



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년09월06일  
(11) 등록번호 10-2018201  
(24) 등록일자 2019년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/70 (2006.01) C12Q 1/6851 (2018.01)  
(52) CPC특허분류  
C12Q 1/701 (2013.01)  
C12Q 1/6851 (2018.05)  
(21) 출원번호 10-2019-0051099  
(22) 출원일자 2019년05월01일  
심사청구일자 2019년05월01일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR101916899 B1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
대한민국  
(72) 발명자  
김용관  
세종특별자치시 다정북로 110, 222-1502  
정원화  
경기도 고양시 일산서구 대화2로 121, 607동 140  
4호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
이동기

전체 청구항 수 : 총 9 항

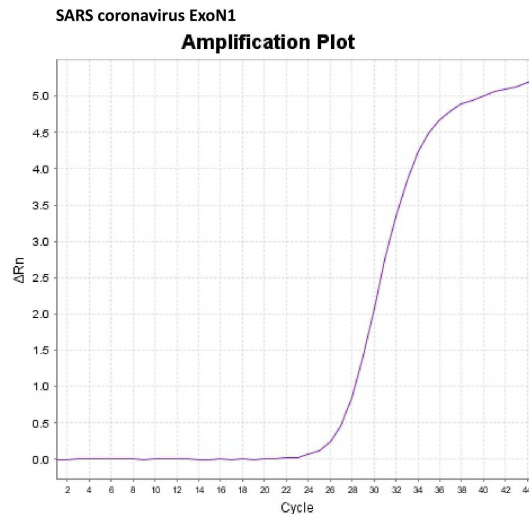
심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 리얼타임 P C R 을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트 및 방법

(57) 요약

본 발명은 사람에게 감염되는 것으로 알려진 박쥐 유래 코로나바이러스 뿐만아니라 조류 등 다른 종으로부터 사람에게 감염될 가능성이 있는 총 27종의 박쥐 유래 코로나바이러스를 리얼타임 PCR로 검출가능하게 하는 특유한 12종의 프라이머들의 조합(7종의 정방향 프라이머들과 5종의 역방향 프라이머들의 조합)과, 특유한 5종의 프로브들의 조합을 제공한다. 본 발명에 따르면, 최소한의 프라이머들을 사용한 리얼타임 PCR을 이용하여 다양한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사를 수행할 수 있어 검사 비용이 저렴하고, 사람에게 감염되는 것으로 알려진 박쥐 유래 코로나바이러스 뿐만아니라 사람에게 감염되는 것으로 알려져 있지 않지만 잠재적 감염 위험성을 갖는 박쥐 유래 코로나바이러스를 신속하고 정확하게 검사하여 박쥐 유래 코로나바이러스 감염 확산의 조기 차단에 기여할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Q 2545/101 (2013.01)

C12Q 2561/113 (2019.08)

C12Q 2563/107 (2013.01)

(72) 발명자

**정혜성**

인천시 서구 환경로 42 국립환경과학원

**손기동**

서울시 금천구 시흥대로 2길 52-3, 202호

**김지수**

인천시 서구 환경로 42 국립환경과학원

**김원명**

경기도 안양시 만안구 연현로79번길 20, 103동  
1301호

**우찬진**

인천시 서구 환경로 42 국립환경과학원

**왕승준**

인천시 서구 환경로 42 국립환경과학원

**박정은**

인천시 서구 환경로 42 국립환경과학원

**홍윤지**

인천시 서구 환경로 42 국립환경과학원

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 사스-유사 코로나바이러스 RsSHC014, 박쥐 코로나바이러스 273/2005, 박쥐 코로나바이러스 JTMC15, 박쥐 사스 코로나바이러스 Rf1/2004, 박쥐 코로나바이러스 Rp/Shaanxi2011, 박쥐 사스 코로나바이러스 Rp3/2004, 박쥐 사스 코로나바이러스 HKU3-1, 박쥐 사스 유사 코로나바이러스 Jiyuan-331, 사스 코로나바이러스 ExoN1, 사스 코로나바이러스 MA15, 사스 코로나바이러스 Sino1-11, 사스 관련 코로나바이러스 Tor2/FP1-10895 및 사스 코로나바이러스 Urbani를 검출하기 위한 프라이머 및 프로브의 조합으로서, 서열번호 1의 정방향 프라이머 및 서열번호 2의 역방향 프라이머 쌍과, 서열번호 3의 프로브와의 제1조합과,

박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 A613/2005, 박쥐 코로나바이러스 A620/2005, 박쥐 코로나바이러스 A701/2005, 박쥐 코로나바이러스 A897/2005 및 박쥐 코로나바이러스 HKU6-1을 검출하기 위한 프라이머 및 프로브의 조합으로서, 서열번호 4의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머 쌍과, 서열번호 7의 프로브와의 제2조합과,

박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 A632/2005 및 박쥐 코로나바이러스 A633/2005를 검출하기 위한 프라이머 및 프로브의 조합으로서, 서열번호 5의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머 쌍과, 서열번호 7의 프로브와의 제3조합과,

박쥐 유래 코로나바이러스 중 베타코로나바이러스 SC2013 및 박쥐 코로나바이러스 16B0133을 검출하기 위한 프라이머 및 프로브의 조합으로서, 서열번호 8의 정방향 프라이머 및 서열번호 9의 역방향 프라이머 쌍과, 서열번호 10의 프로브와의 제4조합과,

박쥐 유래 코로나바이러스 중 HCoV-EMC를 검출하기 위한 프라이머 및 프로브의 조합으로서, 서열번호 11의 정방향 프라이머 및 서열번호 12의 역방향 프라이머 쌍과, 서열번호 13의 프로브와의 제5조합과,

박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 B15-40, 박쥐 코로나바이러스 B15-41 및 박쥐 코로나바이러스 1A AFCD62를 검출하기 위한 프라이머 및 프로브의 조합으로서, 서열번호 14의 정방향 프라이머 및 서열번호 16의 역방향 프라이머 쌍과, 서열번호 17의 프로브와의 제6조합과,

박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 1B AFCD307을 검출하기 위한 프라이머 및 프로브의 조합으로서, 서열번호 15의 정방향 프라이머 및 서열번호 16의 역방향 프라이머 쌍과, 서열번호 17의 프로브와의 제7조합을 포함하고,

상기 27개의 박쥐 유래 코로나바이러스 각각의 유무를 동시에 모두 검사하는, 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

중합효소, dNTPs, PCR 완충용액 및 PCR 증폭산물의 표지물질질을 더 포함하는, 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 표지물질은,

서열번호 3의 프로브의 한쪽 말단과,

서열번호 7의 프로브의 한쪽 말단과,

서열번호 10의 프로브의 한쪽 말단과,

서열번호 13의 프로브의 한쪽 말단과,

서열번호 17의 프로브의 한쪽 말단에 표지되는 것을 특징으로 하는, 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트.

#### 청구항 4

제3항에 있어서,

상기 표지물질은 형광물질이고, 상기 표지물질로부터의 형광의 세기를 측정하여 박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 유전자의 증폭량을 산출하는 것을 특징으로 하는, 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트.

#### 청구항 5

유전자 샘플을 준비하는 단계와,

청구항 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재된 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트를 이용하여, 상기 유전자 샘플을 리얼타임(real-time) PCR로 증폭하는 단계와,

리얼타임 PCR 결과에 기초하여 박쥐 유래 코로나바이러스를 검출하는 단계를 포함하는, 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 방법.

#### 청구항 6

제5항에 있어서,

증폭 전, 박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 유전자의 카피수를 알고 있는 양성 표준자를, 상기 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트와 박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 유전자와 관련하여 유전자 증폭량을 나타내는 표지물질을 이용하여 리얼타임(real-time) PCR로 증폭하는 단계와,

상기 양성 표준자의 전체 PCR 증폭 기간에 대한 상기 표지물질의 형광세기의 변화를 측정하고, 일정한 형광세기에 도달하는 PCR 반응회수(Cp값 또는 Ct값)를 분석하는 단계와,

상기 표지물질의 형광세기의 변화를 측정하여 얻어진 표준곡선으로부터 상기 양성 표준자의 카피수와, Cp값 또는 Ct값을 대응시키는 단계와,

상기 유전자 샘플 내에 존재하는 박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 유전자의 전체 PCR 증폭 기간에 대한 상기 표지물질의 형광세기의 변화를 측정하고, 일정한 형광세기에 도달하는 PCR 반응회수(Cp값 또는 Ct값)를 분석하는 단계와,

상기 유전자 샘플 내에 존재하는 박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 유전자를 PCR 증폭하여 얻은 Cp값 또는 Ct값을 상기 양성 표준자의 카피수에 대응시켜, 상기 유전자 샘플 내의 박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 유전자를 정량적으로 측정하는 단계를 더 포함하는, 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서,

상기 표지물질은,

서열번호 3의 프로브의 한쪽 말단과,

서열번호 7의 프로브의 한쪽 말단과,

서열번호 10의 프로브의 한쪽 말단과,

서열번호 13의 프로브의 한쪽 말단과,

서열번호 17의 프로브의 한쪽 말단에 표지되는 것을 특징으로 하는, 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 방법.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

상기 표지물질은 형광물질이고, 상기 표지물질로부터의 형광의 세기를 측정하여 박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 유전자의 증폭량을 산출하는 것을 특징으로 하는, 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 방법.

## 청구항 9

리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 방법에서 사용되는 리얼타임 PCR용 프라이머 세트로서,

박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 사스-유사 코로나바이러스 RsSHC014, 박쥐 코로나바이러스 273/2005, 박쥐 코로나바이러스 JTM15, 박쥐 사스 코로나바이러스 Rf1/2004, 박쥐 코로나바이러스 Rp/Shaanxi2011, 박쥐 사스 코로나바이러스 Rp3/2004, 박쥐 사스 코로나바이러스 HKU3-1, 박쥐 사스 유사 코로나바이러스 Jiyuan-331, 사스 코로나바이러스 ExoN1, 사스 코로나바이러스 MA15, 사스 코로나바이러스 Sino1-11, 사스 관련 코로나바이러스 Tor2/FP1-10895 및 사스 코로나바이러스 Urbani를 검출하는데 사용되는 서열번호 1의 정방향 프라이머 및 서열번호 2의 역방향 프라이머의 쌍과,

박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 A613/2005, 박쥐 코로나바이러스 A620/2005, 박쥐 코로나바이러스 A701/2005, 박쥐 코로나바이러스 A897/2005 및 박쥐 코로나바이러스 HKU6-1을 검출하는데 사용되는 서열번호 4의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머의 쌍과,

박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 A632/2005 및 박쥐 코로나바이러스 A633/2005를 검출하는데 사용되는 서열번호 5의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머의 쌍과,

박쥐 유래 코로나바이러스 중 베타코로나바이러스 SC2013 및 박쥐 코로나바이러스 16B0133을 검출하는데 사용되는 서열번호 8의 정방향 프라이머 및 서열번호 9의 역방향 프라이머의 쌍과,

박쥐 유래 코로나바이러스 중 HCoV-EMC를 검출하는데 사용되는 서열번호 11의 정방향 프라이머 및 서열번호 12의 역방향 프라이머의 쌍과,

박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 B15-40, 박쥐 코로나바이러스 B15-41 및 박쥐 코로나바이러스 1A AFCD62를 검출하는데 사용되는 서열번호 14의 정방향 프라이머 및 서열번호 16의 역방향 프라이머의 쌍과,

박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 1B AFCD307을 검출하는데 사용되는 서열번호 15의 정방향 프라이머 및 서열번호 16의 역방향 프라이머의 쌍을 포함하고,

상기 27개의 박쥐 유래 코로나바이러스 각각의 유무를 동시에 모두 검사하는데 사용되는, 리얼타임 PCR용 프라이머 세트.

## 발명의 설명

### 기술 분야

- [0001] 본 발명은 리얼타임 PCR (실시간 중합효소 연쇄반응)을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트 및 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 최소한의 프라이머들을 사용한 리얼타임 PCR을 이용하여 사람에게 감염되는 것으로 알려진 박쥐 유래 코로나바이러스(사스 코로나바이러스 및 메르스 코로나바이러스) 뿐만아니라 조류 등 다른 종으로부터 사람에게 감염될 가능성이 있는 다양한 박쥐 유래 코로나바이러스를 검사할 수 있는 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트 및 방법에 관한 것이다.
- [0002] 구체적으로, 본 발명은 특유한 12종의 프라이머들의 조합을 사용한 리얼타임 PCR을 이용하여 검체로부터 27종의 박쥐 유래 코로나바이러스를 신속하면서도 정확하게 그리고 정량화된 데이터에 기초하여 특이도 및 민감도 높게 검출할 수 있는 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트 및 방법에 관한 것이다.
- [0003] 또한, 본 발명은 최소한의 프라이머들을 사용한 리얼타임 PCR을 이용하여 검사 비용이 저렴할 뿐만아니라 증폭 오류 없이 신속하게 다양한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사를 수행할 수 있는 기술을 제공함으로써, 사람에게 감염되는 것으로 알려진 박쥐 유래 코로나바이러스(사스 코로나바이러스 및 메르스 코로나바이러스) 뿐만아니라 사람에게 감염되는 것으로 알려져 있지 않지만 잠재적 감염 위험성을 갖는 박쥐 유래 코로나바이러스를 신속하고 정확하게 검사하여 박쥐 유래 코로나바이러스 감염 확산의 조기 차단에 기여할 수 있는 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트 및 방법에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0004] 코로나바이러스는 단일가닥 양성 RNA를 게놈으로 가지고 있는 외피가 있는 바이러스로 1937년 처음 발견된 이후 사람을 포함하여 다양한 동물에게서 분리되었다. 코로나바이러스는 4개의 그룹으로 나눌 수 있다. 이중 알파-코로나바이러스(Alpha-coronavirus)와 베타-코로나바이러스(Beta-coronavirus)는 주로 포유류에 감염되고, 감마-코로나바이러스(Gamma-coronavirus)와 델타-코로나바이러스(Delta-coronavirus)는 조류에 감염되지만 최근 돼지에서 델타-코로나바이러스(Delta-coronavirus)의 감염이 확인된 사례가 있다.
- [0005] 코로나바이러스는 이중 간 감염이 이루어질 수 있다. 대표적인 사례로서 2003년에 전세계적으로 유행한 중증급성호흡기증후군을 일으키는 사스(SARS) 코로나바이러스와 2015년에 국내에 전파되어 확산된 메르스(MERS) 코로나바이러스를 들 수 있으며, 이들 바이러스 모두 박쥐에서 유래된 것으로 알려져 있다.
- [0006] 박쥐는 포유동물 중 비행능력이 있어 광범위한 지역에 서식할 수 있으며, 동굴 등 협소한 공간에서 다수의 개체가 집단으로 생활하는 특성으로 인하여 한 개체가 바이러스에 감염될 경우 집단으로 감염이 전달되고 비행을 통한 광범위한 지역으로의 이동을 통하여 다른 동물에 감염을 확산시킬 수 있다. 또한 박쥐는 다른 포유류와 달리 체온이 높아 바이러스에 대한 저항력이 있어 코로나바이러스 숙주인 박쥐는 영향을 받지 않고 지속적인 감염을 전파할 수 있다.
- [0007] 상기 기술한 바와 같이 코로나바이러스는 이중 간의 전파가 가능하고 박쥐에서 유래한 신종 코로나바이러스는 사람에게 전파하여 큰 문제를 발생시킬 수 있음이 확인되어 신종 박쥐 유래 코로나바이러스를 검출하기 위한 효과적인 진단법의 개발이 시급하다.
- [0008] 즉, 사스나 메르스 바이러스 대유행으로 큰 혼란을 겪은 바와 같이 사람에게 감염되지 않는 것으로 알려진 박쥐 유래 코로나바이러스의 경우에도 사람에게 감염될 가능성을 배제할 수 없게 되었고, 만약 사람에게 감염되지 않는 것으로 알려진 박쥐 유래 코로나바이러스가 사람에게 감염되어 전파될 경우 감염 확산의 조기 차단이 어려워져 국민 건강의 위협과 그 사회적 파장 및 혼란은 매우 크다고 할 수 있다. 따라서, 사전 예방적인 방역망 구축을 위해 사람에게 감염을 일으킬 수 있는 잠재적 위험성을 갖고 있는 다양한 박쥐 유래 코로나바이러스를 신속하면서 정확하게 그리고 값싸고 편리하게 검사할 수 있는 기술의 개발이 필요하다.
- [0009] 이와 관련하여 대한민국 등록특허공보 제10-0625325호 및 제10-0994568호에서는 사스 코로나바이러스를 PCR로 검출할 수 있는 프라이머와 프로브를 개시하고 있으나, 사스가 대유행한 후 사스 코로나바이러스만을 검출할 수 있도록 개발된 기술이어서 사람에 대한 잠재적 감염 위험성을 갖고 있는 다른 박쥐 유래 코로나바이러스의 검출은 불가능한 한계가 있다. 또한, 대한민국 등록특허공보 제10-1857684호 및 제10-1886274호는 메르스 코로나바이러스를 PCR로 검출할 수 있는 프라이머와 프로브를 개시하고 있으나, 이 역시 메르스가 대유행한 후 메르스 코로나바이러스만을 검출할 수 있도록 개발된 기술이어서 사람에 대한 잠재적 감염 위험성을 갖고 있는 다른 박쥐 유래 코로나바이러스의 검출은 불가능한 한계가 있다.
- [0010] 한편, 대한민국 등록특허공보 제10-1916899호는 사스와 메르스의 증상이 유사한 점을 감안하여 사스 코로나바이러스와 메르스 코로나바이러스를 PCR로 검출할 수 있는 프라이머와 프로브를 개시하고 있지만, 검체 내에 기존에 알려진 사스 코로나바이러스나 메르스 코로나바이러스 외에 사람에 대한 잠재적 감염 위험성을 갖고 있는 다양한 박쥐 유래 코로나바이러스가 존재하는지 여부에 대해서는 전수 검사를 할 수 없는 한계가 있다.
- [0011] 사스나 메르스와 유사한 감염 의심 증상이 나타난 경우, 검체 내에 기존에 알려진 사스 코로나바이러스나 메르스 코로나바이러스 외에 사람에 대한 잠재적 감염 위험성을 갖고 있는 다양한 박쥐 유래 코로나바이러스가 존재하는지 여부에 대해서도 전수 검사를 하는 것이 바람직하다. 이를 위해 다양한 박쥐 유래 코로나바이러스의 검체 내 존재 유무를 신속하면서도 정확하게 확인하는 기술의 개발이 요구되는데, 특이도와 민감도가 높게 현재까지 알려진 거의 모든 박쥐 유래 코로나바이러스를 검출하는 방법이 개발되면 이상적이라고 할 수 있다.
- [0012] 그러나, 전술한 바와 같은 종래기술들에 기초하여 예를 들어 27종의 박쥐 유래 코로나바이러스를 모두 검출하기 위해서는 이론적으로 54종의 프라이머들(정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 합계)이 필요하게 된다. 즉, 종래 기술들에 따라 27종의 박쥐 유래 코로나바이러스를 멀티플렉스 RT-PCR로 검사하기 위해서는 많은 종류의 프라이머를 이용하여 검체 내의 박쥐 유래 코로나바이러스 주형을 증폭해야 하는 문제가 있다. 프라이머의 종류 및 양이 증가함에 따라 검사 비용이 증가할 뿐만 아니라 프라이머들의 이량체의 생성 확률이 높아진다. 프라이머들의 이량체가 생성되면 박쥐 유래 코로나바이러스의 주형 만이 증폭되는 것이 아니라 프라이머들의 이량체들이 증폭되어 PCR 결과 판독에 악영향을 주게 되고, 박쥐 유래 코로나바이러스가 없는 경우에도 오류 증폭에 의해 위양

성으로 판정하게 될 가능성이 높은 문제가 있다.

[0013] 본 발명자들은 인간에게 감염되어 질병을 일으키는 것으로 알려진 박쥐 유래 코로나바이러스 뿐만아니라 사람에게 대한 감염의 위험성이 잠재되어 있는 거의 모든 박쥐 유래 코로나바이러스를 신속하면서도 정확하게 그리고 특이도와 민감도가 높게 검출하는 기술의 개발에 대해 예의 연구를 거듭한 결과, 박쥐 유래 코로나바이러스 RdRp 유전자(RNA-dependent RNA polymerase gene)를 표적유전자로 선정하여 총 27종의 박쥐 유래 코로나바이러스를 모두 검출할 수 있는 리얼타임 PCR 기술을 개발하였다.

[0014] 한편, 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 본 발명의 "선행 기술"로서 이용될 수 있다는 승인으로서 인용한 것은 아님을 이해하여야 한다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0015] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-0625325호 (2006.09.20)  
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허공보 제10-0994568호 (2010.11.15)  
(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허공보 제10-1857684호 (2018.05.14)  
(특허문헌 0004) 대한민국 등록특허공보 제10-1886274호 (2018.08.08)  
(특허문헌 0005) 대한민국 등록특허공보 제10-1916899호 (2018.11.08)

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0016] 본 발명은 최소한의 프라이머들을 사용한 리얼타임 PCR을 이용하여 사람에게 감염되는 것으로 알려진 박쥐 유래 코로나바이러스(사스 코로나바이러스 및 메르스 코로나바이러스) 뿐만아니라 조류 등 다른 종으로부터 사람에게 감염될 가능성이 있는 다양한 박쥐 유래 코로나바이러스를 검사할 수 있는 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트 및 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0017] 구체적으로, 본 발명은 특유한 12종의 프라이머들의 조합을 사용한 리얼타임 PCR을 이용하여 검체로부터 27종의 박쥐 유래 코로나바이러스를 신속하면서도 정확하게 그리고 정량화된 데이터에 기초하여 특이도 및 민감도 높게 검출할 수 있는 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트 및 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 최소한의 프라이머들을 사용한 리얼타임 PCR을 이용하여 검사 비용이 저렴할 뿐만아니라 증폭 오류 없이 신속하게 다양한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사를 수행할 수 있는 기술을 제공함으로써, 사람에게 감염되는 것으로 알려진 박쥐 유래 코로나바이러스(사스 코로나바이러스 및 메르스 코로나바이러스) 뿐만아니라 사람에게 감염되는 것으로 알려져 있지 않지만 잠재적 감염 위험성을 갖는 박쥐 유래 코로나바이러스를 신속하고 정확하게 검사하여 박쥐 유래 코로나바이러스 감염 확산의 조기 차단에 기여할 수 있는 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트 및 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0019] 그러나, 전술한 바와 같은 본 발명의 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

### 과제의 해결 수단

[0020] 본 발명자들은 상기한 발명의 기술적 과제를 해결하고 상기한 발명의 목적에 부합되도록 예의 연구를 거듭한 결과, 27종의 박쥐 유래 코로나바이러스를 리얼타임 PCR로 모두 검출할 수 있는 특유한 12종의 프라이머들의 조합(7종의 정방향 프라이머들과 5종의 역방향 프라이머들의 조합)과, 특유한 5종의 프로브들의 조합을 안출하였고, 이를 바탕으로 특이도 및 민감도 높게 박쥐 유래 코로나바이러스 검사가 가능한 리얼타임 PCR 기술을 고안하기에 이르렀다.

[0021] 본 명세서에서 사용되는 용어인 "검체"란 감염 의심 환자의 혈액, 객담, 타액, 콧물, 눈물 외에도 박쥐 유래 코



로나바이러스의 유전자 검출이 가능한 각종 시료, 예를 들어 박쥐나 다른 숙주동물의 조직, 세포, 혈액, 타액 등도 포함하는 개념으로 사용된다.

- [0022] 본 명세서에서 사용되는 용어인 "유전자 샘플"이란 RNA, DNA, 역전사 효소에 의해 RNA로부터 생성된 cDNA, pre-PCR (예비 PCR)을 통해 증폭된 DNA 또는 cDNA 등을 포함하는 광의의 개념으로 사용된다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 "합성 유전자 서열"은 지금까지 알려진 박쥐 유래 코로나바이러스의 RNA 유전자 서열 뿐만아니라 RNA 유전자로부터 생성된 cDNA 서열로 구성될 수 있다.
- [0023] 본 명세서에서 사용되는 "리얼타임(real-time) PCR"이란 형광물질(fluorescent material)을 PCR 기법에 응용한 것으로 반응 중 검체 내에 존재하는 표적 유전자의 증폭과 함께 형광물질의 발광(emission) 정도를 실시간으로 검출하고 정량 분석하여 표적 유전자의 증폭 유무 및 그 양상을 신속하고 정확하게 분석할 수 있는 방법이다. 이러한 리얼타임(real-time) PCR은 SYBR 그린(SYBR Green)을 사용하는 방법과 이중 표지된 프로브를 이용하는 방법으로 나누어진다.
- [0024] SYBR 그린(SYBR green) 기법은 리얼타임 PCR 증폭 과정에서 증폭된 DNA에 SYBR 그린 염색약이 끼어들어가 PCR 반응으로 합성된 이중가닥 DNA에 결합하여 형광신호를 발생하게 되고 이러한 형광신호를 검출하여 표적 유전자의 존재 여부와 이로부터의 증폭산물의 생성량을 측정할 수 있는 방법이다. 또한, 이중 표지된 프로브(dual labeled probe)를 이용한 리얼타임 PCR 기법은 5'말단에 형광물질이 표지되어 있고 3'말단에 소광물질(Quencher)이 표지된 이중 표지된 프로브를 이용하는 방법으로서, 이중 표지된 프로브에 의한 형광신호를 통해 이중 표지된 프로브가 표적 유전자의 PCR 증폭 산물과 어닐링되었는지 여부를 확인할 수 있고, 표적 유전자의 존재 여부와 이로부터의 증폭산물의 생성량을 측정할 수 있는 방법이다. 본 발명에서는 상기 방법 이외에 TaqMan 프로브법 등 당업계에 알려진 리얼타임 PCR이 적용가능함은 물론이다.
- [0025] 본 발명은 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 방법에서 사용되는 리얼타임 PCR용 프라이머 세트를 제공한다.
- [0026] 본 발명의 리얼타임 PCR용 프라이머 세트는,
- [0027] 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 사스-유사 코로나바이러스 RsSHC014, 박쥐 코로나바이러스 273/2005, 박쥐 코로나바이러스 JTM15, 박쥐 사스 코로나바이러스 Rf1/2004, 박쥐 코로나바이러스 Rp/Shaanxi2011, 박쥐 사스 코로나바이러스 Rp3/2004, 박쥐 사스 코로나바이러스 HKU3-1, 박쥐 사스 유사 코로나바이러스 Jiyuan-331, 사스 코로나바이러스 ExoN1, 사스 코로나바이러스 MA15, 사스 코로나바이러스 Sino1-11, 사스 관련 코로나바이러스 Tor2/FP1-10895 및 사스 코로나바이러스 Urbani를 검출하는데 사용되는 서열번호 1의 정방향 프라이머 및 서열번호 2의 역방향 프라이머의 쌍과,
- [0028] 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 A613/2005, 박쥐 코로나바이러스 A620/2005, 박쥐 코로나바이러스 A701/2005, 박쥐 코로나바이러스 A897/2005 및 박쥐 코로나바이러스 HKU6-1을 검출하는데 사용되는 서열번호 4의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머의 쌍과,
- [0029] 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 A632/2005 및 박쥐 코로나바이러스 A633/2005를 검출하는데 사용되는 서열번호 5의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머의 쌍과,
- [0030] 박쥐 유래 코로나바이러스 중 베타코로나바이러스 SC2013 및 박쥐 코로나바이러스 16B0133을 검출하는데 사용되는 서열번호 8의 정방향 프라이머 및 서열번호 9의 역방향 프라이머의 쌍과,
- [0031] 박쥐 유래 코로나바이러스 중 HCoV-EMC를 검출하는데 사용되는 서열번호 11의 정방향 프라이머 및 서열번호 12의 역방향 프라이머의 쌍과,
- [0032] 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 B15-40, 박쥐 코로나바이러스 B15-41 및 박쥐 코로나바이러스 1A AFCD62를 검출하는데 사용되는 서열번호 14의 정방향 프라이머 및 서열번호 16의 역방향 프라이머의 쌍과,
- [0033] 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 1B AFCD307을 검출하는데 사용되는 서열번호 15의 정방향 프라이머 및 서열번호 16의 역방향 프라이머의 쌍을 포함한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트를 제공한다.
- [0035] 본 발명의 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트는,



- [0036] 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 사스-유사 코로나바이러스 RsSHC014, 박쥐 코로나바이러스 273/2005, 박쥐 코로나바이러스 JTM15, 박쥐 사스 코로나바이러스 Rf1/2004, 박쥐 코로나바이러스 Rp/Shaanxi2011, 박쥐 사스 코로나바이러스 Rp3/2004, 박쥐 사스 코로나바이러스 HKU3-1, 박쥐 사스 유사 코로나바이러스 Jiyuan-331, 사스 코로나바이러스 ExoN1, 사스 코로나바이러스 MA15, 사스 코로나바이러스 Sino1-11, 사스 관련 코로나바이러스 Tor2/FP1-10895 및 사스 코로나바이러스 Urbani를 검출하기 위한 프라이머 및 프로브의 조합으로서, 서열번호 1의 정방향 프라이머 및 서열번호 2의 역방향 프라이머 쌍과, 서열번호 3의 프로브와의 제1조합과,
- [0037] 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 A613/2005, 박쥐 코로나바이러스 A620/2005, 박쥐 코로나바이러스 A701/2005, 박쥐 코로나바이러스 A897/2005 및 박쥐 코로나바이러스 HKU6-1을 검출하기 위한 프라이머 및 프로브의 조합으로서, 서열번호 4의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머 쌍과, 서열번호 7의 프로브와의 제2조합과,
- [0038] 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 A632/2005 및 박쥐 코로나바이러스 A633/2005를 검출하기 위한 프라이머 및 프로브의 조합으로서, 서열번호 5의 정방향 프라이머 및 서열번호 6의 역방향 프라이머 쌍과, 서열번호 7의 프로브와의 제3조합과,
- [0039] 박쥐 유래 코로나바이러스 중 베타코로나바이러스 SC2013 및 박쥐 코로나바이러스 16B0133을 검출하기 위한 프라이머 및 프로브의 조합으로서, 서열번호 8의 정방향 프라이머 및 서열번호 9의 역방향 프라이머 쌍과, 서열번호 10의 프로브와의 제4조합과,
- [0040] 박쥐 유래 코로나바이러스 중 HCoV-EMC를 검출하기 위한 프라이머 및 프로브의 조합으로서, 서열번호 11의 정방향 프라이머 및 서열번호 12의 역방향 프라이머 쌍과, 서열번호 13의 프로브와의 제5조합과,
- [0041] 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 B15-40, 박쥐 코로나바이러스 B15-41 및 박쥐 코로나바이러스 1A AFCD62를 검출하기 위한 프라이머 및 프로브의 조합으로서, 서열번호 14의 정방향 프라이머 및 서열번호 16의 역방향 프라이머 쌍과, 서열번호 17의 프로브와의 제6조합과,
- [0042] 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 1B AFCD307을 검출하기 위한 프라이머 및 프로브의 조합으로서, 서열번호 15의 정방향 프라이머 및 서열번호 16의 역방향 프라이머 쌍과, 서열번호 17의 프로브와의 제7조합을 포함한다.
- [0043] 본 발명의 일구체예의 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트는, 증합효소, dNTPs, PCR 완충용액 및 PCR 증폭산물의 표지물질들을 더 포함한다.
- [0044] 본 발명의 일실시예의 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트에 있어서, 상기 표지물질은 서열번호 3의 프로브의 한쪽 말단과, 서열번호 7의 프로브의 한쪽 말단과, 서열번호 10의 프로브의 한쪽 말단과, 서열번호 13의 프로브의 한쪽 말단과, 서열번호 17의 프로브의 한쪽 말단, 예를 들어 5'말단에 표지될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일실시예의 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트에 있어서, 상기 표지물질은 형광물질이고, 상기 표지물질로부터의 형광의 세기를 측정하여 박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 유전자의 증폭량을 산출할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일실시예의 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 방법은, 검체로부터 유전자 샘플을 준비하는 단계와, 전술한 바와 같은 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트를 이용하여, 상기 유전자 샘플을 리얼타임(real-time) PCR로 증폭하는 단계와, 리얼타임 PCR 결과에 기초하여 상기 검체 내의 박쥐 유래 코로나바이러스를 검출하는 단계를 포함한다.
- [0047] 본 발명의 일실시예의 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 방법은, 증폭 전, 박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 유전자의 카피수를 알고 있는 유전자 샘플인 양성 표준자를, 전술한 바와 같은 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트와 박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 유전자와 관련하여 유전자 증폭량을 나타내는 표지물질을 이용하여 리얼타임(real-time) PCR로 증폭하는 단계와,
- [0048] 상기 양성 표준자의 전체 PCR 증폭 기간에 대한 상기 표지물질의 형광세기의 변화를 측정하고, 일정한 형광세기에 도달하는 PCR 반응회수(Cp값 또는 Ct 값)를 분석하는 단계와,
- [0049] 상기 표지물질의 형광세기의 변화를 측정하여 얻어진 표준곡선으로부터 상기 양성 표준자의 카피수와, Cp값 또는 Ct값을 대응시키는 단계와,

- [0050] 상기 검체의 유전자 샘플 내에 존재하는 박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 유전자의 전체 PCR 증폭 기간에 대한 상기 표지물질의 형광세기의 변화를 측정하고, 일정한 형광세기에 도달하는 PCR 반응회수(Cp값 또는 Ct 값)를 분석하는 단계와,
- [0051] 상기 검체의 유전자 샘플 내에 존재하는 박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 유전자를 PCR 증폭하여 얻은 Cp값 또는 Ct값을 상기 양성 표준자의 카피수에 대응시켜, 상기 검체 내의 박쥐 유래 코로나바이러스 감염 여부를 정량적으로 측정하는 단계를 더 포함한다.
- [0052] 본 발명의 일실시예의 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 방법에 있어서, 상기 표지물질은 서열번호 3의 프로브의 한쪽 말단과, 서열번호 7의 프로브의 한쪽 말단과, 서열번호 10의 프로브의 한쪽 말단과, 서열번호 13의 프로브의 한쪽 말단과, 서열번호 17의 프로브의 한쪽 말단, 예를 들어 5'말단에 표지될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 일실시예의 리얼타임 PCR을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 방법에 있어서, 상기 표지물질은 형광물질이고, 상기 표지물질로부터의 형광의 세기를 측정하여 박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 유전자의 증폭량을 산출할 수 있다.
- [0054] 한편, 본 발명에 있어서 프로브의 한쪽 말단, 예를 들어 5'말단은 Cy5, Cy3, x-로다민, 텍사스 레드, SYBR 그린 (SYBR green), FAM, FAM-NOVA, VIC, JOE, NED, HEX, TET 및 TAMRA 등과 같은 형광물질로 표지될 수 있고, 프로브의 다른쪽 말단, 예를 들어 3'말단은 IABkFQ, DABCYL, BHQ (BHQ1, BHQ1-PLUS, BHQ2 등), EBQ, ZEN-IBFQ 등과 같은 소광물질로 표지될 수 있다. 그러나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니고 당업계에 알려진 다양한 형광 물질 및 소광물질이 사용될 수 있음은 물론이다.

### 발명의 효과

- [0055] 본 발명에 따르면, 최소한의 프라이머들을 사용한 리얼타임 PCR을 이용하여 사람에게 감염되는 것으로 알려진 박쥐 유래 코로나바이러스(사스 코로나바이러스 및 메르스 코로나바이러스) 뿐만아니라 조류 등 다른 종으로부터 사람에게 감염될 가능성이 있는 다양한 박쥐 유래 코로나바이러스를 검사할 수 있다.
- [0056] 구체적으로, 본 발명은 특유한 12종의 프라이머들의 조합을 사용한 리얼타임 PCR을 이용하여 검체로부터 27종의 박쥐 유래 코로나바이러스를 신속하면서도 정확하게 그리고 정량화된 데이터에 기초하여 특이도 및 민감도 높게 검출할 수 있는 장점이 있다.
- [0057] 또한, 본 발명은 최소한의 프라이머들을 사용한 리얼타임 PCR을 이용하여 검사 비용이 저렴할 뿐만아니라 증폭 오류 없이 신속하게 다양한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사를 수행할 수 있는 기술을 제공함으로써, 사람에게 감염되는 것으로 알려진 박쥐 유래 코로나바이러스(사스 코로나바이러스 및 메르스 코로나바이러스) 뿐만아니라 사람에게 감염되는 것으로 알려져 있지 않지만 잠재적 감염 위험성을 갖는 박쥐 유래 코로나바이러스를 신속하고 정확하게 검사하여 박쥐 유래 코로나바이러스 감염 확산의 조기 차단에 기여할 수 있다.
- [0058] 한편, 전술한 바와 같은 효과들에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

### 도면의 간단한 설명

- [0059] 도 1은 박쥐 유래 코로나바이러스 검출을 위한 프라이머 쌍 및 프로브 설계를 위해 수행된 RdRp 유전자에 대한 상동성 분석결과를 나타내는 도면이다.
- 도 2는 본 발명의 12종의 프라이머들의 조합(7종의 정방향 프라이머들과 5종의 역방향 프라이머들의 조합)과 5종의 프로브들의 조합을 이용하여 박쥐 코로나바이러스 16B0133의 합성 RNA 유전자에 대해 리얼타임 PCR을 실시한 결과 그래프이다.
- 도 3은 본 발명의 12종의 프라이머들의 조합(7종의 정방향 프라이머들과 5종의 역방향 프라이머들의 조합)과 5종의 프로브들의 조합을 이용하여 사스 코로나바이러스 ExoN1의 합성 RNA 유전자에 대해 리얼타임 PCR을 실시한 결과 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 12종의 프라이머들의 조합(7종의 정방향 프라이머들과 5종의 역방향 프라이머들의 조합)과 5종의 프로브들의 조합을 이용하여 박쥐 코로나바이러스 A620/2005의 합성 RNA 유전자에 대해 리얼타임 PCR을 실시한 결과 그래프이다.
- 도 5는 본 발명의 12종의 프라이머들의 조합(7종의 정방향 프라이머들과 5종의 역방향 프라이머들의 조합)과 5

종의 프로브들의 조합을 이용하여 베타코로나바이러스 SC2013의 합성 RNA 유전자에 대해 리얼타임 PCR을 실시한 결과 그래프이다.

도 6은 본 발명의 12종의 프라이머들의 조합(7종의 정방향 프라이머들과 5종의 역방향 프라이머들의 조합)과 5종의 프로브들의 조합을 이용하여 HCoV-EMC의 합성 RNA 유전자에 대해 리얼타임 PCR을 실시한 결과 그래프이다.

도 7은 본 발명의 12종의 프라이머들의 조합(7종의 정방향 프라이머들과 5종의 역방향 프라이머들의 조합)과 5종의 프로브들의 조합을 이용하여 박쥐 코로나바이러스 B15-41의 합성 RNA 유전자에 대해 리얼타임 PCR을 실시한 결과 그래프이다.

도 8은 본 발명의 12종의 프라이머들의 조합(7종의 정방향 프라이머들과 5종의 역방향 프라이머들의 조합)과 5종의 프로브들의 조합을 이용하여 박쥐 코로나바이러스 1B AFCD307의 합성 RNA 유전자에 대해 리얼타임 PCR을 실시한 결과 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 이하 본 발명을 하기 실시예에서 보다 상세하게 기술한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아니다. 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다. 본 발명에 인용된 참고문헌들은 본 발명에 참고로서 통합된다.

[0062] **실시예**

[0063] **실시예 1: 박쥐 유래 코로나바이러스 표적유전자의 상동성 분석**

[0064] 박쥐 유래 코로나바이러스를 검출하기 위한 표적유전자로 RdRp 유전자(RNA-dependent RNA polymerase gene)를 선택하였고, 박쥐 샘플에서 확인된 박쥐 유래 코로나바이러스인 박쥐 코로나바이러스 B15-41(KU528588)의 RdRp 유전자를 포함한 총 27개의 박쥐 유래 코로나바이러스의 RdRp 유전자 표준 염기서열을 이용하여 상동성 분석을 실시하였다(표 1 참조). 박쥐 유래 코로나바이러스의 RdRp 유전자의 상동성 분석은 MEGA 소프트웨어(<https://www.megasoftware.net/>)를 이용하여 실시하였다.

### 표 1

[0065] 박쥐 유래 코로나바이러스 상동성 분석을 위한 표준 염기서열

코로나바이러스	Accession No.	코로나바이러스	Accession No.
Bat SARS-like coronavirus RsSHC014	KC881005	Bat CoV 273/2005	DQ648856
Bat coronavirus JTMC15	KU182964	Bat SARS CoV Rf1/2004	DQ412042
Bat coronavirus Rp/Shaanxi2011	JX993987	Bat SARS CoV Rp3/2004	DQ071615
Bat SARS coronavirus HKU3-1	DQ022305	Bat SARS-like coronavirus Jiyuan-331	KF294456
SARS coronavirus ExoN1	FJ882955	SARS coronavirus MA15	JF292915
SARS coronavirus Sinol-11	AY485277	SARS related coronavirus Tor2/FP1-10895	JX163928
SARS coronavirus Urbani	AY278741	Bat coronavirus A613/2005	DQ648826
Bat coronavirus A620/2005	DQ648828	Bat coronavirus A632/2005	DQ648830
Bat coronavirus A633/2005	DQ648831	Bat coronavirus A701/2005	DQ648833
Bat coronavirus A897/2005	DQ648842	Bat coronavirus HKU6-1	DQ249224
BtVs-BetaCoV/SC2013	KJ473821	Bat coronavirus 16B0133	KY938558
HCoV-EMC	NC019843	Bat coronavirus B15-40	KU528587
Bat coronavirus B15-41	KU528588	Bat coronavirus 1A AFCD62	NC010437
Bat coronavirus 1B AFCD307	EU420137		

[0066] 한편, 상기 표 1의 박쥐 유래 코로나바이러스 BatCoV-16B0133과 베타코로나바이러스 SC2013은 유전자 서열이 동일하여 이하의 실시예들에서는 이들 2종의 박쥐 유래 코로나바이러스에 대해서는 1개종으로 취급하여 동일한 프라이머쌍과 프로브를 디자인하였다.

[0068] **실시예 2: 박쥐 유래 코로나바이러스 검출을 위한 프라이머 및 프로브 설계**

[0069] 본 발명자들은 상기 실시예 1의 표 1에 기술된 바와 같은 29개의 박쥐 유래 코로나바이러스의 RdRp 유전자 서열 정보를 바탕으로 예의 연구를 거듭한 결과, 리얼타임 PCR로 27종의 박쥐 유래 코로나바이러스를 모두 검출할 수 있는 특유한 12종의 프라이머들(7종의 정방향 프라이머들 및 5종의 역방향 프라이머들의 조합)과, 특유한 5종의 프로브들(증폭반응 결과물을 특이적으로 확인할 수 있는 형광표지가 된 프로브들)의 조합을 디자인하였다.

[0070] 박쥐 유래 코로나바이러스를 검출하기 위한 프라이머와 프로브 서열은 상기 실시예 1에서 기술한 서열상동성 분석을 통하여 상동성이 높고 리얼타임 PCR 실험을 수행할 수 있는 수준의 T<sub>m</sub> 값을 보유할 수 있는 서열을 선택하였다.

[0071] 하기 표 2에 기재된 각각의 서열은 동일한 온도 조건에서 실험이 가능하도록 유사한 T<sub>m</sub> 값을 유지할 수 있도록 디자인하였다. 하기 표 2의 프라이머와 프로브의 길이, GC%, T<sub>m</sub> 값의 분석은 IDT(INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES)社에서 제공하는 웹 기반 프로그램인 OligoAnalyzer 프로그램(<https://sg.idtdna.com/calc/analyser>)을 이용하여 수행하였다. 이때, 올리고머 농도는 0.25 μM로 하고 Na<sup>+</sup>는 50mM 농도 조건으로 하여 분석하였다. 선택된 올리고 합성은 바이오서치 테크놀로지(Biosearch technologies Inc.)를 통하여 진행하였다. 27종의 박쥐 유래 코로나바이러스 증폭을 위한 프라이머 및 프로브 서열은 아래의 표 2와 같다.

표 2

[0072] 박쥐 유래 코로나바이러스 검출을 위한 프라이머 및 프로브 서열정보

서열번호	5' 표지	서열정보 (5'→3')	3' 표지	길이 (bp)	GC(%)	T <sub>m</sub> (℃)	증폭산물 (bp)
1		CCWAARTGTGACAGAGCCA		19	50	53.5	104
2		CTRTAGAAACGGTGTGA		17	44.1	46.8	
3	FAM-NOVA	TCTTGCTCGCAAACATA	BHQ1	17	41.2	48.6	
4		CCTAAGTGTGACAGGCAT		19	47.4	51.6	74
5		CCTAAGTGTGATAGRCAT		19	44.7	49.8	
6		GTGACRTGCTTAGAACCCA		19	50	53.5	
7	FAM	CCTAATATGATTAGAATGA	BHQ1-PLUS	19	26.3	40.3	70
8		CCTAAGTGTGATCGTGCTA		19	47.4	51.3	
9		CATGTTTTCGCGTCCAAA		17	47.1	51.8	
10	FAM-NOVA	TGCCTAACATGTGTAGGAT	BHQ1	19	42.1	50.5	70
11		CCTAAGTGTGATAGAGCTA		19	42.1	47.5	
12		CATGTTTACGAGCTAATATG		20	35	46.1	
13	FAM-NOVA	TGCCTAATATGTGTAGAATCT	BHQ1	21	33.3	48.2	74
14		AGAGCTTTGCCTAATATGA		19	36.8	48.1	
15		AGAGCACTGCCTAATATGA		19	42.1	50.3	
16		TTRGTACAACAATTTTCATG		20	27.5	45	
17	FAM-NOVA	CGTATGATATCCGCCATGA	BHQ1	19	47.4	51.6	

[0073] \* W: A/T, R: A/G

[0074] 우선, 서열번호 1의 프라이머(정방향 프라이머) 및 서열번호 2의 프라이머(역방향 프라이머)의 쌍은 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 사스-유사 코로나바이러스 RsSHC014(KC881005), 박쥐 코로나바이러스 273/2005(DQ648856), 박쥐 코로나바이러스 JTMC15(KU182964), 박쥐 사스 코로나바이러스 Rf1/2004(DQ412042), 박쥐 코로나바이러스 Rp/Shaanxi2011(JX993987), 박쥐 사스 코로나바이러스 Rp3/2004(DQ071615), 박쥐 사스 코로나바이러스 HKU3-1(DQ022305), 박쥐 사스 유사 코로나바이러스 Jiyuan-331(KF294456), 사스 코로나바이러스 ExoN1(FJ882955), 사스 코로나바이러스 MA15(JF292915), 사스 코로나바이러스 Sino1-11(AY485277), 사스 관련 코로나바이러스 Tor2/FP1-10895(JX163928), 및 사스 코로나바이러스 Urbani(AY278741)를 특이적으로 증폭하여 검출할 수 있다.

[0075] 서열번호 4의 프라이머(정방향 프라이머) 및 서열번호 6의 프라이머(역방향 프라이머)의 쌍은 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 A613/2005(DQ648826), 박쥐 코로나바이러스 A620/2005(DQ648828), 박쥐 코로나바이러스 A701/2005(DQ648833), 박쥐 코로나바이러스 A897/2005(DQ648842) 및 박쥐 코로나바이러스 HKU6-1(DQ249224)을 특이적으로 증폭하여 검출할 수 있고, 서열번호 5의 프라이머(정방향 프라이머) 및 서열번호 6의

프라이머(역방향 프라이머)의 쌍은 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 A632/2005(DQ648830) 및 박쥐 코로나바이러스 A633/2005(DQ648831)를 특이적으로 증폭하여 검출할 수 있다.

[0076] 서열번호 8의 프라이머(정방향 프라이머) 및 서열번호 9의 프라이머(역방향 프라이머)의 쌍은 박쥐 유래 코로나바이러스 중 베타코로나바이러스 SC2013(KJ473821) 및 박쥐 코로나바이러스 16B0133(KY938558)을 특이적으로 증폭하여 검출할 수 있고, 서열번호 11의 프라이머(정방향 프라이머) 및 서열번호 12의 프라이머(역방향 프라이머)의 쌍은 박쥐 유래 코로나바이러스 중 HCoV-EMC(NC019843)를 특이적으로 증폭하여 검출할 수 있다.

[0077] 서열번호 14의 프라이머(정방향 프라이머) 및 서열번호 16의 프라이머(역방향 프라이머)의 쌍은 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 B15-40(KU528587), 박쥐 코로나바이러스 B15-41(KU528588) 및 박쥐 코로나바이러스 1A AFCD62(NC010437)를 특이적으로 증폭하여 검출할 수 있고, 서열번호 15의 프라이머(정방향 프라이머) 및 서열번호 16의 프라이머(역방향 프라이머)의 쌍은 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 1B AFCD307(EU420137)을 특이적으로 증폭하여 검출할 수 있다.

[0078] 다음으로, 서열번호 3의 프로브는 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 사스-유사 코로나바이러스 RsSHC014(KC881005), 박쥐 코로나바이러스 273/2005(DQ648856), 박쥐 코로나바이러스 JTMC15(KU182964), 박쥐 사스 코로나바이러스 Rf1/2004(DQ412042), 박쥐 코로나바이러스 Rp/Shaanxi2011(JX993987), 박쥐 사스 코로나바이러스 Rp3/2004(DQ071615), 박쥐 사스 코로나바이러스 HKU3-1(DQ022305), 박쥐 사스 유사 코로나바이러스 Jiyuan-331(KF294456), 사스 코로나바이러스 ExoN1(FJ882955), 사스 코로나바이러스 MA15(JF292915), 사스 코로나바이러스 Sino1-11(AY485277), 사스 관련 코로나바이러스 Tor2/FP1-10895(JX163928) 및 사스 코로나바이러스 Urbani(AY278741)를 검출할 수 있도록 설계하였다. 서열번호 3의 프로브의 5' 말단에는 FAM-NOVA 형광물질을 표지하였고, 3' 말단에는 소광물질 BHQ1을 표지하였다.

[0079] 서열번호 7의 프로브는 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 A613/2005(DQ648826), 박쥐 코로나바이러스 A620/2005(DQ648828), 박쥐 코로나바이러스 A632/2005(DQ648830), 박쥐 코로나바이러스 A633/2005(DQ648831), 박쥐 코로나바이러스 A701/2005(DQ648833), 박쥐 코로나바이러스 A897/2005(DQ648842) 및 박쥐 코로나바이러스 HKU6-1(DQ249224)을 검출할 수 있도록 설계하였다. 서열번호 7의 프로브의 5' 말단에는 FAM 형광물질을 표지하였고, 3' 말단에는 서열번호 7의 프로브의 경우 Tm 값이 낮은 것을 보정하기 위해 소광물질 BHQ1-PLUS를 표지하였다.

[0080] 서열번호 10의 프로브는 박쥐 유래 코로나바이러스 중 베타코로나바이러스 SC2013(KJ473821) 및 박쥐 코로나바이러스 16B0133(KY938558)을 검출할 수 있도록 설계하였고, 서열번호 13의 프로브는 박쥐 유래 코로나바이러스 중 HCoV-EMC(NC019843)를 검출할 수 있도록 설계하였으며, 서열번호 17의 프로브는 박쥐 유래 코로나바이러스 중 박쥐 코로나바이러스 B15-40(KU528587), 박쥐 코로나바이러스 B15-41(KU528588), 박쥐 코로나바이러스 1A AFCD62(NC010437) 및 박쥐 코로나바이러스 1B AFCD307(EU420137)을 검출할 수 있도록 설계하였다. 또한, 서열번호 10의 프로브, 서열번호 13의 프로브 및 서열번호 17의 프로브의 5' 말단에는 FAM-NOVA 형광물질을 표지하였고, 3' 말단에는 소광물질 BHQ1을 표지하였다.

[0081] 한편, 프로브를 표지하는 형광물질 및 소광물질로는 전술한 예시에 한정되는 것이 아니고, 당업계에 알려진 다양한 형광물질 및 소광물질이 사용될 수 있음은 물론이다. 27종의 박쥐 유래 코로나바이러스 검출을 위한 프라이머 쌍과 프로브의 조합을 정리하면 하기 표 3과 같다.



표 3

27종의 박쥐 유래 코로나바이러스 검출을 위한 프라이머 쌍 및 프로브의 조합

박쥐 유래 코로나바이러스	정방향 프라이머	역방향 프라이머	프로브	박쥐 유래 코로나바이러스	정방향 프라이머	역방향 프라이머	프로브
Bat SARS-like coronavirus RsSHC014	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3	Bat CoV 273/2005	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3
Bat coronavirus JTM15	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3	Bat SARS CoV Rf1/2004	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3
Bat coronavirus Rp/Shaanxi2011	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3	Bat SARS CoV Rp3/2004	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3
Bat SARS coronavirus HKU3-1	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3	Bat SARS-like coronavirus Jiyuan-331	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3
SARS coronavirus ExoN1	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3	SARS coronavirus MA15	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3
SARS coronavirus Sino1-11	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3	SARS related coronavirus Tor2/FP1-10895	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3
SARS coronavirus Urbani	서열번호 1	서열번호 2	서열번호 3	Bat coronavirus A613/2005	서열번호 4	서열번호 6	서열번호 7
Bat coronavirus A620/2005	서열번호 4	서열번호 6	서열번호 7	Bat coronavirus A632/2005	서열번호 5	서열번호 6	서열번호 7
Bat coronavirus A633/2005	서열번호 5	서열번호 6	서열번호 7	Bat coronavirus A701/2005	서열번호 4	서열번호 6	서열번호 7
Bat coronavirus A897/2005	서열번호 4	서열번호 6	서열번호 7	Bat coronavirus HKU6-1	서열번호 4	서열번호 6	서열번호 7
BtVs-BetaCoV/SC2013 (Bat coronavirus 16BO133)	서열번호 8	서열번호 9	서열번호 10	HCoV-EMC	서열번호 11	서열번호 12	서열번호 13
Bat coronavirus B15-40	서열번호 14	서열번호 16	서열번호 17	Bat coronavirus B15-41	서열번호 14	서열번호 16	서열번호 17
Bat coronavirus 1A AFCD62	서열번호 14	서열번호 16	서열번호 17	Bat coronavirus 1B AFCD307	서열번호 15	서열번호 16	서열번호 17

[0082]

[0084] 실시예 3: RNA 양성대조물질 (positive control RNA)의 합성

[0085]

상기 실시예 2에서 설계된 프라이머 쌍과 프로브의 각각의 조합을 이용하여 대응하는 박쥐 유래 코로나바이러스의 특이적 증폭 및 검출이 가능한지 여부를 확인하기 위해 박쥐 유래 코로나바이러스의 RNA 양성대조물질을 합성하였다. 유전자 합성은 IDT社에서 제공하는 지블록스 진 프래그먼트(gBlocks Gene Fragments) 서비스를 이용하여 하기 표 4의 염기서열에 따라 수행하였고, 인비트로 전사(in vitro transcription)를 통한 RNA 합성을 위해 서 5' 방향 말단에 SP6 프로모터 서열을 추가하였다.

[0086]

합성된 유전자는 IDT社에서 제공하는 매뉴얼에 따라서 100 μL의 TE 버퍼를 이용하여 회수하였고 이중 5 μL를 취하여 써모피셔 사이언티픽社(Thermo fisher scientific)(미합중국 매사추세츠주 소재)의 메가스크립트 SP6 인비트로 전사 키트(MEGAscript SP6 in vitro transcription kit)를 이용하여 RNA 양성대조물질을 합성하였으며 합성과정은 상기 제조사에 의해 제공되는 프로토콜에 따라 진행하였다.

표 4

[0087]

RNA 양성대조물질 합성을 위한 염기서열 정보

박쥐 유래 코로나 바이러스	서열정보
Bat coronavirus 16BO133	ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGCCTAAGTGTGACAGGCCATGCCTAACATGCTTAGAATTATGGCTTCACTTGTCTTGCTCGCAAAACATAGCACTTGTGTAACCTTGTCACACCGTTTCTATAG (서열번호 18)
SARS coronavirus ExoN1	ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGCCTAAGTGTGACAGGCCATGCCTAACATGCTTAGGATAATGGCTTCTTGTCTTGCTCGCAAAACATAACACTTGCTGTAACCTATCACACCGTTTCTACAG (서열번호 19)
Bat coronavirus A620/2005	ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGCCTAAGTGTGACAGAGCATTACCTAATATGATTAGAAATGATTCCGCTATGATCTTGGTTCTAAGCAGTCAC (서열번호 20)
BtVs- BetaCoV/SC2013	ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGCCTAAGTGTGATCGTGCTATGCCTAACATGTGTAGGATTTTCGCGTCTCTGATTTTGGCACGCAAAACATG (서열번호 21)
HCoV-EMC	ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGCCTAAGTGTGATAGAGCTATGCCTAATATGTGTAGAAATCTTCGCTTCACTCATATTAGCTCGTAAACATG (서열번호 22)
Bat coronavirus B15-41	ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGAGAGCTTTCGCTAATATGATTCGTATGATATCCGCCATGATTTTGGGTCTAAGCATGAAAATTGTTGTACTAA (서열번호 23)



Bat coronavirus 1B AFCD307	ATTTAGGTGACACTATAGAAGAGAGAGCACTGCCTAATATGATCCGTATGATATCCGCCATGATTTTGGGTTCTAAGCATG AAAATTGTGTACCAA (서열번호 24)
-------------------------------	--

[0088] \* 밑줄: SP6 프로모터 서열

[0090] **실시예 4: RNA 양성대조물질을 이용한 박쥐 유래 코로나바이러스의 검출 실험**

[0091] 리얼타임 PCR 실험을 위해 상기 실시예 3에서 준비된 RNA 양성대조물질은 써모피셔 사이언티픽社의 큐비트 어세이 (Qubit Assays)로 정량한 후 인터넷 기반 DNA/RNA 카피 넘버 계산 프로그램을 이용하여 합성 RNA 유전자 카피수를 계산하였다(<http://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php>). 그리고 상기 실시예 3에서 합성된 RNA 양성대조물질을  $10^5$  copies/ $\mu$ L가 되도록 준비하여 후속의 리얼타임 PCR 실험의 주형으로 사용하였다.

[0092] 리얼타임 RT-PCR 증폭실험은 써모피셔 사이언티픽社의 ABI 7500 패스트 리얼타임(fast real-time) PCR 장비를 이용하여 수행하되, 하기 표 5에 기술된 바와 같은 리얼타임 PCR 반응 조성액을 조제하여 사용하였다. 반응 당  $10^5$  copies/ $\mu$ L의 농도가 되도록 1 $\mu$ L의 준비된 RNA 양성대조물질(주형)을 상기 반응 조성액에 첨가하였다. 2X 리얼타임 PCR 마스터 믹스(Real-time PCR Master Mix)는 제이에스 바이오테크(대한민국 경기도 소재)의 제품을 사용하였다.

**표 5**

[0093] 리얼타임 PCR 반응 조성액

구성물	농도	첨가량
RT-qPCR 마스터믹스	2X	10 $\mu$ L
서열번호 1	100 $\mu$ M	0.1 $\mu$ L
서열번호 2	100 $\mu$ M	0.1 $\mu$ L
서열번호 3	100 $\mu$ M	0.05 $\mu$ L
서열번호 4	100 $\mu$ M	0.1 $\mu$ L
서열번호 5	100 $\mu$ M	0.1 $\mu$ L
서열번호 6	100 $\mu$ M	0.1 $\mu$ L
서열번호 7	100 $\mu$ M	0.05 $\mu$ L
서열번호 8	100 $\mu$ M	0.1 $\mu$ L
서열번호 9	100 $\mu$ M	0.1 $\mu$ L
서열번호 10	100 $\mu$ M	0.05 $\mu$ L
서열번호 11	100 $\mu$ M	0.1 $\mu$ L
서열번호 12	100 $\mu$ M	0.1 $\mu$ L
서열번호 13	100 $\mu$ M	0.05 $\mu$ L
서열번호 14	100 $\mu$ M	0.1 $\mu$ L
서열번호 15	100 $\mu$ M	0.1 $\mu$ L
서열번호 16	100 $\mu$ M	0.1 $\mu$ L
서열번호 17	100 $\mu$ M	0.05 $\mu$ L
RNA 주형	$10^5$ copies/ $\mu$ L	1 $\mu$ L
3차 증류수	-	7.55 $\mu$ L
전체 부피	-	20 $\mu$ L

[0094] 또한, 상기 실시예 2에서 기술한 바와 같이 리얼 타임 PCR 증폭 반응결과물을 확인하고 이를 정량적으로 분석하기 위해 각 프로브는 형광물질 및 소광물질로 이중 표지되는데, 서열번호 3, 서열번호 10, 서열번호 13 및 서열번호 17의 프로브는 모두 5' 말단에 FAM-NOVA로 표지하였고, 이들 프로브의 3'말단에는 소광물질인 BHQ1을 표지하였다. 그리고, 서열번호 7의 프로브는 5' 말단에 FAM으로 표지하였고, 3'말단에는 소광물질인 BHQ1-PLUS를 표지하였다. 한편, 프로브를 표지하는 형광물질 및 소광물질로는 전술한 예시에 한정되는 것이 아니고, 당업계에 알려진 다양한 형광물질 및 소광물질이 사용될 수 있음은 물론이다.

[0095] 리얼타임(real-time) PCR 방법은 이러한 형광물질과 소광물질을 PCR 기법에 응용한 것으로 반응 중 검체 내에 존재하는 표적 유전자의 증폭과 함께 형광물질의 발광(emission) 정도를 실시간으로 검출하고 정량 분석하여 표적 유전자의 증폭 유무 및 그 양상을 신속하고 정확하게 분석할 수 있다. 리얼타임 PCR의 기본 원리는 중합효소

와 형광공명 에너지 이동(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)의 원리에 의해 PCR의 매 주기마다 실시간으로 시행되는 형광의 검출과 정량에 있다.

[0096] 리얼타임 PCR에서의 정량은 PCR시 매 주기의 진행 상황을 감시하여 지수 증가기(exponential phase) 범위 내에서 실시간으로 증폭산물을 측정하는 방법으로서, 이때 중요한 개념이 Ct(threshold cycle) 또는 Cp(crossing point)라는 수치이다. 이 값은 전술한 이중 표지된 프로브에 의해 생기는 형광의 세기가 기본값(baseline level)을 넘어서 감지될 수 있을 정도로 두드러지게 증가하는 시점의 주기수이며, 이는 표적 유전자의 초기 주형량(본 발명의 경우 27종의 박쥐 유래 코로나바이러스 각각의 RNA 유전자 카피수)을 정확하게 반영한다. 따라서, 27종의 박쥐 유래 코로나바이러스 각각의 RNA 유전자를 포함하는 시료를 PCR 증폭하여 전체 PCR 증폭 기간에 대한 형광물질의 형광세기의 변화를 측정하고 일정한 형광세기에 도달하는 PCR 반응회수(Cp값 또는 Ct값)를 분석하고 형광세기의 표준 곡선을 얻은 후, 27종의 박쥐 유래 코로나바이러스 각각의 RNA 유전자가 존재하는지 여부와 시료 내에 포함된 박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 유전자의 초기 주형량을 정량적으로 분석할 수 있다.

[0097] 본 실시예에서는 상기 실시예 3에서 합성된 박쥐 유래 코로나바이러스의 RNA 양성대조물질에 대해 상기 표 5에 나타낸 바와 같은 리얼타임 PCR 증폭 반응액의 조성 하에서, 하기 표 6의 리얼타임 PCR 반응조건으로 실험을 진행하였으며, Ct 값을 기준으로 검출 대상이 되는 각각의 박쥐 유래 코로나바이러스의 음/양성(박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 유전자 존재 여부)을 판정하였다.

## 표 6

[0098] 리얼타임 PCR 반응조건

역전사	45℃	15분
변성(Denaturation)	95℃	5분
45 사이클		
변성(Denaturation)	95℃	15초
어닐링 및 연장 (데이터 수집)	50℃	45초

[0099] 상기 실시예 3에 따라 합성된 박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 각각을 주형으로 하여 상기와 바와 같은 조성 및 반응조건으로 리얼타임 PCR을 수행하고, 리얼타임 PCR 증폭반응이 한번씩 반복될 때마다 FAM 파장에서 형광값을 측정하여 각 반응 사이클에 대한 형광세기를 분석하였다. 그 결과는 도 2 내지 도 8에 도시하였다.

[0100] 상기 결과들로부터 본 발명의 특유한 12종의 프라이머들의 조합(7종의 정방향 프라이머들과 5종의 역방향 프라이머들의 조합)과, 특유한 5종의 프로브들의 조합은 박쥐 유래 코로나바이러스 각각의 RNA 바이러스 유전자를 유효하게 증폭시키고 증폭 사이클에 대한 형광세기의 곡선 역시 각각의 박쥐 유래 코로나바이러스 RNA 유전자의 존재 여부 판단과 정량적 분석에 적합한 것을 확인할 수 있었다.

[0101] 본 발명의 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트 및 방법은 특유한 12종의 프라이머들의 조합(7종의 정방향 프라이머들과 5종의 역방향 프라이머들의 조합)과 특유한 5종의 프로브들의 조합을 이용하여 리얼타임 PCR을 수행함으로써, 사람에게 감염되는 것으로 알려진 박쥐 유래 코로나바이러스 뿐만아니라 조류 등 다른 종으로부터 사람에게 감염될 가능성이 있는 총 27종의 박쥐 유래 코로나바이러스를 검체로부터 신속하면서도 정확하게 그리고 정량화된 데이터에 기초하여 특이도 및 민감도 높게 검출할 수 있다.

[0102] 따라서, 본 발명의 박쥐 유래 코로나바이러스 검사 키트 및 방법은 최소한의 프라이머들을 사용한 리얼타임 PCR을 이용하여 다양한 박쥐 유래 코로나바이러스 검사를 수행할 수 있어 검사 비용이 저렴하고, 사람에게 감염되는 것으로 알려진 박쥐 유래 코로나바이러스 뿐만아니라 사람에게 감염되는 것으로 알려져 있지 않지만 잠재적 감염 위험성을 갖는 박쥐 유래 코로나바이러스를 신속하고 정확하게 검사하여 박쥐 유래 코로나바이러스 감염 확산의 조기 차단에 기여할 수 있다.

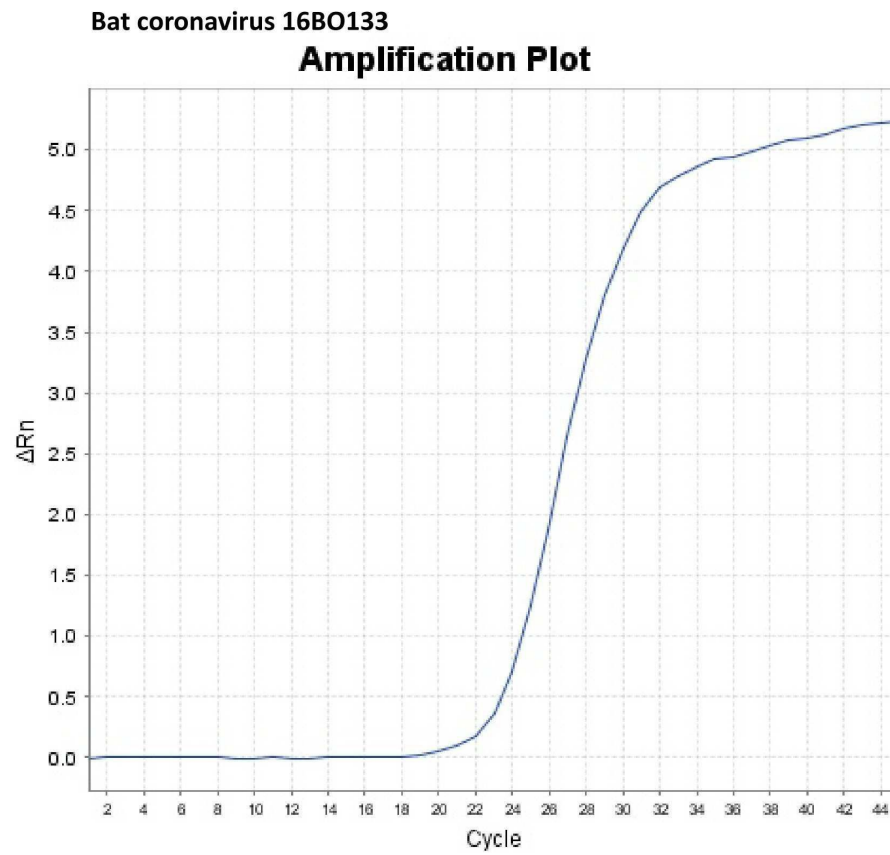
[0103] 이상 본 발명을 상기 실시예를 들어 설명하였으나, 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니다. 당업자라면 본 발명의 취지 및 범위를 벗어나지 않고 수정, 변경을 할 수 있으며 이러한 수정과 변경 또한 본 발명에 속하는 것임을 알 수 있을 것이다.

도면

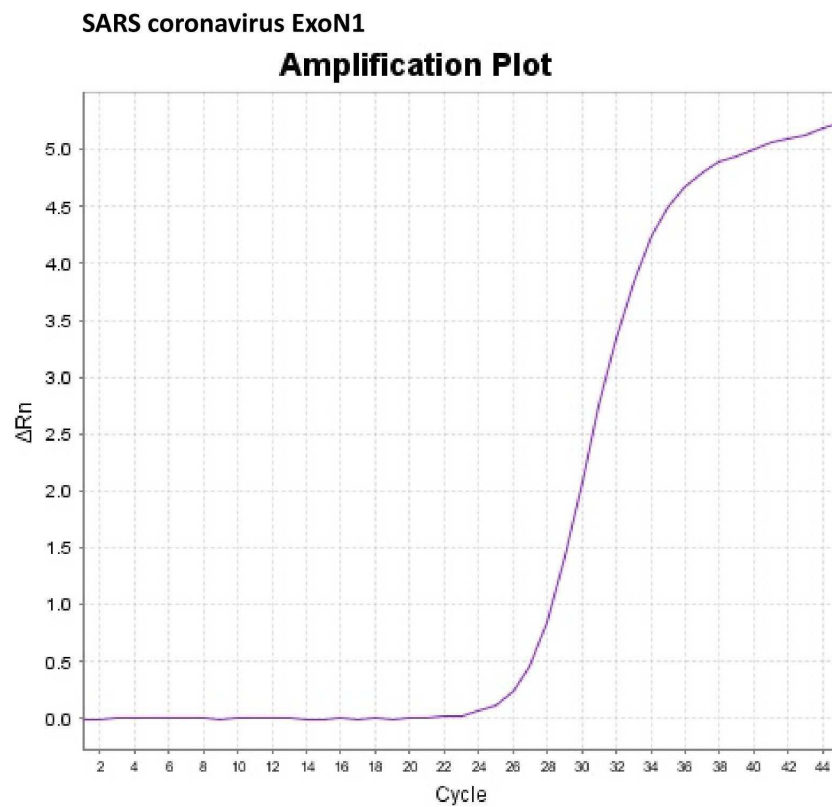
도면1

MX: Alignment Explorer (RDRP sequence alignment(Edited): 정렬.mas)		Data Edit Search Alignment Web Sequencer Display Help	
DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrv			
1. Bal_Cov-R3HCOT4KC681005	A	A	
2. Bal_Cov-273DO648856	A	A	
3. Bal_Cov-273DO648856	A	A	
4. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
5. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
6. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
7. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
8. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
9. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
10. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
11. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
12. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
13. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
14. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
15. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
16. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
17. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
18. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
19. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
20. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
21. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
22. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
23. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
24. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
25. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
26. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
27. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
28. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	
29. Bal_Cov-R1MC19KUT8284	A	A	

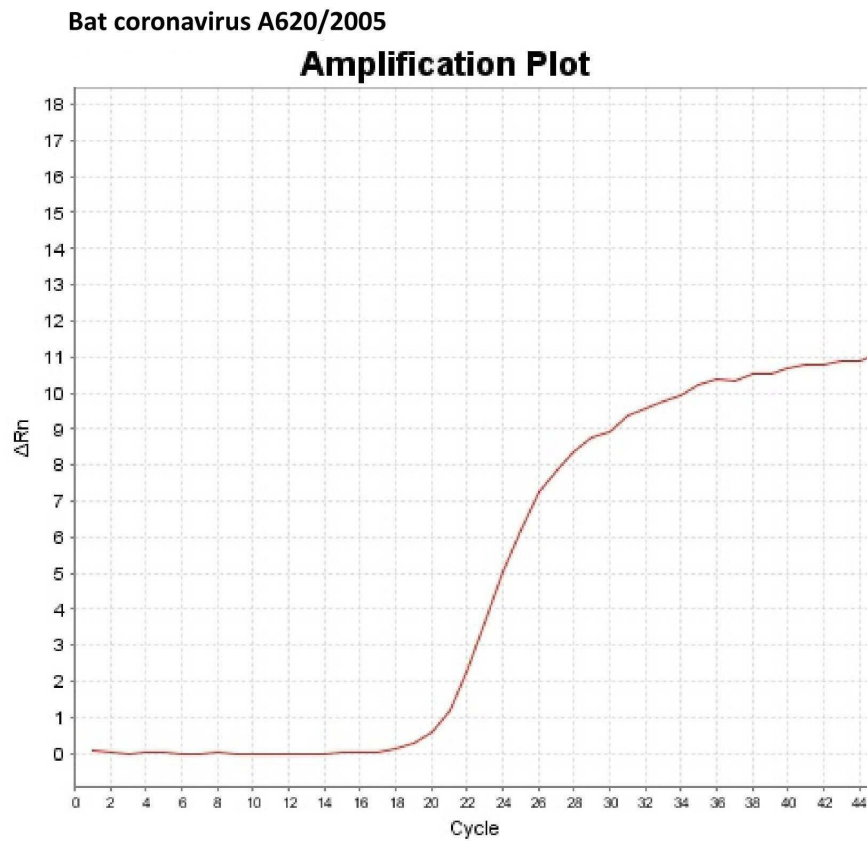
도면2



도면3

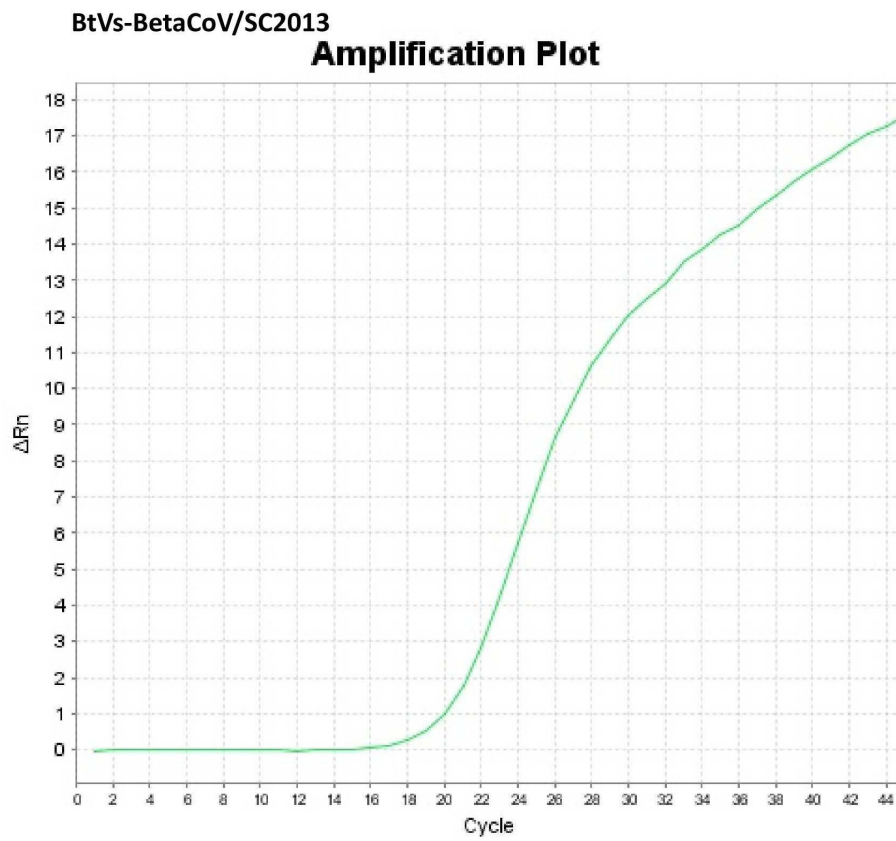


도면4

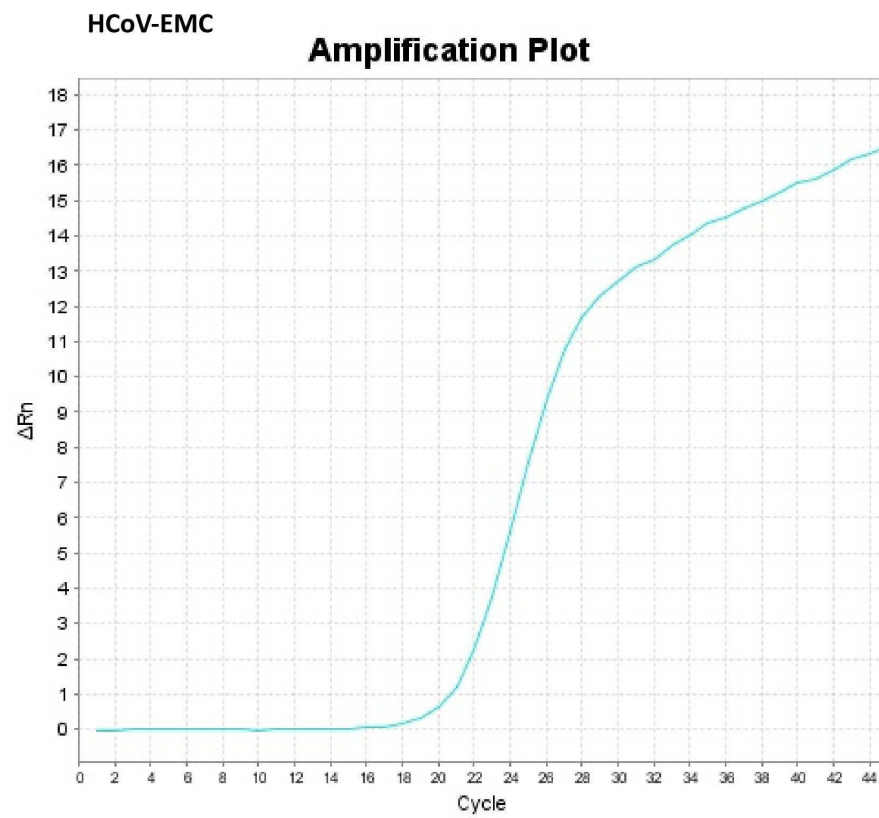




도면5

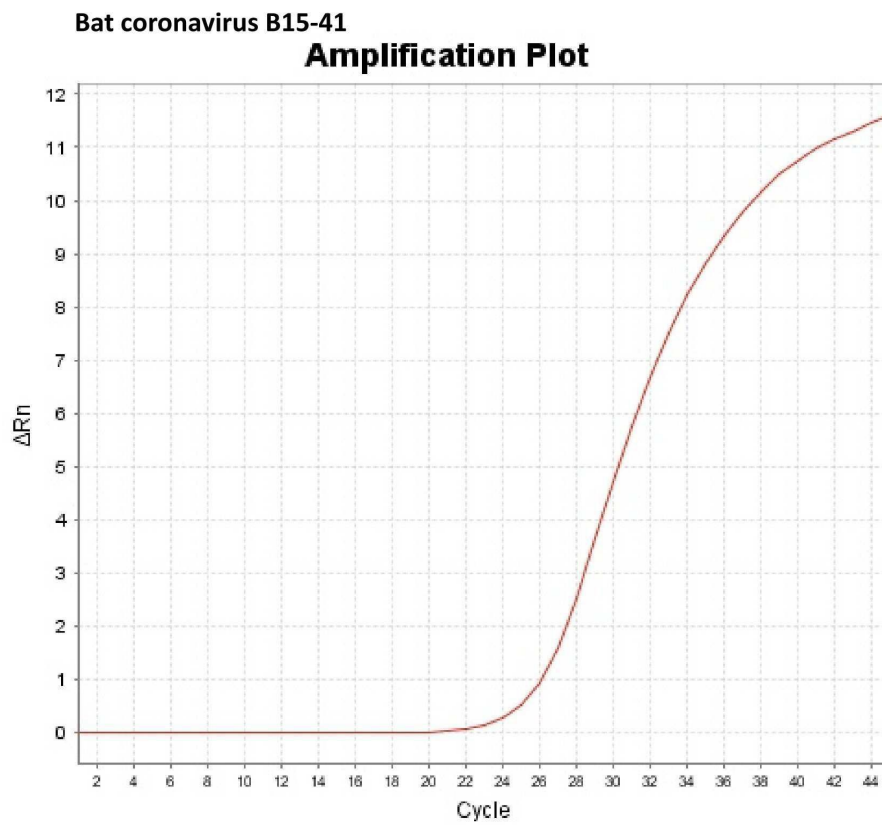


도면6

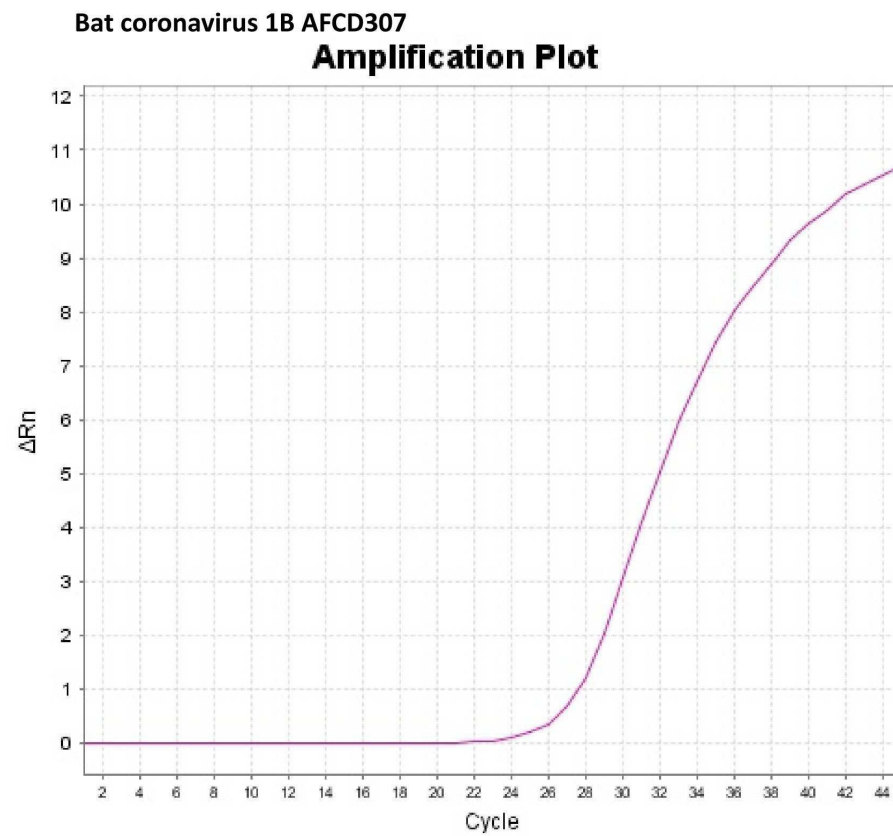




도면7



도면8



## 서열 목록

<110>	National Institute of Environmental Research	
<120>	Method and kit for detecting batcoronavirus using real-time PCR	
<130>	P19-0080KR	
<160>	24	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Batcoronavirus forward primer 1	
<400>	1	
	ccwaartgtg acagagcca	19
<210>	2	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Batcoronavirus reverse primer 1	
<400>	2	
	ctrtagaaac ggtgtga	17
<210>	3	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Batcoronavirus probe 1	
<400>	3	
	tcttgctcgc aaacata	17
<210>	4	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Batcoronavirus forward primer 2-1	
<400>	4	
	cctaagtgtg acagagcat	19

<210  
> 5  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Batcoronavirus forward primer 2-2  
<400> 5  
cctaagtgtg atagrgcat 19  
<210> 6  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Batcoronavirus reverse primer 2  
<400> 6  
gtgacrtgct tagaaccca 19  
<210> 7  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Batcoronavirus probe 2  
  
<400> 7  
cctaatatga ttagaatga 19  
<210> 8  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Batcoronavirus forward primer 3  
<400> 8  
cctaagtgtg atcgtgcta 19  
<210> 9  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Batcoronavirus reverse primer 3

<400>	9	
catgtttgcg tgccaaa		17
<210>	10	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Batcoronavirus probe 3	
<400>	10	
tgccatacat gtgtaggat		19
<210>	11	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Batcoronavirus forward primer 4	
<400>	11	
cctaagtgtg atagagcta		19
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Batcoronavirus reverse primer 4	
<400>	12	
catgtttacg agctaataatg		20
<210>	13	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Batcoronavirus probe 4	
<400>	13	
tgccataatat gtgtagaatc t		21
<210>	14	
<211>	19	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Batcoronavirus forward primer 5-1

<400> 14

agagctttgc ctaatatga 19

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Batcoronavirus forward primer 5-2

<400> 15

agagcactgc ctaatatga 19

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Batcoronavirus reverse primer 5

<400> 16

ttrgtacaac aattttcatg 20

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Batcoronavirus probe 5

<400> 17

cgtatgatat ccgccatga 19

<210> 18

<211> 127

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bat coronavirus 16B0133

<400> 18

atttagtgta cactatagaa gagcctaagt gtgacagagc catgcctaac atgcttagaa 60

ttatggcttc acttggttctt gctcgcaaac atagcacttg ttgtaacttg tcacaccgtt 120

tctatag	127
<210> 19	
<211> 127	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SARS coronavirus ExoN1	
<400> 19	
atttaggtga cactatagaa gagccaaaat gtgacagagc catgcctaac atgcttagga	60
taatggcctc tcttgttctt gctcgcaaac ataacacttg ctgtaactta tcacaccgtt	120
tctacag	127
<210> 20	
<211> 97	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Bat coronavirus A620/2005	
<400> 20	
atttaggtga cactatagaa gagcctaagt gtgacagagc attacctaatt atgattagaa	60
tgatttcgc tatgatcttg ggttctaagc acgtcac	97
<210> 21	
<211> 93	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> BtVs-BetaCoV/SC2013	
<400> 21	
atttaggtga cactatagaa gagcctaagt gtgatcgtgc tatgcctaac atgtgtagga	60
ttttcgcgtc tctgattttg gcacgcaaac atg	93
<210> 22	
<211> 93	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> HCoV-EMC	
<400> 22	



atttaggtga cactatagaa gagcctaagt gtgatagagc tatgcctaata atgtgtagaa 60

tcttcgcttc actcatatta gctcgtaaac atg 93

<210> 23

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bat coronavirus B15-41

<400> 23

atttaggtga cactatagaa gagagagcitt tgcctaataat gattcgtag ataccgcca 60

tgattttggg ttctaagcat gaaaattggt gtactaa 97

<210> 24

<211> 97

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bat coronavirus 1B AFCD307

<400> 24

atttaggtga cactatagaa gagagagcac tgcctaataat gatccgtatg ataccgcca 60

tgattttggg ttctaagcat gaaaattggt gtaccaa 97