



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0032194
(43) 공개일자 2024년03월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/689 (2018.01) C12Q 1/686 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2018.05)
C12Q 1/686 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2022-0108902
(22) 출원일자 2022년08월30일
심사청구일자 2022년08월30일

(71) 출원인
대한민국 (식품의약품안전처장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경
희대학교 국제캠퍼스내)
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
김동혁
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
고세영
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

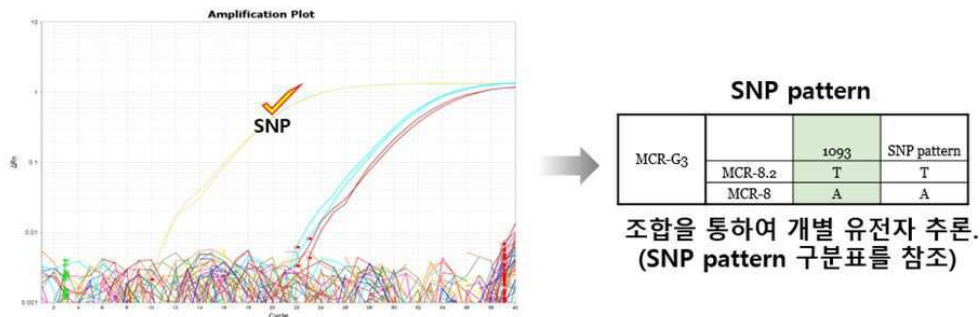
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 콜리스틴 및 퀴놀론 내성 균주 확인을 위한 다중진단 PCR 키트

(57) 요약

본 발명은 콜리스틴 및 퀴놀론 내성 균주 확인을 위한 다중진단 PCR 키트에 관한 것으로서, 본 발명에서는 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 계열 항생제 내성균 전체 99% 이상을 커버할 수 있는 항생제 내성 유전자를 타겟으로 각각의 SNP 패턴을 계산 및 분석하였으며, 분석 결과를 토대로 항생제 내성 유전자를 검출할 수 있는 42쌍의 SNP 조합 프라이머와 16개의 단일 검출 프라이머를 합쳐 총 58쌍의 프라이머 세트를 디자인하여 이를 이용한 다중진단 PCR 키트를 개발하였다. 본 발명은 별도의 DNA 추출단계가 필요 없으며, 항생제 내성 유전자 검출 결과에 이르기 까지 90분 미만의 소요시간이 필요하므로, 빠르게 분석이 가능하며 실험의 편리성 및 효율성이 보장될 것으로 예상된다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12Q 2537/143 (2013.01)

C12Q 2600/156 (2013.01)

C12Q 2600/16 (2013.01)

(71) 출원인

아주대학교산학협력단

경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

김해영

경기도 용인시 수지구 동천로135번길 21, 1307동
901호(동천동, 한빛마을 래미안 이스트팰리스 3단지)

윤현진

경기도 수원시 장안구 조원로58번길 48, 201호(조원동, 개성하이뷰)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호

1475012462

과제번호

DY0002258615-20162위생안010-1

부처명

식품의약품안전처

과제관리(전문)기관명

식품의약품안전평가원

연구사업명

식품등안전관리(R&D)

연구과제명

주요 항생제 내성 유전자 신속검출 키트 개발 연구(1)

기 여 율

1/1

과제수행기관명

울산과학기술원

연구기간

2021.01.01 ~ 2021.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

1) 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 11 및 서열번호 12로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 13 및 서열번호 14로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 15 및 서열번호 16으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 17 및 서열번호 18로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 19 및 서열번호 20으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 21 및 서열번호 22로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 21 및 서열번호 23으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 24 및 서열번호 25로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 24 및 서열번호 26으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 27 및 서열번호 28로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 29 및 서열번호 28로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 30 및 서열번호 31로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 32 및 서열번호 31로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 33 및 서열번호 34로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 35 및 서열번호 34로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 36 및 서열번호 37로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 36 및 서열번호 38로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 39 및 서열번호 40으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 39 및 서열번호 41로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 42 및 서열번호 43으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 44 및 서열번호 45로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 46 및 서열번호 47로 표시되는 프라이머 세트에 이루어진 콜리스틴 내성 그룹 유전자 검출용 프라이머 세트; 및

2) 서열번호 48 및 서열번호 49로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 48 및 서열번호 50으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 51 및 서열번호 52로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 53 및 서열번호 52로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 54 및 서열번호 55로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 56 및 서열번호 55로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 57 및 서열번호 58로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 57 및 서열번호 59로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 60 및 서열번호 61로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 62 및 서열번호 61로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 63 및 서열번호 64로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 65 및 서열번호 64로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 66 및 서열번호 67로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 68 및 서열번호 67로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 69 및 서열번호 70으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 71 및 서열번호 70으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 72 및 서열번호 73으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 72 및 서열번호 74로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 75 및 서열번호 76으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 75 및 서열번호 77로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 78 및 서열번호 79로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 78 및 서열번호 80으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 81 및 서열번호 82로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 81 및 서열번호 83으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 84 및 서열번호 85로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 84 및 서열번호 86으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 87 및 서열번호 88로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 89 및 서열번호 88로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 90 및 서열번호 91로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 92 및 서열번호 93으로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 94 및 서열번호 95로 표시되는 프라이머 세트에 이루어진 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 다중 검출용 프라이머 세트를 포함하는 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 다중 검출용 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 따른 프라이머 세트를 포함하는 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 다중 검출용 키트.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 키트는 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 다중 검출용 키트.

청구항 4

- (1) 제1항에 따른 프라이머 세트를 이용하여, 시료로부터 PCR 증폭을 수행하여, PCR 증폭 산물을 수득하는 단계; 및
- (2) 상기 PCR 증폭 산물을 분석하는 단계를 포함하는 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 다중 검출 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 PCR은 실시간 PCR(Real-Time PCR; RT-PCR)인 것을 특징으로 하는 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 다중 검출 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 PCR 증폭 산물을 분석하는 단계는 PCR 증폭 산물의 SNP 패턴을 분석하는 것을 특징으로 하는 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 다중 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 콜리스틴과 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 계열 항생제 내성균을 타겟으로 한 항생제 내성 유전자를 신속하게 검출할 수 있는 다중진단 PCR 키트에 대한 것이다.

배경 기술

- [0002] 항생제 내성의 문제는 WHO의 global report에서 심각하게 규정하고 있는 세계적인 문제이지만, 한국을 포함한 아시아 국가 내 병원성 세균의 항생제 내성률이 전반적으로 높은 양상을 띄고 있다.
- [0003] 최후의 항생제로써 활용되어온 콜리스틴과 항균력이 우수하여 매우 범용적으로 사용되어온 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 계열 항생제 내성균은 식중독 균을 중점으로 발생하며, 특히 그람 음성균에서 빈번하게 발생하는데 S. enterica, E. coli, Klebisella, Shigella 등을 포함하는 Enterobacteriaceae 계통의 균종이 주요하게 내성이 발생하는 균종이다. 나아가 콜리스틴은 최후의 항생제로써 매우 큰 항균력을 가지고 있고, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 계열 항생제는 범용성이 넓어 실제로 많이 사용되고 있는 항생제이지만, 해당 항생제에 내성을 가진 유전자가 매우 변이율을 가지고 확산되고 있기에 실질적인 대비책을 마련해야하는 상황이다.
- [0004] 병원균의 항생제 내성에 대한 문제는 WHO에서 세계 공공 보건의 심각한 위협으로 규정되어있으나 특히 한국을 포함한 아시아 국가들에서 주요 병원성 세균의 항생제 내성률이 서구 국가에 비하여 전반적으로 높은 양상을 보이고 있다. 따라서 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 계열 내성 균주를 효과적으로 검출할 수 있는 진단 기술과 진단 키트의 제공은 종래의 배양방식 위주의 항생제 내성 유전자 검사를 대체할 수 있는 분자적 진단 방식으로써 대규모 검사 시 소요시간과 단위 비용을 낮출 수 있어, 개발 필요성이 매우 높다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1951846호(2019.02.19 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 다중 검출용 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 다중 검출용 키트 및 이를 이용한 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 다중 검출 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 1) 콜리스틴 내성 그룹 유전자 검출용 프라이머 세트; 및 2) 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 검출용 프라이머 세트를 포함하는 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 다중 검출용 프라이머 세트를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 다중 검출용 키트를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 이용한 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 다중 검출 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 콜리스틴 및 퀴놀론 내성 균주 확인을 위한 다중진단 PCR 키트에 관한 것으로서, 본 발명에서는 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 계열 항생제 내성균 전체 99% 이상을 커버할 수 있는 항생제 내성 유전자를 타겟으로 각각의 SNP 패턴을 계산 및 분석하였으며, 분석 결과를 토대로 항생제 내성 유전자를 검출할 수 있는 42쌍의 SNP 조합 프라이머와 16개의 단일 검출 프라이머를 합쳐 총 58쌍의 프라이머 세트를 디자인하여 이를 이용한 다중진단 PCR 키트를 개발하였다. 본 발명은 별도의 DNA 추출단계가 필요 없으며, 항생제 내성 유전자 검출 결과에 이르기 까지 90분 미만의 소요시간이 필요하므로, 빠르게 분석이 가능하며 실험의 편리성 및 효율성이 보장될 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 총 58개의 타겟 항생제 내성 유전자(콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 계열 항생제)를 검출하기 위한 96 well plate 구성을 나타낸다.

도 2는 개발된 검출 프라이머의 특이성 확인 결과를 나타낸다.

도 3은 개발된 검출 프라이머의 검출 한계 실험을 통해 확인된 표준 곡선을 나타낸다.

도 4는 개발된 검출 프라이머 중 조합 프라이머의 타겟 내성 유전자 검출 기법을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이에, 본 발명에서는 기하급수적으로 증가하고 있는 전장 유전체 염기서열 내 항생제 내성 유전자를 분석한 결과를 통하여 변이 SNP(단일 뉴클레오타이드 다형성) 서열이 매우 빈번하게 일어나는 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 계열 항생제 내성 유전자 전체 99% 이상을 커버할 수 있는 타겟을 선별 및 검출 SNP 패턴을 계산하였다. 계산된 SNP 패턴을 기반으로 총 58쌍의 검출 프라이머를 계산하였고, 이는 1개의 96-well reaction plate에서 총 35개의 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 계열 항생제 내성 유전자를 빠르고 정확하게 검출할 수 있다(도 1).

[0013] 본 발명은 별도의 DNA 추출단계가 필요없으며, 항생제 내성 유전자 검출 결과에 이르기 까지 90분 미만의 소요시간이 필요하다. 기존 배양 방식 위주의 항생제 내성 검사가 소요시간과 단위비용이 크기 때문에 대규모 공정 단계로 이를수록 비용, 시간, 노동 집약적이다. 따라서, 이를 대체할 수 있는 분자적 진단 방식이 필요하지만, 변이가 매우 빠른 항생제 내성 유전자의 특성 상 개발이 쉽지 않다. 이에 본 발명은 기존의 배양 스크리닝 방법보다 낮은 검사가격과 손쉬운 대량 검사에 대한 솔루션을 제공할 수 있는 분자진단 기술을 개발하였으며, 이는 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 계열 항생제 내성 유전자의 약 99% 이상을 커버할 수 있는 검출 타겟 선정 및 검출 프라이머를 디자인하여 빠르고 정확하게 검출할 수 있는 Real-Time PCR 기법을 개발하고, 본 발명을 완성하였다.

[0014] 본 발명은 1) 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 11 및 서열번호 12로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 13 및 서열번호 14로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 15 및 서열번호 16으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 17 및 서열번호 18로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 19 및 서열번호 20으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 21 및 서열번호 22로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 21 및 서열번호 23으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 24 및 서열번호 25로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 24 및 서열번호 26으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 27 및 서열번호 28로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 29 및 서열

번호 28로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 30 및 서열번호 31로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 32 및 서열번호 31로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 33 및 서열번호 34로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 35 및 서열번호 34로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 36 및 서열번호 37로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 36 및 서열번호 38로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 39 및 서열번호 40으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 39 및 서열번호 41로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 42 및 서열번호 43으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 44 및 서열번호 45로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 46 및 서열번호 47로 표시되는 프라이머 세트로서 이루어진 콜리스틴 내성 그룹 유전자 검출용 프라이머 세트; 및

[0015] 2) 서열번호 48 및 서열번호 49로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 48 및 서열번호 50으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 51 및 서열번호 52로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 53 및 서열번호 52로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 54 및 서열번호 55로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 56 및 서열번호 55로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 57 및 서열번호 58로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 57 및 서열번호 59로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 60 및 서열번호 61로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 62 및 서열번호 61로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 63 및 서열번호 64로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 65 및 서열번호 64로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 66 및 서열번호 67로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 68 및 서열번호 67로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 69 및 서열번호 70으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 71 및 서열번호 70으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 72 및 서열번호 73으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 72 및 서열번호 74로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 75 및 서열번호 76으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 75 및 서열번호 77로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 78 및 서열번호 79로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 78 및 서열번호 80으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 81 및 서열번호 82로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 81 및 서열번호 83으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 84 및 서열번호 85로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 84 및 서열번호 86으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 87 및 서열번호 88로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 89 및 서열번호 88로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 90 및 서열번호 91로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 92 및 서열번호 93으로 표시되는 프라이머 세트 및 서열번호 94 및 서열번호 95로 표시되는 프라이머 세트로서 이루어진 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 검출용 프라이머 세트를 포함하는 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 다중 검출용 프라이머 세트를 제공한다.

[0016] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 증폭하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity) 뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다. 본 발명에 있어서, 프라이머로 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 다중 검출용 키트를 제공한다.

[0018] 본 발명의 상기 프라이머 세트 이외에, PCR 키트에 포함되는 통상적인 구성성분을 포함할 수 있다. 상기 키트에 포함되는 통상적인 구성성분은 반응완충액, 중합효소, dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP) 및 Mg^{2+} 와 같은 보조인자(cofactor) 등일 수 있다. 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭 단계에 이용될 수 있으며, *E. coli* DNA 중합효소 I의 클레나우 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이다. 상기 중합효소 대부분은 박테리아 그 자체로부터 분리될 수 있고 또는 상업적으로 구입할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 (1) 상기에 따른 프라이머 세트를 이용하여, 시료로부터 PCR 증폭을 수행하여, PCR 증폭 산물을 수득하는 단계; 및 (2) 상기 PCR 증폭 산물을 분석하는 단계를 포함하는 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 내성 그룹 유전자 다중 검출 방법을 제공한다.

[0020] 바람직하게는, 상기 PCR은 실시간 PCR(Real-Time PCR; RT-PCR)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭 산물의 분석은 모세관 전기영동, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy5 또는 Cy3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지

되며, 이렇게 표시된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행 시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표시한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

[0022] 바람직하게는, 상기 PCR 증폭 산물을 분석하는 단계는 PCR 증폭 산물의 SNP 패턴을 분석하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 한편, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.

[0024] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[0025] <실시예>

[0026] 본 발명은 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 계열 항생제 내성 유전자를 함유하는 주요 내성 균주 확인을 위한 다중진단 PCR 키트를 제공하는 기술로써, 생물정보학을 기반으로 개발되었다.

[0027] 본 발명은 광범위 항생제 내성 유전자를 포함하는 데이터베이스를 이용하여 총 35개의 타겟 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 계열 항생제 내성 유전자를 정렬 및 그룹화하였으며, 각 그룹 내 속한 항생제 내성 유전자 간 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP) 패턴을 계산함으로써 그룹 내에 속한 항생제 내성 유전자를 각기 검출하기 위한 16쌍의 단일 프라이머와 42쌍의 SNP 조합 프라이머를 합쳐 총 58쌍의 프라이머 쌍이 제작되었다.

[0028] 본 발명에서 디자인한 조합용 프라이머 쌍의 디자인은 타겟 유전자 간 염기서열 유사도가 매우 높아 특이적으로 검출이 가능한 서열이 확보되지 않는 경우, 디자인하는 것을 전제로 하였다.

[0029] 본 발명에서 디자인한 조합용 프라이머 쌍의 디자인 과정은 다음과 같다. 데이터베이스를 이용하여 정렬된 총 58개의 콜리스틴, 퀴놀론 및 플로로퀴놀론 타겟 내성 유전자를 클러스터링과 염기 서열 정렬을 통하여 해당 유전자 내 보존 지역과 변이 지역을 확인하였다. 또한, 같은 대립 유전자 간 서열 정렬을 수행하여 SNP가 존재하는 위치와 염기서열을 확인하였다. 이후, 58개의 타겟 내성 유전자를 각각 검출할 수 있는 특이적인 SNP 패턴을 계산하였다.

[0030] 본 발명에서 발명한 SNP 조합 프라이머는 특정 위치의 해당 SNP 염기서열이 프라이머 말단에 위치할 수 있도록 설계하는 3'-mismatch 프라이머 디자인 기법을 활용하였으며, 최대한 SNP를 제외한 그 외 변이 지역이 설계된 프라이머 염기서열 내에 포함되지 않을 수 있도록 설계되었다.

[0031] 본 발명에서 계산한 특이적인 SNP 패턴을 이용하여 분리 균주 내 해당 타겟 내성 유전자의 검출 유무를 RT-PCR 상 확인하기 위해서는, 검출 결과를 쌍으로 비교해야 한다. 이는 mismatch에 의해 유도된 증폭 격차를 확인해야만 특정 위치의 SNP를 확인할 수 있기 때문이다.

[0032] 본 발명에서 개발된 조합 프라이머의 특정 위치의 SNP 패턴을 통하여 타겟 내성 유전자를 추론하는 방식은 도 4에 나타났다. 타겟 내성 유전자는 고유한 위치에 할당된 단일 염기 다형성을 소유하고 있기 때문에, 각 위치에 맞는 검출 염기쌍을 조합하여 분리 균주 내 최종 검출 SNP 패턴을 획득한 후, 타겟 내성 유전자를 추론하는 방식이다.

[0033] 본 발명의 도면에 기재된 예시의 설명은 다음과 같다. MCR_G3의 당해 연도 타겟 유전자는 MCR-8, MCR-8.2이며, 이 2개의 유전자는 SNP로써 구분되어지는데, 해당 point mutation의 위치는 1093(T 또는 A)위치이다. 검출의 방법은 다음과 같다. 첫째, 1093 위치의 SNP를 검출하기 위해 2쌍의 프라이머를 디자인하여 RT-PCR 실험 수행하여 해당 위치의 SNP를 검출하며, 검출의 기준은 먼저 증폭한 패턴만을 확인하였다. 둘째, 각 위치의 SNP가 검출되면 이를 조합하여 최종 검출 SNP 패턴을 도출 및 개별 유전자를 추론하였다. 만약, SNP 위치가 2개 이상인 경우, 해당하는 위치의 SNP를 검출하기 위한 프라이머 쌍에서 먼저 증폭된 SNP 패턴을 적용하여 제공되는 구분표와 대조함으로써 분리 균주 내 포함된 항생제 내성 유전자를 추론할 수 있도록 하였다.

[0034] 단일 프라이머와 SNP 조합 프라이머를 합쳐 총 58쌍의 프라이머 쌍이 디자인되었다. 디자인된 총 52쌍의 프라이머 정보는 표 1 내지 표 5에 나타났다.

표 1

[0035]

Allele	Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)	SNP 위치	SNP
MCR 그룹 검출 프라이머	MCR-1 Group_F	CAT GCG TAT CAT TGG TTT GGG TGT (서열번호 1)	111	N/A	
	MCR-1 Group_R	GCC ACG ATC AAG CCC AAT (서열번호 2)			
	MCR-2 Group_F	GTG TGT TGG TCG CAK TTG C (서열번호 3)	100		
	MCR-2 Group_R	ACA AGC AAC AGC ACA AGG C (서열번호 4)			
	MCR-3 Group_F	GTT CCA TTT TCG ATA CGG TAT (서열번호 5)	149		
	MCR-3 Group_R	GCC TCA TTT TGA TTG GTT TCA (서열번호 6)			
	MCR-4 Group_F	ATG ATT CTG GCT GTA AAG GTG TG (서열번호 7)	153		
	MCR-4 Group_R	TAT CTT GAC TTG GTG CTA CTG C (서열번호 8)			
	MCR-5 Group_F	ATG GAG AAT GCT GCC CTA CTT G (서열번호 9)	101		
	MCR-5 Group_R	GCA TCA TTA CCG CTT GTT TC (서열번호 10)			
	MCR-6 Group_F	TCT GTT GAT GAG CGT GGT C (서열번호 11)	127		
	MCR-6 Group_R	TAG CAC AAG CGC CGT TGA GAT (서열번호 12)			
	MCR-7 Group_F	TGG TGC TGA ACT GGC CTT T (서열번호 13)	134		
	MCR-7 Group_R	GGT AAA GGG GAT AAA GAC GGC (서열번호 14)			
	MCR-8 Group_F	CCG TTC CTT TTC TTT CCA CTC (서열번호 15)	116		
	MCR-8 Group_R	CGC CAA CCA CCA CAA TTC A (서열번호 16)			
	MCR-9 Group_F	GCT TTA CTG TTT ATC ACT GGC TCA C (서열번호 17)	171		
	MCR-9 Group_R	GGC AGG AAG GAT ACC GGT (서열번호 18)			
	MCR-10 Group_F	GTC TTG AAC ATG TGA GGG CG (서열번호 19)	135		
	MCR-10 Group_R	AAC CGG TGA CCA GCA ACA (서열번호 20)			

표 2

[0036]

Allele	Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)	SNP 위치	SNP
MCR G1 Group	MCR_G1_1_F	AGC AGT CAT TAT GCC AGT TTC TT (서열번호 21)	141	643	A
	MCR_G1_1_R(A)	GTG ATA AAT GGT ATC TTT TGG CGT (서열번호 22)			
	MCR_G1_1_F	AGC AGT CAT TAT GCC AGT TTC TT (서열번호 21)	141	1238	G
	MCR_G1_1_R(G)	GTG ATA AAT GGT ATC TTT TGG CGC (서열번호 23)			
	MCR_G1_2_F	CAA TAA CGG CAA AGA TAT GCT GA (서열번호 24)	121	1238	C
	MCR_G1_2_R(C)	AAG CTC ATT ACC TTC ACA CG (서열번호 25)			
	MCR_G1_2_F	CAA TAA CGG CAA AGA TAT GCT GA (서열번호 24)	121	1354	T
	MCR_G1_2_R(T)	AAG CTC ATT ACC TTC ACA CA (서열번호 26)			
	MCR_G1_3_F(T)	TCC AGT GGC TGC AGA CGT (서열번호 27)	104	1354	T
	MCR_G1_3_R	CAT ACC ATG TAG ATA GAC ACC GTT (서열번호 28)			
	MCR_G1_3_F(C)	TCC AGT GGC TGC AGA CGC (서열번호 29)	104	1354	C
	MCR_G1_3_R	CAT ACC ATG TAG ATA GAC ACC GTT (서열번호 28)			
MCR G2 Group	MCR_G2_1_F(G)	AAG GGG ATA AGC TGG TTG GCT (서열번호 30)	159	1118	G
	MCR_G2_1_R	TGG TGT TGT CAT AGG TGT TGG TG (서열번호 31)			
	MCR_G2_1_F(T)	AAG GGG ATA AGC TGG TTG TC (서열번호 32)	159	1370	T
	MCR_G2_1_R	TGG TGT TGT CAT AGG TGT TGG TG (서열번호 31)			
	MCR_G2_2_F(C)	ATC ATG GTG AAT CAC TGG GAG CA (서열번호 33)	90	1370	C
	MCR_G2_2_R	GCA TAG GAA CAC GGG TCT G (서열번호 34)			
	MCR_G2_2_F(A)	ATC ATG GTG AAT CAC TGG GAG AA (서열번호 35)	90	1463	A
	MCR_G2_2_R	GCA TAG GAA CAC GGG TCT G (서열번호 34)			
	MCR_G2_3_F	AAG TAC AAC ACC GCG TT (서열번호 36)	166	1463	C
	MCR_G2_3_R(C)	TAT CAA CGC CTT TCT CTT TGG (서열번호 37)			
	MCR_G2_3_F	AAG TAC AAC ACC GCG TT (서열번호 36)	166	1463	T
	MCR_G2_3_R(T)	TAT CAA CGC CTT TCT CTT TGA (서열번호 38)			

표 3

[0037]

Allele	Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)	SNP 위치	SNP
MCR G3 Group	MCR_G3_1_F	GGT TGT AAG GGA ATC TGC A (서열번호 39)	133	1093	T
	MCR_G3_1_R(T)	CAT TAA TTC GGG ATG AGA GTT GAT A (서열번호 40)			
	MCR_G3_1_F	GGT TGT AAG GGA ATC TGC A (서열번호 39)	133		A
	MCR_G3_1_R(A)	CAT TAA TTC GGG ATG AGA GTT GAT T (서열번호 41)			
MCR-5.1	MCR-5.1_F	TGA AAA CAA GCC GCT TCG CTA (서열번호 42)	114	N/A	
	MCR-5.1_R	GCA ACG ACT TCC CTT GCT TCG (서열번호 43)			
MCR-9	MCR-9_F	TCG CAT TTA GAG CAT GTC AAA (서열번호 44)	157		
	MCR-9_R	TCG AAT AAC TGA CCA GTG AG (서열번호 45)			
MCR-10	MCR-10_F	TTC CTG GTA ATT GGC GAA AC (서열번호 46)	158		
	MCR_10_R	AAC ATA CAG GGC ACC GAG AC (서열번호 47)			
QnrA	QnrA_1_F	TCA CGC CAG GAT TTG AGT G (서열번호 48)	151	171	T
	QnrA_1_R(T)	GAT CGG CAT AGC TGA AGT GA (서열번호 49)			
	QnrA_1_F	TCA CGC CAG GAT TTG AGT G (서열번호 48)	151		C
	QnrA_1_R(C)	GAT CGG CAT AGC TGA AGT GG (서열번호 50)			
QnrB_G1 Group	QnrB_G1_F(G)	GCA ACG TTC AGT GGA TCG (서열번호 51)	88	462	G
	QnrB_G1_R	TGG TCA AAT CAC AGT GCG (서열번호 52)			
	QnrB_G1_F(A)	GCA ACG TTC AGT GGA TCA (서열번호 53)	88		A
	QnrB_G1_R	TGG TCA AAT CAC AGT GCG (서열번호 52)			

표 4

[0038]

Allele	Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)	SNP 위치	SNP
--------	--------	------------------	-----------	--------	-----

QnrB_G2 Group	QnrB_G2_1_F(T)	GCA TTG AAA TTC GCC ACT GT (서열번호 54)	137	303	T
	QnrB_G2_1_R	TTT CGA AAA ATT GGC GTA GCT TAG A (서열번호 55)			
	QnrB_G2_1_F(C)	GCA TTG AAA TTC GCC ACT GC (서열번호 56)	137		C
	QnrB_G2_1_R	TTT CGA AAA ATT GGC GTA GCT TAG A (서열번호 55)			
	QnrB_G2_2_F	CAG AAA GGR TGC AAT TTT AGT CG (서열번호 57)	142	315	C
	QnrB_G2_2_R(C)	CGC GRA AAT CTG CGC C (서열번호 58)			
	QnrB_G2_2_F	CAG AAA GGR TGC AAT TTT AGT CG (서열번호 57)	142		T
	QnrB_G2_2_R(T)	CGC GRA AAT CTG CAC C (서열번호 59)			
	QnrB_G2_3_F(C)	ATT TYC GCG GYG CAA GC (서열번호 60)	100	336	C
	QnrB_G2_3_R	TTC GAA AAA TTG GCG TAG CTT AGA (서열번호 61)			
	QnrB_G2_3_F(T)	ATT TYC GCG GYG CAA GT (서열번호 62)	100		T
	QnrB_G2_3_R	TTC GAA AAA TTG GCG TAG CTT AGA (서열번호 61)			
	QnrB_G2_4_F(C)	CGC CAA TTT TTC GAA AGT CGT GC (서열번호 63)	168	427	C
	QnrB_G2_4_R	GAA TTG GTC AGA TCG CAA TGT GTG (서열번호 64)			
	QnrB_G2_4_F(T)	CGC CAA TTT TTC GAA AGT CGT GTT (서열번호 65)	168		T
	QnrB_G2_4_R	GAA TTG GTC AGA TCG CAA TGT GTG (서열번호 64)			
	QnrB_G2_5_F(G)	TGG GAA AAC CGY TGG ATG (서열번호 66)	121	462	G
	QnrB_G2_5_R	TCA GAT CGC AAT GTG TGA AGT (서열번호 67)			
	QnrB_G2_5_F(A)	TGG GAA AAC CGY TGG ATA (서열번호 68)	121		A
	QnrB_G2_5_R	TCA GAT CGC AAT GTG TGA AGT (서열번호 67)			
	QnrB_G2_6_F(C)	TAC TGG GYG CGA CGT TC (서열번호 69)	100	489	C
	QnrB_G2_6_R	GAA TTG GTC AGA TCG CAA TGT GTG (서열번호 70)			
	QnrB_G2_6_F(T)	TAC TGG GYG CGA CGT TT (서열번호 71)	100		T
	QnrB_G2_6_R	GAA TTG GTC AGA TCG CAA TGT GTG (서열번호 70)			
	QnrB_G2_7_F	CGA CGT TYA GTG GTT CAG AT (서열번호 72)	83	543	A
	QnrB_G2_7_R(A)	CAG ATC GCA ATG TGT GAA GTT T (서열번호 73)			
	QnrB_G2_7_F	CGA CGT TYA GTG GTT CAG AT (서열번호 72)	83		G
	QnrB_G2_7_R(G)	CAG ATC GCA ATG TGT GAA GTT C (서열번호 74)			
	QnrB_G2_8_F	YGG CGA GTT TWC GAC T (서열번호 75)	89	579	A
	QnrB_G2_8_R(A)	CCC GAA TAT CTA AGT CAC CT (서열번호 76)			
	QnrB_G2_8_F	YGG CGA GTT TWC GAC T (서열번호 75)	89		G
	QnrB_G2_8_R(G)	CCC GAA TAT CTA AGT CAC CC (서열번호 77)			
	QnrB_G2_9_F	CTT CAC ACA TTG CGA TCT GAC (서열번호 78)	101	629	G
	QnrB_G2_9_R(G)	GCA ACG AYG CCT GGT AGC (서열번호 79)			
	QnrB_G2_9_F	CTT CAC ACA TTG CGA TCT GAC (서열번호 78)	101		A
	QnrB_G2_9_R(A)	GCA ACG AYG CCT GGT AGT (서열번호 80)			

표 5

[0039]

Allele	Primer	Sequence (5'-3')	Size (bp)	SNP 위치	SNP
QnrS Group	QnrS_1_F	CGA CGT GCT AAC TTG CGT (서열번호 81)	100	182	T
	QnrS_1_R(T)	CAT CRC GAA GRT CTG CGA (서열번호 82)			
	QnrS_1_F	CGA CGT GCT AAC TTG CGT (서열번호 81)	100		C
	QnrS_1_R(C)	CAT CRC GAA GRT CTG CGG (서열번호 83)			
	QnrS_2_F	ATG CAA GTT TCC AAC AAT GCC A (서열번호 84)	122	299	C
	QnrS_2_R(C)	ATK GGC AAA GTT TGY TCG GGA (서열번호 85)			
	QnrS_2_F	ATG CAA GTT TCC AAC AAT GCC A (서열번호 84)			122
	QnrS_2_R(T)	ATK GGC AAA GTT TGY TCG GAA (서열번호 86)			
	QnrS_3_F(A)	TTG AAA ATC GCT GGA TAG GA (서열번호 87)	144	438	A
	QnrS_3_R	CTA AAC CGT CGA GTT CG (서열번호 88)			
	QnrS_3_F(G)	TTG AAA ATC GCT GGA TAG GG (서열번호 89)	144		G
	QnrS_3_R	CTA AAC CGT CGA GTT CG (서열번호 88)			

QnrD1	QnrD1_F	CGT TTG ATT GGT CTT TGG CTG A (서열번호 90)	115	N/A
	QnrD1_R	GCC TGC TCT CCA TCC AAC TT (서열번호 91)		
QnrVC4	QnrVC4_F	AGA TGG ATT GGC GCA AAT CTG A (서열번호 92)	99	
	QnrVC4_R	TTG CAA CCT ACA CTG GCT (서열번호 93)		
QnrE1	QnrE1_F	TGA AGG CGA AAA AAT AGG TCG (서열번호 94)	164	
	QnrE1_R	GCG CCC GAT TAA AGT TAC C (서열번호 95)		

[0040] 58개의 콜리스틴(MCR), 퀴놀론 및 플로로퀴놀론(Qnr) 타겟 내성 유전자 각각의 검출 SNP 패턴은 표 6에 나타냈다.

표 6

[0041]

Allele	gene	SNP position	Detection SNP pattern
MCR 검출 프라이머	MCR-1 Group	-	Individually detection
	MCR-2 Group		Individually detection
	MCR-3 Group		Individually detection
	MCR-4 Group		Individually detection
	MCR-5 Group		Individually detection
	MCR-6 Group		Individually detection
	MCR-7 Group		Individually detection
	MCR-8 Group		Individually detection
	MCR-9 Group		Individually detection
	MCR-10 Group		Individually detection
MCR_G1 Group	MCR-1.7	643, 1238, 1354	ATC
	MCR-1.5		GTT
	MCR-1.9		GCC
	MCR-1		GTC
MCR_G2 Group	MCR-3.5	1118, 1370, 1463	GAT
	MCR-3.4		TCC
	MCR-3.2		GCT
	MCR-3		GCC
MCR_G3 Group	MCR-8.2	1093	T
	MCR-8		A
QnrS	QnrS4	182, 299, 438	CCA
	QnrS9		TTA
	QnrS1		TCA
	QnrS2		TCG
QnrA	QnrA1	171	T
	QnrA6		C
QnrB_G1 Group	QnrB69	462	G
	QnrB4		A
QnrB_G2 Group	QnrB1	303, 315, 336, 427, 462, 489, 543, 579, 629	CCCTACAGA
	QnrB10		TCCTGCAAA
	QnrB13		TCCTGCAGA
	QnrB17		CCCTGCGGA
	QnrB19		CCCTGCAAG
	QnrB2		TCTTGCAGA
	QnrB44		CTCCGCAGA
	QnrB45		TCCCGCAGA
	QnrB6		CCCTGCAGA
	QnrB72		CCCTGTAAA
	QnrB9		CCCCGCAGA
MCR individual	MCR-5.1	-	Individually detection
	MCR-9		Individually detection
	MCR-10		Individually detection

Qnr individual	QnrD1	-	Individually detection
	QnrE1		Individually detection
	QnrVC4		Individually detection

[0042] Real-Time PCR을 위한 반응 조건은 표 7에 나타냈으며, PCR 반응조건은 QuantStudio™3 (Applied Biosystems, USA) 및 THUNDERBIRD®SYBR®qPCR Mix (Toyobo, Japan)를 기준으로 확립되었다.

표 7

구분	온도	시간	반복수
초기변성 (Initial-denaturation)	95℃	10분	1
변성 (denaturation)	95℃	15초	40
결합 (annealing)	55℃	30초	
신장 (extension)	72℃	5초	
후변성 (Post-denaturation)	95℃	15초	1
최종신장 (elongation)	60℃	1분	1
해리곡선 (Dissociation curve)	60℃~95℃	+0.5℃/1초	-

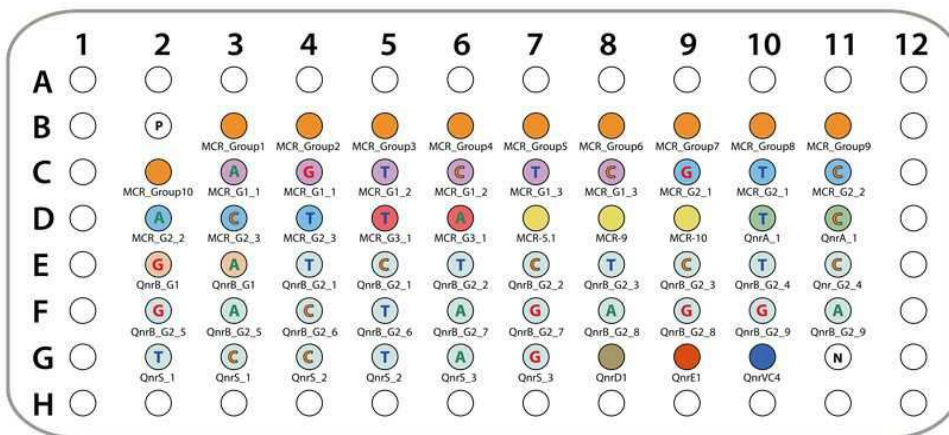
[0044] 디자인된 프라이머를 이용하여 민감도, 특이성 시험을 수행하였다. 특이성 실험에 사용된 주형 DNA는 Genomic DNA와 Plasmid DNA를 동시 추출한 DNA를 주형 DNA로 사용하였고, 특이성 실험에 사용된 주형 DNA의 농도는 100ng로 RT-PCR을 수행하였다(도 2). 민감도 테스트에 사용된 주형 DNA의 농도는 10ng부터 시작하여 1/10씩 4-6 회 희석한 상태에서 RT-PCR 실험을 수행하였다(도 3).

[0045] 사용되는 주형 DNA는 단일 집락 5-10mg을 loop를 이용하여 추출한 후, 열 처리, 원심 분리의 단계를 거쳐 상층 액을 이용해 주형 DNA로써 사용하였다.

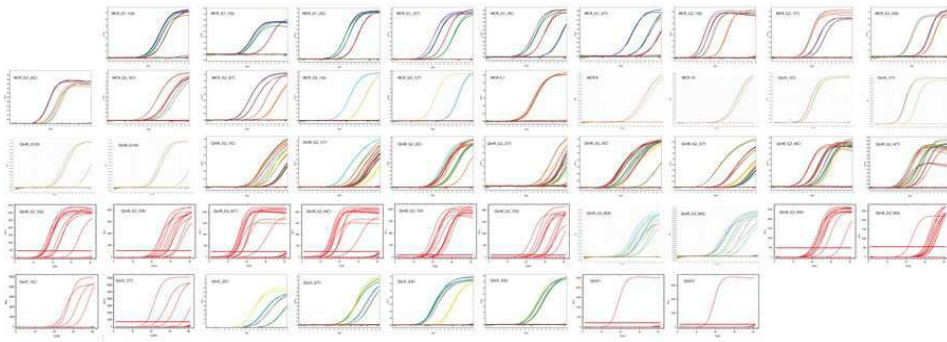
도면

도면1

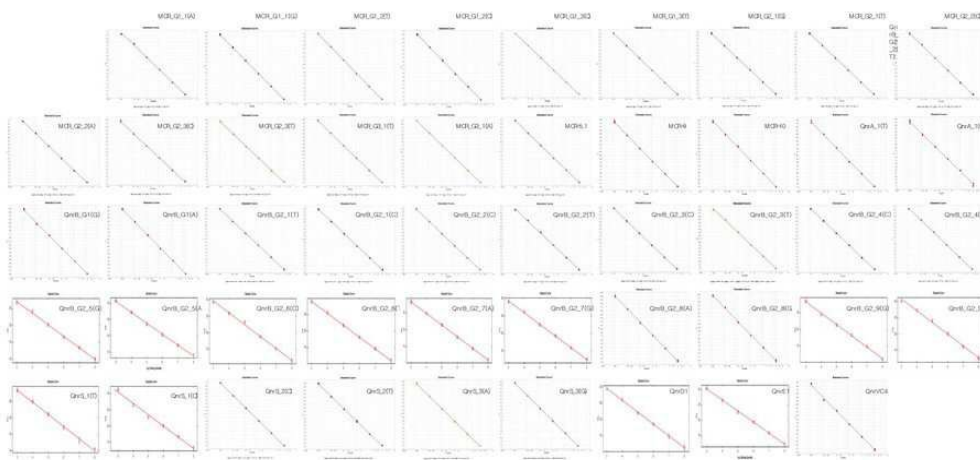
Plate Information



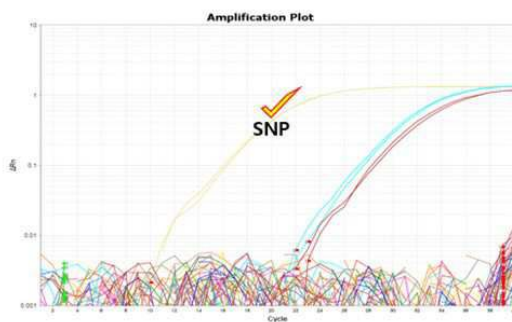
도면2



도면3



도면4



SNP pattern

MCR-G3		1093	SNP pattern
	MCR-8.2	T	T
	MCR-8	A	A

조합을 통하여 개별 유전자 추론.
(SNP pattern 구분표를 참조)

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.