

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 5월 28일 (28.05.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/076542 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/011040
- (22) 국제출원일: 2014년 11월 18일 (18.11.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0140292 2013년 11월 19일 (19.11.2013) KR
- (71) 출원인: 한국표준과학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF STANDARDS AND SCIENCE) [KR/KR]; 305-340 대전시 유성구 가정로 267, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 양인철 (YANG, Inchul); 305-761 대전시 유성구 엑스포로 448, 206-1603, Daejeon (KR). 유한나 (YU, Hannah); 301-845 대전시 중구 태평로 15, 136-403, Daejeon (KR). 양효진 (YANG, Hyo-jin); 305-340 대전시 유성구 가정로 267, 2기숙사 111호, Daejeon (KR). 김숙경 (KIM, Sook-Kyung); 305-315 대전시 유성구 봉명로 48, 803-402, Daejeon (KR). 박상열 (PARK, Sang-

Ryoul); 305-350 대전시 유성구 대덕대로 541번길 87, 15-201, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 특허법인 플러스 (PLUS INTERNATIONAL IP LAW FIRM); 35209 대전시 서구 한밭대로 809, 10층, Daejeon (KR).

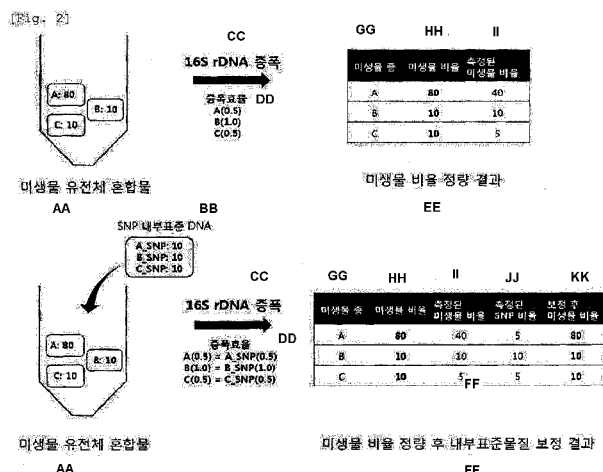
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: QUANTITATIVE ANALYSIS METHOD USING MICROORGANISM 16S rDNA GENE HAVING SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM

(54) 발명의 명칭: 단일 염기 다형성을 갖는 미생물 16S rDNA 유전자를 이용한 정량 분석 방법



(57) Abstract: The present invention relates to utilization of an artificially synthesized nucleic acid. More specifically, gene-based microbial community analysis results can be quantitatively corrected by preparing a microorganism 16S rDNA gene, which has a single nucleotide polymorphism at a particular location so as to be differentiated from a gene of a target microorganism on the nucleotide sequence, and then using the microorganism 16S rDNA gene as an internal standard material which is quantifiable through nucleotide sequencing.

(57) 요약서: 본 발명은 인위적으로 합성된 핵산의 활용에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 대상 미생물의 유전자와 염기서열 상에서 구분이 가능하도록 특정 위치에 단일 염기 다형성을 갖는 미생물의 16S rDNA 유전자를 제조하고 이를 염기서열 분석을 통해 정량이 가능한 내부표준물질로 사용하여 유전자 기반 미생물 군집 분석 결과를 정량적으로 보정할 수 있다.

AA ... Microorganism genome mixture
BB ... SNP internal standard DNA
CC ... 16S rDNA amplification
DD ... Amplification efficiency
EE ... Microorganism ratio quantification results
FF ... Internal standard material adjustment results after microorganism ratio quantification
GG ... Microorganism species
HH ... Microorganism ratio
II ... Measured microorganism ratio
JJ ... Measured SNP ratio
KK ... Microorganism ratio after adjustment



MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, **공개:**
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 단일 염기 다형성을 갖는 미생물 16S rDNA 유전자를 이용한 정량 분석 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 인위적으로 합성된 핵산의 활용에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 대상 미생물의 유전자와 염기서열 상에서 구분이 가능하도록 특정 위치에 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism, SNP)을 갖는 미생물의 16S rDNA 유전자를 제조하고 이를 염기서열 분석을 통해 정량이 가능한 내부표준물질(competitor or internal standard)로 사용하여 유전자 기반 미생물 군집 분석 결과를 정량적으로 보정하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 미생물 군집 분석(microbial community analysis)은 환경, 식품 및 인체에 존재하는 유해 미생물을 검출하고자 하는 용도로 널리 사용되는 기법이다. 특히 PCR을 통한 미생물 유전자의 증폭을 기반으로 하는 16S rDNA 분석 및 다중 유전자 분석(multiple locus strain typing, MLST) 방법을 미생물 군집 분석에 활용하면 고감도, 고정밀의 유전학적 분석을 통해 환경, 식품, 동물 및 인체에서 유래한 미생물의 종류, 변종 여부, 항생제 내성 등 보다 상세한 정보를 얻을 수 있다. 최근에는 차세대 염기서열 분석(next generation sequencing, NGS)을 활용하여 다양한 환경에서 수집된 수백 종의 미지 미생물에 대해 빠르게 미생물 군집 분석을 수행할 수 있는 기술이 알려져 있다. 유전자 분석을 통한 미생물 군집 분석은 짧은 분석 시간을 통해 다양한 미생물을 동시에 검출할 수 있는 장점이 있지만 미생물 군집의 정량적 분석에는 한계를 갖고 있다. 유전자 분석 기반 미생물 군집 분석의 한계는 유전체 추출 및 증폭의 효율이 미생물마다 다를 수 있음에 주로 기인한다. 특히 미생물의 16S rDNA의 증폭을 기반으로 하는 미생물 군집 분석은 최대한 많은 종류의 미생물 유전자를 동시에 증폭하기 위해 허용적 프라이머(degenerate primer)를 사용하여 16S rDNA 유전자를 증폭하므로 미생물 별로 유전자 증폭의 편향성이 커질 수 있다. 상기 유전자 증폭의 편향성은 NGS를 통해 유전자의 기원을 정밀 분석했을 때 더욱 명확해진다. NGS를 통한 미생물 군집 분석의 결과에서는 PCR 증폭 과정에서 기인하는 편향성이 관찰되며, 증폭 위치, 프라이머의 염기서열 등에 영향을 받는 것으로 알려져 있다.
- [3] 따라서, 유전자 기반 미생물 군집의 정량 분석 정확성 향상을 위해서는 PCR에 수반되는 유전자 증폭 편향성을 극복할 수 있는 새로운 기술의 개발이 절실하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 상기 문제점의 해결을 위해, 본 발명에서는 증폭 대상 원본 유전자(16S

rDNA)의 일부 염기서열을 인위적으로 치환한 단일 염기 다형성을 갖는 DNA를 제조하고 이를 내부표준물질(SNP 16S DNA)로 사용하여 미생물 중 별로 다른 16S rDNA 유전자 증폭의 편향성을 정량적으로 보정하고자 하였다.

과제 해결 수단

- [5] 본 발명은 a) 16S rDNA 유전자에 대해 단일염기다형성을 갖도록 일부 염기서열이 치환된 SNP 16S DNA를 제조하는 단계; b) 분석 대상 시료에 상기 SNP 16S DNA를 첨가하여 16S rDNA와 동시에 증폭하는 단계; c) b)단계에서 증폭된 물질의 염기분석을 통해 16S rDNA와 SNP 16S DNA를 구분하여 정량화하는 단계; d) c)단계에서 정량된 16S rDNA의 양을 SNP 16S DNA의 양으로 나누어 16S rDNA의 증폭효율을 보정하는 단계; 를 포함하는 유전자 분석 기반 군집의 정량 방법에 관한 것이다.
- [6] 본 발명에서 상기 SNP 16S DNA는 서로 다른 1 내지 30 종의 군집으로부터 제조한 것을 동시에 첨가할 수 있다.
- [7] 또한 본 발명에서, 상기 a)단계의 16S rDNA 유전자는 제한되지는 않지만 RNA로부터 역전사 반응에 의해 합성된 cDNA를 사용할 수 있다.
- [8] 본 발명에서 상기 군집은 제한되지는 않지만 미생물 또는 진핵생물에서 유래한 유전체인 것이 바람직하다. 상기 미생물은 제한되지는 않지만 *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* 및 *Staphylococcus aureus*로부터 선택된 어느 하나 이상을 사용할 수 있으며, 상기 진핵생물은 동물류, 식물류 및 진균류로부터 선택된 어느 하나 이상에 속하는 생물을 사용할 수 있다.
- [9]
- [10] 인위적으로 단일염기다형성을 갖도록 제조된 SNP 16S DNA는 증폭용 프라이머가 결합하는 부위가 아닌 곳에 평균적으로 약 150 bp 마다 한 개의 단일염기다형성을 갖는다(도 1). 제조된 SNP 16S DNA는 16S rDNA와 99% 정도의 염기서열 동일성을 갖고 있으며, 특히 증폭용 프라이머가 결합하는 부위의 염기서열은 완전히 동일하기 때문에 유전자 증폭 과정에서 원본 유전자와 동일한 증폭 효율을 보인다. 상기와 같이 증폭된 16S rDNA를 염기서열 해독하여 16S rDNA와 SNP 16S DNA의 양적 비율을 계산할 수 있으며, 특정 미생물에서 증폭된 16S rDNA의 양을 SNP 16S DNA의 양으로 나누어 준 값을 적용함으로써 증폭 효율 편향성에 의한 미생물 정량의 편향성을 극복할 수 있다.

발명의 효과

- [11] 본 발명은 유전자 분석을 통해 미생물 군집을 정량적으로 분석하고자 할 때 미생물별로 다른 유전자의 증폭 효율을 보정함으로써 분석의 정확도를 높여줄 수 있다. 이를 통해 인체, 식품, 환경에 존재하는 미생물 군집에 대한 정확한 정량 정보를 제공함으로써 다양한 환경에서 미생물의 효과, 질병유발 요인 및 항생제의 효능 등을 정밀 분석할 수 있게 해 준다. 또한 병원성 미생물에 대한 효과적인 대응에 활용할 수 있으며, 미생물의 의학적, 산업적 활용성을 높이는

테에도 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [12] 도 1은 미생물 SNP 16S DNA의 개략적인 구조와 9개의 단일 염기 다형성의 위치를 나타낸다. V1~V9 미생물 구분에 활용되는 가변부위(variable region)이다.
- [13] 도 2는 SNP 16S DNA를 내부표준물질로 사용하여 16S rDNA 증폭효율을 보정하는 방법이다.
- [14] 도 3은 16S rDNA를 증폭하기 위해 사용된 프라이머의 위치와 증폭 산물에 포함된 단일염기다형성의 위치를 표기한 것이다.
- [15] 도 4는 SNP 16S DNA를 내부표준물질로 활용하여 각 미생물의 16S rDNA의 증폭 효율을 보정한 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [16] 이하 본 발명을 실시예를 참조하여 상세히 설명한다. 그러나 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [17]
- [18] (실시예 1) SNP 16S DNA 제조
- [19] *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* 및 *Staphylococcus aureus*에 대해 SNP 16S DNA를 제조하였다. 상기 4종 미생물의 16S rDNA 염기서열을 NCBI GenBank에서 입수하여 ClustalW 기반 다중 염기서열 정렬 프로그램(<http://www.genome.jp/tools/clustalw>)를 이용하여 정렬하였다. 정렬된 염기서열 상에서 가변부위에 가까우면서 중간 염기서열이 좋은 위치에 9개의 단일염기다형성을 산재하여 갖도록 염기서열을 치환하였다(도 1). 4개의 미생물 별로 16S rDNA 대비 9개의 단일염기다형성을 갖는 4종의 SNP 16S DNA를 제조하여(바이오니아, 한국) 플라스미드 벡터(pGEM-B1™, 바이오니아)에 삽입하였다. 제조한 4종의 SNP 16S DNA의 염기서열은 3730 DNA analyzer(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 확인하였다.
- [20]
- [21] 상기 SNP 16S DNA 서열의 길이는 *E. coli* (Ec_SNP) 1534 bp (서열번호 1), *B. cereus* (Bc_SNP) 1554 bp (서열번호 2), *L. monocytogenes* (Lm_SNP) 1550 bp (서열번호 3) 및 *S. aureus* (Sa_SNP) 1554 bp (서열번호 4)이다.
- [22]
- [23] (실시예 2) SNP 16S DNA를 활용한 유전자 기반 미생물 군집 정량 분석
- [24] 유전체 추출 및 정량
- [25] *Escherichia coli* (KCTC 2571, ATCC 8739), *Bacillus cereus* (KCTC 1012, ATCC 11778), *Listeria monocytogenes* (KCTC 3710, ATCC 19115) 및 *Staphylococcus aureus* (KCTC 1916, ATCC 23832)에서 GenElute™ Bacterial Genomic DNA kit (Sigma, St. Louis, USA)를 이용하여 유전체를 추출하였다. 추출된 유전체를

초음파 파쇄기(Vibra Cell 500; Sonics, Newtown, USA)를 이용해 35%의 파워에서 500 bp~3 kb 정도의 크기를 갖도록 절편화(fragmentation)시킨 후 피코그린(Life Technologies, Carlsbad, USA)을 이용해 정량하였다. 상기 정량된 4종 미생물의 유전체 DNA는 정방향 프라이머 511F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3', 서열번호 6), 역방향 프라이머 798R (5'-GACTACCAGGGTATCTAATCC-3', 서열번호 7)을 이용하여 정량적 PCR(qPCR; SYBR premix EX Taq™; Takara, Otsu, Japan).

- [26] 유전체 양을 기준으로 4종 유전체를 혼합하고 각 16S rDNA가 μL 당 200,000 카피(copy)가 되도록 하였다. SNP 16S DNA에 대해서도 상기와 동일한 절차를 통해 피코그린을 통해 정량한 후, qPCR을 수행하여 개별 SNP 16S DNA의 최종 농도가 μL 당 200,000 카피(copy)가 되도록 하였다. 상기 4종 유전체 혼합물과 SNP DNA 혼합물을 1:1로 혼합하여 8종의 16S DNA가 μL 당 100,000 카피(copy)가 되도록 주형 혼합물(template mixture)을 제조하였다.

[27] 16S rDNA와 SNP 16S DNA의 증폭 효율

- [28] 동일량의 16S rDNA와 SNP 16S DNA가 혼합된 주형 혼합물에 대해 16S 유전자를 증폭용 PCR 반응을 실시한 후, 차세대 염기서열 분석장치(Miseq™, Illumina, San Diego, USA)를 통해 분석하였다. 표준적인 증폭 반응은 qPCR을 이용하여 500 nm 프라이머, 각 100,000 카피의 16S DNA가 혼합되어 있는 주형 혼합물을 첨가한 증폭 반응 혼합물을 제조한 후 StepOne Plus™ 장치(Life Technologies)에서 최종 부피 20 μL 로 수행하였다. 온도 순환 조건은 95 °C에서 5분간 최초 변성 후, 94 °C에서 15초, 60 °C에서 1분간 반응하는 2단계 순환 반응을 40회 실시하였다. 최종 반응으로서 60 °C에서 5분간 연장 반응을 하여 완료하였다.

- [29] 상기 표준적인 증폭 반응 조건 외에도 증폭 반응의 저해 요소인 EDTA가 1 mM로 첨가된 조건, 증폭 반응의 촉진 요소인 DMSO가 5% 첨가된 조건, 증폭 반응의 순환 횟수를 20회로 단축시킨 조건, 각 프라이머의 염기서열에 무작위적인 염기서열 N이 두 개 존재하는 2N 조건 등에 대해서도 증폭 반응을 수행하여 16S rDNA와 SNP 16S DNA의 증폭효율을 검사하였다. 차세대 염기서열 분석장치에 의해 분석된 약 200만 개의 염기서열은 미생물 별 16S rDNA 염기서열 4종, SNP 16S DNA 염기서열 4종에 대해 염기서열 유사성을 비교하여 가장 높은 유사성을 보이는 데이터베이스 항목으로 분류를 하였다. 이때, SNP 부위에 16S rDNA 또는 SNP 16S DNA와 다른 염기서열을 갖는 데이터는 제외하였고, 동시에 두 개 이상의 데이터베이스에 유사성을 보이는 염기서열도 제외하였다. 상기 결과를 표 1에 도시하였다.

[30]

[31] 표 1

[Table 1]

	Ec_g	Ec_SNP	Ec_g/Ec_SNP	Bc_g	Bc_SNP	Bc_g/Bc_SNP	Lm_g	Lm_SNP	LM_g/Lm_SNP
Normal	6442	2553	2.52	7600	2851	2.67	4074	1775	2.30
Normal 2	74562	32101	2.32	87619	32496	2.70	67207	29384	2.29
DMSO	15168	5875	2.58	13392	5336	2.51	8839	3375	2.62
N2	119369	48095	2.48	129119	49882	2.59	89423	41451	2.16
20cycle	1922	671	2.86	2636	867	3.04	1476	623	2.37
EDTA	749	271	2.76	619	232	2.67	2242	1032	2.17

[32]

[33] * Ec_g, Ec_SNP, Bc_g, Bc_SNP, Lm_g, Lm_SNP: read count 값을 나타냄.

[34]

[35] 상기 표 1의 결과는 증폭 반응 조건에 따라 16S rDNA의 증폭 효율이 달라지고 있음을 나타낸다. 예를 들어 *E. coli* 16S rDNA (Ec_g)는 증폭 반응 조건에 따라 749에서 119,369 까지 염기서열 빈도가 달라지는데 이는 약 150 배에 이르는 증폭률이다. 그러나, SNP 16S DNA (Ec_SNP)에서도 유사한 증폭률이 유지되고 있기 때문에 Ec_g/Ec_SNP의 값은 증폭 조건에 무관하게 약 2.5를 유지하고 있음을 확인하였다.

[36]

증폭 효율이 보정된 각 미생물의 16S rDNA 염기서열 빈도에 근거하여 주형 혼합물에 존재하는 각 미생물의 유전체의 양을 정량분석한 결과를 도 4에 도시하였다. 증폭 보정 후 각 미생물 유전체의 혼합 비율이 25%에 가까운 값으로 산출된다. 특히 20 사이클(cycle) 조건이나 EDTA가 첨가된 비우호적 조건에서도 SNP 16S DNA에 의한 보정이 잘 작동함을 확인하였다.

[37]

[38] 상기의 실시예로부터 미생물 각각의 SNP 16S DNA가 다양한 유전자 증폭 조건에서 16S rDNA와 동일한 증폭 효율을 갖는다는 사실을 확인하였고, 증폭 효율이 보정된 미생물 군집 정량 분석 결과는 그 정확도가 매우 높다는 사실을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

서열목록 Free Text

[39] 서열목록 1은 *Escherichia coli*에 대해 제조된 SNP 16S DNA 이다.

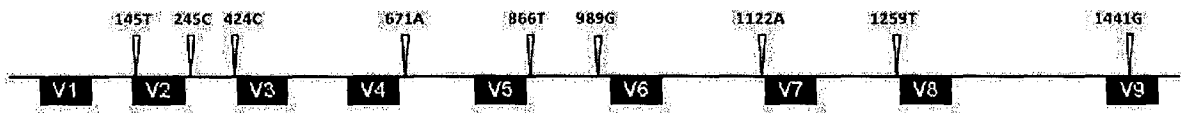
[40] 서열목록 2는 *Bacillus cereus*에 대해 제조된 SNP 16S DNA 이다.

- [41] 서열목록 3은 *Listeria monocytogene*에 대해 제조된 SNP 16S DNA 이다.
- [42] 서열목록 4는 *Staphylococcus aureus*에 대해 제조된 SNP 16S DNA 이다.
- [43] 서열목록 5는 16S 유전자 증폭을 위한 정방향 프라이머 334F이다.
- [44] 서열목록 6은 16S 유전자 증폭을 위한 정방향 프라이머 511F이다.
- [45] 서열목록 7은 16S 유전자 증폭을 위한 역방향 프라이머 798R이다.

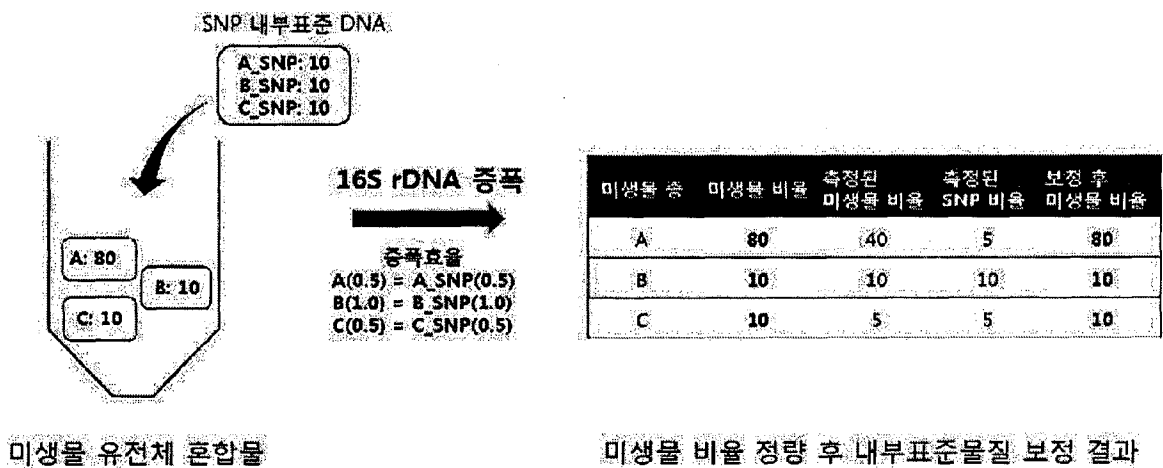
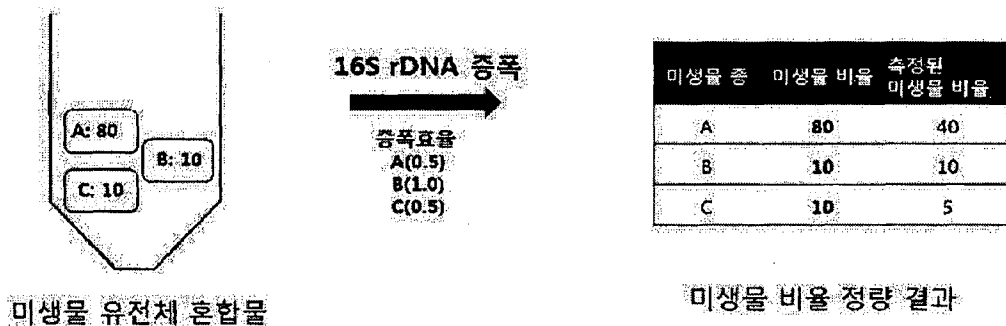
청구범위

- [청구항 1] a) 16S rDNA 유전자에 대해 단일염기다형성을 갖도록 일부 염기서열이 치환된 SNP 16S DNA를 제조하는 단계;
b) 분석 대상 시료에 상기 SNP 16S DNA를 첨가하여 16S rDNA와 동시에 증폭하는 단계;
c) b)단계에서 증폭된 물질의 염기분석을 통해 16S rDNA와 SNP 16S DNA를 구분하여 정량화하는 단계;
d) c)단계에서 정량된 16S rDNA의 양을 SNP 16S DNA의 양으로 나누어 16S rDNA의 증폭효율을 보정하는 단계;
를 포함하는 유전자 분석 기반 군집의 정량 방법.
- [청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 SNP 16S DNA는 서로 다른 1 내지 30 종의 군집으로부터 제조한 것을 동시에 첨가하는 유전자 분석 기반 군집의 정량 방법.
- [청구항 3] 제 1항에 있어서,
상기 a)단계의 16S rDNA 유전자는 RNA로부터 역전사 반응에 의해 합성된 cDNA인 유전자 분석 기반 군집의 정량 방법.
- [청구항 4] 제 1항 내지 제 3항에 중 어느 한 항에 있어서,
상기 군집은 미생물 또는 진핵생물에서 유래한 유전체인 유전자 분석 기반 군집의 정량 방법.
- [청구항 5] 제 4항에 있어서,
상기 미생물은 *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* 및 *Staphylococcus aureus*로부터 선택된 어느 하나 이상인 유전자 분석 기반 군집의 정량 방법.
- [청구항 6] 제 4항에 있어서,
상기 진핵생물은 동물류, 식물류 및 진균류로부터 선택된 어느 하나 이상에 속하는 생물인 유전자 분석 기반 군집의 정량 방법.

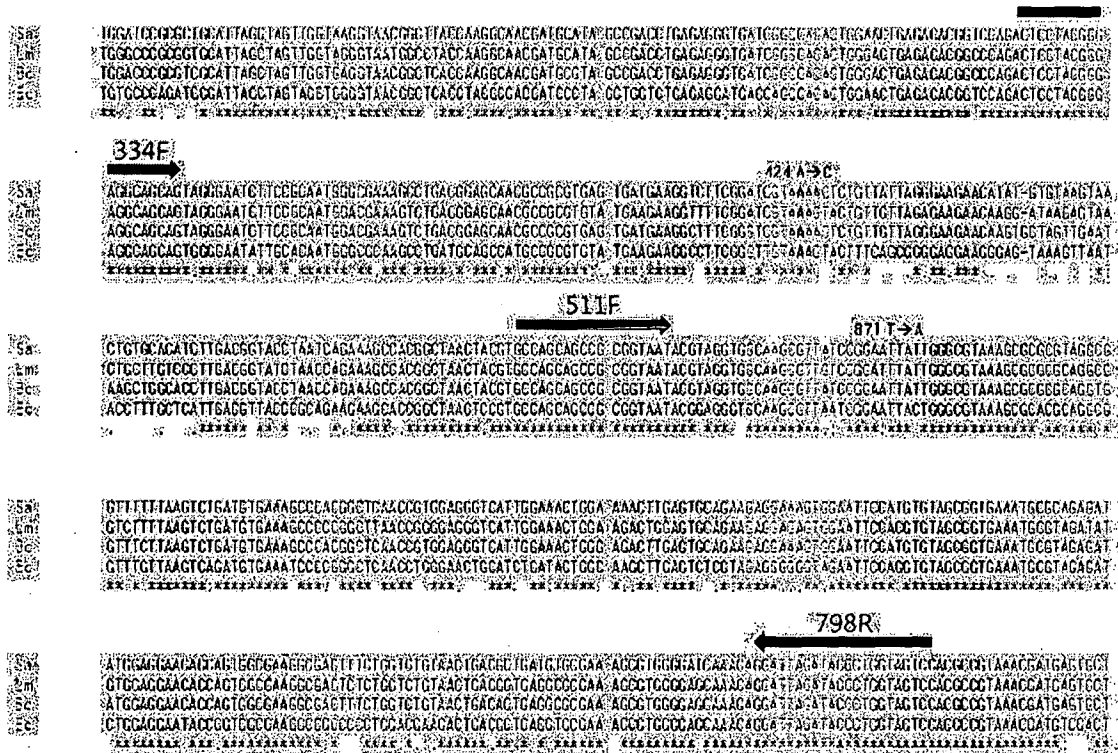
[Fig. 1]



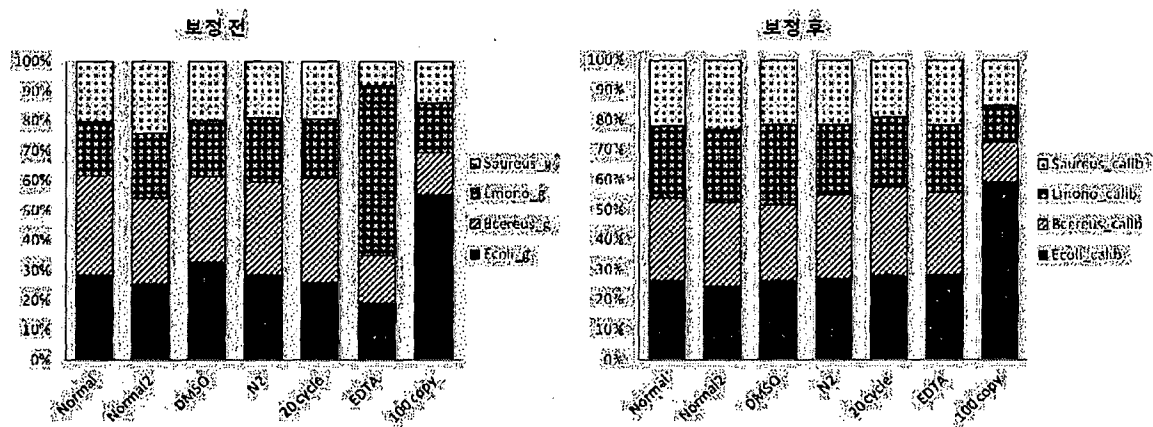
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/011040**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: "16S rDNA, rRNA, SNP, 16S DNA, quantification, calibration, PCR, etc."

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2011-0066018 A (SNU R&DB FOUNDATION) 16 June 2011 See the entire document, especially claims 1-5.	1-6
A	BLOK, H. J. et al., "Quantitative analysis of 16S rDNA using competitive PCR and the QPCR System 5000" Biotechniques, vol. 22, no. 4, pages 700-704, April 1997 See the entire document, especially pages 700-702.	1-6
A	EP 1570086 B1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH et al.) 20 February 2013 See the entire document, especially claim 1.	1-6
A	YOHDA, M. et al., "Quantitative discrimination of 16 S rRNA genes of Dehalococcoides species by MagSNiPer, a quantitative single-nucleotide polymorphism genotyping method" Biotechnol. Appl. Biochem., vol. 51, Pt. 2, pages 111-117, October 2008 See the entire document, especially abstract.	1-6
A	SCHABEREITER-GURTNER, C. et al., "16S rDNA-based identification of bacteria from conjunctival swabs by PCR and DGGE fingerprinting" Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., vol. 42, no. 6 pages 1164-1171, May 2001 See the entire document, especially abstract.	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 FEBRUARY 2015 (12.02.2015)

Date of mailing of the international search report

16 FEBRUARY 2015 (16.02.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/011040

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2011-0066018 A	16/06/2011	NONE	
EP 1570086 B1	20/02/2013	AU 2003-289927 A1	30/06/2004
		AU 2003-289930 A1	30/06/2004
		AU 2003-300825 A1	30/06/2004
		AU 2003-300825 A8	30/06/2004
		CA 2507236 A1	24/06/2004
		CA 2507240 A1	24/06/2004
		CA 2507240 C	24/05/2011
		CA 2507933 A1	24/06/2004
		CA 2507933 C	10/11/2009
		CA 2525482 A1	14/10/2004
		CN 1768151 A	03/05/2006
		CN 1768151 C0	12/03/2008
		EP 1426447 A1	09/06/2004
		EP 1570070 A1	07/09/2005
		EP 1570079 A1	07/09/2005
		EP 1570079 B1	21/07/2010
		EP 1570086 A2	07/09/2005
		EP 1570086 A4	11/01/2006
		EP 1613771 A2	11/01/2006
		EP 1613771 B1	21/03/2012
		EP 2284278 A1	16/02/2011
		JP 04-377375B2	02/12/2009
		JP 04-377378B2	02/12/2009
		JP 05-144605B2	13/02/2013
		JP 2006-508669A	16/03/2006
		JP 2006-508694A	16/03/2006
		JP 2006-518189A	10/08/2006
		JP 2006-521092A	21/09/2006
		JP 2009-232871A	15/10/2009
		US 2006-0099596 A1	11/05/2006
		US 2006-0240427 A1	26/10/2006
		US 2006-0269914 A1	30/11/2006
		US 2006-0269922 A1	30/11/2006
		US 2011-0151550 A1	23/06/2011
		US 7718361 B2	18/05/2010
		US 8137616 B2	20/03/2012
		WO 2004-053148 A1	24/06/2004
		WO 2004-053155 A1	24/06/2004
		WO 2004-053457 A2	24/06/2004
		WO 2004-053457 A3	23/09/2004
		WO 2004-087950 A2	14/10/2004
		WO 2004-087950 A3	25/11/2004

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

NCBI PubMed, eKOMPASS (KIPO internal), '16S rDNA, rRNA, SNP, 16S DNA, quantification, calibration, PCR, etc.'

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2011-0066018 A (서울대학교산학협력단) 2011-06-16 - 본문 전체 참조. 특히 청구항 1-5.	1-6
A	BLOK, H. J. et al., 'Quantitative analysis of 16S rDNA using competitive PCR and the QPCR System 5000' Biotechniques, Vol. 22, No. 4, pp. 700-704, 1997-04 - 본문 전체 참조. 특히 pp. 700-702.	1-6
A	EP 1570086 B1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH 외) 2013-02-20 - 본문 전체 참조. 특히 청구항 1.	1-6
A	YOHDA, M. et al., 'Quantitative discrimination of 16 S rRNA genes of Dehalococcoides species by MagSNIper, a quantitative single-nucleotide-polymorphism genotyping method' Biotechnol. Appl. Biochem., Vol. 51, Pt. 2, pp. 111-117, 2008-10 - 본문 전체 참조. 특히 초록.	1-6
A	SCHABEREITER-GURTNER, C. et al., '16S rDNA-based identification of bacteria from conjunctival swabs by PCR and DGGE fingerprinting' Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., Vol 42, No. 6, pp. 1164-1171, 2001-05 - 본문 전체 참조. 특히 초록.	1-6

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 02월 12일 (12.02.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 02월 16일 (16.02.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 ++82 42 472 3473

심사관

이준혁

전화번호 +82-42-481-8115



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2011-0066018 A	2011/06/16	없음	
EP 1570086 B1	2013/02/20	AU 2003-289927 A1	2004/06/30
		AU 2003-289930 A1	2004/06/30
		AU 2003-300825 A1	2004/06/30
		AU 2003-300825 A8	2004/06/30
		CA 2507236 A1	2004/06/24
		CA 2507240 A1	2004/06/24
		CA 2507240 C	2011/05/24
		CA 2507933 A1	2004/06/24
		CA 2507933 C	2009/11/10
		CA 2525482 A1	2004/10/14
		CN 1768151 A	2006/05/03
		CN 1768151 C0	2008/03/12
		EP 1426447 A1	2004/06/09
		EP 1570070 A1	2005/09/07
		EP 1570079 A1	2005/09/07
		EP 1570079 B1	2010/07/21
		EP 1570086 A2	2005/09/07
		EP 1570086 A4	2006/01/11
		EP 1613771 A2	2006/01/11
		EP 1613771 B1	2012/03/21
		EP 2284278 A1	2011/02/16
		JP 04-377375B2	2009/12/02
		JP 04-377378B2	2009/12/02
		JP 05-144605B2	2013/02/13
		JP 2006-508669A	2006/03/16
		JP 2006-508694A	2006/03/16
		JP 2006-518189A	2006/08/10
		JP 2006-521092A	2006/09/21
		JP 2009-232871A	2009/10/15
		US 2006-0099596 A1	2006/05/11
		US 2006-0240427 A1	2006/10/26
		US 2006-0269914 A1	2006/11/30
		US 2006-0269922 A1	2006/11/30
		US 2011-0151550 A1	2011/06/23
		US 7718361 B2	2010/05/18
		US 8137616 B2	2012/03/20
		WO 2004-053148 A1	2004/06/24
		WO 2004-053155 A1	2004/06/24
		WO 2004-053457 A2	2004/06/24
		WO 2004-053457 A3	2004/09/23
		WO 2004-087950 A2	2004/10/14
		WO 2004-087950 A3	2004/11/25