

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0115004 (43) 공개일자 2012년10월17일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12N 15/11</i> (2006.01) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>C12N 15/70</i> (2006.01)	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)	
(21) 출원번호 10-2011-0032897	(72) 발명자 김태관 서울특별시 강북구 인수봉로72길 4, 107동 1402호 (수유동, 극동아파트)	
(22) 출원일자 2011년04월08일 심사청구일자 2012년05월10일	조경숙 서울특별시 서초구 동광로1길 87, 501호 (방배동, 서래빌딩) 이태우 서울시 노원구 월계3동 18번지 한진 한화 그랑빌 아파트 101동 203호	
	(74) 대리인 손민	

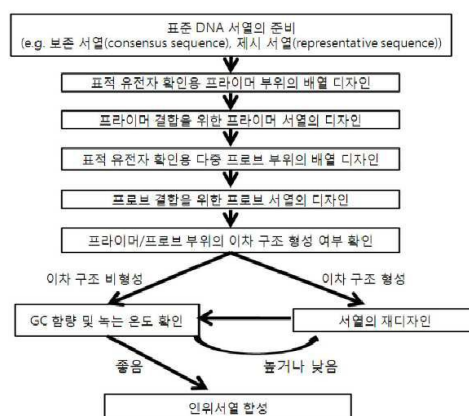
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **표준시료로 인위적 염기서열을 이용하는 정량적 실시간 PCR 및 이를 이용한 미생물의 정량 방법**

(57) 요약

본 발명은 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자에 특이적인 하나 이상의 프라이머 및/또는 프로브 부위를 포함하는 인위적 염기서열, 상기 인위적 염기서열을 제조하는 방법, 표준시료로 상기 인위적 염기서열을 이용하는 정량적 실시간 PCR을 이용하여 미생물을 절대 정량하는 방법, 및 상기 인위적 염기서열을 포함하는 미생물의 절대 정량용 키트를 제공하는 것이다. 본 발명에 따른 표준시료로 인위적 염기서열을 이용하는 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR) 및 이를 이용한 미생물의 정량방법은 다양한 미생물을 검출 및 정량하는데 사용되어질 수 있으며, 다수의 프라이머/프로브의 상보적인 염기서열을 한 개의 인위적 염기서열에 넣어 제작하기 때문에, 각각의 필요한 표준시료 수만큼의 인위적 염기서열을 제작할 필요가 없다는 특징을 갖는다. 따라서, 한 개의 표준시료를 이용하여 다양한 종류의 DNA 정량이 가능하여 인위적 염기서열 제작 시 필요한 비용을 효과적으로 절감할 수 있다는 장점을 갖는다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100018436

부처명 교육과학기술부

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 메타게놈 정보 활용 non-CO₂ 온실가스 및 악취 동시 저감 기술

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2010.06.01 ~ 2011.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

정량적 실시간 PCR의 검량선 작성을 위한 표준시료로 사용되는, 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자에 특이적인 하나 이상의 프라이머 및/또는 프로브 부위를 포함하는 인위적 염기서열.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 인위적 염기서열이 양 말단에 한 쌍의 프라이머 부위를 포함하고 그 내부에 하나 이상의 프로브 부위를 포함하는 것인 인위적 염기서열.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 인위적 염기서열이 양 말단 및 서열 내부에 랜덤하게 한 쌍 이상의 프라이머 부위 및 하나 이상의 프로브 부위를 포함하는 것인 인위적 염기서열.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 인위적 염기서열이 서열번호: 5 및 6의 프라이머 쌍과, 서열번호: 7 내지 16의 프로브 부위로부터 선택되는 하나 이상의 프로브 부위를 포함하는 것인 인위적 염기서열.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 인위적 염기서열이 양 말단에 서열번호: 5 및 6의 프라이머 쌍을 포함하고, 그 내부에 서열번호: 7의 프로브, 서열번호: 8의 프로브, 서열번호: 9의 프로브, 서열번호: 13의 프로브, 서열번호: 14의 프로브 및 서열번호: 15의 프로브 부위를 포함하는 것인 인위적 염기서열.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 인위적 염기서열이 서열번호: 1의 염기서열을 갖는 것인 인위적 염기서열.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 인위적 염기서열이 양 말단에 서열번호: 5 및 6의 프라이머 쌍을 포함하고, 그 내부에 서열번호: 10의 프로브, 서열번호: 11의 프로브, 서열번호: 12의 프로브 및 서열번호: 16의 프로브 부위를 포함하는 것인 인위적 염기서열.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 인위적 염기서열이 서열번호: 2의 염기서열을 갖는 것인 인위적 염기서열.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 인위적 염기서열이 서열번호: 17 및 18의 프라이머 쌍과, 서열번호: 19 내지 22의 프로브 부위로부터 선택되는 하나 이상의 프로브 부위를 포함하는 것인 인위적 염기서열.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 인위적 염기서열이 양 말단에 서열번호: 17 및 18의 프라이머 쌍을 포함하고, 그 내부에 서열번호: 19의 프로브, 서열번호: 20의 프로브, 서열번호: 21의 프로브 및 서열번호: 22의 프로브 부위를 포함하는 것인 인위적 염기서열.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 인위적 염기서열이 서열번호: 3의 염기서열을 갖는 것인 인위적 염기서열.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 인위적 염기서열이 서열번호: 23 및 24의 프라이머 쌍, 서열번호: 25 및 26의 프라이머 쌍 및 서열번호: 27 및 28의 프라이머 쌍으로부터 선택되는 하나 이상의 프라이머 쌍과, 서열번호: 29의 프로브 부위를 포함하는 것인 인위적 염기서열.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 인위적 염기서열이 양 말단 및 서열 내부에 서열번호: 23 및 24의 프라이머 쌍, 서열번호: 25 및 26의 프라이머 쌍 및 서열번호: 27 및 28의 프라이머 쌍과, 서열번호: 29의 프로브 부위를 랜덤하게 포함하는 것인 인위적 염기서열.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 인위적 염기서열이 서열번호: 4로 기재되는 염기서열을 갖는 것인 인위적 염기서열.

청구항 15

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 인위적 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 재조합 벡터.

청구항 16

제15항의 유전자 재조합 벡터로 형질전환된 미생물.

청구항 17

제16항의 형질전환된 미생물로부터 분리, 정제된 인위적 염기서열을 포함하는 플라스미드 벡터.

청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 인위적 염기서열을 표준시료로 이용하여 검량선을 작성하는 단계를 포함하는, 정량적 실시간 PCR을 이용하여 미생물을 절대 정량하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 방법이

- 1) 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자에 특이적인 하나 이상의 프라이머 및/또는 프로브 부위를 포함하는 인위적 염기서열을 제조하는 단계;
- 2) 상기 인위적 염기서열을 표준시료로 하는 정량적 실시간 PCR을 수행하여 검량선을 작성하는 단계;
- 3) 상기 인위적 염기서열에 포함되어 있는 프라이머 및/또는 프로브를 이용하여 시료를 대상으로 정량적 실시간 PCR을 수행하는 단계; 및
- 4) 단계 2)에서 작성된 검량선으로부터 단계 3)에서 검출된 유전자의 복제수를 계산하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 인위적 염기서열을 포함하는 미생물의 절대 정량용 키트.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 표준시료로 인위적 염기서열을 이용하는 정량적 실시간 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 및 이를 이용한 미생물의 정량방법에 관한 것으로서, 구체적으로 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자에 특이적인 하나 이상의 프라이머 및/또는 프로브 부위를 포함하는 인위적 염기서열, 상기 인위적 염기서열을 제조하는 방법, 표준시료로 상기 인위적 염기서열을 이용하는 정량적 실시간 PCR을 이용하여 미생물을

절대 정량하는 방법, 및 상기 인위적 염기서열을 포함하는 미생물의 절대 정량용 키트를 제공하는 것이다.

[0002]

배경 기술

[0003]

중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 시험관 내에서 원하는 DNA 절편(fragment)을 대량으로 합성하는 방법으로, 생체 내에서 일어나는 DNA 복제과정을 시험관 내에서 재현함으로써 한 주기(cycle)가 지날 때마다 이론적으로는 2배의 DNA를 합성한다. 일반적인 PCR은 주로 정성적인 기법으로서 PCR 반응 후의 증폭산물을 아가로오스 겔(agarose gel)에서 분리하여 확인하고, 경우에 따라서는 전기영동 결과를 토대로 증폭산물의 양을 추정할 수 있는데, 이를 종말점(end-point) 정량방법이라 한다. PCR 증폭산물은 이론적으로는 지수함수적(exponential)으로 증가하지만, 실제 시험관 내에서는 다양한 제한 요인의 영향으로 어느 순간 이후에는 증가되지 않는 정체(plateau) 상태를 보인다. 이처럼 최종 PCR 주기 이전에 정체 상태에 도달하면, 실제와 다른 결과를 얻게 된다. 이를 해결하기 위한 방안으로 각 PCR을 지수함수적으로 증가하는 범위 내에서 비교하기 위해 매 시기의 진행상황을 실시간으로 모니터링하는 실시간 PCR(real-time PCR) 방법이 개발되었다(Higuchi R., et al., Nat. Biotechnol. 11: 1026-1030, 1993).

[0004]

DNA 정량기법인 실시간 PCR 방법은 현재 가장 널리 이용되는 분자 생물학적 기법중 하나이다. 실시간 PCR은 열순환기(thermal cycler)와 분광 형광광도계가 일체화된 장치를 이용하여 실시간으로 PCR 증폭산물의 생성과정을 모니터링 함으로써 최초의 시료에 존재하는 표적 DNA 양을 정량하는 방법이다. 미생물 배양에 기초할 수밖에 없었던 기존의 미생물 정성 및 정량방법은 이러한 실시간 PCR 방법을 통해 미생물의 분리 및 배양을 수행하지 않고서도 미생물의 정성 및 정량이 가능하게 되었다.

[0005]

현재 실시간 PCR에 사용되는 검출방법(detection chemistry)은 일반적으로 Sybr Green I을 이용하는 비특이적 방법과 혼성화 프로브(hybridization probe)를 이용하는 특이적 방법으로 나뉜다. Sybr Green I은 이중나선 DNA에 비특이적으로 결합하여 형광을 방출하며 실시간 PCR 기기는 이 형광의 양을 측정하여 DNA의 양을 확인할 수 있다. 혼성화 프로브는 특이적으로 상보적인 염기서열에 혼성화되어 PCR 반응 중에 형광을 방출한다. 예를 들어, 대표적인 혼성화 프로브로서 택맨 프로브(taqman probe, dual labeled fluorogenic probe)는 5'-말단에는 형광 리포터가, 3'-말단에는 소광제(quencher)가 결합되어 있다. 택맨 프로브의 형광 리포터는 소광제와 근접하여 존재하는 경우, 형광이 상쇄되어 검출되지 않는다. 택맨 프로브가 특이적 표적 염기서열에 혼성화되어 PCR 증폭이 진행되면 Taq DNA 폴리머라제의 5'-3' 엑소뉴클레아제 활성에 택맨 프로브가 분해되면서 형광 리포터가 자유롭게 방출되고, 그로 인해 소광제와 멀어지면서 형광을 발산하게 된다. 이를 측정하여 실시간으로 표적 DNA 조각의 생성량을 모니터링 하는 것이다.

[0006]

실시간 PCR 방법은 절대정량(absolute quantification)과 상대정량(relative quantification) 분석으로 구분되는데, 시료 내의 표적 DNA를 정량하기 위해서는 절대정량 분석이 사용되고, 이를 위해서 표준시료의 검량선 작성에 필수적인 요소이다. 표준시료와 미지시료를 대상으로 동시에 정량적 실시간 PCR을 실시하여 표준시료로부터 검량선을 도출한 후, 이 검량선으로부터 미지시료 내 표적 DNA의 양을 정량한다. 이때 표준시료로부터의 검량선(x축, $\log_{10}$ (표준시료)); y축, 역치 주기 수)은 상관지수(R^2)가 1에 가까울수록, 기울기가 -3.33에 가까울수록 이상적이다. 정량적 실시간 PCR 방법에서 사용될 수 있는 프라이머/프로브는 검출하고자 하는 표적 DNA의 염기서열을 통해 용이하게 합성할 수 있다. 그러나, 표준시료의 경우에, 기탁된 미생물이라면 고액이라도 구입이 가능하지만, 구입이 불가능하거나 어떤 환경 내에 존재하는 미생물의 총체적인 계층으로만 존재하는 경우에는 이를 입수하기가 매우 어렵다. 이처럼 표준시료를 이용한 검량선 제작이 불가능하다면 절대정량 분석으로서 정량적 실시간 PCR을 이용하는 것이 불가능하다.

[0007]

이처럼 표준시료의 준비는 정량적 실시간 PCR 방법을 이용하기에 앞서 선결되어야 하지만, 많은 경우 표준시료의 획득에 어려움이 있다. 일례로, 메탄 생성세균과 항생제 내성 유전자의 정성 및 정량을 위한 표준시료의 획득은 매우 힘들다. 메탄 생성세균은 고세균(archaea)에 속하는 절대 혐기미생물로서 다양한 자연 환경에 존재하며 메탄을 생성한다. 그러나, 환경에 존재하는 메탄 생성세균의 정성 및 정량을 위한 연구는 매우 제한적인데, 이는 메탄 생성세균의 분리 및 배양이 매우 힘들고 많은 시간이 요구되며 고가의 장비가 필수적이기 때문이다. 이를 극복하기 위해 최근 분자생물학적 기법이 도입되어 이용되어져 왔다.

[0008]

mcrA(Delta H methyl coenzyme M reductase I alpha subunit) 유전자는 메탄 생성에 필수적인 유전자이며, 계통발생적 연관관계를 잘 반영하기 때문에 분자생물학적 기법의 표적 유전자로서 이용되고 있다. 효율적으로 환

경 내 메탄 생성세균의 군집을 연구하기 위해 메탄 생성세균의 전체 mcrA 유전자와 10개의 분류군(taxon)을 정성 및 정량할 수 있는 프라이머/텍맨 프로브(primer/taqman probe)를 이용한 정량적 실시간 PCR 방법이 보고되었다(Steinberg L.M., et al., Appl. Environ. Microbiol. 75: 4435-4442, 2009). 그러나, 표준시료로서 10개의 분류군을 대표하는 미생물 또는 mcrA 유전자를 획득하기가 매우 힘들거나 불가능하기 때문에 상기 문헌에 보고된 방법을 이용하기는 매우 힘들다.

[0009] 각각의 분석방법의 발전에도 불구하고 환경 시료에 희소하게 존재하는 미생물에 대한 정량/정성분석 및 검출을 위해서는 검량선 작성을 위한 표준시료로 활용할 수 있는 DNA 시료 확보가 필요하다. 그러나, 현재까지 인간이 순수하게 분리하여 배양할 수 있는 미생물의 수는 자연계 전체 미생물의 1% 정도에 불과하다고 알려져 있다(Pace, Science, 276(5313): 734, 1997). 이렇게 배양이 불가능한 미생물 또는 환경에 소수로 존재하는 미생물의 경우에는 이들을 대표하는 표준시료의 입수가 불가능하기 때문에 정량적 실시간 PCR 방법을 적용하는데 한계가 있다.

[0010]

[0011] 이에 본 발명자들은 상기와 같은 종래기술의 한계점을 개선하여 정량하고자 하는 미생물 또는 DNA의 확보 없이 정량적 실시간 PCR을 이용하여 미생물의 정성/정량분석이 가능한 방법을 개발하기 위해 예의 연구 노력한 결과, 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자에 특이적인 하나 이상의 프라이머 및/또는 프로브 부위를 포함하는 인위적 염기서열을 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 검량선을 제작하는 방법을 개발하였고, 이 검량선을 이용하여 미지의 시료에 함유된 다양한 미생물을 효율적으로 검출 및 정량하는 방법을 확립함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0012]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자에 특이적인 하나 이상의 프라이머 및/또는 프로브 부위를 포함하는 인위적 염기서열을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 인위적 염기서열을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 표준시료로 상기 인위적 염기서열을 이용하는 정량적 실시간 PCR을 이용하여 미생물을 절대 정량하는 방법을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 인위적 염기서열을 포함하는 미생물의 절대 정량용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명의 하나의 양태로서, 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자에 특이적인 하나 이상의 프라이머 및/또는 프로브 부위를 포함하는 인위적 염기서열을 제공하는 제공한다.

[0018] 일반적으로 미생물의 검출/정량분석을 제한하는 요인 중 하나로서, 분석용 표준시료가 충분히 공급되지 못하는 문제점을 들 수 있다. 각각의 특정 계통의 미생물만을 포함하고, 그 이외의 계통을 일체 포함하지 않은 순수한 표준시료의 입수는 매우 곤란하다. 실제로 앞서 언급한 선행하는 정량방법에 관한 보고에서는 분석 대상이 모두 표준시료를 입수할 수 있는 계통에 한정되어 있다. 즉, 표준시료의 입수가능성이 상기 정량방법의 적용가능 범위를 한정하는 결과를 초래하고 있다. 또한, 모든 특정 계통의 미생물에 대한 표준시료가 제공되었다고 해도, 계통 내 미생물간의 다양성을 감안할 수 있는 수단을 고안하지 않는 한, 실용적인 미생물의 정량방법이라고 판단할 수는 없다.

[0019] 이에 본 발명은 다양한 미생물을 계통간의 다양성을 감안하기 위해 다수의 프라이머/프로브 부위를 포함하도록 설계된 인위적 인위적 염기서열을 정량적 실시간 PCR의 검량선 작성을 위한 표준시료로 제공하는데 특징이 있다.

[0020] 본 발명에 따른 인위적 염기서열은 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자에 특이적인 하나 이상의 프라이머 및/또는 프로브 부위를 동일 분자 상에 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다. 일반적으로 검출 또는

정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자의 염기서열은 대부분 공지되어 있어 문헌으로부터 용이하게 입수할 수 있다.

[0021] 본 발명에서 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3'hydroxyl group)을 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 작용하는 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형의 복사를 위한 시작지점으로서 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다. 본 발명에 적합한 프라이머 쌍은 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 임의의 유전자를 특이적으로 인식하여 증폭시킬 수 있는 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용될 수 있는데, 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 서열번호: 5 및 6, 서열번호: 17 및 18, 서열번호: 23 및 24, 서열번호: 25 및 26, 및 서열번호: 27 및 29로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하다.

[0022] 본 발명에서 용어, "프로브"는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 것은 수개 염기 내지 길게는 수백 개 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미한다. 프로브는 올리고 뉴클레오타이드 프로브, 단일가닥 DNA 프로브, 이중가닥 DNA 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 임의의 유전자에 대해 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시한 후, 혼성화 여부를 통해 시료 내 미생물의 절대 정량을 예측할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해분야에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다. 본 발명에 적합한 프라이머 쌍은 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 임의의 유전자에 특이적으로 혼성화할 수 있는 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용될 수 있는데, 특별히 이에 제한되는 것은 아니나, 서열번호: 7 내지 16, 서열번호: 19 내지 22 및 서열번호: 28로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하다.

[0023] 본 발명의 일 실시형태에서는, 메탄 생성세균(methanogen)을 정량하고 이들의 군집 구조를 분석하기 위한 인위적 염기서열로서, 문헌(Steinberg L.M., et al., Appl. Environ. Microbiol. 75: 4435-4442, 2009)에 보고된 메탄 생성세균 특이적 프라이머/프로브의 염기서열 정보를 이용하였다. 구체적으로, 메타노박테리움 써모오토트로피쿰(*Methanobacterium thermoautotrophicum*)의 mcrA(delta H methyl coenzyme M reductase I alpha subunit, GenBank accession no. U10036) 유전자의 염기서열 정보를 기준으로 인위적 염기서열을 설계하였다. 먼저, 정방향 및 역방향 프라이머의 위치를 기준 염기서열 위에 결정하였다. 분류군을 대표하는 염기서열을 기준 염기서열과 레이저진 소프트웨어 패키지(Lasergene software package, DNASTAR, Madison, US)를 이용하여 비교(aligned)하였다. 비교된 대표 염기서열의 프로브 위치에 대응하는 기준 염기서열의 위치를 그 프로브의 대응 부위로 결정하였다. 이때, 분류군을 대표하는 프로브 부위가 중첩되지 않으면서 대응하는 부위에 혼성화할 수 있도록 조작하여 총 11개 분류군의 메탄 생성세균을 정량할 수 있는 서열번호: 1 및 2의 염기서열을 갖는 인위적 염기서열을 제작하였다.

[0024] 서열번호: 1의 염기서열을 갖는 인위적 염기서열은 양 말단에 모든 메탄 생성세균을 검출할 수 있는 서열번호: 5 및 6의 프라이머 쌍(m1as 및 mcrA-rev)을 포함하고; 그 내부에 메타노박테이라세아에(*Methanobacteriaceae*) mcrA 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 서열번호: 7의 프로브(mbac-mcrA); 메타노박테이라세아에 mcrT 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 서열번호: 8의 프로브(mrtA); 메타노코르퍼스 쿨라세아에(*Methanocorpusculaceae*)를 특이적으로 검출할 수 있는 서열번호: 9의 프로브(mcp); 비배양 MCR-2 그룹을 특이적으로 검출할 수 있는 서열번호: 13의 프로브(MCR-2b); 비배양 Fen 무리 그룹을 특이적으로 검출할 수 있는 서열번호: 14의 프로브(Fen); 및 메타노사르시나(*Methanosarcina*)를 특이적으로 검출할 수 있는 서열번호: 15의 프로브(msar) 부위를 포함한다.

[0025] 또한, 서열번호: 2의 염기서열을 갖는 인위적 염기서열은 양 말단에 모든 메탄 생성세균을 검출할 수 있는 서열번호: 5 및 6의 프라이머 쌍(m1as 및 mcrA-rev)을 포함하고; 그 내부에 메타노스피릴라세아에(*Methanospirillaceae*)를 특이적으로 검출할 수 있는 서열번호: 10의 프로브(msp); 비배양(uncultured) MCR-7 그룹을 특이적으로 검출할 수 있는 서열번호: 11의 프로브(MCR-7); 비배양 MCR-2 그룹을 특이적으로 검출할 수 있는 서열번호: 12의 프로브(MCR-2a); 및 메타노사에타세아에(*Methanosaetaceae*)를 특이적으로 검출할 수 있는 서열번호: 16의 프로브(msa) 부위를 포함한다.

[0026] 본 발명의 다른 실시형태에서는, 기질확장형 β -락타메이즈(extended spectrum beta-lactamase, ESBL)의 한 종류인 CTX-M 타입의 항생제 내성 유전자를 정량하기 위한 인위적 염기서열로서, 문헌(Birkett C.I., et al., J. Med. Microbiol. 56: 52-55, 2007)에 보고된 프라이머/프로브의 염기서열 정보를 이용하였다. 구체적으로, 기준

에 알려진 CTX-M 유전자 염기서열의 보존적 염기서열을 기준으로 인위적 염기서열을 제작하였다. 기존의 염기서열은 다음과 같다: X92506(blaCTX-M-1), X92507(blaCTX-M-2), AF550415(blaCTX-M-3), AJ005044(blaCTX-M-5), AJ005045(blaCTX-M-7), AF189721(blaCTX-M-8), D89862(blaCTX-M-9), AF255298(blaCTX-M-10), AJ310929(blaCTX-M-11), AY571969(blaCTX-M-12), AF252622(blaCTX-M-14), AY463958(blaCTX-M-15), AF325133(blaCTX-M-18), AF518567(blaCTX-M-25), AY157676(blaCTX-M-26) 및 AF501233(blaKLUg-1). 레이저진 소프트웨어 패키지(DNASTAR, Madison, US)를 이용하여 상기 염기서열을 비교 정렬하고, 이로부터 확인된 보존적 염기서열을 인위적 염기서열의 제작을 위한 기준 염기서열로 이용하였다. 대표 염기서열(위에 열거된 기존의 염기서열 중 하나)을 기준 염기서열에 비교한 후 대표 염기서열의 프로브 부위에 대응하는 기준 염기서열의 위치를 결정하였다. 프로브에 대응된 위치에 DNA 염기서열을 변화시켜 프로브가 적합하게 혼성화할 수 있도록 조작하여 서열번호: 3의 염기서열을 갖는 인위적 염기서열을 제작하였다.

[0027] 서열번호: 3의 염기서열을 갖는 인위적 염기서열은 양 말단에 CTM-X 타입을 검출할 수 있는 서열번호: 17 및 18의 프라이머 쌍(CTM-X forward 및 reverse)을 포함하고; 그 내부에 CTM-X 타입 1을 특이적으로 검출할 수 있는 서열번호: 19의 프로브(CTM-X-1); CTM-X 타입 2를 특이적으로 검출할 수 있는 서열번호: 20의 프로브(CTM-X-2); CTM-X 타입 9를 특이적으로 검출할 수 있는 서열번호: 21의 프로브(CTM-X-9); 및 CTM-X 타입 1을 제외한 CTM-X 타입을 특이적으로 검출할 수 있는 서열번호: 22의 프로브(CTM-X) 부위를 포함한다.

[0028] 본 발명의 또 다른 실시형태에서는, ESBL 종류인 TEM, OXA 및 SHV 타입의 항생제 내성 유전자를 정량하기 위한 인위적 염기서열로서, 문헌(Knapp C.W., et al., Environ. Sci. Technol. 44; 580-587, 2010)에 보고된 프라이머/프로브의 염기서열 정보를 이용하였다. 인위적 염기서열을 제작하기 위해 위의 방법과 달리 각각의 목적으로 하는 염기서열을 순차적으로 배열하였다. 구체적으로, TEM 타입의 항생제 내성 유전자를 정량하기 위해서 서열번호: 23의 BlaTEM-F와 서열번호: 24의 BlaTEM-R의 프라이머 쌍을 이용하였다. SHV 타입의 항생제 내성 유전자를 정량하기 위해서 서열번호: 25의 BlaSHV2-F와 서열번호: 26의 BlaSHV2-R의 프라이머 쌍을 사용하였다. OXA 타입의 항생제 내성 유전자를 정량하기 위해서 서열번호: 27의 blaOXA1-F와 서열번호: 28의 blaOXA1-R의 프라이머 쌍 및 서열번호: 29의 OXA-택맨 프로브를 사용하였다. TEM 타입(AY538698), OXA 타입(ay008291 및 j02967의 보존적 염기서열) 및 SHV 타입(EU280315)의 염기서열에서 상 프라이머 쌍이 증폭시키는 DNA 조각(fragment)의 염기서열을 횡으로 연결시켜 서열번호: 4의 염기서열을 갖는 인위적 염기서열을 제작하였다.

[0029] 본 발명의 다른 하나의 양태로서, 상기 인위적 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 재조합 벡터를 제공한다.

[0030] 본 발명에서 용어, "벡터"란 적당한 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현할 수 있는 벡터로서, 핵산 삽입물이 일정한 복제 수로 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 핵산 제작물을 의미한다.

[0031] 본 발명의 재조합 벡터는 본 발명의 핵산을 적당한 벡터에 연결(삽입)하여 획득할 수 있다. 본 발명의 핵산이 삽입될 벡터는 그것이 숙주 안에서 복제될 수 있는 한 특별히 제한되지는 않는다. 예를 들어, 플라스미드 DNA, 파아지 DNA 등이 사용될 수 있다. 플라스미드 DNA의 구체적인 예로는 pUC18, pIDTSAMRT-AMP 같은 상업적인 플라스미드를 포함한다. 본 발명에 사용될 수 있는 플라스미드의 다른 예로는 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)-유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5) 및 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50)가 있다. 파아지 DNA의 구체적인 예로는 λ -파아지(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λ gt10, λ gt11 및 λ ZAP)가 있다. 또한, 리트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus) 또는 백신시아 바이러스(vaccinia virus)와 같은 동물 바이러스, 배큘로바이러스(baculovirus)와 같은 곤충 바이러스가 또한 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 핵산은 벡터에 작동 가능하게 연결되는 것이 바람직하다. 본 발명의 벡터는 본 발명의 핵산 외에 인핸서(enhancer)와 같은 시스 요소(cis element), 스플라이싱 시그널(splicing signal), 폴리 A 추가 시그널(poly A addition signal), 선택 마커(selection marker), 라이보솜 결합 서열(ribosome binding sequence, SD sequence) 등을 추가로 포함할 수 있다. 선택 마커의 예로, 클로람페니콜 저항 핵산, 암피실린 저항 핵산, 디하이드로폴레이트 환원효소(dihydrofolate reductase), 네오마이신 저항 핵산 등이 사용될 수 있으나, 상기 예들에 의해 작동 가능하도록 연결되는 추가적 구성요소가 제한되는 것은 아니다.

[0033] 본 발명의 일실시예에 있어, 다수의 프로브를 함유한 인위적 염기서열을 정량적 실시간 PCR의 표준시료를 세포 내로 형질 전환하기 위해 상기 인위적 염기서열 1 및 2(서열번호: 1 및 2)를 pUC18 벡터에 클로닝하고, 인위적

염기서열 3 및 4(서열번호: 3 및 4)를 pIDTSAMRT-AMP 벡터에 클로닝한 재조합 유전자 벡터를 제조하였다.

- [0034] 본 발명의 다른 하나의 양태로서, 유전자 재조합 벡터로 형질전환된 것을 특징으로 하는 미생물을 제공한다. 또한, 상기 형질전환된 미생물로부터 얻어진 것을 특징으로 하는 플라스미드 벡터를 제공한다.
- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어, "형질전환(transformation)"이란 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로써 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다.
- [0036] 본 발명의 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 CaCl_2 침전법, CaCl_2 방법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다.
- [0037] 숙주는 본 발명의 핵산을 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주의 특정한 예로는 대장균(*E. coli*)과 같은 에스케리키아(*Escherichia*)속 세균 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)같은 바실러스(*Bacillus*)속 세균 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)같은 슈도모나스(*Pseudomonas*)속 세균 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*), 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*)같은 효모 동물세포 및 곤충 세포가 있다.
- [0038] 본 발명의 일 실시예에 있어, 다수의 프로브를 함유한 인위적 염기서열을 정량적 실시간 PCR의 표준시료를 생산하기 위해 인위적 염기서열 1 및 2(서열번호: 1 및 2)가 클로닝된 재조합 pUC18 벡터 및 인위적 염기서열 3 및 4(서열번호: 3 및 4)가 클로닝된 재조합 pIDTSAMRT-AMP 벡터를 *E. coli*(HIT competent cell, Real Biotech, Taipei, Taiwan)에 형질전환하였고, 그로부터 얻어진 플라스미드 벡터를 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 사용되어질 수 있음을 확인하였다.
- [0039] 본 발명의 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 표준시료로 상기 인위적 염기서열을 이용하는 정량적 실시간 PCR을 이용하여 미생물을 절대 정량하는 방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명에 따른 미생물의 절대 정량방법은,
- [0041] 1) 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자에 특이적인 하나 이상의 프라이머 및/또는 프로브 부위를 포함하는 인위적 염기서열을 제조하는 단계;
- [0042] 2) 상기 인위적 염기서열을 표준시료로 하는 정량적 실시간 PCR을 수행하여 검량선을 작성하는 단계;
- [0043] 3) 상기 인위적 염기서열에 포함되어 있는 프라이머 및/또는 프로브를 이용하여 시료를 대상으로 정량적 실시간 PCR을 수행하는 단계; 및
- [0044] 4) 단계 2)에서 작성된 검량선으로부터 단계 3)에서 검출된 유전자의 복제수를 계산하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0045] 단계 1)은 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자에 특이적인 하나 이상의 프라이머 및/또는 프로브 부위를 포함하는 인위적 염기서열을 제조하는 단계로, 양 말단에 단일 프라이머 쌍이 위치하고 그 내부에 다중 프로브 부위를 포함하는 인위적 염기서열 또는 다중 프라이머 쌍과 다중 프로브 부위를 포함하는 인위적 염기서열을 제조할 수 있다.
- [0046] 구체적으로, 양 말단에 단일 프라이머 쌍이 위치하고 그 내부에 다중 프로브 부위를 포함하는 인위적 염기서열은 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자의 공지된 염기서열에서 보존적 서열을 기준 염기서열을 설정한 후, 서열 정렬(alignment)에 의해 프라이머 부위를 결정한다. 표적 부위에 프라이머가 적절히 혼성화될 수 있도록 서열을 변형하고, 변형된 서열을 이용한 서열 정렬에 의해 다중 프로브 부위를 결정한다. 이어서, 프로브가 표적 부위에 적절히 결합할 수 있도록 서열을 변형하고 결정된 프라이머/프로브 부위에 이차 구조가 형성되는지 여부를 확인한다. 만약 이차 구조가 형성되는 경우에는 다시 서열을 변형하여 이차 구조를 감소시키고, 서열 내 GC 함량 및 융점(melting point)을 조사하여 너무 높으면 다시 서열을 변형하여 적절한 수준으로

만든 후 최종적으로 인위적 염기서열을 제작한다(도 5 참고).

- [0047] 또한, 다중 프라이머 쌍과 다중 프로브 부위를 포함하는 인위적 염기서열은 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자의 공지된 염기서열에서 보존적 서열을 기준 염기서열을 설정한 후, 서열 정렬(alignment)에 의해 프라이머/프로브 부위를 결정한다. 표적 부위에 프라이머/프로브가 적절히 혼성화될 수 있도록 서열을 변형한 후 결정된 프라이머/프로브 부위에 이차 구조가 형성되는지 여부를 확인한다. 만약 이차 구조가 형성되는 경우에는 다시 서열을 변형하여 이차 구조를 감소시키고, 서열 내 GC 함량 및 융점(melting point)을 조사하여 너무 높으면 다시 서열을 변형하여 적절한 수준으로 만든다. 변형된 서열들이 나란히 배열되도록 재조합한 후 최종적으로 인위적 염기서열을 제작한다(도 6 참고).
- [0048] 이 단계에 적합한 인위적 염기서열의 예시로는 서열번호: 1 및 2의 메탄 생성세균을 정량하기 위한 인위적 염기서열, 서열번호: 3의 CTX-M 타입의 항생제 내성 유전자를 정량하기 위한 인위적 염기서열, 및 서열번호: 4의 TEM, OXA 및 SHV 타입의 항생제 내성 유전자를 정량하기 위한 인위적 염기서열이 포함될 수 있다.
- [0049] 단계 2)는 단계 1)에서 제조된 인위적 염기서열을 표준시료로 하는 정량적 실시간 PCR을 수행하여 검량선을 작성하는 단계로, 인위적 염기서열을 순차적으로 10배 희석한 후 이를 대상으로 상기 인위적 염기서열 내에 포함되어 있는 프라이머 쌍 및 프로브를 이용해 정량적 실시간 PCR을 수행함으로써 검량성을 작성한다. 이때, 검량선은 임계값에 도달하는 PCR 주기 수를 종축에 취하고 표준시료의 분자 수($\log_{10}$ (표준시료))를 횡축에 취하며, 표준시료로부터의 검량선은 상관지수(R^2)가 1에 가까울수록, 기울기가 -3.33에 가까울수록 이상적이다.
- [0050] 본 발명에서 사용되는 용어 "정량적 실시간 PCR"이란 일반적으로 증폭반응 개시 시의 주형 DNA 양을 정량하기 위한, PCR을 이용한 일련의 반응을 의미한다. 정량적 PCR에는 기준이 되는 표준시료를 사용하는 내부 표준법과, 증폭반응에 있어서 경쟁하는 분자를 사용하는 경쟁법이 포함되지만, 본 발명에서는 내부 표준법이 사용된다. 또한, 각 서열의 분자 수를 정확하고 간편하게 결정하기 위해서 표준시료라고 불리는 기준이 되는 주형 DNA 서열을 이용한 PCR 방법을 사용하고, 반응 중 임의의 시점에서 반응의 진행상황, 즉 증폭의 정도를 확인한다. 따라서, 본 발명에서 "정량적 PCR"이란 증폭반응 개시 시의 주형 DNA 양을 정량하기 위한 PCR로서, 반응 중 임의의 시점에서 증폭대상의 분자에 대해 증폭을 확인할 수 있는 PCR을 의미한다. 정량을 위해서는 일반적으로 그와 같은 PCR과, 반응 개시 시의 주형 DNA 분자 수와 그 증폭의 지표가 되는 신호를 관련짓는 검량선(檢量線)이 조합된다. 이 검량선은 분자 수가 알려진 표준시료를 이용하여 제작할 수 있다.
- [0051] 본 발명에서 검량선은 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자에 특이적인 하나 이상의 프라이머 및/또는 프로브 부위를 포함하는 인위적 염기서열을 표준시료로 하고, 상기 유전자를 특이적으로 증폭하기 위한 프라이머를 이용하여 정량적 실시간 PCR을 수행함으로써, 인위적 표준시료의 증폭으로부터 작성된 검량선을 기준으로 시료 내 존재하는 표적 유전자의 복제 수를 정량할 수 있다.
- [0052] 또한, 일반적으로 정량적 실시간 PCR 방법에 의해 프라이머 쌍이 증폭하는 영역의 반응 개시 시의 분자 수를 정량할 수 있음이 알려져 있고, 많은 경우 프라이머 쌍 사이에 끼워진 영역의 서열에 상보적인 프로브를 제작하여 사용된다. 이러한 프로브로서는 일반적으로 형광 표지된 핵산이 사용되고, PCR에 의한 증폭반응에 있어 증폭의 진행을 실시간으로 간편하게 모니터링 할 수 있도록 고안된다. 이와 같은 형광 표지 프로브의 사용은 당업자에 잘 알려져 있으며, 그러한 성질을 갖는 적절한 서열의 형광 표지 프로브를 합성하는 방법도 널리 알려져 있다.
- [0053] 본 발명의 다른 하나의 양태로서, 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자에 특이적인 하나 이상의 프라이머 및/또는 프로브 부위를 포함하는 인위적 염기서열을 포함하는 미생물의 절대 정량용 키트를 제공한다.
- [0054] 본 발명에서의 용어, "키트"란, 시료 내에서 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자의 복제 수를 실시간 정량 PCR로 확인하여 표적 미생물의 절대 정량을 가능케 하는 도구를 의미한다. 본 발명에 따른 미생물의 절대 정량용 키트는, 실시간 정량 PCR의 검량성 작성을 위한 표준시료로서 검출 또는 정량하고자 하는 미생물을 대표하는 유전자에 특이적인 하나 이상의 프라이머 및/또는 프로브 부위를 포함하는 인위적 염기서열뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 1종이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0055] 본 발명에 따른 미생물의 절대 정량용 키트는, 분석방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액 또는 장치로 구성된다. 구체적으로, 실시간 PCR 키트는 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제, 멸균수 등을 포함할 수

있다.

발명의 효과

[0056] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 표준시료로 인위적 염기서열을 이용하는 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR) 및 이를 이용한 미생물의 정량방법은 다양한 미생물을 검출 및 정량하는데 사용되어질 수 있으며, 다수의 프라이머/프로브의 상보적인 염기서열을 한 개의 인위적 염기서열에 넣어 제작하기 때문에, 각각의 필요한 표준시료 수만큼의 인위적 염기서열을 제작할 필요가 없다는 특징을 갖는다. 따라서, 한 개의 표준시료를 이용하여 다양한 종류의 DNA 정량이 가능하여 인위적 염기서열 제작 시 필요한 비용을 효과적으로 절감할 수 있다는 장점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 메탄 생성세균 중 6개의 분류군을 정량 분석하기 위한 인위적 염기서열 1을 나타낸 것이다.

도 2는 메탄 생성세균 중 4개의 분류군을 정량 분석하기 위해 인위적 염기서열 2를 나타낸 것이다.

도 3은 항생제 내성 효소인 CTX-M 타입 유전자를 정량 분석하기 위한 인위적 염기서열 3을 나타낸 것이다.

도 4는 항생제 내성 효소인 TEM, SHV 및 OXA 타입 유전자를 정량 분석하기 위한 인위적 염기서열 4를 나타낸 것이다.

도 5 및 6은 본 발명에 따른 인위적 염기서열을 디자인하는 과정을 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명에 따른 인위적 염기서열 1을 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 mcrA 유전자(전체 메탄 생성세균)의 검량선을 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명에 따른 인위적 염기서열 1을 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 메탄 생성세균 mrtA 그룹의 검량선을 나타내었다.

도 9는 본 발명에 따른 인위적 염기서열 1을 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 메탄 생성세균 mbac-mcrA 그룹의 검량선을 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명에 따른 인위적 염기서열 1을 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 메탄 생성세균 mcp 그룹의 검량선을 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명에 따른 인위적 염기서열 1을 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 메탄 생성세균 mcr-2b 그룹의 검량선을 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명에 따른 인위적 염기서열 1을 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 메탄 생성세균 FEN 그룹의 검량선을 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명에 따른 인위적 염기서열 2를 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 메탄 생성세균 mcr-7 그룹의 검량선을 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명에 따른 인위적 염기서열 2를 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 메탄 생성세균 mcr-2A 그룹의 검량선을 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명에 따른 인위적 염기서열 1을 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 메탄 생성세균 msaR 그룹의 검량선을 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명에 따른 인위적 염기서열 2를 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 메탄 생성세균 msp 그룹의 검량선을 나타낸 것이다.

도 17은 본 발명에 따른 인위적 염기서열 2를 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 메탄 생성세균 msa 그룹의 검량선을 나타낸 것이다.

도 18은 본 발명에 따른 인위적 염기서열 3을 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 항생제 내성 유전자인 CTX-M 타입 1그룹의 검량선을 나타낸 것이다.

도 19는 본 발명에 따른 인위적 염기서열 3을 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 항생제 내성 유전자인 CTX-M 타입 2그룹의 검량선을 나타낸 것이다.

도 20은 본 발명에 따른 인위적 염기서열 3을 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 항생제 내성 유전자인 CTX-M 타입 9그룹의 검량선을 나타낸 것이다.

도 21은 본 발명에 따른 인위적 염기서열 3을 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 항생제 내성 유전자인 CTX-M 타입 1을 제외한 모든 CTX-M 그룹의 검량선을 나타낸 것이다.

도 22는 본 발명에 따른 인위적 염기서열 4를 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 항생제 내성 유전자인 TEM 타입의 검량선을 나타낸 것이다.

도 23은 본 발명에 따른 인위적 염기서열 4를 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 항생제 내성 유전자인 OXA 타입의 검량선을 나타낸 것이다.

도 24는 본 발명에 따른 인위적 염기서열 4를 정량적 실시간 PCR의 표준시료로 이용하여 얻어진 항생제 내성 유전자인 SHV 타입의 검량선을 나타낸 것이다.

도 25는 본 발명에 따른 인위적 염기서열을 표준시료로 이용한 정량적 실시간 PCR에 의해 얻어진 검량선을 이용하여 하수 처리장 유입수의 CTX-M 타입의 유전자 수를 정량한 결과(n=5)를 나타낸 것이다.

도 26은 본 발명에 따른 인위적 염기서열을 표준시료로 이용한 정량적 실시간 PCR에 의해 얻어진 검량선을 이용하여 하수 처리장 유입수의 TEM, OXA 및 SHV 타입의 유전자 수를 정량한 결과(n=5)를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0059] <실시예 1> 정량적 실시간 PCR의 검량선 작성을 위한 인위적 염기서열을 제조

[0060] 1-1. 메탄 생성세균의 검출 및 정량을 위한 인위적 염기서열의 디자인

[0061] 다수의 프로브를 함유한 인위적 염기서열을 qRT-PCR의 표준시료로 사용할 수 있음을 확인하기 위해 메탄 생성세균에 대한 인위적 염기서열들을 하기와 같은 방법으로 제작하였다.

[0062] 메탄 생성세균(methanogen)을 정량하고 군집 구조를 분석하기 위한 프라이머/프로브(primer/taqman probe; dual labeled probe)의 정보(Steinberg L.M., et al., Appl. Environ. Microbiol. 75: 4435-4442, 2009)를 이용하여 총 11개 분류군의 메탄 생성세균을 정량할 수 있었다(표 1). 또한, 메타노박테리움 써모오토트로피쿰(*Methanobacterium thermoautotrophicum*)의 mcrA(delta H methyl coenzyme M reductase I alpha subunit, GenBank accession no. U10036) 유전자의 염기서열 정보를 기준으로 인위적 염기서열을 설계하고, 정방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머의 위치를 기준 염기서열상에 결정하여 분류군을 대표하는 염기서열을 기준 염기서열과 레이저진 소프트웨어 패키지(Lasergene software package, DNASTAR, Madison, US)를 이용하여 비교(align)하였다.

[0063] 상기와 같이, 비교된 대표 염기서열의 프로브 위치에 대응된 기준 염기서열의 위치를 그 프로브의 대응 부위로 결정하였다. 대응된 부위를 결정 하였을 때, 10개 분류군의 프로브 부위 중 몇몇이 중복되어짐을 확인하였다. 이를 피하기 위해 두개의 인위적 염기서열을 제작하였다. 프로브에 대응된 부위에 염기서열을 변화 시켜 프로브가 상보적으로 혼성화(hybridization)할 수 있도록 만들어 주었으며, 프라이머/프로브가 대응하는 부위를 가지고 있는 인위적 염기서열의 정보를 표 1에 나타내었다.

표 1

[0064]

Name	Target group	Nucleotide sequence(5'-3') ^a	Suggested position ^b	1 / 2 ^g
mlas ^c (서열번호: 5)	<i>All methanogen</i>	5'-GGTGGTGTGGDTTCACMCARTA-3'	976	1/2
mcrA-rev ^d (서열번호: 6)	<i>All methanogen</i>	5'-CGTTCATBGCCTAGTTVGGRTAGT-3'	1444	1/2
mbac-mcrA (서열번호: 7)	<i>Methanobacteriaceae mcrA</i>	5'-FAM ^e -ARGCACCKAACAMCATGGACACWGT-BHQ ^f -3'	1085	1
mrtA (서열번호: 8)	<i>Methanobacteriaceae mrtA</i>	5'-FAM-CCAACTCYCTCTCMATCAGRAGCG-BHQ-3'	1364	1
mcp (서열번호: 9)	<i>Methanocorpusculaceae</i>	5'-FAM-AGCCGAAGAAACCAAGTCTGGACC-BHQ-3'	1313	1
msp (서열번호: 10)	<i>Methanospirillaceae</i>	5'-FAM-TGGTWCMAACCACTACTCTCTGTC-BHQ-3'	1356	2
MCR-7 (서열번호: 11)	Uncultured MCR-7 group	5'-FAM-TGSCTTGACCTTTRCCWTCTCGYTS-BHQ-3'	1092	2
MCR-2a (서열번호: 12)	Uncultured MCR-2 group	5'-FAM-CCACTCTACTGCCGGTATCAACG-BHQ-3'	1254	2
MCR-2b (서열번호: 13)	Uncultured MCR-2 group	5'-FAM-ATGTATCTCTGCAGCAGCCGGTACA-BHQ-3'	1209	1
Fen (서열번호: 14)	Uncultured Fen Cluster group	5'-FAM-AAVCACGGYGGYMTCCGMAAG-BHQ-3'	1069	1
msar (서열번호: 15)	<i>Methanosarcina</i>	5'-FAM-TCTCTCWGGCTGGTAYCTCTCCATGTAC-BHQ-3'	1269	1
msa (서열번호: 16)	<i>Methanosaetaceae</i>	5'-FAM-CCTTGGCRAATCCKCCGWACTTG-BHQ-3'	1068	2

[0065]

^a R = A or G; K = G or T; M = A or C; W = A or T; Y = C or T; S = G or C; V = A, C, or G; N = Random.

[0066]

^b 메타노박테리움 씨모오토트로피쿰의 mcrA 유전자(U10036) 정보를 기준으로 프로브의 염기서열을 비교하였을 때 대응된 부위

[0067]

^c 정방향 프라이머

[0068]

^d 역방향 프라이머

[0069]

^e 리포터(FAM, 6-carboxy-fluorescein)

[0070]

^f 소광제(BHQ, Black hole quencher) 염료

[0071]

^g 프라이머/프로브에 대응하는 사이트를 가지고 있는 인위적 염기서열

[0072]

제작된 인위적 염기서열의 GC 함량 및 용점(melting temperature)을 예측하고, 필요시 적절하게 변화를 주었다. 이차 구조 형성은 DINAMelt tool(Markham and Zuker, 2005)을 이용하여 예측한 후, 프로브 부위에 60℃ 이상에서 이차 구조가 생기는 경우, 주위 염기서열을 변화시켜 이차 구조의 형성을 감소시켜 제작하였다.

[0073]

상기와 같은 방법으로 509 bp 길이의 인위적 염기서열 두 개를 제작하여, Bio Basic Inc.(Bio Basic, Markham, Canada)를 이용하여 합성하였다. 합성하여 얻어진 인위적 염기서열 1 및 2를 각각 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[0074]

도 1에 도시된 인위적 염기서열 1은 염기번호 21번으로부터 43번에 mlas(정방향 프라이머), 염기번호 113번으로부터 134번에 Fen, 염기번호 132번으로부터 157번에 mbac-mcrA, 염기번호 254번으로부터 278번에 mcr2b, 염기

번호 314번으로부터 341번에 msar, 염기번호 358번으로부터 381번에 mcp, 염기번호 409번으로부터 432번에 mrtA 및 염기번호 466번으로부터 489번에 mcrA-rev(역방향 프라이머) DNA 서열이 통합되어 있다. 도 1의 인위적 염기서열은 서열번호: 1로 기재되는 염기서열을 갖는다.

[0075] 도 2에 도시된 인위적 염기서열 2는 염기번호 21번으로부터 43번에 mlas(정방향 프라이머), 염기번호 112번으로부터 135번에 msa, 염기번호 138번으로부터 162번에 mcr-7, 염기번호 299번으로부터 321번에 mcr2a, 염기번호 401번으로부터 425번에 msp 및 염기번호 466번으로부터 489번에 mcrA-rev(역방향 프라이머) DNA 서열이 통합되어 있다. 도 2의 인위적 염기서열은 서열번호: 2로 기재되는 염기서열을 갖는다.

[0076] 상기 두 인위적 염기서열은 55%의 GC를 함유하고, 60℃에서 각 프라이머와 프로브 부위에 심각한 이차 구조가 형성되지 않는 것을 확인하였다.

[0077] 1-2. 항생제 내성 균주의 검출 및 정량을 위한 인위적 염기서열의 디자인

[0078] 기질 확장성 베타락타메이즈(extended spectrum beta-lactamase, ESBL)의 종류인 CTX-M, TEM, OXA 및 SHV 타입의 항생제 내성 유전자를 정량하기 위한 프라이머와 프로브(taqman probe)의 정보(Birkett C.I., et al., J. Med. Microbiol. 56: 52-55, 2007; Knapp C.W., et al., Environ. Sci. Technol. 44: 580-587, 2010)는 표 2에 나타내었다.

표 2

Primer/probe description	Nucleotide sequence	3/4 ^c
CTX-M Forward primer (서열번호: 17)	5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC-3'	3
CTX-M Reverse primer (서열번호: 18)	5'-ATCACKCGGRTCGCCNGGRAT-3'	3
CTX-M 타입 1 probe (서열번호: 19)	5'-FAM ^a -CCCAGACAGCTGGGAGACGAAACGT-BHQ ^b -3'	3
CTX-M 타입 2 probe (서열번호: 20)	5'-FAM-CAGGTGCTTATCGCTCTCGCTCTGTT-BHQ-3'	3
CTX-M 타입 9 probe (서열번호: 21)	5'-FAM-CTGGATCGCACTGAACCTACGCTGA-BHQ-3'	3
all groups except CTX-M 타입 1 probe(서열번호: 22)	5'-FAM-CGACAATACNGCCATGAA-BHQ-3'	3
TEM Forward primer (서열번호: 23)	5'-TCGGGGAAATGTGCG-3'	4
TEM Reverse primer (서열번호: 24)	5'-GGAATAAGGGCGACA-3'	4
SHV Forward primer (서열번호: 25)	5'-TGATTTATCTGCGGGATACSCC-3'	4
SHV Reverse primer (서열번호: 26)	5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTCGAT-3'	4
OXA Forward primer (서열번호: 27)	5'-CACTTACAGGAACTTGGGGTCG-3'	4
OXA group probe (서열번호: 28)	5'-FAM-ATCAAGCATAAAAGCCAAGAAAAATGC-BHQ-3'	4
OXA Reverse primer (서열번호: 29)	5'-AGTGTGTTTAGAATGGTGATC-3'	4

[0080] ^a 리포터(FAM)

[0081] ^b 소광제 염료(BHQ)

- [0082] ^c 프라이머/프로브에 대응하는 부위를 갖는 인위적 염기서열
- [0083] 이를 이용하여, CTX-M 타입 1, 2, 7 및 타입 I을 제외한 CTX-M 그룹을 정성 및 정량 분석하였다. 기존에 알려진 CTX-M 유전자 염기서열의 보존적(consensus) 염기서열을 기준으로 인위적 염기서열을 제작하였다. 기존의 염기서열은 하기와 같다: X92506(blaCTX-M-1), X92507(blaCTX-M-2), AF550415,(blaCTX-M-3), AJ005044(blaCTX-M-5), AJ005045(blaCTX-M-7), AF189721(blaCTX-M-8), D89862(blaCTX-M-9), AF255298(blaCTX-M-10), AJ310929(blaCTX-M-11), AY571969(blaCTX-M-12), AF252622(blaCTX-M-14), AY463958(blaCTX-M-15), AF325133(blaCTX-M-18), AF518567(blaCTX-M-25), AY157676(blaCTX-M-26) 및 AF501233(blaKLUG-1). 염기서열은 레이저진 소프트웨어 패키지(DNASTAR, Madison, US)를 이용하여 비교 정렬되었고, 그 보존된 염기서열을 인위적 염기서열의 제작을 위한 기준 염기서열로 사용하였다.
- [0084] 또한, TEM, OXA 및 SHV 타입의 항생제 내성 유전자를 정량하기 위해 상기 방법과 달리 각각의 목적으로 하는 염기서열을 순차적으로 배열하였다. TEM 타입의 정량을 위해 문헌(Knapp C.W., et al., Environ. Sci. Technol. 44: 580-587, 2010)에 개시된 BlaTEM-F 및 BlaTEM-R의 프라이머 쌍을 사용하였다. OXA 타입의 정량을 위해 동일 문헌에 개시된 blaOXA1-F 및 blaOXA1-R의 프라이머 쌍과 OXA-택맨 프로브를 사용하였다. SHV 타입의 정량을 위해 동일 문헌에 개시된 blaSHV-F 및 BlaSHV-R의 프라이머 쌍을 약간 변형한 BlaSHV2-F 및 BlaSHV2-R의 프라이머 쌍을 사용하였다. TEM 타입(AY538698), OXA 타입(ay008291 및 j02967의 보존적 염기서열) 및 SHV 타입(EU280315)의 염기서열에서 상기 각 프라이머 세트를 증폭시키는 DNA 절편(fragment)의 염기서열을 횡으로 연결하여 사용하였다.
- [0085] 대표 염기서열(상기 염기서열 중 하나)을 기준 염기서열에 비교하였고, 대표 염기서열의 프로브 부위에 대응하는 기준 염기서열의 위치를 결정하였다. 프로브에 대응된 위치에 DNA 염기서열을 변화시켜 프로브가 적합하게 혼성화할 수 있게 제작하였다. CTX-M 타입 1을 제외한 CTX-M 타입을 정량하는 프로브의 융점은 어닐링(annealing) 온도보다 낮기 때문에 잠금 핵산(locked nucleic acid, LNA)를 함유시켜 융점을 상승시켰다. 이 프로브는 Integrated DNA Technologies Inc.(Coralville, US)에서 합성 구매 하였다. 제작된 인위적 염기서열의 GC 함량 및 융점을 예측하여 적절하게 조절하였다. 이차 구조 형성은 DINAMelt tool(Markham and Zuker, 2005)을 이용하여 예측한 후, 프라이머/프로브의 프로브 부위에 60℃ 이상에서 이차 구조가 생기는 경우, 주위 염기서열을 변화시켜 이차 구조의 형성을 감소시켜 제작하였다.
- [0086] 상기와 같은 방법으로 제작된 356 bp 및 368 bp 길이의 인위적 염기서열 3 및 4를 각각 도 3 및 도 4에 나타내었다.
- [0087] 도 3에 도시된 인위적 염기서열 3은 염기번호 11번으로부터 36번에 CTX-M 정방향 프라이머, 염기번호 54번으로부터 79번에 CTX-M 타입 2, 염기번호 199번으로부터 216번에 CTX-M 타입 1을 제외한 CTX-M 타입, 염기번호 264번으로부터 287번에 CTX-M 타입 1, 염기번호 293번으로부터 317번에 CTX-M 타입 9 및 염기번호 326번으로부터 346번에 CTX-M 역방향 프라이머 DNA 서열이 통합되어 있다. 도 3의 인위적 염기서열은 서열번호: 3으로 기재되는 염기서열을 갖는다. 인위적 염기서열 3은 55% GC를 함유하고, 60℃에서 각 프라이머와 프로브 부위에 이차 구조가 형성되지 않는 것을 확인하였다.
- [0088] 또한, 도 4에 도시된 인위적 염기서열은 염기번호 11번으로부터 25번에 TEM 정방향 프라이머, 염기번호 149번으로부터 163번에 TEM 역방향 프라이머, 염기번호 175번으로부터 196번에 SHV 정방향 프라이머, 염기번호 249번으로부터 269번에 SHV 역방향 프라이머, 염기번호 280번으로부터 302번에 OXA 정방향 프라이머, 염기번호 311번으로부터 337번에 OXA 프로브 및 염기번호 338번으로부터 358번에 OXA 역방향 프라이머 DNA 서열이 통합되어 있다. 도 4의 인위적 염기서열은 서열번호: 4로 기재되는 염기서열을 갖는다. 인위적 염기서열 4는 41% GC를 함유하고, 60℃에서 각 프라이머와 프로브 부위에 이차 구조가 형성되지 않는 것을 확인하였다.
- [0089] 1-3. 인위적 염기서열을 포함하는 발현벡터의 제조
- [0090] 상기 실시예 1-1에서 합성된 인위적 염기서열 1 및 2를 각각 pUC18 벡터에 클로닝하고, 상기 실시예 1-2에서 합성된 인위적 염기서열 3 및 4를 각각 pIDTSAMRT-AMP 벡터에 클로닝하여 *E. coli*(HIT competent cell, Real Biotech, Taipei, Taiwan)에 각각 형질전환(transformation)하였다. 이들을 선택배지(LacZ/X-gal; ampicillin,

100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 배양하여 형질전환된 흰색 콜로니만을 선별하였고, 형질전환된 *E. coli*는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 앰피실린(ampicillin)을 함유하는 500 ml의 LB(Difco Luria-Bertani) 배지에서 하룻밤동안 배양 후, HiYield Plasmid Mini Kit(Real Biotech, Taiwan)를 이용하여 플라스미드(plasmid)를 추출 정제하였다. 이들의 농도는 ASP-2680 Micro-volume Nucleic Acid Spectrophotometer(ACTGene, Piscataway, US)를 이용하여 정량하였다.

[0091]

[0092] <실시예 2> 인위적 염기서열을 이용한 정량적 실시간 PCR용 검량선 작성

[0093]

2-1. 메탄 생성세균의 검출 및 정량을 위한 검량선 작성

[0094]

상기 실시예 1-3에서 얻어진 인위적 염기서열을 함유하는 플라스미드를 표준시료로서 정량적 실시간 PCR의 검량선을 제작하기 위하여 순차적으로 10배 희석하였다. *mcrA*와 *mcrA-rev* 프라이머 세트를 이용한 전체 *mcrA* 유전자 및 이 프라이머 세트와 10개의 메탄 생성세균 분류군 그룹을 정량할 수 있는 텍맨 프로브(taqman probe)를 이용하여 검량선을 작성하였다. 전체 *mcrA* 유전자의 정량을 위해 Sybr Green I 염료를 이용하는 정량적 실시간 PCR을 수행하였다.

[0095]

2.5 μl 10x PCR 완충용액, 0.2 μl Ace Taq 폴리머라제(Ace Taq polymerase; Genenmed, Seoul, Korea), 3 μl dNTP mix(2.5 mM), 0.5 μl 50x SYBR green I(Invitrogen, Carlsbad, US), 0.625 μl *mcrA*(10 μM)와 0.625 μl *mcrA-rev*(10 μM), 0.5 μl 50x ROX(Invitrogen) 및 3 μl 주형(template) DNA를 함유하는 25 μl PCR 혼합물(mixture)을 이용하여, Applied Biosystems 7300 real time PCR system(Applied Biosystems, Foster City, US)을 사용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. *mcrA* 유전자의 정량을 위한 PCR 조건은 전-변성(pre-denaturation)을 위해 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분간 반응한 후, 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15초, 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45초 및 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 그리고 데이터 수집을 위한 83 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초를 40회 반복하였다. 검량선은 Applied Biosystems 7300 system software(Applied Biosystems, Foster City, US)를 이용하여 작성하여 도 5 내지 15에 나타내었다.

[0096]

도 5 내지 15에 인위적 염기서열 1 및 2를 이용하여 얻어진 전체 *mcrA*(기울기, -3.49; R^2 , 0.98, 전체 메탄 생성세균), *mrtA*(기울기, -3.49; R^2 , 1), *mbac-mcrA*(기울기, -3.49; R^2 , 0.99), *mcp*(기울기, -3.49; R^2 , 1), *mcr-2b*(기울기, -3.49; R^2 , 1), *fen*(기울기, -3.49; R^2 , 0.99), *mcr-7*(기울기, -3.49; R^2 , 1), *mcr-2A*(기울기, -3.49; R^2 , 1), *msaR*(기울기, -3.49; R^2 , 1), *mcp*(기울기, -3.49; R^2 , 1) 및 *msa*(기울기, -3.49; R^2 , 1) 그룹의 검량선에 나타난 바와 같이, 모든 그룹 검량선의 기울기는 최소 10^5 범위($10^3 \sim 10^7$)에서 -3.49이고 R^2 값은 0.98 이상이었다.

[0097]

이러한 결과는, 본 발명의 인위적 염기서열 1 및 2를 이용하여 얻어진 검량선들을 이용하여 메탄 생성세균의 11개 분류군을 정량적으로 서로 절대 비교할 수 있음을 나타낸다.

[0098]

3-2. 항생제 내성 군주의 검출 및 정량을 위한 검량선 작성

[0099]

CTX-M 타입 1, 2, 7 및 타입 I을 제외한 CTX-M 그룹을 정량하기 위한 검량선을 작성하기 위해 상기 실시예 2-1의 방법을 하기와 같이 변형하여 실시하였다. PCR 조건은 전-변성(pre-denaturation)을 위해 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분간 반응한 후, 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15초, 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 45초, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 및 데이터 수집을 위한 83 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초를 40회 반복하였고, TEM 타입 유전자의 정량을 위해 전-변성(pre-denaturation)을 위한 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분간 반응한 후, 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15초, 50 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 20초, 그리고 데이터 수집을 위한 82.5 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초를 40회 반복하였으며, SHV 타입의 유전자 정량을 위해 전-변성(pre-denaturation)을 위한 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3분 후, 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15초, 그리고 데이터 수집을 위한 54 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60초를 40회 반복하였다.

[0100]

상기와 같이 수집되어진 데이터를 이용하여 Applied Biosystems 7300 system software(Applied Biosystems, Foster City, US)를 사용하여 검량선을 작성하여 도 16 내지 22에 나타내었다.

[0101]

도 16 내지 19에 인위적 염기서열 3을 이용하여 얻어진 CTX-M 타입 1(기울기, -3.59; R^2 , 0.98), CTX-M 타입 2

(기울기, -3.60 ; R^2 , 1), CTX-M 타입 9(기울기, -3.61 ; R^2 , 0.99), 및 CTX-M 타입 1을 제외한 CTX-M 타입(기울기, -3.59 ; R^2 , 1) 그룹의 검량선에 나타난 바와 같이, 모든 그룹 검량선의 기울기는 최소 10^8 ($10^2 \sim 10^9$)에서 -3.59 내지 -3.61 이고 R^2 값은 0.99 이상이었다.

[0102] 또한, 도 20 내지 22에 인위적 염기서열 4를 이용하여 얻어진 TEM, OXA 및 SHV 타입의 검량선에 나타난 바와 같이, TEM 검량선의 기울기는 최소 10^7 범위($10^2 \sim 10^8$)에서 -3.73 이고 R^2 값은 1이었고, OXA 검량선의 기울기는 최소 10^8 범위($10^2 \sim 10^9$)에서 -3.34 이고 R^2 값은 1이었으며, SHV 검량선의 기울기는 최소 10^6 범위($10^4 \sim 10^8$)에서 -4.07 이고 R^2 값은 1이었다.

[0103] 이러한 결과는, 본 발명의 인위적 염기서열 3 및 4를 이용하여 얻어진 상기 검량선들을 이용하여 항생제 내성 균주들을 그 타입에 따라 정량적으로 서로 절대 비교할 수 있음을 나타낸다.

[0104] <실시예 3> 혐기성 소화조에서 메탄 생성세균의 검출 및 정량

[0105] 본 발명의 인위적 염기서열 1 및 2의 정량적 실시간 PCR 표준시료로의 이용 가능성을 확인하기 위해, 하기와 같은 방법에 따라 환경 시료를 이용하여 메탄 생성세균의 검출 및 정량 실험을 실시하였다.

[0106] 서울시에 위치하는 탄천 물재생센터의 소화조(anaerobic digester)로 부터 2010년 1월과 6월에 시료를 채취하여 -70°C 에서 보관하였다. 각 시료로부터 DNA를 NucleoSpin Soil kit(Macherey-Nagel GmbH, Dren, Germany)를 이용하여 추천 사용법에 따라 추출하고, 실시예 2의 방법에 따라 메탄 생성세균의 유전자를 정량하여 그 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

Probe	January 2010	June 2010
mrtA	bd	bd
mbac-mcrA	2.37×10^8	8.91×10^7
mcp	bd	7.35×10^7
mcr-2b	bd	bd
FEN	bd	bd
mcr-7	4.47×10^8	8.35×10^8
mcr-2a	bd	bd
msaR	bd	1.38×10^8
MSP	bd	1.10×10^8
MSA	bd	1.76×10^8
Total mcrA	1.25×10^9	1.52×10^9

[0108] ^{bd} 정량 한계 이하(below detection limit)

[0109]

[0110] 표 3에 나타난 바와 같이, 2010년 1월의 소화조에서는 mbac-mcrA와 mcr-7 그룹만이 2.37×10^8 와 4.47×10^8 유전자 복제 수/g(DCW)로 정량되었고, 나머지 그룹은 모두 정량 한계치(3000 copy)이하의 유전자 복제 수로 확인되었다. 또한, 2010년 6월의 소화조에서는 mbac-mcrA, mcp, mcr-7, msaR, msp 및 msa 그룹이 각각 8.91×10^7 , 7.35×10^7 , 8.35×10^8 , 1.38×10^8 , 1.10×10^8 , 및 1.76×10^7 유전자 복제 수/g(DCW)로 정량되었다. 이때 전체 mcrA는 1.52×10^9 유전자 복제 수/g(DCW)로 모든 그룹의 합인 1.48×10^9 유전자 복제 수/g(DCW)와 유사한 것으로 나타났다.

- [0111] 이러한 결과는, 본 발명의 인위적 염기서열 1 및 2를 이용하여 실제 환경 시료에서 메탄 생성세균의 유전자를 정밀하게 측정 및 정량할 수 있음을 나타낸다.
- [0112] <실시예 4> 하수처리장 유입수에서 항생제 내성 균주의 검출 및 정량
- [0113] 본 발명의 인위적 염기서열 3 및 4의 정량적 실시간 PCR 표준시료로의 이용 가능성을 확인하기 위해, 하기와 같은 방법에 따라 환경 시료를 이용하여 항생제 내성균주의 검출 및 정량 실험을 실시하였다.
- [0114] 서울시에 위치하는 4 개의 물재생센터(중랑, 난지, 탄천 및 서남)에서 2011년 2월에 유입수를 채취하였다. 각 유입수 40 ml를 15,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 남아있는 바이오메스로 부터 DNA를 NucleoSpin Soil kit(Macherey-Nagel GmbH., Duren, Germany)를 이용하여 추천 사용법에 따라 추출하고, 실시 예 2의 방법에 따라 CTX-M, TEM, SHV 및 OXA 타입의 항생제 내성 유전자를 정량하여, 그 결과를 도 23 및 도 24에 나타내었다.
- [0115]
- [0116] 도 23에 나타난 바와 같이, CTX-M 타입 1은 중랑, 난지, 서남 및 탄천 물재생센터에서 각 5회 반복 실험 시 평균 3.06×10^5 , 5.21×10^5 , 7.48×10^5 및 6.56×10^5 유전자 복제 수/ml로 정량되었다. CTX-M 타입 2는 평균 2.00×10^2 , 8.76×10^2 , 2.06×10^2 , 및 6.96×10^2 유전자 복제 수/ml로 정량되었다. CTX-M 타입 9는 평균 4.95×10^4 , 8.33×10^4 , 7.69×10^4 , 및 9.98×10^4 유전자 복제 수/ml로 정량되었다. CTX-M 타입 1을 제외한 평균 4.96×10^4 , 8.76×10^4 , 7.86×10^4 , 및 1.11×10^5 유전자 복제 수/ml로 정량되었다.
- [0117] 또한, 도 24에 나타난 바와 같이, TEM 유전자는 중랑, 난지, 서남 및 탄천 물재생센터에서 각 5회 반복 실험 시 평균 8.50×10^6 , 7.60×10^6 , 7.37×10^6 , 및 8.73×10^6 유전자 복제 수/ml로 정량되었고, OXA 유전자는 평균 5.36×10^6 , 1.00×10^7 , 8.02×10^6 , 및 9.69×10^6 유전자 복제 수/ml로 정량되었으며, SHV 유전자는 평균 1.64×10^6 , 1.46×10^6 , 1.47×10^6 , 및 2.04×10^6 유전자 복제 수/ml로 정량되었다.
- [0118] 이러한 결과는, 본 발명의 인위적 염기서열 3 및 4를 이용하여 실제 환경 시료에서 CTX-M, TEM, SHV 및 OXA 타입 항생제 내성 유전자를 정밀하게 측정 및 정량할 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0119] 추가적으로, 상기의 결과들을 토대로 본 발명의 하나 이상의 프로브를 갖는 인위적 염기서열은 정량적 실시간 PCR 방법을 통해 동시에 다수의 특정 유전자를 일정한 양으로 증폭시킴으로써 검량선의 작성이 가능하며, 이러한 검량선을 이용하여 다양한 미생물을 한 번에 검출 및 정량하는데 효과적인 표준시료로 이용되어질 수 있음을 나타낸다.

도면

도면1

ggcttggtcatacatgtcaggtggtgtaggattcaccagtagcgaacagcagcctacacagacaacatcctcg
 Forward primer
 acgacttcacctactctcggttaaggagtagctggagggaacacacgggtggtctcggaagggacctaacacccatgg
 Fen
 acacagtcctcggtgagtgaggtcacattctacggacttgaacagtagcaggaataccctgcactcctogaag
 mbac-mcrA
 accagtttggtggatcccagagggcggtatgtatctctgcagcagccggtacatccacagccttcgcaacagcaa
 mcr2b
 atgcccagacaggtctctcaggctggtaacctctccatgtactgtcacaaggagcagcagccgaagaacaacagtc
 msar mcp
 tggaccacgacctccaggaccagtggtgcatccaactccctctcaatcagaagcagcaggggactgccaactgg
 mrtA
 agcttcgtggacctaactatcctaactacgccaatgaacgtgggtcaccaggggtgaatac
 Reverse primer

도면2

ggcttggtcatacatgtcaggtggtgtaggattcaccagtagcgaacagcagcctacacagacaacatcctcg
 Forward primer
 acgacttcacctactctcggttaaggagtagctggagggaaccttggcaaatcctcggtaactgctgccttgacctg
 msa mcr-7
 tccatctcgttggtgagtgaggtcacattctacggacttgaacagtagcaggaataccctgcactcctogaag
 accagtttggtggatcccagagggcggtcagctgttcagctgcagctggatgttcacagccttcgcaacagcacc
 actctactgcgggtatcaacggatggttaacctctcaatgtacctgcacaaggagcagcactccaggctcggattct
 mcr-2a
 acgggttaacgacctccaggaccagtggtgtaacaaactcaactctctgtcagggggcagcaggggactgccaactgg
 msp
 agcttcgtggacctaactatcctaactacgccaatgaacgtgggtcaccaggggtgaatac
 Reverse primer

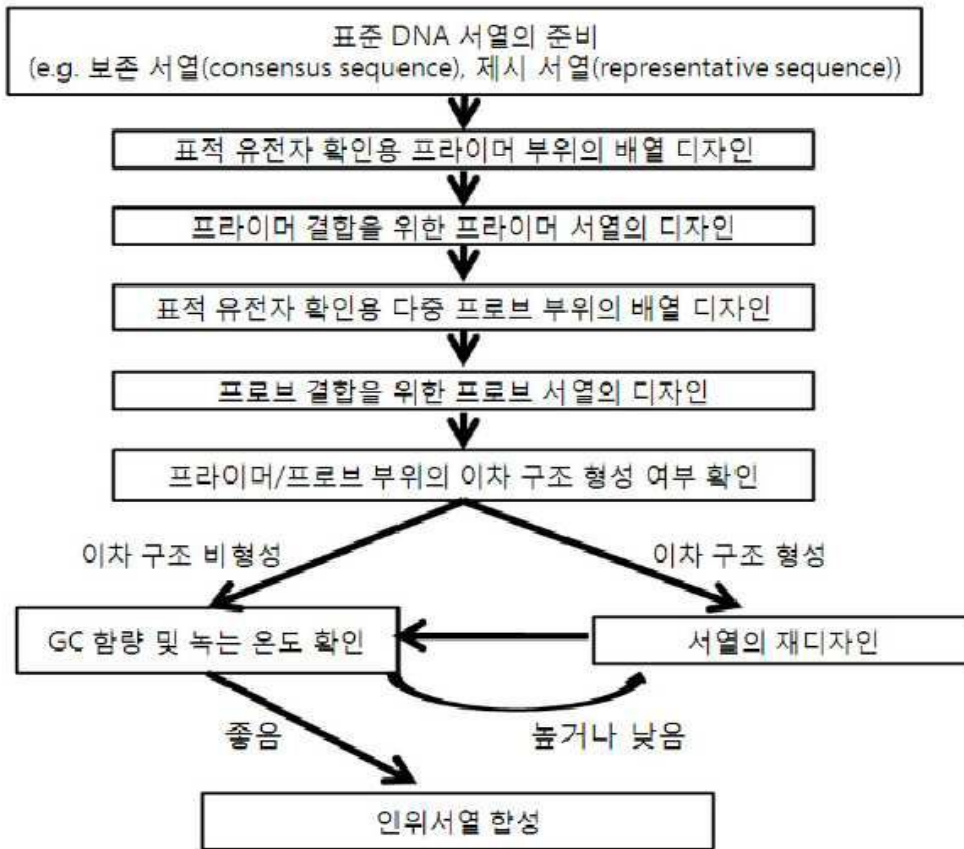
도면3

GCGCTTTGCGATGTGCAGCACCAAGTAAAGTGATGGCGGCGGCGCGGTGCTTAACAGAGCGAGAGCGATAAGCA
 Forward primer CTX-M type 2
 CCTGTTAAATCAGCGAGTTGAGATCAAAACATCTGACCTGGTTAACTACAATCCGATTGCGGAAAAACAGTCAA
 TGGCAGATGACACTGGCTGAGCTTAGCGCGGCCGCGCTACAGTACAGCGACAATACAGCCATGAATAAGCTGAT
 All CTX-M type except 1
 TGCCCATCTTGCGGCGCCGGATAGCGTGACGCGCTTTGCCGACAGCTGGGAGACGAAACGTTCCGTTCTGATCG
 CTX-M type 1
 CACTGAACCTACGCTGAACACCGCCATTCCCGGCGACCGCGTGATACCAACACGC
 CTX-M type 9 Reverse primer

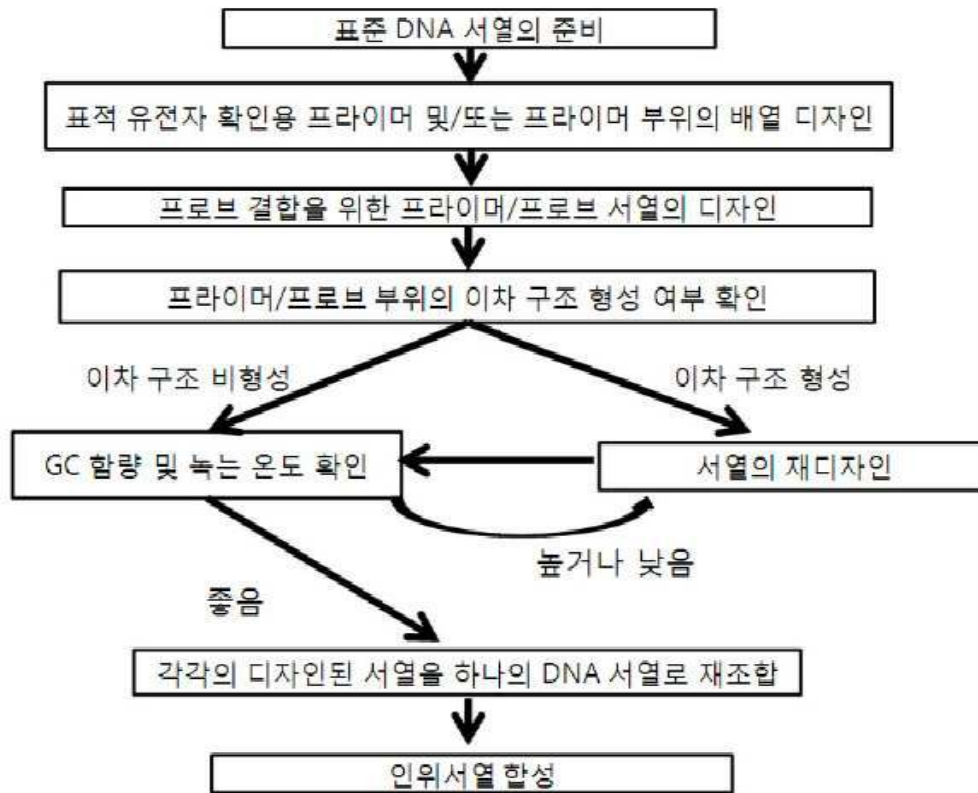
도면4

TATATGATATTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGC
 TEM type forward primer
 TCATGAGACAATAACCTGGTAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGASTATTCAACATTTTCGTG
 TCGCCCTTATTCCTATCTCTCTATGATTATCTGCGGGATACGCGGCGAGCATGGCCGAGCGAAATCAGCAAA
 TEM type reverse primer SHV type forward primer
 TCGCCGGGATCGGCGCGGCTGATCGAGCACTGGCAACGCTAAATATCTCTATCACTTACAGGAACTTGGGGT
 SHV type reverse primer OXA type forward primer
 CGAATTTAATCAAGCATAAAAGCCAAGAAAAATGATCACCATTCTAAACACACTTATCTCTATA
 OXA type probe OXA type reverse primer

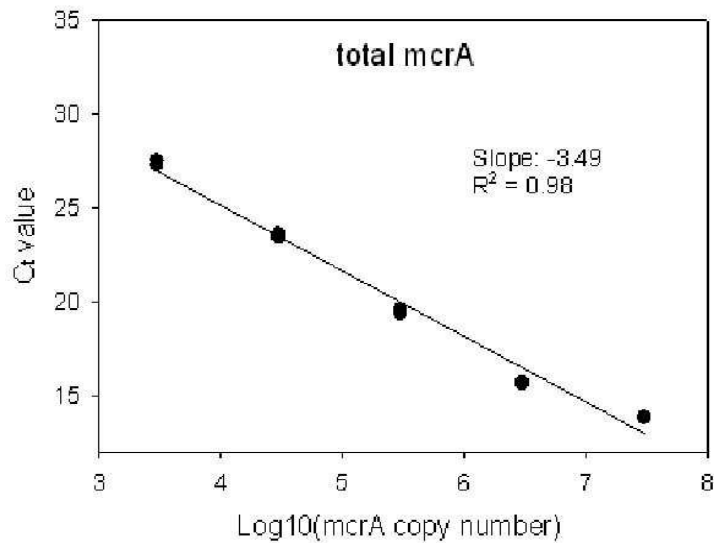
도면5



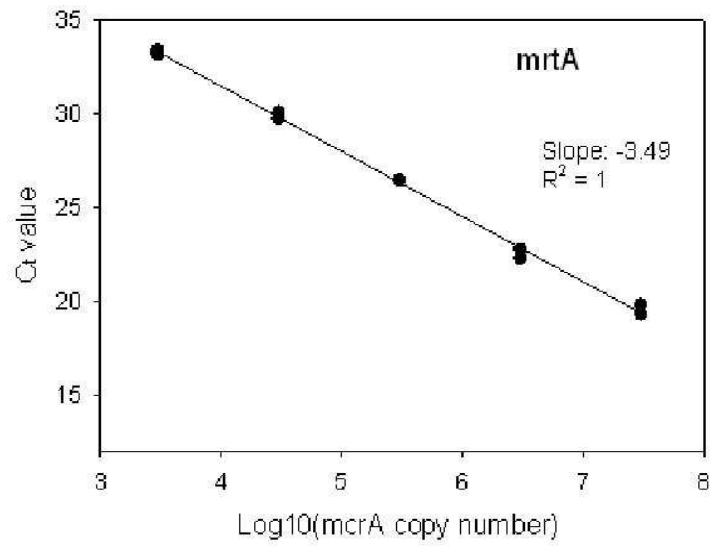
도면6



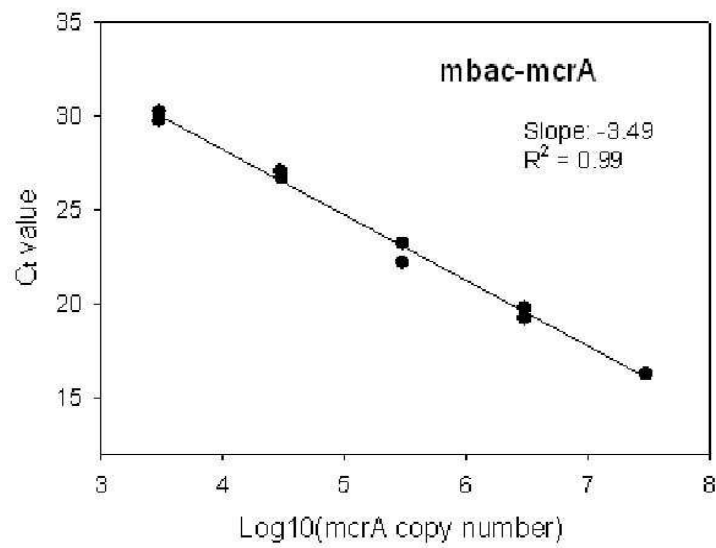
도면7



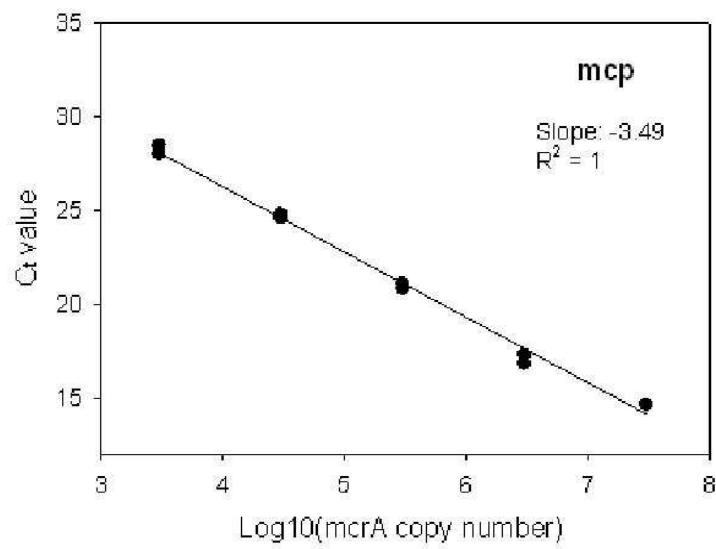
도면8



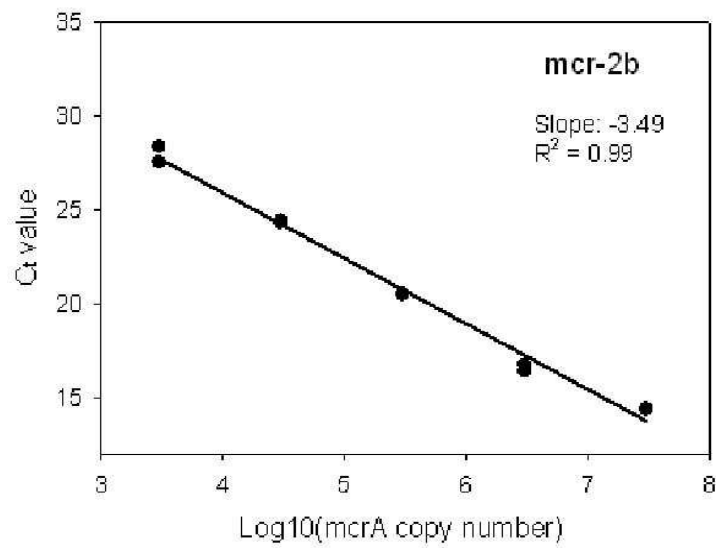
도면9



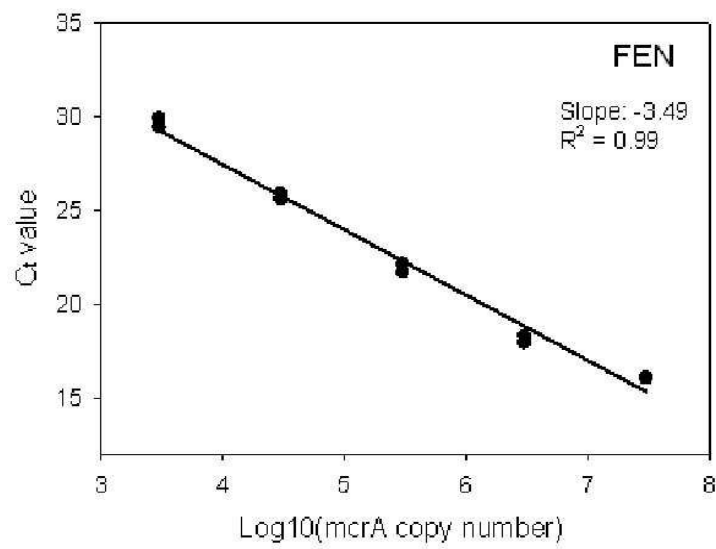
도면10



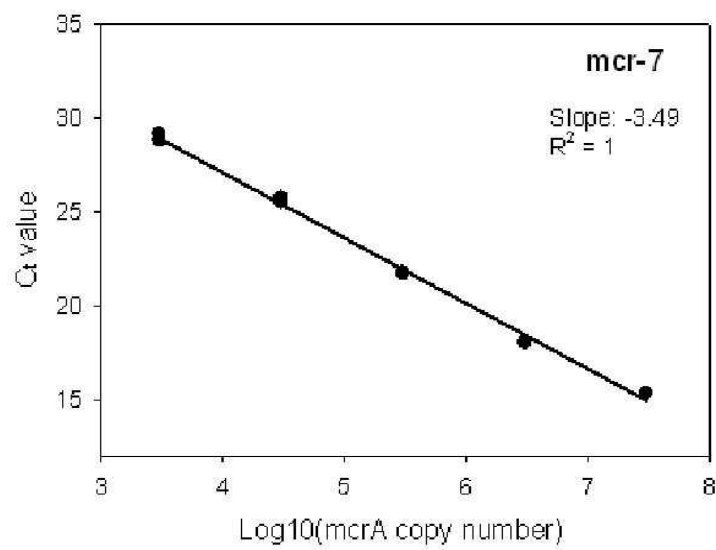
도면11



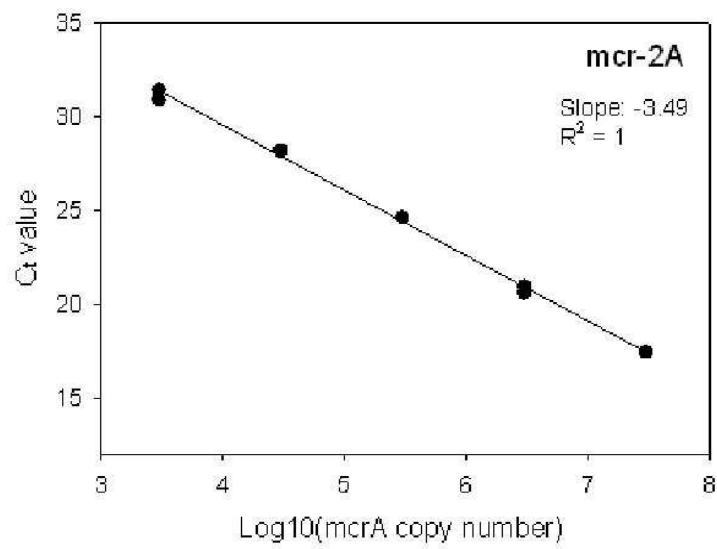
도면12



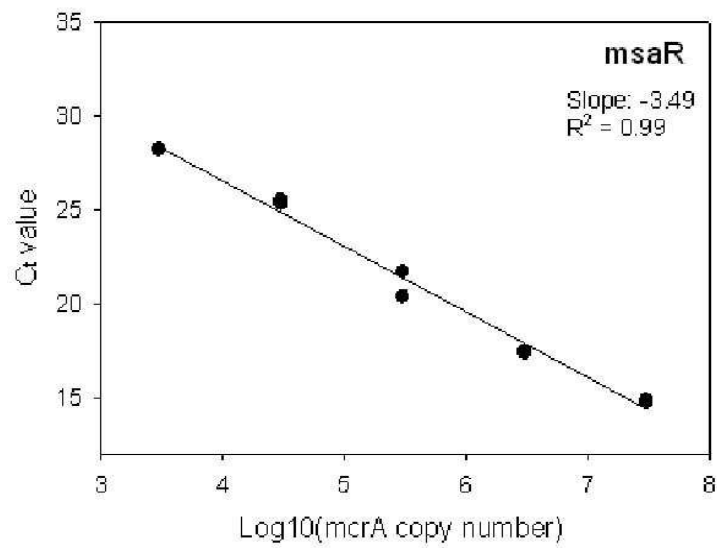
도면13



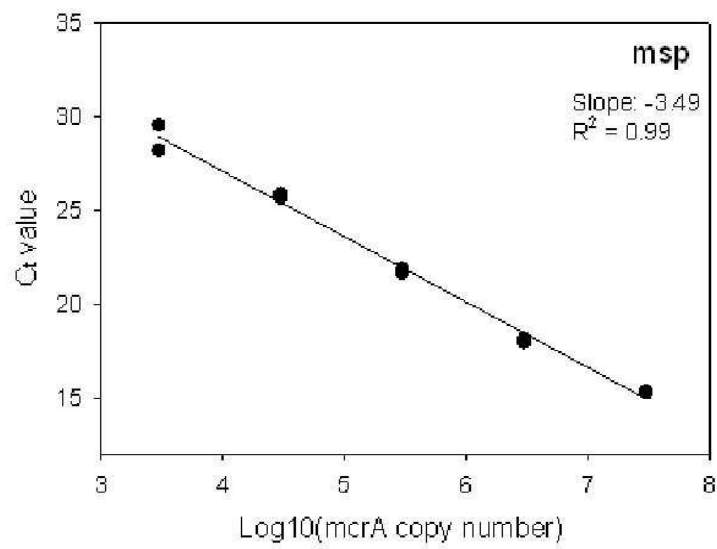
도면14



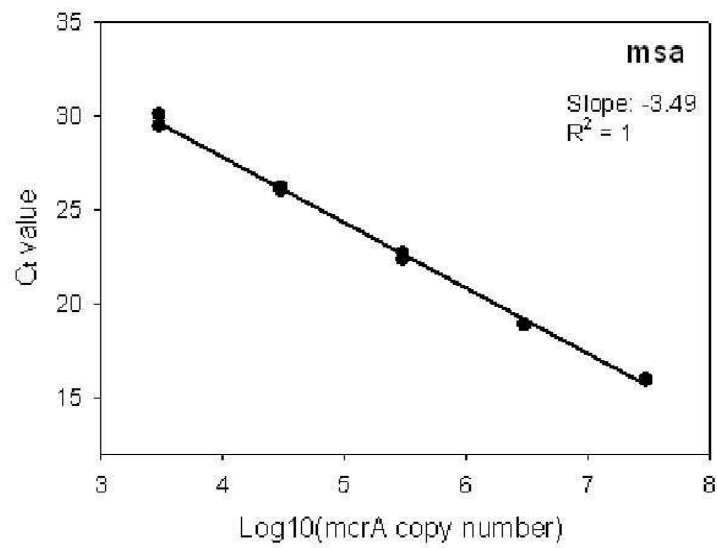
도면15



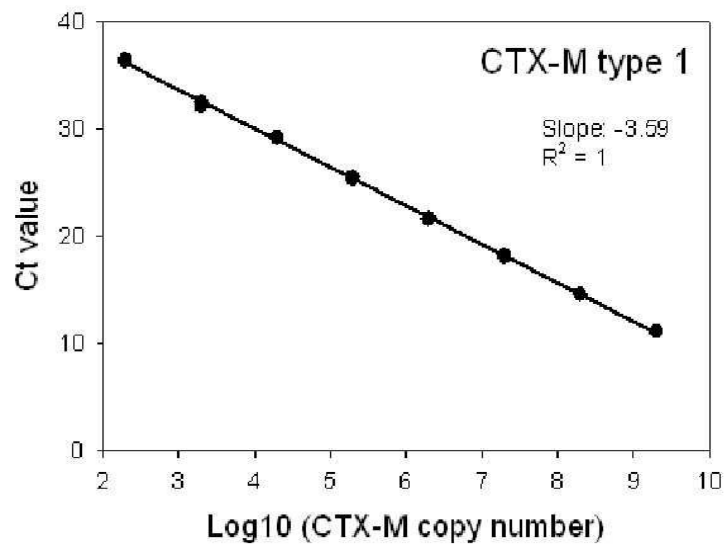
도면16



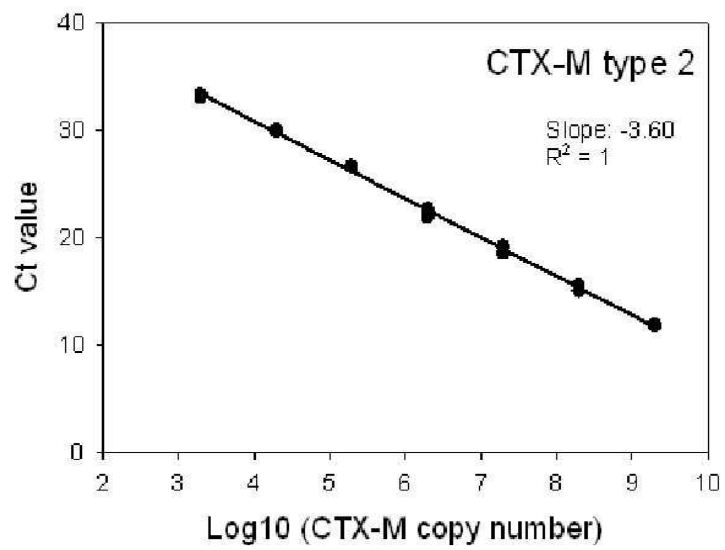
도면17



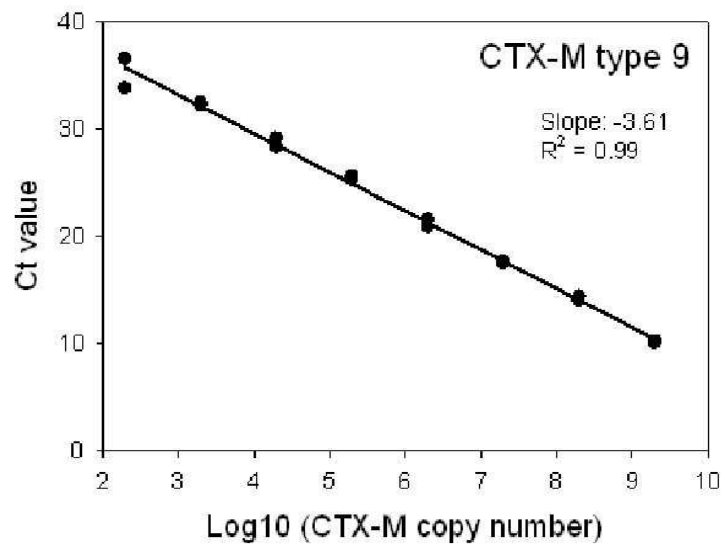
도면18



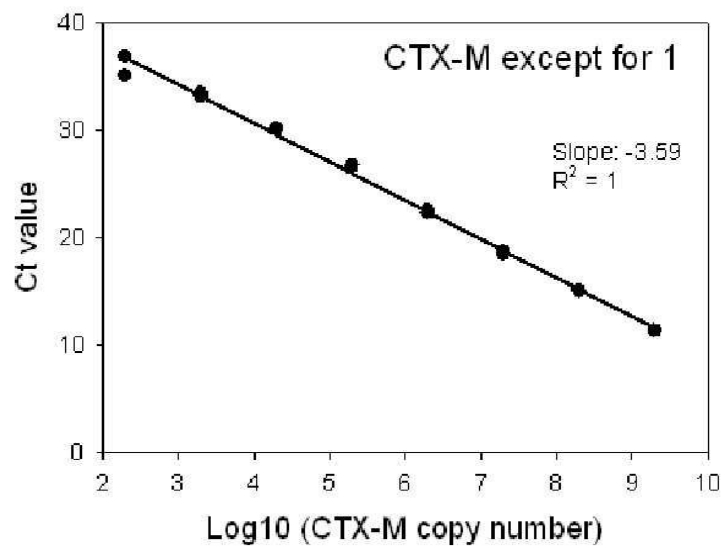
도면19



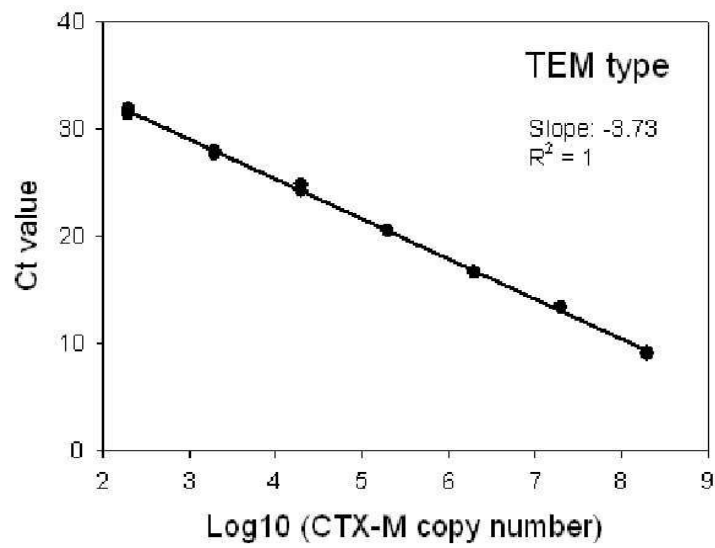
도면20



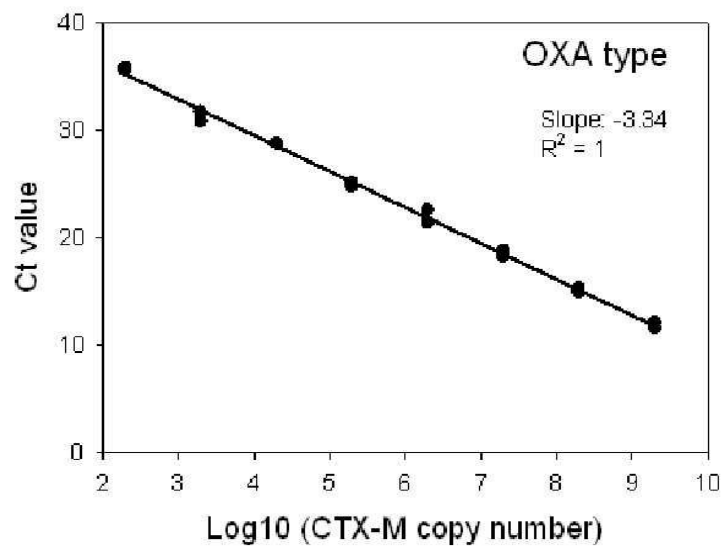
도면21



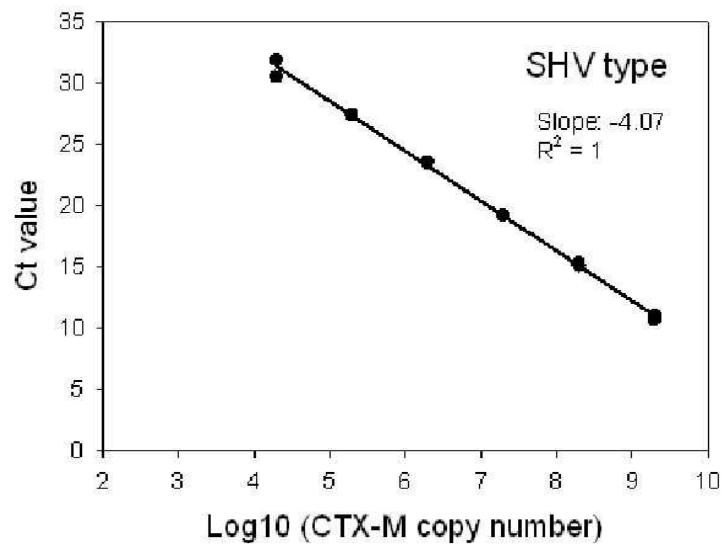
도면22



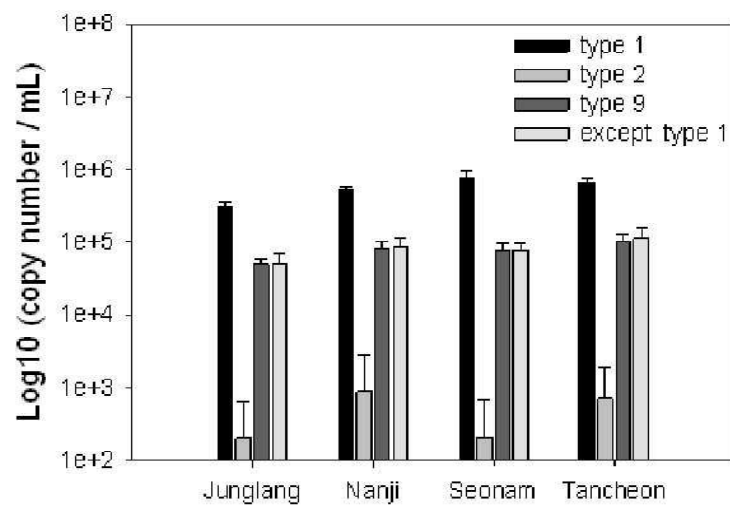
도면23



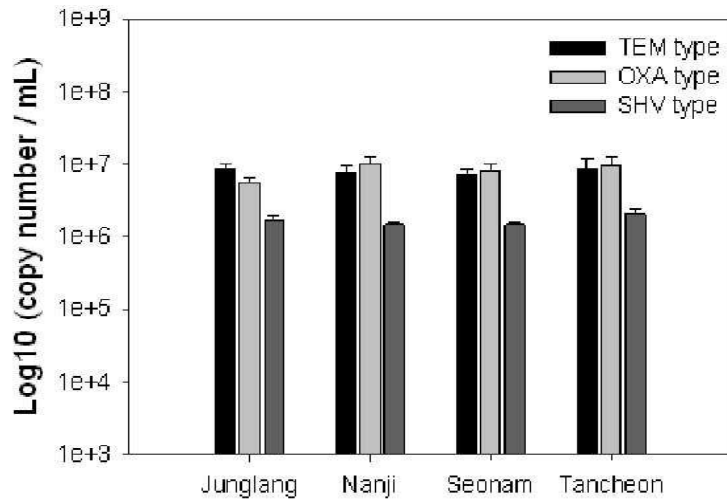
도면24



도면25



도면26



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Quantitative real-time PCR using artificial sequences as a standard sample and method for the quantification of microorganisms using the same
- <130> PA110194/KR
- <160> 29
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 509
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> standard artificial sequence 1
- <400> 1

ggcttggctc atacatgtca ggtggtgtag gattcaccca gtacgcaaca gcagcctaca 60

cagacaacat cctcgacgac ttacctaact tcggttaagga gtacgtggag gacaaacacg 120

gtggtctcgg aaaggcacct aacaccatgg acacagtcct cggttgcgagt gaggtcacat 180

tctacggact tgaacagtac gaggaatacc ctgcactcct cgaagaccag ttgtgtggat 240

cccagagggc ggcatgtatc tctgcagcag ccggtacatc cacagccttc gcaacagcaa 300

atgccacagac aggtctctca ggctgggtacc tctccatgta cctgcacaag gagcagcagc 360

cgaagaaacc aagtctggac cagcacctcc aggaccagtg tggatcatcc aactccctct 420

caatcagaag cgacgaggga ctgccactgg agtttcgtgg acctaactat cctaactacg	480
ccatgaacgt gggtcaccag ggtgaatac	509
<210> 2	
<211> 509	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> standard artificial sequence 2	
<400> 2	
ggcttggctc atacatgtca ggtggtgtag gattcaccca gtacgcaaca gcagcctaca	60
cagacaacat cctcgacgac ttcacctact tcggtaagga gtacgtggag gaccttggca	120
aatctccgt acttgctgc cttgaccttg tccatctcgt tgggtcgagt gaggtcacat	180
tctacggact tgaacagtac gaggaatacc ctgcactcct cgaagaccag ttggtggat	240
cccagagggc ggcagtcgtt gcagctgcag ctggatgttc cacagccttc gcaacagccc	300
actctactgc cggtatcaac ggatgggtacc tctcaatgta cctgcacaag gagcagcact	360
ccaggctcgg attctacggt tacgacctcc aggaccagtg tggatcaacc aactcactct	420
ctgtcagggg cgacgaggga ctgccactgg agtttcgtgg acctaactat cctaactacg	480
ccatgaacgt gggtcaccag ggtgaatac	509
<210> 3	
<211> 356	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> standard artificial sequence 3	
<400> 3	
gcgctttgcg atgtgcagca ccagtaaagt gatggcggcg gcggcgggtgc ttaaacagag	60
cgagagcgat aagcacctgt taaatcagcg agttgagatc aaaacatctg acctggttaa	120
ctacaatccg attgcggaaa aacacgtcaa tggcacgatg acactggctg agcttagcgc	180
ggccgcgcta cagtacagcg acaatacagc catgaataag ctgattgccc atcttggcgg	240
cccggatagc gtgacggcgt ttgcccgaca gctgggagac gaaacgttcc gtctggatcg	300
cactgaacct acgtgaaca ccgccattcc cggcgaccgc cgtgatacca ccacgc	356
<210> 4	
<211> 368	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> standard artificial sequence 4

<400> 4

tatatgatat tcggggaaat gtgcgcggaa ccctatttg tttatttttc taaatacatt 60

caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctggtaaat gttcaataa tattgaaaa 120

ggaagagtat gagtattcaa cattttcgtg tcgcccttat tcctatctct ctattgattt 180

atctgcggga tacgccggcg agcatggccg agcgaaatca gcaaatcgcc gggatcggcg 240

cggcgtgat cgagcactgg caacgctaaa tatctctatc acttacagga aacttggggt 300

cgaatttaac atcaagcata aaagccaaga aaaatgcgat caccattcta aacacactta 360

tctctata 368

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mlas forward primer

<400> 5

ggtggtgtmg gdttcacmca rta 23

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mcrA-rev reverse primer

<400> 6

cgttcatbgc gtagttvggr tagt 24

<210> 7

<211> 25

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mbac-mcrA probe

<400> 7

argcacckaa camcatggac acwgt 25

<210> 8

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mrtA probe
 <400> 8
 ccaactcycy ctcmatcagr agcg 24
 <210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mcp probe
 <400> 9
 agccgaagaa accaagtctg gacc 24

 <210> 10
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> msp probe
 <400> 10
 tggtwcmacc aactcaactct ctgtc 25
 <210> 11
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MCR-7 probe
 <400> 11
 tgscttgacc ttrtccwtct cgyts 25
 <210> 12
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MCR-2a probe
 <400> 12

ccactctact gccggtatca acg	23
<210> 13	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> MCR-2b probe	
<400> 13	
atgtatctct gcagcagccg gtaca	25
<210> 14	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Fen probe	
<400> 14	
aavcacggyg gymtcggmaa g	21
<210> 15	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> msar probe	
<400> 15	
tctctcwggc tggta yctct ccatgtac	28
<210> 16	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> msa probe	
<400> 16	
ccttggcraa tcckccgwac ttg	23
<210> 17	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	CTX-M Forward primer	
<400>	17	
	atgtgcagya ccagtaargt katggc	26
<210>	18	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CTX-M Reverse primer	
<400>		
	18	
	atcackcggr tcgccnggra t	21
<210>	19	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CTX-M type 1 probe	
<400>	19	
	cccgacagct gggagacgaa acgt	24
<210>	20	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CTX-M type 2 probe	
<400>	20	
	caggtgctta tcgctctcgc tctgtt	26
<210>	21	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CTX-M type 9 probe	
<400>	21	
	ctggatcgca ctgaacctac gctga	25
<210>	22	
<211>	18	

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> all groups except CTX-M type 1 probe

<400> 22

cgacaatacn gccatgaa 18

<210> 23

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TEM Forward primer

<400> 23

tcggggaaat gtgcg 15

<210> 24

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TEM Reverse primer

<400> 24

ggaataaggg cgaca 15

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SHV Forward primer

<400> 25

tgatttatct gcgggatacs cc 22

<210> 26

<211> 21

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SHV Reverse primer

<400> 26

ttagcgttgc cagtgcgcga t 21

<210>	27	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OXA Forward primer	
<400>	27	
	cacttacagg aaacttgggg tcg	23
<210>	28	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OXA group probe	
<400>	28	
	atcaagcata aaagccaaga aaaatgc	27
<210>	29	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	OXA Reverse primer	
<400>	29	
	agtgtgttta gaatggtgat c	21