

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 12월 16일 (16.12.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/143761 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) C12R 1/92 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) C12R 1/90 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/003168
- (22) 국제출원일: 2009년 6월 12일 (12.06.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여):
(주) 바이오니아 (BIONEER CORPORATION)
[KR/KR]; 대전 대덕구 문평동 49-3, 306-220 Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 윤홍란 (YIN, Hong Lan) [CN/KR]; 대전 대덕구 목상동 다사랑아파트 101-1212, 306-760 Daejeon (KR). 박한오 (PARK, Han Oh) [KR/KR]; 대전 유성구 전민동 엑스포아파트 208-601, 305-761 Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 권오식 (KWON, Oh-Sig) 등; 대전 서구 둔산동 921 주은리더스텔 4F, 302-120 Daejeon (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR QUICKLY DETECTING INFECTIOUS MICROORGANISMS IN UNKNOWN SAMPLE

(54) 발명의 명칭: 미지시료 내 감염성 미생물을 신속하게 검출하는 방법

(57) Abstract: The present invention relates to a method for quickly detecting infectious microorganisms in an unknown sample, and more particularly to a method for detecting infectious microorganisms existing in an unknown sample in a short time by real-time polymerase chain reaction and cell culture methods. The detection method of the present invention can overcome the disadvantage of real-time polymerase chain reaction in which microorganisms are detected in a detection sample if nucleic acids exist in the microorganism even when the microorganisms are non-infectious. In addition, in contrast to conventional cell culture, the detection method of the present invention can selectively and quickly detect only infectious microorganisms. The detection method can detect infectious microorganisms in a water system as well as be widely used in food inspection such as testing of drinking water, restaurant sanitation inspection, agricultural, livestock, and fishery products inspections, and the like.

(57) 요약서: 본 발명은 미지시료 중에 존재하는 감염성 미생물을 검출하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 실시간 중합효소연쇄반응법과 세포배양법을 이용하여 미지시료 중에 존재하는 감염성 미생물을 빠른 시간 안에 검출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 검출방법을 이용하면 검출 시료 중에 감염성이 없는 미생물일지라도 그 미생물의 핵산만 존재하면 검출되는 중합효소연쇄반응법의 단점을 극복할 수 있을 뿐만 아니라 기존의 세포배양법을 이용하는 방법에 비해 감염성이 있는 미생물만 선택적으로 신속하게 검출할 수 있다. 이러한 검출방법은 수계에 존재하는 감염성 미생물을 검출할 수 있는 외에도 식수검사, 식당 위생검사 및 농축수산물 등의 식품검사에의 활용이 가능하므로 광범하게 이용될 수 있다.

WO 2010/143761 A1

명세서

미지시료 내 감염성 미생물을 신속하게 검출하는 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 미지시료 중에 존재하는 감염성 미생물을 신속하게 검출하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 실시간 중합효소연쇄반응법과 세포배양법을 이용하여 미지시료 중에 존재하는 감염성을 지닌 미생물만을 빠른 시간 안에 검출하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 전 세계적으로 병원성 미생물이 수계 및 인간의 식수와 식품을 오염시켜 많은 질병을 발생시키고 있다. 종래에는 이들을 검출하기 위한 방법들이 개발되어 사용되고 있으나 각각의 검출방법은 유해 시료를 검출하기까지 시간이 오래 걸리거나 정확하게 동정하지 못한다는 단점이 있다.
- [3] 수계에 존재하는 유해 미생물인 바이러스를 동정하기 위한 방법에는 크게 두 가지가 있는데 세포배양법(Information Collection Rule; ICR, Virus Monitoring Protocol for the Information Collection Rule: Laboratory Manual, 1995, EPA Number:814B95002)과 유전자 검출법인 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)법이다.(Yoe-jin Choo and Sang-Jong Kim, Detection of human adenoviruses and enteroviruses in korean oysters using cell culture, integrated cell culture-PCR, and direct PCR, J. of Micro., 2006)
- [4] 세포배양법은 병원성 바이러스와 비병원성 바이러스를 분리하여 동정하기 위한 방법으로 세포병변효과(Cytopathic Effect; CPE)가 일어나는 여부에 의해 판단한다. 일반적으로 세포병변효과가 보일 때까지는 1 ~ 4주 정도의 오랜 시간을 요구하고 있다. 또한 모든 바이러스의 세포배양법이 개발되어 있는 것이 아니고 한 종류의 바이러스가 여러 종류의 세포에 감염될 수 있으며 반대로 한 종류의 세포에 여러 종류의 바이러스가 감염될 수도 있다. 예를 들면 노왁바이러스(Norwalk virus)는 아직까지 세포 배양 기술이 개발이 되지 않아 세포병변효과로 관찰할 수 없고 아데노바이러스는 헬라(Hela) 세포, A549 세포 등에 감염될 수 있고 또 Buffalo Green monkey kidney(BGMK) 세포에는 폴리오바이러스, 에코바이러스, 콕사키바이러스 등 여러 종류의 엔테로바이러스가 감염될 수 있다. 또한 폴리오바이러스는 베로(Vero)세포에 감염될 수 있고, 콕사키바이러스 A9는 HFF 세포에 감염될 수 있으며, 콕사키바이러스 B5는 헬라 세포에 감염될 수 있다. 따라서 이러한 세포배양법에 의하면 바이러스가 존재한다는 것은 알 수 있으나, 몇 종류의 바이러스인지 또 어떤 종류인지는 알 수 없는 단점을 갖고 있다. 이런 세포배양법은 검출하기까지 많은 시간을 소요하기 때문에 수계에 유해 미생물이 존재하는가를 판단하여 그 대비책을 마련하는 데는 효용가치가 떨어진다.

- [5] 유전자 진단법의 하나인 중합효소연쇄반응법은 적은 양의 DNA나 RNA를 증폭시키는 방법으로 민감도, 특이성, 신속성이 세포배양법에 비해 매우 뛰어나 세포배양법의 단점을 극복할 수 있다. 이 중합효소연쇄반응법은 수계의 샘플에서 직접 미생물의 핵산을 추출하여 그 핵산을 증폭한 후 젤 전기영동법으로 미생물의 존재여부를 판단하는 방법이다. 그러나 수계에 미량의 유해 미생물이 존재하거나 핵산 추출과정에서 많은 양이 소실되었을 경우 중합효소연쇄반응법으로 검출하면 음성으로 판단할 수도 있는 단점이 있다. 즉 중합효소연쇄반응법으로 검출되지 않았다 하더라도 미생물이 존재할 가능성이 있다. 또한 중합효소연쇄반응법이 가지는 근본적인 문제점으로 정량분석이 어렵고 오염에 의한 위양성의 위험성이 높은 단점이 있다.
- [6] 이러한 문제점을 해결하기 위해 '세포배양연계 중합효소연쇄반응(Integrated cell culture-Polymerase chain reaction; ICC-PCR)법'이 개발되었는데, 이 방법은 수질샘플을 세포에 감염시켜 보통 72시간 동안 배양하여 그 양을 증가시킨 후, 미생물의 핵산을 추출하여 중합효소연쇄반응법으로 검출하는 방법이다. 이 방법은 일반 중합효소연쇄반응법보다는 시간이 좀 걸리지만 기존의 세포배양법보다 시간이 단축되고 또한 미생물의 양을 증가시켰음으로써 일반 중합효소연쇄반응법 보다 검출 확률이 높은 장점이 있다.
- [7] 또한, ICC-PCR법 이외에도 PCR-nested PCR법도 있다. 이 방법은 한번 유전자를 증폭시킨 후 젤 전기영동으로 확인하여 검출되지 아니하더라도 중합효소연쇄반응 산물을 주형으로 하여 또 한 번 중합효소연쇄반응을 진행하여 미생물의 핵산을 더 증폭시킨 다음 그 존재여부를 판단하는 방법으로 일반 중합효소연쇄반응법보다 검출감도가 높다. 그러나 이 경우 세포에 감염되지 않는 불활성된 미생물도 유전자만 존재하면 검출이 되는 문제점이 있다.
- [8] 이상의 PCR법, ICC-PCR법, PCR-nested PCR법(S.H. Lee et. al., The simultaneous detection of both enteroviruses and adenoviruses in environmental water samples including tap water with an integrated cell culture-multiplex-nested PCR procedure. J. App. Mic. 2005)은 세포배양법에 비해 검출 시간이 단축되었으나 검출되지 않거나 여전히 2 ~ 3일을 소요하거나 중합효소연쇄반응을 두 번 하는 등 번거로움이 있다.
- [9] 기존의 중합효소연쇄반응법이 가지고 있는 한계성을 극복하기 위해 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR)법이 개발되어 이를 이용한 수중의 미생물 검출법이 개발되었다(Nlham T. et. all., Quantification of in vitro and in vivo cryptosporidium parvum infection by using real-time PCR, APP. ENV. Mic., 2006; Real -Time PCR for quantification of giardia and cryptosporidium in environmental water samples and sewage, App. Env. Mic. 2003; Z.Gu, et. all., Multiplexed, Real-Time PCR for Quantitative detection of human adenovirus, J. Cli. Mic., 2003). 실시간 중합효소연쇄반응법은 젤 전기영동절차가 필요 없이

중합효소연쇄반응이 진행되는 단계에서 각 사이클마다 형광 값을 측정하고 일정량 이상의 형광 값이 발생하는 사이클을 확인함으로써 시료의 특정 유전자 초기 농도를 정량적으로 분석하는 방법으로 일반 중합효소연쇄반응법에 비해 정량분석이 가능하고 밀폐된 용기에서 검출이 되므로 오염가능성이 적다. 그러나 이 방법 역시 핵산을 증폭하는 방법으로써 시료 속에 미생물의 핵산만 존재한다면 미생물의 감염성 여부와 관계없이 검출이 되는 단점을 갖고 있다. 음용수의 기준을 통과하기 위해서는 실제로 감염성이 있는 유해 미생물의 수를 정확히 알아야 한다. 그러나 시료에는 감염성이 있는 유해 미생물이 존재할 수 있고 감염성이 없는 미생물, 예를 들면 자연적으로 죽거나 소독으로 불활성화된 미생물이 존재할 수도 있다. 그러므로 실시간 중합효소연쇄반응법도 살아있는 감염성 미생물을 선택적으로 정량분석 할 수 없는 단점을 가지고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명은 상술한 기존의 실시간 중합효소연쇄반응(Real-Time polymerase chain reaction; Real-Time PCR)법과 세포배양법이 가진 각각의 단점을 극복하기 위하여, 실시간 중합효소연쇄반응법에 세포배양법을 적용하여 기존방법으로 불가능했던 감염성이 있는 미생물만을 빠른 시간 내에 분석할 수 있는 방법을 제시하여 본 발명을 완성하였다.
- [11] 따라서, 본 발명의 목적은 실시간 중합효소연쇄반응법과 세포배양법을 이용하여 미지시료 내 감염성 미생물을 신속하게 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

기술적 해결방법

- [12] 본 발명은 미지시료 내 인체에 치명적인 손상을 입힐 수 있는 감염성을 갖는 미생물의 존재여부 및 종류를 신속하고 정확하게 동정하고 검출하는 방법을 제공하고자 한다. 상기 미지시료는 상수원, 수돗물을 포함한 식수, 하천, 정수장 등의 수계 및 농축수산물과 같은 식품류를 비롯해 침, 콧물 등의 분비물, 혈액이나 분변 등과 같은 생물시료를 포함한 미생물이 감염될 수 있는 모든 시료를 말한다. 또한, 감염성 미생물은 바이러스 및 원생동물과 같은 류 중에서 인체 또는 동물에 영향을 미칠 수 있는 감염성을 가진 미생물을 의미한다. 본 발명의 검출 방법은 상기 시료에서의 미생물의 감염 여부 뿐 아니라 감염성 미생물의 정량 분석을 신속하게 처리할 수 있다.
- [13] 보다 상세하게 본 발명을 설명한다.
- [14] 본 발명은 미지시료를 동물세포에 접종하여 배양하는 단계; 상기 세포를 회수하여 핵산을 추출하는 단계; 및 상기 핵산들을 실시간 중합효소연쇄반응(Real-Time polymerase chain reaction; Real-Time PCR)법으로 검출하는 단계: 를 포함하는 미지시료 내 감염성 미생물의 검출방법을 제공한다. 상기 미지시료는 상수원, 식수 등의 수계 및 농축수산물과 같은 식품류를 비롯해

침과 같은 분비물, 동물의 혈액이나 분변등과 같은 생물시료를 포함한 미생물에 감염될 수 있는 모든 시료를 말한다.

- [15] 본 발명에 의한 감염성 미생물 검출방법을 통해 미생물의 감염량을 정량분석할 수 있다. 본 발명은 상기 미지시료 내 감염성 미생물이 존재하는지 확인하기 위하여 미지시료를 동물세포에 접종시켜 배양한 후, 시간에 따라 각각 배양한 동물세포로부터 핵산을 수득하여 핵산량을 비교함으로써 검출하며, 상기 시간 간격은 2, 4, 6, 8, 24, 48 또는 72시간 동안 배양하는 것으로 한다. 이 때, 동물세포에 감염된 상기 미지시료 내 감염성 미생물의 최초의 양을 알기 위해 배양하는 시간은 2시간 내지 8시간이다. 이는 시료의 감염성 여부와 정량을 판별하는데, 접종 후 2시간 내지 8시간이면 시료내의 감염성 미생물을 검출할 수 있다는 것이다. 또한, 시간 간격에 따라 배양한 동물세포로부터 수득한 핵산량을 검출, 비교함으로써 바이러스의 양이 증가되는 것을 확인하였으므로, 극소량의 바이러스가 존재하는 경우라 할지라도 배양시간을 72시간까지 늘리면 충분히 미지시료 내에 존재하는 감염성 미생물을 정량 검출할 수 있다.
- [16] 본 발명의 분석방법을 통해 검출 가능한 미지시료 내 감염성 미생물은 바이러스 및 원생동물을 포함한다. 상기 바이러스는 아데노바이러스(*Adenovirus*); 폴리오바이러스(*poliovirus*), 콕사키바이러스(*Coxsackievirus*), 에코바이러스(*Echovirus*)를 포함하는 엔테로바이러스(*Enterovirus*); 아스트로바이러스(*Astrovirus*); A형 간염 바이러스(*Hepatitis A virus*); E형 간염바이러스(*Hepatitis E virus*); 레오바이러스(*reovirus*); 로타바이러스(*Rotavirus*) 등으로 이루어진 군으로부터 선택 가능하며 이에 한정되는 것은 아니다.
- [17] 또한, 상기 원생동물은 지아디아(*Giardia*), 크립토스포리디움(*Cryptosporidium*)으로 이루어진 군으로부터 선택 가능하며, 더욱 상세하게는 지아디아 람브리아(*Giardia lamblia*), 크립토스포리디움 파르븀(*Cryptosporidium parvum*)으로 이루어진 군으로부터 선택 가능하며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [18] 본 발명의 검출방법은 세포감염법이 개발된 바이러스 또는 원생동물을 대상으로 검출하고자 한다면 무엇이든 적용 가능하다. 예를 들어, 아직 세포감염법이 개발되지 않은 노왁바이러스(*Norwalkvirus*) 등과 같은 바이러스도 세포감염법이 개발된다면 상기 바이러스도 본 발명의 방법으로 검출 가능하다.
- [19] 본 발명은 미지시료 내의 감염성 미생물을 검출하기 위하여 상기 바이러스 및 원생동물을 배양할 수 있는 동물세포를 이용하는데, 상기 동물세포는 헬라세포, A549 세포, 베로(Vero)세포, HFF 세포, BGMK 세포, FRhK-4 세포 및 HCT-8 세포로 이루어진 군으로부터 선택 가능하며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [20] 이하, 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.
- [21] 이때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가진다.
- [22] 또한, 종래와 동일한 기술적 구성 및 작용에 대한 반복되는 설명은 생략하기로

한다.

- [23] 본 발명에 있어서, 용어 '중합효소연쇄반응' 또는 'PCR'은 일반(비정량) PCR과 정량 PCR을 포괄하는 것으로서, 예를 들어, 일반 PCR, 실시간 PCR을 모두 포함하는 개념이나, 문맥에 따라 '일반 PCR'을 가리키는 개념으로 사용될 수 있다.
- [24] 본 발명에 따라 감염성이 있는 바이러스 및 원생동물을 감염성이 없는 바이러스 및 원생동물과 구분하여 검출하기 위해서는 하기와 같은 방법으로 검출한다.
- [25] 먼저 동물세포에 바이러스 및 원생동물을 감염시키는데, 세포에 감염시키는 방법은 세포가 차지하는 면적이 세포배양용기 면적의 80 ~ 90%가 될 때까지 37°C의 CO₂ 배양기에서 배양한 후, 바이러스 혹은 원생동물을 감염시켰다. 이 때, 바이러스에 따라 감염시키는 세포의 종류도 다르다. 아데노바이러스는 헬라세포에 감염시켰고, 엔테로바이러스인 폴리오바이러스, 에코바이러스, 콕사키바이러스는 BGMK 세포에 감염시켰다. 또한, A형 간염 바이러스는 FRhK-4 세포에 감염시켰으며, 원생동물인 지아디아 람브리아는 HCT-8 세포에 감염시켰다. 감염시킨 후 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 24시간, 48시간 및 72시간 등 시간별로 세포를 회수하여 DNA 혹은 RNA를 추출하였다. 그 후 실시간 중합효소연쇄반응법으로 각 시간별 증폭의 Ct 값을 측정하고 시간별로 어떤 차이가 있는가 보았다. 그 결과 세포에 감염시킨 후 2시간, 4시간, 6시간 및 8시간일 경우 거의 비슷한 결과를 나타냈으나, 48시간이나 72시간 후에는 2시간에 비해 10 ~ 100 정도 증가된 결과를 나타냈다. 즉, 감염성 미생물의 최초의 양을 알기 위해서 미생물을 배양할 때는 장시간의 배양이 필요 없으며, 2시간 ~ 8시간의 배양만으로도 미생물의 최초의 양을 알기에 충분하다는 것이다. 그 외 72시간까지 배양은 극소량의 미생물을 검출하기 위해서는 필요하나 최초의 양의 100정도는 증가된다는 것을 알 수 있다.
- [26] 상기와 같은 결과를 통해, 감염성이 있는 바이러스나 원생동물은 세포에 감염시켜 수 시간이면 감염성이 있는 바이러스나 원생동물을 감염성이 없는 바이러스나 원생동물과 분리해 낼 수 있고 또 일반 중합효소연쇄반응법보다 민감도가 높은 실시간 중합효소연쇄반응법을 사용하였기에 세포배양연계 중합효소연쇄반응법처럼 3일씩 배양할 필요가 없다. 또, 세포배양연계 중합효소연쇄반응법은 적은 양의 바이러스를 중합효소연쇄반응법으로 검출할 수 없어 그 양을 세포배양법으로 증가시키는데 그 목적을 두고 있기에 최초의 양을 알기엔 어려움이 있다.
- [27] 그러나 본 방법은 최초의 시료에 존재하는 감염성이 있는 바이러스 양 측정에 그 목적을 두고 있다. 본 방법에 의하면 아주 적은 양 일지라도 민감도가 높은 실시간 중합효소연쇄반응법으로 검출하면 모두 검출해낼 수 있다는 장점이 있다.
- [28] 본 발명에서 언급한 바이러스나 원생동물 이외에 동물세포에 감염시켜 배양할

수 있는 기타 바이러스나 원생동물은 모두 본 발명에 의한 방법으로 유해 미생물을 검출할 수 있다. 예를 들면 아스트로바이러스, 레오바이러스 등은 Caco2 세포에 배양이 가능{R.M. Plnco, et. all., Detection of infectious astroviruses in water, App. Env. Mic., 1996}하고 원생동물인 크립토스포리디움 파르븀은 HCT-8 세포에 감염이 가능하기에{Alexandra R. Keegan, et. all., Cell culture-Taqman PCR Assay for evaluation of Cryptosporidium parvum Disinfection, App. Env. Mic., 2003} 상기와 동일한 방법으로 검출할 수 있다.

- [29] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 감염성을 갖는 미생물의 검출에 있어서 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 방법으로써 이외에도 학교나 회사의 급식 식당에 있어서 위생적으로 병원균의 오염 여부를 판별하고자 할 때에도 식탁과 조리실 어디에서나 병원균을 채취할 수 있는 곳이라면 면봉 등의 채취 도구를 이용하여 손쉽게 채취함으로써 배양 배지에서 배양을 통해 균의 오염 여부와 대상 균의 동정 등의 정량 검출을 할 수 있다. 또한, 동물의 혈액, 분변 또는 분비물에 대한 감염성 미생물 검사 및 농축수산물에 비롯한 식품의 검사로도 활용이 가능하여 소량의 시료만으로도 그 안에 존재하는 미생물을 검출할 수 있다.

유리한 효과

- [30] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따르면 시료 내의 미생물을 감염성이 있는 것과 감염성이 없는 것으로 분리하기 위한 세포배양 시간은 2~4시간 정도 걸리며, 핵산을 추출하여 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하는 데는 2~3시간 정도 소요되어 총 4~7시간 정도이면 감염성 미생물 유무를 판단할 수 있어 기존의 세포배양법, 중합효소연쇄반응법 및 세포배양연계 중합효소연쇄반응법보다 시간을 대폭적으로 단축시켰고, 또 실제 감염성 여부도 판단되어 미지 시료의 감염성 미생물을 동정하는 데에 실제적인 효과가 기대된다. 이러한 검출방법은 병원성 뿐 아니라 수인성 미생물과 식품 검사용 시료 등의 폭넓은 대상 범위에서 시료 내에 존재하는 감염성 미생물의 존재 및 종류 여부를 판별할 수 있으므로 식수검사, 식당 위생검사, 농축수산물 등의 식품검사 및 혈액, 분변 및 분비물과 같은 생물시료의 미생물 감염검사에의 활용이 가능하므로 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [31] 도 1은 아데노바이러스 41의 표준 실시간 중합효소연쇄반응 그래프로써, 각 곡선 1~7은 $10^7 \sim 10$ 카피를 나타낸다.
- [32] 도 2는 아데노바이러스 41을 헬라세포에 감염시킨 후 시간별로 회수하여 실시간 중합효소연쇄반응 그래프를 나타낸 것으로써, 도에 표시된 곡선 1은 72시간 동안 감염시킨 실험군의 반응 결과이며, 곡선 2~5는 각 2, 4, 6, 8시간 동안 감염시킨 실험군의 반응 결과이며, 곡선 6은 음성대조군을 나타낸다.
- [33] 도 3은 콕사키바이러스 B5의 표준 실시간 중합효소연쇄반응 그래프로써, 각

곡선 1 ~ 7은 $10^7 \sim 10$ 카피를 나타낸다.

- [34] 도 4는 콕사키바이러스 B5를 감염시킨 후 시간별로 회수하여 실시간 중합효소연쇄반응 결과 그래프로써, 도에 표시된 곡선 1은 72시간 동안 감염시킨 실험군의 반응 결과이며, 곡선 2 ~ 5는 각 2, 4, 6, 8시간 동안 감염시킨 실험군의 반응 결과이며, 곡선 6은 음성대조군을 나타낸다.
- [35] 도 5는 A형 간염 바이러스의 표준 실시간 중합효소연쇄반응 그래프로써, 각 곡선 1 ~ 7은 $10^7 \sim 10$ 카피를 나타낸다.
- [36] 도 6은 A형 간염 바이러스를 세포에 감염시킨 후 시간별로 회수하여 실시간 중합효소연쇄반응 그래프를 나타낸 것으로써, 도에 표시된 곡선 1은 72시간 동안 감염시킨 실험군의 반응 결과이며, 곡선 2 ~ 5는 각 2, 4, 6, 8시간 동안 감염시킨 실험군의 반응 결과이며, 곡선 6은 음성대조군을 나타낸다.
- [37] 도 7은 지아디아 람브리아의 표준 실시간 중합효소연쇄반응 그래프로써, 각 곡선 1 ~ 7은 $10^7 \sim 10$ 카피를 나타낸다.
- [38] 도 8은 HCT-8 세포에 감염시킨 후 시간별로 회수하여 실시간 중합효소연쇄반응 그래프를 나타낸 것으로써, 도에 표시된 곡선 1은 72시간 동안 감염시킨 실험군의 반응 결과이며, 곡선 2 ~ 5는 각 2, 4, 6, 8시간 동안 감염시킨 실험군의 반응 결과이며, 곡선 6은 음성대조군을 나타낸다.

발명의 실시를 위한 형태

- [39] 이하, 본 발명을 구체적인 실시 예에 의해 보다 더 상세히 설명하고자 한다. 하지만, 본 발명은 하기 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 사상과 범위 내에서 여러 가지 변형 또는 수정할 수 있음은 이 분야에서 당업자에게 명백한 것이다.
- [40] [실시예 1] 동물세포 배양 및 세포내 바이러스 및 원생동물 감염
- [41] 6-웰 배양용기에 BGMK 세포(한국세포주은행), 헬라 세포(한국세포주은행), FRhK-4 세포(한국세포주은행), HCT-8 세포(한국세포주은행)를 각각 넣어 37°C, CO₂배양기(Heal Force, Shanghaiishen Scientific Equipment.Co,Ltd, China)에서 배양하였다.
- [42] 상기 배양된 세포가 현미경하에서 세포가 차지하는 면적이 세포배양용기 면적의 90%가 되는 때에 바이러스를 감염시켰다. 세포에 감염시킬 바이러스로 아데노바이러스 41(VR-930, ATCC, USA)과 더불어 엔테로바이러스인 폴리오바이러스 1(VR-1464, ATCC, USA), 에코바이러스 6(VR-1044, ATCC, USA) 및 콕사키바이러스 B5(VR-185, ATCC, USA), A형 간염 바이러스(VR-1357, ATCC, USA)를 사용하였으며, 원생동물은 지아디아 람브리아(ATCC50803, ATCC, USA)를 사용하였다. 아데노바이러스는 헬라세포에, 폴리오바이러스 1, 에코바이러스 6 및 콕사키바이러스 B5는 BGMK 세포에 각각 감염시켰다. A형 간염 바이러스는 FRhK-4 세포에 감염시키고 원생동물인 지아디아 람브리아는 HCT-8 세포에 감염시켰다.

- [43] 각 바이러스 및 원생동물의 음성대조군으로, 열처리로 불활성화 시킨 각 바이러스와 원생동물을 사용하였다. 열처리는 바이러스의 외막을 파괴하기 위한 것으로 100°C에서 10분 동안 처리하여 바이러스를 불활성화 하였다.
- [44] 각 세포에 바이러스를 감염시키는 구체적인 방법은 세포 배양 용기 내의 배지를 0.5ml 정도 남기고 전부 제거한 다음 37°C 항온조(water bath)(Jeio Tech, Korea)에서 녹인 바이러스 용액을 각각 100ul씩 7개의 세포 배양용기에 첨가하고 잘 흔들어 주었다. 음성대조군으로 불활성화 시킨 동일한 바이러스 및 원생동물을 100ul씩 7개의 세포 배양용기에 첨가하고 잘 흔들어 주었다. 그런 다음 37°C, CO₂배양기에 넣고 15분에 한 번씩 흔들어줌으로서 바이러스가 세포 중에 충분히 감염될 수 있도록 하였다. 한 시간 동안 배양한 후 세포에 감염되지 않고 부유하여 있는 바이러스를 제거하기 위해서 바이러스가 감염된 세포용기를 꺼내 배지를 모두 제거하고, Phosphate Buffered Saline(PBS, Gibco, invitrogen)로 충분히 세척한 다음 새 배지를 3ml 넣어 한 시간 더 배양하여 바이러스가 감염되어 있는 세포를 회수하였다. 더불어, 같은 방법으로 감염 4시간, 6시간, 8시간, 24시간, 48시간, 72시간 후에 바이러스가 감염되어 있는 세포를 회수하여 -20°C에 보관하여 실험 시 꺼내 사용하였다. 불활성화 시킨 바이러스와 원생동물도 동일하게 처리하였다.
- [45] **[실시예 2] DNA 및 RNA 추출**
- [46] 시간별로 회수한 세포는 3000rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 사용하여 아데노바이러스와 지아디아 람브리아는 DNA추출키트(AccuprepGenomic DNA Extraction kit, Bioneer, Korea), 기타 바이러스는 RNA추출키트(AccuprepViral RNA Extraction kit, Bioneer, Korea)를 사용하여 DNA 및 RNA를 추출하였다.
- [47] **[실시예 3] 실시간 중합효소연쇄반응**
- [48] 상기 실시예 2에서 추출한 DNA, RNA를 주형으로 Exicycler™ Quantitative Thermal Block (바이오니아, 한국)을 이용하여 실시간 정량 중합효소연쇄반응을 실행하였다. 실시간 중합효소연쇄반응시 사용한 프라이머 및 프로브 서열은 하기 표 1과 같다.
- [49] 하기 프라이머 및 프로브를 이용하여 아데노바이러스 41과 지아디아 람브리아는 Dualstar(Bioneer, Korea)를 사용하여 95°C 5분 1 사이클, 95°C 10초, 57°C 30초 45 사이클 실시간 중합효소연쇄반응을 수행하였다. RNA 바이러스인 기타 바이러스는 역전사효소(Reverse Transcriptase; RTase)인 Moloney Murine Leukemia Virus(MMLV)를 이용하여 42°C에서 1시간 반응시켜 RNA를 cDNA로 전환시킨 다음 상기와 동일하게 실시간 중합효소연쇄반응을 실시하였다.
- [50] **아데노바이러스 41**
- [51] 순방향 프라이머 : 5'-AGCAGTGACCCTTAAGTATTCACC- 3' (서열번호 1)
- [52] 역방향 프라이머 : 5'-AGAGAGGTGCCGATGTTGTTAAG- 3' (서열번호 2)
- [53] 프로브 : 5'-CCCCGCTTACAGTAAAAGGCCCGCC- 3' (서열번호 3)

- [54] **폴리오바이러스 1**
- [55] 순방향 프라이머 : 5'-GGTATTTTCGAACGCCTATTACAC- 3' (서열번호 4)
- [56] 역방향 프라이머 : 5'-TTTAGAGATGCTGCACCATAGAGG- 3' (서열번호 5)
- [57] 프로브 : 5'-ACCTAGTGCTGCCGACTGGTCCTTCA- 3' (서열번호 6)
- [58] **에코바이러스 6**
- [59] 순방향 프라이머 : 5'-GACATGGTGCGAAGAGTCTATTGA- 3' (서열번호 7)
- [60] 역방향 프라이머 : 5'-CACCTGCTCCGCAGTTAAGATT- 3' (서열번호 8)
- [61] 프로브 : 5'-CCTCCGGCCCCCTGAATGCG- 3' (서열번호 9)
- [62] **콕사키바이러스 B5**
- [63] 순방향 프라이머 : 5'-GGTACCAGTCCCATGTTCTCCTA- 3' (서열번호 10)
- [64] 역방향 프라이머 : 5'-AGACCGATGGCACCGTGTT- 3' (서열번호 11)
- [65] 프로브 : 5'-TTTCCGAGCCAGGCGACTGTGG- 3' (서열번호 12)
- [66] **A형 간염 바이러스**
- [67] 순방향 프라이머 : 5'-CACGCTTTCTGTCTTCTTTCTTCC- 3' (서열번호 13)
- [68] 역방향 프라이머 : 5'-ATCTGTGTCCCAATTTAGACTCC- 3' (서열번호 14)
- [69] 프로브 : 5'-TGCTAATCATGGAGTTGACCCCGCCG- 3' (서열번호 15)
- [70] **지아디아 람브리아**
- [71] 순방향 프라이머 : 5'-AAACGGAGGGTAGAGCATGCT- 3' (서열번호 16)
- [72] 역방향 프라이머 : 5'-GCAACAAGTTGGCCGAGACT- 3' (서열번호 17)
- [73] 프로브 : 5'-TGGCGCATCTATGCACCCTCTTTCC- 3' (서열번호 18)
- [74] 표 1
- [75]

Sequence name	Sequence	Size	Tm (°C)	GC (%)	Start Position
AV41 Forward	AGCAGTGAACCTTAAGTATTCACC	24	58.5	45.8	136
AV41 Reverse	AGAGAGGTGCCGATGTTGTTAAG	23	58.6	47.8	257
AV41 Probe	CCCCGCTTACAGTAAAAGGCCCGCC	25	68.1	64	224
PV1 Forward	GGTATTTTCGAACGCCTATTCACAC	24	58.5	45.8	598
PV1 Reverse	TTTAGAGATGCTGCACCATAGAGG	24	58.4	45.8	704
PV1 Probe	ACCTAGTGCTGCCGACTGGTCCTTCA	26	67.6	57.7	675
Echo6 Forward	GACATGGTGCGAAGAGTCTATTGA	24	56.9	45.8	246
Echo6 Reverse	CACCTGCTCCGCAGTTAAGATT	22	57.1	50	326
Echo6 Probe	CCTCCGGCCCCGTAATGCG	19	66.3	73.7	283
coxsackieB5 Forward	GGTACCAGTCCCATGTTCTCCTA	23	58	52	3575
coxsackieB5 Reverse	AGACCGATGGCACCGTGTT	19	60	58	3661
coxsackieB5 Probe	TTTCCGAGCCAGGCGACTGTGG	22	69	62	3617
HAV Forward	CACGCTTTCTGTCTTCTTTCTTCC	24	58.5	45.8	5
HAV Reverse	ATCTGTGTCCCAATTTAGACTCC	24	58.2	45.8	126
HAV Probe	TGCTAATCATGGAGTTGACCCCGCCG	26	67.2	57.7	92
Giardia Forward	AAACGGAGGGTAGAGCATGCT	21	56.5	52.4	560
Giardia Reverse	GCAACAAGTTGGCCGAGACT	20	56.4	55	651
Giardia Probe	TGGCGCATCTATGCACCTCTTTCC	25	67.5	56	596

- [76] 그 결과 모든 바이러스 및 원생동물은 감염시킨 후 2시간, 4시간, 6시간, 8시간은 거의 비슷한 경향을 나타냈고 72시간 후에는 감염 2시간 후보다 100정도 증가된 경향을 나타냈다. 이는 세포에 감염된 후 2~8시간 안에는 미생물의 양이 감염초기의 양과 비슷하다는 것을 의미한다. 같은 처리를 거친 음성대조군인 불활성화된 바이러스 및 원생동물은 실시간 증합효소연쇄반응법으로 검출되지 않았다. 이는 불활성화된 바이러스는 세포에 감염되지 않아 PBS로 씻을 때 전부 씻겨 나갔기 때문이다. 세포에 감염시키지 않은 음성대조군의 DNA 혹은 RNA를 직접 추출하여 실시간 증합효소연쇄반응을 수행한 결과 증폭곡선을 보였다. 이는 바이러스 및 원생동물의 외막은 파괴되었지만 DNA 혹은 RNA를 갖고 있기 때문이다.
- [77] 상기 실험을 통해 미생물이 감염되도록 시료를 동물세포에 접종하여 함께 배양한 후, 수 시간 뒤 세포를 회수하고 핵산을 추출하여 실시간 증합효소연쇄반응을 수행하면 감염성 미생물만을 검출할 수 있을 뿐만 아니라 정량 분석이 가능하다는 것을 알 수 있다.

서열목록

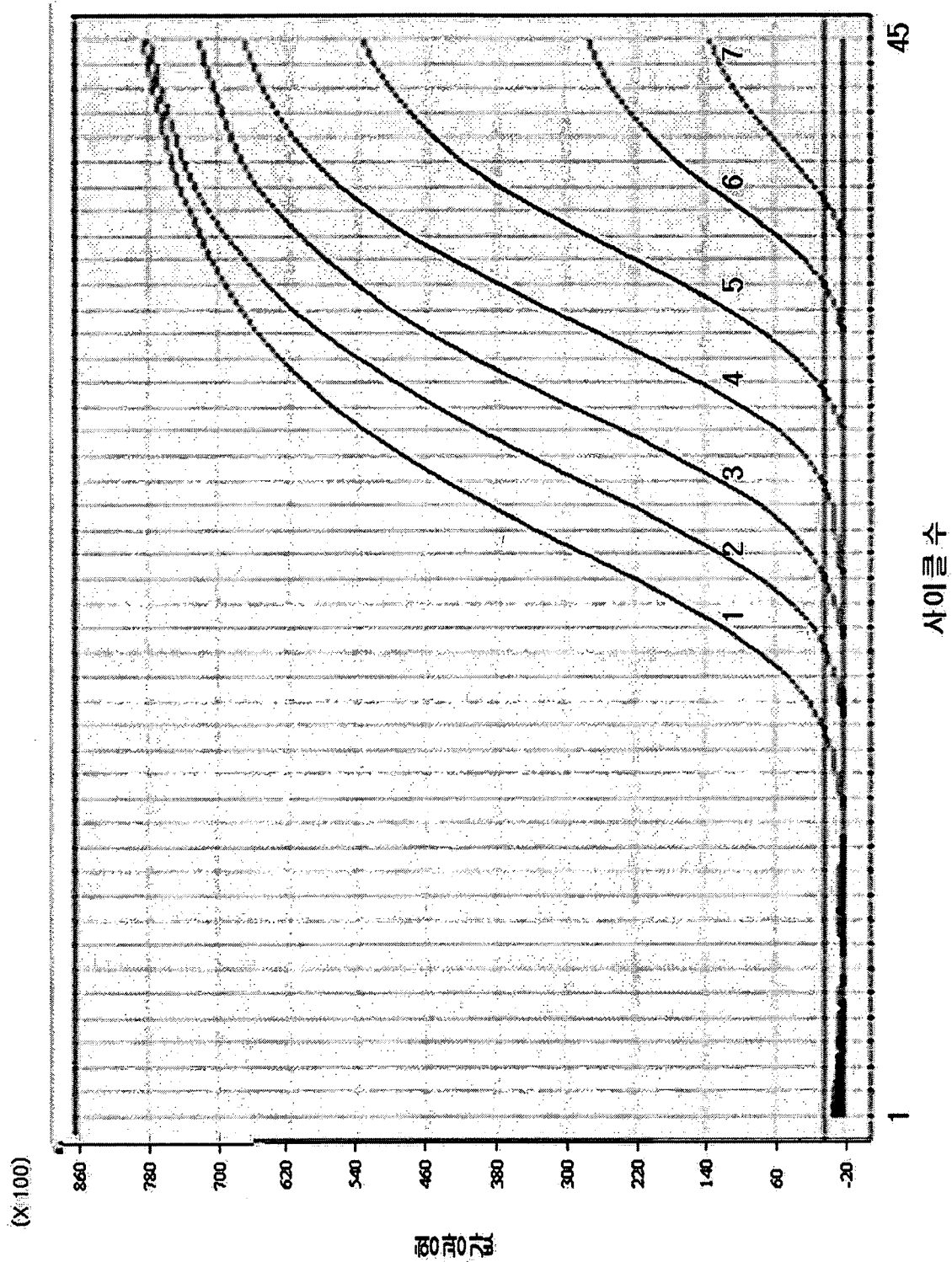
- [78] 서열목록 1은 아데노바이러스 41의 순방향 프라이머이다.
- [79] 서열목록 2는 아데노바이러스 41의 역방향 프라이머이다.
- [80] 서열목록 3은 아데노바이러스 41의 프로브이다.
- [81] 서열목록 4는 폴리오바이러스 1의 순방향 프라이머이다.

- [82] 서열목록 5는 폴리오바이러스 1의 역방향 프라이머이다.
- [83] 서열목록 6은 폴리오바이러스 1의 프로브이다.
- [84] 서열목록 7은 에코바이러스 6의 순방향 프라이머이다.
- [85] 서열목록 8은 에코바이러스 6의 역방향 프라이머이다.
- [86] 서열목록 9는 에코바이러스 6의 프로브이다.
- [87] 서열목록 10은 콕사키바이러스 B5의 순방향 프라이머이다.
- [88] 서열목록 11은 콕사키바이러스 B5의 역방향 프라이머이다.
- [89] 서열목록 12는 콕사키바이러스 B5의 프로브이다.
- [90] 서열목록 13은 A형 간염 바이러스의 순방향 프라이머이다.
- [91] 서열목록 14는 A형 간염 바이러스의 역방향 프라이머이다.
- [92] 서열목록 15는 A형 간염 바이러스의 프로브이다.
- [93] 서열목록 16은 지아디아 람브리아의 순방향 프라이머이다.
- [94] 서열목록 17은 지아디아 람브리아의 역방향 프라이머이다.
- [95] 서열목록 18은 지아디아 람브리아의 프로브이다.

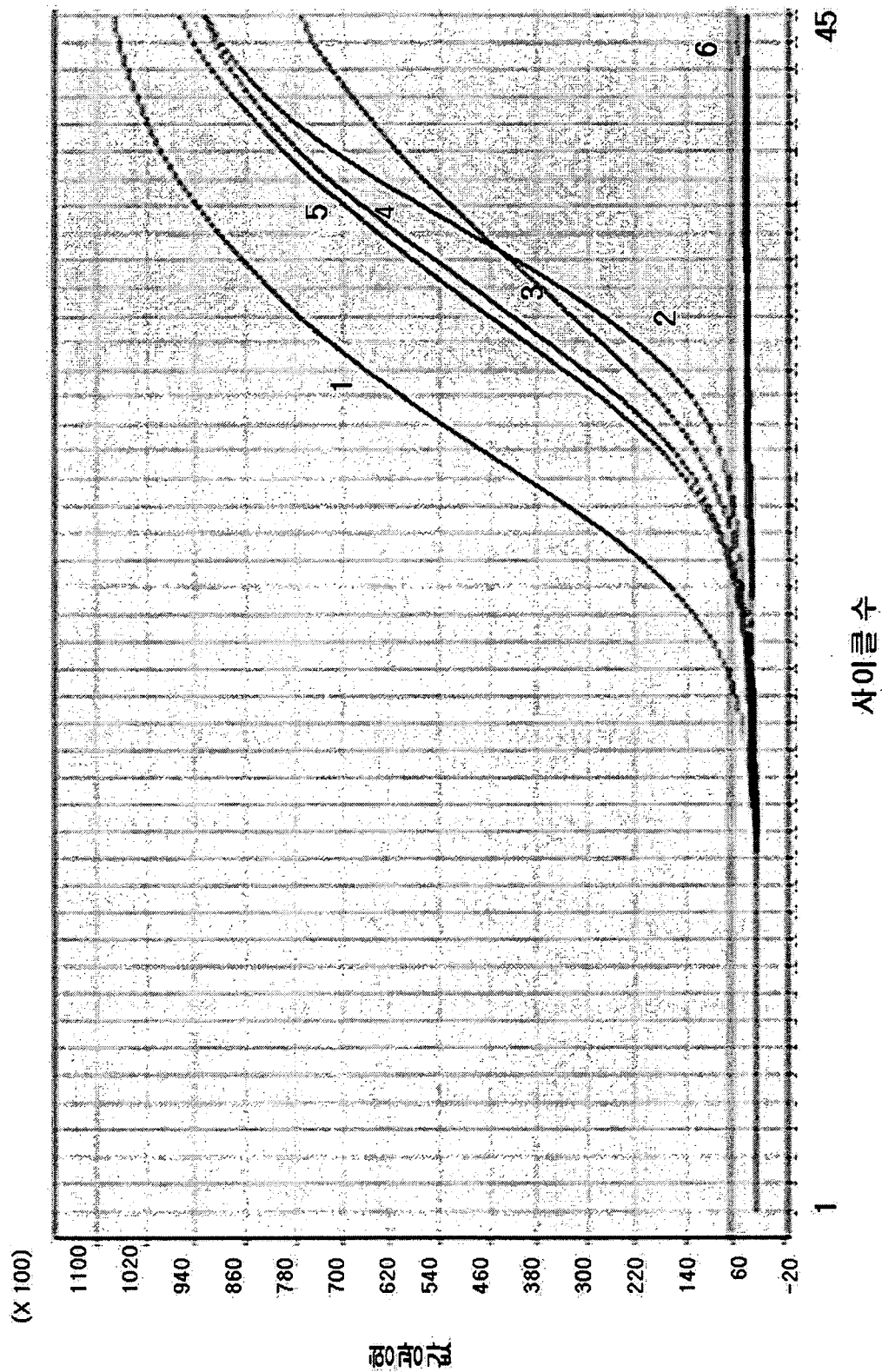
청구범위

- [1] 미지시료를 동물세포에 접종하여 배양하는 단계; 상기 세포를 회수하여 핵산을 수득하는 단계; 및 상기 핵산들을 실시간 중합효소연쇄반응(Real-Time polymerase chain reaction; Real-Time PCR)법으로 분석하는 단계: 를 포함하는 미지 시료 내 감염성 미생물의 검출방법.
- [2] 제 1항에 있어서, 상기 미지시료를 동물세포에 접종하여 배양한 후 시간에 따라 배양한 동물세포로부터 핵산을 수득하여 핵산량을 비교하는 것을 특징으로 하는 감염성 미생물의 검출방법.
- [3] 제 2항에 있어서, 상기 시간 간격은 2, 4, 6, 8, 24, 48 또는 72시간 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 감염성 미생물의 검출방법.
- [4] 제 1항에 있어서, 상기 미지시료를 동물세포에 접종하여 배양한 후 미생물의 최초의 양을 알기 위해 배양하는 시간은 2시간 내지 8시간인 것을 특징으로 하는 감염성 미생물의 검출방법.
- [5] 제 1항에 있어서, 상기 미지시료 내 감염성 미생물은 바이러스 및 원생동물을 포함하는 것을 특징으로 하는 감염성 미생물의 검출방법.
- [6] 제 5항에 있어서, 상기 바이러스는 아데노바이러스(*Adenovirus*); 폴리오바이러스(*poliovirus*), 콕사키바이러스(*Coxsackievirus*), 에코바이러스(*Echovirus*)를 포함하는 엔테로바이러스(*Enterovirus*); 아스트로바이러스(*Astrovirus*); A형 간염 바이러스(*Hepatitis A virus*); E형 간염바이러스(*Hepatitis E virus*); 레오바이러스(*reovirus*); 로타바이러스(*Rotavirus*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 감염성 미생물의 검출방법.
- [7] 제 5항에 있어서, 상기 원생동물은 지아디아(*Giardia*), 크립토스포리디움(*Cryptosporidium*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 감염성 미생물의 검출방법.
- [8] 제 1항에 있어서, 상기 동물세포는 헬라세포, A549 세포, 배로세포, HFF 세포, BGMK 세포, FRhK-4 세포 및 HCT-8 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 감염성 미생물의 검출방법.

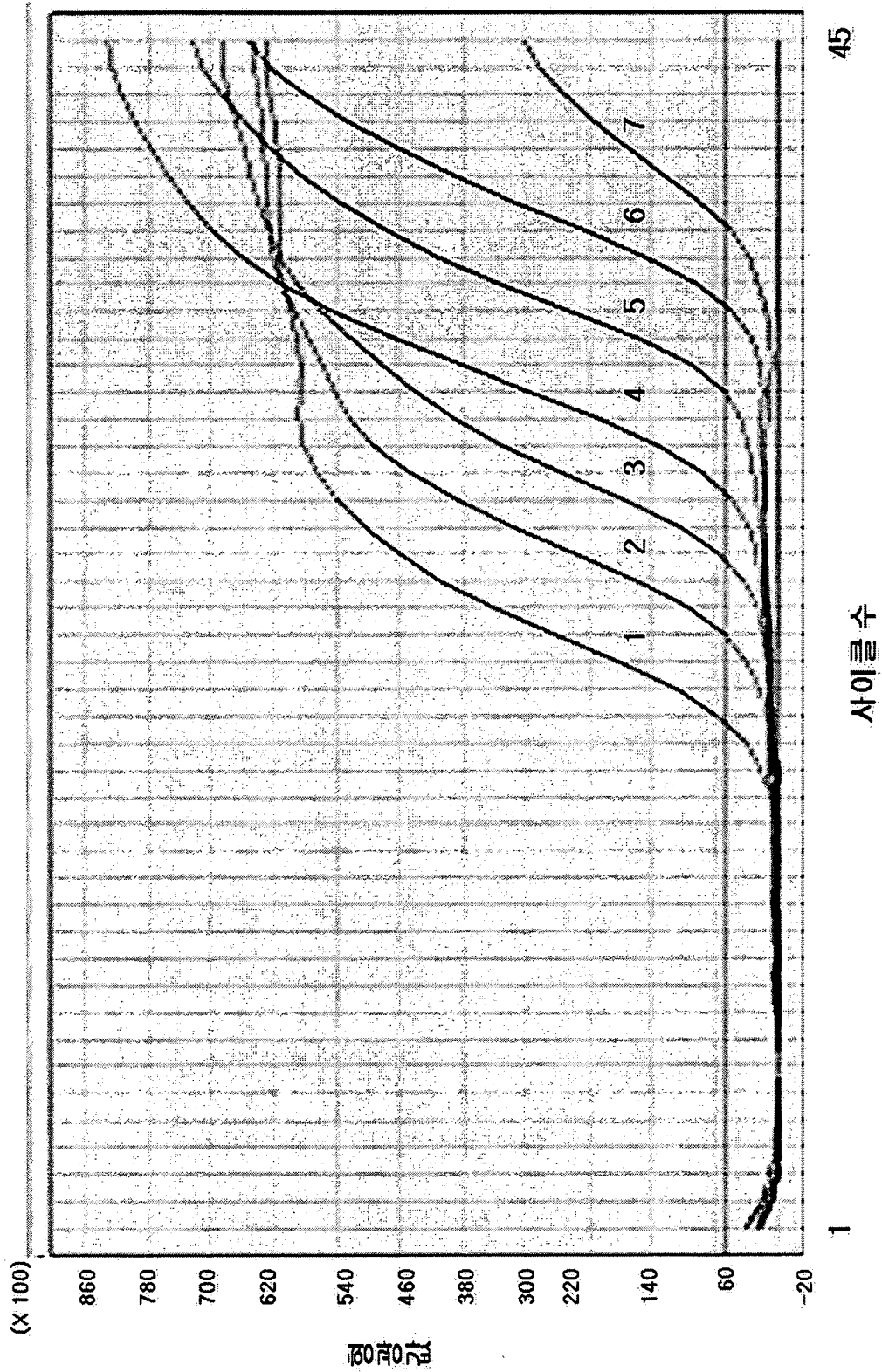
도면
도. 1



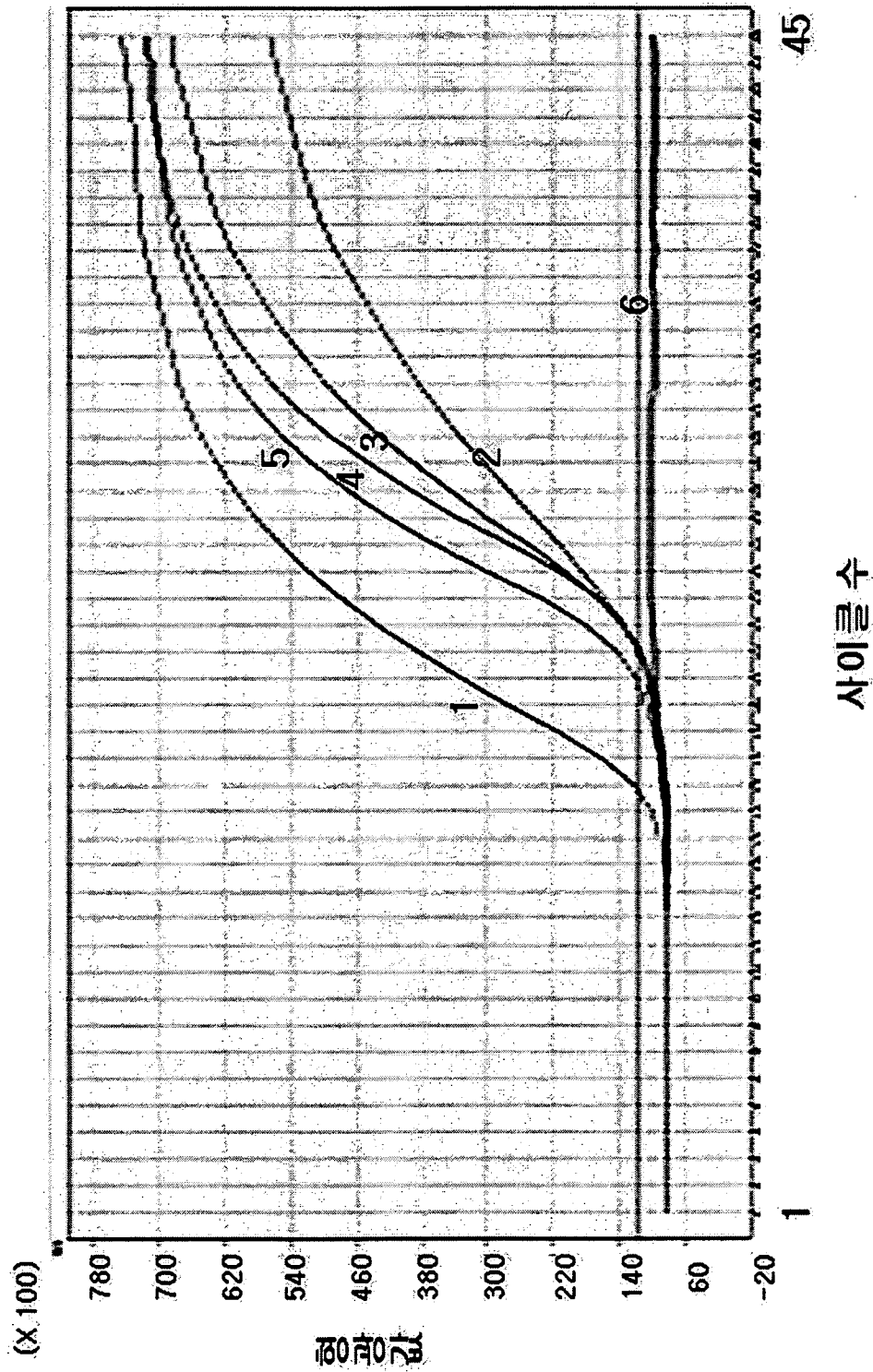
도. 2



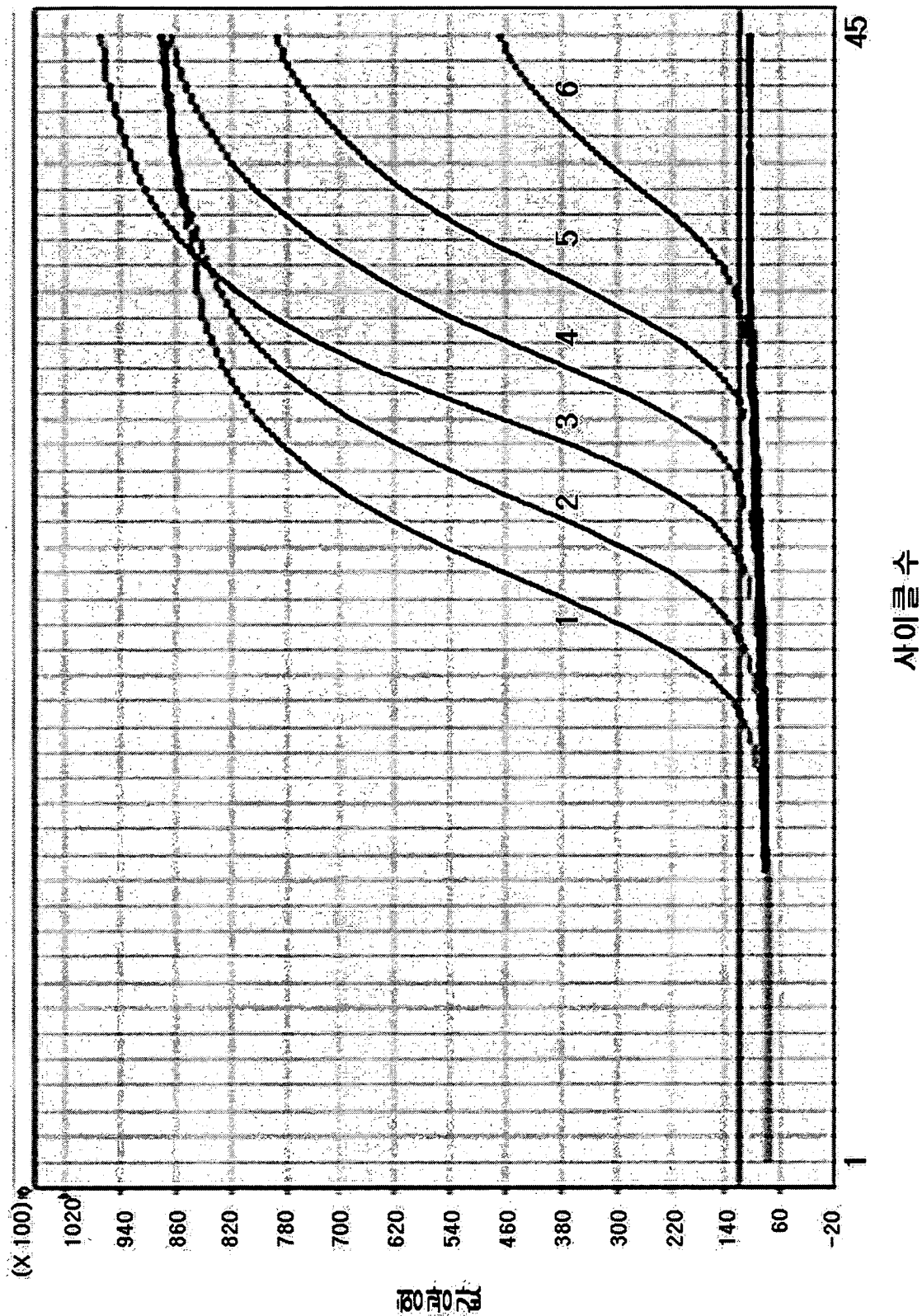
도. 3



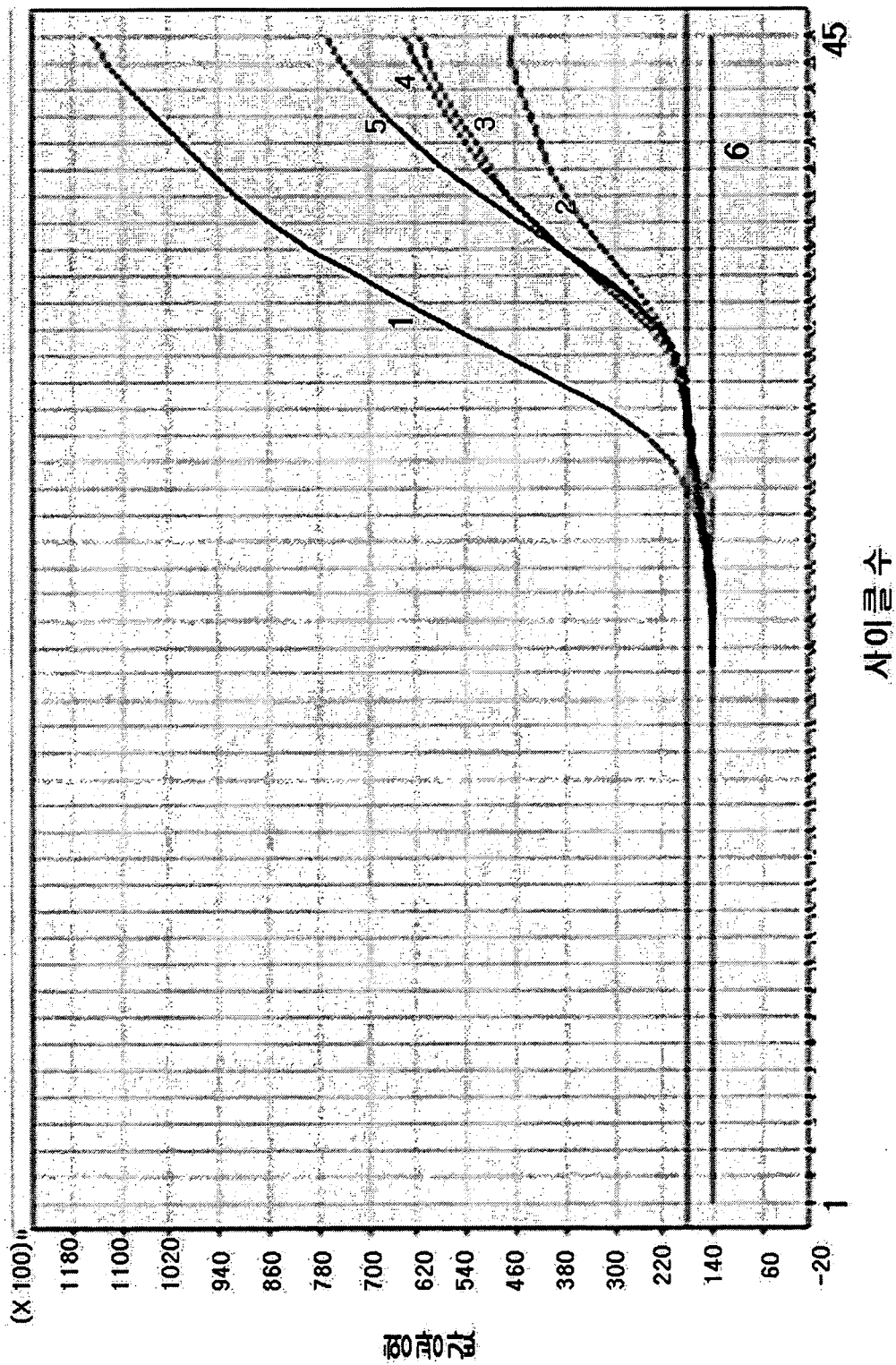
도. 4



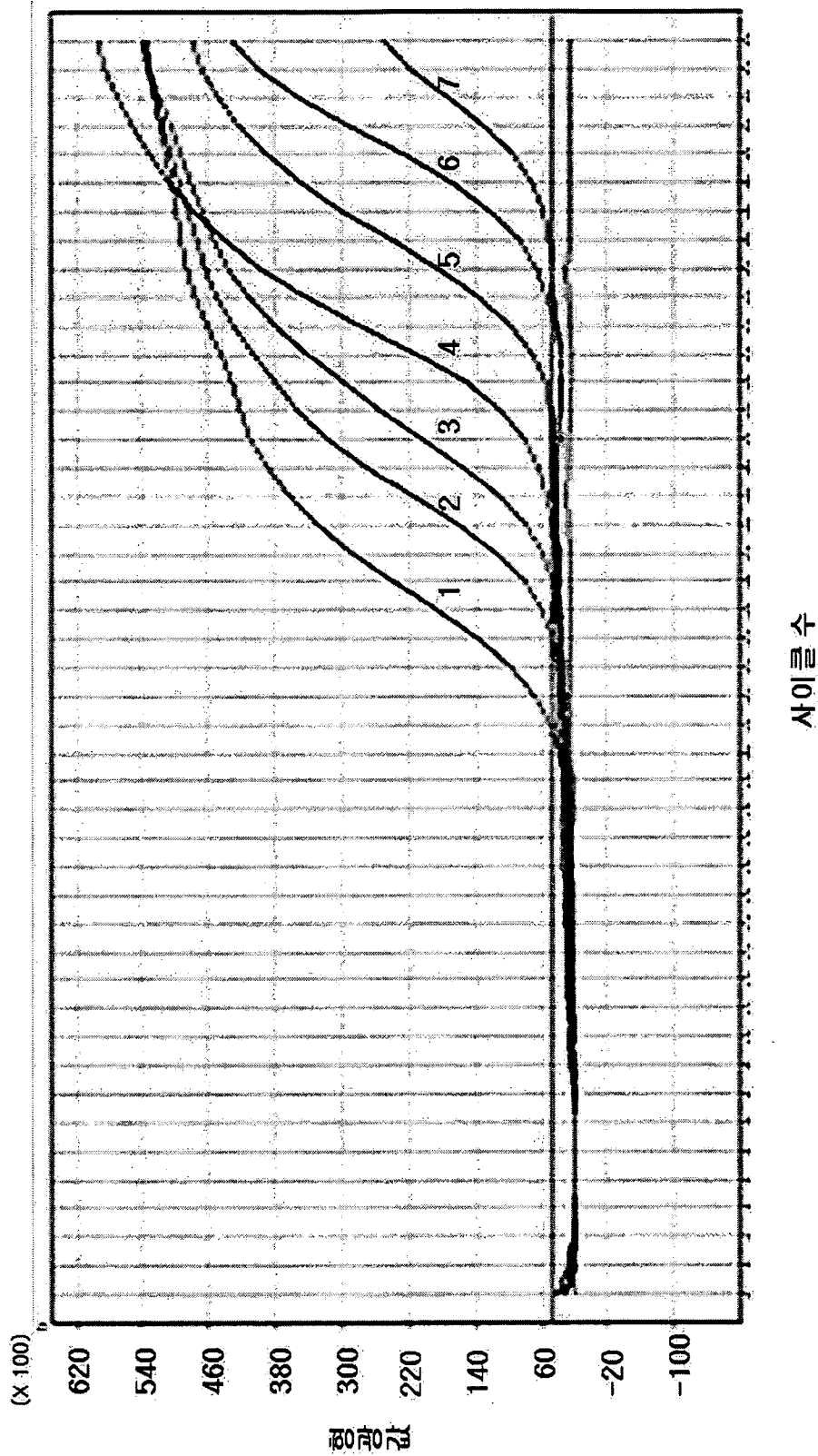
도. 5



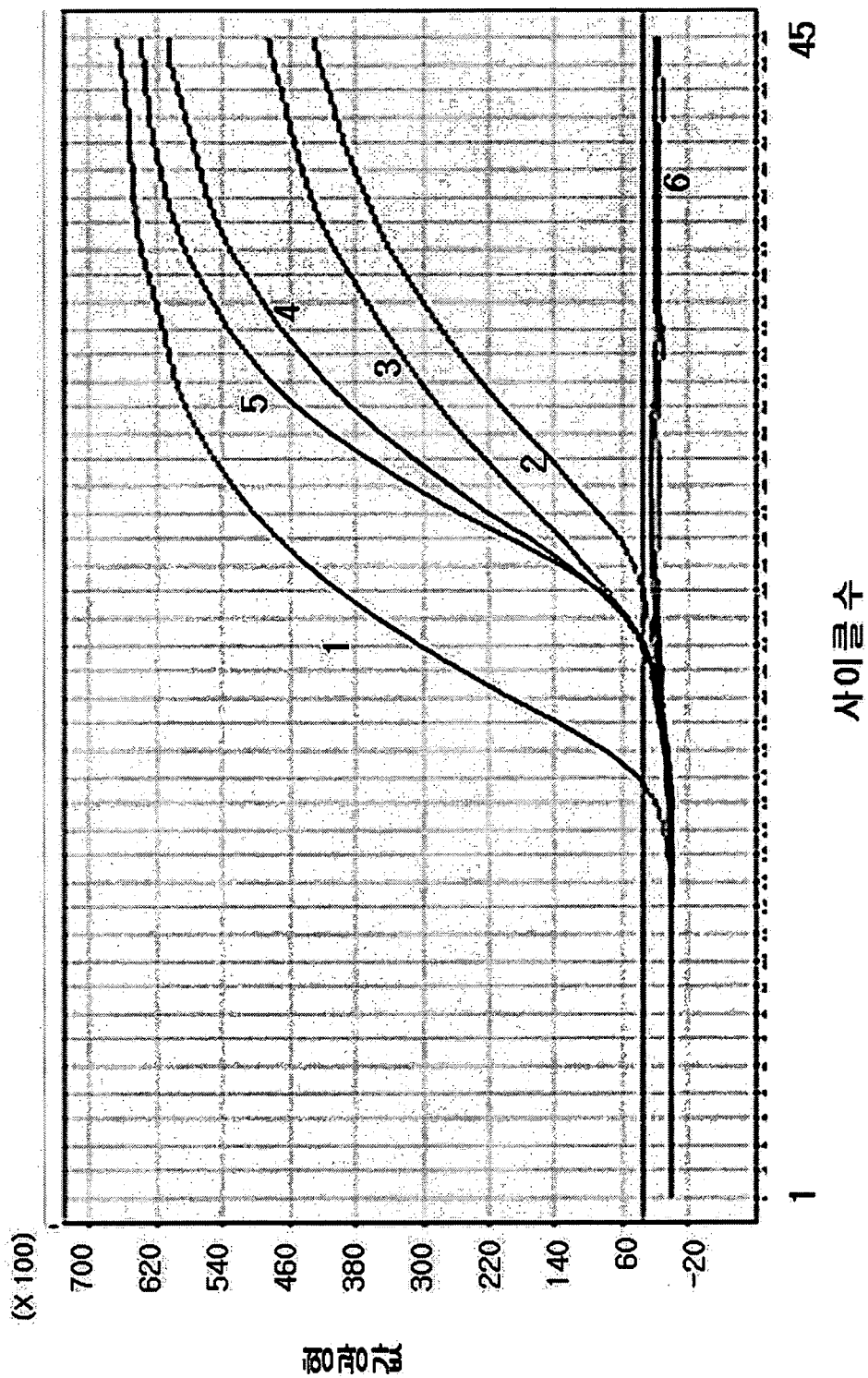
도. 6



도. 7



도. 8



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2009/003168**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12Q 1/68(2006.01)i, C12Q 1/02(2006.01)i, C12R 1/92(2006.01)n, C12R 1/90(2006.01)n***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12Q 1/68, C12Q 1/02, C12R 1/92, C12R 1/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: 'real-time PCR'

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NAGLE, L., et al., 'Real-time PCR-based assay for quantitative detection of Hematodinium sp. in the blue crab Callinectes sapidus.', Dis. Aquat. Organ., 2009.03.09., vol. 84, no. 1, pp. 79-87. See abstract.	1 - 8
A	LI, S., et al., 'Quantification of Fusarium solani f. sp. glycines isolates in soybean roots by colony-forming unit assays and real-time quantitative PCR.', Theor. Appl. Genet., 2008.08., vol. 117, no.3, pp. 343-352. See abstract, materials and methods.	1 - 8
A	US 2007-0141673 A1 (ASIER SAEZ-CIRION, et al.) 21 June 2007 See the entire document.	1 - 8
A	KEEGAN, A.R., et al., 'Cell culture-Taqman PCR assay for evaluation of Cryptosporidium parvum disinfection.', Appl. Environ. Microbiol., 2003.05., vol. 69, no. 5, pp. 2505-2511. See the entire document.	1 - 8
A	EP 1310571 B1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 15 February 2006 See the entire document.	1 - 8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 MARCH 2010 (10.03.2010)

Date of mailing of the international search report

11 MARCH 2010 (11.03.2010)

Name and mailing address of the ISA/

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2009/003168

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2007-0141673 A1	21.06.2007	None	
EP 1310571 B1	15.02.2006	AT 317916 T AU 2002-361573 B2 BR 0214119 A CA 2406745 C CA 2465868 A1 CA 2406745 A1 CN 101426935 A DE 60209193 D1 DE 60209193 T2 DK 1310571 T3 EP 1310571 A3 EP 1310571 A2 EP 1456419 A4 EP 1456419 A2 ES 2258601 T3 HK 1056198 A1 HU 0600229 A2 IL 161827 D0 JP 2003-235562 A JP 2005-525086 A JP 1523-5562nu I I JP 2005-525086 T JP 2009-195237 A JP 3958191 B2 KR 10-2005-0058234 A PA 04004600 A NO 20042183 A NZ 532635 A NZ 548094 A PL 373864 A1 WO 0304-2397A3 WO 2003-042397 A2 WO 2003-042397 A3	15.03.2006 12.06.2008 28.06.2005 10.01.2006 22.05.2003 13.05.2003 06.05.2009 20.04.2006 28.09.2006 19.06.2006 13.08.2003 14.05.2003 09.11.2005 15.09.2004 01.09.2006 16.06.2006 28.06.2006 20.11.2005 26.08.2003 25.08.2005 26.08.2003 25.08.2005 03.09.2009 15.08.2007 16.06.2005 13.08.2004 14.07.2004 31.05.2007 31.07.2008 19.09.2005 05.02.2004 22.05.2003 22.05.2003

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, C12Q 1/02(2006.01)i, C12R 1/92(2006.01)n, C12R 1/90(2006.01)n

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

IPC: C12Q 1/68, C12Q 1/02, C12R 1/92, C12R 1/90

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 'real-time PCR'

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	NAGLE, L., et al., 'Real-time PCR-based assay for quantitative detection of Hematodinium sp. in the blue crab Callinectes sapidus.', Dis. Aquat. Organ., 2009.03.09., vol. 84, no. 1, pp. 79-87. 요약 참조.	1 - 8
A	LI, S., et al., 'Quantification of Fusarium solani f. sp. glycines isolates in soybean roots by colony-forming unit assays and real-time quantitative PCR.', Theor. Appl. Genet., 2008.08., vol. 117, no.3, pp. 343-352. 요약, 재료 및 방법 참조.	1 - 8
A	US 2007-0141673 A1 (ASIER SAEZ-CIRION, et al.) 2007.06.21. 문서 전체 참조.	1 - 8
A	KEEGAN, A.R., et al., 'Cell culture-Taqman PCR assay for evaluation of Cryptosporidium parvum disinfection.', Appl. Environ. Microbiol., 2003.05., vol. 69, no. 5, pp. 2505-2511. 문서 전체 참조.	1 - 8
A	EP 1310571 B1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 2006.02.15. 문서 전체 참조.	1 - 8

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2010년 03월 10일 (10.03.2010)

국제조사보고서 발송일

2010년 03월 11일 (11.03.2010)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 선사로 139,
정부대전청사
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관

이충호

전화번호 82-42-481-8133



제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 대상의 유형



서열목록



서열목록 관련 테이블

b. 대상의 형태



서면



전자적 형태

c. 제출시기



출원시 국제출원에 포함



전자적 형태로 국제출원과 함께 제출



조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록 및/또는 서열목록 관련 테이블에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2007-0141673 A1

2007.06.21

None

EP 1310571 B1

2006.02.15

AT 317916 T	2006.03.15
AU 2002-361573 B2	2008.06.12
BR 0214119 A	2005.06.28
CA 2406745 C	2006.01.10
CA 2465868 A1	2003.05.22
CA 2406745 A1	2003.05.13
CN 101426935 A	2009.05.06
DE 60209193 D1	2006.04.20
DE 60209193 T2	2006.09.28
DK 1310571 T3	2006.06.19
EP 1310571 A3	2003.08.13
EP 1310571 A2	2003.05.14
EP 1456419 A4	2005.11.09
EP 1456419 A2	2004.09.15
ES 2258601 T3	2006.09.01
HK 1056198 A1	2006.06.16
HU 0600229 A2	2006.06.28
IL 161827 D0	2005.11.20
JP 2003-235562 A	2003.08.26
JP 2005-525086 A	2005.08.25
JP 1523-5562nu I I	2003.08.26
JP 2005-525086 T	2005.08.25
JP 2009-195237 A	2009.09.03
JP 3958191 B2	2007.08.15
KR 10-2005-0058234 A	2005.06.16
PA 04004600 A	2004.08.13
NO 20042183 A	2004.07.14
NZ 532635 A	2007.05.31
NZ 548094 A	2008.07.31
PL 373864 A1	2005.09.19
WO 0304-2397A3	2004.02.05
WO 2003-042397 A2	2003.05.22
WO 2003-042397 A3	2003.05.22