



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0131324
(43) 공개일자 2023년09월13일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12Q 1/6888</i> (2018.01) <i>C12Q 1/6818</i> (2018.01)
 <i>C12Q 1/6834</i> (2018.01) <i>C12Q 1/686</i> (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12Q 1/6888</i> (2018.05)
 <i>C12Q 1/6818</i> (2018.05)</p> <p>(21) 출원번호 10-2022-0027480
 (22) 출원일자 2022년03월03일
 심사청구일자 2022년03월03일</p> | <p>(71) 출원인
 한림대학교 산학협력단
 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)</p> <p>(72) 발명자
 김철우
 서울특별시 강남구 삼성로 151, 4동 703호 (대치동, 선경아파트)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인본</p> |
|---|---|

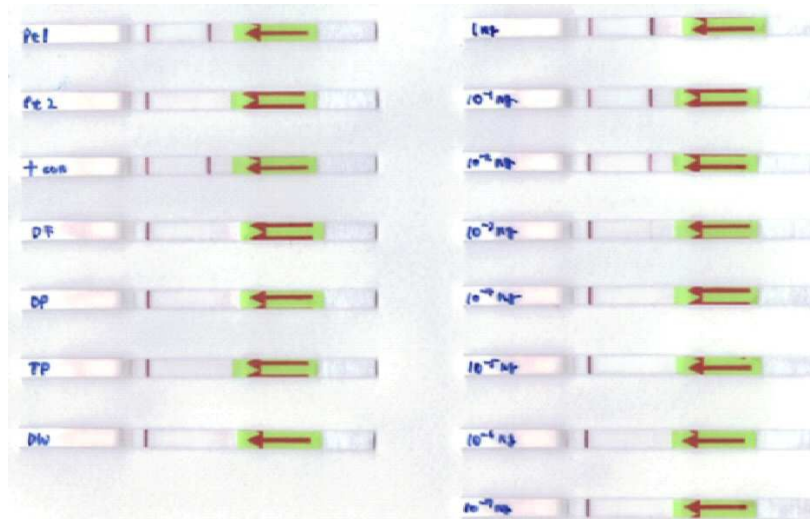
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **핵산 기반의 측면 흐름 분석을 이용한 옴진드기 진단용 정보 제공 방법**

(57) 요약

본 발명은 핵산 기반의 측면 흐름 분석을 이용한 본 발명은 옴진드기 감염의 진단 및 치료 모니터링을 위한 정보 제공 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 옴진드기 계놈을 검출하기 위한 PCR 실시 후, 추가적인 프로브 및 고가의 장비 없이 결과를 확인할 수 있는 옴진드기 감염의 진단 및 치료 모니터링을 위한 정보 제공 방법을 제공할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6834 (2018.05)

C12Q 1/686 (2018.05)

C12Q 2565/625 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711145932
과제번호	2020R1F1A1054401
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기본연구
연구과제명	사람 옮진드기 감염 진단을 위한 간편검사법의 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2020.06.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

옴진드기 진단을 위한 정보 제공 방법으로,
개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 라벨링된 PCR 산물을 수득하는 단계;
탐지입자를 상기 PCR 산물에 추가하여 컨쥬게이트 용액을 수득하는 단계; 및
지지체에 상기 컨쥬게이트 용액을 처리하는 단계;를 포함하는 것이고,
상기 PCR 산물은 제1 표지부 및 제2 표지부를 포함하는 것이고,
상기 탐지입자는 제3 표지부를 포함하고, 상기 제1 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 것이고,
상기 지지체는 상기 제2 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 검출부; 및 상기 제3 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 검출부;를 포함하는,
옴진드기 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 제1 표지부는 플루오레세인이소티오시안산염(FITC)인 것인, 정보 제공 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 제2 표지부는 비오틴(Biotin) 또는 이의 유도체인 것인, 정보 제공 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,
상기 제1 검출부는 아비딘(avidin), 스트렙트아비딘(streptavidin), 뉴트라비딘(neutravidin) 및 캡트아비딘(captavidin)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것인, 정보 제공 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 PCR 산물은 PCR 주기를 32회 내지 34회 수행하여 얻어지는 것인, 정보 제공 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,
상기 PCR 주기는,

92℃ 내지 97℃에서 30초 내지 90초 동안 수행되는 변성(denaturation) 과정;
63℃ 내지 66℃에서 30초 내지 90초 동안 수행되는 결합(annealing) 과정; 및
70℃ 내지 74℃에서 30초 내지 90초 동안 수행되는 신장(extension) 과정;을 포함하는 것인, 정보 제공 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,
상기 PCR 산물은 cox1 유전자를 증폭시키기 위한 것인, 정보 제공 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,
상기 PCR 산물은 서열번호 6의 프라이머 및 서열번호 7의 프라이머에 의해 얻어지는 것인, 정보 제공 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,
상기 제1 검출부가 반응하지 않고, 제2 검출부가 반응할 경우, 음진드기가 감염된 것으로 판단하고,
상기 제1 검출부 및 제2 검출부가 모두 반응할 경우, 음진드기에 감염된 것으로 판단하는 것인, 정보 제공 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,
상기 cox1 유전자는 사람 음진드기(*Sarcoptes scabiei* var *hominis*)에서 유래된 것인, 정보 제공 방법.

청구항 11

제1 표지부로 라벨링 된 제1 프라이머;
제2 표지부로 라벨링 된 제2 프라이머;
제3 표지부를 포함하고, 상기 제1 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 탐지입자; 및
제1 검출부 및 제2 검출부를 포함하는 지지체;를 포함하고,
상기 지지체는 상기 제2 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 검출부; 및 상기 제3 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 검출부;를 포함하는 음진드기 진단을 위한 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,
제1 표지부는 플루오레세인이소티오시안산염(FITC)인 것인, 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,
제2 표지부는 비오틴(Biotin) 또는 이의 유도체인 것인, 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서,
상기 제1 프라이머 및 상기 제2 프라이머는 *cox1* 유전자를 증폭시키기 위한 것인, 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,
상기 제1 프라이머는 서열번호 6의 염기서열을 포함하고,
상기 제2 프라이머는 서열번호 7의 염기서열을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 16

제11항 내지 제 15항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 옴진드기 진단을 위한 키트.

청구항 17

제11항 내지 제 15항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 옴진드기 진단을 위한 진단 장치.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 핵산 기반의 측면 흐름 분석을 이용한 본 발명은 옴진드기 감염의 진단 및 치료 모니터링을 위한 정보 제공 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 옴진드기 계놈을 검출하기 위한 PCR 실시 후, 추가적인 프로브 및 고가의 장비 없이 결과를 확인할 수 있는 옴진드기 감염의 진단 및 치료 모니터링을 위한 정보 제공 방법을 제공할 수 있다.

배경 기술

[0002] 밤에 가려움증을 유발하는 증상을 발생시키는 옴(Scabies)은 옴진드기(*Sarcoptes scabiei*)의 피부 기생에 의해, 약 4주 내지 6주의 잠복기를 거쳐 발병하는 매우 전염성이 강한 감염성 질환이다. 옴은 일반적으로 저소득 국가 또는 중간 소득 국가에 널리 퍼져 있는 질병이지만, 고소득 국가의 노인요양시설에서의 발병률이 점차 증가하고 있다. 한국에서도 1980년 말 이후에 옴의 발병 빈도는 크게 감소했으나, 최근 병원 및 양로원 등에서 옴 발병률이 증가하고 있다. 한편, 옴은 면역 저하 환자, 영유아 또는 노인 및 결정성 옴을 포함하는 특정 경우에 특이한 임상적 특징을 나타낼 수 있으므로, 대부분의 의사들이 옴을 진단할 때 임상적 증상에 의존한다면, 옴을 다른 피부병과 구별하는 것이 어려울 수 있다. 또한, 옴은 전염성이 강하기 때문에, 진단이 늦어지면 가족 구성원에게 전염될 수 있고, 병원의 경우 옴이 다른 환자, 간병인 및 의료진에게 전염될 수 있으므로, 임시 병원 폐쇄가 발생할 수 있다.

[0003] 옴진드기는 대략 200 μ m 내지 450 μ m의 크기로 매우 작기 때문에, 육안으로 관찰할 수 없어, 옴진드기 감염 검사는 일반적으로 환자의 피부를 미세랄 오일로 긁어내어, 이를 슬라이드 글라스로 옮긴 후, 현미경으로 진드기 또는 알을 동정하는 방법으로 수행된다. 그러나, 상기 검사의 신뢰도는 0.46(95% 신뢰구간 0.31 내지 0.62로 매우

낮기 때문에, 상기 현미경 검사에서 음성으로 진단되어도 옴진드기 감염을 배제할 수 없다는 문제점이 있다 (Arch Dermatol 2011; 147:468-73).

[0004] 더모스코피(Dermoscopy; DS)는 일반적으로 모반(naevi), 지루 각화증(seborrheic keratosis) 또는 흑색종(melanoma)과 같은 양성색소병변의 감별 진단을 위한 도구로서 유용하게 사용되었으며, 옴을 진단하는데 있어서 효과적이고 편리하게 사용될 수 있다고 알려졌다. 더모스코피에 기반한 피부찰과 표본 현미경 검사(dermoscopy-guided skin scraping with microscopic examination; DSGSS-ME)는 옴 진단뿐만 아니라 치료 효능을 평가하는데 이용될 수 있다. 그러나, 더모스코피를 이용하는 방법은 오랜 훈련이 필요하다는 문제점이 있다. 한편 대체 진단 도구로 몇 가지 기존 PCR이 도입되었지만, 겔 제작 및 PCR product의 loading, 전기영동을 수행해야 하기 때문에 더 많은 시간과 비용, 노력이 필요한 문제가 있다.

[0005] 한편, 측면 유동 분석법(lateral flow assay; LFA)은 특정 항원 또는 항체의 신속한 검출을 위하여 널리 사용되고 있지만, 주로 단백질 검출 기반으로, 민감도가 낮아 위음성 결과가 나올 위험성이 있는 문제점이 있어, 민감도가 높으면서도 저렴한 비용의 옴진드기 검출 방법의 개발이 절실하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2010-0035644
(특허문헌 0002) 한국공개특허 10-2007-0074626

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 본 발명은 상기한 실정을 고려하여 종래 기술들에서 야기되는 여러가지 결점 및 문제점들을 해결하고자 하는 것으로, 옴진드기 감염 여부를 진단하고 동시에 치료 후 모니터링이 가능한, 옴진드기 감염의 진단 및 치료 모니터링을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 옴진드기 진단을 위한 정보 제공 방법으로, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 라벨링된 PCR 산물을 수득하는 단계; 탐지입자를 상기 PCR 산물에 추가하여 컨쥬게이트 용액을 수득하는 단계; 및 지지체에 상기 컨쥬게이트 용액을 처리하는 단계;를 포함하는 것이고, 상기 PCR 산물은 제1 표지부 및 제2 표지부를 포함하는 것이고, 상기 탐지입자는 제3 표지부를 포함하고, 상기 제1 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 것이고, 상기 지지체는 상기 제2 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 검출부; 및 상기 제3 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 검출부;를 포함하는, 정보 제공 방법이 제공된다.

[0010] 또한 본 발명에서, 상기 제1 표지부는 플루오레세인이소티오시안산염(FITC)인 것일 수 있다.

[0011] 또한 본 발명에서, 상기 제2 표지부는 비오틴(Biotin) 또는 이의 유도체인 것일 수 있다.

[0012] 또한 본 발명에서, 상기 제1 검출부는 아비딘(avidin), 스트렙타아비딘(streptavidin), 뉴트라비딘(neutravidin) 및 캡트아비딘(captavidin)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

- [0013] 또한 본 발명에서, 상기 PCR 산물은 PCR 주기를 32회 내지 34회 수행하여 얻어지는 것일 수 있다.
- [0014] 또한 본 발명에서, 상기 PCR 주기는, 92℃ 내지 97℃에서 30초 내지 90초 동안 수행되는 변성(denaturation) 과정; 63℃ 내지 66℃에서 30초 내지 90초 동안 수행되는 결합(annealing) 과정; 및 70℃ 내지 74℃에서 30초 내지 90초 동안 수행되는 신장(extension) 과정;을 포함하는 것일 수 있다.
- [0015] 또한 본 발명에서, 상기 PCR 산물은 *cox1* 유전자를 증폭시키기 위한 것일 수 있다.
- [0016] 또한 본 발명에서, 상기 PCR 산물은 서열번호 6의 프라이머 및 서열번호 7의 프라이머에 의해 얻어지는 것일 수 있다.
- [0017] 또한 본 발명에서, 상기 제1 검출부가 반응하지 않고, 제2 검출부가 반응할 경우, 옴진드기가 감염된 것으로 판단하고, 상기 제1 검출부 및 제2 검출부가 모두 반응할 경우, 옴진드기에 감염된 것으로 판단하는 것일 수 있다.
- [0018] 또한 본 발명에서, 상기 *cox1* 유전자는 사람 옴진드기(*Sarcoptes scabiei* var *hominis*)에서 유래된 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 제1 표지부로 라벨링 된 제1 프라이머; 제2 표지부로 라벨링 된 제2 프라이머; 제3 표지부를 포함하고, 상기 제1 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 탐지입자; 및 제1 검출부 및 제2 검출부를 포함하는 지지체;를 포함하고, 상기 지지체는 상기 제2 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 검출부; 및 상기 제3 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 검출부;를 포함하는 옴진드기 진단을 위한 조성물을 제공할 수 있다.
- [0020] 또한 본 발명에서, 제1 표지부는 플루오레세인이소티오시안산염(FITC)인 것일 수 있다.
- [0021] 또한 본 발명에서, 제2 표지부는 비오틴(Biotin) 또는 이의 유도체인 것일 수 있다.
- [0022] 또한 본 발명에서, 상기 제1 프라이머 및 상기 제2 프라이머는 *cox1* 유전자를 증폭시키기 위한 것일 수 있다.
- [0023] 또한 본 발명에서, 상기 제1 프라이머는 서열번호 6의 염기서열을 포함하고, 상기 제2 프라이머는 서열번호 7의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물을 포함하는, 옴진드기 진단을 위한 키트를 제공할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물을 포함하는, 옴진드기 진단을 위한 진단 장치를 제공할 수 있다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명에 따른 옴진드기 진단 방법, 진단용 조성물, 진단 키트 및 진단 장치는 기존 PCR에서 젤을 만들고, PCR 산물을 로딩하고, 전기영동을 수행하고, UV 조명 하에서 결과를 시각화하는 과정을 생략하여 진단에 소요되는 시간이 줄어들 수 있다. 또한, 진단을 위한 열 순환기, 전기 영동 챔버, 젤 제조기, 전원 공급 장치, UV 조명기 및 카메라 시스템에 소요되는 비용을 절감할 수 있다. 또한, Real-Time PCR과 비교하여, 추가적인 프로브 준비와 고가의 장비가 불필요한 효과를 가진다.
- [0027] 이에 따른 각 진단 방법에 소요되는 비용을 1달러당 1,112원 환율 기준으로 추산하면(플라스틱 소모품 비용 제외), conventional PCR에 소요되는 비용은 약 \$23,843로 추산되고, Real-Time PCR에 소요되는 비용은 \$34,935로 추산되는 것에 비하여, 본 발명의 NALFA 실시예에 소요되는 비용은 \$23,843로 추산되는 바, 이를 비교하면, 1 (NALFA) : 2.46 (conventional PCR) : 3.61 (nRT-qPCR)로 나타낼 수 있다. 또한, 소요되는 시간(분)의 비율은 5 (NALFA) : 90 (conventional PCR) : 1 (nRT-qPCR)로 추산되었다.
- [0028] 따라서 본 발명은 개발도상국이나 선진국에서도 DS 및 MS에 숙련된 피부과 전문의가 없는 요양원과 같이 자원이 열악한 환경에서 더 유용한 것으로 보이며, 또한 nRT-qPCR과 함께 NALFA를 시행하면 옴진단경력 10년 이상의 피부과 전문의가 시행하는 DS, MS와 동일하거나 더 민감한 결과를 얻을 수 있다.
- [0029] 본 발명의 효과들은 이상에서 언급된 효과로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 본 명세서의 나

머지 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 진단 키트의 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 키트의 움 진드기 검출 민감도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원 시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0032] 한편, 본 명세서에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0033] 본 명세서에서 "유도체(derivative)"는 어떤 화합물의 일부를 화학적으로 변화시켜서 얻어지는 유사한 화합물이다. 보통은 화합물 중의 수소원자 또는 특정 원자단이 다른 원자 또는 원자단에 의하여 치환된 화합물을 말한다.

[0034] 또한 본 명세서에서 어떤 구성요소가 다른 구성요소에 "연결되어" 있다거나 "라벨링되어" 있다거나 "접속되어" 있다고 언급된 때에는, 그 다른 구성요소에 직접적으로 연결되어 있거나 또는 접속되어 있을 수도 있지만, 중간에 다른 구성요소가 존재할 수도 있다고 이해되어야 할 것이다.

[0035] 또한 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 출원에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0036] 본 발명의 용어, "움진드기(Sarcoptes scabiei)"는 동물 등의 피부 속에서 체외 기생하는 기생충으로서 "움벌레"로도 불리우며, 전염성 피부질환인 움(scabies)을 유발하는 것으로 알려져 있다. 움진드기는 사람 움진드기(Sarcoptes scabiei var hominis), 개 움진드기(Sarcoptes scabiei var canis) 및 돼지 움진드기(Sarcoptes scabiei var suis) 등이 알려져 있다.

[0037] 본 발명의 움진드기 감염 진단용 조성물은 사람 움진드기(Sarcoptes scabiei var hominis)의 감염을 진단하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 용어 "움(scabies)"은 전세계적으로 많은 인구가 걸리는 흔한 전염성 피부 질환으로 인종, 연령, 수입과 상관없이 걸릴 수 있다. 움의 증상은 습진, 아토피 피부염, 접촉성 피부염, 벌레물림, 담마진, 농가진과 증상이 유사 하기 때문에, 움 진단시 오진의 가능성이 있다. 또한, 움은 움진드기가 기생한 지 약 1개월이 지나야 증상을 느낄 수 있으므로 가족 또는 같이 사는 사람이 증상이 없다고 해서 치료를 받지 않으면 계속 재감염될 수 있으므로 동시에 치료받는 것이 매우 중요하다.

[0039] 본 발명에서, 용어 "개체"는 움진드기 감염이 의심되거나 움진드기 감염증이 치료중인 모든 생물체를 의미하며,

구체적인 예로, 마우스, 원숭이, 소, 돼지, 미니돼지, 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물, 양식어류 등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명에서는 "옴진드기 감염"과 "옴 발병"은 혼용되어 사용될 수 있다.

[0041] 본 발명에서, 용어 "시료" 내지 "생물학적 시료"는 옴진드기 감염이 발생하거나 발생한 것으로 의심되는 개체로부터 유래된 임의의 물질, 생물학적 체액, 조직 또는 세포를 의미하는 것으로, 예를 들면, 전혈(whole blood), 백혈구(leukocytes), 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells), 백혈구 연층(buffy coat), 혈장(plasma), 혈청(serum), 객담(sputum), 눈물(tears), 점액(mucus), 세비액(nasal washes), 비강 흡인물(nasal aspirate), 호흡(breath), 소변(urine), 정액(semen), 침(saliva), 복강 세척액(peritoneal washings), 복수(ascites), 낭종액(cystic fluid), 뇌척수막 액(meningeal fluid), 양수(amniotic fluid), 선액(glandular fluid), 췌장액(pancreatic fluid), 림프액(lymph fluid), 흉수(pleural fluid), 유두 흡인물(nipple aspirate), 기관지 흡인물(bronchial aspirate), 활액(synovial fluid), 관절 흡인물(joint aspirate), 기관 분비물(organ secretions), 세포(cell), 세포 추출물(cell extract) 또는 뇌척수액(cerebrospinal fluid)을 포함할 수 있고, 일 예로 개체의 피부 각질에서 채취한 시료인 것일 수 있다.

[0042] 본 발명에서, 용어 "대조군"은 옴진드기 감염이 발생하지 않은 일반 개체 또는 옴진드기 감염이 발생한 뒤 회복된 개체를 의미하는 것일 수 있다.

[0043] 본 발명에서, 용어 "마커" 내지 "바이오 마커"는 생명체의 변화를 탐지할 수 있어 생명체의 정상 또는 병리적인 상태, 약물에 대한 반응 정도 등을 객관적으로 측정할 수 있는 것이다. 일 예로, 본 발명의 마커는 옴진드기 미토콘드리아의 cox1 유전자일 수 있다.

[0044] 본 발명에서, 용어 "진단"은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상(subject)의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 대상이 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상의 예후(prognosis)를 예측 내지 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다. 본 발명의 목적상, 상기 진단은 상기한 옴진드기 감염의 중증도 내지 예후를 판별하는 것이다.

[0045] 본 발명에서, 용어 "검출"은 검출하고자 하는 바이오 마커의 존재 여부, 생물학적 시료 내의 농도, 발현 수준 등을 측정하고 비교하기 위한 것일 수 있고, 상기 검출 결과 바이오 마커 수준의 증가는 상기 바이오 마커를 인코딩하는 유전자의 수의 증가, 유전자 전사의 증가(예를 들어, 구성성 프로모터의 제어 하에 유전자를 배치함으로써), 유전자의 번역의 증가, 경쟁 유전자의 낙아웃 또는 이들 및/또는 다른 방법의 조합을 포함하는 다수의 방법에 의할 수 있고, 이는 생물학적 시료 내 농도의 증가로 이어질 수 있다. 반면, 바이오 마커 수준의 감소는 유전자 수의 감소, 유전자의 전사의 감소, 경쟁 유전자의 발현 등에 의할 수 있고, 이는 생물학적 시료 내 농도의 감소로 이어질 수 있다. 일 예로, 개체의 코셉틴(copeptin) 수준이 대조군보다 높다는 것은, 상기 개체로부터 유래된 시료에 포함된 코셉틴(copeptin)이 대조군으로부터 유래된 시료에 포함된 코셉틴(copeptin)보다 농도가 높거나, 양이 많은 것을 의미하는 것일 수 있다.

[0046] 본 발명에서, 상기 바이오 마커들을 검출하는 제제는 특별히 제한하지는 않으나, 예를 들면 상기 바이오 마커에 특이적으로 결합하는 항체, 올리고펩티드, 리간드, PNA(peptide nucleic acid) 및 앵타머(aptamer)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명에서 상기 "항원"과 상기 "항체"는 서로 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 일 예로, 상기 항원은 제1 표지부와, 제2 표지부와 같이 검출하고자 하는 DNA 가닥에 라벨링 또는 태깅될 수 있고, 제3 표지부와 같이 탐지부에 연결된 것일 수 있으며, 상기 항체로는 제1 표지부를 항원으로 인식하는 탐지입자; 제2 표지부를 항원으로 인식하는 제1 검출부; 및 제3 표지부를 항원으로 인식하는 제2 검출부;를 들 수 있다.

[0048] 본 발명의 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기 단백질의 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 과정을 포함하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물로부터 제조될 수 있다. 또한, 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method; Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리 기술(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991 참조)을 이

용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전장의 경쇄 및 2개의 전장의 중쇄를 갖는 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')₂ 및 Fv 등이 있다.

[0049] 본 발명에서 상기 "PNA(Peptide Nucleic Acid)"는 인공적으로 합성된, DNA 또는 RNA와 비슷한 중합체를 가리키며, 1991년 덴마크 코펜하겐 대학교의 Nielsen, Egholm, Berg와 Buchardt 교수에 의해 처음으로 소개되었다. DNA는 인산-리보스당 골격을 갖는데 반해, PNA는 펩티드 결합에 의해 연결된 반복된 N-(2-아미노에틸)-글리신 골격을 가지며, 이로 인해 DNA 또는 RNA에 대한 결합력과 안정성이 크게 증가되어 분자 생물학, 진단 분석 및 안티센스 치료법에 사용되고 있다. PNA는 문헌[Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O (December 1991). "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide". Science 254(5037): 1497-1500]에 상세하게 개시되어 있다.

[0050] 본 발명에서 상기 "애타머"는 올리고핵산 또는 펩티드 분자이며, 애타머의 일반적인 내용은 문헌[Bock LC et al., Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". J Mol Med. 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". Proc Natl Acad Sci USA. 95(24): 142727(1998)]에 상세하게 개시되어 있다.

[0051] 본 발명에서 상기 바이오 마커들을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명에서 상기 "프라이머"는 표적 유전자 서열을 인지하는 단편으로서, 정방향 및 역방향의 프라이머 쌍을 포함하나, 바람직하게는, 특이성 및 민감성을 가지는 분석 결과를 제공하는 프라이머 쌍이다. 프라이머의 핵산 서열이 시료 내 존재하는 비-표적 서열과 불일치하는 서열이어서, 상보적인 프라이머 결합 부위를 함유하는 표적 유전자 서열만 증폭하고 비특이적 증폭을 유발하지 않는 프라이머일 때, 높은 특이성이 부여될 수 있다.

[0053] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은, 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성 (substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, '실질적인 동일성'은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.

[0054] 본 발명에서 상기 "안티센스"는 안티센스 올리고머가 왓슨-크릭 염기쌍 형성에 의해 RNA 내의 표적 서열과 혼성화되어, 표적서열 내에서 전형적으로 mRNA와 RNA:올리고머 헤테로이중체의 형성을 허용하는, 뉴클레오티드 염기의 서열 및 서브유닛 간 백본을 갖는 올리고머를 의미한다. 올리고머는 표적 서열에 대한 정확한 서열 상보성 또는 근사 상보성을 가질 수 있다.

[0055] 본 발명의 일 구현 예에 따르면,

[0056] 음진드기 진단을 위한 정보 제공 방법으로, 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 라벨링된 PCR 산물을 수득하는 단계; 탐지입자를 상기 PCR 산물에 추가하여 컨쥬게이트 용액을 수득하는 단계; 및 지지체에 상기 컨쥬게이트 용액을 처리하는 단계;를 포함하는 것이고, 상기 PCR 산물은 제1 표지부 및 제2 표지부를 포함하는 것이고, 상기 탐지입자는 제3 표지부를 포함하고, 상기 제1 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 것이고, 상기 지지체는 상기 제2 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 검출부; 및 상기 제3 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 검출부;를 포함하는, 정보 제공 방법이 제공된다.

[0057] 본 발명에서, 상기 제1 표지부는 FITC, 로다민 또는 란타니드 인광체와 같은 형광 표지, 양호추냉이 퍼옥시다제, 루시페라제 또는 알칼리성 포스파타제의 효소 표지일 수 있고, 일 예로, 상기 제1 표지부는 플루오레세인이소티오시안산염(FITC)인 것일 수 있다. 상기 FITC는 5-FITC 및 6-FITC 등이 존재하고, 약 495 nm와 519 nm의 녹색 여기 및 방출 스펙트럼 피크 파장을 가지는 색소이다.

[0058] 본 발명에서, 상기 제2 표지부는 비오틴(Biotin) 또는 이의 유도체인 것일 수 있고, 상기 제1 검출부는 아비딘

(avidin), 스트렙타비딘(streptavidin), 뉴트라비딘(neutravidin) 및 캡트아비딘(captavidin)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있는데, 이들은 아비딘 - 비오틴 간 결합 활성을 이용한 것일 수 있다.

[0059] 본 발명에서, 상기 PCR 산물은 PCR 주기를 32회 내지 34회 수행하여 얻어지는 것일 수 있고, 일 예로, 상기 PCR 주기는 33회 수행되어 얻어지는 것일 수 있다.

[0060] 본 발명에서, 상기 PCR 주기는, 92℃ 내지 97℃에서 30초 내지 90초 동안 수행되는 변성(denaturation) 과정; 63℃ 내지 66℃에서 30초 내지 90초 동안 수행되는 결합(annealing) 과정; 및 70℃ 내지 74℃에서 30초 내지 90초 동안 수행되는 신장(extension) 과정;을 포함하는 것일 수 있다.

[0061] 본 발명에서, 상기 PCR 산물은 cox1 유전자를 증폭시키기 위한 것일 수 있다. 상기 cox1 유전자는 산화적 인산화(Oxidative phosphorylation: OXPHOS) 복합체 IV인 시토크롬 c 산화효소(cytochrome c oxidase)의 서브유닛 1을 암호화하는 유전자로서, 미토콘드리아 DNA에 존재하는 유전자이며, 호기성 대사의 핵심 효소이고, 하기 표 1의 서열번호 8 내지 14를 포함하는 염기서열일 수 있다.

표 1

서열번호	서열
8	ATAATTTCTCACATTATTACCTATTCAAGTAATAAAAGAGAACCTTTGGATCTTTAGGTATAATTTATGCTATGATTTCTATTGCAACCTTAGGTTTATTGTATGAGCTCATCATATTTACTGTAGGTTTAGATGTTGATACCCGAGCTTATTTACTTCAGCTACTATAAATTATTGCTGTTCTACAGGAGTAAAAATTTTAGTTGATTATCTACAATATTAGGGG
9	ATGATTTCTATTGCAACCTTAGGTTTATTGTATGAGCTCATCATATTTACTGTAGGTTTAGATGTTGATACCCGAGCTTATTTACTTCAGCTACTATAAATTATTGCTGTTCTACAGGAGT
10	ATTTCTATTGCAACCTTAGGTTTATTGTATGAGCTCATCATATTTACTGTAGGTTTAGATGTTGATACCCGAGCTTATTTACTTCAGCTACTATAAATTATTGCTGTTCTACAGGAGT
11	GCTATGATTTCTATTGCAACCTTAGGTTTATTGTATGAGCTCATCATATTTACTGTAGGTTTAGATGTTGATACCCGAGCTTATTTACTTCAGCTACTATAAATTATTGCTGTTCTACAGGAGT
12	TATGCTATGATTTCTATTGCAACCTTAGGTTTATTGTATGAGCTCATCATATTTACTGTAGGTTTAGATGTTGATACCCGAGCTTATTTACTTCAGCTACTATAAATTATTGCTGTTCTACAGGAGT
13	TCTATTGCAACCTTAGGTTTATTGTATGAGCTCATCATATTTACTGTAGGTTTAGATGTTGATACCCGAGCTTATTTACTTCAGCTACTATAAATTATTGCTGTTCTACAGGAGT
14	TTTGGATCTTTAGGTATAATTTATGCTATGATTTCTATTGCAACCTTAGGTTTATTGTATGAGCTCATCATATTTACTGTAGGTTTAGATGTTGATACCCGAGCTTATTTACTTCAGCTACTATAAATTATTGCTGTTCTACAGGAGTAAAAATTTTAGTTGATTATCTACAATATTAGGGGAAATTAG

[0063] 본 발명의 옴진드기 감염 진단용 조성물에 의해 검출되는 상기 cox1 유전자는 옴진드기(Sarcoptes scabiei)에서 유래된 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 cox1 유전자는 사람 옴진드기(Sarcoptes scabiei var hominis)에서 유래된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 본 발명에서, 상기 PCR 산물은 서열번호 6의 프라이머 및 서열번호 7의 프라이머에 의해 얻어지는 것일 수 있다. 일 예로, 상기 서열번호 6의 정방향 프라이머 및 상기 서열번호 7의 역방향 프라이머를 본 발명의 조건에 따른 상기 변성 - 결합 - 신장 과정을 33회 거칠 경우, 옴진드기 진단 민감도가 극대화될 수 있다.

[0065] 본 발명에서, 상기 제1 검출부가 반응하지 않고, 제2 검출부가 반응할 경우, 옴진드기가 감염된 것으로 판단하고, 상기 제1 검출부 및 제2 검출부가 모두 반응할 경우, 옴진드기에 감염된 것으로 판단하는 것일 수 있다.

[0066] 본 발명에서, 상기 cox1 유전자는 사람 옴진드기(Sarcoptes scabiei var hominis)에서 유래된 것일 수 있다.

[0067] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 명세서의 나머지 기재와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0068] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면,

[0069] 제1 표지부로 라벨링 된 제1 프라이머; 제2 표지부로 라벨링 된 제2 프라이머; 제3 표지부를 포함하고, 상기 제1 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 탐지입자; 및 제1 검출부 및 제2 검출부를 포함하는 지지체;를 포함하고, 상기 지지체는 상기 제2 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 제1 검출부; 및 상기 제3 표지부에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 검출부;를 포함하는 옴진드기 진단을 위한 조성물을 제공할 수 있다.

- [0070] 본 발명에서, 제1 표지부는 플루오레세인이소티오시안산염(FITC)인 것일 수 있다.
- [0071] 본 발명에서, 제2 표지부는 비오틴(Biotin) 또는 이의 유도체인 것일 수 있다.
- [0072] 본 발명에서, 상기 제1 프라이머 및 상기 제2 프라이머는 *cox1* 유전자를 증폭시키기 위한 것일 수 있다.
- [0073] 본 발명에서, 상기 제1 프라이머는 서열번호 6의 염기서열을 포함하고, 상기 제2 프라이머는 서열번호 7의 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0074] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 명세서의 나머지 기재와 마찬가지로 해석될 수 있다.
- [0075] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면,
- [0076] 본 발명의 조성물을 포함하는, 옴진드기 진단을 위한 키트를 제공할 수 있다.
- [0077] 본 발명에서, 용어 “키트”는 바이오 마커 성분에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 항체를 검출 가능한 표지로 표지하여 바이오 마커의 발현 수준을 평가할 수 있는 도구를 말한다. 프로브 또는 항체 관련하여 검출 가능한 물질을 기질과의 반응에 의해서 직접적으로 표지하는 것뿐만 아니라, 직접적으로 표지된 다른 시약과의 반응성에 의한 발색하는 표지체가 접합된 간접적 표지도 포함한다. 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 기타 다른 용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하여 제작될 수 있다. 본 발명에서 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소, 역전사효소, DNase, RNase 억제제, 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 예후 예측용 유전자를 검출하기 위한 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기관을 포함하고 기관은 정량 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 당 업계에 공지되어 있는 것이라면, 이에 제한되지 않는다.
- [0078] 본 발명의 상기 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명에서 상기 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 마커 단백질을 암호화하는 유전자에 대해 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다. 프라이머는 상기 유전자의 핵산 서열에 특이적인 서열을 가지는 뉴클레오타이드로써, 약 7 bp 내지 50 bp의 길이, 보다 바람직하게는 약 10 bp 내지 30 bp의 길이를 가질 수 있다. 또한 대조군 유전자의 핵산 서열에 특이적인 프라이머를 포함할 수 있다. 그 외 역전사 중합효소반응 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 용기, 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.
- [0079] 또한, 본 발명의 상기 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기관, 및 형광 표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기관은 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0080] 본 발명의 상기 키트는 고정체를 더 포함할 수 있고, 상기 고정체로는 니트로셀룰로오즈 막, PVDF 막, 폴리비닐(polyvinyl) 수지 또는 폴리스티렌(polystyrene) 수지로 합성된 웰 플레이트(Well plate), 유리로 된 슬라이드 글래스 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0081] 또한, 본 발명의 상기 키트에서 2차 항체의 표지체는 발색 반응을 하는 통상의 발색제가 바람직하며, HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(colloid gold), FITC(폴리 L-라이신-플루오르세인 아이소티오시아네이트), RITC(로다민-B-아이소티오시아네이트) 등의 형광물질(fluorescein) 및 색소(dye) 등의 표지체가 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0082] 또한, 본 발명의 상기 키트에서 발색을 유도하기 위한 발색 기질은 발색 반응을 하는 표지체에 따라 사용하는 것이 바람직하며, TMB(3,3',5,5'-테트라메틸 베지딘), ABTS[2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)], OPD(o-페닐렌디아민) 등을 사용할 수 있다. 이때, 발색 기질은 완충 용액(0.1 M NaAc, pH 5.5)에 용해된 상태로 제공되는 것이 더욱 바람직하다. TMB와 같은 발색기질은 이차 항체 접합체의 표지체로 사용된 HRP에 의해 분해되어 발색 침적체를 생성하고, 이 발색 침적체의 침적 정도를 육안으로 확인함으로써 상기 마커 단백질들의 존재 유무를 검출한다.

[0083] 본 발명의 상기 키트에서 세척액은 인산염 완충 용액, NaCl 및 트윈 20을 포함하는 것이 바람직하며, 0.02 M 인산염 완충용액, 0.13 M NaCl, 및 0.05% 트윈 20으로 구성된 완충 용액(PBST)이 더욱 바람직하다. 세척액은 항원-항체 결합 반응 후 항원-항체 결합체에 2차 항체를 반응시킨 다음 적당량을 고정체에 첨가하여 3 내지 6회 세척한다. 반응 정지 용액은 황산 용액(H₂SO₄)이 바람직하게 사용될 수 있다.

[0084] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면,

[0085] 본 발명의 조성물을 포함하는, 옴진드기 진단을 위한 진단 장치를 제공할 수 있다.

[0086] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 명세서의 나머지 기재와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0087] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0088] 실시예 1 : 피험자 모집 및 DNA 샘플 추출

[0089] 피험자 모집 및 샘플 추출은 2019년 9월부터 2021년 5월까지 대한민국 서울 한림대학교 강동성심병원에서 수행되었고, 강동성심병원 기관심사위원회(IRB 2021-04-001-002)의 승인을 받았으며, 모든 참가자와 소아 환자의 보호자로부터 서면 동의를 얻었다.

[0090] 이 연구에는 옴 감염이 의심되는 총 111명의 환자가 등록되었다. 평균 연령은 51.88±25.36세(중앙 연령 58.0세, 범위 0.5~93세), 남녀 비는 1:2.08를 나타내었다. 111명의 환자 중 37명은 DS, 40명은 MS, 42명은 NALFA, 44명은 nRT-qPCR에 대해 양성이었다. 현미경으로 확인된 40명의 환자와 nRT-qPCR이 양성인 현미경으로 음성인 4명의 환자는 모두 5% 퍼메트린 크림으로 치료한 후 2-4주 이내에 치유되었다. 모든 검사에서 음성이었던 67명의 환자는 2-4주의 추적 관찰 기간 동안 옴 감염을 암시하는 증상이 나타나지 않았다. 표본에는 (i) 그 곳에서 일하는 의료 종사자, (ii) 그 가족, (iii) 피부경검사나 현미경 검사에 능숙하지 않은 비전문의나 피부과 의사가 의뢰한 환자, (iv) 옴 치료를 받은 적이 없는 사람이 포함되었다.

[0091] 검사는 2008년부터 이 분야에서 일해 온 한 선임 피부과 전문의에 의해 병력 청취, 임상 검사, 피부경 및 현미경 검사가 수행되었다. 모든 환자는 10X 배율에서 피부경 검사(DS)로 검사되었다(Dermlite III; 3Gen Inc., San Juan Capistrano, CA, USA). 다음으로 피부 샘플이 스크래핑되었고 이는 현미경(MS)으로 관찰되어 그 결과는 기록되었다. 유리 슬라이드의 스크래핑 표본을 1.7ml 미세 원심 분리 튜브로 옮기고 추가 PCR 분석을 위해 가능한 한 빨리 -80℃에 보관했다. “jetliner with its trail”은 피부경적 소견에서 양성으로 정의하였고, MS 하에서 관찰된 진드기 또는 알을 양성으로 정의하였다. 각 샘플에서 총 DNA를 추출하기 위하여, Silica-membrane Wizprep™gDNA Mini Kit(Wizbiosolutions, Seongnam-si, South Korea)를 사용하였고, 제조사의 지시를 따랐다.

[0092] 실시예 2 : 프라이머, 프로브 설계 및 PCR 수행

[0093] 본원 명세서의 실시예 및 실험예에서 사용한 프라이머 서열은 하기 표 2에 기재하였고 PCR 방식은 하기 표 3에 기재하였다.

표 2

PCR 종류	프라이머	서열 (5' to 3')	서열번호
Nest	Nest-scab-F2	TTT TTC GGA CAC CCA GAA GT	1
Nest	Nest-scab-R1	CCA ATT GCC CAA TAT ATA GAA GGA	2
Real time	q-scab-F	GCT ATG ATT TCT ATT GCA ACC T	3
Real time	q-scab-R	ACT CCT GTA GGA ACA GCA ATA	4
Real time	probe	56-FAM /AC TGT AGG T/ZEN/T TAG ATG TTG ATA CCC GAG C/3IABkFQ	5
NALFA	FITC-q-scab-F	FITC- GCT ATG ATT TCT ATT GCA ACC T	6
NALFA	Biotin-q-scab-R	Biotin- ACT CCT GTA GGA ACA GCA ATA	7
Conventional	q-scab-F	TTT TTC GGA CAC CCA GAA GT	1

Conventional	q-scab-R	CCA ATT GCC CAA TAT ATA GAA GGA	2
--------------	----------	---------------------------------	---

표 3

PCR 종류	PCR 차수 및 프로그램 순번	프라이머 별 PCR 프로그램
Nest	1-1	95℃에서 10분; 95℃에서 1분, 52.9℃에서 1분, 72℃에서 1분의 35 사이클; 72℃에서 10분간 최종 extension
Real time	2-1	95℃에서 10분; 95℃1분, 58.3℃1분, 72℃1분의 40주기
NALFA	2-2	95℃에서 10분; 95℃1분, 64.4℃1분, 72℃1분의 33주기; 72℃에서 10분간 최종 extension
Conventional	2-3	95℃에서 10분; 95℃에서 1분, 60.2℃에서 1분, 72℃에서 1분의 40 사이클; 72℃에서 10분간 최종 extension

[0096] 1차 PCR 단계에서, 반응 혼합물은 1ul의 샘플 DNA, 1ul의 10pM nest-scab-F2 및 nest-scab-R1 프라이머, 7ul의 증류수(DW), 및 10ul의 PCR 마스터 믹스(H-star Taq PCR Master Mix 1, BioFact, 대전, 대한민국)이고, 프로그램 1에 따라 PCR 반응이 수행되었습니다.

[0097] 다음 2차 PCR 단계는 3가지로 나누어 수행되었다. 먼저 RT-qPCR의 경우 각 PCR 혼합물에는 1차 PCR 산물 1ul, 10pM q-scab-F 및 q-scab-R 프라이머, 0.5ul의 10pM 프로브, 6.5ul의 증류수(DW) 및 10ul의 PCR 마스터 믹스(Multi-Star Real-time PCR Master Mix, BioFact)를 준비하여, 프로그램 2-1에 따라 RT-qPCR 과정을 수행하였다. 구체적으로는 q-scab-F 및 R 프라이머에 의해 획득된 S. scabiei cox1 유전자의 130bp 단편(GenBank accession number: MT133635)이 현미경으로 관찰된 일련의 회색된 클론 DNA로 수행되었다. 확인된 환자가 삽입되었다. 컷오프 값은 $Ct \leq 30$ 으로 정의되었다.

[0098] 둘째, NALFA의 경우 1ul의 1차 PCR 산물, 1ul 각각의 10pM fluorescein isothiocyanate(FITC)-tagged q-scab-F 및 Biotin-tagged q-scab에 의해 제조된 혼합물 -R(biomers.net, Ulm, Germany), 7ul의 DW와 10ul의 PCR master mix(H-star Taq PCR Master Mix 1, BioFact)를 사용하여, 프로그램 2-2에 따라 PCR을 수행하였으며, 도 1과 같은 키트를 설계하여 결과를 시각화했다. 구체적으로는 상기 PCR의 tube에 100ul의 탐지 버퍼(detection buffer)를 넣고 막 스트립(membrane strip)을 삽입하였다. 그 결과, 2분 후 스트립에서 대조군 및 테스트 밴드가 관찰되었다.

[0099] 마지막으로, 일부 샘플의 scabies mite DNA를 시퀀싱하여 확인하기 위해 혼합물은 1차 PCR 생성물 1ul, 10pM q-scab-F 및 q-scab-R 프라이머 각각 1ul, DW 7ul 및 PCR 마스터 10ul 및 mix(H-star Taq PCR Master Mix 1, BioFact)를 준비하였고, 2-3의 프로그램에 따라 수행되었다. 세척된 DNA는 ABI PRISM 3730xl DNA 분석기(Applied Biosystems)에 의한 DNA 증폭에 사용된 동일한 정방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 양방향으로 직접 시퀀싱되었다.

[0100] 실시예 3 : 프라이머, 프로브 설계 및 PCR 수행

[0101] 시험 결과를 평가하기 위하여, McNemar의 테스트와 Fisher의 정확한 테스트를 사용하였고, DS, MS 및 NALFA의 결과를 nRT-qPCR의 결과와 비교하여 하기 표 4 및 표 5에 나타내었다. 통계 분석은 SPSS 소프트웨어(버전 26.0, IBM, Armonk, NY, U.S.A.)를 사용하여 수행했으며, P-값이 0.05 미만이면 통계적으로 유의한 것으로 간주했다.

표 4

진단결과	nRT-qPCR+	nRT-qPCR-
DS+	37	0
DS-	7	67
MS+	40	0
MS-	4	67
NALFA+	42	0
NALFA-	2	67

[0103] 그 결과 상기 표 4와 같이, DS-, MS- 또는 NALFA-양성 환자 중 nRT-qPCR에 대해 음성인 환자는 없었다. 그러면 각 검사의 특이도와 양성예측도는 모두 100%였다. nRT-qPCR의 결과는 DS 음성 환자 74명 중 7명, MS 음성 환자 71명 중 4명, NALFA 음성 환자 69명 중 2명에서 양성이었다.

표 5

진단방법	민감도 (%) (95% CI ^b)	특이도 (%) (95% CI)	양성예측 도 (%)	음성예측도 (%) (95% CI)	정확도 (%) (95% CI)	P-값
DS	84.1 (70.0 - 93.4)	100 (94.6 - 100)	100	90.5 (82.9 - 95.0)	93.7 (87.4 - 97.4)	0.016
MS	90.9 (78.3 - 97.5)	100 (94.6 - 100)	100	94.4 (86.8 - 97.7)	96.4 (91.0 - 99.0)	0.125
NALFA	95.5 (84.5 - 99.4)	100 (94.6 - 100)	100	97.1 (89.6 - 99.2)	98.2 (93.6 - 99.8)	0.500

[0105] 또한, 상기 표 5에서 나타난 것과 같이, DS의 민감도 및 음성 예측 값은 각각 84.1%(95% 신뢰 구간(CI), 70.0 - 93.4) 및 90.5%(95% CI, 82.9 - 95.0)인 반면 MS는 90.9%(95% CI, 78.3 - 97.5) 및 94.4%(95% CI, 86.8 - 97.7), NALFA는 95.5%(95% CI, 84.5 - 99.4) 및 97.1%(95% CI, 89.6 - 99.2)였다. DS의 결과를 nRT-qPCR의 결과와 비교한 McNemar의 테스트는 $P = 0.016 < 0.05$ 로 통계적으로 유의했다. MS 및 NALFA의 결과를 nRT-qPCR의 결과와 비교했을 때 P 값은 각각 0.125 및 0.500으로 통계적으로 유의하지 않았다.

[0106] 실시예 4 : NALFA의 민감도 측정

[0107] NALFA의 검출 한계를 평가하기 위해, 클로닝된 DNA를 1ng에서 10^{-7} ng으로 연속 희석시킨 샘플에 대하여, PCR 및 NALFA를 수행하였다. 그 결과 도 2에 나타난 것처럼, 10^{-2} ng까지는 투명한 밴드가 관찰되었고 10^{-3} ng에서는 매우 약한 밴드가 관찰된 것을 확인할 수 있었다.

[0108] 이것은 음 진단을 위한 핵산 기반 측방유동분석법(NALFA)을 개발하고 이를 DS, MS, nRT-qPCR과 같은 현재 사용 가능한 음 검사 방법과 비교 분석한 최초의 연구이다. NALFA의 결과를 nRT-qPCR의 결과와 비교했을 때 $P = 0.500 > 0.05$ 로 유의한 차이가 없었다. 따라서 NALFA는 nRT-qPCR 대신 음 진단에 사용할 수 있습니다.

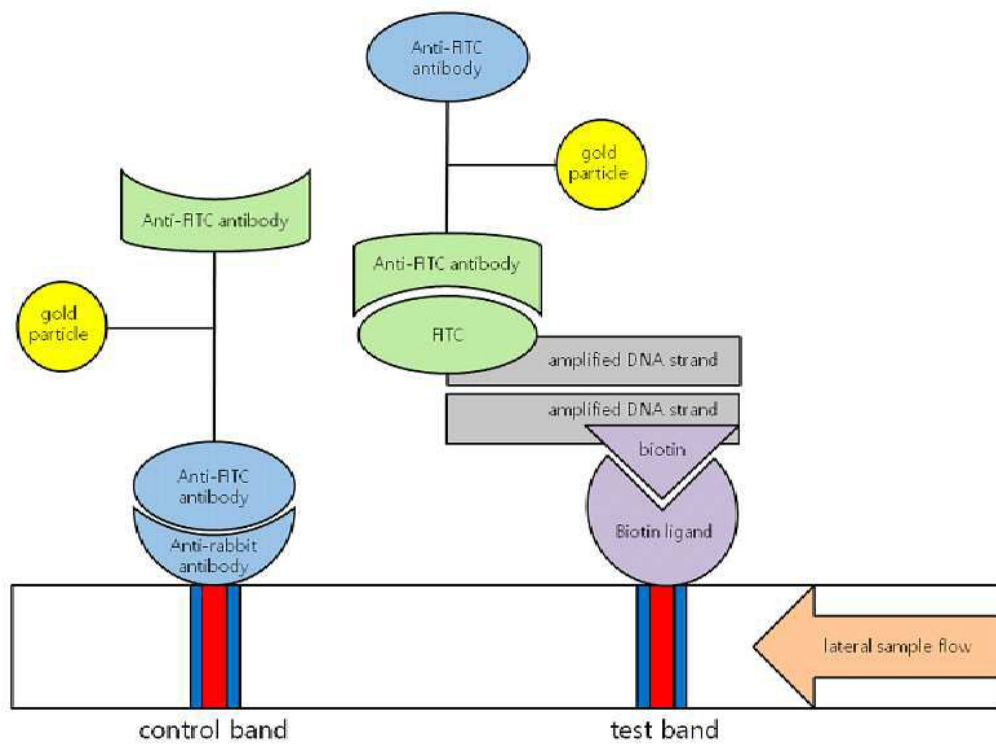
[0109] 상기 실시예에서는 위양성을 최소화하기 위해 nRT-qPCR의 cut-off 값을 $Ct \leq 30$ 으로 정의하였다. 따라서 MS와 PCR 결과의 차이는 이전 연구에 비해 상대적으로 작았다. 이전 연구에서는 전통적인 nested PCR의 민감도가 100%일 때 현미경 검사의 민감도는 75.68%로 24.32%의 차이가 있었다. nested real-time PCR의 민감도가 100%일 때 현미경 검사의 민감도는 85.90%로 14.10%의 차이를 보였으나, 본 발명에서는 nested real-time PCR의 민감도가 100%일 때 현미경 검사의 민감도는 90.91%로 9.09%의 차이를 나타내었다.

[0110] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 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 수 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

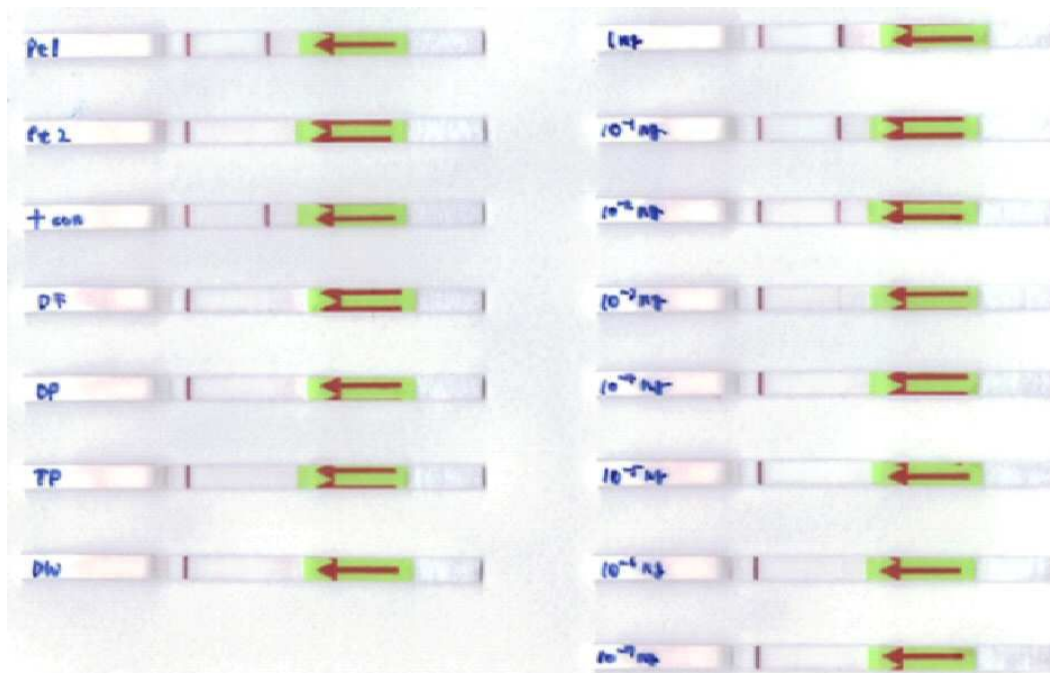
[0111] 본 발명의 범위는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

<110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION HALLYM UNIVERSITY

<120> Method of providing information for *Sarcoptes scabiei* diagnosis
using nucleic acid-based lateral flow analysis

<130> P214470

<160> 14

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 1

tttttcggac acccagaagt 20

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 2

ccaattgccc aatatataga agga 24

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 3

gctatgattt ctattgcaac ct 22

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 4

actcctgtag gaacagcaat a 21

<210>	5	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward primer	
<400>	5	
	actgtaggtt tagatgttga taccgagc	29
<210>	6	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reverse primer	
<400>	6	
	gctatgattt ctattgcaac ct	22
<210>	7	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward primer	
<400>	7	
	actcctgtag gaacagcaat a	21
<210>	8	
<211>	233	
<212>	DNA	
<213>	Sarcoptes Scabiei	
<400>	8	
	ataatttctc acattattac ctattcaagt aataaaagag aaccttttgg atctttaggt	60
	ataatttatg ctatgatttc tattgcaacc ttaggtttta ttgtatgagc tcatcatata	120
	tttactgtag gtttagatgt tgatacccga gcttatttta cttcagctac tataattatt	180
	gctgttccta caggagtaaa aatttttagt tgattatcta caatattagg ggg	233
<210>	9	
<211>	125	
<212>	DNA	
<213>	Sarcoptes Scabiei	

<400> 9
atgatttcta ttgcaacctt aggtttttatt gtaggagctc atcatatatt tactgtaggt 60

ttagatgttg ataccggagc ttattttact tcagctacta taattattgc tgttccctaca 120
ggagt 125

<210> 10
<211> 122
<212> DNA
<213> Sarcoptes Scabiei

<400> 10
atttctattg caaccttagg ttttattgta tgagctcatc atatatttac ttaggttta 60
gatgttgata cccgagctta ttttacttca gctactataa ttattgctgt tcctacagga 120
gt 122

<210> 11
<211> 128
<212>
> DNA
<213> Sarcoptes Scabiei

<400> 11
gctatgattt ctattgcaac cttaggtttt attgtatgag ctcatcatat atttactgta 60
ggtttagatg ttgatacccg agcttatttt acttcagcta ctataattat tgctgttcc 120
acaggagt 128

<210> 12
<211> 131
<212> DNA
<213> Sarcoptes Scabiei

<400> 12
tatgctatga ttictattgc aaccttaggt tttattgtat gagctcatca tatatttact 60
gtaggttttag atgttgatac ccgagcttat tttacttcag ctactataat tattgctgtt 120

cctacaggag t 131

<210> 13
<211> 119
<212> DNA
<213> Sarcoptes Scabiei

<400>	13	
tctattgcaa ccttaggttt tattgtatga gctcatcata ttttactgt aggttttagat	60	
gttgataccc gagcttattt tacttcagct actataatta ttgctgttcc tacaggagt	119	
<210>	14	
<211>	196	
<212>	DNA	
<213>	Sarcoptes Scabiei	
<400>	14	
tttggatctt taggtataat ttatgctatg atttctattg caaccttagg ttttattgta	60	
tgagctcatc atatatttac tgtaggttta gatgttgata cccgagctta ttttacttca	120	
gctactataa ttattgctgt tcttacagga gtaaaaattt ttagttgatt atctacaata	180	
ttagggggaa aattag	196	