



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0016192
(43) 공개일자 2015년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0188757(분할)

(22) 출원일자 2014년12월24일

심사청구일자 2014년12월24일

(62) 원출원 특허 10-2014-0029645

원출원일자 2014년03월13일

심사청구일자 2014년10월07일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93

(72) 발명자

김정옥

강원 강릉시 원대로128번길 14, 102동 306호 (교동, 하이빌현대아파트)

(74) 대리인

특허법인태백

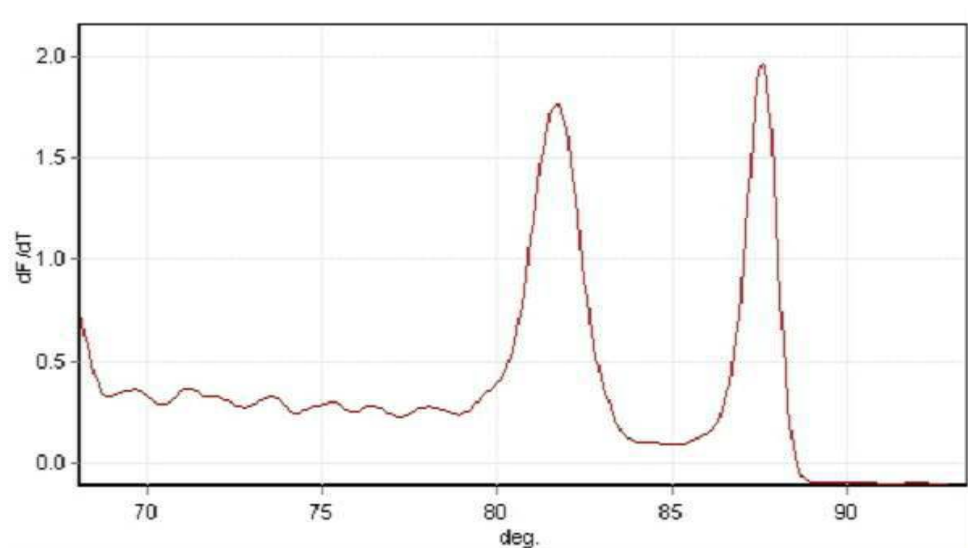
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 실시간 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 이용하는 마이코박테리아의 동정 방법

(57) 요약

본 발명은 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트, 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트를 포함하는 마이코박테리아 동정용 키트 및 이를 이용하는 실시간 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 이용하는 마이코박테리아 동정 방법에 관한 것이다. 상기 방법에 의하면, 동정 가능한 마이코박테리아의 종의 종류가 많고, 검사가 간편하고 정확하며 빠르고, 적은 비용으로 효율적으로 마이코박테리아를 동정할 수 있는 임상진단 수단을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 5의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.xenopi*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및, 서열번호 62의 정방향 프라이머 및 서열번호 63의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.peregrinum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제1 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트;

서열번호 16의 정방향 프라이머 및 서열번호 17의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.abscessus*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 18의 정방향 프라이머 및 서열번호 19의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.intracellulare*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 20의 정방향 프라이머 및 서열번호 21의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.szulgai*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 및 서열번호 22의 정방향 프라이머 및 서열번호 23의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.terrae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제2 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트;

서열번호 24의 정방향 프라이머 및 서열번호 25의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.avium*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 26의 정방향 프라이머 및 서열번호 27의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.chelonae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 30의 정방향 프라이머 및 서열번호 31의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.kansasii* 또는 *M.gastri*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 7의 정방향 프라이머 및 서열번호 9의 역방향 프라이머의 세트를 포함하는 *M.fortuitum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제3 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트;

서열번호 38의 정방향 프라이머 및 서열번호 39의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.simiae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 40의 정방향 프라이머 및 서열번호 41의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.ulcerans*의 HSP65에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 42의 정방향 프라이머 및 서열번호 43의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.septicum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 34의 정방향 프라이머 및 서열번호 35의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.gordonae*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제4 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트;

서열번호 48의 정방향 프라이머 및 서열번호 49의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.scrofulaceum*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 54의 정방향 프라이머 및 서열번호 55의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.marinum* 또는 *M.ulcerans*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 46의 정방향 프라이머 및 서열번호 47의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.smegmatis*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제5 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 및

서열번호 3의 정방향 프라이머 및 서열번호 4의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.gastri*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 64의 정방향 프라이머 및 서열번호 65의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.mucogenicum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 56의 정방향 프라이머 및 서열번호 57의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.celatum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제6 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트로 이루어진 것을 특징으로 하는 마이코박테리아 동정용 키트.

청구항 2

청구항 제1항에 있어서, 상기 제1 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트 내지 제6 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트는 별도의 보관수단에 의해 분리되어 있는 것을 특징으로 하는 마이코박테리아 동정용 키트.

청구항 3

분리된 시료로부터 DNA를 얻는 단계;

청구항 제1항에 의한 마이코박테리아 동정용 키트를 이용하여 상기 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응을 시키는 단계;

온도를 변화시키면서 상기 실시간 중합효소연쇄반응에 의해 증폭된 증폭산물을 용해시켜 용해곡선을 얻는 단계; 및

상기 용해곡선의 용해온도를 확인하는 단계를 포함하는 마이코박테리아 동정 방법.

명세서

기술 분야

- [0001] 본 발명은 실시간 중합효소연쇄반응법과 용해곡선분석을 이용하는 마이코박테리아의 동정 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트, 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트를 포함하는 마이코박테리아 동정용 키트 및 이를 이용하는 실시간 중합효소연쇄반응법과 용해곡선분석을 이용하는 마이코박테리아 동정 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 항산성비결핵균(Nontuberculous mycobacteria)은 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis*)과 나병균(*Mycobacterium leprae*)을 제외한 모든 마이코박테리아균을 지칭한다. 항산성비결핵균은 코흐가 결핵균을 발견한 후 얼마 지나지 않아 알려졌지만 최근에야 중요한 감염균으로 인식되기 시작하였다.
- [0003] 최근 보건당국의 노력으로 국내에서 결핵유병률이 저하하고 있으나 항산성비결핵균에 의한 감염은 증가하는 추세이다. 보고에 의하면 결핵도말 및 배양 양성 검체의 12%에서 항산성비결핵균이 분리된다. 또한 2009년 액체 결핵배양법이 보험급여 됨에 따라 액체결핵배양 검사를 실시하는 검사실이 늘고 있으며, 액체배지를 사용하여 결핵을 배양하는 경우 기존의 고체배지를 사용한 배양보다 항산성비결핵균의 검출이 증가한다.
- [0004] 결핵균에 의한 유병률이 낮은 미국 및 유럽 여러나라에서도 항산성비결핵균에 의한 감염이 증가하고 있다. 미국의 보고에 의하면, 1979년에서 1980년에 분리된 마이코박테리아의 1/3에서 1992년에는 분리된 마이코박테리아의 3/4 으로 항산성비결핵균의 검출이 증가되었다. 또한 미국, 캐나다, 서유럽 등에서는 객담에서 분리된 항산성비결핵균의 40~50%가 폐질환을 일으킨다고 알려져 있다.
- [0005] 마이코박테리아에 의한 감염증의 진단은 전통적으로 배양을 통해 균을 분리하고 생화학방법으로 동정하는 검사법을 사용한다. 그러나 이 방법은 마이코박테리아의 균 특성상 성장이 늦어 배양에 시간이 걸리고, 생화학적 방법만으로 다양한 마이코박테리아 균종을 정확하게 동정할 수 없다. 최근 분자생물학적 기법들을 이용한 마이코박테리아 동정법들이 검사실에 도입되고 있다. Accuprobe, INNO-LiPA 마이코박테리아, GenoType *Mycobacterium* CM, AS 등 상업용 검사 키트 등이다. 이들 검사키트 들은 검사시간이 상대적으로 짧고 민감하지만 동정 가능한 마이코박테리아의 종이 한정되어 있거나 PCR 반응 후 증폭산물을 교잡반응을 하는 과정에서 오염 가능성이 있는 단점이 있다. 따라서, 검사가 간편하고 정확하며 빠르고, 비용도 적게 들며, 동정 가능한 마이코박테리아의 종의 종류가 많은 마이코박테리아 동정 방법이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 마이코박테리아를 특정 종으로 정확하게 검출하고 동정할 수 있는 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트를 제공하는 데 있다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 마이코박테리아를 특정 종으로 정확하게 검출하고 동정할 수 있는 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트를 포함하는 마이코박테리아 동정용 키트를 제공하는 데 있다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 마이코박테리아를 특정 종으로 정확하게 검출하고 동정할 수 있는 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트를 포함하는 마이코박테리아 동정용 키트를 이용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법(real-time polymerase chain reaction)과 용해곡선분석을 이용하는 마이코박테리아 동정 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 서열번호 1의 정방향 프라이머 및 서열번호 2의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.gastr*i의 ITS(Internal transcribed spacer) 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 3의 정방향 프라이머 및 서열번호 4의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.gastr*i의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 5의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.xenopi*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 7의 정방향 프라이머 및 서열번호 8의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.fortuitum*의 ITS 유전자에

특이적인 프라이머 세트; 서열번호 7의 정방향 프라이머 및 서열번호 9의 역방향 프라이머의 세트를 포함하는 *M. fortuitum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 10의 정방향 프라이머 및 서열번호 11의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균(*M. tuberculosis* complex)의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 12의 정방향 프라이머 및 서열번호 13의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성 비결핵균(Nontuberculous mycobacteria)의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 14의 정방향 프라이머 및 서열번호 15의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. abscessus*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 16의 정방향 프라이머 및 서열번호 17의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. abscessus*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 18의 정방향 프라이머 및 서열번호 19의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. intracellulare*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 20의 정방향 프라이머 및 서열번호 21의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. szulgai*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 22의 정방향 프라이머 및 서열번호 23의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. terrae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 24의 정방향 프라이머 및 서열번호 25의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. avium*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 26의 정방향 프라이머 및 서열번호 27의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. chelonae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 28의 정방향 프라이머 및 서열번호 29의 역방향 프라이머의 세트를 포함하는 *M. kansasii* 또는 *M. gastri*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 30의 정방향 프라이머 및 서열번호 31의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. kansasii* 또는 *M. gastri*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 32의 정방향 프라이머 및 서열번호 33의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. gordonae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 34의 정방향 프라이머 및 서열번호 35의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. gordonae*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 36의 정방향 프라이머 및 서열번호 37의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. marinum* 또는 *M. ulcerans*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 38의 정방향 프라이머 및 서열번호 39의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. simiae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 40의 정방향 프라이머 및 서열번호 41의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. ulcerans*의 HSP65(Heat shock protein 65)에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 42의 정방향 프라이머 및 서열번호 43의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. septicum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 44의 정방향 프라이머 및 서열번호 45의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. smegmatis*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 46의 정방향 프라이머 및 서열번호 47의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. smegmatis*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 48의 정방향 프라이머 및 서열번호 49의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. scrofulaceum*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 50의 정방향 프라이머 및 서열번호 51의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. scrofulaceum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 52의 정방향 프라이머 및 서열번호 53의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. haemophilum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 54의 정방향 프라이머 및 서열번호 55의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. marinum* 또는 *M. ulcerans*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 56의 정방향 프라이머 및 서열번호 57의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. celatum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 58의 정방향 프라이머 및 서열번호 59의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. abscessus*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 60의 정방향 프라이머 및 서열번호 61의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. abscessus* 또는 *M. chelonae*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 62의 정방향 프라이머 및 서열번호 63의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. peregrinum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 64의 정방향 프라이머 및 서열번호 65의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. mucogenicum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 서열번호 66의 정방향 프라이머 및 서열번호 67의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. shimoidei*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 2 이상의 프라이머 세트를 포함하는 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트를 제공한다.

[0010]

상기 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트에서, 항산성비결핵균 중 *M. gastri*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. abscessus*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. szulgai*, *M. terrae*, *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. ulcerans*, *M. septicum*, *M. smegmatis*, *M. scrofulaceum*, *M. haemophilum*, *M. celatum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. shimoidei*는 16S rRNA 유전자, hsp65(Heat Shock Protein 65) 유전자, ITS(internal transcribed spacer) 유전자를 타겟으로 하여, 각 균주에 특이적이면서도 각 균주의 실시간 증폭 산물의 용해 곡선의 용해온도(Tm)차이가 크도록 설계된 것이다.

[0011]

서열번호 28의 정방향 프라이머 및 서열번호 29의 역방향 프라이머의 세트를 포함하는 *M. kansasii* 또는 *M. gastri*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트는 *M. kansasii* 또는 *M. gastri*의 균주에 특이적으로, 실시간 증합효소연쇄반응 및 용해곡선 분석 시 상기 두 균주의 간에 염기서열이 동일하여 두 균주를 서로 구별할 수는 없으나, 다른 마이코박테리아 균주와는 구별할 수 있도록 설계된 것이다.

- [0012] 서열번호 30의 정방향 프라이머 및 서열번호 31의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.kansasii* 또는 *M.gastri*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트 *M.kansasii* 또는 *M.gastri*의 균주에 특이적으로, 실시간 중합효소연쇄반응 및 용해곡선 분석 시 상기 두 균주의 간에 염기서열이 동일하여 두 균주를 서로 구별할 수는 없으나, 다른 마이코박테리아 균주와는 구별할 수 있도록 설계된 것이다.
- [0013] 서열번호 36의 정방향 프라이머 및 서열번호 37의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.marinum* 또는 *M.ulcerans*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트는 *M.marinum* 또는 *M.ulcerans*의 균주에 특이적으로, 실시간 중합효소연쇄반응 및 용해곡선 분석 시 상기 두 균주의 간에 염기서열이 동일하여 두 균주를 서로 구별할 수는 없으나, 다른 마이코박테리아 균주와는 구별할 수 있도록 설계된 것이다.
- [0014] 서열번호 54의 정방향 프라이머 및 서열번호 55의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.marinum* 또는 *M.ulcerans*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트는 *M.marinum* 또는 *M.ulcerans*의 균주에 특이적으로, 실시간 중합효소연쇄반응 및 용해곡선 분석 시 상기 두 균주의 간에 염기서열이 동일하여 두 균주를 서로 구별할 수는 없으나, 다른 마이코박테리아 균주와는 구별할 수 있도록 설계된 것이다.
- [0015] 서열번호 60의 정방향 프라이머 및 서열번호 61의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.abscessus* 또는 *M.chelonae*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트는 *M.abscessus* 또는 *M.chelonae*의 균주에 특이적으로, 실시간 중합효소연쇄반응 및 용해곡선 분석 시 상기 두 균주의 간에 염기서열이 동일하여 두 균주를 서로 구별할 수는 없으나, 다른 마이코박테리아 균주와는 구별할 수 있도록 설계된 것이다.
- [0016] 상기 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트에서 결핵균과 항산성비결핵균은 각각 결핵균의 IS6110 유전자 및 항산성비결핵균의 16S rRNA에 특이적이면서 상기 균주 간의 실시간 증폭 산물의 용해 곡선의 용해온도(Tm)차이가 크도록 설계된 것이다.
- [0017] 상기 프라이머 세트는 실시간 증폭 산물의 염기서열, 크기 및 GC 비율에 따라 특징적인 용해곡선을 보이므로 이를 고려하여 설계된 것이다.
- [0018] 상기 서열번호 12의 정방향 프라이머(5'-tktggtggaaagcttttgc-3')는 5'-tgtggtggaaagcttttgc-3' (서열번호 68) 및 5'-tttggtggaaagcttttgc-3' (서열번호 69)를 포함하는 프라이머 세트이다. 예를 들어, 5'-tgtggtggaaagcttttgc-3' (서열번호 68) 및 5'-tttggtggaaagcttttgc-3' (서열번호 69)가 1:1의 비율로 포함되는 프라이머 세트일 수 있다.
- [0019] 상기 서열번호 18의 정방향 프라이머(5'-gggtctaataccgrataggaccttta-3')는 5'-gggtctaataccgataggaccttta-3' (서열번호 70) 및 5'-gggtctaataccgaataggaccttta-3' (서열번호 71)를 포함하는 프라이머 세트이다. 예를 들어, 5'-gggtctaataccgataggaccttta-3' (서열번호 70) 및 5'-gggtctaataccgaataggaccttta-3' (서열번호 71)가 1:1의 비율로 포함되는 프라이머 세트일 수 있다.
- [0020] 상기 서열번호 19의 역방향 프라이머(5'-cgcaaaagctttccaccta-3')는 5'-cgcaaaagctttccaccaa-3' (서열번호 72) 및 5'-cgcaaaagctttccaccta-3' (서열번호 73)를 포함하는 프라이머 세트이다. 예를 들어, 5'-cgcaaaagctttccaccaa-3' (서열번호 72) 및 5'-cgcaaaagctttccaccta-3' (서열번호 73)가 1:1의 비율로 포함되는 프라이머 세트일 수 있다.
- [0021] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 서열번호 1의 정방향 프라이머 및 서열번호 2의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.gastri*의 ITS(Internal transcribed spacer) 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 3의 정방향 프라이머 및 서열번호 4의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.gastri*의 ITS(Internal transcribed spacer) 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 5의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.xenopi*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 7의 정방향 프라이머 및 서열번호 8의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.fortuitum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 7의 정방향 프라이머 및 서열번호 9의 역방향 프라이머의 세트를 포함하는 *M.fortuitum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 10의 정방향 프라이머 및 서열번호 11의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균(*M.tuberculosis* complex)의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 12의 정방향 프라이머 및 서열번호 13의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균(Nontuberculous mycobacteria)의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 14의 정방향 프라이머 및 서열번호 15의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.abscessus*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 16의 정방향 프라이머 및 서열번호 17의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.abscessus*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 18의 정방향 프라이머 및 서열번호 19의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.intracellulare*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 20의 정방향 프라이머 및 서열번호

21의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.szulgai*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 22의 정방향 프라이머 및 서열번호 23의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.terrae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 24의 정방향 프라이머 및 서열번호 25의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.avium*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 26의 정방향 프라이머 및 서열번호 27의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.chelonae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 28의 정방향 프라이머 및 서열번호 29의 역방향 프라이머의 세트를 포함하는 *M.kansasii* 또는 *M.gastri*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 30의 정방향 프라이머 및 서열번호 31의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.kansasii* 또는 *M.gastri*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 32의 정방향 프라이머 및 서열번호 33의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.gordona*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 34의 정방향 프라이머 및 서열번호 35의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.gordona*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 36의 정방향 프라이머 및 서열번호 37의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.marinum* 또는 *M.ulcerans*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 38의 정방향 프라이머 및 서열번호 39의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.simiae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 40의 정방향 프라이머 및 서열번호 41의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.ulcerans*의 HSP65(Heat shock protein 65)에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 42의 정방향 프라이머 및 서열번호 43의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.septicum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 44의 정방향 프라이머 및 서열번호 45의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.smegmatis*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 46의 정방향 프라이머 및 서열번호 47의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.smegmatis*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 48의 정방향 프라이머 및 서열번호 49의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.scrofulaceum*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 50의 정방향 프라이머 및 서열번호 51의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.scrofulaceum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 52의 정방향 프라이머 및 서열번호 53의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.haemophilum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 54의 정방향 프라이머 및 서열번호 55의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.marinum* 또는 *M.ulcerans*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 56의 정방향 프라이머 및 서열번호 57의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.celatum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 58의 정방향 프라이머 및 서열번호 59의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.abscessus*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 60의 정방향 프라이머 및 서열번호 61의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.abscessus* 또는 *M.chelonae*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 62의 정방향 프라이머 및 서열번호 63의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.peregrinum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 64의 정방향 프라이머 및 서열번호 65의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.mucogenicum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 서열번호 66의 정방향 프라이머 및 서열번호 67의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.shimoidae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 2 이상의 프라이머 세트를 포함하는 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트를 포함하는 마이코박테리아 동정용 키트를 제공한다.

[0022] 상기 마이코박테리아 동정용 키트는 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 상기 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하기 위한 시약으로는 DNA 중합효소, dNTPs, PCR 버퍼 등을 포함할 수 있다. 상기 마이코박테리아 동정용 키트는 마이코박테리아를 신뢰성 있게 구별할 수 있도록, 각 균주를 특정 균으로 동정하기 위하여 특정 균주에 특이적인 유전자를 타겟으로 하면서도, 용해온도 차이가 크도록 설계된 프라이머를 포함할 수 있다. 상기 프라이머 세트는 실시간 증폭 산물의 염기서열, 크기 및 GC 비율에 따라 특징적인 용해곡선을 보이므로 이를 고려하여 설계된 것이다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 따른 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트에는 SYBR Green과 같은 형광 색소는 고농도에서 중합효소연쇄반응을 저하시키고 용해과정에서 형광색소의 재분포가 일어나 유전자형결정까지 가능한 고해상도 용해곡선(high-resolution melting curve)분석에는 불리할 수 있으므로, SYTO 9, EvaGreen, LCGreen 등의 형광색소를 포함할 수 있다. 다시 말해, 실시간 중합효소연쇄반응법과 용해곡선분석을 위한 반응액에는 상기 SYTO 9, EvaGreen, LCGreen 등의 형광색소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 중합효소연쇄반응법과 용해곡선분석을 위한 반응액에는 EvaGreen 형광색소가 포함될 수 있다. 본 발명의 일실시예에서 Type-it HRM PCR 키트(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 사용하여 실시간-중합효소연쇄반응을 실시하였다. 상기 Type-it HRM PCR 키트에는 형광색소로서 EvaGreen이 들어 있다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 마이코박테리아 동정용 키트는 서열번호 1의 정방향 프라이머 및 서열번호 2의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.gastri*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 5의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.xenopi*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 7의 정방향 프라이머 및 서열번호 8의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.fortuitum*의 ITS 유전자에 특이적인 프

이머 세트, 서열번호 10의 정방향 프라이머 및 서열번호 11의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 12의 정방향 프라이머 및 서열번호 13의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성 비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제1 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 서열번호 14의 정방향 프라이머 및 서열번호 15의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. abscessus*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 18의 정방향 프라이머 및 서열번호 19의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. intracellulare*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 20의 정방향 프라이머 및 서열번호 21의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. szulgai*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 및 서열번호 22의 정방향 프라이머 및 서열번호 23의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. terrae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제2 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 서열번호 24의 정방향 프라이머 및 서열번호 25의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. avium*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 26의 정방향 프라이머 및 서열번호 27의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. chelonae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 28의 정방향 프라이머 및 서열번호 29의 역방향 프라이머의 세트를 포함하는 *M. kansasii* 또는 *M. gastri*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 32의 정방향 프라이머 및 서열번호 33의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. gordonae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제3 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 서열번호 36의 정방향 프라이머 및 서열번호 37의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. marinum* 또는 *M. ulcerans*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 38의 정방향 프라이머 및 서열번호 39의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. simiae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 40의 정방향 프라이머 및 서열번호 41의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. ulcerans*의 HSP65에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 42의 정방향 프라이머 및 서열번호 43의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. septicum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 44의 정방향 프라이머 및 서열번호 45의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. smegmatis*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제4 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 서열번호 48의 정방향 프라이머 및 서열번호 49의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. scrofulaceum*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 50의 정방향 프라이머 및 서열번호 51의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. scrofulaceum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 52의 정방향 프라이머 및 서열번호 53의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. haemophilum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 56의 정방향 프라이머 및 서열번호 57의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. celatum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제5 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 및 서열번호 58의 정방향 프라이머 및 서열번호 59의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. abscessus*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 62의 정방향 프라이머 및 서열번호 63의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. peregrinum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 64의 정방향 프라이머 및 서열번호 65의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. mucogenicum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 66의 정방향 프라이머 및 서열번호 67의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. shimoidei*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제6 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트에 이루어질 수 있다.

[0025]

본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 마이코박테리아 동정용 키트는 서열번호 3의 정방향 프라이머 및 서열번호 4의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. gastri*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 5의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. xenopi*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 7의 정방향 프라이머 및 서열번호 8의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. fortuitum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 10의 정방향 프라이머 및 서열번호 11의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 12의 정방향 프라이머 및 서열번호 13의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성 비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제1 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 서열번호 16의 정방향 프라이머 및 서열번호 17의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. abscessus*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 18의 정방향 프라이머 및 서열번호 19의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. intracellulare*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 20의 정방향 프라이머 및 서열번호 21의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. szulgai*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 및 서열번호 22의 정방향 프라이머 및 서열번호 23의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. terrae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제2 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 서열번호 24의 정방향 프라이머 및 서열번호 25의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. avium*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 26의 정방향 프라이머 및 서열번호 27의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. chelonae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 28의 정방향 프라이머 및 서열번호 29의 역방향 프라이머의 세트를 포함하는 *M. kansasii* 또는 *M. gastri*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 32의 정방향 프라이머 및 서열번호 33의 역방향 프라이머를 포함하는 *M. gordonae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제3 마이코박테리아 동정용 프라이머

세트; 서열번호 38의 정방향 프라이머 및 서열번호 39의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.simiae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 40의 정방향 프라이머 및 서열번호 41의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.ulcerans*의 HSP65에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 42의 정방향 프라이머 및 서열번호 43의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.septicum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 44의 정방향 프라이머 및 서열번호 45의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.smegmatis*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제4 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 서열번호 48의 정방향 프라이머 및 서열번호 49의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.scrofulaceum*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 52의 정방향 프라이머 및 서열번호 53의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.haemophilum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 54의 정방향 프라이머 및 서열번호 55의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.marinum* 또는 *M.ulcerans*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 서열번호 56의 정방향 프라이머 및 서열번호 57의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.celatum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제5 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 및 서열번호 60의 정방향 프라이머 및 서열번호 61의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.abscessus* 또는 *M.chelonae*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 62의 정방향 프라이머 및 서열번호 63의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.peregrinum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 64의 정방향 프라이머 및 서열번호 65의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.mucogenicum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 66의 정방향 프라이머 및 서열번호 67의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.shimoidei*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제6 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트에 이루어질 수 있다.

[0026]

본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 마이코박테리아 동정용 키트는 서열번호 5의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.xenopi*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 62의 정방향 프라이머 및 서열번호 63의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.peregrinum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 10의 정방향 프라이머 및 서열번호 11의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 12의 정방향 프라이머 및 서열번호 13의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성 비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제1 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 서열번호 16의 정방향 프라이머 및 서열번호 17의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.abscessus*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 18의 정방향 프라이머 및 서열번호 19의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.intracellulare*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 20의 정방향 프라이머 및 서열번호 21의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.szulgai*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 및 서열번호 22의 정방향 프라이머 및 서열번호 23의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.terrae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제2 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 서열번호 24의 정방향 프라이머 및 서열번호 25의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.avium*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 26의 정방향 프라이머 및 서열번호 27의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.chelonae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 30의 정방향 프라이머 및 서열번호 31의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.kansasii* 또는 *M.gastri*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 7의 정방향 프라이머 및 서열번호 9의 역방향 프라이머의 세트를 포함하는 *M.fortuitum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제3 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 서열번호 38의 정방향 프라이머 및 서열번호 39의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.simiae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 40의 정방향 프라이머 및 서열번호 41의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.ulcerans*의 HSP65에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 42의 정방향 프라이머 및 서열번호 43의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.septicum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 34의 정방향 프라이머 및 서열번호 35의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.gordanae*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제4 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 서열번호 48의 정방향 프라이머 및 서열번호 49의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.scrofulaceum*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 54의 정방향 프라이머 및 서열번호 55의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.marinum* 또는 *M.ulcerans*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 46의 정방향 프라이머 및 서열번호 47의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.smegmatis*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제5 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 및 서열번호 3의 정방향 프라이머 및 서열번호 4의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.gastri*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 64의 정방향 프라이머 및 서열번호 65의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.mucogenicum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 56의 정방향 프라이머 및 서열번호 57의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.celatum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제6 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트에 이루어질 수 있다.

[0027]

본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 마이코박테리아 동정용 키트는 서열번호 5의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.xenopi*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 62의 정방향 프

이며 및 서열번호 63의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.peregrinum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 10의 정방향 프라이머 및 서열번호 11의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 12의 정방향 프라이머 및 서열번호 13의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성 비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제1 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 서열번호 16의 정방향 프라이머 및 서열번호 17의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.abscessus*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 18의 정방향 프라이머 및 서열번호 19의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.intracellulare*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 20의 정방향 프라이머 및 서열번호 21의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.szulgai*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 및 서열번호 22의 정방향 프라이머 및 서열번호 23의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.terrae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제2 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 서열번호 24의 정방향 프라이머 및 서열번호 25의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.avium*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 26의 정방향 프라이머 및 서열번호 27의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.chelonae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 30의 정방향 프라이머 및 서열번호 31의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.kansasii* 또는 *M.gastri*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 7의 정방향 프라이머 및 서열번호 9의 역방향 프라이머의 세트를 포함하는 *M.fortuitum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제3 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 서열번호 38의 정방향 프라이머 및 서열번호 39의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.simiae*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 40의 정방향 프라이머 및 서열번호 41의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.ulcerans*의 HSP65에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 42의 정방향 프라이머 및 서열번호 43의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.septicum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 34의 정방향 프라이머 및 서열번호 35의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.gordonae*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제4 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 서열번호 48의 정방향 프라이머 및 서열번호 49의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.scrofulaceum*의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 54의 정방향 프라이머 및 서열번호 55의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.marinum* 또는 *M.ulcerans*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 46의 정방향 프라이머 및 서열번호 47의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.smegmatis*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제5 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트; 및 서열번호 3의 정방향 프라이머 및 서열번호 4의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.gastri*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트, 서열번호 64의 정방향 프라이머 및 서열번호 65의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.mucogenicum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트 및 서열번호 56의 정방향 프라이머 및 서열번호 57의 역방향 프라이머를 포함하는 *M.celatum*의 ITS 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 제6 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트에 이루어질 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 제1 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트 내지 제6 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트는 별도의 보관수단에 의해 분리될 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트 내지 제6 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트는 별도의 튜브에 의해 분리될 수 있다.

[0029] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 검체시료로부터 DNA를 분리하는 단계; 상기 마이코박테리아 동정용 키트를 이용하여 상기 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응을 시키는 단계; 온도를 변화시키면서 상기 실시간 중합효소연쇄반응에 의해 증폭된 증폭산물을 용해시켜 용해곡선을 얻는 단계; 및 상기 용해곡선의 용해온도를 확인하는 단계를 포함하는 마이코박테리아 동정 방법을 제공한다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에 따른 용해곡선분석은 510nm 형광파장을 측정하여 수행할 수 있다.

발명의 효과

[0031] 본 발명은 마이코박테리아를 특정 종으로 정확하게 검출하고 동정할 수 있는 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트, 이를 포함하는 마이코박테리아 동정용 키트 및 이를 이용하는 실시간 중합효소연쇄반응법 및 용해곡선 분석을 이용하는 마이코박테리아 동정 방법을 제공한다. 상기 방법에 의하면, 동정 가능한 마이코박테리아의 종의 종류가 많고, 검사가 간편하고 정확하며 빠르고, 적은 비용으로 효율적으로 마이코박테리아를 동정할 수 있는 임상진단 수단을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1 내지 도 5는 각각 튜브 I-A의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.fortuitum*, *M.gastri*, Nontuberculous mycobacteria, *M.tuberculosis* complex 및 *M.xenopi*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물 (amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광

량의 변화(dF/dT)이다.

도 6 내지 도 9는 각각 튜브 II-A의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.abscessus*, *M.intracellulare*, *M.szulgai* 및 *M.terrae*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

도 10 내지 도 13은 각각 튜브 III-A의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.avium*, *M.chelonae*, *M.gordonae* 및 *M.kansasii*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

도 14 내지 도 18은 각각 튜브 IV-A의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.marinum*, *M.septicum*, *M.simiae*, *M.smegmatis* 및 *M.ulcerans*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

도 19 내지 도 21은 각각 튜브 V-A의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.celatum*, *M.haemophilum* 및 *M.scrofulaceum*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

도 22 내지 도 25는 각각 튜브 VI-A의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.abscessus*, *M.mucogenicum*, *M.peregrinum* 및 *M.shimoidei*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

도 26 내지 도 30은 각각 튜브 I-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.fortuitum*, *M.gastri*, Nontuberculous mycobacteria, *M.tuberculosis* complex 및 *M.xenopi*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

도 31 내지 도 34는 각각 튜브 II-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.abscessus*, *M.intracellulare*, *M.szulgai* 및 *M.terrae*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

도 35 내지 도 38은 각각 튜브 III-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.avium*, *M.chelonae*, *M.gordonae* 및 *M.kansasii*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

도 39 내지 도 42는 각각 튜브 IV-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.septicum*, *M.simiae*, *M.smegmatis* 및 *M.ulcerans*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

도 43 내지 도 47은 각각 튜브 V-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.celatum*, *M.haemophilum*, *M.scrofulaceum*, *M.marinum* 및 *M.ulcerans*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

도 48 내지 도 52는 각각 튜브 VI-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.abscessus*, *M.chelonae*, *M.mucogenicum*, *M.peregrinum* 및 *M.shimoidei*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

도 53 내지 도 56은 각각 튜브 I-C의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.xenopi*, *M.peregrinum*, Nontuberculous mycobacteria 및 *M.tuberculosis* complex의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

도 57 내지 도 60은 각각 튜브 II-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.abscessus*, *M.intracellulare*, *M.szulgai* 및 *M.terrae*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

도 61 내지 도 64는 각각 튜브 III-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.avium*, *M.chelonae*, *M.fortuitum* 및 *M.kansasii*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

도 65 내지 도 68은 각각 튜브 IV-C의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.septicum*, *M.simiae*, *M.gordonae* 및 *M.ulcerans*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

도 69 내지 도 71은 각각 튜브 V-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.scrofulaceum*, *M.marinum* 및 *M.smegmatis*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

도 72 내지 도 74는 각각 튜브 VI-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.gastri*, *M.mucogenicum* 및 *M.celatum*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다. 상기 용해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하지만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

실시예: 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 및 용해곡선분석을 이용하는 마이코박테리아 동정 방법

1. 검출대상 부위 및 프라이머 설계

가. 검출대상 유전자

마이코박테리아의 16S rRNA 유전자, hsp65(Heat Shock Protein 65) 유전자, ITS(internal transcribed spacer) 유전자 염기서열 자료를 Sequencher 4.10로 분석하여 *M.gastri*, *M.xenopi*, *M.fortuitum*, *M.abscessus*, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.szulgai*, *M.terrae*, *M.chelonae*, *M.kansasii*, *M.gordonae*, *M.marinum*, *M.simiae*, *M.ulcerans*, *M.septicum*, *M.smegmatis*, *M.scrofulaceum*, *M.haemophilum*, *M.celatum*, *M.peregrinum*, *M.mucogenicum*, *M.shimoidei*에 특이한 프라이머를 primer3프로그램과 수기법을 사용하여 설계하였다.

염기서열 자료는 NCBI(National center for Biotechnology Information)의 데이터베이스에서 얻었으며, 해당 마이코박테리아에 특이한 프라이머 설계에 사용된 염기서열 자료는 다음과 같았다.

M.gastri(GU142918.1, AF547836.1, AY299182.1, Y14182.1), *M.xenopi*(AJ536033.1, AY082373.1, AF547891.1, AJ243481.1, L15624.1, Y14192.1), *M.fortuitum*(AY458072.1, AY299168.1, AY299167.1, AY457066.1, AF480580.1, GU142933.1, AF144326.1, AM709726.1), *M.abscessus*(AJ419970.1, AJ416940.1, AJ536038, AM709728.1, AF163815.1, FM955485.1, FM955486.1, AY458075.1, EF486338.1), *M.avium*(NR_025584.1, AJ536037.1, EF521892.1, GU362530.1, HM056131.1, AB0266901.1, AF410479.1, L15620.1, X74054.1, Z46421.1), *M.intracellulare*(AY652958.1, AJ536036.1, X52927.1, M61684.1, AB026691.1, AJ306711.1, AJ314865.1, AM709724.1, Z46423.1, GQ153290.1, EU239784.1), *M.szulgai*(X52926.1, AY299141.1, AY299173.1, AF547878.1, AB026704.1, X99220.1), *M.terrae*(NR_029168.1, AY299142.1, AY550211.1, HM584725.1, Z46427.1), *M.chelonae*(AM884324.1, AJ419969.1, AF144327.1, AY458082.1, AY299148.1), *M.kansasii*(M29575.1, X15916.1, AB026695.1, AB232369.1, AM709725.1), *M.gordonae*(GU142923.1, AB026692.1, AJ315574.1, AY604571.1), *M.marinum*(AF456238.1, AY513243.1, AB026701.1, GU827996.1, Y14185.1), *M.simiae*(GQ153280.1, AB026694.1, Y14186.1, Z46426.1), *M.ulcerans*(Z13990.1, X99217.1), *M.septicum*(AY457070.1, AM902922.1), *M.smegmatis*(NR_025311.1, Y08453.1), *M.scrofulaceum*(GQ153271.1, AB026702.1, L15622.1), *M.haemophilum*(V06638.1, AY579398.1, AY579399.1, DQ235664.1), *M.celatum*(L08169.1, AF375990.1, FJ754638.1), *M.peregrinum*(AY457069.1, AM396454.1, AM421288.1), *M.mucogenicum*(AF480585.1, AM902932.1, AY504951.1, DQ235663.1), *M.shimoidei*(X82459.1, AJ005005.1, X99219.1)

나. 프라이머

1) *M.gastri* 1

검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)

- [0043] 정방향프라이머 : 5' -gggcttgtcttgactcgt-3' (서열번호 1)
- [0044] 역방향프라이머 : 5' -tggtgggacaacactcttgg-3' (서열번호 2)
- [0045] 증폭산물 크기 : 39bp
- [0046] 증폭산물 용해온도(Tm) : 75.06℃
- [0047] 2) *M.gastri* 2
- [0048] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0049] 정방향프라이머 : 5' -gcaacactcgggcttgtctt-3' (서열번호 3)
- [0050] 역방향프라이머 : 5' -atggtgggacaacactcttgg-3' (서열번호 4)
- [0051] 증폭산물 크기 : 49bp
- [0052] 증폭산물 용해온도(Tm) : 78.10℃
- [0053] 3) *M.xenopi*
- [0054] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0055] 정방향프라이머 : 5' -gttgggcagcaggcagta-3' (서열번호 5)
- [0056] 역방향프라이머 : 5' -gttcctcaaaccacaacag-3' (서열번호 6)
- [0057] 증폭산물 크기 : 50bp
- [0058] 증폭산물 용해온도(Tm) : 80.86℃
- [0059] 4) *M.fortuitum* 1
- [0060] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0061] 정방향프라이머 : 5' -cccgagccgtgaggaac-3' (서열번호 7)
- [0062] 역방향프라이머 : 5' -caatagtgtgtctggcagtcaaaa-3' (서열번호 8)
- [0063] 증폭산물 크기 : 82bp
- [0064] 증폭산물 용해온도(Tm) : 81.70℃
- [0065] 5) *M.fortuitum* 2
- [0066] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0067] 정방향프라이머 : 5' -cccgagccgtgaggaac-3' (서열번호 7)
- [0068] 역방향프라이머 : 5' -cgacacccgcaacaggat-3' (서열번호 9)
- [0069] 증폭산물 크기 : 141bp
- [0070] 증폭산물 용해온도(Tm) : 85.50℃
- [0071] 6) *M.tuberculosis* complex(결핵균)
- [0072] 검출대상 유전자 : IS6110
- [0073] 정방향프라이머 : 5' -cgaactcaaggagcacatcag-3' (서열번호 10)

- [0074] 역방향프라이머 : 5' -cagggttagccacactttgc-3' (서열번호 11)
- [0075] 증폭산물 크기 : 79bp
- [0076] 증폭산물 용해온도(Tm) : 84.16℃
- [0077] 7) *Nontuberculous mycobacteria*(항산성비결핵균)
- [0078] 검출대상 유전자 : 16S rRNA
- [0079] 정방향프라이머 : 5' -tktggtggaagcttttgc-3' (서열번호 12)
- [0080] 역방향프라이머 : 5' -cgtaggagctctgggccgta-3' (서열번호 13)
- [0081] 증폭산물 크기 : 146bp
- [0082] 증폭산물 용해온도(Tm) : 87.54℃
- [0083] 8) *M. abscessus* 1
- [0084] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0085] 정방향프라이머 : 5' -atgaactaggaacataaagtatgca-3' (서열번호 14)
- [0086] 역방향프라이머 : 5' -aggatttacaaaacatattcaccaagt-3' (서열번호 15)
- [0087] 증폭산물 크기 : 69bp
- [0088] 증폭산물 용해온도(Tm) : 71.70℃
- [0089] 9) *M. abscessus* 2
- [0090] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0091] 정방향프라이머 : 5' -tcgaatgaactaggaacataaagta-3' (서열번호 16)
- [0092] 역방향프라이머 : 5' -gatttacaaaacatattcaccaagtaga-3' (서열번호 17)
- [0093] 증폭산물 크기 : 71bp
- [0094] 증폭산물 용해온도(Tm) : 72.10℃
- [0095] 10) *M. intracellulare*
- [0096] 검출대상 유전자 : 16S rRNA
- [0097] 정방향프라이머 : 5' -ggctctaataccgrataggaccttta-3' (서열번호 18)
- [0098] 역방향프라이머 : 5' -cgcaaaagctttccaccwa-3' (서열번호 19)
- [0099] 증폭산물 크기 : 56bp
- [0100] 증폭산물 용해온도(Tm) : 75.40℃ 혹은 76.90℃
- [0101] 11) *M. szulgai*
- [0102] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0103] 정방향프라이머 : 5' -ggtcctgaggcaacactca-3' (서열번호 20)
- [0104] 역방향프라이머 : 5' -ccaagatggtgggacaacag-3' (서열번호 21)

- [0105] 증폭산물 크기 : 52bp
- [0106] 증폭산물 용해온도(T_m) : 79.66℃
- [0107] 12) *M.terrae*
- [0108] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0109] 정방향프라이머 : 5' -gattccccgtacctcacat-3' (서열번호 22)
- [0110] 역방향프라이머 : 5' -accaccgaccacccactac-3' (서열번호 23)
- [0111] 증폭산물 크기 : 80bp
- [0112] 증폭산물 용해온도(T_m) : 82.86℃
- [0113] 13) *M.avium*
- [0114] 검출대상 유전자 : 16S rRNA
- [0115] 정방향프라이머 : 5' -gacctcaagacgcatgtcttc-3' (서열번호 24)
- [0116] 역방향프라이머 : 5' -cgcaaaagctttccaccag-3' (서열번호 25)
- [0117] 증폭산물 크기 : 39bp
- [0118] 증폭산물 용해온도(T_m) : 73.50℃
- [0119] 14) *M.chelonae*
- [0120] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0121] 정방향프라이머 : 5' -tgtccaccccgtagata-3' (서열번호 26)
- [0122] 역방향프라이머 : 5' -gtgccagcggttcaattcta-3' (서열번호 27)
- [0123] 증폭산물 크기 : 65bp
- [0124] 증폭산물 용해온도(T_m) : 79.00℃
- [0125] 15) *M.kansasii* /*M.gastri* 1
- [0126] 검출대상 유전자 : 16S rRNA
- [0127] 정방향프라이머 : 5' -gcaatctgccctgcacac-3' (서열번호 28)
- [0128] 역방향프라이머 : 5' -ccacaaggcatgctccaa-3' (서열번호 29)
- [0129] 증폭산물 크기 : 80bp
- [0130] 증폭산물 용해온도(T_m) : 81.16℃
- [0131] 16) *M.kansasii* /*M.gastri* 2
- [0132] 검출대상 유전자 : 16S rRNA
- [0133] 정방향프라이머 : 5' -cggaaggtctcttcggagac-3' (서열번호 30)
- [0134] 역방향프라이머 : 5' -tttcccaggcttatcctggt-3' (서열번호 31)
- [0135] 증폭산물 크기 : 88bp

- [0136] 증폭산물 용해온도(T_m) : 83.36℃
- [0137] 17) *M.gordonae* 1
- [0138] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0139] 정방향프라이머 : 5' -tgcaagccttgagtgggtca-3' (서열번호 32)
- [0140] 역방향프라이머 : 5' -ggggacagcaccagagg-3' (서열번호 33)
- [0141] 증폭산물 크기 : 111bp
- [0142] 증폭산물 용해온도(T_m) : 83.80℃
- [0143] 18) *M.gordonae* 2
- [0144] 검출대상 유전자 : 16S rRNA
- [0145] 정방향프라이머 : 5' -taacacatgcaagtcgaaaggt-3' (서열번호 34)
- [0146] 역방향프라이머 : 5' -ctttccaccacagacatgt-3' (서열번호 35)
- [0147] 증폭산물 크기 : 156bp
- [0148] 증폭산물 용해온도(T_m) : 83.74℃
- [0149] 19) *M.marinum* /*M.ulcerans* 1
- [0150] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0151] 정방향프라이머 : 5' -gggtcctgaggcaacatct-3' (서열번호 36)
- [0152] 역방향프라이머 : 5' -caacatcccgaaccaacag-3' (서열번호 37)
- [0153] 증폭산물 크기 : 39bp
- [0154] 증폭산물 용해온도(T_m) : 74.60℃
- [0155] 20) *M.simiae*
- [0156] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0157] 정방향프라이머 : 5' -ctcgccgacttcggtt-3' (서열번호 38)
- [0158] 역방향프라이머 : 5' -agatggaggacaccacttca-3' (서열번호 39)
- [0159] 증폭산물 크기 : 37bp
- [0160] 증폭산물 용해온도(T_m) : 76.40℃
- [0161] 21) *M.ulcerans*
- [0162] 검출대상 유전자 : HSP65(Heat shock protein 65)
- [0163] 정방향프라이머 : 5' -accgagaccctgctcaaa-3' (서열번호 40)
- [0164] 역방향프라이머 : 5' -gctccttgggtctcgacctct-3' (서열번호 41)
- [0165] 증폭산물 크기 : 46bp

- [0166] 증폭산물 용해온도(T_m) : 79.10℃
- [0167] 22) *M.septicum*
- [0168] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0169] 정방향프라이머 : 5' -atggcctcgacactgtag-3' (서열번호 42)
- [0170] 역방향프라이머 : 5' -ccaatagtgtgtctggcagttcta-3' (서열번호 43)
- [0171] 증폭산물 크기 : 72bp
- [0172] 증폭산물 용해온도(T_m) : 81.70℃
- [0173] 23) *M.smegmatis* 1
- [0174] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0175] 정방향프라이머 : 5' -gagctggagcgctgtagt-3' (서열번호 44)
- [0176] 역방향프라이머 : 5' -gaaacagcggttccacac-3' (서열번호 45)
- [0177] 증폭산물 크기 : 73bp
- [0178] 증폭산물 용해온도(T_m) : 84.20℃
- [0179] 24) *M.smegmatis* 2
- [0180] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0181] 정방향프라이머 : 5' -gagccgtgaggagctgga-3' (서열번호 46)
- [0182] 역방향프라이머 : 5' -accgcatctcaacgtttgc-3' (서열번호 47)
- [0183] 증폭산물 크기 : 66bp
- [0184] 증폭산물 용해온도(T_m) : 84.36℃
- [0185] 25) *M.scrofulaceum* 1
- [0186] 검출대상 유전자 : 16S rRNA
- [0187] 정방향프라이머 : 5' -accatcgacgaaggtcac-3' (서열번호 48)
- [0188] 역방향프라이머 : 5' -cacctaccgtcaaccaca-3' (서열번호 49)
- [0189] 증폭산물 크기 : 40bp
- [0190] 증폭산물 용해온도(T_m) : 77.50℃
- [0191] 26) *M.scrofulaceum* 2
- [0192] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0193] 정방향프라이머 : 5' -gcaacactcggctcgttct-3' (서열번호 50)
- [0194] 역방향프라이머 : 5' -agatggaggacaccactca-3' (서열번호 51)
- [0195] 증폭산물 크기 : 38bp

- [0196] 증폭산물 용해온도(T_m) : 77.50℃
- [0197] 27) *M.haemophilum*
- [0198] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0199] 정방향프라이머 : 5' -gcacaacagcaaatgaatcg-3' (서열번호 52)
- [0200] 역방향프라이머 : 5' -acatgggacaagcctgagt-3' (서열번호 53)
- [0201] 증폭산물 크기 : 69bp
- [0202] 증폭산물 용해온도(T_m) : 80.76℃
- [0203] 28) *M.marinum* /*M.ulcerans* 2
- [0204] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0205] 정방향프라이머 : 5' -gggtcctgaggcaacatc-3' (서열번호 54)
- [0206] 역방향프라이머 : 5' -acagaacacgccacccaaa-3' (서열번호 55)
- [0207] 증폭산물 크기 : 133bp
- [0208] 증폭산물 용해온도(T_m) : 83.56℃
- [0209] 29) *M.celatum*
- [0210] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0211] 정방향프라이머 : 5' -cacgaaaaacactccgcatc-3' (서열번호 56)
- [0212] 역방향프라이머 : 5' -gcgatttttccatttgttg-3' (서열번호 57)
- [0213] 증폭산물 크기 : 100bp
- [0214] 증폭산물 용해온도(T_m) : 85.84℃
- [0215] 30) *M.abscessus* 3
- [0216] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)
- [0217] 정방향프라이머 : 5' -catttcccagtcgaatgaacta-3' (서열번호 58)
- [0218] 역방향프라이머 : 5' -ggattttacaaaacatattcaccaagtagatac-3' (서열번호 59)
- [0219] 증폭산물 크기 : 80bp
- [0220] 증폭산물 용해온도(T_m) : 75.10℃
- [0221] 31) *M.abscessus* /*M.chelonae*
- [0222] 검출대상 유전자 : 16S rRNA
- [0223] 정방향프라이머 : 5' -ctaataccggataggaccacaca-3' (서열번호 60)
- [0224] 역방향프라이머 : 5' -gcaaaagctttgcaccact-3' (서열번호 61)
- [0225] 증폭산물 크기 : 52bp

[0226] 증폭산물 용해온도(T_m) : 76.40℃

[0227] 32) *M.peregrinum*

[0228] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)

[0229] 정방향프라이머 : 5' -attcgttggatggcctcac-3' (서열번호 62)

[0230] 역방향프라이머 : 5' -ccacgccaagtttgttgag-3' (서열번호 63)

[0231] 증폭산물 크기 : 65bp

[0232] 증폭산물 용해온도(T_m) : 81.70℃

[0233] 33) *M.mucogenicum*

[0234] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)

[0235] 정방향프라이머 : 5' -catttacatgccctgatcca-3' (서열번호 64)

[0236] 역방향프라이머 : 5' -cgacgacaatcccaacca-3' (서열번호 65)

[0237] 증폭산물 크기 : 76bp

[0238] 증폭산물 용해온도(T_m) : 83.50℃

[0239] 34) *M.shimoidei*

[0240] 검출대상 유전자 : ITS(Internal transcribed spacer)

[0241] 정방향프라이머 : 5' -gaagtcgagccgtgagga-3' (서열번호 66)

[0242] 역방향프라이머 : 5' -accaccaagatgaggcaac-3' (서열번호 67)

[0243] 증폭산물 크기 : 142bp

[0244] 증폭산물 용해온도(T_m) : 86.96℃

[0245] 2. 실시간 중합효소연쇄반응 및 용해곡선 분석

[0246] 가. DNA의 분리

[0247] 임상검체에서 분리된 항산성비결핵균 100주, 마이코박테리아 표준 균주 68주를 사용하였다. 사용된 표준균주는 *M. abscessus* ATCC 19977, *M. acapulcensis* KCTC 9501, *M. africanum* ATCC 25420, *M. agri* KCTC 9502, *M. alvei* KCTC 19709, *M. asiaticum* KCTC 9503, *M. aurum* KCTC 19457, *M. austroafricanum* KCTC 9504, *M. avium* ATCC 25291, *M. bolletii* KCTC 19281, *M. botniense* KCTC 19646, *M. bovis* ATCC 19210, *M. brumae* KCTC 19711, *M. celatum* ATCC 51131, *M. chelonae subsp chelonae* KCTC 9505, *M. chlorophenolicum* KCTC 19089, *M. chubuense* KCTC 19712, *M. diernhoferi* KCTC 9506, *M. fallax* KCTC 9508, *M. flavescens* ATCC 14474, *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. frederiksbergense* KCTC 19100, *M. gadium* ATCC 27726, *M. gastri* ATCC 15754, *M. gilvum* KCTC 19423, *M. goodii* ATCC BAA-955, *M. gordonae* KCTC 9513, *M. haemophilum* ATCC 29548, *M. hassiacum* ATCC 700660, *M. interjectum* ATCC 51457, *M. intermedium* ATCC 51848, *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. intracellulare* KCTC 9514, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. lentiflavum* KMRC 70087, *M. malmoense* ATCC 29571, *M. mantobense* KCTC 9977, *M. marinum* ATCC 927, *M. massiliense* KCTC 19086, *M. microti* ATCC 19422, *M. morioakaense* KCTC 9516, *M. mucogenicum* KCTC 19088, *M. neoaurum* KCTC 19096, *M. nonchromogenicum* ATCC 19530, *M. obuense* KCTC 19097, *M. parascrofulaceum* KCTC 9979, *M. peregrinum* KCTC 9615, KMRC 75002, *M. phlei* KCTC 9689, *M. porcinum* KCTC 9517, *M. pulveris* KCTC 9518, *M. scrofulaceum* ATCC 19981, *M. septicum* ATCC 700731, *M. simiae* ATCC 25275, *M. shimoidei* ATCC 27962, *M. smegmatis* KCTC

9108, *M. szulgai* KCTC 9520, KMRC 31125, *M. terrae* KCTC 9614, *M. triplex* ATCC 700071, *M. triviale* KMRC 70093, *M. tuberculosis* ATCC 25177, ATCC 27294, *M. ulcerans* ATCC 19423, *M. vaccae* KCTC 19087, *M. vanbaalenii* KCTC 9966, *M. wolinskyi* ATCC 700010, *M. xenopi* KMRC 42001이었다.

[0248] 임상검체에서 분리된 항산성비결핵균 100주는 액체배지(MGIT 마이코박테리아 배지)나 고체(Ogawa배지)배지에서 배양하여 검출한 균주이었다. ATCC, KCTC 균주는 액체배지에서 배양하여 사용하였고, KMRC 균주는 고체배지에서 배양하여 사용하였다.

[0249] 액체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 균이 배양된 MGIT 마이코박테리아 배양튜브를 잘 섞은 후에 액체 배지 500 μ l를 취해 1.5ml 튜브에 넣고 14,000 rpm로 5분간 원심분리 시켰다. 원심분리 후 상층액은 버리고 남은 침사부분에 멸균증류수 300 μ l 넣고 끓는 물에 10분간 중탕 가열하였다. 중탕 가열 후 14,000 rpm로 5분간 원심분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0250] 고체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 1.5ml 튜브에 멸균증류수 500 μ l 넣고 고체 배지에서 1 백금이를 취해 멸균증류수에 풀었다. 이 튜브를 끓는 물에 10분간 중탕 가열한 후 14,000 rpm에서 5분간 원심 분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0251] 나. 프라이머 믹스(Primers mix)

[0252] 6 종류의 프라이머 믹스 튜브를 제조하였다. 각각의 프라이머 믹스 튜브에는 해당 마이코박테리아에 특이한 정방향 프라이머와 역방향 프라이머가 동일한 양으로 들어 있다.

[0253] 1) 튜브 I

[0254] a. 튜브 I-A

[0255] *M.gastri* 1 프라이머 10pmole/ μ l

[0256] *M.xenopi* 프라이머 9pmole/ μ l

[0257] *M.fortuitum* 1 프라이머 6pmole/ μ l

[0258] *M.tuberculosis* complex 프라이머 14pmole/ μ l

[0259] Nontuberculous mycobacteria 프라이머 8pmole/ μ l

[0260] b. 튜브 I-B

[0261] *M.gastri* 2 프라이머 8pmole/ μ l

[0262] *M.xenopi* 프라이머 9pmole/ μ l

[0263] *M.fortuitum* 1 프라이머 6pmole/ μ l

[0264] *M.tuberculosis* complex 프라이머 14pmole/ μ l

[0265] Nontuberculous mycobacteria 프라이머 8pmole/ μ l

[0266] c. 튜브 I-C

[0267] *M.xenopi* 프라이머 9pmole/ μ l

[0268] *M.peregrinum* 프라이머 12pmole/ μ l

[0269] *M.tuberculosis* complex 프라이머 14pmole/ μ l

[0270]	Nontuberculous mycobacteria 프라이머 8pmole/ μ l
[0271]	2) 튜브Ⅱ
[0272]	a. 튜브Ⅱ-A
[0273]	<i>M.abscessus</i> 1 프라이머 10pmole/ μ l
[0274]	<i>M.intracellulare</i> 프라이머 10pmole/ μ l
[0275]	<i>M.szulgai</i> 프라이머 10pmole/ μ l
[0276]	<i>M.terrae</i> 프라이머 10pmole/ μ l
[0277]	b. 튜브Ⅱ-B
[0278]	<i>M.abscessus</i> 2 프라이머 12pmole/ μ l
[0279]	<i>M.intracellulare</i> 프라이머 10pmole/ μ l
[0280]	<i>M.szulgai</i> 프라이머 10pmole/ μ l
[0281]	<i>M.terrae</i> 프라이머 10pmole/ μ l
[0282]	3) 튜브Ⅲ
[0283]	a. 튜브Ⅲ-A
[0284]	<i>M.avium</i> 프라이머 10pmole/ μ l
[0285]	<i>M.chelonae</i> 프라이머 14pmole/ μ l
[0286]	<i>M.kansasii</i> / <i>M.gastri</i> 1 프라이머 8pmole/ μ l
[0287]	<i>M.gordonae</i> 1 프라이머 10pmole/ μ l
[0288]	b. 튜브Ⅲ-B
[0289]	<i>M.avium</i> 프라이머 10pmole/ μ l
[0290]	<i>M.chelonae</i> 프라이머 14pmole/ μ l
[0291]	<i>M.kansasii</i> / <i>M.gastri</i> 2 프라이머 8pmole/ μ l
[0292]	<i>M.fortuitum</i> 2 프라이머 10pmole/ μ l
[0293]	4) 튜브Ⅳ
[0294]	a. 튜브Ⅳ-A
[0295]	<i>M.marinum</i> / <i>M.ulcerans</i> 1 프라이머 10pmole/ μ l
[0296]	<i>M.simiae</i> 프라이머 10pmole/ μ l
[0297]	<i>M.ulcerans</i> 프라이머 12pmole/ μ l
[0298]	<i>M.septicum</i> 프라이머 10pmole/ μ l
[0299]	<i>M.smegmatis</i> 1 프라이머 8pmole/ μ l

- [0300] b. 튜브IV-B
- [0301] *M.simiae* 프라이머 10pmole/ μ l
- [0302] *M.ulcerans* 프라이머 12pmole/ μ l
- [0303] *M.septicum* 프라이머 10pmole/ μ l
- [0304] *M.smegmatis* 1 프라이머 8pmole/ μ l
- [0305] c. 튜브IV-C
- [0306] *M.simiae* 프라이머 10pmole/ μ l
- [0307] *M.ulcerans* 프라이머 12pmole/ μ l
- [0308] *M.septicum* 프라이머 10pmole/ μ l
- [0309] *M.gordonae* 2 프라이머 10pmole/ μ l
- [0310] 5) 튜브 V
- [0311] a. 튜브 V-A
- [0312] *M.scrofulaceum* 1 프라이머 12pmole/ μ l
- [0313] *M.scrofulaceum* 2 프라이머 12pmole/ μ l
- [0314] *M.haemophilum* 프라이머 10pmole/ μ l
- [0315] *M.celatum* 프라이머 8pmole/ μ l
- [0316] b. 튜브 V-B
- [0317] *M.scrofulaceum* 1 프라이머 12pmole/ μ l
- [0318] *M.haemophilum* 프라이머 10pmole/ μ l
- [0319] *M.marinum* /*M.ulcerans* 2 프라이머 10pmole/ μ l
- [0320] *M.celatum* 프라이머 8pmole/ μ l
- [0321] c. 튜브 V-C
- [0322] *M.scrofulaceum* 1 프라이머 12pmole/ μ l
- [0323] *M.marinum* /*M.ulcerans* 2 프라이머 10pmole/ μ l
- [0324] *M.smegmatis* 2 프라이머 10pmole/ μ l
- [0325] 6) 튜브VI
- [0326] a. 튜브VI-A
- [0327] *M.abscessus* 3 프라이머 10pmole/ μ l
- [0328] *M.peregrinum* 프라이머 10pmole/ μ l
- [0329] *M.mucogenicum* 프라이머 10pmole/ μ l

[0330] *M.shimoidi* 프라이머 4pmole/ μ l

[0331] b. 튜브VI-B

[0332] *M.abscessus* /*M.chelonae* 프라이머 10pmole/ μ l

[0333] *M.peregrinum* 프라이머 10pmole/ μ l

[0334] *M.mucogenicum* 프라이머 10pmole/ μ l

[0335] *M.shimoidi* 프라이머 4pmole/ μ l

[0336] c. 튜브VI-C

[0337] *M.gastri* 2 프라이머 10pmole/ μ l

[0338] *M.mucogenicum* 프라이머 10pmole/ μ l

[0339] *M.celatum* 프라이머 8pmole/ μ l

[0340] 다. 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 및 용해곡선분석

[0341] Type-it HRM PCR 키트(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 사용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 상기 Type-it HRM PCR 키트에는 형광 색소로서 EvaGreen이 들어 있다. 실시간 중합효소연쇄반응은 Rotor-Gene Q(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 이용하였다. 약 95℃에서 약 5분간 변성 공정을 1 사이클(cycle), 약 95℃에서 약 10초 간 변성, 약 60℃에서 약 15초 간 어닐링 및 연장 공정을 1 사이클로 하여, 40 사이클을 수행하였다. 마지막 중합효소연쇄반응이 끝난 후, 약 68℃에서 약 93℃까지 초당 약 0.2℃ 속도로 온도를 증가시키면서 510nm의 형광파장을 측정하여 용해곡선분석을 하였다. 이 때, 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하는 반응물의 조성은 하기 표 1과 같다.

표 1

성분	부피(μ l)	농도
2X HRM PCR Master Mix	5	1X
프라이머 믹스	0.5	표 2 참조
뉴클레아제가 제거된 물(Nuclease free water)	3.5	-
DNA 주형(DNA template)	1	-
전체	10	

표 2

프라이머 량(pmole/ μ l)	반응액내 농도(μ M)
4	0.2
6	0.3
8	0.4
9	0.45
10	0.5
12	0.6
14	0.7

[0344] <실시예 1>

[0345] 상기 튜브 I-A, 튜브 II-A, 튜브 III-A, 튜브 IV-A, 튜브 V-A 및 튜브 VI-A의 프라이머 믹스를 이용하는 마이코박테리아의 동정 방법이다. 상술한 실시간 중합효소연쇄반응 및 용해곡선 분석에 따라서 마이코박테리아를 동

정하였다.

[0346] <실시예 2>

[0347] 상기 튜브 I-B, 튜브 II-B, 튜브 III-A, 튜브 IV-B, 튜브 V-B 및 튜브 VI-B의 프라이머 믹스를 이용하는 프라이머 믹스를 이용하는 마이코박테리아의 동정 방법이다. 상술한 실시간 중합효소연쇄반응 및 용해곡선 분석에 따라서 마이코박테리아를 동정하였다.

[0348] <실시예 3>

[0349] 상기 튜브 I-C, 튜브 II-B, 튜브 III-B, 튜브 IV-C, 튜브 V-C 및 튜브 VI-C의 프라이머 믹스를 이용하는 마이코박테리아의 동정 방법이다. 상술한 실시간 중합효소연쇄반응 및 용해곡선 분석에 따라서 마이코박테리아를 동정하였다.

[0350] 라. 실시간 중합효소연쇄반응법 및 용해곡선분석 결과

[0351] <실시예 1>

[0352] 도 1 내지 도 5는 각각 튜브 I-A의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.fortuitum*, *M.gastri*, Nontuberculous mycobacteria, *M.tuberculosis* complex 및 *M.xenopi*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0353] 도 6 내지 도 9는 각각 튜브 II-A의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.abscessus*, *M.intracellulare*, *M.szulgai* 및 *M.terrae*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0354] 도 10 내지 도 13은 각각 튜브 III-A의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.avium*, *M.chelonae*, *M.gordonae* 및 *M.kansasii*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0355] 도 14 내지 도 18은 각각 튜브 IV-A의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.marinum*, *M.septicum*, *M.simiae*, *M.smegmatis* 및 *M.ulcerans*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0356] 도 19 내지 도 21은 각각 튜브 V-A의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.celatum*, *M.haemophilum* 및 *M.scrofulaceum*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0357] 도 22 내지 도 25는 각각 튜브 VI-A의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.abscessus*, *M.mucogenicum*, *M.peregrinum* 및 *M.shimoidei*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0358] 도 1 내지 도 25를 통하여, 각각의 마이코박테리아 균주에 따라 디자인한 프라이머에 해당하는 증폭산물 용해온도(Tm)에 해당하는 피크를 나타낼 수 있었다.

[0359] 도 1 및 도 2를 참조하면, 튜브 I-A의 프라이머 믹스를 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하기 때문에, 항산성비결핵균(Nontuberculous mycobacteria)에 해당하는 피크(약 87.54℃)와 함께 각각 *M.fortuitum*(약 81.70℃) 및 *M.gastri*(약 75.06℃)에 해당하는 증폭산물 용해온도(Tm) 피크가 나타났다. 다만, *M.xenopi*의 경우, 항산성비결핵균에 해당하지만 *M.xenopi*에 해당하는 증폭산물 용해온도(Tm) 피크(약 80.86℃)만이 나타났다(도 5 참조).

[0360] 도 18을 참조하면, 튜브 IV-A의 프라이머 믹스를 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하기 때문에, *M.ulcerans*의 균주의 경우, *M.marinum* / *M.ulcerans* 1에 해당하는 증폭산물 용해온도(Tm) 피크(약 74.60℃)와 함께 *M.ulcerans*에 해당하는 증폭산물 용해온도(Tm) 피크(약 79.10℃)가 나타났다.

[0361] 도 21을 참조하면, 튜브 V-A의 프라이머 믹스(*M.scrofulaceum* 1 및 *M.scrofulaceum* 2의 프라이머 세트 포함)를 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하기 때문에, *M.scrofulaceum*의 균주의 경우 증폭산물 용해온도(Tm) 피크(약 77.50℃)가 나타나며, *M.scrofulaceum* 1 및 *M.scrofulaceum* 2의 프라이머 세트에 해당하는 증폭

산물 용해온도(Tm) 피크가 모두 약 77.50℃에 해당하기 때문에 피크가 하나로 나타났다.

[0362] 상기 실시예 1에서 튜브 II-A(*M.abscessus* 1)와 튜브 VI-A(*M.abscessus* 3)에 *M.abscessus*를 검출하여 구별할 수 있는 프라이머 세트를 구비하도록 하여, 임상검체에서 효과적으로 *M.abscessus*를 동정할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 튜브 V-A에 *M.scrofulaceum* 1 및 *M.scrofulaceum* 2를 구비하여, 임상검체에서 *M.scrofulaceum*를 동정할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0363] 실시예 1을 통하여, 결핵균인지 항산성비결핵균인지, 항산성비결핵균 중에서는 *M.gastri*, *M.xenopi*, *M.fortuitum*, *M.abscessus*, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.szulgai*, *M.terrae*, *M.chelonae*, *M.kansasii*, *M.gordanae*, *M.marinum*, *M.simiae*, *M.ulcerans*, *M.septicum*, *M.smegmatis*, *M.scrofulaceum*, *M.haemophilum*, *M.celatum*, *M.peregrinum*, *M.mucogenicum* 및 *M.shimoidei* 중 어떤 균주 인지 효과적으로 동정할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0364] <실시예 2>

[0365] 도 26 내지 도 30은 각각 튜브 I-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.fortuitum*, *M.gastri*, Nontuberculous mycobacteria, *M.tuberculosis* complex 및 *M.xenopi*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0366] 도 31 내지 도 34는 각각 튜브 II-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.abscessus*, *M.intracellulare*, *M.szulgai* 및 *M.terrae*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0367] 도 35 내지 도 38은 각각 튜브 III-A의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.avium*, *M.chelonae*, *M.gordanae* 및 *M.kansasii*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0368] 도 39 내지 도 42는 각각 튜브 IV-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.septicum*, *M.simiae*, *M.smegmatis* 및 *M.ulcerans*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0369] 도 43 내지 도 47은 각각 튜브 V-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.celatum*, *M.haemophilum*, *M.scrofulaceum*, *M.marinum* 및 *M.ulcerans*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0370] 도 48 내지 도 52는 각각 튜브 VI-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.abscessus*, *M.chelonae*, *M.mucogenicum*, *M.peregrinum* 및 *M.shimoidei*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 용해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0371] 도 26 내지 도 52를 통하여, 각각의 마이코박테리아 균주에 따라 디자인한 프라이머에 해당하는 증폭산물 용해온도(Tm)에 해당하는 피크를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0372] 도 26 및 도 27을 참조하면, 튜브 I-B의 프라이머 믹스를 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하기 때문에, 항산성비결핵균(Nontuberculous mycobacteria)에 해당하는 피크(약 87.54℃)와 함께 각각 *M.fortuitum*(약 81.70℃) 및 *M.gastri*(약 78.10℃)에 해당하는 증폭산물 용해온도(Tm) 피크가 나타났다. 다만, *M.xenopi*의 경우, 항산성비결핵균에 해당하지만 *M.xenopi*에 해당하는 증폭산물 용해온도(Tm) 피크(약 80.86℃)만이 나타났다(도 30 참조).

[0373] 도 46 및 도 47을 참조하면, 튜브 V-B의 프라이머 믹스를 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하고, *M.marinum* / *M.ulcerans* 2에 해당하는 증폭산물 용해온도(Tm) 피크(약 83.56℃)에 대하여 *M.marinum* 또는 *M.ulcerans*는 모두 약 83.56℃에 해당하는 증폭산물 용해온도(Tm) 피크를 나타냈다. 이 경우, 튜브 VI-B의 프라이머 믹스를 이용하여 중합효소연쇄반응을 수행하고, 용해곡선 분석을 수행한 결과를 비교하여 볼 때, *M.ulcerans*에 해당하는 증폭산물 용해온도(Tm) 피크(약 79.10℃)가 나타날 경우 *M.ulcerans*으로 균주를 동정할 수 있고, 상기 피크가 안 나타날 경우 *M.marinum*로 균주를 동정할 수 있다. 또한, 튜브 V-B의 프라이머 믹스를 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 *M.marinum* / *M.ulcerans* 2에 해당하는 증폭산물 용해온도(Tm) 피크(약 83.56℃)가 나타나고, 튜브 VI-B의 프라이머 믹스를 이용하여 중합효소연쇄반응을 수행하고, 용해곡선 분

석을 수행하여 *M.ulcerans*에 해당하는 증폭산물 용해온도(Tm) 피크(약 79.10℃)가 나타날 경우, 검체 내에 *M.marinum* 및 *M.ulcerans*이 있는 것으로 동정할 수 있다.

[0374] 상기 실시예 2에서 튜브 II-B(*M.abscessus* 2)와 튜브 III-A(*M.chelonae*)에 각각 *M.abscessus*, *M.chelonae*를 검출하여 구별할 수 있는 프라이머 세트를 구비하면서, 튜브 VI-B에 *M.abscessus*와 *M.chelonae*를 구별할 수는 없지만 *M.abscessus* 또는 *M.chelonae*에 대한 특이성 높은 *M.abscessus* /*M.chelonae*를 구비하여, 임상검체에서 효과적으로 *M.abscessus* 또는 *M.chelonae*를 동정할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0375] 실시예 2를 통하여, 결핵균인지 항산성비결핵균인지, 항산성비결핵균 중에서는 *M.gastri*, *M.xenopi*, *M.fortuitum*, *M.abscessus*, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.szulgai*, *M.terrae*, *M.chelonae*, *M.kansasii*, *M.gordonae*, *M.marinum*, *M.simiae*, *M.ulcerans*, *M.septicum*, *M.smegmatis*, *M.scrofulaceum*, *M.haemophilum*, *M.celatum*, *M.peregrinum*, *M.mucogenicum* 및 *M.shimoidei* 중 어떤 균주 인지 효과적으로 동정할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0376] <실시예 3>

[0377] 도 53 내지 도 56은 각각 튜브 I-C의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.xenopi*, *M.peregrinum*, Nontuberculous mycobacteria 및 *M.tuberculosis* complex의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 융해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0378] 도 57 내지 도 60은 각각 튜브 II-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.abscessus*, *M.intracellulare*, *M.szulgai* 및 *M.terrae*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 융해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0379] 도 61 내지 도 64는 각각 튜브 III-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.avium*, *M.chelonae*, *M.fortuitum* 및 *M.kansasii*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 융해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0380] 도 65 내지 도 68은 각각 튜브 IV-C의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.septicum*, *M.simiae*, *M.gordonae* 및 *M.ulcerans*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 융해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0381] 도 69 내지 도 71은 각각 튜브 V-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.scrofulaceum*, *M.marinum* 및 *M.smegmatis*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 융해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0382] 도 72 내지 도 74는 각각 튜브 VI-B의 프라이머 믹스를 이용하여 *M.gastri*, *M.mucogenicum* 및 *M.celatum*의 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하여 얻어진 증폭산물(amplicon)의 융해곡선분석 결과를 나타낸다.

[0383] 도 53 내지 도 74를 통하여, 각각의 마이코박테리아 균주에 따라 디자인한 프라이머에 해당하는 증폭산물 용해온도(Tm)에 해당하는 피크를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0384] 도 54를 참조하면, 튜브 I-C의 프라이머 믹스를 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하기 때문에, 항산성비결핵균(Nontuberculous mycobacteria)에 해당하는 피크(약 87.54℃)와 *M.peregrinum*(약 81.70℃)에 해당하는 증폭산물 용해온도(Tm) 피크가 나타났다. 다만, *M.xenopi*의 경우, 항산성비결핵균에 해당하지만 *M.xenopi*에 해당하는 증폭산물 용해온도(Tm) 피크(약 80.86℃)만이 나타났다(도 53 참조).

[0385] 실시예 3을 통하여, 결핵균인지 항산성비결핵균인지, 항산성비결핵균 중에서는 *M.gastri*, *M.xenopi*, *M.fortuitum*, *M.abscessus*, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.szulgai*, *M.terrae*, *M.chelonae*, *M.kansasii*, *M.gordonae*, *M.marinum*, *M.simiae*, *M.ulcerans*, *M.septicum*, *M.smegmatis*, *M.scrofulaceum*, *M.celatum*, *M.peregrinum* 및 *M.mucogenicum* 중 어떤 균주 인지 효과적으로 동정할 수 있음을 확인할 수 있었다.

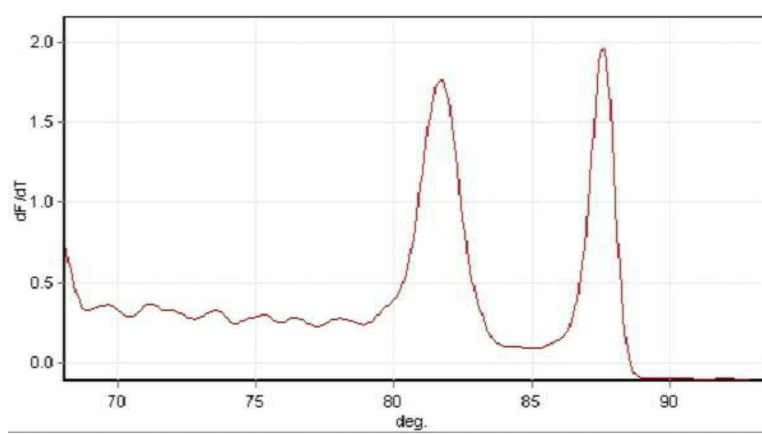
[0386] 실시예 3의 경우, 실시예 1 및 실시예 2와 달리 *M.haemophilum* 및 *M.shimoidei*에 대해서는 동정할 수 있는 마이코박테리아 동정용 프라이머 세트를 구비하지 않는 구성을 가진다. 상기 *M.haemophilum* 및 *M.shimoidei*의 경우, 한국에서는 임상검체에서 잘 나타나지 않으므로, 상기 균주를 동정하기 위한 프라이머 세트를 포함할 때 프라이머 세트들 간의 상호 작용 등에 의한 동정 효율 등의 감소 등을 고려하여 포함하지 않는 구성으로 설계한 것이다.

[0387]

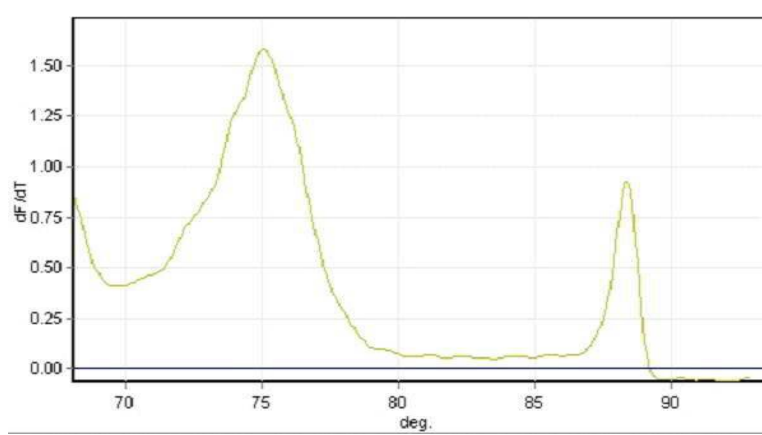
상기 실시 예들에 따라 실시간 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 수행할 경우, 간편하고 정확하며 빠르고, 적은 비용으로 효율적으로 임상 검체에서 마이코박테리아를 높은 신뢰성을 가지고 특정 균주로 동정할 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면

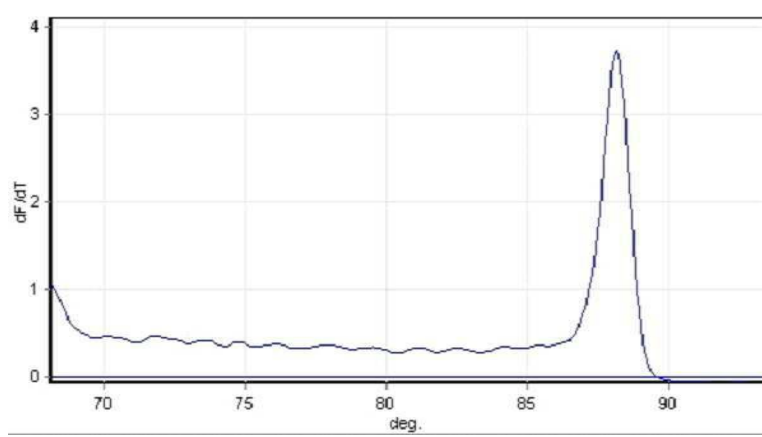
도면1



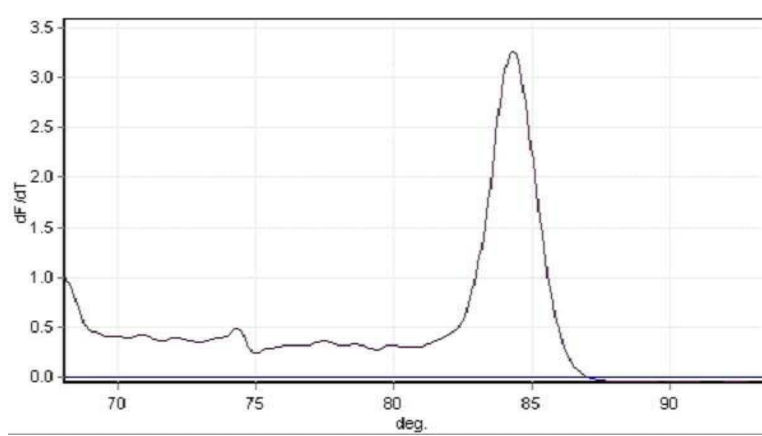
도면2



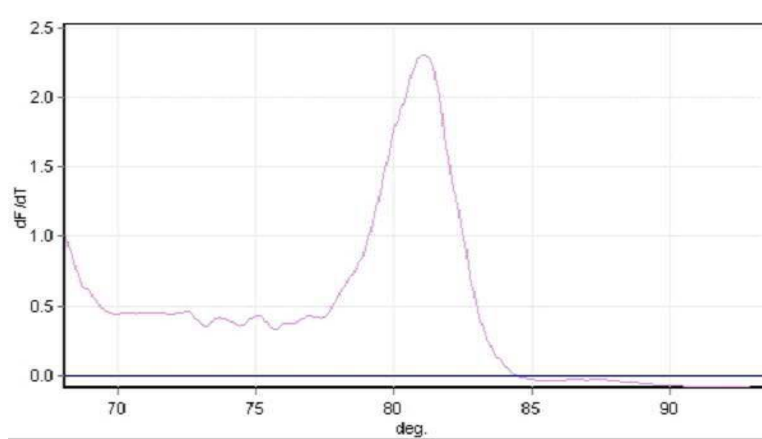
도면3



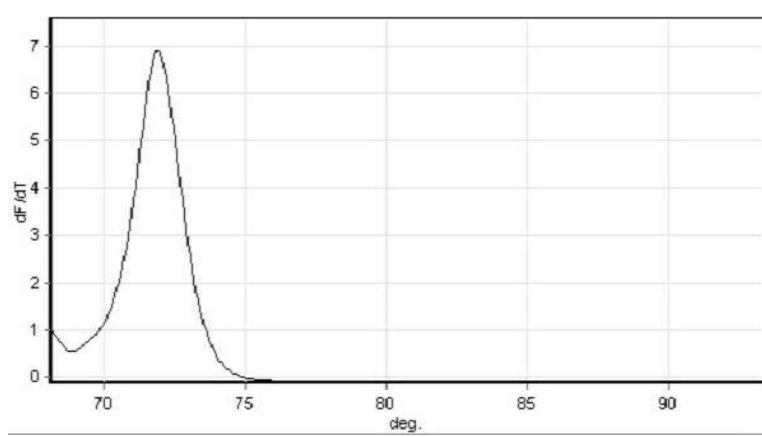
도면4



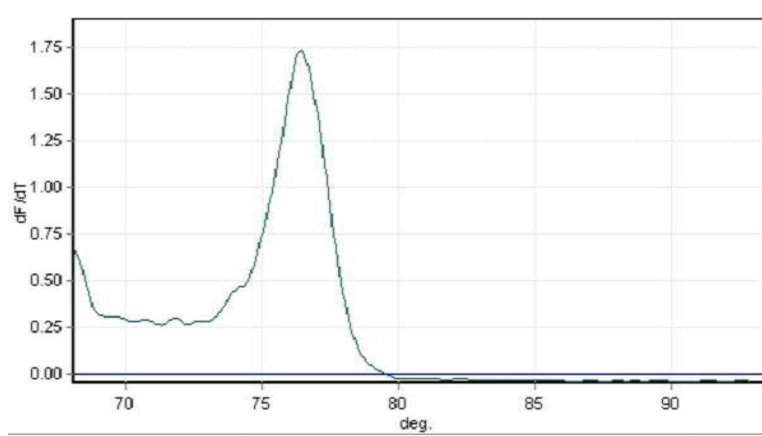
도면5



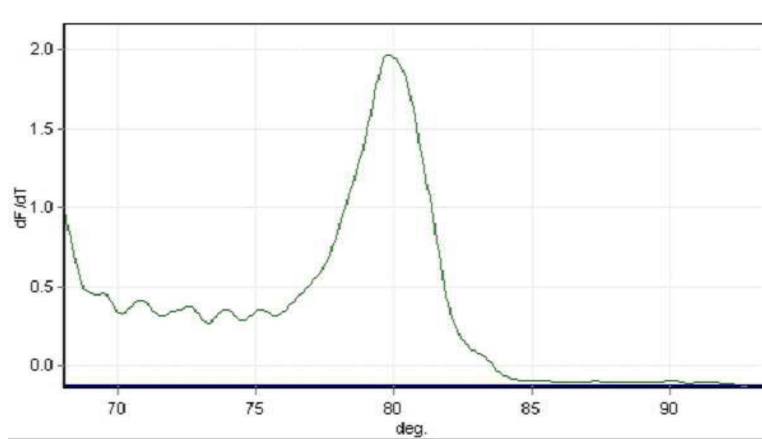
도면6



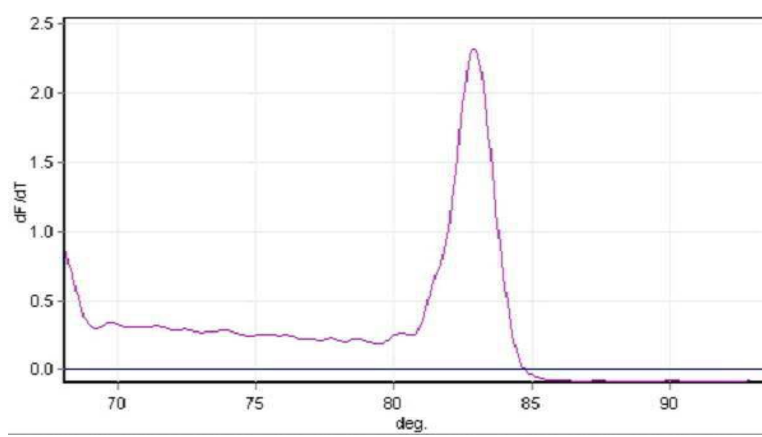
도면7



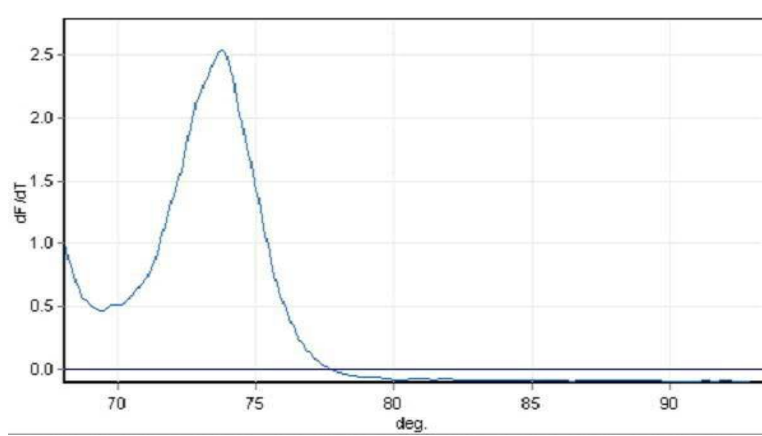
도면8



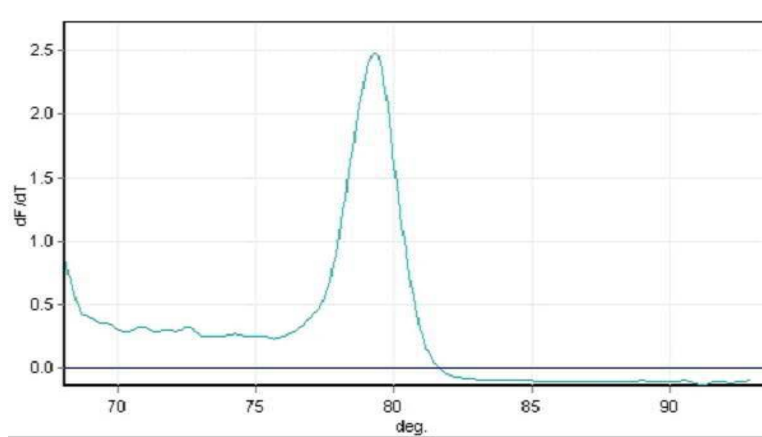
도면9



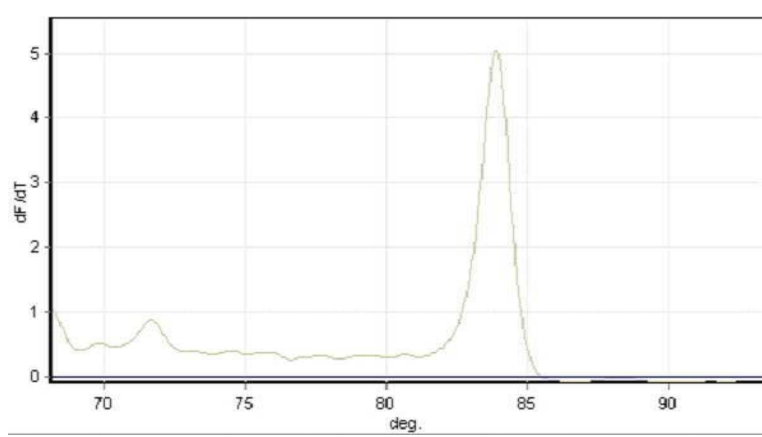
도면10



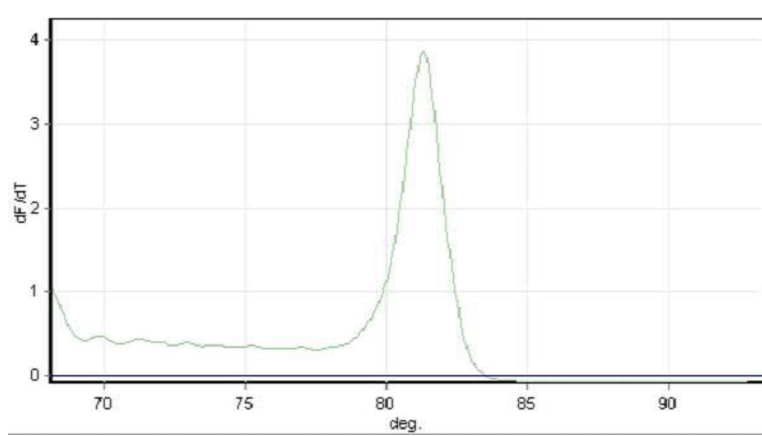
도면11



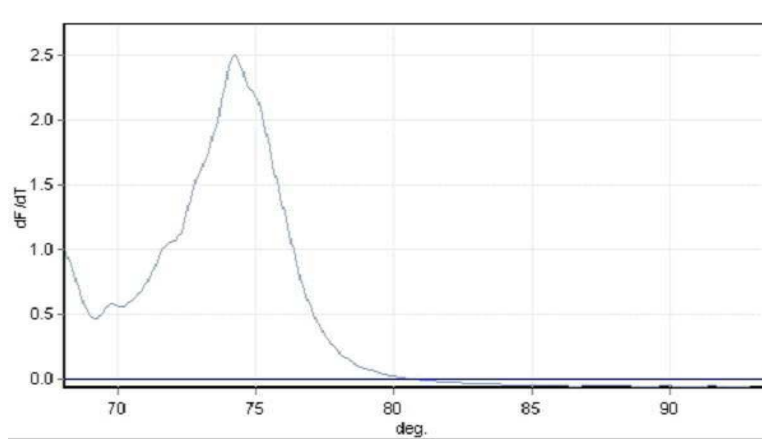
도면12



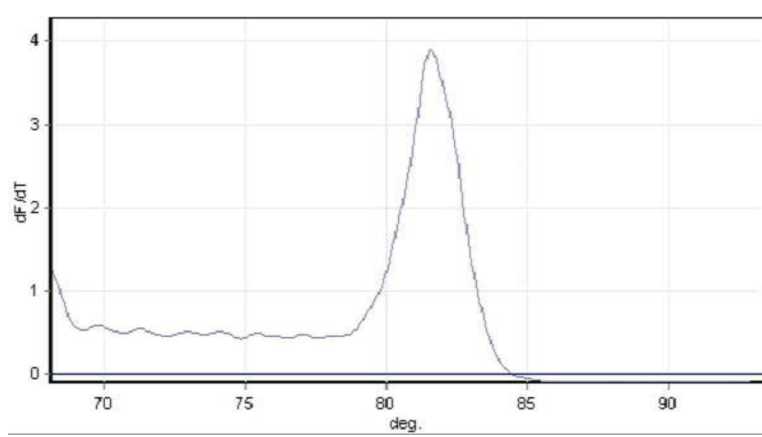
도면13



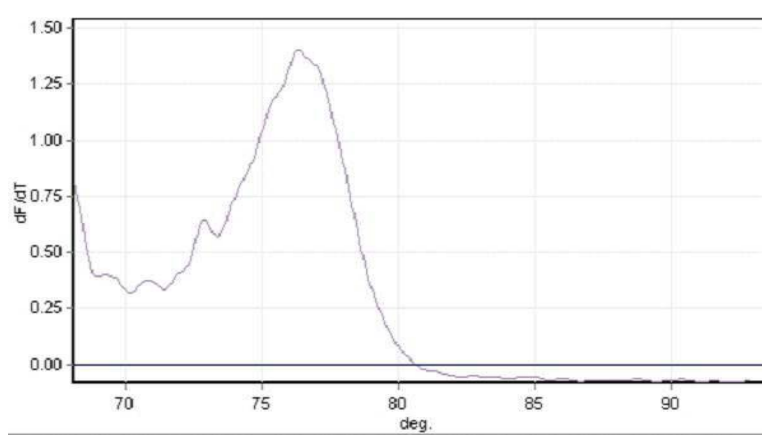
도면14



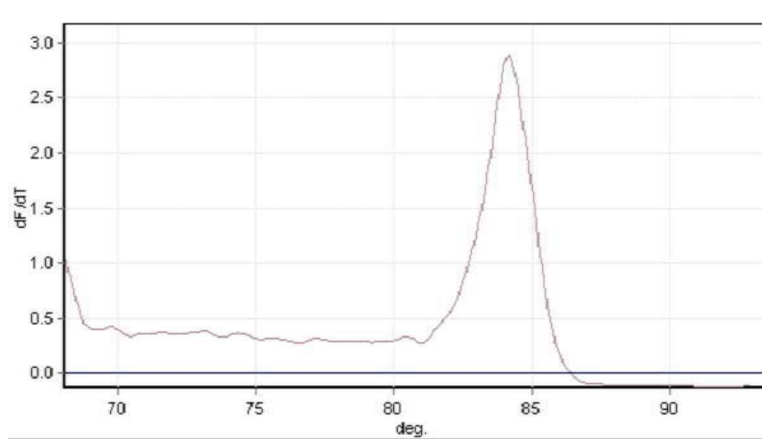
도면15



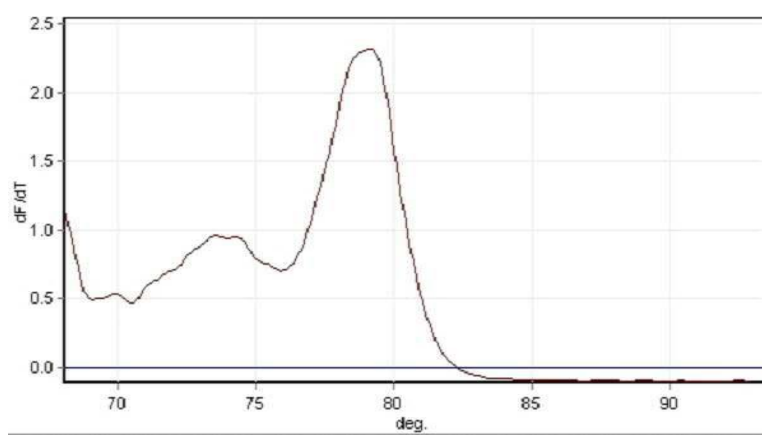
도면16



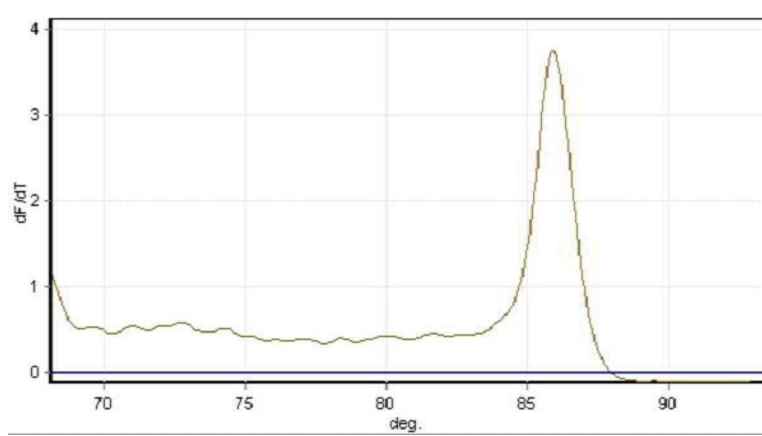
도면17



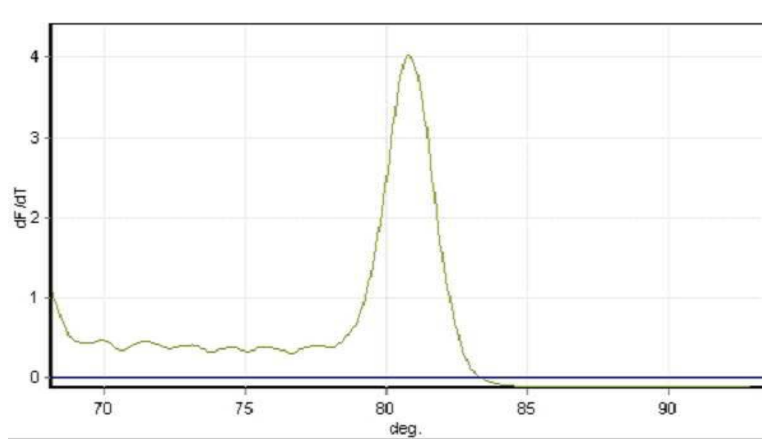
도면18



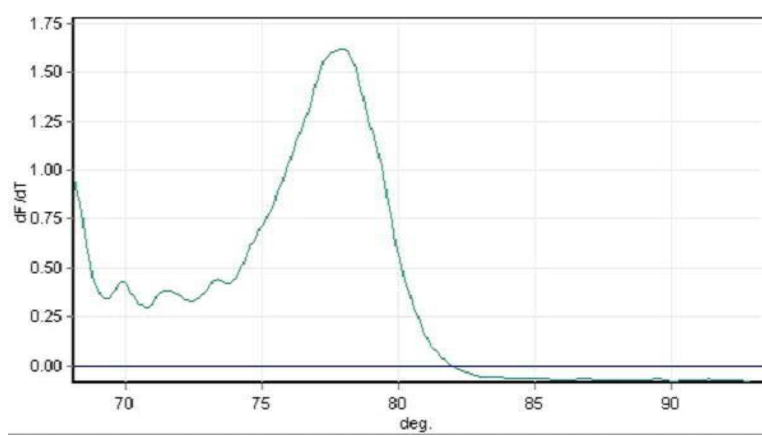
도면19



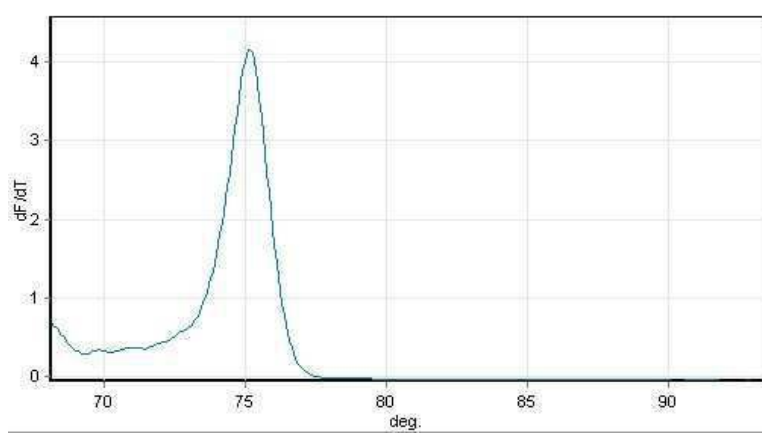
도면20



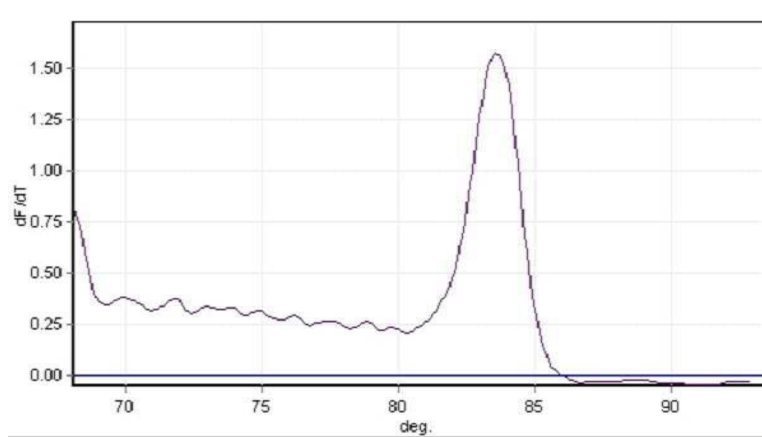
도면21



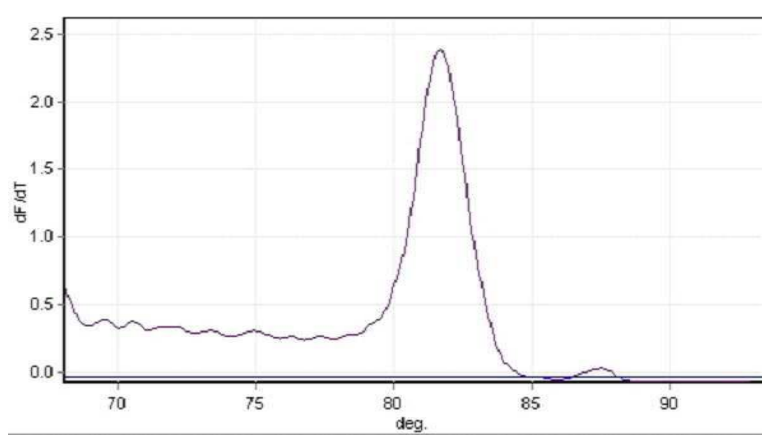
도면22



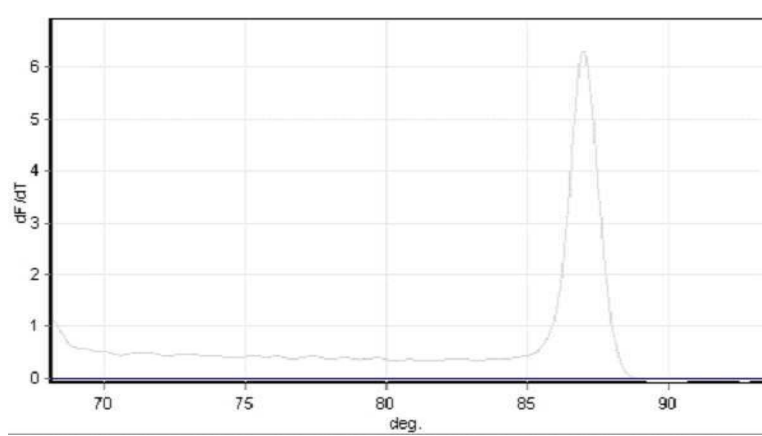
도면23



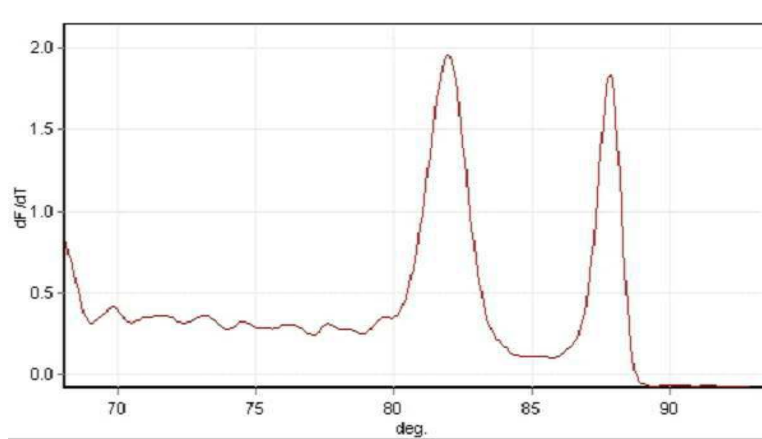
도면24



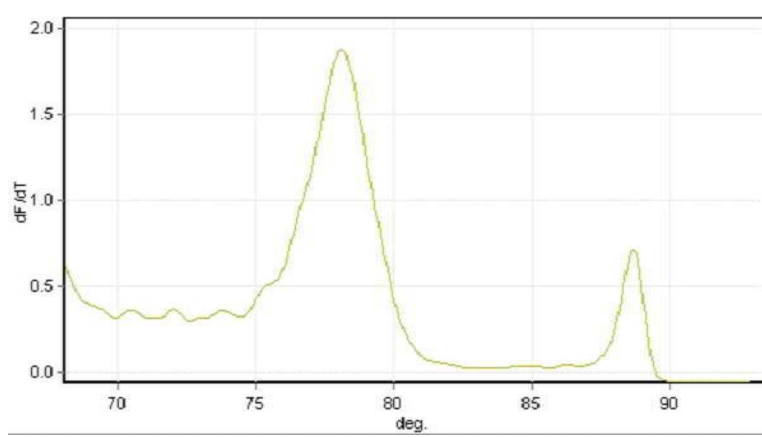
도면25



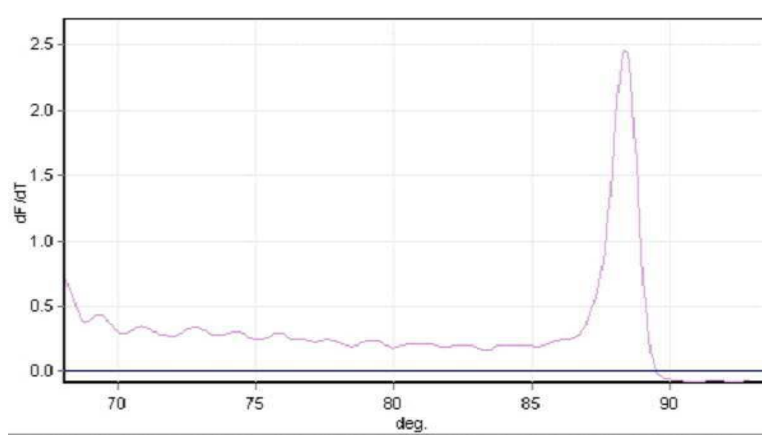
도면26



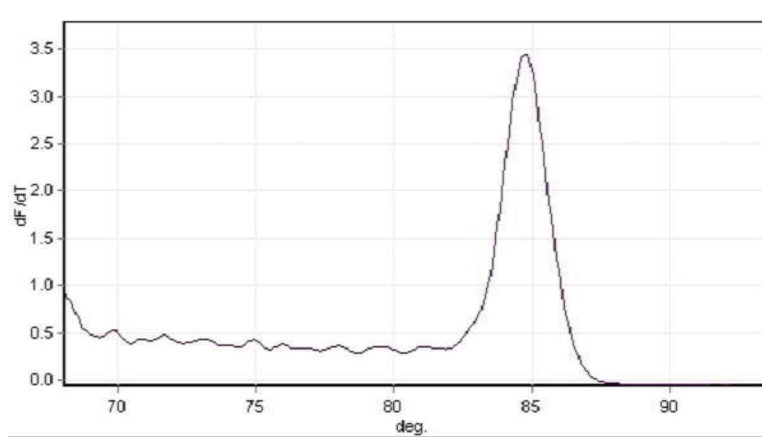
도면27



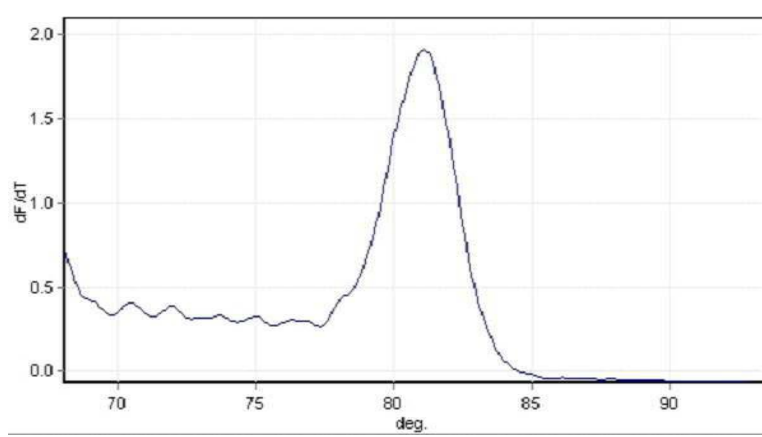
도면28



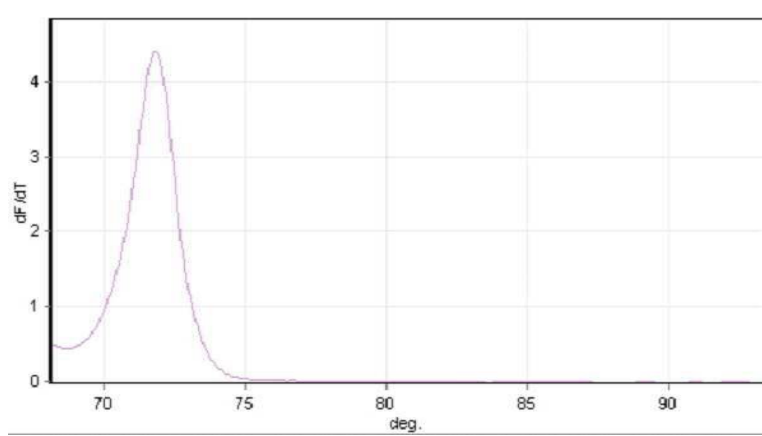
도면29



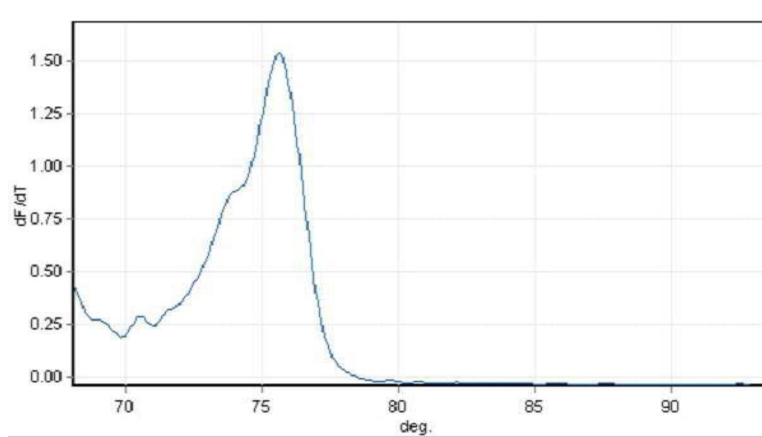
도면30



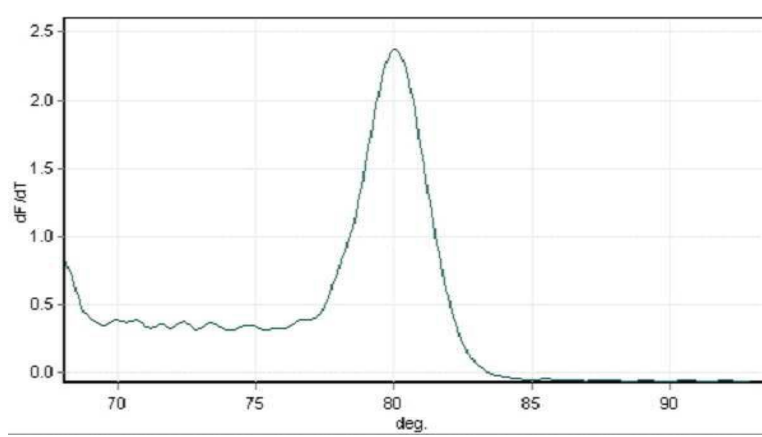
도면31



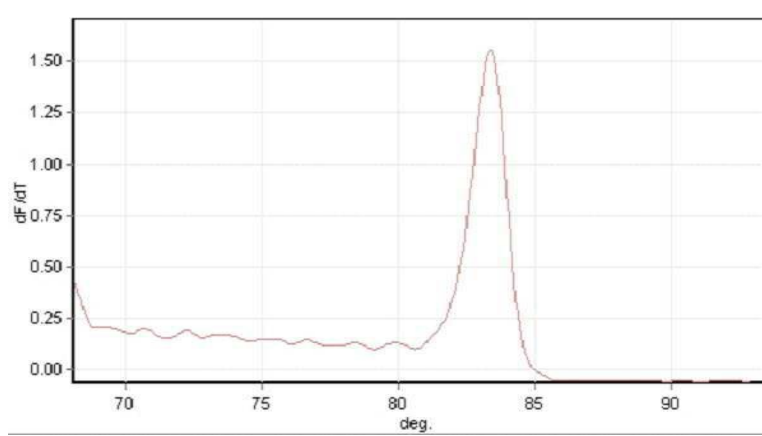
도면32



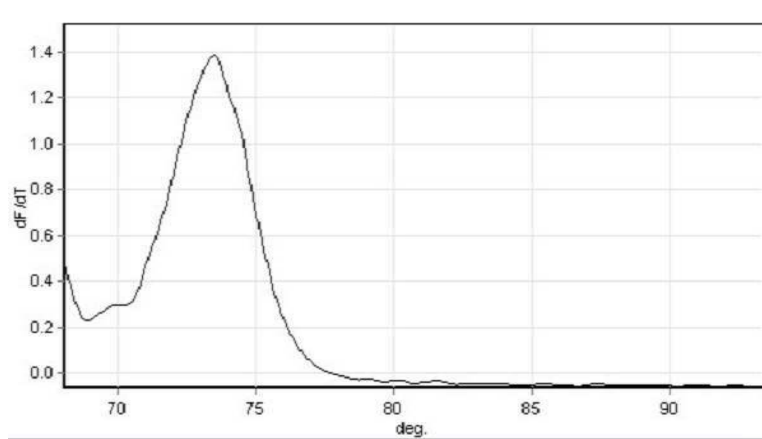
도면33



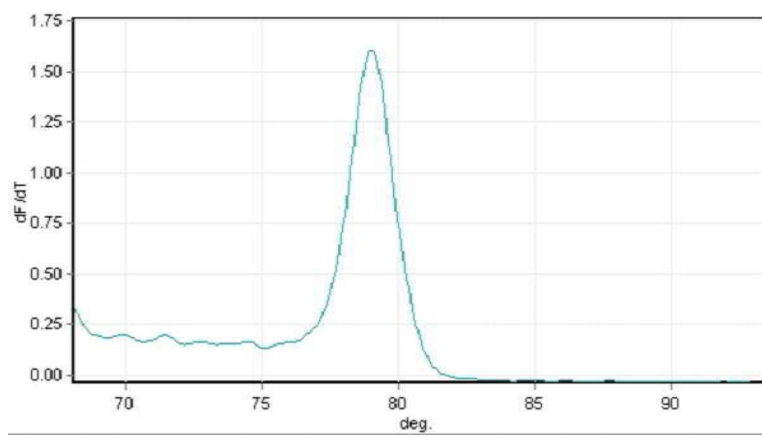
도면34



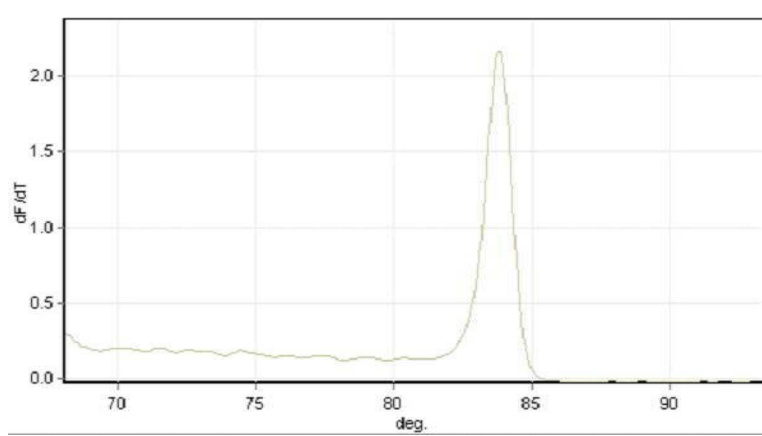
도면35



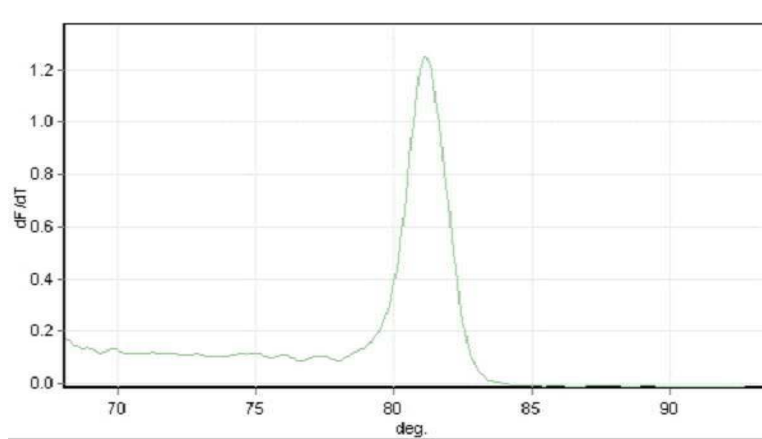
도면36



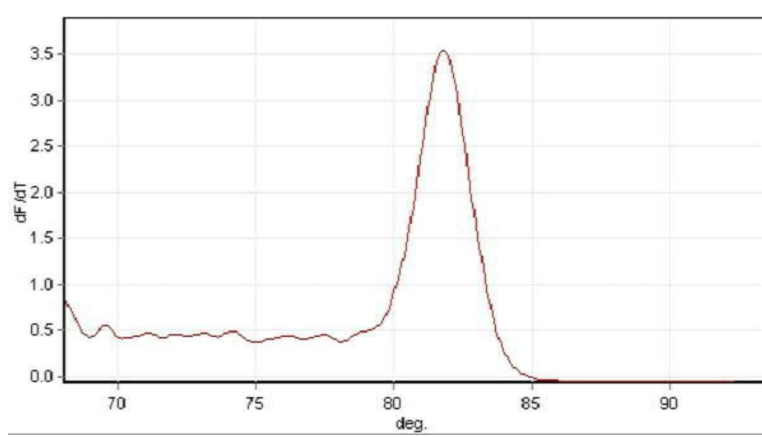
도면37



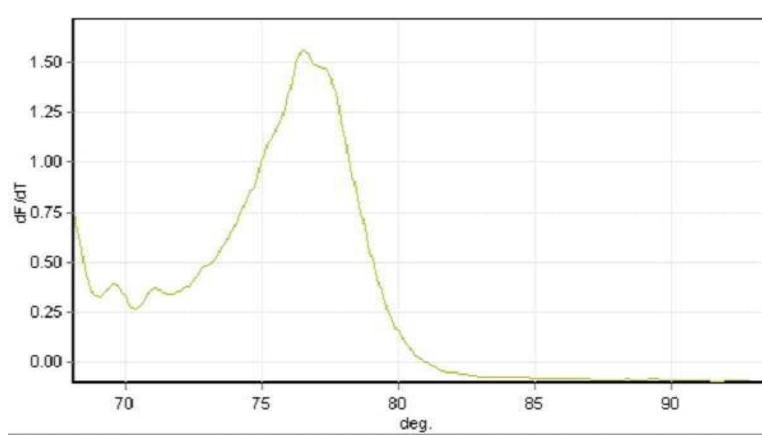
도면38



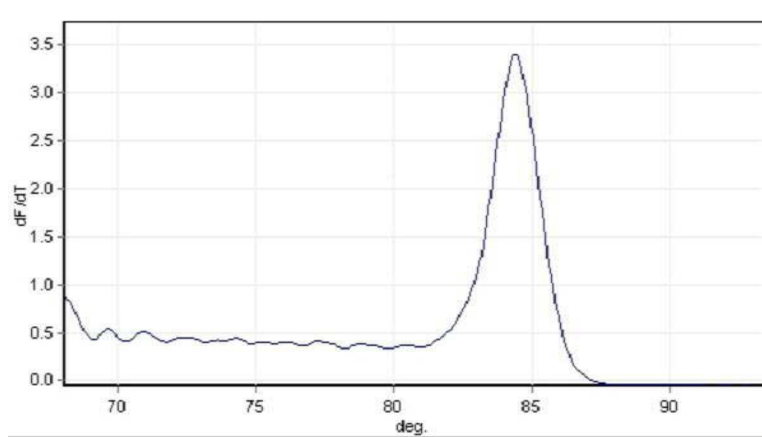
도면39



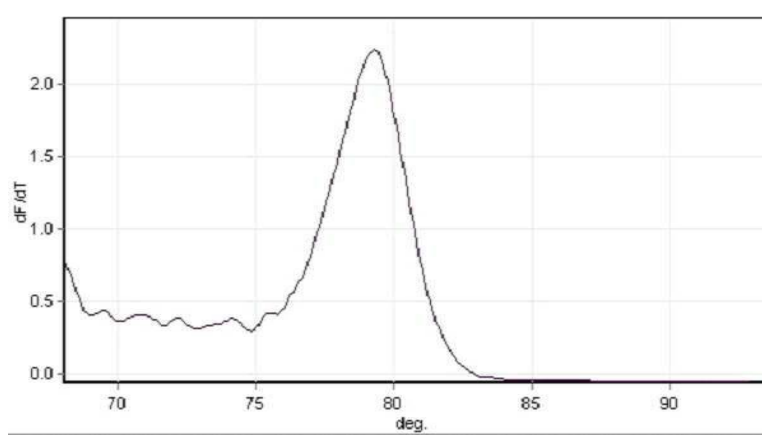
도면40



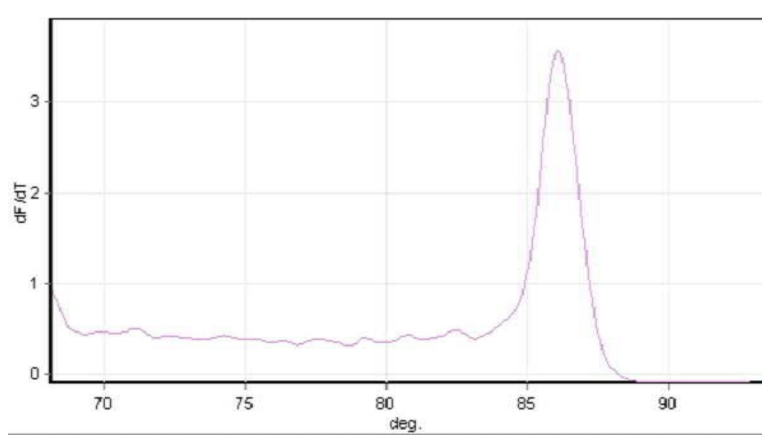
도면41



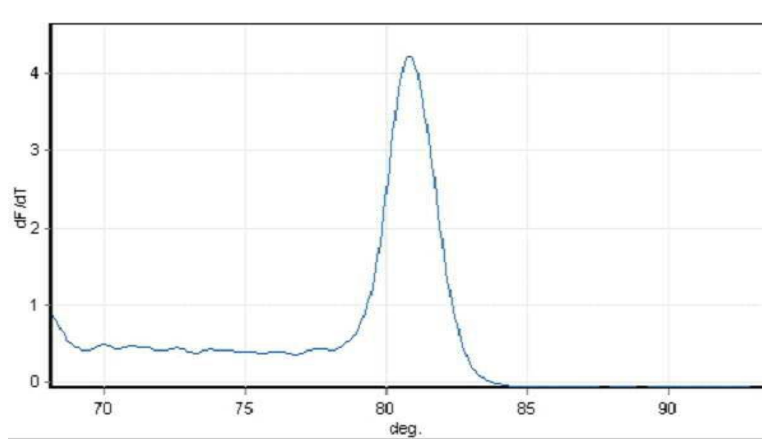
도면42



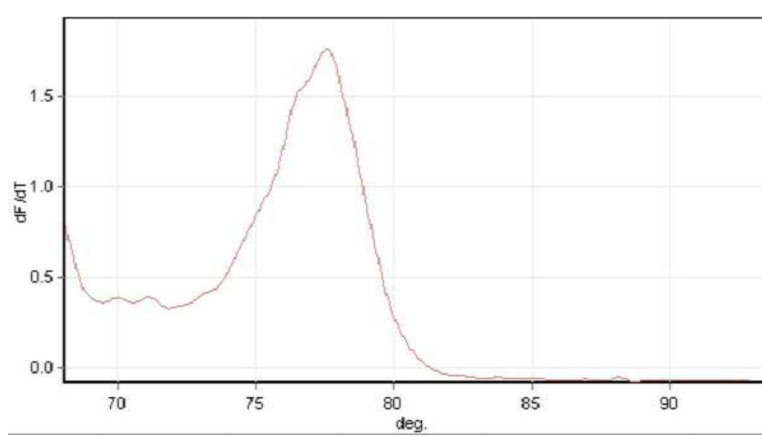
도면43



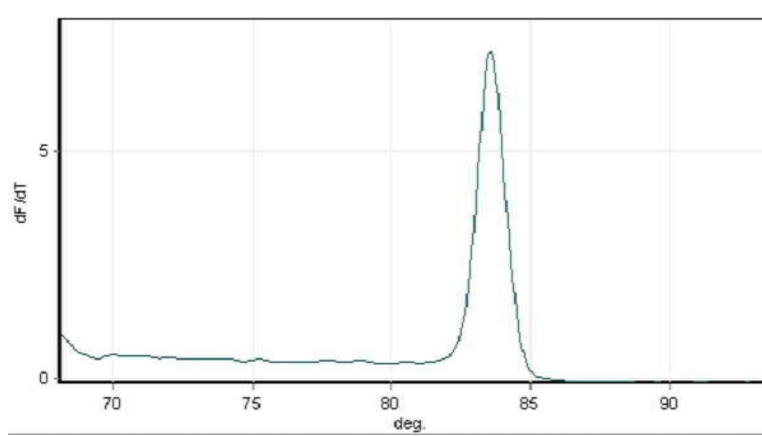
도면44



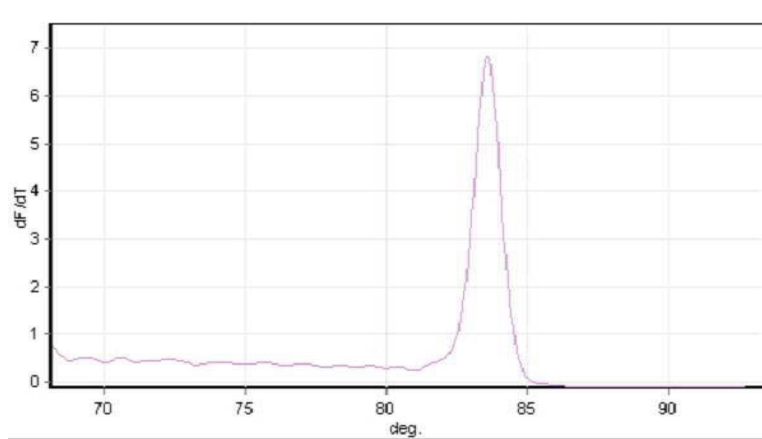
도면45



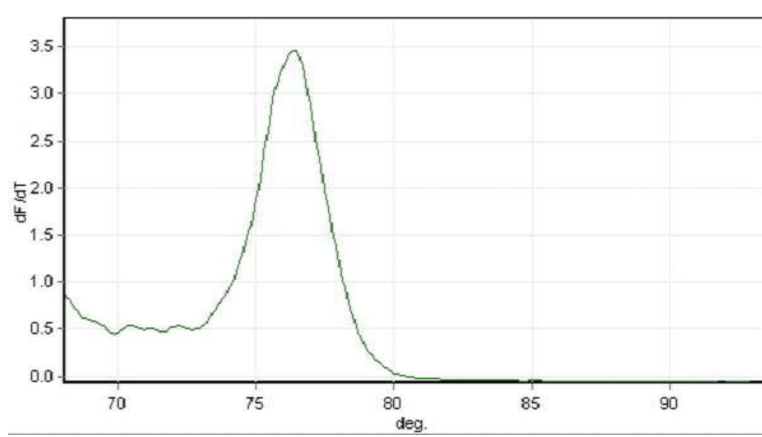
도면46



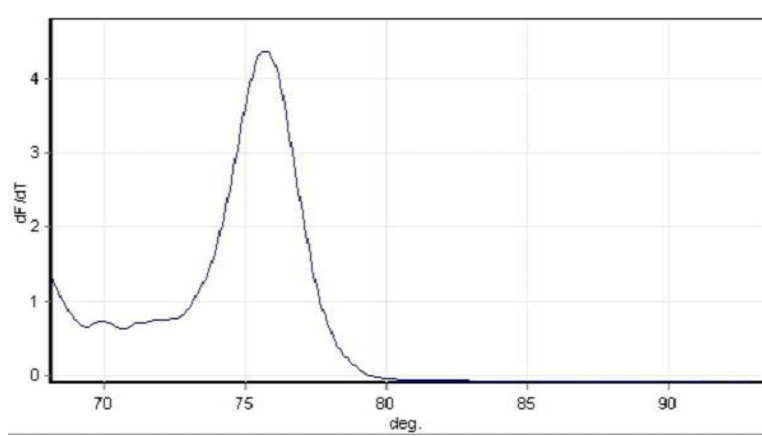
도면47



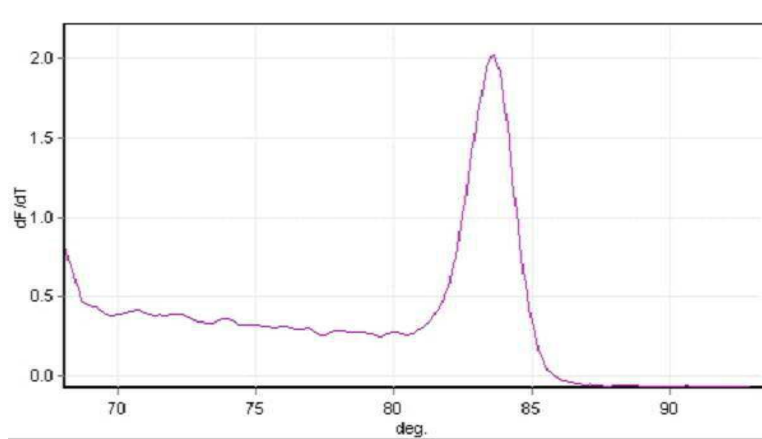
도면48



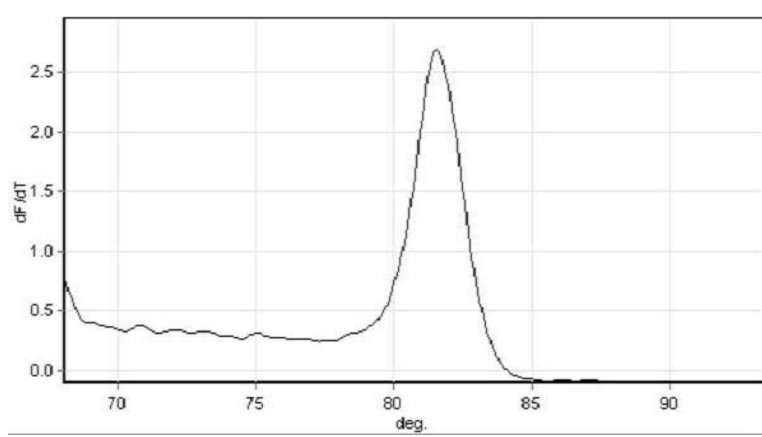
도면49



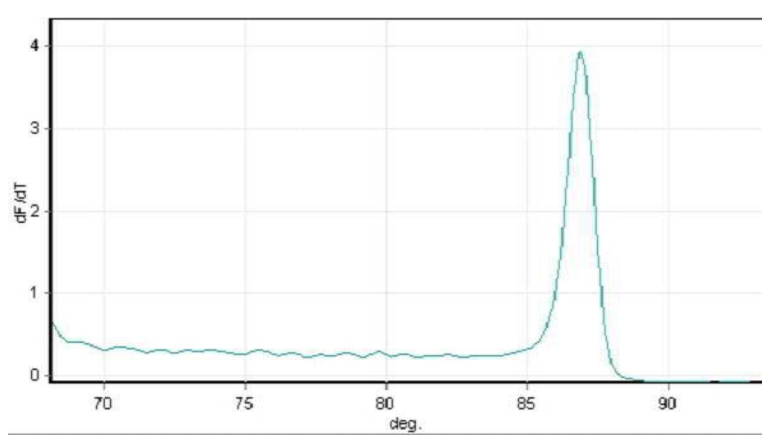
도면50



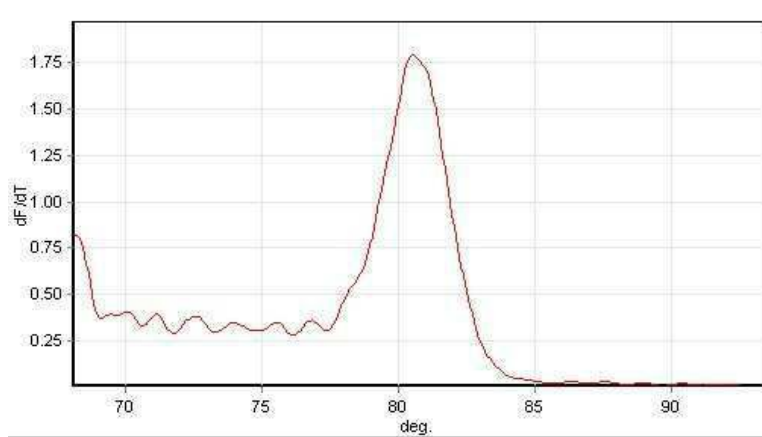
도면51



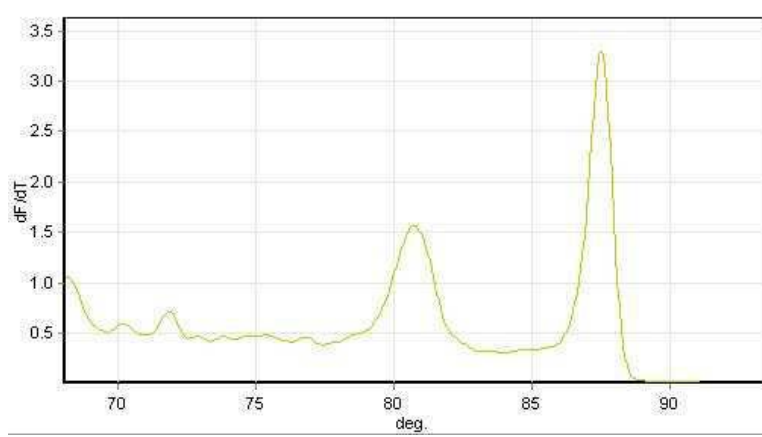
도면52



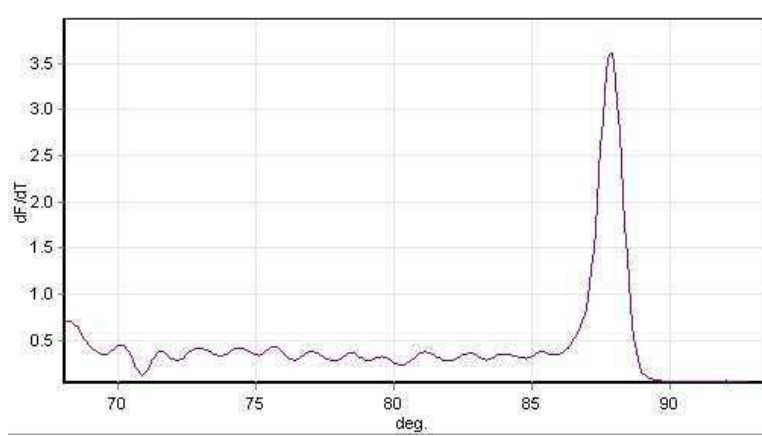
도면53



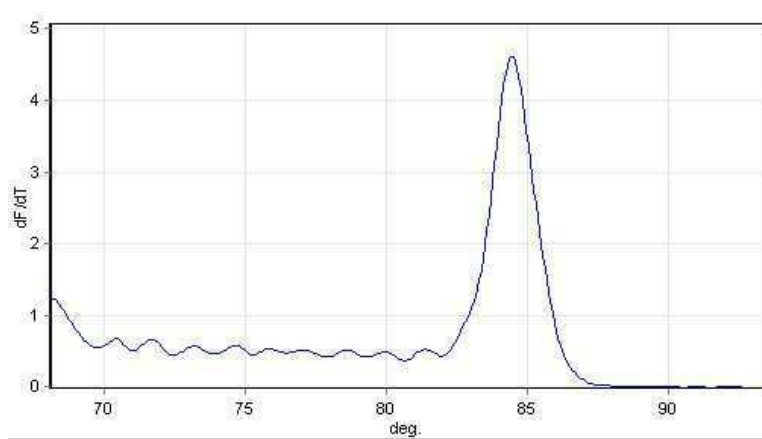
도면54



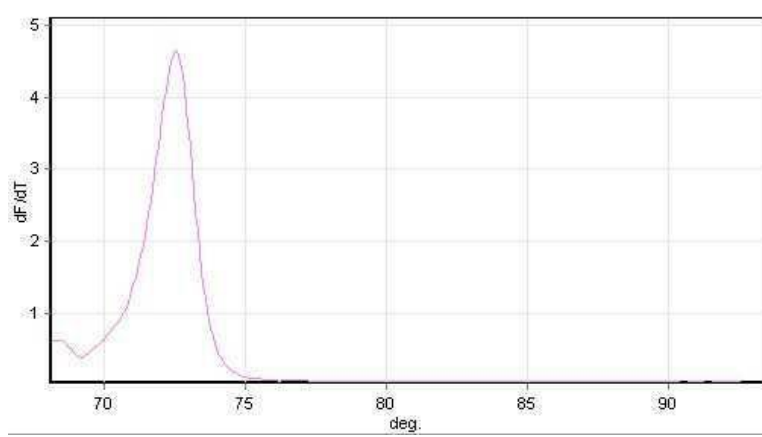
도면55



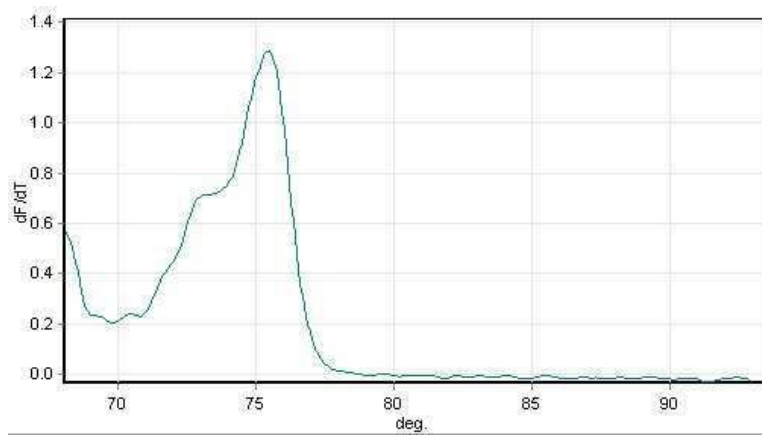
도면56



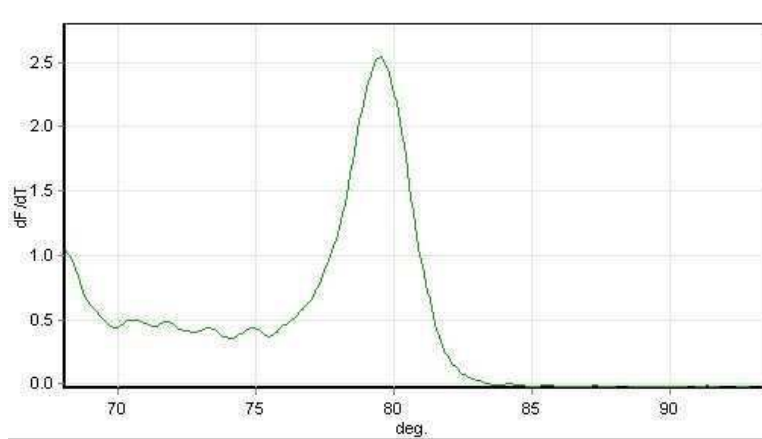
도면57



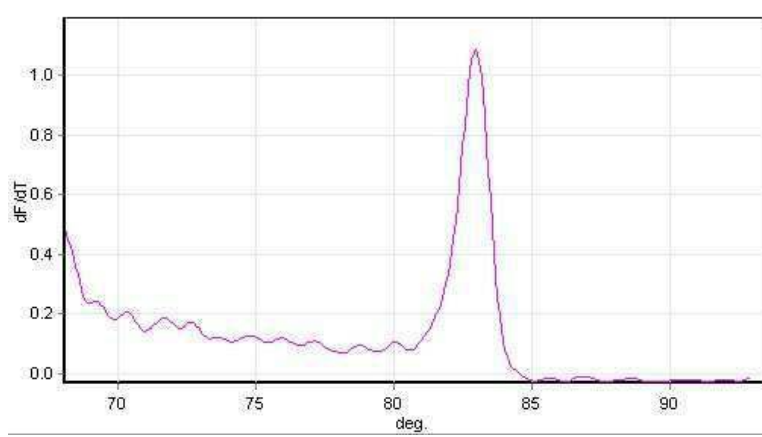
도면58



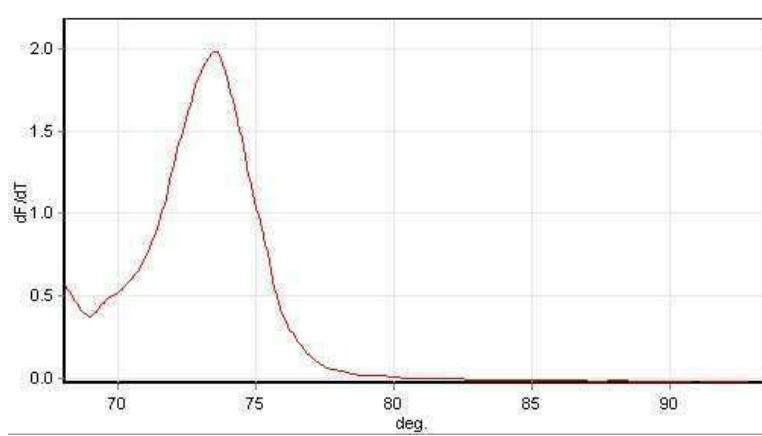
도면59



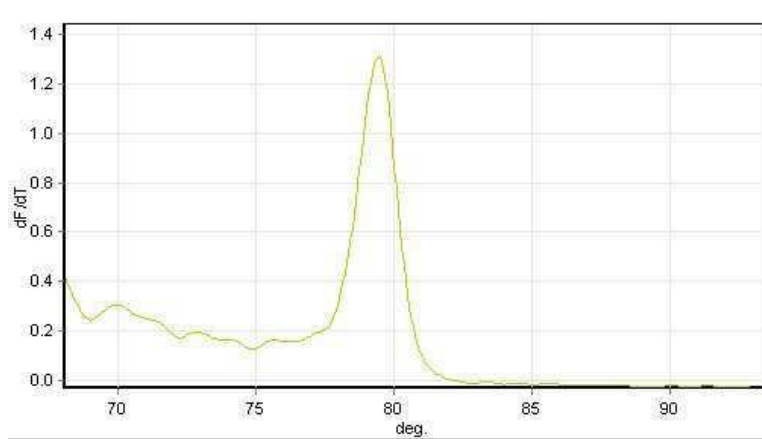
도면60



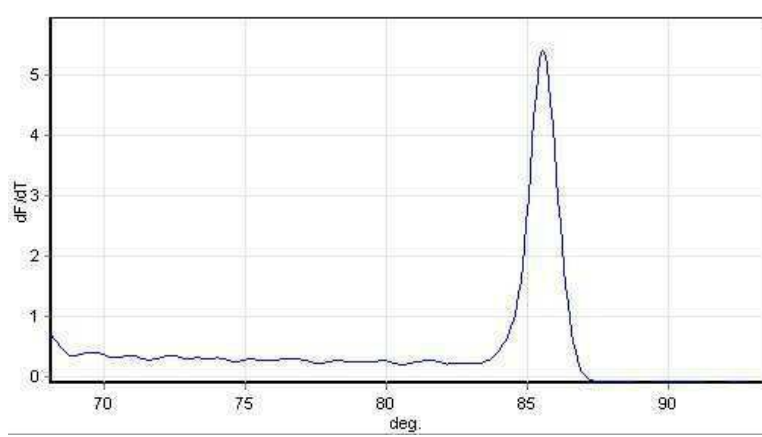
도면61



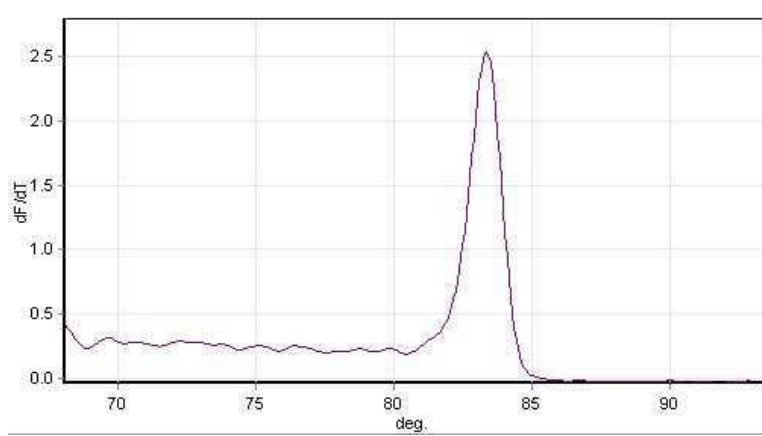
도면62



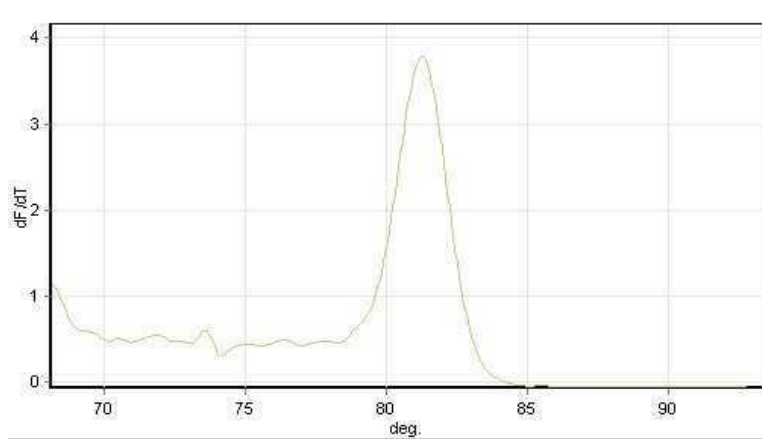
도면63



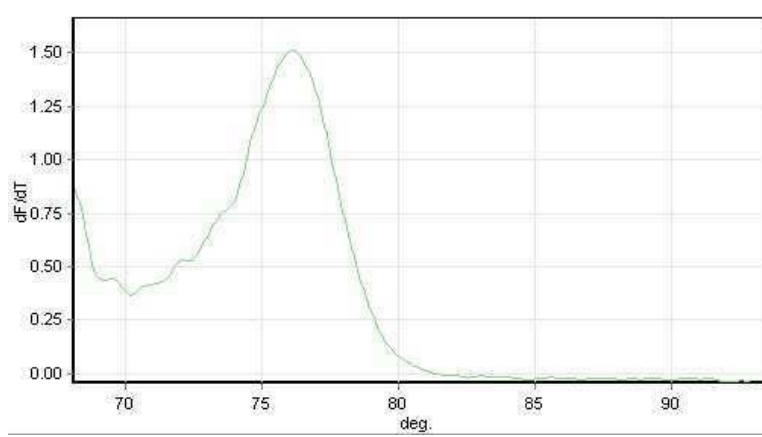
도면64



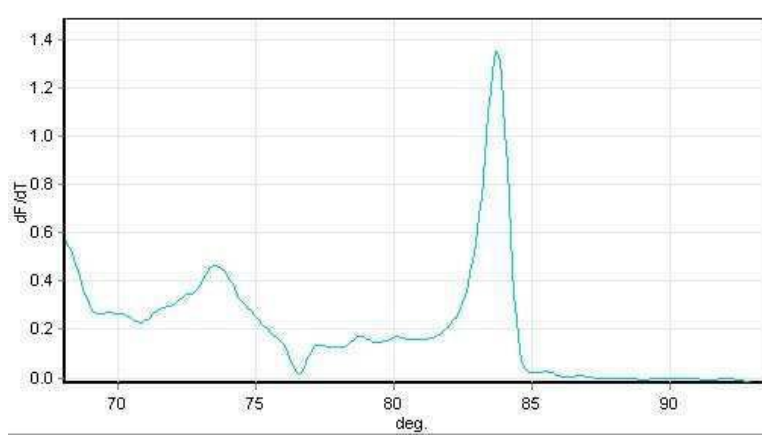
도면65



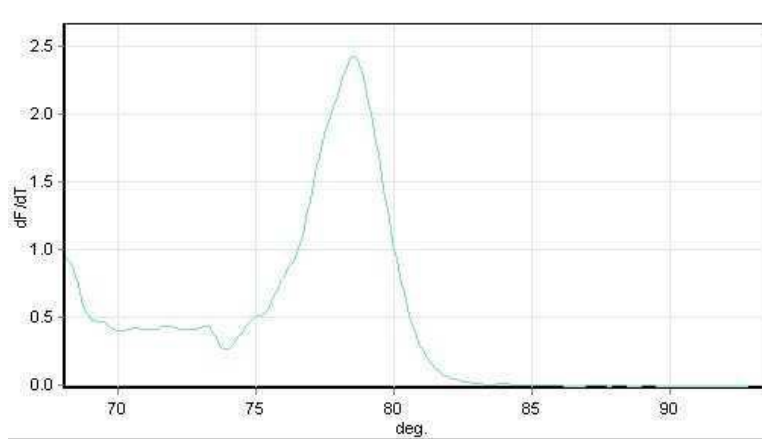
도면66



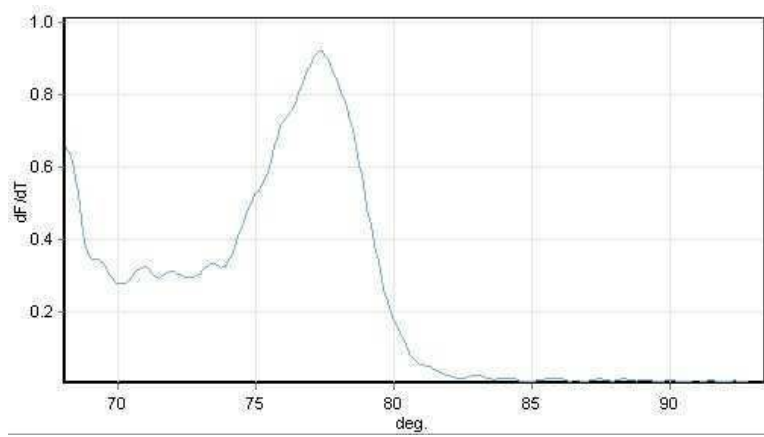
도면67



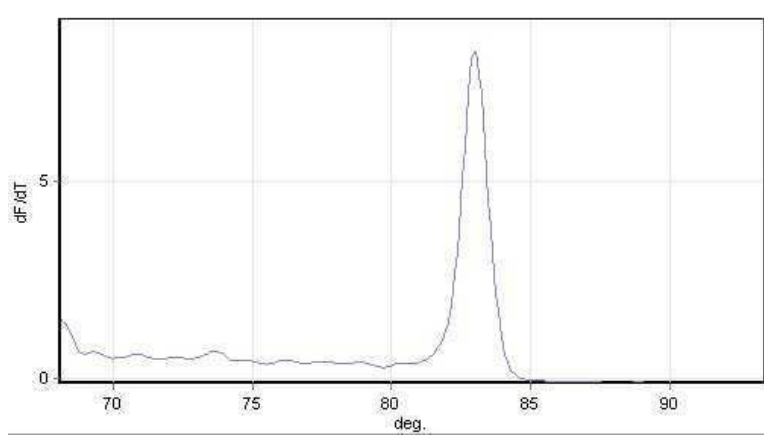
도면68



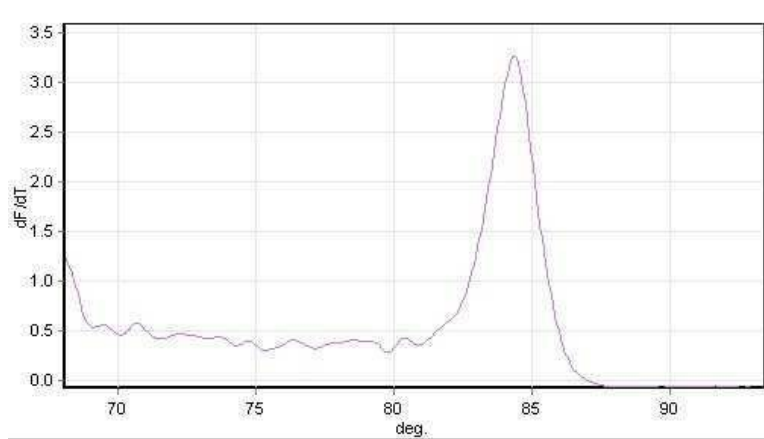
도면69



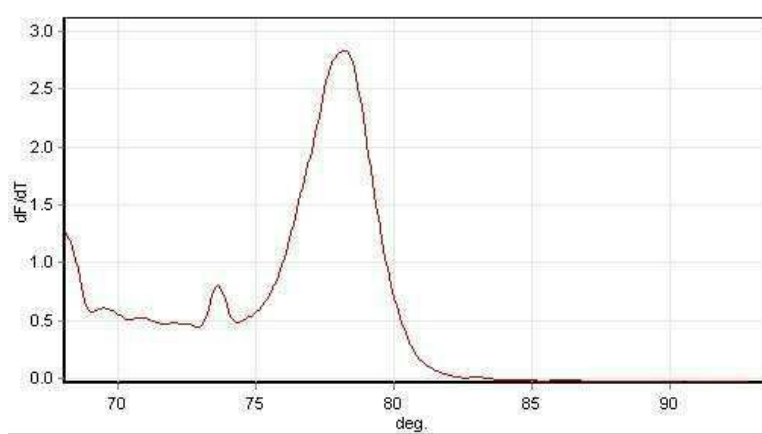
도면70



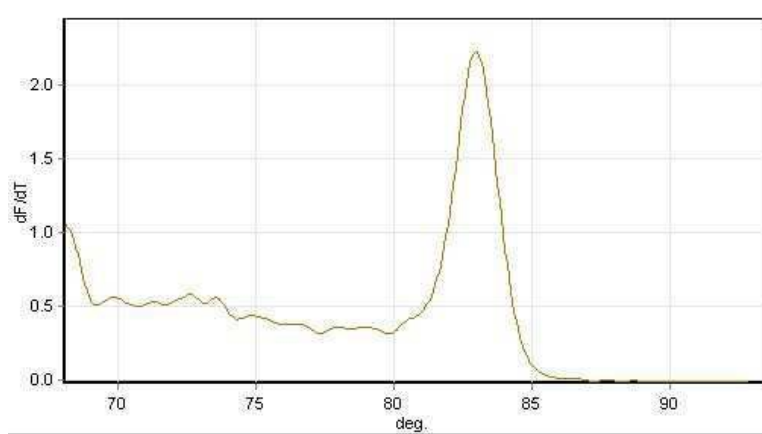
도면71



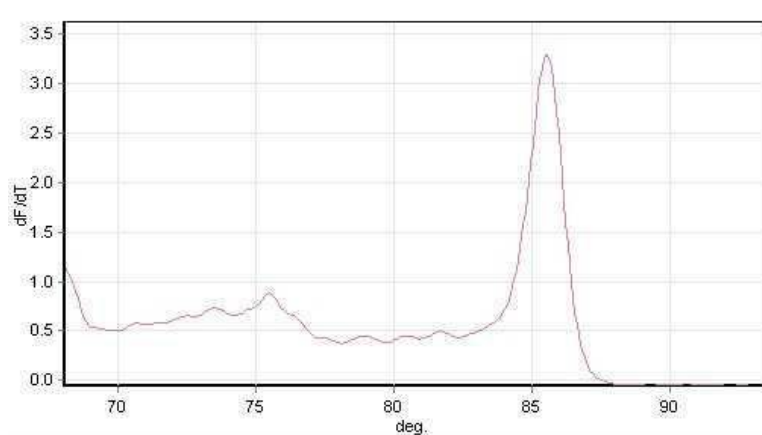
도면72



도면73



도면74



서열목록

- <110> UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION
- <120> METHODS FOR IDENTIFICATION AND DETECTION OF MYCOBACTERIUM USING
REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION AND MELTING CURVE ANALYSIS

<130> ADP-2014-0635

<160> 73

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of
ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.gastri

<400> 1

gggcttgtct tggactcgt 19

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of
ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.gastri

<400> 2

tggtgggaca acactcttgg 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of
ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.gastri

<400> 3

gcaacactcg ggcttgtctt 20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of
ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.gastri

<400>	4	
atggtgggac aacactcttg g		21
<210>	5	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer for amplification specific fragments of	
	ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.xenopi	
<400>	5	
gttgggcagc aggagta		18
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer for amplification specific fragments of	
	ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.xenopi	
<400>	6	
gttgccctcaa aacccaacag		20
<210>	7	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	forward primer for amplification specific fragments of	
	ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.fortuitum	
<400>	7	
cccagaccgt gaggaac		17
<210>	8	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer for amplification specific fragments of	
	ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.fortuitum	
<400>	8	

caatagtgtg tctggcagtc aaaa

24

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of
ITS(Internal transcribed spacer) gene in *M.fortuitum*

<400> 9

cgacaccgc aacaggat

18

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of IS6110
gene in *M.tuberculosis* complex

<400> 10

cgaactcaag gagcacatca g

21

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of IS6110
gene in *M.tuberculosis* complex

<400> 11

cagggttagc cacactttgc

20

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 12

tktggtggaa agcttttgc

19

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 13

cgtaggagtc tgggccgta

19

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of
ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.abscessus

<400> 14

atgaactagg gaacataaag tatgca

26

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of
ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.abscessus

<400> 15

aggatttaca aaacatatc accaagt

27

<210> 16

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of

ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.abscessus

<400> 16

tcgaatgaac tagggaacat aaagta	26
<210> 17	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.abscessus	
<400> 17	
gattacaaa acatattcac caagtaga	28
<210> 18	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in M.intracellulare	
<400> 18	
ggtctaatac cgrataggac cttta	25
<210> 19	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in M.intracellulare	
<400> 19	
cgcaaaagct ttccaccwa	19
<210> 20	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer for amplification specific fragments of ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.szulgai	
<400> 20	
ggtcctgagg caacactca	19

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for amplification specific fragments of
 ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.szulgai
 <400> 21
 ccaagatggt gggacaacag 20

 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for amplification specific fragments of
 ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.terrae
 <400> 22
 gattcccccg tacctcacat 20

 <210> 23
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for amplification specific fragments of
 ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.terrae
 <400> 23

 accaccgacc acccactac 19

 <210> 24
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
 gene in M.avium
 <400> 24
 gacctcaaga cgcatgtctt c 21
 <210> 25

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
 gene in *M.avium*

<400> 25
 cgcaaaagct ttccaccag 19

<210> 26
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for amplification specific fragments of
 ITS(Internal transcribed spacer) gene in *M.chelonae*

<400> 26
 tgtccacccc gtggata 17

<210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for amplification specific fragments of

ITS(Internal transcribed spacer) gene in *M.chelonae*

<400> 27
 gtgccagcgt ttcaattcta 20

<210> 28
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
 gene in *M.kansasii* or *M.gastri*

<400> 28
 gcaatctgcc ctgcacac 18

<210> 29
 <211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
gene in *M.kansasii* or *M.gastri*

<400> 29

ccacaaggca tgctccaa 18

<210> 30

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
gene in *M.kansasii* or *M.gastri*

<400> 30

cggaaaggtc tcttcggaga c 21

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
gene in *M.kansasii* or *M.gastri*

<400> 31

tttcccaggc ttatcctggt 20

<210> 32

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of
ITS(Internal transcribed spacer) gene in *M.gordonae*

<400> 32

tgcaagcctt gagtgtca 19

<210> 33

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of
ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.gordonae

<400> 33

ggggacagca ccagagg 17

<210> 34

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
gene in M.gordonae

<400> 34

taacacatgc aagtcgaaag gt 22

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
gene in M.gordonae

<400> 35

ctttcacca caggacatgt 20

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of
ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.marinum or M.ulcerans

<400> 36

gggtcctgag gcaacatct 19

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of
ITS(Internal transcribed spacer) gene in *M.marinum* or *M.ulcerans*

<400> 37
caacatcccg aaaccaacag 20

<210> 38

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of
ITS(Internal transcribed spacer) gene in *M.simiae*

<400> 38
ctcggccgac ttcggtt 17

<210> 39

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of
ITS(Internal transcribed spacer) gene in *M.simiae*

<400> 39
agatggaggg acaccacttc a 21

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of HSP65(Heat
shock protein 65) gene in *M.ulcerans*

<400> 40
accgagaccc tgctcaaa 18

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of HSP65(Heat shock protein 65) gene in M.ulcerans

<400> 41

gctccttggg ctcgacctct 20

<210> 42

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.septicum

<400> 42

atggcctcgc acctgtag 18

<210> 43

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.septicum

<400> 43

ccaatagtgt gtctggcagt tcta 24

<210> 44

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.smegmatis

<400> 44

gagctggagc gctgtagtg 19

<210> 45

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of

ITS(Internal transcribed spacer) gene in *M.smegmatis*

<400

> 45

gaaacagcgt ttccacac 19

<210> 46

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of

ITS(Internal transcribed spacer) gene in *M.smegmatis*

<400> 46

gagccgtgag gagctgga 18

<210> 47

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of

ITS(Internal transcribed spacer) gene in *M.smegmatis*

<400> 47

accgcatttc aacgtttgc 19

<210> 48

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA

gene in *M.scrofulaceum*

<400> 48

accatcgacg aaggctcac 19

<210> 49

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<

220><223> reverse primer for amplification specific fragments of 16S rRNA

gene in *M.scrofulaceum*

<400> 49

cacctaccgt caaccacaca 19

<210> 50

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of

ITS(Internal transcribed spacer) gene in *M.scrofulaceum*

<400> 50

gcaacactcg gctcgttct 19

<210

> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of

ITS(Internal transcribed spacer) gene in *M.scrofulaceum*

<400> 51

agatggaggg acaccactca 20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of

ITS(Internal transcribed spacer) gene in *M.haemophilum*

<

400> 52

gcacaacagc aaatgaatcg 20

<210> 53

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of

ITS(Internal transcribed spacer) gene in *M.haemophilum*

<400> 53
 acatgggaca agcctgagt 19
 <210> 54
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for amplification specific fragments of
 ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.marinum or M.ulcerans
 <400> 54
 gggtcctgag gcaacatc 18
 <210> 55
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for amplification specific fragments of
 ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.marinum or M.ulcerans
 <400> 55
 acagaacacg ccaccaaa 18
 <210> 56
 <211> 20
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for amplification specific fragments of
 ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.celatum
 <400> 56
 cacgaaaaac actccgcatc 20
 <210> 57
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for amplification specific fragments of
 ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.celatum
 <400> 57

gcgatttttc ccatttgttg 20

<210> 58
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for amplification specific fragments of
 ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.abscessus
 <400> 58
 catttcccag tcgaatgaac ta 22
 <210> 59
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for amplification specific fragments of
 ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.abscessus
 <400>
 > 59
 ggattttacaa aacatattca ccaagtagat ac 32
 <210> 60
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
 gene in M.abscessus or M.chelonae
 <400> 60
 ctaataaccgg ataggaccac aca 23
 <210> 61
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
 gene in M.abscessus or M.chelonae
 <400> 61

gcaaaagctt tgcaccact	19
<210> 62	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer for amplification specific fragments of ITS(Internal transcribed spacer) gene in <i>M.peregrinum</i>	
<400> 62	
attcgttgga tggcctcac	19
<210> 63	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of ITS(Internal transcribed spacer) gene in <i>M.peregrinum</i>	
<400> 63	
ccacgccaag ttgttgag	19
<210> 64	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer for amplification specific fragments of ITS(Internal transcribed spacer) gene in <i>M.mucogenicum</i>	
<400> 64	
catttacctg ccctgatcca	20
<210> 65	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of ITS(Internal transcribed spacer) gene in <i>M.mucogenicum</i>	
<400> 65	
cgacgacaat cccaacca	18

<210> 66
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for amplification specific fragments of
 ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.shimoidei

<400> 66
 gaagtcgagc cgtgagga 18

<210> 67
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for amplification specific fragments of
 ITS(Internal transcribed spacer) gene in M.shimoidei

<400> 67
 accaccaaag atgaggcaac 20

<210> 68
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
 gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 68
 tgtggtggaa agcttttgc 19

<210> 69
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
 gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 69
 tttggtggaa agcttttgc 19

<210> 70

<211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
 gene in M.intracellulare
 <400> 70
 ggtctaatac cggataggac cttta 25
 <210> 71
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
 gene in M.intracellulare
 <400> 71
 ggtctaatac cgaataggac cttta 25
 <210> 72
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
 gene in M.intracellulare
 <400> 72
 cgcaaaagct ttccaccaa 19
 <210> 73
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer for amplification specific fragments of 16S rRNA
 gene in M.intracellulare
 <400> 73
 cgcaaaagct ttccaccta 19