

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0059766

(43) 공개일자 2020년05월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/689 (2018.01) *C12Q 1/6851* (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/689 (2018.05)*C12Q 1/6851* (2018.05)

(21) 출원번호 10-2018-0144882

(22) 출원일자 2018년11월21일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

대한민국 (식품의약품안전처장)

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187

(72) 발명자

이주훈

경기도 수원시 영통구 봉영로 1526, 703동 704호 (영통동, 살구골 진덕,서광,성지,동아 아파트)

곽효선

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 식품의약품안전평가원

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

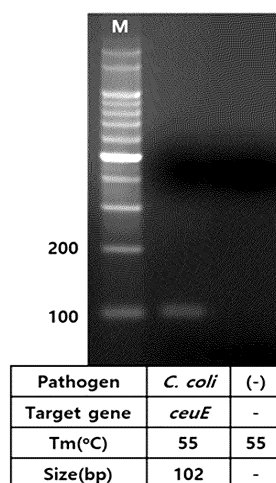
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 *ceuE* 타겟 유전자를 통해 캄필로박터 콜리를 신속검출할 수 있는 Singleplex Real-Time PCR 키트의 개발

(57) 요약

본 발명은 캄필로박터 콜라이 특이적인 유전자에 대한 프라이머 세트에 관한 것으로, 본 발명의 캄필로박터 콜라이 균주에 특이적인 프라이머 세트는 해당 균주만을 특이적으로 검출할 수 있는 정확성, 아주 극소량의 DNA 농도 만으로도 검출이 가능한 민감성, 종래의 검출 키트에 비해 현저히 빠르고 정확하게 검출할 수 있는 활성도가 높으므로, 이를 캄필로박터 콜라이 균주 검출용으로 유용하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



M : 100bp ladder

(-) : *C. coli* 를 제외한 나머지 15가지 균주의 DNA

(52) CPC특허분류

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

(72) 발명자

김순한

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187,
식품의약품안전평가원

이우정

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187,
식품의약품안전평가원

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

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

명세서

청구범위

청구항 1

캠필로박터 콜라이(*Campylobacter coli*) 균주 검출용 프라이머 세트.

청구항 2

제 1항에 있어서, 캠필로박터 콜라이 균주의 *ceuE* 유전자에 특이적으로 결합하는 캠필로박터 콜라이 균주 검출용 프라이머 세트.

청구항 3

제 1항에 있어서, 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머를 포함하는 캠필로박터 콜라이 균주 검출용 프라이머 세트.

청구항 4

캠필로박터 콜라이(*Campylobacter coli*) 균주 검출용 프로브.

청구항 5

제 4항에 있어서, 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 캠필로박터 콜라이 균주 검출용 프로브.

청구항 6

제 1항의 프라이머 세트 및 제 4항의 프로브를 포함하는 캠필로박터 콜라이 균주 검출용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 프로브는 서열번호 3의 염기서열의 5' 말단은 형광물질 및 3' 말단은 소광 물질(quencher) 물질이 포함된, 캠필로박터 콜라이 균주 검출용 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서, 실시간 RT-PCR 분석용 조성물인 캠필로박터 콜라이 균주 검출용 조성물.

청구항 9

제 6항의 캠필로박터 콜라이 균주 검출용 조성물을 포함하는 캠필로박터 콜라이 균주 검출용 키트.

청구항 10

제 9항에 있어서, 반응완충액, dNTP 및 Taq DNA 중합효소를 추가로 포함하는 캠필로박터 콜라이 균주 검출용 키트.

청구항 11

대상 시료에 대해 제 1항의 프라이머 세트를 이용하여 중합효소연쇄반응을 수행하는 단계; 및

상기 중합효소연쇄반응 산물의 크기를 확인하거나 그 염기서열을 분석하여 캠필로박터 콜라이 균주의 존재 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 캠필로박터 콜라이 균주의 검출방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 프로브를 추가로 이용하여 중합효소연쇄반응을 수행하는, 캠필로박터 콜라이 균주의 검출방법.

청구항 13

제 11항에 있어서, 상기 시료는 식품에서 분리한 미생물 또는 이로부터 추출한 핵산 시료인, 캄필로박터 콜라이 균주의 검출방법.

청구항 14

제 11항에 있어서, 상기 중합효소연쇄반응은 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), 역전사 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소연쇄반응(Competitive RT-PCR), Nuclease 보호 분석(RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, 핵산 마이크로어레이, 노던블랏 또는 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법으로 수행되는, 캄필로박터 콜라이 균주의 검출방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 캄필로박터 콜라이 특이적인 유전자에 대한 프라이머 세트에 관한 것으로, 이의 캄필로박터 콜라이 검출 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식중독은 세계적으로 사람의 건강에 대한 주요 문제 중 하나로 손꼽히고 있으며 이에 따른 식품산업, 공공 건강 기관, 미생물 테러 등 중요 분야에서 식중독균의 빠른 검출에 대한 관심을 가지고 있다. 상기 식중독이란 발열, 구토질, 구토, 설사 및 복통 등의 증세를 동반하는 질환으로 (Heymann DL. Control of Communicable Diseases Manual. pp 232-242. The American Public Health Association. Washington. 2004.), 세균이 원인인 세균성 식중독이 대부분이다. 주요 식중독균들로 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 예르시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 대장균 0157:H7(*Escherichiacoli* 0157:H7), 살모넬라(*Salmonella* spp), 시겔라(*Shigella* spp), 비브리오 볼리피쿠스(*Vibrio vulnificus*), 크로노박터 사카자키(*Cronobacter sakazakii*), 캄필로박터 콜라이(*Campylobacter coli*), 엔테로코커스(*Enterococcus* spp) 등이 존재한다. 세균성 식중독은 그 발병 형태에 따라 감염형과 독소형으로 분류된다. 감염형 식중독은 오염된 식품의 섭취시 세균이 장관 내에서 증식하여 일으키는 식중독으로, 살모넬라 속 균주(*Salmonella* spp), 대장균0157(*Escherichia coli* 0157:H7, *E coli* 0157:H7) 또는 비브리오 파라헤몰리티커스(*Vibrio parahaemolyticus*) 등이 주된 원인균이다. 독소형 식중독은 식품 중에서 세균이 증식하면서 독소를 생산하여식품 내에 존재하는 독소를 섭취함으로써 발생하는 식중독이다. 그러므로 이 경우 원인균이 식품 내에서 이미 사멸되었어도 독소가 잔존할 때에는 식중독이 발생할 수 있으며, 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 등이 주된 원인균이다.

[0003] 미국 질병통제 및 예방센터(CDC)의 통계에 의하면, 식품매개에 의하여 연간 500만 건의 질병이 발생하고 있으며, 이 중 약 4,000명이 사망하는 것으로 알려져 있고, 대부분은 살모넬라 속 균주에 의한 식중독이 약 100만 내지 400만 명에게 발생하며, 이중 약 01%에 해당하는 약 2,000 여명이 사망하는 것으로 보고되었다. 또한, 대장균 0157:H7 에 의한 식중독은 연간 약 1만 명이 발생하여 약 300명이 사망하였으며, 리스테리아 모노사이토게네스의 경우, 연간 약 1,500명이 발생하여 약 400명이 사망하는 것으로 알려져 있어, 이들의 주요 병원성 세균에 의한 축산식품의 오염이 심각한 것으로 나타났다. 우리나라의 식중독 발생현황을 살펴보면, 원인식품으로는 육류 및 식육가공품이 약 50% 이상을 차지하고 있으며, 원인병원체는 살모넬라균이 약 50%, 포도상구균이 약 20% 인 것으로 알려져 있다. 정확한 원인균의 동정을 위해서 오염된 가검물이나 식품을 배양하여 생화학적 테스트를 수행하는 것을 원칙으로 하는데, 이는 최소 3일에서 수 주일이 소요된다. 이와 같은 배지법이나 생화학적 테스트는 공인검사법으로 널리 사용되고 있기는 하지만 원인병원체를 파악하고 역학조사를 완료하기 전에 이미 식중독이 집단적으로 확산될 가능성이 매우 높다.

[0004] 이와 같은 식중독균의 검출은 인간의 건강 관리 및 식품산업에서 매우 중시되고 있으며, 특히 식중독 검출에 대하여 빠른 검출과 식중독균의 검출에 대한 민감도가 중요한 요건으로 자리잡고 있다. 식중독균의 빠른 다중검출을 위해 핵산기반의 검출방법이 보고되었으며, 이 방법 중 식중독균 DNA의 특정 염기서열을 증폭시켜 검출시키는 PCR(중합효소연쇄반응)을 일반적으로 사용하고 있다. PCR을 사용하는 경우, 소량의 샘플로도 증폭과정을 거치기

때문에 높은 민감도를 가지며, 빠른 검출이 가능하다는 장점을 가지게 되나, PCR시 사용되는 프라이머의 수가 많아질수록 비특이적 결합으로 인한 문제점이 제기되어 식중독균 다중 검출에 사용되기에는 문제점을 가지고 있다. 또한 균주들 사이에서도 비슷한 속에 속하는 균주들의 경우 DNA의 유사성과 다양성으로 인해 위양성(false positive) 또는 위음성(false negative)의 결과를 나타낼 수 있다는 문제점을 가진다.

[0005] 따라서 최근에는 이러한 식중독을 일으킬 수 있는 병원성 미생물들을 조기에 검출하고 미량의 병원성 미생물도 검출할 수 있는 방법들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 대한민국 등록특허공보 1544050호는 박테리아 검출용 키트 및 방법에 관한 것으로 살모넬라를 항체를 이용하여 검출하는 방법을 개시하고 있고, 대한민국 공개특허 제1999-65107호에는 중합효소연쇄반응을 이용하여 병원성 대장균 0157:H7이 가지고 있는 특이 유전자를 검출할 수 있는 다중 유전자 동시 검출방법이 개시한 바 있다. 그러나 이러한 종래기술에 따른 병원성 미생물 검출 방법들은 비교적 높은 농도의 미생물이 존재할 경우에만 검출이 가능하기 때문에 낮은 농도의 미생물이 존재 시에는 병원균의 존재를 검출하지 못하는 문제점이 있었다. 또한, 기존의 실시간 PCR 병원균 검출 키트의 경우 대체로 활성이 낮고 몇몇 표적 유전자들은 균주가 존재함에도 활성이 관찰되지 않았으며, 현재 시중에 가장 많이 사용되고 있는 Real-time PCR 장비인 ABI 7500과 Bio-Rad CFX Connect에서 동시에 호환이 되지 않는다는 문제점이 있어왔다. 아울러, 검출을 원하는 균주의 유무를 특이적으로 확인하기 어려우며 실제로 식품 샘플에 균주가 어느 정도 존재함에도 불구하고 민감도가 떨어져 검출되지 않는 경우가 있어왔다.

[0006] 이에 본 발명자들은 보다 더 정확하고 특이적인 실시간 PCR 키트의 필요성을 절감하여 식품에 위해한 병원성 미생물에만 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 세트를 고안하였으며, 상기 프라이머 세트를 이용한 PCR 방법으로 매우 낮은 농도에서도 검출이 가능함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 캄필로박터 콜라이 균주 검출용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 캄필로박터 콜라이 균주 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 캄필로박터 콜라이 균주 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 아울러, 본 발명의 목적은 캄필로박터 콜라이 균주의 검출방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 캄필로박터 콜라이 균주 검출용 프라이머 세트를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 캄필로박터 콜라이 균주 검출용 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 캄필로박터 콜라이 균주 검출용 키트를 제공한다.

[0014] 아울러, 본 발명은 캄필로박터 콜라이 균주의 검출방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따르면, 본 발명의 캄필로박터 콜라이 균주에 특이적인 프라이머 세트는 해당 균주만을 특이적으로 검출할 수 있는 정확성, 아주 극소량의 DNA 농도만으로도 검출이 가능한 민감성, 종래의 검출 키트에 비해 현저히 빠르고 정확하게 검출할 수 있는 활성도가 높으므로, 이를 캄필로박터 콜라이 균주 검출용도로 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 프라이머의 캄필로박터 콜라이 특이적 검출을 확인한 도이다.

도 2는 캄필로박터 콜라이 검출에 대한 본 발명의 프라이머의 singleplex Real-time PCR 민감도를 확인한 도이다.

도 3은 종래에 캄필로박터 콜라이 검출에 사용된 실시간 PCR 키트 (A사 *glyA*)와 본 발명의 프라이머를 이용한 실시간 PCR 키트의 캄필로박터 콜라이 검출 활성을 비교한 도이다.

도 4는 캄필로박터 콜라이 균주의 *ceuE*에 대한 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 singleplex real-time PCR

을 ABI 7500 기기를 이용하여 수행한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 캄필로박터 콜라이 균주의 *ceuE*에 대한 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 singleplex real-time PCR을 Bio-rad CFX connect를 이용하여 수행한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0018] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0019] 달리 지시되지 않는 한, 핵산은 좌측에서 우측으로 5'→3' 배향으로 기록된다. 명세서 내에서 열거된 수치 범위는 범위를 정의하는 숫자를 포함하고, 정의된 범위 내의 각각의 정수 또는 임의의 비-정수 분획을 포함한다.
- [0020] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것들과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 재료가 본 발명을 테스트하기 위한 실행에서 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법이 본원에서 기술된다.
- [0021] 본 발명에서 용어, "시료(샘플)"는 대상 식품 또는 재료로부터 얻은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 시료를 의미한다.
- [0022] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.
- [0024] 일 측면에서, 본 발명은 캄필로박터 콜라이 균주 검출용 프라이머 세트에 관한 것이다.
- [0025] 일 구현예에서, 캄필로박터 콜라이 균주 검출용 프라이머 세트는 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 포함할 수 있으며, 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트로 이루어질 수 있다.
- [0026] 일 구현예에서, 본 발명의 서열번호 1의 염기서열로 이루어지는 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트는 캄필로박터 콜라이 균주 특이 유전자 *ceuE*를 102bp로 증폭시킬 수 있다.
- [0027] 일 구현예에서, 본 발명의 프라이머 세트는 통상적인 중합효소연쇄반응에 사용될 수 있으며, 바람직하게는 일반 중합효소연쇄반응 또는 실시간 RT-PCR에 사용될 수 있다.
- [0028] 일 구현예에서, 본 발명의 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)을 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수 있다.
- [0029] 일 구현예에서, 본 발명의 상기 프라이머는 DNA 삽입(intercalating) 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질을 더 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 VIC, NED, FAM 또는 PET 이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 VIC, NED, FAM 또는 PET를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출 가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 ³²P 또는 ³⁵S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 상

기에 기재된 바와 같다.

- [0030] 본 발명에서 사용된 용어 "중합효소연쇄반응" 또는 "PCR"은 일반(비정량) PCR과 정량 PCR을 포괄하는 것으로서, 예를 들어, 일반 PCR, 일반 RT-PCR, 실시간 PCR, 실시간 RT-PCR을 모두 포함하는 개념이나, 문맥에 따라 "일반 PCR 또는 일반 RT-PCR"을 가리키거나 "일반 PCR"을 가리키는 개념으로 사용될 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 사용된 용어 "검출"은 검출 또는 측정된 대상의 존재 여부 및/또는 이의 농도를 정량하는 것을 의미한다.
- [0032] 본 발명에서 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기 (free 3 hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍 (base pair)를 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응 (즉, DNA 폴리머레이트 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다.
- [0033] 일 측면에서, 본 발명은 캄필로박터 콜라이(*Campylobacter coli*) 균주 검출용 프로브에 관한 것이다.
- [0034] 일 구현예에서, 상기 캄필로박터 콜라이 균주 검출용 프로브는 서열번호 3의 염기서열로 이루어질 수 있다.
- [0035] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 캄필로박터 콜라이 균주 검출용 프라이머 세트를 포함하는 캄필로박터 콜라이 균주 검출용 조성물에 관한 것이다.
- [0036] 일 구현예에서, 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 프로브를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 프로브는 서열번호 3의 염기서열의 5' 말단은 형광물질을 및 3' 말단은 소광 물질(quencher) 물질을 포함할 수 있다.
- [0037] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 실시간 RT-PCR 분석용 조성물일 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 용어, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고 뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포로아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0040] 본 발명에서, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시키는 적합한 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, NucleicAcidHybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다.
- [0041] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 캄필로박터 콜라이 균주 검출용 조성물을 포함하는 캄필로박터 콜라이 균주 검출용 키트에 관한 것이다.
- [0042] 일 구현예에서, 상기 키트는 상기 프라이머 세트와 PCR을 이용한 미생물 검출키트의 통상적인 구성성분(반응완충액, Taq DNA 중합효소, 표지물질 등)을 포함할 수 있으며, PCR(Polymerase chain reaction) 또는 실시간 PCR(Real-Time PCR)에 필요한 시약을 추가로 포함할 수 있다.
- [0043] 일 구현예에서, 상기 PCR에 필요한 시약은 예를 들면, 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머, 적당량의 DNA 중합효소(Taq polymerase), dNTP 혼합물, KCl, Tris-HCl 및 MgCl₂를 함유한 PCR 완충용액(buffer) 및 물을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다
- [0044] 일 구현예에서, 상기 키트는 안내서를 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, 역전사 완충액 및

PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

- [0045] 일 측면에서, 본 발명은 대상 시료에 대해 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 중합효소연쇄반응을 수행하는 단계; 및 상기 중합효소연쇄반응 산물의 크기를 확인하거나 그 염기서열을 분석하여 캄필로박터 콜라이 균주의 존재 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 캄필로박터 콜라이 균주의 검출방법에 관한 것이다.
- [0046] 일 구현예에서, 캄필로박터 콜라이 균주의 존재 여부는 상기 중합효소연쇄반응으로 증폭된 DNA 산물을 전기영동하여 상기 증폭된 DNA 산물의 크기를 확인하는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0047] 일 구현예에서, 상기 시료는 식품에서 분리한 미생물 또는 이로부터 추출한 핵산 시료일 수 있다.
- [0048] 일 구현예에서, 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 프로브를 추가로 이용하여 중합효소연쇄반응을 수행할 수 있다.
- [0049] 일 구현예에서, 본 발명의 검출방법은 상기 병원성 미생물인 캄필로박터 콜라이가 발견되는 모든 물질을 대상으로 실시될 수 있으며, 바람직하게로는 식품 또는 사료에 대하여 실시할 수 있다. 일례로, 캄필로박터 콜라이에 오염이 되었으리라고 의심되는 시료를 채취하고, 이를 멸균수 또는 생리식염수에 현탁한 후 프로테아제 K(Proteinase K)를 처리한 후 펠렛을 회수한 후 열수추출하여, PCR 반응에 필요한 시료를 준비하고, PCR을 실시한다. PCR 결과는 통상적인 PCR 검출 수단, 예컨대 전기영동 등의 방법으로 실시된다. 상기 열수추출은 통상적인 DNA 분리방법으로, 예컨대 상기 펠렛을 멸균수로 부유하고 여기에 페놀/클로로포름 (1:1) 혼합액을 처리한 다음 상등액을 수득하고, 상기 상등액에 에탄올을 가한 후 원심분리하여 DNA 펠렛을 수득하는 방법이다. 구체적인 반응조건 및 시간은 통상적인 바에 따른다.
- [0050] 일 구현예에서, 상기 중합효소연쇄반응은 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), 역전사 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소연쇄반응(Competitive RT-PCR), Nuclease 보호 분석(RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, 핵산 마이크로어레이, 노던블랏 또는 DNA 칩으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법으로 수행될 수 있다.
- [0051] 일 구현예에서, 상기 중합효소연쇄반응이 리얼타임 중합효소연쇄반응인 경우에, 상기 중합효소연쇄반응 산물의 크기를 확인하거나 그 염기서열을 분석하여 캄필로박터 콜라이 균주의 존재 여부를 확인하는 단계는 형광정도, 즉, 형광공명에너지이동(fluorescence resonance energy transfer, FRET)을 측정하는 방법으로 수행할 수 있으며, 추가로 증폭된 DNA 산물의 이중나선이 분리되는 온도(melting temperature)를 확인하는 단계를 포함하는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0052] 일 구현예에서, 상기 중합효소연쇄반응이 컨벤셔널 중합효소연쇄반응인 경우에, 상기 중합효소연쇄반응 산물의 크기를 확인하거나 그 염기서열을 분석하여 캄필로박터 콜라이 균주의 존재 여부를 확인하는 단계는 상기 증폭된 DNA 산물을 전기영동하여 상기 증폭된 DNA 산물의 크기를 확인하는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0054] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0056] **실시예 1. 캄필로박터 콜라이(*Campylobacter coli*) 특이적 프라이머 제작**

[0057] 캄필로박터 콜라이에만 특이적으로 존재하는 유전자인 *ceuE*(Accession No. KF541298.1)에 대한 프라이머 세트(표 1, 서열번호 1 및 2)를 제작하였으며, Taqman™ Real-time PCR 방법에서 함께 사용될 프로브(표 1, 서열번호 3)를 제작하였다.

표 1

		서열 (5'→3')	서열번호
프라이머	forward	CTGAATTTATAC TAGAAAAAATCCTG	1
	reverse	GTTGCTTTATCAAGTATGCCT	2
프로브		FAM-TGTGCGCGTTCTTTATTGCCACA-TAMRA	3

[0060] 실험예 1. 정확성 검증

[0061] 종래에 다른 균주까지 검출되었던 Singleplex Real-time PCR 키트에 상기 실시예 1에서 제작한 프라이머를 적용한 경우 정확히 캄필로박터 콜라이 균주만 특이적으로 검출하는지 확인하기 위하여, 캄필로박터 콜라이 균주 또는 하기 표 2의 균주들의 혼합물에서 conventional PCR을 이용하여 Crosscheck PCR 검증을 수행하였다.

표 2

[0062]

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

[0063] 그 결과, 특이적으로 캄필로박터 콜라이 균주에서만 102bp의 밴드가 검출되었으며, 캄필로박터 콜라이 균주를 제외한 나머지 15종의 다른 균주들에서는 밴드가 검출되지 않아, 본 발명의 프라이머 세트는 캄필로박터 콜라이 균주만을 특이적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다 (도 1).

[0065] 실험예 2. 민감성 검증

[0066] 민감도가 낮아 샘플에서 균주의 검출이 어려웠던 종래의 Real-time PCR 키트들을 고려하여 본 발명의 프라이머 세트의 민감도를 확인하였다. 구체적으로, 100 ng/ μ l의 DNA 양을 기준으로 연속 희석(Serial dilution) 실험을 진행하여 DNA 주형이 몇 ng 농도까지 검출되는지 확인하였다.

[0067] 그 결과, 본 발명의 프라이머 세트는 10 pg/ μ l의 아주 극소량의 DNA만 존재해도 캄필로박터 콜라이 균주의 검출이 가능함을 확인할 수 있었다 (도 2).

[0069] 실험예 3. 활성화도 검증

[0070] 캄필로박터 콜라이 균주의 glyA 유전자를 표적으로 하는 Real-time PCR 키트 (A사)와 본 발명의 프라이머 세트를 이용한 Real-time PCR 키트의 활성을 비교 분석하였다.

[0071] 그 결과, 종래의 Real-time PCR 키트를 이용한 경우보다 본 발명의 프라이머 세트를 이용한 경우에 현저히 활성화도가 높은 것으로 나타나 (도 3), 본 발명의 프라이머 세트를 이용하면 더 빠르고 정확하게 캄필로박터 콜라이를 검출할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0073] 실험예 4. 양성 대조군 DNA 검증

[0074] 식품 샘플 내에 존재하는 병원성 균주를 검출하기 위해서는 DNA 정제과정이 필요하나, 이 과정에서 DNA의 오염

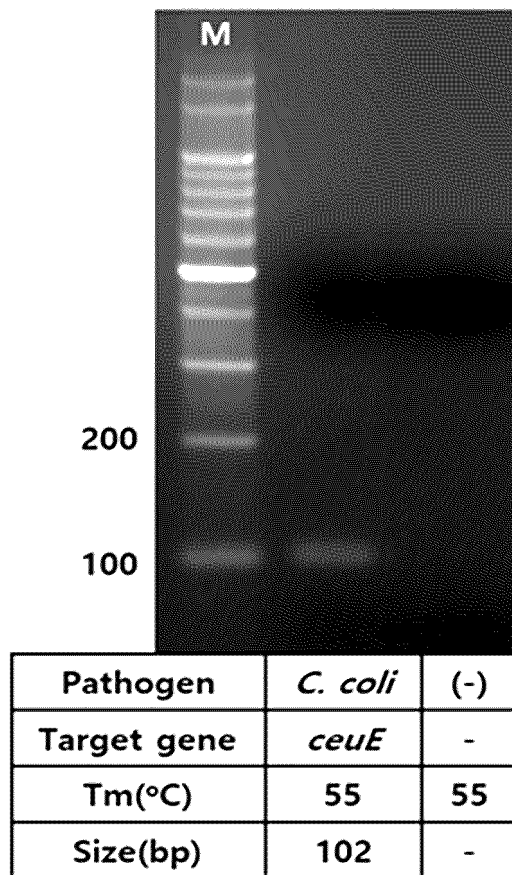
에 의해 정확한 실험 결과가 나오지 않을 수 있으므로, 식품 샘플 내의 병원균을 검출하기 위한 DNA 정제 과정을 모니터링하기 위한 양성 대조군으로서 캄필로박터 콜라이를 이용할 수 있는지 확인하고자, 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 현재 시중에 가장 많이 사용되고 있는 Real-time PCR 장비인 ABI 7500 또는 Bio-rad CFX connect로 real-time PCR을 수행하였다.

[0075]

그 결과, 본 발명의 프라이머 세트는 ABI 7500 및 Bio-Rad CFX Connect 모두에서 캄필로박터 콜라이 균주를 정확히 검출할 수 있었다 (도 4 및 5). 이를 통해, 본 발명의 프라이머 세트가 현재 시중에 가장 많이 사용되고 있는 Real-time PCR 장비인 ABI 7500과 Bio-Rad CFX Connect에서 동시에 호환 가능하며, 이를 식품 샘플에서 균주를 검출하기 위한 실험의 양성 대조군으로 이용할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

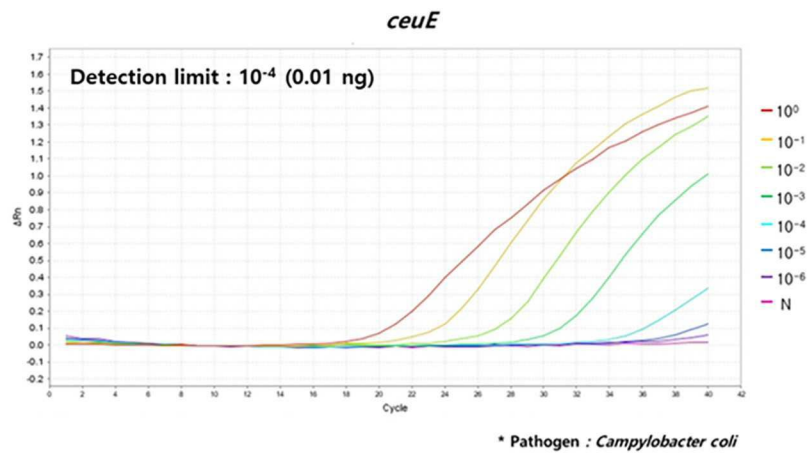
도면1



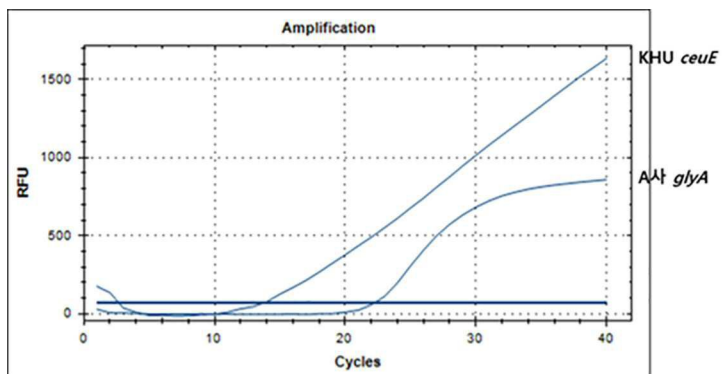
M : 100b.p ladder

(-) : *C. coli*를 제외한 나머지 15가지 균주의 DNA

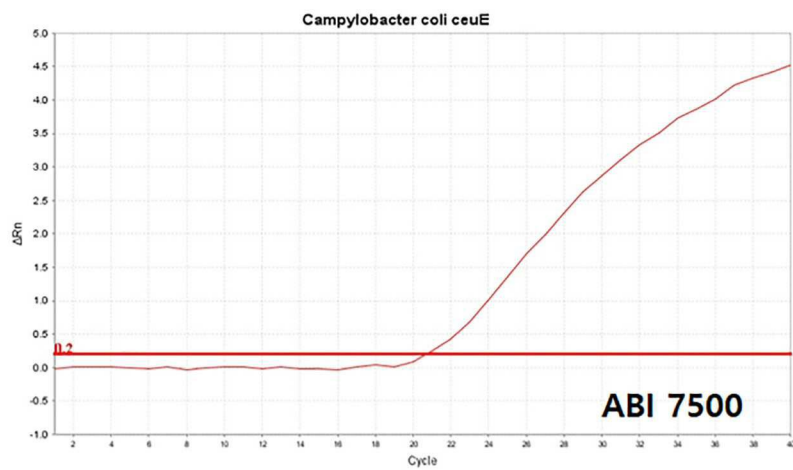
도면2



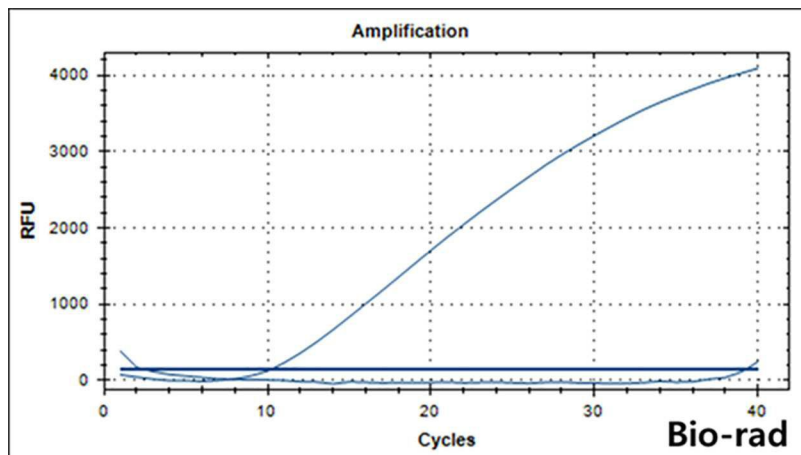
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

KOREA FOOD & DRUG ADMINISTRATION

<120> Development of a Singleplex Real-Time PCR Kit for Rapid Detection
of *Campylobacter coli* *ceuE* target gene

<130> PN1810-399

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> *Campylobacter coli* *ceuE* forward primer

<400> 1

ctgaatttat actagaaaaa aatcctg

27

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> *Campylobacter coli* *ceuE* reverse primer

<400> 2

gttgctttat caagtatgcc t

21

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ceuE probe

<400> 3

tgtgcgcgtt ctttattgcc caca

24