

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0042594
(43) 공개일자 2011년04월27일

(51) Int. Cl.
C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0099328
(22) 출원일자 2009년10월19일
심사청구일자 2009년10월19일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 공동 220번지 충남대학교
(72) 발명자
신성재
대전광역시 중구 문화1동 6번지 충남대학교 의과
대학 미생물학교실
이병수
대전광역시 중구 문화1동 6번지 충남대학교 의과
대학 미생물학교실
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 19 항

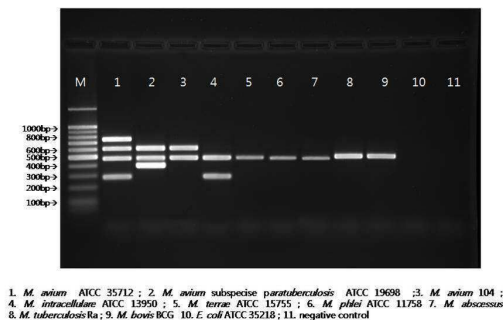
(54) MAC 진단용 프라이머 쌍 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 MAC(*Mycobacterium avium* complex) 진단에 관한 것으로, 보다 자세하게는 MAC 균간에 특이적인 삽입 서열 마커(insertion sequence marker)에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 상기 프라이머 쌍을 포함하는 MAC 진단용 조성물 및 상기 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행한 후 PCR 산물을 확인함으로써 MAC를 진단하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 의하면, MAC의 동정 뿐만 아니라 아종(subspecies)도 감별 진단할 수 있어, 각 아종별로 신속하고 효율적인 치료가 이루어지도록 할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

마이클 티. 콜린스

미합중국, 위스콘신주 53706-110, 메디슨, 2015 린
텐 드라이브, 유니버시티 오브 위스콘신-메디슨

엘리자베스 제이. 비. 메이닝

미합중국, 위스콘신주 53706-110, 메디슨, 2015 린
텐 드라이브, 유니버시티 오브 위스콘신-메디슨

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R01-2007-000-10702-0/R13-2007-020-01000-0

부처명 한국과학재단/한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 특정기초연구사업/기초의과학연구센터

연구과제명 비결핵 미코박테리아의 기회감염 및 잠복감염에 연관된 새로운 병원성 인자의 발굴 및
기능적 특성규명/감염신호네트워크응용연구센터

기여율

주관기관 충남대학교 산학협력단/충남대학교 산학협력단

연구기간 2009년 03월 01일 ~ 2010년 02월 28일/2009년 03월 01일 ~ 2010년 02월 28일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호: 1에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드와 서열번호: 2에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 *M. avium* subsp. *paratuberculosis*(MAP)의 IS(insertion sequence)900에 특이적인 프라이머 쌍.

청구항 2

서열번호: 3에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드와 서열번호: 4에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 *M. avium* subsp. *avium*(MAA)의 IS901에 특이적인 프라이머 쌍.

청구항 3

서열번호: 5에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드와 서열번호: 6에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 *M. intracellulare*(MI)의 DT1에 특이적인 프라이머 쌍.

청구항 4

서열번호: 7에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드와 서열번호: 8에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 *M. avium* complex(MAC)의 IS1311에 특이적인 프라이머 쌍.

청구항 5

서열번호: 9에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드와 서열번호: 10에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 마이코박테리아의 16s rDNA에 특이적인 프라이머 쌍.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 따른 프라이머 쌍을 1종 단독으로, 2종 이상 조합으로 또는 모두 포함하는 MAC 진단용 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

서열번호: 1과 서열번호: 2의 프라이머 쌍을 포함하고, MAP를 진단하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서,

서열번호: 3과 서열번호: 4의 프라이머 쌍을 포함하고, MAA를 진단하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 6항에 있어서,

서열번호: 5와 서열번호: 6의 프라이머 쌍을 포함하고, MI를 진단하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 6항에 있어서,

서열번호: 1과 서열번호: 2의 프라이머 쌍 및 서열번호: 7과 서열번호: 8의 프라이머 쌍을 포함하고, MAH를 진단하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 7항 내지 제 10항에 있어서,

서열번호: 9와 서열번호: 10의 프라이머 쌍을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 따른 프라이머 쌍을 1종 단독으로, 2종 이상 조합으로 또는 모두 포함하고, 추가적으로 Tris, MgCl₂, KCl, betine, dNTP 및 Taq 폴리머라제를 포함하는 MAC 진단용 PCR용 키트.

청구항 13

(1) 제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 따른 프라이머 쌍을 1종 단독으로, 2종 이상 조합으로 또는 모두 이용하여 PCR을 실시하는 단계 및 (2) PCR 산물을 확인하는 단계를 포함하는 MAC 진단방법.

청구항 14

제 13항에 있어서,

상기 프라이머 쌍을 2종 이상 조합으로 이용하여 PCR을 실시하는 경우 멀티플렉스(multiplex) PCR을 수행하는 것을 특징으로 하는 진단방법.

청구항 15

제 13항에 있어서,

IS901 산물이 생성된 경우 MAA로 진단하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 13항에 있어서,

IS900 산물이 생성된 경우 MAP로 진단하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 13항에 있어서,

DT1 산물이 생성된 경우 MI로 진단하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 13항에 있어서,

IS1311 산물이 생성되고, IS900 산물이 생성되지 않는 경우 MAH로 진단하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 13항에 있어서,

상기 PCR은 1~10분간 94~96℃에서 초기화(initialization) 후 94~98℃에서 40~80초간 변성(denaturation), 55~65℃에서 30~50초간 어닐링(annealing), 70~80℃에서 20~40초간 연장(elongation)하는 반응을 25~35회 반복하는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

본 발명은 MAC(*Mycobacterium avium* complex) 진단에 관한 것으로, 보다 자세하게는 MAC 균간에 특이적인 삽입 서열 마커에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍, 상기 프라이머 쌍을 포함하는 MAC 진단용 조성물 및 상기 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행한 후 PCR 산물을 확인함으로써 MAC를 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0001]

- [0002] 마이코박테리아(mycobacteria)는 인류에 가장 심각한 감염질환을 유발시키고 있다. 이에 포함된 마이코박테리아는 *M. tuberculosis* complex와 *M. leprae*, Nontuberculosis mycobacteria(NTM)가 있다. 그 중 최근 감소가 아닌 증가로 돌아선 마이코박테리아가 NTM이다. HIV 감염 환자의 증가, 장기이식, 세포치료, 항암치료에 따른 면역억제가 NTM의 기회감염 비율을 증가시키는 가장 큰 요인이 되고 있다. NTM 감염증은 최근 국내에서 빠른 속도로 증가하고 있으며, 객담 acid-fast bacilli (AFB) 도말양성인 경우 과거에는 폐결핵의 확실한 진단기준이라고 여겨졌으나, 최근에는 이 환자들 중 10~20%가 NTM 폐질환으로 밝혀지고 있다. NTM 폐질환은 결핵에 비해 항생제 내성률이 높고 치료 효율이 낮아 2년 정도의 장기간의 병합항생제 치료에도 불구하고 완치율은 50~60% 이하에 머무르고 있다. 대부분의 NTM은 자연수와 토양 등 자연환경에 널리 분포하고 있으며, 병원성이 낮은 균이다. 사람과 사람 사이에서의 전염은 없으며, 따라서 NTM에 감염된 환자를 격리할 필요는 없다. NTM 폐질환은 주위 환경에 존재하는 균이 공기를 통해 호흡기에 감염되어 발생하는 것으로 알려져 있다.
- [0003] 또한, 이러한 NTM의 경우 각 균체마다의 특징적인 증상과 각기 다른 항생제가 사용되어지고 있고, 결핵과 같이 장시간 부작용이 심한 항생제 등을 먹어야 하므로 균이 정확하게 동정되지 않은 상태에서 항생제가 처방되는 것은 환자의 목숨을 위협하는 또 다른 요소가 될 수 있다. 따라서, NTM에 관한 정확한 동정 방법이 절실히 필요한 실정이다.
- [0004] 미국은 80년대 초반 검사실에서 배양되는 마이코박테리아 중 NTM이 차지하는 비율이 30% 정도이다가 최근에는 50% 이상으로 증가하여 결핵균보다 분리되는 빈도가 더 높아졌다. 우리나라에서는 1980년대 임상 검체에서 분리되는 마이코박테리아의 97~98% 이상이 결핵균이었지만, 1990년대 이후 NTM이 분리되는 비율이 증가하여, NTM이 차지하는 비율이 20~30%에 이른다는 보고도 있다.
- [0005] NTM 폐질환을 일으키는 원인균의 분포는 국가에 따라 그리고 국가 내에서도 지역에 따라 다양하다. 미국과 일본에서 NTM 폐질환의 가장 흔한 원인균은 MAC로 60~80%를 차지하며, *Mycobacterium kansasii*가 두 번째로 흔한 원인균으로 15~20%를 차지한다. *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* 등 고성장(rapid growth) NTM은 폐질환 원인균의 5% 미만인 것으로 알려져 있다.
- [0006] 우리나라에서는 1981년 MAC 폐질환 증례가 처음으로 보고된 이후 1990년대 다양한 원인균에 의한 NTM 폐질환 환자들의 임상상이 보고되었다. 국내 연구결과를 종합하면, 우리나라에서도 NTM 폐질환의 원인균으로 가장 흔한 균은 MAC로 50~60%를 차지하며, *M. avium* 보다 *M. intracellulare*가 더 흔한 것으로 알려져 있다. 우리나라의 NTM 감염의 가장 큰 특징은 외국에서 상대적으로 적은 원인균인 *M. abscessus*가 국내에서는 두 번째로 20~30% 내외로 보고되고, 미국과 일본에서 두 번째로 흔한 *M. kansasii* 폐질환은 국내에서는 상대적으로 발생이 드물었지만, 근래에 들어 환자수가 점차 증가하고 있다. NTM으로 인한 질환은 폐질환, 림프절염, 피부질환, 파종성 질환 등 4가지 특징적인 임상 증후군으로 분류되고 있다. 이중 폐질환은 NTM으로 인한 질환의 90% 이상을 차지하는 가장 흔한 형태이다.
- [0007] 이처럼 점점 증가함에도 불구하고 제대로 된 NTM 치료약이 없을 뿐더러 각 NTM 마다 항생제 치료가 다르기 때문에 무엇보다도 정확한 NTM 진단이 중요하다.
- [0008] 앞서 서술한 바와 같이 NTM 감염사례 중 거의 반수 이상이 MAC에 의한 감염이라도 과언이 아니다.
- [0009] MAC 폐질환은 "상엽 공동형(apical fibrocavitary form)"과 "결절 기관지확장증형(nodular bronchiectatic form)"이라는 서로 다른 두 가지 임상상을 갖는다. 특히, 상엽 공동형은 과거부터 가장 잘 알려져 왔던 질환으로 주로 오랜 기간의 흡연력과 음주력이 있는 중년 이상의 남성에서 발생하고, 만성폐쇄성폐질환, 기존의 폐결핵 등 기저질환을 대부분 갖고 있다. 단순흉부방사선촬영에서는 상엽의 공동이 관찰되는데 폐결핵과 매우 유사한 형태를 갖는다. 림프절 비대와 흉수는 드물게 나타난다. 이러한 형태의 MAC 폐질환은 치료를 하지 않으면 1~2년 이내에 광범위한 폐 실질의 파괴와 사망으로 진행된다. MAC 폐질환의 두 번째 형태는 결절 기관지확장증형으로 이는 1980년대 후반에서야 알려진 질병이다. 이는 중년 이상의 비흡연자 여성에서 호발하며, 특징적으로 기저질환이 발견되지 않는다. 단순흉부방사선촬영에서 상엽의 공동은 관찰되지 않고, 주로 우중엽과 좌상엽의 설상엽(lingular segment)를 침범하며 폐 양측 하부에 결절과 침윤을 보인다. 과거에는 이 질환을 MAC 폐질환이라고 생각하지 않았고, 기관지확장증이 있는 환자에서 MAC가 집락균으로 존재한다고 이해하였다. 이후 고해상도 전산화단층촬영을 이용한 연구에서 이 질환의 특징적인 방사선학적 소견이 발견되었는데 그것은 기관지확장증에 동반된 다발성 중심소엽성 결절(centrilobular nodule)이다. 최근 미국과 일본 그리고 국내보고에서는 전체 MAC 폐질환의 50%를 차지하여 상엽 공동형과 발생률이 같거나 오히려 더 높다. 결절 기관지확장증형의 MAC 폐질환은 상엽 공동형에 비해 진행속도가 매우 느려서, 일부 환자에서는 단순흉부방사선촬영에서 방사선학적 소견의 변화가 수년에 걸쳐 서서히 나타나기도 한다. 따라서 임상적, 방사선학적 변화를 관찰

하기 위해서 5-10년 정도의 장기간의 추적관찰이 필요하기도 하다.

[0010] *M. avium* complex(MAC)에는 *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* sub *hominissuis*와 *M. intracellulare*가 있다.

[0011] (1) *M. avium* subsp. *avium*(MAA)

[0012] 조류결핵이라고도 불리우며 조형결핵이라고도 불리운다. 원래 숙주(host)는 조류이지만, 사람에게도 감염이 되며 주로 폐에 감염되어 여러 결절을 만들며, 감염이 폐에만 국한되지 않는 것이 특징이다. 숙주 전체로 dissemination되어 여러 병증을 유발한다. 위산에도 죽지 않고 견딜 정도로 통제하기 힘든 균이다.

[0013] (2) *M. avium* subsp. *paratuberculosis*(MAP)

[0014] 우리나라보다는 외국에서 더 많이 연구되어 있고, 더 알려져 있는 MAP는 주로 반추동물에서 John's 병을 일으키는 균으로 알려져 있다. 사람에서는 Crohn's병을 일으키는 것으로 알려져 있는 이 균은 주로 장에 감염되어 장에 농과 출혈을 일으키고 항생제 사용에 내성을 갖는 것으로 알려져 있다. 또한, 발견이 어려울 정도로 적은수의 균이 서서히 자라면서 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다.

[0015] (3) *M. avium* subsp. *silvaticum*(MAS)

[0016] 이 균에 관하여서는 많은 연구가 되어 있지 않다. 또한 거의 대부분의 것이 MAA와 유사하며 자연에서 분리되는 경우도 극히 드문 경우에만 일어나는 것으로 알려져 있다.

[0017] (4) *M. avium* sub *hominissuis*(MAH)

[0018] *M. avium* 환자의 반수 이상이 MAH에 감염된 것으로 보고되어 있다. MAH는 돼지형이라고도 말하며, 현재까지도 MAA와 MAH의 쉬운 분류법이 나오지 않은 상태이다. MAA보다 병원성이 약하다고 알려져 있지만 사람에게 가장 많은 질병을 일으키고 치료하기도 힘든 것으로 알려져 있다.

[0019] (5) *M. intracellulare* (MI)

[0020] HPLC 분류로써 MAC에 포함되게 된 마이코박테리아로서 MAA와 가장 유사한 병증을 일으킨다. 저성장(slow growth) 균으로서, 이 균의 특징은 dissemination을 하지 않는다는 것이다. 모든 면에서 MAA와 비슷하고 치료약 또한 MAA와 같이 치료를 한다.

[0021] *M. avium*은 후천성면역결핍증환자에서 90%가 원인 균이 될 정도로 많이 분포한다. 하지만 면역저하가 없는 환자에서의 폐질환은 MI가 70%를 차지할 정도이다. *M. avium* 과 MI는 치료와 예후의 측면에서 차이가 없기 때문에 현재까지는 MAC로 통칭하고 있다. MAC의 경우 폐질환의 증상과 징후는 비특이적으로 나타나며 질환의 경과도 예측하기 힘들다. 그러므로 각 원인균마다 치료도 다르게 해야 하고, 병증도 다르기 때문에 무엇보다도 치료를 위해선 정확한 동정이 우선적으로 필요한 실정이다. 현재 사용되고 있는 여러 동정 방법들은 시간이 오래 걸려 치료시기를 놓칠 수도 있고, 비용 또한 많이 드는 것이 현실이다. 그리하여 효과적이고 빠른 동정 방법이 꼭 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0022] 본 발명자는 상기와 같은 요건에 부합하는 MAC 진단법에 대하여 연구하던 중 MAC 균간에 특이적인 삽입 서열 마커에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 실시하고, PCR 산물을 확인함으로써 단시간에

정확히 MAC를 동정하고 또한, 아종을 감별 진단할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0023] 본 발명은 한 목적은 MAC(*Mycobacterium avium* complex) 군간에 특이적인 삽입 서열 마커(insertion sequence marker)에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍을 제공하는데 있다.

[0024] 본 발명의 다른 목적은 상기 프라이머 쌍을 포함하는 MAC 진단용 조성물을 제공하는데 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행한 후 PCR 산물을 확인함으로써 MAC를 진단하는 방법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0026] 본 발명의 한 관점은 MAC(*Mycobacterium avium* complex)의 삽입 서열 마커(insertion sequence marker)에 특이적인 프라이머 쌍에 관한 것이다. 이하, 본 발명의 프라이머 쌍을 구체적으로 설명한다.

[0027] 본 발명은 서열번호: 1에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드와 서열번호: 2에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 MAP(*M. avium* subsp. *paratuberculosis*)의 IS900에 특이적인 프라이머 쌍에 관한 것이다. 상기 프라이머 쌍은 398bp의 IS900 산물을 생성하게 된다.

[0028] 또한, 본 발명은 서열번호: 3에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드와 서열번호: 4에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 MAA(*M. avium* subsp. *avium*)의 IS901에 특이적인 프라이머 쌍에 관한 것이다. 상기 프라이머 쌍은 753bp의 IS901 산물을 생성하게 된다.

[0029] 또한, 본 발명은 서열번호: 5에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드와 서열번호: 6에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 MI(*M. intracellulare*)의 DT1에 특이적인 프라이머 쌍에 관한 것이다. 상기 프라이머 쌍은 296bp의 DT1 산물을 생성하게 된다.

[0030] 또한, 본 발명은 서열번호: 7에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드와 서열번호: 8에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 MAC(*M. avium* complex)의 IS1311에 특이적인 프라이머 쌍에 관한 것이다. 상기 프라이머 쌍은 608bp의 IS1311 산물을 생성하게 된다.

[0031] 아울러, 본 발명은 서열번호: 9에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드와 서열번호: 10에 나타낸 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 마이코박테리아의 16s rDNA에 특이적인 프라이머 쌍에 관한 것이다. 상기 프라이머 쌍은 484bp의 산물을 생성하게 된다.

[0032] 본 발명의 실시예에서는 MAC를 대상으로 상기된 본 발명의 프라이머 쌍을 이용하여 멀티플렉스(multiplex) PCR을 실시한 후 PCR 산물을 확인한 결과, 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다(도 1 참조).

[0033] MAA에서는 IS901(753bp), IS1311(608bp), DT1(296bp) 및 16s rDNA(484bp)가 나타났다.

[0034] MAP에서는 IS900(398bp), IS1311 및 16s rDNA가 나타났다.

[0035] MAH에서는 IS1311 및 16s rDNA가 나타났다.

[0036] MI에서는 16s rDNA 및 DT1이 나타났다.

[0037] 따라서, 본 발명의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 실시한 후 PCR 산물을 확인함에 있어, IS900 산물이 생성된 경우, MAP 양성으로 진단할 수 있고, IS901 산물이 생성된 경우, MAA 양성으로 진단할 수 있으며, DT1의 산물이 생성된 경우, MI 양성으로 진단할 수 있고, IS900 산물이 생성되지 않고 IS1311 산물이 생성된 경우, MAH 양성으로 진단할 수 있다.

[0038] 이로써, 본 발명의 프라이머 쌍 1종을 단독으로 이용하여 PCR을 실시한 후 PCR 산물을 확인함으로써 MAC를 진단할 수 있다. 또한, 바람직하게는 본 발명의 프라이머 쌍 2종 이상을 조합으로, 보다 바람직하게는 본 발명의 프라이머 쌍 모두를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 실시한 후 PCR 산물을 확인함으로써 MAC를 진단할 수 있다. 후자의 경우, 1회의 PCR을 통해 MAC 동정 뿐만 아니라 아종도 감별 진단할 수 있으므로 특히 유용하다.

[0039] 결론적으로, 본 발명의 프라이머 쌍은 MAC를 진단 (즉, MAC 동정 및/또는 아종 감별 진단)하는데 이용될 수 있다.

- [0040] 프라이머를 이용한 특정 핵산의 검출은 PCR과 같은 증폭 방법을 사용하여 목적 유전자의 서열을 증폭한 다음 당 분야에 공지된 방법으로 유전자의 증폭여부를 확인함으로써 수행될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 다른 관점은, 본 발명에 따른 프라이머 쌍을 포함하는 MAC 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0042] 본 발명의 진단용 조성물은 본 발명의 프라이머 쌍을 1종 단독으로, 바람직하게는 2종 이상 조합으로, 보다 바람직하게는 본 발명의 프라이머 쌍 모두를 포함할 수 있다.
- [0043] 한 양태로서, 서열번호: 1과 서열번호: 2의 프라이머 쌍을 포함하는 조성물은, 398bp의 IS900 산물 생성 여부를 확인함으로써 MAP를 진단할 수 있다.
- [0044] 다른 양태로서, 서열번호: 3과 서열번호: 4의 프라이머 쌍을 포함하는 조성물은, 753bp의 IS901 산물 생성 여부를 확인함으로써 MAA를 진단할 수 있다.
- [0045] 또 다른 양태로서, 서열번호: 5와 서열번호: 6의 프라이머 쌍을 포함하는 조성물은, 608bp의 IS1311 산물 생성 여부를 확인함으로써 MI를 진단할 수 있다.
- [0046] 또 다른 양태로서, 서열번호: 1과 서열번호: 2의 프라이머 쌍 및 서열번호: 7과 서열번호: 8의 프라이머 쌍을 포함하는 조성물은 IS900 산물과 IS1311 산물의 생성 여부를 확인함으로써 MAH를 진단할 수 있다.
- [0047] 상기된 양태의 진단용 조성물은 서열번호: 9와 서열번호: 10의 프라이머 쌍을 추가적으로 포함하는 것이 바람직하다.
- [0048] 본 발명의 MAC 진단용 조성물은 당분야에서 널리 사용되는 다른 구성 성분 또는 장치를 추가로 포함하여 MAC 진단용 키트로 응용, 제작될 수 있다.
- [0049] 구체적인 예로서, 본 발명의 프라이머 쌍 및, 추가적으로 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs; dATP, dGTP, dCTP, dTTP), Taq-폴리머라제와 같은 효소, 멸균수 등을 포함하여 PCR용 키트로 제작될 수 있다. 한 양태로서, 본 발명의 PCR용 키트는 프라이머 쌍 및, 추가로 Tris, MgCl₂, KCl, betine, dNTP, Taq-폴리머라제를 포함할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 관점은 (1) 본 발명의 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 실시하는 단계 및 (2) PCR 산물을 확인하는 단계를 포함하는 MAC 진단방법에 관한 것이다.
- [0051] 한 양태로서, 본 발명의 프라이머 쌍 1종을 단독으로 이용하여 PCR을 실시한 후 PCR 산물을 확인함으로써 MAC를 진단할 수 있다.
- [0052] 다른 양태로서, 본 발명의 프라이머 쌍 2종 이상을 조합으로 또는 본 발명의 프라이머 쌍 모두를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 실시한 후 PCR 산물을 확인함으로써 MAC를 진단할 수 있다.
- [0053] IS901에 특이적인 산물이 생성된 경우 MAA로 진단할 수 있고, IS900에 특이적인 산물이 생성된 경우 MAP로 진단할 수 있으며, DT1에 특이적인 산물이 생성된 경우 MI로 진단할 수 있고, IS1311에 특이적인 산물이 생성되고, IS900에 특이적인 산물이 생성되지 않는 경우 MAH로 진단할 수 있다.
- [0054] 본 발명에서 PCR은 1~10분간 94~96℃에서 초기화(initialization) 후 94~98℃에서 40~80초간 변성(denaturation), 55~65℃에서 30~50초간 어닐링(annealing), 70~80℃에서 20~40초간 연장(elongation)하는 반응을 25~35회 반복하는 것이 바람직하다.
- 효 과**
- [0055] 우리나라의 NTM 감염의 가장 많은 부분을 차지하고 있는 MAC을 본 발명으로 인하여 MAC진단의 시간과 비용 절감의 큰 폭으로 줄일 수 있으며, 각 MAC만의 진단 마커로 인한 군 동정 또한 동시에 할 수 있다는 장점이 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0056] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0057] 본 발명자는 *M. avium* complex가 NTM 중 가장 많은 비율의 감염이 일어남과 이것에 빠른 진단을 위하여 연구하던 중 각 MAC 균간에 특이적인 삽입 서열 마커(insertion sequence marker)가 있다는 것을 발견하고, 이것을 한 번에 볼 수 있는 방법을 고심하던 중 각 조건에 총체적으로 맞는 유전자를 발견하고, 이것을 진단마커로 쓸 수 있을 것이라는 기술적 사상을 도출하게 되었다.

[0058] 본 발명은 특징적인 homology의 특징을 잡기 위해 여러 번의 시행착오를 겪은 후 발명하기에 이르렀으며, 지금까지 알려진 MAC의 구분을 확실하게 알고자 노력하였다.

[0059] 현재까지의 MAC의 구분에 있어 시간이 오래 걸리고, 비용 또한 많이 소모된다. 하지만, 본 발명은 마이코박테리아만의 특별한 유전자를 가지고 하기에 변수가 그 만큼 적고 확증이 가능하다 볼 수 있다.

[0060] (1) 각 MAC 균마다의 특이적인 insertion sequence(IS)를 찾아보았다.

[0061] (2) IS1311(Genbank accession No. U16276)은 MAC의 IS 마커로서 *M. intracellulare*를 제외한 모든 MAC에서 나타난다.

[0062] (3) IS901(Genbank accession No. X59272)은 2~13 카피(copy) 존재하며, MAA의 특이적인 IS로서 MAA에서만 특이적으로 나타난다.

[0063] (4) IS900(Genbank accession No. X16293)은 15~20 카피가 존재하며, MAP에서만 특이적으로 나타난다.

[0064] (5) DT1(Genbank accession No. L04543)은 MAA와 MI에서만 나타난다.

[0065] (6) 16s rDNA는 모든 마이코박테리아에서만 나타난다.

[0066] 앞서 규명된 각 MAC 균마다의 특이적인 IS 마커를 참조하여 하기 나열된 프라이머(표 1)를 설계하였다.

표 1

특이 서열	산물 크기 (bp)	염기 서열	방향	서열 번호	타겟 미생물
IS900	398	5' TGGACAATGACGGTTACGGAGGTGG 3'	Forward	1	MAP
		5' CGCAGAGGCTGCAAGTCGTGG 3'	Reverse	2	
IS901	753	5' GAACGCTGCTCTAAGGACCTGTGG 3'	Forward	3	MAA
		5' GGAAGGGTGATTATCTGGCCTGC 3'	Reverse	4	
DT1	296	5' CGTTGGCTGGCCATTCACGAAGGAGT 3'	Forward	5	MI
		5' GCTAGTTGGATCGCGCGAACACCGG 3'	Reverse	6	
IS1311	608	5' GCGTGAGGCTCTGTGGTGAA 3'	Forward	7	모든 MAC
		5' ATGACGACCGCTTGGGAGAC 3'	Reverse	8	
16s rDNA	484	5' ATAAGCCTGGGAAACTGGGT 3'	Forward	9	마이코 박테리아
		5' CACGCTCACAGTTAAGCCGT 3'	Reverse	10	

[0068] MAC 만을 특이적으로 정확하게 진단할 수 있는지 확인하기 위해 많은 마이코박테리아와 그 외의 임상과

환경 분리 균주도 분석 대상으로 하였다(표 2).

- [0069] PCR 반응 혼합물은 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2.5 mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.2mM, 1M betine, 200 μM dNTP (Promega, Madison, WI), 10pmol의 각 프라이머 쌍, 2.5 U의 Hotstar plus Taq polymerase (Qiagen, Gaithersburg, MD)로 구성하였다.
- [0070] 증폭은 DNA 9700 thermocycler(T-gradient, biometra, Germany) 기계로 95℃ 8분,(95℃ 1분, 60℃ 40초, 72℃ 35초) 29번, 72℃ 10분으로 증폭하였다. PCR 산물을 2% 아가로스에 30분간 전기영동하였다.
- [0071] 그 결과, 본 발명은 많은 마이코박테리아 중에 MAC에 대하여 특별하게 분석이 가능한 것으로 나타났다(도 1).
- [0072] MAA는 IS901(753bp), IS1311(608bp), DT1(256bp), 16s rDNA(484bp)가 나타났다.
- [0073] MAP는 IS900(398bp), IS1311 및 16s rDNA가 나타났다.
- [0074] MAH는 IS1311 및 16s rDNA만 나타났다.
- [0075] MI는 16s rDNA 및 DT1만 나타났다.
- [0076] 표 2는 MAC와 다른 마이코박테리아와 nonmycobacteria의 균들을 이용해 검사한 결과를 나타낸 것이다.
- [0077] 총 107개의 ATCC 균주와 분리 균주를 이용해 실험하였다. 그 중 임상분리균주는 거의 대부분 *M. hominissuis*였고, 그 외에 ATCC 균주들을 대상으로 확인하였다.
- [0078] 본 발명으로 마이코박테리아 중 우리나라에서 NTM 감염 중 가장 많은 비율을 차지하고 있는 MAC에 대하여 특정 프라이머로 동정이 가능하다.

표 2

Bacterial species	No. tested	Strain name and source	Amplification target in PCR				
			16S rRNA	IS900	IS903	IS1311	DTI
<i>M. avium</i> complex							
<i>M. avium</i> ss. <i>paratuberculosis</i>	13	ATCC 19968, JTC303, Bea Linda, Dominic, K-10, 3 JTC strain, DT114, 2 clinical isolate	+	+	-	+	-
<i>M. avium</i> ss. <i>hominis</i>	44	ATCC 700898, 104, 36 clinical* 3 JTC strain	+	-	-	+	-
<i>M. avium</i> ss. <i>avian</i>	8	3 EPA strain, ATCC 35712, ATCC 25291, 3 JTC strain	+	-	+	+	+
<i>M. intracellulare</i>	6	ATCC 13950, ATCC 25123, 3 EPA strain, WSLH	+	-	-	+	+
<i>M. avium</i> ss. <i>cytogenium</i>	1	ATCC 49884	+	-	+	+	+
Mycobacterium other than MAC							
<i>M. tuberculosis</i>	1	ATCC 19977	+	-	-	-	-
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	1		+	-	-	-	-
<i>M. bovis</i> BCG	1	ATCC 19210	+	-	-	-	-
<i>M. bovis</i>	1		+	-	-	-	-
<i>M. fortuitum</i>	2	ATCC 49403, 49404	+	-	-	-	-
<i>M. malmoense</i>	1	ATCC 29571	+	-	-	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	1	ATCC 19981	+	-	-	-	-
<i>M. kansasii</i>	1	ATCC 12478	+	-	-	-	-
<i>M. phlei</i>	1	ATCC 11758	+	-	-	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	1	ATCC 19981	+	-	-	-	-
<i>M. smegmatis</i>	2	ATCC 11758, mc ² 155	+	-	-	-	-
<i>M. terrae</i>	1	ATCC 15785	+	-	-	-	-
<i>M. goodii</i>	1	ATCC 14470	+	-	-	-	-
<i>M. chelonae</i> sub <i>chelonae</i>	1	ATCC 35749	+	-	-	-	-
<i>M. neoaurum</i>	1	ATCC 19250	+	-	-	-	-
<i>M. goodii</i>	1	ATCC 14467	+	-	-	-	-
<i>M. goodii</i>	1	ATCC 15754	+	-	-	-	-
<i>M. vaccae</i>	1	ATCC 15483	+	-	-	-	-
<i>M. ulcerans</i>	1	ATCC 19423	+	-	-	-	-
<i>M. goodii</i>	1	ATCC 927	+	-	-	-	-
<i>M. goodii</i>	2	ATCC 51130, 51131	+	-	-	-	-
Bacteria (non-mycobacterium)							
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	WSLH	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	3	ATCC 25922, ATCC 35218, DH5a	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	ATCC 29212	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	WSLH	-	-	-	-	-
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	ATCC 25285	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	ATCC 29213	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	ATCC 29212	-	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	1	WSLH	-	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	1	WSLH	-	-	-	-	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	1	WSLH	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1	WSLH	-	-	-	-	-
<i>Rhodococcus equi</i>	1	WSLH	-	-	-	-	-
Total	107						

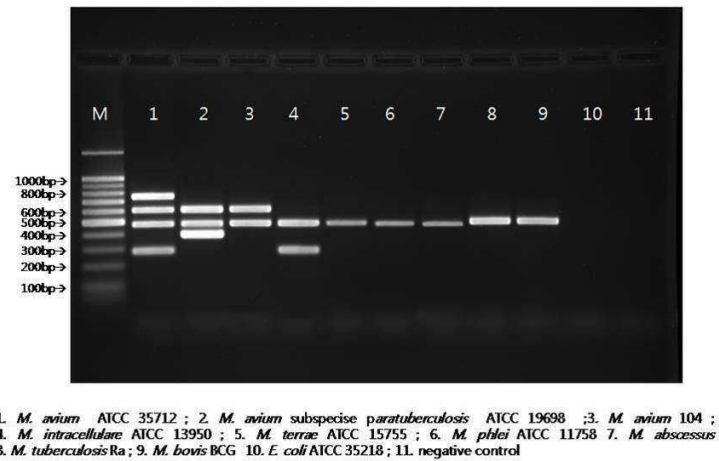
*10 isolates from humans; Sequella, MD

도면의 간단한 설명

도 1은 MAC와 다른 마이코박테리아를 대상으로 본 발명의 프라이머 쌍을 이용하여 멀티플렉스 PCR을 실시한 결과를 나타낸 것이다.

도면

도면1



서열목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University(IAC)
 <120> Primer pairs for diagnosis of Mycobacterium avium complex and
 Usage thereof

<160> 10

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 1

tggacaatga cggttacgga ggtgg

25

<210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 2
 cgacagaggct gcaagtcgtg g 21

<210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 3
 gaacgctgct ctaaggacct gttgg 25

<210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 4
 ggaagggtga ttatctggcc tgc 23

<210> 5
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 5
cgttggctgg ccattcacga aggagt

26

<210> 6
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 6
gctagtgtga tcgcgccgaa caccgg

26

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 7
gcgtgaggct ctgtggtgaa

20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer

<400> 8
atgacgaccg cttgggagac

20

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 9
 ataagcctgg gaaactgggt 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 10
 cacgctcaca gttaagccgt 20