성된 96 웰 플레이트 및 유리로 된 슬라이드글라스 등이 이용될 수 있고, 발색효소는 특별히 이에 제한되지 않으나 퍼옥시다아제(oxidase), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline Phosphatase)가 사용될 수 있으며, 형광물질은 특별히 이에 제한되지 않으나 FITC, RITC 등이 될 수 있고, 발색 기질액은 특별히 이에 제한되지 않으나 ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)) 또는 OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 될 수 있다.
- [0035] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은 상기 브루셀라 감염증 진단용 조성물 또는 키트를

이용하여 브루셀라 감염증의 발병여부를 진단하는 방법을 제공한다.

[0036] 구체적으로, 본 발명에서 제공하는 브루셀라 감염증의 발병여부를 진단하는 방법은 (a) 검사대상 소의 생물학적 시료로부터 박테리오페리틴 유전자의 mRNA 수준 또는 박테리오페리틴 단백질의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 mRNA 수준 또는 이로부터 발현되는 단백질의 수준을 정상 소의 생물학적 시료로부터 측정된 수준과 비교하는 단계를 포함한다. 이때, 소의 생물학적 시료는 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 소의 혈액, 혈청, 혈장, 조직시료 등이 될 수 있다.

[0037] 상기 방법에 있어서, 상기 검사대상 소의 생물학적 시료에서 측정된 박테리오페리틴 유전자의 mRNA 수준 또는 박테리오페리틴 단백질의 수준이 정상 소의 생물학적 시료로부터 측정된 수준과 비교하여 유의하게 증가하는 경우에는 상기 검사대상 소에서 소 브루셀라 감염증이 발병하였다고 판정할 수 있고, 유의하게 증가하지 않은 경우에는 상기 검사대상 소에서 소 브루셀라 감염증이 발병하지 않았다고 판정할 수 있다. 이때, 상기 박테리오페리틴 유전자의 mRNA 수준 또는 박테리오페리틴 단백질의 수준을 측정하는 방법은 상술한 바와 동일하다.

[0038] 상기 진단방법은 브루셀라 감염증이 발병된 소를 대상으로 수행한 것이나, 이는 사람에게 브루셀라 감염증이 발병된 경우에도 동일한 방법으로 수행하여 브루셀라 감염증의 발병여부를 진단할 수 있다.

### 발명의 효과

[0039] 본 발명의 브루셀라 감염증 진단용 조성물 또는 키트를 사용하면, 종래의 기술보다도 높은 수준의 특이도와 정확도로 브루셀라 감염증을 진단할 수 있으므로, 브루셀라 감염증의 효과적인 예방 또는 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 브루셀라 유래 재조합 박테리오페리틴 단백질의 발현 및 면역원성 규명 결과를 나타내는 사진으로서, A는 브루셀라 유래 재조합 박테리오페리틴 단백질의 발현을 나타내는 SDS-PAGE 사진으로, 1번 레인은 크기마커를 나타내고, 2번 레인은 벡터를 나타내며, 3번 레인은 과발현된 재조합 박테리오페리틴을 나타내고, 4번 레인은 정제된 재조합 박테리오페리틴을 나타내며; B는 면역블롯 사진으로, 1번 레인은 감염혈청으로 면역반응시킨 벡터를 나타내고, 2번 레인은 감염혈청으로 면역반응시킨 정제된 재조합 박테리오페리틴을 나타내며, 3번 레인은 비감염혈청으로 면역반응시킨 벡터를 나타내고, 4번 레인은 비감염혈청으로 면역반응시킨 정제된 재조합 박테리오페리틴을 나타낸다.

도 2는 본 발명에서 제공하는 재조합 박테리오페리틴 단백질을 이용한 ELISA 분석을 수행한 결과를 나타내는 그래프로서, 붉은선은 cutoff value를 나타내고, (◆)는 TAT 음성을 나타내며, (□)는 TAT 400을 나타내고, (△)는 TAT 200을 나타내며, (○)은 TAT 100을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

### [0042] 실시예 1: 재조합 박테리오페리틴 단백질의 과발현 및 면역원성 규명

[0043] 본 발명에서 사용된 브루셀라 균주는 *B. abortus* 544균주를 농림축산검역검사본부에서 분양받아 공시하였으며, 재조합 단백질 발현을 위해 *E. coli* DH5α(Introgen)을 이용하였다. 상기 브루셀라 균주를 *Brucella* broth(BD, USA)를 사용하여 배양하고, *E. coli* 균은 LB broth (BD, USA)를 사용하여 37°C에서 하루동안 진탕배

양하였다. 고형배지의 경우 동일한 종류의 broth에 1.5%(w/v) 아가로스(Takara, Japan)를 첨가하고, 필요에 따라 항생제인 암피실린(100 mg/ml)을 첨가하였다.

[0044] 브루셀라 균주의 총 게놈 DNA는 하루동안 배양된 브루셀라균 5ml를 원심분리하고, bacteria genomic DNA purification kit(Intron, Korea)를 이용하여 수득하였다. 상기 수득한 총 게놈 DNA를 주형으로 하고, 하기의 프라이머를 사용한 PCR을 수행하여 박테리오페리틴(bfr) 유전자를 증폭시켰다.

[0045] 정방향 프라이머: 5'-AGCGGATCCATGAAAGGCGAACCAAGGTC-3'(서열번호 3)

[0046] 역방향 프라이머: 5'-ATCCTGCAGTTACTCAGCTTCGTCGGCGGG-3'(서열번호 4)

[0047] 증폭된 bfr 유전자를 pCold vector (Takara, Japan)에 삽입하여, 발현벡터를 수득하고, 상기 수득한 발현벡터를 *E. coli* DH5 α에 도입하여 형질전환체를 수득하였으며, 상기 수득한 형질전환체를 암피실린(100 µg/ml)이 포함된 LB 배지에서 배양하고, 0.4 mM IPTG를 가하여 상기 bfr 유전자의 발현을 유도한 후, 15℃에서 24시간 동안 진탕배양하였다. 배양이 종료된 후, 배양물을 5,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 균체를 수득하고, 상기 균체를 Histalon buffer set (Takara, Japan)에 적용하여 재조합 박테리오페리틴 단백질을 정제하였으며, 이를 SDS-PAGE를 사용하여 확인하였다(도 1의 A).

[0048] 한편, 정제된 재조합 박테리오페리틴 단백질을 대상으로, *B. abortus* 비감염혈청 또는 감염혈청을 이용한 웨스턴블롯 분석을 수행하여, 상기 재조합 박테리오페리틴 단백질의 면역원성을 분석하였다. 이때, 상기 *B. abortus* 비감염혈청 또는 감염혈청은 농림축산검역검사본부에서 입수하였다(도 1의 B).

[0049] 도 1은 브루셀라 유래 재조합 박테리오페리틴 단백질의 발현 및 면역원성 규명 결과를 나타내는 사진으로서, A는 브루셀라 유래 재조합 박테리오페리틴 단백질의 발현을 나타내는 SDS-PAGE 사진으로, 1번 레인은 크기마커를 나타내고, 2번 레인은 벡터를 나타내며, 3번 레인은 과발현된 재조합 박테리오페리틴을 나타내고, 4번 레인은 정제된 재조합 박테리오페리틴을 나타내며; B는 면역블롯 사진으로, 1번 레인은 감염혈청으로 면역반응시킨 벡터를 나타내고, 2번 레인은 감염혈청으로 면역반응시킨 정제된 재조합 박테리오페리틴을 나타내며, 3번 레인은 비감염혈청으로 면역반응시킨 벡터를 나타내고, 4번 레인은 비감염혈청으로 면역반응시킨 정제된 재조합 박테리오페리틴을 나타낸다. 도 1에서 보듯이, *B. abortus* 균주로부터 유래된 재조합 박테리오페리틴 단백질을 생산하고, 이를 SDS-PAGE로 확인한 결과, 약 78kDa의 재조합 박테리오페리틴 단백질을 생산하고(도 1의 A), 상기 생산된 재조합 박테리오페리틴 단백질은 *B. abortus* 균주의 감염에 의한 것과 동일한 면역원성을 나타냄(도 1의 B)을 확인하였다.

## [0050] 실시예 2: 재조합 박테리오페리틴 단백질을 이용한 ELISA 진단법 개발

[0051] ELISA에 사용된 혈청은 2013-2014년도에 채집된 국내 한우혈청을 이용하였다. 사용된 혈청은 시험관응집반응(tube agglutination test; TAT)를 통하여 브루셀라 감염여부를 측정하였고, 양성은 136개, 음성은 120개로 총 256개를 사용하였다. ELISA 측정을 위해 사용된 플레이트(Maxibinding, SPL Life Sciences)에 50µl 재조합 박테리오페리틴(6µg/ml)을 phosphate coating buffer (0.1M, pH 9.6)에 혼합하여, 4℃에서 24시간 coating을 수행하였고, 그 후 200µl의 0.5 % PBS-T를 이용하여 3회 세척한 후 200µl의 blocking buffer(5% skim milk in PBS-T)를 이용하여 실온에서 2시간 반응을 수행하였다. 플레이트는 반응이 끝난 후에 200µl의 0.5 % PBS-T를 이용하여 3회 세척한 후 혈청을 blocking buffer에 1:200배로 희석하여 4℃에서 24시간동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 상기 플레이트를 0.05 % PBS-T로 4회 세척하고, 100µl의 HRP-conjugate protein G를 첨가하여 실온에서 2시간동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 상기 플레이트를 0.05 % PBS-T로 다시 5회 세척하고, 100µl의 O-phenylenediamine(OPD)를 첨가하여 15분간 실온에서 반응시킨 후, 492 nm의 파장 ELISA reader(BioTek, Seoul, Korea)를 이용하여 반응값을 측정함으로써, ELISA 진단법을 확립하였다.

[0052] 상기 설정된 ELISA 진단법을 재조합 박테리오페리틴 단백질의 혈청학적 진단에 응용하기 위하여, Tube agglutination test (TAT)시험에서 판정된 양성혈청 136개 (TAT 400; 56, 200; 40, 100; 40)와 음성혈청 120개를 이용하여 분석을 수행하였다(도 2).

[0053] 도 2는 본 발명에서 제공하는 재조합 박테리오페리틴 단백질을 이용한 ELISA 분석을 수행한 결과를 나타내는 그래프로서, 붉은선은 cutoff value를 나타내고, (◆)는 TAT 음성을 나타내며, (□)는 TAT 400을 나타내고, (△)는 TAT 200을 나타내며, (○)은 TAT 100을 나타낸다.

[0054] 상기 도 2에서 측정된 값의 평균값을 산출하였다(표 1).

표 1

[0055] 재조합 박테리오페리틴 항체를 포함하는 ELISA 키트에 소의 혈청을 가하여 측정한 흡광도

|        | 음성(n=120)   | TAT 400(n=56) | TAT 200(n=40) | TAT 100(n=40) |
|--------|-------------|---------------|---------------|---------------|
| 평균 흡광도 | 0.078±0.051 | 0.434±0.12    | 0.331±0.086   | 0.284±0.105   |

[0056] 상기 표 1에서 보듯이, 음성혈청의 경우 ELISA 값은 0.078±0.051을 나타내고, TAT 400은 0.434±0.12을 나타내며, TAT 200은 0.331±0.086을 나타내고, TAT 100은 0.284±0.105를 나타내었다. 아울러, cut off value는 브루셀라 음성 혈청값의 평균에 두배를 곱한 값(0.156)으로 설정하였다.

[0057] 한편, 앞서 사용된 136개의 양성시료와 120개의 음성시료를 대상으로 분석하였다(표 2).

표 2

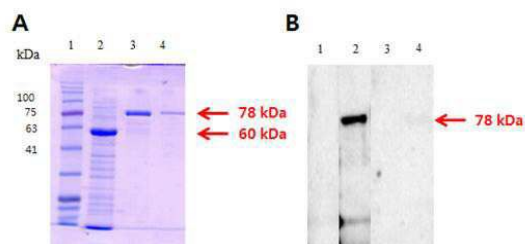
[0058] 표준 TAT(tube agglutination test)와 비교한 재조합 박테리오페리틴 항체 기반 ELISA의 분석능 평가결과

| ELISA |    | TAT 양성(n=136) | TAT 음성(n=120) |
|-------|----|---------------|---------------|
|       | 양성 | 122           | 5             |
|       | 음성 | 14            | 115           |

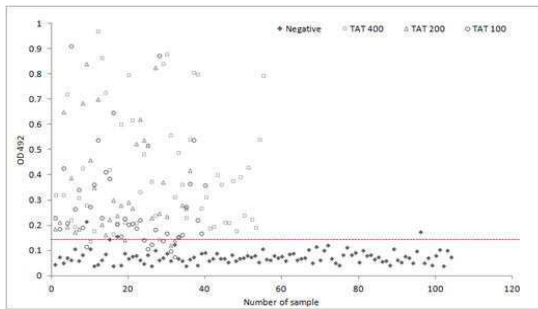
[0059] 표 2에서 보듯이, 136개의 TAT 양성값을 보인 혈청은 ELISA 에서 122개가 양성으로 나와 민감도가 89.71%(122/136)를 보였고, 음성혈청의 경우 120개에서 115개의 음성값을 보여 특이도가 95.83%(115/120)을 나타냈으며, 정확도는 92.58%(237/256)를 나타낼 수 있었다.

## 도면

### 도면1



## 도면2



## 서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Diagnostic method for brucellosis using bacterioferritin

<130> KPA140335-KR

<160> 4

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 483

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> bacterioferritin cDNA

<400> 1

atgaaaggcg aaccaaaggc catcgagcgg cttaacgagg cactgtttct tgagctcggt 60

gcggtaaacc agtattggct gcactaccgt cttctcaacg attgggggtta cacgcgcctt 120

gcaaagaagg aacgcgagga atccatcgag gaaatgcatc acgccgacaa gctgattgat 180

cgcattatct tccttgaagg ctttccgaac ctccagaccg tttcgccgtt gcgcattggc 240

cagaatgtga aggaagtctt cgaagctgac ctcaagggtg aatatgacgc tcgcgcttcg 300

tataaggaat cgcgcgaaat ctgcgacaag ctcggcgact atgtgtcgaa gcagcttttc 360

gacgaacttc tggccgatga agaaggccat atcgacttcc ttgaaacca gcttgacctt 420

ctcgccaaga tcggcggaga acgctatggc cagcttaacg cggcgccgcg cgacgaagct 480

gag 483

<210> 2

<211> 161

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant bacterioferritin

<400> 2

Met Lys Gly Glu Pro Lys Val Ile Glu Arg Leu Asn Glu Ala Leu Phe

1 5 10 15

Leu Glu Leu Gly Ala Val Asn Gln Tyr Trp Leu His Tyr Arg Leu Leu

20 25 30

Asn Asp Trp Gly Tyr Thr Arg Leu Ala Lys Lys Glu Arg Glu Glu Ser

35 40 45

Ile Glu Glu Met His His Ala Asp Lys Leu Ile Asp Arg Ile Ile Phe

50 55 60

Leu Glu Gly Phe Pro Asn Leu Gln Thr Val Ser Pro Leu Arg Ile Gly

65 70 75 80

Gln Asn Val Lys Glu Val Leu Glu Ala Asp Leu Lys Gly Glu Tyr Asp

85 90 95

Ala Arg Ala Ser Tyr Lys Glu Ser Arg Glu Ile Cys Asp Lys Leu Gly

100 105 110

Asp Tyr Val Ser Lys Gln Leu Phe Asp Glu Leu Leu Ala Asp Glu Glu

115 120 125

Gly His Ile Asp Phe Leu Glu Thr Gln Leu Asp Leu Leu Ala Lys Ile

130 135 140

Gly Gly Glu Arg Tyr Gly Gln Leu Asn Ala Ala Pro Ala Asp Glu Ala

145 150 155 160

Glu

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 3

agcggatcca tgaaggcga accaaaggtc

<210> 4

30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 4

atcctgcagt tactcagctt cgtcggcggg

30