



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월08일
(11) 등록번호 10-1997759
(24) 등록일자 2019년07월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6895 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6895 (2018.05)

C12Q 2527/101 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0015316

(22) 출원일자 2018년02월07일

심사청구일자 2018년02월07일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020060124351 A*

Elide A. Pastorello et al., J. Allergy. Clin. Immunol., 114(4), p.908-914, 2004.*

GenBank accession No. EU159429.1 (2009.10.07.)*

GenBank accession No. EU780670.1 (2009.06.01.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김해영

경기도 용인시 수지구 동천로135번길 21, 1307동 901호

박셋별

경기도 광주시 오포읍 오포로 171번길 17-42, 큐브엔파크 2호

서승만

경기도 안산시 상록구 예술대로6길 10

(74) 대리인

특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 6 항

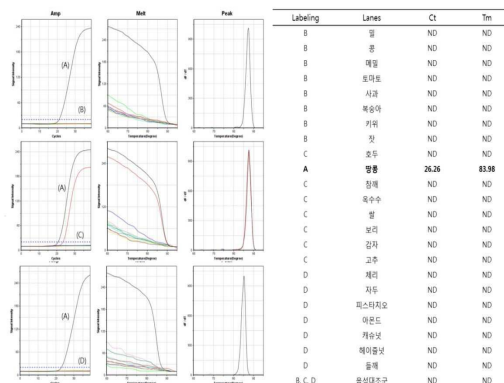
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 알레르기 유발 결과류를 신속 검출할 수 있는 프라이머 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 *Lipid transfer protein* 유전자에 결합하는 프라이머 세트 또는 *Vicilin* 유전자에 결합하는 프라이머 세트를 포함하는 알레르기 유발 결과류 검출용 프라이머 세트가 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2531/113 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

Lipid transfer protein 유전자에 결합하는 서열번호 1의 프라이머 및 서열번호 2의 프라이머로 구성된 프라이머 세트; 및

Vicilin 유전자에 결합하는 서열번호 3의 프라이머 및 서열번호 4의 프라이머로 구성된 프라이머 세트를 포함하는,

땅콩 및 호두 검출용 프라이머 세트.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항의 프라이머 세트를 이용하여 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하는 단계;를 포함하는 땅콩 및 호두 검출방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 중합효소 연쇄반응에서 어닐링(annealing) 온도가 57℃ 내지 59℃인 땅콩 및 호두 검출방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 중합효소 연쇄반응에서 어닐링(annealing) 시간이 4초 내지 6 초인 땅콩 및 호두 검출방법.

청구항 8

제1항의 프라이머 세트, 및 PCR 반응 혼합물을 포함하는 땅콩 및 호두 검출키트.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 PCR 반응 혼합물은 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 포함하는 땅콩 및 호두 검출키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알레르기 유발 식품을 신속 검출할 수 있는 PCR 프라이머, 및 이를 이용한 알레르기 유발 식품 검출 방법 및 검출키트에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 알레르기(Allergy)는 생물체가 어떤 외래성 물질과 접하게 되면 항원항체반응에 의하여 생체 내에 급격한 반응 능력의 변화를 말한다. 생체는 이동물질에 대해서는 그 항원에 특이적으로 반응하는 항체와 림프구를 생산하고 재차 항원과 접하면 여러 가지 면역반응을 일으킨다.
- [0003] 면역반응은 생체의 자기 보존을 위한 중요한 방어 메커니즘의 하나인데, 보통 생체에 대해 보호적으로 작용하지만 때로는 이 메커니즘이 생체에 불리하게 작용하여 장애를 일으키는 경우 알레르기라 한다.
- [0004] 알레르기 반응을 유발하는 항원은 알레르겐(allergen)이라고 하며, 전형적인 알레르겐은 꽃가루, 약물, 식물성 섬유, 세균, 음식물, 염색약, 화학물질 등이 있다. 알레르겐이 식품인 경우를 식품 알레르기라고 한다.
- [0005] 식품 알레르기(food allergy)는 정상인에게는 무해한 식품을 특정인이 섭취하였을 시 그 식품의 특정 알레르겐(allergen)으로 인체의 과도한 면역반응이 일어나는 것을 말한다. 식품 알레르기의 형태는 호흡기, 소화기 피부에 두드러기, 아나필락시스, 가려움 형태로 나타나며, 식품 섭취 후 수분에서 1~2시간 이내에 발생한다.
- [0006] 식품 알레르기를 가진 사람은 소수이지만, 이들은 알레르기 원인 식품으로 인해 심한 경우 목숨까지 위협받을 수 있다. 따라서 식품 안전성 측면에 있어서, 알레르기를 유발하는 식품을 분석하는 것이 매우 중요한 사안으로 부각되고 있다.
- [0007] 식품 알레르기를 가진 사람은 소수이지만, 이들은 알레르기 원인 식품으로 인해 심한 경우 목숨까지 위협받을 수 있다. 전 세계 1억 5천만명(미국인 중 6~7백만 명, 개발도상국 인구의 2.5%, 우리 나라에서는 5~8% 정도)이 식품 알레르기로 고생하고 있다. 따라서 식품 안전성 측면에 있어서, 알레르기를 유발하는 식품을 분석하는 것이 매우 중요한 사안으로 부각되고 있다.
- [0008] 식품 알레르기에 대한 예방 및 치료방법은 특별히 없으며, 이를 예방하는 유일한 방법은 식품에 알레르기 유발 식품에 대한 정확한 표시제도와, 감수성이 있는 소비자들이 해당 식품을 섭취하지 않는 것이다. 이는 식품 자체 뿐만 아니라 이를 원료로 하여 제조, 가공된 가공식품의 경우에도 동일하게 적용되어야 한다.
- [0009] 식품의약품안전청은 계란(가금류), 우유, 메밀, 땅콩, 콩, 밀, 고등어, 게, 새우, 돼지 고기, 복숭아, 토마토, 아황산, 호두, 닭고기, 쇠고기, 오징어, 조개류(굴, 전복, 홍합 포함) 등 21가지에 대한 식품 알레르기 표시 제도를 시행하고 있다. 식품 알레르기 표시 제도는 가공 식품뿐만 아니라 학교 급식 및 패스트 푸드까지 확대되었다.
- [0010] 그러나 드물지 않게 한 가지 이상의 식품에 알레르기 반응이 나타나는 경우가 있으며, 알레르기 비염 등 호흡기 알레르기와 식품 알레르기가 동반되는 경우가 흔하게 보고되고 있다. 이는 원재료 식품들이 서로 분류학적으로 인접하거나, 알레르겐의 분자구조가 유사할 경우 동일한 알레르기 반응이 발생할 수 있으며, 이를 교차반응이라 한다.
- [0011] 교차반응의 예는 꽃가루 관련 식품 알레르기가 있다. 꽃가루 알레르기 환자들이 최소한 한 가지 이상의 식품에 알레르기 반응을 보이는 것이다.
- [0012] 대표적인 예로 자작나무 꽃가루(*Birch pollen*) 관련 알레르기 반응이 있다면, 배, 사과, 멜론, 키위 등의 과일류, 땅콩, 헤이즐넛 등의 견과류 그리고, 옥수수, 상추 등의 채소류 중에서 한 가지 이상의 식품에서 알레르기 반응을 보일 수 있다.
- [0013] 이와 같은 교차반응은 알레르기를 유발하는 특정 알레르겐이 동일하기 때문이다. 따라서 알레르기 유발 식품을 표기하기 위해서 교차반응을 예측할 수 있는 특정 식품 원료의 알레르겐을 검출하는 것이 필요하다.
- [0014] 식품 속에 특정 식품 원료의 알레르겐을 검출하기 위해서, 알레르기 유발 식품의 존재 여부를 검사하는 방법이 필요하다. 알레르기 유발 식품의 존재 여부를 검사하는 방법은 알레르겐을 직접 검출하는 ELISA나 EIA법이 대부분이다.
- [0015] 그러나 검사 대상이 되는 단백질인 알레르겐은 다양한 원료가 혼합되는 여러 단계의 가공 과정에서 쉽게 소실될 수 있기 때문에, 검사의 정확도가 낮고 검출 시간이 오래 걸리는 문제가 있다. 알레르겐은 아주 소량의 존재만으로 치명적인 반응을 일으키기 때문에, 민감도가 높은 알레르기 유발 식품 검출 방법이 필요하다.
- [0016] 한편, DNA는 단백질보다 열에 안정적이기 때문에, 식품 속 DNA를 분석하면 소량으로 존재하는 미생물 또는 원료를 효과적으로 검출할 수 있다.
- [0017] 특히 중합효소연쇄반응(PCR)을 이용하면, 프라이머 세트가 DNA 서열의 일부를 증폭하기 때문에 소량으로 존재하

는 표적 물질을 백만배 이상으로 증폭할 수 있다. 따라서 여러 과정을 거치는 가공 식품의 경우 단백질 보다 PCR를 이용해 DNA를 분석하면 효과적으로 알레르기 유발 원료를 검출 할 수 있다.

[0018] 따라서 다양한 특정 알레르겐을 정확하게 분석할 수 있는 알레르기 유발 식품을 검출하는 방법의 개발 필요성이 꾸준히 대두되고 있는 상황에서, 본 발명자들은 특정 프라이머 세트를 이용하여 민감도 및 정확도가 개선된 알레르기 유발 식품 검출방법을 개발하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 본 발명의 목적은 특정 알레르기를 유발하는 땅콩 또는 호두를 검출할 수 있는 프라이머를 제공하는 것이다.

[0020] 또한, 본 발명의 목적은 알레르기 유발 식품 검출용 프라이머를 이용한 실시간 PCR 방법으로, 식품 및 가공 식품 내 알레르기 유발 건과류의 함유 유무를 검출할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명의 일 측면에 따르면, *Vicilin* 유전자에 결합하는 프라이머 세트 또는 *Lipid transfer protein* 유전자에 결합하는 프라이머 세트를 포함하는 알레르기 유발 건과류 검출용 프라이머 세트가 제공된다.

[0022] 일 실시예에 있어서, 상기 *Vicilin* 유전자에 결합하는 프라이머 세트는 서열번호 1의 프라이머 및 서열번호 2의 프라이머로 구성될 수 있다.

[0023] 일 실시예에 있어서, 상기 *Lipid transfer protein* 유전자에 결합하는 프라이머 세트는 서열번호 3의 프라이머 및 서열번호 4의 프라이머로 구성될 수 있다.

[0024] 일 실시예에 있어서, 상기 알레르기 유발 건과류는 땅콩 또는 호두이다.

[0025] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 프라이머 세트를 이용하여 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하는 단계;를 포함하는 알레르기 유발 건과류 검출방법이 제공된다.

[0026] 일 실시예에 있어서, 상기 중합효소 연쇄반응에서 어닐링(annealing) 온도가 57℃ 내지 59℃이다.

[0027] 일 실시예에 있어서, 상기 중합효소 연쇄반응에서 어닐링(annealing) 시간이 4초 내지 6 초이다.

[0028] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 프라이머 세트, 및 PCR 반응 혼합물을 포함하는 알레르기 유발 건과류 검출키트가 제공된다.

[0029] 일 실시예에 있어서, 상기 PCR 반응 혼합물은 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0030] 본 발명의 프라이머 세트는 알레르기를 유발하는 건과류인 땅콩 또는 호두를 PCR로 신속, 정확하게 판별할 수 있다.

[0031] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머 세트 1의 특이성을 확인하기 위해, 증폭 곡선(Amplification curve)과 용해 곡선(Melting curve)을 분석한 결과이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머 세트 2의 특이성을 확인하기 위해, 증폭 곡선(Amplification curve)과 용해 곡선(Melting curve)을 분석한 결과이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머 세트1 및 2의 민감도를 확인하기 위해, 양성 플라스미드의 copies 수에 따른 증폭 곡선(Amplification curve)과 용해 곡선(Melting curve)을 분석한 결과이다. (a)는 서열목록 1 및 2로 구성된 프라이머 세트 1이고, (b)는 서열목록 3 및 4로 구성된 프라이머 세트 2이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0035] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고저서에 기술되어 있다.
- [0036] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.
- [0037] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 또한, 달리 지시된 바가 없으면, 핵산은 각각 왼쪽에서 오른쪽, 5'에서 3' 방향으로 적혀지고, 아미노산 서열은 왼쪽에서 오른쪽, 아미노에서 카복실 방향으로 적혀진다. 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0039] 본 발명의 일 측면에 따르면, *Lipid transfer protein* 유전자에 결합하는 프라이머 세트 또는 *Vicilin* 유전자에 결합하는 프라이머 세트를 포함하는 알레르기 유발 견과류 검출용 프라이머 세트가 제공 된다.
- [0040] 상기 프라이머 세트의 설계는 A, G, C, T 함량비, 프라이머 결합체(dimer) 형성 방지, 같은 염기서열의 3 회 이상 반복금지 등 여러 가지 제약이 따른다. 그 외에 단독 PCR 반응조건에 있어서 주형(template) DNA의 양, 프라이머의 농도, dNTP의 농도, Mg^{2+} 의 농도, 반응온도, 반응시간 등의 조건이 적정해야 한다.
- [0041] 상기 프라이머(primer)는 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 포함하는 짧은 핵산 서열로 상보적인 핵산의 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 핵산 주형의 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능할 수 있다.
- [0042] 상기 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있으며, 표적 미생물에 존재하는 핵산과 혼성화되어 상기 표적 미생물의 특정 유전자를 증폭하는데 사용될 수 있다.
- [0043] 상기 프라이머는 증폭의 효율을 고려하여 바람직하게는 단일쇄일 수 있으며, 디옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotide)일 수 있다.
- [0044] 상기 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0045] 상기 프라이머는 골격 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 펩타이드 핵산(PNA)(M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 핵소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에티릴-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-테아자퓨린(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.
- [0046] 상기 혼성화는 2개의 단일 가닥 핵산이 상보적인 염기 서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다.
- [0047] 상기 혼성화는 단일 가닥 핵산 서열 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하는 경우에도 일어날 수 있다. 상기 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 반응 조

건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 제어될 수 있다.

- [0048] 일반적으로, 상기 혼성화 온도가 높으면 완전한 매치일 경우 혼성화가 일어날 가능성이 높으며, 혼성화 온도가 낮으면 일부 미스매치가 존재하더라도 혼성화가 일어날 수 있다.
- [0049] 상기 프라이머 세트는 표적 원료에 존재하는 특정 유전자에 혼성화될 수 있으며, 시료 내에 목적하는 원료가 존재하는 경우 중합효소 연쇄반응에 의해 상기 특징적인 유전자의 염기서열이 증폭되므로 상기 증폭된 산물 (amplicon)을 통해 상기 원료의 존재를 판단할 수 있다.
- [0050] 상기 프라이머는 기본 성질을 변화시키지 않은 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 즉 핵산 서열이 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형될 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 뉴클레오타이드의 하나 이상의 동족체로의 치환 및 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트 또는 카바메이트 등의 하전되지 않은 연결체나 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등의 하전된 연결체로의 뉴클레오타이드의 변형이 가능하다. 또한 핵산은 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그널 펩타이드, 폴리 L 리신 등의 단백질, 아크리딘 또는 프소랄렌 등의 삽입제, 금속, 방사성 금속, 철 산화성 금속 등의 킬레이트화제 및 알킬화제 등의 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기를 가질 수 있다.
- [0051] 또한 상기 프라이머 서열은 검출 가능한 시그널을 직접적 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 상기 프라이머는 분광학, 광화학, 생화학, 면역화학 또는 화학적 수단을 이용하여 검출될 수 있는 표지를 포함할 수 있다. 유용한 표지는 ^{32}P , 형광 염료, 전자 밀집 시약, 효소(일반적으로 ELISA 에 이용되는 것), 바이오틴 또는 합텐 및 항혈청 또는 단일클론성 항체가 이용가능한 단백질을 포함한다.
- [0052] 상기 프라이머들은 적절한 서열의 클로닝 및 제한효소 분해 및 나랭(Narang)등의 포스포트리에스테르 방법(1979, Meth, Enzymol. 68:90-99), 보카지(Beaucage)등의 디에틸포스포라미다이트 방법(1981, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862), 및 미국 특허 제 4458066호의 고형물 지지 방법과 같은 직접적인 화학적 합성법을 포함하는 임의의 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.
- [0053] 상기 중합효소 연쇄반응은 당업계에 공지된 통상의 PCR 기기를 사용하여 일반적인 반응 조건에 따라 수행되거나, 또는 일부 변형되어 수행될 수 있다.
- [0054] 상기 *Vicilin* 유전자에 결합하는 프라이머 세트는 서열번호 1의 프라이머 및 서열번호 2의 프라이머로 구성될 수 있다.
- [0055] 상기 *Lipid transfer protein* 유전자에 결합하는 프라이머 세트는 서열번호 3의 프라이머 및 서열번호 4의 프라이머로 구성될 수 있다.
- [0056] 상기 프라이머 세트는 알레르기를 유발하는 견과류인 땅콩 또는 호두를 검출할 수 있다.
- [0057] 상기 *Vicilin* 유전자 및 상기 *Lipid transfer protein* 유전자는 땅콩 및 호두에 포함된 알레르기를 유발하는 단백질을 암호화 하는 유전자이다.
- [0058] 서열번호 1 및 2로 구성된 프라이머 세트 1은 상기 *Vicilin* 유전자에 특이적으로 결합할 수 있다. 프라이머 세트 1로 식품 내의 *Vicilin* 유전자를 포함하는 땅콩의 유무를 판단할 수 있다.
- [0059] 서열번호 3 및 4로 구성된 프라이머 세트 2는 상기 *Lipid transfer protein* 유전자에 특이적으로 결합할 수 있다. 프라이머 세트 2로 식품 내의 *Lipid transfer protein* 유전자를 포함하는 호두의 유무를 판단할 수 있다.
- [0060] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 프라이머 세트를 이용하여 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하는 단계;를 포함하는 알레르기 유발 식품 검출방법이 제공된다.
- [0061] 상기 프라이머 세트는 중합효소 연쇄반응을 통해 표적 원료를 효과적으로 검출할 수 있다.
- [0062] 상기 “중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)”은 중합효소를 사용하여 핵산을 연쇄적으로 합성하여 개시 핵산물질을 기하급수적으로 증폭하는 방법으로 당업계에 널리 공지된 방법으로, 특정 핵산의 존재 유무를 확인하는 정성분석 PCR, 특정핵산의 양을 측정하는 정량 PCR 및 PCR 과정을 실시간으로 추적하여 정성 및 정량 분석을 가능하게 하는 실시간 PCR을 모두 포함하는 개념이다. 상기 중합효소 연쇄반응은 당업계에 공지된 통상의 PCR 기기를 사용하여 일반적인 PCR 반응 조건에 따라 수행될 수 있거나 또는 일부 변형하여 실시할 수 있다.
- [0063] 상기 검출방법은 상기 프라이머 세트를 이용하여 각 특정 DNA를 증폭시킨 후, 특정 DNA의 증폭 반응을 확인하는

단계를 통해 수행될 수 있으며, 상기 특정 DNA의 증폭여부를 확인하는 단계는 PCR 반응산물이 전기영동 등을 통하여 예상되는 DNA 산물의 크기와 일치하는지를 확인함으로써 수행될 수 있다.

- [0064] 상기 "증폭 반응"은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응이 당업계에 널리 보고되어 있으며, 중합효소 연쇄반응(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA)(WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication)(WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오타이드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CPPCR)(미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; APPCR)(미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification; NASBA)(미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호, 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop mediated isothermal amplification; LAMP)를 포함하나, 바람직하게는 실시간(real-time) 중합효소 연쇄반응을 통해 수행할 수 있다.
- [0065] 상기 실시간 중합효소 연쇄반응은 지수적인 증폭이 일어나는 초기 시료의 양을 형광물질의 지수적 증가가 탐지되기 시작하는 사이클의 수(Cycle threshold)로 나타내므로 더욱 정확한 정량분석이 가능하며 증폭 반응을 실시간으로 분석할 수 있다.
- [0066] 상기 정량분석은 절대 정량(absolute quantification) 분석과 상대 정량(relative quantification) 분석으로 구분된다. 시료 내의 표적 DNA를 정량하기 위해서는 표준 시료의 검량선(표준곡선; standard curve) 작성이 필수적인 요소이다. 표준시료와 미지시료를 대상으로 동시에 정량적 Real-time PCR을 실시하여 표준시료로부터 검량선을 도출한 후, 이 검량선으로부터 미지 시료 내 표적 DNA의 양을 정량한다. 이때 표준 시료로부터의 검량선(x축: 표준시료의 농도, y축: 역치 주기 수(Ct; threshold cycle))은 상관지수(R^2)가 1에 가까울수록 이상적이다.
- [0067] 상기 "정량"은 증폭반응 개시 시의 주형 DNA 양을 정량하기 위한, PCR을 이용한 일련의 반응을 의미한다. 정량적 PCR에는 기준이 되는 표준시료를 사용하는 내부 표준법과 증폭반응에 있어서 경쟁하는 분자를 사용하는 경쟁법이 포함된다. 또한, 각 서열의 분자 수를 정확하게 간편하게 결정하기 위해서 표준시료라고 불리는 기준이 되는 주형 DNA 서열을 이용한 PCR 방법을 사용하고, 반응 중 임의의 시점에서 반응의 진행상황, 즉 증폭의 정도를 확인한다.
- [0068] 상기 실시간 중합효소 연쇄반응은 전기영동하여 영상분석기로 강도를 측정하는 단계가 생략되고 형광 광도계 등과 같은 광학 시스템(optical system) 모듈로서 증폭 산물의 증폭 정도를 자동화, 수치화시켜 증폭 곡선(Amplification curve)을 그리며, 신속하고 정확하게 핵산 증폭 산물을 분석할 수 있다.
- [0069] 상기 실시간 중합효소 연쇄반응의 증폭 산물은 용해(melting)시켜 용해 곡선(Melting curve)을 그릴 수 있다. 상기 "용해"는 이중 가닥의 DNA를 단일 가닥의 DNA로 해리시키는 것을 말한다. 용해는 이중 가닥의 DNA를 포함하는 시료를 가온하여 수행될 수 있다. 용해는 예를 들면 50℃ 내지 95℃ 에서 수행될 수 있다.
- [0070] 상기 용해 곡선을 얻는 단계는 형광 염료를 사용하여 수행할 수 있다. 상기 형광 염료는 예를 들면 SYBR Green[®], SYTO[®] 9, EvaGreen[®], LC Green, LC Green Plus, ResoLight, 또는 이들의 조합일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0071] 또한, 증폭 산물은 용해(melting)시켜 증폭 산물의 용해 온도(melting point; T_m)를 구할 수 있다. 상기 용해 온도는 이중 나선 DNA 중 절반이 각각의 가닥으로 분리되는 온도, 즉 50%의 변성이 일어난 상태의 온도를 말한다. 상기 용해 온도는 핵산의 DNA 종류, 폴리뉴클레오타이드 서열, GC 함량, 폴리뉴클레오타이드의 길이, 뉴클레오타이드 변이의 존재 등에 따라 달라질 수 있다.
- [0072] 상기 검출방법에 사용되는 주형 DNA의 시료는 알레르기 유발 식품이 발견될 수 있는 모든 물질, 바람직하게는 다양한 식품 원료를 혼합한 가공 식품에서 수득할 수 있다.
- [0073] 상기 주형 DNA는 당업계에서 통상적으로 사용되는 DNA 추출방법을 통해 수득할 수 있으며, 예컨대 알카라인 추

출법, 열수추출법, 컬럼 추출법 및 페놀/클로로포름 추출법 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0074] 상기 검출방법은 10^2 내지 10^5 copies의 타겟 DNA를 검출할 수 있다.

[0075] 본 발명자들은 표적 유전자 검출을 위한 프라이머 서열을 최적화하였으며, 상기 프라이머 세트는 민감도가 높아 매우 낮은 수준의 타겟 DNA 예컨대, 10^2 copies의 타겟 DNA도 효과적으로 증폭할 수 있다. 이 때, 최소 검출 농도는 40사이클(cycles) 이전에 검출 가능한지 여부로 판단하였다.

[0076] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 프라이머 세트, 및 PCR 반응 혼합물을 포함하는 알레르기 유발 전과류 검출키트가 제공된다.

[0077] 상기 PCR 반응 혼합물은 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 포함할 수 있으며, 이 기술분야의 통상의 기술자가 PCR 반응에 이용할 수 있는 시약을 모두 포함할 수 있다.

[0078] 이하, 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예에 관하여 상세히 서술하나, 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0079] 실시예 1 : 프라이머 설계

[0080] 알레르겐 유발 식품을 검출하기 위해, 프라이머 디자이너 프로그램(Version 3.0; Scientific and Educational Software, USA)을 사용하여 *Vicilin* 유전자 또는 *Lipid transfer protein* 유전자에 특이적인 프라이머를 디자인하였다.

[0081] *Vicilin* 유전자 및 *Lipid transfer protein* 유전자는 미국립보건원 산하 NCBI에서 운영하는 유전자 은행(www.ncbi.nlm.nih.gov)에 등록되어 있는 Genebank 염기서열을 참고하였다.

[0082] BLAST(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 분석을 통해 유사한 서열을 수집하고, T_m 값과 G+C 함량을 고려하여 특정 프라이머를 디자인하였다(표 1).

표 1

구분	서열번호	프라이머 명	유전자 명	크기 (bp)	Genbank No.	검출
세트 1	1	Ara h 9-F	<i>Vicilin</i>	128	EU159429	땅콩
	2	Ara h 9-R				
세트 2	3	W-F	<i>Lipid transfer protein</i>	142	EU780670	호두
	4	W-R				

[0084] *Vicilin*(Genbank accession No. EU159429)는 땅콩 알레르겐(*Vicilin*)을 암호화한다. *Vicilin*의 존재 유무는 식품에 첨가된 땅콩 알레르겐을 검출 할 수 있다.

[0085] 프라이머 세트 1은 프라이머 Ara h 9-F/R로 구성되며, 증폭된 증폭 산물의 크기는 128 bp이다.

[0086] *Lipid transfer protein*(Genbank accession No. EU780670)는 호두 알레르겐(*Lipid transfer protein*)을 암호화한다. *Lipid transfer protein*의 존재 유무는 식품에 첨가된 호두 알레르겐을 검출 할 수 있다.

[0087] 프라이머 세트 2는 프라이머 W-F/R로 구성되며, 증폭된 증폭 산물의 크기는 142 bp이다.

[0088] 실시예 2 : 시료 준비

[0089] 상기 프라이머 세트 1 및 2의 성능을 평가하기 위해서, 밀, 콩, 메밀, 토마토, 사과, 복숭아, 키위, 잣, 호두, 땅콩, 참깨, 옥수수, 쌀, 보리, 감자, 고추, 체리, 자두, 피스타치오, 아몬드, 캐슈넛, 헤이즐넛 및 들깨를 포함하는 전국 23 종의 식품을 선정하였다.

[0090] 각 시료는 국내 시장에서 입수하였고, 액체 질소를 사용하여 균질화 한 후, -20℃에서 보관하였다.

[0091] DNA 추출에는 시료 1g을 사용하였다. 밀, 콩, 메밀, 쌀 및 보리의 시료는 제조사의 지시에 따라 DNeasy Plant Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)로 DNA를 추출하였다. CTAB 방법으로 토마토, 복숭아, 키위, 사과, 체리 및 자두 샘플에서 DNA를 추출하였다.

[0092] 나머지 샘플은 변형된 Qiagen 키트를 사용하였다. Qiagen Kit 방법을 변형하여 500 ml의 클로로포름을 첨가하고

13,000 rpm으로 15 분간 원심 분리하였다. 원심 분리된 상등액을 DNeasy Mini Spin Column에 로딩했다.

DNA 농도 및 순도는 UV / VIS Spectrophotometer (Mecasys, Korea)로 측정 하였다.

실시예 3 : Ultra-fast PCR

상기 실시예 1에서 디자인한 프라이머 세트들의 특이성 및 민감도를 확인하기 위해, Ultra-fast PCR을 실시하였다.

PCR 조성은 5 μ L의 2X Ssofast™ Evagreen® supermix, 1 μ M의 forward primer, 1 μ M의 reverse prime 및 50 ng template DNA을 혼합하였다(표 2).

표 2

시약	최종 농도	부피
샘플 DNA	50 ng	1 μ L
증류수	-	10 μ L 까지
2X Ssofast™ Evagreen® supermix	1X	5 μ L
Forward Primer	1 μ M	1 μ L
Reverse Primer	1 μ M	1 μ L

Ultra-fast PCR 과정은 표 2의 조성으로 구성된 각각의 프라이머 세트를 혼합한 PCR 조성물을 이용하여 94℃ 1 분; (94℃ 5초, 60℃ 5초, 72℃ 5초) 40회 cycle로 증폭하였다(표 3).

표 3

온도	시간	Cycle 수
94 ℃	1분	1
94 ℃	5초	40
58 ℃	5초	
72 ℃	5초	

Real-time PCR 을 진행하면서, PCR 기계의 프로그램에 따라 증폭 곡선(Amplification curve)을 분석하였다.

Real-time PCR 반응이 종료된 후, 반응 산물을 가열하며 형광을 측정하여 용해 곡선(Melting curve)를 분석하였다.

실시예 4 : 양성 플라스미드 제조

상기 실시예 1에서 디자인된 프라이머 세트 1 및 2의 민감도를 측정하기 위해, 각 세트 1 및 2의 DNA positive control(Plasmid DNA)을 제작하였다.

플라스미드 DNA positive control은 각 타겟의 증폭서열을 포함하고, 각각의 프라이머 세트 1 및 2로 증폭되는 증폭 산물을 TA vector에 cloning하여 제작하였다.

플라스미드 DNA positive control을 미생물에 transformation 한 후, 미생물 배양을 통해 증폭하고, 분리하여 각각의 플라스미드 DNA positive control의 농도를 UV spectrophotometer로 정량 한 후 분자량에 기초하여 copy수로 환산하였다.

실험예 1 : 프라이머 세트의 특이성 평가

상기 실시예 1에서 디자인된 프라이머 세트 1 및 2의 특이성을 확인하였다.

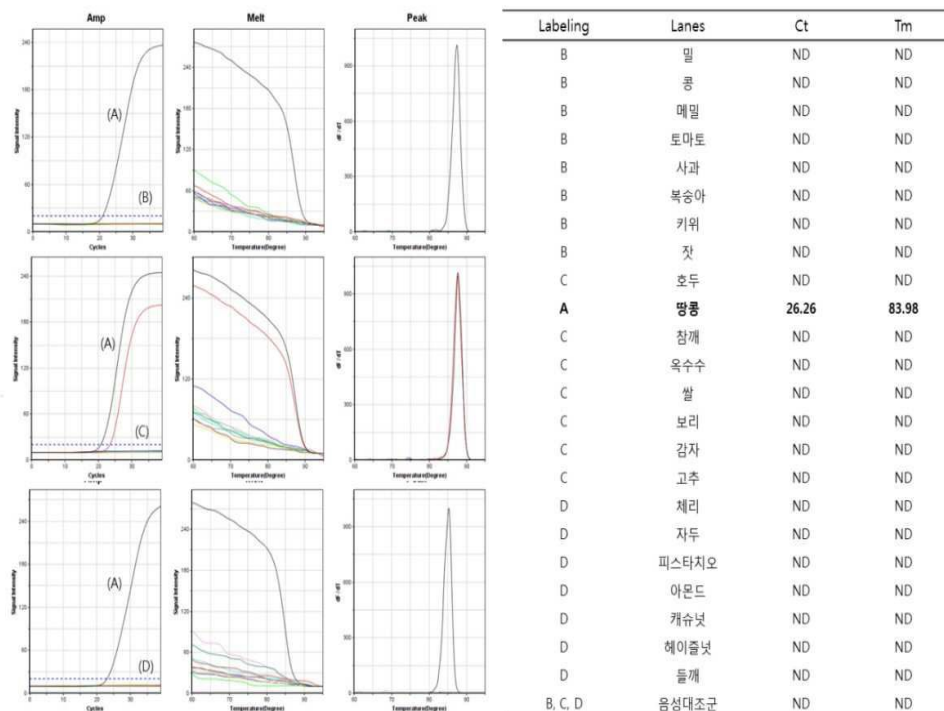
상기 실시예 3에서 설정된 real-time PCR 조건으로 밀, 콩, 메밀, 토마토, 사과, 복숭아, 키위, 잣, 호두, 땅콩, 참깨, 옥수수, 쌀, 보리, 감자, 고추, 체리, 자두, 피스타치오, 아몬드, 캐슈넛, 헤이즐넛 및 들깨를 분석하였다(도 1 및 2). 주형 DNA를 포함하지 않은 것을 음성대조군으로 설정하였다.

도 1을 참조하면, 프라이머 세트 1은 땅콩에서만 증폭 곡선이 증가하였고, Ct는 26.26로 측정되었고, Tm은 83.98℃로 측정되었다.

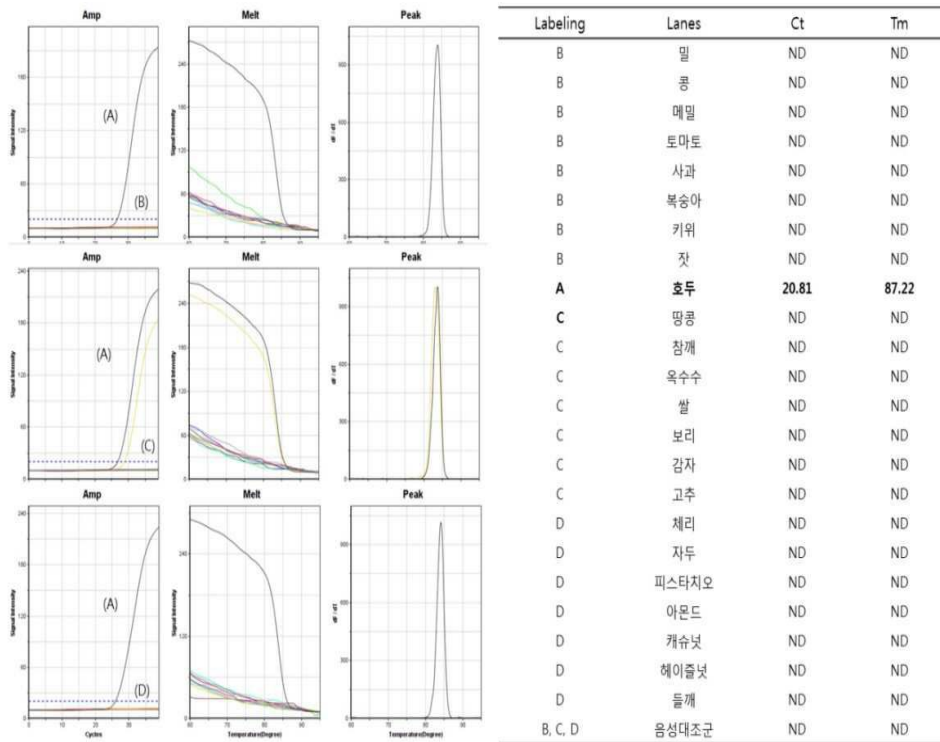
- [0110] 도 2을 참조하면, 프라이머 세트 2는 호두에서만 증폭 곡선이 증가하였고, Ct는 20.81로 측정되었고, Tm은 87.22℃로 측정되었다.
- [0111] 상기 결과는 상기 프라이머 세트 1 및 2로 알레르기 유발 견과류인 땅콩 및 호두를 특이적으로 검출하는 것이 가능하다는 것을 시사한다.
- [0112] **실험예 2 : 프라이머 세트 민감도 평가**
- [0113] 상기 실시예 1에서 디자인된 프라이머 세트 1 및 2의 민감도를 확인하기 위해 실시예 3에서 설정된 real-time PCR 조건으로 실시예 4에서 제조된 각각의 양성 플라스미드를 분석하였다.
- [0114] 한 개의 증폭서열이 삽입된 플라스미드를 1 copy로 지정하여 10^5 copies 부터 10^0 copies까지 단계별로 희석하여 민감도 검사하였다(도 3).
- [0115] 도 3을 참조하면, 프라이머 세트 1 및 2 모두 양성 플라스미드의 100 copies까지 검출되었다.
- [0116] 상기 결과는 본 발명의 알레르기 유발 견과류 검출용 프라이머 세트를 이용하면, PCR 기법으로 다양한 식품의 알레르겐을 검출에 유용한 도구가 될 수 있음을 시사한다.
- [0117] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0118] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

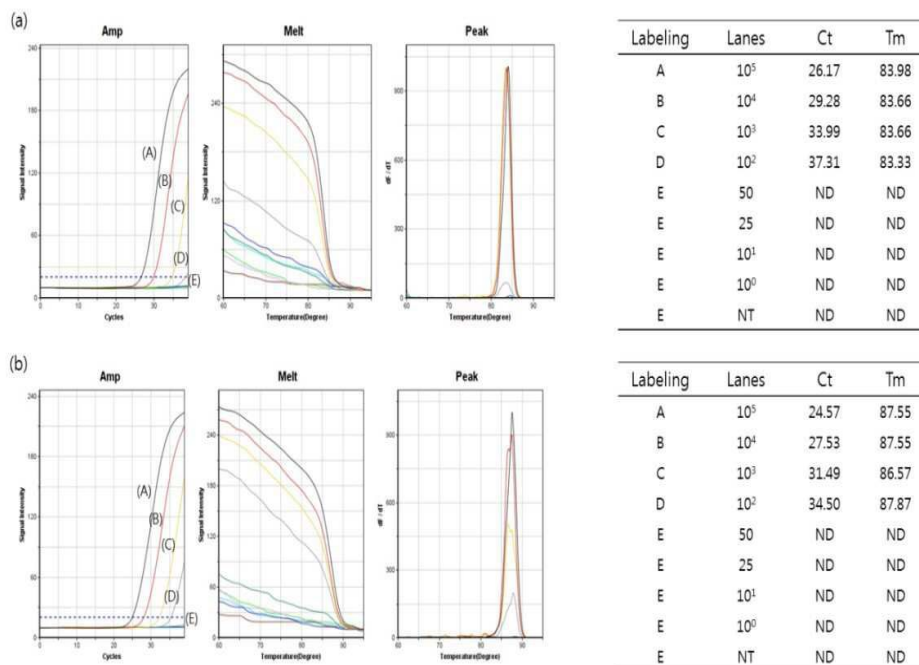
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> Kyung Hee University

<120> PRIMERS FOR RAPID DETECTION OF NUT PRODUCTS CAUSING ALLERGEN AND

USE THEREOF

<130> GKH18P-0011-KR

<160> 4

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ara h 9-F

<400> 1

ctcaagtttg catttgtgat gct 23

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ara h 9-R

<400> 2

gtccaccct ttgtgaggaa a 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> W-F

<400> 3

ttggctacct caggggtacg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> W-R

<400> 4

ccgggatgg aaccagaagt 20