



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0135775
(43) 공개일자 2016년11월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6834 (2013.01)
C12Q 1/689 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7029088
(22) 출원일자(국제) 2015년06월11일
심사청구일자 2016년10월19일
(85) 번역문제출일자 2016년10월19일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2015/002934
(87) 국제공개번호 WO 2015/190109
국제공개일자 2015년12월17일
(30) 우선권주장
JP-P-2014-120916 2014년06월11일 일본(JP)
- (71) 출원인
도요세이칸 그룹 홀딩스 가부시키가이샤
일본 도쿄도 시나가와구 히가시고탄다 2초메 18반 1코
- (72) 발명자
나카지마 카즈키
일본국 2400062 카나가와 요코하마시 호도가야구 오카자와초 22-4도요세이칸 그룹 홀딩스 주식회사 종합연구소내
야마사키 타카아키
일본국 2400062 카나가와 요코하마시 호도가야구 오카자와초 22-4 도요세이칸 그룹 홀딩스 주식회사 종합연구소내
후루카와 사토시
일본국 2400062 카나가와 요코하마시 호도가야구 오카자와초 22-4 도요세이칸 그룹 홀딩스 주식회사 종합연구소내
- (74) 대리인
이희숙, 김석만

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 대장균의 검출 방법 및 대장균 검출용 담체

(57) 요약

병원성을 갖지 않을 것을 포함한 대장균과, 식중독의 원인이 되는 장관 출혈성 대장균의 검출을 동시에, 또한 높은 특이성으로 실시가능하다. 장관 출혈성 대장균 및 대장균(장관 출혈성 대장균을 포함)을 동시에 검출하는 대장균의 검출 방법이며, 시료에서 추출한 게놈 DNA를 주형으로서 대장균의 유리딘 모노 인산 인산화 효소 유전자(pyrH)를 포함한 DNA단편과, 베로 독소 1형 유전자(vtx1)를 포함한 DNA단편과, 베로 독소 2형 유전자(vtx2)를 포함한 DNA단편을 멀티플렉스 PCR에 의해서 동시에 증폭시키고, 각각의 증폭 산물의 유무를 검출함으로써 시료 중에서의 장관 출혈성 대장균의 유무 및 대장균의 여부를 동시에 검출한다.

대표도

사용한 균주	독소유전자 보유상황
(1) <i>Escherichia coli</i> RIMD 05091860	<i>vtx2</i>
(2) <i>Escherichia coli</i> RIMD 05091875	<i>vtx2</i>
(3) <i>Escherichia coli</i> RIMD 05091878	<i>vtx1</i>
(4) <i>Escherichia coli</i> RIMD 05091865	<i>vtx1</i>
(5) <i>Escherichia coli</i> RIMD 05091904	<i>vtx1, vtx2</i>
(6) <i>Escherichia coli</i> NBRC 102203	비보유

(52) CPC특허분류

C12Q 2537/143 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

C12Q 2600/16 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

장관 출혈성 대장균 및 대장균(장관 출혈성 대장균을 포함)을 동시에 검출하는 대장균의 검출 방법이며,

시료에서 추출한 게놈 DNA를 주형으로서 대장균의 우리딘 모노 인산 인산화 효소 유전자(pyrH)를 포함한 DNA단편과, 베로 독소 1형 유전자(vtx1)를 포함한 DNA단편과, 베로 독소 2형 유전자(vtx2)를 포함한 DNA단편을 멀티플렉스 PCR에 의해서 동시에 증폭시키고, 각각의 증폭 산물의 유무를 검출함으로써 시료 중에서의 장관 출혈성 대장균의 유무 및 대장균의 유무를 동시에 검출하는 대장균의 검출 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 pyrH를 포함한 DNA단편을 증폭해서 얻은 증폭 산물과 상보적으로 결합하는 프로브, 상기 vtx1을 포함한 DNA단편을 증폭해서 얻은 증폭 산물과 상보적으로 결합하는 프로브 및 상기 vtx2를 포함한 DNA단편을 증폭해서 얻은 증폭 산물과 상보적으로 결합하는 프로브를 고정화한 대장균 검출용 담체를 사용하여 상기 각각의 증폭 산물의 유무를 동시에 검출하는

것을 특징으로 하는 대장균의 검출 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 pyrH를 포함한 DNA단편을 증폭하기 위한 서열 번호 1에 나타내는 염기 서열로 이루어진 프라이머와 서열 번호 2에 나타내는 염기 서열로 이루어진 프라이머로 이루어진 프라이머 세트와,

상기 vtx1을 포함한 DNA단편을 증폭하기 위한 서열 번호 3에 나타내는 염기 서열로 이루어진 프라이머와 서열 번호 4에 나타내는 염기 서열로 이루어진 프라이머로 이루어진 프라이머 세트와

상기 vtx2를 포함한 DNA단편을 증폭하기 위한 서열 번호 5에 나타내는 염기 서열로 구성된 프라이머와 서열 번호 6에 나타내는 염기 서열로 구성된 프라이머로 이루어진 프라이머 세트를 포함한 PCR반응액을 사용하여 상기 멀티 플렉스 PCR을 하고,

상기 pyrH에서 선택된 서열 번호 7~9에 나타내는 염기 서열로 이루어진 적어도 두개 이상의 프로브와,

상기 vtx1에서 선택된 서열 번호 10~17에 나타내는 염기 서열로 구성된 적어도 하나의 프로브와,

상기 vtx2에서 선택된 서열 번호 18~22에 나타내는 염기 서열로 구성된 적어도 하나의 프로브를 고정화한 대장균 검출용 담체를 사용하여 상기 각각의 증폭 산물의 유무의 검출을 실시하는

것을 특징으로 하는 대장균의 검출 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 각 유전자에서 선택된 적어도 하나의 프로브가 이하의(1)~(3) 중의 어느 하나임을 특징으로 하는 대장균의 검출 방법:

- (1)서열 번호로 나타내는 염기 서열에서 1또는 여러 개의 염기가 결손, 치환 또는 부가된 프로브;
- (2)서열 번호로 나타내는 염기 서열에 대해서 상보적 염기 서열로 이루어진 핵산 단편에 대해서 스트린젠트 조건하에서 하이브리다이징할 수 있는 프로브;
- (3)(1)또는(2)의 프로브에 대해서 상보적 염기 서열을 가진 프로브.

청구항 5

장관 출혈성 대장균 및 대장균(장관 출혈성 대장균을 포함)을 동시에 검출하기 위한 대장균 검출용 담체이며,

대장균의 우리딘 모노 인산 인산화 효소 유전자(pyrH)에서 선택된 서열 번호 7~9에 나타내는 염기 서열로 이루

어진 적어도 두개 이상의 프로브와,

대장균의 베로 독소 1형 유전자(vtx1)에서 선택된 서열 번호 10~17에 나타내는 염기 서열로 이루어진 적어도 하나의 프로브와,

대장균의 베로 독소 2형 유전자(vtx2)에서 선택된 서열 번호 18~22에 나타내는 염기 서열로 이루어진 적어도 하나의 프로브를 고정화한 것을 특징으로 하는 대장균 검출용 담체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 각 유전자에서 선택된 적어도 하나의 프로브가 이하의 (1)~(3) 중 하나임을 특징으로 하는 대장균 검출용 담체:

- (1)서열 번호로 나타내는 염기 서열에서 1 또는 여러 개의 염기가 결손, 치환 또는 부가된 프로브;
- (2)서열 번호로 나타내는 염기 서열에 대해서 상보적인 염기 서열로 구성된 핵산 단편에 대해서 스토린젠트한 조건하에서 하이브리다이징할 수 있는 프로브;
- (3)(1)또는(2)의 프로브에 대해서 상보적인 염기 서열을 가진 프로브.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 식중독 균 등의 미생물을 검출하기 위한 기술에 관한 것이며, 특히 대장균의 검출 방법 및 대장균 검출용 담체에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 최근, 식품이나 환경 등의 공중 위생 분야에서의 위생 수준의 향상에 의해서 식중독의 발생에는 감소 경향이 보이고 있으나, 현재도 일본 국내에서 매년 2만명 이상이 식중독에 걸리고 있다. 이 중에는, 장관 출혈성 대장균 등의 병원성 대장균을 원인으로 하는 것도 적잖이 포함되어 있으며, 그 발생을 방지하기 위해서 식중독 균 등의 검사에서 식품과 환경 중의 병원성 대장균을 정밀도 높게 검출하는 것이 중요하게 되어 있다.
- [0003] 병원성 대장균을 검출하는 방법으로서는 예를 들면 특허 문헌 1, 2에 기재된 바와 같이 베로(Vero)독소 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머를 사용하여 PCR(중합 효소 연쇄 반응)법에 의해서 해당 유전자를 포함한 DNA단편을 증폭하고, 그 증폭 산물의 크기를 전기 영동 법으로 분석하여 실시하는 방법이 있다. 또한 본 출원인에 의한 특허 문헌 3에 기재된 발명과 같이 PCR의 증폭 산물과 상보적으로 결합하는 프로브를 고정화한 DNA칩을 사용하여, 병원성 대장균 등의 검출을 하는 방법도 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0004] (특허문헌 0001) 일본특허 제2905945호 공보
(특허문헌 0002) 일본특허 제2775663호 공보
(특허문헌 0003) PCT 국제 공개 제2011/142119호 공보

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 그런데 공중 위생 분야에서는 식중독의 원인이 되는 병원성 대장균의 유무의 검사뿐만이 아니고, 배설물 오염 등의 위생학적 지표로서 병원성에 관계 없이 대장균의 유무를 동시에 검사할 수 있는 것이 바람직하다.
- [0006] 그렇지만, 상술한 종래의 기술로는 병원성을 갖지 않은 것을 포함한 대장균을 병원성 대장균과 동시에 검출하지

못 하였다.

[0007] 또한 대장균 검사를 하는 실제 현장에서는 검사 시료에 음식물의 유전자 등 다양한 DNA가 혼입되므로 특이성이 뛰어난 검출 정밀도가 요구되고 있었다.

[0008] 본 발명은 상기 사정을 감안하여 이뤄진 것이며 병원성을 갖지 않은 것을 포함한 대장균과, 식중독의 원인이 되는 장관 출혈성 대장균의 검출을 동시에, 또한 높은 특이성으로 실시할 수 있는 대장균의 검출 방법 및 대장균 검출용 담체의 제공을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명의 대장균의 검출 방법은, 장관 출혈성 대장균 및 대장균(장관 출혈성 대장균을 포함)을 동시에 검출하는 대장균의 검출 방법이며, 시료에서 추출한 게놈 DNA를 주형으로서 대장균의 우리딘 모노 인산 인산화 효소 유전자(pyrH)를 포함한 DNA단편과, 베로 독소 1형 유전자(vtx1)를 포함한 DNA단편과, 베로 독소 2형 유전자(vtx2)를 포함한 DNA단편을 멀티플렉스 PCR에 의해서 동시에 증폭시키고, 각각의 증폭 산물의 유무를 검출함으로써 시료 중에서의 장관 출혈성 대장균의 유무 및 대장균의 유무를 동시에 검출하는 방법으로 되어 있다.

[0010] 또한 본 발명의 대장균 검출용 담체는, 장관 출혈성 대장균 및 대장균(장관 출혈성 대장균을 포함)을 동시에 검출하기 위한 대장균 검출용 담체이며, 대장균의 우리딘 모노 인산 인산화 효소 유전자(pyrH)에서 선택된 서열 번호 7~9에 나타내는 염기 서열로 이루어진 적어도 두개 이상의 프로브와, 대장균의 베로 독소 1형 유전자(vtx1)에서 선택된 서열 번호 10~17에 나타내는 염기 서열로 이루어진 적어도 하나의 프로브와, 대장균의 베로 독소 2형 유전자(vtx2)에서 선택된 서열 번호 18~22에 나타내는 염기 서열로 이루어진 적어도 하나의 프로브를 고정화한 구성으로 되어 있다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따르면 병원성을 갖지 않은 것을 포함한 대장균과, 식중독의 원인이 되는 장관 출혈성 대장균의 검출을 동시에, 또한 높은 특이성으로 할 수 있게 된다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법 및 대장균 검출용 담체의 시험 1,3에서 사용한 균주의 독소 유전자 보유 상황을 나타내는 도이다.

도 2는 본 발명의 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법에서 사용되는 3종류의 프라이머 세트의 염기 서열(프라이머 서열)을 나타내는 도이다.

도 3은 본 발명의 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법에서의 멀티 플렉스 PCR에 의한 증폭 산물의 전기 영동 결과를 나타내는 도이다.

도 4는 본 발명의 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법에서의 우리딘 모노 인산 인산화 효소 유전자 영역을 증폭하기 위한 프라이머 세트(pyrH프라이머 세트)를 사용하여 얻어진 검증균 종의 PCR증폭 산물의 전기 영동 결과를 나타내는 도이다.

도 5는 본 발명의 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법 및 대장균 검출용 담체에서의 우리딘 모노 인산 인산화 효소 유전자 영역에서 선택된 각 프로브(pyrH프로브)에 의한 검증균 종의 검출 결과(형광 강도, S/N 비교치)를 나타내는 도이다.

도 6은 본 발명의 실시형태에 관한 대장균 검출용 담체에서의 프로브의 염기 서열(프로브 서열)을 나타내는 도이다.

도 7은 본 발명의 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법 및 대장균 검출용 담체에서의 각 프로브에 의한 대장균의 검출 결과(형광 강도)를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 본 발명의 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법 및 대장균 검출용 담체에 대해서 상세하게 설명한다.

[0014] 본 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법은, 장관 출혈성 대장균 및 대장균(장관 출혈성 대장균을 포함)을 동시

에 검출하는 대장균의 검출 방법이며, 시료에서 추출한 게놈 DNA를 템플레이트로서 대장균의 우리딘 모노 인산 인산화 효소 유전자(pyrH)를 포함한 DNA단편과, 베로 독소 1형 유전자(vtx1)를 포함한 DNA단편과, 베로 독소 2형 유전자(vtx2)를 포함한 DNA단편을 멀티플렉스 PCR에 의해서 동시에 증폭시키고, 각각의 증폭 산물의 유무를 검출함으로써 시료 중에서의 장관 출혈성 대장균의 유무 및 대장균의 유무를 동시에 검출하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 대장균(*Escherichia coli*)은 그람 음성으로 통성 혐기성 간균이다. 장내 세균의 일종으로 대부분의 것은 병원성을 가지고 있지 않으며 사람에게 무해하다. 그러나 공중 위생의 분야에서는 위생학적 지표로서 이러한 병원성의 유무에 관계없이 대장균을 폭넓게 검출 가능하게 하는 것이 바람직하다.

[0016] 그래서 본 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법에서는 대장균의 게놈 DNA에 공통적으로 보유되는 우리딘 모노 인산 인산화 효소 유전자(pyrH)를 증폭 대상 영역(증폭 대상 유전자 영역, 표적 유전자 영역)으로서 PCR법에 의해서 증폭하고 그 증폭 산물을 검출함으로써 시료 중에서의 병원성 있는 것과 없는 것을 포함한 대장균의 유무를 검출 가능하게 하고 있다.

[0017] 또한 대장균은 복통이나 설사 등을 일으키는 것이 존재하고 이들을 일반적으로 병원성 대장균이라고 부른다. 특히 O157등으로 유명한 장관 출혈성 대장균(EHEC, enterohemorrhagic *E. coli*)에는 독소를 생성하는 유전자로서, 베로 독소 1형 유전자(vtx1) 및/또는 베로 독소 2형 유전자(vtx2)를 가진 것이 존재한다.

[0018] 구체적으로는, 예를 들면 도 1에 도시한 바와 같이 베로 독소 유전자의 보유 상황을 알고 있는 균주가 존재하고 있다. 후술하는 실시예에서는 이들의 균주를 사용하여 pyrH, vtx1 및 vtx2의 3가지 유전자를 동시에 검출하고 있다.

[0019] 본 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법으로는 상기의 우리딘 모노 인산 인산화 효소 유전자(pyrH)와 베로 독소 유전자(vtx1, vtx2)를 증폭 대상 영역으로서 PCR법에 의해서 동시에 증폭하고, 그 증폭 산물을 검출함으로써 시료 중에 있어서의, 장관 출혈성 대장균을 포함한 대장균의 유무와 장관 출혈성 대장균의 유무를 동시에 검출 가능하게 하고 있다.

[0020] 이로써, 본 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법에 따르면 대장균에 대해서, 이전의 방법으로는 할 수 없었던 위생 지표균 및 식중독 위해 균의 2종류의 지표를 동시에 식별할 수 있다.

[0021] 본 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법에서 도 2와 같이 대장균의 우리딘 모노 인산 인산화 효소 유전자(pyrH) 영역을 PCR법으로 증폭하기 위한 프라이머 세트(pyrH프라이머 세트)로서 서열 번호 1에 나타내는 염기 서열로 구성된 프라이머(F:포워드 프라이머)와 서열 번호 2에 나타내는 염기 서열로 구성된 프라이머(R:리버스 프라이머)로 이루어진 것을 사용하는 것이 바람직하다.

[0022] 또한, 장관 출혈성 대장균의 베로 독소 1형 유전자(vtx1)영역을 PCR법으로 증폭하기 위한 프라이머 세트(vtx1프라이머 세트)로서 서열 번호 3에 나타내는 염기 서열로 구성된 프라이머(F:포워드 프라이머)와 서열 번호 4에 나타내는 염기 서열로 구성된 프라이머(R:리버스 프라이머)로 이루어진 것을 사용하는 것이 바람직하다.

[0023] 또한, 장관 출혈성 대장균의 베로 독소 2형 유전자(vtx2)영역을 PCR법으로 증폭하기 위한 프라이머 세트(vtx2프라이머 세트)로서 서열 번호 5에 나타내는 염기 서열로 구성된 프라이머(F:포워드 프라이머)와 서열 번호 6에 나타내는 염기 서열로 구성된 프라이머(R:리버스 프라이머)로 이루어진 것을 사용하는 것이 바람직하다.

[0024] 본 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법에서 PCR반응액은 상기의 pyrH프라이머 세트, vtx1프라이머 세트 및 vtx2프라이머 세트를 함유하고, 그 외의 성분에는 일반적인 것을 사용할 수 있다. 구체적으로는, 완충액, 핵산 합성 기질, Ex Taq등의 핵산 합성 효소, Cy5등의 표지 성분, 시료의 DNA 및 물을 포함하는 것 등을 사용할 수 있다.

[0025] 그리고 이와 같은 PCR반응액을 사용하여 서멀 사이클러 등의 핵산 증폭 장치로 시료 중의 게놈 DNA의 일부가 증폭된다. 즉, 상기 프라이머 세트에 의한 증폭 대상 영역을 가진 게놈 DNA가 시료 중에 존재하는 경우, 그 대상 영역이 증폭된다.

[0026] 본 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법에서 사용하는 프라이머는 상기의 염기 서열에 한정되는 것은 아니고 각각의 염기 서열에 있어서 1 또는 몇개의 염기가 결손, 치환 또는 부가된 것을 사용할 수 있다. 또한 각각의 염기 서열에 대해서 상보적인 염기 서열로 구성된 핵산 단편에 대해서 스트린젠트(stringent)한 조건하에서 하이브리다이징할 수 있는 핵산 단편으로 구성될 것을 사용할 수도 있다.

- [0027] 스트린젠트한 조건이란 특이적인 하이브리드가 형성되고 비특이적인 하이브리드가 형성되지 않는 조건을 말한다. 예를 들면 서열 번호 1~6으로 표시되는 서열로 구성된 DNA에 대해서 높은 상동성(상동성이 90%이상, 바람직하게는 95%이상)을 가진 DNA가 서열 번호 1~6으로 표시되는 서열로 구성된 DNA와 상보적인 염기 서열로 구성된 DNA와, 하이브리다이징하는 조건을 들 수 있다. 통상 완전 하이브리드의 용해 온도(T_m)보다 약 5℃~약 30℃, 바람직하게는 약 10℃~약 25℃ 낮은 온도에서 하이브리디제이션이 일어나는 경우를 말한다. 스트린젠트한 조건에 대해서는 J.Sambrook들, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989), 특히 11.45절"Conditions for Hybridization of Oligonucleotide Probes"에 기재되어 있는 조건 등을 사용할 수 있다.
- [0028] 다음에 PCR법으로 얻은 증폭 산물(PCR증폭 산물)을 사용하여 예를 들면 전기 영동을 함으로써 본 실시형태에서의 상기 각 프라이머 세트에 의한 증폭 산물을 얻고 있는지 여부를 확인하고, 시료 중에서의 대장균 및 장관 출혈성 대장균의 유무를 검출하는 것이 바람직하다. 전기 영동은 아가로스 겔 전기 영동이나 폴리 아크릴 아미드 겔 전기 영동, 마이크로 칩 전기 영동 등 일반적인 방법으로 할 수 있다.
- [0029] 또한 PCR증폭 산물을 본 실시형태에 관한 대장균 검출용 담체(DNA칩)위에 떨어뜨리고 해당 담체에 고정화된 프로브에 하이브리다이징한 증폭 산물의 표지를 검출함으로써 시료 중에서의 대장균 및 장관 출혈성 대장균의 유무를 검출하는 것도 바람직하다.
- [0030] 표지의 검출은 형광 스캐닝 장치 등 일반적인 표지 검출 장치를 사용하여 할 수 있으며, 예를 들면 동양 강관 주식 회사의 BIOSHOT(R)를 사용하여 증폭 산물의 형광 강도를 측정함으로써 할 수 있다. 또한 측정 결과로서, 형광 강도의 외에 S/N 비교치(Signal to Noise ratio, (메디안 형광 강도치-백그라운드치)÷백그라운드치)를 산출하는 것도 바람직하다. S/N 비교치를 바탕으로 측정 결과가 양성인지 음성인지를 정밀도 높게 판정할 수 있기 때문이며, 일반적으로 S/N 비교치가 3이상인 경우, 양성으로 판정할 수 있다. 또한 표지는 형광에 국한되지 않고 그 밖의 것을 사용해도 된다.
- [0031] 본 실시형태에 관한 대장균 검출용 담체는 대장균의 우리딘 모노 인산 인산화 효소 유전자(pyrH)영역에서 선택된 프로브(pyrH프로브)로서 서열 번호 7~9에 나타내는 염기 서열로 구성된 적어도 하나를 고정화한 것으로 하는 것이 바람직하다. 또한 특이성의 관점에서 서열 번호 8 또는 9에 나타내는 염기 서열로 구성된 적어도 하나의 프로브를 고정화한 것으로 하는 것이 더욱 바람직하고 서열 번호 7~9에 나타내는 염기 서열로 구성된 적어도 두 개 이상의 프로브를 고정화한 것으로 하는 것이 더욱 바람직하다. 이와 같이 특이성이 뛰어난 프로브를 조합함으로써 위양성(偽陽性) 판정이 이뤄질 가능성을 저감시킬 수 있다.
- [0032] 또한 본 실시형태에 관한 대장균 검출용 담체는, 장관 출혈성 대장균의 베로 독소 1형 유전자(vtx1)영역에서 선택된 프로브(vtx1프로브)로서 서열 번호 10~17에 나타내는 염기 서열로 구성된 적어도 하나의 프로브를 고정화한 것으로 하는 것이 바람직하고, 장관 출혈성 대장균의 베로 독소 2형 유전자(vtx2)영역에서 선택된 프로브(vtx2프로브)로서 서열 번호 18~22에 나타내는 염기 서열로 구성된 적어도 하나의 프로브를 고정화한 것으로 하는 것이 바람직하다.
- [0033] 본 실시형태에 관한 대장균 검출용 담체에 pyrH프로브뿐만 아니라, 이러한 vtx1프로브와 vtx2프로브를 고정화함으로써 대장균(장관 출혈성 대장균을 포함)과 함께, 베로 독소 1형 유전자 및/또는 베로 독소 2형 유전자를 가진 장관 출혈성 대장균을 동시에 특이적으로 검출할 수 있다.
- [0034] 본 실시형태에 관한 대장균 검출용 담체에서 사용하는 프로브도 상기의 염기 서열에 한정되는 것이 아니고 각각의 염기 서열에 있어서 1 또는 여러 개의 염기가 결손, 치환 또는 부가된 것을 사용할 수도 있다. 또한 각각의 염기 서열에 대해서 상보적인 염기 서열로 구성된 핵산 단편에 대해서 스트린젠트한 조건하에서 하이브리다이징할 수 있는 핵산 단편으로 구성된 것을 사용할 수도 있다. 또한 이러한 프로브에 대해서 상보적인 염기 서열을 가진 프로브를 사용할 수도 있다.
- [0035] 이와 같은 대장균 검출용 담체를 사용하여 구체적으로는 PCR증폭 산물에 소정의 완충액을 혼합하여 해당 담체에 떨어뜨린다. 다음에 해당 담체를 45℃에서 1시간 정치하고, 그 후 소정의 완충액에 의해서 하이브리다이징 하지 않은 PCR증폭 산물 등을 해당 담체에서 씻어낸다. 그리고 해당 담체를 표지 검출 장치에 걸어 표지의 검출을 실시함으로써 시료 중에 장관 출혈성 대장균 및 대장균(장관 출혈성 대장균을 포함)의 존재 여부를 동시에 검출할 수 있다.
- [0036] 이상 설명한 바와 같이, 본 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법 및 대장균 검출용 담체에 따르면 병원성을 갖지 않은 것을 포함한 대장균과, 식중독의 원인이 되는 장관 출혈성 대장균의 검출을 동시에, 또한 높은 특이성

으로 할 수 있다.

- [0037] [실시예]
- [0038] <시험 1:3종류의 프라이머 세트를 사용한 동시 증폭의 검증>
- [0039] 도 1에 나타내는 베로 독소 유전자의 보유 상황이 이미 알려진 6종류의 대장균의 균주를 사용하여 이들의 대장균에서 통상의 방법에 의해서 DNA를 추출하였다. 이 도에서 (1)~(5)는 오사카 대학 미생물 병 연구소에서 분양 유래된 것이며, (6)은 독립 행정 법인 제품 평가 기술 기반 기구 생물 유전 자원 센터(NBRC)에서 분양에서 유래된 것이다.
- [0040] 이어서, 도 2에 나타내는 pyrH프라이머 세트, vtx1프리마 세트 및 vtx2프라이머 세트를 사용하여 균주마다 각각의 증폭 대상 영역을 멀티플렉스 PCR에 의해서 동시에 증폭하고 얻은 증폭 산물을 검출할 수 있는지 여부를 검증하였다. 구체적으로는 다음과 같이 하였다.
- [0041] 상기 6종류의 대장균의 균주를 각각 트립티크 소이브로스(일본 BD제)에 접종하여 37℃에서 하룻밤 배양을 한 후, 배양액을 각각 1mL씩 회수하여 5000×으로 10분간의 원심 분리를 하였다.
- [0042] 다음에 상등액을 버리고 얻어진 침전에 20mg/mL농도의 라이소자임 용액(20mM Tris-HCl, pH8.0/2mM EDTA, 1.2% TritonX-100)을 첨가하여, 37℃에서 30분간 용균 처리를 하였다. 또한 DNeasy Blood&Tissue Kit(주식 회사 기아젠제)를 사용하여 칼럼 정제를 함으로써 DNA추출액을 얻었다. 이 DNA추출액을 10pg/μl농도로 조제한 것을 PCR에서 사용하는 시료로 하였다.
- [0043] 다음에 PCR반응액을 다음의 조성으로 조제하였다. 프라이머는 시그마-알드리치 재팬 합동 회사에 합성 위탁하고 그 외의 시약은 타카라 바이오 주식 회사 제의 것을 사용하였다.
- [0044] · 완충액(10×Taq buffer)(2.0 μl)
- [0045] · 핵산 합성 기질(dNTP Mixture)(1.6 μl)
- [0046] · 대장균 pyrH증폭용 F프라이머(5'말단 Cy5수식)(0.2 μl)
- [0047] · 대장균 pyrH증폭용 R프라이머(0.2 μl)
- [0048] · 대장균 vtx1증폭용 F프라이머(0.2 μl)
- [0049] · 대장균 vtx1증폭용 R프라이머(5'말단 Cy5수식)(0.2 μl)
- [0050] · 대장균 vtx2증폭용 F프라이머(0.2 μl)
- [0051] · 대장균 vtx2증폭용 R프라이머(5'말단 Cy5수식)(0.2 μl)
- [0052] · Ex Taq Hot Start Version(0.2 μl)
- [0053] · 시료의 DNA(1.0 μl)
- [0054] · 멸균수(14.0 μl)
- [0055] (전량 20 μl)
- [0056] PCR에 의한 유전자의 증폭에는 서멀 싸이클러 ep그래디언트(에펜도르프 주식 회사)를 사용하였다. 반응 조건은 다음과 같다.
- [0057] (1)95℃ 2분
- [0058] (2)95℃ 10초(DNA사슬의 피리 공정)
- [0059] (3)68℃ 30초(어닐링 공정)
- [0060] (4)72℃ 30초(DNA합성 공정)
- [0061] (5)72℃ 2분
- [0062] (2)~(4)을 40사이클
- [0063] 다음에 이렇게 해서 얻어진 PCR증폭 산물을 포함한 PCR반응액을 마이크로 칩 전기 영동 장치 MultiNA(주식회사

시마즈 제작소)에 제공하여 PCR증폭 산물의 크기를 분석하였다. 그 결과를 도 3에 나타낸다.

- [0064] 도 3에 나타낸 바와 같이, 전기 영동의 결과 pyrH프라이머 세트에 의한 증폭 산물(추정 사이즈 158bp)은 6종류의 균주의 모두에 대해서 검출되었다.
- [0065] 한편 vtx1프라이머 세트에 의한 증폭 산물(추정 사이즈 351bp)은 vtx1유전자를 가진 균주(3)(4)(5)에 대해서만 검출되고, vtx2프라이머 세트에 의한 증폭 산물(추정 사이즈 128bp)은 vtx2유전자를 가진 균주(1)(2)(5)에 대해서만 검출되었다.
- [0066] 이상에서, 본 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법에서의 pyrH프라이머 세트, vtx1프라이머 세트 및 vtx2프라이머 세트에 의해서 이들의 영역을 각각 특이적으로 동시에 검출되었음을 알 수 있다. 이와 같이 본 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법에 따르면 대장균과 장관 출혈성 대장균 검출을 동시에 실시할 수 있음이 확인되었다.
- [0067] <시험 2:대장균의 pyrH프로브의 검증>
- [0068] 대장균의 pyrH영역을 증폭하기 위한 프라이머 세트(서열 번호 1, 2)를 사용하여 PCR을 하는 경우에 있어서, 시료 중에 대장균의 유연종(類緣種)인 엔테로박터(Enterobacter)속균이나 사이트로박터(Citrobacter)속 균의 일부의 균종이 포함되어 있는 경우, 도 4와 같이 그 균종의 게놈 DNA에 따른 증폭 산물이 얻어지는 것을 알았다.
- [0069] 이런 경우 대장균과 장관 출혈성 대장균의 유무의 판정을 전기 영동에 의해서 실시하면 이들의 유연종과의 구별이 되지 않고, 위양성 판정이 이뤄질 가능성이 있다.
- [0070] 그래서 본 실시형태에 관한 대장균 검출용 담체를 사용함으로써 대장균과 이들의 유연종을 식별할 수 있는지를 검증하였다. 구체적으로는 다음과 같이 하였다.
- [0071] 도 4에 나타나는 검증균 종의 균주를 시험 1과 마찬가지로 배양해서 얻은 DNA추출액 10ng/ μ l과 도 2에 도시하는 pyrH프라이머 세트를 사용하여 균주마다 증폭 대상 영역을 PCR에 의해서 증폭하였다. 본 시험에서는 PCR반응액을 이하의 조성으로 조제하고 기타의 점에 대해서는 시험 1과 마찬가지로 PCR증폭 산물을 포함한 PCR반응액을 얻었다.
- [0072] · 완충액(10 $\times$ Taq buffer)(2.0 μ l)
- [0073] · 핵산 합성 기질(dNTP Mixture)(1.6 μ l)
- [0074] · 대장균 pyrH증폭용 F프라이머(5'말단 Cy5수식)(0.2 μ l)
- [0075] · 대장균 pyrH증폭용 R프라이머(0.2 μ l)
- [0076] · Ex Taq Hot Start Version(0.2 μ l)
- [0077] · 시료의 DNA(1.0 μ l)
- [0078] · 멸균수(14.8 μ l)
- [0079] (전량 20 μ l)
- [0080] 또한 미리 도 6에 나타내는 서열 번호 7~9의 염기 서열로 구성된 각 프로브를 고정화한 DNA칩을 제작하였다. 그리고 균주마다 PCR반응액 4 μ L와 하이브리다이제이션용 완충액 2 μ L(3 $\times$ SDS 시트르산-생리 식염수-라우릴 황산 나트륨)을 혼합한 것을 상기 DNA칩에 떨어뜨려서, 45 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다.
- [0081] 반응 후 DNA칩을 실온 하에서 세척액(2 $\times$ SDS용액, 2 $\times$ 용액의 순으로)에 담그어 세정을 하고 커버 유리를 얹어서 형광 검출기 Bioshot(동양 광관 판주식 회사제)에 의해서 각 프로브의 스폿 영역의 형광을 검출하였다.
- [0082] 구체적으로는 프로브에 하이브리다이즈한 증폭 산물의 표지 성분(Cy5)을 레이저 빔에 의해서 여기하여 발광시키고, 그 광량을 검출기 내에 장착한 CCD카메라에 의해서 검출하였다. 또한 광량을 전기 신호로 치환하여 수치화하고 형광 강도를 얻었다. 이 형광 강도는 해당 장치에서의 강도 지표이며 단위는 없고 배경의 수치가 0이 되게 보정하여 하였다. 또한 모두 S/N 비교치를 산출하였다. 그 결과를 도 5에 나타낸다.
- [0083] 이 도와 같이 서열 번호 7의 염기 서열로 구성된 프로브는 검출 대상 균인 Escherichia coli에 대해서 높은 형광 강도를 나타내고, 비대상 균인 Enterobacter kobei 및 Citrobacter freundii에 대해서도 비교적 높은 형광 강도를 나타내고 있다. 특히 Citrobacter freundii에 대해서는 S/N 비교치가 3이상이며 위양성 반응이 생기고 있다.

- [0084] 또한 서열 번호 8의 염기 서열로 구성된 프로브는 검출 대상 균인 *Escherichia coli*에 대해서 높은 형광 강도를 나타내고, 비 대상 균인 *Citrobacter sp*에 대해서도 비교적 높은 형광 강도를 나타내고 있지만, S/N 비교치는 3 미만이며 위양성 반응은 생기지 않았다.
- [0085] 또한 서열 번호 9의 염기 서열로 구성된 프로브는 검출 대상 균인 *Escherichia coli*에 대해서 높은 형광 강도를 나타내고, 비대상 균인 *Enterobacter kobei*에 대해서도 비교적 높은 형광 강도를 보이고 있지만, S/N 비교치는 3미만이며 위양성 반응은 생기지 않았다.
- [0086] 따라서 본 실시형태에 관한 대장균 검출용 담체는 서열 번호 8 또는 9에 나타내는 염기 서열로 구성된 적어도 하나의 프로브를 고정화한 것으로 하는 것이 바람직하다.
- [0087] 또한 서열 번호 7~9의 염기 서열로 구성된 프로브는 각각 다른 균에 대해서 높은 형광 강도를 나타내고 있으므로 이들을 조합함으로써 위양성 판정을 억제하는 효과를 거둘 수 있다. 그러므로 본 실시형태에 관한 대장균 검출용 담체는 서열 번호 7~9에 나타내는 염기 서열로 구성된 적어도 두개 이상의 프로브를 고정화한 것으로 하는 것이 바람직하고 서열 번호 7~9에 나타내는 염기 서열로 구성된 프로브를 모두 고정화한 것으로 하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0088] <시험 3:DNA칩에 의한 동시 검출의 검증>
- [0089] 본 실시형태에 관한 대장균 검출용 담체에 의해서 대장균에서의 *pyrH*, *vtx1*, *vtx2*의 3종류의 유전자를 동시에 특이적으로 검출할 수 있는지 여부를 검증하였다.
- [0090] 구체적으로는 도 6에 나타내는 서열 번호 7~22의 염기 서열로 구성된 각 프로브를 고정화한 DNA칩을 제작하였다.
- [0091] 그리고 도 1에 나타내는 6종류의 대장균의 균주를 사용하여 균주마다 시험 1과 마찬가지로 하여 얻은 PCR반응액 4 μ l과 하이브리다이제이션용 완충액 2 μ l(3 $\times$ SDS 시트르산-생리 식염수-라우릴 황산 나트륨)을 혼합한 것을 이 DNA칩에 떨어뜨리고, 45℃에서 1시간 반응시켰다.
- [0092] 반응 후 시험 2와 마찬가지로 DNA칩을 실온 하에서 세척액(2 $\times$ SDS용액, 2 $\times$ 용액의 순)에 담그어 세척을 하고 커버 유리를 얹어서 형광 검출기 Bioshot(동양 강관 주식 회사제)에 의해서 프로브의 스폿 영역의 형광을 검출하였다. 그 결과를 도 7에 도시한다.
- [0093] 이 도면에 도시한 바와 서열 번호 7~9의 *pyrH*검출용 프로브는 6종류 모두 대장균의 균주에 대해서 높은 형광 강도를 보였다.
- [0094] 이에 대해서 서열 번호 10~17의 *vtx1*검출용 프로브는 *vtx1*유전자를 보유한 균주(3), (4), (5)에 한해서만 높은 형광 강도를 나타내고, *vtx1*유전자를 보유하지 않은 균주(1), (2), (6)에 대해서는 높은 형광 강도를 보이지 않았다. 또한 서열 번호 18~22의 *vtx2*검출용 프로브는 *vtx2*를 보유하는 균주(1), (2), (5)에 한해서만 높은 형광 강도를 나타내고, *vtx2*를 보유하지 않은 균주(3), (4), (6)에 대해서는 높은 형광 강도를 보이지 않았다.
- [0095] 이상으로부터, 본 실시형태에 관한 대장균 검출용 담체에 따르면 시료 중에 *pyrH*, *vtx1*, *vtx2*의 3종류의 유전자를 포함한 DNA단편의 존재 여부를 동시에 특이적으로 판정하는 것이 밝혀졌다.
- [0096] 본 발명은 이상의 실시형태나 실시예에 한정되는 것이 아니고 본 발명의 범위 내에서 다양한 변경 실시가 가능하다. 예를 들면 본 실시형태에 관한 대장균의 검출 방법에서 PCR반응액에 기타의 성분을 함유시키거나 또는 대장균 검출용 담체에 상기 이외의 프로브를 다시 추가하여 고정화하거나 하는 등 적절히 변경할 수 있다.
- 산업상 이용가능성**
- [0097] 본 발명은 식품 검사, 역학적 환경 검사, 환경 검사, 임상 시험 및 가축 위생 등에서 대장균을 검출하는 경우에 알맞게 사용할 수 있다.

도면

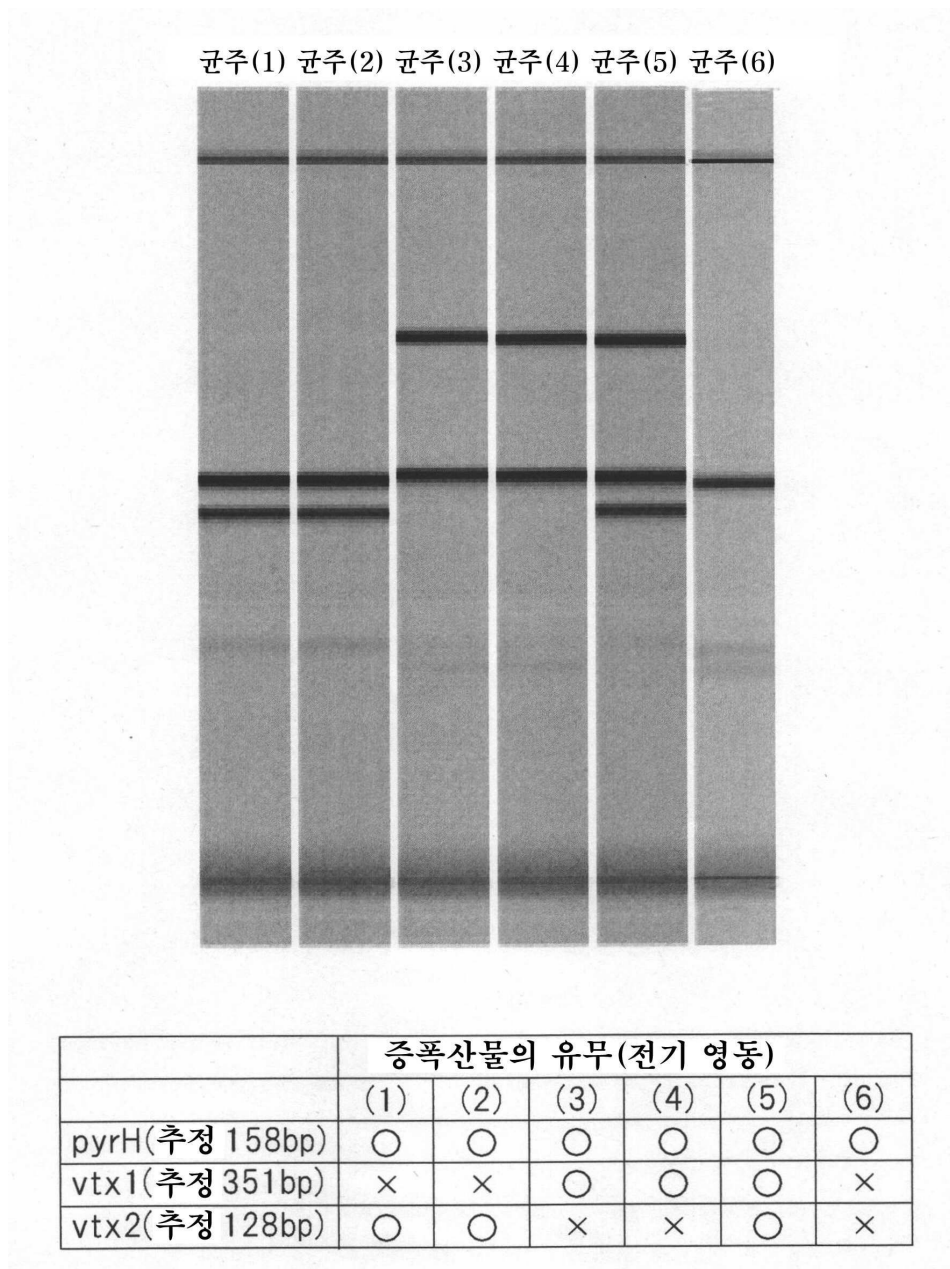
도면1

사용한 균주	독소유전자 보유상황
(1) <i>Escherichia coli</i> RIMD 05091860	<i>vtx2</i>
(2) <i>Escherichia coli</i> RIMD 05091875	<i>vtx2</i>
(3) <i>Escherichia coli</i> RIMD 05091878	<i>vtx1</i>
(4) <i>Escherichia coli</i> RIMD 05091865	<i>vtx1</i>
(5) <i>Escherichia coli</i> RIMD 05091904	<i>vtx1, vtx2</i>
(6) <i>Escherichia coli</i> NBRC 102203	비보유

도면2

식중독균	표적유전자	서열번호	F/R	프라이머 서열
대장균	<i>pyrH</i>	1	F	CGCTCGTCTGATGTCCCGCTATTCCATTGAAT
		2	R	ACCACGCAGGCAAGCTGCTGAGTCGG
	<i>vtx1</i>	3	F	TGTTACTGTGACAGCTGAAGCTTTACGTTTTCG
		4	R	TCCCACAATATTTTATTGTGCGTAATCCCACG
	<i>vtx2</i>	5	F	GGTTCCCATGACAACGGACAGCAGTTA
		6	R	GTCCACTGAACTCCATTAAACGCCAGATATGA

도면3



도면4

검증 균종	균주	증폭산물의 유무 (전기 영동)
<i>Escherichia coli</i> (대장균)	NCTC 12923주	있음
<i>Enterobacter aerogenes</i>	NBRC 13534	있음
<i>(Enterobacter kobei)</i> (16SrRNA 유전자해석에 의한 동정최상위종)	야생주	있음
<i>(Enterobacter asburiae)</i> (16SrRNA 유전자해석에 의한 동정최상위종)	야생주	있음
<i>Citrobacter freundii</i>	NBRC 12681T	있음
<i>Citrobacter sp.</i>	NBRC 13544	있음
<i>Serratia marcescens</i>	NBRC 102204T	없음
<i>Klebsiella oxytoca</i>	NBRC 102593T	없음

도면5

검증균종	서열번호 7		서열번호 8		서열번호 9	
	형광강도	S/N비 교차	형광강도	S/N비 교차	형광강도	S/N비 교차
<i>Escherichia coli</i> (대장균)	57606	37.58	56024	33.74	51718	29.81
<i>Enterobacter aerogenes</i>	184	1.13	336	1.25	221	1.16
<i>(Enterobacter kobei)</i> (16SrRNA 유전자해석에 의한 동정최상위종)	2532	2.92	246	1.19	1181	1.89
<i>(Enterobacter asburiae)</i> (16SrRNA 유전자해석에 의한 동정최상위종)	2	1.00	17	1.01	919	1.69
<i>Citrobacter freundii</i>	18244	14.29	74	1.05	119	1.09
<i>Citrobacter sp.</i>	332	1.24	1884	2.34	223	1.16

도면6

식중독균	표적유전자	서열번호	프로브 서열
대장균	<i>pyrH</i>	7	GCGCAACAGGCTGATAGCTTCT
		8	AGCTGTAGCTGTGCGCACACG
		9	CTTCTGCCCAGCTGTAGCTG
	<i>vtx1</i>	10	TGGGCGTTCTTATGTAATGACTGC
		11	GCTGAAGATGTTGATCTTACATTGAAC
		12	GGAAGTTGAGTAGTGCTCCTGCCT
		13	CATGGACAAGACTCTGTTCTGTTAG
		14	ATTAATGCAATTCTGGGAAGCGTGG
		15	ACTGAATTGTCATCATCATGTCATCGC
		16	ATGCATCGCGAGTTGCCAGAAT
		17	CATCTGATGAGTTTCCTTCTATGTGTCC
	<i>vtx2</i>	18	TGTCGCAGCTCTGGAACGTAC
		19	ATCAGTCGTCATTCACTGTTGGT
		20	AACGTGTCGCAGCGCTGGAA
		21	AACGTTCCGGAATGCAAAATCAGT
		22	GTCGTCACTCACTGGTTTCATCAT

도면7

식중독균	표적유전자	서열번호	형광강도					
			균주(1)	균주(2)	균주(3)	균주(4)	균주(5)	균주(6)
대장균	pyrH	7	15457	13908	14270	19338	17782	15363
		8	12411	11089	11158	14998	14869	14698
		9	5708	5693	5394	7551	7076	5820
	vtx1	10	0	10	55850	56838	56420	15
		11	1	0	48473	55253	52771	0
		12	0	0	32138	40261	39630	6
		13	0	0	41223	46475	41607	0
		14	24	18	56962	57275	57332	24
		15	5	0	57385	58009	57781	2
	vtx2	16	76	15	39370	39664	39675	5
		17	35	13	59441	59020	59424	44
		18	46365	47441	0	0	37860	0
		19	57587	44295	8	0	58085	38
		20	26304	25391	0	0	25338	0
		21	58097	57575	0	0	58083	0
	pyrH vtx1 vtx2	22	59349	58266	12	0	59259	0
		—	○	○	○	○	○	○
		—	×	×	○	○	○	×
		—	○	○	×	×	○	×

서열목록

- <110> TOYO SEIKAN GROUP HOLDINGS, LTD.
- <120> METHOD FOR DETECTING ESCHERICHIA COLI AND CARRIER FOR DETECTING ESCHERICHIA COLI
- <130> IP16-0009
- <150> PCT/KR PCT/JP2015/002934
- <151> 2015-06-11
- <160> 22
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1

<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	1	
	cgctcgtctg atgtccgcta ttccattgaa t	31
<210>	2	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	2	
	accacgcagg caagctgctg agtcgg	26
<210>	3	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	3	
	tgttactgtg acagctgaag ctttacgttt tcg	33
<210>	4	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	4	
	tcccacaata tttattgtg cgtaatccca cg	32
<210>	5	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	5	
	ggtttccatg acaacggaca gcagtta	27
<210>	6	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	

<400>	6	
gtccactgaa ctccattaac gccagatatg a		31
<210>	7	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	7	
gcgcaacagg ctgatatgctt ct		22
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	8	
agctgtagct gtcgcacacg		20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	9	
cttctgcccc gctgtagctg		20
<210>	10	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	10	
tgggcgttct tatgtaatga ctgc		24
<210>	11	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	11	
gctgaagatg ttgatcttac attgaac		27
<210>	12	
<211>	24	

<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	12	
	ggaaggttga gtagtgcct gcct	24
<210>	13	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	13	
	catggacaag actctgttcg ttag	25
<210>	14	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	14	
	attaatgcaa ttctgggaag cgtgg	25
<210>	15	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	15	
	actgaattgt catcatcatg catcgc	26
<210>	16	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	16	
	atgcatcgcg agttgccaga at	22
<210>	17	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Escherichia coli	
<400>	17	

catctgatga gtttccttct atgtgtcc	28
<210> 18	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 18	
tgtcgcagct ctggaacgta c	21
<210> 19	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 19	
atcagtcgtc attcactggt tggt	24
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 20	
aacgtgtcgc agcgctggaa	20
<210> 21	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 21	
aacgttccgg aatgcaaadc agt	23
<210> 22	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Escherichia coli	
<400> 22	
gtcgtcactc actggtttca tcat	24