



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0036741
(43) 공개일자 2023년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/689 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/689 (2018.05)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0119597

(22) 출원일자 2021년09월08일

심사청구일자 2021년09월08일

(71) 출원인

대한민국 (식품의약품안전처장)

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

김해영

경기도 용인시 수지구 동천로135번길 21, 1307동 901호(동천동, 한빛마을 래미안 이스트팰리스 3단지)

양승민

경기도 김포시 하성면 후평로 101-20

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 9 항

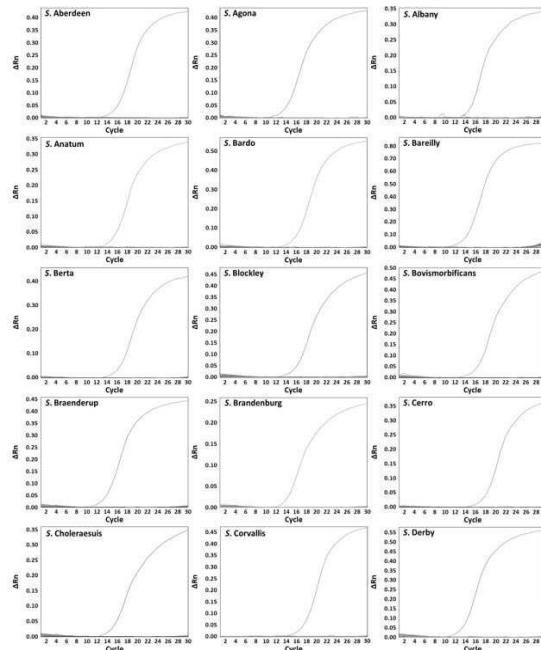
(54) 발명의 명칭 살모넬라 혈청형을 검출할 수 있는 PCR 프라이머 세트 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 살모넬라 혈청형을 검출할 수 있는 PCR 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것으로서, whole genome sequence를 기반으로 한 pan-genome 분석과 real-time PCR법을 사용하여 66개의 혈청형을 하나의 96-well plate로 동시에 검출할 수 있는 방법을 개발하였다. 595개의 대용량 살모넬라 유전체를 효율적으로 분석하였고, 모든

(뒷면에 계속)

대표도 - 도2a



target 혈청형에는 모두 존재하고 다른 혈청형에는 전혀 존재하지 않는 혈청형 특이 바이오마커를 탐색하였다. 이들 바이오마커로부터 혈청형 특이 프라이머를 디자인하였고, 하나의 96-well plate에서 66개의 살모넬라 혈청형을 빠르고 정확하게 검출할 수 있는 real-time PCR법을 개발하였다. 개발된 real-time PCR을 이용하여 426개의 살모넬라 균주 및 29개의 병원성 박테리아 균주에 대한 적용 실험함으로써 개발된 방법의 특이성 및 유효성을 검증하였으며 이 결과로 개발된 real-time PCR법이 66개의 살모넬라 혈청형을 검출하기 위한 high-throughput diagnostic tool로 사용될 수 있음을 시사한다. 또한, 본 발명에서 개발된 방법은 DNA 추출부터 혈청형 예측 결과에 이르기까지 3시간 미만의 시간이 소요되며 샘플 당 하나의 96-well plate만 필요하므로 시간 및 비용 효율적인 방법이다.

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

아주대학교산학협력단

경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)

(72) 발명자

윤현진

경기도 수원시 팔달구 중부대로220번길 10, 101동 1401호(인계동)

김동혁

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제교유번호	1475012501
과제번호	DY0002258539-19162식위생042-1
부처명	식품의약품안전처
과제관리(전문)기관명	식품의약품안전평가원
연구사업명	식품등안전관리(R&D)
연구과제명	RT-PCR에 의한 살모넬라 혈청형 검사법 개발 연구(1)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단(국제캠퍼스)
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

표 1에 기재된 66개의 표적 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자를 유효성분으로 포함하는 살모넬라 혈청형 검출용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 살모넬라 혈청형은 Aberdeen, Agona, Albany, Anatum, Bardo, Bareilly, Berta, Blockley, Bovismorbificans, Braenderup, Brandenburg, Cerro, Choleraesuis, Corvallis, Derby, Dublin, Elisabethville, Enteritidis, Gallinarum, Give, Hadar, Heidelberg, Hindmarsh, I 4,[5],12:i:-, Infantis, Javiana, Kedougou, Kentucky, Kottbus, Litchfield, Livingstone, London, Madelia, Manhattan, Mbandaka, Meleagridis, Menston, Minnesota, Mississippi, Montevideo, Muenchen, Muenster, Newington, Newport, Ohio, Oranienburg, Panama, Paratyphi A, Paratyphi B, Paratyphi C, Poona, Reading, Rissen, Saintpaul, Schwarzengrund, Senftenberg/Dessau, Singapore, Stanley, Tennessee, Thompson, Typhi, Typhimurium, Uganda, Vinohrady, Virchow 및 Weltevreden로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 살모넬라 혈청형인 것을 특징으로 하는 살모넬라 혈청형 검출용 바이오마커 조성물.

청구항 3

표 1에 기재된 66개의 표적 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 살모넬라 혈청형 검출용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 유전자의 발현수준을 측정할 수 있는 제제는 제1항의 표에 기재된 66개의 표적 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 살모넬라 혈청형 검출용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 11 및 서열번호 12로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 13 및 서열번호 14로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 15 및 서열번호 16으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 17 및 서열번호 18로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 19 및 서열번호 20으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 21 및 서열번호 22로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 23 및 서열번호 24로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 25 및 서열번호 26으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 27 및 서열번호 28로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 29 및 서열번호 30으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 31 및 서열번호 32로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 33 및 서열번호 34로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 35 및 서열번호 36으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 37 및 서열번호 38로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 39 및 서열번호 40으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 41 및 서열번호 42로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 43 및 서열번호 44로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 45 및 서열번호 46으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 47 및 서열번호 48로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 49 및 서열번호 50으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 51 및 서열번호 52로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 53 및 서열번호 54로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 55 및 서열번호 56으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 57 및 서열번호 58로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 59 및 서열번호 60으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 61 및 서열번호 62로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 63 및 서열번호 64로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 65 및 서열번호 66으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 67 및 서열번호 68로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 69 및 서열번호 70으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 71 및 서열번호 72로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호

73 및 서열번호 74로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 75 및 서열번호 76으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 77 및 서열번호 78로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 79 및 서열번호 80으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 81 및 서열번호 82로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 83 및 서열번호 84로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 85 및 서열번호 86으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 87 및 서열번호 88로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 89 및 서열번호 90으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 91 및 서열번호 92로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 93 및 서열번호 94로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 95 및 서열번호 96으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 97 및 서열번호 98로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 99 및 서열번호 100으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 101 및 서열번호 102로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 103 및 서열번호 104로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 105 및 서열번호 106으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 107 및 서열번호 108로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 109 및 서열번호 110으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 111 및 서열번호 112로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 113 및 서열번호 114로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 115 및 서열번호 116으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 117 및 서열번호 118로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 119 및 서열번호 120으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 121 및 서열번호 122로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 123 및 서열번호 124로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 125 및 서열번호 126으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 127 및 서열번호 128로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 129 및 서열번호 130으로 표시되는 프라이머 세트 및; 서열번호 131 및 서열번호 132로 표시되는 프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 살모넬라 혈청형 검출용 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 살모넬라 혈청형은 Aberdeen, Agona, Albany, Anatum, Bardo, Bareilly, Berta, Blockley, Bovismorbificans, Braenderup, Brandenburg, Cerro, Choleraesuis, Corvallis, Derby, Dublin, Elisabethville, Enteritidis, Gallinarum, Give, Hadar, Heidelberg, Hindmarsh, I 4,[5],12:i:-, Infantis, Javiana, Kedougou, Kentucky, Kottbus, Litchfield, Livingstone, London, Madelia, Manhattan, Mbandaka, Meleagridis, Menston, Minnesota, Mississippi, Montevideo, Muenchen, Muenster, Newington, Newport, Ohio, Oranienburg, Panama, Paratyphi A, Paratyphi B, Paratyphi C, Poona, Reading, Rissen, Saintpaul, Schwarzengrund, Senftenberg/Dessau, Singapore, Stanley, Tennessee, Thompson, Typhi, Typhimurium, Uganda, Vinohrady, Virchow 및 Weltevreden로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 살모넬라 혈청형인 것을 특징으로 하는 살모넬라 혈청형 검출용 조성물.

청구항 7

제3항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 살모넬라 혈청형 검출용 키트.

청구항 8

(1) 살모넬라에서 DNA를 분리하는 단계;

(2) 상기 분리된 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 11 및 서열번호 12로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 13 및 서열번호 14로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 15 및 서열번호 16으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 17 및 서열번호 18로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 19 및 서열번호 20으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 21 및 서열번호 22로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 23 및 서열번호 24로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 25 및 서열번호 26으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 27 및 서열번호 28로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 29 및 서열번호 30으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 31 및 서열번호 32로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 33 및 서열번호 34로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 35 및 서열번호 36으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 37 및 서열번호 38로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 39 및 서열번호 40으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 41 및 서열번호 42로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 43 및 서열번호 44로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 45 및 서열번호 46으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 47 및 서열번호 48로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 49 및 서열번호 50으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 51 및 서열번호 52로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 53 및 서열번호 54로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 55 및 서열번호 56으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 57 및 서열번호 58로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 59 및 서열번호 60으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 61 및 서

열번호 62로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 63 및 서열번호 64로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 65 및 서열번호 66으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 67 및 서열번호 68로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 69 및 서열번호 70으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 71 및 서열번호 72로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 73 및 서열번호 74로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 75 및 서열번호 76으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 77 및 서열번호 78로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 79 및 서열번호 80으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 81 및 서열번호 82로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 83 및 서열번호 84로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 85 및 서열번호 86으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 87 및 서열번호 88로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 89 및 서열번호 90으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 91 및 서열번호 92로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 93 및 서열번호 94로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 95 및 서열번호 96으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 97 및 서열번호 98로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 99 및 서열번호 100으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 101 및 서열번호 102로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 103 및 서열번호 104로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 105 및 서열번호 106으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 107 및 서열번호 108로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 109 및 서열번호 110으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 111 및 서열번호 112로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 113 및 서열번호 114로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 115 및 서열번호 116으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 117 및 서열번호 118로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 119 및 서열번호 120으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 121 및 서열번호 122로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 123 및 서열번호 124로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 125 및 서열번호 126으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 127 및 서열번호 128로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 129 및 서열번호 130으로 표시되는 프라이머 세트 및; 서열번호 131 및 서열번호 132로 표시되는 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭을 수행하는 단계; 및

(3) 상기 PCR 증폭 산물을 분석하는 단계를 포함하는 살모넬라 혈청형 검출 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 살모넬라 혈청형은 Aberdeen, Agona, Albany, Anatum, Bardo, Bareilly, Berta, Blockley, Bovismorbificans, Braenderup, Brandenburg, Cerro, Choleraesuis, Corvallis, Derby, Dublin, Elisabethville, Enteritidis, Gallinarum, Give, Hadar, Heidelberg, Hindmarsh, I 4,[5],12:i:-, Infantis, Javiana, Kedougou, Kentucky, Kottbus, Litchfield, Livingstone, London, Madelia, Manhattan, Mbandaka, Meleagridis, Menston, Minnesota, Mississippi, Montevideo, Muenchen, Muenster, Newington, Newport, Ohio, Oranienburg, Panama, Paratyphi A, Paratyphi B, Paratyphi C, Poona, Reading, Rissen, Saintpaul, Schwarzengrund, Senftenberg/Dessau, Singapore, Stanley, Tennessee, Thompson, Typhi, Typhimurium, Uganda, Vinohrady, Virchow 및 Weltevreden로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 살모넬라 혈청형인 것을 특징으로 하는 살모넬라 혈청형 검출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 살모넬라 혈청형을 검출할 수 있는 PCR 프라이머 세트 및 이의 용도에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 살모넬라증을 일으키는 살모넬라는 동물과 사람을 감염시켜 공중 보건 문제와 경제적 손실을 야기시킨다. 이것은 유제품, 계란, 육류, 야채 등 오염된 음식을 섭취한 후 12-72 시간 내에 경미한 열, 메스꺼움, 복통 및 설사와 같은 증상을 유발한다. 현재, 살모넬라는 2개의 종과 6개의 아종으로 나뉘며 혈청형은 세 가지 세포 표면 항원인 somatic O-antigen, flagellar H-antigen의 항원 응집(antigenic agglutination) 반응을 통해 2,600가지 이상의 혈청형으로 나뉜다.

[0003] 복잡하고, 시간과 비용이 많이 소모되는 항원 응집(antigenic agglutination)과 생화학적 시험에 의한 혈청형 검출 방법은 점차 분자생물학적 혈청형 분석(molecular serotyping) 방법으로 대체되고 있는 추세이다. 분자생물학적 혈청형 분석(Molecular serotyping) 방법은 O-antigen gene cluster와 H1-, H2-antigen을 암호화하는 fliC, fliB 유전자를 검출하거나 혈청형에 특이적인 유전자 검출로 혈청형 분석을 할 수 있다. 특히, 분자생물학적 혈청형 분석(molecular serotyping) 방법 중, PCR은 살모넬라 혈청형 검출과 임상 진단 및 감시를 신속하게 수행할 수 있는 방법으로 여겨져 왔다. 이 방법은 빠르고 간편할 뿐만 아니라 특이성과 민감도가 높게 혈청

형을 검출할 수 있다는 장점이 있다. 이러한 PCR의 특이성 및 민감성은 대부분 사용된 특이 프라이머에 의존하므로 특이적인 프라이머를 선별하는 것은 높은 효율성을 가진 PCR 방법을 개발하는데 있어 매우 중요하다. 이전 연구에서는 비교유전체 기술을 사용하여 살모넬라 혈청형에 특이적인 유전자를 선별하였고, 이들로부터 특이 프라이머를 개발하였다. 그중 가장 널리 사용되는 유전자에는 Typhimurium을 표적으로 하는 STM0292, STM4200, STM4493 등이 있으며, Enteritidis를 표적으로 하는 SEN1392와 같은 유전자들이 보고되었다. 그러나 최근 연구에서는 이들 유전자가 특이성이 떨어지며 다른 병원성 미생물에 위양성 결과를 나타낸다고 보고되었다. 또한, 이 기술의 현재 제한 요소는 이들 유전자가 많은 혈청형을 검출하지 못하고 주로 가장 일반적인 혈청형에만 초점을 맞추고 있다는 점이다.

[0004] 최근에 whole-genome sequencing 기술이 발전되면서 병원성 미생물에 대한 이해를 향상시키고, 병원성의 발병, 미생물이 가진 독성에 대한 많은 정보가 제공되고 있다. 이러한 whole-genome sequence를 기반으로 한 혈청형 분석법은 빠르고 안정적인 혈청형 정보를 얻고 기존의 분자생물학적 혈청형 분석(molecular serotyping) 방법보다 차별적인 능력을 향상시키는 대체 기술로 사용되고 있다. Whole-genome sequence를 이용한 분석법 중 하나인 pan-genome 분석 방법은 서열 유사성을 기반으로 하며, 병원성 미생물 간 공유되는 필수 유전자의 기능 및 독성에 대해 식별하는데 도움이 된다. 그러나 whole-genome sequence를 기반으로 한 방법들은 많은 샘플을 처리하기 위해 게놈 시퀀싱에 관련된 비용을 고려해야 하며, 생물정보학을 다룰 수 있는 훈련된 연구원이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1529042호(2015.06.10 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 살모넬라 혈청형 검출용 바이오마커 조성물, 상기 바이오마커의 발현수준을 측정할 수 있는 체제를 유효성분으로 포함하는 살모넬라 혈청형 검출용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 살모넬라 혈청형 검출용 키트 및 이를 이용한 살모넬라 혈청형 검출 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 표 1에 기재된 66개의 표적 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자를 유효성분으로 포함하는 살모넬라 혈청형 검출용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 66개의 표적 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 발현수준을 측정할 수 있는 체제를 유효성분으로 포함하는 살모넬라 혈청형 검출용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 살모넬라 혈청형 검출용 키트를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 (1) 살모넬라에서 DNA를 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 11 및 서열번호 12로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 13 및 서열번호 14로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 15 및 서열번호 16으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 17 및 서열번호 18로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 19 및 서열번호 20으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 21 및 서열번호 22로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 23 및 서열번호 24로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 25 및 서열번호 26으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 27 및 서열번호 28로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 29 및 서열번호 30으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 31 및 서열번호 32로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 33 및 서열번호 34로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 35 및 서열번호 36으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 37 및 서열번호 38로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 39 및 서열번호 40으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 41 및 서열번호 42로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 43 및 서열번호 44로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 45 및 서열번호 46으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 47 및 서열번호 48로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 49 및 서열번호 50으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 51 및 서열번호

호 52로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 53 및 서열번호 54로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 55 및 서열번호 56으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 57 및 서열번호 58로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 59 및 서열번호 60으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 61 및 서열번호 62로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 63 및 서열번호 64로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 65 및 서열번호 66으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 67 및 서열번호 68로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 69 및 서열번호 70으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 71 및 서열번호 72로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 73 및 서열번호 74로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 75 및 서열번호 76으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 77 및 서열번호 78로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 79 및 서열번호 80으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 81 및 서열번호 82로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 83 및 서열번호 84로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 85 및 서열번호 86으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 87 및 서열번호 88로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 89 및 서열번호 90으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 91 및 서열번호 92로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 93 및 서열번호 94로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 95 및 서열번호 96으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 97 및 서열번호 98로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 99 및 서열번호 100으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 101 및 서열번호 102로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 103 및 서열번호 104로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 105 및 서열번호 106으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 107 및 서열번호 108로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 109 및 서열번호 110으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 111 및 서열번호 112로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 113 및 서열번호 114로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 115 및 서열번호 116으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 117 및 서열번호 118로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 119 및 서열번호 120으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 121 및 서열번호 122로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 123 및 서열번호 124로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 125 및 서열번호 126으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 127 및 서열번호 128로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 129 및 서열번호 130으로 표시되는 프라이머 세트 및; 서열번호 131 및 서열번호 132로 표시되는 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭을 수행하는 단계; 및 (3) 상기 PCR 증폭 산물을 분석하는 단계를 포함하는 살모넬라 혈청형 검출 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 살모넬라 혈청형을 검출할 수 있는 PCR 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것으로서, whole genome sequence를 기반으로 한 pan-genome 분석과 real-time PCR법을 사용하여 66개의 혈청형을 하나의 96-well plate로 동시에 검출할 수 있는 방법을 개발하였다. 595개의 대용량 살모넬라 유전체를 효율적으로 분석하였고, 모든 target 혈청형에는 모두 존재하고 다른 혈청형에는 전혀 존재하지 않는 혈청형 특이 바이오마커를 탐색하였다. 이들 바이오마커로부터 혈청형 특이 프라이머를 디자인하였고, 하나의 96-well plate에서 66개의 살모넬라 혈청형을 빠르고 정확하게 검출할 수 있는 real-time PCR법을 개발하였다. 개발된 real-time PCR을 이용하여 426개의 살모넬라 균주 및 29개의 병원성 박테리아 균주에 대한 적용 실험함으로써 개발된 방법의 특이성 및 유효성을 검증하였으며 이 결과로 개발된 real-time PCR법이 66개의 살모넬라 혈청형을 검출하기 위한 high-throughput diagnostic tool로 사용될 수 있음을 시사한다. 또한, 본 발명의 방법은 다른 방법들에서 필요로 하는 whole-genome sequencing 분석의 필요성을 완화시키고, O-antigen 및 H-antigen 변이의 검사 또한 한 필요가 없다. 뿐만 아니라, 본 발명에서 개발된 방법은 DNA 추출부터 혈청형 예측 결과에 이르기까지 3시간 미만의 시간이 소요되며 샘플 당 하나의 96-well plate만 필요하므로 시간 및 비용 효율적인 방법이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 66개 살모넬라 혈청형을 검출하기 위한 real-time PCR 96-well plate 레이아웃을 나타낸다. 1, Aberdeen 특이 프라이머 세트; 2, Agona 특이 프라이머 세트; 3, Albany 특이 프라이머 세트; 4, Anatum 특이 프라이머 세트; 5, Bardo 특이 프라이머 세트; 6, Bareilly 특이 프라이머 세트; 7, Berta 특이 프라이머 세트; 8, Blockley 특이 프라이머 세트; 9, Bovismorbificans 특이 프라이머 세트; 10, Braenderup 특이 프라이머 세트; 11, Brandenburg 특이 프라이머 세트; 12, Cerro 특이 프라이머 세트; 13, Choleraesuis 특이 프라이머 세트; 14, Corvallis 특이 프라이머 세트; 15, Derby 특이 프라이머 세트; 16, Dublin 특이 프라이머 세트; 17, Elisabethville 특이 프라이머 세트; 18, Enteritidis 특이 프라이머 세트; 19, Gallinarum 특이 프라이머 세트; 20, Give 특이 프라이머 세트; 21, Hadar 특이 프라이머 세트; 22, Heidelberg 특이 프라이머 세트; 23, Hindmarsh 특이 프라이머 세트; 24, I 4,[5],12:i:- 특이 프라이머 세트; 25, Infantis 특이 프라이머 세트; 26, Javiana 특이 프라이머 세트; 27, Kedougou 특이 프라이머 세트; 28, Kentucky 특이 프라이머 세트; 29,

Kottbus 특이 프라이머 세트; 30, Litchfield 특이 프라이머 세트; 31, Livingstone 특이 프라이머 세트; 32, London 특이 프라이머 세트; 33, Madelia 특이 프라이머 세트; 34, Manhattan 특이 프라이머 세트; 35, Mbandaka 특이 프라이머 세트; 36, Meleagridis 특이 프라이머 세트; 37, Menston 특이 프라이머 세트; 38, Minnesota 특이 프라이머 세트; 39, Mississippi 특이 프라이머 세트; 40, Montevideo 특이 프라이머 세트; 41, Muenchen 특이 프라이머 세트; 42, Muenster 특이 프라이머 세트; 43, Newington 특이 프라이머 세트; 44, Newport 특이 프라이머 세트; 45, Ohio 특이 프라이머 세트; 46, Oranienburg 특이 프라이머 세트; 47, Panama 특이 프라이머 세트; 48, Paratyphi A 특이 프라이머 세트; 49, Paratyphi B 특이 프라이머 세트; 50, Paratyphi C 특이 프라이머 세트; 51, Poona 특이 프라이머 세트; 52, Reading 특이 프라이머 세트; 53, Rissen 특이 프라이머 세트; 54, Saintpaul 특이 프라이머 세트; 55, Schwarzengrund 특이 프라이머 세트; 56, Senftenberg/Dessau 특이 프라이머 세트; 57, Singapore 특이 프라이머 세트; 58, Stanley 특이 프라이머 세트; 59, Tennessee 특이 프라이머 세트; 60, Thompson 특이 프라이머 세트; 61, Typhi 특이 프라이머 세트; 62, Typhimurium 특이 프라이머 세트; 63, Uganda 특이 프라이머 세트; 64, Vinohrady 특이 프라이머 세트; 65, Virchow 특이 프라이머 세트; 66, Weltevreden 특이 프라이머 세트; IPC, Internal Positive Control; NTC, No Template Control.

도 2는 본 발명의 프라이머 세트의 특이성을 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 Real-time PCR의 증폭곡선 및 표준곡선을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이에, 본 발명에서는 정확하게 혈청형 특이 바이오마커를 탐색할 수 있는 pan-genome 분석과 혈청형을 빠르게 검출할 수 있는 real-time PCR법을 결합하였다. 66개의 살모넬라 혈청형을 정확하게 식별하기 위해, 본 발명에서는 대규모 살모넬라 계통으로부터 바이오마커를 효율적으로 선별하기 위해 개발한 *in silico* scheme을 사용하여 바이오마커를 선별하였다. 선별된 바이오마커로부터 혈청형 특이 프라이머를 개발하고 개발된 프라이머로 하나의 96-well plate로 66개의 살모넬라 혈청형을 동시에 검출할 수 있는 real-time PCR법을 개발하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0014] 본 발명은 표 1에 기재된 66개의 표적 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자를 유효성분으로 포함하는 살모넬라 혈청형 검출용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0015] 바람직하게는, 상기 살모넬라 혈청형은 Aberdeen, Agona, Albany, Anatum, Bardo, Bareilly, Berta, Blockley, Bovismorbificans, Braenderup, Brandenburg, Cerro, Choleraesuis, Corvallis, Derby, Dublin, Elisabethville, Enteritidis, Gallinarum, Give, Hadar, Heidelberg, Hindmarsh, I 4,[5],12:i:-, Infantis, Javiana, Kedougou, Kentucky, Kottbus, Litchfield, Livingstone, London, Madelia, Manhattan, Mbandaka, Meleagridis, Menston, Minnesota, Mississippi, Montevideo, Muenchen, Muenster, Newington, Newport, Ohio, Oranienburg, Panama, Paratyphi A, Paratyphi B, Paratyphi C, Poona, Reading, Rissen, Saintpaul, Schwarzengrund, Senftenberg/Dessau, Singapore, Stanley, Tennessee, Thompson, Typhi, Typhimurium, Uganda, Vinohrady, Virchow 및 Weltevreden로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 살모넬라 혈청형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명에 있어서, “마커(marker)”는 유전적으로 불특정 연관된 유전자좌를 동정할 때 참고점으로 사용되는 염기서열을 말한다. 이 용어는 또한 마커 서열을 증폭할 수 있는 프라이머 세트에 사용되는 핵산과 같은 마커 서열에 상보적인 핵산 서열에도 적용된다. 분자 마커(molecular marker)의 유전자 지도상의 위치는 유전자좌(genetic locus)로 일컬어진다.
- [0017] 또한, 본 발명은 표 1에 기재된 66개의 표적 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 살모넬라 혈청형 검출용 조성물을 제공한다.
- [0018] 바람직하게는, 상기 유전자의 발현수준을 측정할 수 있는 제제는 표 1에 기재된 66개의 표적 유전자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0019] 보다 바람직하게는, 상기 프라이머는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 11 및 서

열번호 12로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 13 및 서열번호 14로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 15 및 서열번호 16으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 17 및 서열번호 18로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 19 및 서열번호 20으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 21 및 서열번호 22로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 23 및 서열번호 24로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 25 및 서열번호 26으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 27 및 서열번호 28로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 29 및 서열번호 30으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 31 및 서열번호 32로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 33 및 서열번호 34로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 35 및 서열번호 36으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 37 및 서열번호 38로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 39 및 서열번호 40으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 41 및 서열번호 42로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 43 및 서열번호 44로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 45 및 서열번호 46으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 47 및 서열번호 48로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 49 및 서열번호 50으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 51 및 서열번호 52로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 53 및 서열번호 54로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 55 및 서열번호 56으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 57 및 서열번호 58로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 59 및 서열번호 60으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 61 및 서열번호 62로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 63 및 서열번호 64로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 65 및 서열번호 66으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 67 및 서열번호 68로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 69 및 서열번호 70으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 71 및 서열번호 72로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 73 및 서열번호 74로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 75 및 서열번호 76으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 77 및 서열번호 78로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 79 및 서열번호 80으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 81 및 서열번호 82로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 83 및 서열번호 84로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 85 및 서열번호 86으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 87 및 서열번호 88로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 89 및 서열번호 90으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 91 및 서열번호 92로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 93 및 서열번호 94로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 95 및 서열번호 96으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 97 및 서열번호 98로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 99 및 서열번호 100으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 101 및 서열번호 102로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 103 및 서열번호 104로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 105 및 서열번호 106으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 107 및 서열번호 108로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 109 및 서열번호 110으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 111 및 서열번호 112로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 113 및 서열번호 114로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 115 및 서열번호 116으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 117 및 서열번호 118로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 119 및 서열번호 120으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 121 및 서열번호 122로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 123 및 서열번호 124로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 125 및 서열번호 126으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 127 및 서열번호 128로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 129 및 서열번호 130으로 표시되는 프라이머 세트 및; 서열번호 131 및 서열번호 132로 표시되는 프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0020] 본 발명에 있어서, "프로브"는 DNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링되어 있어서 특정 DNA의 존재 유무, 발현량을 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 적절한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 증폭하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity) 뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다. 본 발명에 있어서, 프라이머로 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 살모넬라 혈청형 검출용 키트를 제공한다.

[0023] 본 발명의 상기 프라이머 세트 이외에, PCR 키트에 포함되는 통상적인 구성성분을 포함할 수 있다. 상기 키트에 포함되는 통상적인 구성성분은 반응완충액, 증합효소, dNTP(dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP) 및 Mg^{2+} 와 같은 보조인자(cofactor) 등일 수 있다. 다양한 DNA 증합효소가 본 발명의 증폭 단계에 이용될 수 있으며, *E. coli* DNA 중

합효소 I의 클레나우 단편, 열안정성 DNA 중합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 중합효소를 포함한다. 바람직하게는, 중합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 중합효소이다. 상기 중합효소 대부분은 박테리아 그 자체로부터 분리될 수 있고 또는 상업적으로 구입할 수 있다.

[0024]

또한, 본 발명은 (1) 살모넬라에서 DNA를 분리하는 단계; (2) 상기 분리된 DNA를 주형으로 하고, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 9 및 서열번호 10으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 11 및 서열번호 12로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 13 및 서열번호 14로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 15 및 서열번호 16으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 17 및 서열번호 18로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 19 및 서열번호 20으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 21 및 서열번호 22로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 23 및 서열번호 24로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 25 및 서열번호 26으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 27 및 서열번호 28로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 29 및 서열번호 30으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 31 및 서열번호 32로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 33 및 서열번호 34로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 35 및 서열번호 36으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 37 및 서열번호 38로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 39 및 서열번호 40으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 41 및 서열번호 42로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 43 및 서열번호 44로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 45 및 서열번호 46으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 47 및 서열번호 48로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 49 및 서열번호 50으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 51 및 서열번호 52로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 53 및 서열번호 54로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 55 및 서열번호 56으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 57 및 서열번호 58로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 59 및 서열번호 60으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 61 및 서열번호 62로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 63 및 서열번호 64로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 65 및 서열번호 66으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 67 및 서열번호 68로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 69 및 서열번호 70으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 71 및 서열번호 72로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 73 및 서열번호 74로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 75 및 서열번호 76으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 77 및 서열번호 78로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 79 및 서열번호 80으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 81 및 서열번호 82로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 83 및 서열번호 84로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 85 및 서열번호 86으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 87 및 서열번호 88로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 89 및 서열번호 90으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 91 및 서열번호 92로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 93 및 서열번호 94로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 95 및 서열번호 96으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 97 및 서열번호 98로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 99 및 서열번호 100으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 101 및 서열번호 102로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 103 및 서열번호 104로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 105 및 서열번호 106으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 107 및 서열번호 108로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 109 및 서열번호 110으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 111 및 서열번호 112로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 113 및 서열번호 114로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 115 및 서열번호 116으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 117 및 서열번호 118로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 119 및 서열번호 120으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 121 및 서열번호 122로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 123 및 서열번호 124로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 125 및 서열번호 126으로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 127 및 서열번호 128로 표시되는 프라이머 세트, 서열번호 129 및 서열번호 130으로 표시되는 프라이머 세트 및; 서열번호 131 및 서열번호 132로 표시되는 프라이머 세트에 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭을 수행하는 단계; 및 (3) 상기 PCR 증폭 산물을 분석하는 단계를 포함하는 살모넬라 혈청형 검출 방법을 제공한다.

[0025]

바람직하게는, 상기 살모넬라 혈청형은 Aberdeen, Agona, Albany, Anatum, Bardo, Bareilly, Berta, Blockley, Bovismorbificans, Braenderup, Brandenburg, Cerro, Choleraesuis, Corvallis, Derby, Dublin, Elisabethville, Enteritidis, Gallinarum, Give, Hadar, Heidelberg, Hindmarsh, I 4,[5],12:i:-, Infantis, Javiana, Kedougou, Kentucky, Kottbus, Litchfield, Livingstone, London, Madelia, Manhattan, Mbandaka, Meleagridis, Menston, Minnesota, Mississippi, Montevideo, Muenchen, Muenster, Newington, Newport, Ohio, Oranienburg, Panama, Paratyphi A, Paratyphi B, Paratyphi C, Poona, Reading, Rissen, Saintpaul, Schwarzengrund, Senftenberg/Dessau, Singapore, Stanley, Tennessee, Thompson, Typhi, Typhimurium, Uganda, Vinohrady, Virchow 및 Weltevreden로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 살모넬라 혈청형일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0026] 살모넬라에서 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있다. 또한, PCR이란 증합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.
- [0027] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.
- [0028] <실험예>
- [0029] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0030] **1. 계능 선별 및 유전체 분석**
- [0031] 66개의 살모넬라 혈청형의 특이 바이오마커를 선별하기 위해 국내외 살모넬라 식중독 발생 빈도수가 높고 임상 병리학적으로 중요한 혈청형으로 선별하였다. 선별된 대상 혈청형은 다음과 같다: Aberdeen, Agona, Albany, Anatum, Bardo, Bareilly, Berta, Blockley, Bovismorbificans, Braenderup, Brandenburg, Cerro, Choleraesuis, Corvallis, Derby, Dublin, Elisabethville, Enteritidis, Gallinarum, Give, Hadar, Heidelberg, Hindmarsh, I 4,[5],12:i:-, Infantis, Javiana, Kedougou, Kentucky, Kottbus, Litchfield, Livingstone, London, Madelia, Manhattan, Mbandaka, Meleagridis, Menston, Minnesota, Mississippi, Montevideo, Muenchen, Muenster, Newington, Newport, Ohio, Oranienburg, Panama, Paratyphi A, Paratyphi B, Paratyphi C, Poona, Reading, Rissen, Saintpaul, Schwarzengrund, Senftenberg/Dessau, Singapore, Stanley, Tennessee, Thompson, Typhi, Typhimurium, Uganda, Vinohrady, Virchow, Weltevreden. 66개의 혈청형에 대한 genome sequence 595개를 미국국립생물공학정보센터 (NCBI)로부터 얻었다. 595개 살모넬라 genome sequence는 Anvi'o v6.1 패키지에 구현된 pangenomics workflow를 사용하여 분석하였다. 혈청형 특이 후보 바이오마커는 Bacterial Pan Genome Analysis (BPGA) pipeline v1.3을 사용하여 선별하였다. Annotation된 genome sequence를 input으로 사용하여 USEARCH v9.0 클러스터링 알고리즘을 사용하여 기본 컷오프 값으로 분석하였다. 혈청형 특이 후보 바이오마커는 타겟으로하는 혈청형의 genome에는 모두 존재하면서 타겟을 제외한 나머지 살모넬라 genome에는 존재하지 않는 유전자로 선별하였다. 선별된 후보 바이오마커는 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)을 통해 57,014,819개의 박테리아 sequence와 대조하였고, 타겟 혈청형을 제외한 나머지 모든 박테리아에는 없는 유전자를 최종으로 선별하였다. 최종으로 선별된 66개의 혈청형 특이 바이오마커를 595개의 genome sequence와 대조하였고, 이들 바이오마커로부터 혈청형 특이 프라이머를 디자인하였다.
- [0032] **2. Bacterial strains의 배양 및 DNA 추출**
- [0033] 426개의 살모넬라 균주와 29개의 병원성 박테리아는 균주은행으로 부터 얻었다. 모든 균주는 37℃에서 18시간 동안 TSB 배지에서 배양하였다. 배양된 박테리아의 DNA를 추출하기 위해 4℃에서 10분 동안 13,600×g에서 10분 동안 원심분리하고 상층액을 제거하였고, DNeasy Blood & Tissue kit를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 농도 및 순도는 MeastoNano®분광광도계 (Maestrogen, Las Vegas, NV, USA)를 사용하여 결정하였다.
- [0034] **3. 디자인된 프라이머의 특이성 및 정확성**
- [0035] 디자인된 프라이머의 특이성 및 정확성을 확인하기 위해 real-time PCR을 수행하였다. Real-time PCR은 7500 Fast Real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하였다. Real-time PCR을 위한 mixture 조성은 20 ng 의 DNA, 500 nM 의 primer pairs, 10 µL 의 2× Thunderbird SYBR®qPCR Mix (Toyobo, Osaka, Japan)로 구성되어 있고 증류수로 총 20 µL의 부피를 맞추었다. Real-time PCR은 다음과 같은 조건에서 수행되었다: 초기 95℃에서 2분, 이후 95℃에서 5초 및 60℃에서 30초로 35회 반복. 용해 곡선 (melting curve)을 작성하기 위한 조건은 다음과 같다: 95℃에서 15초, 60℃에서 1분, 95℃에서 30초 및 60℃에서 15초. 프라이머의 특이성은 66개의 살모넬라 혈청형으로 수행하였고, 정확성을 평가하기 위해, 각 살모넬라 균주로부터 DNA를 연속적으로 희석 (20~0.002 ng)하여 표준곡선을 3회 생성하였다. Real-time PCR 결과는 7500 software v2.3 (Applied Biosystems)를 사용하여 확인하였다.
- [0036] **4. 개발된 real-time PCR 및 96-well plate의 적용 실험**
- [0037] 본 발명에서 본 발명자들은 real-time PCR을 이용하여 하나의 96-well plate로 66개의 살모넬라 혈청형을 동시

에 검출할 수 있는 방법을 개발하였다. 이 방법은 real-time PCR 분석으로 각 특정 프라이머가 하나의 96-well plate에서 독립적으로 실행된다(도 1). 개발된 real-time PCR법은 살모넬라 혈청형까지 확인된 424개의 균주와 살모넬라 종까지 확인된 2개의 균주, 29개의 살모넬라가 아닌 다른 병원성 균주의 DNA를 사용하여 적용하였다. 20 ng의 각 균주의 DNA를 66종의 프라이머와 2× Thunderbird SYBR®qPCR Mix (Toyobo)를 함유한 96-well plate의 각 well에 첨가하였다. 그 후, 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems)을 이용하여 real-time PCR을 수행하였다. Real-time PCR의 조건은 “2.3. 디자인된 프라이머의 특이성 및 정확성”에 표기된 조건과 동일하다. 이 분석에서는 각 well에 하나의 특이 프라이머 세트를 포함하므로, 68개의 well이 하나의 박테리아를 검출하기 위해 모두 사용되었고, real-time PCR의 결과는 혈청형 특이 프라이머를 함유하는 well에서 증폭되었을 때 상응하는 혈청형이 검출된 것으로 판단되었다.

[0038] <실시예>

[0039] 1. 유전체 분석 결과

[0040] 유전체 분석을 통해 얻어진 대부분의 혈청형 특이 바이오마커는 표적(target) 혈청형에서 99~100% 동일성을 나타내었고, 표적(target)을 제외한 나머지 혈청형에서는 0~50%의 동일성을 나타내었다. 이들 바이오마커에 대한 정보는 표 1에 제시되어 있다. 선별된 바이오마커의 특이성을 확인하기 위해 595개의 살모넬라 genome sequence와 66개의 혈청형 특이 바이오마커에 대해 대조하였다. 각 genome에 대한 혈청형 특이 바이오마커의 존재/부재에 관한 matrix는 청색 (유사성이 높음)에서 황색 (유사성이 낮음)의 색상 코드로 지정되었고 heatmap 형태로 표시하였다. Heatmap에 따르면, 혈청형 특이 바이오마커는 표적(target)으로 하는 혈청형의 genome에 대부분 존재하였다. 그러나 Enteritidis의 경우 88개의 genome에서는 99~100%의 동일성으로 특이 바이오마커가 존재하였지만, 하나의 genome에서는 Enteritidis 특이 바이오마커가 존재하지 않았다. 이 genome에는 Enteritidis 특이 바이오마커 대신 Typhimurium의 바이오마커가 존재하였고, 이 genome은 pan-genome 분석 결과에서도 Enteritidis가 아닌 Typhimurium으로 확인된 genome이다. Typhimurium의 경우 48개의 genome에서 100%의 동일성으로 바이오마커가 존재했지만 3개의 Typhimurium에서는 Typhimurium 바이오마커 대신 I 4,[5],12:i:-과 Enteritidis, Tennessee에 대한 바이오마커를 각각 보유하고 있었고, 이들 또한 pan-genome에서 확인된 결과와 동일하였다. Paratyphi B의 경우 2개의 genome에서 바이오마커가 100% 동일성으로 존재하였지만 나머지 2개의 genome에서는 Typhimurium과 Agona의 바이오마커를 보유하고 있었다. 따라서 본 발명에서는 표적(target)으로 하는 혈청형의 genome에는 모두 존재하면서 비-표적(non-target)으로 하는 혈청형에는 존재하지 않는 바이오마커를 선별할 수 있었을 뿐만 아니라 잘못된 genome의 정보 또한 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 하여 살모넬라 혈청형을 정확하게 검출할 수 있는 특이 프라이머를 디자인하였다(표 2).

표 1

번호	Serovar	Target gene	Accession no.	Size (bp)
1	Aberdeen	Glycosyl transferase family 1	SQH80039.1	1,101
2	Agona	Hypothetical protein	ACH51233.1	1,284
3	Albany	Type II restriction endonuclease subunit R	APV71773.1	1,404
4	Anatum	Hypothetical protein	AHW13895.1	681
5	Bardo	Hypothetical protein	APY39417.1	636
6	Bareilly	Hypothetical protein	QGJ28052.1	1,113
7	Berta	Hypothetical protein	ESH53086.1	522
8	Blockley	RNA-dependent DNA polymerase	EBW8522522.1	1,193
9	Bovismorbificans	Hypothetical protein	CDF56891.1	612
10	Braenderup	Hypothetical protein	ASO31941.1	384
11	Brandenburg	Restriction endonuclease subunit S	KNN28838.1	642
12	Cerro	Hypothetical protein	ALI12694.1	1,008
13	Choleraesuis	LD-carboxypeptidase A	EFZ05851.1	966
14	Corvallis	Hypothetical protein	AWD06828.1	990
15	Derby	Replicase family protein	KMM40244.1	846
16	Dublin	Conserved hypothetical protein	ACH74104.1	1,161
17	Elisabethville	Hypothetical protein	EBS4171315.1	1,116
18	Enteritidis	Putative phage membrane protein	CAR32961.1	537
19	Gallinarum	Hypothetical protein	AKW12500.1	1,020
20	Give	DUF1269 domain-containing protein	OZU63064.1	1,662

21	Hadar	Hypothetical protein	KKD96963.1	507
22	Heidelberg	Abortive infection protein	QGF81602.1	1,722
23	Hindmarsh	Hypothetical protein	KTX76082.1	1,926
24	I 4,[5],12:i:-	Hypothetical protein	QGX33576.1	231
25	Infantis	USG protein	CEI43307.1	873
26	Javiana	Hypothetical protein	QDI87568.1	714
27	Kedougou	FRG domain-containing protein	EBU9135186.1	1,410
28	Kentucky	Hypothetical protein	AUW50116.1	453
29	Kottbus	Phage tail protein	EDL0140664.1	1,479
30	Litchfield	Hypothetical protein	KNL82901.1	1,110
31	Livingstone	ABC transporter permease subunit	HAB5790955.1	909
32	London	Hypothetical protein	ESJ48773.1	536
33	Madelia	Transposase and inactivated derivatives	SUH67053.1	762
34	Manhattan	Reverse transcriptase	ASO47481.1	2,019
35	Mbandaka	Hypothetical protein	AYP83194.1	1,824
36	Meleagridis	Hypothetical protein	TSE72805.1	2,961
37	Menston	DUF4238 domain-containing protein	ECG3796773.1	918
38	Minnesota	Amylovoran biosynthesis protein AmsE	APV92647.1	810
39	Mississippi	AAA family ATPas	EDN5268668.1	4,248
40	Montevideo	Hypothetical protein	AHW10654.1	1,767
41	Muenchen	Hypothetical protein	QGH07522.1	810
42	Muenster	Hypothetical protein	AUM47824.1	1,365
43	Newington	Hypothetical protein	ECJ7339255.1	195
44	Newport	Hypothetical protein	ALP98662.1	843
45	Ohio	Adenosylhomocysteinase	AXE13015.1	1,152
46	Oranienburg	Hypothetical protein	AUM45051.1	1,392
47	Panama	Hypothetical protein	AKW08656.1	1,194
48	Paratyphi A	Hypothetical protein	EPE45529.1	246
49	Paratyphi B	Putative bacteriophage protein	ESF91711.1	1,200
50	Paratyphi C	Terminase large subunit	ACN45460.1	1,479
51	Poona	Glycosyltransferase	SQJ10189.1	1,017
52	Reading	Hypothetical protein	KNL67516.1	681
53	Rissen	Helicase domain-containing protein	ELX22432.1	2,502
54	Saintpaul	Hypothetical protein	ASO37389.1	2,277
55	Schwarzengrund	Y4bN protein	ACF91479.1	2,445
56	Senftenberg/Dessau	FRG domain	CRY85796.1	822
57	Singapore	DNA adenine methylase	EDA1367050.1	673
58	Stanley	Hypothetical protein	QBG28938.1	2,142
59	Tennessee	Hypothetical protein	AMW53127.1	306
60	Thompson	Hypothetical protein	AGX13681.1	1,779
61	Typhi	Host-nuclease inhibitor protein Gam	ALG16175.1	531
62	Typhimurium	Putative outer membran	AAL23519.1	558
63	Uganda	BREX-1 system phosphatase PglZ type A	TSB75053.1	2,604
64	Vinohrady	Haloacid dehalogenase-like hydrolase	ECE8801113.1	684
65	Virchow	Hypothetical protein	ESE99108.1	849
66	Weltevreden	Putative phosphatase	CUS01310.1	648

표 2

Serovar	Name	Primer sequences (5'→3')	Size (bp)
Aberdeen	Aberdeen-F	AAC AAC GGG TAC AGG GAT TA (서열번호 1)	131
	Aberdeen-R	AAT CCT TAT TAT CGT CCC CA (서열번호 2)	
Agona	Agona-F	GCA TCT GGC GGT AAG TCA TA (서열번호 3)	190
	Agona-R	GTG AGC GTA ATG GGG ATG TA (서열번호 4)	
Albany	Albany-F	TAG TCA GGT AGC ACC GAG TT (서열번호 5)	163
	Albany-R	ACG CCA TGT AGA TTC GTT AT (서열번호 6)	

Anatum	Anatum-F	AAA GCA CCC TGA GTC AGA TG (서열번호 7)	143
	Anatum-R	CAA GTC CAC CGA CTG CTC TA (서열번호 8)	
Bardo	Bardo-F	CGC CAG TCT CTG CAT TAT CT (서열번호 9)	160
	Bardo-R	GTC GAG TAC AAC CGC CTG AT (서열번호 10)	
Bareilly	Bareilly-F	GGT GGT AGT ACC AAG GAT GT (서열번호 11)	114
	Bareilly-R	ACT GCT AGT TCC TCC GTA AG (서열번호 12)	
Berta	Berta-F	TAA CCG AGG AGC CAA CAG TG (서열번호 13)	145
	Berta-R	CGG AGA GGG TCC AGT TGT TT (서열번호 14)	
Blockley	Blockley-F	TCC GTG GTT CAT GAG CAG TT (서열번호 15)	124
	Blockley-R	GAA GGT CAT CAC GCC TAG GT (서열번호 16)	
Bovismorbificans	Bovismorbificans-F	TCA CTC GTA CTG GCG GTT CT (서열번호 17)	123
	Bovismorbificans-R	CCT CTC GCC CAC CAC TTA TAG (서열번호 18)	
Braenderup	Braenderup-F	GGA GAA TGC TTG CAG GAA GA (서열번호 19)	156
	Braenderup-R	GCT GGT TCA AAG TAA TGC GG (서열번호 20)	
Brandenburg	Brandenburg-F	TGG TTC TAC ACC TAA AGG TGG (서열번호 21)	108
	Brandenburg-R	TAC GCG ACA TCA TCT AGC CT (서열번호 22)	
Cerro	Cerro-F	CGT TTC TCC GTT TAT GTG GA (서열번호 23)	157
	Cerro-R	GGC ATT GTT ACA GAC AAA GC (서열번호 24)	
Choleraesuis	Choleraesuis-F	GCT CCA TCT TCG CCA ATT GA (서열번호 25)	125
	Choleraesuis-R	TCC AGT AAC GCT GTA GGC TCT (서열번호 26)	
Corvallis	Corvallis-F	AAG CGT TTA TTG GAG GCT GA (서열번호 27)	139
	Corvallis-R	CGC TGT TCG ATG CTT CAA GT (서열번호 28)	
Derby	Derby-F	TGC GTC CGT TGT TCA ATG TG (서열번호 29)	106
	Derby-R	CGT TGT ACG CCA TTC AGC TT (서열번호 30)	
Dublin	Dublin-F	GCG TCA AGG TTT ATT GAA TCG (서열번호 31)	114
	Dublin-R	GGA TGT CAA TCG CTG TTG TC (서열번호 32)	
Elisabethville	Elisabethville-F	GAC CAC GAC CGG TAC AGC AA (서열번호 33)	178
	Elisabethville-R	CGG CGG ATA CTG CAC ACG AA (서열번호 34)	
Enteritidis	Enteritidis-F	TTG GTA AAT CCG TCG GAC AA (서열번호 35)	105
	Enteritidis-R	AAT CGC TAC GCG CCT CAA TA (서열번호 36)	
Gallinarum	Gallinarum-F	CGA CGG TCG TCA ATC CTA CT (서열번호 37)	113
	Gallinarum-R	ATC AAC CAC AGC CGT AGC AG (서열번호 38)	
Give	Give-F	TCA TTG GCA CTG GTG AGT CG (서열번호 39)	103
	Give-R	CCT TCA ATG CCT GGC ACA TC (서열번호 40)	
Hadar	Hadar-F	GTG AGT CTT TTT CGG TGA TA (서열번호 41)	162
	Hadar-R	ATC TCA CCC ATT CAC AGA TA (서열번호 42)	
Heidelberg	Heidelberg-F	CGG CGA ATT AAT CAT AAG CG (서열번호 43)	105
	Heidelberg-R	CTC TCA CCT GAT TTT GCC TGT (서열번호 44)	
Hindmarsh	Hindmarsh-F	ACG GCG TAA TAG CAT CTC TG (서열번호 45)	135
	Hindmarsh-R	CCG TAT CAC CTT CAC GAT GT (서열번호 46)	
I 4,[5],12:i:-	I 4,[5],12:i:-F	AAG TGC GCC AGT TAG CTT CT (서열번호 47)	108
	I 4,[5],12:i:-R	GGT ATC GCC GTC AAT ACA CA (서열번호 48)	
Infantis	Infantis-F	GGT CGA GAT GGG TAT GTA GC (서열번호 49)	109
	Infantis-R	CAG GAG TTC CTG CGC AAC CA (서열번호 50)	
Javiana	Javiana-F	TGG CTA CTC AGG CAG TAC TA (서열번호 51)	112
	Javiana-R	AGC ATA ACT CCG TGA GTT TT (서열번호 52)	
Kedougou	Kedougou-F	GTC AGC CTT CCT GAA GTC AT (서열번호 53)	102
	Kedougou-R	CTC GCG TTC ATA CAA TCC TG (서열번호 54)	
Kentucky	Kentucky-F	TGA GCG AGT TTC TTT GCT GA (서열번호 55)	159
	Kentucky-R	CGG AAG CAC CTT CCA TAA GT (서열번호 56)	
Kottbus	Kottbus-F	GCG TCT GAC TGG AGC AGA TT (서열번호 57)	108
	Kottbus-R	ACC ACA GTC AAC GCC TAG GT (서열번호 58)	
Litchfield	Litchfield-F	CAG ACT TAA TAG AGG ACC CA (서열번호 59)	143
	Litchfield-R	CTC CGT TTC ATT CCA TCC AC (서열번호 60)	
Livingstone	Livingstone-F	TCT GCG CAC AGG CGA ATT CT (서열번호 61)	103
	Livingstone-R	CAG ACG CTT AGA GAC GGT GTG A (서열번호 62)	
London	London-F	GGC TCA TCC GGA ACG AAC AA (서열번호 63)	141
	London-R	CAA GCG AGC TTA TAG GCG TAG (서열번호 64)	

Madelia	Madelia-F	GCT GTC GCA CAT CTG ACG TT (서열번호 65)	108
	Madelia-R	CGT CGA AGG AGA ACG ATT CA (서열번호 66)	
Manhattan	Manhattan-F	GCT GAT GCA GCG TAG CAA TA (서열번호 67)	128
	Manhattan-R	GCT CAC TAA GAA GGC ATG ACT C (서열번호 68)	
Mbandaka	Mbandaka-F	ATC GAG GAT CCA AGC ATC AG (서열번호 69)	130
	Mbandaka-R	GGA AAA CAC CAA GGA CTT CG (서열번호 70)	
Meleagridis	Meleagridis-F	TGG CGA TAT ACC GGT TAC CT (서열번호 71)	118
	Meleagridis-R	TCC GCG TAA CTG ATC ACT TC (서열번호 72)	
Menston	Menston-F	TAG TGT TGC GAC GGA GCT AA (서열번호 73)	101
	Menston-R	TTC GAA CAG CCA GCA GTG AA (서열번호 74)	
Minnesota	Minnesota-F	GCG GCT ACA AGC ATC ATC AT (서열번호 75)	117
	Minnesota-R	CCT TCC CAA CTC GAA CTT TAA C (서열번호 76)	
Mississippi	Mississippi-F	CCA CGA CAC CAT CAA TCA TC (서열번호 77)	115
	Mississippi-R	GCA ATA GGC GGT ACT AAG GA (서열번호 78)	
Montevideo	Montevideo-F	CCA ACC TGG CCA ACA AGA TT (서열번호 79)	120
	Montevideo-R	GAA CTG TCG CAC ACC GAT TC (서열번호 80)	
Muenchen	Muenchen-F	GCA CGT ATG CAG ATC GAA GA (서열번호 81)	134
	Muenchen-R	GTT AGC CGT TCC ACT GAC AA (서열번호 82)	
Muenster	Muenster-F	CAC CTC CTG AGA CTG AAG AA (서열번호 83)	175
	Muenster-R	CCG TCA TTT AGA TAA GGA AG (서열번호 84)	
Newington	Newington-F	CGT AGT CGT GGT TGC TGG TA (서열번호 85)	121
	Newington-R	TGC AGC AAG TAT GAC GAA TG (서열번호 86)	
Newport	Newport-F	GTT GCC AAA AAG CAC AAT GA (서열번호 87)	117
	Newport-R	AGC TCG AGT AAT CCG CAT GA (서열번호 88)	
Ohio	Ohio-F	CGA TAA TTG CCG CCT TCT GA (서열번호 89)	119
	Ohio-R	TCA GCA GGA GCG TGA CAG TT (서열번호 90)	
Oranienburg	Oranienburg-F	GCT GAG ATT GTG ATT CCA CC (서열번호 91)	101
	Oranienburg-R	CGC TGT TCT AACCTT GAG GA (서열번호 92)	
Panama	Panama-F	GCT CAA TTA GAT CCA ACA GC (서열번호 93)	104
	Panama-R	GAC TGG AGT GCA AGG TAG TT (서열번호 94)	
Paratyphi A	Paratyphi A-F	ATA CCG GAC GCC ACA AAT GC (서열번호 95)	128
	Paratyphi A-R	AAC GGT TCC TGC TTG GCT CTC (서열번호 96)	
Paratyphi B	Paratyphi B-F	CGA TGG CTC GAT CCT GTT CAA G (서열번호 97)	120
	Paratyphi B-R	GTC CGG CGG ACA ACT ATC AAC C (서열번호 98)	
Paratyphi C	Paratyphi C-F	GAC AGA GCA ATG CAG CAT TCC T (서열번호 99)	146
	Paratyphi C-R	GCT TCC ATC CGT GAT AGA TGA C (서열번호 100)	
Poona	Poona-F	TGT TGG AGG ATG CCA TGA GT (서열번호 101)	127
	Poona-R	AAG GAC AGC TTG CGT ATG GA (서열번호 102)	
Reading	Reading-F	GCG AAT GGC GAT AAG GTT GA (서열번호 103)	128
	Reading-R	GCT CCG ATC AAA ACA TGA GTC (서열번호 104)	
Rissen	Rissen-F	GAG CTA GTT GCC GAA TCG AA (서열번호 105)	117
	Rissen-R	CCG AAT GAA TGC TGG CAA GT (서열번호 106)	
Saintpaul	Saintpaul-F	TGA TGG GAT ATC TCG CAA CA (서열번호 107)	154
	Saintpaul-R	GCC GCT ATG GAA CTT ATT CG (서열번호 108)	
Schwarzengrund	Schwarzengrund-F	TGG CGC TAT TAC CAC TGA TG (서열번호 109)	131
	Schwarzengrund-R	CAA TTG CTG CGG ACC AAC TA (서열번호 110)	
Senftenberg/ Dessau	Senftenberg-F	GAG CAG GAT ATG CGC GAC TA (서열번호 111)	131
	Senftenberg-R	GTT GCT GCT CCA TGG TGT TG (서열번호 112)	
Singapore	Singapore-F	CCA GCA GAT AGG AAC ATA GG (서열번호 113)	109
	Singapore-R	GGA ACG ATA AGG CAT CAT CA (서열번호 114)	
Stanley	Stanley-F	TAC TGG CCT GGT GTC TTG TT (서열번호 115)	120
	Stanley-R	GTA TCC ATT GCC AGC GAG TA (서열번호 116)	
Tennessee	Tennessee-F	ACA AAC AAG CCT TCA GGT GG (서열번호 117)	102
	Tennessee-R	CAG CTC CTT CTG TTG CTC AT (서열번호 118)	
Thompson	Thompson-F	TAT TGC AAC AAT GAG GCC CTC T (서열번호 119)	126
	Thompson-R	GTC GCG ATT CTG AAC CGT GTC (서열번호 120)	
Typhi	Typhi-F	TGA GGC ACA CCG TGA TGA ACT G (서열번호 121)	118
	Typhi-R	ATT ATC CGC TCC GCG AAT GCT (서열번호 122)	

Typhimurium	Typhimurium-F	CGG CGG TAA TAC GAT GAA CT (서열번호 123)	126
	Typhimurium-R	CTT GCT GTC AGT GCT GTC TT (서열번호 124)	
Uganda	Uganda-F	AAG ATG TCT GGC ATG GGC AA (서열번호 125)	106
	Uganda-R	CGG GCT CCA CCA ACA AAA TG (서열번호 126)	
Vinohrady	Vinohrady-F	GAA GGA TTG CGA TTC GCT TT (서열번호 127)	117
	Vinohrady-R	GGA TGA CAT CAG CGA GTT CT (서열번호 128)	
Virchow	Virchow-F	GCC ACT GAT GAG ATG GAG TA (서열번호 129)	172
	Virchow-R	ACT CGC CAT CAG CAA TAC AC (서열번호 130)	
Weltevreden	Weltevreden-F	AAC CGG ATC CTG AGC CAT AC (서열번호 131)	111
	Weltevreden-R	CCG CTG CAA TAG CTG ATC TT (서열번호 132)	

2. 디자인된 프라이머의 특이성 및 정확성 평가

디자인된 프라이머의 특이성 및 정확성을 평가하기 위해 66개의 살모넬라 혈청형 균주를 사용하였다. 표적(Target)으로 하는 균주는 표적(target) 프라이머에서 모두 검출 가능한 amplicon을 형성한 반면, 모든 비-표적(non-target) 혈청형은 어떠한 신호도 생성하지 않았다(도 2). 이들이 검출된 Ct 값 범위는 각각의 혈청형 균주에 대해 11.49에서 18.07을 나타내었다(표 3). 따라서, 본 발명에서 디자인한 모든 프라이머는 살모넬라 혈청형 검출에 특이적인 것으로 확인되었다. 연속적으로 희석한 살모넬라 균주의 DNA를 프라이머의 정확성을 확인하기 위해 사용되었다. 모든 살모넬라 혈청형 특이 프라이머는 20~0.002 ng의 범위에 걸쳐 선형 관계를 나타내었다. 본 발명에서 개발된 모든 프라이머 세트의 slope 값, R^2 값, efficiency 값 모두 codex guideline 범위 내에 있으므로 높은 효율성과 정확성을 나타내는 방법임이 증명되었다(표 4).

표 3

Primer name	Detected species	Ct value
Aberdeen-F,R	Aberdeen NCCP 10142	16.58
Agona-F,R	Agona KCPB 06	14.91
Albany-F,R	Albany MFDS K14	16.17
Anatum-F,R	Anatum FDA 12	13.19
Bardo-F,R	Bardo BRF 07	16.72
Bareilly-F,R	Bareilly MFDS 1007637	13.91
Berta-F,R	Berta KVCC-BA0000581	15.22
Blockley-F,R	Blockley NCCP 10769	12.74
Bovismorbificans-F,R	Bovismorbificans NCCP 12244	16.87
Braenderup-F,R	Braenderup MFDS 1008393	15.93
Brandenburg-F,R	Brandenburg NCCP 12835	13.17
Cerro-F,R	Cerro NCCP 12215	15.71
Choleraesuis-F,R	Choleraesuis ATCC 13312	14.37
Corvallis-F,R	Corvallis NCCP 21031928	14.66
Derby-F,R	Derby MFDS 1009813	14.90
Dublin-F,R	Dublin BFR 15	11.49
Elisabethville-F,R	Elisabethville NCCP 14030	16.42
Enteritidis-F,R	Enteritidis MFDS 1010897	14.88
Gallinarum-F,R	Gallinarum ATCC 9120	15.84
Give-F,R	Give NCCP 13696	17.56
Hadar-F,R	Hadar NCCP 13571	13.92
Heidelberg-F,R	Heidelberg FDA 01	16.92
Hindmarsh-F,R	Hindmarsh BRF 12	15.38
I 4,[5],12:i:--F,R	I 4,[5],12:i:- MFDS 1004858	12.12
Infantis-F,R	Infantis CCARM 8283	14.04
Javiana-F,R	Javiana FDA 05	14.91
Kedougou-F,R	Kedougou NCCP 11685	14.19
Kentucky-F,R	Kentucky FDA 35	15.89
Kottbus-F,R	Kottbus NCCP 12234	18.07
Litchfield-F,R	Litchfield FDA 33	12.75
Livingstone-F,R	Livingstone MFDS 1004819	15.77
London-F,R	London MFDS 1004861	14.91

Madelia-F,R	Madelia FDA 30	14.91
Manhattan-F,R	Manhattan FDA 25	15.93
Mbandaka-F,R	Mbandaka FORC 015	14.91
Meleagridis-F,R	Meleagridis FDA 34	14.90
Menston-F,R	Menston NCCP 21031933	14.96
Minnesota-F,R	Minnesota MFDS 1008449	15.92
Mississippi-F,R	Mississippi FDA 32	11.72
Montevideo-F,R	Montevideo CCARM 8189	14.93
Muenchen-F,R	Muenchen KCPB 03	15.88
Muenster-F,R	Muenster FDA 23	14.92
Newington-F,R	Newington NCCP 10894	16.83
Newport-F,R	Newport FORC 020	12.36
Ohio-F,R	Ohio MFDS 1008118	13.17
Oranienburg-F,R	Oranienburg FDA 27	13.20
Panama-F,R	Panama MFDS 1004857	13.98
Paratyphi A-F,R	Paratyphi A NCCP 14759	12.85
Paratyphi B-F,R	Paratyphi B ATCC 10719	15.91
Paratyphi C-F,R	Paratyphi C ATCC 13428	12.88
Poona-F,R	Poona FDA 22	14.35
Reading-F,R	Reading MFDS 1007899	11.86
Rissen-F,R	Rissen MFDS 1004867	16.71
Saintpaul-F,R	Saintpaul CCARM 8581	12.89
Schwarzengrund-F,R	Schwarzengrund MFDS 1006893	14.90
Senftenberg-F,R	Senftenberg CCARM 0041	13.17
Singapore-F,R	Singapore NCCP 12218	16.76
Stanley-F,R	Stanley MFDS 1004865	13.34
Tennessee-F,R	Tennessee CCARM 8201	12.27
Thompson-F,R	Thompson CCARM 8530	14.90
Typhi-F,R	Typhi ATCC 33459	13.72
Typhimurium-F,R	Typhimurium ATCC 19585	14.93
Uganda-F,R	Uganda KVCC-BA0000596	15.73
Vinohrady-F,R	Vinohrady NCCP 12217	16.26
Virchow-F,R	Virchow MFDS 1004870	11.51
Weltevreden-F,R	Weltevreden NCCP 12239	14.69

표 4

[0046]

Serovar	Slope	R ²	Efficiency (%)
Aberdeen	-3.559	0.998	90.972
Agona	-3.478	0.999	93.886
Albany	-3.617	0.999	89.005
Anatum	-3.497	0.999	93.171
Bardo	-3.261	0.999	102.616
Bareilly	-3.589	0.998	90.031
Berta	-3.516	0.998	92.496
Blockley	-3.58	0.999	90.256
Bovismorbificans	-3.486	0.999	93.562
Braenderup	-3.683	0.997	86.854
Brandenburg	-3.491	0.998	93.412
Cerro	-3.301	0.998	100.872
Choleraesuis	-3.596	0.997	89.715
Corvallis	-3.482	0.996	93.742
Derby	-3.409	0.999	96.502
Dublin	-3.46	0.999	94.562
Elisabethville	-3.541	1	91.591
Enteritidis	-3.395	0.999	97.046
Gallinarum	-3.355	0.999	98.654

Give	-3.594	0.998	89.763
Hadar	-3.19	1	105.807
Heidelberg	-3.396	0.999	96.983
Hindmarsh	-3.263	0.999	102.532
I 4,[5],12:i:-	-3.66	0.997	87.583
Infantis	-3.44	0.999	95.29
Javiana	-3.626	0.999	88.696
Kedougou	-3.428	0.999	95.764
Kentucky	-3.351	0.999	98.809
Kottbus	-3.464	0.998	94.409
Litchfield	-3.387	0.999	97.35
Livingstone	-3.256	0.999	102.844
London	-3.46	0.999	94.551
Madelia	-3.19	0.997	105.835
Manhattan	-3.673	0.998	87.192
Mbandaka	-3.674	0.997	87.153
Meleagridis	-3.554	0.998	91.153
Menston	-3.385	0.997	97.422
Minnesota	-3.594	0.999	89.776
Mississippi	-3.63	0.999	88.574
Montevideo	-3.457	0.999	94.667
Muenchen	-3.425	0.999	95.852
Muenster	-3.459	0.997	94.581
Newington	-3.545	0.998	91.468
Newport	-3.622	0.997	88.839
Ohio	-3.528	0.999	92.057
Oranienburg	-3.512	0.998	92.625
Panama	-3.397	1	96.968
Paratyphi A	-3.182	0.999	106.19
Paratyphi B	-3.501	0.999	93.023
Paratyphi C	-3.552	0.996	91.23
Poona	-3.4	0.999	96.854
Reading	-3.653	0.998	87.826
Rissen	-3.541	1	91.591
Saintpaul	-3.371	0.998	97.976
Schwarzengrund	-3.5	0.999	93.066
Senftenberg/Dessau	-3.589	0.997	89.942
Singapore	-3.532	0.997	91.933
Stanley	-3.23	0.999	103.989
Tennessee	-3.681	0.997	86.911
Thompson	-3.516	0.999	92.482
Typhi	-3.677	0.999	87.042
Typhimurium	-3.61	0.999	89.241
Uganda	-3.434	1	95.526
Vinohrady	-3.456	0.999	94.709
Virchow	-3.535	0.996	91.813
Weltevreden	-3.646	0.998	88.056

[0047] 3. 개발된 real-time PCR법과 96-well plate의 적용 실험 결과

[0048] 본 발명에서 개발된 하나의 96-well plate를 이용하여 66개의 살모넬라 혈청형을 검출할 수 있는 real-time PCR 법을 검증하기 위해 적용 실험을 수행하였다. 66개의 혈청형에 속하는 424개의 살모넬라 균주 및 29개의 병원성 박테리아 균주를 적용 실험에 사용하였다. Real-time PCR 결과는 비-표적(non-target) 혈청형을 가진 살모넬라 와 병원성 박테리아에서는 전혀 검출되지 않는 반면 상응하는 프라이머 세트에 대한 표적(target) 혈청형은 모두 증폭되었다. 또한 살모넬라 종까지만 확인된 2개의 균주로 검출 실험을 실시하였을 때에도 혈청형까지 확인 됨으로써 적용성의 범위가 넓은 것으로 확인 되었다(표 5). 따라서 본 발명에서 개발된 66개의 혈청형 특이 프

라이머와 real-time PCR 법은 살모넬라 혈청형을 검출하는데 100% 정확성을 가진다는 것을 시사한다.

표 5

[0049]

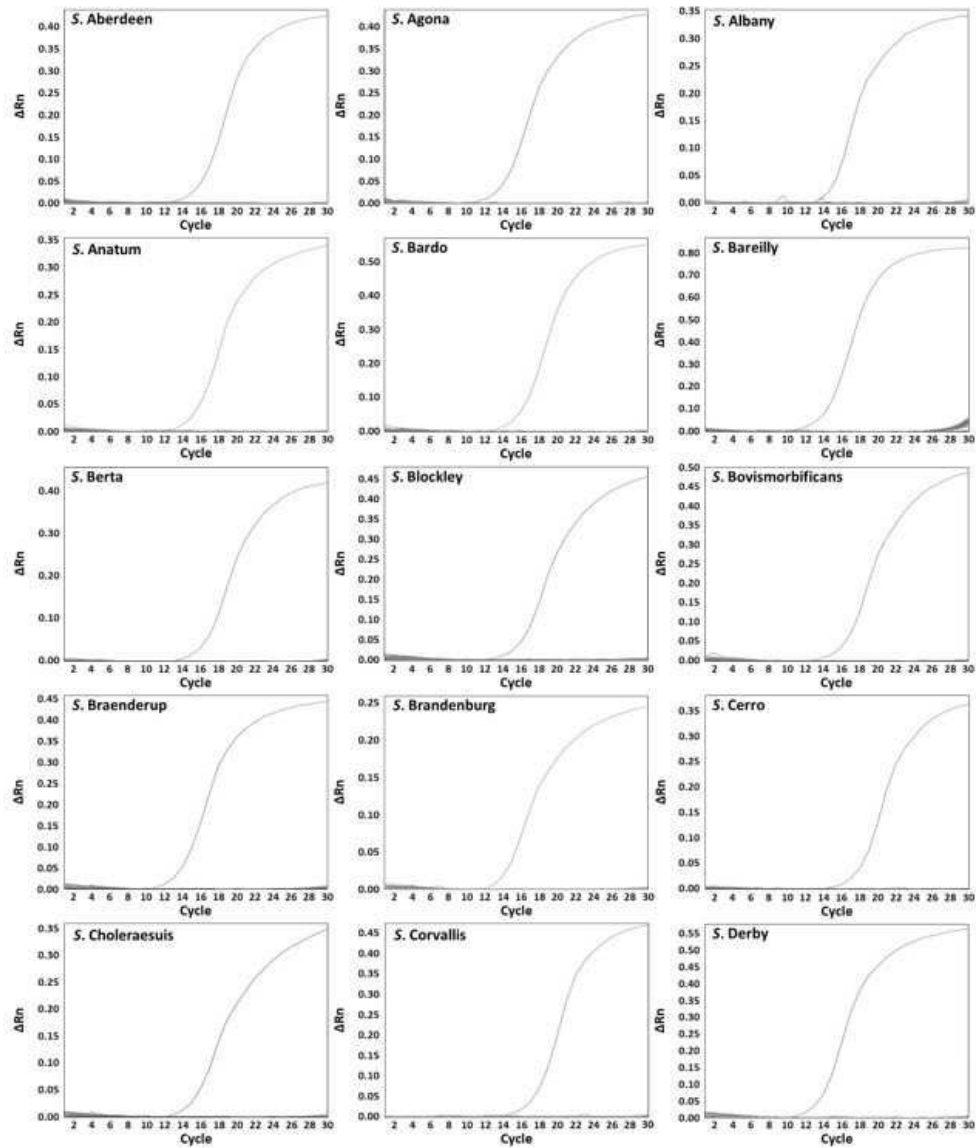
유전자원번호	유전자원명	계통/기탁명	분리원	분리년도	개발된 PCR 검출 결과
KVCC-BA1700172	<i>Salmonella enterica</i>	SE15275	닭	2015	S. Enteritidis
KVCC-BA0000695	<i>Salmonella enterica</i>	세균과 Sal 13	돼지	-	S. Typhimurium

도면

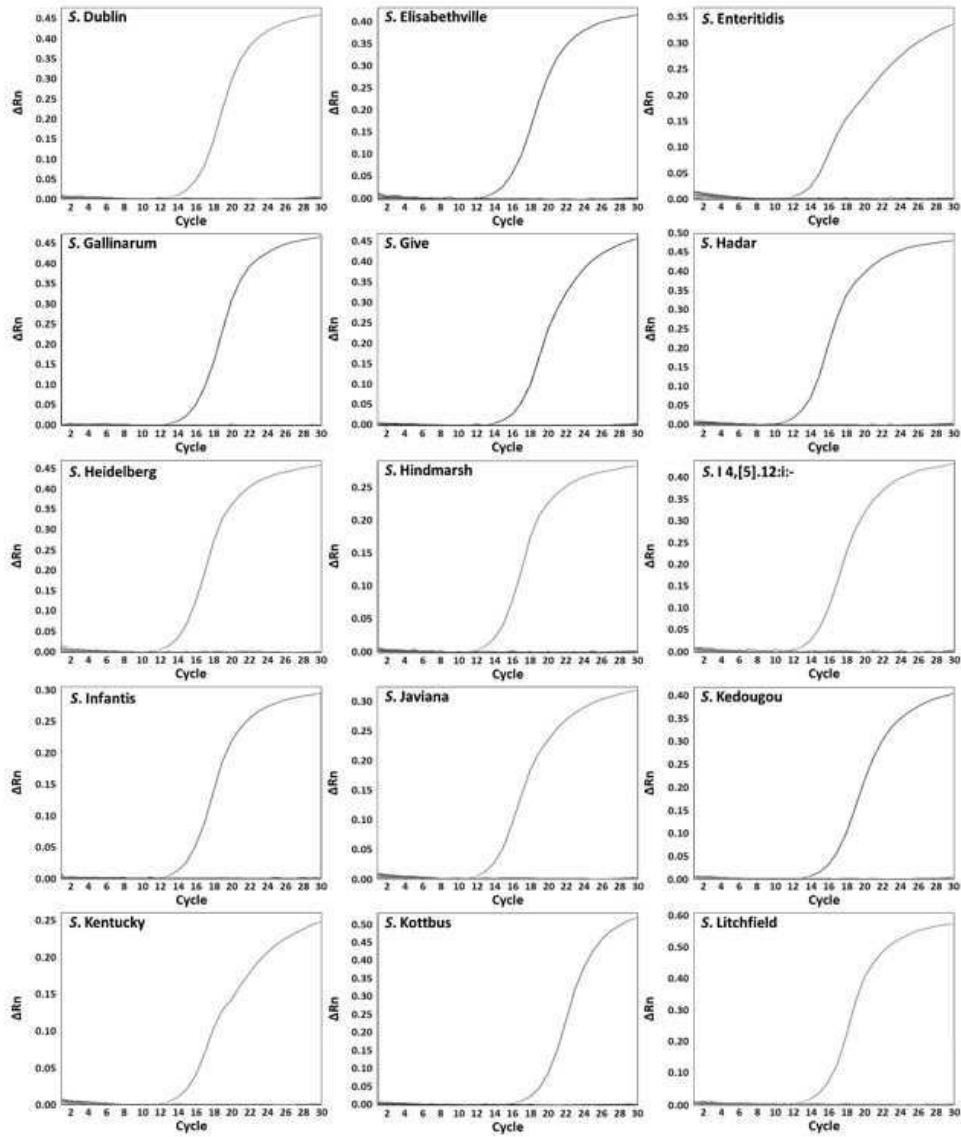
도면1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
C		11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
D		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	
E		31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
F		41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	
G		51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
H		61	62	63	64	65	66	IPC	NTC			

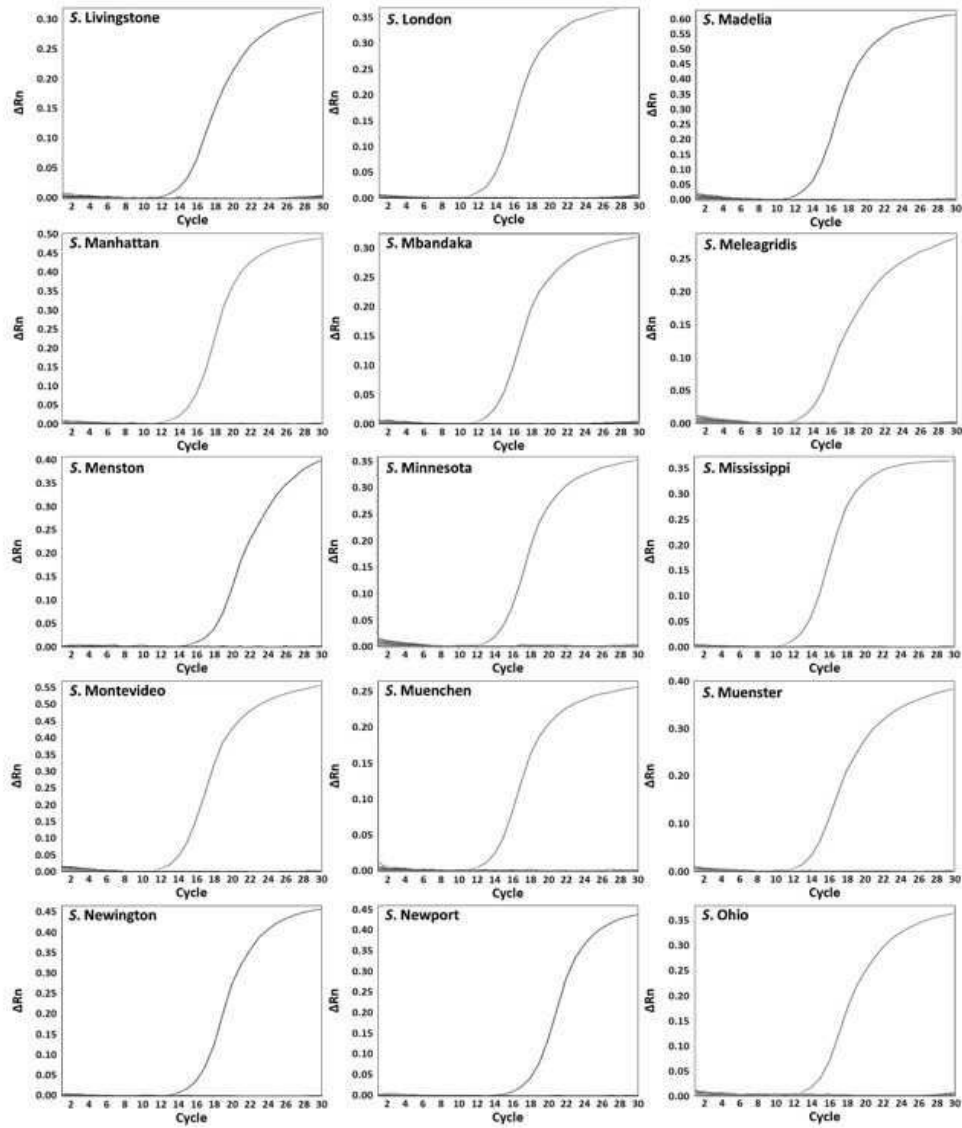
도면2a



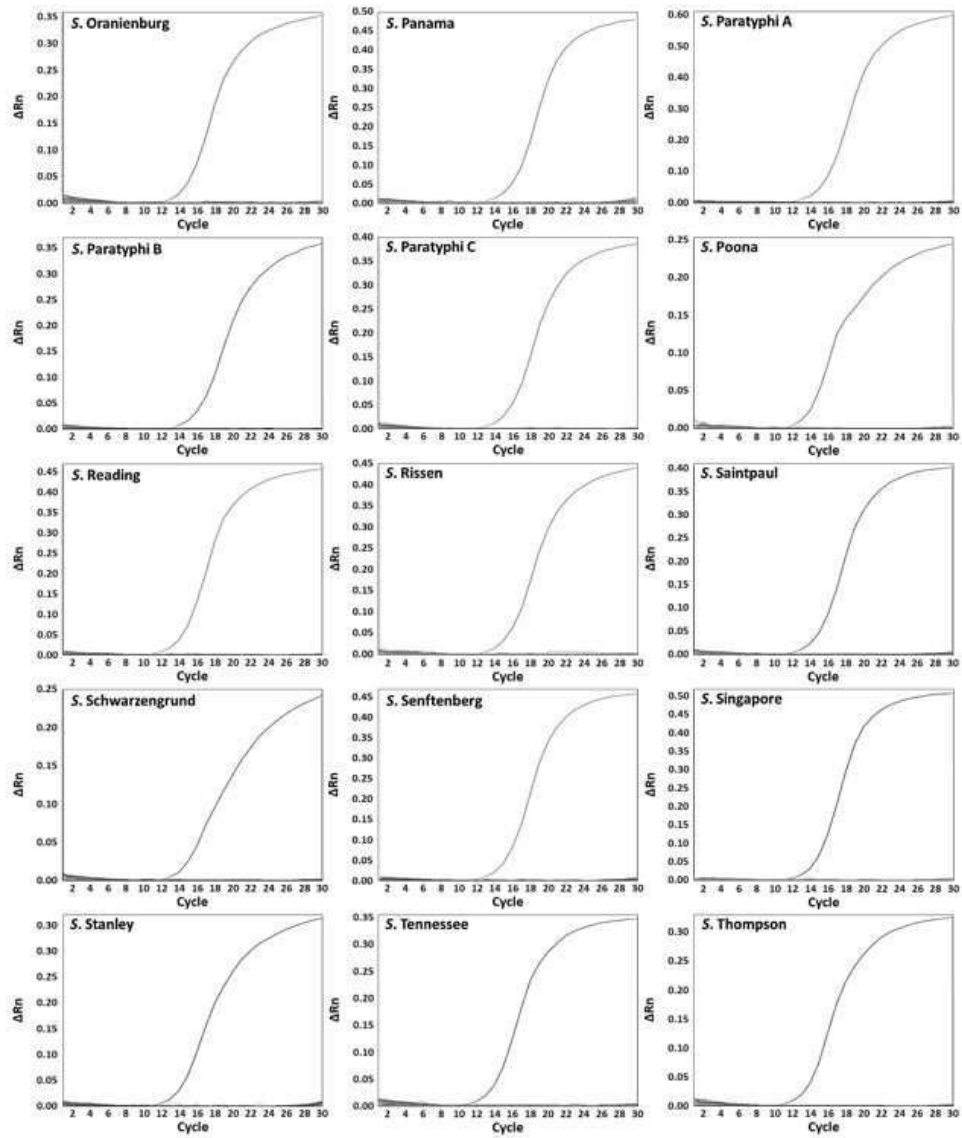
도면2b



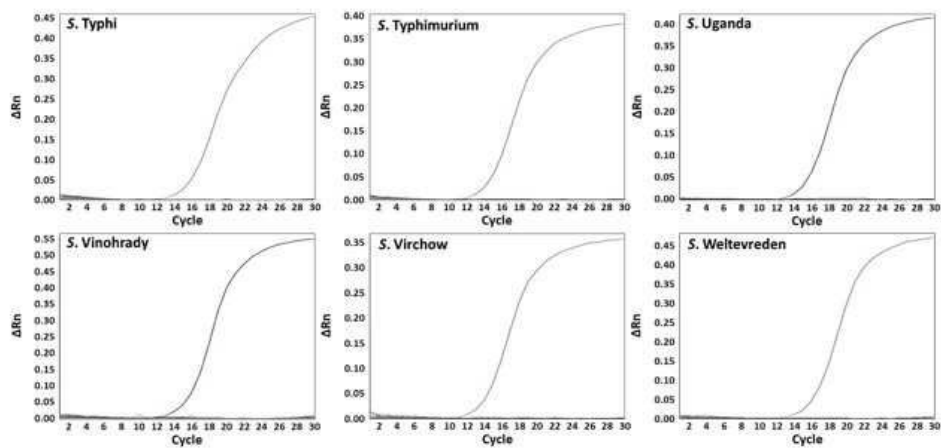
도면2c



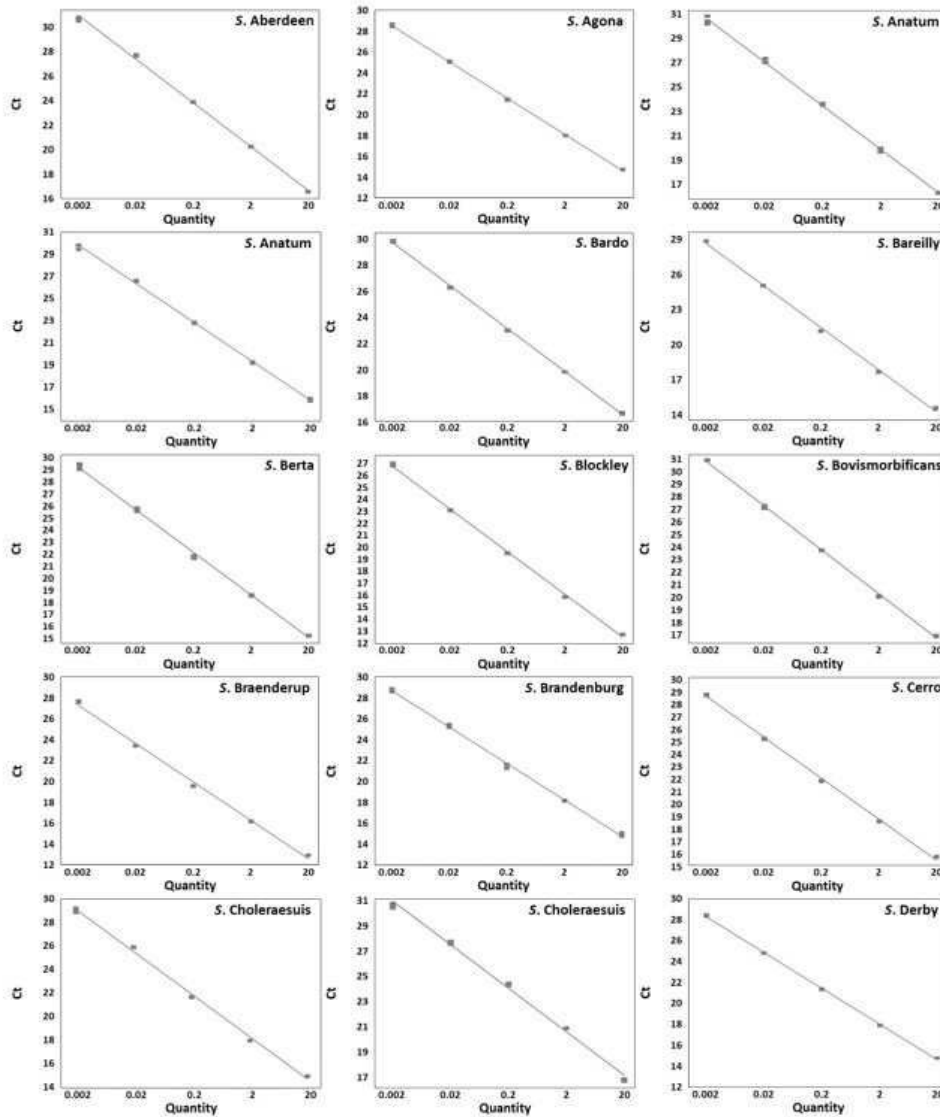
도면2d



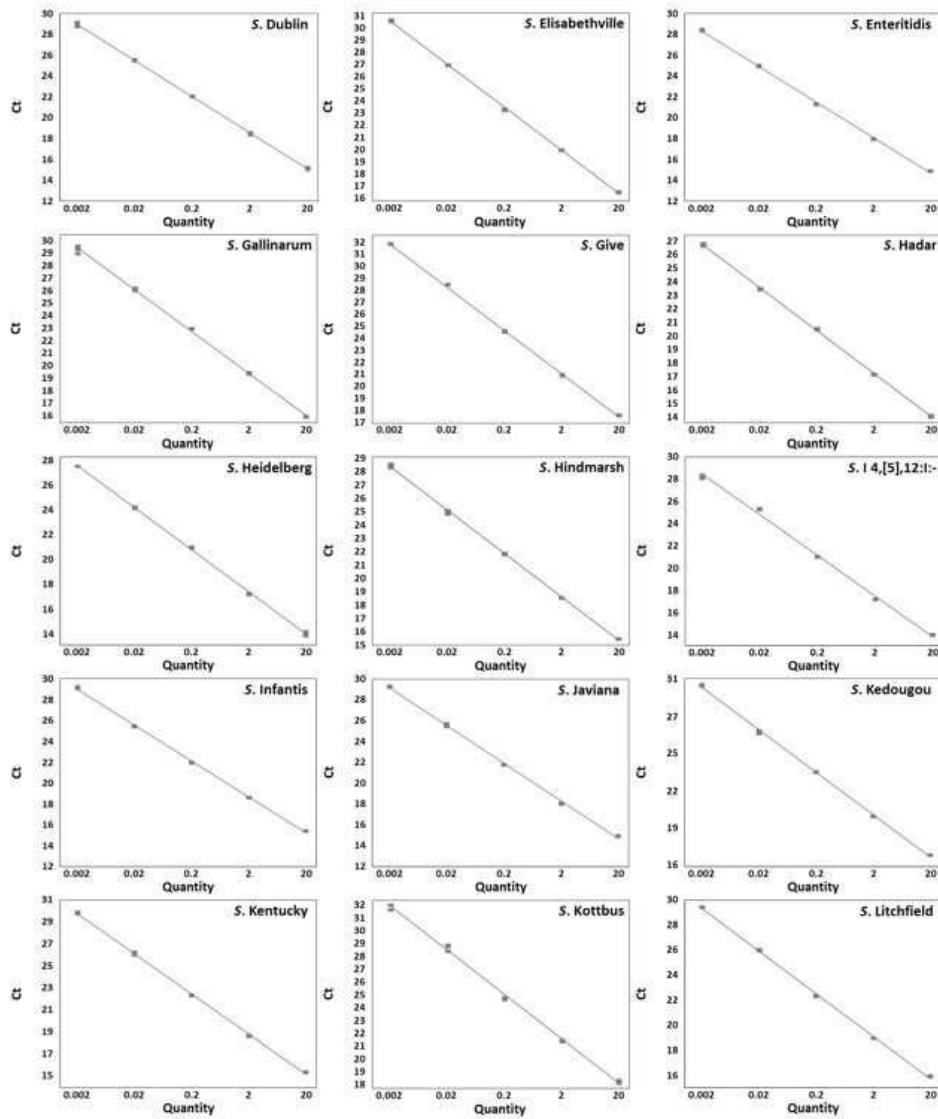
도면2e



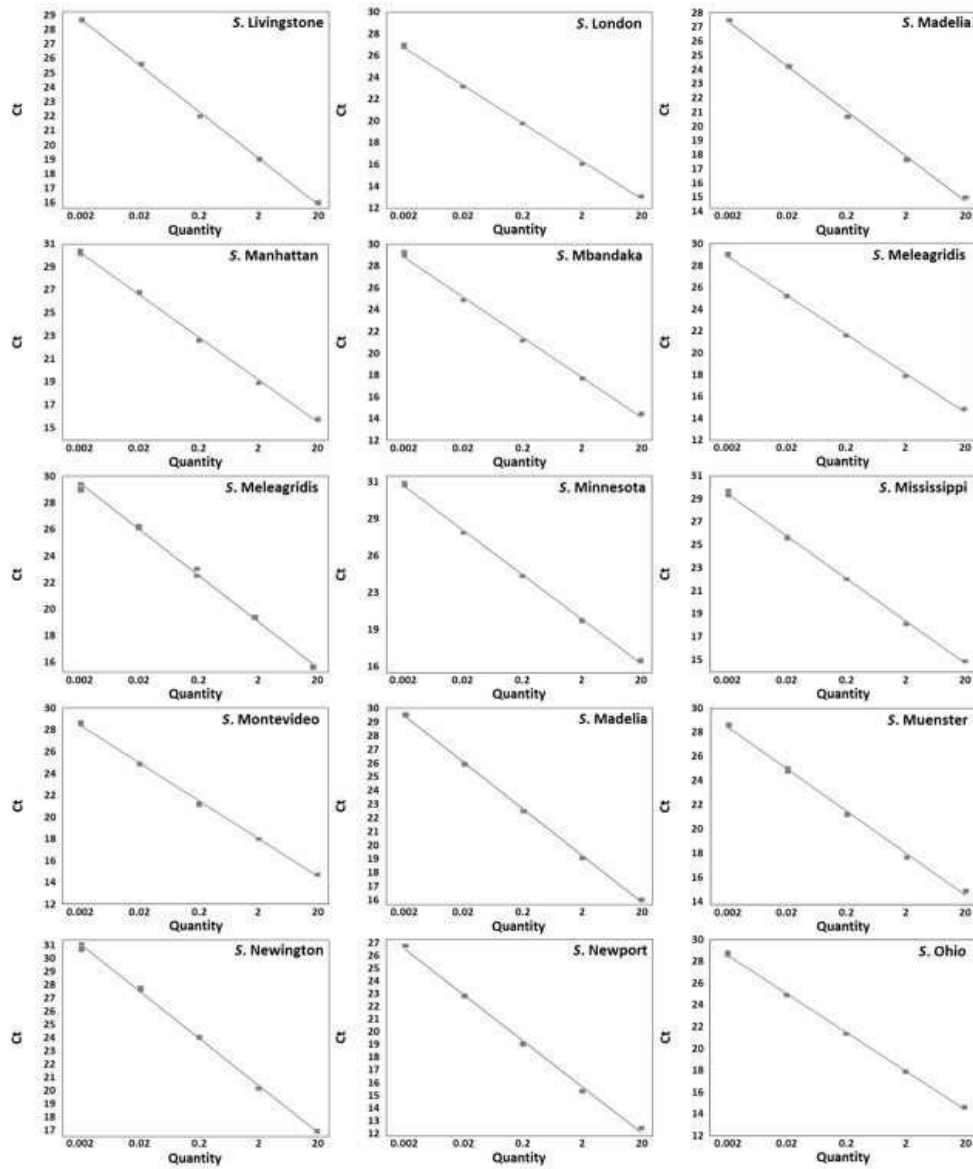
도면3a



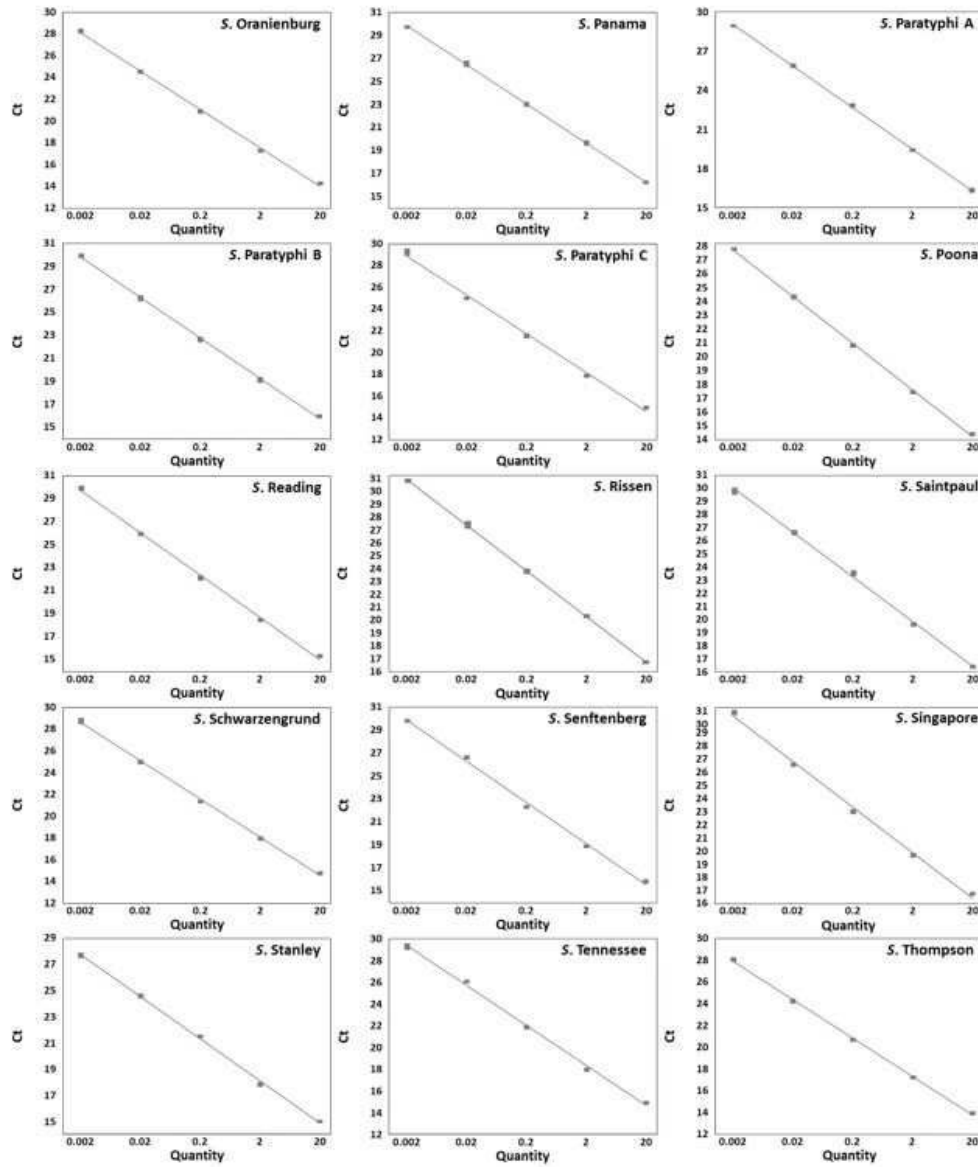
도면3b



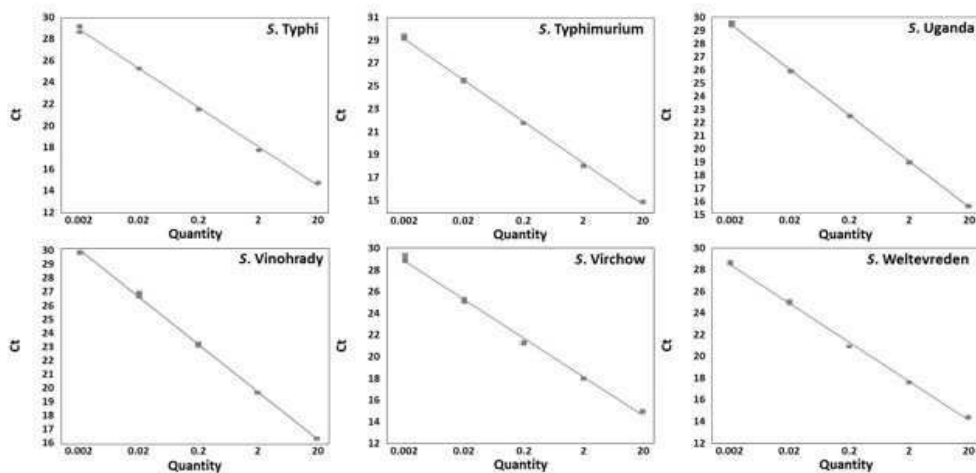
도면3c



도면3d



도면3e



서열 목록

<110> KOREA FOOD & DRUG ADMINISTRATION
University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)
AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> PCR primer set for detecting Salmonella serovars and uses thereof

<130> ADP-2021-0287

<160> 132

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aberdeen-F primer

<400> 1

aacaacgggt acagggatta 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aberdeen-R primer

<400> 2

aatccttatt atcgccccca 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Agona-F primer

<400> 3

gcatctggcg gtaagtcata 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Agona-R primer	
<400>	4	
	gtgagcgtaa tggggatgta	20
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Albany-F primer	
<400>	5	
	tagtcaggta gcaccgagtt	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Albany-R primer	
<400>	6	
	acgccatgta gattcgttat	20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Anatum-F primer	
<400>	7	
	aaagcaccct gagtcagatg	20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Anatum-R primer	
<400>	8	
	caagtccacc gactgctcta	20
<210>	9	
<211>	20	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bardo-F primer
 <400> 9
 cgccagtctc tgcattatct 20

<210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bardo-R primer
 <400> 10
 gtcgagtaca accgcctgat 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bareilly-F primer
 <400> 11
 ggtggtagta ccaaggatgt 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Bareilly-R primer
 <400> 12
 actgctagtt cctccgtaag 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Berta-F primer
 <400> 13
 taaccgagga gccaacagtg 20

<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Berta-R primer	
<400>	14	
	cggagagggt ccagttgttt	20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Blockley-F primer	
<400>	15	
	tccgtgggtt atgagcagtt	20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Blockley-R primer	
<400>	16	
	gaaggtcatc acgcctaggt	20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Bovismorbificans-F primer	
<400>	17	
	tcactcgtagc tggcggttct	20
<210>	18	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Bovismorbificans-R primer	

<400>	18	
cctctcgccc accacttata g		21
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Braenderup-F primer	
<400>	19	
ggagaatgct tgcaggaaga		20
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Braenderup-R primer	
<400>	20	
gctgggttcaa agtaatgcgg		20
<210>	21	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Brandenburg-F primer	
<400>	21	
tggttctaca cctaaaggtg g		21
<210>	22	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Brandenburg-R primer	
<400>	22	
tacgcgacat catctagcct		20
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Cerro-F primer	
<400>	23	
	cgtttctccg tttatgtgga	20
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Cerro-R primer	
<400>	24	
	ggcattgtta cagacaaagc	20
<210>	25	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Choleraesuis-F primer	
<400>	25	
	gtccatctt cgccaattga	20
<210>	26	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Choleraesuis-R primer	
<400>	26	
	tccagtaacg ctgtaggctc t	21
<210>	27	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Corvallis-F primer	
<400>	27	
	aagcgtttat tggaggctga	20
<210>	28	
<211>	20	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Corvallis-R primer

<400> 28
 cgctgttcga tgcttcaagt 20

<210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Derby-F primer

<400> 29
 tgcgtccgtt gttcaatgtg 20

<210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Derby-R primer

<400> 30
 cgttgtacgc cattcagctt 20

<210> 31
 <211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Dublin-F primer

<400> 31
 gcgtaaggt ttattgaatc g 21

<210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Dublin-R primer

<400> 32
 ggatgtcaat cgctgtgtgc 20

<210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Elisabethville-F primer
 <400> 33
 gaccacgacc ggtacagcaa 20

<210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Elisabethville-R primer
 <400> 34
 cggcggatac tgcacacgaa 20

<210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Enteritidis-F primer
 <400> 35
 ttggtaaadc cgtcggacaa 20

<210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Enteritidis-R primer

<400> 36
 aatcgctacg cgcctcaata 20

<210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Gallinarum-F primer

<400>	37	
cgacggtcgt caatcctact		20
<210>	38	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Gallinarum-R primer	
<400>	38	
atcaaccaca gccgtagcag		20
<210>	39	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Give-F primer	
<400>	39	
tcattggcac tggtagtcg		20
<210>	40	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Give-R primer	
<400>	40	
ccttcaatgc ctggcacatc		20
<210>	41	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Hadar-F primer	
<400>	41	
gtgagtcctt ttcggtgata		20
<210>	42	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hadar-R primer

<400> 42

atctcaccca ttcacagata 20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heidelberg-F primer

<400> 43

cggcgaatta atcataagcg 20

<210> 44

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Heidelberg-R primer

<400>

> 44

ctctcacctg attttgcctg t 21

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hindmarsh-F primer

<400> 45

acggcgtaat agcatctctg 20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Hindmarsh-R primer

<400> 46

ccgtatcacc ttcacgatg 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> I 4,[5],12:i:--F primer

<400> 47

aagtgcgccca gttagcttct 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> I 4,[5],12:i:--R primer

<400> 48

ggtatcgccg tcaatacaca 20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Infantis-F primer

<400> 49

ggtcgagatg ggtatgtagc 20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Infantis-R primer

<400> 50

caggagttcc tgcgcaacca 20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Javiana-F primer

<400> 51

ttggtactca ggcagtacta	20
<210> 52	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Javiana-R primer	
<400>	
52	
agcataactc cgtgagtttt	20
<210> 53	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Kedougou-F primer	
<400> 53	
gtcagccttc ctgaagtcac	20
<210> 54	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Kedougou-R primer	
<400> 54	
ctcgcgttca tacaatcctg	20
<210> 55	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Kentucky-F primer	
<400> 55	
tgagcgagtt tctttgctga	20
<210> 56	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Kentucky-R primer

<400> 56

cggaagcacc ttccataagt

20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Kottbus-F primer

<400> 57

gcgtctgact ggagcagatt

20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Kottbus-R primer

<400> 58

accacagtca acgcctaggt

20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Litchfield-F primer

<400> 59

cagacttaat agaggacca

20

<210> 60

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Litchfield-R primer

<400> 60

ctccgtttca ttccatccac

20

<210> 61

<211> 20

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Livingstone-F primer	
<400>	61	
	tctgcgacaca ggcgaattct	20
<210>	62	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Livingstone-R primer	
<400>	62	
	cagacgctta gagacggtgt ga	22
<210>	63	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	London-F primer	
<400>	63	
	ggctcatccg gaacgaacaa	20
<210>	64	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	London-R primer	
<400>	64	
	caagcgagct tataggcgta g	21
<210>	65	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Madelia-F primer	
<400>	65	
	gctgtcgac atctgacgtt	20

<210> 66
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Madelia-R primer
 <400> 66
 cgtcgaagga gaacgattca 20
 <210> 67
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Manhattan-F primer
 <400> 67
 gctgatgcag cgtagcaata 20
 <210> 68
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Manhattan-R primer
 <400>
 > 68
 gctcactaag aaggcatgac tc 22
 <210> 69
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mbandaka-F primer
 <400> 69
 atcgaggatc caagcatcag 20
 <210> 70
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mbandaka-R primer
 <400> 70

ggaaaacacc aaggacttcg	20
<210> 71	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Meleagris-F primer	
<400> 71	
tggcgatata ccggttacct	20
<210> 72	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Meleagris-R primer	
<400> 72	
tccgcgtaac tgatcacttc	20
<210> 73	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Menston-F primer	
<400> 73	
tagtgttgcg acggagctaa	20
<210> 74	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Menston-R primer	
<400> 74	
ttcgaacagc cagcagtga	20
<210> 75	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Minnesota-F primer
 <400> 75
 gcggctacaa gcatcatcat 20
 <210> 76
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Minnesota-R primer
 <400>
 > 76
 ccttccaac tcgaacttta ac 22
 <210> 77
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mississippi-F primer
 <400> 77
 ccacgacacc atcaatcatc 20
 <210> 78
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Mississippi-R primer
 <400> 78
 gcaataggcg gtactaagga 20
 <210> 79
 <211>
 > 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Montevideo-F primer
 <400> 79
 ccaacctggc caacaagatt 20
 <210> 80
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Montevideo-R primer
 <400> 80
 gaactgtcgc acaccgattc 20
 <210> 81
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Muenchen-F primer
 <400> 81
 gcacgtatgc agatcgaaga 20
 <210> 82
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Muenchen-R primer
 <400> 82
 gttagccgtt ccactgacaa 20
 <210> 83
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Muenster-F primer
 <400> 83
 cacctcctga gactgaagaa 20
 <210> 84
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Muenster-R primer
 <400>
 > 84
 ccgtcattta gataaggaag 20

<210> 85
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Newington-F primer
 <400> 85
 cgtagtcgtg gttgctggta 20
 <210> 86
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Newington-R primer
 <400> 86
 tgcagcaagt atgacgaatg 20
 <210> 87
 <211> 20

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Newport-F primer
 <400> 87
 gttgccaaaa agcacaatga 20
 <210> 88
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Newport-R primer
 <400> 88
 agctcgagta atccgcatga 20
 <210> 89
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ohio-F primer
 <400> 89

cgataattgc cgccttctga	20
<210> 90	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Ohio-R primer	
<400> 90	
tcagcaggag cgtgacagtt	20
<210> 91	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oranienburg-F primer	
<400> 91	
gctgagattg tgattccacc	20
<210> 92	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Oranienburg-R primer	
<	
400> 92	
cgctgttcta accttgagga	20
<210> 93	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Panama-F primer	
<400> 93	
gctcaattag atccaacagc	20
<210> 94	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	Panama-R primer	
<400>	94	
	gactggagtg caaggtagtt	20
<210>	95	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Paratyphi A-F primer	
<400>	95	
	ataccggacg ccacaaatgc	20
<210>	96	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Paratyphi A-R primer	
<400>	96	
	aacggttctt gcttggtct c	21
<210>	97	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Paratyphi B-F primer	
<400>	97	
	cgatggctcg atcctgttca ag	22
<210>	98	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Paratyphi B-R primer	
<400>	98	
	gtccggcgga caactatcaa cc	22
<210>	99	
<211>	22	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Paratyphi C-F primer
 <400> 99
 gacagagcaa tgcagcatc ct 22
 <210> 100
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Paratyphi C-R primer

 <400> 100
 gcttccatcc gtgatagatg ac 22
 <210> 101
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Poona-F primer
 <400> 101
 tgttggagga tgccatgagt 20
 <210> 102
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Poona-R primer
 <400> 102
 aaggacagct tgcgtatgga 20
 <210> 103
 <211>
 > 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reading-F primer
 <400> 103
 gcgaatggcg ataaggttga 20

<210>	104	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Reading-R primer	
<400>	104	
	gctccgatca aaacatgagt c	21
<210>	105	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Rissen-F primer	
<400>	105	
	gagctagttg ccgaatcgaa	20
<210>	106	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Rissen-R primer	
<400>	106	
	ccgaatgaat gctggcaagt	20
<210>	107	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Saintpaul-F primer	
<400>	107	
	tgatgggata tctcgcaaca	20
<210>	108	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Saintpaul-R primer	

<400>	108	
gccgctatgg aacttattcg		20
<210>	109	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Schwarzengrund-F primer	
<400>	109	
tggcgctatt accactgatg		20
<210>	110	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Schwarzengrund-R primer	
<400>	110	
caattgctgc ggaccaacta		20
<		
210>	111	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Senftenberg-F primer	
<400>	111	
gagcaggata tgcgcgacta		20
<210>	112	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Senftenberg-R primer	
<400>	112	
gttgctgctc catggtgtg		20
<210>	113	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> Singapore-F primer

<400> 113

ccagcagata ggaacatagg 20

<210> 114

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Singapore-R primer

<400> 114

ggaacgataa ggcacatca 20

<210> 115

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Stanley-F primer

<400> 115

tactggcctg gtgtcttggt 20

<210> 116

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Stanley-R primer

<400> 116

glatccattg ccagcgagta 20

<210> 117

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Tennessee-F primer

<400> 117

acaaacaagc cttcaggtgg 20

<210> 118

<211> 20

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Tennessee-R primer	
<400>	118	
cagctccttc tgttgctcat		20
<210>	119	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Thompson-F primer	
<400>	119	
tattgcaaca atgaggccct ct		22
<210>	120	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Thompson-R primer	
<400>	120	
gtcgcgattc tgaaccgtgt c		21
<210>	121	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Typhi-F primer	
<400>	121	
tgaggcacac cgtgatgaac tg		22
<210>	122	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Typhi-R primer	
<400>	122	
attatccgct ccgcgaatgc t		21

<210>	123	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Typhimurium-F primer	
<400>	123	
	cggcggtaat acgatgaact	20
<210>	124	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Typhimurium-R primer	
<400>	124	
	cttgctgtca gtgctgtctt	20
<210>	125	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Uganda-F primer	
<400>	125	
	aagatgtctg gcatgggcaa	20
<210>	126	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Uganda-R primer	
<400>	126	
	cgggctccac caacaaaatg	20
<210>	127	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Vinohrady-F primer	

<400>	127	
gaaggattgc gattcgcttt		20
<210>	128	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Vinohrady-R primer	
<400>	128	
ggatgacatc agcgagttct		20
<210>	129	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Virchow-F primer	
<400>	129	
gccactgatg agatggagta		20
<210>	130	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Virchow-R primer	
<400>	130	
actcgccatc agcaatacac		20
<210>	131	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Weltevreden-F primer	
<400>	131	
aaccggatcc tgagccatac		20
<210>	132	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> Weltevreden-R primer

<400> 132

ccgctgcaat agctgatctt

20