



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0134004

(43) 공개일자 2015년12월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

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

(21) 출원번호 10-2014-0060752

(22) 출원일자 2014년05월21일

심사청구일자 2014년05월21일

(71) 출원인

대한민국(농림축산식품부 농림축산검역본부장)

경기도 안양시 만안구 안양로 175 (안양동)

주식회사 인트론바이오테크놀로지

경기도 성남시 중원구 사기막골로 137, 중앙인더스피아 701~704호 (상대원동)

(72) 발명자

이경기

경기도 안양시 만안구 연현로79번길 105,
202-704호 (석수동, 석수동LG빌리지)

엄재구

경기도 안양시 만안구 연현로79번길 56,411동 10
3호 (석수동, 석수엘지빌리지)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

한인열

전체 청구항 수 : 총 6 항

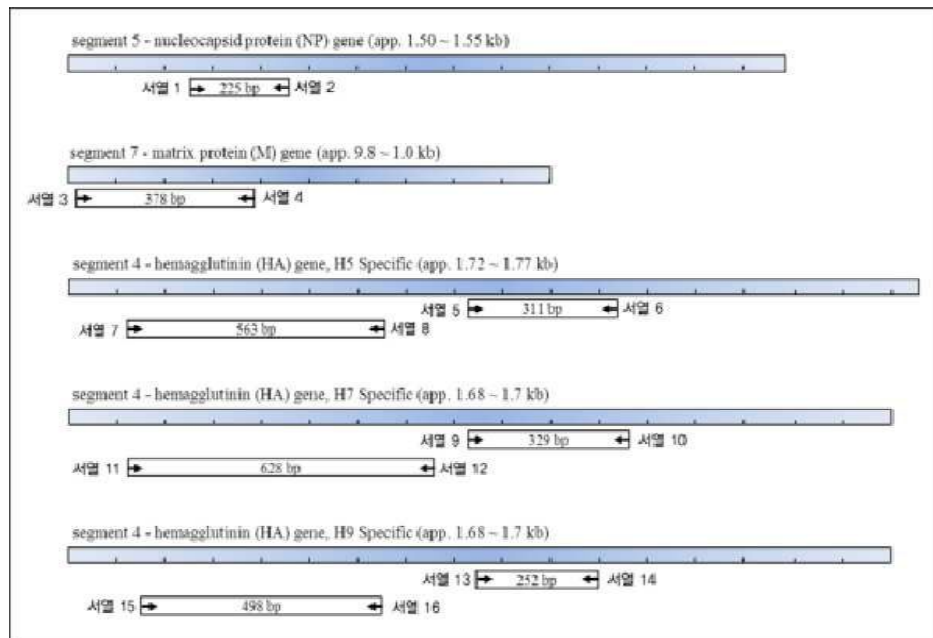
(54) 발명의 명칭 개선된 검출 정확성을 제공해 줄 수 있는 핵산검사 기반의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 키트

(57) 요약

본 발명은 개선된 검출 정확성을 제공해 줄 수 있는 핵산검사 기반의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트는 조류 인플루엔자 바이러스의 목적 유전자에서의 짧은 보존 서열로 인한 문제점

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



을 극복할 수 있는 서열번호 1 내지 서열번호 16으로 특징지어지는 특이 프라이머들이 적용되고, 또한 기존 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 다중유전자증폭에서의 민감도 저하 및 위음성 발생 문제를 회피하기 위하여 8개의 튜브로 구성된 다중튜브 방식이 적용된 것을 특징으로 한다. 본 발명의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형을 동시감별검출 키트는 조류 인플루엔자 바이러스 검출과 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 H7형 및 조류 인플루엔자 H9형의 동시감별검출에 있어 유용하게 활용될 수 있다.

(72) 발명자

김성희

경기도 안양시 만안구 수리산로18번길 6, 101호 (안양동)

박취규

경기도 안양시 동안구 경수대로623번길 46, 111동 1002호 (호계동, 럭키호계아파트)

이윤정

경기도 안양시 동안구 귀인로 258, 106동 1106호 (평촌동, 꿈마을라이프아파트)

강현미

경기도 수원시 장안구 화산로 85, 120동 503호 (천천동, 천천푸르지오아파트)

이은경

경기도 군포시 금산로 91, 120동 3103호 (산본동, 래미안 하이어스 아파트)

송병민

경기도 안양시 만안구 수리산로28번길 3, 810호 (안양동, 비전 하우스)

김혜령

경기도 안양시 동안구 관평로212번길 21, 313-1904 (관양동, 공작부영아파트)

최준구

경기도 안양시 동안구 흥안대로223번길 16, 201-303 (호계동, 샘마을쌍용아파트)

윤성준

서울시 강남구 선릉로 206, 104동 2302호 (대치동, 동부센트레빌)

최윤희

경기도 용인시 처인구 포곡읍 포곡로 159, 108동 702호 (용인포곡삼성쉐르빌아파트)

박지성

경기도 성남시 분당구 판교원로 7, 401동 2101호 (운중동, LIG건영아파트)

전수연

서울특별시 서초구 잠원로4길 34-11, 101동 1406호 (잠원동, 녹원한신아파트)

강상현

서울특별시 송파구 올림픽로 99, 140동 1602호 (잠실동, 잠실엘스아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 16으로 특징지어지는 특이 프라이머들이 수용되는 다중튜브로 구성되는 핵산검사 기반의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 다중튜브의 튜브에는 역전사반응과 PCR 반응이 동시에 한 튜브에서 수행될 수 있도록 0.1-10 unit의 역전사 효소, 1-10 unit의 DNA 중합효소, 10-300 mM의 Tris-HCl, 1-50 mM의 MgCl₂, 1-100 mM의 KCl, 1-5 mM의 dATP, 1-5 mM의 dTTP, 1-5 mM의 dGTP, 1-5 mM의 dCTP, 1-10 unit의 RNase Inhibitor, 0.001-0.1 M의 DTT, 0.5-5 µg의 8-MOP, 10 pmole의 특이 프라이머 쌍이 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 특이 프라이머 쌍이 튜브 1에는 서열번호 1 및 서열번호 2로 구성된 특이 프라이머 쌍이 수용되고, 튜브 2에는 서열번호 3 및 서열번호 4로 구성된 특이 프라이머 쌍이 수용되고, 튜브 3에는 서열번호 5 및 서열번호 6로 구성된 특이 프라이머 쌍이 수용되고, 튜브 4에는 서열번호 7 및 서열번호 8로 구성된 특이 프라이머 쌍이 수용되고, 튜브 5에는 서열번호 9 및 서열번호 10로 구성된 특이 프라이머 쌍이 수용되고, 튜브 6에는 서열번호 11 및 서열번호 12로 구성된 특이 프라이머 쌍이 수용되고, 튜브 7에는 서열번호 13 및 서열번호 14로 구성된 특이 프라이머 쌍이 수용되고, 튜브 8에는 서열번호 15 및 서열번호 16로 구성된 특이 프라이머 쌍이 수용되는 것을 특징으로 하는 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 다중튜브에 포함된 조성물들이 액상 또는 고상 형태인 것을 특징으로 하는 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 동시감별검출 키트가 조류 인플루엔자 바이러스 감염 여부 조사에 사용되는 것을 특징으로 하는 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 동시감별검출 키트가 조류 인플루엔자 진단에 사용되는 것을 특징으로 하는 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 개선된 검출(진단) 정확성(detection accuracy; diagnostic accuracy)을 제공해 줄 수 있는 핵산검사(nucleic acid test) 기반의 조류 인플루엔자 바이러스(avian influenza virus; AIV) 검출 키트에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 조류 인플루엔자 바이러스의 목적 유전자(target gene)에서의 짧은 보존 서열(conserved sequence)로 인한 문제점을 극복할 수 있는 서열번호 1 내지 서열번호 16으로 특징지어지는 특이 프라이머(primer)들이 적용되고, 또한 기존 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 다중유전자증폭(multiplex amplification)에서의 민감도(sensitivity) 저하 및 위음성(false negative) 발생 문제를 회피하기 위하여 8개의 튜브로 구성된 다중튜브(multi-tube) 방식이 적용된 조류 인플루엔자 바이러스 탐색(screening)과 더불어 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스인 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 바이러스 H7형, 및 조류 인

플루엔자 바이러스 H9형을 동시감별검출 할 수 있는 핵산검사 기반의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 조류 인플루엔자는 조류 독감이라고 불리는 전염성 호흡기 질병으로 닭, 칠면조, 오리, 철새 등 여러 종류의 조류들에게서 발병하고 전파속도도 매우 빠르다. 조류 인플루엔자의 원인체(pathogen)는 조류 인플루엔자 바이러스이며, 이 조류 인플루엔자 바이러스는 병원성 정도에 따라 고병원성 조류 인플루엔자(highly pathogenicity avian influenza; HPAI) 바이러스와 저병원성 조류 인플루엔자(low pathogenicity avian influenza; LPAI) 바이러스로 구분된다. 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스는 명칭에서 알 수 있듯이 높은 병원성을 가지고 있는데 이러한 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스에 의한 감염은 전염성과 폐사율이 높아 가축전염병예방법에서는 제1종 가축전염병으로 분류하고 있다. 조류 인플루엔자에 의한 축산분야에서의 피해는 최근 상당히 심각한 실정이다. 이러한 조류 인플루엔자에 의한 피해를 줄이기 위해서는 조류 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 상시 예찰(monitoring) 및 철저한 방역이 필요하다. 이를 위해서는 조류 인플루엔자 바이러스를 용이하게 검출할 수 있는 기술 및 이에 활용될 수 있는 적절한 제품의 개발이 요구된다.
- [0003] 조류 인플루엔자 바이러스는 사람에게도 감염할 수 있어 특히 문제가 된다. 조류 인플루엔자 바이러스는 종(species)에 특이적이기 때문에 일반적으로는 사람에게 감염되지 않는다고 알려져 있으나, 전 세계적으로 조류 인플루엔자 바이러스의 인체감염 사례가 증가하고 있다(조류인플루엔자 인체감염 예방 및 관리지침, 질병관리본부, 발간등록번호 11-1352159-000016-14, 2011년 12월; N Engl J Med 352(4): 333-340, 2005). 이러한 이유로 동물 감염 단계에서부터의 조류 인플루엔자 바이러스 감염에 대한 철저한 예찰, 방역 및 관리가 요구되어진다. 이러한 이유로 인하여서도 조류 인플루엔자 바이러스를 용이하게 검출할 수 있는 기술 및 이에 활용될 수 있는 적절한 제품의 개발이 필요하다.
- [0004] 인플루엔자 바이러스는 A형, B형, 및 C형으로 구분되고, 조류 인플루엔자 바이러스는 인플루엔자 바이러스 A형에 속한다. 인플루엔자 바이러스 A형은 표면의 주요 당단백질 항원인 헤마글루티닌(hemagglutinin; HA)과 뉴라미니다제(neuraminidase; NA)의 구조에 따라 다시 몇 가지의 H형 및 N형으로 분류된다. 조류 인플루엔자 바이러스 중 특별히 동물이나 사람에게 피해 초래가 심각하여 보다 심각하게 관리해야 하는 조류 인플루엔자 바이러스로는 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 바이러스 H7형, 및 조류 인플루엔자 바이러스 H9형이 알려져 있다. 이런 이유로 조류 인플루엔자 바이러스 검출에 있어, 이들 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 바이러스 H7형, 및 조류 인플루엔자 바이러스 H9형을 감별하면서 검출할 수 있다면 보다 바람직하다.
- [0005] 조류 인플루엔자 바이러스를 검출하는 방법으로는 주로 바이러스 자체를 직접 검출하는 항원(antigen) 검사방법이 이용되고 있다. 조류 인플루엔자 바이러스 항원 검사방법으로 가장 대표적인 것이 면역진단을 이용하는 신속 간이 진단 키트를 사용하는 방법이다. 신속 간이 진단 키트를 사용하는 방법은 현장에서 검사를 실시할 수 있고 또한 결과 분석 및 판단에 있어 매우 신속하다는 장점이 있으나, 진단 정확성이 낮다는 단점을 가지고 있다.
- [0006] 이러한 단점을 해결하기 위해 제안된 기술이 핵산검사를 이용하는 방법이다. 이 핵산검사 기반의 방법에서는 먼저 검체로부터 핵산(RNA)을 분리하고, 분리된 핵산을 주형(template)으로 이용하여 역전사 중합효소연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)을 실시한 다음에 얻어진 증폭산물(amplicon)을 분석하여 검체에서의 조류 인플루엔자 바이러스 존재유무를 판단한다. 이 방법은 기존 신속 간이 진단 키트를 사용하는 방법에 비교하여 보다 정확하다는 장점을 가지며, 분석에 소요되는 시간도 1일 이내로 비교적 짧아 기존 신속 간이 진단 키트를 사용하는 방법의 새로운 대체방법으로 주목을 받고 있다.
- [0007] 그런데, 실제의 질병 예찰, 방역 및 관리에 활용하기 위해서는 조류 인플루엔자 바이러스의 검출에 더하여 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 바이러스 H7형, 및 조류 인플루엔자 바이러스 H9형의 동시감별검출도 필요하기 때문에 이를 구현하기 위해서 다중유전자(multiplex) RT-PCR을 일반적으로 사용한다. 다중유전자 RT-PCR은 하나의 튜브에서의 여러 개의 목적 유전자들의 동시증폭을 구현할 수 있는 PCR 방식으로서 다수의 프라이머들을 하나의 튜브에 첨가하여 유전자 증폭을 실시하는 당분야에서는 잘 알려진 방법이다.
- [0008] 그런데, 기존의 조류 인플루엔자 바이러스 동시감별검출에 사용되던 다중유전자 RT-PCR 방법은 다음과 같은 심각한 단점을 갖고 있다. 하나는 조류 인플루엔자 바이러스 각 형(type)의 유전자에 공통으로 존재하는 보존 서열을 기반으로 설계된 프라이머를 사용할 경우에 검출(진단) 민감도와 특이도가 크게 떨어진다는 점이다. 이

는 조류 인플루엔자 바이러스의 경우에 여러 숙주에 감염하면서 유전자 재배열 과정 등으로 인하여 보존적인 서열을 유지하는 구간이 매우 짧기 때문에 발생한다 (BMC Evol Biol 14: 16, 2014; J Virol 86(3): 1750-1757, 2012). 또 하나는 다수의 프라이머들이 사용됨에 따라 프라이머들 간의 상호 간섭 및 경쟁이 초래되어 검출의 민감도와 특이도가 떨어질 뿐만 아니라 위음성 결과까지도 초래된다는 점이다. 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스의 경우에는 보다 정확한 감별검출을 위해서 각각의 H형을 결정짓는 헤마글루티닌 유전자 상의 서로 다른 2가지의 특정 영역에 대한 증폭을 통한 교차 검증을 하는 것이 필요한데, 이를 실시하려고 할 경우에는 앞의 프라이머들 간의 상호 간섭 및 경쟁으로 인한 문제가 일반적으로 수반된다. 즉, 하나의 Segment 상에 4개의 프라이머가 작동하게 되어 이러한 문제가 발생하는 것이다.

[0009] 조류 인플루엔자 바이러스 검출 결과에 따라 대량의 살처분과 같은 후속 작업이 수반된다는 점을 고려할 때 이는 결코 간과되어서는 안 될 문제이고, 또한 이러한 문제를 해결해 줄 수 있는 새로운 기술적 방법 및 이에 적합한 제품의 개발이 필요하다.

[0010] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용은 괄호 내에 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준과 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 이에, 본 발명자들은 기존 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 동시감별검출 목적의 다중유전자 RT-PCR에서의 문제점을 해결하고자 노력한 끝에, 조류 인플루엔자 바이러스의 목적 유전자에서의 짧은 보존 서열로 인한 문제점을 극복할 수 있는 서열번호 1 내지 서열번호 16으로 특징지어지는 특이 프라이머들이 적용되고, 또한 기존 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 다중유전자 RT-PCR에서의 프라이머들 간의 상호 간섭 및 경쟁으로 인한 민감도 저하 및 위음성 발생 문제를 회피하기 위하여 8개의 튜브로 구성된 다중튜브 방식이 적용되어 조류 인플루엔자 바이러스 검출과 더불어 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스인 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 H7형 및 조류 인플루엔자 H9형의 동시감별검출에 유용한 핵산검사 기반의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트를 개발하고, 이 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트가 조류 인플루엔자 바이러스의 검출과 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 바이러스 H7형 및 조류 인플루엔자 바이러스 H9형의 동시감별검출에 매우 효과적이라는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 조류 인플루엔자 바이러스의 목적 유전자에서의 짧은 보존 서열로 인한 문제점을 극복할 수 있어 조류 인플루엔자 바이러스 검출과 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 H7형 및 조류 인플루엔자 H9형의 동시감별검출에 있어 효과적으로 활용될 수 있는 특이 프라이머들을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 조류 인플루엔자 바이러스의 목적 유전자에서의 짧은 보존 서열로 인한 문제점을 극복할 수 있는 특이 프라이머들이 적용되고, 또한 기존 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 다중유전자 RT-PCR에서의 민감도 저하 및 위음성 발생 문제를 회피할 수 있는 다중튜브 방식이 적용되어 조류 인플루엔자 바이러스 검출과 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 H7형 및 조류 인플루엔자 H9형의 동시감별검출에 있어 유용한 핵산검사 기반의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 조류 인플루엔자 바이러스의 목적 유전자에서의 짧은 보존 서열로 인한 문제점을 극복할 수 있는 특이 프라이머들이 적용되고, 또한 기존 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 다중유전자 RT-PCR에서의 민감도 저하 및 위음성 발생 문제를 회피할 수 있는 다중튜브 방식이 적용되어 조류 인플루엔자 바이러스 검출과 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 H7형 및 조류 인플루엔자 H9형의 동시감별검출에 있어 유용한 핵산검사 기반의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검

출 키트를 사용하여 조류 인플루엔자 바이러스 검출과 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 H7형 및 조류 인플루엔자 H9형의 동시감별검출을 실시하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명은 조류 인플루엔자 바이러스의 목적 유전자에서의 짧은 보존 서열로 인한 문제점을 극복할 수 있어 조류 인플루엔자 바이러스 검출과 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 H7형 및 조류 인플루엔자 H9형의 동시감별검출에 있어 효과적으로 활용될 수 있는 특이 프라이머들을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 프라이머들은 조류 인플루엔자 바이러스(보다 정확하게는 인플루엔자 바이러스 A형)에 공통적인 유전자 영역 각 2군데를 증폭하는 데에 사용되는 특이 프라이머 2쌍 (서열번호 1과 서열번호 2로 구성되는 특이 프라이머 쌍, 및 서열번호 3과 서열번호 4로 구성되는 특이 프라이머 쌍), 조류 인플루엔자 바이러스 H5형에 공통적인 유전자 영역 각 2군데를 증폭하는 데에 사용되는 특이 프라이머 2쌍 (서열번호 5과 서열번호 6로 구성되는 특이 프라이머 쌍, 및 서열번호 7과 서열번호 8로 구성되는 특이 프라이머 쌍), 조류 인플루엔자 바이러스 H7형에 공통적인 유전자 영역 각 2군데를 증폭하는 데에 사용되는 특이 프라이머 2쌍 (서열번호 9와 서열번호 10로 구성되는 특이 프라이머 쌍, 및 서열번호 11과 서열번호 12로 구성되는 특이 프라이머 쌍), 및 조류 인플루엔자 바이러스 H9형에 공통적인 유전자 영역 각 2군데를 증폭하는 데에 사용되는 특이 프라이머 2쌍 (서열번호 13과 서열번호 14로 구성되는 특이 프라이머 쌍, 및 서열번호 15와 서열번호 16로 구성되는 특이 프라이머 쌍)이다.
- [0017] 보다 구체적으로는 본 발명의 특이 프라이머들은 조류에 감염되는 모든 조류 인플루엔자 바이러스(인플루엔자 바이러스 A형)의 segment 5-nucleocapsid protein (NP) gene에 공통적으로 존재하는 유전자 단편의 RT-PCR 증폭용 특이 프라이머 쌍(서열번호 1과 서열번호 2로 구성되는 특이 프라이머 쌍)과 모든 조류 인플루엔자 바이러스(인플루엔자 바이러스 A형)의 segment 7matrix protein (M) gene에 공통적으로 존재하는 유전자 단편에 대한 RT-PCR 증폭용 특이 프라이머 쌍(서열번호 3과 서열번호 4로 구성되는 특이 프라이머 쌍)을 비롯하여 조류 인플루엔자 바이러스 H5형의 유전자의 segment 4에 해당하는 헤마글루티닌 각각에 특이적으로 존재하는 각각 2개의 유전자 단편에 대한 RT-PCR 증폭용 특이 프라이머 쌍(서열번호 5와 서열번호 6로 구성되는 특이 프라이머 쌍; 및 서열번호 7과 서열번호 8로 구성되는 특이 프라이머 쌍), 조류 인플루엔자 바이러스 H7형의 유전자의 segment 4에 해당하는 헤마글루티닌 각각에 특이적으로 존재하는 각각 2개의 유전자 단편에 대한 RT-PCR 증폭용 특이 프라이머 쌍(서열번호 9와 서열번호 10로 구성되는 특이 프라이머 쌍; 및 서열번호 11과 서열번호 12로 구성되는 특이 프라이머 쌍), 및 조류 인플루엔자 바이러스 H9형의 유전자의 segment 4에 해당하는 헤마글루티닌 각각에 특이적으로 존재하는 각각 2개의 유전자 단편에 대한 RT-PCR 증폭용 특이 프라이머 쌍(서열번호 13과 서열번호 14로 구성되는 특이 프라이머 쌍; 및 서열번호 15와 서열번호 16로 구성되는 특이 프라이머 쌍)으로 구성된다.
- [0018] 따라서 상기 특이 프라이머들은 조류 인플루엔자 바이러스의 검출에 활용될 수 있을 뿐만 아니라, 이에 더하여 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스인 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 바이러스 H7형, 및 조류 인플루엔자 바이러스 H9형의 단순검출 및 동시감별검출에도 활용될 수 있다.
- [0019] 이들 상기 특이 프라이머들은 특징적으로 프라이머의 5' -말단에 4-5개의 염기가 주형의 프라이밍(priming) 서열에 관계없이 부가되어 있는데, 이 부가된 염기 서열은 이것에 바로 이어지는 실제 프라이밍 서열로 구성된 프라이머 서열의 5' -말단 부위 서열의 역반복 형태이다. 이러한 특이 구조의 도입은 특별한 효과를 제공해 준다. 첫 번째는 상온에서의 비특이 증폭 억제이다. 도입된 특이 구조로 인하여 상온에서는 프라이머가 이합체(프라이머끼리 결합한 것)를 형성하게 되고 이로 인하여 상온에서는 프라이머로 작동할 수 없게 되어 상온에서의 증폭 반응이 억제 되게 된다. 실제 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 RT-PCR에서는 상온에서도 그 온도에 서부터 활성이 조금 있는 효소들의 작용으로 인하여 유전자 증폭이 일어날 수 있고 이러한 유전자 증폭은 특이성이 매우 떨어져 최종적인 PCR의 특이도를 크게 훼손하기 때문에 가급적 억제 되어야 한다. 두 번째는 통상의 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 RT-PCR에서 발견되는 짧은 보존 영역을 기반으로 하여 설계 제작된 프라이머이기 때문에 피할 수 없었던 PCR 증폭산물들과의 약한 결합 문제를 개선시켜 준다. RT-PCR은 역전사 반응 후에 연속하여 PCR이 수행되는데, PCR의 첫 번째 회(round)에서는 RNA를 주형으로 하여 역전사 반응을 통해 합성된 cDNA가 주형이 된다. 그렇지만 그 다음의 회부터는 cDNA에 더불어 PCR을 통하여 새롭게 합성된 PCR 증폭산물들도 PCR의 주형으로 작용한다. 실제 PCR이 진행됨에 따라 cDNA 양보다 이러한 PCR 증폭산물의 양이 훨씬 많게 되어 이러한 PCR 증폭산물들의 주형으로서의 역할이 보다 중요하게 된다. 본 발명에 따른 특이 프라이머를 사용하면 PCR의 두 번째 회부터 특이 프라이머들과 PCR 증폭산물들과의 결합에서 기존 프라이머를 사용했을

때와 비교하여 특이 프라이머에 부가된 염기 수만큼 프라이밍 자리를 추가로 제공해 줄 수 있어 특이 프라이머와 PCR 증폭산물 간의 결합이 일반 프라이머와 일반 프라이머를 사용하여 합성된 PCR 증폭산물 간의 결합에 비교하여 보다 강해진다. 따라서 보다 높은 온도에서의 PCR 수행이 가능하며 이는 보다 엄격한(stringent) PCR 조건을 형성한다. 즉, 본 발명의 특이 프라이머는 특이 프라이머에 도입된 특이 구조로 인하여 짧은 프라이밍 서열에 따른 문제가 개선될 수 있고 PCR 반응의 민감도와 특이도를 개선시켜 줄 수 있다.

[0020] 상기 특이 프라이머들은 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7, 서열번호 8, 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11, 서열번호 12, 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 및 서열번호 16으로 제시된 염기서열로 구성되는 것이 바람직하다.

[0021] 상기 서열번호 1 및 서열번호 2의 특이 프라이머 쌍을 사용했을 때는 225 bp의 특징적 크기의 증폭산물이, 서열번호 3 및 서열번호 4의 특이 프라이머 쌍을 사용했을 때는 378 bp의 특징적 크기의 증폭산물이, 서열번호 5 및 서열번호 6의 특이 프라이머 쌍을 사용했을 때는 311 bp의 특징적 크기의 증폭산물이, 서열번호 7 및 서열번호 8의 특이 프라이머 쌍을 사용했을 때는 563 bp의 특징적 크기의 증폭산물이, 서열번호 9 및 서열번호 10의 특이 프라이머 쌍을 사용했을 때는 329 bp의 특징적 크기의 증폭산물이, 서열번호 11 및 서열번호 12의 특이 프라이머 쌍을 사용했을 때는 628 bp의 특징적 크기의 증폭산물이, 서열번호 13 및 서열번호 14의 특이 프라이머 쌍을 사용했을 때는 252 bp의 특징적 크기의 증폭산물이, 서열번호 15 및 서열번호 16의 특이 프라이머 쌍을 사용했을 때는 498 bp의 특징적 크기의 증폭산물이 생성된다.

[0022] 한편, 조류 인플루엔자 바이러스의 병원성은 헤마글루티닌 단백질과 관련이 있으며 이 헤마글루티닌 단백질 분절부위(cleavage site)는 병원성에 관련된 특정한 유전자 배열을 가진다. 이런 이유로 이 헤마글루티닌 단백질 분절부위에 해당하는 유전자 배열을 조사하여 이를 기준으로 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스 여부를 확진한다. 본 발명의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트에서의 조류 인플루엔자 바이러스 H5형에 대한 증폭산물(서열번호 5 및 서열번호 6으로 구성된 특이 프라이머 쌍을 사용했을 때의 증폭산물과 서열번호 7 및 서열번호 8로 구성된 특이 프라이머 쌍을 사용했을 때의 증폭산물)과 조류 인플루엔자 바이러스 H7형에 대한 증폭산물(서열번호 9 및 서열번호 10으로 구성된 특이 프라이머 쌍을 사용했을 때의 증폭산물과 서열번호 11 및 서열번호 12로 구성된 특이 프라이머 쌍을 사용했을 때의 증폭산물)은 상기한 헤마글루티닌 단백질 분절부위에 해당하는 유전자들의 증폭산물들이므로 이들의 유전자 서열을 조사하면 해당 조류 인플루엔자 바이러스의 고병원성 여부도 확인할 수 있다. 기존 다중유전자 RT-PCR에서는 다수의 증폭산물들이 혼재되어 있어 이들의 유전자 서열 분석을 수행하기 위해서는 증폭산물의 분리 및 정제가 필요하고 이를 위해서는 복잡한 과정이 수행되어야만 했었는데, 본 발명의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트에서는 단일 종의 증폭산물만이 있는 상태에서 증폭산물을 회수하면 되기 때문에 상대적으로 매우 단순한 과정을 통하여 증폭산물을 확보할 수 있어 결과적으로 용이하게 증폭산물의 유전자 서열 분석을 실시할 수 있다.

[0023] 본 발명의 상기 각 특이 프라이머들은 구성염기 서열의 일부가 변경될 수 있다. 이와 같은 변경은 구성염기 서열의 일부결실, 부가, 치환, 또는 이들의 복합적인 것으로 구현될 수 있으나, 이러한 구성염기 서열의 일부 변경은 특이 프라이머들의 주형(cDNA 또는 PCR 증폭산물들)과의 특이적 결합을 훼손할 수 있기 때문에 적용에 있어 상당한 주의를 요한다. 한편, 조류 인플루엔자 바이러스의 경우 여러 숙주를 거치면서 유전자의 재배열을 통한 변이가 매우 활발하기 때문에 주기적으로 최신의 유행하는 조류 인플루엔자 바이러스의 유전자 서열을 탐색하여 특이 프라이머들에 반영하여야 하며, 이에 따라 필요시 특이 프라이머들의 구성염기 서열의 일부 변경이 불가피하다. 이때에는 반드시 특이성을 훼손하지 않는 범위 내에서 실험적으로 조사되어 변경되어야 한다.

[0024] 본 발명은 조류 인플루엔자 바이러스의 목적 유전자에서의 짧은 보존 서열로 인한 문제점을 극복할 수 있는 특이 프라이머들이 적용되고, 또한 기존 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 다중유전자 RT-PCR에서의 민감도 저하 및 위음성 발생 문제를 회피할 수 있는 다중튜브 방식이 적용된 조류 인플루엔자 바이러스 검출과 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 H7형 및 조류 인플루엔자 H9형의 동시감별검출에 있어 유용한 핵산검사 기반의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트를 제공한다.

[0025] 본 발명의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트는 전술한 특이 구조가 도입된 특이 프라이머들이 사용되었을 뿐만 아니라 이에 더하여 기존 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 다중유전자 RT-PCR에서의 민감도 저하 및 위음성 발생 문제를 회피할 수 있게 다중튜브 방식이 적용되어 있다. 하나의 키트에 이러한 다중튜브 방식이 적용되어 있어 사용자는 하나의 키트를 사용하여 한 번의 반응을 통하여 조류

인플루엔자 바이러스 검출과 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 H7형 및 조류 인플루엔자 H9형의 동시감별검출을 수행할 수 있다. 본 발명에 따른 다중튜브 방식은 특이 프라이머 쌍이 구분하여 적용된 8개의 튜브로 구성되는 1개의 스트립(strip) 형태를 지칭한다.

[0026] 본 발명에 따르면 상기 각 튜브에는 특이 프라이머가 구분되어 수용되어 진다. 튜브 1에는 서열번호 1 및 서열번호 2로 구성된 특이 프라이머 쌍이 수용되고, 튜브 2에는 서열번호 3 및 서열번호 4로 구성된 특이 프라이머 쌍이 수용되고, 튜브 3에는 서열번호 5 및 서열번호 6로 구성된 특이 프라이머 쌍이 수용되고, 튜브 4에는 서열번호 7 및 서열번호 8로 구성된 특이 프라이머 쌍이 수용되고, 튜브 5에는 서열번호 9 및 서열번호 10로 구성된 특이 프라이머 쌍이 수용되고, 튜브 6에는 서열번호 11 및 서열번호 12로 구성된 특이 프라이머 쌍이 수용되고, 튜브 7에는 서열번호 13 및 서열번호 14로 구성된 특이 프라이머 쌍이 수용되고, 튜브 8에는 서열번호 15 및 서열번호 16로 구성된 특이 프라이머 쌍이 수용된다.

[0027] 이렇게 특이 프라이머 쌍을 튜브별로 구분하여 수용함으로써 기존 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 다중유전자 RT-PCR에서의 다수의 프라이머들의 프라이머들 간의 상호 간섭 및 경쟁으로 인한 민감도 및 특이도 저하 문제나 위음성 결과 초래 문제가 상당 부분 해소되게 된다. 이에 더하여 본 발명을 따르면 일반 조류 인플루엔자 바이러스 검출 목적에 2군데 특정 진단 영역을 증폭하고, 조류 인플루엔자 바이러스 H5형 검출 목적에 2군데 특정 진단 영역을 증폭하고, 조류 인플루엔자 바이러스 H7형 검출 목적에 2군데 특정 진단 영역을 증폭하고, 조류 인플루엔자 바이러스 H9형 검출 목적에 2군데 특정 진단 영역을 증폭하여 교차 검증이 가능하게 함에도 불구하고 하나의 segment 상에 다수의 프라이머들이 작동하여 초래되던 기존 다중유전자 RT-PCR에서의 문제들을 회피할 수 있다는 장점을 얻을 수 있다. 전술한 바 대로 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스의 경우에는 보다 정확한 감별검출을 위해서 각각의 H형을 결정짓는 헤마글루티닌 유전자 상의 서로 다른 2가지의 진단 영역에 대한 증폭을 통한 교차 검증을 실시하는 것이 필요한데, 본 발명을 따르면 이를 특별한 문제 없이 용이하게 구현할 수 있게 된다.

[0028] 각 튜브에는 특이 프라이머 쌍뿐만 아니라 RT-PCR에 필요한 모든 성분들이 포함된다. 포함되는 성분들로는 이에 국한되지 않지만, 역전사 효소, DNA 중합효소, Tris-HCl, MgCl₂, KCl, dATP, dTTP, dGTP, dCTP, RNase Inhibitor, DTT, 8-MOP 등을 제시할 수 있다. 이들은 적절한 농도 범위에서 포함되어야 하는데, 0.1-10 unit의 역전사 효소, 1-10 unit의 DNA 중합효소, 10-300 mM의 Tris-HCl, 1-50 mM의 MgCl₂, 1-100 mM의 KCl, 1-5 mM의 dATP, 1-5 mM의 dTTP, 1-5 mM의 dGTP, 1-5 mM의 dCTP, 1-10 unit의 RNase Inhibitor, 0.001-0.1 M의 DTT, 0.5-5 μg의 8-MOP을 포함하는 것이 바람직하다.

[0029] 한편, 각 튜브에 첨가된 성분들은 액상 형태로 제조할 수도 있고, 포함 성분들의 자유도를 낮추어 제품의 안정성(stability)을 제고하기 위해 건조된 형태로 제조할 수도 있다. 이러한 건조된 형태의 제조를 위해서는 건조 단계의 적용이 필요하고, 이에 가온건조, 자연건조, 감압건조, 동결건조가 사용되어질 수 있고, 이들의 복합 공정도 사용되어질 수 있다.

[0030] 본 발명은 조류 인플루엔자 바이러스의 목적 유전자에서의 짧은 보존 서열로 인한 문제점을 극복할 수 있는 특이 프라이머들이 적용되고, 또한 기존 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 다중유전자 RT-PCR에서의 민감도 저하 및 위음성 발생 문제를 회피할 수 있는 다중튜브 방식이 적용된 조류 인플루엔자 바이러스 검출과 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 H7형 및 조류 인플루엔자 H9형의 동시감별검출에 있어 유용한 핵산검사 기반의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트를 사용하여 조류 인플루엔자 바이러스 검출과 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 H7형 및 조류 인플루엔자 H9형의 동시감별검출을 실시하는 방법을 제공한다.

[0031] 본 발명의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형을 동시감별검출 방법은

[0032] (1) 검체(시료)로부터 조류 인플루엔자 바이러스 RNA를 추출하는 단계;

[0033] (2) 추출된 상기 RNA를 주형으로 하여 다중튜브 RT-PCR을 실시하는 단계;

[0034] (3) 상기 단계 (2)로부터 얻어진 다중튜브 RT-PCR 산물의 아가로스 젤 전기영동 분석을 통하여 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형을 감별검출 하는 단계를 포함한다.

[0035] 보다 상세히 설명하면, 먼저 검체에서 공지의 방법에 따라 RNA를 추출한 후, 추출된 RNA를 함유한 추출액을 본 발명의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트의 각 튜브들에 첨가한다. 다

음으로, 다중튜브 RT-PCR을 실시한다. 다중튜브 RT-PCR을 실시한 후에 얻어진 산물(반응액)에 대하여 통상적인 방법으로 아가로스 젤 전기영동 분석을 실시하여 증폭산물의 생성 여부 및 그 크기에 근거하여 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 H7형 및 조류 인플루엔자 H9형의 동시감별검출 한다. 판정에 대하여 구체적 설명하면, 1번 튜브 내지는 2번 튜브에 해당하는 225 bp 내지 378 bp 크기의 증폭산물이 관찰되면 이는 조류 인플루엔자 바이러스에 공통적으로 존재하는 유전자로 인한 증폭산물이 확인된 것이므로 검체 내에 조류 인플루엔자 바이러스가 존재한다는 것을 의미한다. 또한 3번 튜브 내지는 4번 튜브에 해당되는 311 bp 내지 563 bp의 크기의 증폭산물이 관찰되면 조류 인플루엔자 바이러스 H5형에 공통적으로 존재하는 유전자로 인한 증폭산물이 확인된 것이므로 검체 내에 조류 인플루엔자 바이러스 H5형이 존재한다는 것을 의미한다. 또한, 5번 튜브 내지는 6번 튜브에 해당되는 329 bp 내지 628 bp의 크기의 증폭산물이 관찰되면 조류 인플루엔자 바이러스 H7형에 공통적으로 존재하는 유전자로 인한 증폭산물이 확인된 것이므로 검체 내에 조류 인플루엔자 바이러스 H7형이 존재한다는 것을 의미한다. 유사하게, 7번 튜브 내지는 8번 튜브에 해당되는 252 bp 내지 498 bp의 크기의 증폭산물이 관찰되면 조류 인플루엔자 바이러스 H9형에 공통적으로 존재하는 유전자로 인한 증폭산물이 확인된 것이므로 검체 내에 조류 인플루엔자 바이러스 H9형이 존재한다는 것을 의미한다. 이와 같이 8개 튜브의 결과를 종합적으로 검토함으로써 검체 내의 조류 인플루엔자 바이러스 유무와 더불어 조류 인플루엔자 바이러스가 조류 인플루엔자 바이러스 H5형인지, 또는 조류 인플루엔자 바이러스 H7형인지, 또는 조류 인플루엔자 바이러스 H9형인지를 감별검출 할 수 있다.

[0036]

본 명세서에서 사용된 “민감도”는 PCR 반응에서 주형 농도에 대한 의존성을 나타내는 것으로 민감도가 개선되었다는 것은 보다 낮은 주형 농도에서도 PCR이 성공적으로 구현됨을 지칭한다. 또한, 본 명세서에 사용된 “특이도”는 목적 유전자에 대한 선택적 증폭 정도를 나타내는 것으로 특이도가 개선되었다는 것은 전체 증폭된 산물 중에 목적하는 특정 증폭이 차지하는 비율이 높아졌음을 지칭한다. 그리고 본 명세서에 사용된 “검출(진단) 정확성”은 진술한 민감도와 특이도 모두에 관련되는 총괄적 의미로 검출(진단) 정확성이 개선되었다는 것은 민감도 또는 특이도가 개선되거나, 또는 이 둘 모두가 개선되는 것을 의미한다.

발명의 효과

[0037]

본 발명은 기존 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 다중유전자 RT-PCR 방법에 비하여 개선된 특이도와 민감도인 한 번의 반응으로 조류 인플루엔자 바이러스를 검출할 수 있게 해 주며, 또한 이에 더하여 질병 관리 및 방역 측면에서 중요한 조류 인플루엔자 바이러스인 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 바이러스 H7형, 및 조류 인플루엔자 바이러스 H9형을 검출 및 동시감별검출 할 수 있게 해 준다. 구체적으로, 본 발명은 조류 인플루엔자 바이러스의 목적 유전자에서의 짧은 보존 서열로 인한 민감도 및 특이도 저하 문제를 개선시켜 주고, 기존 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 다중유전자 RT-PCR에서의 민감도 저하 및 위음성 발생 문제를 회피하면서도 조류 인플루엔자 바이러스를 검출할 수 있게 해 주고 이에 더하여 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 바이러스 H7형 및 조류 인플루엔자 바이러스 H9형을 동시감별검출 할 수 있게 해 준다. 즉, 본 발명은 일반 조류 인플루엔자 바이러스 검출 목적에 2군데 특정 진단 영역을 증폭하고, 조류 인플루엔자 바이러스 H5형 검출 목적에 2군데 특정 진단 영역을 증폭하고, 조류 인플루엔자 바이러스 H7형 검출 목적에 2군데 특정 진단 영역을 증폭하고, 조류 인플루엔자 바이러스 H9형 검출 목적에 2군데 특정 진단 영역을 증폭하여 교차 검증을 가능하게 함에도 불구하고 하나의 segment 상에 다수의 프라이머들이 작동하여 초래되던 기존 다중유전자 RT-PCR에서의 문제들을 회피할 수 있게 하는 장점을 제공한다. 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스의 경우에는 보다 정확한 감별검출을 위해서 각각의 H형을 결정짓는 헤마글루티닌 유전자 상의 서로 다른 2가지의 진단 영역에 대한 증폭을 통한 교차 검증을 실시하는 것이 필요한데, 본 발명을 따르면 이를 특별한 문제 없이 용이하게 구현할 수 있게 된다. 또한 증폭산물에 대한 유전자 서열 분석을 통한 고병원성 조류 인플루엔자 바이러스 확진에도 기존 조류 인플루엔자 바이러스 검출용 다중유전자 RT-PCR에 비교하여 보다 용이하게 활용될 수 있다. 따라서 본 발명의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트는 조류 인플루엔자 바이러스 예찰, 방역 및 관리에 일차적으로 활용될 수 있으며, 조류 인플루엔자 진단용 제품으로도 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038]

도 1은 본 발명에 따른 특이 프라이머로 증폭되는 조류 인플루엔자 바이러스 유전자 부위를 표시한 그림이다.

도 2는 본 발명에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트의 사용방법

을 보여주는 순서도이다.

도 3은 본 발명의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트의 구성을 도식적으로 보여주는 그림이다. 아랫부분의 그림은 각각의 튜브에서의 증폭산물의 크기를 보여주는 것이다.

도 4는 본 발명에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형 및 H9형 동시감별검출 키트의 조류 인플루엔자 바이러스에 대한 검출 민감도를 조사한 결과를 보여주는 전기영동 사진이다. 제시한 logEID₅₀의 값은 실험에 사용한 각각의 바이러스 표준주의 희석 전 농도를 나타낸다. 레인 1은 희석 전 시료를 사용한 경우이며, 레인 2는 레인 1을 10배 희석한 시료를 사용한 경우이며, 레인 3은 레인 2을 10배 희석한 시료를 사용한 경우이며, 레인 4는 레인 3을 10배 희석한 시료를 사용한 경우이며, 레인 5는 레인 4를 10배 희석한 시료를 사용한 경우이며, 레인 6은 레인 5를 10배 희석한 시료를 사용한 경우이다. 또한 레인 N은 음성대조구에 해당하며, 레인 P는 양성대조구에 해당하며, 레인 M은 DNA 마커이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예에 의거하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명하지만, 이들 실시예는 본 발명의 예시일 뿐이며 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출에 유효한 특이 프라이머들의 제작

조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형의 동시감별검출 목적의 RT-PCR에 적합한 특이 프라이머를 표 1과 같이 설계하여 제작하였다. 이들 특이 프라이머들은 조류 인플루엔자 바이러스의 목적 유전자에서의 짧은 보존 서열로 인한 문제점을 극복할 수 있게 프라이밍 서열로 구성되는 프라이머의 5' -말단에 추가의 4-5개의 염기가 부가되어 있는데, 이 추가된 염기서열은 이에 바로 이어지는 프라이머 서열의 5' -말단 일부 서열의 역반복 형태이다. 부가된 염기는 표 1에 제시된 특이 프라이머 서열에서 소문자로 표시하였다.

표 1

증폭 대상 유전자	특이 프라이머 서열번호	특이 프라이머의 염기서열 (5' → 3')	위치 (bp)
조류 인플루엔자 바이러스 segment 5-nucleocapsid protein gene	1	gctcGAGCTCTTGTCTCTGATAGGTG	505-483
	2	ggatATCCCAGTGTGGGAARGAYCCTA	290-313
조류 인플루엔자 바이러스 segment 7-matrix protein gene	3	gttagCTAACCGAGGTCGAAACGTA	10-29
	4	gccagCTGGCAAGTGCACCACTTGA	377-358
조류 인플루엔자 바이러스 H5형의 segment 4-hemagglutinin gene	5	ggcaTGCCTATAAAATGTCAAGAA	832-852
	6	atggCCATACCATCCATCTACCATT	1128-1108
	7	gtgtACACATGCYCARGACATACT	155-174
	8	aragCTYTGRITTYAGTGTGATGTC	699-679
조류 인플루엔자 바이러스 H7형의 segment 4-hemagglutinin gene	9	catagaTCTATGGGAATTCAGAGT	817-834
	10	aaaaTTTTGTAATCTGCAGC	1135-1120
	11	AAAGTAAACACATTAACCTGAAAG	97-119
	12	tgacGTCAATYCTTCCAGATTG	720-703
조류 인플루엔자 바이러스 H9형의 segment 4-hemagglutinin gene	13	tgactAGYCAYGGAAGAACCTGAA	760-779
	14	ggttgCAACCTCCYTCTATGAAYCC	1001-982
	15	agcaTGCTYCACAGARCACAAT	95-114
	16	tgacGTCACACTTGTGTGTGTRTCAG	584-563

표 1의 특이 프라이머의 서열을 나타냄에 있어 IUB 중의성(ambiguity) 코드(code)를 사용했다. 따라서 특이 프라이머 서열에서 A는 아데닌(adenine)을, G는 구아닌(guanine)을, C는 시토신(cytosine)을, T는 티민(thymine)을 나타내고, R은 아데닌과 구아닌 둘 다 가능한 자리를 나타내고, Y는 시토신과 티민 둘 다 가능한 자리를 나타낸다. 이는 본 명세서의 제시한 모든 서열들에 동일하게 적용하였다.

또한, 표 1의 특이 프라이머의 정보를 제시함에 있어 위치는 증폭 대상 유전자에서의 증폭 부위의 위치를 나타

내는 것으로, 서열번호 1과 서열번호 2의 경우에는 조류 인플루엔자 바이러스 segment 5-nucleocapsid protein gene(NCBI accession number: EU735797.1)을 기준으로 나타낸 것이고, 서열번호 3과 서열번호 4의 경우에는 조류 인플루엔자 바이러스 segment 7-matrix protein gene(NCBI accession number: KJ484603.1)을 기준으로 나타낸 것이고, 서열번호 5와 서열번호 6의 경우에는 조류 인플루엔자 바이러스 H5형의 segment 4-hemagglutinin gene(NCBI accession number: CY015089.1)을 기준으로 나타낸 것이고, 서열번호 7과 서열번호 8의 경우에는 조류 인플루엔자 바이러스 H5형의 segment 4-hemagglutinin gene(NCBI accession number: CY015089.1)을 기준으로 나타낸 것이고, 서열번호 9와 서열번호 10의 경우에는 조류 인플루엔자 바이러스 H7형의 segment 4-hemagglutinin gene(NCBI accession number: CY077016.1)을 기준으로 나타낸 것이고, 서열번호 11과 서열번호 12의 경우에는 조류 인플루엔자 바이러스 H7형의 segment 4-hemagglutinin gene(NCBI accession number: CY077016.1)을 기준으로 나타낸 것이고, 서열번호 13과 서열번호 14의 경우에는 조류 인플루엔자 바이러스 H9형의 segment 4-hemagglutinin gene(NCBI accession number: EF154942.1)을 기준으로 나타낸 것이고, 서열번호 15와 서열번호 16의 경우에는 조류 인플루엔자 바이러스 H9형의 segment 4-hemagglutinin gene(NCBI accession number: EF154942.1)을 기준으로 나타낸 것이다.

[0046] **실시예 2: 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트의 제작**

[0047] 실시예 1에서 제작한 특이 프라이머들을 이용하여 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트를 제작하였다. 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트의 스트림을 구성하는 각 튜브에 RT-PCR에 필요한 모든 성분들(3 unit의 역전사 효소, 5 unit의 DNA 중합효소, 50 mM의 Tris-HCl, 25 mM의 MgCl₂, 10 mM의 KCl, 2.5 mM의 dATP, 2.5 mM의 dTTP, 2.5 mM의 dGTP, 2.5 mM의 dCTP, 5 unit의 RNase Inhibitor, 0.01 M의 DTT, 1 µg의 8-MOP)을 첨가한 다음에, 추가하여 튜브 1에는 서열번호 1 및 서열번호 2의 특이 프라이머들을 각각 10 pmole씩 첨가하였고, 튜브 2에는 서열번호 3 및 서열번호 4의 특이 프라이머들을 각각 10 pmole씩 첨가하였고, 튜브 3에는 서열번호 5 및 서열번호 6의 특이 프라이머들을 각각 10 pmole씩 첨가하였고, 튜브 4에는 서열번호 7 및 서열번호 8의 특이 프라이머들을 각각 10 pmole씩 첨가하였고, 튜브 5에는 서열번호 9 및 서열번호 10의 특이 프라이머들을 각각 10 pmole씩 첨가하였고, 튜브 6에는 서열번호 11 및 서열번호 12의 특이 프라이머들을 각각 10 pmole씩 첨가하였고, 튜브 7에는 서열번호 13 및 서열번호 14의 특이 프라이머들을 각각 10 pmole씩 첨가하였고, 튜브 8에는 서열번호 15 및 서열번호 16의 특이 프라이머들을 각각 10 pmole씩 첨가하였다. 그 다음으로는 동결건조하여 건조제형으로 제작하였다. 대조 실험을 위하여 모든 다른 성분들은 같으면서 프라이머만을 특이 구조가 도입되지 않게 제작된 프라이머를 첨가하여 제작한 것도 준비하였다. 이를 본 명세서에서는 대조 키트라 지칭한다.

[0048] **실시예 3: 검체 바이러스주 및 RNA 시료 준비**

[0049] 검체 바이러스주로는 농림축산검역본부에서 보유하고 있는 조류 인플루엔자 바이러스 표준주 및 국내 분리주 등을 사용하였다. 주형으로 사용할 RNA 시료를 준비하기 위한 RNA 추출은 해당 바이러스주 혹은 검체(유체액) 150 µl로부터 Viral Gene-spin™ DNA/RNA Extraction Kit ((주)인트론바이오테크놀로지)를 사용하여 제품사용 설명서에 따라 실시하였다. 이렇게 하여 준비된 RNA 시료는 RT-PCR 반응의 주형으로 사용하였다.

[0050] **실시예 4: 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트의 유효성 조사**

[0051] 본 발명의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트의 유효성을 다음과 같이 조사하였다. 실시예 2에서 제조한 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트의 각 튜브에 실시예 3에서 준비한 RNA 시료(RNA 추출액) 2 µl와 분자생물학 실험용 물 18 µl를 첨가하여 RT-PCR 반응액을 준비하였다. 그 다음으로 RT-PCR 반응액을 이용하여 RT-PCR을 실시하였다. RT-PCR의 첫 번째 단계는 RT-PCR 반응액을 45℃에서 30분간 유지시켜 RNA를 주형으로 하여 cDNA가 합성되게 하였다. 그 다음 단계로는 94℃에서 5분간 유지해 주어 역전사 효소의 활성을 제거시켰다. 그 후 94℃에서 30초, 55℃에서 60초, 72℃에서 60초로 구성된 PCR 주기를 총 40회 반복시키는 방식으로 PCR 반응을 실시하였다. 40회의 PCR 반응이 완료된 후에는 PCR 반응액을 72℃에서 5분간 유지시켜 PCR을 종료하였다.

[0052] 상기와 같은 과정의 수행을 통하여 얻어진 RT-PCR 산물을 사용하여 아가로스 젤 전기영동 분석을 실시하였다.

이를 간략히 설명하면, 핵산 염색 시약인 RedSafe Nucleic Acid Staining Solution(㈜인트론바이오테크놀로지)이 1×의 농도로 포함된 2% 아가로즈 겔에 RT-PCR 산물을 적하(loading)하여 전기영동을 실시하였고, 전기영동이 종료되면 PCR 산물을 분석하여 그 결과를 판독하였다. 그 결과는 도 3에 제시되어 있다. 도 3에 제시된 실험의 경우, 1-4번 튜브는 조류 인플루엔자 바이러스 H5형을 사용하여 준비한 RNA 시료를 주형으로 사용한 경우이고, 5-6번 튜브는 조류 인플루엔자 바이러스 H7형을 사용하여 준비한 RNA 시료를 주형으로 사용한 경우이고, 7-8번 튜브는 조류 인플루엔자 바이러스 H9형을 사용하여 준비한 RNA 시료를 주형으로 사용한 경우이다. 도 3에서 확인할 수 있듯이 본 발명의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트는 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 바이러스 H7형, 및 조류 인플루엔자 바이러스 H9형의 감별검출에 유효하였다.

[0053] 참고로 대조 실험으로 실시한, 특이 구조가 도입되지 않은 프라이머를 첨가하여 제작한 대조 키트를 사용한 경우에는 증폭산물이 확인되지 않거나 증폭산물의 양이 상대적으로 매우 적었다(결과 미제시).

[0054] 실시예 5: 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트의 민감도 측정

[0055] 본 발명에 따라 제작된 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트의 민감도를 다음과 같이 조사하였다.

[0056] 조류 인플루엔자 바이러스 H5형의 경우에는 $\log\text{EID}_{50} = 6.7$ 의 값으로 측정된 표준 바이러스주로부터 추출한 RNA 시료를 십진희석 하여 이를 각각 2 μl 씩 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트의 튜브에 첨가한 다음에 실시예 4의 방법과 유사하게 RT-PCR 및 결과 분석을 실시하여 민감도를 조사하였다. 조류 인플루엔자 바이러스 H7형의 경우에는 $\log\text{EID}_{50} = 7.7$ 의 값으로 측정된 표준 바이러스주로부터 추출한 RNA 시료를 십진희석 하여 이를 각각 2 μl 씩 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트의 튜브에 첨가한 다음에 실시예 4의 방법과 유사하게 RT-PCR 및 결과 분석을 실시하여 민감도를 조사하였다. 조류 인플루엔자 바이러스 H9형의 경우에는 $\log\text{EID}_{50} = 6.8$ 의 값으로 측정된 표준 바이러스주로부터 추출한 RNA 시료를 십진희석 하여 이를 각각 2 μl 씩 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트의 튜브에 첨가한 다음에 실시예 4의 방법과 유사하게 RT-PCR 및 결과 분석을 실시하여 민감도를 조사하였다. 이에 대한 결과는 도 4에 제시되어 있다. 민감도 조사 결과로, 조류 인플루엔자 바이러스 H5형의 경우에는 0.7 $\log\text{EID}_{50}$, 조류 인플루엔자 바이러스 H7형의 경우에는 3.7 $\log\text{EID}_{50}$, 조류 인플루엔자 바이러스 H9형의 경우에는 1.8 $\log\text{EID}_{50}$ 의 민감도가 조사되었다. 참고로 대조 실험으로 실시된, 특이 구조가 도입되지 않은 프라이머를 첨가하여 제작한 대조 키트를 사용한 경우에는 증폭산물이 확인되지 않아 민감도 조사가 불가능하거나 민감도가 상대적으로 매우 높게 나타났다(결과 미제시).

[0057] 상기 결과를 근거로 판단할 때, 본 발명에 따른 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트는 조류 인플루엔자 바이러스 검출과 임상적으로 주요한 조류 인플루엔자 바이러스 H5형, 조류 인플루엔자 H7형 및 조류 인플루엔자 H9형의 동시감별검출에 활용되기에 충분한 정도의 민감도를 제공해 줄 수 있으며 기존의 방식에 비교하여 현저하게 개선된 민감도를 제공해 줄 수 있음을 확인할 수 있다.

[0058] 실시예 6: 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트의 실제 야외 시료에 대한 유효성 조사

[0059] 본 발명의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트의 실제 야외 시료에 대한 유효성을 다음과 같이 조사하였다.

[0060] 실제 야외 시료에 대한 유효성 조사에는 129개의 국내 분리주 시료가 사용되었다. 129개의 국내 분리주는 각각 조류 인플루엔자 바이러스 H5형이 24개, 조류 인플루엔자 바이러스 H7형이 4개, 조류 인플루엔자 바이러스 H9형이 101개로 구성되어 있다. 각각의 야외 시료에 대하여 실시예 3에서와 같이 RNA를 추출하여 RNA 시료를 준비하였고, 이렇게 준비된 RNA 시료 2 μl 씩을 본 발명의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트의 튜브에 첨가하였고(2 반복), 또한 분자생물학 실험용 물 18 μl 를 첨가하여 RT-PCR 반응액을 준비하였다. 그 다음으로 실시예 4에서와 같은 방식으로 RT-PCR 및 아가로즈 겔 전기영동 분석을 실시하였다. 실험 결과는 표 2에 제시하였다.

표 2

[0061]

형	검체 수	양성 판정	음성 판정	검출율 (%)
H5형	24	24	0	100
	24	24	0	
H7형	4	4	0	100
	4	4	0	
H9형	101	101	0	100
	101	101	0	

[0062]

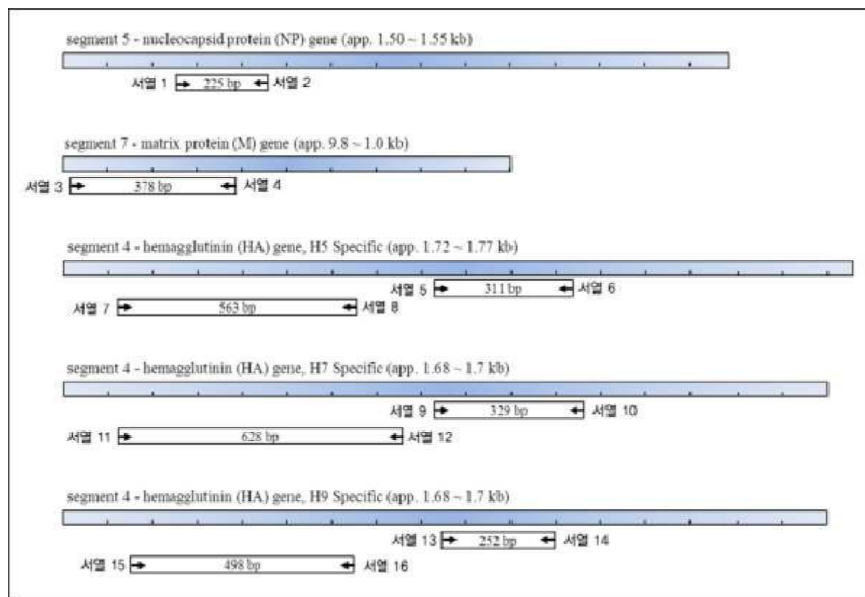
표 2에서 알 수 있듯이 본 발명의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트는 100%의 검출 정확성을 나타내었다. 이 결과로부터 본 발명의 조류 인플루엔자 바이러스 검출 및 H5형, H7형, 및 H9형 동시감별검출 키트는 높은 검출(진단) 정확도를 가지고 있으며, 실제 야의 시료들에도 효과적으로 적용 가능함을 확인할 수 있었다.

[0063]

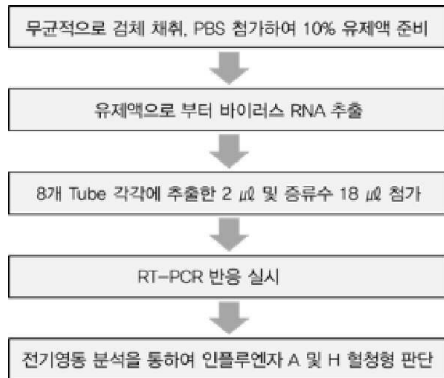
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

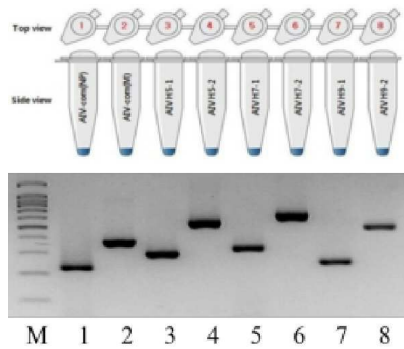
도면1



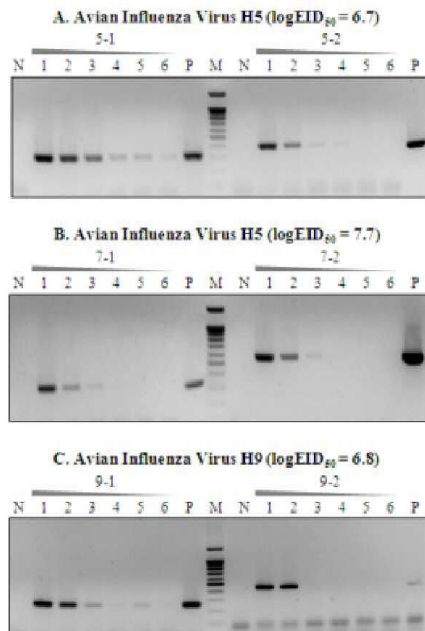
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> iNtRON Biotechnology, Co. Ltd.

<120> Nucleic acid test based avian influenza virus detection kit with

improved detection accuracy	
<130> KP090348	
<160> 16	
<170> KopatentIn 2.0	
<210> 1	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> specific primer sequences	
<400> 1	
gctcgagctc ttgttctctg atagggtg	27
<210> 2	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> specific primer sequences	
<400> 2	
ggatatccca gtgctgggaa rgayccta	28
<210> 3	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> specific primer sequences	
<400> 3	
gttagctaac cgaggtcgaa acgta	25
<210> 4	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> specific primer sequences	
<400> 4	
gccagctggc aagtgcacca gttga	25
<210> 5	

<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	specific primer sequences	
<400>	5	
	ggcatgccta taaaattgtc aagaa	25
<210>	6	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	specific primer sequences	
<400>	6	
	atggccatac catccatcta ccatt	25
<210>	7	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	specific primer sequences	
<400>	7	
	gtgtacacat gcycargaca tact	24
<210>	8	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	specific primer sequences	
<400>	8	
	aragctytgr ttyagtgttg atgtc	25
<210>	9	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	specific primer sequences	
<400>	9	
	catagatcta tgggaattca gagt	24

<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	specific primer sequences	
<400>	10	
aaaattttgt aatctgcagc		20
<210>	11	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	specific primer sequences	
<400>	11	
aaagtaaaca cattaactga aag		23
<210>	12	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	specific primer sequences	
<400>	12	
tgacgtcaat ycttcagat tg		22
<210>	13	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	specific primer sequences	
<400>	13	
tgactagyca yggaagaatc ctgaa		25
<210>	14	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	specific primer sequences	

<400>	14	
ggttgcaacc tccytctatg aaycc		25
<210>		
>	15	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	specific primer sequences	
<400>	15	
agcatgctyc acacagarca caat		24
<210>	16	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	specific primer sequences	
<400>	16	
tgacgtcaca cttgttgtg trtcag		26