

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0127079 (43) 공개일자 2013년11월22일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01)	(71) 출원인 부경대학교 산학협력단 부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)	
(21) 출원번호 10-2012-0050715	(주)바이오니아	
(22) 출원일자 2012년05월14일	대전광역시 대덕구 문평서로 8-11 (문평동)	
심사청구일자 2012년05월14일	(72) 발명자 최태진 부산광역시 해운대구 좌동 1398번지 대림1차아파트 108동 501호 김남일 대전광역시 유성구 송강동 송강한솔아파트 203동 1208호 박한오 대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 208동 601호	
	(74) 대리인 최규환	

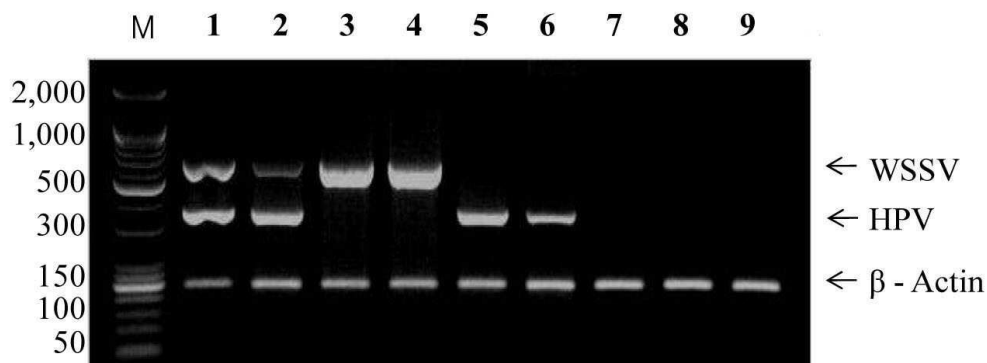
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 WSSV 및 HPV의 동시 진단용 멀티플렉스 프라이머 세트 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1 내지 4로 표시된 2 쌍의 프라이머 세트를 포함하는 WSSV(white spot syndrome virus) 및 HPV(hepatopancreatic parvovirus)의 동시 진단용 멀티플렉스 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 WSSV 및 HPV의 동시 진단용 키트, 상기 프라이머 세트를 이용하여 WSSV와 HPV를 동시에 진단하는 방법, 서열번호 1 및 2로 표시된 프라이머 세트를 포함하는 WSSV 진단용 프라이머 세트 및 서열번호 3 및 4로 표시된 프라이머 세트를 포함하는 HPV 진단용 프라이머 세트에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업	
과제고유번호	20090487
부처명	농림수산식품부
연구사업명	수산기술개발사업
연구과제명	국내 새우 간체장바이러스 집단의 계통 분석과 이를 이용한 Real-Time PCR 진단 키트의 개
발	
기 여 율	1/1
주관기관	부경대학교
연구기간	2009.06.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오타드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타드 및 서열번호 2의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오타드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타드를 포함하는 올리고뉴클레오타드 프라이머 세트; 및

서열번호 3의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오타드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타드 및 서열번호 4의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오타드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타드를 포함하는 올리고뉴클레오타드 프라이머 세트를 포함하는 WSSV(white spot syndrome virus) 및 HPV(hepatopancreatic parvovirus)의 동시 진단용 멀티플렉스 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오타드 프라이머 세트 및 서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오타드 프라이머 세트를 포함하는 WSSV 및 HPV의 동시 진단용 멀티플렉스 프라이머 세트.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오타드 프라이머 세트는 WSSV의 핵산 서열을 특이적으로 증폭하는 것을 특징으로 하는 WSSV 및 HPV의 동시 진단용 멀티플렉스 프라이머 세트.

청구항 4

제2항에 있어서, 서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오타드 프라이머 세트는 HPV의 핵산 서열을 특이적으로 증폭하는 것을 특징으로 하는 WSSV 및 HPV의 동시 진단용 멀티플렉스 프라이머 세트.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열번호 5 및 6의 올리고뉴클레오타드 프라이머 세트를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 WSSV 및 HPV의 동시 진단용 멀티플렉스 프라이머 세트.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, WSSV(white spot syndrome virus) 및 HPV(hepatopancreatic parvovirus)의 동시 진단용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것인 키트.

청구항 8

바이러스에 감염된 새우에서 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, DNA 폴리머라제를 첨가하여, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 산물을 동정하는 단계를 포함하는, WSSV(white spot syndrome virus) 및 HPV(hepatopancreatic parvovirus)를 동시에 진단하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 모세관 전기영동, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또

는 인광 측정을 통해 수행되는 것인 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 새우는 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*) 또는 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 프라이머 세트의 혼합 비율은 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 세트:서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트=3:1의 몰비(mole ratio)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 표적 서열의 증폭은 멀티플렉스 PCR(multiplex PCR)을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 멀티플렉스 PCR의 프라이머 어닐링 온도(annealing temperature)는 52℃~57℃인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 WSSV(white spot syndrome virus) 진단용 프라이머 세트.

청구항 15

서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 HPV(hepatopancreatic parvovirus)의 진단용 프라이머 세트.

명세서

기술 분야

[0001]

본 발명은 새우류의 흰반점 바이러스 (white spot syndrome virus, WSSV) 및 간췌장 파르보바이러스 (hepatopancreatic parvovirus, HPV)의 유전자 특성을 이용하는 것으로 바이러스 염기서열을 분석하여 특이성이 높은 프라이머를 제작하고, 상기 제작한 프라이머를 이용하여 새우로부터 추출한 전체 핵산과 반응시켜 바이러스 염기서열의 특정 부위를 증폭시키는 중합효소연쇄반응(PCR)을 통해 증폭된 산물로 바이러스 감염 여부를 검정하는 유전자 진단 분야이다. 구체적으로는, 서열번호 1 내지 4로 표시된 2 쌍의 프라이머 세트를 포함하는 WSSV 및 HPV의 동시 진단용 멀티플렉스 프라이머 세트, 새우류의 베타액틴 유전자 프라이머, 상기 프라이머 세트를 포함하는 WSSV 및 HPV의 동시 진단용 키트 및 상기 프라이머 세트를 이용하여 WSSV와 HPV를 동시에 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

흰반점 바이러스(white spot syndrome virus)는 니마비리대(*Nimaviridae*)과의 위스포바이러스(*Whispovirus*)속에 속하는데, 빠르게 복제하며, 독성이 있는 병원균이다. WSSV는 181 내지 184개의 주된 오픈 리딩 프레임 포함하고, 약 293 내지 300kbp의 큰 원형 이중가닥 DNA 유전체를 에워싸고 있는, 껍질이 있는 간상형 뉴클레오캡시드를 포함한다. 상기 바이러스는 최초로 태국 및 중국에서 검출되었는데, 그 이래로 대부분의 아시아 전체 국가 및 미대륙에 널리 퍼졌다. WSSV는 한국의 남해안 및 서해안에서 양식하는 보리새우류의 대량 폐사를 야기했다. 흰반점 질병은 일반적으로 임상적 징후 출현 1 주 내에 80 내지 100% 폐사를 야기한다. WSSV 감염으로 인해 1993년 일본에서는 많은 새우 사육장들이 일시적으로 문을 닫았고, 한국에서도 2002년에 비슷한 문제에 직면했다(Jang et al., 2009 Aquaculture 287, 40-45).

[0003]

2002년 이래, 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)는 WSSV에 덜 취약한 태평양 흰새우인 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*)로 대체되었고, 그 결과 2011년도 대하 생산량은 18MT 였으나 흰다리새우의 생산은 2844MT였다

(<http://fs.fips.go.kr>). 흰다리새우가 WSSV에 덜 취약하긴 하지만, 상기 새로운 종의 도입은 신규한 바이러스 질환의 출현을 야기했다. 예를 들어, 흰다리새우의 도입은 중국에서의 감염성 피하 및 혈구 괴사 바이러스(IHHNV) 및 타우라 증후군 바이러스(TSV) 및 태국에서의 TSV의 유행 증가를 야기했다(Yang et al., 2007 Veterinary Microbiology. 120, 63-70).

- [0004] 대조적으로, 흰다리새우 양어장의 최근 조사에서는 한국에서 또다른 새우 바이러스인 간췌장 파르보바이러스(hepatopancreatic parvovirus, HPV)의 높은 발생율을 보여줬다. HPV는 한국에서 1985년에 최초로 대하에서 보고되었고, HPV 감염은 대하 및 흰다리새우 두가지 모두에서 관찰되었다(Jang et al., 2008 Fisheries and Aquatic Science 11, 195-204). HPV는 파르보비리과(Parvoviridae)과의 덴소바이러스(densovirus) 속에 속하며 외막이 없는 정20면체 바이러스이다. 상기 바이러스는 비구조 단백질 2(NS2), 비구조 단백질 1(NS1) 및 구조 단백질의 3가지 단백질을 코딩하는 약 6kb 단일 가닥 DNA 유전체를 포함한다. 최근 대하에서 분리된 한국 HPV 균주의 전체 유전체의 염기서열이 분석되었다(Jeeva et al., 2012 Virus Genes 44, 89-97).
- [0005] 중합효소연쇄반응법(Polymerase Chain Reaction, PCR)은 유전자 진단에 가장 많이 이용되는 방법이다. 생체로부터 추출한 전체 핵산을 이용하여 특정 DNA 부위를 특이적으로 반복하여 시험관 내에서 원하는 DNA 분자를 증폭시켜 전기영동에서 뚜렷한 밴드로 가시화하여 진단하는 매우 유용한 진단법으로 알려져 있다.
- [0006] 중합효소연쇄반응(PCR), PCR-ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), ELISA, 루프-매개성 등은 증폭(LAMP), 실시간 PCR, 측방 유동 크로마토그래피 스트립(LFCS)과 조합된 LAMP, 인시투 혼성화(in situ hybridization) 및 특이적 면역 크로마토그래피 시험(ICTs)과 같은 몇가지 분자적 진단 방법이 HPV 및 WSSV의 검출을 위해 개발된 바 있다.
- [0007] 새우를 감염시키는 20가지가 넘는 바이러스가 보고된 바 있고(Walker and Winton, 2010 Veterinary research 41, 51), 따라서 다중 바이러스 감염이 일반적이다. 다중 바이러스에 의한 새우 감염은, 각 표적 PCR의 별개적 증폭, PCR 및 조직학적 관찰의 조합, RNA 및 DNA 바이러스의 동시 검출을 위한 역전사 PCR(RT-PCR), 단일-단계 멀티플렉스 PCR 및 멀티플렉스 루프-매개성 등은 증폭을 포함하는 다양한 방법에 의해 검출된 바 있다.
- [0008] 2009, 2010 및 2011년도에 수집된 350마리의 흰다리새우 개체들의 예비 조사에서, 이들 새우는 IHHNV(infectious hypodermis and hematopoietic necrosis virus) 및 TSV(taura syndrome virus) 감염은 없으나, WSSV 및 HPV로 감염되어 있다는 것을 보여줬다. 따라서, 이들 두 바이러스를 표적으로 하는 멀티플렉스 PCR 진단 검정법을 개발했다. 최적의 검정 설정을 결정하기 위해 다양한 프라이머 비율 및 반응 조건을 시험했다. 양어장으로부터 수집한 새우 시료들을 시험해 이들 두 바이러스의 발생에 대해 조사하고 상기 방법의 장래 적용 가능성을 시험했다.
- [0009] 한국공개특허 제2003-0078524호에는 'G T P - 결합 단백질의 발현 및 기능을 억제하여 바이러스증식을 억제하는 방법'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2011-0072681호에는 'INSV 및 TSWV의 동시 진단용 듀플렉스 프라이머 및 이의 용도'가 개시되어 있으며, 한국등록특허 제1064866호에는 '소코로나바이러스, 소로타바이러스, 및 소바 바이러스성 설사병바이러스를 동시에 검출할 수 있는 프라이머 및 이를 이용한 소 등 반추류의 설사유발 바이러스 동시 검출법'이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 WSSV 및 HPV의 동시 진단용 멀티플렉스 프라이머 및 이의 용도에 관해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 고감도 동시 진단용 멀티플렉스 프라이머를 제작하였고, 동시 진단에 최적인 PCR 조건을 설정하여 새우에 감염된 WSSV(white spot syndrome virus) 및 HPV(hepatopancreatic parvovirus)의 빠르고 정확한 동시 진단법을 개발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1 내지 4로 표시된 2 쌍의 프라이머 세트 및 두 바이러스가 모두 존재하지 않을 경우 PCR 반응 여부를 확인하기 위한 내부 양성 대조구로서 새우류의 베타 액틴 유전자 프라이머를 포함하는 WSSV 및 HPV의 동시 진단용 멀티플렉스 프라이머 세트를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 멀티플렉스 프라이머 세트를 포함하는 WSSV 및 HPV의 동시 진단용 키트를 제공한다.

- [0013] 또한, 본 발명은 상기 멀티플렉스 프라이머 세트를 이용하여 WSSV 및 HPV를 동시에 진단하는 방법을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 서열번호 1 및 2 또는 서열번호 3 및 4의 상기 멀티플렉스 프라이머 세트를 포함하는 WSSV(white spot syndrome virus) 또는 HPV(hepatopancreatic parvovirus) 진단용 프라이머 세트를 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명의 멀티플렉스 프라이머 세트는 WSSV 및 HPV를 동시에 진단할 수 있어 WSSV 및 HPV에 동시 감염된 새우 또는 어미새우의 진단에 사용할 수 있고, 양식장에 사용하는 유생에 대한 검사 및 양식과정에서의 바이러스 유입의 모니터링에 이용할 수 있다. 이러한 과정을 통해 바이러스의 도입 내지 발병을 지연시켜 이들 바이러스에 의한 피해를 줄일 수 있기 때문에 본 발명에서 개발된 멀티플렉스 PCR 시스템은 새우 양식에서 매우 유용한 발명이다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 내부 양성 대조군을 이용한 멀티플렉스 PCR에 의한 WSSV 및 HPV 동시감염의 진단 검사 결과를 나타낸다. 새우 양식장으로부터 수집한 두 흰다리새우 시료를 WSSV 및 HPV 멀티플렉스 PCR(레인 1 및 2), 또는 WSSV(레인 3 및 4) 또는 HPV(레인 5 및 6) 특이적 프라이머를 이용한 PCR에 의해 시험했다. 바이러스가 없는 대하(레인 7), 흰다리새우(레인 8) 및 보리새우(레인 9)를 β -액틴 유전자에 대한 내부 양성 프라이머를 이용해 시험했다. 레인 M은 1kb DNA 마커를 도시한다. 예상 PCR 생성물의 위치는 화살표로 표시했다.
- 도 2는 WSSV 및 HPV의 PCR 프라이머 세트의 최적 혼합 비율을 이용한 실험 결과를 나타낸다. WSSV 및 HPV로 동시감염된 흰다리새우를 3:1:1 비율의 HPV:WSSV: β -액틴 유전자 프라이머를 이용한 멀티플렉스 PCR(레인 1) 및 WSSV(레인 2), HPV(레인 3) 및 β -액틴에 대한 동량의 프라이머를 이용한 단독적 PCR 반응(레인 4)을 나타낸다. 레인 M은 1kb DNA 마커를 도시한다.
- 도 3은 멀티플렉스 PCR을 이용한 WSSV 및 HPV 동시감염에 대한 필드 흰다리새우의 시험 결과를 나타낸다. 배양 사육장으로부터 수집한 170마리의 흰다리새우 시료를 멀티플렉스 PCR로 시험하고, 동시 및 단독 감염 비율을 나타냈다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 및 서열번호 2의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및
- [0018] 서열번호 3의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 및 서열번호 4의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 WSSV(white spot syndrome virus) 및 HPV(hepatopancreatic parvovirus)의 동시 진단용 멀티플렉스 프라이머 세트를 제공한다.
- [0019] 상기 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 서열번호 1의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 또한, 상기 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 서열번호 2의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0020] 또한, 상기 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 서열번호 3의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 또한, 상기 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 서열번호 4의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 WSSV 및 HPV의 동시 진단용 멀티플렉스 프라이머 세트이다. 상기 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 WSSV의 핵산

서열을 특이적으로 증폭하며, 상기 서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 HPV의 핵산 서열을 특이적으로 증폭한다. 2개의 프라이머 세트를 동시에 이용하면 WSSV 및 HPV에 감염된 새우를 동시에 검출할 수 있다.

- [0022] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 WSSV 및 HPV의 두 바이러스가 모두 존재하지 않을 경우 PCR 반응 여부를 확인하기 위한 내부 양성 대조구로서 새우류의 베타 액틴 유전자 프라이머 세트를 추가로 포함할 수 있는데, 바람직하게는 서열번호 5 및 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 추가로 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 따른 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 또는 서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 WSSV 또는 HPV의 진단용 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트이다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0025] 본 발명에 따른 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, WSSV 및 HPV의 동시 진단용 키트를 제공한다. 본 발명의 키트에서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 버퍼 등을 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0027] 바이러스에 감염된 새우에서 DNA를 분리하는 단계;
- [0028] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, DNA 폴리머라제를 첨가하여, 본 발명에 따른 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0029] 상기 증폭 산물을 동정하는 단계를 포함하는, WSSV 및 HPV를 동시에 진단하는 방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 방법은 바이러스에 감염된 새우 시료에서 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 페놀:클로로포름 추출에 후속한 에탄올 침전화 방법을 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 DNA 폴리머라제를 첨가하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다.
- [0031] 바람직하게는, 상기 표적 서열의 증폭은 멀티플렉스(multiplex) PCR을 통해 수행될 수 있다. 멀티플렉스 PCR이란 복수의 프라이머 세트를 사용하여 동시에 1개의 반응 튜브 내에서 PCR 증폭하는 방법을 말한다. 멀티플렉스 PCR 반응 조건을 어닐링 온도 및 프라이머 비율의 측면에서 최적화 했다. 상기 멀티플렉스 PCR의 프라이머 어닐링 온도는 50℃~60℃일 수 있으며, 바람직하게는 52℃~57℃일 수 있고, 가장 바람직하게는 57℃일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 멀티플렉스 PCR에서 고려된 두번째 요인은 프라이머 세트 혼합 비율이다. 바람직한 증폭은 상이한 HPV:WSSV 프라이머 세트 비율을 이용해 시험했고, 최적의 비율은 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머 세트:서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트=3:1의 몰비(mole ratio)로 정했다.
- [0032] 본 발명의 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 모세관 전기영동, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있고, 바람직하게는 겔 전기영동일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 새우는 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*) 또는 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 또한, 본 발명은 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 WSSV(white spot syndrome virus) 진단용 프라이머 세트를 제공한다.
- [0035] 또한, 본 발명은 서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 포함하는 HPV(hepatopancreatic parvovirus) 진단용 프라이머 세트를 제공한다.
- [0036] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 실험재료 및 방법

[0038] 1) 시료 수집

[0039] 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*) 시료를 한반도 서해안에 위치한 17개의 배양 사육장으로부터 수집했다. 6개의 사육장은 충남 홍성군에 위치했고, 11개는 전남 신안군에 위치했다. 이들은 흰다리새우 생산의 주된 지역이다. 30마리 이상의 건강하게 보이는 개체들을 수확기 중간인 2011년 9월에 양식장으로부터 채집하였다. 20마리의 살아있는 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)는 홍성군의 어시장에서 구입했다. 10마리의 개체들을 각 시료로부터 무작위적으로 선별했고, 핵산 분리시까지 약 -80℃의 50mL 코니칼 튜브에 따로 보관하였다.

[0040] 2) 핵산 추출

[0041] 냉동 시료로부터 약 20mg의 유영각(pleopod)을 0.1M NaCl, 20mM Tris-HCl, EDTA 및 0.5% SDS를 함유하는 500 μ L 버퍼로 균질화시켰다. 페놀:클로로포름:이소아밀알콜(25:24:1)의 혼합물의 같은 부피를 이용해 균질화물로부터 직접 DNA를 추출한 후, 0.1 부피(volume)의 3M NaOAc(pH 5.3) 및 2 부피의 무수 에탄올을 이용해 침전화시켰다. 펠렛을 70% 에탄올로 세척하고, 대기에서 건조시킨 펠렛을 100 μ L TE 완충액에 재현탁시켰다.

[0042] 3) 프라이머 고안 및 새우 감염 바이러스 스크린

[0043] ClustalW2 (EBI)를 이용해 다중 DNA 서열 정렬을 수행하여, 상이한 WSSV 또는 HPV 균주 내 보존된 서열의 위치를 찾았다. WSSV 서열의 GenBank 등록 번호는 DQ902658, AY324881, EU414753, AY249442 및 AY249443이었다. DNA 서열 JN082231, AY008257, EU588991, EU247528, DQ002873, DQ458781, FJ410797 및 GU371276을 HPV 특이적 프라이머 고안에 이용했다. 내부 양성 대조군으로서, 새우 β -액틴 유전자에 특이적인 프라이머를 서열 JQ241179(보리새우(*Penaeus monodon*)), DQ205426(대하) 및 AF300705(흰다리새우)를 이용해 고안했다. 다중 서열 정렬 후, 보존성 영역을 검색했고, 예상된 PCR 생성물이 아가로스 겔 상에서 명확하게 분리되도록 프라이머를 고안했다.

[0044] 4) WSSV 및 HPV DNA 클로닝

[0045] WSSV 및 HPV 유전체 유래의 DNA 절편을 추출된 DNA로부터 증폭시키고, 클로닝하고, 민감도 시험에 이용했다. PCR 프로그램은 95℃에서 3분 동안의 최초 변성; 95℃에서 30초 변성, 57℃에서의 1분 어닐링 및 72℃에서의 1분 중합의 35회 반응; 이어서 72℃에서의 추가적인 10분 중합으로 이루어진다. PCR 생성물을 겔 정제하고, TA 클로닝 키트(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용해 pCR8/GW/TOPO 벡터로 클로닝하고, 대장균(*Escherichia coli*) TOP10 세포에 형질전환시켰다. 서열 확인 후, Victor³ Multilabel Plate Reader(PerkinElmer, Shelton, CT, USA)를 이용해 농도를 결정하고, 카피수로 변환시켰다. 주형 DNA의 일련의 10배 희석을 이용해 검출 한계를 결정했다.

[0046] 5) WSSV 및 HPV 검출을 위한 멀티플렉스 PCR(multiplex PCR)

[0047] WSSV 및 HPV 두가지 모두의 동시 검출을 위한 멀티플렉스 PCR을 개발했다. 상기 두 표적 바이러스의 프라이머에 더하여, 새우 β -액틴에 대한 프라이머 세트를 내부 양성 대조군으로서 추가했다. 반응 혼합물에는 감염된 새우로부터 추출된 총 DNA 40ng, 1U의 prime Taq DNA 중합효소(GeNet Bio, Cheonan, Korea), 0.5mM의 dNTPs, 4mM MgCl₂ 및 2×반응 완충액(Prime Taq premix2X; GeNet Bio)과 멀티플렉스 PCR 생성물의 양이 개별 PCR로부터의 것과 유사하게 되도록 상이한 비율의 3가지 프라이머 세트를 포함시켰다. PCR 프로그램은 상기 기재된 것과 같았다.

[0048] 실시예 1. 프라이머 고안

[0049] 상이한 숙주 및 지리학적 기원의 WSSV 및 HPV의 동시 검출을 위해, 두 바이러스에서 보존성 영역 유래의 프라이머 세트를 고안했다. 추가로, 내부 대조군 프라이머 세트는 3가지의 WSSV 및 HPV 숙주의 β -액틴 유전자의 서열 비교를 근거로 고안했다. PCR 프라이머의 서열 및 생성물의 크기를 표 1에 제시했다.

[0050] 본 발명에서, WSSV의 검출을 위해 5개의 vp28 유전자 서열을 비교했고, 100% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 나타내는, AF332093 유전체 서열의 뉴클레오타이드 244,252 내지 244,855에 해당하는 604bp DNA 절편을 선별했다.

[0051] 상이한 숙주 및 지리학적 영역으로부터 HPV 검출을 가능하게 하기 위해, HPV 유전체 내에서 가장 보존성인 영역을 결정하고자 시도했다. HPV 유전체 서열의 8개의 완전 또는 부분적 다중 정렬 후, JN082231(GenBank 등록 번호)의 뉴클레오타이드 1,414 내지 1,751에 해당하는 338bp DNA 절편을 증폭시키기 위한 프라이머 세트를 고안했다.

[0052] DNA 추출을 위해 페놀:클로로포름 추출에 후속한 에탄올 침전화 및 시판 유전체 DNA 추출 키트(Bioneer, Daejeon, Korea)의 두가지 방법을 시도했으나, 차이점을 발견하지 못했다(데이터 미제시). 그러나 상이한 숙주에 검출 방법을 적용하고, DNA의 양을 모니터링하기 위해, 내부 양성 대조군으로서의 프라이머 세트를 포함시켰다. PCR 저해제에 대해 고려하는 것에 추가하여, 내부 프라이머 고안에서의 여타 고려사항은 표적 바이러스의 숙주 범위였다. 따라서, 프라이머 세트는 가장 광범위하게 배양되는 새우 종들인, 79.7 내지 98.3%의 뉴클레오타이드 서열 동일성(identity)을 나타내는 흰다리새우, 보리새우 및 대하의 β -액틴 유전자의 서열 정렬에 의해 고안되었다. 프라이머 세트는 흰다리새우 β -액틴 유전자(GenBank 등록 번호 AF300705)의 뉴클레오타이드 190 내지 328에 해당하는 139bp DNA 절편을 증폭했다. 도 1에 제시된 바와 같이, 상기 프라이머 세트는 세 종 모두의 표적 유전자를 성공적으로 증폭하여, 멀티플렉스 PCR 시스템이 임의의 상기 숙주 생물체 유래의 WSSV 및 HPV의 동시 검출에 적용될 수 있음을 시사했다.

표 1

[0053] WSSV 및 HPV 동시 진단용 멀티플렉스 프라이머

Target	Primer	Nucleotide Sequence	G+C Content (%)	T _m (°C)	Product (bp)
WSSV	WSSVF	5'-CTTTCACCTCTTTCGGTCGTGTC-3' (서열번호 1)	50	59.2	604
	WSSVR	5'-TACTCGGTCTCAGTGCCAGA-3' (서열번호 2)	55	58.0	
HPV	HPV1414F	5'-GTTAGGAATGGAAGATGTGT-3' (서열번호 3)	38	51.8	338
	HPV1750R	5'-CTCCAATAAAATGTGTAATGAGG-3' (서열번호 4)	33	55.6	
β -actin	β 251F	5'-GTCAYCAGGGTGTGATGGTC-3' (서열번호 5)	58	55.3	139
	β 251R	5'-ATCTTCTCCATGTCRTCCAG-3' (서열번호 6)	50	55.1	

[0054] 실시예 2. 최적화 및 민감도 시험

[0055] 멀티플렉스 PCR 반응 조건을 어닐링 온도 및 프라이머 비율의 측면에서 최적화했다. 먼저, 각 프라이머 세트에 대한 최적 어닐링 온도는 바이러스가 없는 흰다리새우 및 WSSV 또는 HPV에 감염된 흰다리새우로부터 추출된 전체 DNA를 이용해 결정했다. 50 내지 60°C의 어닐링 온도를 이용한 구배적 PCR(gradient PCR)은 표적 WSSV DNA가 52 내지 60°C의 어닐링 온도를 이용해 증폭되었다는 것을 보여줬다. HPV의 경우, 증폭은 57°C가 될 때까지 일정했고, 58°C 이상에서는 연속적으로 감소했다(데이터 미제시). 멀티플렉스 PCR에 대한 최적 어닐링 온도는 52 내지 57°C였다. 더 낮은 어닐링 온도에서는, 1개의 추가적인 PCR 생성물이 관찰되었다(데이터 미제시). 유전자 서열분석은 상기 생성물이 WSSV 프라이머의 HPV 유전체에 대한 비특이적 결합에 의해 생성되었음을 보여줬다. 어닐링 온도를 57°C로 조정하면, 비특이적 밴드가 사라졌다. 따라서, 어닐링 온도는 57°C로 설정했고, 57°C의 어닐링 온도를 갖도록 β -액틴 프라이머 세트를 고안했다.

[0056] 멀티플렉스 PCR에서 고려된 두번째 요인은 프라이머 비율이다. 두 바이러스의 바람직한 증폭은 상이한 HPV:WSSV: β -액틴 프라이머 세트 비율을 이용해 시험했고, 최적의 비율은 3:1:1(20 μ L 반응액 중 7.5pmole HPV 프라이머)로 정했으며, 3:1:1 비율을 이용한 멀티플렉스 PCR 및 단독 PCR로부터의 PCR 생성물의 상대적인 양은 도 2에 제시했다. 표 1에 제시된 바와 같이, 두 HPV 표적 DNA 및 프라이머의 G+C 함량은 낮았지만, 모든 비교 서열에서 보존성 프라이머 부위로 인해 상기 영역이 선별되었다. 상기 기재된 바와 같이, 57°C의 어닐링 온도는 더 낮은 온도에서의 비특이적 증폭으로 인해 멀티플렉스 PCR을 위해 선별되었다. 더 낮은 GC 함량을 가진 HPV

특이적 프라이머에 높은 어닐링 온도가 필요했는데, 이는 여타 두 프라이머 세트에 비해 상기 프라이머가 훨씬 더 많이 필요한 이유를 설명할 수 있다.

[0057] 멀티플렉스 PCR의 민감도는 HPV 및 WSSV 표적 유전자를 포함하는 정제된 제조합 플라스미드를 이용하여 결정했다. 플라스미드 DNA가 연속적으로 10배씩 희석되었고, 멀티플렉스 PCR용 DNA 주형으로 사용되었다. 아가로스 겔 전기영동은 검출 한계가 WSSV의 경우 21.4카피(0.079pg)이고, HPV의 경우 19.0카피(0.0678pg)임을 결정했다(데이터 미제시).

[0058] 실시예 3. WSSV 및 HPV 동시감염의 필드 시험

[0059] 17개의 배양 사육장에서 각 10개체씩 수집된 흰다리새우 시료 및 야생형 대하의 한 군 유래의 10개체를 WSSV 및 HPV 동시감염에 대해 시험했다(표 2). 모든 배양 사육장을 WSSV 또는 HPV로 감염시켰다. 3개의 사육장은 100% WSSV 감염율을 나타냈고, HPV 감염은 없었고; HPV만 감염된 사육장은 없었다. 1개의 사육장은 80% WSSV 감염율 및 바이러스가 없는 2개의 개체를 나타냈다. 1개 사육장의 시료는 WSSV 또는 HPV 감염을 나타냈고, 나머지는 바이러스가 없었다. 따라서, 17개 중 12개의 흰다리새우 사육장이 WSSV 및 HPV로 동시감염되었다. 1개 사육장에서는 모든 10개 개체들이 WSSV 및 HPV에 동시감염되었다. 배양 사육장에 바이러스가 없는 곳은 없었지만, 일부 사육장 유래의 개체들은 두 바이러스에 대해 음성이었다고, 총 170마리 중 25마리(14.7%)의 흰다리새우가 두 바이러스에 대해 음성이었다. 총 170마리의 흰다리새우 개체들 중, 71마리(41.8%)가 WSSV 및 HPV에 동시감염되었고, 68마리(40.0%)가 WSSV로만 단독으로 감염되었고, 6마리(3.5%)는 HPV로만 감염되었다. 따라서, 81.8%의 개체들이 WSSV로 감염되었고, 45.3%가 HPV로 감염되었고, 오직 14.7%만이 바이러스가 없었다. 대하의 경우, 6마리의 개체(60%)가 WSSV 및 HPV로 동시감염되었고, 4마리(40%)가 HPV만으로 감염되어, 100% HPV 감염율을 결과로서 제공했다.

[0060] 이전의 연구에서 3개 또는 6개 바이러스의 다중 검출의 한 부분으로 HPV 및 WSSV의 동시 검출에 대한 멀티플렉스 PCR이 시도되었다(Khawsak et al., 2008 Molecular and Cellular Probes 22, 177-183). 이때 멀티플렉스 PCR이 높은 민감도 및 특이성을 나타내긴 하지만, WSSV 및 HPV의 동시감염은 검출되지 않았다. 따라서, 본 발명에서의 WSSV 및 HPV의 멀티플렉스 PCR이 최초의 WSSV 및 HPV 동시 감염 검출이다.

[0061] 본 발명에서 고려된 여타 사실은 흰다리새우의 높은 HPV 감염율이다. WSSV 및 WSSV/HPV 동시감염의 비율은 40%였다. 본 발명에서 제시된 현장 조사 데이터 및 시료채취 동안의 실제적인 현장 조사는 WSSV 질환이 흰다리새우 배양에서 문제가 됨을 시사한다. 여타 고려사항은 흰다리새우를 유효하게 감염시킬 수 있는 WSSV의 더한 악성 균주의 출현 가능성이다.

[0062] 야생형 대하의 한정된 공급으로 인해, 오직 10마리의 개체만 WSSV 및 HPV에 대해 시험했다. 표 2에 나타난 바와 같이, 이들 중 6마리가 WSSV 및 HPV로 동시감염되었고, 나머지 네 마리는 100% HPV에만 감염되었다. 이전의 연구 결과에 따르면 한반도 주변의 야생형 대하에서 HPV의 증가를 보이고 있다(Jang et al., 2011 Journal of Microbiology and Biotechnology 21, 1109-1115).

[0063] WSSV 및 HPV를 이용한 야생형 대하의 동시감염은 상기 바이러스들이 한반도 주변의 자연 해수에 존재한다는 것을 나타냈으며, 건강한 유생 방생을 위해서는 상기 바이러스에 대한 인공부화물의 모니터링이 필수적이다. 본 발명에서 개발된 멀티플렉스 PCR 시스템은 인공부화물 스크리닝 및 방생 전 유생 시험에 이용될 수 있다.

표 2

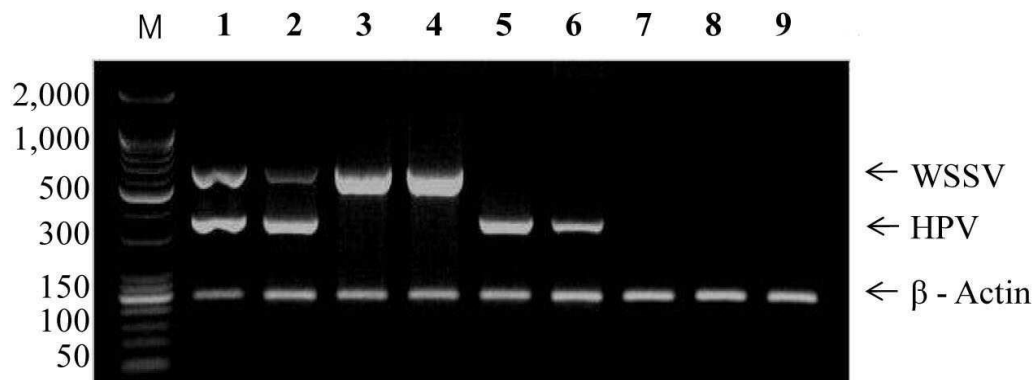
[0064] 2011년도 한국의 17개 사육장에서 WSSV 및 HPV의 유행 및 동시감염

Sample	Location	WSSV	HPV	WSSV/HPV	Negative
1	Cheonbuk-myeon, Boryeong-si	2	3	0	5
4	Cheonbuk-myeon, Boryeong-si	0	0	2	8
5	Cheonbuk-myeon, Boryeong-si	8	0	2	0
13	Taeon-eup, Taeon-gun	2	0	8	0
3	Taeon-eup, Taeon-gun	6	0	4	0
15	Anmyeon-eup, Taeon-gun	0	0	9	1
6	Jido-eup, Sinan-gun	10	0	0	0
7	Jido-eup, Sinan-gun	10	0	0	0
9	Jido-eup, Sinan-gun	1	0	9	0

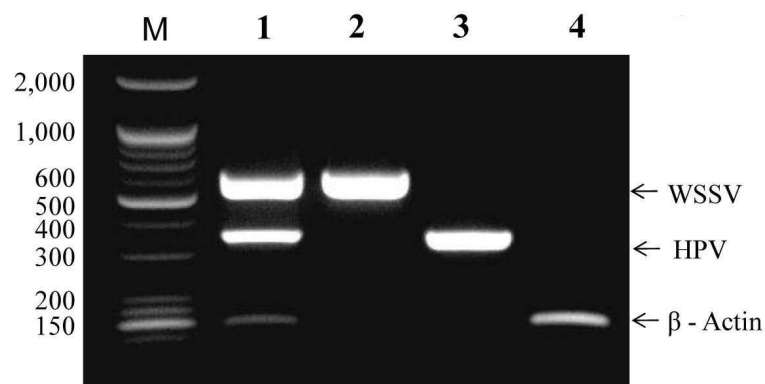
14	Palgeum-myeon, Sinan-gun	4	0	3	3
8	Palgeum-myeon, Sinan-gun	10	0	0	0
11	Anjwa-myeon, Sinan-gun	8	0	0	2
12	Anjwa-myeon, Sinan-gun	0	0	10	0
16	Anjwa-myeon, Sinan-gun	0	0	9	1
17	Anjwa-myeon, Sinan-gun	2	0	7	1
18	Anjwa-myeon, Sinan-gun	2	0	8	0
2	Anjwa-myeon, Sinan-gun	3	3	0	4
<i>L. vannamei</i> total (%)		68 (40%)	6 (3.5%)	71 (41.8%)	25 (14.7%)
<i>F. chinensis</i>	Wild catch	0	4	6	0

도면

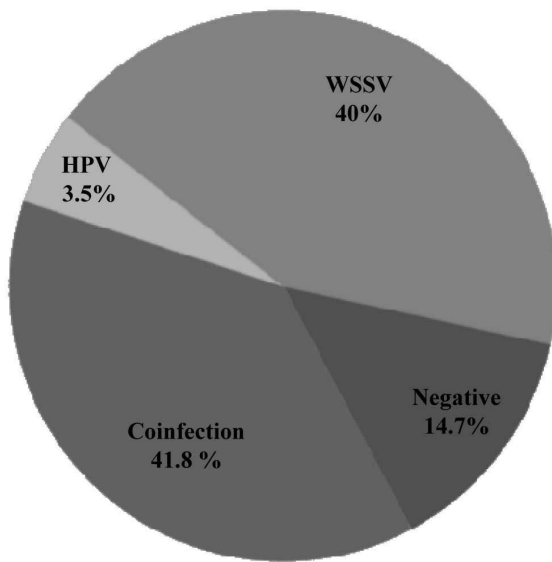
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
BIONEER CORPORATION

<120> Multiplex primer set for simultaneous diagnosing WSSV and HPV and
uses thereof

<130> PN12080

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

ctttcactct ttcggtcgtg tc

22

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

tactcgggtct cagtgccaga	20
<210> 3	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 3	
gttaggaatg gaaagatgtg t	21
<210> 4	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 4	
ctccaataaa atgtgtaaag gagg	24
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 5	
gtcaycaggg tgtgatggtc	20
<210> 6	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 6	
atcttctcca tgtrctccca g	21