(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년06월01일
(11) 등록번호 10-1151944
(24) 등록일자 2012년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0001622(분할)
(22) 출원일자 2012년01월05일
심사청구일자 2012년01월05일
(62) 원출원 특허 10-2011-0009529
원출원일자 2011년01월31일
심사청구일자 2011년06월24일
(56) 선행기술조사문헌
Journal of Clinical Microbiology, Vol. 42, No. 3, pp. 1308-1312 (2004.03.31.)
NCBI, GenBank Accession No. GU142936 (2009.12.02.)
NCBI, GenBank Accession No. AJ242908 (2008.10.23.)

(73) 특허권자
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
(72) 발명자
김정옥
강원도 강릉시 교1동 하이빌아파트 102동 306호
(74) 대리인
특허법인태백

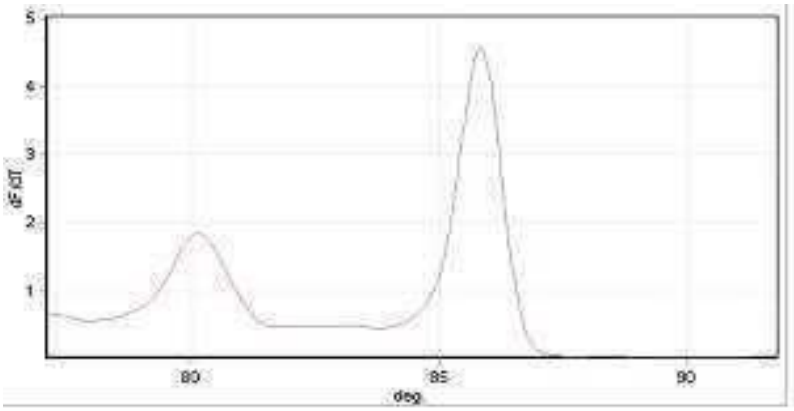
전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 **이중 실시간 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 이용하는 결핵균과 항산성비결핵균의 검출 방법**

(57) 요 약

본 발명은 결핵균 특이적 IS6110 유전자와 항산성비결핵균에 특이적 16S rRNA 유전자에 특이적인 결핵균과 항산성비결핵균 검출용 프라이머, 이를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트 및 이를 이용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선 분석에 의한 결핵균과 항산성비결핵균의 검출 방법을 제공한다. 염기서열에 특이한 프로브를 사용하지 않아 저비용으로 단시간에 결핵균 및/또는 항산성비결핵균을 동시에 보다 효율적으로 검출할 수 있는 임상진단 수단을 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

염기서열 3의 정방향 프라이머;

염기서열 4의 프라이머, 염기서열 5의 프라이머 및 염기서열 6의 프라이머로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 역방향 프라이머; 및

염기서열 7의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트.

청구항 2

염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 2의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및

염기서열 3의 정방향 프라이머, 염기서열 4의 프라이머, 염기서열 5의 프라이머 및 염기서열 6의 프라이머로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 역방향 프라이머 및 염기서열 7의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트.

청구항 3

검체시료로부터 DNA를 분리하는 단계;

염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 2의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 3의 정방향 프라이머, 염기서열 4의 프라이머, 염기서열 5의 프라이머 및 염기서열 6의 프라이머로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 역방향 프라이머 및 염기서열 7의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 사용하여 상기 DNA를 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 시키는 단계;

온도를 변화시키면서 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응에 의해 증폭된 증폭산물을 융해시켜 융해곡선을 얻는 단계; 및

상기 융해곡선의 융해온도를 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, 이를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트 및 이를 이용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 이용하는 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 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 IS6110에 높은 검출력을 가진 프라이머 세트와 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 높은 검출력을 가진 프라이머 세트를 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 목적은 결핵균과 항산성비결핵균의 정확한 검출과 진단을 위한 결핵균 특이적 IS6110 유전자에 높은 검출력을 가진 프라이머 세트 및 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 높은 검출력을 가진 프라이머 세트를 포함하는 검출 키트를 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프라이머 세트를 이용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법(duplex real-time polymerase chain reaction)과 융해곡선분석을 이용하여 결핵균과 항산성비결핵균을 정확하게 검출과 진단할 수 있는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 염기서열 3의 정방향 프라이머; 염기서열 4의 프라이머, 염기서열 5의 프라이머 및 염기서열 6의 프라이머로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 역방향 프라이머; 및 염기서열 7의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 제공한다.

[0010] 상기 염기서열 3의 정방향 프라이머는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 특이적 정방향 프라이머이다. 상기 염기서열 3(5′-ggyrayctgccctgcac-3′)의 경우, 5′-ggtaatctgccctgcac-3′ (염기서열 8), 5′-ggtaacctgccctgcac-3′ (염기서열 9), 5′-ggcaatctgccctgcac-3′ (염기서열 10) 및 5′-ggcaacctgccctgcac-3′ (염기서열 11), 5′-ggtgatctgccctgcac-3′ (염기서열 12), 5′-ggtgacctgccctgcac-3′ (염기서열 13), 5′-ggcgatctgccctgcac-3′ (염기서열 14) 및 5′-ggcgacctgccctgcac-3′ (염기서열 15)을 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 포함하는 프라이머 세트일 수 있다.

[0011] 상기 염기서열 4의 프라이머(NTM-1), 염기서열 5의 프라이머(NTM-1) 및 염기서열 6의 프라이머(NTM-1)는 16S rRNA 유전자 특이적 역방향 프라이머이다. 염기서열 7(NTM-2)의 프라이머는 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 7(5′-catcccacaccgctaccw-3′)의 경우, 5′-catcccacaccgctacct-3′ (염기서열 16)과 5′-catcccacaccgctacca-3′ (염기서열 17)을 포함하는 프라이머 세트를 의미한다. 예를 들어, 염기서열 7의 프라이머는 5′-catcccacaccgctacct-3′와 5′-catcccacaccgctacca-3′를 약 1:1로 포함하는 프라이머 세트일 수 있다.

[0012] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 2의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 3의 정방향 프라이머, 염기서열 4의 프라이머, 염기서열 5의 프라이머 및 염기서열 6의 프라이머로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 역

방향 프라이머 및 염기서열 7의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트를 제공한다.

[0013] 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.

[0014] 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트는 염기서열 3의 정방향 프라이머; 염기서열 4의 프라이머(NTM-1), 염기서열 5의 프라이머(NTM-1) 및 염기서열 6의 프라이머(NTM-1)로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 역방향 프라이머; 및 염기서열 7의 역방향 프라이머(NTM-2)를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함한다. 상기 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자의 역방향 프라이머는 검출 대상이 되는 여러 종의 항산성비결핵균을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다.

[0015] 일 실시예에 따르면, 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트에서 염기서열 4의 역방향 프라이머와 염기서열 7의 역방향 프라이머는 1:1일 수 있으며, 염기서열 7의 역방향 프라이머는 염기서열 8의 역방향 프라이머 및 염기서열 9의 역방향 프라이머를 1:1로 포함할 수 있다. 이에 따라, 염기서열 4의 프라이머, 5′-catcccacaccgctacct-3′ (염기서열 16) 및 5′-catcccacaccgctacca-3′ (염기서열 17)은 2:1:1의 비를 가질 수 있다.

[0016] 일 실시예에 따르면, 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트에서 염기서열 5의 역방향 프라이머와 염기서열 7의 역방향 프라이머는 1:1일 수 있으며, 염기서열 7의 역방향 프라이머는 염기서열 16의 역방향 프라이머 및 염기서열 17의 역방향 프라이머를 1:1로 포함할 수 있다.

[0017] 일 실시예에 따르면, 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트에서 염기서열 6의 역방향 프라이머와 염기서열 7의 역방향 프라이머는 1:1일 수 있으며, 염기서열 7의 역방향 프라이머는 염기서열 16의 역방향 프라이머 및 염기서열 17의 역방향 프라이머를 1:1로 포함할 수 있다.

[0018] 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. 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트는 결핵균과 항산성비결핵균을 신뢰성 있게 구별할 수 있도록 결핵균과 항상성비결핵균 특이적 유전자이면서, 융해온도 차이가 크도록 설계된 프라이머를 포함할 수 있다. 상기 프라이머 세트는 반응산물의 염기서열, 크기 및 GC 비율에 따라 특징적인 융해곡선을 보이므로 이를 고려하여 설계할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 따른 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트에는 SYBR Green과 같은 형광 색소는 고농도에서 중합효소연쇄반응을 저하시키고 융해과정에서 형광색소의 재분포가 일어나 유전자형결정까지 가능한 고해상 융해곡선(high-resolution melting curve)분석에는 불리할 수 있으므로, SYTO 9, EvaGreen, LCGreen 등의 형광색소를 포함할 수 있다. 다시 말해, 다중 실시간 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 위한 반응액에는 상기 SYTO 9, EvaGreen, LCGreen 등의 형광색소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 위한 반응액에는 EvaGreen 형광색소가 포함될 수 있다. 본 발명의 일실시예에서 Type-it HRM PCR 키트(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 사용하여 실시간-중합효소연쇄반응을 실시하였다. 상기 Type-it HRM PCR 키트에는 형광 색소로서 EvaGreen이 들어 있다.

[0020] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 검체시료로부터 DNA를 분리하는 단계; 염기서열 1의 정방향 프라이머 및 염기서열 2의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 3의 정방향 프라이머, 염기서열 4의 프라이머, 염기서열 5의 프라이머 및 염기서열 6의 프라이머로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 둘 이상의 역방향 프라이머 및 염기서열 7의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 사용하여 상기 DNA를 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 시키는 단계; 온도를 변화시키면서 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응에 의해 증폭된 증폭산물을 융해시켜 융해곡선을 얻는 단계; 및 상기 융해곡선의 융해온도를 확인하는 단계를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균의 검출 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 따른 융해곡선분석은 510nm 형광파장을 측정하여 수행할 수 있다.

[0022] 상기 목적을 달성하기 위하여, 염기서열 20의 정방향 프라이머; 및 염기서열 21의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 제공한다.

[0023] 상기 염기서열 20의 정방향 프라이머는 항산성비결핵균의 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 20의 정방향 프라이머의 경우, 5′-catgtcttgtgggggaaagctt-3′ (염기서열 22), 5′-catgttttgtgggggaaagctt-3′ (염기서열 23), 5′-catgtcttctgggggaaagctt-3′ (염기서열 24), 5′-catgtcttgtggtggaaagctt-3′ (염기서열 25), 5′-catgtcttgtggggcaaagctt-3′ (염기서열 26), 5′-catgttttctgggggaaagctt-3′ (염기서열 27), 5′-catgtcttctggtggaaagctt-3′ (염기서열 28), 5′-catgtcttgtggtgcaaagctt-3′ (염기서열 29), 5′-catgttttgtggggcaaagctt-3′ (염기서열 30), 5′-catgtcttctggggcaaagctt-3′ (염기서열 31), 5′-catgttttgtggtggaaagctt-3′ (염기서열 32), 5′-catgttttctggtggaaagctt-3′ (염기서열 33), 5′-catgttttctggggcaaagctt-3′ (염기서열 34), 5′-catgttttgtggtgcaaagctt-3′ (염기서열 35), 5′-catgtcttctggtgcaaagctt-3′ (염기서열 36) 및 5′-catgttttctggtgcaaagctt-3′ (염기서열 37)이 약 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1의 비율로 포함되는 프라이머 세트일 수 있다.

[0024] 상기 염기서열 21의 역방향 프라이머는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 특이적 역방향 프라이머이다.

[0025] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 염기서열 18의 정방향 프라이머 및 염기서열 19의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 20의 정방향 프라이머 및 염기서열 21의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트를 제공한다.

[0026] 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트는 염기서열 18의 정방향 프라이머 및 염기서열 19의 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.

[0027] 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트는 염기서열 20의 정방향 프라이머; 및 염기서열 21의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함한다. 상기 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자의 정방향 프라이머는 검출 대상이 되는 여러 종의 항산성비결핵균을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다.

[0028] 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. 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트는 결핵균과 항산성비결핵균을 신뢰성 있게 구별할 수 있도록 결핵균과 항상성비결핵균 특이적 유전자이면서, 융해온도 차이가 크도록 설계된 프라이머를 포함할 수 있다. 상기 프라이머 세트는 반응산물의 염기서열, 크기 및 GC 비율에 따라 특징적인 융해곡선을 보이므로 이를 고려하여 설계할 수 있다.

[0029] 본 발명의 일실시예에 따른 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트에는 SYBR Green과 같은 형광 색소는 고농도에서 중합효소연쇄반응을 저하시키고 융해과정에서 형광색소의 재분포가 일어나 유전자형결정까지 가능한 고해상 융해곡선(high-resolution melting curve)분석에는 불리할 수 있으므로, SYTO 9, EvaGreen, LCGreen 등의 형광색소를 포함할 수 있다. 다시 말해, 다중 실시간 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 위한 반응액에는 상기 SYTO 9, EvaGreen, LCGreen 등의 형광색소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 위한 반응액에는 EvaGreen 형광색소가 포함될 수 있다. 본 발명의 일실시예에서 Type-it HRM PCR 키트(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 사용하여 실시간-중합효소연쇄반응을 실시하였다. 상기 Type-it HRM PCR 키트에는 형광 색소로서 EvaGreen이 들어 있다.

[0030] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 검체시료로부터 DNA를 분리하는 단계; 염기서열 18의 정방향 프라이머 및 염기서열 2의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 20의 정방향 프라이머 및 염기서열 21의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 사용하여 상기 DNA를 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 시키는 단계; 온도를 변화시키면서 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응에 의해 증폭된 증폭산물을 융해시켜 융해곡선을 얻는 단계; 및 상기 융해곡선의 융해온도를 확인하는 단계를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균을 검출하는 방법을 제공한다.

[0031] 상기 목적을 달성하기 위하여, 염기서열 38의 프라이머, 염기서열 39의 프라이머 및 염기서열 40의 프라이머를 포함하는 정방향 프라이머; 및 염기서열 21의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유

전자에 특이적인 프라이머 세트를 제공한다.

[0032] 상기 염기서열 38(NTM-1), 염기서열 39(NTM-2) 및 염기서열 40(NTM-3)의 정방향 프라이머는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 특이적 정방향 프라이머이다. 상기 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자의 정방향 프라이머는 검출 대상이 되는 여러 종의 항산성비결핵균을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다.

[0033] 상기 염기서열의 정방향 프라이머의 경우, 5′-tgtggtggaaagcttttgc-3′ (염기서열 41), 5′-tttggtggaaagcttttgc-3′ (염기서열 42)이 약 1:1의 비율로 포함되는 프라이머 세트일 수 있다.

[0034] 상기 염기서열의 정방향 프라이머의 경우, 5′-ggtgagtggtgcaaagctt-3′ (염기서열 43), 5′-ggtgtgtggtgcaaagctt-3′ (염기서열 44)이 약 1:1의 비율로 포함되는 프라이머 세트일 수 있다.

[0035] 상기 염기서열 21의 역방향 프라이머는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자 특이적 역방향 프라이머이다.

[0036] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 염기서열 18의 정방향 프라이머 및 염기서열 19의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 38의 프라이머, 염기서열 39의 프라이머 및 염기서열 40의 프라이머를 포함하는 정방향 프라이머 및 염기서열 21의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균 검출키트를 제공한다.

[0037] 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트는 염기서열 18의 정방향 프라이머 및 염기서열 19의 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.

[0038] 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트는 염기서열 38의 프라이머, 염기서열 39의 프라이머 및 염기서열 40의 프라이머를 포함하는 정방향 프라이머 및 염기서열 21의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 포함한다. 상기 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자의 정방향 프라이머는 검출 대상이 되는 여러 종의 항산성비결핵균을 모두 검출할 수 있도록 설계되었다.

[0039] 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. 상기 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트는 결핵균과 항산성비결핵균을 신뢰성 있게 구별할 수 있도록 결핵균과 항상성비결핵균 특이적 유전자이면서, 융해온도 차이가 크도록 설계된 프라이머를 포함할 수 있다. 상기 프라이머 세트는 반응산물의 염기서열, 크기 및 GC 비율에 따라 특징적인 융해곡선을 보이므로 이를 고려하여 설계할 수 있다.

[0040] 본 발명의 일실시예에 따른 결핵균과 항산성비결핵균 검출 키트에는 SYBR Green과 같은 형광 색소는 고농도에서 중합효소연쇄반응을 저하시키고 융해과정에서 형광색소의 재분포가 일어나 유전자형결정까지 가능한 고해상 융해곡선(high-resolution melting curve)분석에는 불리할 수 있으므로, SYTO 9, EvaGreen, LCGreen 등의 형광색소를 포함할 수 있다. 다시 말해, 다중 실시간 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 위한 반응액에는 상기 SYTO 9, EvaGreen, LCGreen 등의 형광색소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 위한 반응액에는 EvaGreen 형광색소가 포함될 수 있다. 본 발명의 일실시예에서 Type-it HRM PCR 키트(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 사용하여 실시간-중합효소연쇄반응을 실시하였다. 상기 Type-it HRM PCR 키트에는 형광 색소로서 EvaGreen이 들어 있다.

[0041] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 검체시료로부터 DNA를 분리하는 단계; 염기서열 18의 정방향 프라이머 및 염기서열 19의 역방향 프라이머를 포함하는 결핵균의 IS6110 유전자에 특이적인 프라이머 세트; 및 염기서열 38의 프라이머, 염기서열 39의 프라이머 및 염기서열 40의 프라이머를 포함하는 정방향 프라이머 및 염기서열 21의 역방향 프라이머를 포함하는 항산성비결핵균의 16S rRNA 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 사용하여 상기 DNA를 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 시키는 단계; 온도를 변화시키면서 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응에 의해 증폭된 증폭산물을 융해시켜 융해곡선을 얻는 단계; 및 상기 융해곡선의 융해온도를 확인하는 단계를 포함하는 결핵균과 항산성비결핵균의 검출 방법을 제공한다.

[0042] 본 발명의 일 실시예에 따른 융해곡선분석은 510nm 형광파장을 측정하여 수행할 수 있다.

발명의 효과

[0043] 본 발명은 염기서열에 특이한 프로브를 사용하지 않아 저비용으로 단시간에 결핵균 및/또는 항산성비결핵균을 동시에 보다 효율적으로 검출할 수 있는 임상진단 수단을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1 내지 도 3은 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻어진 증폭산물(amplicon)의 융해곡선 분석을 나타낸다.

도 1 내지 도 3은 각각 결핵균(MTC), 항산성비결핵균(NTM) 및 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 융해곡선을 나타낸다.

도 4 내지 도 6은 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻어진 증폭산물(amplicon)의 융해곡선 분석을 나타낸다.

도 4 내지 도 6은 각각 결핵균(MTC), 항산성비결핵균(NTM) 및 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 융해곡선을 나타낸다.

도 7 내지 도 9는 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻어진 증폭산물(amplicon)의 융해곡선 분석을 나타낸다.

도 7 내지 도 9는 각각 결핵균(MTC), 항산성비결핵균(NTM) 및 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 융해곡선을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 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.

[0046] <u>참고예: 결핵균과 항산성비결핵균의 특이적 염기서열 탐색</u>

[0047] 1. 대상 및 유전자 부위

[0048] 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

[0049] 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.

[0050] 실시예 1. 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석을 통한 결핵균과 항산성비결핵균의 분리검출 방법

[0051] 1. 검출대상 부위 및 프라이머 설계

[0052] 결핵균(Mycobacterium tuberculosis complex, MTC: *M. tuberculosis*, M.bovis, *M. africanum*, *M. microti*)과 항산성비결핵균(NTM)을 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석을 이용하여 감별하기 위한 방법으로, 결핵균은 IS6110 유전자를 검출대상으로 하고, 항산성비결핵균은 16S rRNA 유전자를 검출대상으로 하여 정방향 프라이머는 모든 마이코박테리아의 공통염기서열부위로 하였고, 역방향 프라이머는 항산성비결핵균의 특이적 염기서열인 NTM-1, NTM-2 염기서열 부위를 이용하였다. 상기 검출대상 부위용 프라이머는 Primer3 프로그램을 이용하여 설계하였다.

[0053] (1) 결핵균(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTC)

[0054] 1) 대상 유전자: IS6110

[0055] 2) 프라이머

[0056] a. 정방향 프라이머: 5′ -cgaactcaaggagcacatca-3′ (염기서열 1)

[0057] b. 역방향 프라이머: 5′ -agtttggtcatcagccgttc-3′ (염기서열 2)

[0058] 3) PCR 산물의 크기: 135bp

[0059] 4) PCR 산물의 평균융해온도(Tm): 약 86.18±0.16℃ (다만, 평균융해온도는 검사배치마다 약간의 차이가 발생할 수 있음)

[0060] (2) 항산성비결핵균(Nontuberculous mycobacteria, NTM)

[0061] 1) 대상유전자: 16S rRNA

[0062] 2) 프라이머

[0063] a. 정방향 프라이머: 5′ -ggyrayctgccctgcac-3′ (염기서열 3)

[0064] b. 역방향 프라이머

[0065] NTM-1: 5′ -cccacaccgcaaaagctt-3′ (염기서열 4) 또는 5′ -cccacaccgcaaaagct-3′ (염기서열 5) 또는 5′ -tcccacaccgcaaaagct-3′ (염기서열 6)

[0066] NTM-2: 5′ -catcccacaccgctaccw-3′ (염기서열 7)

[0067] 3) PCR 산물의 크기: 104bp

[0068] 4) PCR 산물의 평균융해온도(Tm): 약 80.10℃ 내지 82.10℃ (항산성비결핵균의 균종에 따라 Tm값이 다르나, 대략적으로 약 80℃ 내지 약 82℃ 정도의 범위의 Tm 값을 가짐)

[0069] <실시예 1-1. 항산성비결핵균 검출용 역방향 프라이머 NTM-1으로 염기서열 4의 프라이머를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석>

[0070] (1) DNA의 분리

[0071] 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.

[0072] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주는 액체배지(MGIT 마이코박테리아 배지)나 고체(Ogawa배지)배지에서 검출되었거나 객담검체에서 직접 검출된 균주이었다. ATCC 표준균주는 액체배지에서 배양하여 사용하였다.

[0073] 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.

[0074] 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.

[0075] 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.

[0076] (2) 이중 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석

[0077] Type-it HRM PCR 키트(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 사용하여 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 상기 Type-it HRM PCR 키트에는 형광 색소로서 EvaGreen이 들어 있다. 이중 실시간 중합효소연쇄반응은 Rotor-gene 6000(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 60℃에서 약 30초 간 어닐링 및 연장 공정을 1 싸이클로 하여, 40 싸이클을 수행하였다. 마지막 중합효소연쇄반응이 끝난 후, 약 77℃에서 약 91.5℃까지 초당 약 0.2℃ 속도로 온도를 증가시키면서 510nm의 형광파장을 측정하여 융해곡선분석을 하였다. 프라이머의 반응 정도의 차이는 프라이머의 농도, 어닐링 및 연장(extension)온도와 유지 시간을 조절하여 2가지 검출 부위 모두 반응이 잘 일어날 수 있도록 조건을 조절하였다. 이 때, 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하는 반응물의 조성은 하기 표 1과 같다. 하기 primer Mix에는 정방향 프라이머와 역방향 프라이머가 동일한 량(10pmole/㎕)으로 들어 있었다. 따라서 반응에 사용되는 MTC의 primer mix 1.75㎕에는 정방향 및 역방향 프라이머가 각각 17.5pmole이 되며, 총 25㎕의 중합연쇄반응을 수행하는 반응물의 총부피가 25㎕가 되니 농도는 각각 0.7uM(17.5pmoles/25㎕)가 되었다. NTM 프라이머도 마찬가지로 정방향 및 역방향 프라이머가 반응물에 1㎕가 사용되며, 그때의 양이 10pmole이며 농도는 각각 0.4uM(10pmoles/25㎕)이 되었다. 이 때, NTM 정방향 프라이머는 5′-ggtaatctgccctgcac-3′ (염기서열 8), 5′-ggtaacctgccctgcac-3′ (염기서열 9), 5′-ggcaatctgccctgcac-3′ (염기서열 10), 5′-ggcaacctgccctgcac-3′ (염기서열 11), 5′-ggtgatctgccctgcac-3′ (염기서열 12), 5′-ggtgacctgccctgcac-3′ (염기서열 13), 5′-ggcgatctgccctgcac-3′ (염기서열 14) 및 5′-ggcgacctgccctgcac-3′ (염기서열 15)을 포함하는 프라이머 세트로서, 염기서열 8, 염기서열 9, 염기서열 10, 염기서열 11, 염기서열 12, 염기서열 13, 염기서열 14 및 염기서열 15의 프라이머를 각각 약 1:1:1:1:1:1:1:1의 비율로 포함하도록 제작되었다. 즉, 염기서열 8, 염기서열 9, 염기서열 10, 염기서열 11, 염기서열 12, 염기서열 13, 염기서열 14 및 염기서열 15의 프라이머는 동량인 1.25pmole씩 포함하도록 제작하였다. 또한, NTM-1 역방향 프라이머(염기서열 4)와와 NTM-2 역방향 프라이머(염기서열 7)는 동량인 10pmole씩 존재하였고, NTM-2 역방향 프라이머는 5′-catcccacaccgctacct-3′ (염기서열 16)와 5′-catcccacaccgctacca-3′ (염기서열 17)이 동량인 5pmole씩 존재하였다.

표 1

[0078]

성분		부피(㎕)	농도
2X HRM PCR Master Mix		12.5	1X
Primer Mix (10pmole/㎕)	MTC	1.75	0.7uM
	NTM	1.0	0.4uM

Nuclease free water	4.75	-
샘플 DNA template	5	-
전체	25	-

[0079] <실시예 1-2. 항산성비결핵균 검출용 역방향 프라이머 NTM-1으로 염기서열 5의 프라이머를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석>

[0080] 실시예 1-1과 NTM-1의 역방향 프라이머로 염기서열 5의 프라이머를 사용하는 것을 제외하고는 실질적으로 동일한 방법으로 이중 실시간 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 수행하였다.

[0081] <실시예 1-3. 항산성비결핵균 검출용 역방향 프라이머 NTM-1으로 염기서열 6의 프라이머를 사용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석>

[0082] 실시예 1-1과 NTM-1의 역방향 프라이머로 염기서열 6의 프라이머를 사용하는 것을 제외하고는 실질적으로 동일한 방법으로 이중 실시간 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 수행하였다.

[0083] 2. 이중 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석 결과

[0084] 도 1 내지 도 3은 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻어진 증폭산물(amplicon)의 융해곡선분석을 나타낸다. 도 1 내지 도 3은 각 결핵균(MTC), 항산성비결핵균(NTM) 및 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 융해곡선을 나타낸다. 상기 융해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

[0085] 결핵균(MTC)의 PCR 증폭 산물의 평균융해온도(Tm)는 약 86.18±0.16℃, 항산성비결핵균(NTM)의 PCR 증폭 산물의 평균융해온도는 약 80.10℃ 내지 82.10℃로 나타났고, 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)은 상기 결핵균과 항산성 비결핵균의 평균융해온도의 두 개의 피크가 나타났다.

[0086] 따라서, 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 수행할 경우, 임상 검체에서 결핵균과 항산성비결핵균을 동시에 높은 신뢰성을 가지고 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0087] 실시예 2. 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석을 통한 결핵균과 항산성비결핵균의 분리검출 방법

[0088] 1. 검출대상 부위 및 프라이머 설계

[0089] 결핵균(Mycobacterium tuberculosis complex, MTC: *M. tuberculosis*, *M.* bovis, *M. africanum*, *M. microti*)과 항산성비결핵균(NTM)을 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석을 이용하여 감별하기 위한 방법으로, 결핵균은 IS6110 유전자를 검출대상으로 하고, 항산성비결핵균은 16S rRNA 유전자를 검출대상으로 하여 정방향 프라이머는 항산성비결핵균의 특이적 염기서열 부위를 이용하였고, 역방향 프라이머는 모든 마이코박테리아의 공통염기서열부위를 이용하였다. 상기 검출대상 부위용 프라이머는 Primer3 프로그램을 이용하여 설계하였다.

[0090] (1) 결핵균(Mycobacterium tuberculosis complex, MTC)

[0091] 1) 대상 유전자: IS6110

[0092] 2) 프라이머

[0093] a. 정방향 프라이머: 5′ -agaaggcgtactcgacctga-3′ (염기서열 18)

[0094] b. 역방향 프라이머: 5′ -ctgaaccggatcgatgtgta-3′ (염기서열 19)

[0095] 3) PCR 산물의 크기: 75bp

[0096] 4) PCR 산물의 평균융해온도(Tm) : 78.0±0.20℃

[0097] (2) 항산성비결핵균(Nontuberculous mycobacteria, NTM)

[0098] 1) 대상유전자: 16S rRNA

[0099] *2) 프라이머

[0100] a. 정방향 프라이머: 5′ -catgtyttstggkgsaaagctt-3′ (염기서열 20)

[0101] b. 역방향 프라이머: 5′ -cgtaggagtctgggccgta-3′ (염기서열 21)

[0102] 3) PCR 산물의 크기: 152bp

[0103] 4) PCR 산물의 평균융해온도(Tm) : 약 86.7℃ 내지 88.24℃ (항산성비결핵균의 균종에 따라 Tm값이 다르나, 대략적으로 약 86.5℃ 내지 약 88.5℃ 정도의 범위의 Tm 값을 가짐)

[0104] <u>2. 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석</u>

[0105] (1) DNA의 분리

[0106] 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.

[0107] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주는 액체배지(MGIT 마이코박테리아 배지)나 고체(Ogawa배지)배지에서 검출되었거나 객담검체에서 직접 검출된 균주이었다. ATCC, KCTC 균주는 액체배지에서 배양하여 사용하였고, KMRC 균주는 고체배지에서 배양하여 사용하였다.

[0108] 액체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 균이 배양된 MGIT 마이코박테리아 배양 튜브를 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.

[0109] 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.

[0110] 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.

[0111] (2) 이중 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석

[0112] Type-it HRM PCR 키트(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 사용하여 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 상기 Type-it HRM PCR 키트에는 형광 색소로서 EvaGreen이 들어 있다. 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 50℃에서 약 10초 간 어닐링 공정후 63℃에서 약 5초간 연장 공정을 1 싸이클로 하여, 40 싸이클을 수행하였다. 마지막 중합효소연쇄반응이 끝난 후, 약 75℃에서 약 93.5℃까지 초당 약 0.2℃ 속도로 온도를 증가시키면서 510nm의 형광파장을 측정하여 융해곡선분석을 하였다. 프라이머의 반응 정도의 차이는 프라이머의 농도, 어닐링 및 연장(extension)온도와 유지 시간을 조절하여 2가지 검출 부위 모두 반응이 잘 일어날 수 있도록 조건을 조절하였다. 이 때, 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하는 반응물의 조성은 하기 표 2와 같다. 하기 primer Mix에는 정방향 프라이머와 역방향 프라이머가 동일한 량(10pmole/㎕)으로 들어 있었다. 따라서 반응에 사용되는 MTC의 primer mix 1.25㎕에는 정방향 및 역방향 프라이머가 각각 12.5pmole이 되며, 총 25㎕의 중합연쇄반응을 수행하는 반응물의 총부피가 25㎕가 되니 농도는 각각 0.5uM(12.5pmoles/25㎕)가 되었다. NTM 프라이머도 마찬가지로 정방향 및 역방향 프라이머가 반응물에 1.5㎕가 사용되며, 그때의 양이 15pmole이며 농도는 각각 0.6uM(15pmoles/25㎕)이 되었다. 이 때, NTM 정방향 프라이머는 5′-catgtcttgtgggggaaagctt-3′ (염기서열 22), 5′-catgttttgtgggggaaagctt-3′ (염기서열 23), 5′-catgtcttctgggggaaagctt-3′ (염기서열 24), 5′-catgtcttgtggtggaaagctt-3′ (염기서열 25), 5′-catgtcttgtggggcaaagctt-3′ (염기서열 26), 5′-catgttttctgggggaaagctt-3′ (염기서열 27), 5′-catgtcttctggtggaaagctt-3′ (염기서열 28), 5′-catgtcttgtggtgcaaagctt-3′ (염기서열 29), 5′-catgttttgtggggcaaagctt-3′ (염기서열 30), 5′-catgtcttctggggcaaagctt-3′ (염기서열 31), 5′-catgttttgtggtggaaagctt-3′ (염기서열 32), 5′-catgttttctggtggaaagctt-3′ (염기서열 33), 5′-catgttttctggggcaaagctt-3′ (염기서열 34), 5′-catgttttgtggtgcaaagctt-3′ (염기서열 35), 5′-catgtcttctggtgcaaagctt-3′ (염기서열 36) 및 5′-catgttttctggtgcaaagctt-3′ (염기서열 37)이 약 1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1:1로 동량으로 존재하였다.

표 2

[0113]

성분		부피(㎕)	농도
2X HRM PCR Master Mix		12.5	1X
Primer Mix (10pmole/㎕)	MTC	1.25	0.5uM
	NTM	1.5	0.6uM
Nuclease free water		4.75	-
샘플 DNA template		5	-
전체		25	-

[0114] 3. 이중 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석 결과

[0115] 도 4 내지 도 6은 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻어진 증폭산물(amplicon)의 융해곡선분석을 나타낸다. 도 4 내지 도 6은 각 결핵균(MTC), 항산성비결핵균(NTM) 및 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 융해곡선을 나타낸다. 상기 융해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

[0116] 결핵균(MTC)의 PCR 증폭 산물의 평균융해온도(Tm)는 약 78.0±0.20℃, 항산성비결핵균(NTM)의 PCR 증폭 산물의 평균융해온도는 약 86.5℃ 내지 약 88.5℃ 로 나타났고, 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)은 상기 결핵균과 항산성 비결핵균의 평균융해온도의 두 개의 피크가 나타났다.

[0117] 따라서, 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 수행할 경우, 임상 검체에서 결핵균과 항산성비결핵균을 동시에 높은 신뢰성을 가지고 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0118] *실시예 3. 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석을 통한 결핵균과 항산성비결핵균의 분리검출 방법

[0119] 1. 검출대상 부위 및 프라이머 설계

[0120] 결핵균(Mycobacterium tuberculosis complex, MTC: *M. tuberculosis*, *M.* bovis, *M. africanum*, *M. microti*)과 항산성비결핵균(NTM)을 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석을 이용하여 감별하기 위한 방법으로, 결핵균은 IS6110 유전자를 검출대상으로 하고, 항산성비결핵균은 16S rRNA 유전자를 검출대상으로 하여 정방향 프라이머는 항산성비결핵균의 특이적 염기서열 부위를 이용하였고, 역방향 프라이머는 모든 마이코박테리아의 공통염기서열부위를 이용하였다. 상기 검출대상 부위용 프라이머는 Primer3 프로그램을 이용하여 설계하였다.

[0121] (1) 결핵균(Mycobacterium tuberculosis complex, MTC)

[0122] 1) 대상 유전자: IS6110

[0123] 2) 프라이머

[0124] a. 정방향 프라이머: 5′ -agaaggcgtactcgacctga-3′ (염기서열 18)

[0125] b. 역방향 프라이머: 5′ -ctgaaccggatcgatgtgta-3′ (염기서열 19)

[0126] 3) PCR 산물의 크기: 75bp

[0127] 4) PCR 산물의 평균융해온도(Tm) : 78.0±0.20℃

[0128] (2) 항산성비결핵균(Nontuberculous mycobacteria, NTM)

[0129] 1) 대상유전자: 16S rRNA

[0130] 2) 프라이머

[0131] a. 정방향 프라이머

[0132] NTM-1: 5′ -tktggtggaaagcttttgc-3′ (염기서열 38)

[0133] NTM-2: 5′ -ggtgwgtggtgcaaagctt-3′ (염기서열 39)

[0134] *NTM-3: 5′ -tggtggaaagcgtttggt-3′ (염기서열 40)

[0135] b. 역방향 프라이머: 5′ -cgtaggagtctgggccgta-3′ (염기서열 21)

[0136] 3) PCR 산물의 크기: 152bp

[0137] 4) PCR 산물의 평균융해온도(Tm) : 86.6±0.26℃

[0138] 2. 이중 실시간 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석

[0139] (1) DNA의 분리

[0140] 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.

[0141] 임상검체에서 분리된 결핵균 186주, 항산성비결핵균 78주는 액체배지(MGIT 마이코박테리아 배지)나 고체(Ogawa배지)배지에서 검출되었거나 객담검체에서 직접 검출된 균주이었다. ATCC, KCTC 균주는 액체배지에서 배양하여 사용하였고, KMRC 균주는 고체배지에서 배양하여 사용하였다.

[0142] 액체배지에서 자란 마이코박테리아의 DNA는 다음과 같이 추출하였다. 균이 배양된 MGIT 마이코박테리아 배양 튜브를 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.

[0143] 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.

[0144] 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.

[0145] (2) 이중 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석

[0146] Type-it HRM PCR 키트(QIAGEN Inc., Germantown, MD, USA)를 사용하여 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하였다. 상기 Type-it HRM PCR 키트에는 형광 색소로서 EvaGreen이 들어 있다. 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 61℃에서 약 30초 간 어닐링 및 연장 공정을 1 싸이클로 하여, 40 싸이클을 수행하였다. 마지막 중합효소연쇄반응이 끝난 후, 약 72℃에서 약 93℃까지 초당 약 0.2℃ 속도로 온도를 증가시키면서 510nm의 형광파장을 측정하여 융해곡선분석을 하였다. 프라이머의 반응 정도의 차이는 프라이머의 농도, 어닐링 및 연장 온도와 유지 시간을 조절하여 2가지 검출 부위 모두 반응이 잘 일어날 수 있도록 조건을 조절하였다. 이 때, 이중 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하는 반응물의 조성은 하기 표 3과 같다. 하기 primer Mix에는 정방향 프라이머와 역방향 프라이머가 동일한 량(10pmole/㎕)으로 들어 있었다. 따라서 반응에 사용되는 MTC의 primer mix 1.875㎕에는 정방향 및 역방향 프라이머가 각각 18.75pmole이 되며, 총 25㎕의 중합연쇄반응을 수행하는 반응물의 총부피가 25㎕가 되니 농도는 각각 0.75uM(18.75pmoles/25㎕)가 되었다. NTM 프라이머도 마찬가지로 정방향 및 역방향 프라이머가 반응물에 1.25㎕가 사용되며, 그때의 양이 12.5pmole이며 농도는 각각 0.5uM(12.5pmoles/25㎕)이 되었다. 이 때, NTM-1 정방향 프라이머(염기서열 38), NTM-2 정방향 프라이머(염기서열 39) 및 NTM-3 정방향 프라이머(염기서열 40)는 실질적으로 동량 포함되었다. 그리고, NTM-1 정방향 프라이머(염기서열 38)에는 5′ -tgtggtggaaagcttttgc-3′ (염기서열 41), 5′ -tttggtggaaagcttttgc-3′ (염기서열 42)이 약 1:1의 비율로 존재하였고, NTM-2 정방향 프라이머(염기서열 39)에는 5′ -ggtgagtggtgcaaagctt-3′ (염기서열 43), 5′ -ggtgtgtggtgcaaagctt-3′ (염기서열 44)이 약 1:1의 비율로 존재하였다.

표 3

[0147]

성분		부피(㎕)	농도
2X HRM PCR Master Mix		12.5	1X
Primer Mix (10pmole/㎕)	MTC	1.875	0.75uM
	NTM	1.25	0.5uM

Nuclease free water	4.375	-
샘플 DNA template	5	-
전체	25	-

[0148] 3. 이중 중합효소연쇄반응법 및 융해곡선분석 결과

[0149] 도 7 내지 도 9는 상기 균주들의 이중 실시간 중합효소연쇄반응법에서 얻어진 증폭산물(amplicon)의 융해곡선 분석을 나타낸다. 도 7 내지 도 9는 각 결핵균(MTC), 항산성비결핵균(NTM) 및 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)의 융해곡선을 나타낸다. 상기 융해곡선에서, x축은 온도(℃)이고 y축은 단위 시간당 형광량의 변화(dF/dT)이다.

[0150] 결핵균(MTC)의 PCR 증폭 산물의 평균융해온도(Tm)는 약 78.0±0.20℃, 항산성비결핵균(NTM)의 PCR 증폭 산물의 평균융해온도는 약 86.6±0.26℃로 나타났고, 결핵균(MTC)+항산성비결핵균(NTM)은 상기 결핵균과 항산성비결핵균의 평균융해온도의 두 개의 피크가 나타났다.

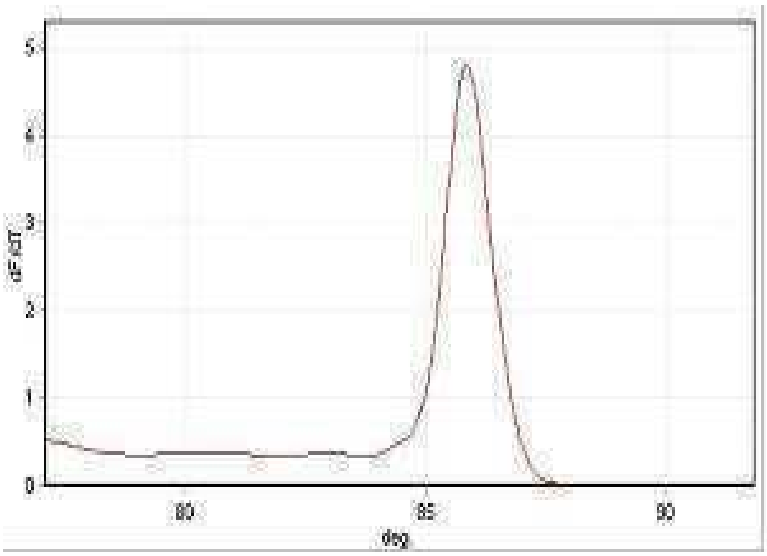
[0151] 따라서, 상기 이중 실시간 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 수행할 경우, 임상 검체에서 결핵균과 항산성비결핵균을 동시에 높은 신뢰성을 가지고 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0152] 본 실시예들을 통하여, 결핵균 특이적 염기서열 및 결핵균에는 없는 항산성비결핵균의 고유염기서열을 정방향 프라이머 또는 역방향 프라이머로 디자인하여, 검사키트를 제작하여 이중 실시간 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석을 수행하여, 상기 결핵균과 항산성비결핵균의 특이적 염기서열 탐색에 이용한 표준균주들에 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.

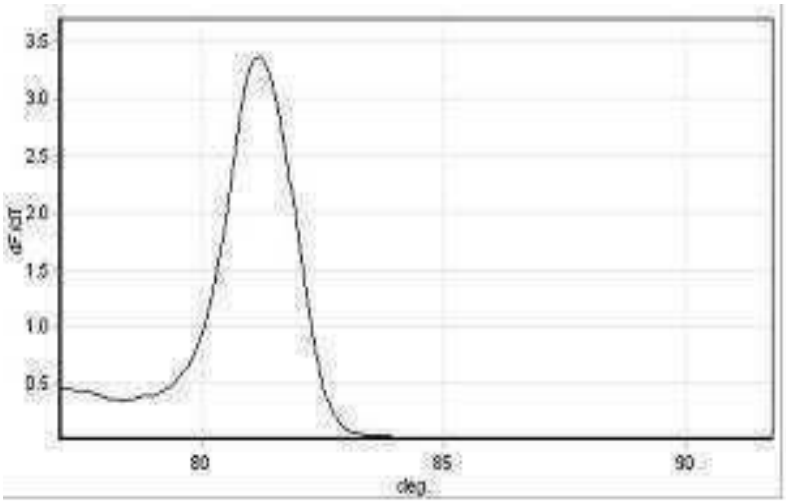
[0153] 본 실시예들에 따르면, 결핵균과 항산성비결핵균에 특이적인 유전자 염기서열을 검출할 수 있는 결핵균과 항산성비결핵균 검출용 프라이머 세트는 결핵균과 항산성비결핵균에 대해 진단 감수성 및 특이성이 높다. 또한, 본 실시예들에 따른 결핵균과 항산성비결핵균 검출용 프라이머를 이용하는 이중 실시간 중합효소연쇄반응법과 융해곡선분석에 의하면 검체 내의 결핵균 및/또는 항산성비결핵균을 동시에 보다 효율적으로 검출할 수 있는 임상진단 수단을 제공할 수 있다.

도면

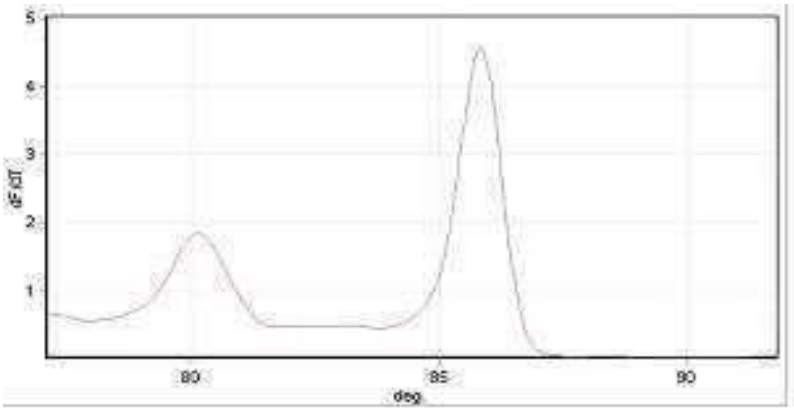
도면1



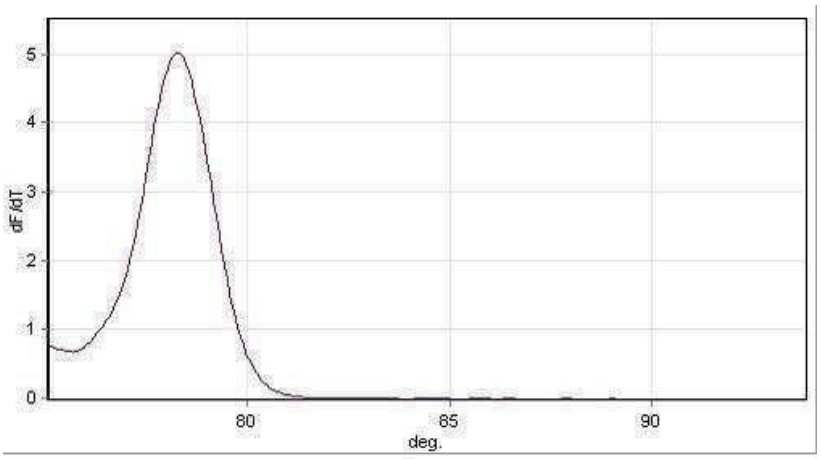
도면2


3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
dF/dT
80
85
90
deg.

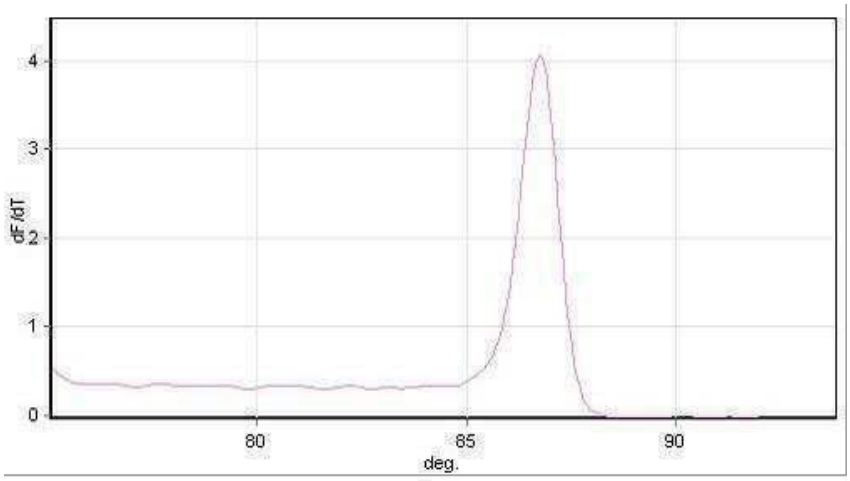
도면3


5
4
3
2
1
dF/dT
80
85
90
deg.

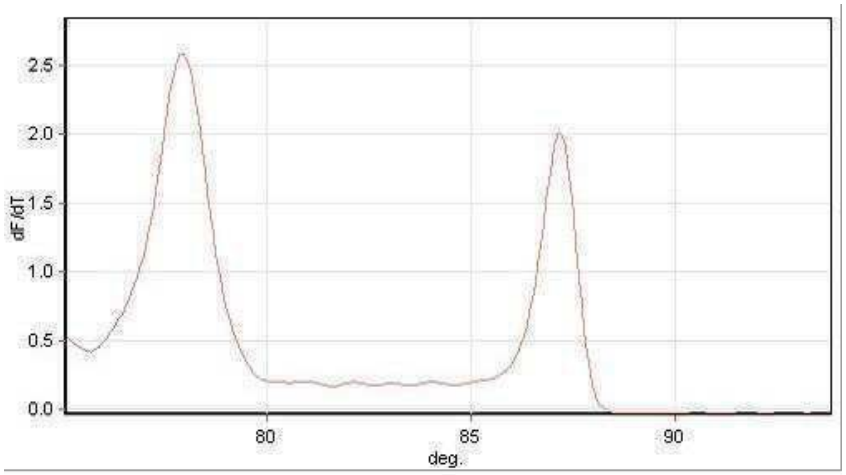
도면4


5
4
3
2
1
0
dF/dT
80
85
90
deg.

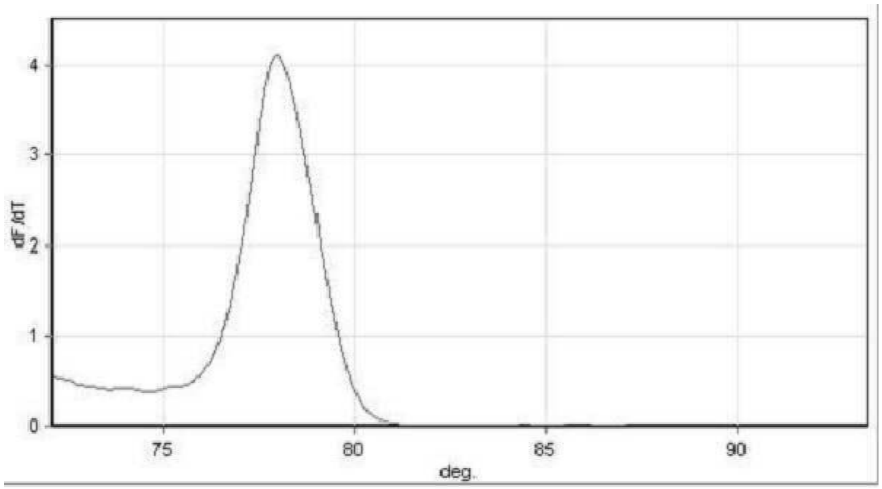
도면5


4
3
2
1
0
dF/dT
80
85
90
deg.

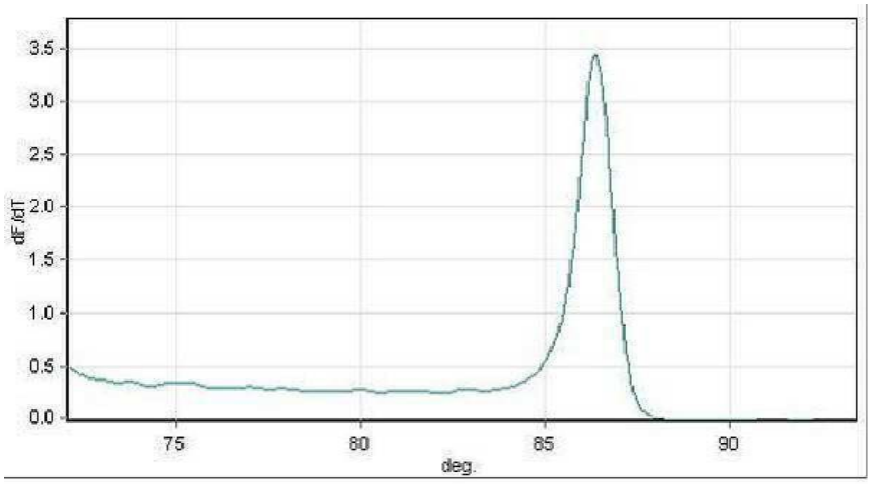
도면6


2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
dF/dT
80
85
90
deg.

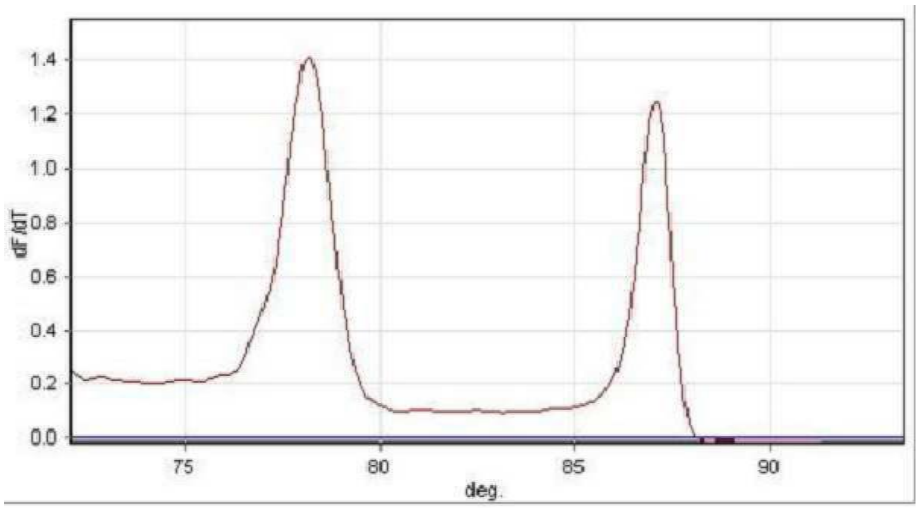
도면7


4
3
2
1
0
dF/dT
75
80
85
90
deg.

도면8



도면9



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부