



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월08일
(11) 등록번호 10-2128651
(24) 등록일자 2020년06월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/70 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/701 (2013.01)
C12Q 2537/143 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0045118
- (22) 출원일자 2018년04월18일
심사청구일자 2018년04월18일
- (65) 공개번호 10-2019-0121600
- (43) 공개일자 2019년10월28일
- (56) 선행기술조사문헌
Chien 등, J. CLIN. MICROBIOL., Vol. 44, No. 4, 페이지 1295-1304 (2006.04.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
주식회사 코젠바이오텍
서울특별시 금천구 가산디지털1로 168, 씨동 110 1호, 1102호, 1103호, 1109호, 1203호, 1212-1호 (가산동, 우림 라이온스밸리)
- (72) 발명자
남용석
경기도 안양시 동안구 시민대로 327번길 55, 107-2802(평촌 더샵 센트럴시티)
김수복
경기도 광명시 하안로 198, 206-1001(동양아파트 2차)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 신우

전체 청구항 수 : 총 6 항

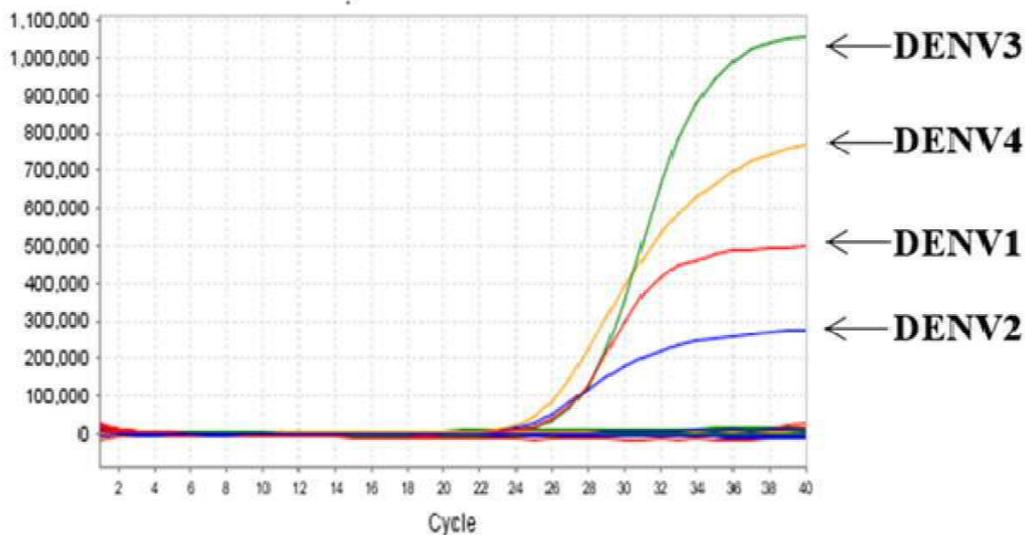
심사관 : 김현태

(54) 발명의 명칭 **다중 실시간 중합효소연쇄반응을 이용한 뎅기 바이러스 혈청형 검출세트 및 검출방법**

(57) 요약

본 발명은 뎅기 바이러스 혈청형 검출세트 및 검출방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 실시간 멀티플렉스 PCR로 4종의 뎅기 바이러스 혈청형을 높은 민감도로 동시에 정확하게 검출할 수 있는 검출세트 및 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



- (52) CPC특허분류
C12Q 2561/113 (2019.08)
C12Q 2563/107 (2013.01)
C12Q 2600/16 (2013.01)

문명진

경기도 의왕시 민백1길 5, 경원빌라 B01호

- (72) 발명자

김진혁

서울 구로구 구로중앙로 134, 101-1007

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711042649

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오. 의료기술개발

연구과제명 Multiplex PCR 을 이용한 모기 매개 바이러스 (황열, 웨스트나일, 치쿤쿠니아 등) 진단 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)코젠바이오텍

연구기간 2017.09.01 ~ 2018.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

(1) 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 땡기 바이러스 타입 1 특이적인 제1프라이머 쌍, 서열번호 3 및 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 땡기 바이러스 타입 1 특이적인 제2프라이머 쌍과 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 땡기 바이러스 타입 1 검출용 프로브;

(2) 서열번호 6 및 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 땡기 바이러스 타입 2 특이적인 프라이머 쌍과 서열번호 8의 염기서열로 이루어진 땡기 바이러스 타입 2 검출용 프로브;

(3) 서열번호 9 및 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 땡기 바이러스 타입 3 특이적인 프라이머 쌍과 서열번호 11의 염기서열로 이루어진 땡기 바이러스 타입 3 검출용 프로브; 및

(4) 서열번호 12 및 서열번호 13의 염기서열로 이루어진 땡기 바이러스 타입 4 특이적인 프라이머 쌍과 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 땡기 바이러스 타입 4 검출용 프로브;

를 포함하는, 다중 실시간 중합효소연쇄반응으로 땡기 바이러스 혈청형을 각각 동시에 검출하기 위한 땡기 바이러스 혈청형 검출세트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프로브의 5'말단과 3'말단은 형광물질로 표지된 것을 특징으로 하는 다중 실시간 중합효소연쇄반응으로 땡기 바이러스 혈청형을 검출하기 위한 땡기 바이러스 혈청형 검출세트.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 프로브의 5'-말단은 JOE, VIC, 헥사클로로-6-카르복시플루오레세인(Hexachloro-6-carboxyfluorescein, HEX), 6-카르복시플루오레세인(6-carboxyfluorescein, FAM), 시아닌-5(Cyanine-5, Cy5) 및 ROX로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광물질로 표지되며, 상기 프로브의 3'-말단은 BHQ(Black hole Quencher)-1, BHQ-2, BHQ-3, TAO 및 MGB로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질로 표지된 것을 특징으로 하는 다중 실시간 중합효소연쇄반응으로 땡기 바이러스 혈청형을 검출하기 위한 땡기 바이러스 혈청형 검출세트.

청구항 4

분리된 시료로부터 추출한 RNA를 제1항의 검출세트를 이용하여 다중 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 산물을 분석하는 단계

를 포함하는, 다중 실시간 중합효소연쇄반응으로 땡기 바이러스 혈청형을 검출하기 위한 땡기 바이러스 혈청형 검출방법.

청구항 5

제1항의 검출세트, 반응완충액 및 데옥시뉴클레오티드(dNTP)를 포함하는 땡기 바이러스 혈청형 검출키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 검출키트는 하나의 반응 용기, 스트립(strip) 또는 마이크로플레이트에 패키징 되는 것을 특징으로 하는 땡기 바이러스 혈청형 검출키트.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 뎅기 바이러스 혈청형 검출세트 및 검출방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 실시간 다중 중합효소연쇄반응을 이용하여 뎅기 바이러스의 4가지 혈청형을 신속 정확하게 검출할 수 있는 검출세트 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뎅기 바이러스는 뎅기열을 일으키는 주 원인으로 5가지의 혈청형(dengue virus 1, 2, 3, 4 그리고 5)이 존재한다. RNA 바이러스로써, 플라비비리대 (Flaviviridae)과 플라비바이러스(flavivirus)속에 속한다. 일반적으로 숲 모기류를 통해 전파되며 그 중 이집트숲모기(*Aedes aegypti*)에 의해 매개되나 흰줄숲모기 (*Aedes albopictus*)에 의해서도 매개되는 걸로 알려졌다. 뎅기 바이러스에 감염이 되면 임상적인 중증도에 따라 뎅기열, 뎅기 출혈열, 뎅기 쇼크 증후군 등으로 진행된다. 이러한 임상적인 중증도에 영향을 주는 인자는 아직 명확하진 않지만 이차 감염, 나이, 바이러스 감염도가 연관이 있다고 보고되었다. 또한, 몇몇 연구에 의하면 특정 혈청형이 감염되었을 때 심한 중증도와 연관이 있다고 보고된 바 있다. 이런 이유로 감염환자에 대한 혈청형 구분 및 복합감염을 확인하는 것이 매우 중요하다. 뎅기 바이러스에 의한 감염은 최근 50년간 30배 이상 증가하였으며, 세계보건기구(WHO)에 의하면 매년 5천만명 이상 감염이 되는 것으로 알려졌다.

[0003] 뎅기 바이러스 감염에 의한 뎅기열은 전 세계적으로 100여 개 이상 국가에서 발생하며, 전 세계 인구 중 약 40%의 인구가 뎅기열 위험에 노출되어 연간 약 5천만~1억 명의 환자가 발생 되는 것으로 추정된다.

[0004] 우리나라는 뎅기열 발생국가에 아니지만, 해외 감염으로 인한 유입이 있다. 최근 3년간 현황을 보면 하계휴가 기간에 급증 되는 것을 알 수 있다. 추정 감염국가는 대부분 동남아시아로 필리핀(42.4%), 태국 86명(14.2%), 인도네시아 84명 (13.9%) 등의 순이다.

[0005] 뎅기열과 같은 모기매개 바이러스 감염병은 진단검사의학적으로 PCR법을 이용한 유전자 검출법을 확진 검사법으로 사용하고 있다. 면역 형광법은 유전자 검출법에 비하여 민감도가 낮기 때문에 확진용 검사법으로 사용하지 않는다.

[0006] 뎅기열이 주로 발생하는 지역들이 열대 및 아열대 지역의 상대적으로 빈곤한 국가들에서 발생하고 있으며 해외 선진국들에서는 국가 내 발병보다는 해당국가에서 감염 후 입국하는 형태이기 때문에 진단법에 대해 연구가 미진하다..

[0007] 뎅기 바이러스는 국내 및 해외에서 상용화된 진단시약이 있지만 임상 검체를 이용한 유효성 검증은 이루어지지 않고 있는 실정이며, 상용화된 대부분의 제품은 미국질병통제예방센터(CDC) 또는 세계보건기구(WHO) 검사법을 기반으로 한 단일 바이러스 검출용 실시간 PCR 키트로 공급되고 있다. 뿐만 아니라 국내에서는 혈청형을 구분하는 실시간 PCR 시스템 키트는 판매되지 않고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 과제는 뎅기 바이러스 4가지 혈청형에 특이적인 프라이머 및 프로브를 포함하는 검출세트를 이용하여 짧은 시간 내에 정확하게 4가지 혈청형을 확인할 수 있는 검출방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기한 과제를 달성하기 위해 본 발명은

[0010] (1) 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 뎅기 바이러스 타입 1 특이적인 제1프라이머 쌍, 서열번호 3 및 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 뎅기 바이러스 타입 1 특이적인 제2프라이머 쌍과 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 뎅기 바이러스 타입 1 검출용 프로브;

[0011] (2) 서열번호 6 및 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 뎅기 바이러스 타입 2 특이적인 프라이머 쌍과 서열번호 8의 염기서열로 이루어진 뎅기 바이러스 타입 2 검출용 프로브;

[0012] (3) 서열번호 9 및 서열번호 10의 염기서열로 이루어진 뎅기 바이러스 타입 3 특이적인 프라이머 쌍과 서열번호 11의 염기서열로 이루어진 뎅기 바이러스 타입 3 검출용 프로브; 및

[0013] (4) 서열번호 12 및 서열번호 13의 염기서열로 이루어진 뎅기 바이러스 타입 4 특이적인 프라이머 쌍과 서열번호

호 14의 염기서열로 이루어진 뎡기 바이러스 타입 4 검출용 프로브;

[0014] 를 포함하는, 다중 실시간 중합효소연쇄반응으로 뎡기 바이러스 혈청형을 검출하기 위한 뎡기 바이러스 혈청형 검출세트를 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은

[0016] 시료로부터 추출한 RNA를 제1항의 검출세트를 이용하여 다중 실시간 중합효소연쇄반응으로 증폭하는 단계; 및

[0017] 상기 증폭 산물을 분석하는 단계

[0018] 를 포함하는, 다중 실시간 중합효소연쇄반응으로 뎡기 바이러스 혈청형을 검출하기 위한 뎡기 바이러스 혈청형 검출방법을 제공한다.

[0019] 또한 본 발명은

[0020] 상기한 검출세트, 반응완충액 및 데옥시뉴클레오티드(dNTP)를 포함하는 뎡기 바이러스 혈청형 검출키트를 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 다중 실시간 중합효소연쇄반응을 통하여 하나의 튜브 내에서 동시에 4가지 혈청형 뎡기 바이러스를 신속하게 검출할 수 있다. 이를 통해 종전의 검사법과는 달리 짧은 시간 내에 뎡기 바이러스의 감염을 정확히 확인할 수 있으며, 또한 혈청형의 구분과 복합 감염 등을 확인할 수 있을 것으로 기대된다. 정확한 뎡기 바이러스 혈청형 검출을 통해 추후 해외 감염 후 국내 유입으로 인한 감염 발생 시 혈청형에 맞춰 효과적인 방역을 진행할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 실시예 1의 프라이머/프로브를 이용하여 실시간 중합효소연쇄반응을 진행한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 실시예 1의 프라이머/프로브를 이용하여 민감도를 비교한 실험 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0024] 본 발명은 4가지 혈청형 뎡기 바이러스에 각각 특이적인 NS5 유전자, 외피 유전자(envelope gene), 캡시드 유전자를 표적 유전자로 하여 PCR을 통해 증폭시키고, 동시에 증폭 산물에 혼성가능하며 검출가능한 수단으로 표지된 프로브를 반응시킴으로써, 다중 실시간 PCR 방법을 통해 4가지 혈청형 뎡기 바이러스를 동시에 검출하는 방법에 관한 것이다.

[0025] 본 발명에서 언급한 실시간 PCR 방법은 thermal cycler와 분광 형광 광도계가 일체화된 장치를 이용하여, 실시간으로 PCR 증폭산물의 생성과정을 모니터링하여 얻고자하는 DNA의 양을 분석하는 방법을 의미한다. 실시간 PCR 방법은 PCR 증폭산물의 확인을 위한 전기영동이 필요 없으며, 증폭이 지수 함수적으로 일어나는 영역에서 증폭 산물량을 비교하여 더욱 정확한 정량이 가능한, 신속성과 정량성이 뛰어난 방법이다.

[0026] 이러한 과정으로 제작한, 본 발명의 뎡기 바이러스 검출 세트의 상세한 사항은 하기 표 1과 같다. 이때, 하기 표 1의 서열번호 1 내지 서열번호 14의 염기서열 중 Y는 C와 T가 혼합되어 있는 것을 의미하고, R은 A와 G가 혼합되어 있는 것을 의미한다.

표 1

프라이머, 프로브 명	프라이머, 프로브 명	염기서열	타겟 유전자
덴기 바이러스 타입 1	DENV 1 F1 (서열번호 1)	5' - GYTTCCTGTGAGCCATTGTGAA- 3'	NS5
	DENV 1 R1 (서열번호 2)	5' - GAAACCCAATACATTTTCATGAGTAGAATT - 3'	
	DENV 1 F2 (서열번호 3)	5' - GATTTAGCAACATTCTRGATGTCATGTT - 3'	
	DENV 1 R2 (서열번호 4)	5' - TACATTTTCATGRGTRGAATTTCTTGAG - 3'	
	DENV 1 probe (FAM, BHQ) (서열번호 5)	5' - ACTGCGYACACAATRTTCTCCTGTTCCACATG - 3'	
덴기 바이러스 타입 2	DENV 2 F1 (서열번호 6)	5' - TGCCAACACAAGGRGAACC - 3'	외피 유전자
	DENV 2 R1 (서열번호 7)	5' - GCRCAGGTCACAATGCCYCC- 3'	
	DENV2 probe(JOE, BHQ) (서열번호 8)	5' - TGGTRGACAGAGGATGGGGRAATGGAT- 3'	
덴기 바이러스 타입 3	DENV 3 F1 (서열번호 9)	5' - CGGGAAAACCGTCTATCAATATGC - 3'	캡시드 유전자
	DENV 3 R1 (서열번호 10)	5' - TGAGAATCTCTTCGCCAACTGTG- 3'	
	DENV3 probe (ROX, BHQ) (서열번호 11)	5' -AACGCGTGAGAAAACCGTGTGTCAACTG- 3'	
덴기 바이러스 타입 4	DENV 4 F1 (서열번호 12)	5' - GGTGAAGAGATTCTCRACYGGACT- 3'	캡시드 유전자
	DENV 4 R1 (서열번호 13)	5' - TGCTGTTGGYGGGATGGAAA - 3'	
	DENV4 probe (cy5 TAO) (서열번호 14)	5' - TCYGGGAAAGGACCCTTACGGATGGTG - 3'	

[0029] 본 발명의 덴기 바이러스 혈청형 검출용 세트 중 프로브의 3' 및 5' 말단에 검출가능한 수단을 포함하거나, 예컨대 표지되어 있을 수 있다.

[0030] 이때, 하나의 PCR 반응물에 동시에 사용하는 덴기 바이러스 혈청형 검출용 세트의 종류에 따라, 각각의 프로브는 서로 상이한 검출가능한 수단으로 표지된다. 상기 검출가능한 수단은 프로브에 연결, 결합, 또는 부착시켜 통상적인 방식으로 밀도, 농도, 양 등을 확인할 수 있는 화합물, 생체 분자 또는 생체 분자 모방체 등을 의미한다. 그 예로, 통상적으로 사용되는 형광 표지인자, 발광물질, 생발광물질, 동위원소 등이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0031] 다른 예로, 형광 표지 인자가 가장 바람직하다. 형광 표지 인자는 현재 시중에 다수 종이 시판되고 있으므로, 용이하게 입수가 가능하다. 형광 표지 인자의 예로는, FAM, VIC, TAMRA, JOE, ROX, NED, HEX, TET, SYBR Green, Cy3, Texas Red, RED610, RED670, Cy5™ 등이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 형광 표지 인자는 종류에 따라 여기 및 방사 과정이 다르며 사용방법 또한 상이하므로, 이를 고려하여 하나의 PCR 반응물에 함께 사용하는 형광 표지 인자는 별개로 검출가능한지 여부를 판단하여 선택 사용하여야 하며, 서로 다른 색상을 사용할 수 있다. 상기 형광 표지 인자에 대한 구체적인 사항 및 선택은 본원 발명에 속하는 기술분야의 당업자들에게 자명한 것이다.

[0032] 일 예로, 형광 표지 인자는 통상의 방법으로 본 발명에 따른 덴기 바이러스 혈청형 검출용 세트에 포함된 프라이머, 또는 프로브에 표지된다. 표지 방법은 인터켈레이팅(interchelating) 방법, TaqMan™ 프로브법 및 분자 비콘(Molecular beacon) 방법들이 있다. 인터켈레이팅 방법은 이중가닥 DNA에 결합하여 형광을 나타내는 시약(inter-chelator: SYBR Green I, EtBr 등)을 PCR 반응에 첨가하여 증폭과 함께 발색하는 형광을 검출하는 방법

으로, 인터칼레이터가 PCR 반응으로 합성된 이중가닥 DNA에 결합하여 형광을 발하며 이 형광강도를 검출하여 증폭산물의 생성량을 측정할 수 있다. TaqMan™ 프로브법은 5'말단을 형광 표지인자(FAM 등)로 3'말단을 quencher 물질(TAMRA 등)로 수식한 올리고뉴클레오티드(TaqMan™ probe)를 PCR 반응액에 첨가하는 방법으로, TaqMan™ 프로브가 어닐링 단계에서 주형 DNA에 특이적으로 혼성화하지만, 프로브상의 형광 억제 물질(quencher)에 의해 형광 발생이 억제되고, 연장 단계에서 Taq DNA 중합효소가 갖는 5'→ 3' 엑소뉴클레아제 활성으로 주형에 혼성화한 TaqMan™ 프로브만 분해되어 형광색소가 프로브에서 유리되므로서 형광 억제 물질(quencher)에 의한 억제가 해제되어 형광을 발하게 된다. 분자 비콘 방법은 양 말단을 형광 표지인자(FAM, TAMRA 등)와 형광 억제 물질(quencher)(DABCYL 등)로 수식한 헤어핀형 이차구조를 만드는 올리고뉴클레오티드 프로브(Molecular Beacon probe)를 PCR 반응액에 첨가하는 방법이다. 분자 비콘 프로브는 유리 상태에서 헤어핀 구조를 취하며 형광 표지인자와 quencher 물질에 근접해 있어 형광발생이 억제되지만, 어닐링 단계에서 주형 DNA와 상보적인 영역에서 특이적으로 혼성화할때 형광 표지인자와 quencher 물질과의 거리가 멀어져 quencher 물질에 의한 억제가 해소됨으로써 프로브상의 형광색소가 형광을 나타내게 된다. 그러나, 혼성화되지 않은 분자 비콘 프로브는 헤어핀 구조를 유지하고 있어 형광을 나타내지 않게 된다.

[0033] 이러한 방법을 본 발명의 뎅기 바이러스를 검출하기 위한 실시간 멀티플렉스 PCR 방법에 적용할 수 있다. 상기한 방법들은 당업계에 공지된 것이므로, 반응 효율, 시간, 형광 표지인자 타입 등을 적절히 고려하여, 특정 방법을 선택할 수 있을 것이다. 본 발명에서는 일 예로, TaqMan™ 프로브 방법을 사용할 수 있다. 이때 상기 프로브는 5'말단이 JOE, VIC, 헥사클로로-6-카르복시플루오레세인(Hexachloro-6-carboxyfluorescein, HEX), 6-카르복시플루오레세인(6-carboxyfluorescein, FAM), 시아닌-5(Cyanine-5, Cy5) 및 ROX로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 형광물질로 표지되며, 상기 프로브의 3'-말단은 BHQ(Black hole Quencher)-1, BHQ-2, BHQ-3, TAO 및 MGB로 이루어진 군으로부터 선택된 1종의 형광 억제 물질(Quencher)로 표지된다.

[0034] 본 발명의 뎅기 바이러스를 검출하는 방법에 있어, 멀티플렉스 실시간 PCR 반응 조건은 통상적인 조건을 취할 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명의 뎅기 바이러스 혈청형 검출용 세트는 통상적인 실시간 PCR 방법 및 장치를 사용하여, 실시할 수 있다. 상기 실시간 PCR 방법은 DNA 중합효소와 형광공명 에너지이동(Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET)의 원리에 의해 PCR의 매 주기마다 실시간으로 시행되는 형광을 검출하고 정량하는 방법이다. 이러한 방법은 특이적인 증폭산물을 비 특이적인 증폭산물로부터 구별하여 확인할 수 있으며, 자동화된 양상으로 분석 결과를 쉽게 입수 할 수 있다.

[0036] 본 발명에 사용가능한 실시간 PCR 기기로는 AB 사의 Real-time PCR 기기 7900, 7500, 7300, Roche 사의 LightCycler®480, Stratagene 사의 Mx3000p, 및 BioRad 사의 Chromo 4 기기 등이 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. PCR 종료시 이러한 실시간 PCR 기기의 레이저는 증폭된 PCR 산물의 프로브에 표지된 형광 표지인자를 감지하여 도 4와 같은 피크를 구현한다. 이에, 전기영동과정없이 기기에 내장된 프로그램을 실행시켜 자동으로 결과를 분석할 수 있다.

[0037] 본 발명의 뎅기 바이러스 혈청형 검출용 세트 및 이를 이용한 뎅기 바이러스 검출 방법에 의해, 기존의 뎅기 바이러스를 식별하기 위한 PCR 과정을 현저하게 단축시킬 수 있을 뿐만 아니라, 그 결과를 실시간으로 신속하게 확인할 수 있다. 이러한 방법은 단일 실시간 중합효소연쇄반응법을 이용한 뎅기 바이러스 검출방법에 비해 민감도가 향상된다.

[0038] 최근 다양한 모기매개 바이러스의 유입이 되고 있다. 그러나 모든 바이러스에 대한 백신이 존재하지 않는다. 결과적으로 가장 효율적인 방제대책은 바이러스의 유입을 최대한 봉쇄하는 것이며, 발생시에는 해당 바이러스에 대한 정확한 진단을 기반으로 바이러스의 전파를 차단하는 것이다. 본 발명은 유사 증상을 보이는 뎅기 바이러스의 혈청형을 다중 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용하여 혈청형을 정확하게 구별할 수 있어 정확한 바이러스 감염경로 유추 및 전파차단에 도움을 줄 수 있다. 이로 인해 뎅기 바이러스 유입시 피해를 최소화하고 다중 실시간 중합효소연쇄반응 기술을 통해 단시간 내에 복수의 타겟에 대한 결과를 확인할 수 있어 뎅기 바이러스 검사에 필요한 인적, 물적 자원의 효율적인 사용이 가능하다.

[0039] 또한, 본 발명은 상기한 검출 세트를 포함하는, 뎅기 바이러스 혈청형 검출용 키트를 제공한다. 상기 프라이머 쌍 및 프로브는 하나의 반응 용기, 스트립 또는 마이크로플레이트에 패키징될 수 있으며, 당업계에 공지된 방법으로 패키징된다. 또한, 본 발명의 키트는 텍 중합효소(Taq polymerase), MgCl₂를 포함한 반응 완충액, dNTP 및 안정화제(stabilizer)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 더 포함할 수 있으며, 그 외에도 당업계에 공

지된 다른 시약, 예컨대 실시간 PCR용 마스터 믹스를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0041] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0043] **실시예 1**

[0044] **1-1. 프라이머 및 프로브**

[0045] NCBI 염기서열 데이터베이스에서 뎡기 바이러스 타입 1, 2, 3, 4에 대한 genomic sequence를 검색 후 alignment 진행하여 각각 3000개(뎡기 바이러스 타입 1), 2965개(뎡기 바이러스 타입 2), 2813개(뎡기 바이러스 타입 3) 그리고 610개(뎡기 바이러스 타입 4)의 서열 DB를 확보하였다.

[0046] 공통서열(Conserved region)을 이용하여 프라이머·프로브를 디자인했으며, 올리고머의 염기서열은 상기 표 1과 같다.

[0047] 디자인한 프로브의 검출률은 수집한 전체 서열 DB에 대해 각각 뎡기 바이러스 타입 1은 95.6% 뎡기 바이러스 타입 2는 96.5%, 뎡기 바이러스 타입 3은 98.9%, 뎡기 바이러스 타입 4는 93%의 검출율을 보였다.

[0048] 뎡기 바이러스 혈청 진단을 위한 다중 실시간 중합효소연쇄반응법 반응액의 제조 방법과 반응 온도 조건은 아래 표 2 및 표 3과 같이 사용하였다.

표 2

[0049]

타겟	이름	프라이머 / 프로브 사용농도 (nM)
뎡기 바이러스 1	DENV 1 F1	250
	DENV 1 F2	250
	DENV 1 R1	250
	DENV 1 R2	250
	DENV 1 probe (FAM, BHQ)	200
뎡기 바이러스 2	DENV2 F1	400
	DENV2 R1	400
	DENV2 probe(JOE, BHQ)	300
뎡기 바이러스 3	DENV3 F1	250
	DENV3 R1	250
	DENV3 probe (ROX, BHQ)	200
뎡기 바이러스 4	DENV4 F1	400
	DENV4 R1	400
	DENV4 probe (cy5 TAO)	300

표 3

[0051]

온도 (°C=)	시간	Cycle
50	30 min	1
95	10 min	1
95	15 sec	40
60	1 min	

[0052] 실시간 중합효소연쇄반응의 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1을 참조하면, 본 발명에 따른 뎡기 바이러스 특이적인 프라이머와 프로브를 조합하여 사용시 하나의 튜브내에서 동시에 4가지 혈청형 뎡기 바이러스를 구분하여 검출할 수 있다.

[0053] **1-2. 특이도 확인**

[0054] 본 발명의 다중 실시간 중합효소연쇄반응 기술을 이용한 뎡기 바이러스 검출키트를 이용하여 아래 표 4의 뎡기 바이러스 gRNA 를 포함한 다양한 종류의 gDNA로 특이도를 측정하였다. 측정 결과 각각의 뎡기 바이러스 gRNA 에서만 선택적으로 증폭되는 것을 확인하였다.

표 4

[0055]

종	이름	검출여부
플라비바이러스속	땡기 바이러스 타입 1	+
	땡기 바이러스 타입 2	+
	땡기 바이러스 타입 3	+
	땡기 바이러스 타입 4	+
	황열 바이러스	-
	진드기 매개 뇌염 바이러스	-
	일본 뇌염 바이러스	-
	웨스트 나일 바이러스	-
	치쿤군야 바이러스	-
박테리아	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
	<i>Vibrio vulnificus</i>	-
	<i>Campylobacter jejuni</i>	-
	<i>Salmonella</i> Dublin	-
	<i>Salmonella</i> Heidelberg	-
	<i>Salmonella</i> typhimurium	-
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	-
	<i>Bacillus cereus</i>	-
	<i>Shigella flexneri</i>	-
	<i>Shigella boydii</i>	-
	<i>Clostridium perfringens</i>	-
	<i>Bacillus subtilis</i>	-
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	-
	<i>E. coli</i> O157	-
	<i>E coli</i> ST	-
	<i>E coli</i> VT	-
	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Arizonae</i>	-
	<i>Salmonella bongori</i>	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	
다른 종	소	-
	양	-
	말	-
	염소	-
	오리	-
	닭	-
	사람	-

[0057]

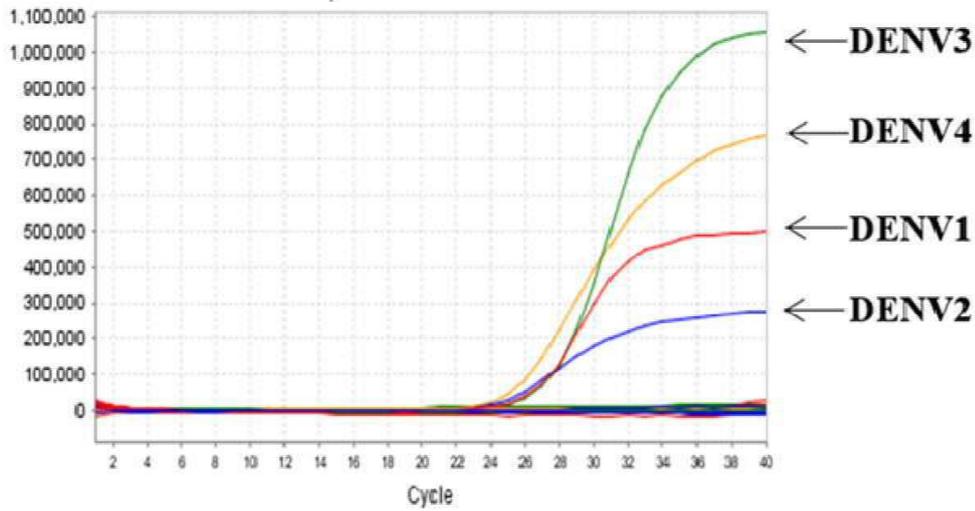
1-3. 민감도 시험결과

[0058]

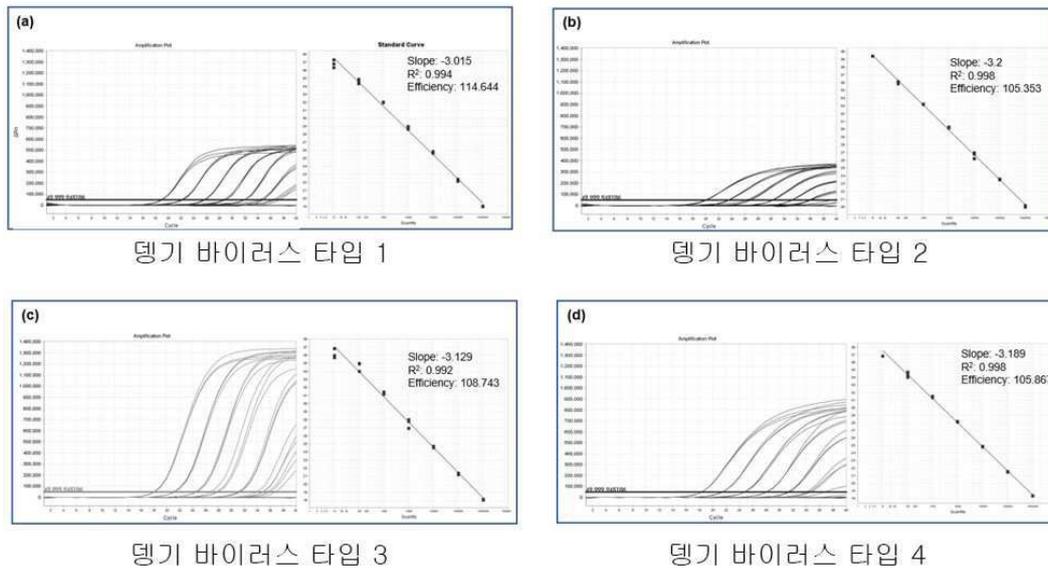
다중 실시간 중합효소연쇄반응 기술을 이용한 땡기 바이러스 혈청형 검출키트의 분석적 민감도를 확인하였다. 10^7 copy/reaction으로 정량 되어있는 각 시료를 10배씩 단계 희석하여 10^1 copy/reaction 까지 희석 후 3반복으로 테스트하였다. 실험결과 땡기 바이러스 타입 1과 타입 3은 10 copies /rxn, 땡기 바이러스 타입 2와 타입 4는 100 copies/rxn까지 검출 가능한 것을 확인하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

도면

도면1



도면2



서열목록

- <110> KOGENE BIOTECH CO. LTD
- <120> DETECTION SET FOR DENGUE VIRUS SEROTYPES USING MULTIPLEX REAL-TIME PCR AND DETECTION METHOD THEREOF
- <130> DP180022
- <160> 14
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Dengue virus type 1 specific forward primer DENV1F1
 <400> 1
 gytctctgtg agccattgtg aa 22
 <210> 2
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Dengue virus type 1 specific reverse primer DENV1R1
 <400> 2
 gaaaccaat acatttcattg agtagaatt 29
 <210> 3
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Dengue virus type 1 specific forward primer DENV1F2
 <400> 3
 gatttagcaa cattctrgat gtcattgtt 28
 <210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Dengue virus type 1 specific reverse primer DENV1R2

 <400> 4
 tacatttcatt grtgrgaatt tcttgag 27
 <210> 5
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Dengue virus type 1 specific probe DENV1 probe

<400> 5
actgcygaca caatrtttcc tgttccacat g 31

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Dengue virus type 2 specific forward primer DENV2F1
<400> 6
tgcccaaacac aaggrgaacc 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Dengue virus type 2 specific reverse primer DENV2R1
<400> 7
gcrcaagtca caatgcccycc 20

<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Dengue virus type 2 specific probe DENV2 probe
<400> 8
tggtgacag aggatggggr aatggat 27

<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Dengue virus type 3 specific forward primer DENV3F1
<400> 9
cgggaaaacc gtctatcaat atgc 24

<210> 10
<211> 23
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dengue virus type 3 specific reverse primer DENV3R1

<400> 10

tgagaatctc ttcgccaact gtg 23

<210> 11

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dengue virus type 3 specific probe DENV3 probe

<400> 11

aacgcgtgag aaaccgtgtg tcaactg 27

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dengue virus type 4 specific forward primer DENV4F1

<400> 12

ggtgaagaga ttctcracyg gact 24

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dengue virus type 4 specific reverse primer DENV4R1

<400> 13

tgctgttgyy gggatgaaa 20

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dengue virus type 4 specific probe DENV4 probe

<400> 14

tcygggaaag gacccttacg gatggtg 27

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 4

【변경전】

시료로부터

【변경후】

분리된 시료로부터