(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0078285
(43) 공개일자 2013년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01) *C12Q 1/04* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0147139
(22) 출원일자 2011년12월30일
심사청구일자 2011년12월30일
기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
공인수
부산광역시 해운대구 우1동 경남마리나아파트 101-204
무하마드 토파잘 호세인
방글라데시 미멘싱 꼬또알리 바그마라 120
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

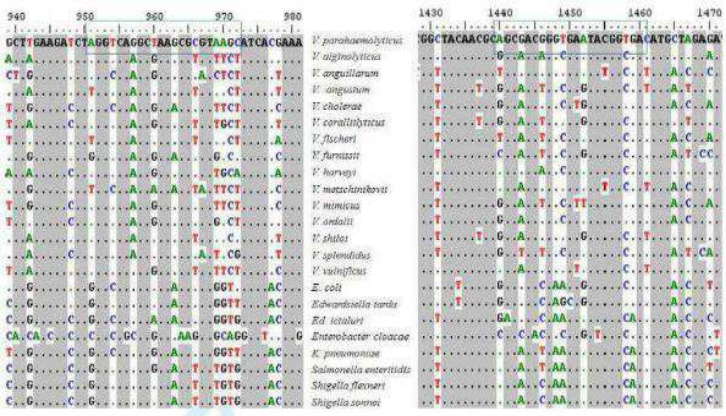
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **장염 비브리오균 검출 마커용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)를 검출하기 위한 유전자 및 이를 이용한 검출방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 특정 유전자 *groEL*의 특정 부위를 증폭시킴으로써 상기 장염 비브리오균(*Vibrio* parahaemolyticus) 특이적으로 검출하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김유리

부산광역시 사상구 덕포1동 713-7

김은영

부산광역시 금정구 서3동 134-1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	YSGRE0701
부처명	국토해양부
연구사업명	해양과학기술연구개발사업
연구과제명	수산물과 양식장 환경에 존재하는 병원성 Vibrio 균의 monitoring을 위한 microarray system의 개발
주관기관	영남 Sea Grant 대학사업단
연구기간	2007.08.01 ~ 2009.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

groEL 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 *groEL* 단백질을 포함하는 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)을 종-특이적으로 검출하기 위한 마커용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 groEL 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 마커용 조성물.

청구항 3

groEL 유전자의 수준 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 *groEL* 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)을 종-특이적으로 검출하기 위한 마커용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 groEL 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 마커용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 *groEL* 유전자의 수준 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 *groEL* 단백질의 수준은 서열번호 1 중 951~972번째 서열 또는 1438~1460번째 서열을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 마커용 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 *groEL* 유전자의 수준을 측정하는 물질은 *groEL* 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브이고, 상기 *groEL* 단백질의 수준을 측정하는 물질은 *groEL* 단백질을 특이적으로 인식하는 항체인 것을 특징으로 하는 마커용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 프라이머는 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머 쌍인 것을 특징으로 하는 마커용 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 조성물은 100pg ~ 1ng의 장염 비브리오균 DNA 검출 민감도를 가지는 것을 특징으로 하는 마커용 조성물.

청구항 9

샘플에 존재하는 *groEL* 유전자의 발현양 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 *groEL* 단백질의 양을 측정하는 단계; 및

상기 단계의 측정결과를 대조군 샘플의 *groEL* 유전자의 발현양 또는 단백질의 양과 비교하는 단계를 포함하는 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)의 종-특이적 검출방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 *groEL* 유전자의 발현양 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 *groEL* 단백질의 양은 서열번호 1 중 951~972번째 서열 또는 1438~1460번째 서열을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 장염 비브리오균의 종-특이적 검출방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 *groEL* 유전자의 발현양은 *groEL* 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브를 이용하고, 상기 *groEL* 단백질의 양은 *groEL* 단백질을 특이적으로 인식하는 항체를 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 장염 비브리오균의 종-특이적 검출방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 프라이머는 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머 쌍인 것을 특징으로 하는 장염 비브리오균의 종-특이적 검출방법.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 샘플은 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 배설물, 점액, 우물물, 타액 및 식품으로 이루어진 군중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 장염 비브리오균의 종-특이적 검출방법.

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 단일 중합효소 연쇄반응, 다중 중합효소 연쇄반응, 웨스턴 블럿, 노던 블럿, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군중에서 선택되는 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는 장염 비브리오균의 종-특이적 검출방법.

청구항 15

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*) 검출키트.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)를 검출하기 위한 유전자 및 이를 이용한 검출방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 특정 유전자 *groEL*의 특정 부위를 증폭시킴으로써 상기 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*) 특이적으로 검출하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인체에 수많은 질병을 일으키는 병원성 미생물의 검출 및 진단은 인류의 복지를 위해 매우 중요한 분야로, 특히 인간에게 가장 중요한 에너지원인 식품의 경우 이러한 병원성 미생물에 대한 안전성 검사가 이루어지지 않는다면 이를 통한 발병이 빈번하게 일어날 수 있다. 이러한 이유로 병원성 미생물을 검출하고 진단하기 위한 노력이 많이 이루어져 왔다. 인간에게 나타나는 주요한 질병 중에 증상으로 나타나는 임상적인 특징들은 발견되나 이러한 증상을 설명할만한 원인이 규명되지 않은 대부분의 질병들이 분류학적 구분이 모호하여 아직까지 동정되지 않은 세균에 의한 것이라는 보고가 있은 후 수년 전부터 이러한 병원성 미생물에 대한 새로운 검출방법의 개발

이 모색되고 있다.

[0003] 장염 비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*)균은 그람음성 간균으로서 해수, 갯벌, 어류, 패류, 해조류와 각종 해산물에 부착하여 서식하는 호염성 세균이다. 이 균은 우리나라, 일본 등 바다와 인접한 나라에서 해산물을 날것으로 먹기 때문에 여름철 발생빈도가 높은 감염형 식중독의 원인균으로서 심한 설사, 복통, 구토를 일으킨다. 감염형 식중독의 원인균들은 장의 상피세포에 부착할 수 있는 감수성 물질인 장관독소를 생성하여 장관막의 adenylate cyclase를 활성화시킴으로서, 숙주세포내 cyclic AMP의 농도를 높인다. 이 높아진 cyclic AMP의 농도가 조직 및 결장내에서 세포의 전해질의 정상조절 작용을 방해함으로서 산독증을 유발하거나, 순환계로부터 수분공급을 충분치 못하게 하는 것이다.

[0004] *V. parahaemolyticus*의 주요 병원성 인자는 wagatsuma 혈액한천 배지상에서 kanagawa phenomenon (KP)을 일으키는 내열성 용혈독(TDH)이 알려져 있으며, 임상 분리주에서는 TDH를 code하는 thermostable direct hemolysin(*tdh*) 유전자를 주로 보유하지만, 이러한 유전자가 없는 것들도 있다. 한편, Honda 등, Kishishita 등과, Okuda 등은 *tdh* 유전자는 갖지 않으나, TDH와 유사한 내열성 용혈독 유사독소(TDH-related hemolysin, TRH)를 code하는 trh 유전자를 보유한 균주에 대해 보고하였고, 이는 urease 생성과 상관관계가 있으며, 최근에 tdh 및 trh 유전자의 염기배열이 밝혀짐에 따라, polymerase chain reation(PCR)이나 DNA probe hybridization 법을 이용하여 진단이 가능하게 되었다.

[0005] 한편, 비브리오균 검출에 관한 본 발명과 유사한 선행문헌은 비브리오 콜레라 또는 비브리오 미미쿠스 검출용 프라이머및 탐침과 이를 이용한 검출방법에 관한 한국공개특허공보 제2005-0075454호, 인간의 패혈증-유발 비브리오 불니피쿠스 검출용 유전자증폭키트 및 마이크로어레이에 관한 한국등록특허 제0949521호 등이 있다.

[0006] 그러나 본 발명에 따른 *V. parahaemolyticus*에 의한 식중독은 생활수준의 향상에도 불구하고, 우리나라의 지리적 여건과 어패류의 생식을 즐기는 식습관 등을 고려할 때, 장염 비브리오균에 의한 식중독의 위험은 상존하고 있다. 특히 호염성 세균으로 해·하수및 어패류 등에서 높은 빈도로 분리되고 있어, 발생 경향의 조사와 식품위생학적 측면에서 본 균에 관한 연구는 매우 중요하리라 생각된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명자들은 식중독을 유발하는 *V. parahaemolyticus*를 검출할 수 있는 유전적 분석(genetic analysis) 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, *V. parahaemolyticus* 유전자 *groEL*에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 이용하여, 특정 서열 부위의 존재를 확인함으로써 *V. parahaemolyticus*를 정확하게 검출할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서 본 발명은 목적은 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)을 종-특이적으로 검출하기 위한 유전자 마커용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명은 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)을 종-특이적으로 검출하기 위한 검출방법을 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 검출용 조성물을 함유하는 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*) 검출키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 *groEL* 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 *groEL* 단백질을 포함하는 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)을 종-특이적으로 검출하기 위한 마커용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 *groEL* 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 서열번호 1 중 951~972번째 서열 또는 1438~1460번째 서열일 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 *groEL* 유전자의 수준 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 *groEL* 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)을 종-특이적으로 검출하기 위한 마커용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 groEL 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 갖을 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 *groEL* 유전자의 염기서열은 서열번호 1 중 951~972번째 서열 또는 1438~1460번째 서열일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 *groEL* 유전자의 수준을 측정하는 물질은 *groEL* 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브이고, 상기 *groEL* 단백질의 수준을 측정하는 물질은 *groEL* 단백질을 특이적으로 인식하는 항체일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머 쌍일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 장염 비브리오균의 검출은 100pg ~ 1ng의 DNA 검출 민감도를 가질 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 샘플에 존재하는 *groEL* 유전자의 발현양 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 단백질의 양을 측정하는 단계; 및 상기 단계의 측정결과를 대조군 샘플의 *groEL* 유전자의 발현양 또는 단백질의 양과 비교하는 단계를 포함하는 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)의 종-특이적 검출방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 *groEL* 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 갖을 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 *groEL* 유전자의 발현양 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 단백질의 양을 측정하는 단계는 서열번호 1 중 951~972번째 서열 또는 1438~1460번째 염기서열을 이용할 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 *groEL* 유전자의 발현양은 *groEL* 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브를 이용하고, 상기 *groEL* 단백질의 양은 *groEL* 단백질을 특이적으로 인식하는 항체를 이용할 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머 쌍일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 샘플은 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 배설물, 점액, 우물물, 타액 및 식품으로 이루어진 군중에서 선택될 수 있다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 단일 중합효소 연쇄반응, 다중 중합효소 연쇄반응, 웨스턴 블럿, 노던 블럿, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군중에서 선택된 방법을 이용할 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*) 검출키트 또는 마이크로어레이를 제공한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명에 따라 식중독의 원인이 되는 주요 병원성 미생물 *V. parahaemolyticus*의 감염 여부를 신속하고 정확하게 판정할 수 있으므로 세균성 식중독의 예방에 효과적으로 활용될 수 있으며, *V. parahaemolyticus*에 대한 종 특이적으로 높은 민감도를 가지는 바, 매우 정확하게 검출할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 groEL 유전자 중 프라이머 서열의 위치를 나타낸 것이다.

도 2는 *Vibrio* 및 non-*Vibrio* 종 유래 PCR 증폭된 DNA 산물에 대한 아가로오스 겔(1.2%) 전기영동 결과이다.

도 3은 *V. parahaemolyticus* DNA의 다양한 농도로부터 PCR-증폭된 DNA 검출의 민감도를 보여주는 아가로오스 겔(1.2%) 전기영동 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명은 식중독 원인균인 비브리오균, 특히 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)을 신속하고 간편하게 종-특이적으로 검출하기 위한 유전자 마커에 관한 것이다.

[0031] 상기 *V. parahaemolyticus* 종-특이적 검출에 사용될 수 있는 마커 유전자는 *groEL*로서, 예를 들어, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성되어 있다. 특히, 상기 *groEL* 유전자 염기서열 중 변이성이 가장 높은 951~972 및

1,438~1,460 염기서열부위를 이용하여 *V. parahaemolyticus* 검출에 활용하는 것이 바람직하다.

[0032] 본 발명의 검출 방법은 테스트 샘플을 검출될 종 내 *groEL* 유전자의 적어도 일부와 혼성화하는 핵산 분자와 접촉시킬 때, 혼성화의 존재 또는 부재를 검출함으로써, 특정 종의 *V. parahaemolyticus* 미생물을 검출할 수 있다.

[0033] 그러므로, 본 발명은 상기 유전자 마커를 이용하여 *V. parahaemolyticus* 종을 특이적으로 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0034] 따라서, 본 발명은 *roEL* 유전자 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 *groEL* 단백질을 포함하는 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)을 종-특이적으로 검출하기 위한 마커용 조성물을 제공한다.

[0035] 또한, *groEL* 유전자의 수준 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 *groEL* 단백질의 수준을 측정하는 물질을 포함하는 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)을 종-특이적으로 검출하기 위한 마커용 조성물을 제공한다.

[0036] 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 물질은 *V. parahaemolyticus* 종에 속하는 계통의 *groEL* 유전자의 염기 서열을 배열함으로써 추출되는 하나 이상의 *V. parahaemolyticus* 종-특이적 염기 서열을 포함할 수 있다.

[0037] 상기 물질은 *V. parahaemolyticus* 종-특이적이고, 상기 배열 및 특징적인 서열추출에 DNASIS pro ver. (Hitachi Software), Beacon designer ver. 5.1 (Molecular Beacon) 및 Clustal W(free software) 와 같은 소프트웨어를 사용할 수 있다.

[0038] 특히, *V. parahaemolyticus* 종-특이적 염기 서열로서, 951 ~ 972 및 1,438 ~ 1,460 염기부위 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 대안적으로, 전술한 과정에서 추출된 종-특이적 염기 서열과 실질적으로 동일한 염기 서열을 포함할 수 있다.

[0039] 따라서, 본 발명에 따른 *groEL* 유전자의 염기서열은 서열번호 1 중 951~972번째 서열 또는 1438~1460번째 서열인 것일 수 있으며, 즉 본 발명은 *groEL* 유전자의 수준 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 *groEL* 단백질의 수준은, 서열번호 1 중 951~972번째 염기서열 또는 1438~1460번째 염기서열을 이용하여 측정할 수 있다.

[0040] 이러한 특정 염기서열을 이용한 본 발명에 따른 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*) 검출은 100pg ~ 1ng의 DNA 검출 민감도를 가지는 특성이 있다.

[0041] 상기 "실질적으로 동일한" 은 전술된 염기 서열을 바탕으로 하고, *groEL* 유전자와의 혼성화 특이성을 유지할 수 있는 범위 내에서 개질된 염기 서열을 말한다. 상기 염기 서열, 상보성 염기 서열, 및 상기 염기 서열 내 하나 이상의 염기가 치환, 삽입, 소실 및 첨가로부터 선택되는 하나 이상의 형태로 개질된 염기 서열이 포함된다. 상기 개질은 특정 계통에 대한 *groEL* 유전자의 염기 서열과 상응하는 염기 서열을 갖도록 수행될 수 있다

[0042] 상기 *groEL* 유전자의 수준을 측정하는 물질은 이에 제한되지 않으나, *groEL* 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브이거나 상기 *groEL* 단백질의 수준을 측정하는 물질은 *groEL* 단백질을 특이적으로 인식하는 항체일 수 있다.

[0043] 즉, 본 발명에서 상기 groEL 유전자의 수준은, 바람직하게 groEL 유전자가 발현된 mRNA 수준, 즉, mRNA의 양을 의미하며, 상기 수준을 측정할 수 있는 물질로는 groEL 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 포함할 수 있다. 본 발명에서 상기 groEL 유전자에 특이적인 프라이머 또는 프로브는 서열번호 1로 나타내는 groEL 유전자 전체 또는 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있으며, 상기 프라이머 또는 프로브는 당업계에 알려진 방법을 통해 디자인할 수 있다.

[0044] 본 발명에서 상기 프라이머란 용어는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 groEL 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머 쌍일 수 있다.

[0045] 상기 증폭 반응은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자의 증폭 반응들에 대해서는 당업계에 잘

알려져 있고, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 리가아제 연쇄반응(LCR), 전자 중재 증폭(TMA), 핵산 염기서열 기판 증폭(NASBA) 등이 포함될 수 있다.

[0046] 본 발명에서, 상기 프로브라는 용어는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타켓 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브는 단일쇄일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오티드일 수 있다. 본 발명의 프로브는 자연 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 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, 헥소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로헥시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에티틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명에서 상기 groEL 단백질의 수준을 측정할 수 있는 물질로는 groEL 단백질에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체 등의 항체를 포함할 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명에 있어서, 상기 기술한 바와 같이 *V. parahaemolyticus*의 존재 여부를 검출할 수 있는 마커 단백질로서 groEL 단백질이 규명되었으므로, 상기 단백질을 이용하여 항체를 생성하는 방법은 당해 기술분야의 일반적 기술자가 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조할 수 있다. 예컨대, 다클론 항체의 경우에는 groEL 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있으며, 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 제조가능하다. 단일클론 항체의 경우에는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마(hybridoma) 방법(Kohler et al., *European Jounral of Immunology*, 6, 511-519, 1976)을 이용하여 제조할 수 있거나 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al, *Nature*, 352, 624-628, 1991, Marks et al, *J. Mol. Biol.*, 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab') 2 및 Fv 등이 있다.

[0049] 한편, 본 발명자들은 *V. parahaemolyticus*를 특이적으로 탐지 할 수 있도록 *groEL* 유전자 및 특정 염기서열을 이용하는데서 더 나아가 510bp의 증폭 산물을 증폭할 수 있는 정방향(F) 및 역방향(R) 프라이머쌍을 고안하였다. 따라서 본 발명에서 사용될 수 있는 프라이머의 염기서열은 가장 바람직하게는 다음과 같으며, 이를 이용한 효과적인 *V. parahaemolyticus* 의 검출이 가능하다.

[0050] PCR 프라이머 F : 5'-AGGTCAGGCTAAGCGCGTAAGC-3'(서열번호 2)

[0051] PCR 프라이머 R : 5'-GTCACCGTATTCACCCGTCGCT-3'(서열번호 3)

[0052] 그리고, 본 발명에서 *groEL* 유전자 및 단백질의 발현양을 측정하기 위해 사용하는 핵산 분자와 테스트 샘플를 접촉시키기 위해서, 테스트 샘플 내에 존재할 수 있는 검출될 대상의 *groEL* 유전자 및 핵산 분자를 혼성화 가능한 상태에 둔다.

[0053] 예를 들어, *groEL* 유전자 및 핵산 분자는 액체 상에서 존재할 수 있거나, 또는 이들 중 하나는 고체상에 결합할 수 있고, 나머지 다른 하나는 고체상과 접촉하게 되는 액체 상에 포함될 수 있다. 상기 접촉을 수행하는 단계는 PCR, RT-PCR,전사 매개 증폭 (TMA), 분지형 DNA (bDNA) 방법, 실시간 PCR 또는 리가아제 연쇄 반응 (LCR) 과 같은 유전자 증폭 기술, 또는 서던 블로팅 방법, 마이크로어레이 방법, 마이크로비드 방법 또는 핵산 (DNA) 크로마토그래피와 같은 핵산 혼성화를 바탕으로 한, 염기 서열 방법의 일부로서 수행될 수 있다. 상기 단계에서 사용되는 기술은 또한, 예를 들어, 사용되는 핵산 분자가 프라이머로서 디자인되는지 또는 프로브로서 디자인되는지에 따라 적절하게 선택될 수 있다.

[0054] 본 방법은 핵산 분자가 테스트 샘플 내의 핵산과 혼성화하는지를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 혼성화

가 일어났는지의 검출은 예를 들어, (1) 핵산 분자 및 테스트 샘플 내 핵산 간의 특정 혼성화의 존재 또는 부재의 직접 검출, (2) 핵산 분자 및 테스트 샘플 내 핵산 간의 특정 혼성화를 바탕으로 한 유전자 증폭 반응의 존재 또는 부재의 검출, 및 (3) 유전자 증폭 반응의 생성물 내 특정 염기 서열의 존재 또는 부재의 검출에 의해 수행될 수 있다

[0055] 상기 (1) 의 경우, 혼성화는 예를 들어, 핵산 분자, 및/또는 테스트 샘플로부터 추출한 핵산 상에서 검출가능한 신호를 생성하는 표지 화합물을 첨가하거나, 또는 혼성화를 통해 층간 삽입 (intercalation) 등에 의해 신호를 생성하는 변화를 발생하는 신호-형성 화합물을 첨가함으로써, 검출될 수 있다. 혼성화 생성물을 효율적으로 검출하기 위해, 핵산 분자, 또는 테스트 샘플 내 핵산을 고체상에 결합시키는 것이 유리하다. 상기 검출은 서던 블로팅 방법, 마이크로어레이 방법, 마이크로비드 방법 (유세포 분석), 또는 핵산 (DNA) 크로마토그래피와같이 핵산의 혼성화를 바탕으로 한 염기 서열 기술로서 수행될 수 있다. 핵산 분자는 프로브 형태를 취할 수 있다.

[0056] 상기 (2) 의 경우, 예를 들어, 프라이머로서 핵산 분자 기능을 갖고 주형으로서 groEL 유전자와 특이적으로 혼성화된 핵산 분자의 신장을 유도함으로써, 전기영동 등에 의해, 주어진 증폭 산물이 수득되었는지를 검출하는 것이 가능하다. 상기 유전자 증폭 및 검출은 PCR, RT-PCR, 전사-매개 증폭 (TMA), 분지형 DNA (bDNA) 방법, 실시간 PCR 또는 리가아제 연쇄 반응 (LCR) 방법과 같은 유전자 증폭 방법 또는 증폭 산물 검출 방법에 의해 수행될 수 있다. 본 발명의 일 구체예로서, 상기 병원성 *V. parahaemolyticus*의 특이 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머쌍을 이용한 다중 중합효소연쇄반응으로 병원성 미생물을 검출하는 방법을 실시예에 기재하고 있다.

[0057] 상기 (3) 에서의 접근은 상기 (2) 및 (1) 을 조합함으로써 수행될 수 있다. 예를 들어, 고정된 범위의 속 또는 종에 특이적인 프라이머를 핵산 분자로서 사용함으로써 유전자 증폭 산물을 수득하고, 또한, 특정 종에 특이적인 프로브를 핵산 분자로서 사용함으로써 생성 유전자 증폭 산물에 관하여 혼성화의 존재 또는 부재를 검출하는 것이 가능하다.

[0058] 또한, 본 발명은 *groEL* 유전자의 수준 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 *groEL* 단백질의 수준을 측정할 수 있는 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)을 종-특이적으로 검출할 수 있는 마커용 조성물을 포함하는 장염 비브리오균 검출키트를 제공한다.

[0059] 본 발명의 키트에 포함되는 상기 마커용 조성물은 *groEL* 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체를 포함할 수 있으며, 이들의 정의는 앞서 기술된 바와 같다.

[0060] 본 발명의 키트가 만일 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, Thermus aquaticus (Taq), Thermus thermophilus (Tth), Thermus filiformis, Thermis flavus, Thermococcus literalis 또는 Pyrococcus furiosus(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며, 본 발명의 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다.

[0061] 나아가, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0062] 또한, 본 발명은 groEL 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)을 종-특이적으로 검출하기 위한 마커용 조성물을 포함하는 장염 비브리오균의 종-특이적 검출 마이크로어레이를 제공한다.

[0063] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, groEL 단백질 또는 이를 암호화하는 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 프라이머, 프로브 또는 항체는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기질(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기질은 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기 기질 상에 배열되고 고정화되며, 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기질에 결합될 수 있다.

[0064] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료가 핵산일 경우에는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화 될 수 있다. 혼성화 조건은 다양할 수 있으며, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표

지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.

[0065] 또한, 본 발명은 샘플에 존재하는 *groEL* 유전자의 발현양 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 단백질의 양을 측정하는 단계; 및 상기 단계의 측정결과를 대조군 샘플의 *groEL* 유전자의 발현양 또는 단백질의 양과 비교하는 단계를 포함하는 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*)의 종-특이적 검출방법을 제공할 수 있다.

[0066] 상기에서 *groEL* 유전자의 발현수준 또는 단백질 수준을 측정하는 방법은 공지의 기술을 이용하여 샘플로부터 mRNA 또는 단백질을 분리하는 공지의 공정을 포함하여 수행될 수 있다.

[0067] 상기 검출방법에서 *groEL* 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 갖는 것이며, 특히, 서열번호 1 중 951~972번째 서열 또는 1438~1460번째 염기서열을 이용하여 *groEL* 유전자의 발현양 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 단백질의 양을 측정하는 단계를 수행할 수 있다.

[0068] 검출방법에서도 마찬가지로, 상기 *groEL* 유전자의 발현양은 *groEL* 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브를 이용하고, 상기 *groEL* 단백질의 양은 *groEL* 단백질을 특이적으로 인식하는 항체를 이용할 수 있는데, 바람직하게는 본 발명의 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머 쌍을 이용할 수 있다.

[0069] 또한, 상기 사용하는 샘플은 제한되지 않으나, *V. parahaemolyticus* 가 존재할 것으로 예상되는 생물학적 시료나 음식물 샘플 등 제한이 없으나, 예를들어, 사람을 포함하여 동물로부터 수합한 혈액, 혈청, 혈장, 세포, 조직, 대변 및 소변과 같은 배설물, 점액, 타액, 우물물 (well water) 또는 식품 등일 수 있다. 샘플은 상기 수합된 물질로부터 핵산을 추출함으로써 수득된 핵산 추출 샘플일 수 있거나, 또는 *groEL* 유전자 또는 그의 일부 (검출될 영역 포함) 의 증폭 산물을 함유하는 샘플일 수 있다.

[0070] 또한, *groEL* 유전자의 발현양 또는 상기 유전자로부터 코딩되는 단백질 양의 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 단일 중합효소 연쇄반응, 다중 중합효소 연쇄반응, 웨스턴 블럿, 노던 블럿, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 또는 면역침전분석법(immunoprecipitation assay) 등을 이용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0071] 이처럼, 본 발명은 *V. parahaemolyticus* 를 검출하기 위하여 groEL 유전자 및 그로부터 코딩된 단백질의 발현수준을 측정할 수 있는 물질을 이용하여 정확하면서도 간편하게 인간의 식중독-유발 *V. parahaemolyticus*를 검출할 수 있다. 특히, 본 발명의 방법에 따른 장염 비브리오균(*Vibrio parahaemolyticus*) 검출은 100pg ~ 1ng의 DNA 검출 민감도를 가진다.

[0072] 한편, 상기 기재된 "약"이라는 것은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미하며, 본 명세서를 통해 문맥에서 달리 필요하지 않으면, "포함하다" 및 "포함하는"이란 말은 제시된 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군을 포함하나, 임의의 다른 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군이 배제되지는 않음을 내포하는 것으로 이해하여야 한다.

[0073] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0074] **<참고예 1>**

[0075] **<1-1> 균주의 배양**

[0076] 본 실험에 사용된 전체 *V. parahaemolyticus*의 70 균주, Vibrio 종의 40 균주 및 장내 non-Vibrio 균주 10종을 표 1에 기재하였다. 모든 비브리오 및 비-비브리오 종을 배양하여 Brain Heart Infusion agar (Bacto)상에 유지시켰다.

표 1

[0077]

미생물	Source or reference
1 *V. aestuarianus*	KCCM 40863
2 *V. alginolyticus*	KCTC 2472, E
3 *V. anguillarum*	KCTC 2711, J-O-2, J-O-3, YT, NB10, E
4 *V. campbellii*	KCCM 41986
5 *V. cholerae*	KCCM 41626
6 *V. cincinnatiensis*	KCTC 2733
7 *V. damsella*	E
8 *V. diazotrophicus*	KCCM 41606
9 *V. fluvialis*	ATCC 33809
10 *V. furnissii*	KCTC 2731, E
11 *V. harveyi*	KCCM 40866
12 *V. hollisae*	KCCM 41680
13 *V. logei*	KCTC 2721
14 *V. mediterranei*	KCCM 40867
15 *V. metschinikovii*	KCTC 2736
16 *V. mimicus*	ATCC 33653
17 *V. natriegens*	KCCM 40868
18 *V. navarrensis*	KCCM 41682
19 *V. nereis*	KCCM 41667
20 *V. ordalii*	KCCM 41669
21 *V. parahaemolyticus*	KCCM 41664 KCCM 11965 KCTC 2471 37 E strains 30 C strains
22 *V. proteolyticus*	KCTC 2730
23 *V. tubiashii*	KCTC 2728
24 *V. vulnificus*	KCCM 41665, KCTC 2962, KCTC 2980, KCTC 2981, KCTC 2982, KCTC 2983, KCTC 2985, KCTC 2986, KCTC 2987, 2 E
25 *Aeromonas hydrophila*	KCTC 2358
26 *Escherichia coli* BL21 (DE3)	L
27 *E. coli* 0157	E
28 *Edwardsiella tarda*	E
29 *Enterobacter cloacae*	E
30 *Klebsiella oxyta*	E
31 *K. pneumoniae*	E
32 *Salmonella typhi*	E
33 *Shigella flexneri*	E
34 *Shigella sonnei*	E

[0078] **<1-2> 올리고뉴클레오티드 프라이머**

[0079] *V. parahaemolyticus* groEL 유전자의 510 bp-증폭된 부분의 특이적 증폭을 위해 gro-vp1: 5′-AGGTCAGGCTAAGCGCGTAAGC-3′ (서열번호 2) 및 gro-vp2: 5′-GTCACCGTATTCACCCGTCGCT-3′ (서열번호 3)의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 고안하여(도 1), NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 BLAST N 써치 프로그램을 사용하여 GenBank로부터 다른 비브리오 및 비-비브리오 종의 알려진 유전자 서열과 비교함으로써 그 특이성을 분석하였다. 상기 프라이머 세트는 Cosmo Genetech(한국)로부터 구입하여 사용하였다.

[0080] **<1-3> PCR 분석**

[0081] Kim et al. (2008)문헌을 참조하여 thermal cycler (2720 Thermal cycler, Applied Biosystems, California, USA)를 이용하여 16S rRNA 프라이머(27F and 1492R)로 PCR 분석을 수행하였다.

[0082] PCR 동안 *groEL* 프라이머를 사용하여 반응 변수들의 2 세트를 적용시켰다. 첫번째 세트는 94℃에서 5분동안 최초 변성(denaturation), 증폭 30 사이클(94℃ 에서 30초동안 변성, 69℃ 및 30초동안 프라이머 어닐링, 72℃ 및 30초동안 프라이머 확장); 72℃에서 7분동안 불완전하게 합성된 DNA의 최종 확장으로 구성하였다. 두번째 세트는 94℃에서 5분동안 최초 변성, 증폭 30 사이클(94℃ 에서 30초동안 변성, 72℃ 및 30초동안 프라이머 어닐링); 72℃에서 7분동안 불완전하게 합성된 DNA의 최종 확장으로 구성하였다. 증폭된 산물(3 μl)을 1.2% 아가로오스 겔 전기영동에 의해 분석하였다.

[0083] **<1-4> 검출 특이성**

[0084] *groEL* 프라이머의 종 특이성을 표 1에 리스팅된 모든 균주의 정제된 게놈 DNA를 증폭시켜 평가하였다. 게놈 DNA는 모든 비브리오 및 비-비브리오 균주의 순수배양으로부터 페놀-클로로포름 추출 및 에탄올 침전 방법(Ausubel et al. (1998) 참조)에 의해 정제하였다.

[0085] **<1-5> 인위적으로 감염된 조개류 및 도다리에서의 *V. parahaemolyticus* 검출**

[0086] 4종의 조개류(*Crassostrea gigas, Saxidomus purpuratus, Mytilus coruscus* 및 *Scapharca subcrenta*)를 시장에서 구입하여, 멸균시킨 인위적 해수로 별도로 균질화시켰다. 각 종의 균질액을 3그룹으로 나누고, 첫 그룹을 100 μl 1× PBS 중 *V. parahaemolyticus* KCCM 41664 (1.5×105 CFU ml-1100)로 접종시켰다. 두 번째 그룹은 *V. parahaemolyticus* KCCM 41664 (1.5×10^{5} CFU ml-1)로 접종시키고 게다가 *V. cholerae* 및 *V. vulnificus*로 접종시켰다. 세번째 그룹은 접종없이 음성적 대조군으로 남겨두었다.

[0087] 37℃에서 접종 5시간 및 18시간 후, 상업적 DNA 추출 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 전체 DNA를 모든 조직으로부터 추출하고 PCR을 수행하였다.

[0088] 9개의 명백히 건강한 넙치(flounders)(*Paralichthys olivaceus*)들이 공기가 통하는 플라스틱 컨테이너(15 L)에서 자랐다. 두 그룹에 조개류 조직을 감염시키는데 사용된 비브리오 종을 동일 양으로 복강 내 주입하였고, 세번째 그룹은 음성 대조군으로 사용하였다.

[0089] 접종 및 비접종 고기들의 내부 기관들(아가미, 간, 장 및 신장)을 감염 후 48시간째 수집하였다. DNA 추출 키트(Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 물고기 조직으로부터 전체 DNA를 추출하고 PCR 증폭을 수행하여 최적화된 반응물 농도 및 열적 순환 변수를 유지하였다.

[0090] **<1-6> 해수에서 *V. parahaemolyticus* 검출**

[0091] 해수에서 *V. parahaemolyticus*를 *groEL* 프라이머로 PCR에 검출할 수 있는지 여부를 확인하기 위해, 해수 샘플을 *V. parahaemolyticus* 로 접종시키고, 감염된 도다리 컨테이너로부터 해수 샘플을 각각 준비하였다.

[0092] 약 300ml의 자연 멸균된 해수를 *V. parahaemolyticus* KCCM 41664 (1.5×105 CFU ml^{-1})로 접종하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다.

[0093] 48시간 후 다른 해수 샘플을 감염된 도다리의 2그룹을 기르고 있는 컨테이너로부터 수집하였다. Cilliers et al. (2000)에 기재된 바와 같은 공정을 사용하여 해수로부터 DNA를 추출하고, 추출된 DNA 및 *groEL* 프라이머로 PCR을 수행하여 *V. parahaemolyticus* 를 검출하였다.

[0094] **<1-7> 검출 민감도**

[0095] 검출 민감도를 체크하기 위해, *V. parahaemolyticus* 유래 1 μg의 염색체 DNA 및 인위적으로 감염된 굴 조직으로부터 추출한 DNA 1 μg을 증류수에 10배 연속적으로 희석시키고(희석 범위 1 μg ~ 10 pg), PCR 증폭 대상으로 하였다.

[0096] **<실시예 1>**

[0097] ***groEL* 프라이머의 특이성**

[0098] 16S rRNA 프라이머들을 사용하여 PCR 후 모든 24 *Vibrio* 및 7 non-*Vibrio* 종으로부터 1,466 bp 밴드들이 나타났다(도 2A 참조).

[0099] *groEL* 프라이머에 의한 *V. parahaemolyticus* DNA 증폭은 69° C (도 2B 참조) 및 72° C (도 2C)에서 510 bp 프래그먼트를 수득한 반면, 50 non-*V. parahaemolyticus* 박테리아 균주로부터는 아무런 생성물이 없었다. 이를 표 2에 기재하였다. *V. parahaemolyticus*의 모든 70 균주로부터 추출한 DNA로도 유사한 패턴이 관찰되었다(데이터 도시 않음).

표 2

[0100]

미생물	Source or reference	PCR reaction
1 *V. aestuarianus*	KCCM 40863	-
2 *V. alginolyticus*	KCTC 2472, E	-
3 *V. anguillarum*	KCTC 2711, J-O-2, J-O-3, YT, NB10, E	-
4 *V. campbellii*	KCCM 41986	-
5 *V. cholerae*	KCCM 41626	-
6 *V. cincinnatiensis*	KCTC 2733	-
7 *V. damsella*	E	-
8 *V. diazotrophicus*	KCCM 41606	-
9 *V. fluvialis*	ATCC 33809	-
10 *V. furnissii*	KCTC 2731, E	-
11 *V. harveyi*	KCCM 40866	-
12 *V. hollisae*	KCCM 41680	-
13 *V. logei*	KCTC 2721	-
14 *V. mediterranei*	KCCM 40867	-
15 *V. metschinikovii*	KCTC 2736	-
16 *V. mimicus*	ATCC 33653	-
17 *V. natriegens*	KCCM 40868	-
18 *V. navarrensis*	KCCM 41682	-
19 *V. nereis*	KCCM 41667	-
20 *V. ordalii*	KCCM 41669	-
21 *V. parahaemolyticus*	KCCM 41664 KCCM 11965 KCTC 2471 37 E strains 30 C strains	+ + + + +
22 *V. proteolyticus*	KCTC 2730	-
23 *V. tubiashii*	KCTC 2728	-
24 *V. vulnificus*	KCCM 41665, KCTC 2962, KCTC 2980, KCTC 2981, KCTC 2982, KCTC 2983, KCTC 2985, KCTC 2986, KCTC 2987, 2 E	-

25 *Aeromonas hydrophila*	KCTC 2358	-
26 *Escherichia coli* BL21 (DE3)	L	-
27 *E. coli* 0157	E	-
28 *Edwardsiella tarda*	E	-
29 *Enterobacter cloacae*	E	-
30 *Klebsiella oxyta*	E	-
31 *K. pneumoniae*	E	-
32 *Salmonella typhi*	E	-
33 *Shigella flexneri*	E	-
34 *Shigella sonnei*	E	-

[0101] **<실시예 2>**

[0102] **인위적으로 감염된 조개류(shellfish), 도다리(flounder) 및 해수에서의 *V. parahaemolyticus* 검출**

[0103] 모든 조개류로부터 감염된 조직에서 *V. parahaemolyticus* 를 정확하고 구체적으로 검출할 수 있었다.

[0104] 모든 경우에서, 어닐링 온도 69℃ (도 2D 참조) 및 72℃(도시않음)에서 510 bp 증폭 산물이 생산되었다. *V. parahaemolyticus* 접종시키지 않은 조개류의 조직 균질물에서는 타겟 유전자 세그먼트의 증폭을 나타내지 않았다(도 2D 참조).

[0105] *groEL* 프라이머 역시, PCR 반응시 어닐링 온도 69℃ 및 72℃(도 2E 및 표 2 참조)에서 모든 샘플로부터 *V. parahaemolyticus* 를 검출할 수 있었다(표 3 참조).

표 3

[0106]

	PCR analysis
Shellfish homogenates	
Crassostrea gigas	++
Saxidomus purpuratus	++
Mytilus coruscus	++
Scapharca subcrenata	++
Water	
Sterilized seawater	++
Seawater containing infected fish	++
Fish (Flounder)	
Gill	+
Liver	+
Intestine	+
Kidney	+

[0107] a: ++, Strong band; +, light band

[0108] **<실시예 3>**

[0109] ***groEL* 프라이머의 민감도(Sensitivity) 분석**

[0110] *V. parahaemolyticuss* 검출을 위한 PCR 분석의 민감도를 도 3에 도시하였다.

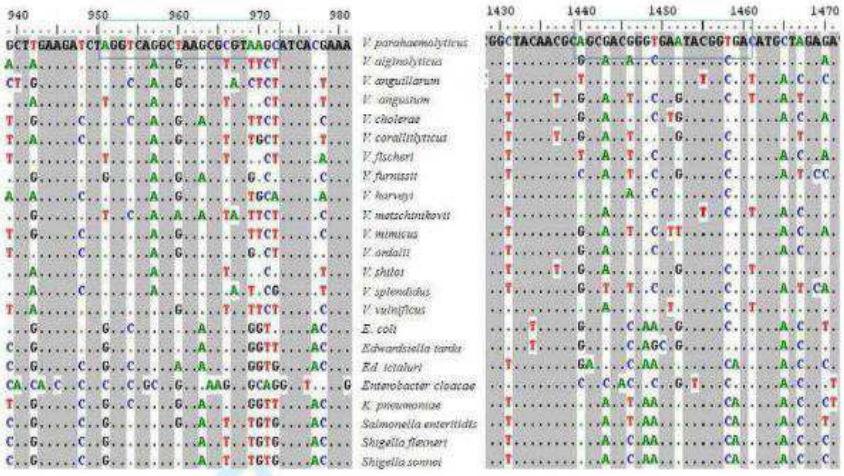
[0111] 정제된 DNA에서 *groEL* 타겟 검출에 대한 한계는 100pg이었다. 이러한 주형의 양으로 510 bp 밴드가 어닐링 온도 69℃ 및 72℃에서 생성되었다.

[0112] 민감도 측정결과 *groEL* 프라이머는 감염된 굴 조직으로부터 정제된 전체 DNA 1ng만큼 작은 양도 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

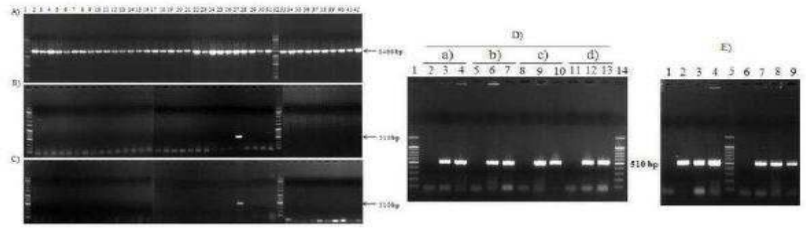
[0113] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

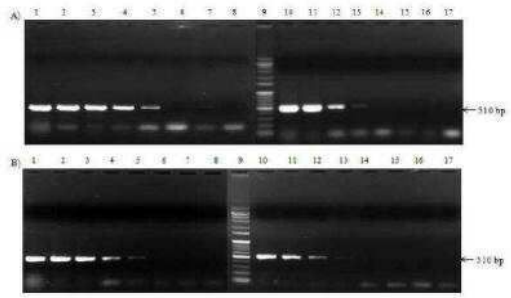
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of Pukyoung national University

<120> Composition for marker detecting of Vibrio parahaemolyticus

<130> np11-1268

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1644

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> V. parahaemolyticus groEL gene

<400> 1

atggctgcta aagacgttaa atttggtaat gacgcacgag ttaagatgct agaaggtgta 60

aacgttctgg ctgacgcagt gaaagtaaca ctgggtccta aaggtcgtaa cgtagttcta 120

gataaatctt tcggtgctcc aaccatcact aaagacggtg tatctgtagc gcgtgaaatt 180

gagctggaag acaagttcca gaacatgggc gcgcaaatgg ttaaagaagt agcgtctaaa 240

gcaaacgacg ctgcgggtga cggtacaaca acagcaaccg tactagcgca agcaatcgta 300

aacgaaggtc taaaagcagt tgcagcgggt atgaacccaa tggatcttaa gcgcggtatc 360

gacaaagctg ttgcagcggc agtagagcaa ctaaaagagc tttctgttga gtgtaacgac 420

accaaagcaa tcgctcaggt tggtactatc tctgcgaact ctgacgcaag cgtaggtaac 480

atcattgctg aagcaatgga acgcgttggc cgcgacggtg ttatcactgt tgaagaaggt 540

caggctctac aagacgagct agacgtagta gaaggtatgc agttcgatcg cggttaccta 600

tctccttact tcatcaacaa ccaagaagcg ggcagcgttg agctagaaaa cccattcatc 660

cttctagttg ataagaagat ctcaaacatt cgtgagcttc taccaactct agaagcagta 720

gcaaaagcat ctcgtccact gctaatcatc gcagaagacg tagaaggcga agctctagcg 780

acattggttg tgaacaacat gcgtggcatc gtgaaagttg ctgcggttaa agcgcctggt 840

tttggtgacc gtcgtaaagc aatgctacaa gacatcgcta tcctaactgg cggtactgtg 900

atttctgaag aaatcggtct agaactagaa aaagtaacgc ttgaagatct aggtcaggct 960

aagcgcgtaa gcatcacgaa agaaaactca accatcatcg atggtgcggg tgaagaagcg 1020

atgatccaag gccgcgttgc tcaaattcgt caacaaatcg aagacgcaac ttcagactac 1080

gacaaagaga aactgcaaga gcgcgttgct aaactggctg gcggtgttgc agtaatcaaa 1140

gttggtgcag cgactgaagt tgaaatgaaa gagaaaaaag accgcgtaga agacgcgcta 1200

cacgcgactc gcgcagcggt tgaagaaggc gtagttgcag gtggtggtgt tgcactaatc 1260

cgcgctgcat ctaagattgt tgacctagaa ggcgacaacg aagaacaaaa cgttggtatc 1320

cgcgttgcgc tacgcgcaat ggaagcacca atccgtcaaa tcacgaagaa cgcaggtgac 1380

gaagactctg ttgttgcgaa caacgtgaaa gcgggtgaag gttcttacgg ctacaacgca 1440

gcgacgggtg aatacggtga catgctagag atgggtatcc tagacccaac taaagtaact 1500

cgtagcgctc tacaatttgc agcgtctgtc gctggtctca tgatcacaac agaagcgatg 1560

gtaactgacc taccacaaaa agaaagcgca ggcatgcctg acatgggtgg tatgggcggt 1620

atgggtggca tgggcatgat gtaa 1644

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer of groEL gene

<400> 2

aggtcaggct aagcgcgtaa gc 22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer of groEL gene

<400> 3

gtcaccgtat tcacccgtcg ct 22