(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0000081
(43) 공개일자 2025년01월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/686 (2018.01) *C12R 1/19* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/686 (2018.05)
C12Q 2521/101 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0114138
(22) 출원일자 2023년08월30일
심사청구일자 2023년08월30일
(30) 우선권주장
1020230081206 2023년06월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김성욱
경기도 고양시 일산서구 강선로 187 (일산동, 후곡마을10단지아파트)
이선주
서울특별시 용산구 서빙고로 17 (한강로3가)
이민우
서울특별시 도봉구 노해로70길 119 (창동, 주공18단지아파트)
(74) 대리인
특허법인(유)남아이피그룹, 특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 15 항

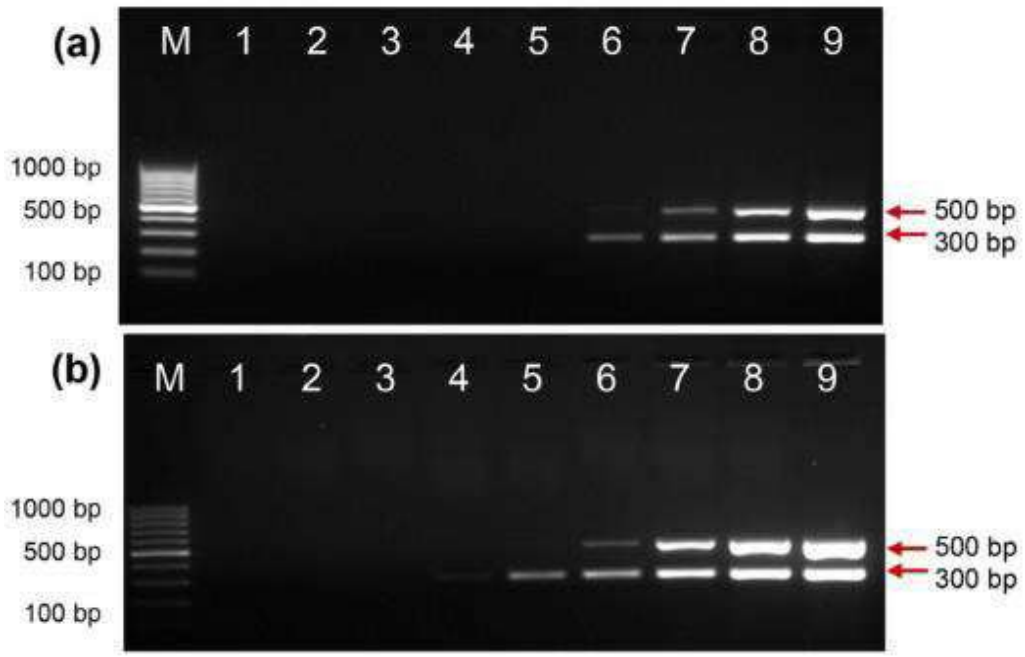
(54) 발명의 명칭 **Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균을 이용한 핫 스타트 PCR**

(57) 요 약

본 발명은 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균을 유효성분으로 포함하는 핫 스타트 PCR용 조성물; 상기 조성물을 포함하는 핫 스타트 PCR용 키트; 및 상기 조성물을 이용한 핫 스타트 PCR 방법에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 유효성분으로 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균을 포함함으로써, 상온에서는 대장균의 세포막 내에 Taq DNA

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도3



중합효소가 물리적으로 구속된 상태이므로 프라이머 및 기타 PCR 시약으로부터 분리되어 효소가 증폭 반응에 참여할 수 없으나, 온도가 고온(90℃ 이상)으로 올라가면 대장균의 세포벽과 세포막이 파괴되어 Taq DNA 중합효소가 증폭 반응에 자유롭게 참여할 수 있는바, 추가적인 화학적 변형 과정 없이도 간단하고 용이하게 핫 스타트 PCR을 구현할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균을 직접 이용함에 따라, Taq DNA 중합효소의 정제 과정에서의 발생되는 비용 및 시간 소요의 문제점을 해결할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 유효성분으로 트윈 20 및 트레할로오스를 포함하는 트리신 완충액을 더 포함함으로써, 핵산의 추출 또는 정제와 같은 전처리 과정을 거치지 않고 검체를 직접 PCR에 사용할 수 있는 이점을 갖는다.

(52) CPC특허분류
C12Q 2527/125 (2019.08)
C12Q 2549/101 (2013.01)
C12R 2001/19 (2021.05)

명 세 서

청구범위

청구항 1

Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균을 유효성분으로 포함하는 핫 스타트 PCR용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 대장균은 상온에서는 세포막 내에 Taq DNA 중합효소가 물리적으로 구속된 상태이며, 90℃ 이상의 온도에서는 대장균의 세포막이 파괴되어 효소가 증폭 반응에 참여할 수 있는 것을 특징으로 하는 핫 스타트 PCR용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 대장균은 -80℃ 내지 40℃ 온도 범위에서 3개월 동안 보관 안정성을 갖는 것을 특징으로 하는 핫 스타트 PCR용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 Taq DNA 중합효소의 화학적 변형; 프라이머 조작; 및 항체 또는 앱타머를 사용한 Taq DNA 중합효소 활성 억제 없이도, 상온에서 DNA 합성이 차단되는 것을 특징으로 하는 핫 스타트 PCR용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 트윈 20 및 트레할로오스를 포함하는 트리신 완충액을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 핫 스타트 PCR용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 트윈 20은 완충액에 1 ~ 10%(v/v)로 포함되는 것을 특징으로 하는 핫 스타트 PCR용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 트레할로오스는 완충액에 0.1 ~ 1M 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 핫 스타트 PCR용 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 완충액은 pH 8.4 ~ 9.0 범위인 것을 특징으로 하는 핫 스타트 PCR용 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 완충액은 2%(v/v) 트윈 20 및 0.4M 트레할로오스를 포함하는 pH 8.4 ~ 9.0 범위의 트리신 완충액인 것을 특징으로 하는 핫 스타트 PCR용 조성물.

청구항 10

제5항에 있어서,

상기 조성물을 이용하는 경우 핵산의 추출 또는 정제 과정 없이 검체를 직접 PCR에 사용할 수 있는 것을 특징으로 하는 핫 스타트 PCR용 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 조성물은 염료를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 핫 스타트 PCR용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 염료는 브로모페놀 블루, 크실렌 시아놀, 브로모크레졸 레드 및 크레졸 레드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 핫 스타트 PCR용 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 핫 스타트 PCR용 키트.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 조성물을 이용한 핫 스타트 PCR 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 PCR은 직접 PCR(direct PCR), 멀티플렉스 PCR(Multiplex PCR), 실시간 PCR(Real-time PCR), 실시간 정량 PCR(Real-time quantitative PCR) 및 RT-PCR(Reverse transcriptase PCR)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 핫 스타트 PCR 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균을 유효성분으로 포함하는 핫 스타트 PCR용 조성물; 상기 조성물을 포함하는 핫 스타트 PCR용 키트; 및 상기 조성물을 이용한 핫 스타트 PCR 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] PCR 반응에 있어서 특이성(specificity)은 표적 유전자 서열에 결합하는 프라이머의 높은 스트린전시(stringency)에 의해 결정된다. 그러나, PCR 수행시 유전자 증폭을 위해 필요한 모든 성분들은 유전자의 초기 변성 전에 실온에서 혼합되므로, 이 조건에서 낮은 스트린전시의 프라이밍(priming)이 발생하게 된다. 낮은 온도에서도 중합효소의 활성이 유지되므로 프라이밍이 발생할 경우 이에 따른 증폭산물이 생성되기 때문에, 이러한 낮은 스트린전시의 프라이밍은 표적 DNA 서열의 복잡성, 낮은 반응 온도 등과 더불어 비특이적인 증폭을 증가시키는 주요한 요인이 되며, 비특이적 증폭은 반복되는 PCR에 있어서 프라이머 및 제한된 농도의 다른 필요 성분들을 소비해 버리기 때문에 결과적으로 경쟁적인 저해제로서 작용하게 된다. 비특이적 증폭은 특히 낮은 사본수(copy number)의 표적 DNA 검출, 낮은 농도의 DNA 시료의 증폭 및 여러 가지 프라이머를 동시에 사용하는 멀티플렉스(multiplux) PCR을 수행하는데 있어서 커다란 문제점으로 지적되고 있다.

[0003] 일반적인 PCR에서 나타나는 이러한 문제점을 해결하기 위한 노력의 결과로 "핫 스타트 PCR(Hot-start PCR)"이 개발되었다. 핫 스타트 PCR은 보다 정확한 PCR 산물을 수득하기 위한 방법의 하나로서, 높은 온도 조건에서 반응물들을 혼합함으로써 실온에서 발생하는 낮은 스트린전시의 프라이밍 및 그로 인한 비특이적인 프라이머의 올리고머화를 방지하여 PCR의 특이성을 증가시키는 효과적인 방법이다.

[0004] 핫 스타트 PCR은 고온에서 PCR 진행함으로써 중합효소 활성이 높아져 비특이적인 증폭을 감소시킬 수 있다. 다

만, 고온에 도달할 때까지 효소의 활성을 막아야 하므로, 종래기술의 경우 다양한 화학적 변형(DNA 중합효소, 항체, 압타머, 왁스, 반응 완충액, 특수 프라이머 사용, 중합효소의 냉감성 돌연변이 등)을 통해 상온에서 DNA 합성을 차단하고 있다. 그러나 이러한 화학적 변형은 추가적인 과정을 거쳐야 하는 번거로움이 있다.

[0005] 호열성 박테리아 써머스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*) 균주에서 유래된 내열성 DNA 중합효소 Taq DNA 중합효소는 일반적으로 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)에서 가장 많이 사용되는 DNA 중합효소이다. 그러나, 대량의 Taq DNA 중합효소는 가격이 높아 개별 실험실에서 일상적으로 사용하기에는 제한이 있다. Taq DNA 중합효소를 포함한 대부분의 내열성 DNA 중합효소는 대장균(*Escherichia coli*, *E.coli*) 발현 시스템을 이용하여 배양 및 정제해서 재조합 단백질로 발현할 수 있어 제품화되어 있으나, 지금까지는 PCR을 수행하기 위해 중합효소 정제가 불가피한 경우가 많았다.

[0006] 한편, 미생물 감염 또는 기타 유전적 목적을 위해 전혈과 같은 임상 샘플을 PCR에 사용하는 경우 정제 및 추출 과정이 필요하다. 정제되지 않은 전혈에는 항응고제나 헤모글로빈과 같은 억제제가 포함되어 있어 PCR 효율을 떨어뜨릴 수 있기 때문이다. 그러나 DNA 추출은 번거롭고 시간이 많이 걸리는 과정이며 이는 큰 단점이 될 수 있다. 따라서 억제제를 효과적으로 극복하고 검체를 직접 활용할 수 있는 직접적인 PCR 방법은 그 중요성이 매우 높다.

[0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자는 Taq DNA 중합효소의 정제 과정에서 발생되는 비용 및 시간 소요의 문제점을 해결할 수 있으며, 또한, 핫 스타트 PCR을 진행함에 있어 종래기술과 같이 상온에서 DNA 합성 차단을 위한 추가적인 화학적 변형 과정 없이도 간단하고 용이하게 핫 스타트 PCR을 진행할 수 있는 프로토콜을 개발하고자 하였다. 그 결과, 핫 스타트 PCR을 진행함에 있어 정제된 중합효소 대신 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균을 직접 이용하는 경우, 상온 조건에서는 대장균의 세포막 내에 Taq DNA 중합효소가 물리적으로 구속된 상태이므로 프라이머 및 기타 PCR 시약으로부터 분리되어 효소가 증폭 반응에 참여할 수 없으나, 온도가 고온(90℃ 이상)으로 올라가면 대장균의 세포벽과 세포막이 파괴되어 Taq DNA 중합효소가 증폭 반응에 자유롭게 참여할 수 있는바, 추가적인 화학적 변형 과정 없이도 간단하고 용이하게 핫 스타트 PCR을 구현할 수 있음을 확인하였다. 뿐만 아니라, 본 발명자는 핵산의 추출 또는 정제와 같은 전처리 과정을 거치지 않고 검체를 직접 활용할 수 있는 직접적인 PCR 방법을 도출하고자 하였으며, 그 결과 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균과 더불어 트윈 20 및 트레할로오스를 포함하는 트리신 완충액을 이용하는 경우, 검체인 전혈을 직접 주형으로 이용하여 PCR 증폭이 가능함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2012-0097793호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 Taq DNA 중합효소의 정제 과정에서의 발생되는 비용 및 시간 소요의 문제점을 해결하고; 추가적인 화학적 변형 과정 없이도 간단하고 용이하게 핫 스타트 PCR을 구현할 수 있으며; 핵산의 추출 또는 정제와 같은 전처리 과정을 거치지 않고 검체인 전혈을 직접 주형으로 이용하여 PCR 증폭이 가능한, 핫 스타트 PCR용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은, 상기 조성물을 포함하는 핫 스타트 PCR용 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 조성물을 이용한 핫 스타트 PCR 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,

[0013] 본 발명은 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균을 유효성분으로 포함하는 핫 스타트 PCR용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 대장균은 상온에서는 세포막 내에 Taq DNA 중합효소가 물리적으로 구속된

상태이며, 90℃ 이상의 온도에서는 대장균의 세포막이 파괴되어 효소가 증폭 반응에 참여할 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 대장균은 -80℃ 내지 40℃ 온도 범위에서 3개월 동안 보관 안정성 가질 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 Taq DNA 중합효소의 화학적 변형; 프라이머 조작; 및 항체 또는 앱타머를 사용한 Taq DNA 중합효소 활성 억제 없이도 상온에서 DNA 합성이 차단할 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 트윈 20 및 트레할로오스를 포함하는 트리신 완충액을 더 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 트윈 20은 완충액에 1 ~ 10%(v/v)로 포함될 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 트레할로오스는 완충액에 0.1 ~ 1M 농도로 포함될 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 완충액은 pH 8.4 ~ 9.0 범위일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 완충액은 2%(v/v) 트윈 20 및 0.4M 트레할로오스를 포함하는 pH 8.4 ~ 9.0 범위의 트리신 완충액일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물을 이용하는 경우 핵산의 추출 또는 정제 과정 없이 검체를 직접 PCR에 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 염료를 더 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 염료는 브로모페놀 블루, 크실렌 시아놀, 브로모크레졸 레드 및 크레졸 레드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 핫 스타트 PCR용 키트를 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 이용한 핫 스타트 PCR 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 PCR은 직접 PCR(direct PCR), 멀티플렉스 PCR(Multiplex PCR), 실시간 PCR(Real-time PCR), 실시간 정량 PCR(Real-time quantitative PCR) 및 RT-PCR(Reverse transcriptase PCR)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 조성물은 유효성분으로 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균을 포함함으로써, 상온에서는 대장균의 세포막 내에 Taq DNA 중합효소가 물리적으로 구속된 상태이므로 프라이머 및 기타 PCR 시약으로부터 분리되어 효소가 증폭 반응에 참여할 수 없으나, 온도가 고온(90℃ 이상)으로 올라가면 대장균의 세포벽과 세포막이 파괴되어 Taq DNA 중합효소가 증폭 반응에 자유롭게 참여할 수 있는바, 추가적인 화학적 변형 과정 없이도 간단하고 용이하게 핫 스타트 PCR을 구현할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균을 직접 이용함에 따라, Taq DNA 중합효소의 정제 과정에서의 발생되는 비용 및 시간 소요의 문제점을 해결할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 유효성분으로 트윈 20 및 트레할로오스를 포함하는 트리신 완충액을 더 포함함으로써, 핵산의 추출 또는 정제와 같은 전처리 과정을 거치지 않고 검체를 직접 PCR에 사용할 수 있는 이점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 Taq DNA 중합효소 유전자가 삽입된 재조합 플라스미드 벡터맵을 나타낸 모식도이다.

도 2는 트윈 20이 있거나 없는 상용 PCR 완충액에서 '본 발명의 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)' 활성을 분석한 결과이다. 예상되는 증폭된 DNA 단편은 화살표로 표시되어 있다. 트윈 20의 0%(a), 1%(b), 2%(c), 5%(d) 및 10%(e) 농도를 상업용 PCR 버퍼에 통합하였다. 본 발명의 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)은 다음 비율로 희석되었다: 1:256(레인 1), 1:128(레인 2), 1:64(레인 3), 1:32(레인 4), 1:16(레인 5), 1 :8(레인 6), 1:4(레인 7), 1:2(레인 8) 및 1:1(레인 9, OD600= 0.8). M, 100bp DNA ladder.

도 3은 상용 Taq DNA 중합효소와 비교한 '본 발명의 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)' 활성을 분석한 결과이다. (a) 상업용 Taq DNA 중합효소는 다음 비율로 희석되었다: 1:256(레인 1), 1:128(레인 2), 1:64(레인 3), 1:32(레인 4), 1:16(레인 5), 1:8(레인 6), 1:4(레인 7), 1:2(레인 8) 및 1:1(레인 9, 0.5 단

위), (b) 본 발명의 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)은 다음 비율로 희석되었다: 1:256(레인 1), 1:128(레인 2), 1:64(레인 3), 1:32(레인 4), 1:16(레인 5), 1:8(레인 6), 1:4(레인 7), 1:2(레인 8) 및 1:1(레인 9, OD600= 0.8). M, 100bp DNA ladder.

도 4는 다양한 보관 온도에서 '본 발명의 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)' 활성을 분석한 결과이다. (a) -80℃, (b) -20℃, (c) 4℃, (d) 25℃ 및 (e) 37℃에서 3개월 동안 보관한 EcoliTaq을 사용하였다. 본 발명의 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)은 다음 비율로 희석되었다: 1:256(레인 1), 1:128(레인 2), 1:64(레인 3), 1:32(레인 4), 1:16(레인 5) , 1:8(레인 6), 1:4(레인 7), 1:2(레인 8) 및 1:1(레인 9, OD600=0.8). M, 100bp DNA ladder.

도 5는 시료로 전혈을 이용하여 '본 발명의 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)' 활성을 분석한 결과이다. 상이한 농도의 트레할로오스((a) 0 M, (b) 0.1 M, (c) 0.2 M, (d) 0.4 M 및 (e) 0.6 M)를 PCR 반응 혼합물에 첨가하였다. 본 발명의 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)은 다음 비율로 희석되었다: 1:256(레인 1), 1:128(레인 2), 1:64(레인 3), 1:32(레인 4), 1:16(레인 5), 1 :8(레인 6), 1:4(레인 7), 1:2(레인 8) 및 1:1(레인 9, OD600= 0.8). M, 100bp DNA ladder.

도 6은 다양한 pH 조건에서 세 가지 항응고제로 처리된 전혈을 사용한 '본 발명의 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)' 활성을 분석한 결과이다. PCR은 EDTA(레인 1-7), 헤파린(레인 8-14) 및 구연산나트륨(레인 15-21)을 포함하는 1 μL의 항응고제 처리 전혈로 수행되었다. (a) 바이신 기반 PCR 완충액은 8.0(레인 2), 8.2(레인 3), 8.4(레인 4), 8.6(레인 5), 8.8(레인 6) 및 9.0(레인 7)의 pH 값으로 사용되었으며, 상업용 PCR 완충액은 레인 1에 사용되었다. (b) 트리신 기반 PCR 완충액은 8.0(레인 2), 8.2(레인 3), 8.4(레인 4), 8.6(레인 5), 8.8(레인 6) 및 9.0(레인 7)의 pH 값으로 사용되었으며, 상업용 PCR 버퍼는 레인 1에 사용되었다. M, 100bp DNA ladder.

도 7은 '본 발명의 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)'을 이용하여 전혈에서 감염성 미생물을 직접 진단한 PCR 증폭결과이다. (a) 장티푸스균에 대한 *invA* 유전자의 PCR 증폭을 수행하였고, 다음 농도를 사용하였다: 레인 1; 12 CFU/mL, 레인 2; 25 CFU/mL, 레인 3; 50 CFU/mL, 레인 4; 100 CFU/mL, 레인 5; 200 CFU/mL, 레인 6; 400 CFU/mL, 레인 7; 800 CFU/mL, 레인 8; 1600 CFU/mL, 레인 9; 3200 CFU/mL, 레인 10; 6400 CFU/mL 및 레인 11; 12800 CFU/mL. (b) 플렉스네리이질균에 대한 *virA* 유전자의 PCR 증폭을 수행하였고, 다음 농도를 사용하였다: 레인 1; 20 CFU/mL, 레인 2; 40 CFU/mL, 레인 3; 80 CFU/mL, 레인 4; 160 CFU/mL, 레인 5; 320 CFU/mL, 레인 6; 640 CFU/mL, 레인 7; 1,280 CFU/mL, 레인 8; 2,560 CFU/mL, 레인 9; 5,120 CFU/mL, 레인 10; 10,240 CFU/mL 및 레인 11; 20,480 CFU/mL. M, 100bp DNA 마커.

도 8은 '본 발명의 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)'을 이용하여 임상 검체에서 HLA-B27 유전자형을 분석한 결과이다. 내부 대조군인 β-글로빈에 특이적인 PCR 산물은 268 bp에서 관찰되었으며, HLA-B27 양성 시료에 특이적인 PCR 산물은 136 bp에서 관찰되었다. M, 100bp DNA 마커.

도 9는 대립유전자 특이적 PCR(Allele specific PCR, ASPCR)에서 '본 발명의 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)'을 이용하여 DNA 또는 전혈을 시료로 사용하여 ABO 유전자형 분석을 수행한 결과이다((a) DNA, (b) 전혈). 레인 1-7: 사용된 프라이머 및 해당 예상 앰플리콘 크기는 표 3에 제시되어 있다. M, 100bp DNA ladder.

도 10은 핫 스타트 PCR에서 DNA 중합효소로서 '본 발명의 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)'의 성능을 평가 결과이다((a) 상용 Taq DNA 중합효소를 주형 DNA와 함께 사용, (b) 핫 스타트용 Taq DNA 중합효소를 주형 DNA와 함께 사용, (c) EcoliTaq을 주형 DNA와 함께 사용, (d) EcoliTaq을 전혈과 함께 사용). 레인 1-11: 사용된 프라이머 및 해당 예상 앰플리콘 크기는 표 4에 제시되어 있다. M, 100bp DNA ladder.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명은 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균을 유효성분으로 포함하는 핫 스타트 PCR용 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명에서 'Taq DNA 중합효소(Taq DNA polymerase)'라 함은 호열성 세균인 써머스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*) 균주에서 유래한 내열성 DNA 중합 효소로서, 상기 중합효소는 72℃가 최적 온도이며, 94℃에서도 안정한 특성을 갖는다.

[0032] 본 발명에서 'Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균'이라 함은 써머스 아쿠아티쿠스(*Thermus aquaticus*) 균주 유래의 Taq DNA 중합효소 유전자가 도입되어 과발현된 대장균을 의미한다.

[0033] 본 발명에서 '핫 스타트 PCR(Hot-start PCR)'은 실온(또는 저온)에서 비특이적 DNA 증폭으로 인해 원치 않는 산물 및 프라이머 이량체의 존재를 감소시키는 기존 중합효소연쇄반응(PCR)의 변형된 형태로서, Taq DNA 중합효소가 높은 온도에서 작동하도록 하여 비특이적인 증폭을 감소시킬 수 있는 PCR 기법이다. 종래기술의 경우, 다양한 화학적 변형(DNA 중합효소, 항체, 압타머, 왁스, 반응 완충액, 특수 프라이머 사용, 중합효소의 냉감성 돌연변이 등)을 통해 상온에서 증폭을 억제하고 있으며, 고온에 도달하였을때 중합효소가 활성화되어 증폭이 진행될 수 있다.

[0034] 본 발명의 핫 스타트 PCR용 조성물은 Taq DNA 중합효소 대신 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0035] 본 발명의 유효성분인 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균은 상온에서는 대장균의 세포막 내에 Taq DNA 중합효소가 물리적으로 구속된 상태이므로 프라이머 및 기타 PCR 시약으로부터 분리되어 중합효소가 증폭 반응에 참여할 수 없으나, 온도가 고온(90℃ 이상)으로 올라가면 대장균의 세포벽과 세포막이 파괴되어 Taq DNA 중합효소가 증폭 반응에 자유롭게 참여할 수 있다.

[0036] 본 발명에서 '상온'이라 함은 PCR 반응 적합 온도에 이르기 전의 온도를 "상온"으로 표기하였으며, 상온은 PCR을 실시하기 위한 반응액을 준비하고 이 준비된 PCR 반응액을 PCR 기기(machine)로 옮기고 하는 동안 준비된 PCR 반응액이 노출되는 외부 온도를 의미한다. 통상적인 상온의 범위는 15℃ 내지 35℃일 수 있다.

[0037] 이에, 상기와 같은 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균을 유효성분으로 포함하는 핫 스타트 PCR용 조성물은 Taq DNA 중합효소의 화학적 변형; 프라이머 조작; 및 항체(또는 앱타머)를 사용한 Taq DNA 중합효소 활성 억제 없이도, 상온에서 DNA 합성이 차단될 수 있다.

[0038] 한편, 본 발명의 하기 실시예에서는, Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균을 -80℃ 내지 40℃ 온도 범위에서 3개월 동안 보관하는 경우 활성이 그대로 유지되는 것을 확인하였는바(도 4 참조), 상기 대장균을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 핫 스타트 PCR용 조성물의 경우 보관 안정성이 우수하다.

[0039] 본 발명의 핫 스타트 PCR용 조성물은 유효성분으로 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균 이외에 트윈 20(tween-20) 및 트레할로오스(trehalose)를 포함하는 트리신 완충액을 더 포함할 수 있다.

[0040] 상기 트윈 20은 완충액에 1 내지 10%(v/v)로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 2%(v/v)로 포함될 수 있다. 트윈 20이 완충액에 1%(v/v) 미만으로 포함되는 경우 PCR 반응이 억제되며, 10%(v/v)를 초과하는 경우 PCR 증폭 효과가 감소될 수 있다.

[0041] 상기 트레할로오스는 완충액에 0.1 내지 1M 농도로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.4M 농도로 포함될 수 있다. 트레할로오스가 완충액에 0.1M 농도 미만으로 포함되는 경우 시료로 전혈을 이용하였을때 PCR 반응이 억제되며, 1M 농도를 초과하는 경우 PCR 증폭 효과가 감소될 수 있다.

[0042] 상기 트리신 완충액은 pH 8.4 ~ 9.0 범위일 수 있으며, 바람직하게는 pH 8.6일 수 있다.

[0043] 본 발명의 하기 실시예에서는, 완충액에 포함되는 성분으로 트윈 20 및 트레할로오스의 농도에 따른 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균의 활성; 및 다양한 pH 범위의 바이신 또는 트리신 기반 완충액에 따른 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균의 활성을 분석한 결과, 2%(v/v) 트윈 20 및 0.4M 트레할로오스를 포함하는 pH 8.6의 트리신 완충액이 최적의 활성을 보임을 확인하였다(도 2-3 및 도 5-6 참조).

[0044] 본 발명의 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균; 및 트윈 20 및 트레할로오스를 포함하는 트리신 완충액을 유효성분으로 포함하는, 핫 스타트 PCR용 조성물을 이용하는 경우, 핵산의 추출 또는 정제 과정 없이 검체를 직접 PCR에 사용할 수 있다.

[0045] 본 발명의 일구체예에서, 본 발명의 핫 스타트 PCR용 조성물은 염료를 더 포함할 수 있다.

[0046] 상기 염료는 로딩 염료(loading dye)로 PCR 반응 후 분석을 위한 아가로스젤 전기영동시 육안 관찰을 가능하게 하는 역할을 하며, PCR 반응에 영향을 미치지 않는 염료가 바람직하다. 예를 들어, 상기 염료는 브로모페놀 블루, 크실렌 시아놀, 브로모크레졸 레드 및 크레졸 레드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 특별히 그 종류를 한정하는 것은 아니다.

[0047] 또한, 본 발명은 상기 핫 스타트 PCR용 조성물을 포함하는 핫 스타트 PCR용 키트를 제공한다.

[0048] 본 발명의 키트는 핫 스타트 PCR용 조성물 이외에, 검출 프라이머를 포함하는 용기, 증폭반응 튜브(또는 컨테이

너), 버퍼, dNTPs, 멸균수, 사용설명서 및 양성 또는 음성 대조군 등에서 선택되는 1 이상의 성분을 더 포함할 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명은 상기 핫 스타트 PCR용 조성물을 이용한 핫 스타트 PCR 방법을 제공한다.

[0050] 본 발명의 일구체예에서, 상기 PCR은 직접 PCR(direct PCR), 멀티플렉스 PCR(Multiplex PCR), 실시간 PCR(Real-time PCR), 실시간 정량 PCR(Real-time quantitative PCR) 및 RT-PCR(Reverse transcriptase PCR)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 특별히 그 종류를 한정하는 것은 아니다.

[0052] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0054] **<실시예>**

[0056] **1. 재료 및 방법**

[0058] **재료**

[0059] 세 가지 항응고제(EDTA, 헤파린, 소디움-구연산염)로 처리된 인간 전혈을 KOMA 바이오텍(서울, 대한민국)에서 구입하였다. 인간 게놈 DNA는 기존의 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germantown, USA)를 사용하여 혈액에서 분리하였다. 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*, KCCM 40253) 및 시겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*, KCCM 40948)는 한국 미생물 배양 센터에서 얻었고, HLA-B27 PCR 키트는 바이오세움(한국, 서울)에서 구입하였다.

[0061] **Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)의 제조**

[0062] Taq DNA 중합효소 유전자를 발현 벡터 pKK223-3에 클로닝하고 그 결과 재조합 플라스미드를 대장균으로 형질전환하였다. 간략하게는, pKK223-3 벡터의 EcoR I과 SalI 제한효소 사이트 자리에 Taq DNA 폴리머라아제 유전자(from *Thermus aquaticus*, 서열번호 38)를 삽입하여 재조합 플라스미드를 제조하였다(도 1 참조). 제조된 재조합 플라스미드는 DH5α competent cell에 형질전환하였으며, 형질전환된 DH5α를 LA-amp 아가 플레이트에 도말하여 단일 콜로니(single colony)를 골라낸 후 37℃ 진탕배양기(shaking incubator)에서 24시간 배양하였다. 이후, 형질전환된 대장균을 10ml의 Lauria Ber-taini 배양액에 접종하고 37℃에서 180rpm으로 3~5시간 동안 진탕배양기에서 배양액의 흡광도 (OD600)가 600nm에서 0.4~0.6이 될 때까지 배양하였다. OD600에서 배양액의 흡광도가 0.4~0.6이 되면 0.1mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) 용액을 첨가하였다. 혼합물을 37℃의 진탕배양기에서 18시간 동안 배양하였다. 배양 후, 혼합물 튜브를 4,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 폐기하고 펠릿을 증류수(DW) 5ml로 두 번 세척하였다. 세척된 혼합물을 증류수로 희석하여 최종 흡광도를 OD600에서 0.8로 만들었다. OD600=0.8의 각 혼합물을 -80℃, -20℃, 4℃, 20℃ 및 37℃에서 각각 보관하였다. -80℃에서 보관할 때 10% 글리세롤을 첨가하였다.

[0063] 상기 과정을 통해 제조한 본 발명의 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균은 'EcoliTaq'로 명명하였다.

[0065] **PCR을 사용한 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균의 활성분석**

[0066] 상업용 DNA 중합효소에 비교하여 적정한 PCR 증폭 분석법을 사용하여 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)의 활성을 측정하였다. 효소 활성 분석을 위해 상용 DNA 중합효소(Takara bio, TaKaRa Taq™ DNA Polymerase)를 보관용 완충액으로 적절히 희석한 후 반응 혼합물에 첨가하거나, 또는 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)을 증류수로 희석(1:256, 1:128, 1:64, 1:32, 1:16, 1:8, 1:4, 1:2, 1:1, OD600 = 0.8)한 후 반응 혼합물에 첨가하였다. 상기 반응 혼합물은 트윈 20과 트레할로오스를 포함하거나 포함하지 않은 1x PCR 완충액, 0.25mM의 dNTP, 박테리오파지 람다 게놈의 뉴클레오티드 7,131-7,630 및 30,537-30,836에 해당하는

500 bp 및 300 bp 단편을 증폭하기 위한 두 개의 프라이머 쌍(하기 표 1 참조) 각각 0.25μM, 및 1ng의 람다 게놈 DNA 또는 1uL 혈액으로 구성된다. 증폭은 95℃에서 5분간 초기 변성 후 94℃에서 30초간 변성, 60℃에서 30초간 프라이머 어닐링 및 72℃에서 30초간 연장을 30회 반복 시행하고, 최종 연장은 72℃에서 10분간 수행하였다. PCR은 Rotor-Gene 6000 시스템(Corbett Research, Sydney, Australia)에서 수행하였다. PCR 반응이 완료된 후, PCR 산물의 10μL 시료를 에티듐 브로마이드로 염색하고 1.5% 아가로스 겔에서 전기영동으로 분석하였다.

표 1

[0068] 박테리오파지 람다 DNA 증폭을 위한 프라이머 쌍

프라이머	시퀀스(5‘->3’)	단편 크기(bp)	서열번호
lambda500_F	GATGAGTTCGTGTCCGTACAACTGG	500	1
lambda500_R	GGTTATCGAAATCAGCCCCACAGCGCC		2
lambda300_F	TTCAGGCGGCGCATTTTTTT	300	3
lambda300_R	ACGTCGATGACATTTGCCGTA		4

[0070] **전혈에서 장티푸스균 및 이질균의 검출방법**

[0071] PCR 증폭은 2% 트윈 20 및 0.4 M 트레할로오스, 0.25 mM dNTP, 1 μL의 전혈과 증류수로 희석된 5μL의 박테리아 혼합물(희석 배수 1:256, 1:128, 1:64, 1:32, 1:16, 1:8, 1:4, 1:2, 1:1, OD600 = 0.8)을 포함하는 1x 트리신 기반 완충액(pH 8.6)의 20 μL 혼합물에서 수행하였다. *invA* 유전자(284bp)에 특이적인 0.25μM의 프라이머를 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*)에 사용하였고, *virA* 유전자(215bp)에 특이적인 0.25μM의 프라이머를 시겔라 플렉스네리(*Shigella flexneri*)에 사용하였다(하기 표 2 참조). 증폭은 95℃에서 5분간 초기 변성 후 94℃에서 30초간 변성, 60℃에서 30초간 프라이머 어닐링 및 72℃에서 30초간 연장을 30회 반복 시행하고, 최종 연장은 72℃에서 10분간 수행하였다. PCR은 동일한 Rotor-Gene 6000 시스템에서 수행되었으며, 결과는 PCR 증폭 분석과 동일한 방식으로 분석되었다.

표 2

[0073] *invA* 유전자 및 *virA* 유전자 증폭용 프라이머 쌍

프라이머	시퀀스(5‘->3’)	단편 크기(bp)	서열번호
invA_F	TCGCCACGTTCGGGCAATTC	284	5
invA_R	CATCGCACCGTCAAAGGAACC		6
virA_F	GCATTCTGGCAATCTCTTCACATC	215	7
virA_R	GAGCTAACTTCGTAAGCCCT		8

[0075] **임상검체를 사용한 HLA-B27 유전자형 분석방법**

[0076] 7uL의 마스터 혼합물을 이용하여 PCR을 수행하였다. 마스터 혼합물은 26~189ng/μL 농도의 DNA 샘플 3μL와 함께, HLA-B27 PCR 키트 및 및 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)을 포함하는 PCR 혼합물로 구성되었다. 증폭은 95℃에서 5분간 초기 변성 후 94℃에서 30초간 변성, 65℃에서 30초간 프라이머 어닐링 및 72℃에서 30초간 연장을 30회 반복 시행하고, 최종 연장은 72℃에서 5분간 수행하였다. 70㎖의 겔 용액에 3.5㎖의 DNA 염색 염료(Red safe, INtRON)를 첨가하여 2% 아가로스 겔을 준비하였다. PCR 산물(5μL)을 겔에 로드하고 약 15분 동안 150V에서 전기영동을 실시하여 밴드를 시각화하였다.

[0078] **대립유전자 특이적 PCR**

[0079] 대립유전자 특이적 PCR(ASPCR)은 20μL의 혼합물(1x 트리신 기반 완충액(pH 8.6)에 2% 트윈 20 및 0.4M 트레할

로오스, 0.25mM dNTP, 3ng의 인간 DNA 또는 1μL의 EDTA 처리 전혈을 넣어 수행하였다. DNA 중합효소로는 5μL의 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq) OD600=0.8을 사용하였다. ABO 유전자형은 하기 표 3에 나열된 각 프라이머 쌍 0.25μM을 사용하여 측정하였다. 대립유전자 특이적 PCR(ASPCR)의 사이클링 조건은 95℃에서 5분간 초기 변성 후 95℃에서 40초, 60℃에서 40초 및 72℃에서 40초간 30회 반복 시행하고, 최종 연장을 72℃에서 5분간 수행하였다. 반응 후, PCR 혼합물 10μL를 에티듐 브로마이드로 염색한 1.5% 에티듐 브로마이드 염색 아가로스 겔에 전기 영동하였다.

표 3

[0081] ABO 유전형 분석을 위한 프라이머

PCR 반응	프라이머	시퀀스(5‘->3’)	단편 크기(bp)	대립유전자 특이성	서열번호
1	261G	GCAGTAGGAAGGATGTCCTCGTGtTG	205	*A101,A102,B101*	9
	int6	AGACCTCAATGTCCACAGTCACTCG			10
2	467C	CCACTACTATGTCTTCACCGACCAtCC	381	*A101,001,002*	11
	803G	CACCGACCCCCCGAAGAtCC			12
3	297A	CCATTGTCTGGGAGGGCcCA	164	*A101,A102,001*	13
	int6	AGACCTCAATGTCCACAGTCACTCG			10
4	467C	CCACTACTATGTCTTCACCGACCAtCC	381	*B101*	11
	803C	CACCGACCCCCCGAAGAtCG			14
5	261A	GCAGTAGGAAGGATGTCCTCGTGtTA	205	*001,002*	15
	int6	AGACCTCAATGTCCACAGTCACTCG			10
6	467T	CCACTACTATGTCTTCACCGACCAtCT	381	*A102*	16
	803G	CACCGACCCCCCGAAGAtCC			12
7	297G	CCATTGTCTGGGAGGGCcCG	164	*B101,002*	17
	int6	AGACCTCAATGTCCACAGTCACTCG			10

[0083] **핫 스타트 PCR**

[0084] 핫 스타트 PCR은 EcoliTaq용 트리신 기반 완충액(pH 8.6) 1배액(2% 트윈 20 및 0.4 M 트레할로오스 포함), 상용 DNA 중합효소용 PCR 완충액(Takara bio, TaKaRa Taq™ DNA Polymerase 10X buffer) 1배액, 0.25 mM dNTP, 3ng의 인간 DNA 또는 1 μL EDTA 처리 전혈을 포함하는 20 μL 혼합물에서 수행하였다. DNA 중합효소로는 5μL의 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq, OD600=0.8) 및 0.5U의 상업용 DNA 중합효소를 사용하였다. 하기 표 4에 나열된 각 프라이머 쌍 0.25μM을 사용하여 p53 유전자 서열 중 하나를 증폭하였다. 증폭은 95℃에서 5분간 초기 변성 후 94℃에서 30초간 변성, 60℃에서 30초간 프라이머 어닐링, 72℃에서 60초간 연장, 72℃에서 10분간 최종 연장하는 30주기를 거쳤다. PCR은 동일한 Rotor-Gene 6000 시스템에서 수행되었으며, 결과는 PCR 증폭 분석과 동일한 방식으로 분석하였다.

표 4

[0086] p53 유전자 증폭을 위한 핫 스타트 PCR 프라이머

PCR 반응	프라이머	시퀀스(5‘->3’)	단편 크기(bp)	서열번호
1	p53T1_F	GGCGACAGAGCGAGATTCCA	286	18
	p53T1_R	GGGTCAGCGGCAAGCAGAGG		19
2	p53T2_F	GAGGTTCCTACAGGCACCTGCCCAG	306	20
	p53T2_R	CAAAATCACCCCTCACAGTACTCTG		21
3	p53T3_F	GACAAGGGTGGTTGGGAGTAGATG	357	22
	p53T3_R	AGAGGAGCTGGTGTTGTTGG		23
4	p53T4_F	TGTTCACTTGTGCCCTGACT	489	24
	p53T4_R	GGAGGGCCACTGACAACCA		25

5	p53T5_F	GGCGACAGAGCGAGATTCCA	606	26
	p53T5_R	CACAAACACGCACCTCAAAG		27
6	p53T6_F	GGCGACAGAGCGAGATTCCA	817	28
	p53T6_R	AGAGGAGCTGGTGTTGTTGG		29
7	p53T7_F	TGCTTTATCTGTTCACTTGTGCCC	1142	30
	p53T7_R	TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC		31
8	p53T8_F	TGTTCACTTGTGCCCTGACT	1191	32
	p53T8_R	GGGTCAGCGGCAAGCAGAGG		33
9	p53T9_F	TGTTCACTTGTGCCCTGACT	1491	34
	p53T9_R	CACAAACACGCACCTCAAAG		35
10	p53T10_F	TGTTCACTTGTGCCCTGACT	1702	36
	p53T10_R	AGAGGAGCTGGTGTTGTTGG		37

[0088] **2. 결과**

[0090] **상업용 중합효소 연쇄반응 완충액을 사용한 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)의 활성 분석**

[0091] 먼저 다중 중합효소연쇄반응을 사용하여 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)의 활성을 확인하였다. 하룻밤 배양하고 세척한 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)을 최종 광학 밀도를 600nm에서 0.8로 조정하여 상업용 완충액과 반응시켰을 때 람다 게놈 타깃(500bp 및 300bp)의 PCR 증폭이 억제되는 것으로 나타났다(도 2(a) 참조). 그러나 도 1(b)-(e)에서 볼 수 있듯이 트윈 20을 첨가하는 경우 뚜렷한 증폭 결과가 관찰되었다. 상용 완충액에 트윈 20을 2%(v/v) 첨가한 결과, 두 개의 람다 게놈 타깃(500bp 및 300bp)을 증폭하는 데 가장 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

[0093] **상용 Taq DNA 중합효소와 비교한 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)의 활성 분석**

[0094] 다음으로 상업용 Taq DNA 중합효소와 비교하여 다중 중합효소연쇄반응을 사용하여 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)의 대략적인 반응단위를 결정하였다. 1:2로 희석된 박테리아 혼합물을 사용한 증폭 결과(도 3b, 레인 8)가 0.5 단위의 상용 Taq DNA 중합효소를 사용한 증폭 결과(도 3a, 레인 9)와 거의 동등한 수준을 나타내었다.

[0096] **다양한 보관 온도에서 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq) 활성 분석**

[0098] *다양한 보관 온도에서 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)의 활성이 얼마나 오래 유지되는지 측정하였다. -80℃(도 4(a)), -20℃(도 4(b)), 4℃(도 4(c)), 25℃(도 4(d)), 37℃(도 4(e))에서 3개월 동안 보관한 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)을 사용한 PCR 증폭 결과는 차이를 거의 보이지 않은 것으로 나타났다. 상기와 같은 결과를 통해, 본 발명의 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)의 경우 -80℃ 내지 37℃ 온도에서 3개월 동안 안정적으로 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

[0100] **전혈이 있는 상태에서 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)의 활성 분석**

[0101] 전혈이 있는 상태에서 다중 중합효소연쇄반응 증폭 분석으로 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)의 활성을 측정하였다. 그 결과는 도 5에서 나타내었다. 먼저, 상용 PCR 완충액을 사용한 전혈 1μL에서는 PCR 증폭 산물을 얻을 수 없었다(도 5(a) 참조). 이러한 결과는 전혈에 PCR 억제제가 존재함을 나타낸다. 반면에, 트레할로오스를 다양한 농도(0.1 ~ 0.6M)로 첨가한 경우, PCR 반응에서 두 개의 명확한 밴드를 확인할 수 있었다(도 5(b)-(e) 참조). 그 중 0.4M 트레할로오스를 첨가했을 때 결과가 가장 좋았다.

[0103] **세 가지 항응고제가 포함된 전혈이 있는 상태에서 다양한 pH 범위의 완충제를 사용한 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)의 활성 분석**

[0104] Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)의 성능을 향상시키기 위해 보다 신뢰할 수 있는 PCR 완충액을 개발하였다. 임상 혈액 샘플에 일반적으로 사용되는 항응고제인 에틸렌디아미네테트라아세트산, 헤파린, 구연산나트륨이 각각 포함된 전혈을 사용하여 다중 중합효소연쇄반응 증폭 분석으로 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)의 활성을 측정하였다. pH 8.0~9.0의 다양한 범위의 바이신 또는 트리신 기반 완충액을 테스트하였다. 그 결과, 상용 PCR 완충액(도 6(a)-(b), 레인 1, 8, 15)과 비교했을 때, 높은 pH에서 2% 트윈 20과 0.4 M 트레할로오스를 함유한 PCR 완충액의 경우 전혈에서 DNA 절편을 효과적으로 증폭하고 PCR 억제제를 차단하는 것으로 나타났다. 도 6(b)에서 볼 수 있듯이 성공적인 PCR을 위한 트리신 완충액의 최적 pH 범위는 8.4~9.0이었다. 2% 트윈 20과 0.4M 트레할로오스(도 6(b), 레인 19)가 포함된 트리신 기반 완충액(pH 8.6)이 가장 좋은 결과를 보였다. 참고로, 도 6의 결과에서 알 수 있듯이 트리신 기반 완충액 결과가 바이신 기반의 결과 보다 밴드의 강도가 더 뚜렷하므로 트리신 기반의 완충액이 효과적임을 알 수 있었다.

[0106] **전혈에서 장티푸스균 및 이질균을 사용한 직접 PCR**

[0107] DNA 정제 없이 전혈에서 감염성 미생물을 직접 진단하였다. 이를 위해 살아있는 장티푸스균(*Salmonella typhimurium*)과 플렉스네리이질균(*Shigella flexneri*)을 접종한 전혈 1μL를 주형 DNA로 사용하였다. Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)과 2% 트윈 20 및 0.4M 트레할로오스를 함유한 pH 8.6의 트리신 기반 완충액을 사용하여 직접 PCR을 수행하였다. 그 결과, 장티푸스균에 대한 284bp의 *invA* 유전자 단편과 플렉스네리이질균에 대한 215bp의 *virA* 유전자 단편 증폭에 성공하였다(도 7 참조). Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)을 사용한 직접 PCR로 쥐장티푸스균을 검출하는 데 필요한 최소 세포 수는 200 CFU/mL였다(도 7(a), 레인 5). Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)을 사용한 직접 PCR로 플렉스네리이질균 검출에 필요한 최소 세포 수는 640 CFU/mL였다(도 7(b), 레인 6).

[0109] **임상 검체를 사용한 HLA-B27 유전자형 검사**

[0110] 임상 검체를 사용하여 HLA-B27 유전자형 검사를 수행한 결과 내부 대조군 베타글로빈(β-globin)의 경우 268bp에서 증폭되었다. HLA-B27 양성 검체의 경우 150bp에서 DNA 절편이 증폭된 결과가 나타났다. 혈액 샘플에서 추출한 DNA를 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)을 사용하여 증폭한 결과, 55개의 양성 샘플과 55개의 음성 샘플 모두 시판되는 DNA 중합효소가 포함된 HLA-B27 키트와 일관된 결과를 보였다(도 8 참조). 상기와 같은 결과를 통해, 본 발명의 Taq DNA 중합효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)은 시판되는 DNA 중합효소(DNA polymerase)와 비슷한 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[0112] **DNA 및 전혈 샘플을 사용한 직접 대립유전자 특이적 PCR**

[0113] 대립 유전자 특이적 PCR(Allele specific PCR, ASPCR)은 단일 염기 치환 또는 결실로 인해 발생하는 대립 유전자를 감별하는 강력한 도구이다. ASPCR의 대립 유전자 판별은 3' 뉴클레오타이드가 DNA 템플릿과 상보적이지 않을 때 교정 활성이 결여된 Taq DNA 중합 효소가 프라이머를 확장하지 못하는 것을 기반으로 하였다. 본 실험에서는 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)과 함께 ASPCR 방법을 사용하여 DNA와 전혈 샘플 모두에서 ABO 유전자형 분석을 수행하였다. 그 결과 표 3에서 유전자형 BO에 대해 예상한 바와 같이, 도 9의 레인 3(164bp) 및 레인 6(381bp)에서는 증폭이 관찰되지 않은 반면, 레인 1(205bp), 레인 2(381bp), 레인 4(381bp), 레인 5(205bp), 레인 7(164bp)에서는 목표 절편의 성공적인 증폭이 이루어진 것으로 나타났다. 상기와 같은 결과를 통해, 대립 유전자 특이적 PCR에서 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)을 DNA 중합효소로 이용할 수 있음을 확인하였으며, 특히, EcoliTaq를 DNA 중합효소로 이용하는 경우 DNA와 전혈 샘플 모두에서 대립 유전자 특이적 PCR이 가능함을 확인할 수 있었다.

[0115] **핫 스타트 PCR에서의 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq) 활성 분석**

[0116] 본 발명에서는 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)을 사용하여 매우 간단한 핫 스타트 방법을 개발하

였다. 이 새로운 방법은 대장균 막으로 둘러싸인 Taq DNA 중합효소를 사용하여 프라이머와 기타 PCR 시약을 낮은 온도에서 격리시켜 중합효소에 의한 연장을 불가능하게 한다.

[0117] 95℃에서 5분간 가열하여 대장균을 용해시키고 중합효소를 제외한 방출된 단백질을 변성시킨 후 PCR 사이클을 수행하면 Taq DNA 중합효소가 쉽게 방출되었다. 단일 사본 p53 유전자를 표적으로 하는 10개의 프라이머 쌍을 사용하여 핫 스타트 PCR에서 DNA 중합효소로서 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)의 성능을 평가하기 위한 실험을 수행하였다. 그 결과는 도 10에서 나타내었다. 먼저, 핫 스타트 기능이 없는 상용 Taq DNA 중합효소를 주형 DNA와 함께 사용했을 때 여러 개의 비특이적 밴드가 관찰되었다(도 10(a) 참조). 한편, 상용 핫 스타트용 Taq DNA 중합효소(Bioneer, HotStart Taq DNA Polymerase, 카탈로그번호 E-2017)를 주형 DNA와 함께 사용했을 때에도 레인 1, 5, 6에서 여러 개의 비특이적 밴드가 관찰되었다(도 10(b) 참조). 반면에, 본 발명의 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)을 DNA와 함께 사용했을 때 단일 사본 p53 유전자에서 10개의 서로 다른 크기의 표적 밴드가 명확하고 뚜렷한 패턴으로 관찰되었다(도 10(c) 참조). 또한, DNA 대신 전혈을 핫 스타트 PCR에 주형으로 사용했을 때에도 본 발명의 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)을 사용하는 경우 비특이적인 PCR 산물 생성 없이 10개의 서로 다른 크기의 표적 밴드가 명확하고 뚜렷하게 나타나는 것을 확인할 수 있었다(도 10(d) 참조). 상기와 같은 결과를 통해, 본 발명의 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)이 열 사이클링 전에 비특이적 제품 형성을 효과적으로 차단하고, 핫 스타트 PCR에서 DNA 중합효소로서 우수한 성능을 발휘한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0118] 종래 기술은 정제된 형태의 Taq DNA 중합효소를 사용함으로써, 상기 효소의 정제 과정에서의 발생되는 비용 및 시간 소요의 문제점 있으나, 본 발명은 Taq DNA 중합효소 대신 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)을 직접 PCR에 사용함으로써 효소 정제로 인한 문제점을 개선하고 간단하고 용이하게 핫 스타트 PCR을 진행할 수 있다.

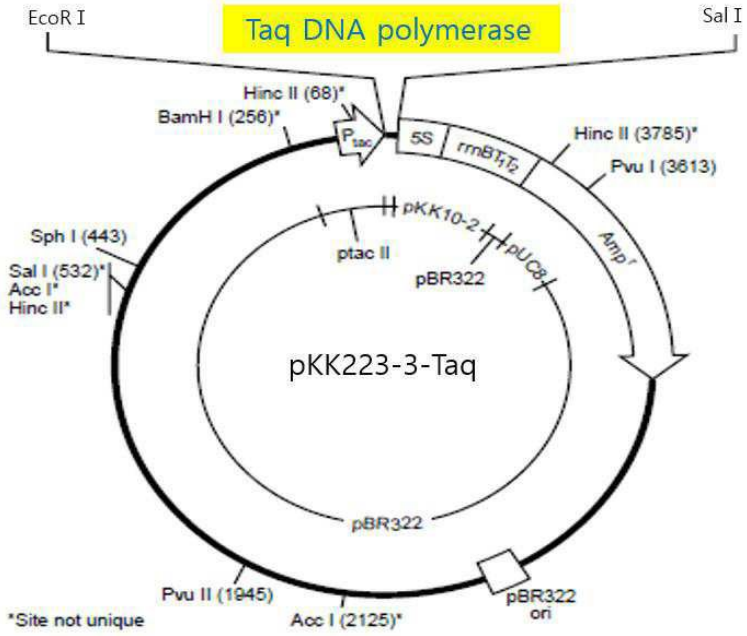
[0119] PCR의 가장 큰 문제점은 72℃에서 프라이머 DNA 증폭반응이 비특이적임에 따라 프라이머-이합체 형성으로 인해 PCR 설정 중에 원하지 않는 DNA 합성이 발생할 있다는 것이다. 이러한 PCR의 단점을 극복하기 위하여 핫 스타트 PCR이 개발되었으며, 핫 스타트 PCR은 94℃에서 PCR 진행함으로써 중합효소 활성이 높아져 비특이적인 증폭을 감소시킬 수 있다. 다만, 94℃ 올라갈때까지 효소의 활성을 막아야 하므로, 종래기술의 경우 다양한 화학적 변형(변형된 DNA 중합효소, 항체, 압타머, 왁스, 반응 완충액, 특수 프라이머 사용, 중합효소의 냉감성 돌연변이 등)을 통해 상온에서 DNA 합성을 차단하고 있다.

[0120] 그러나 이러한 화학적 변형은 추가적인 과정을 거쳐야 하는 번거로움이 있다. 본 발명의 경우 종래기술과 같이 상온에서 DNA 합성 차단을 위한 화학적 변형 과정이 불필요하다. 즉, 본 발명은 Taq DNA 중합 효소가 발현된 대장균(EcoliTaq)을 DNA 중합효소 대신 이용함으로써 상온에서는 상기 효소가 대장균의 세포막 내에 물리적으로 구속된 상태이므로 프라이머 및 기타 PCR 시약으로부터 분리되어 효소가 증폭 반응에 참여할 수 없으나, 온도가 올라가면 대장균의 세포막이 파괴되어 그때서야 Taq DNA 중합효소가 증폭 반응에 자유롭게 참여할 수 있게 된다.

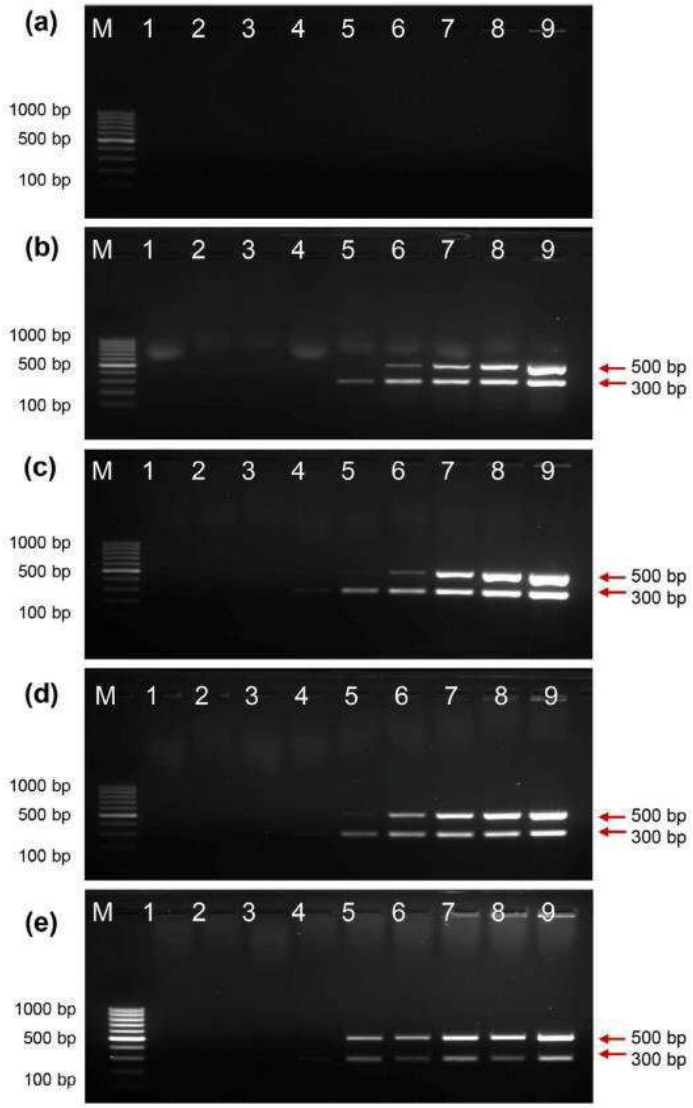
[0122] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

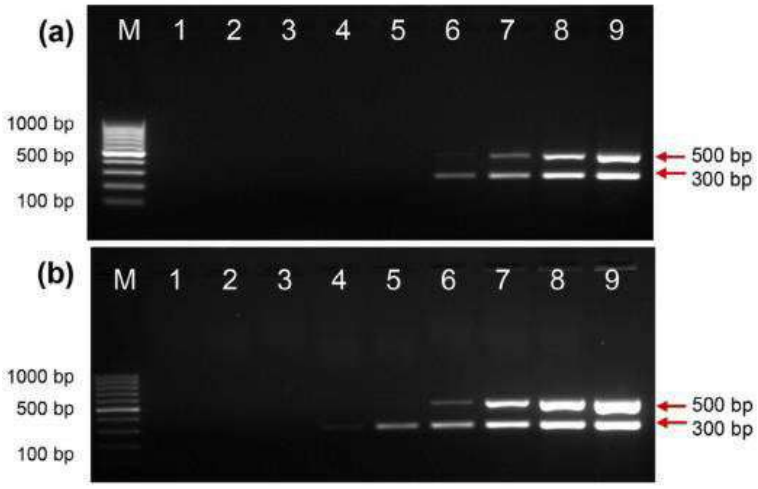
도면1


EcoR I
Taq DNA polymerase
Sal I
Hinc II (68)*
BamH I (256)*
Hinc II (3785)*
Pvu I (3613)
Sph I (443)
Sal I (532)*
Acc I*
Hinc II*
ptac II
pBR322
pUC8
Amp r
pKK223-3-Taq
pBR322
Pvu II (1945)
Acc I (2125)*
pBR322
ori
*Site not unique

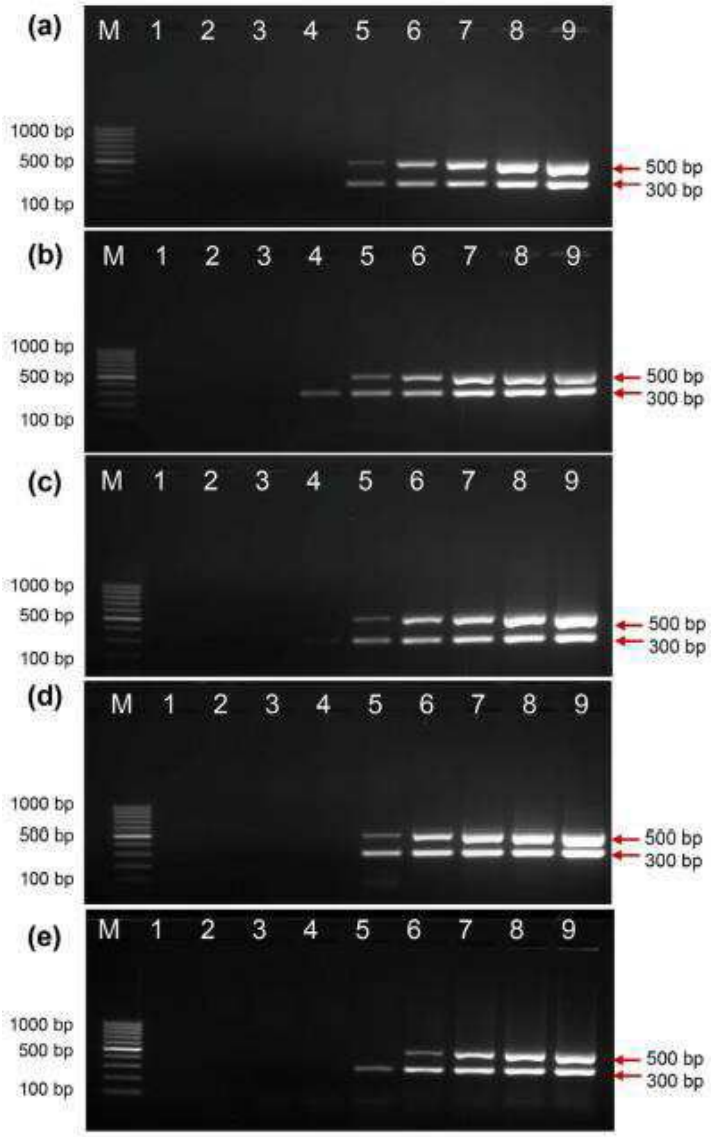
도면2


(a)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
(b)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp
(c)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp
(d)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp
(e)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp

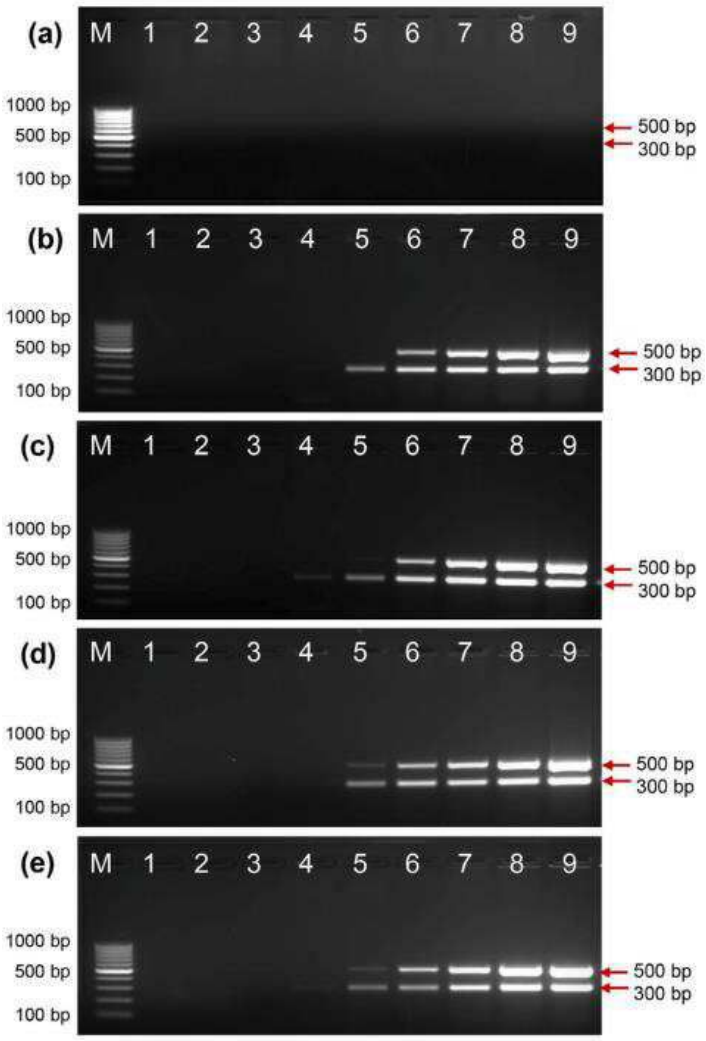
도면3


(a)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp
(b)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp

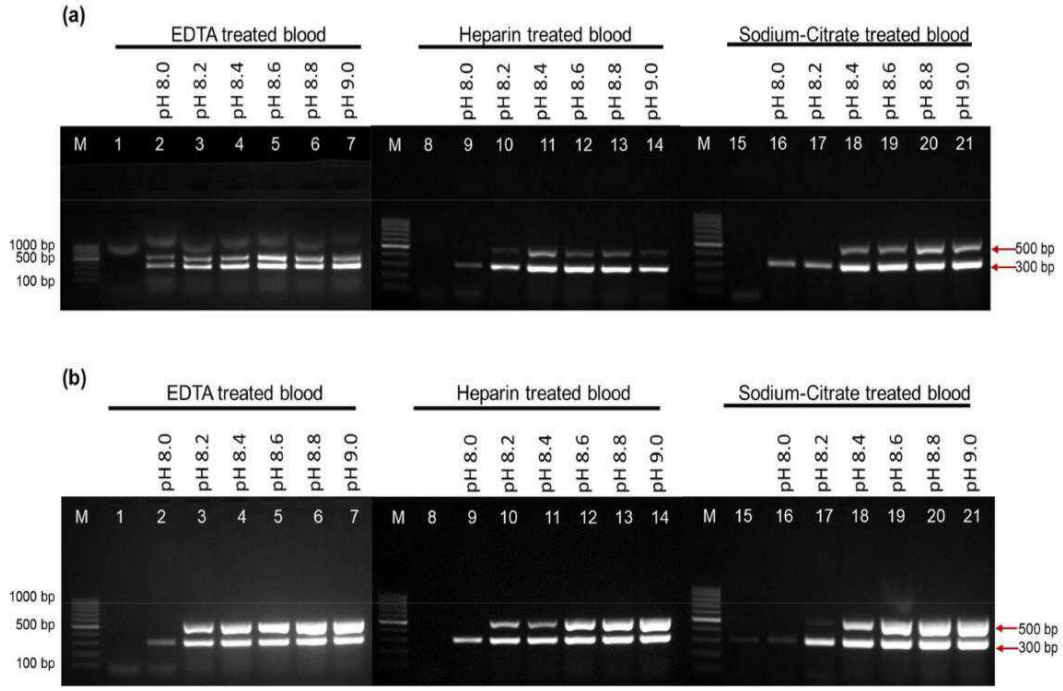
도면4


(a)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp
(b)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp
(c)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp
(d)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp
(e)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp

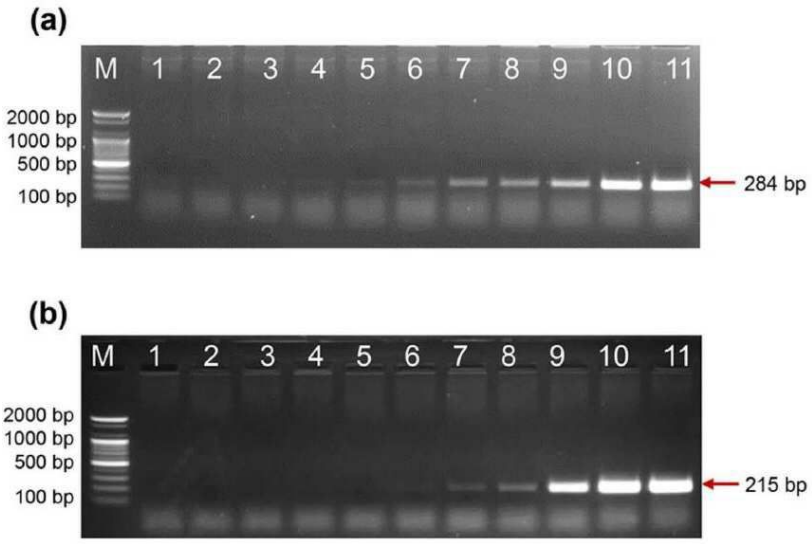
도면5


(a)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp
(b)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp
(c)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp
(d)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp
(e)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp

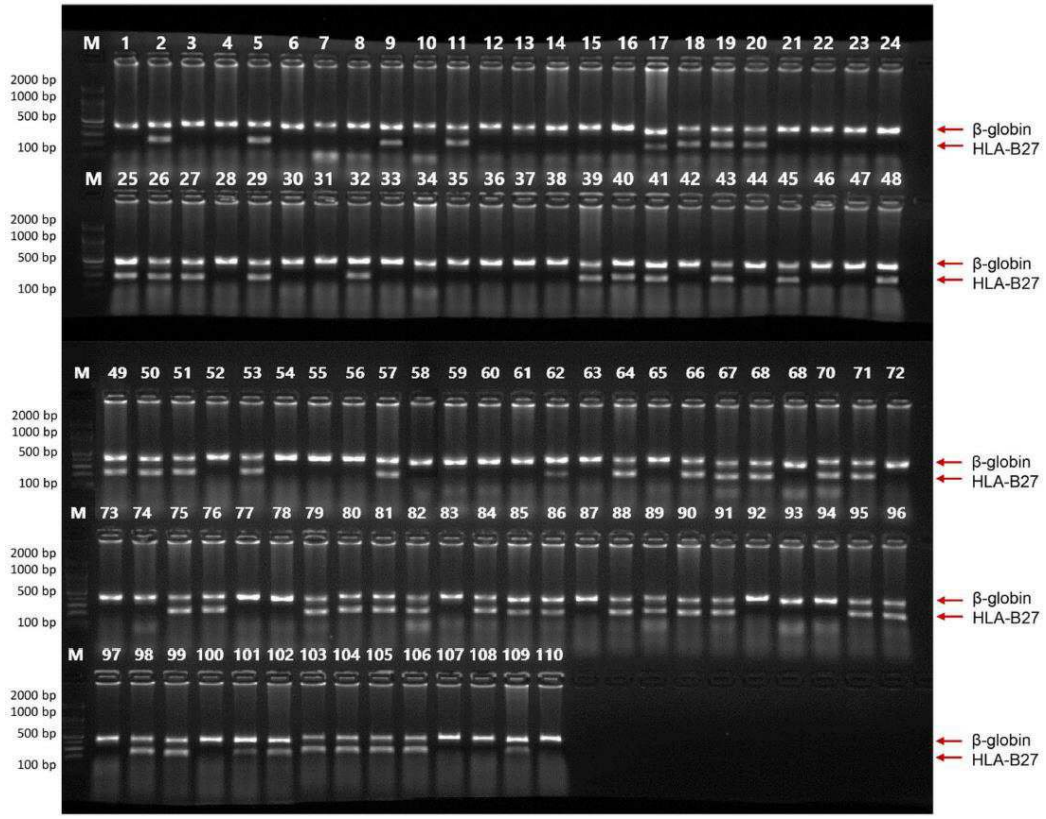
도면6


(a)
EDTA treated blood
Heparin treated blood
Sodium-Citrate treated blood
pH 8.0
pH 8.2
pH 8.4
pH 8.6
pH 8.8
pH 9.0
M 1 2 3 4 5 6 7
M 8 9 10 11 12 13 14
M 15 16 17 18 19 20 21
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp
(b)
EDTA treated blood
Heparin treated blood
Sodium-Citrate treated blood
pH 8.0
pH 8.2
pH 8.4
pH 8.6
pH 8.8
pH 9.0
M 1 2 3 4 5 6 7
M 8 9 10 11 12 13 14
M 15 16 17 18 19 20 21
1000 bp
500 bp
100 bp
500 bp
300 bp

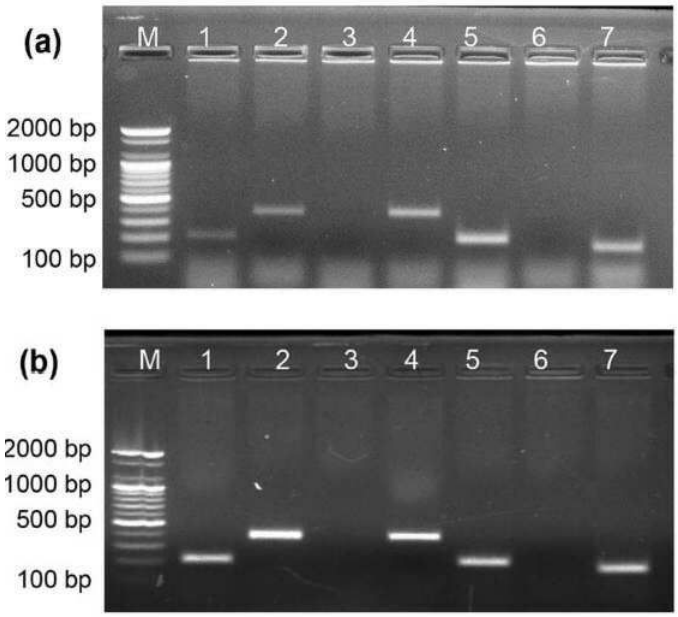
도면7


(a)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
2000 bp
1000 bp
500 bp
100 bp
284 bp
(b)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
2000 bp
1000 bp
500 bp
100 bp
215 bp

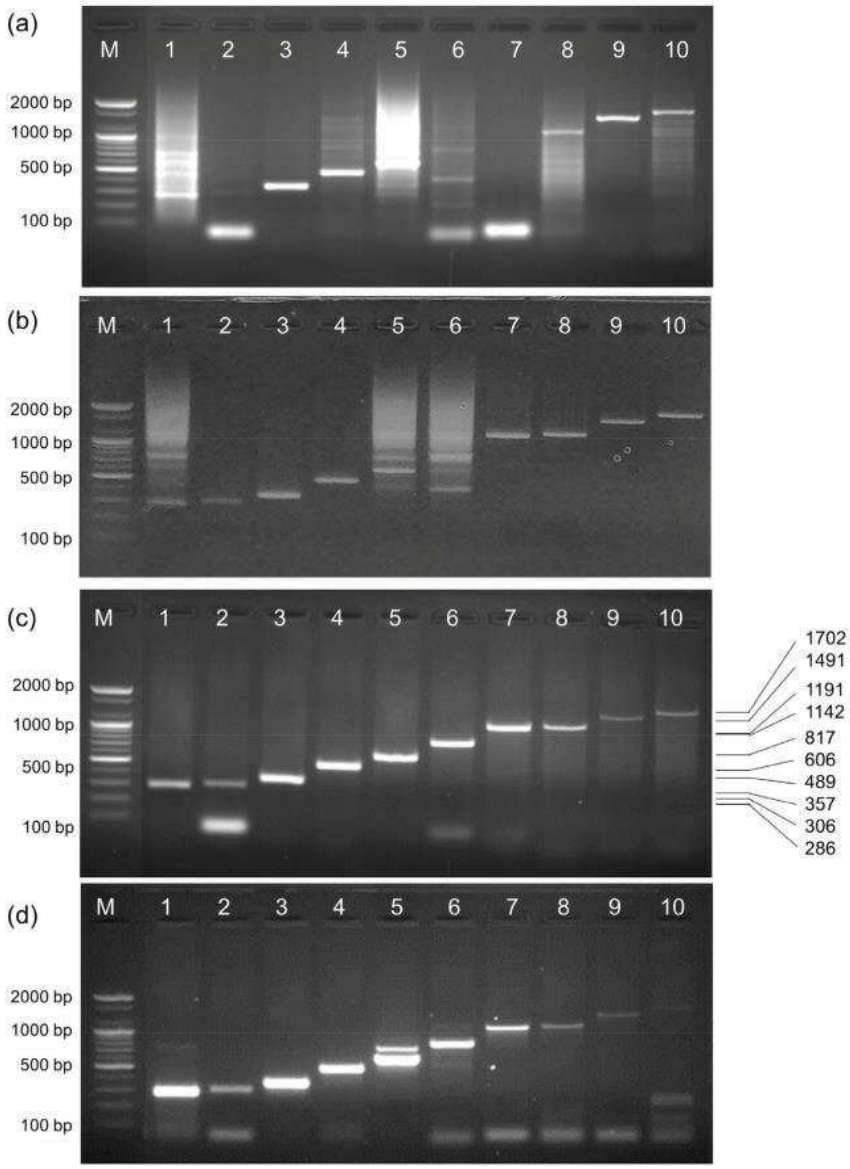
도면8


M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
M 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48
M 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 68 70 71 72
M 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96
M 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110
2000 bp
1000 bp
500 bp
100 bp
β-globin
HLA-B27

도면9


(a)
M 1 2 3 4 5 6 7
2000 bp
1000 bp
500 bp
100 bp
(b)
M 1 2 3 4 5 6 7
2000 bp
1000 bp
500 bp
100 bp

도면10


(a)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
2000 bp
1000 bp
500 bp
100 bp
(b)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
2000 bp
1000 bp
500 bp
100 bp
(c)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
2000 bp
1000 bp
500 bp
100 bp
1702
1491
1191
1142
817
606
489
357
306
286
(d)
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
2000 bp
1000 bp
500 bp
100 bp

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.