



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년07월13일

(11) 등록번호 10-2420294

(24) 등록일자 2022년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/689 (2018.01) C12Q 1/6851 (2018.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2018.05)
C12Q 1/6851 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2021-0151660(분할)

(22) 출원일자 2021년11월05일

심사청구일자 2021년11월05일

(65) 공개번호 10-2021-0135208

(43) 공개일자 2021년11월12일

(62) 원출원 특허 10-2020-0008189

원출원일자 2020년01월21일

심사청구일자 2020년01월21일

(56) 선행기술조사문헌

Alice Layton et al., Appl. Environ. Microbiol., 72(6), p.4214-4224, 2006.*
GENBANK ACCESSION NO. LT223636, KT935669, MN251973*

Yun-Wen Yang et al., Appl. Environ. Microbiol., 81(19), p.6749-6756, 2015.*
KR101212251 B1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경북대학교 산학협력단

대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

신재호

대구광역시 북구 침산로22길 31, 103동 103호

조영재

부산광역시 해운대구 마린시티2로 47, D동 1202호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 피씨알

전체 청구항 수 : 총 8 항

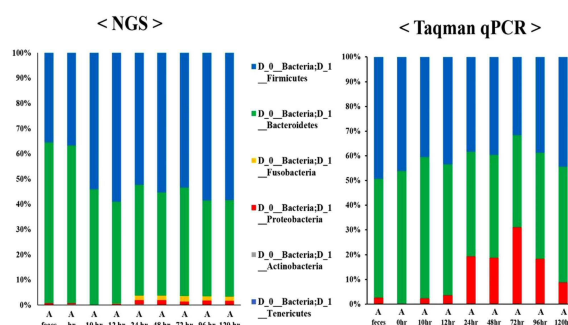
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 장내 미생물 검출 또는 정량용 TaqMan 프로브 및 조성물, 및 이를 이용한 TaqMan 실시간 중합효소연쇄반응에 의한 장내 미생물 검출 또는 정량 방법

(57) 요약

본 발명은 장내 미생물 검출 또는 정량용 TaqMan 프로브 및 조성물, 및 이를 이용한 TaqMan 실시간 중합효소연쇄반응에 의한 장내 미생물 검출 또는 정량 방법에 관한 것으로, NGS(New generation sequencing)를 이용한 분석 대비 검출 시간이 빠르고, 비용이 저렴하므로, 장내 미생물의 정량에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도19



(52) CPC특허분류

C12Q 2561/113 (2019.08)

C12Q 2563/107 (2013.01)

(72) 발명자

김민지

대구광역시 남구 효성로 70-4

최승대

강원도 강릉시 성산면 삼포암길 33-3

정연균

대구광역시 북구 경진로8길 6, 303호

김민철

대구광역시 북구 대학로 59-2, 305호

손현우

대구광역시 달서구 상화로58길 86 105동 406호

강기웅

경상북도 영주시 대학로163번길 22-6, 503호

박영준

대구광역시 달서구 성당로33길 16, 1016호

고 홍

서울특별시 강남구 삼성로111길 8, 205동 204호

박소원

서울시 영등포구 여의대로 6길 17 A동 408호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711081480

과제번호 2018M3A9H3025030

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오. 의료기술개발(R&D)

연구과제명 궤양성대장염 치료를 위한 맞춤형 분변미생물이식 기술개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교

연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프로브;

서열번호 8의 염기서열로 이루어진 프로브; 및

서열번호 13으로 이루어진 프로브

를 포함하는 클로스트리디움 디피실 감염증 환자의 장내 박테로이데테스 문(phylum), 퍼미큐테스 문 및 프로테오박테리아 문 균주 검출 또는 정량용 TaqMan 프로브 조성물로서;

상기 프로브는 5' 말단에 형광발색제(fluorescent reporter dye)가 표지되고 3' 말단에 소광제(quencher)가 표지된 것인 클로스트리디움 디피실 감염증 환자의 장내 미생물 검출 또는 정량용 TaqMan 프로브 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 형광발색제는 FAM(carboxyfluorescein), JOE(2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein), VIC, HEX(2',4',5',7',-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), Cy3(indocarbocyanine-3), Cy5(indocarbocyanine-5), Tex615 및 Rox(6-Carboxy-X-rhodamine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 클로스트리디움 디피실 감염증 환자의 장내 미생물 검출 또는 정량용 TaqMan 프로브 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 소광제는 MGB(minor-groove binding), BHQ-1(Black Hole Quencher 1), BHQ-2(Black Hole Quencher 2), BHQ-3(Black Hole Quencher 3), TAMRA(5-Carboxytetramethylrhodamine), DDQ1(deep dark Quencher 1), 및 DDQ2(deep dark Quencher 2)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인 클로스트리디움 디피실 감염증 환자의 장내 미생물 검출 또는 정량용 TaqMan 프로브 조성물.

청구항 4

제 1 항의 TaqMan 프로브 조성물; 및

장내 미생물 유전자 증폭용 프라이머 세트를 포함하고,

상기 프라이머 세트에 의해 증폭되는 주형(template) 염기서열은 상기 TaqMan 프로브에 상보적인 염기서열을 포함하는 것인

클로스트리디움 디피실 감염증 환자의 장내 미생물 검출 또는 정량용 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 17 및 서열번호 18의 염기서열로 이루어진 것인 클로스트리디움 디피실 감염증 환자의 장내 미생물 검출 또는 정량용 조성물.

청구항 6

- (a) 장내 유래 시료(sample)로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;
 - (b) 상기 게놈 DNA 및 제 4 항의 조성물을 포함하는 실시간 중합효소연쇄반응(Real-Time Polymerase Chain Reaction)액을 제조하는 단계; 및
 - (c) 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하는 단계
- 를 포함하는 클로스트리디움 디피실 감염증 환자의 장내 미생물 검출 또는 정량 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 실시간 중합효소연쇄반응의 어닐링(Annealing) 단계는 60℃에서 30초 동안 이루어지고, 신장(extension) 단계는 72℃에서 30초 동안 이루어지는 것인 클로스트리디움 디피실 감염증 환자의 장내 미생물 검출 또는 정량 방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 상기 조성물에 포함되는 프라이머 세트는 서열번호 17 및 서열번호 18의 염기서열로 이루어진 것인 클로스트리디움 디피실 감염증 환자의 장내 미생물 검출 또는 정량 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 장내 미생물 검출 또는 정량용 TaqMan 프로브 및 조성물, 및 이를 이용한 TaqMan 실시간 중합효소연쇄반응에 의한 장내 미생물 검출 또는 정량 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인체 미생물(human microbiome)은 피부, 구강, 치아, 생식기, 호흡기, 위장관 등 여러 신체부위에 존재하나, 이중 가장 많고 다양한 종류의 미생물을 보유하고 있는 곳은 위장관(gastrointestinal tract)이다. 위장관은 500 내지 1000 개의 다른 종으로 구성된 미생물 군집에 안정적인 거주지를 제공하며 상호작용을 하는 생태계(ecosystem)을 이루고 있다. 위장관 내에 존재하는 미생물의 무게는 대략 0.5 내지 1.5kg에 이르는 것으로 알려져 있으며, 건강한 사람인 경우 그람 음성균인 박테로이데테스 문과 그람 양성균인 퍼미큐테스가 대부분을 차지하며 안정된 상태를 이루고 있다. 하지만 스트레스, 항생제와 같은 외부 요인으로 인해 장내 미생물 군집의 균형이 무너지고 프로테오박테리아(proteobacteria)가 증가하는데 이를 장내 세균 불균형(dysbiosis)이라고 한다.

[0003] 세균 불균형과 연관이 있다고 알려져 있는 질병 중 하나인 클로스트리디움 디피실 감염증(*Clostridium difficile* infection)은 클로스트리디움 디피실 균의 과다 증식으로 설사를 일으키는 질환을 말한다. 클로스트리디움 디피실 감염의 치료는 메트로니다졸, 반코마이신 등의 약제를 1 내지 2주간 경구로 투여하여 이루어지는데, 클로스트리디움 디피실 감염증은 재발이 흔하며 재발 횟수가 늘어날수록 기존의 치료에 반응하지 않는 경우가 많아 치료에 어려움이 있다. 또한, 의학기술의 발달로 인한 고령화 등으로 인하여 난치성 클로스트리디움 디피실 감염증의 유병률이 갈수록 증가하고 있고 적절히 치료되지 않을 경우, 사망의 원인이 되기도 한다.

[0004] 이와 같은 문제를 해결하기 위해 건강인의 대변을 이식하는 방법(분변 미생물군 이식(Fecal Microbiota Transplantation, FMT))이 시도되고 있다. 현재까지 발표된 500건 이상의 사례와 연구보고에 따르면 건강인의 대변을 정제하여 환자의 장내에 주입했을 때, 클로스트리디움 디피실 감염증으로 인한 염증 증상의 개선과 함께 재발이 없는 완치가 90%에 이르렀다는 2012년의 선행 연구를 포함하여 현재까지 클로스트리디움 디피실 감염증 치료를 대변 이식으로 성공했다는 사례가 지속적으로 보고되고 있다.

[0005] 다만, 성공적인 FMT 시술을 위해서는 대변 기증자와 클로스트리디움 디피실 감염증 환자의 정밀한 장내 미생물 군집분석이 선행되어야 한다. 장내 미생물은 크게 박테로이데테스 문(phylum), 퍼미큐테스 문 및 프로테오박테리아 문 등 3 종류의 문으로 이루어진 미생물로 구성된다. 현재까지 FMT 시술을 위한 장내 미생물 군집의 문 단계에서의 우점도 및 유형을 확인하는 방법으로 NGS(Next generation sequencing) 방법이 사용되고 있다. NGS 방법에 의하여 모든 장내 미생물의 검출이 가능하나, 긴 시간과 높은 비용이 부담으로 작용하고, 정량적 분석에

제한이 있다. 따라서, FMT 기술이 시급한 응급상황에서 NGS의 활용도가 낮으므로, NGS를 대체할 수 있는 장내 미생물(gut microbiota)의 신속하고 저렴한 분석방법에 대한 요구가 증가하고 있다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 NGS를 대체할 수 있는 새로운 장내 미생물의 군집분석 방법을 개발하기 위한 연구를 수행하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개 제10-2019-0004586호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프로브; 서열번호 8의 염기서열로 이루어진 프로브; 및 서열번호 13으로 이루어진 프로브를 포함하는 장내 미생물 검출 또는 정량용 TaqMan 프로브를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 TaqMan 프로브; 및 장내 미생물 유전자 증폭용 프라이머 세트를 포함하고, 상기 프라이머 세트에 의해 증폭되는 주형(template) 염기서열은 상기 TaqMan 프로브에 상보적인 염기서열을 포함하는 것인 장내 미생물 검출 또는 정량용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 장내 유래 시료(sample)로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계; (b) 상기 게놈 DNA 및 상기 조성물을 포함하는 실시간 중합효소연쇄반응(Real-Time Polymerase Chain Reaction)액을 제조하는 단계; 및 (c) 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하는 단계를 포함하는 장내 미생물 검출 또는 정량 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양상은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프로브; 서열번호 8의 염기서열로 이루어진 프로브; 및 서열번호 13으로 이루어진 프로브를 포함하는 장내 미생물 검출 또는 정량용 TaqMan 프로브를 제공한다.

[0012] TaqMan qPCR은 SYBR Green에 비해 정확도가 높고 멀티플렉스(multiplex) PCR이 가능하다는 장점이 있으며, NGS 대비 저렴한 가격과 짧은 시간안에 결과를 확인할 수 있다는 장점이 있다.

[0013] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 프로브는 5' 말단에 형광발색제(fluorescent reporter dye)가 표지되고 3' 말단에 소광제(quencher)가 표지된 것일 수 있다.

[0014] TaqMan qPCR 방법은 PCR에 의한 DNA의 증폭 과정에서, 주형(template) DNA에 상보적으로 결합된 프로브의 절단에 의해 발생하는 발광을 측정하여 표적 DNA를 검출 및 정량할 수 있는 방법이다. TaqMan 프로브는 5' 말단에 형광발색제(fluorescent reporter dye)가, 3' 말단에는 상쇄물질인 소광제(quencher)가 결합되어 있는데, 평소에는 소광제에 의해 형광발색제의 빛이 상쇄되고 있으므로 발광이 측정되지 않는다. PCR 과정에서, 프라이머와 프로브가 주형 DNA에 결합한 후 Taq 중합효소(polymerase)가 DNA를 합성하기 시작하면 Taq 중합효소의 핵산 말단분해효소(exonuclease)의 활성으로 인하여 프로브의 염기서열이 끊어지면서 형광발색제와 소광제가 분리됨에 따라 형광발색제에 의한 발광이 측정된다. 이러한 원리에 의하여 표적 DNA의 검출이 가능하며, DNA가 합성될 때마다 발하는 형광의 양도 증가하므로, 실시간으로 형광의 증가량을 분석하여 정량이 가능하다.

[0015] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 형광발색제는 FAM(carboxyfluorescein), JOE(2,7-dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein), VIC, HEX(2',4',5',7',-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein), Cy3(indocarbocyanine-3), Cy5(indocarbocyanine-5), Tex615 및 Rox(6-Carboxy-X-rhodamine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 소광제는 MGB(minor-groove binding), BHQ-1(Black Hole Quencher 1), BHQ-2(Black Hole Quencher 2), BHQ-3(Black Hole Quencher 3), TAMRA(5-Carboxytetramethylrhodamine), DDQ1(deep dark Quencher 1), 및 DDQ2(deep dark Quencher 2)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일

수 있다.

- [0017] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 장내 미생물은 박테로이테테스 문(phylum), 퍼미큐테스 문 및 프로테오박테리아 문 균주일 수 있다.
- [0018] 대부분의 정상인이라 판단되는 사람의 장내미생물 군집상태는 박테로이테테스 문 및 퍼미큐테스 문의 비율이 약 1:1로 유지되고 있으며, 대변샘플의 보관상태에 따라 약간의 프로테오박테리아가 검출되는 것으로 알려져 있다. 본 발명의 장내 미생물 검출 또는 정량용 TaqMan 프로브를 사용한 TaqMan qPCR 결과와 NGS 분석 결과를 비교한 결과, 박테로이테테스와 퍼미큐테스의 비율은 약 1:1로 나타나 NGS의 결과와 동일한 경향을 나타내는 것으로 확인되어, 본 발명의 TaqMan 프로브는 장내 미생물 검출 또는 정량에 효과적으로 활용될 수 있는 것으로 확인되었다.
- [0019] 본 발명의 다른 양상은 상기 TaqMan 프로브; 및 장내 미생물 유전자 증폭용 프라이머 세트를 포함하고, 상기 프라이머 세트에 의해 증폭되는 주형(template) 염기서열은 상기 TaqMan 프로브에 상보적인 염기서열을 포함하는 것인 장내 미생물 검출 또는 정량용 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 장내 미생물 검출 또는 정량용 조성물에 있어서, 전술한 내용과 중복되는 부분은 전술한 의미와 동일한 의미로 사용될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 프라이머 세트는 서열번호 17 및 서열번호 18의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 프로브는 5' 말단에 형광발색제(fluorescent reporter dye)가 표지되고 3' 말단에 소광제(quencher)가 표지된 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 장내 미생물은 박테로이테테스 문(phylum), 퍼미큐테스 문 및 프로테오박테리아 문 균주일 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0025] 본 발명의 키트는 상기 조성물, 구체적으로, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프로브, 서열번호 8의 염기서열로 이루어진 프로브 및 서열번호 13으로 이루어진 TaqMan 프로브 및 장내 미생물 유전자 증폭용 프라이머 세트를 포함하고, 샘플을 담는 구획된 캐리어 수단, 상기 프라이머 세트 및 프로브를 포함하는 용기, PCR 반응용 버퍼 및 DNA 중합효소 등 TaqMan qPCR의 수행에 필요한 재제를 함유하는 용기를 포함한 하나 이상의 용기를 더 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 양상은 (a) 장내 유래 시료(sample)로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계; (b) 상기 게놈 DNA 및 상기 조성물을 포함하는 실시간 중합효소연쇄반응(Real-Time Polymerase Chain Reaction)액을 제조하는 단계; 및 (c) 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하는 단계를 포함하는 장내 미생물 검출 또는 정량 방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명에서 사용되는 장내 유래 시료는 동물의 장에서 채취한 시료일 수 있으며, 예를 들어, 분변일 수 있다.
- [0028] 게놈 DNA를 추출하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법(Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001))을 통해 이루어질 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 사용되는 실시간 중합효소연쇄반응액은 상기 (a) 단계에서 시료로부터 추출한 게놈 DNA를 PCR의 주형 DNA로서 포함한다. 중합효소연쇄반응액은 DNA 중합효소(예를 들어, Taq(*Thermus aquaticus*), Tth(*Thermus thermophilus*), Tfi(*Thermus filiformis*), Thermis flavus, *Thermococcus litoralis* 또는 Pfu(*Pyrococcus furiosus*)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), dNTP 혼합물(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), PCR 버퍼(buffer) 및 DNA 중합 효소 조인자를 포함하는 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 실시간 중합효소연쇄반응의 어닐링(Annealing) 단계는 60℃에서 30초 동안 이루어지고, 신장(extension) 단계는 72℃에서 30초 동안 이루어질 수 있다.
- [0031] 본 발명에서는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프로브, 서열번호 8의 염기서열로 이루어진 프로브, 및 서열번호 13으로 이루어진 프로브를 사용한 TaqMan qPCR에 있어서, 60℃에서 30초의 어닐링(Annealing) 및 72℃에서 30초의 신장(extension) 조건에서 박테로이테테스 문, 퍼미큐테스 문 및 프로테오박테리아 문에 속하는 미생물의 검출이 가장 효과적인 것으로 확인되었다.
- [0032] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 조성물에 포함되는 프라이머 세트는 서열번호 17 및 서열번호 18의 염기서

열로 이루어진 것일 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 조성물에 포함되는 프로브는 5' 말단에 형광발색제(fluorescent reporter dye)가 표지되고 3' 말단에 소광제(quencher)가 표지된 것일 수 있다.

[0034] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 장내 미생물은 박테로이데테스 문(phylum), 페미큐테스 문 및 프로테오박테리아 문 균주일 수 있다.

발명의 효과

[0035] 장내 미생물 검출 또는 정량용 TaqMan 프로브 및 조성물, 및 이를 이용한 TaqMan 실시간 중합효소연쇄반응에 의한 장내 미생물 검출 또는 정량 방법에 따르면, NGS(New generation sequencing)를 이용한 분석 대비 검출 시간이 빠르고, 비용이 저렴하므로, 장내 미생물의 정량에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 TaqMan qPCR 프로브의 제작을 위한 박테로이데테스 문에 속하는 대표 미생물의 MSA(Multiple sequence alignment) 결과 및 각 염기서열의 정보를 나타낸 그림이다.

도 2는 TaqMan qPCR 프로브의 제작을 위한 페미큐테스 문에 속하는 대표 미생물의 MSA 결과 및 각 염기서열의 정보를 나타낸 그림이다.

도 3은 TaqMan qPCR 프로브의 제작을 위한 프로테오박테리아 문에 속하는 대표 미생물의 MSA 결과 및 각 염기서열의 정보를 나타낸 그림이다.

도 4는 TaqMan qPCR 프로브의 제작을 위한 박테로이데테스 문, 페미큐테스 문 및 프로테오박테리아 문에 속하는 대표 미생물의 MSA 결과 및 각 염기서열의 정보를 나타낸 그림이다.

도 5는 TaqMan qPCR 정방향(forward) 프라이머의 제작을 위한 박테로이데테스 문, 페미큐테스 문 및 프로테오박테리아 문에 속하는 대표 미생물의 MSA 결과 및 각 염기서열의 정보를 나타낸 그림이다.

도 6은 TaqMan qPCR 역방향(reverse) 프라이머의 제작을 위한 박테로이데테스 문, 페미큐테스 문 및 프로테오박테리아 문에 속하는 대표 미생물의 MSA 결과 및 각 염기서열의 정보를 나타낸 그림이다.

도 7은 박테로이데테스 문에 대한 후보 프로브의 *in silico* PCR 분석 결과이다.

도 8은 페미큐테스 문에 대한 후보 프로브의 *in silico* PCR 분석 결과이다.

도 9는 프로테오박테리아 문에 대한 후보 프로브의 *in silico* PCR 분석 결과이다.

도 10은 박테로이데테스 문, 페미큐테스 문 및 프로테오박테리아 문에 대한 프로브의 *in silico* PCR 분석 결과이다.

도 11은 박테로이데테스 문, 페미큐테스 문 및 프로테오박테리아 문에 대한 프라이머의 *in silico* PCR 분석 결과이다.

도 12는 *Bacteroides cellulosilyticus* JCM 15632 gDNA에 대한 Bat1 프로브의 특이적 검출 결과를 나타낸 그림이다.

도 13은 *Serratia marcescens* RCS-14 gDNA에 대한 Pro3 프로브의 특이적 검출 결과를 나타낸 그림이다.

도 14는 *Clostridium butyricum* TO-A gDNA에 대한 Fir7 프로브의 특이적 검출 결과를 나타낸 그림이다.

도 15는 사람의 분변에서 추출한 DNA에 대한 Bat1, Fir7 및 Pro3 프로브의 검출 결과를 나타낸 그림이다.

도 16은 신장(extension) 조건 없이 60℃에서 1분 어닐링(annealing) 조건에서의 TaqMan qPCR 분석 결과를 나타낸 그림이다.

도 17은 60℃에서 45초 어닐링 및 72℃에서 15초 신장 조건에서의 TaqMan qPCR 분석 결과를 나타낸 그림이다.

도 18은 60℃에서 30초 어닐링 및 72℃에서 30초 신장 조건에서의 TaqMan qPCR 분석 결과를 나타낸 그림이다.

도 19 내지 도 21은 사람의 분변 샘플에서 추출한 DNA를 NGS 및 TaqMan qPCR 방법으로 분석한 결과를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하 본 발명을 하나 이상의 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 실시예 1. 인간 장내 미생물의 각 문(phylum)에 특이적으로 결합하는 TaqMan qPCR용 프로브 및 프라이머 제작

[0040] 인간 장내 미생물의 각 문에 특이적으로 결합하는 TaqMan qPCR용 프라이머를 제작하기 위하여, CLC genomic workbench ver.8를 사용하여 기존에 장 내 풍부하게 서식한다고 연구된 박테로이데테스, 퍼미큐테스 및 프로테오박테리아 3개의 문에 해당하는 미생물의 대표적인 균을 각 문에서 5종 이상씩 선별한 다음, 16s rRNA 유전자 영역의 염기서열을 MSA(Multiple sequence alignment)하여 공통된 염기서열 영역에서 박테로이데테스 문, 퍼미큐테스 문 또는 프로테오박테리아의 각 문에 특이적으로 사용될 수 있는 TaqMan qPCR용 후보 프로브 서열을 얻었다.

[0041] 구체적으로, 3개 문의 공통된 영역에서 Universal 프라이머 27F가 DNA에 결합하는 영역을 27이라고 했을 때, 각 문별로 해당 영역에서 중복되지 않도록, 368 내지 387 영역을 박테로이데테스 문 균주에 특이적인 후보 프로브 서열로 선별하였고(표 1 및 도 1), 289 내지 310 영역을 퍼미큐테스 문 균주에 특이적인 후보 프로브 서열로 선별하였으며(표 2 및 도 2), 433 내지 460 영역을 프로테오박테리아 문 균주에 특이적인 후보 프로브 서열로 선별하였다(표 3 및 도 3).

[0042] 표 1의 각 염기서열에서 'N'은 A, T, G 또는 C의 염기를 나타낸다. 표 2의 각 염기서열에서 'R'은 G 또는 T의 염기를 나타내며, 'M'은 A 또는 C의 염기를 나타낸다.

표 1

[0044]

프로브 명칭	염기서열(5'→3')	서열번호	Tm(℃)	GC(%)
Bat1	GAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGT	서열번호 1	60.4	50
Bat2	GANGCAGCAGTGAGGAATATTNGT	서열번호 2	58.7	41
Bat3	GCGAGAGCCTGAACCAGCCAAGTA	서열번호 3	63.4	58
Bat4	GCGAGAGCCTGAACCAGTTCAAGTA	서열번호 4	62.2	52
Bat5	GANGCTGCAGTGAGGAATATTNGT	서열번호 5	58.7	41

표 2

[0046]

프로브 명칭	염기서열(5'→3')	서열번호	Tm(℃)	GC(%)
Fir5	AAGGCGACGATCGGTAGCCRM	서열번호 6	61.7	57
Fir6	AAGGCGACGATCGGTAGCCAM	서열번호 7	60.7	57
Fir7	AAGGCGACGATCGGTAGCCGRM	서열번호 8	63.7	59
Fir8	AAGGCGACGATCGGTAGCAGRM	서열번호 9	63.7	59
Fir9	AAGGCGACGATCGGTAGCGGRM	서열번호 10	63.7	59

표 3

[0048]

프로브 명칭	염기서열(5'→3')	서열번호	Tm(℃)	GC(%)
Pro1	GCCTTCGGGTTGTAAAGTTCTTTCATC	서열번호 11	62.4	48
Pro2	GCCTTCGGGTTGTAAAGTTCTTTCAGC	서열번호 12	62.4	48
Pro3	GCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGC	서열번호 13	62.4	48
Pro4	GCCTTCGGGTTGATAAAGTTCTTTCAGC	서열번호 14	62.5	46
Pro5	GCCTTATGGTTGATAAAGTTCTTTCAGC	서열번호 15	59.6	39

[0050] 3개 문의 모든 균주의 TaqMan qPCR 검출을 위한 프로브로는 universal 프라이머로 알려져 있는 염기서열(Eub518)을 사용하였다(표 4 및 도 4).

표 4

프로브 명칭	염기서열(5'→3')	서열번호	Tm(℃)	GC(%)
Eub518	ATTACCGCGGCTGCTGG	서열번호 16	56.0	64

[0052]

[0054]

또한, 박테로이데테스, 퍼미큐테스 및 프로테오박테리아 3개 문의 공통된 영역에서, 각 문별로 선별된 프로브에 의한 TaqMan qPCR이 모두 수행될 수 있는 하나의 프라이머쌍을 제작하였다. 구체적으로, 268 내지 280 영역에서 정방향(forward) 프라이머(Eub268, 표 5 및 도 5)를 제작하였고, 797 내지 820 영역에서 역방향(reverse) 프라이머(Eub797, 표 6 및 도 6)를 제작하였다. 표 5의 각 염기서열에서 'W'은 A 또는 T의 염기를 나타내며, 'Y'는 C 또는 T의 염기를 나타낸다.

표 5

프라이머 명칭	염기서열(5'→3')	서열번호	Tm(℃)	GC(%)
Eub268	TWGGYGRGGTAACGGCYCACCWACG	서열번호 17	62.9	52

[0056]

표 6

프라이머 명칭	염기서열(5'→3')	서열번호	Tm(℃)	GC(%)
Eub797	GGACTACCAGGTATCTAATCTGT	서열번호 18	60.7	46

[0058]

[0060] 실시예 2. *In silico* PCR을 이용한 프라이머의 미생물 검출을 예측

[0061]

실시예 1에서 제작한 각 프로브에 대한 프라이머의 검출율을 예측하기 위하여, SILVA 데이터베이스를 기반으로 한 *In silico* PCR을 수행하였다.

[0062]

그 결과, 박테로이데테스 문의 검출을 위한 표 1의 프로브 중 프로브의 mismatch를 2로 설정하였을 때, 도 7과 같이, 박테로이데테스 문의 검출율이 87%로 가장 높은 것으로 확인되었으며, 퍼미큐테스 문의 검출율은 9.3%로 나타났다. 한편, 프로테오박테리아 문의 검출율은 40%로 확인되었으나, 일반적으로 장 속에서 발견되는 프로테오박테리아 문은 대부분 엔테로박테리시아시에 과가 대부분으로, 엔테로박테리시아시에 과의 검출율은 0.21%로 매우 낮은 것으로 나타났다. 따라서, Bat1(5'-GAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGT-3')을 박테로이데테스 문의 검출을 위한 프로브로 선정하였다.

[0063]

퍼미큐테스 문의 검출을 위한 표 2의 프로브 중 프로브의 mismatch를 2로 설정하였을 때, 도 8과 같이, 퍼미큐테스 문의 검출율이 97%로 가장 높은 것으로 확인되었으며, 박테로이데테스 문의 검출율은 0.51%, 프로테오박테리아 문의 검출율은 2.7%로 나타났다. 따라서, Fir7(5'-AAGCGACGATCGGTAGCCGRM-3')을 퍼미큐테스 문의 검출을 위한 프로브로 선정하였다.

[0064]

프로테오박테리아 문의 검출을 위한 표 3의 프로브 중 프로브의 mismatch를 2로 설정하였을 때, 도 9와 같이, 프로테오박테리아 문의 검출율은 23%로 확인되었다. 프로테오박테리아 문 전체의 검출율은 23%로 비교적 낮은 수치로 나타났으나, 장내 서식한다고 알려진 대부분의 프로테오박테리아 문은 엔테로박테리시아시에 과에 속하며, 엔테로박테리시아시에 과의 검출율은 96%로 가장 높은 것으로 확인되었다. 박테로이데테스 문의 검출율은 0.02%, 퍼미큐테스 문의 검출율은 0.01%로 나타났다. 따라서, Pro3(5'-GCCTTCGGTTGTAAAGTACTTTCAGC-3')를 프로테오박테리아 문의 검출을 위한 프로브로 선정하였다.

[0065]

또한, 표 4의 프로브(Eub518)를 사용할 경우, 전체 박테리아의 검출율은 98%인 것으로 예측되었으며(도 10), TaqMan qPCR의 프라이머인 Eub268(5'-TWGGYGRGGTAACGGCYCACCWACG-3') 및 Eub797(5'-GGACTACCAGGTATCTAATCTGT-3')를 사용할 경우, 전체 박테리아의 검출율은 76%인 것으로 예측되었다(도 11).

[0067]

실시예 3. 선별한 프로브의 특이적 반응 확인

[0068]

Taqman qPCR 용 프로브를 제작하기 전, 실시예 2에서 선별한 프로브 및 프라이머가 표적 DNA에만 특이적으로 작용하는지 확인하기 위하여, *Bacteroides cellulosilyticus* JCM 15632 및 *Serratia marcescens* RCS-14 계통 DNA를 각각 박테로이데테스 및 프로테오박테리아 확인을 위한 주형으로 사용하여 PCR 반응을 수행하였다. 한편, 퍼미

큐테스의 확인을 위하여, 기존에 NGS(New generation sequencing) 데이터가 있는 사람의 분변에서 추출한 DNA를 사용하였다.

[0069] 박테로이데스 문의 특이적 검출 여부를 확인하기 위하여, *Bacteroides cellulosilyticus* JCM 15632를 주형으로, Bat1, Fir7 및 Pro3를 각각 사용하여 PCR 반응을 수행한 결과, Bat1을 사용한 PCR 결과물에서만 DNA 밴드가 확인되었으며, Fir7 또는 Pro3를 사용한 PCR 결과물에서는 밴드가 나타나지 않은 것으로 확인되었다(도 12).

[0070] 프로테오박테리 문의 특이적 검출 여부를 확인하기 위하여, *Serratia marcescens* RCS-14를 주형으로, Bat1, Fir7 및 Pro3를 각각 사용하여 PCR 반응을 수행한 결과, Pro3를 사용한 PCR 결과물에서만 DNA 밴드가 확인되었으며, Bat1 또는 Fir7을 사용한 PCR 결과물에서는 밴드가 나타나지 않은 것으로 확인되었다(도 13).

[0071] 퍼미큐테스 문의 특이적 검출 여부를 확인하기 위하여, *Clostridium butyricum* TO-A를 주형으로, Bat1, Fir7 및 Pro3를 각각 사용하여 PCR 반응을 수행한 결과, Fir7를 사용한 PCR 결과물에서만 DNA 밴드가 확인되었으며, Bat1 또는 Pro3를 사용한 PCR 결과물에서는 밴드가 나타나지 않은 것으로 확인되었다(도 14).

[0072] 한편, 건강한 사람의 대변에서 추출한 gDNA를 주형(template)으로, Bat1, Fir7 및 Pro3를 각각 사용하여 PCR 반응을 수행한 결과, 모든 프로브에서 PCR 밴드가 나타나는 것으로 확인되었다(도 15).

[0073] 이와 같은 결과를 통하여, 실시예 2에서 선별한 각 프로브 및 프라이머는 장내 미생물의 문 특이적 검출에 사용될 수 있는 것으로 확인되었다.

[0075] 실시예 4. TaqMan qPCR 프로브 제작 및 qPCR 최적 조건 확인

[0076] 실시예 3에서 장내 미생물의 문 특이적 검출에 사용될 수 있는 것으로 확인된 Bat1, Fir7 및 Pro3 프로브의 염기서열을 이용해 TaqMan qPCR용 프로브를 제작하였다.

[0077] TaqMan qPCR은 CFX96 장비를 사용하여 수행되었다. 한편, CFX96 장비는 멀티플렉스 qPCR 수행시 5개의 프로브를 동시에 사용할 수 있는 것으로 매뉴얼에 기재되어 있으나, 프로브 간의 파장 간섭을 최소화하기 위하여 최대 4개의 프로브를 사용하여 qPCR을 수행하였다.

[0078] TaqMan qPCR 프로브의 5' 말단에 표지된 형광발색제(fluorescent reporter dye) 및 3' 말단에 표지된 소광제(quencher dye)로써, 박테로이데스 특이적 검출 프로브인 Bat1 프로브는 FAM(carboxyfluorescein) 및 BHQ-1(Black hole quencher 1)을 사용하였고, 퍼미큐테스 특이적 검출 프로브인 Fir7 프로브는 HEX(2',4',5',7',-tetrachloro-6-carboxy-4,7-dichlorofluorescein) 및 BHQ-1을 사용하였으며, 프로테오박테리아 특이적 검출 프로브인 Pro3 프로브는 cy5(indocarbocyanine-3) 및 BHQ-2(Black hole quencher 2)를 사용하였다. 또한, Eub518 프로브는 Tex615 reporter dye 및 BHQ-2를 사용하였다. 프라이머는 실시예 3에서 선별한 Eub268 및 Eub797 프라이머쌍을 사용하였다.

[0079] qPCR의 최적 조건을 확인하기 위하여, qPCR에 가장 큰 영향을 미치는 어닐링(annealing) 및 신장(extension) 구간의 시간 조건에 따른 검출율을 분석하였다. 구체적으로, 사전변성(predenaturation) 구간은 95℃에서 5분, 변성(denaturation) 구간은 95℃에서 30초로 고정시키고, 표 7과 같은 조건으로 어닐링 및 신장을 수행하였다.

표 7

구분	Predenaturation	×40 cycle		
		Denaturation	Annealing	Extension
No.1	95℃, 5분	95℃, 30초	60℃, 1분	-
No.2			60℃, 45초	72℃, 15초
No.3			60℃, 30초	72℃, 30초

[0083] 그 결과, 95℃에서 5분 사전변성 후, 95℃에서 30초 변성, 60℃에서 30초 어닐링 및 72℃에서 30초 신장 × 40cycle 조건에서 각 프로브 별 DNA 밴드의 농도가 가장 균등한 것으로 확인되어(도 16 내지 18), 해당 조건을 최적의 qPCR 조건으로 설정하였다.

[0085] 실시예 5. 선별된 Taqman qPCR 프로브의 유효성 검증

[0086] 다양한 분변 샘플을 대상으로, Bat1, Fir7 및 Pro3 프로브의 유효성을 검증하였다.

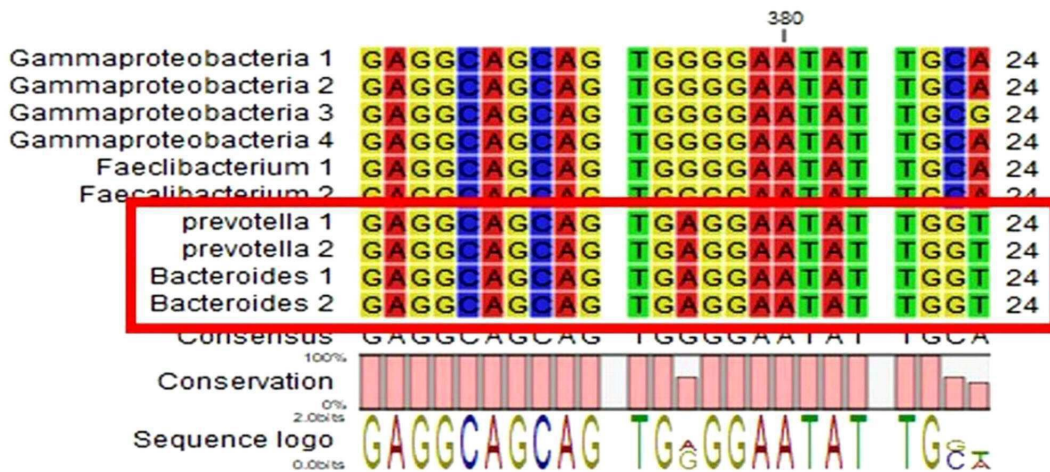
[0087] 구체적으로, 건강한 사람, 환자, 학생에서 유래한 분변 샘플에 대해, 실시예 4의 조건으로, Bat1, Fir7 및 Pro3 프로브와 Eub268 및 Eub797 프라이머로 Taqman qPCR을 수행하여 얻은 인간 장내 미생물의 각 문에 대한 정량값과, NGS(New generation sequencing)로 분석한 인간 장내 미생물에 대한 정량 결과를 비교하여 선별된 프로브의 유효성을 검증하였다. qPCR의 결과로 나타나는 Ct(Cycle threshold)값은 모든 형광물질에서 동일한 임계점을 설정하여 나타내었고, qPCR의 40 cycle에서 통일된 임계점에서의 Ct 값을 빼준 값을 NGS 데이터와 비교하였다.

[0088] 그 결과, 박테로이데테스 균과 페미규테스 균의 상대량이 NGS에서의 결과와 유사한 경향을 나타내는 것으로 확인되었고, NGS 및 TaqMan qPCR 두 방법에서 모두 프로테오박테리아에 감염된 샘플이 검출되어, 인간 장내 미생물의 각 문에 따른 정량에 Bat1, Fir7 및 Pro3 프로브가 적용될 수 있는 것으로 확인되었다(도 19 내지 도 21).

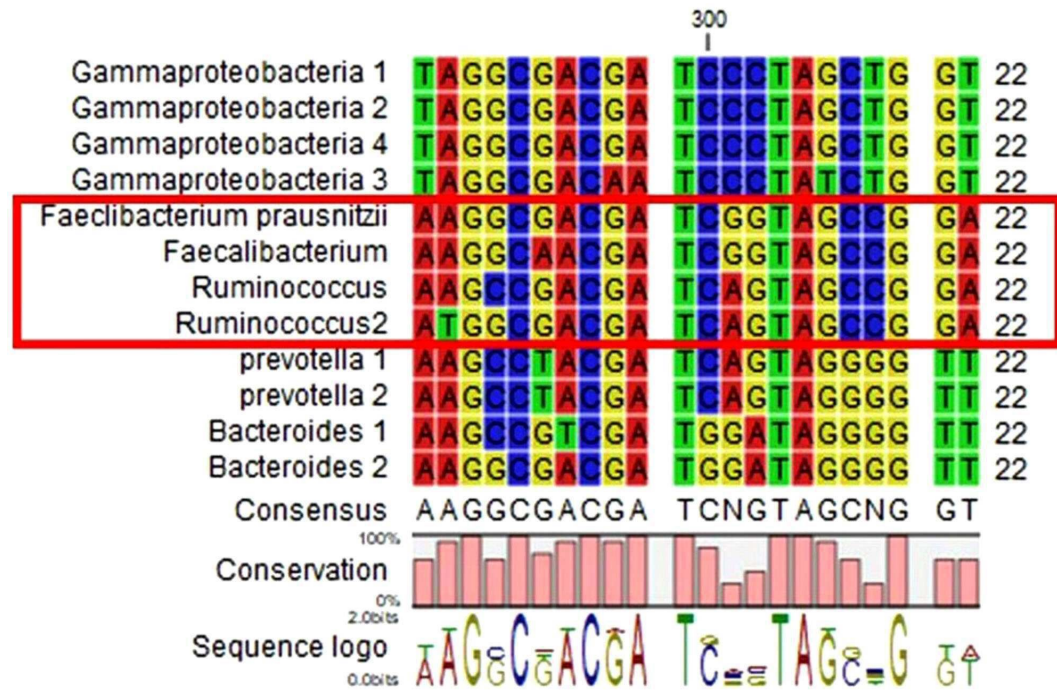
[0090] 이제까지 본 발명에 대하여 그 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

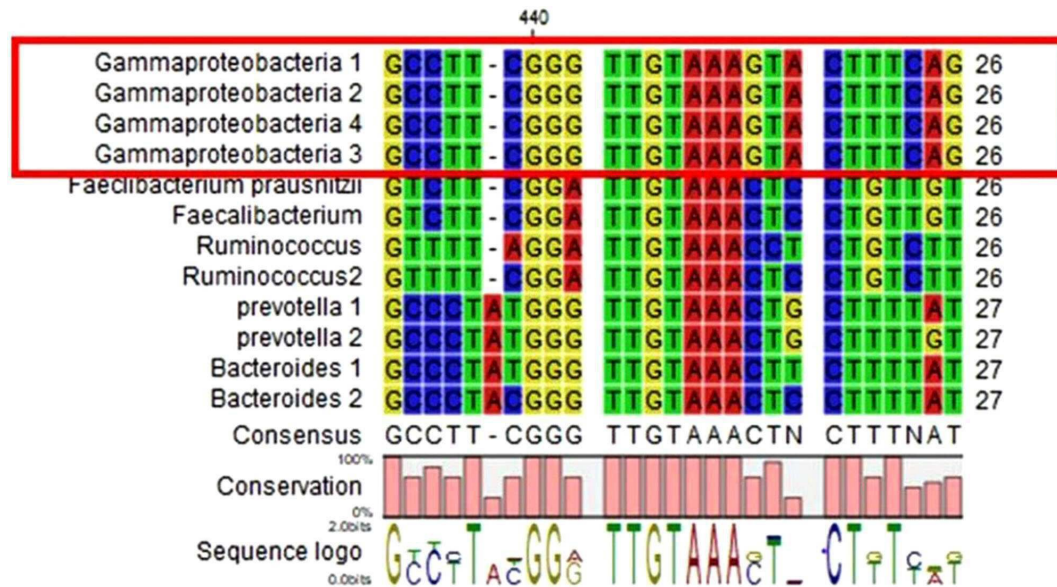
도면1



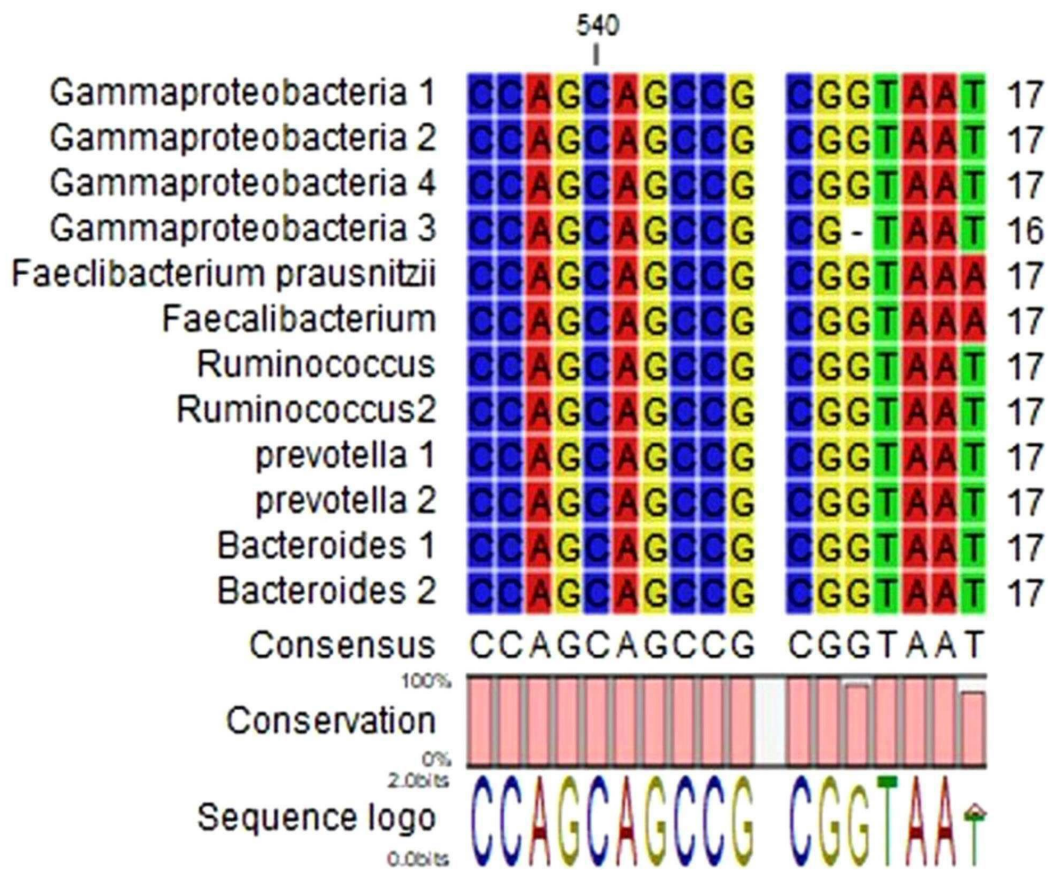
도면2



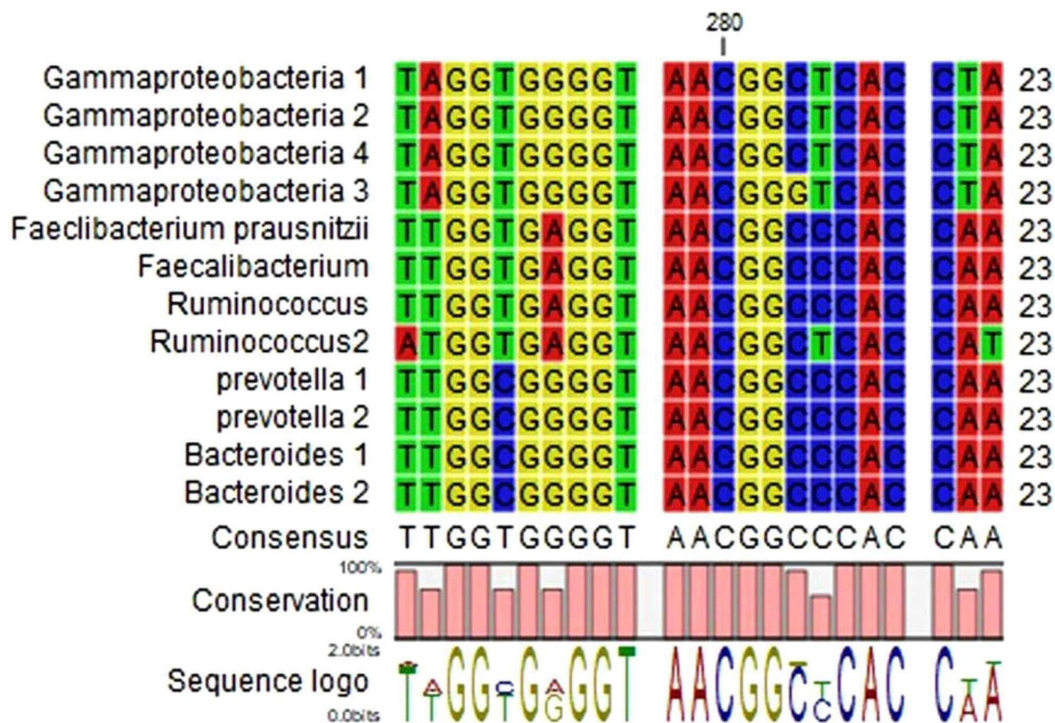
도면3



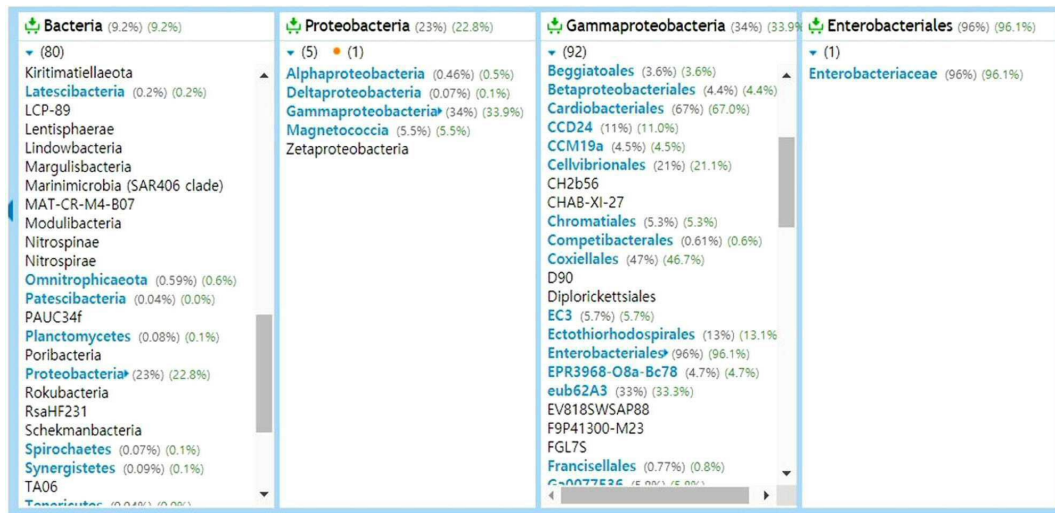
도면4



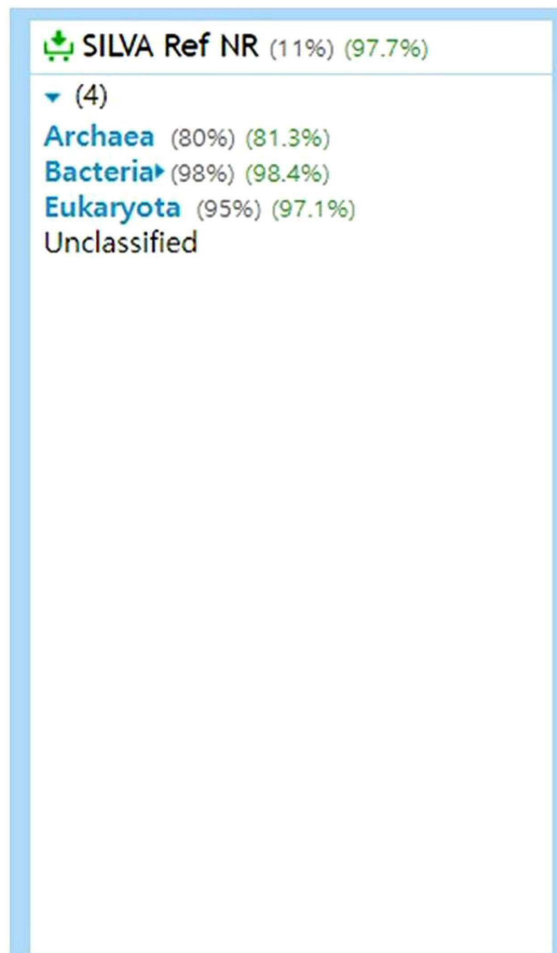
도면5



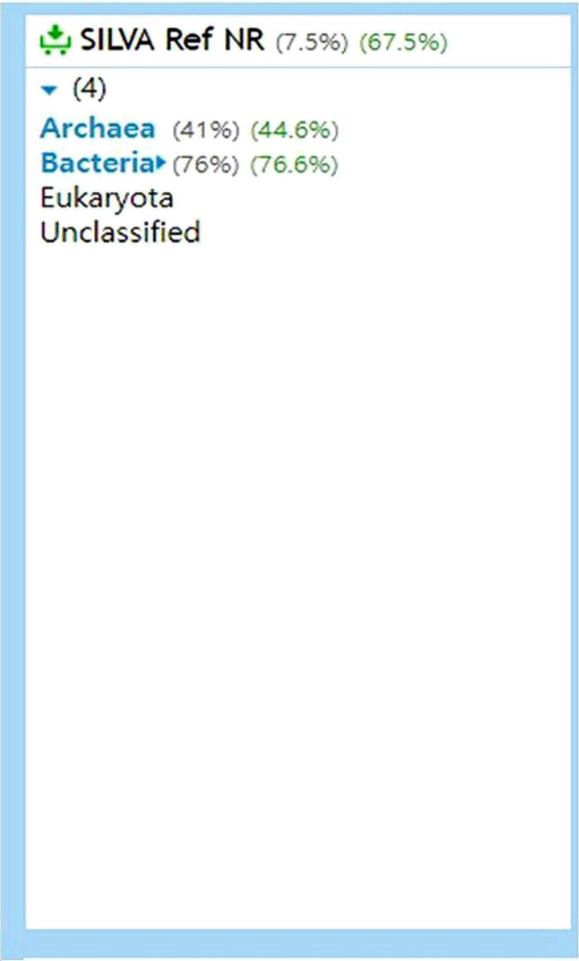
도면9



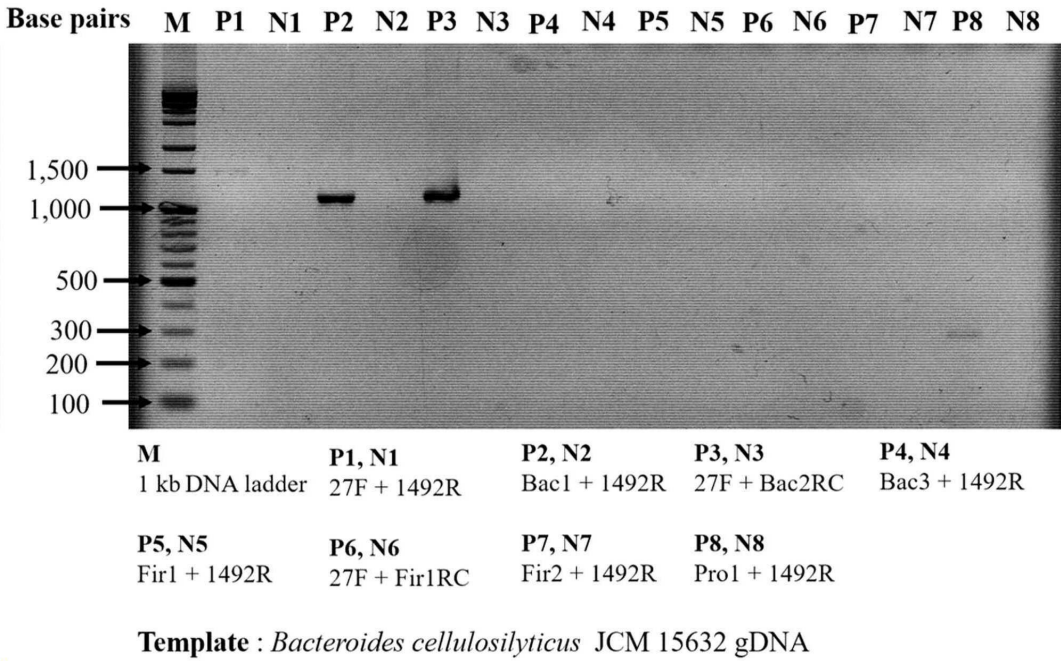
도면10



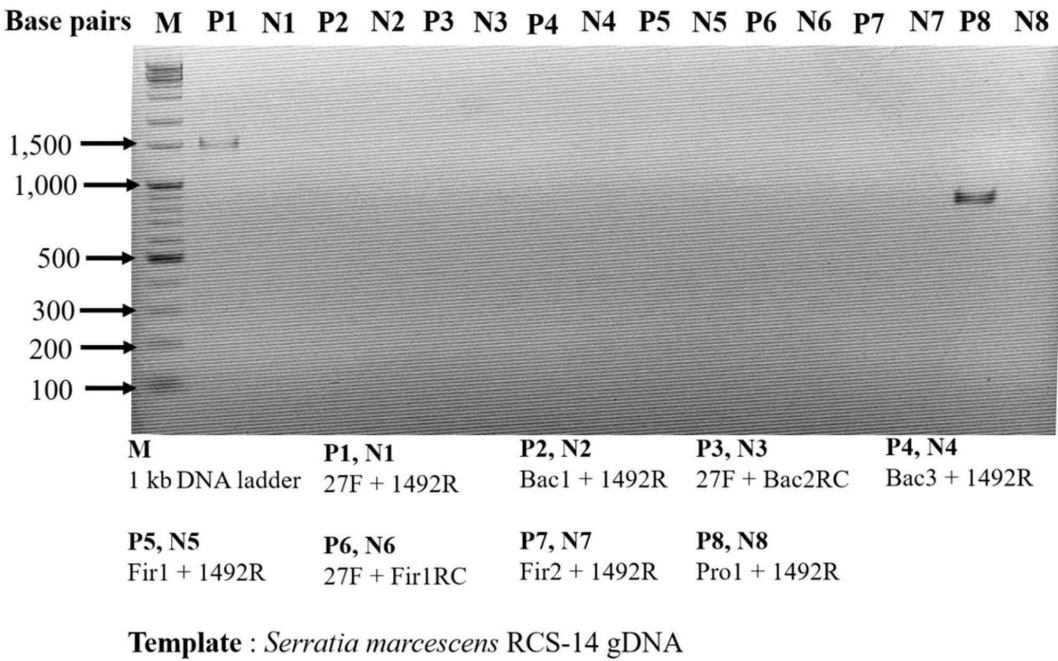
도면11



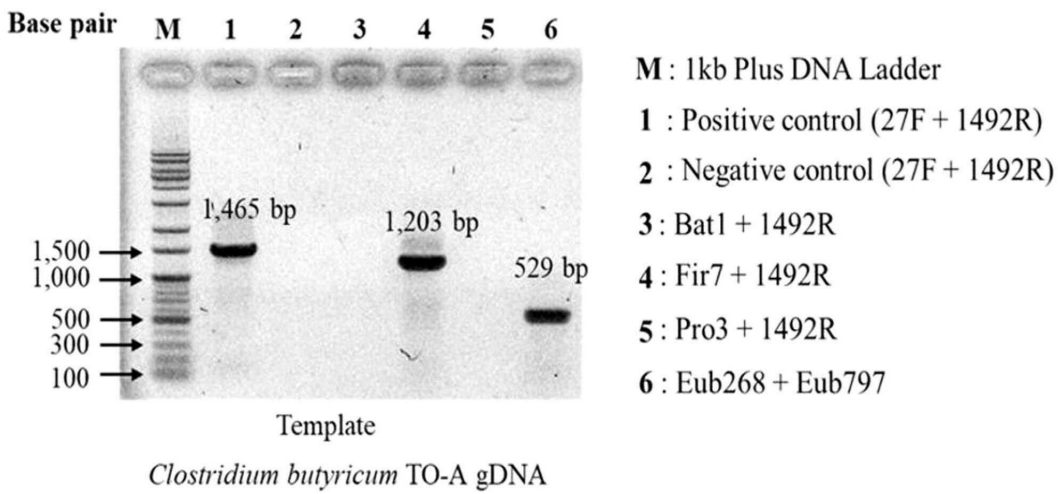
도면12



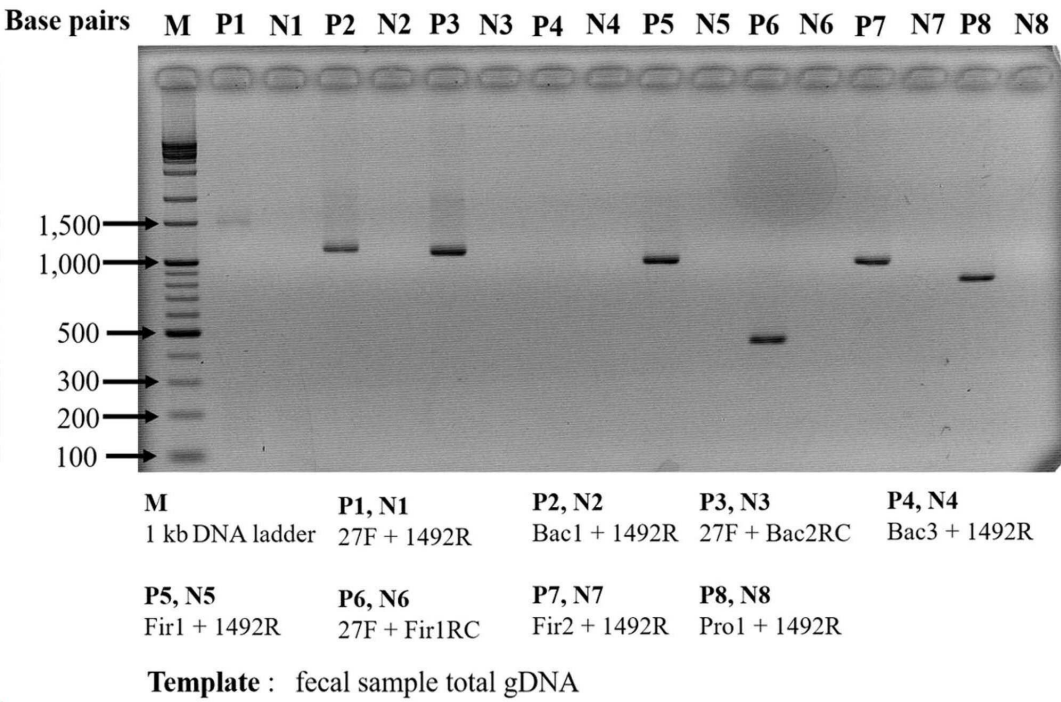
도면13



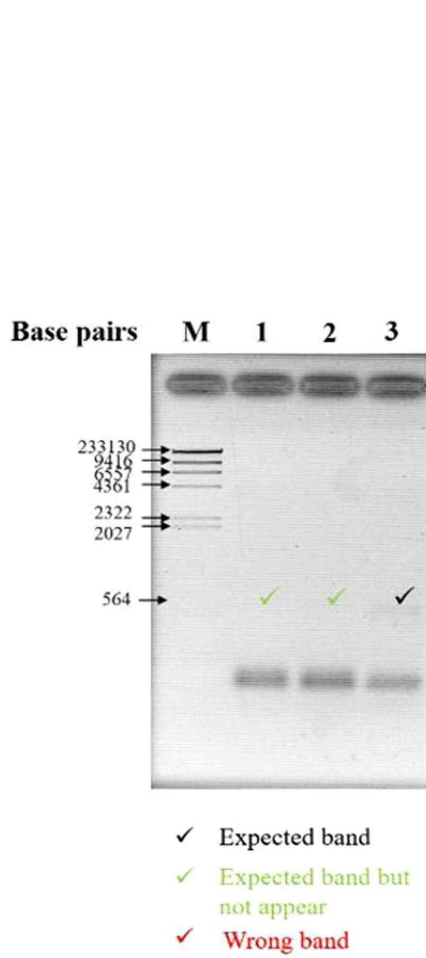
도면14



도면15



도면16



1

Phylum	Fluorescence	C(t)
Proteobacteria	Cy5	N/A
Bacteroidetes	FAM	35.35
Firmicutes	HEX	29.16
Eubacteria	TEX 615	35.88

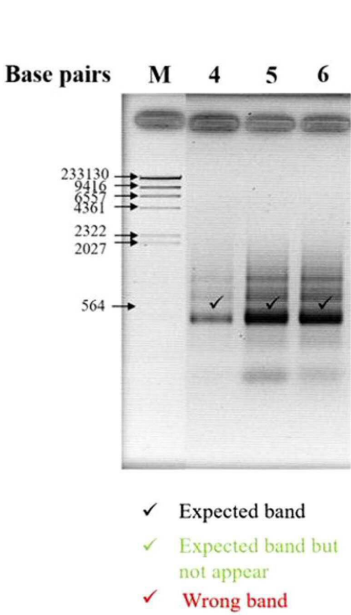
2

Phylum	Fluorescence	C(t)
Proteobacteria	Cy5	N/A
Bacteroidetes	FAM	36.24
Firmicutes	HEX	39.72
Eubacteria	TEX 615	N/A

3

Phylum	Fluorescence	C(t)
Proteobacteria	Cy5	N/A
Bacteroidetes	FAM	39.20
Firmicutes	HEX	1.37
Eubacteria	TEX 615	N/A

도면17



4

Phylum	Fluorescence	C(t)
Proteobacteria	Cy5	N/A
Bacteroidetes	FAM	33.03
Firmicutes	HEX	22.26
Eubacteria	TEX 615	20.48

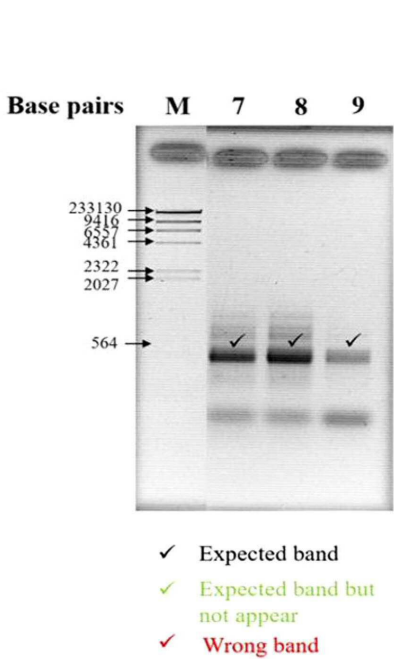
5

Phylum	Fluorescence	C(t)
Proteobacteria	Cy5	N/A
Bacteroidetes	FAM	30.90
Firmicutes	HEX	22.11
Eubacteria	TEX 615	11.96

6

Phylum	Fluorescence	C(t)
Proteobacteria	Cy5	N/A
Bacteroidetes	FAM	32.33
Firmicutes	HEX	22.87
Eubacteria	TEX 615	20.72

도면18



Phylum	Fluorescence	C(t)
Proteobacteria	Cy5	34.55
Bacteroidetes	FAM	20.58
Firmicutes	HEX	22.99
Eubacteria	TEX 615	13.11

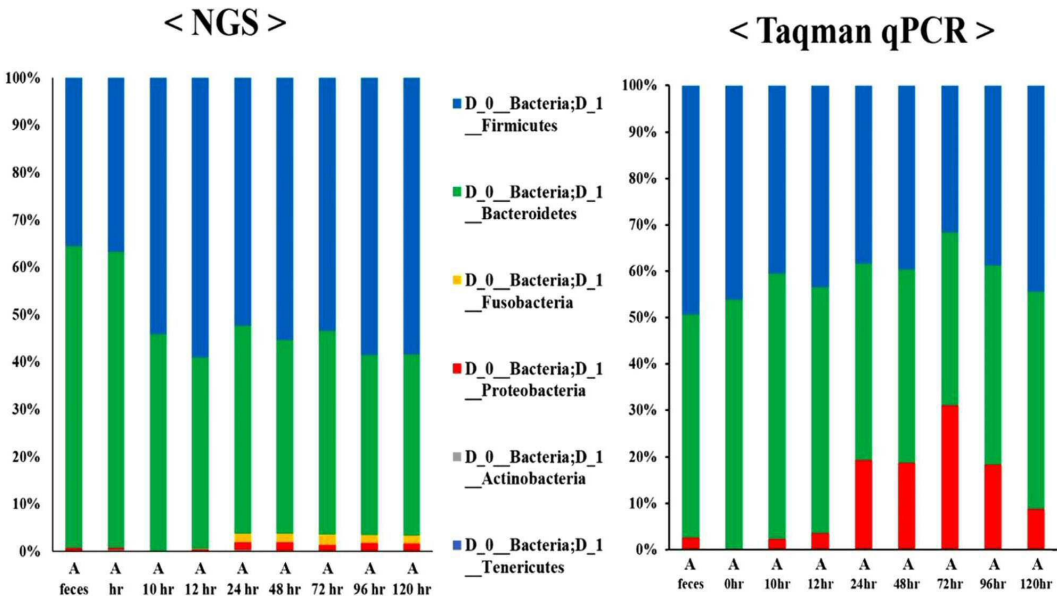
8

Phylum	Fluorescence	C(t)
Proteobacteria	Cy5	35.58
Bacteroidetes	FAM	31.89
Firmicutes	HEX	26.81
Eubacteria	TEX 615	11.39

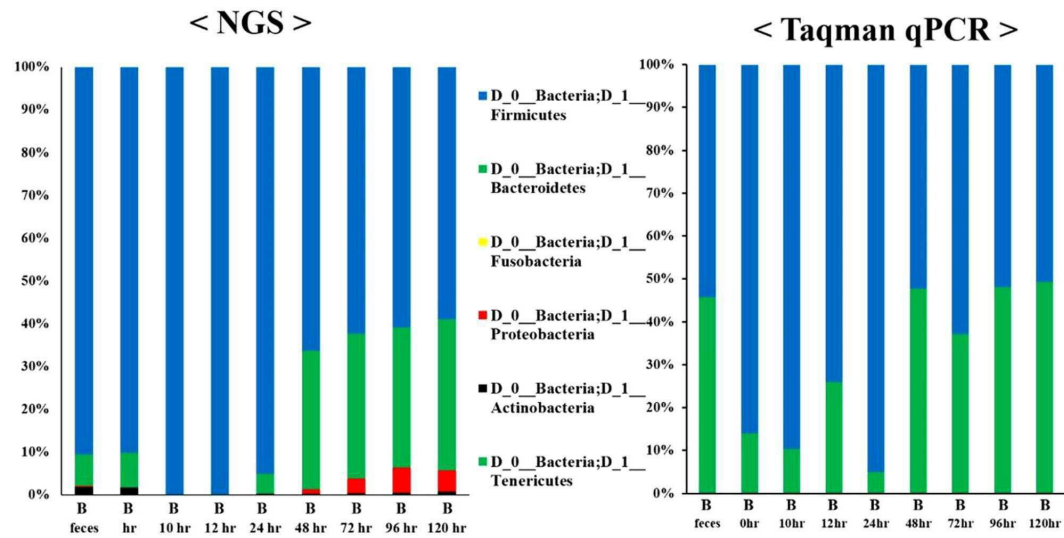
9

Phylum	Fluorescence	C(t)
Proteobacteria	Cy5	34.52
Bacteroidetes	FAM	30.23
Firmicutes	HEX	23.71
Eubacteria	TEX 615	15.20

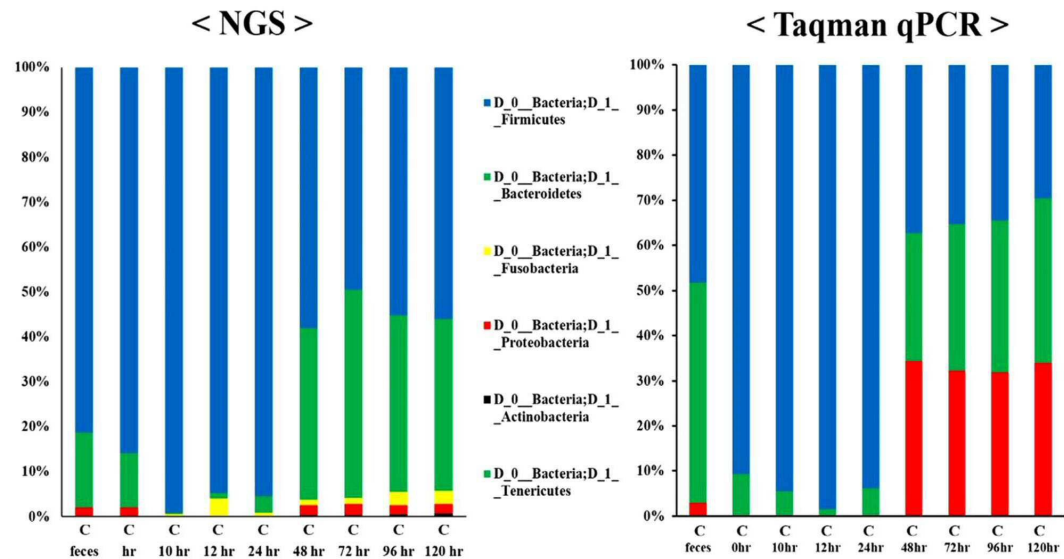
도면19



도면20



도면21



서열목록

- <110> Kyungpook National University Industry-Academic Cooperation Foundation
Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> TaqMan probe and Composition for Detecting or Quantifying Gut
Microbiota, and TaqMan Real-Time PCR Method for Detection or
Quantification of Gut Microbiota
- <130> BPN190280-D1
- <160> 18
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bat1
 <400> 1

 gaggcagcag tgaggaatat tgg 24
 <210> 2
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bat2
 <400> 2

 gangcagcag tgaggaatat tngt 24
 <210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bat3
 <400> 3

 gcgagagcct gaaccagcca agta 24
 <210> 4
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Bat4
 <400> 4

 gcgagagcct gaaccagttc aagta 25
 <210> 5
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bat5
 <400> 5

 gangctgcag tgaggaatat tngt 24

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fir5
 <400> 6
 aaggcgacga tcggtagccr m 21
 <210> 7
 <211> 21
 <
 212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fir6
 <400> 7
 aaggcgacga tcggtagcca m 21
 <210> 8
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fir7
 <400> 8
 aaggcgacga tcggtagccg rm 22
 <210> 9
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fir8
 <400> 9
 aaggcgacga tcggtagcag rm 22

 <210> 10
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fir9

<400>	10	
aaggcgacga tcggtagcgg	rm	22
<210>	11	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Pro1	
<400>	11	
gccttcgggt tgtaaagttc tttcatc		27
<210>	12	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Pro2	
<400>	12	
gccttcgggt tgtaaagttc tttcagc		27
<210>	13	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Pro3	
<400>	13	
gccttcgggt tgtaaagttc tttcagc		27
<210>	14	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Pro4	
<400>	14	
gccttcgggt tgataaagtt ctttcagc		28
<210>	15	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223>	Pro5	
<400>	15	
gccttatggg	tgataaagtt	ctttcagc
		28
<210>	16	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Eub518	
<400>	16	
attaccgcgg	ctgctgg	
		17
<210>	17	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Eub268	
<400>	17	
twggygrggg	aacggcycac	cwacg
		25
<210>	18	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Eub797	
<400>	18	
ggactaccag	ggatatcta	at cctgtt
		26