



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0160467
(43) 공개일자 2022년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/70 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/701 (2013.01)

C12Q 2521/107 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0023221

(22) 출원일자 2022년02월22일

심사청구일자 2022년02월22일

(30) 우선권주장

1020210068194 2021년05월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인

재단법인 아산사회복지재단

서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)

울산대학교 산학협력단

울산광역시 남구 대학로 93(무거동)

(72) 발명자

김성한

서울특별시 강남구 압구정로29길 57, 204동 903호(압구정동, 현대아파트)

김지연

서울특별시 강동구 성안로27길 57-18, 404호(천호동)

(74) 대리인

제일특허법인(유)

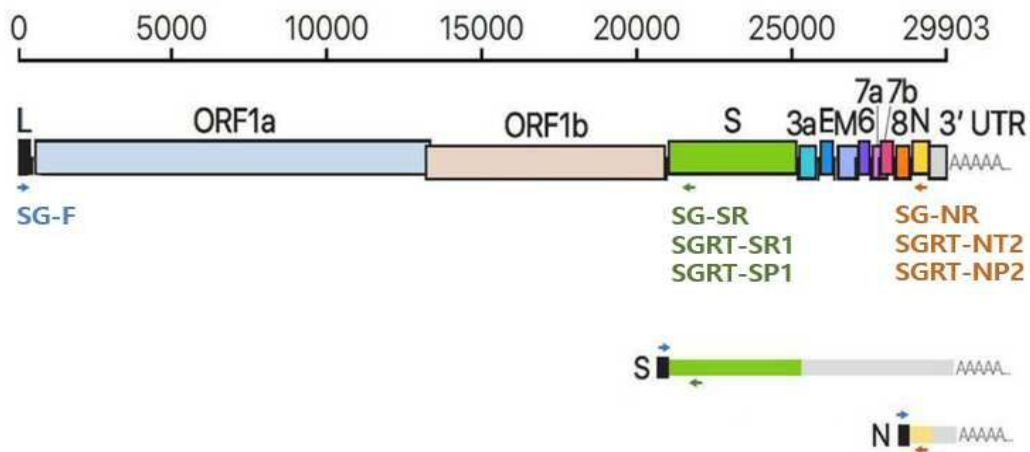
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 SARS-CoV-2 검출용 조성물 및 이를 이용한 COVID-19 진단용 키트

(57) 요약

본 발명은 SARS-CoV-2 검출용 조성물 및 이를 이용한 COVID-19 진단용 키트에 관한 것이다. 본 발명의 프라이머 세트 또는 프라이머-프로브 세트는 SARS-CoV-2의 S 유전자 및 N 유전자의 하위유전체 RNA를 표적으로 제작한 것으로 이를 포함하는 조성물, 진단용 키트 및 정보를 제공하는 방법을 이용함으로써 높은 민감성과 특이성으로 실제 전파력이 있는 SARS-CoV-2를 신속하게 검출할 수 있다. 따라서, 본 발명의 프라이머 세트 또는 프라이머-프로브 세트는 COVID-19 진단 및 격리 해제 판단에 유용하게 쓰일 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2537/16 (2013.01)

C12Q 2561/113 (2019.08)

C12Q 2565/101 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465033503
과제번호	HW20C2062030021
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	감염병방역기술개발(R&D)
연구과제명	신변종 감염병 분자진단을 위한 임상시료 테스트 및 분석
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2021.03.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)의 i) N 유전자의 하위유전체 RNA(subgenomic RNA)와 상보적으로 결합하는 프라이머 세트, ii) S 유전자의 하위유전체 RNA와 상보적으로 결합하는 프라이머 세트, 또는 상기 i) 및 ii) 프라이머 세트 모두를 포함하는, SARS-CoV-2 검출용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

i) 서열번호 7의 염기서열로 이루어지는 정방향 프라이머 및 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 역방향 프라이머를 포함하는 프라이머 세트;

ii) 서열번호 7의 염기서열로 이루어지는 정방향 프라이머, 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 역방향 프라이머를 포함하는 프라이머 세트; 또는

상기 i) 및 ii) 프라이머 세트 모두를 포함하는, SARS-CoV-2 검출용 조성물.

청구항 3

중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)의 i) N 유전자의 하위유전체 RNA(subgenomic RNA)와 상보적으로 결합하는 프라이머-프로브 세트, ii) S 유전자의 하위유전체 RNA와 상보적으로 결합하는 프라이머-프로브 세트, 또는 상기 i) 및 ii) 프라이머-프로브 세트 모두를 포함하는, SARS-CoV-2 검출용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

i) 서열번호 7의 염기서열로 이루어지는 정방향 프라이머, 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 역방향 프라이머, 및 서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 프로브를 포함하는 프라이머-프로브 세트;

ii) 서열번호 7의 염기서열로 이루어지는 정방향 프라이머, 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 역방향 프라이머, 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 프로브를 포함하는 프라이머-프로브 세트; 또는

상기 i) 및 ii) 프라이머-프로브 세트 모두를 포함하는, SARS-CoV-2 검출용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 프로브는 리포터 및 소광제가 부착된 것인, SARS-CoV-2 검출용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 리포터는 5' 말단에 부착되며 FAM, CY5, CAL Fluor Orange 560, VIC, HEX, JOE 및 Quasar 670로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광물질인, SARS-CoV-2 검출용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 소광제는 3' 말단에 부착되며 BHQ1, BHQ1 nova 및 BHQ2로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의

소광물질인, SARS-CoV-2 검출용 조성물.

청구항 8

제1항의 SARS-CoV-2 검출용 조성물을 포함하는, COVID-19 진단용 키트.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 진단은 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)에 의해 이루어지는, COVID-19 진단용 키트.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 키트는 DNA 중합효소, dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP) 혼합물, 완충액(buffer solution) 및 증류수를 더 포함하는 것인, COVID-19 진단용 키트.

청구항 11

제3항의 SARS-CoV-2 검출용 조성물을 포함하는, COVID-19 진단용 키트.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 진단은 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(real-time RT-PCR)에 의해 이루어지는, COVID-19 진단용 키트.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 키트는 DNA 중합효소, dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP) 혼합물, 완충액(buffer solution) 및 증류수를 더 포함하는 것인, COVID-19 진단용 키트.

청구항 14

i) 검체로부터 핵산을 분리하는 단계;

ii) 분리된 핵산을 주형으로 제8항의 COVID-19 진단용 키트로 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하는 단계를 포함하는, COVID-19 존재 여부에 대한 정보 제공 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 검체는 비인두 도말물, 구인두 도말물, 비강 도말물, 가래 또는 타액인 것인, COVID-19 존재 여부에 대한 정보 제공 방법.

청구항 16

제14항에 있어서,

SARS-CoV-2의 N 유전자 유전체 RNA의 복제수를 기준으로 상대적인 바이러스의 양이 4.0 Log copies/ml 미만이고, SARS-CoV-2의 N 유전자 하위유전체 RNA 검출 결과가 음성인 경우; 또는 SARS-CoV-2의 S 유전자 유전체 RNA의 복제수를 기준으로 상대적인 바이러스의 양이 4.0 Log copies/ml 미만이고, S 유전자 하위유전체 RNA 검출 결과가 음성인 경우, SARS-CoV-2가 생존하지 않는다고 판단하는 단계를 추가로 포함하는, COVID-19 존재 여부에 대한 정보 제공 방법.

청구항 17

i) 검체로부터 핵산을 분리하는 단계;

ii) 분리된 핵산을 주형으로 제11항의 COVID-19 진단용 키트로 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하는 단계를 포함하는, COVID-19 존재 여부에 대한 정보 제공 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 검체는 비인두 도말물, 구인두 도말물, 비강 도말물, 가래 또는 타액인 것인, COVID-19 존재 여부에 대한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 SARS-CoV-2 검출용 조성물 및 이를 이용한 COVID-19 진단용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)는 전 세계적으로 유행하는 코로나바이러스 질환 2019(COVID-19)의 원인으로, 전 세계적으로 수백만 명이 넘는 사망자를 발생시키고 있다. 이에, 세계 각국은 전염을 감소시키기 위해 봉쇄 정책을 사용하고 있으며 이로 인해 광범위한 사회적, 경제적 영향이 미치고 있다.

[0003] SARS-CoV-2는 하위유전체 RNA(subgenomic RNA)의 합성을 통한 독특한 불연속 전사 메커니즘을 갖는다. 코로나바이러스 하위유전체 RNA는 유전체 RNA(genomic RNA)의 5' 말단으로부터 유래되는 약 70개 뉴클레오타이드의 공통 리더 서열 및 코로나바이러스 유전체의 3' 말단으로부터의 유래되는 안티센스 RNA의 중첩 세트(nested set)를 포함한다. 이를 통해, 하위유전체 RNA의 검출은 통상적인 유전체 RNA의 검출보다 복제 가능 바이러스를 더 잘 반영할 가능성이 있으나 이에 대해 명확히 확인된 바는 아직 없다.

[0004] 통상적으로 사용되고 있는 COVID-19의 진단은 실시간 역전사 PCR(RT-PCR)에 의한 SARS-CoV-2의 유전체 RNA 검출에 의존하고 있지만, 상기 진단 방법은 지나치게 민감도가 높으며 확진자가 정상으로 판별된 후에도 수주에 걸쳐 바이러스의 RNA가 검출될 수 있다. 이로 인해 진단이 반복되거나 환자의 격리를 불필요하게 연장시키는 등의 문제가 발생하고 있다(Xiao et al., J Clin Virol, 2020, 127, 104346). 또한, 통상적으로 이용되는 진단 방법에 의해 확진된 환자의 경우 SARS-CoV-2의 실제 생존까지는 정확히 알 수 없으므로, 이에 따른 불필요한 접촉자 추적조사를 수행하여야 한다는 문제가 발생하고 있다. SARS-CoV-2의 유전체 RNA 검출을 통한 COVID-19 진단 방법 외에도 SARS-CoV-2를 배양한 후 분리하여 진단하는 방법이 있으나 상기 진단 방법은 생물안전도(Biosafety) 3 시설의 존재 하에 분리가 진행되어야 하며 시간과 노동이 많이 소요된다는 단점이 있다(Kelvin kai-Wang et al., Lancet Infect Dis, 2020, 20, 565-74).

[0005] 따라서, 실제 살아있는 SARS-CoV-2를 검출할 수 있는 신속한 진단 방법 및 SARS-CoV-2의 생존을 판단하는 특이성(specificity)이 높은 진단 방법에 관한 연구와 개발이 필요한 실정이다. 또한, 이러한 진단 방법은 격리 및 격리 해제에 관한 기준으로 쓰일 수 있으므로 그 지속적인 개발이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Xiao et al., J Clin Virol, 2020, 127, 104346

(비특허문헌 0002) Kelvin kai-Wang et al., Lancet Infect Dis, 2020, 20, 565-74

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 현재 유행하고 있는 COVID-19를 진단하는 방법에 대해 연구한 결과, SARS-CoV-2의 S 유전자 및 N 유전자의 하위유전체 RNA를 검출하는 프라이머 세트 및 프라이머-프로브 세트를 제작하고 이를 포함하는

조성물 및 진단용 키트를 사용하는 경우 COVID-19 진단이 정확하고 신속하게 이루어진다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성시켰다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)의 i) N 유전자의 하위유전체 RNA(subgenomic RNA)와 상보적으로 결합하는 프라이머 세트, ii) S 유전자의 하위유전체 RNA와 상보적으로 결합하는 프라이머 세트, 또는 상기 i) 및 ii) 프라이머 세트 모두를 포함하는 SARS-CoV-2 검출용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 측면은, 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)의 i) N 유전자의 하위유전체 RNA(subgenomic RNA)와 상보적으로 결합하는 프라이머-프로브 세트, ii) S 유전자의 하위유전체 RNA와 상보적으로 결합하는 프라이머-프로브 세트, 또는 상기 i) 및 ii) 프라이머-프로브 세트 모두를 포함하는 포함하는 SARS-CoV-2 검출용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 SARS-CoV-2 검출용 조성물을 각각 포함하는 COVID-19 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 측면은, i) 검체로부터 핵산을 분리하는 단계; ii) 분리된 핵산을 주형으로 상기 COVID-19 진단용 키트로 일반적인 또는 실시간 역전사 증합효소 연쇄반응을 수행하는 단계를 포함하는 COVID-19 존재 여부에 대한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명의 프라이머 세트 또는 프라이머-프로브 세트는 SARS-CoV-2의 S 유전자 및 N 유전자의 하위유전체 RNA를 표적으로 제작한 것으로 이를 포함하는 조성물, 진단용 키트 및 정보를 제공하는 방법을 이용함으로써 높은 민감도와 특이성으로 실제 전파력이 있는 SARS-CoV-2를 신속하게 검출할 수 있다.
- [0013] 따라서, 본 발명의 프라이머 세트 또는 프라이머-프로브 세트는 COVID-19 진단 및 격리 해제 판단에 유용하게 쓰일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 프라이머 세트 및 프라이머-프로브 세트의 표적이 되는 SARS-CoV-2의 S 유전자 및 N 유전자의 하위유전체의 위치를 도식화하여 나타낸 것이다.
- 도 2는 SARS-CoV-2의 S 유전자 및 N 유전자의 유전체 RNA 기반 실시간(real time) RT-PCR 반응에 따른 증폭 플롯, 표준 곡선 및 임계 사이클 값을 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 3은 SARS-CoV-2의 S 유전자 및 N 유전자의 하위유전체 RNA 기반 실시간 RT-PCR 반응에 따른 증폭 플롯, 표준 곡선 및 임계 사이클 값을 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 4는 SARS-CoV-2의 S 유전자 및 N 유전자의 하위유전체 RNA 검출 및 세포 배양에 따른 증상 발현 후 검출 지속 기간을 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명의 일 측면은 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)의 i) N 유전자의 하위유전체 RNA(subgenomic RNA)와 상보적으로 결합하는 프라이머 세트, ii) S 유전자의 하위유전체 RNA와 상보적으로 결합하는 프라이머 세트, 또는 상기 i) 및 ii) 프라이머 세트 모두를 포함하는 SARS-CoV-2 검출용 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일 측면은 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)의 i) N 유전자의 하위유전체 RNA(subgenomic RNA)와 상보적으로 결합하는 프라이머-프로브 세트, ii) S 유전자의 하위유전체 RNA와 상보적으로 결합하는 프라이머-프로브 세트, 또는 상기 i) 및 ii) 프라이머-프로브 세트 모두를 포함하는 SARS-CoV-2 검출용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명의 용어 "프라이머"는 적합한 온도 및 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 증합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클

레오타이드를 의미한다.

- [0018] 본 발명의 용어 "프로브"는 상보적인 염기서열과 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 염기서열의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 또한, 실시간 PCR을 수행하기 위해서는 형광표식 프로브를 이용할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 용어 "하위유전체 RNA"는 유전체 RNA의 전사에 의해 만들어지며 RNA 중합효소가 생산한 전사체들이 이 하위유전체 RNA를 제조한다. 이러한 전사 과정에서 하위유전체 RNA의 5' 말단에는 주형의 유전체 RNA의 3' 말단과 동일한 중첩 세트(nested set)를 포함하게 된다. 이렇게 합성된 하위유전체 RNA는 유전체 RNA를 포함하는 구조 단백질 및 보조적인 악세서리 단백질을 합성한다.
- [0020] 이러한 SARS-CoV-2의 하위유전체 RNA(Subgenomic RNA)로는 9종류가 알려져 있으며 구조 단백질에 해당하는 뉴클리오캡시드단백질(N), 스파이크단백질(S), 막단백질(M), 외피단백질(E)과 악세서리 단백질에 해당하는 ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8을 합성하는 하위유전체들이 이에 해당한다. 본 발명의 일 실시예에서는 상기 하위유전체 중 뉴클리오캡시드단백질(N)를 합성하는 N 유전자 하위유전체 RNA 및 스파이크단백질(S)를 합성하는 S 유전자 하위유전체 RNA를 표적으로 하였다.
- [0021] 상기 프라이머 세트는 i) 서열번호 7의 염기서열로 이루어지는 정방향 프라이머 및 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 역방향 프라이머를 포함하는 프라이머 세트; ii) 서열번호 7의 염기서열로 이루어지는 정방향 프라이머, 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 역방향 프라이머를 포함하는 프라이머 세트; 또는 상기 i) 및 ii) 프라이머 세트 모두를 포함할 수 있다.
- [0022] 상기 i)의 프라이머 세트는 SARS-CoV-2의 N 유전자의 하위유전체 RNA(subgenomic RNA)와 상보적으로 결합하는 염기서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 프라이머 세트는 주형으로 하는 염기서열과 상보적인 결합을 하여 해당 염기서열을 특이적으로 증폭시킬 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, N 유전자 하위유전체 RNA의 5' 리더와 상보적으로 결합하는 정방향 프라이머 및 N 유전자 하위유전체 RNA의 유전자 부위와 상보적으로 결합하는 역방향 프라이머를 사용하였다.
- [0023] 상기 ii)의 프라이머 세트는 SARS-CoV-2의 S 유전자의 하위유전체 RNA와 상보적으로 결합하는 염기서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 프라이머 세트는 주형으로 하는 염기서열과 상보적인 결합을 하여 해당 염기서열을 특이적으로 증폭시킬 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, S 유전자 하위유전체 RNA의 5' 리더와 상보적으로 결합하는 정방향 프라이머 및 S 유전자 하위유전체 RNA의 유전자 부위와 상보적으로 결합하는 역방향 프라이머를 사용하였다.
- [0024] 상기 프라이머-프로브 세트는 i) 서열번호 7의 염기서열로 이루어지는 정방향 프라이머, 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 역방향 프라이머, 및 서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 프로브를 포함하는 프라이머-프로브 세트; ii) 서열번호 7의 염기서열로 이루어지는 정방향 프라이머, 서열번호 5의 염기서열로 이루어지는 역방향 프라이머, 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어지는 프로브를 포함하는 프라이머-프로브 세트; 또는 상기 i) 및 ii) 프라이머-프로브 세트 모두를 포함할 수 있다.
- [0025] 상기 i)의 프라이머-프로브 세트는 SARS-CoV-2의 N 유전자의 하위유전체 RNA(subgenomic RNA)와 상보적으로 결합하는 염기서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 프라이머-프로브 세트는 주형으로 하는 염기서열과 상보적인 결합을 하여 해당 염기서열을 특이적으로 증폭시킬 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, N 유전자 하위유전체 RNA의 5' 리더와 상보적으로 결합하는 정방향 프라이머, N 유전자 하위유전체 RNA의 유전자 부위와 상보적으로 결합하는 역방향 프라이머 및 N 유전자 하위유전체 RNA의 유전자 부위와 상보적으로 결합하는 프로브를 사용하였다.
- [0026] 상기 ii)의 프라이머-프로브 세트는 SARS-CoV-2의 S 유전자의 하위유전체 RNA와 상보적으로 결합하는 염기서열을 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 프라이머-프로브 세트는 주형으로 하는 염기서열과 상보적인 결합을 하여 해당 염기서열을 특이적으로 증폭시킬 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, S 유전자 하위유전체 RNA의 5' 리더와 상보적으로 결합하는 정방향 프라이머, S 유전자 하위유전체 RNA의 유전자 부위와 상보적으로 결합하는 역방향 프라이머 및 S 유전자 하위유전체 RNA의 유전자 부위와 상보적으로 결합하는 프로브를 사용하였다.
- [0027] 상기 프로브는 리포터 및 소광제가 부착된 것일 수 있으며, 이 경우 리포터와 소광제가 근접하여 존재하면 형광을 서로 상쇄하여 리포터의 형광이 감지되지 않으나, 증폭이 진행됨에 따라 리포터가 소광제로부터 떨어지면 리

포터의 형광이 감지되는 것이다. 따라서, 형광의 강도는 증폭 사이클이 증가함에 따라 점점 증가하게 된다.

- [0028] 상기 리포터는 5' 말단에 부착되며 FAM, CY5, CAL Fluor Orange 560, VIC, HEX, JOE 및 Quasar 670로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광물질을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, N 유전자 하위유전체 RNA 표적 프로브의 5' 말단에 FAM를 부착하였으며 S 유전자 하위유전체 RNA 표적 프로브의 5' 말단에 CY5를 부착하였다.
- [0029] 상기 소광제는 3' 말단에 부착되며 BHQ1, BHQ1 nova 및 BHQ2로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 소광물질을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, N 유전자 하위유전체 RNA 표적 프로브의 3' 말단에 BHQ1을 부착하였으며 S 유전자 하위유전체 RNA 표적 프로브의 3' 말단에 BHQ2를 부착하였다.
- [0030] 본 발명의 다른 측면은, 상기 프라이머 세트를 포함하는 SARS-CoV-2 검출용 조성물 또는 프라이머-프로브 세트를 포함하는 SARS-CoV-2 검출용 조성물을 포함하는 COVID-19 진단용 키트를 제공한다. 상기 키트를 이용하면, 대상체가 SARS-CoV-2 바이러스에 의해 감염되었는지를 진단할 수 있으며 진단은 일반적인 또는 실시간 역전사 증합효소 연쇄반응(RT-PCR)에 의해 이루어질 수 있다.
- [0031] 본 발명의 용어 "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 SARS-CoV-2 바이러스의 감염 여부 또는 배출 또는 생존 여부를 확인하는 것이다.
- [0032] 본 발명의 용어 "역전사 증합효소 연쇄반응(RT-PCR)" 기법은 증합효소 연쇄 반응기법(Polymerase Chain Reaction, PCR) 이용하는 분자 기법 중 하나이다. RNA가 역전사 효소에 의해 역전사되어 cDNA를 만들고, 만들어진 cDNA를 주형틀로 하여 증합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 일으키고 PCR 산물의 양을 측정함으로써, cDNA와 mRNA의 양을 간접적으로 알 수 있다.
- [0033] 상기 역전사 증합효소 연쇄반응은 일반적인 역전사 증합효소 연쇄반응(conventional RT-PCR)과 실시간 역전사 증합효소 연쇄반응(real-time RT-PCR)으로 구분할 수 있다. 실시간 RT-PCR의 경우 일반적인 RT-PCR과 비교하여 높은 민감도를 가지며 실시간으로 증폭 곡선 확인이 가능하다. 이를 통해, 표준 곡선 및 임계 사이클 값을 구하여 정량 분석이 가능하며 분석을 위한 소요 시간이 짧은 것이 특징이다.
- [0034] 상기 COVID-19 진단용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있으며 역전사 반응 및 역전사 증합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. 구체적으로, 검출 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 외에도 SARS-CoV-2 바이러스의 유전자인 RNA로부터 상보적인 cDNA를 합성하기 위한 역전사 효소, 상보적인 DNA를 증폭하기 위한 DNA 증합 효소, 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있으며 바람직하게는, DNA 증합 효소, dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP) 혼합물, 완충액(buffer solution) 및 증류수를 더 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 측면은 i) 검체로부터 핵산을 분리하는 단계; ii) 분리된 핵산을 주형으로 상기 COVID-19 진단용 키트로 일반적인 또는 실시간 역전사 증합효소 연쇄반응을 수행하는 단계를 포함하는 COVID-19 존재 여부에 대한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0036] 상기 검체는 비인두 도말물, 구인두 도말물, 비강 도말물, 가래 또는 타액일 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 일 실시예에서는 COVID-19 확진 환자 중에서 증상 발현 후 2일 내지 49일 동안 입원했던 10 명의 환자들의 비인두(NP) 도말물, 가래 및 타액 검체를 수집하여 사용하였다.
- [0037] 상기 i) 단계에서 분리된 핵산을 반응액에 첨가하여 일반적인 또는 실시간 역전사 증합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 수행할 수 있으며 상기 반응액은 필요한 여러 물질을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 일반적인 RT-PCR의 경우에는 반응액에 RocketScript RT-PCR 프리믹스(바이오니아 캄파니, 대한민국), 정방향 프라이머 500 nM, 역방향 프라이머 500 nM 및 추출한 RNA 5 μ l를 포함하였으며, 실시간 RT-PCR의 경우에는 반응액에 5 $\times$ 마스터 혼합물(LightCycler Multiplex RNA Virus Master, 스위스) 4 μ l, 200 $\times$ 효소 혼합물 0.1 μ l, S 유전자 프라이머 500 nM, N 유전자 프라이머 500 nM, S 유전자 프로브 200 nM, N 유전자 프로브 200 nM, 내부 대조군 프라이머 250 nM, 내부 대조군 프로브 100 nM, 및 추출된 RNA 5 μ l 또는 대조군 RNA 5 μ l를 포함하였다(실시예 3 및 실시예 4 참조).
- [0038] 상기 ii) 단계에서 실시간 RT-PCR을 수행하는 경우 상기 반응을 통해 PCR 증폭 플롯을 얻을 수 있으며 이를 토대로 한 표준 곡선 및 임계 사이클(threshold cycle, Ct) 값을 이용하여 살아있는 바이러스의 상대적인 양을 측정할 수 있다.

[0039] 상기 i) 단계 및 ii) 단계를 수행한 후에, SARS-CoV-2의 N 유전자 유전체 RNA의 복제수를 기준으로 상대적인 바이러스의 양이 4.0 Log copies/ml 미만이고, SARS-CoV-2의 N 유전자 하위유전체 RNA 검출 결과가 음성인 경우; 또는 SARS-CoV-2의 S 유전자 유전체 RNA의 복제수를 기준으로 상대적인 바이러스의 양이 4.0 Log copies/ml 미만이고, S 유전자 하위유전체 RNA 검출 결과가 음성인 경우, SARS-CoV-2가 생존하지 않는다고 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. SARS-CoV-2의 N 유전자 하위유전체 RNA 검출 결과; 또는 SARS-CoV-2의 S 유전자 하위유전체 RNA 검출 결과가 음성이고, SARS-CoV-2 N 유전자의 복제수를 기준으로 상대적인 바이러스 양; 또는 SARS-CoV-2 S 유전자의 복제수를 기준으로 상대적인 바이러스의 양이 0 내지 4.0 Log copies/ml 미만인 경우, 0 내지 3.0 Log copies/ml 미만인 경우, 0 내지 2.5 Log copies/ml 미만인 경우, 0 내지 2.0 Log copies/ml 미만인 경우 또는 0 내지 1.5 Log copies/ml 미만인 경우 SARS-CoV-2가 생존하지 않는다고 판단할 수 있으며, 바람직하게는 하위유전체 RNA 검출 결과가 음성이고 4.0 Log copies/ml 미만인 경우 SARS-CoV-2가 생존하지 않는다고 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0040] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[0041] 실시예 1 내지 11에서 수행한 통계 분석에 있어 범주형 변수들을 피셔(Fisher) 정확 검정을 이용하여 비교하고, 연속 변수들을 맨 휘트니(Mann Whitney) U-검정을 이용하여 비교하였다. 유의성(significance)에 대한 모든 검정은 양측성(2-tailed)이었으며 p 값 ≤ 0.05 일 때 유의적인 것으로 간주하였다. IBM SPSS 통계 윈도우즈, 버전 23.0(IBM 코포레이션, 미국)를 통계 분석에 사용하였다.

[0042] **실시예 1. 생물학적 검체 수집 및 처리**

[0043] 2020년 2월부터 2020년 11월까지 서울 내에 2,700 여개의 병상이 있는 3차 병원인 아산 병원 메디컬 센터에 입원했던 COVID-19 확진 환자로부터 검체를 수집하였다. 10명의 COVID-19 확진 환자들이 본 연구에 포함되었으며, COVID-19 확진 판정은 각 환자들은 비인두(NP) 도말물 및 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 이용하였다. 구체적으로, 각 환자의 비인두(NP) 도말물에서 SARS-CoV-2의 핵산을 분리한 뒤, RdRp, N, 및 E 유전자의 유전체 RNA에 대한 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(real-time RT-PCR)를 이용하여 확진 판정하였다. 이때, Allplex™ 2019-nCoV 분석(씨젠, 대한민국) 또는 PowerChek 2019-nCoV 실시간 PCR 키트(코젠 바이오텍, 대한민국)를 사용하였다. 상기 확진자들의 상세한 임상 특징들을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

구분	SARS-CoV-2 (n=10)	구분	SARS-CoV-2 (총 10명)
나이	61.5 세 (40-73)	남성	3 (30)
발병-입원까지의 일수	0.5 (0-7)	-	-
기저 질환			
당뇨병	2 (20)	고혈압	3 (30)
심혈관 질환	0 (0)	만성 신장 질환	0 (0)
만성 폐 질환	1 (10)	만성 간 질환	0 (0)
고형 종양	0 (0)	혈액 악성 종양	2 (20)
류마티스 질환	0 (0)	비만 (BMI > 25)	1 (10)
초기 증상			
발열	8 (80)	오한	1 (10)
기침	7 (70)	가래	1 (10)
인후염	0 (0)	호흡 곤란	3 (30)
콧물	0 (0)	객혈	0 (0)
가슴 통증	0 (0)	설사	0 (0)
두통	1 (10)	근육통	1 (10)
코 막힘	1 (10)	저혈압	2 (20)
미각 감퇴	2 (20)	기타	0 (0)
실험실 결과			
백혈구 ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	3250 (2800-4500)	헤모글로빈 (g/dl)	13.2 (12.3-13.7)
혈소판 수 ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	159.5 (135-174)	BUN (mg/dl)	14 (13-15)
크레아티닌 (mg/dl)	0.7 (0.6-0.8)	AST (IU/L)	27 (24-34)
ALT (IU/L)	16 (13-23)	CRP (mg/dl)	1.9 (0.2-4.5)

[0045] 상기 COVID-19 확진 환자 중에서 증상 발현 후 2일 내지 49일 동안 입원했던 10 명의 환자들의 비인두(NP) 도말물, 가래 및 타액 검체를 수집하였다. 구체적으로, 10명의 COVID-19 확진 환자들로부터 총 107개의 검체를 수집하였으며 38개의 비인두(NP) 도말물 검체, 36개의 가래 검체, 33개의 타액 검체로 이루어졌다. 수집한 검체는 1% 페니실린/스트렙토마이신/암포테리신 및 0.1% 소혈청알부민을 첨가한 인산염 완충용액 (phosphate buffered saline, PBS)을 포함한 바이러스 수송 배지에 균질화(homogenization) 한 뒤에 분주하고, 실험할 때까지 -80℃로 급속 냉동하여 보관하였다. 본 연구는 아산 병원의 임상 연구 심의 위원회의 윤리 위원회에 의해 검토 및 승인되었으며, 모든 참가자들은 서면 고지 동의서를 제출하였다.

[0046] **실시예 2. S 유전자 및 N 유전자의 하위유전체 RNA를 표적으로 하는 프라이머 및 프로브 제작**

[0047] 공개된 SARS-CoV-2 유전체 서열(genome sequence)에서 5' 말단 부분, S 유전자 부분, N 유전자 부분을 취하여 각각 7개의 유전자들을 다중 정렬(multiple alignment) 하였으며, 그 중에서 일치성이 높은 부분의 유전자 서열(gene sequence)을 표적 유전자로 선택하였다. Primer3 프로그램을 이용하여 상기 표적 유전자의 프라이머 및 프로브를 디자인하였다. 본 실시예에서는 일반적인 RT-PCR을 위한 프라이머 세트와 실시간 RT-PCR을 위한 프라이머-프로브 세트를 각각 제작하였다. 구체적으로, 공통적인 5' 리더 부분에서 정방향(forward) 프라이머를 디자인하였으며 S 유전자와 N 유전자 부분에서 역방향(reverse) 프라이머를 각각 디자인하여 일반적인 RT-PCR(conventional RT-PCR)을 위한 프라이머 세트를 제작하였다. 또한 같은 방법으로 S 유전자와 N 유전자 부분에서 실시간 RT-PCR(real-time RT-PCR)을 위한 프라이머-프로브 세트를 제작하였다.

[0048] 본 발명에 따른 프라이머 및 프로브를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

RT-PCR 방법	표적	명명	위치	유전자 서열(5' -3')	변형	서열번호
일반적인 RT-PCR (conventional RT-PCR)	N 유전자 하위유전체 RNA의 유전자 부위	SG-NR	28497	ttaattggaacgccttgtcc	-	1
	S 유전자 하위유전체 RNA의 유전자 부위	SG-SR	21905	gggactgggtcttcgaatct	-	2
실시간 RT-PCR (real-time RT-PCR)	N 유전자 하위유전체 RNA의 유전자 부위	SGRT-NT2	28436	cggatgaaccaagacgcagta	-	3
		SGRT-NP2	28322	tttggtggaccctcagattcaactgg	5' -FAM, 3' -BHQ1	4
	S 유전자 하위유전체 RNA의 유전자 부위	SGRT-SR1	21678	gggtataaacaccacgtgtgaa	-	5
		SGRT-SP1	21617	acaaccagaactcaattacccctgca	5' -CY5, 3' -BHQ2	6
공통	N 또는 S 유전자 하위유전체 RNA의 5' 리더	SG-F	15	ccttcccaggtacaacacca	-	7

[0050] 상기 표 2의 프라이머의 정방향 프라이머는 5' 리더 서열 내에 위치하였으며 역방향 프라이머는 N 단백질 또는 S 단백질을 코딩하는 유전자 서열 내에 위치하였다(도 1).

[0051] **실시예 3. 실시간 RT-PCR에 의한 SARS-CoV-2의 N 유전자 및 S 유전자 RNA 검출, 검출 한계 측정 및 바이러스 양(viral loads) 측정**

[0052] 수집한 호흡기 샘플들을 특수 음압 실험실에서 65℃로 30분 동안 가열하여 불활성화시켰다. 그 후, QIAamp 바이

러스 RNA 미니 키트(Qiagen Inc, 독일)를 사용하여 검체들로부터 유전체 RNA를 추출하였다.

[0053] SARS-CoV-2의 유전체 RNA 기반 RT-PCR의 검출 한계를 확인하기 위해, S 유전자 및 N 유전자의 유전체 RNA를 표적으로 하는 하기 표 3의 프라이머, 프로브 및 실시간 RT-PCR을 이용하였다.

표 3

[0054]

표적	명명	위치	유전자 서열(5' -3')	변형	서열번호
N 유전자 유전체 RNA	NF	29356	AACATTCCCACCAACAGAGC	-	8
	NR	29529	GCCTGAGTTGAGTCAGCACT	-	9
	NP	29462	GCTGATGAACTCAAGCCTTACCGCA	5' -CY5, 3' -BHQ2	10
S 유전자 유전체 RNA	SF	21624	GAAGTCAATTACCCCTGCAT	-	11
	SR	21787	ACCATTTGGTCCCAGAGACAT	-	12
	SP	21657	TCACACGTGGTGTATTACCTGACA	5' -FAM, 3' -BHQ1	13
내부 대조군	BAF	1670	ACTAACACTGGCTCGTGTGA	-	14
	BAR	1774	CTTGGGATGGGAGTCTGTT	-	15
	BAP	1700	AGGCTGGTGTAAAGCGCCTTGG	5' -HEX, 3' -BHQ1	16

[0055] 구체적으로, 실시간 RT-PCR 분석을 위한 혼합물 20 μ l은 5 $\times$ 마스터 혼합물(LightCycler Multiplex RNA Virus Master, 스위스) 4 μ l, 200 $\times$ 효소 혼합물 0.1 μ l, S 유전자 프라이머 500 nM, N 유전자 프라이머 500 nM, S 유전자 프로브 200 nM, N 유전자 프로브 200 nM, 내부 대조군 프라이머 250 nM, 내부 대조군 프로브 100 nM, 및 추출된 RNA 5 μ l 또는 대조군 RNA 5 μ l를 포함하였다. 상기 혼합물을 LightCyder 96 시스템(Roche)을 사용하여 PCR을 수행하였다.

표 4

[0056]

PCR 단계	온도	시간
1단계	50℃	10분
2단계	95℃	5분
3단계:	95℃	10초
45 사이클	60℃	30초
4단계	40℃	30초
1단계: 역전사, 2단계: 초기 변성, 3단계: 증폭 (annealing and elongation), 4단계: 냉각 (cooling)		

[0057] PCR 증폭 산물은 QIAquick 겔 추출 키트(Qiagen, 독일)로 용출시키고, 서열 분석은 마크로젠 인코포레이티드(Macrogen Inc, 대한민국)에 의뢰하였으며, BLAST 프로그램을 이용하여 SARS-CoV-2의 N 및 S 유전자와 일치함을 확인하였다. 유전체 기반 분석 결과, 총 107개 검체 중 83개의 검체에서 N 유전자 및 S 유전자의 유전체 RNA가 검출되었다.

[0058] 또한, 검출 한계를 측정하기 위한 검량선(calibration curves)을 생성하기 위해, 10⁷ 내지 5 copies/ μ l의 합성 대조군 RNA의 연속 희석액을 6개의 독립적인 반응 세트에 분석하였다. 이러한 분석을 통해 PCR 증폭 반응에 따른 표준 곡선 및 임계 사이클(threshold cycle, Ct)을 확인하였으며 분석 결과를 도 2에 나타내었다.

[0059] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 유전체 RNA 기반 실시간 RT-PCR을 통한 N 유전자 및 S 유전자 검출은 모두 선형성이 뛰어난 것을 확인할 수 있다. 또한, 유전체 RNA를 기반으로 한 상기 분석의 검출 한계는 5 copies/PCR reaction(2.6 Log copies/ml of specimen)인 것으로 확인하였으며 이 검량선을 기준으로 하여 107개 검체의 SARS-CoV-2 바이러스 농도(copy number)를 측정하였다.

[0060] 실시예 4. 일반적인 RT-PCR 방법에 의한 SARS-CoV-2의 N 유전자 및 S 유전자 하위유전체 RNA 검출

[0061] 상기 실시예 3과 같은 방법으로 수집한 검체들로부터 RNA를 추출하고, S 유전자 및 N 유전자의 하위유전체 RNA를 표적으로 하는 표 2의 일반적인 RT-PCR 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 수행하였다.

[0062] 구체적으로, 일반적인 RT-PCR 분석을 위한 혼합물은 정방향 프라이머 500 nM, 역방향 프라이머 500 nM과 추출

한 RNA 5 μ l를 RocketScript RT-PCR 프리믹스(바이오니아 캄파니, 대한민국)에 혼합하여 제조하였으며, Applied Biosystem thermo-cycler를 사용하여 다음과 같은 조건으로 PCR 증폭하였다.

표 5

PCR 단계	온도	시간
1단계	50℃	30분
2단계	95℃	5분
3단계: 40 사이클	95℃	30초
	55℃	30초
	72℃	1분
4단계	72℃	5분
1단계: 역전사, 2단계: 초기 변성, 3단계: 40 사이클, 변성-어닐링-신장, 4단계: 최종 신장		

PCR 증폭 산물은 QIAquick 겔 추출 키트(Qiagen, 독일)로 용출시키고, 서열 분석은 마크로젠 인코포레이티드 (Macrogen Inc, 대한민국)에 의뢰하였다. 서열 분석에 있어 BLAST 프로그램을 이용하여 5' 리더 서열을 포함하고 동시에 SARS-CoV-2 N, S 유전자와 $\geq 97\%$ 일치한 서열들을 하위유전체 RNA로 확인하였다.

분석 결과, 총 107개의 검체 중 51개의 검체에서 N 유전자 하위유전체 RNA가 검출되었으며 52개의 검체에서 S 유전자 하위유전체 RNA가 검출되었다.

실시예 5. 실시간 RT-PCR 방법에 의한 SARS-CoV-2의 N 유전자 및 S 유전자 하위유전체 RNA 검출

상기 실시예 3과 같은 방법으로 수집한 검체들로부터 RNA를 추출하고, S 유전자 및 N 유전자의 하위유전체 RNA를 표적으로 하는 표 2의 실시간 RT-PCR 프라이머-프로브 세트, 내부 대조군 유전자 검출을 위한 표 3의 프라이머-프로브 세트를 이용하여 실시간 RT-PCR을 수행하였다.

구체적으로, 실시간 RT-PCR 분석을 위한 혼합물 20 μ l는 5 $\times$ 마스터 혼합물(LightCycler Multiplex RNA Virus Master, 스위스) 4 μ l, 200 $\times$ 효소 혼합물 0.1 μ l, S 유전자 프라이머 500 nM, N 유전자 프라이머 500 nM, S 유전자 프로브 250 nM, N 유전자 프로브 250 nM, 내부 대조군 프라이머 250 nM, 내부 대조군 프로브 100 nM, 및 추출된 RNA 5 μ l 또는 대조군 RNA 5 μ l를 포함하였다. 상기 혼합물을 LightCyder 96 시스템(Roche)을 사용하여 표 4와 동일한 조건으로 실시간 PCR 증폭하였다.

또한, 검출 한계를 측정하기 위한 검량선(calibration curves)을 생성하기 위해, 10^7 내지 5 copies/ μ l의 합성 대조군 RNA의 연속 희석액을 6개의 독립적인 반응 세트에 분석하였다. 이러한 분석을 통해 PCR 증폭 반응에 따른 표준 곡선 및 임계 사이클(threshold cycle, Ct)을 확인하였고, 분석 결과를 도 3에 나타내었으며, 검사 결과 Ct 값이 36 미만인 경우에는 양성(Positive)으로, 증폭 곡선이 없거나 Ct 값이 36 이상인 경우에는 음성(Negative)으로 판정하였다.

그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 하위유전체 RNA 기반 RT-PCR을 통한 N 유전자 및 S 유전자 검출은 모두 선형성이 뛰어난 것을 확인할 수 있다. 또한, 하위유전체 RNA를 기반으로 한 상기 분석의 검출 한계는 5 copies/PCR reaction(2.6 Log copies/ml of specimen)인 것으로 확인하였다.

실시예 6. SARS-CoV-2의 분리 및 배양

대한민국 서울 소재의 고려대학교 의과대학의 생물안전도(Biosafety) 3 실험실에서 플라크 분석을 이용하여 검체로부터 SARS-CoV-2를 분리 및 배양하였다. 구체적으로, Vero 세포를 6-웰 플레이트에 9×10^5 cells/well씩 분주한 후 약 24 시간 배양하였다. 1/10의 단계 희석법(serial dilution)으로 희석한 검체를 세포에 접종하고, 37℃, 5% CO₂ 조건에서 15 분마다 부드럽게 흔들어주면서(rocking) 1 시간 동안 배양한 후, 0.6% 옥소이드 한천을 함유하는 DMEM/F-12(Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F12) 배지 2 ml를 더 첨가하였다. 이후, 37℃, 5% CO₂ 조건에서 72 시간 더 배양하고 크리스털 바이올렛 염색을 하여 바이러스 플라크 형성을 가시화시켰다.

배양 결과, 총 107개의 검체 중 25개의 검체가 성공적으로 배양되었으며(배양-양성) 52개의 검체는 배양되지 않았다(배양-음성). 한편, 30개의 검체는 세균 오염 또는 세포 탈착으로 인해 유효하지 않은 결과가 수득되었다.

실시예 7. SARS-CoV-2의 하위유전체 RNA 기반 일반적인 RT-PCR의 민감성 및 특이성 분석

기준에 공지된 유전체 RNA 기반 일반적인 RT-PCR 방법과 상기 실시예 4에 기재된 하위유전체 RNA 기반 일반적인 RT-PCR 방법으로 SARS-CoV-2를 검출하여 각 진단 방법의 민감성 및 특이성을 비교 분석하여 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

	Genomic RNA detection		Subgenomic RNA detection	
	N gene	S gene	N gene	S gene
Sensitivity % (n/N ^a , 95% CI)	100 (25/25, 83-100)	100 (25/25, 83-100)	100 (25/25, 83-100)	100 (25/25, 83-100)
Specificity % (n/N ^b , 95% CI)	31 (16/52, 19-45)	21 (11/52, 12-35)	67 (35/52, 53-79)	69 (36/52, 55-81)
Positive predictive value % (95% CI)	41 (29-54)	35 (26-51)	60 (43-74)	61 (45-75)
Negative predictive value % (95% CI)	100 (76-100)	100 (68-100)	100 (88-100)	100 (88-100)

상기 표 6에 나타난 바와 같이, 성공적으로 배양된 25개의 배양-양성 검체들은 유전체 RNA 및 하위유전체 RNA에 대해 양성이었으며, 검출 민감도(sensitivity)는 100%로 확인되었다.

이를 통해, 배양-양성 검체들에 있어서 유전체 RNA와 하위유전체 RNA는 비슷한 수준으로 민감성을 반영한다는 것을 확인하였다.

N 유전자의 경우, 16개의 배양-음성 검체들이 유전체 RNA에 음성을 나타내었으며 35개의 배양-음성 검체들이 하위유전체 RNA에 음성을 나타내었다. 배양-음성 검체들에 대한 유전체 RNA의 특이성(specificity)은 31%(95% CI, 19-45%)였고 하위유전체 RNA의 특이성은 67%(95% CI, 53-79%)였다(p 값 < 0.001, 피셔 정확 검정).

또한, S 유전자의 경우, 11개의 배양-음성 검체들이 유전체 RNA에 음성을 나타내었으며 36개의 배양-음성 검체들이 하위유전체 RNA에 음성을 나타내었다. 배양-음성 검체들에 대한 유전체 RNA의 특이성은 21%(11/52, 95% CI, 12-35%)였고 하위유전체 RNA의 특이성은 69%(36/52, 95% CI, 55-81%)였다(p 값 < 0.0001, 피셔 정확 검정).

이를 통해, 배양-음성 검체들에 있어서 유전체 RNA에 비해 하위유전체 RNA가 바이러스의 생존을 판단하는 특이성을 더 잘 반영한다는 것을 확인하였다.

실시예 8. SARS-CoV-2 하위유전체 RNA 기반 일반적인 RT-PCR의 증상 발현 후, 검출 지속 기간 확인

기준에 공지된 유전체 RNA 기반 일반적인 RT-PCR 방법과 상기 실시예 4에 기재된 하위유전체 RNA 기반 일반적인 RT-PCR 방법으로 SARS-CoV-2를 검출하여 각 진단 방법의 증상 발현 후, 검출 지속 기간을 비교 분석하여 도 4 및 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

		Days after symptom onset							
		no. positive/no. tested							
Assay		1-5	6-10	11-15	16-20	21-30	31-40	41-50	Total
Genomic RNA	N gene	14/14	21/21	13/15	11/15	7/18	8/13	9/11	83/107
	S gene	14/14	18/21	15/15	12/15	8/18	8/13	8/11	83/107
Subgenomic RNA	N gene	14/14	4/21	7/15	6/15	1/18	6/13	3/11	51/107
	S gene	14/14	5/21	7/15	6/15	1/18	4/13	5/11	52/107
Culture		8/14	7/21	3/15	4/15	0/18	1/13	2/11	25/107

도 4 및 표 7에 나타난 바와 같이, 배양-양성 지속 기간은 증상 발현 후 15.9 ± 14.3일이며, 하위유전체 RNA의

평균 검출 지속 기간은 증상 발현 후 16.7 ± 14.8 일(하위 유전체 RNA 검출-양성과 배양-양성 사이의 유의성, 맨 휘트니 U-검정)인 반면에, 유전체 RNA의 평균 검출 지속 기간은 증상 발현 후 27.3 ± 13.7 일(유전체 RNA 검출-양성과 배양-양성 사이의 유의성, 맨 휘트니 U-검정)이었다. 즉, 배양-양성 지속 기간과 하위 유전체 RNA-양성 검출 기간이 상당히 비슷한 반면, 배양-양성 지속 기간과 유전체 RNA-양성 검출 기간은 10일 이상 차이가 나는 것을 알 수 있다.

[0086] 이를 통해, 하위유전체 RNA는 유전체 RNA보다 바이러스 내에서 빠르게 사라져 짧은 검출 지속 기간을 가지며 바이러스의 생존을 더 잘 반영한다는 것을 확인하였다.

[0087] **실시예 9. SARS-CoV-2의 하위유전체 RNA 기반 일반적인 RT-PCR를 통한 생존 바이러스 정량 분석**

[0088] 상기 실시예 4에 기재된 방법으로 동일하게 RT-PCR을 수행하여 하위유전체 RNA 기반 일반적인 RT-PCR에 의한 바이러스 총량 및 생존 바이러스(배양-양성)를 비교 분석하여 하기 표 8로 나타내었다. 상기 바이러스 총량에 대한 기준은 SARS-CoV-2의 N 유전자 또는 S 유전자의 유전체 RNA(하기 표 8의 "RNA load (Log copies/ml)"이며, 하기 표 8의 RNA load (Log copies/ml)는 실시예 3의 방법으로 얻었다.

표 8

[0089]

	RNA load (Log copies/ml)	No. positive/no. tested		
		Subgenomic RNA	Culture	Contamination/ Cell detached
N gene	≥ 7.0	6/7	6/7	1/7
	6.0-6.99	10/11	7/11	1/11
	5.0-5.99	16/20	10/20	4/20
	4.0-4.99	8/12	2/12	3/12
	3.0-3.99	2/23	0/23	8/23
	< 3.0	0/34	0/34	13/34
	Total	42/107	25/107	30/107
S gene	≥ 7.0	6/7	6/7	1/7
	6.0-6.99	9/11	6/11	2/11
	5.0-5.99	15/18	10/18	3/18
	4.0-4.99	9/21	3/21	8/21
	3.0-3.99	2/18	0/18	1/18
	< 3.0	0/32	0/32	15/32
	Total	41/107	25/107	30/107

[0090] 상기 표 8에 나타난 바와 같이, N 유전자 유전체 복제수를 기준으로 4.0 Log copies/ml 이상인 경우에는 N 유전자 하위유전체 RNA 검출 양성인 검체가 50개 검체 중 40개이며, 배양-양성인 검체는 50개 중 25개였다. S 유전자 유전체 복제수를 기준으로 4.0 Log copies/ml 이상인 경우에는 S 유전자 하위유전체 RNA 검출 양성인 검체가 57개 검체 중 39개였으며, 배양-양성 검체수는 57개 중 25개로 나타났다. N 유전자와 S 유전자 모두 유전체 복제수를 기준으로 4.0 Log copies/ml 미만인 경우에는 각각 57개 검체 중에서 2개 (N)와 50개 검체 중에서 2개 (S)만 하위유전체 검출 양성이었으며, 배양 양성은 한 개도 나타나지 않았다.

[0091] 이를 통해, 바이러스 양과 생존 바이러스 검출은 밀접한 관계가 있으며, 하위유전체 RNA 기반 RT-PCR이 생존 바이러스 검출에 있어 용이하다는 것을 확인하였다. 또한, 바이러스 양이 4.0 Log copies/ml 미만인 경우 생존 바이러스는 거의 검출되지 않는다는 것을 확인하였으며 해당 수치를 COVID-19 확진자가 전파력을 가지고 있는지 판단하는 데에 사용할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0092] **실시예 10. SARS-CoV-2의 하위유전체 RNA 기반 실시간 RT-PCR의 민감성 및 특이성 분석**

[0093] 상기 표 1의 COVID-19 확진 환자 중에서 증상 발현 후 1일 내지 49일 동안 입원했던 10 명의 환자들의 비인두(NP) 도말물, 가래 및 타액 검체를 수집하였다. 구체적으로, 10명의 COVID-19 확진 환자들로부터 총 186개의 검체를 수집하였으며 74개의 비인두(NP) 도말물 검체, 60개의 가래 검체, 52개의 타액 검체로 이루어졌다.

[0094] 상기 실시예 6과 같은 방법으로 검체로부터 SARS-CoV-2를 분리 및 배양하였으며, 배양 결과, 총 186개의 검체 중 62개의 검체가 성공적으로 배양되었으며(배양-양성) 92개의 검체는 배양되지 않았다(배양-음성). 한편, 32개의 검체는 세균 오염 또는 세포 탈착으로 인해 배양이 되지 않았다.

[0095] 이후, 상기 실시예 3(N 유전자 및 S 유전자의 유전체 RNA 기반 실시간 RT-PCR)과 상기 실시예 5(N 유전자 및 S 유전자의 하위유전체 RNA 기반 실시간 RT-PCR)에 기재된 각 방법으로 SARS-CoV-2를 검출하여 각 진단 방법의 민감성 및 특이성을 비교 분석하여 하기 표 9에 나타내었다.

표 9

	Sample	Genomic RNA detection		Subgenomic RNA detection	
		N gene	S gene	N gene	S gene
Sensitivity % (n/N ^a , 95% CI)	All	100 (62/62, 93-100)	100 (62/62, 93-100)	100 (62/62, 93-100)	100 (62/62, 93-100)
	NP swab	100 (31/31, 86-100)	100 (31/31, 86-100)	100 (31/31, 86-100)	100 (31/31, 86-100)
	Sputum	100 (18/18, 78-100)	100 (18/18, 78-100)	100 (18/18, 78-100)	100 (18/18, 78-100)
	Saliva	100 (13/13, 72-100)	100 (13/13, 72-100)	100 (13/13, 72-100)	100 (13/13, 72-100)
Specificity % (n/N ^b , 95% CI)	All	23 (21/92, 15-33)	17 (16/92, 11-27)	65 (60/92, 55-75)	71 (63/92, 60-79)
	NP swab	25 (8/32, 12-44)	6 (2/32, 1.0-22)	69 (22/32, 50-83)	72 (23/32, 53-86)
	Sputum	22 (8/36, 11-40)	19 (7/36, 8.8-38)	64 (23/36, 46-79)	69 (25/36, 52-83)
	Saliva	17 (4/24, 5.4-38)	25 (6/24, 11-47)	63 (15/24, 41-80)	71 (17/24, 49-87)
Positive predictive value % (95% CI)	All	47 (38-55)	45 (37-54)	66 (55-75)	70 (59-78)
	NP swab	56 (42-69)	51 (38-64)	76 (59-87)	78 (61-89)
	Sputum	39 (25-55)	38 (25-54)	58 (39-75)	62 (42-79)
	Saliva	47 (31-64)	50 (33-67)	67 (46-83)	78 (50-87)
Negative predictive value % (95% CI)	All	100 (81-100)	100 (76-100)	100 (93-100)	100 (93-100)
	NP swab	100 (60-100)	100 (20-100)	100 (82-100)	100 (82-100)
	Sputum	100 (60-100)	100 (56-100)	100 (82-100)	100 (83-100)
	Saliva	100 (40-100)	100 (52-100)	100 (75-100)	100 (77-100)

[0097] 상기 표 9에 나타난 바와 같이, 성공적으로 배양된 62개의 배양-양성 검체들은 유전체 RNA 및 하위유전체 RNA에 대해 양성이었으며, 검출 민감도(sensitivity)는 100%로 확인되었다.

[0098] 이를 통해, 실시간 RT-PCR을 이용하는 경우에도 일반적인 RT-PCR을 이용하는 경우와 유사하게 배양-양성 검체들에 있어서 유전체 RNA와 하위유전체 RNA는 비슷한 수준으로 민감성을 반영한다는 것을 확인하였다.

[0099] N 유전자의 경우, 21개의 배양-음성 검체들이 유전체 RNA에 음성을 나타내었으며 60개의 배양-음성 검체들이 하위유전체 RNA에 음성을 나타내었다. 배양-음성 검체들에 대한 유전체 RNA의 특이성(specificity)은 23%(95% CI, 15-33%)였고 하위유전체 RNA의 특이성은 65%(95% CI, 55-75%)였다(p 값 < 0.001, 피셔 정확 검정).

[0100] 또한, S 유전자의 경우, 16개의 배양-음성 검체들이 유전체 RNA에 음성을 나타내었으며 63개의 배양-음성 검체들이 하위유전체 RNA에 음성을 나타내었다. 배양-음성 검체들에 대한 유전체 RNA의 특이성은 17%(16/92, 95% CI, 10-27%)였고 하위유전체 RNA의 특이성은 71%(63/92, 95% CI, 60-79%)였다(p 값 < 0.0001, 피셔 정확 검정).

[0101] 이를 통해, 실시간 RT-PCR을 이용하는 경우에도 일반적인 RT-PCR을 이용하는 경우와 유사하게 배양-음성 검체들에 있어서 유전체 RNA에 비해 하위유전체 RNA가 바이러스의 생존을 판단하는 특이성을 더 잘 반영한다는 것을 확인하였다.

[0102] 실시예 11. SARS-CoV-2 하위유전체 RNA 기반 실시간 RT-PCR의 증상 발현 후, 검출 지속 기간 확인

[0103] 상기 실시예 3(N 유전자 및 S 유전자의 유전체 RNA 기반 실시간 RT-PCR)과 상기 실시예 5(N 유전자 및 S 유전자의 하위유전체 RNA 기반 실시간 RT-PCR)에 기재된 각 방법으로 SARS-CoV-2를 검출하여 각 진단 방법의 증상 발현 후, 검출 지속 기간을 비교 분석하여 하기 표 10에 나타내었다.

표 10

		Days after symptom onset							
		no. positive/no. tested							
Assay		1-5	6-10	11-15	16-20	21-30	31-40	41-50	Total
Genomic RNA	N gene	35/35	43/43	20/23	20/24	6/17	6/8	3/4	133/154
	S gene	35/35	40/43	23/23	21/24	11/17	5/8	3/4	138/154
Subgenomic RNA	N gene	32/35	34/43	13/23	9/24	1/17	3/8	2/4	94/154
	S gene	32/35	31/43	12/23	9/24	1/17	2/8	2/4	89/154
Culture		28/35	22/43	4/23	5/24	0/17	1/8	2/4	62/154

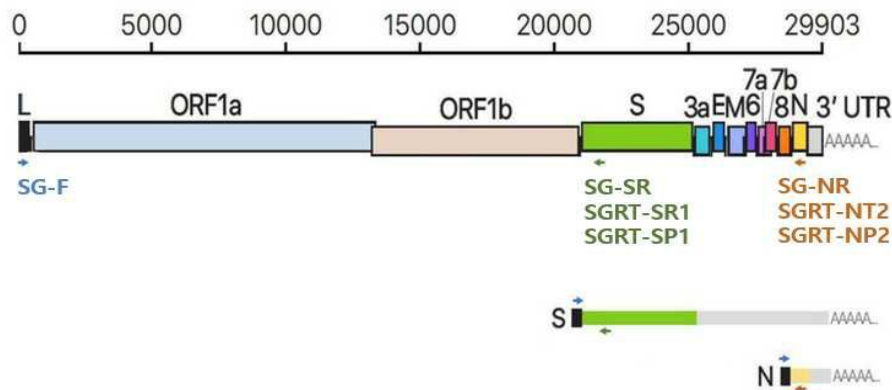
표 10에 나타난 바와 같이, 배양-양성 지속 기간은 증상 발현 후 11.39 ± 10.34 일이며, 하위유전체 RNA의 평균 검출 지속 기간은 증상 발현 후 13.75 ± 11.2 일(p 값 = 0.437, 맨 휘트니 U-검정)인 반면에, 유전체 RNA의 평균 검출 지속 기간은 증상 발현 후 22.60 ± 11.83 일(p 값 < 0.0001, 맨 휘트니 U-검정)이었다. 즉, 배양-양성 지속 기간과 하위유전체 RNA-양성 검출 기간이 상당히 비슷한 반면, 배양-양성 지속 기간과 유전체 RNA-양성 검출 기간은 10일 이상 차이가 나는 것을 알 수 있다.

이를 통해, 실시간 RT-PCR을 이용하는 경우에도 일반적인 RT-PCR을 이용하는 경우와 유사하게 하위유전체 RNA는 유전체 RNA보다 바이러스 내에서 빠르게 사라져 짧은 검출 지속 기간을 가지며 바이러스의 생존을 더 잘 반영한다는 것을 확인하였다.

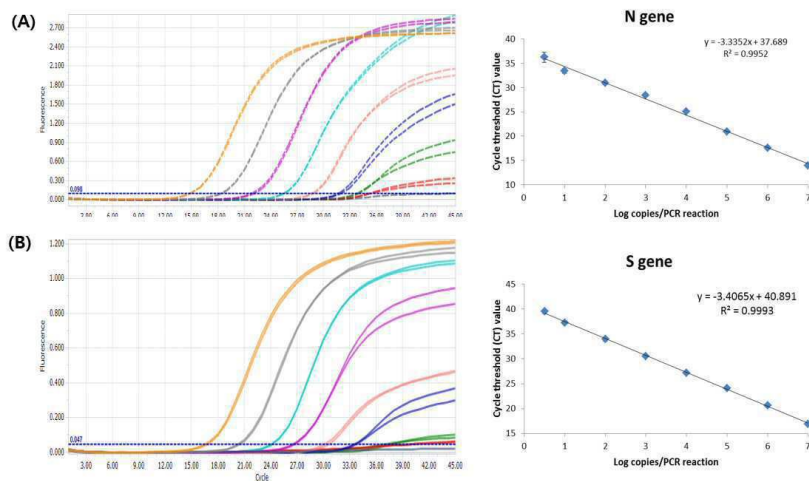
실시에 9 및 실시에 10과 같이, SARS-CoV-2의 N 유전자 및 S 유전자의 하위유전체 RNA를 기반으로 한 실시간 RT-PCR 검사로, 실제 살아있는 SARS-CoV-2 신속한 검출이 가능하여 SARS-CoV-2의 생존을 실시간으로 판단할 수 있으므로, 위 실시간 RT-PCR 검사를 COVID-19 진단에 적용할 수 있음을 확인하였다.

도면

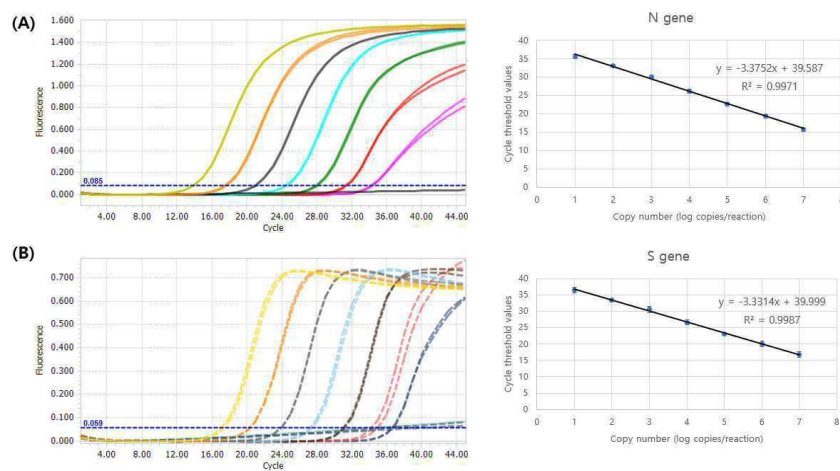
도면1



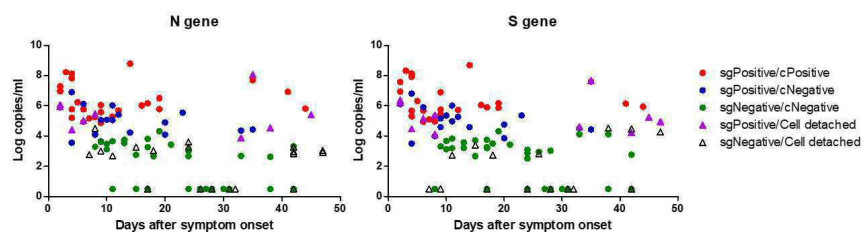
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> THE ASAN FOUNDATION

University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> COMPOSITION FOR DETECTING SARS-CoV-2 AND KIT FOR DIAGNOSING COVID-19 USING THE SAME

<130> FPD/202112-0059

<150> KR 10-2021-0068194

<151> 2021-05-27
 <160> 16
 <170> KoPatent In 3.0
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_SG-NR
 <400> 1
 ttaattggaa cgccttgccc 20

 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_SG-SR
 <400> 2
 gggactgggt cttcgaatct 20

 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_SGRT-NT2
 <400> 3
 cggatgaacca agacgcagta 20

 <210> 4
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <
 220><223> nucleotide sequence for probe_SGRT-NP2
 <400> 4
 tttgggtggac cctcagattc aactgg 26

 <210> 5
 <211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_SGRT-SR1

<400> 5

gggtaataaa caccacgtgt gaa 23

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for probe_SGRT-SP1

<400> 6

acaaccagaa ctcaattacc ccctgca 27

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_SG-F

<400> 7

ccttcccagg taacaaacca 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence for primer_NF

<400> 8

aacattccca ccaacagagc 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> nucleotide sequence for primer_NR

<400> 9

gcctgagttg agtcagcact 20

<210> 10
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for probe_NP
 <400> 10
 gctgatgaaa ctcaagcctt accgca 26
 <210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_SF
 <400> 11
 gaactcaatt accccctgca t 21

 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_SR
 <400> 12
 accattgggtc ccagagacat 20
 <210> 13
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for probe_SP
 <400> 13
 tcacacgtgg tgtttattac cctgaca 27
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> nucleotide sequence for primer_BAF

<400>	14	
actaacactg gctcgtgtga		20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> nucleotide sequence for primer_BAR		
<400>	15	
cttgggatgg ggagtctgtt		20
<210>	16	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223> nucleotide sequence for probe_BAP		
<400>	16	
aggctggtgt aaagcggcct tgg		23