

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 7월 11일 (11.07.2019)



(10) 국제공개번호
WO 2019/135477 A2

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/689 (2018.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/012785
- (22) 국제출원일: 2018년 10월 26일 (26.10.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2018-0002282 2018년 1월 8일 (08.01.2018) KR
- (71) 출원인: 조선대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY) [KR/KR]; 61452 광주시 동구 필문대로 309 (서석동), Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 김동민 (KIM, Dong Min); 61704 광주시 남구 봉선중앙로 8, 101동 402호 (봉선동), Gwangju (KR).
- (74) 대리인: 김종선 (KIM, Jong Sun); 06242 서울시 강남구 역삼로3길 11, 12층 (역삼동, 광성빌딩), Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,

ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

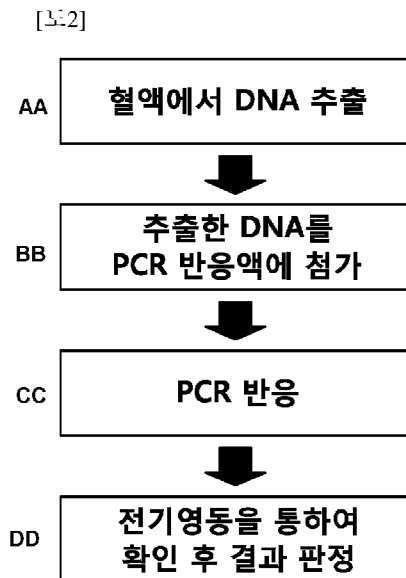
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD OF DIAGNOSING TSUTSUGAMUSHI DISEASE BY USING MULTICOPY GENE

(54) 발명의 명칭: 다복제유전자를 이용한 쓰쓰가무시병의 진단방법



- AA ... Extract DNA from blood
- BB ... Add extracted DNA to PCR reaction solution
- CC ... Conduct PCR reaction
- DD ... Determine result after confirming by electrophoresis

(57) Abstract: The present invention relates to a method of diagnosing tsutsugamushi disease by using multicopy genes. Preferably, the present invention relates to a method of diagnosing tsutsugamushi disease by providing a primer pair based on the nucleotide sequence of a multi-copy gene of *Orientia tsutsugamushi* in order to detect *Orientia tsutsugamushi* bacteria causing tsutsugamushi disease, and detecting *Orientia tsutsugamushi* by using the same. A diagnostic method using a primer pair of the present invention can perform detection with higher sensitivity and specificity compared to conventional test methods using a target gene for detection, thereby being able to perform clinical diagnosis quickly and easily with high accuracy.

(57) 요약서: 본 발명은 다복제유전자를 이용한 쓰쓰가무시병의 진단방법에 관한 것으로, 바람직하게는 쓰쓰가무시병의 원인균인 오리엔티아 쓰쓰가무시 (*Orientia tsutsugamushi*) 균을 검출하기 위하여 오리엔티아 쓰쓰가무시의 다복제유전자의 염기서열에 근거한 프라이머쌍을 제공하고, 이를 이용하여 오리엔티아 쓰쓰가무시를 검출함으로써 쓰쓰가무시병을 진단하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 프라이머쌍을 이용한 진단방법은 종래의 표적 유전자를 이용하여 검출하는 검사 방법들에 비해 높은 민감도와 특이도로 검출할 수 있으므로, 높은 정확도로 신속하고 용이하게 임상진단할 수 있다.

WO 2019/135477 A2

명세서

발명의 명칭: 다복제유전자를 이용한 쓰쓰가무시병의 진단방법 기술분야

- [1] 본 발명은 다복제유전자를 이용한 쓰쓰가무시병의 진단방법에 관한 것으로서, 바람직하게는 쓰쓰가무시병의 원인균인 오리엔티아 쓰쓰가무시(*Orientia tsutsugamushi*)균의 다복제유전자 염기서열을 증폭시킬 수 있는 프라이머 및 이를 이용한 쓰쓰가무시병을 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 쓰쓰가무시병은 급성 발열성 질환으로서 오리엔티아 쓰쓰가무시에 의해 감염된 털진드기의 유충에 물려 감염되며, 전신적 혈관염으로 인한 특징적인 임상 양상을 나타낸다. 주요 숙주는 설치류이며 진드기는 숙주이자 매개체이다. 주요 가을철 열성 질환으로서 우리나라에서는 1951년 처음 보고된 이래, 우리나라 전역에서 9월과 11월 사이에 발생하고 있으며, 특히, 우리나라 가을에 발생하는 환자의 30%가 쓰쓰가무시병으로 진단될 만큼 흔한 질병이다.
- [3] 증상은 감염된 털 진드기의 유충에 물린 후 1~3 주의 잠복기를 거친 후 초기증상으로 발열, 오한, 두통, 근육통을 동반하기도 하며, 홍반성 반점과 구진성 발진이 가슴, 배, 몸통 혹은 상하지 및 드문 경우 얼굴이나 손바닥, 발바닥에 나타난다. 털 진드기에 물린 자리에는 발병 수일 내에 까만 딱지로 덮이는 가피(eschar)가 생기며, 대부분의 경우 통증이나 가려움증 등의 증상은 없으며, 가피의 확인은 신속한 진단에 도움이 된다.
- [4] 대개 병의 경과가 중하지 않고, 항생제 치료에 잘 반응하나, 진단이 늦어질 경우 폐렴, 급성 신부전, 뇌수막염, 뇌염, 상부 위장관 출혈, 다기관 기능 부전, 심지어 심근경색이나 중풍의 형태로 나타날 수 있으며, 이러한 합병증으로 일부 환자에서는 사망을 초래할 수 있다.
- [5] 그러므로, 신속하고 정확한 진단이 환자의 예후 개선을 위해 필수적이다.
- [6] 쓰쓰가무시병에 대한 진단은 환자의 혈액으로부터 오리엔티아 쓰쓰가무시를 배양, 분리하여 확인하는 방법, 환자의 혈청 내에서 오리엔티아 쓰쓰가무시에 대한 항체를 검출하는 방법이 있다. 다만, 균체를 배양하여 질병을 진단하는 방법은 배양에 필요한 시간이 수주 이상 요구되고 있어 실제 환자의 진단 목적으로 합당하지 못하다.
- [7] 주로 진단에 사용되는 검사 방법들은 간접면역형광항체법(IFA), 피동적혈구응집법(PHA) 및 면역크로마토그래피(Immunochromatography)가 가장 흔히 사용되고 있다.
- [8] 이러한 항체를 이용한 진단법은 증상 발생 1-2주 이후에 검출되는 경우가 많아 민감도가 매우 낮고, 위양성이 많아 진단에 큰 도움이 되지 못하는 단점이 있다.
- [9] 예를 들어, 도 1을 참조하면 질병관리본부에 게시되어 있는 쓰쓰가무시병을

진단하는 방법 중 간접면역형광항체법(IFA)을 이용한 진단은 IFA IgG 항체가는 1:256 이상이 되면, 찌찌가무시병 확진으로 판정한다.

[10] 그러나, 항체가 상승하여 진단되는 데에 수주가 걸릴 수 있고 민감도 또한 46.7% 비교적 낮으며 증상 발생 1주에 내원할 경우 전체 환자의 42.1% 만 찌찌가무시병으로 진단할 수 있어 보다 신속하고 판정이 용이한 새로운 진단법이 요구되고 있다.

[11] 대체 진단법으로 PCR(Polymerase Chain reaction)에 기반한 검출법들이 제안되고 있다. PCR은 DNA의 원하는 부분의 복사본(copy)의 수를 기하급수적으로 증폭시킬 수 있는 분자생물학적 방법이다. DNA의 어느 부분이든지 그 서열만 알면 PCR을 통해서 증폭할 수 있다.

[12] PCR법은 전통적인 방법에 의해 이루어지는 컨벤셔널(conventional) PCR과 이를 변형하여 컨벤셔널 PCR법보다 100배 더 민감한 네스티드(nested) PCR법, PCR 반응의 실시간 모니터링(monitring)이 가능하여 2시간 이내에 결과를 속성으로 확인할 수 있는 리얼타임(real time) PCR법 등이 있다.

[13] 종래에는 찌찌가무시 병의 PCR 진단방법에 있어서, 46kDa, 57kDa, groEL 등 다양한 표적 단백 유전자(target protein gene)를 이용한 PCR이 시도되었으며, 컨벤셔널 PCR보다는 네스티드 PCR 및 리얼타임 PCR이 주로 이용되었다. 찌찌가무시병 진단에 있어서 컨벤셔널 PCR을 수행할 경우, 민감도가 10% 이내로 매우 낮다는 단점이 있고, 네스티드 PCR의 경우 PCR을 두 번 시행하여 민감도를 향상시킬 수 있지만, 다른 PCR에 비해 검사시간이 더 소요되는 단점 및 PCR을 두 번하기 때문에 유전자의 오염(contamination)으로 위양성률이 높아지는 단점이 있다.

[14] 다만, PCR 반응의 실시간으로 모니터링 하는 리얼타임 PCR을 수행하여 검사를 속성으로 진단하는 방법이 있지만, 검사 장비가 매우 고가이기 때문에 의료 기관에서 보편적으로 사용되기에는 어려운 실정이다.

[15] 따라서, 높은 민감도와 특이도를 보이면서, 대체로 검사방법이 간단하고 비용이 적은 진단 방법의 개발이 절실하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[16] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명은 오리엔티아 찌찌가무시균의 다복제유전자를 이용하여 찌찌가무시병을 진단하는 방법을 제공하는 것을 대목적으로 한다.

[17] 바람직하게는, 다복제유전자의 염기서열을 증폭할 수 있는 프라이머쌍을 이용하여 찌찌가무시병을 진단하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[18] 또한, 본 발명의 두 번째 목적은, 특정 염기서열을 포함하는 프라이머쌍을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[19] 또한, 본 발명은 세 번째 목적은, 특정 염기서열로 이루어진 프라이머쌍을

포함하는 PCR 진단 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

- [20] 바람직하게는, 본 발명은 민감도와 특이도가 우수한 특정 염기서열로 이루어진 프라이머쌍을 제공함으로써, 찌쯔가무시균을 신속하게 진단할 수 있는 PCT 진단 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [21] 상술한 첫 번째 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 오리엔티아 찌쯔가무시균의 다복제유전자의 염기서열을 증폭할 수 있는 특정 염기서열을 포함하는 프라이머를 개시한다. 본 발명의 프라이머는 서열번호 1 내지 서열번호 36의 염기서열로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 염기서열을 포함한다.
- [22] 바람직하게는, 본 발명의 프라이머쌍은 서열번호 1 내지 서열번호 36의 염기서열로 이루어진 군 중에서 선택된 2종 이상의 염기서열을 포함한다.
- [23] 더욱 바람직하게는 상기 프라이머쌍은 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [24] 본 발명의 두 번째 목적을 달성하기 위한, 본 발명의 찌쯔가무시병 진단방법은, 다복제유전자(multicopy gene)의 염기서열을 증폭시킬 수 있는 프라이머쌍을 이용하여 검출할 수 있다.
- [25] 상기 진단방법은 (a) 시료로부터 DNA를 분리하는 단계, (b) 상기 분리된 DNA를 주형으로 서열번호 1 내지 서열번호 36의 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계, 및 (c) 상기 PCR 산물을 분리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [26] 본 발명의 세 번째 목적을 달성하기 위한, 찌쯔가무시 진단용 PCR 키트는 서열번호 1 내지 서열번호 36의 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 프라이머쌍을 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [27] 본 발명에 따른 특정염기서열을 포함하는 프라이머쌍은 다복제유전자에 대한 높은 특이성을 가진다.
- [28] 또한, 본 발명에 따른 찌쯔가무시병 진단방법은 특정염기서열을 포함하는 프라이머쌍을 이용하여 PCR 반응을 통해 높은 민감도와 특이성으로 검출할 수 있으므로, 높은 신뢰성으로 신속하고 용이하게 임상진단 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [29] 도 1은 간접면역형광항체법을 이용한 진단방법에 따른 검출 민감도 그래프이다.
- [30] 도 2는 본 발명에 따른 PCR검출방법을 이용한 찌쯔가무시병 진단방법을 나타내는 순서도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 이하에서는 본 발명을 상세히 설명하고자 한다.
- [32] 본 발명의 찌쯔가무시병 진단방법은 오리엔티아 찌쯔가무시균의 다복제유전자의 염기서열을 증폭시킬 수 있는 프라이머쌍을 이용하여 검출할

수 있다.

- [33] 상기 다복제유전자(multicopy gene)는 오리엔티아 찌찌가무시 유전자 내에서 여러 위치에 반복하여 존재하는 유전자를 말하며, 바람직하게는 14 종의 Tra-linked 유전자의 염기서열을 포함할 수 있으며, 더 바람직하게는 traB, traE, traC 및 TchA 유전자의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [34] 또한, 상기 다복제유전자는 PCR의 표적 유전자(Target gene)이다.
- [35] 종래 진단방법에 사용되었던 47kDa, 56kDa, groE1-STG 등의 표적 단백질 유전자들은 전체 유전자 내부에 한 위치에만 존재하는 것에 비해 다복제유전자는 여러 위치에 반복하여 존재하기 때문에 PCR을 수행하여 염기서열을 증폭 시 PCR 효율이 높아지므로 찌찌가무시병의 진단의 정확도가 높아질 수 있다.
- [36] 본 발명의 찌찌가무시 진단용 프라이머는 서열번호 1 내지 서열번호 36의 염기서열로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 염기서열을 포함한다.
- [37] 또한, 본 발명의 찌찌가무시 진단용 프라이머쌍은 서열번호 1 내지 서열번호 36의 염기서열로 이루어진 군 중에서 선택된 2종 이상의 염기서열을 포함한다.
- [38] 상기 프라이머쌍은 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [39] 통상적으로 상기 프라이머쌍은 서로 상보적인 염기서열을 갖지 않는 2개의 프라이머(primer)를 말한다.
- [40] 프라이머는 특정 유전자 서열에 대하여 상보적인 짧은 단선의 유전자 서열(oligonucleotide)로 DNA 합성에 기시점이 되며, PCR 검사, DNA시퀀싱(DNA sequencing) 등에 이용된다. 또한, 프라이머는 PCR 검사의 가장 중요한 요소이며, 정확도를 결정한다. 상기 프라이머는 오리엔티아 찌찌가무시(*Orientia tsutsugamushi*) 보령균주에 감염된 환자의 혈액에서 증폭한 보령균주의 다복제유전자의 염기서열에 근거하여 설계하였으며, 다복제유전자와 상보적인 염기서열을 가진다.
- [41] 또한, 상기 찌찌가무시병 진단방법은 (a) 시료로부터 DNA를 분리하는 단계, (b) 상기 분리된 DNA를 주형으로 서열번호 1 내지 서열번호 36의 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계, 및 (c) 상기 PCR 산물을 분리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [42] 상기 (a)단계에서의 DNA 추출은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 따라 수행될 수 있으며, 상업적으로 판매되는 DNA 추출 키트를 이용하여 수행할 수 있다.
- [43] 상기 (b)단계에서 PCR은 분리된 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 프라이머쌍이 DNA 중합효소를 이용하여 상보적 DNA가닥을 합성하여 PCR 반응을 수행할 수 있다.
- [44] 또한, 상기 (b)단계에서 한 쌍의 프라이머로 증폭되는 산물 내 염기서열에 근거하여 프로브(Probe)를 더 포함하여 Real time PCR 반응을 수행할 수 있다.
- [45] 상기 프로브란 염기서열과 특이적으로 결합할 수 있는 수개 내지 수백 개의

염기로 이루어진 핵산단편을 의미하며 라벨링 되어있어 특정 핵산 존재여부를 확인할 수 있다. 프로브는 바람직하게는 5'-말단 및 3'-말단에 각각 형광물질이 표지될 수 있다.

- [46] 또한, 더욱 바람직하게는 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), 6-카르복시-4,5-디클로로-2,7-디메톡시플루오레세인(6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein,6-JOE), 테트라클로로플루오레세인 (tetrachlorofluorescein, TET), 테트라메틸로다민 이소티오시아네이트(tertramethylrhodamine isothiocyanate,Texas Red), 5-카르복시-x-로다민(5-carboxy-X-rhodamine, ROX), 6-카르복시테트라메틸-로다민(6-carboxytetramethyl-rhodamine, TAMRA)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.
- [47] 상기 PCR은 중합효소 연쇄 중합반응(polymerase chain reaction)의 약어로서, DNA 또는 RNA의 특정영역을 시험관 내에서 대량으로 증폭하는 기술이며, 당 업계에 공지된 여러 성분을 포함하는 PCR 반응 혼합액을 이용하여 수행될 수 있다. 상기 PCR반응 혼합액에는 본 발명에서 제공되는 PCR 프라이머쌍 이외에 적당량의 DNA 중합효소, dNTP, PCR 완충용액 및 물(dH₂O)을 포함할 수 있다.
- [48] 또한, PCR 완충용액은 트리스-HCl(tris-HCl), MgCl₂, KCl 등을 포함할 수 있다.
- [49] PCR은 통상적으로 3가지 반응단계로 이루어져 있다. 첫 번째는 DNA 변성단계로, 두 가닥의 DNA를 온도를 가하여 한 가닥의 DNA로 분리시키는 단계이며, 두 번째는 프라이머의 결합단계로, 한 가닥으로 변성한 DNA와 프라이머를 공존시킨 후 온도를 낮추면 프라이머쌍이 각각 상보적인 한 가닥 주형 DNA에 결합되는 단계이고, 세 번째는 신장반응으로 4 종류의 기질(dNTP)이 공존하는 상태에서 DNA 중합효소를 작용시켜 프라이머를 신장시키는 단계로 이루어져 있다.
- [50] 상기 PCR은 통상적인 PCR 반응을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 가장 일반적인 컨벤셔널(Conventional) PCR, 두 번의 PCR을 동시에 또는 연속해서 수행하는 듀플렉스(duplex) PCR 및 네스티드(nested) PCR, 실시간으로 결과를 확인할 수 있는 고가의 리얼타임(Real time) PCR을 모두 이용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 컨벤셔널 PCR 또는 리얼타임 PCR을 이용할 수 있다.
- [51] 상기 리얼타임(Real time) PCR은 PCR 증폭산물의 증가를 실시간으로 모니터링하여 확인할 수 있기 때문에 추가적인 전기영동 분석방법을 이용하지 않아도 되며, 앤드 포인트(End point)에서 PCR 증폭산물을 확인하는 기존의 PCR 법에 비해서 신속하고 간편하게 PCR을 해석할 수 있으며 오염의 위험성이 적다.

- [52] 리얼타임 PCR 증폭산물의 검출방법은 타겟 서열(target sequence)에 특이적이며 형광 염료(dye)가 결합된 프로브(Probe)를 이용하며, 검출 특이성이 높아 비슷한 서열까지도 구별하여 검출할 수 있다.
- [53] 또한, 상기 (c)단계에서는 당 업계에서 널리 공지된 방법에 따라 PCR 산물을 분리할 수 있다. 바람직하게는 아가로스 겔(agarose gel) 또는 폴리아크릴아미드 겔 (polyacrylamide gel) 전기영동 또는 형광분석 장치(ABI prism 3100 genetic analyzer-electropherogram)에 의해 확인할 수 있다. 전기영동 후 에디움 브로마이드(ethidium bromide) 염색으로 전기영동 결과를 분석할 수 있다.
- [54] 본 발명의 찌쯔가무시병 진단용 PCR키트는 서열번호 1 내지 서열번호 36의 염기서열로 이루어진 균에서 선택된 프라이머쌍을 포함할 수 있다.
- [55] 또한, 상기 검출용 PCR 키트에는 상기 다복제유전자의 염기서열을 증폭할 수 있는 프라이머쌍 이외에도, 중합효소 연쇄 중합반응에 관여하는 효소, dNTP, 완충 용액을 포함할 수 있으며, PCR 산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동에 수행에 필요한 구성성분인 미네랄 오일, 표준 마커, 염색시약인 브로모페놀블루 또는 자일렌 FF 등의 PCR용 재료들을 포함할 수 있다.
- [56] 이하, 본 발명을 다음의 실시예에 의하여 균의 검출, 진단 방법에 대해 보다 구체적으로 설명한다.
- [57] 다음의 실시예는 단지 본 발명을 자세히 설명하기 위한 것으로, 이들에 의해 본 발명의 내용 및 범위가 실시예에 의해 한정되는 것은 아니라는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [58]
- [59] <실시예>
- [60] 1. 프라이머 제작
- [61] 우리나라에서 흔한 찌쯔가무시 보령군주에 감염된 환자의 혈액에서 증폭된 다복제유전자(multicopy gene) 유전자에 근거하여 설계되었다.
- [62] 더 바람직하게는, 상기 프라이머는 Genbank Accession No. AM494475.1: *O.tsutsugamushi* Boryoung complete genome thcA gene(conserved hypothetical protein)에 대하여 정방향의 프라이머(position 14-34) 및 역방향 프라이머(position 171-151)로 제작하였으며, 각각 서열번호 1 내지 서열번호 36으로 표기하였다.
- [63] 또한, 프로브(probe)는 Taqman probe(position 58-78)로 제작하였으며, 서열번호 37 및 38로 표기하였다.
- [64] 본 발명의 실시예에 따라 제작된 프라이머 및 프로브를 하기 표 1에 나타내었다.
- [65]

[표1]

서열번호	서열
1	ttttgccc aaaagccttg
2	ggcctagcctttatggttgg
3	atccta atggagctggcaat
4	tggagtagctccaggaattgt
5	tggagctggcaataaacctt
6	gcattgacgaatggggagta
7	cctccaaccataaaggctagg
8	catgctacaattgaggctgaag
9	agagcaattcctccaacat
10	cattatcgaggccgttgaag
11	tttagcatgcctgctgtttag
12	tgctacaattgaggctgaagg
13	tgctaaaggaatatggccagtta
14	tcaattgattatgcgtgggtta
15	tcacaggaacaacatcaatttta
16	tttcaatgagtgatgaggcttt
17	cgaagctaataccaagctcca
18	tcattttcaatgagtgatgagg
19	tggccagttaatttcttggtt
20	ctgaatctcaaaaggctggag
21	tggctgcaattaccaaagaa
22	gatgccactttcatgtctgc
23	tgggcaatttatgtgacgaa
24	tcacctcaaccttctttggaa
25	gcagacatgaaagtggcatc
26	cgctaaaccagtagcgaagc
27	ttccaaagaaggttgaggtga
28	cgccagttaacaacaaaagg
29	gctcctctaactttgtgattgg

30	agcccagtcggttcttattgc
31	tgtggcttcttcttgctc
32	attggagatgcgcttcagtc
33	cctgacgcaataagaacgact
34	gctggaggatcaacaaca
35	gcgcatctccaatctgaaac
36	ggatgaagatggacgttctgg
37	cggcctcgataatgcccaaca
38	cttcaacggcctcgataatgccc

[66] 상기 프라이머는 다복제유전자인 tchA, traB, traE, trbC와 상보적인 염기서열을 가질 수 있다.

[67] 또한, 상기 프라이머의 서열길이는 각각 19nt 내지 30nt, GC함량은 20 내지 60%이며, Tm값은 50 내지 70 °C가 되도록 제작하였다.

[68]

[69] 2. 검체 준비

[70] 2007년부터 2008년 사이에 조선대학교 병원을 내원한 환자를 대상으로 당시 가피 또는 반구진성 발진 등이 있으며, 두통, 전신위약감, 근육통, 기침, 오심, 복통과 같은 2가지 이상의 임상증상을 갖고 있는 환자의 혈액샘플을 채취하고 유전자를 추출하여 검사에 이용하였다.

[71] 혈액 검체에서 간접면역 형광검사법(IFA)에서 오리엔티아 쯔쯔가무시에 대한 IgG 항체가 4배 이상 상승된 경우를 쯔쯔가무시병 확진으로 정의하였으며, 쯔쯔가무시병으로 확진된 환자 52명의 혈액을 양성대조군으로하고, 쯔쯔가무시가 아닌 타 질환으로 진단된 환자 20명의 혈액을 음성대조군으로 이용하였다.

[72]

[73] 3. 오리엔티아 쯔쯔가무시 검출

[74] 제작한 프라이머 및 진단방법의 유효성을 확인하기 위하여 준비한 양성대조군 및 음성대조군에 대한 검체를 대상으로 DNA를 검출하여 도 2에 나타낸 바와 같이 PCR을 진행 하였다.

[75] 환자로부터 전혈을 채취하고, 백혈구 연층을 분리한 다음, QIA amp DNA 미니키트(Qiagen, Germany)를 이용하여 DNA를 분리하였다. 분리방법은 키트에 동봉된 매뉴얼(manual)에 의해 실시하였으며, 분리한 DNA는 오리엔티아 쯔쯔가무시 균의 검출을 위한 주형(template)으로 사용하였다.

[76] 추출된 DNA를 주형으로 하여 컨벤셔널 PCR, 네스티드 PCR 및 리얼타임 PCR을 시행하였다.

- [77] 이때, 실험에 사용한 프라이머로는 본 발명의 서열번호 1 내지 서열번호 36의 염기서열을 가진 프라이머 및 서열번호 37 및 38의 염기서열을 가진 프로브를 이용하였다.
- [78] 켈벤셔널 PCR 및 네스티드 PCR은 AccuPower™ PCR PreMix (1U Top polymerase, 250 μm dNTP, 10 mM Tris-HCl(pH 9.0; Bioneer)에 2 μl 주형 DNA, 각각 1 μl씩 10 pmole/μl 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머, 16 μl의 멸균 3차 증류수를 첨가하여 총 20 μl의 반응액을 만든 다음 튜브를 잘 혼합하여 Biosystems Veriti™ 96-well Thermal cycle(Applied Biosystems)에 세팅한 다음 PCR을 수행하였다.
- [79] 또한, 리얼타임 PCR은 1 μl의 2 pmole/μl probe를 포함하여 상기와 동일한 방법으로 반응액을 만든 다음 튜브를 잘 혼합하여 BIONEER Exicycler™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block(Applied BIONNER)에 세팅한 다음 PCR을 수행하였으며, 프로브의 5'과 3'-말단에 FAM(6-carboxyFluo-rescein)과 BHQ-1(Black Hole Quencher-1)로 표지하여 사용하였다.
- [80] PCR 수행조건은 표 2에 나타내었다.
- [81] PCR 종료 후, 0.5 ng/ml EtBr (ethidium bromide, Bioneer)을 넣은 1.5 % agarose gel (Seakem LE agarose, Cambrex Bio Science)을 바이오니아 전기영동 기기(Bioneer)로 로딩하고, 100 V(1X TEA, Bioneer)조건으로 40분간 PCR 증폭산물을 전기영동을 진행하여 그 결과를 관찰 하였다.
- [82] PCR 검사결과, 음성대조군에 대한 PCR 증폭산물은 전기영동 시켰을 때 어떠한 곳에서도 band가 관찰되지 않았다. 또한, 본 발명의 프라이머에 쌍에 의한 PCR 증폭산물의 크기는 표 3에 표기되어 있으며, 해당 크기의 밴드를 확인 함으로써 오리엔티아 찌찌가무시 검출 여부를 확인하는 것으로 하였으며, PCR 증폭산물은 간접면역 형광검사법과 일치하는 결과가 도출됨을 확인 할 수 있었다.

[83]

[84] [표2]

PCR 반응 조건			
예비 변성(predenaturation)	94°C	10분	35 cycles
변성(denaturation)	94°C	30초	
결합(annealing)	63°C	30초	
신장(extension)	72°C	1분	
추가-신장(extra-extension)	72°C	7분	

[85]

[86]

[표3]

유전자	프라이머쌍 번호	서열	프라이머 서열번호	증폭산물 크기(bp)
tchA	1	ttttgcccaaaagccttg	1	149
		ggcctagcctttatggttg	2	
	2	atcctaattggagctggcaat	3	176
		tggagtagctccaggaattgt	4	
	3	tggagctggcaataaacctt	5	197
		gcattgacgaatggggagta	6	
	4	cctccaaccataaaggctagg	7	186
		catgctacaattgaggctgaag	8	
	5	agagcaattcctccaacat	9	142
		cattatcgaggccgttgaag	10	
	6	ttagcatgcctgctgtttag	11	158
		tgctacaattgaggctgaagg	12	
traC	1	tgctaaaggaatatggccagtta	13	193
		tcaattgattatgcgtgggtta	14	
	2	tcacaggaacaacatcaatttta	15	190
		tttcaatgagtgatgaggcttt	16	
	3	cgaagetaataccaagctcca	17	142
		tcattttcaatgagtgatgagg	18	
	4	tggccagttaatttcttggtt	19	202
		ctgaatctcaaaaggctggag	20	
traE	1	tggctgcaattaccaaagaa	21	190
		gatgccactttcatgtctgc	22	
	2	tgggcaatttatgtgacgaa	23	184
		tcacctcaaccttctttggaa	24	
	3	gcagacatgaaagtggcatc	25	169
		cgctaaaccagtagcgaagc	26	
	4	ttccaaagaaggttgaggtga	27	150
		cgccagttaacaacaaaagg	28	

traB	1	gctcctctaacttttgtgattgg	29	172
		agcccagtcggttcttattgc	30	
	2	tgtggcttcttcttgctc	31	182
		attggagatgcgcttcagtc	32	
	3	cctgacgcaataagaacgact	33	149
		gctggaggatcaacaaca	34	
	4	gcgcatctccaatctgaaac	35	199
		ggtgaagatggacgttctgg	36	

[87] <비교예>

[88] 1. 종래 방법에 의한 오리엔티아 쯔쯔가무시 검출

[89] 본 발명의 프라이머 및 진단방법의 유효성을 비교하기 위하여 하기와 같이 비교 실험을 실행하였다.

[90] 주형 DNA는 상기 혈액검체에서 분리한 것을 동일하게 사용하였으며, 각각의 실험은 쯔쯔가무시 균의 검출에 일반적으로 사용되는 타겟 단백질 유전자인 56kDa, 47kDa에 대한 컨벤셔널 PCR 및 네스티드 PCR을 진행 하였으며, 그 결과를 표 4에 나타내었다.

[91] 각각의 PCR에 사용한 프라이머쌍은 참고 문헌에 따라 제작하거나, 직접 디자인 하여 사용하였으며, 실시예 3과 동일한 방법으로 PCR을 실시하였다.

[92] 47kDa 유전자를 증폭시키기 위한 프라이머쌍은 참고문헌 (Jiang J, Chan TC, Temenak JJ, Dasch GA, Ching WM, Richards AL. Development of a quantitative realtime polymerase chain reaction assay specific for Orientia tsutsugamushi. Am J Trop Med Hyg. 2004 Apr;70(4):351-6.)을 참고하여 제작하였다.

[93] 또한, 56kDa 유전자를 증폭시키기 위한 프라이머쌍은 참고문헌 (Kim DM, Yun NR, Yang TY, Lee JH, Yang JT, Shim SK, et al. Usefulness of nested PCR for the diagnosis of scrub typhus in clinical practice: A prospective study. Am J Trop Med Hyg. 2006 Sep;75(3):542-5.)를 참고하여 제작하였다.

[94]

[95]

[표4]

유전자/PCR	프라이머 명칭	서열	증폭산물 크기(bp)
47kDa/C-PCR	OtsuFP630	AACTGATTTTATTCAACTAATG CTGCT	118
	OtsuRP747	TATGCCTGAGTAAGATACRTG AATRGAATT	
47kDa/N-PCR(External Primer)	OtsuFP555	TCCTTTCGGTTTAAGAGGAAC A	238
	OtsuRP771	GCATTCAACTGCTTCAAGTAC A	
47kDa/N-PCR(Internal Primer)	OtsuFP630	AACTGATTTTATTCAACTAATG CTGCT	118
	OtsuRP747	TATGCCTGAGTAAGATACRTG AATRGAATT	
56kDa/C-PCR	P10	GATCAAGCTTCCTCAGCCTACT ATAATGCC	438
	P11	CTAGGGATCCCGACAGATGCA CTATTAGGC	
56kDa/N-PCR(External Primer)	P34	TCAAGCTTATTGCTAGATCTGC	1003
	P55	AGGGATCCCTGCTGCTGTGCTT GCTGCG	
56kDa/N-PCR(Internal Primer)	P10	GATCAAGCTTCCTCAGCCTACT ATAATGCC	438
	P11	CTAGGGATCCCGACAGATGCA CTATTAGGC	

[96]

[97]

<결과> 쯔쯔가무시병 진단방법의 유효성 확인

[98]

본 발명의 프라이머를 이용한 실시예 3 및 비교예의 오리엔티아 쯔쯔가무시 검출 방법에 있어서, 오리엔티아 쯔쯔가무시의 검출 민감도(sensitivity), 특이도(specificity) 및 검출시간을 측정된 결과를 표 5에 나타내었다.

[99]

표 5에서 알 수 있듯이 실시예 3의 TraB 유전자를 표적으로하여 컨벤셔널(C)-PCR을 진행한 경우, 비교예 1의 56kDa, 47kDa 유전자를 표적으로

한 네스티드(N)-PCR에 비해 적은 시간이 소요되었다.

[100] 또한, 실시예 3의 TraB1, TraB2 유전자를 표적으로하여 컨벤셔널(C)-PCR을 진행한 경우, 각각 82.7%와 88.5%의 민감도를 나타내었다.

[101] 특히, Tch 유전자를 표적으로 이용할 경우에는 컨벤셔널 PCR(C-PCR)을 진행한 경우, 90.4%의 민감도를 보였으며, 리얼타임 PCR(Q-PCR)을 진행한 경우, 검출 시간이 1-2시간에 불과함에도 민감도가 98.1%를 나타내었다.

[102] 따라서, 하기 표 5에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 프라이머쌍은 본 발명이 달성하고자 한 목적 및 효과를 달성하였다.

[103] 상기 결과에 의하면, 본 발명에 따른 프라이머쌍을 이용한 PCR 검출 방법은 오리엔티아 썩썩가무시의 감염여부를 확인하기에 충분한 민감도를 제공해 줄 수 있음을 확인할 수 있다.

[104]

[105] [표5]

	유전자/PCR	민감도	특이도	검출 시간
실시예 3	TchA6/C-PCR	90.4%	100%	3-4h
	TchA6/Q-PCR	98.1%	100%	1-2h
	TrbC1/C-PCR	63.5%	100%	3-4h
	TrbC4/C-PCR	57.7%	100%	3-4h
	TraE1/C-PCR	62.5%	100%	3-4h
	TraE3/C-PCR	62.5%	100%	3-4h
	TraB1/C-PCR	82.7%	100%	3-4h
	TraB2/C-PCR	88.5%	100%	3-4h
비교예 1	56kDa/C-PCR	1.9%	100%	3-4h
	56kDa/N-PCR	84.6%	100%	6-7h
	47kDa/C-PCR	1.9%	100%	3-4h
	47kDa/N-PCR	84.6%	100%	6-7h

[106] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였으며, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 정확한 실시의 예시일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아니며, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[107]

서열목록 Free Text

[108] <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, CHOSUN UNIVERSITY

- [109] <120> Diagnosis method of Tsutsugamushi disease using multicopy genes
[110] <130> 2018-I181
[111] <150> KR 10-2018-0002282
[112] <151> 2018-01-08
[113] <160> 38
[114] <170> KoPatentIn 3.0
[115]
[116] <210> 1
[117] <211> 19
[118] <212> DNA
[119] <213> Artificial Sequence
[120] <220>
[121] <223> Primer for PCR
[122] <400> 1
[123] ttttgccca aaagccttg 19
[124]
[125] <210> 2
[126] <211> 20
[127] <212> DNA
[128] <213> Artificial Sequence
[129] <220>
[130] <223> Primer for PCR
[131]
[132] <400> 2
[133] ggctagcct ttatggttg 20
[134]
[135] <210> 3
[136] <211> 20
[137] <212> DNA
[138] <213> Artificial Sequence
[139] <220>
[140] <223> Primer for PCR
[141] <400> 3
[142] atcctaattg agctggcaat 20
[143]
[144] <210> 4
[145] <211> 21
[146] <212> DNA

- [147] <213> Artificial Sequence
[148] <220>
[149] <223> Primer for PCR
[150] <400> 4
[151] tggagtagct ccaggaattg t 21
[152]
[153] <210> 5
[154] <211> 20
[155] <212> DNA
[156] <213> Artificial Sequence
[157] <220>
[158] <223> Primer for PCR
[159] <400> 5
[160] tggagctggc aataaacctt 20
[161]
[162] <210> 6
[163] <211> 20
[164] <212> DNA
[165] <213> Artificial Sequence
[166] <220>
[167] <223> Primer for PCR
[168] <400> 6
[169] gcattgacga atggggagta 20
[170]
[171] <210> 7
[172] <211> 21
[173] <212> DNA
[174] <213> Artificial Sequence
[175] <220>
[176] <223> Primer for PCR
[177] <400> 7
[178] cctccaacca taaaggctag g 21
[179]
[180] <210> 8
[181] <211> 21
[182] <212> DNA
[183] <213> Artificial Sequence
[184] <220>

[185] <223> Primer for PCR
[186] <400> 8
[187] cctccaacca taaaggctag g 21
[188]
[189] <210> 9
[190] <211> 20
[191] <212> DNA
[192] <213> Artificial Sequence
[193] <220>
[194] <223> Primer for PCR
[195] <400> 9
[196] agagcaattc ctccaacat 20
[197]
[198] <210> 10
[199] <211> 20
[200] <212> DNA
[201] <213> Artificial Sequence
[202] <220>
[203] <223> Primer for PCR
[204] <400> 10
[205] cattatcgag gccgttgaag 20
[206]
[207] <210> 11
[208] <211> 21
[209] <212> DNA
[210] <213> Artificial Sequence
[211] <220>
[212] <223> Primer for PCR
[213] <400> 11
[214] tttagcatgc ctgctgtta g 21
[215]
[216] <210> 12
[217] <211> 21
[218] <212> DNA
[219] <213> Artificial Sequence
[220] <220>
[221] <223> Primer for PCR
[222] <400> 12

[223] tgctacaatt gaggetgaag g 21
[224]
[225] <210> 13
[226] <211> 23
[227] <212> DNA
[228] <213> Artificial Sequence
[229] <220>
[230] <223> Primer for PCR
[231] <400> 13
[232] tgctaaagga atatggccag tta 23
[233]
[234] <210> 14
[235] <211> 22
[236] <212> DNA
[237] <213> Artificial Sequence
[238] <220>
[239] <223> Primer for PCR
[240] <400> 14
[241] tcaattgatt atgcgtgggt ta 22
[242]
[243] <210> 15
[244] <211> 23
[245] <212> DNA
[246] <213> Artificial Sequence
[247] <220>
[248] <223> Primer for PCR
[249] <400> 15
[250] tcacaggaac aacatcaatt tta 23
[251]
[252] <210> 16
[253] <211> 23
[254] <212> DNA
[255] <213> Artificial Sequence
[256] <220>
[257] <223> Primer for PCR
[258] <400> 16
[259] tttcaatga gtgatgagc ttt 23
[260]

- [261] <210> 17
[262] <211> 21
[263] <212> DNA
[264] <213> Artificial Sequence
[265] <220>
[266] <223> Primer for PCR
[267] <400> 17
[268] cgaagctaataccaagctcc a 21
[269]
[270] <210> 18
[271] <211> 22
[272] <212> DNA
[273] <213> Artificial Sequence
[274] <220>
[275] <223> Primer for PCR
[276] <400> 18
[277] tcattttcaatgagtgatga gg 22
[278]
[279] <210> 19
[280] <211> 21
[281] <212> DNA
[282] <213> Artificial Sequence
[283] <220>
[284] <223> Primer for PCR
[285] <400> 19
[286] tggccagtaattcttggt t 21
[287]
[288] <210> 20
[289] <211> 21
[290] <212> DNA
[291] <213> Artificial Sequence
[292] <220>
[293] <223> Primer for PCR
[294] <400> 20
[295] ctgaatctcaaaaggctgga g 21
[296]
[297] <210> 21
[298] <211> 20

- [299] <212> DNA
[300] <213> Artificial Sequence
[301] <220>
[302] <223> Primer for PCR
[303] <400> 21
[304] tggctgcaat taccaaagaa 20
[305]
[306] <210> 22
[307] <211> 20
[308] <212> DNA
[309] <213> Artificial Sequence
[310] <220>
[311] <223> Primer for PCR
[312] <400> 22
[313] gatgccactt tcatgtctgc 20
[314]
[315] <210> 23
[316] <211> 20
[317] <212> DNA
[318] <213> Artificial Sequence
[319] <220>
[320] <223> Primer for PCR
[321] <400> 23
[322] tgggcaattt atgtgacgaa 20
[323]
[324] <210> 24
[325] <211> 21
[326] <212> DNA
[327] <213> Artificial Sequence
[328] <220>
[329] <223> Primer for PCR
[330] <400> 24
[331] tcacctcaac cttctttgga a 21
[332]
[333] <210> 25
[334] <211> 20
[335] <212> DNA
[336] <213> Artificial Sequence

- [337] <220>
[338] <223> Primer for PCR
[339] <400> 25
[340] gcagacatga aagtggcatc 20
[341]
[342] <210> 26
[343] <211> 20
[344] <212> DNA
[345] <213> Artificial Sequence
[346] <220>
[347] <223> Primer for PCR
[348] <400> 26
[349] cgctaaacca gtagcgaagc 20
[350]
[351] <210> 27
[352] <211> 21
[353] <212> DNA
[354] <213> Artificial Sequence
[355] <220>
[356] <223> Primer for PCR
[357] <400> 27
[358] ttccaaagaa gttgaggtg a 21
[359]
[360] <210> 28
[361] <211> 20
[362] <212> DNA
[363] <213> Artificial Sequence
[364] <220>
[365] <223> Primer for PCR
[366] <400> 28
[367] cgccagttaa caacaaaagg 20
[368]
[369] <210> 29
[370] <211> 23
[371] <212> DNA
[372] <213> Artificial Sequence
[373] <220>
[374] <223> Primer for PCR

[375] <400> 29
[376] gctcctctaa cttttgtgat tgg 23
[377]
[378] <210> 30
[379] <211> 20
[380] <212> DNA
[381] <213> Artificial Sequence
[382] <220>
[383] <223> Primer for PCR
[384] <400> 30
[385] agcccagtcg ttcttattgc 20
[386]
[387] <210> 31
[388] <211> 20
[389] <212> DNA
[390] <213> Artificial Sequence
[391] <220>
[392] <223> Primer for PCR
[393] <400> 31
[394] tgtggettct tcttggctc 20
[395]
[396] <210> 32
[397] <211> 20
[398] <212> DNA
[399] <213> Artificial Sequence
[400] <220>
[401] <223> Primer for PCR
[402] <400> 32
[403] attggagatg cgcttcagtc 20
[404]
[405] <210> 33
[406] <211> 21
[407] <212> DNA
[408] <213> Artificial Sequence
[409] <220>
[410] <223> Primer for PCR
[411] <400> 33
[412] cctgacgcaa taagaacgac t 21

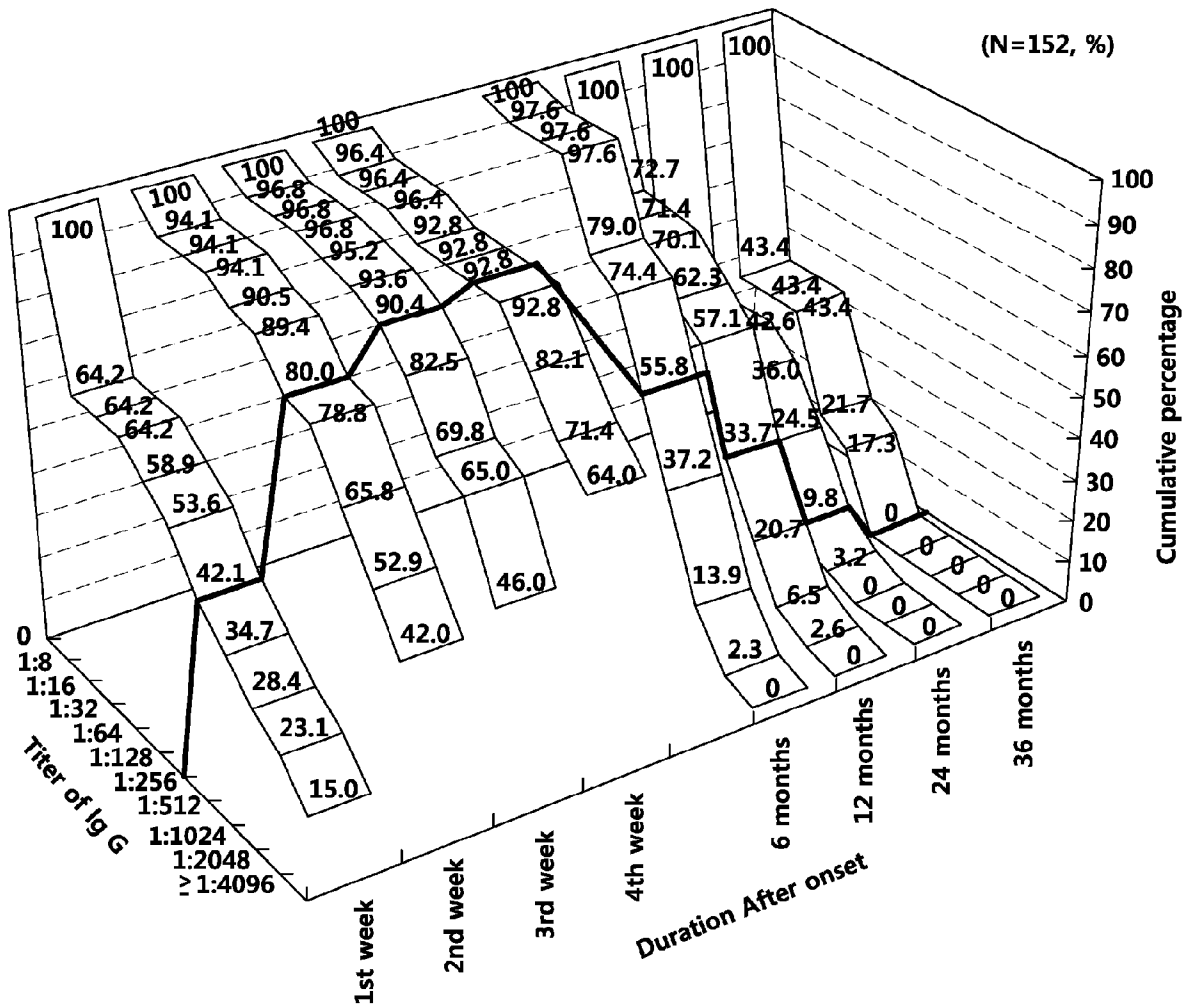
[413]
[414] <210> 34
[415] <211> 20
[416] <212> DNA
[417] <213> Artificial Sequence
[418] <220>
[419] <223> Primer for PCR
[420] <400> 34
[421] gctggaggtc atcaacaaca 20
[422]
[423] <210> 35
[424] <211> 20
[425] <212> DNA
[426] <213> Artificial Sequence
[427] <220>
[428] <223> Primer for PCR
[429] <400> 35
[430] gcgcattccc aatctgaaac 20
[431]
[432] <210> 36
[433] <211> 20
[434] <212> DNA
[435] <213> Artificial Sequence
[436] <220>
[437] <223> Primer for PCR
[438] <400> 36
[439] ggtgaagatg gacgttctgg 20
[440]
[441] <210> 37
[442] <211> 21
[443] <212> DNA
[444] <213> Artificial Sequence
[445] <220>
[446] <223> Probe for PCR
[447] <400> 37
[448] cggcctcgat aatgccaac a 21
[449]
[450] <210> 38

- [451] <211> 23
- [452] <212> DNA
- [453] <213> Artificial Sequence
- [454] <220>
- [455] <223> Probe for PCR
- [456] <400> 38
- [457] ctccaacggc ctcgataatg ccc 23
- [458]

청구범위

- [청구항 1] 오리엔티아 쯔쯔가무시(*Orientia tsutsugamushi*)균의 다복제 유전자(multicopy gene)를 이용하는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 다복제유전자(multicopy gene)의 염기서열을 증폭시킬 수 있는 프라이머쌍을 이용하여 검출하는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단법.
- [청구항 3] 서열번호 1 내지 서열번호 36의 염기서열로 이루어진 균 중에서 선택된 1종 이상의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단용 프라이머.
- [청구항 4] 서열번호 1 내지 서열번호 36의 염기서열로 이루어진 균 중에서 선택된 2종 이상의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단용 프라이머쌍.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서,
상기 프라이머쌍은 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단용 프라이머쌍.
- [청구항 6] (a) 시료로부터 DNA를 분리하는 단계;
(b) 상기 분리된 DNA를 주형으로 서열번호 1 내지 서열번호 36의 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및
(c) 상기 PCR 산물을 분리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단법.
- [청구항 7] 서열번호 1 내지 서열번호 36의 염기서열로 이루어진 균으로 선택된 프라이머쌍을 포함하는 것을 특징으로 하는 쯔쯔가무시병 진단용 PCR 키트.

[도1]



[도2]

