(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0030190
(43) 공개일자 2017년03월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2013.01)
C12Q 1/6844 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0127421
(22) 출원일자 2015년09월09일
심사청구일자 2015년09월09일

(71) 출원인
주식회사 엠모니터
대구광역시 달서구 성서공단로11길 62 , 633호(호산동, 대구융합알앤디센터)
(72) 발명자
전효성
대구광역시 수성구 범어로 61
신수정
대구광역시 수성구 수성로 412
송혜순
대구광역시 북구 내곡로 89
(74) 대리인
박원미

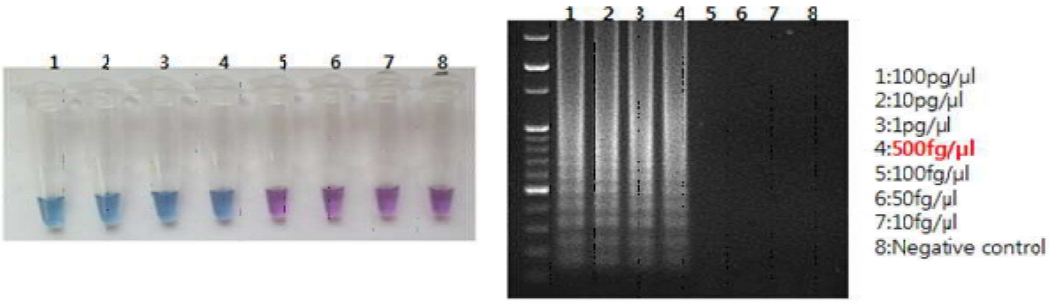
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **LAMP를 이용한 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출용 프라이머 및 그 용도**

(57) 요 약

본원은 식중독균인 클로스트리디움 퍼프린젠스를 등온증폭 방식으로 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 세트, 이를 포함하는 조성물 또는 키트, 및 이를 이용한 방법을 개시한다. 본원에 따른 프라이머 세트는 높은 민감도와 특이성은 물론 신속하게 검체 또는 식품 내 병원체의 감염 또는 오염 여부 검출할 수 있으며, 또한 필요한 경우 반응 종결 후 전기영동과 같은 별도의 처리 없이 바로 검출이 가능하여 편리성이 증대된다.

대 표 도 - 도6b



(52) CPC특허분류
C12Q 2531/119 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014M3A9E2064642
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 미생물 검출을 위한 모바일기기 기반 체외진단기 플랫폼 개발
기 여 율 1/1
주관기관 (주)엠모니터
연구기간 2014.10.01 ~ 2017.09.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

F3 프라이머, B3 프라이머, FIP 프라이머, BIP 프라이머를 포함하는 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 검출을 위한 LAMP 분석용 프라이머 세트로,

상기 F3 프라이머는 서열번호 1 또는 7에서 선택되고;

상기 B3 프라이머는 서열번호 2 또는 8에서 선택되고;

상기 FIP 프라이머는 서열번호 3 또는 9에서 선택되고;

상기 BIP 프라이머는 서열번호 4 또는 10에서 선택되는 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 검출을 위한 LAMP 분석용 프라이머 세트.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 LF 프라이머 및 LB 프라이머를 추가로 포함하며,

상기 LF 프라이머는 서열번호 5 또는 서열번호 11에서 선택되고,

상기 LB 프라이머는 서열번호 6 또는 서열번호 12에서 선택되는, 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출을 위한 LAMP 분석용 프라이머 세트.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 다음 중에서 선택되는 것인, 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출을 위한 LAMP 분석용 프라이머 세트:

서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4를 포함하는 프라이머 세트;

서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 10을 포함하는 프라이머 세트;

서열번호 7, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4를 포함하는 프라이머 세트; 또는

서열번호 1, 서열번호 8, 서열번호 3 및 서열번호 4를 포함하는 프라이머 세트.

청구항 4

제 2 항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 다음 중에서 선택되는 것인, 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출을 위한 LAMP 분석용 프라이머 세트:

서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6을 포함하는 프라이머 세트;

서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12를 포함하는 프라이머 세트;

서열번호 7, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6을 포함하는 프라이머 세트;

서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 11 및 서열번호 6을 포함하는 프라이머 세트;

서열번호 1, 서열번호 8, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6을 포함하는 프라이머 세트; 또는

서열번호 7, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 11 및 서열번호 6을 포함하는 프라이머 세트.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 각 세트의 하나 이상의 프라이머는 검출가능한 표지 물질로 표지된 것인, 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출을 위한 LAMP 분석용 프라이머 세트.

청구항 6

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 따른 프라이머 세트를 이용한 인비트로에서 LAMP 방식으로 클로스트리디움 퍼프린젠스를 검출하는 방법으로, 상기 방법은 하기의 단계를 포함하는 방법:

클로스트리디움 퍼프린젠스 감염 또는 오염이 의심되는 시료를 제공하는 단계;

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 따른 프라이머 세트를 제공하는 단계;

상기 시료 및 프라이머 세트를 이용하여 LAMP 반응을 수행하는 단계; 및

상기 LAMP 반응 중 또는 종료 후에 반응 결과물을 분석하고, 이를 대조군 시료와 비교하여 차이가 있는 경우, 상기 시료를 클로스트리디움 퍼프린젠스 감염 또는 오염으로 판정하는 단계.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 시료는 혈액, 분변, 소변 또는 채액을 포함하는 가검물, 식재료, 식품, 사료, 식품용수, 또는 음용수, 또는 공중시설의 물, 조리도구 또는 병원기구를 포함하는 환경검체인, 방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서,

상기 LAMP 반응 결과물의 분석은 상기 반응 결과물의 색변화 측정 또는 탁도 (turbidity) 중 하나 이상을 이용하여 측정을 통해 결정되는 것인, 방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 따른 프라이머 세트를 포함하는 LAMP 방식을 이용한 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출용 조성물.

청구항 10

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 따른 프라이머 세트를 포함하는 LAMP 방식을 이용한 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출용 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본원은 LAMP 방식을 이용한 식중독을 야기하는 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)를 정확하고 신속하게 검출하는 프라이머 및 그 용도와 관련된 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식중독은 병원성 세균, 독소, 바이러스, 기생충, 화학물질, 자연독 등에 오염된 음식물 섭취함으로써 나타나는 증상을 말하며, 주요 증상은 원인에 따라 복통, 구역질, 구토, 설사, 발열, 두통, 피로감, 두드러기 등을 포함한다(Heymann DL. Control of Communicable Diseases Manual. pp 232-242. The American Public Health Association. Washington. 2004.). 미생물에 의한 식중독은 세균성 식중독과 바이러스성 식중독으로, 세균성 식중독은 독소형과 감염형으로 구분한다. 독소형 식중독의 원인균은 황색포도상구균, 바실루스 세레우스균, 클로스트리디움균 등이고, 감염형 식중독의 원인균은 병원성 대장균, 장염 비브리오균, 살모넬라균, 시겔라균 등이 있다.

[0003] 독소형 식중독의 주 원인균인 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 균은 그람 양성, 운동성이 없는 혐기성의 아포 형성 간균으로 토양, 하천, 하수, 먼지 등 자연환경, 건강한 사람이나 동물의 장관 내 및 식품 등에 널리 존재하며, 특히 아포는 100℃에서 1~4시간 가열해도 사멸되지 않는 내열성이다. (Czeczulin JR1, Collie RE, McClane BA. Regulated expression of Clostridium perfringens enterotoxin in naturally cpe-negative type A, B, and C isolates of C. perfringens. Infect Immun. 1996 Aug;64(8):3301-9; Miyamoto K1, Li J, McClane BA. Enterotoxigenic Clostridium perfringens: detection and identification. Microbes Environ. 2012;27(4):343-9. Epub 2012 Apr 14; 병원성 미생물도감. 2013. http://www.nifds.go.kr_2015년 8월17일 접근).

[0004] 클로스트리디움 퍼프린젠스는 의심되는 음식에서 10^5 cfu/g 이상의 균이 자라거나 대변 검체에서 10^6 cfu/g 이상의 세균수가 존재하여 포자를 생산하는 과정 중에 만들어지는 독소(*Clostridium perfringens* enterotoxin, CPE)를 분비함으로써 식중독을 야기한다 (Miyamoto *ibid*; 병원성 미생물도감. 2013. http://www.nifds.go.kr_2015년 8월17일 접근). 균은 분비하는 독소의 종류(alpha, beta, epsilon 및 iota)에 따라 A 내지 F의 6가지 유형으로 분류되고 그 중 A(alpha 독소)형 균이 대표적인 식중독 원인균이며, C(alpha 및 beta 독소)형 균에 의한 것도 보고되고 있다(Czeczulin, *ibid*; Miyamoto K1, *ibid*).

[0005] 그리고 일년내내 발생하여 계절적인 편중현상은 거의 찾기 어렵고, 감염형 식중독에 비해 잠복기가 짧아 단시간에 대규모의 집단발생을 특징으로 하고 있다(병원성 미생물도감. 2013. http://www.nifds.go.kr_2015년 8월17일 접근).

[0006] 식품의약품안전처 식중독통계시스템의 원인균별 식중독 발생현황(2002~2014년) 자료를 보면, 클로스트리디움 퍼프린젠스에 의한 총 환자수는 4,891명으로, 2011년에는 324명, 2013년에는 516명, 2014년에는 1,689명인 것으로 나타났으며, 증가추세에 있다.

[0007] 이와 같이 현재 학교급식, 핵가족화, 맞벌이 및 고령화 등 사회 변화로 인한 집단급식의 증가, 생활수준 향상에 의한 외식의 증가, 즉석식품의 수요증가 등으로 인해 식중독 발생 비율이 증가하고 있다.

[0008] 대한민국 등록특허공보 1544050호는 박테리아 검출용 키트 및 방법에 관한 것으로 클로스트리디움을 항체를 이용하여 검출하는 방법을 개시한다.

[0009] 하지만 최근 들어서는 식중독이 계절에 상관없이 발생하고, 급식의 보급으로 규모도 점차 대형화하고 있어 식중독 발생의 감소 및 억제를 위한 병원체를 신속하고 정확하게 확인할 수 있는 민감도 및 특이성이 높은 새로운 기술에 기반한 모니터링 및 신속검사법 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본원은 높은 민감도와 특이성을 나타내면서도 신속하고 간편하게 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 감염여부를 검출할 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 한 양태에서 본원은 F3 프라이머, B3 프라이머, FIP 프라이머, BIP 프라이머를 포함하는 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 검출을 위한 LAMP 분석용 프라이머 세트를 제공하며, 상기 F3 프라이머는 서열번호 1 또는 7에서 선택되고; 상기 B3 프라이머는 서열번호 2 또는 8에서 선택되고; 상기 FIP 프라이머는 서열번호 3 또는 9에서 선택되고; 상기 BIP 프라이머는 서열번호 4 또는 10에서 선택되는 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 검출을 위한 LAMP 분석용 프라이머 세트를 제공한다.

[0012] 본원에 따른 각 프라미어 세트에 포함되는 F3 프라이머, B3 프라이머, FIP 프라이머, BIP 프라이머는 다양한 조합으로 포함될 수 있으며, 본원에 따른 일 구현예에서는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4를 포함하는 프라이머 세트; 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 10을 포함하는 프라이머 세트; 서열번호 7, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4를 포함하는 프라이머 세트; 또는 서열번호 1, 서열번호 8, 서열번호 3 및 서열번호 4를 포함하는 프라이머 세트와 같은 조합으로 포함될 수 있다.

[0013] 본원에 따른 프라이머 세트는 신속한 반응을 위해 LF 프라이머 및 LB 프라이머를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 LF 프라이머는 서열번호 5 또는 서열번호 11에서 선택되고, 상기 LB 프라이머는 서열번호 6 또는 서열번호 12에서 선택된다.

[0014] 본원에 따른 각 프라미어 세트에 포함되는 F3 프라이머, B3 프라이머, FIP 프라이머, BIP 프라이머, LF 및 LB 프라이머는 다양한 조합으로 포함될 수 있으며, 본원에 따른 일 구현예에서는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6을 포함하는 프라이머 세트; 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12를 포함하는 프라이머 세트; 서열번호 7, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6을 포함하는 프라이머 세트; 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 11 및 서열번호 6을 포함하는 프라이머 세트; 서열번호 1, 서열번호 8, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6을 포함하는 프라이머 세트; 또는 서열번호 7, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 11 및 서열번호 6을 포함하는 프라이머 세트와 같은 조합으로 포함된다.

[0015] 본원에 따른 프라이머 세트는 실시간으로 또는 반응 종결시 증폭산물의 검출을 위해 필요한 경우, 각 세트에 포함된 하나 이상의 프라이머는 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다.

[0016] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 프라이머 세트를 포함하는 LAMP 방식을 통해 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)를 검출하기 위한 키트 또는 조성물을 제공한다.

[0017] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 개시된 프라이머 세트, 조성물 및/또는 키트를 이용하여 LAMP 방식을 통해 인비트로에서 클로스트리디움 퍼프린젠스를 검출하는 방법에 관한 것으로, 클로스트리디움 퍼프린젠스 감염 또는 오염이 의심되는 시료를 제공하는 단계; 본원에 따른 프라이머 세트를 제공하는 단계; 상기 시료 및 프라이머 세트를 이용하여 LAMP 반응을 수행하는 단계; 및 상기 LAMP 반응 중 또는 반응 종료 후에 결과를 분석하고, 이를 대조군 시료와 비교하여 차이가 있는 경우, 상기 시료를 클로스트리디움 퍼프린젠스 감염 또는 오염으로 판정하는 단계를 포함한다.

[0018] 본원에 따른 프라이머 세트, 키트 및/또는 조성물은 클로스토리디움의 검출이 필요한 다양한 시료, 예를 들면 식품용수, 음용수, 보존식, 섭취식품, 식재료를 포함하는 각종 식품; 사료; 혈액, 소변, 분변, 또는 체액을 포함하는 가검물; 또는 상수도, 지하수, 공중시설의 물, 도마, 칼, 행주를 포함하는 조리도구 또는 병원에서 사용하는 각종 장비 또는 장치를 포함하는 환경검체에 대하여 이용될 수 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본원에 따른 방법에서 LAMP 반응 결과의 분석은 실시간 또는 반응 종료 후에 모두 가능하며, 증폭 여부는 예를 들면 색변화 측정 또는 탁도 (turbidity) 중 하나 이상을 이용한 측정을 통해 결정되며, 대조군과 비교하여 색이 변화하거나 탁도가 증가한 경우, 증폭이 된 것으로 클로스토리디움 양성으로 판단할 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본원에 따른, 클로스트리디움 퍼프린젠스를 등온증폭 방식으로 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 세트, 이를 포함하는 조성물 또는 키트, 및 이를 이용한 방법은 높은 민감도와 특이성은 물론 신속하게 검체 또는 식품 내

병원체의 오염 여부 검출할 수 있으며, 또한 필요한 경우 반응 종결 후 전기영동과 같은 별도의 처리 없이 바로 검출이 가능하여 편리성이 증대된다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본원의 일 구현예 따른 표 1에 기재된 조합의 클로스트리디움 퍼프린젠스 특이적 LAMP 프라이머 세트를 이용한 민감도를 색변화 및 아가로스젤 전기영동으로 검출한 결과이다.

도 2는 본원의 다른 구현예 따른 표 2에 기재된 조합의 클로스트리디움 퍼프린젠스 특이적 LAMP 프라이머 세트를 이용한 민감도를 색변화 및 아가로스젤 전기영동으로 검출한 결과이다.

도 3은 본원의 또다른 구현예 따른 표 3에 기재된 조합의 클로스트리디움 퍼프린젠스 특이적 LAMP 프라이머 세트를 이용한 민감도를 색변화 및 아가로스젤 전기영동으로 검출한 결과이다.

도 4는 본원의 또다른 구현예 따른 표 4에 기재된 조합의 클로스트리디움 퍼프린젠스 특이적 LAMP 프라이머 세트의 민감도를 색변화 및 아가로스젤 전기영동으로 검출한 결과이다.

도 5는 본원의 또다른 구현예 따른 표 5에 기재된 조합의 클로스트리디움 퍼프린젠스 특이적 LAMP 프라이머 세트를 이용한 민감도를 색변화 및 아가로스젤 전기영동으로 검출한 결과이다.

도 6은 본원의 또다른 구현예 따른 표 6에 기재된 조합의 클로스트리디움 퍼프린젠스 특이적 LAMP 프라이머 세트의 특이성 및 민감도를 색변화 및 아가로젤 전기영동으로 관찰한 결과이다.

상기 각 도면에서 민감도는 적색으로 표시하였다. 각 세트별로 총 7개의 다른 농도 및 음성대조군에서 반응이 수행되었으며 각 농도는 다음과 같다: 1:100pg/㎕; 2:10pg/㎕; 3:1pg/㎕; 4:500fg/㎕; 5:100fg/㎕; 6:50fg/㎕; 7:10fg/㎕ 및 8:음성 대조군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본원은 LAMP 방식을 이용하여 클로스트리디움 퍼프린젠스를 핵산 수준에서 높은 정확도와 민감도로 용이하게 검출할 수 있다는 발견에 근거한 것으로, 본원은 클로스트리디움 퍼프린젠스를 LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification, 루프 매개 등온 증폭방법)으로 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 세트, 이를 포함하는 조성물 또는 키트, 및 상기 프라이머 세트 또는 조성물 또는 키트를 이용한 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출 방법에 관한 것이다.

[0023] 한 양태에서 본원은 클로스트리디움 퍼프린젠스를 특이적으로 검출할 수 있는 LAMP 분석용 프라이머 세트에 관한 것이다.

[0024] 본원에서 사용된 용어 “프라이머”는 단일가닥의 올리고뉴클레오타이드로 폴리머라제를 이용한 핵산 증폭 또는 합성 반응에서 그 3‘ 말단에 뉴클레오타이드가 공유결합에 의해 추가되어 연장되는 핵산 분자를 일컫는 것이다. 본원에 따른 프라이머 세트는 핵산의 증폭 즉 LAMP 분석에 사용되는 것이다. 본원에서는 검출의 민감도, 특이도, 신속성 및 편리성을 고려하여, 독소 유전자 또는 그 주변에 특이적으로 결합할 수 있도록 결합 위치를 조정하여 다양한 조합으로 구성될 수 있는 프라이머를 디자인하였다.

[0025] 본원에서 용어 “핵산”은 단일가닥 또는 이중 가닥의 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드로, 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 RNA 또는 DNA 분자 또는 그 유사체 및 그 유도체를 일컫는 것이다. 본원에 따른 프라이머 세트가 사용되는 클로스트리디움 퍼프린젠스 핵산은 유전체의 전부 또는 일부를 포함하고, 일 구현예에서는 DNA를 포함하는 것이다.

[0026] 본원에서 사용된 용어 “올리고뉴클레오타이드” 및 “폴리뉴클레오타이드”는 혼용되어 사용되며, 어느 하나는 양자를 모두 포함하는 것이다. 용어 “프라이머”도 “올리고뉴클레오타이드” 및 “폴리뉴클레오타이드”와 혼용되어 사용될 수 있으며, 핵산 (RNA or DNA), 앱타머 등을 포함하는 것이다.

[0027] 본원에서 용어 “검출”은 클로스트리디움 퍼프린젠스의 오염 또는 감염 여부를 핵산의 존재여부 또는 존재할 경우 그 양을 분석하는 것으로, 특히 후술하는 LAMP 분석에 기반을 둔 것이다.

[0028] 본원에서 사용된 용어 “표적” 또는 “표적 핵산”은 본원의 프라이머 세트가 결합하여 본원에 따른 프라이머 세트에 의해 특이적으로 증폭되는 핵산 서열을 일컫는 것으로, RNA 또는 DNA를 포함하는 것이다.

[0029] 본원에 따른 프라이머는 표적 핵산에 상보성을 통해 특이적으로 결합을 하고 LAMP 방식으로 표적 핵산을 증폭한다. LAMP는 등온조건에서 높은 민감도와 특이성으로 표적 핵산을 증폭할 수 있는 핵산 증폭 방법 (Notomi, T. et al. 2000.Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. Nucleic Acids Res 28, E63)으로 가닥교체 (strand displacement) 활성을 갖는 DNA 폴리머레이즈 및 표적 핵산의 여러 부위에서 특이적으로 고안된 최소 4개의 프라이머 세트 (한국 특허 제612551호 등 참고)를 표준 방법으로 하여, 6개의 프라이머 세트를 이용한 방법 (Nagamine, K. et al. 2002. Accelerated reaction by Loop mediated isothermal amplification using loop primers. Mol Cell Probes 16, 223-9 등 참고)을 모두 포함하는 것이다.

[0030] 본원에서 용어 “상보적” 또는 “상보성”은 소정의 혼성화 (교잡), 결합 또는 어닐링 조건에서 프라이머 또는 올리고뉴클레오타이드가 표적 핵산에 와슨-크릭 염기의 페어링을 통해 서열 특이적으로 결합 할 수 있는 상태를 일컫는 것으로, 부분적 상보성, 실질적으로 상보성(substantially complementary) 및 완전 상보성 (perfectly complementary)인 것을 모두 포함한다. 실질적으로 상보성이란, 두 가닥의 핵산 서열이 서로 완전히 상보적인 것은 아니지만, 표적 핵산에 결합하여 본원에 따른 효과 즉 표적 서열을 LAMP 방식을 통해 증폭할 수 있는 정도의 상보성을 의미하는 것이다.

[0031] 본원에서 사용된 용어 “교잡”또는 “혼성화”는 두 가닥의 상보적 핵산분자가 수소결합을 통해 서열특이적인 복합체를 형성하는 반응을 의미하는 것이다. 교잡은 본원에 따른 프라이머가 사용되는 LAMP 반응에서 프라이머가 표적 핵산 또는 주형 (template)의 결합하는 단계를 구성할 수 있다. 교잡의 정도는 이에 관여하는 임의의 두 개의 핵산 분자의 상보성 정도, 이들의 변성 온도 (melting temperature, Tm) 또는 교잡의 엄격도 (stringency)와 같은 다양한 인자에 의해 영향을 받는다. 교잡 반응 조건도 이를 고려하여 결정될 수 있다. 교잡 반응의 엄격도는 서로 교잡하고자하는 임의의 두 개의 핵산 분자가 얼마나 용이하게 결합할 수 있는 지를 결정하는 조건으로, 상보성, 반응 온도, 이온 강도 및/또는 교잡 반응액에 포함되는 일반적인 물질의 농도 및 종류에 따라 결정될 수 있으며, 예를 들면 J. Sambrook and D. W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 4th Ed., 2012; and F. M. Ausubel, Ed., Short Protocols in Molecular Biology, Wiley; 5th Ed, 2002 등에 기재된 것을 참고 할 수 있다.

[0032] 본원에서 특이적 결합 또는 교잡은 특정 핵산 분자 또는 프라이머가 표적이 아닌 다른 핵산 이외의 핵산에는 실질적으로 결합하지 않고 표적 핵산에만 결합하는 것을 의미한다. 본원에 따른 프라이머는 높은 엄격도 조건에서 본원에 따른 표적인 클로스트리디움 퍼프린젠스 핵산 또는 그 상보서열에 특이적으로 결합할 수 있으며, 주형 기반의 DNA 합성에서 프라이머 서열 길이, 완충액, 핵산 종류, pH, 마그네슘 농도 및 반응온도 등을 고려하여 결정할 수 있을 것이다.

[0033] 본원에 따른 프라이머는 클로스트리디움 퍼프린젠스를 LAMP 방식을 통해 특이적으로 검출할 수 있도록 디자인된 것으로, 표적 핵산 또는 그 상보서열에 특이적으로 결합한다. 본원에 따른 프라이머는 다양한 조합으로 세트를 이루어 클로스트리디움 퍼프린젠스 알파 독소 유전자 부위를 특이적으로 인식하여 높은 민감도로 균을 검출할 수 있도록 디자인 되었다.

[0034] 상술한 바와 같이 표준 LAMP 반응에는 최소 4 종류의 다음과 같은 프라이머가 사용된다: FIP (forward inner primer), BIP (backward inner primer), F3 (forward outer primer) 및 B3 (backward outer primer). 그리고 신속한 반응 (Accelerated LAMP)을 위해서는 LF (Loop F) 및 LB (Loop B)를 추가로 포함하여 총 6개의 프라이머가 사용될 수 있다. 각 F3 프라이머, B3 프라이머, FIP 프라이머, BIP 프라이머, Loop F 프라이머 (LF), 및 Loop B (LB)프라이머의 특징 및 기능에 대하여 앞서 언급한 문헌 Notomi et al., 2000; 및 Nagamine et al., 2002을 참고할 수 있다.

[0035] 본원에 따른 표적 핵산 또는 그 상보서열에 특이적으로 결합하는 프라이머는 길이가 최소 10 뉴클레오타이드이며, F3와 B3의 경우 최소 15 뉴클레오타이드 이며, FIP와 BIP의 경우 최소 30 뉴클레오타이드이며, LF와 LB의 경우 최소 15 뉴클레오타이드이다. 표적 핵산의 상응하는 부분과 최소 70%의 상보성, 특히 80% 상보성, 더욱 90% 상보성, 더더욱 특히 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 상보성을 가진다.

[0036] 본원에 따른 LAMP 프라이머는 표적인 클로스트리디움 퍼프린젠스 핵산에 특이적으로 결합하여 이를 높은 민감도로 검출한다. 일 구현예에서 본원에 따른 프라이머 세트에 포함되는 F3 프라이머는 서열번호 1 또는 7에서 선택되고, B3 프라이머는 서열번호 2 또는 8에서 선택되고, FIP 프라이머는 서열번호 3 또는 9에서 선택되고, BIP 프라이머는 서열번호 4 또는 10에서 선택되며, 상기 각 서열은 이와 실질적으로 동일한 서열의 프라이머를 포함한다. 다른 구현예에서는 6개의 프라이머 세트를 포함하며, 예를 들면 상기 각 프라이머 세트는 서열번호 5 또는 서열번호 11의 LF 프라이머 및 서열번호 6 또는 12의 LB 프라이머 또는 이와 실질적으로 동일한 서열로 표시

되는 서열의 프라이머를 추가로 포함한다. 본원에 개시된 각 F3 프라이머, B3 프라이머, FIP 프라이머, 및 BIP 프라이머는 다양한 조합으로 사용될 수 있으며, LB 및 LF를 추가로 포함하는 경우도 다양한 조합으로 포함될 수 있다.

[0037] 본원에 따른 프라이머는 이와 실질적으로 동일한 것을 포함하며, 표적 핵산 또는 그 상보서열에 특이적으로 결합한다. 실질적으로 동일한 서열의 프라이머는 서열번호 1 내지 12로 표시되는 프라이머와 70%의 상보성, 특히 80% 상보성, 더욱 특히 90% 상보성, 더더욱 특히 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 상보성을 가진다. FIP 및 BIP의 경우 각각 표적핵산 및 그 상보서열에 결합하는 두 가지의 서열이 표적 핵산에 결합하지 않는 링커에 의해 연결될 수 있으며 이 경우 상보성은 링커 부분을 제외한 부분과 상보성을 의미하는 것이다.

[0038] 일 구현예에서는 6개의 프라이머를 포함하는 프라이머 세트가 사용되며, 예를들면 표 1 내지 표 6의 조합을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다.

[0039] 본원에 따른 프라이머 및 이를 포함하는 조성물 또는 키트 및 방법은 감염 또는 오염 여부 검출을 위해 위해세균의 감염 또는 오염여부가 의심되는 다양한 시료에서 오염, 또는 감염 여부의 스크리닝, 존재 유무 검출 및 정량을 위한 다양한 분석에 유용하게 사용될 수 있다.

[0040] 본원에 따른 프라이머 세트, 방법, 또는 키트가 사용될 수 있는 시료는 예를 들면 식품용수, 음용수, 보존식, 섭취식품, 식재료를 포함하는 각종 식품; 사료; 혈액, 소변, 분변, 또는 체액을 포함하는 가검물; 또는 상수도, 지하수, 공중시설의 물, 도마, 칼, 행주를 포함하는 조리도구 또는 병원에서 사용하는 각종 장비 또는 장치를 포함하는 환경검체 대하여 실시될 수 있다. 시료를 채취하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면 식중독균이 오염되었다고 의심되는 시료를 채취한 후, 이를 멸균수 또는 0.85% 생리식염수에 현탁한 후 프로테나제 K(Proteinase K)를 처리한 후 펠렛을 회수한 후 열수추출하여 LAMP 반응을 수행할 수 있다.

[0041] 또한 이러한 생물학적 시료는 검사 직전에 통상의 시료 수득방법에 의해 직접 수득한 것이거나 또는 미리 분리되어 보관된 것일 수 있다.

[0042] 또 다른 구현예에서 본원에 따른 시료는 상술한 시료로부터 분리된 핵산이 시료로서 사용될 수 있다. 분리란 핵산이 포함되어 있던 시료로부터의 분리된 것으로, 다양한 순도로 분리된 것을 포함하는 것이다.

[0043] 본원에 따른 프라이머 및 이를 포함하는 조성물 또는 키트 및 방법은 위해 세균이 존재할 가능성이 있는 임의의 시료에서 세균의 검출을 위해 LAMP 방식의 분석에 사용된다.

[0044] LAMP 분석을 위한 반응에는 본원에 따른 프라이머 세트, dNTPs, 완충액, 마그네슘 및 DNA 폴리머라제 및 시료가 사용된다. 또한 반응을 향상시키기 위한 베타인 또는 DMSO와 같은 물질을 추가로 포함할 수 있다. 반응물에 포함되는 프라이머 세트는 앞서 설명한 바와 같으며, 4개 또는 6개의 프라이머 세트가 사용될 수 있다.

[0045] 마그네슘은 마그네슘 아세테이트, 마그네슘 클로라이드 또는 마그네슘 설페이트와 같은 염의 형태로 사용된다.

[0046] 완충액은 예를들면 소디움포스페이트 완충액, 포타슘포스페이트 완충액, Tris-HCl 완충액 또는 Tricine 완충액 같은 것이 사용될 수 있다.

[0047] 반응에 사용될 수 있는 DNA 폴리머라제는 호열성 미생물 유래의 폴리머라제로서, 특히 5‘->3’ 엑소뉴클리아제 기능이 결여된 폴리머라제를 포함한다. 비제한적 예로는 *Bacillus stearothermophilus*, Bst, DNA 폴리머라제; *Thermus*, *thermophilus*, Tth, DNA 폴리머라제; *Thermus aquaticus*, Taq, DNA 폴리머라제; *Thermococcus litoralis* DNA 폴리머라제; *Pyrococcus furiosus*, Pfu, DNA 폴리머라제; 및 *Bacillus caldotenax* DNA 폴리머라제를 포함한다.

[0048] 또한 반응물에는 dNTP 대신에 뉴클레오타이드 유사체 (analog)도 사용될 수 있다. 뉴클레오타이드 유사체는 변형되거나 또는 자연에서 발견되지 않는 것으로 주형 유도된 DNA 합성 과정에서 천연의 뉴클레오타이드와 함께 또는 단독으로 중합될 수 있는 것이다. 이러한 와슨 크릭 베이스 페어링을 통해 중합될 수 있는 유사체로 뉴클레오타이드 베이스의 유사를 포함하는 것은 예를 들면 치환된 퓨린 또는 피리미딘, 데아자퓨린, 메틸퓨린, 메틸피리미딘, 아미노퓨린, 아미노피리미딘, 티오퓨린, 티오피리미딘, 인돌, 피롤, 7-데아자구아닌, 7-메틸구아닌, 하이포잔틴, 쉐도사이토신, 쉐도아이소사이토신, 아이소사이토신, 아이소구아닌, 2-티오피리미딘, 4-티오티민, 6-티오구아닌, 니트로피롤, 니트로인돌 및 4-메틸인돌을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 치환된 데옥시리

보스 유사체를 포함하는 뉴클레오타이드는 치환 또는 비치환된 아라비노스, 치환 또는 비치환된 자일로스 및 치환 또는 비치환된 피라노스를 포함한다. 포스페이트 에스테르 유사체를 포함하는 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로아미데이트, 포스포로셀로노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포로아닐리데이트, 포스포로아미데이트, 보론포스페이트, 포스포트리에스테르 및 메틸포스포네이트와 같은 알킬 포스포네이트를 포함한다.

[0049] 일 구현예에서 반응물은 총 25 μl에 0.2 μM 의 각 F3 및 B3 프라이머, 1.6 μM의 각 FIP 및 BIP 프라이머, 0.8 μM의 각 LF 및 LB 프라이머, 0.4M betaine, 10 mM MgSO4, 1.4 mM dNTPs, 1× ThermoPol reaction buffer (New England Biolabs), 16 U Bst DNA polymerase (New England Biolabs) 및 1.0~8.5㎕의 분석이 필요한 시료를 포함한다.

[0050] 반응물은 이어서 DNA 폴리머라제 활성에 적합한 온도에서 반응된다. 반응온도는 반응에 사용되는 효소, 표적의 핵산 서열을 고려하여 어려움 없이 결정될 수 있다. 이어 반응물은 표적 핵산의 증폭에 적합한 시간으로 반응된다. 당업자라면 반응조건을 고려하여 반응시간을 결정할 수 있을 것이며, 예를 들면 15분-60분의 시간에서 결정할 수 있으나, 시료에 포함된 표적 핵산의 양에 따라 달라질 수 있으며, 결정될 수 있다. 예를 들면 민감도를 높이기 위해 반응시간을 증가시킬 수 있다.

[0051] 본원에 따른 일 구현예에서는 특히 핵산을 분리하지 않고, 시료가 직접 사용될 수 있다.

[0052] 본원에 따른 LAMP 분석은 다양한 분석 포맷으로 분석될 수 있으며, 예를 들면 액상반응 또는 일부 성분이 고상 기질에 흡착된 상태로 수행될 수도 있다.

[0053] 본원에 따른 프라이머 및 이를 포함하는 조성물 또는 키트 및 방법은 위해 세균이 존재할 가능성이 있는 임의의 생물학적 시료를 사용한 LAMP 방식으로 분석에 사용되며, 증폭된 산물은 주형으로 사용한 분자와 상응하는 서열을 가지며, 당업계에 공지된 다양한 방법으로 분석될 수 있다.

[0054] 증폭 후 증폭반응 산물은 다양한 방법으로 검출될 수 있으며, 예를 들면 DNA 합성에 따른 반응액의 색변화, 탁도변화, 형광 및/또는 전기영동으로 검출될 수 있으며, 검출된 산물은 양성 및/또는 음성 대조군 시료의 산물과 비교되어 정량 또는 정성분석에 사용된다.

[0055] 일 구현예에서 본원에 따른 증폭산물은 DNA 합성에 따른 반응액의 색변화로 검출될 수 있다. 이 경우, 반응액은 적절한 지시 시약 (indicator)를 포함할 수 있으며, 반응액 중 마그네슘 이온 농도에 반응하여 색이 변하는 염료로서 HNB (hydroxy naphthol blue)를 사용하여 양성 및/또는 음성 대조군 시료의 산물과 비교되어 클로스트리디움 퍼프린젠스를 정량 또는 정성분석 할 수 있으며, 특히 나안으로 검출이 가능하여 그 편리성이 증대된다.

[0056] 다른 구현예에서 증폭 산물은 직접적 또는 간접적 방법에 의해 검출될 수 있다. 직접적 방법에서는 검출가능하게 표지된 프라이머가 사용될 수 있으며, 핵산에 특이적 결합 후 표지된 프라이머를 통해 방출되는 신호를 통해 핵산의 증폭여부가 검출되며, 실시간 검출이 가능하다. 간접적 검출방법에서는 증폭된 핵산에 결합할 수 있는 표지된 프로브가 사용될 수 있다. 본원에서 검출가능하게 표지된 것의 의미는 분광학적, 광학적, 광화학적, 생화학적, 효소적, 전기적 및/또는 면역화학적 방법과 같은 임의의 적절한 방법을 이용하여 검출가능한 신호를 방출할 수 있는 물질로 표지된 물질을 의미한다. 이러한 물질은 예를 들면 형광모이어티, 화학발광 모이어티, 생발광모이어티, 자성입자, 효소, 기질, 방사능 및 발색단 물질을 포함한다.

[0057] 일 구현예에서 검출을 위한 표지자 (label)는 이로 제한하는 것은 아니나, 광방출, 광산란, 광흡수 물질과 같은 검출가능한 형광, 화학발광 또는 생발광 신호를 생성 또는 소거할 수 있는 화합물을 포함하며, 예를 들면 Garman A., Non-Radioactive Labeling, Academic Press 1997을 참조할 수 있다. 형광 물질은 예를 들면 이로 제한하는 것은 아니다 플루오레신 (예를 들면 미국특허 6,020,481), 로다민 (예를 들면 미국 특허 6,191,278), 벤조페녹사진 (예를 들면 미국특허 6,140,500), 공여체와 수용체를 포함하는 에너지 전이 형광 염료 (예를 들면 미국특허 5,945,526) 및 사이아나인 (예를 들면 WO1997-45539), 리사민, 파이코에리쓰린, Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, FluorX (Amersham), Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, 6-FAM, Fluorescein Isothiocyanate, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Rhodamine Green, Rhodamine Red, Renographin, ROX, SYPRO, TAMRA, Tetramethylrhodamine, 및/또는 Texas Red는 물론 기타 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 임의의 형광 모이어티를 포함한다. 형광염료는 6-carboxyfluorescein; 2′,4′,1,4,-tetrachlorofluorescein; 및 2′,4′,5′,7′,1,4-hexachlorofluorescein를 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 일 구현예에서는 형광 표지로 SYBR-Green, 6-carboxyfluorescein (“FAM”), TET, ROX,

VIC, 또는 JOE가 사용된다. 일 구현예에서는 리포터 형광물질과 소거형광물질의 두 개의 형광물질로 표지된 프로브가 사용되며, 이 경우 형광물질은 구분이 가능한 파장이 스펙트럼을 방출하는 형광물질이 사용된다. 또한 표지자는 핵산의 결합을 향상, 안정화 또는 핵산의 결합에 영향을 미칠 수 있는 화합물 예를 들면 에씨디움 브로마이드 및 SYBR-Green을 포함하는 인터칼레이터, 마이너그루브 결합체 및 가교가능한 작용기가 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니며, Blackburn et al., eds. “ DNA and RNA Structure” in Nucleic Acids in Chemistry and Biology (1996)을 참조할 수 있다.

[0058] 또한 프라이머의 비 특이적 프라이밍 발생에 의한 비특이적 증폭여부의 검출이 필요한 경우, 비특이적 핵산 결합제인 에씨디움 브로마이드 또는 피코그린과 같은 물질을 주형을 포함하지 않는 대조군 반응에 사용하여 비특이적으로 합성된 총 증폭산물의 양을 결정할 수 있다.

[0059] 본원에 따른 프라이머 세트는 감염 또는 오염 여부 검출을 위해 위해세균의 감염 또는 오염여부가 의심되는 다양한 시료에서 오염, 또는 감염 여부의 스크리닝, 존재 유무 검출 및 정량을 위한 다양한 분석에 유용하게 사용될 수 있다.

[0060] 따라서 다른 양태에서 본원은 또한 상술한 바와 같은 본원에 따른 프라이머 또는 프라이머 세트를 포함하는 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출용 조성물 또는 키트에 관한 것이다.

[0061] 본원에 따른 조성물은 주형을 제외한 상술한 바와 같은 LAMP 반응에 사용되는 성분 및 상술한 4개 또는 6개의 프라이머 세트를 포함할 수 있다.

[0062] 본원에 따른 키트는 주형을 제외한 상술한 바와 같은 LAMP 반응에 사용되는 성분 및 상술한 4개 또는 6개의 프라이머 세트를 별도로 또는 하나의 튜브에 제공할 수 있다. 본원에 따른 키트는 양성대조군, 음성대조군 및 사용설명서를 추가로 포함한다. 음성대조군으로는 핵산을 포함하지 않는 시료, 양성대조군은 하나 이상의 검출대상 핵산을 포함할 수 있다.

[0063] 본원에 따른 프라이머, 키트 및 조성물은 시료에서 클로스트리디움 퍼프린젠스를 핵산수준에서 검출하고, 이를 대조군 또는 참조군과 비교하여, 핵산의 존재 여부, 핵산 증가, 변화 정도에 따라 클로스트리디움 퍼프린젠스 감염, 오염 또는 항생제 치료를 받는 경우 치료의 효과를 예측할 수 있다.

[0064] 이런 측면에서 본원은 또한 클로스트리디움 퍼프린젠스의 검출, 오염, 감염 또는 예후에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 생물학적 시료에서 클로스트리디움 퍼프린젠스를 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0065] 본원에 따른 방법은 상술한 바와 같은 프라이머 세트, 조성물 또는 키트를 이용하여 수행되며, 일 구현예에서 클로스트리디움 퍼프린젠스 오염 또는 감염이 의심되는 시료를 제공하는 단계; 상기 시료로부터 본원에 따른 프라이머 세트를 이용하여 LAMP를 수행하여 표적 핵산을 증폭하는 단계; 이어 반응 중 또는 반응 종료 후에 증폭결과를 대조군의 시료와 비교하는 단계를 포함하며, 상기 시료와 비교하여 증폭산물의 양에 변화가 있는 경우, 이를 클로스트리디움 퍼프린젠스 오염 또는 감염으로 판정하는 단계를 포함한다. 본원에 따른 방법은 정성 또는 정량분석을 통해 감염 여부를 판별할 수 있으며, 예를 들면 음성 대조군과 비교하여 그 양이 증가한 경우, 또는 음성 대조군에는 검출되지 않았으나, 시료에서 양성 반응이 나온 경우, 또는 일정 양 이상으로 검출이 된 경우 이를 오염 또는 감염으로 판정할 수 있을 것이다. 판정 또는 판단 기준은 당업계의 기준을 고려하여 용이하게 결정할 수 있을 것이다.

[0066] 본원의 방법에 사용되는 시료, 시약, 증폭 방법 및 반응 조건 등은 앞서 기술한 바를 참조할 수 있다.

[0067] 이하 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명하나, 본 실시예는 예시적인 것일 뿐 어떤 식으로든 본원의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0068] 본 발명은 달리 언급이 없는 한 세포생물학, 세포배양, 분자생물학, 유전자 형질전환 기술, 미생물학, DNA 재조합기술에 관한 당업자의 기술수준 내인 통상의 기술을 사용하여 실시될 수 있다. 또한, 일반적인 기술에 관한 보다 자세한 설명은 Molecular Biotechnology: (Bernard et al., ASM press 2014); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th Ed. (Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press 2012); Short Protocols in Molecular Biology, 5th Ed. (Ausubel F. et al. eds., John Wiley & Sons 2002) 등을 참고할 수 있다.

[0069] **실시예 1. 식중독 유발 관련 표준균주 확보**

[0070] 전 세계적으로 식중독을 야기하는 것으로 알려진 대표적인 균주들- 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 캠필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 에셰리키아 콜리 O157:H7(*Escherichia coli O157:H7*), 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 살모넬라 종(*Salmonella spp.*), 시겔라 종(*Shigella spp.*), 비브리오 파라헤몰리티커스(*Vibrio parahaemolyticus*), 비브리오 불니피쿠스(*Vibrio vulnifcus*), 여시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*)를 한국미생물 보존센터로부터 확보하였다.

[0071] **실시예 2. 식중독 병원체에 특이적인 프라이머 제작**

[0072] 클로스트리디움 퍼프린젠스 균주의 정확한 검출을 위해 독소 유전자를 NCBI 및 GenBank에서 수득하여 균주에 특이적인 최종 프라이머를 선정하였다. 구체적으로 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)의 표적으로 cpa (GenBank accession number, L43547.1) 유전자를 기반으로 F3, B3, FIP, BIP, LF 및 LB의 각 프라이머 별로 두 종류의 프라이머를 제작하고, 이들은 다양한 조합으로 실험을 수행하여 이중 6 종류의 LAMP 증폭용 프라이머 세트를 완성하였다 (표 1 내지 표 6). 각 프라이머 염기서열은 NCBI (National Center for Biotechnology Information), Genbank 및 Blast (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi website)를 이용하여 검증한 결과 해당 균주 외에는 일치하는 염기서열이 존재하지 않았다. 각 프라이머 세트는 LAMP 반응에 최적화되도록 디자인 및 조합된 것으로 특이성 및 민감도 측면에서 우수한 효과를 나타냈다. 프라이머는 외부에 의뢰하여 합성하였다.

[0073] [표 1]

	서열번호	명명	서열
프라이머 세트 1	1	F3	5'-TGT AAG GCG CTT ATT TGT GC-3'
	2	B3	5'-CAT GCA TGT TCT CTT TTA AAA TCT C-3'
	3	FIP	5'-CAA TCT TTC CAT CCC AAG CGT GCG CTA GCA ACT AGC CTA T-3'
	4	BIP	5'-GGA ACA GGA ACT CAT GCT ATG AGG TTC ATT TTT GGA CAG ATC AT-3'
	5	LF	5'-ACT TTA GTT GAT GCC CCA GC-3'
	6	LB	5'-GTA ACT CAA GGG GTT TCA ATC TTA G-3'

[0074]

[0075] [표 2]

	서열번호	명명	서열
프라이머 세트 2	7	F3	5'-GAT TTG TAA GGC GCT TAT TTG T-3'
	8	B3	5'-GCT CAT GCA TGT TCT CTT TTA AAA-3'
	9	FIP	5'-CTT TCC ATC CCA AGC GTA GAC CGC GCT AGC AAC TAG CCT AT-3'
	10	BIP	5'-ATT GAT GGA ACA GGA ACT CAT GCT TTC TGG TTC ATT TTT GGA CAG ATC-3'
	11	LF	5'-TTT AGT TGA TGC CCC AGC C-3'
	12	LB	5'-CTA TGA TTG TAA CTC AAG GGG TTT CA-3'

[0076]

[0077] [표 3]

	서열번호	명명	서열
프라이머 세트 3	7	F3	5'-GAT TTG TAA GGC GCT TAT TTG T-3'
	2	B3	5'-CAT GCA TGT TCT CTT TTA AAA TCT C-3'
	3	FIP	5'-CAA TCT TTC CAT CCC AAG CGT GCG CTA GCA ACT AGC CTA T-3'
	4	BIP	5'-GGA ACA GGA ACT CAT GCT ATG AGG TTC ATT TTT GGA CAG ATC AT-3'
	5	LF	5'-ACT TTA GTT GAT GCC CCA GC-3'
	6	LB	5'-GTA ACT CAA GGG GTT TCA ATC TTA G-3'

[0078]

[0079] [표 4]

	서열번호	명명	서열
프라이머 세트 4	1	F3	5'-TGT AAG GCG CTT ATT TGT GC-3'
	2	B3	5'-CAT GCA TGT TCT CTT TTA AAA TCT C-3'
	3	FIP	5'-CAA TCT TTC CAT CCC AAG CGT GCG CTA GCA ACT AGC CTA T-3'
	4	BIP	5'-GGA ACA GGA ACT CAT GCT ATG AGG TTC ATT TTT GGA CAG ATC AT-3'
	11	LF	5'-TTT AGT TGA TGC CCC AGC C-3'
	6	LB	5'-GTA ACT CAA GGG GTT TCA ATC TTA G-3'

[0080]

[0081] [표 5]

	서열번호	명명	서열
프라이머 세트 5	1	F3	5'-TGT AAG GCG CTT ATT TGT GC-3'
	8	B3	5'-GCT CAT GCA TGT TCT CTT TTA AAA-3'
	3	FIP	5'-CAA TCT TTC CAT CCC AAG CGT GCG CTA GCA ACT AGC CTA T-3'
	4	BIP	5'-GGA ACA GGA ACT CAT GCT ATG AGG TTC ATT TTT GGA CAG ATC AT-3'
	5	LF	5'-ACT TTA GTT GAT GCC CCA GC-3'
	6	LB	5'-GTA ACT CAA GGG GTT TCA ATC TTA G-3'

[0082]

[0083] [표 6]

	서열번호	명명	서열
프라이머 세트 6	7	F3	5'-GAT TTG TAA GGC GCT TAT TTG T-3'
	2	B3	5'-CAT GCA TGT TCT CTT TTA AAA TCT C-3'
	3	FIP	5'-CAA TCT TTC CAT CCC AAG CGT GCG CTA GCA ACT AGC CTA T-3'
	4	BIP	5'-GGA ACA GGA ACT CAT GCT ATG AGG TTC ATT TTT GGA CAG ATC AT-3'
	11	LF	5'-TTT AGT TGA TGC CCC AGC C-3'
	6	LB	5'-GTA ACT CAA GGG GTT TCA ATC TTA G-3'

[0084]

[0085] **실시예 3. LAMP 반응의 특이도 및 민감도 확인**

[0086] 우선 6 종류의 프라이머 조합 중 1개의 조합 (표 6 참고)을 이용하여 식중독을 야기하는 균주간의 교차반응을 통해 반응물의 색 변화와 전기영동 결과로 특이도를 확인하였다 (도 6a).

[0087] 이를 위해 실시예 1에서 확보한 클로스트리디움 퍼프린젠스 및 기타 식중독유발 11종의 균주들을 표준방법대로 배양하여 유전체를 추출한 후 각각의 DNA를20ng/ul로 준비하였다. 이어 LAMP 분석을 위해 총 부피 25 μl에서 0.2 μM 의 각 F3 및 B3 프라이머, 1.6 μM의 각 FIP 및 BIP 프라이머, 0.8 μM의 각 LF 및 LB 프라이머, 0.4M betaine, 10 mM $MgSO_4$, 1.4 mM dNTPs, 1× ThermoPol reaction buffer (New England Biolabs), 16 U Bst DNA polymerase (New England Biolabs), 120 μM HNB (Sigma) 및 2μl의 상기 분리한 DNA를 포함하는 조성의 용액을 사용하였다. 상기 조성으로 63℃에서 30분 동안 등온증폭을 실시한 뒤 80℃에서 5분간 반응시켜 반응을 종료하였다.

[0088] 결과는 도 6a에 기재된 바와 같이 본원에 따른 프라이머 세트는 다른 유사한 균주에는 교차반응을 하지 않으며, 클로스트리디움 퍼프린젠스만을 특이적으로 검출하는 것으로 나타났다. 상기 결과는 다른 조합의 프라이머 세트 (표 1 내지 표 5)로 특이성도 충분히 나타낼 수 있다.

[0089] 다음으로 각 조합의 프라이머 세트 (표 1 내지 표 6)의 클로스트리디움 퍼프린젠스에 대한 민감도를 확인하였다. 이를 위해 상기와 같이 준비한 클로스트리디움 퍼프린젠스 유전체를 ㎕ 반응액 중에 100pg, 10pg, 1pg, 500fg, 100fg, 50fg, 10fg의 농도로 사용하여 동일한 조성에서 63℃에서 30분 동안 등온증폭을 실시한 뒤 80℃에서 5분간 반응하고 반응물의 색 변화와 전기영동 결과로 민감도를 확인하였다(도 1 내지 도 5 및 도 6b).

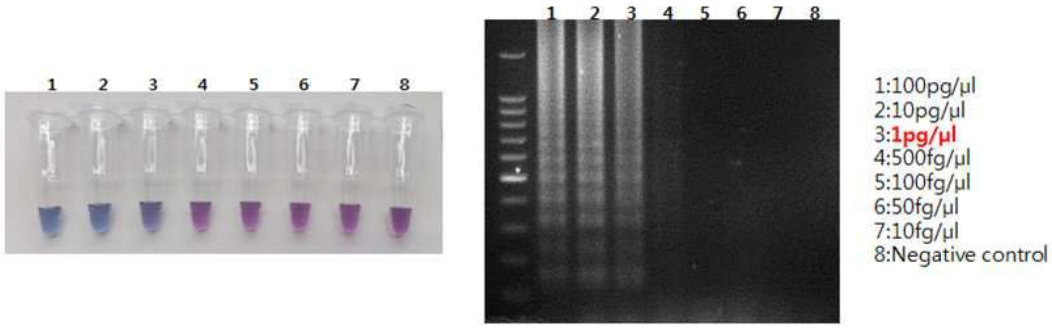
[0090] 색분석은 HNB (hydroxy naphthol blue) 염료를 반응액에 넣어 수행하였다. HNB는 Mg^{2+} 이온 농도의 지시자

(indicator)로서 작용한다. Mg^{2+} 이온이 없을 경우, 하늘색으로 보이며, Mg^{2+} 이온이 있을 경우, 보라색을 띤다. 따라서 반응 전에는 보라색으로 존재하다가, DNA 합성 반응이 일어나면서 Mg^{2+} 이온의 농도가 줄어들고 이에 따라서 보라색에서 푸른색으로 색의 변화 일어난다. 색의 변화는 핵산이 증폭되었음을 나타내는 양성 반응으로, 나안 또는 약 650nm 파장에서 흡광도를 측정하여 정성 및 정량 분석이 가능하다. 본원에 따른 방법은 신속하고 편리하게 결과를 눈으로 보고 정성 분석을 할 수 있으며, 또한 분광광도계를 이용하여 650nm 파장에서 흡광도를 측정할 경우 정성 및 정량 분석이 가능한 장점이 있다.

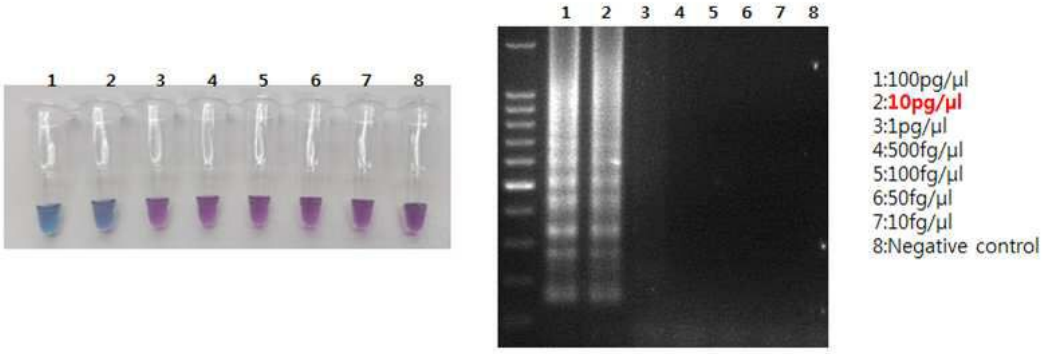
[0091] 도 1 내지 도 5 및 도 6b기재된 바와 같이 본원에 따른 프라이머 세트를 이용한 균의 검출은 민감도가 유전체 DNA를 이용한 경우 10pg 내지 500fg으로 매우 높은 것으로 나타났다.

도면

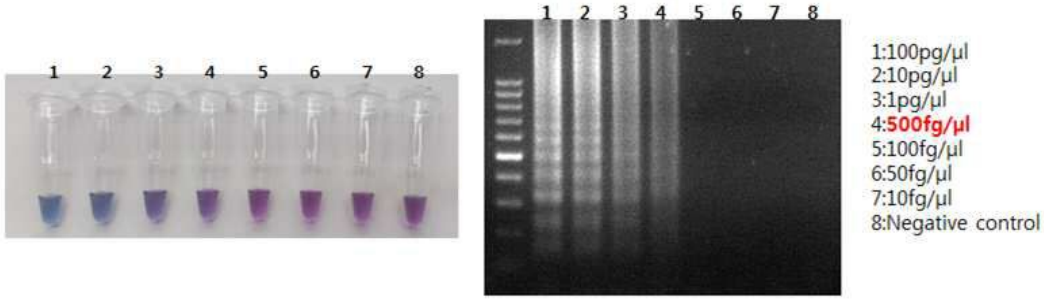
도면1



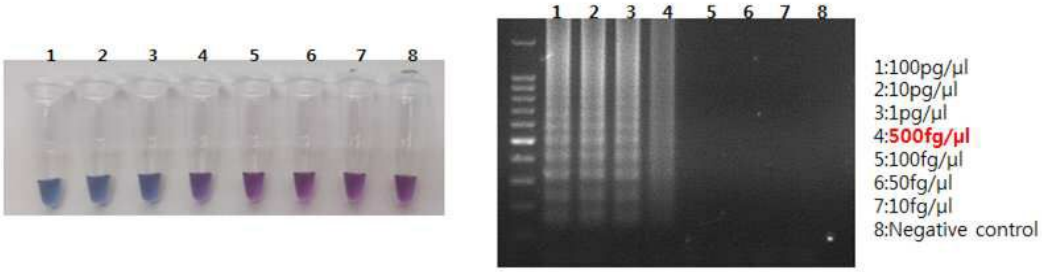
도면2



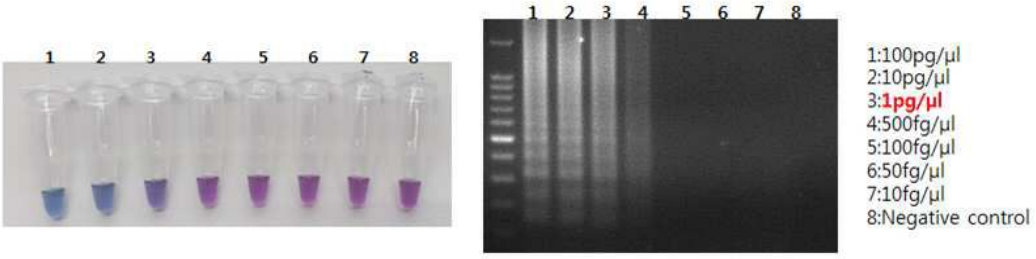
도면3



도면4



도면5

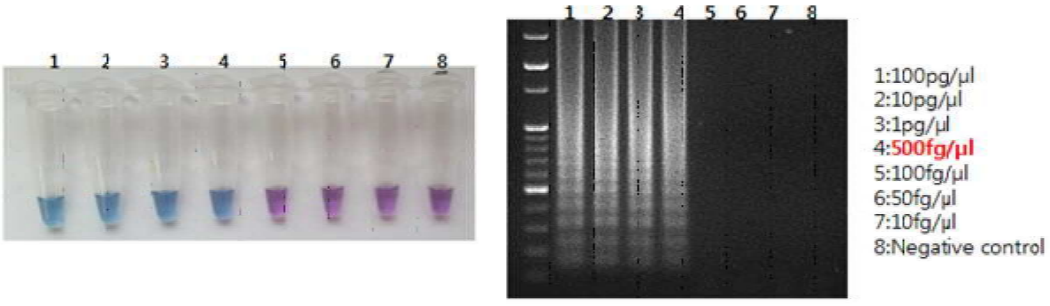


도면6a



N: Negative control, 1: *Clostridium perfringens* , 2: *Bacillus cereus*, 3: *Campylobacter jejuni*, 4: *E.coli O157*, 5: *Listeria monocytogenes*, 6: *Staphylococcus aureus*, 7: *Salmonella spp*, 8: *Shigella flexneri*, 9: *Shigella sonnei*, 10: *Vibrio parahaemolyticus*, 11: *Vibrio vulnificus*, 12: *Yersinia enterocolitica*

도면6b



서 열 목 록

<110> Mmonitor Inc.

<120> Primers used for LAMP reaction for the detection of Clostridiuum perfringens and its use

<130> DP201508007P

<160> 12

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F3 primer for LAMP detection of C. perfringens

<400> 1

tgtaaggcgc ttatttgtgc 20

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> B3 primer for LAMP detection of C. perfringens

<400> 2

catgcatgtt ctcttttaaa atctc 25

<210> 3

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FIP primer for LAMP detection of C. perfringens

<400> 3

caatctttcc atcccaagcg tgcgctagca actagcctat 40

<210> 4

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BIP primer for LAMP detection of C. perfringens

<400> 4

ggaacaggaa ctcatgctat gaggttcatt tttggacaga tcat 44

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LF primer for LAMP detection of C. perfringens

<400> 5

actttagttg atgccccagc 20

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LB primer for LAMP detection of C. perfringens

<400> 6

gtaactcaag gggtttcaat cttag 25

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F3 primer for LAMP detection of C. perfringens

<400> 7

gatttgtaag gcgcttattt gt 22

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> B3 primer for LAMP detection of C. perfringens

<400> 8

gctcatgcat gttctctttt aaaa 24

<210> 9

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FIP primer for LAMP detection of C. perfringens

<400> 9

ctttccatcc caagcgtaga ccgcgctagc aactagccta t 41

<210> 10

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> BIP primer for LAMP detection of C. perfringens

<400> 10

attgatggaa caggaactca tgctttctgg ttcatttttg gacagatc 48

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LF primer for LAMP detection of C. perfringens

<400> 11

tttagttgat gccccagcc 19

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LB primer for LAMP detection of C. perfringens

<400> 12

ctatgattgt aactcaaggg gtttca 26