(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0102529
(43) 공개일자 2022년07월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/701 (2013.01)
C12Q 2563/107 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0012076
(22) 출원일자 2021년01월28일
심사청구일자 2021년01월28일
(30) 우선권주장
1020210004417 2021년01월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김우주
서울특별시 강남구 역삼로 309, 103-1404 (역삼동, 래미안펜타빌)
이한솔
서울특별시 성북구 성북로4길 52 (돈암동, 한신한진아파트)
(74) 대리인
특허법인 무한

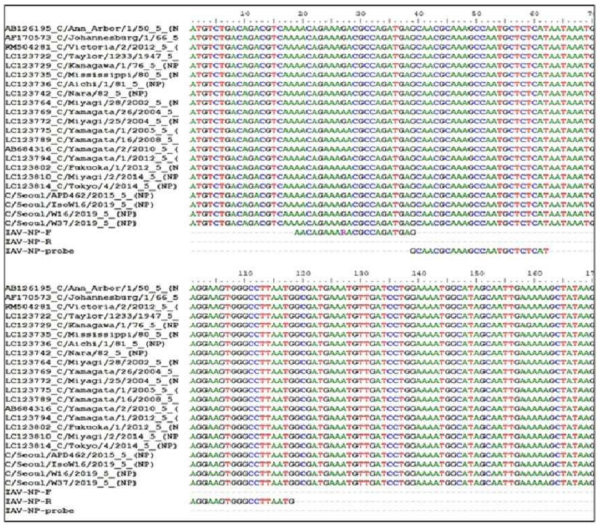
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **C형 인플루엔자 바이러스 검출용 프라이머 및 프로브 세트**

(57) 요 약

본 발명은 C형 인플루엔자 바이러스 검출용 프라이머 및 프로브 세트와 A형, B형, 및 C형 인플루엔자 바이러스의 감별 검출용 프라이머 및 프로브 세트 등에 관한 것으로서, 본 발명의 제공에 의해 신속/정확한 C형 인플루엔자 바이러스의 검출이 가능할 것이며 검출된 바이러스의 특징에 맞는 적절한 치료가 가능하게 할 것이며 정확한 바이러스 유행 진단을 통해 보건 및 방역대책 자료에 활용이 가능하다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711104111
과제번호	2016R1A5A101014821
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	ERC 나노-생체유체 검사 연구단
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 3의 프라이머 세트와 서열번호 2의 프로브를 포함하는, C형 인플루엔자 바이러스 검출용 조성물.

청구항 2

제1항의 조성물을 포함하는 C형 인플루엔자 바이러스 검출용 PCR 키트.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 키트는 DNA 중합효소, dNTPs 및 버퍼를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, C형 인플루엔자 바이러스 검출용 PCR 키트.

청구항 4

서열번호 1 및 3의 프라이머 세트와 서열번호 2의 프로브;

서열번호 4 및 6의 프라이머 세트와 서열번호 5의 프로브; 및

서열번호 7 및 9의 프라이머 세트와 서열번호 8의 프로브;를 포함하는 인플루엔자 바이러스 A형, B형, 및 C형 감별 검출용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 조성물은 서열번호 10 및 12의 프라이머 세트와 서열번호 9의 프로브를 추가로 포함하는, 인플루엔자 바이러스 A형, B형, 및 C형 감별 검출용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 서열번호 2, 5, 및 8의 프로브는 형광물질이 부착된 것을 특징으로 하며, 상기 형광물질은 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(tertramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 씨아디카르보시아닌(thiadicarbocyanine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 인플루엔자 바이러스 A형, B형, 및 C형 감별 검출용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 서열번호 2, 5, 및 8의 프로브는 각각 상이한 파장을 발하는 형광물질이 부착된 것을 특징으로 하는, 인플루엔자 바이러스 A형, B형, 및 C형 감별 검출용 조성물.

청구항 8

제4항의 조성물을 포함하는 인플루엔자 바이러스 A형, B형, 및 C형 감별 검출용 PCR 키트.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 키트는 DNA 중합효소, dNTPs 및 버퍼를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 인플루엔자 바이러스 A형, B형, 및 C형 감별 검출용 PCR 키트.

청구항 10

(1) 생물학적 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 및

(2) 상기 추출된 DNA를 서열번호 1 및 3의 프라이머 세트와 서열번호 2의 프로브를 이용하여 PCR을 수행하는 단계;를 포함하는 C형 인플루엔자 바이러스 감염 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 객담(sputum), 기관지 흡인(bronchial aspiration) 및 기관지세척액(bronchial washing), 체액(body fluid), 및 혈액으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, C형 인플루엔자 바이러스 감염 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 12

(1) 생물학적 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 및

(2) 제4항의 조성물을 이용하여 상기 추출된 DNA의 PCR을 수행하는 단계;를 포함하는 인플루엔자 바이러스 A형, B형, 및 C형 감염의 감별 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 객담(sputum), 기관지 흡인(bronchial aspiration) 및 기관지세척액(bronchial washing), 체액(body fluid), 및 혈액으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 인플루엔자 바이러스 A형, B형, 및 C형 감염의 감별 진단을 위한 정보제공방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 C형 인플루엔자 바이러스 검출용 프라이머 및 프로브 세트와 A형, B형, 및 C형 인플루엔자 바이러스의 감별 검출용 프라이머 및 프로브 세트 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 인플루엔자 바이러스는 감염성 호흡기 질환의 원인 병원체로 단백질(예를 들어, NP (nuleocapsid), 및 M (matrix) 등)의 항원성 차이로 인해 A, B, C, D형으로 구분된다. 이 중 A, B, C형 바이러스는 사람에게 감염되어 호흡기 질환을 동반한 환자의 기저질환 악화를 유발하는 것으로 알려져 있으며 세계적으로 발생하는 계절성 인플루엔자는 매년 약 10억명의 환자를 발생시키고 이 중 25-50만명이 사망한다고 알려져 있다. (참고문헌: WHO, Up to 650 000 people die of respiratory diseases linked to seasonal flu each year) 특히, A형과 B형의 경우 많은 연구를 바탕으로 다양한 진단법들이 알려져 있는 반면 C형 바이러스의 경우 진단 및 배양의 어려움으로 인해 많이 알려져 있지 않다. 최근 진단 및 연구 기법의 발달로 인해 C형 인플루엔자 바이러스가 소아에서 세기관지염 및 폐렴 등 하기도 감염증을 유발할 수 있다고 알려졌다. (참고문헌: Y. Matsuzaki et al., J. Infect. Dis., 193: 1229-.1235, 2006)

[0004] 최근 인플루엔자 바이러스 특이 유전자를 검출하는 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR; reverse transcription-polymerase chanin reaction)부터 다수의 유전자형을 동시에 검출할 수 있는 멀티플렉스 RT-PCR (multiplex RT-PCR)법 등을 이용한 분자생물학적 진단법이 많이 사용된다. (참고문헌: Wright KE et al., J Clin. Microbiol., 33(5): 180-1184, 1995; Stockton J et al., J. Clin. Microbiol., 36(10): 2990- 2995; Poddar SK, J. Virol. Methods, 99: 63- 70, 2002). 이러한 진단법의 발달로 인해 호흡기 감염증상을 보이는 소아에서 C형 인플루엔자 바이러스 검출에 대한 보고가 최근 다양한 나라에서 보고되었다. (참고문헌: HS Lee et al., J. Clin. Virol., 115: 47- 52, 2019; Njouom R et al., Emerg Infect Dis., 25(3): 607- 609, 2019) 또한, C형 인플루엔자 바이러스의 혈청학적 분석 결과에 따르면 소아에서 40-60%, 성인에서 80-100% 양성이 나타난다. (참고문헌: M Homma et al., Microbiol. Immunol. 26: 639-642, 1982) 반면, C형 인플루엔자 바이러스에 특이적인 항바이러스제가 부족한 실정이다.

[0005] 이에, A형과 B형 인플루엔자 바이러스뿐만 아니라 C형 인플루엔자 바이러스를 동시에 진단할 수 있는 방법이 요구된다. 특히, C형 인플루엔자 바이러스에 의해 하기도 감염증을 보일 수 있는 소아에서 신속 정확한 진단법이 필요하다.

[0006] 본 발명자들은 C형 인플루엔자 바이러스에 특이적인 프라이머와 프로브를 제작하였고 기존에 알려져 있던 A형, B형 인플루엔자 바이러스와 같이 동시에 진단할 수 있음을 분리된 바이러스 배양액과 바이러스 감염이 확진된 환자의 검체를 통해 확인하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 멀티플렉스 RT-PCR법에 적합한 C형 인플루엔자 바이러스의 프라이머, 프로브 세트를 제공하고, A형, B형 및 C형 인플루엔자 바이러스 감별 검출이 가능한 진단 키트 제공을 목적으로 한다.

[0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 3의 C형 인플루엔자바이러스 (ICV) 검출용 프라이머 및 프로브 세트와 상기 프라이머 및 프로브 세트를 포함하는 ICV 검출용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 ICV 검출용 조성물을 포함하는 ICV 검출용 PCR 키트를 제공하며, 상기 PCR 키트는 DNA 중합효소, dNTPs 및 버퍼를 추가로 포함할 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명은 서열번호 1 내지 3의 ICV 검출용 프라이머 및 프로브 세트; 서열번호 4 내지 6의 A형 인플루엔자 바이러스 (IAV) 검출용 프라이머 및 프로브 세트; 및 서열번호 7 내지 9의 B형 인플루엔자 바이러스 (IBV) 검출용 프라이머 및 프로브 세트;를 포함하는 IAV, IBV, 및 ICV 동시 감별 검출용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 IAV, IBV, 및 ICV 동시 감별 검출용 조성물은 internal control primer/probe set로서 서열번호 10 내지 12의 프라이머 및 프로브 세트를 추가로 포함할 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 IAV, IBV, 및 ICV 동시 감별 검출용 조성물을 포함하는 IAV, IBV, 및 ICV 동시 감별 검출용 PCR 키트를 제공하며, 상기 PCR 키트는 DNA 중합효소, dNTPs 및 버퍼를 추가로 포함할 수 있다.

[0016] 한편, 본 발명의 프로브 서열(서열번호 2, 5, 8, 및 11)은 각각 독립적으로 형광물질 및 소광자가 결합된 것일 수 있으며, 각 프로브의 형광물질은 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(tertramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-

carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 씨아디카르보시아닌(thiadicarbocyanine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 각 프로브는 서로 다른 파장을 발하는 형광물질로 표지된 것일 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 (1) 생물학적 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 및 (2) 상기 추출된 DNA를 서열번호 1 및 3의 프라이머 세트와 서열번호 2의 프로브를 이용하여 PCR을 수행하는 단계;를 포함하는 C형 인플루엔자 바이러스 감염 진단방법과 상기 감염 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 방법은 (2) 단계 이후에 (3) 상기 증폭된 산물을 검출하는 단계를 포함할 수 있으며, 상기 증폭된 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정, 및 인광 측정으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법으로 수행될 수 있으나, 바람직하게는 형광 측정 방법에 의할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 (1) 생물학적 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 및 (2) 서열번호 1 내지 9의 프라이머 및 프로브 세트를 이용하여 상기 추출된 DNA의 PCR을 수행하는 단계;를 포함하는 인플루엔자 바이러스 A형, B형, 및 C형 감염의 감별 진단 방법 및 상기 감염의 감별 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 동시 감별 진단방법 및 감별 진단을 위한 정보제공방법은 상기 (2) 단계에서 서열번호 10 내지 12의 internal control primer/probe set를 추가로 포함하여 PCR을 수행할 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 동시 감별 진단방법 및 감별 진단을 위한 정보제공방법은 (2) 단계 이후에 (3) 상기 증폭된 산물을 검출하는 단계를 포함할 수 있으며, 상기 증폭된 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정, 및 인광 측정으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 방법으로 수행될 수 있으나, 바람직하게는 형광 측정 방법에 의할 수 있다.

[0022] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 동시 감별 진단방법 및 감별 진단을 위한 정보제공방법은 (3) 단계 이후에 internal control primer/probe set에 의한 증폭산물이 검출되고 다른 primer/probe set에 의한 증폭 산물은 검출되지 않는 경우 음성으로 해석하는 단계를 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명에 있어서, 인플루엔자 바이러스 검출용 프라이머/프로브 세트의 검사 결과가 음성으로 나왔을 때 internal control primer의 증폭 산물이 검출되는 경우 참 음성으로 해석하며, internal control primer의 증폭 산물이 검출되지 않는 경우 재검할 것을 권고한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 C형 인플루엔자 바이러스 특이적인 프라이머/프로브 세트는 특히 ICV에 대한 민감도가 높은바, 신속하고 정확한 C형 인플루엔자 바이러스의 검출이 가능하다. 또한, 본 발명은 상기 ICV 프라이머/프로브 세트는 ICV에 대한 높은 특이도를 나타내는바, A형 및 B형 인플루엔자에 특이적인 프라이머/프로브 세트와 함께 제공되어 A, B, C형 인플루엔자 바이러스의 동시 감별 진단이 가능한 키트에 이용될 수 있고, 상용화된 qRT-PCR 장비를 사용한 검출에 적합하게 프라이머/프로브 세트가 제작되었기에 쉽게 사업화가 가능하다. A, B, C형 인플루엔자 바이러스 동시 검출을 통해 바이러스의 특징에 맞는 적절한 치료가 가능하게 할 것이며 정확한 바이러스 유행 진단을 통해 보건 및 방역대책 자료에 활용에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 C형 인플루엔자 바이러스 NP유전자의 프라이머/프로브 서열 위치 정보를 나타낸 것이다.

도 2는 plasmid DNA를 이용하여 C형 인플루엔자 바이러스 프라이머/프로브 세트 민감도 측정한 결과 그래프이다(왼쪽; 단일 프라이머/프로브 세트, 오른쪽; 다중 프라이머/프로브세트).

도 3은 바이러스 분리 배양액 사용 C형 인플루엔자 바이러스 프라이머/프로브 세트 민감도 측정 결과 도면이다.

도 4는 단일/다중 바이러스와 단일/다중 프라이머/프로브 세트에 대한 실시간 중합효소연쇄반응의 결과 도면이다(도 4a; 단일 프라이머/프로브 세트, 도 4b; 다중 프라이머/프로브세트).

도 5는 공지된 프라이머/프로브와 본 발명의 프라이머/프로브의 C형 인플루엔자 바이러스의 검출 민감도 비교 확인 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 상기 목적을 달성하기 위해 본 발명자들은 C형 인플루엔자 바이러스를 검출하는데 필요한 프라이머 및 프로브를 제공한다.

[0029] 본 발명에서 멀티플렉스 RT-PCR은 프라이머와 형광물질이 결합된 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로 실시간으로 모니터할 수 있는 실시간 RT-PCR방법을 사용하였다. 사용된 프로브는 양 끝에 리포터(reporter)물질로서 형광물질과 소광제(quencher)가 연결되어 있는 구조체로 리포터와 소광제가 근접하게 존재하면 형광신호가 서로 상쇄하여 리포터의 형광이 감지되지 않으나, 증폭이 진행됨에 따라 올리고뉴클레타이드로 연결된 리포터와 소광제가 떨어지게되고 형광신호가 증가되게 된다.

[0030] 본 발명은 C형 인플루엔자 바이러스를 검출하고자 독자적으로 유전자 서열 분석을 통해서 C형 인플루엔자 바이러스 특이적인 프라이머와 프로브를 도 1에 따라 디자인 하였고 기존의 A형, B형 인플루엔자 바이러스와 교차반응이 없도록 설계하였다.

[0031] 또한, 본 발명의 검출 방법은 멀티플렉스 RT-PCR방법으로 적은양의 시료에서 A형, B형, C형 인플루엔자 바이러스를 동시에 검출할 수 있는 방법으로 각각의 프로브에는 구별되는 형광리포터를 부착하여 형광신호를 통해 실시간으로 증폭을 확인할 수 있어 검출확인 시간을 줄일 수 있다. 또한 RNA 분리 및 증폭과정이 잘 수행되었는지 확인하기 위해 내부 양성 컨트롤(IPC; internal positive control)프라이머 와 프로브를 추가로 제작하여 제공하였다. 각각의 프라이머 및 프로브는 실시예에서 자세히 기술하였다.

[0032] 본 발명에 있어서, "프라이머 (primer)"란 적절한 완충용액 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도 하에서 주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드를 말한다. 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 통상 15 내지 30 뉴클레오티드이다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 안정한 혼성체를 형성하기 위해서는 더 낮은 온도를 필요로 한다. 프라이머 서열은 주형과 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화할 정도로 충분히 상보적이어야 한다.

[0033] 본 발명의 프라이머는 예를 들면, 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법과 같은 당 분야에 공지된 방법을 이용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 또한, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 프라이머는 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지의 예로는, 효소(예를 들어, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타아제), 방사성 동위원소(예를 들어, 32P), 형광성 분자, 화학그룹(예를 들어, 바이오틴) 등이 있다.

[0034] 본 발명에서 “프로브”란 염기서열과 특이적으로 결합할 수 있는 수개 내지 수백 개의 염기로 이루어진 핵산단편을 의미하며 라벨링되어 있어 특정 핵산 존재여부를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드 프로브, 단쇄 DNA 프로브, 이중쇄 DNA 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고 비오틴, FITC, 로다민, DIG 등으로 표지되거나 방사선 동위 원소등으로 표지될 수 있다.

[0035] 본 발명의 프로브는 바람직하게는 5'-말단에 형광물질로 표지될 수 있으며, 3'-말단은 소광자(quencher)가 접합된 것일 수 있다. 본 발명에서 상기 형광물질은 FAM(6-carboxyfluorescein), 텍사스 레드(texas red), 플루오레신(fluorescein), HEX(2',4',5',7'-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸 로다민(tetramethyl rhodamine), FITC(fluorescein isothiocyanate), 오레곤 그린(oregon green), 알렉사 플루오로(alexa fluor), JOE(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein), ROX(6-Carboxyl-XRhodamine), TET(Tetrachloro-Fluorescein), TRITC(tertramethylrodamine isothiocyanate), TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), NED(N-(1-Naphthyl) ethylenediamine), 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 씨아디카르보시아닌(thiadicarbocyanine) 등일 수 있으며, 또한 상기 소광자는 TAMRA(6-carboxytetramethyl-rhodamine), BHQ1(black hole quencher 1), BHQ2(black hole quencher 2), BHQ3(black hole quencher 3), NFQ(nonfluorescent quencher), 답실(dabcyl), Eclipse, DDQ(Deep Dark Quencher), 블랙베리 퀀처(Blackberry Quencher), 아이오와 블랙(Iowa black) 등일 수 있다.

[0036] 본 발명에서 생물학적 시료는 객담(sputum), 기관지 흡인(bronchial aspiration) 및 기관지세척액(bronchial washing), 체액(body fluid) 등을 포함하는 신체의 다양한 부분의 세포 또는 조직을 포함할 수 있으며, 혈액, 혈청, 혈장, 말초혈 단핵세포, 말초혈 백혈구, 타액, 소변, 분변, 인두 면봉 스와브(throat swabs), 피부 상처

스와브(dermal lesion swabs), 뇌척수액(cerebrospinal fluids), 경부 도말 표본(cervical smears), 농즙 샘플, 식품 기질(food matrices), 및 뇌, 비장 및 간을 포함하는 신체의 다양한 부분의 세포 또는 조직에 제한되지 않는다.

[0037] 본 발명의 조성물은 인플루엔자 바이러스 검출을 위한 PCR에 이용될 수 있으며 상기 PCR에는 멀티플렉스 PCR (multiplex PCR), 실시간 PCR (realtime PCR) 또는 이들의 조합이 포함될 수 있다.

[0039] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0041] **[실시예]**

[0042] **실시예 1. 인플루엔자 바이러스 핵산 준비**

[0043] 인플루엔자 바이러스 A 및 B 바이러스의 핵산을 확보하기 위해 질병관리본부 및 ATCC에서 구입하였으며 C형 바이러스의 경우 환자의 상기도 샘플에서 분리한 것을 사용하였다. 또한 환자의 샘플에서 바이러스 검출이 잘되는지 확인하기 위해 각각의 바이러스가 진단된 환자의 상기도 샘플을 사용하였다.

[0044] 바이러스 배양액 및 환자의 샘플에서 핵산을 추출하기 위해 Qiagen사의 QIAamp(R) viral RNA kit를 사용하여 제조사 프로토콜을 따라 추출하였다. 또한 검출한계를 확인하기 위해 해당위치를 함유하고 있는 plasmid DNA를 제작하여 copy number 측정한 후, 사용하였으며 추출된 핵산은 -80 ℃에 보관하였다.

[0046] **실시예 2. 인플루엔자 검출용 프라이머 및 프로브 세트 설계**

[0047] C형 인플루엔자 바이러스 NP유전자의 염기서열을 바탕으로 1 - 200번 염기서열과 혼성화할 수 있는 18 - 25 bp 길이의 프라이머 및 프로브를 Tm 값이 55 - 60 ℃가 되도록 설계하고 제작하였다(도 1). 또한, 인터널 컨트롤 (Internal control) 유전자로 사람의 GAPDH 유전자를 선택하고 IPC 프라이머와 프로브 세트를 제작하였고, A형과 B형 인플루엔자 바이러스는 기존에 알려져 있는 프라이머와 프로브를 사용하였다. 이용된 프라이머 및 프로브 세트의 구체적인 정보는 하기 표 1에 기술하였다.

표 1

[0049]

서열번호	프라이머/프로브 세트		염기서열 (5' - 3')	제작 및 기존 서열 문헌
1	ICV-NP	정방향	AACAGAAARACGCCAGATGAG	제작
2		프로브	ATGAGAGCATTGGCTTTGCGTTGC	
3		역방향	CATTAAGGCCCACTTCCTTACA	
4	IAV-M	정방향	CTTCTAACCGAGGTCGAAACGTA	JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Sept. 2002, p. 3256-3260
5		프로브	TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA	
6		역방향	GGTGACAGGATTGGTCTTGTCTTTA	
7	IBV-NP	정방향	TCCTCAACTCACTCTTCGAGCG	JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 2011, p. 1653-1656
8		프로브	CCAATTCGAGCAGCTGAAACTGCGGTG	
9		역방향	CGGTGCTCTTGACCAAATTGG	
10	IPC	정방향	CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC	제작
11		프로브	ACAGCGACACCCACTCCTCC	
12		역방향	CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTC	

[0050] **실시예 3. C형 인플루엔자 바이러스에 대한 표준 주형 실시간 역전사 중합효소반응**

[0051] 상기 실시예 1에서 제작한 Plasmid DNA를 10^8 ~ 1 Copy 수로 희석하여 주형으로 사용하였다. Taqman-master mix(2X), 서열번호 1-3 프라이머/프로브 세트, D.W, 주형 plasmid DNA를 농도별(10^8 ~ 1 Copy)로 첨가하여 혼합물을 조성하였고 Applied Biosystems™ Quantstudio™ 6 Flex 장비를 이용하여 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 실시하였다. 반응 조건 및 시간은 60℃에서 30초, 95℃에서 10분간 변성시간 후, 95℃에서 15초, 60℃에서 1분씩 40회 반응시켰다. 그 결과, 10^2 copy에서 검출한계를 보였으며 검출되는 싸이클은 한계점(Threshold)을 1로 지정하였을 때 37-39 Ct 사이로 상이하게 나타났다(도 2).

[0052] 이어서, 서열번호 1-12을 혼합한 다중 프라이머/프로브 세트를 사용하여 동일 실험을 반복하였다. 그 결과, 상기와 동일한 결과를 확인하였으며 C형 인플루엔자 바이러스만 검출되는 것을 확인하였다(도 2).

[0053] 환자에서 분리된 바이러스를 세포 배양하여 배양액에서 핵산을 추출하고, 60ng ~ 0.6pg/ul의 핵산과 Random hexmer, Takara cDNA synthesis kit를 사용하여 20ul cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 4ul 사용하여 C형 인플루엔자 바이러스의 검출효과를 확인한 결과 6pg/ul의 핵산추출물에서 10^2copy수와 동일한 결과가 나타나는 것을 확인하였다(도 3).

[0055] **실시예 4. 반복성 및 재현성 확인**

[0056] 실시예 3에서 진행했던 실험을 시료의 농도 10^6, 10^4, 10^2 copy/ul를 사용하여 3일간 2회 반복하여 진행하였고 반복된 실험을 시험간, 날짜간 Ct value의 변이계수(CV%)를 측정하였고 결과값은 아래 표 2와 같았다.

표 2

[0057]

반복성/재현성	변이계수 (CV (%))		
	10^6 copies /ul	10^4 copies /ul	10^2 copies /ul
시험간	0.035	0.353	3.544
날짜간	0.304	0.773	3.638

[0059] **실시예 5. 바이러스 분리주를 사용한 멀티플렉스 실시간 중합효소 연쇄반응**

[0060] 실시예 1에서 추출된 다양한 바이러스 RNA를 사용하여 단일 바이러스 RNA일 경우, 혼합된 바이러스 RNA검체일 경우 검출 차이를 비교하였고 또한 프라이머/프로브가 단일 세트일때와 다중 프라이머/프로브 세트일 경우 검출 차이를 비교하였다. 실험은 2반복 실험을 진행하였고 IPC RNA는 사람유래 배양세포에서 핵산 추출하여 본 실험에 사용하였다.

[0061] 그 결과, 도 4a 및 도 4b에 나타낸 바와 같이, 프라이머/프로브 세트가 단일 세트 또는 다중 세트에 관계없이 동일한 Ct 값을 나타내는 것을 확인할 수 있었고 바이러스 RNA 역시 단일 바이러스 또는 혼합 바이러스에 관련없이 동일한 Ct 값을 나타내는 것을 표 3에서 확인할 수 있다. 음성대조군은 D.W를 사용하였으며 반응결과 검출된 것이 없는 것을 확인할 수 있었다.

표 3

[0063]

	Multiplex primer reaction				Singleplex primer reaction			
	IAV	IBV	ICV	IPC	IAV	IBV	ICV	IPC
CA07	19.294	N/A	N/A	N/A	19.606	-	-	-
(A/H1N1)	19.303	N/A	N/A	N/A	19.915	-	-	-
VIC361	19.355	N/A	N/A	N/A	19.933	-	-	-
(A/H3N2)	19.421	N/A	N/A	N/A	19.591	-	-	-

SWITZ (A/H3N2)	18.637	N/A	N/A	N/A	18.824	-	-	-
	18.555	N/A	N/A	N/A	18.842	-	-	-
APD462 (ICV)	N/A	N/A	24.462	N/A	-	-	24.756	-
	N/A	N/A	24.517	N/A	-	-	24.714	-
B/BRI (IBV)	N/A	17.259	N/A	N/A	-	17.495	-	-
	N/A	17.352	N/A	N/A	-	17.583	-	-
B/MASS (IBV)	N/A	15.634	N/A	N/A	-	15.724	-	-
	N/A	15.624	N/A	N/A	-	15.755	-	-
IPC	N/A	N/A	N/A	20.435	-	-	-	20.341
	N/A	N/A	N/A	20.335	-	-	-	20.369
Mixed virus	18.780	15.995	24.817	23.723	19.191	16.029	25.447	21.432
	18.772	16.020	24.630	23.849	19.063	15.959	25.411	21.328
NTC	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

[0064] **실시예 6. C형 인플루엔자 바이러스 검출 민감도, 반복성 및 재현성의 우수성 비교 확인**

[0065] 표 1의 C형 인플루엔자 바이러스의 검출용 프라이머/프로브 세트(서열번호 1-3)의 ICV에 대한 민감도와 검출 반복성 및 재현성을 Ct 값과 CV 값 측정을 통해 확인하였다.

[0066] 비교 대상 프라이머 프로브 세트는 공지된 ICV 검출용 프라이머/프로브 세트(WHO information for the molecular detection of influenza viruses, Microbiology Division, Centre for Health Protection, Hong Kong SAR, China, (National Influenza Centre, WHO H5 Reference Laboratory)를 이용하였으며, 구체적인 정보는 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0067]

프라이머/프로브 세트		염기서열 (5' - 3')	position
FluC-NP-Hong Kong	정방향	GCTTTGGACTTGCTTAT	1043
	프로브	Probe-CCCTCTTAAGTTGAGAAACAGAATG-Quanchor	1095
	역방향	GACTCTGAAGTTTCCTATTT	1141
FluC-NP (ICV-NP)	정방향 (서열번호 1)	AACAGAAARACGCCAGATGAG	19
	프로브 (서열번호 2)	Probe-ATGAGAGCATTGGCTTTGCGTTGC-Quanchor	62
	역방향(서열번호 3)	CATTAAGGCCCACTTCCTTACA	118

[0068]

[0069] **실시예 7. 환자의 검체를 사용한 멀티플렉스 중합효소 연쇄반응 검증**

[0070] 고려대학교 의과대학 부속 구로병원에서 임상증상과 신속항원검사/중합효소 연쇄반응을 통해 바이러스 검출이 확인된 환자의 검체에서 추출한 RNA를 사용하여 실시예3의 방법을 사용하여 특이적으로 검출이 되는지 검증하였다. 그 결과, 각각의 특이적인 바이러스에 대해서 검출이 이루어졌으며 IPC은 모든 검체에서 검출되었음을 표 5에서 확인할 수 있었다.

표 5

[0072]

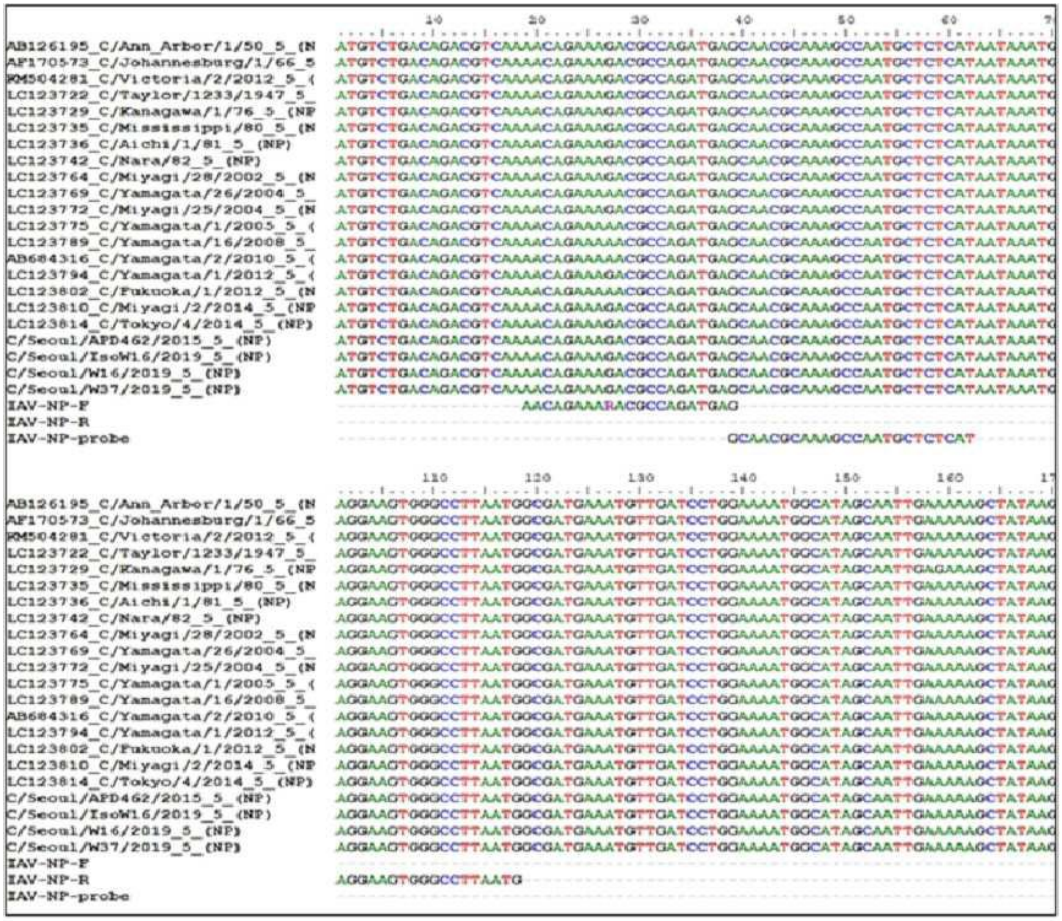
VTM (virus positive sample)		Result			
		A	B	C	IPC
W41	A/H3	30.933 ± 0.306	N/A	N/A	31.115 ± 0.028
W13	A/H1	31.593 ± 0.221	N/A	N/A	28.890 ± 0.106

W16	C	N/A	N/A	25.151 ± 0.081	32.440 ± 0.689
W37	C	N/A	N/A	36.450 ± 0.428	31.011± 0.263
GPD1708	B	N/A	27.299 ± 0.133	N/A	37.667 ± 0.541
GPD1715	B	N/A	27.366 ± 0.132	N/A	37.414 ± 1.048
W28	RSVA	N/A	N/A	N/A	31.344 ± 0.161
W36	RSVA	N/A	N/A	N/A	30.518 ± 0.108
NC	D.W	N/A	N/A	N/A	N/A
PC	Virus mix	20.907 ± 0.302	19.592 ± 0.226	24.527 ± 0.640	22.920 ± 0.610

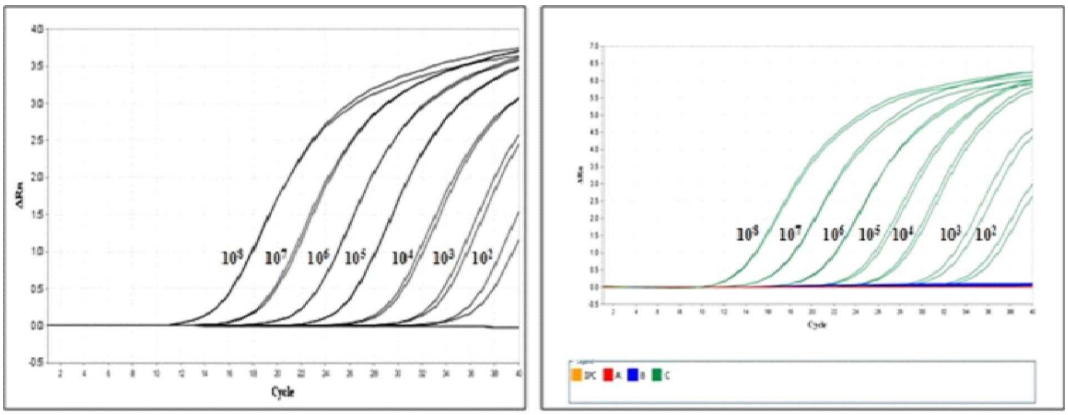
[0075] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

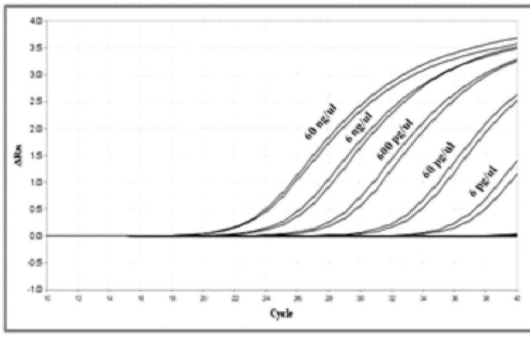
도면1



도면2

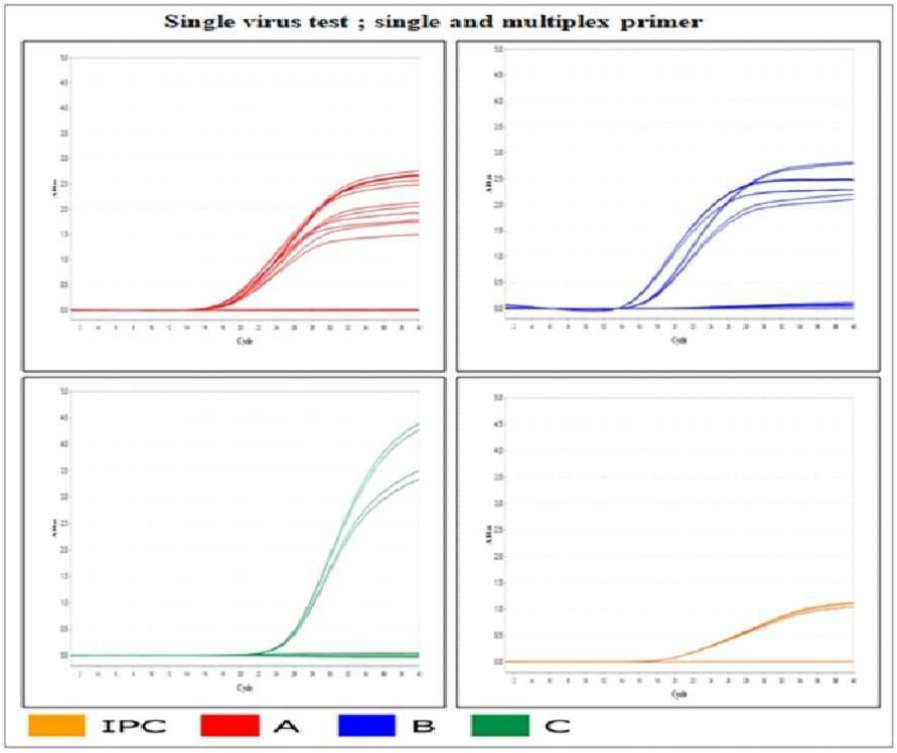


도면3

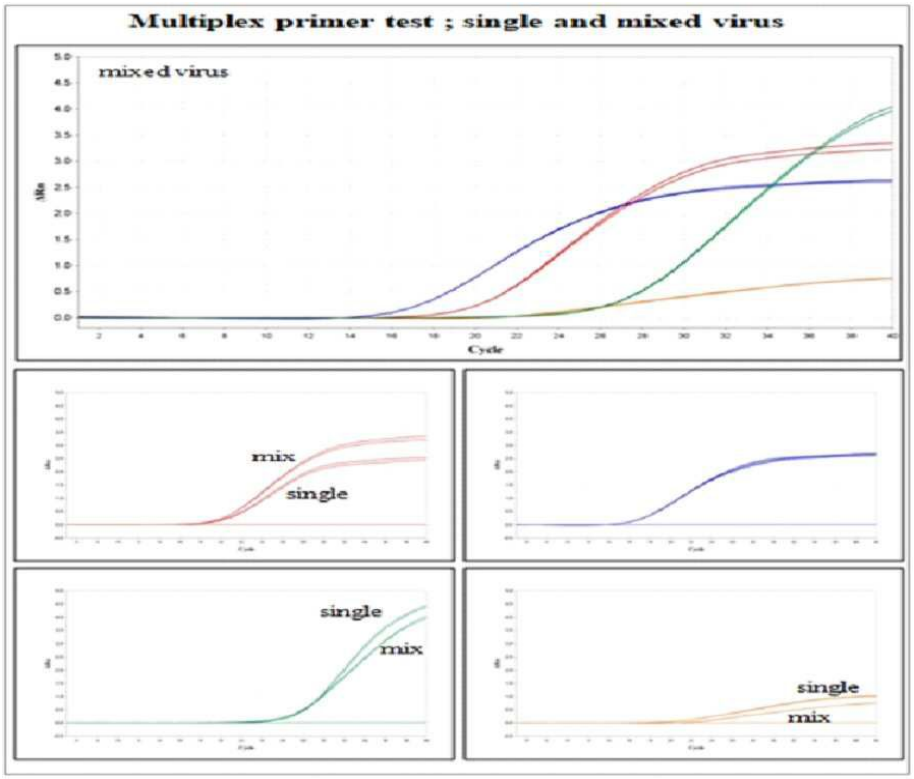


Total RNA concentration	Ct value		
	Duplication	Average	S.D
60 ng/ul	25.856	25.733171	0.17393634
	25.610		
6 ng/ul	28.231	28.027546	0.28769237
	27.824		
600 pg/ul	31.376	31.10762	0.37935805
	30.839		
60 pg/ul	35.492	35.245155	0.34931037
	34.998		
6 pg/ul	39.567	39.236404	0.46699247
	38.906		
0.6 pg/ul	Undetermined	Undetermined	
	Undetermined		
Threshold	1		

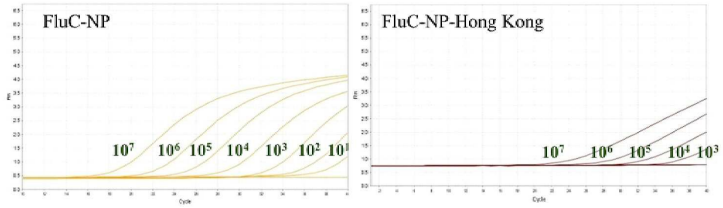
도면4a



도면4b



도면5



Primer/probe set	Ct value for target plasmid DNA(copy number)								Co-efficient Variation (CV) between day		
	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10	1	10^6 copies	10^4 copies	10^2 copies
FluC-NP	18.69 ±0.15	22.14 ±0.00	25.32 ±0.04	29.08 ±0.22	32.76 ±0.32	35.73 ±0.06	38.08	N/A	0.405	0.671	3.406
FluC-NP-Hong Kong	22.76 ±0.14	28.94 ±0.08	31.59 ±0.34	35.62 ±0.17	39.27 ±0.21	N/A	N/A	N/A	1.409	1.466	N/A