



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0098778
 (43) 공개일자 2018년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/701 (2013.01)
C12Q 2561/113 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0025316
 (22) 출원일자 2017년02월27일
 심사청구일자 2017년02월27일

(71) 출원인
서경대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 서경로 124 (정릉동, 서경대학교내)

(72) 발명자
조홍범

경기도 광주시 퇴촌면 안도장골길 131-19

(74) 대리인
특허법인다울

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **지카 바이러스 진단용 프라이머 세트, 이를 포함하는 진단 키트, 및 이를 이용한 지카 바이러스 진단 방법**

(57) 요약

본 발명은 다양한 지카 바이러스를 검출할 수 있고, 또한 높은 민감도로 지카 바이러스만을 특이적으로 검출할 수 있는 지카 바이러스 진단용 프라이머 세트, 이를 포함하는 진단 키트, 및 이를 이용한 지카 바이러스 진단 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 지카 바이러스 진단용 프라이머 세트는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머; 및 서열번호 2 내지 4 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머를 포함한다.

본 발명에 따른 지카 바이러스 진단 키트는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머; 서열번호 2 내지 4 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머; 및 서열번호 5 또는 6의 염기서열을 갖는 프로브를 포함한다.

본 발명에 따른 지카 바이러스 진단 방법은 진단 키트를 이용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Real time RT-PCR)을 시행하는 것을 포함한다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2563/107 (2013.01)

C12Q 2565/101 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머; 및 서열번호 2 내지 4 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 하는 지카 바이러스 진단용 프라이머 세트.

청구항 2

서열번호 1의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머; 및 서열번호 2, 3 및 4의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머 세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 지카 바이러스 진단용 프라이머 세트.

청구항 3

서열번호 1의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머; 서열번호 2 내지 4 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머; 및 서열번호 5 또는 6의 염기서열을 갖는 프로브를 포함하는 것을 특징으로 하는 지카 바이러스 진단 키트.

청구항 4

서열번호 1의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머; 서열번호 2, 3 및 4의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머 세트; 및 서열번호 5 및 6의 염기서열을 갖는 프로브 세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 지카 바이러스 진단 키트.

청구항 5

제3 항 또는 제4 항에 있어서,

상기 진단은 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Real time RT-PCR)에 의한 것인 지카 바이러스 진단 키트.

청구항 6

제3 항 또는 제4 항에 있어서,

상기 서열번호 5 또는 6의 프로브는 5' 말단에 형광물질로 FAM이 표지되고, 3' 말단에 소광물질로 Iowa Black FQ이 표지되는 것을 특징으로 하는 지카 바이러스 진단 키트.

청구항 7

제3 항 또는 제4 항에 따른 지카 바이러스 진단 키트를 이용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Real time RT-PCR)을 시행하는 단계를 포함하는 지카 바이러스 진단 방법.

청구항 8

제7 항에 있어서,

상기 서열번호 5 또는 6의 프로브는 5' 말단에 형광물질로 FAM이 표지되고, 3' 말단에 소광물질로 Iowa Black

FQ이 표시되는 것을 특징으로 하는 지카 바이러스 진단 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 지카 바이러스의 감염 여부를 검출하기 위한 프라이머와 프로브 세트, 그리고 이를 이용한 진단 키트와 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 지카 바이러스(Zika virus; ZIKV)는 뎅기(Dengue), 치쿤구니야(Chikungunya) 바이러스처럼 모기를 매개체로 하여 전염이 이루어지는 감염성 질환이다. 2016년 11월 현재 브라질을 중심으로 남반구 지역에서 대량의 감염자들이 발생하였으며 소두증이나 GBS(길랭바레)의 원인 감염원으로 의심받고 있는 상황이다.

[0003] 2007년 Yap State, Federated States of Micronesia에서 발생한 지카 유행의 경우 단일 스트레인(strain) 바이러스에서 시작된 유행으로 추정되고 있는데, 2015년부터 남미를 중심으로 이루어지고 있는 유행의 경우 다양한 종류의 스트레인 바이러스에서 촉발되었을 것으로 예상되며, RNA 바이러스 특성으로 인해 해당 기간 중 다양한 변이 스트레인(strain)을 발생시켰을 가능성이 매우 높다. 이에 Zika virus의 유행이 북반구를 포함한 전지역으로 확산될 경우 이전보다 더욱 다양한 Zika virus 변이 strain이 발생할 가능성이 높다.

[0004] 그런데, 2015년 이전에 발표된 Zika 관련 논문들은 Zika 유행이 발생한 이후 당시에 발견된 해당 Zika strain을 바탕으로 프라이머와 프로브를 고안하였기에 현재 NCBI에서 검색되는 많은 종류의 Zika stain들과 다소간의 차이를 보이고 있다.

[0005] 일부 논문의 경우 Zika virus의 다양한 스트레인(strain)들의 서열 차이를 극복하기 위한 방법으로 프라이머와 프로브에 워블염기(wobble base)를 사용하고 있다. 그러나 프라이머 제작 과정에 워블염기를 사용하는 경우 각기 다른 서열의 스트레인(strain)간의 반응성 차이가 발생하여 PCR 반응의 민감도를 떨어트리는 원인으로 작용할 가능성이 높다.

[0006] 결국, Zika virus의 최종 진단법으로 사용되는 RT PCR의 프라이머들과 프로브들을 이용한 종래 진단 방법은 다양한 Zika virus strain을 진단하기 어려운 상황이다. 따라서, 2015년 남반구 유행으로 인해 확인되는 새로운 Zika virus sequence 정보들을 바탕으로 최근의 다양한 지카 바이러스를 높은 민감도와 특이도로 검출할 수 있는 진단방법의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Enfissi et al., Zika virus genome from the Americas. 2016. Lancet 387 (10015): 227-8

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Kuno et al., Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. Archives of Virology 152 (4): 687-696

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Faye et al., One-step RT-PCR for detection of Zika virus. 2008. J Clin.Virol 43:96-101

(비특허문헌 0004) 비특허문헌 4: Balm et al., A Diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus, 2012. J. Med. Virol. 84:1501-1505

(비특허문헌 0005) 비특허문헌 5: Lanciotti et al., Genetic and serologic properties of zika virus associated with an epidemic, Yap state, Micronesia, 2007. 2008 Emerg. Infect, Dis. 14(8): 1232-1239

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 최근 특히 2015년 이후의 다양한 지카 바이러스를 검출할 수 있고, 또한 높은 민감도로 지카 바이러스만을 특이적으로 검출할 수 있는 지카 바이러스 진단용 프라이머 세트, 이를 포함하는 진단 키트, 및 이를 이용한 지카 바이러스 진단 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명에 따른 지카 바이러스 진단용 프라이머 세트는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머; 및 서열번호 2 내지 4 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0010] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명에 따른 지카 바이러스 진단 키트는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머; 서열번호 2 내지 4 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머; 및 서열번호 5 또는 6의 염기서열을 갖는 프로브를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0011] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명에 따른 지카 바이러스 진단 방법은 서열번호 1의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머; 서열번호 2 내지 4 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머; 및 서열번호 5 또는 6의 염기서열을 갖는 프로브를 이용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(Real time RT-PCR)을 시행하는 것을 포함한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따르면, 약 60 카피(copy)의 검출한계(LoD)를 나타내어 높은 민감도로 지카 바이러스를 검출할 수 있으며, 지카 바이러스와 유사한 뎅기 바이러스 내지 웨스트나일 바이러스에는 반응하지 않고 지카 바이러스만을 특이적으로 검출할 수 있는 효과가 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 프라이머 및 프로브 세트는 2015년 이후 발견된 지카 바이러스 스트레인을 포함시켜 설계된 것인 바, 종래 지카 바이러스 진단 방법들과 달리 과거 유행주는 물론 2015년 이후 유행하는 지카 바이러스도 검출할 수 있는 효과가 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명에서 사용하는 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0015] 또한, 본 명세서에서, 일 구성요소가 다른 구성요소와 "연결된다" 거나 "접속된다" 등으로 언급된 때에는, 상기 일 구성요소가 상기 다른 구성요소와 직접 연결되거나 또는 직접 접속될 수도 있지만, 특별히 반대되는 기재가 존재하지 않는 이상, 중간에 또 다른 구성요소를 매개하여 연결되거나 또는 접속될 수도 있다고 이해되어야 할 것이다.

[0016] 이하에서는, 본 발명의 바람직한 실시예, 장점 및 특징에 대하여 상세히 설명하도록 한다.

[0017] 본원 발명자는 NCBI에 등재된 다양한 지카 바이러스 스트레인(Zika virus strain) 서열들을 분석하였으며, 많은 서열 보고가 이루어진 서열 부위에서 프라이머(Primer)와 프로브(Probe)를 고안하는 것이 많은 종류의 지카 바이러스를 검출하는데 유리할 것으로 판단하였다. 이에 지카 바이러스 서열들 중 가장 많이 보고된 서열들을 검색하였고, 그 결과 약 2600bp 부근의 서열들에 대한 보고가 가장 많이 이루어졌음을 확인하여 해당 서열에서 지카 바이러스 검출을 위한 RT-PCR에 사용할 수 있는 프라이머 및 프로브를 설계하였다.

[0018] 구체적으로, 서열번호 1의 올리고뉴클레오티드를 갖는 정방향 프라이머, 서열번호 2 내지 4 중 어느 하나의 올리고뉴클레오티드를 갖는 역방향 프라이머를 포함하는 새로운 프라이머 세트를 고안하였고, 서열번호 5와 6 중 어느 하나의 올리고뉴클레오티드를 갖는 프로브를 설계하였다.

[0019] 이 프라이머 세트와 프로브를 사용하여 민감도 테스트를 시행한 결과, 검출한계(LoD: Limit of Detection)가 60 카피(copy) 정도로 나타나 높은 민감도로 지카 바이러스를 검출할 수 있음을 확인하였으며, 지카 바이러스와 유사한 뎅기 바이러스(Dengue virus) 내지 웨스트나일 바이러스(West Nile virus)에는 반응하지 않고 지카 바이

러스에만 반응하는 특이도를 확인하였다.

[0020] 그리고, 이와 같이 프라이머 세트와 프로브는 2015년 이후 발견된 지카 바이러스 스트레인을 포함시켜 고안된 것인 바, 종래 지카 바이러스 진단 방법들과 달리 과거 유행주는 물론 2015년 이후 유행하는 지카 바이러스도 검출할 수 있는 장점이 있다.

[0021] 바람직한 실시예에 따르면, 정방향 프라이머는 서열번호 1의 올리고뉴클레오티드를 갖는 것으로 형성되고, 역방향 프라이머는 서열번호 2, 3 및 4의 올리고뉴클레오티드를 갖는 역방향 프라이머들로 이루어진 프라이머 세트로 구성되며, 프로브는 서열번호 5 및 6의 올리고뉴클레오티드를 갖는 프로브 세트로 구성된다.

[0022] 이와 같이 고안된 프라이머 세트와 프로브는 진단 키트 형태로 구현되어 지카 바이러스의 감염 여부의 진단 또는 매개 모기에서의 바이러스를 검출하는 용도로 사용될 수 있다. 상기 진단 키트는 지카 바이러스를 검출할 수 있는 시약, 기구 또는 장치 형태로 구성될 수 있으나 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 특히, 상기의 바람직한 실시예에 따른 프라이머 세트 및 프로브 세트를 이용하여 진단 키트를 제조하면, 하나의 진단 키트만으로도 2015년 이후 유행하는 지카 바이러스를 포함한 대부분의 지카 바이러스를 모두 검출할 수 있는 장점이 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 환자 혈액 또는 피검체로부터 RNA를 추출하는 단계; 서열번호 1의 올리고뉴클레오티드를 갖는 정방향 프라이머, 서열번호 2 내지 4 중 적어도 어느 하나의 올리고뉴클레오티드를 갖는 역방향 프라이머(또는 프라이머 세트), 서열번호 5와 6 중 적어도 어느 하나의 올리고뉴클레오티드를 갖는 프로브(또는 프로브 세트)를 이용하여, 상기 추출된 RNA로부터 역전사 증합효소 연쇄반응(Real time RT-PCR)을 통해 cDNA의 합성 및 유전자 증폭하는 단계를 포함하는 지카 바이러스 진단 방법을 제공한다.

[0025] 바람직한 실시예에 따르면, 본 발명의 진단 방법은 유전자의 증폭을 실시간으로 정량화하는 단계를 포함할 수 있는데, 예컨대 실시간 역전사 증합효소 연쇄반응(Real time RT-PCR)을 통해 유전자 증폭시, 실시간으로 모니터링하여 얻게 되는 증폭 곡선으로부터 Ct 값(Cycle threshold)를 산출하고 이를 이용하여 유전자 증폭 산물 내에 목표하는 유전자의 존재 유무나 증폭 산물을 정량화하는 단계로 이루어질 수 있다.

[0026] <실시예 1 : 지카 바이러스 진단용 프로브 및 프라이머 설계>

[0027] (1) 프로브(Probe) 설계

[0028] NCBI에 등재된 다양한 지카 바이러스 스트레인(Zika virus strain) 서열들을 분석하여 가장 많이 보고된 서열들을 정렬한 결과, 약 2600bp 부근의 서열들에 대한 보고가 가장 많이 이루어졌음을 확인하였다. 이에 해당 서열에서 지카 바이러스 검출을 위한 RT-PCR에 사용할 수 있는 프로브를 설계하였으며, 상기 유전자 부위를 이용하여 제작된 프로브를 다음의 표 1에 나타내었다.

표 1

[0029]

서열번호	명칭	염기서열(5' - 3')	위치	용도
1	ZikF1	GGAGGAATGTCTGGTTCTCACA	2346 - 2369	정방향 프라이머
2	ZikR1	TCCACATGATGTTTCCATTCT	2669 - 2697	역방향 프라이머
3	ZikR2	TCCACATGATGTTCTCCATTCT		
4	ZikR3	TCCACATAATGTTTCCATTCT		
5	ZikPc	GGTACAAGTACCATCTGACTCCCC	2578 - 2603	프로브

6	ZikPt	GGTACAAGTATCATCCTGACTCCCC
---	-------	---------------------------

[0030] 본 발명의 서열번호 5 또는 6의 염기서열을 갖는 프로브는 유전자 증폭 산물의 검출을 용이하게 하기 위하여 5' 말단에는 리포터(Reporter)로 작용하는 형광물질로 표시될 수 있으며, 이와 별개로 3' 말단에는 소광물질(Quencher)로 표시될 수 있다.

[0031] 실시예 1의 경우 프로브는 5' 말단에는 형광물질로 FAM이 표시(Labeling)되었고, 3' 말단에는 소광물질로 Iowa Black FQ이 표시되었다. 더 나아가 프로브는 3' 말단에 내부 소광물질로(Inner Quencher)로 ZEN이 더 표시되었다.

[0032] (2) 프라이머(Primer) 설계

[0033] 본 발명에 따른 프라이머는 실시예 1에서 선정된 프로브 서열의 주변 서열에서 설계하였으며, 이에 따라 제작된 프라이머를 표 1에 나타내었다. 그런데, 이와 같이 설계된 프라이머 서열 부위에도 서열 차이를 나타내는 다수의 지카 바이러스 스트레인(Zika virus strain)들이 존재하게 된다.

[0034] 이에 본원 발명자는 PCR 반응의 민감도와 특이도를 임계 수준 이상으로 유지하면서 다양한 종류의 지카 바이러스 스트레인을 검출할 수 있도록 각 스트레인 타입에 대해 특이적인 프라이머(Specific Primer)를 각각 사용하는 형태로 설계하였으며, 구체적으로 지카 바이러스 스트레인 서열별 특이적인 역방향 프라이머 및 프로브를 설계하였다.

[0035] 다음의 표 2는 지카 바이러스 스트레인 서열별 특이적인 프라이머 및 프로브의 염기서열을 나타낸 것이다.

표 2

[0036]

지카 바이러스 스트레인	정방향 프라이머 염기서열	프로브 염기서열	역방향 프라이머 염기서열
MR 766	서열번호 1	서열번호 5	서열번호 2
R116265		서열번호 6	
ArD128000			서열번호 5
INMI1		서열번호 3	
6-740		서열번호 4	

[0037] 따라서, 본 발명의 프라이머는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머, 및 서열번호 2 내지 4 중 어느 하나의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머를 포함하는 프라이머 세트에 구성될 수 있다.

[0038] 바람직하게는, 본 발명의 프라이머는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 정방향 프라이머, 및 서열번호 2, 3 및 4의 염기서열을 갖는 역방향 프라이머들이 모두 구비된 역방향 프라이머 세트를 포함하는 프라이머 세트에 구성될 수 있다. 상기 경우 프로브는 서열번호 5 및 6의 염기서열을 갖는 프로브들로 구성된 프로브 세트에 구성될 수 있으며, 이와 같이 구성된 프라이머 세트와 프로브 세트를 이용하여 진단 키트를 제조하면, 하나의 진단 키트로 다양한 종류의 지카 바이러스 스트레인에 대응할 수 있는 장점이 있다.

[0039] <실시예 2 : RNA standard 제작>

[0040] 본 발명은 실시예 1에서 제작한 프라이머 세트와 프로브를 이용하여 지카 바이러스를 검출할 수 있는 실시간

RT-PCR을 제공하는데, 실시간 RT-PCR의 반응결과로 생성될 증폭산물의 검출한계(LoD) 실험을 위한 양성 대조군으로 사용하기 위하여 다음과 같은 RNA 표준물질(standard)을 제작하였다. 올리고(oligo) RNA의 경우 90base를 초과할 수 없기 때문에, 본 발명의 프라이머 및 프로브 서열을 제외한 다른 부위 서열을 삭제하여 90base 이내의 크기로 제작하였다. 그리고 본 발명의 프라이머와 프로브들의 특이도를 확인하기 위해 서열 유사도가 높은 뎅기 바이러스 (Dengue virus)와 웨스트나일 바이러스(West Nile virus)의 해당 부위 서열을 함께 제작하였다.

[0041] <실시예 3 : 지카바이러스 검출용 실시간 RT-PCR>

[0042] 본 발명의 일 실시예에 따른 지카 바이러스 검출을 위한 실시간 RT-PCR법은 다음과 같다.

[0043] 본 발명의 실시예 내지 실험에 사용된 모든 올리고(oligo)들은 IDT사에 의뢰하여 제작하였다. RT-PCR 반응은 BioFACT OneStep RT-PCR kit(Biofact, Korea)를 사용하였고, 6 μl의 5X onestep RT buffer, 1 μl의 dNTP(10mM each dNTP, solgent, Korea), 2U의 RNasin(Promega, Madison, USA), 2 μl의 enzyme mix를 사용하였다.

[0044] 그리고, 프라이머들은 각각 10pmol씩 사용하였고, 프로브들은 2pmole씩 사용하였고, 실시예 2에서 제작된 RNA standard(positive, internal control)는 각각 5 μl 씩 사용하였으며, 사용된 모든 과정에는 Rnase free water(sigma, USA)가 사용되었다.

[0045] 그리고, MX3005P(Agilent Technologies, USA)장비를 제조사가 제공하는 실험법에 따라 시행하였다. 구체적으로, 50℃ 30분(RT step), 94℃ 15분(pre denatuer), 94℃ 40초, 60℃ 45초, 72℃ 45초의 조건으로 40 cycle이 시행되었다. 그리고 real time 형광 확인은 매 cycle의 72℃에 시행되었다.

[0046] <실시예 4 : 실시간 RT-PCR 검출한계(LoD)>

[0047] 본 발명의 프라이머 세트와 프로브를 사용하여 시행된 민감도 테스트는 제작된 standard RNA를 희석하여 이루어졌다. ENDMEMO사에서 제공하는 DNA/RNA copy number calculation program (<http://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php>)을 이용하여 분석한 결과 Zika standard RNA의 경우 1pmole 당 6.02×10^{11} copy가 존재하는 것으로 나타났다.

[0048] 제작된 Zika standard RNA를 1P의 농도로 만든 후 10^{-12} 까지 10배씩 단계 희석하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄 반응(Real time RT-PCR)을 통해 검출한계 (LoD)를 산출하였으며, 그 실험 결과는 다음의 표 3과 같다.

표 3

[0049]

Synthetic RNA copy/ul	nb positive /nb	Ct
6.02×10^{10}	3/3	11.92
6.02×10^9	3/3	7.35
6.02×10^8	3/3	9.62
6.02×10^7	3/3	13.47
6.02×10^6	3/3	17.29
6.02×10^5	3/3	20.72
6.02×10^4	3/3	24.90
6.02×10^3	3/3	29.11

6.02×10^2	3/3	33.41
6.02×10^1	3/3	38.69
6.02×10^0	0/3	No Ct
0	0/3	No Ct

[0050] 표 3의 검출한계(LoD) 테스트는 0.1P 이하부터 10^{-12} 까지 총 12개 농도별 RNA standard가 사용되었고, 각 농도별 RNA standard 마다 3번씩 테스트를 수행하였다.

[0051] 표 3에서 알 수 있듯이, 제일 낮은 Ct 값은 6.02×10^9 에서 7.35를 발생시켰고, 3번의 테스트 모두에서 양성반응을 나타내었다. 그리고, 제일 높은 Ct 값은 6.02×10^1 에서 38.69를 산출하였으며, 6.02×10^9 보다 낮은 6.02×10^0 에서는 Ct 값이 발생하지 않았다.

[0052] 결국, 본 발명에 따른 프라이머 세트와 프로브를 사용하여 민감도 테스트를 시행한 결과 검출한계(LoD)가 60 카피(copy) 정도로 나타났고, ENDMEMO사에서 제공하는 DNA/RNA copy number calculation program의 분석 결과와 유사한 정도를 나타내어 지카 바이러스에 대한 민감도가 높은 것으로 추정된다.

[0053] 한편, 6.02×10^{10} 의 경우 6.02×10^9 보다 높은 값인 11.92의 Ct 값을 산출하였는데, 이는 너무 높은 농도의 RNA standard가 PCR 반응을 저해한 효과 때문인 것으로 추정된다.

[0054] <실시예 5 : 실시간 RT-PCR 특이도>

[0055] 본 발명에 따른 프라이머와 프로브의 지카바이러스 특이도를 조사하기 위하여, 지카 바이러스와 동일한 플라비 바이러스속의 뎅기 바이러스(Dengue virus)와 웨스트나일 바이러스(West Nile virus)의 핵산 서열에 대한 실시간 RT-PCR을 시행한 결과 모두 음성으로 나타났다.

[0056] 구체적으로, Dengue virus 4 strain Haiti/0324/2014 및 West Nile virus strain Greece/2013/Thessaloniki_3의 해당 부위 서열을 합성하여 분석한 결과 뎅기 바이러스와 웨스트나일 바이러스 합성 DNA들은 본 발명의 프라이머 및 프로브들과 반응하지 않는 것으로 나타났다.

[0057] 따라서, 본 발명에 따른 프라이머 세트와 프로브는 지카 바이러스만을 검출하는 지카바이러스 특이적임을 알 수 있다.

[0058] 상기에서 본 발명의 바람직한 실시예가 특정 용어들을 사용하여 설명되었지만 그러한 용어는 오로지 본 발명을 명확히 설명하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 실시예 및 기술된 용어는 다음의 청구범위의 기술적 사상 및 범위로 부터 이탈되지 않고서 여러가지 변경 및 변화가 가해질 수 있는 것은 자명한 일이다. 이와 같이 변형된 실시예들은 본 발명의 사상 및 범위로 부터 개별적으로 이해되어져서는 안되며, 본 발명의 청구범위 안에 속한다고 해야 할 것이다.

서열 목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation of Seokyeong University
- <120> Primer set for diagnosing Zika virus, kit with the same, and method of diagnosing Zika virus using the same
- <130> p17-0045
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer
 <400> 1
 ggaggaatgt cctggttctc aca 23
 <210> 2
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer
 <400> 2
 tccacatgat gttttccatt ct 22
 <210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer
 <400> 3
 tccacatgat gtttccatt ct 22
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer
 <400> 4
 tccacataat gttttccatt ct 22
 <210> 5
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Probe

<400> 5

ggtacaagta ccatcctgac tcccc

25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Probe

<400> 6

ggtacaagta tcacctgac tcccc

25