(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0127081
(43) 공개일자 2013년11월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0050717
(22) 출원일자 2012년05월14일
심사청구일자 2012년05월14일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(주)바이오니아
대전광역시 대덕구 문평서로 8-11 (문평동)
(72) 발명자
최태진
부산광역시 해운대구 좌동 1398번지 대림1차아파트 108동 501호
김남일
대전광역시 유성구 송강동 송강한솔아파트 203동 1208호
박한오
대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 208동 601호
(74) 대리인
최규환

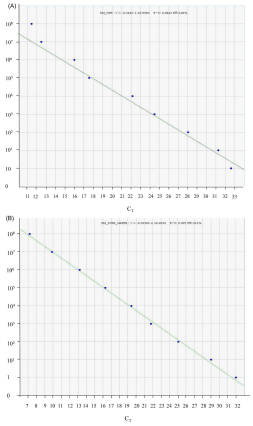
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **HPV의 실시간 진단용 프라이머 세트 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 서열번호 3 및 4로 표시된 프라이머 세트를 포함하는 HPV의 실시간 진단용 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 HPV의 실시간 진단용 키트 및 상기 프라이머 세트를 이용하여 HPV를 실시간 진단하는 방법에 관한 것이다. 에 관한 것이다.

대 표 도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20090487
부처명	농림수산식품부
연구사업명	수산기술개발사업
연구과제명	국내 새우 간췌장바이러스 집단의 게놈 분석과 이를 이용한 Real-Time PCR 진단 키트의 개발
기 여 율	1/1
주관기관	부경대학교
연구기간	2009.06.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 3의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 4의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 HPV(hepatopancreatic parvovirus)의 실시간 진단용 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 실시간 진단용 프라이머 세트.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, HPV 실시간 진단용 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 실시간 진단용 키트는 탐지자(probe)로서 서열번호 13의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 HPV 실시간 진단용 키트.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것인 HPV 실시간 진단용 키트.

청구항 6

바이러스에 감염된 새우에서 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, DNA 폴리머라제를 첨가하여, 제1항 또는 제2항에 따른 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 산물에 대한 형광 값을 분석하는 단계를 포함하는 HPV 실시간 진단 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 표적 서열을 증폭하는 단계는 탐지자(probe)로서 서열번호 13으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 추가로 첨가하여 증폭하는 것을 특징으로 하는 HPV 실시간 진단 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 새우는 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*) 또는 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)인 것을 특징으로 하는 HPV 실시간 진단 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 표적 서열의 증폭은 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 HPV 실시간 진단 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 HPV(hepatopancreatic parvovirus)의 유전자 특성을 이용하는 것으로 바이러스 염기서열을 분석하여

특이성이 높은 프라이머를 제작하고, 상기 제작한 프라이머를 이용하여 새우로부터 추출한 핵산과 반응시켜 바이러스 염기서열의 특정 부위를 증폭시키는 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)을 통해 증폭된 산물로 바이러스 감염 여부를 검정하는 유전자 진단 분야이다. 구체적으로는, 서열번호 3 및 4로 표시된 프라이머 세트를 포함하는 HPV의 실시간 진단용 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 HPV의 실시간 진단용 키트 및 상기 프라이머 세트를 이용하여 HPV를 실시간 진단하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 1974년에 Couch가 바이러스 질병에 대해 처음 보고한 이후로, 양식 새우의 바이러스성 질병은 아시아, 인도양 및 미국에서 경제적 손실의 중요한 요인이 되었다. 양식 새우에서 발생하는 질병 손실의 약 60%는 바이러스성 질병과 연관되어 있고, 40%는 박테리아, 곰팡이 및 다른 병원균들과 연관되어 있다.

[0003] 두 가지의 작은 새우 파르보바이러스인 감염성 피하 및 혈구 괴사 바이러스(IHHNV) 및 간췌장 파르보바이러스(HPV)는 파르보비리대(*Parvoviridae*)과의 주요한 성질을 공유하는 것으로 보고되어 있다. 20여 가지의 새우 바이러스 중에서 주된 새우 감염성 바이러스인 HPV는 소화선(간췌장) 및 중장의 상피 세포에 감염된다. HPV 감염 세포의 전자 현미경 분석은 지름 22-24nm의 바이러스성 입자를 포함하는 핵 내부의 봉입체(nuclear inclusion bodies)를 나타낸다. 이러한 바이러스는 높은 사망률 및 감염된 유충 및 후기 유충 그리고 유생의 성장 지연을 초래할 수 있다. 성충 새우의 감염은 100% 사망을 야기하지 않으나, 질병의 뚜렷한 징후를 보이지 않는 바이러스의 운반체가 될 수 있어 상업적인 수산 양식에 영향을 끼칠 수 있다.

[0004] HPV(hepatopancreatic parvovirus)의 6.3kb 단일 가닥 선형 DNA 유전체는 세개의 ORF(open reading frame)를 포함하는데, 왼쪽 및 중간의 ORF는 비구조 단백질(NS1 및 NS2)을 코딩하고 오른쪽 ORF는 바이러스 구조 단백질(VP)을 코딩한다. 블랙타이거새우(*Penaeus monodon*), 브라운타이거새우(*P. esculentus*), 보리새우(*P. japonicas*), 홍다리얼룩새우(*P. semisulcatus*), 인도흰새우(*P. indicus*), 붉은꼬리새우(*P. penicillatus*), 남부흰새우(*P. schmitti*), 바나나새우(*P. merguiensis*), 서방청새우(*P. stylirostris*), 흰다리새우(*Litopeneaus vannamei*), 대하(*Fenneropenaeus chinensis*) 및 담수산새우(*Macrobrachium rosenbergii*)를 포함하는 숙주의 넓은 범위 및 지리적 영역 때문에 상기 바이러스들은 다른 분리균의 같은 바이러스 내에서 유전체 구조의 높은 다양성을 보여줬다. 현재까지 HPV의 네개의 완전한 유전체가 보고되었는데, 이것들은 전체 유전체 크기(6,321bp, 6,310bp, 6,299bp 및 6,336bp), 유전체 서열 및 5' 및 3' 말단에서의 고리 유사 구조(loop like structure) 같은 유전체 구조가 모두 다르다. 또한, 정제된 바이러스 입자의 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 분석 결과 블랙타이거새우에서 분리된 종(*Pm*DNV)에서 이중 밴드(54 및 57kDa)를 나타낸 것과 대조적으로 한국의 대하에서 분리된 HPV 종에서 약 54kDa의 단일 밴드를 나타냈다.

[0005] HPV의 효과적인 진단 방법의 개발은 유년기의 새우 양식장으로의 도입과 상기 운반체들에 의한 이차 감염의 예방에 있어 중요하다. 초기에는 시간이 오래 걸리고, 바이러스 양적 분석 및 HPV의 유전적으로 다양한 종의 분석에 있어 제한적인 민감도를 가지고 있는 조직병리학 및 전자 현미경 관찰법과 같은 전통적인 진단 방법이 사용되었다. 상기 방법들의 한계점을 극복하기 위해, 인시투 혼성화(in situ hybridization), 유전자 탐지자(probe), 중합효소 연쇄반응-효소 연계 면역흡수검정(PCR-ELISA), 웨스턴블랏, 루프-매개성 등온 증폭(LAMP), 중합효소연쇄반응(PCR) 같은 빠른 분자적 및 면역학적인 방법을 기반으로 한 고감도 진단 방법들이 개발되었다.

[0006] 전통적인 PCR 방법에 더하여, 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)은 DNA 증폭 과정의 감지를 가능하게 하였고, 새우 바이러스 증폭에 적용되었다. 실시간 중합효소 연쇄반응 과정에서, DNA의 합성은 PCR 과정 동안 생성되는 형광의 강도에 의해 측정되며 이것은 모니터에서 확인할 수 있다. 형광 신호의 생성을 기반으로 한 세 가지의 가장 일반적인 qRT-PCR 방법이 있다. 첫번째는, 이중 가닥 DNA에 혼입될 때 형광이 급격히 증가하는 SYBR green I 및 SYBR green ER 염료와 같은 형광 물질이 반응에 첨가되고, DNA가 합성되는 동안 형광물질의 혼입이 감지된다. 두번째 방법은 형광 프라이머 확장을 기반으로 빛을 활용한 방법(LUX RT-PCR)으로, 형광 프라이머는 5' 말단에 4 내지 6개의 뉴클레오티드의 짧은 서열 꼬리를 가지며, 이것은 3' 말단과 상보적이다. 헤어핀 2차 구조의 결과는 형광의 적절한 억제를 제공한다. 프라이머가 PCR 과정 동안 이중 가닥 DNA에 결합될 때, 형광이 발산되고 10배까지 신호가 증가하게 된다. 세번째 방법은, 5' 말단에 형광 리포터 염료 및 다른 끝에 소광제에 의해 표지된 가수분해 탐지자(20 내지 30 염기)가 반응 혼합액에 첨가되는 것이다. 탐지자가 온전히 남아 있는 동안, 소광제와 형광 리포터 염료의 근접은 리포터에 의해 발산된 형광을 현저하게 감소시킨다. DNA 합성 동안, Taq DNA 폴리머라제의 5'에서 3'으로의 엑소뉴클레아제 활성은 소광제로부터 리포터 염료를 분리하고, 리포터 염료 신호는 비례적으로 증가하게 된다.

[0007] 비록 분자 기반 진단법이 특이적이고 민감하지만, 상기 방법은 유전체 다양성의 넓은 범위 때문에 모든 HPV 분

리균의 검출 효율이 낮아질 수 있고, 진단시 병원균의 진단이 안 될 가능성도 있다. 7개의 HPV 분리균에서 유래된 오른쪽 ORF의 아미노산 서열을 기반으로 한 계통발생학적 분석법은 HPV 분리균에서 3가지의 유전자형을 나타냈다. 따라서, 국내 고유의 HPV 분리균에 대한 빠르고 민감한 진단 방법의 개발은 매우 중요하다. 본 발명에서는 한국에서 분리된 HPV 종의 서열 비교를 통해 얻은 프라이머를 이용하여 한국 HPV 분리균의 효과적인 스크리닝을 위한 신뢰할 수 있고 시간 소모가 적은 두가지 실시간 정량 중합효소 연쇄반응 키트를 개발하였다.

[0008] 한국공개특허 제2003-0078524호에는 'ＧＴＰ－결합 단백질의 발현 및 기능을 억제하여 바이러스증식을 억제하는 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제0743822호에는 'Ｂ형 간염 바이러스 진단용 프라이머, 그 키트 및 그 키트를 이용한 검출 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 HPV 실시간 진단용 프라이머 세트 및 이의 용도에 관해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 폭넓은 숙주 범위로 인해 유전체 구조의 높은 다양성을 보이는 HPV(hepatopancreatic parvovirus)에 대한 고감도 실시간 중합효소 연쇄반응 프라이머를 제작하고, 진단에 최적인 PCR 조건을 설정하여 HPV의 빠르고 정확한 실시간 중합효소 연쇄반응 진단법을 개발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 3 및 4로 표시된 프라이머 세트를 포함하는 HPV(hepatopancreatic parvovirus)의 실시간 진단용 프라이머 세트를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 HPV 실시간 진단용 키트를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 이용하여 HPV를 실시간으로 진단하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 프라이머 세트는 HPV를 실시간으로 진단할 수 있어 HPV 감염 초기의 새우 개체들을 빠르고 민감하게 진단할 수 있고, 건강한 유생 방생을 위한 인공부화물의 모니터링이 가능하다. 본 발명에서 개발된 실시간 중합효소 연쇄반응 시스템은 인공부화물 스크리닝 및 방생 전 유생 시험에 이용될 수 있는 매우 유용한 발명이다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 다양한 분리균의 표적 뉴클레오티드 서열의 다양성 및 표적 영역의 프라이머 및 탐지자를 나타낸다. *Fc*DNV, *L.vannamei* 및 HPVchin은 한국 분리균이다. GenBank 등록 번호와 해당 균주는 다음과 같다: JN082231:*Fc*DNV, AY008257:HPVchin, EU588991:탄자니아, EU247528:마다가스카르, DQ002873:*Pm*DNV, 태국), DQ458781:*Pmerg*DNV, 호주, FJ410797:*Pm*DNV, 인도, GU371276:중국. 탐지자 서열은 밑줄로 나타냈다. 정방향 및 역방향 프라이머는 음영처리하였다.

도 2는 Green Star qRT-PCR 키트를 이용한 결과를 나타낸다. (A) 표준 플라스미드 및 샘플 증폭 곡선 분석, (B) 표준 플라스미드 및 샘플 표준 곡선 분석. 표준 플라스미드는 1 x 10^9부터 1 x 10^3까지 연속적으로 희석했고 HPV에 감염되거나 감염되지 않은 DNA 샘플은 시험 샘플로 사용했다. 연속 희석된 표준 플라스미드의 곡선 및 시험 샘플의 결과를 선(A) 또는 점(B)으로 나타냈다.

도 3은 Green Star 키트의 특이성 분석을 융해 곡선 분석으로 시험한 결과(A) 및 PCR 생성물의 겔 전기영동 분석을 통한 Green Star 키트의 특이성 분석(B)을 나타낸다. M은 100bp DNA 마커, P는 HPV 감염 DNA 샘플, N은 바이러스가 없는 새우 DNA를 나타냈다.

도 4는 Dual Star qRT-PCR 키트를 이용한 표준 플라스미드와 샘플 증폭 곡선 분석(A) 및 표준 플라스미드와 샘플 표준 곡선 분석(B)을 나타낸다. 표준 플라스미드는 1 x 10^9부터 1 x 10^3까지 연속적으로 희석했고 HPV에 감염되거나 감염되지 않은 DNA 샘플은 시험 샘플로 사용했다. 연속 희석한 표준 플라스미드의 곡선 및 시험 샘플의 결과를 선(A) 또는 점(B)으로 나타냈다.

도 5는 PCR 생성물의 겔 전기영동 분석을 통한 Dual Star 키트의 특이성 분석을 나타낸다. M은 100bp DNA 마커,

P는 HPV 감염 DNA 샘플, N은 바이러스가 없는 새우 DNA를 나타냈다.

도 6은 클로닝된 HPV DNA를 이용한 Green Star 키트의 최소 검출 한계를 분석한 결과(A) 및 Dual Star 키트의 최소 검출 한계를 분석한 결과(B)를 나타낸다. 클로닝된 HPV DNA는 1 x 10^8부터 1카피까지 연속으로 희석하여 주형으로 사용했다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 서열번호 3의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 4의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 HPV(hepatopancreatic parvovirus)의 실시간 진단용 프라이머 세트를 제공한다.

[0016] 상기 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 서열번호 3의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 또한, 상기 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 서열번호 4의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 구현 예에 따른 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트는 서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 HPV의 실시간 진단용 프라이머 세트이다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 서열번호 3 및 4의 HPV 진단용 프라이머 세트 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, HPV 실시간 진단용 키트를 제공한다. 본 발명의 일 구현 예에 따른 HPV 실시간 진단용 키트에서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼 등을 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 구현 예에 따른 HPV 실시간 진단용 키트는 탐지자(probe)로서 서열번호 13의 서열 내의 15개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드들로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드는 바람직하게는 서열번호 13의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드일 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0021] 바이러스에 감염된 새우에서 DNA를 분리하는 단계;

[0022] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, DNA 폴리머라제를 첨가하여, 상기 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

[0023] 상기 증폭 산물에 대한 형광값을 분석하는 단계를 포함하는 HPV 실시간 진단 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명의 방법은 바이러스에 감염된 새우 시료에서 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 페놀:클로로포름 추출에 후속한 에탄올 침전화 방법을 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 이용하고 DNA 폴리머라제를 첨가하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 구현 예에 따른 HPV 실시간 검출 방법에서, 상기 표적 서열을 증폭하는 단계는 서열번호 13으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 탐지자(probe)로서 추가로 첨가하여 증폭할 수 있다.

[0026] 본 발명의 프라이머 세트를 이용한 HPV 실시간 진단 방법은 real-time PCR(또는 qPCR (quantitative PCR))을 이용하였는데, real-time PCR에는 대표적으로 taqman 분석, molecular beacon, sybr green을 이용하는 방법이 있다. 이 중에서 taqman 분석 및 molecular beacon는 PCR 산물과 상보적으로 결합할 수 있는 탐지자(probe)를 필요로 한다.

[0027] 본 발명에서 사용한 taqman 분석은 *AccuPower* Dual Star qPCR premix(Bioneer Corporation, Daejeon, Korea)를 이용하였고, 이 때 프라이머 세트 이외에 탐지자를 사용하였다. 탐지자는 양 프라이머가 붙는 위치 사이에 결합하는 올리고(oligo)이다. 단 5'과 3'에 염료(dye)가 붙어 있는데, 주로 5'에 형광 염료가, 3'에는 그 형광을 제거해 주는 소광자(quencher)가 붙어 있다. 따라서 탐지자 자체는 형광이 아주 적으나, PCR이 진행되는 경우를 보면, 탐지자도 붙고 프라이머도 붙어서 중합(polymerization)이 된다. 이때 중합효소(polymerase)가 탐지자가

있는 위치까지 진행하고 탐지자를 분해하게 된다(5-3' 엑소뉴클라아제 활성). 그러면 탐지자는 소광자로부터 멀리 떨어져 드디어 형광을 나타낸다. 따라서 탐지자의 분해 정도는 탐지자가 결합한 DNA의 양에 비례한다. 따라서 매 사이클 마다 형광을 측정하면 그것이 곧 증폭된 DNA의 양에 해당된다.

[0028] 본 발명의 실시간 중합효소 연쇄반응은 10pmol의 각 프라이머, 10배 희석된 표준 플라스미드 또는 약 80ng의 HPV 관련 DNA를 첨가한 20ul의 *AccuPower* Green Star qPCR premix(Bioneer Corporation, Daejeon, Korea) 및 *AccuPower* Dual Star qPCR premix(Bioneer Corporation, Daejeon, Korea)를 이용하여 수행했다. Exicycler(Bioneer Corporation, Daejeon, Korea) 기기를 이용한 DNA의 합성은 PCR 과정 동안 생산되는 형광의 강도에 의해 측정되며 스크린에서 감지했다. 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)의 특이성은 융해 정점 분석과 증폭된 PCR 생성물의 2% 아가로스 겔 전기영동을 통해 시험했다. 순환 역치(cycle threshold, C_T)는 Exicycler3s 버전 3.547의 자동화된 역치 분석을 통해 결정했다. 최소 검출 한계는 클로닝된 HPV DNA의 1부터 1 x 10^8 카피를 이용하여 분석했다.

[0029] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 새우는 흰다리새우(*Litopenaeus vannamei*) 또는 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

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

[0031] **실험재료 및 방법**

[0032] 1) DNA 분리

[0033] HPV와 관련된 DNA는 2008년 충남 서천군에 위치한 수산 양식장에서 수집한 대하(*Fenneropenaeus chinensis*)의 흉각(pereiopod)에서 분리하였고, 흰다리새우(*Litopeneaus vannamei*)는 2010년에 전남 신안군에 위치한 수산 양식장에서 수집했다. 개별 새우에서 흉각의 약 20mg을 제거했고 0.1M NaCl, 20mM Tris-HCl, EDTA 및 0.5% SDS를 함유하는 500ul 버퍼로 균질화시켰다. 페놀:클로로포름:이소아밀알콜(25:24:1)의 혼합물의 같은 부피를 이용해 균질화물로부터 직접 DNA를 추출한 후, 0.1부피(volume)의 3M NaOAc(pH 5.3) 및 2부피의 무수 에탄올을 이용해 침전시켰다. 펠렛을 70% 에탄올로 세척하고, 대기에서 건조시킨 펠렛을 100ul TE 완충액에 재현탁시켰다. DNA 농도는 ASP-3700 분광광도계(ACTGene, Inc., New Jersey USA)를 이용하여 OD 260/280nm에서 광학 농도를 측정하여 결정했다.

[0034] 2) 표준 플라스미드 준비

[0035] 추출된 총 DNA에서 표 1에 표기된 서열 F2/R2, F3/R3 및 F4/R4 프라이머를 이용하여 약 1.7, 1.5 및 1.8kb의 DNA 절편을 증폭했고, pCR8/GW/TOPO 벡터(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 클로닝하였다. 재조합 플라스미드는 플라스미드 미니 추출 키트(GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 분리했고, 삽입된 DNA의 확인을 위해 Eco*RI*으로 절단 후 1% 아가로스 겔 상에서 전기영동을 수행했다. 그리고 G&C Bio(Daejeon, Korea)에서 서열을 분석했다. 재조합 플라스미드의 농도와 순도는 Victor^3 Multi label Plate Reader(PerkinElmer, Shelton, CT, USA)를 이용하여 260/280nm에서 흡광량으로 측정했고 카피수로 변환했다.

[0036] 3) 실시간 중합효소 연쇄반응을 위한 프라이머

[0037] 대하에서 유래된 3개의 플라스미드와 흰다리새우에서 유래된 3개의 플라스미드의 총 6개 플라스미드의 뉴클레오티드 서열을 결정했고, 각 DNA 절편에서 유래된 실시간 PCR 프라이머 세트 고안을 위해 비교했다. 프라이머의 세가지 세트는 www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3에서 이용 가능한 Primer3 소프트웨어를 이용하여 실시간 PCR 용도로 고안했다. 프라이머 서열은 표 1에 나타냈고, 대하(*Fc*DNV, JN082231)에서 유래된 HPV 한국종에서의 상기 프라이머의 위치는 다음과 같다; 2,325-2,487(162bp) 상의 RT-1F/RT-1R, 3,476-3,604(129bp) 상의 RT-2F/RT-2R 및 5,232-5,432(201bp) 상의 RT-3F/RT-3R. 종래의 PCR 방법으로 상기 프라이머 세트의 특이성과 어닐링 온도를 시험했다. 각 프라이머 10pmol과 40 내지 100ng의 DNA 주형이 첨가된 PCR 반응 혼합액 튜브

(Prime Taq premix2X, Genetbio, Nonsan, Korea)에서 PCR을 수행했다. PCR 반응은 Gradient Thermal cycler(Bio-Rad Laboratories, Inc, USA)를 이용하여 95℃에서 3분 동안의 최초 변성; 95℃에서 30초 변성, 52-55℃에서의 40초 어닐링 및 72℃에서의 1분 중합의 35회 반응을 수행했다. 각 프라이머 세트의 어닐링 온도는 표 1에 나타내었다.

표 1

본 발명에 사용된 프라이머의 뉴클레오티드 서열, 위치 및 Tm.

[0038]

Primer	Nucleotide Sequences (5'-3')	Nucleotide Location (JN082231)	Tm
RT-1F	CAG CAG GCA GAT TAT ATT GAG G (서열번호 1)	2,325-2,346	52°C
RT-1R	TCT GTC TGC TCT GTC CAA TCA (서열번호 2)	2,487-2,467	
RT-2F	ACG ATC AGA GCA ATC CGA AG (서열번호 3)	3,476-3,495	55°C
RT-2R	TGG CTC TCT CCA GGT ATT CG (서열번호 4)	3,604-3,585	
RT-3F	CTC ATT GGA GTC ATG CCA AG (서열번호 5)	5,232-5,251	52°C
RT-3R	GAA TAT CGG AGC ACC CTC TG (서열번호 6)	5,432-5,413	
F2	AGC CAA TAA AGT ATG TAA GAA CAT ATA TG (서열번호 7)	1,696-1,725	52°C
R2	ACT GTG TCT GCA ACG ACC TG (서열번호 8)	3,421-3,440	
F3	AGG ATG ATT CCA ATC AAG AAG AA (서열번호 9)	3,051-3,073	52°C
R3	ACA CAT TGT CTC CAA TGT GTT TG (서열번호 10)	4,541- 4,563	
F4	GAG GCG GAA GAT ACG ATG G (서열번호 11)	4,347-4,563	52°C
R4	GAG GCG GAA GAT ACG ATG G (서열번호 12)	6,138-6,155	

[0039] 4) SYBR green을 이용한 실시간 중합효소 연쇄반응에 의한 프라이머 시험

[0040] 분석의 민감도와 재현성을 결정하기 위해 표준 플라스미드를 포함하는 HPV 유전자의 1 x 10^9부터 1 x 10^4 카피의 일련의 희석을 통해 세개의 표준 곡선을 독립적으로 생성했다. HPV에 감염된 조직에서 추출된 DNA 및 주형이 없는 대조군을 각각 양성 대조군 및 음성 대조군으로 사용했다. 10pmol의 각 프라이머, 10배 희석된 표준 플라스미드 또는 약 80ng의 HPV 관련 DNA를 첨가한 20ul의 *AccuPower* Green Star qPCR premix(Bioneer Corporation, Daejeon, Korea)으로 Exicycler 기기(Bioneer Corporation, Daejeon, Korea)를 이용해 반응을 수행했다. 온도 변화 양상은 95℃에서 7분 동안의 최초 변성; 95℃에서 30초 변성, 52-55℃에서 40초의 40회 반응으로 구성된 투-스텝 양상으로 구성했다.

[0041] 5) 선별된 표적의 서열 분석

[0042] RT-2F 및 RT-2R 프라이머로 증폭하여 생성된 129bp의 선별된 표적 서열은 프라이머 및 탐지자 결합 위치의 다양성을 비교하기 위해 Clustal W2(EBI)를 이용하여 GenBank(JN082231(*Fc*DNV, 한국), AY008257(HPVchin, 한국), EU588991(탄자니아), EU247528(마다가스카르), DQ002873(*Pm*DNV, 태국), DQ458781(*Pmerg*DNV, 호주), FJ410797(*Pm*DNV, 인도) 및 GU371276(중국)) 내에서 가능한 다른 HPV 서열과 함께 다중 정렬을 수행했다.

[0043] 6) Green Star qRT-PCR 진단 키트의 개발과 시험

[0044] SYBR green I 염료를 이용하는 Green Star qRT-PCR 진단 키트는 초기 SYBR green RT-PCR 시험에서 최상의 결과를 나타낸 RT-2F/RT-2R 프라이머 세트를 사용하여 한국의 대전에 위치한 ㈜바이오니아에서 고안하고 생산했다. 상기 키트는 15pmole의 RT-2F 및 RT-2R 프라이머, SYBR green I 염료 및 RT-PCR을 위한 필수 구성 성분이 포함

되었다. 시험 키트는 HPV에 감염되거나 감염되지 않은 샘플의 표준 플라스미드를 이용해 분석되었다. 각 20ul의 반응에서 표준 곡선 생성을 위하여 HPV 표준 플라스미드의 연속된 희석(1×10^3 - 1×10^9)을 사용했고, HPV에 감염되거나 감염되지 않은 새우로부터 추출한 총 DNA의 80ng을 샘플 시험에 사용했다. RT-PCR 온도 순환은 95℃에서 7분 동안의 최초 변성; 95℃에서 30초 변성, 55℃에서의 40초 어닐링 및 DNA 합성의 40회 반응으로 구성된 프로그램으로 Exicycler를 이용하여 수행되었다. 융해 곡선 분석은 0.1℃/2초의 전환 조건으로 60℃부터 95℃까지의 온도 증가를 통해 수행되었다. qRT-PCR 특이성은 융해 정점(melting peak) 분석과 증폭된 PCR 생성물의 2% 아가로스 겔 전기영동을 통해 시험했다. 순환 역치값(C_T)은 Exicycler3s 버전 3.547의 자동화된 역치 분석을 통해 결정되었다. 최소 검출 한계는 클로닝된 HPV DNA의 1부터 1×10^8 카피를 이용하여 분석되었다.

[0045] 7) Dual Star qRT-PCR 진단 키트의 개발과 시험

[0046] 형광 탐지자를 이용한 Dual Star qRT-PCR 반응 키트는 동결 건조된 형태로 한국의 대전에 위치한 ㈜바이오니아에서 생산했다. 한국 종 HPV(*Fc*DNV)의 서열에서 유래된, FAM이 결합된 TaqMan 탐지자(5'-CGGAGGGAGCTAACGAAATTAACGA-3'; 서열번호 13)는 www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3에서 이용 가능한 Primer3 소프트웨어를 이용하여 고안했다. 동결 건조된 각 튜브의 최종 반응 혼합액 20ul 내에는 real-time PCR 반응에 필요한 모든 구성 성분, RT-2F 및 RT-2R 15pmol 프라이머 및 탐지자 15pmol이 포함되어 있다. HPV 표준 플라스미드의 연속된 희석(1×10^3 - 1×10^9)은 표준 곡선 생성에 사용되었고 HPV에 감염되거나 감염되지 않은 새우에서 추출된 80ng 총 DNA는 실험군으로 사용되었다. RT-PCR 온도 순환은 95℃에서 7분 동안의 최초 변성; 95℃에서 30초 변성, 55℃에서의 40초 프라이머 어닐링 및 DNA 합성의 40회 반응으로 구성된 프로그램으로 Exicycler를 이용하여 수행되었다. 표준 증폭물은 특이성 시험을 위해 2% 아가로스 겔 상에서 분석되었다. Dual Star 키트의 최소 검출 한계는 클로닝된 HPV DNA의 1부터 1×10^8 카피를 이용하여 분석되었다.

[0047] 8) 검출 한계의 결정

[0048] 연속 희석된 HPV 플라스미드 DNA는 1부터 1×10^8 카피까지 제조되었다. 분석은 연속적으로 희석된 HPV 플라스미드 DNA 및 나머지 반응 성분이 포함된 20ul의 Green Star 및 Dual Star 반응 튜브 내에서 수행했다. 온도 순환 반응은 95℃에서 7분 동안의 최초 변성; 95℃에서 30초 변성, 55℃에서의 40초 프라이머 어닐링 및 DNA 합성의 40회 반응으로 구성된 프로그램으로 Exicycler를 이용하여 수행되었다.

[0049] **실시예 1. 최적 프라이머 조합의 선별**

[0050] RT-1F/RT-1R, RT-2F/RT-2R 및 RT-3F/RT3R의 세가지 프라이머 세트는 종래의 PCR 반응 수행을 통해 클로닝된 DNA로부터 각각 163bp, 129bp 및 201bp의 예상된 크기로 표적 DNA를 증폭시켰다. 모든 프라이머 세트에서 비특이적 증폭 및 프라이머 다이머는 나타나지 않았다(데이터 미제시). 따라서 클로닝된 DNA 및 HPV에 감염되거나 감염되지 않은 새우에서 추출된 DNA를 주형으로 하여 상기 세가지 프라이머 세트의 민감도 및 효율을 실시간 PCR 방법을 이용해 시험되었다. 세가지 프라이머 세트 모두 클로닝된 DNA 및 HPV에 감염된 새우에서 추출된 DNA로부터 형광 신호를 생산했으나 바이러스에 감염되지 않은 새우의 DNA에서는 형광 신호가 감지되지 않았다. 그러나, RT-3F/RT-3R 프라이머 세트를 사용한 RT-PCR은 일관되지 않았고 표준 곡선의 기울기 값은 -0.1866이었다. RT-2F/RT-2R 프라이머 세트를 이용한 반응의 효율은 99%였고 RT-1F/RT-1R은 87%, RT-3F/RT-3R은 57%였다. 따라서 본 발명에서는 RT-2F/RT-2R 프라이머 세트를 진단 키트 개발을 위한 프라이머로 선정하였다.

[0051] **실시예 2. 서열 분석**

[0052] RT-2F/RT-2R 프라이머 증폭을 통해 생성된 129bp의 표적 서열은 프라이머 위치 및 RT-PCR 탐지자 위치와 함께 도 1에 나타내었다. HPV 한국 분리균인 *Fc*DNV 및 대하로부터 분리된 HPVchin 및 흰다리새우에서 유래된 표적 서열은 100% 뉴클레오티드 서열과 동일성을 나타냈다. 그러나, 상기 영역은 다음과 같이 다른 지리학적 지역에서 분리된 HPV 종과는 낮은 서열 동일성 나타냈다. 탄자니아 종과 94.6%, 마다가스카르 종과 93.8%, 중국 종과

88.5%, *Pmerg*DNV와 88.4%, *Pm*DNV 인도 종과 76.3%, *Pm*DNV 태국 종과 72.4%의 동일성을 나타냈다.

[0053] **실시예 3. Green Star qRT-PCR 진단 키트의 분석**

[0054] Green Star 키트는 HPV 표준 플라스미드 및 HPV에 감염된 새우에서 무작위로 선별된 DNA 샘플을 이용해 분석했다. 표준 플라스미드의 1 x 10^9부터 1 x 10^3까지의 반응당 카피수로 증폭 곡선 및 표준 곡선을 생성했다(도 2). 표준 곡선은 -0.3257의 적절한 기울기를 나타냈고, 회귀 계수(regression coefficient) R^2 값은 0.997을 나타냈다. Green Star 키트의 특이성은 비특이 결합 또는 프라이머 다이머로부터 생성되는 다른 부가적인 피크 없이 하나의 반응 당 바람직한 단일 증폭 정점만을 보여주는 융해 정점(meltimg peak) 분석을 통해 확인했다(도 3A). 상기 결과는 증폭된 PCR 생성물의 아가로스 겔 전기영동을 통해 추가적으로 확인했다(도 3B). 무작위로 선별된 샘플 시험은 HPV에 감염된 새우에서 추출된 총 DNA의 80ng에서 7.74 x 10^1 부터 1.49 x 10^3카피의 HPV를 나타냈다.

[0055] **실시예 4. Dual Star qRT-PCR 진단 키트의 분석**

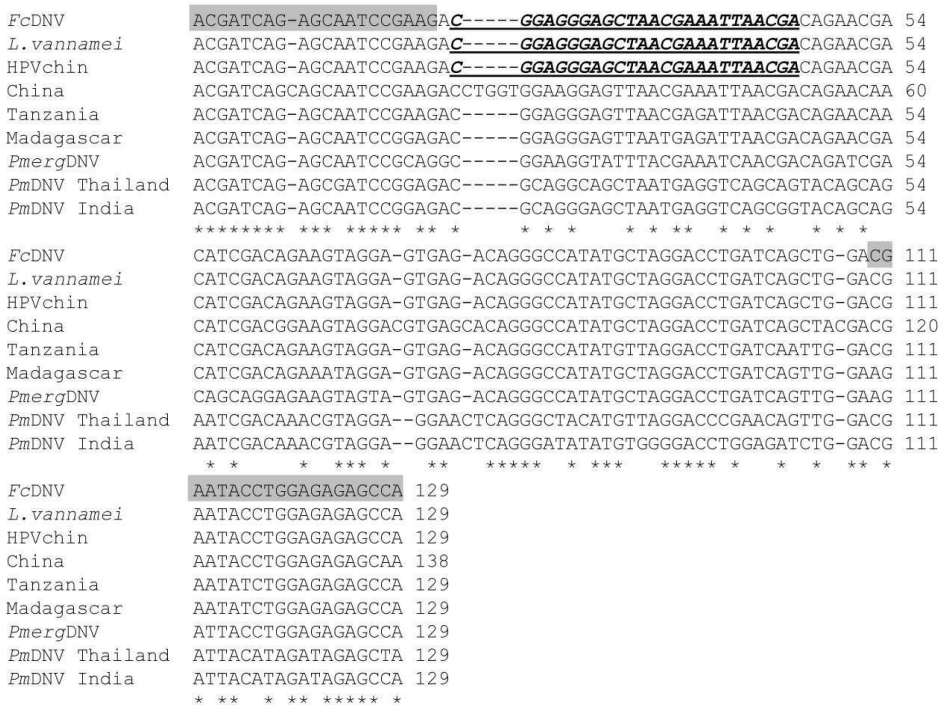
[0056] Dual Star 키트의 증폭 곡선과 표준 곡선은 도 4에 나타난 바와 같이 1 x 10^9부터 1 x 10^3 반응당 카피수까지의 표준 플라스미드를 통해 나타냈다. 표준 곡선은 -0.348의 적절한 기울기를 나타냈고, 0.9916의 높은 회귀 계수 R^2 값을 나타냈다. 증폭신호는 클로닝된 DNA 및 감염된 샘플에서만 검출되었다. HPV에 감염되지 않은 새우에서 추출된 총 DNA에서는 증폭 신호가 나타나지 않았다. Dual Star 키트의 특이성은 모든 증폭된 PCR 생성물의 2% 아가로스 겔 전기영동을 통해 분석했다. 도 5에서 나타낸 바와 같이, 129bp의 PCR 생성물만이 클로닝된 DNA 및 감염된 새우에서 검출되었고 다른 비특이 증폭은 나타나지 않았다. 무작위로 선별된 DNA 샘플로 수행된 시험은 80ng의 총 DNA에서 9.06 x 10^1부터 2.16 x 10^3 카피의 HPV 일치성을 보이는 특정 증폭을 나타냈다.

[0057] **실시예 5. 검출 한계의 결정**

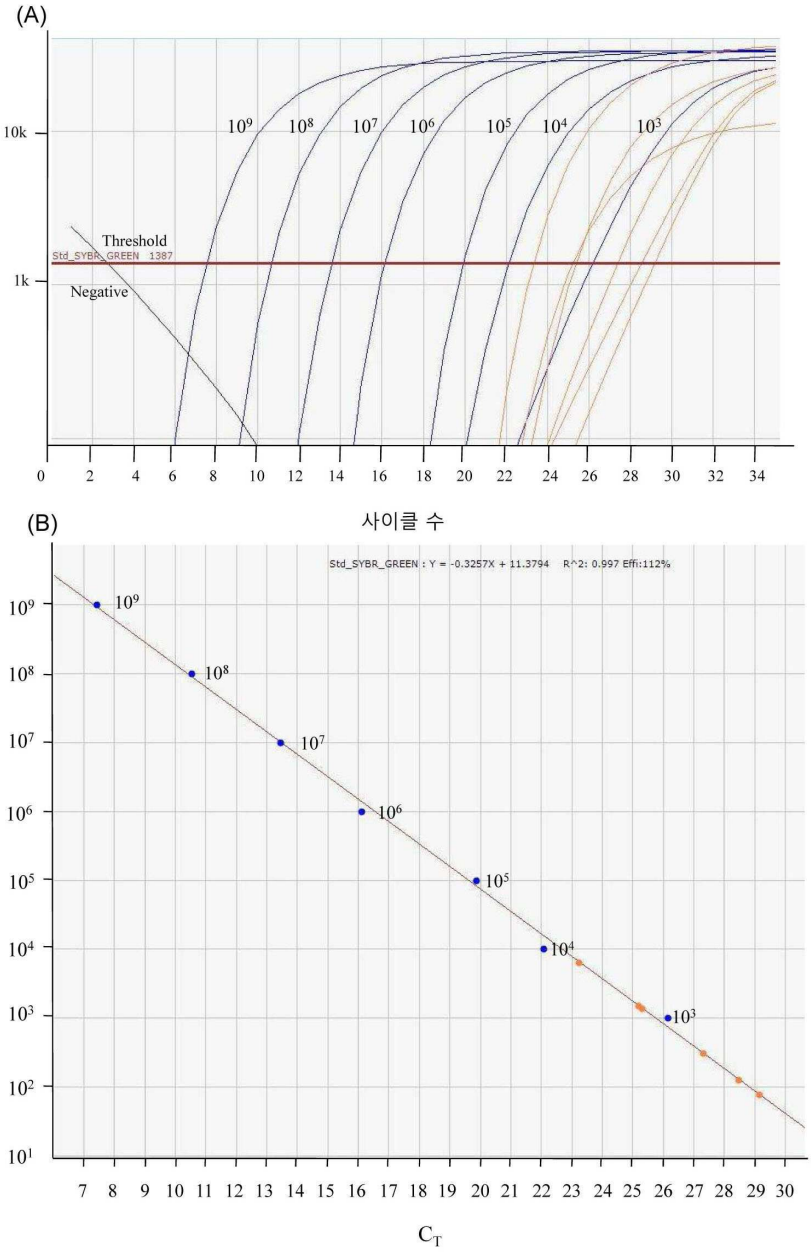
[0058] 두가지 진단 키트의 검출 한계는 반응당 표준 플라스미드의 1부터 1 x 10^8 카피수까지의 연속 희석을 이용해 결정했다. 표준 곡선은 Green Star에서는 -0.3238, Dual Star에서는 -0.314의 적절한 기울기를 나타냈다. Green Star 분석법의 회귀 계수 R^2 값은 0.997, 효율은 111%를 나타냈고 모든 희석된 플라스미드 DNA 샘플에서 신호가 검출되었다(도 6). Dual Star 분석법 역시 106%의 높은 효율을 나타냈고 회귀 계수 R^2 값은 0.9441을 나타냈으며 전체 희석된 플라스미드 DNA의 증폭 신호가 검출되었다(도 6). 상기 결과는 두 키트 모두 주형 DNA의 반응당 1 카피의 낮은 농도까지 검출 가능함을 나타냈다.

도면

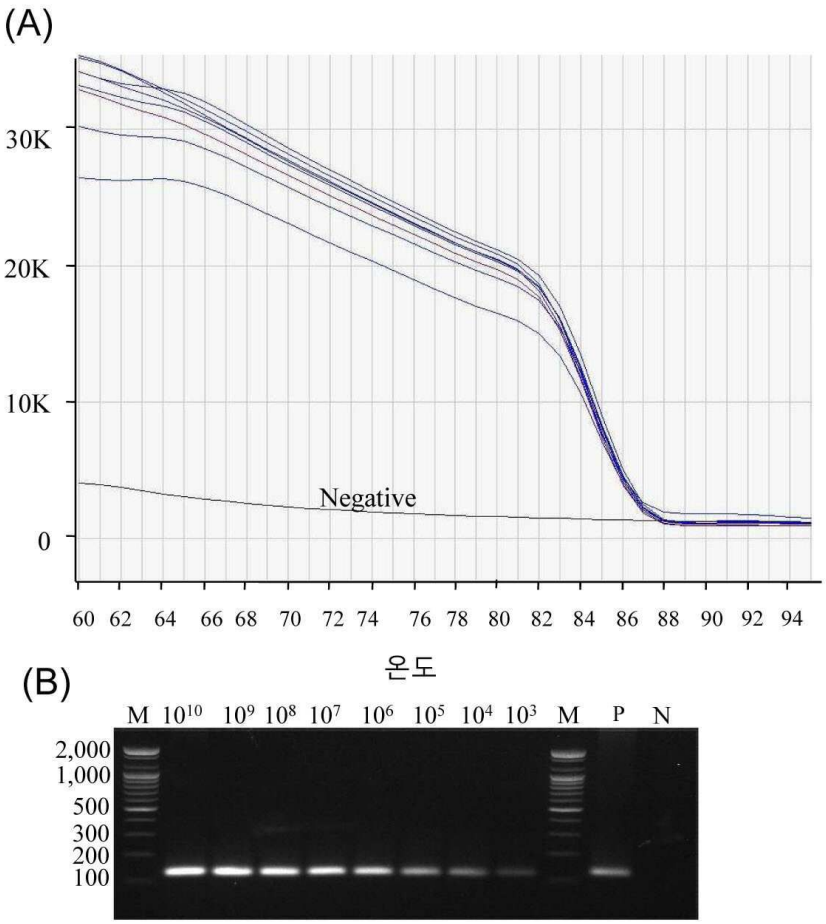
도면1


FcDNV ACGATCAG-AGCAATCCGAAGAC-----GGAGGGAGCTAACGAAATTAACGACAGAACGA 54
L.vannamei ACGATCAG-AGCAATCCGAAGAC-----GGAGGGAGCTAACGAAATTAACGACAGAACGA 54
HPVchin ACGATCAG-AGCAATCCGAAGAC-----GGAGGGAGCTAACGAAATTAACGACAGAACGA 54
China ACGATCAGCAGCAATCCGAAGACCTGGTGGAAGGAGTTAACGAAATTAACGACAGAACAA 60
Tanzania ACGATCAG-AGCAATCCGAAGAC-----GGAGGGAGTTAACGAGATTAACGACAGAACAA 54
Madagascar ACGATCAG-AGCAATCCGGAGAC-----GGAGGGAGTTAATGAGATTAACGACAGAACGA 54
PmergDNV ACGATCAG-AGCAATCCGCAGGC-----GGAAGGTATTTACGAAATCAACGACAGATCGA 54
PmDNV Thailand ACGATCAG-AGCGATCCGGAGAC-----GCAGGCAGCTAATGAGGTCAGCAGTACAGCAG 54
PmDNV India ACGATCAG-AGCAATCCGGAGAC-----GCAGGGAGCTAATGAGGTCAGCGGTACAGCAG 54
FcDNV CATCGACAGAAGTAGGA-GTGAG-ACAGGGCCATATGCTAGGACCTGATCAGCTG-GACG 111
L.vannamei CATCGACAGAAGTAGGA-GTGAG-ACAGGGCCATATGCTAGGACCTGATCAGCTG-GACG 111
HPVchin CATCGACAGAAGTAGGA-GTGAG-ACAGGGCCATATGCTAGGACCTGATCAGCTG-GACG 111
China CATCGACGGAAGTAGGACGTGAGCACAGGGCCATATGCTAGGACCTGATCAGCTACGACG 120
Tanzania CATCGACAGAAGTAGGA-GTGAG-ACAGGGCCATATGTTAGGACCTGATCAATTG-GACG 111
Madagascar CATCGACAGAAATAGGA-GTGAG-ACAGGGCCATATGCTAGGACCTGATCAGTTG-GAAG 111
PmergDNV CAGCAGGAGAAGTAGTA-GTGAG-ACAGGGCCATATGCTAGGACCTGATCAGTTG-GAAG 111
PmDNV Thailand AATCGACAAACGTAGGA--GGAACTCAGGGCTACATGTTAGGACCCGAACAGTTG-GACG 111
PmDNV India AATCGACAAACGTAGGA--GGAACTCAGGGATATATGTGGGGACCTGGAGATCTG-GACG 111
FcDNV AATACCTGGAGAGAGCCA 129
L.vannamei AATACCTGGAGAGAGCCA 129
HPVchin AATACCTGGAGAGAGCCA 129
China AATACCTGGAGAGAGCAA 138
Tanzania AATATCTGGAGAGAGCCA 129
Madagascar AATATCTGGAGAGAGCCA 129
PmergDNV ATTACCTGGAGAGAGCCA 129
PmDNV Thailand ATTACATAGATAGAGCTA 129
PmDNV India ATTACATAGATAGAGCCA 129

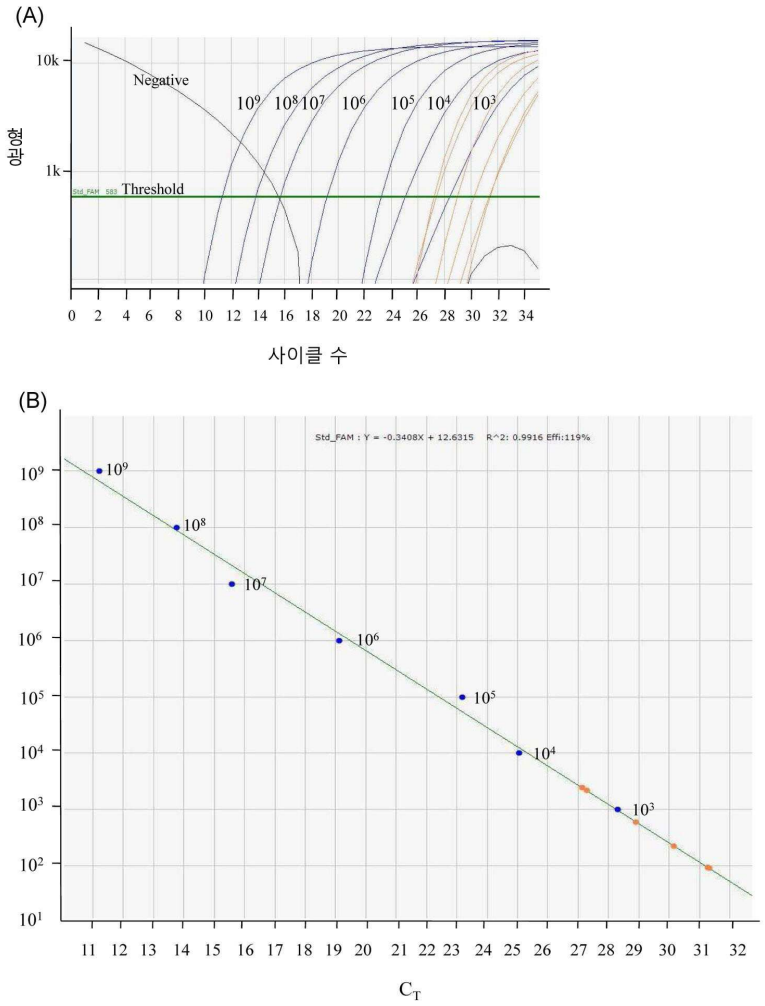
도면2


(A)
10k
1k
Threshold
Std_SYBR_GREEN 1387
Negative
10^9 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34
사이클 수
(B)
Std_SYBR_GREEN : Y = -0.3257X + 11.3794 R^2: 0.997 Effi:112%
10^9 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1
7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
C_T

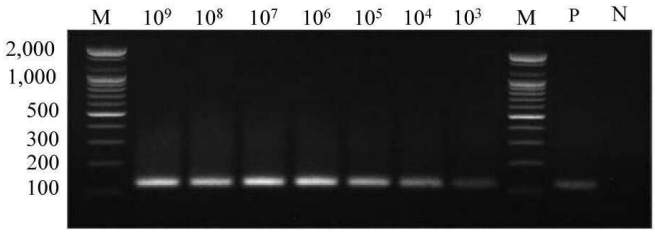
도면3


(A)
30K
20K
10K
0
Negative
60 62 64 66 68 70 72 74 76 78 80 82 84 86 88 90 92 94
온도
(B)
M 10^10 10^9 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 M P N
2,000
1,000
500
300
200
100

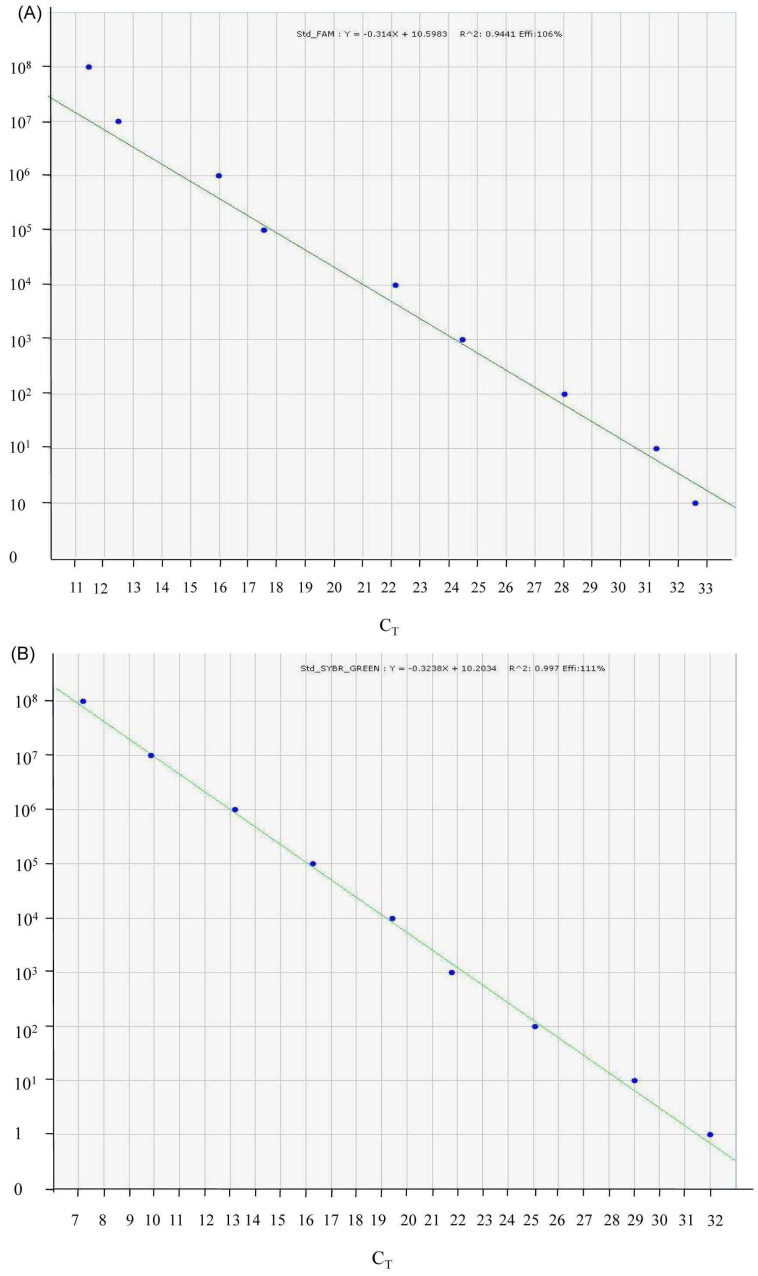
도면4


(A)
10k
1k
형광
Negative
Threshold
10^9 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34
사이클 수
(B)
Std_FAM : Y = -0.3408X + 12.6315 R^2: 0.9916 Effi:119%
10^9 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 10^2 10^1
11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32
C_T

도면5


M 10^9 10^8 10^7 10^6 10^5 10^4 10^3 M P N
2,000
1,000
500
300
200
100

도면6



서 열 목 록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

BIONEER CORPORATION

<120> Primer set for real-time diagnosing HPV, and uses thereof

<130> PN12095

<160> 13

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

cagcaggcag attatattga gg 22

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

primer

<400> 2

tctgtctgct ctgtccaatc a 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

acgatcagag caatccgaag 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

tggctctctc caggtattcg 20

<210> 5

<211> 20

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

ctcattggag tcatgccaag 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

gaatatcgga gcaccctctg 20

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

agccaataaa gtatgtaaga acatatatg 29

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

actgtgtctg caacgacctg 20

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

aggatgattc caatcaagaa gaa 23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

acacattgtc tccaatgtgt ttg 23

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

gaggcggaag atacgatgg 19

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

gaggcggaag atacgatgg 19

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> probe

<400> 13

cggagggagc taacgaaatt aacga 25