



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0058024
(43) 공개일자 2024년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/689 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/689 (2018.05)

C12Q 2531/113 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0141397

(22) 출원일자 2023년10월20일

심사청구일자 2023년10월20일

(30) 우선권주장

1020220136535 2022년10월21일 대한민국(KR)

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

이주훈

서울특별시 서초구 효령로33길 50, 101동 702호(방배동, 방배서리풀이편한세상)

신은지

서울특별시 관악구 관악로15길 22, 1105호(봉천동)

(74) 대리인

특허법인이름리온

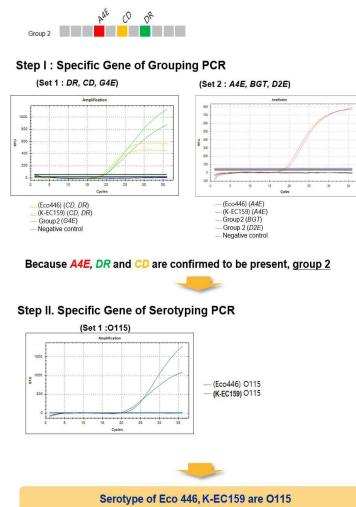
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 대장균의 O115 혈청형 신속 동정용 프라이머 세트 및 이를 이용한 대장균의 혈청형 동정 방법

(57) 요약

본 발명은 대장균의 O115 혈청형 신속 동정용 프라이머 세트 및 이를 이용한 대장균의 혈청형 동정 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 대장균의 각 혈청형별로 특정 패턴을 가지는 유전자에 특이적인 6개의 프라이머 세트를 이용하여 대장균의 혈청형을 O115를 포함하는 그룹으로 그룹핑하는 방법 및 그룹핑 후 상기 혈청형에 대해 특이적인 각 프라이머 세트를 처리하여 대장균의 혈청형을 동정하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

C12Q 2537/143 (2013.01)

C12Q 2561/101 (2019.08)

C12Q 2561/113 (2019.08)

C12Q 2600/16 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 i) 내지 vi)의 프라이머 세트를 포함하는, 대장균의 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하기 위한 프라이머 세트:

- i) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 세트;
- ii) 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 세트;
- iii) 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제3 프라이머 세트;
- iv) 서열번호 10의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 11의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제4 프라이머 세트;
- v) 서열번호 13의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 14의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제5 프라이머 세트; 및
- vi) 서열번호 16의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 17의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제6 프라이머 세트.

청구항 2

다음의 i) 내지 vi)의 프라이머 세트와 프로브를 포함하는, 대장균의 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하기 위한 조성물:

- i) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 세트와 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제1 프로브;
- ii) 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 세트와 서열번호 6의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제2 프로브;
- iii) 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제3 프라이머 세트와 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제3 프로브;
- iv) 서열번호 10의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 11의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제4 프라이머 세트와 서열번호 12의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제4 프로브;
- v) 서열번호 13의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 14의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제5 프라이머 세트와 서열번호 15의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제5 프로브; 및
- vi) 서열번호 16의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 17의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제6 프라이머 세트와 서열번호 18의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제6 프로브.

청구항 3

제2항의 조성물을 포함하는, 대장균의 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하기 위한 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 5

제1항의 프라이머 세트; 또는 제2항의 조성물을 이용한, 대장균의 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 방법은 다음의 a) 및 b) 단계를 포함하는, 방법:

a) 상기 제1 프라이머 세트와 제1 프로브, 상기 제2 프라이머 세트와 제2 프로브 및 상기 제3 프라이머 세트와 제3 프로브를 포함하는 제1 세트, 및 상기 제4 프라이머 세트와 제4 프로브, 상기 제5 프라이머 세트와 제5 프로브 및 상기 제6 프라이머 세트와 제6 프로브를 포함하는 제2 세트를 각각 시료에 처리하여 중합효소연쇄반응 (Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하는 단계; 및

b) 상기 시료에서 각 프라이머 세트와 프로브에 의한 증폭 산물을 확인하는 단계.

청구항 7

제6항에 있어서, c) 상기 시료에서 제1 프라이머 세트와 제1 프로브에 의한 증폭 산물, 제2 프라이머 세트와 제2 프로브에 의한 증폭 산물 및 제4 프라이머 세트와 제4 프로브에 의한 증폭 산물이 검출되고, 제3 프라이머 세트와 제3 프로브에 의한 증폭 산물, 제5 프라이머 세트와 제5 프로브에 의한 증폭 산물 및 제6 프라이머 세트와 제6 프로브에 의한 증폭 산물이 검출되지 않는 경우, 상기 시료에 존재하는 대장균의 혈청형을 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 8

서열번호 19의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머와 서열번호 20의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 대장균의 0115 혈청형 동정용 프라이머 세트.

청구항 9

서열번호 19의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머와 서열번호 20의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 프라이머 세트와 서열번호 21의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프로브를 포함하는, 대장균의 0115 혈청형 동정을 위한 조성물.

청구항 10

제9항의 조성물을 포함하는, 대장균의 0115 혈청형 동정을 위한 키트.

청구항 11

제10항에 있어서, 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 12

제8항의 프라이머 세트; 또는 제9항의 조성물을 이용한, 대장균의 0115 혈청형 동정 방법.

청구항 13

i) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 세트, 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 세트, 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제3 프라이머 세트, 서열번호 10의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 11의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제4 프라이머 세트, 서열번호

호 13의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 14의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제5 프라이머 세트, 및 서열번호 16의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 17의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제6 프라이머 세트를 포함하는, 대장균의 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하기 위한 프라이머 세트; 및

ii) 대장균의 0115 혈청형 동정을 위한 프라이머 세트;를 포함하는, 대장균의 0115 혈청형 동정을 위한 키트.

청구항 14

제13항에 있어서, 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제1 프로브, 서열번호 6의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제2 프로브, 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제3 프로브, 서열번호 12의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제4 프로브, 서열번호 15의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제5 프로브 및 서열번호 18의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제6 프로브를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 대장균의 0115 혈청형 동정을 위한 프라이머 세트는 서열번호 19의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머와 서열번호 20의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는, 키트.

청구항 16

제13항에 있어서, 서열번호 21의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프로브를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 17

제13항에 있어서, 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 추가로 포함하는, 키트.

청구항 18

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항의 키트를 이용한, 대장균의 0115 혈청형 동정 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 방법은 다음의 a) 내지 d) 단계를 포함하는, 방법:

a) 제1 프라이머 세트와 제1 프로브, 제2 프라이머 세트와 제2 프로브 및 제3 프라이머 세트와 제3 프로브를 포함하는 제1 세트, 및 제4 프라이머 세트와 제4 프로브, 제5 프라이머 세트와 제5 프로브 및 제6 프라이머 세트와 제6 프로브를 포함하는 제2 세트를 각각 시료에 처리하여 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하는 단계;

b) 상기 시료에서 각 프라이머 세트와 프로브에 의한 증폭 산물을 확인하는 단계;

c) 상기 시료에서 제1 프라이머 세트와 제1 프로브에 의한 증폭 산물, 제2 프라이머 세트와 제2 프로브에 의한 증폭 산물 및 제4 프라이머 세트와 제4 프로브에 의한 증폭 산물이 검출되고, 제3 프라이머 세트와 제3 프로브에 의한 증폭 산물, 제5 프라이머 세트와 제5 프로브에 의한 증폭 산물 및 제6 프라이머 세트와 제6 프로브에 의한 증폭 산물이 검출되지 않는 경우, 상기 시료에 존재하는 대장균의 혈청형을 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하는 단계; 및

d) 대장균의 0115 혈청형을 동정하기 위한 프라이머 세트와 프로브를 상기 시료에 처리하는 단계.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 d) 단계에서 대장균의 0115 혈청형을 동정하기 위한 프라이머 세트와 프로브는 서열번호 19의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머와 서열번호 20의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 프라이머 세트와 서열번호 21의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프로브를 포함하는, 방법.

발명의 설명

기술분야

- [0001] 본 발명은 대장균의 O115 혈청형 신속 동정용 프라이머 세트 및 이를 이용한 대장균의 혈청형 동정 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 대장균의 각 혈청형별로 특정 패턴을 가지는 유전자에 특이적인 6개의 프라이머 세트를 이용하여 대장균의 혈청형을 O115를 포함하는 그룹으로 그룹핑하는 방법 및 그룹핑 후 상기 혈청형에 대해 특이적인 각 프라이머 세트를 처리하여 대장균의 혈청형을 동정하는 방법을 제공한다.

배경기술

- [0002] 대표적인 식중독균인 대장균은 혈청형에 따라 그 독성과 인체 내 기작이 다르고, 비병원성 대장균이 존재하기 때문에 대장균에 대한 단순한 검출 여부로 식품 폐기나 유통 정지는 식품산업에 막대한 비용 손실을 초래한다. 따라서, 선택 배지나 16S 동정방법으로 대장균의 검출뿐만 아니라 혈청형에 대한 동정이 필요하다. 기존의 혈청형 동정 방법은 항원-항체 반응을 활용한 항혈청(antiserum) 방법으로, 항혈청 자체가 고가일 뿐만 아니라 혈청형 동정을 위해 긴 반응 시간이 소요되며, 육안으로 결과를 판단해야하기 때문에 그 결과가 모호하다는 한계점을 가지고 있다. 또한, 최근 활용되는 NGS(Next generation sequencing)로부터 염기서열을 확보하여 소프트웨어를 사용하는 인실리코 혈청형결정 (*in silico* serotyping) 방법은 혈청형을 동정하기 위해 해당 균주의 게놈 서열 (genome sequence) 정보를 필요로 하며, 이를 얻기 위한 시퀀싱 (sequencing) 비용 역시 매우 고가이고, 장비의 분석 소요 시간이 최소 3일 이상이라는 한계점을 가지고 있다. 병원성 대장균에 의한 식중독의 발생을 감시하고 예방하기 위해 빠른 혈청형 동정이 필요함에도 불구하고 기존 혈청형 동정 방법은 이러한 한계점을 가지고 있기 때문에, 새로운 혈청형 동정 방법의 개발의 필요성을 절감하게 되었다.
- [0003] 한편, 비특허문헌 1에서는 O-항원 유전자 클러스터 내에서 고유한 유전자 서열을 표적으로 하는 프라이머 세트를 이용하여 중합효소연쇄반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 통해 대장균의 혈청형을 동정하는 방법을 개시하고 있다. 그러나, 이 방법은 O-그룹의 수많은 혈청형을 개별 동정하기 위한 각 프라이머 세트를 필요로 한다.
- [0004] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 대장균의 각 혈청형별로 특정 패턴을 가지는 6개의 유전자에 대한 각 프라이머 세트를 사용하여 증폭 산물의 검출 여부를 확인함으로써 대장균의 O-그룹 혈청형을 1차적으로 그룹핑한 후, 그룹핑된 혈청형에 특이적인 각 프라이머 세트를 처리하여, 각 프라이머 세트의 비특이적 반응 및 교차 반응 없이 혈청형을 신속하게 동정할 수 있는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) DebRoy C, Fratamico PM, Roberts E. Molecular serogrouping of *Escherichia coli*. Anim Health Res Rev. 2018 Jun;19(1):1-16.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 대장균의 O 혈청형을 특정 그룹으로 그룹핑하기 위한 프라이머 세트, 조성물, 키트 및 이를 이용한 O 혈청형 그룹핑 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 대장균의 개별 O 혈청형을 동정하기 위한 프라이머 세트, 조성물 키트 및 이를 이용한 개별 O 혈청형 동정 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 진술한 대장균의 O 혈청형 그룹핑용 프라이머 세트 및/또는 대장균의 개별 O 혈청형 동정용 프라이머 세트를 포함하는 대장균의 O 혈청형 동정을 위한 키트 및 이를 이용한 대장균의 O 혈청형 동정 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 대장균의 각 혈청형별로 특정 패턴을 가지는 유전자에 각각 특이적

로 결합하는, 대장균의 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하기 위한 프라이머 세트를 제공한다.

- [0010] 추가로, 본 발명은 전술한 프라이머 세트 및 대장균의 각 혈청형별로 특정 패턴을 가지는 유전자에 각각 특이적으로 결합하는 프로브를 포함하는, 대장균의 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하기 위한 조성물을 제공한다.
- [0011] 이때, 상기 프라이머 세트는 다음의 제1 프라이머 세트 내지 제6 프라이머 세트를 포함할 수 있다:
- [0012] i) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 세트;
- [0013] ii) 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 세트;
- [0014] iii) 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제3 프라이머 세트;
- [0015] iv) 서열번호 10의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 11의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제4 프라이머 세트;
- [0016] v) 서열번호 13의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 14의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제5 프라이머 세트; 및
- [0017] vi) 서열번호 16의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 17의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제6 프라이머 세트.
- [0018] 이때, 상기 프로브는 다음의 제1 프로브 내지 제6 프로브를 포함할 수 있다:
- [0019] i) 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제1 프로브;
- [0020] ii) 서열번호 6의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제2 프로브;
- [0021] iii) 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제3 프로브;
- [0022] iv) 서열번호 12의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제4 프로브;
- [0023] v) 서열번호 15의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제5 프로브; 및
- [0024] vi) 서열번호 18의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제6 프로브.
- [0025] 추가로, 본 발명은 전술한 조성물을 포함하는 대장균의 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하기 위한 키트를 제공한다.
- [0026] 이때, 상기 키트는 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 추가로 포함할 수 있다.
- [0027] 추가로, 본 발명은 전술한 프라이머 세트, 조성물 또는 키트를 이용한 대장균의 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하는 방법을 제공한다.
- [0028] 이때, 상기 방법은 a) 제1 프라이머 세트와 제1 프로브, 제2 프라이머 세트와 제2 프로브 및 제3 프라이머 세트와 제3 프로브를 포함하는 제1 세트, 및 제4 프라이머 세트와 제4 프로브, 제5 프라이머 세트와 제5 프로브 및 제6 프라이머 세트와 제6 프로브를 포함하는 제2 세트를 각각 시료에 처리하여 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하는 단계; 및 b) 상기 시료에서 각 프라이머 세트와 프로브에 의한 증폭 산물을 확인하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0029] 이때, 상기 방법은 c) 상기 시료에서 제1 프라이머 세트와 제1 프로브에 의한 증폭 산물, 제2 프라이머 세트와 제2 프로브에 의한 증폭 산물 및 제4 프라이머 세트와 제4 프로브에 의한 증폭 산물이 검출되고, 제3 프라이머 세트와 제3 프로브에 의한 증폭 산물, 제5 프라이머 세트와 제5 프로브에 의한 증폭 산물 및 제6 프라이머 세트와 제6 프로브에 의한 증폭 산물이 검출되지 않는 경우, 상기 시료에 존재하는 대장균의 혈청형을 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명은 또한, 서열번호 19의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머와 서열번호 20의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제7 프라이머 세트를 포함하는, 대장균의 0115 혈청형을 혈청형 동정을 위한 프라이머 세트를 제공한다.

- [0031] 추가로, 본 발명은 전술한 프라이머 세트 및 프로브를 포함하는 대장균의 0115 혈청형 동정을 위한 조성물, 키트 및 이를 이용한 대장균의 0115 혈청형 동정 방법을 제공한다.
- [0032] 이때, 상기 프로브는 서열번호 21의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제7 프로브일 수 있다.
- [0033] 이때, 상기 키트는 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 추가로 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명은 또한, 대장균의 각 혈청형별로 특정 패턴을 가지는 유전자에 각각 특이적으로 결합하는 프라이머 세트; 및 대장균의 0115 혈청형 동정을 위한 프라이머 세트를 포함하는, 대장균의 0115 혈청형 동정을 위한 키트를 제공한다.
- [0035] 이때, 상기 대장균의 각 혈청형별로 특정 패턴을 가지는 유전자에 각각 특이적으로 결합하는 프라이머 세트는 다음의 제1 프라이머 세트 내지 제6 프라이머 세트를 포함할 수 있다:
- [0036] i) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 세트;
- [0037] ii) 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 세트;
- [0038] iii) 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제3 프라이머 세트;
- [0039] iv) 서열번호 10의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 11의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제4 프라이머 세트;
- [0040] v) 서열번호 13의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 14의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제5 프라이머 세트; 및
- [0041] vi) 서열번호 16의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 17의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제6 프라이머 세트.
- [0042] 이때, 상기 키트는 대장균의 각 혈청형별로 특정 패턴을 가지는 유전자에 각각 특이적으로 결합하는, 다음의 제1 프로브 내지 제6 프로브를 추가로 포함할 수 있다:
- [0043] i) 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제1 프로브;
- [0044] ii) 서열번호 6의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제2 프로브;
- [0045] iii) 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제3 프로브;
- [0046] iv) 서열번호 12의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제4 프로브;
- [0047] v) 서열번호 15의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제5 프로브; 및
- [0048] vi) 서열번호 18의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제6 프로브.
- [0049] 이때, 상기 대장균의 0115 혈청형 동정을 위한 프라이머 세트는 서열번호 19의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머와 서열번호 20의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제7 프라이머 세트를 포함할 수 있다.
- [0050] 이때, 상기 키트는 서열번호 21의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제7 프로브를 포함할 수 있다.
- [0051] 이때, 상기 키트는 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 추가로 포함할 수 있다.
- [0052] 추가로, 본 발명은 전술한 키트를 이용한 대장균의 0115 혈청형 동정 방법을 제공한다.
- [0053] 이때, 상기 방법은 다음의 a) 내지 d) 단계를 포함할 수 있다:
- [0054] a) 제1 프라이머 세트와 제1 프로브, 제2 프라이머 세트와 제2 프로브 및 제3 프라이머 세트와 제3 프로브를 포함하는 제1 세트, 및 제4 프라이머 세트와 제4 프로브, 제5 프라이머 세트와 제5 프로브 및 제6 프라이머 세트와 제6 프로브를 포함하는 제2 세트를 각각 시료에 처리하여 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하는 단계;

- [0055] b) 상기 시료에서 각 프라이머 세트와 프로브에 의한 증폭 산물을 확인하는 단계;
- [0056] c) 상기 시료에서 제1 프라이머 세트와 제1 프로브에 의한 증폭 산물, 제2 프라이머 세트와 제2 프로브에 의한 증폭 산물 및 제4 프라이머 세트와 제4 프로브에 의한 증폭 산물이 검출되고, 제3 프라이머 세트와 제3 프로브에 의한 증폭 산물, 제5 프라이머 세트와 제5 프로브에 의한 증폭 산물 및 제6 프라이머 세트와 제6 프로브에 의한 증폭 산물이 검출되지 않는 경우, 상기 시료에 존재하는 대장균의 혈청형을 O115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하는 단계; 및
- [0057] d) 대장균의 O115 혈청형을 동정하기 위한 프라이머 세트와 프로브를 상기 시료에 처리하는 단계.
- [0058] 이때, 상기 d) 단계에서 대장균의 O115 혈청형을 동정하기 위한 프라이머 세트와 프로브는 서열번호 19의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머와 서열번호 20의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제7 프라이머 세트와 서열번호 21의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제7 프로브를 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0059] 본 발명에 따른 대장균 혈청형 동정 방법은 제1 프라이머 세트 내지 제6 프라이머 세트와 제1 프로브 내지 제6 프로브를 이용하여, 각 프라이머 세트와 프로브에 의한 증폭 산물의 검출 여부를 확인함으로써, 1차적으로 대장균의 혈청형을 O115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑한 후, 상기 그룹핑된 혈청형에 특이적인 프라이머 세트를 처리함으로써, 프라이머 세트의 비특이적 반응 및 교차 반응 없이 혈청형을 신속하고 정확하게 동정할 수 있다. 또한, 본 발명의 방법에 적용된 실시간 PCR 기법은 PCR이 진행됨에 따라 증폭되는 DNA를 실시간으로 검출하는 방법으로, 일반적인 PCR과 다르게 추가적인 전기영동 없이 증폭된 DNA 확인이 가능하며, Taqman probe 방식의 실시간 PCR을 적용함에 따라 정방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머와 더불어 5' 및 3' 말단에 형광 물질을 부착시켜 표적 유전자가 증폭될 때마다 신호를 나타내어 정확도가 매우 높아 검출 한계(detection limit)가 낮은 장점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

- [0060] 도 1은 대장균 혈청형 O115를 포함하는 그룹 2에 대한 표 1의 그룹핑용 PCR 프라이머와 프로브의 멀티플렉스 PCR 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 대장균 혈청형 O115를 포함하는 그룹 2에 대한 표 2의 개별 혈청형 동정용 PCR 프라이머와 프로브의 멀티플렉스 PCR 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 대장균 혈청형 O115를 포함하는 그룹 2에 대한 표 1의 그룹핑용 PCR 프라이머와 프로브의 멀티플렉스 실시간 PCR 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 대장균 혈청형 O115를 포함하는 그룹 2에 대한 표 2의 개별 혈청형 동정용 PCR 프라이머와 프로브의 멀티플렉스 실시간 PCR 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 자연 환경으로부터 수득한 미지의 시료로부터 분리된 균주에 대한 표 1의 그룹핑용 PCR 프라이머와 프로브의 멀티플렉스 실시간 PCR 결과 및 표 2의 개별 혈청형 동정용 PCR 프라이머와 프로브의 멀티플렉스 실시간 PCR 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 자연 환경으로부터 수득한 미지의 시료로부터 분리된 균주에 대해 항혈청 방법으로 혈청형을 동정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0061] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0062] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다.
- [0063] 상술한 바와 같이, 기존 혈청형 동정 방법인 항혈청 방법이나 인실리코 혈청형결정 방법은 혈청형을 동정하기 위해 긴 분석시간 및 고가의 비용이 소요된다는 한계점을 가지고 있다. 이에 따라, 본 발명자들은 분석 시간을 단축시키면서 비용 면에서 경제적인 뿐만 아니라, 혈청형 동정 정확도가 높은 키트를 개발하고자 예의 노력한

결과, 대장균의 각 혈청형별로 특정 패턴을 가지는 6개의 유전자에 특이적인 프라이머 세트를 이용하여 1차적으로 특정 혈청형을 가지는 대장균을 그룹핑할 수 있고, 상기 그룹핑된 혈청형에 특이적인 각 프라이머 세트를 처리하여 각 프라이머 세트의 비특이적 반응 및 교차 반응 없이 혈청형을 신속하고 정확하게 동정할 수 있음을 확인하고, 대장균의 혈청형을 그룹핑할 수 있는 6개의 프라이머 세트 및 특정 혈청형을 포함하는 것으로 그룹핑된 그룹의 개별 혈청형을 동정할 수 있는 프라이머 세트를 제공함으로써, 상술한 문제의 해결방안을 모색하였다.

[0064] 구체적으로, 본 발명자들은 NCBI에서 1339개의 대장균 전체 유전체 서열 (complete genome sequence)을 다운받은 후, 인실리코 혈청형 방법 (*In silico* serotyping; Serotypefinder tool)으로 혈청형을 동정하였다. 그런 다음, 동정한 데이터를 기반으로 각 혈청형별로 n값 (complete genome sequence)을 1~3개씩 선택한 후, 범유전체 분석 (pan-genome analysis)을 진행하였다. 이후 각 혈청형별로 특정 패턴을 가지는 6개의 유전자를 확인하였고, 이들 각 유전자의 유무에 따라 대장균의 혈청형이 9개의 그룹으로 나누어지는 것을 발견하였다.

[0065] 본 발명은 상기 결과에 따라, 제2 그룹 (Group 2)으로 그룹핑된 대장균의 혈청형을 동정하는 기술에 관한 것으로, 제1 그룹은 제2 프라이머 세트와 제1 프로브에 의한 증폭 산물, 제2 프라이머 세트와 제2 프로브에 의한 증폭 산물 및 제4 프라이머 세트와 제4 프로브에 의한 증폭 산물이 검출되고, 제3 프라이머 세트와 제3 프로브에 의한 증폭 산물, 제5 프라이머 세트와 제5 프로브에 의한 증폭 산물 및 제6 프라이머 세트와 제6 프로브에 의한 증폭 산물이 검출되지 않는, 0115 혈청형을 포함한다.

[0066] 따라서, 본 발명의 제1 측면은 다음의 제1 프라이머 세트 내지 제6 프라이머 세트를 포함하는, 대장균의 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하기 위한 프라이머 세트, 조성물, 키트 및 이를 이용한 대장균의 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하는 방법에 관한 것이다:

[0067] i) 서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 세트;

[0068] ii) 서열번호 4의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 5의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제2 프라이머 세트;

[0069] iii) 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 8의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제3 프라이머 세트;

[0070] iv) 서열번호 10의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 11의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제4 프라이머 세트;

[0071] v) 서열번호 13의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 14의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제5 프라이머 세트; 및

[0072] vi) 서열번호 16의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 17의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제6 프라이머 세트.

[0073] 본 발명에서 용어 "프라이머"는 폴리뉴클레오타이드 신장이 개시되는 조건 하에 놓일 때 주형-방향으로 핵산 합성의 개시점으로서 작용할 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 프라이머는 또한 de novo RNA 합성 및 시험관내 전사-관련 공정의 개시체로서 포함되는, 다양한 기타 올리고뉴클레오타이드-중재 합성 공정에서 사용될 수 있다. 프라이머는 전형적으로는, 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 올리고데옥시리보뉴클레오타이드)이다. 프라이머의 적절한 길이는 전형적으로는 6 내지 40 개의 뉴클레오타이드 범위, 보다 전형적으로는 15 내지 35 개의 뉴클레오타이드 범위에서 의도되는 사용에 따라 달라진다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 충분히 안정적인 혼성화 착물을 형성하기 위해 보다 저온의 온도를 요구한다. 프라이머는 주형의 정확한 서열을 반영하는 것은 요구되지 않으나, 프라이머가 신장되기 위한 주형과 혼성화되기 위해 충분히 상보적이어야 한다. 특정 구현예에서, 용어 "프라이머 세트"는 증폭되는 핵산 서열의 5'-말단에 상보적으로 혼성화되는 5'-센스 프라이머를 포함하고, 증폭되는 서열의 3' 말단에 혼성화되는 3'-안티센스 프라이머를 포함하는 프라이머의 세트를 의미한다. 프라이머는, 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 검출될 수 있는 표지를 혼입함으로써 표지될 수 있다. 예를 들어, 유용한 표지는 하기를 포함한다: ³²P, 형광 염료, 전자-텐스 시약, 효소 (ELISA 분석에서 통상적으로 사용됨), 비오틴, 또는 합텐 및 항혈청 또는 모노클로날 항체가 이용될 수 있는 단백질.

[0074] 본 발명에 있어서, 제1 프라이머 세트의 정방향 프라이머는 'DR-F', 역방향 프라이머는 'DR-R'로 지칭되고, 제2 프라이머 세트의 정방향 프라이머는 'CD-F', 역방향 프라이머는 'CD-R'로 지칭되고, 제3 프라이머 세트의 정방

항 프라이머는 'G4E-F', 역방향 프라이머는 'G4E-R'로 지칭되고, 제4 프라이머 세트의 정방향 프라이머는 'A4E-F', 역방향 프라이머는 'A4E-R'로 지칭되고, 제5 프라이머 세트의 정방향 프라이머는 'BGT-F', 역방향 프라이머는 'BGT-R'로 지칭되고, 제6 프라이머 세트의 정방향 프라이머는 'D2E-F', 역방향 프라이머는 'D2E-R'로 지칭된다.

[0075] 본 발명에 따른 대장균의 O115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하기 위한 조성물은 전술한 프라이머 세트 및 대장균의 각 혈청형별로 특정 패턴을 가지는 유전자에 각각 특이적으로 결합하는 프로브를 포함할 수 있다.

[0076] 본 발명에서 용어 "프로브"란 상보적인 염기서열과 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수 백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 표지되어 (labeling) 있으므로 특정 염기서열의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드 (oligonucleotide) 프로브, 단일가닥 DNA (single stranded DNA) 프로브, 이중가닥 DNA (double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 또한, 실시간 PCR을 수행하기 위해서는 형광표식 프로브를 이용할 수 있다. 보다 구체적으로 TaqMan 프로브를 이용하는 경우 5' 말단은 형광물질로 3' 말단은 소광물질 (quencher)로 표지한 올리고뉴클레오타이드를 PCR 반응액에 첨가한다. 또한, 사이클링 (Cycling) 프로브를 이용한 실시간 PCR은 RNA와 DNA로 이루어지는 키메라 프로브와 RNase H로 구성된 고감도의 검출방법이다. 이 역시 프로브의 5' 말단은 형광물질로 3' 말단은 소광물질로 표지한다.

[0077] 프로브는 증폭 과정 동안 정방향 및 역방향 프라이머 사이에 위치한 특정 표적 서열에 어닐링되며, PCR 사이클의 연장 단계 (extension phase) 동안 Taq 중합효소의 5'뉴클레아제 활성에 의해 절단되어 형광물질 (리포터 염료)이 소광물질 (소광 염료)로부터 분리되어 형광 강도가 증가된다. 형광 강도는 실시간 PCR 시스템에 의해 각 PCR 사이클에서 모니터링될 수 있다.

[0078] 본 발명에 있어서, 상기 대장균의 각 혈청형별로 특정 패턴을 가지는 유전자에 각각 특이적으로 결합하는 프로브는 다음의 제1 프로브 내지 제6 프로브를 포함할 수 있다:

[0079] i) 서열번호 3의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제1 프로브; ii) 서열번호 6의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제2 프로브; iii) 서열번호 9의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제3 프로브; iv) 서열번호 12의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제4 프로브; v) 서열번호 15의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제5 프로브; 및 vi) 서열번호 18의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제6 프로브.

[0080] 본 발명에 있어서, 상기 제1 프로브는 'DR-P', 제2 프로브는 'CD-P', 제3 프로브는 'G4E-P', 제4 프로브는 'A4E-P', 제5 프로브는 'BGT-P', 제6 프로브는 'D2E-P'로 지칭되며, 각각 순서대로 상기 제1 프라이머 세트 내지 제6 프라이머 세트와 함께 사용될 수 있다.

[0081] 본 발명에 따른 대장균의 O115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하기 위한 키트는 전술한 조성물의 구성을 포함할 수 있다.

[0082] 본 발명의 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 상기 키트는 멀티플렉스 PCR (multiplex PCR) 또는 멀티플렉스 실시간 PCR (multiplex real-time PCR)을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. 구체적으로, 상기 키트는 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 키트는 버퍼, DNA 중합효소 보조인자 및 테옥시리보뉴클레오타이드-5-트리포스페이트와 같은 표적 핵산 증폭 반응(예컨대, PCR 반응)을 실시하는데 필요한 시약을 선택적으로 포함할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 또한 다양한 폴리뉴클레오타이드 분자, 역전사효소, 다양한 버퍼 및 시약, 및 DNA 중합효소 활성을 억제하는 항체를 포함할 수 있다. 또한, 상기 키트는 특정 반응에서 사용되는 시약의 최적량은, 본 명세서에 개시사항을 습득한 당업자에 의해서 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 장비는 앞서 언급된 구성 성분들을 포함하는 별도의 포장 또는 컴파트먼트(compartment)로 제작될 수 있다.

[0083] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 음성 대조군과 양성 대조군을 추가로 포함할 수 있다. 음성 대조군 (negative control)은 DNA 혼합물이 없는 대조군으로 PCR 수행 시 오염 가능성을 제거하기 위해 필요하다. 양성 대조군 (positive control)은 PCR이 의도한대로 수행되었는지 유효성을 확인하기 위해 필요하다.

[0084] 본 발명에 따른 대장균의 O115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하는 방법은 전술한 프라이머 세트, 조성물 또는 키트를 이용하여 수행될 수 있다.

[0085] 구체적으로, 상기 방법은 제1 프라이머 세트와 제1 프로브, 제2 프라이머 세트와 제2 프로브 및 제3 프라이머

세트와 제3 프로브를 포함하는 제1 세트, 및 제4 프라이머 세트와 제4 프로브, 제5 프라이머 세트와 제5 프로브 및 제6 프라이머 세트와 제6 프로브를 포함하는 제2 세트를 각각 시료에 처리하여 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하는 단계; 및 b) 상기 시료에서 각 프라이머 세트와 프로브에 의한 증폭 산물을 확인하는 단계를 포함할 수 있다.

[0086] 본 발명에 있어서, 상기 a) 단계에 사용되는 프라이머 세트와 프로브에 대한 설명은 전술한 바와 동일하므로, 그 기재를 생략한다.

[0087] 본 발명의 방법은 PCR에 의해 구현되며, 이때, 프라이머는 유전자 증폭 반응 (amplification reactions)에 이용된다.

[0088] 본 발명의 그룹핑하는 방법은 상기 제1 프라이머 세트와 제1 프로브, 제2 프라이머 세트와 제2 프로브 및 제3 프라이머 세트와 제3 프로브를 포함하는 제1 세트를 처리한 시료, 및 제4 프라이머 세트와 제4 프로브, 제5 프라이머 세트와 제5 프로브 및 제6 프라이머 세트와 제6 프로브를 포함하는 제2 세트를 처리한 시료에 대해 각각 PCR을 수행하는 방식으로 수행될 수 있다.

[0089] PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운 (touchdown) PCR, 핫 스타트 (hot start) PCR, 네스티드 (nested) PCR 및 부스터 (booster) PCR이 개발되었다. 또한, 멀티플렉스 PCR, 실시간 (real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR (differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭 (rapid amplification of cDNA ends: RACE), 인버스 중합효소 연쇄반응 (inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트 (vectorette) PCR 및 TAIL-PCR (thermal asymmetric interlaced PCR)이 특정한 응용을 위해 개발되었다. PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. PCR. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있으며, 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다.

[0090] 본 명세서에서 사용되는 용어 "증폭 반응"은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당 업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR; 미국 특허 제4,683,195호, 제4,683,202호, 및 제4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR; Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등 (EP 329,822)의 방법, 멀티플렉스 PCR(McPherson and Moller, 2000), 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭 (transcription-mediated amplification, TMA; WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication; WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오타이드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences; 미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction, CP-PCR; 미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction, AP-PCR; 미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification, NASBA; 미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭 방법들은 미국특허 제5,242,794호, 제5,494,810호, 제4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다.

[0091] 본 발명에 따른 방법은 프라이머 세트를 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시함으로써, 분석 대상, 예를 들어, 식품을 비롯하여 임상 검체인 객담, 혈액, 타액 또는 소변 등으로부터 분리된 DNA 시료)에서 타겟 유전자들을 동시에 검출할 수 있다.

[0092] 따라서, 본 발명의 방법에 있어서, 상기 a) 단계의 시료는 식품에서 유래된 시료일 수 있으나, 이에 한정되지는 않으며, 임상 검체에서 유래된 시료도 사용될 수 있다. 상기 임상 검체는 객담, 타액, 혈액 및 소변을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0093] 시료에서 DNA를 추출하는 것은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다 (참조: Sambrook, J. et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., 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)).

- [0094] 본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중쇄 구조를 형성한다. 이러한 이중쇄 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B.D., 등, Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.
- [0095] 다양한 DNA 중합효소가 본 발명의 증폭에 이용될 수 있으며, *E. coli* DNA 중합효소 I의 클레나우(Klenow) 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 구체적으로는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis*, 및 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)를 포함한다.
- [0096] 증합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg^{2+} 와 같은 보조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 요구되는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서, 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.
- [0097] 본 발명에 있어서 어닐링은 타겟 뉴클레오타이드 서열과 프라이머 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격한 조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다.
- [0098] 본 발명의 방법은 상술한 바와 같이 상기 제1 프라이머 세트 내지 제6 프라이머 세트 및 제1 프로브 내지 제6 프로브에 의한 증폭 산물 검출 여부를 확인함으로써 대장균의 혈청형을 그룹핑할 수 있다.
- [0099] 본 명세서에서 사용되는 용어 "혼성화(hybridization)"는 2개의 단일 가닥 핵산이 상보적인 염기 서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다. 혼성화는 단일 가닥 핵산 서열 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하여도 일어날 수 있다. 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 반응 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 조절될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "어닐링"과 "혼성화"는 차이가 없으며, 본 명세서에서 혼용된다.
- [0100] 본 발명에 따른 방법은 멀티플렉스 PCR 또는 멀티플렉스 실시간 PCR로 수행될 수 있다.
- [0101] 상기 "실시간 PCR"은 PCR을 수행할 때 실시간으로 그 과정을 모니터링할 수 있다. 따라서, 데이터는 PCR이 종료되는 시점이 아니라, PCR 과정 전반에 걸쳐 수집된다. 실시간 PCR에서, 반응은 고정된 사이클 수 후에 축적된 표적 양보다는 증폭이 처음으로 검출될 때의 사이클 동안의 시점을 특징으로 한다. 주로 염료 기반 검출 및 프로브 기반 검출의 두 가지 방법이 정량적 PCR을 수행하는데 사용된다.
- [0102] 본 발명의 방법은 PCR에 의한 증폭 결과를 Ct (cycle threshold) 값을 측정하여 확인하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0103] Ct(cycle threshold) 값은 반응에서 발생된 형광이 역치(threshold)를 넘어서는 사이클 수를 의미하며, 이는 초기 카피 수의 대수에 반비례한다. 그러므로, 특정 웰에 할당된 Ct 값은 반응에서 앰플리콘의 충분한 수가 축적된 사이클의 수를 반영한다. Ct 값은 ΔR_n 의 증가가 처음으로 검출된 사이클이다. R_n 은 각 시점에서 PCR 동안 발생된 형광 시그널의 크기를 의미하며, ΔR_n 은 레퍼런스 염료의 형광 방출 강도로 나뉘어진 리포터 염료의 형광 방출 강도(표준화된 리포터 시그널)를 의미한다. Ct 값은 LightCycler에서는 Cp(crossing point)로도 명명된다. Ct 값은 시스템이 로그-선형 단계(log-linear phase)에서 PCR 생산물의 지수성장과 관련된 형광 시그널의 증가를 검출하기 시작하는 시점을 나타낸다. 이 시기는 반응에 대한 가장 유용한 정보를 제공한다. 로그-선형 단계의 기술기는 증폭 효율(amplification efficiency, Eff)을 나타낸다 (<http://www.appliedbiosystems.co.kr/>).
- [0104] PCR에서는 PCR 증폭 산물을 형광을 통해 검출할 수 있다. 검출 방법은 크게 인터칼레이팅 (interchelating) 방법(SYBR 그린 I 방법), 형광 표지 프로브를 이용하는 방법 (TaqMan 프로브 방법) 등이 있다. 인터칼레이팅 방법은 이중 가닥 DNA를 모두 검출하기 때문에 유전자별 프로브를 준비할 필요가 없어 저렴한 비용으로 반응계를 구축할 수 있다. 형광 표지 프로브를 이용하는 방법은 고비용이 드는 반면에 검출 특이성이 높아 유사 서열까지도 구별해서 검출할 수 있다.

- [0105] TaqMan 프로브는 전형적으로 5'-말단에 형광물질(fluorophore) 및 3'-말단에 소광물질(quencher; 예컨대, TAMRA 또는 비-형광 소광물질(NFQ))을 포함하는 프라이머(예컨대, 20-30 뉴클레오타이드) 보다 더 긴 올리고뉴클레오타이드이다. 여기된 형광물질은 형광을 내기 보다는 근처의 소광물질에 에너지를 전달한다(FRET = Frster or fluorescence resonance energy transfer; Chen, X., et al., Proc Natl Acad Sci USA, 94(20): 10756-61(1997)). 그러므로, 프로브가 정상인 경우, 어떠한 형광도 발생되지 않는다. TaqMan 프로브는 PCR 생산물의 내부 부위에 어닐링할 수 있도록 고안된다.
- [0106] TaqMan 프로브는 어닐링 단계에서 주형 DNA에 특이적으로 혼성화하지만, 프로브 상에 소광물질에 의해 형광 발색이 억제된다. 연장 반응 시에 Taq DNA 폴리머라제가 갖는 5' 내지 3' 뉴클레아제 활성에 의해 주형에 혼성화한 TaqMan 프로브가 분해되어 형광 색소가 프로브로부터 유리되면서 소광물질에 의한 억제가 해제되어 형광을 나타낸다. 이때, TaqMan 프로브의 5'-말단은 상기 연장 프라이머의 3'-말단의 다운스트림에 위치하여야 한다. 즉, 연장 프라이머의 3'-말단이 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 연장되는 경우, 이 중합효소의 5' 내지 3' 뉴클레아제 활성에 의해 TaqMan 프로브의 5'-말단이 절단되어 리포터 분자의 형광 시그널이 발생하게 된다.
- [0107] TaqMan 프로브에 결합되어 있는 상기 리포터 분자 및 소광물질 분자는 형광성 물질 및 비형광성 물질을 포함한다. 본 발명에 이용될 수 있는 형광성 리포터 분자 및 소광물질 분자는 당업계에 공지되어 있는 어떠한 것도 이용할 수 있으며, 그 예는 다음과 같다(괄호의 숫자는 나노미터 단위로 표시한 발광 최대 파장이다): Cy2TM (506), YOPROTM-1 (509), YOYOTM-1 (509), Calcein (517), FITC (518), FluorXTM (519), AlexaTM (520), Rhodamine 110 (520), 5-FAM (522), Oregon GreenTM 500 (522), Oregon GreenTM 488 (524), RiboGreenTM (525), Rhodamine GreenTM (527), Rhodamine 123 (529), Magnesium GreenTM (531), Calcium GreenTM (533), TO-PROTM-1 (533), TOTO1 (533), JOE (548), BODIPY530/550 (550), DiI (565), BODIPY TMR (568), BODIPY558/568 (568), BODIPY564/570 (570), Cy3TM (570), AlexaTM 546 (570), TRITC (572), Magnesium OrangeTM (575), Phycoerythrin R&B (575), Rhodamine Phalloidin (575), Calcium OrangeTM (576), Pyronin Y (580), Rhodamine B (580), TAMRA (582), Rhodamine RedTM (590), Cy3.5TM (596), ROX (608), Calcium CrimsonTM (615), AlexaTM 594 (615), Texas Red(615), Nile Red (628), YO-PROTM-3 (631), YOYOTM-3 (631), R-phycocyanin (642), CPhycocyanin(648), TO-PROTM-3 (660), TOTO3 (660), DiD DiIC(5) (665), Cy5TM (670), Thiadicarbocyanine (671), Cy5.5 (694), HEX (556), TET (536), VIC (546), BHQ-1 (534), BHQ-2 (579), BHQ-3 (672), Biosearch Blue (447), CAL Fluor Gold 540 (544), CAL Fluor Orange 560 (559), CAL Fluor Red 590 (591), CAL Fluor Red 610 (610), CAL Fluor Red 635 (637), FAM (520), Fluorescein (520), Fluorescein-C3 (520), Pulsar 650 (566), Quasar 570 (667), Quasar 670 (705) 및 Quasar 705 (610). 괄호의 숫자는 나노미터 단위로 표시한 발광 최대 파장이다.
- [0108] 적합한 리포터-소광물질 쌍(pairs)은 많은 문헌에 개시되어 있다: Pesce et al., editors, FLUORESCENCE SPECTROSCOPY(Marcel Dekker, New York, 1971); White et al., FLUORESCENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH (Marcel Dekker, New York, 1970); Berlman, HANDBOOK OF FLUORESCENCE SPECTRA OF AROMATIC MOLECULES, 2nd EDITION (Academic Press, New York, 1971); Griffiths, COLOUR AND CONSTITUTION OF ORGANIC MOLECULES(Academic Press, New York, 1976); Bishop, editor, INDICATORS(Pergamon Press, Oxford, 1972); Haugland, HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS(Molecular Probes, Eugene, 1992); Pringsheim, FLUORESCENCE AND PHOSPHORESCENCE(Interscience Publishers, New York, 1949); Haugland, R. P., HANDBOOK OF FLUORESCENT PROBES AND RESEARCH CHEMICALS, Sixth Edition, Molecular Probes, Eugene, Oreg., 1996; U.S. Pat. Nos. 3,996,345 and 4,351,760.
- [0109] 또한, TaqMan 프로브에 결합되어 있는 상기 리포터 분자 및 소광물질 분자에 이용되는 비형광성 물질은 마이너 그루브 결합 모이어티(minor groove binding(MGB) moiety)를 포함할 수 있다. 본 명세서의 용어 "TaqMan MGB-컨쥬게이트 프로브(MGB-conjugate probe)"는 프로브의 3'-말단에 MGB와 컨쥬게이션된 TaqMan 프로브를 의미한다.
- [0110] MGB는 높은 친화도로 DNA의 마이너 그루브에 결합하는 물질로서, 네트로핀(netropsin), 디스타마이신(distamycin), 렉시트로핀(lexitropsin), 미트라마이신(mithramycin), 크로모마이신(chromomycin) A3, 올리보마이신(olivomycin), 안트라마이신(anthramycin), 시비로마이신(sibiromycin), 펜타미딘(pentamidine),

스틸바미딘 (stilbamidine), 베레닐 (berenil), CC-1065, Hoechst 33258, DAPI (4-6-diamidino-2-phenylindole), CDPI의 다이머, 트리머, 테트라머 및 펜타머, MPC (N-methylpyrrole-4-carbox-2-amide) 및 이의 다이머, 트리머, 테트라머 및 펜타머를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0111] 프로브와 MGB의 컨쥬게이션(conjugation)은 프로브와 이의 타겟 간에 형성되는 하이브리드의 안정성을 현저하게 증가시킨다. 보다 상세하게는, 증가된 안정성(즉, 혼성화 정도의 증가)는 정상 프로브와 비교하여 MGB-컨쥬게이트 프로브에 의해 형성된 하이브리드 듀플렉스의 증가된 Tm(melting temperature)을 유발한다. 따라서, MGB는 반데르발스 힘을 안정화시켜 프로브 길이의 증가 없이 MGB-컨쥬게이트 프로브의 Tm(melting temperature)를 증가시킴으로써 보다 엄격 조건 하의 Taqman 실시간 PCR에서 더 짧은 프로브(예컨대, 21개 이하의 뉴클레오타이드)의 이용을 가능하게 해준다.

[0112] 또한, MGB-컨쥬게이트 프로브는 백그라운드 형광을 보다 효율적으로 제거시켜 준다. 따라서, 본 발명의 프로브는 TaqMan MGB-컨쥬게이트 형태일 수도 있으며, 이때 프로브의 길이는 15-30개의 뉴클레오타이드를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0113] 본 발명에 있어서, 상기 방법은 c) 상기 시료에서 제1 프라이머 세트와 제1 프로브에 의한 증폭 산물, 제2 프라이머 세트와 제2 프로브에 의한 증폭 산물 및 제4 프라이머 세트와 제4 프로브에 의한 증폭 산물이 검출되고, 제3 프라이머 세트와 제3 프로브에 의한 증폭 산물, 제5 프라이머 세트와 제5 프로브에 의한 증폭 산물 및 제6 프라이머 세트와 제6 프로브에 의한 증폭 산물이 검출되지 않는 경우, 상기 시료에 존재하는 대장균의 혈청형을 O115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0114] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, *E. coli* O115에 대해 전술한 혈청형 그룹핑용 프라이머 세트와 프로브를 사용하여 멀티플렉스 PCR을 진행한 후, 증폭 산물을 전기영동으로 확인하였다. 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 상기 혈청형의 대장균은 제1 프라이머 세트(DR-F 및 DR-R)와 제1 프로브(DR-P), 제2 프라이머 세트(CD-F 및 CD-R)와 제2 프로브(CD-P) 및 제4 프라이머 세트(A4E-F 및 A4E-R)와 제4 프로브(A4E-P)에 의한 증폭 산물이 확인되었으나, 제3 프라이머 세트(G4E-F 및 G4E-R)와 제3 프로브(G4E-P), 제5 프라이머 세트(BGT-F 및 BGT-R)와 제5 프로브(BGT-P) 및 제6 프라이머 세트(D2E-F 및 D2E-R)와 제6 프로브(D2E-P)에 의한 증폭 산물은 확인되지 않아, O115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑되었고, 이러한 결과는 *E. coli* O115를 실험 균주로 사용한 것과 일치하였다.

[0115] 본 발명의 다른 구체적인 일 실시예에서는 *E. coli* O115에 대해 전술한 혈청형 그룹핑용 프라이머 세트 및 프로브를 사용하여 멀티플렉스 실시간 PCR을 진행하여, 형광 검출을 통해 각 프라이머 세트와 프로브에 대한 증폭 곡선을 확인하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 실험 균주로 사용된 *E. coli* O115는 각각 제1 프라이머 세트(DR-F 및 DR-R)와 제1 프로브(DR-P), 제2 프라이머 세트(CD-F 및 CD-R)와 제2 프로브(CD-P) 및 제4 프라이머 세트(A4E-F 및 A4E-R)와 제4 프로브(A4E-P)에 의한 증폭 곡선이 확인되었으나, 제3 프라이머 세트(G4E-F 및 G4E-R)와 제3 프로브(G4E-P), 제5 프라이머 세트(BGT-F 및 BGT-R)와 제5 프로브(BGT-P) 및 제6 프라이머 세트(D2E-F 및 D2E-R)와 제6 프로브(D2E-P)에 의한 증폭 곡선은 확인되지 않았다. 이러한 결과는 상기 멀티플렉스 PCR을 진행한 후 증폭 산물을 전기영동으로 확인한 결과와 일치하며, 실험에 사용한 균주가 O115 혈청형을 가질 가능성이 있음을 의미한다.

[0116] 상기와 같은 단계를 거쳐 시료에서 검출된 대장균 혈청형이 O115 혈청형을 가질 가능성이 있는 것으로 판별된 경우, 상기 혈청형에 특이적인 프라이머 세트를 처리하여 각 프라이머 세트의 비특이적 반응 및 교차 반응 없이 개별 혈청형을 신속하고 정확하게 동정할 수 있다.

[0117] 따라서, 본 발명의 제2 측면은 대장균의 O115 중 혈청형 동정을 위한 프라이머 세트, 조성물, 키트 및 이를 이용한 대장균의 O115 중 혈청형 동정 방법에 관한 것이다.

[0118] 본 발명에 따른 혈청형 동정용 프라이머 세트는 서열번호 19의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 정방향 프라이머와 서열번호 20의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 제7 프라이머 세트를 포함할 수 있다.

[0119] 본 발명에 따른 혈청형 동정용 조성물은 전술한 프라이머 세트 및 O115 혈청형의 고유한 유전자 영역에 특이적으로 결합하는 프로브를 포함할 수 있다.

[0120] 본 발명에 있어서, 상기 O115 혈청형의 고유한 유전자 영역에 특이적으로 결합하는 프로브는 서열번호 21의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 제7 프로브일 수 있다.

- [0121] 본 발명에 따른 대장균의 0115 혈청형 동정을 위한 키트는 상기 제2 측면에 따른 프라이머 세트 또는 조성물을 포함할 수 있으며, 이외의 키트 구성에 대한 설명은 제1 측면에 따른 키트에서 설명한 바와 동일하므로, 그 기재를 생략한다.
- [0122] 본 발명에 따른 대장균의 0115 혈청형 동정 방법은 상기 제2 측면에 따른 프라이머 세트, 조성물 또는 키트를 이용하여 수행될 수 있다.
- [0123] 본 발명에 따른 혈청형 동정 방법은 상기 제2 측면에 따른 프라이머 세트, 조성물 또는 키트를 처리하여 각 프라이머 세트 및 프로브에 의한 증폭 산물을 확인함으로써 혈청형을 동정할 수 있다. 예를 들어, 제7 프라이머 세트와 제7 프로브에 의한 증폭 산물이 확인되는 경우 0115 혈청형으로 동정할 수 있다.
- [0124] 본 발명에 따른 혈청형 동정 방법을 수행하는 방법은 상기 제2 측면에 따른 프라이머 세트, 조성물 또는 키트를 처리하여 각 프라이머 세트 및 프로브에 의한 증폭 산물을 확인하는 것을 제외하고, 전술한 제1 측면에 따른 그룹핑 방법과 동일하므로, 그 기재를 생략한다.
- [0125] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, *E. coli* 0115에 대해 전술한 혈청형 동정용 프라이머 세트와 프로브를 사용하여 멀티플렉스 PCR을 진행한 후, 증폭 산물을 전기영동으로 확인하였다. 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 상기 혈청형에 상응하는 PCR 산물 (163 bp)이 관찰되어, 실험 균주의 혈청형과 동일한 혈청형으로 동정되었음을 확인하였다.
- [0126] 본 발명의 다른 구체적인 일 실시예에서는, *E. coli* 0115에 대해 전술한 혈청형 동정용 프라이머 세트와 프로브를 사용하여 멀티플렉스 실시간 PCR을 진행하여, 형광 검출을 통해 각 유전자에 대한 증폭 곡선을 확인하였다. 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 실험 균주로 사용된 *E. coli* 0115는 혈청형에 특이적으로 표적하는 유전자가 증폭되어, 해당 혈청형에 상응하는 증폭 곡선이 확인되었다. 이러한 결과는 상기 멀티플렉스 PCR을 진행한 후 증폭 산물을 전기영동으로 확인한 결과와 일치하며, 실험 균주의 혈청형과 동일한 혈청형으로 동정되었음을 의미한다.
- [0127] 본 발명의 혈청형 그룹핑용 프라이머 세트와 혈청형 동정용 프라이머 세트는 하나의 키트 형태로 제공되어, 대장균의 0115 혈청형을 동정하는 데 사용될 수 있다.
- [0128] 따라서, 본 발명의 제3 측면은 대장균의 각 혈청형별로 특정 패턴을 가지는 6개의 유전자에 각각 특이적인 프라이머 세트; 및 대장균의 0115 혈청형 동정을 위한 프라이머 세트를 포함하는, 대장균의 0115 혈청형 동정을 위한 키트에 관한 것이다.
- [0129] 본 발명의 제3 측면에 따른 키트는 전술한 제1 측면에 따른 프라이머 세트 및 제2 측면에 따른 프라이머 세트를 포함할 수 있으며, 이에 대한 설명은 전술한 바와 동일하므로, 그 기재를 생략한다.
- [0130] 또한, 본 발명의 제3 측면에 따른 키트는 전술한 제1 측면에 따른 프로브 및 제2 측면에 따른 프로브를 포함할 수 있으며, 마찬가지로, 이에 대한 설명은 전술한 바와 동일하므로, 그 기재를 생략한다.
- [0131] 본 발명의 제3 측면에 따른 키트는 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 추가로 포함할 수 있으며, 이외에도 키트에 포함되는 구성은 전술한 바와 동일하므로, 그 기재를 생략한다.
- [0132] 본 발명의 제3 측면에 따른 키트는 대장균의 0115 혈청형을 동정하는 데 사용될 수 있으며, 구체적으로 다음의 a) 내지 d) 단계를 포함하여 수행될 수 있다:
- [0133] a) 제1 프라이머 세트와 제1 프로브, 제2 프라이머 세트와 제2 프로브 및 제3 프라이머 세트와 제3 프로브를 포함하는 제1 세트, 및 제4 프라이머 세트와 제4 프로브, 제5 프라이머 세트와 제5 프로브 및 제6 프라이머 세트와 제6 프로브를 포함하는 제2 세트를 각각 시료에 처리하여 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하는 단계;
- [0134] b) 상기 시료에서 각 프라이머 세트와 프로브에 의한 증폭 산물을 확인하는 단계;
- [0135] c) 상기 시료에서 제1 프라이머 세트와 제1 프로브에 의한 증폭 산물, 제2 프라이머 세트와 제2 프로브에 의한 증폭 산물 및 제4 프라이머 세트와 제4 프로브에 의한 증폭 산물이 검출되고, 제3 프라이머 세트와 제3 프로브에 의한 증폭 산물, 제5 프라이머 세트와 제5 프로브에 의한 증폭 산물 및 제6 프라이머 세트와 제6 프로브에 의한 증폭 산물이 검출되지 않는 경우, 상기 시료에 존재하는 대장균의 혈청형을 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑하는 단계; 및

- [0136] d) 대장균의 0115 혈청형을 동정하기 위한 프라이머 세트 및 프로브를 상기 시료에 처리하는 단계.
- [0137] 본 발명의 제3 측면에 따른 혈청형 동정 방법은 전술한 제1 측면에 따른 혈청형 그룹핑 방법을 1차로 수행하고, 이후 제2 측면에 따른 혈청형 동정 방법을 수행하는 것일 수 있으며, 이에 대한 설명은 전술한 바와 동일하므로, 그 기재를 생략한다.
- [0138] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명에 따른 혈청형 그룹핑용 프라이머 세트와 프로브 및 혈청형 동정용 프라이머 세트와 프로브를 이용한, 대장균의 0115 혈청형 동정 방법의 유효성을 검증하기 위해, 미지의 시료에서 분리된 균주에 대해 혈청형을 동정하고, 기존의 항혈청 방법 및 인실리코 방법의 결과와 비교하였다. 그 결과, 도 5, 도 6 및 표 5에서 확인되는 바와 같이, 본 발명에 따른 혈청형 동정 결과와 기존의 항혈청 방법 및 인실리코 방법의 결과에서, Eco446과 K-EC159는 0115 혈청형으로 동정되어, 동정 결과가 모두 일치함을 알 수 있었다.
- [0139] 본 발명에서 사용된 프라이머 및 프로브 세트에 상응하는 서열이 서열번호로 표시되었으나, 상기 프라이머 및 프로브는 기능적 동일성이 유지되는 범위 내에서 일부 서열이 치환, 결실 또는 부가되는 경우 본 발명과 균등한 것으로 해석될 수 있다.
- [0140] 본 발명에서 사용된 용어 "동정"은 판별, 검출 또는 식별 등의 용어와 교환적으로 사용될 수 있다.
- [0141] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 단, 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 형태를 가질 수 있는바, 이하에서 기술하는 특정 실시예 및 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명을 특정한 개시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니다. 본 발명의 범위는 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

실시예 1

- [0142] 실험 균주 *E. coli* 0115에 대한 멀티플렉스 PCR의 수행
- [0143] 1-1. 실험 균주 및 배양
- [0144] 대장균 균주 *E. coli* 0115(L-EC 008, SNU culture collection)를 트립톤, 효모 추출물 및 염화나트륨을 첨가한 LB 액체배지에서 3 °C 교반 배양기를 이용하여 배양하였다.
- [0145] 1-2. 혈청형 그룹핑 및 동정용 프라이머 세트 및 프로브의 설계
- [0146] 대장균 혈청형을 그룹핑하기 위한 6개의 표적 유전자에 대해 각각 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 및 프로브를 표 1과 같이 설계하였다.

표 1

세트	명칭	서열	서열 번호	앰플리콘 길이/bp ^b	프라이머 함량 (F, R 각각)	프로브 함 량
세트 1	DR-F	CCGGACCAGCTGGGTATATG	1	195	15 pmol	15 pmol
	DR-R	TGGTACAAGCCTGCGACTTC	2			
	DR-P	FAM-TGCGCCAAGTGGCGCAGAGTTGC-TAMRA	3			
	CD-F	AAGACATCATCGTGACCAAA	4	158	15 pmol	15 pmol
	CD-R	TTGCTGAAAATGTCCGGTAT	5			
	CD-P	CY5-GACCAGCGGGTTGGCGACAA-BHQ1	6			
	G4E-F	ATGCACTTGCCTTACCCACT	7	124	15 pmol	15 pmol
	G4E-R	ACTGTGTTGTTGCGCAGAAT	8			
	G4E-P	HEX-ACGCTGTCAGCTCAGTGCGCGTGA-BHQ3	9			

세트 2	A4E-F	GCGCAAGCAGGTGTACGTTA	10	98	10 pmol	10 pmol
	A4E-R	TTATAGCGGCATCCTTCCAGT	11			
	A4E-P	FAM-CCCAATGCATATGCAGATGCAAAC C-TAMRA	12			
	BGT-F	GGGGTACTTGTGGAAAACT	13	149	15 pmol	15 pmol
	BGT-R	AAAATAATGCTTTTATATGCTGAAG	14			
	BGT-P	CY5-CGGGAACAGGCAATTCGTGCCTCC GG-BHQ1	15			
	D2E-F	AAGAACTCACGAGCTGTGCT	16	171	20 pmol	20 pmol
	D2E-R	ATCCAGCGCTTGTAAATACGC	17			
	D2E-P	HEX-AGCGCATGAGCGTCCGGAAGGCT- BHQ3	18			

[0148] 또한, 표 2에 나타난 바와 같이, 개별 혈청형으로 0115 혈청형을 동정하기 위한 각 프라이머 세트 및 프로브를 설계하고, 정확도와 민감도 실험을 진행하여, 표 2와 같은 프라이머 세트 및 프로브를 최종 선별하였다. 본 발명에서 사용된 프라이머와 프로브는 (주)바이오닉스 (<http://www.bionicsro.co.kr/>)에 의뢰하여 제조하였다.

표 2

그룹	혈청형	명칭	서열	서열 번호	앰플리콘 길이/bp ^b	프라이머 함 량 (F, R 각각)	프로브 함량
그룹2	0115	0115-F	GAACCCGATTATTTGTTCG T	19	163	15 pmol	15 pmol
		0115-R	AGACACGATGCAAATACCAA	20			
		0115-P	FAM-ACGGGAACAATTGTCG GCGGCT-BHQ1	21			

[0150] 1-3. 실험 균주를 이용한 그룹핑용 PCR 프라이머 세트의 정확성 평가

[0151] 실시예 1-1에서 수득된 배양액 또는 G-spin Genomic DNA Extraction Kit (박테리아용) (Intronbio)를 이용하여 제조사 지침에 따라 실시예 1-1의 균주로부터 총 DNA 40ng을 분리하여 준비하였다. 다음으로, 대장균의 혈청형을 그룹으로 나누기 위한 그룹핑 PCR 단계를 진행하기 위해, 시약 Mix (효소, dNTP, 버퍼 등)와 표 1의 프라이머 세트와 프로브 및 분자 물(Molecular water)을 표 3의 농도로 준비하였다. 상기 준비된 총 DNA와 믹스처를 실시간 PCR 튜브에 첨가하고 표 4의 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR 산물은 4% 아가로스 젤에 로딩하고 전기영동한 후 EtBr 염색하여 확인하였다. 음성 대조군(-)으로 DNA 혼합물이 없는 시료를 사용하였고, 양성 대조군(+)으로 각 혈청형의 게놈 DNA (genomic DNA) 혼합물을 사용하여 PCR이 정확하게 수행되었는지 판단하였다. 증폭 산물의 검출 결과는 혈청형 그룹핑용 프라이머 세트와 프로브의 명칭에 따라 각각 DR, CD, G4E, A4E, BGT 및 D2E로 도 1에 나타내었다.

표 3

샘플	부피	양
주형 DNA	1	40 ng
R 프라이머 (20 μ M)	0.75	15 pmol
F 프라이머 (20 μ M)	0.75	15 pmol
qPCR 믹스 (2X)	10	
TaqMan 프로브 (20 μ M)	0.75	15 pmol
분자 물	6.75	
총	20	

표 4

단계	온도 (°C)	시간	사이클
전-변성 (Pre-denaturation)	95	5 분	1
변성 (Denaturation)	95	30 초	35

어닐링 (Annealing)	60	1 분	35
-----------------	----	-----	----

[0154] 도 1에서 확인되는 바와 같이, 제1 프라이머 세트와 제1 프로브(DR-F, DR-R 및 DR-P)에 의한 증폭 산물, 제2 프라이머 세트와 제2 프로브(CD-F, CD-R 및 CD-P)에 의한 증폭 산물 및 제3 프라이머 세트와 제4 프라이머 세트와 제4 프로브(A4E-F, A4E-R 및 A4E-P)에 의한 증폭 산물은 검출되었으나, 제3 프라이머 세트와 제3 프로브(G4E-F, G4E-R 및 G4E-P), 제5 프라이머 세트와 제5 프로브(BGT-F, BGT-R 및 BGT-P) 및 제6 프라이머 세트와 제6 프로브(D2E-F, D2E-R 및 D2E-P)에 의한 증폭 산물은 검출되지 않아, 실험에 사용한 균주가 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑되는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 *E. coli* 0115를 실험 균주로 사용한 것과 일치한다.

[0155] 1-4. 실험 균주를 이용한 혈청형 동정용 PCR 프라이머 세트의 정확성 평가

[0156] 그룹핑 PCR과 동일한 조건으로, 표 2의 0115 혈청형에 대한 프라이머 세트와 프로브를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하였다. 도 2에서 확인되는 바와 같이, 각각 0115 혈청형 균주에서만 특이적으로 각 혈청형에 상응하는 PCR 산물 (각각 163 bp)이 관찰되었다.

실시예 2

[0157] 실험 균주 *E. coli* 0115에 대한 멀티플렉스 실시간 PCR의 수행

[0158] 2-1. 실험 균주를 이용한 그룹핑용 PCR 프라이머 세트의 정확성 평가

[0159] 실시예 1-1의 실험 균주에 대해 실시예 1-3과 동일한 조건으로 멀티플렉스 실시간 PCR의 수행하였다. 이때, 실시간 PCR 중 결합 및 연장 단계에서 프로브에 의해 생성된 형광을 CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection system (Bio-rad, 미국)을 이용하여 측정하였다. 혈청형 그룹핑용 프라이머 세트와 프로브에 의한 증폭 곡선은 각 프라이머 세트와 프로브의 명칭에 따라 각각 DR, CD, G4E, A4E, BGT 및 D2E로 도 3에 나타내었다.

[0160] 도 3에서 확인되는 바와 같이, 실험 균주로 사용된 *E. coli* 0115는 제1 프라이머 세트와 제1 프로브(DR-F, DR-R 및 DR-P)에 의한 증폭 곡선, 제2 프라이머 세트와 제2 프로브(CD-F, CD-R 및 CD-P)에 의한 증폭 곡선 및 제4 프라이머 세트와 제4 프로브(A4E-F, A4E-R 및 A4E-P)에 의한 증폭 곡선이 확인되었으나, 제3 프라이머 세트와 제3 프로브(G4E-F, G4E-R 및 G4E-P), 제5 프라이머 세트와 제5 프로브(BGT-F, BGT-R 및 BGT-P) 및 제6 프라이머 세트와 제6 프로브(D2E-F, D2E-R 및 D2E-P)에 의한 증폭 곡선은 확인되지 않았다. 이러한 결과는 실시예 1-3의 멀티플렉스 PCR 결과와 일치하며, 실험에 사용한 균주가 0115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑 되었음을 의미한다.

[0161] 2-2. 실험 균주를 이용한 혈청형 동정용 PCR 프라이머 세트의 정확성 평가

[0162] 실시예 1-1의 실험 균주에 대해 실시예 1-4와 동일한 조건으로 멀티플렉스 실시간 PCR의 수행하였다. 이때, 실시간 PCR 중 결합 및 연장 단계에서 프로브에 의해 생성된 형광을 CFX96 Touch Deep Well Real-Time PCR Detection system (Bio-rad, 미국)을 이용하여 측정하였다.

[0163] 도 4에서 확인되는 바와 같이, 실험 균주로 사용된 *E. coli* 0115는 해당 혈청형을 특이적으로 표적하는 유전자가 증폭되어, 상기 혈청형에 상응하는 증폭 곡선이 확인되었다. 이러한 결과는 상기 멀티플렉스 PCR을 진행한 후 증폭 산물을 전기영동으로 확인한 결과와 일치하며, 실험 균주의 혈청형과 동일한 혈청형으로 동정되었음을 의미한다.

실시예 3

[0164] 미지의 시료에 대한 멀티플렉스 실시간 PCR의 수행 및 기존 혈청형 동정 방법과의 비교 검증

[0165] 표 1의 혈청형 그룹핑용 프라이머 세트와 프로브 및 표 2의 혈청형 동정용 프라이머 세트와 프로브의 유효성을 검증하기 위해, 자연에서 수득한 미지의 시료로부터 분리된 78종의 균주에 대해 실시예 2와 동일한 조건으로 멀티플렉스 실시간 PCR을 수행하였고, 이를 기존 혈청형 동정 방법인 항혈청 (Antisera) 방법 및 인실리코 (*In silico*) 혈청형 방법의 결과와 비교하였다. 혈청형 그룹핑용 프라이머 세트와 프로브에 의한 증폭 곡선은 각 프라이머 세트와 프로브의 명칭에 따라 각각 DR, CD, G4E, A4E, BGT 및 D2E로 도 5에 나타내었다.

[0166] 본 발명에 따른 혈청형 동정 방법을 수행한 결과, 도 5에서 확인되는 바와 같이, 미지의 시료로부터 분리된 Eco446 및 K-EC159 균주는 각각 제1 프라이머 세트와 제1 프로브(DR-F, DR-R 및 DR-P)에 의한 증폭 곡선, 제2 프라이머 세트와 제2 프로브(CD-F, CD-R 및 CD-P)에 의한 증폭 곡선 및 제4 프라이머 세트와 제4 프로브(A4E-F,

A4E-R 및 A4E-P)에 의한 증폭 곡선이 확인되었으나, 제3 프라이머 세트와 제3 프로브(G4E-F, G4E-R 및 G4E-P), 제5 프라이머 세트와 제5 프로브(BGT-F, BGT-R 및 BGT-P) 및 제6 프라이머 세트와 제6 프로브(D2E-F, D2E-R 및 D2E-P)에 의한 증폭 곡선은 확인되지 않아, 1차적으로 O115 혈청형을 포함하는 그룹으로 그룹핑되었다. 또한, 개별 혈청형 동정을 위한 멀티플렉스 실시간 PCR 단계에서 Eco446 및 K-EC159는 O115 혈청형에 특이적인 증폭 곡선이 확인되어, 모두 O115 혈청형으로 동정되었다.

[0167] 다음으로, Eco446 및 K-EC159 균주에 대해 E. COLI O ANTISERA FOR USE WITH BOILED CULTURE:O116 (SSI DIAGNOSTICA)를 사용하여 항혈청 방법을 수행한 결과, 도 6에서 확인되는 바와 같이 Eco446 및 K-EC159는 O115 혈청형으로 동정되어 본 발명에 따른 혈청형 동정 방법 결과와 일치하였다.

[0168] 마지막으로, Eco446 및 K-EC159 균주에 대해 인실리코 혈청형 방법을 수행한 결과, 표 5에서 확인되는 바와 같이 O115 혈청형으로 동정되어, 마찬가지로 본 발명에 따른 혈청형 동정 방법 결과와 일치함을 알 수 있었다.

표 5

[0169]

	PCR 혈청형 결과	항혈청 혈청형 결과	인실리코 혈청형 결과		
균주	예상된 혈청형	예상된 혈청형	유전자	동일성	예상된 혈청형
Eco446	O115	O115	wzy	99.91 (1068 / 1068)	O115
			wzx	100 (1488 / 1488)	
K-EC159	O115	O115	wzy	100 (1068 / 1068)	O115
			wzx	100 (1488 / 1488)	

[0170] 본 실시예의 결과를 통해, 본 발명의 혈청형 그룹핑용 프라이머 세트 및 프로브와 개별 혈청형 동정용 프라이머 세트 및 프로브의 유효성을 검증할 수 있었다.

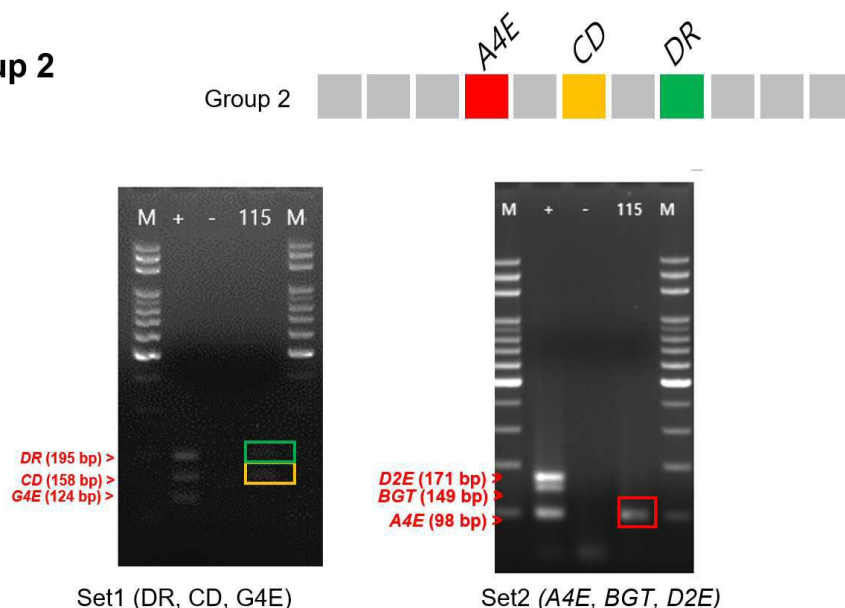
[0171] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

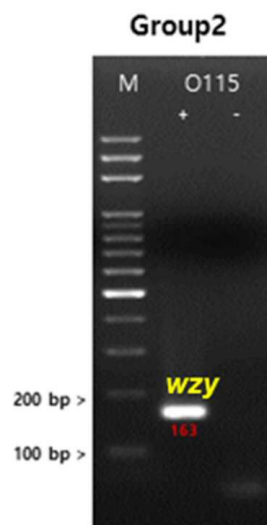
도면1

(2) Group 2

: O115



도면2



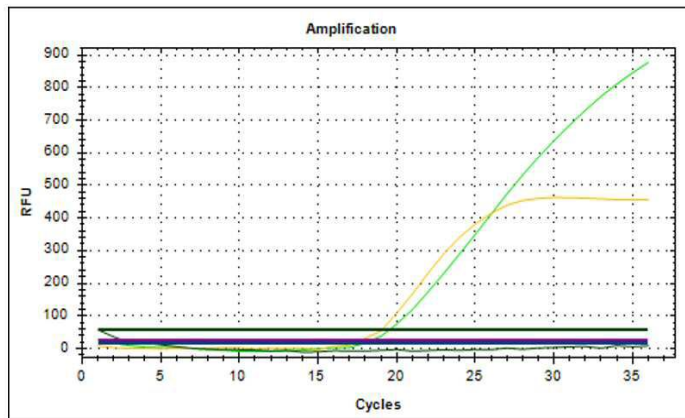
도면3

(2) Group 2

: O115

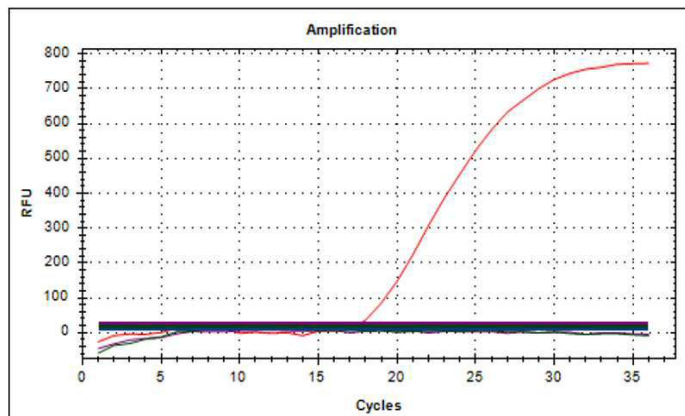


Set1 (DR, CD, G4E)



— O115 (CD, DR)
— Group 2 (G4E)
— Negative control

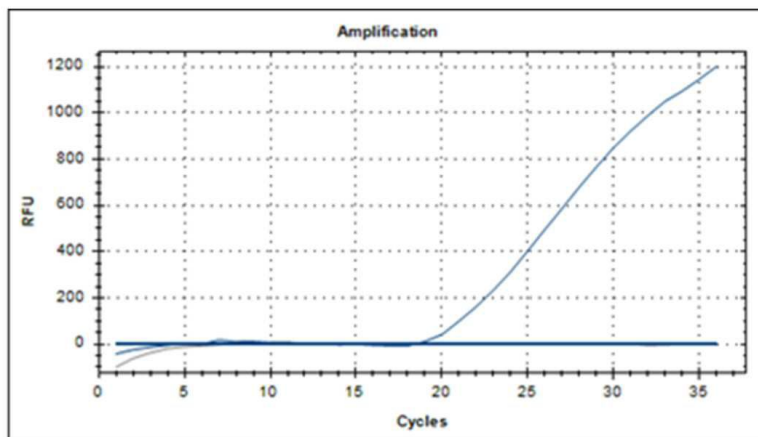
Set2 (A4E, BGT, D2E)



— O115 (A4E)
— Group 2 (BGT)
— Group 2 (D2E)
— Negative control

도면4

Group 2



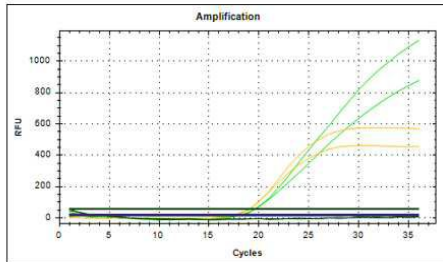
— O115

도면5



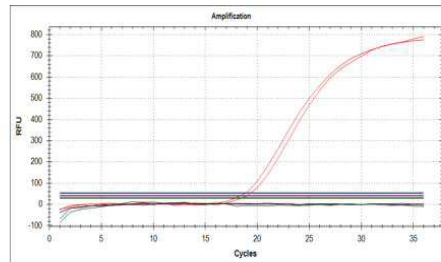
Step I : Specific Gene of Grouping PCR

(Set 1 : DR, CD, G4E)



— (Eco446) (CD, DR)
— (K-EC159) (CD, DR)
— Group2 (G4E)
— Negative control

(Set 2 : A4E, BGT, D2E)



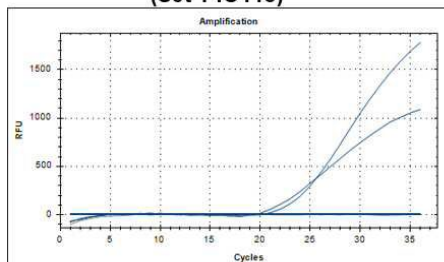
— (Eco446) (A4E)
— (K-EC159) (A4E)
— Group2 (BGT)
— Group2 (D2E)
— Negative control

Because **A4E**, **DR** and **CD** are confirmed to be present, group 2



Step II. Specific Gene of Serotyping PCR

(Set 1 :O115)



— (Eco446) O115
— (K-EC159) O115



Serotype of Eco 446, K-EC159 are O115

도면6

Group 2

