(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.[7]
C12Q 1/68

(11) 공개번호 특2003-0087784
(43) 공개일자 2003년11월15일

(21) 출원번호 10-2002-0025686
(22) 출원일자 2002년05월09일

(71) 출원인 (주)메디제네스
서울특별시 강남구 수서동 713-6 수서현대벤쳐빌 1822호

(72) 발명자 이상엽
대전광역시유성구전민동464-1엑스포아파트212-702

장경희
서울특별시마포구동교동165-8LG펠리스1109호

유승민
서울특별시구로구구로본동452-19

금기창
서울특별시양천구신정동삼성아파트101동402호

유내춘
서울특별시서대문구연희3동45-24현대빌라다동101호

유원민
서울특별시성북구동소문동3가48

유소영
대전광역시유성구어은동99번지한빛아파트137동708호

박선영
대전광역시유성구어은동103-1번지301호

이진
경기도용인시수지읍상현동동일스위트아파트263동101호

김준명
서울특별시서초구반포2동한신3차아파트34-1101

(74) 대리인 손민
이세진
김성남

심사청구 : 없음

(54) 감염 질환 원인균 검출용 DNA 칩

요약

본 발명은 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii)* 균의 고유한 유전자 서열 부분을 탐침으로 선발하여, 유리기판 위에 집적, 임상 검체와 혼성화 함으로써 감염 질환의 원인균을 신속히 검출하고 동정하여 정확하고 신속한 진단 및 치료가 이루어지기 위한 새로운 진단법인 DNA 칩에 관한 것이다.

대표도

도 2

색인어

모르가넬라 모르가니(Morganella morganii)균, 탐침, DNA 칩

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 균의 특이적인 부분을 탐침으로 부착하여 제작된 DNA 칩의 개략도이다.

도 2는 비대칭중합효소연쇄반응 산물과 유리기판 위의 탐침과의 혼성화 정도에 대한 검사 결과이다. 즉, 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii)* 균의 23S rRNA와 ITS부분을 증폭한 부분에 대한 DNA 칩이다(Se- S.epidermidis , Spy-S. pyrogenes, Bur- Burkholderia, Vcho-Vibrio cholera, Citf-Citrobacter freundii, Hin-H.influenza, Kpneu-K.pneumoniae, Styp-Salmonella spp., Vvul-Vibrio vulnif icus, Eco-E.coli, Svi-S.viridans, Sflex-S.flexneri, Sm-Strentrophomonas maltophila, Pa-P.aeroginosa, Pm-Proteus mirabilis, Ah-Aeromonas hydrophila, Nm-Nesseria meningitidis, Strepp-S.pneumoniae, Saur-S.aureus, Lm-Listeria monocytogenes, Ente-Enterobacter, Efcium-Enterococcus faecium).

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 감염 질환 원인균 동정용 DNA 칩에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 감염 질환 원인균인 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii)* 균의 특이적인 부분을 탐침으로 부착하여 제작한 DNA 칩에 관한 것이다.

감염 질환은 세균, 진균, 바이러스와 같은 다양한 미생물이 혈액, 체액 및 인체의 조직 내에 출현하여 서식하기 시작하면서 발병하는 질환으로서, 균의 정확한 동정 및 적절한 치료가 이루어지지 않을 경우, 인명을 잃을 수 있는 질병이다. 더욱이 최근에는 항생제의 투여의 오남용으로 인해 세균의 배양률이 감소하게 되었고, 이식에 따른 면역 억제제 사용의 증가, 항암 치료로 인한 약물투여의 증가, AIDS의 증가로 인한 원인 균주가 다양해지게 되면서 배양 검사와 같은 기존의 감염질환을 진단하는 진단 방법들이 점차 어려움이 부딪치고 있는 실정이다.

Proteeae 류에는 *Proteus* , *Morganella* , *Providentia* 의 세가지 균주가 있다. 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii)* 는 주로 요로 감염을 일으키는데, 병원성 요로 감염의 포발적 감염의 흔한 원인균으로, 30일 이상 카테터를 유지하는 경우에 자주 발생한다. 이러한 경우 카테터 내에는 생물막(biofilm)이 형성되고 카테터 내에 가피가 생겨서 카테터가 자주 폐쇄된다. 또한 요로 결석의 형성과 스트루바이트(struvite) 방광으로 인하여 요로계의 감염이 성립된다. 이러한 결석은 요로 감염이 재발되는 주된 원인으로 작용할 수 있으며, 요로계의 폐쇄와 관련이 있다. 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii)* 는 요로 감염 외에도 장기 수용 시설에서 감염을 일으키는 주된 균주이다. 또한, 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii)* 는 그밖에도 창상 감염, 당뇨병성 괴양을 포함한 연부 조직 감염, 화상 창상 감염, 폐렴, 호흡기 관련 폐렴, 혈관 내 장치 감염, 복강 내 감염 등을 일으키는 원인균이다. 균혈증도 드물지만 일으킬 수 있으며, 요로 감염과 동반되어 나타날 수 있다 (참조: Braunwald et al., Harrison's Principles of Internal Medicine, Vol. 1, 15th ed. 2001, p. 959).

최근에는 병원성 감염이 사회적으로 크게 부각되고 있는데, 그 빈도가 점차 증가하고 있고 의료계에서 법적인 문제가 되기 시작한 병원 감염은 조기 진단과 합병증 없는 신속한 치료가 중요하기 때문에 이러한 균주들에 대한 정확하고 신속한 진단법의 개발은 시대가 요구하는 의료 기술이다. 병원성 감염 질환의 중요한 원인균으로써 그람 음성균 중 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii)* 를 들 수 있는데 모르가넬라 모르가니 (*Morganella morganii)* 는 특히 원내 요로 감염을 흔히 일으킨다. 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii)* 는 병원성 요로 감염 환자, 특히 장기

간 요도관을 이용한 환자에 있어서 가장 흔히 발견되었으나 (참조: Warren J.W. et al., *J. Infect. Dis.* , 155, 1151-1158, (1987)), 최근에는 내성이 점차 증가하고 있어서 빠른 진단에 따른 올바른 항생제 치료가 매우 중요하다. 치료를 실패하면 여러 가지 이차적인 합병증이 생기는데, 신우신염, 균혈증, 패혈증, 요로 폐쇄, 요로 결석, 만성 신장 감염, 신부전, 나아가 방광암까지도 발생할 수 있다.

상술한 바와 같이, 특정균의 경우 인체에 매우 치명적이고 중한 질환을 야기시키기 때문에 이를 조속히 진단함과 동시에 원인균의 종류를 확인하는 것이 치료에 있어서 상당히 중요한 위치를 차지한다. 이와 같은 필요성으로 인해 오랫동안 감염질환 원인균을 동정하고자 하는 진단 방법들이 연구 및 개발되어 왔다.

첫째로, 미생물학적 방법인 도말 및 배양 검사가 있다. 적절한 감별 배지를 선택하여 배양하여 균의 종류를 동정하는 방법이다. 미생물 동정을 위한 자동화 배양 기기도 등장하였는데 자동화 혈액 배양기(VITAL Automated System for Blood Culture), ATB 자동화 동정기(ATB Automated Identification System), 마이크로스켄(MicroScan) 전자동 세균검사 시스템이 그것이다.

1) 자동화 혈액 배양기(VITAL Automated System for Blood Culture)

호기성 Vital AER 배지(O_2 + CO_2 mixture) 또는 혐기성 Vital ANA 배지(N_2 + CO_2 mixture)에 환자의 혈액을 각각 2-5 ㎖를 주입한 다음 VITAL 자동화 혈액 배양기에서 배양하면 매 15분 간격으로 측정하여 미생물의 배양 여부를 알 수 있다. VITAL 자동화 혈액배양기의 원리는 형광물질인 H.F.T. (Homogeneous Fluorescence Technology)를 혼합한 배양액에 혈액을 접종하면 미생물 성장의 대사과정에서 CO_2 생성, pH 변화, 배지의 산화환원 전위차(Oxydo-reductant potential)변화 등으로 형광물질인 H.F.T가 감소된다. 매 15분 간격으로 배양병에 555nm 파장의 빛(Excitation light)을 배양액에 조사하면 미생물의 성장에 따라 감소된 형광인 H.F.T의 600nm의 파장을 Kinetic방법으로 측정하여 미생물의 배양 여부를 자동으로 감지한다.

2) ATB 자동화 동정기 (ATB Automated Identification System)

ATB 자동화 동정기는 미생물의 동정과 약제 감수성 검사를 자동으로 처리하는 기기이며 하드웨어(hardware), 소프트웨어(software), 소모품의 3부분으로 구성된다. 하드웨어(Hardware)를 구성하는 요소로는 덴시토미터(Densitometer), 오토메틱 리더(Automatic reader), 컴퓨터, 프린터, 전자 피펫(Electronic pipette)가 있다. 덴시토미터는 스트립에 분주하는 미생물 부유액의 탁도를 표준화한다. 오토메틱 리더는 검체 스트립을 판독하는 분석 모듈로서 익스프레션(Expression)이라 부르며 비색(colorimetric)방법 및 터빈페로메트릭(turbinephelometric)방법으로 측정한다. 비색측정은 빛의 투과도로 각 cupule의 반응색을 측정하는 것이며 터빈페로메트릭 법은 세균 성장에 따라 투과광 양이 달라지므로 30 ° 각도로 산란되는 산란광을 측정하는 원리를 이용한 것이다. 컴퓨터는 프로그램, 자료 입력, 자료 검색, 저장 등의 소프트웨어를 수행한다. 전자 피펫은 지정된 양의 세균 부유액을 strip의 cupule에 분주한다. 스트립은 동정과정에 사용한다. 그람 양성균 부유액은 현탁배지(Suspension medium)를 사용하고, 그람음성균은 0.85% NaCl 배지를 사용한다. 환자의 검체를 블로드 아가(Blood agar), P 아가(P agar), 만니톨 염 아가(Manitol salt agar), Baird Parker 또는 맥콩키 배지(MacConkey medium) 등의 배지에 접종하여 배양한다. 동정하고자 하는 병원성 콜로니를 여러 개 선택하여 현탁배지에 부유시킨다. 스트립의 판독은 스트립의 '0'열에 해당하는 시험항목에 반응시약을 1방울씩 가하여 5분 후에 판독하고 10분이 초과하면 안된다. ATB 시스템인 컴퓨터와 연결된 리더를 이용하여 스트립 큐플(strip cupule)의 반응색을 판독한다.

3) 마이크로스캔 전자동 세균검사 시스템

마이크로스캔 전자동 세균검사 시스템은 미생물의 동정과 항생제 감수성 검사를 동시에 전자동으로 처리하여 결과를 출력하는 전자동 세균 검사 기기이다. 마이크로스캔은 마이크로스캔 패널을 프로세스할 수 있는 수에 따라 WalkAway-40과 WalkAway-96으로 구분하지만 기능은 동일하다. 시스템은 리더, 컴퓨터, 바코드 프린터, 리포트 프린터, 리녹(Renok), 소모품 등으로 구성된다. 미생물 배양을 위한 항온장치, 패널을 장착하는 8개의 타워, 패널의 바 코드를 인식하는 리더, 패널에 시약 분주하는 디스펜서(dispenser), 반응을 측정하는 텅스텐-할로겐 램프, fiber-optics, photodiode 등의 광학장치로 구성되어 있으며 컴퓨터와 접속되어 있다. 측정에 사용하는 파장은 405, 440, 505, 560, 590, 620nm의 파장을 사용한다. 패널에 균액을 접종한 후 바코드를 부착하여 장착하면 배양시간 관리, 패널에 시약을 적하하여 각 웰의 반응을 비색법, 비탁법 또는 형광법으로 판독하여 동정 결과를 컴퓨터에 자동적으로 입력한다. 40/96 웰의 마이크로타이터 패널(microtiter panel)을 미생물 동정에 사용하며, 패널의 구분은 상업적/크로모제닉 패널(conventional/chromogenic panels), 신속 크로모제닉 패널(rapid chromogenic panels), 신속 플로로제닉 패널(rapid fluorogenic panels) 등이 있다. 상업적 크로모제닉 패널은 미생물 동정시간이 18 내지 24시간이며, 신속 크로모제닉 패널은 미생물 동정시간이 4시간이며, 신속 플로로제닉 패널은 그람양성 및 그람음성 미생물 동정시간이 2시간이지만 약제 감수성을 동시에 하는 콤보 패널을 사용하며 3시 간에서 7시간이 필요하며 일부 그람 양성균에서는 15시간이 소요된다.

이와 같은 선택배지를 통한 미생물의 배양을 통하여 진단을 할 수는 있으나 현재 임상 진단에서 사용되고 있는 배양 방법을 통한 진단율은 매우 낮다. 예를 들어 패혈증 환자에서 혈액 배양으로 세균을 검출할 확률은 50% 이하이다 (참조: Novis D.A. et al., Arch Pathol. Lab. Med., 125, 1290-1294, (2001)). 감염성 심내막염의 경우 2.5 - 31%가 혈액 배양 진단 결과가 음성으로 판정되고, 심내막염 환자가 수술 후에 감염된 판막에서도 배양의 결과가 음성으로 판정되는 경우가 흔히 발생하고 있다 (참조: Schled W.M. et al., Principles and Practive of Infectious Diseases. 3rd ed. New York; Churchill Livingstone, 670-706, 1990). 혈액뿐만 아니라, 뇌막염, 심낭염, 복막염, 늑막염, 관절염 등의 체액에서도 역시 배양 진단의 정확성이 현저하게 떨어지기 때문에 조기 치료를 통한 질병의 호전 가능성이 지극히 낮은 실정이다. 특히, 혐기성 세균은 호기성 세균과는 달리, 검체가 공기와 접하게 되면 균주가 생존을 못하기 때문에 검체를 채취하는 방법과 운송에 있어서 많은 어려움이 있고, 증식 속도가 느리고, 배양시 혐기성 환경을 제공하는 어려움이 있어 세균의 동정율이 매우 낮다 (참조: Finegold S.M. et al., A Clinical Guide to Anaerobic Infections. Belmont, Calif., Star, (1992)). 또한 그람 음성 호기성 간균 중에서 *Pseudomonas spp.* 와 *Enterobactericeae spp.* 를 제외한 균들은 특수한 배지를 요구하기 때문에 일반 배양 검사에서 진단되는 것이 거의 불가능하다. 이들 균주는 성장 속도가 느리고, 배양 조건도 까다로워서 배양에 실패하는 경우가 많은 단점을 가지고 있다 (참조: Holmes B. et al., Manual of Clinical Microbiology 6th ed. Washington, DC.: American Society of Microbiology, 499-508, (1995)).

둘째로, 면역혈청학적 검사가 임상에서 사용되고 있는데 대표적인 면역혈청학적검사법은 세균응집검사, 보체결합시험, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(radioimmunoassay), 면역형광측정법(immunofluorescent test), 면역블롯(Immunoblot) 등이 있으나 일반적으로는 ELISA 검사법이 가장 많이 이용되고 있다. 이들은 즉 항원 · 항체간의 면역반응을 이용하여 검사하는 방법이라고 할 수 있다. 면역혈청학에 쓰이는 방법을 소개하자면 다음과 같다.

1) Anti-Streptolysin-O Test

Streptolysin O는 group A hemolytic straptococci가 생산하는 hemolytic factor로 β-Hemolytic streptococci 감염 확인, Rheumatic fever나 post-streptococcal glomerulonephritis진단, Joint pain이 있는 환자의 rheumatic fever와 rheumatoid arthritis 감별 등에 유용하다. Group A streptococci가 생성하는 균체외 성분에 대한 항체 중 현재 실시되고 있는 검사종목으로서는 ASO(antistreptolysin O), ASK(antideoxyribonuclease B), antideoxyribonuclease (ADNase), AH(antihyaluronidae) 등이다. 이것은 Lance field 분류의 C군, Grns 중 일부가 생성하는 균체 외 성분과도 반응한다. 용혈성 연쇄상구균 그 자체에 대한 항체로서는 A군 특이성 다당체에 대한 항체(antistreptococcal polyliposaccharide, ASP)가 있다. 용혈성 연쇄상구균 일차감염증으로써 편도선 염, 인두염, 피부화농증, 성홍열과 속발성으로서 rheumatic fever, acute nephritis를 의심하는 경우에 검사가 요구된다. 항생제 치료중에는 반응이 억제되고 lipoprotein level이 올라가 있을 때에는 false positive를 볼 수 있다. 건강 보균자(Carrer)도 때에 따라서는 titer가 높을 때가 있다.

2) 항-마이코플라즈마 항체(Anti-Mycoplasma Antibody)

마이코플라스마 감염 확인검사로 실시된다. 약 200여종의 마이코플라스마 중에서 사람에게 특히 중요한 것은 마이코플라스마 퓨모니에(*Mycoplasma pneumoniae)* 이며 이것은 사람에게 급성의 상기도 및 하기도염을 일으키는 질환으로서 발열이나 객담을 그다지 동반하지 않는 심한 기침을 한다. 주로 성인이나 어린이에게 감염이 많고 노인(60세 이상)에게는 이환율이 낮은 질병이다. 마이코플라스마는 pleuropneumonia like organism(PPLO)이라고도 불리운다. 발병 직후는 항체수치가 상승되지 않지만 발병 2-3주 후의 항체수치가 4배이상 상승하면 확진이 된다. 완전 고정 테스트(Complement fixation test)는 감염 초기에 나타나는 IgM 계열 항체와 감염후 수개월 동안 지속되는 IgG 계열 항체의 두 가지를 측정한다. 발병 후 7-10일부터 항체가 상승하여 3-4주만에 피크가 되고 이후부터는 낮아지지만 몇 개월간은 어느 정도 높은 항체가 지속된다. 타닌산 처리 민감성 sensitized red cell를 사용한 PHA반응은 IgM class antibody를 주로 측정한다.

3) Cold Agglutinins

Primary atypical pneumonia의 확인 및 cold agglutinin disease와 lymphoreticular malignancy의 분별과 대비 목적으로 검사한다. 원래는 cold agglutinin에 의한 anemia 등의 chronic cold agglutinin disease 질환 진단에 응용되지만 빈도로 보아 *Mycoplasma* 감염증을 의심할 때 검사하는 수가 많다. 이외 바이러스성 호흡기 감염증이나 비만질환, 기관지염에서도 증가되는 수가 있으므로 이러한 질환의 활동성 평가 지표의 하나로 사용된다.

Cold agglutinin은 RBC(Red blood cell) membrane antigen에 대한 auto antibody이며 막 항원에는 몇 가지 알려져 있지만 중요한 것은 I/i계이다. Mycoplasma 항원은 적혈구 I 항원과 교차반응성을 가져서 감염증 때 한냉응집소가가 상승한다. *Mycoplasma pneumoniae* 감염으로 발병후 1주부터 상승하기 시작하여 2-3주에 peak에 달하고 이후 차츰 낮아져 4-6주에는 음성화된다. 그러므로 감염초기 1-2주에 감염 여부를 판정하는 데 보조가 된다.

상 승 원 인
>32배(-256배): Mycoplasma infection(회복기 증례에서는 경과 관찰을 한다) (55% of primary atypical pneumonia) 비만성 기관지염, lymphoreticular malignancy Cold agglutinin monoclonal antibody: Chronic cold agglutinin disease, lymphocytic malignant tumor, Cold agglutinin polylclonal antibody: Mycopl;asma infection, 비만성 범세기관지염성, 만성 기도감염질환, infectious disease, gangrene, congenital syphilis, cirrhosis, old age at temperature 0-10℃.

4) Anti-Epstein Barr Virus(anti EBV) Antibodies

Anti-Epstein-Bar virus antibody 검사는 heterophile negative(monospot test)인 infectious mononucleosis의 감별 및 EBV의 antibody 상태(lymphoproliferative processes인 immunosuppressed patient에서)를 위하여 검사한다.

5) Amoebiasis antibody(Entamoeba histolytica antibody, Serum)

장관내 기생원충 이질 아메바 질환의 원인인 *E. histolytica* 의 항체를 검출하기 위한 검사법이다. 통상적인 분별검사로는 cysts나 trophozoites를 검출하여 확인되지만 현미경적 음성검사는 확인이 안 된다. 즉 다른 검사법으로 장관 이외 기생원충을 확인 검사하여야 한다. Liver abscess는 장관 이외의 감염이어서 통상적인 분별검사로는 확인이 안 된다.즉 혈청학적 검사로 진단이 이루어진다. 검사법은 indirect hemagglutination 또는 latex agglutination 및counterimmunoelectrophoresis법으로 실시한다.

6) Aspergillus Antibodies, Serum

Immuno-diffusion법으로 *Aspergillus* organism (*A. Flavus, A. Fumigatus, A. niger*)의 antibody를 검출하는 검사이다. 또 allergic bronchospasm으로 면역결핍증 환자에게 치명적일 수 있다. *Aspergillus* 감염은 cronchopulmonary disease, endophthamitis, kidney, heart, brain 및 bone disease와 연결된다. normal person은 negative이다. Serum 중에는 1-4개의 precipitin band가 존재한다. 강한 band는 심한 aspergillosis 감염때 나타나고 약한 band는 hypersensitivity pneumonitis의 초기를 암시한다.

7) Menigitis Antigen, Bacterial

Counter immunoelectrophoresis로 CSF, urine, serum 중의 specific antigen (*Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae* type B)를 검출하는 검사이다. 즉 meningitis의 etiologic agents를 CSF, urine, serum, pleural fluid 혹은 joint fluid로 실시한다. 대개는 CSF와 urine이 추천된다. 정상인은 negative이다. 양성결과는 *S. pneumoniae* , *N. meningitidis* , *H. influenza* , 및 *streptococci* group B의 3개월 이내 소아 감염을 EMt한다. 이 방법은 Antimicrobial therapy의 영향을 받지만 culture 보다는 양호한 편이다. 검체의 오염은 감사결과에 영향을 끼치므로 무균적 검체 취급이 요구된다.

8) *Candida* Antibody, Serum

Candida albicans 는 인체 상재균 saprophytic yeast로서 생체의 저항성이 약해지면 병원성을 나타낸다. Candidiasis는 대개 제한적으로 skin이나 mucosa에만 감염되는데 전신감염으로 발전되면 치명적인 질병이다. Candidiasis는 흔히 antibacterial, antimetabolic, corticosteroid therapy 및 immunologic defects나 pregnancy, obesity, diabetes, delibitating disease 등에 감수성이 높다. 어린이에서는 oral candidiasis가 benign이지만 어른에서는 acquired immunodeficiency syndrome의 첫 증상일 수 있다. Candidiasis의 진단은 culture나 histopathology 검사로 진단되지만 그렇지 못할 때는 candidida antibody로 전신적 candidiasis의 진단에 도움이 될 수 있다. 그러나 serological systemic candidiasis의 진단은 신빙성이 낮다는 의견도 있다. 이 검사는 정상인에서도 20-25%에서 양성반응이 되므로 신중한 판단을 하여야 한다.

9) Cryptococcus Antigen, Serum or CSF

Cryptococcus antigen은 serum이나 CSF 중의 항원을 latex agglutination법으로 검출하는 검사법이다. *Cryptococcus neopormans* 는 yeast like fungus로서 심한 감염증에서는 열과 두통, 현지증, 운동실조, 졸음과 기침증상이 나타난다. 중추신경으로 침범되어 치료를 게을리하면 치명적일 수 있다. 그러나 Meningitis가 아닌 환자에서도 30%의 양성 반응을 나타낸다.

10) Cytomegalovirus Antibody Screen, Serum

Cytomegalovirus antibody의 존재는 과거 CMV의 감염을 나타낸다. 수혈이나 조직이식에 문제가 되며 검사법으로서 passive hemagglutination, latex agglutination, enzyme immunoassay 및 indirect immunofluorescence법이 이용된다. Complement fixation test는 다른 검사에 비하여 60%의 감도가 있어 screening test로는 이용이 안 된다. 이 검사법은 정성 검사이며 1:5배의 혈청으로 과거의 감염 여부를 검사하는 것이다. 정량검사는 희석률을 세밀히 하여 CMV의 acute infection 여부를 탐지한다.

11) STS, TPHA amp; FTA-Abs

매독 검사와 이의 종합적 평가를 위하여 실시된다. 매독의 혈청학적 반응은 크게 나누어 지질항원과 매독 treponema 항원으로 구분된다. 지질항원에 의한 방법은 일반적으로 STS라고 하고, VDRL(microscopic clumpint), RPR(macroscopic clumping), carbon RPR 등의 방법이 있다. 매독 treponema 항원은 여러 가지 방법의 명칭이 있어 TPHA, FTA-Abs 등이 이 부류에 속한다. 매독반응은 매독에 이환되었을 때 산생되는 항체를 검출하는 검사법이고 매독 항원인 treponema를 검출하는 방법은 아니다. 검출되는 항체는 cardiolipin이라는 지질 항원과 반응하는 항체이고 매독에 반응성은 높지만 이와 유사한 항원성분이 있으면 false positive가 될 수 있다. 한편 TPHA에서 검출되는 항체와 FTA-Abs에서 검출되는 항체는 같은 것이 아닐 수 있다.

12) Toxoplasmosis

Toxoplasma gondii 원충에 의해 발병되는 감염증으로서 세계 각지에 널리 퍼져 있다. 임신부의 congenital toxoplasmosis 감염 여부의 감별과 위험 에방, immunodeficiency case에서 toxoplasmosis의 진단, congenital toxoplasmosis 진단 및 acquired toxoplasmosis 진단 등에 유용하다.

13) *Chlamydia*

Chlamydia infection 검출목적으로 시행되는데, 결막염, 상기도염, 폐렴, 요도염 등 각과 영역에 걸쳐 관계되어 신속한 진단이 절실히 요구된다. 병원체는 *Chlamydia psittaci* (CP)와 *Chlamydia trachomatis* (CT)의 두 가지이지만 새로운 Chlamydia가 규명되고 있다고 한다. 주로 남자의 요도염, 부고환염, CT생식기 감염증의 남자 상대 여성, 난관염, PID, 신생아 결막염, 성인 결막염, trachoma, 성병성 림프육아종이 의심되는 환자, β-lactum제 무효 기도 감염증(조류와의 접촉 경력으로 생기는 psittacosis)에서 검사된다. 검출할 수 있는 진단법으로는 직접 검출법과 혈청학적 진단법으로 나눌 수 있다.

가) 직접 검출법

A. 형광항체법

a) Cultureset: Chlamydia족 특이성 monoclonal antibody를 사용하여 CT, CP, TWAR의 방법으로 모두 검출된다. 채취에서 한 시간 이내에 결과를 얻는데 종의 감별은 불가능하다.

b) Micro track: CT만을 선택적으로 검출할 수가 있고 약 30분이내에 결과를 얻는다. 그러나 Staphylococcus aureus와의 교차반응이 보고되고 있어 유의하여야 한다.

c) Chlamydia TWAR: monoclonal antibody TWAR만을 선택적으로 검출한다.

B. 효소항체법

Chlamydia족 특이항체를 이용한 항원검출법으로서 다수의 검체를 처리할 수가 있는데 측정시간이 4시간이 걸린다.

C. DNA hybridization

나) 혈청학적 진단법

사람의 질병에서는 병소에서 CP를 항유한 검체를 얻기 어렵고 CT감염증에서도 항균제 치료후 CT의 세균학적 검출이 어렵다. 따라서 진단은 혈청학적 진단방법에 의뢰하는 수 밖에 특별한 방도가 없다.

A. Complement fixation reaction(보체결합법): 족 특이성의 검사법이다. 그러므로 CP, CT 감염증의 감별은 안 된다. 형광항체법이나 효소항체법에 비하여 감도가 낮아 high titer를 나타내는 *Chlamydia psittaci* 병, 서혜림프육아종(CP에서는 32배 이상, 서혜림프육종에서는 64배 이상이 많다)에는 유효하지만, CT TWAR 감염증에서는 진단상 어려움이 있다. 간격 채혈한 검체에서 4배 이상의 항체가 상승, 혹은 일반적으로 16배 희석에서의 항체가는 CP, CT 감염증을 의심하게 한다.

B. Fluorescent method: *Chlamydia* 증식 cycle에서의 기본소체(elementary body)라고 부르는 감염성, 비증식성의 소체를 항원으로 하여 종 특이성을 갖는다. 이 항원은 CT serum형 특이성 항원이므로 MIF에 의한 항체가, 항체의 Ig class별과 같이 CT 혈청형 특이성을 알 수 있다.

C. Microplate immunofluorescence antibody technique: 종특이성 검사법인데 항원에 대한 반응성의 강약에 따라 CP인지의 감별이 가능하다. 현재 TWAR감염증에도 응용이 검토되고 있다.

D. 효소 항체법: 종특이성의 검사법으로서 다수의 검체를 처리할 수 있는 잇점이 있다.

14) Febrile Agglutination Tests (Widal 및 Weil-Felix 반응)

Salmonella 질환은 항원 검출인 균을 검출하는 것이 우선이며 제1주에는 blood culture, 제2주에는 blood 및 stool, urine culture, 제3주에는 urine 및 stool 중에 검출되는 점을 생각하여야 한다. serological agglutination test는 발병 초, 2주 이후 3주에 계속 응집 titre를 검사한다. *Typhoid* 균은 O, H 및 Vi 항원이 사용된다. 진단적 의의는 간격을 두어 중복 측정검체에 대한 역가 상승을 관찰한다. O항원은 단일 혈청검체는 1:80 내지 160배 이상에서, Vi 항원은 20배 이상에서(para-A 및 para-B는 각기 80배 이상) 역가를 일단 양성으로 판단한다(Widal test for salmonella). 비특이적인 것이지만 이제까지 rickettsia성 질환의 serological 시험에서 널리 사용되고 있는 것은 Weil-Felix 반응이 있다. 발진티프스의 진단으로 이용하며 항원으로서 *proteus* 균(OX-19, OX-K, OX-2)을 사용한 응집반응인데 일반검사로 간단하여 널리 사용한다. 쓰쓰가무시병 등에도 이 진단법이 응용된다.

셋째로, 분자학적 검사가 제안되고 있다. 현재까지 질병 진단을 위해 가장 많이 사용된 실험실 적 방법은 단백질을 이용한 것이었다. 최근 분자생물학의 발달로 각종 단백질이 cloning되어 그 염기배열이 밝혀짐에 따라, DNA나 RNA를 이용한 질환의 진단이 가능하게 되었다. 임상에서 활발히 사용되는 대표적인 예로써 수백 종류가 밝혀져 있는 암유전자(oncogene) 뿐 아니라, 암 억제유전자 (suppressor genes), 약제내성유전자(Drug resistant gene), 각종 감염증 검사(infectious disease), 유전질환 검사(genetic disease), 친자감별검사(Paternity test), 법의학적검사(forensic medicine) 등에 널리 이용되고 있으며, 향후 그 범위는 유전자치료까지 진행될 것으로 보인다. 이러한 유전자분석을 임상진단에 이용하는 것은 의학계에 획기적인 전기를 마련할 것이다. 여기서는 유전자분석에 가장 많이 이용되는 southern blot방법과 PCR(polymerase chain reaction)을 간단히 소개하고 이 방법으로 활용할 수 있는 검사항목을 소개하고자 한다.

1) Southern blot 방법을 이용한 진단

가) DNA 증폭 또는 재구성의 검색

DNA를 추출하여 제한효소로 절단한 후, 전기영동을 하고 nylon filter로 transfer하여 검출하고자 하는 부위를 가진 probe로 hybridization을 한다. 얻어진 band의 강도와 크기로 증폭과 재구성을 결정한다.

나) RFLPs를 사용한 검색

DNA를 제한효소로 절단하면 특정 DNA marker에 상당하는 단편의 길이가 개개인에 따라서 다를 경우가 있으며, 이것을 Restriction Fragment Length Polymorphi는(RFLPs)라고 부르고 있다. 이것을 southern blot법으로 분석하였을 때 대립유전자가 다른 크기의 band을 나타내는 것을 이형접합체(heterozygote)라고 한다. 정상세포는 이형집합체를 나타내는데, 종양세포를 동형접합체(homozygote)를 나타내는 경우를 이형접합체의 소실(loss of heterozygosity, LOH)이라고 한다. 이러한 원리를 이용하여 여러 가지 찾고자 하는 유전자를 검색할 수 있다.

2) PCR 법을 이용한 진단

PCR은 1985년 P.K. Saiki 등에 의해 염색체 DNA의 β-globin유전자의 염기배열을 primer로 이용하여 특정 영역을 효소적으로 증폭하여, 유전병인 겸상적혈구를 진단하는 새로운 방법으로 처음 보고되었다. PCR의 기본원리는 목적하는 유전자의 양끝에 해당하는 1쌍의 primer를 유전자에 접합시킨 뒤 DNA 중합효소로 두 primers사이를 합성하고 합성된 DNA는 다시 같은 두 primer의 반복되는 접합과 중합효소에 의한 합성으로 기하급수적으로 증폭하는 것이다. 그 반복횟수에 따라 특정 DNA를 2^n 만큼 증폭시킬 수 있어 10^5-10^9 까지 증폭된 DNA를 얻을 수 있다. 이는 감염 원인균의 유전자를 검체에서 분리하여 증폭한 후 염기서열 분석을 통하여 균의 존재 및 종류를 규명하는 방법으로 적절하게 사용될 수 있다. PCR법을 이용하면 검체중의 분석하려는 DNA 영역을 수 십만 배로 증폭 할 수 있으므로 분석의 감도를 높일 수 있으며, 극미량의 검체로 분석이 가능하다. 이러한 특징을 이용하여 미생물 감염증의 진단 세균, 바이러스 유전자 검색을 행하는데, 진단 PCR에 이용하는 종류로는 PCR (Polymerase Chain Reaction), Hot-start PCR, Nested PCR, Multiplex PCR, DOP (Degenerate Oligonucleotide Primer) PCR, RT-PCR (Reverse Transcriptiase PCR), Quantitative RT-PCR, FISH (Fluorescent In Situ Hybridization), In Situ PCR 등이 있다. 이는 감염 원인균의 유전자를 검체에서 분리하여 증폭한 후 염기서열 분석을 통하여 균의 존재 및 종류를 규명하는 방법으로서, 이는 소량의 DNA를 증폭시켜 검출하므로 균주의 배양 과정을 거치지 않고 검체에 존재하는 소량의 병원균 혹은 균의 유전자의 존재만으로도 동정이 가능하다는 장점이 있다. 이러한 PCR에 의한 검출방법은 증폭시키는 표적 유전자의 선택이 매우 중요한데, 일반적으로 16S rRNA와 23S rRNA, 내부전사지역(Internal Transcribed Spacer Region : 이하 ITS라 한다)이 이용되고 있다(참조 : P. Wattiau et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 56, 816-819, 2001, D, A. Stahlm et al., *J. Bacterial* ., 172, 116-124, 1990, Boddinghaus. B. et al., *J. Clin., Microbiol* ., 28, 1751-1759, 1990, T. Rogall et al., *J. Gen. Microbiol* ., 136, 1915-1920, 1990, and T. Rogall, et al., *Int'l J. Syste m* . *Bacteriol* ., 40, 323-330, 1990, K. Rantakokko-Jalava et al, *J. Clin., Mirobiol* ., 38(1), 32-39, 2000, H.Y. Park et al, *J. Clin., Mirobiol* ., 38(11), 4080-4085, 2000, A. Schmalenberger et al, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* , 67(8), 3557-3563, 2001). 그러나, 16S rRNA는 다형성이 적어서 종을 구별하지 못하는 균종이 있다는 단점이 있다.

넷째로, 올리고뉴클레오티드 프로브의 혼성화(Hybridization)에 의한 동정 방법이 있다. 혼성화 반응(Hybridization)이란 한 가닥으로 된 핵산이 이와 상보적인 염기 서열의 또 다른 한 가닥의 핵산과 적당한 조건에서 만나게 되면 이중 나선을 형성하는 현상이다.

최근 (주)에스제이하이테크에서 인체 병원성 혐기성 세균의 유전형감별을 위해 균의 특이적인 탐침을 선발하여, 그것을 바탕으로 DNA 칩을 이용한 균 동정 시스템을 개발하였다. 그러나, 이 연구에서는 세균 중에서 일부의 혐기성 세균들에 국한하여 진단법을 개발하였으며, 임상적으로 중하고 시급한 질환이 아닌 여드름과 같은 질환을 야기시키는 균들을 포함하여 선정하였다 (참조: 2000년도 벤처 및 중 소기업 기술개발사업 최종보고서, 보건복지부 HMP-00-VN-01-31400-0034, 2000). 따라서, 본 발명에서 제기한 균들을 동정하기 위한 시스템의 필요성이 절실히 요구된다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명에서는 균 동정 및 감염 여부를 진단하는 종래의 방법의 문제점을 고려하여 간단하면서도 정확도와 효율성 높은 방법을 제공하고자 한다.

본 발명에서 제기한 균은 현재 임상적으로는 균 배양의 방법을 이용하여 동정되어지고 있다. 그러나, 앞에서 설명한 바와 같이 각 균들은 배양조건이 각기 다르고 까다로울 뿐만 아니라, 배양시간도 오래 걸리고 검사하는 데도 많은 시간이 소요되기 때문에 촉각을 다투는 병의 진단방법으로서는 매우 부적절하다.

따라서, 감염 질환의 원인균을 보다 간단하면서도 신속, 정확하게 진단하는 방법을 개발하고자 예의 연구를 노력한 바, 박테리아의 유전자를 이용하여 원인균의 감염여부 및 종류를 초기에 진단하는 DNA칩을 만드는데 성공하였고, 실제 진단에 사용하여 검사의 3가지 조건인 간편성, 신속성, 정확성을 모두 충족함을 확인한 후 본 발명을 완성하였다. 즉, 본 발명의 목적은 균에 특이적인 염기 서열 부위를 동정용 탐침으로 제공함으로써 검체 내에 세균이 존재하는지 여부와 함께 임상적으로 중요한 혐기성 세균 및 몇몇 그람음성균을 정확하게 동정하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

DNA 칩은 분자생물학적 방법으로서, 단 하나의 염기의 차이도 구별할 수 있 을 만큼 매우 정밀한 기술방법이다. 이로 인해 한 종내에서도 아종의 구별이 가능하므로 질병 진단과 균주 동정에 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 까다로운 동정과정을 거치지 않고도 신속하고 정확한 균주 동정이 가능하다. 이와 같은 DNA chip의 장점은 시간을 다투는 질환을 진단하는 방법으로서 매우 적합하다. 그러므로, 균주를 동정하기 위해서 신속하고 정확하게 진단할 수 있는 방법으로서 DNA chip 개발은 절실히 필요하다. 따라서, 본 발명의 감염질환 동정용 DNA chip 개발은 질병을 조기에 진

단하는 방법뿐만 아니라 종류를 밝힘으로써 효율적인 치료 처방을 신속하게 할 수 있는 방법을 제시할 수 있다.

본 발명에서는 DNA 칩의 장점들을 살려서 다음과 같은 조건을 만족하는 감염질환 원인균 동정용 DNA 칩을 발명하였다.

첫째, 고체 기판 위에 고정화시킨 균의 특이적인 유전자와 표준균주로부터 추출한 균의 유전자사이의 결합 정도를 가지고 감염 여부를 확인함으로써 검사 결과의 높은 정확성을 추구하였다.

둘째, 여러 검체를 동시에 진단할 수 있기에 진단 시간과 비용을 크게 절감함으로써 신속성을 추구하였다.

셋째, 전문적인 기술을 요하지 않는 간단한 절차를 통해 검사가 이루어지도록 하여 간편성을 추구하였다.

본 발명에서는 감염 질환의 특정 원인균의 특이적인 유전자를 소형의 고체 기판 위에 동시에 집적한 DNA 칩을 제공함으로써 보다 정확한 진단을 가능하게 하였고, 또한 고체 기판 위에 최대수의 DNA를 집적함과 동시에 많은 수의 검체를 동 시에 검사함으로써 최소의 비용과 시간을 투자하여 결과를 분석할 수 있도록 하였다.

기존에 동정하지 않았던 균을 포함하여 임상적으로 중요한 균주의 동정이 동시에 가능하도록 하기 위해 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii)* 균의 ITS와 23S rRNA 염기서열로부터 탐침을 디자인하였다. 23S rRNA는 16S rRNA와 비교해 볼 때, 상대적으로 긴 염기 서열을 가지고 있고, 염기 서열이 잘 보존되어 있는 부분과 각 균만이 특이적으로 가지고 있는 부분들이 고루 분포되어 있기에 모든 균의 23S rRNA를 한쌍의 프라이머로 증폭시킬 수 있는 공통 프라이머와 각 균에 특이적인 탐침을 제작할 수 있는 선택의 폭이 훨씬 넓다. 또한 ITS 부분은 균간의 염기 서열이 너무나 다양하여 탐침에 사용하기에는 매우 용이하다 (참조 : V. Gurtler et al, 3-16, 1996).

이에 따라, 본 발명에서는 임상적으로 중요하면서 아직 염기 서열이 밝혀지지 않은 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii)* 균의 23S rRNA와 ITS 염기 서열을 밝히고, 이들을 이용하여 균종의 구별이 가능한 탐침을 디자인하였다.

탐침을 얻는 방법은 크게 두 가지가 있다. 첫째, 단일가닥의 탐침을 얻는 방법이다. 가장 대표적인 예로서 자동 화학합성기에서 DMT(dimethoxytrityl) off 방식에 의해 합성하여 탈보호 반응을 시행한 후, 원하는 수의 염기로 이루어진 탐침을 합성할 수 있다. 이렇게 제작된 탐침은 합성시 한 쪽 가닥 말단에 FITC와 같은 형광물질을 부착하여 특정 핵산의 존재유무를 확인할 수 있다. 다른 방법으로는 단일가닥의 DNA를 주형으로 하여 그와 상보적인 염기서열을 가지는 탐침을 만드 는 방법으로, 주형의 DNA에 프라이머를 교잡시키고, 그 프라이머로부터 Klenow 효소와 형광물질이 부착된 염기(dNTP)를 사용하여 탐침을 합성하게 된다. 이는 DNA 내부에 형광물질이 부착하게 되므로, 높은 민감도 및 특이성을 갖는 탐침을 합성할 수 있다. 둘째로, 이중가닥의 탐침을 얻는 방법이 있다. Genomic DNA 혹은 plasmid DNA를 특정 제한효소로 절단하여 원하는 부분의 유전자 혹은 염기부분을 포함한 탐침을 얻을 수 있다. Random priming 방법은 6개의 random hexamer와 주형 DNA를 교잡시킨 후, 형광물질이 부착되어 있는 다양한 길이의 탐침을 합성하는 방법이고, 또 다른 방법으로는 DNA의 5'말단에 ^{32}P를 T4 polynucleotide kinase를 이용하여 옮겨서 형광물질이 부착된 탐침을 합성할 수도 있으며, DNase I을 이용하여 이중가닥의 DNA에 절단부분을 만든 후, 이 DNA를 주형으로 하여 DNA 중합효소 I과 형광물질이 부착된 염기(dNTP)를 사용하여 탐침을 합성할 수 있다. 이렇게 이중가닥으로 합성된 탐침은 변성(denaturation)과정을 거쳐 단일가닥으로 만든 후 혼성화 반응에 사용된다.

탐침과 혼성화 반응을 하는 DNA는 보통 두 종류의 방법으로 제작되어진다. 첫째는, Southern-blot 또는 Northern-blot시 사용되는 방법으로, genomic DNA 혹은 plasmid DNA를 적당한 제한효소로 자른 후 agarose gel 상에서 전기영동을 하여 크기별로 DNA 조각을 분리하여 사용한다. 둘째는, PCR 방법을 이용하여 원하는 부분의 DNA를 증폭시켜 사용하는 방법이다. 이때, 사용하는 PCR 방법을 살펴보면, 포워드와 리버스 프라이머를 동일한 양을 사용해서 증폭시키는 가장 보편화되어 있는 PCR과 프라이머를 비대칭적으로 첨가시켜서 2중 가닥과 단일 가닥의 band를 동시에 얻을 수 있는 비대칭 증폭 방법(Asymmetric PCR), 여러 가지의 프라이머를 넣어서 한꺼번에 증폭시킬 수 있는 Multiplex PCR, 특이적인 4개의 Primer와 Ligase를 이용해 증폭한 후 효소면역법으로 형광량을 판정하는 LCR(Ligase Chain Reaction)방법, 이 밖에도 Hot-start PCR, Nested PCR, DOP (Degenerate Oligonucleotide Primer) PCR, RT-PCR (Reverse Transcriptiase PCR), Semi-quantitative RT-PCR, Real time PCR, RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends), Competitive PCR, STR(short tandem repeats), SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism), ISPCR(In Situ Polymerase Chain Reaction), DDRT-PCR(Differential Display Reverse Transcriptase PCR) 등의 방법 등이 있다.

Hot start PCR이란 온도가 올라가는 데 소요되는 시간까지 생각하여 PCR과정에 끼칠 수 있는 영향을 고려해서 DNA가 변성되기 시작하는 단계의 높은 온도로 PCR을 시작하는 것으로 주로 DNA중합효소를 이용하여 DNA의 일부분을 복제하거나 DNA의 일부를 증폭시켜 원하는 DNA부분을 각 단계마다 두 배로 양을 늘려 원래 DNA보다 많은 양을 증폭시켜 전기영동으로 분석하기 위할 때 사용되는 것으로 원리 및 조건을 살펴보면 DNA의 변성(denaturation)은 90

℃ 96℃로 가열하여 두가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 분리시키는데 높은 온도일수록 단일가닥 DNA로 잘 이행되지만 온도가 너무 높으면 Taq DNA polymerase 역시 활성도가 낮아질 수 있으므로 보통 94℃로 한다. 첫 Cycle에서는 확실한 변성을 위한 여 약 5분간 지속시킨다. Primer 의 결합(annealing) 에서는 50℃ 65℃에서 진행되는데 염기간의 결합은 G, C의 경우 세 군데에서 수소결합이 일어나고 A, T는 두군데에서 결합이 일어나므로 G+C 비율 에 따라 결합 온도에 변화를 주는 것이 좋다. 사실 primer를 만드는 것도 Annealing temperature를 고려하여 합성해야 한다. DNA의 합성(polymerization) 단계에서는 70℃ 74℃에서 시행하며 원하는 PCR 산물의 크기가 크거나 반응요소의 농도가 낮을 때에는 시간을 연장한다. Taq DNA polymerase는 보통 1분에 2,000 4,000 뉴클레오티드를 합성할 수 있으므로 원하는 PCR 산물의 크기 1 kb마다 1분 정도의 시간을 배당하면 충분히 반응이 일어난다. Cycle이 계속되면서 효소 활성이 감소할 수 있고 DNA 산물은 점점 많이 존재하게 되므로 cycle 후반부에는 반응시간을 조금씩 늘려가는 것도 좋은 방법의 하나이며 마지막 cycle 에는 약 10분 정도 시간을 충분히 주어서 효소의 활성이 충분히 발휘되도록 한다. Nested PCR이란 보통의 PCR이 PCR에서 한 set의 primer(forward 및 reverse)를 사용하는데 비해 nested PCR은 두 set의 primer를 사용하는데서 그 결정적 차이가 있다. 즉, 보통의 PCR이 사용하는 것과 같은 한 종류의 primer set을 사용해서 1차 PCR을 한 후에 nested primer set을 사용하여 다시 PCR을 한다고 해서 nested PCR이라고 부르는 것이다. Nested primer set은 nested PCR에서 사용된 첫번째 primer에 의해 증폭되는 product를 다시 증폭할 수 있는 primer set으로서 첫번째 primer set에 의해 증폭된 DNA의 안쪽 부분을 증폭할 수 있는 primer set을 말한다. 따라서 1차 primer set과 2차 primer set(이것이 nested primer)은 같은 DNA상에 있지만 그 위치가 다른 것이라고 할 수 있다. 꼭 지켜야 하는 것은 1차 primer set에 의해 증폭되는 PCR product가 반드시 2차 primer set에 의해 증폭되도록 primer set이 준비되어야만 한다. 보통의 PCR이 한 set의 primer로만 증폭을 하기 때문에 template 의 양이 극단적으로 낮은 경우는 PCR로 증폭하기가 쉽지 않은 반면 nested PCR은 일차로 한 set의 primer를 이용하여 PCR을 한 다음 그 일차 PCR을 nested primer set으로 다시 하기 증폭하기 때문에 template의 양이 극단적으로 낮은 경우라 하더라도 일차 PCR에서 template가 증폭되는 효과로 인해 원하는 증폭결과를 쉽게 얻을 수가 있다. 다음으로 DOP (Degenerate Oligonucleotide Primer)PCR은 새로운 유전자 혹은 유전자 family를 cloning하기 위한 방법 중 하나이다. family내 대부분의 유전자는 구조적으로 유사한 구조를 띈다. 이것은 유사 단백질간 단백질 sequence가 연관되어있다는 것에서도 확인이 된다. 이러한 정보를 기초로 단지 단백질의 아미노산 서열에 관한 정보만을 가지고 있을 때, 얻고자 하는 DNA를 증폭시키기 위하여 아미노산 서열로부터 역으로 유전자의 염기서열을 추정한 degenerate PCR primer를 이용하여 conserved protein motif를 cloning 할 수 있다. Degeneracy는 한 종류의 아미노산이 복수의 codon에 대응하는 현상임으로 어떤 특이한 아미노산 서열을 code하는 유전자의 염기서열을 결정 할 수는 없지만, 가능한 주어진 아미노산을 code한 뉴클레오티드를 모두 조합한 pool을 만들어 primer로 사용한다. DOP PCR로 해결되는 문제들은 특정 단백질을 분리한 후 아미노산 sequence를 밝힌 후 연관 유전자를 cloning하고자 하거나 Human gene을 분리한 후 그와 유사한 gene을 쥐 혹은 초파리에서 분리하고자 할 때 유전자의 진화과정을 연구 시 연관된 종에서 보고자 할 때 유전자 family를 연구할 때 사용된다. 또한 RT-PCR(Reverse Transcription - PCR)이란 특정 부위의 RNA를 template로 하여 이에 상응하는 cDNA(complementary DNA)를 합성한 다음 이를 이용하여 PCR 증폭을 시 행하는 기술이며, 실험과정은 1) 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 RNA로부터 cDNA를 제조하는 과정과 2) cDNA를 이용하여 특정부위를 증폭시키는 과정으로 나뉘어지며, 2) 과정은 genomic DNA로부터 특정 유전자 부위를 증폭시키는 방법과 같다. 이 방법은 Northern blot hybridization과 같은 방법을 통해 가능하던 RNA 분석보다 실험방법이 더욱 간단할 뿐 아니라 유전자의 염기서열 결정이 가능하기 때문에 주로 mRNA의 염기서열 및 전사량을 연구할 때 크게 도움이 된다. 염기서열이 알려진 유전자의 경우 RT-PCR을 통해서 전체 길이의 cDNA를 간단하게 합성하여 cloning 할 수 있을 뿐만 아니라 RNA검사의 sensitivity를 증가시켰을 뿐 아니라 소량의 RNA로부터 염기서열을 분석할 수 있게 되었다. Semi-quantitative PCR은 각각의 상대적인 양을 densitrometer or Image analysis program을 통해 비교하는 것으로 Semi-quantitative RT-PCR의 경우는 우선 각 sample의 양을 동일하게 한다. 역전사를 한 후, PCR을 수행하게 되는데 이 때 master mix를 만들어서 나눈다. PCR에서는 두 종류의 primer set을 사용해야 하는데 주의해야 하는 것은 각 primer set에 의해 detection되는 band size가 200bp 정도의 미소한 차이로 정도여야 PCR이 실험에 미치는 영향을 최소화 할 수 있다. PCR cycle 수도 매우 중요한데 무턱대고 cycle 수를 늘리면 어떤 sample에서는 dNTP와 primer가 limiting factor가 되어서 실제 값과는 완전히 다른 결과를 낼 수 있으므로 cycle 수를 20 cycle 정도로 해야 한다. PCR이 끝나면 agarose gel에 걸고 두 band, 즉 일반적으로 positive control로 쓰이는 GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase)와 원하는 target band의 intensity를 모든 sample에 걸쳐 조사한다. 그런 다음 전체에 걸쳐 동일한 GAPDH band intensity를 얻으려면 각 sample에서 상대적으로 어느 정도의 양을 취해야 하는지 계산할 수 있다. 이 계산에 따라 agarose gel에 걸면 모든 sample에서 GAPDH band intensity는 동일하게 나타나지만 원하는 target band의 intensity는 sample마다 다르게 나타난다. 더 나아가 target band를 southern blotting으로 정말 그 DNA인지를 보여주면 확실한 정보를 얻을 수 있다. 이렇게 하면 존재하는 target RNA의 상대적인 양을 대략적으로 파악 할 수 있다. 다음으로 Real time PCR의 특징적인 것은 PCR 반응 이후 analysis 과정 없이 핵산의 초기량을 정확히 정량해내는 것이 가능하다는 것이다. Real-time PCR을 하기 위해서는 전체 반응을 monitor하기 위하여 형광 reporter 물질을 사용하기도 하거나 형광 label된 oligonucleotide probe를 사용하는 방법이 있다. 이 경우, 원하는 product에 대한 signal만을 받아들여 정확하게 정량할 수 있다는 장점이 있다. Taq polymerase는 5' exonuclease 기능을 가지고 있으므로 PCR extension 단계에 이미 target 과 결합되어 있던 형광으로 부착된 hybridization probe를 절단해 나가게 된다. 형광 TaqMan assay의 경우, probe의 5' end에는 fluorescein과 같은 reporter dye를 붙이고 3' end에는 quencher 물질인 TAMRA와 같은 또 다른 형광 dye를 label 시킨다. reporter 와 quencher가 20-30bp 길이의 프로브 양쪽 끝에 붙어있는 경우에 light source로부터 빛을 받아 excite 되면 reporter dye로부터 발산된 형광은 quencher에 흡수되어 측정되지 않는다.

Taq polymerase가 extension을 하여 미리 결합되어 있던 probe를 만나면 probe를 하나하나 분해하여 reporter가 quencher로 부터 분리되므로 reporter로부터의 형광이 측정된다. 다음으로 RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)란 cDNA의 일부 염기서열을 알고 있고, 이 부분에서 gene specific primer를 합성하고 PCR reaction을 통해 5' 혹은 3'-end 까지의 DNA를 증폭하는 것이다. 3'-RACE에서는 mRNA의 3'-end에 존재하는 poly(A) tail을 이용할 수 있으므로, down stream primer로 oligo-(dT) primer를 쓴다. 그러나, 5'-RACE의 경우는 gene specific primer로 합성한 1st single strand cDNA의 끝에 TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase)를 사용하여 poly(A) 혹은 poly(C) tail을 인위적으로 만들어 주어야만 한다. 다음으로 Competitive PCR은 'DNA competitor' 또는 'Internal standard'라고 부르는 DNA단편을 이용하는데 이 DNA competitor의 조건은 다음의 3가지를 들 수 있다. 첫번째는 목적 DNA와 같은 primer로 증폭이 가능하다는 점과 PCR 증폭 후 목적 DNA를 구별할 수 있다는 점 마지막으로 농도 또는 양을 알고 있다는 것이다. DNA competitor와 목적 DNA를 동일 반응액 내에서 같은 primer로 동시에 증폭하면 primer간의 경합에 의해 양자의 증폭이 경합적으로 일어나기 때문에 증폭산물량의 비가 주형량의 비를 반영하는 것이 되며, 농도를 알고 있는 competitor와 비교하여 목적 DNA의 양을 추정할 수 있다. 다음으로 STR (short tandem repeats)이란 인간의 염색체내에 있는 tandem repeat sequence로 2 7개의 염기로 이루어진 짧은 단위가 반복적으로 적게는 1회 많게는 수십 회까지 반복되는 형태의 초변이성 tandem repeat sequence를 칭하며 유전자 좌우로 존재하고 반복횟수는 사람마다 다양하다. 이러한 STR polymorphism은 대립유전자의 수가 매우 많지만, 그 분포는 염색체상의 말단 쪽에 편중되어 있다. 이 polymorphism의 일부는 반복서열의 전후를 PCR로 증 폭하여, PCR 산물의 길이 다형성으로 검출 할 수 있다. 이런 특정 염기의 반복은 세대를 거쳐 유전되기 때문에 유전자 감식을 이용한 친자확인에도 이용된다. 다음으로 SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism)이란 어떤 입자들의 전기장 내에서의 이동속도는 그 입자의 크기와 형태에 영향을 받는다. 또한 Single strand DNA는 non-denaturing 조건하에서 분자내의 상호작용에 의하여 2차 구조를 형성하게 되는데 이 2차 구조는 DNA의 염기서열에 의하여 결정된다. 그러므로 DNA 염기서열중 하나의 염기서열의 변화(point mutation, deletion 또는 insertion)에 의해서도 전기영동상 전개되는 속도에 영향을 받으므로 이동거리에 차이가 발생하게 된다. 이와 같은 원리를 바탕으로 1989년 Orita 등에 의하여 고안된 SSCP는 유전자의 돌연변이를 검색하는 유용한 도구로서 사용되고 있다. 최초의 SSCP 방법은 genomic DNA를 적당한 제한효소로 절단하고 alkali로 denaturation시킨 후 non-denaturing polyacrylamide gel에서 전기영동한 다음 이를 nylon membrane에 transfer하여 fragment DNA를 옮겨 놓은 후 방사성 동위원소로 표지된(radiolabeled) RNA 혹은 DNA probe를 이용하여 autoradiography를 실시함으로써 X-ray film에 나타나는 정상 유전자와 변이된 유전자와의 전개거리의 차이를 확인하여 돌연변이를 검색하였다. 그러나 그 후 PCR 산물을 SSCP로 분석하는 방법이 소개되었고, 이 방법이 대중화됨에 따라 요즘은 PCR-SSCP라는 용어로 많이 불리어지고 있다. 최근까지는 PCR-SSCP를 할 경우 PCR 산물에 직접 동위원소를 표지하여 autoradiography를 통해 결과를 얻는 방법이 많이 이용되었으나 최근에는 silver staining으로 polyacrylamide gel을 검색하는 방법이 소개되어 현재 이 방 법이 유용하게 이용되고 있다. Silver staining 방법은 방사성 동위원소를 사용하지 않고도 훨씬 더 빠른 시간에 PCR 산물을 분석할 수 있는 장점이 있으며 민감도(sensitivity)에는 방사성 동위원소를 이용한 방법과 별 차이가 없으므로 더욱 편리하고 안전하게 실험을 진행할 수가 있게 되었다. 다음으로 ISPCR(In Situ Polymerase Chain Reaction)을 살펴보면 PCR은 원하는 DNA를 대량으로 증폭시키는 방법이고, in situ hybidization (ISH)은 세포나 조직에 존재하는 극미량의 DNA 및 RNA를 찾아낼 수 있음은 물론 원하는 유전자들의 위치까지 확인할 수 있는 방법이다. ISPCR은 이 두 가지 방법의 장점을 혼합하여 응용한 방법으로서 PCR의 sensitivity와 ISH의 specificity를 고루 갖추고 있다. ISPCR의 실험원리는 일반적인 PCR 방법과 같으나, slide glass 등의 사용에 적합한 ISPCR용 기구가 필요하며 사용하는 기구에 따라 반응시키는 방법들이 다양하게 제시되어 있다. ISPCR은 세포내의 target sequence를 증폭시키는 것으로부터 반응이 시작되며 세포막을 통해 여러 물질(예: PCR 용액에 들어 있는 salt 등)들이 쉽게 이동할 수 있도록 세포막을 HCl, protease K 또는 Triton X-100 등으로 처리해 주는 과정을 거쳐야 한다. 이 과정에 이상이 생기면 세포가 손상되거나 파괴되는 수가 있으므로 PCR이 끝난 후에 세포 안에서 증폭된 PCR 산물이 세포 밖으로 빠져 나오는 원인이 되기도 한다. 그러므로 적당한 세제의 적절한 선택과 사용이 무엇보다 중요하며 PCR 산물이 세포 밖으로 유출되는 것을 막기 위해서는 single primer pair with complementary tail, biotinylated dNTPs, multiple overlapping primer pair 등을 이용한 방법등이 있다. 현재까지 ISPCR 방법의 효율은 그다지 높지 못한 것으로 알 려져 있으며 specificity를 증가시키기 위해서는 DNA probe를 이용한 in situ hybridization을 시행하거나 Southern blot hybridization을 시행하는 것이 좋은 방법이 된다. 효율이 별로 높지 못한 방법임에도 불구하고 ISPCR에 대한 관심이 최근 크게 증가하고 있는 것은 여러 가지 질병들의 조기 발견에 큰 도움을 받을 수 있을 것으로 기대되기 때문이며, 지금도 여러 회사에서 ISPCR에 유용한 기구들을 제작, 판매하고 있으나 더 좋은 기구의 개발이 이루어져 효율을 더욱 높일 수 있다면 ISPCR이 더욱 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다. 다음으로 DDRT-PCR(Differential Display Reverse Transcriptase PCR)이란 서로 다른 세포로부터 RNA를 분리한 후 특정하게 발현되는 mRNA를 찾아내기 위하여 T 염기 10개와 비특정염기 2개가 연결된 oligonucleotide를 primer로 이용하여 cDNA를 합성한 후 이 primer와 비특정 염기서열을 지닌 oligonucleotide를 primer로 이용하여 PCR 하였을 때 나타나는 여러가지 PCR 산물을 비교함으로써 서로 다른 세포로부터 증폭된 PCR 산물에 차이가 있는지 없는지를 확인하는 방법이다. 서로 다르게 증폭된 PCR 산물을 선택하여 이와 같이 증폭된 DNA가 특정 세포에서 특징적으로 발현되는 유전자인지를 보는 것으로 subtractive hybridization보다 방법이 훨씬 간단한 것이 장점이지만, 실험의 sensitivity와 specificity가 낮은 것이 단점이다.

최근 몇 년 동안은 FISH(Fluorescent *in situ* hybridization)라는 기술이 도입되어 연구되어지고 있는데, 이는 기존의 기술보다 빠르고 간단하면서도 신속하게 결과를 얻을 수 있다는 장점을 가지고 있으나(참조 : G. J. Jansen et al., *J. Clin. Microbiol* ., 38(2), 814-817, 2000, and A. J. Volkhard et al, *J. Clin. Microbiol* ., 38(2), 2000), 탐침의 세포

벽 침투력의 정도 차이, 세포 내의 낮은 리보좀 양, 탐침의 표적 위치에 대한 적합성 여부에 따라 검사 결과의 정확성이 결정되므로, 안정된 결과를 얻어야 할 필요성이 있는 임상 검사로서 행해지기에는 아직까지 많은 문제점을 가지고 있다. 최근 문헌에서는, 리보좀의 고차적인 구조로 인해 탐침과 표적 위치사이에 결합력의 차이가 생겨 200개의 탐침 중 1/3이 20% 미만의 낮은 수준의 시그널을 나타낸다는 사실을 보고하였다(참조 : M. F. Berngard et al., *Appl. Environl Microbiol.* , 66(8), 3603-3607, 2000). 감염 질환의 원인균을 동정하기 위해 특정 유전자를 선정하는 데 있어서 가장 널리 사용하고 있는 것은 리보좀 RNA이다(참조: R. Amann et al, *FEMS Microbiology Reviews* , 24, 555-565, 2000). 23S rRNA를 이용하여 프로브를 디자인하여 감염 질환을 빠르게 진단할 수 있는 DNA 칩도 보고된 바 있다(참고 : R. M. Anthony et al, *J. Clin. Microbiol* ., 38(2), 781-788, 2000). 또한, 박테리아의 전체 유전자 혹은 100개 이상의 유전자를 작은 길이로 단편화하여 고형의 지지체위에 고정화시킨 후 균을 동정한 바 있다(참조: J. C. Cho et al., *Appl. Environl Microbiol.* , 67(8), 3677-3682, 2001, C. A. Molloff et al, *J. Mol. Biol* , 312, 1-5, 2001 , A. E. Murray, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , 98(17), 9853-9858, 2001, U. Dobrindt, *Current opinion in Microbiol* , 4, 550-557, 2001).

이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예>

실시예 1

모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii*) 균주의 23S rRNA, ITS 염기서열 결정

모르가넬라 모르가니 표준균주(*Morganella morganii,* ATCC 25830) 균으로부터 QIAmp DNA mini kit (QIAGEN, USA)를 이용하여 chromosome DNA를 추출하였다. 알려져 있는 각 균의 16S rRNA의 염기 서열을 multiple alignment와 BLAST를 실시하여 모든 균에 공통적으로 가지고 있는 염기 서열 부분을 공통 프라이머로 제작했다. 또한, 이미 알려져 있는 23S rRNA의 공통 프라이머(Anthony. R. M., et al., *J. Clin. Microbiol.* 38(2), 781-788, 2000)를 제작하여 중합효소연쇄반응 (이하 PCR이라 한다) 프라이머로 사용하여 PCR을 수행한 후 산물을 정제 후 DNA auto sequencer(Perkin Elmer, ABI prism 3700 sequencer)로 염기 서열을 결정하였다(서열번호 1).

실시예 2

감염균 동정을 위한 DNA 탐침 제작 및 고정화

감염균의 존재 여부 및 동정을 확인하기 위해서 유리판 위에 고정화시킬 DNA 단편 탐침을 제작하였다.

각 부위의 염기 서열들을 multiple alignment와 BLAST를 통해 비교한 후, 특정 균이 특이적으로 가지고 있는 염기 서열을 검색하여 탐침을 제작하였다. 탐침은 15개의 염기로 구성되도록 제작하였다.

DNA 탐침을 고정화하기 위해서는 모든 DNA 단편 탐침을 합성할 때, 3' 첫번째 위치에 아미노링커컬럼 (Aminolinker column, Cruachem, Glasgrow, Scotland)을 이용하여 아민기 (amino residue)를 가진 염기를 삽입하였고, 유리판 (slide glass)은 알데히드기(aldehyde residue)로 코팅화되어 있는 것을 구입(CEL Associates, Inc. Huston, Taxas, USA) 하였다. 탐침을 3× SSC (0.45M NaCl, 15mM $C_6H_5Na_3O_7$, pH 7.0) 완충 용액에 용해시킨 상태로 본 실험실에서 자체 제작한 마이크로어레이어(microarrayer)를 이용(참조: Yoon. S. H., et al, *J. Microbiol. Biotechnol.* 10(1), 21-26, 2000)하여 스폿팅한 후, 55% 정도의 습도가 유지되는 조건에서 1시간 이상 화학 반응을 유도하고, 6시간 이상 방치하여 DNA 탐침을 고정화하였다. 균 검색용 탐침은 100μM의 농도로 전체 탐침을 275㎛ 간격을 두고 순서대로 집적화시켜 DNA 칩을 제작하였다.

탐침의 아민기와 유리판 위의 알데히드 사이의 반응이 원활히 이루어져 고정화가 잘 이루어졌는지 확인하기 위해 사이브로 그린 II (SYBRO green II, Molecular Probe, Inc., Leiden, Netherlands) 로 염색하여 확인하였다.

각각의 표준 균주에서 추출한 유전자를 주형으로 비대칭 증폭 방법(Asymmetric PCR)을 수행하여 단편 유전자를 수행하였다. 단편 유전자는 포워드 프라이머와 리버스 프라이머의 첨가비율을 1 : 5로 차별화 함으로써 한번의 중 합효소연쇄반응으로 획득하였다. 이때, 사용한 프라이머는 박테리아류가 공통적으로 가지고 있는 염기 서열 부분이다. PCR 수행시 탐침과 결합한 DNA를 확인하기 위해 Cy3-dUTP를 첨가하여 형광을 통해 결합 여부를 확인함으로써 감염 여부와 감염균의 종류를 알 수 있도록 하였다.

PCR시 사용한 프라이머는 23S rRNA에 존재하면서 모든 균에 존재하는 염기 서열이다(참조 : Pirkko K. et al., *Clin. Micorbiol* .,36(8), 2205-2209). 또한, 이 프라이머로 증폭할 수 없는 부분을 얻기 위해 바이오인포메틱스(Bioinfor

matics) 방법으로 multialignment, BLAST를 실시하여 프라이머를 디자인하였다. PCR 반응에 사용한 프라이머는 다음과 같다.

프라이머 1 ; 센스 (서열번호 2)

TTGTACACACCGCCCGTC

프라이머 2 ; 안티센스 (서열번호 3)

TTTCGCCTTTCCCTCACGGTACT

프라이머 3 ; 센스 (서열번호 4)

TTTGGGACCTTAGCTGG

프라이머 4 ; 안티센스 (서열번호 5)

AGTACCGTGAGGGAAAGG

프라이머 5 ; 센스 (서열번호 6)

AGGATGTTGGCTTAGAAGCA

프라이머 6 ; 안티센스 (서열번호 7)

CCCGACAAGGAATTTCGCTACCTTA

PCR 반응은 다음과 같은 조건으로 수행하였다. 처음에는 94℃에서 7분간(denaturation)은 한번 하였다. 두 번째 변성은 94℃에서 1분, 교잡(annealing)은 48℃에서 1 분, 연장(extension)은 72℃에서 2분간 수행하였으며, 이를 10회 반복하였다. 그 후, 다시 세 번째 변성은 94℃에서 1분, 교잡(annealing)은 52℃에서 1 분, 연장(extension)은 72℃에서 2분간 수행하였으며, 이를 30회 반복하였다. 이후 72℃에서 7분간 마지막 연장(extension)을 1회 수행하였다. PCR 반응결과로 생성된 산물은 아가로스 겔 전기영동법(agarose gel electrophoresis)으로 확인하였다. 각 균들에 대해 DNA 이중 가닥과 단편 가닥이 동시에 합성되었음을 확인하였고, 이로써, 균의 동정을 위해 23S rRNA와 ITS를 이용할 경우, 본 발명에서 사용된 프라이머들을 이용하여 모든 박테리아종의 23S rRNA 와 ITS를 증폭할 수 있음을 알 수 있다.

실시예 3

탐침과 분석물과의 반응 및 검사 결과 해석

균체로부터 추출한 유전자를 비대칭증폭 방법을 통해 증폭한 후, DNA 칩을 이용하여 검색하여 보았다.

결합완충용액 (hybridization buffer : 6× SSPE, 20% (v/v) formamide)에 Asymmetric PCR 로 증폭시킨 유전자를 15㎕ 넣어서 총 부피가 200㎕가 되도록 제조한다. 제조된 용액을 탐침이 고정화되어 있는 유리판 위에 분주한 후 probe-clip press-seal incubation chamber (Sigma Co., St. Louis, MO)를 덮은 후, 30℃ shaking incubator에서 6시간 동안 반응시켜 상보적인 결합을 유도해 보았다.

시간이 경과한 후 3× SSPE (0.45M NaCl, 15mM $C_6H_5Na_3O_7$, pH 7.0), 2× SSPE (0.3M NaCl, 10mM $C_6H_5Na_3O_7$, pH 7.0), 1× SSPE (0.15M NaCl, 5mM $C_6H_5Na_3O_7$, pH 7.0) 순으로 각각 5분씩 세척하였다.

Scanarray 5000 (GSI Lumonics Inc., Bedford, MA) 을 이용하여 검색하였고, 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

선정한 탐침의 특이성과 민감도를 확인하기 위해 총 13개의 표준 균주의 DNA를 대상으로 하여 실험해 보았다. 몇 개의 탐침의 경우 다른 균과 교차 혼성화가 일어났다. 하지만, 대부분은 각 균에 대해서만 특이적으로 결합이 일어났음을 확인할 수 있었다. 도 2의 그림에서 빨간 테두리로 표시된 것은 다른 균과 전혀 교 차 혼성화 없이 각 균에 대해서만 특이적으로 결합하는 탐침을 의미한다. 노란 테두리로 표시된 부분은 박테리아에 특이적인 탐침을 의미한다. 따라서, 본 발명에서 디자인한 탐침을 이용하게 되면 임상 검체 내의 균 존재 여부와 함께 어떠한 균에 감염 되었는지를

확인할 수 있다.

본 발명에서 확인되어진 탐침의 위치와 염기 서열은 다음과 같다.

동정 균주	탐침 명칭	위치	염기서열	서열번호
Morganella morganii ATCC 25830	Mor2	ITS	AAGAACACTCACAGA	8

발명의 효과

본 발명은 각 균체에 특이적인 탐침들이 부착되어 있는 감염 질환 원인 균 동정용 DNA 칩은 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii)* 균을 정확하고 신속하게 검출할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.
서열번호 8의 염기서열을 가지는 DNA 단편.

청구항 2.
제 1항에 있어서, 상기 DNA 단편이 모르가넬라 모르가니(*Morganella morganii)* 균 검출용임을 특징으로 하는 DNA 단편.

청구항 3.
제 1항의 DNA 단편이 부착된 마이크로어레이.

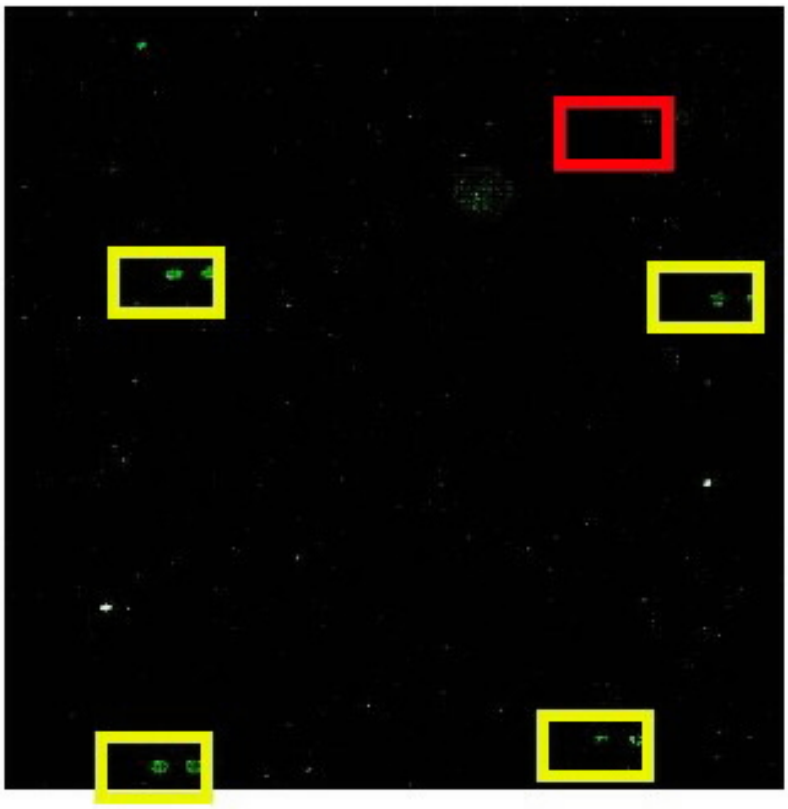
도면

도면1

N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Por1	Por1	Por2	Por2	Por3	Por3	Mor1	Mor1	Mor2	Mor2	Coma1	Coma1
Pep1	Pep1	Pep2	Pep2	Pep3	Pep3	Coma2	Coma2	Coma3	Coma3	Coma4	Coma4
Car1	Car1	Car2	Car2	Car3	Car3	Rot	Rot	Rot2	Rot2	Rot3	Rot3
Chry1	Chry1	Chry2	Chry2	Chry3	Chry3	Bacf1	Bacf1	Bacf2	Bacf2	Bacf3	Bacf3
Ochr1	Ochr1	Ochr2	Ochr2	Ochr3	Ochr3	Ss1	Ss1	Acti1	Acti1	Acti2	Acti2
Ochr4	Ochr4	OChr5	OChr5	Acii1	Acii1	Acti3	Acti3	Anas1	Anas1	Anas2	Anas2
Acii2	Acii2	Acii3	Acii3	Bacteria	Bacteria	Anas3	Anas3	Anas4	Anas4	Bacteria	Bacteria

N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Koxy1	Koxy1	Koxy2	Koxy2	Koxy3	Koxy3	Sflex	Sflex	Sm	Sm	Pa	Pa
Se1	Se1	Se2	Se2	Se3	Se3	Pm	Pm	Ah	Ah	Nm1	Nm1
Spy1	Spy1	Spy2	Spy2	Spy3	Spy3	Nm2	Nm2	Strepp	Strepp	Saur	Saur
Bur	Bur	Vcho	Vcho	Ciff	Ciff	Lm	Lm	Ente1	Ente1	Ente2	Ente2
Hin	Hin	Kpneu	Kpneu	Styp	Styp	Ente3	Ente3	Efcium1	Efcium1	Efcium2	Efcium2
Vvul	Vvul	Eco1	Eco1	Eco2	Eco2	Bacteria	Bacteria	N	N	N	N
Svi1	Svi1	Svi2	Svi2	Bacteria	Bacteria	N	N	N	N	N	N

도면2



<110> MEDIGENES

<120> DNA chip for detection of infectious bacteria

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 2047

<212> DNA

<213> Morganella morganii

<220>

<221> rRNA

<222> (1)..(2047)

<223> 23S rRNA and Internal Transcribed Spacer region

<400> 1

tttgtaacac ccgagccggt ggagtaacca tttggagcta gccgtcgaag gtgggacaaa 60

tgattggggt gaagtcgtaa caaggtagcc gtatcggaag gtgcggctgg atcacctcct 120

ttctaaggat atattcggaa catctcgtag agatgatacg gaataacgtg acatattgta 180

ttcagttttg aatgtttatg ttaaaacatt cattttaatt gaatattgca tttactatta 240

tattttgcta taatacttag atgtgattat taattaatga cattgtacat tgaaaactag 300

ataagtaagt aaatagattt taccaagcaa aaccgagtga atagagtttt aaataagctt 360

gaattcataa aaaataatcg ctagtgttcg aaagaacact cacagattaa taactatatt 420

agattaagtt attaagggcg cacggtggat gccttggcac tagaagccga tgaaggacgt 480

tactaacgac gatatgcttt gggtagctgt aagtaagcgt tgatccagag atttccgaat 540

ggggaaaccc agcacaagtt atgttgtgtt atcgacaagt gaattcatag cttgtcagaa 600

ggcagacccg gagaactgaa acatcttagt acccggagga agagaaagaa aattcgattc 660

cctgagtagc ggcgagcgaa acgggaagag cccaaaccaa taagcttgct tattggggtt 720

gtaggacact ctatacggag ttacaaagga atatattaaa cgaatcatct ggaaagttga 780

atcaaagaag gtaataatcc tgtagttgaa aatatattct ctcttgagtg gatcctgagt 840

acgacggagc acgtgaaatt ccgtcggaat ctgggaggac catctcctaa ggctaaatac 900

tctctagtga ccgatagtga accagtaccg tgagggaaag gtgaaaagta ccccggaagg 960

ggagtgaaag agaacttgaa accgtgtgct tacaagtagt cagagcccgt taatgggtga 1020

tggcgtgcct tttgtagaat gaaccggcga gttacgatct gatgcaaggt taagcagaaa 1080

atgtggagcc gtagcgaaag cgagtctgaa tagggcgtgt agtatttggt cgtagacccg 1140

aaaccaggtg atctacccat ggtcaggttg aagttcaggt aacactgaat ggaggaccga 1200

accgacttac gttgaaaagt gagcggatga actgtgggta gcggagaaat tccaatcgaa 1260

cttggagata gctggttctc tccgaaatag ctttagggct agcctcaagt gatgattatt 1320

ggaaggtaga gcactgtttg gacgagggcc cctctcgggg ttaccgaatt cagacaaact 1380

ccgaaatgcc aattaattta acttgggagt cagaacatgg gtgataaggt ccgtgttcga 1440

aagggaaaca gcccagacca ccagctaagg tcccaaaata tatgttaagt ggaaaaggat 1500

gtggcgttgc ccagacaact aggatgttgg cttagaagca gccatcattt aaagagtgcg 1560

taatagctca ctagtcgagt gacactgcgc cgaaaatgta ccggggctaa acatattacc 1620

gaagctgtgg attgtccttt ggacaatggt aggagagcgt tctaagggcg ttgaagcatg 1680

atcgcaagga catgtggagc gcttagaagt gagaatgccg gtgtgagtag cgaaagacgg 1740

gtgagaatcc cgtccaccga ttgactaagg tttccagagg aaggctcgtc cgctctgggt 1800

tagtcgggtc ctaagctgag gccgacaggc gtaggcgatg gataacaggt tgatattcct 1860

gtaccaccta taatcgtttt aatcgatggg gggacgcagt aggataggcg aagcgtacga 1920

ttggattgta cgtctaagca gtgagattga gtgttaggca aatccggcac tcttaagatt 1980

gagctgtgat ggggagagga aattgtttcc tcgagtcgtt gatttcacac tgccgagaaa 2040

agcctct 2047

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

ttgtacacac cgcccgtc 18

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

tttcgccttt ccctcacggt act 23

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

tttgggacct tagctgg 17

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 5

agtaccgtga gggaaagg 18

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 6

aggatgttgg cttagaagca 20

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 7

cccgacaagg aatttcgcta ccttа 25

<210> 8

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Probe Mor2

<400> 8

aagaacactc acaga 15