



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년02월09일
(11) 등록번호 10-2359838
(24) 등록일자 2022년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/689 (2018.01) C12Q 1/6869 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2018.05)
C12Q 1/6869 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2020-0115887
(22) 출원일자 2020년09월10일
심사청구일자 2020년09월10일
(56) 선행기술조사문헌
J.S.SOHAL ET AL, MICROBIOLOGICAL RESEARCH,
2009, VOL.164, ISSUE.3, PP.330_337
R J WHITTINGTON ET AL, MOL CELL PROBES.,
2001, 15(3), PP.139_145
KAREN STEVENSON, VETERINARY RESEARCH, 2015,
46:64, PP.1_13
NCBI REFERENCE SEQUENCE: WP_010948981

(73) 특허권자
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
김동혁
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
임재원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 요네병균의 서브타입 판별용 바이오마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)의 서브타입을 결정하는 기술에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 상기 균주의 서브타입 판별용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 서브타입 판별 방법 등에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 상기 균주의 대사단백질인 MoeA 내 특정 영역에서 서브타입 간에 발린 아미노산의 개수가 상이함을 발견하였고, 이를 기반으로 상기 아미노산에 대한 코돈 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 검출할 수 있는 프라이머 세트를 제작하여 qPCR을 실시함으로써 상기 서브타입간 발린 개수의 차이를 기반으로 상기 균주의 서브타입을 간단하고 효율적으로 판별할 수 있음을 확인하였다. 이에, 본 발명의 기술은 감염된 균주의 서브타입을 결정하거나 감염이 예상되는 가축의 종류를 미리 확인해 발병을 예방할 수 있으므로 종래 사용되던 서열분석 기반의 유전자 분석방법을 대체하여 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1b

S-Type	ESET	VVV--	RPGT	GAGTCGGAGACG	GTGGTGTTG-----	CGGCCCGGCACC
C-Type	ESET	VVVV-	RPGT	GAGTCGGAGACG	GTGGTGTTGTTGTTG---	CGGCCCGGCACC
B-Type	ESET	VVVVV	RPGT	GAGTCGGAGACG	GTGGTGTTGTTGTTGTTG	CGGCCCGGCACC

(52) CPC특허분류

C12Q 2561/113 (2019.08)

(72) 발명자

유한상

경기도 과천시 별양로 111, 506동 603호 (별양동, 주공아파트)

박홍태

경기도 시흥시 서울대로264번길 12, 202동 2005호 (정왕동, 시흥배곧 C2블록 호반 씨밋플레이스 아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545020890

과제번호 918020043SB010

부처명 농림축산식품부

과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원

연구사업명 포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업(R&D)(농림부)

연구과제명 소 요네병원인체, Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, 신규병원성인자 규

명 및 조절기법이용 새로운 방제 기법 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 서울대학교 산학협력단

연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째, 35번째 및 36번째의 아미노산 중 3개 이상의 아미노산에 대응하는 코돈을 포함하는 12 내지 15개의 연속 염기서열의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)의 서브타입 판별용 마커 조성물로서,

상기 MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째 아미노산은 발린(Valine)이고, 35번째 아미노산이 발린이 아닌 경우 S형(S-Type);

상기 MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째 및 35번째 아미노산은 발린(Valine)이고, 36번째 아미노산이 발린이 아닌 경우 C형(C-Type);

상기 MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째, 35번째 및 36번째 아미노산이 발린(Valine)인 경우, B형(B-Type)으로 판별하는 것인, 서브타입 판별용 마커 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 S형, C형, 및 B형 서브타입 군주의 MoaD 단백질을 암호화하는 유전자는 각각 서열번호 6, 8 및 10의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 마커 조성물.

청구항 5

MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째, 35번째 및 36번째의 아미노산 중 3개 이상의 아미노산에 대응하는 코돈을 포함하는 12 내지 15개의 연속 염기서열의 폴리뉴클레오타이드를 검출할 수 있는 체제를 포함하는, 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)의 서브타입 판별용 조성물로서,

상기 MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째 아미노산은 발린(Valine)이고, 35번째 아미노산이 발린이 아닌 경우 S형(S-Type);

상기 MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째 및 35번째 아미노산은 발린(Valine)이고, 36번째 아미노산이 발린이 아닌 경우 C형(C-Type);

상기 MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째, 35번째 및 36번째 아미노산이 발린(Valine)인 경우, B형(B-Type)으로 판별하는 것인, 서브타입 판별용 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 S형, C형, 및 B형 서브타입 군주의 MoaD 단백질을 암호화하는 유전자는 각각 서열번호 6, 8 및 10의 염기 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 판별용 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 제제는 상기 폴리뉴클레오티드에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 판별용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 프라이머는 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 1 및 서열번호 3의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 프라이머 세트; 및 서열번호 1 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 판별용 조성물.

청구항 11

제5항의 조성물을 포함하는, 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)의 서브타입 판별용 키트.

청구항 12

MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째, 35번째 및 36번째의 아미노산 중 3개 이상의 아미노산에 대응하는 코돈을 포함하는 12 내지 15개의 연속 염기서열의 폴리뉴클레오티드를 검출하는 단계를 포함하는, 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)의 서브타입 판별방법으로서,

상기 MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째 아미노산은 발린(Valine)이고, 35번째 아미노산이 발린이 아닌 경우 S형(S-Type);

상기 MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째 및 35번째 아미노산은 발린(Valine)이고, 36번째 아미노산이 발린이 아닌 경우 C형(C-Type);

상기 MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째, 35번째 및 36번째 아미노산이 발린(Valine)인 경우, B형(B-Type)으로 판별하는 것인, 판별방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)의 서브타입을 결정하는 기술에 관한 것으로, 보다 구체적으로 상기 균주의 서브타입 판별용 바이오마커 조성물 및 이를 이용한 서브타입 판별 방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 마이코박테리움(*Mycobacterium*) 속에는 결핵, 우형 결핵 및 자병과 같이 인간과 동물에 심각한 질병을 일으키는 균종뿐만 아니라, 기회감염균으로 일컬어지는 균종, 및 자연환경에서 볼 수 있는 사물기생의 균종(saprophytic species) 등 현재까지 약 72종이 보고되었으며, 이 중 인체질환과 관련된 것은 25종에 이르는 것으로 알려져 있다.

[0003] 그 중 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*; MAP)은 반추동물에서 만성 육아종성 장질환인 요네병(Johne's disease)의 원인균으로 알려져 있으며, 만성 설사, 성장지연, 유량감소와 함께 결국 폐사에 이를 수 있는 전염성질환을 유발한다. 특히, 성장지연 및 유량감소는 경제적으로도 중요한 영향을 미친다. 상기 질환은 주로 소, 양, 염소 및 사슴과 같은 반추동물을 비롯하여 다양한 비-반추동물에서도 감염이 전세계적으로 보고되었다. 또한, 인간에서 만성 염증성 장질환의 일종인 크론병과 MAP와의 관련성은 많은 연구를 통해 지속적으로 제기되고 있다. 현재 이들 질병에 의한 국내의 경제적인 피해는 약 1000억/년으로 추정되며, 경제성장에 따라 안전한 축산물에 대한 소비자들의 요구가 증가하고 있는 추세이므로 상기 질환의 발생원을 규명하여 이를 예방하는 것이 무엇보다 중요하게 여겨지고 있다.

[0004] 이러한 측면에서, MAP의 유전적 다양성을 결정하는 것은 MAP의 역학과 생물학을 이해하고 질병 통제 전략을 수립하는데 필요하다. MAP 균주는 'Cattle 타입(Cattle type)' 또는 'C형(C-type)' 과 'Sheep 타입(Sheep type)' 또는 'S형(S-type)' 으로 알려진 두 가지 주요 서브타입으로 구분된다. 또한 'Bison 타입(Bison type)' 또는 'B형(B-type)' 으로 알려진 추가적 서브타입은 IS1311의 223bp 위치에서 단일뉴클레오티드다형성(single nucleotide polymorphism; SNP)을 기반으로 분화되었다(Mol Cell Probes, 2001, 15(3): p.139-145.).

[0005] 현재 MAP 감염의 진단은 혈청학적 진단에 의존하고 있는데, 진단의 민감도와 특이성에 많은 문제가 제기되고 있고, 또한 현재의 진단법으로는 질병 후기에만 진단이 가능하며 감염된 MAP의 서브타입을 구분할 수 없는 문제가 있다. 이에, MAP 균주 감염에 의한 질병 근절을 위해 상기 균주 감염을 간단하고 효율적으로 진단하고 서브타입을 판별할 수 있는 방법의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 상기와 같은 배경하에, 본 발명자들은 종래 IS1311 분석을 보완한 새로운 유전형 분석방법을 연구하던 중 상기 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* 균주의 MoaD/ThiS 계열의 단백질 내 특정 영역에서 균주의 서브타입간 발린 아미노산의 개수가 상이함을 확인하였고, 상기 서열 차이를 서브타입 판별용 마커로 하여 상기 균주의 서브타입 판별이 가능함을 구체적으로 확인하였는바, 이로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 이에, 본 발명은 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)의 서브타입 판별용 마커 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) 서브타입 판별용 조성물을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) 서브타입 판별용 키트를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)의 서브타입 판별 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째, 35번째 및

36번째의 아미노산 중 3개 이상의 아미노산에 대응하는 코돈을 포함하는 9 내지 15개의 연속 염기서열의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)의 서브타입 판별용 마커 조성물을 제공한다.

- [0014] 또한, 본 발명은 MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째, 35번째 및 36번째의 아미노산 중 3개 이상의 아미노산에 대응하는 코돈을 포함하는 9 내지 15개의 연속 염기서열의 폴리뉴클레오티드를 검출할 수 있는 제제를 포함하는, 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)의 서브타입 판별용 조성물을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)의 서브타입 판별용 키트를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일구현예로, 상기 아미노산은 발린(Valine)인 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 서브타입은 S형(S-Type), C형(C-Type) 또는 B형(B-Type)인 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 S형, C형, 및 B형 서브타입 군주의 MoaD 단백질을 암호화하는 유전자는 각각 서열번호 6, 8 및 10의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 제제는 상기 폴리뉴클레오티드에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 프라이머는 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 1 및 서열번호 3의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 프라이머 세트; 및 서열번호 1 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명은 MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째, 35번째 및 36번째의 아미노산 중 3개 이상의 아미노산에 대응하는 코돈을 포함하는 9 내지 15개의 연속 염기서열의 폴리뉴클레오티드를 검출하는 단계를 포함하는, 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)의 서브타입 판별방법을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일구현예로, 상기 아미노산에 대응하는 코돈을 포함하는 9개의 연속 염기서열의 폴리뉴클레오티드가 검출된 경우 서브타입이 S형(S-Type)인 것으로 판별하거나,
- [0023] 상기 아미노산에 대응하는 코돈을 포함하는 12개의 연속 염기서열의 폴리뉴클레오티드가 검출된 경우 서브타입이 C형(C-Type)인 것으로 판별하거나, 및
- [0024] 상기 아미노산에 대응하는 코돈을 포함하는 15개의 연속 염기서열의 폴리뉴클레오티드가 검출된 경우 서브타입이 B형(B-Type)인 것으로 판별할 수 있다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에 따르면, 반추류의 요네병 원인체인 *M. avium* subsp. *paratuberculosis*(MAP)의 대사단백질인 MoaD 내 특정 영역에서 서브타입 간에 발린 아미노산의 개수가 상이함을 발견하였고, 이를 기반으로 상기 아미노산에 대한 코돈 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 검출할 수 있는 프라이머 세트를 제작하여 qPCR을 실시함으로써 상기 서브타입간 발린 개수의 차이를 기반으로 상기 군주의 서브타입을 간단하고 효율적으로 판별할 수 있음을 확인하였다. 이에, 본 발명의 기술은 감염된 군주의 서브타입을 결정하거나 감염이 예상되는 가축의 종류를 미리 확인해 발병을 예방할 수 있으므로 종래 사용되던 서열분석 기반의 유전자 분석방법을 대체하여 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 Real-time PCR을 통한 MAP 군주의 서브타입 판별용 신규 바이오마커를 규명한 결과로서, 도 1a는 MoaD/ThiS 유전자의 DNA 염기서열 및 단백질의 아미노산 서열을 나타낸 것이고, 도 1b는 MAP 군주의 서브타입인 S형(S-Type), C형(C-Type) 및 B형(B-Type)에 따른 발린(V) (GTG) 반복횟수 변이를 보여주는 것이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 MAP 군주의 서브타입 판별용 바이오마커 검출을 위한 프라이머를 이용해 real-time PCR을 수행한 결과로서, 각각 S형과 동일한 발린 반복횟수를 갖는 MAA 101 및 MAH 104(도 2a), C형인 MAP 25 및 MAP Q2(도 2b) 및 B형인 MAP 12 및 MAP 15(도 2c)군주를 이용해 real-time PCR을 수행하여 해당 영역의 증폭 결과를 보여주는 것이다(●: S형 프라이머, ■: C형 프라이머, ▲: B형 프라이머).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명은 요네병균(*M. avium* subsp. *paratuberculosis*)의 대사관련 단백질인 MoaD의 특정 위치에 존재하는 발린 아미노산의 개수의 차이를 기반으로 하여 상기 균주의 서브타입을 결정하는 기술에 관한 것이다.
- [0028] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0029] 본 발명은 MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째, 35번째 및 36번째의 아미노산 중 3개 이상의 아미노산에 대응하는 코돈을 포함하는 9 내지 15개의 연속 염기서열의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)의 서브타입 판별용 마커 조성물을 제공한다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 아미노산은 발린(Valine)이고, 상기 아미노산에 대응하는 코돈을 코딩하는 염기서열은 바람직하게 발린 아미노산을 코딩하는 염기서열이며, 더욱 바람직하게는 GTG(구아닌-티민-구아닌)일 수 있다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 요네병균의 서브타입은 S형(S-Type), C형(C-Type) 또는 B형(B-Type)일 수 있다.
- [0032] 상기 S형 서브타입을 갖는 요네병균의 MoaD 단백질 및 이를 암호화하는 유전자는 각각 서열번호 5의 아미노산 서열 및 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 구체적으로, S형 서브타입은 MoaD 단백질의 32번째, 33번째 및 34번째 아미노산이 발린으로 구성되어 있고, MoaD 단백질을 암호화하는 유전자의 염기서열에서 94번째부터 102번째 위치의 뉴클레오티드는 발린을 코딩하는 GTG 염기서열이 연속적으로 3회 반복하여 위치한다.
- [0033] 상기 C형 서브타입을 갖는 요네병균의 MoaD 단백질 및 이를 암호화하는 유전자는 각각 서열번호 7의 아미노산 서열 및 서열번호 8의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 구체적으로, C형 서브타입은 MoaD 단백질의 32번째부터 35번째 아미노산이 발린으로 구성되어 있고, MoaD 단백질을 암호화하는 유전자의 염기서열에서 94번째부터 105번째 위치의 뉴클레오티드는 발린을 코딩하는 GTG 염기서열이 연속적으로 4회 반복하여 위치한다.
- [0034] 상기 B형 서브타입을 갖는 요네병균의 MoaD 단백질 및 이를 암호화하는 유전자는 각각 서열번호 9의 아미노산 서열 및 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 구체적으로, B형 서브타입은 MoaD 단백질의 32번째부터 36번째 아미노산이 발린으로 구성되어 있고, MoaD 단백질을 암호화하는 유전자의 염기서열에서 94번째부터 108번째 위치의 뉴클레오티드는 발린을 코딩하는 GTG 염기서열이 연속적으로 5회 반복하여 위치한다.
- [0035] 본 발명자들은 구체적인 실시예에서 *M. avium* subsp. *paratuberculosis* 균주의 MoaD/ThiS 계열의 단백질 내 특정 위치에서 서브타입간 발린 아미노산의 개수가 상이함을 발견하였다. 이에, 상기 서열 차이를 서브타입 판별용 바이오마커로 하여 이를 검출할 수 있는 프라이머를 제작하였으며, 상기 각 서브타입별 프라이머 세트를 이용하여 real-time PCR을 실시하고 증폭곡선을 분석한 결과 상기 균주의 서브타입 판별이 가능함을 확인하였다(실시예 2 및 3 참조).
- [0036] 이에, 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째, 35번째 및 36번째의 아미노산 중 3개 이상의 아미노산에 대응하는 코돈을 포함하는 9 내지 15개의 연속 염기서열의 폴리뉴클레오티드를 검출할 수 있는 체제를 포함하는, 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)의 서브타입 판별용 조성물을 제공한다.
- [0037] 본 발명에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드를 검출할 수 있는 체제는 상기 폴리뉴클레오티드에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 사용되는 용어, “프라이머(Primer)”란 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로서, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오티드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다. 본 발명에 있어서 프라이머는 중합효소연쇄반응을 수행하는데 이용할 수 있고, 바람직하게는 실시간 중합효소연쇄반응에 이용될 수 있다. 상기 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(예컨대, Taq DNA 중합효소) 및 상이한 4가지 dNTP(deoxynucleoside triphosphate)의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머는 공통적으로 적용되는 서열번호 1의 정방향 프라이머(forward primer) 및 각 서브타입에 따라 상이한 서열번호 2, 3 또는 4의 역방향 프라이머(reverse primer)로 구성될 수 있다. 구체적으로, 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 프라이머 세트; 서열번호 1 및 서열번호 3의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 프라이머 세트; 및 서열번호 1 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오티드로 이루어진

프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

- [0040] 구체적으로, 상기 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 프라이머 세트는 S형 서브타입에 대한 것으로, 서열번호 2의 프라이머는 S형 서브타입의 MoaD 단백질에서 발린이 3개 존재하는 특정 영역을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 결합하는 것일 수 있다.
- [0041] 상기 서열번호 1 및 서열번호 3의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 프라이머 세트는 C형 서브타입에 대한 것으로, 서열번호 3의 프라이머는 C형 서브타입의 MoaD 단백질에서 발린이 4개 존재하는 특정 영역을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 결합하는 것일 수 있다.
- [0042] 상기 서열번호 1 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 프라이머 세트는 B형 서브타입에 대한 것으로, 서열번호 4의 프라이머는 B형 서브타입의 MoaD 단백질에서 발린이 5개 특정 영역을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열에 결합하는 것일 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 사용되는 용어, “프로브(Probe)”란 효소 화학적인 분리정제 또는 합성과정을 거쳐 제작된 수 염기 내지 수백 염기 길이의 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 방사성 동위원소나 효소 등을 표지하여 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있으며, 공지된 방법으로 디자인하고 변형시켜 사용할 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)의 서브타입 판별용 키트를 제공한다.
- [0045] 본 발명의 요네병균 서브타입 판별용 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성된다. 구체적으로, 본 발명의 키트는 중합효소연쇄반응(PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR; qPCR), DNA 칩 또는 ELISA 등의 분석용일 수 있고, 바람직하게는 real-time PCR 분석용일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 예컨대, 본 발명의 키트는 real-time PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 어느 것이나 포함할 수 있다. 상기 키트는 본 발명에 따른 마커에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 주형 DNA, dNTP, DNA 중합효소 및 발색제 등이 포함될 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 MoaD 단백질의 32번째, 33번째, 34번째, 35번째 및 36번째의 아미노산 중 3개 이상의 아미노산에 대응하는 코돈을 포함하는 9 내지 15개의 연속 염기서열의 폴리뉴클레오타이드를 검출하는 단계를 포함하는, 요네병균(*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)의 서브타입 판별방법을 제공한다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 검출은 바람직하게는 real-time PCR을 이용하여 이루어질 수 있으나, 본 발명에 따른 요네병균의 서브타입 판별용 바이오마커에 기반하여 서브타입을 판별할 수 있는 방법이라면 구체적으로 제한되지 않으며, 당업자가 공지된 적절한 방법을 적용하여 실시할 수 있다.
- [0049] 본 발명에서는, 구체적인 실시예를 통해 상기 서열번호 1 및 2의 프라이머 세트, 서열번호 1 및 3의 프라이머 세트 및 서열번호 1 및 4의 프라이머 세트를 이용해 real-time PCR을 수행하고 증폭곡선을 분석함으로써 요네병균의 서브타입이 간단하고 효과적으로 결정될 수 있음을 확인하였다.
- [0050] 본 발명에서 사용되는 용어, “증폭 곡선”이란 실시간으로 DNA가 증폭되는 모습을 모니터링한 그림을 말한다. PCR에서는 1 사이클(cycle)마다 DNA가 지수적으로 증폭되다가 안정기에 도달하는데, Real-time PCR에서 증폭산물량이 형광으로 검출 가능한 양에 도달하면 증폭곡선이 일어나기 시작해 지수적으로 시그널이 상승하다가 안정기에 도달한다. 초기 DNA량이 많을수록 증폭산물량이 검출 가능한 양에 달하도록 돌아가는 cycle 수가 적어지므로 증폭곡선이 빨리 나타난다. 여기서 적당한 지점에 threshold를 설정하면 threshold와 증폭곡선이 교차하는 지점인 Ct값(Threshold Cycle)이 산출된다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 상기 아미노산에 대응하는 코돈을 포함하는 9개의 연속 염기서열의 폴리뉴클레오타이드가 검출된 경우 서브타입이 S형(S-Type)인 것으로 판별하거나, 상기 아미노산에 대응하는 코돈을 포함하는 12개의 연속 염기서열의 폴리뉴클레오타이드가 검출된 경우 서브타입이 C형(C-Type)인 것으로 판별하거나, 및 상기 아미노산에 대응하는 코돈을 포함하는 15개의 연속 염기서열의 폴리뉴클레오타이드가 검출된 경우 서브타입이 B형(B-Type)인 것으로 판별할 수 있다.
- [0052] 예컨대, real-time PCR 분석을 실시하는 경우, 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 프

라이머 세트를 이용한 경우에, 서열번호 1 및 서열번호 3의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 프라이머 세트 및 서열번호 1 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 프라이머 세트를 이용한 경우 보다 낮은 역치 사이클(Threshold Cycle; Ct) 값을 나타내는 경우, 상기 서브타입이 S형(S-Type)인 것으로 판별하거나,

[0053] 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 프라이머 세트 및 서열번호 1 및 서열번호 3의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 프라이머 세트를 이용한 경우에, 서열번호 1 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 프라이머 세트를 이용한 경우 보다 낮은 Ct 값을 나타내는 경우, 상기 서브타입이 C형(C-Type)인 것으로 판별하거나,

[0054] 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 프라이머 세트, 서열번호 1 및 서열번호 3의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 프라이머 세트, 및 서열번호 1 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 프라이머 세트를 이용한 경우에 모두 유사한 Ct 값을 나타내는 경우, 상기 서브타입이 B형(B-Type)인 것으로 판별하는 것일 수 있다.

[0056] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

실시예 1. 실험방법

1-1. gDNA 추출

[0061] 총 12개 균주 즉, 한국 (n=9), 체코 (n=1), *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* 균주 104 및 101 (n=2)를 확보하였다. 이 중 B형과 C형 균주는 각각 5개였고 S형의 MAP(*M. avium* subsp. *paratuberculosis*)는 확보하지 못하였다. 상기 확보된 각 균주를 Middlebrook OADC 및 마이코박틴 J(2mg/L)가 보충된 5mL의 Middlebrook 7H9 브로스(broth)에서 37℃ 하에 6주 동안 배양하였고, 이후 균주 현탁액을 3,000 x g에서 20분 동안 원심분리하였다. 이어서 펠릿을 1mL의 L6 용해 완충액(5.25M GuSCN, pH 6.4의 50mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 1.3% Triton X-100, 증류수)에 용해시켰다. 이후의 과정은 일반적으로 공지된 방법에 따라 수행하여 각 균주로부터 gDNA를 분리하였다.

1-2. Real-time PCR

[0064] 모든 PCR 반응은 DNA 주형 200pg, 2X THUNDERBIRD SYBR qPCR mix(Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) 10μl 및 각 프라이머 1pg를 포함하여 최종 반응부피를 20μl로 하였다. PCR은 Applied Biosystems QuantStudio 3 Real-Time PCR 시스템을 이용하여 다음과 같은 조건으로 수행하였다: 95℃에서 3분; 95℃ (30초), 55℃ (30초) 및 72℃ (30초) 40 사이클; 및 4℃에서 유지.

실시예 2. MAP 균주의 서브타입 판별용 바이오마커 확인

[0067] IS1311 유전형 분석(genotyping)은 일반적으로 많은 연구자들이 사용하고 있으며 균주의 서브타입에 따른 차이를 확인하는데 중요한 방법이다. 이에, 본 발명자들은 IS1311 분석을 보완한 새로운 유전형 분석방법을 개발하고자 하기 위해 연구노력하였으며, accessory-genome을 찾는 과정 중 하나의 유전자에서 흥미로운 부분을 발견하였다. 구체적으로, 도 1a에 나타난 바와 같이 상기 유전자는 단백질 ID가 WP_010948981.1인 MoaD/ThiS 계열의 단백질로써 MAP_RS04120 유전자와 태그(locus tag)를 갖는다. 염기서열에서 짧은 서열이 반복(short sequence repeats; SSR)되는 경우는 많이 보고되어 있으나, 해당 서열의 반복은 종래에 보고되지 않은 새로운 발견이었다(게놈 내 위치: 826,200~826,211). 유전자는 원래 K10의 (-) 가닥에 위치하며, 도 1a에 코딩 서열을 염기서열로 나타내었다. 구체적으로 이 유전자는 32번째에서 35번째에 발린(Valine; V)(GTG)이 위치하여 발린이 4번 반복되는 단백질 서열을 가지는 것을 확인하였다(빨간색 상자). 또한 상기 영역은 바이러스 타입에 따라 다른 패턴을 나타내는데, 보다 상세하게 도 1b에서 볼 수 있는 바와 같이 MAP의 S형(S-Type)의 경우 발린이 3회 반복되며 B형(B-Type)에서는 5회 반복되는 것을 확인하였다. 이에, 본 발명자들은 상기 영역에서 발린의 반복횟수 차이를 MAP 균주의 서브타입 즉, S형, C형 및 B형을 판별할 수 있는 바이오마커로 이용하고자 하였다.

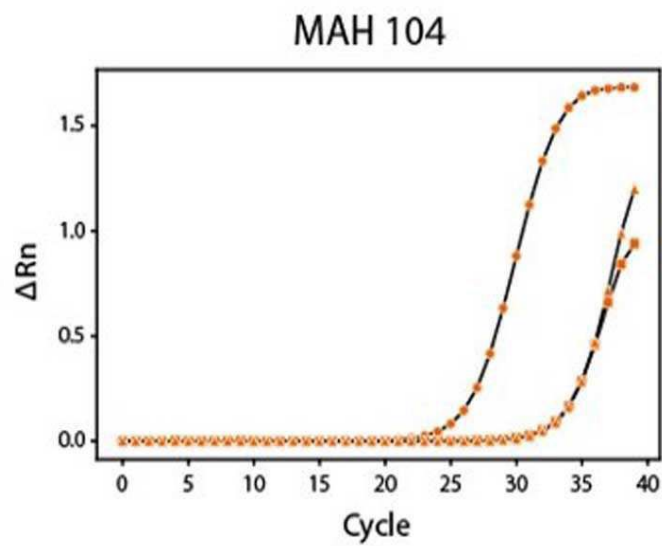
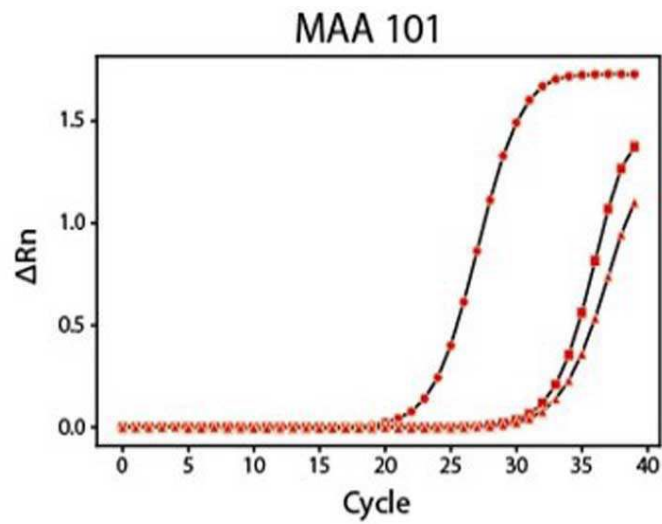
실시예 3. MAP 균주의 서브타입 판별용 바이오마커 검출을 위한 프라이머 제작

[0070] 본 발명자들은 상기 실시예 2에서 확인한 MAP 균주의 서브타입 판별용 바이오마커를 검출하기 위한 수단으로 PCR을 이용하고자 하였다. 이를 위해, 염기서열 분석(sequencing)을 통해 유전자의 염기서열 정보를 확인하는 것이 더욱 효율적이지만 시간과 비용이 더 많이 소요된다는 단점이 있는바, 이를 절약하기 위해 Real-Time PCR

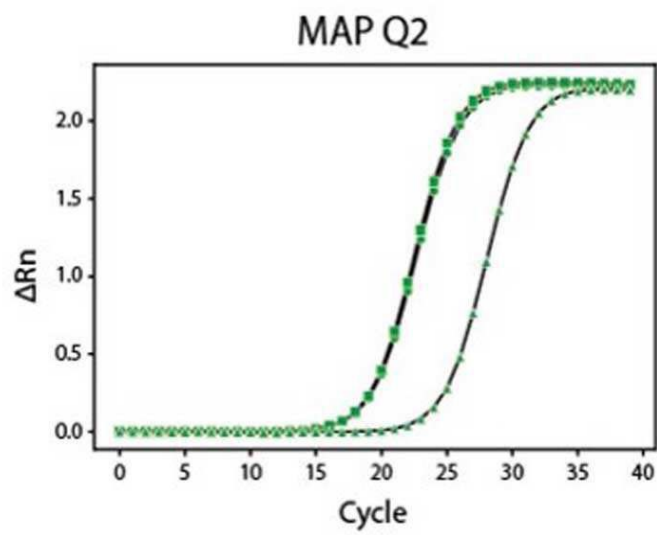
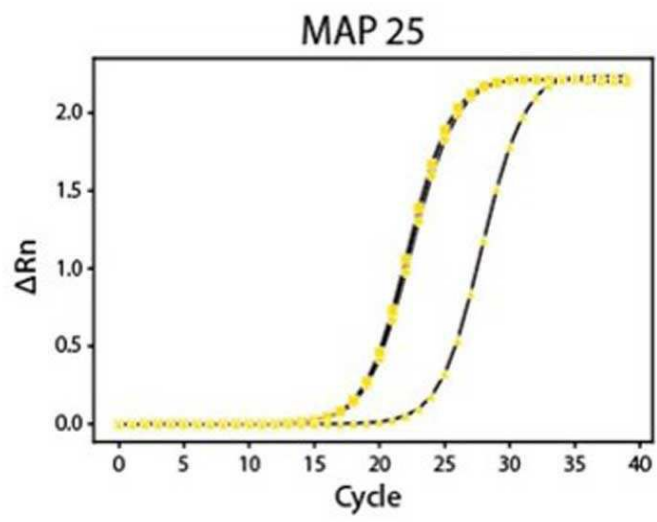
도면1b

S-Type	ESET	VVV--	RPGT	GAGTCGGAGACG	GTGGTGGTG-----	CGGCCCCGGCACC
C-Type	ESET	VVVV-	RPGT	GAGTCGGAGACG	GTGGTGGTGGTG---	CGGCCCCGGCACC
B-Type	ESET	VVVVV	RPGT	GAGTCGGAGACG	GTGGTGGTGGTGGTG	CGGCCCCGGCACC

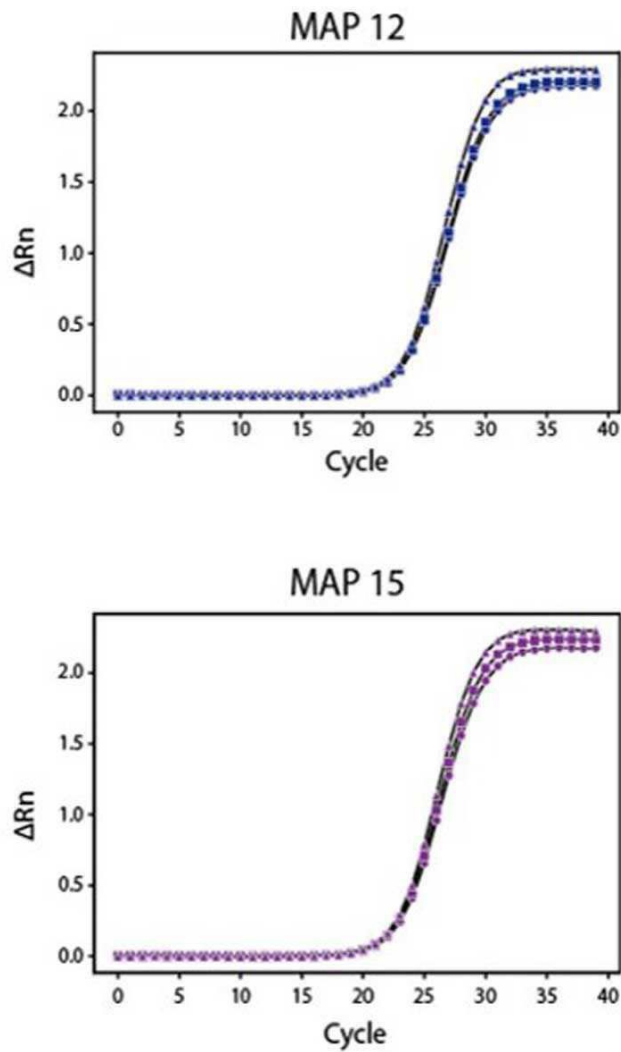
도면2a



도면2b



도면2c



서열 목록

- <110> ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
Seoul National University R&DB Foundation
- <120> Biomarker for discrimination of Mycobacterium avium subsp.
paratuberculosis subtype and use thereof
- <130> PD20-171
- <160> 10
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 18
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> MoaD_Forward

<400> 1
cgcgatgtgg gcccaagcc 18
<210> 2
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> MoaD_Reverse_S
<400> 2
cgggccgcac caccac 16
<210> 3
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> MoaD_Reverse_C
<400> 3
ggccgcacca ccaccac 17
<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> MoaD_Reverse_B
<400> 4
ccacaccacc accaccac 18
<210> 5
<211> 92
<212> PRT
<213> MAP_MoaD_S type
<400> 5
Met Gly Arg Val Pro Val Gln Ala Asn Gly Ile Ser Val Met Val Arg
1 5 10 15
Tyr Phe Ala Ala Ala Arg Ala Ala Ala Gly Ala Glu Ser Glu Thr Val
20 25 30
Val Val Arg Pro Gly Thr Thr Val Gly Glu Leu Val Glu Arg Leu Ala

35 40 45
Val Arg Gly Ser Arg Leu Ala Glu Val Leu Ser Arg Cys Ser Tyr Leu

50 55 60
Cys Asp Gly Ile Ala Val Arg Asp Glu Thr Gln Ser Leu Arg Ser Gly

65 70 75 80
Asp Thr Ile Asp Val Leu Pro Pro Phe Ser Gly Gly

85 90

<210> 6
<211> 279
<212> DNA
<213> MAP_MoaD_S type
<400> 6

atgggacgcg tcccggtcca ggccaacggc atctcagtga tggatgcgcta cttcgcggcc 60
gcccggggcgg cggcggggcgc cgagtcggag acggtggtgg tgcggcccgg caccacggtg 120

ggcgcgactgg tcgagcggct cgcggtgcgc ggatcccgcc tggccgaggt gttgagccgc 180
tgctcctacc tgtgtgacgg gatcgcggtc cgcgcagaga cccagtcgtt gcggtccggt 240
gacacgatcg acgttttgcc gcccttctcc ggcggtctga 279

<210> 7
<211> 93
<212> PRT
<213> MAP_MoaD_C type
<400> 7

Met Gly Arg Val Pro Val Gln Ala Asn Gly Ile Ser Val Thr Val Arg
1 5 10 15
Tyr Phe Ala Ala Ala Arg Ala Ala Ala Gly Ala Glu Ser Glu Thr Val

20 25 30
Val Val Val Arg Pro Gly Thr Thr Val Gly Glu Leu Val Glu Arg Leu

35 40 45
Ala Val Arg Gly Ser Arg Leu Ala Glu Val Leu Ser Arg Cys Ser Tyr

50 55 60
Leu Cys Asp Gly Ile Ala Val Arg Asp Glu Thr Gln Ser Leu Arg Ser

65 70 75 80

Gly Asp Thr Ile Asp Val Leu Pro Pro Phe Ser Gly Gly

85

90

<210> 8

<211> 282

<212> DNA

<213> MAP_MoaD_C type

<400> 8

atgggacgcg tcccgggtcca ggccaacggc atctcagtga cgggtcgcta cttcgcggcc 60

gccccggcgg cggcggggcgc cgagtcggag acggtggtgg tgggtcggcc cggcaccacg 120

gtgggcgagc tggtcgagcg gctcgcggtg cgcggatccc gcctggccga ggtgttgagc 180

cgtgtctcct acctgtgtga cgggatcgcg gtccgcgacg agaccagtc gttgcggtec 240

ggtgacacga tcgacgtttt gccgcccttc tccggcggct ga 282

<210> 9

<211> 94

<212> PRT

<213> MAP_MoaD_B type

<400> 9

Met Gly Arg Val Pro Val Gln Ala Asn Gly Ile Ser Val Thr Val Arg

1 5 10 15

Tyr Phe Ala Ala Ala Arg Ala Ala Ala Gly Ala Glu Ser Glu Thr Val

20 25 30

Val Val Val Val Arg Pro Gly Thr Thr Val Gly Glu Leu Val Glu Arg

35 40 45

Leu Ala Val Arg Gly Ser Arg Leu Ala Glu Val Leu Ser Arg Cys Ser

50 55 60

Tyr Leu Cys Asp Gly Ile Ala Val Arg Asp Glu Thr Gln Ser Leu Arg

65 70 75 80

Ser Gly Asp Thr Ile Asp Val Leu Pro Pro Phe Ser Gly Gly

85

90

<210> 10

<211> 285

<212> DNA

<213> MAP_MoaD_B type

<400> 10

atgggacgcg tcccggtcca ggccaacggc atctcagtga cgggtgcgcta cttcgcggcc 60

gcccggggcg cggcgggcgc cgagtcggag acggtggtgg tgggtggtgcg gcccggcacc 120

acggtgggcg agctggtcga gcggctcgcg gtgcgcggat cccgcctggc cgaggtgttg 180

agccgctgct cctacctgtg tgacgggatc gcggtccgcg acgagacca gtcgttcgcg 240

tccggtgaca cgatcgacgt ttgcccgc tctccggcg gctga 285