



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0115482
(43) 공개일자 2011년10월21일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)

C12R 1/90 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0035011

(22) 출원일자 2010년04월15일

심사청구일자 2010년04월15일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교

국민대학교산학협력단

서울특별시 성북구 정릉동 861-1 국민대학교내

(72) 발명자

박순정

서울특별시 송파구 잠실동 101-1 우성A 17-303

김주리

서울특별시 성동구 성수2가1동 843번지 서울숲힐스테이트 105동 904호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

전체 청구항 수 : 총 6 항

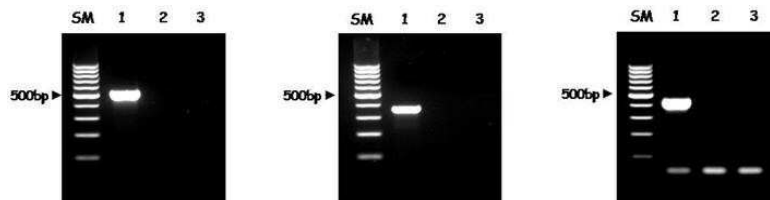
(54) 램블편모충 검출장치

(57) 요약

본 발명은 램블편모충(*Giardia lamblia*) 검출용 키트 및 대상시료 내 램블편모충 검출방법에 관한 것이다. 본 발명자들은 램블편모충에 특이적인 마커로 이용될 수 있는 세가지 유전자(surface-labeled trophozoite antigen(*sta*, GenBank 접근번호: XM_773533), vacuolar sorting protein (*vsp*, GenBank 접근번호: XM_773285), GLORF-C4(*c4*, GenBank 접근번호: AJ291756))를 발굴하고, 상기 마커유전자와 특이적으로 반응할 수 있는 프라이머를 설계하였다.

본 발명은 수인성 감염으로 인체에 소화기 질환을 유발하는 주요 병원성 원생동물인 램블편모충의 효율적인 검출 또는 진단에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

이혜연

경기도 군포시 산본동 1151-5 수리한양아파트 810
동 402호

성문희

서울특별시 성북구 돈암동 609-1 한신아파트 104동
801호

조재창

경기도 용인시 처인구 모현면 왕산리 산 89 자연과
학대학 환경학과

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10580

부처명 서울특별시

연구관리전문기관

연구사업명 서울시산학협력사업 기술기반 구축사업

연구과제명 바이오소재 산업화 혁신 클러스터

기여율

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2009년 08월 01일 ~ 2010년 07월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

서열목록 제 1 서열 내지 제 3 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 램블편모충(*Giardia lamblia*) 검출용 키트.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 검출용 키트는 서열목록 제 4 서열과 제 5 서열, 제 6 서열과 제 7 서열 및 제 8 서열과 제 9 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 프라이머 쌍을 포함하는 유전자 증폭키트인 것을 특징으로 하는 램블편모충(*Giardia lamblia*) 검출용 키트.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 검출용 키트는 서열목록 제 4 서열 내지 제 9 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프로브를 포함하는 마이크로 어레이인 키트인 것을 특징으로 하는 램블편모충(*Giardia lamblia*) 검출용 키트.

청구항 4

서열목록 제 1 서열 내지 제 3 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 검출하는 단계를 포함하는 대상시료 내 램블편모충(*Giardia lamblia*) 검출방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 검출방법은 서열목록 제 4 서열과 제 5 서열, 제 6 서열과 제 7 서열 및 제 8 서열과 제 9 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 프라이머 쌍을 이용한 유전자 증폭을 통하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 검출방법.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 검출방법은 서열목록 제 4 서열 내지 제 9 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프로브를 이용한 마이크로 어레이를 통하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 검출방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 램블편모충 특이적 유전자를 마커로 한 램블편모충의 유전적 검출 장치 또는 검출방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 램블편모충(*Giardia lamblia*)은 사람의 소장 특히 십이지장에 기생하는 원생동물이며, 영양형(Trophozoite)은

길이 9.5-21 μm , 폭 5-15 μm , 두께 2-4 μm 의 층체로서 전방은 넓고 후방은 뾰족한 서양배 모양의 유원형이다. 좌우 대칭이고 옆에서 볼 때 배측이 볼록하게 나왔으며 복측은 약간 굽어 들어간 모습이다. 전방의 복측 양쪽에 1개씩의 커다란 흡반이 있고 각 흡반에는 층체의 정중선에 근접해서 난원형의 핵이 있으며 핵소체는 중심성이다. 포낭(Cyst)은 4핵성이고 8-12 x 7-10 μm 크기의 난원형 내지 타원형으로서 영양형에서 관찰되는 여러 구조물들을 내포하고 있다. 핵은 보통 4개이고 대체로 전방에 몰려 있으며 핵소체는 중심성 또는 편재성으로 위치한다. 람블편모충은 4핵성 포낭이 경구를 통해 침입할 경우 십이지장에서 탈낭되고 2분열로 증식, 발육한다. 영양형은 편모의 활발한 운동으로 빠르게 이동하며 흡반을 이용하여 상피 표면에 흡착한다. 영양형은 핵이 먼저 분열되고 이어 신경운동 장치, 흡반 그리고 세포질의 순으로 분열, 2개의 낭영양형이 된다. 주된 기생 장소는 십이지장의 음와이고, 이에 근접한 소장 상부에서도 발견된다. 영양형은 설사변에서 발견되는 것이 보통이고 대장으로 내려가면 피포되어 포낭이 된다. 선진국에서 대변검사를 통한 람블편모충의 검출률은 1% 이하이나, 열대에서는 10-20%, 유행 지역에서는 30%에 미친다. 람블편모충의 포낭은 물에서 3개월 이상 생존하는 것으로 알려져 있고, 미국과 영국에서 수인성 전염병으로 지정되어 수질규제기준이 포함되어 있다.

[0003] 람블편모충을 검출하는 다양한 진단방법들이 개발되어 있으나 가장 전형적인 방법은 수질이나 대변에 존재하는 람블편모충의 포낭을 현미경을 이용하여 관찰하는 방법이다. 이 방법은 낮은 민감도와 관찰자의 숙련된 경험을 필요로 한다는 점에서 실용성이 낮다고 여겨지고 있다. 이를 보완하여 특이적으로 관찰하는 방법으로는 람블편모충의 포낭을 형광 염색하여 현미경으로 확인하는 방법이 있다. 이러한 람블편모충 포낭에 특이한 항체를 이용한 효소 면역반응 키트(enzyme immunoassay kit)는 수질이나 대변에 포함된 람블편모충을 탐지하는데 용이하나 그 민감도에 있어서는 낮은 효율을 가지고 있다(1). 또한 시판되고 있는 진단 키트로 고상 면역크로마토그래피 분석 키트(solid-phase immunochromatographic assay kit)가 있는데 이들은 10분이라는 빠른 시간 안에 람블편모충 유무를 진단할 수 있는 장점이 있으나(1,2), 이 키트로 진단을 할 경우 정확도가 떨어지는 단점이 보고된 바 있다(3).

[0004] 람블편모충에 특이적인 유전정보를 이용한 분자생물학적 방법인 효소중합 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 현미경 관찰에 비해 적은 수의 포낭으로도 람블편모충의 존재를 탐지할 수 있는 민감한 방법이라 할 수 있겠다(4,5). 람블편모충에 대한 특이성이 높은 프로브를 얻기 위해 본 발명자들은 람블편모충에 특이적으로 존재하는 유전자를 발굴하여 이들 유전자의 특정부위를 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 설계함으로써 이들을 높은 신뢰도와 효율성으로 검출할 수 있는 방법을 구축하고자 하였다.

[0005] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 수인성 감염으로 인체에 소화기 질환을 유발하는 주요 병원성 원생동물인 람블편모충(*Giardia lamblia*)의 효율적인 검출방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과 *sta*, *vsp* 및 *c4* 유전자를 마커로 이용할 경우, 높은 민감성과 특이성으로 람블편모충을 검출할 수 있다는 사실을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 람블편모충 검출용 키트를 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 대상시료 내 람블편모충(*Giardia lamblia*) 검출방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제 1 서열 내지 제 3 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴

클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 람블편모충(*Giardia lamblia*) 검출용 키트를 제공한다. 본 발명자들은 수인성 감염을 일으키는 주요 병원성 원생동물인 람블편모충의 효율적인 검출방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과 유전적 분석(genetic analysis)을 위한 마커로서 *sta*, *vsp* 및 *c4* 유전자를 이용할 경우, 높은 민감성과 특이성으로 람블편모충을 검출할 수 있다는 사실을 발견하였다.

- [0011] 본 발명에 따르면, surface-labeled trophozoite antigen, vacuolar sorting protein 및 GLORF-C4 단백질을 각각 인코딩하는 *sta*, *vsp* 및 *c4* 유전자는 람블편모충에 특이적으로 존재하는 마커 유전자(marker gene)로서, 이들의 존재를 유전자 증폭 또는 마이크로어레이 방법을 통해 검출할 경우 람블편모충의 존재를 높은 신뢰도와 특이도(specificity)로 예측할 수 있다. 본 발명에 따르면, 서열목록 제 1 서열, 제 2 서열 및 제 3 서열은 각각 *sta*, *vsp* 및 *c4* 유전자의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0012] 본 명세서에서, 용어 “뉴클레오타이드”는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0013] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합체의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일체이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 프라이머는 타겟 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 연장 프라이머(extension primer)일 수 있으며, 이는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.
- [0015] 본 발명에서 이용되는 연장 프라이머는 타겟 핵산의 제1위치에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다. 본 명세서에서, 프라이머 서열과 관련하여 사용되는 용어, “실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.
- [0016] 프라이머는, 중합체의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, 응용분야 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 용어 “어닐링” 또는 “프라이밍”은 주형 핵산에 올리고디옥시뉴클레오타이드 또는 핵산이 병치(apposition)되는 것을 의미하며, 상기 병치는 중합효소가 뉴클레오타이드를 중합시켜 주형 핵산 또는 그의 일부분에 상보적인 핵산 분자를 형성하게 한다.
- [0017] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 상술한 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 이러한 프라이머의 디자인은 상술한 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 키트에서 출발물질이 gDNA인 경우, gDNA의 분리는 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Rogers & Bendich (1994)).
- [0019] 출발물질이 mRNA인 경우에는, 당업계에 공지된 통상의 방법에 총 RNA를 분리하여 실시된다(참조: Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular*

Biology, John Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* 162:156(1987)). 분리된 총 RNA는 역전사효소를 이용하여 cDNA로 합성된다. 상기 총 RNA는 인간(예컨대, 비만 또는 당뇨 환자)으로부터 분리된 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 용이하게 합성할 수 있다(참조: *PNAS USA*, 85:8998(1988); Libert F, et al., *Science*, 244:569(1989); 및 Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)).

- [0020] 본 발명의 키트에 있어서, 상기 특정 서열을 규명하는 것은 당업계에 공지된 다양한 방법을 응용하여 실시될 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 응용될 수 있는 기술은, 형광 인 situ 혼성화 (FISH), 직접적 DNA 서열결정, PFGE 분석, 서던 블롯 분석, 단일-가닥 컨퍼메이션 분석(SSCA, Orita et al., *PNAS, USA* 86:2776(1989)), RNase 보호 분석(Finkelstein et al., *Genomics*, 7:167(1990)), 닷트 블롯 분석, 변성 구배 젤 전기영동(DGGE, Wartell et al., *Nucl.Acids Res.*, 18:2699(1990)), 뉴클레오타이드 미스매치를 인식하는 단백질(예: *E. coli*의 mutS 단백질)을 이용하는 방법(Modrich, *Ann. Rev. Genet.*, 25:229-253(1991)), 및 대립형-특이 PCR을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 서열변화가 단일-가닥 분자내 염기 결합의 차이를 초래하여, 이동성이 다른 밴드를 출현하게 하는 데, SSCA는 이 밴드를 검출한다. DGGE 분석은 변성 구배 젤을 이용하여, 야생형 서열과 다른 이동성을 나타내는 서열을 검출한다.
- [0022] 다른 기술들은 일반적으로 본 발명의 마커 유전자인 *sta*, *vsp* 및 *c4*의 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 프라이머를 이용한다.
- [0023] 예를 들어, RNase 보호 분석에서, 본 발명의 유전자들을 포함하는 서열에 상보적인 리보프로브가 이용될 수 있다. 상기 리보프로브와 인간으로부터 분리한 DNA 또는 mRNA를 혼성화시키고, 이어 미스매치를 검출할 수 있는 RNase A 효소로 절단한다. 만일, 미스매치가 있어 RNase A가 인식을 한 경우에는, 보다 작은 밴드가 관찰된다.
- [0024] 혼성화 시그널을 이용하는 분석에서, 본 발명의 유전자 서열에 상보적인 프로브가 이용된다. 이러한 기술에서, 프로브와 타겟 서열의 혼성화 시그널을 검출하여 직접적으로 DM 또는 MS 여부를 결정한다.
- [0025] 본 명세서에서, 용어 “프로브”는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 바람직하게는, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이다. 프로브는 바람직하게는 디옥시리보뉴클레오타이드이다.
- [0026] 본 발명에 이용되는 프로브로서, 본 발명의 마커 유전자인 *sta*, *vsp* 및 *c4* 서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 프로브는 본 발명의 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 포함되는 10-30개의 연속 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다.
- [0027] 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다. 혼성화에 이용되는 엄격한 조건(stringent condition)은 온도, 이온세기(완충액 농도) 및 유기 용매와 같은 화합물의 존재 등을 조절하여 결정될 수 있다. 이러한 엄격한 조건은 혼성화되는 서열에 의존하여 다르게 결정될 수 있다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 “검출”은 특정 대상시료 또는 개체 내의 목적균주의 존재, 농도, 조성 또는 활성을 판단하거나 예측하는 것 뿐 아니라, 이러한 분석결과를 통해 질병 또는 질환에 대한 분석대상 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것)을 포함한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 유전자들을 마커로 하여 이의 존재가 상술한 방법을 통해 확인되면 대상시료 내의 램블편모충이 존재하는 것으로 판단된다.

- [0029] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 검출용 키트는 서열목록 제 4 서열과 제 5 서열, 제 6 서열과 제 7 서열 및 제 8 서열과 제 9 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 프라이머 쌍을 포함하는 유전자 증폭키트이다.
- [0030] 본 발명에 따르면, 서열목록 제 4 서열과 제 5 서열은 *sta* 유전자를 증폭하기 위한 정방향 및 역방향 프라이머 쌍이고, 서열목록 제 6 서열과 제 7 서열은 *vsp* 유전자를 증폭하기 위한 정방향 및 역방향 프라이머 쌍이며, 서열목록 제 8 서열과 제 9 서열은 *c4* 유전자를 증폭하기 위한 정방향 및 역방향 프라이머 쌍이다.
- [0031] 본 발명의 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 그 구성으로 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 검출용 키트는 서열목록 제 4 서열 내지 제 9 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프로브를 포함하는 마이크로 어레이 키트이다.
- [0033] 프로브 제작 시 본 발명 마커의 뉴클레오타이드 서열인 서열목록 제 1 서열 내지 제 3 서열을 참조하여 프로브를 디자인할 수 있으며, 본 발명의 프로브는 상기 나열한 본 발명의 마커 유전자인 *sta*, *vsp* 및 *c4*의 연속된 10-100개 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열을 갖는다. 보다 바람직하게는 본 발명의 프로브는 서열목록 제 4 서열 내지 제 9 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열로 디자인할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제 1 서열 내지 제 3 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열을 검출하는 단계를 포함하는 대상시료 내 람블편모충(*Giardia lamblia*) 검출방법을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 검출방법은 서열목록 제 4 서열과 제 5 서열, 제 6 서열과 제 7 서열 및 제 8 서열과 제 9 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 프라이머 쌍을 이용한 유전자 증폭을 통하여 이루어진다.
- [0036] 본 발명이 유전자 증폭 방식으로 실시되는 경우, 바람직하게는 프라이머를 이용한 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다.
- [0037] 본 명세서에 기재된 용어 “증폭 반응”은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)(17, 18), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA)(19)(WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication)(20)(WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오타이드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CP-PCR)(미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-PCR)(미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification; NASBA)(미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호, 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification)(21, 22) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)(23)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭 방법들은 미국특허 제5,242,794, 5,494,810, 4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다.
- [0038] PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 분

별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR 및 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)이 특정한 응용을 위해 개발되었다. PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. *PCR*. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있다.

- [0039] 본 발명의 방법을 프라이머를 이용하여 실시하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열을 분석하여 진단한다. 본 발명은 본 발명의 마커 유전자의 뉴클레오티드 서열을 검출하는 것이기 때문에, 분석 대상의 시료(예컨대, 지놈 DNA)에서 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열을 결정함으로써 조사하여 MS 또는 DM을 결정할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 가장 바람직한 구현예에서, 증폭 과정은 미국특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호에 개시된 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다.
- [0041] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 검출방법은 서열목록 제 4 서열 내지 제 9 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프로브를 이용한 마이크로 어레이를 통하여 이루어진다.
- [0042] 본 발명의 방법이 마이크로어레이 방식에 의하는 경우에는, 마이크로어레이의 고상표면에 프로브가 고정화 되어 있다. 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기한 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기체(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기체는 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함한다. 상기한 혼성화 어레이 요소는 상기의 기체 상에 배열되고 고정화 된다. 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 예폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기체에 결합될 수 있다.
- [0043] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화된다. 혼성화 조건은 다양하게 할 수 있다. 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.
- [0044] 프로브의 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신 (fluorescein), 피코에리트린 (phycoerythrin), 로다민, 리사민 (lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5 (Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P^{32} 및 S^{35}), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 증금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션 (nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법(Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법 (Maxam & Gilbert, *Methods in Enzymology*, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.
- [0045] 분석 대상이 되는 핵산 시료는 다양한 생시료(biosamples)에서 얻은 mRNA를 이용하여 제조할 수 있다. 프로브 대신에 분석 대상이 되는 cDNA를 표지하여 혼성화 반응-기초 분석을 실시할 수도 있다.
- [0046] 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 상기 엄격조건 중에서 고 엄격조건은 0.5 M NaHPO₄, 7% SDS(sodium dodecyl sulfate), 1 mM EDTA에

서 65℃ 조건으로 혼성화하고, 0.1 x SSC(standard saline citrate)/0.1% SDS에서 68℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 또는, 고 엄격조건은 6 x SSC/0.05% 소듐 파이로포스페이트에서 48℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다. 저 엄격조건은 예를 들어, 0.2 x SSC/0.1% SDS에서 42℃ 조건으로 세척하는 것을 의미한다.

[0047] 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 이 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다. 이용될 수 있는 효소/기질의 조합은, 퍼옥시다아제(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenazine methosulfate) 등이다. 프로브가 금 입자로 표지된 경우에는 실버 나이트레이트를 이용하여 실버 염색 방법으로 검출할 수 있다. 따라서 본 발명의 네거티브 마커를 검출하는 방법을 혼성화에 기초하여 실시하는 경우에는, 구체적으로 (i) 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 프로브를 핵산 시료에 혼성화시키는 단계; (ii) 상기 혼성화 반응 발생 여부를 검출하는 단계를 포함한다. 혼성화 과정에 의한 혼성화 시그널의 세기를 분석함으로써, 시료 내 램블편모충의 존재를 예측할 수 있다. 즉, 시료에서 본 발명의 마커의 뉴클레오티드 서열에 대한 혼성화 시그널이 정상 시료보다 강하게 나오는 경우에는 램블편모충이 존재하는 것으로 판단한다.

발명의 효과

[0048] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0049] (a) 본 발명은 램블편모충(*Giardia lamblia*) 검출용 키트 및 대상시료 내 램블편모충 검출방법을 제공한다.

[0050] (b) 본 발명은 수인성 감염으로 인체에 소화기 질환을 유발하는 주요 병원성 원생동물인 램블편모충(*Giardia lamblia*)의 효율적인 검출 또는 진단에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 램블편모충 *sta*(surface-labeled trophozoite antigen) 유전자의 염기서열을 나타낸 그림이다. *sta*의 길이는 총 2,166 bp이며, 밑줄로 표시된 부분은 *sta*를 특이적으로 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트인 *sta*-F와 *sta*-R을 나타낸다. 이들 프라이머 세트는 PCR을 수행 할 때 증폭되는 526 bp에 해당하는 부분은 진하게 표시하였다.

도 2는 램블편모충 *vsp*(vacuolar sorting protein) 유전자의 염기서열을 나타낸 그림이다. *vsp*의 길이는 총 1,596 bp이며, 밑줄로 표시된 부분은 *vsp*를 특이적으로 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트인 *vsp*-F와 *vsp*-R을 나타낸다. 이들 프라이머 세트는 PCR을 수행 할 때 증폭되는 368 bps에 해당하는 부분은 진하게 표현하였다.

도 3은 램블편모충 *GLORF-C4* 유전자의 염기서열을 나타낸 그림이다. 밑줄로 표현된 부분은 *GLORF-C4*를 특이적으로 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트인 *c4*-F와 *c4*-R을 나타내고 있다. 이들 프라이머 세트는 PCR을 수행 할 때 증폭되는 443 bps에 해당하는 부분은 진하게 표현하였다.

도 4는 램블편모충 지놈 DNA를 이용하여 특이적 유전자의 증폭을 확인한 결과를 나타낸 그림이다. 250 ng/ μ l의 램블편모충 gDNA를 주형으로 이용하여 선별된 특이적 세 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 세트(*sta*-F/*sta*-R, *vsp*-F/*vsp*-R 및 *c4*-F/*c4*-R)를 적용하여 PCR을 수행한 결과 526 bp의 *sta* 유전자 산물(1번 레인), 368 bp의 *vsp* 유전자 산물(2번 레인), 443 bp의 *c4* 유전자 산물(3번 레인)이 증폭됨을 확인하였다. SM; size marker.

도 5는 선별된 특이적 프라이머 세트를 이용하여 램블편모충에 대한 특이성을 조사한 결과를 나타낸 그림이다. 선별된 프라이머 세트를 서로 다른 주형에 적용하여 PCR을 수행하였다. 이를 위해 램블편모충과 이질아메바는 각각 TYI-S-33과 변형 TYI-S-33 배지에 키워 세포들을 수득하였다. 이들에서 INtRON Biotechnology사의

G-DEX™ genomic DNA extraction kit(Cat. Number 17021)을 이용하여 각각의 지놈 DNA를 분리하였다. 또 다른 원생생물인 작은와포자충은 ATCC로부터 지놈 DNA를 구매하여 사용하였다(Cat. Number PRA-67D). 서로 다른 종류의 250 ng/ μ l의 지놈 DNA를 주형으로 PCR을 수행한 결과 세 유전자 모두 램블편모충에서만 증폭됨을 확인하였다. 1번 레인; 램블편모충 지놈 DNA, 2번 레인; 이질아메바 지놈 DNA, 3번 레인; 작은와포자충 지놈 DNA. SM; size marker.

도 6은 선별된 특이적 프라이머 세트에 대한 민감도 조사결과를 나타낸 그림이다. 선별된 특이적 프라이머 세트의 램블편모충의 주형 농도에 대한 민감도를 조사하기 위하여 램블편모충 지놈 DNA 250 ng/ μ l를 10배 배수로 희석하여 준비하였다. 250 ng/ μ l(1번 레인), 25 ng/ μ l(2번 레인), 2.5 ng/ μ l(3번 레인), 250 pg/ μ l(4번 레인), 25 pg/ μ l(5번 레인)의 지놈 DNA로부터 증폭된 PCR 산물을 보여주고 있다. 각 농도를 주형으로 PCR 반응을 수행한 결과 세 유전자 모두 2.5 ng/ μ l 농도에서부터 증폭됨을 알 수 있었다. SM; size marker

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0053] 실시예

[0054] 실시예 1: 램블편모충 및 이질아메바의 배양

[0055] 램블편모충 WB 주(ATCC30957) 영양형을 TYI-S-33(2% 카제인 소화액, 1% 효모 추출물, 1% 글루코스, 0.2% NaCl, 0.2% L-시스테인, 0.02% 아스코르빈산, 0.2% K₂HPO₄, 0.06% KH₂PO₄, 10% 우아 혈청(calf serum) 및 0.5 mg/mL 우담즙(bovine bile, pH7.1; 6) 배지에서 72시간 동안 37°C 배양기에서 배양하였다.

[0056] 이질아메바(*Entamoeba histolytica*, HM1:IMSS) 영양형은 변형 TYI-S-33(2% 카제인 소화액, 1% 효모 추출물, 1% 글루코스, 0.2% NaCl, 0.1% L-시스테인, 0.02% 아스코르빈산, 0.2% K₂HPO₄, 0.06% KH₂PO₄, 10% 우아 혈청 pH 6.8; 7) 배지에서 37°C 배양기로 72시간 배양하여 준비하였다.

[0057] 실시예 2: 램블편모충의 특이적 염기서열 조사 및 프라이머 제작

[0058] GenBank 데이터베이스에 기탁된 램블편모충 지놈 DNA를 탐색한 후, 이 원생동물에 특이적으로 존재하는 염기서열을 분석하였다. 이를 바탕으로 세 가지 유전자를 선택하였고, 이들이 코딩하는 각 단백질의 이름은 surface-labeled trophozoite antigen(*sta*, GenBank 접근번호: XM_773533), vacuolar sorting protein (*vsp*, GenBank 접근번호: XM_773285), GLORF-C4(*c4*, GenBank 접근번호: AJ291756)이다(표 1). 이들 중 GLORF-C4는 본 발명자들에 의하여 처음 발견하여 NCBI(National Center for Biotechnology Information)에 보고한 바 있다. 본 발명자들은 이들 유전자의 일부분을 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 제작하였고, 이들을 각각 *sta*-F/*sta*-R, *vsp*-F/*vsp*-R 및 *C4*-F/*C4*-R라 명명하였으며, 그 염기서열과 증폭된 예상 결과물의 크기를 표 2에 표시하였다.

표 1

[0059] 선별된 램블편모충 특이적 유전자 및 단백질

유전자	단백질
<i>sta</i>	Surface-labeled trophozoite antigen
<i>vsp</i>	Vacuolar sorting protein
<i>c4</i>	GLORF-C4

표 2

[0060]

람블편모충 특이 유전자 증폭용 프라이머 세트

프라이머 이름	염기서열	PCR 결과물의 크기
sta-F	5 '-TAGCTATTGATGGGACAAAG-3'	526 bp
sta-R	5 '-GCGCAGTTCAAGCAATTACT-3'	
vsp-F	5 '-GGTGAAGAGTAACAAGGTTC-3'	368 bps
vsp-R	5 '-CAGCATCCATCGCGTTAATA-3'	
c4-F	5 '-AGTCATCATCGTCCTCTA-3'	443 bps
c4-R	5 '-CAATCTTGTTTGCATACGA-3'	

[0061]

실시예 3: 지놈 DNA 분리

[0062]

위의 배양조건에서 배양한 5×10^7 람블편모충 영양형과 3×10^7 이질아메바 영양형을 상온에서 3,000 rpm으로 20분 간 원심분리하여 채집하였다. 이들로부터 G-DEX™ genomic DNA extraction kit(INtRON Biotechnology, Cat. Number 17021)을 이용하여 지놈 DNA를 분리하였다. 간단히 방법을 설명하면 모아진 세포들에 600 μ l의 용해 완충액(lysis buffer)을 넣어준 후 65℃에서 10분간 방치하였다. 여기에 200 μ l의 솔루션 II(protein PPT buffer)를 넣고 10초간 볼텍싱하여 혼합하고 얼음에 5분간 올려놓았다. 상기 용액을 상온에서 13,000 rpm으로 35분 간 원심분리하여 상층액을 새로운 튜브에 옮겨준 후 600 μ l 이소프로판올을 첨가하여 혼합하여주고 상온에서 13,000 rpm으로 1분 간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 튜브에 남아있는 침점물(pellet)에 동량의 70% 에탄올을 넣어 다시 한번 원심분리 한 후 상층액을 제거하고 침점물을 건조시켰다. 건조된 침전물에 100 μ l의 솔루션 III(DNA 재수화 용액)을 넣고 볼텍싱하여 지놈 DNA를 용해시켰다.

[0063]

작은와포자충(*Cryptosporidium parvum*)의 지놈 DNA는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여 사용하였다(Cat. Number PRA-67D).

[0064]

실시예 4: 효소중합연쇄반응

[0065]

앞서 준비한 총 3종의 원생동물(*G. lamblia* ATCC30957, *C. parvum* PRA-67D, *E.histolytica* HM1:IMSS)의 지놈 DNA를 PCR 주형으로 사용하였다. 효소중합 연쇄반응을 위한 총 반응액 20 μ l는 다음과 같이 준비하였다: 주형 gDNA, 0.25 μ g, 1 X PCR buffer; 10 mM Tris-HCl, 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂(pH 9.0), dNTP mix, 각 0.25mM, 정방향 프라이머와 역방향 프라이머 20 pmole, Taq DNA 폴리머레이즈, 1.0 U. 준비된 반응액은 변성 전(pre-denaturing) 과정으로 94℃에서 2분간 반응시킨 후, 94℃에서 1분, 56℃에서 1분, 72℃에서 1분간 30회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 10분간 반응시켜 DNA를 증폭하였다. PCR 결과물은 1.5% 아가로스젤에 로딩 한 후, 전기영동을 하고 EtBr(ethidium bromide)용액으로 염색하여 UV 하에서 관찰하였다.

[0066]

실시예 5: 람블편모충에서 특이적으로 증폭되는 염기서열 조사

[0067]

본 발명자들은 상기에서 조사한 세 종류의 람블편모충 유전자가 특이성을 갖는지를 확인하고자 하였다. 앞서 기술했듯이 세 종류의 유전자는 *surface-labeled trophozoite antigen(sta*, Genbank 접근번호:XM_773533), *vacuolar sorting protein(vsp*, Genbank 접근번호:XM_773285), *GLORF-C4(c4*, Genbank 접근번호:AJ291756)이다(표 1). 각 유전자의 총 길이는 *sta* 유전자가 2,166 bp, *vsp* 유전자가 1,596 bp, 그리고 *c4* 유전자가 597 bp이다(도 1 내지 도 3). 본 발명자들은 상기 유전자들을 증폭하는데 있어 람블편모충에만 특이적이라 여겨지는 부분이 증폭될 수 있도록 프라이머 세트를 제작하였다(표 2). 도 1은 *sta* 유전자의 총 길이를 나타낸 것이며, 밑줄로 표시한 부분은 특이적인 *sta* 유전자의 부분을 증폭하기 위해 제작한 sta-F(sta-forward)와 sta-R(sta-reverse) 프라이머의 위치를 표시하고 있다. 진하게 표시한 부분이 이 두 프라이머를 이용했을 때 증폭되는 유전자서열로써 그 크기가 526 bp에 해당한다. 마찬가지로 도 2와 도 3은 각각 *vsp* 유전자와 *c4* 유전자의 염기 서열이며, 이들을 각각 vsp-F/vsp-R, c4-F/c4-R로 증폭할 경우 각각 368 bp와 443 bp에 해당하는 PCR 산물이 생성되었다. 우선 이들 결과물이 예상대로 증폭되는지를 보기 위해 람블편모충 지놈 DNA를 주형으로 하여 PCR를 수행하였다. 그 결과 도 4와 같이 *sta* 유전자, *vsp* 유전자 및 *c4* 유전자가 각각 526bp, 368bp 및 443bp의 PCR 산물로 증폭됨을 관찰하였다.

[0068]

본 발명자들은 증폭 유전자들의 PCR 산물들이 람블편모충 지놈 DNA에만 특이적인가를 확인하기 위해 람블편모충

과 함께 인체에 위해하다고 알려져 있는 다른 원생동물 병원체인 이질아메바와 작은와포자충의 지놈 DNA를 주형으로 하여 동일한 실험을 수행하였다. 실험 결과, 도 5에서와 같이 동량의 주형을 사용한 실험에서 램블편모충을 제외한 나머지 원생동물에서는 이들 세 종류의 유전자가 증폭되지 않음을 확인하였다. 이로써 본 발명자들이 제작한 세 종류의 프라이머 세트가 램블편모충에 특이적이라고 할 수 있겠다.

[0069] 실시예 6: 특이적으로 증폭되는 염기서열의 민감도 조사

[0070] 본 발명자들은 특이성이 확인된 상기 세가지 유전자의 프라이머 세트가 램블편모충 지놈 DNA의 농도에 얼마나 민감한가를 확인하고자 하였다. 이는 얼마나 적은 양의 시료에서 본 발명의 프라이머가 상기 유전자들과 반응할 수 있는지를 확인하는 실험으로서, 이를 위해 주형으로 사용한 250 ng/ μ l의 램블편모충 지놈 DNA를 10배로 순차적으로 희석하여 각각 25 ng/ μ l, 2.5 ng/ μ l, 250 pg/ μ l 및 2.5 pg/ μ l로 준비하였다. 이후 이들을 주형으로 하여 PCR을 수행한 그 결과, 도 6과 같이 세 유전자 모두 2.5 ng/ μ l 농도에서부터 유전자가 증폭됨을 알 수 있었다. 이것은 처음 농도보다 100배 낮은 농도에서도 램블편모충 특이적 유전자를 증폭할 수 있음을 확인하여 본 발명의 프라이머의 높은 민감성 및 특이성을 보여주는 결과이다.

[0071] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0072] 참고문헌

- [0073] 1. Johnston, J. P., M. M. Ballard, M. J. Beach, L. Causer, and P. P. Wilkens. Evaluation of three commercial assays for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* organisms in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 41:623626(2003).
- [0074] 2. Katanik, M. T., S. K. Schneider, J. E. Rosenblatt, G. S. Hall, and G. W. Procop. Evaluation of ColorPAC *Giardia/Cryptosporidium* rapid assay and ProSecT *Giardia/Cryptosporidium* microplate assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* in fecal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 39:45234525(2001)
- [0075] 3. Centers for Disease Control and Prevention. Manufacturer's recall of rapid assay kits based on false positive antigen tests Wisconsin, 20012002. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 51:189(2002).
- [0076] 4. Bialek, R., N. Binder, K. Dietz, A. Joachim, J. Knobloch, and U. E. Zelck. Comparison of fluorescence, antigen and PCR assays to detect *Cryptosporidium parvum* in fecal specimens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 43:283288(2002).
- [0077] 5. McGlade, T. R., I. D. Robertson, A. D. Elliot, and R. C. A. Thompson. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. *Vet. Parasitol.* 110:197205(2003).
- [0078] 6. Keister, D.B. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Me. Hyg.* 77:974-488(1983).
- [0079] 7. Diamond, L.S., Harlow, D.R., Cunnick, C.C. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 72:431-432(1978).

도면

도면1

```

atgttcgaaaaaattctcttcacaaactgcatttgcaattggcctggataatacaaacagtagctggggcatgcacacgggag
aaactgggtccaactaaagtgtaaaacctgtgacgctatcataggcacagacagctattgcagcgagtgtagaccaggcggcggaagg
acccatcaatggagtatgtacaagcgagctaaagcggcaatacttgcgctaataagatatgcacccagtgcgtaaaagaattacttc
ttatataaaggagtagctataaatttgccgaatcacgggaaacatcatatgtgaagacgcgtagatgcagctggcggaacgg
acggagtgtgtaccacgtgcaaggctgtcaacggcttcttcaagcatccgcgccctgcagaaacaaaacagtcctgcattgcttg
taatgaaacggccggagtgtgtgacagtgacacacgtacaagggtagatccaactgcctgaagtgtgacccgcgcgctgctgca
attggagctagagcagataaaaatggcagtggtgactctttgcgatcagactaagtatctcaaggaaagcgcatgtgtcgagaag
caggggtgcggcgccaacatgttttgtaagccaagtgtacaggacgggaataaatgcattgcgtgcggggattcaaatgctggtat
agaggggttgcgtgagtgactgcgctgatgaaccaactatatacccaactgtacaaaatgcacggtaacaaactacctgaaa
accacaagcgaaggcagctgctgctgacaaaaggacaatgtaatggggcctacttctctaatgtagttagacggtaagaac
agtgcggttctgctgtggcgtgcaactaaataaaggcataacccagctgactgcattgcaatctactcagcagtcgctagaaaacagt
tctattataatgctctgctgcagaaagtgggaagaagcctaatgaagatggatctgctgctgctgacgcccaggggccctctcca
gaagaatgctgctgacgaaggatgtcagataatgttgcgatgacaaaaagacgtgtgataaagtgcacatcaaaacactatctcactc
caacaaaactctgcatactgattgcaagaagctcggaaactattattagctacggagcaaaacactgggagctgcaggggagt
cgctatggttaattgcaaaagagtgtactgagaacggtaagtgtggaaatgcaacgatggcttttacctcctgaatgaggaatgt
aagccatgtaatgtagtgcagacgtgcgaggggtggagtggaaatctgataaagtgcactagctgtaagtctggaagtgtctta
tttatgcaggcaacggaaatcacggcacatgtagtctggttgcataccacaaatcaagtgcagatcctgggtcttgcaagacatg
tgatttagctattgtagggacaaagtattgctcagtggtgtaagtggataaagaataccctcaaacggagcttctgctggcacc
sta-F
aaggcgcgtgcatcctcatgccaagtggaaaagttaataatgggtgatgtagtaagtgcgagacaggggttcttcttatagaatg
gggagtggtatgaaataaocaagtatcccggaacacagtttgacagtaagacagcggtgtaggtacatgtgagacaccgcgcac
cggttttagtctaagtagcaatacactcaaaagcttgctttgaaggttggctaaagtgtgctactggtagcattgttctgaatgc
atcagcgctatgtatcagggtagtcacccctaaatagttgcgaaaagtgtagtagctggttggtctacatgctacccctactgcacga
cttgacacatctgtcttctgctggatactatacaatctggacctaagtgcattgcctgtgataaagatgattctactatcaaaaggtat
tagtaattgcttgaaactgcgcgcctcctcatgtctggtagtggtctgtcctctgttatctcatgaaaggtgcgacaaacacggc
sta-R
gggagcacgaacaagagcggcctcagcacaggcgccatagcggggatctctgtcgtgcatcgttgttgggggggctcgtcg
gcttctctgtggtggttctgtgtgcggggcaaggcgtga

```

도면2

```

atgctcggcggtacagacactcaaaaaacgctgttgtgaatttttgaacaggatattaaaaagtaacggggagatg
tocaaggcccaaaaagtgaaagtagtaacaaaggttcaatttcttcagcttcgactggaaatataccctcgttcttactctg
vsp-F
gccaaagattacgcgccagatagacgatgatgtgcgcgaaggaagtcacatcgtgcctgcagacactgtcatgcccga
tcgggtcgttagtcagcaactccggaggaaagagccttgcttatgactctgtgtgctgcgaactacagggagtgttgag
actaacgacgagcaggccaattgcgccttcattttctcctgctgcaaggatagccaagggtgcaggggacccctcacatat
cccgaacggttcgggttcgatttctcgcgggaacacgctccctgtgagactatataacgcgatggatgctgcgttctgco
vsp-R
ataaagtactttctagttctgactctgaagaccaagactggcaattactctggagatacagagtttgcctgtctgaag
taccttcttaaacgcgtagagacactcccccacaggacggaaaataggagtggaggacactctgcaactggagctggaa
ctcaacaacacgttctctgacatttcaaggacatgctggttggcgcgcttcaacttctgcatgcggccaagaaagctg
gaagaaatggccattatcattagaaggagggagctcttcogtaagagcaagagctctacggagtgggttcgcctctgcc
tggaacgacatacactactacgatcatggaaggtgcgccaaactgcgaggaagtcataccgttcagaatatacatg
tcaaaacttgcaactatctccatcctttagtagacagatattgcaaaactagagtagtgcggtgctcctttcgtgatogag
tcgagagtaggagctacttcgggtcacacagagctcacgctctatagaggcttcccagacgggaaggaagcggagag
cagaatatcaacccgcagtggtatcaagctatgtcaacagcaggaggtgcccgcacagagacccaggtttcttttccct
ggagctgctgcccgtccacagccatgccctacggcgatcctaagctggttgcacatccatgatgcctcaggcgggt
gtgcctcagcagcaacctcagtagtgaagtgcataatggtggagatacggcgctgggtaggcgtacggcgctcccag
ccacacattccggcctgtctcgggtgcacagagctcacgctctggttgggccaaggcgcaacagtagccaacagtttggaac
cagcaggggtctcagatgcctcctcctattcagcccaagggcagctaggcgctgctaccatcccttcagtcacttcc
gttgaaagctacgcccagataggatcaacacaaagtggcctttaggcgcacctccccacaatcttcgatgtaaggt
gatgcttataagtcagagggctctgggtaggcaaaccccttatggcactcctagtttttagtcagaatccctatggcaat
ccctatggtgcctgcagctggtctgtacgggttcgtag

```

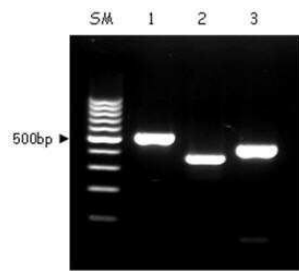
도면3

```

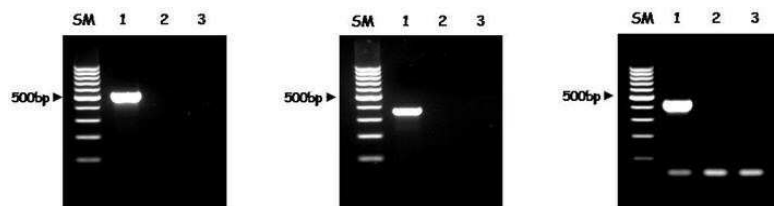
atgcacgagccaaggcagcgaacggcgagttcttttgaaggaggcatcatggaaggcgtccaacgggatg
aaagctccagctcatcatcgtcctctagctgtgagtgcggaagctggccatgatgaaaggagtgctgtag
c4-F
acagggccacaggccatactgctgcgaccgcgagcgcgcgaaaattctggaacacagggcccccgttctcc
cactttattaaagggcaggggacatcatggacccactgttcaaaagaagagcgctggaccggtcccaaac
cctgcccatttctgtcatccaaagatatgaatgagcttctgtcaccgttcatcacggaagcatgcccag
tgtgcacgtggagtggtgcagtttcatattgtatcagaaaataagcgcgtccataacaatctccaaatcc
ggcgccatcactgttagggcagatggaatcaagctctctagcgcctccctgaaggaaaattatcctgctg
ataaggtcgttgcgtcgtatgcaacaagattgtcgttatccgtattccttgcaacatagtcacacctga
c4-R
gccttctgttgatattcctattacgattcagaagtaa

```

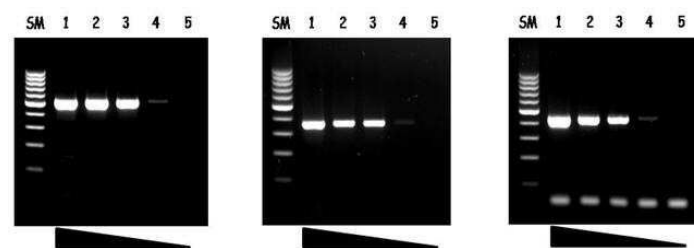

도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation Yonsei University

<120> Giardia lamblia Detection Devices

<160> 9

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 654

<212> DNA

<213> Giardia lamblia

<400> 1

ggagcttggtg ctggcatcaa ggcgctgca tcctcatgcc aagatggaaa tgttaataat 60

ggtgtatgta gtaagtgcga gacaggggttc ttccttatga atgggggatg ttatgaaata 120

accaagtatc ccgggaaaac agtttgcagt aagacagcgg ctgatggtac atgtgagaca 180

cccgcgaccg gctttagtct aagtagcaat acactcaaag cttgctttga aggtttgtgt 240

aagtgtgcta ctggtgacga ttgttctgaa tgcattcagcg gctatgtatc aggtagtacc 300
 cctaatagtt gcgaaaagtg tagtactggt tgtgtacat gctaccctac tgccacgact 360
 tgcacatctt gtcttgctgg atactatcaa tctggaccta agtgcatcgc ctgtgataaa 420
 gatgattcta ctatcaaagg tattagtaat tgcctgaact gcgcccctcc atcgtctggt 480
 agtggctctg tcctctgtta tctcatgaaa ggtgccgaca acaacggcgg gaggacgaac 540
 aagagcggcc tcagcacagg cgccatagcg gggatctctg tcgtgtcat cgttgttgtg 600
 gggggcctcg tcggcttcct ctgctggtgg ttcgtgtgcc ggggcaaggc gtga 654

<210> 2

<211> 1596

<212> DNA

<213> Giardia lamblia

<400> 2

atgctcggcg gtacagacac tcaaaaaaac gctgttgtga attttttgaa caggatatta 60
 aaaagtaacg gggagatgtc caaggcccaa aaggtgaaga gtaacaaggt tcattttctc 120
 agcttcgact ggaatatacc ctggttcctt actctggcca agattacgcg ccagatagac 180
 gatgatgtgc gcaaggaagt catcatcgtg cctgcagaca ctgtcattgc cggatcggtc 240
 gtagtcagca actccggagg aaagagcctt gcttatgact ctgttgtcgt cgaactacag 300
 ggagtgtgtg agactaacga cgagcaggcc attcgccttc catttttctc cgttgcaagg 360

atagccaagg gtgcaggac cctcacatat cccgaaacgt tcgggttcga ttctctcggg 420
 aacacgctcc cctgtgagac tattaacgcg atggatgctg cgttctgcat aaagtacttt 480
 ctagtctgca ctctgaagac caagactggc aattactctg gagatacaga gtttgcttgt 540
 ctgaagtacc ttctaaacc gctagagacc atccccatca ggacggaaat aggagtggag 600
 gacactctgc aactggagct ggaactcaac aacacgttcc ttgacatttc aaggacatg 660
 ctggttgggc gcgttcactt tgtgcatgcg gccaaagaagc tggaagaaat ggccattatc 720
 attagaagga gggagctctt ccgtaagagc aagagctcta cggagtgtgt cgcctctgcc 780

tggcagcaca tacactacta cgatatcatg gaaggtgccc caactcgcga ggaagtcata 840
 ccgttcagaa tatacatgtc aaacttgcaa ctatctccat ccttttagtac agatattgca 900
 aaactagagt atgcggtcgt cctttcgtcg atcgattcgg agagtaggag ctacttcggg 960
 tcacacgagc tcacgtctta tagaggcttc ccagacggga aggaagccgg agagcagaat 1020
 atcaaccgcg cagtggatca agctatgtca acagcaggag gtgcccgcta cgagaccag 1080
 gtttctttcc ctggagctgc tgccccgtcc acagccatgc cctacggcga tcctacagct 1140

ggcttgtcat ccatgatgcc tcaggcgggt gtgcctcagc agcaacctca gtatggaagt 1200

gcataatggtg gaggatacgg cgctgggatg gcgtacggcg ctcccagcc acaccattcc 1260

gggcctgtct ctggggtgc catgcctgtt gggccagggc cgcaacagta ccaacagttt 1320

ggaaaccagc aggggtctca gatgcctcct cctattcagc cccaaggga gctaggcgct 1380

gctaccatcc cttcagtcac ttccgttgaa gctacgccc agataggatc aacaccaagt 1440

ggcccttatg gcgcacctcc cccacaatct tcgatgtacg gtgatgctta taagtcagag 1500

ggctctggga tggcaaacc ttatggcact cctagtitta gtcagaatcc ctatggcaat 1560

ccctatggtg cctcgactgg tctgtacggt tcgtag 1596

<210> 3

<211> 597

<212> DNA

<213> Giardia lamblia

<400> 3

atgcacgagc caaggcacgc caacggcgag ttctttggaa ggaggcatca tggaggcggt 60

ccaccggatg aaagctccag ctcatcatcg tcctctagct gtgagtgcga agctggccat 120

gatgaaaggg agtgctgtag acagggccca ggcccatact gctgcgaccg cgagcgccgc 180

aaattctgga aacacgggcc cccgttctcc cactttatta agggcagggg acatcatgga 240

ccccactgtt caaaagaaga gcgctggacc ggtcccaaac cctgcccatt tctgtcatcc 300

aaagatatga atgagcttcc tgtcacggtt catcacggaa gcatgccgat tgtcgcacgt 360

ggagtgggtca cgtttcatat tgtatcagaa ataaagccgt ccataacaat ctccaatacc 420

ggcgccatca ctgtagaggc agatggaatc aagcttctta gcgcctccct gaaggaaaat 480

tatctgtctg ataaggtcgt tgcgtcgtat gcaaacaaga ttgtcgttat ccgtattcct 540

tgcaacatag tcacacctga gccttctgtt gatattccta ttacattca gaagtaa 597

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sta Forward primer

<400> 4

tagctattga tgggacaaag 20

<210> 5

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> sta reverse primer
 <400> 5
 gcgcagttca agcaattact 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> vsp forward primer
 <400> 6
 ggtgaagagt aacaaggttc 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> vsp reverse primer
 <400>
 7
 cagcatccat cgcgtaata 20
 <210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c4 forward primer
 <400> 8
 agctcatcat cgtcctcta 19
 <210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c4 reverse primer
 <400> 9
 caatcttggt tgcatacga 19