



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0098564
(43) 공개일자 2019년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/701 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0018659

(22) 출원일자 2018년02월14일

심사청구일자 2018년02월14일

(71) 출원인

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

대한민국(농림축산식품부 농림축산검역본부장)

경상북도 김천시 혁신8로 177 (율곡동)

(72) 발명자

전보영

강원도 원주시 단구로75번길 10-1 (일산동)

이형우

경기도 시흥시 함송로29번길 54, 109동 202호 (정왕동, 세종아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이재영, 특허법인 정안

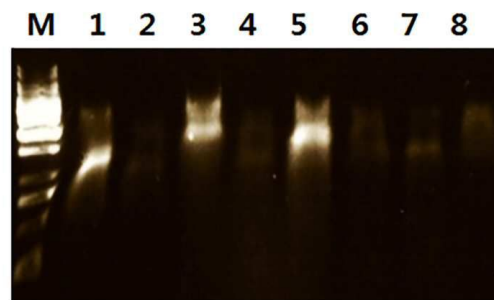
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 구체역 바이러스 A 타입 검출용 프라이머 세트

(57) 요약

본 발명은 구체역 바이러스 A 타입 검출용 프라이머 세트로서, 본 발명에 따른 구체역 바이러스 검출용 프라이머 세트는 혈청형 A 타입 특이적인 검출이 가능할 뿐만 아니라, 등온증폭법을 사용할 수 있기 때문에 현장에서 실시간으로 구체역 바이러스를 검출할 수 있다. 또한, 낮은 농도의 RNA도 검출할 수 있는 높은 민감도 및 정확성을 가지고 있기 때문에 다양한 키트 및 진단기기에 폭넓게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도4



WWA 476 probe (0.5 ul)
324 F / 625 R (1 ul)

1. 연 천 (A)
2. 진 천 (O)
3. 포 천 (A)
4. Asia Shamir
5. A22 Iraq (A)
6. AD2002 (O)
7. AD2010 (O)
8. DDW

(72) 발명자

구복경

경상북도 김천시 농소면 남곡길 51-99, 306호

나진주

경상북도 김천시 혁신4로 72, 203동 904호 (울곡동, 경북혁신엘에이치천년나무2단지)

유소윤

경상북도 김천시 용전3로 10, 304동 103호 (울곡동, 경북혁신엘에이치천년나무3단지)

신문균

충청남도 천안시 서북구 봉서산1길 35, 107동 201호 (쌍용동, 파크밸리동일하이빌)

위성환

경기도 군포시 오금로 34, 377동 1501호 (금정동, 삼익소월아파트)

배윤희

서울특별시 광진구 능동로 120 (화양동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 Z-1543082-2017-18-01

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림축산검역본부

연구사업명 농림축산검역검사기술개발 융역연구과제

연구과제명 등온유전자 증폭법을 이용한 구제역 현장 진단법 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경북대학교

연구기간 2017.04.17 ~ 2018.11.15

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 프라이머를 포함하는, 구제역 바이러스 검출용 프라이머 세트.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 프로브를 추가로 포함하는, 구제역 바이러스 검출용 프라이머 세트.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 구제역 바이러스는 혈청형 A 타입인, 구제역 바이러스 검출용 프라이머 세트.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 구제역 바이러스 검출용 프라이머 세트는 RT-RPA(Reverse transcriptase-recombinase polymerase amplification) 용도인, 구제역 바이러스 검출용 프라이머 세트.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 구제역 바이러스 검출용 프라이머 세트를 포함하는, 구제역 바이러스 검출용 조성물.

청구항 6

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 구제역 바이러스 검출용 프라이머 세트를 포함하는, 구제역 바이러스 검출용 키트.

청구항 7

(a) 생물학적 시료로부터 총 RNA를 분리하는 단계;

(b) 상기 분리된 RNA를 주형으로 하여 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 프라이머를 이용하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

(c) 상기 증폭 산물을 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 프로브를 이용하여 검출하는 단계를 포함하는, 구제역 바이러스 검출 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 골수, 조직, 세포, 타액, 객담, 모피, 또는 소변인, 검출 방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

상기 구제역 바이러스는 혈청형 A 타입인, 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 구제역 바이러스 A 타입 검출용 프라이머 세트 및 이의 이용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 구제역 바이러스(Foot-and-Mouth Disease Virus; FMDV)는 피코나바이러스과 아프소바이러스(Aphthovirus)속에 속하는 바이러스로서 소, 돼지, 양, 염소 등과 같은 우제류에 감염되는 고전염성 동물바이러스이다. 이러한 구제역 바이러스는 O, A, C, Asia 타입 등 여러가지 유형의 혈청형으로 분류되며, 입자의 직경은 22 내지 28nm이고, 8,500 염기쌍으로 구성된 단일가닥의 RNA를 함유하고 있으며, VP-1, VP-2, VP-3, 및 VP-4 네 개의 단백질이 60개씩 모여서 바이러스 외피를 구성한다. 또한, 제1종 바이러스성 법정전염병으로 고전염성으로 무리에서 한 마리가 감염되면 나머지 가축 모두 급속도로 감염된다(국내출원특허 10-2011-0050917). 그러나 이러한 구제역 바이러스에 의한 감염은 특별한 치료법이 없기 때문에, 전파를 방지하기 위해서는 감염 동물이 발생한 근처 지역의 동물을 모두 살처분해야 하기 때문에 피해를 줄이기 위해서는 최대한 신속하게 진단하고 대처하는 것이 필요하다. 또한, 구제역은 혈청형별로 항체에 의한 교차방어 효율이 낮기 때문에 구제역 발생시 백신 정책의 수행을 위해서는 혈청형의 신속한 판단이 중요하다. 우리나라에서는 2000년 이후 현재까지 총 9차례의 구제역 발생을 경험하였고, 이로 인해 지출된 직접적인 방역비용만 약 4조원에 달한다. 2017년 현재 한국에는 새로운 혈청형인 O 타입과 A 타입의 구제역 바이러스가 새롭게 유입되어 이로 인한 문제가 새롭게 발생되고 있는 실정이다.

[0003] 현재 구제역바이러스 항원을 진단하는 방법인 유전자 검출방법으로는 리얼타임 RT-PCR 또는 일반적인 RT-PCR 등을 들 수 있으며, 리얼타임 RT-PCR의 경우, 구제역바이러스 검출 민감도가 가장 높은 방법으로써, 감염의심 시료(혈액, 타액, 정액, 조직 등)를 실험실로 수송하여, 특수 차폐 실험실 내(생물안전3등급 실험실)에서 시료로부터 총 RNA를 채취하여, 형광 검출 리얼타임 PCR 기기로 구제역바이러스 특이 유전자 증폭을 수행하여, 구제역 양성 여부를 확인하는데 사용되나, RNA 추출부터 리얼타임 PCR을 작동하는 단계까지 상당한 숙련된 연구자가 요구되며, 특수 실험실 및 고가의 시약과 장비가 필요하다.

[0004] 이와 같이, 구제역 바이러스에 의한 피해를 감소시키고, 바이러스의 전파를 최대한 감소시키기 위해서는 구제역 감염 가축을 신속, 정확하게 확인하여 신속한 초동 방역 조치를 취하는 것이 핵심이며, 이를 위하여 고감도 현장 검출이 가능할 뿐만 아니라, 단시간 내에 혈청형 타입별 검출 정확성이 향상된 검출 방법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 구제역 바이러스 A 타입 검출용 프라이머 세트 및 이의 이용 방법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0006] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물, 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.

- [0009] 명세서에서 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0011] 본 명세서에 있어서, "구제역 바이러스(foot-and-mouth disease virus)"란, 소, 돼지, 양, 염소 등과 같은 우제류에 감염되는 동물성 바이러스로서, 구제역의 원인이 되는 바이러스를 의미한다. 상기 바이러스는 바람직하게는 O, A, C, Asia 타입 등 여러가지 유형의 혈청형으로 분류되며, 입자의 직경은 22 내지 28nm이고, 8,500 염기쌍으로 구성된 단일가닥의 RNA를 함유하고 있으며, VP-1, VP-2, VP-3, 및 VP-4 네 개의 단백질이 60개씩 모여서 바이러스 외피를 구성하는 바이러스이나, 구제역의 원인이 되는 바이러스라면 이에 제한되지 않는다.
- [0012] 본 명세서에 있어서, "프라이머(primer)"란 짧은 서열의 뉴클레오티드인 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)로서 목적하는 DNA 또는 RNA의 반대편 가닥의 상보적 위치에 특이적으로 부착되어 유전자의 증폭(amplification)을 개시하는 역할을 하는 올리고뉴클레오티드로서, 바람직하게는 구제역 바이러스의 VP-1 유전자에 특이적으로 결합하는 올리고뉴클레오티드일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 1 및/또는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 1 및/또는 서열번호 2의 염기서열과 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상 유사한 서열일 수 있다.
- [0013] 본 명세서에 있어서, "프로브(probe)"란, 목적하는 유전자에 특이적으로 부착되어 목적 유전자를 확인 및/또는 검출하는 탐침자를 포괄적으로 포함하는 광의의 개념이며, 바람직하게는 구제역 바이러스의 VP-1 유전자에 특이적으로 결합하는 화합물, 항체, 단백질, 올리고뉴클레오티드 등 일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드로서, 상기 올리고뉴클레오티드는 서열번호 3의 염기서열과 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 99% 이상 유사한 서열일 수 있다. 또한, 상기 프로브는 용이한 검출을 위한 표지를 하나 이상 포함할 수 있다.
- [0014] 본 명세서에 있어서, "키트(kit)"란 구제역 바이러스의 RNA를 증폭 및/또는 검출하여 구제역 바이러스 감염 여부를 예측할 수 있는 검진용 기기를 의미하며, 구제역 바이러스에 감염되었을 것으로 의심되는 동물로부터 분리된 생물학적 시료로부터 구제역 바이러스의 감염 여부를 확인할 수 있는 형태라면 제한이 없다. 바람직하게는 구제역 바이러스의 VP-1 유전자에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브(probe) 또는 프라이머(primer) 세트를 포함할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 본 발명의 프라이머 세트를 포함할 수 있으며, 또는 구제역 바이러스 VP-1에 특이적으로 결합하는 항체(antibody) 또는 앵타머(aptamer)를 포함하는 형태일 수 있으나, 구제역 바이러스의 RNA를 증폭 및/또는 검출하여 구제역 바이러스 감염 여부를 예측할 수 있는 형태라면 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 본 명세서에 있어서, "검출(detection)"이란 구제역 바이러스에 감염되었을 것으로 의심되는 동물의 구제역 바이러스 감염 여부를 판단하는 방법에 관한 것으로서, 구제역 바이러스의 RNA를 확인하여 바이러스 감염 여부를 확인하는 방법을 의미한다.
- [0016] 본 명세서에 있어서, "생물학적 시료(biological sample)"란 구제역 바이러스에 감염된 동물에서 구제역 바이러스의 RNA를 포함하고 있는 모든 시료를 의미하며, 바람직하게는 혈액, 혈장, 혈청, 골수, 조직, 세포, 타액, 객담, 모피, 소변 등일 수 있으나, 구제역 바이러스의 RNA를 확인할 수 있는 시료라면 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 프라이머를 포함하는, 구제역 바이러스 검출용 프라이머 세트를 제공한다. 상기 프라이머 세트는 서열번호 1 및/또는 2의 서열 일부를 포함할 수 있으며, 또는 서열번호 1 및/또는 2에 추가로 다른 서열을 포함할 수 있으며, 구제역 바이러스 A 타입을 특이적으로 검출할 수 있는 서열이라면 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 프로브를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 프로브는 서열번호 3의 일부 서열을 포함할 수 있으며, 또는 서열번호 3에 추가로 다른 서열을 포함할 수 있으며, 이는 상기 프라이머 세트를 이용하여 증폭된 서열을 특이적으로 검출할 수 있는 서열이라면 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 프로브는 검출을 용이하게 하기 위하여 말단 부위 또는 중간 부위에 하나 이상의 표지를 포함할 수 있으며, 상기 표지는 바람직하게는 형광 모이어티이며, 더욱 바람직하게는 다민, 쿠마린, 시아닌, EvoBlue, 옥사진, 카르보피로닌(carbopyronin), 나프탈렌, 바이페닐, 안트라센(anthracene), 페난트렌, 파이렌, 카르바졸 등을 기본 백본으로 가지는 형광 색소 또는 이의 유도체 같은 형광 모이어티가 선택적으로 연결 또는 컨쥬게이션될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 형광 모이어티는 Cy5.5 (694), Cy7 (773),

ATTO 390TM (479), ATTO 425TM (484), ATTO 465TM (508), ATTO 488TM (523), ATTO 495TM (527), ATTO 520TM (538), ATTO 532TM (553), ATTO Rho6GTM (570), ATTO 550TM (576), ATTO 565TM (592), ATTO Rho3BTM (565), ATTO Rho11TM (608), ATTO Rho12TM (532), ATTO Thio12TM (579), ATTO 610TM (634), ATTO 611 XTM (681), ATTO 620TM (643), ATTO Rho14TM (625), ATTO 633TM (657), ATTO 647TM (669), ATTO 647 NTM (669), ATTO 655TM (684), ATTO Oxa12TM (663), ATTO 700TM (719), ATTO 725TM (752), ATTO 740TM (764), BODIPY TMR (568), BODIPY558/568 (568), BODIPY564/570 (570), EvoBlue10TM, EvoBlue30TM, MR121, Cy2TM (506), YO-PROTM-1 (509), YOYOTM-1 (509), Calcein (517), FITC (518), FluorXTM (519), AlexaTM (520), 로다민(Rhodamine) 110 (520), 5-FAM (522), Oregon GreenTM 500 (522), Oregon GreenTM 488 (524), RiboGreenTM (525), Rhodamine GreenTM (527), Rhodamine 123 (529), Magnesium GreenTM (531), Calcium GreenTM (533), TO-PROTM-1 (533), TOTO1 (533), JOE (548), BODIPY530/550 (550), Dil (565), Cy3TM (570), AlexaTM 546 (570), TRITC (572), Magnesium OrangeTM (575), 피코에리트린 R&B (575), Rhodamine Phalloidin (575), Calcium OrangeTM (576), 피로닌 Y (580), Rhodamine B (580), TAMRA (582), Rhodamine RedTM (590), Cy3.5TM (596), ROX (608), Calcium CrimsonTM (615), AlexaTM 594 (615), Texas Red(615), Nile Red (628), YO-PROTM-3 (631), YOYOTM-3 (631), R-피코시아닌 (642), C-피코시아닌 (648), TOPROTM-3 (660), TOTO3 (660), DiD DilC(5) (665), Cy5TM (670), 티아디카르보시아닌 (671), Biosearch Blue (447), CAL Fluor Gold 540 (544), CAL Fluor Orange 560 (559), CAL Fluor Red 590 (591), CAL Fluor Red 610 (610), CAL Fluor Red 635 (637), FAM (520), Fluorescein (520), Fluorescein-C3 (520), Pulsar650 (566), Quasar570 (667), Quasar670 (705), Quasar705 (610) 및 이의 유도체 또는 컨쥬게이트와 연결될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 괄호의 숫자는 나노미터 단위로 표시한 발광 최대 파장이다. 또한, 상기 형광 모이어티 유도체는 본 발명의 검출을 방해하지 않는 한 자유 카르복실기, 에스테르(예컨대, N-하이드로숙신이미드(NHS) 에스테르) 또는 말레이미드 유도체를 추가적으로 포함할 수 있다. 또는, 형광 빛을 흡수하여 퀀칭시킬 수 있는 퀀처가 선택적으로 연결 또는 컨쥬게이션될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 퀀처는 답실(Dabsyl), BHQ(Black Hole Quencher)-0, BHQ-1, BHQ-2, BHQ-3, Iowa Black[®] FQ, Iowa Black[®] RQ, QXLTM 490, IRDye QC-1, Deep Dark QuencherII, Deep Dark QuencherI, Eclipse[®] Dark Quencher, ATTO 540Q, ATTO 580Q, ATTO 612Q 및 이의 유도체 또는 컨쥬게이트와 연결될 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 퀀처 유도체는 본 발명의 검출을 방해하지 않는 한 자유 카르복실기, 에스테르(예컨대, N-하이드로숙신이미드(NHS) 에스테르) 또는 말레이미드 유도체를 추가적으로 포함할 수 있다. 또는 상기 표지는 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파 등 검출이 가능한 시그널을 제공할 수 있는 표지라면 제한이 없다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 프라이머 세트는 혈청형 A 타입을 검출하는 것을 특징으로 한다. 그러나 상기 프라이머 세트는 검출 가능한 타입이라면 이에 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 구체역 바이러스 검출용 프라이머 세트는 바람직하게는 등온증폭 용도이며, 더욱 바람직하게는 RT-RPA(Reverse transcriptase-recombinase polymerase amplification) 용도일 수 있으나, 현장에서 단시간 내에 유전자를 증폭 및 검출 가능한 방법이라면 제한이 없다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 구체역 바이러스 검출용 프라이머 세트를 포함하는 구체역 바이러스 검출용 조성물을 제공한다.

[0024] 상기 검출용 조성물은 추가로 유전자를 증폭할 수 있는 효소, 완충용액, dNTP 등을 포함할 수 있으나, 유전자를 증폭하는데 필요한 요소라면 제한이 없다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 구체역 바이러스 검출용 프라이머 세트를 포함하는 구체역 바이러스 검출용 키트를 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 (a) 생물학적 시료로부터 총 RNA를 분리하는 단계; (b) 상기 분리된 RNA를 주형으로 하여 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 프라이머를 이용하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 (c) 상기 증폭 산물을 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 프로브를 이용하여 검출하는 단계를 포함하는 구체역 바이러스 검출 방법을 제공한다.

[0029] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 골수, 조직, 세포, 타액, 객담, 모피, 소변 등일 수 있으나, 구체적 바이러스의 RNA를 포함하고 있는 시료라면 이에 제한되지 않는다.

[0030] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 검출 방법은 구체적 바이러스 A 타입을 특이적으로 검출하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0031] 본 발명에 따른 구체적 바이러스 검출용 프라이머 세트는 혈청형 A 타입 특이적인 검출이 가능할 뿐만 아니라, 등온증폭법을 사용할 수 있기 때문에 현장에서 실시간으로 구체적 바이러스를 검출할 수 있다. 또한, 낮은 농도의 RNA도 검출할 수 있는 높은 민감도 및 정확성을 가지고 있기 때문에 다양한 키트 및 진단기기에 폭넓게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 다양한 국가의 구체적 바이러스 A 타입의 유전자 분석을 수행한 결과를 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 구체적 바이러스 A 타입의 VP-1 유전자 분석을 수행한 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 RT-RPA를 수행한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 RT-RPA 및 아가로스겔 전기영동을 수행한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0035] 실시예

[0036] 실시예 1: 구체적 바이러스 A 타입 검출용 프라이머의 제작

[0037] 구체적 바이러스 A 타입 특이적인 검출용 프라이머를 제작하기 위하여, 일차적으로 기존에 검출된 바이러스의 유전 정보를 이용하여 다중 정렬(multiple alignment)을 수행하였다. 그 결과는 도 1에 나타내었다. 구체적 바이러스의 유전자 중 VP-1을 선택하였고, 2차적으로 VP-1 유전자 정보를 이용하여 다시 다중 정렬을 통한 유전자 분석을 수행하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다. 유전자 서열이 유사한 지역을 선택하고 DNAMAN DNA analysis software package를 이용하여 다양한 프라이머들을 제작하였다. 제작된 프라이머들을 이용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)을 실시하여 헤어핀 구조가 생성되는지, 다이머(dimer)를 형성하는지 등에 대하여 확인하고, 최종적으로 포워드 프라이머(forward primer), 리버스 프라이머(reverse primer) 및 검출용 프로브(detection probe)를 제작하였다. 검출용 프로브는 올리고뉴클레오타이드 골격에 dT-fluorophore(FAM-dT)와 이에 상응하는 dT-quencher(BHQ-dT) 그룹을 abasic 뉴클레오타이드 유사체(tetrahydrofuran residue; THF, 혹은 dSpacer)에 인접하도록 제작하였고, 중합효소에 의한 중합반응(연장)을 방지하기 위하여 3' 말단에는 3'-modification 그룹인 C3-spacer를 배치함으로써, 프로브 결합시 형광의 발생을 통하여 구체적 바이러스를 검출할 수 있도록 제작하였다. 그 서열은 하기와 표 1과 같다.

표 1

[0039]

종류	프라이머 서열	서열번호
포워드 프라이머	5'-CAAAGCACCATTACGAGACTTGCCTCCCTTACA-3'	1
리버스 프라이머	5'-CAGGTGCAATGATCTTCTGCTTGTGCTGTCTTG -3'	2
검출용 프로브	5'-TCGCCGCACAGCTTCTGCCTCTTTCAACT [FAM-dT] C [THF] G [BHQ-dT] GCAATTCTGGGCCACG-[3'-block]	3

[0041] **실시에 2: 프라이머 확인**

[0042] **2.1. 1차 확인 실험**

[0043] 실시예 1의 방법으로 제작된 프라이머를 이용하여 구제역 바이러스 A 타입 특이적 검출이 가능한지 확인하기 위하여, Rapid viral RNA detection 키트(SPG-FMDV-A-001, Scorpigen Co. cooperated with TwistDx Co.)를 이용하여 RT-RPA(reverse transcriptase-recombinase polymerase amplification)를 실시하였다. RT-RPA를 실시하기 위하여 충청북도 보은군에서 분리된 구제역 바이러스 O 타입 및 경기도 연천군에서 분리된 구제역 바이러스 A 타입으로부터 viral RNA extraction 키트(1020953, QIAGEN)을 이용하여 RNA를 추출하고, 추출된 RNA를 정량하여 100pg, 10ng, 및 1ug의 RNA를 각각의 튜브에 담고, 실시예 1의 방법으로 제조된 프라이머들은 각각 1uL씩, 그리고 프로브는 0.5uL를 각각의 튜브에 첨가하고, 재수화-완충용액(rehydration buffer)을 29.5uL씩 첨가하였다. 그리고 증류수로 50uL를 맞춰준 후에 280mM의 아세트산마그네슘을 2.5uL씩 첨가하고 39℃에서 증폭 반응을 개시한 후에 초기반응 4분 후에 튜브를 꺼내어 5초간 와류시키고, 짧게 스핀다운 시킨 후에 다시 튜브를 39℃에서 20분 동안 반응시키며 형광을 관찰하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0044] 도 3에 나타난 바와 같이, 구제역 바이러스 O 타입의 경우에는 높은 농도의 RNA에서도 관찰이 되지 않은 반면 A 타입의 경우에는 10ng의 RNA 농도에서는 6분 정도에 이미 검출이 가능하고, 100pg의 낮은 농도에서도 10분이 지나면 관찰이 가능한 것을 확인하였다. 상기 결과를 통하여, 본원 발명의 프라이머 세트 및 프로브를 이용하여 단 시간에 적은 RNA 양으로도 A 타입 특이적인 관찰이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

[0046] **2.2. 2차 확인 실험**

[0047] 본 발명의 프라이머 세트의 검출 정확성을 재확인하기 위하여, 경기도 연천군에서 발견된 구제역 바이러스 A 타입, 충청북도 진천군에서 발견된 O 타입, 경기도 포천시에서 발견된 A 타입, Asia 타입인 Asia Shamir, 백신주로 사용되고 있는 이라크 A22, 경상북도 안동시에서 2002년도에 발견된 O 타입(AD2002), 및 2010년도에 발견된 O 타입(AD2010) 구제역 바이러스를 이용하여 실시예 2.1과 동일한 방법으로 RT-RPA를 실시하여 RNA를 증폭시킨 후, 아가로스겔 전기영동을 실시하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0048] 도 4에 나타난 바와 같이, A 타입인 연천 구제역 바이러스, 포천 구제역 바이러스, 및 이라크 A22에서는 RNA가 잘 증폭되어 단일 밴드가 생성되었지만, Asia 타입 및 O 타입 구제역 바이러스에서는 밴드가 관찰되지 않는 것을 확인하였다.

[0050] 상기 결과들을 통하여 본 발명의 프라이머 세트를 이용하면 다양한 구제역 바이러스의 A 타입을 낮은 농도에서도 특이적으로 검출이 가능할 뿐만 아니라, 프로브와 함께 이용하면 등온증폭법인 RT-RPA가 가능하기 때문에 현장에서 분단위로 신속하게 검출이 가능하다는 것을 확인할 수 있었다.

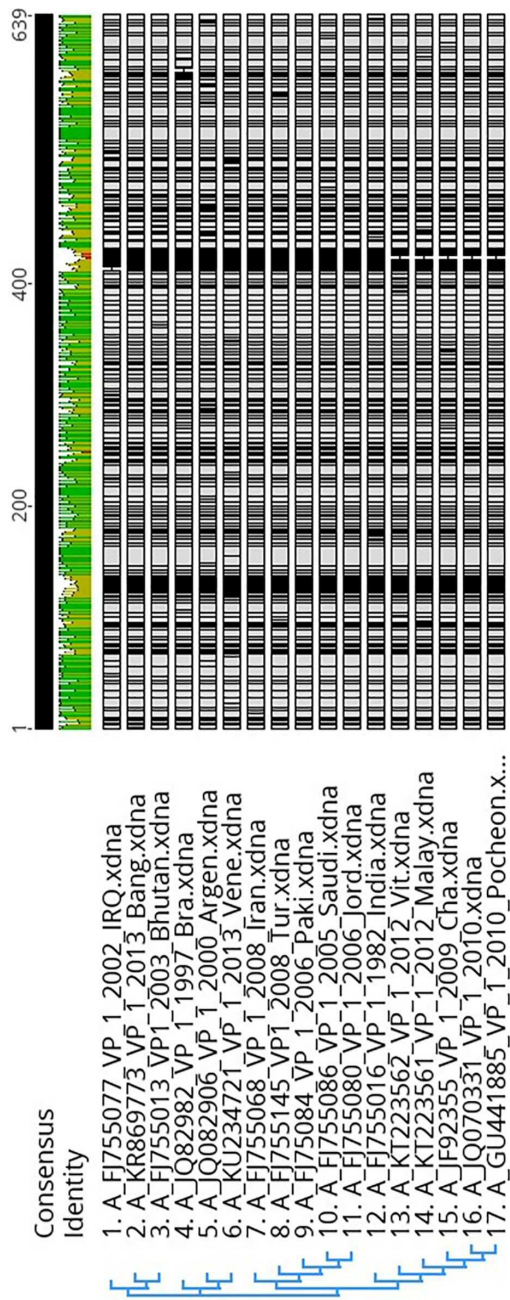
[0052] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

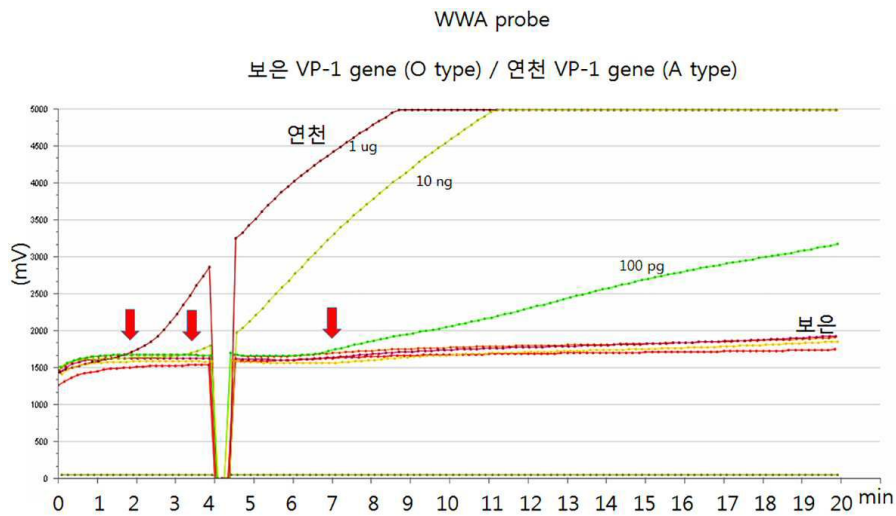
도면1

A_JQ070331_V...	A_JQ0...	A_GU4...	A_JF9...	A_KT2...	A_KT2...	A_JF7...	A_JF7...	A_JF7...	A_JF7...	A_KR8...	A_JF7...	A_JF7...	A_JQ8...	A_JQ0...	A_KU2...
A_GU441885_V...	100%	97.6%	97.6%	95.1%	91.6%	83.3%	79.7%	80.4%	79.8%	78.2%	80.3%	78.6%	78.7%	77.0%	76.8%
A_JF92355_VP...	97.6%	97.6%	97.6%	95.9%	91.4%	83.3%	79.7%	80.4%	79.8%	78.2%	80.3%	78.6%	78.7%	77.0%	76.8%
A_KT223561_V...	95.1%	95.1%	95.9%	91.0%	91.0%	82.3%	79.2%	80.1%	79.0%	78.4%	79.3%	78.6%	79.3%	77.5%	76.7%
A_KT223562_V...	91.4%	91.4%	91.4%	91.0%	91.0%	83.3%	80.9%	81.5%	80.4%	79.5%	81.4%	80.1%	78.6%	76.5%	76.2%
A_JF75016_V...	83.3%	83.3%	83.1%	83.3%	83.3%	83.3%	84.5%	85.1%	84.2%	83.7%	85.3%	80.1%	80.8%	78.9%	78.2%
A_JF755086_V...	79.7%	79.7%	80.1%	79.2%	80.9%	84.5%	98.6%	97.8%	95.8%	82.6%	95.8%	82.8%	79.8%	79.7%	78.2%
A_JF75084_VP...	80.4%	80.4%	80.9%	80.1%	81.5%	85.1%	98.2%	97.8%	95.9%	83.4%	96.4%	83.6%	80.9%	80.4%	78.9%
A_JF755080_V...	79.8%	79.8%	80.0%	79.0%	80.4%	84.2%	97.9%	97.3%	96.1%	82.3%	94.5%	82.2%	79.7%	79.8%	78.7%
A_JF755145_V...	78.6%	78.6%	79.0%	78.1%	79.8%	83.3%	95.8%	95.9%	96.1%	82.0%	94.1%	82.2%	79.8%	79.8%	78.6%
A_JF755088_V...	80.3%	80.3%	80.4%	79.3%	81.4%	85.3%	95.8%	96.4%	94.5%	82.8%	94.2%	83.3%	80.4%	79.8%	77.6%
A_KR869773_V...	78.2%	78.2%	78.4%	78.4%	79.5%	83.7%	82.6%	83.4%	82.3%	94.2%	82.8%	84.7%	81.5%	79.2%	79.5%
A_JF755013_V...	78.6%	78.6%	78.9%	78.6%	80.1%	84.7%	82.8%	83.6%	82.2%	94.2%	83.3%	84.5%	81.2%	79.8%	79.0%
A_JF755077_V...	79.2%	79.2%	79.2%	79.0%	79.2%	82.8%	81.1%	81.8%	81.2%	84.7%	84.5%	79.3%	78.7%	78.7%	80.6%
A_JQ82982_VP...	78.7%	78.7%	79.3%	78.6%	78.6%	80.8%	79.8%	80.9%	79.8%	81.5%	80.4%	79.3%	82.2%	82.2%	80.6%
A_JQ082906_V...	77.0%	77.0%	77.5%	77.5%	76.5%	78.9%	79.7%	80.4%	79.8%	79.2%	79.8%	78.7%	82.2%	80.4%	80.4%
A_KU234721_V...	76.8%	76.8%	76.7%	76.2%	76.5%	78.2%	78.2%	78.9%	78.1%	79.5%	77.6%	79.0%	80.6%	80.4%	80.4%

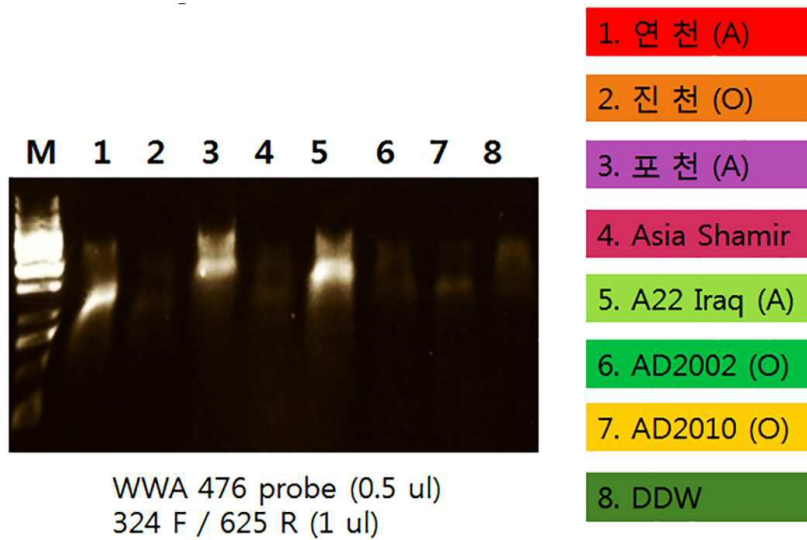
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Republic of Korea(Animal and Plant Quarantine Agency)
Yonsei University Wonju Industry-Academic Cooperation Foundation
- <120> Primer set for detecting foot-and-mouth disease serotype A
- <130> DPB174067
- <160> 3
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 35
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 1

caaagcacca ttcacgagac ttgcgctccc ttaca

35

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 2

caggtgcaat gatcttctgc ttgtgtctgt cttg

34

<210> 3

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Detection probe

<400> 3

tcgccgcaca gcttcctgcc tctttcaact cggcaattcg ggccacg

47