



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0030408
(43) 공개일자 2022년03월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/70 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/701 (2013.01)

C12Q 2527/101 (2019.08)

(21) 출원번호 10-2020-0110079

(22) 출원일자 2020년08월31일

심사청구일자 2020년08월31일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

임채승

경기도 안양시 동안구 귀인로 294, 302동 804호 (평촌동, 꿈마을아파트)

장웅식

서울특별시 동작구 여의대방로 28, 현대아파트 102동 108호

(74) 대리인

특허법인 다해

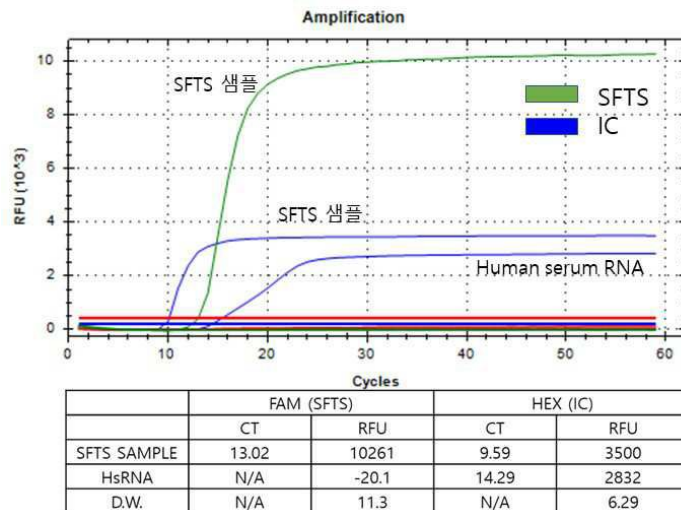
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 중증열성혈소판감소증후군 바이러스 검출용 루프매개등온증폭반응 프라이머 세트

(57) 요약

본 발명은 중증열성혈소판감소증후군 바이러스(Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome virus, SFTSV)의 L분절(Large segment)를 특이적으로 검출할 수 있는 루프매개등온증폭반응(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 프라이머 및 프로브 세트에 관한 것으로서, 본 발명에 의해 전기영동 과정 없이 검체의 SFTS 바이러스 감염 여부를 1시간 이내에 높은 민감도와 정확도로 진단할 수 있고, 형광 프로브를 이용하여 다른 유사한 증상의 바이러스와 함께 하나의 튜브 내에서 다중 진단(multiplexing)이 가능하다는 점에서 기존의 SFTS 바이러스 검출법을 대체하는 분자진단검사방법으로 이용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Q 2563/107 (2013.01)

C12Q 2565/101 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711039355
과제번호 2016R1A5A101014821
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터지원사업
연구과제명 나노-생체유체 검사 연구단
기 여 율 25/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2016.06.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465029709
과제번호 HI15C1512000019
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 임상연구인프라조성사업
연구과제명 [5차년도]체외진단용기기 분야 의료기기 중개임상시험 지원센터
기 여 율 25/100
과제수행기관명 고려대학교 산학협력단
연구기간 2019.10.01 ~ 2020.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465031049
과제번호 HG18C0012010020
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 방역연계 범부처 감염병 연구개발
연구과제명 현장검사용 분자진단시약의 정도관리물질 제조 및 임상시험
기 여 율 25/100
과제수행기관명 고려대학교 산학협력단
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465031664
과제번호 HR20C0021
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구중심병원 육성 R&D
연구과제명 신종 감염병 초고속 정밀진단기술 개발 및 사업화
기 여 율 25/100
과제수행기관명 고려대학교 구로병원
연구기간 2020.07.16 ~ 2028.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 6의 프라이머와 서열번호 7 및 8의 프로브를 포함하는, 중증열성혈소판감소증후군 바이러스 (Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome virus, SFTSV) 검출용 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 서열번호 7의 프로브는 5' 말단에 형광물질이 부착된 것을 특징으로 하는, SFTSV 검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 서열번호 8의 프로브는 3' 말단에 소광물질이 부착된 것을 특징으로 하는, SFTSV 검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 서열번호 9 내지 14의 프라이머와 서열번호 15 및 16의 프로브를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, SFTSV 검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 서열번호 7 및 15의 프로브는 5' 말단에 형광물질이 부착된 것을 특징으로 하는, SFTSV 검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 서열번호 8 및 16의 프로브는 3' 말단에 소광물질이 부착된 것을 특징으로 하는, SFTSV 검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 형광물질은 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein),

HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(tertramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 씨아디카르보시아닌(thiadicarbocyanine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, SFTSV 검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 소광물질은 IABkFQ(Iowa black FQ quencher), IAbRQSp(Iowa black RQ quencher), DABCYL(4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride), BHQ (Black Hole Quencher), EBQ(Excellent Bioneer Quencher), 및 ZEN-IBFQ(ZEN-Iowa Black FQ)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, SFTSV 검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 9

제4항의 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, SFTSV 검출용 키트.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 중합효소, dNTPs 및 버퍼로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는, SFTSV 검출용 키트.

청구항 11

(1) 시료의 게놈 DNA(gDNA)를 분리하는 단계;

(2) 상기 분리된 gDNA를 주형으로 하고 제4항의 프라이머 세트를 이용하여 등온 증폭반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

(3) 상기 증폭된 산물을 검출하는 단계;를 포함하는 SFTSV 검출 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 (1) 단계의 시료는 혈액, 혈청, 혈장, 말초혈 단핵세포, 말초혈 백혈구, 타액, 소변, 분변, 인두 면봉 스와브(throat swabs), 피부 상처 스와브(dermal lesion swabs), 뇌척수액(cerebrospinal fluids), 경부 도말 표본(cervical smears), 농집 샘플, 식품 기질(food matrices)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, SFTSV 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 중증열성혈소판감소증후군 바이러스(Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome virus, SFTSV)에 감염된 환자를 신속하고 정확하게 진단하기 위한 방법으로서 혈액 샘플로부터 SFTS 바이러스의 뉴클레오티드 서열을 검출할 수 있는 루프매개등온증폭반응(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 프라이머 및 프로브 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 중증열성혈소판감소증후군(Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome, SFTS)은 2009-2010년에 중국 중동부 지역과 북부지역 6개성(Liaoning, Shandong, Henan, Hubei, Anhui, Jiangsu)에 걸쳐 원인을 알 수 없는 고열과 혈소판감소를 주증상으로 한 환자들이 나타나, 이들에 대한 조사 결과가 2011년 New England Journal of Medicine(NEJM)에 보고됨으로써 세상에 처음 알려졌다. 작은소참진드기(Haemaphysalis longicornis)에 의해 감염되는 SFTS 바이러스는 심한 열이 나고 심한 경우 발열, 호흡기 또는 위장관 증상, 혈소판 감소증, 백혈구 감소증 및 출혈을 특징으로 약 6-30 %의 사망률을 나타내고 있다.

[0004] 부니아바이러스과(Bunyaviridae Family) 계통의 SFTS 바이러스는 직경 약 90-100 nm 정도의 크기로 구형이거나 비정형으로 나타난다. 유전자구조는 크기에 따라 크게 3개의 주요 분절(segment)에 대해 각각 L분절(6368 bp, RNA-dependent RNA polymerase, RdRp), M분절(3378 bp, two envelop glycoprotein, Gn+Gc), 및 S분절(1743 bp, Nucleocapsid protein and nonstructural S protein)로 이루어져 있다. SFTS의 임상 특징은 비특이적이며 아나플라즈마 파고사이트필리움(*Anaplasma phagocytophilum*)에 의한 인간 과립구 아나플라즈마증(Human granulocytic anaplasmosis(HGA)), 신장 증후군을 동반한 출혈열 및 렙토스피라증(Leptospirosis)을 동반하는 것으로 알려져 있고, 사람과 사람간 전염된 사례도 보고되었다. 따라서 SFTS의 조기 진단을 제공하기 위해 신뢰할 수 있는 SFTS 바이러스 탐지 도구가 시급히 필요한 실정이다.

[0005] 현재 바이러스의 검출은 바이러스 감염 후 바이러스가 혈중에 분포하게 되는 단계(viremia)에서 검출 및 분리가 가능하며, 뒤이어 수일 이내에 특이 항체 IgM, IgG가 형성되는 것으로 알려져 이에 대한 효소면역흡착분석(ELISA), 면역형광분석(IFA) 등의 검사법을 사용한 진단이 가능하다. 최근에는 분자진단 검사법으로서 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 SFTS 바이러스를 진단하는 방법에 대한 연구가 활발히 되고 있으나 항원항체법은 민감도와 특이도가 낮고 실시간 PCR법은 PCR 증폭 확인까지 2시간 정도의 시간이 소요되어 현장에서 빠르게 진단까지 어려움이 있다. 본 연구에서는 SFTS의 조기 진단을 위해 현장에서 적용 가능한 SFTS에 대한 실시간 루프매개등온증폭반응(LAMP) 프라이머와 프로브를 개발했고 내부 대조군(internal control)을 사용하여 허위 음성(false negative)을 배제하여 SFTS 진단의 정확성을 높였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Norihiro, T. et. al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nature protocols. 2008;3:5.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 현장에서 고가의 PCR 장비나 기술 없이 빠르게 SFTS 바이러스를 하나의 튜브에서 진단 가능한 SFTS 바이러스 검출용 루프매개등온증폭반응 프라이머와 프로브 세트 및 내부 대조군 프라이머와 프로브 세트를 제공하는 것이다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 6의 프라이머와 서열번호 7 및 8의 프로브를 포함하는, 중증열성혈소판감소증후군 바이러스(Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome virus, SFTSV) 검출용 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 프라이머 세트를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 6의 프라이머와 서열번호 7 및 8의 프로브를 포함하는, 하나의 튜브 내에서 다중 진단(multiplexing)이 가능한 SFTSV 검출용 LAMP 프라이머 세트를 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 프라이머 세트는 SFTSV, 찌즈가무시균(*Orientia tsutsugamushi*), 및 한타바이러스(hantavirus)를 동시에 진단할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 9 내지 14의 프라이머와 서열번호 15 및 16의 프로브를 추가로 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 서열번호 7 및 15의 프로브는 5' 말단에 형광물질이 부착된 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 형광물질은 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(tertramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 씨아디 카르보시아닌(thiadicarbocyanine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 서열번호 7 및 15의 프로브는 서로 다른 파장을 발하는 형광물질이 부착될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 서열번호 8 및 16의 프로브는 3' 말단에 소광물질이 부착된 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 소광물질은 IAbkFQ(Iowa black FQ quencher), IAbRQSp(Iowa black RQ quencher), DABCYL(4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride), BHQ (Black Hole Quencher), EBQ(Excellent Bioneer Quencher), 및 ZEN-IBFQ(ZEN-Iowa Black FQ)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 6의 프라이머와 서열번호 7 및 8의 프로브를 포함하는 SFTSV 검출용 키트를 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 6, 및 9 내지 14의 프라이머와 서열번호 7, 8, 15, 및 16의 프로브를 포함하는 SFTSV 검출용 키트를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 키트는 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 추가로 포함할 수 있으며, 상기 시약은 DNA 중합효소, dNTPs 및 버퍼로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 (1) 시료의 게놈 DNA(gDNA)를 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 gDNA를 주형으로 하고 서열번호 1 내지 6의 프라이머와 서열번호 7 및 8의 프로브를 포함하는 SFTSV 검출용 프라이머 세트를 이용하여 등온 증폭반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 (3) 상기 증폭된 산물을 검출하는 단계;를 포함하는 SFTSV 검출 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (1) 단계의 시료는 혈액, 혈청, 혈장, 말초혈 단핵세포, 말초혈 백혈구, 타액, 소변, 분변, 인두 면봉 스와브(throat swabs), 피부 상처 스와브(dermal lesion swabs), 뇌척수액(cerebrospinal fluids), 경부 도말 표본(cervical smears), 농즙 샘플, 식품 기질(food matrices)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 (2) 단계의 프라이머 세트는 서열번호 9 내지 14의 프라이머와 서열번호 15 및 16의 내부 대조군 프라이머 세트를 추가로 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 (3) 단계는 DNA 칩, 젤 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정, 및 인광 측정으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법으로 수행될 수 있으나, 바람직하게는 형광 측정 방법에 의한

수 있다.

- [0027] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 방법은 (3) 단계 이후에 SFTSV 검출용 프라이머 세트에 의해 증폭된 산물이 모두 검출되는 경우 SFTSV 양성으로 해석하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 방법은 (3) 단계 이후에 내부 대조군프라이머 세트에 의한 증폭산물이 검출되고 다른 프라이머 세트에 의한 증폭 산물은 검출되지 않는 경우 음성으로 해석하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 방법은 (3) 단계 이후에 (3) 단계의 검출 시간을 측정하여 SFTS 바이러스를 정량화 하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 “정량화”는 본 발명에 따른 프라이머 세트를 이용한 증폭반응 수행 시의 표준곡선과 비교하여 DNA 농도에 따른 형광물질 검출 시간을 정량화하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 (3) 단계 이후의 증폭 산물을 형광지표를 이용하여 검출함으로써 형광물질 검출 시간을 측정하여 DNA 농도를 정량화하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명의 프라이머 세트는 SFTS 바이러스의 L분절을 특이적으로 검출할 수 있는 루프매개등온증폭반응(LAMP) 프라이머 및 프로브를 개발한 것으로서, 높은 민감도와 정확도를 나타내며 검체의 SFTS 바이러스 감염 여부를 1 시간 이내에 전기영동 과정 없이 빠르게 진단할 수 있는 장점이 있다.
- [0032] 또한 본 발명은 형광 프로브를 이용하기 때문에 다른 유사한 증상의 바이러스와 함께 하나의 튜브 내에서 다중 진단(multiplexing)이 가능하다는 점에서 시간과 비용 측면에서 유리하여 기존의 SFTS 바이러스 검출법을 대체하는 분자진단검사방법으로 이용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 SFTS 바이러스에서 특이적인 L분절 유전자 서열에서 LAMP 프라이머 세트의 위치를 나타낸 것이다.
- 도 2는 SFTS 임상 검체를 대상으로 SFTS 바이러스의 L분절과 인간의 포도당-6-인산탈수소효소(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)를 증폭하는 내부 대조군(internal control)의 프라이머 및 프로브 세트를 이용하여 다중 진단(multiplexing) LAMP 실험 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 양성 대조군에 대한 SFTS 바이러스의 L분절의 LAMP 프라이머 및 프로브 세트의 민감도 테스트 결과를 보여주는 그래프이다.
- 도 4는 10배씩 연속적으로 희석한 임상 검체를 대상으로 개발된 SFTS 검출용 LAMP 프라이머 세트와 기존(reference) SFTS 검출용 LAMP 프라이머 세트의 성능을 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명의 SFTS 바이러스 검출용 LAMP 프라이머 및 프로브 세트가 다중진단(multiplexing)으로 동시에 SFTS 바이러스, 쯔쯔가무시균(*Orientia tsutsugamushi*), 및 한타바이러스(hantavirus), 세 종류 감염병을 검출할 수 있다는 것을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 본 발명자들은 현장에서 SFTS 바이러스에 감염된 환자를 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 방법에 대해 예의 연구하여 본 발명을 완성하였다.
- [0036] 구체적으로, 본 발명자들은 중증열성혈소판감소증후군 바이러스(Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome virus, SFTSV) 유전자의 L 분절(Large segment)에 특이적인 프라이머 세트를 루프매개등온증폭반응(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 기반으로 제작하였다.
- [0037] 본 발명의 LAMP 기반의 프라이머 세트는 전통적인 PCR과 달리 온도변화를 요구하지 아니하여 단순하고 가벼운 증폭 기기를 이용할 수 있고 분석에 소요되는 시간을 획기적으로 감소시킬 수 있다. 구체적으로, 본 발명은 실시간(Real-time) RT-LAMP 방법을 이용함으로써 종래의 Quantitative Real-time PCR(qRT-PCR)에 비해 시간을 40 분 이상 단축시킬 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명은 역방향 루프 프라이머(Backward Loop Primer, BLP)에 형광이 결합된 올리고뉴클레오타이드 프로

브를 표지하여 기존의 형광 염료(dye)를 사용하는 LAMP 방법보다 정확도와 특이도를 향상시킬 수 있다.

- [0039] 본 발명은 기존의 일반 PCR법으로 발생될 수 있는 결과 분석의 에러와 소요 시간을 줄이기 위해서 인간의 G6PD 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 제작하여 내부대조군(internal control)으로 제공함으로써 하나의 튜브 안에서 SFTS 바이러스를 검출할 수 있으며, 허위 음성(false negative)을 판정할 수 있다.
- [0040] 구체적으로, 본 발명은 L분절(Large segment) 유전자에 특이적인 LAMP 프라이머 및 프로브를 포함하는 중증열성혈소판증후군 바이러스(Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus, SFTSV) 검출용 LAMP 프라이머 및 프로브 세트를 제공한다.
- [0041] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 및 프로브 세트 및 상기 내부대조군 프라이머 세트를 포함하는 중증열성혈소판증후군 바이러스(SFTSV) 검출용 조성물을 제공한다. 하기 표 1의 서열번호 1-8은 SFTSV를 위한 프라이머 및 프로브 세트이며, 서열번호 9-16은 내부 대조군으로서 G6PD를 위한 프라이머 및 프로브 세트이다. 상기 프라이머 및 프로브 세트, 및 이를 포함하는 조성물은 실시간(Real-time) RT-LAMP를 이용한 중증열성혈소판증후군 바이러스(SFTSV) 검출법에 사용될 수 있다.
- [0042] 구체적으로, SFTSV의 L분절을 표적하는 상기 서열번호 1의 F3 프라이머, 서열번호 2의 B3 프라이머, 서열번호 3의 FIP 프라이머, 서열번호 4의 BIP 프라이머, 서열번호 5의 FL 프라이머, 서열번호 6의 BL 프라이머로 구성된 프라이머 세트, 및 서열번호 7의 프로브는 상기 BL 프라이머의 5' 말단에 형광이 결합된 35mer의 올리고뉴클레오타이드를 연결하여 디자인하였고, 이와 상보적인 서열번호 8의 올리고뉴클레오타이드(35mer)의 3' 말단에 BHQ-1(Black Hole Quencher-1)을 결합시켜 소광물질(quencher) 프로브를 제작하였다.
- [0043] 상기 내부대조군 프라이머 세트로서 인간의 포도당-6-인산탈수소효소(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD)를 표적하는 상기 서열번호 9의 F3 프라이머, 서열번호 10의 B3 프라이머, 서열번호 11의 FIP 프라이머, 서열번호 12의 BIP 프라이머, 서열번호 13의 FL 프라이머, 서열번호 14의 BL 프라이머로 구성된 프라이머 세트, 및 서열번호 15의 프로브는 상기 BL 프라이머의 5' 말단에 형광이 결합된 35mer의 올리고뉴클레오타이드를 연결하여 디자인하였고 이와 상보적인 서열번호 16의 올리고뉴클레오타이드(35mer)의 3' 말단에 BHQ-1을 결합시켜 소광물질(quencher) 프로브로 사용하였다.
- [0044] 상기 프로브에 부착되는 형광물질은 형광을 발하는 것이라면 제한되지 아니하나, 그 비제한적인 예로서 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(tertramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 씨아디카르보시아닌(thiadycarbocyanine) 등이 있다.
- [0045] 상기 프로브에 부착되는 소광물질은 IABkFQ(Iowa black FQ quencher), IABRQSp(Iowa black RQ quencher), DABCYL(4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride), BHQ (Black Hole Quencher; BHQ-1, BHQ-2 등), EBQ(Excellent Bioneer Quencher), ZEN-IBFQ(ZEN-Iowa Black FQ)일 수 있다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니고 당업계에 알려진 다양한 소광물질이 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명에서 검체 시료는 생물학적 시료로서 혈액, 혈청, 혈장, 말초혈 단핵세포, 말초혈 백혈구, 타액, 소변, 분변, 인두 면봉 스와브(throat swabs), 피부 상처 스와브(dermal lesion swabs), 뇌척수액(cerebrospinal fluids), 경부 도말 표본(cervical smears), 농즙 샘플, 식품 기질(food matrices), 및 뇌, 비장 및 간을 포함하는 신체의 다양한 부분의 세포 또는 조직을 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명에 있어서, “루프매개등온증폭반응(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)”은 기존 PCR법과 달리 PCR 사이클이 필요 없는 Bst, Gsp 등의 중합효소를 이용하여 등온의 조건에서 반응을 수행하는 방법으로, 기본적으로 4개의 프라이머를 이용하여, 양끝을 고리(loop) 구조로 합성하여 유전자의 특정 부위를 무한대로 증폭하고, 증폭된 DNA 산물을 형광 검출용 시약을 이용하거나 침전 반응시켜 증폭 유무를 확인하는 방법으로서, 바람직하게는 형광 검출용 시약을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0048] 또한, 본 발명에 있어서, “실시간 다중 루프매개등온증폭반응(Real-Time multiplex LAMP)”은 증폭 유무를 실시간으로 확인하는 방법으로서, 다양한 유전자를 동시에 검출할 수 있으며, 바람직하게는 실시간으로 시료에서

SFTS 바이러스를 검출할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0049] 본 발명의 프라이머 세트는 루프매개등온증폭반응(LAMP)에 사용되는 것이 바람직하며, 루프매개등온증폭반응은 표적 DNA를 LAMP에 의하여 증폭하는 단일-단계(one-step) LAMP일 수 있고, 실시간 LAMP (real-time LAMP)일 수 있으며, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0050] 본 발명에 있어서, "프라이머 (primer)"란 적절한 완충용액 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도 하에서 주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드를 말한다. 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 통상 15 내지 30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 안정한 혼성체를 형성하기 위해서는 더 낮은 온도를 필요로 한다. 프라이머 서열은 주형과 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화할 정도로 충분히 상보적이어야 한다.
- [0051] 본 발명의 프라이머는 예를 들면, 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법과 같은 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 프라이머는 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지의 예로는, 효소(예를 들어, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타아제), 방사성 동위원소(예를 들어, ^{32}P), 형광성 분자, 화학그룹(예를 들어, 바이오틴) 등이 있다.
- [0052] 본 발명에 있어서, "내부 프라이머(inner primer)"는 주형 DNA에 결합하여 새로운 DNA 사슬 합성의 시작점으로 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0053] 본 발명에 있어서, "외부 프라이머(outer primer)"는 내부 프라이머가 주형 DNA에 결합한 위치보다 더 바깥쪽에서 주형 DNA에 결합하는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 내부 프라이머가 주형 DNA에 결합하여 DNA 사슬이 신장된 이후, 외부 프라이머와 주형 DNA의 결합으로 사슬 변위(strand displacement)가 발생하여 먼저 형성된 사슬이 떨어져 나오게 된다.
- [0054] 본 발명에 있어서, "고리 프라이머(loop primer)"는 상기 내부 프라이머 및 외부 프라이머가 주형 DNA에 결합하여 형성된 초기 줄기 고리(stem loop) 구조 사슬이 고리(loop) 구조 생성 횟수를 증가시켜 결과적으로 전체 반응을 가속화시킬 수 있도록 하는, 뉴클레오타이드 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0055] 한편, 본 발명에서 고리 프라이머에서 형광물질이 부착된 염기를 특정하기 위한 염기의 번호매김은 통상적으로 올리고뉴클레오타이드의 염기 순서를 확인하는 방법과 동일하게 3'에서 5' 순서로 이루어진다.
- [0056] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0058] **실시예 1: SFTS 바이러스 검출용 LAMP 프라이머 세트, 중합효소연쇄반응 혼합물 조성 및 반응 조건**
- [0059] SFTS 바이러스 L분절의 염기서열을 바탕으로 디자인된 SFTS 바이러스 검출용 프라이머 (도 1) 및 프로브 세트와 G6PD의 염기서열을 바탕으로 디자인된 내부 대조군 프라이머 및 프로브 세트 서열을 표 1에 정리하였다. RT-LAMP 프라이머 믹스 조성은 표 2에, 반응 혼합물의 시약 조성은 표 3에 정리하였으며, RT-LAMP 반응 조건은 표 4에 나타내었다.

표 1

서열번호	Name	Sequence (5'-3')	Target gene
1	SFTS L LAMP primer set	SFTS2_F3 CCG ACT CAG GCT TTG GTT C	L segment RNA polymerase (1043-1260)
2		SFTS2_B3 AAG GCA GGC TTG AAT CGC	
3		SFTS2_FIP CTA CCC CCT CCA CAT TGC CYT TRA TGG ATC ATG GCG CAT A	
4		SFTS2_BIP TCA GTG ACC CTG CAA AAG ARC TTT TGC CTC TTT GGG GGT RTC	
5		SFTS2_LF TTG CCC ACA GCT CAC CA	
6		SFTS2_LB CAT TGC YAT CTC TGA TGA TCC AGA W	
7		SFTS_LAMP3_BL CGG GCC CGT ACA AAG GGA ACA CCC ACA CTC	
8		P3 (FAM) CGT TGC CCA CAG CTC ACC A	
9		P3_QUANCHER GAG TGT GGG TGT TCC CTT TGT ACG GGC CCG	
10	Internal Control LAMP primer set	IC_LAMP_7_F3 TGTCACCAGCAACATCTCGA	G6PD
11		IC_LAMP_7_B3 TCCTCAGGGAAGCAAATGAC	
12		IC_LAMP_7_FIP ATAGCAGAGAGGCTGCCTACGGTTTTGATGTCCCTGTCCCACCA	
13		IC_LAMP_7_BIP AAGAAAAGCAGACGCAGCAGCTTTTGGGGCTGTTGCGGATT	
14		IC_LAMP_7_FLP GGGGTGGCCATGGAGTGC	
15		IC_LAMP_7_BLP TCCCAACCTCAATGCCCTGC	
16		IC_LAMP_7_BLP CGG GCC CGT ACA AAG GGA ACA CCC ACA CTC	
16		_PROBE3 HEX CGT CCC AAC CTC AAT GCC CTG C	
17	Reference SFTS LAMP primer set [J. Microbiol. Biotechnol. 2018, 28(11), 1928-1936]	P3_QUANCHER GAG TGT GGG TGT TCC CTT TGT ACG GGC CCG	L segment RNA polymerase (4393-4598)
18		SFTS_REF_F3 TTCCCTCAGGCTCAAGAGT	
19		SFTS_REF_B3 AGACGGGGTCCAAGCTTAG	
20		SFTS_REF_FIP GACAATGTTTCTCTCCCTAATGCACATTGCTTGAGGAAAGT	
21		SFTS_REF_BIP TTCCAAGAGCCAGTGGACTTGCCCAAAACCACACCTCTGACAC	
22		SFTS_REF_LF CAACAAATTTCCCTGTTAGGTGTTT	
22		SFTS_REF_LB GGTGCAAGGCAGAAGATCTG	

[0061]

표 2

SFTS LAMP primer	Internal Control LAMP primer	Vol(ul)
SFTS2_F3	IC_LAMP_7_F3	4
SFTS2_B3	IC_LAMP_7_B3	4
SFTS2_FIP	IC_LAMP_7_FIP	32
SFTS2_BIP	IC_LAMP_7_BIP	32
SFTS2_LF	IC_LAMP_7_FLP	10
SFTS2_LB	IC_LAMP_7_BLP	4
SFTS_LAMP3_BL_PROBE3_FAM	IC_LAMP_7_BLP_PROBE3_HEX	6
DW		8
TOTAL		100

[0062]

표 3

구분	부피
RM	12.5
EM	2
Distilled water	3.625
Primer mix	1.25 (SFTS2-P4)
	0.625 (IC-P4)
QUANCHER P4	2.5
Template	2.5
TOTAL	25

[0063]

표 4

실험 1. 원스텝 RT-LAMP검출실험		
온도	반응시간	
65 °C	1분	60 Cycle
80 °C	5분	
전체반응시간	65분	

[0064]

[0066]

실시예 2: SFTS 바이러스 균주 검출

[0067]

본 발명의 SFTS 검출용 LAMP 프라이머 세트와 내부 대조군 LAMP 프라이머 세트에 대하여 임상 검체를 대상으로 다중 진단(multiplexing) PCR 실험을 진행한 결과, SFTS 바이러스의 L분절과 내부 대조군인 G6PD 유전자를 동시에 검출할 수 있다는 점이 확인되었다(도 2).

[0069]

실시예 3: 민감도 테스트

[0070]

본 발명의 양성 대조군(positive control)을 제작하고, 1X10의 농도부터 10까지 희석하여 민감도를 확인하였다(표 5 및 도 3). 양성대조물질로서 SFTS 바이러스의 L분절 유전자를 삽입한 플라스미드 DNA(plasmid DNA)에 대해 10분의 1 희석배수를 이용하여 농도별 분석능을 검증한 결과, SFTS 검출용 LAMP 프라이머 세트는 10 copy에서 증폭이 확인되는 높은 민감도를 보이는 것으로 확인되었다.

표 5

No	Copies/ μ l	Ct value	RFU
1	10^8	9.02	11135
2	10^7	10.31	12624
3	10^6	11.43	12472
4	10^5	12.28	12005
5	10^4	13.33	11837
6	10^3	14.65	12252
7	10^2	22.04	10858
8	10^1	25.89	11790
9	10^0	N/A	38.2

[0072]

[0074]

임상검체 원액을 1×10^{-6} 의 농도까지 희석하여 본 발명의 SFTS 검출용 LAMP 프라이머 세트와 기존 SFTS 검출용 LAMP 프라이머 세트[J. Microbiol. Biotechnol. 2018, 28(11), 1928-1936]의 민감도를 비교하였다(표 6 및 도 4). 기존 SFTS 검출용 LAMP 프라이머 세트는 10^{-3} 까지 SFTS 바이러스를 검출한 반면, 본 발명의 SFTS 검출용 LAMP 프라이머 세트는 10^{-4} 까지 SFTS 바이러스를 검출했고 내부 대조군은 10^{-2} 까지 SFTS 바이러스를 검출하였다.

표 6

SFTS 검체	개발 SFTS 멀티플렉스 LAMP 프라이머 세트				Reference LAMP Primer set	
	SFTS(FAM)		Internal control (HEX)		SFTS(FAM)	
	CT	RFU	CT	RFU	CT	RFU
원검체(고**)	13.71	12974	13.12	2404	21.65	32432
검체10-1 희석	14.89	13008	15.10	2129	24.02	28013
검체10-2 희석	16.65	12587	18.08	2083	26.05	19329
검체10-3 희석	17.82	15325	N/A	143	30.16	31599
검체 10-4 희석	52.07	2481	N/A	36.7	N/A	891
검체 10-5 희석	N/A	189	N/A	117	N/A	1070
검체 10-6 희석	N/A	70.7	N/A	25.4	N/A	1679
DW1	N/A	1.08	N/A	0.137	N/A	341

[0076]

[0078]

실시예 4: 임상시료에 대한 SFTS 바이러스 진단 키트 효능 검증 결과

[0079]

10개의 SFTS 임상 양성샘플을 대상으로 본 발명의 SFTS 바이러스 진단 키트의 성능평가 실험을 실시하였다. 상기 10개의 SFTS 샘플에서 30분 이내에 증폭이 확인되었고, 내부 대조군도 Ct 값 10 부근에서 모두 증폭이 확인되었으며(표 7), 10개의 SFTS 음성 샘플에 대해서 SFTS 검출용 LAMP 프라이머 세트는 모두 음성으로 확인되었고, 내부 대조군은 Ct 값 10 부근에서 모두 음성으로 확인되었다(표 8).

[0080]

상기 10개의 SFTS 샘플에 대한 기존 SFTS 검출용 LAMP 프라이머 세트와의 성능비교 실험을 실시한 결과, 상기 기존 LAMP 프라이머 세트는 상기 10개 샘플 중 8개를 검출한 반면, 본 발명의 LAMP 프라이머 세트는 10개 샘플 모두를 검출하였고, 상기 10개 샘플이 모두 기존 LAMP 프라이머 세트보다 더 낮은 Ct 값을 나타내었다(표 9). 또한, 본 발명의 LAMP 프라이머 세트는 다중 진단(multiplexing)이 가능하므로 추후 다른 바이러스 검출과 조합하여 진단이 가능하다고 할 것이다(도 5).

표 7

SFTS 양성검체 수	SFTS LAMP (FAM)		Internal control (Hex)	
	Ct 값	RFU	Ct 값	RFU
1	12.79	11284	9.35	2959
2	15.55	11881	11.79	3309
3	26.82	11004	10.85	3194
4	10.9	11789	9.05	3313
5	10.88	11009	9.17	3173
6	18.61	9291	9.26	2935
7	18	11545	9.47	3184
8	17.63	11475	10.57	3233
9	29.31	10574	10.56	2975
10	10.44	10786	9.18	3174

[0082]

표 8

SFTS 음성검체 수	SFTS LAMP (FAM)		Internal control (Hex)	
	Ct 값	RFU	Ct 값	RFU
1	N/A	-15.6	12.1	2816
2	N/A	-27.1	8.71	3064
3	N/A	-32.6	11.04	3522
4	N/A	-21.9	9.02	3314
5	N/A	-23.7	9.67	3359
6	N/A	-34	14.05	3278
7	N/A	-20.9	11.61	3011
8	N/A	-14	9.07	2892
9	N/A	-17.7	8.19	3000
10	N/A	-21.9	7.68	2699

[0083]

표 9

SFTS 양성검체 수	개발 SFTS 바이러스 LAMP 키트				논문 SFTS LAMP 프라이머 세트	
	SFTS LAMP (FAM)		Internal control (Hex)		Ct 값	RFU
	Ct 값	RFU	Ct 값	RFU		
1	13.33	12352	8.41	3504	34.65	24580
2	14.86	13597	9.07	4265	N/A	101
3	14.03	14081	9.5	3853	N/A	63.2
4	11.07	14043	8.11	3851	27.93	30067
5	11.06	13750	8.14	3855	24.8	22719
6	27.76	11945	8.19	3905	29.17	25663
7	32.51	9444	8.35	4031	33.06	21291
8	36.51	4467	8.89	4316	38.19	23161
9	37.21	3051	8.91	3784	38.3	31362
10	11.3	14970	8.21	3952	23.23	24692

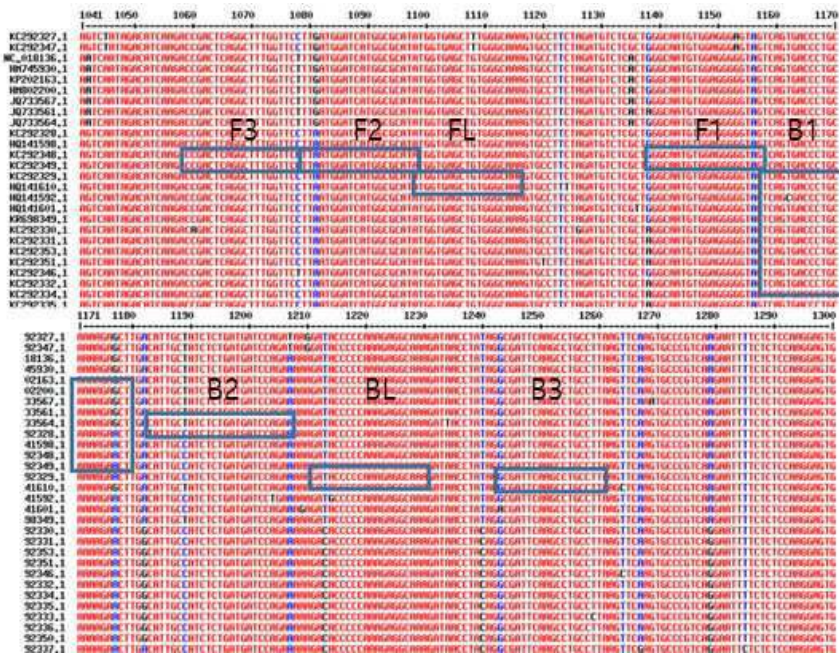
[0084]

[0086]

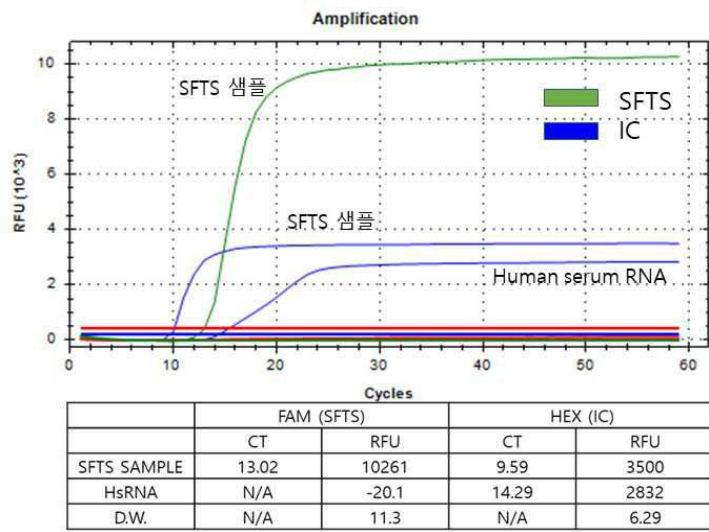
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

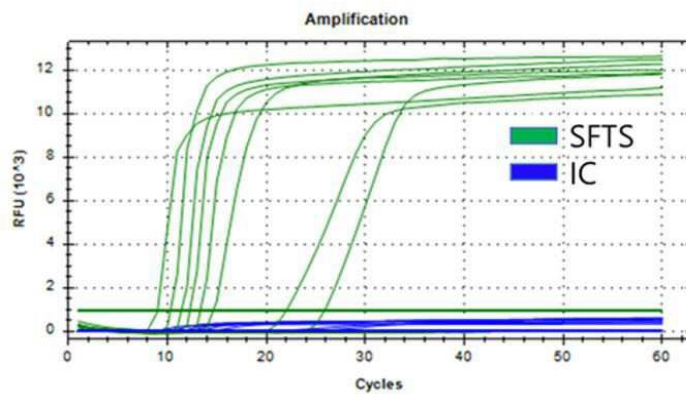
도면1



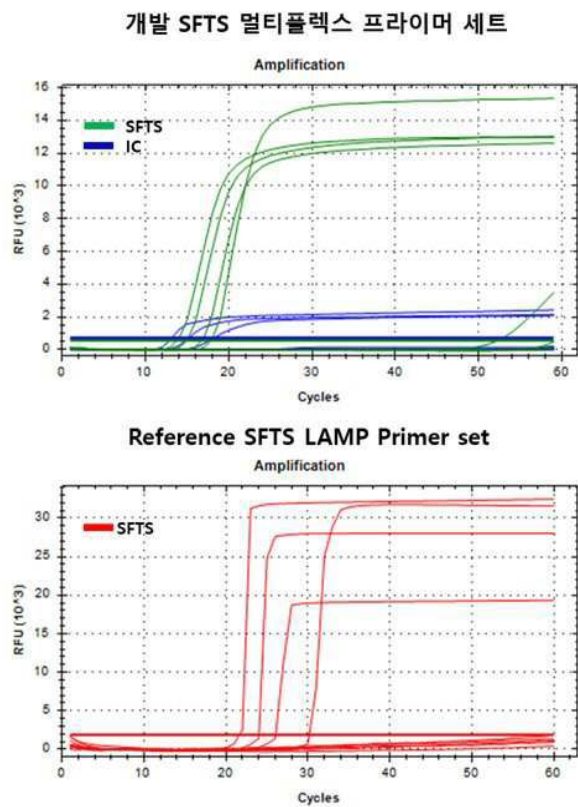
도면2



도면3



도면4



도면5

