(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월09일
(11) 등록번호 10-2099344
(24) 등록일자 2020년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/689 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2018.05)
C12Q 2600/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0023395
(22) 출원일자 2019년02월27일
심사청구일자 2019년02월27일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020040077544 A*
Berthier et al, FEMS Microbiol Lett. 1998 Apr 1;161(1):97-106
CN108251546A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김해영
경기도 용인시 수지구 동천로135번길 21, 1307동 901호 (동천동, 한빛마을 래미안 이스트팰리스 3단지)
김이슬
경기도 김포시 하성면 후평로 101-20
(74) 대리인
특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **락토바실러스 균주 검출용 멀티플렉스 PCR 프라이머 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주의 검출용 조성물, 키트, 이를 이용한 검출방법 및 스크리닝 방법에 관한 것이다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 918005-4
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원
연구사업명 포스트게놈 다부처 유전체사업
연구과제명 발효식품의 기능성 미생물 유전체 분석 및 유용유전자 발굴
기 여 율 1/1
주관기관 조선대학교 산학협력단
연구기간 2018.04.25 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 제 1 프라이머 쌍; 서열번호 3의 염기서열 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 제 2 프라이머 쌍; 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 제 3 프라이머 쌍; 서열번호 7의 염기서열 및 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 제 4 프라이머 쌍; 서열번호 9의 염기서열 및 서열번호 10의 염기서열을 포함하는 제 5 프라이머 쌍; 서열번호 11의 염기서열 및 서열번호 12의 염기서열을 포함하는 제 6 프라이머 쌍; 서열번호 13의 염기서열 및 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 제 7 프라이머 쌍; 서열번호 15의 염기서열 및 서열번호 16의 염기서열을 포함하는 제 8 프라이머 쌍; 서열번호 17의 염기서열 및 서열번호 18의 염기서열을 포함하는 제 9 프라이머 쌍; 서열번호 19의 염기서열 및 서열번호 20의 염기서열을 포함하는 제 10 프라이머 쌍; 서열번호 21의 염기서열 및 서열번호 22의 염기서열을 포함하는 제 11 프라이머 쌍; 서열번호 23의 염기서열 및 서열번호 24의 염기서열을 포함하는 제 12 프라이머 쌍; 서열번호 25의 염기서열 및 서열번호 26의 염기서열을 포함하는 제 13 프라이머 쌍; 서열번호 27의 염기서열 및 서열번호 28의 염기서열을 포함하는 제 14 프라이머 쌍; 서열번호 29의 염기서열 및 서열번호 30의 염기서열을 포함하는 제 15 프라이머 쌍; 서열번호 31의 염기서열 및 서열번호 32의 염기서열을 포함하는 제 16 프라이머 쌍; 서열번호 33의 염기서열 및 서열번호 34의 염기서열을 포함하는 제 17 프라이머 쌍; 서열번호 35의 염기서열 및 서열번호 36의 염기서열을 포함하는 제 18 프라이머 쌍; 서열번호 37의 염기서열 및 서열번호 38의 염기서열을 포함하는 제 19 프라이머 쌍; 서열번호 39의 염기서열 및 서열번호 40의 염기서열을 포함하는 제 20 프라이머 쌍; 서열번호 41의 염기서열 및 서열번호 42의 염기서열을 포함하는 제 21 프라이머 쌍; 서열번호 43의 염기서열 및 서열번호 44의 염기서열을 포함하는 제 22 프라이머 쌍; 서열번호 45의 염기서열 및 서열번호 46의 염기서열을 포함하는 제 23 프라이머 쌍; 서열번호 47의 염기서열 및 서열번호 48의 염기서열을 포함하는 제 24 프라이머 쌍; 서열번호 49의 염기서열 및 서열번호 50의 염기서열을 포함하는 제 25 프라이머 쌍; 서열번호 51의 염기서열 및 서열번호 52의 염기서열을 포함하는 제 26 프라이머 쌍; 서열번호 53의 염기서열 및 서열번호 54의 염기서열을 포함하는 제 27 프라이머 쌍; 서열번호 55의 염기서열 및 서열번호 56의 염기서열을 포함하는 제 28 프라이머 쌍; 서열번호 57의 염기서열 및 서열번호 58의 염기서열을 포함하는 제 29 프라이머 쌍; 서열번호 59의 염기서열 및 서열번호 60의 염기서열을 포함하는 제 30 프라이머 쌍; 서열번호 61의 염기서열 및 서열번호 62의 염기서열을 포함하는 제 31 프라이머 쌍; 서열번호 63의 염기서열 및 서열번호 64의 염기서열을 포함하는 제 32 프라이머 쌍; 서열번호 65의 염기서열 및 서열번호 66의 염기서열을 포함하는 제 33 프라이머 쌍; 서열번호 67의 염기서열 및 서열번호 68의 염기서열을 포함하는 제 34 프라이머 쌍; 서열번호 69의 염기서열 및 서열번호 70의 염기서열을 포함하는 제 35 프라이머 쌍; 서열번호 71의 염기서열 및 서열번호 72의 염기서열을 포함하는 제 36 프라이머 쌍; 서열번호 73의 염기서열 및 서열번호 74의 염기서열을 포함하는 제 37 프라이머 쌍; 및

서열번호 75의 염기서열 및 서열번호 76의 염기서열을 포함하는 제 38 프라이머 쌍;으로 구성되는 프라이머 세트;를 포함하고,

락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*); 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*); 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*); 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*); 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*); 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*); 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*); 락토바실러스 플랜타룸(*Lactobacillus plantarum*); 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*); 락토바실러스 파라플랜타룸(*Lactobacillus paraplantarum*); 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*); 락토바실러스 커바투스(*Lactobacillus curvatus*); 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*); 락토바실러스 상리바리우스(*Lactobacillus salivarius*); 락토바실러스 류테리(*Lactobacillus reuteri*); 락토바실러스 코리니포미스(*Lactobacillus coryniformis*); 락토바실러스 파르시미니스(*Lactobacillus farciminis*); 락토바실러스 지메(*Lactobacillus zymae*); 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus pentosus*); 락토바실러스 크루스토럼(*Lactobacillus crustorum*); 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*); 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*); 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*); 락토바실러스 아밀로보러스(*Lactobacillus amylovorus*); 락토바실러스 헤이롱지안젠시스(*Lactobacillus heilongjiangensis*); 락토바실러스 파라부크네리(*Lactobacillus parabuchneri*); 락토바실러스 애시디피시스(*Lactobacillus acidipiscis*); 락토바실러스 샌프란시스센시스(*Lactobacillus*

sanfranciscensis); 락토바실러스 루미니스(*Lactobacillus ruminis*); 락토바실러스 아길리스(*Lactobacillus agilis*); 락토바실러스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii*); 락토바실러스 아밀로필러스(*Lactobacillus amylophilus*); 락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*); 락토바실러스 아세토톨러란스(*Lactobacillus acetotolerans*); 락토바실러스 린드네리(*Lactobacillus lindneri*); 락토바실러스 갈리나룸(*Lactobacillus gallinarum*); 및 락토바실러스 아밀로리티쿠스(*Lactobacillus amylolyticus*);로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주 검출용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항의 조성물을 포함하는,

락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주 검출용 키트.

청구항 4

제1항의 조성물을 포함하는,

락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주 검출용 바이오 칩(chip).

청구항 5

대상 시료에 제1항의 조성물을 처리하는 단계;를 포함하는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주 검출방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하는 단계;를 추가로 포함하는,

락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주 검출 방법.

청구항 7

a) 대상 시료에 제1항의 조성물을 처리하는 단계;및

b) 상기 시료 내에 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*); 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*); 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*); 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*); 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*); 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*); 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*); 락토바실러스 플랜타룸(*Lactobacillus plantarum*); 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*); 락토바실러스 파라플랜타룸(*Lactobacillus paraplantarum*); 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*); 락토바실러스 커바투스(*Lactobacillus curvatus*); 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*); 락토바실러스 상리바리우스(*Lactobacillus salivarius*); 락토바실러스 류테리(*Lactobacillus reuteri*); 락토바실러스 코리니포미스(*Lactobacillus coryniformis*); 락토바실러스 파르시미니스(*Lactobacillus farciminis*); 락토바실러스 지메(*Lactobacillus zymae*); 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus pentosus*); 락토바실러스 크루스토럼(*Lactobacillus crustorum*); 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*); 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*); 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*); 락토바실러스 아밀로보러스(*Lactobacillus amylovorus*); 락토바실러스 헤이롱지안젠시스(*Lactobacillus heilongjiangensis*); 락토바실러스 파라부크네리(*Lactobacillus parabuchneri*); 락토바실러스 애시디피시스(*Lactobacillus acidipiscis*); 락토바실러스 샌프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*); 락토바실러스 루미니스(*Lactobacillus ruminis*); 락토바실러스 아길리스(*Lactobacillus agilis*); 락토바실러스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii*); 락토바실러스 아밀로필러스(*Lactobacillus amylophilus*); 락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*); 락토바실러스 아세토톨러란스(*Lactobacillus acetotolerans*); 락토바실러스 린드네리(*Lactobacillus lindneri*); 락토바실러스 갈리나룸(*Lactobacillus gallinarum*); 및 락토바실러스 아밀로리티쿠스(*Lactobacillus amylolyticus*);로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주의 포함 여부를 확인하는 단계를 포함하는,

락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주 포함 시료의 스크리닝 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하는 단계;를 추가로 포함하는,

락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주 포함 시료의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주의 검출용 조성물, 키트, 이를 이용한 검출방법 및 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 락토바실러스(*Lactobacillus*)는 그람양성균의 무포자 간균으로 카탈라아제(catalase) 음성 유산균이다. 유산균과(Lactobacillaceae)에 속하는 락토바실러스는 현재까지 170여 종이 알려져 있다. 사람의 위장관에는 장에서 분리된 플랜타룸(*L. plantarum*), 람노서스(*L. rhamnosus*), 퍼맨텀(*L. fermentum*) 및 카세이(*L. casei*)를 비롯한 다양한 유산균이 있으며 이러한 락토바실러스들은 기본적으로 낮은 pH에 생육할 수 있는 능력이 있어 김치, 요구르트, 치즈와 같은 산도가 낮은 식품에 활용되기도 한다. 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)과 함께 락토바실러스는 프로바이오틱 제품에 가장 흔히 쓰이는 유산균으로, 특이 아시도필러스(*L. acidophilus*), 카세이(*L. casei*), 람노서스(*L. rhmanosus*), 플랜타룸(*L. plantarum*) 및 파라카세이(*L. paracasei*)가 종종 단일 형태나 다른 락토바실러스와 혼합된 형태로 프로바이오틱 제품에 사용된다.

[0003] 프로바이오틱스는 숙주에게 건강상 이로움을 주는 살아있는 미생물로 사람에게는 면역 체계 강화, 혈액 내 콜레스테롤 감소, 장내 균총 균형화, 항암작용 등의 효능을 나타내는 것으로 보고되었다. 최근 몇 년 동안 건강에 대한 관심이 증가하면서 건강 증진에 도움이 되는 프로바이오틱 시장이 급속도로 확장되었고, 프로바이오틱 시장이 확장됨에 따라 프로바이오틱 제품의 기능성과 안전성에 관련하여 소비자들의 우려가 증가되고 있다. 따라서 소비자들에게 안전한 프로바이오틱 제품을 제공하기 위해 라벨에 표기된 유산균의 정보를 정확하게 제공하여 소비자들에게 신뢰성을 부여하는 것은 매우 중요한 일이다. 그러나 프로바이오틱 제품에 실제로 함유된 유산균은 라벨에 표시된 성분과 일치하지 않는 경우가 빈번하다고 보고되고 있다.

[0004] 유산균 동정 또는 프로바이오틱 제품의 미생물 군집을 확인하기 위해 기존에는 미생물의 표현형 특성을 이용한 생화학 방법이 주로 사용되었다. 그러나 이러한 방법들은 시간이 많이 소모되고 유산균들의 발효 패턴에 따라 잘못된 결과가 나타나는 등의 단점이 있었다. 이를 개선하기 위해 분자유전학 분석법이 개발되어 왔고, 가장 유용하게 사용되는 기법이 16S rRNA 유전자를 사용하는 메타지놈 시퀀싱(metagenome sequencing), PCR-DGGE, 16S rRNA 유전자 시퀀싱(gene sequencing)이다.

[0005] 미생물의 16S rRNA gene은 동일한 종간의 서열이 상당히 보존되어 있어 계통 발생 연구에 유용하게 사용되는 유전자이다. 그러나 락토바실러스의 경우 16S rRNA 유전자 서열이 매우 비슷하여 16S rRNA 유전자를 이용한 기법이나 16S rRNA 유전자 시퀀싱을 이용해서는 일부 락토바실러스를 종 수준까지 동정할 수 없다.

[0006] 특히 락토바실러스에는 여러 그룹이 존재하며, 대표적으로 락토바실러스 애시도필러스(*L. acidophilus*) 그룹에 속하는 애시도필러스(*L. acidophilus*), 헬베티커스(*L. helveticus*), 갈리나룸(*L. gallinarum*); 락토바실러스 카세이(*L. casei*) 그룹에 속하는 카세이(*L. casei*), 파라카세이(*L. paracasei*), 람노서스(*L. rhamnosus*); 락토바실러스 플랜타룸(*L. plantarum*) 그룹에 속하는 플랜타룸(*L. plantarum*), 파라플랜타룸(*L. paraplantarum*), 펜토서스(*L. pentosus*); 락토바실러스 사케이(*L. sakei*) 그룹에 속하는 사케이(*L. sakei*), 그라미니스(*L. graminis*), 커베투스(*L. curvatus*) 등이 이에 해당한다.

[0007] 같은 그룹에 속하는 락토바실러스 종의 16S rRNA 유전자 서열은 98~99% 일치한다. 때문에 16S rRNA 유전자를 이용한 종래의 방법으로는 같은 그룹에 속하는 락토바실러스 종을 구별하기 어렵다는 한계점이 존재한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1193410호

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1732676호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 검출용 조성물을 포함하는 락토바실러스 속 균주 검출용 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 검출용 조성물을 포함하는 락토바실러스 속 균주 검출용 바이오 칩(chip)을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 검출용 조성물을 이용해 대상 시료내 락토바실러스를 검출할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 검출용 조성물을 이용해 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주 포함 시료의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 측면은, 서열번호 1 내지 74의 염기서열을 포함하는 프라이머 쌍으로 이루어진 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주의 검출용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명에서 “프라이머 쌍”은 정방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머를 합쳐 동시에 지칭하는 용어이고, “프라이머 세트”는 상기 제 1 프라이머 쌍 내지 제37 프라이머 쌍 중에서 선택된 하나 이상으로 구성된 다수의 프라이머 쌍 묶음을 지칭하는 용어로 사용하였다.

[0016] 프라이머 쌍의 설계는 A, G, C, T 함량비, 프라이머 결합체(dimer) 형성 방지, 같은 염기서열의 3 회 이상 반복 금지 등 여러 가지 제약이 따른다. 그 외에 주형(template) DNA의 양, 프라이머의 농도, dNTP의 농도, Mg2+의 농도, 반응온도, 반응시간 등의 조건이 적정해야 한다.

[0017] 상기 프라이머(primer)는 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 포함하는 짧은 핵산 서열로 상보적인 핵산의 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 핵산 주형의 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능할 수 있다.

[0018] 상기 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있으며, 표적 물질에 존재하는 핵산과 혼성화 되어 상기 표적 물질의 특정 유전자를 증폭하는데 사용될 수 있다.

[0019] 상기 프라이머는 증폭의 효율을 고려하여 구체적으로는 단일쇄일 수 있으며, 디옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotide)일 수 있고, 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.

[0020] 상기 혼성화는 2개의 단일 가닥 핵산이 상보적인 염기 서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다.

[0021] 상기 혼성화는 단일 가닥 핵산 서열 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하는 경우에도 일어날 수 있다. 상기 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 반응 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 제어될 수 있다. 일반적으로, 상기 혼성화 온도가 높으면 완전한 매치일 경우 혼성화가 일어날 가능성이 높으며, 혼성화 온도가 낮으면 일부 미스매치가 존재하더라도 혼성화가 일어날 수 있다.

[0022] 상기 프라이머 세트는 표적 원료에 존재하는 특정 유전자에 혼성화될 수 있으며, 시료 내에 목적하는 원료가 존

재하는 경우 중합효소 연쇄반응에 의해 상기 특징적인 유전자의 염기서열이 중폭 되므로 상기 증폭된 산물(amplicon)을 통해 상기 원료의 존부를 판단할 수 있다.

[0023] 상기 프라이머는 기본 성질을 변화시키지 않은 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 즉 핵산 서열이 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형될 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 뉴클레오타이드의 하나 이상의 동족체로의 치환 및 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트 또는 카바메이트 등의 하전되지 않은 연결체나 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등의 하전된 연결체로의 뉴클레오타이드의 변형이 가능하다. 또한 핵산은 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그날 펩타이드, 폴리 L 리신 등의 단백질, 아크리딘 또는 프소랄렌 등의 삽입제, 금속, 방사성 금속, 철 산화성 금속 등의 킬레이트화제 및 알킬화제 등의 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기를 가질 수 있다.

[0024] 또한 상기 프라이머 서열은 검출 가능한 신호를 직접적 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 상기 프라이머는 분광학, 광화학, 생화학, 면역화학 또는 화학적 수단을 이용하여 검출될 수 있는 표지를 포함할 수 있다. 유용한 표지는 32P, 형광 염료, 전자 밀집 시약, 효소(일반적으로 ELISA에 이용되는 것), 바이오틴 또는 합텐 및 항혈청 또는 단일클론성 항체가 이용가능한 단백질을 포함한다.

[0025] 상기 프라이머들은 적절한 서열의 클로닝 및 제한효소 분해 및 나랭(Narang)등의 포스포트리에스테르 방법(1979, Meth, Enzymol. 68:90-99), 보카지(Beaucage)등의 디에틸포스포라미다이트 방법(1981, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862), 및 미국 특허 제 4458066호의 고형물 지지 방법과 같은 직접적인 화학적 합성법을 포함하는 임의의 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0026] 일 실시예에 있어서, 상기 프라이머 세트는 제 1 프라이머 쌍 내지 제37 프라이머 쌍으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있다.

[0027] 구체적으로, 상기 프라이머 세트는 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 제 1 프라이머 쌍; 서열번호 3의 염기서열 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 제 2 프라이머 쌍; 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 제 3 프라이머 쌍; 서열번호 7의 염기서열 및 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 제 4 프라이머 쌍; 서열번호 9의 염기서열 및 서열번호 10의 염기서열을 포함하는 제 5 프라이머 쌍; 서열번호 11의 염기서열 및 서열번호 12의 염기서열을 포함하는 제 6 프라이머 쌍; 서열번호 13의 염기서열 및 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 제 7 프라이머 쌍; 서열번호 15의 염기서열 및 서열번호 16의 염기서열을 포함하는 제 8 프라이머 쌍; 서열번호 17의 염기서열 및 서열번호 18의 염기서열을 포함하는 제 9 프라이머 쌍; 서열번호 19의 염기서열 및 서열번호 20의 염기서열을 포함하는 제 10 프라이머 쌍; 서열번호 21의 염기서열 및 서열번호 22의 염기서열을 포함하는 제 11 프라이머 쌍; 서열번호 23의 염기서열 및 서열번호 24의 염기서열을 포함하는 제 12 프라이머 쌍; 서열번호 25의 염기서열 및 서열번호 26의 염기서열을 포함하는 제 13 프라이머 쌍; 서열번호 27의 염기서열 및 서열번호 28의 염기서열을 포함하는 제 14 프라이머 쌍; 서열번호 29의 염기서열 및 서열번호 30의 염기서열을 포함하는 제 15 프라이머 쌍; 서열번호 31의 염기서열 및 서열번호 32의 염기서열을 포함하는 제 16 프라이머 쌍; 서열번호 33의 염기서열 및 서열번호 34의 염기서열을 포함하는 제 17 프라이머 쌍; 서열번호 35의 염기서열 및 서열번호 36의 염기서열을 포함하는 제 18 프라이머 쌍; 서열번호 37의 염기서열 및 서열번호 38의 염기서열을 포함하는 제 19 프라이머 쌍; 서열번호 39의 염기서열 및 서열번호 40의 염기서열을 포함하는 제 20 프라이머 쌍; 서열번호 41의 염기서열 및 서열번호 42의 염기서열을 포함하는 제 21 프라이머 쌍; 서열번호 43의 염기서열 및 서열번호 44의 염기서열을 포함하는 제 22 프라이머 쌍; 서열번호 45의 염기서열 및 서열번호 46의 염기서열을 포함하는 제 23 프라이머 쌍; 서열번호 47의 염기서열 및 서열번호 48의 염기서열을 포함하는 제 24 프라이머 쌍; 서열번호 49의 염기서열 및 서열번호 50의 염기서열을 포함하는 제 25 프라이머 쌍; 서열번호 51의 염기서열 및 서열번호 52의 염기서열을 포함하는 제 26 프라이머 쌍; 서열번호 53의 염기서열 및 서열번호 54의 염기서열을 포함하는 제 27 프라이머 쌍; 서열번호 55의 염기서열 및 서열번호 56의 염기서열을 포함하는 제 28 프라이머 쌍; 서열번호 57의 염기서열 및 서열번호 58의 염기서열을 포함하는 제 29 프라이머 쌍; 서열번호 59의 염기서열 및 서열번호 60의 염기서열을 포함하는 제 30 프라이머 쌍; 서열번호 61의 염기서열 및 서열번호 62의 염기서열을 포함하는 제 31 프라이머 쌍; 서열번호 63의 염기서열 및 서열번호 64의 염기서열을 포함하는 제 32 프라이머 쌍; 서열번호 65의 염기서열 및 서열번호 66의 염기서열을 포함하는 제 33 프라이머 쌍; 서열번호 67의 염기서열 및 서열번호 68의 염기서열을 포함하는 제 34 프라이머 쌍; 서열번호 69의 염기서열 및 서열번호 70의 염기서열을 포함하는 제 35 프라이머 쌍; 서열번호 71의 염기서열 및 서열번호 72의 염기서열을 포함하는 제 36 프라이머 쌍; 서열번호 73의 염기서열 및 서열번호 74의 염기서열을 포함하는 제 37 프라이머 쌍; 서열번호 75의 염기서열 및 서열번호 76의 염기서열을 포함하는 제 38 프

라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것으로 구성될 수 있다.

[0028] 본 발명에서, “락토바실러스(*Lactobacillus*)”는 당류를 발효하여 에너지를 획득하여 다량의 유산을 생성하는 세균으로, 다른 세균을 죽이기 위해 젖산(유산)을 분비하는 특성이 있어 '유산균'이라는 이름이 붙었다. 락토바실러스는 유산균과(Lactobacillaceae)에 속하고, 현재까지 170여 종이 알려져 있다. 락토바실러스는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)과 함께 프로바이오틱 제품에 가장 흔히 쓰이는 유산균이며, 장내 유해 세균 증식을 막아 면역력을 정상 수치로 조절해 아토피, 건선 같은 피부질환이나 감염증을 개선하고, 비만과 성인병을 억제하는 효과 등이 있다고 알려져 있다.

[0029] 구체적으로, 상기 락토바실러스 속 균주는 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*); 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*); 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*); 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*); 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*); 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*); 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*); 락토바실러스 플랜타룸(*Lactobacillus plantarum*); 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*); 락토바실러스 파라플랜타룸(*Lactobacillus paraplantarum*); 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*); 락토바실러스 커바투스(*Lactobacillus curvatus*); 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*); 락토바실러스 상리바리우스(*Lactobacillus salivarius*); 락토바실러스 류테리(*Lactobacillus reuteri*); 락토바실러스 코리니포미스(*Lactobacillus coryniformis*); 락토바실러스 파르시미니스(*Lactobacillus farciminis*); 락토바실러스 지메(*Lactobacillus zymae*); 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus pentosus*); 락토바실러스 크루스토럼(*Lactobacillus crustorum*); 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*); 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*); 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*); 락토바실러스 아밀로보러스(*Lactobacillus amylovorus*); 락토바실러스 헤이롱지안젠시스(*Lactobacillus heilongjiangensis*); 락토바실러스 파라부크네리(*Lactobacillus parabuchneri*); 락토바실러스 애시디피시스(*Lactobacillus acidipiscis*); 락토바실러스 샌프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*); 락토바실러스 루미니스(*Lactobacillus ruminis*); 락토바실러스 아길리스(*Lactobacillus agilis*); 락토바실러스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii*); 락토바실러스 아밀로필러스(*Lactobacillus amylophilus*); 락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*); 락토바실러스 아세토톨러란스(*Lactobacillus acetotolerans*); 락토바실러스 린드네리(*Lactobacillus lindneri*); 락토바실러스 갈리나룸(*Lactobacillus gallinarum*); 락토바실러스 아밀로리티쿠스(*Lactobacillus amylolyticus*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다.

[0030] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*)의 유전자를 검출하는 제 1 프라이머 쌍은 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0031] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)의 유전자를 검출하는 제 2 프라이머 쌍은 서열번호 3의 염기서열 및 서열번호 4의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0032] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)의 유전자를 검출하는 제 3 프라이머 쌍은 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0033] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)의 유전자를 검출하는 제 4 프라이머 쌍은 서열번호 7의 염기서열 및 서열번호 8의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0034] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)의 유전자를 검출하는 제 5 프라이머 쌍은 서열번호 9의 염기서열 및 서열번호 10의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0035] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*)의 유전자를 검출하는 제 6 프라이머 쌍은 서열번호 11의 염기서열 및 서열번호 12의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0036] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*)의 유전자를 검출하는 제 7 프라이머 쌍은 서열번호 13의 염기서열 및 서열번호 14의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0037] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 플랜타룸(*Lactobacillus plantarum*)의 유전자를 검출하는 제 8 프라이머 쌍은 서열번호 15의 염기서열 및 서열번호 16의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0038] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*)의 유전자를 검출하는 제 9 프라이머 쌍은 서열번호 17의 염기서열 및 서열번호 18의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0039] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 파라플랜타룸(*Lactobacillus paraplantarum*)의 유전자를 검출하는 제

10 프라이머 쌍은 서열번호 19의 염기서열 및 서열번호 20의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0040] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*)의 유전자를 검출하는 제 11 프라이머 쌍은 서열번호 21의 염기서열 및 서열번호 22의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0041] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 커바투스(*Lactobacillus curvatus*)의 유전자를 검출하는 제 12 프라이머 쌍은 서열번호 23의 염기서열 및 서열번호 24의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0042] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*)의 유전자를 검출하는 제 13 프라이머 쌍은 서열번호 25의 염기서열 및 서열번호 26의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0043] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*)의 유전자를 검출하는 제 14 프라이머 쌍은 서열번호 27의 염기서열 및 서열번호 28의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0044] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 류테리(*Lactobacillus reuteri*)의 유전자를 검출하는 제 15 프라이머 쌍은 서열번호 29의 염기서열 및 서열번호 30의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0045] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 코리니포미스(*Lactobacillus coryniformis*)의 유전자를 검출하는 제 16 프라이머 쌍은 서열번호 31의 염기서열 및 서열번호 32의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0046] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 파르시미니스(*Lactobacillus farciminis*)의 유전자를 검출하는 제 17 프라이머 쌍은 서열번호 33의 염기서열 및 서열번호 34의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0047] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 지메(*Lactobacillus zymae*)의 유전자를 검출하는 제 18 프라이머 쌍은 서열번호 35의 염기서열 및 서열번호 36의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0048] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus pentosus*)의 유전자를 검출하는 제 19 프라이머 쌍은 서열번호 37의 염기서열 및 서열번호 38의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0049] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 크루스토럼(*Lactobacillus crustorum*)의 유전자를 검출하는 제 20 프라이머 쌍은 서열번호 39의 염기서열 및 서열번호 40의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0050] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*)의 유전자를 검출하는 제 21 프라이머 쌍은 서열번호 41의 염기서열 및 서열번호 42의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0051] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*)의 유전자를 검출하는 제 22 프라이머 쌍은 서열번호 43의 염기서열 및 서열번호 44의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0052] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*)의 유전자를 검출하는 제 23 프라이머 쌍은 서열번호 45의 염기서열 및 서열번호 46의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0053] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 아밀로보러스(*Lactobacillus amylovorus*)의 유전자를 검출하는 제 24 프라이머 쌍은 서열번호 47의 염기서열 및 서열번호 48의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0054] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 헤이롱지안젠시스(*Lactobacillus heilongjiangensis*)의 유전자를 검출하는 제 25 프라이머 쌍은 서열번호 49의 염기서열 및 서열번호 50의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0055] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 파라부크네리(*Lactobacillus parabuchneri*)의 유전자를 검출하는 제 26 프라이머 쌍은 서열번호 51의 염기서열 및 서열번호 52의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0056] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 애시디피시스(*Lactobacillus acidipiscis*)의 유전자를 검출하는 제 27 프라이머 쌍은 서열번호 53의 염기서열 및 서열번호 54의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0057] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 샌프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*)의 유전자를 검출하는 제 28 프라이머 쌍은 서열번호 55의 염기서열 및 서열번호 56의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0058] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 루미니스(*Lactobacillus ruminis*)의 유전자를 검출하는 제 29 프라이머 쌍은 서열번호 57의 염기서열 및 서열번호 58의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0059] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 아길리스(*Lactobacillus agilis*)의 유전자를 검출하는 제 30 프라이머 쌍은 서열번호 59의 염기서열 및 서열번호 60의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0060] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii*)의 유전자를 검출하는 제 31 프

라이머 쌍은 서열번호 61의 염기서열 및 서열번호 62의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0061] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 아밀로필러스(*Lactobacillus amylophilus*)의 유전자를 검출하는 제 32 프라이머 쌍은 서열번호 63의 염기서열 및 서열번호 64의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0062] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*)의 유전자를 검출하는 제 33 프라이머 쌍은 서열번호 65의 염기서열 및 서열번호 66의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0063] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 아세토톨러란스(*Lactobacillus acetotolerans*)의 유전자를 검출하는 제 34 프라이머 쌍은 서열번호 67의 염기서열 및 서열번호 68의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0064] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 린드네리(*Lactobacillus lindneri*)의 유전자를 검출하는 제 35 프라이머 쌍은 서열번호 69의 염기서열 및 서열번호 70의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0065] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 갈리나룸(*Lactobacillus gallinarum*)의 유전자를 검출하는 제 36 프라이머 쌍은 서열번호 71의 염기서열 및 서열번호 72의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0066] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 아밀로리티쿠스(*Lactobacillus amylolyticus*)의 유전자를 검출하는 제 37 프라이머 쌍은 서열번호 73의 염기서열 및 서열번호 74의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0067] 일 실시예에 있어서, 락토바실러스 속에 해당하는 균주를 검출할 수 있는 제 38 프라이머 쌍은 서열번호 75의 염기서열 및 서열번호 76의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0068] 또한, 상기 프라이머 쌍은 선택된 1 종의 프라이머 쌍이 포함되거나 2 종 이상의 복수 개의 프라이머 쌍이 포함된 형태로 프라이머 세트를 구성할 수 있다.

[0069] 본 발명 일 실시예에서는 상기 본 발명의 각 프라이머 쌍들이 37종 락토바실러스 속 균주의 종 각각에 대해 매우 높은 특이도를 나타냄을 확인하였으며(표 5), 여러 균주가 혼합된 프로바이오틱스 제품에 대해 적용하였을 때에도 각 균주를 한 번에 모두 선별해내었는 바(표 6), 본 발명의 상기 프라이머 쌍들은 단독 또는 복합된 형태로 프라이머 세트로서 활용될 수 있다.

[0070] 본 발명의 다른 측면은, 상기 조성물을 포함하는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주 검출용 키트를 제공한다.

[0071] 상기 검출용 키트는 용액, 동결건조 분말, 냉동 용액, 또는 스트립 형태를 가질 수 있으며, 각각의 형태는 당업계에서 통상적인 방법으로 제제화할 수 있다. 예를 들어, 용액 형태의 검출용 키트는 나트륨-인산, 칼륨-인산, 트리스-염산 및 이외의 여러 종류의 완충액 등의 완충액에 단백질 또는 프라이머 등을 별도로 또는 혼합하여 제제화할 수 있으며, 필요에 따라 냉동시키거나 동결 건조할 수도 있다.

[0072] 상기 검출용 키트는 면역측방유동 스트립 방식을 이용한 것일 수 있다. 측방유동분석법(lateral flow assay)은 크로마토그래피 방법을 기본으로 하는 단백질 또는 핵산의 검출 방법이다. 이러한 측방유동분석법은 임신진단, 암진단, 기타 특정 단백질 또는 유전자의 존재 여부 또는 미생물탐지 등 다양한 분야에 널리 사용되고 있다. 측방유동분석법은 항원-항체 반응과 같은 두 물질 간의 특이적인 반응을 기본으로 하는 것으로, 민감도와 특이성이 높고, 빠른시간 내에 결과를 확인할 수 있다는 장점이 있어 질병의 진단 및 빠른 예방 조치를 가능하게 한다.

[0073] 본 발명의 검출용 키트에는 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 락토바실러스 속 균주를 검출하는데 필요한 실험(예: PCR) 및 결과 확인에 필요한 여러 가지 시약들, 예컨대, PCR 조성물, 제한효소, 아가로스, 혼성화 및 전기영동에 필요한 완충용액 등이 추가로 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 PCR 조성물은 역전사 반응에 의해서 합성된 상보적 DNA와 본 발명에서 제공되는 PCR 프라이머 쌍 이외에 적당량의 DNA 중합효소(예, Thermusaquaticus(Taq), Thermusthermophilus(Tth), Thermusfiliformis, Thermisflavus, Thermococcusliteralis 또는 Pyrococcus furiosus(Pfu)로부터 얻은 열 안정성 DNA 중합효소), dNTP, PCR 완충용액 및 물(dH_2O)을 포함할 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 트리스-HCl(Tris-HCl), $MgCl_2$, KCl 등을 포함할 수 있다.

[0074] 또한, 상기 검출용 키트는 RT-PCR 키트일 수 있다. 구체적으로, RT-PCR 조성물을 동결 건조된 형태로 플라스틱 튜브에 담아 제조될 수 있으며, 상기 키트는 RT-PCR 조성물 외에, 분석에 사용되는 적절한 시약 및 도구를 더 포함할 수 있다. 이러한 시약 및 도구로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제 등이 포함된다. 상기 적합한 담체로는, 이에 한정되지는 않으나, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지

된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 덱스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다

[0075] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 조성물을 포함하는 락토바실러스 속 균주 검출용 바이오 칩(chip)을 제공한다.

[0076] 본 발명에서, 상기 “바이오 칩(chip)”은 DNA 칩이라고도 불리우며, 매우 작은 DNA 조각들이 고체 표면에 집적된 것으로, 플라스틱, 유리, 실리콘 등의 투명 또는 반투명한 재질로 이루어진 기판에 시료용액과 시약을 수용할 수 있는 챔버 및 채널을 포함한 형태일 수 있다.

[0077] 바이오 칩은 두께가 얇고 투명하며 히터블록과의 접촉면적이 넓기 때문에 PCR시간을 크게 단축할 수 있고, 동시에 최소한 수백 개 이상의 유전자를 빠른 시간 안에 검색할 수 있는 장점이 있다. 또한, 고형체를 사용함으로써 아주 적은 양의 유전 물질을 고밀도로 붙일 수 있으며, 동시에 많은 수의 유전자를 검색할 수 있으며, 많은 양의 유전자의 발현 정도를 동시에 측정하거나 게놈의 다양한 부분의 유전자형을 파악하기 위해 사용할 수 있다.

[0078] 바이오 칩은 붙이는 유전물질의 크기에 따라 cDNA(complementary DNA)칩과 올리고뉴클레오티드 칩(oligonucleotide)으로 분류될 수 있다. cDNA 칩에는 최소한 500bp 이 상의 유전자(full-length open reading frame 또는 EST)가 포함될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 칩에는 약 15 내지 25개의 염기들로 이루어진 올리고뉴클레오티드가 접착될 수 있고, 칩 내에 포함되는 용액에 포함될 수 있으나, 상기 형태에 한정되지 않으며 필요에 따라 적절히 변형할 수 있다.

[0079] 본 발명의 또 다른 측면은, 대상 시료에 상기 조성물을 처리하는 단계;를 포함하는 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주 검출방법을 제공한다.

[0080] 상기 검출방법에 사용하는 대상 시료는 락토바실러스 속 균이 발견될 수 있는 모든 물질, 바람직하게는 다양한 프로바이오틱 식품에서 수득할 수 있다. 구체적으로, 상기 대상 시료는 당업계에서 통상적으로 사용되는 DNA 추출방법을 통해 수득할 수 있으며, 예컨대 알카라인 추출법, 열수추출법, 컬럼 추출법 및 페놀/클로로포름 추출법 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0081] 상기 검출방법은 대상 시료 내 존재하는 락토바실러스의 DNA를 검출할 수 있는 특정 방법들을 의미하는 것으로, DNA 서열 분석 방법; 프로브 하이브리드화 방법; 구조 특이적인 절단 분석; 효소 미스매치 절단 방법(enzyme mismatch cleavage method); 중합효소 연쇄 반응(PCR); 측쇄 하이브리드화 방법; 롤링 서클 복제(rolling circle replication); 핵산서열기반 증폭(Nucleic acid sequence based amplification, NASBA); 분자 비콘 기술(molecular beacon technology); E-센서 기술(미국 특허 제6,248,229호 등); 사이클링 프로브 기술(cycling probe technology); 데이드 베링(Dade Behring) 시그날 증폭 방법; 리가제 연쇄 반응; 및 샌드위치 하이브리드화 방법 또는 서던 블로팅(southern blotting)을 이용하는 것일 수 있다.

[0082] 상기 검출방법은 상기 조성물을 이용하여 특정 DNA를 증폭시킨 후, 특정 DNA의 증폭 반응을 확인하는 단계를 통해 수행될 수 있으며, 상기 특정 DNA의 증폭여부를 확인하는 단계는 검출방법의 반응산물이 전기 영동 등을 통하여 예상되는 DNA 산물의 크기와 일치하는지를 확인함으로써 수행될 수 있다.

[0083] 구체적으로, 상기 검출방법은 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0084] 본 발명에서, 상기 “중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)”은 중합효소를 사용하여 핵산을 연쇄적으로 합성하여 개시 핵산물질을 기하급수적으로 증폭하는 방법으로 당업계에 널리 공지된 것으로, 특정 핵산의 존재 유무를 확인하는 정성분석 PCR, 특정 핵산의 양을 측정하는 정량 PCR 및 PCR 과정을 실시간으로 추적하여 정성 및 정량 분석을 가능하게 하는 실시간 PCR을 모두 포함하는 개념이다.

[0085] 상기 중합효소 연쇄반응은 당업계에 공지된 통상의 PCR 기기를 사용하여 일반적인 반응 조건에 따라 수행되거나, 또는 일부 변형되어 수행될 수 있다. 또한, 상기 PCR 반응 혼합물은 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 포함할 수 있으며, 이의 수행을 위한 설명서를 포함할 수 있다.

[0086] 본 발명 일 실시예에서는 1 종 또는 복수의 락토바실러스 속 균주를 검출할 수 있는 프라이머 세트를 구축하였으며, 상기 프라이머 세트는 민감도가 높아 매우 낮은 수준의 타겟 DNA 농도에서도 효과적으로 타겟 DNA를 증폭할 수 있음을 확인하였다.

[0087] 더욱 구체적으로, 상기 중합효소 연쇄반응은 본 발명의 조성물을 이용한 멀티플렉스 PCR(multiplex PCR) 방법일

수 있다.

[0088] 본 발명에서, 상기 “멀티플렉스 PCR(multiplex PCR)”은 복수의 프라이머 쌍을 동시에 사용하여, 복수의 표적 유전자를 같은 반응액 중에서 증폭하는 방법을 지칭하는 것으로, 본 발명에서는 한 번의 PCR 반응으로 대상 시료내 존재하는 1 내지 37종의 락토바실러스를 동시에 검출할 수 있는 방법을 제공한다. 상기 멀티플렉스 PCR은 다양한 시료를 한 번의 증폭 반응으로 확인할 수 있으므로 경제적이고, 시간이 절약될 수 있다.

[0089] 멀티플렉스 PCR을 사용하면 기존 방식의 PCR과 달리 1회의 PCR 반응을 통해 하나 이상의 락토바실러스 각각의 특이 지역을 동시에 증폭할 수 있으며,

[0090] 하나 이상의 프라이머 쌍을 혼합하여 동시에 PCR을 수행함으로써 대상 시료 내 1 종 이상의 유전자를 한 번에 확인할 수 있다.

[0091] 본 발명의 또 다른 측면은, a) 대상 시료에 제1항 또는 제2항 중 어느 한 항의 조성물을 처리하는 단계; 및 b) 상기 시료 내에 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*); 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*); 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*); 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*); 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*); 락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*); 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*); 락토바실러스 플랜타룸(*Lactobacillus plantarum*); 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*); 락토바실러스 파라플랜타룸(*Lactobacillus paraplantarum*); 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*); 락토바실러스 커바투스(*Lactobacillus curvatus*); 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*); 락토바실러스 상리바리우스(*Lactobacillus salivarius*); 락토바실러스 류테리(*Lactobacillus reuteri*); 락토바실러스 코리니포미스(*Lactobacillus coryniformis*); 락토바실러스 파르시미니스(*Lactobacillus farciminis*); 락토바실러스 지메(*Lactobacillus zymae*); 락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus pentosus*); 락토바실러스 크루스토럼(*Lactobacillus crustorum*); 락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*); 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*); 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*); 락토바실러스 아밀로보러스(*Lactobacillus amylovorus*); 락토바실러스 헤이롱지안젠시스(*Lactobacillus heilongjiangensis*); 락토바실러스 파라부크네리(*Lactobacillus parabuchneri*); 락토바실러스 애시디피시스(*Lactobacillus acidipiscis*); 락토바실러스 샌프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*); 락토바실러스 루미니스(*Lactobacillus ruminis*); 락토바실러스 아길리스(*Lactobacillus agilis*); 락토바실러스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii*); 락토바실러스 아밀로필러스(*Lactobacillus amylophilus*); 락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*); 락토바실러스 아세토톨러란스(*Lactobacillus acetotolerans*); 락토바실러스 린드네리(*Lactobacillus lindneri*); 락토바실러스 갈리나룸(*Lactobacillus gallinarum*); 및 락토바실러스 아밀로리티쿠스(*Lactobacillus amylolyticus*);로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주의 포함 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 균주 포함 시료의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0092] 본 발명에서, 상기 “시료”는 락토바실러스 속 균주의 포함 여부를 확인하고자 하는 대상이 되는 물질을 말한다. 구체적으로 프로바이오틱스 제제, 화장품, 식품, 영양제, 음료, 첨가제, 각종 식이에 포함되는 물질 등을 대상으로 할 수 있으나, 상기 형태에 제한되는 것은 아니며 락토바실러스 속 균주의 포함 여부를 확인하고자 하는 것이라면 모두 대상 시료가 될 수 있다.

[0093] 상기 스크리닝 방법은 특별한 제한 없이 당업계에 공지된 방법에 의해 수행되는 모든 유전자 스크리닝 방법을 통해 수행되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0094] 본 발명의 제 1 프라이머 쌍 내지 제 37 프라이머 쌍에서 하나 이상 선택된 것으로 이루어진 락토바실러스 검출용 조성물을 이용하면, 대상 시료 내 존재하는 락토바실서스를 종(species) 수준까지 정확히 판별할 수 있다.

[0095] 또한, 본 발명의 제 1 프라이머 쌍 내지 제 37 프라이머 쌍은 멀티플렉스 PCR용 프라이머로써, 1 내지 37 종의 락토바실러스 균을 동시에 검출할 수 있다.

[0096] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0097] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0098] **실시예 1 : 락토바실러스 표준 균주와 프로바이오틱 제품의 준비**

[0099] 37종의 락토바실러스 표준 균주는 한국생물자원센터 (KCTC) 및 국립 농업과학원 미생물 은행 (KACC) 으로부터 분양 받았다 (표 1).

표 1

[0100]

번호	락토바실러스 종(Species)	균주 번호.
1	락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*)	KCTC 3163
2	락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)	KCTC 3237
3	락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)	KCTC 3498
4	락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)	KCTC 3603
5	락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)	KCTC 3801
6	락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*)	KCTC 5194
7	락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*)	KACC 11441
8	락토바실러스 플랜타룸(*Lactobacillus plantarum*)	KACC 11451
9	락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*)	KACC 12361
10	락토바실러스 파라플랜타룸(*Lactobacillus paraplantarum*)	KACC 12373
11	락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*)	KACC 12413
12	락토바실러스 커바투스(*Lactobacillus curvatus*)	KACC 12415
13	락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*)	KACC 12419
14	락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*)	KCTC 3600
15	락토바실러스 류테리(*Lactobacillus reuteri*)	KCTC 3594
16	락토바실러스 코리니포미스(*Lactobacillus coryniformis*)	KACC 12411
17	락토바실러스 파르시미니스(*Lactobacillus farciminis*)	KACC 12423
18	락토바실러스 지메(*Lactobacillus zymae*)	KACC 16349
19	락토바실러스 펜토서스(*Lactobacillus pentosus*)	KACC 12428
20	락토바실러스 크루스토럼(*Lactobacillus crustorum*)	KACC 16344
21	락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*)	KACC 12381
22	락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*)	KACC 12416
23	락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*)	KACC 12418
24	락토바실러스 아밀로보러스(*Lactobacillus amylovorus*)	KACC 12435
25	락토바실러스 헤이롱지안젠시스(*Lactobacillus heilongjiangensis*)	KACC 18741
26	락토바실러스 파라부크네리(*Lactobacillus parabuchneri*)	KACC 12363
27	락토바실러스 애시디피시스(*Lactobacillus acidipiscis*)	KACC 12394
28	락토바실러스 샌프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*)	KACC 12431
29	락토바실러스 루미니스(*Lactobacillus ruminis*)	KACC 12429
30	락토바실러스 아길리스(*Lactobacillus agilis*)	KACC 12433
31	락토바실러스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii*)	KACC 12420
32	락토바실러스 아밀로필러스(*Lactobacillus amylophilus*)	KACC 11430
33	락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*)	KACC 19371
34	락토바실러스 아세토톨러란스(*Lactobacillus acetotolerans*)	KACC 12447
35	락토바실러스 린드네리(*Lactobacillus lindneri*)	KACC 12445
36	락토바실러스 갈리나룸(*Lactobacillus gallinarum*)	KACC 12370
37	락토바실러스 아밀로리티쿠스(*Lactobacillus amylolyticus*)	KACC 12374

[0101] 분양 받은 표준 균주는 모두 MRS 액체 배지에서 30° C, 48시간 동안 혐기적 조건으로 배양하였다. 제품 모니터링을 위한 프로바이오틱 제품은 마켓으로부터 구입하였다.

[0102] **실시예 2 : DNA 추출 방법**

[0103] 모든 락토바실러스 표준 균주의 DNA 추출을 위해 MRS 액체배지에서 30° C, 48시간 동안 혐기적 조건으로 배양하였다. 배양 후 13,600 g에서 5분 동안 원심분리 하였고, 상층액을 제거한 뒤 펠렛을 이용하여 유전체 DNA를 추출하였다. 유전체 DNA는 bacterial genomic DNA extraction kit (Intron Biotechnology, Seongnam, Korea)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 추출하였다. 프로바이오틱 제품의 DNA는 DNeasy®Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 추출하였다. 모든 DNA는 분광광도계를 이용하여 농도와 순도를 측정하였으며, 1% 아가로스 겔에서 150V로 전기영동하였고, 브로민화 에티듐(Ethidium Bromide, EtBr)으로 염색한 뒤 UV-일루미네이터를 이용하여 DNA를 확인하였다.

[0104] **실시예 3 : 락토바실러스 종 특이 프라이머 디자인 및 특이도 확인 방법**

[0105] 143개의 락토바실러스 균주, 37개 종의 전장 유전자 염기서열은 미국 국립생물공학정보 센터 (NCBI)에서 다운로드하였다. 전장 유전자 염기서열 중 16S rRNA, 16S~23S rRNA 인터널 스페이서(internal spacer), 23S rRNA 유전자를 추출하기 위해 자체 파이썬(python) 코드를 사용하여 자동으로 추출하였다. 그 후 추출된 서열은 Geneious 프로그램으로 얼라인먼트(alignment) 하였고, 얼라인먼트 결과를 토대로 종 특이 서열을 찾아 해당 지점부터 프라이머 디자인을 수행하였다.

[0106] 이때, 16S~23S rRNA 유전자의 서열이 매우 비슷하여 종 특이 서열을 선별할 수 없는 균주는 전장 유전체 비교분석을 통하여 종 특이 유전자를 추출하였다. 종 특이 유전자를 선별하기 위한 타깃 균주의 전장 유전자 염기서열을 바탕으로 USEARCH 프로그램을 이용하여 동일 타깃 종이 80% 이상 보유하고 있는 유전자를 추출하였고, 이를 유전자들을 타깃 종을 제외한 나머지 락토바실러스 종의 전장 유전자 염기서열과 비교하여 타깃 종에만 특이적으로 존재하는 유전자를 선별하였다. 선별된 유전자는 NCBI BLAST를 이용하여 한 번 더 재확인 과정을 거친 후 최종적으로 선별된 타깃 종 특이 유전자로부터 프라이머 디자인을 수행하였다.

[0107] DNA 존재를 확인하기 위한 내재 프라이머는 락토바실러스 16S rRNA 유전자 서열을 모두 얼라인먼트하여 모든 락토바실러스에 변이가 거의 없이 보존되고 있는 서열로부터 디자인하였다.

[0108] 각 개발된 종 특이 프라이머의 특이도를 확인하기 위해 전통적인 PCR을 수행하였다. PCR을 수행하기 위한 반응액은 락토바실러스 표준 균주 DNA, 종 특이 프라이머, 0.5 유닛 Taq 폴리머라아제, dNTP를 포함할 수 있다. PCR 반응은 94° C에서 10분간 전-변성(pre-denaturation)을 수행하였고, 변성(denaturation)은 94° C에서 30초, 결합(annealing)은 60° C에서 30초, 신장(extension)은 72° C에서 30초 반응을 총 30회 반복 수행한 뒤 마지막으로 72° C에서 5분 동안 최종 연장을 진행하였다. PCR 결과 증폭 산물은 2% 아가로스 겔에서 150V로 EtBr로 염색한 뒤 UV-일루미네이터를 이용하여 밴드를 확인하였다.

[0109] **실시예 4 : Real-time PCR 조건 설정**

[0110] 실시간(Real-time) PCR을 수행하기 위한 반응액 조성은 2X LeGene SB-Green qPCR Master mix (LeGene Biosciences, San Diego, CA, USA)와 종 특이 프라이머, 락토바실러스 표준 균주 DNA이다. 실시간 PCR은 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 장비를 사용하였고, 반응 조건은 95° C에서 2분 동안 변성한 후 95° C에서 5초, 60° C에서 30초 반응을 30회 반복 수행하였다. 멜트 커브(Melt curve) 데이터를 얻기 위해 95° C에서 15초, 60° C에서 1분, 95° C에서 30초, 60° C에서 15초 반응을 수행하였다. 실시간 PCR의 정확성을 평가하기 위해, 50~0.005 ng로 연속 희석(serial dilution) 한 각 락토바실러스 표준 균주 DNA와 종 특이 프라이머를 사용하여 표준곡선(standard curve)을 그렸다. 37개 락토바실러스 표준 균주 DNA를 사용하여 내재 프라이머로는 균주의 유무를 확인하였고, 종 특이 프라이머는 특이도를 각각 확인하였다. 실시간 PCR 실험 결과는 7500 software V2.3을 이용하여 확인하였다.

[0111] **실시예 5 : 프로바이오틱 제품 적용 실험 방법**

[0112] 실시간 PCR을 통해 특이도와 정확성이 확인된 종 특이 프라이머 세트를 이용하여 프로바이오틱 제품 적용 실험을 수행하였다. 적용 실험은 96 웰 실시간 PCR plate 각 웰에 종 특이 프라이머 세트와 내재 프라이머를 넣고 프로바이오틱 제품 DNA와 마스터 믹스가 첨가된 반응액을 각 웰에 주입하여 한 번의 실시간 PCR 반응으로 37종의 락토바실러스가 검출되는 것을 확인하였다.

[0113] 실시간 PCR 조건은 실시예 4의 조건과 동일하게 수행하였고, 실험 결과 Ct 값이 28이내로 나오는 것은 해당 락토바실러스가 검출되었다고 판단하고, 검출 결과를 프로바이오틱 제품의 라벨과 비교하였다.

[0114] **실험예 1 : 종 특이 유전자 선택 및 프라이머 디자인**

[0115] 상기 실시예 3의 방법을 통해 37종 중 23종의 락토바실러스는 16S-23S rRNA 유전자 중 종 특이 지역을 확인하였고, 해당 지점으로부터 프라이머 디자인을 진행하였다.

[0116] 나머지 14종의 락토바실러스는 전장 유전자의 비교 유전체 분석을 통해 각 종에 특이적인 유전자를 선별하였다. 그 결과 알파 베타 슈퍼패밀리 히드롤라제(alpha beta superfamily hydrolase), 가설적 단백질(hypothetical protein), 막 단백질(membrane protein), MFS-타입 트랜스포터 YcnB (MFS-type transporter YcnB), LPXTG-모티프 세포벽 부착 도메인 단백질(LPXTG-motif cell wall anchor domain protein), GHKL 도메인 포함 단백질(GHKL domain-containing protein), 및 탈카르복실화/아미노산:양이온 Na+/H+ 공동수송체 패밀리 단백질(decarboxylate/amino acid:cation Na+/H+ symporter family protein)이 각 종에 특이적으로 존재하는 유전자로 확인되었다. 이 유전자들로부터 14종의 락토바실러스의 종 특이 프라이머를 디자인하고, 이를 표 2에 나타내었다.

[0117] 상기 과정을 통해 디자인된 37쌍의 프라이머 쌍은 증폭 효율 증가와 가공식품 적용에 적합하도록 증폭산물의 크기를 모두 260 bp 이하로 설정하였다.

표 2

[0118]

세트 번호	종(species)	타겟 유전자	프라이머	염기서열 (5'-3')	서열 번호
1	*L.* 가세리 (*L. gasseri*)	16S-23S	Gasseri-F	TCA AGA GCT GTT AAG GCT GT	1
			Gasseri-R	CTA TCG CTT CAA GTG CTT TC	2
2	*L.* 람노서스 (*L. rhamnosus*)	16S-23S	Rhamnosus-F	GCC GAT CGT TGA CGT TAG TTG G	3
			Rhamnosus-R	CAG CGG TTA TGC GAT GCG AAT	4
3	*L.* 브레비스 (*L. brevis*)	16S-23S	Brevis-F	GGG CAA CGA AGC AAG ATC GC	5
			Brevis-R	TTC CAA TCG TGT GCA CAC CA	6
4	*L.* 사케이 (*L. sakei*)	16S-23S	Sakei-F	TCG AAC GCA CTC TCG TTT AG	7
			Sakei-R	CGA AAC CAT CTT TCA ACC CT	8
5	*L.* 존소니 (*L. johnsonii*)	16S-23S	Johnsonii-F	AGA GAG AAA CTC AAC TTG AAA TA	9
			Johnsonii-R	CCT TCA TTA ACC TTA ACA GTT AA	10
6	*L.* 젠세니 (*L. jensenii*)	16S-23S	Jensenii-F	AGT TCT TCG GAA TGG ACA TAG	11
			Jensenii-R	GCC GCC TTT TAA ACT TCT T	12
7	*L.* 퍼멘텀 (*L. fermentum*)	특이 유전자	Fermentum-F	GAC CAG CGC ACC AAG TGA TA	13
			Fermentum-R	AGC GTA GCG TTC GTG GTA AT	14
8	*L.* 플랜타룸 (*L. plantarum*)	특이 유전자	Plantarum-F	GCT GGC AAT GCC ATC GTG CT	15
			Plantarum-R	TCT CAA CGG TTG CTG TAT CG	16
9	*L.* 파라카세이 (*L. paracasei*)	특이 유전자	Paracasei-F	CAA TGC CGT GGT TGT TGG AA	17
			Paracasei-R	GCC AAT CAC CGC ATT AAT CG	18
10	*L.* 파라플랜타룸 (*L. paraplantarum*)	특이 유전자	Paraplantarum-F	TTA TTC AAG CCG TCG GAG TG	19
			Paraplantarum-R	TCG CTG GTG CTA ATG CAA TG	20
11	*L.* 카세이 (*L. casei*)	특이 유전자	Casei-F	CCA CAA TCC TTG GCT GTT CT	21
			Casei-R	GCT TGA GGC GAT TGT AAT CC	22
12	*L.* 커바투스 (*L. curvatus*)	16S-23S	Curvatus-F	ACT CTC ATT GAA TTA GGA CGT T	23
			Curvatus-R	CCC GTG TTG GTA CTA TTT AAT	24
13	*L.* 애시도필러스 (*L. acidophilus*)	16S-23S	Acidophilus-F	CCT TTC TAA GGA AGC GAA GGA T	25
			Acidophilus-R	ACG CTT GGT ATT CCA AAT CGC	26
14	*L.* 살리바리우스 (*L. salivarius*)	16S-23S	Salivarius-F	TAC ACC GAA TGC TTG CAT TCA	27
			Salivarius-R	AGG ATC ATG CGA TCC TTA GAG A	28
15	*L.* 류테리 (*L. reuteri*)	16S-23S	Reuteri-F	GAT TGA CGA TGG ATC ACC AGT	29
			Reuteri-R	CAT CCC AGA GTG ATA GCC AA	30
16	*L.* 코리니포미스 (*L. coryniformis*)	16S-23S	Coryniforminis-F	CAA GTC GAA CGC ACT GAC G	31
			CoryniRorminis-R	ACA TTC AGG CCA TGT GGT CT	32
17	*L.* 파르시미니스 (*L. farciminis*)	특이 유전자	Farciminis-F	ACG AAT CCG GCA GTC AAG AA	33
			Farciminis-R	AAG AAT CGC CAA GCT CTA GG	34

18	*L. 지메* *(L. zymae)*	16S-23S	Zymae-F	GCT AAA GCA AGC GCA CGA TT	35
			Zymae-R	TCG GCA GTG TGA CAT GGA G	36
19	*L. 펜토서스* *(L. pentosus)*	특이 유전자	Pentosus-F	GCG GTA TCG ATT CGA TTG GT	37
			Pentosus-R	TGA TGT CAA TCG CCT CTT GG	38
20	*L. 크루스토럼* *(L. crustorum)*	16S-23S	Crustorum-F	GGA ATA GCC CAA ACC AGA G	39
			Crustorum-R	ACT GAA TGG AGT GGG TCA GA	40
21	*L. 뮤코세* *(L. mucosae)*	16S-23S	Mucosae-F	ACG GAC TTG ACG TTG GTT TAC	41
			Mucosae-R	GTG ATA GCC GAA ACC ACC TT	42
22	*L. 부크네리* *(L. buchneri)*	16S-23S	Buchneri-F	CAA GTC GAA CGC GTC TCC AT	43
			Buchneri-R	CCG AAG CCG TCT TTT AAA CC	44
23	*L. 헬베티커스* *(L. helveticus)*	특이 유전자	Helveticus-F	CTA CTT CGC AGG CGT TAA CT	45
			Helveticus-R	GTA CTT GAT GCT CGC ATA CC	46
24	*L. 아밀로보러스* *(L. amylovorus)*	특이 유전자	Amylovorus-F	CAA GCA CGA TTG GCA AGA TG	47
			Amylovorus-R	ATT GGA TTC CGC TTC TGT GG	48
25	*L. 헤이롱지안젠시스* *(L. heilongjiangensis)*	16S-23S	Heilongjiangensis-F	GCT TCA TGA ATC GGA TCT AA	49
			Heilongjiangensis-R	TAA ACT ACG ATC ATG TGA AAG TA	50
26	*L. 파라부크네리* *(L. parabuchneri)*	특이 유전자	Parabuchneri-F	AGC GTC GTG ATT CCT GAT AC	51
			Parabuchneri-R	CGA CTC TCC GAT CGT TGT TA	52
27	*L. 애시디피시스* *(L. acidipiscis)*	특이 유전자	Acidipiscis-F	AGC GGT TCG ATG GCT TAT AC	53
			Acidipiscis-R	TCC AAG TCC GAC ACC AGT CA	54
28	*L. 샌프란시스센시스* *(L. sanfranciscensis)*	특이 유전자	Sanfranciscensis-F	TGG AAC TGA TAC GCG GAT GT	55
			Sanfranciscensis-R	GGC CAA TTC CTC CAA TAA CG	56
29	*L. 루미니스* *(L. ruminis)*	16S-23S	Ruminis-F	TTG CAT TCA CCG AAA GAA GC	57
			Ruminis-R	CAT AAA CAT CAT GCG GTG TTC	58
30	*L. 아길리스* *(L. agilis)*	16S-23S	Agilis-F	TCG TAG CTT GCT ACA CCG ATT G	59
			Agilis-R	CAT AAT GAC CAT GCG ATC ATC A	60
31	*L. 델브루엑키* *(L. delbrueckii)*	16S-23S	Delbreueckii-F	CAT GTG CAG ACA TGC TAT CCT T	61
			Delbreueckii-R	CTC TGA AGT GCC ATG TCT CAG T	62
32	*L. 아밀로필러스* *(L. amylophilus)*	16S-23S	Amylophilus-F	CGA GTT CTG GTT AAG AGT AGC G	63
			Amylophilus-R	CGC CAT CTT TCA AAC ATC TAT C	64
33	*L. 쿤케이* *(L. kunkeei)*	16S-23S	Kunkeei-F	GAA CGA GCT CTC CCA AAT TGA	65
			Kunkeei-R	GAA CCA TGC GGT TCC AAC TA	66
34	*L. 아세토톨러란스* *(L. acetotolerans)*	16S-23S	Acetotolerans-F	GAT TAC CTT CGG GTA TGA AGT T	67
			Acetotolerans-R	TCA TGT GAT CTC TCC TTT TAT CC	68
35	*L. 린드네리* *(L. lindneri)*	특이 유전자	Lindneri-F	CGG CGT TCT CGA GGA CCA TA	69
			Lindneri-R	CAT CCG GCG TCC TTC ATA GC	70
36	*L. 갈리나룸* *(L. gallinarum)*	특이 유전자	Gallinarum-F	AAC TGG CGG TTA TCG TAG AC	71
			Gallinarum-R	CAC AGC AGG AAC CAT TTT AG	72
37	*L. 아밀로리티쿠스* *(L. amylolyticus)*	16S-23S	Amylolyticus-F	TTC GGT AGT GAC GTT TCG GA	73
			Amylolyticus-R	TCA AGC AAG TGC CAT GCA G	74

[0119] **실험예 2 : 내재 프라이머의 증폭 및 특이도 확인**

[0120] 락토바실러스 균주에 높은 비율로 보존되어 있는 16S rRNA 유전자를 이용하여 다음과 같은 내재 프라이머를 개발하였다.

표 3

[0121]

세트 번호	대상	타겟 유전자	프라이머	염기서열 (5'-3')	서열 번호
38	내재 프라이머 (Internal Positive Control)	16S-23S	IPC-F	ACG CGA AGA ACC TTA CCA G	75
			IPC-R	TCA CGA CAC GAG CTG ACG AC	76

[0122] 내재 프라이머의 증폭을 확인하기 위해 전통적인 PCR을 수행하여 락토바실러스 속 37종의 표준 균주 DNA에 모두 반응하는 것을 확인하였다. 이에 따라, 상기 내재 프라이머 역시 락토바실러스 속 균주를 검출하기 위한 용도로 사용될 수 있다.이하, 모든 락토바실러스 속 균주에서 정확히 증폭하는 상기 내재 프라이머를 양성대조군으로 설정하고 실시간 PCR에 적용하였다.

[0123] 종 특이 프라이머의 특이도를 확인하기 위해 전통적인 PCR을 수행하였다. 각각의 종 특이 프라이머는 락토바실러스 37종의 표준 균주 DNA에 모두 반응하는 것을 확인하였으며, 각각의 종 특이 프라이머는 타깃으로 하는 균주에만 특이적으로 증폭되었고 다른 균주에 대해서는 교차반응이 관찰되지 않았다. 타깃 균주에서 정확히 증폭하는 프라이머 쌍들은 특이도가 있다고 판단하고 실시간 PCR에 적용하였다.

[0124] **실험예 3 : 실시간(Real-time) PCR의 특이도 확인**

[0125] 실시간 PCR의 정확성을 확인하기 위해 37종 락토바실러스 속 균주의 종 특이 프라이머를 대상으로 하여 특이도를 확인하였다.

[0126] 이에 앞서, 상기 실시예 4에서 설정한 실시간 PCR의 조건이 적절한 것인지 우선적으로 PCR의 효율성을 확인하였다. 연속적으로 희석(serial dilution)한 37종의 락토바실러스 DNA의 형광 증폭 곡선 결과를 바탕으로 표준 그래프를 작성하였고, 모든 그래프의 경사(slope), R2, 효율(efficiency) 값은 표 4에 나타내었다.

표 4

[0127]

종(species)	경사도(Slope)	R^{2--}값	효율(Efficiency) (%)
L. 가세리	-3.214	0.999	104.701
L. 람노서스	-3.362	0.998	98.35
L. 브레비스	-3.444	1	95.158
L. 사케이	-3.212	1	104.797
L. 존소니	-3.214	0.999	104.701
L. 젠세니	-3.328	0.996	99.764
L. 퍼멘텀	-3.56	0.995	90.955
L. 플랜타룸	-3.221	0.995	104.396
L. 파라카세이	-3.305	0.98	100.694
L. 파라플랜타룸	-3.256	0.998	102.822
L. 카세이	-3.284	0.999	101.612
L. 커바투스	-3.485	0.999	93.617
L. 애시도필러스	-3.506	1	92.845
L. 살리바리우스	-3.564	1	90.809
L. 류테리	-3.342	0.999	99.161
L. 코리니포미스	-3.217	0.989	104.578
L. 파르시미니스	-3.386	0.991	97.39
L. 지메	-3.5	0.997	93.073
L. 펜토서스	-3.292	0.999	101.251
L. 크루스토럼	-3.438	0.999	95.366
L. 뮤코세	-3.478	0.986	93.886
L. 부크네리	-3.411	0.993	96.424
L. 헬베티커스	-3.230	0.998	103.98
L. 아밀로보러스	-3.582	0.993	90.167
L. 헤이룽지안젠시스	-3.462	1	94.458
L. 파라부크네리	-3.207	1	105.049

L. 애시디피시스	-3.528	0.984	92.075
L. 샌프란시스센시스	-3.229	0.999	104.034
L. 루미니스	-3.295	1	101.153
L. 아길리스	-3.508	1	92.795
L. 델브루엑키	-3.31	0.999	100.479
L. 아밀로필러스	-3.481	0.984	93.768
L. 쿤케이	-3.571	0.998	90.568
L. 아세토톨러란스	-3.209	1	104.92
L. 린드네리	-3.559	0.982	90.972
L. 갈리나룸	-3.346	0.999	98.989
L. 아밀로리티쿠스	-3.552	0.996	91.209

[0128] CODEX 가이드라인에 따르면 경사(slope) 값은 -3.1~-3.6, R2 값은 0.98 이상일 때 실시간 PCR의 효율성이 우수하다고 제시하였다. 상기 표 4에 나타난 결과와 CODEX 가이드라인 수치를 비교하였을 때, 모든 값이 가이드라인 안에 들어옴으로써 실시예 4에서 설정한 실시간 PCR 조건은 우수한 효율을 갖는 것을 확인하였다.상기한 실시간 PCR 조건에서 각 종별 특이 프라이머의 특이도를 확인하였다. 37종의 락토바실러스 표준 균주 DNA를 대상으로 종 특이 프라이머 쌍을 모두 반응시켰을 때, 타깃 종에만 증폭되고 타깃을 제외한 나머지 종에는 어떤 증폭도 일어나지 않는 것을 모두 확인함으로써 본 발명의 37개의 종 특이 프라이머 쌍은 각 종별로 현저한 특이도를 가진다는 사실을 확인하였다(표 5).

표 5

[0129]

프라이머	탐지된 균주	Ct vaule	온도 (℃)
Gasseri_F,R	*L. gasseri* KCTC 3163	5.366	83.749
Rhamnosus_F,R	*L. rhamnosus* KCTC 3237	11.258	79.329
Brevis_F,R	*L. brevis* KCTC 3498	5.762	85.319
Sakei_F,R	*L. sakei* KCTC 3603	11.139	82.441
Johnsonii_F,R	*L. johnsonii* KCTC 3801	6.450	84.193
Jensenii_F,R	*L. jensenii* KCTC 5194	6.583	81.378
Fermentum_F,R	*L. fermentum* KACC 11441	4.260	88.582
Plantarum_F,R	*L. plantarum* KACC 11451	10.715	82.027
Paracasei _F,R	*L. paracasei* KACC 12361	12.012	80.746
Paraplantarum_F,R	*L. paraplantarum* KACC 12373	10.884	82.306
Casei_F,R	*L. casei* KACC 12413	10.739	82.513
Curvatus_F,R	*L. curvatus* KACC 12415	13.832	82.686
Acidophilus_F,R	*L. acidophilus* KACC 12419	12.383	79.308
Salivarius_F,R	*L. salivarius* KCTC 3600	14.905	81.806
Reuteri_F,R	*L. reuteri* KCTC 3594	9.142	83.439
Coryniformis_F,R	*L. coryniformis* KACC 12411	13.638	84.793
Farciminis_F,R	*L. farciminis* KACC 12423	10.678	80.465
Zymae_F,R	*L. zymae* KACC 16349	7.546	82.568
Pentosus_F,R	*L. pentosus* KACC 12428	11.603	84.268
Crustorum_F,R	*L. crustorum* KACC 16344	12.467	82.012
Mucosae_F,R	*L. mucosae* KACC 12381	11.598	83.109
Buchneri_F,R	*L. buchneri* KACC 12416	11.606	82.206
Helveticus_F,R	*L. helveticus* KACC 12418	12.087	79.059
Amylovorus_F,R	*L. amylovorus* KACC 12435	11.256	82.037
Heilongjiangensis_F,R	*L. heilongjiangensis* KACC 18741	11.922	81.205
Parabuchneri_F,R	*L. parabuchneri* KACC 12363	9.377	81.604
Acidipiscis_F,R	*L. acidipiscis* KACC 12394	10.743	81.566
Sanfranciscensis_F,R	*L. sanfranciscensis* KACC 12431	10.273	79.814
Ruminis_F,R	*L. ruminis* KACC 12429	9.724	82.341
Agilis_F,R	*L. agilis* KACC 12433	11.758	82.095
Delbrueckii_F,R	*L. delbrueckii* KACC 12420	8.621	83.114
Amylophilus_F,R	*L. amylophilus* KACC 11430	10.943	82.733
Kunkeei_F,R	*L. kunkeei* KACC 19371	8.542	83.217
Acetotolerans_F,R	*L. acetotolerans* KACC 12447	11.912	82.031

Lindneri_F,R	*L. lindneri* KACC 12445	12.910	79.917
Gallinarum_F,R	*L. gallinarum* KACC 12370	10.132	78.138
Amylolyticus_F,R	*L. amylolyticus* KACC 12374	11.694	83.460

[0130] 상기 표 5에 나타난 바와 같이, 모든 종 특이 프라이머의 Ct 값 범위는 9.0~15.0 값 사이로 락토바실러스 표준 균주 DNA가 특이적으로 증폭된 것을 확인하였다. Ct 값이란, PCR 증폭 산물이 일정량 증폭되었을 때의 사이클 수이다. 또한 내재유전자로부터 디자인한 프라이머가 실제로 락토바실러스의 모든 종에 증폭되는지 확인한 결과 모든 종에서 Ct 값 5.7~9.1의 범위로 증폭되는 것을 확인하였다.

[0131] **실험예 4. 프로바이오틱 제품에 대한 PCR 적용 실험**

[0132] 개발된 실시간 PCR 법을 이용하여 프로바이오틱 제품의 락토바실러스 동정을 위한 적용 실험을 수행하였다. 총 3개의 프로바이오틱 제품에 대해 확인하였으며 실시간 PCR 결과는 제품 라벨과 비교하였다. 그 결과 3가지 제품에 대해서 라벨과 실시간 PCR 결과 검출된 락토바실러스 종이 모두 일치하였다.

표 6

[0133]

종(Species)	제품A		제품B		제품 C	
	라벨	PCR	라벨	PCR	라벨	PCR
L. 애시도필러스	+	17.27	+	19.90	-	-
L. 카세이	+	20.34	+	22.27	-	-
L. 가세리	+	15.29	-	-	-	-
L. 델브루엑키	-	-	+	14.34	+	10.23
L. 헬베티커스	-	-	-	-	-	-
L. 퍼멘텀	-	-	-	-	-	-
L. 파라카세이	+	15.99	+	14.44	+	12.81
L. 플랜타룸	+	21.56	+	17.27	-	-
L. 류테리	+	19.23	-	-	-	-
L. 람노서스	+	15.96	-	-	-	-
L. 살리바리우스	-	-	+	21.04	-	-
L. 브레비스	-	-	+	20.16	-	-
L. 아밀로보러스	-	-	-	-	-	-
L. 아세토톨러란스	-	-	-	-	-	-
L. 애시디피시스	-	-	-	-	-	-
L. 아길리스	-	-	-	-	-	-
L. 아밀로리티쿠스	-	-	-	-	-	-
L. 아밀로필러스	-	-	-	-	-	-
L. 부크네리	-	-	-	-	-	-
L. 코리니포미스	-	-	-	-	-	-
L. 크루스토럼	-	-	-	-	-	-
L. 커바투스	-	-	-	-	-	-
L. 파르시미니스	-	-	-	-	-	-
L. 갈리나룸	-	-	-	-	-	-
L. 헤이롱지안젠시스	-	-	-	-	-	-
L. 젠세니	-	-	-	-	-	-
L. 존소니	-	-	-	-	-	-
L. 쿤케이	-	-	-	-	-	-
L. 린드네리	-	-	-	-	-	-
L. 뮤코세	-	-	-	-	-	-
L. 파라부크네리	-	-	-	-	-	-
L. 파라플랜타룸	-	-	-	-	-	-
L. 펜토서스	-	-	-	-	-	-
L. 루미니스	-	-	-	-	-	-
L. 사케이	-	-	-	-	-	-
L. 샌프란시스센시스	-	-	-	-	-	-
L. 지메	-	-	-	-	-	-

[0134] 본 발명은 락토바실러스를 종 수준에서 빠르고 정확하게 동정할 수 있도록 비교 유전체학을 이용하여 종 특이 프라이머 쌍, 프라이머 세트 및 이들을 포함하는 락토바실러스 검출용 조성물을 제공하고, 이들을 이용하여 락토바실러스를 검출할 수 있는 키트, 바이오 칩 및 검출방법을 제공한다. 또한, 상기 조성물을 이용한 검출방법을 프로바이오틱 제품 모니터링에 적용하여 제품의 라벨에 보고된 락토바실러스의 존재와 보고되지 않은 락토바실러스의 존재 여부도 결정할 수 있는 능력을 확인하였다. 이 방법은 프로바이오틱 제품뿐만 아니라 식품이나 환경 샘플로부터 다양한 락토바실러스를 한 번에 검출할 수 있는 연구에도 적용 가능한 것이다.전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[0135] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> MULTIPLEX PCR PRIMERS FOR DETECTION OF LACTOBACILLUS SPECIES, AND USE THEREOF

<130> 18PP31213

<160> 76

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gasseri-F

<400> 1

tcaagagctg ttaaggctgt 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gasseri-R

<400> 2

ctatcgcttc aagtgctttc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rhamnosus-F

<400> 3

ctatcgcttc aagtgctttc 20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Rhamnosus-R

<400> 4

cagcggttat gcgatgcgaa t 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Brevis-F

<400> 5

cagcggttat gcgatgcgaa t 21

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Brevis-R

<400> 6

ttccaatcgt gtgcacacca 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sakei-F

<400> 7

tcgaacgcac tctcgtttag 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sakei-R

<400> 8

cgaaaccatc tttcaaccct 20

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Johnsonii-F

<400> 9

agagagaaac tcaacttgaa ata 23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Johnsonii-R

<400> 10

ccttcattaa ccttaacagt taa 23

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Jensenii-F

<400> 11

agttcttcgg aatggacata g 21

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Jensenii-R

<400> 12

gccgcctttt aaacttctt 19

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fermentum-F

<400> 13

gaccagcgca ccaagtgata 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fermentum-R

<400> 14

agcgtagcgt tcgtggtaat 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Plantarum-F

<400> 15

gctggcaatg ccatcgtgct 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Plantarum-R

<400> 16

tctcaacggt tgctgtatcg 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Paracasei-F

<400> 17

caatgccgtg gttgttggaa 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Paracasei-R

<400> 18

gccaatcacc gcattaatcg 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Paraplantarum-F

<400> 19

ttattcaagc cgtcggagtg 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Paraplantarum-R

<400> 20

tcgctggtgc taatgcaatg 20

<210> 21

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Casei-F

<400> 21

ccacaatcct tggctgttct 20

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Casei-R

<400> 22

gcttgaggcg attgtaatcc 20

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Curvatus-F

<400> 23

actctcattg aattaggacg tt 22

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Curvatus-R

<400> 24

cccgtgttgg tactatttaa t 21

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Acidophilus-F

<400> 25

cctttctaag gaagcgaagg at 22

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Acidophilus-R

<400> 26

acgcttggta ttccaaatcg c 21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Salivarius-F

<400> 27

tacaccgaat gcttgcattc a 21

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Salivarius-R

<400> 28

aggatcatgc gatccttaga ga 22

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reuteri-F

<400> 29

gattgacgat ggatcaccag t 21

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reuteri-R

<400> 30

catcccagag tgatagccaa 20

<210> 31

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coryniforminis-F

<400> 31

caagtcgaac gcactgacg 19

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coryniforminis-R

<400> 32

acattcaggc catgtggtct 20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Farciminis-F

<400> 33

acgaatccgg cagtcaagaa 20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Farciminis-R

<400> 34

aagaatcgcc aagctctagg 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Zymae-F

<400> 35

gctaaagcaa gcgcacgatt 20

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Zymae-R

<400> 36

tcggcagtgt gacatggag 19

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pentosus-F

<400> 37

gcggtatcga ttcgattggt 20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Pentosus-R

<400> 38

tgatgtcaat cgcctcttgg 20

<210> 39

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Crustorum-F

<400> 39

ggaatagccc aaaccagag 19

<210

> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Crustorum-R

<400> 40

actgaatgga gtgggtcaga 20

<210> 41

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mucosae-F

<400> 41

acggacttga cgttggttta c 21

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mucosae-R

<400> 42

gtgatagccg aaaccacctt 20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Buchneri-F

<400> 43

caagtcgaac gcgtctccat 20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Buchneri-R

<400> 44

ccgaagccgt cttttaaacc 20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Helveticus-F

<400> 45

ctacttcgca ggcgttaact 20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Helveticus-R

<400> 46

gtacttgatg ctcgcatacc 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amylovorus-F

<400> 47

gtacttgatg ctcgcatacc 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amylovorus-R

<400> 48

attggattcc gcttctgtgg 20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heilongjiangensis-F

<400> 49

gcttcatgaa tcggatctaa 20

<210> 50

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heilongjiangensis-R

<400> 50

taaactacga tcatgtgaaa gta 23

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Parabuchneri-F

<400

> 51

agcgtcgtga ttcctgatac 20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Parabuchneri-R

<400> 52

cgactctccg atcgttgtta 20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Acidipiscis-F

<400> 53

agcggttcga tggcttatac 20

<210> 54

<211> 20

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Acidipiscis-R

<400> 54

tccaagtccg acaccagtca 20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sanfranciscensis-F

<400> 55

tggaactgat acgcggatgt 20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sanfranciscensis-R

<400> 56

ggccaattcc tccaataacg 20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ruminis-F

<400> 57

ttgcattcac cgaaagaagc 20

<210> 58

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ruminis-R

<400> 58

cataaacatc atgcggtgtt c 21

<210> 59

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Agilis-F

<400> 59

tcgtagcttg ctacaccgat tg 22

<210> 60

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Agilis-R

<400> 60

cataatgacc atgcgatcat ca 22

<210> 61

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Delbreueckii-F

<400> 61

catgtgcaga catgctatcc tt 22

<210> 62

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Delbreueckii-R

<400> 62

ctctgaagtg ccatgtctca gt 22

<210> 63

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amylophilus-F

<400> 63

cgagttctgg ttaagagtag cg 22

<210> 64

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amylophilus-R

<400> 64

cgccatcttt caaacatcta tc 22

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Kunkeei-F

<400> 65

gaacgagctc tcccaaattg a 21

<210> 66

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Kunkeei-R

<400> 66

gaaccatgcg gttccaacta 20

<210> 67

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Acetotolerans-F

<400> 67

gattaccttc gggtatgaag tt 22

<210> 68

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Acetotolerans-R

<400> 68

tcatgtgatc tctcctttta tcc 23

<210> 69

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lindneri-F

<400> 69

cggcgttctc gaggaccata 20

<210> 70

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lindneri-R

<400> 70

catccggcgt ccttcatagc 20

<210> 71

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gallinarum-F

<400> 71

aactggcggt tatcgtagac 20

<210> 72

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gallinarum-R

<400> 72

cacagcagga accattttag 20

<210> 73

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amylolyticus-F

<400> 73

ttcggtagtg acgtttcgga 20

<210> 74

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amylolyticus-R

<400> 74

tcaagcaagt gccatgcag 19

<210> 75

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IPC-F

<400> 75

acgcgaagaa ccttaccag 19

<210> 76

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IPC-R

<400> 76

cataatgacc atgcgatcat ca 22