(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0103952
(43) 공개일자 2025년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/70 (2022.05)
C12Q 2531/113 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0195708
(22) 출원일자 2023년12월28일
심사청구일자 2023년12월28일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
주식회사 중앙백신연구소
대전광역시 유성구 유성대로 1476-37 (화암동)
(72) 발명자
이종수
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동)
윤인중
대전광역시 유성구 유성대로 1476-37 (화암동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

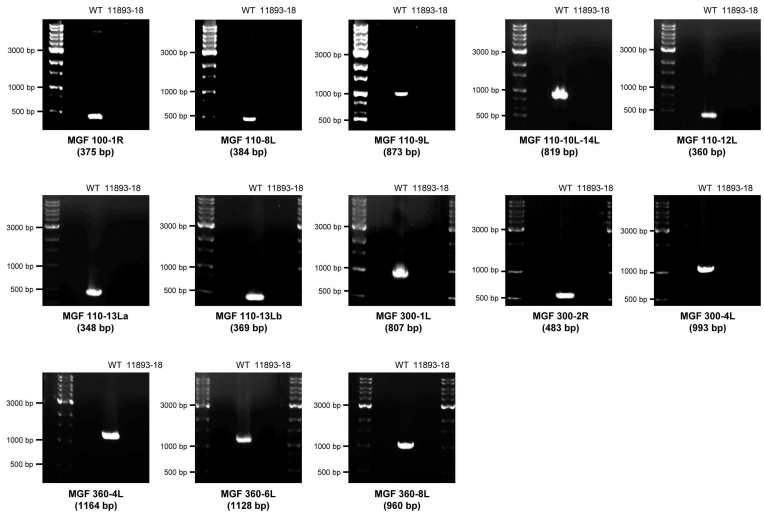
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **아프리카돼지열병 바이러스의 야외주와 생백신 바이러스를 판별할 수 있는 프라이머 세트 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 아프리카돼지열병 바이러스의 야외주와 생백신 바이러스를 판별할 수 있는 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 아프리카돼지열병 바이러스의 야외주와 생백신 바이러스를 판별할 수 있는 13종의 conventional PCR용 프라이머 세트 및 12종의 qRT-PCR용 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 아프리카돼지열병 바이러스의 야외주 및 백신주 판별용 키트 및 상기 프라이머 세트를 이용한 아프리카돼지열병 야외 바이러스 감염 돼지과 동물과 백신주 접종 돼지과 동물의 판별 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2561/113 (2019.08)
(72) 발명자
이주용
대전광역시 유성구 유성대로 1476-37 (화암동)
유성식
대전광역시 유성구 유성대로 1476-37 (화암동)
권혁일
대전광역시 유성구 유성대로 1476-37 (화암동)
이승철
대전광역시 유성구 유성대로 1476-37 (화암동)
김민호
대전광역시 유성구 유성대로 1476-37 (화암동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345365507
과제번호	2021R1A6A1A03045495
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	동물의과학연구소
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교 산학협력단
연구기간	2021.06.01 ~ 2030.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 26의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드에서, 서열번호 1부터 인접한 2개의 올리고뉴클레오티드가 하나의 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 13개의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트 중 어느 하나의 프라이머 세트를 포함하는, 아프리카돼지열병 바이러스 야외주와 백신주를 판별할 수 있는 conventional PCR용 프라이머 세트 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아프리카돼지열병 바이러스 백신주는 서열번호 53의 게놈 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 conventional PCR용 프라이머 세트 조성물.

청구항 3

서열번호 27 내지 50의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드에서, 서열번호 27부터 인접한 2개의 올리고뉴클레오티드가 하나의 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 12개의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트 중 어느 하나의 프라이머 세트; 및 서열번호 51 및 서열번호 52의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드프라이머 세트;를 포함하는, 아프리카돼지열병 바이러스 야외주와 백신주를 판별할 수 있는 qRT-PCR용 프라이머 세트 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 아프리카돼지열병 바이러스 백신주는 서열번호 53의 게놈 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 qRT-PCR용 프라이머 세트 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제3항의 프라이머 세트 조성물 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 아프리카돼지열병 바이러스의 야외주 및 백신주 판별용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것인 키트.

청구항 7

아프리카돼지열병 바이러스 감염 의심 돼지과 동물의 단리된 시료에서 게노믹 DNA를 추출하는 단계;

상기 분리된 게노믹 DNA를 주형으로 하고, 제1항 또는 제3항의 프라이머 세트 조성물을 이용하여 증폭반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 단계 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 아프리카돼지열병 야외 바이러스 감염 돼지과 동물과 백신주 접종 돼지과 동물의 판별 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 겔 전기영동, DNA 칩, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것인 판별 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아프리카돼지열병 바이러스의 야외주와 생백신 바이러스를 판별할 수 있는 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 아프리카돼지열병 야외주 바이러스에 대한 특이적 결합성을 가지며 아프리카돼지열병 생백신 바이러스에는 결합하지 않는 프라이머 세트를 이용하여 아프리카돼지열병 야외 바이러스와 아프리카돼지열병 생백신주를 감별하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 아프리카돼지열병(African swine fever, ASF)은 아스파비리대(Asfarviridae)에 속하는 아프리카돼지열병 바이러스(African swine fever virus, ASFV) 감염에 의한 돼지의 급성열성바이러스성 전염병으로, 1921년 케냐에서 최초 보고가 있은 후 주로 사하라 이남지역에서 발생보고가 있었고, 2007년 이후로 조지아주 유입 후 러시아, 폴란드 등 동유럽 국가로 확산되었다. 특히 러시아 내에서 동서로 발생이 확산되다가 2018년 8월 아시아 지역인 중국으로 확산되어 최초 발생한 후 베트남, 미얀마 등 다른 아시아 지역으로 확산되었으며, 2019년 9월 국내 양돈장에서 처음 발생하였으며 현재까지 야생 멧돼지를 통해 전국적으로 확산되고 있는 실정이다.

[0003] 아프리카 돼지열병은 사육돼지 및 멧돼지의 돼지과 동물에서만 발생하는 급성열성바이러스성 전염병으로, 전연령대에 거쳐 발생하며 급성의 경우 1주 이내 100% 폐사된다. 아직까지 상용화된 효과적인 백신이 없기 때문에 발생 시 양돈산업에 매우 큰 영향을 미치며, 바이러스 특성상 환경저항성이 높기 때문에 유입 후 질병근절이 매우 어렵다. 또한, 발생 즉시 처분해야 하는 위험도가 높은 전염병으로 질병의 진단이 매우 중요하다.

[0004] 현재까지는 국내 사육돼지에서는 아프리카돼지열병 백신접종이 실시되고 있지 않지만, 향후 아프리카돼지열병 백신접종이 실시될 것으로 생각되며, 국내에서 돼지열병은 현재 생백신을 사용하고 있기 때문에 아프리카돼지열병 야외 바이러스 감염 돼지와 아프리카돼지열병 생백신 바이러스 접종 돼지의 감별진단은 특히 필요하다.

[0005] 아프리카돼지열병을 효과적으로 예방하기 위하여 감염 농가 및 도축장에 출하되는 돼지의 혈액을 검사하여 야외 감염과 백신 접종을 효율적으로 감별할 수 있는 방법이 향후 절실히 요구될 것이다.

[0006] 한편, 한국공개특허 제2014-0076137호에는 돼지열병 바이러스에만 결합하고 다른 페스티바이러스(BVDV나 BDV)에는 결합하지 않는 프라이머를 이용한 '돼지열병 야외 바이러스 감염 돼지와 유전자 재조합 돼지열병 백신 접종 돼지의 감별방법 및 이를 위한 프라이머 세트'가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2023-0075194호에는 아프리카돼지열병 바이러스의 *P30* 유전자에 특이적인 분자마커를 이용한 '아프리카돼지열병 바이러스 신속 검출을 위한 재조합효소 중합효소 증폭 반응용 조성물'이 개시되어 있으나, 본 발명의 '아프리카돼지열병 바이러스의 야외주와 생백신 바이러스를 판별할 수 있는 프라이머 세트 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하고자 연구를 수행하던 중, 프라이머 세트의 특이적 결합성을 이용하여 아프리카돼지열병 야외 바이러스와 아프리카돼지열병 생백신 바이러스를 효과적으로 판별할 수 있음을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1 내지 26의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드에서, 서열번호 1부터 인접한 2개의 올리고뉴클레오티드가 하나의 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 13개의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트 중 어느 하나의 프라이머 세트를 포함하는, 아프리카돼지열병 바이러스 야외주와 백신주를 판별할 수 있는 conventional PCR용 프라이머 세트 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 서열번호 27 내지 50의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드에서, 서열번호 27부터 인접한 2개의 올리고뉴클레오티드가 하나의 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 12개의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트 중 어느 하나의 프라이머 세트; 및 서열번호 51 및 서열번호 52의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드프라이머 세트;를 포함하는, 아프리카돼지열병 바이러스 야외주와 백신주를 판별할 수 있는 qRT-PCR용 프라이머 세트 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트 조성물 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 아프리카돼지열병 바이러스의 야외주 및 백신주 판별용 키트를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 아프리카돼지열병 바이러스 감염 의심 돼지과 동물의 단리된 시료에서 게노믹 DNA를 추출하는 단계; 상기 분리된 게노믹 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 프라이머 세트 조성물을 이용하여 증폭반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 단계 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 아프리카돼지열병 야외 바이러스 감염 돼지과 동물과 백신주 접종 돼지과 동물의 판별 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 의한 프라이머 세트 조성물 및 이를 이용한 아프리카돼지열병 바이러스의 야외주 및 백신주 감별방법은, 유전자적 분석에 기반하여 감별이 용이하고, 아프리카돼지열병 백신주 바이러스의 변이를 추적할 수 있으므로, 아프리카돼지열병 야외 바이러스가 감염된 돼지를 조기에 감별하여 제거함으로써, 아프리카돼지열병의 청정화에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 conventional PCR 프라이머 세트(표 2)를 이용하여 야외주(WT)와 백신주(11893-18)를 감별한 결과이다.

도 2 및 도 3은 qRT-PCR 프라이머 세트(표 3)를 이용하여 야외주(WT)와 백신주(11893-18)를 감별한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 26의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드에서, 서열번호 1부터 인접한 2개의 올리고뉴클레오티드가 하나의 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 13개의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트 중 어느 하나의 프라이머 세트를 포함하는, 아프리카돼지열병 바이러스 야외주와 백신주를 판별할 수 있는 conventional PCR용 프라이머 세트 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, 서열번호 27 내지 50의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드에서, 서열번호 27부터 인접한 2개의 올리고뉴클레오티드가 하나의 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 12개의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트 중 어느 하나의 프라이머 세트; 및 서열번호 51 및 서열번호 52의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드프라이머 세트;를 포함하는, 아프리카돼지열병 바이러스 야외주와 백신주를 판별할 수 있는 qRT-PCR용 프라이머 세트 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명에 따른 아프리카돼지열병 바이러스 야외주와 백신주를 판별할 수 있는 프라이머 세트 조성물에 있어서, 상기 아프리카돼지열병 바이러스 백신주는 바람직하게는 서열번호 53의 게놈 서열을 가진 것일 수 있다.

[0017] 상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 1 내지 52의 서열 내의 16개 이상, 17개이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1의 프라이머(34개 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 1의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상, 26개 이상, 27개 이상, 28개 이상, 29개 이상, 30개 이상, 31개 이상, 32개 이상, 33개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 서열번호 1 내지 52의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복합도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.

[0019] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명은 또한, 본 발명의 프라이머 세트 조성물 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 아프리카돼지열병 바이러스의 야외주 및 백신주 판별용 키트를 제공한다.

[0021] 본 발명에 따른 키트에 있어서, 상기 프라이머 세트 조성물은 conventional PCR용 또는 qRT-PCR용일 수 있으며, 전술한 것과 같다.

[0022] 본 명세서에서, "아프리카돼지열병 바이러스 야외주"는 특별한 언급이 없으면, 야외(외부)로부터 감염된 돼지열

병 바이러스주를 지칭하며, 백신의 기능을 하는 "아프리카돼지열병 바이러스 백신주"와 구별되는 개념이다.

[0023] 또한, 본 발명에 따른 키트에 있어서, 상기 아프리카돼지열병 바이러스 백신주는 바람직하게는 서열번호 53의 게놈 서열을 가진 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 키트는 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 추가로 포함할 수 있고, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 또한, 상기 키트는 또한 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, 역전사 완충액 및 PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면상에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

[0026] 본 발명은 또한, 아프리카돼지열병 바이러스 감염 의심 돼지과 동물의 단리된 시료에서 게노믹 DNA를 추출하는 단계; 상기 분리된 게노믹 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 프라이머 세트 조성물을 이용하여 증폭반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 단계 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 아프리카돼지열병 야외 바이러스 감염 돼지과 동물과 백신주 접종 돼지과 동물의 판별 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명의 방법은 아프리카돼지열병 바이러스 감염 의심 돼지과 동물의 단리된 시료 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, CTAB 방법을 이용할수도 있고, Wizard prep 키트(Promega 사)를 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Qβ 복제효소(replicase)를 통한 증폭 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법이 있다. 이 중에서, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.

[0028] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 아프리카돼지열병 야외 바이러스 감염 돼지과 동물과 백신주 접종 돼지과 동물의 판별 방법은 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계를 포함하며, 상기 증폭 단계 산물의 검출은 겔 전기영동, DNA 칩, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 겔 전기영동을 수행할 수 있으며, 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 모세관 전기영동을 수행할 수도 있으며 모세관 전기영동은 예를 들면, ABi Sequencer를 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

[0030] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0032] **재료 및 방법**

[0033] **1. ASFV 야외주 및 백신주**

[0034] 본 발명에서 사용한 ASFV는 국립야생동물질병관리원 및 중앙백신연구소로부터 제공받았다. 상기 ASFV 야외주(ASF/Korea/Wildbore/Inje-11893/2021)는 2022년 강원도 인제 지역에서 발생한 야생 멧돼지 아프리카돼지열병에서 분리한 것이고, ASFV 백신주는 상기 야외주를 원숭이 신장 세포 유래 CA-CAS-01-A 세포주(기탁번호

KCTC14568BP)에 감염시켜 18번 계대배양하여 수득한 것이다. 본 발명에서 사용된 ASFV 백신주(11893-18)는 *MGF 100-1R, ASFV G ACD 00190, MGF 110-9L, MGF 110-10L, MGF 110-14L, ASFV G ACD 00240, MGF 110-12L, MGF 110-13La, MGF 110-13Lb, ASFV G ACD 00270, MGF 360-4L, MGF 360-6L, MGF 360-8L partial, MGF 300-1L, MGF 300-2R, MGF 300-4L, MGF 110-8L partial, ASFV G ACD 00210, ASFV G ACD 00300, ASFV G ACD 00320, ASFV G ACD 00330, ASFV G ACD 00350, ASFV G ACD 00360* 및 *X69R* 유전자가 결손되어 약독화된 것이 특징으로, 서열번호 53의 게놈 서열을 가지고 있다.

[0036] **2. 프라이머 세트 디자인**

[0037] ASFV 야외주 및 백신주 판별을 위한 프라이머 세트는, ASFV Georgia 2007/1 게놈 서열(GenBank: FR6824682)을 기준으로 ASFV 백신주에서 결손된 유전자 부위를 표적으로 하여 MBiotech- South Korea IDT portal qPCR primer design 프로그램을 이용하여 제작하였다. 본 발명에서는 conventional PCR용 프라이머 세트 13종과 qRT-PCR(quantitative real-time PCR)용 프라이머 세트 12종을 디자인하였다.

[0039] **3. DNA 추출 및 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)**

[0040] ASFV 야외주 및 백신주(11893-18)의 게노믹 DNA는 감염된 세포 용해물로부터 Maxwell RSC whole blood DNA kit (Promega)를 사용하여 추출하였다. 추출한 게노믹 DNA는 50 ㎍/㎕의 농도로 조정하여 사용하였다. conventional PCR 및 qRT-PCR용 반응액의 구성은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0041] PCR 반응액

conventional PCR		qRT-PCR	
Component	Vol. (㎕)	Component	Vol. (㎕)
DNA	100 ng (1㎕)	DNA	5 ng (1㎕)
10 pmole primer_forward	5	8 pmole primer_forward	1
10 pmole primer_reverse	5	8 pmole primer_reverse	1
2.5 mM dNTPs	5	2× SmartGene Sybr Green Q-PCR Master Mix (SMART GENE)	10
Taq polymerase (5 units/㎕)	1	D.W.	7
Buffer	5		
D.W.	28		

[0043] **실시예 1. conventional PCR을 통한 ASFV 야외주와 백신주의 판별**

[0044] ASFV 야외주와 백신주를 판별하기 위한 conventional PCR용 프라이머 세트는 ASFV 백신주(11893-18)의 결손된 개별 유전자에 특이적으로 디자인 하였으며, 그 정보는 하기 표 2와 같다. 증폭반응은 48℃ 1분의 결합(annealing) 단계와 72℃ 1분의 신장(extension) 단계로 수행되었다. 증폭 산물을 1% 아가로스 겔에 로딩하여 결과를 확인하였다.

표 2

[0045] 본 발명에 사용된 conventional PCR용 프라이머 세트

ASFV 유전자	프라이머 서열(5'-3')	서열번호
MGF 100-1R	F- AAATAAGGAAACTATCCTTAGTTAGTCGAGGAAG	1
	R- ATTCTATAAGAAAATCCATTCCAAGAATATTTAC	2
MGF 110-8L	F- AAGACCCATTTAGAAGAAAAAAATAAAGTTTATA	3
	R- AAACGGCTCTAAATTTTAGTTCTTTGTCTTCAAC	4
MGF 110-9L	F- CCCGTTGCAAAATAAGAAAAAAAAAACAAACTTA	5
	R- TACGTTGCAGTATTGCAACCCATAAGTTGCAACT	6

MGF 110-10L-14L	F- GTTACCACAAAAAATAAATGCTGGATTTTTAAGA	7
	R- GCAAAATTTAAATCTTTTTTAAAATGACAGGTGC	8
MGF 110-12L	F- TTCAAACTCTCTTATAAGTACATGTAGGAAATGG	9
	R- TTTTTTTTAAATAACATCTGTGGTATGAACGCAA	10
MGF 110-13La	F- ACAGTATGTGATATACACATACCACAAAAATGTT	11
	R- TGCTTTGTATGTGCGCTTTGTAAGAATCTGCGTC	12
MGF 110-13Lb	F- CAATGATGAAATAGAGACAGTATTGCTTTATAGA	13
	R- TTTTTTTTTGTAAGTGCAGGTGTCATTTAGACG	14
MGF 300-1L	F- AACCACCTAAATAAATGAACGTCTTTTTCATCTTA	15
	R- TTTTTTTAGTAAAGACTTTTATCTAACAAATTGGA	16
MGF 300-2R	F- AAATATTCCGTGTGCATTATTGCTTTTAATCAGT	17
	R- GTAATATCTGTTTGTTTTAAATACATATTATCAT	18
MGF 300-4L	F- AATATCTGGGAAATTATTTTTTTTTCTCATACCC	19
	R- TACTAAAACATGATACTAACCTCATTTTAATAAA	20
MGF 360-4L	F- TTGTATATAGGCTAATCATCTTTATATATAGATT	21
	R- GATTACGTTTACTCCTGTTATTCATAATAATACG	22
MGF 360-6L	F- TTTTAAATGTATTCATGGATACATTATAACATTT	23
	R- GATTACATTTACTGCTTTCATTCATGATAATACG	24
MGF 360-8L	F- CCTACTAAACCAAAAAAAAATCAAATTGACTAAG	25
	R- AACTTAATTTGAGTTTTTTTTTCAAGAAGTTATC	26

[0046] 상기 표 2의 프라이머 세트를 이용한 증폭반응 수행 결과, ASFV 백신주와 야외주가 명확하게 판별되는 것을 확인할 수 있었다(도 1).

[0048] **실시예 2. qRT-PCR을 통한 ASFV 야외주와 백신주의 판별**

[0049] 실시간으로 시료 내 ASFV 판별을 위해 ASFV 백신주(11893-18)의 결손된 개별 유전자에 특이적인 qRT-PCR용 프라이머 세트를 제작하였다(표 3). qRT-PCR은 Rotor-Gene Q(QIAGEN) 장비를 이용하여 수행하였으며, 증폭반응은 95℃ 3분, 64℃ 15초, 및 72℃ 15초의 과정을 총 40회 반복하였다. ASFV의 *P72* 유전자를 표적으로 하는 프라이머 세트를 제작하여 양성 대조구로 사용하였다.

표 3

[0050] 본 발명에 사용된 qRT-PCR용 프라이머 세트

ASFV 유전자	프라이머 서열(5'-3')	서열번호
MGF 100-1R	F- CGTAGGTCTCGTAAAATCCAGG	27
	R- CCAGGAACATTTTCTAGCAAACG	28
MGF 110-8L	F- GTATGGGATGTTGGATTTGCG	29
	R- CAGGATTCAAACAGATTGGCC	30
MGF 110-9L	F- GGTCATGCCACCGGGAAACT	31
	R- ACGAATGCGAATGCAAGCCG	32
MGF 110-10L-14L	F- ACCCGGCTGAGATAGCCAAA	33
	R- TCGCAATTCCTGGGGGTGTT	34
MGF 110-12L	F- TCGCAAATGCAACGCAACCA	35
	R- TCAATCACCAACAACCCCGTG	36
MGF 110-13La	F- AGGCGTATAGGTCCTTGGTA	37
	R- TTTCGTTCTTTTGAGTATTTTGGTTTG	38
MGF 110-13Lb	F- CCATCTTGACAGTCCCAACAG	39
	R- CTCAGTCCTCATTCTCGCAC	40
MGF 300-1L	F- AAAGCGCACCTGTTCACGCA	41
	R- AGCCGTAGCAAGGACGTTGT	42

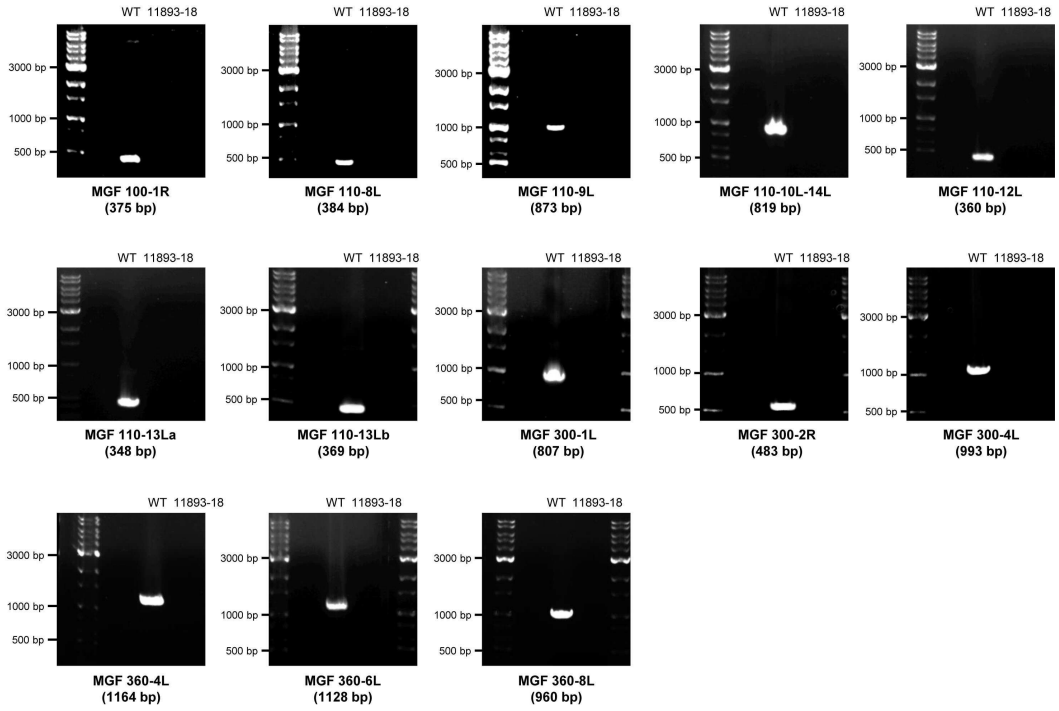
MGF 300-2R	F- ACACCCCGATAGCCGTGAAA	43
	R- GTTACATCCGCGCCCATTCCT	44
MGF 300-4L	F- GCTCCCCAACACAAAAGCCG	45
	R- CCAAACGGGCAGCAACATGG	46
MGF 360-4L	F- CGGGTTGGCACCCAAACCTA	47
	R- GCAGACCTTGACCGTGCCTT	48
MGF 360-6L	F- TCGTCCTTTCCGTCTTGGCAC	49
	R- GACAGAGCCTTGGTGAGGGC	50
p72 (positive control)	F- CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA	51
	R- GATACCACAAGATCAGCCGT	52

[0051] 분석 결과, 도 2 및 도 3에 개시된 바와 같이, ASFV 야외주(WT)와 백신주(11893-18)가 감별될 수 있음을 확인할 수 있었다. 특히, ASFV 백신주 시료는 양성 대조구인 *P72* 유전자에 대해서만 형광 신호가 확인되어 증폭반응이 정상적으로 이루어졌음을 알 수 있었다.

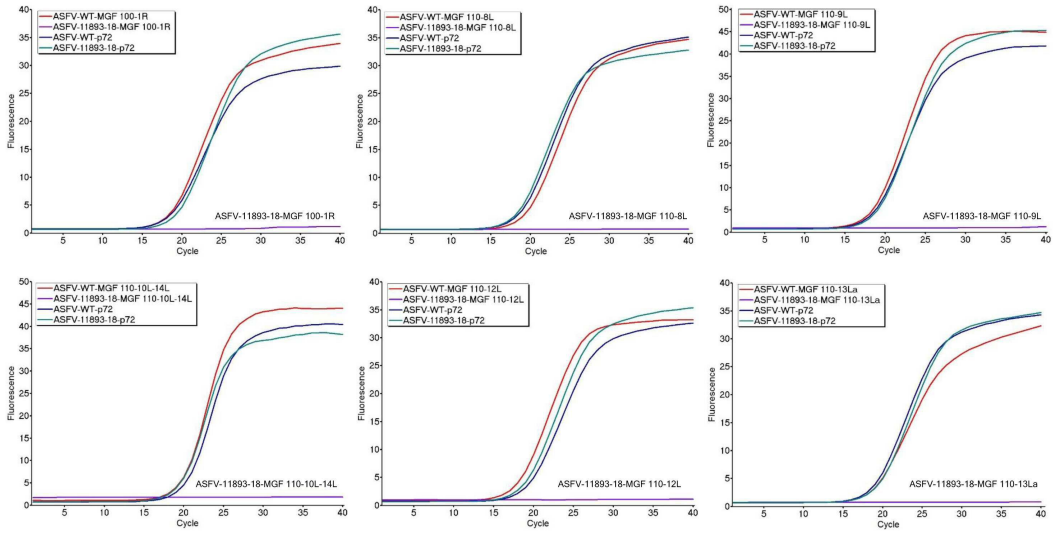
[0052] 이상의 결과를 통해, 본 발명의 프라이머 세트가 ASFV 야외주(WT)와 백신주(11893-18)를 명확하게 구별할 수 있음을 알 수 있었고, 이를 통해 ASFV 야외주 감염 돼지 또는 11893-18 백신주 접종 돼지 감별에 본 발명의 프라이머 세트가 유용하게 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

도면

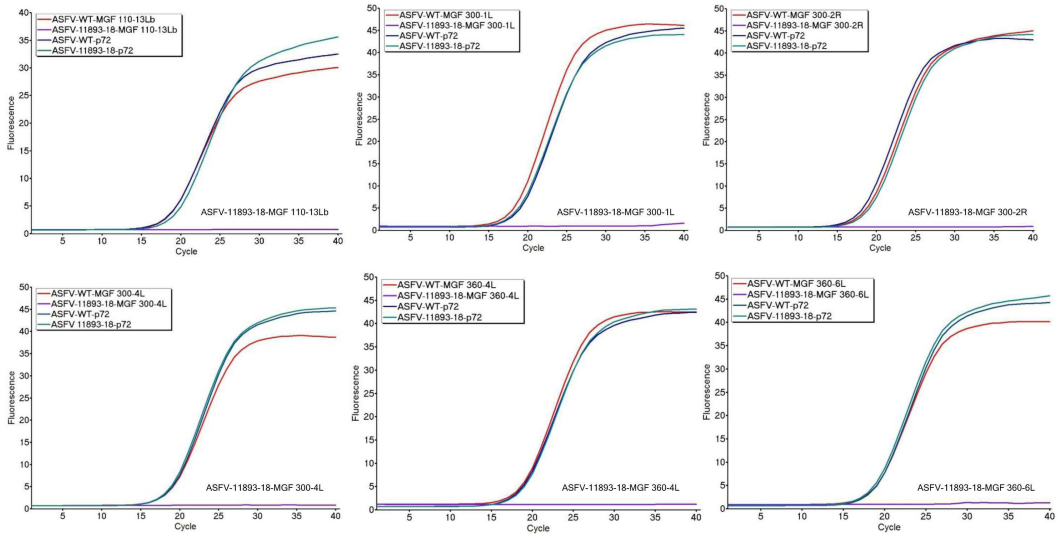
도면1



도면2


ASFV-WT-MGF 100-1R
ASFV-11893-18-MGF 100-1R
ASFV-WT-p72
ASFV-11893-18-p72
ASFV-11893-18-MGF 100-1R
ASFV-WT-MGF 110-8L
ASFV-11893-18-MGF 110-8L
ASFV-WT-p72
ASFV-11893-18-p72
ASFV-11893-18-MGF 110-8L
ASFV-WT-MGF 110-9L
ASFV-11893-18-MGF 110-9L
ASFV-WT-p72
ASFV-11893-18-p72
ASFV-11893-18-MGF 110-9L
ASFV-WT-MGF 110-10L-14L
ASFV-11893-18-MGF 110-10L-14L
ASFV-WT-p72
ASFV-11893-18-p72
ASFV-11893-18-MGF 110-10L-14L
ASFV-WT-MGF 110-12L
ASFV-11893-18-MGF 110-12L
ASFV-WT-p72
ASFV-11893-18-p72
ASFV-11893-18-MGF 110-12L
ASFV-WT-MGF 110-13La
ASFV-11893-18-MGF 110-13La
ASFV-WT-p72
ASFV-11893-18-p72
ASFV-11893-18-MGF 110-13La
Fluorescence
Cycle

도면3


ASFV-WT-MGF 110-13Lb
ASFV-11893-18-MGF 110-13Lb
ASFV-WT-p72
ASFV-11893-18-p72
ASFV-11893-18-MGF 110-13Lb
ASFV-WT-MGF 300-1L
ASFV-11893-18-MGF 300-1L
ASFV-WT-p72
ASFV-11893-18-p72
ASFV-11893-18-MGF 300-1L
ASFV-WT-MGF 300-2R
ASFV-11893-18-MGF 300-2R
ASFV-WT-p72
ASFV-11893-18-p72
ASFV-11893-18-MGF 300-2R
ASFV-WT-MGF 300-4L
ASFV-11893-18-MGF 300-4L
ASFV-WT-p72
ASFV 11893-18-p72
ASFV-11893-18-MGF 300-4L
ASFV-WT-MGF 360-4L
ASFV-11893-18-MGF 360-4L
ASFV-WT-p72
ASFV-11893-18-p72
ASFV-11893-18-MGF 360-4L
ASFV-WT-MGF 360-6L
ASFV-11893-18-MGF 360-6L
ASFV-WT-p72
ASFV-11893-18-p72
ASFV-11893-18-MGF 360-6L
Fluorescence
Cycle

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.