



등록특허 10-2127358



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월29일
(11) 등록번호 10-2127358
(24) 등록일자 2020년06월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01) *C12N 7/00* (2006.01)
C12Q 1/04 (2017.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6897 (2018.05)
C12N 1/20 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7028678
- (22) 출원일자(국제) 2014년03월13일
심사청구일자 2019년02월26일
- (85) 번역문제출일자 2015년10월12일
- (65) 공개번호 10-2015-0131199
- (43) 공개일자 2015년11월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/026536
- (87) 국제공개번호 WO 2014/160418
국제공개일자 2014년10월02일
- (30) 우선권주장
61/779,177 2013년03월13일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (56) 선행기술조사문헌
WO2008131230 A1
US5736388 A
Mol. Microbiol., 72(1), p.98-108, 2009.
Proc. Natl. Acad. Sci., 109(40),
p.16300-16305, 2012.

전체 청구항 수 : 총 36 항

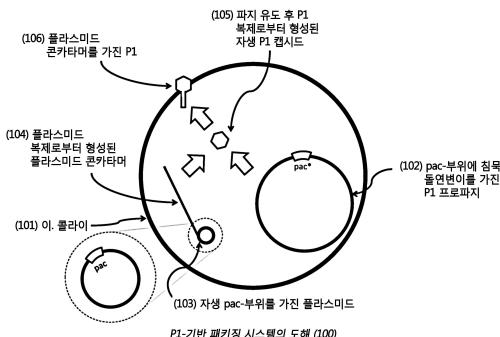
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 비-복제 형질도입 입자 및 형질도입 입자-기반 리포터 시스템

(57) 요약

리포터 분자로서 사용하기 위해 비-복제 형질도입 입자에 리포터 핵산 분자를 패키징하기 위한 방법 및 시스템이 제공된다. 비-복제 형질도입 입자는 바이러스로부터 구성될 수 있거나, 또는 바이러스 형질도입 및 복제 시스템을 사용할 수 있다. 리포터 핵산 분자는 표적 유전자 또는 세포를 검출하기 위한 리포터 유전자, 예컨대 리포터 분자 또는 선택성 마커를 포함한다. 리포터 분자로서 비-복제 형질도입 입자를 사용한 세포 및 표적 핵산 분자의 검출을 위한 방법 및 시스템이 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

C12N 15/74 (2013.01)

C12N 7/00 (2013.01)

C12Q 1/04 (2013.01)

C12Q 1/66 (2013.01)

C12N 2795/10143 (2013.01)

(72) 발명자

콕스, 헤더

미국, 캘리포니아 95032, 로스 가토스, 빌딩
비200, 유니버시티 애비뉴 983, 지니워브 바이오사
이언시스, 인코포레이티드

슈클라, 소니

미국, 캘리포니아 95032, 로스 가토스, 빌딩
비200, 유니버시티 애비뉴 983, 지니워블 바이오사
이언시스, 인코포레이티드

(30) 우선권주장

61/897,040 2013년10월29일 미국(US)

61/939,126 2014년02월12일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

비-복제 형질도입 입자에 리포터 핵산 분자를 패키징하기 위한 박테리아 세포 패키징 시스템으로, 상기 박테리아 세포는,

상기 비-복제 형질도입 입자로의 박테리오파지 핵산 분자의 패키징을 차단하는 제1 박테리오파지 유전자의 패키징 개시 부위 서열의 결실을 포함하는 제1 박테리오파지 유전자를 포함하는 용원화된 박테리오파지 게놈; 및

상기 비-복제 형질도입 입자로의 상기 리포터 핵산 분자의 레플리카의 패키징을 촉진하는 제2 패키징 개시 부위 서열을 포함하는 제2 박테리오파지 유전자를 포함하고, 상기 제2 박테리오파지 유전자는 단백질을 암호화하고, 상기 리포터 핵산 분자의 상기 레플리카는 상기 비-복제 형질도입 입자에의 패키징을 위한 레플리콘을 형성하는 리포터 핵산 분자;

를 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 2

비-복제 형질도입 입자에 리포터 핵산 분자를 패키징하기 위한 박테리아 세포 패키징 시스템으로, 상기 박테리아 세포는,

패키징 개시 부위 서열을 암호화하는 박테리오파지 유전자를 결여한 용원화 박테리오파지 게놈으로, 상기 박테리오파지 유전자의 결실이 상기 비-복제 형질도입 입자로의 박테리오파지 핵산 분자의 패키징을 차단하는 것; 및

제2 박테리오파지 유전자를 포함하는 리포터 핵산 분자로, 상기 제2 박테리오파지 유전자는 패키징 개시 부위 서열을 암호화하고 상기 비-복제 형질도입 입자로의 상기 리포터 핵산 분자의 레플리카의 패키징을 촉진하며, 상기 제2 박테리오파지 유전자는 상기 유전자에 의해서 암호화되는 단백질을 발현할 수 있고, 상기 리포터 핵산 분자의 상기 레플리카는 상기 비-복제 형질도입 입자로 패키징 될 수 있는 레플리콘을 형성하는 것;

을 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 3

비-복제 형질도입 입자에 리포터 핵산 분자를 패키징하기 위한 박테리아 세포 패키징 시스템으로, 상기 박테리아 세포는,

제1 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열을 포함하는 용원화된 박테리오파지 게놈으로, 상기 제1 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열이 상기 비-복제 형질도입 입자로의 박테리오파지 핵산 분자의 패키징을 차단하는 돌연변이를 포함하는 것; 및

제2 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열을 포함하는 리포터 핵산 분자로, 상기 제2 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열은 상기 돌연변이를 결여하고 상기 비-복제 형질도입 입자로의 상기 리포터 핵산 분자의 레플리카의 패키징을 촉진하며, 상기 리포터 핵산 분자의 상기 레플리카는 상기 비-복제 형질도입 입자로의 패키징을 위한 레플리콘을 형성하는 것;

을 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 4

비-복제 형질도입 입자에 리포터 핵산 분자를 패키징하기 위한 박테리아 세포 패키징 시스템으로, 상기 박테리

아 세포는,

패키징 유전자를 결여하고 상기 비-복제 형질도입 입자를 형성하는 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 용 원화된 박테리오파지 게놈; 및

리포터 핵산 분자와 패키징 유전자를 포함하는 게놈 섬 핵산 분자;

를 포함하는 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포터 핵산 분자는 프로모터에 작동 가능하게 연결되는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 6

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포터 핵산 분자가 복제 기점을 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 7

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 레플리콘이 상기 비-복제 형질도입 입자에 패키징될 수 있는 콘카타머를 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 제2 박테리오파지 유전자는 SEQ ID NO:9의 서열을 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 제1 박테리오파지 유전자는 SEQ ID NO:8의 서열을 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 10

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 제1 및 상기 제2 박테리오파지 유전자는 상기 패키징 개시 부위 서열을 포함하는 작은 터미나아제(terS) 유전자를 각각 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 terS 유전자는 에스. 아우레우스(*S. aureus*) 박테리오파지 ϕ 11 또는 ϕ 80α terS 유전자인, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 12

제 3 항에 있어서, 상기 제1 및 상기 제2 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열은 작은 터미나아제 유전자로부터의 패키징 개시 부위 서열을 각각 포함하거나,

상기 제1 및 상기 제2 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열은 에스. 아우레우스 박테리오파지 ϕ 11 또는 ϕ 80α의 작은 터미나아제(terS) 유전자로부터의 pac-부위 서열을 각각 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 13

제 4 항에 있어서, 상기 패키징 유전자는 작은 터미나아제(terS) 유전자를 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

상기 terS 유전자는 에스. 아우레우스 박테리오파지 ϕ 80α terS 유전자 또는 박테리오파지 ϕ 11 terS 유전자를 포함하거나,

상기 terS 유전자는 SEQ ID NO:9의 서열을 포함하는,

박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 15

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 레플리콘은 에스. 아우레우스 pT181 플라스미드 복제 기점으로부터 유래되는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 16

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 레플리콘은 SEQ ID NO:5의 서열을 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 17

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 상기 제2 박테리오파지 유전자 또는 제 4 항의 상기 패키징 유전자의 상기 패키징 개시 부위 서열은 pac-부위를 포함하는 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 18

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리포터 핵산 분자를 포함하는 플라스미드를 더 포함하는 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 19

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 제2 박테리오파지 유전자가 프로모터에 작동 가능하게 연결되는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 20

제 19 항에 있어서, 상기 프로모터는 유도성 프로모터 또는 구성성 프로모터인, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 21

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 박테리오파지는 에스. 아우레우스 박테리오파지 ϕ 80 a 또는 박테리오파지 ϕ 11을 포함하는 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 22

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 박테리아 세포는,

a). 콜라이(*E. coli*) 세포;

그람음성 세포; 또는

그람양성 세포;

를 포함하는 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 23

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 박테리아 세포는 에스. 아우레우스 세포를 포함하는 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 24

제 1 항에 있어서, 상기 리포터 핵산 분자는 리포터 유전자를 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 25

제 24 항에 있어서, 상기 리포터 유전자는,

검출 가능한 마커 및/또는 선택성 마커를 암호화하는 것; 또는

발광 반응을 매개하는 유전자 인코딩 효소, 비색 반응을 매개하는 유전자 인코딩 효소, 유전자 인코딩 형광 단백질, 핵산 분자 인코딩 친화성 웹티드 및 유전자 인코딩 선택성 마커로 구성되는 군으로부터 선택되는 것인, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 상기 발광 반응을 매개하는 유전자 인코딩 효소는 luxA, luxB, luxAB, luc, ruc 및 nluc로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 27

제 25 항에 있어서, 상기 비색 반응을 매개하는 유전자 인코딩 효소는 lacZ 및 HRP로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 28

제 25 항에 있어서, 상기 유전자 인코딩 형광 단백질은 GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry 및 근적외선 형광 단백질로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 29

제 25 항에 있어서, 상기 핵산 분자 인코딩 친화성 웹티드는 His-tag 및 3X-FLAG로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 30

제 25 항에 있어서, 상기 유전자 인코딩 선택성 마커는 ampC, tet(M), CAT 및 erm로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 31

제 4 항에 있어서, 상기 게놈 섬 핵산 분자는,

- a) SaPIbov2 게놈 섬 핵산 분자를 포함하고;
- b) SaPI, SaPI1, SaPI2, SaPIbov1 및 SaPibov2 게놈 섬 핵산 분자로 구성되는 군으로부터 선택되며;
- c) 인테그라아제 유전자를 포함하고, 상기 인테그라아제 유전자는 상기 박테리아 세포의 박테리아 게놈의 외부와 내부에서 상기 게놈 섬 핵산 분자를 절제하고 통합하기 위한 인테그라아제 단백질을 암호화하며;
- d) 상기 박테리아 세포의 박테리아 게놈에 통합되고;
- e) 복제되어 분자 레플리콘을 형성할 수 있고, 상기 분자 레플리콘은 상기 박테리아 세포에서 박테리오파지 패키징 기구에 의해서 패키징될 수 있는 것이며; 또는
- f) 인테그라아제 유전자를 결여하는;

박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 32

제 31 항에 있어서,

상기 c)의 상기 인테그라아제 유전자는 SEQ ID NO:10의 서열을 포함하는 것;

상기 e)에서 상기 핵산 분자는 콘카타머를 형성하는 것;

상기 e)에서 상기 복제된 게놈 섬 핵산 분자는 상기 비-복제 형질도입 입자에 패키징될 수 있는 것;

상기 f)에서 프로모터에 작동 가능하게 연결된 인테그라아제 유전자를 포함하는 박테리아 유전자를 더 포함하는 것; 및

상기 f)에서 상기 인테그라아제 유전자는 상기 박테리아 세포의 박테리아 게놈의 외부와 내부에서 상기 게놈 섬 핵산 분자를 절제하고 통합하기 위한 인테그라아제 단백질을 암호화하는 것;

중 하나 이상을 더 포함하는, 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 33

비-복제 형질도입 입자에 리포터 핵산 분자를 패키징하기 위한 방법으로서,

상기 리포터 핵산 분자와 패키징된 비-복제 형질도입 입자를 생성하기 위해 상기 박테리오파지의 세포용해 기

(phase)를 유도하는 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항의 상기 박테리아 세포에 대한 조건을 제공하는 단계;
및
상기 리포터 핵산 분자를 포함하는 상기 비-복제 형질도입 입자를 분리하는 단계;
를 포함하는 방법.

청구항 34

제 33 항에 있어서, 상기 비-복제 형질도입 입자는 복제된 박테리오파지 계놈을 함유하지 않는 것인, 방법.

청구항 35

제 33 항에 있어서, 상기 세포용해 기의 상기 유도는 상기 박테리아 세포의 상기 계놈으로부터 상기 계놈 섬 핵산 분자의 삭제를 촉발하는 것인, 방법.

청구항 36

제 33 항의 상기 방법으로부터 생성된 상기 리포터 핵산 분자의 레플리카를 포함하는 상기 비-복제 형질도입 입자를 포함하는 조성물.

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

청구항 166

삭제

청구항 167

삭제

청구항 168

삭제

청구항 169

삭제

청구항 170

삭제

청구항 171

삭제

청구항 172

삭제

청구항 173

삭제

청구항 174

삭제

청구항 175

삭제

청구항 176

삭제

청구항 177

삭제

청구항 178

삭제

청구항 179

삭제

청구항 180

삭제

청구항 181

삭제

청구항 182

삭제

청구항 183

삭제

청구항 184

삭제

청구항 185

삭제

청구항 186

삭제

청구항 187

삭제

청구항 188

삭제

청구항 189

삭제

청구항 190

삭제

청구항 191

삭제

청구항 192

삭제

청구항 193

삭제

청구항 194

삭제

청구항 195

삭제

청구항 196

삭제

청구항 197

삭제

청구항 198

삭제

청구항 199

삭제

청구항 200

삭제

청구항 201

삭제

청구항 202

삭제

청구항 203

삭제

청구항 204

삭제

청구항 205

삭제

청구항 206

삭제

청구항 207

삭제

청구항 208

삭제

청구항 209

삭제

청구항 210

삭제

청구항 211

삭제

청구항 212

삭제

청구항 213

삭제

청구항 214

삭제

청구항 215

삭제

청구항 216

삭제

청구항 217

삭제

청구항 218

삭제

청구항 219

삭제

청구항 220

삭제

청구항 221

삭제

청구항 222

삭제

청구항 223

삭제

청구항 224

삭제

청구항 225

삭제

청구항 226

삭제

청구항 227

삭제

청구항 228

삭제

청구항 229

삭제

청구항 230

삭제

청구항 231

삭제

청구항 232

삭제

청구항 233

삭제

청구항 234

삭제

청구항 235

삭제

청구항 236

삭제

청구항 237

삭제

청구항 238

삭제

청구항 239

삭제

청구항 240

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

본 출원은 2013년 3월 13일자 제출된 미국 임시 출원 No. 61/779,177, 2013년 10월 29일자 제출된 미국 임시 출원 No. 61/897,040, 및 2014년 2월 12일자 제출된 미국 임시 출원 No. 61/939,126의 이익을 주장하며, 이들은 각각 참고자료로 그 전체가 본원에 포함된다.

[0003] 기술분야

본 발명은 세포에서의 표적 유전자의 검출을 위해 세포에의 비-복제 형질도입 리포터 분자의 패키징 및 송달을 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 형질도입 입자는 비-바이러스 핵산을 세포에 송달할 수 있는 바이러스를 말한다. 바이러스-기반 리포터 시스템은 세포의 존재를 검출하는데 사용되며, 세포로부터 리포터 분자의 발현을 허용하는 바이러스의 용원기에 의존한다. 바이러스-기반 리포터 시스템은 리포터 분자를 발현하고 표적 세포가 검출 가능한 신호를 방출하도록 하는 복제-컴페턴트 형질도입 입자를 사용한다.

[0006] 그러나, 바이러스의 세포용해 주기가 바이러스-기반 리포터 분석에 악영향을 키지는 것으로 밝혀졌다(Carriere, C. et al., Conditionally replicating luciferase reporter phages: Improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. Journal of Clinical Microbiology, 1997. 35(12): p. 3232-3239). Carriere et al.은 30°C에서 억제되지만 37°C에서 활성인 세포 용해 주기를 가지는 엠. 투베르콜로시스/바실루스 칼메트-구에린(BCG) 루시페라제 리포터 과자를 개발했다. 이 시스템을 사용하여 Carriere et al.은 세포용해 주기가 억제된 리포터 과자를 사용한 BCG의 검출을 증명했다.

[0007] 그러나, 박테리오파지-기반 리포터 분석에서 박테리오파지의 복제 기능을 제거하지 않고 억제한 것과 관련되는 몇 가지 단점이 있다. 먼저, 박테리오파지의 복제 기능을 제어하는 경우 분석 조건에 제한이 생긴다. 예를 들어, Carriere et al.에 의해 사용된 리포터 과자 phAE40의 세포용해 주기는 이 과자가 30°C의 비-허용 온도에서 세포를 감염시키는데 사용되었을 때 억제되었다. 이 온도 요건은 표적 박테리아의 최적 온도가 37°C였다는 점에서 리포터 분석에 제한적 조건이 되었다. 이들 제한적 조건은 최적 분석 성능을 저해한다.

[0008] 더욱이, 바이러스의 복제 기능은 제어하기 어렵다. 바이러스의 복제는 리포터 시스템으로서 형질도입 입자의 사용 동안 억제되어야 한다. 예를 들어, Carriere et al.에 의해서 보고된 리포터 과자 phAE40의 세포용해 활성은 감소되었지만 제거되지는 않았으며, 그 결과 분석에서의 루시페라제 신호가 약해졌다. Carriere et al.은 무손상 과자-발현 유전자 및 분석의 온도 제한과 같은 리포터 신호를 최종적으로 약화시킨 원인을 강조했고, 이들은 모두 과자 리포터의 세포용해 주기가 제거되지 않았다는 사실로부터 기인한다.

[0009] 과자의 자연적 용원 주기에 의존하는 리포터 분석은 세포용해 활성을 산발적으로 나타낼 것으로 예상될 수 있다. 게다가, 과자의 용원 주기에 의존하는 분석은 유사한 과자로 이미 용원화된 표적 세포와 침입한 바이러스 핵산을 표적화하는 자연 발생 숙주 제한 시스템으로부터 중복감염 면역을 나타내는 경향이 있을 수 있고, 이것이 리포터 과자의 숙주 범위를 제한한다.

[0010] 다른 예에서, 형질도입 입자 제조 시스템은 외래 핵산 분자를 패키징하도록 설계되지만, 형질도입 입자는 주로 외래 핵산 분자와 자생 자손 바이러스 핵산 분자의 조합을 함유한다. 자생 바이러스는 분석 성능을 저해하는 세포용해 활성을 나타낼 수 있으며, 형질도입 입자를 정제하기 위해서는 바이러스의 세포용해 활성이 제거되어

야 한다. 그러나, 이러한 정제는 일반적으로 불가능하다. Scholl et al.에 의해 발명의 명칭 "Reporter Plasmid Packaging System for Detection of Bacteria"으로 개시된 U.S. 2009/0155768 A는 이러한 형질도입 입자 시스템의 개발을 보고했다. 이 시스템의 생성물은 리포터 형질도입 입자와 자생 박테리오파지의 조합이다 (참고자료의 도 8). 상기 저자들은 형질도입 입자와 자생 박테리오파지가 초원심 분리에 의해서 분리될 수 있다고 했지만, 이 분리는 형질도입 입자와 자생 바이러스가 초원심 분리에 의한 분리를 허용하는 상이한 밀도를 나타내는 시스템에서만 가능하다. 이러한 속성은 참고자료에서 개시된 박테리오파지 T7-기반 패키징 시스템에 의해서 제시되지만, 이것은 다른 바이러스 시스템에도 일반적으로 적용될 수 있는 속성이 아니다. 바이러스 패키징 기구는 흔히 초원심 분리에 의해 분리될 수 없는 구별 불가능한 밀도를 나타내는 자생 바이러스와 형질도입 입자를 야기하는 헤드풀 패키징을 나타낸다. 또한, 바이러스 패키징 시스템은 구별 불가능한 밀도를 가진 자생 바이러스와 형질도입 입자를 야기하는 적절한 바이러스 구조 조립을 위한 요건으로서 패키징의 최소량에 의존한다.

[0011] 따라서, 검출 한계를 증가시키고 거짓 음성 결과를 가져옴으로써 리포터 분석의 성능을 제한할 수 있는, 바이러스의 세포용해 기능으로부터의 악영향과 중복감염 면역 및 바이러스 핵산 분자와 바이러스 기능을 표적화하는 숙주 제한 기전에 의해서 제한될 가능성에 의해서 영향을 받지 않는 비-복제 형질도입 입자가 요구된다.

[0012] 형질도입 입자가 조작된 경우에도, 세포에서 표적 핵산 분자를 검출하고 보고하기 위해 형질도입 입자를 사용하는 방법에는 몇 가지 제한이 있다. 일부 방법은 세포의 파괴와 세포 용해물에서 전사체를 분리하고 검출하기 위한 복잡한 기술을 필요로 한다. 검출 방법은 항체, 앱타머, 또는 핵산 프로브와 같은 표지된 프로브를 사용하는 것을 포함한다. 표적 유전자에 지정된 표지 프로브는 의도치 않은 표적과의 비-특이적 결합을 가져오거나, 또는 높은 신호-대-노이즈 비율을 가진 신호를 생성할 수 있다. 따라서, 세포에서의 내인성 핵산 분자의 검출 및 보고를 위한 특이적이며 효과적이고 정확한 방법이 요구된다.

[0013] 따라서, 복제-컴페턴트 자손 바이러스를 제거하면서 세포에서의 리포터 분자의 패키징 및 발현을 허용하는 비-복제 형질도입 입자를 생성하기 위한 방법 및 시스템이 요구된다. 또한, 발현된 리포터 분자를 사용하여 세포에서 분자를 검출하기 위한 효과적이며 정확한 방법도 요구된다.

발명의 내용

[0014] 비-복제 형질도입 입자에 리포터 핵산 분자를 패키징하기 위한 박테리아 세포 패키징 시스템이 본원에 개시되며, 상기 박테리아 세포는 패키징 개시 부위 서열을 암호화하는 박테리오파지 유전자를 결여한 용원화된 박테리오파지 계놈; 및 제2 박테리오파지 유전자를 포함하는 리포터 핵산 분자를 포함하고, 상기 박테리오파지 유전자의 결실은 상기 비-복제 형질도입 입자에 박테리오파지 핵산 분자의 패키징을 차단하며, 상기 제2 박테리오파지 유전자는 패키징 개시 부위 서열을 암호화하고 상기 비-복제 형질도입 입자에 상기 리포터 핵산 분자의 레플리카의 패키징을 촉진하고, 상기 제2 박테리오파지 유전자는 상기 유전자에 의해서 암호화된 단백질을 발현 할 수 있으며, 상기 리포터 핵산 분자의 상기 레플리카는 상기 비-복제 형질도입 입자에 패키징될 수 있는 레플리콘을 형성한다.

[0015] 일부 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 다른 구체예에서, 프로모터는 상기 박테리아 세포에서 상기 리포터 핵산 분자로부터 발현된 리포터 분자의 반응성에 기여하도록 선택된다. 하나의 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 복제의 기원을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 레플리콘은 상기 비-복제 형질도입 입자에 패키징될 수 있는 콘카타머를 포함한다.

[0016] 한 구체예에서, 제1 및 상기 제2 박테리오파지 유전자는 각각 엔테로박테리아세아에 박테리오파지 P1의 pacA 유전자를 포함하고, 상기 패키징 개시 부위 서열을 포함한다. 하나의 구체예에서, 제2 박테리오파지 유전자는 SEQ ID NO:9의 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 레플리콘은 엔테로박테리아세아에 박테리오파지 P1 세포용 해 레플리콘이다. 특정 구체예에서, 레플리콘은 C1 리프레서-제어 P53 프로모터, 프로모터 P53 안티센스, repL 유전자, 및 k11A 유전자의 프레임 내 결실을 포함한다. 하나의 구체예에서, 레플리콘은 SEQ ID NO:3의 서열을 포함한다.

[0017] 또 다른 구체예에서, 제1 및 상기 제2 박테리오파지 유전자는 각각 상기 패키징 개시 부위 서열을 포함하는 작은 터미나아제(terS) 유전자를 포함한다. 하나의 구체예에서, terS 유전자는 에스. 아우레우스 박테리오파지 φ11 또는 φ80α terS 유전자이다.

[0018] 다른 구체예에서, 레플리콘은 에스. 아우레우스 pT181 플라스미드 복제 기원으로부터 유래된다. 또 다른 구체예에서, 레플리콘은 SEQ ID NO:5의 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제2 박테리오파지 유전자의 패키

정 개시 부위 서열은 pac-부위를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 제2 박테리오파지 유전자의 pac-부위는 SEQ ID NO:7의 서열을 포함한다. 한 양태에서, 상기 제2 박테리오파지 유전자의 패키징 개시 부위 서열은 cos-부위를 포함한다. 다른 양태에서, 상기 제2 박테리오파지 유전자의 패키징 개시 부위 서열은 콘카타며 접합부를 포함한다.

[0019] 다른 양태에서, 플라스미드는 상기 리포터 핵산 분자를 포함한다. 하나의 양태에서, 제2 박테리오파지 유전자는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 다른 구체예에서, 프로모터는 유도성 프로모터 또는 구성성 프로모터이다. 하나의 구체예에서, 박테리오파지는 엔테로박테리아세아에 박테리오파지 P1을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 박테리오파지는 에스. 아우레우스 박테리오파지 ϕ 80α 또는 박테리오파지 ϕ 11을 포함한다. 하나의 양태에서, 박테리아 세포는 이. 콜라이 세포를 포함한다. 다른 양태에서, 박테리아 세포는 에스. 아우레우스 세포를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 박테리아 세포는 그람음성 세포를 포함한다. 다른 구체예에서, 박테리아 세포는 그람양성 세포를 포함한다.

[0020] 다른 양태에서, 리포터 핵산 분자는 리포터 유전자를 포함한다. 하나의 양태에서, 리포터 유전자는 검출 가능한 마커 및/또는 선택성 마커를 암호화한다. 특정 양태에서, 리포터 유전자는 발광 반응을 매개하는 효소(luxA, luxB, luxAB, luc, ruc, nluc), 비색 반응을 매개하는 효소(lacZ, HRP), 형광 단백질(GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, 근적외선 형광 단백질), 친화성 웹티드(His-tag, 3X-FLAG) 및 선택성 마커(ampC, tet(M), CAT, erm)로 구성되는 군으로부터 선택된다. 다른 양태에서, 리포터 핵산 분자는 앱타머를 포함한다. 또 다른 양태에서, 리포터 핵산 분자는 상기 리포터 핵산 분자에서 제2 서열에 상보성인 핵산 전사체 서열을 포함한다.

[0021] 하나의 구체예에서, 핵산 전사체 서열은 세포 전사체에 상보성이다. 다른 구체예에서, 핵산 전사체 서열은 시스-억제 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 리포터 핵산 분자의 레플리카는 상기 리포터 핵산 분자의 상기 레플리카에서 제2 서열에 상보성인 핵산 전사체 서열을 포함하며, 여기서 핵산 전사체 서열은 세포 전사체에 상보성이고, 상기 핵산 전사체 서열은 시스-억제 서열을 포함한다.

[0022] 일부 구체예에서, 상기 리포터 핵산 분자와 패키징된 비-복제 형질도입 입자를 생성하기 위해 본원에 개시된 상기 박테리아 세포에 박테리오 파지의 세포용해 기를 유도하는 조건을 제공하는 단계; 및 상기 리포터 핵산 분자를 포함하는 상기 비-복제 형질도입 입자를 분리하는 단계를 포함하는 비-복제 형질도입 입자에 리포터 핵산 분자를 패키징하는 방법이 제공된다. 하나의 구체예에서, 비-복제 형질도입 입자는 복제된 박테리오파지 게놈을 함유하지 않는다. 다른 구체예에서, 상기 세포용해 기의 유도는 상기 박테리아 세포의 상기 게놈으로부터 상기 게놈 섬 핵산 분자의 절제를 촉발한다.

[0023] 다른 구체예에서, 본원에 개시된 방법으로부터 생성된 상기 리포터 핵산 분자의 레플리카를 포함하는 상기 비-복제 형질도입 입자를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0024] 본 발명은 비-복제 형질도입 입자에 리포터 핵산 분자를 패키징하는 박테리아 세포 패키징 시스템을 포함하며, 상기 박테리아 세포는 제1 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열을 포함하는 용원화된 박테리오파지 게놈, 및 제2 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열을 포함하는 리포터 핵산 분자를 포함하고, 상기 제1 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열은 상기 비-복제 형질도입 입자에 박테리오파지 핵산 분자의 패키징을 차단하는 돌연변이를 포함하며, 상기 제2 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열은 상기 돌연변이를 결여하고 상기 비-복제 형질도입 입자에 상기 리포터 핵산 분자의 레플리카의 패키징을 촉진하며, 상기 리포터 핵산 분자의 상기 레플리카는 상기 비-복제 형질도입 입자에의 패키징을 위한 레플리콘을 형성한다.

[0025] 하나의 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 다른 구체예에서, 프로모터는 상기 박테리아 세포에서 상기 리포터 핵산 분자로부터 발현된 리포터 분자의 반응성에 기여하도록 선택된다. 또 다른 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 복제 기원을 포함한다. 하나의 구체예에서, 레플리콘은 상기 비-복제 형질도입 입자에 패키징될 수 있는 콘카타머를 포함한다. 다른 양태에서, 제1 및 상기 제2 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열은 각각 작은 터미나아제 유전자로부터의 패키징 개시 부위 서열을 포함한다. 하나의 양태에서, 제1 및 상기 제2 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열은 각각 엔테로박테리아세아에 박테리오파지 P1의 pacA 유전자로부터의 pac-부위 서열을 포함한다. 다른 양태에서, 제1 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열은 SEQ ID NO:2를 포함한다. 또 다른 양태에서, 제2 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열은 SEQ ID NO:1을 포함한다. 하나의 구체예에서, 레플리콘은 엔테로박테리아세아에 박테리오파지 P1 세포용해 레플리콘을 포함한다. 다른 구체예에서, 레플리콘은 C1 리프레서-제어 P53 프로모터, 프로모터 P53 안티센스, repL 유전자, 및 k1A 유전자의 프레임 내 결실을 포함한다. 다른 양태에서, 레플리콘은 SEQ ID NO:3의 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 제1

및 상기 제2 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열은 각각 에스. 아우레우스 박테리오파지 ϕ 11 또는 ϕ 80a의 작은 터미나아제(terS) 유전자로부터의 pac-부위 서열을 포함한다. 다른 양태에서, 레플리콘은 에스. 아우레우스 pT181 플라스미드 복제 기원으로부터 유래된다. 또 다른 양태에서, 레플리콘은 SEQ ID NO:5의 서열을 포함한다. 하나의 양태에서, 제1 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열은 SEQ ID NO:2의 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, 제2 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열은 SEQ ID NO:1의 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 패키징 개시 부위 서열은 pac-부위를 포함한다. 다른 구체예에서, 패키징 개시 부위 서열은 cos-부위를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 패키징 개시 부위 서열은 콘카타며 접합부를 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 제1 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열에서 돌연변이는 침묵 돌연변이를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 제1 박테리오파지 패키징 개시 부위 서열에서 돌연변이는 상기 패키징 개시 서열의 절단을 차단한다. 다른 구체예에서, 플라스미드는 상기 리포터 핵산 분자를 포함한다. 하나의 구체예에서, 박테리오파지는 엔테로박테리아세아에 박테리오파지 P1을 포함한다.

[0026] 다른 구체예에서, 박테리오파지는 에스. 아우레우스 박테리오파지 ϕ 11 또는 ϕ 80a를 포함한다. 하나의 구체예에서, 박테리아 세포는 이. 콜라이 세포를 포함한다. 다른 구체예에서, 박테리아 세포는 에스. 아우레우스 세포를 포함한다. 일부 구체예에서, 박테리아 세포는 그람음성 박테리아 세포를 포함한다. 하나의 양태에서, 박테리아 세포는 그람양성 박테리아 세포를 포함한다. 다른 양태에서, 리포터 핵산 분자는 리포터 유전자를 포함한다. 또 다른 양태에서, 리포터 유전자는 검출 가능한 마커 및/또는 선택성 마커를 암호화한다.

[0027] 다른 양태에서, 리포터 유전자는 발광 반응을 매개하는 효소를 암호화하는 유전자(luxA, luxB, luxAB, luc, ruc, nluc), 비색 반응을 매개하는 효소를 암호화하는 유전자(lacZ, HRP), 형광 단백질을 암호화하는 유전자(GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, 근적외선 형광 단백질), 친화성 웹티드를 암호화하는 핵산 분자(His-tag, 3X-FLAG) 및 선택성 마커를 암호화하는 유전자(ampC, tet(M), CAT, erm)로 구성되는 군으로부터 선택된다. 다른 양태에서, 리포터 핵산 분자는 앱타머를 포함한다. 다른 양태에서, 레플리콘은 박테리오파지 패키징 기구에 의해서 상기 비-복제 형질도입 입자에 패키징된다. 일부 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 상기 리포터 핵산 분자에서 제2 서열에 상보성인 핵산 전사체 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 핵산 전사체 서열은 세포 전사체에 상보성이다.

[0028] 하나의 양태에서, 핵산 전사체 서열은 시스-억제 서열을 포함한다. 다른 양태에서, 상기 리포터 핵산 분자의 레플리카는 상기 리포터 핵산 분자의 상기 레플리카에서 제2 서열에 상보성인 핵산 전사체 서열을 포함하며, 상기 핵산 전사체 서열은 세포 전사체에 상보성이고, 상기 핵산 전사체 서열은 시스-억제 서열을 포함한다.

[0029] 특정 양태에서, 리포터 핵산 분자와 패키징된 비-복제 형질도입 입자를 생성하기 위해 본원에 개시된 상기 박테리아 세포에 상기 박테리오파지의 세포용해 기를 유도하는 조건을 제공하는 단계; 및 상기 리포터 핵산 분자를 포함하는 상기 비-복제 형질도입 입자를 분리하는 단계를 포함하는 리포터 핵산 분자를 패키징하는 방법이 제공된다.

[0030] 다른 양태에서, 비-복제 형질도입 입자는 복제된 박테리오파지 게놈을 함유하지 않는다. 하나의 양태에서, 상기 세포용해 기의 도입은 상기 박테리아 세포의 상기 게놈으로부터 상기 게놈 섭 핵산 분자의 절제를 촉발한다.

[0031] 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 상기 방법으로부터 생성된 상기 리포터 핵산 분자의 레플리카를 포함하는 상기 비-복제 형질도입 입자를 포함하는 조성물을 포함한다.

[0032] 하나의 양태에서, 본 발명은 비-복제 형질도입 입자에 리포터 핵산 분자를 패키징하기 위한 박테리아 세포 패키징 시스템을 포함하며, 상기 박테리아 세포는 상기 비-복제 형질도입 입자에 박테리오파지 핵산 분자의 패키징을 차단하는 제1 박테리오파지 유전자의 패키징 개시 부위 서열의 결실을 포함하는 제1 박테리오파지 유전자를 포함하는 용원화된 박테리오파지 게놈; 및 상기 비-복제 형질도입 입자에 상기 리포터 핵산 분자의 레플리카의 패키징을 촉진하는 제2 패키징 개시 부위 서열을 포함하는 제2 박테리오파지 유전자를 포함하는 리포터 핵산 분자를 포함하고, 상기 제2 박테리오파지 유전자는 단백질을 암호화하며, 상기 리포터 핵산 분자의 상기 레플리카는 상기 비-복제 형질도입 입자에의 패키징을 위한 레플리콘을 형성한다.

[0033] 다른 양태에서, 리포터 핵산 분자는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 하나의 양태에서, 프로모터는 상기 박테리아 세포에서 상기 리포터 핵산 분자로부터 발현된 리포터 분자의 반응성에 기여하도록 선택된다. 특정 양태에서, 리포터 핵산은 복제 기원을 포함한다. 다른 양태에서, 레플리콘은 상기 비-복제 형질도입 입자에 패키징될 수 있는 콘카타며를 포함한다. 하나의 양태에서, 제1 및 상기 제2 박테리오파지 유전자는 각각 엔테로박테리아세아에 박테리오파지 P1의 pacA 유전자를 포함하고, 상기 패키징 개시 부위 서열을 포함한다. 다른 양

태에서, 제1 박테리오파지 유전자는 SEQ ID NO:6의 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 제2 박테리오파지 유전자는 SEQ ID NO:7의 서열을 포함한다. 하나의 양태에서, 레플리콘은 엔테로박테리아세아에 박테리오파지 P1 세포용해 레플리콘을 포함한다. 또 다른 양태에서, 레플리콘은 C1 리프레서-제어 P53 프로모터, 프로모터 P53 안티센스, repL 유전자, 및 kilA 유전자의 프레임 내 결실을 포함한다. 다른 양태에서, 레플리콘은 SEQ ID NO:3의 서열을 포함한다. 다른 양태에서, 제1 및 상기 제2 박테리오파지 유전자는 각각 상기 패키징 개시 부위 서열을 포함하는 작은 터미나아제(terS) 유전자를 포함한다. 하나의 양태에서, terS 유전자는 에스. 아우레우스 박테리오파지 φ11 또는 φ80α terS 유전자이다. 다른 양태에서, 제1 박테리오파지 유전자는 SEQ ID NO:8의 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, 제2 박테리오파지 유전자는 SEQ ID NO:9의 서열을 포함한다. 하나의 양태에서, 레플리콘은 에스. 아우레우스 pT181 플라스미드 복제 기원으로부터 유래된다. 하나의 구체예에서, 레플리콘은 SEQ ID NO:5의 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 제2 박테리오파지 유전자의 패키징 개시 부위 서열은 pac-부위를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 상기 제2 박테리오파지 유전자의 패키징 개시 부위 서열은 cos-부위를 포함한다.

[0034] 특정 구체예에서, 상기 제2 박테리오파지 유전자의 패키징 개시 부위 서열은 콘카타머 접합부를 포함한다. 하나의 구체예에서, 플라스미드는 상기 리포터 핵산 분자를 포함한다. 다른 구체예에서, 제2 박테리오파지 유전자는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 또 다른 구체예에서, 프로모터는 유도성 프로모터 또는 구성성 프로모터이다. 특정 구체예에서, 박테리오파지는 엔테로박테리아세아에 박테리오파지 P1을 포함한다. 하나의 구체예에서, 박테리오파지는 에스. 아우레우스 박테리오파지 φ80α 또는 박테리오파지 φ11을 포함한다. 다른 구체예에서, 박테리아 세포는 이. 콜라이 세포를 포함한다. 다른 구체예에서, 박테리아 세포는 에스. 아우레우스 세포를 포함한다. 하나의 구체예에서, 박테리아 세포는 그람음성 세포를 포함한다. 다른 구체예에서, 박테리아 세포는 그람양성 세포를 포함한다.

[0035] 다른 양태에서, 리포터 핵산 분자는 리포터 유전자를 포함한다. 하나의 양태에서, 리포터 유전자는 검출 가능한 마커 및/또는 선택성 마커를 암호화한다. 다른 양태에서, 리포터 유전자는 발광 반응을 매개하는 효소를 암호화하는 유전자(luxA, luxB, luxAB, luc, ruc, nluc), 비색 반응을 매개하는 효소를 암호화하는 유전자(lacZ, HRP), 형광 단백질을 암호화하는 유전자(GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, 근적외선 형광 단백질), 친화성 웨პ티드를 암호화하는 핵산 분자(His-tag, 3X-FLAG) 및 선택성 마커를 암호화하는 유전자(ampC, tet(M), CAT, erm)로 구성되는 군으로부터 선택된다. 하나의 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 앱타머를 포함한다. 다른 구체예에서, 레플리콘은 박테리오파지 패키징 기구에 의해서 상기 비-복제 형질도입 입자에 패키징된다. 또 다른 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 상기 리포터 핵산 분자에서 제2 서열에 상보성인 핵산 전사체 서열을 포함한다. 하나의 구체예에서, 핵산 전사체 서열은 세포 전사체에 상보성이다. 다른 구체예에서, 핵산 전사체 서열은 시스-억제 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 리포터 핵산 분자의 레플리카는 상기 리포터 핵산 분자의 상기 레플리카에서 제2 서열에 상보성인 핵산 전사체 서열을 포함하며, 상기 핵산 전사체 서열은 세포 전사체에 상보성이고, 상기 핵산 전사체 서열은 시스-억제 서열을 포함한다.

[0036] 본 발명은 비-복제 형질도입 입자에 리포터 핵산 분자를 패키징하는 방법을 포함하며, 이것은 상기 리포터 핵산 분자와 패키징된 비-복제 형질도입 입자를 생성하기 위해 상기 박테리아 세포에 상기 박테리오파지의 세포용해기를 유도하는 조건을 제공하는 단계; 및 상기 리포터 핵산 분자를 포함하는 상기 비-복제 형질도입 입자를 분리하는 단계를 포함한다. 하나의 구체예에서, 비-복제 형질도입 입자는 복제된 박테리오파지 게놈을 함유하지 않는다. 다른 구체예에서, 상기 세포용해 기의 유도는 상기 박테리아 세포의 상기 게놈으로부터 상기 게놈 섬 핵산 분자의 절제를 촉발한다.

[0037] 일부 양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 상기 방법으로부터 생성된 상기 리포터 핵산 분자의 레플리카를 포함하는 상기 비-복제 형질도입 입자를 포함하는 조성물을 포함한다.

[0038] 다른 양태에서, 본 발명은 비-복제 형질도입 입자에 리포터 핵산 분자를 패키징하기 위한 박테리아 세포 패키징 시스템을 포함하며, 상기 박테리아 세포는 패키징 유전자를 결여하고 상기 비-복제 형질도입 입자를 형성하는 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 용원화된 박테리오파지 게놈; 및 리포터 핵산 분자와 패키징 유전자를 포함하는 게놈 섬 핵산 분자를 포함한다. 하나의 양태에서, 패키징 유전자는 작은 터미나아제(terS) 유전자를 포함한다. terS 유전자는 에스. 아우레우스 박테리오파지 φ80α terS 유전자 또는 박테리오파지 φ11 terS 유전자를 포함한다.

[0039] 하나의 양태에서, terS 유전자는 SEQ ID NO:9의 서열을 포함한다. 다른 양태에서, 게놈 섬 핵산 분자는 SaPIbov2 게놈 섬 핵산 분자를 포함한다. 또 다른 양태에서, 게놈 섬 핵산 분자는 SaPI, SaPI1, SaPI2,

SaPIbov1 및 SaPIbov2 게놈 섬 핵산 분자로 구성되는 군으로부터 선택된다. 다른 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 또 다른 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 복제 기원을 포함한다. 일부 구체예에서, 박테리오파지는 에스. 아우레우스 박테리오파지 ϕ 80a 또는 박테리오파지 ϕ 11을 포함한다. 다른 구체예에서, 박테리아 세포는 에스. 아우레우스 세포를 포함한다. 하나의 구체예에서, 게놈 섬 핵산 분자는 인테그라아제 유전자를 포함하며, 상기 인테그라아제 유전자는 상기 박테리아 세포의 박테리아 게놈 밖과 내부에서 상기 게놈 섬 핵산 분자의 절제 및 통합을 위한 인테그라아제 단백질을 암호화한다. 다른 구체예에서, 인테그라아제 유전자는 SEQ ID NO:10의 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 게놈 섬 핵산 분자는 상기 박테리아 세포의 박테리아 게놈에 통합된다.

[0040] 특정 양태에서, 게놈 섬 핵산 분자는 복제될 수 있고, 상기 박테리아 세포에서 박테리아파지 패키징 기구에 의해서 패키징될 수 있는 분자 레플리콘을 형성한다. 다른 양태에서, 핵산 분자는 콘카타머를 형성한다. 또 다른 양태에서, 복제된 게놈 섬 핵산 분자는 상기 비-복제 형질도입 입자에 패키징될 수 있다. 특정 양태에서, 패키징 유전자는 pac-부위 서열을 포함한다. 다른 양태에서, 패키징 유전자는 cos-부위 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 패키징 유전자는 콘카타머 접합부를 포함한다.

[0041] 다른 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 리포터 유전자를 포함한다. 일부 구체예에서, 리포터 유전자는 선택성 마커 및/또는 선택성 마커를 암호화한다. 다른 구체예에서, 리포터 유전자는 발광 반응을 매개하는 효소(luxA, luxB, luxAB, luc, ruc, nluc), 비색 반응을 매개하는 효소(lacZ, HRP), 형광 단백질(GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, 근적외선 형광 단백질), 친화성 웹티드(His-tag, 3X-FLAG) 및 선택성 마커(ampC, tet(M), CAT, erm)로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 앱타머를 포함한다. 다른 구체예에서, 게놈 섬 핵산 분자는 인테그라아제 유전자를 결여한다. 다른 구체예에서, 본 발명은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 인테그라아제 유전자를 포함하는 박테리아 유전자를 포함하며, 상기 인테그라아제 유전자는 상기 박테리아 세포의 박테리아 게놈 외부나 안에서 상기 게놈 섬 핵산 분자의 절제 및 통합을 위한 인테그라아제 단백질을 암호화한다. 한 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 상기 리포터 핵산 분자에서 제2 서열에 상보성인 핵산 전사체 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 핵산 전사체 서열은 세포 전사체에 상보성이다. 또 다른 구체예에서, 핵산 전사체 서열은 시스-억제 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 리포터 핵산 분자의 레플리카는 상기 리포터 핵산 분자의 상기 레플리카에서 제2 서열에 상보성인 핵산 전사체 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 핵산 전사체 서열은 세포 전사체에 상보성이다. 다른 구체예에서, 핵산 전사체 서열은 시스-억제 서열을 포함한다.

[0042] 본 발명은 비-복제 형질도입 입자에 리포터 핵산 분자를 패키징하는 방법을 포함하고, 이것은 상기 리포터 핵산 분자와 패키징된 비-복제 형질도입 입자를 제공하기 위해 상기 박테리오파지의 세포용해 기를 유도하는 조건을 상기 박테리아 세포에 제공하는 단계; 및 상기 리포터 핵산 분자를 포함하는 상기 비-복제 형질도입 입자를 분리하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 비-복제 형질도입 입자는 복제된 박테리오파지 게놈을 함유하지 않는다. 한 구체예에서, 상기 세포용해 기의 유도는 상기 박테리아 세포의 상기 게놈으로부터 상기 게놈 섬 핵산 분자의 절제를 촉발한다.

[0043] 다른 구체예에서, 본 발명은 본원에 개시된 상기 방법으로부터 생성된 상기 리포터 핵산 분자의 레플리카를 포함하는 상기 비-복제 형질도입 입자를 포함하는 조성물을 포함한다.

[0044] 또한, 본 발명은 샘플에서 박테리아 세포의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 포함하고, 이것은 리포터 분자를 암호화하여 박테리오파지 게놈을 결여한 리포터 유전자를 포함하는 비-복제 형질도입 입자를 상기 비-복제 형질도입 입자가 상기 박테리아 세포를 형질도입할 수 있고 상기 리포터 유전자가 상기 박테리아 세포에서 발현될 수 있는 조건하에 샘플에 도입하는 단계; 상기 리포터 분자의 활성화를 위한 조건을 제공하는 단계; 및 상기 발현된 리포터 분자로부터 전달된 리포터 신호의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하며, 상기 리포터 신호의 존재는 상기 박테리아 세포의 존재를 정확하게 나타낸다.

[0045] 한 구체예에서, 상기 방법은 표준을 기준으로 적어도 80% 검출 특이성, 표준을 기준으로 적어도 90% 검출 특이성, 또는 표준을 기준으로 적어도 95% 검출 특이성을 달성한다. 다른 구체예에서, 상기 방법은 표준을 기준으로 적어도 80% 검출 감도, 표준을 기준으로 적어도 85% 검출 감도, 표준을 기준으로 적어도 90% 검출 감도, 표준을 기준으로 적어도 95% 검출 감도를 달성한다. 또 다른 구체예에서, 상기 방법은 표준을 기준으로 적어도 95% 검출 특이성과 적어도 90% 검출 감도를 달성한다. 다른 구체예에서, 표준은 금 표준이다. 또 다른 구체예에서, 박테리아 세포는 메티실린 내성 스타필로코쿠스 아우레우스(MRSA) 세포를 포함한다. 다른 구체예에서, 박테리아 세포는 메티실린 감응성 스타필로코쿠스 아우레우스(MSSA) 세포를 포함한다.

- [0046] 다른 구체예에서, 리포터 유전자는 검출 가능한 마커 또는 선택성 마커를 암호화한다. 한 구체예에서, 리포터 유전자는 발광 반응을 매개하는 효소를 암호화하는 유전자(luxA, luxB, luxAB, luc, ruc, nluc), 비색 반응을 매개하는 효소를 암호화하는 유전자(lacZ, HRP), 형광 단백질을 암호화하는 유전자(GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, 근적외선 형광 단백질), 친화성 웹티드를 암호화하는 핵산 분자(His-tag, 3X-FLAG) 및 선택성 마커를 암호화하는 유전자(ampC, tet(M), CAT, erm)로 구성되는 군으로부터 선택된다. 한 구체예에서, 리포터 유전자는 구성성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.
- [0047] 다른 양태에서, 리포터 신호는 1,000 콜로니 형성 단위(CFU) 미만의 검출 한계(LoD)에서 샘플로부터 검출될 수 있다. 다른 양태에서, 리포터 신호는 100 콜로니 형성 단위(CFU) 미만의 검출 한계(LoD)에서 샘플로부터 검출될 수 있다. 한 양태에서, 리포터 신호는 10 콜로니 형성 단위(CFU) 미만의 검출 한계(LoD)에서 샘플로부터 검출될 수 있다. 다른 양태에서, 리포터 신호는 5 CFU 미만의 LoD에서 샘플로부터 검출될 수 있다. 다른 양태에서, 리포터 신호는 3 이하의 CFU의 LoD에서 샘플로부터 검출될 수 있다.
- [0048] 한 구체예에서, 상기 방법은 미리 정해진 농도로 상기 샘플에 항생물질을 제공하는 단계 및 상기 박테리아 세포가 상기 항생물질에 내성인지 감응성인지 결정하기 위해 상기 리포터 신호의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함한다. 다른 구체예에서, 상기 방법은 상기 샘플에 미리 정해진 항생물질의 농도를 변화시키면서 제공하는 단계 및 상기 항생물질에 대한 상기 박테리아 세포의 최소 억제 농도를 결정하기 위한 상기 리포터 신호의 양을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0049] 한 양태에서, 본 발명은 적어도 두 가지 입체구조를 형성할 수 있는 핵산 리포터 전사체를 암호화하는 핵산 구조체를 포함하는 조성물을 포함하고, 두 가지 입체구조는 제1 하위서열과 제2 하위서열을 포함하는 문자내 이중가닥 영역을 포함하는 리포터 발현을 차단하는 제1 입체구조, 및 상기 문자내 이중가닥 영역을 결여하며 리포터 유전자 발현을 허용하는 제2 입체구조를 포함하고, 상기 제1 입체구조와 제2 입체구조 사이의 전환은 상기 제1 및/또는 상기 제2 하위서열과 세포 전사체의 경쟁 결합에 의해서 매개된다.
- [0050] 다른 양태에서, 본 발명은 상기 핵산 구조체를 포함하는 비-복제 형질도입 입자를 포함한다. 또 다른 양태에서, 상기 제1 및/또는 상기 제2 하위서열과 상기 세포 전사체의 경쟁 결합은 상기 핵산 리포터 구조체의 상기 제2 입체구조를 야기한다. 한 양태에서, 제1 하위서열 또는 상기 제2 하위서열은 시스-억제 서열을 포함한다. 다른 양태에서, 시스-억제 서열은 상기 세포 전사체의 일부에 상보성이거나 실질적으로 상보성인 서열을 포함한다. 다른 양태에서, 제1 하위서열 또는 상기 제2 하위서열은 리포터 유전자 서열을 포함한다. 또 다른 양태에서, 리포터 유전자 서열은 리보솜 결합 부위를 포함한다. 다른 양태에서, 리포터 유전자 서열은 검출 가능한 문자를 암호화한다. 다른 양태에서, 검출 가능한 마커는 형광 분자 또는 발광이나 비색 반응을 매개할 수 있는 효소를 포함한다. 한 구체예에서, 리포터 유전자 서열은 선택성 마커를 암호화한다. 다른 구체예에서, 선택성 마커는 항생물질 내성 유전자를 포함한다.
- [0051] 다른 구체예에서, 제1 하위서열 및 상기 제2 하위서열은 상기 문자내 이중가닥 영역을 형성하기 위해 상기 핵산 구조체에서 서로에 대해 시스 위치된다. 특정 구체예에서, 제1 하위서열 및 상기 제2 하위서열은 상기 문자내 이중가닥 영역을 형성하기 위해 서로 상보성이거나 실질적으로 상보성이다. 한 구체예에서, 상기 제1 입체구조의 제1 하위서열 또는 상기 제2 하위서열은 전사 인핸서 서열을 포함하며, 상기 전사 인핸서 서열은 상기 리포터 유전자 서열의 코딩 영역으로부터 상류에 있다. 다른 구체예에서, 상기 핵산 리포터 전사체의 제1 입체구조는 절단 효소에 결합할 수 있다. 다른 구체예에서, 상기 핵산 리포터 전사체의 제1 입체구조는 세포 효소에 의한 분해의 표적이다. 다른 양태에서, 제1 입체구조는 비-결합 문자내 영역을 포함한다. 다른 양태에서, 비-결합 문자내 영역은 상기 제1 하위서열의 3'과 상기 제2 하위서열의 5'에 위치된다. 다른 양태에서, 비-결합 문자내 영역은 서열 YUNR을 포함하며, 여기서 Y는 피리미딘, U는 우라실, N은 어떤 뉴클레오티드, R은 퓨린이다.
- [0052] 한 구체예에서, 제1 하위서열 또는 상기 제2 하위서열은 상기 세포 전사체의 변형된 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 변형된 서열은 뉴클레오티드 치환을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 변형된 서열은 상기 세포 전사체의 서열 삽입, 결실 또는 반전을 포함한다.
- [0053] 방법은 유전자 리포터 서열을 포함하는 핵산 리포터 전사체를 암호화하여 상기 핵산 리포터 전사체의 적어도 두 가지 입체구조를 형성할 수 있는 핵산 구조체를 포함하는 조성물을 포함하며, 두 가지 입체구조는 상기 핵산 리포터 전사체에서 상기 리포터 유전자 서열의 번역을 차단하는 제1 불안정한 입체구조, 및 세포 전사체와 상기 제1 불안정한 입체구조의 결합으로부터 생긴 제2 안정한 입체구조이고, 상기 제2 안정한 2차 입체구조는 상기 핵산 리포터 전사체의 상기 리포터 유전자 서열의 번역을 허용한다.

- [0054] 한 구체예에서, 조성물은 상기 핵산 구조체을 포함하는 비-복제 형질도입 입자를 포함한다. 다른 구체예에서, 세포 전사체는 상기 핵산 리포터 전사체의 3' UTR 서열에서 결합한다. 한 구체예에서, 제2 안정한 2차 입체구조는 상기 제1 불안정한 2차 입체구조의 서열의 일부의 절단에 의해서 형성된다. 다른 구체예에서, 리포터 유전자 서열은 검출 가능한 문자를 암호화한다. 일부 구체예에서, 검출 가능한 마커는 형광 문자 또는 발광이나 비색 반응을 매개할 수 있는 효소를 포함한다. 다른 구체예에서, 리포터 유전자 서열은 선택성 마커를 암호화한다. 다른 구체예에서, 선택성 마커는 항생물질 내성 유전자를 포함한다.
- [0055] 또한, 본 발명은 리포터 유전자 서열을 포함하는 핵산 리포터 전사체를 암호화하고 상기 핵산 리포터 전사체의 적어도 두 가지 입체구조를 형성할 수 있는 핵산 구조체을 포함하는 조성물을 포함하고, 두 가지 입체구조는 상기 핵산 구조체의 추가 전사를 차단하는 제1 입체구조, 및 세포 전사체와 상기 제1 입체구조의 결합시 형성되는 제2 입체구조를 포함하며, 상기 제2 입체구조는 상기 핵산 구조체의 전사를 허용한다. 일부 구체예에서, 이 조성물은 상기 핵산 구조체을 포함하는 비-복제 형질도입 입자를 포함한다. 다른 구체예에서, 핵산 리포터 전사체는 시스-억제 서열을 포함한다.
- [0056] 한 구체예에서, 핵산 리포터 전사체는 리포터 유전자 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 제1 입체구조는 상기 리포터 유전자 서열에 상기 시스-억제 서열의 결합으로부터 형성된다. 일부 구체예에서, 제1 입체구조는 절단 효소를 위한 기질이다. 한 구체예에서, 상기 핵산 리포터 전사체의 제1 입체구조는 전사 종결 구조를 형성하는 서열을 포함한다. 다른 구체예에서, 전사 종결 구조를 형성하는 상기 구조에 상기 세포 전사체의 결합은 상기 핵산 리포터 전사체의 일부의 절단 및 상기 제2 입체구조의 형성을 야기한다.
- [0057] 본 발명은 본원에 개시된 상기 핵산 리포터 전사체를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 서열을 포함하는 벡터를 포함한다.
- [0058] 본 발명은 세포에서 표적 전사체를 검출하는 방법을 포함하고, 이것은 상기 세포에 본원에 개시된 상기 핵산 리포터 구조체을 도입하는 단계; 및 상기 세포로부터의 출력 신호의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하며, 상기 출력 신호의 상기 존재는 상기 세포에서 표적 전사체의 존재를 나타낸다. 이 방법은 상기 표적 전사체의 상기 존재를 검출하는 것에 기초하여 박테리아 세포의 존재를 검출하는 것을 포함한다.
- [0059] 한 구체예에서, 샘플에서 박테리아 세포의 존재를 검출하는 방법은 상기 샘플에 본원에 개시된 상기 핵산 리포터 구조체을 도입하는 단계; 및 상기 샘플로부터의 출력 신호의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하며, 상기 출력 신호의 상기 존재는 상기 샘플에서 박테리아 세포의 존재를 나타낸다.
- [0060] 본 발명은 본원에 개시된 상기 핵산 리포터 구조체과 세포를 포함하는 샘플을 보유하기 위한 구획; 및 상기 샘플로부터의 출력 신호의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 설명서를 포함하는 키트를 포함하며, 출력 신호의 존재는 상기 세포에서 표적 전사체의 존재를 나타낸다.
- [0061] 본 발명은 리포터 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터를 포함하는 핵산 리포터 구조체을 포함하는 비-복제 형질도입 입자를 포함하는 조성물을 포함하며, 상기 제1 프로모터는 박테리아 세포에 내인성인 인듀서 단백질에 의해서 유도될 수 있다.
- [0062] 본 발명은 샘플에서 박테리아 세포의 존재를 검출하는 방법을 포함하고, 이것은 상기 샘플을 리포터 유전자에 작동 가능하게 연결된, 상기 박테리아 세포에 내인성인 인듀서 단백질에 의해서 유도될 수 있는 제1 프로모터를 포함하는 핵산 리포터 구조체을 포함하는 비-복제 형질도입 입자와 접촉시키는 단계; 및 상기 리포터 유전자로부터의 출력 신호의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하며, 상기 출력 신호의 상기 존재는 상기 샘플에서 상기 박테리아 세포의 존재를 나타낸다.
- [0063] 한 구체예에서, 제1 프로모터는 상기 박테리아 세포에서 표적 핵산 분자에 작동 가능하게 연결된 유도성 프로모터와 동일하다.
- [0064] 본 발명은 리포터 분자를 암호화하는 리포터 유전자를 포함하는 핵산 리포터 구조체을 포함하며 박테리아 세포로 들어갈 수 있는 비-복제 형질도입 입자; 및 상기 박테리아 세포에 외인성인 봉쇄된 기질로서 봉쇄가 해제되면 상기 세포에서 상기 리포터 분자와 반응할 수 있는 기질을 포함하는 조성물을 포함한다.
- [0065] 본 발명은 샘플에서 박테리아 세포의 존재를 검출하는 방법을 포함하고, 이것은 상기 샘플을 리포터 분자를 암호화하는 리포터 유전자를 포함하는 핵산 리포터 구조체을 포함하는 비-복제 형질도입 입자 및 상기 세포에 외인성인 봉쇄된 기질로서 봉쇄가 해제되면 상기 박테리아 세포에서 상기 리포터 분자와 결합할 수 있는 기질과 접촉시키는 단계; 및 상기 리포터 분자로부터의 출력 신호의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하며, 상기

출력 신호의 상기 존재는 상기 샘플에서 상기 박테리아 세포의 존재를 나타낸다.

[0066] 한 구체예에서, 상기 세포에서 표적 효소는 상기 봉쇄된 기질과 결합하여 봉쇄가 해제된 기질을 생성한다. 일부 구체예에서, 봉쇄가 해제된 기질을 상기 리포터 분자와 반응하여 상기 출력 신호를 생성한다.

[0067] 또한, 본 발명은 복합체를 형성하기 위해 박테리아 세포에서 표적 분자와 결합할 수 있는 스위치 가능한 분자를 암호화하는 핵산 리포터 구조체를 포함하는 비-복제 형질도입 입자; 및 상기 세포로부터 검출 가능한 신호를 생성하기 위하여 상기 세포에 침투해서 상기 복합체와 결합할 수 있는 기질을 포함하는 조성물을 포함한다.

[0068] 본 발명은 샘플에서 박테리아 세포의 존재를 검출하는 방법을 포함하고, 이것은 복합체를 형성하기 위해 상기 세포에서 표적 분자와 결합할 수 있는 스위치 가능한 분자를 암호화하는 핵산 리포터 구조체를 포함하는 비-복제 형질도입 입자 및 기질-결합 복합체를 형성하기 위해 상기 복합체와 결합할 수 있는 기질과 상기 샘플을 접촉시키는 단계; 및 상기 기질-결합 복합체로부터의 출력 신호의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하며, 상기 출력 신호의 존재는 상기 샘플에 상기 박테리아 세포의 존재를 나타낸다. 한 구체예에서, 상기 스위치 가능한 분자와 상기 표적 분자의 결합은 상기 스위치 가능한 분자에서 입체구조 변화를 야기한다. 다른 구체예에서, 상기 스위치 가능한 분자에서 입체구조 변화는 상기 기질이 상기 복합체와 결합하는 것을 허용한다.

도면의 간단한 설명

[0069] 본 발명의 이들 및 다른 특징들, 양태들 및 이점들은 이후의 설명 및 첨부한 도면을 참조하여 더 잘 이해될 것이다.

도 1은 본 발명의 구체예에 따른 침묵 돌연변이/보상-기반 P1 플라스미드 패키징 시스템의 디자인 및 기능의 일례를 도시한다.

도 2는 본 발명의 구체예에 따른 pGWP10001 백터의 도해를 도시한다.

도 3은 본 발명의 구체예에 따른 pac-부위 결실/보상 플라스미드 패키징 시스템의 디자인 및 기능의 일례를 도시한다.

도 4는 본 발명의 구체예에 따른 pGW80A0001 백터의 도해를 도시한다.

도 5는 본 발명의 구체예에 따른 박테리오파지에 의한 게놈 섬(GI) 패키징을 위한 과정을 도시한다.

도 6은 본 발명의 구체예에 따른 GI-기반 패키징 시스템의 디자인 및 기능의 일례를 도시한다.

도 7은 본 발명의 구체예에 따른 인테그라아제 유전자를 결여한 GI-기반 패키징 시스템의 디자인 및 기능을 도시한다.

도 8은 본 발명의 구체예에 따른 인테그라아제 유전자를 결여한 SaPIbov2-기반 패키징 시스템의 디자인 및 기능을 도시한다.

도 9는 본 발명의 구체예에 따른 생육성 세포 내에서 유전자 프로모터를 표적화하기 위한 인듀서의 검출을 위한 NRTP의 사용을 위한 시스템을 도시한다.

도 10은 본 발명의 구체예에 따른 엔테로코쿠스 파에시움(또는 이.파에시움)에서 반코마이신 내성(vanA) 유전자의 프로모터의 인듀서인, VanR을 검출하기 위해 구성된 리포터 핵산 분자(예를 들어, 플라스미드)를 포함하는 리포터 시스템을 도시한다. 이 리포터 플라스미드는 vanA 유전자 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 운반한다.

도 11은 본 발명의 구체예에 따른 씨. 디필실의 독소 A 및 B 유전자(tcdA 및 tcdB, 각각)의 프로모터의 인듀서인, TcdD를 검출하기 위해 구성된 리포터 핵산 분자(예를 들어, 플라스미드)를 포함하는 리포터 시스템을 도시한다. 이 리포터 핵산 분자는 tcdA 유전자 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함한다.

도 12는 본 발명의 구체예에 따른 에스. 아우레우스의 단백질 A 유전자(spa)의 프로모터의 인듀서인, SarS를 검출하기 위해 구성된 리포터 핵산 분자(예를 들어, 플라스미드)를 포함하는 리포터 시스템을 도시한다. 이 리포터 핵산 분자는 spa 유전자 프로모터에 작동 가능하게 연결된 박테리아 루시페라제 유전자 luxA 및 luxB를 포함한다.

도 13은 본 발명의 구체예에 따른 표적 세포내 효소에 의해서 봉쇄가 해제될 수 있는 봉쇄된 기질 분자를 이용한 생육성 세포 내에서 효소의 검출을 위한 시스템을 포함하는 리포터 시스템을 도시한다.

도 14는 본 발명의 구체예에 따른 β -락타마아제 효소 검출 시스템의 디자인 및 기능을 도시한다.

도 15는 본 발명의 구체예에 따른 표적 분자와 결합할 때 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 스위치 가능한 분자를 이용한 생육성 세포 내에서 효소의 검출을 위한 리포터 시스템을 도시한다.

도 16은 본 발명이 구체예에 따른 박테리오파지/스위치 가능한-애타머(SA)-기반 세포내 분자 리포터 시스템의 디자인 및 기능을 도시한다.

도 17은 본 발명의 구체예에 따른 리포터 전사체 상에서 리포터 서열의 5' UTR(미변역 영역)을 표적화할 수 있는 시스-억제 기전을 사용한 시스템의 일례를 도시한다.

도 18은 본 발명의 구체예에 따른 리포터 전사체에서 리포터 서열의 리보솜 결합 부위(RBS)를 표적화하는 시스-억제 기전에 기초한 세포에서 표적 전사체의 존재를 검출하기 위한 시스템의 일례를 도시한다.

도 19는 본 발명의 구체예에 따른 리포터 전사체에서 리포터 서열의 코딩 영역("AUG")을 표적화하는 시스-억제 기전에 기초한 세포에서 표적 전사체의 존재를 검출하기 위한 예시적인 시스템을 도시한다.

도 20은 본 발명의 구체예에 따른 불안정한 리포터 전사체를 사용한 억제 기전에 기초한 세포에서 표적 전사체의 존재를 검출하기 위한 예시적인 시스템을 도시한다.

도 21은 본 발명의 구체예에 따른 형질도입 분석의 결과를 도시하며, 여기서는 36개의 테트라사이클린-감응성 MRSA를 pGW80A0001을 가진 형질도입 입자에 노출시킨 다음 5ug/mL의 테트라사이클린을 함유하는 배지 플레이트 위해 스팽팅했다.

도 22는 본 발명의 구체예에 따른 형질도입 입자로 형질도입된 메티실린 감응성 에스. 아우레우스(MSSA)의 28개 임상 분리주와 MRSA의 80개 임상 분리주로부터 측정된 발광을 도시한다.

도 23은 4, 8, 16, 32, 64, 및 128ug/mL의 세폭시틴에서 성장된 에스. 아우레우스의 결과를 도시한다.

도 24는 4, 8, 16, 32, 64, 및 128ug/mL의 세폭시틴의 존재하에 NRTP 분석에 의해서 얻어진 RLU 값을 도시한다. 도 24에서 x-축은 MSSA RLU 컷오프 값으로 설정된다.

도 25는 MFold에 의해서 계산되고 VARNA로 시각화된 최저 에너지 입체구조에 기초하여 생성된 meca 전사체(SEQ ID NO:16)의 2차 구조를 도시한다.

도 26은 YUNR 컨센서스 서열을 함유하는 meca 전사체(SEQ ID NO:16의 뉴클레오티드 1,464-1,519)의 말단 루프 T23(T23)을 도시한다.

도 27은 luxA 유전자(SEQ ID NO:19의 뉴클레오티드 1-61)의 RBS 서열("AAGGAA")을 차단하는 줄기-루프 구조를 형성하도록 디자인되고, luxAB 유전자의 5' 말단에 첨가된 시스-억제 서열을 도시한다.

도 28은 표적 전사체(SEQ ID NO:16의 뉴클레오티드 1,464-1,519)와 리포터 전사체(SEQ ID NO:19의 뉴클레오티드 1-61)의 시스-억제 서열의 염기쌍의 다이어그램을 도시한다.

도 29는 본 발명의 구체예에 따른 표적 meca 유전자 서열(SEQ ID NO:15)의 일례를 도시한다.

도 30은 본 발명의 구체예에 따른 리포터 전사체(SEQ ID NO:16)를 디자인하는데 사용될 수 있는 예시적인 meca 전사체 서열을 도시한다.

도 31은 본 발명의 구체예에 따른 리포터 전사체를 디자인하는데 사용될 수 있는 luxAB 유전자와 DNA 서열(SEQ ID NO:17)의 일례를 도시한다.

도 32는 본 발명의 구체예에 따른 리포터 전사체(SEQ ID NO:18)를 디자인하는데 사용될 수 있는 luxAB 전사체 서열의 일례를 도시한다.

도 33은 본 발명의 구체예에 따른 리포터 전사체(SEQ ID NO:19)를 디자인하는데 사용될 수 있는 luxAB 시스-억제 전사체 서열의 일례를 도시한다.

도 34는 본 발명의 구체예에 따른 리포터 전사체를 암호화하는 벡터를 포함하는 세포의 일례를 도시하며, 여기서 세포에는 내인성 meca 전사체가 없다.

도 35는 세포에 도입된 벡터를 도시하며, 이 벡터는 시스-억제 서열 및 리포터 서열(luxA 및 luxB 유전자)을 포함하는 리포터 전사체를 암호화한다. 세포에 존재하는 meca 전사체가 시스-억제 서열과 결합했을 때 억제성 혜

어핀 루프가 열리고 luxA 유전자에 대한 RBS가 노출된다. 이 경우 리포터 서열(luxA 및 luxB)의 번역이 진행될 수 있어, luxAB 효소가 형성된다. luxAB 효소는 검출 가능한 발광 신호를 생성한다. 이 방식에서, 전사체 리포터 벡터는 세포 내의 내인성 mecA 전사체의 존재를 보고한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 정의

[0070] 청구항과 명세서에서 사용된 용어들은 달리 명시되지 않는다면 아래 제시된 것과 같이 정의된다.

[0071] [0072] 본원에서 사용된 "리포터 핵산 분자"는 DNA 또는 RNA 분자를 포함하는 뉴클레오티드 서열을 말한다. 리포터 핵산 분자는 자연 발생할 수 있거나, 또는 인공 또는 합성 분자일 수 있다. 일부 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 숙주 세포에 외인성이고, 플라스미드 또는 벡터와 같은 외래 핵산 분자의 일부로서 숙주 세포에 도입될 수 있다. 특정 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 세포에서 표적 유전자에 상보성일 수 있다. 다른 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 리포터 분자(예를 들어, 리포터 효소, 단백질)를 암호화하는 리포터 유전자를 포함한다. 일부 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 "리포터 구조체" 또는 "핵산 리포터 구조체"로서 언급된다.

[0073] "리포터 분자" 또는 "리포터"는 검출 가능한 또는 선택성 표현형을 유기체에 부여하는 분자(예를 들어, 핵산 또는 단백질)를 말한다. 검출 가능한 표현형은, 예를 들어 비색, 형광 또는 발광일 수 있다. 리포터 분자는 발광 반응을 매개하는 효소를 암호화하는 리포터 유전자(luxA, luxB, luxAB, luc, ruc, nluc), 비색 반응을 매개하는 효소를 암호화하는 유전자(lacZ, HRP), 형광 단백질을 암호화하는 유전자(GFP, eGFP, YFP, RFP, CFP, BFP, mCherry, 근적외선 형광 단백질), 친화성 웹티드를 암호화하는 핵산 분자(His-tag, 3X-FLAG) 및 선택성 마커를 암호화하는 유전자(ampC, tet(M), CAT, erm)로부터 발현될 수 있다. 리포터 분자는 세포로의 핵산 분자 또는 외래 서열(플라스미드)의 성공적인 흡수를 위한 마커로서 사용될 수 있다. 또한, 리포터 분자는 본원에 개시된 대로 표적 유전자, 표적 핵산 분자, 표적 세포내 분자, 또는 세포의 존재를 나타내는 데 사용될 수 있다. 또는, 리포터 분자는 앱타머 또는 리보자임과 같은 핵산일 수 있다.

[0074] 본 발명의 일부 양태에서, 리포터 핵산 분자는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 본 발명의 다른 양태에서, 프로모터는 특정 세포(예를 들어, 특정 종)에서만 프로모터의 활성에 기초하여 리포터 시스템의 반응성 및 교차-반응성에 기여하도록 선택되거나 설계될 수 있다. 특정 양태에서, 리포터 핵산 분자는 복제 기원을 포함한다. 다른 양태에서, 표적 세포 내에서의 리포터 핵산 분자의 복제가 특정 세포(예를 들어, 특정 종)에서의 복제 기원의 활성에 기초하여 리포터 신호 생성에 기여하는 경우, 복제 기원의 선택이 리포터 시스템의 반응성 및 교차-반응성에 유사하게 기여할 수 있다. 일부 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 바이러스 복제 동안에 자손 바이러스에 콘카타며 DNA로서 패키징될 수 있는 레플리콘을 형성한다.

[0075] 본원에서 사용된 "표적 전사체"는 표적 유전자의 전사 동안에 형성된 것과 1차 전사 생성물의 RNA 프로세싱 생성물인 mRNA를 포함하는 표적 세포에 의해 자연적으로 형성된 DNA 서열 또는 mRNA 분자의 뉴클레오티드 서열의 일부를 말한다. 또한, 표적 전사체는 세포 전사체 또는 자연 발생 전사체로서 언급될 수 있다.

[0076] 본원에서 사용된 용어 "전사체"는 DNA 또는 RNA 주형 서열 또는 유전자로부터 전사된 뉴클레오티드 서열(DNA 또는 RNA)의 길이를 말한다. 전사체는 RNA 주형으로부터 전사된 cDNA 서열 또는 DNA 주형으로부터 전사된 mRNA 서열일 수 있다. 전사체는 단백질 코딩 또는 비-코딩일 수 있다. 또한, 전사체는 조작된 핵산 구조체로부터 전사될 수 있다.

[0077] 리포터 핵산 분자로부터 유래된 전사체는 "리포터 전사체"로서 언급될 수 있다. 리포터 전사체는 리포터 서열 및 시스-억제 서열을 포함할 수 있다. 리포터 전사체는 상보성 영역을 형성하는 서열을 가질 수 있으며, 이로써 전사체는 듀플렉스(예를 들어, 문자간 듀플렉스 영역)를 형성하는 두 영역을 포함한다. 하나의 영역은 "시스-억제 서열"로서 언급될 수 있으며, 표적 전사체 및/또는 리포터 서열의 일부 또는 전부에 상보성을 가진다. 전사체의 제2 영역은 "리포터 서열"로 칭해지며, 시스-억제 서열에 상보성을 가질 수 있다. 상보성은 완전한 상보성 또는 실질적인 상보성일 수 있다. 시스-억제 서열과 리포터 서열의 존재 및/또는 결합은 리포터 전사체에서 어떤 입체구조를 형성할 수 있으며, 이것은 리포터 분자의 추가적인 발현을 차단할 수 있다. 리포터 전사체는 2차 구조, 예컨대 헤어핀 구조를 형성할 수 있으며, 이로써 서로 상보성인 리포터 전사체 내의 영역들이 서로 혼성화할 수 있다.

[0078] 핵산 분자 또는 외래 서열(예를 들어, 플라스미드, 벡터, 구조체)을 언급할 경우, "세포에 도입하는"은 당업자에게 이해되는 대로 세포로의 흡수를 촉진하는 것을 의미한다. 핵산 구조체 또는 전사체의 흡수는 비-보조 확

산 또는 활성 세포 과정을 통해서, 또는 박테리오파지, 바이러스 및 형질도입 입자의 사용을 포함하는 보조제나 장치에 의해서 일어날 수 있다. 이 용어의 의미는 시험관내 세포에만 제한되지 않으며, 세포가 살아있는 유기체의 일부인 경우에도 핵산 분자는 "세포에 도입"될 수 있다. 이러한 예에서, 세포로의 도입은 유기체로의 송달을 포함할 것이다. 예를 들어, 생체내 송달을 위해, 본 발명의 핵산 분자, 구조체 또는 벡터는 조직 부위에 주사되거나 전신 투여될 수 있다. 세포로의 시험관내 도입은 전기천공 및 리포렉션과 같은 본 분야에 알려진 방법을 포함한다. 추가적인 접근법도 본원에 개시되거나 본 분야에 알려져 있다.

- [0079] "형질도입 입자"는 세포에 비-바이러스 핵산 분자를 송달할 수 있는 바이러스를 말한다. 이 바이러스는 박테리오파지, 아데노바이러스 등일 수 있다.
- [0080] "비-복제 형질도입 입자"는 세포에 비-바이러스 핵산 분자를 송달할 수 있지만 자신의 복제된 바이러스 게놈을 형질도입 입자에 패키징하지는 않는 바이러스를 말한다. 이 바이러스는 박테리오파지, 아데노바이러스 등일 수 있다.
- [0081] "플라스미드"는 물리적으로 분리된 형태인 작은 DNA 분자이며, 세포 내에서 염색체 DNA와 독립적으로 복제할 수 있다. 박테리아에서 작은 원형 이중가닥 DNA 분자가 가장 흔하게 발견되며, 플라스미드는 때로는 고세균 및 진핵 유기체에 존재한다. 플라스미드는 적합한 숙주 내에서 자체적으로 복제할 수 있는 레플리콘으로 간주된다.
- [0082] "벡터"는 다른 세포로 외래 유전자 물질을 인공적으로 운반할 수 있는 비히클로서 사용되는 핵산 분자이며, 이것은 복제 및/또는 발현될 수 있다.
- [0083] "바이러스"는 다른 유기체의 살아있는 세포 내에서만 복제하는 작은 감염성 물질이다. 바이러스 입자(비리온으로 알려져 있다)는 두 부분 또는 세 부분을 포함한다: i) 유전 정보를 가진 DNA 또는 RNA 분자로부터 제조된 유전자 물질; ii) 이를 유전자를 보호하는 단백질 코팅; 및 일부 경우 단백질 코팅을 둘러싼 지질 외피.
- [0084] "MRSA"는 메티실린-내성 스타필로코쿠스 아루레우스를 말한다.
- [0085] "MSSA"는 메티실린-감응성 스타필로코쿠스 아루레우스를 말한다.
- [0086] 용어 "완화하는"은 질환 치료에서 어떤 유익한 결과, 예를 들어 예방, 중증도 또는 진행의 감소, 개선 또는 치유를 포함하는 질환 상태의 어떤 치료적으로 유익한 결과를 말한다.
- [0087] 용어 "인시튜"는 살아있는 유기체와 분리되어 성장중인, 예를 들어 조직 배양물에서 성장중인 살아있는 세포에서 일어나는 과정을 말한다.
- [0088] 용어 "생체내"는 살아있는 유기체에서 일어나는 과정을 말한다.
- [0089] 본원에서 사용된 용어 "포유동물"은 사람과 비-사람을 모두 포함하며, 제한은 아니지만 사람, 비-사람 영장류, 개과, 고양이과, 뮤린, 소과, 말과 및 돼지과를 포함한다.
- [0090] "G", "C", "A" 및 "U"는 각각 일반적으로 구아닌, 시토신, 아데닌 및 우라실을 염기로서 각각 함유하는 뉴클레오티드를 표시한다. "T"와 "dT"는 본원에서 상호 교환하여 사용되며, 뉴클레오염기가 티미딘인 데옥시리보뉴클레오티드, 예를 들어 데옥시리보티미딘을 말한다. 그러나, 용어 "리보뉴클레오티드", "뉴클레오티드" 또는 "데옥시리보뉴클레오티드"는 또한 아래 더 상세히 설명된 대로 변형된 뉴클레오티드, 또는 대용 대체 부분을 말할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 당업자는 구아닌, 시토신, 아데닌 및 우라실이 이러한 대체 부분을 가진 뉴클레오티드를 포함하는 올리고뉴클레오티드의 염기쌍 특성의 실질적인 변경 없이 다른 부분으로 대체될 수 있다는 것을 잘 알고 있다. 예를 들어, 제한은 아니지만, 이노신을 염기로서 포함하는 뉴클레오티드는 아데닌, 시토신 또는 우라실을 함유하는 뉴클레오티드와 염기쌍을 이룰 수 있다. 따라서, 우라실, 구아닌 또는 아데닌을 함유하는 뉴클레오티드는, 예를 들어 이노신을 함유하는 뉴클레오티드로 본 발명의 뉴클레오티드 서열에서 대체될 수 있다. 이러한 대체 부분을 포함하는 서열도 본 발명의 구체예이다.
- [0091] 본원에서 사용된 용어 "상보성"은 제2 뉴클레오티드 서열과 관련하여 제1 뉴클레오티드 서열을 개시하기 위해 사용될 때 당업자에게 이해되는 대로 제2 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드와 특정 조건에서 혼성화하여 듀플렉스 구조를 형성할 수 있는 제1 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 능력을 말한다. 상보성 서열들은 또한 서로 결합하는 것으로서 개시되며, 결합 친화성에 의해서 특성화된다.
- [0092] 예를 들어, 제1 뉴클레오티드 서열은 긴축 혼성화 조건하에 두 서열이 혼성화(예를 들어, 아닐링)할 때 제2 뉴클레오티드 서열과 상보성인 것으로 설명될 수 있다. 혼성화 조건은 온도, 이온 강도, pH, 및 아닐링 및/또는

세척 단계를 위한 유기용매 농도를 포함한다. 용어 "긴축 혼성화 조건"은 제1 뉴클레오티드 서열이 그것의 표적 서열, 예를 들어 제2 뉴클레오티드 서열과 우선적으로 혼성화하고, 다른 서열들과는 더 적은 규모로 혼성화하거나, 또는 전혀 혼성화하지 않는 조건을 말한다. 긴축 혼성화 조건은 서열 의존적이며, 상이한 환경에서 상이하다. 일반적으로, 긴축 혼성화 조건은 규정된 이온 강도 및 pH에서 뉴클레오티드 서열에 대한 열 용융점 (T_m)보다 약 5°C 더 낮도록 선택된다. T_m 은 제1 뉴클레오티드 서열의 50%가 완전히 매치된 표적 서열과 혼성화하는 온도(규정된 이온 강도 및 pH에서)이다. 핵산의 혼성화에 관한 광범한 지침은, 예를 들어 Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes part I, chap. 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," Elsevier, N.Y. ("Tijssen")*를 참조한다. 유기체 내에서 일어날 수 있는 생리학적으로 관련된 조건과 같은 다른 조건들도 적용될 수 있다. 당업자는 혼성화된 뉴클레오티드의 최종 용도에 따라서 두 서열의 상보성 시험에 가장 적합한 조건을 설정할 수 있다.

[0093] 상보성은 제1 및 제2 뉴클레오티드 서열의 전체 길이에 걸쳐서 제2 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드와 제1 뉴클레오티드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 염기쌍화를 포함한다. 이러한 서열들은 본원에서 서로에 관해서 "완전히 상보성"인 것으로 언급될 수 있다. 그러나, 본원에서 제1 서열이 제2 서열에 관하여 "실질적으로 상보성"인 것으로 언급된 경우, 두 서열은 완전히 상보성일 수 있거나, 또는 혼성화시 최종 용도와 관련된 조건하에서 혼성화하는 능력을 보유하면서 하나 이상의, 일반적으로 4 이하, 3 또는 2개의 미스매치 염기쌍을 형성할 수 있다. 그러나, 2개의 올리고뉴클레오티드가 혼성화시 하나 이상의 단일 가닥 오버행을 형성하도록 설계된 경우, 이러한 오버행은 상보성 결정과 관련하여 미스매치로 간주되지 않아야 한다. 예를 들어, 21개 뉴클레오티드 길이의 하나의 올리고뉴클레오티드와 23개 뉴클레오티드 길이의 다른 올리고뉴클레오티드를 포함하는 dsRNA는, 더 긴 올리고뉴클레오티드가 더 짧은 올리고뉴클레오티드와 완전히 상보성인 21개 뉴클레오티드의 서열을 포함할 때도 본원에 개시된 취지로서 "완전히 상보성"인 것으로 언급될 수 있다.

[0094] 또한, 본원에서 사용된 "상보성" 서열은 혼성화하는 능력과 관련한 상기 요건들이 충족되는 한에서 비-천연 및 변형된 뉴클레오티드로부터 형성된 염기쌍 및/또는 비-왓슨-크릭 염기쌍을 포함하거나, 그로부터 형성될 수 있다. 이러한 비-왓슨-크릭 염기쌍은, 제한은 아니지만, G:U Wobble 또는 Hoogstein 염기쌍을 포함한다.

[0095] 본원에서 사용된 용어 "상보성", "완전히 상보성" 및 "실질적으로 상보성"은 이들의 사용과 관련하여 설명된 대로 dsRNA의 두 가닥 사이의, 또는 dsRNA의 안티센스 가닥과 표적 서열 사이의, 또는 단일 가닥 RNA 서열과 단일 가닥 DNA 서열의 상보성 가닥들 사이의 염기 매칭과 관련하여 사용될 수 있다.

[0096] 본원에서 사용된 "듀플렉스 구조"는 2개의 역-평행하며 실질적으로 상보성인 핵산 서열을 포함한다. 핵산 구조체에서 두 전사체 사이, 전사체 내의 두 영역 사이, 또는 전사체와 표적 서열 사이의 상보성 서열이 "듀플렉스 구조"를 형성할 수 있다. 일반적으로, 각 가닥의 뉴클레오티드의 대부분은 리보뉴클레오티드이지만, 본원에 상세히 개시된 대로, 각 가닥 또는 양쪽 가닥은 또한 적어도 하나의 비-리보뉴클레오티드, 예를 들어 데옥시리보뉴클레오티드 및/또는 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 듀플렉스 구조를 형성하는 2개 가닥은 하나의 큰 RNA 분자의 상이한 부분일 수 있거나, 또는 별개의 RNA 분자일 수 있다. 두 가닥이 하나의 큰 분자의 일부이어서, 한 가닥의 3'-단부와 각각의 나머지 가닥의 5'-단부 사이가 뉴클레오티드의 중단되지 않은 사슬에 의해서 연결되어 듀플렉스 구조를 형성하는 경우, 연결하는 RNA 사슬은 "헤어핀 루프"라고 언급된다. 한 가닥의 3'-단부와 각각의 나머지 가닥의 5'-단부 사이에서의 뉴클레오티드의 중단되지 않은 사슬 이외의 다른 수단에 의해서 두 가닥이 공유 연결되어 듀플렉스 구조를 형성하는 경우, 연결하는 구조는 "링커"라고 언급된다. RNA 가닥은 동일하거나 상이한 수의 뉴클레오티드를 가질 수 있다. 염기쌍의 최대 수는 듀플렉스의 최단 가닥의 뉴클레오티드의 수에서 듀플렉스에 존재하는 어떤 오버행을 뺀 것이다. 일반적으로, 듀플렉스 구조는 15 내지 30 또는 25 내지 30, 또는 18 내지 25, 또는 19 내지 24, 또는 19 내지 21, 또는 19, 20 또는 21개 염기쌍 길이이다. 하나의 구체예에서, 듀플렉스는 19개 염기쌍 길이이다. 다른 구체예에서, 듀플렉스는 21개 염기쌍 길이이다. 두 상이한 siRNA가 조합하여 사용되었을 때 듀플렉스 길이는 동일할 수 있거나 상이할 수 있다.

[0097] 본원에서 사용된 용어 "상보성 영역"은 본원에서 정의된 대로 서열, 예를 들어 표적 서열에 실질적으로 상보성인 안티센스 가닥 상의 영역을 말한다. 상보성의 영역이 표적 서열에 완전히 상보성이 아닐 경우, 미스매치는 말단 영역에서 가장 용인되며, 일반적으로 말단 영역 또는 다른 영역들에, 예를 들어 5' 및/또는 3' 말단의 6, 5, 4, 3, 또는 2 뉴클레오티드 내에 존재한다.

[0098] 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩ти드 서열에 관해서 용어 "동일성" 퍼센트는 아래 설명된 서열 비교 알고리즘(예를

들어, BLASTP 및 BLASTN 또는 당업자가 이용가능한 다른 알고리즘) 중 하나를 사용하여 또는 육안 검사에 의해 서 측정하여 최대 상응성에 맞게 비교하고 정렬했을 때 명시된 퍼센트의 뉴클레오티드 또는 핵산 잔기가 동일한 이상의 서열 또는 하위서열을 말한다. 용도에 따라서 "동일성" 퍼센트는 비교되는 서열의 어떤 영역에 걸쳐서, 예를 들어 기능 도메인에 걸쳐서 존재할 수 있거나, 또는 비교되는 두 서열의 전 길이에 걸쳐서 존재할 수 있다.

[0099] 서열 비교를 위해, 전형적으로 하나의 서열은 시험 서열이 비교되는 기준 서열로 작동한다. 서열 비교 알고리즘을 사용할 때 시험 서열과 기준 서열이 컴퓨터에 입력되고, 필요하다면 하위서열 좌표가 지정되며, 서열 알고리즘 프로그램 변수가 지정된다. 다음에, 서열 비교 알고리즘이 지정된 프로그램 변수에 기초하여 기준 서열에 대한 시험 서열(들)의 서열 동일성 퍼센트를 계산한다.

[0100] 비교를 위한 최적의 서열 정렬은, 예를 들어 Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981)의 국소 상동성 알고리즘, Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)의 상동성 정렬 알고리즘, Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988)의 유사성 검색 방법, 이들 알고리즘의 컴퓨터 실행(GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA, the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), 또는 육안 검사(일반적으로 Ausubel et al. 참조)에 의해서 수행될 수 있다.

[0101] 서열 동일성 및 서열 유사성 퍼센트 결정에 적합한 알고리즘의 한 가지 예는 BLAST 알고리즘이며, 이것은 Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)에 개시된다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 National Center for Biotechnology Information(www.ncbi.nlm.nih.gov/)를 통해 공개적으로 이용할 수 있다.

[0102] 용어 "충분한 양"은 원하는 효과를 생성하기에 충분한 양, 예를 들어 세포로부터 검출 가능한 신호를 생성하기에 충분한 양을 의미한다.

[0103] 용어 "치료적 유효량"은 질환의 증상을 완화하는데 효과적인 양이다. 예방이 치료적 효과가 있는 경우는 치료적 유효량은 "예방적 유효량"일 수 있다.

[0104] 명세서 및 첨부된 청구항에서 사용된 단수형 "한" 및 "그"는 문맥상 명백히 다른 의미가 아니라면 복수의 언급을 포함한다는 것이 주지되어야 한다.

II. 바이러스의 용원 및 세포용해 주기

[0106] 바이러스는 숙주 세포에서 용원 주기 및 세포용해 주기를 겪는다. 용원 주기가 시작된 경우, 파지 염색체는 박테리아 염색체에 통합될 수 있거나, 또는 숙주에서 자체적으로 안정한 플라스미드를 확립할 수 있으며, 이 경우 장기간 동안 휴면 상태를 유지할 수 있다. 용원이 유도된 경우, 파지 게놈은 박테리아 염색체로부터 절제되고 세포용해 주기를 개시하며, 이 주기는 세포의 용해 및 파지 입자의 방출시 종료된다. 세포용해 주기는 숙주의 세포용해에 의해서 방출되는 새로운 파지 입자의 생성을 초래한다.

[0107] 특정 평균 파지는 세포용해 활성을 나타낼 수 있고, 이런 경향은 숙주 박테리아가 변함에 따라 변할 수 있다. 이 현상을 증명하기 위해, 10개의 MRSA 임상 분리주에서 2개의 기본 에스. 아우레우스 파지의 세포용해 활성을 플라크 분석을 통해서 시험되었다(표 1). 파지 ϕ 11은 10개 임상 MRSA 분리주 중 10개에서 세포용해 활성을 나타냈고, ϕ 80 a는 10개 임상 MRSA 분리주 중 6개에서 세포용해 활성을 나타냈다. 따라서, 파지의 자연적인 용원 주기에 의존하는 리포터 분석은 세포용해 활성을 산발적으로 나타낼 것으로 예상될 수 있다.

표 1

[0108] 10개의 임상 MRSA 분리주에서 에스. 아우레우스 기본 파지 ϕ 11 및 ϕ 80 a의 세포용해 활성(문자 "x"로 표시된다)

MRSA 분리주	ϕ 11	ϕ 80 a
1	x	
2	x	
3	x	x
4	x	x
5	x	x
6	x	
7	x	x
8	x	
9	x	x

10	X	X
----	---	---

[0109] 게다가, 파지-기반 리포터와 같은 바이러스-기반 리포터 분석은 숙주-기반 및 프로파지-유래 파지 내성 기전에 의해서 야기된 파지 숙주 범위의 제한으로 인한 제한된 반응성(즉, 분석 포괄성)으로 인해 어려움을 겪을 수 있다. 이들 내성 기전은 자생 파지 핵산을 표적화하여 파지 DNA와 기능을 변성시키거나 억제할 수 있다. 이러한 내성 기전은 파지-유래 전사체를 억제하는 파지 DNA 및 CRISPR 시스템을 절단하는 제한 시스템을 포함한다.

[0110] 세포용해 활성과 파지 내성은 모두 리포터 파지에 기초한 분석에서 억제성일 수 있다. 세포용해 활성은 검출 가능한 신호를 생성하는 세포를 파괴하거나 억제함으로써 신호를 억제할 수 있으며, 이로써 검출 가능한 신호의 양을 감소시키거나 검출 가능한 신호의 생성을 차단함으로써 검출 한계에 영향을 미친다. 파지 내성 기전은 파지의 숙주 범위를 제한할 수 있고, 파지-기반 리포터의 포괄성을 제한할 수 있으며, 이는 또한 검출 가능한 신호의 양을 감소시키거나 검출 가능한 신호의 생성을 차단함으로써 검출 한계에 영향을 미친다. 리포터 파지에서의 파지 DNA의 통합에 의해서 야기된 세포용해 활성과 파지 내성은 모두 파지 리포터를 통합한 분석에서 거짓-음성 결과를 초래할 수 있다.

III. 비-복제 형질도입 입자(NRTP)의 제조 방법

A. 비-복제 형질도입 입자를 제조하기 위한 파괴/보상-기반 방법

1) 침묵 돌연변이/보상 패키징 시스템

[0114] 본 발명은 침묵 돌연변이/보상-기반 방법을 사용하여 NRTP를 생성하기 위한 방법을 포함한다.

[0115] 비-복제 형질도입 입자 패키징 시스템은 바이러스 생성 동안에 게놈 패키징이 개시되는 요소로서 바이러스 패키징 기구에 의해서 인식되는 바이러스의 게놈 성분에 침묵 돌연변이를 도입하는 것에 기초한다. 이러한 요소의 예들은 pac-타입 박테리오파지의 pac-부위 서열 및 cos-타입 박테리오파지의 cos-부위 서열을 포함한다.

[0116] 이들 패키징 개시 부위는 주로 바이러스 생성에 필수적인 유전자의 코딩 영역 내에서 발견되기 때문에 pac-부위가 바이러스 패키징 기구에 의한 패키징 개시 부위로서 더 이상 인식되지 않도록 침묵 돌연변이가 도입된다. 동시에, 돌연변이는 상기 부위가 암호화되는 유전자를 파괴하지 않는다. 패키징 부위 서열을 파괴함으로써, 돌연변이된 바이러스는 세포용해 주기를 겪을 수 있지만, 패키징 유닛에 게놈 DNA를 패키징할 수 없게 된다.

[0117] 플라스미드 DNA와 같은 외래 리포터 핵산 분자가 돌연변이된 패키징 개시 부위 서열을 가진 바이러스 게놈으로 용원화된 숙주 세포에 도입될 수 있다. 외래 리포터 핵산 분자는 자생 패키징 개시 부위 서열을 포함할 수 있다. 외래 리포터 핵산 분자는 세포에 도입되어 세포에서 복제될 수 있다. 돌연변이된 바이러스가 세포용해 주기를 겪을 때 발현된 바이러스 패키징 기구가 바이러스 패키징 유닛에 자생 패키징 개시 부위 서열을 가진 외래 리포터 핵산 분자를 패키징한다. 바이러스 게놈은 패키징 개시 부위 서열이 돌연변이되었기 때문에 패키징 유닛에 패키징되지 않는다. 특정 구체예에서, 패키징 개시 부위 서열의 돌연변이는 패키징 개시 서열의 절단을 차단하고 패키징 개시 부위 서열을 포함하는 유전자 생성물의 발현을 저해하지 않는 침묵 돌연변이를 포함한다. 이것은 비-복제 형질도입 입자, 예를 들어 복제된 외래 핵산 분자를 가진 바이러스 구조 성분을 생성한다.

[0118] 이러한 시스템의 예는 박테리오파지 P1, pac-타입 파지에 기초한다. 한 구체예에서, 자생 P1 pac-부위를 포함하는 플라스미드가 세포로 형질전환된다. 세포는 P1 프로파지 게놈으로 용원화된다. P1 프로파지 게놈은 P1의 pacA 유전자 내에 암호화된 pac-부위 서열에 침묵 돌연변이를 포함한다. 프로파지의 세포용해 주기가 유도되면, 이 시스템은 플라스미드 DNA를 가진 P1-기반 형질도입 입자를 생성한다. 이 시스템에 적합한 침묵 돌연변이의 예는 그 전체가 참고자료로 포함되는 2002년 11월 7일자 제출된 미국 특허공개 No. 2005/0118719에 개시된다. 또한, 한 예는 아래 제시된 SEQ ID NO: 2에서 발견된다(침묵 돌연변이를 가진 P1 pac-부위, 소문자가 돌연변이된 염기를 표시한다).

[0119] 도 1은 본 발명의 구체예에 따른 침묵 돌연변이/보상-기반 P1 플라스미드 패키징 시스템(100)의 디자인 및 기능의 일례를 도시한다. 이 시스템에서, 이. 콜라이 세포(101)가 패키징 개시 부위 서열(예를 들어, pac-부위)에 침묵 돌연변이를 포함하는 P1 프로파지(102)로 용원화된다. 이 세포는 자생 pac-부위를 함유하는 플라스미드(103)로 형질전환되고, 이 플라스미드가 세포에서 복제되어 플라스미드 콘카타머(104)를 형성한다. 또한, 이 플라스미드는 리포터 분자를 암호화하는 리포터 유전자를 포함할 수 있다. P1 프로파지의 세포용해 주기가 유도된 경우, P1 프로파지는 박테리아 게놈으로부터 절제되고, 캡시드 단백질과 같은 P1 구조 성분(105)이 발현된다. P1 구조 성분은 오직 자생 pac-부위를 함유하는 DNA(예를 들어, 플라스미드 DNA)만 패키징하며, 따라서 플

라스미드 DNA(예를 들어, 리포터 유전자)를 가진 비-복제 형질도입 입자(106)를 생성한다.

[0120] 침묵 돌연변이/보상-기반 P1 플라스미드 패키징 시스템에 사용하는 예시적인 백터가 도 2에 도시된다. 침묵 돌연변이/보상-기반 P1 플라스미드 패키징 시스템의 균주와 백터를 구성하는 방식에 대한 상세한 내용은 아래 실시예 1에 상세히 개시된다.

2) 결실/보상-기반 패키징 시스템

[0122] 본 발명은 결실/보상-기반 방법을 사용하여 NRTP를 생성하기 위한 방법을 포함한다.

[0123] 이 비-복제 형질도입 입자 패키징 시스템은 게놈 패키징이 바이러스 생성 동안에 개시되는 요소로서 바이러스 패키징 기구에 의해서 인식되는 바이러스의 게놈 성분의 결실에 기초한다. 이러한 요소의 예들은 pac-타입 박테리오파지의 pac-부위 서열 및 cos-타입 박테리오파지의 cos-부위 서열을 포함한다. 이를 패키징 개시 부위는 주로 바이러스 생성에 필수적인 유전자의 코딩 영역 내에서 발견된다. 일부 구체예에서, 패키징 개시 부위만 결실되어, 돌연변이된 바이러스는 세포용해 주기를 겪지만 게놈 DNA를 패키징할 수는 없다. 예를 들어, SEQ ID NO: 6은 pac-부위 서열이 결실된 P1 pacA 유전자의 예이다(소문자가 결실된 pac-부위 서열을 표시한다). 다른 구체예에서, 패키징 개시 부위를 포함하는 전체 유전자가 결실된다. 예를 들어, SEQ ID NO: 8은 terS 유전자의 결실을 나타낸다(소문자가 결실된 서열을 나타낸다).

[0124] 하나의 예에서, 세포의 게놈은 패키징 개시 부위가 결실된 바이러스 게놈으로 용원화된다. 보상성 플라스미드가 세포에 도입되며, 이 플라스미드 DNA는 바이러스 게놈에서 결실된 패키징 개시 부위 서열을 보상하는 패키징 개시 부위 서열을 가진 유전자를 포함한다. 돌연변이된 바이러스가 세포용해 주기를 겪을 때, 바이러스 패키징 단백질은 패키징 개시 부위 때문에 플라스미드 DNA의 래플리콘을 패키징 유닛에 패키징하고, 복제된 플라스미드 DNA를 가진 비-복제 형질도입 입자가 생성된다.

[0125] 일부 구체예에서, 결실/보상은 돌연변이된 바이러스 DNA와 보상성 외래 DNA 사이에 상동성이 없도록 설계되는 것이 바람직하다. 이것은 돌연변이된 바이러스 DNA와 보상성 외래 DNA 사이에 상동성이 결여된 경우 바이러스 게놈에 패키징 서열이 재도입될 수 있는 두 DNA 분자들 사이의 상동성 재조합의 가능성을 피할 수 있기 때문이다. 상동성의 결여를 달성하기 위한 하나의 전략은 바이러스 게놈으로부터 패키징 개시 부위 서열을 함유하는 전체 유전자를 결실시킨 후, 이 유전자를 바이러스로부터 결실된 DNA 서열보다 더 적은 서열을 함유하는 외래 DNA 분자로 보상하는 것이다. 이 전략에서, 보상성 DNA 분자는 바이러스로부터 결실된 유전자를 발현하도록 설계된다.

[0126] 이러한 시스템의 다른 예는 박테리오파지 ϕ 80 α , pac-타입 파지를 사용하여 제공된다. 이 파지 게놈은 숙주 박테리아 세포에서 용원화되며, pac-타입 프로파지 ϕ 80 α 의 pac-부위가 결실된 작은 터미나아제 유전자를 포함한다. 자생 pac-부위를 가진 상보성 작은 터미나아제 유전자를 포함하는 플라스미드가 세포로 형질전환된다. 용원화된 프로파지의 세포용해 주기가 유도된 경우, 박테리오파지 패키징 시스템은 플라스미드 DNA를 자생 박테리오파지 DNA에 패키징하는 것이 아니라 자손 박테리오파지 구조 성분에 패키징한다. 따라서, 이 패키징 시스템은 플라스미드 DNA를 가진 비-복제 형질도입 입자를 생성한다.

[0127] 도 3은 본 발명의 구체예에 따른 pac-부위 결실/보상 플라스미드 패키징 시스템(300)의 디자인 및 기능의 일례를 도시한다. 박테리아 세포(301)가 작은 터미나아제(terS) 유전자가 결실된 pac-타입 파지(302)로 용원화된다. 이 세포는 파지에서의 terS 유전자 결실을 보상하는 작은 터미나아제 유전자를 포함하는 롤링 서클 복제 플라스미드(303)로 형질전환된다. 작은 터미나아제 유전자는 패키징 개시 부위 서열, 예를 들어 pac-부위를 함유한다. 플라스미드(303)는 또한 리포터 분자를 암호화하는 리포터 유전자를 포함할 수 있다.

[0128] 작은 터미나아제와 큰 터미나아제 단백질을 포함하는 단백질 복합체는 pac-부위나 근처에서 이중 가닥 DNA 분자를 인식하고 절단할 수 있으며, 이것은 플라스미드 DNA 분자가 파지 캡시드에 패키징되도록 한다. 세포에서 프로파지가 유도된 경우, 파지의 세포용해 주기는 파지의 구조 단백질(304)과 파지의 큰 터미나아제 단백질(305)을 생성한다. 보상성 플라스미드가 복제되고, 작은 터미나아제 단백질(306)이 발현된다. terS 유전자(및 리포터 유전자)를 함유하는 복제된 플라스미드 DNA(307)는 파지 캡시드에 패키징되어 플라스미드 DNA만을 가진 비-복제 형질도입 입자(308)를 생성한다. 도 4는 pac-부위 결실/보상 플라스미드 패키징 시스템에서 사용된 백터의 예를 도시한다. pac-부위 결실/보상 플라스미드 패키징 시스템의 성분 및 구성에 대한 더 상세한 내용은 아래 실시예 2에 개시된다.

B. 병원성 섬-기반 패키징 시스템

[0130] 병원성 섬(SaPI)은 계놈 섬으로 알려진 수평적으로 전달되는 유전자 요소의 하위세트이다. 특정한 잔류 프로파지에 의해서 절제하고 복제하도록 유도되는 스타필로코쿠스 아우레우스에 특정 패밀리의 고 이동성 PTI가 존재한다. 이들 PTI는 작은 두부의 파지-유사 입자에 패키징되며, 파지의 플라크-형성 역가와 상응하는 빈도로 전달된다. 이 과정은 SaPI 절제 복제-패키징(ERP) 주기라고 언급되며, 정통의 일반화된 형질도입(CGT)과 구별하기 위해 고-빈도 SaPI 전달은 SaPI-특이적 전달(SPST)이라고 언급된다. SaPI는 박테리오파지와 평행하며, 모든 다른 수평적으로 취득된 계놈 섬과 확실히 구별하는 고도로 보존적인 유전자 조직을 가진다. SaPII-암호화된 및 SaPIbov2-암호화된 인테그라아제가 상응하는 요소의 절제 및 통합에 요구되며, 이것은 다른 SaPI에도 마찬가지일 것으로 추정된다. 파지 80a은 SaPI1, SaPI2, 및 SaPIbov1을 포함하는 몇 개의 상이한 SaPI를 유도할 수 있고, φ11은 SaPIbov1를 유도할 수 있으나 다른 두 SaPI를 유도할 수 없다.

[0131] 도 5는 박테리오파지에 의한 계놈 섬(GI) 패키징(500)을 위한 자연적 과정을 도시한다. 자연적으로, 적합한 프로파지(503)로 용원화되고 GI(504)를 가진 박테리아 세포(501)는 GI 콘카타머를 가진 파지 입자(512)를 생성할 수 있다. 이 과정에서, 파지가 세포용해 주기로 유도된 경우, 박테리아 계놈(502)으로부터 파지 계놈이 절제된 (미도시) 후, 캡시드 구성성분(505)과 큰 터미나아제 단백질(TerL)(506)을 포함하는 박테리오파지 단백질을 발현한다. 프로파지의 유도는 또한 GI 인테그라아제 단백질(int)(507)의 발현을 통한 GI 절제를 촉발한다. 절제된 파지 계놈(미도시)과 유사한 방식으로, GI는 원형화되고(508), 작은 터미나아제 단백질(TerS)(509)을 발현하며, 복제하여 GI 콘카타머(510)를 생성하기 시작한다. 다음에, 파지 TerL 유전자와 GI TerS 유전자가 조합되고 결합되며 GI 계놈에서 pac-부위 서열을 통해 GI 콘카타머를 절단한 후, GI 콘카타머가 파지 캡시드에 패키징(511)되어 GI 콘카타머를 가진 파지 입자(512)를 생성한다.

[0132] 도 5에 도시된 자연적 시스템에서, 파지로부터 생성된 세포 용해물은 자생 파지 입자와 GI-함유 파지 입자를 모두 포함한다. 자생 파지 입자는 파지 계놈 콘카타며 내에서의 pac-부위의 인식으로 인한 자생 파지 계놈의 패키징의 결과물이다.

1) 계놈 섬(GI) 패키징 시스템의 디자인 및 기능

[0134] NRTP를 생성하기 위한 본 발명의 방법은 GI 기반-패키징 시스템을 포함한다.

[0135] 플라스미드 패키징 시스템과 비교하여, 자연적 GI-패키징 시스템은 패키징되는 DNA가 박테리아 계놈 내의 계놈 영역으로부터 유래되고, 따라서 박테리아 숙주에 의한 플라스미드를 필요로 하지 않는 장점이 있다.

[0136] 일부 구체예에서, 본 발명은 비-복제 형질도입 입자에 리포터 핵산 분자를 패키징하기 위한 박테리아 세포 패키징 시스템을 포함하며, 상기 박테리아 세포는 패키징 유전자를 결여한 용원화된 박테리오파지 계놈, 및 계놈 섬, 은닉 파지, 또는 핵산 분자의 이동을 위한 박테리오파지(예컨대, 헬퍼 파지)를 필요로 하며, 리포터 핵산 분자와 패키징 유전자를 포함하는 다른 핵산 분자를 포함한다. 계놈 섬-기반 시스템은, 예를 들어 에스. 아우레우스 병원성 섬(SaPI), 이. 콜라이 은닉 파지 P4 및 헬퍼 파지 P2, 및 엔테로코시 은닉 파지 P7 및 헬퍼 파지 P1에 기초할 수 있다.

[0137] GI-패키징 시스템을 이용하여 외래 핵산 서열이 박테리오파지에 의해서 패키징될 수 있다. 이것은 외래 핵산 서열을 GI에 통합시킴으로써 달성을 수 있다.

[0138] 이 과정에서 자생 파지를 제거하기 위하여, 프로파지의 작은 터미나아제 유전자가 결실될 수 있다. 작은 터미나아제 유전자 서열은 자생 파지의 pac-부위 서열을 함유하며, 이 결실은 자생 파지 DNA의 패키징을 차단하는 효과를 가진다. 다른 구체예에서, 작은 터미나아제 유전자의 단지 pac-부위만 결실될 수 있다. 패키징될 GI는 pac-부위와 적합한 작은 터미나아제 단백질을 발현하는 작은 터미나아제 유전자를 포함하고, 단지 GI DNA만 이 시스템에서 패키징될 수 있을 것이다.

[0139] 도 6은 본 발명의 구체예에 따른 GI-기반 패키징 시스템(600)의 디자인 및 기능의 일례를 도시한다. 이 시스템에서, 박테리아 세포(601)는 작은 터미나아제 유전자가 결실된 적합한 프로파지로 용원화된 계놈(603)을 가지며, 세포의 계놈(602)은 GI(604)를 가진다. 파지가 세포용해 주기로 유도된 경우, 파지 계놈이 박테리아 계놈(602)으로부터 절제된다(미도시). 파지 계놈은 캡시드 구성성분(605) 및 큰 터미나아제 단백질(TerL)(606)을 포함하는 박테리오파지 단백질을 발현한다. 프로파지의 유도는 또한 GI 인테그라아제 단백질(int)(607)의 발현을 통해 GI 절제를 촉발한다. 절제된 파지 계놈(미도시)과 유사한 방식으로, GI는 원형화되고(608), 작은 터미나아제 단백질(TerS)(609)을 발현하며, 복제되어 GI 콘카타머(610)를 형성한다. 다음에, 파지 TerL 유전자와 GI TerS 유전자가 조합되고 결합되며, GI DNA에서 pac-부위 서열을 통해 GI 콘카타머를 절단한다. 다음에, GI 콘카타머가 파지 캡시드에 패키징(611)되어 콘카타머를 가진 파지 입자(612)가 얻어진다. 이 시스템에서,

파지 DNA는, 파지의 pac-부위 서열을 함유하는 terS 유전자를 결여하고, 따라서 발현된 GI TerS 및 파지 TerL 단백질에 의해 인식될 수 없기 때문에 파지 입자에 패키징되지 않을 것이다.

[0140] 패키징된 GI DNA를 함유하는 파지 입자가 레시피언트 세포에 투여된 경우, 파지는 레시피언트 세포의 표면에 결합하여 패키징된 GI DNA 콘카타머를 세포에 도입할 것이다. GI는 일단 세포 내부에서 다시 인테그라아제 단백질을 발현한 후, 레시피언트 세포의 계놈에서의 특이적 부위에 통합될 것이다. 패키징 전에 외래 DNA 서열이 GI에 포함된 경우, 패키징 시스템은 레시피언트 세포로 외래 DNA 서열을 송달하고 레시피언트 세포의 계놈에 외래 DNA 서열을 통합시킨다.

2) 인테그라아제를 결여한 GI-기반 패키징 시스템

[0142] 다른 구체예에서, 패키징 시스템은 패키징된 GI DNA가 레시피언트 세포의 계놈에 통합될 수 없도록 설계된다. 이것은 GI에서 인테그라아제 유전자를 결실시키고 GI로부터 트랜스로 인테그라아제 유전자의 발현을 야기함으로써 상기 결실을 보상함으로써 달성될 수 있다. 이 방식으로, 인테그라아제 단백질은 패키징 숙주 세포에서 GI의 절제에 이용될 수 있으며, 박테리오파지에 패키징된 GI DNA는 인테그라아제 유전자를 함유하지 않아서 인테그라아제 단백질을 발현할 수 없고, 따라서 송달된 GI의 통합을 차단한다.

[0143] 도 7은 본 발명의 구체예에 따른 int 유전자(700)를 결여한 GI-기반 패키징 시스템의 디자인 및 기능을 도시한다. 이 시스템에서, 박테리아 세포(701)는 작은 터미나아제 유전자가 결실된 적합한 프로파지(703)로 용원화된다. 세포 계놈(702)은 인테그라아제 단백질(Int)이 결실된 GI(704)와 적합한 프로모터에 작동 가능하게 연결된 결실된 int 유전자(705)를 가진다. 따라서, int 유전자는 GI로부터 트랜스로 인테그라아제 단백질(Int)(706)을 발현할 수 있다. 파지가 세포용해 주기로 유도된 경우, 파지 계놈은 박테리아 계놈(702)으로부터 절제된(미도시) 후, 캡시드 구성성분(707)과 큰 터미나아제 단백질(TerL)(708)을 포함하는 박테리오파지 단백질을 발현한다. 또한, 파지 유도는 인테그라아제 단백질(706)의 발현을 통해서 GI 절제를 촉발한다. 절제된 파지 계놈(미도시)과 유사한 방식으로, 절제된 GI는 원형화되고(709), 작은 터미나아제 단백질(TerS)을 발현하며, 복제하여 GI 콘카타머(711)를 형성하기 시작한다. 파지 TerL 유전자가 GI TerS 유전자가 조합되고 결합되어 GI 콘카타머를 GI DNA에 있는 pac-부위 서열을 통해 절단할 수 있으며, 다음에 GI 콘카타머는 파지 캡시드에 패키징(712)되어 콘카타머를 가진 파지 입자(713)를 생성할 수 있다. 이 시스템에서, 파지 DNA는 파지의 pac-부위 서열을 함유하는 terS 유전자를 결여하며, 따라서 발현된 GI TerS 및 파지 TerL 단백질에 의해 인식될 수 없기 때문에 패키징되지 않을 것이다.

[0144] int 유전자를 결여한 패키징된 GI DNA를 함유하는 파지 입자가 레시피언트 세포에 투여된 경우, 파지는 레시피언트 세포의 표면에 결합한 다음 세포에 패키징된 GI DNA 콘카타머를 도입할 것이다. GI는 일단 세포 내부에서 인테그라아제 유전자의 결여로 인하여 인테그라아제 단백질을 발현할 수 없고, 레시피언트 세포의 계놈에서의 특이적 부위에 통합될 수 없다. 패키징 전에 외래 DNA 서열이 GI에 포함되는 경우, 패키징 시스템은 외래 DNA 서열을 레시피언트 세포로 송달하고, 송달된 DNA 서열은 GI 통합을 위한 특이적 부위에서 레시피언트 세포의 계놈에 통합되지 않는다.

3) 인테그라아제를 결여한 SaPIbov2-기반 패키징의 디자인 및 기능

[0146] 일부 구체예에서, NRTP 생성 방법은 GI-기반 패키징 시스템에서 GI SaPIbov2 및 박테리오파지 φ11을 이용한다. 다른 구체예는 박테리오파지 80α와 함께 SaPI의 SaPI1, SaPI2, SaPIbov1 및 SaPIbov2를 포함하는 다른 SaPI GI 및 다른 적합한 박테리오파지, 및 박테리오파지 φ11과 함께 SaPI의 SaPIbov1 및 SaPIbov2를 이용할 수 있다. 당업자는 섹션 II A에 개시된 대로 int 유전자를 결여한 GI-기반 패키징 시스템의 개발 방식을 알고 있을 것이다.

[0147] 도 8은 본 발명의 구체예에 따른 int 유전자를 결여한 SaPIbov2-기반 패키징 시스템(800)의 디자인 및 기능을 도시한다. 이 시스템에서, 에스. 아우레우스 세포(801)는 작은 터미나아제 유전자가 결실된 φ11(803)로 용원화된다. 세포의 계놈(802)은 인테그라아제(int) 유전자가 결실된 SaPIbov2(804)를 가지고, 또한 구성적으로 발현된 PclpB 유전자 프로모터에 작동 가능하게 연결된 결실된 int 유전자(805)를 가진다. int 유전자는 SaPIbov2로부터 트랜스로 인테그라아제 단백질(Int)(806)을 발현할 수 있다. 파지가 세포용해 주기로 유도된 경우, 파지 계놈은 박테리아 계놈(802)으로부터 절제된(미도시) 후, 캡시드 구성성분(807)과 큰 터미나아제 단백질(TerL)을 포함하는 박테리오파지 단백질을 발현한다. 프로파지 유도는 인테그라아제 단백질(807)의 발현을 통해서 SaPIbov2 절제를 촉발한다(808). 절제된 파지 계놈(미도시)과 유사한 방식으로, 절제된 SaPIbov2는 원형화되고(809), 작은 터미나아제 단백질(TerS)(810)을 발현하며, 복제하여 SaPIbov2 콘카타머(811)를 형성하기

시작한다. 파지 TerL 유전자와 SaPIbov2 TerS 유전자가 조합되고 결합되어 SaPIbov2 콘카타머를 SaPIbov2 DNA에 있는 pac-부위 서열을 통해 절단할 수 있고, 다음에 SaPIbov2 콘카타머는 파지 캡시드에 패키징(812)되어 SaPIbov2 콘카타머를 가진 파지 입자(813)를 생성할 수 있다. 이 시스템에서, 파지 DNA는 파지의 pac-부위 서열을 함유하는 terS 유전자를 결여하며, 따라서 발현된 SaPIbov2 TerS 및 파지 TerL 단백질에 의해 인식될 수 없기 때문에 패키징되지 않을 것이다.

[0148] IV. 리포터

[0149] 일부 구체예에서, NRTP 및 본 발명의 구조체은 리포터 유전자를 포함하는 리포터 핵산 분자를 포함한다. 리포터 유전자는 리포터 분자를 암호화할 수 있고, 리포터 분자는 검출 가능한 마커 또는 선택성 마커일 수 있다. 특정 구체예에서, 리포터 유전자는 세포에서 발현되었을 때 검출 가능한 신호를 생성하는 리포터 분자를 암호화한다.

[0150] 특정 구체예에서, 리포터 분자는 형광 리포터 분자, 예컨대 제한은 아니지만, 녹색 형광 단백질(GFP), 증진된 GFP, 황색 형광 단백질(YFP), 시안 형광 단백질(CFP), 청색 형광 단백질(BFP), 적색 형광 단백질(RFP) 또는 mCherry, 뿐만 아니라 근적외선 형광 단백질일 수 있다.

[0151] 다른 구체예에서, 리포터 분자는 발광반응을 매개하는 효소일 수 있다(luxA, luxB, luxAB, luc, ruc, nluc 등). 리포터 분자는 박테리아 루시페라제, 진핵 루시페라제, 비색 검출에 적합한 효소(lacZ, HRP), 면역 검출에 적합한 단백질, 예컨대 친화성 웨პ티드(His-tag, 3X-FLAG), 앱타머로서 기능하거나 효소 활성을 나타내는 핵산(리보자임) 또는 선택성 마커, 예컨대 항생물질 내성 유전자(ampC, tet(M), CAT, erm)를 포함할 수 있다. 본 분야에 잘 알려진 다른 리포터 분자들도 표적 핵산 또는 세포를 검출하기 위한 신호를 생성하는데 사용될 수 있다.

[0152] 다른 양태에서, 리포터 분자는 핵산 분자를 포함한다. 일부 양태에서, 리포터 분자는 특이적 결합 활성을 갖거나, 또는 효소 활성을 나타내는 앱타머이다(예를 들어, 앱타자임, DNazyme, 리보자임).

[0153] 리포터 및 리포터 분석은 본원의 섹션 V에서 더 자세히 개시된다.

[0154] V. NRTP 및 리포터 분석

[0155] A. 인듀서 리포터 분석

[0156] 본 발명은 생육성 세포 내에서 유전자 프로모터를 표적화하는 내인성 또는 자생 인듀서와 함께 사용하기 위한 리포터 분자로서 NRTP의 사용 방법을 포함한다. 본 발명의 NRTP는 섹션 III 및 아래 실시예 1-6에 개시된 방법을 사용하여 조작될 수 있다.

[0157] 일부 구체예에서, 상기 방법은 리포터로서 NRTP를 이용하는 것을 포함하며, 상기 NRTP는 표적 세포 내에서 표적 유전자의 발현을 제어하는 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함한다. 리포터 유전자를 포함하는 NRTP가 표적 세포에 도입되었을 때, 리포터 유전자의 발현은 리포터 핵산 분자에서 표적 유전자 프로모터의 유도를 통해서 가능하다.

[0158] 도 9는 두 유전자, 즉 인듀서를 암호화하는 유전자(902)와 표적 유전자(903)를 가진 표적 세포의 계놈 유전자좌(900)를 도시한다. 또한, 표적 세포의 표적 유전자의 프로모터(906)에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자(905)를 포함하는 리포터 핵산 분자(904)가 도시된다. 리포터 핵산 분자(904)는 NRTP를 통해서 세포에 도입될 수 있다.

[0159] 자생 세포에서, 인듀서 유전자(902)가 발현되고 인듀서 단백질(907)을 생성할 때, 인듀서 단백질(907)은 표적 유전자에 작동 가능하게 연결된 표적 유전자 프로모터(906)를 유도할 수 있으며, 따라서 표적 유전자의 발현 및 표적 유전자 생성물(908)을 생성한다.

[0160] 리포터 핵산 분자(904)가 표적 유기체 내에 존재하는 경우, 인듀서(907)는 또한 리포터 핵산 분자(904) 내에 존재하는 표적 유전자 프로모터(906)를 유도할 수 있으며, 따라서 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 리포터 분자(909)를 생성하는 리포터 유전자(905)의 발현을 야기한다.

[0161] 따라서, 리포터 분자(909)로부터의 검출 가능한 신호의 생성은 표적 세포 내에 인듀서 단백질(907)의 존재에 기초하여 세포의 존재를 나타낸다.

[0162] 1) VanR 리포터 시스템

- [0163] 하나의 구체예에서, 리포터 시스템은 리포터 핵산 분자(예를 들어, 플라스미드)를 포함하는 NRTP를 포함한다. 리포터 핵산 분자는 엔테로코쿠스 파에시움(또는 이.파에칼리스)에서 반코마이신 내성(vanA) 유전자의 프로모터의 인듀서인 VanR을 검출하도록 구성될 수 있다. 이 리포터 플라스미드는 vanA 유전자 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 가진다.
- [0164] 도 10은 VanR 리포터 시스템의 디자인 및 기능을 개략한다. 도 10은 이.파에시움에 존재할 수 있는 트랜스포존 Tn1546(1001)의 영역을 묘사한다. Tn1546 트랜스포존은 vanR 인듀서 유전자(1002)와 vanA 표적 유전자(1003)를 포함할 수 있다. 또한, 이 도면에는 NRTP에 패키징되어 세포에 도입될 수 있는 리포터 핵산 분자(1004)가 묘사된다. 리포터 핵산 분자(1004)는 vanA 유전자를 포함하는 vanHAX 오페론의 발현을 제어하는 프로모터 PH(1006)에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자(1005)를 포함한다. 자생 세포에서, vanR 유전자(1002)가 발현되어 VanR 단백질(1007)을 생성할 때, VanR은 Tn1546 트랜스포존에서 PH(1006)를 유도할 수 있고, 따라서 vanA 유전자의 발현을 야기하며, VanA 단백질(1008)을 생성한다. 리포터 핵산 분자(1003)(벡터)가 표적 유기체 내에 존재할 경우, VanR은 리포터 핵산 분자(1003) 내에서 PH(1006)을 유도할 수 있으며, 따라서 리포터 분자(1009)의 발현을 야기한다. 따라서, 리포터 분자의 생성은 표적 세포 내에 VanR의 존재를 표시한다.
- [0165] VRE 분석의 개발에 적합한 프로모터의 예들은 vanA 유전자 프로모터 및 vanB 유전자 프로모터를 포함한다 (Arthur, M., et al., The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. *J. Bacteriol.*, 1997. 179(1): p. 97-106. 참조).
- [0166] 2) TcdD 리포터 시스템
- [0167] 이 시스템의 다른 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 NRTP를 사용하여 세포에 도입된다. 리포터 핵산 분자는 씨. 디피실의 독소 A 및 B 유전자(각각 tcdA 및 tcdB)의 프로모터의 인듀서인 TcdD를 검출하도록 구성될 수 있다. 리포터 핵산 분자는 tcdA 유전자 프로모터에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함한다.
- [0168] 도 11은 본 발명의 구체예에 따른 TcdD 리포터 시스템의 디자인 및 기능을 개략한다. 도 11은 씨. 디피실에 존재할 수 있는 트랜스포존 PaLoc(1101)의 영역을 묘사한다. PaLoc 트랜스포존은 tcdD 유전자(1102)와 tcdA 표적 유전자(1103)를 포함할 수 있다. 또한, 이 도면에는 NRTP를 사용하여 세포에 도입될 수 있는 리포터 핵산 분자(1104)(예를 들어, 벡터)가 묘사된다. 리포터 핵산 분자(1104)는 tcdA 유전자 프로모터(PtcdA)(1106)에 작동 가능하게 연결된 리포터 유전자(1105)를 포함한다.
- [0169] 자생 세포에서, tcdD 유전자가 발현되어 TcdD 단백질(1107)을 생성할 때, TcdD는 PaLoc 트랜스포존(1101)에서 PtcdA(1106)를 유도할 수 있고, 따라서 tcdD 유전자(1103)의 발현을 야기하며, 독소 A 단백질(1108)을 생성한다.
- [0170] 리포터 핵산 분자(1104)가 표적 유기체 내에 존재할 경우, TcdD는 리포터 벡터 내에서 PtcdA(1106)를 유도할 수 있으며, 따라서 리포터 분자(1109)의 발현을 야기한다. 따라서, 리포터 분자(1109)의 생성은 표적 세포 내에 TcdD의 존재를 표시한다.
- [0171] 씨. 디피실 분석의 개발에 적합한 프로모터의 예들은 tcdA 유전자 프로모터 및 tcdB 유전자 프로모터를 포함한다 (Karlsson, S., et al., Expression of Clostridium difficile Toxins A and B and Their Sigma Factor TcdD Is Controlled by Temperature. *Infect. Immun.*, 2003. 71(4): p. 1784-1793 참조).
- [0172] 표적 세포 및 인듀서: 표적 세포는 진핵 및 원핵 세포 표적과 관련된 인듀서를 포함할 수 있다.
- [0173] 벡터 송달 시스템: 재조합 DNA를 함유하는 벡터의 송달은 비-생물학적 또는 생물학적 시스템에 의해서 수행될 수 있다. 제한은 아니지만 리포솜, 바이러스-유사 입자, 파지 또는 바이러스로부터 유래된 형질도입 입자, 및 콘쥬게이션을 포함한다.
- [0174] 3) 박테리오파지-기반 SarS 리포터 시스템
- [0175] 본 발명의 다른 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 에스. 아우레우스에서 단백질 A 유전자(spa)의 프로모터의 인듀서인 SarS를 검출하도록 구성된다. 리포터 핵산 분자는 NRTP에서 세포에 도입될 수 있고, spa 유전자 프로모터(Pspa)에 작동 가능하게 연결된 박테리아 루시페라제 유전자 luxA 및 luxB를 포함한다. 리포터 핵산 분자는, 예를 들어 NRTP를 통해서 에스. 아우레우스에 송달된다. SarS가 세포에 존재한다면, luxAB 유전자의 발현을 유도할 것이고, 따라서 발광 신호를 생성할 수 있는 루시페라제 효소를 생성한다.

[0176] 도 12는 본 발명의 구체예에 따른 SarS 리포터 시스템의 디자인 및 기능을 개략한다. 도 12는 SarS 유전자(1202) 및 spa 유전자(1203)를 함유하는 에스. 아우레우스 계놈(1201)의 영역을 묘사한다. 또한, 이 도면에는 세포에 NRTP에 의해서 송달되는 리포터 핵산 분자(예를 들어, 벡터)(1204)가 묘사되며, 이것은 spa 유전자(1203)의 발현을 제어하는 프로모터 Pspa(1206)에 작동 가능하게 연결된 luxAB 리포터 유전자(1205)를 포함한다.

[0177] 자생 세포에서, sarS 유전자(1202)가 발현되어 SarS 단백질(1207)을 생성할 때, 이 단백질은 에스. 아우레우스 계놈 트랜스포존에서 Pspa(1206)을 유도할 수 있고, 따라서 spa 유전자(1203)의 발현을 야기하며, 단백질 A(1208)을 생성한다.

[0178] 리포터 핵산 분자(1204)가 표적 유기체 내에 존재할 경우, SarS(1207)는 리포터 핵산 분자(1204) 내에서 Pspa(1206)를 유도할 수 있으며, 따라서 발광 신호를 생성할 수 있는 루시페라제 효소(1209)를 생성하는 luxAB의 발현을 야기한다. 따라서, 루시페라제의 생성은 표적 세포 내에 SarS의 존재를 표시한다.

B. 효소 리포터 분석

[0180] 본 발명은 본 발명의 구체예에 따라서 표적 세포내 효소에 의해서 봉쇄 해제될 수 있는 봉쇄된 기질을 이용한 생육성 세포 내에서 효소의 검출을 위한 시스템을 포함한다.

[0181] 도 13은 세포내 효소 검출 시스템의 디자인 및 기능을 도시한다. 리포터 분자-발현 벡터(1301)가 NRTP(미도시)에 의해 표적 세포(1302)에 송달된다. 리포터 분자-발현 벡터(1301)는 NRTP를 통해 표적 세포(1302)에 침투하여 리포터 분자 유전자(1303)를 표적 세포(1302)에 송달한 후, 리포터 분자(1304)가 리포터 분자 유전자(1303)로부터 발현될 수 있다. 또한, 봉쇄된 기질(1305)이 표적 세포(1302)에 첨가되어, 침투할 수 있다. 표적 세포내 효소(1307)가 표적 세포(1302)에 존재하는 경우, 효소(1307)는 봉쇄된 기질(1305)의 봉쇄 성분을 제거할 수 있고, 따라서 봉쇄 해제된 기질(1308)을 생성한다. 다음에, 봉쇄 해제된 기질(1308)은 세포(1302) 내부의 리포터 분자(1304)와 반응하고, 이 반응의 생성물은 검출 가능한 신호(1309)를 생성한다.

[0182] **표적 세포 및 효소:** 표적 세포는 진핵 및 원핵 세포 표적과 관련된 효소들, 예를 들어 에스. 아우레우스에서 β -락타마아제를 포함할 수 있다.

[0183] **벡터 송달 시스템:** 재조합 DNA를 함유하는 벡터의 송달은 비-생물학적 또는 생물학적 시스템에 의해서 수행될 수 있다. 제한은 아니지만 리포솜, 바이러스-유사 입자, 과지 또는 바이러스로부터 유래된 형질도입 입자, 및 콘쥬게이션을 포함한다.

[0184] **리포터 분자 및 봉쇄된 기질:** 다양한 리포터 분자 및 봉쇄된 기질로는 Daniel Sobek, J.R., Enzyme detection system with caged substrates, 2007 Zymera, Inc.에 개시된 것들을 이용할 수 있다.

1) 박테리오파지-기반 β -락타마아제 리포터

[0186] 하나의 구체예에서, 리포터 분자-발현 벡터는 NRTP에 의해 담지될 수 있으며, 이로써 벡터가 박테리아 세포에 송달될 수 있다. 발현되는 리포터 분자는 레닐라 루시페라제일 수 있고, 봉쇄된 기질은 봉쇄된 레닐라 루시페린일 수 있으며, 이로써 표적 세포에 내인성인 β -락타마아제 효소가 봉쇄된 루시페린으로부터 봉쇄 화합물을 절단해서 봉쇄 해제된 루시페린을 방출할 수 있다.

[0187] 도 14는 본 발명의 구체예에 따른 β -락타마아제 효소 검출 시스템의 디자인 및 기능을 도시한다. 박테리오파지-기반 NRTP(1401)에 의해서 담지된 레닐라 루시페라제-발현 벡터가 표적 에스. 아우레우스 세포(1402)에 침가된다. 레닐라 루시페라제-발현 벡터는 벡터를 포함하는 NRTP를 사용하여 표적 세포(1402)에 침투할 수 있다. NRTP는 표적 세포(1402)에 레닐라 루시페라제 유전자(1403)를 송달한 후, 레닐라 루시페라제(1404)가 유전자로부터 발현될 수 있다. 또한, 봉쇄된 레닐라 루시페린(1405)이 표적 세포(1402)에 첨가되어, 침투할 수 있다. 세포내 β -락타마아제(1407)가 표적 세포(1402)에 존재할 경우, 효소가 봉쇄된 루시페린(1406)의 봉쇄 성분을 제거할 수 있고, 따라서 봉쇄 해제된 루시페린(1408)을 생성한다. 다음에, 봉쇄 해제된 루시페린(1408)은 세포(1402) 내부의 레닐라 루시페라제(1404)와 반응할 수 있고, 이 반응의 생성물은 발광(1409)을 생성한다.

[0188] 이 방식에서, β -락타마아제를 함유하는 표적 세포가 NRTP 및 봉쇄된 루시페린에 노출되었을 때, 이 세포는 세포에 존재하는 β -락타마아제의 존재를 나타내는 발광 신호를 나타낼 것이다.

C. 세포내 분자 리포터

[0190] 본 발명은 표적 분자에 결합시 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 스위치 가능한 분자를 이용한 생육성 세포

내에서 분자의 검출을 위한 시스템을 포함한다.

[0191] 도 15는 스위치 가능한 분자(SM)-기반 세포내 분자 검출 시스템의 디자인 및 기능을 도시한다. SM-발현 벡터(1501)가 NRTP에서 표적 세포(1502)에 송달된다. SM-발현 벡터(1501)는 표적 세포(1502)에 침투할 수 있고, SM 유전자(1503)를 표적 세포(1502)에 송달할 수 있다. 다음에, SM 단백질(1504)이 SM 유전자(1503)로부터 발현될 수 있다. 다음에, SM 단백질(1504)은 세포 내부의 표적 분자(1505)와 결합하고, 따라서 SM-표적 분자 복합체(1506)를 형성할 수 있다. SM(1504)과 표적 분자(1505)의 결합은 SM(1504)의 입체구조를 변화시켜서 SM이 기질과 결합될 수 있도록 한다. 기질(1508)이 세포(1502)에 첨가되어 침투할 수 있다. 세포(1502) 내부의 결합된 SM이 또한 기질과 결합하여 SM-표적 분자-기질 복합체(1509)를 형성할 수 있다. 마지막으로, 표적 분자-SM 결합체와 기질(1508)의 결합은 검출 가능한 신호(1510)를 생성한다. 따라서, 이 시스템에 의해서 생성된 검출 가능한 신호는 세포 내부에 표적 분자의 존재를 나타낸다.

[0192] **표적 세포 및 분자:** 다양한 진핵 및 원핵 세포 표적이 이용될 수 있고, 스위치 가능한 앱타머-기반 SM은 Samie Jaffrey, J.P., Coupled recognition/detection system for in vivo and in vitro use, 2010, Cornell University에서 개시된 대로 다양한 핵산 및 아미노산-기반 세포내 분자 표적을 표적화하도록 설계될 수 있다.

[0193] **벡터 송달 시스템:** 재조합 DNA를 함유하는 벡터의 송달은 비-생물학적 또는 생물학적 시스템에 의해서 수행될 수 있다. 제한은 아니지만 리포솜, 바이러스-유사 입자, 파지 또는 바이러스로부터 유래된 형질도입 입자, 및 콘쥬게이션을 포함한다.

1) 비-복제 형질도입 입자/스위치 가능한 앱타머-기반 세포내 분자 리포터 시스템

[0195] 이 방법의 하나의 예에서, 스위치 가능한 분자-발현 벡터는 벡터가 박테리아 세포에 송달될 수 있도록 박테리오파지-기반 형질도입 입자에 의해서 담지될 수 있다. 발현되는 스위치 가능한 분자는 세포내 표적 분자와 결합시 입체구조 변화를 겪도록 설계된 스위치 가능한 앱타머일 수 있다. 입체구조 변화는 앱타머가 계속해서 형광단과 결합하도록 하며, 형광단은 앱타머에 의해서 결합되었을 때 증진된 형광을 나타낸다.

[0196] 도 16은 박테리오파지/스위치 가능한-애타머(SA)-기반 세포내 분자 리포터 시스템의 디자인 및 기능을 도시한다. NRTP에 의해 담지된 SA-발현 벡터(1601)가 표적 세포(1602)에 첨가된다. NRTP은 SA-발현 벡터(1601)와 SA-발현 유전자(1603)를 표적 세포(1602)에 송달할 수 있다. 다음에, SA 단백질(1604)이 SA 유전자(1603)로부터 발현될 수 있다. 다음에, SA 단백질(1604)은 세포 내부의 표적 분자(1605)와 결합해서 SA-표적 분자 복합체(1606)를 형성할 수 있다. SA(1604)와 표적 분자(1605)의 결합은 SA의 입체구조를 변화시켜서 SA가 형광단과 결합(1608)할 수 있도록 한다. 형광단(1607)이 세포에 첨가되어 침투(1608)할 수 있다. 세포 내부의 결합된 SA가 또한 형광단과 결합하여 SA-표적 분자-형광단 복합체(1609)를 형성할 수 있다. 마지막으로, 표적 분자-SA의 결합체와 형광단의 결합은 형광단의 형광(1610)을 증진시킨다. 따라서, 이 시스템에 의해서 생성된 검출 가능한 형광 신호는 세포 내부에 표적 분자의 존재를 나타낸다.

D. 전사체 리포터 분석

[0198] 본 발명은 표적 전사체가 세포 내에 존재하는 경우 리포터 분자의 발현을 야기함으로써 생육성 세포 내에서 표적 전사체를 검출하기 위한 안티센스 RNA-기반 방법을 포함하는 리포터 분석을 포함한다.

[0199] 유전자 발현을 억제하기 위한 본 분야의 특정 세포내 방법은 세포에서 전사된 유전자를 표적화하기 위해 이중가닥 RNA(dsRNA)와 같은 작은 간섭 RNA를 이용한다. dsRNA는 세포에 송달되거나 세포에서 발현되는 안티센스 및 센스 가닥을 포함하고, dsRNA의 가닥들은 트랜스-작용 억제 기전을 통해서 작용하며, 하나의 가닥(전형적으로 안티센스 가닥)은 표적 유전자 서열(RNA 전사체)에 결합하여 표적 유전자 서열의 발현을 억제한다. 이중가닥 RNA 분자는 RNA 간섭(RNAi)으로 알려진 고도로 보존적인 조절 기전에서 유전자 발현을 차단(녹다운)하는 것으로 확인되었다. WO 99/32619(Fire et al.)는 씨. 엘레강스에서 유전자의 발현을 억제하기 위한 적어도 25개 뉴클레오티드 길이의 dsRNA의 사용을 개시한다. 또한, dsRNA는 식물(WO 99/53050, Waterhouse et al.; 및 WO 99/61631, Heifetz et al. 참조), 초파리(Yang, D., et al., Curr. Biol. (2000) 10:1191-1200 참조), 및 포유동물(WO 00/44895, Limmer; 및 DE 101 00 586.5, Kreutzer et al. 참조)을 포함하는 다른 유기체에서 표적 RNA를 분해하는 것으로 확인되었다. 그러나, dsRNA의 어떤 가닥과 표적 유전자의 결합은 비-특이적일 수 있다. 유사한 기전이 검출 시스템에 적용되었다면, 이 비-특이적 결합은 높은 거짓 양성을 가져올 수 있고, 따라서 이것은 임상적으로 유용한 검출 시스템의 개발에 부적합하다.

[0200] 기존의 트랜스-작용 억제 기전은 임상적으로 유용한 검출 시스템의 개발에는 부적합한 것으로 확인되었다. 예를 들어, 일부 방법은 높은 수준의 비-특이적 신호와 90% 분석 감도를 달성할 때 최대 90%의 거짓 양성을 야

기한다(미국특허 No. 8,329,889 참조). 녹색 형광 단백질 마커와 같은 시스-억제 마커 전사체를 사용하는 유전자 발현의 전사 후 조절을 위한 특정 방법이 개발되었는데, 이 경우 트랜스-활성화 RNA 전사체와 함께 마커의 리보솜 결합 부위는 시스-억제 서열에 의해서 차단된다. 트랜스-활성화 RNA 전사체가 시스-억제 마커 전사체에 결합한 경우, 시스-억제 마커 전사체의 헤어핀 구조가 변경되고, 마커 유전자의 상류 리보솜 결합 부위가 노출되어 마커 유전자는 전사 및 발현한다. 그러나, 이들 방법은 내인성 전사체의 검출에는 사용된 적이 없고, 세포에서 유전자의 발현을 제어하기 위한 기본적인 스위칭 기전외에는 상공한 적이 없다.

[0201] 1) 핵산 분자 상호작용 및 기전

본 발명의 방법은 세포에 핵산 분자를 송달하기 위해서, 세포에서 안티센스 RNA(asRNA) 기전을 포함하는 전사체-수준 조절 기전의 이점을 활용한다. 안티센스 기전은 표적 전사체의 감소된, 제거된, 증가된, 활성화된, 또는 변경된 발현을 초래하는 모든 형태의 서열-특이적 mRNA 인식을 포함한다(Good, L., Translation Repression By Antisense Sequences. Cellular and Molecular Life Sciences, 2003 60(5): p. 854-861, 및 Lioliou, E., RNA-mediated regulation in bacteria: from natural to artificial systems, New Biotechnology. 2010. 27(3): p. 222-235 참조). 자연 발생 asRNA는 생명의 세 영역 모두에서 발견되며, 메신저 RNA(mRNA) 파괴, 억제 및 활성화 뿐만 아니라 RNA 프로세싱 및 전사에 영향을 미친다(Sabine, B., Antisense-RNA regulation and RNA Interference. Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Gene Structure and Expression, 2001. 1575(1-3): p. 15-25 참조). 이 기전은 치료 용도를 위해 단백질 합성을 억제하는 과정에서 조사되었다.

안티센스 RNA는 세포 내에서 전사된 메신저 RNA(mRNA) 가닥에 상보성인 단일가닥 RNA이다. asRNA는 그것과 염기쌍을 이루어 번역 기구를 물리적으로 차단함으로써 상보성 mRNA의 번역을 억제하기 위해서 세포에 도입될 수 있다. 상보성 mRNA 표적 서열에 대한 안티센스 RNA 아닐링, 및 mRNA 표적 서열의 번역은 리보솜 접근 또는 리보솜 판독의 입체적 방해 결과로서 파괴된다.

안티센스 RNA 기전은 이중가닥 RNA 단편(dsRNA, 작은 간섭 RNA(siRNA)라고도 칭한다)이, 가장 전형적으로 mRNA 와 결합하여 그것을 분해하도록 RNA-유도 침묵화 복합체(RISC)를 표적화함으로써 촉매 매개된 유전자 침묵화를 촉발하는 관련된 과정인 RNA 간섭(RNAi)과 상이하다. mRNA 또는 DNA에 대한 dsRNA 분자의 가닥의 아닐링은 세포에서 리보뉴클레아제에 의해서, 또는 안티센스 화합물 자체에 의한 표적 RNA의 절단에 의해서 듀플렉스 RNA, 하이브리드 RNA/DNA 듀플렉스, 또는 듀플렉스 RNA 재조립 전구체 tRNA의 빠른 분해를 가져올 수 있다.

RNAi 경로는 많은 진핵생물에서 발견되며, 효소 다이서에 의해 개시되는데, 이것은 긴 이중가닥 RNA(dsRNA) 분자를 siRNA라 칭하는 약 20개 뉴클레오티드의 짧은 이중가닥 단편으로 절단한다. 각 siRNA는 2개의 단일가닥 RNA(ssRNA), 즉 패신저 가닥과 가이드 가닥으로 풀린다. 패신저 가닥은 분해되고, 가이드 가닥은 RNA-유도 침묵화 복합체(RISC)에 통합된다. 전사 후 유전자 침묵화에서 가이드 가닥은 메신저 RNA 분자에 있는 상보성 서열과 염기쌍을 이루고, RISC 복합체의 촉매 성분인 아고나우트라 칭하는 단백질에 의해서 절단된다.

본 발명의 기전의 핵산 상호작용과 관련하여, 리포터 전사체와 표적 전사체 사이의 상호작용은 두 전사체에 존재하는 루프들 사이의 염기쌍화(예를 들어, "키싱 복합체"), 또는 루프와 단일가닥(ss) 영역 사이의 염기쌍화에 의존할 수 있다. 일부 경우, 키싱 복합체 형성은 상호작용의 바람직한 효과를 매개하기에 충분하고, 다른 경우에는 일차 접촉의 전파가 상호작용을 초래하여 원하는 결과를 가져올 것이다.

[0207] 2) 전사체-수준 조절을 통한 리포터 구조체의 번역의 시스-억제 및 트랜스-활성화를 위한 기전

다음의 설명은 본 발명의 구체예에 따라서 사용될 수 있는 다양한 억제/활성화 기전에 기초한 전사체 리포터 시스템을 예시한다. 도 17-20의 각각에서 벡터는 리포터 서열을 포함하는 리포터 구조체, 및 시스-억제 서열에 의한 억제에 대해 표적화될 수 있는 영역을 포함해서 각 도면에서 리포터 구조체가 도시된 영역을 포함한다. 아래 개시은 전사 약화, 번역 약화, 및 전사체 탈안정화를 포함하는 다양한 억제 기전, 및 입체구조 변화 및 절단을 포함하는 다양한 활성화 기전의 비제한적 예들을 제공한다.

도 17은 리포터 전사체(1703) 상에서 리포터 서열(1702)의 5' UTR(미번역 영역)을 표적화할 수 있는 시스-억제 기전을 사용한 시스템(1700)의 일례를 도시한다. 리포터 서열(1702) 내의 영역(5' UTR(1701), RBS, 코딩 영역 및 3' UTR)이 또한 도시된다. 시스-억제 서열(1705)은 리포터 서열의 상류에서 최대 리포터 서열의 5' UTR(1701)에 있다. RNA 중합효소(1704)는 리포터 구조체(1703)의 서열을 벡터(1706)로부터 전사한다.

전사 동안에 어떤 지점에서 전사 과정이 전사된 시스-억제 서열(1705) 내에서의 상호작용으로 인하여 리포터 전사체(1703)에서 전사 종결(TT) 줄기-루프 구조(1707)의 형성에 의해 중단된다. 전사 종결 구조(1707)는 RNA 중합효소(1704)가 벡터(1706)를 전사하는 것을 중단시킨다(1708). 일부 구체예에서, 전사 종결 단백질(예를

들어, 이. 콜라이에서 NusA)은 RNA 중합효소 및/또는 전사 종결 구조(1707)와 결합하여 리포터 구조체의 전사를 중단시킨다.

[0211] 표적 전사체(1709)가 세포에 존재할 경우, 표적 전사체(1709)는 리포터 전사체(1703)와 결합한다. 일부 구체예에서, 표적 전사체와 리포터 전사체 사이의 결합은 각 서열의 뉴클레오티드의 염기쌍화에 의해 이루어진다. 표적 전사체(1709)와 리포터 전사체(1703) 사이의 상호작용은 전사 종결(TT) 줄기-루프 구조(1707)가 절단(1710)되도록 한다. 리포터 전사체(1703)의 절단은 세포 효소, 예컨대 RNase III에 의해서 일어날 수 있다. 이 경우, 표적 전사체의 2차 구조가 2차 구조의 ssRNA 영역 중 RNase III 컨센서스 서열, 예를 들어 5'-nnWAWGNNUU-3'(SEQ ID NO:20) 또는 5'-NAGNNNNCWUWnn-3'(SEQ ID NO:21)의 존재에 대해 분석되는데, 여기서 "N" 및 "n"은 어떤 뉴클레오티드이고, "W"는 A 또는 U이고, "N"은 왓슨-크릭 염기쌍화에 대한 상대적으로 엄격한 요건을 나타내며, "n"은 염기쌍화에 대한 최소 요건을 나타낸다. 이러한 컨센서스 서열이 표적 전사체에서 발견될 때, 전사 종결 구조(1707)의 루프는 각 RNA 분자에서 ssRNA가 혼성화하도록 상기 RNase III 컨센서스 서열에 상보성이도록 설계될 수 있고, RNase III 절단 부위가 전사 종결 구조(1707)를 절단하도록 형성된다. *mecA* 전사체에서, 뉴클레오티드 1,404에서 시작하는 루프 T23이 이러한 접근법에 적합한 서열 CAGAUACAUUU(SEQ ID NO:22)를 가진다.

[0212] 일부 구체예에서, 절단 부위는 리포터 전사체가 전사 후 절단되도록 리포터 구조체에서 조작된다. 제공된 예에서 절단은 전사 터미네이터 구조에서 루프의 위치에 바로 인접하여 일어날 수 있다. 전사는 RNA 중합효소(1704)에 의해서 다시 개시된다(1711). 전사 종결(TT) 줄기-루프 구조(1707)의 절단은 리포터 서열(1702)의 나머지 부분이 전사되고 이어서 번역되도록 한다. 이로 인해 번역된 리포터 분자로부터 검출 가능한 마커 또는 선택성 마커가 생성된다.

[0213] 원핵생물에서 전사 종결 구조(1707)는 시토신-구아닌 염기쌍으로 부화된 7-20개 염기쌍 길이인 줄기-루프 구조를 가진 Rho-독립적 기전을 포함하며, 이어서 우라실 잔기 사슬이 뒤따른다. NusA가 전사 종결 줄기-루프 구조(1707)에 결합하여 폴리-우라실 서열의 전사 동안에 RNA 중합효소를 가둔다. 약한 아데닌-우라실 결합은 RNA-DNA 듀플렉스에 대한 탈안정화 에너지를 저하시키며, 이로써 RNA 중합효소로부터 풀려서 해리될 수 있다. 진핵생물에서, 전사 종결 구조(1707)는 단백질 인자에 의해 인식되고, 새로운 전사체의 절단과 뒤따른 폴리아데닐화를 포함한다.

[0214] 도 18은 리포터 전사체(1703)에서 리포터 서열(1702)의 리보솜 결합 부위 (RBS)(1801)를 표적화하는 시스-억제 기전에 기초한 세포에서 표적 전사체의 존재를 검출하기 위한 시스템(1800)의 일례를 도시한다. RBS(1801)는 단백질 번역을 개시할 때 리보솜(1802)에 의해 결합되는 mRNA의 서열이다. 시스-억제 서열(1705)은 RBS(1801)와 결합하도록 설계된다(예를 들어 시스-억제 서열(1705)이 RBS(1801) 서열에 상보성이다). RBS(1801)는 시스-억제 서열(1705)에 결합해서 격리되어(리보솜(1802)에 의한 접근 불가능), 리포터 전사체(1703)의 번역을 차단한다. 세포로부터의 표적 전사체(1709)가 리포터 전사체(1703)에 결합할 경우, 표적 전사체(1709)는 RBS 서열(1801)에 대해 더 높은 결합 친화성을 가지며, 시스-억제 서열(1705)과 RBS 서열(1801) 사이의 결합을 해제하는 방식으로 리포터 전사체(1703)의 입체구조가 변화된다. 이로 인해 리보솜(1802)은 RBS(1801)와 결합하여, 리포터 전사체(1703)의 번역을 가능하게 된다.

[0215] 도 19는 리포터 전사체(1703)에서 리포터 서열(1702)의 코딩 영역("AUG") (1901)을 표적화하는 시스-억제 기전에 기초한 세포에서 표적 전사체의 존재를 검출하는 예시적인 시스템(1900)을 도시한다. 시스-억제 서열(1705)은 리포터 서열(1702)의 코딩 영역(1901)과 결합하도록(예를 들어, 상보성) 구성된다. 코딩 영역(1901)의 일부로서 "AUG" 출발 코돈이 도시된다. 시스-억제 서열(1705)과 코딩 영역(1901)의 결합은 리포터 구조체(1703)의 절단(1902)을 초래하는 입체구조를 가져온다. 리포터 전사체(1703)의 절단은 번역을 차단한다.

[0216] 표적 전사체(1709)가 세포에 존재할 경우, 표적 전사체(1709)는 리포터 전사체(1703)의 입체구조를 변화시키는 방식으로 시스-억제 서열(1705)과 결합한다. 이러한 입체구조의 변화는 시스-억제 서열(1705)과 리포터 서열(1702)의 코딩 영역(1901) 사이의 상호작용을 차단하거나 제거하며, 이로써 리포터 서열(1702)의 번역이 가능하게된다.

[0217] 도 20은 불안정한 리포터 전사체(2001)를 사용한 억제 기전에 기초한 세포에서 표적 전사체의 존재를 검출하기 위한 예시적인 시스템(2000)을 도시한다. 리포터 전사체(2001)는 번역을 차단하는 불안정한 입체구조를 형성하도록 불안정하게 설계된다. 리포터 전사체(2001)는 엑소좀 복합체 또는 디그라도솜의 활성과 같은 다양한 요인들로 인해 빠른 분해의 경향을 나타낸다면 불안정한 것으로 정의된다. 세포에서 표적 전사체(1709)는 불안정한 리포터 전사체(2001)의 일부와 결합한다. 이 예에서, 전사체의 탈안정화를 초래하는 부분은 리포터 서열의 3'

UTR(2005)에 위치되고, 이 3' UTR(2005)는 리포터 구조체(1703)의 시스-억제 서열처럼 작동한다. 표적 전사체(1709)와 리포터 서열의 3' UTR(2005)의 결합은 절단(2003)을 야기하며, 이것은 리포터 전사체를 안정화(2001)시켜, 리포터 전사체(2001)의 번역(2004)을 가능하게한다. 절단은 표적 전사체(1709)의 결합시 발생하며, 전사체의 탈안정화를 초래하는 서열의 일부를 제거하는 작용을 한다. 이 예에서, 표적 전사체(1709)는 리포터 서열의 3' UTR(405)에 결합하지만, 시스템(400)은 또한 결합 및 절단이 5' UTR, 5' UTR의 상류, 또는 3' UTR의 하류에서 일어나도록 설계될 수도 있다. 결합 및 절단은 리포터 서열(1702)의 번역에 필요한 영역 바깥에서 일어날 수 있다.

[0218] 일부 구체예에서, 시스-억제 서열 자체는 서로 결합할 수 있는 두 서열을 포함하고(예를 들어, 서로 상보성), 이 두 서열의 결합으로부터 생긴 리포터 전사체의 입체구조는 리포터 전사체에서 리포터 서열의 번역을 차단한다.

3) 억제/활성화 기전을 위한 자연 발생 및 합성 시스템

[0220] 도 17-20에 도시된 각 예에서 이용된 개별 기전(즉, 입체구조 변화 및 절단)을 증명하기 위해서 몇몇 자연 발생 및 합성 생성된 전사체-수준 기전이 개시되었다.

[0221] 전사 종결이 안티센스 RNA(asRNA)-매개 전사 약화시 관찰되었다. 하나의 예에서, RNAlII/repR mRNA 사이의 두 루프-루프 상호작용 후에 계속해서 안정한 듀플렉스가 형성된다. 이 복합체는 Rho-독립적 터미네이터 구조를 안정화시켜 RNA 중합효소(RNAP)에 의한 신장을 중단시킨다.

[0222] RBS 격리 기전은 합성 리보스위치 시스템의 개발을 통해서 개시되었다. 이 시스템에서, RBS에 상보성인 서열이 RBS의 상류에 위치하게 되어, 두 영역 사이에 링커 서열이 존재하게 된다. mRNA의 전사 후 두 상보성 영역이 혼성화하여 리보솜의 도킹을 차단하는 헤어핀을 생성한다. 번역을 활성화하기 위해서 RBS 서열을 가진 합성 트랜스-활성화 RNA가 혼성화된 RNA에 결합한 결과, RBS가 노출되어 번역에 이용될 수 있도록 한다.

[0223] 또한, RNA의 절단으로 인한 번역 차단이 asRNA MicC가 ompD mRNA의 코딩 영역 내부의 서열을 표적화하는 자연적 시스템에서 설명되었다. Hfq에 의해서 촉진된 상호작용이 RNase E에 의한 mRNA의 절단을 야기한다.

[0224] 또 다른 자연적 기전은 번역을 억제하는 것이 아니라 활성화하기 위한 절단을 증명한다. 이. 콜라이 GadY asRNA는 gadXW 오페론의 두 유전자 사이의 상호간 영역을 표적화한다. GadY와 gadX의 3' UTR 사이에 안정한 헬릭스의 형성 후, 전사체에서 RNase 절단이 일어나고 gadX 전사체를 안정화하여 그것을 번역한다.

4) 리포터 서열의 시스-억제 및 표적 전사체의 결합에 의한 입체구조 변화의 기전

[0226] 본 발명에서 이용된 일반적인 기전은 두 연속 기전을 야기할 수 있는 문자간 핵산 문자 상호작용이다: (1) 핵산 문자의 2차 구조의 입체적 변화, 및 (2) 절단. 시스-억제 입체구조와 탈-억제 입체구조 간에 입체구조 변화를 일으킬 수 있는 리포터 전사체를 설계하는 방법이 본원에 개시되며, 여기서 입체구조 변화는 리포터 전사체와 표적 전사체의 결합에 의해서 유도된다.

[0227] 상기 개시된 대로, 리포터 전사체는 리포터 서열을 포함할 수 있고, 리포터 유전자 서열의 번역이 리포터 유전자의 리보솜 결합 부위(RBS)의 시스-억제에 의해서 차단되도록 설계될 수 있다.

[0228] 일부 구체예에서, 아래와 같은 방식이 본 발명의 리포터 전사체를 설계하는데 사용될 수 있다.

[0229] 1) RNA Institute College of Arts and Sciences, University at Albany, State University of New York(Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res. 31 (13), 3406-15 (2003))(<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>)에 의해서 유지되는 서버에서 이용 가능한 Mfold와 같은 2차 구조 프로그램을 사용하여 RNA 2차 구조가 계산된다.

[0230] 2) Graduate School of Information Science, Nara Institute of Science and Technology(NAIST), Department of Biosciences and Informatics, Keio University Japan(<http://rna.naist.jp/ractip/>)에 의해서 유지되는 서버에서 이용 가능한 Integer Programming(RactIP)을 사용한 RNA-RNA InterACTION 예측과 같은 소프트웨어 프로그램을 사용하여 문자간 RNA 상호작용이 계산된다.

[0231] 3) RNA의 2차 구조 드로잉 전용 Java 경량 애플리언 RNA용 비쥬얼라이제이션 애플리(VarNA)(<http://varna.lri.fr/>)을 사용하여 RNA 2차 구조가 시작화된다.

[0232] 표적 전사체의 2차 구조는 MFold에 의해 계산된 최저 에너지 입체구조에 기초하여 생성되고 VarNA로 시작화될

수 있다.

[0233] ssRNA 영역 또는 표적 영역은 리포터 전사체에 결합하기에 이상적일 수 있는 표적 전사체 내에서 확인될 수 있다. 일부 예에서, 표적 전사체의 2차 구조는 리포터 서열의 일부에 결합할 수 있는 컨센서스 서열 또는 루프 서열을 포함한다. 예를 들어, 메티실린 내성 에스. 아우레우스의 *mecA* 전사체에는 리포터 전사체의 시스-억제 서열에 결합하기 위해 사용될 수 있는 컨센서스 YUNR 서열("UUGG")을 포함하는 말단 루프가 있다. 표적 전사체의 2차 구조의 분석은 시스-억제 서열에 결합하기에 적합할 수 있는 하나 이상의 ssRNA 영역을 드러낸다. 리포터 전사체의 시스-억제 서열은 하나 이상의 ssRNA 영역에 결합하도록 설계될 수 있다.

[0234] 일부 구체예에서, 시스-억제 서열은 리포터 전사체에서 리포터 서열의 RBS에 결합하고 리포터 전사체 내의 줄기-루프 구조를 형성하도록 설계될 수 있으며, 이로써 시스-억제 서열은 리포터 서열의 RBS와 RNA 중합효소의 결합을 차단한다. 시스-억제 서열과 표적 전사체의 ssRNA 영역의 결합시 리포터 서열의 RBS가 노출될 수 있고, 리포터 서열의 번역이 개시될 수 있다.

[0235] 일부 구체예에서, 리포터 전사체의 시스-억제 서열은 리포터 서열의 5' 말단에 위치되도록 설계되고 리포터 서열에서 줄기-루프 구조를 생성하도록 설계될 수 있으며, 이로써 리포터 서열의 RBS 서열이 차단된다. 시스-제한 줄기-루프 구조는 MFold에 의해 계산되고 VARNA로 시각화되었을 때 리포터 전사체의 최저 에너지 입체구조에 기초하여 RBS 서열을 차단하도록 설계될 수 있다. 표적 전사체와 리포터 전사체의 시스-억제 서열 사이의 예측된 문자간 상호작용은 RactIP에 의해 계산되고 VARNA에 의해 시각화될 수 있다. 아래 도 28에 도시된 대로 표적 전사체와 리포터 전사체의 시스-억제 서열 사이의 염기쌍화를 시각화하기 위한 다이어그램이 그려질 수 있다.

[0236] 상호작용은 표적 서열과 시스-억제 서열에서 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 또는 50 또는 그 이상의 뉴클레오티드 사이의 염기쌍화를 포함할 수 있다. 두 서열 사이의 상보성 결합은 완전히 상보성, 실질적으로 상보성, 또는 부분적으로 상보성일 수 있다. 염기쌍화는, 예를 들어 도 28에 도시된 대로 표적과 시스-억제 서열 내의 연속 뉴클레오티드 서열 또는 영역을 가로질러 이루어질 수 있다.

5) 시스-억제 전사체 또는 리포터 전사체에 대한 절단 기전

[0238] 본 발명에서 이용된 일반적인 기전은 두 연속 기전을 야기할 수 있는 문자간 핵산 문자 상호작용이다: (1) 핵산 문자의 2차 구조의 입체적 변화, 및 (2) 절단. 절단을 이용하는 리포터 전사체를 설계하기 위한 방법 및 시스템이 본원에 개시된다.

[0239] 일부 구체예에서, 절단 기전은 시스-억제 또는 트랜스-활성화를 위해 본 발명의 시스템 및 방법에서 이용될 수 있다. 예를 들어, 도 17, 19 및 20를 참조하여 상기 개시된 대로, 시스템은 절단 효소(RNase)에 리포터 전사체의 핵산 서열을 노출시키거나 또는 서열 특이적 RNAase에 의해서 인식되는 단일가닥 서열을 격리시킴으로써 절단 기전의 이점을 이용하도록 설계될 수 있다.

[0240] 한 예에서, 리보뉴클레아제 E(RNase E) 부위가 리포터 전사체에서 설계될 수 있다(*는 절단 부위를 표시한다): (G,A)N(C,A)N(G)(G,U,A)*(A,U)(C,U)N(C,A)(C,A). Kaberdin et al., Probing the substrate specificity of *E. coli* RNase E using a novel oligonucleotide-based assay. Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, No. 16(doi: 10.1093/nar/gkg690)를 참조한다.

[0241] 시스-억제 시스템에서, 시스-억제 서열은 리포터 전사체의 디자인에 통합될 수 있으며, 이로써 전사되었을 때 리포터 전사체의 입체구조가 절단될 원하는 부위에서 서열 RNase E 인식 모티프를 함유하는 단일가닥 영역을 노출시킨다. 일부 구체예에서, 절단 부위는, 예를 들어 절단 부위가 리포터 유전자의 코딩 영역 내에 있는 경우, 리포터 전사체의 전사 억제에 포함될 수 있다.

[0242] 트랜스-탈억제 시스템의 경우, 시스-억제 전사체가 표적 전사체에 결합하도록 조작될 수 있으며, 이로써 상호작용이 리포터 전사체에 입체구조 변화를 야기하여 RNase E 부위를 함유하는 단일가닥 영역을 격리시킨다.

[0243] 상기 시스템은 시스-억제 기전이 상기 개시된 전사 종결 구조와 같은 시스-억제 서열의 입체구조에 의해서 생성된 특이적 2차 구조로 인한 것이도록 설계될 수 있다. 이 예에서, 절단은 리포터 서열을 탈억제하는 작용을 한다. 이것은 자연 발생 플라스미드 또는 다른 세포 전사체와 상호작용(결합)하도록 시스-억제 서열을 설계함으로써 달성될 수 있으며, 이로써 상호작용은 절단될 수 있고, 따라서 리포터 전사체로부터 시스-억제 서열을 제

거할 수 있는 RNase E 부위를 함유하는 단일가닥 영역이 생성된다.

[0244] 일부 구체예에서, 절단이 리포터의 발현에 이용된 경우, RNase E 부위는 생육성 리포터 전사체를 허용하기 위해 서 5' 및 3' UTR에 충분한 서열 길이를 가진 리포터 서열의 코딩 영역을 벗어나 있도록 설계된다. 이 경우, RNase E 부위는 원핵 시스템에서 출발 코돈의 상류에 적어도 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 또는 그 이상의 염기쌍이 있고, 진핵 시스템에서 출발 코돈의 상류에 적어도 18, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 또는 그 이상의 염기쌍이 있거나, 또는 중단 코돈의 하류에 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 또는 그 이상의 염기쌍이 있도록 설계된다. 다른 구체예에서, 절단이 리포터의 억제에 이용된 경우, RNase E 부위는 리포터 서열의 코딩 영역 내에 있도록 설계되거나, 또는 리포터의 발현을 억제할 수 있도록 위치된다.

6) 전사체

[0245] 상기 개시된 대로, 전사체는 DNA 또는 RNA 주형 서열 또는 유전자로부터 전사된 뉴클레오티드 서열(DNA 또는 RNA)의 길이이다. 전사체는 RNA 주형으로부터 전사된 cDNA 서열 또는 DNA 주형으로부터 전사된 mRNA 서열일 수 있다. 전사체는 조작된 핵산 구조체로부터 전사될 수 있다. 전사체는 자체 내에 상보성 영역을 가질 수 있으며, 이로써 전사체는 문자내 듀플렉스를 형성할 수 있는 두 영역을 포함한다. 하나의 영역은 리포터 서열에 결합하여 번역을 차단하는 "시스-억제 서열"로서 언급될 수 있다. 전사체의 제2 서열은 검출 가능한 마커 또는 선택성 마커와 같은 리포터 문자를 암호화하는 "리포터 서열"로서 칭해진다.

[0246] [0247] 본 발명의 전사체는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개 뉴클레오티드 길이일 수 있는 전사체 서열일 수 있다. 다른 구체예에서, 전사체는 적어도 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000개 또는 그 이상의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 시스-억제 서열과 리포터 서열은 동일한 길이 또는 상이한 길이일 수 있다.

[0248] 일부 구체예에서, 시스-억제 서열은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60개 또는 그 이상의 스페이서 뉴클레오티드에 의해서 리포터 서열과 분리된다.

7) 벡터

[0249] [0250] 다른 양태에서, 본 발명의 전사체(안티센스 및 센스 서열 포함)는 DNA 또는 RNA 벡터에 삽입된 전사 유닛으로부터 발현된다(예를 들어, Couture, A, et al., TIG. (1996), 12:5-10; Skillern, A., et al., 국제 PCT 공보 No. WO 00/22113, Conrad, 국제 PCT 공보 No. WO 00/22114, 및 Conrad, 미국 특허공개 No. 6,054,299 참조). 이들 서열은 선형 구조체, 원형 플라스미드, 또는 박테리오파지-기반 벡터를 포함하는 바이러스 벡터로서 도입될 수 있으며, 이들은 숙주 계놈에 통합된 트랜스젠으로서 통합되고 유전될 수 있다. 전사체는 또한 염색체와 플라스미드로서 유전되는 것을 허용하도록 구성될 수 있다(Gassmann, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92:1292 참조).

[0251] 전사체 서열은 발현 플라스미드 상에 위치된 프로모터에 의해 번역될 수 있다. 하나의 구체예에서, 시스-억제 및 리포터 서열이 전사체가 줄기 및 루프 구조를 갖도록 링커 폴리뉴클레오티드 서열에 의해서 이어진 반전된 반복부로서 발현된다.

[0252] 재조합 발현 벡터가 본 발명의 전사체를 발현하기 위해 사용될 수 있다. 재조합 발현 벡터는 일반적으로 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터이다. 전사체를 발현하는 바이러스 벡터는, 제한은 아니지만, 아데노-관련 바이러스(Muzyczka, et al., Curr. Topics Micro. Immunol. (1992) 158:97-129) 참조); 아데노바이러스(Berkner, et al., BioTechniques (1998) 6:616, Rosenfeld et al. (1991), Science 252:431-434, 및 Rosenfeld et al. (1992), Cell 68:143-155 참조); 또는 알파바이러스 뿐만 아니라 본 분야에 알려진 다른 것들로부터 구성될 수 있다. 레트로바이러스는 시험판내 및 생체내에서 내피세포를 포함하는 많은 상이한 세포 타입에 다양한 유전자를 도입하는데 사용되었다(예를 들어, Eglitis, et al., Science (1985) 230:1395-1398; Danos and Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1998) 85:6460-6464; Wilson et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 3014-3018; Armentano et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6141-6145; Huber et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8039-8043; Ferry et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8377-8381; Chowdhury et al., 1991, Science 254:1802-1805; van Beusechem. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7640-19; Kay et al., 1992, Human Gene Therapy 3:641-647; Dai et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10892-10895; Hwu et al., 1993, J. Immunol. 150: 4104-4115; 미국특허 No. 4,868,116; 미국특허 No.

4,980,286; PCT 출원 WO 89/ 07136; PCT 출원 WO 89/02468; PCT 출원 WO 89/05345; 및 PCT 출원 WO 92/07573 참조). 세포 계놈에 삽입된 유전자를 형질도입하고 발현할 수 있는 재조합 레트로바이러스 벡터가 재조합 레트로바이러스 계놈을 PA317 및 Psi-CRIP와 같은 적합한 패키징 셀라인으로 트랜스펙션함으로써 생성될 수 있다 (Comette et al., 1991, Human Gene Therapy 2:5-10; Cone et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349 참조). 재조합 아데노바이러스 벡터는 감수성 숙주에서 광범위한 여러 세포와 조직을 감염시키기 위해 사용될 수 있고(예를 들어, 래트, 햄스터, 개 및 침팬지)(Hsu et al., 1992, J. Infectious Disease, 166:769 참조), 또한 감염에 유사분열 활성 세포가 필요하지 않다는 이점을 가진다.

[0253] 발현되는 전사체(들)에 대한 코딩 서열을 수용할 수 있는 어떤 바이러스 벡터가 사용될 수 있고, 예를 들어 아데노바이러스(AV); 아데노-관련 바이러스(AAV); 레트로바이러스(예를 들어, 렌티바이러스(LV), 랍도바이러스, 뮤린 백혈병 바이러스); 헤르페스 바이러스 등으로부터 유래된 벡터가 있다. 바이러스 벡터의 트로피즘은 벡터를 다른 바이러스로부터의 외피 단백질이나 다른 표면 항원으로 수도타이핑함으로써, 또는 적절하다면 상이한 바이러스 캡시드 단백질을 치환함으로써 변형될 수 있다.

[0254] 예를 들어, 본 발명에서 특정된 렌티바이러스 벡터는 소포 스토마티스 바이러스(VSV), 라비에스, 에볼라, 모콜라 등으로부터의 표면 단백질로 수도타이핑될 수 있다. 본 발명에서 특정된 AAV 벡터는 상이한 캡시드 단백질 혈청형을 발현하도록 벡터를 조작함으로써 상이한 세포를 표적화하도록 제조될 수 있다. 상이한 캡시드 단백질 혈청형을 발현하는 AAV 벡터를 구성하는 기술은 본 분야의 기술 범위 내이다; 예를 들어, 전체 내용이 참고자료로 본원에 포함되는 Rabinowitz J E et al. (2002), J Virol 76:791-801을 참조한다.

[0255] 본 발명에 사용하기 적합한 재조합 바이러스 벡터의 선택, 벡터에 전사체를 발현하기 위해 핵산 서열을 삽입하는 방법, 및 관심 세포에 바이러스 벡터를 송달하는 방법은 본 분야의 기술 범위 내이다. 예를 들어, Dornburg R (1995), Gene Therap. 2: 301-310; Eglitis M A (1988), Biotechniques 6: 608-614; Miller A D (1990), Hum Gene Therap. 1: 5-14; Anderson W F (1998), Nature 392: 25-30; 및 Rubinson D A et al., Nat. Genet. 33: 401-406을 참조하며, 이들의 전체 내용은 참고자료로 본원에 포함된다.

[0256] 바이러스 벡터는 AV 및 AAV로부터 유래될 수 있다. 본 발명에서 특정된 전사체를 발현하기 위한 적합한 AV 벡터, 재조합 AV 벡터를 구성하는 방법, 및 표적 세포에 벡터를 송달하는 방법은 Xia H et al. (2002), Nat. Biotech. 20:1006-1010에 개시된다. 또한, 본 발명에서 특정된 전사체를 발현하기 위한 적합한 AAV 벡터, 재조합 AV 벡터를 구성하는 방법, 및 표적 세포에 벡터를 송달하는 방법은 Samulski R et al. (1987), J. Virol. 61:3096-3101; Fisher K J et al. (1996), J. Virol, 70:520-532; Samulski R et al. (1989), J. Virol. 63:3822-3826; 미국특허 No. 5,252,479; 미국특허 No. 5,139,941; 국제특허출원 No. WO 94/13788; 및 국제특허 출원 No. WO 93/24641에 개시되며, 이들의 전체 내용이 참고자료로 본원에 포함된다.

[0257] 본 발명에서 특정된 DNA 플라스미드 또는 바이러스 벡터에서 전사체 발현을 추진하는 프로모터는 진핵 RNA 중합효소 I(예를 들어, 리보솜 RNA 프로모터), RNA 중합효소 II(예를 들어, CMV 조기 프로모터 또는 액틴 프로모터 또는 U1 snRNA 프로모터) 또는 RNA 중합효소 III 프로모터(예를 들어, U6 snRNA 또는 7SK RNA 프로모터) 또는 원핵 프로모터, 예를 들어 T7 프로모터일 수 있으며, 다만 발현 플라스미드는 또한 T7 프로모터로부터의 전사에 필요한 T7 RNA 중합효소를 암호화한다. 프로모터는 또한 트랜스젠 발현을 췌장에 지시할 수 있다(예를 들어, 췌장에서의 인슐린 조절 서열(Bucchini et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:2511-2515) 참조).

[0258] 게다가, 전사체의 발현은, 예를 들어 유도성 조절 서열 및 특정한 생리학적 조절인자, 예를 들어 순환 글루코오스 수준, 또는 호르몬에 감응하는 조절 서열과 같은 발현 시스템에 의해서 정확히 조절될 수 있다(Docherty et al., 1994, FASEB J. 8:20-24 참조). 세포 또는 포유동물에서 트랜스젠 발현의 제어에 적합한 이러한 유도성 발현 시스템은 엑디손, 에스트로겐, 프로게스테론, 테트라사이클린, 이량화의 화학적 인ду서, 및 이소프로필-베타-D-1-티오갈락토피라노시드(IPTG)에 의한 조절을 포함한다. 당업자는 dsRNA 트랜스젠의 사용 목적에 기초하여 적절한 조절/프로모터 서열을 선택할 수 있을 것이다.

[0259] 일반적으로, 전사체 분자를 발현할 수 있는 재조합 벡터가 하기 개시된 대로 송달되고, 표적 세포에서 지속된다. 또는, 전사체 분자의 일시 발현을 제공하는 바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 이러한 벡터는 필요에 따라 반복적으로 투여될 수 있다. 일단 투여되면 전사체는 표적 RNA와 결합하여 기능이나 발현을 조정한다. 전사체 발현 벡터의 송달은, 예컨대 정맥내 또는 근육내 투여, 환자로부터 외식된 표적 세포에 투여 후 환자에 재도입, 또는 원하는 표적 세포에 도입 가능하게 하는 어떤 다른 수단에 의해서 전신적으로 이루어질 수 있다.

[0260] 전사체 발현 DNA 플라스미드는 전형적으로 양이온성 지질 캐리어(예를 들어, 올리고펩타민) 또는 비-양이온성

지질-기반 캐리어(예를 들어, 트랜짓-TKOTM)와의 복합체로서 표적 세포에 트랜스펙션된다. 또한, 1주 이상의 기간에 걸쳐서 단일 PROC 유전자 또는 다수 PROC 유전자의 상이한 영역들을 표적화하는 dsRNA-매개 녹다운을 위한 다중 지질 트랜스펙션의 본 발명에 의해서 제시된다. 숙주 세포로의 벡터의 성공적인 도입은 다양한 공지된 방법을 사용하여 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 일시 트랜스펙션인 녹색 형광 단백질(GFP)과 같은 형광 마커와 같은 리포터로 신호화될 수 있다. 생체외 세포의 안정한 트랜스펙션은 히그로마이신 B 내성과 같은 특정 환경 요인(예를 들어, 항생물질 및 약물)에 내성을 가진 트랜스펙션된 세포를 제공하는 마커를 사용하여 보장될 수 있다.

[0261] 재조합 DNA를 함유하는 벡터의 송달은 비-생물학적 또는 생물학적 시스템에 의해서 수행될 수 있다. 제한은 아니지만 리포솜, 바이러스-유사 입자, 과자 또는 바이러스로부터 유래된 형질도입 입자, 및 콘쥬게이션을 포함한다.

8) 전사체 분석을 위한 리포터

[0263] 일부 구체예에서, 핵산 구조체는 리포터 서열(예를 들어, 리포터 유전자 서열)을 포함한다. 리포터 유전자는 세포에서 발현되었을 때 신호를 생성하는 리포터 분자를 암호화한다. 일부 구체예에서, 리포터 분자는 검출 가능한 마커 또는 선택성 마커일 수 있다. 특정 구체예에서, 리포터 분자는 형광 리포터 분자, 예컨대 녹색 형광 단백질(GFP), 황색 형광 단백질(YFP), 시안 형광 단백질(CFP), 청색 형광 단백질(BFP), 또는 적색 형광 단백질(RFP)일 수 있다. 다른 구체예에서, 리포터 분자는 화학발광 단백질일 수 있다.

[0264] 리포터 분자는 박테리아 루시페라제, 진핵 루시페라제, 형광 단백질, 비색검출에 적합한 효소, 면역검출에 적합한 단백질, 면역검출에 적합한 웨티드 또는 앱타미로서 기능하거나 효소 활성을 나타내는 핵산일 수 있다.

[0265] 선택성 마커가 또한 리포터로서 사용될 수 있다. 선택성 마커는, 예를 들어 항생물질 내성 유전자일 수 있다.

9) 전사체 리포터 분석을 위한 세포 및 표적 유전자

[0267] 검출에 사용될 수 있는 세포의 예들은 그람양성 및 그람음성 박테리아, 예컨대 에스. 아우레우스, 이. 콜라이, 케이. 뉴모니아에 등, 진균, 예컨대 스트렙토미세스 코엘리콜라, 및 사람, 다른 포유동물, 곤충, 무척추동물, 또는 식물로부터의 세포를 포함하는 다른 진핵 세포를 포함한다.

[0268] 표적 전사체는 코딩이거나 비-코딩인 어떤 내인성 전사체를 포함할 수 있다. 표적 전사체는 진행 및 원핵 세포로부터 유래될 수 있으며, 예를 들어 에스. 아우레우스 세포의 *mecA* 전사체(MRSA의 표시), 씨. 디피실의 *tcdB* 전사체(독성 씨. 디피실의 표시), 및 자궁경부 내피세포의 HPV E6/E7 전사체(자궁경부암의 표시)를 포함한다. HIV, HPV 등을 포함하는 바이러스와 같은 감염원과 관련된 유전자도 역시 표적일 수 있다. 표적 유전자의 다른 예들은 비-코딩 RNA, 예컨대 전달 RNA(tRNA) 및 리보솜 RNA(rRNA) 뿐만 아니라 snoRNA, microRNA, siRNA, snRNA, exRNA, 및 piRNA 및 ncRNA와 같은 RNA들을 포함한다.

실시예

[0270] 하기 실시예는 본 발명을 수행하기 위한 특정 구체예들의 실시예이다. 이 실시예들은 단지 예시의 목적으로 제공되며, 본 발명의 범위를 어떤 식으로도 제한하지 않는다. 사용된 숫자(예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 확보하기 위한 노력이 이루어졌지만 일부 실험 오차 및 편차는 당연히 허용되어야 한다.

[0271] 본 발명의 실시는 달리 나타내지 않는다면 본 분야의 기술 범위 내에서 단백질 화학, 생화학, 재조합 DNA 기술 및 약학 분야의 종래의 방법을 이용할 것이다. 이러한 기술들은 문현에 상세히 개시된다. 예를 들어, T.E. Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties(W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry(Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual(2nd Edition, 1989); Methods In Enzymology(S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg Advanced Organic Chemistry 3rd Ed.(Plenum Press) Vols A and B(1992)를 참조한다.

실시예 1: 침묵 돌연변이/보상 패키징 시스템

[0273] 다음은 비-복제 형질도입 입자를 생성하기 위한 침묵 돌연변이/보상-기반 패키징 시스템의 설계 및 구성의 실시 예이다.

[0274] 패키징 시스템의 개발에 사용된 재료들은 다음과 같다:

[0275] 박테리아 균주:

- N1706, 이. 콜라이 K-12 P1 c1-100 Tn9 용원

벡터:

- Y14439(pBHR1 백본)

[0279] 다음의 GenBank 수탁 번호(N.B., 수탁 번호로서 인용된 서열은 본 출원의 우선일 현재 데이터베이스에 기록된 것들이다) 또는 SEQ ID NOs.가 벡터 백본 및 카세트 서열에 사용될 수 있다:

- X06758 (박테리아 루시페라제 유전자 luxAB)

- SEQ ID NO:1 (자생 P1 pac-부위)

- SEQ ID NO:3 (C1 리프레서-제어 P53 프로모터, 프로모터 P53 안티센스, repL 유전자, 및 k11A 유전자의 프레임 내 결실을 함유하는 P1 세포용해 레플리콘)

- SEQ ID NO:4 (luxAB 밸현을 추진하는 Pblast 프로모터)

[0284] N1706(pac)의 구성: pacA 돌연변이된 균주: pacA 돌연변이된 서열의 예시적인 서열이 SEQ ID NO:2에 제시되며, 이것은 하기 비공식 서열목록에 제시된다. 이 돌연변이는 유전자 합성을 통해 돌연변이된 서열을 구성하고, 이어서 N1706의 자생 서열을 대립형질 교환 접근법을 통해 돌연변이된 서열로 치환하여 달성될 수 있다.

[0285] GWP10001 리포터 벡터의 구성: GWP10001 벡터는 광범한 그람음성 활성을 나타내는 pBHR1 복제 기원, 카나마이신과 클로람페니콜에 대한 두 선택성 마커, 자생 박테리오파지 P1 pac-부위 서열, 구성성 블라스티실린 프로모터(Pblast)에 작동 가능하게 연결된 비브리오 하베이이로부터의 luxA 및 luxB 유전자, 및 C1 리프레서-제어 P53 프로모터, 프로모터 P53 안티센스, repL 유전자, 및 k11A 유전자의 프레임 내 결실을 함유하는 P1 세포용해 레플리콘을 함유한다.

[0286] 도 2는 자생 공급원으로부터 PCR을 통해서 또는 유전자 합성을 통해서 카세트를 얻고, 전통적인 제한 효소-기반 클로닝이나 Gibson 조립과 같은 대안적 기술을 통해서 벡터를 조립하는 것을 포함하는 당업자에게 알려진 여러 방식으로 구성될 수 있는 벡터(GWP10001, SEQ ID NO:11)를 도시한다.

[0287] 침묵/보상 패키징 시스템: 이 패키징 시스템은 벡터 pGWP10001로 보상된 pacA 돌연변이 균주 N1706(pac)를 포함한다. 당업자에게 알려진 대로, 이 시스템을 구성하는 방식은 벡터 pGWP10001로의 N1706(pac) 형질전환에 의해서 달성될 수 있다. 벡터 pGWP10001은 50ug/mL 카나마이신의 존재하에 형질전환체를 성장시킴으로써 형질전환된 N1706(pac)의 배양물에 유지될 수 있다.

[0288] 플라스미드 DNA를 가진 형질도입 입자의 생성: 벡터 pGWP10001을 가진 비-복제 형질도입 입자가 42°C에서 열 유도를 통해서 N1706(pac) 형질전환체로부터 생성될 수 있다. 42°C에서 인큐베이션은 P1 세포용해 주기를 유도하며, 도 1에 도시된 대로 프로파지가 N1706 계놈으로부터 절제되어 파지 구조 요소를 생성하고, 자손 파지 입자에 세포용해 레플리콘에 의해 형성된 pGWP10001 콘카타며 DNA를 패키징한다. 다음에, 얻어진 세포 용해물이 수집되면, 이것은 비-복제 형질도입 입자를 함유하고, 각 입자는 pGWP10001 DNA의 선형 콘카타머를 가진 박테리오파지 P1 입자로 구성된다.

실시예 2: 결실/보상 패키징 시스템

[0289] 다음은 비-복제 형질도입 입자를 생성하기 위한 결실/보상-기반 패키징 시스템의 설계 및 구성의 실시예이다.

[0290] 패키징 시스템의 개발에 사용된 재료들은 다음과 같다:

박테리아 균주:

[0291] RN4220은 NCTC 8325의 비-용원성 유도체인 제한 결핍 에스. 아우레우스 균주이며, 이것은 이. 몰리 DNA의 효과적인 레시피언트이다. 이것은 Kreiswirth, B.N. et al., The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. Nature, 1983. 305(5936): p. 709-712에 최초로 개시되었다.

[0292] RN10616은 박테리오파지 φ80α로 RN4220을 용원화하여 유도된다(Ubeda C. et al. Specificity of staphylococcal phage and SaPI DNA packaging as revealed by integrase and terminase mutations. Molecular Microbiology, 2009. 72(1): p. 98-108 참조).

- [0295] ST24는 RN10616의 용원화된 박테리오파지 ϕ 80 α 로부터 작은 터미나아제 유전자 terS를 결실시켜 유도된다 (Ubeda C. et al. Specificity of staphylococcal phage and SaPI DNA packaging as revealed by integrase and terminase mutations. Molecular Microbiology, 2009. 72(1): p. 98-108참조).
- [0296] 벡터:
- [0297] 본 발명의 일부 구체예에서 카세트를 위한 플라스미드 공급원으로 사용될 수 있는 플라스미드의 예들은 Charpentier E., et al., Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 2004. 70(10): p. 6076-6085에 개시된다.
- [0298] 다음의 GenBank 수탁 번호가 카세트 서열에 사용될 수 있다:
- SEQ ID NO:5 (에스. 아우레우스 pT181 플라스미드 기원 또는 복제 카피수 변이체 pT181cop-623 repC)
- [0300] - M21136 (tetA(M))
- [0301] - SEQ ID NO:12 (PclpB 프로모터 서열)
- [0302] - SEQ ID NO:9 (ϕ 11 작은 터미나아제(terS) 유전자 서열)
- [0303] - L09137 (amp ColE1 ori)
- [0304] - X06758 (luxAB)
- [0305] - M62650 (전사 종결)
- [0306] terS 결실: terS 녹아웃 균주의 예시적인 서열이 SEQ ID NO:13에 제시된다(하기 서열목록에 제시됨). SEQ ID NO:13은 ϕ 80 α terS 결실 및 보상을 나타내는 RN10616 게놈 서열 유전자좌이다.
- [0307] 벡터 구성: GW80A0001 벡터는 이.콜리/에스.아우레우스 셔틀 벡터이다. 이 벡터는 에스.아우레우스(pT181cop-623 repC) 및 이.콜리(ColE1ori) 복제 기원, 각각 이.콜리 및 에스.아우레우스에서의 선택을 위한 암피실린(amp) 및 테트라사이클린(tet(M)) 내성에 대한 선택성 마커, 자신의 프로모터를 포함하는 ϕ 11 작은 터미나아제(terS) 유전자 서열, 구성성 에스. 아우레우스 PclpB 프로모터에 작동 가능하게 연결된 비브리오 하베이이로부터의 luxA 및 luxB 유전자 및 전사 종결 서열(TT)를 함유한다.
- [0309] 도 4는 당업자에게 알려진 여러 방식으로 구성될 수 있는 벡터(pGW80A0001, SEQ ID NO:14)를 도시한다. 하나의 예에서, tet(M) 카세트와 luxAB 유전자는 공개적으로 이용 가능한 pCN36 및 pCN58 벡터(Charpentier, E., et al.)로부터 PCR 증폭을 통해 얻어질 수 있다. PclpB는 에스. 아우레우스 RN4220로부터 PCR 증폭으로부터 얻어질 수 있고, terS는 RN10616로부터 PCR 증폭을 통해 얻어질 수 있다. 벡터 백본은 공개적으로 이용 가능한 벡터 pCN48(Charpentier E., et al.)로부터 ermC 유전자를 제거함으로써 얻어질 수 있고, 최종 벡터 pGW80A0001의 다양한 성분들이 이 벡터 백본 위에서 적절히 설계된 제한 효소-기반 클로닝을 통해 조립될 수 있다.
- [0310] 결실/보상 패키징 시스템: 이 패키징 시스템은 균주 GW24를 생성하기 위해서 벡터 pGW80A0001로 보상된 terS 녹아웃 균주 ST24를 포함할 수 있다. 당업자에게 알려진 대로, 이 시스템을 구성하는 방식은 벡터 pGW80A0001로의 ST24 형질전환에 의해서 달성될 수 있다. 벡터 pGW80A0001은 50ug/mL 테트라사이클린의 존재하에 형질전환체를 성장시킴으로써 형질전환된 ST24의 배양물에 유지될 수 있다.
- [0311] 플라스미드 DNA를 가진 형질도입 입자의 생성: 벡터 pGW80A0001을 가진 비-복제 형질도입 입자가 이.콜라이에서 최초로 증명되었고 현재는 용원화된 박테리아로부터 프로파지를 얻기 위한 표준 기술인 미토마이신 C-유도 방법을 통해 GW24로부터 생성될 수 있다(Otsuji, N. et al., Induction of Phage Formation in the Lysogenic Escherichia coli K-12 by Mitomycin C. Nature, 1959. 184(4692): p. 1079-1080 참조). 이 프로파지 유도 방법은 ϕ 80 α 의 세포용해 주기를 유도하며, 도 2에 도시된 대로 프로파지가 GW24 게놈으로부터 절제되어 파지 구조 요소를 생성하고, 자손 파지 입자에 pGW80A0001 콘카타미 DNA를 패키징한다. 다음에, 얻어진 세포 용해물이 수집되며, 이것은 비-복제 형질도입 입자를 함유하고, 각 입자는 pGW80A0001 DNA의 선형 콘카타미를 가진 박

테리오파지 ϕ 80α 입자로 구성된다.

[0312] **실시예 3: 인테그라아제를 결여한 SaPIbov2-기반 패키징 시스템**

[0313] 다음은 비-복제 형질도입 입자를 생성하기 위한 SaPIbov2-기반 패키징 시스템의 설계 및 구성의 실시예이다.

[0314] 패키징 시스템의 개발에 사용된 재료들은 다음과 같다:

[0315] 다음과 같은 재료들이 인테그라아제를 결여한 SaPIbov2-기반 패키징 시스템을 개발하기 위해 사용될 수 있다.

[0316] 박테리아 균주:

[0317] RN451은 박테리오파지 ϕ 11로 용원화된 에스. 아우레우스 균주이다.

[0318] JP2131은 SaPIbov2로 용원화된 RN451이다(Maiques, E. et al., Role of Staphylococcal Phage and SaPI Integrase in Intra- and Interspecies SaPI Transfer. J. Bacteriol., 2007. 189(15): p. 5608-5616 참조).

[0319] JP2488은 SapIbov2로부터 int 유전자가 결실된 균주 JP2131이다(SaPIbov2Δint). Maiques, E. et al., Role of Staphylococcal Phage and SaPI Integrase in Intra- and Interspecies SaPI Transfer. J. Bacteriol., 2007. 189(15): p. 5608-5616를 참조한다.

[0320] 박테리오파지:

[0321] 박테리오파지 ϕ 11은 이. 콜라이에서 최초로 증명되었고 현재는 용원화된 박테리아로부터 프로파지를 얻기 위한 표준 기술인 미토마이신 C-유도 방법을 통해 에스. 아우레우스 균주 RN0451로부터 얻어질 수 있다(Otsuji N. et al., Induction of Phage Formation in the Lysogenic Escherichia coliK-12 by Mitomycin C. Nature, 1959. 184(4692): p. 1079-1080 참조).

[0322] 프로모터:

[0323] PclpB가 이 실시예에서 프로모터로 사용될 수 있다. clpB 유전자 프로모터는 int 유전자의 발현을 제어하기 위해 사용된 구성성 프로모터이다. 에스. 아우레우스 clpB(PclpB) 유전자 프로모터 서열은 2004년에 최초로 밝혀졌다(Frees, D., et al., Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Molecular Microbiology, 2004. 54(5): p. 1445-1462 참조). 또한, 이것은 2004년에 플라스미드에서 유전자 발현을 제어하기 위해 최초로 이용되었다(Arnaud, M., A. Chastanet and M. Debarbouille, New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Non-transformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 2004. 70(11): p. 6887-6891 참조). 이 프로모터는 2004년에 개시된 프라이머를 사용하여 에스. 아우레우스 RN4220으로부터 얻어질 수 있다(동일 자료 참조).

[0324] ϕ 11/SaPIbov2Δint 공통-용원의 생성(RN451(ϕ 11 SaPIbov2Δint)): ϕ 11로 JP2488을 용원화함으로써 균주 JP2488(ϕ 11 SaPIbov2Δint)가 생성될 수 있다.

[0325] ϕ 11 terS의 결실(RN451(ϕ 11ΔterS SaPIbov2Δint)): Tormo, M.A. et al., Staphylococcus aureus Pathogenicity Island DNA Is Packaged in Particles Composed of Phage Proteins. J. Bacteriol., 2008. 190(7): p. 2434-2440에 개시된 대로, RN451(ϕ 11SaPIbov2Δint)로부터 ϕ 11 terS 유전자를 결실시킴으로써 균주 RN451(ϕ 11ΔterS SaPIbov2Δint)가 생성될 수 있다.

[0326] 에스. 아우레우스 계놈에 PclpB-int의 통합(RN451(ϕ 11ΔterS SaPIbov2Δint PclpB-int)): 표준 분자생물학 기술을 통해서 PclpB와 int를 먼저 융합한 후, PclpB-int 융합체를 RN451(ϕ 11ΔterS SaPIbov2Δint)의 계놈에 삽입하고, 이어서 ϕ 11 및 SaPIbov2 영역의 바깥쪽에 삽입된 PclpB-int를 가진 클론을 선택함으로써 RN451(ϕ 11 ΔterS SaPIbov2Δint PclpB-int)가 생성될 수 있다.

[0327] SaPIbov2Δint PclpB-int 콘카타미만을 가진 ϕ 11 입자의 생성: Otsuji, N. et al., Induction of Phage Formation in the Lysogenic Escherichia coliK-12 by Mitomycin C. Nature, 1959. 184(4692): p. 1079-1080에 개시된 대로, RN451(ϕ 11ΔterS SaPIbov2Δint PclpB-int)의 미토마이신-C 유도를 통해서 SaPIbov2Δint PclpB-int 콘카타미만을 가진 ϕ 11 입자가 생성될 수 있다. 세포 용해물은 비-복제 형질도입 입자를 함유하고, 각 입자는 GI-유도 DNA의 선형 콘카타미를 가진 박테리오파지 ϕ 11 구조 단백질로 구성된다.

[0328] 당업자는 상기 언급된 재료들과 본 분야에 잘 알려진 분자생물학 및 유전자 기술을 사용하여 본 발명의 NRTP를

구성하는 방식을 이해할 수 있을 것이다.

[0329] 실시예 4: terS 결실/보상-기반 SarS 리포터 형질도입 입자

[0330] 다음은 terS 결실/보상-기반 비-복제 형질도입 입자를 이용한 인듀서 리포터-기반 SarS 리포터 시스템의 실시예이다.

[0331] 리포터 유전자: 박테리아 루시페라제(luxAB). luxA 및 luxB 유전자는 비브리오 하베이이로부터 기원한다. 이들은 전사 프로모터를 결여하고, 리보솜 결합 부위를 각각 함유한다.

[0332] Spa 유전자 프로모터(Pspa): spa 유전자 프로모터는 luxAB 유전자의 발현을 제어하기 위해 사용될 것이다.

[0333] Pspa-luxAB 융합체의 구성: luxAB 유전자는 luxAB 유전자가 Pspa 프로모터에 작동 가능하게 연결되도록 Pspa 프로모터 서열과 융합될 수 있다.

[0334] luxAB-발현 리포터 벡터의 구성:

[0335] luxAB-발현 리포터 벡터는 하기 개시된 셔틀 벡터의 MCS에 Pspa-luxAB 융합 생성물을 통합함으로써 표준 분자생물학 기술을 통해서 생성될 수 있다.



[0336] [0337] 이. 콜리/에스.아우레우스 셔틀 벡터는 에스. 아우레우스(pT181cop-623 repC) 및 이. 콜라이(ColElori) 복제 기원, 암페실린(amp)과 테트라사이클린(tet(M)) 내성 유전자, 구성성 프로모터(Pc1pB)의 제어하의 φ11 작은 터미나아제(terS) 유전자, 다중 클로닝 부위(MCS), 및 전사 종결 서열(TT)을 가진다.

[0338] 카세트 서열에 대한 GenBank 수탁 번호:

[0339] - J01764 (pT181 레플리콘)

[0340] - M21136 (tetA(M))

[0341] - 수탁 번호가 아직 이용될 수 없음 (Pc1pB)

[0342] - AF424781 REGION: 16526..16966 (terS)

[0343] - L09137 (amp ColE1 ori)

[0344] - M62650 (TT)

[0345] 시험관내 조작의 수행과 조작의 겸종을 위한 벡터의 종식은 이. 콜라이 Top 10을 통해서 달성을 수 있고, 이어서 최종 변형된 벡터가 에스. 아우레우스 RN0451ΔterS에 도입될 수 있다. 셔틀 벡터를 가진 형질도입 입자가 1959년 이. 콜라이에서 최초로 증명되었고 현재는 용원화된 박테리아로부터 프로파지를 얻기 위한 표준 기술인 미토마이신 C-유도 방법을 통해 RN0451ΔterS 형질전환체로부터 생성될 수 있다(Otsuji, N., et al., Induction of Phage Formation in the Lysogenic Escherichia coli K-12 by Mitomycin C. Nature, 1959, 184(4692): p. 1079-1080 참조). 다음에, 비-복제 형질도입 입자를 함유하는 세포 용해물이 수집되면, 각 입자는 표적 에스. 아우레우스 세포에서 SarS의 존재에 대해 확인할 수 있는 플라스미드 DNA의 선형 콘카타머를 가진 박테리오파지 φ11 구조 단백질로 구성된다.

[0346] 실시예 5: terS 결실/보상-기반 β-락타마아제 리포터 형질도입 입자

[0347] 다음은 terS 결실/보상-기반 비-복제 형질도입 입자를 이용한 세포내 효소 리포터-기반 β-락타마아제 리포터 시스템의 실시예이다.

[0348] 리포터 유전자: 레닐라 루시페라제 (ruc)

[0349] 프로모터: 프로모터는 PblaZ일 수 있다. 구성성 베타-락타마아제가 ruc 유전자의 발현을 촉진하기 위해 사용될 수 있다.

[0350] 봉쇄된 기질: 봉쇄된 코엘렌테라진-포스페이트는 Daniel Sobek, J.R., Enzyme detection system with caged substrates, 2007, Zymera, Inc.에 개시된다.

[0351] PblaZ-ruc 융합체의 구성: ruc 유전자는 ruc 유전자가 PblaZ 프로모터에 작동 가능하게 연결되도록 PblaZ 프로

모터 서열과 융합될 수 있다.

[0352] ruc-발현 리포터 벡터의 구성: ruc-발현 리포터 벡터는 상기 섹션 V, A, 3), i)에 개시된 셔틀 벡터의 MCS에 PblaZ-ruc 융합 생성물을 통합함으로써 표준 분자생물학 기술을 통해서 생성될 수 있다.

[0353] 시험관내 조작의 수행과 조작의 검증을 위한 벡터의 종식은 이. 콜라이 Top 10을 통해서 달성될 수 있고, 이어서 최종 변형된 벡터가 에스. 아우레우스 RN0451ΔterS에 도입될 수 있다. 셔틀 벡터를 가진 형질도입 입자가 1959년 이. 콜라이에서 최초로 증명되었고 현재는 용원화된 박테리아로부터 프로파지를 얻기 위한 표준 기술인 미토마이신 C-유도 방법을 통해 RN0451ΔterS 형질전환체로부터 생성될 수 있다(Otsuji, N., et al., Induction of Phage Formation in the Lysogenic Esche-richia coliK-12 by Mitomycin C. Nature, 1959. 184(4692): p. 1079-1080 참조). 다음에, NRTP를 함유하는 세포 용해물이 수집되며, 각 입자는 ϕ 11 숙주 범위 내의 생육성 에스. 아우레우스 내에서 레닐라 루시페라제를 발현할 수 있는 플라스미드 DNA의 선형 콘카타머를 가진 박테리오파지 ϕ 11 구조 단백질로 구성된다.

실시예 6: terS 결실/보상-기반 세포내 분자 리포터 형질도입 입자

[0355] 다음은 terS 결실/보상-기반 비-복제 형질도입 입자를 이용한 세포내 분자 리포터-기반 리포터 시스템의 실시예이다.

[0356] 프로모터: 프로모터는 PblaZ일 수 있다. 구성성 베타-락타마아제가 ruc 유전자의 발현을 촉진하기 위해 사용될 수 있다.

[0357] 스위치 가능한 앱타머: 스위치 가능한 앱타머가 Samie Jaffrey, J.P., Coupled recognition/detection system for in vivo and in vitro use, 2010, Cornell University에 개시된 대로 설계되고 구성될 수 있다.

[0358] 형광단 기질: 스위치 가능한 앱타머와 상응하는 형광단 기질이 Samie Jaffrey, J.P., Coupled recognition/detection system for in vivo and in vitro use, 2010, Cornell University에 개시된 대로 설계되고 구성될 수 있다.

[0359] PblaZ-SA 융합체의 구성: SA 유전자는 SA 유전자가 PblaZ 프로모터에 작동 가능하게 연결되도록 PblaZ 프로모터 서열과 융합될 수 있다.

[0360] SA-발현 리포터 벡터의 구성: SA-발현 리포터 벡터는 실시예 4에 개시된 셔틀 벡터의 MCS에 PblaZ-SA 융합 생성물을 통합함으로써 표준 분자생물학 기술을 통해서 생성될 수 있다.

[0361] 시험관내 조작의 수행과 조작의 검증을 위한 벡터의 종식은 이. 콜라이 Top 10을 통해서 달성될 수 있고, 이어서 최종 변형된 벡터가 에스. 아우레우스 RN0451ΔterS에 도입될 수 있다. 셔틀 벡터를 가진 형질도입 입자가 1959년 이. 콜라이에서 최초로 증명되었고 현재는 용원화된 박테리아로부터 프로파지를 얻기 위한 표준 기술인 미토마이신 C-유도 방법을 통해 RN0451ΔterS 형질전환체로부터 생성될 수 있다(Otsuji, N., et al., Induction of Phage Formation in the Lysogenic Esche-richia coliK-12 by Mitomycin C. Nature, 1959. 184(4692): p. 1079-1080 참조). 다음에, 비-복제 형질도입 입자를 함유하는 세포 용해물이 수집되며, 각 입자는 ϕ 11 숙주 범위 내에서의 생육성 에스. 아우레우스 내에서 SA를 발현할 수 있는 플라스미드 DNA의 선형 콘카타머를 가진 박테리오파지 ϕ 11 구조 단백질로 구성된다.

실시예 7: 비-복제 형질도입 입자-기반 리포터 시스템

[0363] 상기 개시된 비-복제 형질도입 입자는 리포터 분자(예를 들어, luxAB)의 발현을 통해서 생육성 박테리아의 존재를 검출하기 위한 리포터 시스템에 사용될 수 있다. 이 형질도입 입자가 리포터 벡터(예를 들어, pGW80A0001)를 형질도입 입자의 숙주 범위 내의 세포에 도입할 때, 프로모터(예를 들어, PclpB)가 세포 전사 기구에 의해 인식되는 세포는 해당 세포 내에서 리포터 분자의 발현을 촉진할 수 있다.

[0364] 에스. 아우레우스 세포의 존재를 검출하기 위한 리포터로서 비-복제 형질도입 입자의 기능성을 시험하기 위하여 다양한 MSSA/MRSA 리포터 분석이 개발되었다. 한 구체예에서, 비-복제 형질도입 입자가 에스. 아우레우스-특이적 박테리오파지로부터 개발되었고, 구성성 프로모터의 제어하에 박테리아 루시페라제 유전자 luxAB가 통합되었다. 비-복제 형질도입 입자가 에스. 아우레우스에 리포터 핵산을 송달했을 때, 구성성 프로모터는 생육성 에스. 아우레우스의 존재를 확인하는데 적합한 luxAB를 발현했다.

[0365] 또한, 항생물질 세포시틴이 에스. 아우레우스 세포를 함유하는 샘플에 형질도입 입자를 첨가하기 전에, 동시에, 또는 이후에 첨가되었다. 세포가 세포시틴에 표현형적으로 내성이 아닌 경우(즉, MRSA가 아니었다면) 발광은

감소되거나 검출되지 않으며, 이는 세포가 MSSA임을 나타낸다. 그러나, 세포가 세포시틴에 표현형적으로 내성인 경우(즉, MRSA였다면) 발광은 증가되거나 검출 가능하며, 이는 세포가 MRSA임을 나타낸다.

비-복제 형질도입 입자-기반 생육성 세포 리포터 분석 기능

[0366] 리포터로서 비-복제 형질도입 입자의 기능이 분석되었다. 박테리오파지 ϕ 80α-기반 비-복제 형질도입 입자의 형질도입 숙주 범위가 101개 임상 MRSA 분리주에서 시험되었다. 형질도입 분석은 비-복제 형질도입 입자를 함유하는 GW24 세포 용해물에 변형된 TSB에서 성장된 각 박테리아 분리주의 배양물을 노출시키고, 이 혼합물을 테트라사이클린을 함유하는 고체 배지 상에서 배양함으로써 수행되었다.

[0367] 이 실시예에서, 비-복제 형질도입 입자는 테트라사이클린 선택성 마커를 가졌다. 비-복제 형질도입 입자로 형질도입된 세포는 테트라사이클린에 내성인 것으로 예상되었다. 또한, 형질도입은 액체 배양물 중의 각 박테리아 분리주를 비-복제 형질도입 입자를 함유하는 세포 용해물에 노출시키고, 이 혼합물을 인큐베이션 후 박테리아 루시페라제 발광 활성에 대해 평가하는 발광 분석을 통해서 시험되었다.

[0368] 이 형질도입 분석은 ϕ 80α-기반 비-복제 형질도입 입자가 MRSA의 101개 임상 분리주를 전부 형질도입할 수 있었고, 비-에스. 아우레우스 스타필로코시는 어느 것도 형질도입할 수 없었음을 나타냈다.

[0369] 도 21은 36개 테트라사이클린-감응성 MRSA가 pGW80A0001을 가진 형질도입 입자에 노출된 후, 5ug/mL 테트라사이클린을 함유하는 배지 플레이트 위에 스폿팅된 형질도입 분석의 결과를 나타낸다. 이 결과는 모든 36개 MRSA 군주가 테트라사이클린을 함유하는 배지에서 pGW80A0001로의 형질도입으로 인해 성장했음을 나타낸다. MRSA 분리주가 형질도입 입자에 노출 없이 테트라사이클린 함유 배지 위에 스폿팅되었던 대조군 실험은 성장을 나타내지 않았다(미도시). 또한, 형질도입된 MRSA 군주로부터의 플라스미드 분리는 분리된 플라스미드의 서열화를 통해서 확인된 대로 pGW80A0001 플라스미드의 회수를 증명했다. 따라서, 형질도입 결과는 리포터 플라스미드의 복제 기원이 시험된 모든 MRSA 분리주에 대해 활성을 나타낸다는 것을 증명했다.

[0370] 도 22는 형질도입 입자로 형질도입된 MRSA의 80개의 임상 분리주와 메티실린 감응성 에스. 아우레우스(MSSA)의 28개 임상 분리주로부터 측정된 발광을 도시한다. 이 실험에서, MRSA와 MSSA의 배양물은 600nm에서 0.1의 광학 밀도까지 성장된 후, 변형된 TSB에서 성장된 배양물 100uL이 형질도입 입자를 함유하는 GW24 세포 용해물 10uL 와 혼합되었고, 발광 분석 전에 4시간 동안 37°C에서 더 인큐베이션되었다. 발광 측정은 박테리아 루시페라제를 발현하는 세포 내에서 발광 반응을 촉발하는 알데하이드인 Decanal 1mM 용액 10uL를 첨가함으로써 수행되었다. 예상된 대로, 발광은 에스. 아우레우스-특이적 비-복제 형질도입 입자로 형질도입된 MRSA와 MSSA 모두로부터 관찰되었다. 또한, 세포시틴이 형질도입 입자의 첨가와 동시에 세포 배양물에 첨가되었을 때는 MRSA로부터는 발광이 관찰되었지만 MSSA에서는 발광이 관찰되지 않았는데, 이는 MSSA와 MRSA의 존재에 대해 모두 확인할 수 있는 형질도입 입자의 능력을 증명한다. 따라서, 발광 결과는 luxAB 발현을 촉진하는 프로모터가 시험된 에스. 아우레우스 분리주 전부에 대한 활성을 나타낸다는 것을 증명한다.

비-복제 형질도입 입자-기반 생육성 세포 리포터 MRSA 분석의 최적화 - 형질도입 입자 시약 제제

[0371] 비-복제 형질도입 입자 시약의 제조 및 제제는 최종 제제에 최적화되었다. 요약하면, 15L 스케일 발효가 GW24의 퍼옥사이드 유도를 포함하는 TSB 배지를 사용하여 수행되었다. 15L 발효장치 배치가 200mL 밤샘 시드 배양물로 접종되었다(1.3%(v/v)의 접종물 비율). 이 배양물은 과산화수소로 0.8의 O.D.에서 유도되었고, pH 또는 DO 제어 없이 유도 후 25°C까지 냉각되었다. 다음날 아침 파지 형질도입 입자를 세포 파편으로부터 정화할 목적으로 접선 유동 여과(TFF)에 의해서 배양 상청액을 수거했다. 다음에, 이 물질을 농축하고 젤라틴이 없는 SM 버퍼에서 투석 여과했으며, 최종 멸균 여과 및 저장 전에 2-8°C에 보관했다.

[0372] 이 과정의 상세한 요약은 다음과 같다:

시드 플라스스크 성장:

[0373] (1) GW24와 함께 5ug/mL 테트라사이클린을 함유하는 TSB 200mL를 접종한다.

[0374] (2) 10-18시간 동안 37°C, 200 RPM에서 인큐베이션한다.

발효 접종(15L TSB, 5ug/mL 테트라사이클린):

[0375] (1) 다음과 같은 발효 조건을 가진 발효장치를 준비한다: 37°C, 250 RPM 교반, 15 LPM 기류, 및 3 psig 배압.

[0376] (2) 200mL 밤샘 시드 배양물을 사용하여 발효장치를 접종한다.

[0381] 배양물 유도:

(1) 일단 OD_{600nm}가 0.8(0.6~0.9)에 도달하면 배양물을 0.5mM H₂O₂로 유도한다.

(2) 42°C까지 발효장치의 온도 세트포인트를 증가시킨다.

[0384] 유도 후 조건 및 모니터링:

(1) 일단 30분 유도가 완료되면 발효장치의 온도 목표를 25°C로 리셋한다.

(2) 냉각 1시간 후에 발효장치에 공기 공급을 중단하고 교반을 0으로 설정한다.

(3) OD_{600nm}가 0.40 이하로 감소할 때까지 1시간 간격으로, 또는 필요에 따라 더 빈번히 발효 배양물을 모니터 한다.

[0388] 수거/정화:

(1) 발효 배양물 OD₆₀₀이 0.40 이하의 최소값에 도달한 후, 발효장치에 20mL 무균 샘플을 취해서 벤조나아제 30 μL를 첨가한다.

(2) 교반을 250rpm으로 리셋한다. 벤조나아제 인큐베이션 동안 60분 교반한다.

(3) 3000g에서 15분 원심분리하여 EOF 샘플을 정화한다.

(4) 정화된 물질을 0.45μm 막 필터를 통과시킨다.

[0393] 농축 및 버퍼 교환:

(1) 정화된 배양물을 500kDa 플랫 시트 막 10-폴드를 사용하여 TFF에 의해서 정화된 배양물을 농축한다.

(2) 농축에 사용된 500kDa TFF 막을 사용하여 젤라틴이 없는 SM 버퍼에 대해 일정한 부피에서 농축된 배양물을 투석 여과한다.

[0396] 최종 여과:

(1) 농축된 버퍼 교환 물질을 0.2 μm 필터를 통해 여과한다.

(2) 최종 여과된 과자 물질을 2~8°C에 보관한다.

제제를 얻기 위하여 당업자에게 알려진 다양한 다른 시약 및 제제가 사용될 수 있다.

[0400] 비-복제 형질도입 입자-기반 생육성 세포 리포터 MRSA 분석의 최적화 - 성장 배지 제제

성장 배지 제제가 NRTP-기반 생육성 세포 리포터 MRSA 분석을 위해 최적화되었다. NRTP-기반 MRSA 분석에서 발광을 생성하기 위해 배지는 스타필로코쿠스 아우레우스 성장에 대해 균형을 이루어야 하며, NRTP의 형질도입이 선호되도록 충분한 양의 양이온과 첨가제를 가져야 한다. 이 연구 전에 분석에서 사용된 TSBmod 배지는 배지의 안정성에 영향을 미치는 침전 문제를 갖는 것으로 알려졌다. 성장 배지 제제는 실온에서 1년 동안 최종 제제의 안정성을 요구했다.

[0402] 방법/과정: MRSA 분석을 위한 세포 증식

(1) 하위세트 분석을 위한 MRSA의 10개의 특유한 균주들과 MSSA의 하나의 특유한 균주가 MRSA 분석에서 시험되었다.

(2) 밤샘 배양은 냉동된 1-배 사용 스톡으로부터 TSB 중에 1:50 희석비로 딥 96웰 플레이트에서 시작되었고, >15시간 동안 케도 쉐이커에서 37°C에서 인큐베이션되었다. TSB(392 μl) 중 MRSA/MSSA(8 μl).

(3) 다음날, 밤샘 배양물로부터 1:50 희석비에서 일과 배양이 96웰 딥 웰 플레이트에서 TSB 중에서 시작되었고 (392 μl TSB + 8μl 세포), 4시간 동안 케도 쉐이커에서 37°C에서 인큐베이션되었다.

(4) 세포는 1800g 힘 및 10°C에서 5분간 원심분리 회전되었고, 소비된 배지는 펠릿을 파괴하지 않고 흡인되었다.

(5) 회전된 세포는 50mM Tris-HCl pH 7.2에서 세척되고, 원심분리되고, 버퍼가 펠릿을 파괴하지 않고 흡인되었으며, 400 μl RPMI에 재현탁되었다. 세포의 대사 상태의 다양성을 감소시키고 임상 샘플에서 발견되는 낮은 대

사작용을 의태하기 위해서 RPMI가 사용된다.

[0408] (6) 플레이트가 기공성 시일로 피복되었고, 48시간 동안 벤치에서 인큐베이션되었다.

[0409] (7) 셀로우 웰 OD 플레이트에 RPMI 배양물 200 μ l를 전달함으로써 OD가 판독되었고, RPMI 배지만을 가진 블랭크 웰은 블랭크 OD를 차감하기 위해 사용되었다.

[0410] (8) 세포는 100 μ l에서 OD 0.1에 맞춰 정규화되었다.

[0411] (9) 0.006의 OD를 얻기 위한 다른 희석비는 RPMI에서 1:10이었다.

[0412] 분석 기초 배지는 표 2에 나타낸 대로 시험되도록 제조되었고, MRSA 분석을 위한 제조에서 배지 변형의 대표적인 세트가 표 3에 제시된다.

표 2

성장 배지 제제 개발을 위한 기초 배지

성분	TSB	B2	BSS-2	비고
대두 밀의 효소 소화물 (g)	3	0	3	10N NaOH로 pH 7.2로 조정.
카제인의 효소 소화물 (g)	17	10	10	고압가열 또는 여과 멸균
효소 추출물 (g)	N/A	25	25	
염화나트륨 (g)	5	25	25	
인산이칼륨 (g)	2.5	1	0	
알파-D 글루코오스 (g)	2.5	5	5	
부피 (리터)	1	1	1	

표 3

성장 배지 제제 개발을 위한 기초 배지 변형

엽의 농도/변형을 위한 첨가제							
기초 배지 (30ml)	Mod 번호	CaCl ₂ (mM)	MgCl ₂ (mM)	BGP (mM)	Tris-HCl pH7.0 (mM)	EDTA (mM)	HEPES (mM)
B2	M53	5.0	2.0	0.0	50.0	10.0	0.0
BSS-2	M50	10.0	2.0	60.0	50.0	10.0	0.0
BSS-2	M54	6.7	3.3	60.0	50.0	0.0	0.0
BSS-2	M55	5.0	5.0	60.0	50.0	0.0	0.0
BSS-2	M56	6.7	3.3	60.0	0.0	0.0	10.0
BSS-2	M57	5.0	5.0	60.0	0.0	0.0	10.0
TSB	M1 (original)	5.0	10.0	60.0	0.0	0.0	0.0
TSB	M58	5.0	10.0	60.0	0.0	11.1	0.0

[0415] 각 배지 제조물에 NRTP와 세폭시틴을 아래 표 4에 따라서 첨가하여 NRTP 배지 시약을 제조했다:

표 4

MRSA 분석 성장 배지/형질도입 임자 시약 조합

30ml 배지	최종 농도
세폭시틴	5ug/ml
GW24 세포 용해물	30X

[0417] MRSA 분석은 다음 단계에 따라 수행되었다:

[0418] (1) 분석 플레이트 셋업: 배지 시약 198 μ l와 RPMI 중 박테리아 0.05 OD 및 0.005 OD의 각 희석물 2.0 μ l(각각 20,000 및 2,000 CFU/mL에 대략 등가) 또는 블랭크로서 RPMI 2.0uL를 첨가한다.

[0419] (2) 분석 플레이트 인큐베이션: 분석 플레이트를 케도 쉐이커에서 약 100rpm으로 4시간 동안 37°C에서 인큐베이

션한다.

[0420] (3) 발광계(Molecular Devices SpectraMax L) 준비: 시약 라인을 70% 에탄올과 DI 수로 차례로 세척한 다음 기질 시약으로 초기 자극한다. Fast Kinetic으로 소프트웨어를 설정해서 10 베이스라인 포인트 후 기질 시약 50 μL 를 250 μL /초로 주사하고, 0.25초마다 40포인트에서 판독한다.

[0421] (4) 분석 수행: 실온에서 5분간 플레이트를 평형화한 후 각 박테리아 희석물 플레이트를 시험한다.

[0422] 분석:

[0423] (1) 모든 복제물과 시간 포인트에 대해 블랭크 RLU의 평균을 구하고 세 표준 편차를 더해서 컷오프를 결정한다.

[0424] (2) SoftMaxPro를 사용하여 각 샘플에 대해 최대 RLU를 결정한다.

[0425] (3) 최대 RLU가 컷오프 RLU를 초과할 경우를 결정하고, 초과한 경우의 샘플 데이터를 배지 성능의 비교에 사용한다.

[0426] (4) 특정 희석비에서 분석되는 균주에 대해 모든 최대 RLU 값을 TBS M1(개발이 시작되기까지 사용된 배지)에서의 최대 RLU에 맞춰 정규화한다.

[0427] (5) 특정 배지 및 그것의 변형에 대해 모든 MRSA 균주에 대해 정규화된 RLU 값의 평균을 구한다.

[0428] (6) 두 희석 플레이트의 평균을 구하며, 이것은 궁극적으로 시험된 2개 세포 희석물에서 10개의 상이한 MRSA 균주에 대해 특정 배지의 RLU에 기초한 성능의 증가 배수를 나타내는 단일 수치값을 야기한다.

NRTP-기반 생육성 세포 리포터 MRSA 분석의 결과

[0430] 컷오프 RLU의 결정: RLU의 평균 및 표준 편차를 각 블랭크 복제물(4)에 대해 모든 시간 포인트(25)에서 계산했다. 평균 블랭크 RLU + 세 표준 편차로서 각 플레이트에 대해 컷오프를 계산했다.

[0431] 상대적 개선의 결정: 최대 RLU가 SoftMaxPro로부터 각 샘플(블랭크, 모든 희석비의 MSSA 및 MRSA)에 대해 출력되었고 컷오프 RLU와 비교되었다. 샘플이 과지 농도에 대해 컷오프를 초과하는 데이터 포인트를 2개 가진 경우의 최대 RLU 값을 분석에 이용했다.

[0432] 특정 최대 RLU를 대조군 조건(TSB M1-오리지널 배지 중의 균주, 분석되는 희석비에서)의 최대 RLU로 나눔으로써 값을 정규화했다. 얻어진 비율은 각 배지 조건과 각 희석비에서 10개 MRSA에 대해 평균을 구했으며, 이것을 표 5에 나타낸다. 두 희석비의 평균이 또한 표에 제시된다.

표 5

다양한 성장 배지 제제로부터의 MRSA 분석 결과

배지	플레이트 1	플레이트 2	두 희석물의 평균
B2	M53	1.89	1.88
BSS-2	M50	1.37	1.47
BSS-2	M54	1.50	1.76
BSS-2	M55	1.82	2.90
BSS-2	M56	2.38	6.00
BSS-2	M57	2.00	3.92
TSB	M1	1.00	1.00
TSB	M58	1.18	0.96
			1.07

[0433] 결론

[0435] BSS2-M56은 시험된 다양한 배지들에서 평균적으로 최상의 성능을 나타냈다. HEPES 버퍼 기반 배지는 Tris-HCl 완충된 배지보다 잘 작동했다. HEPES는 Tris-HCl과 달리 생물학적으로 유리한 완충 시스템인 것으로 알려져 있다. B2 기반 베이스/브로스는 TSB 기반 브로스보다 좋은 성능을 가졌다.

[0436] 다양한 다른 시약 및 제제들이 제제를 얻기 위해 사용될 수 있으며 당업자에게 알려져 있다. 다른 적합한 제제들도 상기 개시된 유사한 실험을 통해서 개발되었다. 다른 적합한 제제의 예들이 아래 표 6, 7 및 8에 포함된다.

표 6

BSC 배지 제제

BSC 성분	양
카제인의 효소 소화물	14.5g
효모 추출물	35.5g
염화나트륨	35.5g
알파-D 글루코오스	7g
합계 부피	1 L

표 7

BSC 배지 변형

BSC-M64	
화학명	최종 (분석) 농도
BGP (mM)	60.0
HEPES (mM)	10.0
LiCl(mM)	84.0
BSC	1 L 까지

표 8

형질도입 입자 배지 변형

형질도입 입자 제제(PM4)	
화학물질	최종 (분석) 농도
CaCl ₂ (M)	0.00667
MgCl ₂ (M)	0.00335
HEPES (M)	0.01000
GW24 세포용해물 스톡	0.01250
나트륨 아지드 (%)	0.0006
물	1mL 까지

비-복제 형질도입 입자-기반 생육성 세포 리포터 MRSA 분석의 최적화 - 기질 시약 제제

MRSA 분석에서 발광을 생성하기 위해서, 기질 시약은 루시페라제에 대한 기질로서 알데하이드를 포함한다. 초기 개발된 지방족 알데하이드 제제(TSB 중 4.2mM 트리테란알)는 안정하지 않았고 용액보다는 비균질 에멀젼을 형성했다. 이 실시예는 실온 또는 2-8°C에서 6개월 동안 안정성을 확보한 기질 시약 제제의 개발을 개략한다.

이 실시예는 기질 시약으로부터 최종 제제를 개발하기 위해 채택된 단계들을 개시한다.

방법/과정

모든 스크리닝 및 안정성 실험은 LuxAB-발현 플라스미드를 가진 에스. 아우레우스 균주 RN4220으로 구성된 "모델 시스템"을 사용하여 수행되었다. 전형적인 제조 및 시험 방법은 다음과 같았다.

(1) 밤샘 배양물: 2mL TSB + 1uL 10mg/mL 테트라사이클린 + TSA 플레이트로부터의 모델 시스템 박테리아 1 콜론리를 37°C에서 하룻밤 225rpm에서 쉐이킹한다.

(2) 일과 배양물: TSB + 5ug/mL 테트라사이크린에 밤샘 배양물을 1:50 또는 1:100 희석하고 37°C에서 1.5-2시간 225rpm에서 쉐이킹한다.

(3) 일과 배양물 정규화: 600nm에서 큐벳이 있는 Nanodrop에서 일과 배양물 1mL를 측정하며, TSB + 5ug/mL 테트라사이클린을 블랭크로 한다. TSB + 5ug/mL 테트라사이클린으로 0.1 OD까지 희석한다.

(4) 시험을 위한 배양물 희석: 대략 100000, 10000 및 1000 CFU/mL와 등가인 1:200, 1:2000 및 1:20000 희석비

에서 TSB + 5ug/mL 테트라사이클린으로 0.1 OD 배양물을 희석한다.

[0449] (5) 박테리아 평판: 각 희석물 및 블랭크(박테리아가 없는 TSB + 5ug/mL 테트라사이클린) 200uL을 시험되는 각 기질에 대해 3개 복제물에 Greiner Bio-one 백색 분석 플레이트에 첨가한다.

[0450] (6) 발광계(SpectraMax L) 준비: 시약 라인을 70% 에탄올과 DI 수로 차례로 세척한 다음 기질로 초회 자극한다. Fast Kinetic으로 소프트웨어를 설정해서 10 베이스라인 포인트 후 기질 50 μ L를 250uL/초로 주사하고, 0.25초마다 40포인트에서 판독한다.

[0451] (7) 분석 수행: 각 기질 사이에 세척하고 초회 자극한 SpectraMax L로 기질 시약의 각 제제를 시험한다. 모든 기질 시약은 시험 전에 실온으로 한다.

[0452] 새로운 제제를 스크리닝하기 위해 사용된 모델 시스템으로서 실제 분석에서 유사한 결과를 보장하기 위해서 MRSA 분석을 사용하여 모든 확인 실험을 수행했다.

[0453] (1) 배양물 준비: 10개의 MRSA 저 성능 균주와 1개의 MSSA 균주를 2mL 딥 웰 블록에서 TSB 중에서 로그-파지까지 성장시킨다. 세포를 회전시키고 1x PBS로 세척한 다음, RPMI 배지에 재현탁한다.

[0454] (2) 박테리아 정규화: 600nm에서 VersaMax에서 Greiner Bio-one 투명 플레이트에서 200uL의 RPMI 배양물과 RPMI 블랭크를 측정한다. 각 균주에서 블랭크 OD를 차감한다. 각 균주를 RPMI 배지에서 0.05 OD에 맞춰 정규화한다.

[0455] (3) 박테리아 희석: RPMI 배지에서 0.05 OD 배양물을 0.005 OD까지 1:10로 희석한다.

[0456] (4) 파지 배지 시약 준비: 파지, 세폭시틴, 및 나트륨 피루베이트를 다음을 포함하는 BSS-M56에 첨가한다:

[0457] a. 세폭시틴 (5 ug/mL)

[0458] b. GW24 세포 용해물 스톡 (0.03X)

[0459] c. 나트륨 피루베이트 (0.025M)

[0460] (5) 분석 플레이트 셋업 = 198uL 파지 배지 시약과 2uL의 각 박테리아 희석물(0.05 OD 및 0.005 OD RPMI에서, 대략 20000 또는 2000 CFU/mL와 등가) 또는 블랭크로서 2uL의 RPMI를 두 복제물에 첨가한다.

[0461] (6) 분석 플레이트 인큐베이션 = 궤도 쉐이커에서 4시간 동안 약 100rpm에서 37°C에서 분석 플레이트를 인큐베이션한다.

[0462] (7) 발광계(SpectraMax L) 준비: 시약 라인을 70% 에탄올과 DI 수로 차례로 세척한 다음 기질로 초회 자극한다. Fast Kinetic으로 소프트웨어를 설정해서 10 베이스라인 포인트 후 기질 50uL를 250uL/초로 주사하고, 0.25초마다 40포인트에서 판독한다.

[0463] (8) 분석 수행: 각 기질 사이에 세척하고 초회 자극한 SpectraMax L로 기질 시약의 각 제제를 시험한다.

[0464] 다음과 같은 개선을 이끄는 기질 시약 제제의 개발을 위한 실험을 설계했다:

[0465] (1) 계면활성제(Tween 20, Triton X-100, NP-40, Brij-35, SNS 등) 첨가, 용매(에탄올, 메탄올, DMSO 등) 첨가, 및 비-휘발성 오일(피마자유) 첨가를 통한 용해성 개선

[0466] (2) 안정제(트리에탄올아민, 시클로덱스트린 등) 첨가, 항산화제(비타민 E, 비타민 E 아세테이트, 비타민 E PEG 1000, 옥시라아제 등) 첨가, 트리데칸알 첨가의 조정(계면활성제와 함께, 용매와 함께, 최종 용액에, 항산화제와 함께 등), 알데하이드 산화를 감소시키기 위해 트리데칸알과 기질 시약을 질소 하에 저장, 및 ProClin과 같은 보존제의 첨가와 기질 시약의 멀균 여과에 의한 미생물 오염 가능성 감소를 통한 안정성 개선

[0467] (3) 제제 및 버퍼 시스템의 pH의 조정을 통한 분석 성능 개선

[0468] (4) 최고 RLU 출력을 가진 알데하이드 결정을 통한 전체 성능 개선(용해성, 안정성 및 분석 성능에 개선이 관찰되었는지 결정하기 위해 다수의 제제에서 6-14개 탄소의 알데하이드를 시험)

[0469] (5) 시약의 제조 및 분석 동안 샘플에 시약의 첨가 과정에서의 거품 형성을 감소시키기 위한 거품차단제의 첨가를 통한 전체 성능 개선

분석 및 결과

[0471] 각 샘플에 대한 키네틱 반응을 플롯팅했고, 3개 복제물의 각 판독 포인트에서 평균에 맞춰 라인을 피팅했다. 전형적으로, 0.1 OD 모델 시스템 박테리아의 1:2000 희석에서 결과가 얻어졌고, 이것은 대략 10,000 CFU/mL 또는 2,000 CFU/분석과 동가였다.

[0472] 기준 기질 시약에 대해 정규화된 최대 RLU를 안정성 실험에서 분석했다. 각 안정성 시간 포인트에서, 각 샘플에 대한 최대 RLU가 기준 기질 최대 RLU에 맞춰 정규화되었다. 정규화된 최대 RLU가 시간 포인트에 대해 플로팅되었고, 95% CI의 선형 회귀가 플로팅되었다.

결론

[0473] 최종 기질 시약 제제를 제조하기 위해 기준 제제로부터 조정되는 중요 변수가 표 9에 요약된다.

표 9

시약 제제 개발 결과의 요약

기질 시약에 대한 변형	이유
4.2 mM 트리데칸알+TSB	오리지널 기질 시약
TSB 제거	오염 가능성 감소
1% Tween 20 첨가	용해성 개선
pH3으로 조정, 79.45% 0.1 M 시트르산-19.55% 0.2 M 나트륨 포스페이트 다이베이직 베퍼로	분석 성능 개선
농축 계면활성제에 직접 트리데칸알 첨가	안정성 개선
기질 기약 여과 추가, 0.2 μm PES 막 사용	안정성 개선
0.05% ProClin 300 첨가	안정성 개선
트리에탄올아민 첨가	안정성 개선
1% Tween 20에서 0.5% Triton X-100로 변화	안정성 개선, 용해성 개선
79.45% 0.1 M 시트르산-19.55% 0.2 M 나트륨 포스페이트 다이베이직 베퍼에서 82% 0.1 M 시트르산-18% 0.1 M 나트륨 시트레이트 베퍼로 변화, pH3 유지	분석 성능 개선, 포스페이트 베퍼의 제거로 인한 침전 가능성 감소
100 ppm 거품차단제 Y30 첨가	분석 성능 개선
0.5% 비타민 E 아세테이트 첨가	안정성 개선, 침전 감소
주 트리데칸알 제조사를 Alfa Aesar에서 Sigma/OmegaChem로 변경	분석 성능 개선
0.5% 비타민 E 아세테이트를 1-2% 비타민 E PEG 1000로 변화	분석 성능 개선, 용해성 개선, 안정성 개선

[0476] 두 상이한 온도에서 보관될 두 기질 시약 제제를 제조했으며, 하나는 2-8°C에 저장하고, 하나는 18-24°C에 저장한다.

[0477] 2-8°C에 보관되는 최종 기질 시약 제제. 제제: 0.5% Triton X-100 + 4.2mM 트리데칸알 + 0.5% 비타민 E 아세테이트 + 100ppm 거품차단제 Y30 + 0.5% 트리에탄올아민 + 82% 0.1M 시트르산 + 18% 0.1M 나트륨 시트레이트 @pH3 + 0.05% ProClin 300. 이 제제는 2-8°C에서 1개월 후 침전하지 않았고, 제0일과 똑같이 MRSA 균주를 검출할 수 있었다.

[0478] 18-24°C에 보관되는 최종 기질 시약 제제. 제제: 0.5% Triton X-100 + 6.3mM 트리데칸알 + 100ppm 거품차단제 Y30 + 0.5% 트리에탄올아민+ 82% 0.1M 시트르산 + 18% 0.1M 나트륨 시트레이트 @pH3 + 2% a-토코페롤-PEG 1000 석시네이트 + 0.05% ProClin 300. 이 제제는 18-24°C에서 1개월 후 침전하지 않았고, 제0일과 똑같이 MRSA 균주를 검출할 수 있었다.

[0479] 다양한 다른 시약 및 제제들이 당업자에게 알려진 대로 제제를 얻기 위해 사용될 수 있다.

비-복제 형질도입 입자-기반 생육성 세포 리포터 MRSA 분석의 성능

[0481] 최적화된 NRTP MRSA 분석의 성능을 시험했으며, 이것은 분석의 검출 한계를 분석하고, 비-표적 유기체로 시험 감염되었을 때 분석의 교차-반응성과 미생물 간섭을 분석하는 것을 포함한다.

A) 검출 한계 분석

- [0483] NRTP 분석의 검출 한계를 블랭크 샘플로부터 결정된 역치를 넘는 상대 광 단위(RLU) 신호를 생성할 수 있는 다양한 균주를 나타내는 MRSA 세포의 최저량을 결정하는 것을 통해 평가했다. MRSA 균주는 종래의 FDA-승인 MRSA PCR 분석에서 검출에 실패한 MRSA 균주인 SCCmec 타입 I, II 및 IV와 mecA 유전자 변이체 mecC를 가진 MRSA 균주를 포함했다.
- [0484] 다음의 재료가 임상 성능 연구에 사용되었다:
- [0485] 성장 배지 시약: BSS-M56
- [0486] 기질 시약: 상기 개시된 대로 18-24°C에 보관되는 최종 기질 시약 제제
- [0487] 형질도입 입자 시약: 10ug/mL(즉, 2x 농도) 세폭시틴을 가진 BSS-M56 베이스와 2x 농도의 상기 개시된 형질도입 입자 시약
- [0488] LoD 연구 프로토콜:
- [0489] 밤샘 배양물: 각 MRSA 균주 및 MSSA 음성 대조군 균주에 대해, 2mL TSB에 이미 TSA 플레이트에 성장된 균주 콜로니를 접종했다. 밤샘 MRSA 배양물은 5ug/mL 세폭시틴을 포함했다. 모든 샘플은 쉐이킹 인큐베이터에서 37°C에서 하룻밤 인큐베이션되었다.
- [0490] 일과 배양물: 각 밤샘 배양물 20uL를 2mL 성장 배지 시약을 함유하는 새로운 배양 튜브로 옮겼다. 다음에, 접종물을 OD(600nm)가 0.1에 도달할 때까지 대략 1시간 45분 동안 쉐이킹하면서 37°C에서 인큐베이션했다.
- [0491] 연속 희석:
- [0492] a) 각 샘플 1000uL를 2mL 딥 웰 96웰 플레이트에 디스펜스했다.
- [0493] b) 다음에, 나머지 열(B-H)은 900uL의 성장 배지 시약으로 채웠다.
- [0494] c) 다음에, 열 A에서 100uL을 취하고 열 B에 혼합하는 등의 과정을 통해서 10배 연속 희석물을 제조했으며, 이로써 열 H는 열 A 물질의 샘플을 10^{-7} 희석물로 함유했다.
- [0495] 박테리아 로드의 계수: E 열의 각 웰 5uL를 TSA 플레이트 위에 스폿팅한 다음, 이것을 액체의 스폿이 플레이트 위에 펼쳐지도록 기울였다(나중에 콜로니 카운팅을 용이하게 하기 위해서)(E 열은 A 열의 10^{-4} 희석물이다). 다음에, 플레이트를 37°C에서 하룻밤 인큐베이션했다.
- [0496] 분석 준비:
- [0497] a) 백색 96웰 분석 플레이트의 웰을 100uL의 2x 형질도입 입자 시약으로 채웠다.
- [0498] b) 다음에, F 및 G 열(즉, 각각 A 열의 10^{-5} 및 10^{-6} -배 희석)을 사용하여 형질도입 입자 시약을 함유하는 96웰 분석 플레이트의 웰을 채웠으며, 각 샘플은 4개 복제물로 플레이트에 첨가했다.
- [0499] c) 다음에, 플레이트를 통기성 시일로 밀봉하고, 가볍게 쉐이킹하면서 37°C에서 4시간 인큐베이션했다.
- [0500] 4시간 후에 플레이트를 인큐베이터에서 꺼낸 후 즉시 $50\mu\text{l}$ 기질 시약이 주사된 SpectraMax L에서 발광을 측정했고, 1시간 동안 발광을 측정했다.
- [0501] 분석:
- [0502] 각 샘플로부터의 발광 데이터를 RLU 대 시간으로 플롯팅했다. 블랭크 샘플을 사용하여 블랭크 샘플의 모든 시간 포인트로부터 계산된 컷오프를 다음의 식을 사용하여 결정했다: (평균 블랭크 RLU + 3 * SD 블랭크 RLU)
- [0503] 다음에, 기질 주사 후 평균 피크 RLU가 각 샘플에 대해 얻어졌고, 블랭크 샘플 컷오프 이상인 RLU 값을 생성했던 최고 희석 샘플을 결정했다.
- [0504] 블랭크 샘플 컷오프 이상인 RLU 값을 생성했던 최고 희석콜로니 형성 유닛(CFU) 카운트를 계수 연구로부터 결정했고, 이 CFU 카운트를 이 연구에서 LoD로 결정했다.
- [0505] 결과:
- [0506] 시험된 모든 MRSA 샘플에 대한 LoD는 10 CFU 이하인 것으로 확인되었다. 표 11은 이 연구에서 얻어진 최저 LoD의 결과를 요약한다.

[0507] [표 11]: LoD 연구에서 얻어진 최저 LoD의 결과

SCCmec 타입	LoD (CFU)
I	3
II	2
IV	3
mecC	1

[0508]

[0509] 시험된 모든 MRSA 균주는 블랭크 샘플로부터 계산된 컷오프를 넘어서 NRTP 분석에서 검출된 10 CFU 보다도 적은 결과를 야기했다. MSSA는 블랭크 샘플 컷오프를 넘는 RLU 값을 생성하지 않았다.

[0510]

RLU 값은 각 샘플에 대해 시험된 4개 복제물에 대해 평균 RLU 값과 표준편차로 플롯팅되었을 때 블랭크 샘플 컷오프를 넘는 RLU 값이 생성되었던 최고 회석비에서 나타난다. 수평 축은 블랭크 샘플 컷오프로 설정되고, 각 RLU 데이터 포인트를 생성한 샘플에 대한 CFU 카운트가 데이터와 겹쳐진다. 모든 MRSA 샘플은 컷오프를 넘는 RLU 값을 생성했지만 MSSA는 그렇지 않았다.

[0511]

교차-반응성 및 미생물 간섭 연구

[0512]

교차-반응성 및 미생물 간섭 연구를 수행했다. 이 연구의 목적은 임상 샘플에서 통상 직면하며 MRSA 분석에서 박테리오파지 φ80α의 숙주 범위 내에 존재한다고 알려진 일군의 박테리아 균주를 시험하기 위한 것이었으며, 시험에 사용된 파지 또는 기질과 이들 균주의 교차-반응성이나 간섭이 있었는지 알아보았다.

[0513]

임상 샘플을 사용한 기존 실험들은 BBL™ CHROMagar™ 스타프 아우레우스 플레이트에 평판했을 때 청색 및 백색 콜로니의 존재로부터 나타난 대로 엔테로코시 파에칼리스 및 스타필로코쿠스 에피더미디스의 존재로 인하여 거짓 양성 결과를 가져왔다. 게다가, 리스테리아 모노사이토게네스와 리스테리아 이노쿠아도 파지 φ80α의 감염성 또는 침투성 숙주 범위 내에 있을 수 있으며, 이들 역시 MRSA 분석에서 교차-반응성에 기여할 수 있다. 이 연구는 엔테로코시 파에칼리스, 스타필로코쿠스 에피더미디스, 리스테리아 모노사이토게네스 및 리스테리아 이노쿠아를 생육성 MRSA 분석에서 교차-반응성/간섭에 대해 시험했다. 각 균주를 10^6 , 10^7 또는 10^8 세포 정도의 높은 세포수에서 시험했다. 균주의 잠재적 자체발광을 다루기 위해서 시험은 GW24 세포 용해물의 첨가 없이 수행되었다.

[0514]

실험 1은 다양한 균주(MSSA-S121, NRS# 9-스타필로코쿠스 헤몰리티쿠스, NRS # 6-스타필로코쿠스 에피더미디스, ATCC 12228-스타필로코쿠스 에피더미디스, ATCC 15305-스타필로코쿠스 사프로피티쿠스, ATCC 29212-엔테로코쿠스 파에칼리스, ATCC 60193-칸디다 알비칸스, ATCC 12453-프로테우스 미라빌리스)를 정상 분석 조건에서 높은 세포수에서 발광에 대해 시험했다.

[0515]

실험 2: 바탕 발광을 쾤칭하기 위하여 실험 1에서 발광한 균주의 하위세트를 다양한 항생물질의 존재하에 다양한 농도에서 재분석했다.

[0516]

실험 3: 이. 파에칼리스 및 S32(MRSA)를 GW24 세포 용해물과 인큐베이션 없이 상기 개시된 대로 개발된 다양한 기질 제제로 시험했다.

[0517]

실험 4: ATCC 33090-리스테리아 이노쿠아 및 ATCC 19111-리스테리아 모노사이토게네스를 바탕 신호와 비-특이적 발광에 대해 시험했고, 이. 파에칼리스 및 에스. 에피더미디스와 함께 상기 개시된 대로 개발된 다양한 기질 제제로 재시험했다.

[0518]

실험 5: 이. 파에칼리스를 상기 개시된 대로 개발된 최종 기질 제제로 재시험했다.

[0519]

이 연구에서 시험된 기질 시약 제제가 표 10에 요약된다.

표 10

기질 시약 제제

실험	기질	설명
1	오리지널 기질	1% Tween20 + 4.2 mM 트리테칸알, pH3.0
2	오리지널 기질	

3	기질1	6.3 mM 트리데칸알 + 0.5% 비타민 E 아세테이트, pH 3.0
	기질2	20 mM 노난알 + 0.5% 비타민 E 아세테이트, pH 3.0
	기질3	8.4 mM 트리데칸알 + 0.5% 비타민 E 아세테이트, pH 3.0
	기질4	6.3 mM 트리데칸알 + 1% α-토코페롤-PEG 1000 석시네이트, pH 3.0
4	오리지널 기질	1% Tween20 + 4.2 mM 트리데칸알, pH 3.0
	기질5	0.5% Triton + 4.2 mM 트리데칸알 (Sigma) + 0.5% 비타민 E 아세테이트, pH 3.0
5	기질6	6.3 mM 트리데칸알 + 2% VitE PEG, pH 3.0

[0521] 방법/과정

[0522] MRSA 분석을 위해 다음과 같은 단계들이 수행되었다.

A) 실험 1-5를 위해 성장된 균주

[0524] 분석 하루 전날에 냉동된 1-배 사용 스톡으로부터 TSB 중 1:50 희석비로 딥 96웰 플레이트에서 밤샘 배양을 시작하고, >15시간 동안 쿼드 쉐이커에서 37°C에서 인큐베이션했다. TSB(392uL) 중 박테리아(8uL).

[0525] 배양물의 흡광도를 Versamax에서 측정했다. TSB는 SoftmaxPro에서 주형에서 블랭크로 설정되었다. 광학 밀도 (OD)는 600nm에서 측정되었다.

[0526] 분석 날에 세포를 OD 0.5까지 재현탁하고 분석을 수행했다. 실험 1-5를 위해 BSS-M56을 준비했다.

[0527] B) 형질도입 입자 배지 시약을 모든 실험 1, 2, 4 및 5를 위해 준비했다(실험 3에서는 형질도입 입자 시약이 사용되지 않음): 15ug/mL 세폭시틴 + 30x의 상기 개시된 것으로부터 GW24 세포 용해물 스톡

[0528] C) 샘플 준비: 균주의 밤샘 배양물로부터 다양한 희석물을 제조했다. 모든 균주는 희석된 BSS M56이었다.

[0529] D) MRSA 분석을 실험 1-5에서 수행했다.

[0530] 배지를 분석 플레이트에 5 μg/ml의 세폭시틴 및 과자와 함께 또는 과자 없이 로딩했다. 2.5uL 세포를 첨가했다. 분석 플레이트를 4시간 동안 대략 100rpm으로 설정된 속도로 쿼드 쉐이커에서 37°C에서 플레이트 리드를 덮어 인큐베이션했다.

[0531] 다음에, 분석 플레이트를 다음의 표준 분석 변수에 따라 SpectraMax L에서 측정했다.

[0532] Fast Kinetic 발광:

[0533] 0.5초 간격으로 20시간 포인트에서 판독. 기질을 5번의 베이스라인 판독을 포함하여 250uL/초로 50uL/웰을 M 주사기로 주사했다. 인큐베이션 온도는 설정하지 않았고 실온에서 판독했다.

[0534] SpectraMax L을 분석을 수행하기 전에 기질 시약으로 초회 자극했다.

[0535] 결과를 다음과 같이 분석했다:

[0536] A) 모든 복제물과 시간 포인트에 대해 블랭크 RLU의 평균을 구하고 세 표준 편차를 더해서 컷오프를 결정했다.

[0537] B) SoftMaxPro를 사용하여 각 샘플에 대해 최대 RLU를 결정했다.

[0538] C) 최대 RLU가 컷오프 RLU를 초과했는지를 결정하고, 초과한 경우 샘플 데이터를 분석에 사용했다.

결과 요약

[0540] 실험 1: 다양한 균주가 오리지널 기질 제제를 사용하여 교차 반응성 및 간섭에 대해 시험되었다. 시험된 것들 중 NRS# 9- 에스. 해몰리티쿠스, NRS # 6- 에스. 에피더미디스 및 이. 파에칼리스는 MRSA 분석에서 거짓 양성을 시험했다.

[0541] 실험 2: 시험된 세 균주 중 NRS #9와 이. 파에칼리스는 시험된 모든 세폭시틴 조건에서 MRSA 양성을 시험했다. 모든 세 균주(NRS #9, 이. 파에칼리스, NRS #6)는 형질도입 입자 시약이 분석에 사용되었을 때 양성을 시험했으며, 이는 비-특이적 발광이 형질도입 입자 시약 의존적이지 않았고, 오히려 균주 및 기질 시약 의존적이었음을 나타낸다. 시험된 모든 농도에서 Carb(카벤실린)이 거짓 양성 신호를 제거하는데 효과적이었다.

[0542] 실험 3: 이. 파에칼리스는 형질도입 입자 시약 없이 양성 신호를 제공했다. MRSA 균주 S32도 형질도입 입자 시

약 없이 양성 신호를 제공했다. 이 결과는 바탕 발광을 야기하는 기질 시약을 나타냈다. 기질 4는 분석에서 바탕 신호를 제거하는데 효과적이었다.

[0543] 실험 4: 균주 ATCC 33090-리스테리아 이노쿠아, ATCC 19111-리스테리아 모노사이토겐을 형질도입 입자 시약 및 기질 시약과 함께 발광에 대해 시험했으며, 리스테리아 종은 MRSA 분석에서 사용된 박테리오파지의 숙주 범위 내일 수 있다. 발광이 엘. 이노쿠아로부터 형질도입 입자 시약이 있을 때와 없을 때 오리지널 기질 제제를 사용하여 관찰되었으며, 이는 발광이 잠재적으로 기질과의 비-특이적 반응으로 인한 것이었음을 나타낸다. 기질 5는 리스테리아로부터 발광을 제거하는데 효과적이었지만 이. 파에칼리스에서는 효과적이지 않았다.

[0544] 실험 5: 기질 6과 함께 이. 파에칼리스를 재시험했다. 0.5 OD의 세포의 높은 로드로 두 다른 날에 수행된 두 독립적 실험에서 분석은 음성 결과를 제공했다.

결론

[0546] 교차-반응성 연구는 높은 로딩에서 몇몇 박테리아 종들로부터의 바탕 발광을 증명했다. 광 출력은 형질전환 입자 시약과 비-특이적 신호에 기여된 포스페이트 이온을 이용한 특정 기질 제제를 필요로 하지 않았다. 교차-반응성 종들로부터의 광 출력이 형질도입 입자 시약의 사용으로부터 관찰되지 않았기 때문에, $\phi 80\alpha$ 가 교차-반응성 종들에 침투한 경우, 광 출력은 박테리아 루시페라제 유전자에 작동 가능하게 연결된 에스. 아우레우스 PclpB 프로모터의 활성 결여 및/또는 이를 종들 내에서 에스. 아우레우스 pT181 복제 기원의 활성 결여로 인해 차단된다.

[0547] 제제에서 나트륨 포스페이트 다이베이직 버퍼를 나트륨 시트레이트와 시트르산으로 치환한 결과, 이. 파에칼리스를 제외하고 시험된 모든 교차-반응성 종들로부터 바탕 발광이 제거되었다. 토코페롤-PEG 1000 석시네이트 성분이 첨가된 기질 6은 이. 파에칼리스로부터 나머지 비-특이적 신호를 제거했다.

비-복제 형질도입 입자-기반 생육성 세포 리포터 MRSA 분석의 임상 성능 - CHROMAgar MRSA II 위에 직접 평판한 것에 대한 결과

[0549] $\phi 80\alpha$ -기반 luxAB 발현 비-복제 형질도입 입자(NRTP)를 이용한 MRSA 스크리닝 분석이 개발되었다. 이 분석은 MRSA를 함유한다고 의심되는 임상 샘플에 NRTP를 첨가하고, 샘플을 37°C에서 4시간 동안 인큐ベ이션하고, 이어서 광전배증관 튜브로 발광을 측정하면서 샘플에 알데하이드를 주사하여 인큐베이션된 샘플을 분석하는 것으로 구성되었다. 분석의 감도 및 특이성을 결정하기 위해, 분석 결과를 기준으로서 SA의 검출을 위해 설계된 상업적으로 이용 가능한 크로모겐 배지의 결과와 비교하였다. 둘 다 생육성 MRSA 세포의 존재를 필요로 하고, MRSA 표현형의 발현에 의존하므로 이 NRTP-기반 분석은 배양물-기초 기준과 잘 상관될 것으로 예상되었다. 결과는 기준과 우수한 상관성을 나타냈다.

[0550] 이 연구의 목적은 MRSA 스크리닝을 위해 수집된 나머지 코 스왑 샘플의 시험으로부터 CHROMAgar MRSA II에 대해서 NRTP-기반 MRSA 분석의 성능을 결정하는 것이었다.

별위:

[0552] 임상 기구에 의한 MRSA 감독을 위해 환자로부터 수집된 식별되지 않은 코 스왑 샘플을 MRSA의 존재하여 직접 평판 및 부화된 배양물의 평판을 통해서 NRTP-기반 MRSA 분석, CHROMAgar MRSA II, CHROMAgar SA 및 혈액 아가 TSA를 사용하여 시험했다. CHROMAgar MRSA II에 대한 NRTP-기반 MRSA 분석의 감도 및 특이성을 계산하기 위해 NRTP-기반 MRSA 분석의 결과를 CHROMAgar MRSA II 분석의 결과와 비교했다.

[0553] 다음의 재료들이 임상 성능 연구에 사용되었다:

[0554] 성장 배지 시약: BSS-M56

[0555] 기질 시약: 상기 개시된 대로 18-24°C에서 보관되는 최종 기질 시약 제제

[0556] 형질도입 입자 시약: 10ug/mL(즉, 2x 농도) 세폭시틴을 가진 BSS-M56 베이스와 2x 농도의 상기 개시된 형질도입 입자 시약

방법/과정

[0558] 임상 샘플: 액체 Amies(220093- BD BBL™ CultureSwab™ Liquid Amies)를 함유하는 샘플 수송 튜브가 임상 기구에 의해 수집된 식별되지 않은 나머지 코 스왑을 수집하기 위해서 임상 기구에 제공되었다. 코 스왑을 제공된 샘플 수송 튜브에 넣기 전에 임상 기구는 이 스왑을 사용해서 배양 플레이트 위에 스트리킹함으로써 직접 배

양 MRSA 스크리닝을 수행하도록 했다. 더 구체적으로, 콧구멍 앞쪽의 견본을 임상 기구 내부 표준 과정에 따라 임상 기구의 표준 수집 스왑을 사용하여 수집했다. 다음에, 임상 기구는 이 스왑으로 직접 배양 스크리닝을 수행했다. 다음에, 나머지 스왑을 샘플 수송 튜브에 스왑의 끝이 샘플 수송 튜브 안의 Amies 버퍼에 잠기도록 해서 넣었다. 다음에, 샘플은 추가 처리 전에 2-24시간 동안 실온에 유지되었다.

[0559] 샘플 취급: 수령시 샘플은 스왑이 샘플 수송 튜브 Amies 버퍼에 잠기는 것을 보장하도록 위로 세워서 생물 안전 캐비넷에 넣어 실온에서 하룻밤 보관되었다. 하룻밤 보관 후 샘플은 다음과 같이 처리되었다.

[0560] 임상 샘플 준비:

[0561] 1mL 피펫을 사용하여 300 μ L 성장 배지 시약을 15mL 팔콘 튜브에 첨가했다.

[0562] 나머지 코 스왑으로부터 스왑을 원래 수송 튜브로부터 꺼내서 상용하는 팔콘 튜브의 성장 배지 시약에 담갔다. 다음에, 스왑을 성장 배지 시약에서 4-6번 앞뒤로 굴려서 스왑 내용물을 팔콘 튜브에서 성장 배지 시약으로 용출시켰다. 다음에, 스왑을 원래 수송 튜브에 다시 넣고 연구 종료시까지 2-8°C에 보관했으며, 팔콘 튜브 안의 용출된 임상 샘플은 1.5mL 튜브로 옮겨서 추가 처리시까지 실온에 유지했다.

[0563] NRTP MRSA 분석 수행: 다음의 샘플을 백색 96웰 분석 플레이트에 직접 로딩했다.

[0564] 임상 샘플: 각 임상 샘플의 용출된 물질 100 μ L, 한 번

[0565] MRSA 양성 대조군: 98uL 성장 배지 시약에 공지된 MRSA 분리주의 완전히 혼합된 0.1 OD 배양물 2 μ L, 세 번

[0566] MSSA 음성 대조군: 98uL 성장 배지 시약에 공지된 MSSA 분리주의 완전히 혼합된 0.1 OD 배양물 2 μ L, 세 번

[0567] 블랭크: 성장 배지 시약 100 μ L, 세 번

[0568] 각 샘플에 100 μ L 형질도입 입자 시약을 첨가했다. 다음에, 분석 플레이트를 37°C로 설정된 인큐베이터에 넣고 4시간 동안 퀘도 쉐이커에서 쉐이킹했다. 4시간 종료시 플레이트를 인큐베이터에서 꺼낸 후 즉시 기질 시약 50 μ L가 주사된 SpectraMax L에서 발광을 측정하고, 1분 동안 발광을 측정했다.

[0569] 임상 샘플 CFU 계수를 위한 박테리아 평판:

[0570] 다음과 같이 직접 및 부화된 배양물을 통해서 CHROMAgar MRSA II, CHROMAgar SA 및 혈액 아가(TSA II) 상의 박테리아 콜로니 카운트를 결정하기 위해서 각 용출된 임상 샘플을 평판했다. 유기체 CFU 카운트는 직접 평판에 의해 결정되었다. MRSA CFU 카운트는 CHROMAgar MRSA II 상에 평판하여 결정되었다. 에스. 아우레우스 CFU 카운트는 CHROMAgar SA 플레이트 상에 평판하여 결정되었다. 성장이 혈액 아가 TSAdp 의해서 지원되는 어떤 유기체의 CFU 카운트는 혈액 아가 TSA 상에 평판하여 결정되었다. 직접 평판이 사용된 플레이트의 검출 한계 이하인 유기체의 로딩으로 인해 콜로니를 생성하지 않았던 경우에는, 쉐이킹하면서 37°C에서 하룻밤 TSB 중에서 용출된 임상 샘플의 일부를 인큐베이션하고, CHROMAgar MRSA II 상에 부화된 배양물을 다시 평판함으로써 샘플 부화가 또한 수행되었다. 모든 플레이트는 37°C에서 20-24시간 동안 인큐베이션되었다. 인큐베이션 후, 각 플레이트에 출현한 어떤 콜로니의 CFU 카운트가 기록되었다.

[0571] 분석: MRSA, 에스. 아우레우스 및 용출된 임상 샘플당 총 유기체의 존재 및 CFU 로드가 각각 CHROMAgar MRSA II, CHROMAgar SA, 및 혈액 아가 TSA에서 얻어진 CFU 카운트에 기초하여 계산되었다.

[0572] NRTP 분석: 각 샘플로부터의 데이터를 RLU 대 시간으로 플롯팅했다.

[0573] 컷오프 결정: 분석 컷오프는 블랭크 샘플의 모든 시간 포인트로부터 다음의 식을 사용하여 계산되었다: (평균 블랭크 RLU + 3 * SD 블랭크 RLU).

[0574] MRSA 양성 결정: 기질 주사 후 각 시간 포인트의 RLU가 분석 컷오프 이상인지 이하인지 결정되었다. 주사 후 둘 이상의 데이터 포인트가 분석 컷오프 이상인 경우 이 샘플은 "MRSA 양성"으로 지정되었다.

[0575] 결과: NRTP 분석의 MRSA 양성 결과를 CHROMAgar MRSA II 위의 직접 평판 및 부화된 배양물 평판의 결과와 비교했다. CHROMAgar MRSA II에 대해 NTRP 분석 감도 및 특이성을 결정하기 위해서 다음의 계산이 수행되었다.

[0576] - 참 양성(TP)

[0577] o NRTP 분석 및 CHROMAgar MRSA II에 대해 MRSA 양성 결과를 생성한 샘플

[0578] - 참 음성(TN)

- [0579] o NRTP 분석 및 CHROMAgar MRSA II에 대해 MRSA 음성 결과를 생성한 샘플
- [0580] - 거짓 양성(FP)
- [0581] o NRTP 분석에서 MRSA 양성 결과와 CHROMAgar MRSA II에서 MRSA 음성 결과를 생성한 샘플
- [0582] - 거짓 음성(FN)
- [0583] o NRTP 분석에서 MRSA 음성 결과와 CHROMAgar MRSA II에서 MRSA 양성 결과를 생성한 샘플
- [0584] - 감도 = $TP/(TP+FN)$
- [0585] - 특이성 = $TN/(TN+FP)$
- [0586] **CHROMAgar MRSA II 위의 직접 평판에 대한 결과**
- [0587] 표 11은 CHROMAgar MRSA II 상의 직접 평판에 대해 NRTP 분석을 비교하여 얻어진 결과를 나타낸다.

표 11

NRTP 분석 결과 대 CHROMAgar MRSA II 상의 직접 평판 결과

총 샘플	CHROMAgar MRSA II 양성	CHROMAgar MRSA II 음성	NRTP 분석 양성	NRTP 분석 음성	참 양성	참 음성	거짓 양성	거짓 음성
69	7	62	12	57	7	57	5	0

- [0589] 상기 데이터에 기초하여, CHROMAgar MRSA II 상의 직접 평판에 대한 분석의 감도 및 특이성은 다음과 같이 계산되었다:
- [0590] 감도 = 100%
- [0591] 특이성 = 92%
- [0592] **비-복제 형질도입 입자-기반 생육성 세포 리포터 MRSA 분석의 임상 성능 - 부화된 배양물을 CHROMAgar MRSA II 위에 평판한 것에 대한 결과**
- [0593] CHROMAgar MRSA II에서 직접 평판에 대한 결과에 기초하여, 모든 임상 샘플을 부화된 배양물에 대해 재시험했고, 이어서 CHROMAgar MRSA II 상에 평판했다. 추적 시험을 위한 근거는 직접 플레이팅과 비교했을 때 거짓 양성 결과가 실제로는 NRTP 분석에 의해 검출되었지만 직접 평판에서는 빠졌을 수 있는 참 양성일 수 있다는 가능성을 기초했다. 나머지 용출된 스왑 샘플의 일부를 상기 개시된 대로 NRTP 분석을 통해 재시험했다. 나머지 용출된 스왑 샘플의 다른 일부를 부화된 배양물을 통해서 시험했고, 이어서 CHROMAgar MRSA II 위에 평판했다. 부화된 배양물 시험은 나머지 용출된 스왑 블질 100uL를 TSB 2mL에 첨가하고, 18~24시간의 기간 동안 쉐이킹하면서 37°C에서 인큐베이션하는 것으로 구성되었다. 다음에, 얻어진 배양물을 CHROMAgar MRSA II 위에 스트리킹하여 배양물 중 MRSA의 존재를 확인했다. 표 12는 직접 평판과 부화 후 평판 분석의 데이터를 요약하며, 이 표에는 NRTP 분석이나 CHROMAgar MRSA II에서 MRSA 양성 결과를 생성한 샘플만 제시된다.

표 12

NRTP 분석 결과 대 직접 평판 및 부화된 배양물을 CHROMAgar MRSA II에 평판한 결과

샘플 #	NRTP 분석	직접 CHROMAgar MRSA II	부화 + NRTP 분석	부화 + CHROMAgar MRSA II
1	+	+	+	+
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	+	+
7	+	+	+	+
8	+	-	+	+
9	+	-	+	+

10	+	-	+	+
11	+	-	+	+
12	+	-	+	-

[0595] NRTP 분석 또는 CHROMAgar MRSA II에서 MRSA 양성 결과를 생성한 샘플만 도시된다.

[0596] 표 13은 부화된 배양물을 CHROMAgar MRSA II 위에 평판한 임상 샘플에 대해 NRTP 분석을 비교하여 얻어진 결과를 나타낸다.

표 13

[0597]

NRTP 분석 결과 대 부화된 배양물을 CHROMAgar MRSA II 위에 평판한 결과

총 샘플	CHROMAgar MRSA II 양성	CHROMAgar MRSA II 음성	NRTP 분석 양성	NRTP 분석 음성	참 양성	참 음성	거짓 양성	거짓 음성
69	11	58	12	57	11	57	1	0

[0598] 상기 데이터에 기초하여, 부화된 배양물을 CHROMAgar MRSA II에 평판한 것에 대한 분석의 감도 및 특이성이 다음과 같이 계산되었다:

[0599]

- 감도 = 100%

[0600]

- 특이성 = 98.3%

[0601]

실시예 8: 항균 감수성 시험을 위한 NRTP-기반 분석 - 최소 억제 농도와 빛광 출력의 상관성

[0602]

다른 예로서, 세폭시틴 내성 에스. 아우레우스의 성장을 억제하는데 필요한 세폭시틴의 최소 억제 농도를 결정하기 위해 에스. 아우레우스 세폭시틴 감수성 분석이 개발되었다. 세폭시틴 내성 에스. 아우레우스로부터 세폭시틴 감응성인 것을 구별하는 상기 개시된 MRSA 세폭시틴 내성 분석과는 달리, 이 실시예에서 MRSA 세폭시틴 감수성 분석은 세폭시틴의 존재하에 에스. 아우레우스의 성장을 억제하는데 필요한 세폭시틴의 최소량을 결정하기 위한 분석의 개발을 개시한다.

[0603]

다음의 물질이 임상 성능 연구에 사용되었다:

[0604]

성장 배지 시약: BSS-M56

[0605]

기질 시약: 실시예 7에 개시된 대로 18-24°C에 저장된 최종 기질 시약 제제

[0606]

형질도입 입자 시약: 10ug/mL(즉, 2x 농도) 세폭시틴을 가진 BSS-M56 염기와 2x 농도 MIC 연구 프로토콜에서 실시예 7에 개시된 형질도입 입자 시약

[0607]

밤샘 배양: 각 MRSA 균주(NRS35 및 S7) 및 MSSA 음성 대조군 균주(MSSA121)에 대해, TSB 2mL를 TSA 플레이트에서 이미 성장된 균주 콜로니로 접종했다. 밤샘 MRSA 배양물은 5ug/mL 세폭시틴을 포함했다. 모든 샘플을 쉐이킹 인큐베이터에서 37°C에서 하룻밤 인큐베이션했다.

[0608]

일과 배양: 밤샘 배양물 각각 20uL을 성장 배지 시약 2mL를 함유하는 새로운 배양튜브로 옮겼다. 다음에, 접종 물을 대략 1시간 45분간 쉐이킹하면서 OD(600nm)이 0.1에 도달할 때까지 37°C에서 인큐베이션했다.

[0609]

평판을 통한 MIC 결정:

[0610]

a) 각 일과 배양물을 4, 8, 16, 32, 64, 및 128ug/mL로 세폭시틴을 함유하는 TSA 플레이트 위에 스트리킹했다.

[0611]

b) 플레이트를 37°C에서 18시간 인큐베이션하여 성장을 결정했다.

[0612]

NRTP 분석 준비:

[0613]

a) 흰색 96웰 분석 플레이트의 웰을 2x 형질도입 입자 시약 100uL로 채웠다.

[0614]

b) 일과 배양물 각각에 대해 5개의 웰을 일과 배양물 100uL로 채웠다.

[0615]

c) 일과 배양물 각각에 대해 세폭시틴을 웰에서 세폭시틴 농도가 4, 8, 16, 32, 64, 및 128ug/mL이 되도록 각 웰에 첨가했다.

- [0616] d) 다음에, 플레이트를 통기성 시일로 밀봉하고 50rpm으로 가볍게 쉐이킹하면서 37°C에서 4시간 인큐베이션했다.
- [0617] 4시간 종료시 플레이트를 인큐베이터에서 꺼낸 후 즉시 기질 시약 50 μL가 주사된 SpectraMax L 상에서 발광에 대해 측정하고, 1분 동안 발광에 대해 측정했다.
- [0618] 분석:
- [0619] 각 샘플로부터의 기질 시약 첨가 후 최대 발광 값을 플롯팅했다. MSSA 샘플 RLU 값을 사용하여 다음 식에 따라 계산된 컷오프를 결정했다: (평균 MSSA RLU + 3 * SD MSSA RLU).
- [0620] 결과:
- [0621] 도 23은 4, 8, 16, 32, 64, 및 128ug/mL의 세폭시틴에서 에스. 아우레우스 성장의 결과를 도시한다. 도 24는 4, 8, 16, 32, 64, 및 128ug/mL의 세폭시틴의 존재하에 NRTP 분석에 의해서 얻어진 RLU 값을 도시한다. 도 24에서 x-축은 MSSA RLU 컷오프 값으로 설정된다.
- [0622] 도 23에서 볼 수 있는 대로, MRSA NRS25는 128ug/mL 세폭시틴의 MIC를 나타냈고, MRSA S7은 64ug/mL 세폭시틴의 MIC를 나타냈다. 상응하여, MRSA NRS25는 최대 64ug/mL 세폭시틴의 세폭시틴 농도까지 MSSA RLU 컷오프를 넘는 인지 가능한 발광을 나타났고, MRSA S7은 최대 32ug/mL의 세폭시틴 농도까지 MSSA RLU를 넘는 발광을 나타냈다.
- [0623] 상기 데이터에 기초하여, NRTP 분석은 얻어진 RLU 값이 MIC 결과와 상관되고, 따라서 NRTP 분석이 항생물질 감수성 분석을 개발하는데 사용될 수 있음을 증명한다.
- [0624] 실시예 9: 전사체 리포터 분석: M_{ec}A 유전자 전사체에 의해서 활성화된 LuxAB 번역의 RBS-차단 시스-억제에 의한 입체구조 변화의 기전
- [0625] 상기 개시된 대로, 리포터 전사체는 리포터 유전자 서열의 번역이 리포터 유전자의 리보솜-결합 부위(RBS)의 시스-억제에 의해서 차단되도록 설계될 수 있다.
- [0626] 다음과 같은 방식이 본 발명의 리포터 전사체를 디자인하기 위해 사용되었다.
- [0627] 1) Mfold(<http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>)와 같은 2차 구조 프로그램을 사용하여 RNA 2차 구조가 계산되었다.
- [0628] 2) Integer Programming(RactIP)(<http://rna.naist.jp/ractip/>)을 사용하는 RNA-RNA InterACTion 예측과 같은 소프트웨어 프로그램을 사용하여 문자간 RNA 상호작용이 계산되었다.
- [0629] 3) RNA용 비쥬얼라이제이션 애플리케이션 VARNA(<http://varna.lri.fr/>)을 사용하여 RNA 2차 구조가 시각화되었다.
- [0630] 도 25는 MFold에 의해서 계산되고 VARNA로 시각화된 최저 에너지 입체구조에 기초하여 생성된 *mecA* 전사체의 2차 구조를 도시한다. 말단 루프 23(T23)은 *mecA* 전사체 서열의 염기 1,487-1,490로 구성된 YUNR 서열 UUGG를 함유한다. *mecA* 유전자 전사체의 2차 구조의 분석은 리포터와 ssRNA 영역 사이의 상호작용을 통해서 탈억제될 수 있는 시스-억제 luxAB 리포터를 설계하는데 적합했다.
- [0631] 도 26에 상세히 도시된 대로, *mecA* 전사체의 말단 루프 23(T23)은 YUNR 컨센서스 서열을 함유한다. YUNR(pYrimidine-Uracil-Nucleotide-puRine) 컨센서스 서열은 자연계에서 문자간 RNA 복합체에 대한 중요한 표적인 것으로 확인되었다. 시스-억제 서열은 리포터 서열의 RBS와 함께 줄기-루프 구조를 형성하도록 설계되었으며, 이로써 시스-억제 서열이 RNA 중합효소와 리포터 서열의 RBS의 결합을 차단한다. 리포터 서열은 시스-억제 줄기-루프 구조의 루프와 *mecA* 전사체의 T23의 결합시 노출되었다.
- [0632] 도 27에 도시된 대로, 시스-억제 서열(2701)은 luxAB 유전자의 5' 말단에 첨가되고, luxA 유전자의 RBS 서열 ("AAGGAA") (2702)을 차단하는 줄기-루프 구조를 형성하도록 설계되었다. 시스-억제 줄기-루프 구조는 MFold에 의해 계산되고 VARNA로 시각화된 luxAB 전사체의 5' 말단에 시스-억제 서열을 포함하는 luxAB 전사체의 최저 에너지 입체구조에 기초하여 luxA RBS ("AAGGAA") 서열을 차단할 것으로 예측되었다.
- [0633] 시스-억제 luxAB 유전자의 처음 61개 뉴클레오티드가 도 7에 도시되며, 이것은 luxA 유전자의 출발 코돈 AUG까지이다. RBS 서열 "AAGGAA"은 염기 47-52를 포함한다. 리포터 전사체의 이 말단 루프는 YUNR 서열을 함유하는 *mecA* 전사체의 말단 루프 23(T23)과 상호작용(결합)하도록 설계되었다.

[0634] 시스-억제 서열의 말단 루프는 *mecA* 전사체의 T23과 상호작용하도록 설계되었으며, 이로써 시스-억제 *luxAB* 전사체와 *mecA* 전사체의 시스-억제 줄기-루프 구조로부터의 루프와 *mecA* 전사체의 T23의 상호작용을 통한 혼성화가 *luxA* 유전자의 RBS의 노출을 야기한다. 도 28은 RactIP에 의해서 계산되고 VARNA에 의해서 시각화된 *luxAB* 전사체 상의 시스-억제 서열과 *mecA* T23 서열 사이의 예측된 문자간 상호작용을 도시한다. 라인은 *mecA* 전사체와 시스-억제 *luxAB* 전사체 사이의 염기쌍화를 나타낸다. 두 서열 사이의 상호작용은 *luxA* RBS 서열 AAGGAA의 노출과 그에 따른 *luxAB* 리포터의 탈억제를 야기한다.

실시예 10: 전사체 리포터 분석: *mecA-luxAB* 리포터 시스템을 사용하여 표적 전사체 또는 유전자를 검출하는 방법

[0635] 다른 예로서, *mecA-luxAB* 리포터 시스템을 사용하여 표적 *mecA* 유전자를 검출하기 위한 방법이 제공된다. 여기서, *mecA*는 표적 전사체이고, *luxAB*는 리포터 분자이다.

1. 리포터 구조체의 구성

[0636] *luxAB*를 암호화하는 리포터 구조체을 포함하는 벡터는 리포터 구조체을 이. 콜라이와 에스. 아우레오스에서 모두 증식할 수 있는 셔틀 벡터에 통합함으로써 표준 분자생물학 기술을 통해서 구성될 수 있다. 이 벡터는 이. 콜라이에서 기능성인 복제 기원과 이. 콜라이에서 발현되는 선택성 마커를 함유할 수 있으며, 벡터로 형질전환되고 선택적 조건하에 성장된 이. 콜라이 세포를 성장시키기에 적합하다. 또한, 이 벡터는 에스. 아우레우스에서 기능성인 복제 기원과 에스. 아우레우스에서 발현되는 선택성 마커를 함유할 수 있으며, 벡터로 형질전환되고 선택적 조건하에 성장된 이. 콜라이 세포를 성장시키기에 적합하다. 시험관내 조작을 수행하고 조작을 검증하기 위한 벡터의 증식은 이. 콜라이의 적합한 실험실 클로닝 균주를 통해서 달성될 수 있으며, 이어서 최종 변형된 벡터가 에스. 아우레우스 균주에 도입될 수 있다.

[0639] 리포터 구조체은 먼저 구조체의 전사와 리포터 전사체의 생성을 위해 에스. 아우레우스 세포에 도입될 수 있다.

2. 시스-억제 리포터 전사체의 구성

[0641] *mecA*-표적 전사체에 결합할 수 있는 시스-억제 리포터 전사체를 구성하기 위한 방법이 제공된다. 리포터 전사체는 표준 분자생물학 기술을 통해 구성될 수 있다. *luxA* 및 *luxB* 유전자가 리포터 유전자로서 작용하며, 이들은 비브리오 하베이이로부터 유래될 수 있다. 이 유전자들은 전사 프로모터를 결여하며, 각각 그 자신의 리보솜 결합 부위(RBS)를 함유한다. *luxA*와 *luxB* 유전자가 모두 세포에서 번역된 경우, *luxA* 및 *luxB* 단백질이 복합체를 이루어 활성 루시페라제 효소(*luxAB*)를 형성한다(Farinha, M.A. and A.M. Kropinski, Construction of broad-host-range plasmid vectors for easy visible selection and analysis of promoters. J. Bacteriol., 1990. 172(6): p. 3496-3499 참조).

[0642] 시스-억제 서열은 *luxAB* 유전자의 상류와 프로모터의 하류에 놓일 수 있고, *luxA* RBS에 상보성인 서열을 포함한다. 링커 서열이 시스-억제 서열과 *luxA* 서열의 상보성 영역을 분리할 수 있다. 벡터 전사 후, 시스-억제 서열과 *luxA* RBS 서열의 상보성 영역이 복합체를 이루어 리보솜의 도킹을 차단함으로써 번역을 차단하는 줄기-루프를 생성한다.

[0643] 리포터 전사체의 줄기-루프는 자연 발생 *mecA* 전사체 서열(세포에 내인성)과 상호작용할 때 탈안정화하여 개방된 복합체를 형성하도록 설계된다. *luxA* 유전자 서열의 번역을 활성화하기 위해 자연적 *mecA* 전사체가 시스-억제 리포터 전사체에 결합하는 트랜스-활성화 RNA로서 작용하며, *luxA* 유전자의 RBS를 격리시키는 억제성 줄기-루프를 개방한다. RBS가 시스-억제 서열에 의해서 격리되지 않는다면 *luxA*의 번역이 진행될 수 있다. 리포터 구조체의 전사는 시스-억제 서열의 상류에 있는 구성성 프로모터에 리포터 서열을 작동 가능하게 연결하는 것을 통해서 달성된다.

[0644] 표적 *mecA* 유전자 서열의 예가 도 29에 도시된다. 이 서열은 *mecA* 유전자과 DNA 서열이며(스타필로코쿠스 아우레우스 아종, 아우레우스 SA40로부터, 완벽한 게놈 GenBank: CP003604.1; SEQ ID NO:15), 리포터 서열과 시스-억제 서열을 포함하는 리포터 구조체을 생성하는데 사용될 수 있다. -10 위치(2901), 전사 시작 위치(2902), RBS(2903), 코딩 영역(회색 부분)(2904) 및 전사 종결 서열(2905)이 도시된다.

[0645] 도 30은 본 발명의 구체예에 따라서 리포터 전사체(SEQ ID NO:16)을 설계하는데 사용될 수 있는 예시적인 *mecA* 전사체 서열을 도시한다. RBS(3001)와 코딩 서열(3002)이 *mecA*에 대해 도시된다.

[0646] 도 31은 본 발명의 구체예에 따라서 리포터 전사체를 설계하는데 사용될 수 있는 *luxAB* 유전자과 DNA 서열의 일례이다. *luxAB* 유전자과 DNA 서열은 루시페라제 알파 및 베타 서브유닛에 대해 비브리오 피스체리 유전자 *luxA*

및 luxB로부터 얻어졌다(GenBank: X06758.1)(SEQ ID NO: 17). -10 위치(3101), 전사 시작 위치(3102), luxA에 대한 RBS(3103), luxA 코딩 영역(3104)(회색 음영) 및 luxB에 대한 RBS(3105), 및 luxB 코딩 서열(3106)(회색 음영)이 도시된다.

[0647] 도 32는 리포터 전사체를 설계하는데 사용될 수 있는 luxAB 전사체 서열의 일례이다(SEQ ID NO:18). luxA에 대한 RBS(3201), luxA 코딩 서열(3202)(회색 음영), luxB에 대한 RBS(3203), 및 luxB 코딩 서열(3204)(회색 음영)이 도시된다.

[0648] 도 33은 리포터 전사체에 사용될 수 있는 luxAB 시스-억제 전사체 서열의 예이다(SEQ ID NO:19). 시스-억제 서열(3301)(점선 박스), luxA에 대한 RBS(3302), luxA 코딩 서열(3303)(회색 음영), luxB에 대한 RBS(3304), 및 luxB 코딩 서열(3305)(회색 음영)가 도시된다.

3. 리포터 전사체를 사용하여 *mecA* 표적 전사체의 존재 또는 부재를 검출하는 방법

[0649] 본 발명의 리포터 전사체를 사용하여 세포에서 *mecA* 표적 전사체의 존재 또는 부재를 검출하기 위한 예들이 제공된다. 도 34는 리포터 전사체(1410)를 암호화하는 벡터(3400)를 포함하는 세포의 예를 도시하며, 여기서 세포(3401)에는 내인성 *mecA* 전사체가 없다(예를 들어, 세포의 게놈이 *mecA* 유전자를 함유하지 않는다). 이 경우, 시스-억제 서열(3420)이 luxAB 유전자의 RBS(3430)와 결합한다. 일부 구체예에서, 시스-억제 서열(3420)이 luxA 유전자의 RBS, luxB 유전자의 RBS, 또는 이 둘 다의 일부 또는 전부와 결합할 수 있다. 이 결합은 luxAB 유전자의 번역을 차단 및 방지하여, 리포터 분자(예를 들어, 루시페라제)가 세포에서 생성되지 않는다. 따라서, 신호가 검출되지 않고, 이는 세포에서 *mecA* 유전자의 부재를 나타낸다.

[0651] 다른 예로서, 세포는 내인성 *mecA* 전사체를 포함한다(예를 들어, 세포의 게놈이 *mecA* 유전자를 함유한다). 도 35는 세포(3401)에 도입된 벡터(3400)를 도시한다. 벡터(3400)는 시스 억제 서열(3420)과 리포터 서열(luxA 및 luxB 유전자)을 포함하는 리포터 전사체(3410)를 암호화한다. 세포에 존재하는 *mecA* 전사체(3510)가 시스-억제 서열(3420)에 결합할 때, 억제성 헤어핀 루프가 개방되고, luxA 유전자의 RBS(3430)가 노출된다. 이 경우, 리포터 서열(luxA 및 luxB)의 번역이 진행되어, luxAB 효소(3520)를 형성한다. luxAB 효소(3520)는 검출 가능한 발광 신호(3530)를 생성한다. 이 방식으로, 전사체 리포터 벡터(3400)는 세포(3401) 내에서 내인성 *mecA* 전사체(3510)의 존재를 보고한다.

[0652] 본 발명은 바람직한 구체예와 다양한 대안의 구체예를 참조하여 특별히 나타내고 설명되었지만, 본 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고 그 안에서 형태 및 상세한 내용에 다양한 변화가 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 이해될 것이다.

[0653] 본 명세서 내에서 인용된 모든 참고자료, 발행 특허 및 특허출원은 모든 목적을 위해서 그 전체가 본원에 참고자료로 포함된다.

인용문헌

- [0655] 1. Michael G. Schmidt, D.A.S., Caroline Westwater, Joseph W. Dolan, Brian D. Hoel, Philip A. Werner, James S. Norris, Laura M. Kasman, Nucleic Acid Delivery and Expression, 2005.
- [0656] 2. Kreiswirth, B.N. et al., The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. Nature, 1983. 305(5936): p. 709-712.
- [0657] 3. Ubeda, C. et al., Specificity of staphylococcal phage and SaPI DNA packaging as revealed by integrase and terminase mutations. Molecular Microbiology, 2009. 72(1): p. 98-108.
- [0658] 4. Otsuji, N. et al., Induction of Phage Formation in the Lysogenic Escherichia coliK-12 by Mitomycin C. Nature, 1959. 184(4692): p. 1079-1080.
- [0659] 5. Brantl, S. (2007) Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. Curr. Opin. Microbiol. 10, 102-109.
- [0660] 6. Isaacs, F.J. et al. (2004) Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression. Nat. Biotechnol. 22, 841?847.
- [0661] 7. Pfeiffer, V. et al. (2009) Coding sequence targeting by MicC RNA reveals bacterial mRNA silencing downstream of translational initiation. Nat. Struct. Mol. Biol. 16, 840-846.

- [0662] 8. Opdyke, J.A. et al. (2004) GadY, a small-RNA regulator of acid response genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 6698-6705.
- [0663] 9. Carriere, C., et al., Conditionally replicating luciferase reporter phages: Improved sensitivity for rapid detection and assessment of drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997. 35(12): p. 3232-3239.
- [0664] 10. Merten, O.-W. and M. Al-Rubeai, Viral Vectors for Gene Therapy : Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology*. Vol. 737. 2011.
- [0665] 11. Lofdahl, S., J.E. Sjostrom, and L. Philipson, CLONING OF RESTRICTION FRAGMENTS OF DNA FROM STAPHYLOCOCCAL BACTERIOPHAGE-PHI-11. *Journal of Virology*, 1981. 37(2): p. 795-801.
- [0666] 12. Charpentier, E., et al., Novel Cassette-Based Shuttle Vector System for Gram-Positive Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004. 70(10): p. 6076-6085.
- [0667] 13. Novick, R.P., I. Edelman, and S. Lofdahl, Small *staphylococcus-auerus* plasmids are transduced as linear multimers that are formed and resolved by replicative processes. *Journal of Molecular Biology*, 1986. 192(2): p. 209-220.
- [0668] 14. Westwater, C., et al., Development of a P1 phagemid system for the delivery of DNA into Gram-negative bacteria. *Microbiology*, 2002. 148(4): p. 943-950.
- [0669] 15. Norris, J.U., et al., Tissue-Specific and Pathogen-Specific Toxic Agents and Ribozymes. 1999.
- [0670] 16. Maiques, E., et al., Role of Staphylococcal Phage and SaPI Integrase in Intra- and Interspecies SaPI Transfer. *J. Bacteriol.*, 2007. 189(15): p. 5608-5616.
- [0671] 17. Frees, D., et al., Clp ATPases are required for stress tolerance, intracellular replication and biofilm formation in *staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 2004. 54(5): p. 1445-1462.
- [0672] 18. Arnaud, M., A. Chastanet, and M. Debarbouille, New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Nontransformable, Low-GC-Content, Gram-Positive Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2004. 70(11): p. 6887-6891.
- [0673] 19. Tormo, M.A., et al., *staphylococcus aureus* Pathogenicity Island DNA Is Packaged in Particles Composed of Phage Proteins. *J. Bacteriol.*, 2008. 190(7): p. 2434-2440.
- [0674] 20. Arthur, M., et al., The VanS sensor negatively controls VanR-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction. *J. Bacteriol.*, 1997. 179(1): p. 97-106.
- [0675] 21. Karlsson, S., et al., Expression of *Clostridium difficile* Toxins A and B and Their Sigma Factor TcdD Is Controlled by Temperature. *Infect. Immun.*, 2003. 71(4): p. 1784-1793.
- [0676] 22. Daniel Sobek, J.R., Enzyme detection system with caged substrates, 2007, Zymera, Inc.
- [0677] 23. Samie Jaffrey, J.P., Coupled recognition/detection system for in vivo and in vitro use, 2010, Cornell University.
- [0678] 24. Good, L., Translation repression by antisense sequences. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003. 60(5): p. 854-861.
- [0679] 25. Sabine, B., Antisense-RNA regulation and RNA interference. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 2002. 1575(1-3): p. 15-25.
- [0680] 약식 서열목록
- [0681] SEQ ID NO: 1
- [0682] 자생 P1 pac-부위
- [0683] CCACTAAAAGCATGATCATTGATCACTCTAACATGATCACACATGCAGGTGATCACATTGCCGCTGAAATAGCGGAAAAACAAAGAGTTAATGCCGTTGTCAGT

GCCGCAGTCGAGAATGCGAAGCGCCAAAATAAGCGCATAAATGATCGTCAGATGATCATGACGTGATCACCGC

[0684] SEQ ID NO:2

[0685] 침묵 돌연변이를 가진 P1 pac-부위, 소문자는 돌연변이된 염기를 표시

[0686] CCACTAAAAAGCATGATaATaGAcCACTCTAAcGAcCAACATGCAGGgGAgCACATTGCCGCTGAAATAGCGGAAAAGCAGAGgGTgAATGCCGTTGTCAGT
GCCGCAGTCGAGAATGCGAAGCGCCAAAATAAGCGCATAAAcGAcCGTTCAGAcGAcCATGACGTtATtACCCGC

[0687] SEQ ID NO: 3

[0688] C1 억제제-제어 P53 프로모터, 프로모터 P53 안티센스, repL 유전자 및 k11A 유전자의 프레임 내 결실을 함유하는 P1 세포 용해 레플리콘

[0689] CTCGCTAACGACATTGGCTTATTAAATTTTATCCACACCCCCATGTCAAAATGATAACCCCTCCCCCTGTCAGGATGACGTGGCAATAAAGAATAAGAAG
TCACAAGTTAAAAAAACAAAAGATCAGTTCCGGCGGTGCCGAACAACCAGCCTCAAAAAATTGACTTCATGGATCGCTAAGGCAAAGCAAAGGCTGAC
AATCTCGGGTTATCCAAAAACCGACTCAAAACATGAGTTCAAGCAGAAAGTAGAGGCCGCTGCGCGAAATATGCTTACCTGAAGAACAGCTCGCCT
GATATTGGCGGGATATCAAACCTCGATAACCTACCGCATTGATGACGGTAAACGAAGGCTCTTAATGCCGTTTAGCCAAAATAAGATAACGAACAATGG
GGTATACCGCAGGATTTCAGAGGGTAATGAATTGCTCTAAATTACCATGCATACTTCAACACCTCTAGTTGCCATGAGGCAAACACTCATAGGTGTCCTG
GTAAGAGGACACTGTGCCAAACTGGACGCCATTATTGCAATTAAACAACGACAATTCTACCTAACAAATAAGTGGCTAAAAAACCGCC
CCGGCGGGTTTTATCTAGAGCTAGCGGATCCGGCGCCGGCCCTCTGGGCCTCATGGGCCTCCGCTACTGCCGTTCCAG

[0690] SEQ ID NO: 4

[0691] Pblast 프로모터 서열

[0692] CGTCAGGTGGCACTTTGGAAATGTGCGCGAACCCCTATTGTTATTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAA
ATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGT

[0693] SEQ ID NO: 5

[0694] S. aureus pT181 플라스미드 기원 또는 복제 카피 수 변이체 pT181cop-623 repC

[0695] TACTCAACTGAAAAATAATGAGGTCAATTATTGGAGAAATTCCCTGCTCGATGTATTCAAGATTATCGCAATGATTAACCTTTTACAAATGGGCTTAG
TGTTGTTAGCAGAGCTAAAGGATATCAGGTTACCACTGGCGAACCTGTTGCCAGACCCGTCGTCTAAATAGTCGGATAGATAAGTAAGATATATGTT
CAATAAAATAACTTAGCGTTATGTTATATAAATGGTTCTTATTAAATAAGATGAAATATTCTTAATATAGATTGAATTAAAGTGAAAGG
AGGAGATTGTTATTATAAACTACAAGTGGATATTGTCCTATTGTTGAAATAAAACAAGACTACGAACATCGAGTGGACTACTAACTAAAAATTCCCTT
TATACAGCCCCAATGTAAGAACGAAACTTAAATTAAATGTCAAAAATGAATATAACAATCAAAGAGCCAGACGCCAGACGCGATAATTG
AGAAATGAAACTCTCATCTTATCGCTTTGTTATCTGAATTACTGACTAGCCTCAATTTC

[0696] SEQ ID NO: 6

[0697] P1 pacA 유전자, 소문자는 결실된 pac-부위 서열을 표시

[0698] GTGGATTGAGCATCGTAGAGAAGAAATTGCCGATATCGCGATACAGGTGGTTATGGTATGTCATGCCAGGGCATATCAAACGAAGCATGGCTGAACA
GGATCTGGACGAAGACGAGGAGGAAGACGAAGATTACCGCAAACGTACGGGATGATGATTAA

[0699] SEQ ID NO: 7

[0700] 자생 P1 pacA 유전자

[0701] GTGGATTGAGCATCGTAGAGAAGAAATTGCCGATATCGCGATACAGGTGGTTATGGTATGTCATGCCAGGGCATATCAAACGAAGCATGGCTGAACA
GGATCTGGACGAAGACGAGGAGGAAGACGAAGATTACCGCAAACGTACGGGATGATGATTAA

[0702] SEQ ID NO:8

[0703] terS 유전자, 소문자는 결실된 서열을 표시

[0704] ATGAACGAAAAACAAAGAGATCCGAGATGAATATATAATGAATGGATGTAATGGTAAAAAGCAGCAATTTCAGCAggttatagtaaagaaaaacagcagag
tcttagcaagtcgattgttaagaaatgttaatgtttcgaaatatataaagaacgattagaacagatacaagaagagcgttatagcattacagaact
ttagcgttatctgttctattgttagaggagaacctaagggctacagtaaagaaatatgaccattaaacgatgaagtggaaaaagaggttactacaca
atcacaccaactttgaagagcgtcagagatcttgaccacataactaaagttatgttgcgtatatcgacaaaaaaaagaaattactcagaagaatattgag
attaatAGATCTATTGACCACATACTAAAGTCATGGTGCCTATATCGACAAAAAGAAATTACTCAGAAGAATATTGAGATTAATATTGGTGAGTAC

GATGACGAAAGTTAA

[0705] SEQ ID NO:9

[0706] 자생 terS 유전자를 함유하는 서열

[0707] AATTGGCAGTAAAGTGGCAGTTTGATACCTAAAATGAGATATTGATAGTGTAGGATATTGACTATCTTACTGCCTTCCCTATCGCAATTAGGAATA
AAGGATCTATGTGGGTGGCTGATTATGCCAATCCTTTTAATTAAAAAGCGTATAGCGCAGAGTGGTGGTAAATGAAATGAACGAAAACAAAAG
AGATTCGCAGATGAATATATAATGAATGGATGTAATGGTAAAAAGCAGCAATTTCAGCAGGTTATAGTAAGAAAACAGCAGAGTCTTAGCAAGTCGATTG
TTAAGAAATGTTAATGTTCGGAATATATTAAAGAACGATTAGAACAGATAACAAGAGCGTTAATGAGCATTACAGAAGCTTAGCGTTATCGCTTCT
ATTGCTAGAGGAGAACCTCAAGAGGCTACAGTAAGAAATATGACCATTAAACGATGAAGTGGAAAAGAGGTTACTACACAATCACACCAACTTGTAA
GAGCGTCAGAGATCTATTGACCACATACTAAAGTTCATGGTGCCTATATCGACAAAAAAGAAATTACTCAGAAGAATATTGAGATTAATATTGGTGAGTAC
GATGACGAAAGTTAAATTAAACTTAACAAACCATCTAATGTTCAACAG

[0708] SEQ ID NO:10

[0709] SaPi bov2 인테그라아제 유전자

[0710] CATAGTATTTATACGAAAATAGTATGTACCGTTAGCGCTTTATATGTTGTGGATAGGTTAAGTTGTTCTATGGGAATCAC

[0711] SEQ ID NO:11

[0712] pGWP10001 전체 서열

[0713] TATCCAGCTGAACGGCTGGTTAGGTACATTGAGCACTGACTGAAATGCCCTAAATGTTCTTACGATGCCATTGGATATCAACGGTGGTATATC
CAGTGATTTTTCTCCTTACGTTAGCTCCTGAAATCTCGATAACTCAAAAATACGCCCTAGTGATCTTATTCATTGGTAAAGTTGG
AACCTCTACGTGCCATCACGCTCATTTCGCCAAAAGTTGGCCAGGGCTCCCGTATCAACAGGGACACCAGGGATTATTCTGCGAAGTGAT
CTTCCGTCACAGGTATTATTCCAAGACGAAAGGCCCTGATACGCTATTAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTCTAGACGTCAGGTGGC
ACTTTCCGGGAAATGTGCGCCCGCTGCTGGCTGGGCTGTTCTGGCGCTGGACTTCCGCTGTTCCGTCAGCAGCTTCGCCACGGCCT
TGATGATGCGCCGCGCTTGGCCTGCATATCCGATTCAACGGCCCCAGGGCGTCAGAACGGCTCAGGCCTCCGAAGGT

[0714] SEQ ID NO:12

[0715] S. aureus PclpB 프로모터 서열

[0716] GTCTAGTTAATGTGTAACGTAACATTAGCTAGATTTTTATTCAAAAAATATTACAAATATTAGGAAATTAGTGTAAAGAGGTTGATAATGATTAT
ATTGGGACTATAATATAATTAAAGGTC

[0717] SEQ ID NO:13

[0718] φ 80 α terS 결실 및 상보성을 보여주는 RN10616 계놈 서열 유전자좌. terS = 팔호안 텍스트, 결실 = 밑줄 텍스트, 상보성 = 진한 텍스트

[0719] ATTAGACAACAAACAGTCATTGAAAATTGACTTATTCAAAAAGAAATTGATAGCGCAGATATAAGCTAGGTTAAAGTAGGCATAAGGTAGA
AGTTAAAACAATCGGTATAGAACATCTTTAAATTATCCGCTTATACGAAGTAAAGAAGGTAGATAAACATGATTAACAAACTAAGACTA
TTATTCTACTAGCAATGTATGAGTTAGGTAAGTATGTAACGTGAGTATATTGATGACGGCTAATGATGATGAGGTCGAGTGACTTCGCG
AAGTTGAGCAGTCAGTCAGATTGATGAGGGCGAGGTGACGGAGTAGATGATGTTAGTCAGCAATTATATTACTAGTCATCTTATTGTTGGTGTG
ATGTTGCAAGCTGAAACAGTTAAAGGCGATGTGAAAGTTAAAGAGCGGGAGATAGAGATATTAAAGAAGTAGATTGAGACATTGAGATTAAAATTTG
TATGGAGGGTATTGACTAAAAAGAAATGGATTAAATTCAACAGTTGAAAGTTAGAAGATGAGTTGTTGATTATCCTAATTATCATAAGCAAC
TCGAAGATTAAAGTGAATAATGACACCATGGATTCCAACAGATAAAATAGGCCGGAGTTGATCCGCTAATACATCGAAAACAGAAATGGCAG
TAACTAATTATCTTGTAGTATACGAAGAGGTTAAAGAGCTGATTAAGAGCGTATTGAAGCTATAACACACATCAAGTAGGAAAGAACGCGAATTCA
TTCAAGAGTATTATTTAATAAAAAGGAATTAGTGAAGTTGATGACATACACATTCTGATAGAAGTCTGATAGAATCAAAGGAAAATCATATCTA
GATTGGCGGAAGAGTTAGGGGAAGAGTGAATTGGCAGTAAAGTGGCAGTTTGATACCTAAATGAGATATTGATAGTGTAGGATATTGACTATCTA
CTGCGTTCCCTTATCGCAATTAGGAATAAGGATCTATGTTGGCTGATTAGCCAATCCTTTAATTAAAAGCGTATAGCGCAGAGTTGG
TGGTAAATGAA

[0720] [[ATGAACGAAAACAAAGAGATTCGAGATGAATATATAATGAATGGATGTAATGGTAAAAAGCAGCAATTTCAGCAGGTTATAGTAAGAAAACAGCAG
AGTCTTAGCAAGTCGATTGTTAAGAAATGTTAATGTTGCGAATATTAAAGAACGATTAGAACAGATAACAAGAACAGCTTAAAGCAGATTACAGAAG
CTTACGCTTATCTGCTTCTATTGCTAGAGGAGAACCTCAAGAGGCTACAGTAAGAAATATGACCATTAAACGATGAAGTGGAAAAGAGGTTACTACA
CAATCACACCAACTTTGAAGAGCGTCAGAGATCTATTGACCAACATACTAAAAGTTCAATGGTGCCTATATCGACAAAAAGAAATTACTCAGAAGAATATTG

AGATTAATATTGGTGAGTACGATGACGAAAGTTAA]]

[0721] ATTTAAACTTAACAAACCATCTAATGTTTCAACAGGGTGTTCAGACTATTGAAGAGTTGACAACATGGCAAAAGGACAAAGATACTGGTGAAT
ATACCAATGAACCACTAGATACATACATTCAGTATCGATTGCGTTATTCAAGTGAACGATTG

[0722] SEQ ID NO:14

[0723] pGW80A0001 전체 서열

[0724] TATTAAAGTGCCTGCTTTCTCATTTATAAGGTTAATAATTCTCATATATCAAGCAAAGTGACA

[0725] SEQ ID NO:15(mecA 유전자좌 DNA 서열(*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* SA40로부터, 완전 개놈 GenBank: CP003604.1))

[0726] AGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTGCTTCACTGTTT

[0727] SEQ ID NO:16(mecA 전사체 서열)

[0728] GUACGAUGGUUGCUCACUGUUUU

[0729] SEQ ID NO:17(luxAB 유전자좌 DNA 서열(루시페라제 알파 및 베타 서브유닛에 대한 *Vibrio fischeri* 유전자 luxA 및 luxB - GenBank: X06758.1))

[0730] TGTCCGATATTAAAGATGTAAAAGATATTATTGATATGTTGAACCAAAAAATCGAAATGAATTACCATATAAAATTAAAGGCAATTCTATATTAGATTG
CCTTTAAATTTC

[0731] SEQ ID NO: 18(luxAB 전사체 서열)

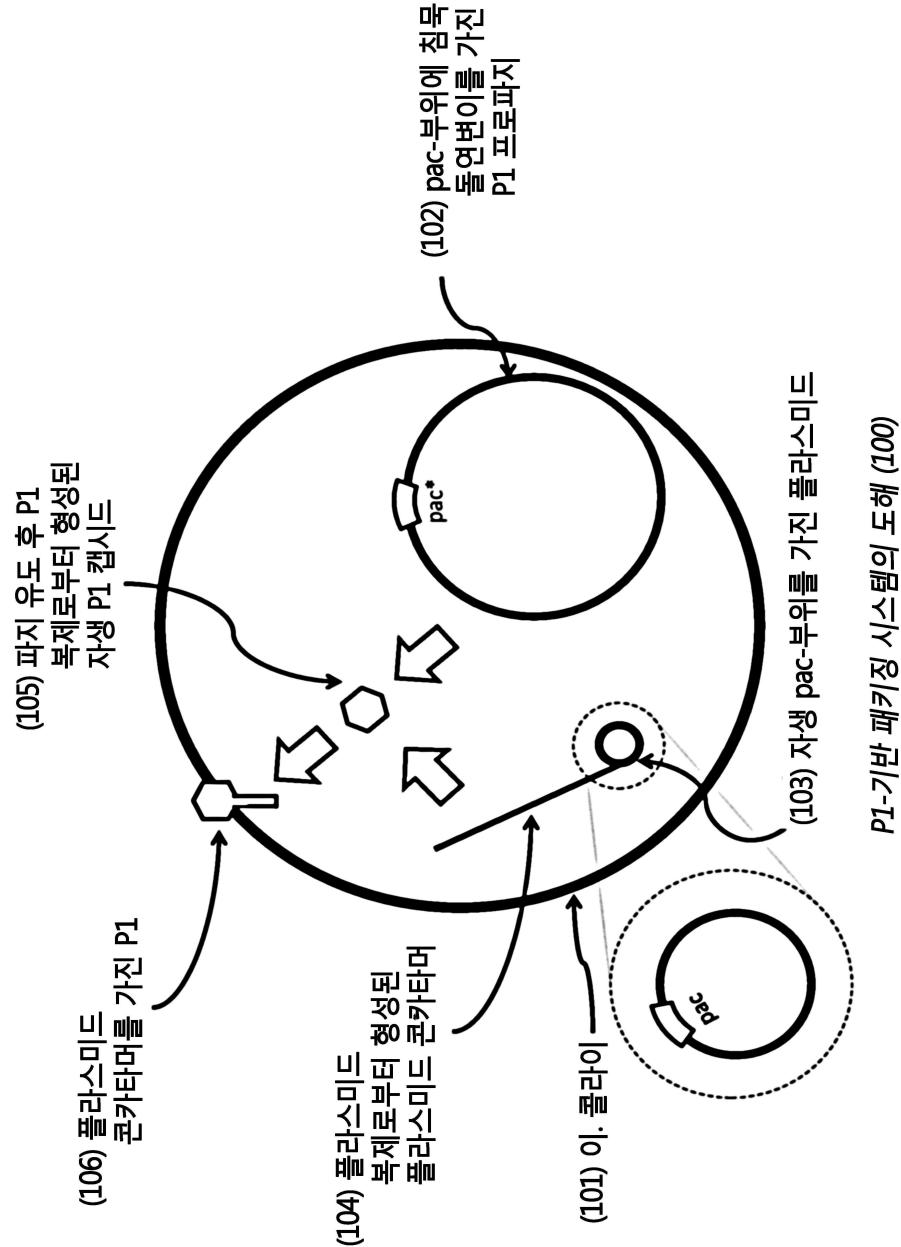
[0732] AUGUAAAAGAUUAUUGAUAGUUGAACCAAAAAUCGAAUUGAAUUACCAUAAAUAAGGCAUUUCUAUUAAGAUUGGCCUUUU

[0733] SEQ ID NO: 19(시스-엑체 luxAB 전사체 서열)

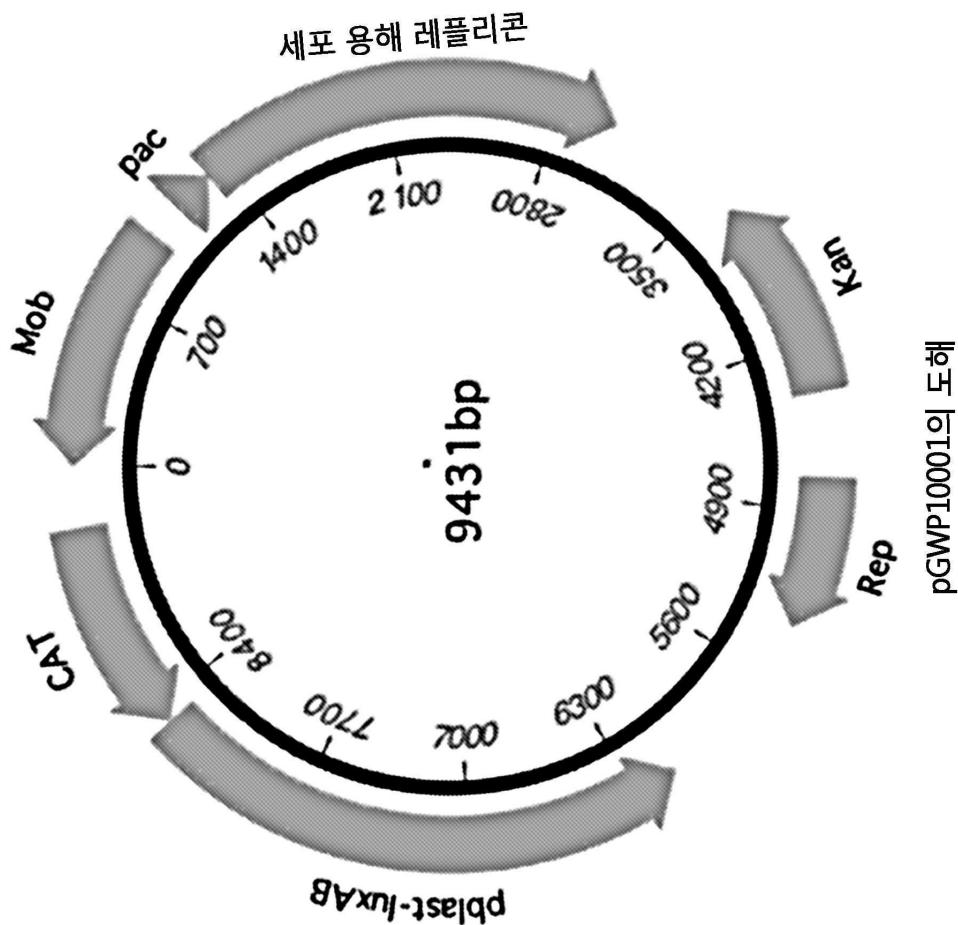
[0734] CAAAUGGACAGAGAUGAAAAAUACUGCAUUAUGAAGAGAAUGCAGUUGGGUCUCAUGAUGACUUAUGAAUCGACAAAUAUGCAGUGGAAAAACA
GGGUUUAAAUAUUUAUUAUCGUUUGAAUCAUGUCCGAAUUAAGAUGUAAAAGAUUAUJUGAUUAGUJUGAACCAAAAAUCGAAAUGAAUUAACCA
UAAAUAUUAAGGCAUUUCUAUUAAGAUUGGCCUUUU

도면

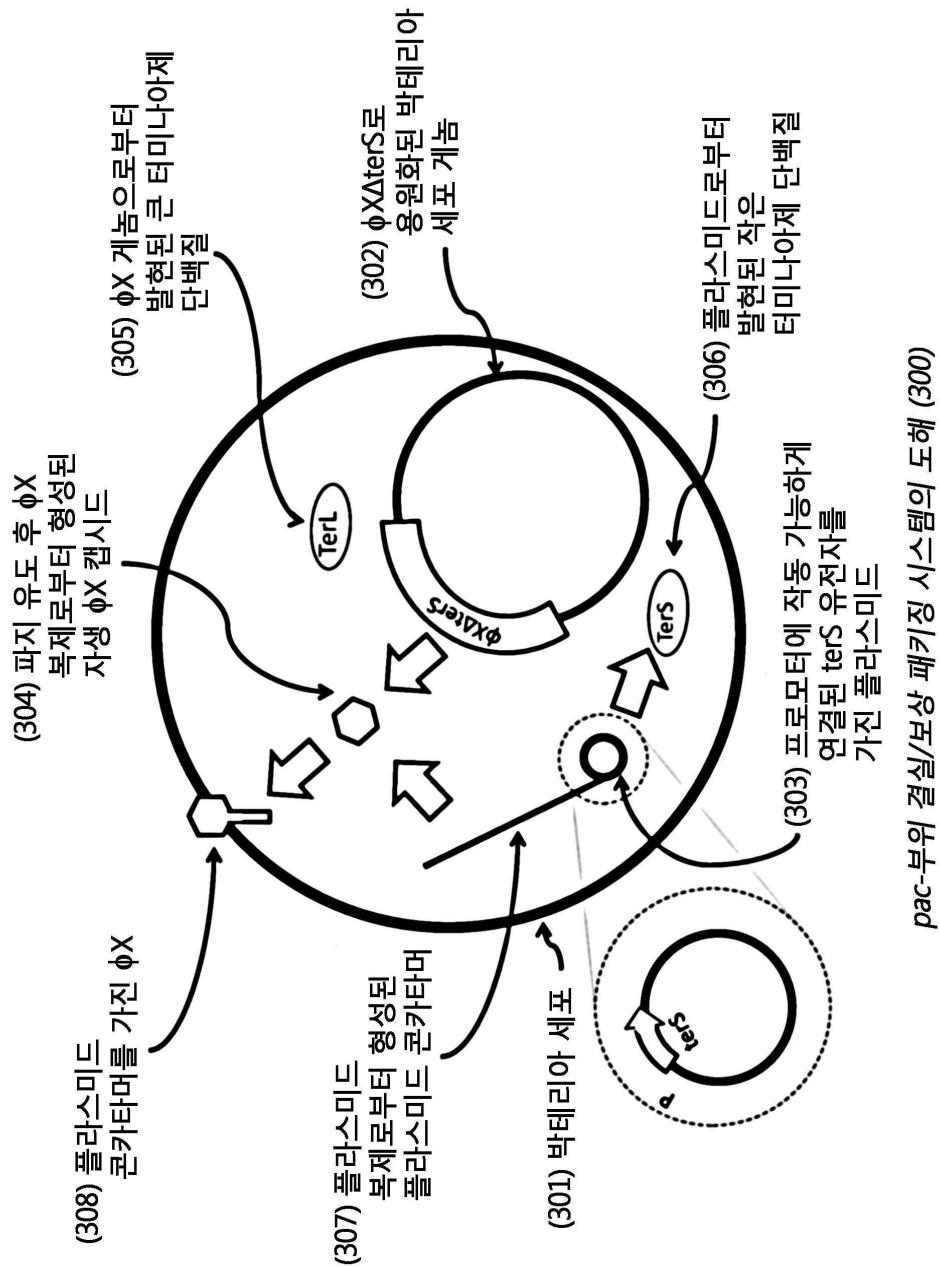
도면 1



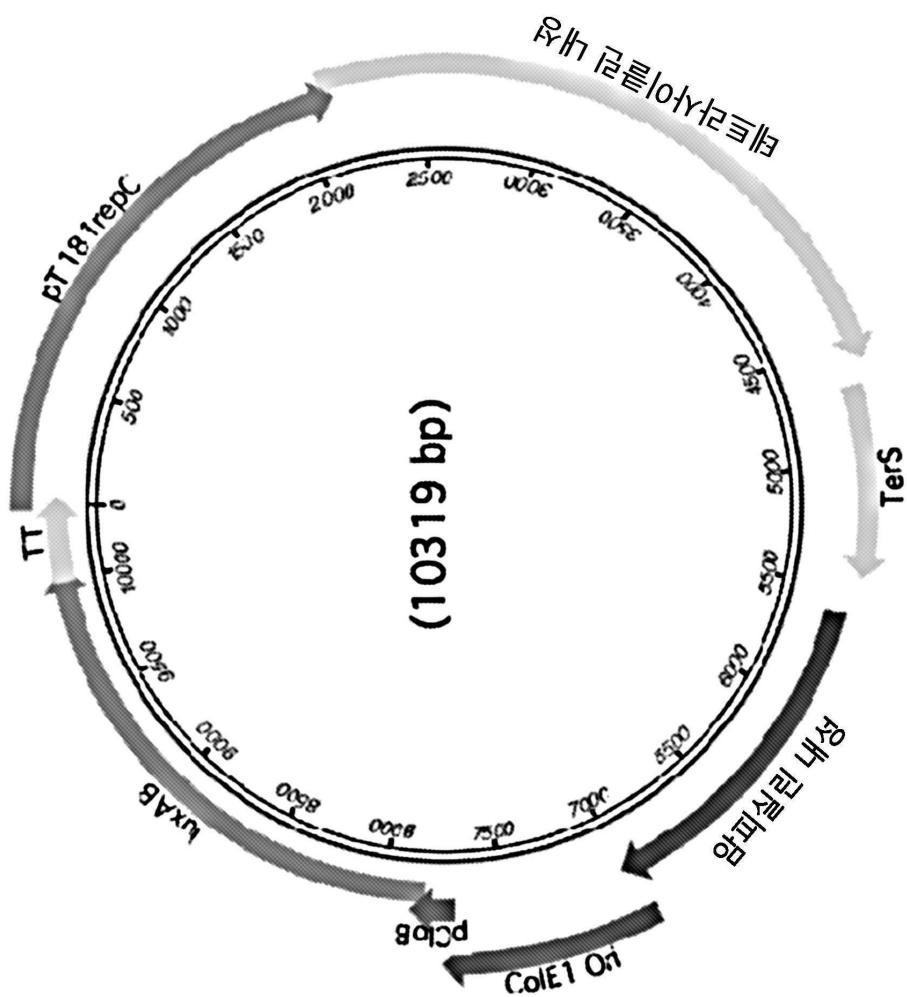
도면2



도면3

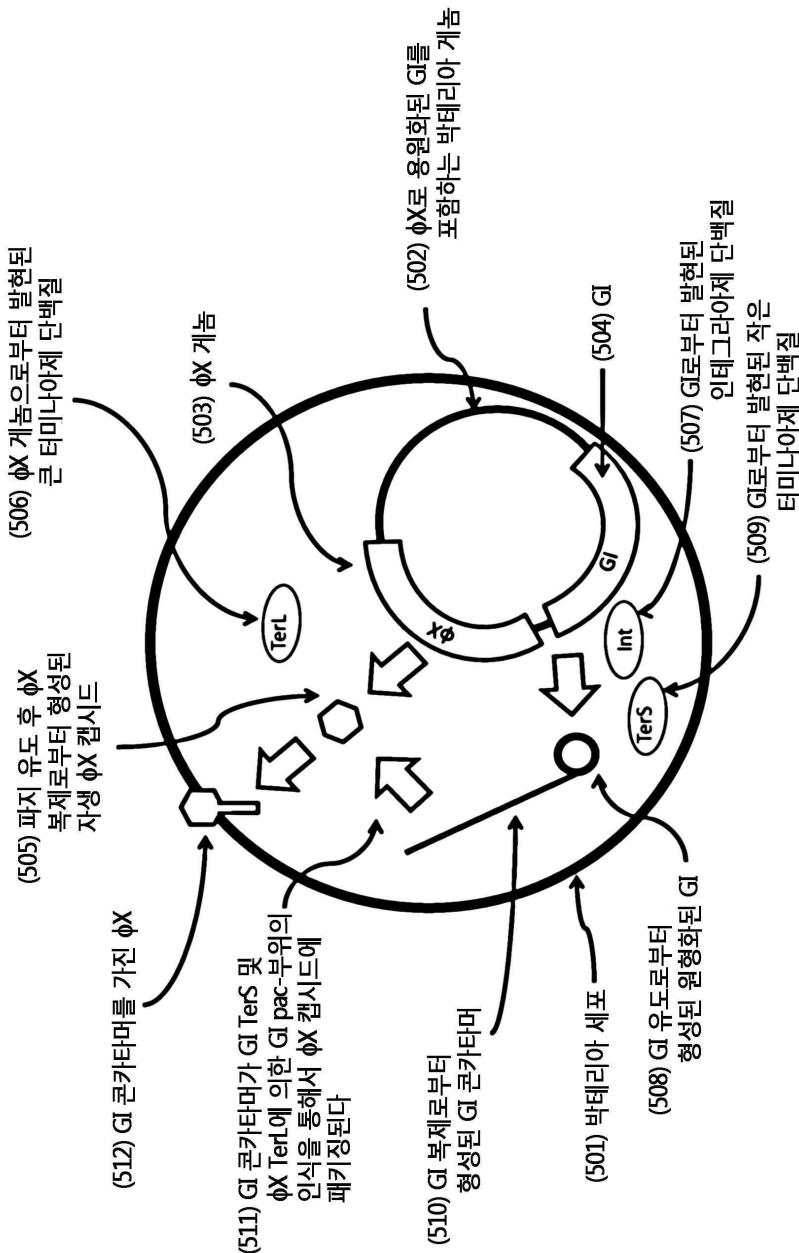


도면4



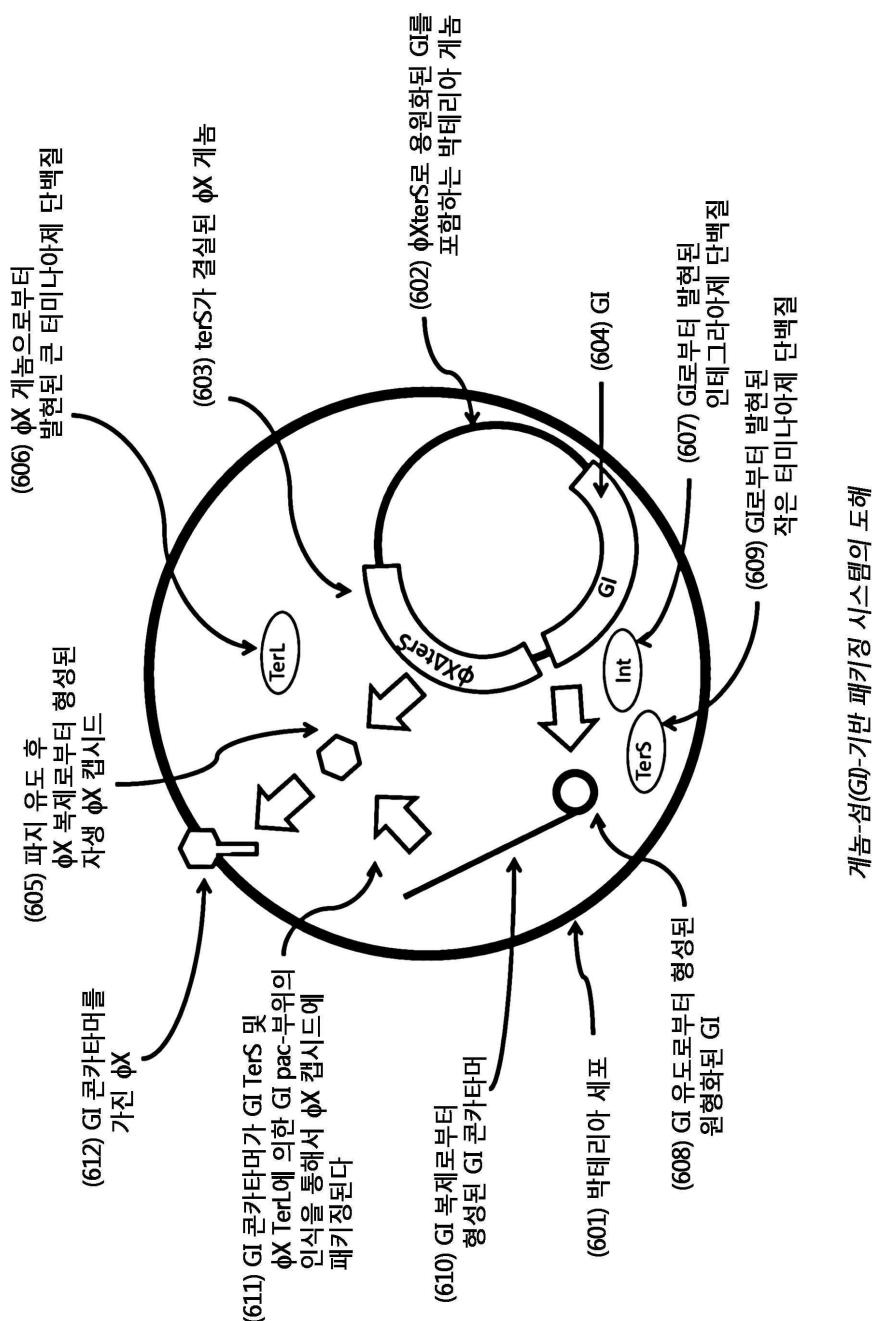
pGW80A0001의 도해

도면5



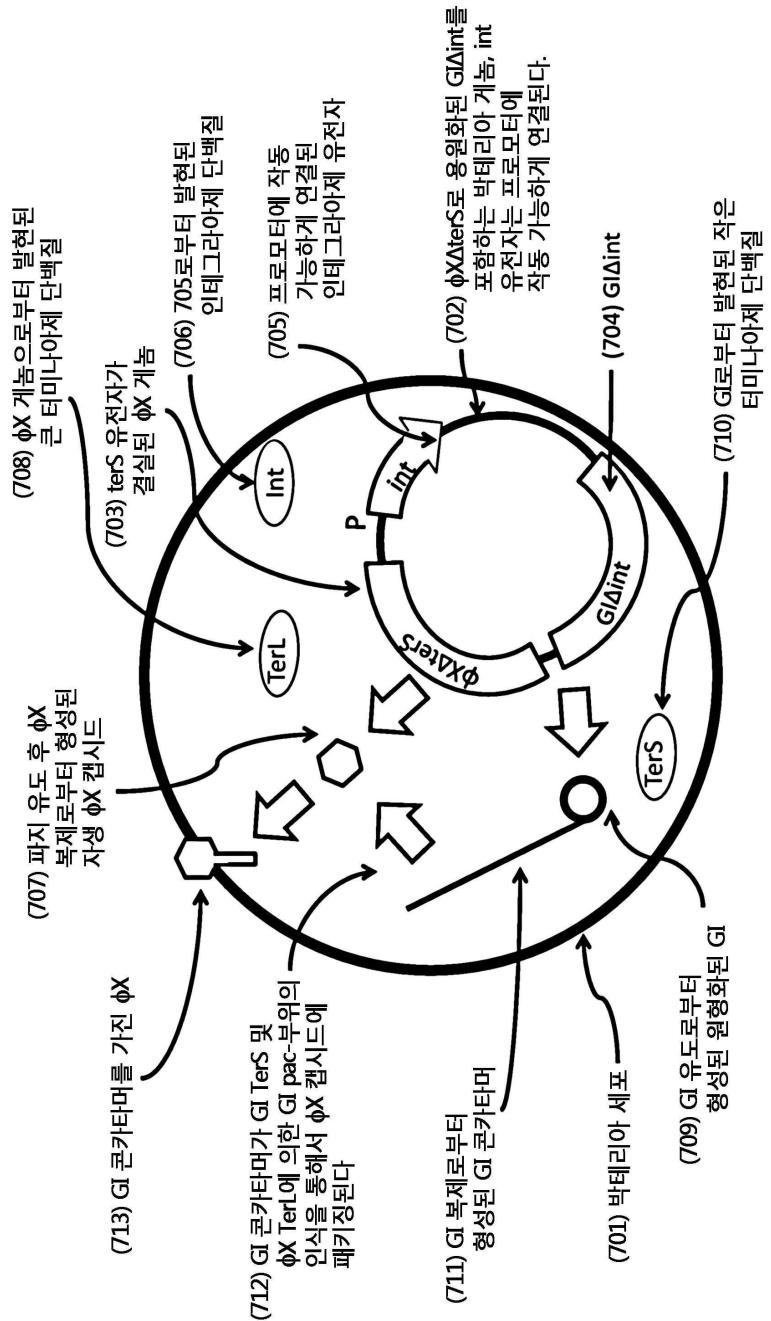
자연적 개념-섬 패키징 시스템의 도해 (500)

도면6

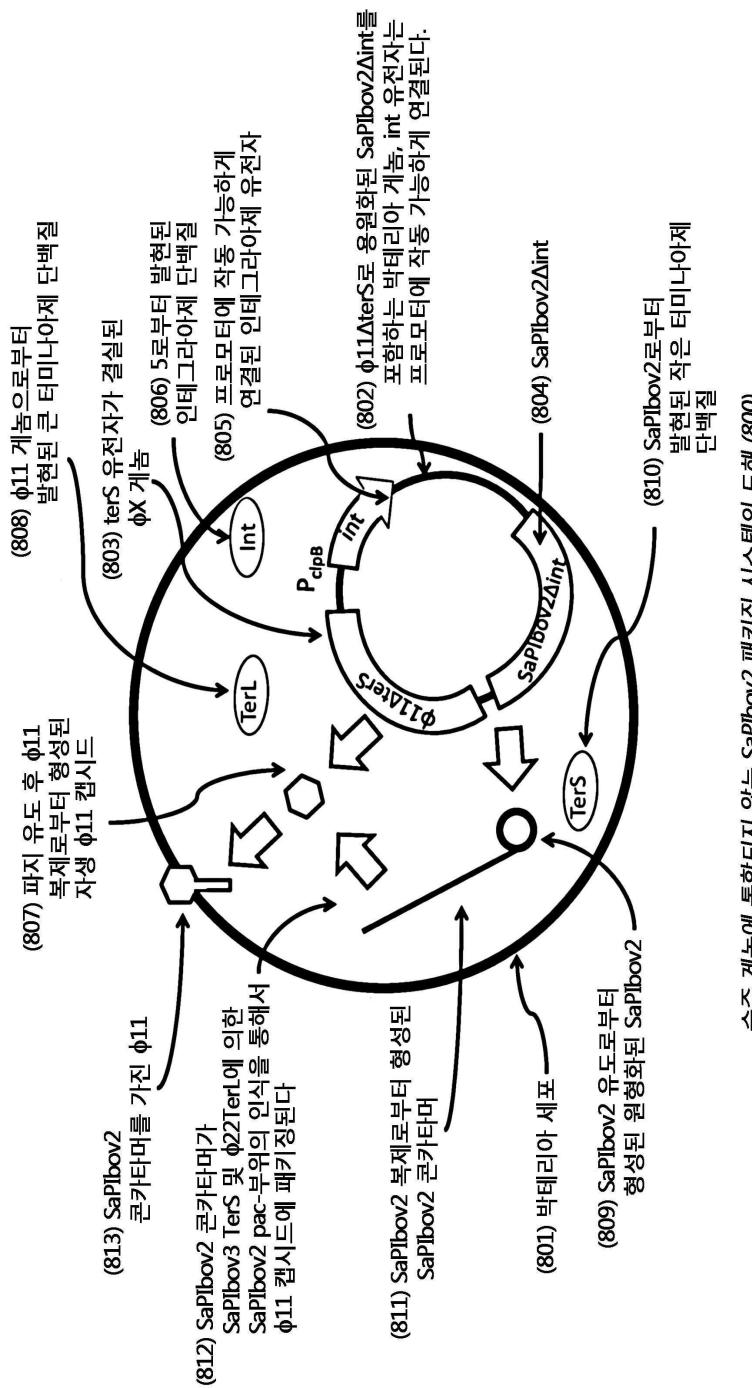


제작-섬(GI)-기반 패키징 시스템의 도해

도면7

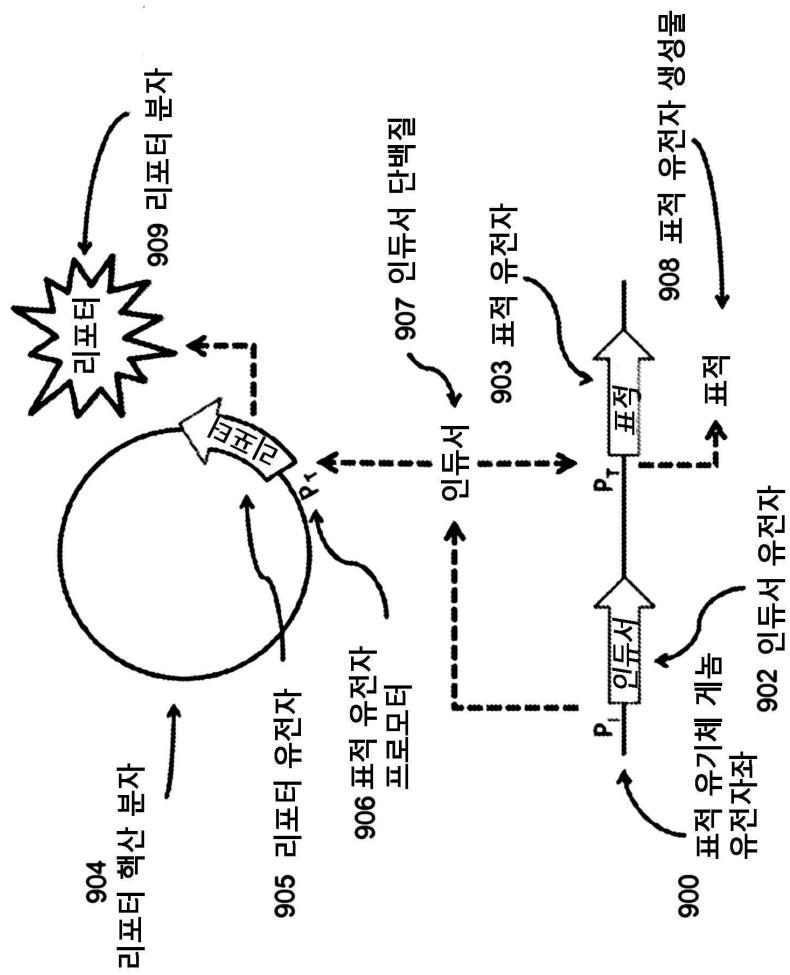


도면 8

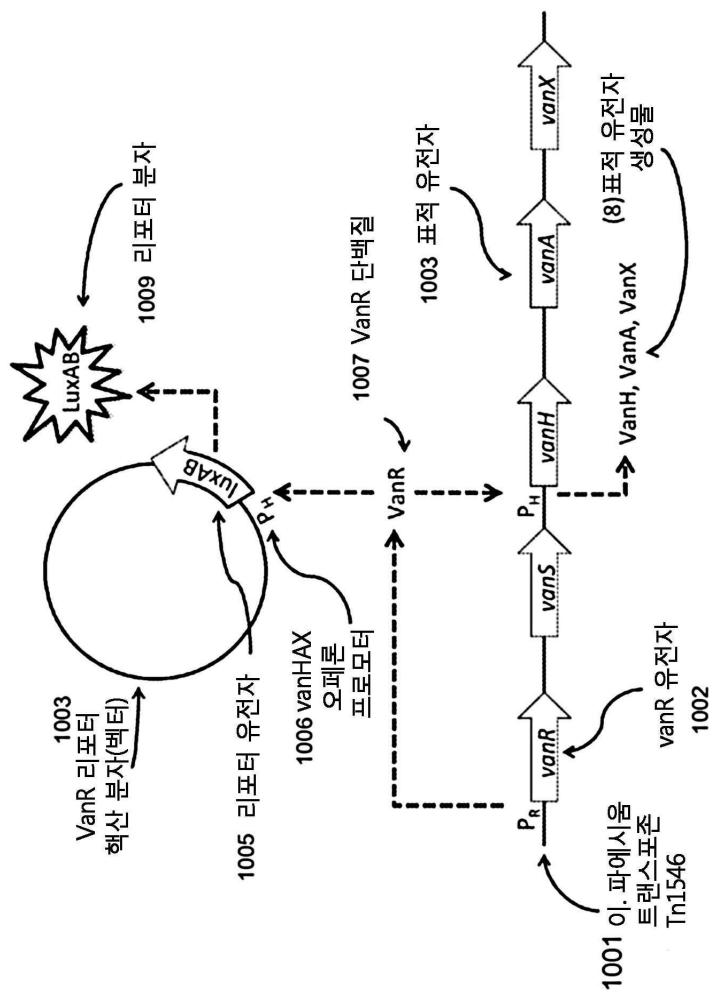


숙주 계놈에 통합되지 않는 SaPIbov2 패키징 시스템의 도해 (80)

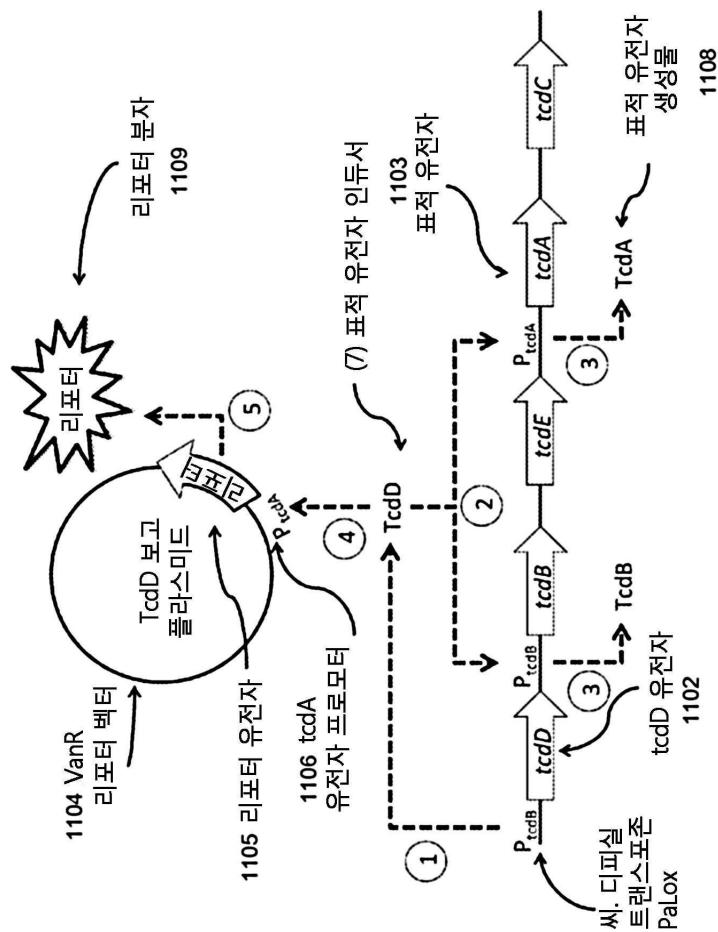
도면9



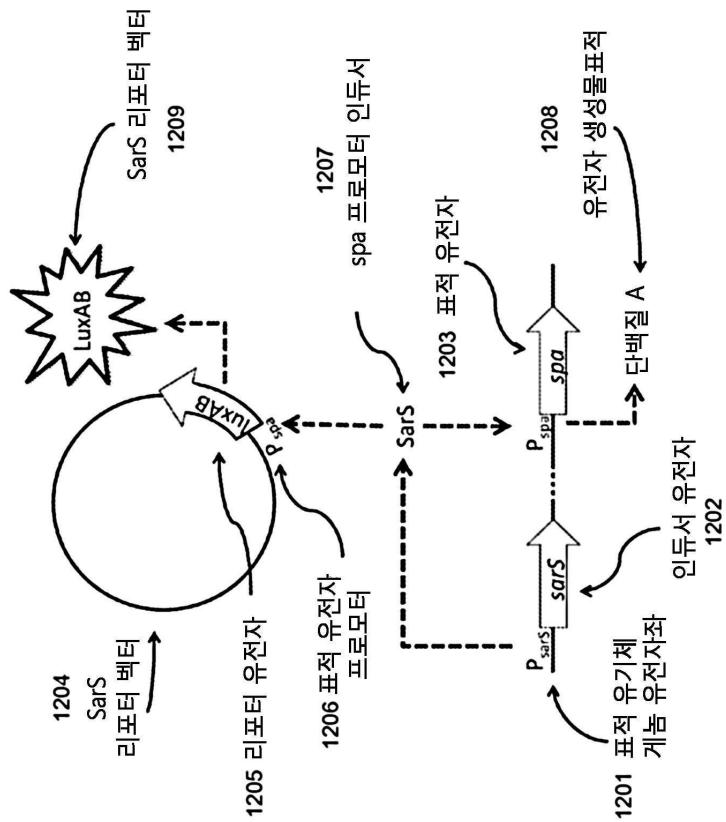
도면 10



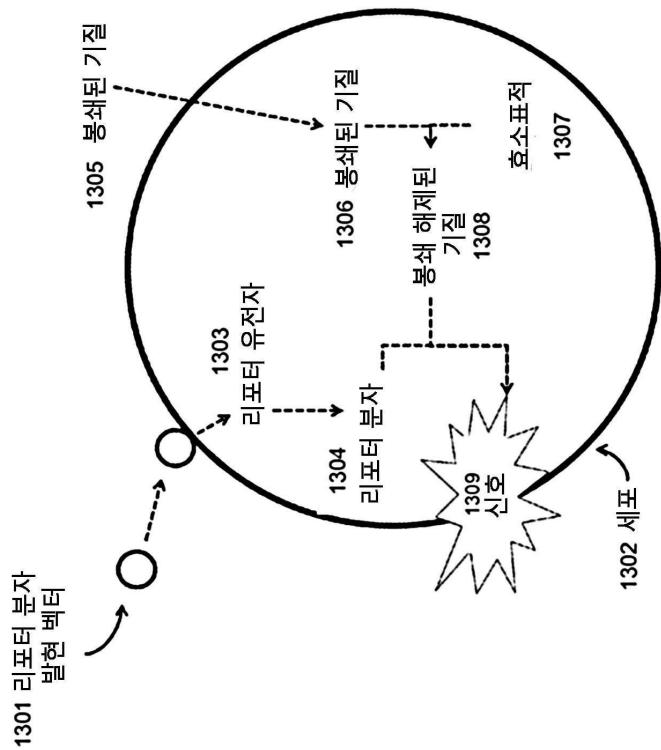
도면 11



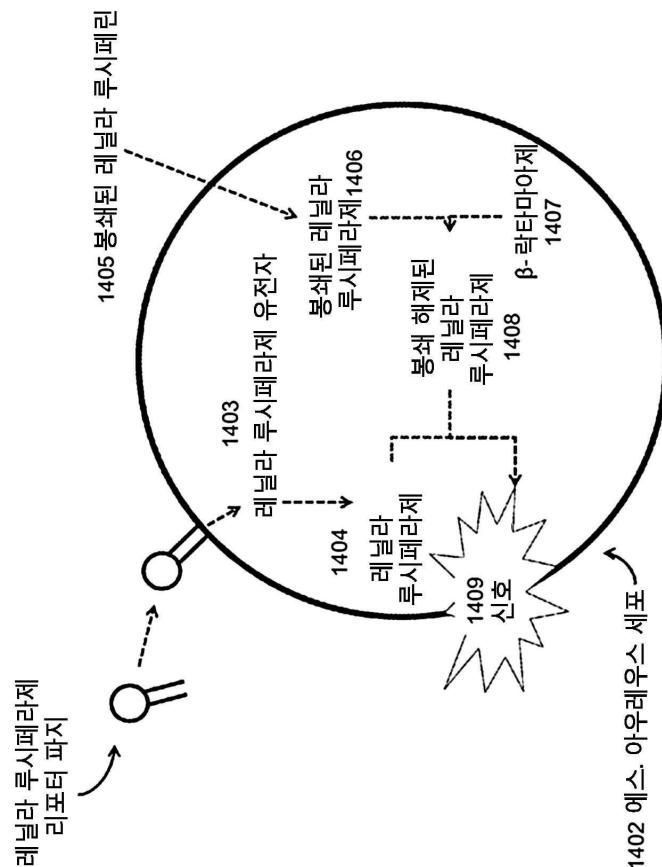
도면12



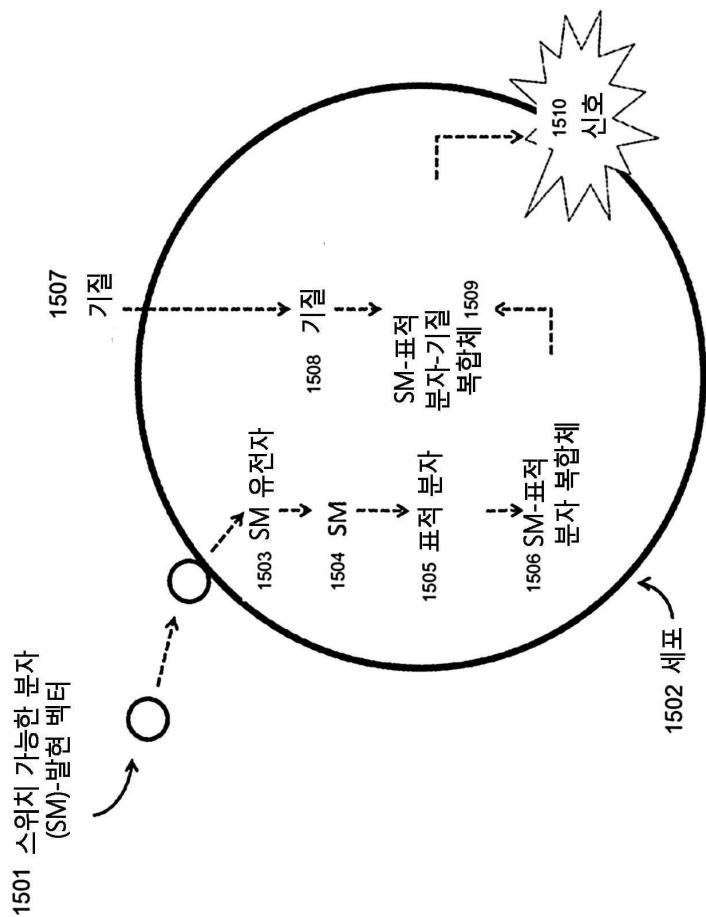
도면 13



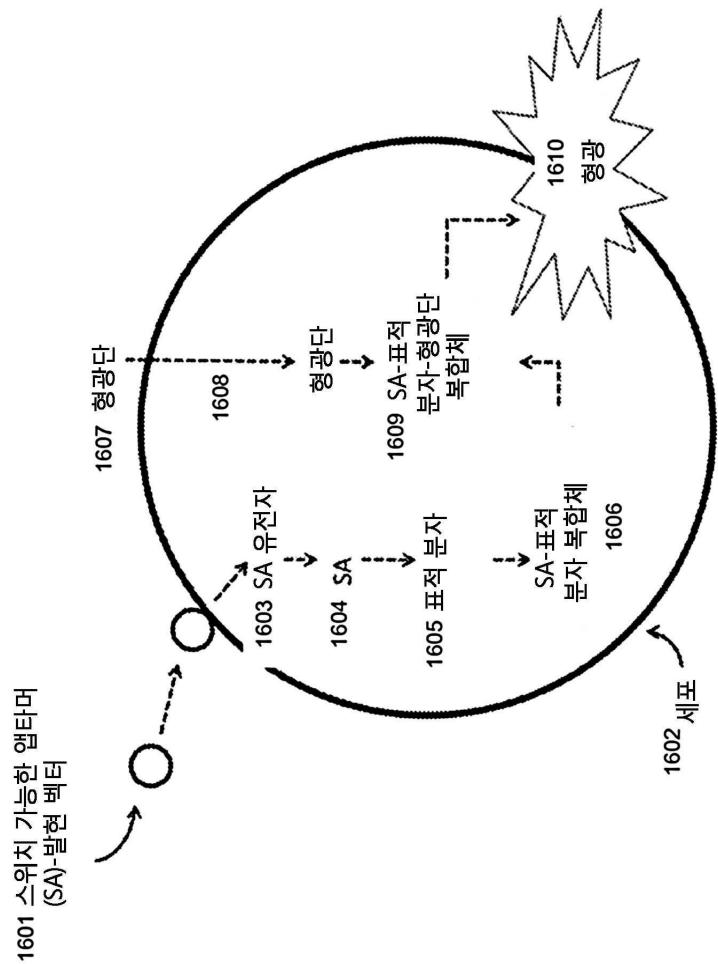
도면 14



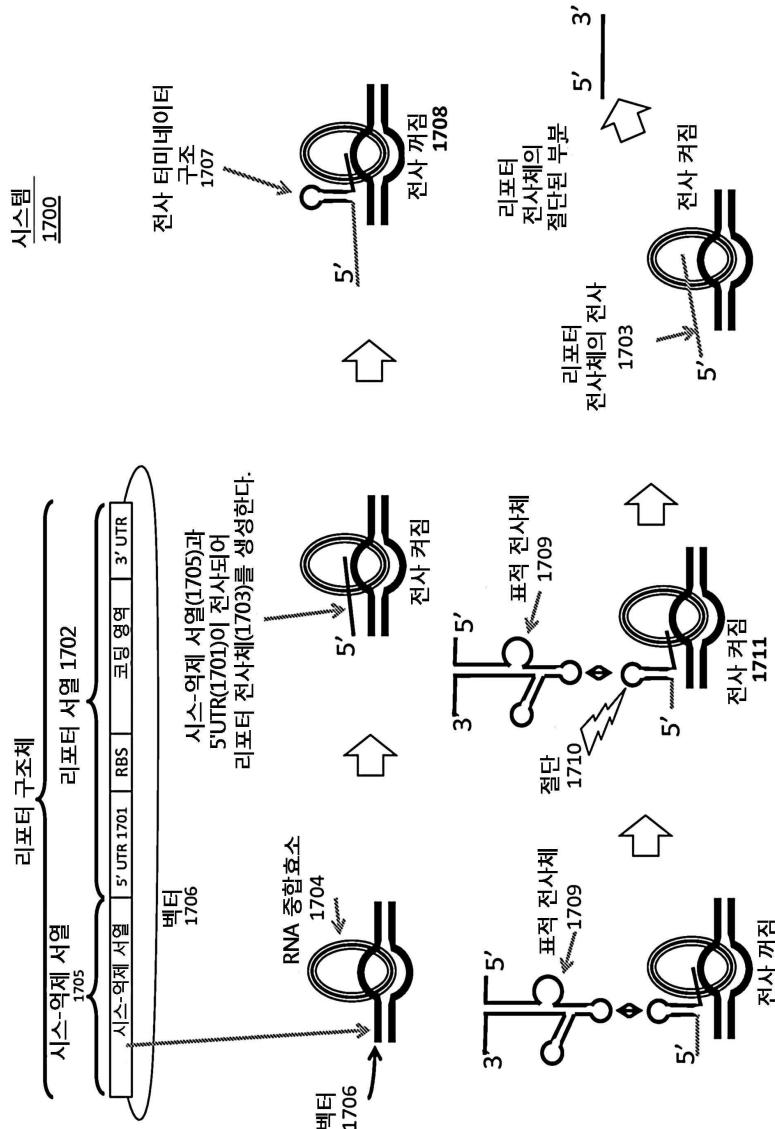
도면 15



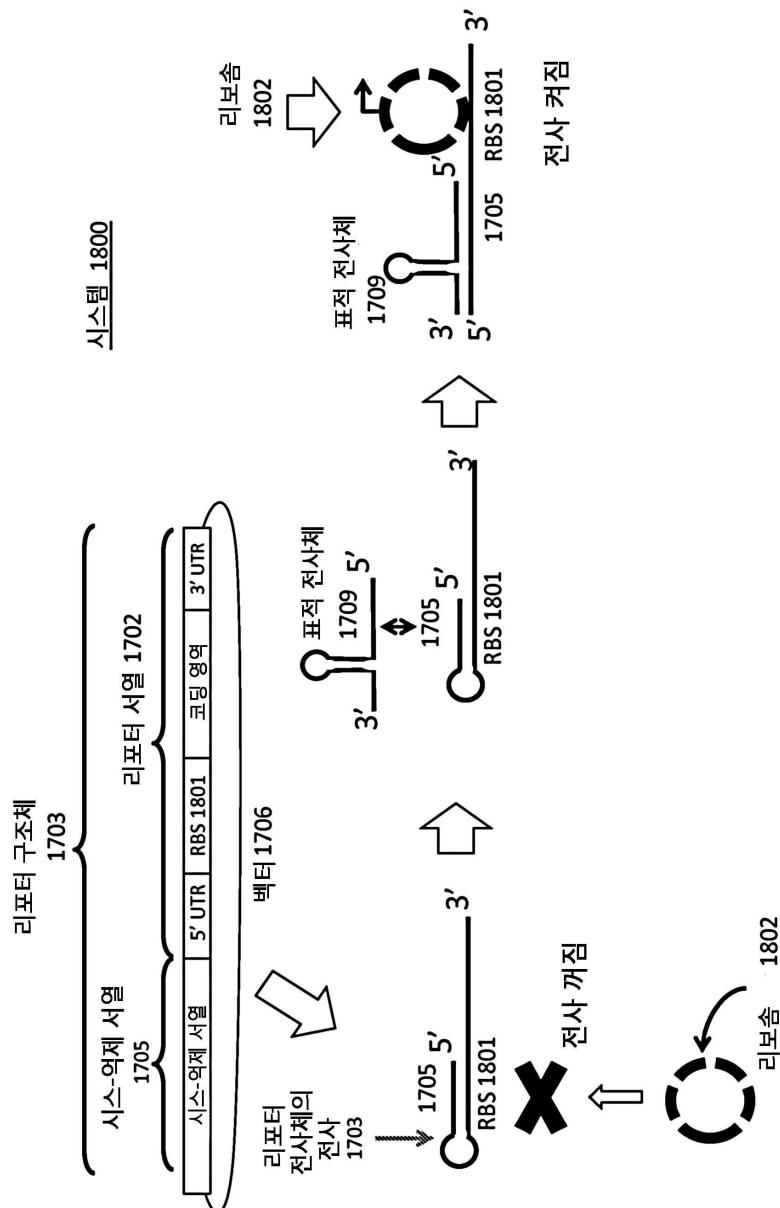
도면 16



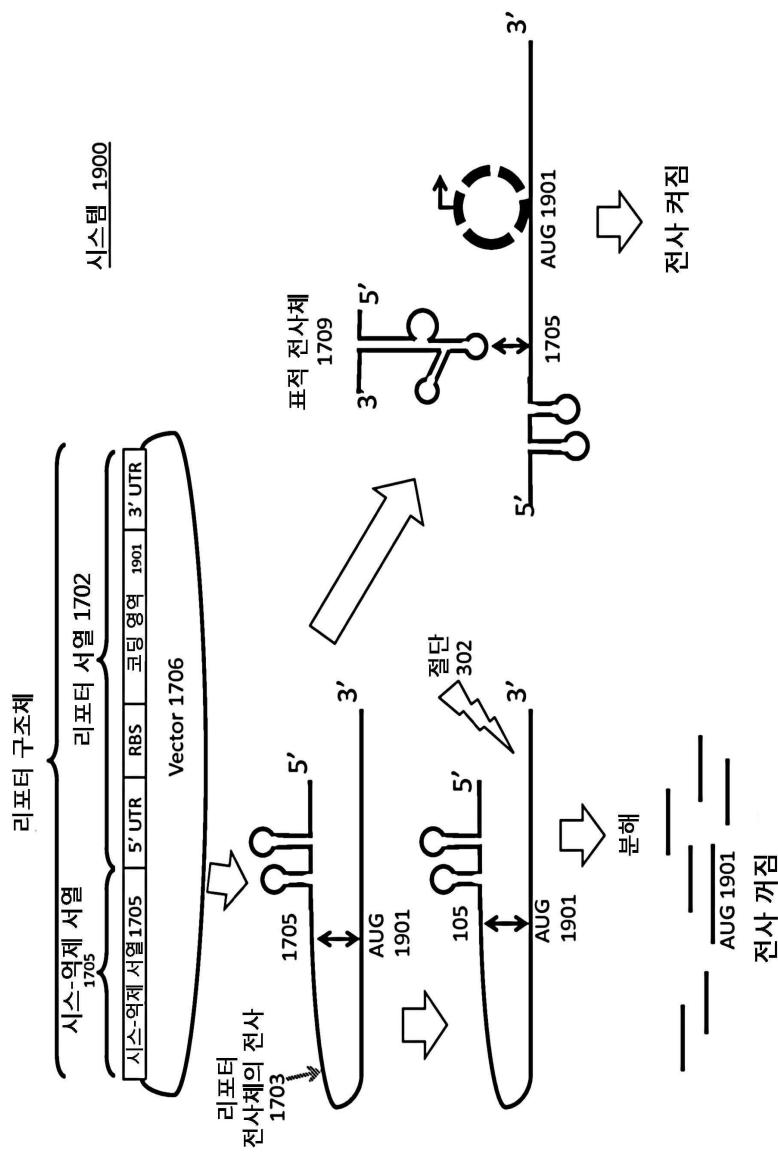
도면17



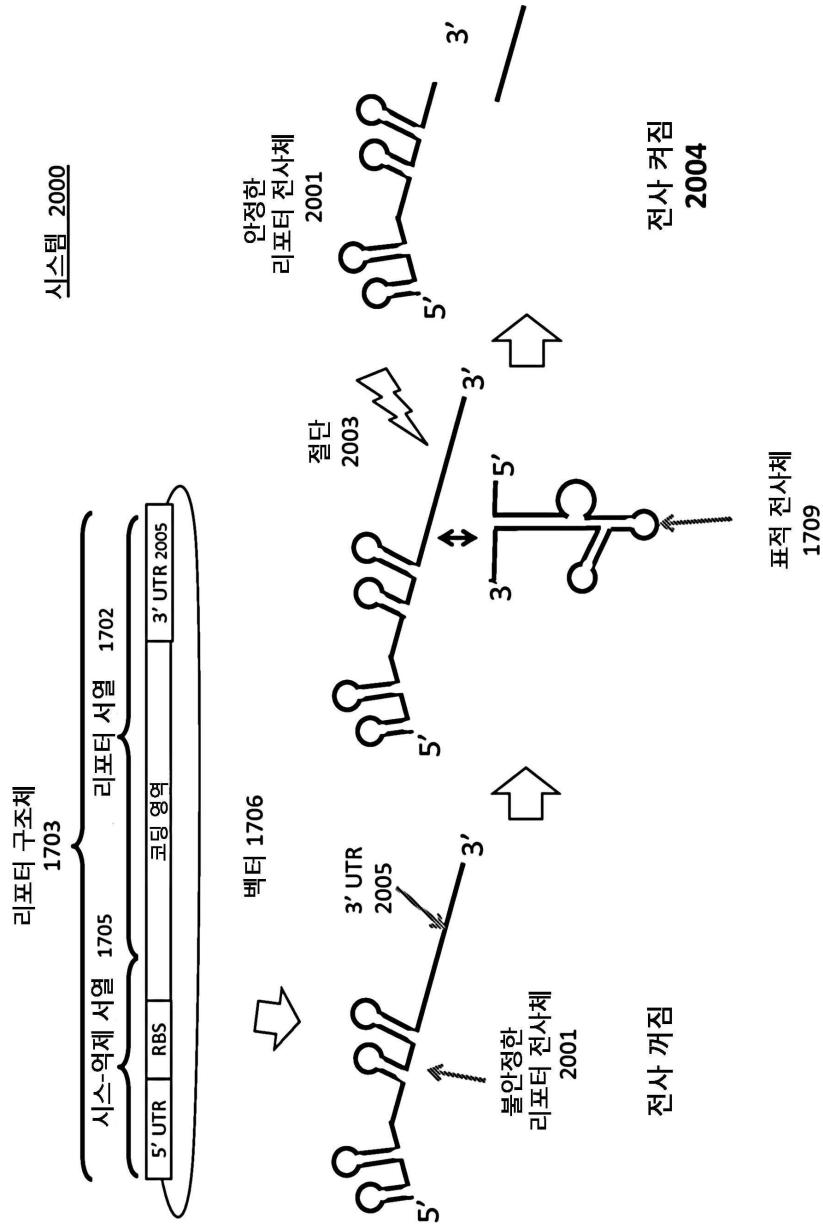
도면 18



도면 19



도면20



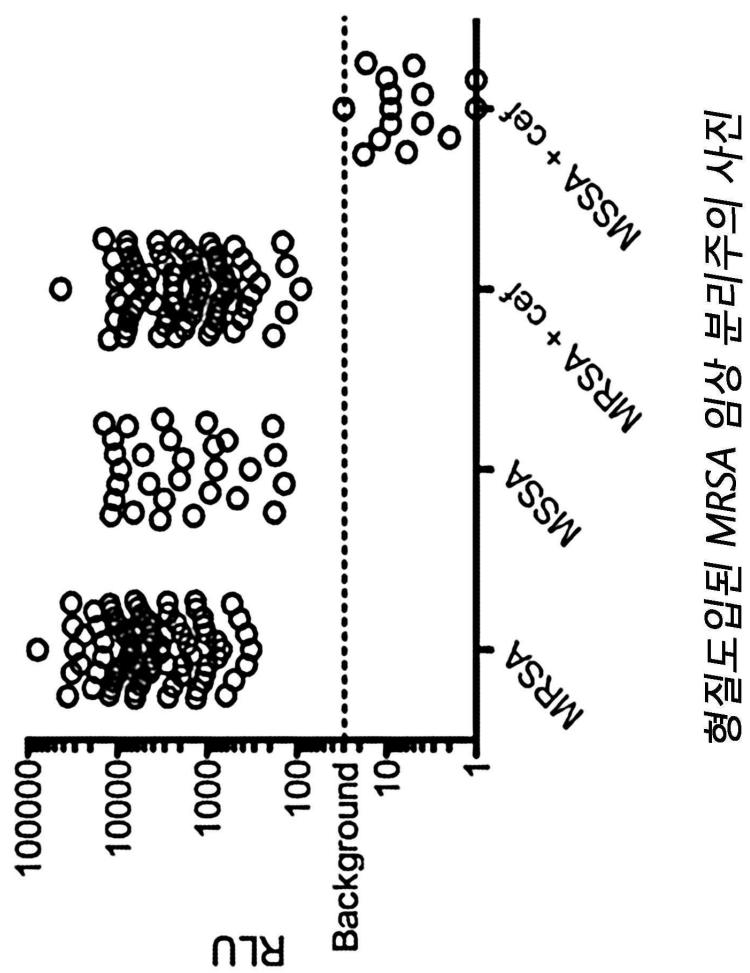
도면21



S33-72

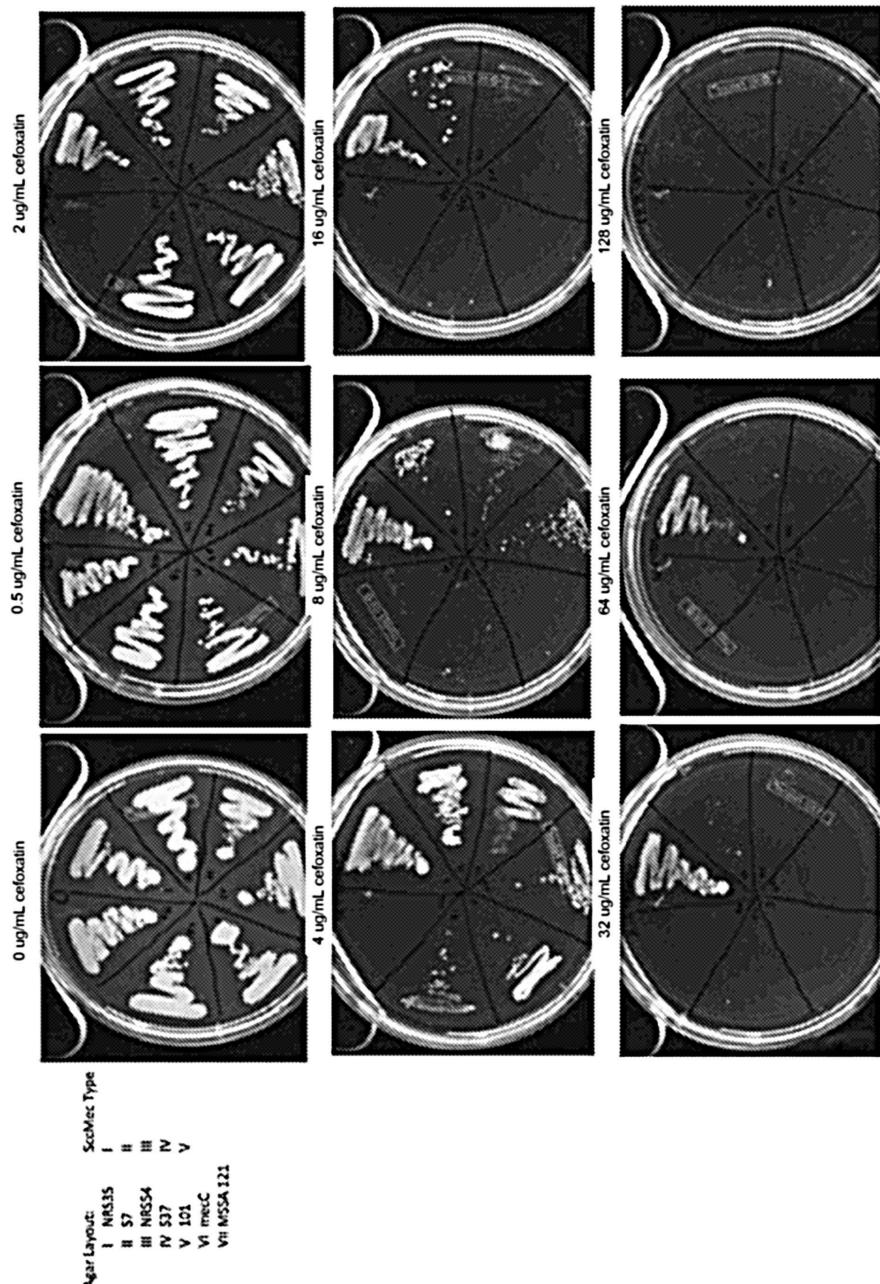
형질도입된 MRSA 임상 분리주의 사진

도면22

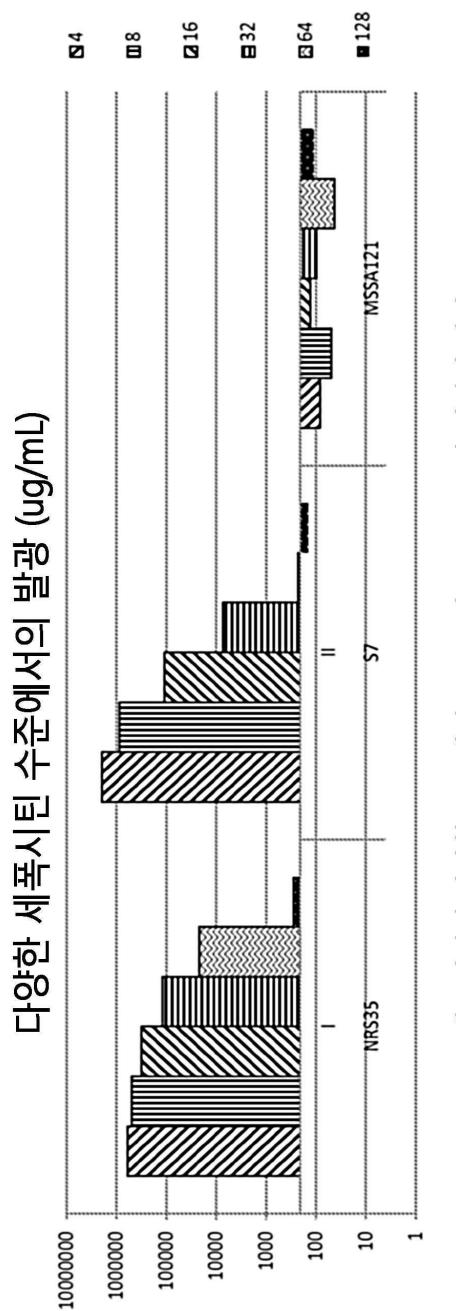


형질도입된 MRSA 임상 분리주의 사진

도면23

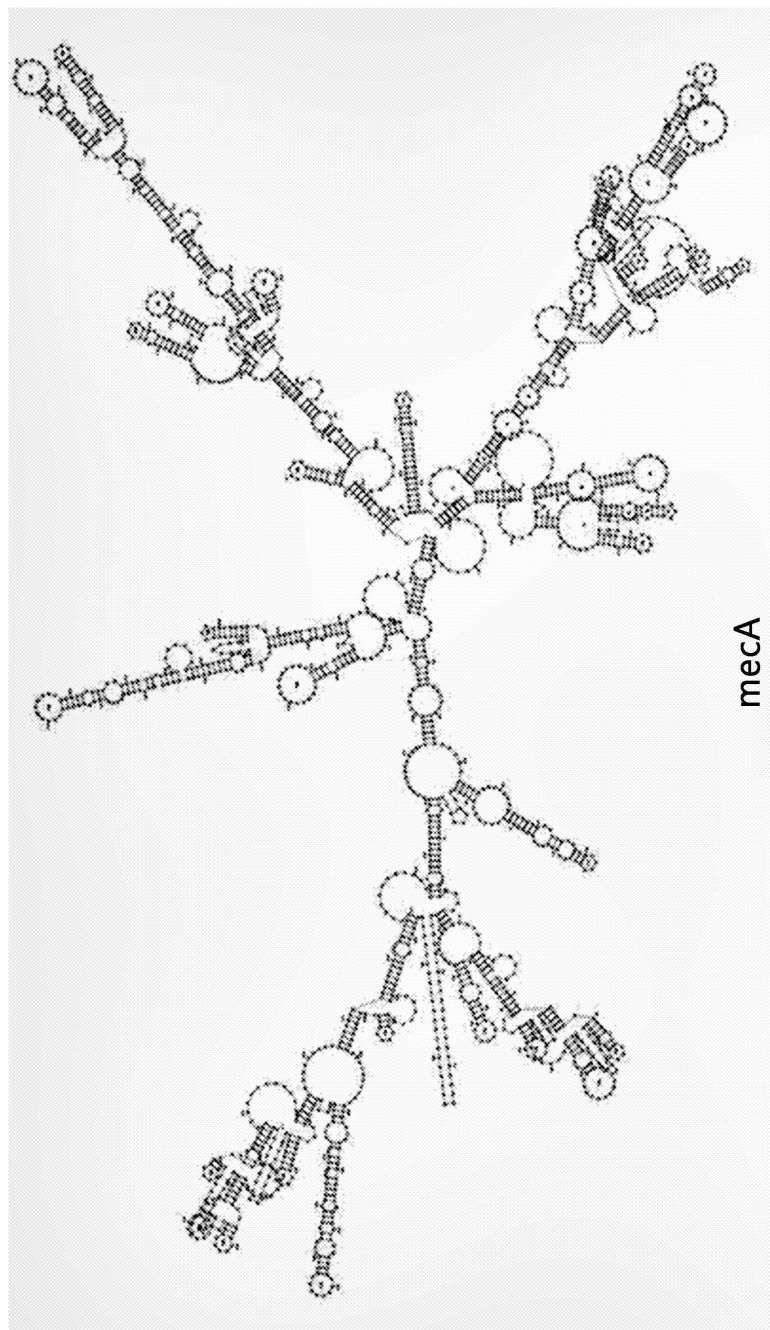


도면24

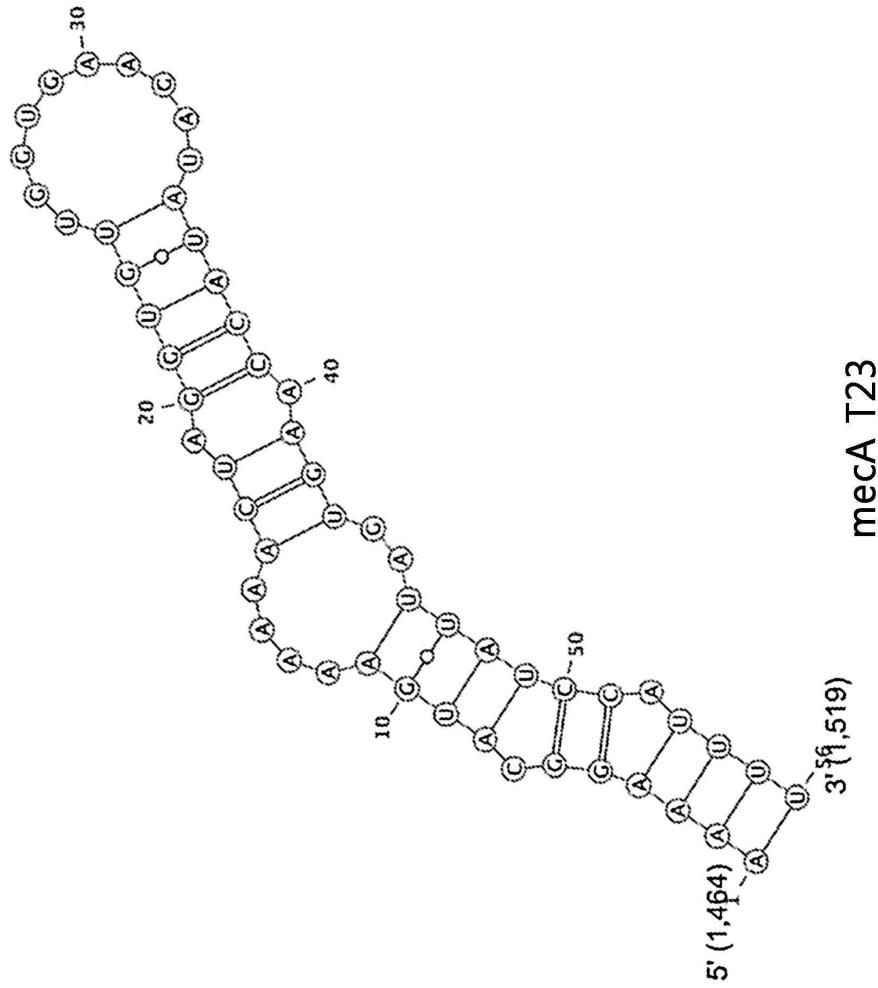


세포시틴의 다양한 농도에서 MRSA 및 MSSA로부터 얻어진 발광

도면25

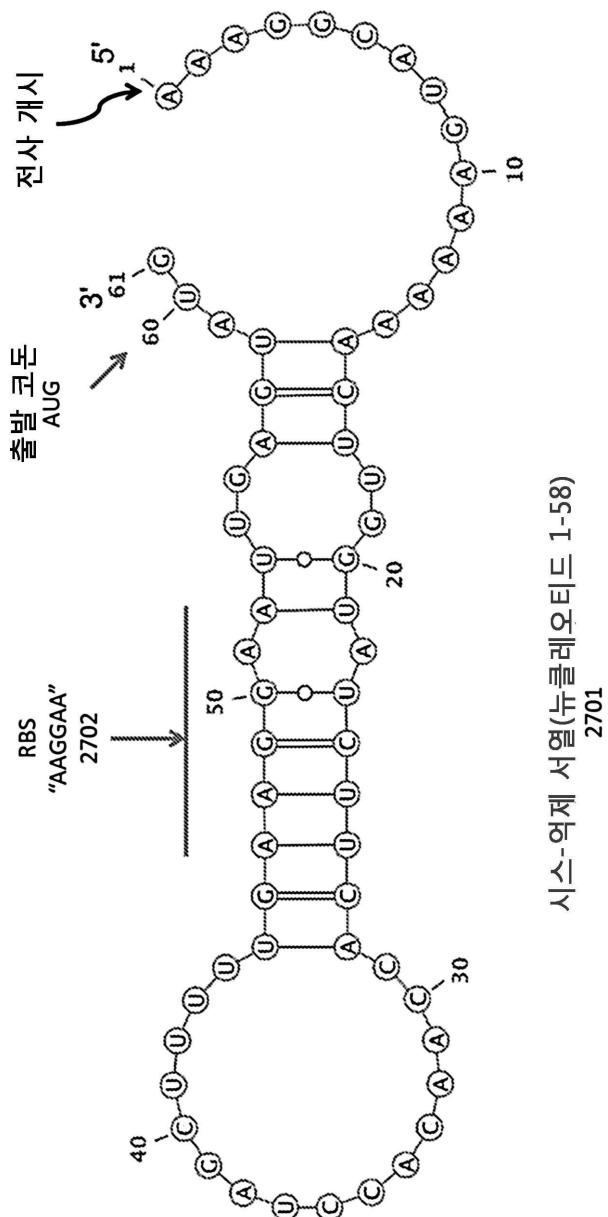


도면26



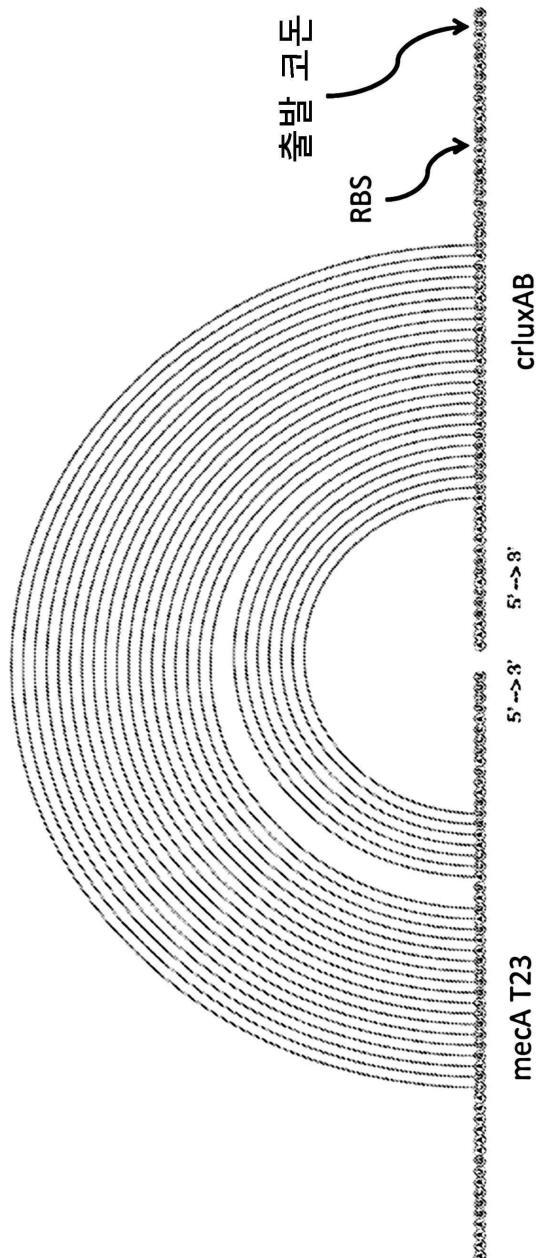
meCA T23

도면27

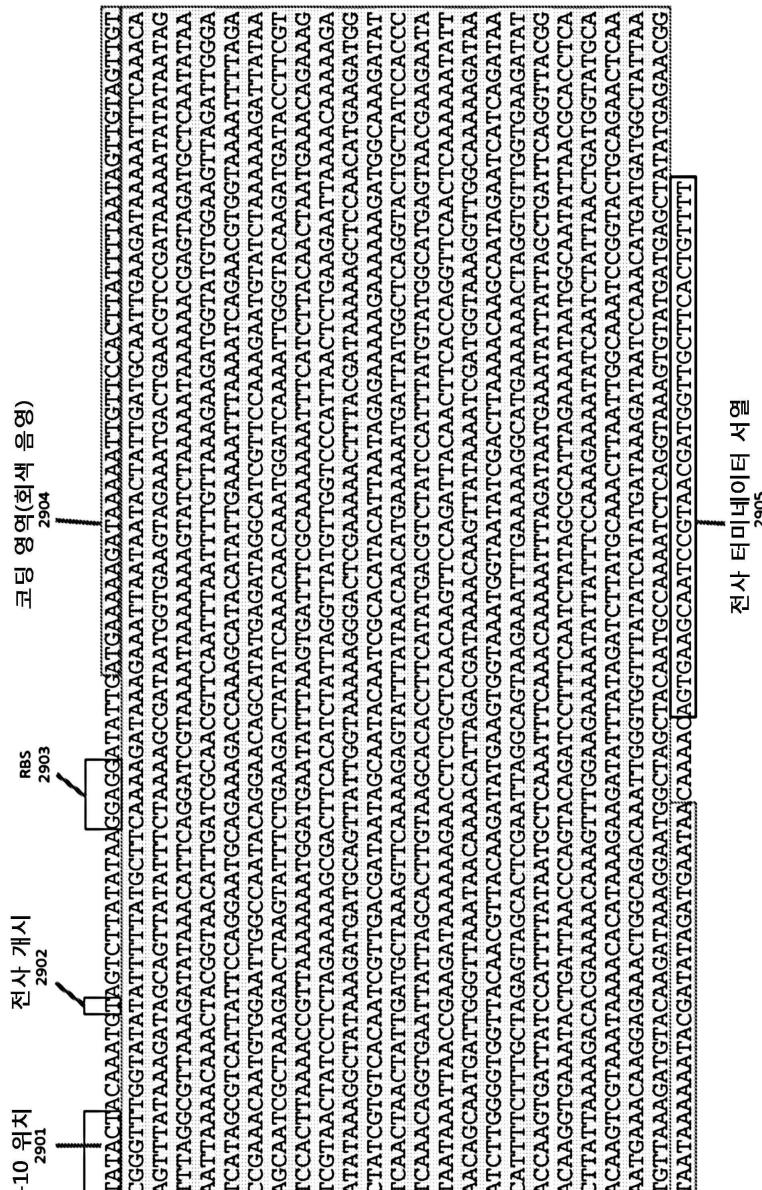


시스-억제 서열(뉴클레오티드 1-58)
2701

도면28



도면 29



전사 터미네이터 서열
2905

도면30

RBS 30001 코딩 서열 3002

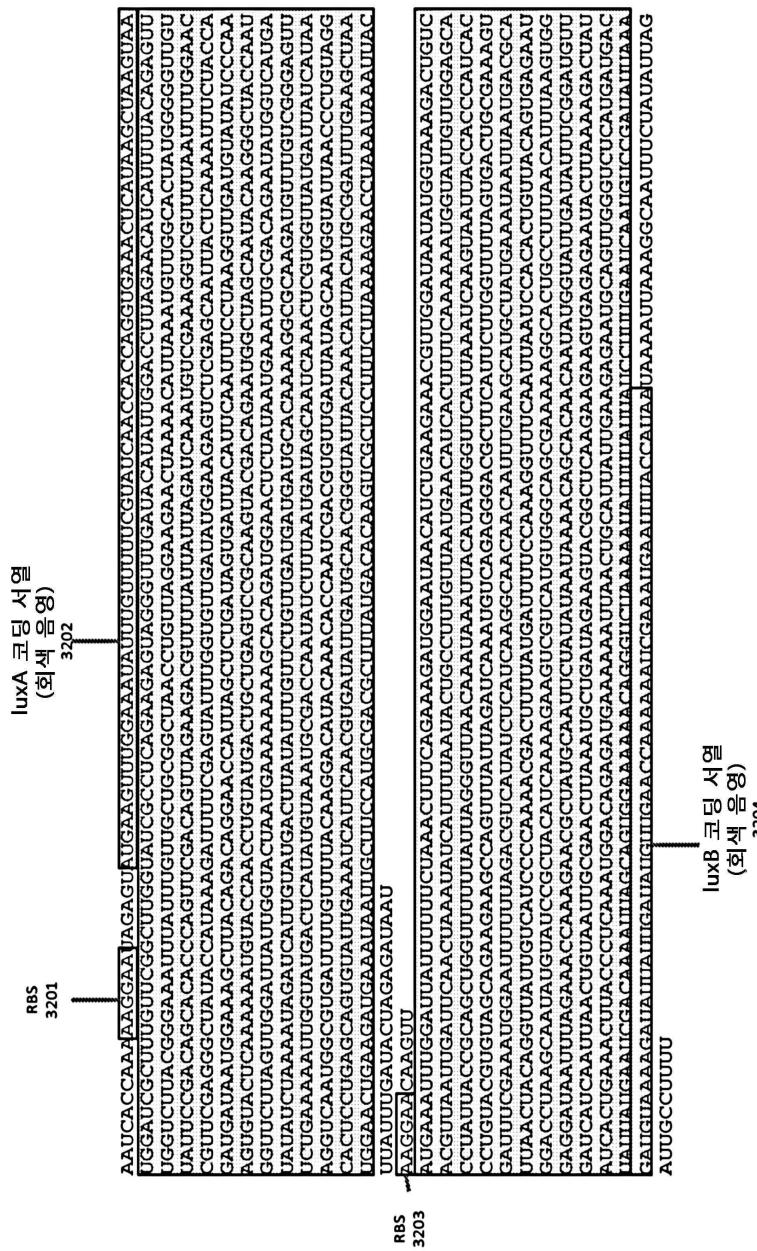
도면31

luxA 코딩 서열
(호색 음성)

RBS
3103

uxB 코딩 서열
(회색 음성)
3106

도면32



도면33

서지-액자 서열 전서

三

luxA 코딩 서열(호색 음정)

三

885

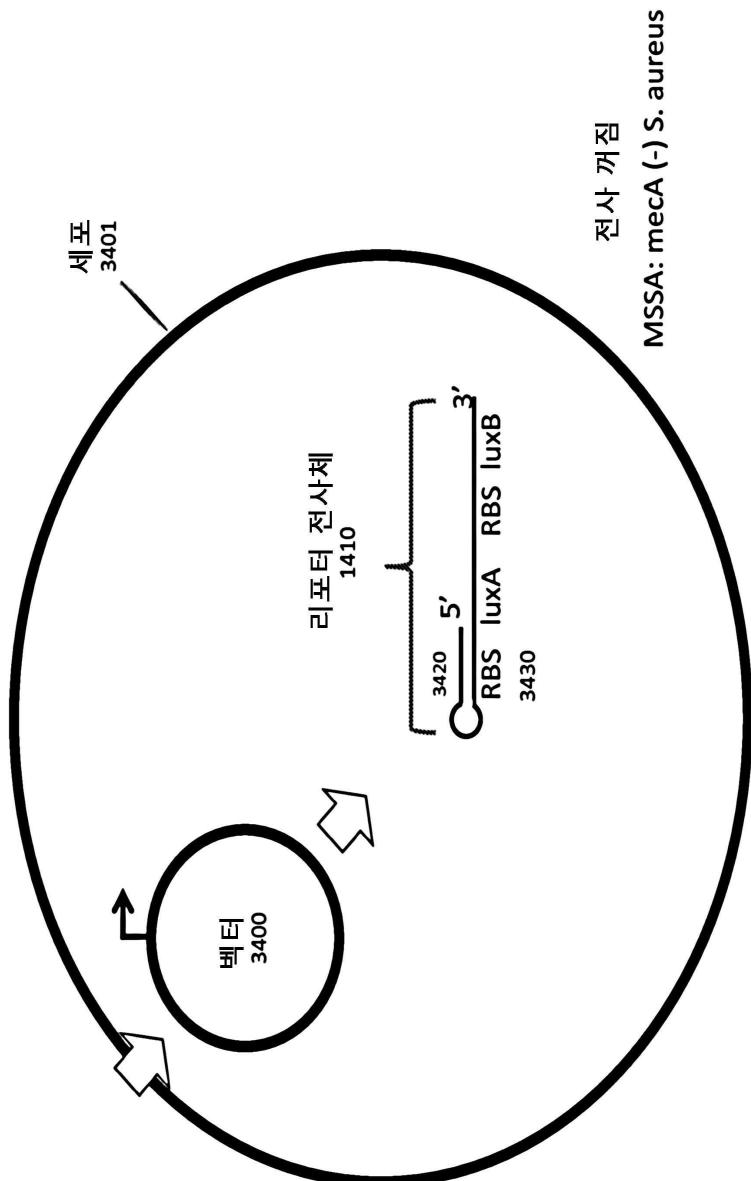
RB

III B 쿠딩 서역(호색 을 놀)

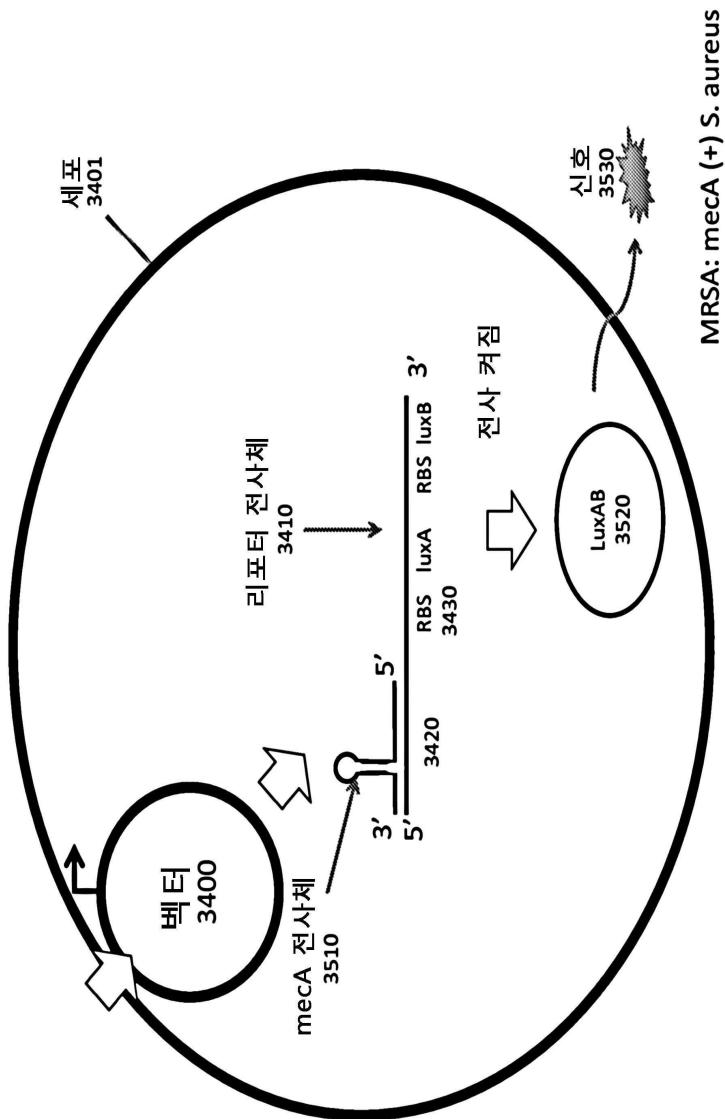
303

- 107 -

도면 34



도면35



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENEWEAVE BIOSCIENCES, INC.

<120> NON-REPLICATIVE TRANSDUCTION PARTICLES AND TRANSDUCTION

PARTICLE-BASED REPORTER SYSTEMS

<130> 28421-25938/PCT

<140> PCT/US2014/026536

<141> 2014-03-13

<150> 61/939,126

<151> 2014-02-12

<150> 61/897,040

<151> 2013-10-29

<150> 61/779,177

<151> 2013-03-13

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 177

<212> DNA

<213> Enterobacteria phage P1

<400> 1

ccactaaaaa gcatgatcat tgcgttctt aatgtcaac atgcaggta tcacattgc	60
---	----

gctgaaatag cgaaaaaca aagagttaat gccgttgtca gtgccgcgt cgagaatgc	120
--	-----

aagcgccaaa ataagcgcat aaatgtcgt tcagatgtc atgacgttat caccgc	177
---	-----

<210> 2

<211> 177

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 2

ccactaaaaa gcatgataat agaccactt aacgaccaac atgcaggga gcacattgc	60
--	----

gctgaaatag cgaaaaagca gagggtaat gccgttgtca gtgccgcgt cgagaatgc	120
--	-----

aagcgccaaa ataagcgcat aaacgaccgt tcagacgacc atgacgttat taccgc	177
---	-----

<210> 3

<211> 1727

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 3

cactataggg cgaattggcg gaaggccgtc aaggccgtat ttggccggcg cgcggat	60
--	----

cccgtagctc tagactggca ggttctgag cagatgtcc aaccgtatct ggatcgggtc	120
---	-----

agaaaaattt gctctaataa attcgaaaa ctaagtcaa agaatcacca ttgcggatgt	180
gtgattgaag gttgatgcaa atttgagaa aaaatgcaac aaacattcaa tgcggatatg	240
aatatatcaa acttcatca aatgtcgat cttcaacca ctgtccgt tatttgtgt	300
gttgaattt cgaccgaccg cgctggccgt tacaacctt atgcttaca cagagcgac	360
ggactcggtg cccataaagc gccagctaa tggtaagaa cgctgtcagc taaacagctc	420
atcgaagac ttgaaaaaga aactatgcag aattgcatag ttgcgttac aagcaatgga	480
agcaggattt cttaacgac tcgtataacc ggcaaaaggc agcagtggct gatgaagcga	540
ttgcgttgcg ctgggtgtc ggtacctgtc gcggcaacgc gctaacagac gtgtaaagaa	600
ccaccagcat tgaatgctg gctaaagtc ctttcgtag ctgtataacg atgagcgatt	660
ttacttttc tggctatgaa ttggcctgtc ttgtacaca ctccgtcta tcccgtagcg	720
ccggcataat cctgtcgaa tgtgcaaattc tcgcggcaac aaccagtgaa tacttcatc	780
acaaggctca ccgcctgatc gcggcagaaa ctggttatag ccaatcaacc gtcgttgcgt	840
cattccgtga agctgtaaac aaaggaattc tgtctgtaga gattgttatac ggcgtatacc	900
gtgaacgtcg cgtaaacctg taccgttta caccatcctt ttggccttc gcacaacaag	960
ccaaaaatgc gctgatagaa agcaaattaa agatctttc agcggcaacc aaggttaag	1020
ctgttctgc taagacattt gctttatata atttttatac cacacccca tgtcaaaatg	1080
atacccctc cccctgtcag gatgacgtgg caataaagaa taagaagtca caagttaaaa	1140
aaacaaaaag atcgtttcc ggccgtgcgg gaacaaccag cctcaaaaaa ttgacttcat	1200
ggatcgtaa ggcaaaagca aaggctgaca atctgcgtt atccaaaaaa cgcactcaaa	1260
aacatgagtt caagcagaaa gtagaggcgg ctgcgcggaa atatgcttac ctgaagaaca	1320
agcgttgcg tgatattggc gggatataaa acttcgataa cttaccgtt tgcatgacgg	1380
taaacgaagc tcttaatgct gtttagcca aaaataaaga taacgaacaa tgggttatac	1440
cgccaggattt cagaggtaa tgaattgtc taattataac catgcataact ttcaacacct	1500
ctagttgcc atgaggcaaa ctcatacgatc ttctggtaag aggacactgt tgccaaaact	1560
ggacccccca ttattgcaat taataaaca ctaacggaca attctaccta acaataagt	1620
gcttaaaaaa acccgccccg gcgggttttt ttatctagag ctgcggatc cggcgcccg	1680
ggcccttcgt ggccctcatgg gccttcgtc cactgcccgc ttccag	1727
<210> 4	
<211> 131	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 4

cgtcaggtagtgg cacttttcgg gaaatgtgcg cggaaccctt atttgtttat tttctaaata	60
cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatattga	120

aaaggaagag t	131
--------------	-----

<210> 5

<211> 4681

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<220><221> modified_base

<222> (301)..(301)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<220><221> modified_base

<222> (4056)..(4056)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 5

tttgcggaaa gagttagtaa gttaacagaa gacgagccaa acctaattgg ttttagcagga	60
aacttagata aaaaaatgaa tccagaatta tattcagaac aggaacagca acaagagcaa	120

caaaagaatc aaaaacgaga tagaggtatg cacttataga acatgcattt atgccgagaa	180
---	-----

aacttattgg ttggaatggg ctatgttta gctaacttgt tagcgagttt gttggacttg	240
--	-----

aattgggatt aatcccaaga aagtaccggc tcaacaaccc ataaaggccct gtaggttccg	300
--	-----

nccaataagg aaattggaat aaagcaataa aaggagttga agaaatgaaa ttcagagaag	360
---	-----

ccttgagaa tttataaca agtaagtatg tacttggtt ttttagtagtc ttaactgttt	420
---	-----

accagataat acaaatgctt aaataaaaaa agacttgatc tgattagacc aaatctttt	480
--	-----

atagtgttat attaataaca aaataaaaag gagtcgctca cgcctacca aagtttgtga	540
--	-----

acgacatcat tcaaagaaaa aaacactgag ttgttttat aatcttgtat attagatat	600
---	-----

taaacgatat ttaaatatac atcaagatat atattgggt gagcgattac ttaaacgaaa	660
--	-----

ttgagattaa ggagtcgatt tttatgtat aaaaacaatc atgcaaatca ttcaaatcat	720
--	-----

ttggaaaatc acgattttaga caattttct aaaaccggct actctaatacg ccggttggac	780
--	-----

gcacatactg tgtcatatc tgatccaaa ttaagtttgc atgcaatgac gatcggttggaa	840
aatctcaacc gagacaacgc tcaggccctt tctaatttttg tgagtgttaga gccccaaata	900
agactttggg atattcttca aacaaagttt aaagctaaag cacttcaaga aaaagtttat	960
attgaatatg acaaagtgaa agcagatagt tggatagac gtaatatgcg tattgaattt	1020
aatccaaaca aacttacacg agatgaaatg atttggttaa aacaaaatat aataagctac	1080
atggaagatg acggttttac aagatttagat ttgccttg attttgaaga tgatttgagt	1140
gactactatg caatgtctga taaagcagtt aagaaaacta tttttatgg tcgtaatgg	1200
aagccagaaa caaaatattt tggcgtgaga gatagtaata gatttattag aatttataat	1260
aaaaagcaag aacgtaaaga taatgcagat gctgaagtta tgctgaaca tttatggcgt	1320
gtagaaatcg aacttaaaag agatatggtg gattactgga atgattgctt tagtgattta	1380
catacttgc aaccagattt gaaaactatc caacgcactg cgatagagc aatagtttt	1440
atgttattga gtgatgaaga agaatggga aagcttcaca gaaattcttag aacaaaatat	1500
aagaatttga taaaagaaat ttgcgcagtc gatttaacgg acttaatgaa atcgactta	1560
aaagcgaacg aaaaacaatt gaaaaacaa atcgattttt ggcaacatga attttaaattt	1620
tggaaatagt gtacatatta atattactga acaaaaatga tatatttaaa ctattctaat	1680
ttaggaggat tttttatga agtgtctatt taaaatttg gggatttat atgaggtgaa	1740
agaataattt accctataa acttagcca cctcaagtaa agaggtaaaa ttgttttagtt	1800
tatataaaaa atttaaggt ttgtttata gcgtttatt ttggcttgc attcttcatt	1860
tttttagtgt attaaatgaa atggttttaa atgtttctt acctgatatt gcaaattttt	1920
ttaatactac tcctggatt acaaactggg taaacactgc atatatgtta acttttcga	1980
taggaacagc agtataatgga aaattatctg attatataaa tataaaaaaaa ttgttaattt	2040
ttggatttag ttgagctgt ctgggttcat tgattgctt tattggccc acctaggcaa	2100
atatgctctt acgtgttattt atttaagtga ctatataaa ggagtttaata aatatgcggc	2160
aaggattct taaataaact gtcaatttga tagcgggaac aaataatttgc atgtcccttt	2220
ttaggaggc ttagttttt gtacccagtt taagaatacc ttatcatgt gattctaaag	2280
tatccagaga atatctgtat gctttgtata cctatggta tgcataaaaa tcccgatgt	2340
aaaagtattt atcactggga tttttatgcc cttttgggtt tttgaatggaa ggaaaatcac	2400
atgaaaattt ttaatattgg agtttttagct catgttgatg cagaaaaac taccttaaca	2460
gaaagcttat tatataacag tggagcgtt acagaatttttgc gaagcgtgga caaaggtaca	2520
acgaggacgg ataatacgct tttagaacgt cagagggaa ttacaattca gacagggata	2580

accttttc agtggaaaa tacgaaggtg aacatcatag acacgccagg acatatggat	2640
ttcttagcag aagtatatcg ttcattatca gtttagatg gggcaattct actgattct	2700
gcaaaagatg gcgtacaagc acaaactcgat atattatttc atgcacttag gaaaatgggg	2760
attcccacaa tccttttat caataagatt gaccaaaatg gaattgattt atcaacggtt	2820
tatcaggata ttaaagagaa acttctgcc gaaattgtaa tcaaacagaa ggtagaactg	2880
tatcctaata tgtgtgtgac gaacttacc gaatctgaac aatggatac ggtaatagag	2940
gaaacgata acctttaga gaaatatacg tccgtaaat cattagaagc attgaaactc	3000
gaacaagagg aaagcataag attcagaat tgttcttgt tcccttttta tcatgaaatg	3060
gcaaaaagta atataggat tgataacctt atagaagtta ttactaataa attttattca	3120
tcaacacatc gaggtccgtc tgaactttgc ggaaatgtt tcaaattga atatacaaaa	3180
aaaagacaac gtctgcata tatacgctt tatagtggag tactacattt acgagattcg	3240
gttagagttt cagaaaaaga aaaaataaaa gttacagaaa tgtatacttc aataaatgg	3300
gaattatgtt agattgtatag agcttattct ggagaaattt ttatggca aatgagttt	3360
ttgaagttt atagtgttct tggagataca aaactattgc cacagagaaa aaagattgaa	3420
aatccgcacc ctctactaca aacaactgtt gaaccgagta aacctgaaca gagagaaatg	3480
ttgcttgatg ccctttgga aatctcagat agtgatccgc ttctacgata ttacgtggat	3540
tctacgacac atgaaattat actttcttc tttagggaaag tacaatggta agtgattagt	3600
gcactgttgc aagaaaagta tcatgtggag atagaactaa aagagctac agtcattat	3660
atggagagac cgttaaaaaa tgcagaatatt accattcaca tcgaagtgcc gccaaatcct	3720
ttctggcctt ccattggttt atctgtatca ccgcattccgt tggaaagtgg aatgcgtat	3780
gagagctcgg ttctcttgg atacttaat caatcatttc aaaatgcagt tatgaaagg	3840
gtacgctatg gttgcgaaca aggattatg gtttggaaatg tgacggattt taaaatctgt	3900
tttaagtacg gtttatacta tagccctgtt agtactccag cagatttcg gatgttact	3960
cctattgtac tggagcaagc cttagaaaaa gctgaaacag aattgttaga gccatatctt	4020
agtttaaag ttatgcacc acaggaatattt cttcnccgg catataacga tgctccaaa	4080
tattgtgcaa atatcgtaaa tactcaactg aaaaataatg aggtcattat tattggagaa	4140
attcctgctc gatgttattca agattatcgc aatgatttaa cttttttac aaatggcctt	4200
agtgtttgtt tagcagagct aaaaggatatt caggtaacca ctggcaacc tggttgcag	4260
acccgtcgatc taaaatgtcg gatagataaa gtaagatata tggtaataa aataacttag	4320

tgcgtttat gttgttat ataatgggt tcttattaaa taagatgaaa tattcttaa	4380
tatagattt aattaaagt gaaaggagga gattgttatt ataaactaca agtgatatt	4440
gtgtcctatt tgtggaaata aaacaagact acgaaatacg gtggatacta tactaaaaa	4500
tttccctta tacagcccc aatgtaaaga cggaaacttta attaatgttc aaaaaatgaa	4560
tataataaca atcaaagagc cagacgcca gacgcagagc cgataattt gaaaaatgaaa	4620
ctctcatctt atcggctttt ttgtttatc tgaattttac tgacttagcct tcaatatttc	4680
c	4681

<210> 6

211 <211> 1194

<212> DNA

<213> Enterobacteria phage P1

<400> 6

gtgacacctgg acgatcacaa gaagaattt gctgcctgg cgcgagatgg tggttacacc	60
atcgcacagt atgccggca gttaatctt aaccctaata ccgcacgtcg ttatctccgt	120
gccttcaaag aagacaccag gactacggac agccgcaagc caaataagcc agtcaggaag	180
ccactaaaaa gcatgatcat tgatcactct aatgatcaac atgcaggta tcacattgcg	240
gctgaaatag cgaaaaaaca aagagttat gccgttgtca gtgcccagt cgagaatgca	300
aaggcgccaaa ataagcgcat aaatgatcgt tcagatgatc atgacgtgat caccgcgcc	360

caccggacct tacgtgatcg cctggAACgc gacaccctgg atgatgtatgg tgaacgctt	420
gaattcgaag ttggcgatta cctgatagat aacgttgaag cgccggaaaggc cgccgcgcct	480
atgttcgcgc ggtccggggc cgatgttctg gaaaccactc ttctggaaaa gtctttct	540
catctccta tgctggagaa cgccaggat acgtgtattc gcctggtgca ggaaatgcgc	600
gatcagcaaa aagacgtatga tgaaggtaact ccgcctgaat accgtatcgc gagcatgcta	660
aacagctttt ccgcgcagat aagcagcctg atacaacacca tttacagcat ccggaaataac	720
tatcgaaaaag aaagccggga ggcggaaaag caacgtttat ctatggggca agctggcatt	780

gttaagctgg catacgaacg aaagcgtgaa aataactggt cagtgctgga agcggctgaa	840
ttcatcgagg cgcatggagg aaaagtgccg cccctgatgc tggagcaaat caaagccgat	900
ctgcgtgctc ctaagaccaa taccgatgat gaggaaaacc aaacagcatc tggcgctcca	960
tcacttgaag atctggataa aatcgcgca gaacgggccc ccagccgccc cgctgatgcc	1020
gcatttgtgaa ttgagcatcg tagagaagaa attgccgata tcgtcgatac aggtggttat	1080
ggtagatgtcg atgcggaaagg catatcaaac gaagcatggc ttgaacagga tctggacgaa	1140

gacgaggagg aagacgaaga agttacccgc aaactgtacg gggatgatga ttaa 1194

<210> 7

<211> 1194

<212> DNA

<213> Enterobacteria phage P1

<400> 7

gtgacacctgg acgatcacaa gaagaatttt gctcgctgg cgcgagatgg tggttacacc 60

atcgcacagt atgccgccga gttaatctt aaccctaata ccgcacgtcg ttatctccgt 120

gccttcaaag aagacaccag gactacggac agccgaagc caaataagcc agtcaggaag 180

ccactaaaaa gcatgatcat tgcactt aatgatcaac atgcaggtga tcacattgcg 240

gctgaaatag cgaaaaaca aagagttat gccgttgta gtgccgcagt cgagaatgcg 300

aagcgccaaa ataagcgcat aaatgatcgt tcagatgatc atgacgtgat caccgcgccc 360

caccggacct tacgtgatcg cctggaacgc gacaccctgg atgatgatgg tgaacgcitt 420

gaattcgaag ttggcgatta cctgatagat aacgttgaag cgccgaaggc cgccgcgcgt 480

atgttgcgtc ggccggggc cgatgttctg gaaaccactc ttctggaaaa gtctttct 540

catctccta tgcggagaa cgccaggat acgtgtattc gcctggtgca ggaaatgcgc 600

gatcagcaaa aagacgatga tgaaggtact ccgcctgaat accgtatcgc gagcatgcta 660

aacagctgtt ccgcgcagat aagcagcctg atcaacacca ttacagcat ccggaaataac 720

tatcgaaaag aaagccggga ggcggaaaag cacgtttat ctatgggca agctggcatt 780

gttaagctgg catacgaacg aaagcgtgaa aataactggt cagtgcgttga agcggctgaa 840

ttcatcgagg cgcattggagg aaaagtgcgc cccctgatgc tggagcaaat caaagccgat 900

ctgcgtgctc ctaagaccaa taccgatgat gaggaaaacc aaacagcatc tggcgctcca 960

tcacttgaag atctggataa aatcgcgca gaacggcccg ccagccgcgc cgctgatgcc 1020

gcattgtgga ttgagcatcg tagagaagaa attgccgata tcgtcgatc aggtggttat 1080

ggtgatgtcg atgcggagg catatcaaac gaagcatggc ttgaacagga tctggacgaa 1140

gacgaggagg aagacgaaga agttacccgc aaactgtacg gggatgatga ttaa 1194

<210> 8

<211> 525

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 8

atgaacgaaa aacaaaagag attcgcatg gaatatataa tgaatggatg taatggtaaa	60
aaagcagcaa tticagcagg ttatagtaag aaaacacgag agtcttagc aagtcgttg	120
ttaagaaatg ttaatgttc ggaatatatt aaagaacat tagaacagat acaagaagag	180
cgttaatga gcattacaga agctttagcg ttatctgctt ctattgttag aggagaacct	240
caagaggctt acagtaagaa atatgaccat ttaaacatg aagtggaaaa agaggttact	300

tacacaatca caccacat tgaagagcgt cagagatcta ttgaccacat actaaaagt	360
catggcgt atatcgacaa aaaagaaatt actcagaaga atattgagat taatattaga	420
tctattgacc acatactaaa agttcatggt gcgttatatcg aaaaaaaaaa aattactcag	480
aagaatattg agattaat tggtgagtac gatgacgaaa gttaa	525

<210> 9

<211> 663

<212> DNA

<213> Staphylococcus phage 80alpha

<400> 9

aattggcgt aaagtggcag ttttgatac ctaaatgag atattatgat agtgttaggt	60
attgactatc ttactgcgtt tcccttatcg caattaggaa taaaggatct atgtgggttg	120

gctgattata gccaatcctt ttttaatttt aaaaagcgta tagcgcgaga gttggtgta	180
aatgaaatga acgaaaaaca aaagagattc gcagatgaat atataatgaa tggatgtat	240
ggtaaaaaag cagcaatttc agcaggttat agtaagaaaa cagcagatgc ttttagcaagt	300
cgattgttaa gaaatgttaa tgttcggaa tatattaaag aacgattaga acagatacaa	360
gaagagcgtt taatgagcat tacagaagct ttagcgttat ctgcttctat tgcttagagga	420
gaacctcaag aggcttacag taagaaat gaccattaa acgtgaagt ggaaaaagag	480
gttacttaca caatcacacc aactttgaa gagcgtcaga gatctattga ccacatacta	540

aaagttcatg gtgcgtatcgacaaaaaaa gaaattactc agaagaatat tgagattaat	600
attggtgagt acgtgacgaa gatggaaattt aaacttaac aaaccatcta atgtttcaa	660
cag	663

<210> 10

<211> 1116

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 10

tcataaatat ttaactattt ctttctgtgt actagggtac aaatgaccgt atcggttata	60
tacttcatta ctatcagcat ggcctaaacg ctgtgttatt accatgatac ttgcgccatg	120
attgactagc atagacgcat ggctatgtct taactcatga attacaattc taggaatgt	180

ctgaccgtct ggtagttgtt catctaatac tttaatgca gcggtaaacc aacgatctat	240
agttgattca ctataagctt tgaagaatgt accgaataat acataatcat cttaatatac	300
attttttctt ttgtaccatt ttaaatattt ttgtatca ttcatcatgt gaacaggtaa	360
gtatatatca cgatttgctg cttttgtttt agggctgtc acttcaccgt gatagtctgt	420
tttgttaata tggatgaaat catcatcata gttaatatca cgccatgtga gggctctaat	480
ttcgcctta cgtgcaccag agtaaaacag tagcttaaag aataactttt gttttgtgt	540
agctaaagcc tcataagaattt gattgaattt ttctaatgtc caatagttca aacgcttatt	600

tgattctatt tcaaagttac ctactagaga ggctacattt tgcttagat catgaaaactt	660
catagcatgg ttaagtaacg atactaagaa cacgtgcatt ttcttaggt actctccaga	720
gtgtccctct tttaacttcg tattctgaaa cttcataata tcttgtgttag tcatattaa	780
cacgtccata gactaaaaat agggtagcaa atgggtgttt gtatgtgtct ttaatgttt	840
cacactagat gacttacgac gtgcagaata ccactctata tactcatcta cgagcttatac	900
aaagggcagt ttgttatct gtcctacacc ctctaaactcg tccataattt cattacattt	960
cttcaatgcc tcttacgct gttaaagcc actctttttt atttcttac gttgattaaa	1020

tttatcatag tattttatac gaaaatagta tgtaccacgt ttagcgtctt tatatatgtt	1080
gtgggatagg tttaagttgtt gttctatggg aatcac	1116

<210> 11

<211> 10844

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<220><221> modified_base

<222> (8807)..(8807)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 11

ctcgccgt ctcttggct tgatcggct tcttgcgtat ctcacgcgt cctgcggcgg	60
--	----

cctgttagggc aggttcatac ccctgccaa ccgttttgt cagccggtcg gccacggctt	120
ccggcgtctc aacgcgttt gagattccca gctttcgcc caatccctgc ggtgcataagg	180
cgcgtggctc gaccgttgc gggctgatgg tgacgtggcc cactggtggc cgctccagg	240
cctcgtagaa cgcctgaatg cgcgtgtgac gtgccttgct gcctcgatg ccccggttgc	300
gccttagatc gcccacagcg gcccacaacg tggctggc gcgggtcatc tgccgttgt	360
tgcgcgtgaa ctccctggcc gacagcctgc cgtcctgcgt cagcggcacc acgaacgcgg	420
tcatgtgcgg gctgggttcg tcacggtgga tgctggcgt cacgatgcga tccgccccgt	480
acttgtccgc cagccacttg tgcccttct cgaagaacgc gcctgctgt tcttggctgg	540
ccgacttcca ccattccggg ctggccgtca tgacgtactc gaccgccaac acagcgtcct	600
tgcgccgtt ctctggcagc aactcgcga gtcggccat cgcttcatcg tgctgtgg	660
ccgcccagtgc tctgttctct gggtcctgc tggcgtcagc gttggcggtc tgcgcgtcgc	720
gttaggcgtg cttagactg gcccacgt tgcccattt cgcgcgtt tcgcatcgca	780
tgcgcgtta tgccgcatg ctcgccttc cttttgggt tccaaccggc tcgacgggg	840
cagcgaagg cggcgcctcc ggcggccac tcaatgcgtt agtatactca ctgcacttt	900
ttcgcgaagg tcgtgaccgc ctacggcgcc tacgggcttgc ctctccggc	960
ttcgccctgc gcggtcgctg cgctcccttg ccagccgtg gatatgtgga cgtatggccgc	1020
gagcggccac cggctggctc gtttcgtcg gcccgtggac aaccctgtcg gacaagctga	1080
tggacaggct ggcctgccc acgagcttga ccacaggat tgcccacgg ctaccactat	1140
agggcgaatt ggcggaaaggc cgtcaaggcc gcattggc cggcgcgcgg gatccgcta	1200
gctctagacc tctagaccag ccaggacaga aatgcctcgat ttgcgtgtc gccaagg	1260
gcccgggtgac gcacaccgtg gaaacggatg aaggcacgaa cccagttggac ataaggctgt	1320
tcggttcgta agtgcataatg caagtagcgt gcccgttccg ggcctttga catgtgactt	1380
tcgttacct cgcgtcaaaa agatttta cgaaaggaag cataagtgc ctggacgat	1440
cacaagaaga attttgtcg cttggcgca gatgggtttt acaccatgc acagtatgc	1500
gccgagttta atcttaaccc taataccgca cgtcgatc tccgtgcctt caaagaagac	1560
accaggacta cggacagccg caagccaaat aagccgtca ggaagccact aaaaagcatg	1620
atcatttgc acgttatgc tcaacatgc ggtgatcaca ttgcggctga aatagcgaa	1680
aaacaaagag ttaatgcgt tgcgtatgc gcaatgcgtt gatgcgttgc aatgcgttgc	1740
cgcataaatg atcgatcaga tgcgtatgc gatgcgttgc gcaatgcgttgc aatgcgttgc	1800

gatgcctgg aacgcgacac cctggatgt gatggtaac gcttgatt cgaagttggc	1860
gattaccta tagataacgt tgaagcgccg aaggccgcgc gcgcatagtt cgctcggtcc	1920
ggggccgatg ttctggaaac cactttctg gaaaagtctc ttctcatct ctttatgctg	1980
gagaacgccca gggatacgtt tattcgctg gtgcaggaaa tgcgcatca gcaaaaagac	2040
gatgtgttgg gtactccgcc tgaataccgt atcgcgagca tgctaaacag ctgtcccg	2100
cagataagca gcctgtatcaa caccattac agcatccgga ataactatcg aaaagaagc	2160
cgggaggcgg aaaagcacgc ttatctatg gggcaagctg gcattgttaa gctggcatac	2220
gaacgaaagc gtgaaaataa ctggtcagt ctggaaagccg ctgaattcat cgaggcgcat	2280
ggaggaaaag tgccgcccct gatgtggag caaatcaag ccgatctgcg tgctccatag	2340
accaataccg atgatgagga aaaccaaaca gcatctggcg ctccatcat tgaagatctg	2400
gataaaatcg cgcgagaacg ggccgcccage cgccgcgcgtg atggcgcatt gtggatttag	2460
catctgttgc aagaaattgc cgatatcgatc gatacagggtt gttatgttgc tgtcgatgcg	2520
gaaggcatat caaacgaagc atggcttgcgaa caggatctgg acgaagacga ggaggaagac	2580
gaagaagtttta cccgcaact gtacggggat gatgattaat taaaaaaacc cgccccggcg	2640
gtttttttta tcttagagcta gcgatccgg cgccgcgggc cttctggc ctcatggcc	2700
ttccgctcac tgccgctt ccagcaactt agggcgaatt ggccggaggc cgtaaggcc	2760
gcatttggc ccggcgccgc ggatccgcta gctctagact ggcaggttc tgagcagatc	2820
gtccaaaccg atctggatcg ggtcagaaaa atttgcata ataaatttcg ttttctaagt	2880
gcaaaagatc accatttcga gctggtgatt gaagggttgc gcaaaattgg agaaaaaatg	2940
caacaaacat tcaatgcgga tatgaatata tcaaaccctt ataaaaatgt cgatcctca	3000
accactctgc ccgttatttg tggtgttgcgaa attacgaccg accgcgttgc ccgttacaac	3060
cttaatgctc tacacagagc gagcggactc ggtgccata aagcgccagc tcaatggcta	3120
agaacgctgt cagctaaaca gctcatcgaa gagcttggaaa aagaaactat gcagaattgc	3180
atagttcgat tcacaagcaa tgaaagcagg atttcttca cgactcgat aaccggcaaa	3240
ggtcagcgtt ggctgtatggaa ggcattgtt gatgtggat tgctggatcc tgctcgcc	3300
acgcgctaacc agacgttagta agaaccacca gcattgtat gctggctaaa gtcactttcc	3360
tgagctgtat aacgtatggc gatttactt ttctggctt tgaattggcc tgctttgtaa	3420
cacactccgg tctatccgtt agcgccggc atatcctgtc gcaatgtgca aatctcgccg	3480
caacaaccag tgaataacttc attcacaagc ctcaccgcgt gatcgccgca gaaactggtt	3540
atagccaatc aaccgtcgat cgtgcattcc gtgaagctgtt aaacaaagga attctgtctg	3600
tagagattgtt tatcgccgtt caccgttgcgaa gtcgcgttcc cctgttccgg tttacaccat	3660

ccttttggc cttcgcacaa caagccaaaa atgcgctgat agaaagcaaa ttaaagatct	3720
cttcagggc aaccaagggt aaagctgttc tcgctaagac attggcttta ttaatttt	3780
tatccacacc cccatgtcaa aatgataccc cctccccctg tcaggatgac gtggcaataa	3840
agaataagaa gtcacaagtt aaaaaaacaa aaagatcagt ttccggcggt gccggaacaa	3900
ccagcctcaa aaaattgact tcatggatcg ctaaggcaaa agcaaggct gacaatctgc	3960
ggttatccaa aaaacgcact caaaaacatg agttcaagca gaaagttagag gcggctgcgc	4020
gaaaatatgc ttacctgaag aacaagcgtt cgccgtat tggcgggata tcaaacttcg	4080
ataacctacc gcattgcatg acgtaaacg aagctttaa tgccgtttta gccaaaata	4140
aagataacga acaatggggt ataccggcag gattcagagg gtaatgaatt gctctaatta	4200
taaccatgca tacttcaac acctctagtt tgccatgagg caaactcata ggtgtcctgg	4260
taagaggaca ctgttgccaa aactggacgc cccattattg caattaataa acaactaacg	4320
gacaattcta cctaacaata agtggcttaa aaaaaccgc cccggcggt tttttatct	4380
agagctagcg gatccggcgc gccggccct tctggccctc atggccttc cgctcactgc	4440
ccgctttcca gccagccttc gaccacatac ccaccggctc caactgcgc gcctgcggcc	4500
ttgccccatc aatttttta atttctctg gggaaaagcc tccggcctgc ggcctgcgc	4560
cttcgcttgc cggttgaca ccaagtggaa ggccggtcaa ggctcgcgc gcgaccgcgc	4620
agcggcttgg ctttgacgcg cctggaacga cccaaagccta tgcgagtggg ggcagtcgaa	4680
ggcgaagccc gccgcctgc ccccgagac ctgcaggggg gggggggcgc tgaggtctgc	4740
ctcgtgaaga aggtgttgc gactcatacc aggctgaat cgccccatca tccagccaga	4800
aagtgaggga gccacggttg atgagagctt tggtaggt ggaccagtt gtgattttga	4860
actttgctt tggcacggaa cggctgcgt tgcggaaatg atgcgtgate tgatcctca	4920
actcagcaaa agttcgattt attcaacaaa gccggcgtcc cgtcaagtca gcgtaatgct	4980
ctgccagtgt tacaaccaat taaccaattc tgattagaaa aactcatcga gcatcaaatg	5040
aaactgcaat ttattcatat caggattatc aataccatat tttgaaaaa ggcgtttctg	5100
taatgaagga gaaaactcac cgaggcagtt ccataggatg gcaagatcct ggtatcggtc	5160
tgcgattccg actcgtccaa catcaataca acctattaaat ttccctcgtaaaaaataag	5220
gttatcaagt gagaatcac catgagtgac gactgaatcc ggtgagaatg gcaaaagctt	5280
atgcattctt tccagactt gttcaacagg ccagccatta cgctcgatc caaaatcact	5340
cgcataacc aaaccgttat tcattcgtga ttgcgcctga gcgagacgaa atacgcgtatc	5400
gctgttaaaa ggacaattac aaacaggaat cgaatgcac cggcgcagga acactgccag	5460
cgcataaca atatttcac ctgaatcagg atattcttcaataacgtggaa atgcgtttt	5520

cccggggatc gcagtggta gtaaccatgc atcatcagga gtacggataa aatgttgat	5580
ggtcggaaga ggcataaatt ccgtcagcca gtttagtctg accatctcat ctgtAACATC attggcaacg ctaccttgc catgttcag aaacaactct ggccatcg gcttccata caatcgatag attgtcgac ctgattgcc gacattatcg cgagcccatt tataccata taaatcagca tccatgttgg aatTAATCG cggcctcgag caagacgtt cccgttgaat atggctata acaccccttg tattactgtt tatgtaaAGCA gacagtttta ttgttcatga tgatataATTt ttatcttgg caatgtaaACa tcagagattt tgagacacAA cgtggcttc cccccccccc ctgcaggTCC cgagcctac ggcggcgagt gccccggTTC caaggggca	5640 5700 5760 5820 5880 5940 6000
gcccaccc ttggcaaggcc gaaggcccg cagtcgtca acaagcccc gagggccac ttttgcgg agggggagcc gcccgaagg cgtggggaa cccgcagg gtgcctct ttggcacca aagaactaga tatagggcga aatgcgaaag actaaaaat caacaactta aaaaaggggg gtacgcaaca gtcattgcg gcacccccc caatagctca ttgcgttagt taaagaaaat ctgtattga ctgcaactt tacgcaacgc ataatttttgcgctgcc gaaaagtgc agctgattgc gcatgggcc gcaaccgtgc ggaccccta ccgcattggag ataagcatgg ccacgcagtc cagagaaatc ggcattcaag ccaagaacaa gcccggcac	6060 6120 6180 6240 6300 6360 6420
tgggtgcaaa cggAACGCAA agcgcatgag gcgtggccg ggcttattgc gagggaaaccc acggcgcaa tgctgctgca tcacctcgta ggcgcagatgg gccaccagaa cggcggt gtcagccaga agacacttc caagctcatc ggacgttctt tgccgcgtt ccaatacgca gtcaaggact tggggccga ggcgtggatc tccgtcgta agtcaacgg cccggcacc gtgtcgccct acgtggtaa tgaccgcgtg gcgtggggcc agcccccgcg ccagttgcgc ctgtcggtgt tcagtgcgc cgtgggtttt gatcagcgc accaggacga atcgctgttgc ggcatggcg acctgcgcgc catccgcacc ctgtatccgg ggcggcagca actaccgacc	6480 6540 6600 6660 6720 6780 6840
ggccccggcg aggagccgccc cagccagccc ggcattccgg gcatggaaacc agacctgcca gcctgaccg aaacgggagga atgggaacgg cgccggcagc agegcctgcc gatccccat gagccgtgtt ttctggacga tggcgagccg ttggagccgc cgacacgggt cacgctgcc cgccggtagc acttgggttgc cgcagcaacc cgtaaatgcg ctgttcaga ctatcgctg tagccgcctc gcccgcctat accttgcgtc cctcccccgc ttgcgtcgcc gtgcattggag ccggccacc tcgacctgaa tggaaagccgg cggcacctcg ctaacggatt cacggtttt atcaggctct gggaggcaga ataaatgatc atatcgtaa ttattacctc cacggggaga	6900 6960 7020 7080 7140 7200 7260

tctcatcaag gcaacaacaa ttgaaagcat gctatgaaat aattaatgac gcattaacta 9180
 cagggtatttgc tcatccccaa aacgactttt atgatccaa aaaggttca attaatccac 9240
 actgttacag tgagaatgga cctaagcaat atgtatccgc tacatcaaaa gaagtgtca 9300
 tgtggcagc gaaaaaggca ctgccttaa catitaagtggaggataat tttagaaacca 9360

aagaacgcta tgcatttcta tataataaaa cagcacaaca atatggatt gatatttcgg 9420
 atgttgatca tcaattaact gtaattgcga acttaaatgc tgatagaagt acggctcaag 9480
 aagaagttag agaataactta aaagactata tcactgaaac ttaccctcaa atggacagag 9540
 atgaaaaat taactgcatt attgaagaga atgcagttgg gtctcatgtat gactattatg 9600
 aatcgacaaa attagcagtg gaaaaaacag ggtctaaaaa tattttatta tccttigaat 9660
 caatgtccga tattaaagat gtaaaagata ttattgtat gttgaaccaa aaaatcgaaa 9720
 tgaatttacc ataaagtagt actgttgtaa ttcatcaagc attctgccga catggaagcc 9780

atcacagacg gcatgatgaa cctgaatcgc cagcggcatc agcaccttgt cgcccttcggt 9840
 ataatattttgc cccatggtga aaacgggggc gaagaagttg tccatattgg ccacgtttaa 9900
 atcaaaaactg gtgaaactca cccaggatt ggctgagacg aaaaacatata tctcaataaa 9960
 cccttaggg aaataggcca ggttttacc gtaacacgcc acatcttcg aatatatgt 10020
 tagaaactgc cgaaatcgt cgtggatttgc actccagacg gatgaaaacg tttcagtttgc 10080
 ctcatggaaa acgggtgtac aagggtgaac actatcccattt atcaccagctt caccgtt 10140
 cattggccata cgaaattccg gatgagcattt catcaggccg gcaagaatgtt gaataaaggc 10200

cggataaaac ttgtgcttat tttctttac ggtctttaaa aaggccgtaa tatccagctg 10260
 aacggctctgg ttataggtac attgagcaac tgactgaaat gcctcaaaat gttctttacg 10320
 atgcatttgc gatataatcaa cgggtgtata tccagtgtt tttttctcca ttttagcttc 10380
 cttagctcct gaaaatctcg ataactcaaa aaatacgccc ggtgtgtatc ttatttcatt 10440
 atggtaaag ttggAACCTC ttacgtgcgc atcaacgtt cattttcgcc aaaagttggc 10500
 ccagggttcc cggttatcaa cagggacacc aggatttttatttctgcga agtgcatttc 10560
 cgtcacaggtt atttattcga agacgaaagg gcctcgat acgccttattt ttataggtta 10620

atgtcatgtt aataatggtt tcttagacgt caggtggcac tttcgggga aatgtgcgcg 10680
 cccgcgttcc tgcgtggcgctt gggctgtttt ctggcgctgg acttccgcgttccgtcag 10740
 cagctttcg cccacggcct tgcgtgcgc ggcggccttgcgcgtat cccgattcaa 10800
 cggccccagg gcgtccagaa cggcgttcag ggcgtcccgaa aggt 10844

<210> 12

<211> 128

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 12

gtctagttaa tggttaacgt aacatttagt agatttttt attcaaaaaa atatttaca	60
atattaggaa attaagtgt aaaagagttg ataaatgatt atattggac tataatataa	120

ttaaggtc	128
----------	-----

<210> 13

<211> 2769

<212> DNA

<213> Staphylococcus phage 80alpha

<400> 13

attagacaac aaacaagtca ttgaaaattc cgacttatta ttcaaaaaga aatttgatag	60
cgcagatata caagctaggtaaaaatggcgataaggta gaagttaaaa caatcggtta	120
tagaatacac tttaaatttataccgtt cttatacgaa gtaaagaagg tagataaaca	180
atgattaaac aaatactaag actattttc ttactagcaa tgtatgagtt aggtaagtt	240
gtaactgagc aagtatat tatgatgacg gctaatgatg atgttagaggt gccgagtgac	300

ttcgcgaagt tgagcgatca gtcagattt atgagggcgg aggtgacgga gtagatgat	360
tggtagtca tagcaattt attactatgc atcttattgt ttgggtgtat gttgcaagct	420
gaacagttaa aaggcgatgt gaaagttaaa gagcgggaga tagagatatt aagaagtaga	480
ttgagacatt ttgaagatta aaaatatttgc tatgggggtt attcatgact aaaaagaaat	540
atggattaaa attatcaaca gttcgaaagt tagaagatga gttgtgtat taccataatt	600
atcataagca actcgaaatg ttaagaagtg aaataatgac accatggatt ccaacagata	660
caaataatagg cgggagttt gtaccgtcta atacatcgaa aacagaaatg gcagtaacta	720

attatcttg tagtatacga agaggtaaaa tccttgagtt taagagcgct attgaacgta	780
taatcaacac atcaagttagg aaagaacgca aatttattca agagtattttttaataaaaa	840
aggaatttagt gaaagttgtt gatgacatac acatttctga tagaactgct catagaatca	900
aaagggaaat catabctaga ttggcggaaag agtttagggaa agagtggaaat tggcgtttaaa	960
gtggcagttt ttgataccta aaatgagata ttatgatagt gtaggatatt gactatctta	1020
ctgcgttcc ctatcgcaaa ttagaataa aggtctatg tgggtggct gattatagcc	1080
aatcctttt taatttaaa aagcgtatag cgcgaggtt ggtggtaat gaaatgaacg	1140

aaaaacaaaa gagattcgca gatgaatata taatgaatgg atgtatggt aaaaaagcag	1200
--	------

caatttcagc aggttatagt aagaaaacag cagagtctt agcaagtcgatgttaagaa	1260
atcggaatat attaaagaac gattagaaca gatacaagaa gagcgttaa	1320
ttagcattac agaagcttgcgttatctg cttctattgc tagaggagaa cctcaagagg	1380
cttacagtaa gaaatatgac catttaaacg atgaagtggaaaagaggacttacacaa	1440
tcacaccaac tttgaagag cgtagagat ctattgacca catactaaaa gttcatggtg	1500
cgtatatacgca caaaaaagaa attactcaga agaatattga gattaatatttggagtacg	1560
atgacgaaag taaaattaaa cttaacaaa ccatctaattttcaacag aaacatattc	1620
gaaatactaa ccaattacga taacttcaacttgaagttacatt acgggtggagg ttcgagtgg	1680
aagtcacg gcgttatataaaaatgttcaagcat tgcaagactg gaaatatcct	1740
aggcgtatac tatggcttag aaaagtccaa tcaacaattt aagatagttt attcgaagat	1800
gtcaagatt gttgataaa cttcggtatt tggacatgt gcctttggaa taagactgat	1860
aacaaagttt aattgccaaa cggcgcagtt ttttgttta aaggattaga taacccagag	1920
aaaataaagt cgataaaagg catatcagac atagtcatttgg aagaagcgctc tgaattcaca	1980
ctaaatgatt acacgcaatt aacgttgcgt ttgaggagc gtaaacacgt gaataagcaa	2040
atattttga ttttaaccc agtatctaaa ctgaatttggg tttataagta tttcttgaa	2100
catggtaac caatggaaaa tgtcatgatt agacaatcta gttatcgaga taataagttt	2160
cttgatgaaa tgacacgaca aaacttagag ttgttagcaa atcgtaatcc agcatattac	2220
aaaatttatg ctttaggtga atttctaca ctagacaaat tggtttccc taagttatgaa	2280
aaacgtttaa taaataaaga ttagttttaga catttaccc ttattttgg attggacttt	2340
ggctacgtta atgatccttag tgctttata cattctaaaa tagatgtaaa gaaaaagaag	2400
ttatacatca ttgaagagta tttaaacaa ggtatgctga atgatgaaat agctaattgtc	2460
ataaagcaac ttggttatgc taaagaagaa attacagcag atagtcgaga acaaaaaagt	2520
atagctgaat taaggaatct agggcttaaa aggatttac caacaaaaaaa agggaaaggc	2580
tcgggttac aagggttaca attcttaatg caatttggaa tcattttgtga tgaacgttgt	2640
ttcaagacta ttgaagagtt tgacaactac acatggcaaa aggacaaaaga tacaggtgaa	2700
tataccaatg aaccagttaga tacatacaat cattgtatcg attcggttgc ttattcagt	2760
gaacgattc	2769

<210> 14

<211> 10319

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide

<400> 14

```
ggcgccatgg ttaaggcccc ttgcggaaa gagtttagtaa gttAACAGAA gacgAACCAA 60  
aactaaatgg tttagcagga aacttagata aaaaaatgaa tccagaatta tattcagaac 120  
aggAACAGCA acaAGAACAA caaaAGAATC aaaaACGAGA tagAGGTATG cacttatAGA 180  
acatgcattt atGCCGAGAA aacttattgg ttGGAATGGG ctatgttta gctAACTTGT 240  
tagcggatgtg gttggacttg aattgggatt aatcccAAGA aagtaccAA tcaacaACAC 300
```

ataaaggcct	gtaggttcg	accaataagg	aaattggaat	aaagcaataa	aaggagttga	360
agaaatgaaa	ttcagagaag	ccttgagaa	ttttataaca	agtaagtatg	tacttggtgt	420
tttagtagtc	ttaactgttt	accagataat	acaaatgctt	aaataaaaaa	agacttgatc	480
tgatttagacc	aatcttttg	atagtgttat	attaataaca	aaataaaaag	gagtcgccta	540
cgcctacca	aagtttgta	acgacatcat	tcaaagaaaa	aaacactgag	ttgttttat	600
aatcttgtat	attttagatat	taaacgatat	ttaaatatac	atcaagatat	atatttgggt	660
gagcgattac	ttaaacgaaa	ttgagattaa	ggagtcgatt	ttttatgtat	aaaaacaatc	720

attttgaaga tgatttgagt gactactatg caatgtctga taaaggcgtt aagaaaacta	1200
tttttatgg tcgtaatggt aagccagaaa caaaatattt tggcgtgaga gatagtaata	1260
gatttattag aatttataat aaaaagcaag aacgtaaaga taatgcagat gctgaagtta	1320
tgtctgaaca tttatggcgt gttagaaatcg aacttaaaag agatatggcgtt gattactgga	1380
atgattgctt tagtgattt catacttgc aaccagattt gaaaactatc caacgcactg	1440
cggatagagc aatagtttt atgttattga gtgtatgaaa agaatgggaa aagcttcaca	1500
gaaattctag aacaaaatat aagaatttga taaaagaaaat ttgcgcgtt gatttaacgg	1560

acttaatgaa atcgacttta aaagcgaacg aaaaacaatt gcaaaaacaat atcgatttt 1620
ggcacatga atttaaattt tgaaaaatgt gtacatatta atattactga acaaaaaatga 1680

tatatttaaa ctattctaat ttaggaggat tttttatga agtgtctatt taaaatttg	1740
ggaaatttat atgaggtgaa agaataattt accctataa acttagcca cctcaagtaa	1800
agaggtaaaa ttgttagtt tatataaaaa atttaaaggt ttgtttata gcgtttatt	1860
ttggcittgt aticttcat tttagtigt attaaatgaa atggtttaa atgttictt	1920
acctgatatt gcaaattcatt ttaatactac tcctggaatt acaaactggg taaacactgc	1980
atatatgtta acttttcga taggaacagc agtataatgga aaattatctg attatataaa	2040
tataaaaaaa ttgttaatta ttggatttag tttagctgt ctgggtcat tgattgctt	2100
tattggcc acctaggcaa atatgcttt acgtgttattt atttaagtga ctatttaaaa	2160
ggagttata aatatgcggc aaggtatct taaataaact gtcaatttga tagcggAAC	2220
aaataattag atgcctttt ttaggaggc tttagttttt gtaccagtt taagaatacc	2280
tttatcatgt gattctaaag tatccagaga atatctgtat gctttgtata cctatggtta	2340
tgcataaaaa tcccagtgtat aaaagtattt atcactggga ttttatgcc ctgggtt	2400
tttgaatgga gaaaaatcac atgaaaattttaa ttaatattgg agtttagct catgttgatg	2460
caggaaaaac tacctaaca gaaagcttata tataaacag tggagcgatt acagaattag	2520
gaagcgtgga caaaggtaca acgaggacgg ataatacgct tttagaacgt cagagaggaa	2580
ttacaattca gacaggaata acctctttt agtggggaaaa tacgaaggtg aacatcatag	2640
acacGCCAGG acatatggat ttcttagcag aagtataatcg ttcattatca gtttttagatg	2700
ggcaattct actgattct gcaaaagatg gcgtacaagc acaaactcgt atattatttc	2760
atgcacttag gaaaatgggg attccccacaa tctttttat caataagattt gaccaaaatg	2820
gaattgattt atcaacggtt tattcaggata ttaaagagaa actttctgcc gaaattgtaa	2880
tcaaacagaa ggttagactg tattcctaata tttgtgtgac gaactttacc gaatctgaac	2940
aatggatac ggttaatagag ggaaacgata acctttaga gaaatataatg tccgtaat	3000
cattagaagc attggaaactc gaacaagagg aaagcataag atttcagaat ttgttctgt	3060
tcccttttta tcatggaagt gcaaaaagta atataggat tgataacctt atagaagtta	3120
ttactaataa attttattca tcaacacatc gaggtccgtc tgaactttgc gggaaatgttt	3180
tcaaaaattga atataaaaaaa aaaagacaac gtcttgacata tatacgccctt tatagtggag	3240
tactacattt acgagattcg gtttaggtat cagaaaaaga aaaaataaaaaa gttacagaaaa	3300
tgtatacttc aataaaatggt gaattatgtat agattgtat agtttattct ggagaaatttg	3360
ttatTTTgca aatagagttt ttgaagttaa atagtgttct tggagataca aaactattgc	3420
cacagagaaaa aaagattgaa aatccgcacc ctctactaca aacaactgtt gaaccgagta	3480
aacctgaaca gagagaaaatg ttgcttgatg ccctttgga aatctcagat agtgcgtccgc	3540

ttctacgata ttacgtggat tctacgacac atgaaattat acttcttc ttagggaaag	3600
tacaaatgga agtgattagt gcactgttgc aagaaaagta tcatgtggag atagaactaa	3660
aagagcctac agtcattat atggagagac cgtaaaaaa tgcaaatat accattcaca	3720
tcgaagtgcc gccaaatcct ttctggcct ccattggtt atctgtatcg ccgcttcgt	3780
tggaaagtgg aatgcagttt gagagctcg tttctttgg atacttaat caatcattc	3840
aaaatgcagt tatggaaggg gtacgctatg gttgcgaaca aggattatat gtttggaaatg	3900
tgacggattt gaaaaatctgt ttaagtacg gtttatacta tagccctgtt agtactccag	3960
cagatttcg gatgcttact cctattgtac tggagcaagc cttagaaaaa gctggAACAG	4020
aattgttaga gccatatctt agttttaag tttatgcacc acaggaatat ct当地acggg	4080
catataacga tgctccaaa tattgtcaa atatcgaaa tactcaactg aaaaataatg	4140
aggtcattat tattggagaa attcctgctc gatgtattca agattatcgc aatgattaa	4200
ctttttac aaatggcctt agtgggtt tagcagact aaaaggatata cagttacca	4260
ctggcgaacc tggccag acccgctgc taaatagtcg gatagataaa gtaagatata	4320
tgttcaataa aataacttag tgcgtttat gtttataat aatatgggtt tcttattaa	4380
taagatggaaa tattcttaa tatagattt aattaaatgt gaaaggagga gattgttatt	4440
ataaaactaca agtggatatt gtgtcctagt tgtggaaata aaacaagact acgaatacga	4500
gtggatacta tactaaaaa tttccctta tacagccccaa aatgtaaagaa cgaaacttta	4560
attaatgttc aaaaaatgaa tataataaca atcaaagagc cagacccaa gacgcagagc	4620
cgataatttgc agaaatgaaa ctctcattt atcggtctt tttgttatac tgaattttac	4680
tgactagcct tcaatatttc cgccgcagc ttactatgcc attattaatgc ttgtatatac	4740
ggagggttta ttaattggca gtaaagtggc agttttgtat accttaatgt agatattatg	4800
atagtgttagg atattgacta tcgtactgcg tttccctacc gcaaattagg aataaaggat	4860
ctatgtgggt tggctgatta tagccaatcc ttttttaatt ttaaaaagcg tatacgcgaa	4920
gagttgggtgg taaatgaaat gaacgaaaaa caaaagagat tcgcagatga atatataatg	4980
aatggatgtaaatggta aatggtaaaaaa agcagcaatt acagtaggtt atagtaagaa aacagcagag	5040
tcttagcaa gtcgattgtt aagaaatgtt aatgtttcg aatataattaa agaacgttta	5100
gaacaggtac aagaagagcg ttatgttattt attacagaag cttagcgtt atctgctct	5160
attgttagag gagaacctca agaggcttac agtaagaaat atgaccattt aaacgttggaa	5220
gtggaaaaag aggttactta cacaatcaca ccaactttt aagagcgtca gagatctatt	5280

gaccacatac taaaagtaca tggtgcgtat atcgataaaa aagaattac tcagaagaat	5340
attgagatta atattggta gtacgatgac gaaagttaaa ttgaacttta acaaaccgtc	5400
taatgtttc aatagccgca gggcccaac acaccaactt ttgaagagcg tcagagatct	5460
attgaccaca tactaaaagt acatggtgcg tatatcgata aaaaagaaat tactcagaag	5520
aatattgaga ttaatattgg ttagtacgt gacgaaagtt aaattaaact ttaacaacc	5580
gtctaattttt ttcaatagcc gcggggccc aacgagcggc cgcatagttt agccagcccc	5640
gacacccgcc aacacccgct gacgcgcctt gacgggctt tctgctcccg gcatccgctt	5700
acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggtttca ccgtcatcac	5760
cgaacacgcg gagacgaaag ggcctcgtga tacgcattttttat tagttttaatgtcatga	5820
taataatggttt ttcttagacg tcaggtggca ctttcgggg aaatgtgcgc ggaaccccta	5880
tttggtttattttt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat	5940
aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga gtatgagttt tcaacatttc cgtgtcgccc	6000
ttatccctt tttgcggca tttgccttc ctgttttgc tcacccagaa acgctggta	6060
aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca	6120
acagcggtaa gatcctttagt agtttcgccc ccgaagaacg tttccaaatg atgagcactt	6180
ttaaaggttct gctatgtggc gcggtatttat cccgtattga cgccggcaaa gagcaactcg	6240
gtcggccat acactattct cagaatgact tggttgagta ctacccgtc acagaaaagc	6300
atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata	6360
acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcctttt	6420
tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcggtt ggaacccggag ctgaatgaag	6480
ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgttagc aatggcaaca acgtgtcgca	6540
aactattaac tggcgaacta cttactcttag cttccggca acaattaata gactggatgg	6600
aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcgccct tccggctggc tggtttatttgc	6660
ctgataaatc tggagccggt gagegtgggt ctgcggat cattgcagca ctggggccag	6720
atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggat	6780
aacgaaatag acagatcgct gagataggtt cctcaactgtat taagcattgg taactgtcag	6840
accaagtttta ctcatatata ctttagattt atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga	6900
tcttaggtgaa gatcctttt gataatctca tgacccaaat cccttaacgt gagtttcgt	6960
tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc	7020

ctgaagatga aataattgct tccatgcgac gctttatgac acaagtcgt cctttcttaa	8940
aagaacctaa ataaattact tatttgatac tagagataat aaggaacaag ttatgaaatt	9000
tggattattt ttcttaact ttcagaaaga tggataaca tctgaagaaa cgttggataa	9060
tatggtaaag acigtacgt taattgattc aactaaatat catttaata ctgccttgt	9120

taatgaacat cactttcaa aaaatggat tggtggagca cctattaccg cagctggttt	9180
tttatttaggg ttaacaataa aattacatata tggttcatta aatcaagtaa ttaccacca	9240
tcaccctgta cgtgtacgag aagaagccag tttatttagat caaatgtcag agggacgctt	9300
cattcttgtt tttagtgact gcgaaagtga ttgcgaaatg gaatttttt gacgtcatat	9360
ctcatcaagg caacaacaat ttgaagcatg ctatgaaata attaatgacg cattaactac	9420
aggttattgc catccccaaa acgactttt tgatttcca aaggttcaa ttaatccaca	9480
ctgttacagt gagaatggac ctaagcaata tgtatcgct acatcaaaag aagtgcgtcat	9540

gtggcagcg aaaaaggcac tgccttaac gtttaagtgg gaggataatt tagaaaccaa	9600
agaacgctat gcaattctat ataataaaac agcacaacaa tatggtattt atatttcgga	9660
tgttgcattt caattaactg taattgcgaa cttaaatgct gatagaagta cggctcaaga	9720
agaagtgaga gaatacttaa aagactatac cactgaaact tacccctaaa tggacagaga	9780
tgaaaaattt aactgcatta ttgaagagaa tgcagttggg tctcatgatg actattatga	9840
atcgacaaaa ttgcgttgg aaaaaacagg gtctaaaaat attttattt ccttgaatc	9900
aatgtccgat attaaagatg taaaagatata tattgatatg ttgaacccaa aaatcgaaat	9960

gaatttacca taataaaattt aaaggcaatt tctatattttag attgccttt tggcgcgcct	10020
attctaattgc ataataaaata ctgataacat cttatatttt gtatttatattt ttgtattatc	10080
gttgacatgt ataattttga tatcaaaaac tgattttccc tctattttt tcgagattta	10140
ttttcttaat tctcttaac aaactagaaa tattgtatatac aaaaaattt attaataata	10200
gatgaatagt ttaattttagt gtgttcatca atcgaaaaag caacgtatct tattttaaat	10260
gcgttgcttt ttctcattt ataaggtaa ataattctca tataatcaagc aaagtgcata	10319

<210> 15

<211> 2088

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 15

tataactcaa atgttgtctt atataaggag gatattgtatg aaaaagataa aaattgttcc	60
acttattttt atagttgtatg ttgtcggtt tggtatataat tttatgctt caaaagataa	120

ctcaggtaaa gtgtatgatg agctatatga gaacggtaat aaaaaatacg atatagatga	2040
ataacaaaac agtgaagcaa tccgtaacga tggttgctc actgttt	2088
<210> 16	
<211> 2075	
<212> RNA	
<213> Staphylococcus aureus	
<400> 16	
uagucuuua uaaggaggau auugaugaaa aagauaaaaa uuguuccacu uauuuuaaua	60
guuguaguug ucggguuugg uauauauuuu uaugcucaa aagauaaaga aauuaauau	120
acauuugaug caauugaaga uaaaaauuuuc aaacaaguuu auaaagauag caguuaauu	180
ucuaaaagcg auaugguga aguagaaug acugaacguc cgauaaaaau auauaaauagu	240
uuaggcguua aagauauaaa cauucaggau cguaaaaaua aaaaaguauuc uaaaaauaaaa	300
aaacgaguag augcucaaaua uaaaaauaaaa acaaacuacg guaacauuga ucgcaacguu	360
caauuuuaauu uuguuaaaga agaugguaug uggaaguag auuggauca uagcguauu	420
auuccaggaa ugcagaaaga ccaaagcaua cauauugaaa auuuaaaaauc agaacguggu	480
aaaauuuuag accgaaacaa uguggaaauug gccaaauacag gaacagcaua ugagauaggg	540
aucguuccaa agaauguauc uaaaaaagau uauaaagcaa ucgcuaaaga acuaaguauu	600
ucugaagacu auaucaaaca acaauggau caaaaugggg uacaagauga uacciuicguu	660
ccacuuaaaa ccguuaaaaa aauggaugaa uauuaagug auuucgcaaa aaaauuucau	720
cuuacaacua augaaacaga aagucguaac uauccucuag aaaaagcgcac uucacaucua	780
uuagguaug uuggucccau uaacucugaa gaaauaaaaac aaaaagaaua uaaaggcuau	840
aaagaugaug caguauuugg uaaaaaggga cucgaaaaac uuuacgauaa aaagcuccaa	900
caugaagaug gcuaucgugu cacaaucguu gacgauuaaua gcaauacaau cgcacauaca	960
uuaauagaga aaaagaaaaa agauggcaaa gauauucaac uaacauuuga ugcuaaaguu	1020
caaaagagua uuuauaacaa caugaaaaau gauuauggcu cagguacugc uauccacccu	1080
caaacaggug aauuaauuagc acuuguaagc acaccuucau augacgucua uccauuuau	1140
uauggcauga guaacgaaga auauaaauaaa uuaaccgaag auaaaaaaga accucugcuc	1200
aacaaguucc agauuacaac uucaccaggu ucaacucaa aaaaauuaac agcaaugauu	1260
ggguuaauua acaaacaauu agacgauaaa acaaguuaaua aaaucgaugg uaaaggguugg	1320
caaaaagaua aaucuugggg ugguuacaac guuacaagau augaaguggu aaaugguaau	1380
aucgacuuua aacaagcaau agaaucauca gauaacauuu ucuuugcuag aguagcacuc	1440

gaauuaggca guaagaaauu ugaaaaaggc augaaaaaac uagguguugg ugaagauua	1500
ccaagugauu auccuuuuua uaaugcucaa auuucaaaca aaaauuuaga uaaugaaaua	1560
uuauuagcug auucaggua cggacaaggua gaaaucuga uuaacccagu acagauccuu	1620
ucaaucuaua gcgcattuaga aaauaauggc aauauuaacg caccucacuu auuaaaagac	1680
acgaaaaaca aaguuuuggaa gaaaaauuuu auiiuuccaaag aaaauaucaaa ucuaauuacu	1740
gaugguaugc aacaagucgu aaauaaaaca cauaaagaag auauuuauag aucuuauugca	1800
aacuuauug gcaaaucgg uacugcagaa cuaaaauga aacaaggaga aacuggcaga	1860
caaaauuggu ggaaaaauauc auauugauaaa gauaauccaa acaugaugau ggcuaauuau	1920
guuaaagaug uacaagauaa aggaauuggu agcuacaauug ccaaaucuc agguaaagug	1980
uaugaugagc uauaugagaa cgguauuaaa aaauacgaua uagaugaua acaaaacagu	2040
gaagcaaucc guaacgaugg uugcuucacu guuuu	2075
<210> 17	
<211> 2166	
<212> DNA	
<213> Vibrio fischeri	
<220><221> modified_base	
<222> (1194)..(1194)	
<223> a, c, t, g, unknown or other	
<400> 17	
ggcttaata aacagaatca ccaaaaagga atagagtatg aagtttggaa atatttgttt	60
ttcgtatcaa ccaccaggtaa aaactcataa gctaagtaat ggatcgctt gttcggcttg	120
gtatcgctc agaagagtag ggttgatac atattggacc tttagaacatc attttacaga	180
gtttggctt acggaaatt tatttgtgc tgccgctaac ctgttaggaa gaactaaaac	240
attaaatgtt ggcactatgg gggttggat tccgacagca cacccagttc gacagtttaga	300
agacgtttta ttattagatc aaatgtcgaa aggtcgttt aatttggaa cggttcgagg	360
gctataccat aaagattttc gagtattttgg tggtgatatg gaagagtctc gagcaattac	420
tcaaaatttc taccagatga taatggaaag cttacagaca ggaaccatta gctctgatag	480
tgattacatt caatttccta aggttgatgt atatccaaa gtgtactcaa aaaatgtacc	540
aacctgtatg actgctgagt ccgcaagtac gacagaatgg ctagcaatac aagggtacc	600
aatggttctt agttggatta ttggtactaa tgaaaaaaaaa gcacagatgg aactctataa	660
tgaatttgcg acagaatatg gtcatgat atctaaaata gatcatgtt tgacttat	720

ttgttctgtt gatgatgatg cacaaggc gcaagatgt tgcggagt ttctaaaaa	780
ttggatgac tcataatgtaa atgcgaccaa tatcttaat gatacgatc aaactcggt	840
ttatgattat cataaaggc aatggcgtga ttttgttta caaggacata caaacacaa	900
tcgacgttt gattatagca atggtattaa ccctgttagc actcctgagc agtgtattga	960
aatcattcaa cgtgatattg atgcaacggg tattacaac attacatgca gattgaagc	1020
taatgaaact gaagatgaaa taattgcttc catgacgc tttatgacac aagtgcgtcc	1080
tttctaaaaa gaacctaataa aattactta ttgtacta gagataataa ggaacaagtt	1140
atgaaatttg gattatttt tctaaacttt cagaaagatg gaataacatc tgangaaacg	1200
ttggataata tggtaaagac tgcacgtt attgattcaa cttaatataca tttaatact	1260
gcctttgtta atgaacatca ctttcaaaa aatggtattg ttggagcacc tattaccga	1320
gctggttttt tattagggtt aacaataaa ttacatattg gttcatataa tcaagtaatt	1380
accacccatc accctgtacg tgcacgaa gaagccagtt tattagatca aatgtcagag	1440
ggacgcttca ttcttggtt tagtgactgc gaaagtgatt tcgaaatgga atttttaga	1500
cgtcatatct catcaaggca acaacaattt gaagcatgct atgaaataat taatgacgca	1560
ttaactacag gttattgtca tccccaaac gactttatg atttccaaa ggttcaatt	1620
aatccacact gttacagtga gaatggacct aagcaatatg tatccgtac atcaaagaa	1680
gtcgtcatgt gggcagcgaa aaaggcactg ccttaacat ttaagtggga ggataattta	1740
gaaacccaaag aacgctatgc aattctatat aataaaacag cacaacaata tggattgat	1800
attcggatg ttgatcatca attaactgtatc attgcgact taaatgctga tagaagtacg	1860
gctcaagaag aagtgagaga atactaaaaa gactatataca ctgaaactta ccctcaaatg	1920
gacagagatg aaaaaattaa ctgcattatt gaagagaatg cagttgggtc tcatgatgac	1980
tattatgaat cgacaaaattt agcagtggaa aaaacagggt cttaatataat tttattatcc	2040
tttgaatcaa tgcgttatataa agatgtttt tttatgtttt gaacccaaaaa	2100
atcgaaatga attaccata ataaaattaa aggcaatttc tatattatgt tgcctttta	2160
aatttc	2166
<210> 18	
<211> 2143	
<212> RNA	
<213> Vibrio fischeri	
<400> 18	
aaucaccaaa aaggaauaga guaugaagu uggaaauuu uguuuuucgu aucaaccacc	60

aggugaaacu cauaagcuua guaauggauc gcuuugguucg gcuugguauc gccucagaag	120
aguaggguuu gauacauuu ggaccuuaga acaucuuuu acagaguuug gucuuacggg	180
aaauuuauuu guugcugcgg cuaaccuguu aggaagaacu aaaacauuaa auguuggcac	240
uaugggguu guuauuccga cagcacaccc aguucgacag uuagaagacg uuuuauuuau	300
agaucaaauug ucgaagguc guuuuaauuu uggaaccguu cgagggcuau accauaaaga	360
uuuucgagua uugguguug auuggaaga gucucgagca auuacucaa auuucuacca	420
gaugauaauug gaaagcuuac agacaggaac cauugcucu gauagugauu acauuaauu	480
uccuaagguu gauguaauac ccaaagugua cuaaaaaaau guaccaaccu guaugacugc	540
ugaguccgca aguacgacag auggcuagc aauacaaggg cuaccaauugg uucuuaguug	600
gauuaauuggu acuaaugaaa aaaaagcaca gauggaacuc uauuaugaaa uugcgacaga	660
auauggucau gauuaaucua aauuagaua uuguauagacu uauuuuuguu cuguugauga	720
ugaugcaca aaggcgcaag auguuugucg ggaguuucug aaaaauuggu augacuaua	780
uguaaaugcg accaaauacu uuaugauag caaucaaacu cgugguuuug auuaucauaa	840
aggucuauugg cgugauuuug uuuuacaagg acauacaaac accaaucgac guguugauua	900
uagcaauggu auuaacccug uaggcacucc ugagcagugu auugaaauca uucaacguga	960
uauugaugca acggguauua caaacauuac augcggauuu gaagcuauug gaacugaaga	1020
ugaaauaaauu gciuccaung gacgcuuuau gacacaaguc gcuccuuuuc uaaaagaacc	1080
uuuuuuuuu acuuauuuga uacuagagau aauaaggaac aaguuuugaa auuuggauua	1140
uuuuuucuua acuuuucagaa agauggaaau acaucugaag aaacguugga uaauauggua	1200
aagacuguu cguuaauuuga uucaacuaaa uaucuuuuua auacugccuu ugguuaugaa	1260
caucacuuu caaaaaauugg uauuguugga gcaccuuua ccgcagcugg uuuuuuuuuu	1320
ggguuaacaa auuuuuuaca uauugguuca uuuauucaag uaauuaccac ccaucacccu	1380
guacguguag cagaagaagc caguuuuaua gauaaauugu cagagggacg ciucauuuu	1440
gguuuuuagug acugcgaaag ugauuuucgaa auggaauuuu uuagacguca uaucucauca	1500
aggcaacaac auuuugaagc augcuauaa auuuuuauug acgcaauuac uacagguuau	1560
ugucaucccc aaaacgacuu uuauguuuuu ccaaaggguu caauuaaucc acacguuac	1620
agugagaaug gaccuaagca auauguaucc gcuacaucaa aagaagucgu caugugggca	1680
gcgaaaaagg cacugccuuu aacuuuuuag ugaggaggaua auuuagaaac caaagaacgc	1740
uaugcaauuc uauuaauuaa aacagcaca caauauggua uugauauuuc ggauguugau	1800
caucaauuaa cuguaauugc gaacuuauuu gcugauagaa guacggcuca agaagaagug	1860
agagaauacu uaaaagacua uaucacugaa acuuacccuc aaauggacag agaugaaaaa	1920

auuaacugca uuauugaaga gaaugcaguu gggucucaug augacauua ugaaucgaca	1980
aaauuagcag ugaaaaaac agggucuaaa aauauuuuau uauccuuuga aucaaugucc	2040
gauauuaag augaaaaga uauuuugau auguugaacc aaaaaaucga aaugaauua	2100
ccauaauaaa auuaaggca auuucuauau uagauugccu uuu	2143

<210> 19

<211> 2294

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 19

aaaggcauga aaaaacuugg uaucuucacc aacaccuagc uuuuugaagg aauugaguau	60
gaaguuugga aauauugguu guucguauca accaccaggu gaaacucuaua agcuaaaggc	120
augaaaaaac uaggugaucu ucaccaacac cuaguuuuuu caaggaauug aguauugaagu	180
uuggaaauau uuguuuuuucg uaucaaccac caggugaaac ucauaagcua aguauggau	240
cgcuuuguuc ggcuugguau cgccucagaa gaguaggguu ugauacauau uggaccuuag	300

aacaucauuu uacagaguuu ggucuuacgg gaaauuuauu uguugcugcg gcuaaccugu	360
uaggaagaac uaaaacauua aauguuggca cuauggggu uguuauuccg acagcacacc	420
caguucgaca guuagaagac guuuuauuu uagaucaaau gucgaaaggu cguuuuauu	480
uuggaaccgu ucgagggcua uaccauaag auuuucgagu auwugguguu gauauggaag	540
agucucgagc aauuacucaa auuuucuacc agaughaua ggaaagcuu cagacaggaa	600
ccauuagcuc ugauagugau uacauucaau uuccuaaggu ugauguaau cccaaagugu	660
acucaaaaaa uguaccaacc uguauugacug cugaguuccgc aaguacgaca gaauggcuag	720

caauacaagg gcuaccaaag guucuuaguu ggauuaugg uacuaugaa aaaaaagcac	780
agauggaacu cuauauggaa auugcgacag aauaugguca ugauauaucu aaaaauagauc	840
auuguaugac uuauauuugu ucuguugaug augaughcaca aaaggcgcaa gauguuuguc	900
gggaguuuucu gaaaaauugg uaugacuau auguaauugc gaccaauauc uuuauugaua	960
gcaaucaaac ucgugguuau gauuaucuaa aagguaug gcgugauuu guuuuacaag	1020
gacauacaaa caccaaucga cguguugauu auagcauagg uauuaacccu guaggcacuc	1080
cugagcagug uauugaaauc auucaacgug auauugaua aacggguauu acaaacauua	1140

caugcggauu ugaagcuaau ggaacugaag augaaauua ugcuuccaug cgacgcuuua	1200
--	------

ugacacaagu cgcuccuuuc uuaaaagaac cuaaauaaau uacuuauuug auacuagaga	1260
uaauaaggaa caaguuuauga aauuuggauu auuuuuuucua aacuuucaga aagauggaau	1320
aacaucugaa gaaacguugg auaauauggu aaagacuguc acguuaauug auucaacuaa	1380
auaucuuuu aauacugccu uuguuuauga acaucacuuu ucaaaaaaug guauuguugg	1440
agcaccuuu accgcagcug guuuuuuauu aggguaaca auaauuuac auauugguuc	1500
auuaaucaa guaauuacca cccaucaccc uguacgugua gcagaagaag ccaguuuuuu	1560

agaucaaaug ucagagggac gcuucauuuc ugguuuuagu gacugcgaaa gugauuuucga	1620
aauggaauuu uuuagacguc auaucucauc aaggcaacaa caauuugaag caugcuuga	1680
aaauauuaau gacgcuuuaa cuacagguua uugucauccc caaaacgacu uuuaugauuu	1740
uccaaagguu ucaauuaauc cacacuguua cagugagaau ggaccuaagc auaauguauc	1800
cgcuacauca aaagaagucg ucaugugggc agcgaaaaag gcacugccuu uaacauuuua	1860
gugggaggau aauuuagaaa ccaaagaacg cuaugcaauu cuauauuaaua aaacagcaca	1920
acaauauuggu auugauauuu cggauguuga ucaucaauua acuguaauug cgaacuuuu	1980

ugcugauaga aguacggcuc aagaagaagu gagagaauac uuaaaagacu auaucacuga	2040
aacuuacccu caaauggaca gagaugaaaa auuuaacugc auuauugaag agaaugcagu	2100
ugggucucau gaugacuuu augaaucggc aaaauuagca guggaaaaaa cagggucuua	2160
aaauauuuua uuauccuuug aaucauguc cgauauuaaa gaugaaaaag auauuuuuga	2220
uauguugaac caaaaaaucg aaaugaauuu accauuaaua auuuaaggc auuuucuaua	2280
uuagauugcc uuuu	2294

<210> 20

<211> 12

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<220><221> modified_base

<222> (7)..(9)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<220>

<223> See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments

<400> 20

n nwawgnnnu un

12

<210> 21

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<220><221> modified_base

<222> (4)..(7)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<220><221> modified_base

<222> (12)..(13)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<220>

<223> See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments

<400

> 21

n agnnnnncwu wnn

13

<210> 22

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 22

cagauaacau uuu

13