



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0059764
(43) 공개일자 2020년05월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/689 (2018.01) C12Q 1/6851 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2018.05)
C12Q 1/6851 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2018-0144880
(22) 출원일자 2018년11월21일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
대한민국 (식품의약품안전처장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
(72) 발명자
이주훈
경기도 수원시 영통구 봉영로 1526, 703동 704호 (영통동, 살구골 진덕,서광,성지,동아 아파트)
곽효선
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 식품의약품안전평가원
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

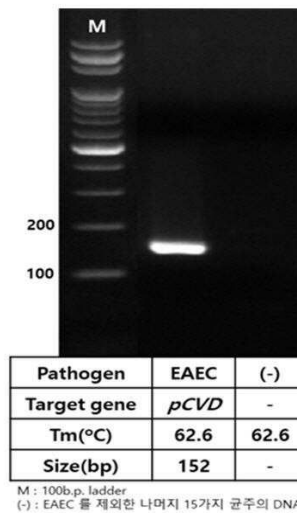
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 pCVD 타겟 유전자를 통해 장관흡착성 대장균 (EAEC)을 신속검출할 수 있는 Singleplex Real-Time PCR 키트의 개발

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 EAEC(Enteraggregative *Escherichia coli*) 균주의 검출용 프라이머 세트; 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 프로브; 상기 프라이머 세트 및 프로브를 포함하는 EAEC 균주의 검출용 조성물; 이를 포함하는 키트; 및 이를 이용한 EAEC 균주의 검출 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2537/165 (2013.01)
C12Q 2561/113 (2019.08)
C12Q 2563/107 (2013.01)
C12Q 2565/101 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

김순한

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187,
식품의약품안전평가원

이우정

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187,
식품의약품안전평가원

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	14162유전체972
부처명	식품의약품안전처
연구관리전문기관	식품의약품안전평가원
연구사업명	지원사업
연구과제명	식중독균 유전체 연구
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2014.03.01 ~ 2018.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주의 검출용 프라이머 세트.

청구항 2

서열번호 3의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주의 검출용 프로브.

청구항 3

제 1 항의 프라이머 세트를 포함하는 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주의 검출용 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 조성물은 제 2 항의 프로브를 추가적으로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 프로브는 5'-말단에 형광 표지인자(reporter)가 결합되어 있고, 3'-말단에 형광 억제물질(quencher)이 결합되어 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 형광 표지인자는 FAM(6-carboxyfluorescein), HEX(hexachloro-6-carboxyfluorescein), TET(tetrachlorofluorescein), 텍사스 레드(texas red), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine), NED(N-(1-naphthyl) ethylenediamine), Cy5(cyanine-5) 또는 Cy3(cyanine-3)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 형광 억제물질은 TAMRA(6-carboxytetramethylrhodamine), BHQ1(black hole quencher 1), BHQ2(black hole quencher 2), BHQ3(black hole quencher 3), DDQ(Deep Dark Quencher), 블랙베리 퀸처(Blackberry Quencher) 또는 아이오와 블랙(Iowa black)인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 3 항 또는 제 4 항의 조성물을 포함하는 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주의 검출용 키트.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 키트는 DNA 중합효소, dNTP 및 버퍼를 추가적으로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 10

시료로부터 분리된 DNA에 대하여 제 1 항의 프라이머 세트 및 제 2 항의 프로브를 이용하여 중합효소연쇄반응

(polymerase chain reaction)을 수행하고 분석하는 단계를 포함하는 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주의 검출 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 시료는 식품 내에 존재하는 미생물인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

상기 중합효소연쇄반응은 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 또는 경쟁적 중합효소연쇄반응(Competitive RT-PCR)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 10 항에 있어서,

상기 분석에서 PCR 산물이 152 bp의 밴드로 확인되면 시료 내에 EAEC 균주가 존재하는 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 10 항에 있어서,

상기 분석에서 Ct 값이 확인되면 시료 내에 ETEC 균주가 존재하는 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 병원성 대장균인 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주의 검출용 프라이머 세트, 프로브, 상기 프라이머 세트 및 프로브를 포함하는 EAEC 균주의 검출용 조성물, 이를 포함하는 키트 및 이를 이용한 EAEC 균주의 검출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 설사병은 개발도상국의 어린아이들의 높은 사망률을 보이는 심각성을 갖는 질병이며, 설사병을 일으키는 가장 빈번한 세균은 병원성 대장균으로 알려져 있다 (Nataro, JP and Kaper, JB, 1998). 병원성 대장균은 병원 인자와 발병 기작에 따라, 장출혈성 대장균 (enterohemorrhagic *Escherichia coli*, EHEC), 장병원성 대장균 (enteropathogenic *Escherichia coli*, EPEC), 장독소원성 대장균 (enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC), 장관흡착성 대장균 (enteroaggregative *Escherichia coli*, EAEC), 장관조직침입성 대장균 (enteroinvasive *Escherichia coli*, EIEC) 등 5 종류로 분류된다.

[0003] 병원성 균주를 검출하기 위한 기존의 real-time PCR Kit의 경우 대체로 활성이 낮고 몇몇 표적 유전자들은 균주가 존재함에도 활성이 관찰되지 않는다. 또한, 현재 시중에 가장 많이 사용되고 있는 real-time PCR 장비인 ABI 7500과 Bio-Rad CFX Connect에서 동시에 호환이 되지 않는다는 문제점이 있다. 더욱이, 실제로 식품샘플에 병원성 대장균이 어느 정도 존재함에도 불구하고 민감도가 떨어져 검출되지 않는 경우가 있다. 이러한 문제점들로 인해 사회적으로 아주 큰 이슈로 대두될 수 있어, 보다 특이적이며 신속하고 정확하게 병원성 대장균의 검출이 가능한 real-time PCR kit의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1156719호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주의 검출용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주의 검출용 프로브를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프라이머 세트를 포함하는 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주의 검출용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주의 검출용 키트를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 시료로부터 분리된 DNA에 대하여 상기 프라이머 세트 및 상기 프로브를 이용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 수행하고 분석하는 단계를 포함하는 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주의 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주의 검출용 프라이머 세트를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 프로브를 포함하는 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주의 검출용 프로브를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주의 검출용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조성물은 프로브를 추가적으로 더 포함하는 것일 수 있고, 상기 프로브는 5'-말단에 형광 표지인자(reporter)가 결합되어 있고, 3'-말단에 형광 억제물질(quencher)이 결합되어 있는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 형광 표지인자는 FAM(6-carboxyfluorescein), HEX(hexachloro-6-carboxyfluorescein), TET(tetrachlorofluorescein), 텍사스 레드(texas red), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine), NED(N-(1-naphthyl)ethylenediamine), Cy5(cyanine-5) 또는 Cy3(cyanine-3)인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 형광 억제물질은 TAMRA(6-carboxytetramethylrhodamine), BHQ1(black hole quencher 1), BHQ2(black hole quencher 2), BHQ3(black hole quencher 3), DDQ(Deep Dark Quencher), 블랙베리 퀸처(Blackberry Quencher) 또는 아이오와 블랙(Iowa black)인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주의 검출용 키트를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 키트는 DNA 중합효소, dNTP 및 버퍼를 추가적으로 더 포함하는 것일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 시료로부터 분리된 DNA에 대하여 상기 프라이머 세트 및 상기 프로브를 이용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 수행하고 분석하는 단계를 포함하는 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주의 검출 방법을 제공한다.

- [0021] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 시료는 식품 내에 존재하는 미생물인 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 중합효소연쇄반응은 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 또는 경쟁적 중합효소연쇄반응(Competitive RT-PCR)인 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 분석에서 PCR 산물이 152 bp의 밴드로 확인되면 시료 내에 EAEC 균주가 존재하는 것으로 판단하는 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 분석에서 Ct 값이 확인되면 시료 내에 EAEC 균주가 존재하는 것으로 판단하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명에 따른 프라이머 세트 및 프로브는 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*) 균주에만 특이적인 존재하는 유전자를 표적으로 제작되어 EAEC 균주에 대한 특이도 및 민감도가 높음으로써, 식품 내에 존재하는 EAEC 균주만을 특이적으로 신속하고 정확하게 검출하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 EAEC 균주에 특이적으로 존재하는 *pCVD* 유전자를 표적으로 하는 프라이머 세트 및 프로브를 이용하여 singleplex, crosscheck PCR을 수행한 결과이다.
- 도 2는 EAEC 균주에 특이적으로 존재하는 *pCVD* 유전자를 표적으로 하는 프라이머 세트 및 프로브를 이용하여 singleplex real-time PCR을 통해 민감도를 확인한 결과이다
- 도 3은 EAEC 균주에 특이적으로 존재하는 *pCVD* 유전자를 표적으로 하는 프라이머 세트 및 프로브를 이용하여 singleplex real-time PCR을 통해 기존 A사의 PCR 키트와의 활성도를 비교한 결과이다 (KHU: 본 발명의 프라이머 세트를 사용한 경우; 및 A 사: A 사의 PCR 키트를 사용한 경우) .
- 도 4는 EAEC 균주에 특이적으로 존재하는 *pCVD* 유전자를 표적으로 하는 프라이머 세트 및 프로브를 이용하여 양성 대조군 DNA에 대한 singleplex real-time PCR을 ABI 7500 기기를 이용하여 수행한 결과이다.
- 도 5는 EAEC 균주에 특이적으로 존재하는 *pCVD* 유전자를 표적으로 하는 프라이머 세트 및 프로브를 이용하여 양성 대조군 DNA에 대한 singleplex real-time PCR을 Bio-rad CFX connect 기기를 이용하여 수행한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명은 병원성 대장균 중 EAEC(*Enteraggregative Escherichia coli*, 장관흡착성 대장균) 균주의 검출을 위한 프라이머 세트 및 프로브; 이를 포함하는 조성물; 이를 포함하는 키트; 및 이를 이용한 EAEC 균주의 검출 방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명에서의 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3'-말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기서열로서, 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍을 형성할 수 있고, 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 작용하는 짧은 염기서열을 말한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(DNA 중합효소 또는 역전사효소) 및 상이한 4가지 dNTP(Deoxynucleoside triphosphate)의 존재 하에 DNA 합성을 개시할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 프라이머 세트는 EAEC 균주에 특이적으로 존재하는 유전자를 증폭을 위하여 각각 정방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머로 구성되어 있다. 본 발명의 프라이머 세트는 프라이머의 길이, T_m 값, 프라이머의 GC 함량, 및 프라이머 내의 자가-상보적 서열에 의한 프라이머의 복합체(dimer) 형성 방지와 같은 조건들을 충분히 고려하고, EPEC 균주의 검출에 대한 민감도 및 특이도를 최대화할 수 있도록 세심하게 디자인된 것이다.
- [0031] 본 발명의 프라이머 세트는 포스포아미다이트(phosphoramidite) 고체 지지체 합성법이나 기타 널리 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 염기서열은 또한 당해 기술분야에 공지된 다양한 방법을 통해 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형

이 있다. 또한, 본 발명의 프라이머 세트의 염기서열은 검출 가능한 시그널을 직접적 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다.

[0032] 본 발명의 프로브는 프로브의 말단에 형광물질로 표지될 수 있다. 프로브의 5'-말단에는 형광 표지인자(reporter dye)가 결합될 수 있고, 3'-말단에는 형광 억제물질(quencher)이 결합될 수 있다.

[0033] 상기 형광 표지인자로는 현재까지 개발된 어떠한 물질을 사용하여도 무방하며, 예를 들어, FAM(6-carboxyfluorescein), HEX(hexachloro-6-carboxyfluorescein), TET(tetrachlorofluorescein), 텍사스 레드(texas red), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine), NED(N-(1-naphthyl) ethylenediamine), Cy5(cyanine-5) 또는 Cy3(cyanine-3)이 사용될 수 있고, 바람직하게는 FAM(6-carboxyfluorescein)을 사용할 수 있다.

[0034] 상기 형광 억제물질로는 TAMRA(6-carboxytetramethylrhodamine), BHQ1(black hole quencher 1), BHQ2(black hole quencher 2), BHQ3(black hole quencher 3), DDQ(Deep Dark Quencher), 블랙베리 퀸처(Blackberry Quencher) 또는 아이오와 블랙(Iowa black)이 사용될 수 있고, 바람직하게는 TAMRA(6-carboxytetramethylrhodamine)를 사용할 수 있다.

[0035] 본 발명에서 중합효소연쇄반응은 (i) 초기 변성(denaturation) 단계; (ii) 변성(denaturation), 어닐링(annealing) 및 연장(extension)으로 이루어지는 한 사이클을 수회 내지 수십 회 반복하는 단계; 및 (iii) 최종 열처리 단계; 또는 이들 단계를 적절하게 변형한 열 사이클(thermal cycle) 프로그램을 통해 수행될 수 있다.

[0036] 구체적으로, 본 발명에서의 PCR 조건으로는 90~95℃에서 5~20분간 열처리하여 초기 변성시킨 후, 90~95℃에서 10초~2분간 변성 단계(denaturation); 54~60℃(T_m)에서 10초~2분간 어닐링 단계(annealing); 및 70~75℃에서 10초~2분간 합성 단계(extension)를 총 10~50회 반복하여 PCR 증폭을 실시할 수 있으며, 상기 반응 온도 및 반응 시간 조건은 당업자가 적절하게 변형하여 수행할 수 있다. 보다 바람직하게는, 95℃에서 5분간 변성시킨 후, 95℃에서 30초, 60.3℃ 또는 60℃(T_m)에서 30초, 72℃에서 30초씩 20~50번 반복한 다음, 72℃에서 15분 반응시킬 수 있다.

[0037] 본 발명에서 PCR 증폭 산물의 크기의 분석은 당업계에 알려진 임의의 방법이 사용될 수 있다. 예를 들면, 아가로스 또는 폴리아크릴아미드 젤 전기영동에 의하여 표적 크기 마커와의 비교를 통하여 증폭 산물의 크기를 알 수 있다.

[0038] 본 발명에서 실시간 중합효소연쇄반응은 타겟 DNA의 증폭과 동시에 형광 방출에 의한 타겟 DNA의 절대 또는 상대적인 정량이 가능한 실험방법으로서, 전기영동하여 분석하는 단계가 생략되고, 증폭산물의 증폭정도를 자동화, 수치화시켜 신속하고 정확하게 검출 및 정량이 가능하다. 상기 방법을 수행하는 경우 타겟 DNA 내의 증폭된 서열에 특이적으로 결합하고 형광 표지인자 및 형광 억제물질이 태깅되어 있는 프로브를 사용하여 수행될 수 있고, 프로브의 사용없이 SYBR-Green 등의 형광물질을 사용하여 수행될 수도 있다. 실시간 중합효소연쇄반응에 대한 결과는 Ct(cycle threshold) 값을 이용하여 분석될 수 있다.

[0040] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 실시예 1. 프라이머 세트(Primer set)의 제작

[0043] 본 발명자들은 EAEC(Enteraggregative *Escherichia coli*) 균주만을 특이적으로 검출 또는 정량하기 위하여, 상기 EAEC 균주에만 특이적으로 존재하는 *pCVD* 유전자 (Accession No. X81423.1)를 표적으로 하여 Taqman™ Real-time PCR 방법에 사용될 프라이머 세트를 제작하였다. 프라이머 세트 및 프로브의 염기서열 정보는 하기 표 1과 같다.

[0044]

표 1

gene	방향	서열
------	----	----

<i>pCVD</i> gene	forward primer	5'-GATGTCCTTGAGGAGGAGGA-3' (서열번호 1)
	reverse primer	5'-GTTTTTGTTCAGCTAATAATGTATAG-3' (서열번호 2)
	probe	5'-FAM-TTCCTGAGAGTGCAATCCCAGACA-TAMRA-3' (서열번호 3)

[0047] 실시예 2. EAEC 균주의 검출에 대한 특이도 검증

[0048] 기존 Singleplex real-time PCR 키트는 하나의 균주를 타겟으로 설정하였음에도 불구하고 다른 균주까지 검출되는 사례가 빈번하다는 문제가 있었다. 이에 본 발명자들은 제작된 프라이머 세트를 이용하여 EAEC 균주만을 특이적으로 정확히 검출할 수 있는지 확인하기 위하여, conventional PCR을 이용하여 Crosscheck PCR 검증을 수행하였다. 상기 검증을 통해 EAEC 균주 이외의 균주에 대한 활성이 나오는지 여부를 확인하였다.

[0049] 그 결과, *pCVD* 유전자를 표적으로 하여 제작된 프라이머 세트를 이용하여 PCR를 수행한 경우 EAEC 균주에서는 152 bp의 밴드(band)가 확인되었고, EAEC 균주를 제외한 나머지 15종의 균주((-)로 표시함)에서는 상기 사이즈의 밴드가 확인되지 않았다 (도 1). 15종의 균주에 대한 정보는 하기 표 2와 같다.

표 2

[0051]

15종의 Pathogen
<i>Campylobacter jejuni</i>
<i>Campylobacter coli</i>
<i>Vibrio cholerae</i>
<i>Vibrio vulnificus</i>
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
<i>Salmonella</i> Typhimurium
<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Bacillus cereus</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Clostridium perfringens</i>
EPEC (Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>)
EIEC (Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>)
EHEC (Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>)
ETEC (Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>)

[0053] 따라서, 본 발명의 프라이머 세트를 이용할 경우 real-time PCR 뿐만 아니라, conventional PCR 방법을 통해서도 EAEC 균주만을 특이적으로 검출할 수 있음을 확인하였다.

[0055] 실시예 3. EAEC 균주의 검출에 대한 민감도 검증

[0056] 기존 real-time PCR 키트는 민감도가 낮다는 문제가 있었다. 이에 본 발명자들은 제작된 프라이머 세트에 대하여 민감도를 확인하는 실험을 수행하였다. 민감도를 확인하기 위한 DNA 샘플은 100 ng/μl의 양을 기준으로 연속희석(serial dilution) 방법을 수행하여, 100 ng/μl (도 2에서 10⁰), 10 ng/μl (도 2에서 10⁻¹), 1 ng/μl (도 2에서 10⁻²), 100 pg/μl (도 2에서 10⁻³), 10 pg/μl (도 2에서 10⁻⁴), 1 pg/μl (도 2에서 10⁻⁵) 및 0.1 pg/μl (도 2에서 10⁻⁶)의 양이 포함된 DNA template를 준비하였다.

[0057] 그 결과, *pCVD* 유전자를 표적으로 제작된 프라이머 세트를 이용한 경우에는 0.1 pg/μl의 DNA 샘플에서도 EAEC 균주의 검출이 가능하였다 (도 2).

[0058] 따라서, 본 발명의 프라이머 세트를 이용할 경우 0.1 pg/ μ l의 양으로 포함된 EAEC 균주를 검출할 수 있어, EAEC 균주의 검출에 대한 민감도가 높은 것으로 확인하였다.

[0060] 실시예 4. 활성도 측정

[0061] 기존 real-time PCR 키트는 활성이 크지 않아 오랜 시간동안 real-time PCR 활성을 관찰해야 하는 문제점이 있었다. 이에 본 발명자들은 제작된 프라이머 세트를 이용한 경우 기존 real-time PCR 키트보다 활성도가 높은지 확인하는 실험을 수행하였다.

[0062] 그 결과, *pCVD* 유전자를 표적으로 하여 제작된 프라이머 세트를 이용한 경우 기존 키트보다 활성도가 현저히 높게 나타났음을 확인하였다 (도 3).

[0063] 따라서, 본 발명의 프라이머 세트를 이용할 경우 신속하고 정확하게 EAEC 균주의 검출이 가능함을 확인하였다.

[0065] 실시예 5. 양성 대조군 DNA를 통한 검증

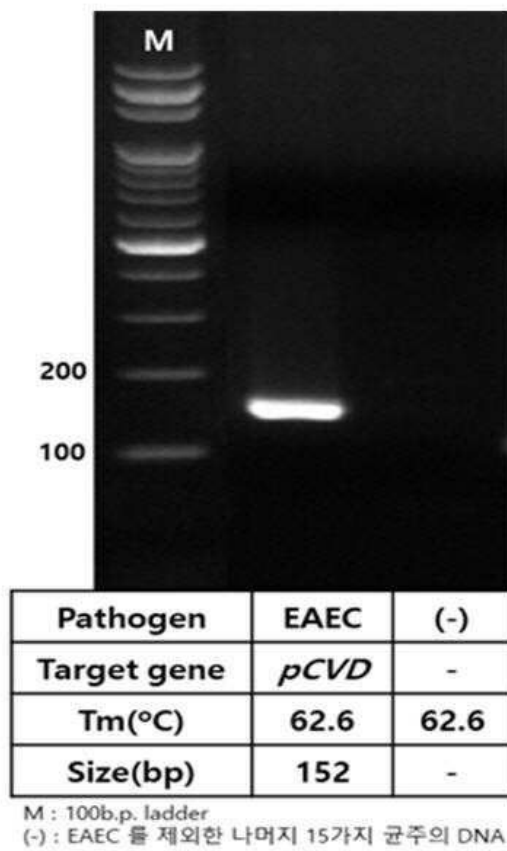
[0066] 식품 샘플 내에 존재하는 EAEC 균주를 검출하기 위해서는 DNA 정제과정이 필요하고, 이 과정에서 DNA의 오염에 의해 정확한 실험 결과가 나오지 않을 수 있다는 문제가 있다. 이에 본 발명자들은 EAEC 균주에 대한 양성 대조군 DNA를 사용하여 제작된 프라이머 세트에 대한 검증을 수행하였다.

[0067] 그 결과, 제작된 프라이머 세트를 이용하여 real-time PCR 장비 중 하나인 ABI 7500을 통해 real-time PCR를 수행한 경우 EAEC 균주를 정확히 검출할 수 있음을 확인하였다 (도 4). 또한, 다른 장비인 Bio-rad CFX connect를 통해 real-time PCR을 수행한 경우에도 EAEC 균주를 정확히 검출할 수 있음을 확인하였다 (도 5).

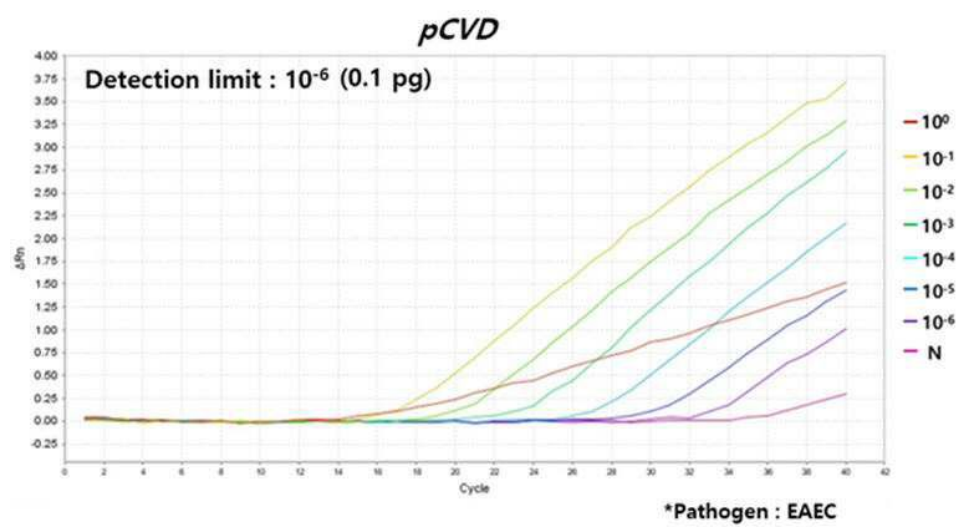
[0068] 따라서, 식품 내에 존재하는 EAEC 균주로부터 DNA를 정확히 정제한 후, 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 real-time PCR를 수행할 경우 EAEC 균주만을 특이적으로 신속하고 정확하게 검출할 수 있음을 확인하였다.

도면

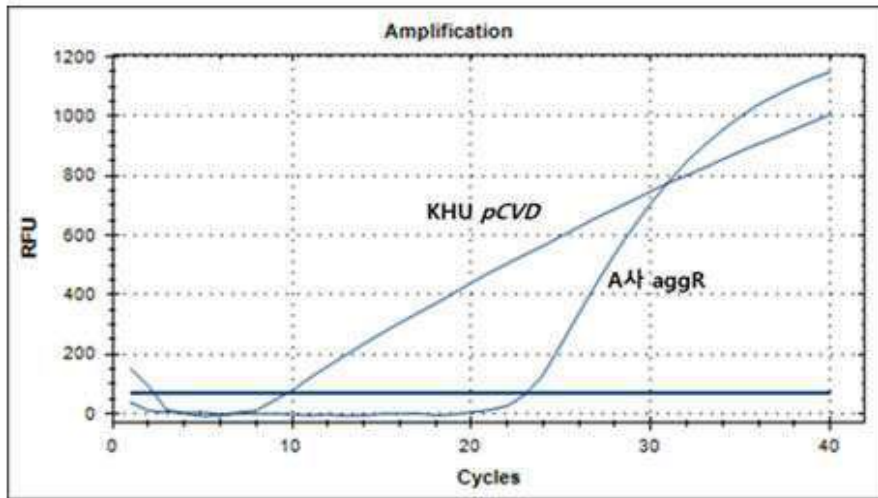
도면1



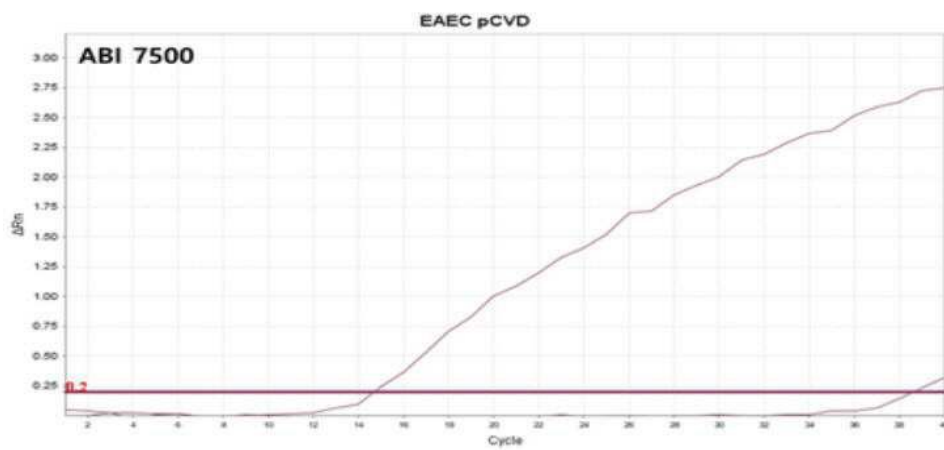
도면2



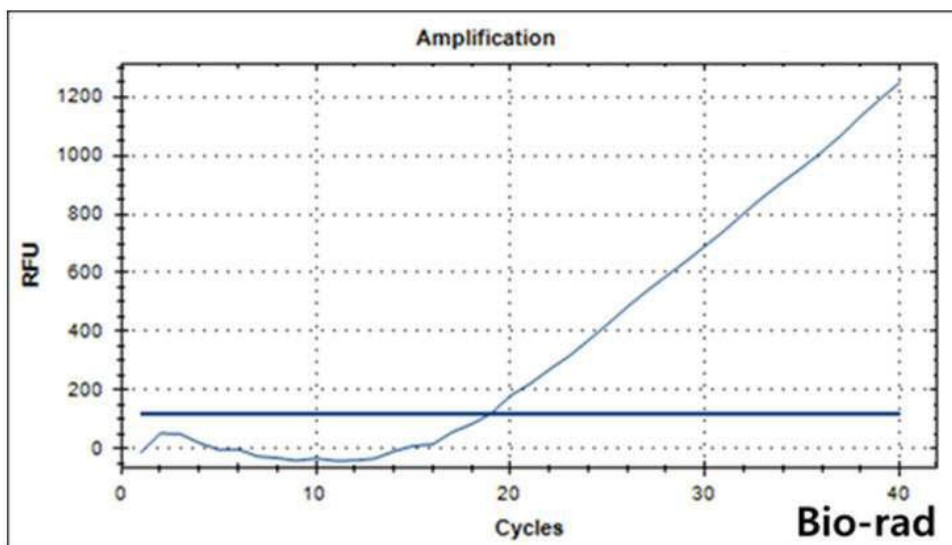
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
KOREA FOOD & DRUG ADMINISTRATION

<120> Development of a Singleplex Real-Time PCR Kit for Rapid Detection
of Enteroaggregative Escherichia coli (EAEC) pCVD target gene

<130> PN1810-397

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCVD forward primer

<400> 1

gatgtccttg aggaggagga 20

<210> 2

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCVD reverse primer

<400> 2

gttttttggtt ttcagctaataatgtatag 29

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCVD probe

<400> 3

ttcctgagagtgcaatccca gaca 24