(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0009999
(43) 공개일자 2009년01월28일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0073140
(22) 출원일자 2007년07월20일
심사청구일자 2007년07월20일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울 마포구 신수동 1-1 서강대학교
(72) 발명자
김건수
서울시 마포구 신수동 1번지 서강대학교 생명과학과
김익중
경기 안양시 동안구 비산1동 552-15
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

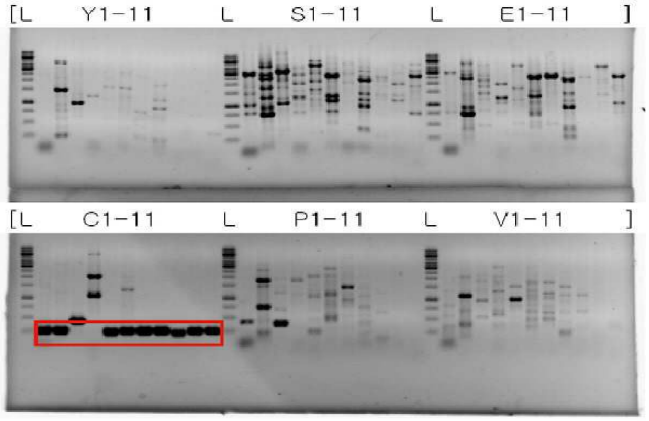
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 콜레라-유발 비브리오 콜레라에 검출용 유전자 증폭키트및 마이크로어레이

(57) 요 약

본 발명은 콜레라-유발 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*)를 검출하기 위하여 비브리오 콜레라에의 특정 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 검출용 유전자 증폭키트 또는 마이크로어레이에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 정확하면서도 간편하게 콜레라-유발 비브리오 콜레라에를 검출할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이규호

경기 용인시 처인구 모현면 왕산리 한국외국어대학교환경학과

박순정

서울 서대문구 신촌동 134번지 연세대학교 의과대학

조재창

경기 용인시 처인구 모현면 왕산리 한국외국어대학교환경학과

양재명

서울 마포구 신수동 1번지 서강대학교 생명과학과

조유희

서울 마포구 신수동 1번지 서강대학교 생명과학과

고광표

서울 종로구 연건동 28번지 서울대학교 보건대학원 408호

성문희

서울 성북구 정릉동 861-1 국민대학교 생명나노화학과

특허청구의 범위

청구항 1

서열목록 제1서열 및 서열목록 제2서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제3서열 및 서열목록 제4서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제9서열 및 서열목록 제10서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제11서열 및 서열목록 제12서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제13서열 및 서열목록 제14서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제15서열 및 서열목록 제16서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제17서열 및 서열목록 제18서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제19서열 및 서열목록 제20서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제21서열 및 서열목록 제22서열로 이루어진 프라이머쌍, 또는 상기 프라이머쌍의 조합을 포함하는 콜레라-유발 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*)의 검출용 유전자 증폭 키트.

청구항 2

서열목록 제1서열 내지 제22서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프로브를 포함하는 콜레라-유발 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*)의 검출용 마이크로어레이.

청구항 3

서열목록 제1서열 및 서열목록 제2서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제3서열 및 서열목록 제4서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제9서열 및 서열목록 제10서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제11서열 및 서열목록 제12서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제13서열 및 서열목록 제14서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제15서열 및 서열목록 제16서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제17서열 및 서열목록 제18서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제19서열 및 서열목록 제20서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제21서열 및 서열목록 제22서열로 이루어진 프라이머쌍 또는 상기 프라이머쌍의 조합을 이용하고, 콜레라-유발 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*)의 유전자 서열을 주형으로 얻은 증폭 산물을 포함하는 콜레라-유발 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*)의 검출용 마이크로어레이.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 콜레라-유발 비브리오 콜레라에 검출용 유전자 증폭키트에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 비브리오 콜레라에 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머를 이용하여, 비브리오 콜레라에의 특정 유전자 서열을 분석함으로써 콜레라를 유발하는 비브리오 콜레라에를 정확하게 검출할 수 있는 유전자 증폭키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*)는 콜레라의 원인균으로 현재도 전 세계적으로 질병을 일으키고 있는 세균이다. 비브리오 콜레라에는 주로 염분기가 있는 해수에서 발견되며, 특히 만이나 강어귀 등에서 많이 발견되고 있다. 주로 어패류 등의 식품매개로 전파되나 드물게 환자 또는 병원체 보유자의 대변이나 구토물과 직접 접촉에 의한 감염도 가능한 것으로 알려져 있다.

<3> 콜레라는 인간에게 치명적인 질병으로 적절히 치료하지 않으면 40-50%의 높은 치사율을 보인다. 비브리오 콜레라에는 아주 오래 전부터 인간에게 병을 일으킨 것으로 알려져 있는데, 1817년 전까지는 콜레라는 인도지역에만 머물러 있는 풍토성 질병이었으나 1817년 이후에는 전 세계적으로 확산되었다. 1991년 비브리오 콜레라에 O1형의 유행으로 남아메리카 10개국에서 39만명 이상의 환자가 발생하였으며, 1997년에 전 세계적으로 14만 7천명 이상의 환자가 보고 된 바 있다. 특히 1992년 인도에서 O139형이 처음 발견되었으며 세계보건기구 (World Health Orgnization)의 콜레라 발생 현황 보고에 의하면, 2001년에는 전 세계적으로 엘토르(El Tor)형 콜레라가 발생하였다.

<4> 비브리오 콜레라에는 그람음성(gram negative) 간균으로, 분류학적으로는 프로테오박테리아 중 감마 그룹(gamma group)의 Vibrionaceae 과에 속한다. 비브리오 콜레라에는 혈청형으로 종 이하수준의 분류를 하고 있는데 이 중 유행을 일으키는 혈청형은 O1이며, 혈청형 O1은 또한 두개의 생물형, 즉 인도지방 등에서 유래한 진성콜레

라균(classical)과 이의 생물학적 변형인 엘 토르(El Tor)로 나눌 수 있다. 01 El Tor는 현재 진행 중인 7번째 유행(pandemic)의 주역이다.

<5> 한편, 생화학적 방법을 이용한 종래의 검사방법은 숙련된 기술과 많은 노력 및 시간을 요한다. 이러한 단점을 극복하고자, 정확하고 신속하고 간편한 비브리오 콜레라에의 검출을 목적으로 한 유전자에 의한 검사방법이 시도되고 있다.

<6> 또한, 콜레라 증상의 원인인 콜레라 독소를 암호화하는 유전자를 검출하는 프라이머가 이미 존재한다(참조: *J. Biol. Chem.*, 258:13722-13726(1983)). 그러나 상기 프라이머로는 콜레라 독소 유전자를 가지지 않고 다른 독소를 만드는 비브리오 콜레라에를 검출하는 것은 불가능하다.

<7> 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<8> 본 발명자들은 콜레라를 유발하는 비브리오 콜레라에를 검출할 수 있는 유전적 분석(genetic analysis) 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 비브리오 콜레라에 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 이용하여, 비브리오 콜레라에의 특정 유전자 서열을 분석함으로써 콜레라를 유발하는 비브리오 콜레라에를 정확하게 검출할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

<9> 따라서, 본 발명의 목적은 콜레라-유발 비브리오 콜레라에 검출용 유전자 증폭키트를 제공하는 데 있다.

<10> 본 발명의 다른 목적은 콜레라-유발 비브리오 콜레라에의 검출용 마이크로어레이를 제공하는 데 있다.

<11> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결수단

<12> 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열 및 서열목록 제2서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제3서열 및 서열목록 제4서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제9서열 및 서열목록 제10서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제11서열 및 서열목록 제12서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제13서열 및 서열목록 제14서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제15서열 및 서열목록 제16서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제17서열 및 서열목록 제18서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제19서열 및 서열목록 제20서열로 이루어진 프라이머쌍, 서열목록 제21서열 및 서열목록 제22서열로 이루어진 프라이머쌍, 또는 상기 프라이머쌍의 조합을 포함하는 콜레라-유발 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*)의 검출용 유전자 증폭 키트를 제공한다.

<13> 본 발명자들은 콜레라를 유발하는 비브리오 콜레라에를 검출할 수 있는 유전적 분석(genetic analysis) 방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 비브리오 콜레라에 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 이용하여, 비브리오 콜레라에의 특정 유전자 서열을 분석함으로써 콜레라를 유발하는 비브리오 콜레라에를 정확하게 검출할 수 있음을 확인하였다.

<14> 비브리오 콜레라에를 검출하기 위하여 프라이머를 이용하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 비브리오 콜레라에의 특정 유전자의 유무를 조사한다. 이 경우, 비브리오 콜레라에의 gDNA(genomic DNA) 또는 mRNA를 주형으로 하고, 본 발명의 프라이머쌍을 이용하여 특정 유전자를 특이적으로 증폭한다.

<15> 비브리오 콜레라에 세포로부터 gDNA의 분리는, 예컨대, 페놀-클로로포름 추출 방법으로 얻을 수 있다(Neumann B, et al., Rapid isolation of genomic DNA from Gram-negative bacteria., *Trends Genet*. 8:332-333(1992))

<16> PCR에서 프라이머를 이용하여 gDNA를 증폭하는 경우 칩 제작에 쓰였던 동일한 프라이머 믹스(타깃이 되는 균을 대상으로 한 모든 프라이머를 동일한 비율로 섞은 것)를 넣어 멀티플렉스 PCR을 한다. 다만, PCR 산물의 기질이 되는 dNTP 중에서 dTTP는 aa-dUTP(aminoallyl dUTP)와 3:2비율로 첨가하여 aa-dUTP를 통한 Cy 염료 간접 표지를 한다.

<17> 본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중쇄 구조를 형성한다. 이러한 이중쇄 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A*

Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., 등, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.

<18> 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭에 이용될 수 있으며, *E. coli* DNA 중합효소 I의 "클레나우" 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis*, 및 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)를 포함한다.

<19> 중합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg^{2+}와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 소망하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 소망된다.

<20> 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.

<21> 본 발명에 있어서 어닐링 또는 혼성화는 타깃 뉴클레오타이드 서열과 프라이머 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다.

<22> 본 명세서에 기술된 용어 "증폭 반응"은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고 되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(이하 PCR이라 한다)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(이하 RT-PCR로 표기한다)(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)(17, 18), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA)(19) (WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication)(20)(WO 90/06995), 타깃 폴리뉴클레오티드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CP-PCR)(미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-PCR)(미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification; NASBA)(미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호, 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification)(21, 22) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)(23)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭 방법들은 미국특허 제5,242,794, 5,494,810, 4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다.

<23> 본 발명의 가장 바람직한 구현예에서, 증폭 과정은 미국특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호에 개시된 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다.

<24> PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR, TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)및 멀티플렉스 PCR이 특정한 응용을 위해 개발되었다. PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. *PCR*. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있으며, 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다.

<25> 본 발명에서 증폭 반응에 이용되는 프라이머는 비브리오 불니피쿠스의 gDNA 또는 cDNA 서열에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드이다. 본 명세서에서 용어 "프라이머"는 적합한 온도에서 적합한 완충액 내에서

적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 인자, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변이가 있지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 하이브리드 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다.

<26> 본 발명의 프라이머쌍은 다음과 같은 전략 하에 비브리오 콜레라에의 유전자를 특이적으로 증폭하도록 제작된 것이다: (i) 비브리오 콜레라에에만 존재하는 유전자 또는 뉴클레오타이드 서열을 선정; (ii) 프라이머의 길이는 전부 20 bp로 통일; (iii) 증폭산물의 크기는 약 200-250 bp; (iv) 프라이머 쌍 안에서의 Tm 값 차이가 최대 3℃가 넘지 않도록 제한(평균 0.99℃); (v) 다른 종류의 생명체에서 유래한 서열과의 유사한 부분이 만약 불가피하게 있게 될 경우, 되도록 프라이머의 끝부분에 위치하게 하여 특이성을 증가시킴; 그리고 (vi) 프라이머에 의해 형성되는 셀프-다이머(self-dimer)와 헤테로-다이머(hetero-dimer)에 대한 부분도 고려를 하여, 모든 다이머의 경우에 있어서 Gibbs 결합에너지가 대부분 -10 $kcalmol^{-1}$ 이상이 되도록 하였고, 프라이머와 주형인 gDNA와의 결합에너지는 대부분 -35 $kcalmol^{-1}$ 이하가 되도록 함.

<27> 상술한 전략 하에 본 발명의 프라이머쌍이 디자인 및 합성된다.

<28> 구체적으로, 본 발명의 프라이머쌍이 타깃으로 하는 비브리오 콜레라에의 유전자는 하기 표 1에 정리되어 있다.

표 1

<29>

병원체	SEQ ID NO	명칭	프라이머 서열 (5' → 3')	이용서열
비브리오 콜레라에	1	VC-Ace-F1	GGC AAA ACG GGT CAT CAA AG	Ace gene
	2	VC-Ace-R1	GAC TGG CTA ATT GAT GGC TT	
	3	VC-AphA-F1	GTG TTA GAC AAG CAG CAA CG	AphA gene
	4	VC-AphA-R1	CGG TGA TGG TAT CTA GAG GC	
	5	VC-AcfDA-F1	GGA TCC GAA CAC CAA TAT CT	AcfDA gene
	6	VC-AcfDA-R1	CAA TAT ACG GTG CTG CAT TT	
	7	VC-Cep-F1	CTT GGG CTT CAC CAC AAA CA	Cep gene
	8	VC-Cep-R1	GCC TTA CGA ATT AAG CCA AT	
	9	VC-EpsE-F1	GTG ATC TCT CCA GCT GAG CG	EpsE gene
	10	VC-EpsE-R1	CAC GCT GAT AGA CTT GGG TT	
	11	VC-EpsL-F1	GTG TGG GCA GCG TTT TGA AG	EpsL gene
	12	VC-EpsL-R1	CTT GGG CTT CAC CAC AAA CA	
	13	VC-RtxA-F1	GTA AAG AGG CAA TGC TAT GG	RtxA gene
	14	VC-RtxA-R1	GCG ACG AGC TTG TAC CAA AT	
	15	VC-TcpH-F1	CGC TTT GAC AGG AAA ACC AC	TcpH gene
	16	VC-TcpH-R1	CCA ATG TTT GGC TTA CCC AG	
	17	VC-TcpP-F1	CAT GAG GCC AAA GTG CTT TA	TcpP gene
	18	VC-TcpP-R1	GGT ATG TCC GCG TGA TTT AT	
	19	VC-ToxRS-F1	GCT TGA GCA AGT GTT AAC CT	ToxRS gene
	20	VC-ToxRS-R1	CGC TGA TAT CCC ATT CAC CA	
	21	VC-Zot-F1	GGA TTG TCG TGT AAG CCG TA	Zot gene
	22	VC-Zot-R1	GGG CAA AGT TTA CCC TGA CC	

<30> 본 발명의 프라이머쌍을 이용하여 증폭된 비브리오 콜레라에의 유전자는 적합한 방법으로 분석된다. 예를 들어, 상술한 증폭 반응 결과물을 젤 전기영동을 하고, 그 결과 형성되는 밴드를 관찰 및 분석함으로써 비브리오 콜레라에 유전자의 존재 유무, 즉 비브리오 콜레라에의 유무를 분석한다.

<31> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 서열목록에 기재된 서열로 이루어진 프로브를 포함하는 인간의 패혈증-유발 비브리오 불니피쿠스(*Vibrio vulnificus*)의 검출용 마이크로어레이를 제공한다.

<32> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 서열목록에 기재된 서열로 이루어진 프로브를 포함하는 콜

레라-유발 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*)의 검출용 마이크로어레이를 제공한다.

<33> 비브리오 콜레라에 gDNA 또는 cDNA에 혼성화 되는 프로브를 이용하여 혼성화-기초 분석을 하여 비브리오 콜레라에를 검출할 수 있다. 본 명세서에서 용어 "프로브"는 단일쇄 핵산 분자이며, 타깃 핵산 서열에 상보적인 서열을 포함한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 프로브의 이점, 즉 혼성화 특이성의 개선이 손상되지 않는 범위 내에서, 본 발명의 프로브를 변형할 수 있다. 이들 변형, 즉 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신 (fluorescein), 피코에리트린 (phycoerythrin), 로다민, 리사민 (lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5 (Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P^{32} 및 S^{35}), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 햅텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션 (nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법 (Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법 (Maxam & Gilbert, *Methods in Enzymology*, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.

<34> 본 발명의 일 구현예에 따르면, 비브리오 콜레라에의 gDNA 또는 cDNA에 혼성화 되는 본 발명의 프로브는 불용성 담체(예컨대, 니트로셀룰로오스 또는 나일론 필터, 유리판, 실리콘 및 플루오로카본 지지체)에 고정화되어, 마이크로어레이를 제조할 수 있다. 마이크로어레이에 있어서 본 발명의 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용된다. 불용성 담체에로의 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 담체에 결합될 수 있다.

<35> 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 비브리오 콜레라에의 gDNA 또는 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타깃 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M $NaHPO_4$, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에서 65℃ 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다.

<36> 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 이 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다. 이용될 수 있는 효소/기질의 조합은, 퍼옥시다아제(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), *o*-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate) 등이다. 프로브가 금 입자로 표지된 경우에는 실버 니트레이트를 이용하여 실버 염색 방법으로 검출할 수 있다.

<37> 상술한 혼성화 과정에 의한 혼성화 시그널의 세기를 분석함으로써, 비브리오 콜레라에를 검출할 수 있다. 즉, 비브리오 콜레라에 gDNA 또는 cDNA에 대한 시그널이 정상 시료 보다 강하게 나오는 경우에는 비브리오 콜레라에

에 감염된 것으로 비브리오 콜레라에를 검출 할 수 있다.

<38> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 서열목록에 기재된 서열로 이루어진 프라이머쌍을 이용하고, 콜레라-유발 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*)의 유전자 서열을 주형으로 얻은 증폭 산물을 포함하는 콜레라-유발 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae*)의 검출용 마이크로어레이를 제공한다.

<39> 본 발명의 콜레라-유발 비브리오 콜레라에 검출용 키트가 만일 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소 (예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다.

<40> 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

<41> 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

<42> (ⅰ) 본 발명은 콜레라-유발 비브리오 콜레라에를 검출하기 위하여 비브리오 콜레라에의 특정 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 검출용 유전자 증폭키트 또는 마이크로어레이에 관한 것이다.

<43> (ⅱ) 본 발명에 따르면, 정확하면서도 간편하게 콜레라-유발 비브리오 콜레라에를 검출할 수 있다.

효 과

<44> 이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명은 본 발명은 콜레라-유발 비브리오 콜레라에를 검출하기 위하여 비브리오 콜레라에의 특정 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 검출용 유전자 증폭키트 또는 마이크로어레이에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 정확하면서도 간편하게 인간의 콜레라-유발 비브리오 콜레라에를 검출할 수 있다.

<45> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

<46> **참고문헌**

<47> 1. Michael D. Kane et al. Assessment of the sensitivity and specificity ofoligonucleotide (50mer) microarrays 2000 28 Nucleic Acids Research 4552-4557

<48> 2. Jaroslaw Letowski et al. Designing better Probes: effect of probe size, mismatch position and number on hybridization in DNA oligonucleotide microarrays 57 (2004) Journal of Microbiological Methods 269-278

<49> 3. Jost Liebich et al. Improvement of Oligonucleotide Probe Design Criteria for Functional Gene Microarrays in Environmental Applications Feb. 2006 APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, , p. 1688-1691

<50> 4. Steven R. Bateset al. Cooperativity of paired oligonucleotide probes for microarray hybridization assays 342 (2005) Analytical Chemistry 59-68

<51> 5. Neumann B, Pospiech A, Schairrer HU Rapid isolationof genomic DNA from Gram-negative bacteria. (1992) Trends Genet. 8: 332-333

<52> 6. Wright AC, Simpson LM, Oliver JD, Morris JG Phenotypic evaluation of acapsular transposon mutants of Vibrio vulnificus. (1990) Infect Immun. Jun;58(6):1769-73

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<53> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<54> **실시예**

<55> **실시예 1: 병독성 인자(Virulence factor)의 선정**

<56> 콜레라 발병 메커니즘에 핵심적인 역할을 수행하는 것으로 연구가 되어진 비브리오 콜레라에(*Vibrio cholerae* 01 El tor) 유전자를 11개 선정하였다. 선정기준은 다른 종류의 균에는 존재하지 않는 유전자를 우선으로 하였으며, 그 다음으로는 존재하더라도 특이성을 가지는 부분만을 골라서 프로브 또는 프라이머 지역으로 선정하였다. 아울러 프로브(또는 프라이머)의 길이보다 유전자의 길이 전체가 더 짧은 경우는 제외하였다.

<57> **실시예 2: 프라이머 설계**

<58> 프라이머의 길이는 전부 20 mer로 통일하였고, 산물의 길이는 약 220-250 bp 정도가 되도록 하였다. 이 정도 길이의 프라미어는 50-75% 이하의 유사성을 보이는 타깃이라면 비-특이적 결합을 보이지 않으며(1), 보편적으로 쓰이는 1 kb 래더(ladder)와의 크기 비교를 통해 PCR 결과를 확인 할 수가 있다. 220-250 bp크기의 PCR 프로브는 프로브 내의 염기서열 정보가 20-50 mer크기의 올리고뉴클레오타이드 프로브에 비해 많으면서 500-1 kb크기의 cDNA 프로브나 ORF 프로브처럼 염기서열 정보가 너무 많지도 않으므로, 혼성화(hybridization)와 세척 과정을 엄격하게만 해준다면 환경적 시료(environmental sample) 내의 DNA(특히 아직 Genbank에도 등록되어 있지 않은 미지 서열의 DNA)와의 결합에서도 특이성이라는 측면에서 올리고뉴클레오타이드에 비해 더 특이적인 결합이 기대되므로 상용화에 더욱 적합하다.

<59> 반면 500-1 kb 이상의 크기를 가지는 프로브의 경우 프로브의 크기가 늘어날수록 병원성유전자에서 균의 특이적인 부분을 얻기가 힘들고 크기가 작은 유전자의 경우 특이적 부분을 찾는 것이 불가능한 경우가 생긴다. 또한 염기서열 정보가 너무 많으므로, 시료 내의 크기가 작은 DNA에 대해 가질 수 있는 원치 않는 과다한 특이적 결합의 가능성도 있는데 200-250 bp 정도 크기의 프로브라면 이런 가능성을 크게 줄일 수 있는 크기라 생각된다. 아울러 기존에 쓰였던 20-30 mer 크기의 올리고뉴클레오티드 프로브에 비해, 프로브 크기를 증가시키면 시그널 강도(intensity)를 높일 수가 있으며(4), 타깃이 어느 정도의 농도를 가진다면 민감도(sensitivity)에 관련해서도 비슷한 정도의 수준을 보여준다(1).

<60> OligoAnalyzer 3.0(Integrated DNA Technology, Coralville,. IA, 미합중국)을 통해 프라이머에 대한 분석을 수행하였으며, 프라이머 쌍 안에서의 Tm 값 차이가 최대 3℃가 넘지 않도록 했다(평균 0.99℃)(프라이머 디자인에서 가장 우선하는 조건으로 두었음). Tm 값의 평균은 약 54.63℃이며 표준 편차 값은 2.211이다. 이 정도의 값이라면 멀티플렉스 PCR을 하더라도 무방한 수준이라 예상된다. NCBI 웹 검색을 통해 다른 종류의 생명체에서 유래한 서열과의 유사한 부분이 만약 불가피하게 있게 될 경우, 되도록 프라이머의 끝부분에 위치하게 하여 특이성을 증가시켰다(2). 또한 다른 생명체 유래 서열과 각 PCR 앰플리콘(amplicon)의 중복된 부분이 최대 11% 이하가 되도록 하였으며, 있다 하더라도 연속한 부분이 20 bp 이상 연속하지 않도록 하였다(1). 아울러 셀프-다이머(self-dimer)와 헤테로-다이머(hetero-dimer)에 대한 부분도 고려를 하여, 모든 다이머의 경우에 있어서 Gibbs 결합에너지가 대부분 -10 $kcalmol^{-1}$ 이상이 되도록 하였고, 프라이머와 주형인 gDNA와의 결합에너지는 대부분 -35 $kcalmol^{-1}$ 이하가 되도록 하였다. 이 정도 에너지 값이면 교차-혼성화가 방지 된다고 보는 수준이다(3). 비브리오 콜레라에에서 선정된 병원성 유전자와 해당하는 프라이머 서열은 표 2에 나타내었다.

표 2a

<61>

종(species)	No.	타깃 유전자	전방향 프라이머	Tm ℃	역방향 프라이머	Tm ℃

V. cholerae	1	*Ace*	GGC AAA ACG GGT CAT CAA AG	54.8	GAC TGG CTA ATT GAT GGC TT	52.8
	2	*AphA*	GTG TTA GAC AAG CAG CAA CG	54.4	CGG TGA TGG TAT CTA GAG GC	54.4
	3	*AcfDA*	GGA TCC GAA CAC CAA TAT CT	51.8	CAA TAT ACG GTG CTG CAT TT	51.1
	4	*Cep*	CTT GGG CTT CAC CAC AAA CA	49.3	GCC TTA CGA ATT AAG CCA AT	50.8
	5	*EpsE*	GTG ATC TCT CCA GCT GAG CG	57.5	CAC GCT GAT AGA CTT GGG TT	54.7
	6	*EpsL*	GTG TGG GCA GCG TTT TGA AG	57.5	CTT GGG CTT CAC CAC AAA CA	56
	7	*RtxA*	GTA AAG AGG CAA TGC TAT GG	55.1	GCG ACG AGC TTG TAC CAA AT	55.7
	8	*TcpH*	CGC TTT GAC AGG AAA ACC AC	54.7	CCA ATG TTT GGC TTA CCC AG	54.1
	9	*TcpP*	CAT GAG GCC AAA GTG CTT TA	53.3	GGT ATG TCC GCG TGA TTT AT	52.5
	10	*ToxRS*	GCT TGA GCA AGT GTT AAC CT	53.1	CGC TGA TAT CCC ATT CAC CA	54.7
	11	*Zot*	GGA TTG TCG TGT AAG CCG TA	54.6	GGG CAA AGT TTA CCC TGA CC	56.1

표 2b

<62>

종(species)	No.	타깃 유전자	GenBank 접근 번호	증폭산물	산물 길이 bp
V. cholerae	1	*Ace*	AAD51357.1, AAL09689.1, AF175708	Accessory cholera enterotoxin	248
	2	*AphA*	AF065442.1, AE003852.1, AAD31382.1	Quorum sensing-regulated activator	248
	3	*AcfDA*	S41756, AAB22796.1, AAB22797.1	Accessory colonization factor	241
	4	*Cep*	AF416590.1, AAL09687.1, AAF29544.1	Core-encoded pilin	242
	5	*EpsE*	CP000627.1, AE003852.1	General secretion pathway protein E	235
	6	*EpsL*	AE004338.1, L33796.1	General secretion pathway protein L	249
	7	*RtxA*	AE004223.1, AF119150.1	Rtx toxin	249
	8	*TcpH*	AF325733.1, X64098.1, AE004168.1	Toxin co-regulated pilus biosynthesis protein H	240
	9	*TcpP*	X64098.1, AF325733.1, AF319655.1	Toxin co-regulated pilus biosynthesis protein P	203
	10	*ToxRS*	M62761.1, AE003179.1	Transmembrane regulatory protein	233
	11	*Zot*	DQ774433.1, AE004224.1, AF238367.1	Zona occludens toxin	244

<63> **실시예 3: gDNA의 분리**

<64> 기본적인 방법은 페놀-클로로포름 추출법을 따른다(5). 비브리오 콜레라에 01 El tor 균주(실험실 콜렉션)를 LB 배지에서 30℃ 하룻밤 배양 하였다. TE 완충액 900 ㎕에 세포 펠릿을 풀어주었고, 5%의 sarkosyl 300 ㎕를 inversion으로 섞어주었다. 그 다음 5 mg/ml의 단백질 분해효소 K(Proteinase K, Genenmed, 대한민국)를 50 ㎕ 첨가하였고, 역시 inversion으로 섞은 후 37℃에서 약 15분 동안 배양하였다. 피펫팅으로 세포를 풀어주고

3% NaCl 포화된 페놀로 동량의 부피를 넣어 3회 추출하였다. 그리고 동량의 클로로포름 : 이소아밀 알코올(24 : 1)과 에틸 에테를로 1회씩 추출 한 다음 두 배 부피의 에탄올을 넣어 침전시키고, 20 ㎍/㎕의 +RNA 분해효소 A(+Ribonuclease A, Sigma-Aldrich)를 100 ㎕에 녹였다.

<65> **실시예 4: PCR, 프로브 제조 및 DNA 칩 제작**

<66> 모든 프라이머(Cosmo genetech, 대한민국)는 OPC 정제를 하였으며 특별한 변형은 거치지 않았다. 전체 부피를 100 ㎕로 하여 50-100 ng의 gDNA를 주형으로 넣어주었고 20 μM 농도의 프라이머를 각각 3 ㎕씩, 2.5 mM의 dNTP 믹스를 8 ㎕(Genenmed, 대한민국), Han-Taq 폴리머라제 XL(Genenmed, 대한민국)을 2.5 유닛 씩 넣어 주었다. 그 다음 94℃에서 30초, 54℃에서 1분 및 72℃에서 1분으로 구성된 사이클을 25회 반복하였다. 100 ㎕의 반응액에서 5 ㎕ 만을 0.8%/TBE 아가로스 겔 전기영동과 EtBr 염색을 통해 산물을 확인하였다(도 1). 대상 프라이머와 gDNA가 맞는 경우에만 원하는 약 200-250 bp 크기의 밴드가 확인되었다.

<67> 도 1에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 프라이머쌍은 3번(*acfDA* 유전자)과 4번(*cep* 유전자)를 제외하고 비브리오 콜레라에의 특정 유전자를 높은 특이성으로 증폭할 수 있도록 하였다(도 1의 좌측 하단).

<68> 증폭 산물 확인 후, 95 ㎕의 반응액을 LaboPass PCR 키트(Cosmo genetech, 대한민국)의 프로토콜에 따라 정제를 하였고, 비-특이적 밴드가 나왔을 경우 0.8% TBE 아가로스 겔에 모두 걸어 LaboPass 겔 키트(Cosmo genetech, 대한민국)로 원하는 밴드만을 골라내었다. 정량을 하여 최종 농도를 맞춰 주기 위해 건조기(SpeedVac, ModuleSpin 40, Biotron)로 말린 후, 50% DMSO(Sigma-Aldrich)에 녹여 스팟팅 용액을 준비하였다.

<69> 사용한 어레이어(arrayer)는 Affimetrix사의 427 Arrayer이며 슬라이드는 Corning사의 GAPSII 코팅 슬라이드이다.

<70> 프로브의 서열에 관계없이 무작위적으로 혼성화 될 수 있는 가능성을 보기 위해 20 mer 길이의 폴리A(5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3')를 40, 20 및 10 ng/㎕의 농도로 스팟팅 하였다. 또한 스팟팅 용액 자체의 효과 때문에 결합 가능성을 보기 위해 음성 대조군으로 프로브가 포함되어 있지 않은 스팟팅 용액(50% DMSO)을 준비하였다. 각 균의 gDNA에서 얻은 PCR 산물을 클러스터로 묶어 임의로 부여한 순서대로(표 2b) 스팟팅하였으며, PCR에 실패한 것은 빈칸으로 남기고 스팟팅하지 않았다. 클러스터마다 첫 스팟에는 각 병원균에 대한 양성 대조군을 잡아주었는데 이는 각 균마다 스팟팅된 모든 프로브를 동일한 비율로 섞어 스팟팅 한 것이다(즉 이는 각 균의 병원성 유전자 중에서 단 하나의 시그널이 있어도 시그널이 생기는 양성 대조군 스팟 이다). 그리고 시행착오를 줄이기 위해 각 스팟당 5개씩의 레플리케이트를 스팟팅하였다.

<71> 전체 실험과정에 문제가 없는지를 확인하기 위해 양성 대조군을 준비하였으며, 이를 위한 프로브는 6종류의 균에서 유래한 16S rRNA 코딩 영역의 공통부분을 선택하였다. 생존에 있어 필요한 유전자이므로 세균에 따라 동일한 유전자가 4-5영역에서 공통으로 존재한다. 프로브를 제작하기 위한 프라이머 서열은 다음과 같다:

표 3

<72>

종	유전자	전방향 프라이머	Tm	역방향 프라이머	Tm	산물 길이
양성 대조군	16S rRNA 영역	GTC TGC AAC TCG ACT CCA TG	55.7	ACC TTG TTA CGA CTT CAC CC	54.6	195

<73> 도 3에서 확인할 수 있듯이 래더(ladder), 살모넬라 타이피(*Salmonella typhi*), 시겔라 플렉시네리(*Shigella flexneri*), 에셔리키아 콜리(*Escherichia coli*) H7:0157, 비브리오 콜레라에(*Vibrio choleae*), 비브리오 파라헤모리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*) 및 비브리오 불니피쿠스(*Vibrio vulnificus*)의 순으로 모든 균에서 PCR 과정에서 양성 대조군이 잘 만들어짐을 알 수 있었다.

<74>

<75> 혼성화를 위한 슬라이드 처리

<76> 스팟팅이 끝난 슬라이드는 3일 이상 상온에서 건조시켰다. 혼성화 직전에 끓는 증류수에서 2분 동안 세척하여 샘플이 스팟 이외의 지역에 결합하지 못하도록 하였으며, 95% EtOH에 약 15 초 정치 후 SpeedVac(ModuleSpin 40, Biotron)으로 원심 탈수(Spin-dry)하였고 Prehybridization 완충액(5X SSC, 0.1% SDS, 1% BSA)에서 약 45 분 동안 42℃에서 블럭킹(Blocking)을 해 주었다. 그 다음 증류수에서 2분씩 5회 세척하였으며 이소프로판올

에서 약 2분 동안 세척하고 원심 탈수(spin-dry)하였다.

<77>

<78> PCR을 이용한 샘플의 제작

<79> 각 균에 해당하는 프라이머에 대한 검증이 끝난 만큼, 동일한 프라이머를 이용하여 샘플에 있는 gDNA를 표지하여 대상 병원균의 동정을 할 수 있다.

<80> PCR 반응액 100 ㎕안에 10 U의 Taq 폴리머라제, 완충액(Cosmogenetech, 대한민국), 및 500 μM의 dATP, dCTP 및 dGTP를 넣어 주었고, dTTP와 aa-dUTP를 3:2의 비율로 각각 300 μM 및 200 μM씩 첨가하였다. 그리고 프라이머 세트들의 균별 특이성을 검증하기 위하여 각 세균의 gDNA를 모두 섞은 gDNA 믹스를 만들었고, 각 세균의 gDNA를 500 ng씩 넣어주었다. 그리고 각 세트의 프라이머를 50 μM씩 넣어주었다(살모넬라 프라이머 쌍 No.:2,3,4,5,7,8 및 9, 시겔라 프라이머 쌍 No.:1,2,3,5,6,7,8,9,10 및 11, *E.coli*O157 프라이머 쌍 No.:1,2,3,4,5,6,7,9,10 및 11, V.콜레라에 프라이머 쌍 No.:1,2,5,6,7,8,9,10 및 11, V.파라헤모리티쿠스 프라이머 쌍 No.:2 및 4, V.불니피쿠스 프라이머 쌍 No.:1,2,3,4,5,6,7,8,9,10 및 11). 그리고 양성 대조군을 위한 프라이머 쌍 50 μM 넣어주었다.

<81> 도 4에서 확인 할 수 있듯이(가운데 1 kb ladder의 왼쪽이 실험결과임), 가장 왼쪽부터 gDNA 믹스에 대한 살모넬라, 시겔라, *E.coli*O157, V.콜레라에, V.파라헤모리티쿠스, V.불니피쿠스 프라이머 세트의 PCR 결과 전반적으로 200-250 bp 크기에 다량의 PCR 산물이 만들어 졌음을 알 수 있다.

<82>

<83> 샘플의 정제(purification)와 Cy 염료 표지(labeling)

<84> 젤 전기영동을 통한 확인 후 나머지 95 ㎕의 반응액은 LaboPass PCR 키트(Cosmo genetech, 대한민국)의 프로토콜에 따라 정제를 하였으며(단, 프로토콜에서 PE 완충액 대신에 포스페이트 세척 완충액(5 mM KPO_4, pH 8.0, 80% EtOH), EB 완충액 대신에 포스페이트 용리(elution) 완충액(4 mM KPO_4)를 사용했고 키트에 포함된 완충액에는 아미노 그룹이 있는 트리스-염이 포함되어 있어 이후 Cy 염료와의 에스테르화를 방해한다), SpeedVac(ModuleSpin 40, Biotron)으로 말린 후, 약 20 ㎕의 0.5 M Na_2CO_3에 녹인 후 그 중 4.5 ㎕만을 DMSO에 녹인 Cy3 또는 Cy5 염료(GE Healthcare, Buckinghamshire, 영국) 4.5 ㎕와 상온에서 약 1시간 반응시켰다. 그리고 PCR 정제 키트(Qiagen, Valencia, 미합중국)를 가지고 커플링 되지 않은 Cy 염료를 제거한 후. 역시 SpeedVac으로 말렸다. 이후 30 ㎕의 증류수에 Cy3로 표지된 샘플을 녹이고 이를 모두 Cy5로 표지된 샘플에 옮겨 같이 녹였다. 95℃에 약 5분간 두어 샘플의 DNA를 완전히 변성시키고 30 ㎕의 2X 혼성화 완충액(50% formamide, 10X SSC 0.2% SDS)를 첨가하였고 제작한 슬라이드에서 42℃에 14시간 동안 혼성화 시켰다.

<85>

<86> 슬라이트 세척과 스캐닝

<87> 혼성화 상태에서 슬라이드는 높은 농도의 염 상태이므로 여러 단계에 걸쳐서 서서히 세척 조건을 완화시켜주면서 진행하였다. 세척에 쓰인 용액의 구성과 횟수, 및 세척조건은 다음과 같다:

표 4

<88>

용액의 종류	SSC 농도	SDS 농도	세척온도	세척시간	횟수
1	1X	0.2%	42℃	5분	1회
2	0.5X	0.01%	상온	5분	1회
3	0.1X	0%	상온	4분	5회
4	0.01X	0%	상온	5분	1회

<89> 마지막 세척까지 끝난 후 SpeedVac(ModuleSpin 40, Biotron)으로 원심 탈수(Spin-dry)하였고, 준비된 슬라이드는 Genepix 4000B dual-color confocal 레이저 스캐너(Axon Instruments, 미합중국)을 이용하고, GenePix Pro 5.0으로 결과를 이미지화 하였다. 이미지 결과는 도 2에 나타나 있다.

<90> 도 2에서 볼 수 있듯이, 양성 대조군에서는 신호를 보이고 음성 대조군에서는 신호를 보이지 않고 있다. 실험

군으로서 총 11개의 비브리오 콜레라에 특이적인 유전자의 PCR 산물을 각각 다섯 번씩 반복하여 프린트하였다. 도 2에서 보듯이 비브리오 콜레라에의 DNA에 의하여 매우 특이적으로 신호를 보임을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

<91> 도 1은 본 발명의 프라이머를 이용하여 비브리오 콜레라에의 특정 유전자를 PCR 증폭한 결과를 보여주는 전기영동 젤 사진이다. 젤 사진에서 사각형으로 표시된 부분은 원하는 크기의 증폭산물이 생성 되었음을 보여준다. 전기영동 젤 사진은 여러 세균의 gDNA에 대한 비브리오 콜레라에 프라이머의 특이성을 본 것으로 젤 상의 순서는 다음과 같다: 좌측 상단부터 L Y1-11, L S1-11 및 L E1-11이고, 좌측 하단부터 L C1-11, L P1-11 및 L V1-11을 나타낸다. 또한, 약어 L, Y, S, E, C ,P 및 V는 각각 1 kb 래더(ladder), 살모넬라 타이피(*Salmonella typhi*) gDNA, 시겔라 플렉시네리(*Shigella flexneri*) gDNA, 에셔리키아 콜리(*Escherichia coli*) H7:0157 gDNA, 비브리오 콜레라에(*Vibrio choleae*) gDNA, 비브리오 파라헤모리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*) gDNA 및 비브리오 불니피쿠스(*Vibrio vulnificus*) gDNA를 나타낸다.

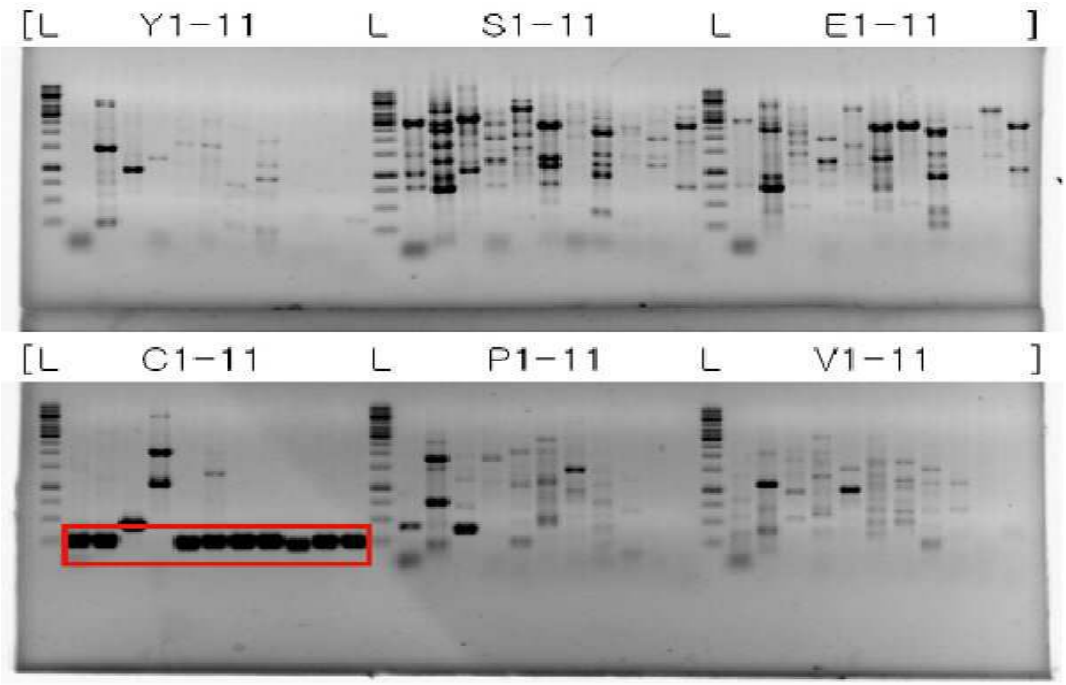
<92> 도 2는 본 발명의 마이크로어레이를 이용하여 비브리오 콜레라에를 탐지한 결과를 보여주고 있다. 양성 대조군(Positive control)은 6개 종의 병원성 세균(살모넬라 타이피, 시겔라 플렉시네리, 에셔리키아 콜리 H7:0157, 비브리오 콜레라에, 비브리오 파라헤모리티쿠스 및 비브리오 불니피쿠스)으로부터 유래한 16S rDNA의 PCR 산물들의 혼합물을 사용하였고, 음성 대조군(negative control)은 폴리A DNA 절편과 DNA를 첨가하지 않은 스팟팅 용액을 사용하였다. 이 그림에서 보듯이 양성 대조군에서는 신호를 보이고 음성 대조군에서는 신호를 보이지 않고 있다. 실험군으로서 총 11개의 비브리오 콜레라에 특이적인 유전자의 PCR 산물을 각각 다섯 번씩 반복하여 프린트하였다. 이 그림에서 보듯이 비브리오 콜레라에의 DNA에 의하여 매우 특이적으로 신호를 보임을 알 수 있다.

<93> 도 3은 양성 대조군의 전기영동 젤 사진이다. 좌측부터 래더, 살모넬라 타이피, 시겔라 플렉시네리, 에셔리키아 콜리 H7:0157, 비브리오 콜레라에, 비브리오 파라헤모리티쿠스 및 비브리오 불니피쿠스를 나타낸다.

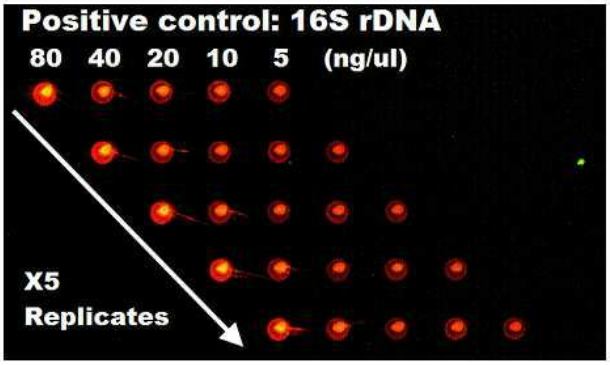
<94> 도 4는 각 세균의 프라이머 세트에 대한 200-250 bp크기의 PCR 산물이 만들어짐을 보여주는 전기영동 젤 사진이다. 가운데 1 kb 래더의 좌측이 실험결과로서, 가장 좌측부터 gDNA 믹스에 대한 살모넬라, 시겔라, *E.coli*0157, V. 콜레라에, V. 파라헤모리티쿠스 및 V. 불니피쿠스 프라이머 세트에 대한 PCR 산물을 나타낸다.

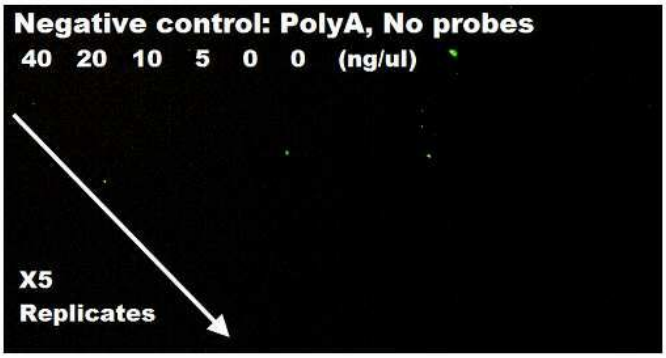
도면

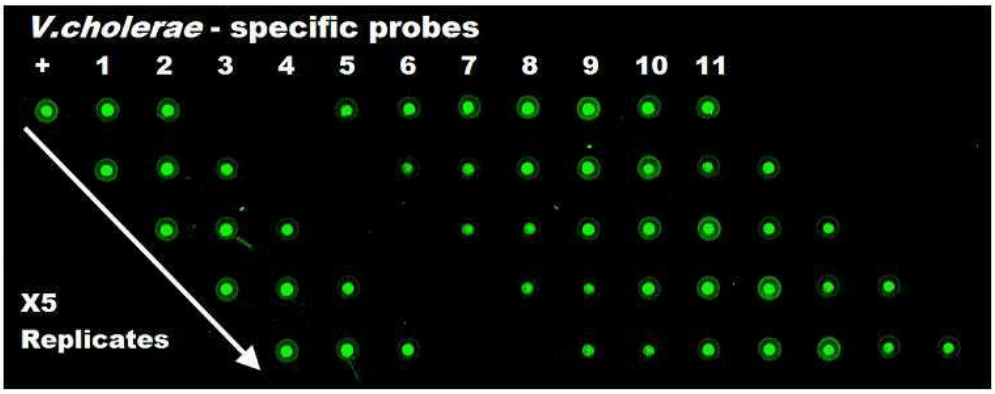
도면1



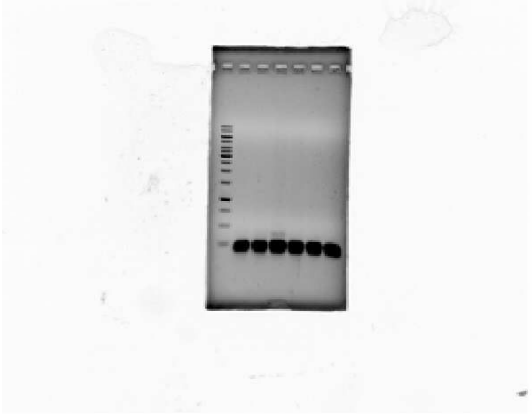
도면2


Positive control: 16S rDNA
80 40 20 10 5 (ng/ul)
X5
Replicates


Negative control: PolyA, No probes
40 20 10 5 0 0 (ng/ul)
X5
Replicates


V.cholerae - specific probes
+ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
X5
Replicates

도면3



도면4

