(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0038203
(43) 공개일자 2024년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01) *C12Q 1/6851* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/70 (2022.05)
C12Q 1/6851 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2022-0116465
(22) 출원일자 2022년09월15일
심사청구일자 2022년09월15일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
서태석
경기도 수원시 영통구 청명북로 33, 433동 1901호(영통동, 청명마을삼성아파트)
부민판
경기도 수원시 영통구 덕영대로1673번길 8-11, B04호
(74) 대리인
특허법인 천지

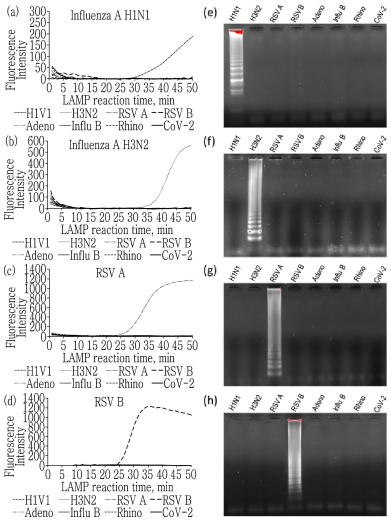
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **호흡기 바이러스 감염 진단을 위한 RT-qLAMP용 프라이머 세트 및 이를 포함하는 키트**

(57) 요 약

본 발명은 호흡기 바이러스 검출을 위한 역전사 정량 고리매개등온증폭용 프라이머 세트로서, 4 종 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하여, 교차반응성 없이 상기 바이러스에 대한 높은 특이성을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2521/107 (2013.01)
C12Q 2525/301 (2013.01)
C12Q 2527/101 (2019.08)
C12Q 2537/143 (2013.01)
C12Q 2600/16 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711154202
과제번호 2021R1A5A6002853
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터지원사업
연구과제명 결정기능화공정기술센터 후속지원
기 여 율 1/3
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2021.03.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465036858
과제번호 HI22C0426000022
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 의료현장 맞춤형 진단기술개발
연구과제명 다종 호흡기 바이러스 신속 및 고용량 (High-throughput) 진단을 위한 회전형 현장 분자진단 (Point-of-care molecular diagnostics) 시스템 개발
기 여 율 1/3
과제수행기관명 경희대학교산학협력단
연구기간 2022.04.01 ~ 2024.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415177485
과제번호 P0017363
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국산업기술진흥원
연구사업명 산업혁신인재성장지원
연구과제명 기능성 유무기 복합소재 실용화 전문인력 양성사업
기 여 율 1/3
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2021.03.01 ~ 2026.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

호흡기 바이러스 검출을 위한 역전사 정량 고리매개등온증폭(RT-qLAMP)용 프라이머 세트로서,

인플루엔자 바이러스 A형 H1N1의 HA 유전자 부위에 특이적인 서열번호 1 내지 4의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제1 프라이머 세트;

인플루엔자 바이러스 A형 H1N1의 HA 유전자 부위에 특이적인 서열번호 7 내지 10의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제2 프라이머 세트;

인플루엔자 바이러스 A형 H3N2의 HA 유전자 부위에 특이적인 서열번호 13 내지 16의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제3 프라이머 세트;

인플루엔자 바이러스 A형 H3N2의 NA 유전자 부위에 특이적인 서열번호 19 내지 22의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제4 프라이머 세트;

호흡기 세포 융합 바이러스(RSV; Respiratory Syncytial Virus) A형의 F 유전자 부위에 특이적인 서열번호 24 내지 27의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제5 프라이머 세트;

호흡기 세포 융합 바이러스 B형의 F 유전자 부위에 특이적인 서열번호 29 내지 32의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제6 프라이머 세트;

아데노 바이러스의 Penton base 유전자 부위에 특이적인 서열번호 34 내지 37의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제7 프라이머 세트;

인플루엔자 바이러스 B형의 NS1 유전자 부위에 특이적인 서열번호 40 내지 43의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제8 프라이머 세트;

SARS-CoV-2의 orf1ab 유전자 부위에 특이적인 서열번호 46 내지 49의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제9 프라이머 세트;

SARS-CoV-2의 S 유전자 부위에 특이적인 서열번호 52 내지 55의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제10 프라이머 세트;

리노 바이러스의 5'UTR 유전자 부위에 특이적인 서열번호 58 내지 61의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제11 프라이머 세트; 및

리노 바이러스의 5'UTR 유전자 부위에 특이적인 서열번호 62 내지 65의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제12 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 것인, 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1 프라이머 세트는,

서열번호 5 및 6 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 더 포함하는 것인, 프라이머 세트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제2 프라이머 세트는,

서열번호 11 및 12 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 더 포함하는 것인, 프라이머 세트.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제3 프라이머 세트는,

서열번호 17 및 18 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 더 포함하는 것인, 프라이머 세트.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제4 프라이머 세트는,

서열번호 23의 올리고뉴클레오티드를 더 포함하는 것인, 프라이머 세트.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제5 프라이머 세트는,

서열번호 28의 올리고뉴클레오티드를 더 포함하는 것인, 프라이머 세트.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 제6 프라이머 세트는,

서열번호 33의 올리고뉴클레오티드를 더 포함하는 것인, 프라이머 세트.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 제7 프라이머 세트는,

서열번호 38 및 39 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 더 포함하는 것인, 프라이머 세트.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 제8 프라이머 세트는,

서열번호 44 및 45 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 더 포함하는 것인, 프라이머 세트.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 제9 프라이머 세트는,

서열번호 50 및 51 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 더 포함하는 것인, 프라이머 세트.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 제10 프라이머 세트는,

서열번호 56 및 57 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 더 포함하는 것인, 프라이머 세트.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 프라이머 세트; 및

버퍼 용액, 형광 염료 및 효소를 포함하는 시약을 포함하는,

호흡기 바이러스 검출용 키트.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 프라이머 세트와 상기 시약을 1:2 내지 1:6의 부피 비율로 포함하는 것인, 호흡기 바이러스 검출용 키트.

청구항 14

호흡기 바이러스 감염 의심 환자로부터 분리된 시료와 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 프라이머 세트를 접촉시켜 역전사 정량 고리매개등온증폭 반응으로 표적서열을 증폭시켜 반응 산물을 형성하는 단계; 및

상기 반응 산물을 검출하는 단계를 포함하는 호흡기 바이러스 검출 방법.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 역전사 정량 고리매개등온증폭 반응은,

50 내지 70℃에서 5 내지 60 분 동안 수행하는 것인, 호흡기 바이러스 검출 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 호흡기 바이러스 감염 여부를 확인하기 위한 RT-qLAMP용 프라이머 세트 및 이를 포함하는 키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] SARS-CoV-2(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2) 감염에 의한 신종감염병 증후군의 일종인 COVID-19은 2019년에 처음 발생한 뒤, 불과 몇 개월 내에 다양한 접촉 경로를 통해 전세계로 확산되었으며, 여러 변이를 거치면서 확산세가 누그러지지 않고 있다.

[0003] 또한, 최근에는 SARS-CoV-2 뿐만 아니라 인플루엔자(Influenza), 호흡기 세포 융합 바이러스(RSV; Respiratory Syncytial Virus), 아데노 바이러스(ADV; Adenovirus), 리노 바이러스(Rhinovirus) 등 다양한 호흡기 바이러스가 주기적으로 발생 및 전파되고 있다. 많은 연구자들이 바이러스의 전파를 최소화하고, 감염 환자의 신속한 치료를 위해 보다 정확하고 신속한 바이러스의 검출 방법을 연구하고 있다.

[0004] SARS-CoV-2 등 호흡기 바이러스 검출에는 중합효소연쇄반응(PCR; Polymerase Chain Reaction) 기반의 실시간 정량 중합효소연쇄반응(RT-qPCR; Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction)이 가장 널리 사용되고 있다. 실시간 정량 중합효소연쇄반응은 중합효소연쇄반응을 실시간으로 모니터링 및 정량 분석이 가능하며 정확한 결과 값을 얻는 데에 유리하나, 상기 분석은 정교한 장치 및 시설을 필요로 하며 수 시간이 소요되는 한계가 있었다.

[0005] 고리매개등온증폭(LAMP; Loop-Mediated Isothermal Amplification) 반응은 일반적으로 4종 이상의 프라이머를 사용하여 표적 유전자의 6개 영역을 증폭하는 것이다. 고리매개등온증폭 반응에서 상기 프라이머는 증폭 반응 산물에 루프 구조를 형성하는데, 상기 루프는 단일 가닥으로서, 두 가닥으로의 변성이 요구되어 열 순환기를 사용하는 중합효소연쇄반응과는 달리 일정한 온도에서 수행될 수 있다. 또한, 고리매개등온증폭 반응은 중합효소연쇄반응 대비 시약 사용량이 적고, 핵산 추출 없이 임상 표본에 대한 반응이 가능하고, 열 순환기를 사용하지 않아 분석 시간이 단축되는 장점이 있다. 다만, 고리매개등온증폭 반응은 일반적으로 중합효소연쇄반응 대비 민감도(sensitivity)가 낮고 교차 반응성(cross-reactivity)이 높아 위양성(false-positive)이 발생하는 한계가 있었다.

[0006] 상기와 같은 한계는 특정한 유전자에 대해 교차 반응성이 낮은 복수 개의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 프라이머 세트를 설계하여 극복할 수 있다. 이에 따라, 연구자들은 호흡기 바이러스의 검출시 중합효소반응과 유사한 수준의 민감도 및 특이성을 달성할 수 있는 고리매개등온증폭 반응용 프라이머 세트를 설계하기 위해 많은

노력을 기울이고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 인플루엔자 바이러스, 호흡기 세포 융합 바이러스, 아데노 바이러스, SARS-CoV-2 및 리노 바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 호흡기 바이러스를 고리매개등온증폭 반응으로 검출하는 데에 사용하기 위한 프라이머 세트 및 이를 포함하는 호흡기 바이러스 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 상기 프라이머 세트를 이용하는 역전사 정량 고리매개등온증폭(RT-qLAMP; Reverse Transcription quantitative LAMP) 반응을 포함하는 호흡기 바이러스 검출 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 측면은 호흡기 바이러스 검출을 위한 역전사 정량 고리매개등온증폭용 프라이머 세트로서, 인플루엔자 바이러스 A형 H1N1의 HA 유전자 부위에 특이적인 서열번호 1 내지 4의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제1 프라이머 세트, 인플루엔자 바이러스 A형 H1N1의 HA 유전자 부위에 특이적인 서열번호 7 내지 10의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제2 프라이머 세트, 인플루엔자 바이러스 A형 H3N2의 HA 유전자 부위에 특이적인 서열번호 13 내지 16의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제3 프라이머 세트, 인플루엔자 바이러스 A형 H3N2의 NA 유전자 부위에 특이적인 서열번호 19 내지 22의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제4 프라이머 세트, 호흡기 세포 융합 바이러스 A형의 F 유전자 부위에 특이적인 서열번호 24 내지 27의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제5 프라이머 세트, 호흡기 세포 융합 바이러스 B형의 F 유전자 부위에 특이적인 서열번호 29 내지 32의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제6 프라이머 세트, 아데노 바이러스의 Penton base 유전자 부위에 특이적인 서열번호 34 내지 37의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제7 프라이머 세트, 인플루엔자 바이러스 B형의 NS1 유전자 부위에 특이적인 서열번호 40 내지 43의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제8 프라이머 세트, SARS-CoV-2의 orf1ab 유전자 부위에 특이적인 서열번호 46 내지 49의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제9 프라이머 세트, SARS-CoV-2의 S 유전자 부위에 특이적인 서열번호 52 내지 55의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제10 프라이머 세트, 리노 바이러스의 5'UTR 유전자 부위에 특이적인 서열번호 58 내지 61의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제11 프라이머 세트, 및 리노 바이러스의 5'UTR 유전자 부위에 특이적인 서열번호 62 내지 65의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제12 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 것이다.

[0010] 상기 제1 프라이머 세트는, 서열번호 5 및 6 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 더 포함할 수 있다.

[0011] 상기 제2 프라이머 세트는, 서열번호 11 및 12 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 더 포함할 수 있다.

[0012] 상기 제3 프라이머 세트는, 서열번호 17 및 18 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 더 포함할 수 있다.

[0013] 상기 제4 프라이머 세트는, 서열번호 23의 올리고뉴클레오티드를 더 포함할 수 있다.

[0014] 상기 제5 프라이머 세트는, 서열번호 28의 올리고뉴클레오티드를 더 포함할 수 있다.

[0015] 상기 제6 프라이머 세트는, 서열번호 33의 올리고뉴클레오티드를 더 포함할 수 있다.

[0016] 상기 제7 프라이머 세트는, 서열번호 38 및 39 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 더 포함할 수 있다.

[0017] 상기 제8 프라이머 세트는, 서열번호 44 및 45 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 더 포함할 수 있다.

[0018] 상기 제9 프라이머 세트는, 서열번호 50 및 51 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 더 포함할 수 있다.

[0019] 상기 제10 프라이머 세트는, 서열번호 56 및 57 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 더 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 다른 일 측면은 본 발명에 따른 프라이머 세트, 및 버퍼 용액, 형광 염료 및 효소를 포함하는 시약을

포함하는 호흡기 바이러스 검출용 키트에 관한 것이다.

[0021] 상기 호흡기 바이러스 검출용 키트는, 상기 프라이머 세트와 상기 시약을 1:3 내지 1:6의 부피 비율로 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명의 또 다른 일 측면은 호흡기 바이러스 감염 의심 환자로부터 분리된 시료와 본 발명에 따른 프라이머 세트를 접촉시켜 역전사 정량 고리매개등온증폭 반응으로 표적서열을 증폭시켜 반응 산물을 형성하는 단계, 및 상기 반응 산물을 검출하는 단계를 포함하는 호흡기 바이러스 검출 방법에 관한 것이다.

[0023] 상기 역전사 정량 고리매개등온증폭 반응은, 50 내지 70℃에서 5분 내지 60분 동안 수행할 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따른 프라이머 세트는 인플루엔자 바이러스 A형 H1N1과 H3N2, 호흡기 세포 융합 바이러스 A형과 B형, 아데노 바이러스, 인플루엔자 바이러스 B형, SARS-CoV-2 및 리노 바이러스로 이루어진 호흡기 바이러스에 대해 교차 반응성이 낮아 역전사 정량 고리매개등온증폭 반응을 통한 바이러스 검출시 높은 신뢰도를 나타낼 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명에 따른 호흡기 바이러스 검출용 키트는 호흡기 바이러스 감염 의심 환자로부터 분리된 시료로부터 핵산을 추출하여 상기 바이러스를 검출하거나, 핵산 추출 없이 등온 단일 단계로 상기 바이러스를 검출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 실시예 1에서 제조한 프라이머 세트를 이용하여 (a) 인플루엔자 바이러스 A형 H1N1에 대한 RT-qLAMP를 수행한 결과와 (e) 그 증폭 산물의 전기영동 결과이며, (b) 인플루엔자 바이러스 A형 H3N2에 대한 RT-qLAMP를 수행한 결과와 (f) 그 증폭 산물의 전기영동 결과이며, (c) 호흡기 세포 융합 바이러스 A형에 대한 RT-qLAMP를 수행한 결과와 (g) 그 증폭 산물의 전기영동 결과이며, (d) 호흡기 세포 융합 바이러스 B형에 대한 RT-qLAMP를 수행한 결과와 (h) 그 증폭 산물의 전기영동 결과이다.

도 2는 실시예 1에서 제조한 프라이머 세트를 이용하여 (a) 아데노 바이러스에 대한 RT-qLAMP를 수행한 결과와 (e) 그 증폭 산물의 전기영동 결과이며, (b) 인플루엔자 바이러스 B형에 대한 RT-qLAMP를 수행한 결과와 (f) 그 증폭 산물의 전기영동 결과이며, (c) 리노 바이러스에 대한 RT-qLAMP를 수행한 결과와 (g) 그 증폭 산물의 전기영동 결과이며, (d) SARS-CoV-2에 대한 RT-qLAMP를 수행한 결과와 (h) 그 증폭 산물의 전기영동 결과이다.

도 3은 실시예 2에서 H1N1 양성 시료에 대한 (a) RT-qPCR 분석 결과와 (b) RT-qLAMP 분석 결과이다.

도 4는 실시예 2에서 H3N2 양성 시료에 대한 (a) RT-qPCR 분석 결과와 (b) RT-qLAMP 분석 결과이다.

도 5는 실시예 2에서 RSV A 양성 시료에 대한 (a) RT-qPCR 분석 결과와 (b) RT-qLAMP 분석 결과이다.

도 6은 실시예 2에서 RSV B 양성 시료에 대한 (a) RT-qPCR 분석 결과와 (b) RT-qLAMP 분석 결과이다.

도 7은 실시예 2에서 ADV 양성 시료에 대한 (a) RT-qPCR 분석 결과와 (b) RT-qLAMP 분석 결과이다.

도 8은 실시예 2에서 Influ B 양성 시료에 대한 (a) RT-qPCR 분석 결과와 (b) RT-qLAMP 분석 결과이다.

도 9는 실시예 2에서 SARS-CoV-2 양성 시료에 대한 RT-qLAMP 분석 결과이다.

도 10은 실시예 2에서 음성 시료에 대한 (a) RT-qPCR 분석 결과와 (b) RT-qLAMP 분석 결과이다.

도 11은 실시예 2에서 음성 시료에 대한 (a) RT-qPCR 분석 결과와 (b) RT-qLAMP 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 각 구성을 보다 상세히 설명하나, 이는 하나의 예시에 불과할 뿐, 본 발명의 권리범위가 다음 내용에 의해 제한되지 아니한다.

[0028] 본 명세서에 사용된 "포함한다"는 용어는 본 발명에 유용한 재료, 조성물, 장치, 및 방법들을 나열할 때 사용되며 그 나열된 예에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 명세서에 사용된 "고리매개등온증폭"은 등온 조건에서 수행 가능한 증폭 방법으로서, 특정한 바이러스의 유전자 부위에 대해 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드인 프라이머를 4종(F3, B3, FIP, BIP) 이상 사용하여 단일 가닥에 고리(loop)를 형성하는 단계를 포함하는 것을 의미한다. 바람직하게는, 고리매개등온증폭은 역전사 정량 고리매개등온증폭(RT-qLAMP)을 의미할 수 있다.

[0030] 상기 4종의 프라이머는 정방향 외부 프라이머(F3; Forward outer primer), 역방향 외부 프라이머(B3; Backward outer primer), 정방향 내부 프라이머(FIP; Forward Inner Primer) 및 역방향 내부 프라이머(BIP; Backward Inner Primer)로 이루어질 수 있으며, 하나의 프라이머 세트를 구성할 수 있다. 외부 프라이머는 DNA의 이중 가닥을 풀어줄 수 있으며, 내부 프라이머는 단일 가닥에 고리를 형성할 수 있다. 프라이머 세트는 외부 프라이머와 내부 프라이머를 1:7 내지 1:9의 몰 비율로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 1:8의 몰 비율로 포함할 수 있다.

[0031] 프라이머 세트는 추가적으로 1종 이상의 고리 프라이머를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 프라이머 세트는 정방향 고리 프라이머(LF; Forward Loop primer)와 역방향 고리 프라이머(LB; Backward Loop primer) 중 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 고리 프라이머는 내부 프라이머가 결합되지 않은 염기서열에 결합하여 고리매개등온증폭 반응을 가속시킬 수 있다. 프라이머 세트는 외부 프라이머와 고리 프라이머를 1:2 내지 1:4의 몰 비율로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 1:3의 몰 비율로 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명은 호흡기 바이러스 검출을 위한 역전사 정량 고리매개등온증폭용 프라이머 세트로서, 인플루엔자 바이러스 A형 H1N1의 HA 유전자 부위에 특이적인 서열번호 1 내지 4의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제1 프라이머 세트, 인플루엔자 바이러스 A형 H1N1의 HA 유전자 부위에 특이적인 서열번호 7 내지 10의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제2 프라이머 세트, 인플루엔자 바이러스 A형 H3N2의 HA 유전자 부위에 특이적인 서열번호 13 내지 16의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제3 프라이머 세트, 인플루엔자 바이러스 A형 H3N2의 NA 유전자 부위에 특이적인 서열번호 19 내지 22의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제4 프라이머 세트, 호흡기 세포 융합 바이러스 A형의 F 유전자 부위에 특이적인 서열번호 24 내지 27의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제5 프라이머 세트, 호흡기 세포 융합 바이러스 B형의 F 유전자 부위에 특이적인 서열번호 29 내지 32의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제6 프라이머 세트, 아데노 바이러스의 Penton base 유전자 부위에 특이적인 서열번호 34 내지 37의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제7 프라이머 세트, 인플루엔자 바이러스 B형의 NS1 유전자 부위에 특이적인 서열번호 40 내지 43의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제8 프라이머 세트, SARS-CoV-2의 orf1ab 유전자 부위에 특이적인 서열번호 46 내지 49의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제9 프라이머 세트, SARS-CoV-2의 S 유전자 부위에 특이적인 서열번호 52 내지 55의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제10 프라이머 세트, 리노 바이러스의 5'UTR 유전자 부위에 특이적인 서열번호 58 내지 61의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제11 프라이머 세트, 및 리노 바이러스의 5'UTR 유전자 부위에 특이적인 서열번호 62 내지 65의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 제12 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 것을 제공한다.

[0033] 상기 역전사 정량 고리매개등온증폭 프라이머 세트는 단일 바이러스에 대한 하나 이상의 프라이머 세트를 포함할 수 있다. 예를 들어, 인플루엔자 바이러스는 돌연변이율이 높기 때문에, 하나의 유전자에 대해 두 개 이상의 프라이머 세트를 사용하거나, 하나의 바이러스에 대한 복수 개의 유전자 각각에 대한 프라이머 세트를 사용할 수 있다.

[0034] 상기 역전사 정량 고리매개등온증폭 프라이머 세트는 둘 이상의 바이러스에 대해 각각 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는 멀티플렉스 프라이머 세트일 수 있다. 멀티플렉스 프라이머 세트를 포함하는 호흡기 바이러스 검출용 키트는 단일 키트에서 다중 핵산 검출이 가능하다. 멀티플렉스 프라이머 세트에서는 프라이머 세트 간의 간섭이나 억제가 발생하지 않는 프라이머 세트의 선정이 중요하다. 본 발명에서는 단일 증폭 반응에서 사용 가능한 것으로 미리 정해진 온도 범위 내에서 사용되는 모든 프라이머 세트의 특이적 결합이 가능한 염기서열을 선정하였다.

[0035] 상기 역전사 정량 고리매개등온증폭 프라이머 세트는 F3, B3, FIP 및 BIP인 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함하는 프라이머 세트를 포함할 수 있다. 상기 프라이머 세트는 LF 및 LB 중 적어도 하나의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 더 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 프라이머는 15개 이상의 연속 뉴클레오티드 절편을 포함할 수 있다.

[0036] 상기 제1 프라이머 세트는 인플루엔자 바이러스 A형 H1N1의 HA 유전자 부위에 특이적인 서열번호 1 내지 4의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함할 수 있다. 서열번호 1 내지 4의 프라이머는 순서대로 F3, B3, FIP 및 BIP이다. 상기 제1 프라이머 세트는 서열번호 5 및 6 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 더 포함

할 수 있다. 서열번호 5 및 6의 프라이머는 순서대로 LF 및 LB이다.

[0037] 상기 제2 프라이머 세트는 인플루엔자 바이러스 A형 H1N1의 HA 유전자 부위에 특이적인 서열번호 7 내지 10의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함할 수 있다. 서열번호 7 내지 10의 프라이머는 순서대로 F3, B3, FIP 및 BIP이다. 상기 제2 프라이머 세트는 서열번호 11 및 12 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 더 포함할 수 있다. 서열번호 11 및 12의 프라이머는 순서대로 LF 및 LB이다.

[0038] 서열번호 1 내지 12의 올리고뉴클레오티드 프라이머의 염기 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0039]

제1 프라이머 세트		인플루엔자 바이러스 A형 H1N1 HA 유전자
서열번호	프라이머 종류	염기 서열
1	F3	AAGCTCAGCAAATCCTACA
2	B3	TCCCTCACTTTGGGTCTT
3	FIP	GACTTTGTTGGTCAGCAGTAGTAGATTAAAGGGAAAGAAGTTCTCG
4	BIP	ATCAGAATGCAGATGCATATGTTTTGCTATTTCCGGCTTGAACT
5	LF	CGATACCCCGTAAGTGGTAG
6	LB	TTGTGGGGACATCAAGATACAGC
제2 프라이머 세트		인플루엔자 바이러스 A형 H1N1 HA 유전자
서열번호	프라이머 종류	염기 서열
7	F3	AGGAGCTAAGAGAGCAATT
8	B3	TTTCCCTTTATCATTAATGTAGGATT
9	FIP	CACCTTTGTTCGAGTCATGATTACTCAGTGTCATCATTTGAAAGGTTT
10	BIP	TAACGGCAGCATGTCCTCAGTATGAATTTCCTTTTTTAACTAGCCA
11	LF	CCATGAACTTGTCTTGGGGAATA
12	LB	GCTGGAGCAAAAAGCTTCTACA

[0041] 상기 제3 프라이머 세트는 인플루엔자 바이러스 A형 H3N2의 HA 유전자 부위에 특이적인 서열번호 13 내지 16의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함할 수 있다. 서열번호 13 내지 16의 프라이머는 순서대로 F3, B3, FIP 및 BIP이다. 상기 제3 프라이머 세트는 서열번호 17 및 18 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 더 포함할 수 있다. 서열번호 17 및 18의 프라이머는 순서대로 LF 및 LB이다.

[0042] 상기 제4 프라이머 세트는 인플루엔자 바이러스 A형 H3N2의 NA 유전자 부위에 특이적인 서열번호 19 내지 22의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함할 수 있다. 서열번호 19 내지 22의 프라이머는 순서대로 F3, B3, FIP 및 BIP이다. 상기 제3 프라이머 세트는 서열번호 23의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 더 포함할 수 있다. 서열번호 23의 프라이머는 LB이다.

[0043] 서열번호 13 내지 23의 올리고뉴클레오티드 프라이머의 염기 서열은 하기 표 2와 같다.

표 2

[0044]

제3 프라이머 세트		인플루엔자 바이러스 A형 H3N2 HA 유전자
서열번호	프라이머 종류	염기 서열
13	F3	TGAGCTACATTCTATGTCTGG
14	B3	GTGAGGACTGTCGCATAT
15	FIP	CGTTTGGTACTGCATGGTGCTTTTCGCTCAAAAAATTCCTGG
16	BIP	AGTGAAAACAATCACAAATGACCGCACCTATTGAGGAATTCTGAAC
17	LF	AGCGTCGCCGTGCTATTGT
18	LB	TGAAGTTACTAATGCTACTGAGTTGG
제4 프라이머 세트		인플루엔자 바이러스 A형 H3N2 NA 유전자
서열번호	프라이머 종류	염기 서열
19	F3	CAAGAGAACCTTATGTGTCATG
20	B3	AACTTGAGCTGGACCATG
21	FIP	ACTGTGTTATTTGAATGCACGTTGTCAAGTGTTATCAATTTGCCCT
22	BIP	CGTGATAGGACCCCTTATCGGACTATGCACACTTGCTTGG
23	LB	ATTGATGAATGAGTTGGGTGTTCCT

[0046] 상기 제5 프라이머 세트는 호흡기 세포 융합 바이러스 A형의 F 유전자 부위에 특이적인 서열번호 24 내지 27의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함할 수 있다. 서열번호 24 내지 27의 프라이머는 순서대로 F3, B3, FIP 및 BIP이다. 상기 제5 프라이머 세트는 서열번호 28의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 더 포함할 수 있다. 서열번호 28의 프라이머는 LF이다.

[0047] 상기 제6 프라이머 세트는 호흡기 세포 융합 바이러스 B형의 F 유전자 부위에 특이적인 서열번호 29 내지 32의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함할 수 있다. 서열번호 29 내지 32의 프라이머는 순서대로 F3, B3, FIP 및 BIP이다. 상기 제6 프라이머 세트는 서열번호 33의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 더 포함할 수 있다. 서열번호 33의 프라이머는 LF이다.

[0048] 서열번호 24 내지 33의 올리고뉴클레오티드 프라이머의 염기 서열은 하기 표 3과 같다.

표 3

[0049]

제5 프라이머 세트		호흡기 세포 융합 바이러스 A형 F 유전자
서열번호	프라이머 종류	염기 서열
24	F3	GATCTGCAATCGCCAGTG
25	B3	TCTATCACAGTTTCAATGTTTGA
26	FIP	TGTGGATAGTAGAGCACTTTTGATTGCATTGCCGTATCCAAGG
27	BIP	CTAATGGAGTCAGTGTCTTAACCAGGCTTGTTAACAATAGGTAACAACT
28	LF	GTTCACTTCCCCTTCTAGGTGTA
제6 프라이머 세트		호흡기 세포 융합 바이러스 B형 F 유전자
서열번호	프라이머 종류	염기 서열
29	F3	CACCAGCTGTCAACAACC
30	B3	GCATTTTTGATCTTGTTCACTT
31	FIP	TCGTTTCCTCTTCTTGCTTATTGATCAGAAGAGAAGCACCACA
32	BIP	ATTTCTGGGCTTCTTGTTAGGTGCTCCTTCAAGGTGTAGAACTT
33	LF	TCTGCAATAGCAAGTGGTATAGCT

[0051] 상기 제7 프라이머 세트는 아데노 바이러스의 Penton base 유전자 부위에 특이적인 서열번호 34 내지 37의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함할 수 있다. 서열번호 34 내지 37의 프라이머는 순서대로 F3, B3, FIP 및 BIP이다. 상기 제7 프라이머 세트는 서열번호 38 및 39 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 더 포함할 수 있다. 서열번호 38 및 39의 프라이머는 순서대로 LF 및 LB이다.

[0052] 상기 제8 프라이머 세트는 인플루엔자 바이러스 B형의 NS1 유전자 부위에 특이적인 서열번호 40 내지 43의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함할 수 있다. 서열번호 40 내지 43의 프라이머는 순서대로 F3, B3, FIP 및 BIP이다. 상기 제8 프라이머 세트는 서열번호 44 및 45 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 더 포함할 수 있다. 서열번호 44 및 45의 프라이머는 순서대로 LF 및 LB이다.

[0053] 서열번호 34 내지 45의 올리고뉴클레오티드 프라이머의 염기 서열은 하기 표 4와 같다.

표 4

[0054]

제7 프라이머 세트		아데노 바이러스 Penton base 유전자
서열번호	프라이머 종류	염기 서열
34	F3	CTGCTCTCACAGATCACGG
35	B3	CCCCGCCAAACATCTTGC
36	FIP	AACGTAGGGGCAGGTGCGGCAGCATCGGAGGAGTCCA
37	BIP	CGTCCTATCGAGCCGCACTTTCCCCAGCCTGTGTTATTGC
38	LF	CGTCAGTAATGGTCACTCGC
39	LB	AACATGTCCATCCTTATATCGCC
제8 프라이머 세트		인플루엔자 바이러스 B형 NS1 유전자
서열번호	프라이머 종류	염기 서열

40	F3	GGACATGAACAACAAAGATGC
41	B3	GGCAACAAGTTTAGCAACAA
42	FIP	GGACAATACATTACGCATATCCCTTGATAAAGGAGGAAGTAAACACTCA
43	BIP	GGAACATTCCTCAAACACCCCAGCCTTCCACTCTGGTCAT
44	LF	GTCAAACGGAACTTCCCTTCTTTC
45	LB	GATACAAGTCCTTATCAACTCTGCA

[0056] 상기 제9 프라이머 세트는 SARS-CoV-2의 orf1ab 유전자 부위에 특이적인 서열번호 46 내지 49의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함할 수 있다. 서열번호 46 내지 49의 프라이머는 순서대로 F3, B3, FIP 및 BIP이다. 상기 제9 프라이머 세트는 서열번호 50 및 51 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 더 포함할 수 있다. 서열번호 50 및 51의 프라이머는 순서대로 LF 및 LB이다.

[0057] 상기 제10 프라이머 세트는 SARS-CoV-2의 S 유전자 부위에 특이적인 서열번호 52 내지 55의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함할 수 있다. 서열번호 52 내지 55의 프라이머는 순서대로 F3, B3, FIP 및 BIP이다. 상기 제10 프라이머 세트는 서열번호 56 및 57 중 적어도 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 더 포함할 수 있다. 서열번호 56 및 57의 프라이머는 순서대로 LF 및 LB이다.

[0058] 서열번호 46 내지 57의 올리고뉴클레오티드 프라이머의 염기 서열은 하기 표 5와 같다.

표 5

[0059]

제9 프라이머 세트		SARS-CoV-2 orf1ab 유전자
서열번호	프라이머 종류	염기 서열
46	F3	TGCAACTAATAAAGCCACG
47	B3	CGTCTTTCTGTATGGTAGGATT
48	FIP	TCTGACTTCAGTACATCAAACGAATAAATACCTGGTGTATACGTTGTC
49	BIP	GACGCGCAGGGAATGGATAATTCCACTACTTCTTCAGAGACT
50	LF	TGTTTCAACTGGTTTTGTGCTCCA
51	LB	TCTTGCCTGCGAAGATCTAAAAC
제10 프라이머 세트		SARS-CoV-2 S 유전자
서열번호	프라이머 종류	염기 서열
52	F3	CTGACAAAGTTTTCAGATCCTCAG
53	B3	AGTACCAAAAATCCAGCCTCTT
54	FIP	TCCCAGAGACATGTATAGCATGGAATCAACTCAGGACTTGTTCTTACC
55	BIP	TGGTACTAAGAGGTTTGATAACCCTGTTAGACTTCTCAGTGGAAGCA
56	LF	CCAAGTAACATTGGAAAAGAAA
57	LB	GTCCTACCATTTAATGATGGTGTTT

[0061] 상기 제11 프라이머 세트는 리노 바이러스의 5'UTR 유전자 부위에 특이적인 서열번호 58 내지 61의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함할 수 있다. 서열번호 58 내지 61의 프라이머는 순서대로 F3, B3, FIP 및 BIP이다.

[0062] 상기 제12 프라이머 세트는 리노 바이러스의 5'UTR 유전자 부위에 특이적인 서열번호 62 내지 65의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함할 수 있다. 서열번호 62 내지 65의 프라이머는 순서대로 F3, B3, FIP 및 BIP이다.

[0063] 서열번호 58 내지 65의 올리고뉴클레오티드 프라이머의 염기 서열은 하기 표 6과 같다.

표 6

[0064]

제11 프라이머 세트		리노 바이러스 5'UTR 유전자
서열번호	프라이머 종류	염기 서열
58	F3	AGCCTGCGTGGCTGCC
59	B3	GAAACACGGACACCCAAA
60	FIP	CATTCAGGGGCCGGAGGAGACAAGGTGTGAAGAGCC
61	BIP	GGCTAATCCAACCCTGCAGCGTAGTCGGTTCCGTCCC

제12 프라이머 세트		리노 바이러스 5'UTR 유전자
서열번호	프라이머 종류	염기 서열
62	F3	CCAGCCTGCGTGGCTGCC
63	B3	CCAGCCTGCGTGGCTGCC
64	FIP	CATTCAGGGGCCGGAGGAGACAAGGTGTGAAGAGCC
65	BIP	GGCTAACCTTAAMCCTGGAGCGTAGTCGGTCCCATCCC

[0066] 본 발명은 상기와 같은 역전사 정량 고리매개등온증폭용 프라이머 세트, 및 버퍼 용액, 형광 염료 및 효소를 포함하는 시약을 포함하는 호흡기 바이러스 검출용 키트를 제공한다. 상기 역전사 정량 고리매개등온증폭용 프라이머 세트는 제1 내지 제12 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 프라이머 세트를 포함할 수 있다.

[0067] 상기 버퍼 용액은 tris-HCl, DNA 중합효소, 염화마그네슘, 염화칼륨, 계면활성제 및 디옥시뉴클레오티드를 포함하는 2X Mastermix 버퍼 (Eiken Chemical Co., Ltd.) 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0068] 상기 형광 염료는 SYBR Green I, TaqMan Probe, 페놀 레드, 칼세인, 히드록시나프톨 블루일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 상기 형광 염료는 SYBR Green I과 같은 인터칼레이팅 다이(intercalating dye) 또는 TaqMan Probe와 같은 분자 비콘(molecular beacon)일 수 있다. 인터칼레이팅 다이는 고리매개등온증폭이 수행되어 DNA의 이중 나선이 형성되면 상기 이중 나선 사이에 삽입되어 형광 시그널을 나타낼 수 있다. 분자 비콘은 형광체(fluorophore)와 소광체(quencher)가 붙어있다가, 고리매개등온증폭이 수행됨에 따라 상기 소광체가 상기 형광체로부터 떨어지거나 멀어지면서 상기 형광체가 형광 시그널을 나타낼 수 있다.

[0069] 상기 효소는 역전사 효소, Bst DNA 중합효소 등 DNA 중합효소를 포함하는 효소의 혼합물일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0070] 상기 키트는 상기 프라이머 세트와 상기 시약을 1:2 내지 1:6의 부피 비율로 포함하여, 상기 범위 내에서 최적의 반응 조건을 제공할 수 있다.

[0071] 상기 키트는 상기 프라이머 세트와 상기 시약을 반응시키기 위한 반응 튜브를 포함할 수 있다. 호흡기 바이러스 감염 의심 환자로부터 시료를 분리한 후, 핵산의 추출 또는 핵산의 추출 없이 상기 프라이머 세트 및 상기 시약과 함께 상기 반응 튜브에서 혼합하여 역전사 정량 고리매개등온증폭 반응을 바로 수행할 수 있다.

[0072] 상기 키트는 고리매개등온증폭 반응을 위한 사용 설명서를 더 포함할 수 있다. 상기 사용 설명서는 호흡기 바이러스 감염 의심 환자로부터 시료 채취 방법, 상기 시료와 프라이머 세트 및 시약의 혼합 방법, 고래매개등온증폭 반응 조건 등을 기재하는 팜플렛, 안내 책자, 키트에 부착되는 라벨, 키트 또는 상기 키트를 포함하는 포장재 표면의 인쇄 또는 각인일 수 있다.

[0073] 본 발명에 따른 호흡기 바이러스 검출 방법은, 호흡기 바이러스 감염 의심 환자로부터 분리된 시료와 프라이머 세트를 접촉시켜 역전사 정량 고리매개등온증폭 반응으로 표적서열을 증폭시켜 반응 산물을 형성하는 단계, 및 상기 반응 산물을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0074] 상기 시료는 호흡기 바이러스 감염 의심 환자로부터 비인두 면봉 검사법을 통해 채취한 것 또는 상기 환자로부터 분리한 혈액일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0075] 상기 표적서열은 상기 프라이머 세트와 특이적으로 결합할 수 있는 서열로서 호흡기 바이러스 유전자에 포함된 것일 수 있다.

[0076] 상기 역전사 정량 고리매개등온증폭 반응은 50 내지 70℃에서 5 내지 60 분 동안 수행되는 것일 수 있다. 상기 역전사 정량 고리매개등온증폭 반응은 증폭에 따라 나타나는 형광 염료의 형광 시그널 세기를 실시간으로 관측하여, 타겟 유전자의 증폭 및 바이러스 진단을 수행할 수 있다.

[0078] 이하에서는, 구체적인 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0079] **실시예 1. 역전사 정량 고리매개등온증폭용 프라이머 세트 설계**

[0080] 프라이머 세트의 준비

[0081] NCBI 데이터베이스에서 호흡기 바이러스 8종의 유전자 정보를 확인하고, Primer Explorer V5(Eiken Chemical Co., Ltd.) 소프트웨어를 이용하여 F3, B3, FIP 및 BIP를 포함하는 프라이머 세트를 설계한 뒤, NetPrimer(Premier Biosoft)를 이용하여 호환성을 확인하였다. 가능한 경우, 반응을 가속화할 수 있는 LF 또는 LB 프라이머를 더 포함하는 프라이머 세트를 설계하였다.

[0082] 상기 표 1 내지 6과 같이 설계된 프라이머 세트를 합성하였으며, 외부 프라이머 0.2 μM, 내부 프라이머 1.6 μM의 농도로 준비하고, 고리 프라이머를 더 포함하는 경우 고리 프라이머는 0.6 μM의 농도로 포함하도록 준비하였다.

[0083] 프라이머 세트의 특이성 확인

[0084] 총 10가지 바이러스 샘플을 준비하여, 프라이머 세트를 사용한 RT-qLAMP를 수행하여, 표적에 대한 특이성을 확인하였다. 한국병원성바이러스은행으로부터, Influ A 바이러스 H1N1(KBPV-KR-76), H3N2(KBPV-VR-71), RSV A(KBPV-VR-73), RSV B(KBPV-VR-42), ADV(KBPV-VR-58), Influ B 바이러스(KBPV-VR-72), 엔테로바이러스(KBPV-VR-58), 메타뉴모바이러스(HMPV; KBPV-VR-87) 및 리노 바이러스(KBPV VR-39)를 구매하였으며, Koram Biotech Corp로부터 열 비활성화된 SARS-CoV-2(ATCC VR-1986)를 구매하여 사용하였다.

[0085] 도 1 및 2의 (a) 내지 (d)는 각 표적에 대한 특이성을 RT-qLAMP 반응 시간에 대한 형광도로 나타낸 것이고, (e) 내지 (h)는 각각 (a) 내지 (d)에 다른 반응 후 표적 서열에 대한 겔 전기영동 관찰 결과이다. 도 1 및 2의 (a) 내지 (d)에서 가로축은 RT-qLAMP 반응 시간(분)이며, 세로축은 형광 시그널의 강도(a.u.)이다. 제1과 제2; 제3과 제4; 제5; 제6; 제7; 제8; 제9와 제10; 그리고 제11 과 제12 프라이머 세트는 각각 H1N1; H3N2; RSV A; RSV B; ADV; Influenza B; SARS-CoV-2; 그리고 리노 바이러스에 대한 특이성을 나타내는 것으로 확인되었다.

[0086] **실시예 2. 호흡기 바이러스 검출능 분석**

[0087] 시료의 준비

[0088] 호흡기 감염 증상이 있는 환자에게서 비인두 면봉 검사법을 통해 비인두 면봉 시료를 수집하였으며, RT-qPCR로 바이러스 병원체에 대한 1차 스크리닝을 수행하였다. SEEPREP32™(Seegene Inc.)를 사용하여 시료에서 RNA를 추출하였으며, 남은 시료는 고리매개등온증폭 반응 전까지 -80℃에서 동결하여 보관하였다. 1차 스크리닝에 따라 양성 185개(인플루엔자 바이러스 A형 H1N1 27개, 인플루엔자 바이러스 A형 H3N2 14개, 호흡기 세포 융합 바이러스 A형 29개, 호흡기 세포 융합 바이러스 B형 4개, 아데노 바이러스 97개, 인플루엔자 바이러스 B형 4개, SARS-CoV-2 10개), 음성 130개 총 315개의 시료를 선정하였다.

[0089] RT-qLAMP 분석

[0090] 2X Mastermix 버퍼(Eiken Chemical Co., Ltd.) 4.4 ㎕, Enzyme mix(Eiken Chemical Co., Ltd.) 0.2 ㎕, 1X SYBR Green I(ThermoFisher Scientific, USA) 0.4 ㎕, 물 1.0 ㎕를 혼합하여 시약을 준비하고, 반응 튜브에 주입한 뒤, 서열번호 1 내지 6의 프라이머를 포함하는 제1 프라이머 세트 2.4 ㎕를 주입한다. 그리고 준비된 양성 또는 음성 시료 1.6 ㎕를 반응 튜브에 추가하여 총 10 ㎕의 개별 반응을 준비하였다. 그 후 CFX Connect Detection System(Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 사용하여 64 ℃에서 60 분 동안 테스트를 수행하였다.

[0091] 같은 방법으로, 제2 내지 제12 프라이머 세트에 대한 테스트를 수행하였다.

[0092] RT-qLAMP 및 RT-qPCR의 비교 분석

[0093] RT-qLAMP 분석과의 비교를 위한 비교군으로 상기 시료를 이용하여 RT-qPCR을 수행하였다(Allplex™, Seegene, Inc.).

[0094] 1차 스크리닝을 통해 호흡기 바이러스에 감염된 것으로 확인된 환자로부터 분리된 양성 시료를 RT-qPCR 및 실시예에 따른 프라이머 세트 및 시약을 이용한 RT-qLAMP로 분석하여 도 3 내지 9에 나타내었다. 도 3 내지 9에서 가로축은 RT-qPCR 또는 RT-qLAMP의 반응 시간(분)이며, 세로축은 형광 시그널의 강도(a.u.)이다.

[0095] 도 3은 인플루엔자 바이러스 A형 H1N1에 감염된 것으로 확인된 환자로부터 분리된 시료 중 어느 하나의 (a) RT-qPCR 및 (b) RT-qLAMP 분석 결과이다. 도 4는 인플루엔자 바이러스 A형 H3N2에 감염된 것으로 확인된 환자로부터 분리된 시료 중 어느 하나의 (a) RT-qPCR 및 (b) RT-qLAMP 분석 결과이다. 도 5는 호흡기 세포 융합 바이러스 A형(RSV A)에 감염된 것으로 확인된 환자로부터 분리된 시료 중 어느 하나의 (a) RT-qPCR 및 (b) RT-qLAMP

분석 결과이다. 도 6은 호흡기 세포 융합 바이러스 B형(RSV B)에 감염된 것으로 확인된 환자로부터 분리된 시료 중 어느 하나의 (a) RT-qPCR 및 (b) RT-qLAMP 분석 결과이다. 도 7은 아데노 바이러스(ADV)에 감염된 것으로 확인된 환자로부터 분리된 시료 중 어느 하나의 (a) RT-qPCR 및 (b) RT-qLAMP 분석 결과이다. 도 8은 인플루엔자 바이러스 B형(Influ B)에 감염된 것으로 확인된 환자로부터 분리된 시료 중 어느 하나의 (a) RT-qPCR 및 (b) RT-qLAMP 분석 결과이다. 도 9는 SARS-CoV-2에 감염된 것으로 확인된 환자로부터 분리된 시료 중 어느 하나의 RT-qLAMP 분석 결과이다. 도 3 내지 8의 (a)에서 NC는 음성 대조군, PC는 양성 대조군이다.

[0096] 도 3 내지 9 모두 사용된 양성 시료의 바이러스가 특이적으로 검출되는 것으로 나타났다. 도 3 내지 9에서와 같이, RT-qLAMP 분석 결과는 RT-qPCR 결과에 부합하는 것으로 나타났다.

[0097] 1차 스크리닝을 통해 호흡기 바이러스에 감염되지 않은 것으로 확인된 환자로부터 분리된 음성 시료를 RT-qPCR 및 실시예에 따른 프라이머 세트 및 시약을 이용한 RT-qLAMP로 분석하여 도 10 및 11에 나타내었다.

[0098] 도 10 및 11은 각각 음성 시료 중 어느 하나의 (a) RT-qPCR 및 (b) RT-qLAMP 분석 결과이다. 도 10 및 11에서와 같이, RT-qLAMP 분석 결과는 RT-qPCR 결과에 부합하는 것으로 나타났다.

[0099] 양성 및 음성 시료 전체에 대한 RT-qPCR 및 RT-qLAMP 결과는 하기 표 7에 나타내었다. 양성은 +, 음성은 -로 기재하였으며, 증폭 시간의 중간값은 시간 경과에 따라 증폭되는 시료 숫자를 기준으로 확인하였으며, 특이도는 실시예 2와 같이 환자샘플을 사용하여 분석하였다.

표 7

[0101]

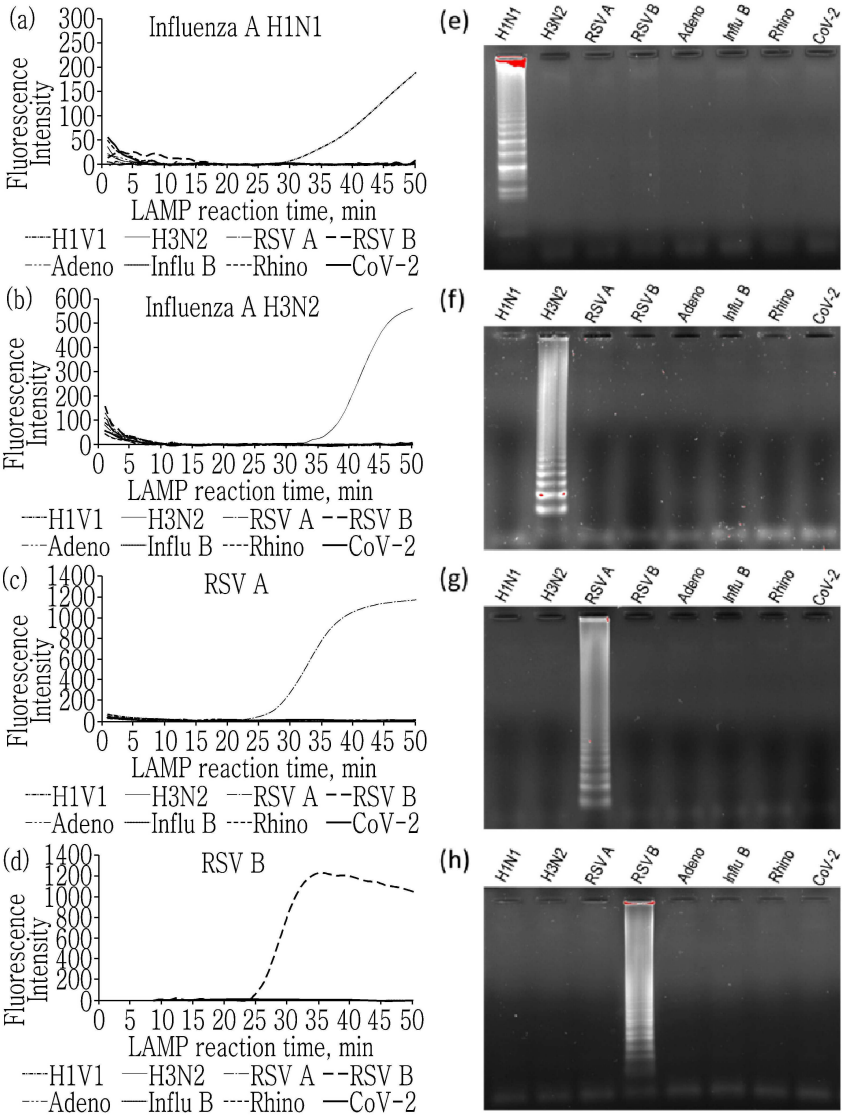
바이러스 종류	RT-qPCR	RT-qLAMP			민감도 (%)	특이도 (%)
		+ 양성샘플	_ 음성샘플	증폭 시간 중간값		
H1N1	+	25	2	23 min 21 sec	92.6	100
	-	0	289			
H3N2	+	14	0	24 min 41 sec	100	100
	-	0	301			
RSV A	+	26	3	37 min 47 sec	89.7	100
	-	0	286			
RSV B	+	3	1	19 min 79 sec	75	100
	-	0	311			
ADV	+	96	1	16 min 50 sec	99.0	100
	-	0	218			
Influ B	+	3	1	25 min 25 sec	75	100
	-	0	311			
SARS-CoV-2	+	9	1	24 min 55 sec	90	100
	-	0	305			
합계	+	176	9	22 min 34 sec	95.1	100

[0103] 표 7을 참조하면, 본 발명 실시예에 따른 프라이머 세트를 사용하여 RT-qLAMP 분석시, RT-qPCR과 유사한 수준의 민감도 및 100%의 특이도를 나타내는 것으로 확인하였다. 두 가지 방법의 일치율은 97.1%로 나타났고, RT-qLAMP 분석시 증폭 시간의 중간 값은 22분 34초로 나타난 데에 비해, RT-qPCR은 핵산 추출 및 최종 결과를 얻는 데까지 총 3 내지 6시간이 소요되었다. RT-qLAMP 분석시 소요된 최대 시간(RSV A에 대해 대략 47분)을 고려하더라도, 실시예에 따른 프라이머 세트 사용시 미지의 표본에 대한 분석이 60분, 바람직하게는 50분 내에 완료될 수 있다.

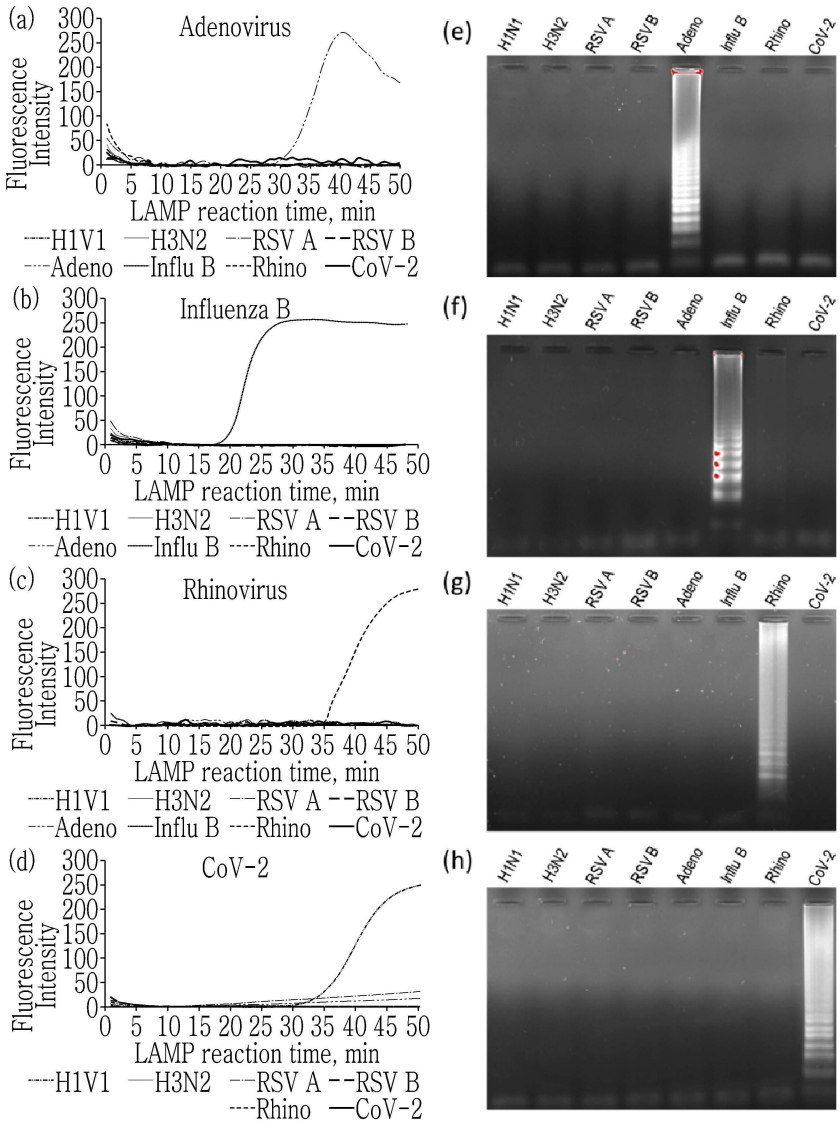
[0104] 실시예에 따른 프라이머 세트는 교차 반응성이 확인되지 않았으며, LAMP 호흡기 바이러스의 용이한 검출을 위한 현장 진단 테스트에 적용할 수 있음을 확인하였다.

도면

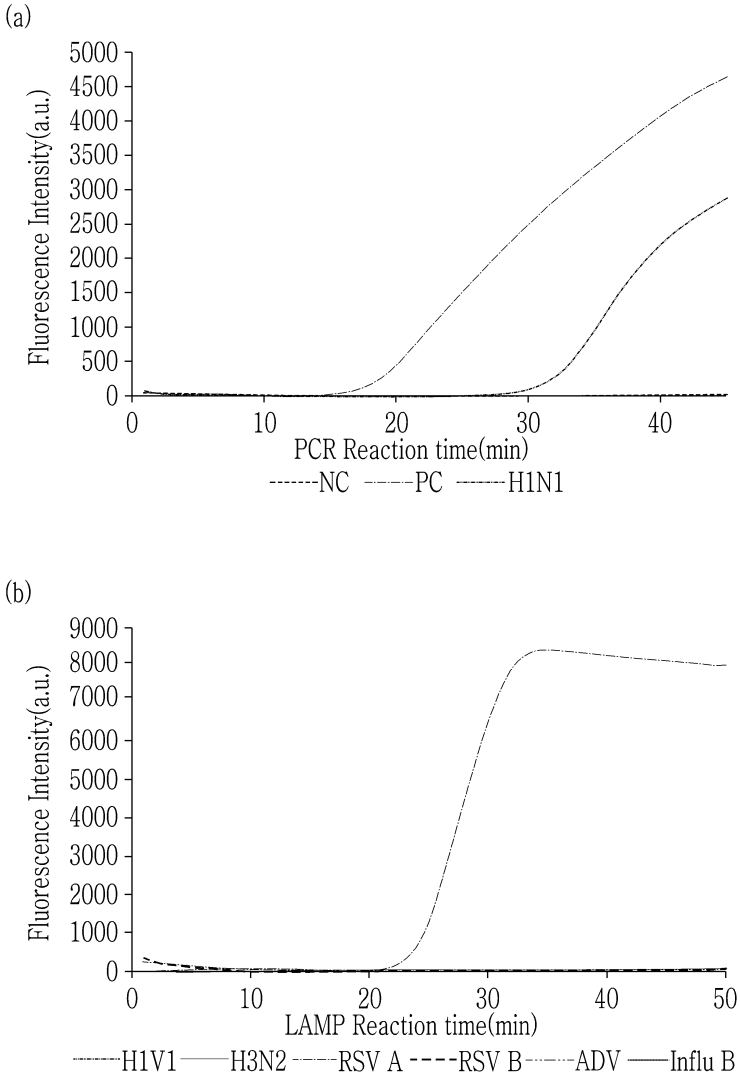
도면1


(a)
Influenza A H1N1
Fluorescence Intensity
LAMP reaction time, min
H1V1 H3N2 RSV A RSV B
Adeno Influ B Rhino CoV-2
(b)
Influenza A H3N2
(c)
RSV A
(d)
RSV B
(e)
(f)
(g)
(h)
H1N1
H3N2
RSV A
RSV B
Adeno
Influ B
Rhino
CoV-2

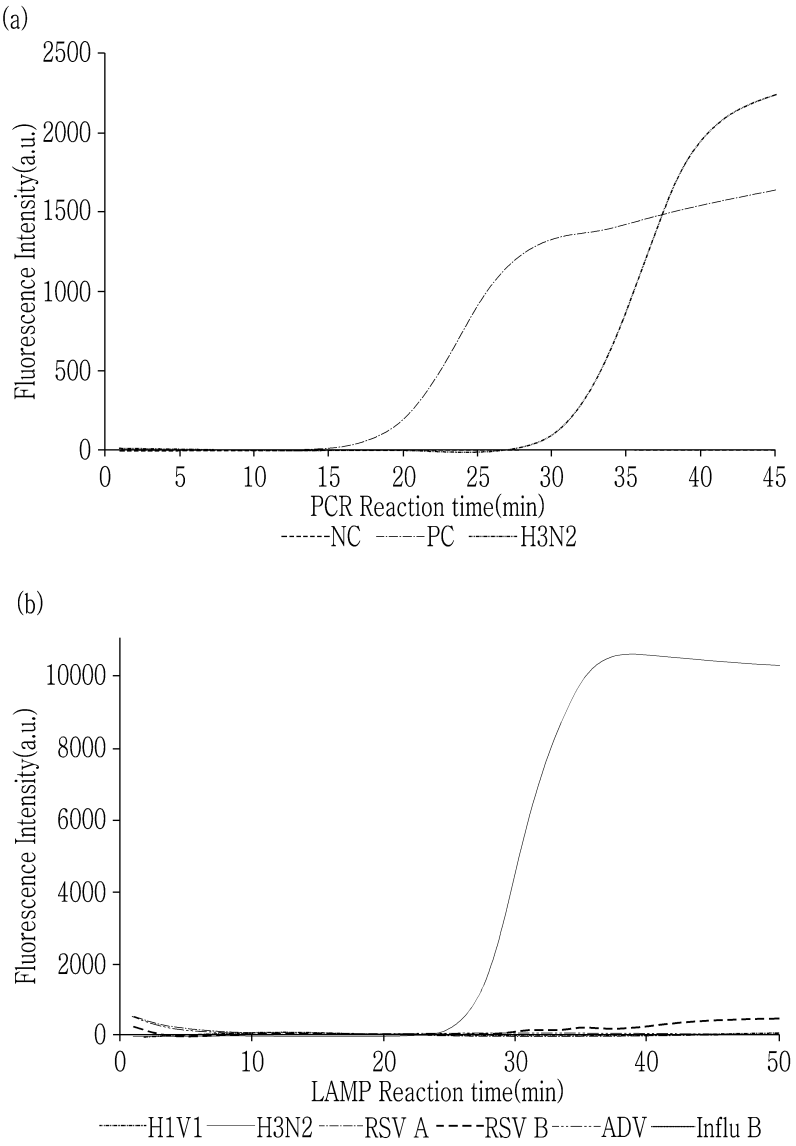
도면2


(a)
Adenovirus
Fluorescence Intensity
LAMP reaction time, min
H1V1 H3N2 RSV A RSV B
Adeno Influ B Rhino CoV-2
(b)
Influenza B
(c)
Rhinovirus
(d)
CoV-2
(e)
(f)
(g)
(h)
H1N1
H3N2
RSV A
RSV B
Adeno
Influ B
Rhino
CoV-2

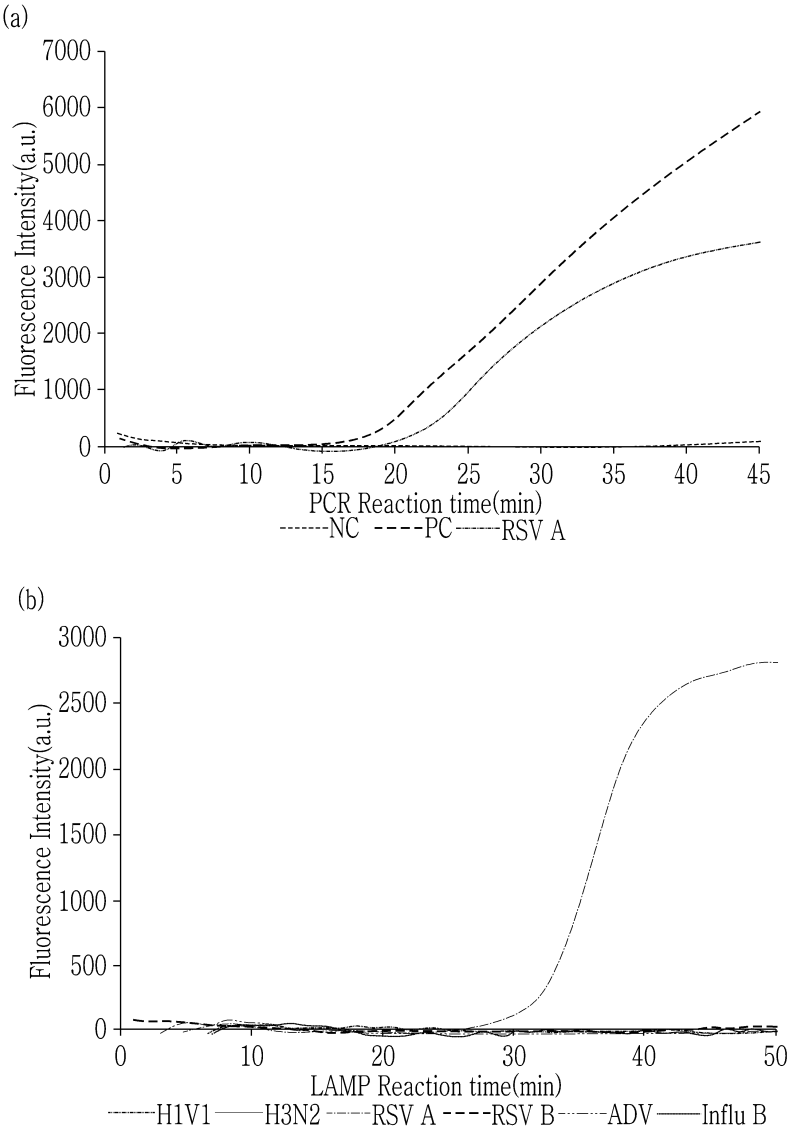
도면3


(a)
Fluorescence Intensity(a.u.)
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
PCR Reaction time(min)
NC
PC
H1N1
(b)
Fluorescence Intensity(a.u.)
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
50
LAMP Reaction time(min)
H1V1
H3N2
RSV A
RSV B
ADV
Influ B

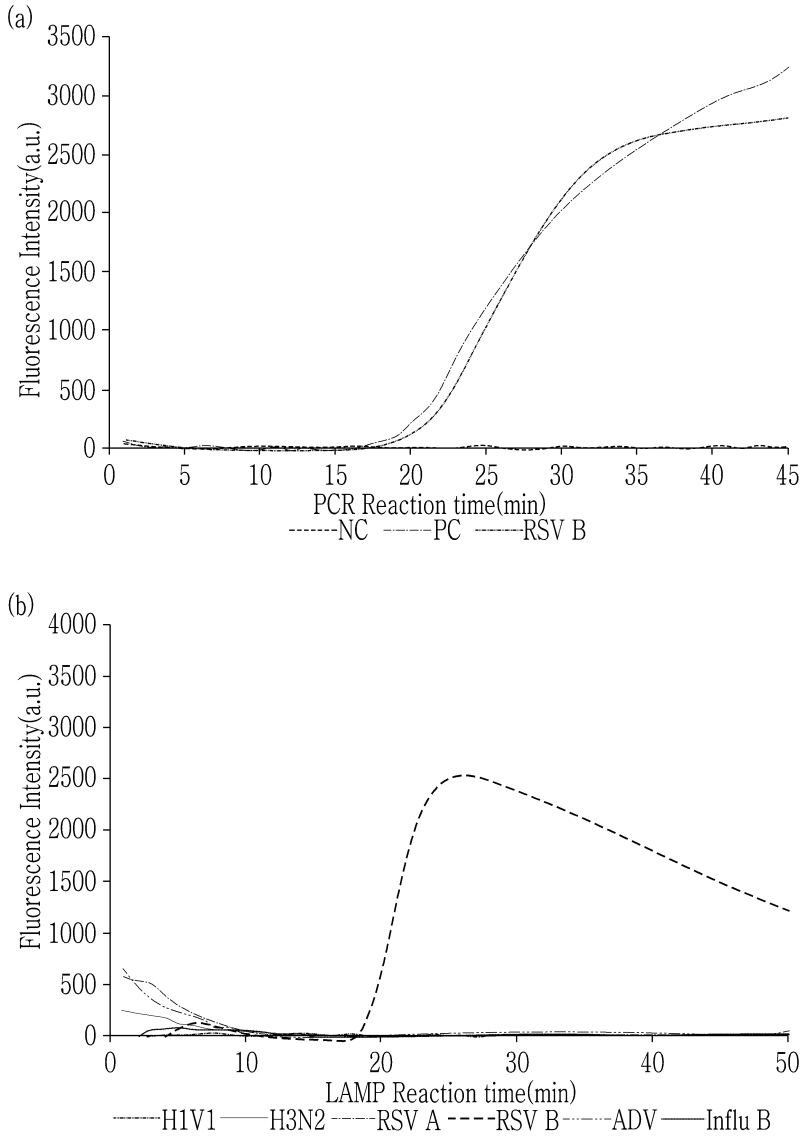
도면4


(a)
Fluorescence Intensity(a.u.)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
PCR Reaction time(min)
NC
PC
H3N2
(b)
Fluorescence Intensity(a.u.)
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
10
20
30
40
50
LAMP Reaction time(min)
H1V1
H3N2
RSV A
RSV B
ADV
Influ B

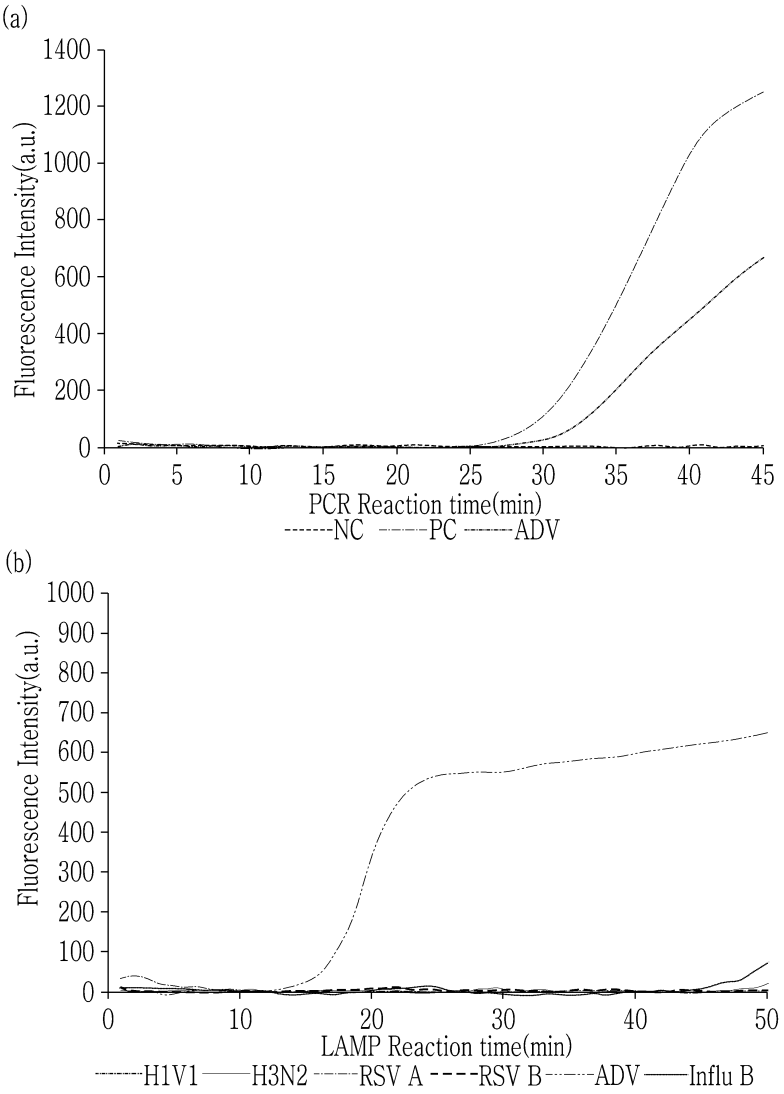
도면5


(a)
Fluorescence Intensity(a.u.)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
PCR Reaction time(min)
NC
PC
RSV A
(b)
Fluorescence Intensity(a.u.)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
LAMP Reaction time(min)
H1V1
H3N2
RSV A
RSV B
ADV
Influ B

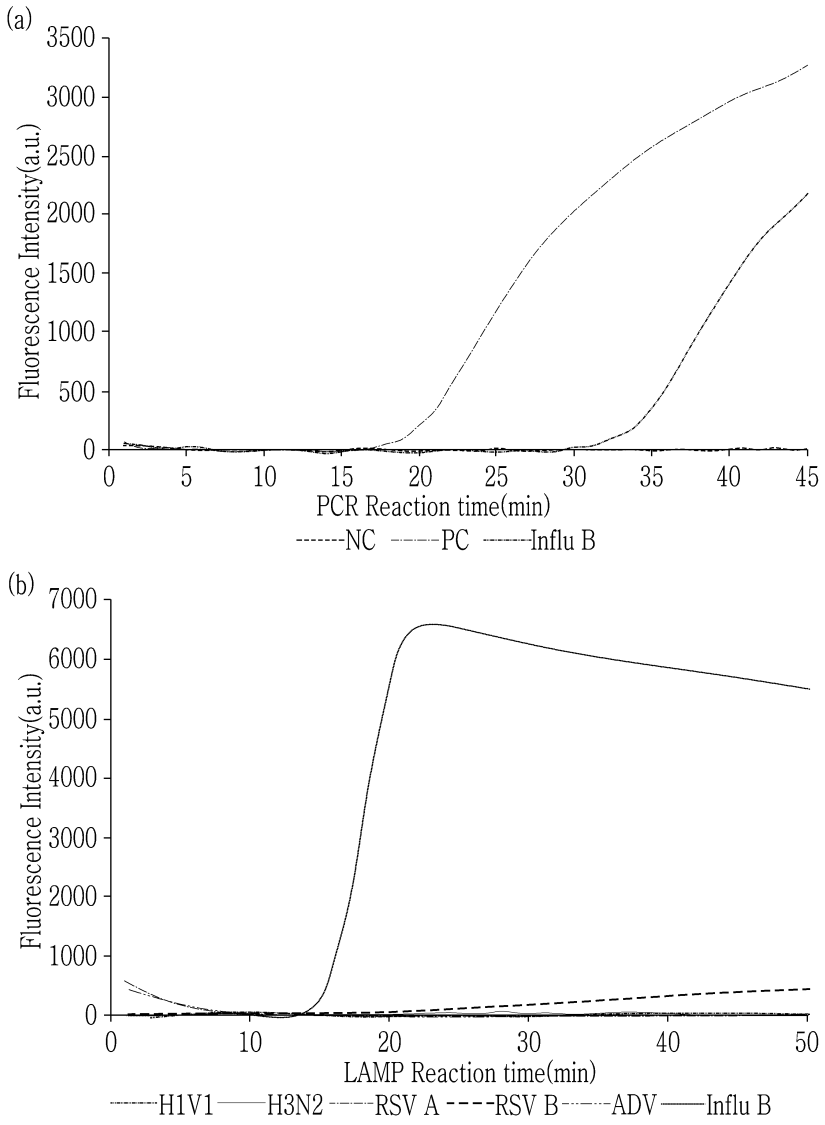
도면6


(a)
Fluorescence Intensity(a.u.)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
PCR Reaction time(min)
NC
PC
RSV B
(b)
Fluorescence Intensity(a.u.)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
LAMP Reaction time(min)
H1V1
H3N2
RSV A
RSV B
ADV
Influ B

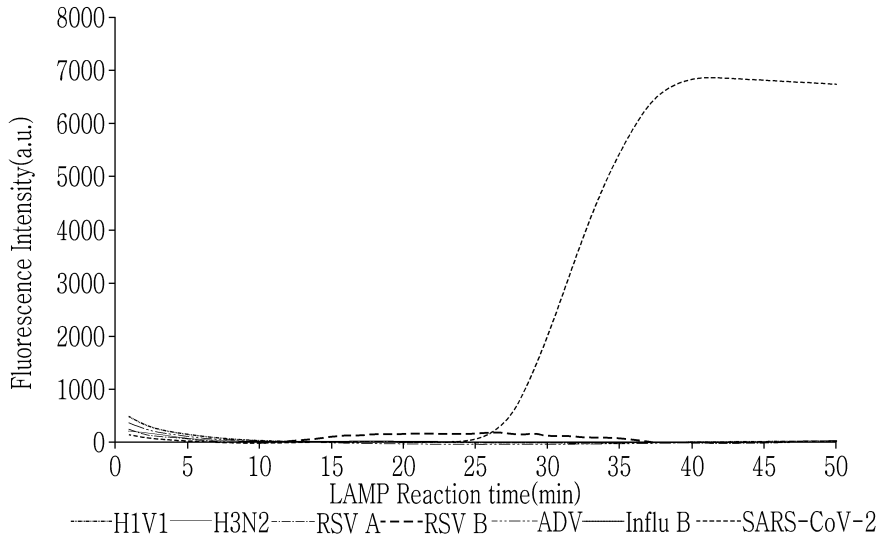
도면7


(a)
Fluorescence Intensity(a.u.)
PCR Reaction time(min)
NC
PC
ADV
(b)
Fluorescence Intensity(a.u.)
LAMP Reaction time(min)
H1V1
H3N2
RSV A
RSV B
ADV
Influ B

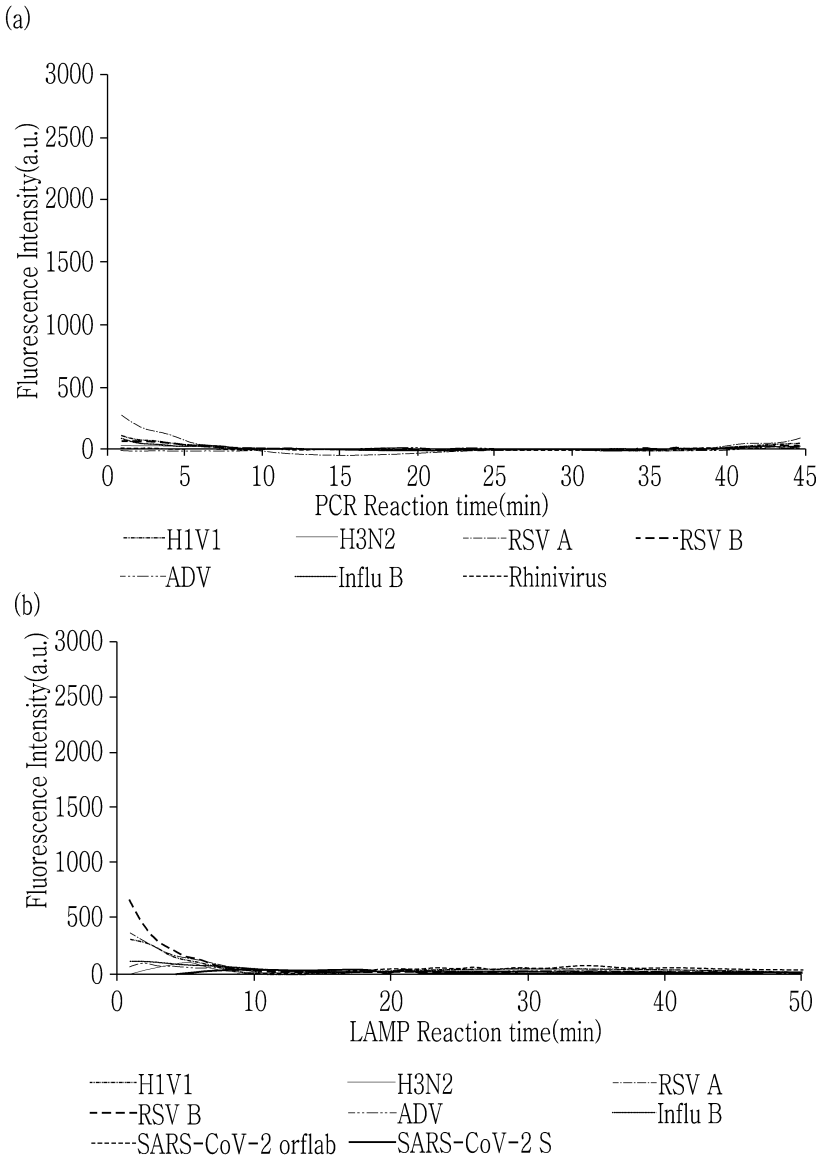
도면8


(a)
Fluorescence Intensity(a.u.)
PCR Reaction time(min)
NC
PC
Influ B
(b)
Fluorescence Intensity(a.u.)
LAMP Reaction time(min)
H1V1
H3N2
RSV A
RSV B
ADV
Influ B

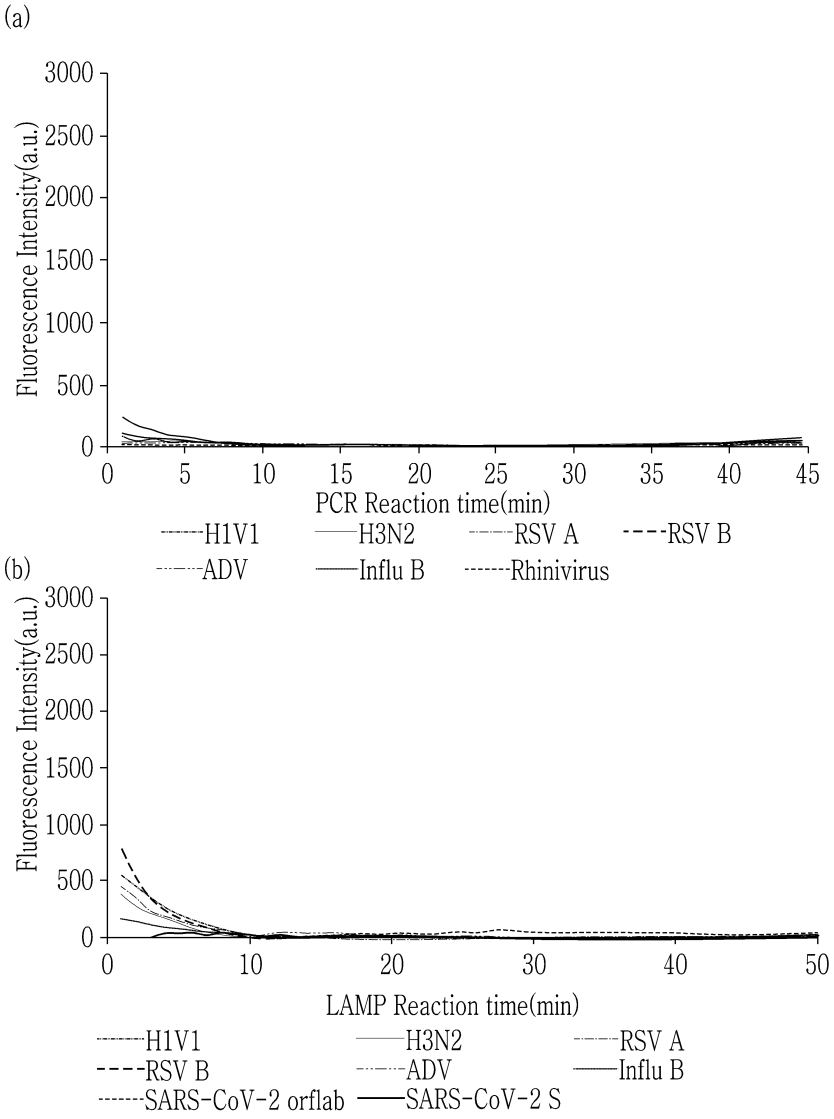
도면9


Fluorescence Intensity(a.u.)
LAMP Reaction time(min)
H1V1
H3N2
RSV A
RSV B
ADV
Influ B
SARS-CoV-2

도면10


(a)
Fluorescence Intensity(a.u.)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
PCR Reaction time(min)
H1V1
H3N2
RSV A
RSV B
ADV
Influ B
Rhinivirus
(b)
Fluorescence Intensity(a.u.)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
LAMP Reaction time(min)
H1V1
H3N2
RSV A
RSV B
ADV
Influ B
SARS-CoV-2 orflab
SARS-CoV-2 S

도면11


(a)
Fluorescence Intensity(a.u.)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
PCR Reaction time(min)
H1V1
H3N2
RSV A
RSV B
ADV
Influ B
Rhinivirus
(b)
Fluorescence Intensity(a.u.)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
LAMP Reaction time(min)
H1V1
H3N2
RSV A
RSV B
ADV
Influ B
SARS-CoV-2 orflab
SARS-CoV-2 S

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.