



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0122695
(43) 공개일자 2020년10월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/686 (2018.01) *C12Q 1/689* (2018.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/686 (2018.05)
C12Q 1/689 (2018.05)
- (21) 출원번호 10-2019-0045711
- (22) 출원일자 2019년04월18일
심사청구일자 2019년04월18일
- (71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
압티지엠제이 주식회사
광주광역시 북구 첨단과기로 123 ,광주과학기술원(오룡동,창업진흥센터에이동217-2)
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)
- (72) 발명자
심원보
경상남도 김해시 월산로 112-34, 1001동 1601호(부곡동, 월산마을10단지에스케이뷰)
이정은
경상남도 김해시 월산로 26, 605동 404호(부곡동, 석봉마을6단지대동아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
최규환

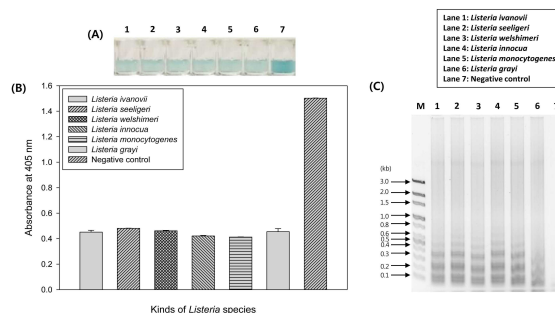
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 분자비콘을 포함하는 등온비색 검출용 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 분자비콘을 포함하는 등온비색 검출용 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 조성물은 위양성을 배제하고자 증폭된 산물에 혼성화되는 분자비콘을 사용하여 검출의 정확도를 향상시켰으므로, 미생물 진단 분야에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2527/101 (2019.08)

C12Q 2531/119 (2013.01)

(72) 발명자

김솔아

경상남도 진주시 충의로 67, 507동 2002호 (충무공동, 혁신도시엘에이치아파트5단지)

류경열

전라북도 전주시 덕진구 틀못4길 33, 104동 1502호 (장동, LH 이노팰리스아파트 1단지)

김원일

전라북도 전주시 덕진구 만성로 150, 109동 305호 (만성동, 중흥에스클래스더퍼스트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395061220 (세부과제번호 PJ013536042019)
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	농축산물수출확대장애평가인해소기술개발
연구과제명	버섯 및 재배환경 중 리스테리아균의 신속 간이진단기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상대학교
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

미생물 감염 의심 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 분자비콘(molecular beacon) 및 표적 서열에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 조성물을 이용하여 등은 증폭(isothermal amplification) 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 등은 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 미생물의 검출 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 분자비콘은 서열 가운데 DNA 기반 효소(DNAzyme)의 서열을 포함하고, 양 말단은 등은 증폭 반응 산물에 상보적인 서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 미생물의 검출 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 증폭 단계 산물의 검출은 비색(colorimetric) 반응을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 미생물의 검출 방법.

청구항 4

서열번호 1의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 3의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 프라이머 세트;와 서열번호 5의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 분자비콘(molecular beacon);을 포함하는 리스테리아속 균의 검출용 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 리스테리아속 균은 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 리스테리아 이바노비(*L. ivanovii*), 리스테리아 세에리게리(*L. seeligeri*), 리스테리아 웰쉬메리(*L. welshimeri*), 리스테리아 인노쿠아(*L. innocua*) 또는 리스테리아 그레이(*L. grayi*)인 것을 특징으로 하는 LAMP 조성물.

청구항 6

서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 7의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 8의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 및 서열번호 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 프라이머 세트;와 서열번호 10의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 분자비콘(molecular beacon);을 포함하는 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*) 검출용 LAMP 조성물.

청구항 7

제4항 또는 제6항의 LAMP 조성물; 증폭 반응을 수행하기 위한 시약; 및 증폭 반응 산물을 검출하기 위한 시약을 포함하는 리스테리아속 균의 검출용 키트.

청구항 8

리스테리아균 감염 의심 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제4항 또는 제6항의 LAMP용 조성물을 이용하여 등은 증폭(isothermal amplification) 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 등은 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 리스테리아속 균의 검출 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 리스테리아속 균은 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 리스테리아 이바노비(*L. ivanovii*), 리스테리아 세에리게리(*L. seeligeri*), 리스테리아 웰쉬메리(*L. welshimeri*), 리스테리아 인노쿠아(*L. innocua*) 또는 리스테리아 그레이(*L. grayi*)인 것을 특징으로 하는 리스테리아속 균의 검출 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 증폭 단계 산물의 검출은 비색 반응을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 리스테리아속 균의 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 분자비콘을 포함하는 등온비색 검출용 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인체에 수많은 질병을 일으키는 병원성 미생물의 검출 및 진단은 인류의 복지를 위해 매우 중요한 분야로, 특히 인간에게 가장 중요한 에너지원인 식품의 경우 이러한 병원성 미생물에 대한 안전성 검사가 이루어지지 않는다면 이를 통한 발병이 빈번하게 일어날 수 있다. 이러한 이유로 병원성 미생물을 검출하고 진단하기 위한 노력이 많이 이루어져 왔다.

[0003] 최근 전통적인 PCR 기반의 진단방법보다 진일보한 LAMP(loop-mediated isothermal amplification, 고리 매개 등온증폭) 반응이 개발되었다. LAMP 반응은 기존 PCR에서 증폭반응이 변성(denaturation), 어닐링(annealing) 및 신장(extension)의 3단계로 이루어지던 것과는 다르게, 온도변화 없이 일정한 온도에서 어닐링 및 신장이 가능하기 때문에 반응 시간이 1시간 이내로 짧고, 온도 변화에 따른 DNA 손실 및 손상이 없으며, 일정온도만 유지하면 되기 때문에 고가의 장비 필요없이 간단한 항온기만으로 실험이 가능하여 현장 활용성이 높다. 또한 증폭하고자 하는 유전자 서열의 6개 부위를 인지하는 특이적인 4개의 프라이머를 사용하기 때문에 표적 유전자에 대한 특이성이 매우 높다.

[0004] 리스테리아(*Listeria*)의 균종들은 그람 양성, 통성 혐기성 간균으로서 자연계에 널리 분포하고 있다. 리스테리아 속(*Listeria* spp.) 균에는 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 리스테리아 이바노비(*L. ivanovii*), 리스테리아 세에리게리(*L. seeligeri*), 리스테리아 웰쉬메리(*L. welshimeri*), 리스테리아 인노쿠아(*L. innocua*) 및 리스테리아 그레이(*L. grayi*) 등의 다수의 종들이 있으며, 이 중에서 리스테리아 모노사이토게네스만이 사람에게 병원성이 있으며, 동물에 병원성이 있는 균주는 리스테리아 모노사이토게네스와 리스테리아 이바노비이다. 특히, 리스테리아 모노사이토게네스는 냉장 보존을 요하는 식품에 오염되는 경우 저온 보존 과정에서 오랫동안 생존 및 증식이 가능하기 때문에 냉장보존 식품을 매개로한 식중독 발생의 중요한 원인균이 되고 있다. 따라서, 리스테리아증을 예방하기 위하여 리스테리아 모노사이토제네스에 의한 식품의 오염 여부를 신속하게 검출할 필요가 있다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제0607901호에는 '분자비콘을 이용한 특정물질의 동정 및 분석방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제0574069호에는 '리스테리아속 균종을 검출하는 방법 및 검출키트'가 개시되어 있으나, 본 발명의 분자비콘을 포함하는 등온비색 검출용 조성물 및 이의 용도는 기재된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 분자비콘(molecular beacon) 및 표적 서열에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 조성물을 이용하여 등온 증폭(isothermal amplification) 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭한 후 등온 증폭 단계의 산물을 비색 반응을 통해 검출할 수 있음을 확인하였다. 일례로 본 발명자들은 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*)에 특이적이거나, 리스테리아속 균주에 특이적인 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification)용 프라이머 세트와, 상기 프라이머 세트를 통해 증폭되는

산물에 결합할 수 있는 DNA 기반 효소 서열을 포함한 분자비콘을 제작하였고, 상기 프라이머 세트와 분자비콘을 이용하여 리스테리아 모노사이토게네스 및/또는 리스테리아속 미생물을 대상으로 LAMP 반응을 수행한 결과, 본 발명의 프라이머 세트 및 분자비콘을 포함하는 LAMP용 조성물이 리스테리아 모노사이토게네스 및/또는 리스테리아속 균을 특이적으로 검출하며, LAMP 반응의 위양성(false positive)을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 미생물 감염 의심 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 분자비콘(molecular beacon) 및 표적 서열에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 조성물을 이용하여 등온 증폭(isothermal amplification) 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 등온 증폭 단계의 산물을 비색으로 검출하는 단계를 포함하는, 미생물의 검출 방법을 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 3의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 프라이머 세트;와 서열번호 5의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 분자비콘(molecular beacon);을 포함하는 리스테리아속 균의 검출용 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 조성물을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 7의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 8의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 및 서열번호 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 프라이머 세트;와 서열번호 10의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 분자비콘;을 포함하는 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*) 검출용 LAMP 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 LAMP 조성물; 증폭 반응을 수행하기 위한 시약; 및 증폭 반응 산물을 검출하기 위한 시약을 포함하는 리스테리아속 균의 검출용 키트를 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 리스테리아균 감염 의심 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 LAMP용 조성물을 이용하여 등온 증폭(isothermal amplification) 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 등온 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 리스테리아속 균의 검출 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명에 따른 리스테리아속 균의 검출용 LAMP 조성물 및 이를 이용한 리스테리아속 균의 검출 방법은 등온 조건에서 표적 유전자를 효과적으로 증폭할 수 있어 온도 구배가 필요한 전통적인 PCR에 비해 상대적으로 반응시간이 짧고, 온도변화에 따른 DNA 손상 및 손실이 적어 증폭 효율이 우수하며, 고가의 유전자 증폭기(thermal cycler)와 같은 장비가 필요없고, 비색반응을 통한 육안 검출이 가능하여 현장검시에 유용하게 활용될 수 있는 장점이 있다. 또한, 본 발명의 LAMP 조성물은, 위양성을 배제하고자 증폭된 산물에 혼성화되는 분자비콘을 사용하여 검출의 정확도를 향상시켜, 미생물 진단 분야에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 본 발명의 서열번호 1 내지 4의 LAMP 프라이머 세트와 서열번호 5의 분자비콘을 이용한 리스테리아속 균의 검출 결과를 보여주는 것으로, (A)는 최종 반응 산물의 비색 반응 결과이고, (B)는 비색 반응 종료 후 450nm 파장에서 흡광도를 측정한 값을 그래프화한 것이고, (C)는 등온 증폭 반응 산물의 아가로스 젤 로딩 사진이다.
- 도 2는 본 발명의 서열번호 5 내지 9의 LAMP 프라이머 세트와 서열번호 10의 분자비콘을 이용한 리스테리아 모노사이토게네스 균의 검출 결과를 보여주는 것으로, (A)는 최종 반응 산물의 비색 반응 결과이고, (B)는 비색 반응 종료 후 450nm 파장에서 흡광도를 측정한 값을 그래프화한 것이고, (C)는 등온 증폭 반응 산물의 아가로스 젤 로딩 사진이다.
- 도 3은 리스테리아 속 균에 대한 검출 민감도를 확인한 것이다.
- 도 4 및 도 5는 각각 리스테리아 모노사이토게네스 및 리스테리아 속 균에 대한 검출 특이도를 확인한 것이다.
- 도 6은 LAMP에서 흔히 나타나는 위양성(false positive) 결과를 확인할 수 있는 전기영동 결과(A)이며, 위양성 결과를 보였던 LAMP 반응물을 본 발명의 서열번호 1 내지 4의 LAMP 프라이머 세트와 서열번호 5의 분자비콘을 이용하여 검정한 결과(B)이다. P: 양성 시료, N: 음성 시료.

도 7은 LAMP에서 흔히 나타나는 위양성(false positive) 결과를 확인할 수 있는 전기영동 결과(A)이며, 위양성 결과를 보였던 LAMP 반응물을 본 발명의 서열번호 6 내지 9의 LAMP 프라이머 세트와 서열번호 10의 분자비콘을 이용하여 검정한 결과(B)이다. P: 양성 시료, N: 음성 시료.

도 8은 본 발명의 분자비콘을 이용한 LAMP 반응법의 작용원리를 모식화한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 미생물 감염 의심 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 분자비콘(molecular beacon) 및 표적 서열에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 조성물을 이용하여 등온 증폭(isothermal amplification) 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 등온 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 미생물의 검출 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 미생물 검출 방법에 있어서, 상기 미생물은 세균류(bacteria), 원생동물류(protozoa), 사상균류(fungi) 또는 효모류(yeast)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 본 명세서에서, 용어 "분자비콘(molecular beacon)"이란, LAMP 증폭 반응 산물에 상보적이되도록 디자인된 올리고뉴클레오타이드로, 서열 가운데 DNA 기반 효소(DNAzyme)의 서열을 포함하고, 양 말단은 등온 증폭 반응 산물에 상보적인 서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드로, 용어 "DNA 기반 효소(DNAzyme)"란 다른 핵산 분자들을 효소적으로 쪼갤 수 있는 합성 DNA 분자를 의미한다.
- [0017] 본 발명의 일 구현 예에 따른 미생물의 검출 방법에 있어서, 상기 분자비콘의 DNA 기반 효소는 HRPzyme(horseradish peroxidase-like DNA)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 등온 증폭 반응 산물에 상보적인 양 말단(즉, 5' 및 3')은 바람직하게는 8~12bp 크기로 디자인될 수 있고, 더욱 바람직하게는 10bp 크기로 디자인될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 명세서에서 용어, "올리고뉴클레오타이드"란 수 개에서 수십 개의 뉴클레오타이드가 인산디에스테르결합으로 중합한 상태로서, 당부분이 리보오스로 구성된 올리고리보뉴클레오타이드와 디옥시리보오스로 구성된 올리고디옥시리보뉴클레오타이드가 있다.
- [0019] 또한, 본 발명의 미생물 검출 방법에 있어서, 상기 표적 서열에 특이적인 프라이머 세트는 등온의 조건에서 표적 서열 증폭 반응을 수행할 수 있는 프라이머일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 미생물 검출 방법에 있어서, 상기 증폭 단계 산물의 검출은 비색(colorimetric) 반응을 통해 수행되는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 미생물 검출 방법은, 등온 증폭 반응 종료 후 반응 용액에 헤민(hemin)을 첨가하여, 등온 증폭 반응 산물과 결합하지 않은 유리(free) 분자비콘 서열의 HRPzyme 서열과 헤민이 결합하여 G-quadruplex/hemin 복합체를 형성하도록 유도한 후, 과산화수소(H_2O_2)와 TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)를 넣어 반응시킨 후, 발색 반응 종료 시약(황산 또는 염산)을 첨가하여 반응을 종료하게 하는 것으로, 검출 대상인 미생물이 포함된 양성 시료의 경우 등온 증폭 산물에 분자비콘이 혼성화되어, 반응물 내 유리하는 분자비콘이 아예 없거나 극히 소량으로 존재하게 되므로, 헤민과 G-quadruplex를 형성하지 않거나, 형성된 G-quadruplex의 양이 적으며, 음성 시료가 포함된 경우 LAMP 증폭산물에 분자비콘이 혼성화되지 않기 때문에, 반응물 내에 분자비콘이 유리상태로 존재하여 헤민과 반응하여 G-quadruplex를 형성하게 된다. 따라서, TMB 등과 같은 기질용액을 첨가하면, 음성 시료에서는 형성된 G-quadruplex가 기질과 반응하여 강한 비색 반응을 나타내며, 양성 시료에서는 약한 비색 반응 또는 비색 반응이 나타나지 않아, 음성 시료에 비해 발색의 정도가 낮게 확인되는 것이 특징이다.
- [0022] 본 발명은 또한, 서열번호 1의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 3의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 프라이머 세트;와 서열번호 5의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 분자비콘(molecular beacon);을 포함하는 리스테리아속 균의 검출용 LAMP(Loop-mediated isothermal amplification) 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 리스테리아속 균의 검출용 LAMP 조성물에 있어서, 상기 리스테리아속 균은 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 리스테리아 이바노비(*L. ivanovii*), 리스테리아 세엘리게리(*L. seeligeri*), 리스테리아 웰쉬메리(*L. welshimeri*), 리스테리아 인노쿠아(*L. innocua*) 또는 리스테리아 그레이(*L. grayi*)일 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서, 용어 'LAMP(Loop-mediated isothermal amplification, 고리매개 등온증폭법)'는 기준

PCR(polymerase chain reaction) 법과 달리 등온의 조건에서 표적 서열의 증폭 반응을 수행할 수 있는 방법이다. LAMP 반응을 위해서는 기본적으로 4종의 올리고뉴클레오타이드 프라이머(FIP, BIP, F3, B3)가 필요하다. 상기 4종의 프라이머는 외부(outer) 프라이머 2종과 내부(inner) 프라이머 2종으로 구성되며, 외부 프라이머는 정방향 외부(forward outer, F3) 프라이머와 역방향 외부(backward outer, B3) 프라이머 2 종으로 구성되고 반응의 비순환기(non-cyclic step) 동안 DNA 이중 가닥을 풀어주는 역할을 한다. 내부 프라이머는 정방향 내부 프라이머(forward inner primer, FIP)와 역방향 내부 프라이머(backward inner primer, BIP) 2종으로 구성되고 고리매개 등온증폭반응에 필수적인 고리(loop)를 만들 수 있도록 정방향 및 역방향 염기서열에 해당하는 뉴클레오타이드로 구성된다.

[0025] 본 발명은 또한, 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 7의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 8의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 및 서열번호 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 프라이머 세트;와 서열번호 10의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 분자비콘;을 포함하는 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*) 검출용 LAMP 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명의 일 구현 예에 따른 리스테리아속 균의 검출용 LAMP 조성물에 있어서, 서열번호 1 내지 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 리스테리아속 균의 *ssrA* 유전자를 표적으로 하는 프라이머 세트이고, 서열번호 6 내지 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 리스테리아 모노사이토게네스의 용혈소(hemolysin) 유전자(*hly*)를 표적으로 하는 프라이머 세트이고, 서열번호 1 및 서열번호 6의 프라이머는 정방향 외부 프라이머인 F3이고, 서열번호 2 및 서열번호 7의 프라이머는 역방향 외부 프라이머인 B3이고, 서열번호 3 및 서열번호 8의 프라이머는 정방향 내부 프라이머인 FIP이고, 서열번호 4 및 서열번호 9의 프라이머는 역방향 내부 프라이머인 BIP이다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 따른 LAMP 조성물에 있어서, 서열번호 5 및 서열번호 10의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 분자비콘은 LAMP 반응에 의해 증폭된 표적 산물에 혼성화될 수 있는 프로브로, 양 말단 8~12bp의 염기는 LAMP 반응에 의해 증폭된 산물과 상보적인 서열로 이루어져 있으며, 내부에는 DNA 기반 효소(DNAzyme)의 서열을 포함하여 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명의 LAMP 조성물에 있어서, 상기 DNA 기반 효소는 HRPzyme 서열일 수 있고, 구체적으로는 서열번호 5 또는 서열번호 10의 염기서열에서 11번째부터 28번째 염기가 HRPzyme 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본 명세서에서, 용어 "프라이머"는 복제하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥의 올리고뉴클레오타이드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity) 뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.

[0030] 본 발명에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)을 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명의 상기 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 6 및 서열번호 7 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 8 및 서열번호 9 내의 35개 이상, 36개 이상, 37개 이상, 38개 이상, 39개 이상, 40개 이상, 41개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1의 프라이머(19개 올리고뉴클레오타이드)는 서열번호 1의 서열 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상의 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0032] 본 발명은 또한, 상기 리스테리아속 균 또는 리스테리아 모노사이토게네스 검출용 LAMP 조성물; 증폭 반응을 수행하기 위한 시약; 및 증폭 반응 산물을 검출하기 위한 시약을 포함하는 리스테리아속 균의 검출용 키트를 제공한다.

[0033] 본 발명의 키트에서, 상기 리스테리아속 균 또는 리스테리아 모노사이토게네스 검출용 LAMP 조성물은 서열번호 1의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 3의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 프라이머 세트;와 서열번호 5의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 분자비콘(molecular beacon);을 포함하는 리스테리아속 균 검출용 또는 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 7의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 8의 올리고뉴클레오타이드

프라이머; 및 서열번호 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 프라이머 세트;와 서열번호 10의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 분자비콘;을 포함하는 리스테리아 모노사이토게네스 검출용일 수 있다. 또한, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 중합효소, dNTPs 및 버퍼 등을 포함할 수 있고, 상기 증폭 반응 산물을 검출하기 위한 시약은 본 발명의 분자비콘 서열 내에 포함된 DNA 기반 효소(DNAzyme)의 촉매 및 기질을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

- [0034] 본 발명은 또한, 상기 리스테리아속 균 또는 리스테리아 모노사이토게네스 검출용 LAMP 조성물을 이용한 리스테리아속 균의 검출 방법을 제공한다.
- [0035] 본 발명에 따른 검출 방법은 구체적으로는,
- [0036] 리스테리아균 감염 의심 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [0037] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 리스테리아속 균 또는 리스테리아 모노사이토게네스 검출용 LAMP 조성물을 이용하여 등은 증폭(isothermal amplification) 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0038] 상기 등은 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0039] 본 발명의 검출 방법에 있어서, 상기 LAMP 조성물 및 리스테리아속 균은 전술한 것과 같다.
- [0040] 본 발명의 일 구현 예에 따른 리스테리아속 균의 검출 방법에 있어서, 서열번호 1의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 3의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 프라이머 세트;와 서열번호 5의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 분자비콘(molecular beacon);을 포함하는 LAMP 조성물을 이용할 경우 리스테리아속 균의 검출이 가능하고, 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 7의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 서열번호 8의 올리고뉴클레오타이드 프라이머; 및 서열번호 9의 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 프라이머 세트;와 서열번호 10의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 분자비콘;을 포함하는 LAMP 조성물을 이용할 경우 리스테리아 모노사이토게네스의 특이적 검출이 가능하다.
- [0041] 본 발명의 리스테리아속 균의 검출 방법은 리스테리아균 감염 의심 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, CTAB 방법을 이용할 수도 있고, Wizard prep 키트(Promega 사)를 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 LAMP 프라이머 세트와 분자비콘을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일 구현 예에 따른 검출 방법에서, 상기 표적 서열을 증폭하는 단계는 60~62℃의 온도 조건에서 수행될 수 있고, 바람직하게는 60℃의 온도일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 표적 서열을 증폭하는 단계에서 분자비콘의 농도는 바람직하게는 2μM일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 표적 서열을 증폭하는 단계에서 등은 증폭 반응 시간은 20~30분일 수 있으며, 바람직하게는 30분일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 비색 분석, 형광 측정, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있고, 바람직하게는 비색(colorimetric) 분석을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 본 발명의 일 구현 예에 따른 리스테리아속 균의 검출 방법은, 등은 증폭 반응 종료 후 반응 용액에 헤민(hemin)을 첨가하여, 유리(free) 분자비콘 서열의 HRPzyme 서열과 헤민이 결합하여 G-quadruplex/hemin 복합체를 형성하도록 유도한 후, 과산화수소(H₂O₂)와 TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)를 넣어 반응시킨 후, 발색 반응 종료 시약(황산 또는 염산)을 첨가하여 반응을 종료하게 한다. 반응 종료 후의 용액 내의 흡광도는 당업계의 공지된 기술을 통해 측정할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서는 양성 시료가 포함된 경우 LAMP 증폭산물에 분자비콘이 혼성화되어, 반응물 내 유리하는 분자비콘이 아예 없거나 극히 소량으로 존재하게 되므로, 헤민과 G-quadruplex를 형성하지 않거나, 형성된 G-quadruplex의 양이 적으며, 음성 시료가 포함된 경우 LAMP 증폭산물에 분자비콘이 혼성화되지 않기 때문에, 반응물 내에

분자비콘이 유리상태로 존재하여 해민과 반응하여 G-quadruplex를 형성하게 된다. 따라서, TMB 등과 같은 기질 용액을 첨가하면, 음성 시료에서는 형성된 G-quadruplex가 기질과 반응하여 강한 비색 반응을 나타내며, 양성 시료에서는 약한 비색 반응 또는 비색 반응이 나타나지 않아, 음성 시료에 비해 발색의 정도가 낮게 확인된다. 본 발명의 방법은 LAMP 반응에서 문제가 되는 위양성(false positive) 문제를 해결하여 검출의 정확도를 향상시킨 방법이다.

[0046] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 재료 및 방법

[0048] 사용균주

[0049] 본 발명에서는 생물자원센터(KCTC) 또는 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받은 리스테리아속 균종인 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 리스테리아 이바노비(*L. ivanovii*), 리스테리아 세에리게리(*L. seeligeri*), 리스테리아 웰쉬메리(*L. welshimeri*), 리스테리아 인노쿠아(*L. innocua*) 또는 리스테리아 그레이(*L. grayi*)를 이용하였다. 또한, 본 발명의 검출 특이성을 확인하기 위하여 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*; KCTC 7464), 대장균(*Escherichia coli*; KCCM 40405), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella Typhimurium*; ATCC 19585), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*; ATCC 14458) 및 비브리오 파라해모리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*; KCTC 2471)를 분양받아 실험에 사용하였다.

[0050] 시약 및 기기

[0051] DNA 증폭은 T100™ Thermal Cycler(Bio-Rad, 미국)를 사용하였고, 아가로스 겔은 아가로스 LE(iNtRON, 한국)를 사용하였으며, 전기영동장치는 Mupid-α(Advance, 일본)를 이용하였다. 증폭산물의 비색반응은 1-Step™ Ultra TMB-ELISA (Thermo, 미국)와 30% 과산화수소(DUKSAN, 한국) 및 2M 황산(Thermo)을 사용하였다. 또한, 아가로스 겔의 이미지는 Fusion FX(VILBER LOURMAT, 독일)로 촬영하였고, 흡광도는 SPARK 10M (TECAN, 스위스)을 사용하여 450nm에서 측정하였다.

[0052] 배지 및 DNA 분리

[0053] 리스테리아속 균은 Baird-parker agar base(BPA, OXOID, 영국)에 도말하여 형성된 단일 콜로니를 10% 염화나트륨이 포함된 Tryptic soy broth(TSB) 배지에 접종하고 37℃에서 18시간 진탕배양한 후 사용하였다. DNA의 분리는 상기 배양한 리스테리아속 균의 배양액을 Labopass™ Genomic DNA Isolation 키트(Cosmo genetech, 한국)를 이용하여 공급자가 제시한 방법에 따라 DNA를 분리하였다.

[0054] LAMP 프라이머 세트 및 분자비콘(molecular beacon) 디자인

[0055] 리스테리아속 균에 특이적인 *ssrA* 유전자(리스테리아 모노사이토게네스(GenBank accessions AF440348, AF440347, AF440346, AF440345, AF440344, AF440343); 리스테리아 이바노비(AF440342); 리스테리아 세에리게리(AF440350, FN557490); 리스테리아 웰쉬메리(AF440351, AM263198); 리스테리아 인노쿠아(AF440341, AF440340, AF440339, AF440338, AF440337); 리스테리아 그레이(AF440349, AF440336)) 또는 리스테리아 모노사이토게네스에 특이적인 용혈소(hemolysin) 유전자(CFSAN 008100 chromosome, complete genome 참고)의 염기서열을 사용하여 Primer Explorer V4 software program and Primer3 Input(version 0.4.0, DNA STAR, Inc., Madison, WI, 미국) 프로그램을 이용하여 LAMP용 프라이머 세트(FIP, BIP, F3 및 B3)와 분자비콘을 설계하였으며, 설계된 프라이머 세트 및 분자비콘은 Xenotech사(한국)에 의뢰하여 합성하였다(표 1).

표 1

[0056] LAMP 프라이머 세트 및 분자비콘 서열 정보

For <i>Listeria</i> Species	
F3	5'-ACGGTAAGGGTCTCACTT-3' (서열번호 1)
B3	5'-AGACAAGAAGGAGGGTCC-3' (서열번호 2)
FIP	5'-CCATTCAGCTAGTCTGATTAAGCTCTTTTGGGCTACACTAAATAATCTCC-3' (서열번호 3)
BIP	5'-CTGTTACCGGGCTGATGTTTATTTTATCGGCACTTAAATATCTACGAG-3' (서열번호 4)
molecular beacon	5'-CCGTCTGGGGGGGTAGGGCGGGTTGGGTTTCAGACTAGC-3' (서열번호 5)
For <i>Listeria Monocytogenes</i>	

F3	5'-TGC GCAACAACTGAAGC-3' (서열번호 6)
B3	5'-GCTTTTACGAGACCTGG-3' (서열번호 7)
FIP	5'-CGTGTTCCTTTTCGATTGGCGTCTTTTTCATCCATGGCACCACC-3' (서열번호 8)
BIP	5'-CCACGGAGATGCAGTGACAAATGTTTGGATTCTTCTTTTCTCCACAAC-3' (서열번호 9)
molecular beacon	5'-CCAGCATCTCGGGTAGGGCGGGTGGGTCGCCAATCGA-3' (서열번호 10)

[0057] **LAMP 반응 조건**

[0058] 등온비색 PCR법은 Notomi 등(Nucleic Acids Research, 2000, 28(12):E63)의 방법을 이용하여 시행하였으며, 총 반응용액은 반응 튜브당 다음과 같이 제조하였다. 10X 반응 버퍼(20mM Tris-HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 10mM KCl, 2mM MgSO₄, 0.1% Triton[®] X-100, pH 8.8, Enzynomics, 한국) 5.0 μ l, 40 μ M의 내부 프라이머(FIP, BIP)와 10 μ M의 외부 프라이머(F3, B3)가 혼합된 프라이머 혼합물 4.0 μ l, 100 μ M의 molecular beacon 2.0 μ l, 10nM dNTP mix(2.5 mM each, Cosmo, 한국) 8.0 μ l, Bst DNA 중합효소(Large length, Enzynomics) 4.0 μ l와 멸균수를 포함하여 44 μ l가 되도록 혼합하였으며 한 번에 제조하여 분주하였다. 여기에 시료 50 μ g/ml 농도의 DNA 6 μ l를 첨가하여 최종 부피가 50 μ l가 되도록 하였고, 60°C에서 30분 반응하였다.

[0059] **전기영동에 의한 증폭산물 확인**

[0060] 1.0%(w/v) 아가로스 겔을 이용하여 Mupid- α 전기영동 장치로 PCR 산물을 분석하였다. 각 레인에는 증폭산물 5 μ l와 6X loading star(Dyne Bio, 한국) 1 μ l를 섞어서 5 μ l씩 로딩하고 100V에서 25분 동안 전기영동하였다. 그 후에 UV transilluminator 위에 겔을 올려놓고 표적 산물의 증폭여부를 확인하였다.

[0061] **비색법에 의한 증폭산물 확인**

[0062] DMSO(Dimethyl Sulfoxide; Sigma, 미국)을 용매로 한 100 μ M의 헤민(hemin; sigma)을 각 웰에 1 μ l 분주하고 PCR 산물을 10 μ l 첨가한 후, 30% 과산화수소 2 μ l와 TMB 용액 1ml을 볼텍싱하여 혼합하고 이를 상기 각 웰에 100 μ l 첨가하고 2분 동안 반응시켰다. 그 후, 반응 종료를 위해 2M 황산을 100 μ l씩 첨가하고, 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0063] **실시예 1. LAMP 프라이머 세트 및 분자비콘을 이용한 리스테리아 균의 검출능 확인**

[0064] 상기 표 1에 제시된 프라이머 세트 및 분자비콘을 이용하여, 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 리스테리아 이바노비(*L. ivanovii*), 리스테리아 세에리게리(*L. seeligeri*), 리스테리아 웰쉬메리(*L. welshimeri*), 리스테리아 인노쿠아(*L. innocua*) 또는 리스테리아 그레이(*L. grayi*)의 검출능을 분석하였다.

[0065] 그 결과, 리스테리아속 균의 *ssrA* 유전자에 특이적인 서열번호 1 내지 4의 LAMP 프라이머 세트 및 서열번호 5의 분자비콘을 이용한 반응 결과, 리스테리아 균을 포함하는 양성 시료에서의 흡광도가 음성 시료보다 낮은 것으로 확인되었으며(도 1B), 등온 반응 산물을 아가로스 겔에 로딩한 결과, 음성 시료에서는 반응 산물이 확인되지 않음을 알 수 있었다(도 1C).

[0066] 또한, 리스테리아 모노사이토게네스에 특이적인 서열번호 6 내지 9의 LAMP 프라이머 세트 및 서열번호 10의 분자비콘을 이용한 반응 결과에서도 양성 시료의 흡광도가 음성 시료보다 낮은 것으로 확인되었으며, 아가로스 겔 로딩 결과에서도 음성 시료에서는 반응 산물이 확인되지 않는 것으로 확인되었다(도 2).

[0067] **실시예 2. LAMP 프라이머 세트 및 분자비콘의 민감도 및 특이도 분석**

[0068] 상기 실시예 1을 통해 리스테리아 균의 검출이 확인된 서열번호 1 내지 4의 LAMP 프라이머 세트 및 서열번호 5의 분자비콘; 또는 리스테리아 모노사이토게네스 균의 특이 검출이 확인된 서열번호 6 내지 9의 LAMP 프라이머 세트 및 서열번호 10의 분자비콘;을 이용하여 리스테리아 속 균에 대한 검출 민감도(sensitivity) 및 특이도(specificity)를 분석하였다.

[0069] 민감도 확인을 위해 10⁷~10⁰ CFU/ml 수준의 균 배양액으로부터 게놈 DNA를 추출하여 LAMP 반응을 수행하였다. 그 결과, 10⁰ CFU/ml의 DNA 시료에 대해서도 음성 대조군과 비교하여 뚜렷한 증폭신호를 확인할 수 있었다(도 3). 또한, 본 발명의 검출 특이성을 확인하기 위하여 리스테리아속 균종인 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*), 리스테리아 이바노비(*L. ivanovii*), 리스테리아 세에리게리(*L. seeligeri*), 리스테리아 웰쉬

메리(*L. welshimeri*), 리스테리아 인노쿠아(*L. innocua*) 및 리스테리아 그레이(*L. grayi*)와 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*; KCTC 7464), 대장균(*Escherichia coli*; KCCM 40405), 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella Typhimurium*; ATCC 19585), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*; ATCC 14458) 및 비브리오 파라헤모리틱스(*Vibrio parahaemolyticus*; KCTC 2471)에 대한 DNA 시료를 준비하고, LAMP 반응을 수행하였다. 그 결과, 리스테리아 모노사이토제네스를 표적으로 하는 서열번호 6 내지 9 및 서열번호 10의 분자비콘을 이용한 분석법의 경우 리스테리아 모노사이토제네스 시료에서만 단독으로 열린 비색 반응 결과가 확인되었으며(도 4), 리스테리아 속을 표적으로 하는 서열번호 1 내지 4 및 서열번호 5의 분자비콘을 이용한 분석법의 경우 리스테리아 속 6종의 시료에서만 열린 비색 반응 결과가 확인되어, 특이성이 있음을 확인할 수 있었다(도 5).

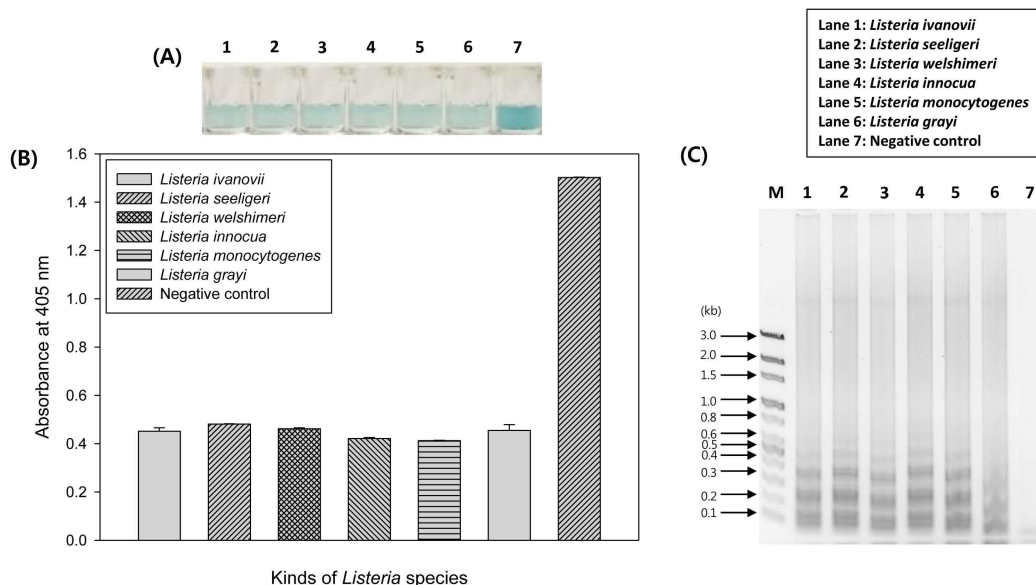
[0070] 실시예 3. 분자비콘의 사용에 따른 위양성(false positive) 분석

[0071] HRPzyme DNA 서열을 포함하는 분자비콘의 사용에 따른 LAMP 반응의 위양성 결과를 분석하였다. 리스테리아속 균주 또는 리스테리아 모노사이토제네스균(양성)과 스타필로코커스 아우레우스(음성)의 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 LAMP용 프라이머 세트를 이용하여 조건 최적화 실험을 수행하던 중, 등은 증폭 반응의 시간이 60분인 조건에서, 최종 증폭 산물에서 위양성이 확인되었다(도 6 및 도 7). 이에 본 발명자들은 해당 시료를 대상으로, 분자비콘을 이용한 비색반응을 통해 결과 해석의 보정이 가능한지 확인하였다.

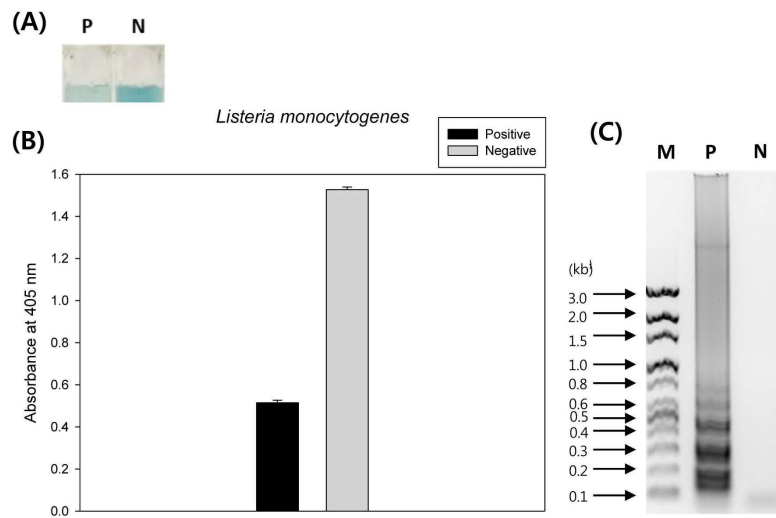
[0072] 그 결과, 아가로스 겔 로딩 결과를 통해서서는 정확한 검출이 불가능하였던 시료가, 분자비콘을 이용한 비색반응 결과를 통해서서는 발색 정도의 명확한 차이를 통해 양성과 음성 시료가 구분될 수 있음을 확인할 수 있었다(도 6 및 도 7). 즉, LAMP 반응 산물의 전기영동 결과에서는 표적 미생물의 정확한 판별이 불가능하였으나, 비색 반응을 통해서서는 음성 시료의 강한 발색과 대비되는 약한 발색 수준의 양성 시료에 대한 판별이 육안으로 용이하게 구별될 수 있음을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 분자비콘을 이용한 본 발명의 LAMP 방법의 위양성 문제를 효과적으로 해결하여 검출 결과의 정확도를 향상시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면

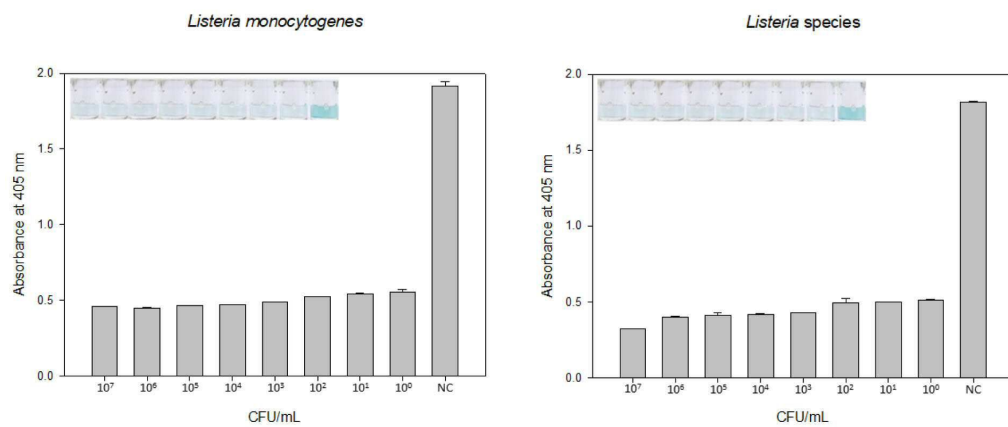
도면1



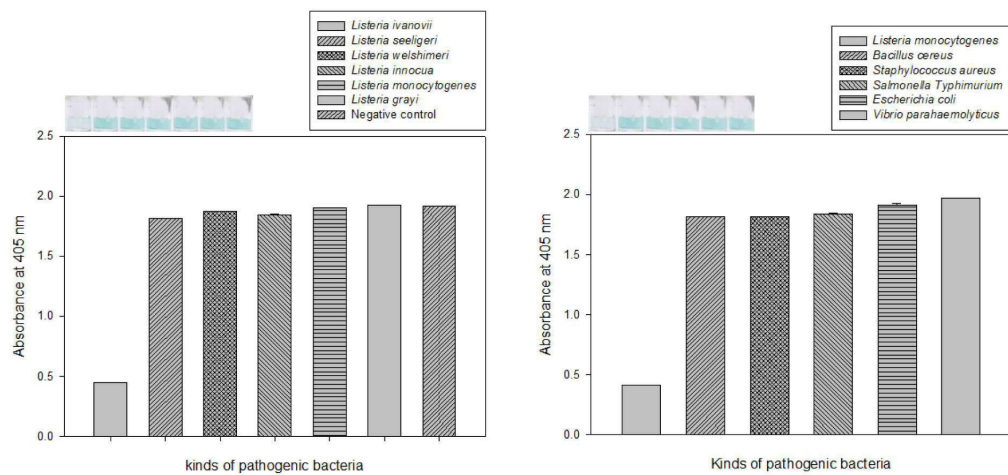
도면2



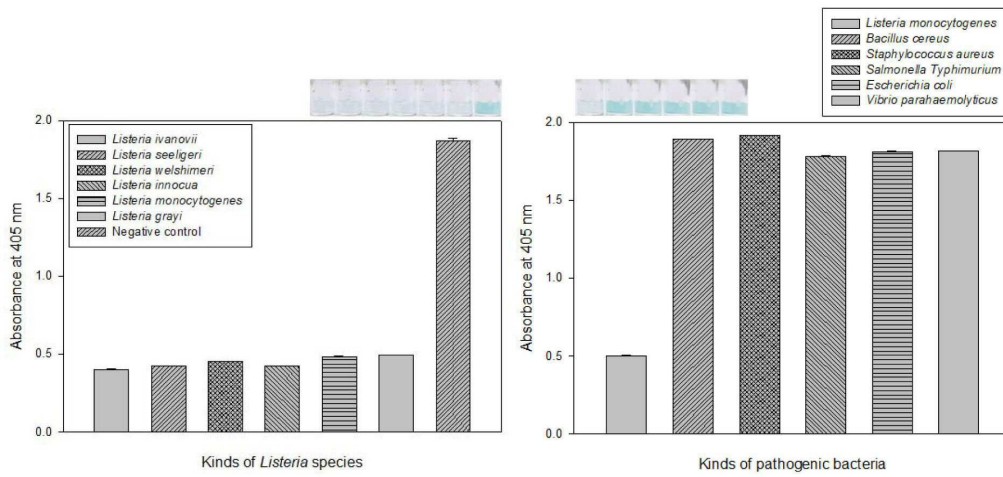
도면3



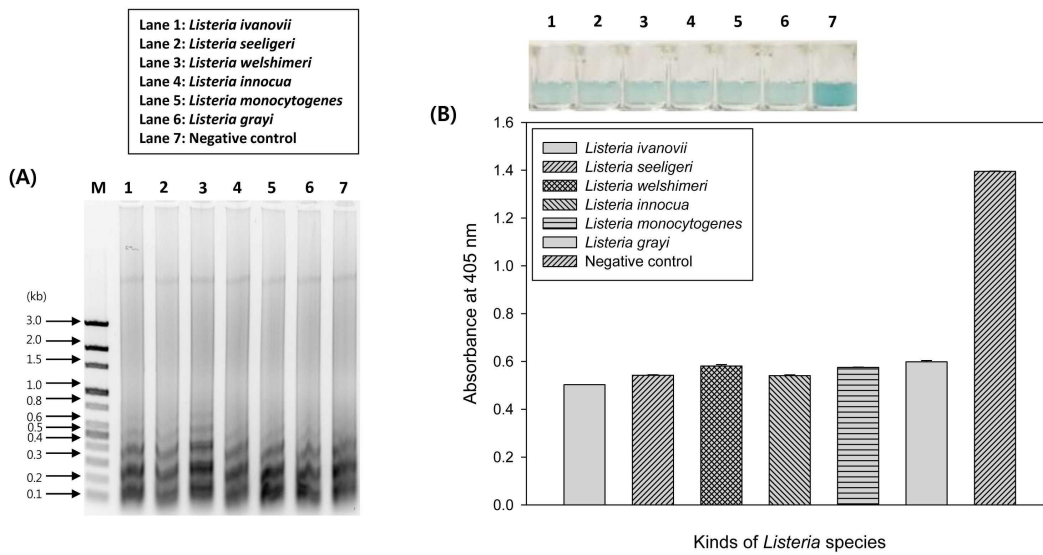
도면4



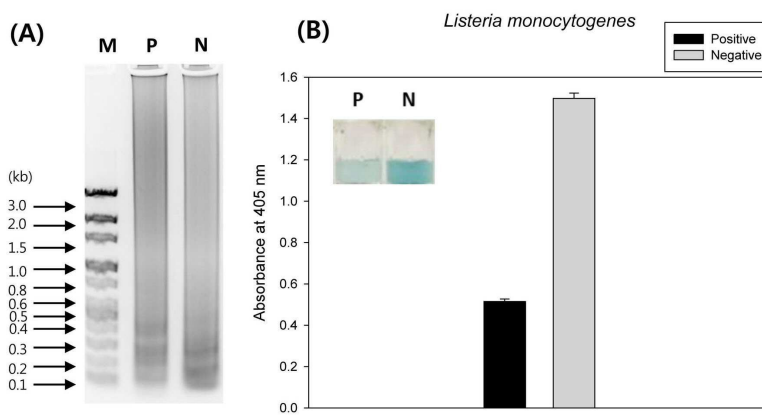
도면5



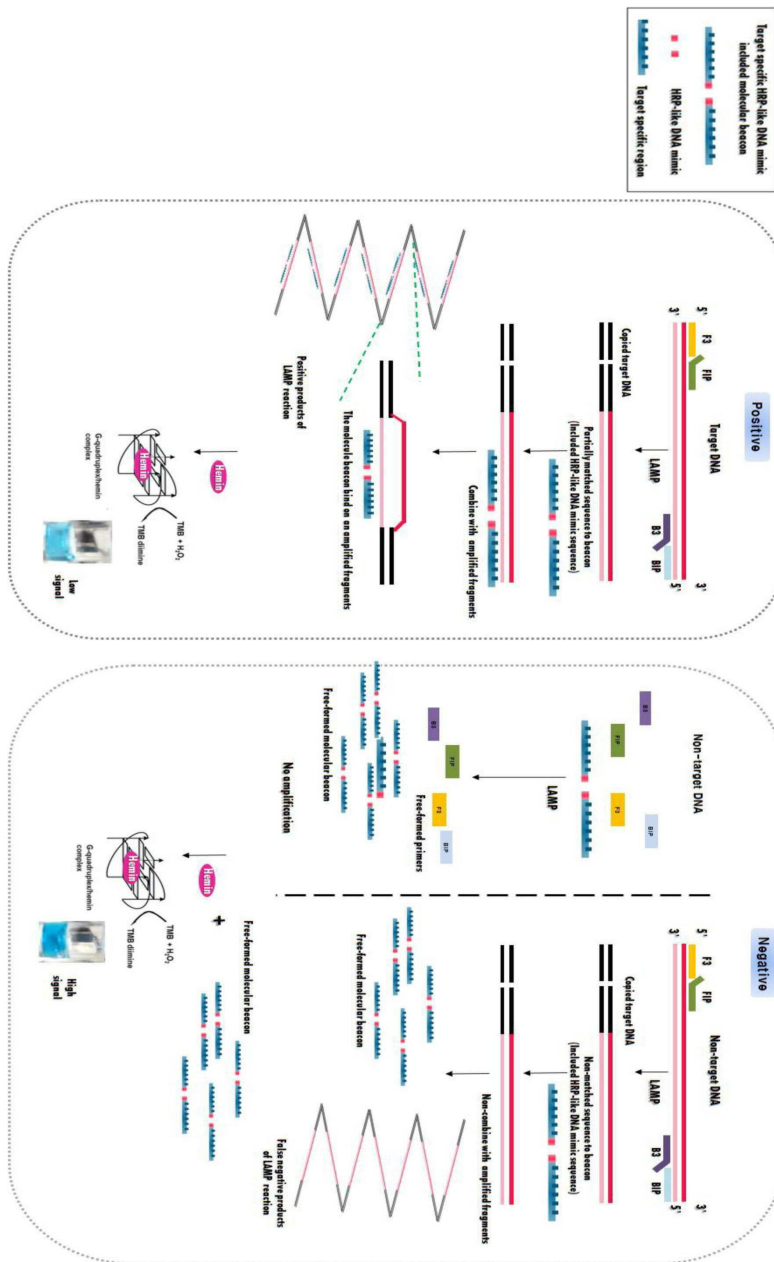
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Composition for colorimetric isothermal detection comprising molecular beacon and uses thereof
- <130> PN19128
- <160> 10
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 18

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> F3 primer
 <400> 1
 acggttaaggg tctcactt 18
 <210> 2
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B3 primer
 <400> 2
 agacaagaag gaggggtcc 18
 <210> 3
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FIP primer
 <400> 3
 ccattcagct agtctgatta agctcttttt gggtacact aaataatctc c 51
 <210> 4
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> BIP primer
 <400> 4
 ctgttaccgg gctgatgttt attttttattc ggcaactaaa tatctacgag 50
 <210> 5
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> molecular beacon
 <400> 5
 ccgtctgggg gggtaggcg gggtgggttc agactagc 38

<210>	6	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	F3 primer	
<400>	6	
	tgcgcaacaa actgaagc	18
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	B3 primer	
<400>	7	
	gcttttacga gagcacctgg	20
<210>	8	
<211>	46	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	FIP primer	
<400>	8	
	cgtgtttctt ttcgattggc gtcttttttt catccatggc accacc	46
<210>	9	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	BIP primer	
<400>	9	
	ccacggagat gcagtgacaa atgttttgga tttcttcttt ttctccacaa c	51
<210>	10	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	molecular beacon	
<400>	10	

ccagcatctc gggtagggcg ggttgggtcg ccaatcga

38