(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0059759
(43) 공개일자 2020년05월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/689 (2018.01) *C12Q 1/6851* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2018.05)
C12Q 1/6851 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2018-0144875
(22) 출원일자 2018년11월21일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
대한민국 (식품의약품안전처장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
(72) 발명자
이주훈
경기도 수원시 영통구 봉영로 1526, 703동 704호 (영통동, 살구골 진덕,서광,성지,동아 아파트)
곽효선
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 식품의약품안전평가원
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

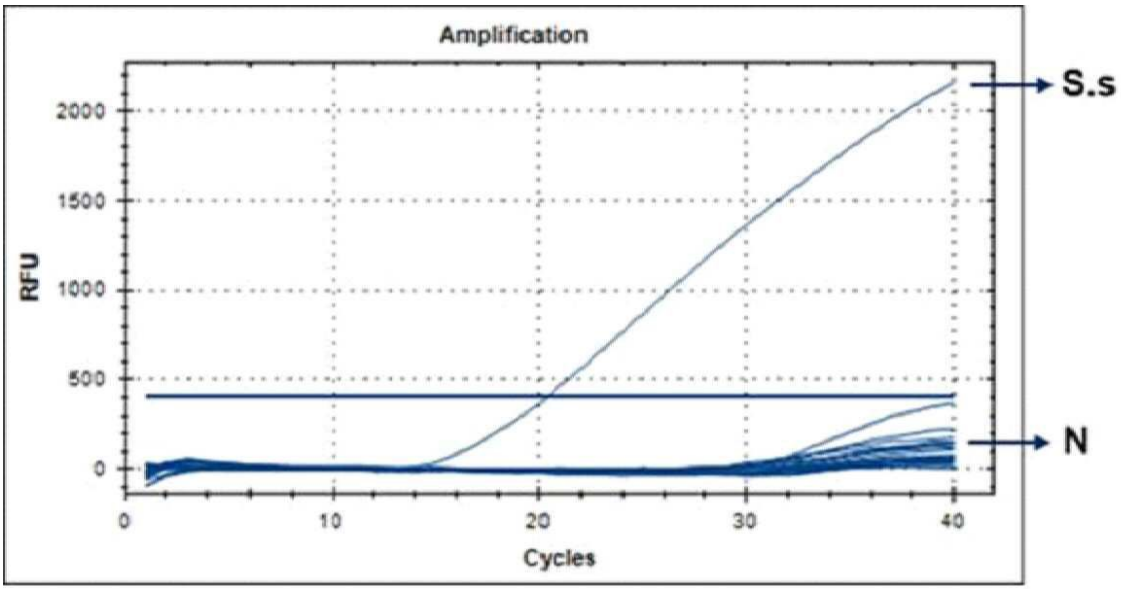
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **aplIR 유전자를 통해 시겔라 손네이를 신속 검출할 수 있는 Singleplex Real-Time PCR 키트의 개발**

(57) 요 약

본 발명은 시겔라 손네이(*Shigella sonnei*) 균주의 검출용 프라이머 세트, 프로브, 이를 포함하는 시겔라 손네이 균주의 검출용 조성물, 키트 및 검출 방법에 관한 것이다. 본 발명의 프라이머 세트 및 프로브를 이용하여 conventional PCR 또는 Real-Time PCR을 수행 시, *aplIR* 유전자를 특이적으로 타겟하여 시겔라 손네이만을 특이적으로 검출하는 특이도 및 극소량의 시료 농도에서도 검출되는 민감도가 매우 우수함을 확인하였고, 시겔라 손네이 검출을 위한 양성대조군 DNA로서도 이용 가능한 효과가 있어, 관련 산업에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 2527/146 (2019.08)
C12Q 2537/165 (2013.01)
C12Q 2561/113 (2019.08)
C12Q 2600/158 (2013.01)
(72) 발명자
김순한
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 식품의약품안전평가원

이우정
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 식품의약품안전평가원

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 14162유전체972
부처명 식품의약품안전처
연구관리전문기관 식품의약품안전평가원
연구사업명 지원사업
연구과제명 식중독균 유전체 연구
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교 산학협력단
연구기간 2014.03.01 ~ 2018.11.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 시겔라 손네이(*Shigella sonnei*) 균주 검출용 프라이머 세트.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 프라이머 세트는 시겔라 손네이 균주의 *apl1R* 유전자에 특이적으로 결합하는, 프라이머 세트.

청구항 3

서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 포함하는 시겔라 손네이 균주 검출용 프로브.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 프로브는 시겔라 손네이 균주의 *apl1R* 유전자에 특이적으로 결합하는, 프로브.

청구항 5

제1항의 프라이머 세트 및 제3항의 프로브를 포함하는 시겔라 손네이 균주 검출용 조성물.

청구항 6

제1항의 프라이머 세트 및 제3항의 프로브를 포함하는 시겔라 손네이 균주 검출용 키트.

청구항 7

시료로부터 분리된 핵산 시료를 분리하는 단계; 및

서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 프라이머 세트로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 수행하여 표적 핵산 서열을 증폭시킨 후 분석하는 단계;를 포함하는, 시겔라 손네이 균주의 검출 또는 정량방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 검출 방법은 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로브를 더 혼성화하는 것인, 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 시료는 식품에서 분리한 미생물 또는 이로부터 추출한 핵산 시료인, 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 중합효소연쇄반응은 실시간 PCR (Real-time PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), 역전사 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소연쇄반응(Competitive RT-PCR), Nuclease 보호 분석(RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, 핵산 마이크로어레이, 노던블랏 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 방법으로 수행되는 것인, 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 정량 방법은 Ct값을 표준 검량선에 대입하여 시료에 존재하는 시겔라 손네이의 수를 특이적으로 정량하는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 시겔라 손네이(*Shigella sonnei*) 균주의 검출용 프라이머 세트, 프로브, 이를 포함하는 시겔라 손네이 균주의 검출용 조성물, 키트 및 검출 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 시겔라(Shigella, 이질균)는 유행성 또는 급성으로 발병하는 소화기 계통의 전염성 질환으로, 1898년 일본의 시가(Shiga)에 의해 분리되었으며 혈액이 섞인 설사를 일으키는 법정 전염병으로서 세균성 이질과 아메바성 이질이 있다. 최근에는, 아메바성 이질은 거의 볼 수 없어 이질이라 하면 보통 세균성 이질(bacillary dysentery)을 의미한다.

[0003] 세균성 이질은 일반적으로 2-6일의 잠복기를 거쳐 38-39℃의 발열과 복통 및 점혈성 설사를 하루에 10회 이상 일으킨다. 일반적으로, 배설후에 남는 불쾌한 통증(이급후증, tensemus)을 호소한다. 대부분 1-10세의 소아에게서 많으며 미국에서는 소아 설사의 15% 정도가 이질균이 원인이며 개도국에서는 유아 설사와 그로 인한 사망의 주요인이다. 시겔라는 40여종의 혈청형이 분리되어 있지만 혈청학적 성상에 의해 균체 O 항원에 의하여 4가지 혈청군으로 나누어지고, 각각의 혈청군은 다음과 같다: A군, 시겔라 디센테리애(S. dysenteriae); B군, 시겔라 플렉서너리(S. flexneri); C군, 시겔라 보이디(S. boydii); 및 D군 시겔라 소네이(S. sonnei). 한국에서 가장 많이 분리되는 시겔라의 균종은 B군인 시겔라 플렉서너리와 D군인 시겔라 소네이이다. 시겔라 플렉서너리의 경우, 합병증으로 Reiter 증후군을 유발한다.

[0004] 시겔라속 균은 그람 음성 간균으로 0.6X1-3 ㎛의 크기이며 통성혐기성의 균이지만 호기적으로 일반한천에서 잘 발육하나 일반적으로 다른 장내세균에 비해 증식이 느리다. 일반한천배지에서 투명, 원형, 습윤 및 평활(smooth)한 집락을 만들고 무아포, 무협막이며 무모균으로 비운성이다. 장내세균 분리배지에서 유당비분해 무색의 집락 형태를 보여 살모넬라와 비슷하다. 또한, 시겔라는 적정 습도만 유지되면 낮은 온도에서 견딜 수 있고 실온에서는 수중에서 6개월 이상 살 수 있다.

[0005] 정확한 원인균의 동정을 위해서 오염된 가검물이나 식품을 배양하여 생화학적 테스트를 수행하는 것을 원칙으로 하는데, 이는 최소 3일에서 수 주일이 소요된다. 이와 같은, 배지법이나 생화학적 테스트는 공인검사법으로 널리 사용되고 있기는 하지만 원인병원체를 파악하고 역학조사를 완료하기 전에 이미 세균성 이질이 집단적으로 확산될 가능성이 매우 높아 시겔라균에서 발생하는 식중독을 정확히 검출하지 못하는 한계가 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 식중독 원인균인 시겔라 손네이를 검출 및 정량하기 위하여, *apl1R* 유전자를 특이적으로 타겟하는 프라이머 세트 및 프로브를 제작하고 이를 적용한 결과, *apl1R* 유전자를 정확하게 타겟하는 정확성, 시겔라 손네이만을 특이적으로 검출하는 특이도, 극소량의 시료 농도에서도 검출되는 민감도가 매우 우수함을 확인하여 시겔라 손네이 양성대조군 DNA로서도 이용 가능함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 시겔라 손네이(*Shigella sonnei*) 균주 검출용 프라이머 세트를 제공할 수 있다.

[0008] 또한 본 발명의 목적은 시겔라 손네이 균주 검출용 프로브를 제공할 수 있다.

[0009] 또한 본 발명의 목적은 시겔라 손네이 균주 검출용 조성물을 제공할 수 있다.

[0010] 또한 본 발명의 목적은 시겔라 손네이 균주 검출용 키트를 제공할 수 있다.

[0011] 또한 본 발명의 목적은 시겔라 손네이 균주의 검출 또는 정량방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 시겔라 손네이(*Shigella sonnei*) 균주 검출용 프라이머 세트를 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 포함하는 시겔라 손네이 균주 검출용 프로브를 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 상기 프라이머 세트 및 상기 프로브를 포함하는 시겔라 손네이 균주 검출용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 상기 프라이머 세트 및 상기 프로브를 포함하는 시겔라 손네이 균주 검출용 키트를 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은 시료로부터 분리된 핵산 시료를 분리하는 단계; 및 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 수행하여 표적 핵산 서열을 증폭시킨 후 분석하는 단계;를 포함하는, 시겔라 손네이 균주의 검출 또는 정량방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 프라이머 세트 및 프로브를 이용하여 conventional PCR 또는 Real-Time PCR을 수행 시, *apl1R* 유전자를 특이적으로 타겟하여 시겔라 손네이만을 특이적으로 검출하는 특이도, 극소량의 시료 농도에서도 검출되는 민감도가 매우 우수함을 확인하여 시겔라 손네이 검출을 위한 양성대조군 DNA로서도 이용 가능한 효과가 있어, 관련 산업에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 conventional PCR를 수행하여 *apl1R* 유전자를 특이적으로 타겟하여 시겔라 손네이에 대한 타겟 정확성을 확인한 도이다.

도 2는 본 발명의 프라이머 세트 및 프로브를 이용하여 Real-Time PCR을 수행한 후 시겔라 손네이 strain에 대한 검출 특이도를 확인한 도이다.

도 3은 본 발명의 프라이머 세트 및 프로브를 이용하여 Real-Time PCR을 수행한 후 시겔라 손네이 strain에 대한 검출 민감도를 확인한 도이다.

도 4는 Bio-rad CFX connect real-time PCR 장비를 이용하여 본 발명의 프라이머 세트 및 프로브의 양성대조군 DNA로서의 이용성을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 시겔라 손네이(*Shigella sonnei*) 균주 검출용 프라이머 세트를 제공한다.

[0020] 상기 프라이머 세트는 시겔라 손네이 균주의 *apl1R* 유전자에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0021] 본 발명에서 용어 "검출"은 검출 또는 측정된 대상의 존재 여부 및/또는 이의 농도를 정량하는 것을 의미한다.

[0022] 본 발명에서 사용하는 용어인 "프라이머"란 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(DNA 중합효소 또는 역전사 효소) 및 상이한 4가지 dNTP (deoxynucleoside triphospate)의 존재하에서 DNA합성을 개시할 수 있다.

[0023] 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 본 발명에서 상기 서열번호 1 내지 2의 염기서열을 포함하는 프라이머는 각각 서열 상동성이 95% 이상인 염기서열을 포함하는 개념이다. 예를 들어, 프라이머가 20bp인 경우, 20bp 중 2개 이상 틀리면 용융 온도(melting temperature)의 감소가 5도 이상이 되므로 결과가 좋지 않게 나타나지만, 1개만 틀릴 경우에는 PCR 과정에서 열처리(annealing) 온도를 약간 내려 실험 할 경우 동등한 결과를 얻을 수 있기 때문이다.

[0024] 본 발명의 프라이머는 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 비제한적인 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. 핵산은 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기, 예를 들면, 단백질(예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그날 펩타이드, 폴리-L-리신 등), 삽입제(예: 아크리딘, 프소랄렌 등), 킬레이트화제(예: 금속, 방사성금속,철, 산화성 금속 등), 및 알킬화제를 함유할 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명의 프라이머 핵산 서열은 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.

[0027] 또한 본 발명은 서열번호 3으로 표시되는 염기서열을 포함하는 시겔라 손네이 균주 검출용 프로브를 제공한다.

[0028] 본 발명에서 용어 "프로브"란 염기서열과 특이적으로 결합할 수 있는 수개 내지 수백 개의 염기로 이루어진 핵산단편을 의미하며 라벨링되어 있어 특정 핵산 존재여부를 확인 할 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.

[0029] 본 발명의 프로브는 바람직하게는 5'-말단 및 3'-말단에 각각 형광물질이 표지될 수 있다. 또한, 더욱 바람직하게는 상기 5'-말단에 표지된 형광물질은 6-카르복시플루오레세인 (6-carboxyfluorescein, FAM), 헥사클로로-6-카르복시플루오레세인 (hexachloro-6-carboxyfluorescein, HEX), 테트라클로로-6-카르복시플루오레세인 (tetrachloro-6-carboxyfluorescein), 및 Cyanine-5 (Cy5)으로 이루어진 군에서 선택되고, 상기 3'-말단에 표지된 형광물질은 6-카르복시테트라메틸-로다민 (6-carboxytetramethyl-rhodamine, TAMRA) 또는 black holequencher-1,2,3 (BHQ-1,2,3)일 수 있으며, 이에 한정 되는 것은 아니다.

[0030] 프로브의 5'-말단 및 3'-말단에 표지된 각각의 형광물질은 상호 간섭 현상을 나타내는 것 일 수 있다. 이에 따라, 프로브가 시료에 존재하는 표적 염기서열에 결합된 상태에서는 3'-말단의 형광물질 에너지에 의해 5'-말단의 형광물질이 억제되어 발색이 제한되고, 중합효소 연쇄반응의 수행시 프로브가 분해되면서 5'-말단의 형광물질이 유리되면서 3'-말단의 형광물질에 의한 억제가 해제되어 형광물질이 발색 반응을 하게 된다.

[0032] 또한 본 발명은 상기 프라이머 세트 및 상기 프로브를 포함하는 시겔라 손네이 균주 검출용 조성물을 제공한다.

[0033] 또한 본 발명은 상기 프라이머 세트 및 상기 프로브를 포함하는 시겔라 손네이 균주 검출용 키트를 제공한다.

[0034] 이러한 조성물의 성분의 비제한적인 예로는 반응용 완충용액, dNTP, Mg^{2+}이온, DNA 중합효소가 포함될 수 있다. 상기 반응용 완충용액은 1~10mM TrisHCl, 10~~40mM KCl(pH 9.0)을 사용할 수 있으며, 상기 dNTP는 dATP, dTTP, dGTP, dCTP 중에서 선택된 어느 하나 이상을 사용할 수 있다. 상기 키트에는 실험상의 편의, 안정화 및 반응성 향상을 위해 안정화제 및/또는 비반응성 염료 등를 포함할 수 있다. 상기 비반응성 염료 물질이란 중합효소연쇄반응에 영향을 미치지 않는 물질로부터 선택되어져야 하며, 중합효소 연쇄반응 산물을 이용한 분석이나 식별을 위해 사용되는 것을 목적으로 한다. 이러한 조건을 만족시키는 물질로는 로다민, 탐라, 락스, 브로모페놀 블루, 크실렌 시아놀, 브로모크레졸 레드, 크레졸 레드 등의 수용성 염료로 사용될 수 있다. 상기 비반응성 염료 물질은 조성물 전체 중량 대비 0.0001~0.01중량%의 함량으로 포함될 수 있으며, 0.001~0.005중량%의 함량으로 포함되는 것이 바람직하다. 조성물 전체 중량 대비 0.01중량% 초과의 함량으로 첨가되는 경우 중합효소 연쇄반응 시 고농도의 수용성 염료가 반응 저해제로 작용될 수 있는 문제점이 있다. 또한, 상기 다가알코올류는 본 발명의 키트 구성성분을 보다 안정화시키기 위한 안정화 물질로 사용될 수 있으며, 글루코스, 글리세롤, 만니톨, 갈락시톨, 글루시톨, 솔비톨 중 하나 이상의 물질을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 다가알코올류는 10~500mM의 함량으로 포함될 수 있으며, 50~300mM의 함량으로 포함되는 것이 바람직하다. 만일, 다가알코올류가 500mM를 초과하게 되면 수용성 중합체 자체의 용해도로 인해 수용액으로 용해하기 어려우며, 높은 점도로 인해 충분한 혼합이 이루어지기 어렵고, 부피가 필요 이상으로 커지며, 중합효소연쇄반응을 위해 멸균 증류수로 용해 시 용해가 쉽게 되지 않는다. 또한, 중합효소연쇄반응시 고농도의 수용성 중합체가 반응 저해제로 작용할 수 있는 문제점이 있다. 그리고, 10mM 미만이면 대상효소와 표면 물분자를 충분히 코 팅하여 보호할 수 없기 때문에 효율적인 효소의 안정화 효과를 기대하기 어려우며 또한, 용액의 점도가 너무 낮아 튜브 바닥면 전체에 넓게 퍼지면서 이상적인 형태로 건조되지 못하는 문제점과 효소가 충분히 보호되지 못하는 문제점이 있다.

[0035] 상기 키트 구성성분은 액상 형태로 제공될 수 있으며, 안정성, 보관의 간편성 및 장기 보관성을 증가시키기 위하여 건조된 상태인 것이 바람직하다. 상기 건조는 일반적인 상온건조, 가온건조, 동결건조, 감압건조와 같은 공지의 건조 방법에 의해 수행될 수 있으며, 조성물의 성분이 손실되지 않는 한, 임의의 건조 방법은 모두 사용 가능하다.

[0037] 또한 본 발명은 시료로부터 분리된 핵산 시료를 분리하는 단계; 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트로 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 수행하여 표적 핵산 서열을 증폭시킨 후 분석하는 단계;를 포함하는, 시겔라 손네이 균주의 검출 또는 정량방법을 제공한다.

[0038] 상기 검출 방법은 서열번호 3으로 표시되는 프로브를 더 혼성화할 수 있으며, 상기 프라이머 세트와 프로브는 그를 구성하는 각 프라이머 또는 프로브 사이에 간섭현상 없이 미생물의 유전자를 real-time PCR에 의하여 성공적으로 증폭하는데 사용할 수 있다. 즉, 프라이머 이량체, 헤어핀 고리 등이 형성되지 않고 높은 민감도로 각각의 미생물을 동시에 검출할 수 있다.

[0039] 상기 시료는 식품에서 분리한 미생물 또는 이로부터 추출한 핵산 시료로서, DNA를 추출하는 방법은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Sambrook, J. etal., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. etal., Plant Mol. Biol. Rep., 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology,John Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. 162:156(1987)).

[0040] 상기 중합효소연쇄반응은 실시간 PCR (Real-time PCR), 실시간 RT-PCR (Real-time RT-PCR), 역전사 중합효소연쇄반응, 경쟁적 중합효소연쇄반응(Competitive RT-PCR), Nuclease 보호 분석(RNase, S1 nuclease assay), in situ 교잡법, 핵산 마이크로어레이, 노던블랏 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 방법으로 수행되나, 바람직하게는 실시간 PCR (Real-time PCR)이고 이에 제한되지 않는다.

[0041] 상기 정량 방법은 Ct값을 표준 검량선에 대입하여 시료에 존재하는 시겔라 손네이의 수를 특이적으로 정량할 수 있다.

[0042] 상기 "정량"과 관련하여, real-time PCR 방법은 절대 정량 (absolute quantification)과 상대 정량 (relative quantification) 분석으로 구분되는데, 시료 내의 표적 DNA를 정량하기 위해서는 표준시료의 검량선 (표준곡선; standard curve) 작성이 필수적인 요소이다. 표준시료와 미지시료를 대상으로 동시에 정량적 real-time PCR을 실시하여 표준시료로부터 검량선을 도출한 후, 이 검량선으로부터 미지시료 내 표적 DNA의 양을 정량한다. 이때 표준시료로부터의 검량선 (x축: 표준시료의 농도, y축: 역치 주기수 (CT; threshold cycle))은 상관지수 (R^2)가 1에 가까울수록 이상적이다.

[0043] 본 발명에서 real-time PCR을 이용한 정량은 일반적으로 증폭반응 개시 시의 주형 DNA 양을 정량하기 위한, PCR을 이용한 일련의 반응을 의미한다. 정량적 PCR에는 기준이 되는 표준시료를 사용하는 내부 표준법과 증폭반응에 있어서 경쟁하는 분자를 사용하는 경쟁법이 포함된다. 또한, 각 서열의 분자 수를 정확하고 간편하게 결정하기 위해서 표준시료라고 불리는 기준이 되는 주형 DNA 서열을 이용한 PCR 방법을 사용하고, 반응 중 임의의 시점에서 반응의 진행상황, 즉 증폭의 정도를 확인한다. 따라서, 본 발명에서 "정량"이란 증폭반응 개시 시의 주형 DNA 양을 정량하기 위한 PCR로서, 반응 중 임의의 시점에서 증폭대상의 분자에 대해 증폭을 확인할 수 있는 PCR을 의미한다. 정량을 위해서는 일반적으로 그와 같은 PCR과 반응 개시 시의 주형 DNA 분자 수와 그 증폭의 지표가 되는 신호를 관련짓는 검량선이 조합된다. 이 검량선은 분자 수가 알려진 표준시료를 이용하여 제작할 수 있다.

[0044] 본 발명에서 검량선은 정량하고자 하는 시겔라 손네이의 유전자를 표준시료로 하고, 상기 유전자를 특이적으로 증폭하기 위한 프라이머를 이용하여 정량적 real-time PCR을 수행함으로써, 표준시료의 증폭으로부터 작성된 검량선을 기준으로 시료 내 존재하는 표적 유전자의 역치 주기 수 (CT)를 확인하여 시겔라 손네이의 농도를 예측할 수 있다.

[0046] 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.

[0048] **<실시예 1> 프라이머 세트 및 프로브 제작**

[0049] 시겔라 손네이 균주만을 특이적으로 검출하기 위하여, 상기 균주에만 특이적으로 존재하는 *ap1IR* 유전자 (Accession No. NC_007384.1)를 타겟하는 프라이머 세트 및 프로브를 제작하였다. 구체적으로, 균주에 최적인

신규 타겟 유전자를 선정하기 위해 *in silico* 상에서 시겔라 genome의 pan-genome 분석을 통하여 시겔라 손네이만이 가지고 있는 유전자인 *apl1R*를 선정하였고, 이를 타겟하는 *apl1R* 유전자의 프라이머 및 프로브를 제작하였다. 상기 프라이머 서열 및 프로브의 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0050]

	서열 (5'->3')	서열번호
forward	TGCGACAGATGGGCCTATAA	1
reverse	CCGGTTCAGAAGCAAACCAT	2
probe	FAM-TCTCGCTGAACCCAGCGTCA-TAMRA	3

[0051] **<실시예 2> 타겟 정확성 및 시겔라 손네이 균주에 대한 검출 특이도 확인**

[0052] **2-1. conventional PCR을 통한 *apl1R* 유전자 타겟 정확성 및 검출 특이도 확인**

[0053] 상기 실시예 1에 제작한 프라이머 세트 및 프로브는 시겔라 손네이의 *apl1R* 유전자를 타겟하도록 제작하였는바, 이에 대한 정확성 및 검출 특이도를 확인하였다. 시겔라 손네이 균주의 DNA를 추출한 후, 결합(annealing) 온도는 60.5도로 두었고 conventional PCR을 수행하여 하였다. 하기 표 2에 나타낸 바와 같이,19종의 다른 균주를 대조군으로 준비하여, 시겔라 손네이에 대한 검출 특이도를 확인하였다.

[0054] 도 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 프라이머 세트 및 프로브는 186bp 밴드가 확인되어, *apl1R* 유전자를 정확하게 타겟함을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 프라이머 세트 및 프로브는 특정 유전자 타겟하여 시겔라 손네이를 검출하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0055] 또한, 시겔라 손네이에만 186bp 밴드가 나타났고, 다른 19종의 대조군에는 밴드가 전혀 나타나지 않음을 확인하였다.

표 2

[0057]

Pathogen
Campylobacter jejuni
Campylobacter coli
Vibrio cholerae
Vibrio vulnificus
Vibrio parahaemolyticus
Salmonella Typhimurium
Listeria monocytogenes
Bacillus cereus
Yersinia enterocolitica
Staphylococcus aureus
Clostridium perfringens
EAEC (Enteroaggregative *Escherichia coli*)
EPEC (Enteropathogenic *Escherichia coli*)
EIEC (Enteroinvasive *Escherichia coli*)
EHEC (Enterohemorrhagic *Escherichia coli*)
EPEC(Enteropathogenic *Eshcherichia coli*)
Cronobacter sakazakii
Shigella flexneri
Salmonella Enteritidis

[0058] **2-2. 시겔라 손네이 균주 검출 특이도 확인**

[0059] 기존 Singleplex real-time PCR 키트는 하나의 균주를 타겟으로 설정하였음에도 불구하고 다른 균주까지 검출되

는 사례가 빈번하다는 문제가 있었다. 이에 본 발명자들은 제작된 프라이머 세트 및 프로브를 이용하여 시겔라 손네이 균주만을 특이적으로 정확히 검출할 수 있는지 확인하기 위하여, real-time PCR 장비(Bio-rad CFX connect)를 사용하였다. 표 2에 나타낸 바와 같이, 19종의 다른 균주를 대조군으로 준비하여, 시겔라 손네이에 대한 검출 특이도를 확인하였다.

[0060] 도 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 프라이머 세트 및 프로브를 이용할 경우, 시겔라 손네이에만 활성이 나타남을 확인하였고, 다른 19종의 대조군에는 활성이 전혀 나타나지 않음을 확인하였다.

[0061] 따라서, 다른 미생물에 대해서도 어떠한 반응이 나타나지 않아, 시겔라 손네이만을 정확하게 검출하는 검출 특이도가 매우 우수함을 확인하였다.

[0062] 또한, 본 발명의 프라이머 세트를 이용할 경우 real-time PCR 뿐만 아니라, conventional PCR 방법을 통해서도 시겔라 손네이 균주만을 특이적으로 검출할 수 있음을 확인하였다.

[0064] **<실시예 3> 시겔라 손네이 균주에 대한 검출 민감도 확인**

[0065] 종래 real-time PCR 키트는 민감도가 낮다는 문제가 있었다. 따라서, 본 벌명자의 프라이머 세트 및 프로브에 대하여 민감도를 확인하는 실험을 수행하였다. 민감도를 확인하기 위한 DNA 샘플은 100 ng/㎕의 양을 기준으로 연속 희석(serial dilution) 방법을 수행하여, 100 ng/㎕ (10^{0}), 10 ng/㎕ (10^{-1}), 1 ng/㎕ (10^{-2}), 100 pg/㎕ (10^{-3}), 10 pg/㎕ (10^{-4}) 및 1 pg/㎕ (10^{-5})의 양이 포함된 DNA template를 준비하였다. 그 후, DNA template가 몇 ng 농도까지 검출되는지 확인하였다.

[0066] 도 3에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 프라이머 세트 및 프로브는 1 pg/㎕의 극소량의 DNA만 존재해도 시겔라 손네이 균주를 특이적으로 검출가능함을 확인하여, 민감도가 매우 우수함을 확인하였다.

[0068] **<실시예 4> 양성 대조군 DNA로서 이용 가능성 확인**

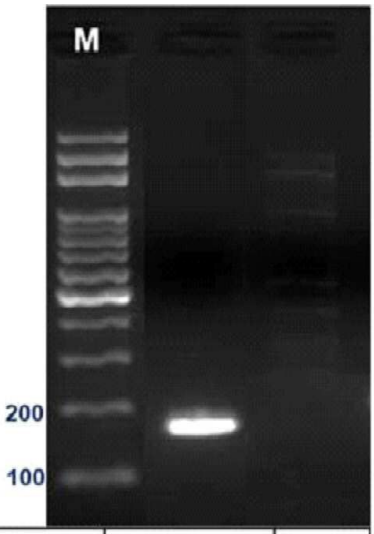
[0069] 식품 샘플 내에 존재하는 시겔라 손네이 균주를 검출하기 위해서는 DNA 정제과정이 필요하고, 이 과정에서 DNA의 오염에 의해 정확한 실험 결과가 나오지 않을 수 있다는 문제가 있다. 이에 본 발명자들은 시겔라 손네이 균주에 대한 양성 대조군 DNA를 사용하여 제작된 프라이머 세트에 대한 검증을 수행하였으며, real-time PCR 장비 중 하나인 Bio-rad CFX connect을 통해 real-time PCR를 수행하였다.

[0070] 도 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 프라이머 세트 및 프로브를 이용하여 real-time PCR 장비 중 하나인 Bio-rad CFX connect을 통해 real-time PCR를 수행한 경우 시겔라 손네이 균주를 정확히 검출할 수 있음을 확인하였다.

[0071] 따라서, 본 발명의 프라이머 세트 및 프로브는 시겔라 손네이 검출에 양성 대조군 DNA로서 우수하게 이용할 수 있다.

도면

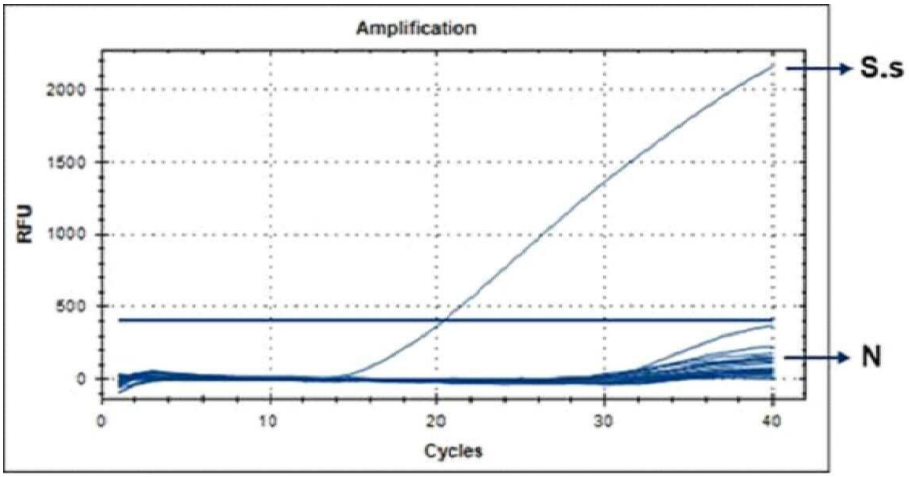
도면1



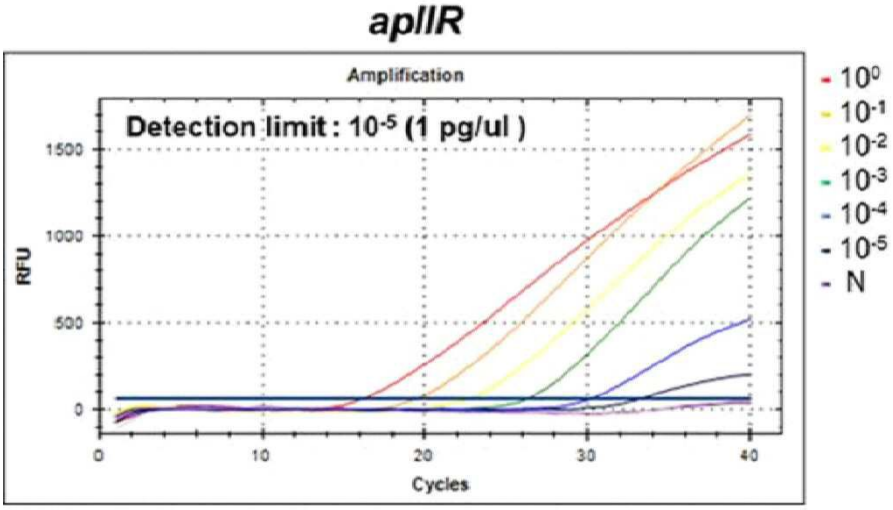
Pathogen	*S. sonnei*	M.W
Target gene	*aplIR*	-
Tm(°C)	60.5	60.5
Size(bp)	186	-

M : 100b.p. ladder
M.W : Molecular water

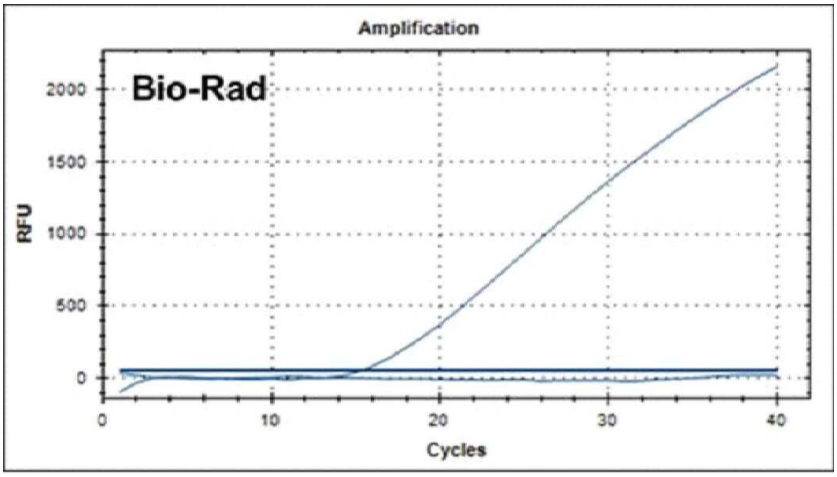
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

KOREA FOOD & DRUG ADMINISTRATION

<120> Development of a Singleplex Real-Time PCR Kit for Rapid Detection of Shigella sonnei aplIR target gene

<130> PN1810-368

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 1

tgcgacagat gggcctataa 20

<210> 2

<

211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 2

ccggttcaga agcaaaccat 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 3

tctcgctgaa cccagcgtca 20