



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0022540
(43) 공개일자 2023년02월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/70 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/701 (2013.01)

C12Q 2565/101 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0104429

(22) 출원일자 2021년08월09일

심사청구일자 2021년08월09일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

송진원

서울특별시 서초구 서초중앙로 220, 102동 1901호(반포동, 반포 래미안아파트)

리진영

서울특별시 동대문구 휘경로 60, 102동 701호(휘경동, 휘경에스케이뷰)

(74) 대리인

위병갑

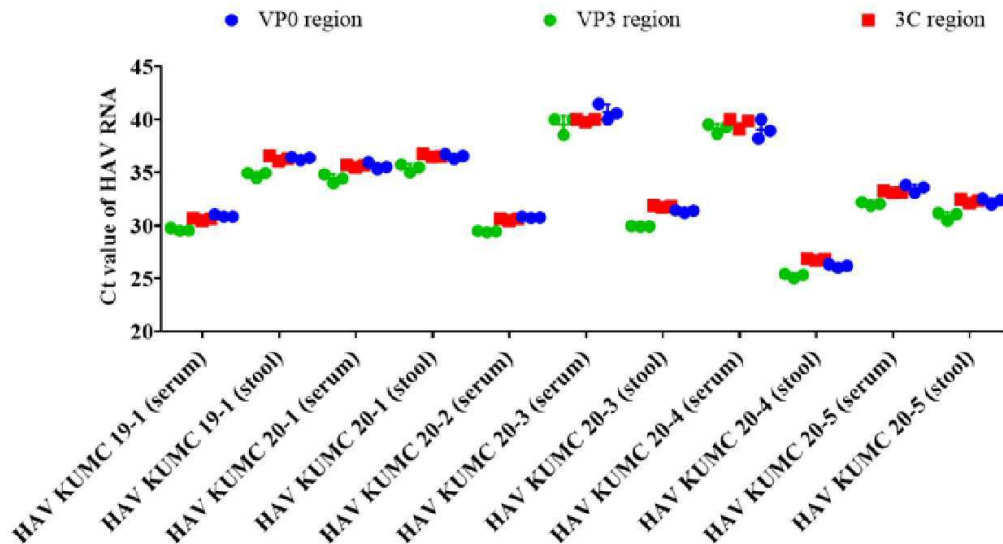
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 A형 간염바이러스의 검출 및 정량 방법

(57) 요약

본 발명은 A형 간염바이러스의 검출 및 정량을 위한 프라이머 및 프로브, 및 이를 이용한 A형 간염바이러스의 검출 및 정량 방법에 관한 것으로, 본 발명의 프라이머 및 프로브 세트들은 A형 간염바이러스에서 보존된 유전체 부위인 VP0 유전자, VP3 유전자 및 3C 유전자 부위를 한번에 검출 및 정량할 수 있으므로, TaqMan-기반 실시간 qPCR 방법을 이용하여 극미세소량의 A형 간염바이러스 유전체를 짧은 시간 안에 정확하게 검출 및 정량하여, A형 간염바이러스의 분석 방법의 민감도, 특이도 및 정확도를 높이는 효과가 있다.

대표도 - 도3



명세서

청구범위

청구항 1

A형 간염바이러스(Hepatitis A virus, HAV)의 VP0 유전자, VP3 유전자 및 3C 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함하는 A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프라이머 세트.

청구항 2

제 1항에 있어서, 서열번호 2 및 3의 프라이머쌍, 서열번호 5 및 6의 프라이머쌍, 및 서열번호 8 및 9의 프라이머쌍으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 프라이머 쌍을 포함하는, A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프라이머 세트.

청구항 3

제 1항에 있어서, 서열번호 2 및 3의 프라이머쌍, 서열번호 5 및 6의 프라이머쌍, 및 서열번호 8 및 9의 프라이머쌍을 포함하는, A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프라이머 세트.

청구항 4

제 3항에 있어서, A형 간염바이러스의 전장 유전체 내에서 67bp, 76bp 및 107bp의 PCR 산물이 생성되는, A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프라이머 세트.

청구항 5

A형 간염바이러스의 VP0 유전자, VP3 유전자 및 3C 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자에 특이적인 프로브를 포함하는 A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프로브.

청구항 6

제 5항에 있어서, 서열번호 1, 4 및 7의 프로브로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 프로브를 포함하는, A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프로브.

청구항 7

제 5항에 있어서, 5' 말단에 형광발색제(fluorescent reporter dye)가 표지되고 3' 말단에는 소광제(quencher)가 표지된, A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프로브.

청구항 8

제 5항에 있어서, 프로브는 TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응(TaqMan-based real-time qPCR)용인, A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프로브.

청구항 9

제 1항의 프라이머 세트, 및 제 5항의 프로브를 포함하는 A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프라이머 및 프로브 세트.

청구항 10

제 9항에 있어서, 서열번호 1의 프로브, 서열번호 2의 정방향 프라이머 및 서열번호 3의 역방향 프라이머, 서열번호 4의 프로브, 서열번호 5의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머, 또는 서열번호 7의 프로브, 서열번호 8의 정방향 프라이머 및 서열번호 9의 역방향 프라이머를 포함하는, A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프라이머 및 프로브 세트.

청구항 11

제 9항에 있어서, TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응(TaqMan-based real-time qPCR)용인, A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프라이머 및 프로브 세트.

청구항 12

제 1항의 프라이머 세트, 제 5항의 프로브, 또는 제 9항의 프라이머 및 프로브 세트를 포함하는, A형 간염바이러스 감염 진단용 조성물.

청구항 13

제 12항의 조성물을 포함하는, A형 간염바이러스 감염 진단 키트.

청구항 14

- (a) 검사 대상체로부터 분리한 생물학적 시료에서 RNA를 분리하는 단계;
- (b) 분리된 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계;
- (c) 제 9항의 프라이머 및 프로브 세트를 이용하여 TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응을 수행하는 단계; 및
- (d) 증폭 산물의 유무 및 증폭 산물의 양을 확인하는 단계를 포함하는 A형 간염바이러스의 검출 또는 정량 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, (d) 단계는:

- i) 농도별로 희석한 A형 간염바이러스의 표준 정량 시료를 이용하여 수행한 TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응의 증폭 산물의 양을 측정하여 표준 곡선(standard curve)을 산출하는 단계; 및
- ii) 시료로부터 수득한 RNA를 대상으로 수행한 TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응 산물의 양을 산출된 표준 곡선에 도입하여 A형 간염바이러스를 정량하는 단계를 포함하는, A형 간염바이러스의 검출 또는 정량 방법.

청구항 16

제 14항에 있어서, 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변 및 대변으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인, A형 간염바이러스의 검출 또는 정량 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 A형 간염바이러스의 검출 및 정량을 위한 프라이머 및 프로브, 및 이를 이용한 A형 간염바이러스의 검출 및 정량 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 수인성식품매개질환은 병원성미생물(바이러스) 또는 독성 물질에 오염된 물, 식품 등을 섭취하여 발생하는 모든 질환을 의미한다. 수인성식품매개질환은 원인 병원성 미생물이 경구를 통해 위장관에서 증식을 하면서 염증을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 주로 복통, 설사, 오심, 구토 등의 위장관과 관련된 증상을 보이는 것으로 보고되었다. 국내에서 유행하는 수인성식품매개질환 원인 바이러스는 노로바이러스, 로타바이러스, 콕사키바이러스, 아데노바이러스, A형 간염바이러스 등으로 보고되었다.

[0003] 이 중, A형 간염바이러스(Hepatitis A virus; HAV)는 주로 오염된 식품이나 물로 매개되어 전파된 후, 간염 및 간부전(liver failure) 등을 일으키며, 그 지역의 보건 위생 및 사회경제적인 생활수준과 밀접한 관련이 있다 (Fields virology, David M. Knipe, Peter M. Howley, Fourth edition, 2001). 처음에는 엔테로바이러스(enteroviruses) 타입 72에 분류되었으나, 여러 생화학적, 물리적 특성상의 차이로 인해 엔테로바이러스에서 분리되어 피코르나과(Picornaviridae family)의 헤파토바이러스(Hepatovirus)라는 새로운 속(genus)에 편입되었

다. A형 간염바이러스는 바이러스가 분리된 지역과 그 시점에 따라 다양한 균주(strain)로 구분된다. 그 중 가장 대표적인 균주는 사람으로부터 분리된 HM175(Australia, 1976), CR326(Costa Rica, 1960), MS-1(New York, 1964), SD11(California, 1974), LA(California, 1976), HAS15(Arizona, 1979), MBB(Northern Africa, 1978), GBM(Germany, 1976) 및 H2(China, 1982)이 있고, 동물로부터 분리된 PA21(owl monkey, Panama, 1980) 및 AGM27(Africa green monkey, Russia, 1985)이 있다. 상기 균주는 기본적으로 생장특성에 따라 구분되기도 하지만, 대부분은 유전자적 염기서열을 기준으로 구분된다. A형 간염바이러스는 외피(envelop)가 없지만 담즙이나 여러 조건의 장관경로에서 안정적이며, 바닷물, 폐수, 토양 및 굴과 같은 여러 환경에서 생존이 가능하다. 이는 A형 간염바이러스가 가지고 있는 여러 환경에 대한 물리, 화학적 저항성에 의한 것이라 할 수 있다. A형 간염바이러스는 경구 감염(fecal-oral route) 및 비 경구적인 경로로 전파가 가능한 바이러스로, 오염된 음식 또는 환경과 접촉 시 감염되고, 드물게는 사람과 접촉 시에도 감염되는 것으로 알려져 있다. A형 간염의 임상증상은 발열, 식욕감퇴, 구역, 구토, 쇠약감, 복통, 설사 등 다른 바이러스 간염과 유사하지만 물을 매개한 경구감염을 통해 전파된다. A형 간염바이러스는 경구적 경로로 몸에 들어와 소화기관에서 1차 증식을 하며, 대변을 통해서 체외로 배출된다. 장내감염을 시작으로 하여 바이러스가 간장으로 확산되면서 증상을 일으키며, 발병 후 급성기나 잠복기에 대변을 통해 바이러스가 약 3~4주간 배출될 수 있다. 이렇게 배출된 A형 간염바이러스는 수인성 경로를 통하여 다시 전파되기 때문에 물 환경을 포함한 다양한 시료와 환자 등에서는 중요한 관리대상으로 간주된다.

[0004] 현재, A형 간염바이러스 감염 여부를 확인하는 검사방법으로는 IgM anti-HAV(항A형 간염바이러스 면역글로불린M 항체검사), RT-PCR(reverse transcription-PCR) 방법 등이 있다. 항A형 간염바이러스 IgM 항체는 증상이 나타나기 시작할 무렵에서 감염이 회복된 후 6개월까지 검사상 양성으로 나타날 수 있으며 급성 A형 간염의 확진에만 이용되는 항체검사이다. RT-PCR 분석법은 민감도는 높으나 전기영동 장치 및 자외선 투과조명기(UV transilluminator)와 같은 부가적인 장비를 필요로 하며, PCR 후 증폭된 유전자 산물을 아가로스겔 전기영동을 통해 가시화해야 검출 결과를 확인할 수 있어, 진단 시간 (30분~1시간)이 오래 걸리는 단점을 가지고 있다. 전기영동할 필요가 없으며 PCR 증폭 산물의 증가를 형광물질 검출을 이용하여 실시간으로 탐지할 수 있는 SYBR Green-based real-time qPCR 방법은 전기영동할 필요가 없으며 PCR 증폭 산물의 증가를 형광물질 검출을 이용하여 실시간으로 탐지할 수 있으나, 표적 산물 외 프라이머 이합체(dimer)와 같은 비-특이적 PCR 산물에도 형광 dye가 결합하여, 상대적인 PCR 산물을 검출할 수 있으므로 민감도는 높으나 정확도가 낮은 방법인 문제가 있다.

[0005] 따라서, 이러한 문제점 없이 A형 간염바이러스를 높은 특이도 및 민감도로 검출할 수 있는 기술 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 목적은 A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프로브를 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프라이머 및 프로브 세트를 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 A형 간염바이러스 감염 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 목적은 A형 간염바이러스 감염 진단 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 아울러, 본 발명의 목적은 A형 간염바이러스의 검출 또는 정량 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 A형 간염바이러스의 VP0 유전자, VP3 유전자 및 3C 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함하는 A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프라이머 세트를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 A형 간염바이러스의 VP0 유전자, VP3 유전자 및 3C 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자에 특이적인 프로브를 포함하는 A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프로브를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트, 및 상기의 프로브를 포함하는 A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프라이머 및 프로브 세트를 제공한다.

- [0015] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트, 상기 프로브, 또는 상기 프라이머 및 프로브 세트를 포함하는 A형 간염바이러스 감염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 A형 간염바이러스 감염 진단 키트를 제공한다.
- [0017] 아울러, 본 발명은 A형 간염바이러스의 검출 또는 정량 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명의 프라이머 및 프로브 세트들은 A형 간염바이러스에서 보존된 유전체 부위인 VP0 유전자, VP3 유전자 및 3C 유전자 부위를 한번에 검출 및 정량할 수 있으므로, TaqMan-기반 실시간 qPCR 방법을 이용하여 극미세소량의 A형 간염바이러스 유전체를 짧은 시간 안에 정확하게 검출 및 정량하여, A형 간염바이러스의 분석 방법의 민감도, 특이도 및 정확도를 높이는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 A형 간염바이러스 전체 유전체 서열 중에서 잘 보존된 유전체 부위를 선별하기 위해 A형 간염바이러스 전체 유전체 서열 중 각 유전체 부위에 따른 서열 상동성을 확인한 도이다.
- 도 2는 본 발명의 다중 프로브 및 프라이머로 TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응을 수행하였을 때 예상되는 유전체 부위의 반응 생성물의 위치 및 크기를 나타낸 모식도이다.
- 도 3은 본 발명의 다중 프로브 및 프라이머 세트를 사용하여 TaqMan-based real-time qPCR을 수행하여 A형 간염바이러스 환자의 시료에서 A형 간염바이러스를 검출한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 HAV 재조합 플라스미드 DNA의 스탠다드 커브를 나타낸 도이다.
- 도 5는 본 발명의 다중 프로브 및 프라이머 세트를 사용하여 VP3 유전체(유전자)를 표적으로 한 경우와 VP4 유전체를 표적으로 한 경우의 A형 간염바이러스를 검출 결과를 비교한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0021] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0022] 본 발명에서 용어, "대상체" 또는 "환자"는 인간, 유인원, 원숭이, 소, 개, 기니아 피그, 토끼, 닭, 곤충 등을 포함하여 치료가 요구되는 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 소견을 보이지 않는 임상 연구 시험에 참여한 임의의 대상 또는 역학 연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상이 대상에 포함된다.
- [0023] 본 발명에서 용어, "시료(샘플)" 또는 "검체"는 대상 또는 환자로부터 얻은 생물학적 시료를 의미한다. 생물학적 시료의 공급원은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고형 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성분; 대상의 세포일 수 있다.
- [0025] 일 측면에서, 본 발명은 A형 간염바이러스(Hepatitis A virus, HAV)의 VP0 유전자, VP3 유전자 및 3C 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함하는 A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프라이머 세트에 관한 것이다.
- [0026] 일 구현예에서, 상기 프라이머 쌍은 서열번호 2 및 3의 프라이머쌍, 서열번호 5 및 6의 프라이머쌍, 및 서열번호 8 및 9의 프라이머쌍으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 프라이머 쌍일 수 있으며, 서열번호 2 및 3

의 프라이머쌍, 서열번호 5 및 6의 프라이머쌍, 및 서열번호 8 및 9의 프라이머쌍을 모두 포함하는 것이 더욱 바람직하고, 이들은 각각 A형 간염바이러스의 전장 유전체 내에서 76bp, 107bp 및 67bp의 PCR 산물을 생성할 수 있어, A형 간염바이러스의 VP0 유전자, VP3 유전자 및 3C 유전자를 동시에 검출 및 정량할 수 있다.

- [0027] 일 구현예에서, 상기 프라이머쌍은 TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응(TaqMan-based real-time qPCR)용일 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기 (free 3 hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)서열과 염기쌍 (base pair)를 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열로, 중합효소연쇄반응법(PCR)에서 이용되는 표적 핵산에 인접해 있는 5' 말단 서열 및 3' 말단 서열에 상보적인 단일가닥의 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 또한, "정방향 프라이머(forward primer)" 및 "역방향 프라이머(reverse primer)"라는 용어는 중합 효소 연쇄 반응에 의해 증폭되는 주형의 일정한 부위의 3' 말단 및 5' 말단에 각각 결합하는 프라이머를 의미한다. 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서, 일 구체예에 따른 프라이머 세트는 주형인 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 서열에 혼성화(hybridization)되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분한 것으로 해석된다.
- [0029] 일 측면에서, 본 발명은 A형 간염바이러스의 VP0 유전자, VP3 유전자 및 3C 유전자로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자에 특이적인 프로브를 포함하는 A형 간염바이러스 검출 또는 정량용 프로브에 관한 것이다.
- [0030] 일 구현예에서, 서열번호 1, 4 및 7의 프로브로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 프로브를 포함할 수 있다.
- [0031] 일 구현예에서, 5' 말단에 형광발색제(fluorescent reporter dye)가 표지되고 3' 말단에는 소광제(quencher)가 표지될 수 있다.
- [0032] 일 구현예에서, 형광발색제는 FAM(carboxyfluorescein), JOE(2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein), VIC, HEX(2',4',5',7',-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), Cy3(indocarbocyanine-3), Cy5(indocarbocyanine-5), 및 Rox(6-Carboxy-X-rhodamine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0033] 일 구현예에서, 소광제는 MGB(minor-groove binding), BHQ-1(Black Hole Quencher 1), BHQ-2(Black Hole Quencher 2), BHQ-3(Black Hole Quencher 3), TAMRA(5-Carboxytetramethylrhodamine), DDQ1(deep dark Quencher 1), MGBNFQ(Minor Groove Binder NonFluorescent Quencher), DABCYL, QSY 및 DDQ2(deep dark Quencher 2)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0034] 일 구현예에서, 상기 프로브는 TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응(TaqMan-based real-time qPCR)용 프로브일 수 있다.
- [0035] 일 구현예에서, 상기 프로브는 A형 간염바이러스의 전장 유전체 내에서 VP0, VP3 및 3C의 특정 유전체 부위에 반응하여 A형 간염바이러스의 VP0 유전자, VP3 유전자 및 3C 유전자를 동시에 검출 및 정량할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 용어, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 올리고뉴클레오타이드를 말하는 것으로, 자연적으로 발생하거나 합성적으로, 제조합적으로, 또는 PCR 증폭에 의해 생산되는 것으로 목적하는 다른 올리고뉴클레오타이드에 대해 최소 부분에 결합할 수 있다. 프로브는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 프로브는 특정 서열의 검출, 정의 및 분리에 유용하다. 바람직한 양태로서, 본 발명에 사용된 프로브는 형광성, 방사성 및 발광성 시스템을 포함할 수 있고, 다른 검출 시스템에서 검출할 수 있도록 "리포터 분자"로 표지될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0038] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 프라이머 세트, 및 본 발명의 프로브를 포함하는 A형 간염바이러스 검출 또

는 정량용 프라이머 및 프로브 세트에 관한 것이다.

- [0039] 일 구현예에서, 상기 프라이머 및 프로브 세트는 1) 서열번호 1의 프로브, 서열번호 2의 정방향 프라이머 및 서열번호 3의 역방향 프라이머; 2) 서열번호 4의 프로브, 서열번호 5의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머; 및 3) 서열번호 7의 프로브, 서열번호 8의 정방향 프라이머 및 서열번호 9의 역방향 프라이머로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있으며, 상기 세 가지 조합의 프라이머쌍 및 프로브를 모두 포함하는 다중 프로브 및 프라이머인 것이 가장 바람직하다.
- [0040] 일 구현예에서, 상기 프라이머 및 프로브 세트는 시료에서 A형 간염바이러스의 전장 유전체 서열 중에서 잘 보존된 세 가지 부위인 VP0 유전자, VP3 유전자 및 3C 유전자를 동시에/한번에 실시간 정량 중합효소연쇄반응으로 확인하여 바이러스의 유전체를 검출 및 정량할 수 있다.
- [0041] 일 구현예에서, 상기 프라이머 및 프로브 세트는 TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응(TaqMan-based real-time qPCR)용일 수 있다.
- [0042] 일 구현예에서, 상기 프라이머 및 프로브 세트는 다중 프로브 및 프라이머 유전체 반응 방법에 기반을 둔 TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응을 통해 A형 간염바이러스의 유전체(genome)를 검출 및 정량할 수 있다.
- [0043] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 프라이머 및 프로브 세트를 포함하는 TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응용 키트에 관한 것이다.
- [0044] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 프라이머 세트, 본 발명의 프로브, 또는 본 발명의 프라이머 및 프로브 세트를 포함하는, A형 간염바이러스 감염 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0045] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 포함하는, A형 간염바이러스 감염 진단 키트에 관한 것이다.
- [0046] 일 구현예에서, 상기 키트는 완충용액, 염화칼륨, 염화마그네슘 또는 dNTP 등을 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명에서, 사용된 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)(예컨대, A형 간염바이러스 감염에 의한 감염의 단계 결정 또는 치료에 대한 반응성 결정)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다.
- [0048] 일 측면에서, 본 발명은 (a) 검사 대상체로부터 분리한 생물학적 시료에서 RNA를 분리하는 단계; (b) 분리된 RNA로부터 cDNA를 합성하는 단계; (c) 본 발명의 프라이머 및 프로브 세트를 이용하여 TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응을 수행하는 단계; 및 (d) 증폭 산물의 유무 및 증폭 산물의 양을 확인하는 단계를 포함하는 A형 간염바이러스의 검출 또는 정량 방법에 관한 것이다.
- [0049] 일 구현예에서, 상기 (d) 단계는 i) 농도별로 희석한 A형 간염바이러스의 표준 정량 시료를 이용하여 수행한 TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응의 증폭 산물의 양을 측정하여 표준 곡선(standard curve)을 산출하는 단계; 및 ii) 시료로부터 수득한 RNA를 대상으로 수행한 TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응 산물의 양을 산출된 표준 곡선에 도입하여 A형 간염바이러스를 정량하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0050] 일 구현예에서, 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 소변 및 대변으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0052] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0054] **실시예 1. A형 간염바이러스 유전체 검출용 프로브 및 프라이머 설계 및 제작**
- [0055] *Hepatovirus*속(Genus)에 속하는 A형 간염바이러스(Hepatitis A virus, HAV)의 세 가지 유전체 검출을 가능하게 하는 프로브 및 프라이머의 설계 및 제작을 위해 전 세계 HAV 59개 균주에 대한 전장 유전체 염기서열을 정렬(alignment)한 후 상대적으로 잘 보존된 영역을 확인하였다 (도 1). 이를 통해, A형 간염바이러스의 전장 유전체에서 VP0, VP3 및 3C 유전자 부위를 선택하고 (도 2), 이에 대한 TaqMan 프로브 및 프라이머 세트로서 A형 간

염바이러스의 ssRNA(single-stranded RNA)에서 67bp, 76bp 및 107bp 길이로 산물을 증폭할 수 있는 일반적인 단일 프라이머와 프로브를 설계하였다 (표 1).

표 1

Oligo	Name	Sequence (5' -> 3')	5' Reporter	3' Quencher	Region	Size	서열번호
프로브	VP0-P	AGA AGA CTC AGG GGG AGA AG	VIC	MGBNFQ	960-979		1
Forward 프라이머	VP0-PF	TGA AAA CCT CTG TTG ATA AAC CTG			930-953		2
Reverse 프라이머	VP0-PR	CAA TCA GCA GAA TGA ATC AGG A			984-1005	76bp	3
프로브	VP3-P	TGA CTT CTC CTT CTA ATG TTG CTT CTC A	FAM	MGBNFQ	2097-2124		4
Forward 프라이머	VP3-PF	GCC ATT GGG AAG CTT ATT GTG			2060-2080		5
Reverse 프라이머	VP3-PR	CAT TCC AAA TTA ATT GCT GAA AG			2144-2166	107bp	6
프로브	3C-P	TGT GTG GTG GGG CCC TGG TGT C	FAM	QSV	5802-5823		7
Forward 프라이머	3C-PF	GGT CTT CCT GGA ATG TGT GG			5789-5808		8
Reverse 프라이머	3C-PR	CCA AAA TTG CAT TCT GTA TGG AC			5833-5855	67bp	9

실시예 2. A형 간염바이러스 검출 확인

상기 실시예 1에서 설계한 A형 간염바이러스 유전체 검출용 프로브 및 프라이머가 실제로 A형 간염바이러스 감염 시료에서 A형 간염바이러스를 검출할 수 있는지 확인하기 위해, TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응 (TaqMan-based real-time qPCR)을 수행하였다. 구체적으로, A형 간염 환자의 혈청 시료 및 대변 시료를 확보하고, LS TRIzol (Invitrogen)을 이용하여 총 RNA를 분리하였다. 분리한 총 RNA 9.0ul를 High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems)를 사용하여 최종 볼륨 20ul로 준비하고, 37℃에서 60분, 94℃에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 이렇게 만들어진 cDNA 1.0ul를 주형(template)으로 이용하고, 상기 실시예 1의 세 가지 프로브 (각각의 프로브 농도 10pM) 각 1.0ul, forward 프라이머 (각각의 프라이머 농도 36pM) 각 0.5ul, reverse 프라이머 (각각의 프라이머 농도 36pM) 각 0.5ul, 2X Taqman Master Mixture 10.0ul 및 증류수 (Molecular grade) 3.0ul를 혼합하여 최종 볼륨 25ul가 되도록 하여 TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응을 수행하였다. TaqMan 기반 실시간 정량 중합효소연쇄반응 조건은 하기 표 2의 95℃에서 10분 동안 초기 변성시킨 후, 95℃에서 15초, 60℃에서 1분 단계를 45 사이클로 수행하였으며, 이를 통해 유전자의 감염 유무를 확인하고 바이러스양을 정량하였다.

표 2

<PCR Mixture>	VP0	VP3	3C
Probe (each 10p)	1 ul	1 ul	1 ul
Forward primer (each 36p)	0.5 ul	0.5 ul	0.5 ul
Reverse primer (each 36p)	0.5 ul	0.5 ul	0.5 ul
Template		1.0 ul	
2X Taqman Master Mixture		10.0 ul	
D.W to		25.0 ul	

<PCR condition>	
95°C	10min
95°C	15sec
60°C	1min

X45

→ Applied Biosystems QuantStudio 3 Real-Time PCR System

[0060]

[0061]

그 결과, 11개의 환자의 혈청 및 대변(patient serum and stool)에서 바이러스양에 따라 표적 유전체 영역에 대한 반응 산물의 발현양을 확인할 수 있었으며 (도 3), 이를 통해, 본 발명의 A형 간염바이러스의 다중 프로브 및 프라이머가 A형 간염바이러스를 검출할 수 있음을 알 수 있다.

[0063]

실시예 3. A형 간염바이러스 검출 특이도 및 민감도 비교

[0064]

본 발명의 VP3 유전자 부위를 표적으로 하는 다중 프로브 및 프라이머의 TaqMan qPCR 검출 특이도 및 민감도를 A형 간염바이러스 유전자의 기준 부위(reference region)인 VP4 유전체(유전자)를 표적으로 한 경우와 비교하였다. 구체적으로, 4개의 환자의 혈청 및 대변 시료에서 VP3 유전자 (741bp)의 플라스미드 DNA를 pTOP Blunt V2 벡터 (Enzynomics Co., Ltd., Seoul, ROK)를 사용하여 합성한 뒤, 재조합 플라스미드 DNA의 농도는 Nano drop (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 260 nm 및 280 nm에서 UV 흡광도로 측정하고 1×10^1 에서 1×10^{10} copies/ μ L로 연속 희석하였다 (1/10씩 10회). 이 후 Quantstudio 5 Flex 실시간 PCR 시스템(Applied Biosystems)에서 TaqMan PCR를 통해 1×10^1 에서 1×10^{10} copies/ μ L의 재조합 플라스미드 DNA 표준의 연속 희석액을 증폭하고 스탠다드 커브를 구축하였다 (도 4). 여기에서, VP3 유전체를 표적으로 한 프로브 및 프라이머 서열은 본 발명의 다중 프로브 및 프라이머이며, VP4 유전체를 표적으로 한 프로브 및 프라이머 서열은 프로브 FAM-5'-AAA CAA GGA ATT TTC CAG AC-3', 정방향 프라이머 5'-GCA TTT AGG TTT TTC CTC ATT-3' 및 정방향 프라이머 5'-ACK GAC TGA ATC ATT-3'이며, PCR 조건은 상기 표 2와 동일하다. 스탠다드 커브를 통해 각 시료 당 확인된 Ct 값을 이용하여 HAV 바이러스의 양(viral load)을 정량하였다 (표 3). DNA 마이크로그램당 플라스미드의 복제 수는 플라스미드의 총 뉴클레오티드 수를 사용하여 계산되었으며, 각 데이터 포인트는 삼중(triplicates)에서 얻은 평균 Ct 값을 나타냈다. 환자 시료와 플라스미드 DNA를 이용한 TaqMan qPCR 실험 조건은 동일하다.

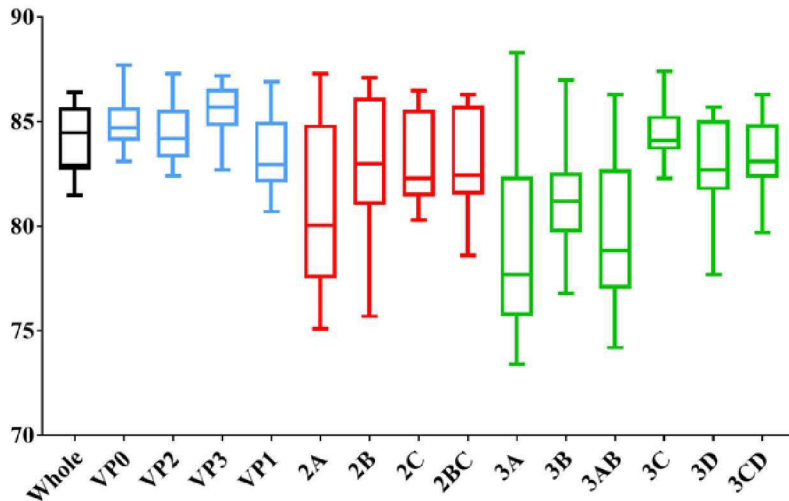
표 3

Sample	Sample type	HAV RNA copy number (log10 copies/ μ l)
HAV KUMC 20-4	Stool	4.5
HAV KUMC 20-3	Stool	3.0
HAV KUMC 20-2	Serum	3.2
HAV KUMC 19-1	Serum	3.2
HAV KUMC 20-5	Stool	2.7
HAV KUMC 20-5	Serum	2.4
HAV KUMC 20-1	Serum	1.7
HAV KUMC 19-1	Stool	1.5
HAV KUMC 20-1	Stool	1.4
HAV KUMC 20-4	Serum	0.5
HAV KUMC 20-3	Serum	0.3

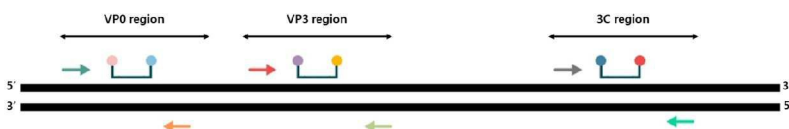
[0066] 그 결과, HAV KUMC 19-1(혈청), HAV KUMC 20-2(혈청), HAV KUMC 20-3(대변), HAV KUMC 20-4(대변), HAV KUMC 20-5(혈청) 및 HAV KUMC 20- 5(대변)는 2.4 내지 4.5 log10 copies/ μ L의 A형 간염바이러스에 해당하는 26.1~32.9의 Ct 값을 나타내 (표 3), A형 간염바이러스 양이 VP0, VP3 및 3C 특이적 TaqMan qPCR에 의해 정량화되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 35.2 ~ 39.8의 Ct 값을 가진 HAV KUMC 19-1(대변), HAV KUMC 20-1(혈청), HAV KUMC 20-1(대변), HAV KUMC 20-3(혈청) 및 HAV KUMC 20-4(혈청) 시료에서는 A형 간염바이러스 RNA의 0.5-1.7 log10 copies/ μ L에 해당하는 극미세소량의 바이러스를 검출할 수 있었다. 아울러, 본 발명의 VP3 유전체를 표적으로 하여 검출한 경우가 VP4 유전체를 이용한 경우보다 A형 간염바이러스 검출에 더 높은 특이도 및 민감도를 나타내는 것을 확인하였다 (도 5).

도면

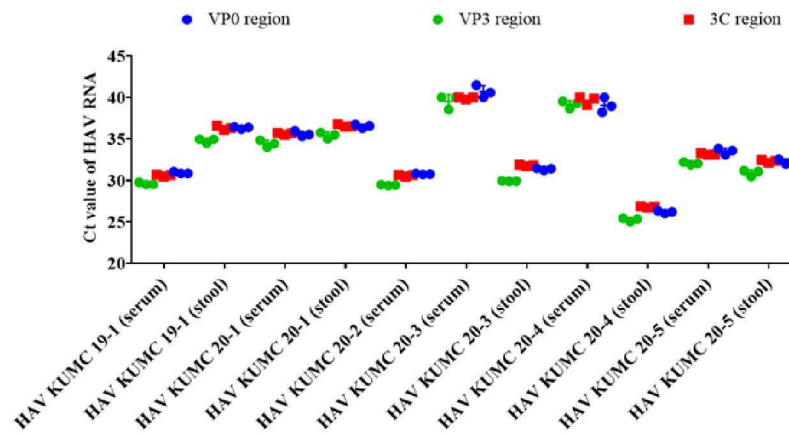
도면1



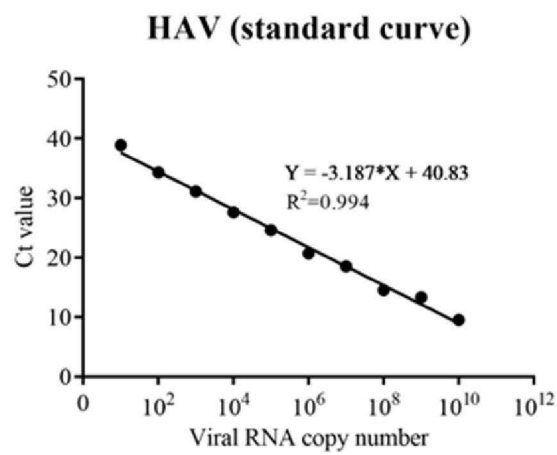
도면2



도면3

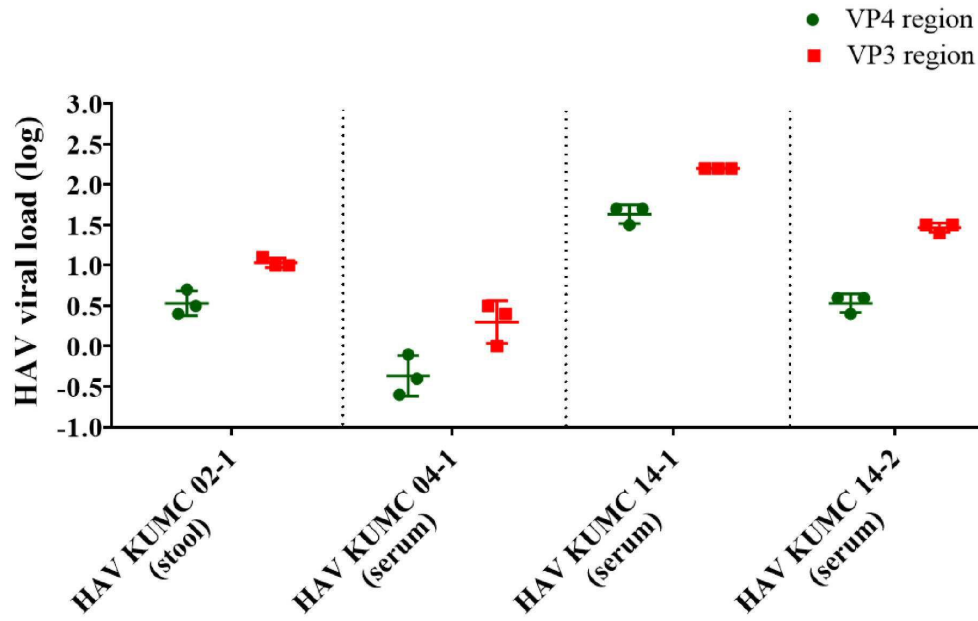


도면4



Standard curve obtained with serial 10-fold dilutions of HAV recombinant plasmid DNA, ranging from 1×10^{10} to 1×10 copies/ μ L.

도면5



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> METHOD FOR DETECTION AND QUANTIFICATION OF HEPATITIS A VIRUS

<130> DP-2021-0525

<160> 9

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VP0-P

<400> 1

agaagactca gggggagaag 20

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VP0-PF

<400> 2

tgaaaacctc tgttgataaa cctg 24

<210> 3
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VP0-PR
 <400> 3
 caatcagcag aatgaatcag ga 22
 <210> 4
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VP3-P
 <400> 4
 tgacttctcc ttctaattgtt gcttctca 28
 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VP3-PF
 <400> 5
 gccattggga agcttattgt g 21

 <210> 6
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VP3-PR
 <400> 6
 cattccaaat taattgctga aag 23
 <210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 3C-P
 <400> 7

tgtgtggtgg ggcctggtg tc 22

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3C-PF

<400> 8

ggtcttctg gaatgtgtg 20

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3C-PR

<400> 9

ccaaaattgc attctgtatg gac 23