



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0048082
(43) 공개일자 2020년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/689 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/689 (2018.05)

C12Q 2527/101 (2019.08)

(21) 출원번호 10-2018-0129762

(22) 출원일자 2018년10월29일

심사청구일자 2018년10월29일

(71) 출원인

주식회사 스콜피오진

경기도 성남시 수정구 산성대로 553, 을지대학교
교을지관608호(양지동)

(72) 발명자

이형우

경기도 시흥시 함송로29번길 54, 109동 202호(정
왕동, 세종1차아파트)

배윤희

서울특별시 광진구 능동로 120 (화양동)

(74) 대리인

이재영

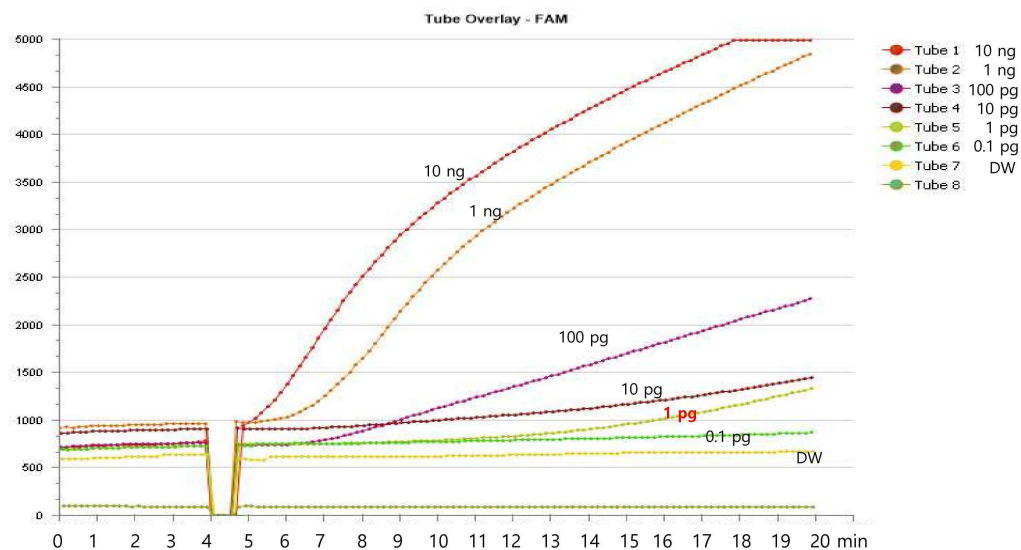
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **쯔쯔가무시균 감염 질환 진단용 키트**

(57) 요약

본 발명은 쯔쯔가무시균(*O. tsutsugamushi*)에 의한 쯔쯔가무시병에 대해 진단하기 위한 키트에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류
C12Q 2531/107 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 3에 대응하는 프라이머 염기쌍 또는 프로브를 포함하는 쯔쯔가무시병(scrub typhus) 진단 키트.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 프라이머 염기쌍은 서열번호 1 및 2인, 진단 키트.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 프로브는 5'-ATCGAACAG ATACAGAGTAAATCCAAGAAT [FAM-dT] A [THF] G [BHQ-dT] GATACATTGGAAGAA-[3'-block]인, 진단 키트.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 쯔쯔가무시병(scrub typhus)은 오리엔티아 쯔쯔가무시균(*Orientia tsutsugamushi*) 감염 질환에 의한 것인, 진단 키트.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 프라이머쌍은 검체 내의 쯔쯔가무시균을 검출하는 것인, 진단 키트.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 검체는 진단 대상의 전혈, 혈장, 혈청인, 진단 키트.

청구항 7

서열번호 3에 대응하는 프로브 또는 프라이머 염기쌍을 시료에 첨가하는 단계를 포함하는, *in-vitro*에서 쯔쯔가무시균을 검출하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 프로브는 5'-ATCGAACAG ATACAGAGTAAATCCAAGAAT [FAM-dT] A [THF] G [BHQ-dT] GATACATTGGAAGAA-[3'-block]인, 검출 방법.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 프라이머 염기쌍은 서열번호 1 및 2인, 검출 방법.

청구항 10

제 7항에 있어서,

상기 시료로 재조합효소 증합효소 증폭 (recombinase polymerase amplification, RPA)하는 단계를 포함하는,

검출 방법.

청구항 11

제 7항에 있어서,

상기 RPA 단계에서 반응 온도는 37℃ 내지 42℃인, 검출 방법.

청구항 12

제 7항에 있어서,

상기 RPA 단계에서 반응 시간은 10분 내지 20분인, 검출 방법.

청구항 13

제 7항에 있어서,

상기 찌뜨가무시균은 오리엔티아 찌뜨가무시균(*Orientia tsutsugamushi*)으로서, 찌뜨가무시병(*scrub typhus*)을 유발하는 것인, 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 찌뜨가무시균(*O. tsutsugamushi*)에 의한 찌뜨가무시병에 대해 진단하기 위한 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 찌뜨가무시병(*scrub typhus*)은 오리엔티아 찌뜨가무시균(*Orientia tsutsugamushi*)에 의해 감염된 털진드기의 유충에 물렸을 때, 혈액과 림프액을 통해 전신적 혈관염이 발생하는 것을 특징으로 하는 급성 발열성 질환이다. 이는 매개진드기에 물린 자리에 가피(*eschar*)를 나타내는 것을 특징으로 한다. 초원열(*scrub typhus*), 잠복열 또는 양충병이라고도 일컫는다.

[0003] 리케치아의 일종인 오리엔티아 찌뜨가무시균(*O. tsutsugamushi*)은 절대 세포내 기생 세균으로서 김자액 염색을 하면 그람 음성 간구균(*coccobacillus*) 모양으로 보통 직경은 0.5-0.7 μm 이고, 길이는 1.2-2.5 μm 이다. 원형질은 세포외막과 세포내막으로 싸여 있으며 지당체, 펩티도글리칸, 점액층이 없고 매우 두꺼운 세포벽의 외층을 가지고 있다. 항원성이 서로 다른 혈청형이 존재하며, 쥐를 이용한 병독성 시험에서 혈청형에 따라 병원성에 차이가 있음이 확인되었으며, 숙주 진드기의 종류도 다를 것으로 추정된다. Gilliam, Karp, Kato가 주요 균주이며, 지역별로 특이적인 유행주가 존재하는데 국내는 Boryong주가 주요 유행주이다(*Microbiol Immunol.* 1984;28(8):873-82).

[0004] 잠복기는 6~20일이지만 보통은 10~12일인 것이 특징이다. 처음에는 두통이 심해지고, 오한과 전율이 생기면서 열이 나고 근육통이 심해진다. 초기에 진드기 물린 부위에는 1cm 정도의 가피(*eschar*)가 나타나고, 붉고 경화된 병변이 시간이 경과함에 따라 수포를 형성한 후 터져 흑색으로 착색된다. 3~5일만에 몸통에 발진이 사지로 퍼진다. 열이 나는 첫 주에는 기침이 많으며, 2주째는 폐렴으로 진행할 수 있다. 드물게는 쇼크가 발생하거나 중추신경계를 침범하여 장애를 초래하기도 한다.

[0005] 종래의 기술에서는 찌뜨가무시병 진단을 위해 임상적 특징, 감염균주의 분리 및 동정, 간접면역형광법(*indirect immunofluorescence assay*; IFA)에 의한 혈원형 분석(*serotyping*) 및 면역우성적 56kDa 형 특이적 항원(56kDa type specific antigen; TSA)의 PCR 증폭에 의한 유전형 분석 등을 사용하였다. 또한, 공개특허 제 2002-0020281호에는 오리엔티아 찌뜨가무시(*Orientia tsutsugamushi*)의 항원결정기로부터 유래된 2 종 이상의 단백질 유전자를 연결한 DNA를 포함하는 벡터로 형질전환시킨 균주를 배양하여 얻어지는 유전자 재조합 단백질 항원을 이용하여 찌뜨가무시병을 진단하는 방법을 기재하고 있다. 하지만 상기 방법 간접면역형광법은 일반적으로 찌뜨가무시병의 진단에 사용되지만 균체 배양을 하여야 하기 때문에 세포배양시설이 필요하고 유지비용이 소요되며, 병의 초기에 진단하기 어렵고, 교차반응이 일어나며, 결과의 해석에 숙련된 전문가가 필요하다는 단점이 있다.

[0006] 하지만, 본 발명자들은 보다 높은 정확도로 검출 가능하고 다양한 변이에 대응할 수 있는 서열의 찌뜨가무시병에 대한 효과적인 진단용 키트를 고안하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은 오리엔티아 쯔쯔가무시균(*O. tsutsugamushi*)에 의한 쯔쯔가무시병을 진단하기 위한 키트를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 오리엔티아 쯔쯔가무시균(*O. tsutsugamushi*) 감염 질환의 원인 유전자 진단 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 오리엔티아 쯔쯔가무시균(*O. tsutsugamushi*) 감염 질환의 진단 마커용 변이유전자를 제공하는 것이다.
- [0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 이하, 본원에 기재된 다양한 구현예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구현예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구현예" 또는 "구현예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구현예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구현예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구현예" 또는 "구현예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구현예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구현예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.
- [0012] 본 발명 내 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당 업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0014] 재조합효소 중합효소 증폭(Recombinase polymerase amplification; RPA)은 핵산의 빠른 증폭을 위한 방법이다. 일정한 온도에서 사용되는 효소와 단백질 (재조합효소, 단일 가닥 결합 단백질 및 가닥 이동성 DNA 중합효소(strand displacing DNA polymerase))의 특정 조합에 의존하여 증폭한다. 엑소-프로브를 통해 RPA 증폭산물의 실시간 검출이 가능하다. 형광 물질은 혼성화된 엑소-프로브의 내부 무염기 부위 유사체(abasic site mimic, 예를 들어 테트라하이드로푸란 (THF)을 들 수 있다)에서 엑소뉴클레아제 III 절삭을 통한 형광단(fluorophore) 및 소광물질(quencher) 등을 사용할 수 있다. 형광 신호는 랩톱 (ESeQuant Tubescanner 장치, Qiagen Lake Constance GmbH, Stockach, Germany)을 포함하는 무게가 1.2kg인 현장 진단 스캐너를 통해 실시간으로 측정된다. 예를 들어, 비오틴 또는 겨자무과산화효소(horseradish peroxidase)로 표지된 역방향 프라이머를 사용하여 분석에 필요한 단계 수를 줄이기 위해 다른 표지 전략의 사용을 조사한 것이다. 사용된 증폭 온도를 최적화하고 표면 차단제를 사용하고자 한 방법이다. 이러한 변화의 조합은 $1 * 10^{-15}$ M의 검출 한계 (LOD)를 낮추어 훨씬 더 신속한 증폭 및 검출 프로토콜을 용이하게 한 방법이다(J. Clin. Microbiol., 50 (2012), pp. 2234-2238).
- [0015] 역전사 재조합효소 중합효소 증폭 (reverse transcription-recombinase polymerase amplification, RPA)은 상기한 RPA 방법에서 역전사 효소를 첨가한 것이다.
- [0016] 본 명세서에 있어서, "프라이머(primer)"란 짧은 서열의 뉴클레오타이드인 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)로서 목적하는 DNA 또는 RNA의 반대편 가닥의 상보적 위치에 특이적으로 부착되어 유전자의 증폭(amplification)을 개시하는 역할을 하는 올리고뉴클레오타이드로서, 바람직하게는 쯔쯔가무시균의 56 kDa 타입 특이적 항원 유전자에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오타이드일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 1 및/또는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드로서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 서열번호 1 및/또는 서열번호 2의 염기서열과 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상 유사한 서열일 수 있다.
- [0017] 본 명세서에 있어서, "프로브(probe)"란, 목적하는 유전자에 특이적으로 부착되어 목적 유전자를 확인 및/또는

검출하는 탐침자를 포괄적으로 포함하는 광의의 개념이며, 바람직하게는 쯔쯔가무시균의 56 kDa 타입 특이적 항원 유전자에 특이적으로 결합하는 화합물, 항체, 단백질, 올리고뉴클레오타이드 등 일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열 5'-ATCGAACAG ATACAGAGTAAAATCCAAGAAT [FAM-dT] A [THF] G [BHQ-dT] GATACATTGGAAGAA-[3'-block]의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드로서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 상기 서열의 염기서열과 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상 유사한 서열일 수 있다. 또한, 상기 프로브는 용이한 검출을 위한 표지를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0018] 본 명세서에 있어서, "키트(kit)"란 쯔쯔가무시균의 DNA 또는 RNA를 증폭 및/또는 검출하여 쯔쯔가무시균 감염 여부를 예측할 수 있는 검진용 기기를 의미하며, 쯔쯔가무시균에 감염되었을 것으로 의심되는 대상체로부터 분리된 생물학적 시료로부터 쯔쯔가무시균의 감염 여부를 확인할 수 있는 형태라면 제한이 없다. 바람직하게는 쯔쯔가무시균의 56 kDa 타입 특이적 항원 유전자에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브 또는 프라이머 세트를 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 본 발명의 프라이머 세트를 포함할 수 있으며, 또는 쯔쯔가무시균 3D에 특이적으로 결합하는 항체(antibody) 또는 앵타머(aptamer)를 포함하는 형태일 수 있으나, 쯔쯔가무시균의 DNA를 증폭 및/또는 검출하여 쯔쯔가무시균 감염 여부를 예측할 수 있는 형태라면 이에 제한되지 않는다.

[0019] 본 명세서에 있어서, "검출(detection)"이란 쯔쯔가무시균에 감염되었을 것으로 의심되는 대상체의 감염 여부를 판단하는 방법에 관한 것으로서, 상기 균의 단백질, DNA, 또는 RNA를 확인하여 감염 여부를 확인하는 방법을 의미한다.

[0020] 본 명세서에 있어서, "생물학적 시료(biological sample)"란 쯔쯔가무시균에 감염된 대상체에서 상기 쯔쯔가무시균의 단백질, DNA, 또는 RNA를 포함하고 있는 모든 시료를 의미하며, 바람직하게는 혈액, 혈장, 혈청, 골수, 조직, 세포, 타액, 객담, 모피, 소변 등일 수 있으나, 상기 쯔쯔가무시균의 단백질, DNA, 또는 RNA를 확인할 수 있는 시료라면 이에 제한되지 않는다.

[0022] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 3에 대응하는 프라이머 염기쌍 또는 프로브를 포함하는 쯔쯔가무시병(scrub typhus) 진단 키트를 제공한다.

[0023] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 프라이머 염기쌍은 서열번호 1 및 2이다. 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 프로브는 5'-ATCGAACAG ATACAGAGTAAAATCCAAGAAT [FAM-dT] A [THF] G [BHQ-dT] GATACATTGGAAGAA-[3'-block]이다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 쯔쯔가무시병(scrub typhus)은 오리엔티아 쯔쯔가무시균(*Orientia tsutsugamushi*) 감염 질환에 의한 것이다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 프라이머쌍은 검체 내의 쯔쯔가무시균을 검출하는 것이다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 검체는 진단 대상의 전혈, 혈장, 혈청이다.

[0024] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 3에 대응하는 프로브 또는 프라이머 염기쌍을 시료에 첨가하는 단계를 포함하는, *in-vitro*에서 쯔쯔가무시균을 검출하는 방법을 제공한다.

[0025] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 프로브는 5'-ATCGAACAG ATACAGAGTAAAATCCAAGAAT [FAM-dT] A [THF] G [BHQ-dT] GATACATTGGAAGAA-[3'-block]이다. 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 프라이머 염기쌍은 서열번호 1 및 2이다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 시료로 재조합효소 증합효소 증폭 (recombinase polymerase amplification, RPA)하는 단계를 포함한다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 RPA 단계에서 반응 온도는 37℃ 내지 42℃이다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 RPA 단계에서 반응 시간은 10분 내지 20분이다. 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 쯔쯔가무시균은 오리엔티아 쯔쯔가무시균(*Orientia tsutsugamushi*)으로서, 쯔쯔가무시병(scrub typhus)을 유발하는 것이다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에서 제공하는 쯔쯔가무시균 감염 진단 키트는 개체에서 쯔쯔가무시균 감염에 대하여 효과적이고 빠르게 검출 및 진단하여, 쯔쯔가무시균 감염에 대한 예방 및 치료 효과를 우수하게 하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 쯔쯔가무시균에 대한 프라이머 및 프로브의 효율을 평가한 그래프이다.

도 2는 기본 키트를 사용하여 쯔쯔가무시 DNA를 검출하기 위한 RPA 반응을 실시한 이미지이다. 도 2의 A는 PRA 산물을 5μl 로딩한 것이고, B는 PRA 산물을 2.5μl 로딩한 것이고, C는 PRA 산물을 1.0μl 로딩한 것이고, D는

RPA 반응의 시약 조성을 나타낸다.

도 3은 다른 농도의 프라이머를 가지고 기본 키트를 사용하여 찌찌가무시균을 검출하기 위한 RPA 반응을 실시한 도면이다. 도 3의 A는 PRA 산물을 1.0 μ l 로딩한 것이고, B는 PRA 산물을 5.0 μ l 로딩한 것이며, C는 각각 프라이머를 8pM 첨가한 것의 조성을 나타내고, D는 각각 프라이머를 5pM 첨가한 것의 조성을 나타내며, E는 각각 프라이머를 3pM 첨가한 것의 조성을 나타내는 것이다. 겔 이미지에서 짝수 번호 레인은 반응 혼합물에 찌찌가무시 DNA를 1.0ng 첨가한 것이고 홀수 번호 레인은 증류수만을 첨가한 것이다.

도 4는 반응 시간에 따라 기본 키트를 이용하여 찌찌가무시균을 검출하기 위한 RPA 반응을 비교한 것을 나타내는 도면이다. 도 4의 A는 RPA 반응에 의해 생성된 증폭산물을 아가로스겔 전기영동으로 확인한 것이다. 도 4의 B는 RPA 반응의 조성 성분을 나타낸 것이다. 1.0 μ l의 PRA 산물을 각 레인에 로딩하였다.

도 5는 반응 온도에 따라 기본 키트를 이용하여 찌찌가무시균을 검출하기 위한 RPA 반응을 비교한 것을 나타내는 도면이다. 도 5의 A는 각각 5℃ 내지 55℃의 온도 범위에서 20분간 실시한 것을 아가로스겔 전기영동으로 확인한 것이다. 도 5의 B는 각각 37℃에서부터 42℃의 온도 범위에서 실시한 것을 나타낸 것이다. 1.0 μ l의 PRA 산물을 각 레인에 로딩하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예

실시예 1: 찌찌가무시균 검출용 프라이머 및 프로브 세트

찌찌가무시균 검출용 프라이머 세트 및 프로브를 하기에 정리하였다.

- Forward (서열번호 1)(본원에서 811 F라고도 표기함) :

5'-ATATATAGTGATATAAAGCCATTGCTGATATAGC-3'

- Reverse (서열번호 2)(본원에서 988 R이라고도 표기함) :

5'-TCTGATTAACAAAAGCATTATTAATATACCCATCA-3'

- 프로브 (본원에서 898 P라고도 표기함) :

5'-ATCGAACAG ATACAGAGTAAATCCAAGAAT [FAM-dT] A [THF] G [BHQ-dT] GATACATTGGAAGAA-[3'-block]

본원 발명자들은 보다 높은 정확도로 찌찌가무시균에 대한 검출이 가능하고 다양한 변이에 대응할 수 있는 서열(서열번호 3) 및 이의 서열을 포함하는 효과적인 진단용 키트를 고안하였다.

찌찌가무시 DNA를 0.1pg부터 10ng까지 연속 희석(serial dilution)하였다. EXO RT 키트 (TwistDx Co. UK)에 상기 프라이머 및 프로브를 혼합하여, 재조합효소 증폭효소 증폭 (recombinase polymerase amplification, RPA) 반응을 실시하였다. 하지만, 상기한 키트에 한정되는 것은 아니다. 이 RPA 반응은 T8 UV 스캐너 상에서 39℃에서 20분간 반응시켰다. RPA 반응은 1.0pg까지 희석한 찌찌가무시 DNA농도까지 잘 증폭하였다. DNA를 1.0pg부터 10ng까지 희석한 모든 샘플이 15분 이내에 양성반응을 보였다(도 1).

서열번호 3: atatatagtg atataaagcc atttgetgat atagetggta ttaatgttcc tgatactggt ttgcctaata gtgcatctat cgaacagata cagagtaaaa tccaagaatt aggtgatata ttggaagaac tcagagattc tttgatggg tatattaata a

실시예 2: RPA 반응 혼합물 조성 및 반응 조건

고안한 프라이머로 실시간 RPA 이외에도 기본 키트를 이용한 전기영동 상에서 유전자 증폭을 확인하는 방법에도 응용가능한지를 조사하였다. 그 결과 실시간 PCR 기기가 없는 실험실에서 유용한 방법임을 검증하였다. 찌찌가

무시 DNA는 0.0001 ng에서 10 ng으로 연속 희석하였다. 도 2에 나타난 바와 같이, 50 μ l 반응액 중에서 단 1 μ l 씩만 로딩하여도 충분히 육안으로 겔 상에서 관찰 가능하였다. 즉 0.0001ng/ μ l까지의 쯔쯔가무시 DNA를 검출할 수 있었다. 또한, 이로부터 20분 안에 충분한 RPA 증폭이 일어남을 알 수 있었다. RPA 반응에 의해 생성된 증폭 산물(amplicon)은 아가로스겔 전기영동으로 확인하였다(도 2).

[0047] 또한, 다른 농도의 프라이머를 가지고 기본 키트를 사용하여 쯔쯔가무시균 감염 여부를 검출하기 위한 RPA 반응을 실시하였다. RPA 반응에 의해 생성된 증폭산물은 아가로스겔 전기영동으로 확인하였다(도 3). 각각 개별적으로 PRA 산물을 1.0 μ l(도 3의 A 참고), 및 5.0 μ l(도 3의 B 참고)를 로딩하였다. 각각 프라이머를 겔 상의 레인 1 및 2에는 8pM을 첨가하고, 레인 3 및 4 에는 5pM을 첨가하고, 레인 5 및 6에는 3pM을 첨가하였다(도 3의 C 내지 E 참고). 도 3에서 나타난 바와 같이, 겔 이미지에서의 짝수 번호 레인은 반응 혼합물에 쯔쯔가무시 DNA를 1.0ng 첨가한 것이고 홀수 번호 레인은 증류수만을 첨가한 것으로 표시하였다.

[0048] 또한, 반응 시간에 따라 기본 키트를 이용하여 쯔쯔가무시균을 검출하기 위한 RPA 반응을 비교하였다. 도 4의 B 에 나타난 바와 같이, RPA 반응의 조성 성분을 준비하였다. 1.0 μ l의 PRA 산물을 각 레인에 로딩하였다. RPA 반응에 의해 생성된 증폭산물을 아가로스겔 전기영동으로 확인하였다(도 4의 A 참고). 기본 키트를 이용한 RPA 반응은 시간이 10분 후부터 겔 상에서 증폭된 산물을 관찰할 수 있었다. 특히, 20분까지 반응시킨 샘플에서 가장 진한 밴드를 확인할 수 있었다.

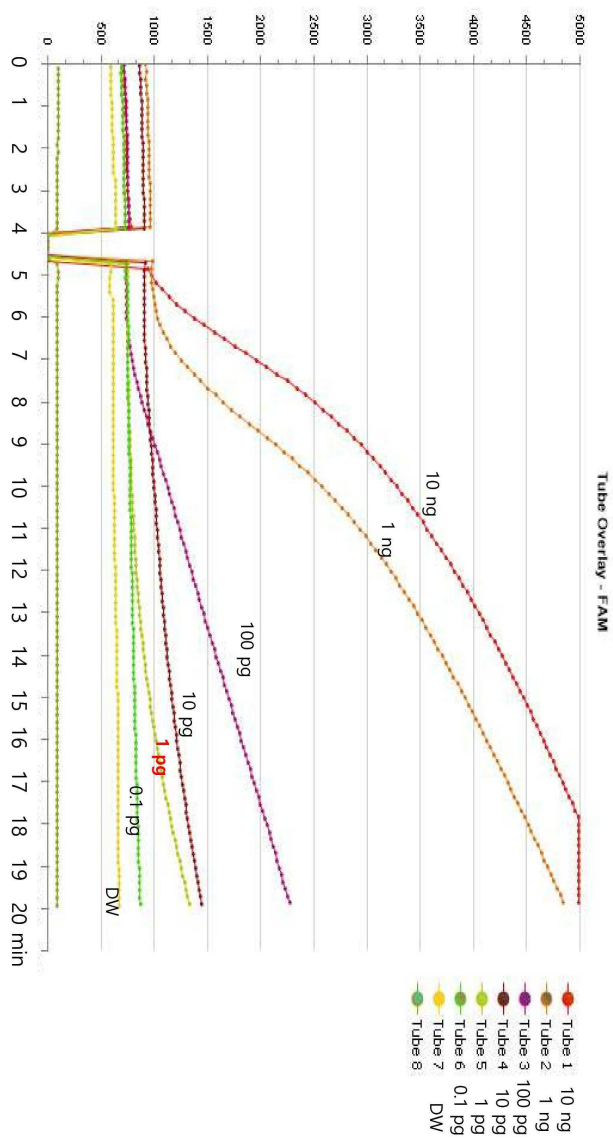
[0049] 또한, 반응 온도에 따라 기본 키트를 이용하여 쯔쯔가무시균을 검출하기 위한 RPA 반응을 비교하였다. 도 5의 C 에 나타난 바와 같이, RPA 반응의 조성 성분을 준비하였다. 1.0 μ l의 PRA 산물을 각 레인에 로딩하고, 각각 5 $^{\circ}$ C 내지 55 $^{\circ}$ C의 온도 범위에서 20분간 실시하였다(도 5의 A). 온도가 35 $^{\circ}$ C 및 45 $^{\circ}$ C인 레인에서 밴드를 확인할 수 있었다. 그 후에, 1.0 μ l의 PRA 산물을 각 레인에 로딩하고, 각각 37 $^{\circ}$ C 내지 42 $^{\circ}$ C의 온도 범위에서 20분간 다시 실시하였다(도 5의 B). 그 결과, RPA반응은 5, 15, 25, 55 $^{\circ}$ C에서는 반응하지 않았다. 그러나, 37 $^{\circ}$ C에서부터 42 $^{\circ}$ C까지는 RPA반응에서 크게 차이는 보이지 않고, 모두 잘 반응한 것을 확인할 수 있었다.

[0050] 결론적으로, 본원에 따른 방법은 실시간 PCR기기, T8 UV 스캐너, 또는 T16 스캐너를 이용할 수 없는 실험실에서 활용가능하다는 장점이 있다. 온도가 37 $^{\circ}$ C에서부터 42 $^{\circ}$ C이고, 바람직하게는 39 $^{\circ}$ C에서, 10분 이상, 바람직하게는 10분 내지 20분간 반응하면 1.0pg까지의 유전자 샘플을 검출할 수 있을 것으로 기대되었다.

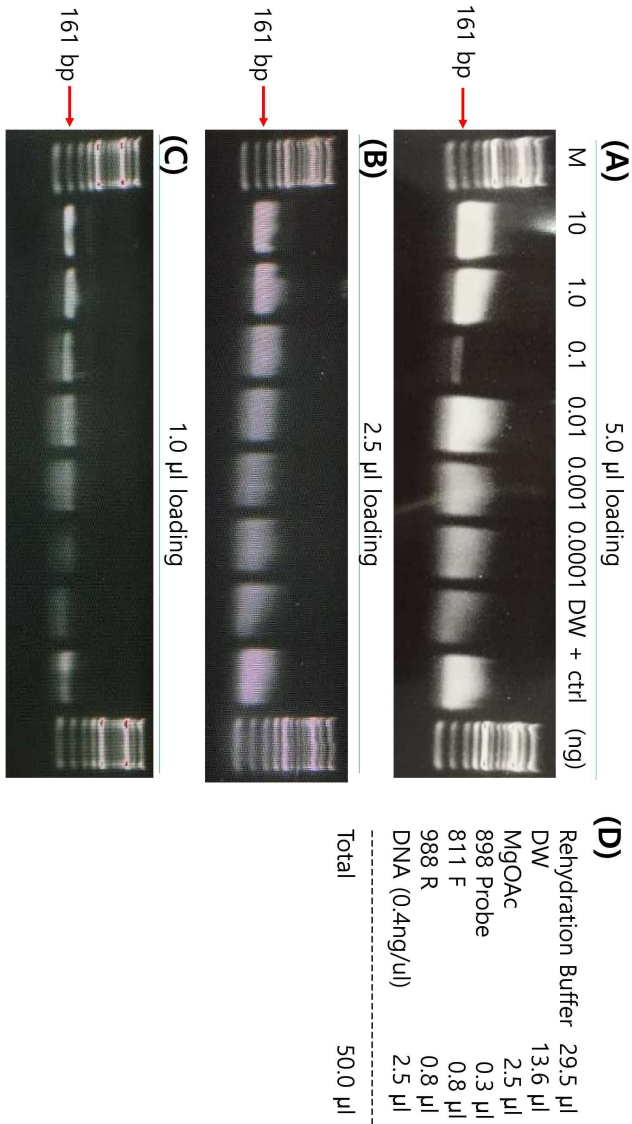
[0051] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

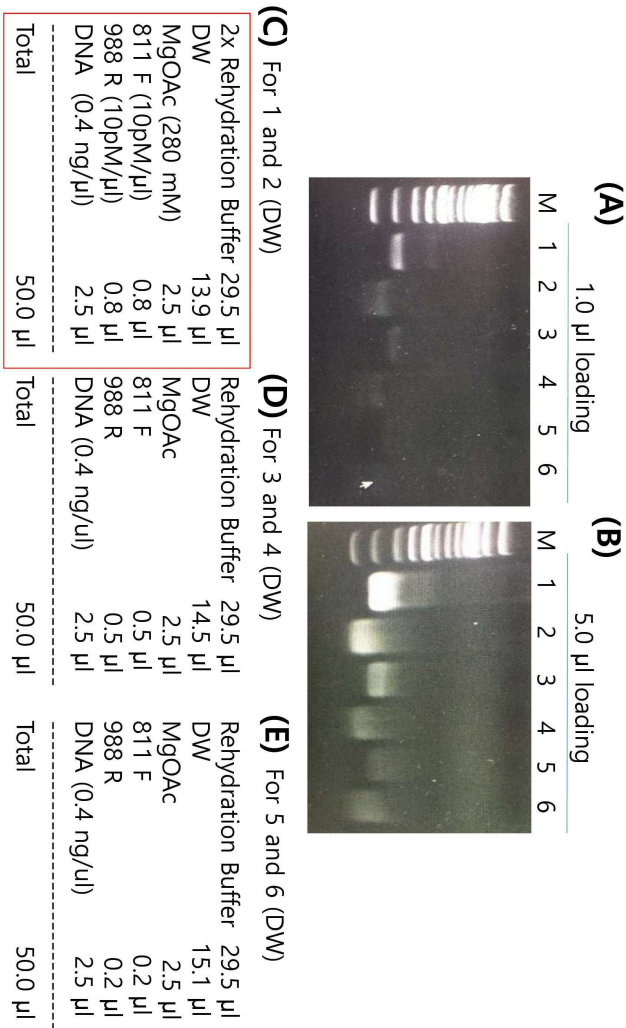
도면1



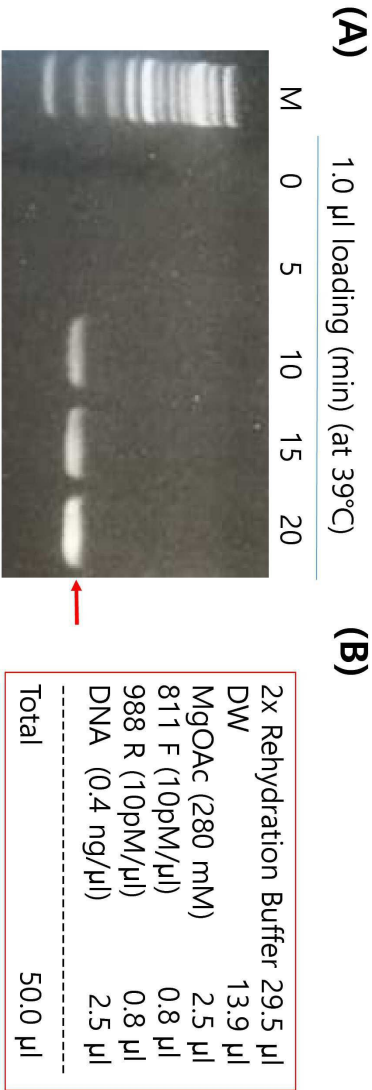
도면2



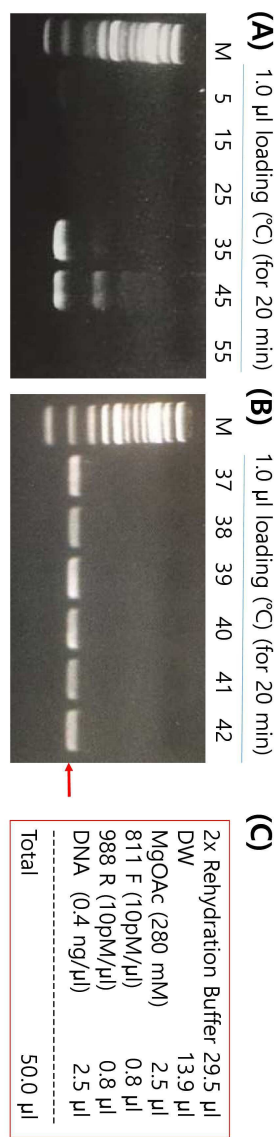
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Scorpiogen Co.
- <120> KIT FOR DIAGNOSING INFECTION DUE TO ORIENTIA TSUTSUGAMUSHI
- <130> PDPB187215
- <160> 3
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 35
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Artificial Sequence
- <400> 1

atatatagtg atataaagcc atttgctgat atagc	35
<210> 2	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 2	
tctgattaac aaaagcatta ttaatatacc catca	35
<210> 3	
<211> 161	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Artificial Sequence	
<400> 3	
atatatagtg atataaagcc atttgctgat atagctggta ttaatgttcc tgatactggt	60
ttgcctaata gtgcatctat cgaacagata cagagtaaaa tccaagaatt aggtgataca	120
ttggaagaac tcagagattc ttttgatggg tatattaata a	161