(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0065687
(43) 공개일자 2019년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2018.05)
C12Q 2527/146 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0165107
(22) 출원일자 2017년12월04일
심사청구일자 2017년12월04일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
대한민국 (식품의약품안전처장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
(72) 발명자
이주훈
경기도 수원시 영통구 봉영로 1526 703동 704호
곽효선
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 연구심사동 A
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 하나

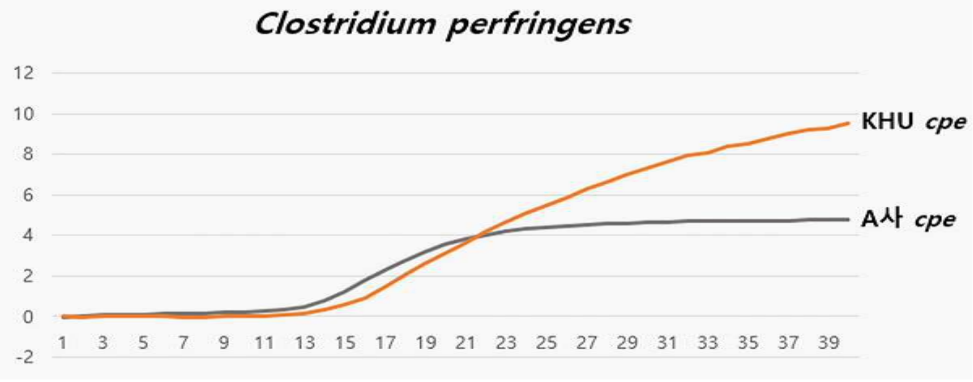
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **cpa와 cpe 타겟 유전자를 통해 클로스트리디움 퍼프린젠스를 검출할 수 있는 Singleplex Real-Time PCR 키트 개발**

(57) 요 약

본 발명은 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 검출용 프라이머 세트에 관한 것으로, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머를 포함하는 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출용 프라이머 세트가 제공된다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12Q 2531/113 (2013.01)
C12Q 2561/113 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자
이우정
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 연구심사동 A
김순한
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 오송보건의료행정타운 식품의약품안전처 연구심사동 A
박명주
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 경희대학교 국제캠퍼스 생명과학대학

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	14162유전체972
부처명	식품의약품안전처
연구관리전문기관	식품의약품안전평가원
연구사업명	식중독균 유전체 연구 사업단
연구과제명	식중독균의 신규 유전체 해독 및 메타게놈 정보 분석
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2017.01.01 ~ 2017.11.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

cpa 또는 *cpe* 유전자에 결합하는 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 검출용 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 *cpa*에 결합하는 프라이머 세트는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머를 포함하는 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출용 프라이머 세트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 *cpe*에 결합하는 프라이머 세트는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 프라이머 및 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 프라이머를 포함하는 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출용 프라이머 세트.

청구항 4

제1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 프라이머 세트를 이용하여 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하는 단계;를 포함하는 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

0.001 내지 100 ng/μL 농도의 타겟 DNA를 검출하는 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출방법.

청구항 6

제1항 내지 제 3항 중 어느 한 항의 프라이머 세트, 및 PCR 반응 혼합물을 포함하는 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출키트.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 PCR 반응 혼합물은 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 포함하는 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 클로스트리디움 퍼프린젠스 실시간 검출용 프라이머 세트, 및 이를 이용한 클로스트리디움 퍼프린젠스 실시간 검출방법 및 검출키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식중독은 식품 섭취로 인하여 인체에 유해한 미생물 또는 유독물질에 의하여 발생하였거나 발생한 것으로 판단되는 감염성 질환 또는 독소형 질환을 의미하는 것으로, 주로 발열, 구역질, 구토, 설사, 복통 등의 증세를 동반한다.

[0003] 식중독은 미생물학적 식중독 및 화학물질에 의한 식중독으로 분류될 수 있다. 미생물학적 식중독은 세균성 식중

독, 바이러스성 식중독, 원충성 식중독으로 분류될 수 있고, 화학물질에 의한 식중독은 자연독 식중독, 화학적 식중독으로 분류될 수 있다.

[0004] 독소형 식중독의 주 원인균인 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 균은 그람 양성, 운동성이 없는 혐기성의 아포 형성 간균으로 토양, 하천, 하수, 먼지 등 자연환경, 건강한 사람이나 동물의 장관 내 및 식품 등에 널리 존재하며, 특히 아포는 100℃에서 1시간 이상 가열해도 사멸되지 않는 내열성이다.

[0005] 클로스트리디움 퍼프린젠스는 의심되는 음식에서 10^5 cfu/g 이상의 균이 자라거나 대변 검체에서 10^6 cfu/g 이상의 세균수가 존재하여 포자를 생산하는 과정 중에 만들어지는 독소(*Clostridium perfringens* enterotoxin, CPE)를 분비함으로써 식중독을 야기한다.

[0006] 한편, 최근 기존의 표준배양법과 병용하여 유전자 기반의 검출법인 PCR법(Polymerase Chain Reaction) 및 실시간(real-time) PCR법 등이 여러 분야에 응용되고 있다.

[0007] 클로스트리디움 퍼프린젠스에 의한 감염 여부 및 식품에서의 오염 여부를 신속히 확인하기 위한 진단 방법으로 중합효소 연쇄반응(PCR)법과 같은 분자 생물학적 방법이 이용되고 있으나, 기존의 실시간 PCR 검출키트는 활성이 낮고, 일부 타겟 유전자는 균주의 존재에도 불구하고 활성이 관찰되지 않는 경우가 빈번하였다.

[0008] 또한 기존의 실시간 중합효소 연쇄반응 검출키트는 가장 널리 사용되는 실시간 PCR 장비인 ABI 7500 및 Bio-Rad CFX Connect에서 동시에 호환이 되지 않는 문제가 있었다.

[0009] 본 발명자들은 민감도 및 정확도가 개선된 PCR 검출키트를 개발하고자 예의 노력한 결과, 클로스트리디움 퍼프린젠스의 검출에 최적화된 타겟 유전자를 발굴하고 상기 타겟 유전자에 대한 프라이머 서열을 최적화함으로써 미생물 검출 효율을 현저히 개선하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 민감도 및 정확도가 개선된 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 측면에 따르면, *cpa* 또는 *cpe* 타겟 유전자에 결합하는 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 검출용 프라이머 세트가 제공된다.

[0012] 일 실시예에 있어서, 상기 *cpa*에 결합하는 프라이머 세트는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머를 포함할 수 있다.

[0013] 일 실시예에 있어서, 상기 *cpe*에 결합하는 프라이머 세트는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 프라이머 및 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 프라이머를 포함할 수 있다.

[0014] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 프라이머 세트를 이용하여 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하는 단계;를 포함하는 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출방법이 제공된다.

[0015] 일 실시예에 있어서, 상기 검출방법은 0.001 내지 100 ng/μL 농도의 타겟 DNA를 검출할 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 프라이머 세트, 및 PCR 반응 혼합물을 포함하는 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출키트가 제공된다.

[0017] 일 실시예에 있어서, 상기 PCR 반응 혼합물은 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 프라이머 세트는 클로스트리디움 퍼프린젠스의 특정 타겟 유전자와 특이적으로 결합하므로 실시간 PCR 검출법에 있어서 유용하게 활용할 수 있다.

[0019] 특히, 본 발명의 프라이머 세트는 종래 검출키트와 비교하여 민감성 및 정확도가 현저히 우수하다.

[0020] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 crosscheck PCR 검증을 통해 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머 세트의 특이성을 평가한 것이다.

도 2 및 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머 세트의 민감도를 평가한 것이다.

도 4 및 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머 세트 및 종래 프라이머 세트의 활성을 비교한 것이다.

도 6 내지 9는 Positive control DNA를 통해 양성 대조군을 설정하고 실험의 정확도를 평가한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[0023] 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[0024] 달리 정의되지 않는 한, 분자 생물학, 미생물학, 단백질 정제, 단백질 공학, 및 DNA 서열 분석 및 당업자의 능력 범위 안에서 재조합 DNA 분야에서 흔히 사용되는 통상적인 기술에 의해 수행될 수 있다. 상기 기술들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 표준화된 교재 및 참고저서에 기술되어 있다.

[0025] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.

[0026] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 또한, 달리 지시된 바가 없으면, 핵산은 각각 왼쪽에서 오른쪽, 5'에서 3' 방향으로 씌여지고, 아미노산 서열은 왼쪽에서 오른쪽, 아미노에서 카르복실 방향으로 씌여진다. 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0028] 본 발명의 일 측면에 따르면, *cpa* 또는 *cpe* 유전자에 결합하는 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*) 검출용 프라이머 세트가 제공된다.

[0029] 상기 검출용 프라이머 세트는 클로스트리디움 퍼프린젠스의 *cpa* 또는 *cpe* 유전자에 특이적으로 결합하여 클로스트리디움 퍼프린젠스를 효과적으로 검출할 수 있으며, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머를 포함할 수 있다.

[0030] 상기 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*)는 편성 혐기성균(산소의 존재 하에서는 거의 생육할 수 없는 세균)이다. 상기 클로스트리디움 퍼프린젠스는 인간 혹은 소, 돼지, 염소 등의 여러 동물에게 심각한 질병을 유발할 수 있는 원인균으로 사람의 가스괴저, 패혈증을 비롯한 각종 감염증을 일으키며, 식품 중에서도 증식하여 식중독을 유발할 수 있다.

[0031] 상기 프라이머 세트는 클로스트리디움 퍼프린젠스의 *cpa* 또는 *cpe* 유전자에 특이적으로 결합하므로 클로스트리디움 퍼프린젠스에 의해 유발되는 다양한 질환의 초기 진단이나 질환의 발병 가능성 판단에 유용하게 사용될 수 있다.

[0032] 상기 프라이머(primer)는 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 포함하는 짧은 핵산 서열로 상보적인 핵산의 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 핵산 주형의 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능할 수 있다.

[0033] 상기 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있으며, 표적 미생물에 존재하는 핵산과 혼성화되어 상기 표적 미생물의 특정 유전자를 증폭하는데 사용될 수 있다.

[0034] 상기 프라이머는 증폭의 효율을 고려하여 바람직하게는 단일쇄일 수 있으며, 디옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotide)일 수 있다.

[0035] 상기 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.

[0036] 상기 프라이머는 골격 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 펩타이드 핵산(PNA)(M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 헥소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로헥시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에티틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조 릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

[0037] 상기 혼성화는 2개의 단일 가닥 핵산이 상보적인 염기 서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다.

[0038] 상기 혼성화는 단일 가닥 핵산 서열 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하는 경우에도 일어날 수 있다. 상기 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 반응 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 제어될 수 있다.

[0039] 일반적으로, 상기 혼성화 온도가 높으면 완전한 매치일 경우 혼성화가 일어날 가능성이 높으며, 혼성화 온도가 낮으면 일부 미스매치가 존재하더라도 혼성화가 일어날 수 있다.

[0040] 상기 프라이머 세트는 표적 미생물의 특징적인 유전자에 혼성화될 수 있으며, 시료 내에 목적하는 미생물이 존재하는 경우 중합효소 연쇄반응에 의해 상기 특징적인 유전자의 염기서열이 증폭되므로 상기 증폭된 산물(amplicon)을 통해 상기 미생물의 존부를 판단할 수 있다.

[0041] 상기 중합효소 연쇄반응은 당업계에 공지된 통상의 PCR 기기를 사용하여 일반적인 반응 조건에 따라 수행되거나, 또는 일부 변형되어 수행될 수 있다.

[0042] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 프라이머 세트를 이용하여 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 수행하는 단계;를 포함하는 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출방법이 제공된다.

[0043] 상기 프라이머 세트는 중합효소 연쇄반응을 통해 표적 미생물을 효과적으로 검출할 수 있다.

[0044] 상기 "중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)"은 중합효소를 사용하여 핵산을 연쇄적으로 합성하여 개시 핵산물질을 기하급수적으로 증폭하는 방법으로 당업계에 널리 공지된 방법으로, 특정 핵산의 존재 유무를 확인하는 정성분석 PCR, 특정핵산의 양을 측정하는 정량 PCR 및 PCR 과정을 실시간으로 추적하여 정성 및 정량 분석을 가능하게 하는 실시간 PCR을 모두 포함하는 개념이다. 상기 중합효소 연쇄반응은 당업계에 공지된 통상의 PCR 기기를 사용하여 일반적인 PCR 반응 조건에 따라 수행될 수 있거나 또는 일부 변형하여 실시할 수 있다.

[0045] 상기 검출방법은 상기 프라이머 세트를 이용하여 각 미생물의 특정 DNA를 증폭시킨 후, 특정 DNA의 증폭 반응을 확인하는 단계를 통해 수행될 수 있으며, 상기 특정 DNA의 증폭여부를 확인하는 단계는 PCR 반응산물이 전기영동 등을 통하여 예상되는 DNA 산물의 크기와 일치하는지를 확인함으로써 수행될 수 있다.

[0046] 상기 "증폭 반응"은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응이 당업계에 널리 보고되어 있으며, 중합효소 연쇄반응(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(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, 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), 타깃 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; CPPCR)(미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; APPCR)(미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification; NASBA)(미국 특허 제

5,130,238호, 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)를 포함하나, 바람직하게는 실시간(real-time) 중합효소 연쇄반응을 통해 수행할 수 있다.

[0047] 상기 실시간 중합효소 연쇄반응은 지수적인 증폭이 일어나는 초기 시료의 양을 형광물질의 지수적 증가가 탐지되기 시작하는 사이클의 수(Cycle threshold)로 나타내므로 더욱 정확한 정량분석이 가능하며 증폭 반응을 실시간으로 분석할 수 있다.

[0048] 상기 실시간 중합효소 연쇄반응은 전기 영동하여 영상분석기로 강도를 측정하는 단계가 생략되고 형광 광도계 등과 같은 광학 시스템(optical system) 모듈로서 증폭산물의 증폭 정도를 자동화, 수치화시켜 신속하고 정확하게 핵산 증폭 산물을 분석할 수 있다.

[0049] 상기 검출방법에 사용되는 주형 DNA의 시료는 상기 클로스트리디움 퍼프린젠스가 발견될 수 있는 모든 물질, 바람직하게는 식품, 사료 및 가검물일 수 있으며, 바람직하게는 식품에서 수득할 수 있다.

[0050] 상기 주형 DNA는 당업계에서 통상적으로 사용되는 DNA 추출방법을 통해 수득할 수 있으며, 예컨대 알카라인 추출법, 열수추출법, 컬럼 추출법 및 페놀/클로로포름 추출법 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 상기 검출방법은 0.001 내지 100 ng/μL 농도의 타겟 DNA를 검출할 수 있다.

[0052] 본 발명자들은 표적 유전자 검출을 위한 프라이머 서열을 최적화하였으며, 상기 프라이머 세트는 민감도가 높아 매우 낮은 수준의 타겟 DNA 예컨대, 0.001 ng/μL 농도의 타겟 DNA도 효과적으로 증폭할 수 있다. 이 때, 최소 검출 농도는 35사이클(cycles) 이전에 검출 가능한지 여부로 판단하였다.

[0053] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 프라이머 세트, 및 PCR 반응 혼합물을 포함하는 클로스트리디움 퍼프린젠스 검출키트가 제공된다.

[0054] 상기 PCR 반응 혼합물은 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 포함할 수 있으며, 이 기술분야의 통상의 기술자가 PCR 반응에 이용할 수 있는 시약을 모두 포함할 수 있다.

[0055] 이하, 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예에 관하여 상세히 서술하나, 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0056] <u>실시예 : singleplex Real-time PCR</u>

[0057] 실시간 중합효소 연쇄반응은 주형 DNA(40 ng/㎕) 1㎕, 제1프라이머 세트(서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머) 또는 제2프라이머 세트(서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머), 및 프로브 세트 혼합물 2.65㎕, MG 2X qPCR MasterMix (TaqMan) (MGmed, KOR) 10㎕,, 증류수 6.35㎕를 첨가한 후 최종 20㎕가 되도록 반응액을 조제하였다.

[0058] PCR 반응은 실시간 유전자 증폭장치 7500FAST(ABI, USA)를 사용하여 50℃에서 3분간 반응시켜 PCR 산물의 오염을 제거하한 후 실시간 PCR 증폭을 수행하였다.

[0059] 증폭 반응은 95℃에서 10분간 예비변성(pre-denaturation)을 실시한 후, 95℃에서 15 초간 변성(denaturation), 60℃에서 1분간 결합(annealing)과 연장(extention)을 40 사이클(cycles) 수행하였다.

[0060] 주형(template)은 클로스트리디움 퍼프린젠스에서 추출한 Genomic DNA를 사용하였으며, 음성대조군(negative control)은 증류수를 사용하여 교차오염을 확인하였다.

[0061] 대립유전자 구별 그래프(Allelic discrimination plot)와 PCR 증폭 그래프(PCR amplification plot)는 실시간 중합효소 연쇄반응기 7500의 소프트웨어 프로그램(v. 2.0.6)을 사용하여 확인하였다.

[0062] <u>실험예 1 : 프라이머의 정확성 평가</u>

[0063] 균주에 최적화된 신규 타겟 유전자를 선정하여 보다 더 효율적인 검출이 가능하다. 기존 Singleplex 실시간 PCR 키트의 경우 특정 균주를 타겟으로 설정하였음에도 불구하고 다른 균주도 함께 검출되는 사례가 빈번하였다.

[0064] Crosscheck PCR 검증을 통해 타겟 균주 이외의 균주에 대한 활성이 있는지 확인하였으며, 클로스트리디움 퍼프린젠스에만 상기 프라이머가 특이적으로 검출되는지 시험하였다.

[0065] 도 1을 참조하면, 좌측 라인에서 상기 제1프라이머 세트 및 제2프라이머 세트가 특이적으로 균주를 검출하였으며, 우측 라인(-)에서 타겟 균주를 제외한 나머지 15 종의 다른 균주에 대한 활성이 나타나지 않았다.

[0066] 상기 결과는 *cpa* 유전자에 특이적으로 결합하는 제1프라이머 세트 및 *cpe* 유전자에 특이적으로 결합하는 제2프라이머 세트가 클로스트리디움 퍼프린젠스에 특이적인 활성을 가짐을 시사한다.

[0067] <u>실험예 2 : 프라이머의 민감도 평가</u>

[0068] 상기 제1프라이머 세트 및 제2프라이머 세트의 민감도를 평가하고자, Serial dilution 실험을 진행하였다. 연속희석법을 통해, 주형 DNA가 검출되는 수준을 평가하였다.

[0069] 도 2 및 3을 참조하면, 상기 상기 제1프라이머 세트 및 제2프라이머 세트는 매우 낮은 농도의 주형 DNA를 검출하였으며, 특히, 극미량(0.001ng/μL)의 DNA 주형을 효과적으로 검출하였다.

[0070] <u>실험예 3 : 프라이머의 활성도 평가</u>

[0071] 종래 실시간 PCR 키트의 경우 활성이 낮아 장시간 실시간 PCR을 수행하였다.

[0072] 상기 제1프라이머 세트 및 제2프라이머 세트의 활성을 평가하고자 타사의 프라이머 세트와 활성도를 비교하였다.

[0073] 도 4 및 5를 참조하면, 본 발명의 프라이머 세트는 타사의 프라이머 세트와 비교하여 활성도가 월등히 높은 수준으로 평가되었으므로, 더욱 신속하고 정확하게 클로스트리디움 퍼프린젠스를 검출할 수 있다.

[0074] 또한, Positive control DNA를 통해 양성 대조군을 설정하고 정확하게 실험을 진행할 수 있다. 일반적으로 식품 샘플 안에 존재하는 Pathogen을 검출하기 위해 DNA 정제과정을 거치며, 정제과정에서 DNA가 적절하게 정제되지 않을 수 있으므로 양성 대조군을 설정하여 실험 정확도를 담보할 수 있다.

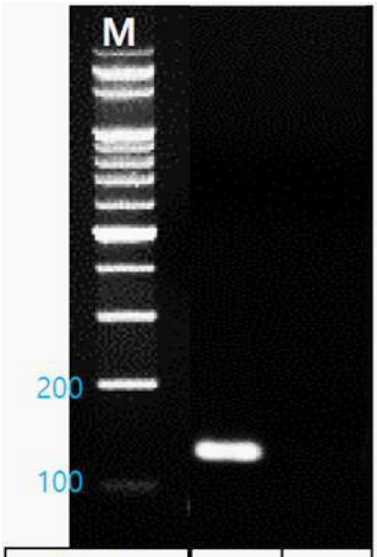
[0075] 도 6 내지 9을 참조하면, 본 발명의 프라이머 세트는 양성 대조군에 대한 높은 활성을 나타내었으며, 특히 실시간 PCR 장비인 ABI 7500 및 Bio-Rad CFX Connect에서 모두 우수한 활성이 확인되었다.

[0076] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

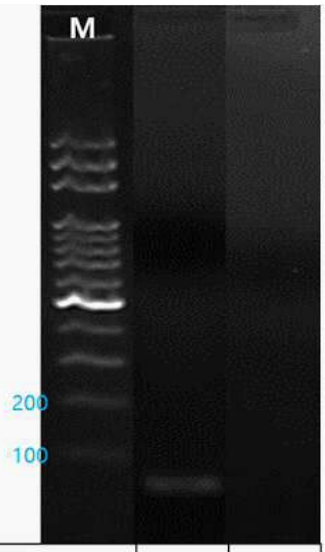
[0077] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1

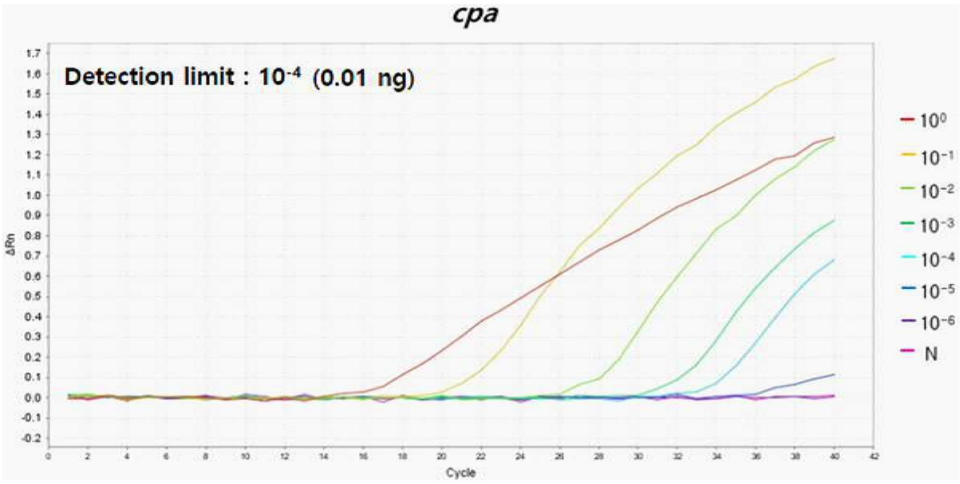


Pathogen	*C.p*	(-)
Target gene	*cpa*	*cpa*
Tm (℃)	60.5	60.5
Size (bp)	124	-

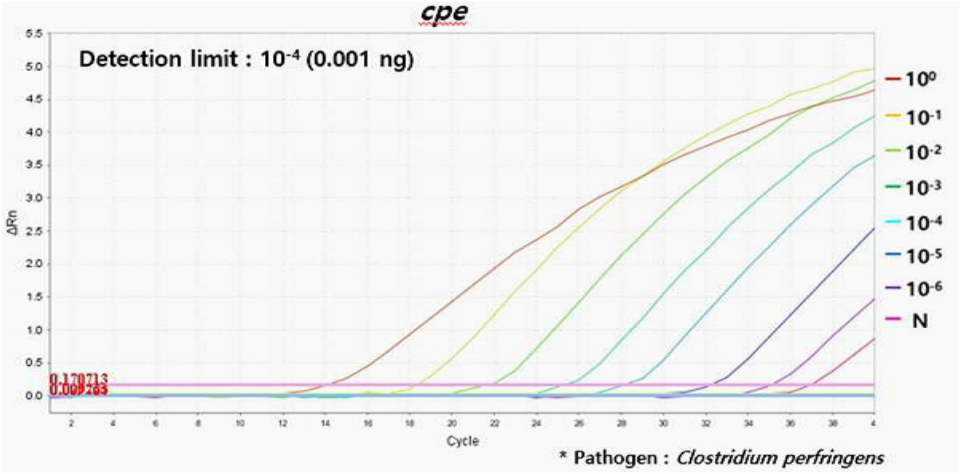


Pathogen	*C.p*	(-)
Target gene	*cpe*	*cpe*
Tm(℃)	61.5	61.5
Size(b.p)	88	-

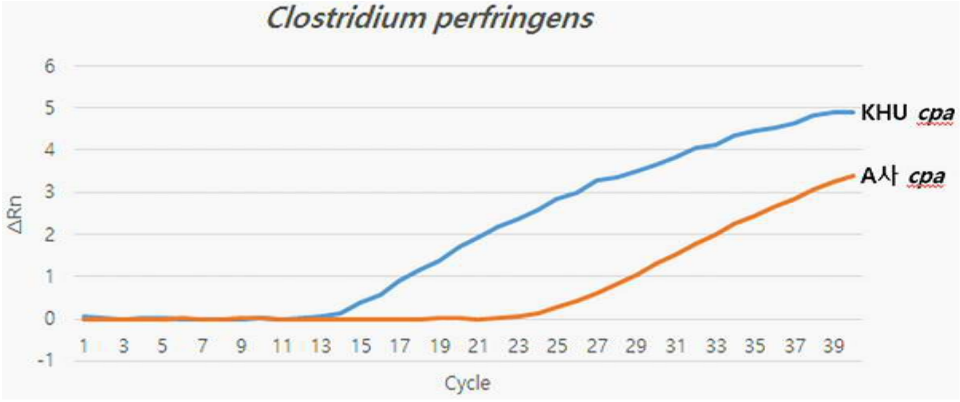
도면2



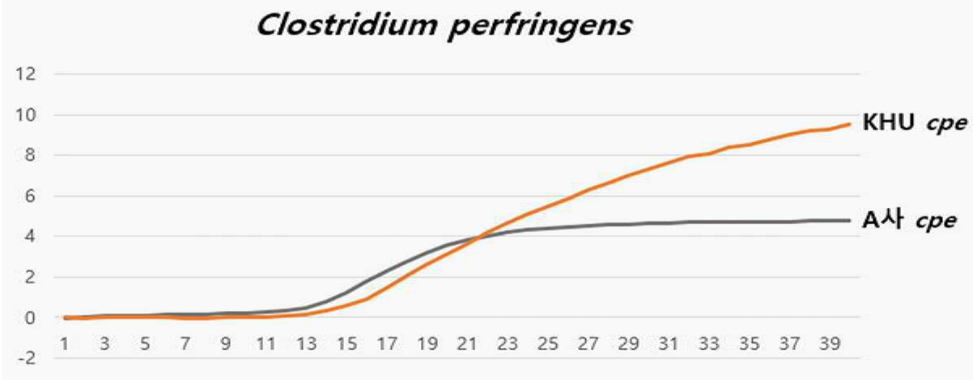
도면3


cpe
Detection limit : 10-4 (0.001 ng)
ΔRn
Cycle
10⁰
10-1
10-2
10-3
10-4
10-5
10-6
N
* Pathogen : Clostridium perfringens

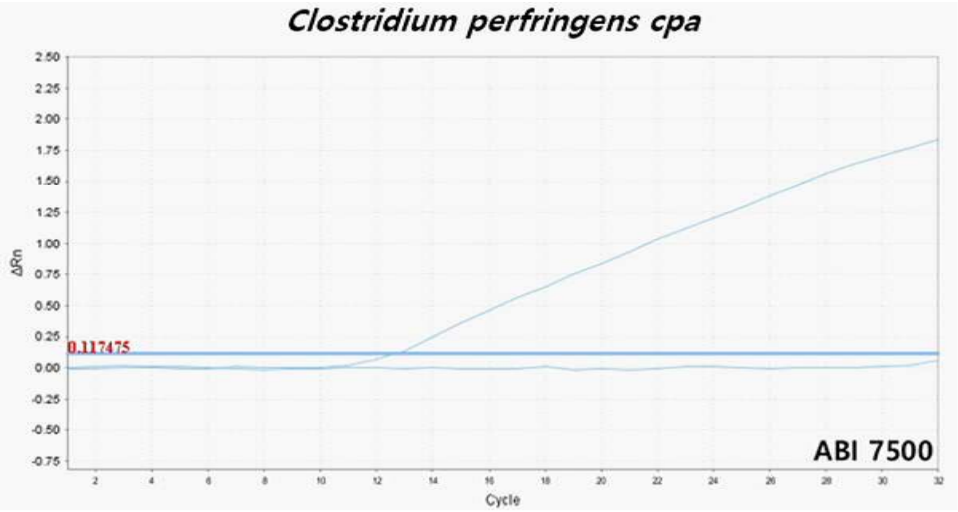
도면4


Clostridium perfringens
ΔRn
Cycle
KHU cpa
A사 cpa

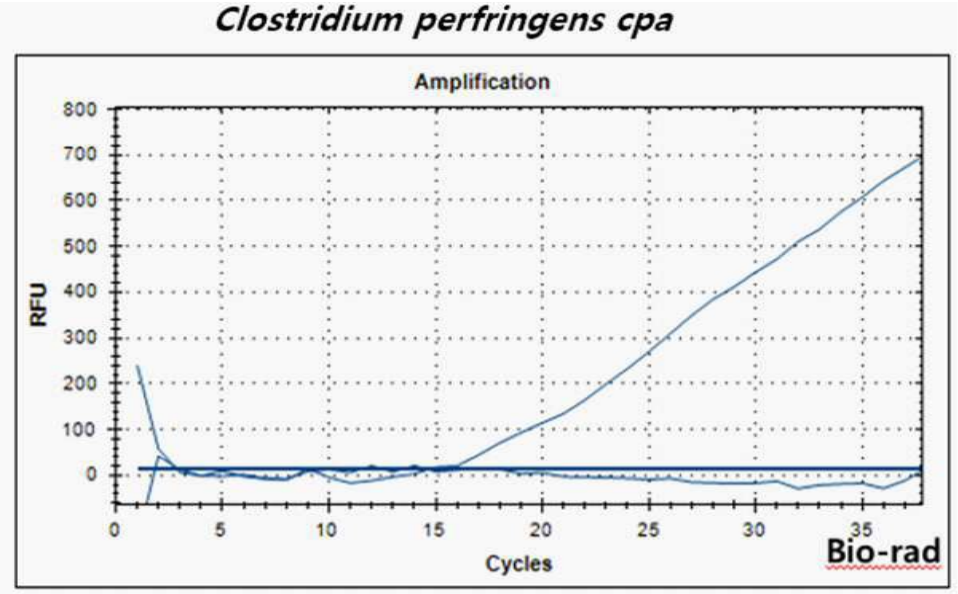
도면5


Clostridium perfringens
KHU cpe
A사 cpe

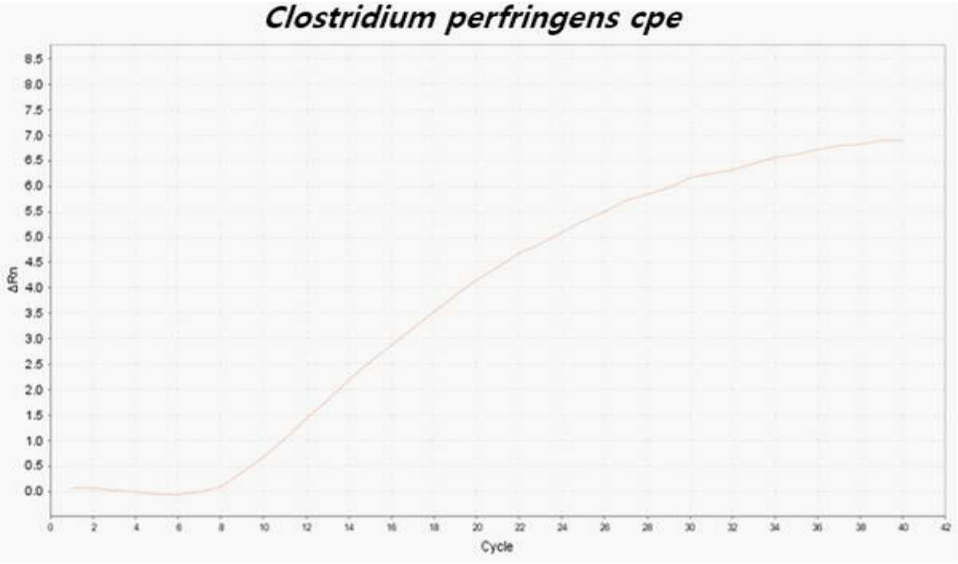
도면6


Clostridium perfringens cpa
ΔRn
0.117475
ABI 7500
Cycle

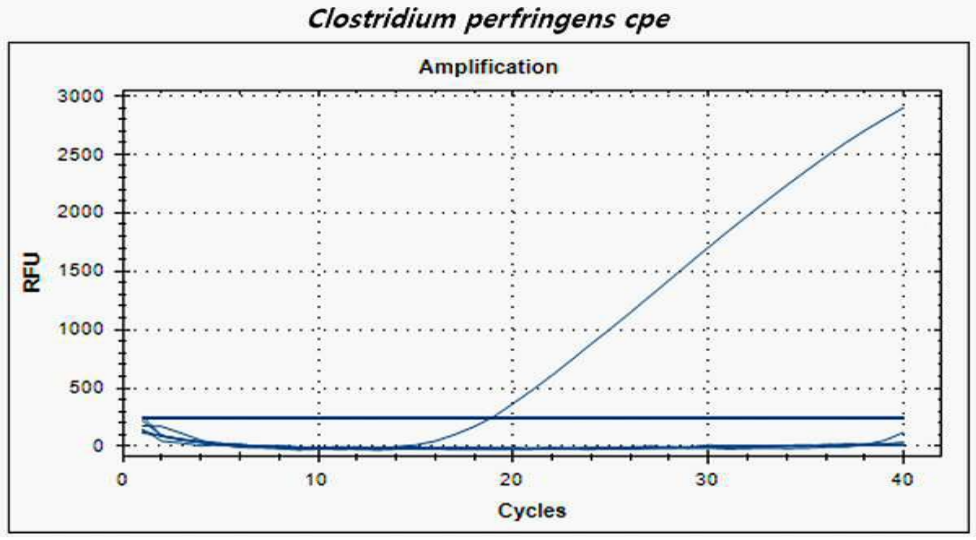
도면7


Clostridium perfringens cpa
Amplification
RFU
Cycles
Bio-rad

도면8



도면9



서 열 목 록

<110> Kyung Hee University

<120> DEVELOPMENT OF SINGLEPLEX REAL-TIME PCR KIT FOR RAPID DETECTION OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS USING cpa, cpe TARGET GENE

<130> GKH17P-0112-KR

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cpa

<400> 1

ttctatcttg gagaggctat gcactatttt 30

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cpa

<400> 2

tttcaaactt aacatgtcct gcgc 24

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cpe

<400> 3

aactatagga gaacaaaata caatag 26

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> cpe

<400> 4

tgcataaacc ttataatata catattc 27