



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0166731
(43) 공개일자 2023년12월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/689 (2018.01) C12Q 1/6844 (2018.01)
C12Q 1/6883 (2018.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2018.05)
C12Q 1/6844 (2018.05)
- (21) 출원번호 10-2022-0067115
(22) 출원일자 2022년05월31일
심사청구일자 2022년05월31일
- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자
임채승
경기도 안양시 동안구 동편로 135, 402동 903호(관양동, 동편마을)
- 장웅식
서울특별시 동작구 여의대방로 28, 102동 108호(신대방동, 현대아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 무한

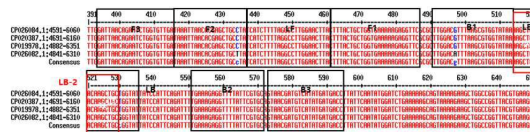
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 B군 연쇄상구균 검출을 위한 고리매개 등온증폭반응 프라이머 세트

(57) 요약

본 발명은 B군 연쇄상구균(Group B streptococcus, GBS) 검출을 위한 다중 등온 증폭반응용 프라이머 세트 등에 관한 것으로서, 본 발명에 의하면 고리매개 등온증폭 반응에 의해 PCR기기 없이도 GBS를 빠르고 정확도 높게 검출할 수 있고, 이를 통해 조기에 태아 또는 산모의 GBS 감염여부 진단이 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2022.01)

C12Q 2525/301 (2013.01)

C12Q 2527/101 (2019.08)

C12Q 2563/107 (2013.01)

C12Q 2565/101 (2013.01)

(72) 발명자

임민섭

경기도 안양시 동안구 부림로 10, 302동 804(평촌
동, 꿈마을건영아파트)

조금준

서울특별시 양천구 목동서로 234, 102동 1107호(목
동, 목동성원아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 5의 프라이머를 포함하는, B군 연쇄상구균(Group B streptococcus) 검출용 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 프라이머 세트.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는, 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 프로브를 추가로 포함하는, B군 연쇄상구균 검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 프라이머 세트는, 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 소광자(quencher)를 추가로 포함하는, B군 연쇄상구균 검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 프로브는 5' 말단에 형광표지물질질을 포함하는, B군 연쇄상구균 검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 형광표지물질은 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(tertramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 씨아디카르보시아닌(thiadicarbocyanine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, B군 연쇄상구균 검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 6

제 3항에 있어서, 상기 소광자는 TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), BHQ1(black hole quencher 1), BHQ2(black hole quencher 2), BHQ3(black hole quencher 3), NFQ(nonfluorescent quencher), 답실(dabcyl), Eclipse, DDQ(Deep Dark Quencher), 블랙베리 퀸처(Blackberry Quencher), 및 아이오와 블랙(Iowa black)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, B군 연쇄상구균 검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 서열번호 8 내지 14의 프라이머를 추가로 포함하는 것인, B군 연쇄상구균 검출용 LAMP 프라이머 세트.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항의 프라이머 세트를 포함하는, B군 연쇄상구균 검출용 조성물.

청구항 9

제 8항의 조성물을 포함하는, B군 연쇄상구균 검출용 LAMP 프라이머 키트.

청구항 10

- (1) 생물학적 시료의 게놈 DNA(gDNA)를 분리하는 단계;
- (2) 상기 분리된 gDNA를 주형으로 하고 서열번호 1 내지 서열번호 5의 프라이머 및 서열번호 6 내지 서열번호 7의 프로브를 이용하여 LAMP 등온증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- (3) 상기 증폭된 산물을 검출하는 단계;를 포함하는 B군 연쇄상구균 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 (2) 단계에서의 상기 등온증폭반응은 서열번호 8 내지 서열번호 14의 프라이머 세트를 더 포함하여 이루어지는 것인, B군 연쇄상구균 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서,

상기 (1) 단계의 상기 시료는 질 도말, 자궁경부 도말, 질 분비물, 질 세척액 및 체액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, B군 연쇄상구균 진단을 위한 정보제공방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 B군 연쇄상구균(Group B streptococcus)을 검출할 수 있는 고리매개 등온증폭반응용 프라이머 세트 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 스트렙토코커스 아갈락티아(*Streptococcus agalactiae*)는 연쇄상구균속에 속하는 그람 양성균이다. 혈청학적 분류인 란스필드 분류(Lancefield grouping)상에서는 B군(group B)에 속하기 때문에 B군 연쇄상구균(group B

streptococcus, GBS)이라고도 불린다. 인간의 하부 소화기관, 배설계 및 생식계의 정상세균총(normal flora)을 구성하는 균이다. 많게는 4명 중 1명의 여성이 GBS를 직장-질내에 보유하며, 이는 분만 전 또는 그 동안에 양수 또는 신생아를 감염시켜 패혈증, 폐렴 및 수막염을 유발할 수 있다(Baker 2013; Heath, P.T., et al., BMJ Clin. Evid. (Online), pii:0323 (2014)). 수막염으로부터 생존한 유아의 25퍼센트는 신경학적 손상을 앓고 있으며 19%는 인지 지연, 뇌성 마비, 실명 및 청각 상실을 경험한다(Libster, R., et al., Pediatrics, 130(1):e8-152012 (2012)). GBS는 또한 유산 및 조기 분만을 유발할 수 있고 사산과도 연관되는 것으로 알려졌다.

[0004] 따라서, 이러한 GBS 감염질환의 예방 및 신속한 대처를 위해 GBS의 검출방법이 개발되었는데 종래에는 세균배양, 라텍스 응집법, 면역크로마토그래피법, 분자진단 핵산 증폭 검사법등이 사용되고 있었다. 최근에는 분자진단 검사법로서 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)을 많이 이용하나, PCR법의 진단에는 기본적으로 110-150분의 긴 검사 시간이 필요하고 숙련된 검사자와 고가의 장비가 필요하여 지방의 소규모병원이나 경제적으로 어려운 저개발국가에서는 사용이 어려운 단점이 존재하였다.

[0005] 최근, 온도 변화 없이 일정한 온도에서 유전자를 증폭하는 등온 증폭 반응법(loop-mediated isothermal amplification reaction, LAMP)이 개발되었다. 고리매개 등온 증폭 반응법(LAMP)은 주형에 상보적인 프라이머 6개를 사용하여 각기 다른 8개의 부위를 인식하여 유전자 증폭을 진행하는데 20-30분의 빠른 검사시간을 보이고 저가의 등온 증폭기를 사용할 수 있는 장점이 있지만 다수의 유전자를 동시에 증폭하는 다중진단에 어려움이 있다. 즉 약제 내성의 타겟으로 사용되는 SNP같은 돌연변이(mutation)를 보이는 부위의 검출이 어렵다. 이외에 위 양성 등 오염의 문제가 자주 발생한다.

[0006] 이에 본 발명자들은 다중등온증폭기와 특이적인 서열을 갖는 고리매개 등온 증폭 반응법(LAMP)의 형광 프로브 및 이를 포함하는 프라이머 세트를 개발하여 이러한 문제를 해결하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-2011-0007539

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 GBS 검출용 LAMP프라이머와 프로브를 포함하는 프라이머 세트 및 이를 이용하여 GBS를 감별하여 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 1 내지 5의 프라이머를 포함하는, B군 연쇄상구균(Group B streptococcus) 검출용 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 프라이머 세트가 제공된다.

[0012] 일 측에 따르면, 상기 프라이머 세트는, 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 프로브를 추가로 포함할 수 있으며 상기 프로브는 5' 말단에 형광표지물질을 포함할 수 있다. 상기 형광표지물질은 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(terramethylrhodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 써아디카르보시아닌(thiadibocyanine)으로 구성된 군으로

부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

- [0013] 일 측에 따르면, 상기 프라이머 세트는, 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 소광자(quencher)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 소광자는 TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), BHQ1(black hole quencher 1), BHQ2(black hole quencher 2), BHQ3(black hole quencher 3), NFQ(nonfluorescent quencher), 답실(dabcyl), Eclipse, DDQ(Deep Dark Quencher), 블랙베리 퀀처(Blackberry Quencher), 및 아이오와 블랙(Iowa black)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0014] 일 측에 따르면, 상기 LAMP 프라이머 세트는 허위음성 결과를 배제하기 위하여 액틴베타(actin beta) 유전자를 타겟하는 내부대조군(internal control)으로 서열번호 8 내지 14의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 프라이머 세트를 포함하는, B군 연쇄상구균 검출용 조성물이 제공된다.
- [0016] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 검출용 조성물을 포함하는 B군 연쇄상구균 검출용 LAMP 프라이머 키트가 제공된다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면,
- [0018] (1) 생물학적 시료의 게놈 DNA(gDNA)를 분리하는 단계;
- [0019] (2) 상기 분리된 gDNA를 주형으로 하고 서열번호 1 내지 서열번호 5의 프라이머 및 서열번호 6 내지 서열번호 7의 프로브를 이용하여 LAMP 등온증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0020] (3) 상기 증폭된 산물을 검출하는 단계;를 포함하는 B군 연쇄상구균 진단을 위한 정보제공방법이 제공된다.
- [0021] 일 측에 따르면, 상기 (2) 단계에서의 상기 등온증폭반응은 서열번호 8 내지 서열번호 14의 프라이머 세트를 더 포함하여 이루어질 수 있다.
- [0022] 일 측에 따르면, 상기 (1) 단계의 상기 시료는 질 도말, 자궁경부 도말, 질 분비물, 질 세척액 및 체액으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명에 따르면, 고가의 PCR장비나 숙련된 인력 없이도 현장에서 빠르게 GBS 검출이 가능하다. 본 발명의 프라이머 세트는 GBS 분질을 특이적으로 검출할 수 있어 높은 민감도와 정확도를 나타내며, 검체의 GBS 감염여부를 빠른 시간 내에 진단할 수 있다. 또한, 내부 대조군을 포함하여 위음성배제가 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 GBS의 타겟 유전체인 NJ1606의 서열에서 LAMP 프라이머 세트의 위치를 나타낸 도면이다.
- 도 2는 희석 농도 10^0 내지 10^2 의 검출한계 실험결과를 나타낸 도면이다.
- 도 3은 희석 농도 10^2 내지 10^8 의 검출한계 실험결과를 나타낸 도면이다.
- 도 4는 다른 균과의 교차검출 실험 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 5는 내부대조군 프라이머 세트와 함께 LAMP 수행시 Cy5의 형광을 나타낸 것이다.
- 도 6은 내부대조군 프라이머 세트와 함께 LAMP 수행시 HEX의 형광을 나타낸 것이다.
- 도 7은 기존의 프라이머 세트와의 비교실험을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명자들은 현장에서 고가의 장비나 숙련된 인력 없이도 GBS 감염을 빠르고 신속하게 진단하기 위하여 LAMP 프라이머에 관한 본 발명을 완성하였다.

- [0028] 본 명세서에서 사용된 용어 “B군 연쇄상구균”은 학명 *Streptococcus agalactiae*의 균을 지칭하는 것이며, GBS, *S. agalactiae*, B군 연쇄상구균 등과 동일한 의미로 교환적으로 사용될 수 있다.
- [0029] 구체적으로, 본 발명자들은 GBS의 NJ1606에 특이적인 프라이머와 프로브로 구성되는 프라이머 세트를 LAMP 기반으로 제작하였다. 본 발명의 LAMP 기반의 프라이머 세트는 전통적인 PCR과 달리 온도변화를 요구하지 아니하여 단순하고 가벼운 증폭 기기를 이용할 수 있고 분석에 소요되는 시간을 획기적으로 감소시킬 수 있다.
- [0030] 구체적으로 본 발명은, 서열번호 1 내지 5로 이루어지는 GBS에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트와 서열번호 6 및 7로 이루어지는 프로브 및 소광자를 제공한다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트 및 프로브를 포함하는 GBS 검출용 조성물을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 GBS 검출을 위한 multiplex LAMP 프라이머 세트의 구성은 하기 표 2와 같으며, 반응 시간 및 온도는 하기 표 3과 같다.
- [0033] 한편, 본 발명의 프로브는 5' 말단이 형광표지물질로 표지된 것일 수 있으며, 바람직하게는 내부대조군과 서열번호 6의 프로브가 발하는 파장범위가 상이한 형광물질로 표지될 수 있다.
- [0034] 상기 각 프로브에 부착되는 형광물질은 형광을 발하는 것이라면 제한되지 아니하나, 그 비제한적인 예로서 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(tertramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 써아디카르보시아닌(thiadycarbocyanine) 등이 있다.
- [0035] 본 발명의 내부대조군(internal control)로 사용된 액틴베타(Actin beta) 유전자를 타겟으로 하는 LAMP 프라이머 세트는 서열번호 8 내지 14의 프라이머를 포함한다. 상기 내부 대조군의 존재로 인해 시료가 전혀 검출되지 않아 발생할 수 있는 위음성을 배제할 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명은 GBS 진단이 필요한 개체의 생물학적 시료에서 게놈 DNA(gDNA)를 분리하고, 상기 gDNA를 주형으로 하여 상기 프라이머 세트, 조성물 및 키트 중 어느 하나를 이용하여 LAMP를 수행함으로써 표적 서열을 증폭하고, 그 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는 GBS 진단을 위한 정보제공방법을 제공할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 “개체”는 GBS의 진단이 필요한 포유류라면 제한되지 아니하나, 바람직하게는 인간일 수 있다. 또한, 본 발명에서 “생물학적 시료”는 체내에서 GBS가 검출될 수 있는 부위의 도말시료, 세척시료 등이라면 제한되지 아니하나 바람직하게는 질 도말, 자궁경부 도말, 질 분비물, 질 세척액 및 체액 중 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0038] 본 발명에 있어서, “등온증폭반응(LAMP; Loop-mediated isothermal amplification)”은 기존 PCR법과 달리 PCR 사이클이 필요 없는 Bst, Gsp 등의 중합효소를 이용하여 등온의 조건에서 반응을 수행하는 방법으로, 기본적으로 4개의 프라이머를 이용하여, 양끝을 고리(loop) 구조로 합성하여 유전자의 특정 부위를 무한대로 증폭하고, 증폭된 DNA 산물을 형광 검출용 시약을 이용하거나 침전 반응시켜 증폭 유무를 확인하는 방법으로서, 바람직하게는 형광 검출용 시약을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 상기 프라이머 세트를 포함하는 키트는 GBS의 진단을 위한 등온증폭반응(LAMP; Loop-mediated isothermal amplification)에 사용되는 것이 바람직하며, 등온증폭반응은 표적 DNA를 LAMP에 의하여 증폭하는 단일-단계(one-step) LAMP일 수 있고, 실시간 LAMP (real-time LAMP)일 수 있으며, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서, “프라이머 (primer)”란 적절한 완충용액 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도 하에서 주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 말한다. 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 통상 15 내지 30 뉴클레오티드이다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 안정한 혼성체를 형성하기 위해서는 더 낮은 온도를 필요로 한다. 프라이머 서열은 주형과 완전하

게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화할 정도로 충분히 상보적이어야 한다.

- [0041] 본 발명의 프라이머는 예를 들면, 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법과 같은 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 프라이머는 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지의 예로는, 효소(예를 들어, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타아제), 방사성 동위원소(예를 들어, ³²P), 형광성 분자, 화학그룹(예를 들어, 바이오틴) 등이 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, “내부 프라이머(inner primer)”는 주형 DNA에 결합하여 새로운 DNA 사슬 합성의 시작점으로 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 의미한다.
- [0043] 본 발명에 있어서, “외부 프라이머(outer primer)”는 내부 프라이머가 주형 DNA에 결합한 위치보다 더 바깥쪽에서 주형 DNA에 결합하는 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 의미하는 것으로, 내부 프라이머가 주형 DNA에 결합하여 DNA 사슬이 신장된 이후, 외부 프라이머와 주형 DNA의 결합으로 사슬 변위(strand displacement)가 발생하여 먼저 형성된 사슬이 떨어져 나오게 된다.
- [0044] 본 발명에 있어서, “고리 프라이머(loop primer)”는 상기 내부 프라이머 및 외부 프라이머가 주형 DNA에 결합하여 형성된 초기 줄기 고리(stem loop) 구조 사슬이 고리(loop) 구조 생성 횟수를 증가시켜 결과적으로 전체 반응을 가속화시킬 수 있도록 하는, 뉴클레오티드 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 의미한다.
- [0045] 본 발명에 있어서, “소광자(quencher)”는 프로브의 형광표지물질의 형광을 평시에 흡수하다가 프로브가 분해되는 경우 형광표지물질과 소광자가 서로 분리되어 형광표지물질에서 형광을 발할 수 있게 하는 물질을 의미하며, 바람직한 예로는 TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), BHQ1(black hole quencher 1), BHQ2(black hole quencher 2), BHQ3(black hole quencher 3), NFQ(nonfluorescent quencher), 답실(dabcyl), Eclipse, DDQ(Deep Dark Quencher), 블랙베리 퀸처(Blackberry Quencher) 및 아이오와 블랙(Iowa black) 으로 이루어지는 군에서 선택될 수 있다.
- [0046] 본 발명에 있어서, 선택적으로 내부대조군이 이용될 수 있다. 바람직하게는 인간 액틴베타 유전자를 타겟팅하는 프라이머 세트가 PCR 과정에서 추가적으로 도입될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 상기 프라이머 세트의 프로브는 GBS를 타겟팅하는 프로브와 서로 다른 형광물질로 표지될 수 있어, 2 이상의 형광을 동시에 검출할 수 있다. 상기 액틴베타 유전자는 하우스키핑 유전자의 일종으로 모든 조직에서 발현되므로 상기 내부대조군의 존재로 인하여, 검체 시료가 잘못 채취되어 전혀 검출되지 않거나 바람직하지 못한 PCR 조건으로 인하여 형광 증폭이 이루어지지 않는 위음성의 경우를 배제할 수 있다.
- [0048] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.
- [0050] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, “포함하다” 또는 “가지다” 등의 용어는 명세서 상에 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.
- [0052] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0054] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0055] 실시예 1: 재료 및 방법

[0056] 1-1. GBS 박테리아 DNA의 확보

[0057] 고려대학교 구로병원에서 Vaginal swab (질 도말)에서 채집된 GBS 박테리아의 핵산(DNA)을 확보하였으며, 각 샘플의 감염 여부는 병원에서 임상검체의 미생물 배양 및 동정을 통해 미생물학적으로 확인되었다.

[0058] 1-2. GBS 박테리아 검출용 프라이머 세트, LAMP 혼합물 조성 및 반응조건

[0059] GBS 박테리아의 염기서열을 바탕으로 디자인된 GBS 박테리아 검출용 프라이머 세트 서열을 하기 표 1에 나타내었으며, 타겟유전자인 *Streptococcus agalactiae* strain NJ1606 크로모솜 서열에서 LAMP 프라이머 세트의 위치를 도 1에 나타내었다. LAMP를 이용한 GBS의 검출은 EIKEN사의 Loopamp DNA Amplification kit를 사용하였다. 실시간(real-time) LAMP를 위한 반응 혼합물의 시약 조성은 하기 표 2에 나타내었으며, 실시간 LAMP의 반응 조건 및 시간은 하기 표 3에 나타내었다.

표 1

	서열번호	명칭	서열(5'-3')	길이	위치
Group B Streptococcus (NJ1606),	1	GBS F3	GATTAACAGAATCTGGTGTGA	22	394-415
	2	GBS B3	GGTCATCATATGACATCGTTAC	22	573-594
	3	GBS FIP	GAACCTCTTTTTCACCAGCAGTAAA -TAAATTAACACGAGCTGCTA	46	416-436 462-486
	4	GBS BIP	TTGGACRTTTAAGCGTGGTATAA -GCACGAATAAAACCTCTTTCA	44	551-571 491-513
	5	GBS LF	GTAAGTTCCAAGGCCTAAAAGATGA	25	437-461
	6	GBS LB-2 probe	GTCAGTGCAGGCTCCCGTGTAGGA CGAGGGTAGG-AAGCTCCACAAGCTGC	51	514-529
	7	GBS LB-2 quencher	CCTACCCTCGTCTTAACACGGGAGC CTGCACTGAC	35	

[0060]

[0061] 상기 서열번호 6의 GBS LB-2 프로브는 5' 말단이 Cy5로 표지되었으며, 상기 서열번호 7의 GBS LB-2 소광자(quencher)는 3' 말단이 BHQ2로 표지되었다.

표 2

LAMP primer mix 조성	
Name	조성
2X Reaction buffer	12.5 µl
Enzyme buffer	1 µl
프라이머 (FIP,BIP,FLP,BLP)	각 최종 농도 800 nM
프라이머 (F3 ,B3)	각 최종 농도 100 nM
증류수(Distilled water)	8.5 µl
주형 DNA(Template DNA)	2 µl
총 부피	25 µl

[0062]

표 3

LAMP 온도 조건 및 시간		
온도	반응시간	
65 °C	1분	60 Cycle
80 °C	5분	
전체반응시간	75분	

[0063]

[0064]

실시예 2. 검출 한계 테스트

[0065]

검출 한계를 확인하기 위해 해당 위치를 함유하고 있는 DNA 서열을 합성하여 카피 수를 측정 후 DNA 분해효소가 존재하지 않는 증류수로 희석하여 사용하였다. 테스트에 사용된 핵산은 비사용시 -50℃에서 보관하였다. 제작된 각각의 양성 대조군(positive control)을 1×10^8 Copies/rxn의 농도부터 10까지 희석하여 민감도를 확인하여 표 4, 도 2 및 도 3에 나타내었다. 도 2는 희석 농도 10^0 내지 10^2 의 실험결과이고, 도 3은 희석 농도 10^2 내지 10^8 의 실험결과이다. 10분의 1 희석배수를 이용하여 농도별로 분석능을 검증한 결과, 10^2 copy에서 증폭이 확인되어 높은 검출 한계를 보이는 것으로 확인되었다.

표 4

시료 희석 농도 (copies/rxn)	Group B Streptococcus	
	CT	RFU
10^8	6.5	2987
10^7	7.4	2992
10^6	8.43	3043
10^5	9.36	3178
10^4	11.13	2911
10^3	12.83	3156
10^2	16.99	3057
10^1	N/A	3.51
10^0	N/A	4.82

[0066]

[0067]

실시예 3. 교차 반응 테스트

[0068]

프라이머 세트의 특이도를 확인하기 위하여 황색포도상구균(*S. aureus*), 표피포도상구균(*S. epidermidis*), 엔테로코커스 패시움(*E. faecium*), 엔테로코커스 패칼리스(*E. faecalis*), 대장균(*E. coli*), 클레브시엘라 옥시토카(*K. oxytoca*), 녹농균(*P. aeruginosa*), 아시네토박터 바우마니(*A. baumannii*) 및 스테노트로포모나스 말토폰리아(*S. maltophilia*) 시료를 대상으로 LAMP를 수행하여 검출된 형광의 Ct 값과 RFU를 하기 표 5 및 도 4에 나타내었다. 결과적으로, 양성대조군(GBS)를 제외한 다른 9종의 세균에서는 검출이 되지 않아 높은 특이도를 확인할 수 있었다.

표 5

시료	C _q S	
	Ct	RFU
<i>S.aureus</i>	N/A	2.36
<i>S.epidemicus</i>	N/A	1.98
<i>E.faecium</i>	N/A	4.21
<i>E.faecalis</i>	N/A	1.83
<i>E.Coli</i>	N/A	2.85
<i>K.oxytoca</i>	N/A	1.87
<i>P.aeruginosa</i>	N/A	2.42
<i>A.baumannii</i>	N/A	2.49
<i>S.maltophilia</i>	N/A	3.86
D.W.	N/A	3.35
Positive control	12.6	2292

[0069]

[0070]

[0071]

실시예 4. 임상검체에서의 민감도 및 특이도 실험

고려대학교 구로 병원에서 제공받은 GBS 10개, 음성 10개, 총 20개의 검체로 임상실험을 실시하였다. 추출된 DNA 검체를 대상으로 한 실시간 LAMP의 GBS 박테리아의 검출 결과를 확인하여 GBS 양성시료에 대한 실험결과를 표 6에, 음성시료에 대한 실험결과를 표 7에 나타내었으며 원내 배양결과와 모두 동일한 결과를 얻어 높은 민감도 및 특이도를 보여주었다. 또한, 표 6에 나타난 것과 같이, 검사 결과가 30분 이내로 매우 빠르게 나옴을 알 수 있다.

표 6

Sample	NO.	원내배양결과	LAMP	
			CT	RFU
Group B Streptococcus	1	+	14.69	2454
	2	+	12.5	2532
	3	+	10.89	2386
	4	+	6.57	2483
	5	+	15.61	2427
	6	+	14.17	2395
	7	+	11.2	2282
	8	+	6.5	2375
	9	+	16.03	2491
	10	+	6.88	2472
	PC	+	16.09	2106
	DW	+	N/A	N/A

[0072]

표 7

Sample	NO.	원내배양결과	LAMP	
			CT	RFU
Group B Streptococcus	1	-	NA	NA
	2	-	NA	NA
	3	-	NA	NA
	4	-	NA	NA
	5	-	NA	NA
	6	-	NA	NA
	7	-	NA	NA
	8	-	NA	NA
	9	-	NA	NA
	10	-	NA	NA
	PC	+	16.09	2106
	DW	+	N/A	N/A

[0073]

[0074] 실시예 5. GBS NJ1606과 내부 대조군(Act-BD)의 프라이머 및 프로브 세트를 이용한 실험 결과

[0075] GBS 양성 및 음성 검체로 상기 실시예 1의 프라이머 세트와 내부 대조군 프라이머 세트(표8)를 혼합하여 표 9의 조성으로 다중 등온증폭반응을 수행하며 반응조건은 하기와 같다. 60.0℃에서 1분으로 59회 반복 후 80.0℃에서 5분 반응하였다. GBS NJ1606 프라이머 세트에 포함된 각 프로브는 Cy5로 형광표지 되었고, 내부 대조군(Act-BD) 프라이머 세트에 포함된 프로브는 HEX로 염색되었다. 실험결과를 도 5, 도 6 및 표 10에 나타내었다. GBS 양성 검체는 Cy5 형광으로 검출할 수 있고(도 5 및 표 10), GBS 음성 검체는 HEX로 검출 가능함을 확인할 수 있었다(도 6 및 표 10). 즉, 내부 대조군을 통해 허위 음성 결과를 배제할 수 있다.

표 8

서열번호	명칭	부피(ul)	서열(5'-3')
8	IC_LAMP_ACTB_F3	4	AGT ACC CCA TCG AGC ACG
9	IC_LAMP_ACTB_B3	4	AGC CTG GAT AGC AAC GTA CA
10	IC_LAMP_ACTB_FIP	32	GAG CCA CAC GCA GCT CAT TGT ATC ACC AAC TGG GAC GAC A
11	IC_LAMP_ACTB_BIP	32	CTG AAC CCC AAG GCC AAC CGG CTG GGG TGT TGA AGG TC
12	IC_LAMP_ACTB_LF	10	TGT GGT GCC AGA TTT TCT CCA
13	IC_LAMP_ACTB_LB	6	CGA GAA GAT GAC CCA GAT CAT GT
14	IC_LAMP_ACTB_LB_P 4_HEX	4	CGGGCCCGTACAAAGGGAACACCCACACTCCG CGA GAA GAT GAC CCA GAT CAT GT
	DW	8	
	TOTAL	100	

[0076]

표 9

LAMP PCR Reagent (M monitor DNA kit 사용)		Vol(ul)
RM		12.5
EM		1
Distilled water		1
Primer mix	GBS 3	2.5
	I.C.	2.5
Quencher 4		1.5
Quencher 2		1.5
Template		2.5
TOTAL		25

[0077]

표 10

sample GBS + ACT B	HEX (ACT B HEX)		Cy5 (GBS 3)	
	CT	RFU	CT	RFU
GBS	N/A	36.9	11.01	2455
H.S.	23.11	6672	N/A	9.47
D.W.	N/A	2.57	N/A	4.11

[0078]

[0079]

실시예 6. 종래 프라이머 세트와의 비교실험

[0080]

종래 제작된 프라이머 세트로서, GBS의 16s 유전자를 타겟팅하는 프라이머 세트(J. Dairy Sci. 2016. 99:2142-2150)와 본원발명의 NJ1606 유전자를 타겟팅하는 프라이머 세트를 비교실험하였다. 실시예 2의 실험방법과 같이 실험하였으며, 시료 희석 농도를 1×10^0 Copies/rxn 부터 1×10^8 Copies/rxn까지 조절하며 민감도를 비교하여 이를 표 11 및 도 7에 나타내었다. 기존 GBS LAMP 프라이머세트는 1×10^3 농도까지 GBS를 검출하였고, 본원발명의 GBS 프라이머 세트는 1×10^2 농도까지 GBS를 검출하여 종래 프라이머세트보다 더 높은 민감도를 가짐을 확인하였다.

표 11

시트 희석 농도 (copies/rxn)	기존 GBS LAMP (reference)		개발 GBS LAMP	
	CT	RFU	CT	RFU
10^8	14.10	18788	6.5	2987
10^7	15.34	6945	7.4	2992
10^6	17.10	9066	8.43	3043
10^5	22.12	9094	9.36	3178
10^4	22.43	6690	11.13	2911
10^3	41.03	2105	12.83	3156
10^2	N/A	120	16.99	3057
10^1	N/A	5.71	N/A	3.51
10^0	N/A	0.232	N/A	4.82

[0081]

[0082]

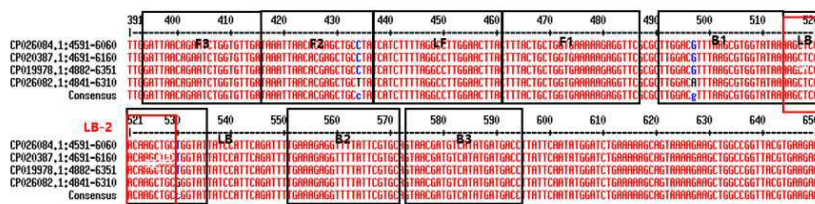
이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[0083]

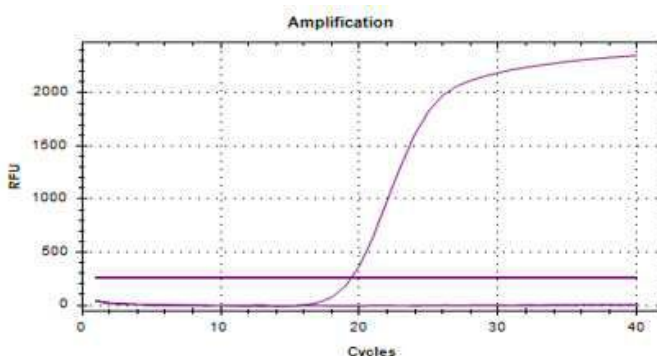
그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

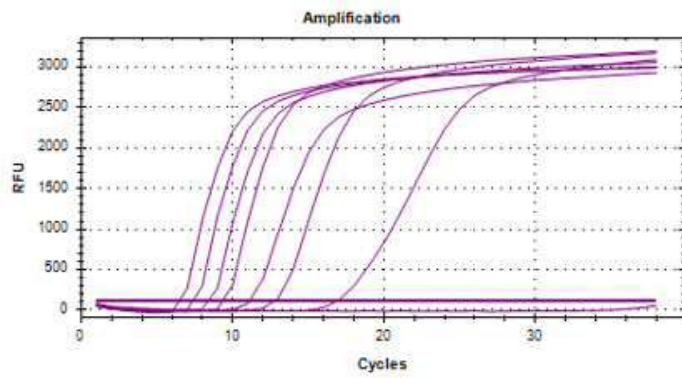
도면1



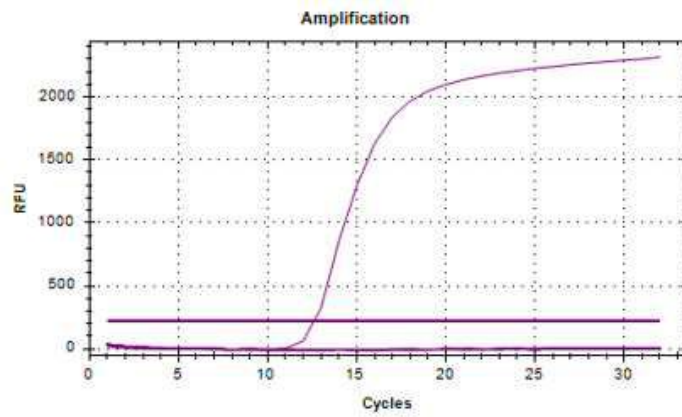
도면2



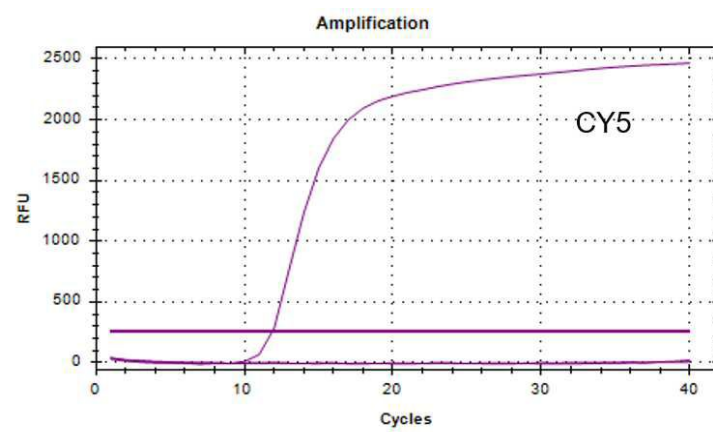
도면3



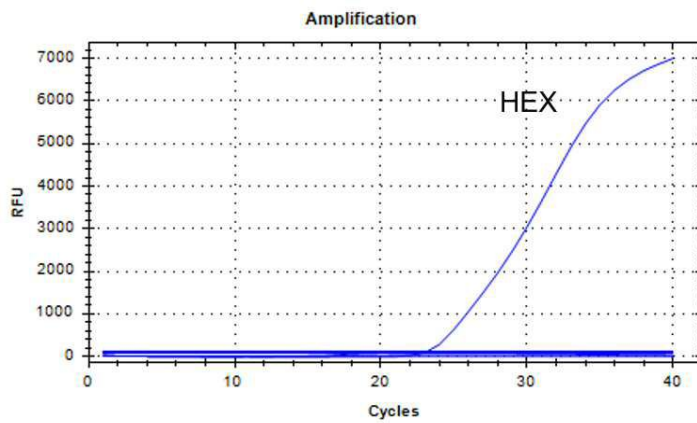
도면4



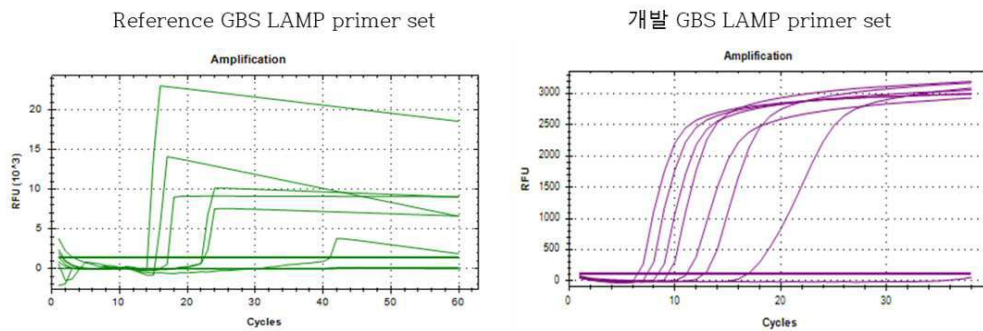
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Loop-mediated isothermal amplification primer set for detection
of group B streptococcus
- <130> APC-2022-0102
- <160> 14
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> GBS F3 Primer
- <400> 1

gattaacaga atctggtgtt ga

22

- <210> 2
- <211> 22
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> GBS B3 Primer

<400> 2

ggtcacata tgacatcgtt ac 22

<210> 3

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GBS FIP Primer

<400> 3

gaacctcttt ttcaccagca gtaaataaat taacacgagc tgcyta 46

<210> 4

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GBS BIP Primer

<400> 4

ttggacrttt aagcgtggta taagcacgaa taaacacctt ttca 44

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GBS LF Primer

<400> 5

gtaagttcca aggcctaaaa gatga 25

<210> 6

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GBS LB-2 Probe

<400> 6

gtcagtgcag gctcccggtg taggacgagg gtaggaagct ccacaagctg c 51

<210> 7

<211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GBS LB-2 Quencher
 <400> 7
 cctaccctcg tcctaacacg ggagcctgca ctgac 35

<210> 8
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IC_LAMP_ACTB_F3 Primer
 <400> 8
 agtaccat cgagcacg 18

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IC_LAMP_ACTB_B3 Primer
 <400> 9
 agcctggata gcaacgtaca 20

<210> 10
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IC_LAMP_ACTB_FIP Primer
 <400> 10
 gagccacacg cagctcattg taccaccaac tgggacgaca 40

<210> 11
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> IC_LAMP_ACTB_BIP Primer
 <400> 11

ctgaaccca aggccaaccg gctggggtgt tgaaggtc 38

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IC_LAMP_ACTB_LF Primer

<400> 12

tgtggtgcc a gattttctcc a 21

<210> 13

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IC_LAMP_ACTB_LB Primer

<400> 13

gtcagtgag gctcccggtg taggacgagg gtaggaagct ccacaagctg c 51

<210> 14

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IC_LAMP_ACTB_LB_P4_HEX

<400> 14

cgggcccgta caaagggaac acccacactc cgcgagaaga tgaccagat catgt 55