



(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

W02008131230 A1

US5736388 A

Mol. Microbiol., 72(1), p.98-108, 2009.

Proc. Natl.Acad. Sci., 109(40),

p.16300-16305, 2012.

(73) 특허권자

지니위브 바이오사이언시스, 인코포레이티드

미국, 캘리포니아 95032, 로스 가토스, 빌딩
비200, 유니버시티 애비뉴 983

(72) 발명자

레이, 디에고, 아리엘

미국, 캘리포니아 95032, 로스 가토스, 빌딩
비200, 유니버시티 애비뉴 983, 지니위브 바이오
사이언시스, 인코포레이티드

드포리스트, 니콜

미국, 캘리포니아 95032, 로스 가토스, 빌딩
비200, 유니버시티 애비뉴 983, 지니위브 바이오
사이언시스, 인코포레이티드

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김영철, 김 순 영

전체 청구항 수 : 총 36 항

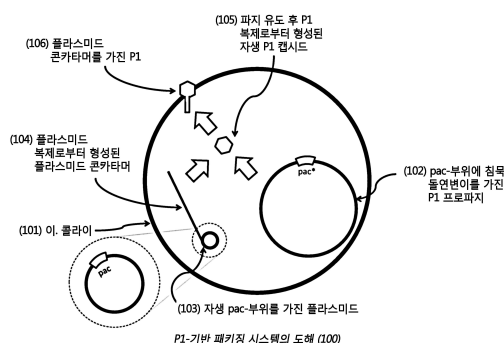
심사관 : 이재영

(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.

대표도



(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, 지니위브 바이오사
이언시스, 인코포레이티드

슈클라, 소니

미국, 캘리포니아 95032, 로스 가토스, 빌딩
비200, 유니버시티 애비뉴 983, 지니위브 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 박테리아

아 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 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 80a 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 $\phi 11$ 또는 $\phi 80 \alpha$ 의 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 $\phi 80 \alpha$ terS 유전자 또는 박테리오파지 $\phi 11$ 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 $\phi 80 \alpha$ 또는 박테리오파지 $\phi 11$ 을 포함하는 박테리아 세포 패키징 시스템.

청구항 22

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

이. 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 펩티드 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 펩티드는 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 게놈을 함유하지 않는 것인, 방법.

청구항 35

제 33 항에 있어서, 상기 세포용해 기의 상기 유도는 상기 박테리아 세포의 상기 게놈으로부터 상기 게놈 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

[0002] 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

[0004] 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℃에서 억제되지만 37℃에서 활성인 세포용해 주기를 가지는 엠. 투베르쿨로시스/바실루스 칼메트-구에린(BCG) 루시페라제 리포터 파지를 개발했다. 이 시스템을 사용하여 Carriere et al.은 세포용해 주기가 억제된 리포터 파지를 사용한 BCG의 검출을 증명했다.

[0007] 그러나, 박테리오파지-기반 리포터 분석에서 박테리오파지의 복제 기능을 제거하지 않고 억제된 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 파지 phAE40의 세포용해 주기는 이 파지가 30℃의 비-허용 온도에서 세포를 감염시키는데 사용되었을 때 억제되었다. 이 온도 요건은 표적 박테리아의 최적 온도가 37℃였다는 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 파지 phAE40의 세포용해 활성은 감소되었지만 제거되지는 않았으며, 그 결과 분석에서의 루시페라제 신호가 약해졌다. Carriere et al.은 무손상 파지-발현 유전자 및 분석의 온도 제한과 같은 리포터 신호를 최종적으로 약화시킨 원인을 강조했고, 이들은 모두 파지 리포터의 세포용해 주기가 제거되지 않았다는 사실로부터 기인한다.

[0009] 파지의 자연적 용원 주기에 의존하는 리포터 분석은 세포용해 활성을 산발적으로 나타낼 것으로 예상될 수 있다. 게다가, 파지의 용원 주기에 의존하는 분석은 유사한 파지로 이미 용원화된 표적 세포와 침입한 바이러스 핵산을 표적화하는 자연 발생 숙주 제한 시스템으로부터 중복감염 면역을 나타내는 경향이 있을 수 있고, 이것이 리포터 파지의 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 헤드폴 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, 앵타머, 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 계능; 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 발현할 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 세포용해 레플리콘이다. 특정 구체예에서, 레플리콘은 C1 리프레서-제어 P53 프로모터, 프로모터 P53 안티센스, *repL* 유전자, 및 *kilA* 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 $\phi 11$ 또는 $\phi 80\alpha$ *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

징 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 콘카타머 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 $\phi 80\alpha$ 또는 박테리오파지 $\phi 11$ 을 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 펩티드 (His-tag, 3X-FLAG) 및 선택성 마커 (ampC, tet(M), CAT, erm)로 구성되는 군으로부터 선택된다. 다른 양태에서, 리포터 핵산 분자는 앵타머를 포함한다. 또 다른 양태에서, 리포터 핵산 분자는 상기 리포터 핵산 분자에서 제2 서열에 상보적인 핵산 전사체 서열을 포함한다.

[0021] 하나의 구체예에서, 핵산 전사체 서열은 세포 전사체에 상보적이다. 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 상보적인 핵산 전사체 서열을 포함하며, 여기서 핵산 전사체 서열은 세포 전사체에 상보적이고, 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 박테리오파지의 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 입자의 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 kila 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 $\phi 11$ 또는 $\phi 80\alpha$ 의 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 콘카타머 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 $\phi 11$ 또는 $\phi 80\alpha$ 를 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 펩티드를 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 앵타머를 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 섬 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 콘카타머를 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 리프레스-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 ϕ 11 또는 ϕ 80a 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 ϕ 80a 또는 박테리오파지 ϕ 11을 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 펩티드를 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 앵타머를 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 상보적인 핵산 전사체 서열을 포함한다. 하나의 구체예에서, 핵산 전사체 서열은 세포 전사체에 상보적이다. 다른 구체예에서, 핵산 전사체 서열은 시스-억제 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 상기 리포터 핵산 분자의 레플리카는 상기 리포터 핵산 분자의 상기 레플리카에서 제2 서열에 상보적인 핵산 전사체 서열을 포함하며, 상기 핵산 전사체 서열은 세포 전사체에 상보적이고, 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 세포용해기의 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 ϕ 80a terS 유전자 또는 박테리오파지 ϕ 11 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 $\phi 80\alpha$ 또는 박테리오파지 $\phi 11$ 을 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 박테리오파지 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 펩티드(His-tag, 3X-FLAG) 및 선택성 마커(ampC, tet(M), CAT, erm)로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 앵타머를 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 암호화하며 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 스태필로코쿠스 아우레우스(MRSA) 세포를 포함한다. 다른 구체예에서, 박테리아 세포는 메티실린 감응성 스태필로코쿠스 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 펩티드를 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 분자내 이중가닥 영역을 포함하는 리포터 발현을 차단하는 제1 입체구조, 및 상기 분자내 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 상보적인 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 분자를 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 분자내 이중가닥 영역을 형성하기 위해 상기 핵산 구조체에서 서로에 대해 시스 위치된다. 특정 구체예에서, 제1 하위서열 및 상기 제2 하위서열은 상기 분자내 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 분자내 영역을 포함한다. 다른 양태에서, 비-결합 분자내 영역은 상기 제1 하위서열의 3'과 상기 제2 하위서열의 5'에 위치된다. 다른 양태에서, 비-결합 분자내 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 암호화하며 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 구조체를 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 분자를 암호화한다. 일부 구체예에서, 검출 가능한 마커는 형광 분자 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 구조체를 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 구조체를 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 구조체를 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 구조체를 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 구조체와 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 구조체를 포함하는 비-복제 형질도입 입자를 포함하는 조성물을 포함하며, 상기 제1 프로모터는 박테리아 세포에 내인성인 인두서 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 인두서 단백질에 의해서 유도될 수 있는 제1 프로모터를 포함하는 핵산 리포터 구조체를 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 구조체를 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 구조체를 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 벡터의 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 벡터의 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 인두서의 검출을 위한 NRTP의 사용을 위한 시스템을 도시한다.

도 10은 본 발명의 구체예에 따른 엔테로코쿠스 파에시움(또는 이.파에시움)에서 반코마이신 내성(vanA) 유전자의 프로모터의 인두서인, 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 인두서인, 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 인두서인, 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-엡타머(SA)-기반 세포내 분자 리포터 시스템의 디자인 및 기능을 도시한다.
- 도 17은 본 발명의 구체예에 따른 리포터 전사체 상에서 리포터 서열의 5' UTR(미번역 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 스팟팅했다.
- 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 세콕시틴에서 성장된 에스. 아우레우스의 결과를 도시한다.
- 도 24는 4, 8, 16, 32, 64, 및 128ug/mL의 세콕시틴의 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:16)의 뉴클레오티드 1,464-1,519)의 말단 루프 23(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 해

어떤 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

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

본원에서 사용된 "리포터 핵산 분자"는 DNA 또는 RNA 분자를 포함하는 뉴클레오타이드 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.

"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 펩티드를 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 앵타머 또는 리보자임과 같은 핵산일 수 있다.

본 발명의 일부 양태에서, 리포터 핵산 분자는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 본 발명의 다른 양태에서, 프로모터는 특정 세포(예를 들어, 특정 종)에서만 프로모터의 활성화에 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 활성화에 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 콘카타머 DNA로서 패키징될 수 있는 레플리콘을 형성한다.

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 뉴클레오타이드 서열의 일부를 말한다. 또한, 표적 전사체는 세포 전사체 또는 자연 발생 전사체로서 언급될 수 있다.

본원에서 사용된 용어 "전사체"는 DNA 또는 RNA 주형 서열 또는 유전자로부터 전사된 뉴클레오타이드 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.

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, 분자간 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.

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 리포펙션과 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) 이들 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, 뿔린, 소과, 말과 및 돼지과를 포함한다.
- [0090] "G", "C", "A" 및 "U"는 각각 일반적으로 구아닌, 시토신, 아데닌 및 우라실을 염기로서 각각 함유하는 뉴클레오타이드를 표시한다. "T"와 "dT"는 본원에서 상호 교환하여 사용되며, 뉴클레오타이드가 티미딘인 데옥시리보뉴클레오타이드, 예를 들어 데옥시리보티미딘을 말한다. 그러나, 용어 "리보뉴클레오타이드", "뉴클레오타이드" 또는 "데옥시리보뉴클레오타이드"는 또한 아래 더 상세히 설명된 대로 변형된 뉴클레오타이드, 또는 대용 대체 부분을 말할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 당업자는 구아닌, 시토신, 아데닌 및 우라실이 이러한 대체 부분을 가진 뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드의 염기쌍 특성의 실질적인 변경 없이 다른 부분으로 대체될 수 있다는 것을 잘 알고 있다. 예를 들어, 제한은 아니지만, 이노신을 염기로서 포함하는 뉴클레오타이드는 아데닌, 시토신 또는 우라실을 함유하는 뉴클레오타이드와 염기쌍을 이룰 수 있다. 따라서, 우라실, 구아닌 또는 아데닌을 함유하는 뉴클레오타이드는, 예를 들어 이노신을 함유하는 뉴클레오타이드로 본 발명의 뉴클레오타이드 서열에서 대체될 수 있다. 이러한 대체 부분을 포함하는 서열도 본 발명의 구체예이다.
- [0091] 본원에서 사용된 용어 "상보성"은 제2 뉴클레오타이드 서열과 관련하여 제1 뉴클레오타이드 서열을 개시하기 위해 사용될 때 당업자에게 이해되는 대로 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드와 특정 조건에서 혼성화하여 듀플렉스 구조를 형성할 수 있는 제1 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 능력을 말한다. 상보성 서열들은 또한 서로 결합하는 것으로서 개시되며, 결합 친화성에 의해서 특성화된다.
- [0092] 예를 들어, 제1 뉴클레오타이드 서열은 긴축 혼성화 조건하에 두 서열이 혼성화(예를 들어, 아닐링)할 때 제2 뉴클레오타이드 서열과 상보적인 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 뉴클레오타이드 서열이 그것의 표적 서열, 예를 들어 제2 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 서열에 대한 열 용융점 (T_m)보다 약 5°C 더 낮도록 선택된다. T_m 은 제1 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드의 최종 용도에 따라서 두 서열의 상보성 시험에 가장 적합한 조건을 설정할 수 있다.

[0093] 상보성은 제1 및 제2 뉴클레오타이드 서열의 전체 길이에 걸쳐서 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드와 제1 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드의 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 올리고뉴클레오타이드가 혼성화시 하나 이상의 단일 가닥 오버행을 형성하도록 설계된 경우, 이러한 오버행은 상보성 결정과 관련하여 미스매치로 간주되지 않아야 한다. 예를 들어, 21개 뉴클레오타이드 길이의 하나의 올리고뉴클레오타이드와 23개 뉴클레오타이드 길이의 다른 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 dsRNA는, 더 긴 올리고뉴클레오타이드가 더 짧은 올리고뉴클레오타이드와 완전히 상보성인 21개 뉴클레오타이드의 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 뉴클레오타이드로부터 형성된 염기쌍 및/또는 비-왓슨-크릭 염기쌍을 포함하거나, 그로부터 형성될 수 있다. 이러한 비-왓슨-크릭 염기쌍은, 제한은 아니지만, G:U Wobble 또는 Hoogsteen 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 뉴클레오타이드의 대부분은 리보뉴클레오타이드이지만, 본원에 상세히 개시된 대로, 각 가닥 또는 양쪽 가닥은 또한 적어도 하나의 비-리보뉴클레오타이드, 예를 들어 데옥시리보뉴클레오타이드 및/또는 변형된 뉴클레오타이드를 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 일부 이어서, 한 가닥의 3'-단부와 각각의 나머지 가닥의 5'-단부 사이가 뉴클레오타이드의 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 뉴클레오타이드의 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 뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 염기쌍의 최대 수는 듀플렉스의 최단 가닥의 뉴클레오타이드의 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 뉴클레오타이드 내에 존재한다.

[0098] 둘 이상의 핵산 또는 폴리펩티드 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 의해서 측정하여 최대 상응성에 맞게 비교하고 정렬했을 때 명시된 퍼센트의 뉴클레오타이드 또는 핵산 잔기가 동일한 둘 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.

[0105] 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 활성이 플라크 분석을 통해서 시험되었다(표 1). 파지 $\phi 11$ 은 10개 임상 MRSA 분리주 중 10개에서 세포용해 활성을 나타냈고, $\phi 80 \alpha$ 는 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 $\phi 11$ 및 $\phi 80 \alpha$ 의 세포용해 활성(문자 "x"로 표시된다)

MRSA 분리주	$\phi 11$	$\phi 80 \alpha$
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 활성화와 파지 내성은 모두 리포터 파지에 기초한 분석에서 억제성일 수 있다. 세포용해 활성화는 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 파지에 서의 파지 DNA의 통합에 의해서 야기된 세포용해 활성화와 파지 내성은 모두 파지 리포터를 통합한 분석에서 거짓-음성 결과를 초래할 수 있다.

[0111] III. 비-복제 형질도입 입자(NRTP)의 제조 방법

[0112] A. 비-복제 형질도입 입자를 제조하기 위한 파괴/보상-기반 방법

[0113] 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 벡터가 도 2에 도시된다. 침묵 돌연변이/보상-기반 P1 플라스미드 패키징 시스템의 균주와 벡터를 구성하는 방식에 대한 상세한 내용은 아래 실시예 1에 상세히 개시된다.

[0121] 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 계놈 패키징이 바이러스 생성 동안에 개시되는 요소로서 바이러스 패키징 기구에 의해서 인식되는 바이러스의 계놈 성분의 결실에 기초한다. 이러한 요소의 예들은 pac-타입 박테리오파지의 pac-부위 서열 및 cos-타입 박테리오파지의 cos-부위 서열을 포함한다. 이들 패키징 개시 부위는 주로 바이러스 생성에 필수적인 유전자의 코딩 영역 내에서 발견된다. 일부 구체예에서, 패키징 개시 부위만 결실되어, 돌연변이된 바이러스는 세포용해 주기를 겪지만 계놈 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 계놈은 패키징 개시 부위가 결실된 바이러스 계놈으로 용원화된다. 보상성 플라스미드가 세포에 도입되며, 이 플라스미드 DNA는 바이러스 계놈에서 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 레플리콘을 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 계놈에 패키징 서열이 재도입될 수 있는 두 DNA 분자들 사이의 상동성 재조합의 가능성을 피할 수 있기 때문이다. 상동성의 결여를 달성하기 위한 하나의 전략은 바이러스 계놈으로부터 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 $\phi 80\alpha$, pac-타입 파지를 사용하여 제공된다. 이 파지 계놈은 숙주 박테리아 세포에서 용원화되며, pac-타입 프로파지 $\phi 80\alpha$ 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 패키징되도록한다. 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 벡터의 예를 도시한다. pac-부위 결실/보상 플라스미드 패키징 시스템의 성분 및 구성에 대한 더 상세한 내용은 아래 실시예 2에 개시된다.

[0129] B. 병원성 섬-기반 패키징 시스템

- [0130] 병원성 섬(PTI)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 마찬가지로 지일 것으로 추정된다. 파지 80 α은 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 콘카타머 내에서의 pac-부위의 인식으로 인한 자생 파지 계놈의 패키징의 결과물이다.
- [0133] **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 달성될 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 게놈에서의 특이적 부위에 통합될 것이다. 패키징 전에 외래 DNA 서열이 GI에 포함된 경우, 패키징 시스템은 레시피언트 세포로 외래 DNA 서열을 송달하고 레시피언트 세포의 게놈에 외래 DNA 서열을 통합시킨다.

[0141] 2) 인테그라아제를 결여한 GI-기반 패키징 시스템

[0142] 다른 구체예에서, 패키징 시스템은 패키징된 GI DNA가 레시피언트 세포의 게놈에 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 게놈(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 게놈은 박테리아 게놈(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 게놈(미도시)과 유사한 방식으로, 절제된 GI는 원형화되고(709), 작은 터미나아제 단백질(TerS)을 발현하며, 복제하여 GI 콘카타머(711)를 형성하기 시작한다. 파지 TerL 유전자와 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 게놈에서의 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 게놈에 통합되지 않는다.

[0145] 3) 인테그라아제를 결여한 SaPIbov2-기반 패키징의 디자인 및 기능

[0146] 일부 구체예에서, NRTP 생성 방법은 GI-기반 패키징 시스템에서 GI SaPIbov2 및 박테리오파지 $\phi 11$ 을 이용한다. 다른 구체예는 박테리오파지 80 α 와 함께 SaPI의 SaPI1, SaPI2, SaPIbov1 및 SaPIbov2를 포함하는 다른 SaPI GI 및 다른 적합한 박테리오파지, 및 박테리오파지 $\phi 11$ 과 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 $\phi 11$ (803)로 용원화된다. 세포의 게놈(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 게놈은 박테리아 게놈(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 게놈(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.

IV. 리포터

일부 구체예에서, NRTP 및 본 발명의 구조체는 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.

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.

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 펩티드(His-tag, 3X-FLAG), 앵타머로서 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.

다른 양태에서, 리포터 분자는 핵산 분자를 포함한다. 일부 양태에서, 리포터 분자는 특이적 결합 활성을 갖거나, 또는 효소 활성을 나타내는 앵타머이다(예를 들어, 앵타자임, DNAzyme, 리보자임).

리포터 및 리포터 분석은 본원의 섹션 V에서 더 자세히 개시된다.

V. NRTP 및 리포터 분석

A. 인두서 리포터 분석

본 발명은 생육성 세포 내에서 유전자 프로모터를 표적화하는 내인성 또는 자생 인두서와 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.

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.

도 9는 두 유전자, 즉 인두서를 암호화하는 유전자(902)와 표적 유전자(903)를 가진 표적 세포의 게놈 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.

자생 세포에서, 인두서 유전자(902)가 발현되고 인두서 단백질(907)을 생성할 때, 인두서 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.

리포터 핵산 분자(904)가 표적 유기체 내에 존재하는 경우, 인두서(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.

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

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 인두서인 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 인두서 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 인두서인 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 인두서: 표적 세포는 진핵 및 원핵 세포 표적과 관련된 인두서를 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 콘주게이션을 포함한다.
- [0174] **3) 박테리오파지-기반 SarS 리포터 시스템**
- [0175] 본 발명의 다른 구체예에서, 리포터 핵산 분자는 에스. 아우레우스에서 단백질 A 유전자(spa)의 프로모터의 인두서인 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 계능(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 계능 트랜스포존에서 Pspa(1206)을 유도할 수 있고, 따라서 spa 유전자(1203)의 발현을 야기하며, 단백질 A(1208)를 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.
- [0179] **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:** 제조할 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 콘주게이션을 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.
- [0185] **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 첨가된다. 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.
- [0189] **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 앵타머-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 콘주게이션을 포함한다.
- [0194] **1) 비-복제 형질도입 입자/스위치 가능한 앵타머-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 결합 시 입체구조 변화를 겪도록 설계된 스위치 가능한 앵타머일 수 있다. 입체구조 변화는 앵타머가 계속해서 형광단과 결합하도록 하며, 형광단은 앵타머에 의해서 결합되었을 때 증진된 형광을 나타낸다.
- [0196] 도 16은 박테리오파지/스위치 가능한-앵타머(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.
- [0197] **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 뉴클레오타이드 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 양성율을 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 양성율을 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

[0202] 본 발명의 방법은 세포에 핵산 분자를 전달하기 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.

[0203] 안티센스 RNA는 세포 내에서 전사된 메신저 RNA(mRNA) 가닥에 상보적인 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 관독의 입체적 방해 결과로서 파괴된다.

[0204] 안티센스 RNA 기전은 이중가닥 RNA 단편(dsRNA, 작은 간섭 RNA(siRNA)라고도 칭한다)이, 가장 전형적으로 mRNA와 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 재조합 전구체 tRNA의 빠른 분해를 가져올 수 있다.

[0205] RNAi 경로는 많은 진핵생물에서 발견되며, 효소 다이에 의해 개시되는데, 이것은 긴 이중가닥 RNA(dsRNA) 분자를 siRNA라 칭하는 약 20개 뉴클레오타이드의 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.

[0206] 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

[0208] 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 개시된 전사 약화, 번역 약화, 및 전사체 탈안정화를 포함하는 다양한 억제 기전, 및 입체구조 변화 및 절단을 포함하는 다양한 활성화 기전의 비제한적 예들을 제공한다.

[0209] 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.

[0210] 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'-nnWAWGNNNUUN-3'(SEQ ID NO:20) 또는 5'-NAGNNNCWUWnn-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 상보성하도록 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 CAGUAACAUUUU(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 가능하게 된다.

[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 활성화와 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.

[0219] 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, RNAIII/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.

[0225] 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 분자간 핵산 분자 상호작용이다: (1) 핵산 분자의 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 분자간 RNA 상호작용이 계산된다.

[0231] 3) RNA의 2차 구조 드로잉 전용 Java 경량 애플릿인 RNA용 비주얼라이제이션 애플릿(VARNA)(http://varna.lri.fr/)을 사용하여 RNA 2차 구조가 시각화된다.

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

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 분자간 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 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 서열 또는 영역을 가로질러 이루어질 수 있다.
- [0237] **5) 시스-억제 전사체 또는 리포터 전사체에 대한 절단 기전**
- [0238] 본 발명에서 이용된 일반적인 기전은 두 연속 기전을 야기할 수 있는 분자간 핵산 분자 상호작용이다: (1) 핵산 분자의 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 위해서 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.

[0245] 6) 전사체

[0246] 상기 개시된 대로, 전사체는 DNA 또는 RNA 주형 서열 또는 유전자로부터 전사된 뉴클레오타이드 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 분자내 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 분자를 암호화하는 "리포터 서열"로서 칭해진다.

[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 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드 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 뉴클레오타이드에 의해서 리포터 서열과 분리된다.

[0249] 7) 벡터

[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 계통에 통합된 트랜스젠으로서 통합되고 유전될 수 있다. 전사체는 또한 염색체의 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 위치한 프로모터에 의해 번역될 수 있다. 하나의 구체예에서, 시스-억제 및 리포터 서열이 전사체가 줄기 및 루프 구조를 갖도록 링커 폴리뉴클레오타이드 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 시험관내 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 계능에 삽입된 유전자를 형질도입하고 발현할 수 있는 재조합 레트로바이러스 벡터가 재조합 레트로바이러스 계능을 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), 랩도바이러스, 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 스토마티티스 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 Robinson 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 국제특허출원 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 초기 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 채장에 지시할 수 있다(예를 들어, 채장에서의 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 엑시손, 에스트로겐, 프로게스테론, 테트라사이클린, 이량화의 화학적 인두서, 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, 올리고펙타민) 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 트랜스펙션이 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. 생체의 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] 제조합 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 콘주게이션을 포함한다.

[0262] 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 펩티드 또는 앵타머로서 기능하거나 효소 활성을 나타내는 핵산일 수 있다.

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

[0266] 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.

[0269] 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, 제조합 DNA 기술 및 약학 분야의 종래의 방법을 이용할 것이다. 이러한 기술들은 문헌에 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.

[0272] 실시예 1: 침묵 돌연변이/보상 패키징 시스템

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

[0274] 패키징 시스템의 개발에 사용된 재료들은 다음과 같다:

- [0275] 박테리아 균주:
- [0276] - N1706, 이. 콜라이 K-12 P1 c1-100 Tn9 용원
- [0277] 백터:
- [0278] - 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 백터 백본 및 카세트 서열에 사용될 수 있다:
- [0280] - X06758 (박테리아 루시페라제 유전자 luxAB)
- [0281] - SEQ ID NO:1 (자생 P1 pac-부위)
- [0282] - SEQ ID NO:3 (C1 리프레서-제어 P53 프로모터, 프로모터 P53 안티센스, repL 유전자, 및 kila 유전자의 프레임 내 결실을 함유하는 P1 세포용해 레플리콘)
- [0283] - SEQ ID NO:4 (luxAB 발현을 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 백터의 구성: GWP10001 백터는 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 하베이로부터의 luxA 및 luxB 유전자, 및 C1 리프레서-제어 P53 프로모터, 프로모터 P53 안티센스, repL 유전자, 및 kila 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 백터를 조립하는 것을 포함하는 당업자에게 알려진 여러 방식으로 구성될 수 있는 백터(GWP10001, SEQ ID NO:11)를 도시한다.
- [0287] 침묵/보상 패키징 시스템: 이 패키징 시스템은 백터 pGWP10001로 보상된 pacA 돌연변이 균주 N1706(pac)를 포함한다. 당업자에게 알려진 대로, 이 시스템을 구성하는 방식은 백터 pGWP10001로의 N1706(pac) 형질전환에 의해서 달성될 수 있다. 백터 pGWP10001은 50ug/mL 카나마이신의 존재하에 형질전환체를 성장시킴으로써 형질전환된 N1706(pac)의 배양물에 유지될 수 있다.
- [0288] 플라스미드 DNA를 가진 형질도입 입자의 생성: 백터 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 계능으로부터 절제되어 파지 구조 요소를 생성하고, 자손 파지 입자에 세포용해 레플리콘에 의해 형성된 pGWP10001 콘카타머 DNA를 패키징한다. 다음에, 얻어진 세포 용해물이 수집되며, 이것은 비-복제 형질도입 입자를 함유하고, 각 입자는 pGWP10001 DNA의 선형 콘카타머를 가진 박테리오파지 P1 입자로 구성된다.
- [0289] 실시예 2: 결실/보상 패키징 시스템
- [0290] 다음은 비-복제 형질도입 입자를 생성하기 위한 결실/보상-기반 패키징 시스템의 설계 및 구성의 실시예이다.
- [0291] 패키징 시스템의 개발에 사용된 재료들은 다음과 같다:
- [0292] 박테리아 균주:
- [0293] 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.
- [0294] RN10616은 박테리오파지 ϕ 80 α 로 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 $\phi 80\alpha$ 로부터 작은 터미나아제 유전자 *terS*를 결실시켜 유도된다 (Ubeda C. et al. Specificity of staphylococcal phage and SaPIDNA packaging as revealed by integrase and terminase mutations. *Molecular Microbiology*, 2009. 72(1): p. 98-108참조).
- [0296] 백터:
- [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:
- [0299] - 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 (*PcIpB* 프로모터 서열)
- [0302] - SEQ ID NO:9 ($\phi 11$ 작은 터미나아제(*terS*) 유전자 서열)
- [0303] - L09137 (*amp ColEI ori*)
- [0304] - X06758 (*luxAB*)
- [0305] - M62650 (전사 종결)
- [0306] terS 결실: *terS* 녹아웃 균주 ST24의 구성은 $\phi 80\alpha$ 작은 터미나아제 유전자의 코딩 서열 대부분을 제거한 프레임 내 결실을 야기하는 대립형질-교환-기반 전략으로 달성될 수 있다. 이 전략의 상세한 내용은 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. 98-108에 개시된다.
- [0307] *terS* 녹아웃 균주의 예시적인 서열이 SEQ ID NO:13에 제시된다(하기 서열목록에 제시됨). SEQ ID NO:13은 $\phi 80\alpha$ *terS* 결실 및 보상을 나타내는 RN10616 게놈 서열 유전자좌이다.
- [0308] 백터 구성: GW80A0001 백터는 이.콜리/에스.아우레우스 셔틀 백터이다. 이 백터는 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 $\phi 11$ 작은 터미나아제(*terS*) 유전자 서열, 구성성 에스. 아우레우스 *PcIpB* 프로모터에 작동 가능하게 연결된 비브리오 하베이로부터의 *luxA* 및 *luxB* 유전자 및 전사 종결 서열(TT)를 함유한다.
- [0309] 도 4는 당업자에게 알려진 여러 방식으로 구성될 수 있는 백터(pGW80A0001, SEQ ID NO:14)를 도시한다. 하나의 예에서, *tet*(M) 카세트와 *luxAB* 유전자는 공개적으로 이용 가능한 pCN36 및 pCN58 백터(Charpentier, E., et al.)로부터 PCR 증폭을 통해 얻어질 수 있다. *PcIpB*는 에스. 아우레우스 RN4220로부터 PCR 증폭으로부터 얻어질 수 있고, *terS*는 RN10616으로부터 PCR 증폭을 통해 얻어질 수 있다. 백터 백본은 공개적으로 이용 가능한 백터 pCN48(Charpentier E., et al.)로부터 *ermC* 유전자를 제거함으로써 얻어질 수 있고, 최종 백터 pGW80A0001의 다양한 성분들이 이 백터 백본 위에서 적절히 설계된 제한 효소-기반 클로닝을 통해 조립될 수 있다.
- [0310] 결실/보상 패키징 시스템: 이 패키징 시스템은 균주 GW24를 생성하기 위해서 백터 pGW80A0001로 보상된 *terS* 녹아웃 균주 ST24를 포함할 수 있다. 당업자에게 알려진 대로, 이 시스템을 구성하는 방식은 백터 pGW80A0001로의 ST24 형질전환에 의해서 달성될 수 있다. 백터 pGW80A0001은 50ug/mL 테트라사이클린의 존재하에 형질전환체를 성장시킴으로써 형질전환된 ST24의 배양물에 유지될 수 있다.
- [0311] 플라스미드 DNA를 가진 형질도입 입자의 생성: 백터 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 $\phi 80\alpha$ 의 세포용해 주기를 유도하며, 도 2에 도시된 대로 프로파지가 GW24 게놈으로부터 절제되어 파지 구조 요소를 생성하고, 자손 파지 입자에 pGW80A0001 콘카타머 DNA를 패키징한다. 다음에, 얻어진 세포 용해물이 수집되며, 이것은 비-복제 형질도입 입자를 함유하고, 각 입자는 pGW80A0001 DNA의 선형 콘카타머를 가진 박

테리오파지 $\phi 80 \alpha$ 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 $\phi 11$ 로 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(SaPIbov2 Δ int). 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 $\phi 11$ 은 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 Micro-biology, 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. Micro-biol., 2004. 70(11): p. 6887-6891 참조). 이 프로모터는 2004년에 개시된 프라이머를 사용하여 에스. 아우레우스 RN4220으로부터 얻어질 수 있다(동일 자료 참조).

[0324] $\phi 11$ /SaPIbov2 Δ int 공통-용원의 생성(RN451($\phi 11$ SaPIbov2 Δ int)): $\phi 11$ 로 JP2488을 용원화함으로써 균주 JP2488($\phi 11$ SaPIbov2 Δ int)가 생성될 수 있다.

[0325] $\phi 11$ terS의 결실(RN451($\phi 11\Delta$ terS SaPIbov2 Δ int)): 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($\phi 11$ SaPIbov2 Δ int)로부터 $\phi 11$ terS 유전자를 결실시킴으로써 균주 RN451($\phi 11\Delta$ terS SaPIbov2 Δ int)가 생성될 수 있다.

[0326] 에스. 아우레우스 게놈에 PclpB-int의 통합(RN451($\phi 11\Delta$ terS SaPIbov2 Δ int PclpB-int)): 표준 분자생물학 기술을 통해서 PclpB와 int를 먼저 융합한 후, PclpB-int 융합체를 RN451($\phi 11\Delta$ terS SaPIbov2 Δ int)의 게놈에 삽입하고, 이어서 $\phi 11$ 및 SaPIbov2 영역의 바깥쪽에 삽입된 PclpB-int를 가진 클론을 선택함으로써 RN451($\phi 11\Delta$ terS SaPIbov2 Δ int PclpB-int)가 생성될 수 있다.

[0327] SaPIbov2 Δ int PclpB-int 콘카타머만을 가진 $\phi 11$ 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($\phi 11\Delta$ terS SaPIbov2 Δ int PclpB-int)의 미토마이신-C 유도를 통해서 SaPIbov2 Δ int PclpB-int 콘카타머만을 가진 $\phi 11$ 입자가 생성될 수 있다. 세포 용해물은 비-복제 형질도입 입자를 함유하고, 각 입자는 GI-유도 DNA의 선형 콘카타머를 가진 박테리오파지 $\phi 11$ 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.

실시예 4: terS 결실/보상-기반 SarS 리포터 형질도입 입자

다음은 terS 결실/보상-기반 비-복제 형질도입 입자를 이용한 인두서 리포터-기반 SarS 리포터 시스템의 실시예이다.

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

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

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

luxAB-발현 리포터 벡터의 구성:

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



이.콜리/에스.아우레우스 서틀 벡터는 에스. 아우레우스(pT181cop-623 repC) 및 이. 콜라이(ColE1ori) 복제 기원, 암피실린(amp)과 테트라사이클린(tet(M)) 내성 유전자, 구성성 프로모터(PclpB)의 제어하의 $\phi 11$ 작은 터미나아제(terS) 유전자, 다중 클로닝 부위(MCS), 및 전사 종결 서열(TT)을 가진다.

카세트 서열에 대한 GenBank 수탁 번호:

- J01764 (pT181 레플리콘)
- M21136 (tetA(M))
- 수탁 번호가 아직 이용될 수 없음 (PclpB)
- AF424781 REGION: 16526..16966 (terS)
- L09137 (amp ColE1 ori)
- M62650 (TT)

시험관내 조작의 수행과 조작의 검증을 위한 벡터의 증식은 이. 콜라이 Top 10을 통해서 달성될 수 있고, 이어서 최종 변형된 벡터가 에스. 아우레우스 RN0451 Δ terS에 도입될 수 있다. 서틀 벡터를 가진 형질도입 입자가 1959년 이. 콜라이에서 최초로 증명되었고 현재는 용원화된 박테리아로부터 프로파지를 얻기 위한 표준 기술인 미토마이신 C-유도 방법을 통해 RN0451 Δ terS 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 표적 에스. 아우레우스 세포에서 SarS의 존재에 대해 확인할 수 있는 플라스미드 DNA의 선형 콘카타머를 가진 박테리오파지 $\phi 11$ 구조 단백질로 구성된다.

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

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

리포터 유전자: 레닐라 루시페라제 (ruc)

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

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

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 서틀 벡터의 MCS에 PblaZ-ruc 융합 생성물을 통합함으로써 표준 분자생물학 기술을 통해서 생성될 수 있다.
- [0353] 시험관내 조작의 수행과 조작의 검증을 위한 벡터의 증식은 이. 콜라이 Top 10을 통해서 달성될 수 있고, 이어서 최종 변형된 벡터가 에스. 아우레우스 RN0451ΔterS에 도입될 수 있다. 서틀 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 ϕ11 숙주 범위 내의 생육성 에스. 아우레우스 내에서 레닐라 루시페라제를 발현할 수 있는 플라스미드 DNA의 선형 콘카타머를 가진 박테리오파지 ϕ11 구조 단백질로 구성된다.
- [0354] 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 앵타머: 스위치 가능한 앵타머가 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 앵타머와 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 서틀 벡터의 MCS에 PblaZ-SA 융합 생성물을 통합함으로써 표준 분자생물학 기술을 통해서 생성될 수 있다.
- [0361] 시험관내 조작의 수행과 조작의 검증을 위한 벡터의 증식은 이. 콜라이 Top 10을 통해서 달성될 수 있고, 이어서 최종 변형된 벡터가 에스. 아우레우스 RN0451ΔterS에 도입될 수 있다. 서틀 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 ϕ11 숙주 범위 내에서의 생육성 에스. 아우레우스 내에서 SA를 발현할 수 있는 플라스미드 DNA의 선형 콘카타머를 가진 박테리오파지 ϕ11 구조 단백질로 구성된다.
- [0362] 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 세폭시틴이 에스. 아우레우스 세포를 함유하는 샘플에 형질도입 입자를 첨가하기 전에, 동시에, 또는 이후에 첨가되었다. 세포가 세폭시틴에 표현형적으로 내성이 아닌 경우(즉, MRSA가 아니었다면) 발광은

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

[0366] **비-복제 형질도입 입자-기반 생육성 세포 리포터 분석 기능**

[0367] 리포터로서 비-복제 형질도입 입자의 기능이 분석되었다. 박테리오파지 $\phi 80 \alpha$ -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.

[0368] 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.

[0369] 이 형질도입 분석은 $\phi 80 \alpha$ -기반 비-복제 형질도입 입자가 MRSA의 101개 임상 분리주를 전부 형질도입할 수 있었고, 비-에스. 아우레우스 스타필로코키는 어느 것도 형질도입할 수 없었음을 나타냈다.

[0370] 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 균주가 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 균주로부터의 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.

[0371] 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 10uL와 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, 세콰시틴이 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 전체에 대한 활성을 나타낸다는 것을 증명한다.

[0372] **비-복제 형질도입 입자-기반 생육성 세포 리포터 MRSA 분석의 최적화 - 형질도입 입자 시약 제제**

[0373] 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.

[0374] 이 과정의 상세한 요약은 다음과 같다:

[0375] **시드 플라스크 성장:**

[0376] (1) GW24와 함께 5ug/mL 테트라사이클린을 함유하는 TSB 200mL를 접종한다.

[0377] (2) 10-18시간 동안 37°C, 200 RPM에서 인큐베이션한다.

[0378] **발효 접종(15L TSB, 5ug/mL 테트라사이클린):**

[0379] (1) 다음과 같은 발효 조건을 가진 발효장치를 준비한다: 37°C, 250 RPM 교반, 15 LPM 기류, 및 3 psig 배압.

[0380] (2) 200mL 밤샘 시드 배양물을 사용하여 발효장치를 접종한다.

- [0381] 배양물 유도:
- [0382] (1) 일단 OD600nm가 0.8(0.6-0.9)에 도달하면 배양물을 0.5mM H₂O₂로 유도한다.
- [0383] (2) 42℃까지 발효장치의 온도 세트포인트를 증가시킨다.
- [0384] 유도 후 조건 및 모니터링:
- [0385] (1) 일단 30분 유도가 완료되면 발효장치의 온도 목표를 25℃로 리셋한다.
- [0386] (2) 냉각 1시간 후에 발효장치에 공기 공급을 중단하고 교반을 0으로 설정한다.
- [0387] (3) OD600nm가 0.40 이하로 감소할 때까지 1시간 간격으로, 또는 필요에 따라 더 빈번히 발효 배양물을 모니터링한다.
- [0388] 수거/정화:
- [0389] (1) 발효 배양물 OD600이 0.40 이하의 최소값에 도달한 후, 발효장치에 20mL 무균 샘플을 취해서 벤조나아제 30 μL를 첨가한다.
- [0390] (2) 교반을 250rpm으로 리셋한다. 벤조나아제 인큐베이션 동안 60분 교반한다.
- [0391] (3) 3000g에서 15분 원심분리하여 EOF 샘플을 정화한다.
- [0392] (4) 정화된 물질을 0.45uM 막 필터를 통과시킨다.
- [0393] 농축 및 버퍼 교환:
- [0394] (1) 정화된 배양물을 500kDa 플랫 시트 막 10-폴드를 사용하여 TFF에 의해서 정화된 배양물을 농축한다.
- [0395] (2) 농축에 사용된 500kDa TFF 막을 사용하여 젤라틴이 없는 SM 버퍼에 대해 일정한 부피에서 농축된 배양물을 투석 여과한다.
- [0396] 최종 여과:
- [0397] (1) 농축된 버퍼 교환 물질을 0.2 μm 필터를 통해 여과한다.
- [0398] (2) 최종 여과된 파지 물질을 2-8℃에 보관한다.
- [0399] 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**
- [0401] 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**
- [0403] (1) 하위세트 분석을 위한 MRSA의 10개의 특유한 균주들과 MSSA의 하나의 특유한 균주가 MRSA 분석에서 시험되었다.
- [0404] (2) 밤샘 배양은 냉동된 1-배 사용 스톱으로부터 TSB 중에 1:50 희석비로 딥 96웰 플레이트에서 시작되었고, >15시간 동안 케도 셰이커에서 37℃에서 인큐베이션되었다. TSB(392 μl) 중 MRSA/MSSA(8 μl).
- [0405] (3) 다음날, 밤샘 배양물로부터 1:50 희석비에서 일과 배양이 96웰 딥 웰 플레이트에서 TSB 중에서 시작되었고 (392 μl TSB + 8ul 세포), 4시간 동안 케도 셰이커에서 37℃에서 인큐베이션되었다.
- [0406] (4) 세포는 1800g 힘 및 10℃에서 5분간 원심분리 회전되었고, 소비된 배지는 펠릿을 파괴하지 않고 흡인되었다.
- [0407] (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) 웰로우 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 나타난 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. 고압가열 또는 여과 멸균
카제인의 효소 소화물 (g)	17	10	10	
효소 추출물 (g)	N/A	25	25	
엽화나트륨 (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

염의 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 입자 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: 파지 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 레도 셰이커에서 약 100rpm으로 4시간 동안 37°C에서 인큐베이

선한다.

- [0420] (3) 발광계(Molecular Devices SpectraMax L) 준비: 시약 라인을 70% 에탄올과 DI 수로 차례로 세척한 다음 기질 시약으로 초회 자극한다. Fast Kinetic으로 소프트웨어를 설정해서 10 베이스라인 포인트 후 기질 시약 50 μ L를 250 μ L/초로 주사하고, 0.25초마다 40포인트에서 판독한다.
- [0421] (4) 분석 수행: 실온에서 5분간 플레이트를 평형화한 후 각 박테리아 회석물 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 회석비에서 분석되는 군주에 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 군주에 대해 정규화된 RLU 값의 평균을 구한다.
- [0428] (6) 두 회석 플레이트의 평균을 구하며, 이것은 궁극적으로 시험된 2개 세포 회석물에서 10개의 상이한 MRSA 군주에 대해 특정 배지의 RLU에 기초한 성능의 증가 배수를 나타내는 단일 수치값을 야기한다.
- [0429] **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 회석비의 MSSA 및 MRSA)에 대해 출력되었고 컷오프 RLU와 비교되었다. 샘플이 파지 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 군주, 분석되는 회석비에서)의 최대 RLU로 나눔으로써 값들을 정규화했다. 얻어진 비율은 각 배지 조건과 각 회석비에서 10개 MRSA에 대해 평균을 구했으며, 이것을 표 5에 나타낸다. 두 회석비의 평균이 또한 표에 제시된다.

표 5

- [0433] 다양한 성장 배지 제제로부터의 MRSA 분석 결과

배지		플레이트 1	플레이트 2	두 회석물의 평균
B2	M53	1.89	1.88	1.89
BSS-2	M50	1.37	1.47	1.42
BSS-2	M54	1.50	1.76	1.63
BSS-2	M55	1.82	2.90	2.36
BSS-2	M56	2.38	6.00	4.19
BSS-2	M57	2.00	3.92	2.96
TSB	M1	1.00	1.00	1.00
TSB	M58	1.18	0.96	1.07

- [0434] **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

[0437]

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

[0438]

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

[0439]

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 스톱	0.01250
나트륨 아지드 (%)	0.0006
물	1mL 까지

[0440] **비-복제 형질도입 입자-기반 생육성 세포 리포터 MRSA 분석의 최적화 - 기질 시약 제제**

[0441] MRSA 분석에서 발광을 생성하기 위해서, 기질 시약은 루시페라제에 대한 기질로서 알데하이드를 포함한다. 초기 개발된 지방족 알데하이드 제제(TSB 중 4.2mM 트리데칸알)는 안정하지 않았고 용액보다는 비균질 에멀전을 형성했다. 이 실시예는 실온 또는 2-8℃에서 6개월 동안 안정성을 확보한 기질 시약 제제의 개발을 개략한다.

[0442] 이 실시예는 기질 시약으로부터 최종 제제를 개발하기 위해 채택된 단계들을 개시한다.

[0443] **방법/과정**

[0444] 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.

[0445] (1) 밤샘 배양물: 2mL TSB + 1uL 10mg/mL 테트라사이클린 + TSA 플레이트로부터의 모델 시스템 박테리아 1 콜로니를 37℃에서 하룻밤 225rpm에서 웨이킹한다.

[0446] (2) 일과 배양물: TSB + 5ug/mL 테트라사이클린에 밤샘 배양물을 1:50 또는 1:100 희석하고 37℃에서 1.5-2시간 225rpm에서 웨이킹한다.

[0447] (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.

[0448] (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-과지까지 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) 과지 배지 시약 준비: 과지, 세콰시틴, 및 나트륨 피루베이트를 다음을 포함하는 BSS-M56에 첨가한다:
- [0457] a. 세콰시틴 (5 ug/mL)
- [0458] b. GW24 세포 용해물 스톱 (0.03X)
- [0459] c. 나트륨 피루베이트 (0.025M)
- [0460] (5) 분석 플레이트 셋업 = 198uL 과지 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 = 웨도 셰이커에서 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, 시클로텍스트린 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 멸균 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
- [0470] **분석 및 결과**

- [0471] 각 샘플에 대한 키네틱 반응을 플롯팅했고, 3개 복제물의 각 관독 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 등가였다.
- [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 플롯팅되었고, 95% CI의 선형 회귀가 플롯팅되었다.
- [0473] **결론**
- [0474] 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 버퍼로	분석 성능 개선
농축 계면활성제에 직접 트리데칸알 첨가	안정성 개선
기질 기약 여과 추가, 0.2 um 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 버퍼에서 82% 0.1 M 시트르산-18% 0.1 M 나트륨 시트레이트 버퍼로 변화, pH3 유지	분석 성능 개선, 포스페이트 버퍼의 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℃에 저장하고, 하나는 18-24℃에 저장한다.
- [0477] 2-8℃에 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℃에서 1개월 후 침전하지 않았고, 제0일과 똑같이 MRSA 균주를 검출할 수 있었다.
- [0478] 18-24℃에 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% α-토코페롤-PEG 1000 석시네이트 + 0.05% ProClin 300. 이 제제는 18-24℃에서 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.
- [0480] **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.
- [0482] **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 웨이킹 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 웨이킹하면서 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 웨이킹하면서 37°C에서 4시간 인큐베이션했다.
- [0500] 4시간 후에 플레이트를 인큐베이터에서 꺼낸 후 즉시 50μl 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 N RTP 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 희석비에서 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 $\phi 80 \alpha$ 의 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 가져왔었다. 게다가, 리스테리아 모노사이토게네스와 리스테리아 이노쿠아도 파지 $\phi 80 \alpha$ 의 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 퀀칭하기 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

[0520] 기질 시약 제제

실험	기질	설명
1	오리지널 기질	1% Tween20 + 4.2 mM 트리데칸알, 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 식시네이트, 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	6.3mM 트리데칸알 + 2% VitE PEG, pH 3.0

[0521] **방법/과정**

[0522] MRSA 분석을 위해 다음과 같은 단계들이 수행되었다.

[0523] A) 실험 1-5를 위해 성장된 균주

[0524] 분석 하루 전날에 냉동된 1-배 사용 스톱으로부터 TSB 중 1:50 희석비로 딥 96웰 플레이트에서 밤샘 배양을 시작하고, >15시간 동안 케도 셰이커에서 37℃에서 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 세콰시틴 + 30x의 상기 개시된 것으로부터 GW24 세포 용해물 스톱

[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 세콰시틴 및 파지와 함께 또는 파지 없이 로딩했다. 2.5ul 세포를 첨가했다. 분석 플레이트를 4시간 동안 대략 100rpm으로 설정된 속도로 케도 셰이커에서 37℃에서 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.

[0539] **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. 에피데미디스 및 이. 파에칼리스는 MRSA 분석에서 거짓 양성을 시험했다.

[0541] 실험 2: 시험된 세 균주 중 NRS #9와 이. 파에칼리스는 시험된 모든 세콰시틴 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 모노사이토젠을 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 체제를 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 제시했다. 0.5 OD의 세포의 높은 로드로 두 다른 날에 수행된 두 독립적 실험에서 분석은 음성 결과를 제공했다.

[0545] **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 체제를 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 이들 종들 내에서 에스. 아우레우스 pT181 복제 기원의 활성 결여로 인해 차단된다.

[0547] 체제에서 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.

[0548] **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 인큐베이션하고, 이어서 광전배출관 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 이용가능한 크로모젠 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.

[0551] **범위:**

[0552] 임상 기구에 의한 MRSA 감독을 위해 환자로부터 수집된 식별되지 않은 코 스왑 샘플을 MRSA의 존재하에 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) 세콰시틴을 가진 BSS-M56 베이스와 2x 농도의 상기 개시된 형질도입 입자 시약

[0557] **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 캐비닛에 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 상응하는 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: 98 μ L 성장 배지 시약에 공지된 MRSA 분리주의 완전히 혼합된 0.1 OD 배양물 2 μ L, 세 번

[0566] MSSA 음성 대조군: 98 μ L 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 케도 셰이커에서 셰이킹했다. 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 의해서 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, 셰이킹하면서 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 NRTP 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

[0588] 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 제시했고, 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 제시했다. 나머지 용출된 스왑 샘플의 다른 일부를 부화된 배양물을 통해서 시험했고, 이어서 CHROMagar MRSA II 위에 평판했다. 부화된 배양물 시험은 나머지 용출된 스왑 물질 100uL를 TSB 2mL에 첨가하고, 18-24시간의 기간 동안 웨이킹하면서 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

[0594] 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 발광 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℃에 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 대조균 균주(MSSA121)에 대해, TSB 2mL를 TSA 플레이트에서 이미 성장된 균주 콜로니로 접종했다. 밤샘 MRSA 배양물은 5ug/mL 세폭시틴을 포함했다. 모든 샘플을 웨이킹 인큐베이터에서 37℃에서 하룻밤 인큐베이션했다.

[0608] 일과 배양: 밤샘 배양물 각각 20uL을 성장 배지 시약 2mL를 함유하는 새로운 배양튜브로 옮겼다. 다음에, 접종물을 대략 1시간 45분간 웨이킹하면서 OD(600nm)이 0.1에 도달할 때까지 37℃에서 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℃에서 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 셰이킹하면서 37℃에서 4시간 인큐베이션했다.
- [0617] 4시간 종료시 플레이트를 인큐베이터에서 꺼낸 후 즉시 기질 시약 50 μ L가 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 세콕시틴에서 에스. 아우레우스 성장의 결과를 도시한다. 도 24는 4, 8, 16, 32, 64, 및 128ug/mL의 세콕시틴의 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 세콕시틴의 MIC를 나타냈고, MRSA S7은 64ug/mL 세콕시틴의 MIC를 나타냈다. 상응하여, MRSA NRS25는 최대 64ug/mL 세콕시틴의 세콕시틴 농도까지 MSSA RLU 컷오프를 넘는 인지 가능한 발광을 나타냈고, MRSA S7은 최대 32ug/mL의 세콕시틴 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: Mrsa의 mecA 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 분자간 RNA 상호작용이 계산되었다.
- [0629] 3) RNA용 비뉴클라이제이션 애플릿(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 분자간 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)와 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 분자간 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.
- [0635] **실시예 10: 전사체 리포터 분석: mecA-luxAB 리포터 시스템을 사용하여 표적 전사체 또는 유전자를 검출하는 방법**
- [0636] 다른 예로서, mecA-luxAB 리포터 시스템을 사용하여 표적 mecA 유전자를 검출하기 위한 방법이 제공된다. 여기서, mecA는 표적 전사체이고, luxAB는 리포터 분자이다.
- [0637] **1. 리포터 구조체의 구성**
- [0638] luxAB를 암호화하는 리포터 구조체를 포함하는 벡터는 리포터 구조체를 이. 콜라이와 에스. 아우레우스에서 모두 증식할 수 있는 서틀 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 구조체는 먼저 구조체의 전사와 리포터 전사체의 생성을 위해 에스. 아우레우스 세포에 도입될 수 있다.
- [0640] **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. luxA와 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 luxA의 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 유전자와 DNA 서열이며(스타필로코쿠스 아우레우스 아종, 아우레우스 SA40로부터, 완벽한 게놈 GenBank: CP003604.1; SEQ ID NO:15), 리포터 서열과 시스-억제 서열을 포함하는 리포터 구조체를 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)를 설계하는데 사용될 수 있는 예시적인 mecA 전사체 서열을 도시한다. RBS(3001)와 코딩 서열(3002)이 mecA에 대해 도시된다.
- [0646] 도 31은 본 발명의 구체예에 따라서 리포터 전사체를 설계하는데 사용될 수 있는 luxAB 유전자와 DNA 서열의 일례이다. luxAB 유전자와 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 일레이다(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.

[0649] 3. 리포터 전사체를 사용하여 mecA 표적 전사체의 존재 또는 부재를 검출하는 방법

[0650] 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 참고 자료로 포함된다.

[0654] 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 coli K-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-aureus 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] CCACTAAAAAGCATGATCATTGATCACTCTAATGATCAACATGCAGGTGATCACATTGCGGCTGAAATAGCGGAAAAACAAAGAGTTAATGCCGTTGTCAGT

GCCGCAGTCGAGAATGCGAAGCGCCAAAATAAGCGCATAAATGATCGTTCAGATGATCATGACGTGATCACCCGC

- [0684] SEQ ID NO:2
- [0685] 침묵 돌연변이를 가진 P1 pac-부위, 소문자는 돌연변이된 염기를 표시
- [0686] CCACTAAAAAGCATGATaATaGAcCACTCTAAcGAcCAACATGCAGGgGAgCACATTGCGGCTGAAATAGCGGAAAAgCAGAgGTgAATGCCGTTGTCAGT
GCCGCAGTCGAGAATGCGAAGCGCCAAAATAAGCGCATAAAcGAcCGTTCAGAcGAcCATGACGTtATtACCCGC
- [0687] SEQ ID NO: 3
- [0688] C1 억제제-제어 P53 프로모터, 프로모터 P53 안티센스, repL 유전자 및 kila 유전자의 프레임 내 결실을 함유하
는 P1 세포 용해 레플리콘
- [0689] CTCGCTAAGACATTGGCTTTATTTAATTTTTTATCCACACCCCATGTCAAAATGATACCCCTCCCTGTCAGGATGACGTGGCAATAAAGAATAAGAAG
TCACAAGTTAAAAAACAAAAGATCAGTTTCCGGCGGTGCCGAACAACAGCCTCAAAAAATTGACTTCATGGATCGCTAAGGCAAAAGCAAAGGCTGAC
AATCTGCGGTATCCAAAAACGCACTCAAAACATGAGTTCAAGCAGAAAGTAGAGGCGGTGCGCGGAAATATGCTTACCTGAAGAACAAGCGTTCCCT
GATATTGGCGGGATATCAAACTTCGATAACCTACCGCATTGCATGACGGTAAACGAAGCTCTTAATGCGGTTTTAGCCAAAAATAAGATAACGAACAATGG
GGTATACCGGCAGGATTGAGAGGTAATGAATTGCTCTAATTATAACCATGCATACTTTCAACACCTCTAGTTTGCCATGAGGCAAACTCATAGGTGTCCTG
GTAAGAGGACACTGTTGCCAAAACCTGGACGCCCCATTATTGCAATTAATAAAACAATAACGACAATTCTACCTAACATAAGTGGCTTAAAAAACCCGCC
CCGGCGGTTTTTTTATCTAGAGCTAGCGGATCCGGCGCGCGGGCCCTTCTGGGCTCATGGGCTTCCGCTCACTGCCGCTTCCAG
- [0690] SEQ ID NO: 4
- [0691] Pblast 프로모터 서열
- [0692] CGTCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAA
ATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGT
- [0693] SEQ ID NO: 5
- [0694] S. aureus pT181 플라스미드 기원 또는 복제 카피 수 변이체 pT181cop-623 repC
- [0695] TACTCAACTGAAAAATAATGAGGTCATTATTATTGGAGAAATTCCTGCTCGATGTATTCAAGATTATCGCAATGATTTAACTTTTTTACAAATGGGCTTAG
TGTTTGTAGCAGAGCTAAAAGGATATCAGGTTACCACTGGCGAACCTGTTTGCCAGACCCGTCGTCTAAATAGTCGGATAGATAAAGTAAGATATATGTT
CAATAAAATAACTTAGTCGTTTTATGTTGTATATAAATATGGTTTCTTATTAATAAGATGAAATATTCTTTAATATAGATTTGAATTAAGTGGAAGG
AGGAGATTGTTATTATAAATACTACAAGTGATATTGTGCTCTATTGTGGAAATAAAACAAGACTACGAATACGAGTGGATACTATACTTAAAAATTTCCCTT
TATACAGCCCCAAATGTAAGAACGAACTTTAATTAATGTTCAAAAAATGAATATAATAACAATCAAAGAGCCAGACGCCAAGACGCAGAGCCGATAATTG
AGAAATGAACTCTCATCTTATCGGCTCTTTTTGTTTATCTGAATTTTACTGACTAGCCTTCAATATTTCC
- [0696] SEQ ID NO: 6
- [0697] P1 pacA 유전자, 소문자는 결실된 pac-부위 서열을 표시
- [0698] GTGGATTGAGCATCGTAGAGAAGAAATTGCCGATATCGTCGATACAGGTGGTTATGGTGATGTCGATGCGGAAGGCATATCAAACGAAGCATGGCTTGAACA
GGATCTGGACGAAGACGAGGAGGAAGACGAAGAAGTTACCCGCAAACTGTACGGGGATGATGATTAA
- [0699] SEQ ID NO: 7
- [0700] 자생 P1 pacA 유전자
- [0701] GTGGATTGAGCATCGTAGAGAAGAAATTGCCGATATCGTCGATACAGGTGGTTATGGTGATGTCGATGCGGAAGGCATATCAAACGAAGCATGGCTTGAACA
GGATCTGGACGAAGACGAGGAGGAAGACGAAGAAGTTACCCGCAAACTGTACGGGGATGATGATTAA
- [0702] SEQ ID NO:8
- [0703] terS 유전자, 소문자는 결실된 서열을 표시
- [0704] ATGAACGAAAAACAAAAGAGATTGCGAGATGAATATATAATGAATGGATGTAATGGTAAAAAGCAGCAATTCAGCAggttatagtaagaaaacagcagag
tcttttagcaagtcgattgttaagaaatgttaattgttcggaatatattaagaacgattagaacagatacaagaagagcgtttaatgagcattacagaagct
ttagcgttatctgcttctattgctagaggagaacctcaagaggcttacagtaagaaatatgaccatttaaacgatgaagtggaaaaagaggttacttacaca
atcacaccaacttttgaagagcgtcagagatctattgaccacataactaaaagttcatggcgctatcgacaaaaaagaaattactcagaagaatttgag
attaattattAGATCTATTGACCACATACTAAAAGTTCATGGTGGTATATCGACAAAAAAGAAATTACTCAGAAGAATATTGAGATTAATATTGGTGAGTAC

GATGACGAAAGTTAA

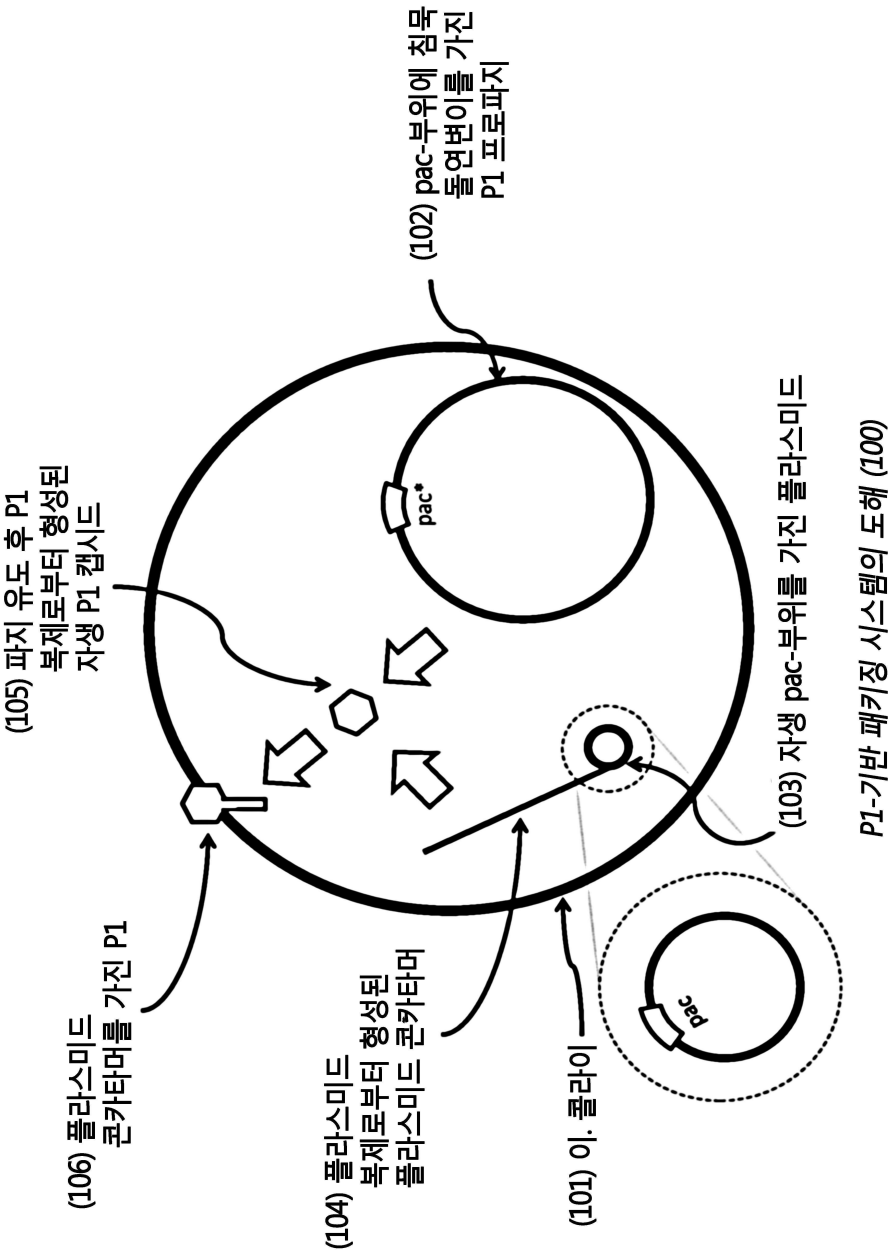
- [0705] SEQ ID NO:9
- [0706] 자생 terS 유전자를 함유하는 서열
- [0707] AATTGGCAGTAAAGTGGCAGTTTTTGATACCTAAAATGAGATATTATGATAGTGTAGGATATTGACTATCTTACTGCGTTTCCCTTATCGCAATTAGGAATA
AAGGATCTATGTGGGTGGCTGATTATAGCCAATCCTTTTTTAATTTTTAAAAAGCGTATAGCGGAGAGTTGGTGGTAAATGAAATGAACGAAAAACAAAAG
AGATTGCGAGATGAATATATAATGAATGGATGTAATGGTAAAAAGCAGCAATTTTCAGCAGGTTATAGTAAGAAAACAGCAGAGTCTTTAGCAAGTCGATTG
TTAAGAAATGTTAATGTTTCGGAATATATTAAGAACGATTAGAACAGATACAAGAAGAGCGTTTAAATGAGCATTACAGAAGCTTTAGCGTTATCTGCTTCT
ATTGCTAGAGGAGAACCTCAAGAGGCTTACAGTAAGAAATATGACCATTTAAACGATGAAGTGGAAAAAGAGGTTACTTACACAATCACACCAACTTTTGAA
GAGCGTCAGAGATCTATTGACCACATACTAAAAGTTCATGGTGGTATATCGACAAAAAAGAAATTACTCAGAAGAATATTGAGATTAATATTGGTGAGTAC
GATGACGAAAGTTAAATTAACCTTTAACAAACCATCTAATGTTTTCAACAG
- [0708] SEQ ID NO:10
- [0709] SaPibov2 인테그라아제 유전자
- [0710] CATAGTATTTTATACGAAAATAGTATGTACCACGTTTAGCGTCTTTATATATGTTGTGGGATAGGTTTAAGTTGTGTTCTATGGGAATCAC
- [0711] SEQ ID NO:11
- [0712] pGWP10001 전체 서열
- [0713] TATCCAGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACGGTGGTATATC
CAGTGATTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTCATTATGGTGAAAGTTGG
AACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATCTGCGAAGTGAT
CTTCCGTCACAGGATTTTATTCGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGC
ACTTTTCGGGAAATGTGCGCGCCCGCTTCTGCTGGCGCTGGGCTGTTTCTGGCGCTGGACTTCCCGCTGTCCGTCAGCAGCTTTTCGCCACGGCCT
TGATGATCGCGCGGCTTGGCTGTCATATCCCGATTCAACGGCCCCAGGGCGTCCAGAACGGGCTTCAGGCGTCCCGAAGGT
- [0714] SEQ ID NO:12
- [0715] S. aureus PclpB 프로모터 서열
- [0716] GTCTAGTTAATGTGTAACGTAACATTAGCTAGATTTTTTATTCAAAAAATATTTACAAATATTAGGAAATTAAGTGTAAGAGAGTTGATAAATGATTAT
ATTGGGACTATAATATAATTAAGGTC
- [0717] SEQ ID NO:13
- [0718] ϕ 80 α terS 결실 및 상보성을 보여주는 RN10616 게놈 서열 유전자좌. terS = 괄호안 텍스트, 결실 = 밑줄 텍
스트, 상보성 = 진한 텍스트
- [0719] ATTAGACAACAACAAGTCATTGAAAATCCGACTTATTATTCAAAAAGAAATTTGATAGCGCAGATATACAAGCTAGGTTAAAAGTAGGCGATAAGGTAGA
AGTTAAAACAATCGGTTATAGAATACACTTTTTAAATTTATATCCGTCCTTATACGAAGTAAGAAGGTAGATAAACAATGATTAAACAAATACTAAGACTA
TTATCTTACTAGCAATGTATGAGTTAGGTAAGTATGTAACGAGCAAGTATATATTATGATGACGGCTAATGATGATGTAGAGGTGCCGAGTGACTTCGCG
AAGTTGAGCGATCAGTCAGATTTGATGAGGGCGAGGTGACGGAGTAGATGATGTGGTTAGTCATAGCAATTATATTACTAGTCATCTTATTGTTTGGTGTG
ATGTTGCAAGCTGAACAGTTAAAAGGCGATGTGAAAGTTAAAGAGCGGGAGATAGAGATATTAAGAAGTAGATTGAGACATTTTGAAGATTAAAAATATTTG
TATGGAGGGTATTATGACTAAAAAGAAATATGGATTAAAATTATCAACAGTTCGAAAGTTAGAAGATGAGTTGTGTGATTATCCTAATTATCATAAGCAAC
TCGAAGATTTAAGAAGTGAATAATGACACCATGGATTCCAACAGATACAAATATAGGCGGGGAGTTTGTACCGTCTAATACATCGAAAACAGAAATGGCAG
TAACTAATTATCTTTGTAGTATACGAAGAGGTAAAAATCCTTGAGTTTAAAGAGCGCTATTGAACGTATAATCAACACATCAAGTAGGAAAGAACGCGAATTCA
TTCAAGAGTATTATTTTAAAAAAGGAATTAGTGAAGTTTGTGATGACATACACATTTCTGATAGAACTGCTCATAGAATCAAAAGGAAAAATCATATCTA
GATTGGCGGAAGAGTTAGGGGAAGAGTGAAATTGGCAGTAAAGTGGCAGTTTTTGATACCTAAAATGAGATATTATGATAGTTAGGATATTGACTATCTTA
CTGCGTTTCCCTTATCGCAATTAGGAATAAAGGATCTATGTGGGTGGCTGATTATAGCCAATCCTTTTTTAATTTTAAAAAGCGTATAGCGGAGAGTTGG
TGGTAAATGAA
- [0720] [[ATGAACGAAAAACAAAAGAGATTCGCAGATGAATATATAATGAATGGATGTAATGGTAAAAAGCAGCAATTTTCAGCAGGTTATAGTAAGAAAACAGCAG
AGTCTTTAGCAAGTCGATTGTTAAGAAATGTTAATGTTTCGGAATATATTAAGAACGATTAGAACAGATACAAGAAGAGCGTTAATGAGCATTACAGAAG
CTTAGCGTTATCTGCTTCTATTGCTAGAGGAGAACCTCAAGAGGCTTACAGTAAGAAATATGACCATTTAAACGATGAAGTGGAAAAAGAGGTTACTTACA
CAATCACACCAACTTTTGAAGAGCGTCAGAGATCTATTGACCACATACTAAAAGTTCATGGTGGCTATATCGACAAAAAAGAAATTACTCAGAAGAATATTG

AGATTAATATTGGTGAGTACGATGACGAAAGTTAA]]

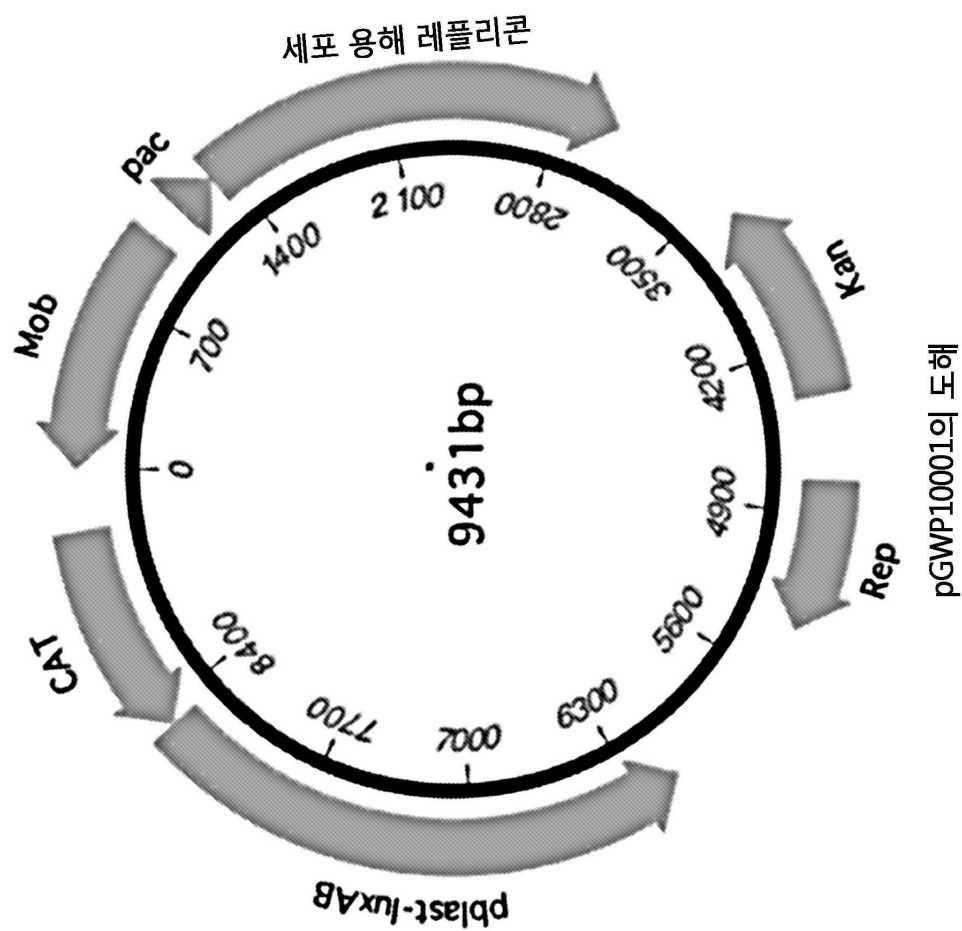
- [0721] **ATTAAACTTTAACAACCATCTAATGTTTTCAACAG**GTTGTTTCAAGACTATTGAAGAGTTTGACAACACATGGCAAAAGGACAAAGATACAGGTGAAT
ATACCAATGAACCAGTAGATACATACAATCATTGTATCGATTTCGTTGCGTTATTCAGTGGAACGATTC
- [0722] SEQ ID NO:14
- [0723] pGW80A0001 전체 서열
- [0724] TATTTAAAGTGCGTTGCTTTTTTCTCATTTATAAGGTTAAATAATTCTCATATATCAAGCAAAGTGACA
- [0725] SEQ ID NO:15(mecA 유전자좌 DNA 서열(Staphylococcus aureus subsp. aureus SA40로부터, 완전 게놈 GenBank: CP003604.1))
- [0726] AGTGAAGCAATCCGTAACGATGGTTGCTTCACTGTTTT
- [0727] SEQ ID NO:16(mecA 전사체 서열)
- [0728] GUAACGAUGGUUGCUUCACUGUUUU
- [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] TGTCCGATATTAAAGATGTAAAAGATATTATTGATATGTTGAACCAAAAAATCGAAATGAATTTACCATAATAAAATTAAAGGCAATTTCTATATTAGATTG
CCTTTTTAAATTC
- [0731] SEQ ID NO: 18(luxAB 전사체 서열)
- [0732] AUGUAAAAGAUUUUUGAUUUGUUGAACCAAAAAUUCGAAAUGAAUUUACCAUAAUAAAAUUAAGGCAAUUUCUAUUUAGAUUGCCUUUU
- [0733] SEQ ID NO: 19(시스-억제 luxAB 전사체 서열)
- [0734] CAAAUUGGACAGAGAUGAAAAAUUACUGCAUUUUGAAGAGAAUGCAGUUGGGUCUCAUGAUGACUAAUUAUGAAUCGACAAAAUAGCAGUGGAAAAACA
GGGUCUAAAAAUUUUUAUUAUCCUUGAAUCAUUGCCGAUUAUAAAGAUGUAAAAGAUUUAUUGAUUUGAUGAACCAAAAAUUCGAAUUGAAUUUACCA
UAAUAAAAUUAAGGCAAUUUCUAUUUAGAUUGCCUUUU

도면

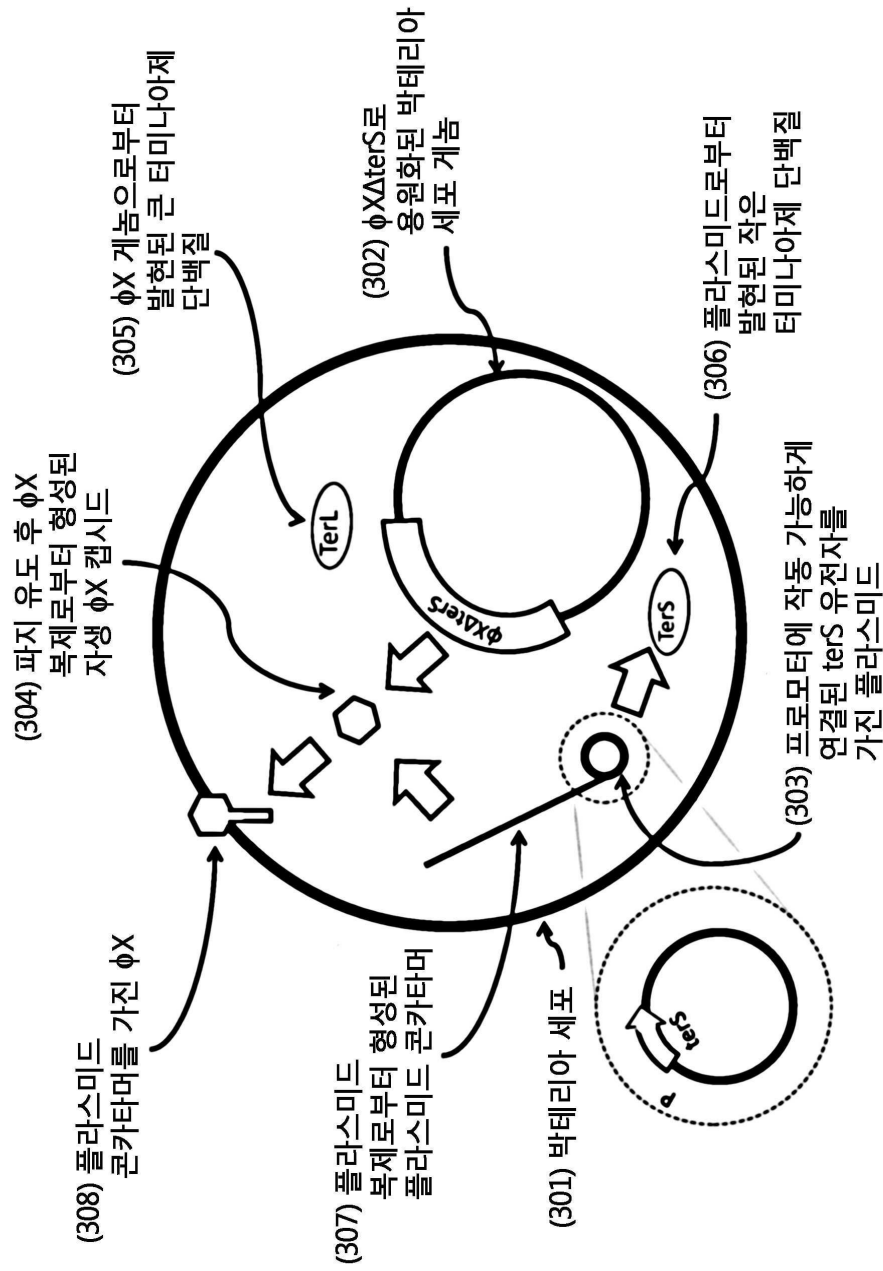
도면1



도면2

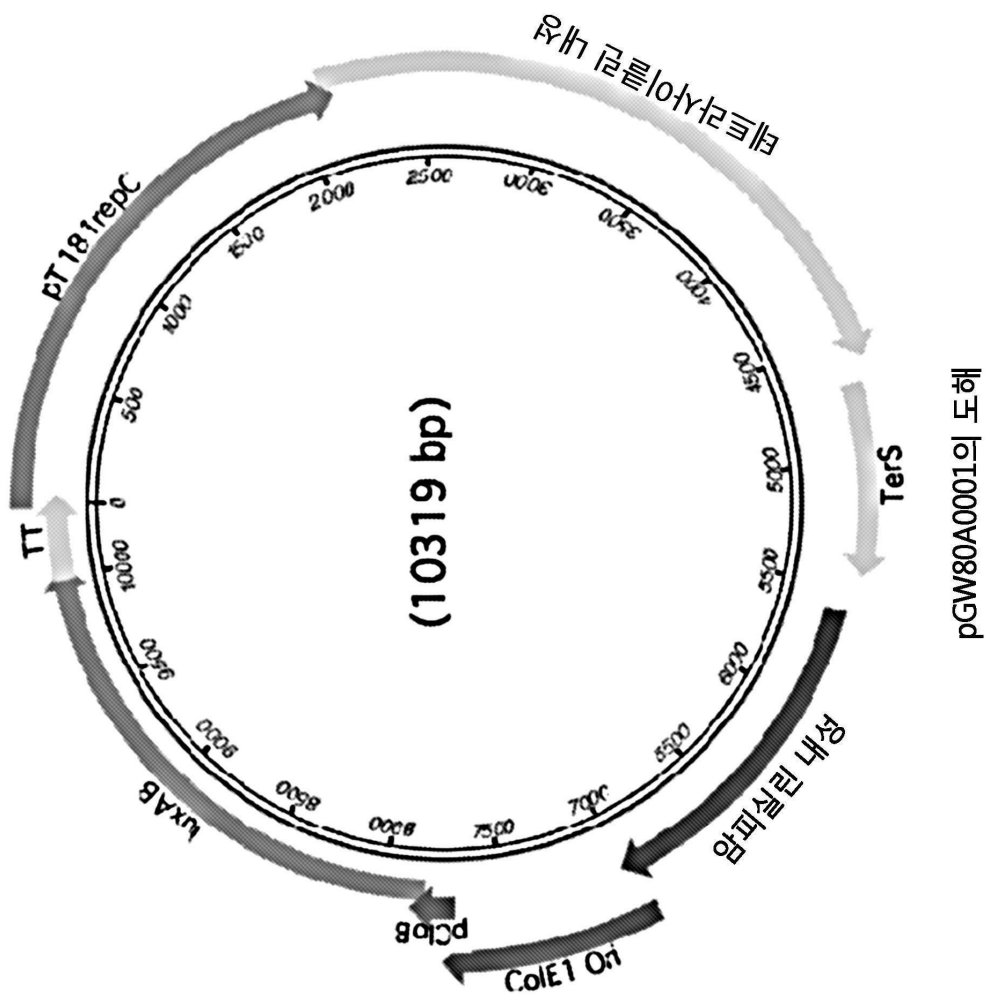


도면3

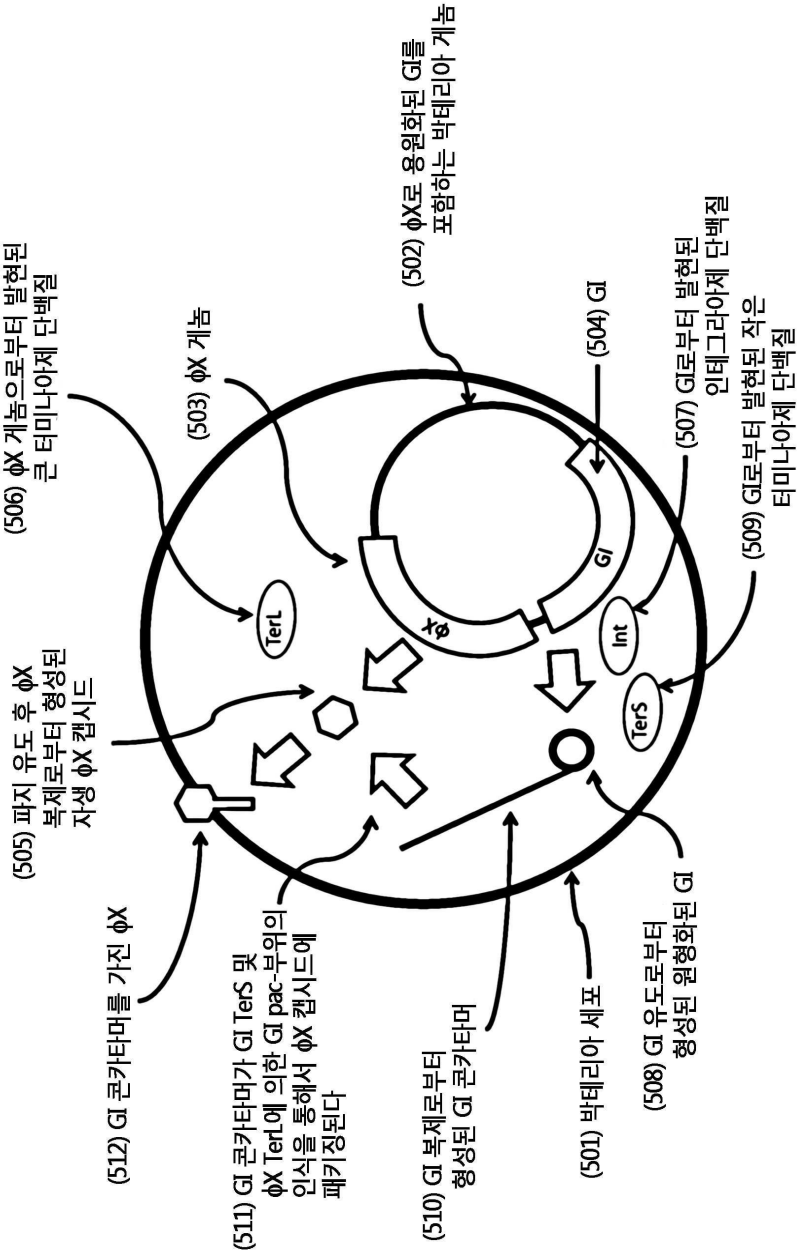


pac-부위 결실/보상 패키징 시스템의 도해 (300)

도면4

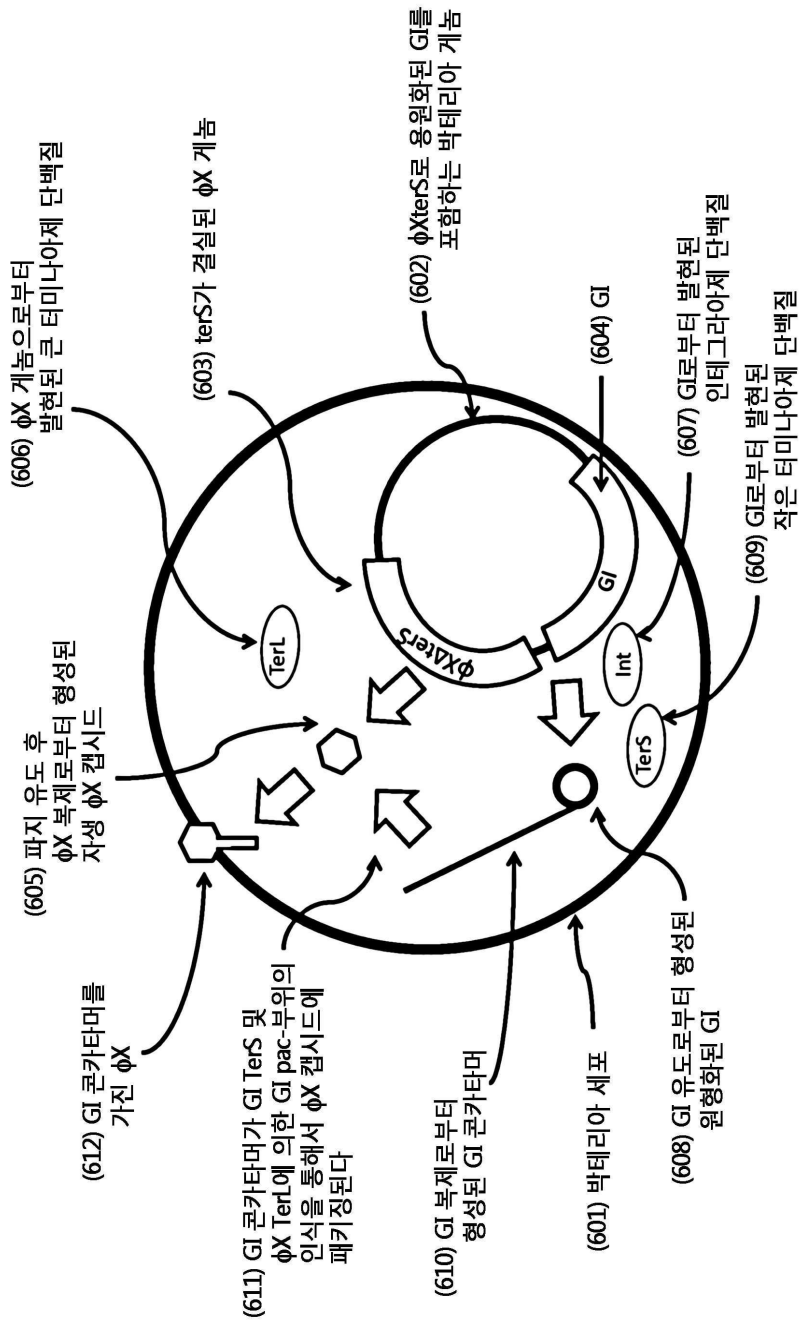


도면5



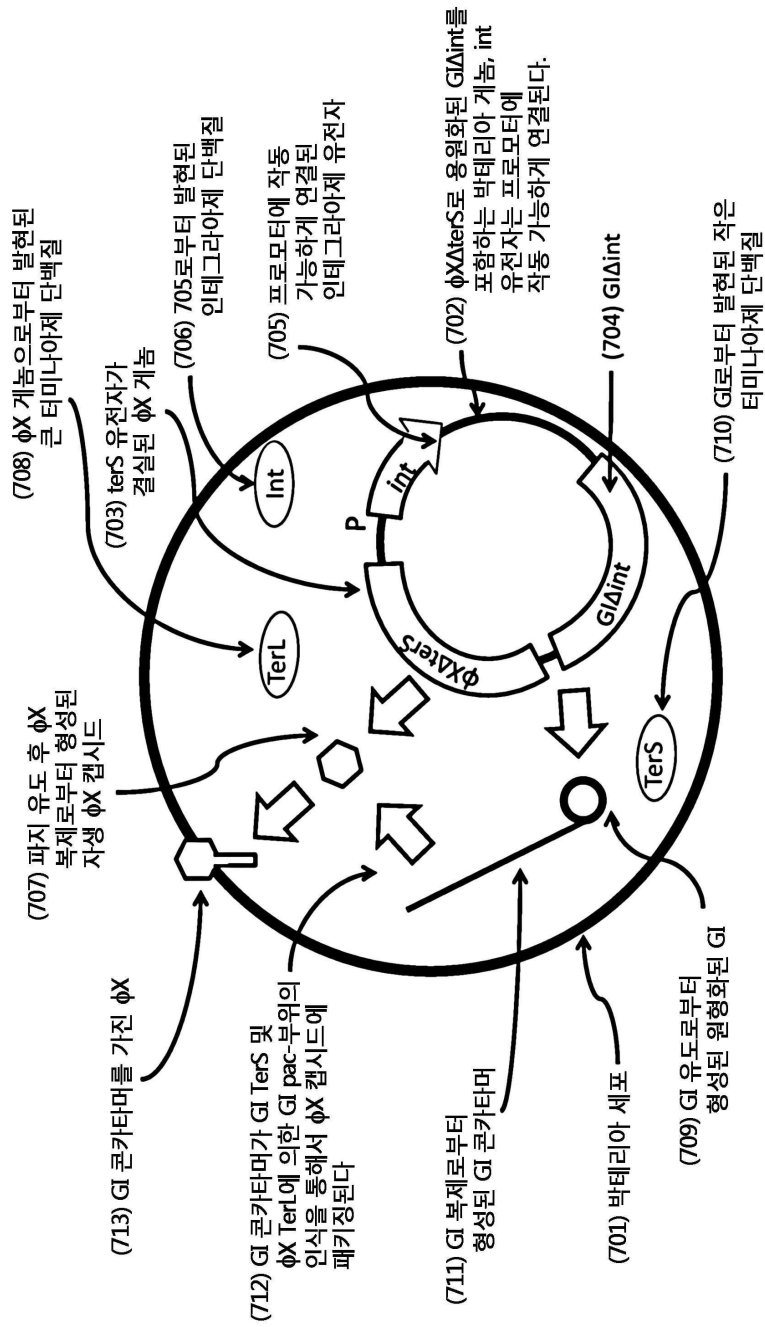
자연적 게놈-섬 패키징 시스템의 도해 (500)

도면6



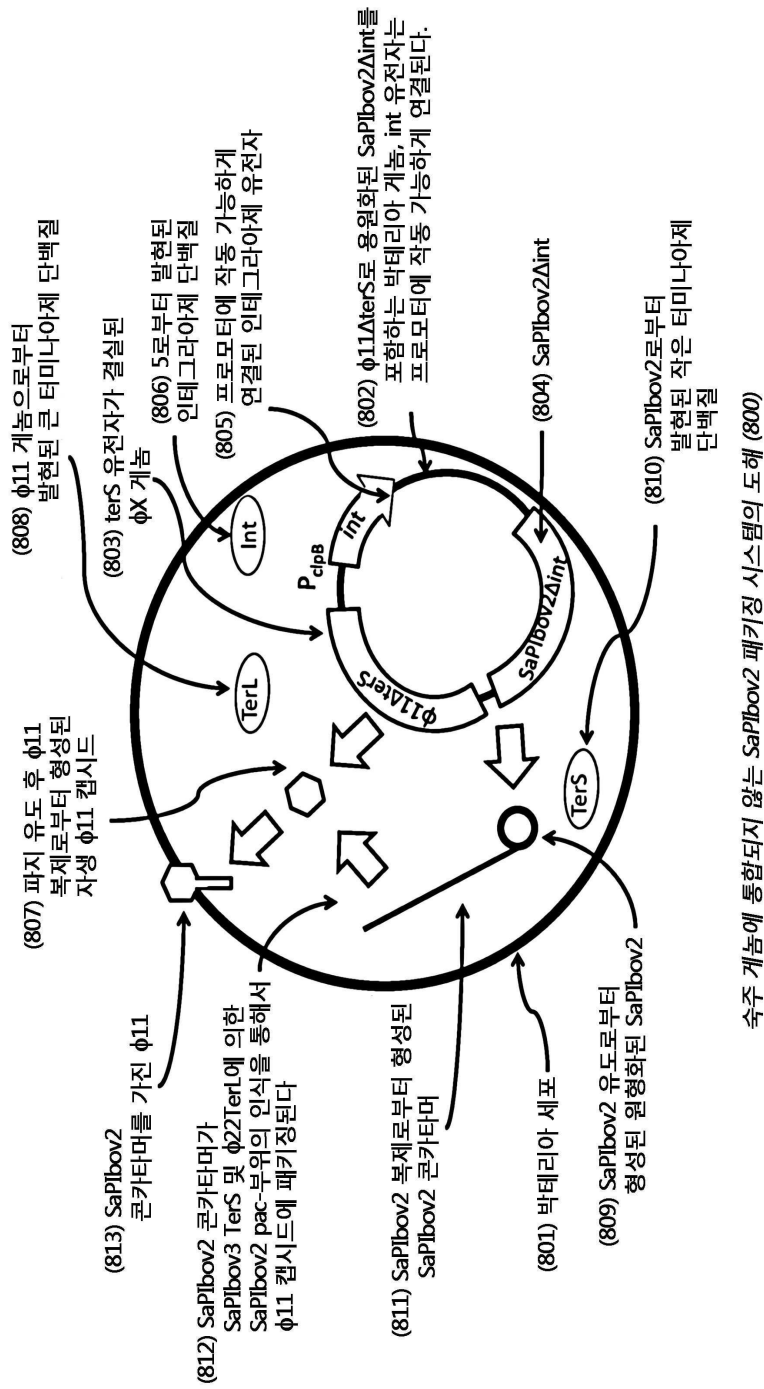
게놈-섬(GI)-기반 패키징 시스템의 도해

도면7

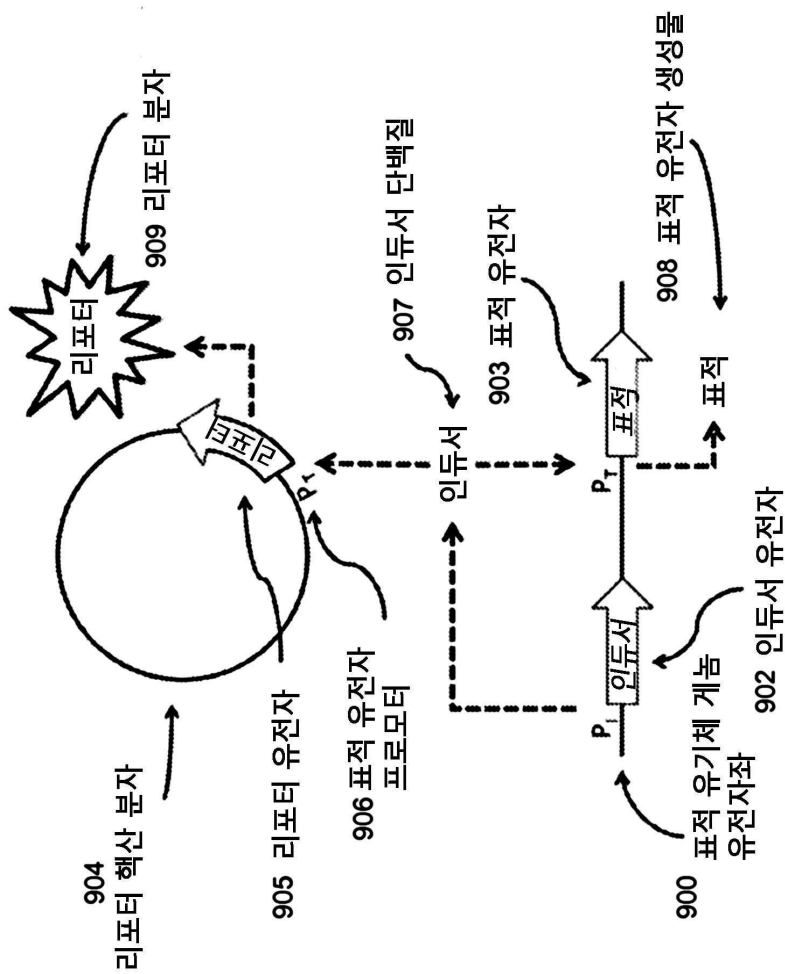


숙주 게놈에 통합되지 않는 게놈-섬 패키징 시스템의 도해 (700)

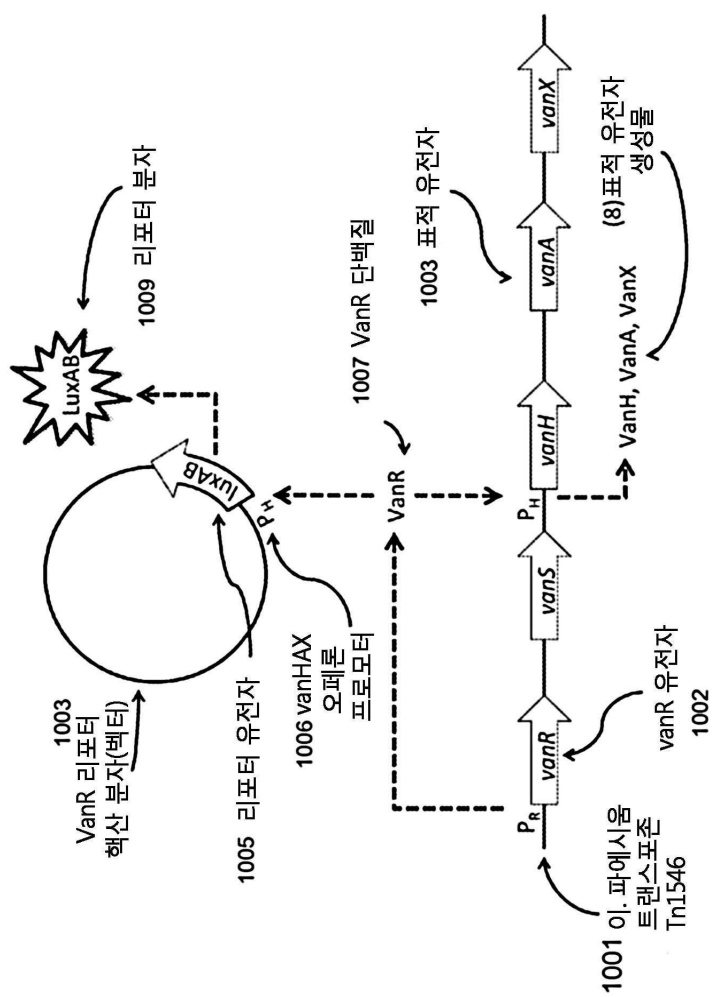
도면8



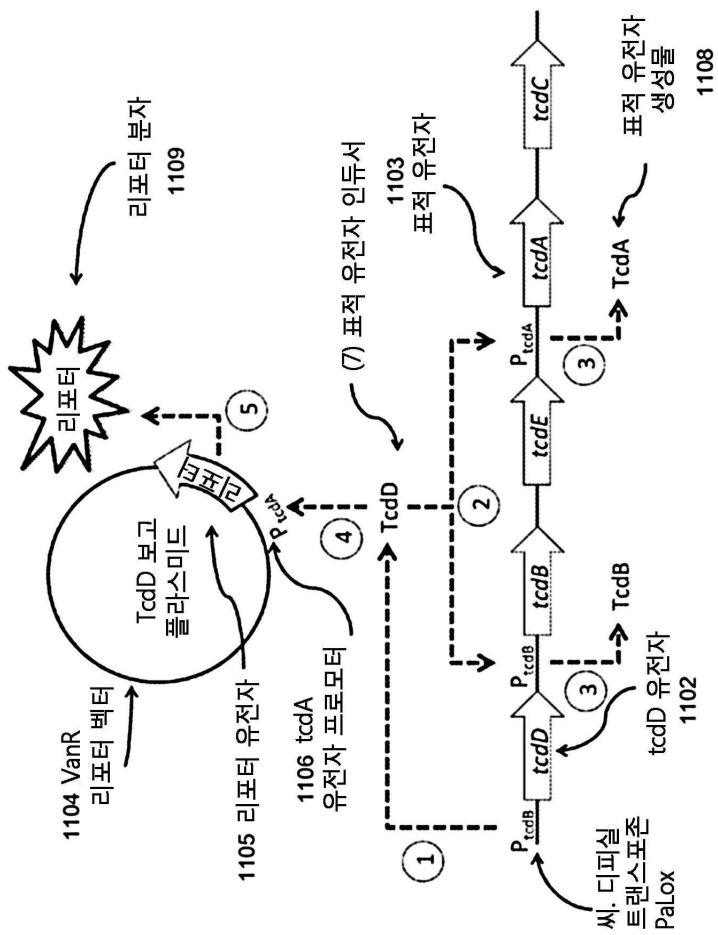
도면9



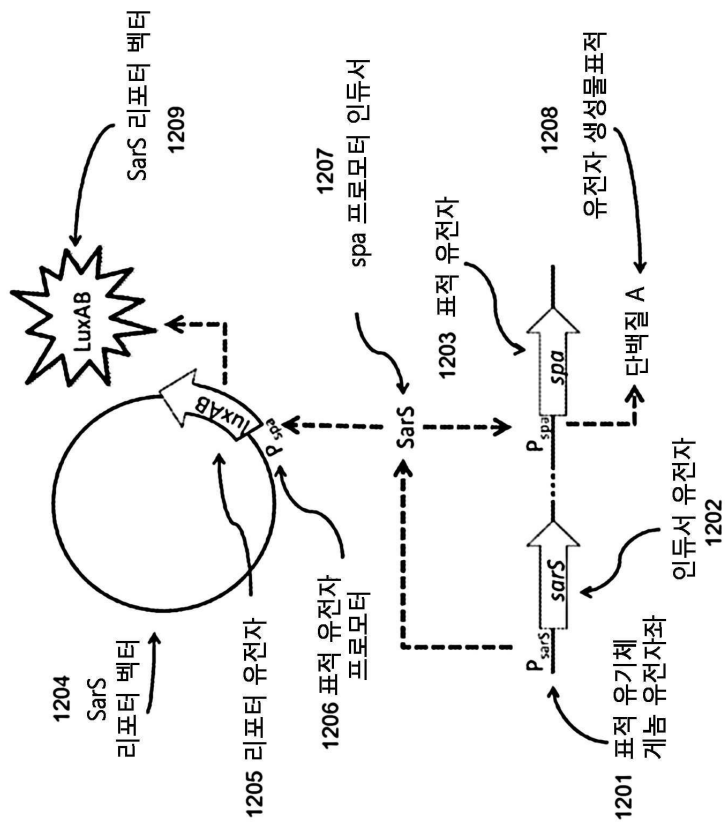
도면10



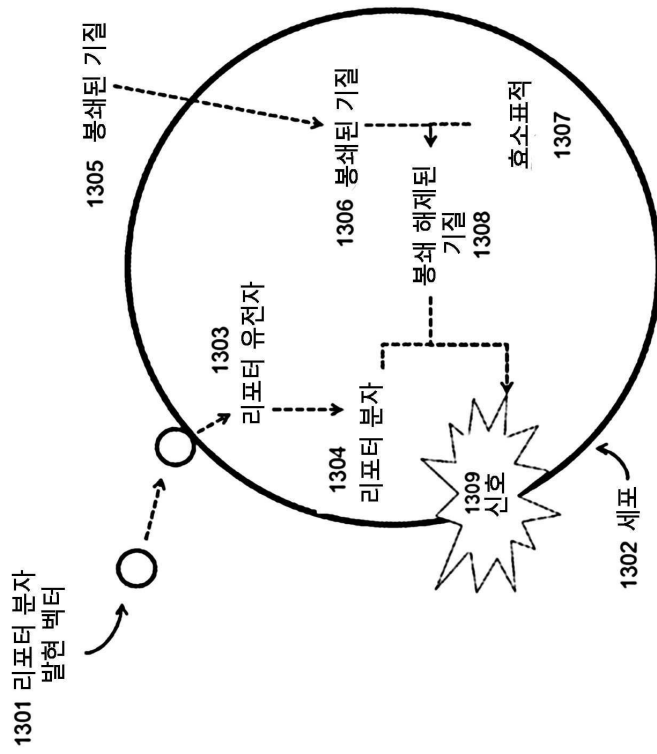
도면11



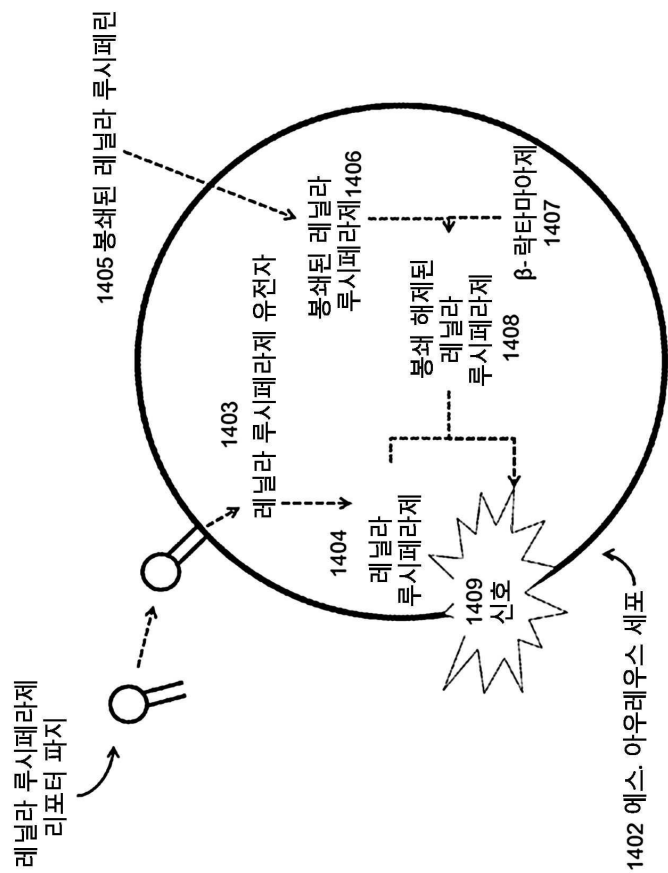
도면12



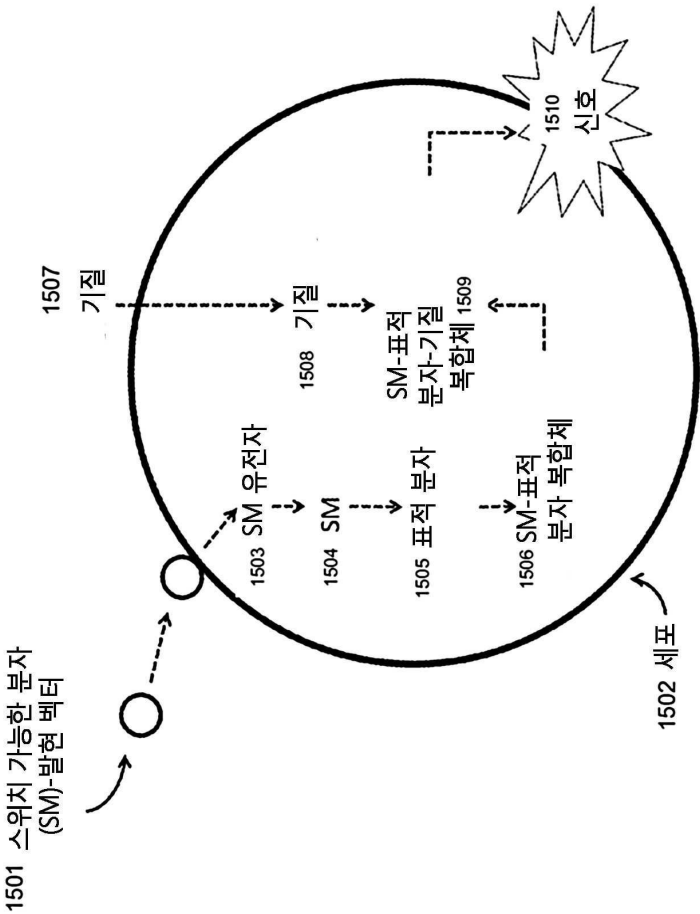
도면13



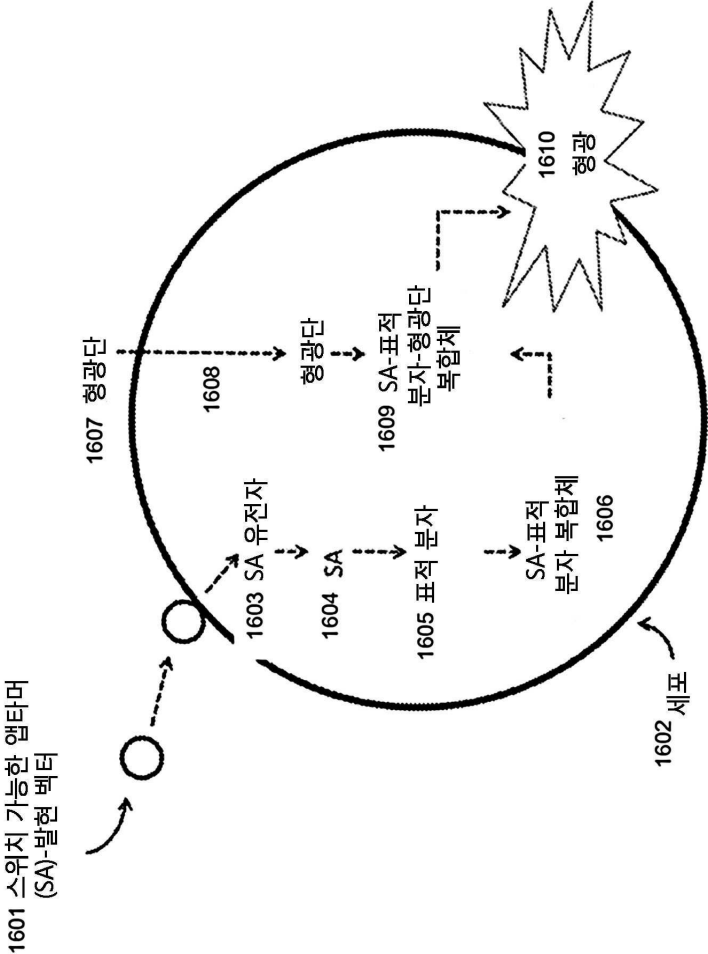
도면14



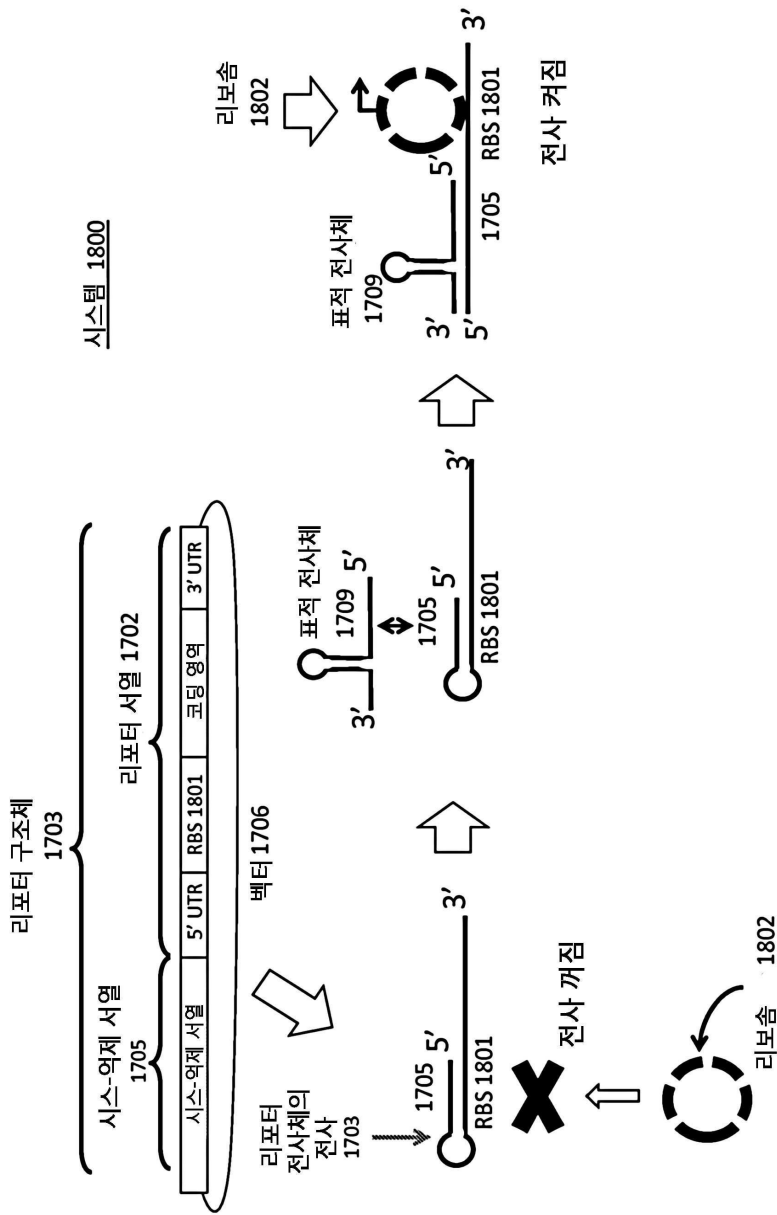
도면15



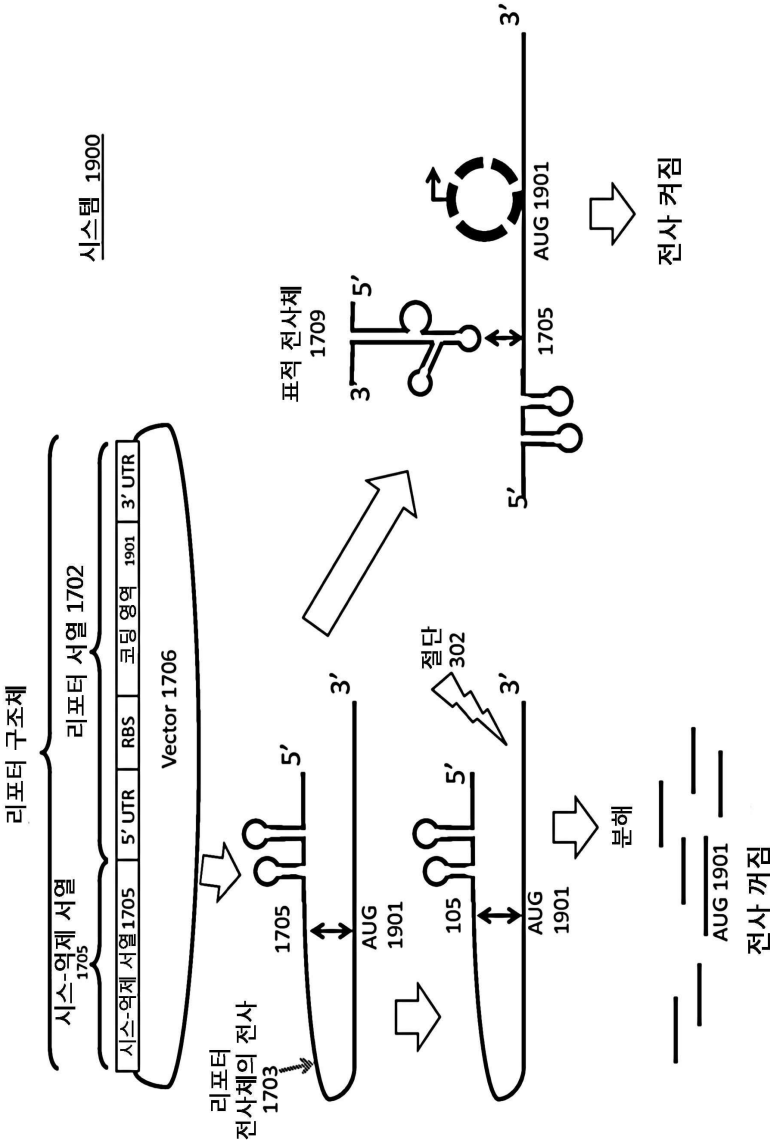
도면16



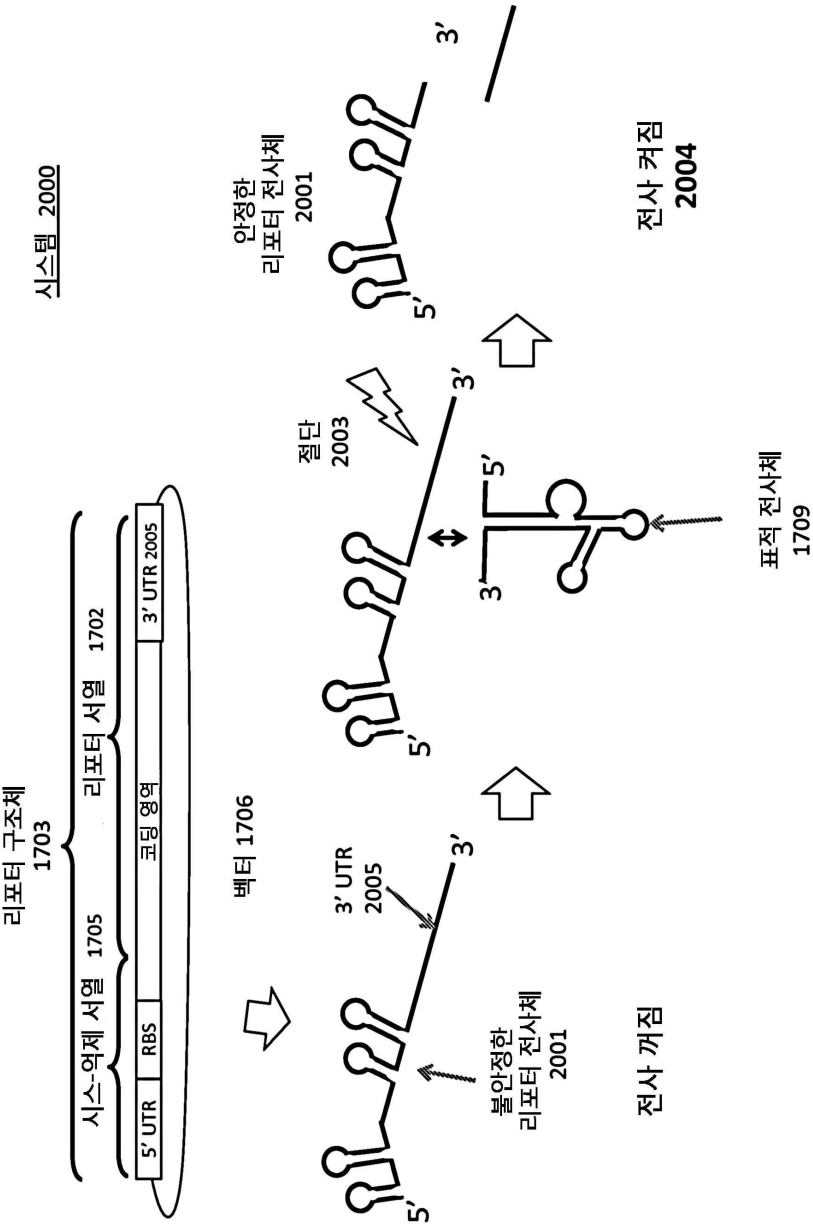
도면18



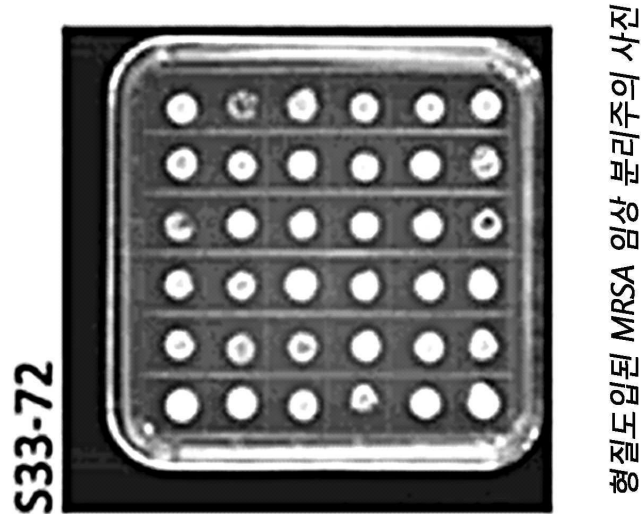
도면19



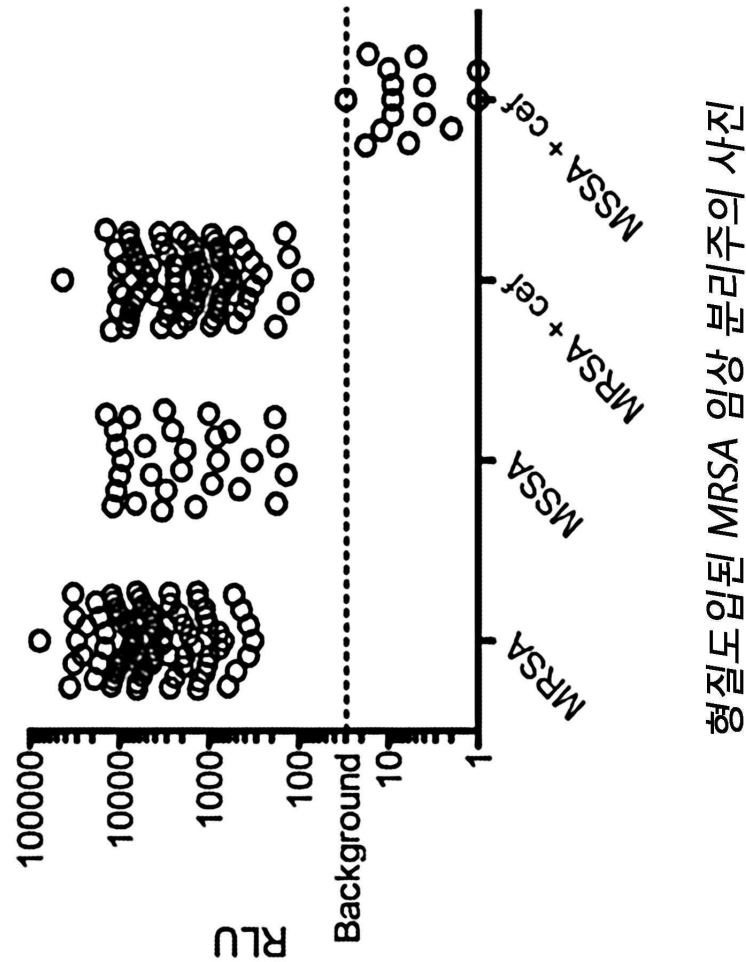
도면20



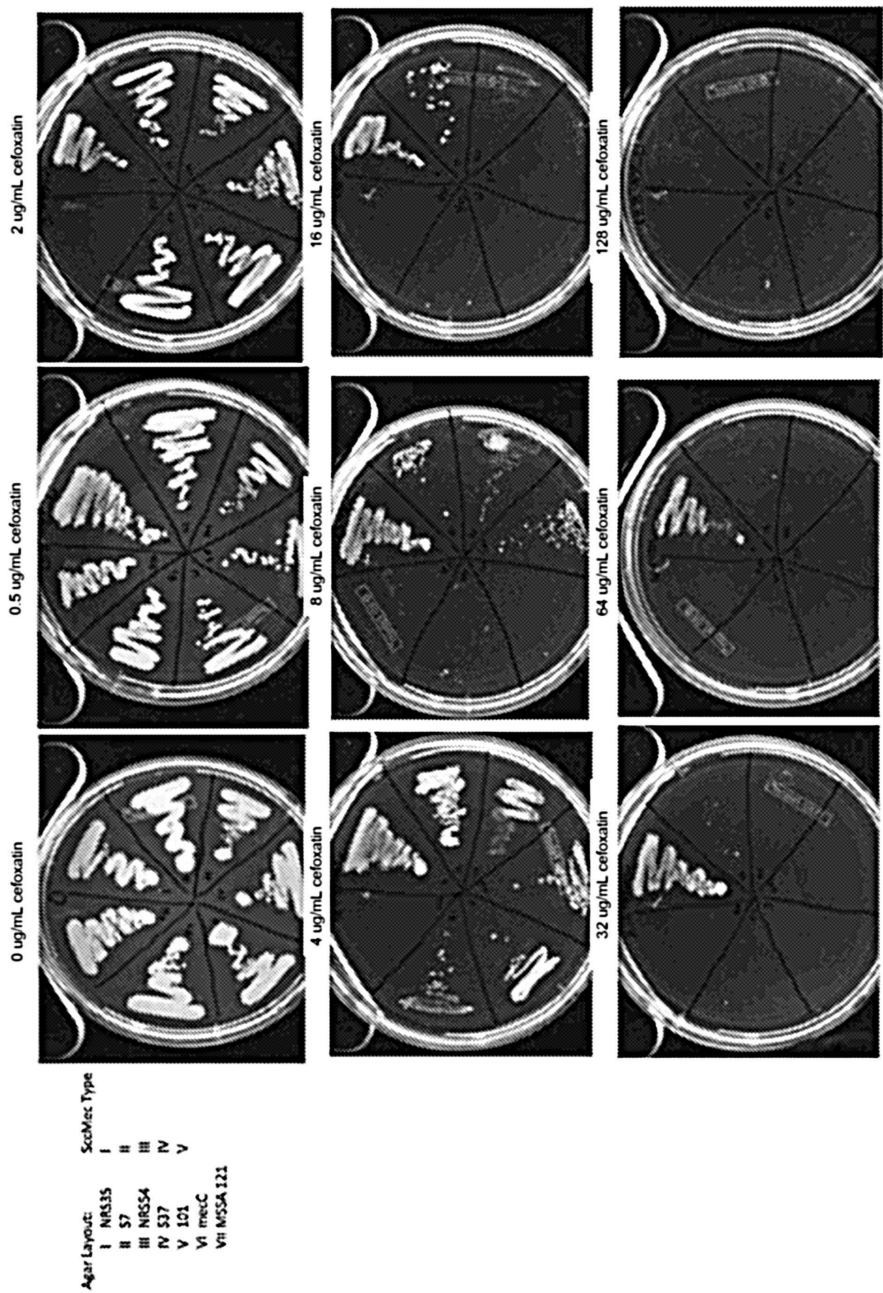
도면21



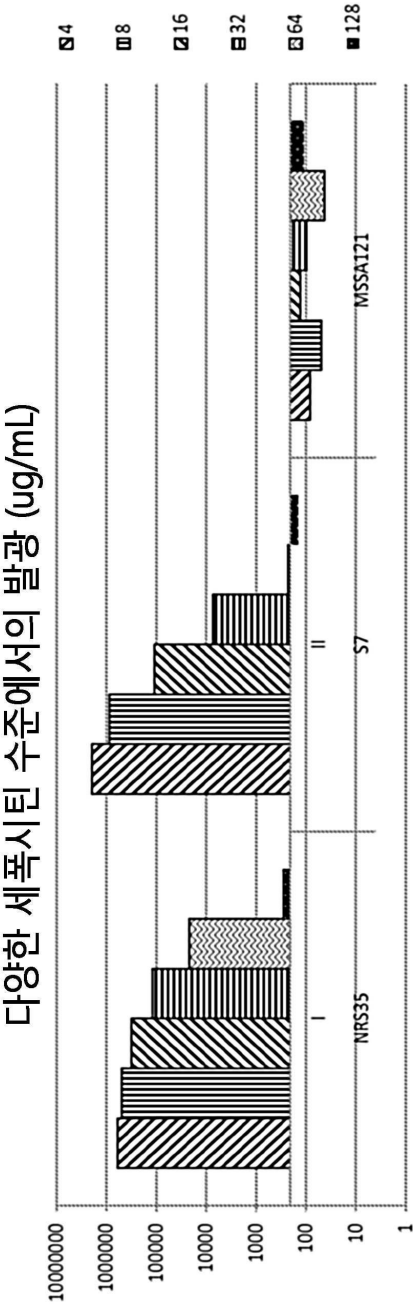
도면22



도면23

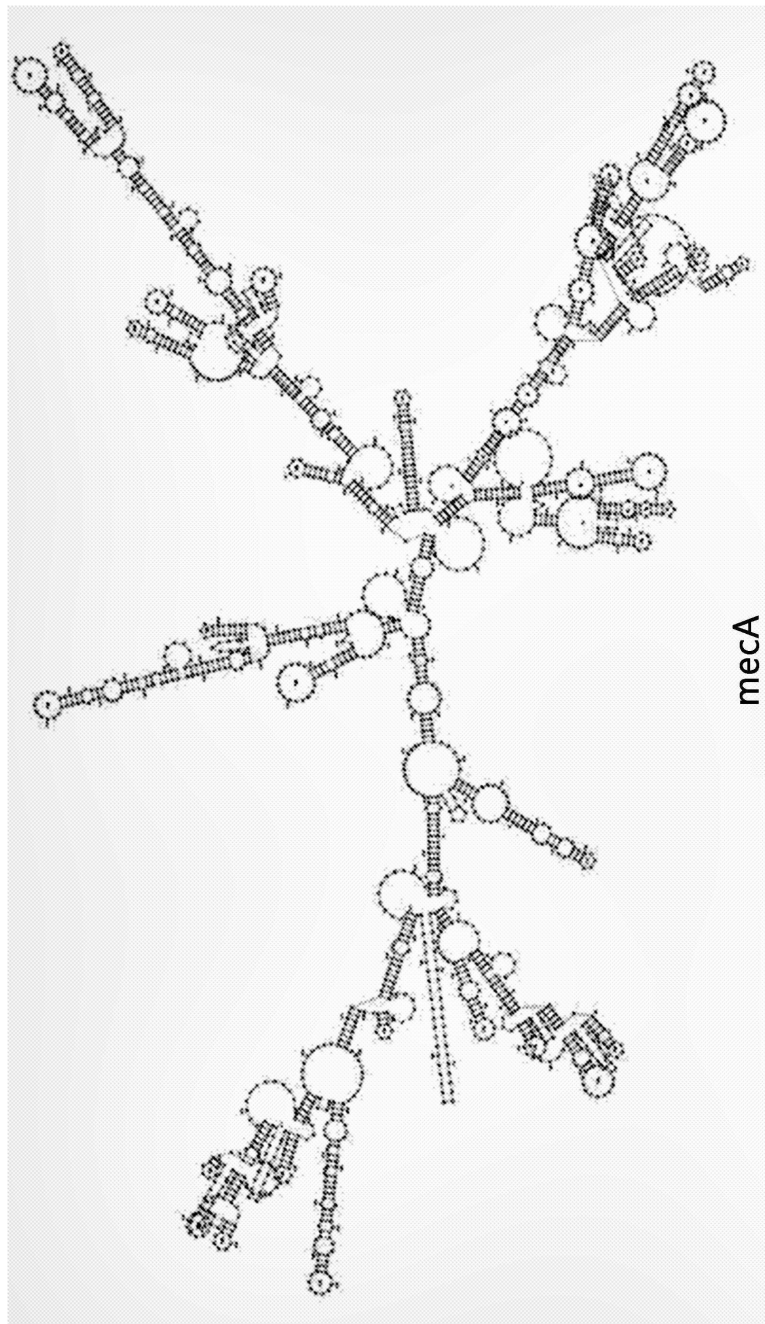


도면24

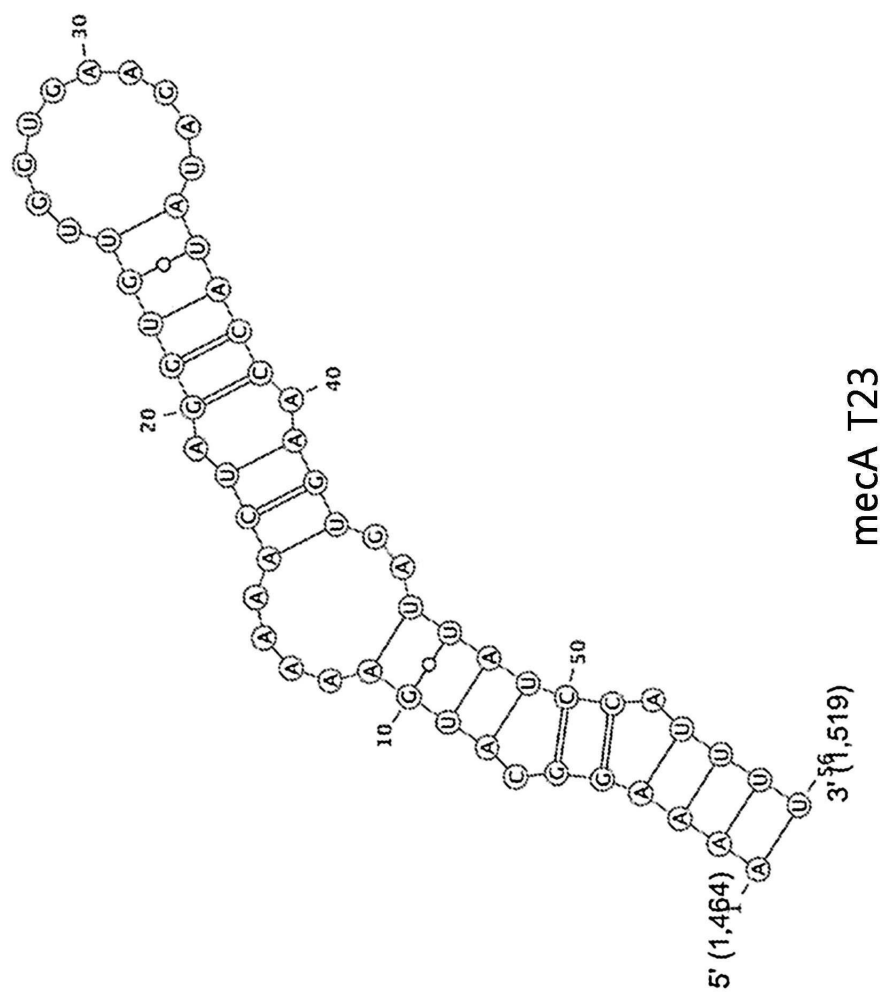


세폭시틴의 다양한 농도에서 MRSA 및 MSSA로부터 얻어진 발광

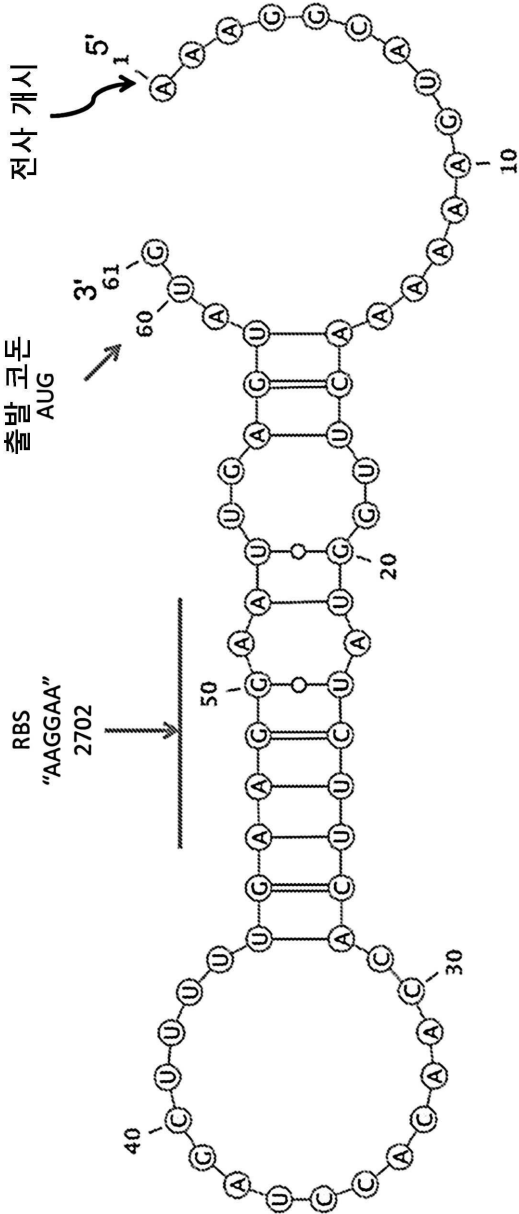
도면25



도면26

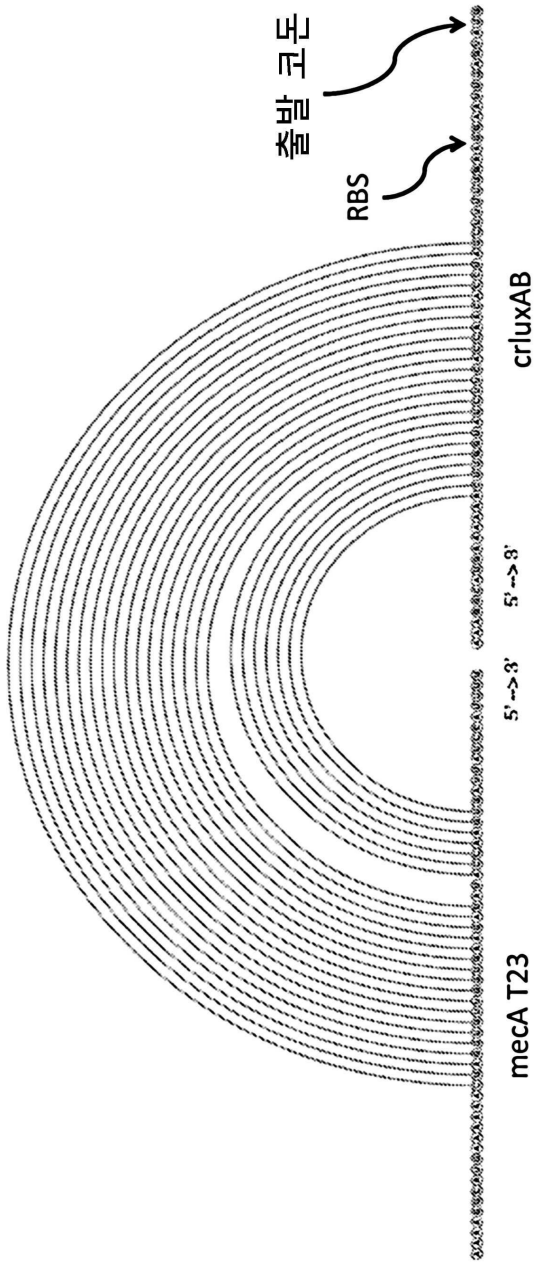


도면27

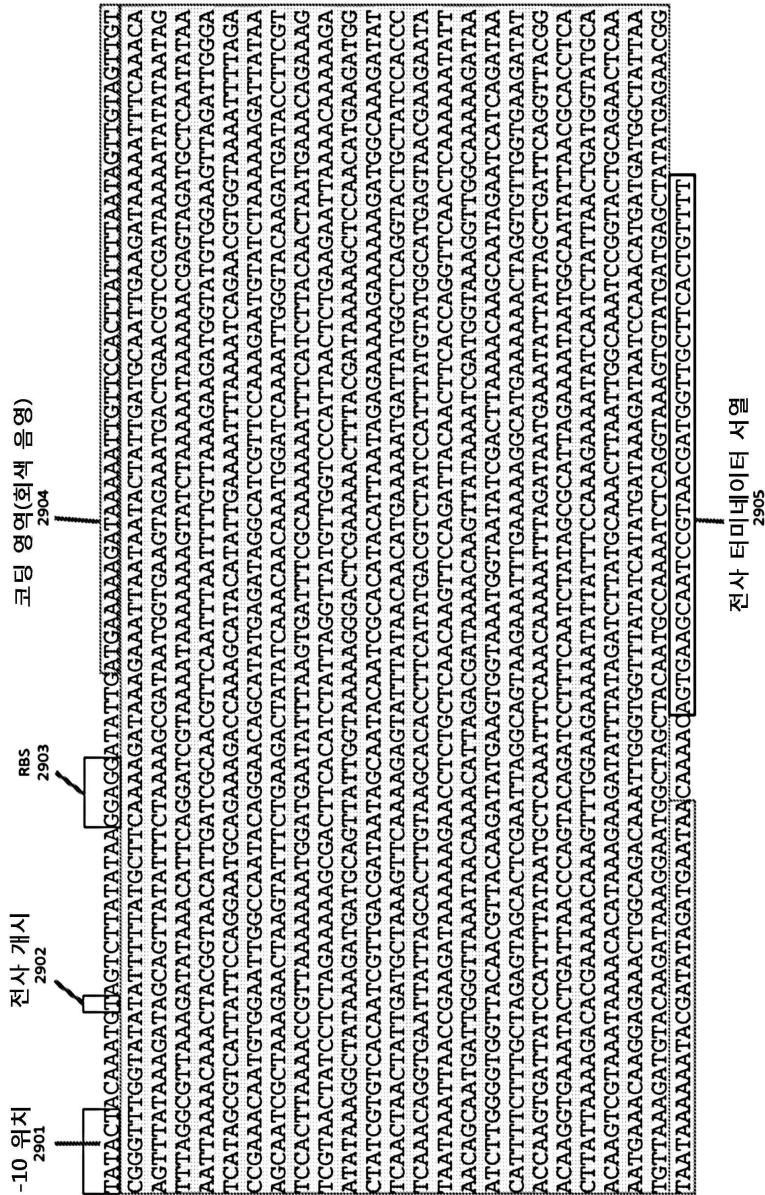


시스-억제 서열(뉴클레오타이드 1-58)
2701

도면28



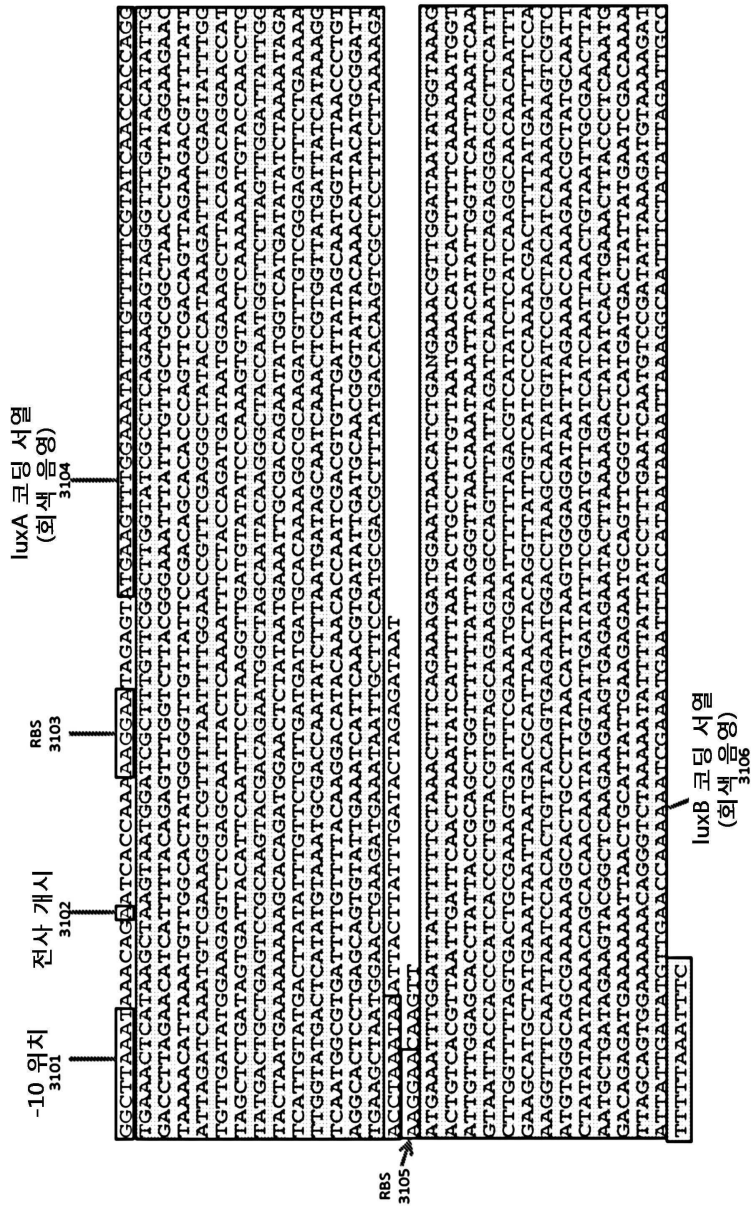
도면29



RBS
3001

[illegible]

도면31



luxA 코딩 서열
(회색 음영)

RBS
3201

[illegible]

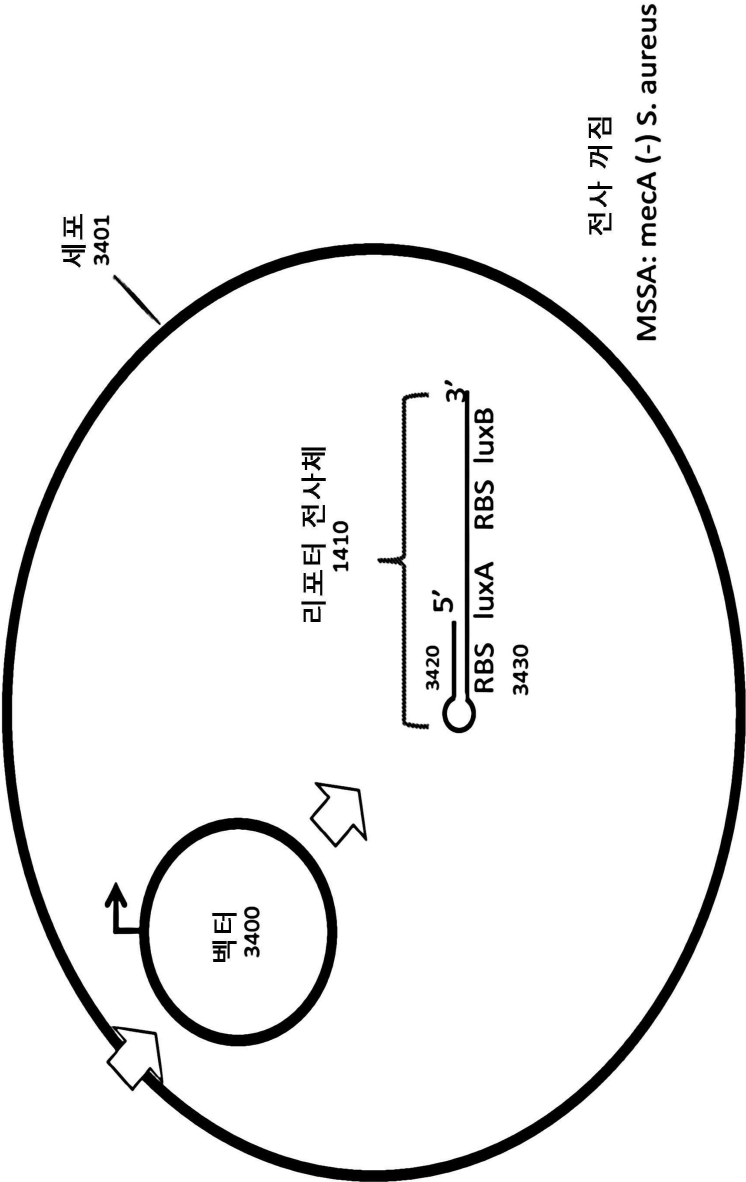
**RBS
3203**

luxB 코딩 서열
(히색 음영)
3204

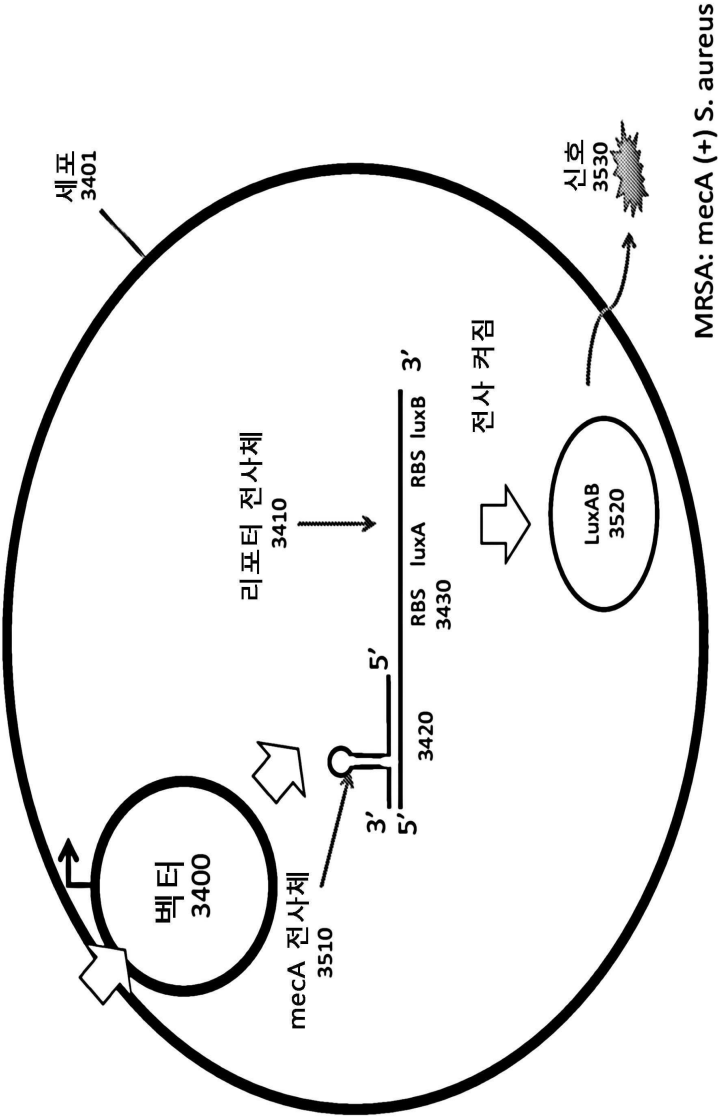
3204 唱

[illegible]

도면34



도면35



서열 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 tgatcactct aatgatcaac atgcaggtga tcacattgcg 60

gctgaaatag cggaaaaaca aagagttaat gccgttgtca gtgccgcagt cgagaatgcg 120

aagcgccaaa ataagcgcat aaatgatcgt tcagatgatc atgacgtgat caccgcg 177

<210> 2

<211> 177

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 2

ccactaaaaa gcatgataat agaccactct aacgaccaac atgcagggga gcacattgcg 60

gctgaaatag cggaaaagca gaggtgaat gccgttgtca gtgccgcagt cgagaatgcg 120

aagcgccaaa ataagcgcat aaacgaccgt tcagacgacc atgacgttat tacccgc 177

<210> 3

<211> 1727

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 3

cactataggg cgaattggcg gaaggccgtc aaggccgcat ttgggcccgg cgcgccggat 60

ccgctagctc tagactggca ggttttctgag cagatcgtcc aaccgatctt ggatcgggtc 120

agaaaaattt gctctaataa atttcgtttt ctaagtgcaa agaataacca tticgagctg 180
 gtgattgaag gttgatgcaa atttgagaa aaaatgcaac aaacattcaa tgcgcatatg 240
 aatatatcaa accctcatca aaatgtcgat ccttcaacca ctctgcccggt tatttgggt 300

 gttgaaatta cgaccgaccg cgctggccgt tacaacctta atgctctaca cagagcgagc 360
 ggactcgggtg ccataaagc gccagctcaa tggctaagaa cgctgtcagc taaacagctc 420
 atcgaagagc ttgaaaaaga aactatgcag aattgcatag tticgttcac aagcaatgga 480
 agcaggattt cttcacgac tcgtataacc ggcaaaggct agcagtggct gatgaagcga 540
 ttgcttgatg ctggtgtgct ggtacctgtc gcggcaacgc gctaacagac gtagtaagaa 600
 ccaccagcat tgtaatgtg gctaaagtca ctttctgag ctgtataacg atgagcgatt 660
 ttactttttc tggctatgaa ttggcctgct ttgtaacaca ctccggtcta tcccgtagcg 720

 ccgggcataat cctgtcgcaa tgtgcaaata tcgcggcaac aaccagtgaat tacttcattc 780
 acaagcctca ccgcctgacg gcggcagaaa ctgggttatag ccaatcaacc gtcgttcgtg 840
 cattccgtga agctgtaaac aaaggaattc tgtctgtaga gattgttacc ggcgatcacc 900
 gtgaacgtcg cgtaacctg taccggttta caccatcctt ttggccttc gcacaacaag 960
 ccaaaaatgc gctgatagaa agcaaatata agatctcttc agcggcaacc aagggttaag 1020
 ctgttctcgc taagacattg gctttattta atttttatc cacaccccca tgtcaaatg 1080
 atacccctc cccctgtcag gatgacgtgg caataaagaa taagaagtca caagttaaaa 1140

 aaacaaaaag atcagtttcc ggcggtgccg gaacaaccag cctcaaaaaa ttgacttcat 1200
 ggatcgttaa ggcaaaagca aaggctgaca atctgcggtt atcaaaaaa cgcactcaaa 1260
 aacatgagtt caagcagaaa gtagaggcgg ctgcgcggaa atatgcttac ctgaagaaca 1320
 agcgttcgcc tgatattggc gggatatcaa acttcgataa cctaccgcat tgcattgacg 1380
 taaacgaagc tcttaatgcg gttttagcca aaaataaaga taacgaacaa tggggtatac 1440
 cggcaggatt cagagggtaa tgaattgtc taattataac catgcatact ttcaacacct 1500
 ctagtttgcc atgaggcaaa ctcatagggt tcttggttaag aggacactgt tgccaaaact 1560

 ggacgcccc ttattgcaat taataaaca ctaacggaca attctaccta acaataagt 1620
 gcttaaaaa acccgcccc gcgggttttt ttatctagag ctacggatc cggcgcgccg 1680
 ggcccttctg ggcctcatgg gccttcgct cactgcccgc tttccag 1727

<210> 4

<211> 131

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<400> 4

cgtcagggtgg cacttttcgg gaaatgtgcg cggaaccctt attgtttat ttctaaata 60

cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatttga 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 gagtttagtaa gttaacagaa gacgagccaa acctaaatgg tttagcagga 60

aacttagata aaaaaatgaa tccagaatta tattcagaac aggaacagca acaagagcaa 120

caaaagaatc aaaaacgaga tagaggtatg cacttataga acatgcattt atgccgagaa 180

aacttattgg ttggaatggg ctatgtgtta gctaacttgt tagcgagttg gttggacttg 240

aattgggatt aatcccaaga aagtaccggc tcaacaaccc ataaagccct gtaggttccg 300

nccaataagg aaattggaat aaagcaataa aaggagtga agaaatgaaa ttcagagaag 360

cctttgagaa ttttataaca agtaagtatg tacttggtgt tttagtagtc ttaactgttt 420

accagataat acaaatgctt aaataaaaaa agacttgatc tgattagacc aaatcttttg 480

atagtgttat attaataaca aaataaaaag gagtcgtca cgcctacca aagtttgtga 540

acgacatcat tcaaagaaaa aaacactgag ttgtttttat aatcttgtat atttagatat 600

taaacgatat ttaaataaac atcaagatat atatttgggt gagcgattac ttaaagcaaa 660

ttgagattaa ggagtcgatt ttttatgtat aaaaacaatc atgcaaatca ttcaaatcat 720

ttggaaaatc acgatttga caatttttct aaaaccggct actctaatac ccggttggac 780

gcacatactg tgtgcatatc tgatccaaaa ttaagttttg atgcaatgac gatcgttga 840
aatctcaacc gagacaacgc tcaggccctt tctaaattta tgagtgtaga gccccaaata 900
agactttggg atattcttca aacaaagttt aaagctaaag cacttcaaga aaaagtttat 960

attgaatatg acaaagtga agcagatagt tgggatagac gtaatatgcg tattgaattt 1020
aatccaaaca aacttacacg agatgaaatg atttggttta aacaaatat aataagctac 1080
atggaagatg acggttttac aagattagat ttagcctttg attttgaaga tgatttgagt 1140
gactactatg caatgtctga taaagcagtt aagaaaacta tttttatgg tcgtaatggt 1200
aagccagaaa caaaatattt tggcgtgaga gatagtaata gatttattag aatttataat 1260
aaaaagcaag aacgtaaaga taatgcagat gctgaagtta tgtctgaaca tttatggcgt 1320
gtagaaatcg aacttaaaag agatatggtg gattactgga atgattgctt tagtgattta 1380

catatcttgc aaccagattg gaaaactatc caacgcactg cggatagagc aatagttttt 1440
atgttattga gtgatgaaga agaattggga aagcttcaca gaaattctag aacaaatat 1500
aagaatttga taaaagaaat ttcgccagtc gatttaacgg acttaatgaa atcgacttta 1560
aaagcgaacg aaaaacaatt gcaaaaacaa atcgattttt ggcaacatga atttaaattt 1620
tggaaatagt gtacatatta atattactga acaaaaatga tataatttaa ctattcta 1680
ttaggaggat tttttatga agtgtctatt taaaaattg gggaaattat atgaggtgaa 1740
agaataattt acccctataa actttageca cctcaagtaa agaggtaaaa ttgtttagtt 1800

tataataaaa atttaaaggt ttgttttata gcgttttatt ttggctttgt attctttcat 1860
tttttagtgt attaaatgaa atggttttta atgtttcttt acctgatatt gcaaatcatt 1920
ttaatactac tcttgaatt acaaaactggg taaacactgc atatatgtta actttttcga 1980
taggaacagc agtatatgga aaattatctg attatataaa tataaaaaaa ttgttaatta 2040
ttggtattag tttgagctgt cttggttcat tgattgcttt tattgggccc acctaggcaa 2100
atatgctctt acgtgctatt atttaagtga ctattttaa ggagttaata aatatgcggc 2160
aaggtattct taaataaact gtcaatttga tagcgggaac aaataattag atgtcctttt 2220

ttaggagggc ttagtttttt gtaccagtt taagaatacc tttatcatgt gattctaaag 2280
tatccagaga atatctglat gctttgtata cctatggtta tgcataaaaa tcccagtgat 2340
aaaagtattt atcactggga tttttatgcc cttttgggtt tttgaatgga ggaaatcac 2400
atgaaaatta ttaatatgg agtttttagct catgttgatg caggaaaaac taccttaaca 2460
gaaagcttat tatataacag tggagcgatt acagaattag gaagcgtgga caaaggtaca 2520
acgaggacgg ataatacgct tttagaacgt cagagaggaa ttacaattca gacaggaata 2580

acctcttttc agtgggaaaa tacgaagggtg aacatcatag acacgccagg acatatggat	2640
ttcttagcag aagtatatcg ttcattatca gttttagatg gggcaattct actgatttct	2700
gcaaaagatg gcgtacaagc acaaactcgt atattatttc atgcacttag gaaaatgggg	2760
attcccacaa tcttttttat caataagatt gaccaaaatg gaattgattt atcaacggtt	2820
tatcaggata ttaaagagaa actttctgcc gaaattgtta tcaaacagaa ggtagaactg	2880
tatcctaata tgtgtgtgac gaactttacc gaatctgaac aatgggatac ggtaatagag	2940
ggaaacgata acctttttaga gaaatatatg tccggtaaat cattagaagc attggaactc	3000
gaacaagagg aaagcataag atttcagaat tgttctctgt tccctcttta tcatggaagt	3060
gcaaaaagta atatagggat tgataacctt atagaagtta ttactaataa attttattca	3120
tcaacacatc gaggtccgtc tgaactttgc ggaaatgttt tcaaaattga atatacaaaa	3180
aaaagacaac gtcttgcata tatacgcctt tatagtggag tactacattt acgagattcg	3240
gttagagtat cagaaaaaga aaaaataaaa gttacagaaa tgtatacttc aataaatggt	3300
gaattatgta agattgatag agcttattct ggagaaattg ttattttgca aaatgagttt	3360
ttgaagttaa atagtgttct tggagataca aaactattgc cacagagaaa aaagattgaa	3420
aatccgcacc ctctactaca aacaactgtt gaaccgagta aacctgaaca gagagaaatg	3480
ttgcttgatg ccccttttga aatctcagat agtgatccgc ttctacgata ttacgtggat	3540
tctacgacac atgaaattat actttctttc ttagggaagag tacaaatgga agtgattagt	3600
gcactgttgc aagaaaagta tcatgtggag atagaactaa aagagcctac agtcatttat	3660
atggagagac cgltaaaaaa tgcagaatat accattcaca tcgaagtgcc gccaaatcct	3720
ttctgggctt ccattggttt atctgtatca ccgcttccgt tgggaagtgg aatgcagtat	3780
gagagctcgg tttctcttgg atacttaaat caatcatttc aaaatgcagt tatggaaggg	3840
gtacgtatg gttgcgaaca aggattatat ggttggaatg tgacggattg taaaatctgt	3900
tttaagtacg gtttatacta tagccctgtt agtactccag cagattttcg gatgcttact	3960
cctattgtac tggagcaagc ctttagaaaa gctggaacag aattgttaga gccatatctt	4020
agttttaaag ttatgcacc acaggaatat ctttcncggg catataacga tgctcccaaa	4080
tattgtgcaa atatcgtaaa tactcaactg aaaaataatg aggtcattat tattggagaa	4140
attctgtctc gatgtattca agattatcgc aatgatttaa ctttttttac aaatgggctt	4200
agtgtttgtt tagcagagct aaaaggatat caggttacca ctggcgaacc tgtttgccag	4260
acccgtcgtc taaatagtcg gatagataaa gtaagatata tgttcaataa aataacttag	4320

tgcgttttat gttgttatat aaatatggtt tcttattaaa taagatgaaa tattcttttaa 4380
 tatagatttg aattaaagtg gaaaggagga gattgttatt ataaactaca agtggatatt 4440
 gtgtcctatt tgtggaaata aaacaagact acgaatacga gtggatacta tacttaaaaa 4500
 ttcccttta tacagcccca aatgtaagaa cgaaacttta attaatgttc aaaaaatgaa 4560
 tataataaca atcaaagagc cagacgcaa gacgcagagc cgataatttg agaaatgaaa 4620
 ctctcatctt atcggtcttt ttgttttatt tgaattttac tgactagcct tcaatatctt 4680
 c 4681

<210> 6

<211> 1194

<212> DNA

<213> Enterobacteria phage P1

<400> 6

gtgacctggg acgatcacia gaagaatttt gctcgctgg cgcgagatgg tggttacacc 60
 atcgcacagt atgccgcca gttaatactt aaccttaata ccgcacgtcg ttatctccgt 120
 gccttcaaag aagacaccag gactacggac agccgcaagc caaataagcc agtcaggaag 180
 ccactaaaa gcatgatcat tgatcactct aatgatcaac atgcaggtga tcacattgcg 240
 gctgaaatag cgaaaaaca aagagttaat gccgttgtca gtgccgcagt cgagaatgcg 300
 aagcgccaaa ataagcgcat aaatgatcgt tcagatgatc atgacgtgat caccgcgcc 360

 caccggacct tacgtgatcg cctggaacgc gacaccctgg atgatgatgg tgaacgttt 420
 gaattcgaag ttggcgatta cctgatagat aacgttgaag cgcggaaggc cgcgcgcgct 480
 atgttgctgc ggtccggggc cgatgttctg gaaaccactc ttctgaaaa gtctctttct 540
 catctcctta tgctggagaa cgccagggat acgtgtattc gcctggtgca ggaaatgcgc 600
 gatcagcaaa aagacgatga tgaaggtaact ccgcctgaat accgtatcgc gagcatgcta 660
 aacagctggt ccgcgcagat aagcagcctg atcaacacca ttacagcat ccggaataac 720
 tatcgaaaag aaagccggga ggccgaaaag cacgctttat ctatggggca agctggcatt 780

 gttaagctgg catacgaacg aaagcgtgaa aataactggt cagtgtgga agcggctgaa 840
 ttcatcgagg cgcatggagg aaaagtgccg cccctgatgc tggagcaaat caaagccgat 900
 ctgcgtgctc ctaagaccaa taccgatgat gaggaaaacc aaacagcatc tggcgtcca 960
 tcacttgaag atctggataa aatcgcgca gaacgggccg ccagccgccg cgctgatgcc 1020
 gcattgtgga ttgagcatcg tagagaagaa attgccgata tcgtcgatac aggtggttat 1080
 ggtgatgtcg atgcggaagg catatcaaac gaagcatggc ttgaacagga tctggacgaa 1140

gacgaggagg aagacgaaga agttacccgc aaactgtacg gggatgatga ttaa 1194

<210> 7

<211> 1194

<212> DNA

<213> Enterobacteria phage P1

<400> 7

gtgacctggg acgatcacia gaagaatttt gctcgcttgg cgcgagatgg tggttacacc	60
atcgcacagt atgccgccga gtttaattctt aaccctaata ccgcacgtcg ttatctccgt	120
gccttcaaag aagacaccag gactacggac agccgcaagc caaataagcc agtcaggaag	180
ccactaaaaa gcatgatcat tgatcactct aatgatcaac atgcaggtga tcacattgcg	240
gctgaaatag cggaaaaaca aagagttaat gccgttgtca gtgccgcagt cgagaatgcg	300
aagcgccaaa ataagcgcat aaatgatcgt tcagatgatc atgacgtgat caccgcgcc	360
caccggacct tacgtgatcg cctggaacgc gacaccctgg atgatgatgg tgaacgttt	420
gaattcgaag ttggcgatta cctgatagat aacgttgaag cgcggaaggc cgcgcgcgt	480
atgttgctgc ggtccggggc cgatgttctg gaaaccactc ttctggaaaa gtctctttct	540
catctcctta tgctggagaa cgccagggat acgtgtattc gcctggtgca ggaaatgcgc	600
gatcagcaaa aagacgatga tgaaggtact ccgcctgaat accgtatcgc gagcatgcta	660
aacagctgtt ccgcgcagat aagcagcctg atcaacacca ttacagcat ccggaataac	720
tatcgaaaag aaagccggga ggccgaaaag cacgctttat ctatggggca agctggcatt	780
gttaagctgg catacgaacg aaagcgtgaa aataactggt cagtgcctgga agcggctgaa	840
ttcatcgagg cgcattgagg aaaagtgcg ccctgatgc tggagcaaat caaagccgat	900
ctgcgtgctc ctaagaccaa taccgatgat gaggaaaacc aaacagcatc tggcgtcca	960
tcacttgaag atctggataa aatcgcgca gaacgggccg ccagccgccg cgctgatgcc	1020
gcattgtgga ttgagcatcg tagagaagaa attgccgata tcgtcgatac aggtggttat	1080
ggtgatgtcg atcggaagg 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 attcgagat gaatatataa tgaatggatg taatggtaaa	60
aaagcagcaa tticagcagg ttatagtaag aaaacagcag agtcttttagc aagtcgattg	120
ttaagaaatg ttaatgtttc ggaatatatt aaagaacgat tagaacagat acaagaagag	180
cgtttaatga gcattacaga agcttttagcg ttatctgctt ctattgctag aggagaacct	240
caaggaggctt acagtaagaa atatgacat ttaaacgatg aagtggaaaa agaggttact	300
tacacaatca caccaacttt tgaagagcgt cagagatcta ttgaccacat actaaaagtt	360
catgggtcgt atatcgacaa aaaagaaatt actcagaaga atattgagat taatattaga	420
tctattgacc acatactaaa agttcatggt gcgtatatcg acaaaaaaga aattactcag	480
aagaatattg agattaatat tggtagtac gatgacgaaa gttaa	525

<210> 9

<211> 663

<212> DNA

<213> Staphylococcus phage 80alpha

<400> 9

aattggcagt aaagtggcag tttttgatac ctaaaatgag atattatgat agttaggat	60
attgactatc ttactgcgtt tcccttatcg caattaggaa taaaggatct atgtgggttg	120
gctgattata gccaatcctt ttttaatttt aaaaagcgta tagcgcgaga gttggtggtg	180
aatgaaatga acgaaaaaca aaagagattc gcagatgaat atataatgaa tggatgtaat	240
ggtaaaaaag cagcaatttc agcaggttat agtaagaaaa cagcagagtc tttagcaagt	300
cgattgttaa gaaatgttaa tgtttcggaa tatattaaag aacgattaga acagatacaa	360
gaagagcgtt taatgagcat tacagaagct ttagcggtat ctgcttctat tgctagagga	420
gaacctcaag aggcttacag taagaaatat gaccatttaa acgatgaagt ggaaaaagag	480
gttacttaca caatcacacc aacttttgaa gagcgtcaga gatctattga ccacatacta	540
aaagttcatg gtgcgtatat cgacaaaaaa gaaattactc agaagaatat tgagattaat	600
attggtgagt acgatgacga aagttaaatt aaactttaac aaaccatcta atgttttcaa	660
cag	663

<210> 10

<211> 1116

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 10

tcataaatat ttaactatctt cttctgtgt actagggtac aaatgaccgt atcggttata	60
tacttcatta ctatcagcat ggccaaacg ctgtgctatt accatgatac ttgcgccatg	120
attgactagc atagacgcat ggctatgtct taactcatga attacaattc tagggaatgt	180
ctgaccgtct ggtagttgtt catctaatac ttttaatgca gcggtaaacc aacgatctat	240
agttgattca ctataagctt tgaagaatgt accgaataat acataatcat ctttatatac	300
attgttttct ttgtaccatt ttaaatttc ttgatatac ttcacatgt gaacaggtaa	360
gtatatatac cgtattgctg cttttgtttt aggggctgtc acttcaccgt gatagtctgt	420
tttgtaata tgiatgaaat catcatcata gttaatatca cgccatgtga gggctctaat	480
ttcgccctta cgtgcaccag agtaaacag tagcttaaag aataactttt gttgttgtgt	540
agctaaagcc tcatagaatt gattgaattg ttctaattgc caatagttca aacgcttatt	600
tgattctatt tcaaagttac ctactagaga ggctacattt tgctttagat catgaaactt	660
catagcatgg ttaagtaacg atactaagaa cacgtgcatt ttctttaggt actctccaga	720
gtgtccctct tttacttcg tattctgaaa cttcataata tcttgtag tagcatattaa	780
cacgtccata gacttaaaat agggtagcaa atgggtgttt gtatgtgtct ttaatgcttt	840
cacactagat gacttacgac gtgcagaata ccactctata tactcatcta cgagcttacc	900
aaaggcagc ttgtttatct gtccacacc ctctaactcg tccataattt cattacattt	960
cttcaatgcc tctttacgt gtttaagcc actctttttt atttctttac gttgattaaa	1020
tttatcatag tattttatcc gaaaatagta tttaccacgt tttagctctt tatatatgtt	1080
gtgggatagg tttaagttgt 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

ctcgggccgt ctcttgggct tgatcgccct tcttgccat ctcacgcgt cctgcggcgg	60
---	----

cctgtagggc aggcataac ccctgccgaa ccgcttttgt cagccggtcg gccacggctt 120

 ccggcgtctc aacgcgcttt gagattcca gcttttcggc caatccctgc ggtgcatagg 180
 cgcgtaggctc gaccgcttgc gggctgatgg tgacgtggcc cactgggtggc cgctccaggg 240
 cctcgtagaa cgctgaatg cgcgtgtgac gtgccttctt gccctcgatg ccccggttga 300
 gccctagatc ggccacagcg gccgcaaacg tggcttggtc gcgggtcatc tgcgctttgt 360
 tgccgatgaa ctcttggcc gacagcctgc cgtcctgcgt cagcggcacc acgaacgcgg 420
 tcatgtgcgg gctggtttgc tcacggtgga tgctggccgt cacgatgcga tccgccccgt 480
 acttgtccgc cagccacttg tgcgcttct cgaagaacgc cgctgctgt tcttggctgg 540

 ccgacttcca ccattccggg ctggccgtca tgacgtactc gaccgccaac acagcgtcct 600
 tgcgccgctt ctctggcagc aactcgcga gtgcggccat cgcttcatcg gtgctgctgg 660
 ccgccagtgc ctcttctctt ggcgtcctgc tggcgtcagc gttgggcgtc tcgctcgcgc 720
 ggtaggcgtg cttagactg gccgccacgt tgccatttt cgccagcttc ttgcatcgca 780
 tgatcgcgta tgccgccatg cctgccccct ctttttgggtg tccaaccggc tcgacggggg 840
 cagcgcaagg cggtgccctc ggccgggccac tcaatgcttg agtatactca ctgactttg 900
 ctctgcaaag tcgtgaccgc ctacggcggc tgccggcgccc tacgggcttg ctctccgggc 960

 ttgcacctgc gcggtcgtg cgctcccttg ccagcccggtg gatagttgga cgatggccgc 1020
 gagcggccac cggttggtc gcttcgctcg gcccgtaggac aacctgctg gacaagctga 1080
 tggacaggct gcgctgccc acgagcttga ccacagggat tgccaccgg ctaccactat 1140
 agggcgaatt ggccgaaggc cgtcaaggcc gcatttgggc ccggcgccgc ggatccgcta 1200
 gctctagacc tctagaccag ccaggacaga aatgcctcga cttcgtgct gcccaaggtt 1260
 gccgggtgac gcacaccgtg gaaacggatg aaggcacgaa ccagtggtgac ataagcctgt 1320
 tcggttcgta agctgtaatg caagtagcgt gcccgttccg ggcttttga catgtgactt 1380

 tcgttacctt cgctcaaaa agagttttta cgaaaggaag cataagtac ctgggacgat 1440
 cacaagaaga attttgctcg cctggcgcca gatggtggtt acaccatgc acagtatgcc 1500
 gccgagttta atcttaacc taataccgca cgtcgttata tccgtgcctt caaagaagac 1560
 accaggacta cggacagccg caagccaaat aagccagtca ggaagccact aaaaagcatg 1620
 atcattgac actctaata tcaacatgca ggtgatcaca ttgcggctga aatagcgga 1680
 aaacaaagag ttaatgccgt tgtcagtgcc gcagtcgaga atgcgaagcg ccaaaataag 1740
 cgcataaatg atcgttcaga tgatcatgac gtgatcacc gcgcccaccg gaccttacgt 1800

gatcgcttg aacgcgacac cctggatgat gatggtgaac gctttgaatt cgaagtggc	1860
gattacctga tagataacgt tgaagcgcgg aaggccgcgc gcgctatgtt gcgtcggtcc	1920
ggggccgatg ttctggaac cactcttctg gaaaagtctc tttctcatct ctttatgctg	1980
gagaacgcca gggatacgtg tattcgccctg gtgcaggaaa tgcgcgatca gcaaaaagac	2040
gatgatgaag gtactccgcc tgaataccgt atcgcgagca tgctaaacag ctgttccgcg	2100
cagataagca gccgatcaa caccatttac agcatccgga ataactatcg aaaagaaagc	2160
cgggagggcg aaaagcacgc tttatctatg gggcaagctg gcattgttaa gctggcatac	2220
gaacgaaagc gtgaaaataa ctggtcagtg ctggaagcgg ctgaattcat cgaggcgcat	2280
ggaggaaaag tgccgcccct gatgctggag caaatcaaag ccgatctgcg tgctcctaag	2340
accaataccg atgatgagga aaaccaaaca gcactctggcg ctccatcact tgaagatctg	2400
gataaaatcg cgcgagaacg ggccgccagc cgcgcgctg atgccgatt gtggattgag	2460
catcgtagag aagaaattgc cgatatctgc gatacagtg gttatggtga tgtcgatgcg	2520
gaaggcatat caaacgaagc atggcttgaa caggatctgg acgaagacga ggaggaaagc	2580
gaagaagtta cccgcaaact gtacggggat gatgattaat taaaaaacc cgccccggcg	2640
ggttttttta tctagagcta gcggatccgg cgcgccgggc cttcttgggc ctcatgggcc	2700
ttccgctcac tgcccgcttt ccagcactat agggcggaatt ggcggaaggc cgtcaaggcc	2760
gcatttgggc cggcgcgcc ggatccgcta gctctagact ggaggtttc tgagcagatc	2820
gtccaacccg atctggatcg ggtcagaaaa atttgctcta ataaatttcg ttttctaagt	2880
gcaaagaatc accatttcga gctggtgatt gaaggttgat gcaaatttgg agaaaaatg	2940
caacaaacat tcaatgcgga tatgaatata tcaaaccttc atcaaatgt cgatccttca	3000
accactctgc ccgttatattg tgggtttgaa attacgaccg accgcgctgg ccgttacaac	3060
cttaatgctc tacacagagc gagcggactc ggtgcccata aagcgccagc tcaatggcta	3120
agaacgctgt cagctaaaca gctcatcgaa gagcttgaaa aagaaactat gcagaattgc	3180
atagtttcgt tcacaagcaa tggaagcagg atttctttca cgactcgtat aaccggcaaa	3240
ggtcagcagt ggctgatgaa gcgattgctt gatgctgggtg tgctgggtacc tgtcgcggca	3300
acgcgctaac agacgtagta agaaccacca gcattgtaat gctggctaaa gtcactttcc	3360
tgagctgtat aacgatgagc gattttactt tttctggcta tgaattggcc tgctttgtaa	3420
cacactccgg tctatccgt agcgcggggc atatcctgtc gcaatgtgca aatctcgcg	3480
caacaaccag tgaatacttc attcacaagc ctaccgcct gatcgcgga gaaactggtt	3540
atagccaatc aaccgtcgtt cgtgcattcc gtgaagctgt aaacaaagga attctgtctg	3600
tagagattgt tatcggcgat caccgtgaac gtcgcgctaa cctgtaccgg ttacaccat	3660

cctttttggc cttcgcacaa caagccaaaa atgcgctgat agaaagcaaa ttaaagatct 3720
 cttcagcggc aaccaaggtt aaagctgttc tcgctaagac attggcttta tttatTTTT 3780
 tatccacacc cccatgtcaa aatgataccc cctccccctg tcaggatgac gtggcaataa 3840
 agaataagaa gtcacaagtt aaaaaaacia aaagatcagt ttccggcggt gccggaacia 3900

 ccagcctcaa aaaattgact tcatggatcg ctaaggcaaa agcaaaggct gacaatctgc 3960
 ggttatccaa aaaacgcact caaaaacatg agttcaagca gaaagtagag gcggctgcgc 4020
 ggaaatatgc ttacctgaag aacaagcgtt cgcctgatat tggcgggata tcaaacttcg 4080
 ataacctacc gcattgcatg acggtaaacg aagctcttaa tgcggtttta gccaaaaata 4140
 aagataacga acaatggggg ataccggcag gattcagagg gtaatgaatt gctctaatta 4200
 taacatgca tactttcaac acctctagtt tgccatgagg caaactcata ggtgtcctgg 4260
 taagaggaca ctgttgccaa aactggacgc cccattattg caattaataa acaactaacg 4320

 gacaattcta cctaacaata agtggcttaa aaaaaccgc cccggcggtt tttttatct 4380
 agagctagcg gatccggcgc gccgggcctt tctgggcctc atgggccttc cgctcactgc 4440
 ccgctttcca gccagccttc gaccacatac ccaccggctc caactgcgcg gcctgcggcc 4500
 ttgccccatc aatTTTTTTT attttctctg gggaaaagcc tccggcctgc ggctgcgcg 4560
 cttcgttgc cggttggaca ccaagtggaa ggcggttcaa ggctcgcga gcgaccgcgc 4620
 agcggcttgg ccttgacgcg cctggaacga cccaagccta tgcgagtggg ggcagtcgaa 4680
 ggcaagccc gcccgctgc ccccgagac ctgcaggggg gggggggcgc tgaggtctgc 4740

 ctctgaaga aggtgttgc gactcatacc aggcctgaat cgcccatca tccagccaga 4800
 aagttaggga gccacggttg atgagagctt tgtttaggt ggaccagttg gtgatttga 4860
 acttttctt tgccacgaa cggctctgct tctcggaag atgcgtgac tgatccttca 4920
 actcagcaaa agttcgattt attcaacaaa gccgccgtcc cgtcaagtca gcgtaatgt 4980
 ctgccagtgt tacaaccaat taaccaattc tgattagaaa aactcatga gcatcaaatg 5040
 aaactgcaat ttattcatat caggattatc aataccatat tttgaaaaa gccgtttctg 5100
 taatgaagga gaaaactcac cgaggcagtt ccataggatg gcaagatcct ggtatcggtc 5160

 tgcgattccg actcgtccaa catcaataca acctattaat ttccctcgt caaaaataag 5220
 gttatcaagt gagaaatcac catgagtac gactgaatcc ggtgagaatg gcaaaagctt 5280
 atgcatttct ttccagactt gttcaacagg ccagccatta cgctcgtcat caaaatcact 5340
 cgcatcaacc aaaccgttat tcattcgtga ttgcgcctga gcgagacgaa atacgcgatc 5400
 gctgttaaaa ggacaattac aaacaggaat cgaatgcaac cggcgagga aactgccag 5460
 cgcatcaaca atattttcac ctgaatcagg atattcttct aatactgga atgctgtttt 5520

cccggggatc gcagtgggtga gtaacatgc atcatcagga gtacggataa aatgcttgat 5580

 ggtcgggaaga ggcataaatt ccgtcagcca gtttagtctg accatctcat ctgtaacatc 5640
 attggaacg ctacctttgc catgtttcag aaacaactct ggcgcatcgg gcttcccata 5700
 caatcgatag atgtcgcac ctgattgcc gacattatcg cgagccatt tataccata 5760
 taaatcagca tccatgttgg aatttaatcg cggcctcgag caagacgttt cccgttgaat 5820
 atggctcata acacccttg tattactgtt tatgtaagca gacagtitta ttgttcatga 5880
 tgatatattt ttatcttctg caatgtaaca tcagagattt tgagacacaa cgtggctttc 5940
 ccccccccc ctgcaggctc cgagcctcac ggcggcgagt gcgggggttc caagggggca 6000

 gcgccacctt gggcaaggcc gaaggccgcg cagtcgatca acaagccccg gaggggccac 6060
 tttttgccgg agggggagcc gcgccgaagg cgtgggggaa ccccgagggt gtgcccttct 6120
 ttgggacca aagaactaga tataggcgga aatgcgaaag acttaaaaat caacaactta 6180
 aaaaaggggg gtacgaaca gctcattgcg gcacccccg caatagctca ttgcgtaggt 6240
 taaagaaaat ctgtaattga ctgccacttt tacgaacgc ataattgttg tcgcgtgcc 6300
 gaaaagtgtc agctgattgc gcatggtgcc gcaaccgtgc ggaccccta ccgcatggag 6360
 ataagcatgg ccacgcagtc cagagaaatc ggcatccaag ccaagaacaa gcccggtcac 6420

 tgggtgcaaa cggaacgcaa agcgcatgag gcgtgggccc ggcttattgc gaggaaccc 6480
 acggcggcaa tgctgctga tcacctctg gcgcagatgg gccaccagaa cgccgtggtg 6540
 gtcagccaga agacactttc caagctcatc ggacgttctt tgcggacggt ccaatacga 6600
 gtcaaggact tgggtggcca gcgtgggac tccgtcgtga agtcaacgg ccccgccacc 6660
 gtgtcggcct acgtggtcaa tgaccgcgtg gcgtggggcc agccccgcga ccagtgcgc 6720
 ctgtcgtgtg tcagtgcgcg cgtggtggtt gatcacgacg accaggacga atcgtgttg 6780
 gggcatggcg acctgcgcg catcccgacc ctgtatccgg gcgagcagca actaccgacc 6840

 ggccccggcg aggagccgcc cagccagccc ggcatccgg gcatggaacc agacctgcca 6900
 gccttgaccg aaacggagga atgggaacgg cgcgggcagc agcgctgcc gatgcccgat 6960
 gagccgtgtt ttctggacga tggcgagccg ttggagccgc cgacacgggt cacgctgccg 7020
 cgccgtagc acttgggttg cgcagcaacc cgtaatgctg ctgttccaga ctatcggtg 7080
 tagccgctc gccgacctat acctgtctg cctccccgcg ttgcgtcgcg gtgcatggag 7140
 ccgggccacc tcgacctgaa tggaagccgg cggcacctcg ctaacggatt caccgttttt 7200
 atcaggctct gggaggcaga ataatgatc atatcgtcaa ttattacctc cacggggaga 7260

gcctgagcaa actggcctca ggcatttgag aagcacacgg tcacactgct tccggtagtc	7320
aataaaccgg taaaccagca atagacataa gcggctatatt aacgaccctg ccctgaaccg	7380
acgaccgggt cgaatttgct ttccaatttc tgccattcat ccgcttatta tacttattca	7440
ggcgtagcac caggcgttta agggcaccaa taactgcctt aaaaaaatta cgccccgccc	7500
tgccactcat cgcactcgtc aggtggcact ttccggggaa atgtgcgcgg aaccctatt	7560
tgtttatttt tctaaataca ttcaaatatg tatccgtca tgagacaata accctgataa	7620
atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgaagtttg gaaatatttg ttttcgtat	7680
caaccaccag gtgaaactca taagctaagt aatggatcgc tttgttcggc ttggtatcgc	7740
ctcagaagag tagggtttga tacatattgg acctagaac atcattttac agagtittgt	7800
cttacgggaa atttatttgt tgctgcggct aacctgttag gaagaactaa aacattaaat	7860
gttggcacta tgggggttgt tattccgaca gcacaccag ttcgacagtt agaagacgtt	7920
ttattattag atcaaatgtc gaaaggtcgt ttaattttg gaaccgttcg agggctatac	7980
cataaagatt ttcgagtatt tgggtttgat atggaagagt ctcgagcaat tactcaaat	8040
ttctaccaga tgataatgga aagcttacag acaggaacca ttagctctga tagtgattac	8100
attcaatttc ctaaggttga tgtatatccc aaagtgtact caaaaaatgt accaacctgt	8160
atgactgctg agtccgcaag tacgacagaa tggctagcaa tacaagggt accaatggtt	8220
cttagttgga ttatttggtac taatgaaaaa aaagcacaga tggaaactcta taatgaaatt	8280
gcgacagaat atggtcatga tatactaaa atagatcatt gtatgactta tttttgtct	8340
gttgatgatg atgcacaaaa ggcgcaagat gtttgtcggg agtttctgaa aaattggtat	8400
gactcatatg taaatgcgac caatatcttt aatgatagca atcaaactcg tggttatgat	8460
tatcataaag gtcaatggcg tgattttgtt ttacaaggac atacaacac caatcgacgt	8520
gttgattata gcaatggtat taacctgta ggcactcctg agcagtgtat tgaaatcatt	8580
caacgtgata ttgatgcaac gggatttaca aacattacat gcgatttga agctaattgga	8640
actgaagatg aaataattgc ttccatgcga cgctttatga cacaagtcgc tcctttctta	8700
aaagaacctt aataaattac ttatttgata ctagagataa taaggaacaa gttatgaaat	8760
ttggattatt ttttctaac ttccagaaag atggaataac atctgangaa acgttggata	8820
atatggtaaa gactgtcacg ttaattgatt caactaata tcattttaat actgcctttg	8880
ttaatgaaca tcacttttca aaaaatggta ttgttggagc acctattacc gcagctggtt	8940
ttttattagg gttaacaaat aaattacata ttggttcatt aaatcaagta attaccaccc	9000
atcacctgt acgtgtagca gaagaagcca gtttattaga tcaaatgtca gagggacgt	9060
tcattcttgg ttttagtgac tgcgaaagt atttcgaaat ggaatttttt agacgtcata	9120

tctcatcaag gcaacaacaa tttgaagcat gctatgaaat aattaatgac gcattaacta 9180
caggttattg tcatcccaaa aacgactttt atgattttcc aaaggtttca attaatccac 9240
actgttacag tgagaatgga cctaagcaat atgtatccgc tacatcaaaa gaagtcgtca 9300
tgtgggcagc gaaaaaggca ctgcctttta catttaagtg ggaggataat ttagaaacca 9360

aagaacgcta tgcaattcta tataataaaa cagcacaaca atatggtatt gatatttcgg 9420
atgttgatca tcaattaact gtaattgcga acttaaatgc tgatagaagt acggctcaag 9480
aagaagtgag agaatactta aaagactata tcaactgaaac ttaccctcaa atggacagag 9540
atgaaaaaat taactgcatt attgaagaga atgcagttgg gtctcatgat gactattatg 9600
aatcgacaaa attagcagtg gaaaaaacag ggctctaaaa tattttatta tcctttgaat 9660
caatgtccga tattaagat gtaaaagata ttattgatat gttgaaccaa aaaatcgaaa 9720
tgaatttacc ataaagtagt actgttgtaa ttcattaagc attctgccga catggaagcc 9780

atcacagacg gcatgatgaa cctgaatcgc cagcggcatc agcaccttgt cgccttgcgt 9840
ataatatttg cccatggtga aaacgggggc gaagaagttg tccatattgg ccacgtttaa 9900
atcaaaactg gtgaaactca cccagggatt ggctgagacg aaaaacatat tctcaataaa 9960
ccctttaggg aaataggcca ggttttcacc gtaacacgcc acatcttgcg aatatatgtg 10020
tagaaactgc cggaaatcgt cgtggtattc actccagagc gatgaaaacg tttcagtttg 10080
ctcatggaaa acggtgtaac aagggtgaac actatcccat atcaccagct caccgtcttt 10140
cattgccata cggaattccg gatgagcatt catcaggcgg gcaagaatgt gaataaagcc 10200

cggataaaac ttgtgcttat tttcttttac ggtcttttaa aaggccgtaa tatccagctg 10260
aacggctctg ttataggtac attgagcaac tgactgaaat gccitaaaat gttctttacg 10320
atgccattgg gatatatcaa cgggtgtata tccagtattt tttttctcca ttttagcttc 10380
cttagctcct gaaaatctcg ataactcaaa aaatacggcc ggtagtgatc ttatttcatt 10440
atggtgaaag ttggaacctc ttacgtgccg atcaacgtct cattttcgcc aaaagtggc 10500
ccagggtctc ccggtatcaa caggacaccc aggatttatt tattctgcga agtgatcttc 10560
cgtcacaggt atttattcga agacgaaagg gcctcgtgat acgcctattt ttataggtta 10620

atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt cagggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg 10680
cccgcttcc tgcctggcgt gggcctgttt ctggcgttgg acttcccgt gttccgtcag 10740
cagcttttcg cccacggcct tgatgatcgc ggcggccttg gccatcatat cccgattcaa 10800
cggccccagg gcgtccagaa cgggcttcag gcgtccccga aggt 10844

<210> 12

<211> 128

<212> DNA

<213> Staphylococcus aureus

<400> 12

gtctagttaa tggtaacgt aacattagct agattttttt attcaaaaaa atatttacia 60

atattaggaa attaagtggt aaaagagttg ataatgatt atattgggac tataatataa 120

ttaaggtc 128

<210> 13

<211> 2769

<212> DNA

<213> Staphylococcus phage 80alpha

<400> 13

attagacaac aaacaagtca ttgaaaattc cgacttatta ttcaaaaaaga aatttgatag 60

cgcagatata caagctaggt taaaagtagg cgataaggta gaagttaaaa caatcgggtta 120

tagaatacac tttttaaat tatatccggt ctatatacgaa gtaagaagg tagataaaca 180

atgattaaac aaatactaag actattattc ttactagcaa tgtatgagtt aggttaagtat 240

gtaactgagc aagtatafat tatgatgacg gctaagtatg atgtagaggt gccgagtgac 300

ttcgcaagt tgagcgatca gtcagatttg atgagggcgg aggtgacgga gtagatgatg 360

tggtagtca tagcaattat attactagtc atcttattgt ttggtgtgat gttgcaagct 420

gaacagttaa aaggcgatgt gaaagttaaa gagcgggaga tagagatatt aagaagtaga 480

ttgagacatt ttgaagatta aaaatatttg tatggagggt attcatgact aaaaagaaat 540

atggattaaa attatcaaca gttagaaagt tagaagatga gttgtgtgat taccctaatt 600

atcataagca actcgaagat ttaagaagtg aaataatgac accatggatt ccaacagata 660

caaatatagg cggggagttt gtaccgtcta atacatcgaa aacagaaatg gcagtaacta 720

attatctttg tagtatacga agaggtaaaa tccttgagtt taagagcgct attgaacgta 780

taatcaacac atcaagtagg aaagaacgag aattcattca agagtattat ttaataaaaa 840

aggaattagt gaaagtttgt gatgacatac acatttctga tagaactgct catagaatca 900

aaaggaaaat catatctaga ttggcggaag agttagggga agagtgaat tggcagtaaa 960

gtggcagttt ttgataccta aaatgagata ttatgatagt gtaggatatt gactatctta 1020

ctgcgtttcc cttatcgcaa ttaggaataa aggatctatg tgggttggt gattatagcc 1080

aatccttttt taatttttaa aagcgtatag cgcgagagtt ggttgtaaat gaaatgaacg 1140

aaaaacaaaa gagattcgca gatgaatata taatgaatgg atgtaatggt aaaaaagcag 1200

caatttcagc aggttatagt aagaaaacag cagagtcttt agcaagtcga ttgttaagaa 1260
 atgttaatatg ttcggaatat attaaagaac gattagaaca gatacaagaa gagcgittaa 1320
 tgagcattac agaagcttta gcgttatctg cttctattgc tagaggagaa cctcaagagg 1380
 cttacagtaa gaaatatgac catttaaacg atgaagtggg aaaagagggtt acttacacaa 1440
 tcacaccaac ttttgaagag cgtcagagat ctattgacca cactactaaa gtcatggtg 1500
 cgtatatcga caaaaaagaa attactcaga agaatatga gattaatat ggtgagtacg 1560

 atgacgaaag ttaaattaaa ctttaacaaa ccatctaag ttttcaacag aaacatatc 1620
 gaaatactaa ccaattacga taacttcact gaagtacatt acggtggagg ttcgagtgg 1680
 aagtctcacg gcgttataca aaaagttgta cttaaagcat tgcaagactg gaaatatcct 1740
 aggcgtatac tatggcttag aaaagtcaa tcaacaatta aagatagttt attcgaagat 1800
 gtcaaagatt gtttgataaa cttcgggtatt tgggacatgt gcctttggaa taagactgat 1860
 aacaaagttg aattgccaaa cggcgcagtt tttttgttta aaggattaga taaccagag 1920
 aaaataaagt cgataaaagg catatcagac atagtcatgg aagaagcgtc tgaattcaca 1980

 ctaaagtatt acacgcaatt aacgttgcgt ttgaggagc gtaaacacgt gaataagcaa 2040
 atatttttga tgtttaaccc agtatctaaa ctgaattggg tttataagta tttctttgaa 2100
 catggtgaac caatggaaaa tgtcatgatt agacaatcta gttatcgaga taataagttt 2160
 cttgatgaaa tgacacgaca aaacttagag ttgttagcaa atcgtaatcc agcatattac 2220
 aaaatttatg cgttaggtga attttctaca ctagacaaat tggttttccc taagtatgaa 2280
 aaacgtttaa taaataaaga tgagttaaga catttacctt cttattttgg attggacttt 2340
 ggctacgtta atgatcctag tgcttttata cattctaaaa tagatgtaaa gaaaaagaag 2400

 ttatacatca ttgaagagta tgtaaacaa ggtatgctga atgatgaaat agctaattgc 2460
 ataaagcaac ttggttatgc taaagaagaa attacgcag atagtgcaga acaaaaaagt 2520
 atagctgaat taaggaatct agggcttaaa aggattttac caaccaaaaa agggaagggc 2580
 tcggttgtac aagggttaca attcttaatg caatttgaaa tcattgttga tgaacgttgt 2640
 ttcaagacta ttgaagagtt tgacaactac acatggcaaa aggacaaaga tacaggtgaa 2700
 tataccaatg aaccagtaga tacatacaat cattgtatcg attcgttgcg ttattcagtg 2760
 gaacgattc 2769

<210> 14

<211> 10319

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 14

ggcgccatgg ttaagggccc ttgctgaaa gagttagtaa gttaacagaa gacgaaccaa	60
aactaatgg tttagcagga aacttagata aaaaaatgaa tccagaatta tattcagaac	120
aggaacagca acaagaacaa caaaagaatc aaaaacgaga tagaggtagt cacttataga	180
acatgcattt atgccgagaa aacttattgg ttggaatggg ctatgtgtta gctaacttgt	240
tagcgagttg gttggacttg aattgggatt aatccaaga aagtaccaac tcaacaacac	300
ataaagccct gtaggttccg accaataagg aaattggaat aaagcaataa aaggagtga	360
agaaatgaaa ttcagagaag cctttgagaa tttataaca agtaagtatg tacttggtgt	420
tttagtagtc ttaactgttt accagataat acaaatgctt aaataaaaaa agacttgatc	480
tgattagacc aaatcttttg atagtgttat attaataaca aaataaaaag gagtcgctca	540
cgcctacca aagtttgtag acgacatcat tcaaagaaaa aaacactgag ttgtttttat	600
aatcttgtag atttagatat taaacgatat ttaaatatac atcaagatat atatttgggt	660
gagcgattac ttaaacgaaa ttgagattaa ggagtcgatt ttttatgtat aaaaacaatc	720
atgcaaatca ttcaaatcat ttggaaaatc acgatttaga caatttttct aaaaccggct	780
actctaatag cgggttgtag gcacatactg tgtgcatatc tgatccaaaa ttaagttttg	840
atgcaatgac gatcgttgga aatctcaacc gagacaacgc tcaggccctt tctaaattta	900
tgagtgtaga gcccacaaata agactttggg atattcttca aacaaagttt aaagctaaag	960
cacttcaaga aaaagtttat attgaatatg acaaagtga agcagatagt tgggatagac	1020
glaatatgag tattgaattt aatccaaca aacttacag agatgaaatg atttggttaa	1080
aacaaaatat aataagctac atggaagatg acggttttac aagattagat ttagcctttg	1140
attttgaaga tgatttgagt gactactatg caatgtctga taaagcagtt aagaaaacta	1200
ttttttatgg tcgtaatggg aagccagaaa caaaatattt tggcgtgaga gatagtaata	1260
gatttattag aatttataat aaaaagcaag aacgtaaaga taatgcagat gctgaagtta	1320
tgtctgaaca tttatggcgt gtagaaatcg aacttaaaag agatatgggt gattactgga	1380
atgattgctt tagtgattta catatcttgc aaccagattg gaaaactatc caacgcactg	1440
cggatagagc aatagttttt atgttattga gtgatgaaga agaattggga aagcttcaca	1500
gaaattctag aacaaaatat aagaatttga taaaagaaat ttcgccagtc gatttaacgg	1560
acttaatgaa atcgacttta aaagcgaacg aaaaacaatt gcaaaaacaa atcgattttt	1620
ggcaacatga atttaattt ttggaatagt gtacatatta atattactga acaaaaatga	1680

tatatTTAAA ctattcTaat ttaggaggat tttttatga agtGtctatt taaaaattg	1740
gggaatttat atgaggTgaa agaataattt acccctataa actttagcca cctcaagtaa	1800
agaggtaaaa ttgtttagtt tatataaaaa atttaaaggt ttgttttata gcgttttatt	1860
ttggctttgt attctttcat tttttagtgt attaaatgaa atggttttaa atgtttcttt	1920
acctgatatt gcaaatcatt ttaatactac tcctggaatt acaaactggg taaacactgc	1980
atataTgtta actttttcga taggaacagc agtataTgga aaattatctg attatataaa	2040
tataaaaaa ttgttaatta ttggtattag tttagagctgt cttggttcat tgattgcttt	2100
tattgggccc acctaggcaa atatGctctt acgtGctatt atttaagtga ctatttAAAA	2160
ggagTtaata aaatgcggc aaggtattct taaataaact gtcaatttga tagcgggaac	2220
aaataattag atGtctttt ttaggagggc ttagttttt gtaccagtt taagaatacc	2280
tttatcatgt gattctaaag tatccagaga atatctgtat gctttgtata cctatggtta	2340
Tgcataaaaa tccagtgat aaaagtattt atcactggga tttttatgcc cttttgggtt	2400
tttgaatgga ggaaaatcac atgaaaatta ttaatatTgg agttttagct catgttgatg	2460
caggaaaaac taccttaaca gaaagcttat tatataacag tggagcgatt acagaattag	2520
gaagcgtTga caaaggtaca acgaggacgg ataatacgt tttagaacgt cagagaggaa	2580
ttacaattca gacaggaata acctctttc agtgggaaaa tacgaaggTg aacatcatag	2640
acacgccagg acatatggat ttcttagcag aagtatatcg ttcatatca gttttagatg	2700
gggcaattct actgatttct gcaaaagatg gcgtacaagc acaaactcgt atattatttc	2760
atgcacttag gaaaatgggg attcccacaa tcttttttat caataagatt gacccaaatg	2820
gaattgattt atcaacggtt tatcaggata ttaaagagaa actttctgcc gaaattgtaa	2880
tcaaacagaa ggtagaactg tatcctaata tgtgtgtgac gaactttacc gaatctgaac	2940
aatgggatac ggtaatagag ggaaacgata accttttaga gaaatatatg tccggtaaat	3000
cattagaagc attggaactc gaacaagagg aaagcataag atttcagaat tgttctctgt	3060
tcctcttta tcatggaagt gcaaaaagta atatagggat tgataacctt atagaagtta	3120
ttactaataa attttattca tcaacacatc gaggtccgtc tgaactttgc ggaaatgttt	3180
tcaaaatTga atatacaaaa aaaagacaac gtcttgcata tatacgcctt tatagtggag	3240
tactacattt acgagattcg gttagagtat cagaaaaaga aaaaataaaa gttacagaaa	3300
tgtatacttc aaTaaatggt gaattatgia agattgatag agcttattct ggagaaattg	3360
ttattttgca aaatgagttt ttgaagttaa atagtgttct tggagataca aaactattgc	3420
cacagagaaa aaagattgaa aatccgcacc ctctactaca aacaactgtt gaaccgagta	3480
aacctgaaca gagagaaatg ttgcttgatg cccttttTga aatctcagat agtgatccgc	3540

ttctacgata ttacgtggat tctacgacac atgaaattat actttctttc ttagggaaag	3600
tacaaatgga agtgattagt gcactgttgc aagaaaagta tcatgtggag atagaactaa	3660
aagagcctac agtcatttat atggagagac cgttaaaaaa tgcagaatat accattcaca	3720
tcgaagtgcc gccaaatcct ttctgggcct ccattgggtt atctgtatcg ccgcttcctt	3780
tgggaagtgg aatgcagtat gagagctcgg tttctcttgg atacttaaat caatcatttc	3840
aaaatgcagt tatggaaggg gtacgctatg gttgcgaaca aggattatat ggttggaatg	3900
tgacggattg taaaatctgt ttttaagtac gtttatacta tagccctgtt agtactccag	3960
cagattttcg gatgcttact cctattgtac tggagcaagc ctttagaaaa gctggaacag	4020
aattgttaga gccatatctt agttttaaag tttatgcacc acaggaatat ctttcacggg	4080
catataacga tgctcccaaa tattgtgcaa atatcgtaaa tactcaactg aaaaataatg	4140
aggtcattat tattggagaa attcctgctc gatgtattca agattatcgc aatgatttaa	4200
ctttttttac aaatgggcct agtgtttgtt tagcagagct aaaaggatat caggttacca	4260
ctggcgaacc tgtttgccag acccgctcgc taaatagtcg gatagataaa gtaagatata	4320
tgttcaataa aataacttag tgcgttttat gttgtttatat aaatatggtt tcttattaaa	4380
taagatgaaa tattctttta tatagatttg aattaaagtg gaaaggagga gattgttatt	4440
ataaactaca agtggatatt gtgtcctagt tgtggaataa aaacaagact acgaatacga	4500
gtggatacta tacttaaaaa ttccctttta tacagcccca aatgtaagaa cgaaacttta	4560
attaatgttc aaaaaatgaa tataataaca atcaaagagc cagacgcaa gacgcagagc	4620
cgataatttg agaaatgaaa ctctcatctt atcggtcttt tttgtttatc tgaattttac	4680
tgactagcct tcaatatttc cgcggccagc ttactatgcc attattaagc ttgtaatatc	4740
ggagggttta ttaattggca gtaaagtggc agtttttgat accttaaatg agatattatg	4800
atagttagg atattgacta tcgtactgcg ttccctacc gcaaattagg aataaaggat	4860
ctatgtgggt tggctgatta tagccaatcc ttttttaatt ttaaaaagcg tatagcgca	4920
gagttggtgg taaatgaaat gaacgaaaaa caaaagagat tcgcagatga atatataatg	4980
aatggatgta atggtaaaaa agcagcaatt acagtaggtt atagtaagaa aacagcagag	5040
tctttagcaa gtcgattgtt aagaaatgtt aatgtttcgg aatatattaa agaacgatta	5100
gaacaggtag aagaagagcg tttaatgagt attacagaag ctttagcgtt atctgcttct	5160
attgctagag gagaacctca agaggcttac agtaagaaat atgaccattt aaacgatgaa	5220
gtggaaaaag aggttactta cacaatcaca ccaacttttg aagagcgtca gagatctatt	5280

gaccacatac taaaagtaca tgggtgcgtat atcgataaaa aagaaattac tcagaagaat 5340

attgagatta atattgggtga gtacgatgac gaaagttaaa ttgaacttta acaaaccgtc 5400

taatgttttc aatagccgcg ggggcccaac acaccaactt ttgaagagcg tcagagatct 5460

attgaccaca tactaaaagt acatgggtgcg tatatcgata aaaaagaaat tactcagaag 5520

aatattgaga ttaatatggg tgagtacgat gacgaaagtt aaattaaact ttaacaaacc 5580

gtctaagtgt ttcaatagcc gcggggggccc aacgagcggc cgcatagtta agccagcccc 5640

gacaccggcc aacaccggct gacgcgcctt gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt 5700

acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac 5760

cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttatagggt aatgtcatga 5820

taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccta 5880

tttgtttatt ttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taacctgat 5940

aatgtcttca ataatatga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc 6000

ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcaccagaa acgctgggtga 6060

aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cagcagtggtg ttacatcgaa ctggatctca 6120

acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg tttccaatg atgagcactt 6180

ttaaagtctt gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg 6240

gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctaccgggtc acagaaaagc 6300

atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtata 6360

acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt 6420

tgcaacaat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag 6480

ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca 6540

aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccgga acaattaata gactggatgg 6600

aggcgataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg 6660

ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat cattgcagca ctggggccag 6720

atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtgcagca actatggatg 6780

aacgaaatag acagatcgct gagatagggt cctcactgat taagcattgg taactgtcag 6840

accaagttaa ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga 6900

tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaaat cccttaacgt gagttttcgt 6960

tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc 7020

tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaacaaa aaccaccgct accagcgggtg gtttttttgc	7080
cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac	7140
caaatactgt tcttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac	7200
cgcttacata cctcgtctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt	7260
cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgag cggtcgggct	7320
gaacgggggg ttctgacaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaacctgaga	7380
tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagagaaa ggccggacagg	7440
tatccggtaa ggggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac	7500
gcctggtatc tttatagtc tgctgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg	7560
tgatgctcgt caggggggag gagcctatgg aaaaaccca gcaacgcggc ctttttacgg	7620
ttcctggcct tttgctggcc ttttctcac atgttcttcc ctgcgttacc cctgattct	7680
gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctggcgggt ctagttaatg tgtaacgtaa	7740
cattagctag atttttttat tcaaaaaaat atttacaat attaggaaat ttaagttaa	7800
aagagtgtat aaatgattat attgggacta taatataatt aaggtcgatt gaattcgta	7860
actaattaat caccaaaaag gaatagagta tgaagtttgg aaatatttgt ttttcgtatc	7920
aaccaccagg tgaactcat aagcaagtaa tggatcgctt tgttcggctt ggtatcgct	7980
cagaagaggt agggtttgat acatatggga ccttagaaca tcattttaca gagtttggtc	8040
ttacgggaaa tttatttgtt gctgcggcta acctgttagg aagaactaaa acattaatg	8100
ttggcactat gggggttgtt attccgacag cacaccagc tcgacagtta gaagacgttt	8160
tattattaga tcaaatgtcg aaaggtcgtt ttaattttgg aaccgttcga gggtataacc	8220
ataaagattt tcgagtattt ggtgttgata tggaagagtc tcgagcaatt actcaaaatt	8280
tctaccagat gataatggaa agcttacaga caggaacat tagctctgat agtgattaca	8340
ttcaatttcc taaggttgat gtatatccca aagtgtactc aaaaaatgta ccaacctgta	8400
tgactgctga gtccgcaagt acgacagaat ggctagcaat acaagggcta ccaatggttc	8460
ttagtggat tattggtact aatgaaaaaa aagcacagat ggaactctat aatgaaattg	8520
cgacagaata tggatcatgat atatctaaaa tagatcattg tatgacttat atttgttctg	8580
ttgatgatga tgcacaaaag gcgcaagatg tttgtcggga gtttctgaaa aattggtatg	8640
actcatatgt aaatgcgacc aatatcttta atgatagcaa tcaaaactcg ggttatgatt	8700
atcataaagg tcaatggcgt gatattgttt tacaaggaca tacaacacc aatcgacgtg	8760
ttgattatag caatggtatt aaccccgtag gcactcctga gcagtgtatt gaaatcattc	8820
aacgtgatat tgatgcaacg ggtattacaa acattacatg cggatttgaa gctaattggaa	8880

ctgaagatga aataattgct tccatgcgac gctttatgac acaagtcgct cctttcttaa 8940
aagaacctaa ataaattact tatttgatac tagagataat aaggaacaag ttatgaaatt 9000
tggattatth tttctaaact ttcagaaaga tggataaaca tctgaagaaa cgttgataa 9060
tatggtaaag acgtcacgt taattgattc aactaaatat cttttaata ctgccttgt 9120

taatgaacat cacttttcaa aaaatggtat tgttgagca cctattaccg cagctggttt 9180
tttattaggg ttaacaaata aattacatat tggttcatta aatcaagtaa ttaccacca 9240
tcacctgta cgtgtagcag aagaagccag tttattagat caaatgtcag aggagcgtt 9300
cattcttggg tttagtact gcgaaagtga tttcgaaatg gaattttta gacgtcatat 9360
ctcatcaagg caacaacaat ttgaagcatg ctatgaaata attaatacag cattaactac 9420
aggttatgac catcccaaaa acgactttta tgattttcca aaggtttcaa ttaatccaca 9480
ctgttacagt gagaatggac ctaagcaata tgtatccgct acatcaaaag aagtcgtcat 9540

gtgggcagcg aaaaaggcac tgcctttaac gtttaagtgg gaggataatt tagaaaccaa 9600
agaacgctat gcaattctat ataataaac agcacaacaa tatggtattg atatttcgga 9660
tgttgatcat caattaactg taattgcgaa cttaaagtct gatagaagta cggctcaaga 9720
agaagtgaga gaatacttaa aagactatat cactgaaact tacctcaaa tggacagaga 9780
tgaaaaaatt aactgcatta ttgaagagaa tgcagttggg tctcatgatg actattatga 9840
atcgacaaaa ttagcagttg aaaaaacagg gtctaaaaat attttattat cctttgaatc 9900
aatgtccgat attaaagatg taaaagatat tattgatatg ttgaacaaa aaatcgaaat 9960

gaatttacca taataaaatt aaaggcaatt tctatattag attgcctttt tggcgcgcct 10020
attctaagc ataataaata ctgataacat cttatattht gtattatatt ttgtattatc 10080
gttgacatgt ataattttga tatcaaaaac tgattttccc tctattatth tcgagattta 10140
ttttcttaat tctctttaac aaactagaaa tattgtatat acaaaaaatt ataaataata 10200
gatgaatagt ttaattatag gtgttcacat atcgaaaaag caacgtatct tttttaagt 10260
gcgttgctth tttctcatth ataaggthaa ataattctca tatatcaagc aaagtgaca 10319

<210> 15
<211> 2088
<212> DNA
<213> Staphylococcus aureus

<400> 15
tatactacaa atgtagtctt atataaggag gatattgatg aaaaagataa aaattgttcc 60
acttatthta atagttgtag ttgtcgggtt tggatatat ttttatgctt caaaagataa 120

agaaattaat aatactattg atgcaattga agataaaaat ttcaaacaag ttataaaga 180
 tagcagttat atttctaaaa gcgataatgg tgaagtagaa atgactgaac gtccgataaa 240
 aatatataat agtttaggcg ttaaagatat aaacattcag gatcgtaaaa taaaaaaagt 300
 atctaaaaat aaaaaacgag tagatgctca atataaaatt aaaacaaact acggtaacat 360
 tgatcgcaac gttcaattta attttgtaa agaagatggg atgtggaagt tagattggga 420

 tcatagcgtc attattccag gaatgcagaa agaccaaagc atacatattg aaaatttaaa 480
 atcagaacgt ggtaaaattt tagaccgaaa caatgtggaa ttggccaata caggacacgc 540
 atatgagata ggcatcgttc caaagaatgt atctaaaaaa gattataaag caatcgctaa 600
 agaactaagt atttctgaag actatatcaa acaacaaatg gatcaaaatt gggtaacaaga 660
 tgataccttc gtccactta aaaccgttaa aaaaatggat gaatatttaa gtgatttcgc 720
 aaaaaaattt catcttaca ctaatgaaac agaaagtcgt aactatcctc tagaaaaagc 780
 gacttcacat ctattaggtt atgttggtcc cattaactct gaagaattaa aacaaaaaga 840

 atataaaggc tataaagatg atgcagttat tggtaaaaag ggactcgaaa aactttacga 900
 taaaaagctc caacatgaag atggctatcg tgcacaatc gttgacgata atagcaatac 960
 aatcgcatat acattaatag agaaaaagaa aaaagatggc aaagatattc aactaactat 1020
 tgatgctaaa gttcaaaaga gtatttataa caacatgaaa aatgattatg gtcaggtac 1080
 tgctatccac cctcaaacag gtgaattatt agcacttgta agcacacctt catatgacgt 1140
 ctatccattt atgtatggca tgagtaacga agaataaat aaattaaccg aagataaaaa 1200
 agaacctctg ctcaacaagt tccagattac aacttcacca ggttcaactc aaaaaatatt 1260

 aacagcaatg atigggttaa ataacaaaac attagacgat aaaacaagtt ataaatcga 1320
 tggtaaaagt tggcaaaaag ataaatcttg ggggtggttac aacgttaca gatatgaagt 1380
 ggtaaatggt aatatcgact taaaacaagc aatagaatca tcagataaca ttttctttgc 1440
 tagagtagca ctgaattag gcagtaagaa atttgaaaaa ggcatgaaaa aactaggtgt 1500
 tgggtgaagat ataccaagtg attatccatt ttataatgct caaatttcaa acaaaaattt 1560
 agataatgaa atattattag ctgattcagg ttacggacaa ggtgaaatac tgattaaccc 1620
 agtacagatc ctttcaatct atagcgcat agaaaataat ggcaatatta acgcacctca 1680

 ctatttaaaa gacacgaaaa acaaagtttg gaagaaaaat attatttcca aagaaaatat 1740
 caatctatta acigatggta tgcaacaagt cgtaataaaa acacataaag aagatattta 1800
 tagatcttat gcaaaactta ttggcaaact cggtactgca gaactcaaaa tgaaacaagg 1860
 agaaactggc agacaaattg ggtggtttat atcatatgat aaagataatc caaacatgat 1920
 gatggctatt aatgttaaag atgtacaaga taaaggaatg gctagctaca atgccaaaat 1980

ctcaggtaaa gtgtatgatg agctatatga gaacggtaat aaaaaatacg atatagatga 2040
ataacaaaac agtgaagcaa tccgtaacga tggttgcttc actgtttt 2088

<210> 16
<211> 2075
<212> RNA
<213> Staphylococcus aureus
<400> 16

uagucuuaua uaaggaggau auugaugaaa aagauaaaaa uuguuccacu uauuuuaaua 60
guuguaguug ucggguuugg uauauuuuuu uaugcuuca aagauaaaga aauuaauaua 120
acuaauaug caauugaaga uaaaauuuc aaacaaguuu auaaagauag caguuaauuu 180
ucuaaaagcg auaaugguga aguagaaaug acugaacguc cgauaaaaau auuaauuagu 240
uuaggcguua aagauauaaa cauucaggau cguaaaaaaa aaaaagauuc uaaaauuaa 300
aaacgaguag augcucaua uaaaauuuaa acaaacuacg guaacauuga ucgcaacguu 360

caauuuauuu uuguuaaaga agaugguaug uggaaguuaug auugggauca uagcgucuuu 420
auuccaggaa ugcagaaaga ccaaagcaua cauauugaaa auuuuuuauc agaacguggu 480
aaaauuuuag accgaaacaa uguggaauug gccaaucag gaacagcaua ugagauaggc 540
aucguuccaa agaauuguac uaaaaaagau uauaaagcaa ugcuaaaga acuaaguuuu 600
ucugaagacu auaucaaca acaaauggau caaaauuggg uacaagauga uaccuucguu 660
ccacuuuaaa ccguuaaaaa aauggaugaa uauuuuagug auuucgcaa aaaaauucau 720
cuuacaacua augaaacaga aagucguaac uaaccucuag aaaaagcgac uucacauca 780

uuagguuuug uugguccau uaacucugaa gaauuuuuac aaaaagaaua uaaaggcuau 840
aaagaugaug caguuaugg uaaaaaggga cucgaaaaac uuuacgauaa aaagcuccaa 900
caugaaug gcuauugugu cacaauuguu gacgauaaua gcaauacaau cgcacauaca 960
uuauuagaga aaaagaaaaa agauggcaaa gauauucaac uaacuauuga ugcuaaaguu 1020
caaaagagua uuuaaaca caugaaaaau gauuauuggc cagguacugc uauccacccu 1080
caaacaggug aauuuuagc acuuguaagc acaccuucua augacgucua uccauuuuag 1140
uauggcauga guaacgaaga auauauuaa uuaaccgaag auaaaaaaga accucugcuc 1200

aacaaguucc agauuacaac uuccaccaggu ucaacucaaa aaauuuuac agcaaugauu 1260
ggguuuaua acaaaacauu agacgauaaa acaaguuaa aaauucgaug uaaagguugg 1320
caaaaagaua aaucuuuggg ugguuacaac guuacaagau augaaguggu aaauugguau 1380
aucgacuuua aacaagcau agaaucau gauaacuuu ucuuugcuag aguagcacuc 1440

gaauuaggca gaaagaaauu ugaaaaaggc augaaaaaac uagguguugg ugaagauaua 1500

ccaagugauu auccauuuua uaaugcucaa auuuccaaca aaaauuuaga uaaugaaaua 1560

uuauuagcug auucagguua cggacaaggu gaaauacuga uuaacccagu acagaucuu 1620

ucaaucuaua gcgcauuaga aaauaauggc aaauuaacg caccucacuu auuaaaagac 1680

acgaaaaaca aaguuuaggaa gaaaaauuu auuuccaaag aaaauaucaa ucuaauuacu 1740

gaugguauagc aacaagucgu aaauaaaaca cauaaagaag auauuuauag aucuuauagca 1800

aacuuauuug gcaauccgg uacugcagaa cucaaaauga aacaaggaga aacuggcaga 1860

caauuugggu gguuuauauc auaugauaaa gaaauuccaa acaugaugau ggcuaauuau 1920

guuaaagauu uacaagauaa aggaauugcu agcuacaug ccaaaucuc agguaaagug 1980

uauaugagc uauaugagaa cgguaauaaa aaauacgaa uagaugaaua acaaacagu 2040

gaagcaaucc gaaacgaugg 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 caaaaagga atagagtatg aagtttgaa atattgttt 60

ttcgtatcaa ccaccaggtg aaactcataa gctaagtaat ggatcgcttt gttcggttg 120

gtatcgctc agaagagtag ggtttgatac atattggacc ttagaacatc attttacaga 180

gtttgtctt acgggaaatt tatttgttgc tgcggctaac ctgttaggaa gaactaaaac 240

attaatggtt ggcactatgg gggttgttat tccgacagca caccagtgc gacagttaga 300

agacgtttta ttattagatc aaatgtcgaa aggtcgcttt aattttggaa ccgttcgagg 360

gctataccat aaagatttc gagtatttgg tgttgatatg 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

tgaaattgcg acagaatatg gtcagatat atctaaaata gatcattgta tgacttatat 720

ttgttctgtt gatgatgatg cacaaaaggc gcaagatgtt tgtcgggagt ttctgaaaaa	780
ttggtatgac tcatatgtaa atgcgaccaa tatctttaat gatagcaatc aaactcgtgg	840
ttatgattat cataaaggtc aatggcgtga ttttgtttta caaggacata caaacaccaa	900
tcgacgtgtt gattatagca atggatattaa cctgttaggc actcctgagc agtgtattga	960
aatcattcaa cgtgatattg atgcaacggg tattacaaac attacatgcg gatttgaagc	1020
taatggaact gaagatgaaa taattgcttc catgcgacgc tttatgacac aagtcgctcc	1080
tttcttaaaa gaacctaaat aaattactta ttgatacta gagataataa ggaacaagtt	1140
atgaaatttg gattattttt tctaaacttt cagaaagatg gaataacatc tgangaaacg	1200
ttggataata tggtaaagac tgtcacgtta attgattcaa ctaaatatca ttttaatact	1260
gcctttgtta atgaacatca cttttcaaaa aatggatttg ttggagcacc tattaccgca	1320
gctggttttt tattagggtt aacaaaataa ttacatattg gttcattaaa tcaagtaatt	1380
accacccatc accctgtacg tgtagcagaa gaagccagtt tattagatca aatgtcagag	1440
ggacgcttca ttcttggttt tagtgactgc gaaagtgatt tcgaaatgga attttttaga	1500
cgtcatatct catcaaggca acaacaattt gaagcatgct atgaaataat taatgacgca	1560
ttaactacag gttattgtca tccccaaaac gacttttatg attttccaaa ggtttcaatt	1620
aatccacact gttacagtga gaatggacct aagcaatatg tatccgtac atcaaaagaa	1680
gtcgtcatgt gggcagcgaa aaaggcactg cttttaacat ttaagtggga ggataattta	1740
gaaaccaaag aacgctatgc aattctatat aataaaacag cacaacaata tggatttgat	1800
atttcggatg ttgatcatca attaaactgta attgcgaact taaatgctga tagaagtacg	1860
gctcaagaag aagtgagaga atacttaaaa gactatatca ctgaaactta ccctcaaattg	1920
gacagagatg aaaaaattaa ctgcattatt gaagagaatg cagttgggtc tcatgatgac	1980
tattatgaat cgacaaaatt agcagtggaa aaaacagggt ctaaaaatat tttattatec	2040
tttgaatcaa tgtccgatat taaagatgta aaagatatta ttgatatgtt gaaccaaaaa	2100
atcgaaatga atttaccata ataaaaattaa aggcaatttc tatattagat tgccttttta	2160
aatttc	2166
<210> 18	
<211> 2143	
<212> RNA	
<213> <i>Vibrio fischeri</i>	
<400> 18	
aaucacaaaa aaggaauga guaugaaguu uggaaauuu uguuuuucgu aucaaccacc	60

aggugaaacu cauaagcuua gaaauggauc gcuuuguucg gcuugguauc gccucagaag	120
aguaggguuu gauacauauu ggaccuuaga acaucauuuu acagaguuuug gucuuacggg	180
aaaauuuuuu guugcugcgg cuaaccuguu aggaagaacu aaaacauuaa auguuggcac	240
uauggggguu guuauuccga cagcacaccc aguucgacag uuagaagacg uuuuuuuuu	300
agaucaaaug ucgaaagguc guuuuuuuuu uggaaccguu cgagggcuaa accauaaaga	360
uuuucgagua uuugguguug auauggaaga gucucgagca auuacucaaa auuucuaacca	420
gaugauaaug gaaagcuuac agacaggaac cauuaagcucu gauagugauu acauucaauu	480
uccuaagguu gauguauauc ccaaagugua cucaaaaaau guaccaaccu guaугacugc	540
ugaguccgca aguacgacag aauggcuagc aauacaaggg cuaccaaugg uucuuaguug	600
gauuauuggu acuaaugaaa aaaaagcaca gauggaacuc uauaaugaaa uugcgacaga	660
auauggucau gauuauucua aaauagauc uuguuagacu uauuuuuuuu cuguugauga	720
ugaugcaciaa aaggcgcaag auguuugucg ggaguuuucug aaaaauuggu augacucaua	780
uguaaaugcg accaauaucu uuaaugauag caaucaaacu cgugguuuug auuaucauaa	840
aggucaaugg cgugauuuug uuuuacaagg acauacaaac accaaucgac guguugaaua	900
uagcaauggu auuaaccugc uaggcacucc ugagcagugu auugaaauc uucaacguga	960
uauugaugca acggguauua caaacauuac augcggauuu gaagcuauug gaacugaaga	1020
ugaaaauuuu gcuuccaugc gacgcuuuuau gacacaaguc gcuccuuuuu uaaaagaacc	1080
uaaaauuuuu acuuuuuuga uacuagagau auaaaggaac aaguuuugaa auuuggauua	1140
uuuuuuucaa acuuucagaa agauggaaua acaucugaag aaacguugga uauuauugga	1200
aagacuguca cguaauuuga uucaacuaaa uaucauuuuu auacugccuu uguuaaugaa	1260
caucacuuuu caaaaaaugg uauuguugga gcaccuauua ccgcagcugg uuuuuuuua	1320
ggguuaacaa auaauuuaca uauugguuca uuaauucaag uauuuaccac ccaucacccu	1380
guacguguag cagaagaagc caguuuuuu gaucaaaugu cagagggcag cuucauucuu	1440
gguuuuuagug acugcgaaag ugauuucgaa auggaauuuu uuagacguca uaucucauca	1500
aggcaacaac auuuugaagc augcuuugaa auuuuuuauug acgcauuuac uacagguuau	1560
ugucaucucc aaaacgacuu uuaugauuuu ccaaagguuu cauuuuaucc acacuguuac	1620
agugagaauug gaccuaagca auauuguaucc gcuacaucaa aagaagucgu caugugggca	1680
gcgaaaaagg cacugccuuu aacauuuuag ugggaggaua auuuagaaac caaagaacgc	1740
uaucaauuuc uauuuuuuuu aacagcacia caauuuggua uugauuuuuc ggauguugau	1800
caucauuuaa cuguuuuugc gaacuuuuuu gcuuauagaa guacggcuca agaagaagug	1860
agagaauacu uaaaagacua uaucacugaa acuuaccuc aaauggacag agaugaaaa	1920

auuaacugca uuauugaaga gaaugcaguu gggucucaug augacuauua ugaaucgaca 1980
 aauuuagcag uggaaaaaac agggucuaaa aaauuuuuau uaucuuuga aucaaugucc 2040
 gauuuuaag auguaaaaga uauuauugau auguugaacc aaaaaaucga aaugaauua 2100
 ccauaaaaa auuaaaggca auuucuaauu 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 aaugaguau 60
 gaaguugga aaauugguu guucguauca accaccaggu gaaacucaua agcuaaaggc 120
 augaaaaac uaggugaucu ucaccaacac cuaguuuuuu caaggaauug aguaugaagu 180
 uuggaaaauu uuguuuuucg uaucaaccac caggugaaac ucauaagcua aguaauggau 240
 cgcuuuguuc ggcuuuguau cgccucagaa gaguaggguu ugauacauau uggaccuag 300

aacaucauuu uacagaguuu ggucuuacgg gaaaauuuuu uguugcugcg gcuaaccugu 360
 uaggaagaac uaaaacauua aauguuggca cuauugggggu uguuuuuccg acagcacacc 420
 caguucgaca guuagaagac guuuuuuuu uagaucaauu gucgaaaggu cguuuuuuuu 480
 uuggaacgcu ucgaggggcu uaccuuaaag auuuucgagu auuugguguu gauauggaag 540
 agucucgagc aaauacuca aaauucucc agaugauau ggaaagcuua cagacaggaa 600
 ccuuuagcuc ugauagugau uacauucaau uuccuaaggu ugauguauu cccaaagugu 660
 acuaaaaaa uguaccaacc uguaugacug cugaguccgc aaguacgaca gaauggcuaug 720

caauacaagg gcuaaccaug guucuuaguu ggauuuuugg uacuaaugaa aaaaaagcac 780
 agauggaacu cuuaaauugaa auugcgacag aaauugguca ugauauaucu aaaaauagau 840
 auuguauagc uuauuuuugu ucuguugaug augaugcaca aaaggcgcaa gauguuuguc 900
 gggaguuuu gaaaaauugg uaugacucau auguaaauug gaccaauauc uuuuauugau 960
 gcaaucaaac ucgugguuau gauuaucaua aaggucuaug gcgugauuuu guuuuacaag 1020
 gacauacaaa caccaaucga cguguugauu auagcaaugg uauuaaccu guaggcacuc 1080
 cugagcagug uauugaaauc auucaacgug auauugaugc aacggguauu acaaacauua 1140

caugcggaau ugaagcuauu ggaacugaag augaaauau ugcuccaug cgacgcuua 1200

ugacacaagu cguccuuuc uaaaaagaac cuaaaaaaau uacuuuuug auacuagaga 1260
 uaauaaggaa caaguuuga aauuuggauu auuuuuucua aacuuucaga aagauggaa 1320
 aacaucugaa gaaacguugg auauauuggu aaagacuguc acguuuauug auucaacuaa 1380
 auaucauuuu aaucugccu uuguuauga acaucacuuu ucaaaaaaug guauuguugg 1440
 agcaccuauu accgcagcug guuuuuuuuu aggguaaaca aaaaaauuac auauugguuc 1500
 auuuaucaaa guauuuacca cccaucaccc uguacgugua gcagaagaag ccaguuuuuu 1560

agaucaaaug ucagagggac gcuucauuc ugguuuuagu gacugcgaaa gugauuucga 1620
 aauggaauuu uuugagcug auaucucauc aaggcaacaa cauuuugaag caugcuuga 1680
 aaauuuuuu gacgcauuu cuacagguu uugucauccc caaacgacu uuuaugauuu 1740
 uccaaggguu ucauuuauuc cacacuguu cagugagaau ggaccuaagc aaauuguauc 1800
 cgcuacauc aaagaaguc ucaugugggc agcgaaaaag gcacugccuu uaacuuuuu 1860
 gugggaggau auuuuagaaa ccaaagaacg cuaugcauu cuauuuuuu aaacagcaca 1920
 acaauauggu auugauuuu cggauguuga ucaucauuu acuguaauug cgaacuuuu 1980

ugcugauaga aguacggcuc aagaagaagu gagagaauac uaaaaagacu auaucacuga 2040
 aacuuacccu caauggaca gagaugaaaa auuuuacugc auuuuugaag agaauugcagu 2100
 ugggucucu gaugacuauu augaauugc aaaaauugca guggaaaaa caggguuua 2160
 aaauuuuuu uuauccuuug auucaaugc cgauuuuuu gauguaaaag auuuuuuuga 2220
 uauguugaac caaaaaucg aaugaauuu accauuuuu auuuuaggc auuuucuaa 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

nnwawgnnnu 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

nagnnnnncwu wnn

13

<210> 22

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<400> 22

cagauaacau uuu

13