(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0088560
(43) 공개일자 2012년08월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01) *G01N 33/52* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0001636(분할)
(22) 출원일자 2012년01월05일
심사청구일자 2012년01월05일
(62) 원출원 특허 10-2011-0009530
원출원일자 2011년01월31일
심사청구일자 2011년06월24일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
(72) 발명자
김정욱
강원도 강릉시 교1동 하이빌아파트 102동 306호
(74) 대리인
특허법인태백

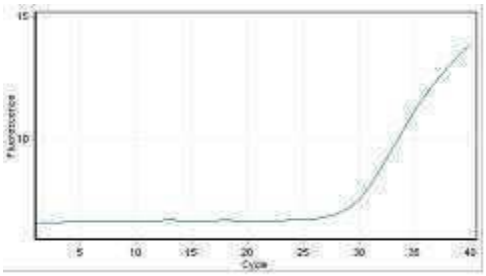
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **이중 실시간 중합효소연쇄반응법을 이용한 결핵균과 항산성비결핵균의 검출 방법**

(57) 요 약

본 발명은 결핵균 특이적 IS6110 유전자 또는 16S rRNA 유전자와 항산성비결핵균에 특이적 16S rRNA 유전자에 특이적인 결핵균과 항산성비결핵균 검출용 프라이머 세트 및/또는 프로브, 이를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트 및 이를 이용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에 의한 결핵균과 항산성비결핵균의 검출 방법을 제공한다. 결핵균 및/또는 항산성비결핵균을 동시에 보다 효율적으로 검출 및 분석할 수 있는 임상진단 수단을 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도2a



특허청구의 범위

청구항 1

염기서열 37의 프로브, 염기서열 38의 프로브 및 염기서열 39의 프로브로 이루어진 군으로부터 선택되는 항산성 비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA, BHQ-1,2,3 및 MGBNFQ로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질로 표지된 것을 특징으로 하는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브.

청구항 3

염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 20의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트;

염기서열 21의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브;

염기서열 35의 정방향 프라이머 및 염기서열 36의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및

염기서열 37의 프로브, 염기서열 38의 프로브 및 염기서열 39의 프로브로 이루어진 군으로부터 선택되는 항산성 비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출키트.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA 및 BHQ-1,2,3으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질(Quencher)로 표지되고,

상기 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA 및 BHQ-1,2,3으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질로 표지되고,

상기 결핵균의 IS6110 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단과 상기 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 서로 다른 형광 표지 인자로 표지된 것을 특징으로 하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트.

청구항 5

검체시료로부터 DNA를 분리하는 단계;

염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 20의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 염기서열 21의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브; 염기서열 35의 정방향 프라이머 및 염기서열 36의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 37의 프로브, 염기서열 38의 프로브 및 염기서열 39의 프로브로 이루어진 군으로부터 선택되는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 사용하여 상기 DNA를 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 시키는 단계; 및

상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응 결과를 확인하는 단계를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균을 검출하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 결핵균과 항산성비결핵균의 검출 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 결핵균과 항산성비결핵균에 특이적인 유전자 염기서열을 검출할 수 있는 결핵균과 항산성비결핵균 검출용 프라이머 세트 및/또는 프로브, 이를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트 및 이를 이용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법을 이용한 결핵균과 항산성비결핵균의 동시 검출 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 항산성비결핵균(nontuberculous mycobacteria)은 토양이나 물 등 자연환경 등에 널리 존재하는 비병원성 균으로 인식되어 왔다. 그러나, 1980년대 후천성면역결핍증(AIDS)이 유행하면서, 상기 균이 후천성 면연결핍증 환자의 기회 균주로서 항산성비결핵균 유발 질환이 확인되고, 정상 환자에게서도 감염을 일으킬 수 있음이 알려지면서 임상적 중요성에 대한 인식이 확산되었다.

[0003] 최근에는 결핵균에 의한 유병률이 낮은 미국 및 유럽 여러 나라 항산성비결핵균에 의한 감염증이 증가하고 있고, 국내에서도 결핵 유병율이 저하하고 있으나 상대적으로 항산성비결핵균에 의한 감염이 증가하는 추세이다. 2009년 액체 결핵배양법이 보험급여 됨에 따라 액체결핵배양 검사를 실시하는 검사실이 늘고 있으며 액체배지를 사용하여 결핵을 배양하는 경우 기존의 고체배지를 사용한 결핵 배양보다 항산성 비결핵균이 더 검출되고 있다. 보고에 의하면 결핵도말 및 배양 양성 검체의 약 12%에서 항산성비결핵균이 분리되고 있으며, 일본, 홍콩, 우리나라의 경우 객담에서 분리된 항산성비결핵균의 약 10~20%가 폐질환을 야기하고 미국, 캐나다, 서유럽 등에서는 약 40~50%가 폐질환을 야기하는 것으로 알려지고 있다.

[0004] 그런데 항산성비결핵균에 의한 폐질환은 천천히 진행되는 폐결핵과 유사하여 오진되기 쉬우나, 결핵균과 항산성비결핵균에 감수성을 보이는 약제가 달라 치료 약제를 선택하기 위해 신속하고 정확한 결핵균과 항산성비결핵균의 분리검출 방법이 요청되고 있다.

[0005] 하지만, 현재 시판되고 있는 결핵균과 항산성비결핵균을 검출하는데 사용되는 검사시약은 항산성비결핵균에만 고유한 부위가 아니고, 결핵균도 가지고 있는 염기서열 부위를 사용함으로써, 특정 농도의 결핵균만 있을 시에 결핵균 검출 프라이머에는 반응하지 않고 항산성비결핵균의 프라이머에만 반응 하는 항산성비결핵균으로 잘못 동정되거나, 항산성비결핵균과 결핵균이 동시에 존재하는 경우 항산성비결핵균만 검출되는 경우도 관찰되는 등 검출 및 진단 정확성이 떨어지는 문제가 발생하고 있다. 따라서, 결핵균에는 없고 항산성비결핵균의 고유염기서열을 인식할 수 있는 프라이머 세트 및/또는 프로브 및 이를 이용한 신속하고 정확한 결핵균과 항산성비결핵균의 분리 검출 방법이 요청되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 결핵균과 항산성비결핵균의 정확한 검출과 진단을 위한 결핵균 특이적 IS6110 유전자에 높은 검출력을 가진 프라이머 세트와 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 높은 검출력을 가진 프라이머 세트를 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 결핵균과 항산성비결핵균의 정확한 검출과 진단을 위한 결핵균 특이적 IS6110 유전자 또는 16S rRNA 유전자에 높은 검출력을 가진 프로브와 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 높은 검출력을 가진 프로브를 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 목적은 상기 프라이머 세트 및/또는 프로브를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균의 검출 키트를 제공하는데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프라이머 및/또는 프로브를 이용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법(duplex real-time polymerase chain reaction)을 이용하여 결핵균과 항산성비결핵균을 정확하게 검출과 진단할 수 있는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 염기서열 9의 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA, BHQ-1,2,3 및 MGBNFQ(molecular grove binding non-fluorescence quencher)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질(Quencher)로 표지될 수 있다.

[0012] 상기 염기서열 9의 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 염기서열 4의 정방향 프라이머; 염기서열 5의 프라이머, 염기서열 6의 프라이머 및 염기서열 7의 프라이머로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 역방향 프라이머; 및 염기서열 8의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 이용한 중합효소연쇄반응법의 반응산물에 특이적인 프로브이다.

[0013] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 2의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 염기서열 3의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브; 염기서열 4의 정방향 프라이머, 염기서열 5의 프라이머, 염기서열 6의 프라이머 및 염기서열 7의 프라이머로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 역방향 프라이머 및 염기서열 8의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 9의 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트를 제공한다.

[0014] 상기 검출 키트는 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 상기 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하기 위한 시약으로는 DNA 중합효소, dNTPs, PCR 버퍼 등을 포함할 수 있다.

[0015] 상기 염기서열 9의 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브와 상기 염기서열 3의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브는 서로 상이한 검출 가능한 수단으로 표지될 수 있다. 상기 검출가능한 수단은 프로브에 연결, 결합, 또는 부착시켜 통상적인 방식으로 밀도, 농도, 양 등을 확인할 수 있는 화합물, 생체 분자 또는 생체 분자 모방체 등을 의미한다. 그 예로, 통상적으로 사용되는 형광 표지인자, 발광물질, 생발광물질, 동위원소 등이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 형광 표지 인자는 종류에 따라 여기 및 방사 파장이 다르면 사용방법 또한 상이하므로, 이를 고려하여 하나의 중합효소연쇄반응법 반응물에 함께 사용하는 형광 표지 인자는 별개로 검출 가능한지 여부를 판단하여 선택 사용하여야 하며, 서로 다른 색상을 사용할 수 있다. 상기 형광 표지 인자에 대한 구체적인 사항 및 선택은 본원 발명에 속하는 기술분야의 당업자들에게 자명한 것이다.

[0016] 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트는 염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 2의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함한다. 상기 결핵균의 IS6110 유전자의 프라이머 세트는 검출 대상이 되는 여러 종의 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTC)을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 염기서열 3의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브와 염기서열 9의 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 Taqman 프로브일 수 있다.

[0018] 상기 염기서열 3의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브는 염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 2의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 이용한 중합효소연쇄반응법의 반응산물에 특이적인 프로브이다.

[0019] 일실시예에 따르면, 상기 염기서열 4의 정방향 프라이머는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 특이적 정방향 프라이머이다. 상기 염기서열 4(5′ -ggyrayctgccctgcac-3′)의 경우, 5′ -ggtaatctgccctgcac-3′ (염기서열 12), 5′ -ggtaacctgccctgcac-3′ (염기서열 13), 5′ -ggcaatctgccctgcac-3′ (염기서열 14) 및 5′ -ggcaacctgccctgcac-3′ (염기서열 15), 5′ -ggtgatctgccctgcac-3′ (염기서열 16), 5′ -ggtgacctgccctgcac-3′ (염기서열 17), 5′ -ggcgatctgccctgcac-3′ (염기서열 18) 및 5′ -ggcgacctgccctgcac-3′ (염기서열 19)를 포함하는 프라이머 세트일 수 있다.예를 들어, 5′ -ggtaatctgccctgcac-3′ , 5′ -ggtaacctgccctgcac-3′ , 5′ -ggcaatctgccctgcac-3′ 및 5′ -ggcaacctgccctgcac-3′ , 5′ -ggtgatctgccctgcac-3′ , 5′ -ggtgacctgccctgcac-3′ , 5′ -ggcgatctgccctgcac-3′ 및 5′ -ggcgacctgccctgcac-3′ 를 약 1:1:1:1:1:1:1:1의 비율로 포함되는 프라이머 세트일 수 있다.

[0020] 상기 염기서열 5의 프라이머(NTM-1), 염기서열 6의 프라이머(NTM-1) 및 염기서열 7의 프라이머(NTM-1)는 16S rRNA 유전자 특이적 역방향 프라이머이다. 염기서열 8의 프라이머(NTM-2)는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 특이적 역방향 프라이머이다. 상기 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자의 역방향 프라이머는 검출 대상이 되는 여러 종의 항산성비결핵균을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다. 상기 염기서열 8(5′ -catcccacaccgctaccw-3′)의 경우, 5′ -catcccacaccgctacct-3′ (염기서열 10)과 5′ -catcccacaccgctacca-3′ (염기서열 11)을 포함

하는 프라이머 세트를 의미한다. 예를 들어, 염기서열 8의 프라이머는 5′ -catcccacaccgctacct-3′ 와 5′ -catcccacaccgctacca-3′ 를 약 1:1로 포함하는 프라이머 세트일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브 및 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA, BHQ-1,2,3 및 MGBNFQ로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질로 표지된 것을 특징으로 표지되고, 상기 결핵균의 IS6110 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단과 상기 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 서로 다른 형광 표지 인자로 표지될 수 있다. 일 예로서, 상기 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 VIC, 3′ 말단이 MGBNFQ으로 표지되고, 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 FAM, 3′ 말단이 MGBNFQ이 표시될 수 있다.

[0022] 일 실시예에 따르면, 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트에서 염기서열 5의 역방향 프라이머와 염기서열 8의 역방향 프라이머는 1:1일 수 있으며, 염기서열 8의 역방향 프라이머는 염기서열 10의 역방향 프라이머 및 염기서열 11의 역방향 프라이머를 1:1로 포함할 수 있다. 이에 따라, 염기서열 5의 프라이머, 5′ -catcccacaccgctacct-3′ 및 5′ -catcccacaccgctacca-3′ 은 2:1:1의 비를 가질 수 있다.

[0023] 일 실시예에 따르면, 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트에서 염기서열 6의 역방향 프라이머와 염기서열 8의 역방향 프라이머는 1:1일 수 있으며, 염기서열 8의 역방향 프라이머는 염기서열 10의 역방향 프라이머 및 염기서열 11의 역방향 프라이머를 1:1로 포함할 수 있다.

[0024] 일 실시예에 따르면, 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트에서 염기서열 7의 역방향 프라이머와 염기서열 8의 역방향 프라이머는 1:1일 수 있으며, 염기서열 8의 역방향 프라이머는 염기서열 10의 역방향 프라이머 및 염기서열 11의 역방향 프라이머를 1:1로 포함할 수 있다.

[0025] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 검체시료로부터 DNA를 분리하는 단계; 염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 2의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 염기서열 3의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브; 염기서열 4의 정방향 프라이머, 염기서열 5의 프라이머, 염기서열 6의 프라이머 및 염기서열 7의 프라이머로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 역방향 프라이머(NTM-1) 및 염기서열 8의 역방향 프라이머(NTM-2)를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 9의 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 사용하여 상기 DNA를 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 시키는 단계; 및 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응 결과를 확인하는 단계를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균을 검출하는 방법을 제공한다.

[0026] 상기 목적을 달성하기 위하여, 염기서열 22의 정방향 프라이머; 염기서열 5의 프라이머, 염기서열 6의 프라이머 및 염기서열 7의 프라이머로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 역방향 프라이머; 및 염기서열 8의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 제공한다.

[0027] 상기 염기서열 22의 정방향 프라이머는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 특이적 정방향 프라이머이다.

[0028] 상기 염기서열 5의 프라이머, 염기서열 6의 프라이머 및 염기서열 7의 프라이머는 16S rRNA 유전자 특이적 역방향 프라이머(NTM-1)이다. 염기서열 8의 프라이머(NTM-2)는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 특이적 역방향 프라이머이다. 상기 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자의 역방향 프라이머는 검출 대상이 되는 여러 종의 항산성비결핵균을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다. 상기 염기서열 8(5′ -catcccacaccgctaccw-3′)의 경우, 5′ -catcccacaccgctacct-3′ (염기서열 10)과 5′ -catcccacaccgctacca-3′ (염기서열 11)을 포함하는 프라이머 세트로서, 염기서열 10과 염기서열 11을 약 1:1로 포함하는 프라이머 세트일 수 있다.

[0029] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 염기서열 23의 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 제공한다.

[0030] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA 및 BHQ-1,2,3으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질로 표지될 수 있다.

[0031] 상기 염기서열 23의 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 염기서열 22의 정방향 프라이머, 염기서열 5의 프라이머, 염기서열 6의 프라이머 및 염기서열 7의 프라이머로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 역방향 프라이머 및 염기서열 8의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응법의 반응산물에 특이적인 프로브이다.

[0032] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 20의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 염기서열 21의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브; 염기서열 22의 정방향 프라이머, 염기서열 5의 프라이머, 염기서열 6의 프라이머 및 염기서열 7의 프라이머로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 역방향 프라이머 및 염기서열 8의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 23의 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트를 제공한다.

[0033] 상기 검출 키트는 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 상기 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하기 위한 시약으로는 DNA 중합효소, dNTPs, PCR 버퍼 등을 포함할 수 있다.

[0034] 상기 염기서열 23의 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브와 상기 염기서열 21의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브는 서로 상이한 검출 가능한 수단으로 표지될 수 있다. 상기 검출가능한 수단은 프로브에 연결, 결합, 또는 부착시켜 통상적인 방식으로 밀도, 농도, 양 등을 확인할 수 있는 화합물, 생체 분자 또는 생체 분자 모방체 등을 의미한다. 그 예로, 통상적으로 사용되는 형광 표지인자, 발광물질, 생발광물질, 동위원소 등이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 형광 표지 인자는 종류에 따라 여기 및 방사 파장이 다르면 사용방법 또한 상이하므로, 이를 고려하여 하나의 중합효소연쇄반응법 반응물에 함께 사용하는 형광 표지 인자는 별개로 검출가능한지 여부를 판단하여 선택 사용하여야 하며, 서로 다른 색상을 사용할 수 있다. 상기 형광 표지 인자에 대한 구체적인 사항 및 선택은 본원 발명에 속하는 기술분야의 당업자들에게 자명한 것이다.

[0035] 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트는 염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 20의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함한다. 상기 결핵균의 IS6110 유전자의 프라이머는 검출 대상이 되는 여러 종의 결핵균(MTC)을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다.

[0036] 일 실시예에 따르면, 상기 염기서열 21의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브와 염기서열 23의 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 Taqman 프로브일 수 있다.

[0037] 상기 염기서열 21의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브는 염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 20의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 이용한 중합효소연쇄반응법의 반응산물에 특이적인 프로브이다.

[0038] 상기 염기서열 5의 프라이머, 염기서열 6의 프라이머 및 염기서열 7의 프라이머는 16S rRNA 유전자 특이적 역방향 프라이머(NTM-1)이다. 염기서열 8의 프라이머(NTM-2)는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 특이적 역방향 프라이머이다. 상기 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자의 역방향 프라이머는 검출 대상이 되는 여러 종의 항산성비결핵균을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다. 상기 염기서열 8(5′ -catcccacaccgctaccw-3′)의 경우, 5′ -catcccacaccgctacct-3′ (염기서열 10)과 5′ -catcccacaccgctacca-3′ (염기서열 11)을 포함하는 프라이머 세트를 의미한다. 예를 들어, 염기서열 8의 프라이머는 5′ -catcccacaccgctacct-3′ 와 5′ -catcccacaccgctacca-3′ 를 약 1:1로 포함하는 프라이머 세트일 수 있다.

[0039] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브 및 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA 및 BHQ-1,2,3으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질로 표지된 것을 특징으로 표지되고, 상기 결핵균의 IS6110 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단과 상기 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 서로 다른 형광 표지 인자로 표지될 수 있다. 일 예로서, 상기 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 HEX, 3′ 말단이 BHQ-1으로 표지되고, 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 FAM, 3′ 말단이 BHQ-1이 표시될 수 있다.

[0040] *일 실시예에 따르면, 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트에서 염기서열 5의 역방향 프라이머와 염기서열 8의 역방향 프라이머는 1:1일 수 있으며, 염기서열 8의 역방향 프라이머는 염기서열 10의 역방향 프라이머 및 염기서열 11의 역방향 프라이머를 1:1로 포함할 수 있다. 이에 따라, 염기서열 5의 프라이머, 5′ -catcccacaccgctacct-3′ 및 5′ -catcccacaccgctacca-3′ 은 2:1:1의 비를 가질 수 있다.

[0041] 일 실시예에 따르면, 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트에서 염기서열 6의 역방향 프라이머와 염기서열 8의 역방향 프라이머는 1:1일 수 있으며, 염기서열 8의 역방향 프라이머는 염기서열 10의 역방향 프라이머 및 염

기서열 11의 역방향 프라이머를 1:1로 포함할 수 있다.

[0042] 일 실시예에 따르면, 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트에서 염기서열 7의 역방향 프라이머와 염기서열 8의 역방향 프라이머는 1:1일 수 있으며, 염기서열 8의 역방향 프라이머는 염기서열 10의 역방향 프라이머 및 염기서열 11의 역방향 프라이머를 1:1로 포함할 수 있다.

[0043] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 검체시료로부터 DNA를 분리하는 단계; 염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 20의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 염기서열 21의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브; 염기서열 22의 정방향 프라이머, 염기서열 5의 프라이머, 염기서열 6의 프라이머 및 염기서열 7의 프라이머로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 역방향 프라이머 및 염기서열 8의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 23의 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 사용하여 상기 DNA를 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 시키는 단계; 및 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응 결과를 확인하는 단계를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균을 검출하는 방법을 제공한다.

[0044] 상기 목적을 달성하기 위하여, 염기서열 26의 결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 제공한다.

[0045] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA, BHQ-1,2,3 및 MGBNFQ로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질로 표지될 수 있다.

[0046] 상기 염기서열 26의 결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 염기서열 24의 정방향 프라이머 및 염기서열 25의 역방향 프라이머 세트를 포함하는 결핵균 및 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위한 공통 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응법의 반응산물 중 결핵균의 반응산물에 특이적인 프로브이다.

[0047] 상기 목적을 달성하기 위하여, 염기서열 27의 프로브 및 염기서열 28의 프로브를 포함하는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 제공한다.

[0048] 상기 염기서열 27의 프로브 및 염기서열 28의 프로브를 포함하는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 염기서열 24의 정방향 프라이머 및 염기서열 25의 역방향 프라이머 세트를 포함하는 결핵균 및 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위한 공통 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응법의 반응산물 중 항산성비결핵균의 반응산물에 특이적인 프로브이다.

[0049] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA, BHQ-1,2,3 및 MGBNFQ로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질로 표지될 수 있다.

[0050] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 염기서열 24의 정방향 프라이머 및 염기서열 25의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균 및 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위한 공통 프라이머 세트; 염기서열 26의 결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브; 및 염기서열 27의 프로브 및 염기서열 28의 프로브를 포함하는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트를 제공한다.

[0051] 상기 검출 키트는 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 상기 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하기 위한 시약으로는 DNA 중합효소, dNTPs, PCR 버퍼 등을 포함할 수 있다.

[0052] 상기 염기서열 26의 결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브와 상기 염기서열 27의 프로브 및 염기서열 28의 프로브를 포함하는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 서로 상이한 검출 가능한 수단으로 표지될 수 있다. 상기 검출가능한 수단은 프로브에 연결, 결합, 또는 부착시켜 통상적인 방식으로 밀도, 농도, 양 등을 확인할 수 있는 화합물, 생체 분자 또는 생체 분자 모방체 등을 의미한다. 그 예로, 통상적으로 사용되는 형광 표지인자, 발광물질, 생발광물질, 동위원소 등이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 형광 표지 인자는 종류에 따라 여기 및 방사 파장이 다르면 사용방법 또한 상이하므로, 이를 고려하여 하나의 중합효소연쇄반응법 반응물에 함께 사용하는 형광 표지 인자는 별개로 검출가능한지 여부를 판단하여 선택 사용하여야 하며, 서로 다른 색상을 사용할 수 있다. 상기 형광 표지 인자에 대한 구체적인 사항 및 선택은 본원 발명에 속하는 기술분야의 당업자들에게 자명한 것이다.

[0053] 염기서열 24의 정방향 프라이머 및 염기서열 25의 역방향 프라이머는 마이코박테리아의 16S rRNA 유전자 부위를 증폭할 수 있는 프라이머로서, 결핵균 및 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위한 공통 프라이머 세

트이다.

[0054] 일 실시예에 따르면, 염기서열 24의 정방향 프라이머는 5′-ggataagcctgggaaactgg-3′ (염기서열 29)과 5′-ggataagcttgggaaactgg-3′ (염기서열 30)이 약 1:1의 비율로 포함되는 프라이머 세트일 수 있다. 또한, 염기서열 25의 역방향 프라이머는 5′-accccaccaacaagctgata-3′ (염기서열 31)과 5′-accccaccaactagctgata-3′ (염기서열 32)이 약 1:1의 비율로 포함되는 프라이머 세트일 수 있다.

[0055] 일 실시예에 따르면, 상기 염기서열 26의 결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브와 상기 염기서열 27의 프로브 및 염기서열 28의 프로브를 포함하는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 Taqman 프로브일 수 있다.

[0056] 상기 염기서열 26의 결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브와 상기 염기서열 27의 프로브 및 염기서열 28의 프로브를 포함하는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 결핵균(MTC)과 항산성비결핵균(NTM)을 특이적으로 구별할 수 있는 16S rRNA 염기부위을 타겟이 되도록 설계되었다.

[0057] 일 실시예에 따르면, NTM-2 프로브인 염기서열 28의 프로브는 5′-FAM-tggaaagcgtttggtagc-MGB-3′ (염기서열 33)과 5′-FAM-tggaaagtgtttggtagc-MGB-3′ (염기서열 34)이 약 1:1 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 염기서열 26의 결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브와 상기 염기서열 27의 프로브 및 염기서열 28의 프로브를 포함하는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA, BHQ-1,2,3 및 MGBNFQ로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질로 표지된 것을 특징으로 표지되고, 상기 염기서열 26의 결핵균의 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브와 상기 염기서열 27의 프로브 및 염기서열 28의 프로브를 포함하는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단과 상기 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 서로 다른 형광 표지 인자로 표지될 수 있다. 일 예로서, 상기 결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 VIC, 3′ 말단이 MGBNFQ으로 표지되고, 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 FAM, 3′ 말단이 MGBNFQ이 표시될 수 있다.

[0059] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 검체시료로부터 DNA를 분리하는 단계; 염기서열 24의 정방향 프라이머 및 염기서열 25의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균 및 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위한 공통 프라이머 세트; 염기서열 26의 결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브; 및 염기서열 27의 프로브 및 염기서열 28의 프로브를 포함하는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 사용하여 상기 DNA를 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 시키는 단계; 및 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응 결과를 확인하는 단계를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균을 검출하는 방법을 제공한다.

[0060] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 염기서열 37의 프로브, 염기서열 38의 프로브 및 염기서열 39의 프로브로 이루어진 군으로부터 선택되는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 제공한다.

[0061] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA, BHQ-1,2,3 및 MGBNFQ(molecular grove binding non-fluorescence quencher)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질(Quencher)로 표지될 수 있다.

[0062] 염기서열 37의 프로브, 염기서열 38의 프로브 및 염기서열 39의 프로브로 이루어진 군으로부터 선택되는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 염기서열 35의 정방향 프라이머 및 염기서열 36의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 이용한 중합효소연쇄반응법의 반응산물에 특이적인 프로브이다.

[0063] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 20의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 염기서열 21의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브; 염기서열 35의 정방향 프라이머 및 염기서열 36의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 37의 프로브, 염기서열 38의 프로브 및 염기서열 39의 프로브로 이루어진 군에서 선택되는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출키트를 제공한다.

[0064] 상기 검출 키트는 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 상기 DNA를 실시

간 중합효소연쇄반응으로 증폭하기 위한 시약으로는 DNA 중합효소, dNTPs, PCR 버퍼 등을 포함할 수 있다.

[0065] 염기서열 37의 프로브 염기서열 38의 프로브 및 염기서열 39의 프로브로 이루어진 군에서 선택되는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브와 상기 염기서열 21의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브는 서로 상이한 검출 가능한 수단으로 표지될 수 있다. 상기 검출 가능한 수단은 프로브에 연결, 결합, 또는 부착시켜 통상적인 방식으로 밀도, 농도, 양 등을 확인할 수 있는 화합물, 생체 분자 또는 생체 분자 모방체 등을 의미한다. 그 예로, 통상적으로 사용되는 형광 표지인자, 발광물질, 생발광물질, 동위원소 등이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 형광 표지 인자는 종류에 따라 여기 및 방사 파장이 다르면 사용방법 또한 상이하므로, 이를 고려하여 하나의 중합효소연쇄반응법 반응물에 함께 사용하는 형광 표지 인자는 별개로 검출가능한지 여부를 판단하여 선택 사용하여야 하며, 서로 다른 색상을 사용할 수 있다. 상기 형광 표지 인자에 대한 구체적인 사항 및 선택은 본원 발명에 속하는 기술분야의 당업자들에게 자명한 것이다.

[0066] 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트는 염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 20의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함한다. 상기 결핵균의 IS6110 유전자의 프라이머 세트는 검출 대상이 되는 여러 종의 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTC)을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다.

[0067] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 염기서열 21의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브와 상기 염기서열 37의 프로브 염기서열, 38의 프로브 및 염기서열 39의 프로브로 이루어진 군에서 선택되는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 Taqman 프로브일 수 있다.

[0068] 상기 염기서열 21의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브는 염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 20의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 이용한 중합효소연쇄반응법의 반응산물에 특이적인 프로브이다.

[0069] 상기 염기서열 37의 프로브, 염기서열 38의 프로브 및 염기서열 39의 프로브로 이루어진 군에서 선택되는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 염기서열 35의 정방향 프라이머 및 염기서열 36의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 이용한 중합효소연쇄반응법의 반응산물에 특이적인 프로브이다.

[0070] 염기서열 35의 정방향 프라이머는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 특이적 정방향 프라이머이다. 상기 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자의 정방향 프라이머는 검출 대상이 되는 여러 종의 항산성비결핵균을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다. 상기 염기서열 35의 경우, 5′-catgtcttgtgggggaaagctt-3′ (염기서열 40), 5′-catgttttgtgggggaaagctt-3′ (염기서열 41), 5′-catgtcttctgggggaaagctt-3′ (염기서열 42), 5′-catgtcttgtggtggaaagctt-3′ (염기서열 43), 5′-catgtcttgtggggcaaagctt-3′ (염기서열 44), 5′-catgttttctgggggaaagctt-3′ (염기서열 45), 5′-catgtcttctggtggaaagctt-3′ (염기서열 46), 5′-catgtcttgtggtgcaaagctt-3′ (염기서열 47), 5′-catgttttgtggggcaaagctt-3′ (염기서열 48), 5′-catgtcttctggggcaaagctt-3′ (염기서열 49), 5′-catgttttgtggtggaaagctt-3′ (염기서열 50), 5′-catgttttctggtggaaagctt-3′ (염기서열 51), 5′-catgttttctggggcaaagctt-3′ (염기서열 52), 5′-catgttttgtggtgcaaagctt-3′ (염기서열 53), 5′-catgtcttctggtgcaaagctt-3′ (염기서열 54) 및 5′-catgttttctggtgcaaagctt-3′ (염기서열 55)를 포함하는 프라이머 세트를 의미한다. 예를 들어, 염기서열 35의 프라이머는 염기서열 40 내지 55의 프라이머를 각각 실질적으로 동량 포함하는 프라이머 세트일 수 있다.

[0071] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브 및 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA 및 BHQ-1,2,3으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질로 표지되고, 상기 결핵균의 IS6110 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단과 상기 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 서로 다른 형광 표지 인자로 표지될 수 있다. 일 예로서, 상기 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 HEX, 3′ 말단이 BHQ-1으로 표지되고, 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 FAM, 3′ 말단이 BHQ-1이 표시될 수 있다.

[0072] 일 실시예에 따르면, 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트에서 염기서열 38의 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 FAM-cctgagagggtgaccgg-BHQ1 (염기서열 56) 및 FAM-cctgagagggtgtccgg-BHQ1 (염기서열 57)이 약 1:1로 포함할 수 있다.

[0073] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 검체시료로부터 DNA를 분리하는 단계; 염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 20의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 염기서열 21의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브; 염기서열 35의 정방향 프라이머 및 염기서열 36의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 37의 프로브, 염기서열 38의 프로브 및 염기서열 39의 프로브로 이루어진 군에서 선택되는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 사용하여 상기 DNA를 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 시키는 단계; 및 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응 결과를 확인하는 단계를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균을 검출하는 방법을 제공한다.

[0074] 상기 목적을 달성하기 위하여, 염기서열 61의 정방향 프라이머; 및 염기서열 5의 프라이머 및 염기서열 8의 프라이머를 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 제공한다.

[0075] 상기 염기서열 61의 정방향 프라이머는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 특이적 정방향 프라이머이다.

[0076] *상기 염기서열 5의 프라이머(NTM-1) 및 염기서열 8의 프라이머(NTM-2)는 16S rRNA 유전자 특이적 역방향 프라이머이다. 상기 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자의 역방향 프라이머는 검출 대상이 되는 여러 종의 항산성비결핵균을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다. 상기 염기서열 8(5′-catcccacaccgctaccw-3′)의 경우, 5′-catcccacaccgctacct-3′ (염기서열 10)과 5′-catcccacaccgctacca-3′ (염기서열 11)을 포함하는 프라이머 세트로서, 염기서열 10과 염기서열 11을 약 1:1로 포함하는 프라이머 세트일 수 있다.

[0077] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 염기서열 58의 정방향 프라이머 및 염기서열 59의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 염기서열 21의 프로브 또는 염기서열 60의 프로브에서 선택되는 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브; 염기서열 61의 정방향 프라이머 및 염기서열 5의 프라이머 및 염기서열 8의 프라이머를 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 62의 프로브 또는 염기서열 63의 프로브에서 선택되는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트를 제공한다.

[0078] 상기 검출 키트는 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 상기 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하기 위한 시약으로는 DNA 중합효소, dNTPs, PCR 버퍼 등을 포함할 수 있다.

[0079] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 염기서열 21의 프로브 또는 염기서열 60의 프로브에서 선택되는 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브 및 염기서열 62의 프로브 또는 염기서열 63의 프로브에서 선택되는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 서로 상이한 검출 가능한 수단으로 표지될 수 있다.

[0080] 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트는 염기서열 58의 정방향 프라이머 및 염기서열 59의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함한다. 상기 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트는 검출 대상이 되는 여러 종의 결핵균(Mycobacterium tuberculosis complex, MTC)을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다.

[0081] 상기 염기서열 21의 프로브 또는 염기서열 60의 프로브는 염기서열 58의 정방향 프라이머 및 염기서열 59의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 이용한 중합효소연쇄반응법의 반응산물에 특이적인 프로브이다.

[0082] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 염기서열 21의 프로브 또는 염기서열 60의 프로브에서 선택되는 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브는 Taqman 프로브일 수 있다.

[0083] 상기 염기서열 61의 정방향 프라이머는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 특이적 정방향 프라이머이다. 상기 염기서열 5의 프라이머(NTM-1) 및 염기서열 8의 프라이머(NTM-2)는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 특이적 역방향 프라이머이다.

[0084] 상기 염기서열 62의 프로브 또는 염기서열 63의 프로브는 염기서열 61의 정방향 프라이머 및 염기서열 5의 프라이머 및 염기서열 8의 프라이머를 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 이용한 중합효소연쇄반응법의 반응산물에 특이적인 프로브이다.

[0085] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 염기서열 62의 프로브 또는 염기서열 63의 프로브에서 선택되는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 Taqman 프로브일 수 있다.

[0086] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA, BHQ-1,2,3 및 MGBNFQ로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질로 표지되고, 상기 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA, BHQ-1,2,3 및 MGBNFQ로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질로 표지되고, 상기 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단과 상기 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 서로 다른 형광 표지 인자로 표지될 수 있다.

[0087] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 검체시료로부터 DNA를 분리하는 단계; 염기서열 58의 정방향 프라이머 및 염기서열 59의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 염기서열 21의 프로브 또는 염기서열 60의 프로브에서 선택되는 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브; 염기서열 61의 정방향 프라이머 및 염기서열 5의 프라이머 및 염기서열 8의 프라이머를 포함하는 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 62의 프로브 또는 염기서열 63의 프로브에서 선택되는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 사용하여 상기 DNA를 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 시키는 단계; 및 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응 결과를 확인하는 단계를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균을 검출하는 방법을 제공한다.

[0088] 상기 목적을 달성하기 위하여, 염기서열 65의 프라이머, 염기서열 66의 프라이머 및 염기서열 67의 프라이머를 포함하는 정방향 프라이머; 및 염기서열 36의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 제공한다.

[0089] 상기 염기서열 65의 프라이머(NTM-1), 염기서열 66의 프라이머(NTM-2) 및 염기서열 67의 프라이머(NTM-3)를 포함하는 정방향 프라이머는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 특이적 정방향 프라이머이다. 상기 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 정방향 프라이머는 검출 대상이 되는 여러 종의 항산성비결핵균을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다. 상기 염기서열 65(5′ -tktggtggaaagcttttgc-3′)의 경우, 5′ -tgtggtggaaagcttttgc-3′ (염기서열 69)과 5′ -tttggtggaaagcttttgc-3′ (염기서열 70)을 포함하는 프라이머 세트로서, 염기서열 69와 염기서열 70을 약 1:1로 포함하는 프라이머 세트일 수 있다. 상기 염기서열 66(5′ -ggtgwgtggtgcaaagctt-3′)의 경우, 5′ -ggtgagtggtgcaaagctt-3′ (염기서열 71)과 5′ -ggtgtgtggtgcaaagctt-3′ (염기서열 72)을 포함하는 프라이머 세트로서, 염기서열 71과 염기서열 72를 약 1:1로 포함하는 프라이머 세트일 수 있다.

[0090] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 염기서열 58의 정방향 프라이머 및 염기서열 20의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 염기서열 21의 프로브 또는 염기서열 64의 프로브에서 선택되는 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브; 염기서열 65의 프라이머, 염기서열 66의 프라이머 및 염기서열 67의 프라이머를 포함하는 정방향 프라이머 및 염기서열 36의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 39의 프로브 또는 염기서열 68의 프로브에서 선택되는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트를 제공한다.

[0091] 상기 검출 키트는 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 상기 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하기 위한 시약으로는 DNA 중합효소, dNTPs, PCR 버퍼 등을 포함할 수 있다.

[0092] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 염기서열 21의 프로브 또는 염기서열 64의 프로브에서 선택되는 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브 및 염기서열 39의 프로브 또는 염기서열 68의 프로브에서 선택되는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 서로 상이한 검출 가능한 수단으로 표지될 수 있다.

[0093] 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트는 염기서열 58의 정방향 프라이머 및 염기서열 20의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함한다. 상기 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트는 검출 대상이 되는 여러 종의 결핵균(Mycobacterium tuberculosis complex, MTC)을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다.

[0094] 상기 염기서열 21의 프로브 또는 염기서열 64의 프로브는 염기서열 58의 정방향 프라이머 및 염기서열 20의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 이용한 중합효소연쇄반응법의 반응산물에 특이적인 프로브이다.

[0095] *본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 염기서열 21의 프로브 또는 염기서열 64의 프로브에서 선택되는 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브는 Taqman 프로브일 수 있다.

[0096] 상기 염기서열 65의 프라이머, 염기서열 66의 프라이머 및 염기서열 67의 프라이머를 포함하는 정방향 프라이머는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 특이적 정방향 프라이머이다. 상기 염기서열 36의 역방향 프라이머는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 특이적 역방향 프라이머이다.

[0097] 상기 염기서열 39의 프로브 또는 염기서열 68의 프로브는 염기서열 65의 프라이머, 염기서열 66의 프라이머 및 염기서열 67의 프라이머를 포함하는 정방향 프라이머 및 염기서열 36의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 이용한 중합효소연쇄반응법의 반응산물에 특이적인 프로브이다.

[0098] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 염기서열 39의 프로브 또는 염기서열 68의 프로브에서 선택되는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 Taqman 프로브일 수 있다. 상기 염기서열 68의 프로브(5′-FAM-cctgagagggtgwccg-MGB-3′)의 경우, 5′-FAM-cctgagagggtgaccg-MGB-3′ (염기서열 73)과 5′-FAM-cctgagagggtgtccg-MGB-3′ (염기서열 74)을 포함하는 프라이머 세트로서, 염기서열 73 및 염기서열 74를 1:1로 포함하는 프로브 세트일 수 있다.

[0099] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA, BHQ-1,2,3 및 MGBNFQ로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질로 표지되고, 상기 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA, BHQ-1,2,3 및 MGBNFQ로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질로 표지되고, 상기 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단과 상기 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 서로 다른 형광 표지 인자로 표지될 수 있다.

[0100] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 검체시료로부터 DNA를 분리하는 단계; 염기서열 58의 정방향 프라이머 및 염기서열 20의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 염기서열 21의 프로브 또는 염기서열 64의 프로브에서 선택되는 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브; 염기서열 65의 프라이머, 염기서열 66의 프라이머 및 염기서열 67의 프라이머를 포함하는 정방향 프라이머 및 염기서열 36의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 39의 프로브 또는 염기서열 68의 프로브에서 선택되는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 사용하여 상기 DNA를 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 시키는 단계; 및 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응 결과를 확인하는 단계를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균을 검출하는 방법을 제공한다.

[0101] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 염기서열 58의 정방향 프라이머 및 염기서열 59의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 염기서열 60의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브; 염기서열 24의 정방향 프라이머 및 염기서열 75의 역방향 프라이머를 포함하는 마이코박테리아의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 27의 프로브 및 염기서열 76의 프로브를 포함하는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트를 제공한다.

[0102] 상기 검출 키트는 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하기 위한 시약을 포함할 수 있다. 상기 DNA를 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하기 위한 시약으로는 DNA 중합효소, dNTPs, PCR 버퍼 등을 포함할 수 있다.

[0103] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 염기서열 60의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브 및 염기서열 27의 프로브(NTM-1) 및 염기서열 76의 프로브(NTM-2)를 포함하는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 서로 상이한 검출 가능한 수단으로 표지될 수 있다.

[0104] 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트는 염기서열 58의 정방향 프라이머 및 염기서열 59의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함한다. 상기 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트는 검출 대상이 되는 여러 종의 결핵균(Mycobacterium tuberculosis complex, MTC)을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다.

[0105] 상기 염기서열 60의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브는 염기서열 58의 정방향 프라이머 및 염기서열 59의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 이용한 중합효소연쇄반응법의

반응산물에 특이적인 프로브이다.

[0106] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 염기서열 60의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브는 Taqman 프로브일 수 있다.

[0107] 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트는 염기서열 24의 정방향 프라이머 및 염기서열 75의 역방향 프라이머를 포함하는 마이코박테리아의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함한다. 상기 염기서열 24의 정방향 프라이머 및 염기서열 75의 역방향 프라이머는 마이코박테리아의 16S rRNA 유전자 부위를 증폭할 수 있는 프라이머로서, 결핵균 및 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위한 공통 프라이머 세트이다.

[0108] 상기 염기서열 24의 정방향 프라이머는 마이코박테리아의 16S rRNA 유전자 특이적 정방향 프라이머이다. 상기 염기서열 24(5′ -ggataagcytgggaaactgg-3′)의 경우, 5′ -ggataagcctgggaaactgg-3′ (염기서열 29)과 5′ -ggataagcttgggaaactgg-3′ (염기서열 30)을 포함하는 프라이머 세트로서, 염기서열 29와 염기서열 30을 약 1:1로 포함하는 프라이머 세트일 수 있다.

[0109] 상기 염기서열 36의 역방향 프라이머는 마이코박테리아의 16S rRNA 유전자 특이적 역방향 프라이머이다.

[0110] 상기 염기서열 27의 프로브 및 염기서열 76의 프로브를 포함하는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 염기서열 24의 정방향 프라이머 및 염기서열 75의 역방향 프라이머를 포함하는 마이코박테리아의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 이용한 중합효소연쇄반응법의 반응산물 중에서 항산성비결핵균의 중합효소연쇄반응법의 반응산물에 특이적인 프로브이다.

[0111] 상기 염기서열 27의 프로브 및 염기서열 76의 프로브를 포함하는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브는 검출 대상이 되는 여러 종의 항산성비결핵균을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다.

[0112] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA, BHQ-1,2,3 및 MGBNFQ로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질로 표지되고, 상기 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 FAM, VIC, TET, JOE, HEX, CY3, CY5, ROX, RED610, TEXAS RED, RED670 및 NED로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광 표지 인자로 표지되며, 3′ 말단이 6-TAMRA, BHQ-1,2,3 및 MGBNFQ로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질로 표지되고, 상기 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단과 상기 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브의 5′ 말단이 서로 다른 형광 표지 인자로 표지될 수 있다.

[0113] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 검체시료로부터 DNA를 분리하는 단계; 염기서열 58의 정방향 프라이머 및 염기서열 59의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 염기서열 60의 결핵균 IS6110 유전자 탐지용 프로브; 염기서열 24의 정방향 프라이머 및 염기서열 75의 역방향 프라이머를 포함하는 마이코박테리아의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 27의 프로브 및 염기서열 76의 프로브를 포함하는 항산성비결핵균 16S rRNA 유전자 탐지용 프로브를 사용하여 상기 DNA를 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 시키는 단계; 및 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응 결과를 확인하는 단계를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균을 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0114] 본 발명은 결핵균과 항산성비결핵균에 특이적인 유전자 염기서열을 검출할 수 있는 결핵균과 항산성비결핵균 검출용 프라이머 세트 및/또는 프로브, 및 이를 포함하는 검출키트 및 이를 이용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에 의한 결핵균과 항산성비결핵균의 검출 방법을 제공할 수 있다. 상기 방법에 의하면, 결핵균과 항산성비결핵균에 특이적인 프라이머 및/또는 프로브를 이용하여 결핵균 및/또는 항산성비결핵균을 동시에 보다 효율적으로 검출할 수 있는 임상진단 수단을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0115] 도 1a 내지 도 3b는 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻은 결과를 나타낸다.

도 1a 및 도 1b는 각각 결핵균(MTC)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 2a 및 도 2b는 각각 항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 3a 및 도 3b는 각각 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 4a 내지 도 6b는 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻은 결과를 나타낸다.

도 4a 및 도 4b는 각각 결핵균(MTC)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 노랑채널과 녹색채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 5a 및 도 5b는 각각 항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 노랑채널과 녹색채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 6a 및 도 6b는 각각 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 노랑채널과 녹색채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 7a 내지 도 9b는 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻은 결과를 나타낸다.

도 7a 및 도 7b는 각각 결핵균(MTC)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 8a 및 도 8b는 각각 항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 9a 및 도 9b는 각각 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 10a 내지 도 12b는 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻은 결과를 나타낸다.

도 10a 및 도 10b는 각각 결핵균(MTC)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 11a 및 도 11b는 각각 항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 12a 및 도 12b는 각각 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 13a 내지 도 15b는 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻은 결과를 나타낸다. 상기 그래프들에서, x축은 중합효소연쇄반응의 싸이클 수이고 y축은 형광세기(fluoresence, F)이다.

도 13a 및 도 13b는 각각 결핵균(MTC)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 14a 및 도 14b는 각각 항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 15a 및 도 15b는 각각 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 16a 내지 도 18b는 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻은 결과를 나타낸다. 상기 그래프들에서, x축은 중합효소연쇄반응의 싸이클 수이고 y축은 형광세기(fluoresence, F)이다.

도 16a 및 도 16b는 각각 결핵균(MTC)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 17a 및 도 17b는 각각 항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 18a 및 도 18b는 각각 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 19a 내지 도 21b는 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻은 결과를 나타낸다. 상기 그래프들에서, x축은 중합효소연쇄반응의 싸이클 수이고 y축은 형광세기(fluoresence, F)이다.

도 19a 및 도 19b는 각각 결핵균(MTC)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 20a 및 도 20b는 각각 항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

도 21a 및 도 21b는 각각 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0116] 이하, 본 발명을 참고예 및 실시예에 의해 상세히 설명하지만, 하기 참고예 및 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0117] 참고예: 결핵균과 항산성비결핵균의 특이적 염기서열 탐색

[0118] 1. 대상 및 유전자 부위

[0119] 결핵균과 항산성비결핵균의 특이적 염기서열 탐색에는 *M. abscessus* (AJ419970.1, AJ416940.1, AJ536038), *M. acapulcensis* (AF480575.1), *M. africanum* (AF480605.1), *M. agri* (AJ429045.1), *M. aichiense* (X55598.1), *M. alvei* (NR_024859.1), *M. asiaticum* (X55604.1), *M. aurum* (FJ172298.1), *M. austroafricanum* (GU121552.1), *M. avium* (NR_025584.1, AJ536037.1, EF521892.1), *M. bohemicum* (NR_026054.1), *M. botniense* (NR_028878.1), *M. bovis* (GU142937.1), *M. branderi* (AF480574.1), *M. brumae* (NR_025233.1), *M. celatum* (L08169.1), *M.chelonae* (AM884324.1, AJ419969.1), *M. chitae* (NR_029220.1), *M. chlorophenolicum* (NR_026173.1), *M. chubuense* (X55596.1), *M. confluentis* (AJ634379.1), *M. conspicuum* (X029298.1), *M. cookii* (X53896.1), *M. diernhoferi* (AF480599.1), *M. doricum* (NR_025099.1), *M. duvalii* (NR_026073.1), *M. engbaekii* (AF480577.1), *M. fallax* (AF480600.1), *M. farcinogenes* (X55592.1), *M. flavescens* (AY734993.1), *M. fortuitum* (AY457066.1, AF480580.1, GU142933.1), *M. gadium* (NR_026087.1), *M. gastri* (GU142918.1), *M. genavense* (NR_029223.1), *M. gilvum* (AB491971.1), *M. goodii* (AY457079.1), *M. gordonae* (GU142923.1), *M. haemophilum* (V06638.1), *M. hassiacum* (NR_026011.1), *M. heidelbergense* (NR_025268.1), *M. hiberniae* (NR_026092.1), *M. hodleri* (NR_026286.1), *M. immunogen* (AJ011771.1), *M. interjectum* (X70961.1), *M. intermedium* (X67847.1), *M.intracellulare* (AY652958.1, AJ536036.1, X52927.1, M61684.1), *M.kansasii* (M29575.1, X15916.1), *M. lentiflavum* (AF480583.1), *M. mageritense* (AY457076.1), *M. malmoense* (GQ153278.1), *M. marinum* (AF456238.1, AY513243.1), *M. microti* (NR_025234.1), *M. monacense* (GU142931.1), *M. moriokaense* (AY859686.1), *M. mucogenicum* (AF480585.1), *M. neoaurum* (FJ172306.1), *M.nonchromogenicum* (DQ058406.1), *M. obuense* (X55597.1), *M. paraffinicum* (GQ153282.1), *M. parafortuitum* (NR_026285.1), *M. peregrinum* (AY457069.1), *M. phlei* (AF480603.1), *M. porcinum* (AY457077.1), *M. poriferae* (NR_025235.1), *M. pulveris* (NR_025528.1), *M. rhodesiae* (NR_025529.1), *M. scrofulaceum* (GQ153271.1), *M. senuense* (DQ536409.1), *M. septicum* (AY457070.1), *M. shimoidei* (X82459.1), *M. simiae* (GQ153280.1), *M. smegmatis* (NR_025311.1), *M. sphagni* (X55590.1), *M. szulgai* (X52926.1), *M. terrae* (NR_029168.1), *M. thermoresistibile* (GU142928.1), *M. tilburgii* (AJ580826.1), *M. triplex* (GQ153279.1), *M. triviale* (DQ058405.1), *M. tuberculosis* (GU142936.1, GU142935.1, AY53603.1, X55588.1, X52917.1), *M. tusciae* (NR_024903.1), *M. ulcerans* (Z13990.1), *M. vaccae* (X55601.1), *M. wolinskyi* (AY457083.1), *M. xenopi* (X52929.1)의 16S ribosomal RNA 유전자의 염기서열 자료를 분석에 이용하였다. 상기 마이코박테리아의 16S ribosomal RNA 유전자의 염기서열 자료는 NCBI(National center for Biotechnology Information)의 데이터베이스(Databases)에서 얻었다

[0120] 상기 마이코박테리아 균종의 16S rRNA 유전자의 염기서열 자료를 Sequencher 4.9로 분석하여 특이 염기서열 부위를 발견하였다. 즉, 결핵균 특이적 염기서열 및 결핵균에는 없고 항산성비결핵균의 고유염기서열을 발견하였다.

[0121] 실시예 1: 결핵균과 항산성비결핵균의 분리검출 방법 1

[0122] 1. 검출대상 부위 및 프라이머 설계

[0123] 결핵균(Mycobacterium tuberculosis complex, MTC: *M. tuberculosis*, M.bovis, *M. africanum*, *M. microti*)은 IS6110 유전자를 검출 대상으로 하고, 항산성비결핵균(NTM)은 16S rRNA 유전자를 검출대상으로 하여 Taqman 프로브와 프라이머를 사용하였다. 상기 검출대상 부위용 프라이머는 Primer3 프로그램을 이용하여 설계하였다.

[0124] (1) 결핵균(MTC)

[0125] 1) 대상 유전자: IS6110

[0126] 2) 프라이머

[0127] a. 정방향 프라이머: 5′ -cgaactcaaggagcacatca-3′ (염기서열 1)

[0128] b. 역방향 프라이머: 5′ -agtttggtcatcagccgttc-3′ (염기서열 2)

[0129] 3) Taqman 프로브

[0130] 5′ -VIC-agtgtggctaaccctgaa-MGB-3′ (염기서열 3)

[0131] 4) PCR 산물의 크기: 135bp

[0132] (2) 항산성비결핵균(NTM)

[0133] 1) 대상유전자: 16S rRNA

[0134] 2) 프라이머

[0135] a. 정방향 프라이머: 5′ -ggyrayctgccctgcac-3′ (염기서열 4)

[0136] b. 역방향 프라이머

[0137] NTM-1: 5′ -cccacaccgcaaaagctt-3′ (염기서열 5) 또는 5′ -cccacaccgcaaaagct-3′ (염기서열 6) 또는 5′ -tcccacaccgcaaaagct-3′ (염기서열 7)

[0138] NTM-2: 5′ -catcccacaccgctaccw-3′ (염기서열 8)

[0139] 3) Taqman 프로브

[0140] 5′ -FAM-cggtattagacccagtttcc-MGB-3′ (염기서열 9)

[0141] 4) PCR 산물의 크기: 104bp

[0142] <실시예 1-1. 항산성비결핵균 검출용 역방향 프라이머 NTM-1으로 염기서열 5의 프라이머를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법>

[0143] (1) DNA의 분리

[0144] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주, 마이코박테리아 표준 균주 7주를 사용하였다. 사용된 ATCC 표준균주는 *M. tuberculosis* (ATCC 25177), *M. intracellulare* (ATCC 13950), *M. scrofulaceum* (ATCC 19981), *M. kansasii* (ATCC 12478), *M. fortuitum* (ATCC 6841), *M. abscessus* (ATCC 19977), *M. avium* (ATCC 25291)이었다.

[0145] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주, 마이코박테리아 표준 균주 7주를 사용하였다. 사용된 ATCC 표준균주는 *M. tuberculosis* (ATCC 25177), *M. intracellulare* (ATCC 13950), *M. scrofulaceum* (ATCC 19981), *M. kansasii* (ATCC 12478), *M. fortuitum* (ATCC 6841), *M. abscessus* (ATCC 19977), *M. avium* (ATCC 25291)이었다.

[0146] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주는 액체배지(MGIT 마이코박테리아 배지)나 고체(Ogawa 배지)배지에서 검출되었거나 객담검체에서 직접 검출된 균주이었다. ATCC 표준균주는 액체배지에서 배양하여 사용하였다.

[0147] 액체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 균이 배양된 MGIT 마이코박테리아 배양튜브를 잘 섞은 후에 액체 배지 500㎕를 취해 1.5㎖ 튜브에 넣고 14,000 rpm로 5분간 원심분리 시켰다. 원심분리

후 상층액은 버리고 남은 침사부분에 멸균증류수 300㎕ 넣고 끓는 물에 10분간 중탕 가열하였다. 중탕 가열 후 14,000 rpm로 5분간 원심분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0148] 고체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 1.5㎖튜브에 멸균증류수 500㎕넣고 고체배지에서 1 백금이를 취해 멸균증류수에 풀었다. 이 튜브를 끓는 물에 10분간 중탕 가열한 후 14,000 rpm에서 5분간 원심 분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0149] 객담검체는 다음과 같이 처리하였다. 15㎖ 혹은 50㎖ 튜브에 담긴 객담량과 동일한 량의 1N NaOH를 첨가하여 10분간 방치하여 객담을 액화시켰다. 14,000rpm에서 2분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 남아 있는 침전물에 멸균증류수 1㎖를 넣고 10초간 잘 섞은 후 14,000rpm으로 2분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 남아 있는 침전물에 멸균증류 1㎖를 넣고 10초간 잘 섞은 후 14,000rpm에서 2분간 원심 분리 한 후 상층액을 버렸다. 상층액을 제거하고 남아 있는 침전물에 5% chelex 수지(Biorad, USA) 100㎕와 10㎎/㎖ proteinase K 1㎕를 넣고 잘 섞어 주었다. 56℃에서 15분간 방치한 후 잘 혼합하여 끓은 물에 10분간 중탕 가열하였다. 중탕 가열 후 14,000 rpm 5분간 원심 분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0150] (2) 이중 실시간 중합효소연쇄반응법

[0151] Rotor-Gene multiplex PCR Kit (QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 사용하여 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 이중 실시간 중합효소연쇄반응은 Rotor-Gene Q(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 이용하였다. 약 95℃에서 약 5분간 변성 공정을 1 사이클(cycle), 약 95℃에서 약 15초 간 변성, 약 66℃에서 약 15초 간 어닐링 및 연장 공정을 1 싸이클로 하여, 40 싸이클을 수행하였다. 이때, 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하는 반응물의 조성은 하기 표 4와 같다. 하기 primer-probes Mix에는 정방향 프라이머와 역방향 프라이머가 동일한 량(10pmole/㎕)으로 들어 있고 프루브는 4pmole/㎕이 있었다. 따라서 반응에 사용되는 MTC의 primer-probes mix 1.25㎕에는 정방향 및 역방향 프라이머가 각각 12.5pmole이 되고 프로브는 5pmole이 들어 있게 되었다. 총 25uL의 중합연쇄반응을 수행하는 반응물의 총부피가 25㎕이니 primer의 농도는 0.5uM(12.5pmoles/25㎕), 프로브는 0.2uM(5pmole/25㎕)가 사용되었다. NTM의 정방향 및 역방향 프라이머, 프로브의 농도 및 부피는 MTC와 동일하게 사용되었다. NTM-1 역방향 프라이머로는 염기서열 5의 프라이머가 NTM-2 역방향 프라이머로는 염기서열 8의 프라이머가 동량으로 사용하였다. NTM-2 역방향 프라이머는 5′ -catcccacaccgctacct-3′ (염기서열 10)와 5′ -catcccacaccgctacca-3′ (염기서열 11)이 동량으로 존재하도록 설계되었다. NTM 정방향 프라이머는 5′ -ggtaatctgccctgcac-3′ (염기서열 12), 5′ -ggtaacctgccctgcac-3′ (염기서열 13), 5′ -ggcaatctgccctgcac-3′ (염기서열 14), 5′ -ggcaacctgccctgcac-3′ (염기서열 15), 5′ -ggtgatctgccctgcac-3′ (염기서열 16), 5′ -ggtgacctgccctgcac-3′ (염기서열 17), 5′ -ggcgatctgccctgcac-3′ (염기서열 18) 및 5′ -ggcgacctgccctgcac-3′ (염기서열 19)을 포함하는 프라이머 세트로서, 염기서열 12, 염기서열 13, 염기서열 14, 염기서열 15, 염기서열 16, 염기서열 17, 염기서열 18 및 염기서열 19의 프라이머를 각각 약 1:1:1:1:1:1:1:1의 비율로 포함하도록 제작되었다.

표 1

[0152]

성분		부피(㎕)	농도
2X Rotor-Gene Multiplex PCR Master Mix		12.5	1X
Primers-Probes Mix	프라이머(10pmole/㎕)	1.25	0.5uM
	프로브(4pmole/㎕)		0.2uM
Nuclease free water		6.25	-
샘플 DNA template		5	-
전체		25	-

[0153] 이중 실시간 중합효소연쇄반응 중 결합 및 연장단계에서 프로브에 의해 생성된 형광을 Rotor-Gene Q(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)에서 측정한다. 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응 방법은 DNA 중합효소와 형광공명 에너지이동(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)의 원리에 의해 실시간 중합효소연쇄반응의 매 주기마다 실시간으로 시행되는 형광을 검출하고 정량하는 방법이다. 실시간 모니터 상에서 FAM™ 이 발색되는 경우 녹색채널(510±5nm), VIC™이 발색되는 경우 노랑채널(555±5nm)에서 표시하도록 지정하였다. 녹색채널(green channel)과 노랑채널(Yellow channel)에서 형광을 관찰하였다.

[0154] <실시예 1-2. 항산성비결핵균 검출용 역방향 프라이머 NTM-1으로 염기서열 6의 프라이머를 사용하는 이중 실시

간 중합효소연쇄반응법>

[0155] 실시예 1-1과 NTM-1의 역방향 프라이머로 염기서열 6의 프라이머를 사용하는 것을 제외하고는 실질적으로 동일한 방법으로 이중 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하였다.

[0156] <실시예 1-3. 항산성비결핵균 검출용 역방향 프라이머 NTM-1으로 염기서열 7의 프라이머를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법>

[0157] 실시예 1-1과 NTM-1의 역방향 프라이머로 염기서열 7의 프라이머를 사용하는 것을 제외하고는 실질적으로 동일한 방법으로 이중 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하였다.

[0158] 2. 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 수행 결과

[0159] 도 1a 내지 도 3b는 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻은 결과를 나타낸다. 상기 그래프들에서, x축은 중합효소연쇄반응의 싸이클 수이고 y축은 형광세기(fluoresence, F)이다. 도 1a 및 도 1b는 각각 결핵균(MTC)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 2a 및 도 2b는 각각 항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 3a 및 도 3b는 각각 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

[0160] 도 1a 내지 도 3b를 참조하면, 결핵균(MTC)은 노랑채널에서 IS6110 유전자, 항산성비결핵균(NTM)은 녹색채널에서 16S rRNA 유전자, 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)은 각각 노랑채널과 녹색채널에서 IS6110 유전자와 16S rRNA 유전자가 특이적으로 증폭되는 결과를 나타내어, 본 발명에 의한 프라이머 및 프로브를 이용할 경우, 이중 실시간 중합효소연쇄반응법으로 임상 검체에서 결핵균과 항산성비결핵균을 동시에 높은 신뢰성을 가지고 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0161] 실시예 2. 결핵균과 항산성비결핵균의 분리검출 방법 2

[0162] 1. 검출대상 부위 및 프라이머 설계

[0163] 결핵균(Mycobacterium tuberculosis complex, MTC: *M. tuberculosis*, *M.* bovis, *M. africanum*, *M. microti*)은 IS6110 유전자를 검출 대상으로 하고, 항산성비결핵균(NTM)은 16S rRNA 유전자를 검출대상으로 하여 Taqman 프로브와 프라이머를 사용하였다. 상기 검출대상 부위용 프라이머는 Primer3 프로그램을 이용하여 설계하였다.

[0164] (1) 결핵균(MTC)

[0165] 1) 대상 유전자: IS6110

[0166] 2) 프라이머

[0167] a. 정방향 프라이머: 5′ -cgaactcaaggagcacatca-3′ (염기서열 1)

[0168] b. 역방향 프라이머: 5′ -cagggttagccacactttgc-3′ (염기서열 20)

[0169] 3) Taqman 프로브

[0170] 5′ -HEX-cgccaactacggtgtttacggtg-BHQ1-3′ (염기서열 21)

[0171] 4) PCR 산물의 크기: 79bp

[0172] (2) 항산성비결핵균(NTM)

[0173] 1) 대상유전자: 16S rRNA

[0174] 2) 프라이머

[0175] a. 정방향 프라이머: 5′ -gtggcgaacgggtgagtaa-3′ (염기서열 22)

[0176] b. 역방향 프라이머

[0177] NTM-1: 5′ -cccacaccgcaaaagctt-3′ (염기서열 5) 또는 5′ -cccacaccgcaaaagct-3′ (염기서열 6) 또는 5′ -

tcccacaccgcaaaagct-3′ (염기서열 7)

[0178] NTM-2: 5′ -catcccacaccgctaccw-3′ (염기서열 8)

[0179] 3) Taqman 프로브

[0180] 5′ -FAM-cggtattagacccagtttcccaggct-BHQ1-3′ (염기서열 23)

[0181] 4) PCR 산물의 크기: 128bp

[0182] <실시예 2-1. 항산성비결핵균 검출용 역방향 프라이머 NTM-1으로 염기서열 5의 프라이머를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법>

[0183] (1) DNA의 분리

[0184] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주, 마이코박테리아 표준 균주 7주를 사용하였다. 사용된 ATCC 표준균주는 *M. tuberculosis* (ATCC 25177), *M. intracellulare* (ATCC 13950), *M. scrofulaceum* (ATCC 19981), *M. kansasii* (ATCC 12478), *M. fortuitum* (ATCC 6841), *M. abscessus* (ATCC 19977), *M. avium* (ATCC 25291)이었다.

[0185] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주, 마이코박테리아 표준 균주 7주를 사용하였다. 사용된 ATCC 표준균주는 *M. tuberculosis* (ATCC 25177), *M. intracellulare* (ATCC 13950), *M. scrofulaceum* (ATCC 19981), *M. kansasii* (ATCC 12478), *M. fortuitum* (ATCC 6841), *M. abscessus* (ATCC 19977), *M. avium* (ATCC 25291)이었다.

[0186] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주는 액체배지(MGIT 마이코박테리아 배지)나 고체(Ogawa 배지)배지에서 검출되었거나 객담검체에서 직접 검출된 균주이었다. ATCC 표준균주는 액체배지에서 배양하여 사용하였다.

[0187] 액체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 균이 배양된 MGIT 마이코박테리아 배양튜브를 잘 섞은 후에 액체 배지 500㎕를 취해 1.5㎖ 튜브에 넣고 14,000 rpm로 5분간 원심분리 시켰다. 원심분리 후 상층액은 버리고 남은 침사부분에 멸균증류수 300㎕ 넣고 끓는 물에 10분간 중탕 가열하였다. 중탕 가열 후 14,000 rpm로 5분간 원심분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0188] 고체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 1.5㎖튜브에 멸균증류수 500㎕넣고 고체배지에서 1 백금이를 취해 멸균증류수에 풀었다. 이 튜브를 끓는 물에 10분간 중탕 가열한 후 14,000 rpm에서 5분간 원심 분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0189] 객담검체는 다음과 같이 처리하였다. 15㎖ 혹은 50㎖ 튜브에 담긴 객담량과 동일한 량의 1N NaOH를 첨가하여 10분간 방치하여 객담을 액화시켰다. 14,000rpm에서 2분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 남아 있는 침전물에 멸균증류수 1㎖를 넣고 10초간 잘 섞은 후 14,000rpm으로 2분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 남아 있는 침전물에 멸균증류 1㎖를 넣고 10초간 잘 섞은 후 14,000rpm에서 2분간 원심 분리 한 후 상층액을 버렸다. 상층액을 제거하고 남아 있는 침전물에 5% chelex 수지(Biorad, USA) 100㎕와 10mg/㎖ proteinase K 1㎕를 넣고 잘 섞어 주었다. 56℃에서 15분간 방치한 후 잘 혼합하여 끓은 물에 10분간 중탕 가열하였다. 중탕 가열 후 14,000 rpm 5분간 원심 분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0190] (2) 이중 실시간 중합효소연쇄반응법

[0191] Rotor-Gene multiplex PCR Kit (QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 사용하여 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 이중 실시간 중합효소연쇄반응은 Rotor-Gene Q(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)을 이용하였다. 약 95℃에서 약 5분간 변성 공정을 1 사이클(cycle), 약 95℃에서 약 10초 간 변성, 약 65℃에서 약 15초 간 어닐링 및 연장 공정을 1 싸이클로 하여, 40 싸이클을 수행하였다. 이때, 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하는 반응물의 조성은 하기 표 2와 같다. 하기 primer-probes Mix에는 정방향 프라이머와 역방향 프라이머가 동일한 량(10pmole/㎕)으로 들어 있고 프루브는 4pmole/㎕이 있었다. 따라서 반응에 사용되는 MTC의 primer-probes mix 1.25㎕에는 정방향 및 역방향 프라이머가 각각 12.5pmole이 되고 프로브는 5pmole이 들어 있게 되었다. 총 25uL의 중합연쇄반응을 수행하는 반응물의 총부피가 25㎕이니 primer의 농도는 0.5uM(12.5pmoles/25㎕), 프로브는 0.2uM(5pmole/25㎕)가 사용되었다. NTM의 정방향 및 역방향 프라이머, 프로브의 농도 및 부피는 MTC와 동일하게 사용되었다. NTM-1 역방향 프라이머로는 염기서열 5의 프라이머가 NTM-2 역방향 프라이머로는 염기서열 8의 프라이머가 동량으로 사용하였다. NTM-2 역방향 프라이머는 5′ -catcccacaccgctacct-3′ (염기서열 10)

과 5′ -catcccacaccgctacca-3′ (염기서열 11)이 동량으로 존재하도록 설계되었다.

표 2

[0192]

성분		부피(㎕)	농도
2X Rotor-Gene Multiplex PCR Master Mix		12.5	1X
Primers-Probes Mix	프라이머(10pmole/㎕)	1.25	0.5uM
	프로브(4pmole/㎕)		0.2uM
Nuclease free water		6.25	-
샘플 DNA template		5	-
전체		25	-

[0193] 이중 실시간 중합효소연쇄반응 중 결합 및 연장단계에서 프로브에 의해 생성된 형광을 Rotor-Gene Q(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)에서 측정한다. 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응 방법은 DNA 중합효소와 형광공명 에너지이동(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)의 원리에 의해 실시간 중합효소연쇄반응의 매 주기마다 실시간으로 시행되는 형광을 검출하고 정량하는 방법이다. 실시간 모니터 상에서 FAM™ 이 발색되는 경우 녹색채널(510±5nm), VIC™이 발색되는 경우 노랑채널(555±5nm)에서 표시하도록 지정하였다. 녹색채널(green channel)과 노랑채널(Yellow channel)에서 형광을 관찰하였다.

[0194] <실시예 2-2. 항산성비결핵균 검출용 역방향 프라이머 NTM-1으로 염기서열 6의 프라이머를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법>

[0195] 실시예 2-1과 NTM-1의 역방향 프라이머로 염기서열 6의 프라이머를 사용하는 것을 제외하고는 실질적으로 동일한 방법으로 이중 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하였다.

[0196] <실시예 2-3. 항산성비결핵균 검출용 역방향 프라이머 NTM-1으로 염기서열 7의 프라이머를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법>

[0197] 실시예 2-1과 NTM-1의 역방향 프라이머로 염기서열 7의 프라이머를 사용하는 것을 제외하고는 실질적으로 동일한 방법으로 이중 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하였다.

[0198] 2. 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 수행 결과

[0199] 도 4a 내지 도 6b는 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻은 결과를 나타낸다. 상기 그래프들에서, x축은 중합효소연쇄반응의 싸이클 수이고 y축은 형광세기(fluoresence, F)이다. 도 4a 및 도 4b는 각각 결핵균(MTC)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 노랑채널과 녹색채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 5a 및 도 5b는 각각 항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 노랑채널과 녹색채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 6a 및 도 6b는 각각 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 노랑채널과 녹색채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

[0200] 도 4a 내지 도 6b를 참조하면, 결핵균(MTC)은 노랑채널에서 IS6110 유전자, 항산성비결핵균(NTM)은 녹색채널에서 16S rRNA 유전자, 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)은 각각 노랑채널과 녹색채널에서 IS6110 유전자와 16S rRNA 유전자가 특이적으로 증폭되는 결과를 나타내어, 본 발명에 의한 프라이머 및 프로브를 이용할 경우, 이중 실시간 중합효소연쇄반응법으로 임상 검체에서 결핵균과 항산성비결핵균을 동시에 높은 신뢰성을 가지고 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0201] 실시예 3: 결핵균과 항산성비결핵균의 분리검출 방법 3

[0202] 1. 검출대상 부위 및 프라이머 설계

[0203] 공통 프라이머로 마이코박테리아(mycobacteria)의 16S rRNA 유전자 부위를 증폭하고 결핵균(MTC: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*)과 항산성비결핵균(NTM)을 특이적으로 구별할 수 있는 16S rRNA 염기부위를 Taqman 프로브로 사용하였다. 상기 검출대상 부위용 Taqman 프로브는 primer3 프로그램을 사용

하여 설계하였다.

[0204] (1) 공통 프라이머(대상 유전자: 16S rRNA)

[0205] a. 정방향 프라이머: 5′ -ggataagcytgggaaactgg-3′ (염기서열 24)

[0206] *b. 역방향 프라이머: 5′ -accccaccaacwagctgata-3 ′ (염기서열 25)

[0207] (2) Taqman 프로브(대상 유전자: 16S rRNA)

[0208] a. 결핵균(MTC) Taqman 프로브

[0209] 5′ -VIC-tggtggaaagcgcttta-MGB-3′ (염기서열 26)

[0210] b. 항산성비결핵균 Taqman 프로브

[0211] NTM-1: 5′ -FAM-tggtggaaagcttttgc-MGB-3′ (염기서열 27)

[0212] NTM-2: 5′ -FAM-tggaaagygtttggtagc-MGB-3′ (염기서열 28)

[0213] 2. 이중 실시간 중합효소연쇄반응법

[0214] (1) DNA의 분리

[0215] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주, 마이코박테리아 표준 균주 7주를 사용하였다. 사용된 ATCC 표준균주는 *M. tuberculosis* (ATCC 25177), *M. intracellulare* (ATCC 13950), *M. scrofulaceum* (ATCC 19981), *M. kansasii* (ATCC 12478), *M. fortuitum* (ATCC 6841), *M. abscessus* (ATCC 19977), *M. avium* (ATCC 25291)이었다.

[0216] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주, 마이코박테리아 표준 균주 7주를 사용하였다. 사용된 ATCC 표준균주는 *M. tuberculosis* (ATCC 25177), *M. intracellulare* (ATCC 13950), *M. scrofulaceum* (ATCC 19981), *M. kansasii* (ATCC 12478), *M. fortuitum* (ATCC 6841), *M. abscessus* (ATCC 19977), *M. avium* (ATCC 25291)이었다.

[0217] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주는 액체배지(MGIT 마이코박테리아 배지)나 고체(Ogawa 배지)배지에서 검출되었거나 객담검체에서 직접 검출된 균주이었다. ATCC 표준균주는 액체배지에서 배양하여 사용하였다.

[0218] 액체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 균이 배양된 MGIT 마이코박테리아 배양튜브를 잘 섞은 후에 액체 배지 500㎕를 취해 1.5㎖ 튜브에 넣고 14,000 rpm로 5분간 원심분리 시켰다. 원심분리 후 상층액은 버리고 남은 침사부분에 멸균증류수 300㎕ 넣고 끓는 물에 10분간 중탕 가열하였다. 중탕 가열 후 14,000 rpm로 5분간 원심분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0219] 고체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 1.5㎖튜브에 멸균증류수 500㎕넣고 고체배지에서 1 백금이를 취해 멸균증류수에 풀었다. 이 튜브를 끓는 물에 10분간 중탕 가열한 후 14,000 rpm에서 5분간 원심 분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0220] 객담검체는 다음과 같이 처리하였다. 15㎖ 혹은 50㎖ 튜브에 담긴 객담량과 동일한 량의 1N NaOH를 첨가하여 10분간 방치하여 객담을 액화시켰다. 14,000rpm에서 2분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 남아 있는 침전물에 멸균증류수 1㎖를 넣고 10초간 잘 섞은 후 14,000rpm으로 2분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 남아 있는 침전물에 멸균증류 1㎖를 넣고 10초간 잘 섞은 후 14,000rpm에서 2분간 원심 분리 한 후 상층액을 버렸다. 상층액을 제거하고 남아 있는 침전물에 5% chelex 수지(Biorad, USA) 100㎕와 10mg/㎖ proteinase K 1㎕를 넣고 잘 섞어 주었다. 56℃에서 15분간 방치한 후 잘 혼합하여 끓은 물에 10분간 중탕 가열하였다. 중탕 가열 후 14,000 rpm 5분간 원심 분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0221] (2) 이중 실시간 중합효소연쇄반응법

[0222] Rotor-Gene multiplex PCR Kit (QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 사용하여 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 이중 실시간 중합효소연쇄반응은 Rotor-Gene Q(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)을 이용하였다. 약 95℃에서 약 5분간 변성 공정을 1 사이클(cycle), 약 95℃에서 약 15초 간 변성, 약 66℃에서 약 15초

간 어닐링 및 연장 공정을 1 싸이클로 하여, 40 싸이클을 수행하였다. 이때, 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하는 반응물의 조성은 하기 표 3과 같다. 하기 primer-probes Mix에는 마이코박테리아의 공통프라이머의 정방향 프라이머와 역방향 프라이머가 동일한 량(10pmole/㎕)으로 들어 있었고 MTC 프로브, NTM-1 프로브 및 NTM-2 프로브가 각각 4pmole/㎕씩 들어 있었다. 따라서, 반응에 사용되는 primer-probes mix 1.25㎕에는 공통 프라이머의 정방향 및 역방향 프라이머가 각각 12.5pmole이 되고 MTC, NTM-1, NTM-2 프로브가 각각 5pmole씩 들어있었다. 이에 따라, 총 25㎕의 중합연쇄반응을 수행하는 반응물의 총부피가 25㎕이니 primer의 농도는 0.5uM(12.5pmole/25㎕), MTC, NTM-1, NTM-2의 프로브는 0.2uM(5pmole/25㎕)의 농도를 가지도록 설계하였다. 이때, 마이코박테리아의 염기서열 24의 정방향 프라이머는 5′-ggataagcctgggaaactgg-3′ (염기서열 29)과 5′-ggataagcttgggaaactgg-3′ (염기서열 30)이 동량인 6.25pmole씩 존재하도록 설계되었다. 또한, 염기서열 25의 역방향 프라이머는 5′-accccaccaacaagctgata-3′ (염기서열 31)과 5′-accccaccaactagctgata-3′ (염기서열 32)이 동량인 6.25pmole씩 존재하도록 설계되었다. 또한, NTM-2 프로브인 염기서열 28의 프로브는 5′-FAM-tggaaagcgtttggtagc-MGB-3′ (염기서열 33)과 5′-FAM-tggaaagtgtttggtagc-MGB-3′ (염기서열 34)이 동량인 2.5pmole씩 존재하도록 설계되었다.

표 3

[0223]

성분		부피(㎕)	농도
2X Rotor-Gene Multiplex PCR Master Mix		12.5	1X
Primers-Probes Mix	프라이머(10pmole/㎕)	1.25	0.5uM
	프로브(4pmole/㎕)		0.2uM
Nuclease free water		6.25	-
샘플 DNA template		5	-
전체		25	-

[0224] 이중 실시간 중합효소연쇄반응 중 결합 및 연장단계에서 프로브에 의해 생성된 형광을 Rotor-Gene Q(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)에서 측정한다. 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응 방법은 DNA 중합효소와 형광공명 에너지이동(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)의 원리에 의해 실시간 중합효소연쇄반응의 매 주기마다 실시간으로 시행되는 형광을 검출하고 정량하는 방법이다. 실시간 모니터 상에서 FAM™ 이 발색되는 경우 녹색채널(510±5nm), VIC™이 발색되는 경우 노랑채널(555±5nm)에서 표시하도록 지정하였다. 녹색채널(green channel)과 노랑채널(Yellow channel)에서 형광을 관찰하였다.

[0225] 3. 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 수행 결과

[0226] 도 7a 내지 도 9b는 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻은 결과를 나타낸다. 상기 그래프들에서, x축은 중합효소연쇄반응의 싸이클 수이고 y축은 형광세기(fluoresence, F)이다. 도 7a 및 도 7b는 각각 결핵균(MTC)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 8a 및 도 8b는 각각 항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 9a 및 도 9b는 각각 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

[0227] 도 7a 내지 도 9b를 참조하면, 결핵균(MTC)은 노랑채널에서, 항산성비결핵균(NTM)은 녹색채널에서, 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)은 각각 녹색채널과 노랑채널에서 16S rRNA 유전자의 발현을 확인하여, 본 발명에 의한 프라이머 및 프로브를 이용할 경우, 이중 실시간 중합효소연쇄반응법으로 임상 검체에서 결핵균과 항산성비결핵균을 동시에 높은 신뢰성을 가지고 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0228] 실시예 4: 결핵균과 항산성비결핵균의 분리검출 방법 4

[0229] 1. 검출대상 부위 및 프라이머 설계

[0230] 결핵균(Mycobacterium tuberculosis complex, MTC: *M. tuberculosis*, M.bovis, *M. africanum*, *M. microti*)은 IS6110 유전자를 검출 대상으로 하고, 항산성비결핵균(NTM)은 16S rRNA 유전자를 검출대상으로 하여 Taqman 프

로브와 프라이머를 사용하였다. 상기 검출대상 부위용 프라이머는 Primer3 프로그램을 이용하여 설계하였다.

[0231] (1) 결핵균(MTC)

[0232] 1) 대상 유전자: IS6110

[0233] 2) 프라이머

[0234] a. 정방향 프라이머: 5′ -cgaactcaaggagcacatca-3′ (염기서열 1)

[0235] b. 역방향 프라이머: 5′ -cagggttagccacactttgc-3′ (염기서열 20)

[0236] 3) Taqman 프로브

[0237] 5′ -HEX-cgccaactacggtgtttacggtg-BHQ1-3′ (염기서열 21)

[0238] 4) PCR 산물의 크기: 79bp

[0239] (2) 항산성비결핵균(NTM)

[0240] 1) 대상유전자: 16S rRNA

[0241] 2) 프라이머

[0242] a. 정방향 프라이머: 5′ -catgtyttstggkgsaaagctt-3′ (염기서열 35)

[0243] b. 역방향 프라이머: 5′ -cgtaggagtctgggccgta-3′ (염기서열 36)

[0244] 3) Taqman 프로브

[0245] FAM-tagccggcctgagagggtg-BHQ1 (염기서열 37) 또는 FAM-cctgagagggtgwccggcc-BHQ1 (염기서열 38) 또는 FAM-cgggtagccggcctgagag-BHQ1 (염기서열 39)

[0246] 4) PCR 산물의 크기: 152bp

[0247] <실시예 4-1. 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 37의 Taqman 프로브를 사용하는 이중 실시간 중합효소 연쇄반응법>

[0248] (1) DNA의 분리

[0249] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주, 마이코박테리아 표준 균주 68주를 사용하였다. 사용된 표준균주는 *M. abscessus* ATCC 19977, *M. acapulcensis* KCTC 9501, *M. africanum* ATCC 25420, *M. agri* KCTC 9502, *M. alvei* KCTC 19709, *M. asiaticum* KCTC 9503, *M. aurum* KCTC 19457, *M. austroafricanum* KCTC 9504, *M. avium* ATCC 25291, *M. bolletii* KCTC 19281, *M. botniense* KCTC 19646, *M. bovis* ATCC 19210, *M. brumae* KCTC 19711, *M. celatum* ATCC 51131, *M. chelonae subsp chelonae* KCTC 9505, *M. chlorophenolicum* KCTC 19089, *M. chubuense* KCTC 19712, *M. diernhoferi* KCTC 9506, *M. fallax* KCTC 9508, *M. flavescens* ATCC 14474, *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. frederiksbergense* KCTC 19100, *M. gadium* ATCC 27726, *M. gastri* ATCC 15754, *M. gilvum* KCTC 19423, *M. goodii* ATCC BAA-955, *M. gordonae* KCTC 9513, *M. haemophilum* ATCC 29548, *M. hassiacum* ATCC 700660, *M. interjectum* ATCC 51457, *M. intermedium* ATCC 51848, *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. intracellulare* KCTC 9514, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. lentiflavum* KMRC 70087, *M. malmoense* ATCC 29571, *M. mantobense* KCTC 9977, *M. marinum* ATCC 927, *M. massiliense* KCTC 19086, *M. microti* ATCC 19422, *M. moriokaense* KCTC 9516, *M. mucogenicum* KCTC 19088, *M. neoaurum* KCTC 19096, *M. nonchromogenicum* ATCC 19530, *M. obuense* KCTC 19097, *M. parascrofulaceum* KCTC 9979, *M. peregrinum* KCTC 9615, KMRC 75002, *M. phlei* KCTC 9689, *M. porcinum* KCTC 9517, *M. pulveris* KCTC 9518, *M. scrofulaceum* ATCC 19981, *M. septicum* ATCC 700731, *M. simiae* ATCC 25275, *M. shimoidei* ATCC 27962, *M. smegmatis* KCTC 9108, *M. szulgai* KCTC 9520, KMRC 31125, *M. terrae* KCTC 9614, *M. triplex* ATCC 700071, *M. triviale* KMRC 70093, *M. tuberculosis* ATCC 25177, ATCC 27294, *M. ulcerans* ATCC 19423, *M. vaccae* KCTC 19087, *M. vanbaalenii* KCTC 9966, *M. wolinskyi* ATCC 700010, *M. xenopi* KMRC 42001이었다.

[0250] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주는 액체배지(MGIT 마이코박테리아 배지)나 고체(Ogawa 배지)배지에서 검출되었거나 객담검체에서 직접 검출된 균주이었다. ATCC, KCTC 균주는 액체배지에서 배양하여 사용하였고, KMRC 균주는 고체배지에서 배양하여 사용하였다.

[0251] 액체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 균이 배양된 MGIT 마이코박테리아 배양튜브를 잘 섞은 후에 액체 배지 500㎕를 취해 1.5㎖ 튜브에 넣고 14,000 rpm로 5분간 원심분리 시켰다. 원심분리 후 상층액은 버리고 남은 침사부분에 멸균증류수 300㎕ 넣고 끓는 물에 10분간 중탕 가열하였다. 중탕 가열 후 14,000 rpm로 5분간 원심분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0252] *고체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 1.5㎖튜브에 멸균증류수 500㎕넣고 고체배지에서 1 백금이를 취해 멸균증류수에 풀었다. 이 튜브를 끓는 물에 10분간 중탕 가열한 후 14,000 rpm에서 5분간 원심 분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0253] 객담검체는 다음과 같이 처리하였다. 15㎖ 혹은 50㎖ 튜브에 담긴 객담량과 동일한 량의 1N NaOH를 첨가하여 10분간 방치하여 객담을 액화시켰다. 14,000rpm에서 2분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 남아 있는 침전물에 멸균증류수 1㎖를 넣고 10초간 잘 섞은 후 14,000rpm으로 2분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 남아 있는 침전물에 멸균증류 1㎖를 넣고 10초간 잘 섞은 후 14,000rpm에서 2분간 원심 분리 한 후 상층액을 버렸다. 상층액을 제거하고 남아 있는 침전물에 5% chelex 수지(Biorad, USA) 100㎕와 10mg/㎖ proteinase K 1㎕를 넣고 잘 섞어 주었다. 56℃에서 15분간 방치한 후 잘 혼합하여 끓은 물에 10분간 중탕 가열하였다. 중탕 가열 후 14,000 rpm 5분간 원심 분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0254] (2) 이중 실시간 중합효소연쇄반응법

[0255] Rotor-Gene multiplex PCR Kit (QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 사용하여 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 이중 실시간 중합효소연쇄반응은 Rotor-Gene Q(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)을 이용하였다. 약 95℃에서 약 5분간 변성 공정을 1 사이클(cycle), 약 95℃에서 약 12초 간 변성, 약 63℃에서 약 12초 간 어닐링 및 연장 공정을 1 싸이클로 하여, 40 싸이클을 수행하였다. 이때, 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하는 반응물의 조성은 하기 표 4와 같다. 하기 primer-probes Mix에는 정방향 프라이머와 역방향 프라이머가 동일한 량(10pmole/㎕)으로 들어 있고 프루브는 4pmole/㎕이 있었다. 따라서 반응에 사용되는 MTC의 primer-probes mix 1.25㎕에는 정방향 및 역방향 프라이머가 각각 12.5pmole이 되고 프로브는 5pmole이 들어 있게 되었다. 총 25㎕의 중합연쇄반응을 수행하는 반응물의 총부피가 25㎕이니 primer의 농도는 0.5uM(12.5pmoles/25㎕), 프로브는 0.2uM(5pmole/25㎕)가 사용되었다. NTM의 정방향 및 역방향 프라이머, 프로브의 농도는 MTC와 동일하게 사용되었다. 이 때, NTM 정방향 프라이머(염기서열 35)는 5′ -catgtcttgtgggggaaagctt-3′ (염기서열 40), 5′ -catgttttgtgggggaaagctt-3′ (염기서열 41), 5′ -catgtcttctgggggaaagctt-3′ (염기서열 42), 5′ -catgtcttgtggtggaaagctt-3′ (염기서열 43), 5′ -catgtcttgtggggcaaagctt-3′ (염기서열 44), 5′ -catgttttctgggggaaagctt-3′ (염기서열 45), 5′ -catgtcttctggtggaaagctt-3′ (염기서열 46), 5′ -catgtcttgtggtgcaaagctt-3′ (염기서열 47), 5′ -catgttttgtggggcaaagctt-3′ (염기서열 48), 5′ -catgtcttctggggcaaagctt-3′ (염기서열 49), 5′ -catgttttgtggtggaaagctt-3′ (염기서열 50), 5′ -catgttttctggtggaaagctt-3′ (염기서열 51), 5′ -catgttttctggggcaaagctt-3′ (염기서열 52), 5′ -catgttttgtggtgcaaagctt-3′ (염기서열 53), 5′ -catgtcttctggtgcaaagctt-3′ (염기서열 54) 및 5′ -catgttttctggtgcaaagctt-3′ (염기서열 55)이 약 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1로 동량으로 존재하였다.

표 4

[0256]

성분		부피(㎕)	농도
2X Rotor-Gene Multiplex PCR Master Mix		12.5	1X
Primers-Probes Mix	프라이머(10pmole/㎕)	1.25	0.5uM
	프로브(4pmole/㎕)		0.2uM
Nuclease free water		6.25	-
샘플 DNA template		5	-
전체		25	-

[0257] 이중 실시간 중합효소연쇄반응 중 결합 및 연장단계에서 프로브에 의해 생성된 형광을 Rotor-Gene Q(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)에서 측정한다. 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응 방법은 DNA 중합효소와 형광공명 에너지이동(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)의 원리에 의해 실시간 중합효소연쇄반응의 매

주기마다 실시간으로 시행되는 형광을 검출하고 정량하는 방법이다. 실시간 모니터 상에서 FAM™ 이 발색되는 경우 녹색채널(510±5nm), Hex™이 발색되는 경우 노랑채널(555±5nm)에서 표시하도록 지정하였다. 녹색채널(green channel)과 노랑채널(Yellow channel)에서 형광을 관찰하였다.

[0258] <실시예 4-2. 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 38의 Taqman 프로브를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법>

[0259] 실시예 4-1과 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 38의 Taqman 프로브를 사용하는 것을 제외하고 실질적으로 동일한 방법으로 이중 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하였다. 염기서열 38의 프로브는 FAM-cctgagagggtgaccggcc-BHQ1 (염기서열 56) 및 FAM-cctgagagggtgtccggcc-BHQ1 (염기서열 57)이 동량으로 존재하도록 설계된 것이다.

[0260] <실시예 4-3. 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 39의 Taqman 프로브를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법>

[0261] 실시예 4-1과 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 39의 Taqman 프로브를 사용하는 것을 제외하고 실질적으로 동일한 방법으로 이중 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하였다.

[0262] 2. 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 수행 결과

[0263] 도 10a 내지 도 12b는 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻은 결과를 나타낸다. 상기 그래프들에서, x축은 중합효소연쇄반응의 싸이클 수이고 y축은 형광세기(fluoresence, F)이다. 도 10a 및 도 10b는 각각 결핵균(MTC)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 11a 및 도 11b는 각각 항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 12a 및 도 12b는 각각 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

[0264] 도 10a 내지 도 12b를 참조하면, 결핵균(MTC)은 노랑채널에서 IS6110 유전자, 항산성비결핵균(NTM)은 녹색채널에서 16S rRNA 유전자, 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)은 각각 노랑채널과 녹색채널에서 IS6110 유전자와 16S rRNA 유전자가 특이적으로 증폭되는 결과를 나타내어, 본 발명에 의한 프라이머 및 프로브를 이용할 경우, 이중 실시간 중합효소연쇄반응법으로 임상 검체에서 결핵균과 항산성비결핵균을 동시에 높은 신뢰성을 가지고 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0265] 실시예 5: 결핵균과 항산성비결핵균의 분리검출 방법 5

[0266] 1. 검출대상 부위 및 프라이머 설계

[0267] 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTC: *M. tuberculosis*, M.bovis, *M. africanum*, *M. microti*)은 IS6110 유전자를 검출 대상으로 하고, 항산성비결핵균(NTM)은 16S rRNA 유전자를 검출대상으로 하여 Taqman 프로브와 프라이머를 사용하였다. 상기 검출대상 부위용 프라이머는 Primer3 프로그램을 이용하여 설계하였다.

[0268] (1) 결핵균(MTC)

[0269] 1) 대상 유전자: IS6110

[0270] 2) 프라이머

[0271] a. 정방향 프라이머: 5′ -cgaactcaaggagcacatcag-3′ (염기서열 58)

[0272] b. 역방향 프라이머: 5′ -gagtttggtcatcagccgttc-3′ (염기서열 59)

[0273] 3) Taqman 프로브

[0274] 5′ -HEX-cgccaactacggtgtttacggtg-BHQ1-3′ (염기서열 21) 또는

[0275] 5′ -VIC-agtgtggctaaccctgaac-MGB-3′ (염기서열 60)

[0276] 4) PCR 산물의 크기: 136bp

[0277] (2) 항산성비결핵균(NTM)

[0278] 1) 대상유전자: 16S rRNA

[0279] 2) 프라이머

[0280] a. 정방향 프라이머: 5′ -tggcgaacgggtgagtaa-3′ (염기서열 61)

[0281] b. 역방향 프라이머

[0282] 5′ -cccacaccgcaaaagctt-3′ (염기서열 5)

[0283] 5′ -catcccacaccgctaccw-3′ (염기서열 8)

[0284] 3) Taqman 프로브

[0285] 5′ -FAM-cggtattagacccagtttcccagg-BHQ1-3′ (염기서열 62) 또는

[0286] 5′ -FAM-tgggaaactgggtctaatac-MGB-3′ (염기서열 63)

[0287] 4) PCR 산물의 크기: 127bp

[0288] <실시예 5-1. 결핵균(MTC) 검출용 프로브로 염기서열 21의 Taqman 프로브를 사용하고, 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 62의 Taqman 프로브를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법>

[0289] (1) DNA의 분리

[0290] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주, 마이코박테리아 표준 균주 68주를 사용하였다. 사용된 표준균주는 *M. abscessus* ATCC 19977, *M. acapulcensis* KCTC 9501, *M. africanum* ATCC 25420, *M. agri* KCTC 9502, *M. alvei* KCTC 19709, *M. asiaticum* KCTC 9503, *M. aurum* KCTC 19457, *M. austroafricanum* KCTC 9504, *M. avium* ATCC 25291, *M. bolletii* KCTC 19281, *M. botniense* KCTC 19646, *M. bovis* ATCC 19210, *M. brumae* KCTC 19711, *M. celatum* ATCC 51131, *M. chelonae subsp chelonae* KCTC 9505, *M. chlorophenolicum* KCTC 19089, *M. chubuense* KCTC 19712, *M. diernhoferi* KCTC 9506, *M. fallax* KCTC 9508, *M. flavescens* ATCC 14474, *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. frederiksbergense* KCTC 19100, *M. gadium* ATCC 27726, *M. gastri* ATCC 15754, *M. gilvum* KCTC 19423, *M. goodii* ATCC BAA-955, *M. gordonae* KCTC 9513, *M. haemophilum* ATCC 29548, *M. hassiacum* ATCC 700660, *M. interjectum* ATCC 51457, *M. intermedium* ATCC 51848, *M. intracellulare* ATCC 13950, *M. intracellulare* KCTC 9514, *M. kansasii* ATCC 12478, *M. lentiflavum* KMRC 70087, *M. malmoense* ATCC 29571, *M. mantobense* KCTC 9977, *M. marinum* ATCC 927, *M. massiliense* KCTC 19086, *M. microti* ATCC 19422, *M. moriokaense* KCTC 9516, *M. mucogenicum* KCTC 19088, *M. neoaurum* KCTC 19096, *M. nonchromogenicum* ATCC 19530, *M. obuense* KCTC 19097, *M. parascrofulaceum* KCTC 9979, *M. peregrinum* KCTC 9615, KMRC 75002, *M. phlei* KCTC 9689, *M. porcinum* KCTC 9517, *M. pulveris* KCTC 9518, *M. scrofulaceum* ATCC 19981, *M. septicum* ATCC 700731, *M. simiae* ATCC 25275, *M. shimoidei* ATCC 27962, *M. smegmatis* KCTC 9108, *M. szulgai* KCTC 9520, KMRC 31125, *M. terrae* KCTC 9614, *M. triplex* ATCC 700071, *M. triviale* KMRC 70093, *M. tuberculosis* ATCC 25177, ATCC 27294, *M. ulcerans* ATCC 19423, *M. vaccae* KCTC 19087, *M. vanbaalenii* KCTC 9966, *M. wolinskyi* ATCC 700010, *M. xenopi* KMRC 42001이었다.

[0291] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주는 액체배지(MGIT 마이코박테리아 배지)나 고체(Ogawa 배지)배지에서 검출되었거나 객담검체에서 직접 검출된 균주이었다. ATCC, KCTC 균주는 액체배지에서 배양하여 사용하였고, KMRC 균주는 고체배지에서 배양하여 사용하였다.

[0292] 액체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 균이 배양된 MGIT 마이코박테리아 배양튜브를 잘 섞은 후에 액체 배지 500㎕를 취해 1.5㎖ 튜브에 넣고 14,000 rpm로 5분간 원심분리 시켰다. 원심분리 후 상층액은 버리고 남은 침사부분에 멸균증류수 300㎕ 넣고 끓는 물에 10분간 중탕 가열하였다. 중탕 가열 후 14,000 rpm로 5분간 원심분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0293] 고체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 1.5㎖튜브에 멸균증류수 500㎕넣고 고체배지에서 1 백금이를 취해 멸균증류수에 풀었다. 이 튜브를 끓는 물에 10분간 중탕 가열한 후 14,000 rpm에서 5분간 원심 분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0294] 객담검체는 다음과 같이 처리하였다. 15㎖ 혹은 50㎖ 튜브에 담긴 객담량과 동일한 량의 1N NaOH를 첨가하여 10분간 방치하여 객담을 액화시켰다. 14,000rpm에서 2분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 남아 있는 침전물에 멸균증류수 1㎖를 넣고 10초간 잘 섞은 후 14,000rpm으로 2분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 남아 있는 침전물에 멸균증류 1㎖를 넣고 10초간 잘 섞은 후 14,000rpm에서 2분간 원심 분리 한 후 상층액을 버렸다. 상층액을 제거하고 남아 있는 침전물에 5% chelex 수지(Biorad, USA) 100㎕와 10㎎/㎖ proteinase K 1㎕를 넣고 잘 섞어 주었다. 56℃에서 15분간 방치한 후 잘 혼합하여 끓은 물에 10분간 중탕 가열하였다. 중탕 가열 후 14,000 rpm 5분간 원심 분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0295] (2) 이중 실시간 중합효소연쇄반응법

[0296] Rotor-Gene multiplex PCR Kit (QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 사용하여 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 이중 실시간 중합효소연쇄반응은 Rotor-Gene Q(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)을 이용하였다. 약 95℃에서 약 5분간 변성 공정을 1 사이클(cycle), 약 95℃에서 약 15초 간 변성, 약 65℃에서 약 15초 간 어닐링 및 연장 공정을 1 싸이클로 하여, 40 싸이클을 수행하였다. 이때, 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하는 반응물의 조성은 하기 표 5와 같다. 하기 primer-probes Mix에는 정방향 프라이머와 역방향 프라이머가 동일한 량(10pmole/㎕)으로 들어 있고 프루브는 4pmole/㎕이 있었다. 따라서 반응에 사용되는 MTC의 primer-probes mix 1.25㎕에는 정방향 및 역방향 프라이머가 각각 12.5pmole이 되고 프로브는 5pmole이 들어 있게 되었다. 총 25uL의 중합연쇄반응을 수행하는 반응물의 총부피가 25㎕이니 primer의 농도는 0.5uM(12.5pmoles/25㎕), 프로브는 0.2uM(5pmole/25㎕)가 사용되었다. NTM의 정방향 및 역방향 프라이머, 프로브의 농도는 MTC와 동일하게 사용되었다.

표 5

[0297]

성분		부피(㎕)	농도
2X Rotor-Gene Multiplex PCR Master Mix		12.5	1X
Primers-Probes Mix	프라이머(10pmole/㎕)	1.25	0.5uM
	프로브(4pmole/㎕)		0.2uM
Nuclease free water		6.25	-
샘플 DNA template		5	-
전체		25	-

[0298] 이중 실시간 중합효소연쇄반응 중 결합 및 연장단계에서 프로브에 의해 생성된 형광을 Rotor-Gene Q(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)에서 측정한다. 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응 방법은 DNA 중합효소와 형광공명 에너지이동(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)의 원리에 의해 실시간 중합효소연쇄반응의 매 주기마다 실시간으로 시행되는 형광을 검출하고 정량하는 방법이다. 실시간 모니터 상에서 FAM™ 이 발색되는 경우 녹색채널(510±5nm), Hex™나 VIC™이 발색되는 경우 노랑채널(555±5nm)에서 표시하도록 지정하였다. 녹색채널(green channel)과 노랑채널(Yellow channel)에서 형광을 관찰하였다.

[0299] <실시예 5-2. 결핵균(MTC) 검출용 프로브로 염기서열 21의 Taqman 프로브를 사용하고, 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 63의 Taqman 프로브를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법>

[0300] 실시예 5-1과 결핵균(MTC) 검출용 프로브로 염기서열 21의 Taqman 프로브를 사용하고, 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 63의 Taqman 프로브를 사용하는 것을 제외하고 실질적으로 동일한 방법으로 이중 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하였다.

[0301] <실시예 5-3. 결핵균(MTC) 검출용 프로브로 염기서열 60의 Taqman 프로브를 사용하고, 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 62의 Taqman 프로브를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법>

[0302] 실시예 5-1과 결핵균(MTC) 검출용 프로브로 염기서열 60의 Taqman 프로브를 사용하고, 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 62의 Taqman 프로브를 사용하는 것을 제외하고 실질적으로 동일한 방법으로 이중 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하였다.

[0303] <실시예 5-4. 결핵균(MTC) 검출용 프로브로 염기서열 60의 Taqman 프로브를 사용하고, 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 63의 Taqman 프로브를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법>

[0304] 실시예 5-1과 결핵균(MTC) 검출용 프로브로 염기서열 60의 Taqman 프로브를 사용하고, 항산성비결핵균 검출용

프로브로 염기서열 63의 Taqman 프로브를 사용하는 것을 제외하고 실질적으로 동일한 방법으로 이중 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하였다.

[0305] 2. 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 수행 결과

[0306] 도 13a 내지 도 15b는 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻은 결과를 나타낸다. 상기 그래프들에서, x축은 중합효소연쇄반응의 싸이클 수이고 y축은 형광세기(fluoresence, F)이다. 도 13a 및 도 13b는 각각 결핵균(MTC)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 14a 및 도 14b는 각각 항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 15a 및 도 15b는 각각 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

[0307] 도 13a 내지 도 15b를 참조하면, 결핵균(MTC)은 노랑채널에서 IS6110 유전자, 항산성비결핵균(NTM)은 녹색채널에서 16S rRNA 유전자, 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)은 각각 노랑채널과 녹색채널에서 IS6110 유전자와 16S rRNA 유전자가 특이적으로 증폭되는 결과를 나타내어, 본 발명에 의한 프라이머 및 프로브를 이용할 경우, 이중 실시간 중합효소연쇄반응법으로 임상 검체에서 결핵균과 항산성비결핵균을 동시에 높은 신뢰성을 가지고 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0308] 실시예 6: 결핵균과 항산성비결핵균의 분리검출 방법 6

[0309] 1. 검출대상 부위 및 프라이머 설계

[0310] 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTC: *M. tuberculosis*, M.bovis, *M. africanum*, *M. microti*)은 IS6110 유전자를 검출 대상으로 하고, 항산성비결핵균(NTM)은 16S rRNA 유전자를 검출대상으로 하여 Taqman 프로브와 프라이머를 사용하였다. 상기 검출대상 부위용 프라이머는 Primer3 프로그램을 이용하여 설계하였다.

[0311] (1) 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTC)

[0312] 1) 대상 유전자: IS6110

[0313] 2) 프라이머

[0314] a. 정방향 프라이머: 5′ -cgaactcaaggagcacatcag-3′ (염기서열 58)

[0315] b. 역방향 프라이머: 5′ -cagggttagccacactttgc-3′ (염기서열 20)

[0316] 3) Taqman 프로브

[0317] 5′ -Hex-cgccaactacggtgtttacggtg-BHQ1-3′ (염기서열 21) 또는

[0318] 5′ -VIC-ctacggtgtttacggtgc-MGB-3′ (염기서열 64)

[0319] 4) PCR 산물의 크기: 79bp

[0320] (2) 항산성비결핵균(Nontuberculous mycobacteria, NTM)

[0321] 1) 대상유전자: 16S rRNA

[0322] 2) 프라이머

[0323] a. 정방향 프라이머

[0324] NTM-1: 5′ -tktggtggaaagcttttgc-3′ (염기서열 65)

[0325] NTM-2: 5′ -ggtgwgtggtgcaaagctt-3′ (염기서열 66)

[0326] NTM-3: 5′ -tggtggaaagcgtttggt-3′ (염기서열 67)

[0327] b. 역방향 프라이머: 5′ -cgtaggagtctgggccgta-3′ (염기서열 36)

[0328] 3) Taqman 프로브

[0329] 5′ -FAM-cgggtagccggcctgagag-BHQ1-3′ (염기서열 39) 또는

[0330] 5′ -FAM-cctgagagggtgwccg-MGB-3′ (염기서열 68)

[0331] 4) PCR 산물의 크기: 146bp ~ 148bp

[0332] <실시예 6-1. 결핵균(MTC) 검출용 프로브로 염기서열 21의 Taqman 프로브를 사용하고, 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 39의 Taqman 프로브를 사용하는 이중 중합효소연쇄반응법>

[0333] (1) DNA의 분리

[0334] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주, 마이코박테리아 표준 균주 68주를 사용하였다. 사용된 표준균주는 실시예 5-1에서 언급한 것과 실질적으로 동일하다.

[0335] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주는 액체배지(MGIT 마이코박테리아 배지)나 고체(Ogawa 배지)배지에서 검출되었거나 객담검체에서 직접 검출된 균주이었다. ATCC, KCTC 균주는 액체배지에서 배양하여 사용하였고, KMRC 균주는 고체배지에서 배양하여 사용하였다.

[0336] 액체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 균이 배양된 MGIT 마이코박테리아 배양튜브를 잘 섞은 후에 액체 배지 500㎕를 취해 1.5㎖ 튜브에 넣고 14,000 rpm로 5분간 원심분리 시켰다. 원심분리 후 상층액은 버리고 남은 침사부분에 멸균증류수 300㎕ 넣고 끓는 물에 10분간 중탕 가열하였다. 중탕 가열 후 14,000 rpm로 5분간 원심분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0337] 고체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 1.5㎖튜브에 멸균증류수 500㎕넣고 고체배지에서 1 백금이를 취해 멸균증류수에 풀었다. 이 튜브를 끓는 물에 10분간 중탕 가열한 후 14,000 rpm에서 5분간 원심 분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0338] 객담검체는 다음과 같이 처리하였다. 15㎖ 혹은 50㎖ 튜브에 담긴 객담량과 동일한 량의 1N NaOH를 첨가하여 10분간 방치하여 객담을 액화시켰다. 14,000rpm에서 2분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 남아 있는 침전물에 멸균증류수 1㎖를 넣고 10초간 잘 섞은 후 14,000rpm으로 2분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 남아 있는 침전물에 멸균증류 1㎖를 넣고 10초간 잘 섞은 후 14,000rpm에서 2분간 원심 분리 한 후 상층액을 버렸다. 상층액을 제거하고 남아 있는 침전물에 5% chelex 수지(Biorad, USA) 100㎕와 10mg/㎖ proteinase K 1㎕를 넣고 잘 섞어 주었다. 56℃에서 15분간 방치한 후 잘 혼합하여 끓은 물에 10분간 중탕 가열하였다. 중탕 가열 후 14,000 rpm 5분간 원심 분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0339] (2) 이중 실시간 중합효소연쇄반응법

[0340] Rotor-Gene multiplex PCR Kit (QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 사용하여 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 이중 실시간 중합효소연쇄반응은 Rotor-Gene Q(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)을 이용하였다. 약 95℃에서 약 5분간 변성 공정을 1 사이클(cycle), 약 95℃에서 약 15초 간 변성, 약 64℃에서 약 15초 간 어닐링 및 연장 공정을 1 싸이클로 하여, 40 싸이클을 수행하였다. 이때, 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하는 반응물의 조성은 하기 표 6과 같다. 하기 primer-probes Mix에는 정방향 프라이머와 역방향 프라이머가 동일한 량(10pmole/㎕)으로 들어 있고 프루브는 4pmole/㎕이 있었다. 따라서 반응에 사용되는 MTC의 primer-probes mix 1.25㎕에는 정방향 및 역방향 프라이머가 각각 12.5pmole이 되고 프로브는 5pmole이 들어 있게 되었다. 총 25uL의 중합연쇄반응을 수행하는 반응물의 총부피가 25㎕이니 primer의 농도는 0.5uM(12.5pmoles/25㎕), 프로브는 0.2uM(5pmole/25㎕)가 사용되었다. NTM의 정방향 및 역방향 프라이머, 프로브의 농도는 MTC와 동일하게 사용되었다.

표 6

[0341]

성분		부피(㎕)	농도
2X Rotor-Gene Multiplex PCR Master Mix		12.5	1X
Primers-Probes Mix	프라이머(10pmole/㎕)	1.25	0.5uM
	프로브(4pmole/㎕)		0.2uM
Nuclease free water		6.25	-
샘플 DNA template		5	-
전체		25	-

[0342] 이중 실시간 중합효소연쇄반응 중 결합 및 연장단계에서 프로브에 의해 생성된 형광을 Rotor-Gene Q(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)에서 측정한다. 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응 방법은 DNA 중합효소와 형광공명 에너지이동(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)의 원리에 의해 실시간 중합효소연쇄반응의 매 주기마다 실시간으로 시행되는 형광을 검출하고 정량하는 방법이다. 실시간 모니터 상에서 FAM™ 이 발색되는 경우 녹색채널(510±5nm), Hex™나 VIC™이 발색되는 경우 노랑채널(555±5nm)에서 표시하도록 지정하였다. 녹색채널(green channel)과 노랑채널(Yellow channel)에서 형광을 관찰하였다.

[0343] <실시예 6-2. 결핵균(MTC) 검출용 프로브로 염기서열 21의 Taqman 프로브를 사용하고, 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 68의 Taqman 프로브를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법>

[0344] 실시예 6-1과 결핵균(MTC) 검출용 프로브로 염기서열 21의 Taqman 프로브를 사용하고, 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 68의 Taqman 프로브를 사용하는 것을 제외하고 실질적으로 동일한 방법으로 이중 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하였다.

[0345] <실시예 6-3. 결핵균(MTC) 검출용 프로브로 염기서열 64의 Taqman 프로브를 사용하고, 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 39의 Taqman 프로브를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법>

[0346] 실시예 6-1과 결핵균(MTC) 검출용 프로브로 염기서열 64의 Taqman 프로브를 사용하고, 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 39의 Taqman 프로브를 사용하는 것을 제외하고 실질적으로 동일한 방법으로 이중 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하였다.

[0347] <실시예 6-4. 결핵균(MTC) 검출용 프로브로 염기서열 64의 Taqman 프로브를 사용하고, 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 68의 Taqman 프로브를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법>

[0348] 실시예 6-1과 결핵균(MTC) 검출용 프로브로 염기서열 64의 Taqman 프로브를 사용하고, 항산성비결핵균 검출용 프로브로 염기서열 68의 Taqman 프로브를 사용하는 것을 제외하고 실질적으로 동일한 방법으로 이중 실시간 중합효소연쇄반응법을 수행하였다.

[0349] 2. 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 수행 결과

[0350] 도 16a 내지 도 18b는 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻은 결과를 나타낸다. 상기 그래프들에서, x축은 중합효소연쇄반응의 싸이클 수이고 y축은 형광세기(fluoresence, F)이다. 도 16a 및 도 16b는 각각 결핵균(MTC)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 17a 및 도 17b는 각각 항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 18a 및 도 18b는 각각 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

[0351] 도 16a 내지 도 18b를 참조하면, 결핵균(MTC)은 노랑채널에서 IS6110 유전자, 항산성비결핵균(NTM)은 녹색채널에서 16S rRNA 유전자, 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)은 각각 노랑채널과 녹색채널에서 IS6110 유전자와 16S rRNA 유전자가 특이적으로 증폭되는 결과를 나타내어, 본 발명에 의한 프라이머 및 프로브를 이용할 경우, 이중 실시간 중합효소연쇄반응법으로 임상 검체에서 결핵균과 항산성비결핵균을 동시에 높은 신뢰성을 가지고 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0352] 실시예 7: 결핵균과 항산성비결핵균의 분리검출 방법 7

[0353] 1. 검출대상 부위 및 프라이머 설계

[0354] 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTC: *M. tuberculosis*, M.bovis, *M. africanum*, *M. microti*)은 IS6110 유전자를 검출 대상으로 하고, 항산성비결핵균(NTM)은 16S rRNA 유전자를 특이적으로 구별할 수 있는 16S rRNA 염기부위를 Taqman 프로브로 사용하였다. 16S rRNA 유전자의 경우 공통프라이머로 마이코박테아의 16S rRNA 유전자 부위를 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하였다. 상기 검출대상 부위용 프라이머는 Primer3 프로그

램을 이용하여 설계하였다.

[0355] (1) 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTC)

[0356] 1) 대상 유전자: IS6110

[0357] 2) 프라이머

[0358] a. 정방향 프라이머: 5′ -cgaactcaaggagcacatcag-3′ (염기서열 58)

[0359] b. 역방향 프라이머: 5′ -gagtttggtcatcagccgttc-3′ (염기서열 59)

[0360] 3) Taqman 프로브

[0361] 5′ -VIC-agtgtggctaaccctgaac-MGB-3′ (염기서열 60)

[0362] 4) PCR 산물의 크기: 136bp

[0363] (2) 항산성비결핵균(Nontuberculous mycobacteria, NTM)

[0364] 1) 대상유전자: 16S rRNA

[0365] *2) 프라이머

[0366] a. 정방향 프라이머: 5′ -ggataagcytgggaaactgg-3′ (염기서열 24)

[0367] b. 역방향 프라이머: 5′ -cgtaggagtctgggccgta-3′ (염기서열 75)

[0368] 3) Taqman 프로브

[0369] NTM-1: 5′ -FAM-tggtggaaagcttttgc-MGB-3′ (염기서열 27)

[0370] NTM-2: 5′ -FAM-ccacaccgctaccaaac-MGB-3′ (염기서열 76)

[0371] 4) PCR 산물의 크기: 205bp

[0372] 2. 이중 실시간 중합효소연쇄반응법

[0373] (1) DNA의 분리

[0374] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주, 마이코박테리아 표준 균주 68주를 사용하였다. 사용된 표준균주는 실시예 5-1에서 언급한 것과 실질적으로 동일하다.

[0375] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주는 액체배지(MGIT 마이코박테리아 배지)나 고체(Ogawa 배지)배지에서 검출되었거나 객담검체에서 직접 검출된 균주이었다. ATCC, KCTC 균주는 액체배지에서 배양하여 사용하였고, KMRC 균주는 고체배지에서 배양하여 사용하였다.

[0376] 액체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 균이 배양된 MGIT 마이코박테리아 배양튜브를 잘 섞은 후에 액체 배지 500㎕를 취해 1.5㎖ 튜브에 넣고 14,000 rpm로 5분간 원심분리 시켰다. 원심분리 후 상층액은 버리고 남은 침사부분에 멸균증류수 300㎕ 넣고 끓는 물에 10분간 중탕 가열하였다. 중탕 가열 후 14,000 rpm로 5분간 원심분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0377] 고체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 1.5㎖튜브에 멸균증류수 500㎕넣고 고체배지에서 1 백금이를 취해 멸균증류수에 풀었다. 이 튜브를 끓는 물에 10분간 중탕 가열한 후 14,000 rpm에서 5분간 원심 분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0378] 객담검체는 다음과 같이 처리하였다. 15㎖ 혹은 50㎖ 튜브에 담긴 객담량과 동일한 량의 1N NaOH를 첨가하여 10분간 방치하여 객담을 액화시켰다. 14,000rpm에서 2분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 남아 있는 침전물에 멸균증류수 1㎖를 넣고 10초간 잘 섞은 후 14,000rpm으로 2분간 원심 분리하여 상층액을 제거하였다. 남아 있는 침전물에 멸균증류 1㎖를 넣고 10초간 잘 섞은 후 14,000rpm에서 2분간 원심 분리 한 후 상층액을 버렸다. 상층액을 제거하고 남아 있는 침전물에 5% chelex 수지(Biorad, USA) 100㎕와 10mg/㎖ proteinase K 1㎕를 넣고 잘 섞어 주었다. 56℃에서 15분간 방치한 후 잘 혼합하여 끓은 물에 10분간 중탕 가열하였다. 중탕 가열 후 14,000

rpm 5분간 원심 분리 시켜서 상층액을 중합효소연쇄반응의 주형 DNA로 사용하였다.

[0379] (2) 이중 실시간 중합효소연쇄반응법

[0380] Rotor-Gene multiplex PCR Kit (QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 사용하여 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 이중 실시간 중합효소연쇄반응은 Rotor-Gene Q(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)을 이용하였다. 약 95℃에서 약 5분간 변성 공정을 1 사이클(cycle), 약 95℃에서 약 15초 간 변성, 약 65℃에서 약 15초 간 어닐링 및 연장 공정을 1 싸이클로 하여, 40 싸이클을 수행하였다. 이때, 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하는 반응물의 조성은 하기 표 7과 같다. 하기 primer-probes Mix에는 정방향 프라이머와 역방향 프라이머가 동일한 량(10pmole/㎕)으로 들어 있고 프루브는 4pmole/㎕이 있었다. 따라서 반응에 사용되는 MTC의 primer-probes mix 1.25㎕에는 정방향 및 역방향 프라이머가 각각 12.5pmole이 되고 프로브는 5pmole이 들어 있게 되었다. 총 25uL의 중합연쇄반응을 수행하는 반응물의 총부피가 25㎕이니 primer의 농도는 0.5uM(12.5pmoles/25㎕), 프로브는 0.2uM(5pmole/25㎕)가 사용되었다. NTM의 정방향 및 역방향 프라이머, 프로브의 농도는 MTC와 동일하게 사용되었다.

표 7

[0381]

성분		부피(㎕)	농도
2X Rotor-Gene Multiplex PCR Master Mix		12.5	1X
Primers-Probes Mix	프라이머(10pmole/㎕)	1.25	0.5uM
	프로브(4pmole/㎕)		0.2uM
Nuclease free water		6.25	-
샘플 DNA template		5	-
전체		25	-

[0382] 이중 실시간 중합효소연쇄반응 중 결합 및 연장단계에서 프로브에 의해 생성된 형광을 Rotor-Gene Q(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)에서 측정한다. 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응 방법은 DNA 중합효소와 형광공명 에너지이동(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)의 원리에 의해 실시간 중합효소연쇄반응의 매 주기마다 실시간으로 시행되는 형광을 검출하고 정량하는 방법이다. 실시간 모니터 상에서 FAM™ 이 발색되는 경우 녹색채널(510±5nm), VIC™이 발색되는 경우 노랑채널(555±5nm)에서 표시하도록 지정하였다. 녹색채널(green channel)과 노랑채널(Yellow channel)에서 형광을 관찰하였다.

[0383] 3. 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 수행 결과

[0384] 도 19a 내지 도 21b는 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻은 결과를 나타낸다. 상기 그래프들에서, x축은 중합효소연쇄반응의 싸이클 수이고 y축은 형광세기(fluoresence, F)이다. 도 19a 및 도 19b는 각각 결핵균(MTC)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 20a 및 도 20b는 각각 항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다. 도 21a 및 도 21b는 각각 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 이중 실시간 중합효소연쇄반응의 녹색채널과 노랑채널에서의 중합효소연쇄반응의 싸이클 수에 대한 y축은 형광세기의 변화를 나타내는 그래프이다.

[0385] 도 19a 내지 도 21b를 참조하면, 결핵균(MTC)은 노랑채널에서 IS6110 유전자, 항산성비결핵균(NTM)은 녹색채널에서 16S rRNA 유전자, 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)은 각각 노랑채널과 녹색채널에서 IS6110 유전자와 16S rRNA 유전자가 특이적으로 증폭되는 결과를 나타내어, 본 발명에 의한 프라이머 및 프로브를 이용할 경우, 이중 실시간 중합효소연쇄반응법으로 임상 검체에서 결핵균과 항산성비결핵균을 동시에 높은 신뢰성을 가지고 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

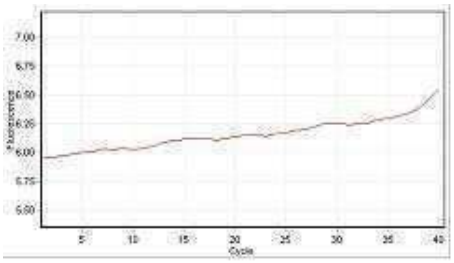
[0386] 본 실시예들을 통하여, 결핵균 특이적 염기서열 및 결핵균에는 없는 항산성비결핵균의 고유염기서열을 정방향 프라이머 또는 역방향 프라이머; 및/또는 프로브로 디자인하여, 검사키트를 제작하여 이중 실시간 중합효소연쇄반응법으로, 상기 결핵균과 항산성비결핵균의 특이적 염기서열 탐색에 이용한 표준균주 들에 평가할 때, 높은 수준의 신뢰성으로 결핵균과 항산성비결핵균을 평가할 수 있는 수단임을 확인할 수 있었다. 따라서, 여러 종의

결핵균과 항상성비결핵균을 효과적으로 검출할 수 있는 수단을 제공할 수 있다.

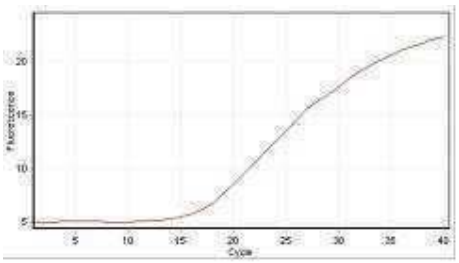
[0387] 본 실시예들에 따르면, 결핵균과 항산성비결핵균에 특이적인 유전자 염기서열을 검출할 수 있는 결핵균과 항산성비결핵균 검출용 프라이머 및/또는 프로브는 결핵균과 항산성비결핵균에 대해 진단 감수성 및 특이성이 높다. 또한, 본 실시예들에 따른 결핵균과 항산성비결핵균 검출용 프라이머 및/또는 프로브를 이용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에 의하면 검체내에 결핵균과 항산성비결핵균을 동시에 보다 효율적으로 검출할 수 있는 임상진단 수단을 제공할 수 있다.

도면

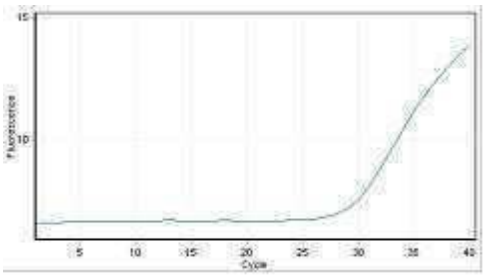
도면1a



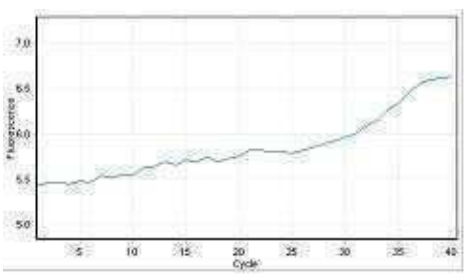
도면1b



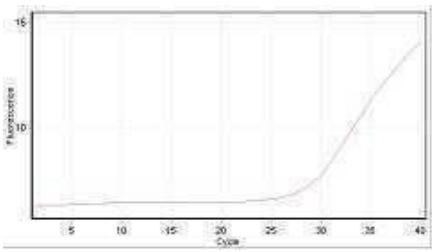
도면2a



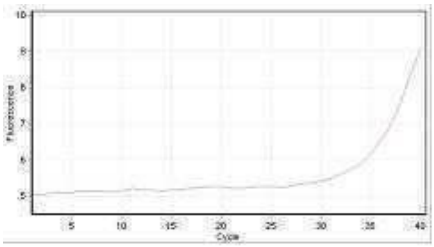
도면2b



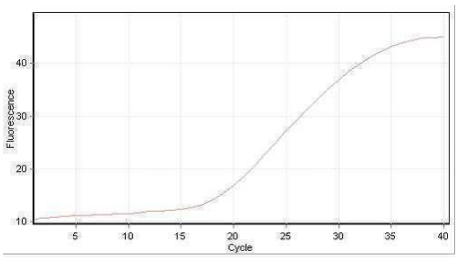
도면3a



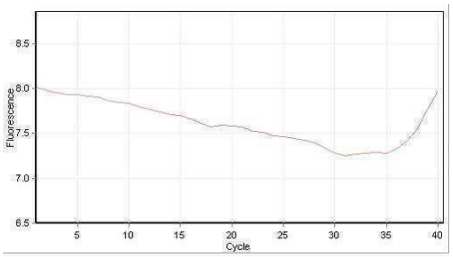
도면3b



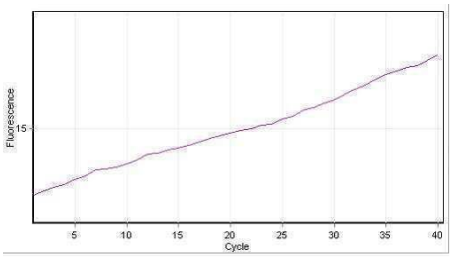
도면4a



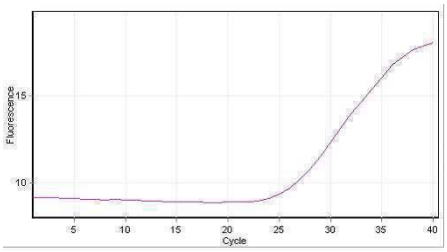
도면4b



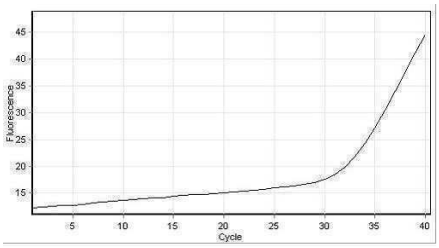
도면5a



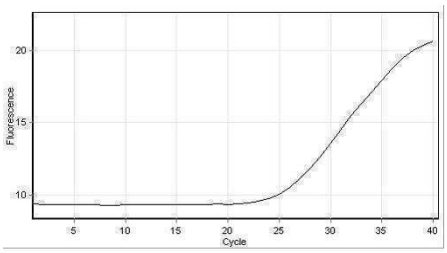
도면5b



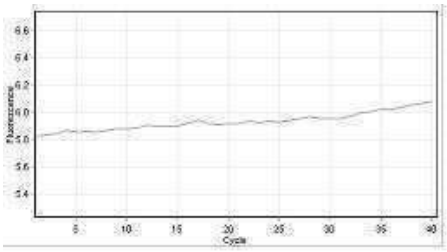
도면6a



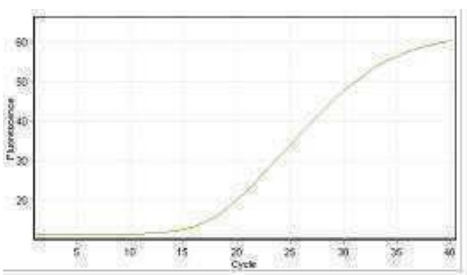
도면6b



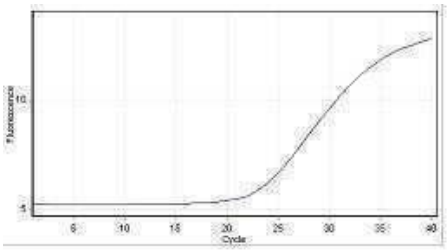
도면7a



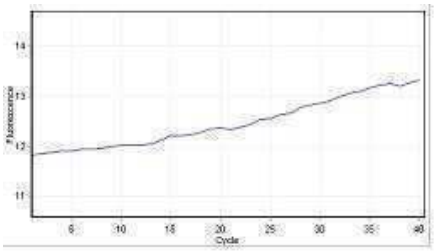
도면7b



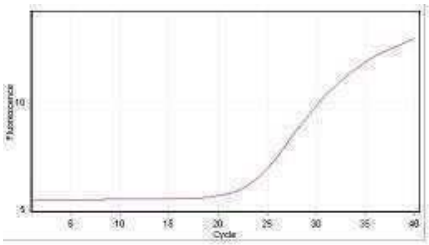
도면8a



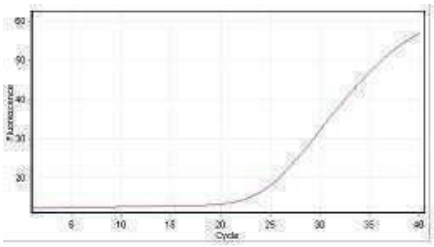
도면8b



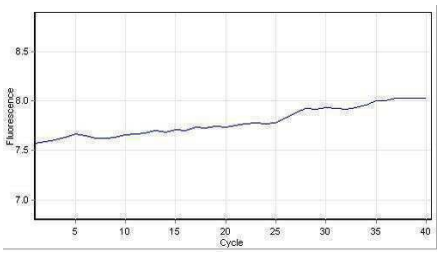
도면9a



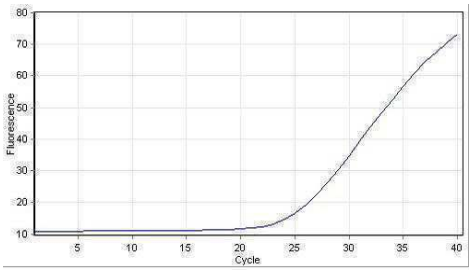
도면9b



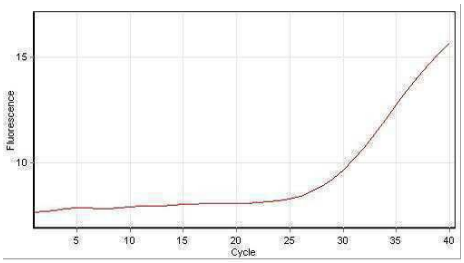
도면10a



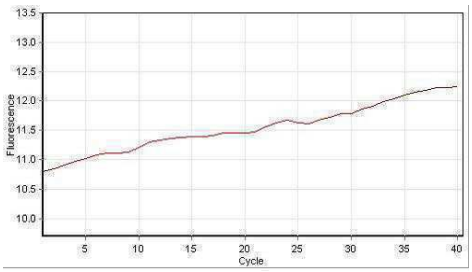
도면10b



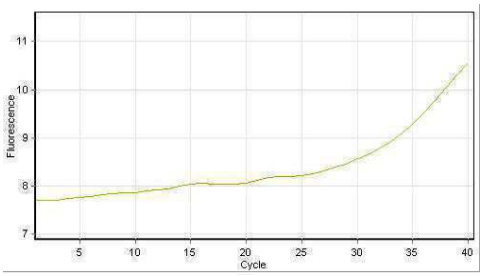
도면11a



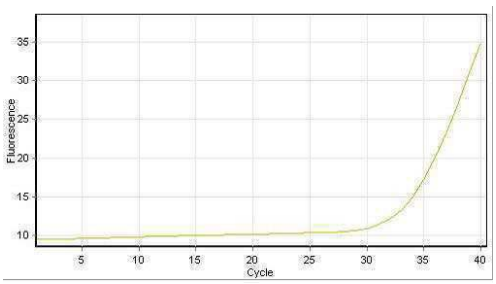
도면11b



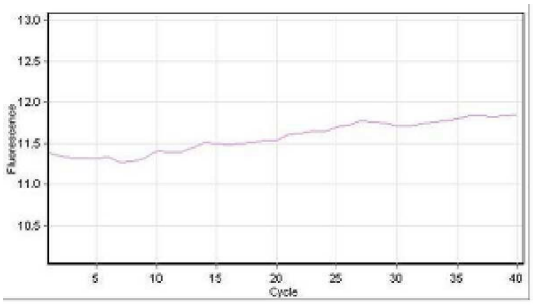
도면12a



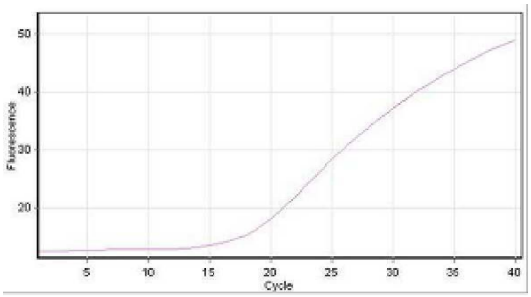
도면12b



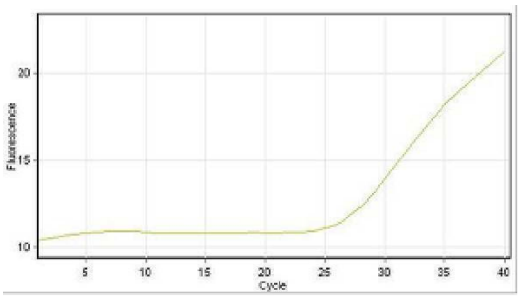
도면13a



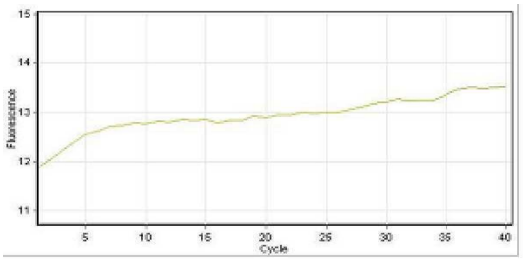
도면13b



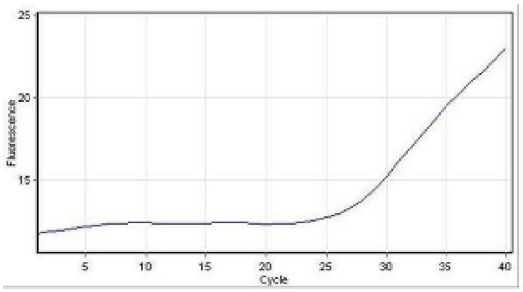
도면14a



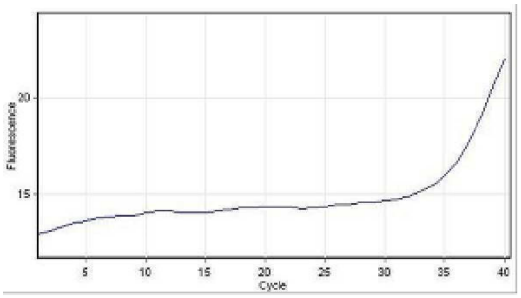
도면14b



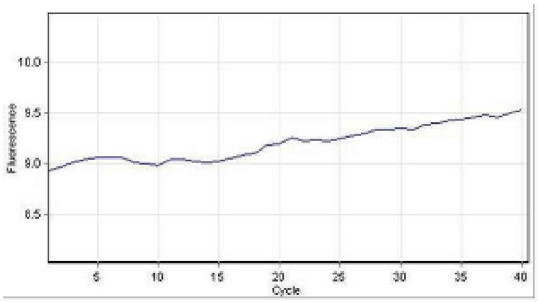
도면15a



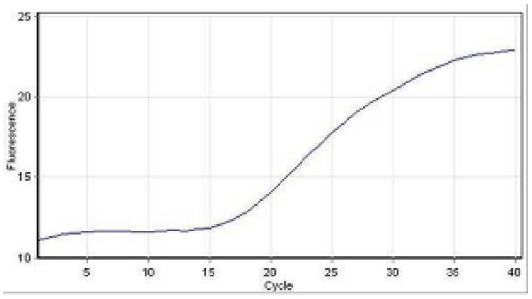
도면15b



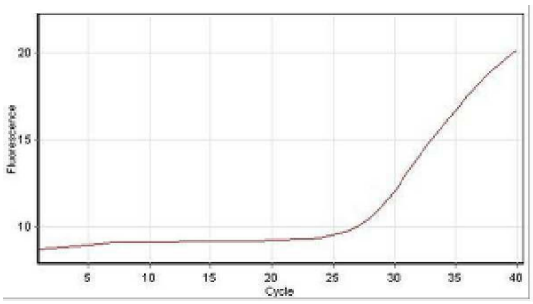
도면16a



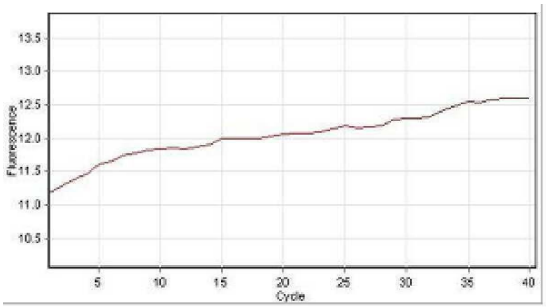
도면16b



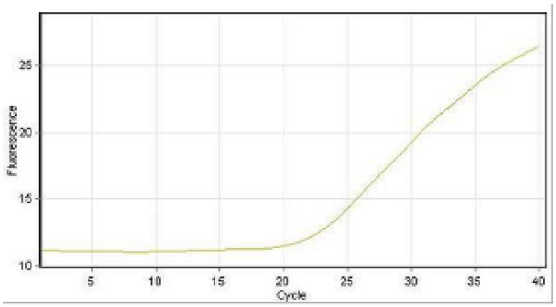
도면17a



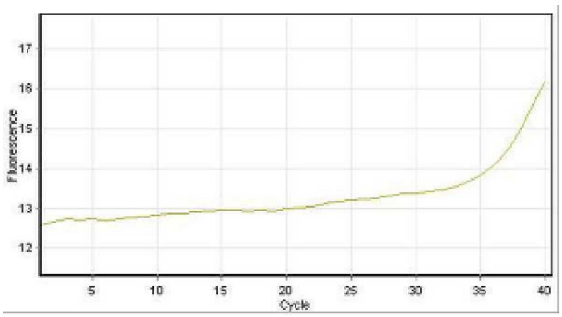
도면17b



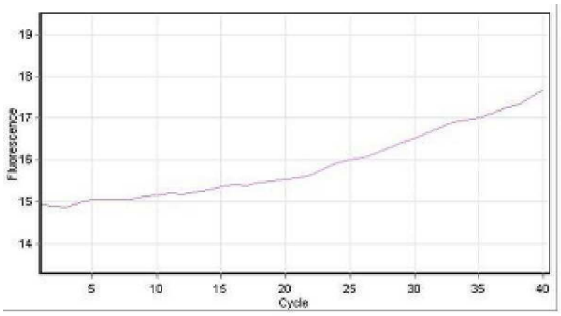
도면18a



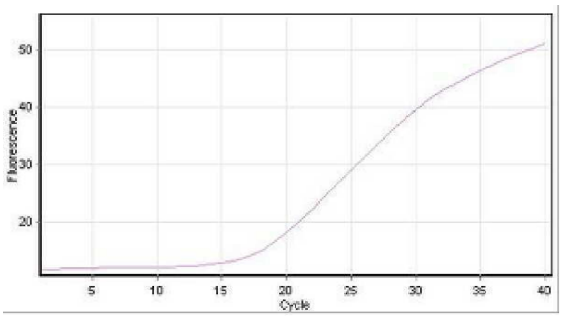
도면18b



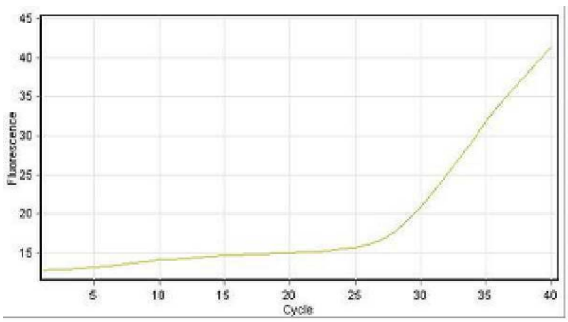
도면19a



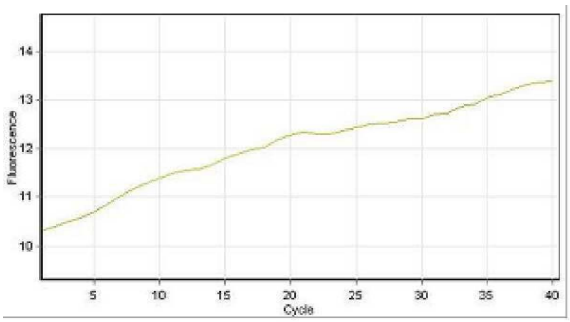
도면19b



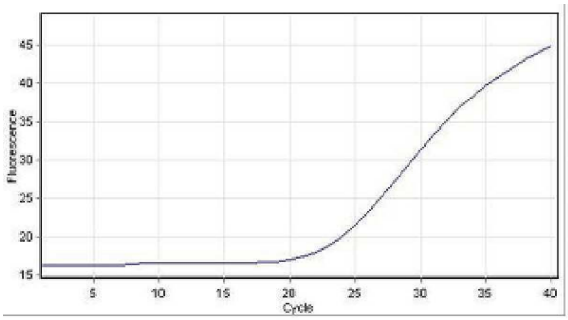
도면20a



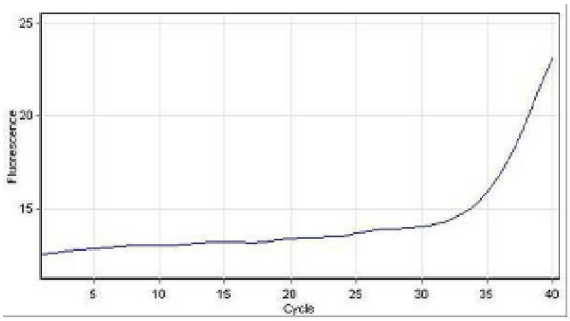
도면20b



도면21a



도면21b



서 열 목 록

<110> UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION

<120> METHODS FOR IDENTIFICATION AND DETECTION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS COMPLEX AND NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA USING DUPLEX REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

<130> DP-2010-0773

<150> KR 10-2010-0049692

<151> 2010-05-27

<150> KR 10-2010-0062847

<151> 2010-06-30

<160> 76

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of IS6110 gene in Mycobacterium tuberculosis complex

<400> 1

cgaactcaag gagcacatca 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of IS6110 gene in Mycobacterium tuberculosis complex

<400> 2

agtttggtca tcagccgttc 20

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe for detection of specific fragments of IS6110 gene in Mycobacterium tuberculosis complex

<400> 3

agtgtggcta accctgaa 18

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 4

ggyrayctgc cctgcac 17

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer(NTM-1) for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 5

cccacaccgc aaaagctt 18

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer(NTM-1) for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 6

cccacaccgc aaaagct 17

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer(NTM-1) for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 7

tcccacaccg caaaagct 18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer(NTM-2) for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 8

catcccacac cgctaccw 18

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 9

cggtattaga cccagtttcc 20

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer(NTM-2) for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 10

catcccacac cgctacct 18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer(NTM-2) for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 11

catcccacac cgctacca 18

<210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 12

ggtaatctgc cctgcac 17

<210> 13

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 13

ggtaacctgc cctgcac 17

<210> 14

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 14

ggcaatctgc cctgcac 17

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 15

ggcaacctgc cctgcac 17

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 16

ggtgatctgc cctgcac 17

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 17

ggtgacctgc cctgcac 17

<210> 18

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 18

ggcgatctgc cctgcac 17

<210> 19

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 19

ggcgacctgc cctgcac 17

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of IS6110 gene in Mycobacterium tuberculosis complex

<400> 20

cagggttagc cacactttgc 20

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe for detection of specific fragments of IS6110 gene in Mycobacterium tuberculosis complex

<400> 21

cgccaactac ggtgtttacg gtg 23

<210> 22

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 22

gtggcgaacg ggtgagtaa 19

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 23

cggtattaga cccagtttcc caggct 26

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward universal primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Mycobacterium

<400> 24

ggataagcyt gggaaactgg 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse universal primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Mycobacterium

<400> 25

accccaccaa cwagctgata 20

<210> 26

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in Mycobacterium tuberculosis complex

<400> 26

tggtggaaag cgcttta 17

<210> 27

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe(NTM-1) for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 27

tggtggaaag cttttgc 17

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe(NTM-2) for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 28

tggaaagygt ttggtagc 18

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward universal primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Mycobacterium

<400> 29

ggataagcct gggaaactgg 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward universal primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Mycobacterium

<400> 30

ggataagctt gggaaactgg 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse universal primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Mycobacterium

<400> 31

accccaccaa caagctgata 20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse universal primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Mycobacterium

<400> 32

accccaccaa ctagctgata 20

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe(NTM-2) for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 33

tggaaagcgt ttggtagc 18

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe(NTM-2) for detection of specific fragments of 16S rRNA gene

in Nontuberculous mycobacteria

<400> 34

tggaaagtgt ttggtagc 18

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 35

catgtyttst ggkgsaaagc tt 22

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 36

cgtaggagtc tgggccgta 19

<210> 37

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 37

tagccggcct gagagggtg 19

<210> 38

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 38

cctgagaggg tgwccggcc 19

<210> 39

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 39

cgggtagccg gcctgagag 19

<210> 40

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 40

catgtcttgt gggggaaagc tt 22

<210> 41

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 41

catgttttgt gggggaaagc tt 22

<210> 42

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 42

catgtcttct gggggaaagc tt 22

<210> 43

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 43

catgtcttgt ggtggaaagc tt 22

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 44

catgtcttgt ggggcaaagc tt 22

<210> 45

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 45

catgttttct gggggaaagc tt 22

<210> 46

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 46

catgtcttct ggtggaaagc tt 22

<210> 47

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 47

catgtcttgt ggtgcaaagc tt 22

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 48

catgttttgt ggggcaaagc tt 22

<210> 49

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 49

catgtcttct ggggcaaagc tt 22

<210> 50

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 50

catgttttgt ggtggaaagc tt 22

<210> 51

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 51

catgttttct ggtggaaagc tt 22

<210> 52

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 52

catgttttct ggggcaaagc tt 22

<210> 53

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 53

catgttttgt ggtgcaaagc tt 22

<210> 54

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 54

catgtcttct ggtgcaaagc tt 22

<210> 55

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 55

catgttttct ggtgcaaagc tt 22

<210> 56

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 56

cctgagaggg tgaccggcc 19

<210> 57

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 57

cctgagaggg tgtccggcc 19

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of IS6110 gene in Mycobacterium tuberculosis complex

<400> 58

cgaactcaag gagcacatca g 21

<210> 59

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for amplification specific fragments of IS6110 gene in Mycobacterium tuberculosis complex

<400> 59

gagtttggtc atcagccgtt c 21

<210> 60

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe for detection of specific fragments of IS6110 gene in Mycobacterium tuberculosis complex

<400> 60

agtgtggcta accctgaac 19

<210> 61

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 61

tggcgaacgg gtgagtaa 18

<210> 62

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 62

cggtattaga cccagtttcc cagg 24

<210> 63

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in

Nontuberculous mycobacteria

<400> 63

tgggaaactg ggtctaatac 20

<210> 64

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe for detection of specific fragments of IS6110 gene in

Mycobacterium tuberculosis complex

<400> 64

ctacggtgtt tacggtgc 18

<210> 65

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer(NTM-1) for amplification specific fragments of 16S

rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 65

tktggtggaa agcttttgc 19

<210> 66

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer(NTM-2) for amplification specific fragments of 16S

rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 66

ggtgwgtggt gcaaagctt 19

<210> 67

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer(NTM-3) for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 67

tggtggaaag cgtttggt 18

<210> 68

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 68

cctgagaggg tgwccg 16

<210

> 69

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer(NTM-1) for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 69

tgtggtggaa agcttttgc 19

<210> 70

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer(NTM-1) for amplification specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 70

tttggtggaa agcttttgc 19

<210> 71

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer(NTM-2) for amplification specific fragments of 16S

rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 71

ggtgagtggt gcaaagctt 19

<210> 72

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer(NTM-2) for amplification specific fragments of 16S

rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 72

ggtgtgtggt gcaaagctt 19

<210> 73

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in

Nontuberculous mycobacteria

<400> 73

cctgagaggg tgaccg 16

<210> 74

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

probe for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in

Nontuberculous mycobacteria

<400> 74

cctgagaggg tgtccg 16

<210> 75

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse universal primer for amplification specific fragments of

16S rRNA gene in Mycobacterium

<400> 75

cgtaggagtc tgggccgta 19

<210> 76

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe(NTM-2) for detection of specific fragments of 16S rRNA gene in Nontuberculous mycobacteria

<400> 76

ccacaccgct accaaac 17