(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0059172
(43) 공개일자 2022년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/689 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2018.05)
C12Q 2561/113 (2019.08)
(21) 출원번호 10-2020-0144449
(22) 출원일자 2020년11월02일
심사청구일자 2020년11월02일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김해영
경기도 용인시 수지구 동천로135번길 21, 1307동 901호(동천동, 한빛마을 래미안 이스트팰리스 3단지)
김이슬
경기도 용인시 기흥구 서그내로 31, 104동 1302호(서천동, 용인서천 효성해링턴플레이스)
(74) 대리인
특허법인 하나

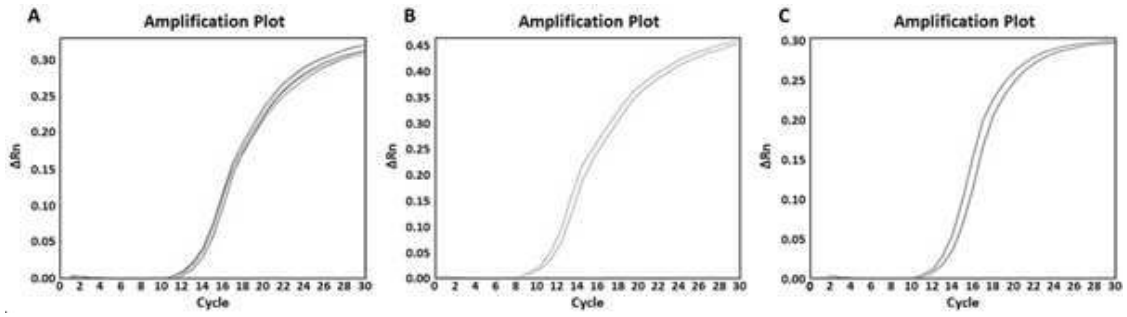
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **락토바실러스 델브루엑키 그룹 특이 프라이머 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 락토바실러스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii*) 그룹에 속하는 균종을 구별할 수 있는 검출용 조성물, 키트, 이를 이용한 검출방법 및 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4



명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 제 1 프라이머 쌍; 서열번호 3의 염기서열 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 제 2 프라이머 쌍; 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 제 3 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 프라이머 쌍으로 구성되는 프라이머 세트;를 포함하는, 락토바실러스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii*) 그룹에 속하는 균종의 구별 검출용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 락토바실러스 델브루엑키 그룹에 속하는 균종은 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*) 및 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)로 구성된 군에서 하나 이상 선택된 것인, 검출용 조성물.

청구항 3

제1항의 조성물을 포함하는, 락토바실러스 델브루엑키 그룹에 속하는 균종의 구별 검출용 키트.

청구항 4

제1항의 조성물을 포함하는, 락토바실러스 델브루엑키 그룹에 속하는 균종의 구별 검출용 바이오 칩(chip).

청구항 5

대상 시료에 제1항의 조성물을 처리하는 단계;를 포함하는 락토바실러스 델브루엑키 그룹에 속하는 균종의 구별 검출 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

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

락토바실러스 델브루엑키 그룹에 속하는 균종의 구별 검출 방법.

청구항 7

a) 대상 시료에 제1항의 조성물을 처리하는 단계; 및

b) 상기 시료 내에 락토바실러스 델브루엑키 그룹에 속하는 균종은 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*) 및 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 포함 여부를 확인하는 단계를 포함하는,

락토바실러스 델브루엑키 그룹 포함 시료의 스크리닝 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

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

락토바실러스 델브루엑키 그룹 포함 시료의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 락토바실러스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii*) 그룹에 속하는 균종을 구별할 수 있는 검출용 조성물, 키트, 이를 이용한 검출방법 및 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 락토바실러스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii*) 그룹은 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*L. delbrueckii* subsp. *lactis*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 인디쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *indicus*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 야콥세니(*L. delbrueckii* subsp. *jakobsenii*) 및 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 순키(*L. delbrueckii* subsp. *sunkii*)를 포함하는 6개의 아종으로 구성된다.

[0003] 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스 및 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스는 일반적으로 치즈 및 요구르트와 같은 유제품 제조에 활용되며, 이 둘은 광범위한 탄수화물 대사능력을 기반으로 구별될 수 있다. 또한, 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 인디쿠스, 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 야콥세니 및 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 순키는 각각 인도 유제품, 발효 알코올 음료 및 전통 일본 음식으로 무염 피클 등으로부터 분리될 수 있는 비교적 작은 아종이다.

[0004] 식품에서 락토바실러스 델브루엑키의 아종을 정확하게 구별하는 것은 프로바이오틱 특성을 확인하고, 제품의 품질 평가를 수행하는데 중요한 문제이다. 상업적인 프로바이오틱 및 유제품에 일반적으로 사용되는 젖산 박테리아의 효율적인 식별 및 검출을 위하여 종래 유전자 마커 및 분자 기반 방법이 사용되었다. 예컨대 증폭된 단편 길이 다형성(amplified fragment length polymorphism, AFLP), DNA-DNA 혼성화(DNA- DNA hybridization, DDH), 다중-위치 서열 분석(multi-locus sequence analysis, MLST) 및 제한 단편 길이 다형성(restriction fragment length polymorphism, RFLP) 등의 분자 기반 방법이 젖산 박테리아의 동정 및 분류를 위해 사용되었다. 그러나 이러한 기술은 노동 집약적이고 비용이 많이들고 재현성이 낮으며 시간이 많이 소요된다.

[0005] PCR 기반 방법은 젖산 박테리아를 식별하는데 빠르고 민감하며 신뢰할 수 있는 방법 중 하나이다. 16S rRNA 유전자 및 16S-23S rRNA 유전자 간 스페이서 영역과 같은 유전자 마커는 락토바실러스 델브루엑키 구별을 위해 사용되었다. 그러나 락토바실러스 델브루엑키의 경우 16S rRNA 유전자 서열이 매우 비슷하여 16S rRNA 유전자를 이용한 기법이나 16S rRNA 유전자 시퀀싱을 이용해서 아종 수준까지 정확히 구별하기 어렵다는 한계점이 존재한다.

[0006] 이에 락토바실러스 델브루엑키의 아종 수준까지 신속하면서도 정확하고 민감하게 구별할 수 검출 방법이 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2099344호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 락토바실러스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii*) 그룹에 속하는 균종의 구별을 위한 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 검출용 조성물을 포함하는 락토바실러스 델브루엑키 그룹 검출용 키트를 제공하는

것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 검출용 조성물을 포함하는 락토바실러스 델브루엑키 그룹 검출용 바이오 칩(chip)을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 검출용 조성물을 이용해 대상 시료내 존재하는 락토바실러스 델브루엑키 그룹을 명확히 구별할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 검출용 조성물을 이용해 락토바실러스 델브루엑키 그룹 포함 시료의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 측면은 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 제 1 프라이머 쌍; 서열번호 3의 염기서열 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 제 2 프라이머 쌍; 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 제 3 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 프라이머 쌍으로 구성되는 프라이머 세트;를 포함하는, 락토바실러스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii*) 그룹에 속하는 균종의 구별 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0014] 본 발명에서 “프라이머 쌍”은 정방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머를 합쳐 동시에 지칭하는 용어이고, “프라이머 세트”는 상기 하나 또는 복수의 프라이머 쌍 예컨대, 제 1 프라이머 쌍 내지 제 2 프라이머 쌍 중에서 선택된 하나 이상으로 구성된 다수의 프라이머 쌍 묶음을 지칭하는 용어로 사용하였다.

[0015] 프라이머 쌍의 설계는 A, G, C, T 함량비, 프라이머 결합체(dimer) 형성 방지, 같은 염기서열의 3 회 이상 반복 금지 등 여러 가지 제약이 따른다. 그 외에 주형(template) DNA의 양, 프라이머의 농도, dNTP의 농도, Mg^{2+}의 농도, 반응온도, 반응시간 등의 조건이 적정해야 한다.

[0016] 상기 프라이머(primer)는 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 포함하는 짧은 핵산 서열로 상보적인 핵산의 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 핵산 주형의 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능할 수 있다.

[0017] 상기 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있으며, 표적 물질에 존재하는 핵산과 혼성화되어 상기 표적 물질의 특정 유전자를 증폭하는데 사용될 수 있다.

[0018] 상기 프라이머는 증폭의 효율을 고려하여 구체적으로는 단일쇄일 수 있으며, 디옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotide)일 수 있고, 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.

[0019] 상기 혼성화는 2개의 단일 가닥 핵산이 상보적인 염기 서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다.

[0020] 상기 혼성화는 단일 가닥 핵산 서열 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하는 경우에도 일어날 수 있다. 상기 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 반응 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 제어될 수 있다. 일반적으로, 상기 혼성화 온도가 높으면 완전한 매치일 경우 혼성화가 일어날 가능성이 높으며, 혼성화 온도가 낮으면 일부 미스매치가 존재하더라도 혼성화가 일어날 수 있다.

[0021] 상기 프라이머 세트는 표적 원료에 존재하는 특정 유전자에 혼성화될 수 있으며, 시료 내에 목적하는 원료가 존재하는 경우 중합효소 연쇄반응에 의해 상기 특징적인 유전자의 염기서열이 증폭 되므로 상기 증폭된 산물(amplicon)을 통해 상기 원료의 존부를 판단할 수 있다.

[0022] 상기 프라이머는 기본 성질을 변화시키지 않은 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 즉 핵산 서열이 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형될 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 뉴클레오타이드의 하나 이상의 동족체로의 치환 및 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트 또는 카바메이트 등의 하전되지 않은 연결체나 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등의 하전된 연결체로의 뉴클레오타이드의 변형이 가능하다. 또한 핵산은 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그날 펩타이드, 폴리 L 리신 등의 단백질, 아크리딘 또는

프소랄렌 등의 삽입제, 금속, 방사성 금속, 철 산화성 금속 등의 킬레이트화제 및 알킬화제 등의 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기를 가질 수 있다.

[0023] 또한 상기 프라이머 서열은 검출 가능한 신호를 직접적 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 상기 프라이머는 분광학, 광화학, 생화학, 면역화학 또는 화학적 수단을 이용하여 검출될 수 있는 표지를 포함할 수 있다. 유용한 표지는 32P, 형광 염료, 전자 밀집 시약, 효소(일반적으로 ELISA에 이용되는 것), 바이오틴 또는 합텐 및 항혈청 또는 단일클론성 항체가 이용가능한 단백질을 포함한다.

[0024] 상기 프라이머들은 적절한 서열의 클로닝 및 제한효소 분해 및 나랑(Narang)등의 포스포트리에스테르 방법(1979, Meth, Enzymol. 68:90-99), 보카지(Beaucage)등의 디에틸포스포라미다이트 방법(1981, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862), 및 미국 특허 제 4458066호의 고형물 지지 방법과 같은 직접적인 화학적 합성법을 포함하는 임의의 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0025] 구체적으로, 상기 프라이머 세트는 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 제 1 프라이머 쌍; 서열번호 3의 염기서열 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 제 2 프라이머 쌍; 및 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 제 3 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것을 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명에서, “락토바실러스(*Lactobacillus*)”는 당류를 발효하여 에너지를 획득하여 다량의 유산을 생성하는 세균으로, 다른 세균을 죽이기 위해 젖산(유산)을 분비하는 특성이 있어 '유산균'이라는 이름이 붙었다. 락토바실러스는 유산균과에 속하고, 현재까지 170여 종이 알려져 있다. 락토바실러스는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)과 함께 프로바이오틱 제품에 가장 흔히 쓰이는 유산균이며, 장내 유해 세균 증식을 막아 면역력을 정상 수치로 조절해 아토피, 건선 같은 피부질환이나 감염증을 개선하고, 비만과 성인병을 억제하는 효과 등이 있다고 알려져 있다.

[0027] 특히 락토바실러스에는 여러 그룹이 존재하며, 대표적으로 락토바실러스 애시도필러스(*L. acidophilus*) 그룹에 속하는 애시도필러스(*L. acidophilus*), 헬베티커스(*L. helveticus*), 갈리나룸(*L. gallinarum*); 락토바실러스 카세이(*L. casei*) 그룹에 속하는 카세이(*L. casei*), 파라카세이(*L. paracasei*), 람노서스(*L. rhamnosus*); 락토바실러스 플란타럼(*L. plantarum*) 그룹에 속하는 플란타럼(*L. plantarum*), 파라플란타럼(*L. paraplantarum*), 펜토수스(*L. pentosus*); 락토바실러스 사케이(*L. sakei*) 그룹에 속하는 사케이(*L. sakei*), 그라미니스(*L. graminis*), 커베투스(*L. curvatus*) 등이 이에 해당한다.

[0028] 구체적으로, 상기 락토바실러스 델브루엑키 그룹에 속하는 균종은 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*L. delbrueckii* subsp. *lactis*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 인디쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *indicus*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 야콥세니(*L. delbrueckii* subsp. *jakobsenii*) 및 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 순키(*L. delbrueckii* subsp. *sunkii*)로 구성된 군에서 하나 이상 선택된 것을 의미할 수 있다.

[0029] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스의 유전자를 검출하는 제 1 프라이머 쌍은 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0030] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스의 유전자를 검출하는 제 2 프라이머 쌍은 서열번호 3의 염기서열 및 서열번호 4의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0031] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키의 유전자를 검출하는 제 3 프라이머 쌍은 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열로 구성될 수 있다.

[0032] 또한, 상기 프라이머 쌍은 선택된 1 종의 프라이머 쌍을 포함하거나 2 종 이상의 복수 개의 프라이머 쌍을 포함한 형태로 프라이머 세트를 구성할 수 있다.

[0033] 본 발명 일 실시예에서는 상기 본 발명의 각 프라이머 쌍들이 락토바실러스 델브루엑키 그룹에 속하는 균종 각각에 대해 매우 높은 특이도를 나타냄을 확인하였다.

[0034] 본 발명의 다른 측면은, 상기 조성물을 포함하는 락토바실러스 델브루엑키 그룹에 속하는 균종의 구별 검출용 키트를 제공한다.

[0035] 상기 검출용 키트는 용액, 동결건조 분말, 냉동 용액, 또는 스트립 형태를 가질 수 있으며, 각각의 형태는 당업

계에서 통상적인 방법으로 제제화할 수 있다. 예를 들어, 용액 형태의 검출용 키트는 나트륨-인산, 칼륨-인산, 트리스-염산 및 이외의 여러 종류의 완충액 등의 완충액에 단백질 또는 프라이머 등을 별도로 또는 혼합하여 제제화할 수 있으며, 필요에 따라 냉동시키거나 동결 건조할 수도 있다.

[0036] 상기 검출용 키트는 면역측방유동 스트립 방식을 이용한 것일 수 있다. 측방유동분석법(lateral flow assay)은 크로마토그래피 방법을 기본으로 하는 단백질 또는 핵산의 검출 방법이다. 이러한 측방유동분석법은 임신진단, 암진단, 기타 특정 단백질 또는 유전자의 존재 여부 또는 미생물탐지 등 다양한 분야에 널리 사용되고 있다. 측방유동분석법은 항원-항체 반응과 같은 두 물질 간의 특이적인 반응을 기본으로 하는 것으로, 민감도와 특이성이 높고, 빠른시간 내에 결과를 확인할 수 있다는 장점이 있어 질병의 진단 및 빠른 예방 조치를 가능하게 한다.

[0037] 본 발명의 검출용 키트에는 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 락토바실러스 속 균주를 검출하는데 필요한 실험(예: PCR) 및 결과 확인에 필요한 여러 가지 시약들, 예컨대, PCR 조성물, 제한효소, 아가로스, 혼성화 및 전기영동에 필요한 완충용액 등이 추가로 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 PCR 조성물은 역전사 반응에 의해서 합성된 상보적 DNA와 본 발명에서 제공되는 PCR 프라이머 쌍 이외에 적당량의 DNA 중합효소(예, Thermusaquaticus(Taq), Thermusthermophilus(Tth), Thermusfiliformis, Thermisflavus, Thermococcusliteralis 또는 Pyrococcus furiosus(Pfu)로부터 얻은 열 안정성 DNA 중합효소), dNTP, PCR 완충용액 및 물(dH_2O)을 포함할 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 트리스-HCl(Tris-HCl), $MgCl_2$, KCl 등을 포함할 수 있다.

[0038] 또한, 상기 검출용 키트는 실시간-PCR(real-time PCR, RT-PCR) 키트일 수 있다. 구체적으로, RT-PCR 조성물을 동결 건조된 형태로 플라스틱 튜브에 담아 제조될 수 있으며, 상기 키트는 RT-PCR 조성물 외에, 분석에 사용되는 적절한 시약 및 도구를 더 포함할 수 있다. 이러한 시약 및 도구로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제 등이 포함된다. 상기 적합한 담체로는, 이에 한정되지는 않으나, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 덱스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다

[0039] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 조성물을 포함하는 락토바실러스 델브루엑키 그룹에 속하는 균종의 구별 검출용 바이오 칩(chip)을 제공한다.

[0040] 본 발명에서, 상기 “바이오 칩(chip)”은 DNA 칩이라고도 불리우며, 매우 작은 DNA 조각들이 고체 표면에 집적된 것으로, 플라스틱, 유리, 실리콘 등의 투명 또는 반투명한 재질로 이루어진 기판에 시료용액과 시약을 수용할 수 있는 챔버 및 채널을 포함한 형태일 수 있다.

[0041] 바이오 칩은 두께가 얇고 투명하며 히터블록과의 접촉면적이 넓기 때문에 PCR 시간을 크게 단축할 수 있고, 동시에 최소한 수백 개 이상의 유전자를 빠른 시간 안에 검색할 수 있는 장점이 있다. 또한, 고형체를 사용함으로써 아주 적은 양의 유전 물질을 고밀도로 붙일 수 있으며, 동시에 많은 수의 유전자를 검색할 수 있으며, 많은 양의 유전자의 발현 정도를 동시에 측정하거나 게놈의 다양한 부분의 유전자형을 파악하기 위해 사용할 수 있다.

[0042] 바이오 칩은 붙이는 유전물질의 크기에 따라 cDNA(complementary DNA)칩과 올리고뉴클레오티드 칩(oligonucleotide)으로 분류될 수 있다. cDNA 칩에는 최소한 500bp 이상의 유전자(full-length open reading frame 또는 EST)가 포함될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 칩에는 약 15 내지 25개의 염기들로 이루어진 올리고뉴클레오티드가 접착될 수 있고, 칩 내에 포함되는 용액에 포함될 수 있으나, 상기 형태에 한정되지 않으며 필요에 따라 적절히 변형할 수 있다.

[0043] 본 발명의 또 다른 측면은, 대상 시료에 상기 조성물을 처리하는 단계;를 포함하는 락토바실러스 델브루엑키 그룹에 속하는 균종의 구별 검출 방법을 제공한다.

[0044] 상기 검출방법에 사용하는 대상 시료는 락토바실러스 속 균이 발견될 수 있는 모든 물질, 바람직하게는 다양한 프로바이오틱 식품에서 수득할 수 있다. 구체적으로, 상기 대상 시료는 당업계에서 통상적으로 사용되는 DNA 추출방법을 통해 수득할 수 있으며, 예컨대 알카라인 추출법, 열수추출법, 컬럼 추출법 및 페놀/클로로포름 추출법 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 상기 검출방법은 대상 시료 내 존재하는 락토바실러스의 DNA를 검출할 수 있는 특정 방법들을 의미하는 것으로, DNA 서열 분석 방법; 프로브 하이브리드화 방법; 구조 특이적인 절단 분석; 효소 미스매치 절단 방법(enzyme mismatch cleavage method); 중합효소 연쇄 반응(PCR); 측쇄 하이브리드화 방법; 롤링 서클 복제(rolling circle replication); 핵산서열기반 증폭(Nucleic acid sequence based amplification, NASBA); 분자 비콘 기술(molecular beacon technology); E-센서 기술(미국 특허 제6,248,229호 등); 사이클링 프로브 기술(cycling probe technology); 데이드 베링(Dade Behring) 시그날 증폭 방법; 리가제 연쇄 반응; 및 샌드위치 하이브리드화 방법 또는 서던 블로팅(southern blotting)을 이용하는 것일 수 있다.

[0046] 상기 검출방법은 상기 조성물을 이용하여 특정 DNA를 증폭시킨 후, 특정 DNA의 증폭 반응을 확인하는 단계를 통해 수행될 수 있으며, 상기 특정 DNA의 증폭여부를 확인하는 단계는 검출방법의 반응산물이 전기영동 등을 통하여 예상되는 DNA 산물의 크기와 일치하는지를 확인함으로써 수행될 수 있다.

[0047] 구체적으로, 상기 검출방법은 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0048] 본 발명에서, 상기 “중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)”은 중합효소를 사용하여 핵산을 연쇄적으로 합성하여 개시 핵산물질을 기하급수적으로 증폭하는 방법으로 당업계에 널리 공지된 것으로, 특정 핵산의 존재 유무를 확인하는 정성분석 PCR, 특정 핵산의 양을 측정하는 정량 PCR 및 PCR 과정을 실시간으로 추적하여 정성 및 정량 분석을 가능하게 하는 실시간 PCR을 모두 포함하는 개념이다.

[0049] 상기 중합효소 연쇄반응은 당업계에 공지된 통상의 PCR 기기를 사용하여 일반적인 반응 조건에 따라 수행되거나, 또는 일부 변형되어 수행될 수 있다. 또한, 상기 PCR 반응 혼합물은 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 포함할 수 있으며, 이의 수행을 위한 설명서를 포함할 수 있다.

[0050] 본 발명 일 실시예에서는 1 종 또는 복수의 락토바실러스 델브루엑키 그룹 균주를 검출할 수 있는 프라이머 세트를 구축하였으며, 상기 프라이머 세트는 민감도가 높아 매우 낮은 수준의 타겟 DNA 농도에서도 효과적으로 타겟 DNA를 증폭할 수 있음을 확인하였다.

[0051] 구체적으로, 상기 중합효소 연쇄반응은 실시간-PCR(real-time PCR, RT-PCR) 일 수 있다. 일반적인 PCR의 경우 반응이 완료된 후 최종산물의 양을 알 수 있는 반면, 실시간 PCR은 PCR이 진행하는 동안 DNA 분자가 증폭되는 과정을 정량적으로 관찰할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0052] 본 발명에서 상기 실시간 PCR은 형광 탐침을 이용하는 Taqman 방법 또는 SYBR Green을 사용할 수 있고, 구체적으로는 SYBR Green을 이용하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0053] 상기 SYBR Green을 이용하는 실시간 PCR은, 목적하는 서열이 증폭됨에 따라 DNA 양이 증가하고, 이때 이중 가닥(double stranded) DNA에 끼어 들어가는 성질이 있는 형광 염료인 SYBR Green이 이중가닥 DNA에 끼어들어가게 된다. 상기 SYBR은 DNA에 끼어들어 발광하는 성질을 나타내므로, 발광 정도를 측정하여 증폭된 DNA양의 검출이 가능하다. SYBR Green을 이용하는 실시간 PCR법은 프라이머나 탐침에 형광 염료를 부착하지 않아도 되기 때문에 저렴하다는 장점이 있다. 그러나, SYBR Green을 이용하는 실시간 PCR 방법은 한 종류의 PCR 산물만 증폭되는 조건이어야 하고, 통상적인 PCR에서 일어나는 비특이적 산물이나 프라이머간의 다이머(dimer)의 형성이 일어나지 않는 민감한 프라이머 조건을 요구한다.

[0054] 본 발명의 또 다른 측면은, a) 대상 시료에 서열번호 1 내지 6의 프라이머 쌍을 포함하는 조성물을 처리하는 단계; 및 b) 상기 시료 내에 락토바실러스 델브루엑키 그룹에 속하는 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*) 및 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 포함 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 락토바실러스 델브루엑키 그룹 포함 시료의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0055] 구체적으로, 실시간-중합효소 연쇄반응(Real time-Polymerase chain reaction; PCR)을 수행하는 단계;를 추가로 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명에서, 상기 “시료”는 락토바실러스 속 균주의 포함 여부를 확인하고자 하는 대상이 되는 물질을 말한다. 구체적으로 프로바이오틱스 제제, 화장품, 식품, 영양제, 음료, 첨가제, 각종 식이에 포함되는 물질 등을 대상으로 할 수 있으나, 상기 형태에 제한되는 것은 아니며 락토바실러스 속 균주의 포함 여부를 확인하고자 하는 것이라면 모두 대상 시료가 될 수 있다.

[0057] 상기 스크리닝 방법은 특별한 제한 없이 당업계에 공지된 방법에 의해 수행되는 모든 유전자 스크리닝 방법을 통해 수행되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0058] 본 발명의 제 1 프라이머 쌍 내지 제 3 프라이머 쌍에서 하나 이상 선택된 것으로 이루어진 락토바실러스 검출용 조성물을 이용하면, 대상 시료 내 존재하는 락토바실서스 델브루엑키 그룹에 속하는 균종(species)을 정확하게 판별할 수 있다.

[0059] 또한, 본 발명의 제 1 프라이머 쌍 내지 제 3 프라이머 쌍은 한번의 실시간-PCR을 통해 락토바실러스 델브루엑키 그룹 균종을 정확히 검출할 수 있다.

[0060] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 6개의 락토바실러스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii*) 아종의 유전자 마커 선택을 위한 인실리코(*in silico*) 접근 방법을 도식화하여 나타낸 것이다.

도 2는 락토바실러스 델브루엑키 그룹의 범유전체 분포도를 나타낸 것이다.

도 3은 45개의 게놈에 대한 아종 특이적 유전자의 존재/부존재 여부를 확인한 결과를 히트맵으로 나타낸 것이다.

도 4는 54개의 젖산 박테리아에 대한 아종 특이적 프라이머 쌍의 특이성을 측정한 결과를 나타낸 것이다(A: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*특이 프라이머의 특이성, 증폭곡선: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* KACC 12420, LI 00010, LI 00011, LI 00012, LI 00013 및 LI 00014; B: *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 특이 프라이머의 특이성, 증폭곡선: *L. delbrueckii* subsp. *lactis* KACC 12417 및 LI 00015; C: *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* 특이 프라이머의 특이성, 증폭곡선: KACC 13439 및 KCTC 13730).

도 5는 락토바실러스 델브루엑키 아종 프라이머에 대한 표준 정량 곡선을 구축한 결과를 나타낸 것이다 (A: *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*증폭 플롯, 용융 곡선 및 표준 곡선, B: *L. delbrueckii* subsp. *lactis* 증폭 플롯, 용융 곡선 및 표준 곡선, C: *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* 증폭 플롯, 용융 곡선 및 표준 곡선).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0063] **실시예 1. 표준 균주의 준비**

[0064] 국립농업과학원 미생물은행(KACC, 전주, 한국), 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC, 대전, 한국), 한국미생물보존센터(KCCM, 서울, 한국) 및 실험실 분리주(LI, Yongin, 한국)로부터 락토바실러스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii*) 아종을 포함하는 총 54개의 표준 균주를 분양받았다(표 1).

[0065] 분양받은 모든 표준 균주는 MRS 액체배지 (Difco, Becton & Dickinson, Sparks, MD, USA)에서 42℃, 48시간 동안 혐기적 조건으로 배양하였다.

표 1

[0066]

번호	종	균주 번호
1	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	KACC[a] 12420
2	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	LI[b] 00010
3	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	LI 00011
4	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	LI 00012

5	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	LI 00013
6	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	LI 00014
7	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*)	KACC 12417
8	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*)	LI 00015
9	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)	KACC 13439
10	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)	KCTC 13730
11	락토바실러스 에시디피시스(*Lactobacillus acidipiscis*)	KACC 12394
12	락토바실러스 에시디필루스(*Lactobacillus acidophilus*)	KACC 12419
13	락토바실러스 아질리스(*Lactobacillus agilis*)	KACC 12433
14	락토바실러스 아밀로리티쿠스(*Lactobacillus amylolyticus*)	KACC 12374
15	락토바실러스 아밀로필루스(*Lactobacillus amylophilus*)	KACC 11430
16	락토바실러스 아밀로보러스(*Lactobacillus amylovorus*)	KACC 12435
17	락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)	KCTC[c] 3498
18	*락토바실러스* 부츠너리(*Lactobacillus buchneri*)	KACC 12416
19	락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)	KACC 12413
20	락토바실러스 치아이엔시스(*Lactobacillus chiayiensis*)	NBRC[d] 112906
21	락토바실러스 코리니포미스(*Lactobacillus coryniformis*)	KACC 12411
22	락토바실러스 크루스토룸(*Lactobacillus crustorum*)	KACC 16344
23	락토바실러스 커바투스(*Lactobacillus curvatus*)	KACC 12415
24	락토바실러스 팔시미니스(*Lactobacillus farciminis*)	KACC 12423
25	락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*)	KACC 11441
26	락토바실러스 갈리나룸(*Lactobacillus gallinarum*)	KACC 12370
27	락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*)	KCTC 3163
28	락토바실러스 헤이롱지안젠시스(*Lactobacillus heilongjiangensis*)	KACC 18741
29	락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*)	KACC 12418
30	락토바실러스 젠세니(*Lactobacillus jensenii*)	KCTC 5194
31	락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*)	KCTC 3801
32	락토바실러스 쿤케이(*Lactobacillus kunkeei*)	KACC 19371
33	락토바실러스 린드네리(*Lactobacillus lindneri*)	KACC 12445
34	락토바실러스 뮤코세(*Lactobacillus mucosae*)	KACC 12381
35	락토바실러스 파라부크네리(*Lactobacillus parabuchneri*)	KACC 12363
36	락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*)	KCTC 3165
37	락토바실러스 파라플란타럼(*Lactobacillus paraplantarum*)	KACC 12373
38	락토바실러스 파라플란타럼(*Lactobacillus paraplantarum*)	KCTC 5045
39	락토바실러스 펜토수스(*Lactobacillus pentosus*)	KACC 12428
40	락토바실러스 펜토수스(*Lactobacillus pentosus*)	KCCM[e] 40997
41	락토바실러스 플란타럼 서브스페시스 아르젠토라텐시스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *argentoratensis*)	KACC 12404
42	락토바실러스 플란타럼 서브스페시스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*)	KACC 11451
43	락토바실러스 류테리(*Lactobacillus reuteri*)	KCTC 3594
44	락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)	KCTC 3237
45	락토바실러스 루미니스(*Lactobacillus ruminis*)	KACC 12429
46	락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*)	KCTC 3603
47	락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*)	KCTC 3600
48	락토바실러스 샌프란시스센시스(*Lactobacillus sanfranciscensis*)	KACC 12431
49	락토바실러스 지메(*Lactobacillus zymae*)	KACC 16349
50	비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*)	KACC 16638
51	비피도박테리움 비피둠(*Bifidobacterium bifidum*)	KCTC 3418
52	비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*)	KACC 16639
53	비피도박테리움 롱검 서브스페시스 인팬티스(*Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*)	KCTC 3249

54	비피도박테리움 롱검 서브스페시스 롱검(*Bifidobacterium longum* subsp. *longum*)	KCCM 11953

[0067] **실시예 2. 범유전체 분석 및 유전자 마커(genetic marker)의 선택**

[0068] 락토바실러스 델브루엑키 아종의 검출을 위한 새로운 유전자 마커를 식별하기 위해 게놈 비교 분석을 수행하였다. 게놈 비교 분석을 위해 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*L. delbrueckii* subsp. *lactis*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 인디쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *indicus*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 야콥세니(*L. delbrueckii* subsp. *jakobsenii*) 및 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 순키(*L. delbrueckii* subsp. *sunkii*)의 락토바실러스 델브루엑키 아종에 속하는 총 41개의 게놈을 생물정보센터 (NCBI: ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/)로부터 얻었다(표 2).

표 2

[0069]

번호	락토바실러스 델브루엑키 아종	균주 번호	사이즈 (Mb)	GC%	CDS	어셈블리	수탁 번호
1	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	ATCC BAA-365	1.85695	49.7	1579	complete	CP000412.1
2	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	ATCC 11842	1.865	49.7	1561	complete	CR954253.1
3	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	2038	1.87292	49.7	1562	complete	CP000156.1
4	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	CNCM I-1519	1.79654	49.9	1630	contig	AGHW01
5	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	INRA-MIG	1.85324	49.8	1692	scaffold	CCET01
6	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	DSM 20081	1.75853	49.9	1533	scaffold	JQAV01
7	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	MN-BM-F01	1.87507	49.7	1585	complete	CP013610.1
8	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	CFL1	1.75792	49.8	1539	contig	CZPS01
9	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	LBB.B5	1.77788	49.8	1558	contig	LUGK01
10	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	DSM 20080	1.86818	49.8	1564	complete	CP019120.1
11	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	ND04	1.86175	49.6	1538	complete	CP016393.1

12	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	MBT 92059	1.83117	49.8	1648	scaffold	QOVB01
13	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	L99	1.84811	49.7	1575	complete	CP017235.1
14	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	KLDS1.0207	1.86918	49.8	1620	complete	CP032451.1
15	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	FAM 21277	2.01984	49.2	1830	contig	VBSR01
16	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	NBRC 13953	1.72582	50.0	1519	contig	BJMY01
17	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	KLDS1.1011	1.88749	49.8	1634	complete	CP041280.1
18	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	LJJ	1.89109	49.5	1604	complete	CP049052.1
19	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	ACA-DC 87	1.856	49.8	1579	complete	LT899687.1
20	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)	KACC 13439	1.76619	50.0	1485	contig	LHPL01
21	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)	KCTC 13731	1.91051	50.0	1600	complete	CP018216.1
22	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)	DSM 20074	1.95372	49.6	1577	complete	CP018615.1
23	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)	TUA4408L	2.01244	49.9	1718	complete	CP021136.1
24	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)	NBRC 3534	1.78742	50.3	1588	contig	BJLM01
25	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)	NBRC 3202	1.91031	50.1	1653	complete	AP019750.1
26	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 인디쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *indicus*)	JCM 15610	1.87741	49.5	1627	contig	LGAS01
27	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 인디쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *indicus*)	DSM 15996	1.86357	49.6	1621	scaffold	AZFL01
28	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 인디쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *indicus*)	JCM 15610	2.02186	49.4	1694	complete	CP018614.1

29	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 야콥세니(*L. delbrueckii* subsp. *jakobsenii*)	ZN7a-9	1.73081	50.2	1552	contig	ALPY01
30	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 야콥세니(*L. delbrueckii* subsp. *jakobsenii*)	DSM 26046	1.74924	50.3	1568	scaffold	JQCG01
31	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 야콥세니(*L. delbrueckii* subsp. *jakobsenii*)	DSM 26046	1.8918	50.1	1614	complete	CP018218.1
32	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 야콥세니(*L. delbrueckii* subsp. *jakobsenii*)	DSM 26046	1.78119	50.1	1585	scaffold	PUFG01
33	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*L. delbrueckii* subsp. *lactis*)	CRL581	2.13682	49.6	1639	scaffold	ATBQ01
34	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*L. delbrueckii* subsp. *lactis*)	KCCM 34717	2.26338	49.1	1905	complete	CP018215.1
35	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*L. delbrueckii* subsp. *lactis*)	DSM 20072	2.16598	49.0	1793	complete	CP022988.1
36	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*L. delbrueckii* subsp. *lactis*)	KCTC 3034	2.23761	49.0	1889	complete	CP023139.1
37	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*L. delbrueckii* subsp. *lactis*)	NBRC 3734	1.81291	50.2	1653	contig	BJLO01
38	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*L. delbrueckii* subsp. *lactis*)	*lactis*1	2.05032	49.6	1694	complete	LS991409.1
39	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*L. delbrueckii* subsp. *lactis*)	NWC_2_2	2.269179	48.7	1934	complete	CP031023.1
40	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 순키(*L. delbrueckii* subsp. *sunkii*)	JCM 17838	1.94526	50.1	1713	contig	LGHR01
41	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 순키(*L. delbrueckii* subsp. *sunkii*)	JCM 17838	2.00434	50.1	1726	complete	CP018217.1

[0070] Anvi'o v6 소프트웨어를 이용하여 범유전체학 기반의 계통수 분석을 수행하였다. 개발자의 권고에 따라 Anvi'o v6 게놈 저장소를 사용하여 범유전체 분석을 위한 데이터베이스를 구축하였으며, NCBI BLASTp 및 MCL 알고리즘을 사용하여 범유전체 군집 빈도를 기반으로 계통수(Phylogenetic tree)를 구축하였다.

[0071] 박테리아 범유전체 분석(Bacterial Pan Genome Analysis, BPGA) 파이프라인 v1.3 (Chaudhari, Gupta, & Dutta, 2016)을 사용하여 종- 또는 아종- 특이적 유전자를 조사하였다. 후보 유전자 마커는 타겟 아종을 제외한 모든 게놈에 존재하는 단백질을 암호화하는 유전자로 구성된 범유전체와 모든 게놈에 존재하는 단백질을 암호화하는 유전자로 구성된 핵심유전체의 데이터베이스를 비교하여 선택하였다. 락토바실러스 델브루엑키의 41개의 유전체의 총 67,178개의 유전자 분석 결과, 범유전체는 3,456개, 핵심(core-), 부가(accessory-) 및 유니크(unique-) 유전체는 각각 749, 2,071 및 636개의 유전자 클러스터로 이루어져 있음을 확인하였다.

[0072] 타겟 유전자를 제외한 모든 유전체에 존재하는 단백질을 암호화하는 유전자에 대해 핵심유전체와 범유전체를 비교한 후 5 - 50 개의 유전자를 각 아종에 대한 후보 유전자 마커로 선정하였다. 상기 선택된 후보 유전자 마커는 BLASTN을 사용하여 59,196,562 서열에 맞추어 정렬하였고, 상기 후보 유전자 마커 중 타겟 아종에만 존재하며 다른 박테리아 게놈에는 존재하지 않는 유전자 마커를 선택하였다.

[0073] 그 결과, 락토바실러스 델브루엑키 아종인 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*L. delbrueckii* subsp. *lactis*), 락토바실

러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 인디쿠스(*L. delbrueckii* subsp. *indicus*), 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 야콥세니(*L. delbrueckii* subsp. *jakobsenii*) 및 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 순키(*L. delbrueckii* subsp. *sunkii*)에 대한 유전자 마커는 각각 YcaO-유사 패밀리 단백질 (accession no. ABJ57813.1), Ser/Thr 단백질 키나아제 (accession no. EGD27260.1), 콜린(choline) 키나아제 (accession no. KNZ37552.1), DNA 메틸트랜스퍼레이즈 (accession no. KNE31255.1), RpoD 패밀리 RNA 폴리머레이즈 시그마 인자 (accession no. EOD03403.1) 및 가설 단백질 (accession no. APG74821.1) 임을 확인하였다.

[0074] **실시예 3. 락토바실러스 델브루엑키 아종에 특이적인 프라이머 디자인**

[0075] 종 수준으로 등록된 총 4개의 게놈 서열을 NCBI에서 얻었다. 유전자 마커의 특이성을 확인하기 위해 USEARCH ver. 9.0을 사용하여 종 수준으로 알려진 게놈을 포함하는 45 개의 게놈 서열에 맞추어 정렬하였다.

[0076] 정렬 결과를 맷플롯립(Matplotlib)의 씨본 파이썬(Seaborn python) 라이브러리를 이용하여 히트맵으로 시각화하였으며, 프라이머 디자이너 (Scientific and Education Software, Durham, NC, USA)를 사용하여 이러한 특이 유전자를 기반으로 아종- 특이적 프라이머를 설계하였다(표 3).

표 3

[0077]

세트 번호	타겟 종 (species)	타겟 유전자	프라이머	시퀀스 (5'-3')	서열번호
1	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	YcaO-유사 패밀리 단백질 (accession no. ABJ57813.1)	Bulgaricus_F	TAC CGC TGT TCT GTC TCA AGG	1
			Bulgaricus_R	TAT GCC TCC GTG AGC GAT CT	2
2	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스 (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*)	Ser/Thr 단백질 키나아제 (accession no. EGD27260.1),	Lactis_F	TTG TGC AAG AGC CAG CTG AA	3
			Lactis_R	GCC GCC ATT ACT GAA GTG GA	4
3	락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)	콜린(choline) 키나아제 (accession no. KNZ37552.1)	Dellbrueckii_F	CAT GGA ACT TCT GCG AAG GT	5
			Dellbrueckii_R	TAG ATC CGG AGC TGT TCC AC	6

[0078] **실시예 4. DNA 추출 방법**

[0079] 상기 표 1의 표준 균주의 DNA 추출을 위해 MRS 액체배지(Difco, Becton & Dickinson, Sparks, MD, USA)에서 42℃, 48시간 동안 혐기적 조건으로 배양하였다. 배양 후 13,600 x g에서 5분 동안 원심분리 하였고, 상층액을 제거한 뒤 표준 균주의 게놈 DNA는 프로토콜에 따라 DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 추출하였다.

[0080] DNA 농도 및 순도는 MaestroNano®분광광도계 (Maestrogen, Las Vegas, NV, USA)를 사용하여 확인하였다.

[0081] **실시예 5. 실시간 PCR(Real-time PCR) 조건**

[0082] 프라이머의 특이성과 정확성을 확인하기 위해 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 실시간 PCR을 수행하였다. 실시간 (Real-time) PCR을 수행하기 위한 반응액 조성은 20 ng의 게놈 DNA, 10 μL의 2X Thunderbird SYBR®qPCR Mix (Toyobo, Osaka, Japan), 500 nM의 각 프라이머 쌍에 증류수를 혼합하여 20 μL가 되도록 준비하였다.

[0083] 타겟의 증폭은 95℃ 에서 2분 동안 변성한 후, 95℃에서 5초 및 60℃에서 30초 반응을 30 사이클(cycle) 반복 수행하였다. 용융 곡선 데이터를 얻기 위해 95℃에서 15초, 60℃에서 1분, 95℃에서 30초, 60℃에서 15초 반응을 수행하였다.

[0084] **실험예 1. 아종 특이적 유전자 마커 특이성 확인**

[0085] 상기 실시예 2에서 선택된 유전자 마커의 특이성을 확인하기 위해 종 수준에서 등록된 게놈을 포함한 45개의 게

놈을 사용하여 인실리코(*in silico*) 분석을 수행하였다(도 1).

[0086] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 각각의 유전자 마커는 대부분 상응하는 아종의 게놈과 95% 이상 서열 동일성을 가지며 존재하였다. 락토바실러스 델브루엑키 AVK, TJA31 및 328M은 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스에 대한 유전자 마커를 포함하고 있으며, 락토바실러스 델브루엑키 LDELB18P1은 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스에 대한 유전자 마커를 포함하고 있음을 확인하였다.

[0087] 이와 같은 결과를 통해, 본 발명에서 선택된 유전자 마커는 락토바실러스 델브루엑키 아종 및 기타 박테리아 균주에 특이적이며, 알려지지 않은 게놈에 대한 아종 수준을 정확하게 구별할 수 있음을 보여준다.

[0088] **실험예 2. 실시간(Real-time) PCR의 특이도 및 민감도 확인**

[0089] 아종-특이적 프라이머 쌍에 대한 특이성을 확인하기 위해 54개 참조 유산균 균주를 대상으로 PCR을 수행하였다. 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스, 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스, 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키, 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 인디쿠스, 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 야콥세니 및 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 순키 특이적 프라이머는 상기 표 3의 개발된 프라이머를 사용하였다.

[0090] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 각 락토바실러스 델브루엑키 그룹 균주는 해당 특정 프라이머에 대하여 검출 가능한 산물(amplicon)을 생성한 반면, 다른 균주는 증폭 신호를 보이지 않았다. 구체적으로, Ct 값 범위는 락토바실러스 델브루엑키 그룹 균주에 대하여 12.72 내지 16.94 범위에 해당하였다. 이와 같은 결과는, 본 발명의 프라이머가 각 락토바실러스 델브루엑키 그룹의 균주의 종 또는 아종 검출에 특이적임을 보여준다.

[0091] 또한 상기 실시간 PCR의 특이도 및 민감도가 적절한 것인지 확인하기 위하여, 0.002 ng 내지 20 ng 범위 양으로 연속적으로 희석(serial dilution)한 락토바실러스 델브루엑키 그룹 종 또는 아종의 유전체 DNA를 이용하여 실시간 PCR의 정확도를 확인하였다.

[0092] 상기 실시간 PCR의 형광 증폭 곡선 결과를 바탕으로 표준 그래프를 작성한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 3 종류(락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스, 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스, 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키)의 종 특이적 프라이머 쌍 모두에서 전 범위에 걸쳐 선형 비례 관계를 나타내었다.

[0093] 구체적으로, 표준 그래프의 경사(slope) 및 R^2 값은 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0094]

종(species)	경사도(slope)	R^{2-}값
락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)	-3.44	≥0.998
락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*)	-3.46	≥0.998
락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 델브루엑키(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*)	-3.34	≥0.998

[0095] 유효한 프라이머를 얻기 위해서는 표준 곡선의 경사도 및 R^2 값이 각각 -3.1~-3.6 및 ≥0.98이상이어야 하며(Broeders et al., 2014), 상기 실험 결과와 비교하였을 때 모두 유효한 수치 값 이내에 들어옴으로써 본 발명의 실시간 PCR법은 높은 효율성 및 정확도를 갖는 것을 확인하였다.

[0096] 상기 모든 값은 높은 효율성을 나타내는 실시간 PCR 조건을 충족하였으며, 따라서 본 연구에서 개발된 실시간 PCR 법운 높은 정확도를 나타내며 락토바실러스 델브루엑키 아종의 빠르고 정확한 식별이 가능함을 시사한다.

[0097] **실험예 3. 프로바이오틱 제품에 대한 PCR 적용 실험**

[0098] 개발된 실시간 PCR 법의 적용 시험을 수행하기 위해, 64개의 분리주, 15개의 프로바이오틱 제품, 11개의 유제품을 사용하였다. 프로바이오틱 및 유제품에 대한 실시간 PCR 결과를 제품 라벨과 비교 하였다. 15개의 프로바이오틱 및 11개의 유제품을 전 세계 시장에서 구입하였다.

[0099] 그 결과 라벨 표기와 동일한 아종으로 총 26개의 제품이 검출되었으며, 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0100]

제품	라벨에 표시된 균종 (species)	PCR 결과 검출된 균종 (species)
제품 모니터링		
프로바이오틱 제품 1 (파우더, 한국)	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
프로바이오틱 제품 2 (파우더, 한국)	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
프로바이오틱 제품 3 (캡슐, 캐나다)	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
프로바이오틱 제품 4 (캡슐, 캐나다)	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
프로바이오틱 제품 5 (파우더, 한국)	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
프로바이오틱 제품 6 (캡슐, 한국)	*L. bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
프로바이오틱 제품 7 (캡슐, 미국)	*L. bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
프로바이오틱 제품 8 (캡슐, 미국)	*L. bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
프로바이오틱 제품 9 (파우더, 한국)	*L. bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
프로바이오틱 제품 10 (파우더, 한국)	*L. bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
프로바이오틱 제품 11 (캡슐, 캐나다)	*L. bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
프로바이오틱 제품 12 (파우더, 한국)	*L. bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
프로바이오틱 제품 13 (캡슐, 캐나다)	*L. bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
프로바이오틱 제품 14 (파우더, 한국)	*L. bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
프로바이오틱 제품 15 (파우더, 한국)	*L. bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
유제품 1 (요거트, 한국)	*L. bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
유제품 2 (요거트, 한국)	*L. bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
유제품 3 (요거트, 한국)	*L. bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
유제품 4 (요거트, 한국)	*L. bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
유제품 5 (요거트, 한국)	*L. bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
유제품 6 (요거트, 한국)	*L. bulgaricus*	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
유제품 7 (요거트, 한국)	Lactic acid bacteria	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
유제품 8 (요거트, 한국)	Lactic acid bacteria	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
유제품 9 (요거트, 한국)	Lactic acid bacteria	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
유제품 10 (요거트, 한국)	Lactic acid bacteria	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
유제품 11 (요거트, 한국)	Lactic acid bacteria	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
분리주 식별		
원유 (소젖, 한국)	Unknown isolates	*L. delbrueckii* subsp. *lactis*
원유 (소젖, 한국)	Unknown isolates	*L. delbrueckii* subsp. *lactis*
원유 (소젖, 한국)	Unknown isolates	*L. delbrueckii* subsp. *lactis*
유제품 (파우더, 한국)	Unknown isolates	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
유제품 (요거트, 한국)	Unknown isolates	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
유제품 (요거트, 한국)	Unknown isolates	*L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

[0101] 상기 표 5에 나타난 바와 같이, 라벨링이 잘못된 16개의 제품 모두 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스가 아닌 락토바실러스 불가리쿠스로 라벨링하고 있는 것을 확인하였다. 또한 유산균으로만 라벨링된 유제품은 실시간 PCR에 의해 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스를 포함하는 것임을 확인하였다.

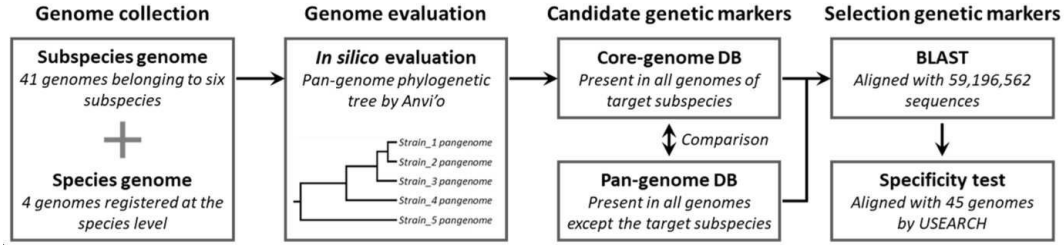
[0102] 본 발명의 실시간 PCR 법을 다른 분리주에 적용한 결과, 원유 및 유제품에서 분리된 총 64개 균주가 17개의 락

토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 락티스 및 47개의 락토바실러스 델브루엑키 서브스페시스 불가리쿠스임을 확인하였다. 이러한 결과는 본 연구에서 개발 된 실시간 PCR 법이 프로바이오틱 및 유제품에 존재하는 균주와 박테리아 분리주를 아종 수준까지 정확하게 식별할 수 있음을 보여준다.

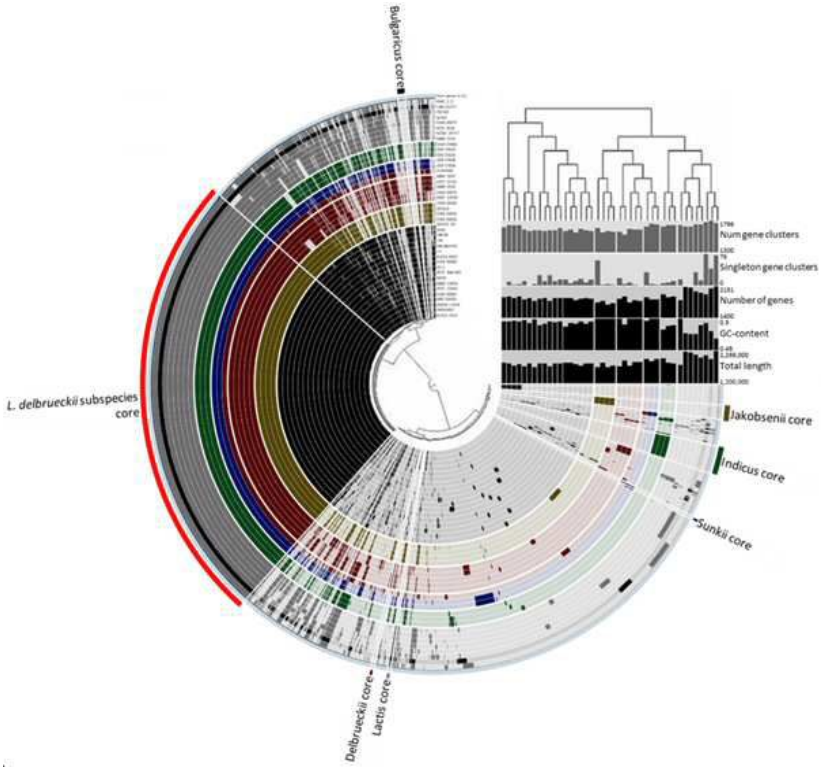
[0103] 본 발명에서는 락토바실러스 델브루엑키 그룹에 속하는 균종을 빠르고 정확하게 동정할 수 있도록 비교 유전체학을 이용하여 종 특이 프라이머 쌍, 프라이머 세트 및 이들을 포함하는 락토바실러스 검출용 조성물을 제공하고, 이들을 이용하여 락토바실러스를 검출할 수 있는 키트, 바이오 칩 및 검출방법을 제공한다. 또한, 상기 조성물을 이용한 검출방법을 프로바이오틱 제품 모니터링에 적용하여 제품의 라벨에 보고된 락토바실러스의 존재와 보고되지 않은 락토바실러스의 존재 여부도 결정할 수 있는 능력을 확인하였다. 이 방법은 프로바이오틱 제품뿐만 아니라 식품이나 환경 샘플로부터 다양한 락토바실러스를 한 번에 검출할 수 있는 연구에도 적용 가능한 것이다.

도면

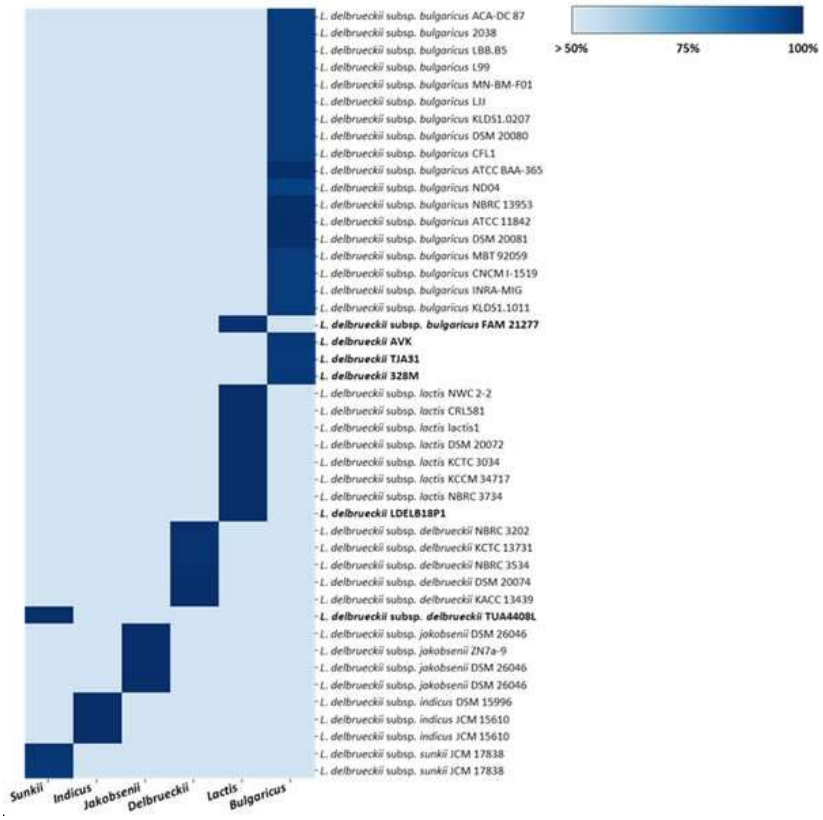
도면1



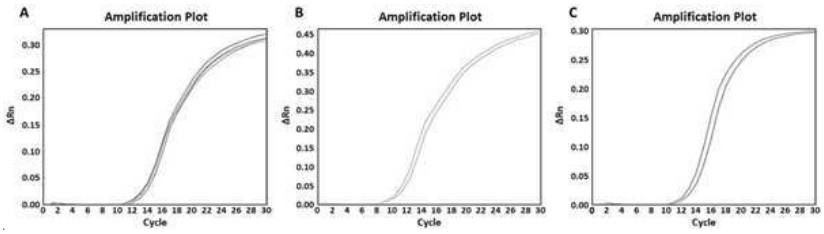
도면2



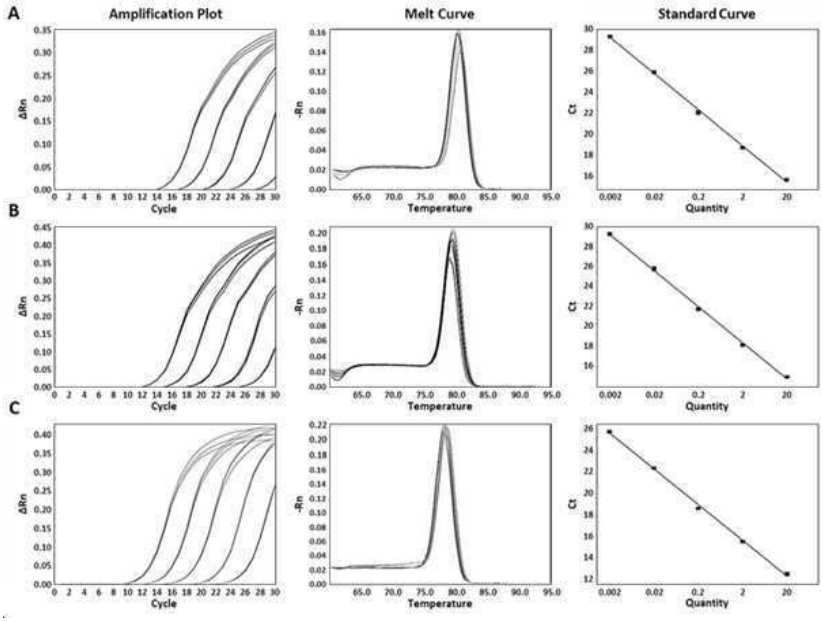
도면3


> 50%
75%
100%
L. delbrueckii subsp. bulgaricus ACA-DC 87
L. delbrueckii subsp. bulgaricus 2038
L. delbrueckii subsp. bulgaricus LBB.B5
L. delbrueckii subsp. bulgaricus L99
L. delbrueckii subsp. bulgaricus MN-BM-F01
L. delbrueckii subsp. bulgaricus LJI
L. delbrueckii subsp. bulgaricus KLDS1.0207
L. delbrueckii subsp. bulgaricus DSM 20080
L. delbrueckii subsp. bulgaricus CFL1
L. delbrueckii subsp. bulgaricus ATCC BAA-365
L. delbrueckii subsp. bulgaricus ND04
L. delbrueckii subsp. bulgaricus NBRC 13953
L. delbrueckii subsp. bulgaricus ATCC 11842
L. delbrueckii subsp. bulgaricus DSM 20081
L. delbrueckii subsp. bulgaricus MBT 92059
L. delbrueckii subsp. bulgaricus CNCM I-1519
L. delbrueckii subsp. bulgaricus INRA-MIG
L. delbrueckii subsp. bulgaricus KLDS1.1011
L. delbrueckii subsp. bulgaricus FAM 21277
L. delbrueckii AVK
L. delbrueckii TJA31
L. delbrueckii 328M
L. delbrueckii subsp. lactis NWC 2-2
L. delbrueckii subsp. lactis CRL581
L. delbrueckii subsp. lactis lactis1
L. delbrueckii subsp. lactis DSM 20072
L. delbrueckii subsp. lactis KCTC 3034
L. delbrueckii subsp. lactis KCCM 34717
L. delbrueckii subsp. lactis NBRC 3734
L. delbrueckii LDELB18P1
L. delbrueckii subsp. delbrueckii NBRC 3202
L. delbrueckii subsp. delbrueckii KCTC 13731
L. delbrueckii subsp. delbrueckii NBRC 3534
L. delbrueckii subsp. delbrueckii DSM 20074
L. delbrueckii subsp. delbrueckii KACC 13439
L. delbrueckii subsp. delbrueckii TUA4408L
L. delbrueckii subsp. jakobsenii DSM 26046
L. delbrueckii subsp. jakobsenii ZN7a-9
L. delbrueckii subsp. jakobsenii DSM 26046
L. delbrueckii subsp. jakobsenii DSM 26046
L. delbrueckii subsp. indicus DSM 15996
L. delbrueckii subsp. indicus JCM 15610
L. delbrueckii subsp. indicus JCM 15610
L. delbrueckii subsp. sunkii JCM 17838
L. delbrueckii subsp. sunkii JCM 17838
Sunkii
Indicus
Jakobsenii
Delbrueckii
Lactis
Bulgaricus

도면4


A
Amplification Plot
B
Amplification Plot
C
Amplification Plot
ΔRn
Cycle

도면5



서 열 목 록

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

<120> PRIMERS FOR DETECTION OF LACTOBACILLUS DELBRUECKII GROUP, AND USE THEREOF

<130> 20PP30862

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bulgaricus_F

<400> 1

taccgctgtt ctgtctcaag g 21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bulgaricus_R

<400> 2

tatgcctccg tgagcgatct 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lactis_F

<400> 3

ttgtgcaaga gccagctgaa 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lactis_R

<400> 4

gccgccatta ctgaagtgga 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dellbrueckii_F

<400> 5

catggaactt ctgcgaaggt 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Dellbrueckii_R

<400> 6

tagatccgga gctgttccac 20