(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0112001
(43) 공개일자 2012년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0018161
(22) 출원일자 2012년02월22일
심사청구일자 2012년02월22일
(30) 우선권주장
1020110028406 2011년03월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내
(주)바이오니아
대전광역시 대덕구 문평서로 8-11 (문평동)
(72) 발명자
국중기
서울특별시 강남구 선릉로 604 502호 (삼성동, 호산프라자)
박순낭
광주광역시 서구 상무대로1099번길 15-1 101동 609호 (화정동, 중흥파크맨션)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 충정

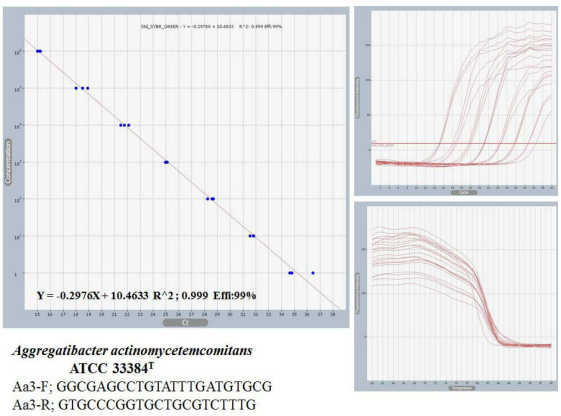
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 구강 세균감염성질환을 일으키는 원인균을 정성 및 정량적으로 검출할 수 있으며, 종-특이성이 뛰어난 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머, 검출용 조성물, 키트 및 마이크로어레이에 관한 것이다. 본 발명에 따른 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머는 민감도가 높고 종-특이성이 뛰어나며, 다양한 세균에 의한 구강 내 치주조직의 감염 여부를 신속하고 간단하게 검출, 탐지할 수 있으며, 구강 세균감염성질환을 일으키는 원인균을 정성 및 정량적으로 검출할 수 있는 효과가 있다. 또한, 세균학적 예후평가를 규명하는 도구로 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

임윤경

광주광역시 북구 금호로 54 105동 114호 (운암동, 일신아파트)

김민정

광주광역시 동구 의재로 149-7 203동 1802호 (운림동)

조유진

광주광역시 북구 용봉로90번길 31 301호 (중흥동 중흥파크빌)

임채광

광주광역시 북구 서하로94번길 10 106동 1103호 (용봉동, 쌍용예가아파트)

김동춘

중국 길림성 연길시 신흥가 민안위 2조

박한오

대전광역시 유성구 엑스포로 448 208동 601호 (전민동, 엑스포아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0076542

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업 일반연구자지원사업

연구과제명 RpoB 유전자를 기반으로 치주질환 병원성 세균 검출을 위한 실시간 정량 중합효소연쇄반응 키트 개발

주관기관 조선대학교

연구기간 2009.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

rpoB(DNA-directed RNA polymerase subunit beta) 유전자의 폴리뉴클레오티드에 특이적으로 결합하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 원인균은 *Actinomyces naeslundii*(CCUG 35333^{T}), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(ATCC 33384^{T}), *Atopobium rimae*(KCTC 5749^{T}), *Campylobacter rectus*(ATCC 33238^{T}), *Capnocytophaga gingivalis*(ATCC 33624^{T}), *Capnocytophaga ochracea*(KCTC 5787^{T}), *Capnocytophaga sputigena*(KCTC 5789^{T}), *Eikenella corrodens*(KCOM 1378), *Fusobacterium necrophorum*(ATCC 25286^{T}), *Fusobacterium nucleatum*(ATCC 25586^{T}), *Fusobacterium periodonticum*(ATCC 33693^{T}), *Fusobacterium simiae*(CCUG 16798^{T}), *Leptotrichia buccalis*(CCUG 34316^{T}), *Neisseria meningitidis*(ATCC 13077^{T}), *Neisseria sicca*(ATCC 29256^{T}), *Neisseria subflava*(ATCC 49275^{T}), ,*Porphyromonas asaccharolytica*(ATCC 43037^{T}), *Porphyromonas endodontalis*(ATCC 35406^{T}), *Porphyromonas gingivalis*(ATCC 33277^{T}), *Prevotella baroniae*(CCUG 50418^{T}), *Prevotella bivia*(ATCC 29303^{T}), *Prevotella buccae*(ATCC 33574^{T}), *Prevotella buccalis*(CCUG 15557^{T}), *Prevotella corporis*(ATCC 33547^{T}), *Prevotella disiens*(CCUG 9558^{T}), *Prevotella intermedia*(ATCC 25611^{T}), *Prevotella marshii*(CCUG E9.34^{T}), *Prevotella melaninogenica*(ATCC 25845^{T}), *Prevotella nigrescens*(ATCC 33563^{T}), *Prevotella oralis*(ATCC 33269T^{T}), *Prevotella oris*(CCUG 15405^{T}), *Prevotella oulorum*(ATCC 43324^{T}), *Prevotella pallens*(ATCC 700821^{T}), *Prevotella veroralis*(ATCC 33779^{T}), *Rothia dentocariosa*(KCTC 3204^{T}), *Selenomonas noxia*(KCTC 5749^{T}), *Streptococcus anginosus*(ATCC 700231^{T}), *Streptococcus constellatus*(ATCC 27823^{T}), *Streptococcus intermedius*(KCTC 3268^{T}), *Streptococcus oralis*(CCUG 13229^{T}) *Streptococcus sanguinis*(CCUG 17826^{T}), *Tannerella forsythia*(ATCC 43037^{T}), *Treponema denticola*(ATCC 35405^{T}), 및 *Veillonella parvula*(KCTC 5019^{T}) 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 프라이머는 서열번호 1 내지 서열번호 88의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기서열로 구성되는 군에서 적어도 하나 이상 선택되는 폴리뉴클레오티드로 구성되는 것을 특징으로 하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 프라이머는 하기 표에 기재된 구강 세균감염성질환 원인균을 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 쌍으로 구성되는 것을 특징으로 하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머

본 발명에 따른 프라이머 쌍과 검출 가능한 세균 종의 이름

세균 종 이름	프라이머 서열목록	세균 종 이름	프라이머 서열목록
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	1 2	*Prevotella oralis*	45 46
Atopobium rimae	3 4	*Prevotella oris*	47 48
Cannocytophaga gingivalis	5 6	*Prevotella oulorum*	49 50
Cannocytophaga ochracea	7 8	*Prevotella pallens*	51 52
Cannocytophaga sputigena	9 10	*Prevotella veroralis*	53 54
Fusobacterium necrophorum	11 12	*Selenomonas noxia*	55 56
Fusobacterium nucleatum	13 14	*Streptococcus constellatus*	57 58
Fusobacterium periodonticum	15 16	*Streptococcus intermidius*	59 60
Fusobacterium simiae	17 18	*Streptococcus oralis*	61 62
Leptotrichia buccalis	19 20	*Streptococcus sanguinis*	63 64
Neisseria meningitidis	21 22	*Veillonella parvula*	65 66
Neisseria subflava	23 24	*Actinomyces naeslundii*	67 68
Porphyromonas endodontalis	25 26	*Campylobacter rectus*	69 70
Porphyromonas gingivalis	27 28	*Eikenella corrodens*	71 72
Prevotella baroniae	29 30	*Neisseria sicca*	73 74
Prevotella bivia	31 32	*Porphyromonas asaccharolytica*	75 76
Prevotella corporis	33 34	*Prevotella buccae*	77 78
Prevotella disiens	35 36	*Prevotella buccalis*	79 80
Prevotella intermedia	37 38	*Rothia dentocariosa*	81 82
Prevotella marshii	39 40	*Streptococcus anginosus*	83 84
Prevotella melaninogenica	41 42	*Tannerella forsythia*	85 86
Prevotella nigrescens	43 44	*Treponema denticola*	87 88

.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 구강 세균감염성질환은 치주질환, 치은염, 치아우식증, 치수, 치근관질환, 치근단질환 및 악골 골수염으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 프라이머를 포함하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 프라이머를 포함하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 키트.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 프라이머를 포함하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 마이크로어레이.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR) 또는 마이크로어레이(microarray)로 구강 세균감염성질환 원인균를 탐지하는 단계를 포함하는 구강 세균감염성질환 원인균의 검출 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 PCR은 정량 실시간 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)인 것을 특징으로 하는 구강 세균감염성질환 원인균의 검출방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 구강 세균감염성질환을 일으키는 원인균을 정성 및 정량적으로 검출할 수 있으며, 종-특이성이 뛰어난 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머, 검출용 조성물, 키트 및 마이크로어레이에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인간의 구강 내에는 약 700여 세균 종이 있다고 알려져 있으며, 수많은 세균이 덩어리를 이룬 채로 서식하여 치면세균막(dental plaque 혹은 dental biofilm)을 이루고 있다. 치아와 치아 사이나 치아와 잇몸사이에 생긴 치면세균막은 칫솔질에 의해서도 제거되지 않고 잔류하며, 이러한 부위에 남아있는 치면세균막 내에서 세균들이 증식하면서 치은조직에 직접 작용하여 면역반응을 유발시키거나 세포 독성물질을 방출하여 치은조직에 염증을 일으킨다. 이러한 염증은 치조골까지 진행되면서 치주염을 일으키게 된다.

[0003] 치주 질환(Periodontal Disease)은 위에서 기술한 것과 같이 치면세균막에 존재하는 세균에 의해 치아의 지지조직(백악질, 치은, 치조골, 치주인대)에 염증이 발생하는 질환이다. 치주 질환은 크게 임상적으로 치조골 파괴가 동반되지 않고 치은 조직에만 염증이 존재하는 치은염(gingivitis)과, 치조골 파과까지 동반된 치주염(periodontitis)으로 분류할 수 있다.

[0004] 이처럼, 치주질환의 초기단계인 치은염은 연한 잇몸조직에만 침범한 것으로 이 단계에서는 치면세균막과 치석의 제거만으로도 회복이 가능하다. 하지만, 치료를 받지 않으면 치조골이 파괴되는 치주염으로 진행되고, 잇몸 수술 등의 치료를 받지 않을 경우 결국 치아를 잃게 된다.

[0005] 현재까지의 연구 결과에 의하면, 흡연 여부, 당뇨병 등의 전신 질환 및 면역 결핍을 동반하는 질병 등이 치주질환으로의 발병에 영향을 주지만, 치은연하 치면세균막에 존재하는 그람-음성 세균 종들이 치주 질환을 일으키는 주요한 병인으로 알려져 있다. 여러 연구자들의 역학연구들에 의해, 치주질환의 주요한 원인균종으로 트로포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*), 포필로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 테너넬라 포사이시아(*Tannernella forsythia*), 애그리거터박터 액티노마이세템코미탄스(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) 프로보텔라 인터미디어(*Prevotella intermedia*), 캠파일로박터 렉터스(*Campylobacter rectus*), 퓨소박테리아 뉴크레아텀(*Fusobacterium nucleatum*) 등이라고 알려져 있지만, 아직까지 정확한 원인균종은 밝혀져 있지 않다. 또한, 어느 지역에 사는 사람인가에 따라 치주질환에 연관된 세균 종이 다르다는 연구도 있다. 그러므로, 치주질환의 원인균을 밝히기 위해서는 전 인류를 대상으로 하는 대단위 역학연구가 필요하고, 이때 모든 연구자들이 공동적으로 사용할 수 있으면서 정확성 및 재현성이 우수한 세균 검출법이 필요하다.

[0006] 한편, 현재까지 치주 질환은 임상 및 방사선학적 결과를 토대로, 환자 연령에 따른 치주 조직의 변화, 예를 들어 치조골의 소실 정도, 동요도, 염증 양상 등을 종합하여 진단한다. 하지만, 치주 질환과 관련해서는 대부분 치조골 소실량이 50% 이상 진행된 상태에서 병원을 찾게 되므로 지속적인 처치를 요하게 된다.

[0007] 그러나 지금까지 치주 질환과 관련하여 그 원인균에 의한 감염 여부 또는 원인균의 존재 여부를 조기에 탐지, 검색할 수 있는 검출방법 또는 분석 키트는 전무하였다. 그나마 지금까지 이와 관련한 치주질환에 관련된 병원성 세균 종을 찾기 위한 분자역학적 연구는 주로 16S rRNA gene(16S rDNA)을 표적으로 하여 PCR법을 이용하여 정성 분석한 것이 대부분이었다. 그러나 상기의 기존의 방법으로는 수많은 치주질환 병원성 세균 종을 종-특이적으로 검출해 낼 수 있는 PCR 프라이머 설계 및 개발이 불가능했으며, 치주질환 원인균의 분자역학적 연구를 위해 정성 및 정량 데이터를 동시에 얻을 수 있는 세균 종 검출기법의 개발에도 한계가 존재하였다.

[0008] 치아우식증(dental caries)은 치면세균막에 서식하는 세균들의 당질 대사에 의해 생성된 젖산 등의 유기산에 의해 치아 표면의 탈회가 진행되어 발생하기 시작한다. 이러한 치아우식증의 주요한 원인균종으로는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*), 스트렙토코커스 소브라이너스(*Streptococcus sobrinus*), 악티노마이세스 종(*Actinomyces* spp.), 락토바실러스 종(*Lactobacillus* spp.) 등이 관여하는 것으로 알려져 있다. 치아는 표면으로부터 법랑질, 상아질, 및 치수로 구성되어 있고, 법랑질에 발생하는 초기 치아우식증을 조기에 치료를 하지 않을 경우 상아질 및 치수로 까지 진행될 수 있다. 특히 치수로까지 염증이 진행될 경우를 치수염이라고 하고, 치아뿌리쪽 치수 염증을 치근관염이라고 한다. 통상 치수는 치관과 치근관이 연결되어 있기 때문에 치수 및 치근관염이라고 표현한다. 이러한 치수 및 치근관염이 더 진행되면, 치아 뿌리(치근) 밑의 골조직까지 염증이 진행되는 치근단 낭종, 치근단 농양, 치근단 골육종 등이 발생할 수 있는 데, 이들을 치근단 질환이라고 한다. 또

한 면역력이 약한 사람의 경우 악골 골수염까지 진행될 수 있다. 이러한 치수 및 치근관염, 치근단 질환들 및 악골 골수염을 유발시키는 세균 종들은 일반적으로 치주질환을 일으키는 세균들과 연관성이 깊은 것으로 알려져 있으나, 아직까지 정확한 원인균종은 밝혀져 있지 않고 있다.

[0009] 따라서, 상기의 세균감염성 구강질환의 원인 세균 종을 밝히는 역학 연구와 특히 치주질환의 예방, 발병가능성 및 치료 후 예후 판정을 위해 세균감염성 구강질환의 원인균종을 효율적이면서도 민감도가 높은 방법으로 검출할 수 있는 시스템 개발의 필요성이 제기되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에 본 발명자들은 구강 세균감염성질환을 일으키는 병원성 세균을 동정 및 검출하기 위하여 계통분류학적으로 잘 보존이 되어 있으며, 세균 종간의 상동성이 16S rDNA보다는 큰 *rpoB* 유전자를 바탕으로 구강 세균감염성질환 병원성 세균 종을 검출할 수 있는 종-특이적 PCR 프라이머 및 키트를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 구강 세균감염성질환과 밀접한 관련이 있는 다양한 세균에 의한 구강 내 치주 조직의 감염 여부나 검체에 존재하는 구강 내 세균 종을 신속 정확하고 간단하게 검출 및 탐지할 수 있는 올리고뉴클레오티드로 구성되는 프라이머를 제공하고자 하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상술한 프라이머를 이용하여 구강 세균감염성질환 원인균을 선택적으로 검출할 수 있는 일반 PCR 및 정량 PCR 키트 그리고 이들의 마이크로어레이 형태의 정량 PCR 키트를 제공하고자 하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 구강 세균감염성질환 원인균의 존재 유무를 진단할 수 있도록, 상술한 프라이머와 표적 샘플 사이의 교잡 반응 및/또는 증폭 반응에 의하여 표적 샘플의 치주 질환 원인균의 감염 여부를 확인하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *rpoB*(DNA-directed RNA polymerase subunit beta: 이하 간단하게 "*rpoB*"라 함) 유전자의 폴리뉴클레오티드염기서열에 특이적으로 결합하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머를 제공한다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 원인균은 *Actinomyces georgiae*(CCUG 32935^T), *Actinomyces israelii*(ATCC 12102^T), *Actinomyces meyeri*(CCUG 21024^T), *Actinomyces naeslundii*(CCUG 35333^T), *Actinomyces odontolyticus*(CCUG 20536^T), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(ATCC 33384^T), *Atopobium parvulum*(KCTC 3663^T), *Atopobium rimae*(KCTC 5749^T), *Campylobacter rectus*(ATCC 33238^T), *Capnocytophaga gingivalis*(ATCC 33624^T), *Capnocytophaga ochracea*(KCTC 5787^T), *Capnocytophaga sputigena*(KCTC 5789^T), *Eikenella corrodens*(KCOM 1378), *Eubacterium limosum*(KCTC 2487^T), *Filifactor alocis*(ATCC 35896^T), *Fusobacterium canifelinum*(CCUG 49733^T), *Fusobacterium naviforme*(ATCC 50052), *Fusobacterium necrophorum*(ATCC 25286^T), *Fusobacterium nucleatum*(ATCC 25586^T), *Fusobacterium periodonticum*(ATCC 33693^T), *Fusobacterium simiae*(CCUG 16798^T), *Gemella haemolysans*(KCOM 1381), *Haemophilus aphrophilus*(ATCC 33389^T), *Haemophilus parainfluenzae*(ATCC 33392^T), *Haemophilus paraphrophilus*(ATCC 29242^T), *Leptotrichia buccalis*(CCUG 34316^T), *Neisseria meningitidis*(ATCC 13077^T), *Neisseria mucosa*(ATCC 19696^T), *Neisseria sicca*(ATCC 29256^T), *Neisseria subflava*(ATCC 49275^T), *Porphyromonas asaccharolytica*(ATCC 43037^T), *Porphyromonas endodontalis*(ATCC 35406^T), *Porphyromonas gingivalis*(ATCC 33277^T), *Prevotella baroniae*(CCUG 50418^T), *Prevotella bivia*(ATCC 29303^T), *Prevotella brevis*(ATCC 19188^T), *Prevotella buccae*(ATCC 33574^T), *Prevotella buccalis*(CCUG 15557^T), *Prevotella corporis*(ATCC 33547^T), *Prevotella dentalis*(ATCC 49559^T), *Prevotella denticola*(CCUG 29542^T), *Prevotella disiens*(CCUG 9558^T), *Prevotella enoeca*(ATCC 51261^T),

Prevotella heparinolytica(ATCC 35895^T), *Prevotella intermedia*(ATCC 25611^T), *Prevotella loescheii*(ATCC 15930^T), *Prevotella marshii*(CCUG E9.34^T), *Prevotella melaninogenica*(ATCC 25845^T), *Prevotella nigrescens*(ATCC 33563^T), *Prevotella oralis*(ATCC 33269T^T), *Prevotella oris*(CCUG 15405^T), *Prevotella oulorum*(ATCC 43324^T), *Prevotella pallens*(ATCC 700821^T), *Prevotella ruminicola*(ATCC 19189^T), *Prevotella veroralis*(ATCC 33779^T), *Propionibacterium acnes*(KCTC 3314^T), *Propionibacterium propionicum*(KCTC 5342^T), *Rothia dentocariosa*(KCTC 3204^T), *Selenomonas artemidis*(KCTC 5742^T), *Selenomonas noxia*(KCTC 5749^T), *Streptococcus anginosus*(ATCC 700231^T), *Streptococcus constellatus*(ATCC 27823^T), *Streptococcus gordonii*(CCUG 33482^T), *Streptococcus intermedius*(KCTC 3268^T), *Streptococcus mitis*(KCTC 3556^T), *Streptococcus mutans*(ATCC 25175^T), *Streptococcus oralis*(CCUG 13229^T) *Streptococcus parasanguinis*(CCUG 30417^T), *Streptococcus pneumoniae*(CCUG 28588^T), *Streptococcus sanguinis*(CCUG 17826^T), *Streptococcus sobrinus*(ATCC 33478^T), *Tannerella forsythia*(ATCC 43037^T), *Treponema denticola*(ATCC 35405^T), *Veillonella dispar*(KCOM 1301) 및 *Veillonella parvula*(KCTC 5019^T)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 1 내지 서열번호 88의 염기서열 또는 이들 염기 서열에 각각 상보적인 염기서열로 구성되는 군에서 적어도 하나 이상 선택되는 폴리뉴클레오티드로 구성되는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 서열번호 1 및 2의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 3 및 4의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Atopobium rimae*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 5 내지 6의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Capnocytophaga gingivalis*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 7 및 8의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Capnocytophaga ochracea*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 9 및 10의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Capnocytophaga sputigena*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 11 및 12의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Fusobacterium necrophorum*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 13 및 14 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Fusobacterium nucleatum*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 15 및 16의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Fusobacterium periodonticum*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 17 내지 18의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Fusobacterium simiae*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 19 및 20의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Leptotrichia buccalis*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 21 및 22의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Neisseria meningitidis*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 23 및 24의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Neisseria subflava*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 25 및 26의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Porphyromonas endodontalis*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 27 및 28의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Porphyromonas gingivalis*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 29 및 30의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Prevotella baroniae*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 31 및 32의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Prevotella bivia*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 33 및 34의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Prevotella corporis*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 35 및 36의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Prevotella disiens*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번37 및 38의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Prevotella intermedia*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 39 및 40의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Prevotella marshii*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 41 및 42의 염기서열

또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Prevotella melaninogenica*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 43 및 44의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Prevotella nigrescens*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 45 및 46의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Prevotella oralis*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 47 및 48의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Prevotella oris*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 49 및 50의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Prevotella oulorum*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 51 및 52의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Prevotella pallens*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 53 및 54의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Prevotella veroralis*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 55 및 56의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Selenomonas noxia*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 57 및 58의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Streptococcus constellatus*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 59 및 60의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Streptococcus intermidius*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 61 및 62의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Streptococcus oralis*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 63 및 64의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Streptococcus sanguinis*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 상기 서열번호 65 및 66의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Veillonella parvula*의 게놈과 특이적으로 교잡하는 것일 수 있다. 또한, 서열번호 67 및 68의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Actinomyces naeslundii*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 서열번호 69 및 70의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Campylobacter rectus*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 서열번호 71 및 72의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Eikenella corrodens*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 서열번호 73 및 74의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Neisseria sicca*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 서열번호 75 및 76의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Porphyromonas asaccharolytica*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 서열번호 77 및 78의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Prevotella buccae*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 서열번호 79 및 80의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Prevotella buccalis*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 서열번호 81 및 82의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Rothia dentocariosa*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 서열번호 83 및 84의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Streptococcus anginosus*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 서열번호 85 및 86의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Tannerella forsythensis*의 게놈과 특이적으로 교잡하고, 서열번호 87 및 88의 염기서열 또는 이들 염기서열에 각각 상보적인 염기 서열로 구성되는 뉴클레오티드는 *Treponema denticola*의 게놈과 특이적으로 교잡할 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 구강 세균감염성질환은 치주질환, 치아우식증, 치수염, 치근관질환, 치근단질환 및 악골 골수염으로 이루어진 군중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 *rpoB* 유전자의 뉴클레오티드 염기서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머를 포함하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 조성물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 *rpoB* 유전자의 뉴클레오티드 염기서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머를 포함하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 키트를 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 *rpoB* 유전자의 뉴클레오티드 염기서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머를 포함하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 마이크로어레이를 제공한다.

[0022] 나아가, 본 발명은 *rpoB* 유전자의 뉴클레오티드 염기서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR) 또는 마이크로어레이(microarray)로 구강 세균감염성질환 원인균를 탐지하는 단계를 포함하는 구강 세균감염성질환 원인균의 검출방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 PCR은 정량 실시간 PCR(qRT-PCR) 일 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에 따른 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머는 민감도가 높고 종-특이성(species-specificity)이 뛰어나, 다양한 세균에 의한 구강 내 치주 조직의 감염 여부 또는 구강 세균 종들의 존재여부를 신속하고 간단하게 검출, 탐지할 수 있으며, 구강 세균감염성질환을 일으키는 원인균을 정성 및 정량적으로 검출할 수 있다. 더 나아가, 치주질환 치료 전후의 세균 종 검출 결과 비교분석을 통해 세균학적 예후평가를 규명하는 도구로 이용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 *A. actinomycetemcomitans*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 2는 Pg-F/Pg-R 프라이머의 종-특이성을 살펴보기 위해 각각의 유전제 DNA 4ng을 사용하여 PCR을 수행하고, PCR 반응물을 1.5% 아가로스겔로 전기영동한 결과를 나타낸다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 *P. gingivalis*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 *Atopobium rimae*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 *Capnocytophaga gingivalis* 에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 *Capnocytophaga ochracea*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 *Capnocytophaga sputigena*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 *Fusobacterium necrophorum*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 9는 본 발명의 일실시예에 따른 *Fusobacterium nucleatum* 에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 10은 본 발명의 일실시예에 따른 *Fusobacterium periodonticum*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 11은 본 발명의 일실시예에 따른 *Fusobacterium simiae*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 12는 본 발명의 일실시예에 따른 *Leptotrichia buccalis*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 13은 본 발명의 일실시예에 따른 *Neisseria meningitidis*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 14는 본 발명의 일실시예에 따른 *Neisseria subflava*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 15는 본 발명의 일실시예에 따른 *Porphyromonas endodontalis* 에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 16은 본 발명의 일실시예에 따른 *Prevotella baroniae*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 17은 본 발명의 일실시예에 따른 *Prevotella bivia*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 18은 본 발명의 일실시예에 따른 *Prevotella corporis*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 19은 본 발명의 일실시예에 따른 *Prevotella disiens*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 20은 본 발명의 일실시예에 따른 *Prevotella intermedia*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 21은 본 발명의 일실시예에 따른 *Prevotella marshii*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 22은 본 발명의 일실시예에 따른 *Prevotella melaninogenica*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 23은 본 발명의 일실시예에 따른 *Prevotella nigrescens*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 24은 본 발명의 일실시예에 따른 *Prevotella oralis*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 25은 본 발명의 일실시예에 따른 *Prevotella oris*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 26은 본 발명의 일실시예에 따른 *Prevotella oulorum* 에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 27은 본 발명의 일실시예에 따른 *Prevotella pallens*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 28은 본 발명의 일실시예에 따른 *Prevotella veroralis*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 29은 본 발명의 일실시예에 따른 *Selenomonas noxia*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 30은 본 발명의 일실시예에 따른 *Streptococcus constellatus*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 31은 본 발명의 일실시예에 따른 *Streptococcus intermidius*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 32은 본 발명의 일실시예에 따른 *Streptococcus oralis*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 33은 본 발명의 일실시예에 따른 *Streptococcus sanguinis* 에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 34은 본 발명의 일실시예에 따른 *Veillonella parvula*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 35은 본 발명의 일실시예에 따른 *Actinomyces naeslundii*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 36은 본 발명의 일실시예에 따른 *Campylobacter rectus*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 37은 본 발명의 일실시예에 따른 *Eikenella corrodens*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 38은 본 발명의 일실시예에 따른 *Neisseria sicca*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 39은 본 발명의 일실시예에 따른 *Porphyromonas asaccharolytica*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 40은 본 발명의 일실시예에 따른 *Prevotella buccae*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 41은 본 발명의 일실시예에 따른 *Prevotella buccalis*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 42는 본 발명의 일실시예에 따른 *Rothia dentocariosa*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 43은 본 발명의 일실시예에 따른 *Streptococcus anginosus*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타

낸다.

도 44는 본 발명의 일실시예에 따른 *Tannerella forsythia*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

도 45는 본 발명의 일실시예에 따른 *Treponema denticola*에 대한 Standard curve 및 최소검출한도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명은 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머 및 이를 포함하는 검출용 조성물에 관한 것으로, 최초로 구강 세균감염성질환을 일으키는 병원성 세균의 동정 및 검출에 *rpoB* 유전자를 이용하였다는 점에 그 특징이 있다.

[0027] 본 발명자들은 구강 세균감염성질환을 일으키는 병원성 세균을 동정 및 검출하기 위한 프라이머를 개발하기 위한 표적 유전자로 *rpoB* 유전자에 주목하였는데, *rpoB* 유전자는 RNA 중합효소의 베타 서브유닛이 인코딩된 유전자로서, 약 4~5kbp로 구성되어 있으며, *Escherichia coli*의 핵산염기서열(4,026bp)을 기준으로 여러 세균 종들 간의 핵산염기서열의 상동성 분석을 한 결과 9개의 유전학적 상동성이 잘 보존된 영역과 그들 사이의 8개의 상동성이 떨어지는 영역이 있는 것으로 알려져 있다(Severinow et al., 1996).

[0028] 또한, *rpoB*는 16S rDNA와 같이 세균분류학적 측면에서 같은 세균 종에 속하는 균주들 간에 핵산염기서열이 잘 보존되어 있으나, 16S rDNA보다 핵산염기서열이 약 3배 정도 크며, 세균 종간의 상이성이 비교적 크다는 특성이 있다. 그러므로 *rpoB* 유전자에서 특정 세균 속(genus)에 속한 모든 세균 종의 *rpoB* 유전자와 상보적으로 결합할 수 있는 PCR 프라이머를 설계할 수 있으며, 종간 상이성이 인정되는 부위를 다양하게 변형시킨 세균 종-특이성 PCR 프라이머를 개발할 수 있다.

[0029] 구강 내에는 약 700여 세균 종이 존재하는 것으로 알려져 있으며, 현재까지구강 세균감염성질환에 관련된 병원성 세균 종을 찾기 위한 분자역학연구는 주로 16S rDNA를 표적으로 하여 PCR법을 이용하여 정성분석을 한 것이 대부분이었다. 그러나 16S rDNA로는 치주질환 병원성 세균 종을 특이적으로 정성 및 정량적으로 검출할 수 있는 real-time PCR 프라이머 개발에 한계가 있었다.

[0030] 이에 본 발명자들은 계통분류학적으로 잘 보존이 되어 있으며, 세균 종간의 상동성이 16S rDNA보다는 큰 *rpoB* 유전자를 바탕으로 구강 세균감염성질환 병원성 세균 종을 검출할 수 있는 real-time PCR 키트를 개발하여, 향후 치주질환과 같은 구강 세균감염성질환 분자역학연구에 활용할 수 있도록 하고자 한다.

[0031] 따라서 본 발명에서는 구강 내 치면세균막에 존재하는 세균 종 중에서 구강 세균감염성질환과 관련성이 높다고 알려진 세균 종, 관련성이 적다고 알려진 세균 종 및 아직까지 구강 세균감염성질환과 관련성이 밝혀지지 않은 세균 종들을 포함하여 총 74종의 세균들의 표준균주들의 *rpoB* 유전자를 클로닝하여 핵산염기서열을 결정하였으며, *rpoB* 유전자들의 핵산염기서열을 바탕으로 종-특이적 real-time PCR 프라이머를 개발하였다.

[0032] 이에 본 발명은 구강 세균감염성 질환 원인균의 존재 여부를 확인하기 위한 프라이머로서, *rpoB* 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열에 특이적으로 결합하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머를 제공한다.

[0033] 본 발명의 프라이머를 이용하여 검출할 수 있는 구강 세균감염성 질환 원인균으로는 *Actinomyces naeslundii*(CCUG 35333^T), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(ATCC 33384^T), *Atopobium rimae*(KCTC 5749^T), *Campylobacter rectus*(ATCC 33238^T), *Capnocytophaga gingivalis*(ATCC 33624^T), *Capnocytophaga ochracea*(KCTC 5787^T), *Capnocytophaga sputigena*(KCTC 5789^T), *Eikenella corrodens*(KCOM 1378), *Fusobacterium necrophorum*(ATCC 25286^T), *Fusobacterium nucleatum*(ATCC 25586^T), *Fusobacterium periodonticum*(ATCC 33693^T), *Fusobacterium simiae*(CCUG 16798^T), *Leptotrichia buccalis*(CCUG 34316^T), *Neisseria meningitidis*(ATCC 13077^T), *Neisseria sicca*(ATCC 29256^T), *Neisseria subflava*(ATCC 49275^T), *Porphyromonas asaccharolytica*(ATCC 43037^T), *Porphyromonas endodontalis*(ATCC 35406^T), *Porphyromonas gingivalis*(ATCC 33277^T), *Prevotella baroniae*(CCUG 50418^T), *Prevotella bivia*(ATCC 29303^T), *Prevotella buccae*(ATCC 33574^T), *Prevotella buccalis*(CCUG 15557^T), *Prevotella corporis*(ATCC 33547^T), *Prevotella*

disiens(CCUG 9558^{T}), *Prevotella intermedia*(ATCC 25611^{T}), *Prevotella marshii*(CCUG E9.34^{T}), *Prevotella melaninogenica*(ATCC 25845^{T}), *Prevotella nigrescens*(ATCC 33563^{T}), *Prevotella oralis*(ATCC 33269T^{T}), *Prevotella oris*(CCUG 15405^{T}), *Prevotella oulorum*(ATCC 43324^{T}), *Prevotella pallens*(ATCC 700821^{T}), *Prevotella veroralis*(ATCC 33779^{T}), *Rothia dentocariosa*(KCTC 3204^{T}), *Selenomonas noxia*(KCTC 5749^{T}), *Streptococcus anginosus*(ATCC 700231^{T}), *Streptococcus constellatus*(ATCC 27823^{T}), *Streptococcus intermedius*(KCTC 3268^{T}), *Streptococcus oralis*(CCUG 13229^{T}) *Streptococcus sanguinis*(CCUG 17826^{T}), *Tannerella forsythia*(ATCC 43037^{T}), *Treponema denticola*(ATCC 35405^{T}), 및 *Veillonella parvula*(KCTC 5019^{T}) 뿐만아니라 이들 균주들의 세균종에 해당하는 임상균주들을 포함한다.

[0034] 본 발명에서 상기 프라이머는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고 뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 바람직하다.

[0035] 상기 증폭 반응은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자의 증폭 반응들에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있고, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 리가아제 연쇄반응(LCR), 전자 중재 증폭(TMA), 핵산 염기서열 기판 증폭(NASBA) 등이 포함될 수 있다.

[0036] 본 발명의 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머는 *rpoB* 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖으며, 서열번호 1 내지 서열번호 88의 염기서열 또는 이들 염기 서열에 각각 상보적인 염기서열로 구성되는 군에서 적어도 하나 이상 선택되는 뉴클레오티드로 구성되는 것이 바람직하다.

[0037] 상기 프라이머는 하기 표 1에 기재된 구강 세균감염성질환 원인균을 특이적으로 검출할 수 있는 하기의 서열목록을 가진 프라이머 쌍으로 구성될 수 있다.

표 1

본 발명에 따른 프라이머 쌍과 검출 가능한 세균 종의 이름

세균 종 이름	프라이머 서열목록	세균 종 이름	프라이머 서열목록
Aggregatibacter actinomycetemcomitans	1	*Prevotella oralis*	45
	2		46
Atopobium rimae	3	*Prevotella oris*	47
	4		48
Cannocytophaga gingivalis	5	*Prevotella oulorum*	49
	6		50
Cannocytophaga ochracea	7	*Prevotella pallens*	51
	8		52
Cannocytophaga sputigena	9	*Prevotella veroralis*	53
	10		54
Fusobacterium necrophorum	11	*Selenomonas noxia*	55
	12		56
Fusobacterium nucleatum	13	*Streptococcus constellatus*	57
	14		58
Fusobacterium periodonticum	15	*Streptococcus intermidius*	59
	16		60
Fusobacterium simiae	17	*Streptococcus oralis*	61
	18		62
Leptotrichia buccalis	19	*Streptococcus sanguinis*	63
	20		64
Neisseria meningitidis	21	*Veillonella parvula*	65
	22		66
Neisseria subflava	23	*Actinomyces naeslundii*	67
	24		68
Porphyromonas endodontalis	25	*Campylobacter rectus*	69
	26		70
Porphyromonas gingivalis	27	*Eikenella corrodens*	71
	28		72
Prevotella baroniae	29	*Neisseria sicca*	73
	30		74
Prevotella bivia	31	*Porphyromonas asaccharolytica*	75
	32		76
Prevotella corporis	33	*Prevotella buccae*	77
	34		78
Prevotella disiens	35	*Prevotella buccalis*	79
	36		80
Prevotella intermedia	37	*Rothia dentocariosa*	81
	38		82
Prevotella marshii	39	*Streptococcus anginosus*	83
	40		84
Prevotella melaninogenica	41	*Tannerella forsythia*	85
	42		86
Prevotella nigrescens	43	*Treponema denticola*	87
	44		88

[0038]

[0039] 본 발명의 일실시예에 따른 *rpoB* 핵산염기서열을 바탕으로 설계된 종-특이 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머는 서열번호 1 내지 88 중에서 선택된 서로 다른 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍일 수 있으며, 각각의 프라이머 쌍이 특이적으로 탐지할 수 있는 세균 종 이름, 염기서열, 서열번호, PCR 산물 크기, 어닐링 온도에 대해 하기 표 2에 나타내었다. 표 2 및 첨부한 서열목록에 나타난 각 프라이머의 이름(예:Pg-F)은 종-특이적으로 검출가능한 해당 세균 종 이름(예:*Porphyromonas gingivalis*)의 약자(Pg)와 함께 포워드(forward, F) 또는 리버스(reverse, R) 프라이머 임을 나타낸다.

표 2

본 발명에 따른 프라이머 쌍의 염기서열, 검출 가능한 세균 종, 서열번호, PCR 산물 크기, 어닐링 온도 (1)

[0040]

순번	세균 종 이름	염기서열(5 '- to -3 ')	서열목록	PCR 산물크기 (base pair)	어닐링 온도 (℃)	민감도 (DNA양/ C_T)
1	*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*	Aa3-F: GGCGAGCCTGTATTTGATGTGCG	1	113	72	2fg/35.3
		Aa3-R: GTGCCCGGTGCTGCGTCTTTG	2			
2	*Atopobium rimae*	Ar-P5: CGCGCTCGGTACCGTTGATGATAA	3	101	72	20fg/37.9
		Ar-R8: GAACAAGGAGACGGGCGAGAAAAAG	4			
3	*Capnocytophaga gingivalis*	Cg-P5: CTATCACCGACACCCGCAACCAG	5	96	72	2fg/32
		Cg-R5: GTCCACGCTCTATACACTCCTCCAC	6			
4	*Capnocytophaga ochracea*	Co-P1: GACCCCGAGCACGAAGATTTTG	7	139	72	2fg/37.2
		Co-R1: CCCCTGGTGAACGGTGTAACTGC	8			
5	*Capnocytophaga sputigena*	Cspu-P2: CACCGACCCTGAGCACGAA	9	156	68	2fg/35.0
		Cspu-R2: TGACCGAAGAATACCCCAGGA	10			
6	*Fusobacterium necrophorum*	Fnc-F11: TGGAGCCGGGAGATATTTTGGTC	11	150	72	2fg/33.8
		Fnc-R11: TTCCTTTTGATCCGTGAGGCATAC	12			
7	*Fusobacterium nucleatum*	Fn-P1: ACCTAAGGGAGAAACAGAACCA	13	171	66	20fg/37.7
		Fn-R1: CCTGCCTTTAATTCATCTCCAT	14			
8	*Fusobacterium periodonticum*	Fp-P2: TTGCTGAAAAACGTAAGATAACTGTA	15	88	66	2fg/32.3
		Fp-R2: TCTGCAGGTAATACTCTTGAAACA	16			
9	*Fusobacterium simiae*	Fsi-P1: AAGAGCAGGGTTTGAAGTAAGAGATGTC	17	115	70	2fg/35
		Fsi-R2: AGCATAAGTAGCAAGCGATCCAATAAGC	18			
10	*Leptotrichia buccalis*	Lb-P1: GGACAAAATGCACGCCAGAGC	19	132	72	2fg/35.2
		Lb-R1: GATGCACCGTAGGCTTCCAATG	20			
11	*Neisseria meningitidis*	Nmen-P4: GATGCTGCAACGGATACCACT	21	139	66	20fg/37.7
		Nmen-R4: ATGCCGATTTGGATTCAGAT	22			
12	*Neisseria subflava*	Nsub-P6: TTGGCTCAATTGGCTGGAA	23	194	62	2fg/32.1
		Nsub-R6: GTAATCGTCGTGTTCGTTCTGTG	24			

표 3

본 발명에 따른 프라이머 쌍의 염기서열, 검출 가능한 세균 종, 서열번호, PCR 산물 크기, 어닐링 온도 (2)

순번	세균 종 이름	염기서열(5 '- to -3 ')	서열목록	PCR 산물크기 (base pair)	어닐링 온도 (℃)	민감도 (DNA양/Cx)
13	*Porphyromonas endodontalis*	Pe-F1: AGCAGAGTTCCGTCGTCGTATTCA	25	130	72	2fg/87.4
		Pe-R1: GCGCCCTGCCATCTTGTCTC	26			
14	*Porphyromonas gingivalis*	Pg-F: GGAAGAGAAGACCGTAGCACAAGGA	27	143	72	2fg/87.3
		Pg-R: GAGTAGGCGAAACGTCCATCAGGTC	28			
15	*Prevotella baroniae*	Pba-F4: GAAGATACGGGCGAAGTGGTGTCC	29	148	72	2fg/86.8
		Pba-R4: ACTTATTAGCTGCTTCGGCGTCCTTG	30			
16	*Prevotella bivia*	Pbi-F1: CTGCGCTTGGTCCTGGTGGTT	31	105	72	2fg/88.4
		Pbi-R1: CTTCAGGCGACTCAATAGGACACAAA	32			
17	*Prevotella corporis*	Pco-F8: TGGAGCAGAGCGTGTTGTTGTTTCA	33	108	72	2fg/87.8
		Pco-R8: GGAATGATGCGGGCACTGTAAAGC	34			
18	*Prevotella disiens*	Pdi-F2: AAAGACCCAAGCCACTCAGAA	35	145	68	2fg/81.5
		Pdi-R2: CTACTTCGCCAAGGTCATAACG	36			
19	*Prevotella intermedia*	Pi-F4: TTCGGAGACAAGGCAGGTGAT	37	117	70	20fg/88.4
		Pi-R4: CTTGCTTTCGCGTGTCTTGATA	38			
20	*Prevotella marshii*	Pmh-F1: TGGCACAAATCCGTTATCACAA	39	98	70	2fg/88.5
		Pmh-R1: AAAGGCCACCAGGACCAAGA	40			
21	*Prevotella melaninogenica*	Pm-F8: TGACCGTAAGAAGAAGTTGCCTGTA	41	141	71	2fg/87.1
		Pm-R8: TTGCGACCGATAGCTGCCTTCATA	42			
22	*Prevotella nigrescens*	Pn-F1: CTCCACAGCAAATAGCCTCAGTA	43	150	72	2fg/88
		Pn-R1: TTTCCAAACCGGTCCCTACAATA	44			
23	*Prevotella oralis*	Poral-F8: GTTACAACATTACTGCGTGCTATCGGG	45	180	72	2fg/87.1
		Poral-R8: TTGCGGCGAGTCTTCTTCCCAC	46			
24	*Prevotella oris*	Pori-F1: AGAAGTTGGGGCTCGACACAGAC	47	141	72	2fg/81.9
		Pori-R1: GCACACGGCGGTTACTCAAG	48			
25	*Prevotella oulorum*	Pou-F: TGAGCGCAACGAGGTGATTA	49	129	70	20fg/80.9
		Pou-R: ATGGTGTATTTGCTTGCTGACTCG	50			
26	*Prevotella pallens*	Ppa-F2: TGCGTAATGCTGATGCTGCC	51	97	70	2fg/84
		Ppa-R2: CGTCCTACTTCGCCTAAATCG	52			
27	*Prevotella veroralis*	Pv-F2: ACGATGCTCCGATTGTTGGT	53	86	68	2fg/84.4
		Pv-R2: TACACCTTCACCTTCAGCCATAAT	54			

[0041]

표 4

본 발명에 따른 프라이머 쌍의 염기서열, 검출 가능한 세균 종, 서열번호, PCR 산물 크기, 어닐링 온도 (3)

순번	세균 종 이름	염기서열(5 '- to -3 ')	서열 목록	PCR 산물크기 (base pair)	어닐링 온도 (℃)	민감도 (DNA양/Cr)
28	*Selenomonas noxia*	Sn-F5: GAGCGCAAAGGACTCAAAGGAA	55	115	72	2fg/86.8
		Sn-R6: GCGCAGGAGCTATCAGTGGTTTC	56			
29	*Streptococcus constellatus*	Scon-F4: TTCCCGTATCGTTCCAGTTGAG	57	142	69	2fg/84.1
		Scon-R4: GTTGCGAGCAGCCATACCA	58			
30	*Streptococcus intermidius*	Sin-F4: GGTATCCACATTGCAACGCCAGTC	59	138	72	2fg/84.6
		Sin-R1: ACGGTTATCAAACGGTTCGCCA	60			
31	*Streptococcus oralis*	Sor-F2: GTTGACAGCCGATGAAGAAGATGAA	61	81	68	2fg/88.4
		Sor-R2: TTCTCAGCAAAAGTACCGTCCTCG	62			
32	*Streptococcus sanguinis*	Ssa-F2: CGTGAAGATCTTTACCCGTGCT	63	135	68	2fg/86.6
		Ssa-R2: ACCCCCTTGTTTCCGTGAC	64			
33	*Veillonella parvula*	Vp-F2: GAACGTTTGTTGCGTGCTATTTTTGGT	65	128	72	2fg/88.1
		Vp-R2: TCGTCGCCATTTTCAGGGTAA	66			
34	*Actinomyces naeslundii*	An-F3: CTGCTGCTGACATCGCCGCTCGTA	67	144	72	2fg/87.6
		An-R3: TCCGCTCGCGCCACCTCTCGTTA	68			
35	*Campylobacter rectus*	Cr-F2: GGTTTGGGCGCTTGAGGCATAC	69	146	70	20fg/84.9
		Cr-R2: ACGTCTCGGGGATACCTGTTTCA	70			
36	*Eikenella corrodens*	Ec-F7: GGCTACCTGAAGGGCGATTTGATTAC	71	120	72	2fg/84.3
		Ec-R7: CGAGGCGGCTACGGATACCACT	72			
37	*Neisseria sicca*	Nsi-F7: GCGTTACTTTACCTACCAACACATCACCT	73	111	72	20fg/84.7
		Nsi-R7: GCGATATTCCGAACTTGTCCGAG	74			
38	*Fornbyromonas asaccharolytica*	Pas-F2: GAGCCAATCGTAAGGGAGGTAT	75	150	72	200fg/84.8
		Pas-R2: AGTCCGTTGCCGTGGTCTTGTG	76			
39	*Prevotella buccae*	Pbca-F2: CCGCCTGCCGAAGTGGACA	77	75	70	2fg/85.2
		Pbca-R2: GAAAGGAATCAGACCGGCAGAGACT	78			
40	*Prevotella buccalis*	Pbcl-F2: TGGTGCTTCGACGCTCCTGTTA	79	142	68	2fg/85.2
		Pbcl-R2: TTCGGCATTACGCAACTGACG	80			
41	*Rothia dentocariosa*	Rd-F8: CTGGGCAAAGCGTCTGGAAAAC	81	106	70	2fg/86.4
		Rd-R8: GAAATCACGAATCGGGGAAATCTC	82			
42	*Streptococcus anginosus*	San-F9: GGTGCAGGGGTTGTCCGTGAT	83	137	72	2fg/88
		San-R9: CGTCCAGCCATCTTATCCCCAACA	84			
43	*Tannerella forsythia*	Tf-F2: GGATTGACCACCGGCGAAGACA	85	134	72	2fg/85.4
		Tf-R2: CGGACACGACGGTTACTCAAATGG	86			
44	*Treponema denticola*	Td-F2: CGGGCGTGCATCTTGTCGTCTAC	87	99	72	2fg/88.2
		Td-R2: CTTAACCGGCCGCCTCTTTGAA	88			

[0042]

[0043] 본 발명에서 구강 세균감염성질환으로는 치주질환, 치은염, 치아우식증, 치수염 및 치근관질환, 치근단질환, 악골 골수염 등을 모두 포함할 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명은 *rpoB* 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머를 포함하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 조성물을 제공한다.

[0045] 또한, 본 발명은 *rpoB* 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머를 포함하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 키트를 제공한다.

[0046] 상기 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 조성물 또는 키트에 포함되는 프라이머용어에 대해서는 앞서 기술된 바와 같으며, 바람직하게 상기 프라이머는 서열번호 1 내지 서열번호 88의 염기서열 또는 이들 염기 서열에 각각 상보적인 염기서열로 구성되는 군에서 적어도 하나 이상 선택되는 뉴클레오티드로 구성될 수 있다.

[0047] 본 발명의 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 키트가 만일 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며, 본 발명의 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다. 나아가, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명은 *rpoB* 유전자의 뉴클레오티드 서열에 대하여 상보적인 서열을 갖는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머를 포함하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 마이크로어레이를 제공한다.

[0049] 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, 상기 프라이머는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기질(substrate) 상에 고정화된다. 바람직한 기질은 적합한 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함할 수 있다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기 기질 상에 배열되고 고정화되며, 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기질에 결합될 수 있다.

[0050] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료가 핵산일 경우에는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화 될 수 있다. 혼성화 조건은 다양할 수 있으며, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.

[0051] 따라서 본 발명에서는 구강 세균감염성 질환 원인균의 존재 유무를 진단할 수 있도록 상술한 프라이머와 표적 샘플 사이의 교잡 반응 및/또는 증폭 반응에 의하여 표적 샘플의 구강 세균감염성 질환 원인균의 감염 여부를 확인할 수 있다.

[0052] 이에 본 발명은 *rpoB* 유전자의 폴리뉴클레오티드 서열에 대하여 특이적으로 결합하는 구강 세균감염성질환 원인균 검출용 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR) 또는 프로브로 이용되어 마이크로어레이(microarray)로 구강 세균감염성질환 원인균를 탐지하는 단계를 포함하는 구강 세균감염성질환 원인균의 검출 방법을 제공한다.

[0053] 상기 중합효소연쇄반응(PCR)은 당업계에 알려진 여러 종류의 PCR 방법을 모두 포함하는 것으로, 일반 PCR 방법을 비롯하여, 정량적 결과 도출이 가능한 정량 실시간 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 기법을 모두 포함한다.

[0054] 본 발명의 일실시예에서는 구강 세균감염성 질환 원인균이 되는 세균 종 중 상기 44종류에 대한 종-특이적 및 정략적 검출효과를 확인하였다.

[0055] 일 예로써, *A. actinomycetemcomitans*를 들어 설명한다.

[0056] *A. actinomycetemcomitans*의 프라이머로 본 발명자들이 설계한 Aa3-F/Aa3-R 프라이머는 일반 PCR 결과, 함께 실험한 다른 구강 내 다른 세균 종들에서 와는 달리, *A. actinomycetemcomitans* 균주에서만 PCR 증폭물들을 확인할 수 있어, 상기 프라이머를 통해 *A. actinomycetemcomitans* 종을 특이적으로 검출할 수 있음을 확인하였다. 또한, qRT-PCR을 추가적으로 시행하여, 본 발명에 따른 상기 프라이머를 통해 *A. actinomycetemcomitans* 유전체 DNA를 4 fg까지 종-특이적으로 검출할 수 있음을 확인하였는 바, Aa3-F/Aa3-R 프라이머 쌍은 qRT-PCR법에 의해 *A. actinomycetemcomitans* 1.7 균주에 해당하는 세균 유전체 DNA까지도 검출이 가능한 탁월한 민감도를 지니고 있음을 알 수 있었다(실시예 1 참조).

[0057] 또한, 또 다른 예로써, 구강 감염성질환 원인균인 *P. gingivalis* 종의 프라이머인 Pg-F/Pg-R 프라이머를 이용한 PCR 실험 결과, 상기 *A. actinomycetemcomitans* 균주에서와 동일하게, 일반 PCR 결과 *P. gingivalis* 종에서만 PCR 증폭물이 발견되어, 종-특이적임을 확인할 수 있었으며, qRT-PCR을 통해서는 *P. gingivalis* 1.6 균주에 해당하는 세균 유전체 DNA까지도 검출이 가능함을 역시 알 수 있었다(실시예 2 참조).

[0058] 이렇듯, 본 발명에 따른 프라이머들은 PCR 방법을 통해 종-특이적으로 특정 구강 세균감염성질환 원인균만을 검출할 수 있는 특성을 지녀, 일반적으로 당업계에 알려진 PCR 방법을 통해 검체에 존재하는 특정 세균들의 존재 여부를 효과적으로 확인할 수 있을 뿐만 아니라, 특별히 정량 실시간 PCR 방법을 통해서는 매우 뛰어난 민감도, 즉 특정한 한 균주에 해당하는 세균 유전체 DNA까지도 검출이 가능한, 월등한 효과의 구강 세균감염성질환의 원인균 검출 시스템 및 방법을 제공할 수 있다.

[0059] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실 시 예 1

[0060] **세균 및 세균 배양**

[0061] 본 실시예에서 사용된 균주들은 하기 표 3에 나타내었다. 이들 균주들은 ATCC(American Type Culture Collection, USA), CCUG(Culture Collection, University of G, Sweden) 및 KCTC(Korean Collection for Type Cultures, Biological Resource Center, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 그리고, 한국인에서 분리된 임상균주들은 한국구강미생물자원은행(KCOM : Korean Collection for Oral Microbiology, Gwangju, Korea)에서 분양받아 사용하였다.

표 5

No	Species	strains	No	Species	strains
1	*Actinomyce naeslundii*	CCUG35333^T	38	*Streptococcus constellatus*	ATCC27823^T
2	*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*	ATCC33384^T	39	*Streptococcus intermedius*	KCTC3268^T
3	*Atopobium rimae*	KCTC5749^T	40	*Streptococcus oralis*	CCUG13229^T
4	*Campylobacter rectus*	ATCC33238^T	41	*Streptococcus sanguinis*	CCUG17826^T
5	*Capnocytophaga gingivalis*	ATCC33624^T	42	*Tannerella forsythia*	ATCC43037^T
6	*Capnocytophaga ochracea*	KCTC5787^T	43	*Treponema denticola*	ATCC35405^T
7	*Capnocytophaga sputigena*	KCTC5789^T	44	*Veillonella parvula*	KCTC5019^T
8	*Eikenella corrodens*	KCOM 1378	45	*Actinomyces georgiae*	CCUG32935^T
9	*Fusobacterium necrophorum*	ATCC25286^T	46	*Actinomyce sisraelii*	ATCC12102^T
10	*Fusobacterium nucleatum*	ATCC25586^T	47	*Actinomyces meyeri*	CCUG21024^T
11	*Fusobacterium periodonticum*	ATCC33693^T	48	*Actinomyces odontolyticus*	CCUG20536^T
12	*Fusobacterium simiae*	CCUG16798^T	49	*Atopobium parvulum*	KCTC3663^T
13	*Leptotrichia buccalis*	CCUG34316^T	50	*Eubacterium limosum*	KCTC2487^T
14	*Neisseria meningitidis*	ATCC13077^T	51	*Filifactor alocis*	ATCC35896^T
15	*Neisseria sicca*	ATCC29256^T	52	*Fusobacterium canifelinum*	CCUG49733^T
16	*Neisseria subflava*	ATCC49275^T	53	*Gemella haemolysans*	KCOM 1381
17	*Porphyromonas asaccharolytica*	KCTC5471^T	54	*Haemophilus aphrophilus*	ATCC33389^T
18	*Porphyromonas endodontalis*	ATCC35406^T	55	*Haemophilus parainfluenzae*	ATCC33392^T
19	*Porphyromonas gingivalis*	ATCC33277^T	56	*Haemophilus paraphrophilus*	ATCC29242^T
20	*Prevotella baroniae*	CCUG50418^T	57	*Neisseria mucosa*	ATCC19696^T
21	*Prevotella bivia*	ATCC29303^T	58	*Prevotella brevis*	ATCC19188^T
22	*Prevotella buccae*	ATCC33574^T	59	*Prevotella dentalis*	ATCC49559^T
23	*Prevotella buccalis*	CCUG15557^T	60	*Prevotella denticola*	CCUG29542^T
24	*Prevotella corporis*	ATCC33547^T	61	*Prevotella enoeca*	ATCC51261^T
25	*Prevotella disiens*	CCUG9558^T	62	*Prevotella heparinolytica*	ATCC35895^T
26	*Prevotella intermedia*	ATCC25611^T	63	*Prevotella loescheii*	ATCC15930^T
27	*Prevotella marshii*	CCUGE9 34^T	64	*Prevotella ruminicola*	ATCC19189^T
28	*Prevotella melaninogenica*	ATCC25845^T	65	*Propionibacterium acnes*	KCTC3314^T
29	*Prevotella nigrescens*	ATCC33563^T	66	*Propionibacterium propionicum*	KCTC5342^T
30	*Prevotella oralis*	ATCC33269^T	67	*Selenomonas artemidis*	KCTC5742^T
31	*Prevotella oris*	CCUG15405^T	68	*Streptococcus gordonii*	CCUG33482^T
32	*Prevotella oulorum*	ATCC43324^T	69	*Streptococcus mitis*	KCTC3556^T
33	*Prevotella pallens*	ATCC700821^T	70	*Streptococcus mutans*	ATCC25175^T
34	*Prevotella veroralis*	ATCC33779^T	71	*Streptococcus parasanguinis*	CCUG30417^T
35	*Rothia dentocariosa*	KCTC3204^T	72	*Streptococcus pneumoniae*	CCUG28588^T
36	*Selenomona sinoxia*	KCTC5749^T	73	*Streptococcus sobrinus*	ATCC33478^T
37	*Streptococcus anginosus*	ATCC700231^T	74	*Veillonella dispar*	KCOM 1301

[0062]

[0063] *A. actinomycetemcomitans* 균주들은 0.6% yeast extract, 5% horse serum, 75㎍/ml bacitracin 및 5㎍/ml vancomycin(Sigma, USA)이 첨가된 tryptic soy broth(TSB, Difco Laboratories, USA) 배지에서 배양하였다. *Haemophilus spp.* 균주들은 0.5% yeast extract, 0.5 mg/ml hemin 및 2 ㎍/ml vitamin K_1가 첨가된 TSB 배지에서 배양하였고, 연쇄상구균들은 Todd Hewitt broth(TH broth, Difco Diagnostics)배지에서 배양하였다. 그 외 균주들은 TSB(trypticase soy broth)에 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine HCl-H_2O, 0.5 mg/㎖ hemin 및 2 ㎍/㎖ vitamin K_1가 첨가된 배지에 배양하였다.

[0064] *Haemophilus spp.* 및 *Streptococcus spp.* 균주들은 37℃ 호기성 세균배양기(ThermoForma, USA)에서 배양하였으며, 그 외 모든 균주들은 85% N_2, 10% CO_2, 5% H_2가 공급되는 37℃ 혐기성 세균배양기(Bactron I, Sheldon Manufacturing Inc., USA)에서 배양하였다.

[0065] **세균 지놈 DNA 추출**

[0066] 세균의 지놈 DNA들은 G-spin™ Genomic DNA Extraction Kit(iNtRON Co., Seoul, Korea)를 이용하여 제조회사의 지시에 따라 추출하였다. 즉, 세균 배양액 1.5 ㎖를 10,000×g의 원심력을 이용하여 세균을 수확한 다음 50 ㎕의 Pre-incubation solution과 3 ㎕의 lysozyme solution을 넣고 잘 혼합한 다음 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 여기에 250 ㎕의 G-buffer solution을 넣고 잘 혼합한 다음 65℃에서 15분간 반응시키고, 250 ㎕의 Binding solution을 넣고 잘 혼합한 다음 vortexing하였다. 이러한 cell lysates를 G-spin™ column에 넣고 13,000rpm에서 1분간 원심분리하였다. Column에 500㎕의 washing buffer A를 넣고 다시 1분간 원심분리하였다. 여기에 500 ㎕의 washing buffer B를 넣고 다시 1분간 원심분리하고, G-spin™ column을 새로운 eppendorf tube에 넣고 100 ㎕의 elution buffer를 넣고 1분간 실온에 방치한 다음 13,000rpm에서 1분간 원심분리하였다.

[0067] **실시예 1 : 본 발명에 따른 프라이머를 이용한 *A. actinomycetemcomitans*의 검출**

[0068] 본 발명자들은 구강 세균감염성질환의 주요한 병원성 세균 중 하나인 *A.* actinomycetemcomitans의 종 수준에서의 정량적 검출을 위한 종-특이적 프라이머를 개발하기 위하여 다음과 같이 수행하였다.

[0069] **1-1. *A. actinomycetemcomitans*의 종 특이적 프라이머의 설계**

[0070] *A. actinomycetemcomitans*의 *rpoB* 핵산염기서열(GenBank accession no. AY362930)을 바탕으로 PrimerSelect 프로그램(DNASTAR Inc., USA)을 이용하여 본 발명에 따른 종-특이적 프라이머를 설계하였으며, 프라이머 서열은 하기 표 4에 나타내었다. PCR 증폭물의 크기는 113 bp이었다.

표 6

프라이머 서열

프라이머	프라이머 서열	서열번호
forward primer(Aa3-F)	5'-GGC GAG CCT GTA TTT GAT GTG CG-3'	1
reverse primer(Aa3-R)	5'-GTG CCC GGT GCT GCG TCT TTG-3'	2

[0071]

[0072] **1-2. *A. actinomycetemcomitans*에 대한 프라이머의 종-특이성 검증**

[0073] **(1) 일반적인 PCR 방법을 통한 분석**

[0074] Aa3-F/Aa3-R 프라이머의 *A. actinomycetemcomitans*에 대한 종-특이성을 우선 일반적인 PCR 방법으로 테스트하였다. PCR은 *AccuPower* PCR PreMix(Bioneer) 및 *MyGenie*™ 96 Gradient Thermal Block(Bioneer)을 이용하여 실시하였다.

[0075] 먼저, PCR 반응 혼합용액이 20 ㎕가 되도록 20 pmoles씩의 Aa3-F/Aa3-R 프라이머와 4 ng의 세균 유전체 DNA를 넣고 95℃에서 10분간 predenaturation, 95℃에서 10초간 denaturation, 72℃에서 30초간 annealing과 extension 과정을 30회 시행하였다. PCR이 끝난 후 20㎕의 반응물 중 10㎕를 Tris-acetate buffer(0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA, pH 8.0)를 전해질로 사용하고 1.5% 아가로스 젤을 매질로 이용하여 100V에서 15분간 전기영동하였다. 증폭물을 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator로 발색 여부를 확인하였다.

[0076] *A. actinomycetemcomitans*의 검출을 위해 설계된 본 발명에 따른 프라이머(Aa3-F/Aa3-R)의 종-특이성을 일반적인 PCR법으로 조사한 결과, 하기 표 5에 나타낸 바와 같이, *A. actinomycetemcomitans* 균주(참고균주 3주 및 임상균주 6주)에서만 113bp의 PCR 증폭물을 모두 확인할 수 있었고 3종(8균주)의 *Haemophilus spp.* 및 구강 내 다른 세균 종(40 종 40균주)에서는 PCR 증폭물은 확인되지 않았다.

표 7

Aa3-F/Aa3-R 프라이머의 종-특이성 결과

Genus and species (no. of strains tested /no. species)	*rpoB*
Aggregatibacter atinomycetemcomitans (9/1)	+
Haemophilus spp. (8/3)	-
Neisseria spp. (4/4)	-
Actinomyces spp. (5/5)	-
Porphyromonas spp. (2/2)	-
Prevotella spp. (2/2)	-
Tannerella forsythia (1/1)	-
Campylobacter rectus (1/1)	-
Capnocytophaga spp. (3/3)	-
Propionibacterium spp. (2/2)	-
Eubacterium limosum (1/1)	-
Rothia dentocariosa (1/1)	-
Selenomonas spp. (2/2)	-
Fusobacterium spp. (5/5)	-
Leptotrichia buccalis (1/1)	-
Streptococcus spp. (11/11)	-
Veillonella parvula (1/1)	-

[0077]

[0078] **(2)qRT-PCR 방법을 통한 분석**

[0079] qRT-PCR은 바이오니아사(Bionner, Korea)의 *AccuPower* GreenStar™ qPCR PreMix 및 *Exicycler*™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block를 사용하여 실시하였다.

[0080] PCR PreMix에 forward 및 reverse 프라이머 각각 60 pmoles와 세균 유전체 DNA를 PCR 튜브에 넣고, PCR PreMix kit에 동봉된 DEPC water를 넣어 최종 반응물이 50㎕가 되도록 한 후 충분히 voltexing하였다. qRT-PCR 조건은 95℃에서 10분간 predenaturation 시행한 후 95℃에서 10초간 denaturation, 72℃에서 30초간 annealing과 extension하고, scanning하는 과정을 45회 반복하였다. 반응 특이성은 60℃에서 94℃까지 1℃/sec로 온도를 서서히 올렸을 때 형광의 세기를 측정하여 나타낸 melting curve 분석을 통해 확인하였다.

[0081] *A. actinomycetemcomitans*의 검출을 위해 설계된 Aa3-F/Aa3-R 프라이머의 민감도(sensitivity)를 조사하기 위해, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384^{T}의 유전체 DNA를 40 ng부터 4 fg까지 10단계씩 희석해 qRT-PCR을 수행하여 Standard curve와 최소검출한도를 측정하였다.

[0082] 그 결과, Aa3-F/Aa3-R 프라이머는 *A. actinomycetemcomitans* ATCC 33384^{T}의 유전체 DNA 4 fg까지 검출되는 것을 확인할 수 있었다(표 6, 도 1)

표 8

A. actinomycetemcomitans ATCC 33384^{T}의 C_T 값

Genomic DNA amount	Cell number corresponding to genomic DNA amount	C_T
40 ng	1.7×10^7	11.43
4 ng	1.7×10^6	14.47
400 pg	1.7×10^5	17.91
40 pg	1.7×10^4	21.15
4 pg	1.7×10^3	24.61
400 fg	1.7×10^2	28.42
40 fg	1.7×10^1	31.63
4 fg	1.7×10^0	36.13
0	0	ND

[0083]

[0084] 상기와 같은 결과들을 통해, 본 발명에서 설계된 Aa3-F/Aa3-R 프라이머는 qRT-PCR에 의해 *A. actinomycetemcomitans* 유전체 DNA를 4fg까지 종-특이적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다. *A. actinomycetemcomitans*의 세균 유전체 크기가 2.1 Mb인 점을 고려하면, Aa3-F/Aa3-R 프라이머 쌍은 qRT-PCR법에 의해 *A. actinomycetemcomitans* 1.7 마리에 해당하는 세균 유전체 DNA까지도 검출이 가능하다는 것을 의미한다.

[0085] **실시예 2: 본 발명에 따른 프라이머를 이용한 *P. gingivalis*의 검출**

[0086] 본 발명자들은 구강 세균감염성질환의 주요한 병원성 세균 중 하나인 *P.* gingivalis의 종 수준에서의 정량적 검출을 위한 종-특이적 프라이머를 개발하기 위하여 다음과 같이 수행하였다.

[0087] **2-1. *P. gingivalis*의 종-특이적 프라이머의 설계**

[0088] *P. gingivalis*(GenBank accession no. NC_010729)의 *rpoB* 핵산염기서열을 바탕으로 PrimerSelect 프로그램(DNASTAR Inc., USA)을 이용하여 종-특이적 프라이머 쌍을 설계하였으며, 프라이머 서열은 하기 표 7에 나타내었다. PCR 증폭물의 크기는 143 bp이었다.

표 9

프라이머 서열

프라이머	프라이머 서열	서열번호
forward primer(Pg-F)	5'-GGA AGA GAA GAC CGT AGC ACA AGG A-3'	27
reverse primer(Pg-R)	5'-GAG TAG GCG AAA CGT CCA TCA GGT C-3'	28

[0089]

[0090] **2-2 *P. gingivalis*에 대한 프라이머의 종-특이성 검증**

[0091] **(1) 일반적인 PCR 방법을 통한 분석**

[0092] 본 발명에 따른 프라이머(Pg-F/Pg-R)의 *P. gingivalis*에 대한 종-특이성을 우선 일반적인 PCR 방법으로 테스트하였다. PCR은 5 nmole deoxynucleoside triphosphate, 0.8μmole KCl, 0.2μmole Tris-HCl(pH 9.0), 0.03μ

mole $MgCl_2$ 및 1 unit Taq DNA polymerase를 포함하는 *AccuPower* PCR PreMix(Bioneer, Korea)를 이용하여 실시하였다.

[0093] PCR 반응 혼합용액이 20 ㎕가 되도록 PCR PreMix 튜브에 4 ng의 세균 유전체 DNA와 20 pmoles씩의 Pg-F/Pg-R 프라이머를 넣고, Peltier thermal cycler(Model PTC-200 DNA Engine™, MJ Research Inc., USA)를 사용하여 95℃에서 10분간 초기 변성(initial denaturation)시키고, 95℃에서 30초간 변성(denaturation), 72℃에서 30초간 어닐링(annealing) 및 신장(extension) 과정을 30회 반복 수행하였다. PCR이 끝난 후 20 ㎕의 반응물 중 6 ㎕를 Tris-acetate buffer(0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA, pH 8.0)를 전해질로 사용하고 1.5% 아가로스 젤을 매질로 이용하여 100V에서 30분간 전기영동하였다. 증폭물을 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator로 발색 여부를 확인하였다.

[0094] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, *P. gingivalis*의 검출을 위해 설계된 프라이머(Pg-F/Pg-R)의 종-특이성을 일반적인 PCR법으로 *P. gingivalis* 균주(4균주)와 유전자 레벨에서 *P. gingivalis*와 가장 밀접하게 관련있는 종인 *P. endodontalis*를 포함하는 구강 내 다른 세균 종(46균주)에 대해 일반적인 PCR 방법으로 테스트한 결과, PCR 증폭물을 확인할 수 있었다(도 2 참조).

[0095] **(2) qRT-PCR 방법을 통한 분석**

[0096] qRT-PCR은 바이오니아사(Bionner, Korea)의 *AccuPower* GreenStar™ qPCR PreMix 및 *Exicycler*™ 96 Real-Time Quantitative Thermal Block을 사용하여 실시하였다.

[0097] PreMix PCR 튜브에 3㎕씩의 forward 및 reverse 프라이머(최종 농도는 각각 500nM)와, 5 ㎕의 세균 유전체 DNA를 넣은 후, 살균된 DNase-RNase-free water를 넣어 최종 반응물이 50 ㎕가 되도록 한 후 충분히 voltexing하였다. qRT-PCR 조건은 95℃에서 10분간 initial denaturation 시행한 후 95℃에서 10초간 denaturation, 72℃에서 30초간 annealing 및 extension하는 과정을 40회 반복하였으며, 25℃에서 1분간 냉각시켰다. 반응 특이성은 65℃에서 94℃까지 1℃/sec로 온도를 서서히 올렸을 때 형광의 세기를 측정하여 나타낸 melting curve 분석을 통해 확인하였다.

[0098] *P. gingivalis*의 검출을 위해 설계된 Pg-F/Pg-R 프라이머의 민감도(sensitivity)를 조사하기 위해, *P. gingivalis* ATCC 33277^{T}의 유전체 DNA를 4 ng부터 4 fg까지 10단계씩 희석해 qRT-PCR을 수행하여 Standard curve와 최소검출한도를 측정하였다.

[0099] 그 결과, Pg-F/Pg-R 프라이머는 *P. gingivalis* ATCC 33277^{T}의 유전체 DNA 4 fg까지 검출되는 것을 확인할 수 있었다(표 8, 도3 참조). *P. gingivalis* ATCC 33277^{T}의 게놈 사이즈는 2.35Mb이고, Pg-F/Pg-R 프라이머는 1.6의 *P. gingivalis* 유전체를 검출할 수 있다(표 8 참조).

표 10

P. gingivalis ATCC 33277^{T}의 C_T 값

Genomic DNA amount	Cell number corresponding to DNA amout	C_T
4 ng	1.6×10^{0}	14.66
400 pg	1.6×10^{5}	18.57
40 pg	1.6×10^{4}	22.35
4 pg	1.6×10^{3}	26.19
400 fg	1.6×10^{2}	29.93
40 fg	1.6×10^{1}	33.54
4 fg	1.6×10^{0}	38.46
0	0	ND

[0100]

[0101] 상기와 같은 결과들을 통해, 본 발명에서 설계된 Pg-F/Pg-R 프라이머는 qRT-PCR에 의해 *P. gingivalis* 유전체 DNA를 4fg까지 종-특이적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다. *P. gingivalis*의 세균 유전체 크기가 2.35 Mb인 점을 고려하면, Pg-F/Pg-R 프라이머 쌍은 qRT-PCR법에 의해 *P. gingivalis* 1.6 균주에 해당하는 세균 유전체 DNA까지도 검출이 가능하다는 것을 의미한다.

[0102] **실시예 3 ~ 44 : 다양한 구강 세균감염성질환의 병원성 세균 검출**

[0103] 상기 실시예 1 및 2와 유사한 방법을 이용하여, 본 발명의 프라이머를 이용한 하기 병원성 세균들에 대해서 검출하였다. 이들의 결과에 대해서는 각각 도 3 ~ 45에 나타내었다.

표 11

[0104]

세균 종 이름	실시예	프라이머 서열목록
Atopobium rimae	실시예3	3
		4
Capnocytophaga gingivalis	실시예4	5
		6
Capnocytophaga ochracea	실시예5	7
		8
Capnocytophaga sputigena	실시예6	9
		10
Fusobacterium necrophorum	실시예7	11
		12
Fusobacterium nucleatum	실시예8	13
		14
Fusobacterium periodonticum	실시예9	15
		16
Fusobacterium simiae	실시예10	17
		18
Leptotrichia buccalis	실시예11	19
		20
Neisseria meningitidis	실시예12	21
		22
Neisseria subflava	실시예13	23
		24
Porphyromonas endodontalis	실시예14	25
		26
Prevotella baroniae	실시예15	29
		30
Prevotella bivia	실시예16	31
		32
Prevotella corporis	실시예17	33
		34
Prevotella disiens	실시예18	35
		36
Prevotella intermedia	실시예19	37
		38
Prevotella marshii	실시예20	39
		40

표 12

[0105]

세균 종 이름	실시예	프라이머 서열목록
Prevotella melaninogenica	실시예21	41
		42
Prevotella nigrescens	실시예22	43
		44
Prevotella oralis	실시예23	45
		46
Prevotella oris	실시예24	47
		48
Prevotella oulorum	실시예25	49
		50
Prevotella pallens	실시예26	51
		52
Prevotella veroralis	실시예27	53
		54
Selenomonas noxia	실시예28	55
		56
Streptococcus constellatus	실시예29	57
		58
Streptococcus intermidius	실시예30	59
		60
Streptococcus oralis	실시예31	61
		62
Streptococcus sanguinis	실시예32	63
		64
Veillonella parvula	실시예33	65
		66
Actinomyces naeslundii	실시예34	67
		68
Campylobacter rectus	실시예35	69
		70
Eikenella corrodens	실시예36	71
		72
Neisseria sicca	실시예37	73
		74
Porphyromonas asaccharolytica	실시예38	75
		76
Prevotella buccae	실시예39	77
		79
Prevotella buccalis	실시예40	78
		80
Rothia dentocariosa	실시예41	81
		82
Streptococcus anginosus	실시예42	83
		84
Tannerella forsythensis	실시예43	85
		86
Treponema denticola	실시예44	87
		88

[0106] qRT-PCR을 수행하여 얻은 각 프라이머의 Standard curve 및 최소검출한도는 도 3에서 도 45에 나타나 있는 바와 같다.

[0107] 특히, 설계된 종-특이 qRT-PCR 프라이머의 각 세균종의 지놈 DNA에 대한 CT 값 (민감도 측정 결과)은 다음과 같이 나타났다.

표 13

순번	세균 종 이름	Genomic DNA amount							
		2 ng	200 pg	20 pg	2 pg	200 fg	20 fg	2 fg	0
1	*Actinomyces naeslundii*	16.5	19.6	23.1	26.5	30.0	33.6	37.6	0
2	*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*	15.1	18.5	21.8	25.0	28.5	31.7	35.3	0
3	*Atopobium rimae*	17.6	21.0	24.9	29.5	33.4	37.98	ND	0
4	*Campylobacter rectus*	18.7	21.9	25.3	28.6	32.5	34.9	ND	0
5	*Capnocytophaga gingivalis*	11.9	15.0	18.5	21.7	25.0	28.4	32.0	0
6	*Capnocytophaga ochracea*	15.5	18.9	22.6	26.1	29.3	33.1	37.2	0
7	*Capnocytophaga sputigena*	13.7	16.8	20.1	23.4	26.7	30.3	33.7	0
8	*Eikenella corrodens*	14.9	18.3	21.5	25.0	28.7	32.4	34.3	0
9	*Fusobacterium necrophorum*	11.1	15.0	18.7	22.3	26.3	30.1	33.8	0
10	*Fusobacterium nucleatum*	15.1	20.2	24.6	29.5	33.8	37.7	ND	0
11	*Fusobacterium periodonticum*	12.3	16.6	19.1	22.5	26.3	30.0	32.3	0
12	*Fusobacterium simiae*	13.8	17.1	20.6	23.9	27.6	31.4	35.0	0
13	*Leptotrichia buccalis*	13.3	17.0	20.3	24.0	27.7	31.6	35.2	0
14	*Neisseria meningitidis*	23.3	26.6	29.9	33.2	36.0	37.7	ND	0
15	*Neisseria sicca*	17.6	21.5	24.8	28.4	31.8	34.7	ND	0
16	*Neisseria subflava*	17.3	20.3	23.4	27.0	30.2	31.1	32.1	0
17	*Porphyromonas asaccharolytica*	21.1	22.9	27.3	30.9	34.8	ND	ND	0
18	*Porphyromonas endodontalis*	15.1	18.0	21.3	25.2	29.1	33.0	37.4	0
19	*Porphyromonas gingivalis*	15.9	19.5	23.4	26.3	29.8	33.6	37.3	0
20	*Prevotella baroniae*	16.6	20.2	24.1	27.4	30.9	35.0	36.8	0

ND: not detected

[0108]

표 14

순번	세균 종 이름	Genomic DNA amount							
		2 ng	200 pg	20 pg	2 pg	200 fg	20 fg	2 fg	0
21	*Prevotella bivia*	15.1	18.6	22.1	25.4	29.3	32.2	33.4	0
22	*Prevotella buccae*	15.3	18.7	21.9	25.3	28.6	32.4	35.2	0
23	*Prevotella buccalis*	14.0	17.3	20.7	24.0	27.6	31.5	35.2	0
24	*Prevotella corporis*	15.6	19.5	23.2	26.9	30.6	34.3	37.8	0
25	*Prevotella dissiens*	13.8	17.2	20.4	23.9	27.0	29.9	31.5	0
26	*Prevotella intermedia*	15.3	19.5	23.0	26.7	30.6	33.4	ND	0
27	*Prevotella marshii*	16.4	20.2	23.5	27.2	31.4	34.9	38.5	0
28	*Prevotella melaninogenica*	17.1	20.5	24.3	28.0	32.4	35.6	37.1	0
29	*Prevotella nigrescens*	14.5	18.0	21.3	24.6	28.1	31.2	33.0	0
30	*Prevotella oralis*	15.5	19.1	22.7	26.1	29.5	33.6	37.1	0
31	*Prevotella oris*	13.9	17.2	20.5	23.3	27.0	30.5	31.9	0
32	*Prevotella oulorum*	14.5	17.5	21.0	23.9	27.5	30.9	ND	0
33	*Prevotella salivae*	13.6	16.8	20.0	23.7	27.0	30.5	34.0	0
34	*Prevotella veroralis*	15.8	19.1	22.4	25.7	29.2	32.6	34.4	0
35	*Rothia dentocariosa*	15.7	19.2	22.6	26.4	30.7	35.0	36.4	0
36	*Selenomonas noxia*	17.8	21.5	25.5	29.7	33.4	35.6	36.3	0
37	*Streptococcus anginosus*	13.5	16.7	20.3	23.4	27.1	30.8	33.0	0
38	*Streptococcus constellatus*	15.0	18.4	21.9	25.6	28.9	32.4	34.1	0
39	*Streptococcus intermidius*	13.0	16.6	20.3	23.9	27.8	31.4	34.6	0
40	*Streptococcus oralis*	13.0	16.2	19.5	22.8	26.3	29.5	33.4	0
41	*Streptococcus sanguinis*	15.6	19.1	22.5	26.0	29.4	32.6	36.6	0
42	*Tannerella forsythia*	15.4	18.4	21.9	25.1	28.8	32.7	35.4	0
43	*Treponema denticola*	16.3	19.3	22.5	26.0	29.8	33.9	38.2	0
44	*Veillonella parvula*	14.0	17.3	20.5	24.0	27.4	30.4	33.1	0

[0109] ND: not detected

표 15

순번	세균 종 이름	Genomic DNA amount							
		2 ng	200 pg	20 pg	2 pg	200 fg	20 fg	2 fg	0
23	*Prevotella buccalis*	14.0	17.3	20.7	24.0	27.6	31.5	35.2	0
24	*Prevotella corporis*	15.6	19.5	23.2	26.9	30.6	34.3	37.8	0
25	*Prevotella dissiens*	13.8	17.2	20.4	23.9	27.0	29.9	31.5	0
26	*Prevotella intermedia*	15.3	19.5	23.0	26.7	30.6	33.4	ND	0
27	*Prevotella marshii*	16.4	20.2	23.5	27.2	31.4	34.9	38.5	0
28	*Prevotella melaninogenica*	17.1	20.5	24.3	28.0	32.4	35.6	37.1	0
29	*Prevotella nigrescens*	14.5	18.0	21.3	24.6	28.1	31.2	33.0	0
30	*Prevotella oralis*	15.5	19.1	22.7	26.1	29.5	33.6	37.1	0
31	*Prevotella oris*	13.9	17.2	20.5	23.3	27.0	30.5	31.9	0
32	*Prevotella oulorum*	14.5	17.5	21.0	23.9	27.5	30.9	ND	0
33	*Prevotella pallens*	13.6	16.8	20.0	23.7	27.0	30.5	34.0	0
34	*Prevotella veroralis*	15.8	19.1	22.4	25.7	29.2	32.6	34.4	0
35	*Rothia dentocariosa*	15.7	19.2	22.6	26.4	30.7	35.0	36.4	0
36	*Selenomonas noxia*	17.8	21.5	25.5	29.7	33.4	35.6	36.3	0
37	*Streptococcus anginosus*	13.5	16.7	20.3	23.4	27.1	30.8	33.0	0
38	*Streptococcus constellatus*	15.0	18.4	21.9	25.6	28.9	32.4	34.1	0
39	*Streptococcus intermidius*	13.0	16.6	20.3	23.9	27.8	31.4	34.6	0
40	*Streptococcus oralis*	13.0	16.2	19.5	22.8	26.3	29.5	33.4	0
41	*Streptococcus sanguinis*	15.6	19.1	22.5	26.0	29.4	32.6	36.6	0
42	*Tannerella forsythia*	15.4	18.4	21.9	25.1	28.8	32.7	35.4	0
43	*Treponema denticola*	16.3	19.3	22.5	26.0	29.8	33.9	38.2	0
44	*Veillonella parvula*	14.0	17.3	20.5	24.0	27.4	30.4	33.1	0

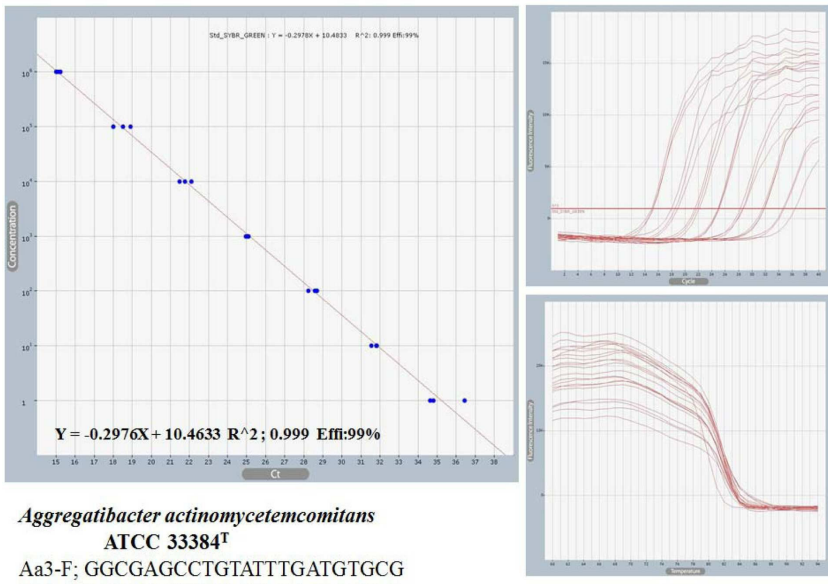
ND: not detected

[0110]

[0111] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

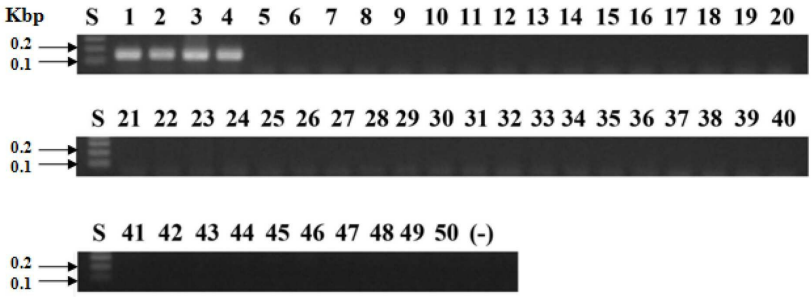
도면

도면1

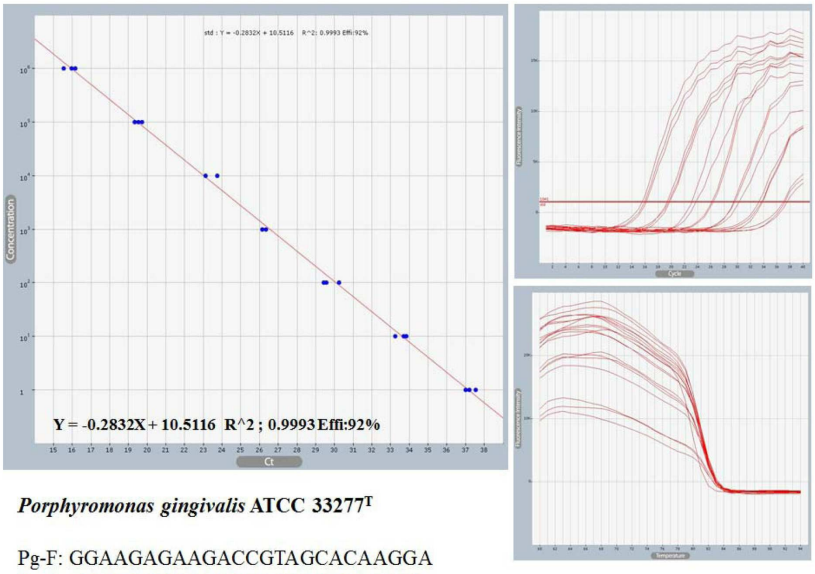


Aggregatibacter actinomycetemcomitans
ATCC 33384^{T}
Aa3-F; GGCGAGCCTGTATTTGATGTGCG
Aa3-R; GTGCCCGGTGCTGCGTCTTTG

도면2



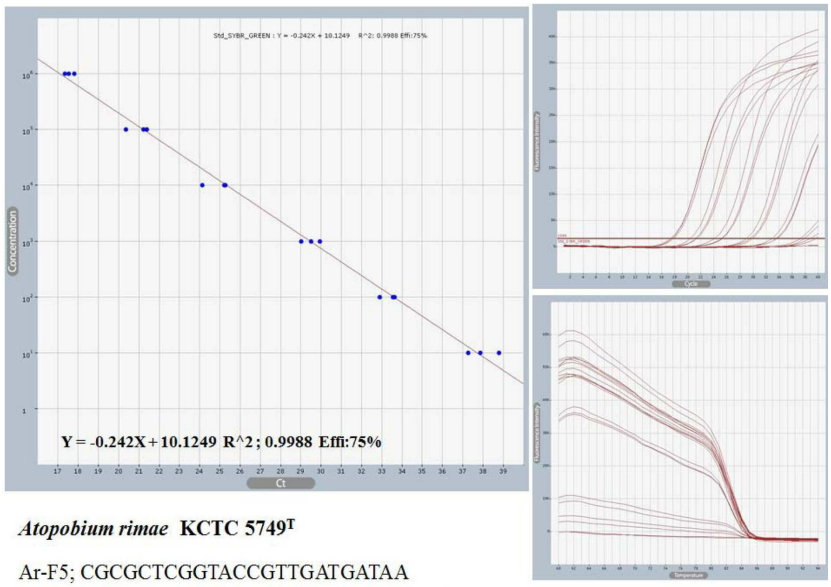
도면3



***Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277^T**

Pg-F: GGAAGAGAAGACCGTAGCACAAGGA
Pg-R: GAGTAGGCGAAACGTCCATCAGGTC

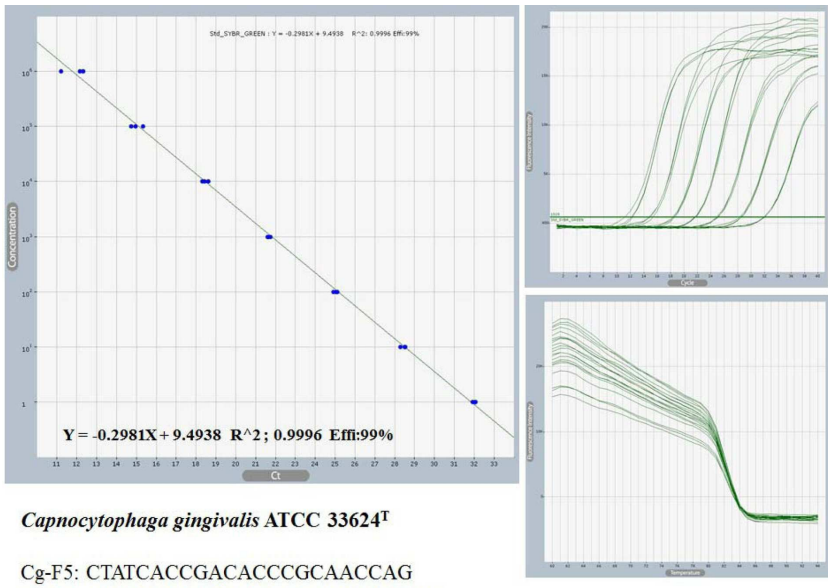
도면4



***Atopobium rimae* KCTC 5749^T**

Ar-F5; CGCGCTCGGTACCGTTGATGATAA
Ar-R8; GAACAAGGAGACGGGCGAGAAAAAG

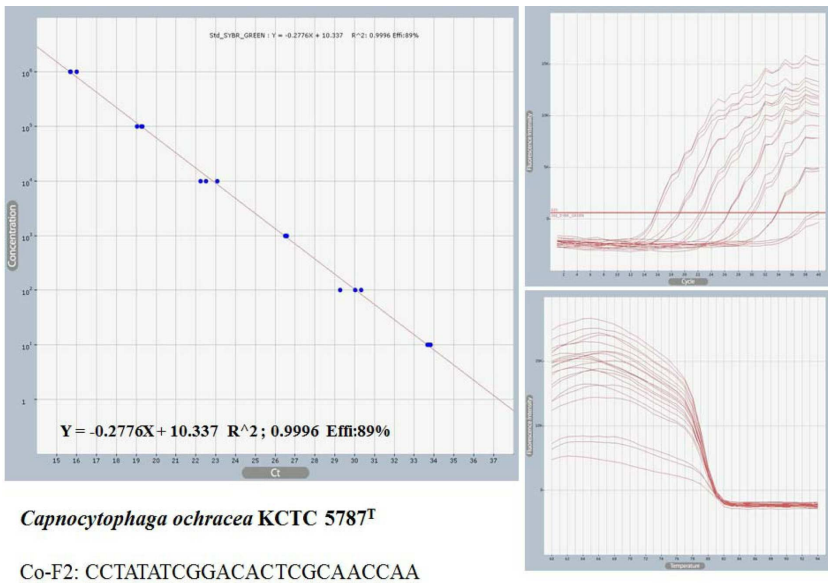
도면5



Capnocytophaga gingivalis ATCC 33624^T

Cg-F5: CTATCACCGACACCCGCAACCAG
Cg-R5: GTCCACGCTCTATACACTCCTCCAC

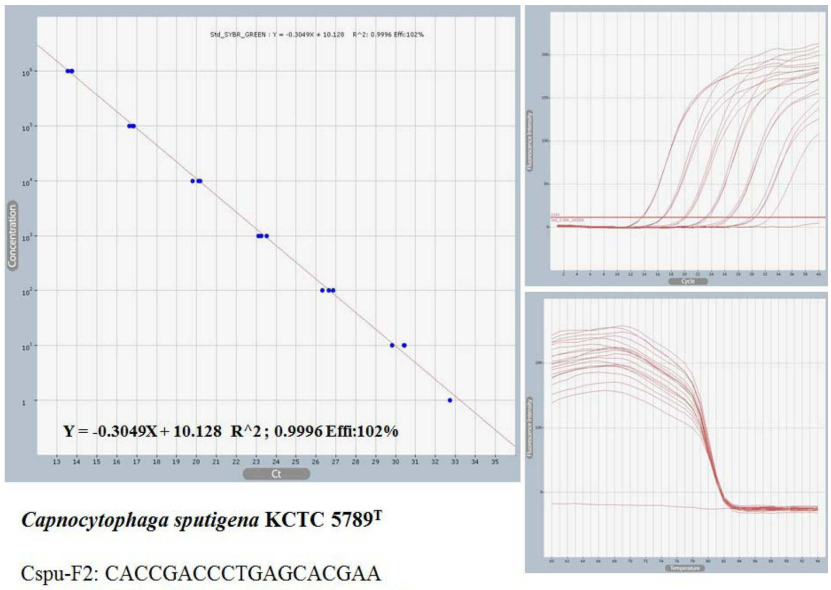
도면6



Capnocytophaga ochracea KCTC 5787^T

Co-F2: CCTATATCGGACACTCGCAACCAA
Co-R2: TTAATCGGGCTTTCAGAGGCACA

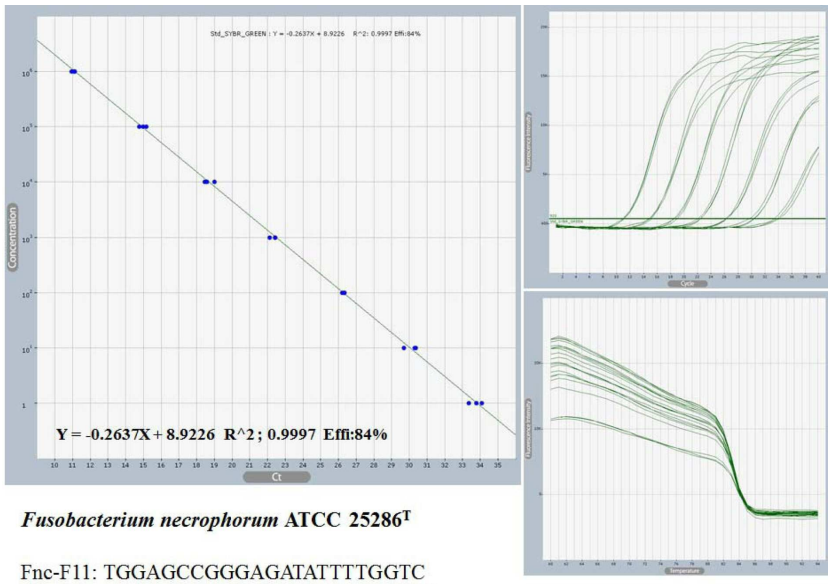
도면7



Capnocytophaga sputigena KCTC 5789^T

Cspu-F2: CACCGACCCTGAGCACGAA
Cspu-R2: TGACCGAAGAATACCCCAGGA

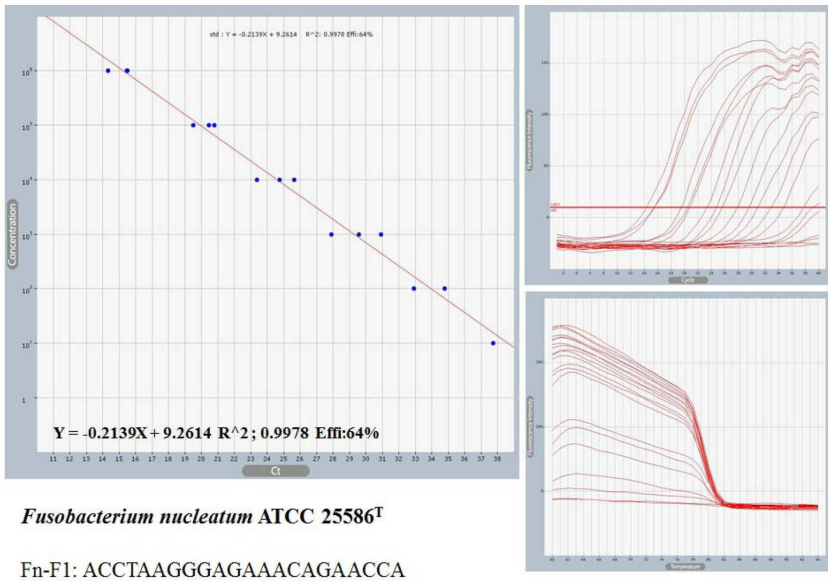
도면8



Fusobacterium necrophorum ATCC 25286^T

Fnc-F11: TGGAGCCGGGAGATATTTTGGTC
Fnc-R11: TTCCTTTTGATCCGTGAGGCATAC

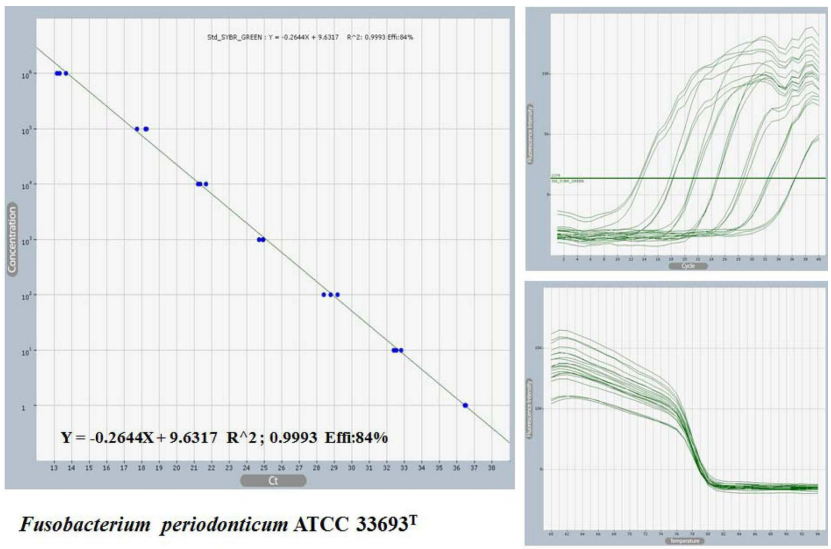
도면9



***Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586^T**

Fn-F1: ACCTAAGGGAGAAACAGAACCA
Fn-R1: CCTGCCTTTAATTCATCTCCAT

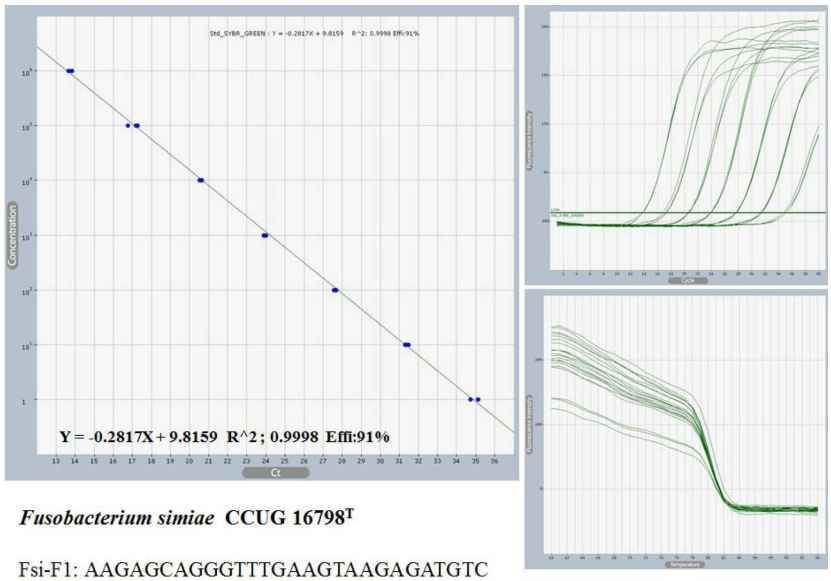
도면10



***Fusobacterium periodonticum* ATCC 33693^T**

Fp-F2: TTGCTGAAAAACGTAAGATAACTGTA
Fp-R2: TCTGCAGGTAATACTCTTGAAACA

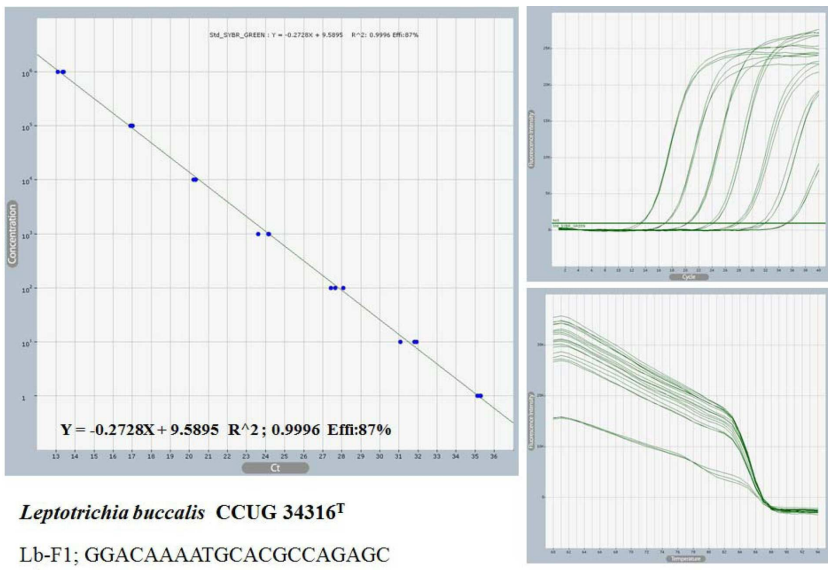
도면11



Fusobacterium simiae CCUG 16798^T

Fsi-F1: AAGAGCAGGGTTTGAAGTAAGAGATGTC
Fsi-R2: AGCATAAGTAGCAAGCGATCCAATAAGC

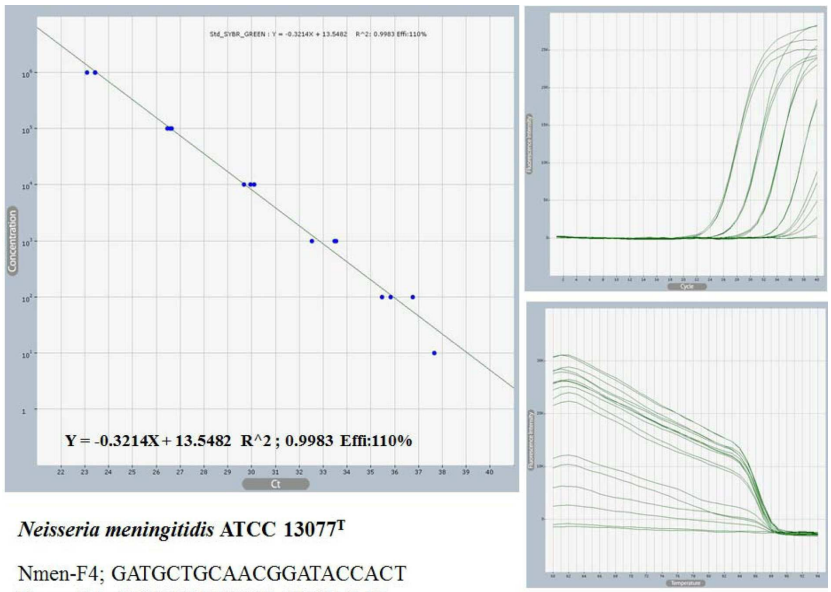
도면12



Leptotrichia buccalis CCUG 34316^T

Lb-F1; GGACAAAATGCACGCCAGAGC
Lb-R1; GATGCACCGTAGGCTTCCAATG

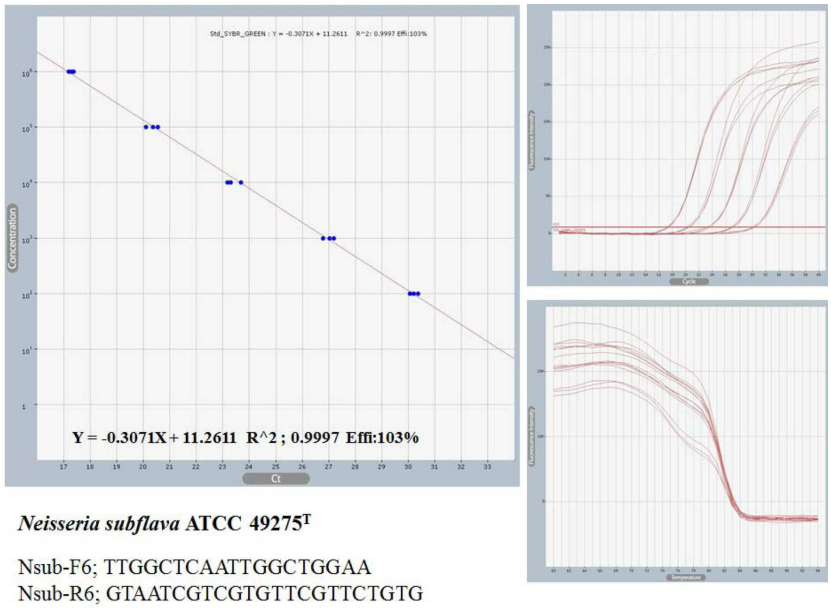
도면13



***Neisseria meningitidis* ATCC 13077^T**

Nmen-F4; GATGCTGCAACGGATACCACT
Nmen-R4; ATGCCGATTTGGATTCAGAT

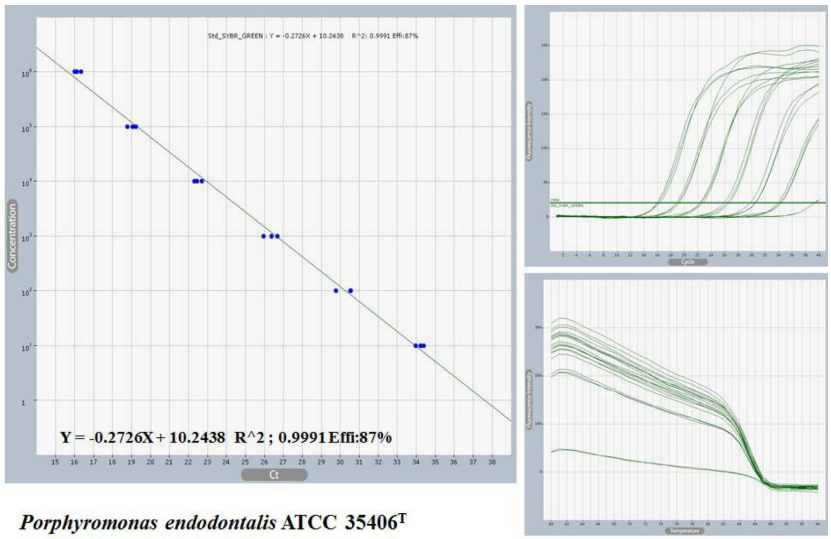
도면14



***Neisseria subflava* ATCC 49275^T**

Nsub-F6; TTGGCTCAATTGGCTGGAA
Nsub-R6; GTAATCGTCGTGTTCGTTCTGTG

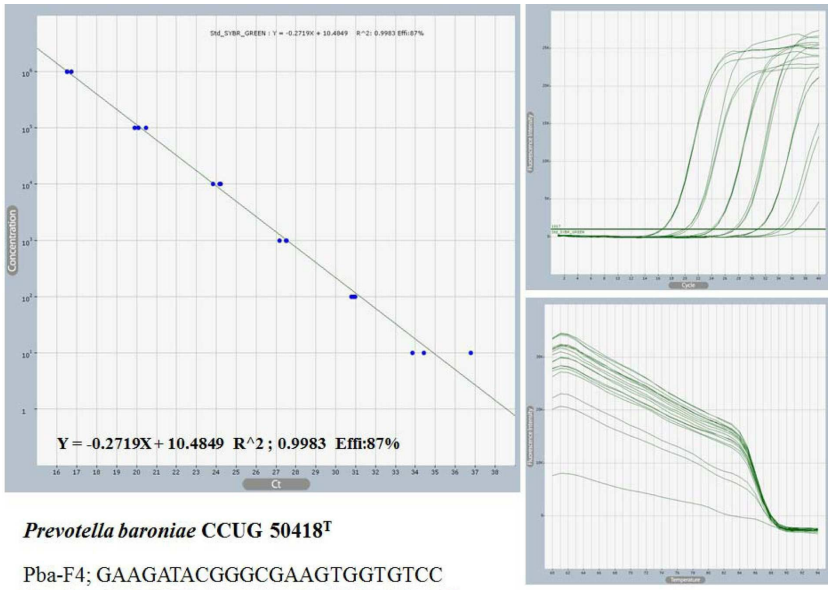
도면15



***Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406^T**

Pe-F1: AGCAGAGTTCCGTCGTCGTATTCA
Pe-R1: GCGCCCTGCCATCTTGTCTC

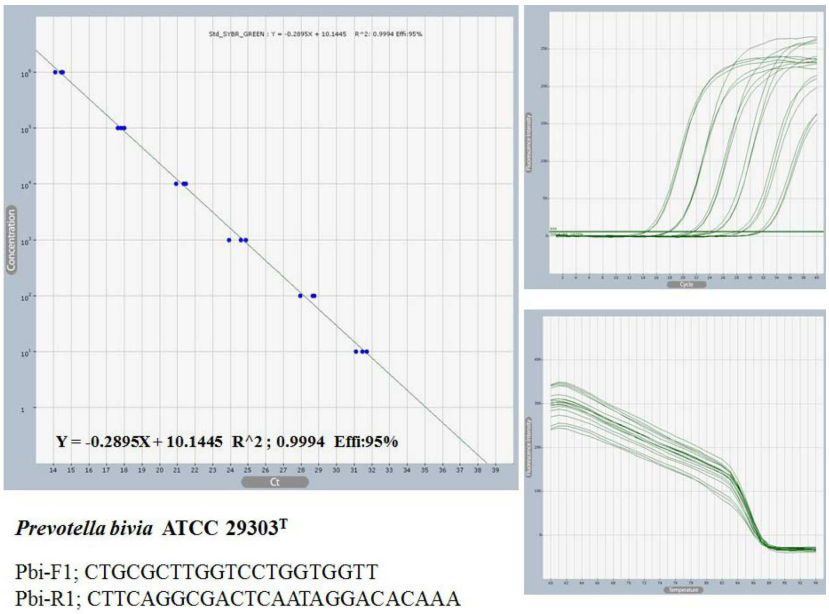
도면16



***Prevotella baroniae* CCUG 50418^T**

Pba-F4; GAAGATACGGGCGAAGTGGTGTCC
Pba-R4; ACTTATTAGCTGCTTCGGCGTCCTTG

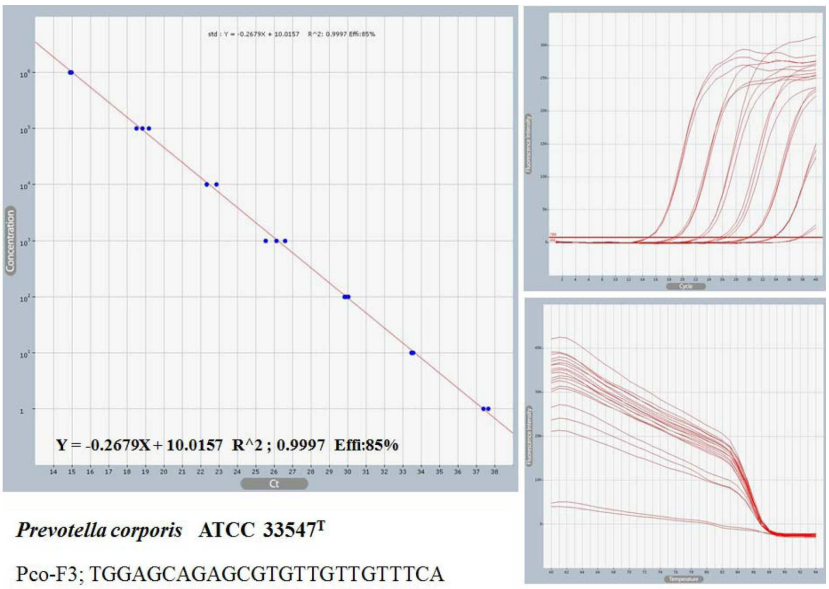
도면17



***Prevotella bivia* ATCC 29303^T**

Pbi-F1; CTGCGCTTGGTCCTGGTGGTT
Pbi-R1; CTTCAGGCGACTCAATAGGACACAAA

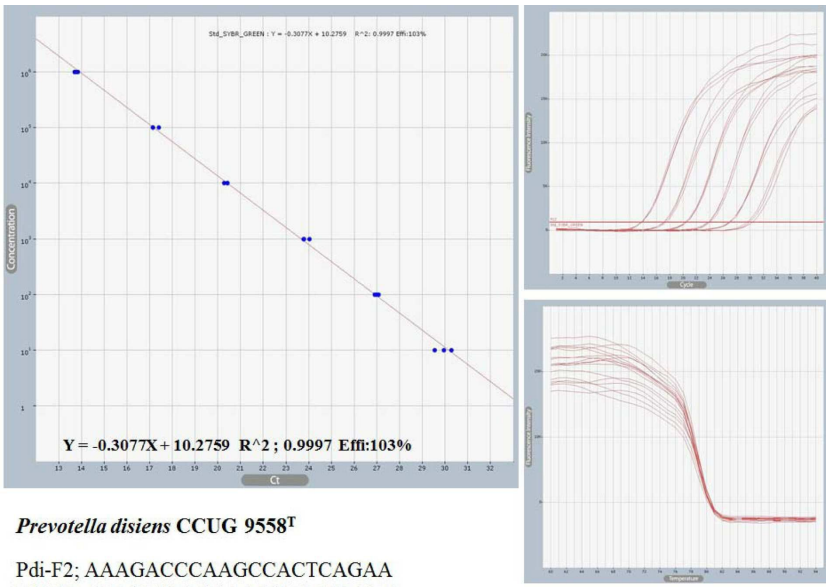
도면18



***Prevotella corporis* ATCC 33547^T**

Pco-F3; TGGAGCAGAGCGTGTTGTTGTTTCA
Pco-R3; GGAATGATGCGGGCACTGTAAAGC

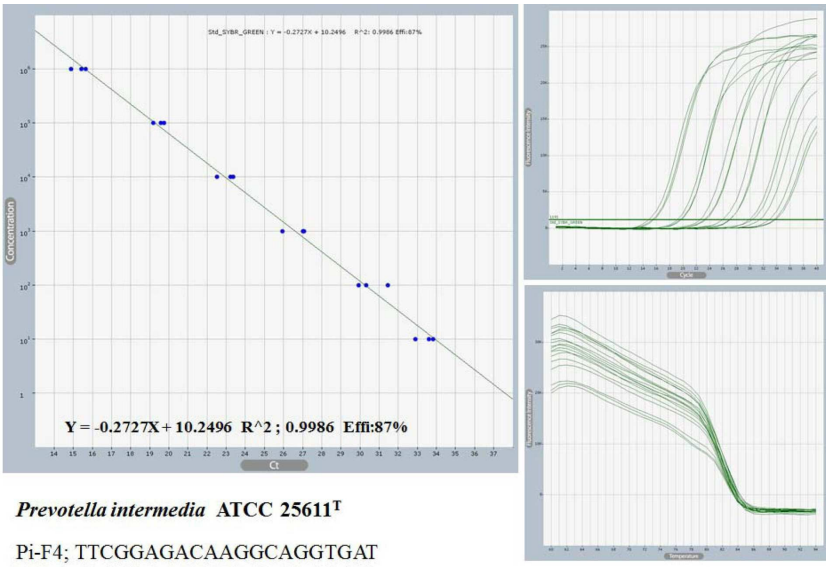
도면19



***Prevotella disiens* CCUG 9558^T**

Pdi-F2; AAAGACCCAAGCCACTCAGAA
Pdi-R2; CTACTTCGCCAAGGTCATAACG

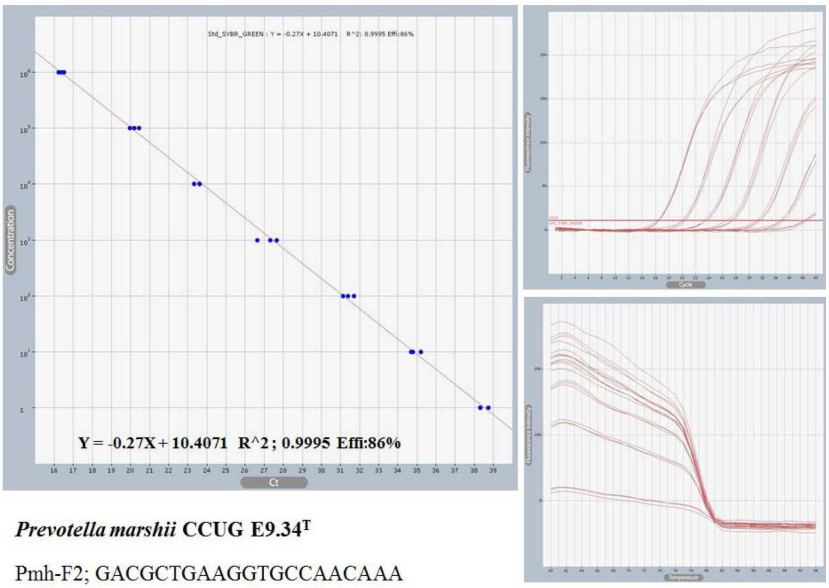
도면20



***Prevotella intermedia* ATCC 25611^T**

Pi-F4; TTCGGAGACAAGGCAGGTGAT
Pi-R4; CTTGCTTTCGCGTGTCTTGATA

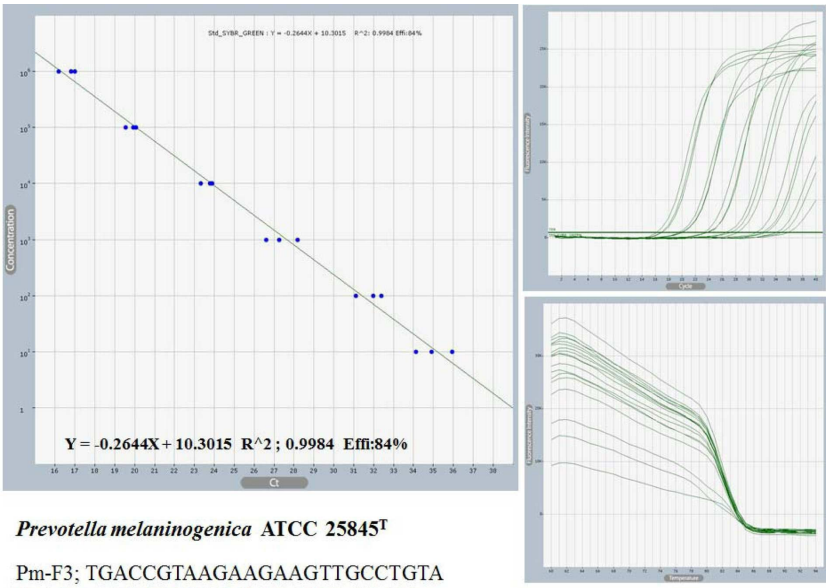
도면21



***Prevotella marshii* CCUG E9.34^T**

Pmh-F2; GACGCTGAAGGTGCCAACAAA
Pmh-R2; CAGGGTCAGCATTACGCAACT

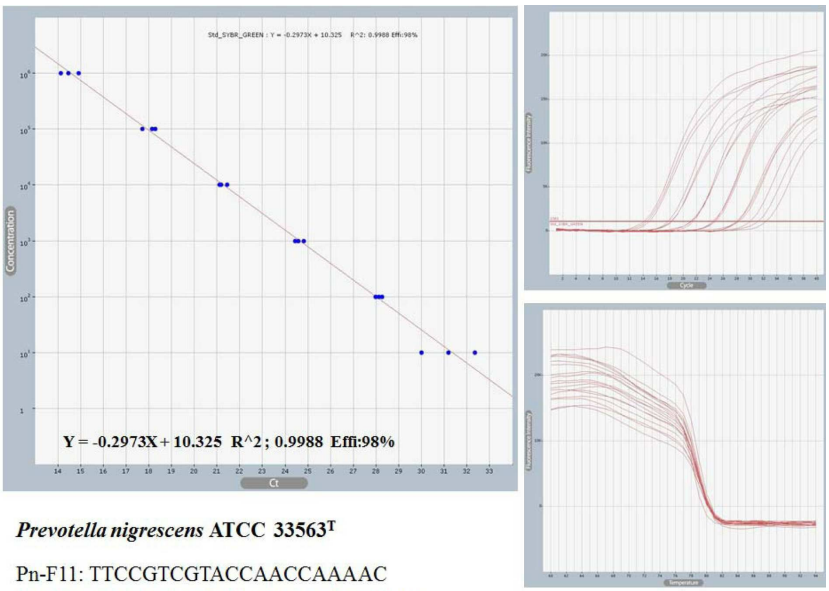
도면22



***Prevotella melaninogenica* ATCC 25845^T**

Pm-F3; TGACCGTAAGAAGAAGTTGCCTGTA
Pm-R3; TTGCGACCGATAGCTGCCTTCATA

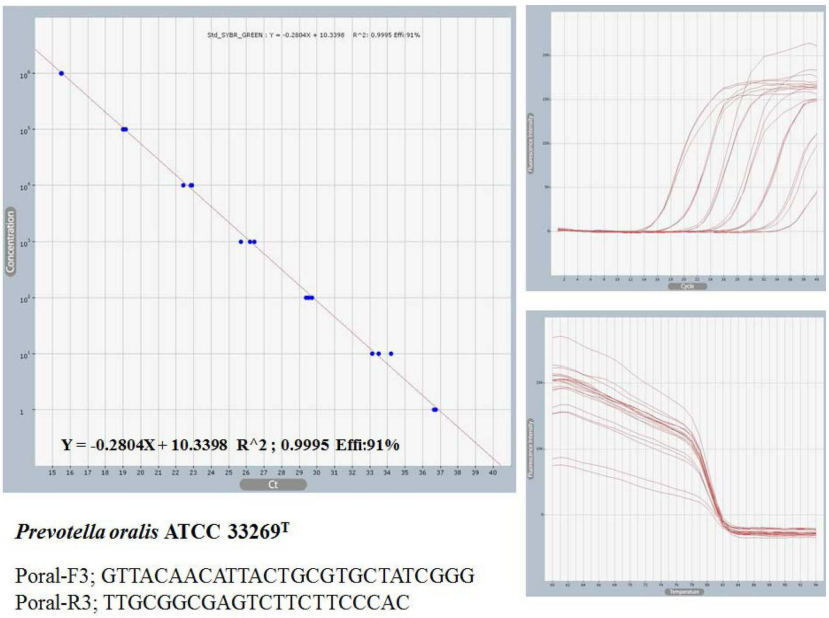
도면23



***Prevotella nigrescens* ATCC 33563^T**

Pn-F11: TTCCGTCGTACCAACCAAAAC
Pn-R11: CTAAAAGATTTCGCCCAAGTGCT

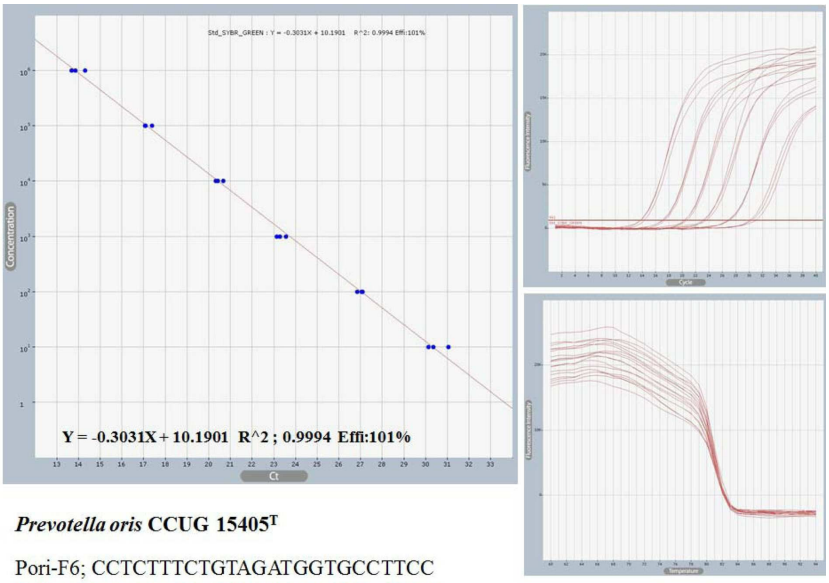
도면24



***Prevotella oralis* ATCC 33269^T**

Poral-F3; GTTACAACATTACTGCGTGCTATCGGG
Poral-R3; TTGCGGCGAGTCTTCTTCCCAC

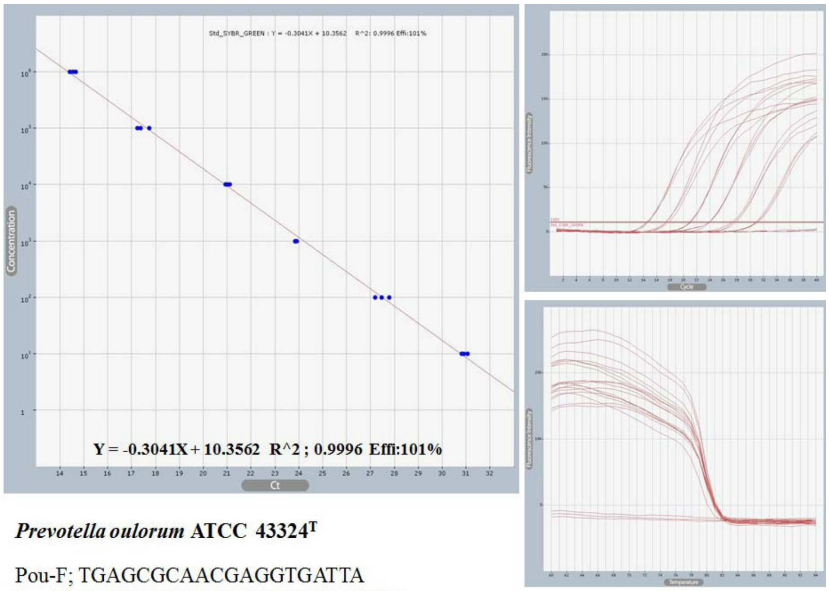
도면25



***Prevotella oris* CCUG 15405^T**

Pori-F6; CCTCTTTCTGTAGATGGTGCCTTCC
Pori-R6; GACGCATCATATTACATCCCATCAG

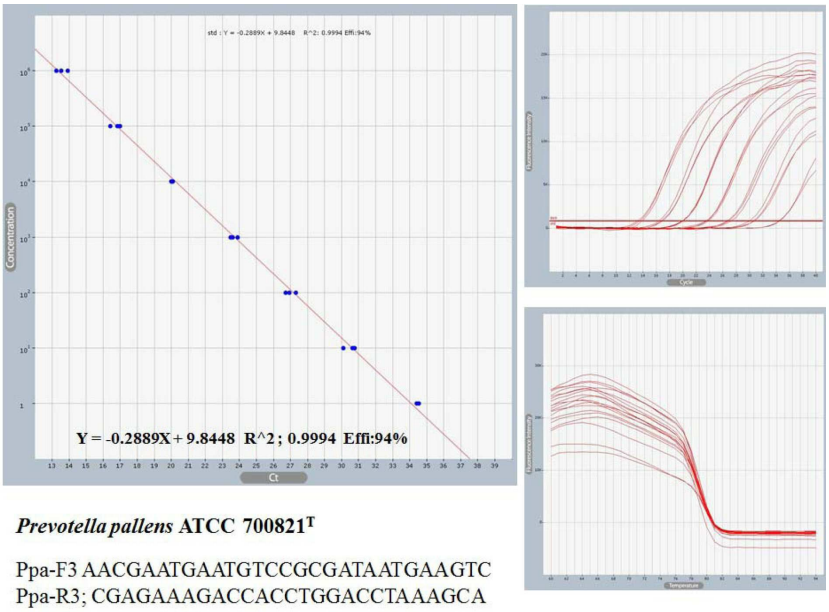
도면26



***Prevotella oulorum* ATCC 43324^T**

Pou-F; TGAGCGCAACGAGGTGATTA
Pou-R; ATGGTGTATTTGCTTGCTGACTCG

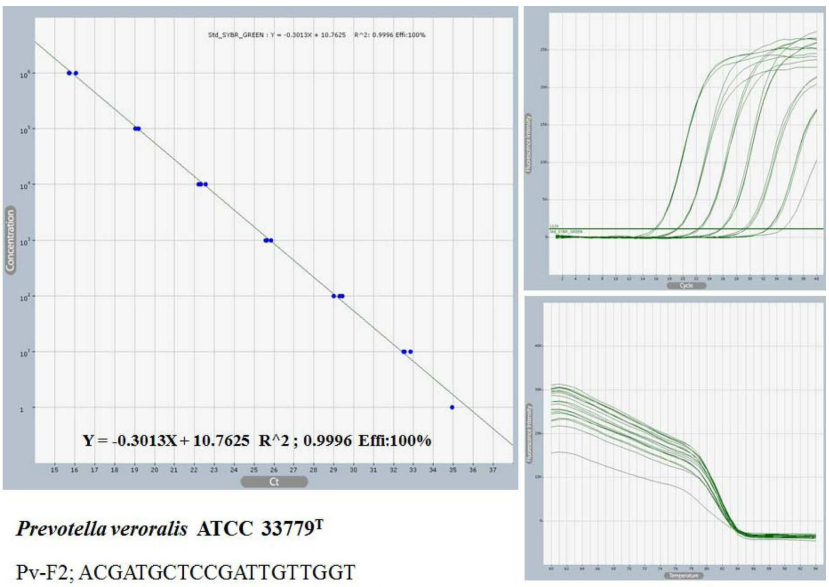
도면27



***Prevotella pallens* ATCC 700821^T**

Ppa-F3 AACGAATGAATGTCCGCGATAATGAAGTC
Ppa-R3; CGAGAAAGACCACCTGGACCTAAAGCA

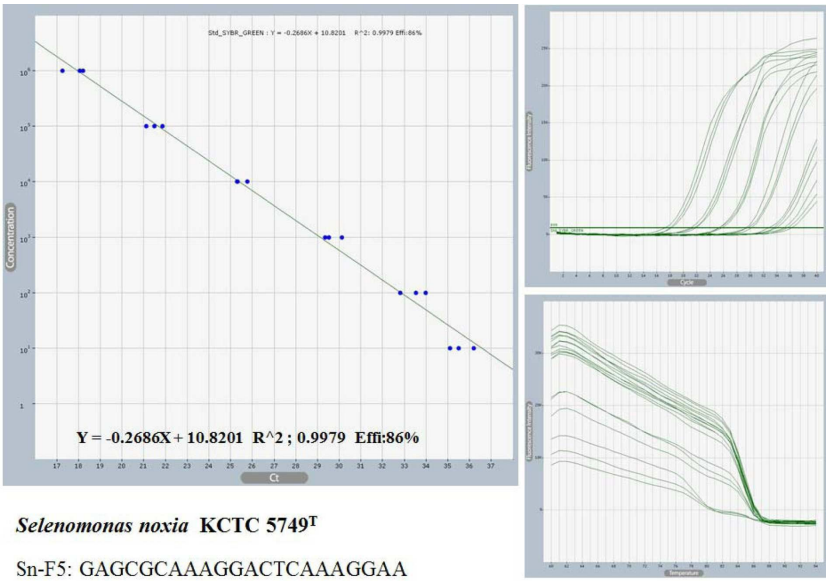
도면28



***Prevotella veroralis* ATCC 33779^T**

Pv-F2; ACGATGCTCCGATTGTTGGT
Pv-R2; TACACCTTCACCTTCAGCCATAAT

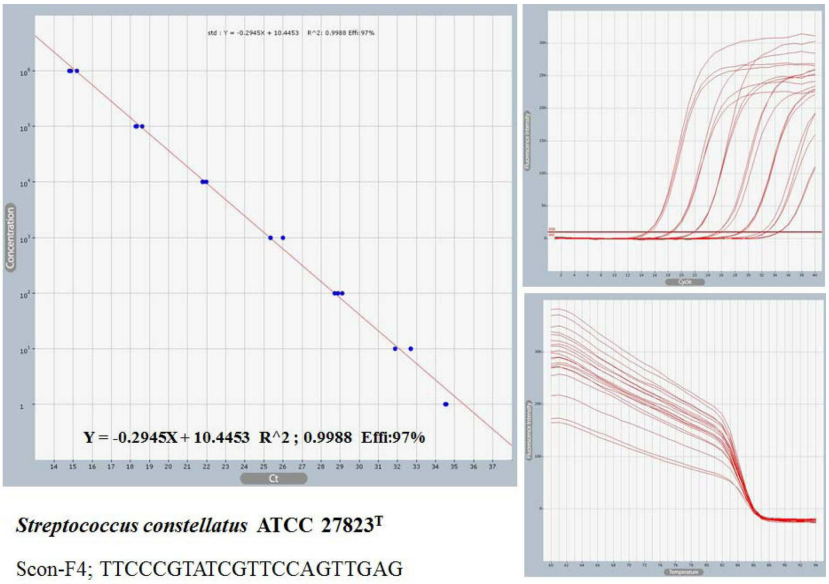
도면29



Selenomonas noxia **KCTC 5749^T**

Sn-F5: GAGCGCAAAGGACTCAAAGGAA
Sn-R6: GCGCAGGAGCTATCAGTGGTTTC

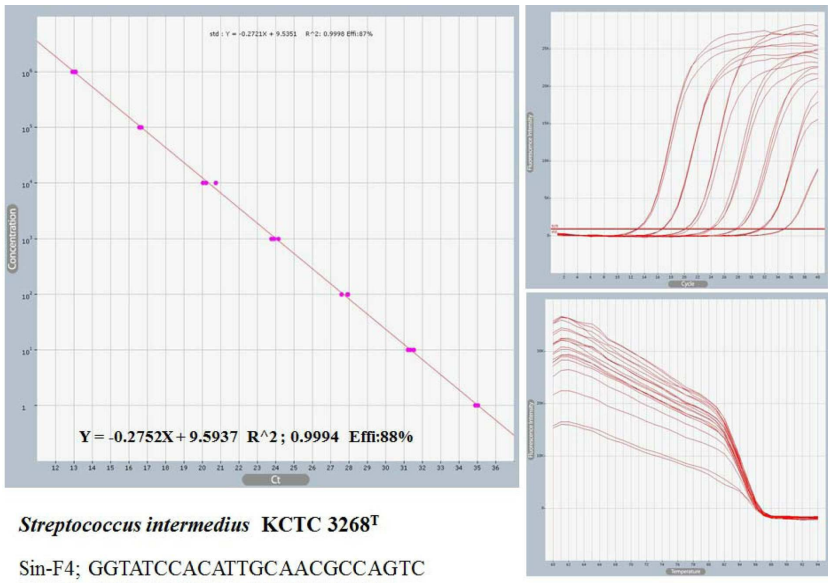
도면30



Streptococcus constellatus **ATCC 27823^T**

Scon-F4; TTCCCGTATCGTTCCAGTTGAG
Scon-R4; GTTGCGAGCAGCCATACCA

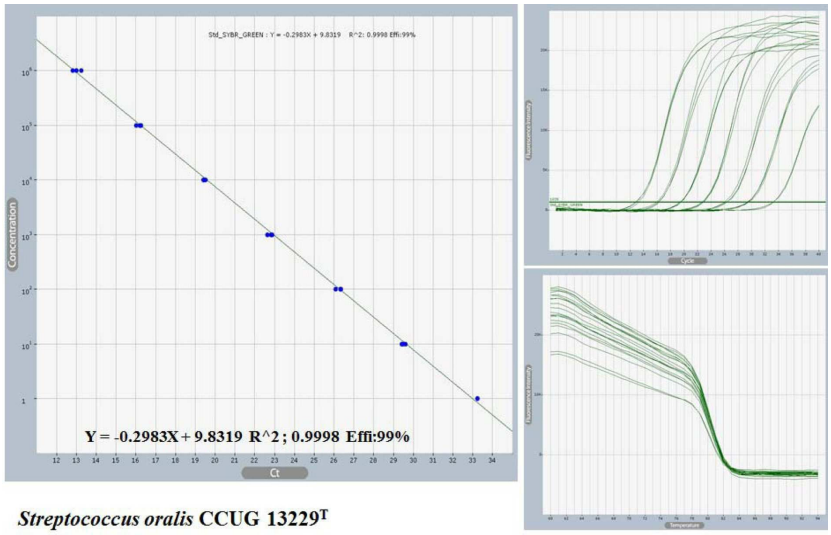
도면31



Streptococcus intermedius **KCTC 3268^T**

Sin-F4; GGTATCCACATTGCAACGCCAGTC
Sin-R1; ACGGTTATCAAACGGTTCGCCA

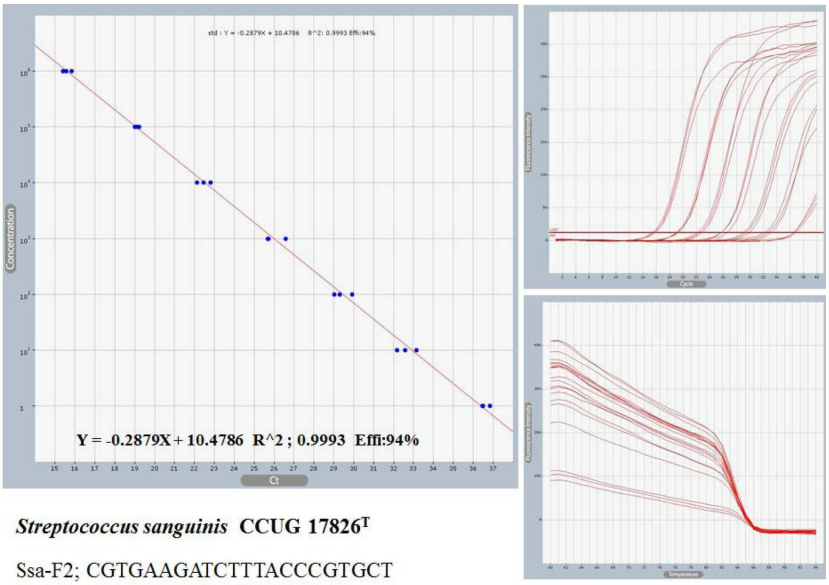
도면32



Streptococcus oralis **CCUG 13229^T**

Sor-F2: GTTGACAGCCGATGAAGAAGATGAA
Sor-R2: TTCTCAGCAAAAGTACCGTCCTCG

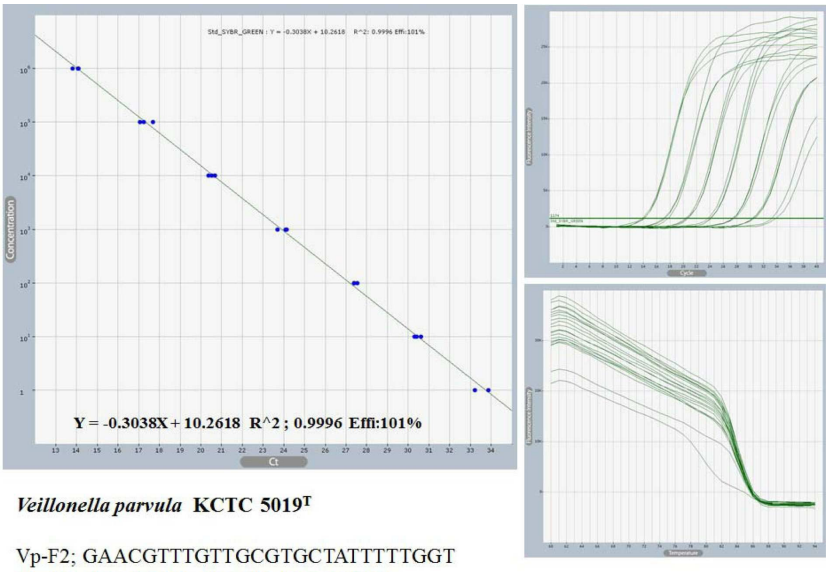
도면33



***Streptococcus sanguinis* CCUG 17826^T**

Ssa-F2; CGTGAAGATCTTTACCCGTGCT
Ssa-R2; ACCCCCTTGTTTCCGTGAC

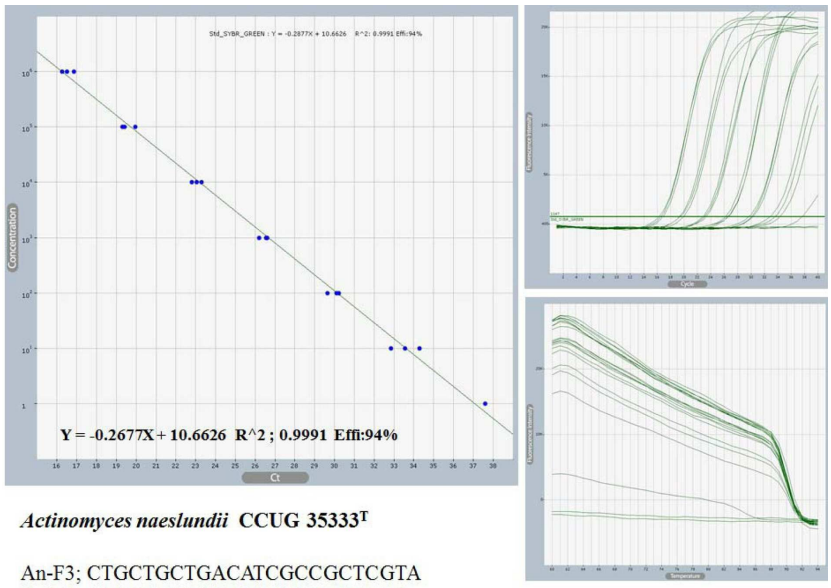
도면34



***Veillonella parvula* KCTC 5019^T**

Vp-F2; GAACGTTTGTTGCGTGCTATTTTTGGT
Vp-R2; TCGTCGCCATTTTCACGGGTAA

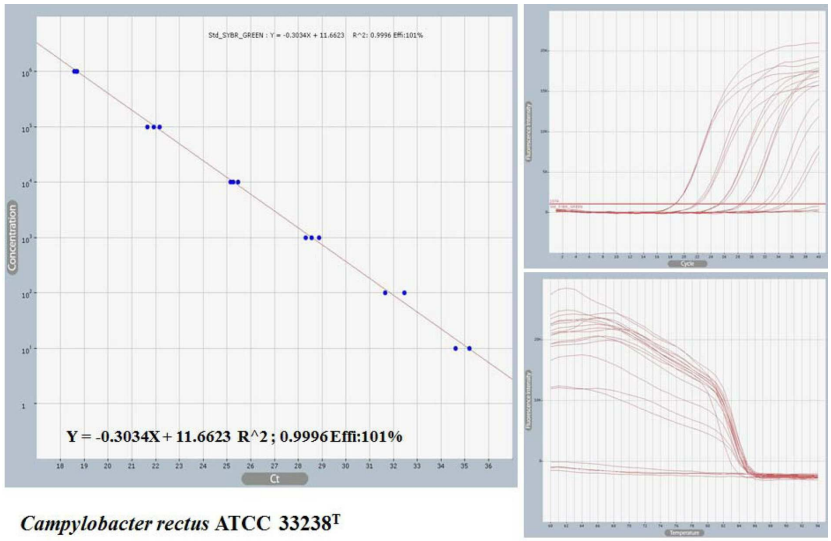
도면35



***Actinomyces naeslundii* CCUG 35333^T**

An-F3; CTGCTGCTGACATCGCCGCTCGTA
An-R3; TCCGCTCGCGCCACCTCTCGTTA

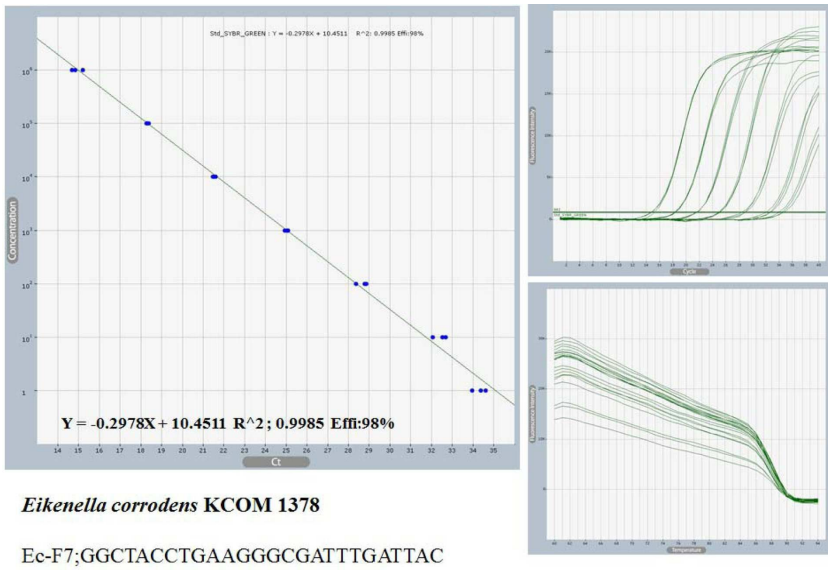
도면36



***Campylobacter rectus* ATCC 33238^T**

Cr-F2: GGTTTGGGCGCTTGAGGCATAC
Cr-R2:ACGTCTCGGGGATACCTGTTTCA

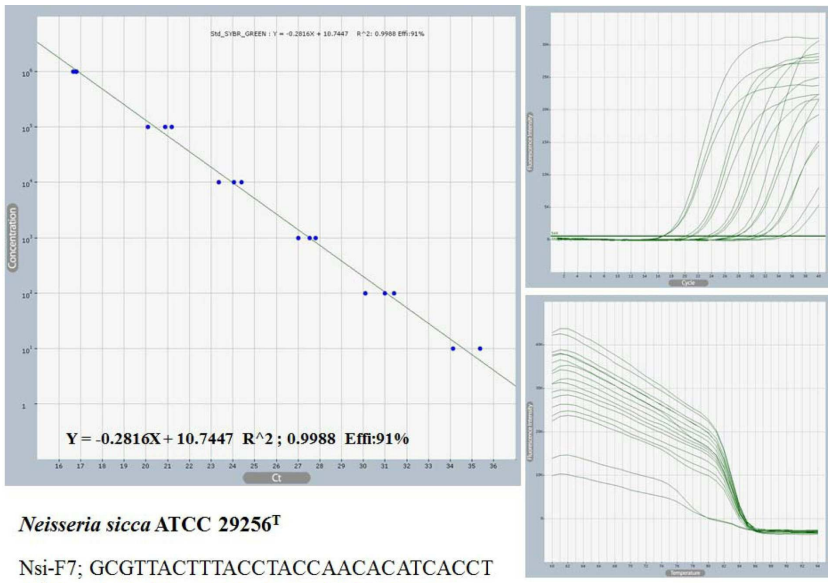
도면37



***Eikenella corrodens* KCOM 1378**

Ec-F7;GGCTACCTGAAGGGCGATTTGATTAC
Ec-R7; CGAGGCGGCTACGGATACCAC

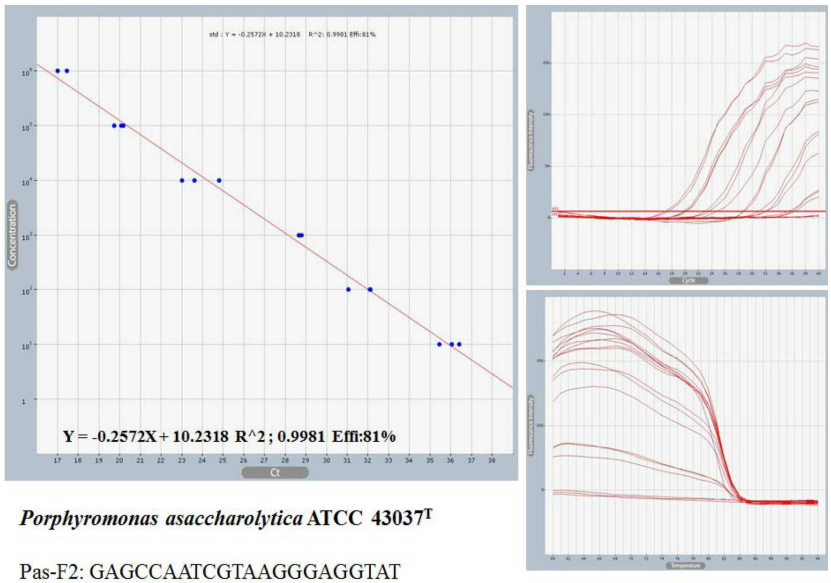
도면38



***Neisseria sicca* ATCC 29256^T**

Nsi-F7; GCGTTACTTTACCTACCAACACATCACCT
Nsi-R7; GCGATATTCCGAACTTGTCCGAG

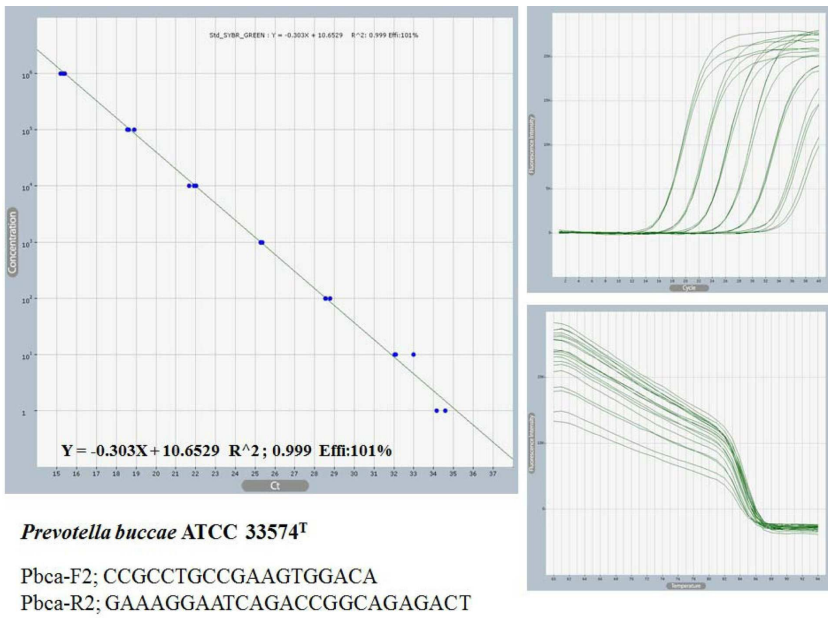
도면39



***Porphyromonas asaccharolytica* ATCC 43037^T**

Pas-F2: GAGCCAATCGTAAGGGAGGTAT
Pas-R2: AGTCCGTTGCCGTGGTCTTGTG

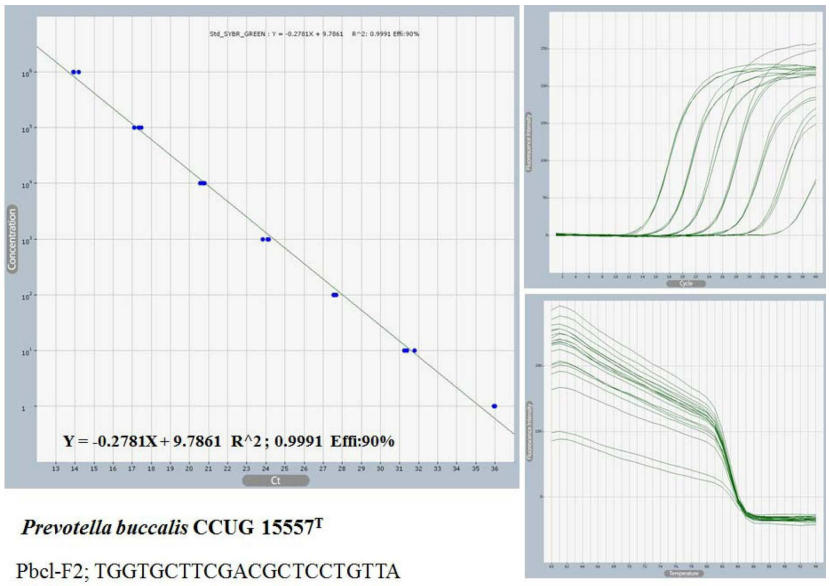
도면40



***Prevotella buccae* ATCC 33574^T**

Pbca-F2; CCGCCTGCCGAAGTGGACA
Pbca-R2; GAAAGGAATCAGACCGGCAGAGACT

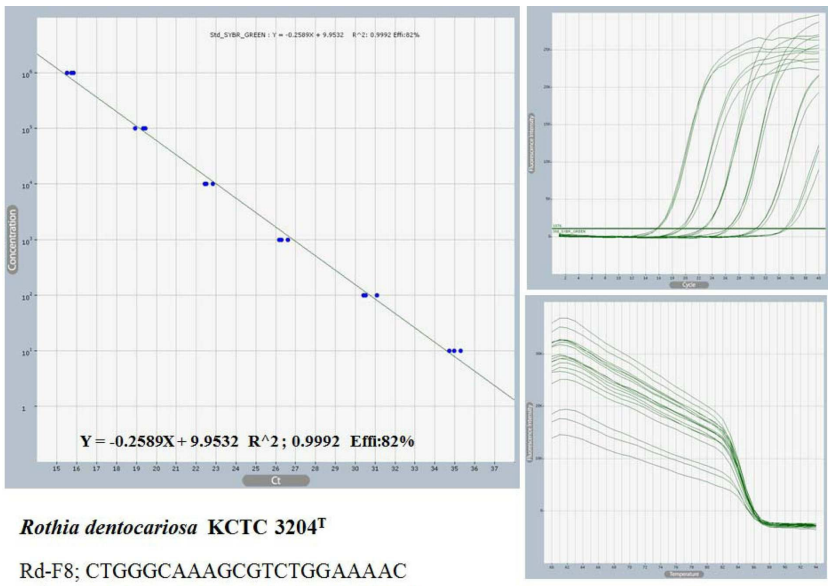
도면41



***Prevotella buccalis* CCUG 15557^T**

Pbcl-F2; TGGTGCTTCGACGCTCCTGTTA
Pbcl-R2; TTCGGCATTACGCAACTGACG

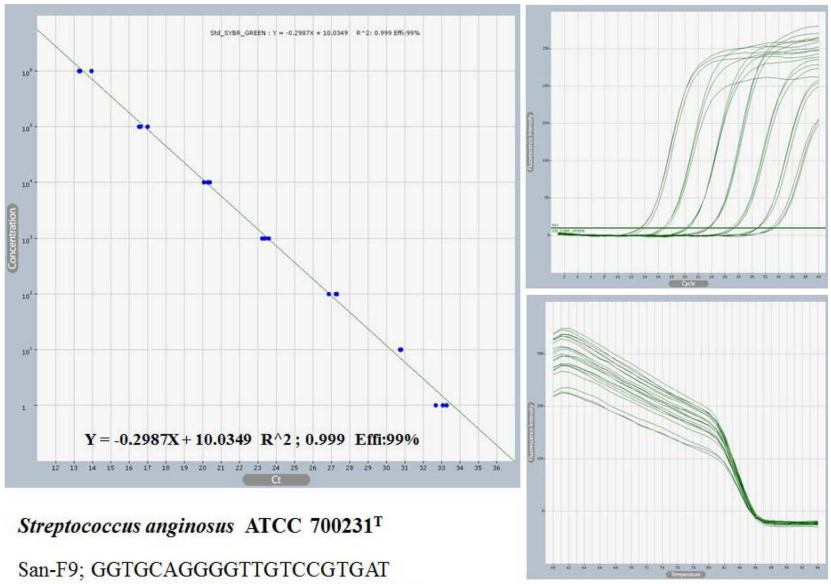
도면42



***Rothia dentocariosa* KCTC 3204^T**

Rd-F8; CTGGGCAAAGCGTCTGGAAAAC
Rd-R8; GAAATCACGAATCGGGGAAATCTC

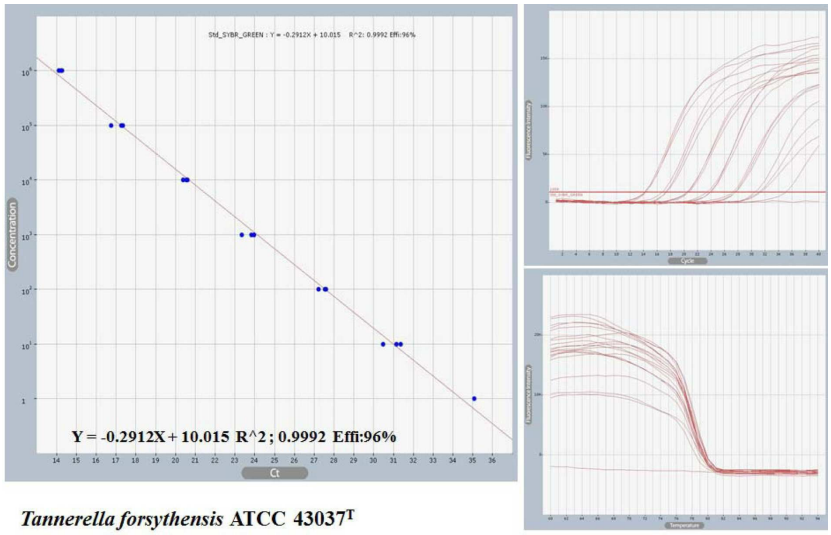
도면43



***Streptococcus anginosus* ATCC 700231^T**

San-F9; GGTGCAGGGGTTGTCCGTGAT
San-R9; CGTCCAGCCATCTTATCCCCAACA

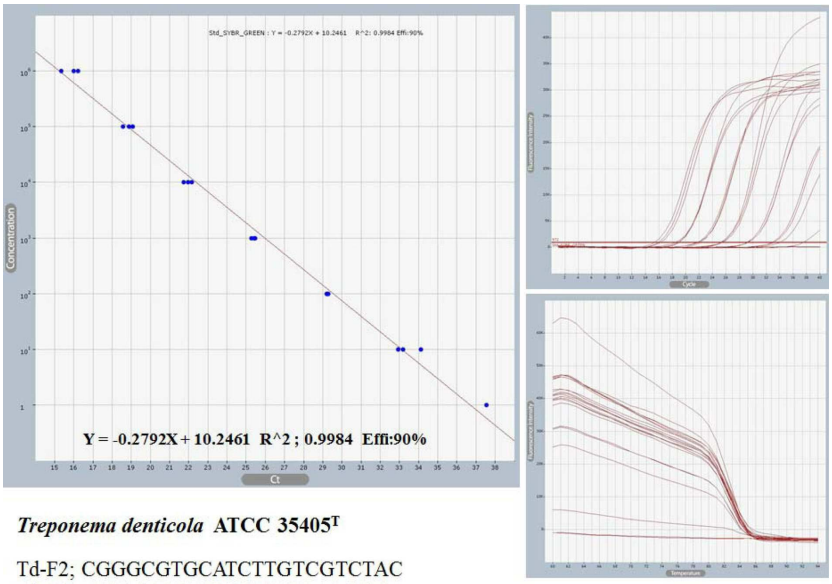
도면44



***Tannerella forsythensis* ATCC 43037^T**

Tf-F2: GGATTGACCACCGGCGAAGACA
Tf-R2: CGGACACGACGGTTACTCAAATGG

도면45



Treponema denticola ATCC 35405^{T}

Td-F2; CGGGCGTGCATCTTGTCGTCTAC
Td-R2; CTTAACCGGCCGCCTCTTTGAA

서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of Chosun University

<120> Primers for detecting bacteria related to oral infectious diseases and use thereof

<160> 88

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aa3-F primer

<400> 1

ggcgagcctg tatttgatgt gcg 23

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aa3-R primer

<400> 2

gtgcccggtg ctgcgtcttt g 21

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ar-F5 primer

<400> 3

cgcgctcggt accgttgatg ataa 24

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ar-R8 primer

<400> 4

gaacaaggag acgggcgaga aaaag 25

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cg-F5 primer

<400> 5

ctatcaccga cacccgcaac cag 23

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cg-R5 primer

<400> 6

gtccacgctc tatacactcc tccac 25

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Co-F1 primer

<400> 7

gaccccgagc acgaagattt tg 22

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Co-R1 primer

<400> 8

cccctggtga acggtgtaac tgc 23

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cspu-F2 primer

<400> 9

caccgaccct gagcacgaa 19

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cspu-R2 primer

<400> 10

tgaccgaaga ataccccagg a 21

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fnc-F11 primer

<400> 11

tggagccggg agatattttg gtc 23

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fnc-R11 primer

<400> 12

ttccttttga tccgtgaggc atac 24

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fn-F1 primer

<400> 13

acctaaggga gaaacagaac ca 22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fn-R1 primer

<400> 14

cctgccttta attcatctcc at 22

<210> 15

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fp-F2 primer

<400> 15

ttgctgaaaa acgtaagata actgta 26

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fp-R2 primer

<400> 16

tctgcaggta atactcttga aaca 24

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fsi-F1 primer

<400> 17

aagagcaggg tttgaagtaa gagatgtc 28

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fsi-R2 primer

<400> 18

agcataagta gcaagcgatc caataagc 28

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lb-F1 primer

<400> 19

ggacaaaatg cacgccagag c 21

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lb-R1 primer

<400> 20

gatgcaccgt aggcttccaa tg 22

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nmen-F4 primer

<400> 21

gatgctgcaa cggataccac t 21

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nmen-R4 primer

<400> 22

atgccgattt ggattcagat 20

<210> 23

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nsub-F6 primer

<400> 23

ttggctcaat tggctggaa 19

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nsub-R6 primer

<400> 24

gtaatcgtcg tgttcgttct gtg 23

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pe-F1 primer

<400> 25

agcagagttc cgtcgtcgta ttca 24

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pe-R1 primer

<400> 26

gcgccctgcc atcttgtctc 20

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pg-F primer

<400> 27

ggaagagaag accgtagcac aagga 25

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pg-R primer

<400> 28

gagtaggcga aacgtccatc aggtc 25

<210> 29

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pba-F4 primer

<400> 29

gaagatacgg gcgaagtggt gtcc 24

<210> 30

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pba-R4 primer

<400> 30

acttattagc tgcttcggcg tccttg 26

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pbi-F1 primer

<400> 31

ctgcgcttgg tcctggtggt t 21

<210> 32

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pbi-R1 primer

<400> 32

cttcaggcga ctcaatagga cacaaa 26

<210> 33

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pco-F3 primer

<400> 33

tggagcagag cgtgttgttg tttca 25

<210> 34

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pco-R3 primer

<400> 34

ggaatgatgc gggcactgta aagc 24

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pdi-F2 primer

<400> 35

aaagacccaa gccactcaga a 21

<210> 36

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pdi-R2 primer

<400> 36

ctacttcgcc aaggtcataa cg 22

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pi-F4 primer

<400> 37

ttcggagaca aggcaggtga t 21

<210> 38

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pi-R4 primer

<400> 38

cttgctttcg cgtgtcttga ta 22

<210> 39

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pmh-F1 primer

<400> 39

tggcacaaat ccgttatcac aa 22

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pmh-R1 primer

<400> 40

aaaggccacc aggaccaaga 20

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pm-F3 primer

<400> 41

tgaccgtaag aagaagttgc ctgta 25

<210> 42

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pm-R3 primer

<400> 42

ttgcgaccga tagctgcctt cata 24

<210> 43

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pn-F1 primer

<400> 43

ctccacagca aatagcctca gta 23

<210> 44

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pn-R1 primer

<400> 44

tttccaaacc ggtccctaca ata 23

<210> 45

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Poral-F3 primer

<400> 45

gttacaacat tactgcgtgc tatcggg 27

<210> 46

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Poral-R3 primer

<400> 46

ttgcggcgag tcttcttccc ac 22

<210> 47

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pori-F1 primer

<400> 47

agaagttggg gctcgacaca gac 23

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pori-R1 primer

<400> 48

gcacacggcg gttactcaag 20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pou-F primer

<400> 49

tgagcgcaac gaggtgatta 20

<210> 50

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pou-R primer

<400> 50

atggtgtatt tgcttgctga ctcg 24

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ppa-F2 primer

<400> 51

tgcgtaatgc tgatgctgcc 20

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ppa-R2 primer

<400> 52

cgtcctactt cgcctaaatc g 21

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pv-F2 primer

<400> 53

acgatgctcc gattgttggt 20

<210> 54

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pv-R2 primer

<400> 54

tacaccttca ccttcagcca taat 24

<210> 55

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sn-F5 primer

<400> 55

gagcgcaaag gactcaaagg aa 22

<210> 56

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sn-R6 primer

<400> 56

gcgcaggagc tatcagtggt ttc 23

<210> 57

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Scon-F4 primer

<400> 57

ttcccgtatc gttccagttg ag 22

<210> 58

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Scon-R4 primer

<400> 58

gttgcgagca gccatacca 19

<210> 59

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sin-F4 primer

<400> 59

ggtatccaca ttgcaacgcc agtc 24

<210> 60

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sin-R1 primer

<400> 60

acggttatca aacggttcgc ca 22

<210> 61

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sor-F2 primer

<400> 61

gttgacagcc gatgaagaag atgaa 25

<210> 62

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sor-R2 primer

<400> 62

ttctcagcaa aagtaccgtc ctcg 24

<210> 63

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ssa-F2 primer

<400> 63

cgtgaagatc tttacccgtg ct 22

<210> 64

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ssa-R2 primer

<400> 64

acccccttgt ttccgtgac 19

<210> 65

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vp-F2 primer

<400> 65

gaacgtttgt tgcgtgctat ttttggt 27

<210> 66

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Vp-R2 primer

<400> 66

tcgtcgccat tttcacgggt aa 22

<210> 67

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> An-F3 primer

<400> 67

gaacgtttgt tgcgtgctat ttttggt 27

<210> 68

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> An-R3 primer

<400> 68

tccgctcgcg ccacctctcg tta 23

<210> 69

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cr-F2 primer

<400> 69

ggtttgggcg cttgaggcat ac 22

<210> 70

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Cr-R2 primer

<400> 70

acgtctcggg gatacctgtt tca 23

<210> 71

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ec-F7 primer

<400> 71

ggctacctga agggcgattt gattac 26

<210> 72

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ec-R7 primer

<400> 72

cgaggcggct acggatacca ct 22

<210> 73

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nsi-F7 primer

<400> 73

gcgttacttt acctaccaac acatcacct 29

<210> 74

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nsi-R7 primer

<400> 74

gcgatattcc gaacttgtcc gag 23

<210> 75

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pas-F2 primer

<400> 75

gagccaatcg taagggaggt at 22

<210> 76

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pas-R2 primer

<400> 76

agtccgttgc cgtggtcttg tg 22

<210> 77

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pbca-F2 primer

<400> 77

ccgcctgccg aagtggaca 19

<210> 78

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pbca-R2 primer

<400> 78

gaaaggaatc agaccggcag agact 25

<210> 79

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pbc1-F2 primer

<400> 79

tggtgcttcg acgctcctgt ta 22

<210> 80

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pbc1-R2 primer

<400> 80

ttcggcatta cgcaactgac g 21

<210> 81

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rd-F8 primer

<400> 81

ctgggcaaag cgtctggaaa ac 22

<210> 82

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rd-R8 primer

<400> 82

gaaatcacga atcggggaaa tctc 24

<210> 83

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> San-F9 primer

<400> 83

ggtgcagggg ttgtccgtga t 21

<210> 84

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> San-R9 primer

<400> 84

cgtccagcca tcttatcccc aaca 24

<210> 85

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tf-F2 primer

<400> 85

ggattgacca ccggcgaaga ca 22

<210> 86

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tf-R2 primer

<400> 86

cggacacgac ggttactcaa atgg 24

<210> 87

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Td-F2 primer

<400> 87

cgggcgtgca tcttgtcgtc tac 23

<210> 88

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Td-R2 primer

<400> 88

cgggcgtgca tcttgtcgtc tac 23