

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2016년 9월 9일 (09.09.2016)



(10) 국제공개번호  
**WO 2016/140540 A1**

- (51) 국제특허분류:  
*C12Q 1/68* (2006.01) *C12Q 1/44* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/002165
- (22) 국제출원일: 2016년 3월 4일 (04.03.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2015-0030615 2015년 3월 4일 (04.03.2015) KR
- (71) 출원인: 포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) [KR/KR]; 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동), Gyeongsangbuk-do (KR).
- (72) 발명자: 고용송 (GHO, Yong Song); 37673 경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 4동 1003호 (지곡동, 교수아파트), Gyeongsangbuk-do (KR). 윤예진 (YOON, Yae Jin); 47760 부산시 동래구 반송로 341번길 48-7, B동 202호 (명장동, 옥천아파트), Busan (KR).
- (74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로 85길 28, 6층 (대치동), Seoul (KR).

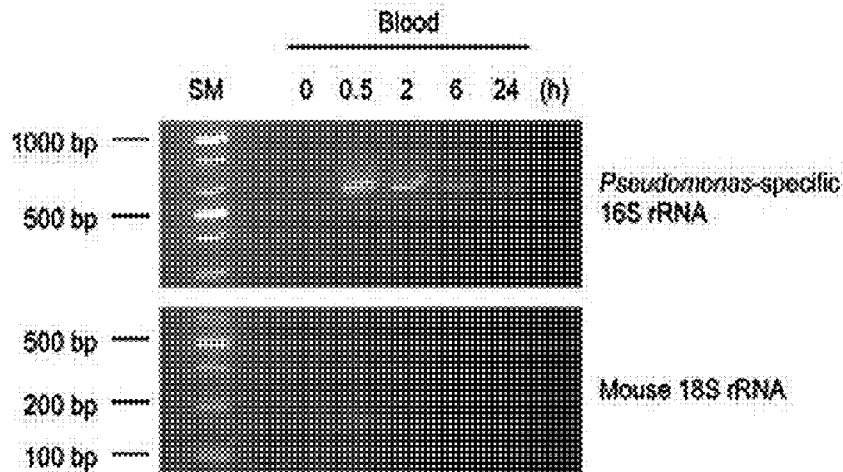
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: BACTERIA IDENTIFICATION USING EXTRACELLULAR VESICLE DERIVED FROM NUCLEASE-TREATED BACTERIA

(54) 발명의 명칭 : 뉴클레아제가 처리된 세균 유래 세포막 소포체를 이용한 세균 동정



(57) Abstract: The present invention relates to a method for identifying bacteria by using the nucleic acid of an extracellular vesicle from which external nucleic acids are removed by nuclease treatment. According to the method of the present invention, the usability of a method for identifying bacteria by using an extracellular vesicle can be increased since external nucleic acids of an extracellular vesicle are removed by treating a bacteria-derived extracellular vesicle with a nuclease, and the accuracy of the method for identifying bacteria can be improved.

(57) 요약서: 본 발명은 뉴클레아제를 처리에 의해 외부의 핵산이 제거된 세포막 소포체의 핵산을 이용하여 세균을 동정하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의하면, 세균 유래 세포막 소포체에 뉴클레아제를 처리하여 세포막 소포체 외부의 핵산을 제거함으로써 세포막 소포체를 이용한 세균의 동정방법의 사용 가능성을 높일 수 있으며, 상기 세균 동정방법의 정확성을 향상시킬 수 있다.

WO 2016/140540 A1

## 명세서

### 발명의 명칭: 뉴클레아제가 처리된 세균 유래 세포막 소포체를 이용한 세균 동정

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 뉴클레아제 처리에 의해 외부의 핵산이 제거된 세포막 소포체의 핵산을 분석하여 세균을 동정하는 방법에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 그람 음성균(Gram-negative bacteria) 및 그람 양성균(Gram-positive bacteria)은 세포간 정보교환을 위해 세포막 소포체(extracellular vesicles)를 세포 밖 환경으로 분비한다. 세포막 소포체는 20-200 nm의 직경을 가지는 구형의 인지질 이중층으로 구성되어 있으며, 흔히 나노소포체(nanovesicles)라고도 불린다. 그람 음성균 유래 세포막 소포체는 LPS(lipopolysaccharide), 독성 단백질, 및 세균의 핵산(nucleic acids)인 DNA와 RNA 등을 가지고 있다. 그람 양성균 유래 세포막 소포체는 독성 단백질 및 핵산 이외에 세포벽 구성성분인 펩티도글리칸(peptidoglycan) 및 리포테이코산(lipoteichoic acid)도 함유하고 있다. 또한, 핵산과 같이 세포 밖에서 불안정할 수 있는 물질들은 세포막 소포체 내부에 싸여져서 분비됨으로써 세포 밖에서도 안정하게 존재할 수 있다. 따라서 세포막 소포체는 그 구성 성분이 유래된 세포 또는 세균을 대변한다. 예를 들어, 폐렴구균에서 유래한 세포막 소포체는 폐렴구균 특이적 단백질 및 핵산을 포함하고 있다.
- [3] 한편, 리보솜 RNA(ribosomal RNA; rRNA)는 리보솜을 구성하는 RNA로서, 세포 내 RNA의 약 80%를 차지한다. rRNA는 각 개체별로 동일한 염기 서열 부분과 상이한 염기 서열 부분(variable region)으로 이루어져 있으며, 상이한 염기서열 부분을 분석하여 세균을 구분할 수 있다. 예를 들면, 세균의 작은 30S 리보솜 소단위체를 구성하는 16S rRNA의 서열은 약 1500개의 염기로 구성되어 있으며, 대부분 상당히 보존되어있는 한편, 일부 구간에서는 높은 염기서열의 다양성을 나타낸다. 즉, 세균 종간에는 변화가 매우 적은 부위 중의 하나로 서열의 다양성이 거의 없는 반면 타종 간에는 다양성이 높게 나타나므로 16S rRNA 유전자는 진화론적 계통 분석에 가장 적합하며, 세균 동정에 많이 사용되고 있다.
- [4] 세포막 소포체는 유래된 세포 또는 세균을 대변하고 있기 때문에, 세균의 DNA, rRNA 및 mRNA 등의 핵산을 포함하고 있다. 따라서 세포막 소포체에 존재하는 핵산을 이용하여 세균을 동정하고 감염 여부를 진단하고자 하는 연구들이 수행되고 있다. 하지만 세포막 소포체에 존재하는 핵산은 세포막 소포체의 내부뿐만 아니라 외부에도 존재하며, 외부에 존재하는 핵산은 다른 종의 죽은 세균에서 유래될 가능성이 있어 그 유래가 불분명하기 때문에 핵산의 위치를

고려하지 않고 진단에 사용할 경우, 세균을 정확하게 동정할 수 없으며, 감염질환 진단의 정확성을 떨어뜨릴 수 있다.

- [5] 그러나 아직까지 세포막 소포체 내부와 외부에 존재하는 핵산을 구분하여 진단에 사용한 경우는 없다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [6] 본 발명자들은, 상기와 같은 종래의 문제점 해결을 위하여 세균 유래 세포막 소포체에 뉴클레아제를 처리하여 세포막 외부의 핵산을 제거하였을 때 세포막 소포체에 존재하는 핵산만으로 특정 세균의 동정이 가능함을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [7] 이에, 본 발명은 뉴클레아제가 처리된 세균 유래 세포막 소포체의 핵산을 이용한 세균 동정방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [8] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제 해결 수단

- [9] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 샘플에서 세포막 소포체를 분리하는 단계; (b) 상기 세포막 소포체에 뉴클레아제를 처리하는 단계; (c) 상기 뉴클레아제가 처리된 산물에 대하여 세균 종 특이적인 프라이머를 이용하여 핵산을 분석하는 단계; 및 (d) 상기 분석 산물의 검출 유무에 따라 세균의 존재 여부를 판정하는 단계를 포함하는, 뉴클레아제가 처리된 세균 유래 세포막 소포체를 이용한 세균의 동정방법을 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 (a) 샘플에 뉴클레아제를 처리하는 단계; (b) 상기 뉴클레아제가 처리된 샘플에서 세포막 소포체를 분리하는 단계; (c) 상기 분리된 세포막 소포체에 대하여 세균 종 특이적인 프라이머를 이용하여 핵산을 분석하는 단계; 및 (d) 상기 분석 산물의 검출 유무에 따라 세균의 존재 여부를 판정하는 단계를 포함하는, 뉴클레아제가 처리된 세균 유래 세포막 소포체를 이용한 세균의 동정방법을 제공한다.
- [11] 본 발명의 일 구현예로, 상기 세포막 소포체를 분리하는 단계는 연속적인 원심분리, 초고속원심분리, 폴리머를 이용한 침전법(polymer-based precipitation), 및 겔 여과법 등으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 포함할 수 있다.
- [12] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 (b) 및 (c) 단계 사이에 핵산을 분리 정제하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [13] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 샘플은 혈액, 소변, 복수, 활액, 모유, 가래, 침, 땀, 눈물, 콧물, 및 대변으로 이루어진 군으로부터 선택되는 체액일 수 있다.
- [14] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 샘플은 먼지, 수돗물, 바닷물, 흙, 공기, 및 빗물로 이루어진 군으로부터 선택되는 주변 환경일 수 있다.

- [15] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 샘플은 맥주, 된장, 간장, 김치, 요구르트, 및 요거트로 이루어진 군으로부터 선택되는 발효식품일 수 있다.
- [16] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 뉴클레아제는 디옥시리보뉴클레아제(deoxyribonuclease) 또는 리보뉴클레아제(ribonuclease)인 것을 특징으로 한다.
- [17] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 리보뉴클레아제는 RNase A, RNase H, RNase I, RNase II, RNase III, RNase L, RNase P, RNase PhyM, RNase T1, RNase T2, RNase U2, RNase V, RNase V1, Polynucleotide Phosphorylase, RNase PH, RNase R, RNase D, Oligoribonuclease, Exoribonuclease I, 및 Exoribonuclease II로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [18] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 핵산은 16S rDNA, 16S rRNA, DNA 또는 mRNA일 수 있다.
- [19] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 프라이머는 세균 종 특이적인 16S rRNA, 16S rDNA; 또는 항생제 내성 유전자 또는 병원성 유전자에 대한 DNA 또는 RNA를 타겟으로 하는 것일 수 있다.
- [20] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 핵산 분석은 PCR(polymerase chain reaction), RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction), real-time PCR, real time RT-PCR, 및 FISH(fluorescence in situ hybridization)로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법으로 수행될 수 있다.

### 발명의 효과

- [21] 본 발명의 방법에 의하면, 세균 유래 세포막 소포체에 뉴클레아제를 처리하여 세포막 소포체 외부의 핵산을 제거함으로써 세포막 소포체를 이용한 세균 동정방법의 사용 가능성을 높일 수 있으며, 상기 세균 동정방법의 정확성을 향상시킬 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은, 녹농균(*P. aeruginosa*) 유래 세포막 소포체 분리과정에서 황색포도상구균(*S. aureus*)의 RNA를 넣고 리보뉴클레아제를 처리하거나 처리하지 않았을 때 녹농균과 황색포도상구균 종 특이적 16S rRNA의 프라이머를 이용한 PCR 수행 결과이다.
- [23] 도 2a는, 녹농균(*P. aeruginosa*), 황색포도상구균(*S. aureus*), 및 이들 세균 유래 세포막 소포체의 리보솜 RNA의 존재를 확인한 결과이며, 도 2b는, PCR을 통하여 녹농균(*P. aeruginosa*), 황색포도상구균(*S. aureus*), 이들 세균 유래 세포막 소포체, 및 포유류 세포(SW480, Colon26)에서 세균 공통 16S rRNA, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종 또는 포도상구균(*Staphylococcus*) 종 특이적 16S rRNA, 및 포유류 공통적 18S rRNA를 확인한 결과이다.
- [24] 도 3a 내지 도 3c는, 리보뉴클레아제 처리 유무에 따른 녹농균(*P. aeruginosa*)과 황색포도상구균(*S. aureus*) 유래 세포막 소포체의 RNA를 확인한 결과로써, 도

3a는, 리보뉴클레아제 처리에 의해 전체 RNA의 양이 감소함을 보여주는 결과이고, 도 3b는, 리보뉴클레아제 처리에 의한 녹농균의 16S rRNA와 23S rRNA의 감소를 보여주는 결과이며, 도 3c는, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종 또는 포도상구균(*Staphylococcus*) 종 특이적 16S rRNA 프라이머를 사용하여 녹농균과 황색포도상구균의 16S rRNA의 존재를 PCR로 확인한 결과이다.

- [25] 도 4a 내지 도 4c는, 리보뉴클레아제 처리 유무에 따른 녹농균(*P. aeruginosa*) 유래 세포막 소포체의 세균 공통적 16S rRNA와 녹농균 특이적 유전자인 *acpP*, *aprA*, *katB*, *recN*, 그리고 *rpoD*의 전사체인 mRNA의 양을 실시간 PCR(Real-time PCR)을 통해 확인한 결과로서, 도 4a는, 실시간 PCR 결과 Ct Value(cycles)를 보여주는 결과이고, 도 4b는, Ct Value(cycles)를 표로 나타낸 것이며, 도 4c는, 상기 16S rRNA와 각 전사체들이 세포막 소포체의 외부와 내부에 존재하는 위치를 모식도로 나타낸 것이다.

- [26] 도 5a 내지 도 5c는, 리보뉴클레아제 처리 유무에 따른 황색포도상구균(*S. aureus*) 유래 세포막 소포체의 세균 공통적 16S rRNA와 황색포도상구균 특이적 유전자인 *atlA* 및 *clfB*의 전사체인 mRNA의 양을 실시간 PCR(Real-time PCR)을 통해 확인한 결과로서, 도 5a는, 실시간 PCR 결과 Ct Value(cycles)를 보여주는 결과이고, 도 5b는, Ct Value(cycles)를 표로 나타낸 것이며, 도 5c는, 상기 16S rRNA와 각 전사체들이 세포막 소포체의 외부와 내부에 존재하는 위치를 모식도로 나타낸 것이다.

- [27] 도 6a 및 도 6b는, 마우스에 녹농균(*P. aeruginosa*) 유래 세포막 소포체를 복강 투여하고 마우스에서 샘플을 얻어 리보뉴클레아제를 처리한 후 시간별로 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종 특이적 16S rRNA와 마우스의 18S rRNA의 존재를 PCR을 통해 확인한 결과로서, 도 6a는 혈액 샘플, 도 6b는 소변 샘플을 이용해 PCR을 수행한 결과이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [28] 본 발명은 뉴클레아제 처리에 의해 외부의 핵산이 제거된 세균 유래 세포막 소포체의 핵산을 이용한 세균 동정방법을 제공한다.

- [29] 본 발명의 일 실시예에서는, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래 세포막 소포체 분리과정에서 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 전체 RNA를 넣어준 후 분리된 녹농균 유래 세포막 소포체에 리보뉴클레아제(ribonuclease; RNase)를 처리하였다. 소포체를 터트려 모든 핵산을 얻고 디옥시리보뉴클레아제(deoxyribonuclease; DNase)를 처리하여 RNA만을 얻은 후 PCR을 수행한 결과, 리보뉴클레아제 처리에 의해 황색포도상구균 유래 RNA는 분해되어 동정되지 않았으며, 녹농균이 속하는 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종 특이적인 16S rRNA는 동정되었다. 따라서 다양한 세균이 존재하는 상황에서 세포막 소포체의 리보솜 RNA를 통해 특정세균을 동정할 수 있음을 확인하였다(실시예 1 참조).

- [30] 본 발명의 다른 실시예에서는, 녹농균과 황색포도상구균 세포 및 상기 세균들 유래 세포막 소포체로부터 모두 세균의 공통적인 16S rRNA와 23S rRNA가 존재함을 확인하였다. 또한, 인간 및 마우스 유래 포유동물세포(SW480, Colon26)에서 각각 RNA를 분리하여 상기 세균 및 세균 유래 세포막 소포체와 함께 PCR을 수행한 결과, 녹농균과 황색포도상구균 세포 및 이들 세균 유래 세포막 소포체에서 세균의 공통적인 16S rRNA를 확인하였고, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 또는 포도상구균(*Staphylococcus*) 종 특이적 프라이머를 이용한 경우 각각 녹농균과 황색포도상구균이 동정되었다. 포유류 세포에서는 포유류의 공통적인 18S rRNA만이 동정됨을 확인하였다(실시예 2 참조).
- [31] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 녹농균 또는 황색포도상구균 유래 세포막 소포체에 리보뉴클레아제를 처리한 경우 전체 RNA의 약 96-97%가 제거된 것을 확인하였다. 하지만 16S rRNA의 경우 리보뉴클레아제 처리 후에도 소포체 내부에 소량 존재하였으며, PCR을 통해 세균의 공통적 16S rRNA, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 또는 포도상구균(*Staphylococcus*) 종 특이적 16S rRNA를 동정함으로써 리보뉴클레아제 처리에 의해 대부분의 핵산이 제거되나, 세포막 소포체 내부의 소량의 핵산을 통해 세균의 동정이 가능함을 확인하였다(실시예 3 참조).
- [32] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 녹농균 또는 황색포도상구균의 세포막 소포체에 리보뉴클레아제를 처리한 후 소포체를 터트려 모든 핵산을 얻은 후 디옥시리보뉴클레아제를 처리하여 RNA만을 얻어 실시간 PCR을 수행하여 세균 공통적인 16S rRNA와 녹농균 또는 황색포도상구균에 특이적인 유전자 전사체의 양을 확인하였다. 상기 두 가지 세균의 경우 모두 세균의 공통적인 16S rRNA는 세포막 소포체 내부에 소량 남아있음을 확인하였으며, 각 세균에 특이적인 유전자의 전사체들은 대부분 소포체 내부에 존재하는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [33] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 마우스에 녹농균 유래 세포막 소포체를 복강으로 주입한 후 혈액과 소변을 얻어 리보뉴클레아제를 처리한 결과, PCR을 통해 혈액과 소변에서 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종 특이적인 16S rRNA를 확인함으로써 녹농균을 동정하였다(실시예 5 참조).
- [34] 본 발명은 샘플에서 세포막 소포체를 분리하는 단계; 상기 세포막 소포체에 뉴클레아제를 처리하는 단계; 상기 뉴클레아제가 처리된 산물에 대하여 세균 종 특이적인 프라이머를 이용하여 핵산을 분석하는 단계; 및 상기 분석 산물의 검출 유무에 따라 세균의 존재 여부를 판정하는 단계를 포함하는 뉴클레아제가 처리된 세균 유래 세포막 소포체를 이용한 세균의 동정방법을 제공한다.
- [35] 또한, 본 발명은 샘플에 뉴클레아제를 처리하는 단계; 상기 뉴클레아제가 처리된 샘플에서 세포막 소포체를 분리하는 단계; 상기 분리된 세포막 소포체에 대하여 세균 종 특이적인 프라이머를 이용하여 핵산을 분석하는 단계; 및 상기 분석 산물의 검출 유무에 따라 세균의 존재 여부를 판정하는 단계를 포함하는

뉴클레아제가 처리된 세균 유래 세포막 소포체를 이용한 세균의 동정방법을 제공한다.

- [36] 본 발명의 상기 세포막 소포체는 세포에서 분리되고, 이중 지질막에 의해 내부와 외부가 구분되며, 유래한 세포의 세포막 지질과 세포막 단백질, 유전자, 및 대사물등을 가지고 있다. 또한, 상기 세포막 소포체는 구형의 형태를 가지며 직경이 20 내지 1000 nm일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [37] 본 발명의 상기 핵산 분석 이전 단계에서는 세포막 소포체로부터 핵산을 분리 정제하는 단계를 더 포함할 수 있고, 상기 세포막 소포체로부터 핵산을 분리하는 과정은 기존에 세포나 조직에서 유전자를 분리하는 방법과 원리는 동일하며, 유전자를 분리하는 방법이 이에 제한되는 것은 아니다.
- [38] 본 발명에서 상기 샘플은 혈액, 소변, 복수, 활액, 모유, 가래, 침, 땀, 눈물, 콧물, 및 대변 등 체내 유래를 포함하며, 먼지, 수돗물, 바닷물, 흙, 공기, 및 빗물 등의 주변 환경 유래, 또는 맥주, 된장, 간장, 김치, 요구르트, 및 요거트 등 발효 식품에서 얻을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [39] 본 발명의 상기 샘플에서 세포막 소포체를 분리하는 방법은 연속적인 원심분리(centrifugation), 초고속원심분리(ultracentrifugation), 폴리머를 이용한 침전법(polymer-based precipitation), 및 겔 여과법(gel filtration)을 통해 수행될 수 있으며, 기존에 세포막 소포체를 분리하는 방법에 따르나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [40] 본 발명에서 사용되는 용어, “뉴클레아제”는 핵산을 뉴클레오티드(nucleotide)로 가수분해할 때 촉매작용을 하는 효소를 의미하며, 넓은 의미로는 뉴클레오티드나 뉴클레오시드(nucleoside)의 가수분해에 관여하는 효소도 포함한다. 본 발명의 상기 뉴클레아제는 디옥시리보뉴클레아제(deoxyribonuclease; DNase) 또는 리보뉴클레아제(ribonuclease; RNase)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [41] 또한, 본 발명의 상기 리보뉴클레아제는 RNase A, RNase H, RNase I, RNase II, RNase III, RNase L, RNase P, RNase PhyM, RNase T1, RNase T2, RNase U2, RNase V, RNase V1, Polynucleotide Phosphorylase, RNase PH, RNase R, RNase D, Oligoribonuclease, Exoribonuclease I, 및 Exoribonuclease II로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [42] 본 발명에서 사용되는 용어, “핵산”은 오탄당, 인산기, 염기로 구성된 뉴클레오티드(nucleotide)인 모노머(monomer)로 구성된 생명체의 유전물질로서, 대표적으로 DNA(deoxyribonucleic acid)와 RNA(ribonucleic acid)를 포함한다. 보다 구체적으로 DNA를 포함하는 디옥시리보핵산은 DNA, mtDNA, 및 cDNA 등이 있고, RNA를 포함하는 리보핵산은 RNA, mRNA, tRNA, rRNA, ncRNA, sgRNA, shRNA, siRNA, snRNA, miRNA, snoRNA 및 LNA 등이 있으며, 그밖에 핵산 유사체인 GNA, PNA, TNA, 및 모폴리노(morpholino) 등을 포함한다. 본 발명의 상기 핵산은 16S rDNA, 16S rRNA, DNA, 및/또는 mRNA일 수 있으나,

이에 제한되는 것은 아니다.

- [43] 상기 세포밖 소포체의 구성 성분 중에서 분석에 사용되는 핵산은 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR), 역전사중합효소연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(real time polymerase chain reaction; real time PCR), 실시간 역전사중합효소연쇄반응(real time reverse transcription polymerase chain reaction; real time RT-PCR), 및 제자리형광잡종화(Fluorescence in situ hybridization; FISH) 등을 통해 확인될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 중합효소연쇄반응을 위한 프라이머는 세균 종 특이적인 16S rRNA, 16S rDNA; 또는 항생제 내성 유전자 또는 병원성 유전자에 대한 DNA 또는 RNA를 타겟으로 할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[44]

- [45] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[46]

[47] [실시예]

- [48] 실시예 1. 다양한 세균 존재하에서 세균 유래 세포밖 소포체의 리보솜 RNA를 통한 특정 세균의 동정

- [49] 다양한 세균이 존재하는 상황에서 특정 세균을 동정하기 위한 방법으로서는, 세균 유래 세포밖 소포체 안에 존재하는 리보솜 RNA(ribosomal RNA; rRNA)를 이용하여 세균을 동정하고자 하였다.

- [50] 구체적으로, 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)을 키운 배양액을 원심분리하고, 상층액을 얻어 0.45  $\mu\text{m}$ 와 0.22  $\mu\text{m}$  필터에 차례로 걸러 배양액 내의 세포를 제거한 후 배양액에 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*)의 RNA를 넣어주었다. 이후 상기 배양액을 4°C에서 150,000 g로 3시간 동안 초고속원심분리하여 배양액으로부터 녹농균 유래 세포밖 소포체를 분리하였다. 분리한 녹농균 유래 세포밖 소포체에 RNA 분해효소인 리보뉴클레아제(Ribonuclease; RNase)를 처리하거나 처리하지 않고 95°C에서 10분 동안 배양하여 소포체를 터트리 세포밖 소포체 안과 밖에 존재하는 모든 핵산이 나오도록 하였다. 디옥시리보뉴클레아제(Deoxyribonuclease; DNase)를 처리하여 세포밖 소포체로부터 나온 핵산에서 DNA를 제거한 후 DNase 억제제를 통해 DNase 활성을 저해하고, 랜덤 프라이머(random primer), AMV 역전사효소(reverse transcriptase), dNTP, 리보뉴클레아제 억제제(RNase inhibitor)를 넣고 cDNA 합성을 수행하였다. 이후 합성한 cDNA를 주형으로 사용하여 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종 특이적인 16S rRNA와 포도상구균(*Staphylococcus*) 종 특이적인 16S rRNA의 존재 여부를 PCR을 통해 확인하였다.

- [51] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 리보뉴클레아제를 처리하지 않은 녹농균

유래 세포막 소포체에서는 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종 특이적인 16S rRNA와 포도상구균(*Staphylococcus*) 종 특이적인 16S rRNA가 모두 동정되었다. 반면에 리보뉴클레아제를 처리한 녹농균 유래 세포막 소포체에서는 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종 특이적인 16S rRNA만이 동정되었다. 따라서 리보뉴클레아제 처리를 통해 배양액에 넣어준 포도상구균의 RNA가 분해되어 동정되지 않았음을 확인하였다.

[52]

[53] 실시예 2. 세균 유래 세포막 소포체에서 리보솜 RNA 존재 확인[54] 세균 유래 세포막 소포체에 리보솜 RNA가 존재하는지 확인하기 위해 그람 음성균인 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)과 그람 양성균인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 및 상기 두 가지 세균의 배양액에서 분리한 세포막 소포체에서 리보솜 RNA를 확인하였다.[55] 녹농균 유래 세포막 소포체는 녹농균을 LB 배지가 들어있는 플라스크에 넣고 37°C 인큐베이터(incubator)에서 O.D. 600 측정값이 1.5가 될 때까지 배양한 후 4°C에서 6,000 g로 20분 동안 원심분리를 수행하여 녹농균 세포를 제거하였다. 상층액을 0.45  $\mu$ m 필터로 통과시켜 남아있는 세균을 제거한 뒤에 100 kD 멤브레인(membrane)을 가지는 필터를 이용하여 100 kD보다 큰 사이즈를 가지는 세포 배양액만을 분리하여 농축하였다. 100 kD보다 큰 사이즈를 가지는 농축된 세포 배양액을 0.22  $\mu$ m 필터로 거른 후 4°C에서 150,000 g로 3시간 동안 초고속원심분리를 수행하여 세포막 소포체를 얻었다.

[56] 황색포도상구균 유래 세포막 소포체는 황색포도상구균을 nutrient broth 배지가 들어있는 플라스크에 넣고 37°C 인큐베이터에서 O.D. 600 측정값이 1.5가 될 때까지 배양한 후 4°C에서 10,000 g로 20분 동안 원심분리를 수행하여 세포를 제거하였다. 이후 과정은 상기 녹농균의 경우와 동일하게 수행하여 황색포도상구균 유래 세포막 소포체를 얻었다.

[57] 녹농균 또는 황색포도상구균에서 얻은 세포와 세포막 소포체로부터 RNA를 분리하기 위해 PowerMicrobiome™ RNA 분리 키트(MoBio)를 이용하였다.  $\beta$ -mercaptoethanol을 포함하는 lysis buffer를 각각의 세포와 세포막 소포체에 처리한 뒤에 glass bead를 이용하여 화학적 그리고 물리적인 파쇄를 수행하였다. 원심분리를 통해 glass bead를 제거한 후 얻은 상층액을 RNA만이 결합하는 컬럼(column)에 처리하였다. 컬럼에 RNA가 결합한 상태에서 DNase를 처리하여 최종적으로 DNA가 제거된 RNA만을 분리하였다.

[58] 또한, 세균 또는 세균 유래 세포막 소포체에서 분리한 RNA와 비교하기 위하여 포유동물의 세포에서 RNA를 분리하였다. 인간 유래 세포의 경우 SW480 세포에서, 마우스 유래 세포의 경우 Colon26 세포에서 miRNeasy RNA 분리 키트(QIAGEN)를 이용하여 RNA 추출을 수행하였다. 각각의 세포에 TRIzol 용액을 처리하고 5분 동안 배양한 뒤에 클로로포름(chloroform)을 처리하여 aqueous phase를 얻었다. Aqueous phase를 100% 에탄올과 섞은 뒤에 RNA만

결합하는 컬럼에 처리하였다. 컬럼에 RNA가 결합한 상태에서 DNase를 처리하여 최종적으로 DNA가 제거된 RNA만을 분리하였다.

- [59] 녹농균 및 황색포도상구균 세포와 세포막 소포체에서 얻은 RNA를 Bioanalyzer 2100 장비를 이용하여 전체 RNA를 분석하였다. 그 결과, 도 2a에 나타낸 바와 같이, 녹농균 세포(*P. aeruginosa* cell)와 녹농균 유래 세포막 소포체(*P. aeruginosa* EV), 황색포도상구균 세포(*S. aureus* cell)와 황색포도상구균 유래 세포막 소포체(*S. aureus* EV) 모두 16S rRNA와 23S rRNA가 존재함을 확인하였다.
- [60] 상기 결과에 더하여 PCR을 통해 리보솜 RNA의 존재를 확인하기 위해 상기 녹농균과 황색포도상구균 세포 및 각 세균 유래 세포막 소포체, 그리고 포유류 세포에서 얻은 RNA(1  $\mu$ g)를 이용하여 실시예 1의 방법과 동일하게 cDNA 합성을 수행하였다. 합성한 cDNA를 주형으로 사용하여 세균 공통적인 16S rRNA, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종 특이적인 16S rRNA, 포도상구균(*Staphylococcus*) 종 특이적인 16S rRNA, 그리고 포유류 공통적인 18S rRNA를 증폭시키기 위한 각각의 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다.
- [61] 그 결과, 도 2b에 나타낸 바와 같이, 녹농균 및 황색포도상구균 세포와 세포막 소포체는 모두 세균의 공통적인 16S rRNA가 존재하는 반면에 포유동물세포에는 세균 공통적인 16S rRNA는 존재하지 않았다. 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종 특이적인 16S rRNA는 녹농균 유래 세포와 세포막 소포체에서만 동정되었으며, 포도상구균(*Staphylococcus*) 종 특이적인 16S rRNA는 황색포도상구균 유래 세포와 세포막 소포체에서만 동정되는 종 특이적인 특성을 보였다. 반면에 포유류 공통적인 18S rRNA는 포유동물세포에서는 동정되었으나, 세균 유래 세포와 세포막 소포체에서는 모두 동정되지 않았다.

[62]

[63] 실시예 3. 리보뉴클레아제 처리 후 세균 유래 세포막 소포체의 리보솜 RNA 존재 확인

- [64] 상기 실시예 2의 방법으로 얻은 녹농균 또는 황색포도상구균 유래 세포막 소포체에 리보뉴클레아제 1  $\mu$ g/ml을 37°C에서 10분 동안 처리한 후 리보뉴클레아제 억제제를 처리하고 4°C에서 150,000 g로 3시간 동안 초고속원심분리를 수행하여 리보뉴클레아제가 처리된 세포막 소포체를 다시 얻었다.
- [65] 리보뉴클레아제를 처리하거나 또는 처리하지 않은 세포막 소포체에서 실시예 2의 방법으로 각각 RNA를 얻어 정량한 결과, 도 3a에 나타낸 바와 같이, 세포막 소포체가 가지고 있는 전체 RNA 양의 96-97%가 리보뉴클레아제 처리에 의해 제거됨을 확인하였다. 또한, 도 3b에 나타낸 바와 같이, 리보뉴클레아제를 처리하거나 또는 처리하지 않은 녹농균 유래 세포막 소포체에서 RNA를 분리하여 Bioanalyzer 2100 장비로 분석한 결과, 대부분의 16S rRNA와 23S rRNA가 제거되었으나, 여전히 소량의 16S rRNA가 리보뉴클레아제 처리 후에도

남아있음을 확인하였다.

- [66] 또한, 리보뉴클레아제를 처리하거나 처리하지 않은 녹농균 또는 황색포도상구균 유래 세포막 소포체에서 얻은 RNA(1  $\mu$ g)를 이용하여 실시예 1의 방법과 동일하게 cDNA 합성을 수행하였다. 합성한 cDNA를 주형으로 사용하여 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종 특이적인 16S rRNA 또는 포도상구균(*Staphylococcus*) 종 특이적인 16S rRNA의 존재 여부를 PCR을 통해 확인하였다.
- [67] 그 결과, 도 3c에 나타낸 바와 같이, 리보뉴클레아제를 처리하면 대부분의 16S rRNA가 제거되어 처리 전에 존재하는 16S rRNA에 비해 소량 존재함을 확인하였다.
- [68] 상기 결과들을 통해 녹농균 또는 황색포도상구균 유래 세포막 소포체에 존재하는 16S rRNA는 대부분이 소포체 밖에 존재하여 리보뉴클레아제 처리에 의해 제거되나, 여전히 소포체 안에 소량의 16S rRNA가 존재하며 이들은 각각의 종 특이적인 프라이머에 의해 PCR을 통해 증폭 가능함을 확인하였다.

[69]

[70] 실시예 4. 리보뉴클레아제 처리 후 세포막 소포체 내부에 존재하는 리보솜 RNA와 전사체 확인

- [71] 실시예 3의 방법으로 녹농균 또는 황색포도상구균 유래 세포막 소포체에 리보뉴클레아제를 처리하거나 처리하지 않은 후 상기 각각의 세균 유래 세포막 소포체(10  $\mu$ g in proteins)를 95°C에서 10분 동안 배양하여 세포막 소포체를 터트려 세포막 소포체 안과 밖에 존재하는 모든 핵산이 나오도록 하였다. 이후 DNase를 처리하여 DNA를 제거한 뒤에 DNase 억제제 처리를 통해 DNase 활성을 저해한 후 실시예 1의 방법과 동일하게 cDNA 합성을 수행하였다. 합성한 cDNA를 주형으로 사용하여 세균 공통적인 16S rRNA와 녹농균 또는 황색포도상구균 특이적인 전사체에 대한 실시간 PCR(Real-time PCR)을 수행하여 각 RNA 양의 변화를 확인하였다.
- [72] 녹농균의 경우, 녹농균 특이적인 유전자로써 아실 캐리어 단백질(Acyl carrier protein; ACP)을 암호화하는 *acpP* 유전자, 알칼라인 프로테아제(Alkaline protease)를 암호화하는 *aprA* 유전자, 카탈라아제(Catalase)를 암호화하는 *katB* 유전자, DNA 리페어 단백질(DNA repair protein) RecN을 암호화하는 *recN* 유전자, 및 RNA 폴리머레이즈 시그마 팩터(RNA polymerase sigma factor) RpoD를 암호화하는 *rpoD* 유전자의 각 전사체 즉, 각 유전자의 전사를 통해 생성된 mRNA 양을 확인하였다.
- [73] 그 결과, 도 4a 및 도 4b에 나타낸 바와 같이, 녹농균 유래 세포막 소포체는 리보뉴클레아제 처리에 의해 16S rRNA는 Ct(threshold cycle) 값이 15 cycles 정도 뒤에 나오는 반면, 전사체(*acpP*, *aprA*, *katB*, *recN*, 그리고 *rpoD*)는 차이가 없거나 대부분 5 cycles 정도 뒤에 값이 나왔다. 상기 결과는 도 4c에 나타낸 바와 같이, 대부분의 16S rRNA는 바깥쪽에 존재하나 일부는 여전히 세포막 소포체의 안쪽에 존재하고, 전사체 중 *aprA*는 리보뉴클레아제 영향을 받지 않았으므로

모두 세포막 소포체 안쪽에 존재하며, *acpP*, *katB*, *recN*, 그리고 *rpoD*는 대부분 세포막 소포체 안쪽에 존재하나 일부는 바깥쪽에 존재함을 의미한다.

- [74] 황색포도상구균의 경우에는 황색포도상구균 특이적인 유전자로써 가수분해효소인 *AtlA*를 암호화하는 *atlA* 유전자와 clumping factor B(*ClfB*)를 암호화하는 *clfB* 유전자의 각 전사체 즉, mRNA의 양을 확인하였다.
- [75] 그 결과, 도 5a 및 도 5b에 나타낸 바와 같이, 황색포도상구균 유래 세포막 소포체는 리보뉴클레아제 처리에 의해 16S rRNA의 Ct(threshold cycle) 값이 10 cycles 정도 뒤에 나오는 반면, 전사체(*atlA* 그리고 *clfB*)는 cycle에 큰 차이가 없었다. 상기 결과는 도 5c에 나타낸 바와 같이, 대부분의 세균 공통적인 16S rRNA는 바깥쪽에 존재하나 일부는 여전히 안쪽에 존재하며, 전사체인 *atlA*와 *clfB*는 리보뉴클레아제 영향을 받지 않았으므로 대부분이 세포막 소포체 안쪽에 존재함을 의미한다.

[76]

- [77] 실시예 5. 마우스 동물모델에서 혈액과 소변에 존재하는 세포막 소포체 유래 리보솜 RNA와 전사체 확인

- [78] 마우스에 녹농균 유래 세포막 소포체를 주입한 후 마우스의 혈액과 소변을 얻어 리보뉴클레아제를 처리하였을 때 세포막 소포체 유래 리보솜 RNA와 전사체 확인을 통해 녹농균의 동정이 가능한지 검증하였다.

- [79] 마우스(C57BL/6, male, 6-8주)에 녹농균 유래 세포막 소포체(10  $\mu$ g in proteins)를 복강 주입하고 0, 0.5, 2, 6, 그리고 24시간 뒤에 혈액과 소변을 얻었다. 마우스 혈액과 소변에 리보뉴클레아제를 처리한 후, 별도의 세균 유래 세포막 소포체의 분리 과정 없이 PowerMicrobiome™ RNA 분리 키트(MoBio)를 이용하여 RNA를 분리하였다. 마우스 혈액과 소변에서 얻은 RNA(1  $\mu$ g)를 이용하여 실시예 1의 방법에 따라 cDNA 합성을 수행하였다. 합성한 cDNA를 주형으로 PCR을 수행하여 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종 특이적인 16S rRNA 그리고 마우스 특이적인 18S rRNA의 존재 여부를 확인하였다.

- [80] 그 결과, 도 6a에 나타낸 바와 같이, 마우스 혈액에서 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종 특이적인 16S rRNA는 0.5시간부터 동정되기 시작하며 이후 24시간으로 갈수록 감소하는 경향성을 보이며, 마우스 특이적인 18S rRNA는 0.5시간에서만 동정되었다.

- [81] 또한, 도 6b에 나타낸 바와 같이, 마우스 소변에서는 슈도모나스(*Pseudomonas*) 종 특이적인 16S rRNA는 2시간부터 동정되기 시작하며 이후 24시간으로 갈수록 감소하는 경향성을 보이며, 18S rRNA는 동정되지 않았다.

- [82] 상기 결과를 통해 마우스 혈액과 소변에 존재하는 복강 주입한 녹농균 유래 세포막 소포체의 바깥쪽에 존재하는 핵산, 특히 리보솜 RNA가 리보뉴클레아제 처리에 의해 전부 제거되어도 세포막 소포체 안쪽에 존재하는 리보솜 RNA에 의해 녹농균 동정이 가능함을 확인하였다.

[83]

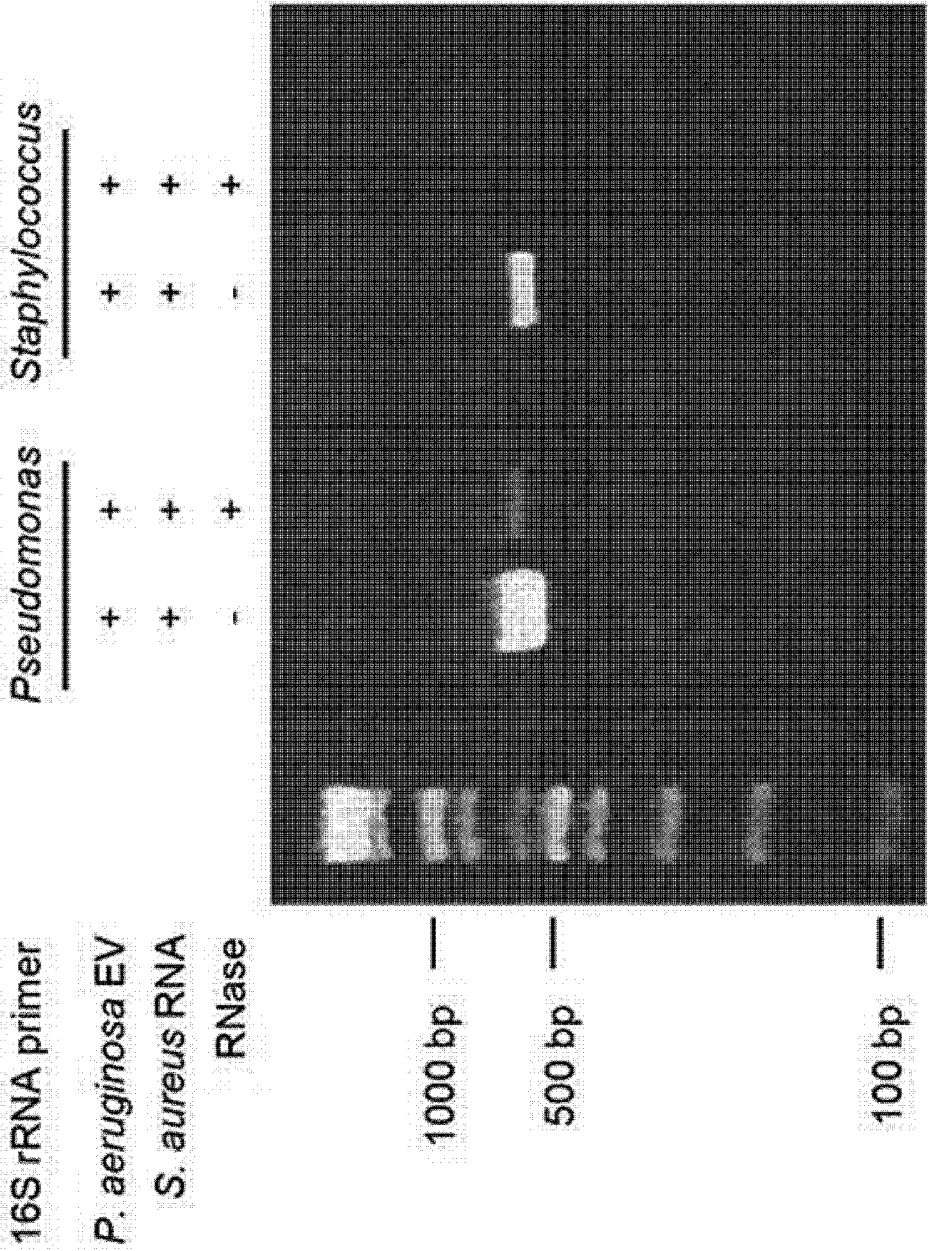
- [84]      상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

## 청구범위

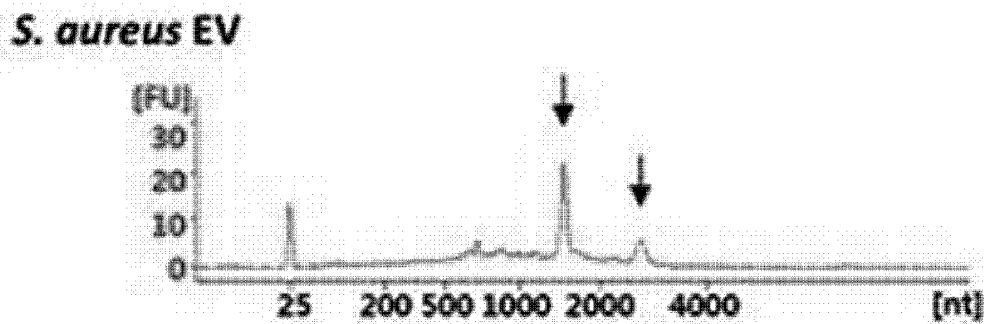
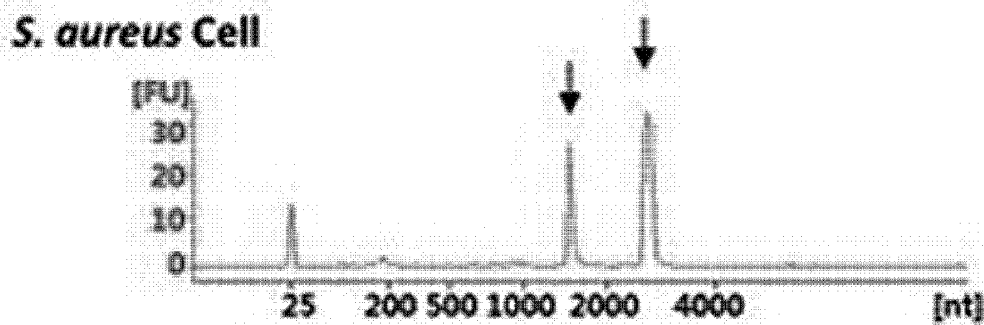
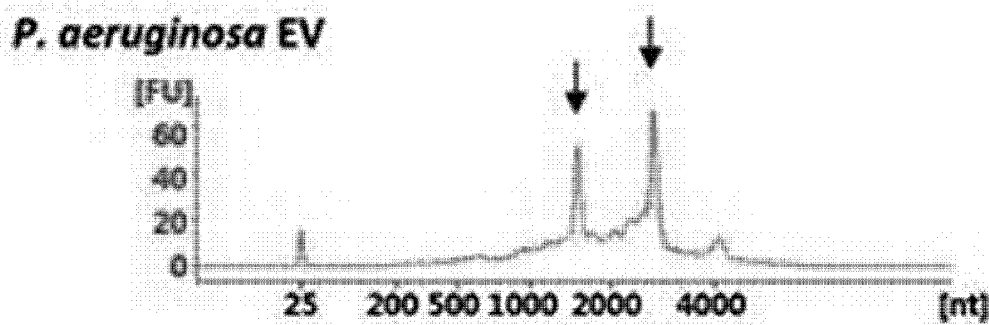
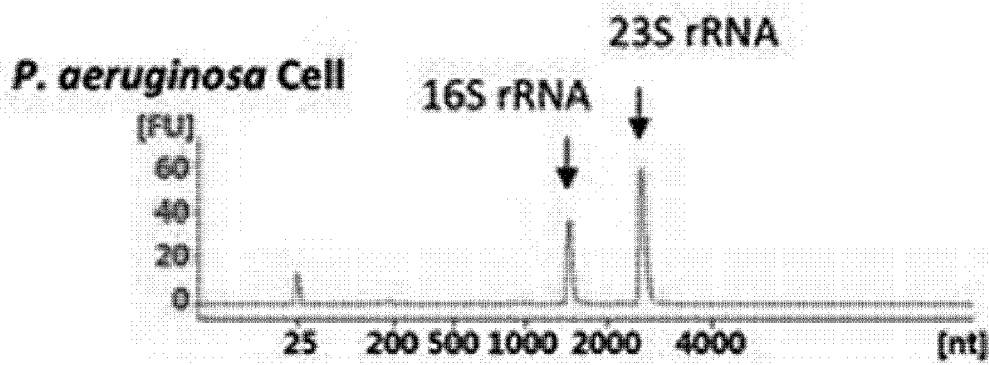
- [청구항 1] 하기의 단계를 포함하는, 뉴클레아제가 처리된 세균 유래 세포막 소포체를 이용한 세균의 동정방법:  
 (a) 샘플에서 세포막 소포체를 분리하는 단계;  
 (b) 상기 세포막 소포체에 뉴클레아제를 처리하는 단계;  
 (c) 상기 뉴클레아제가 처리된 산물에 대하여 세균 종 특이적인 프라이머를 이용하여 핵산을 분석하는 단계; 및  
 (d) 상기 분석 산물의 검출 유무에 따라 세균의 존재 여부를 판정하는 단계.
- [청구항 2] 하기의 단계를 포함하는, 뉴클레아제가 처리된 세균 유래 세포막 소포체를 이용한 세균의 동정방법:  
 (a) 샘플에 뉴클레아제를 처리하는 단계;  
 (b) 상기 뉴클레아제가 처리된 샘플에서 세포막 소포체를 분리하는 단계;  
 (c) 상기 분리된 세포막 소포체에 대하여 세균 종 특이적인 프라이머를 이용하여 핵산을 분석하는 단계; 및  
 (d) 상기 분석 산물의 검출 유무에 따라 세균의 존재 여부를 판정하는 단계.
- [청구항 3] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
 상기 세포막 소포체를 분리하는 단계는 연속적인 원심분리, 초고속원심분리, 폴리머를 이용한 침전법(polymer-based precipitation), 및 겔 여과법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법을 포함하는 것을 특징으로 하는, 동정방법.
- [청구항 4] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
 상기 (b) 및 (c) 단계 사이에 핵산을 분리 정제하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 동정방법.
- [청구항 5] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
 상기 샘플은 혈액, 소변, 복수, 활액, 모유, 가래, 침, 땀, 눈물, 콧물, 및 대변으로 이루어진 군으로부터 선택되는 체액인 것을 특징으로 하는, 동정방법.
- [청구항 6] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
 상기 샘플은 먼지, 수돗물, 바닷물, 흙, 공기, 및 빗물로 이루어진 군으로부터 선택되는 주변 환경인 것을 특징으로 하는, 동정방법.
- [청구항 7] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
 상기 샘플은 맥주, 된장, 간장, 김치, 요구르트, 및 요거트로 이루어진 군으로부터 선택되는 발효식품인 것을 특징으로 하는, 동정방법.
- [청구항 8] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
 상기 뉴클레아제는 디옥시리보뉴클레아제(deoxyribonuclease) 또는

- 리보뉴클레아제(ribonuclease)인 것을 특징으로 하는, 동정방법.
- [청구항 9] 제 8 항에 있어서,  
 상기 리보뉴클레아제는 RNase A, RNase H, RNase I, RNase II, RNase III, RNase L, RNase P, RNase PhyM, RNase T1, RNase T2, RNase U2, RNase V, RNase V1, Polynucleotide Phosphorylase, RNase PH, RNase R, RNase D, Oligoribonuclease, Exoribonuclease I, 및 Exoribonuclease II로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 동정방법.
- [청구항 10] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
 상기 핵산은 16S rDNA, 16S rRNA, DNA, 또는 mRNA인 것을 특징으로 하는, 동정방법.
- [청구항 11] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
 상기 프라이머는 세균 종 특이적인 16S rRNA, 16S rDNA; 또는 항생제 내성 유전자 또는 병원성 유전자에 대한 DNA 또는 RNA를 타겟으로 하는 것을 특징으로 하는, 동정방법.
- [청구항 12] 제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,  
 상기 (c) 단계에서 핵산 분석은 PCR(polymerase chain reaction), RT-PCR(reverse transcription polymerase chain reaction), real time PCR, real-time RT-PCR, 및 FISH(fluorescence in situ hybridization)로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법으로 수행되는 것을 특징으로 하는, 동정방법.

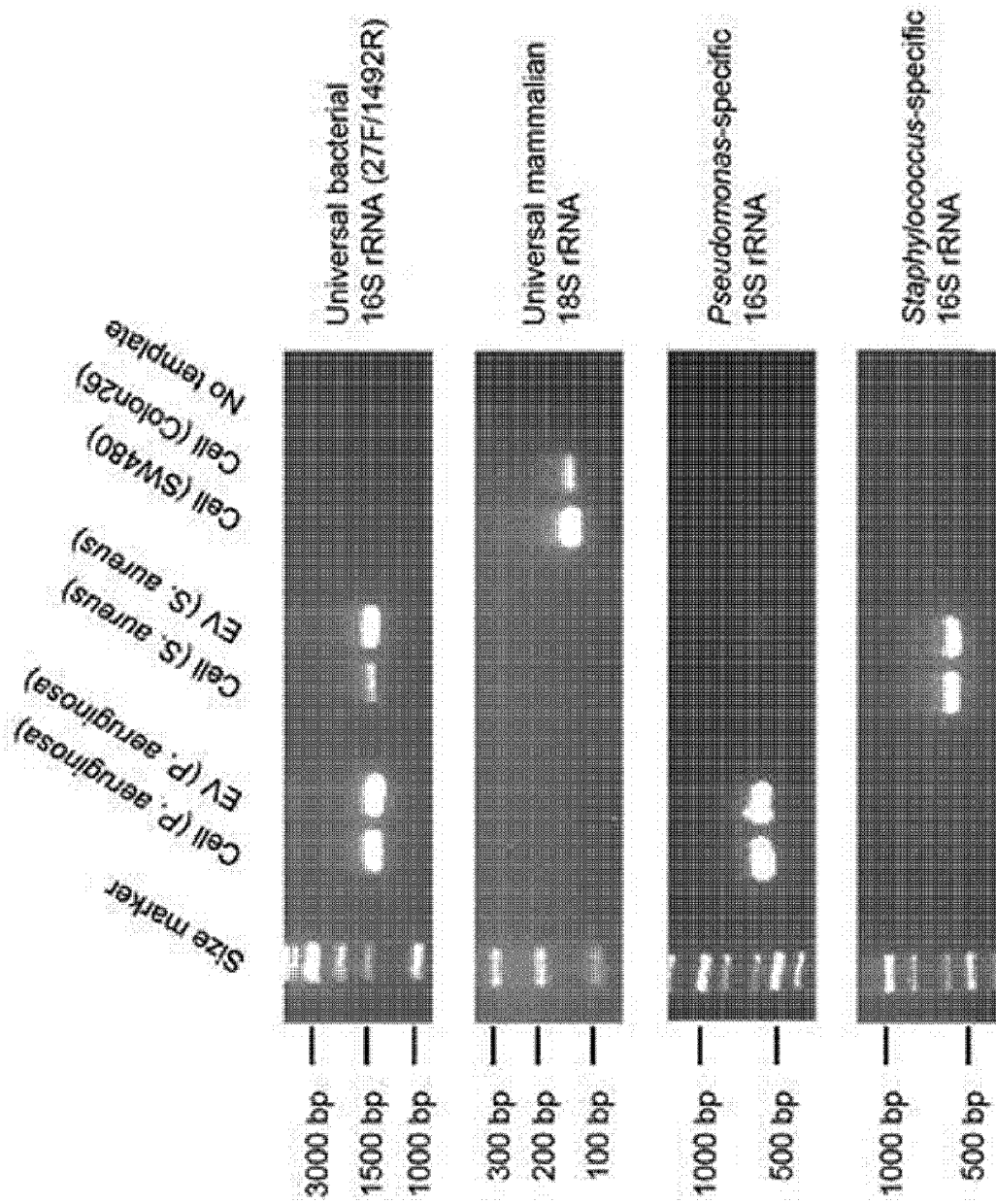
[도1]



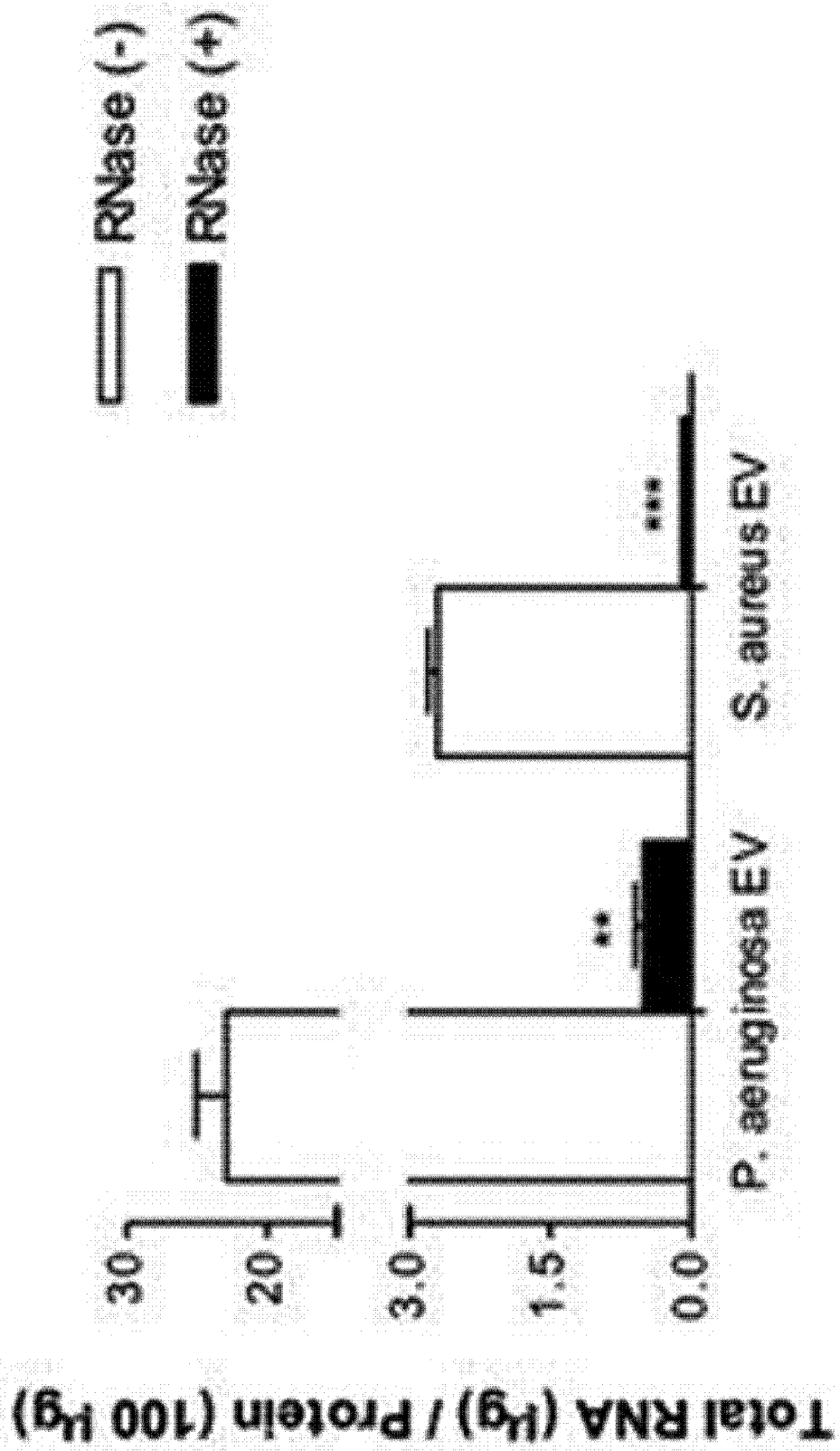
[도2a]



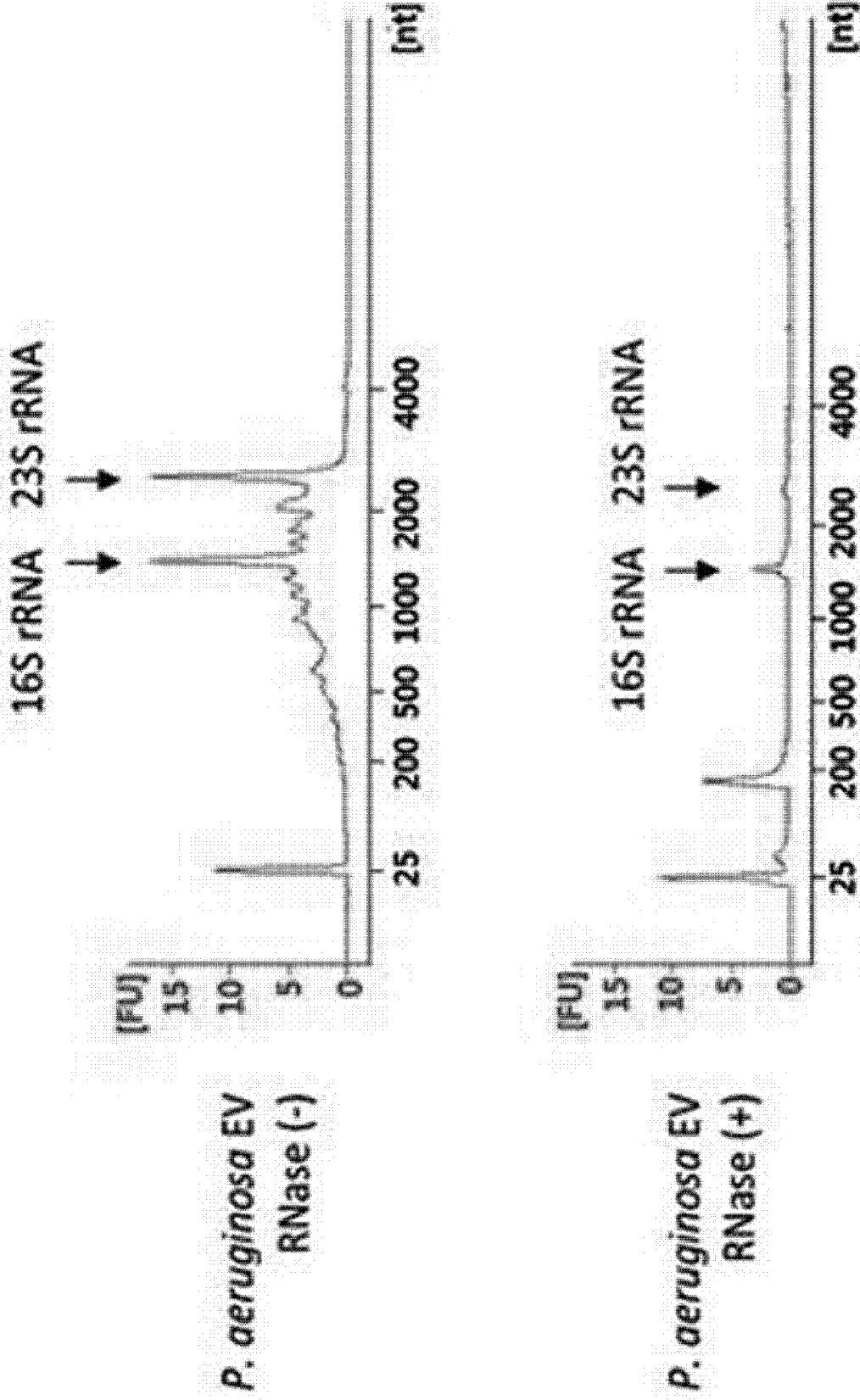
[도2b]



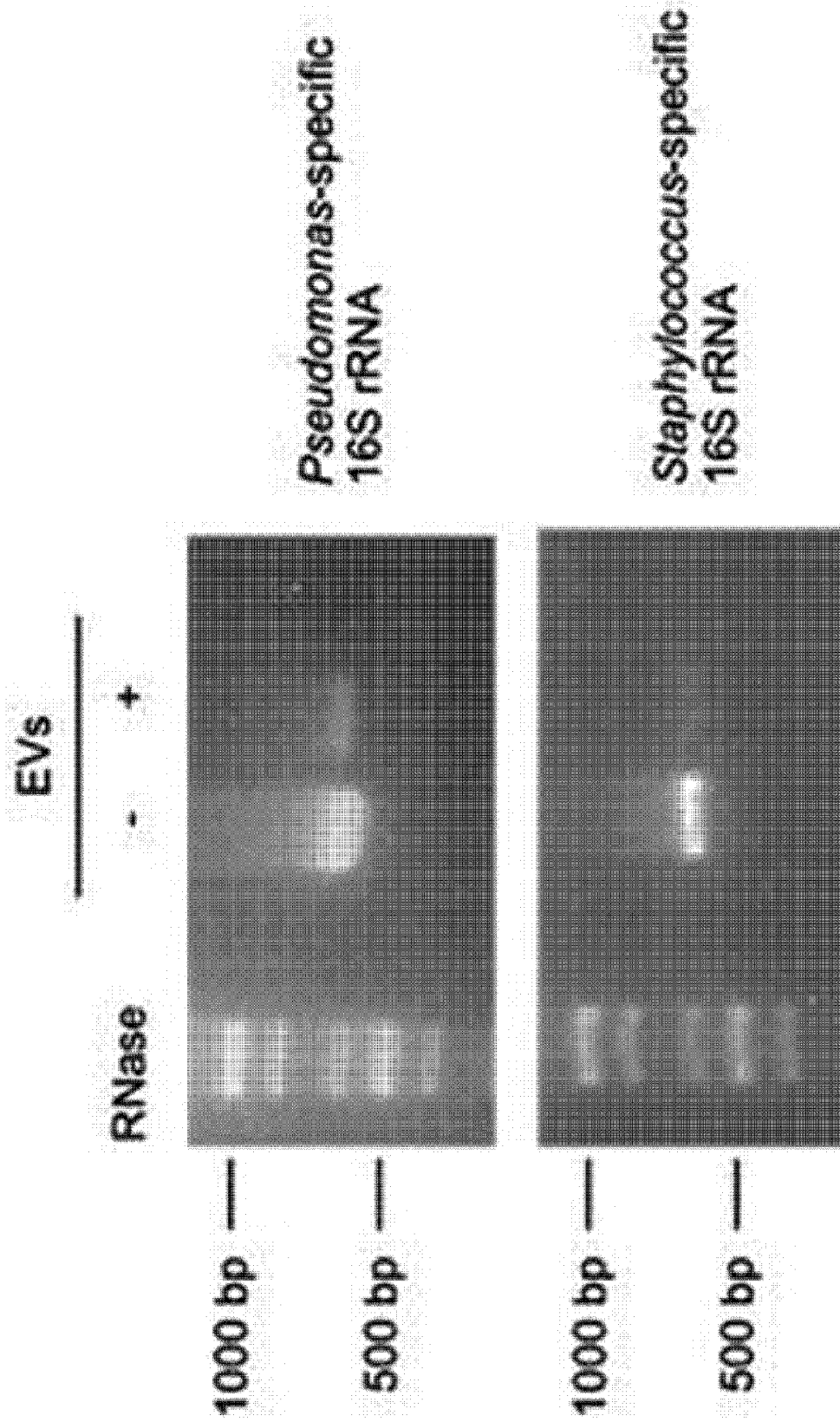
[도3a]



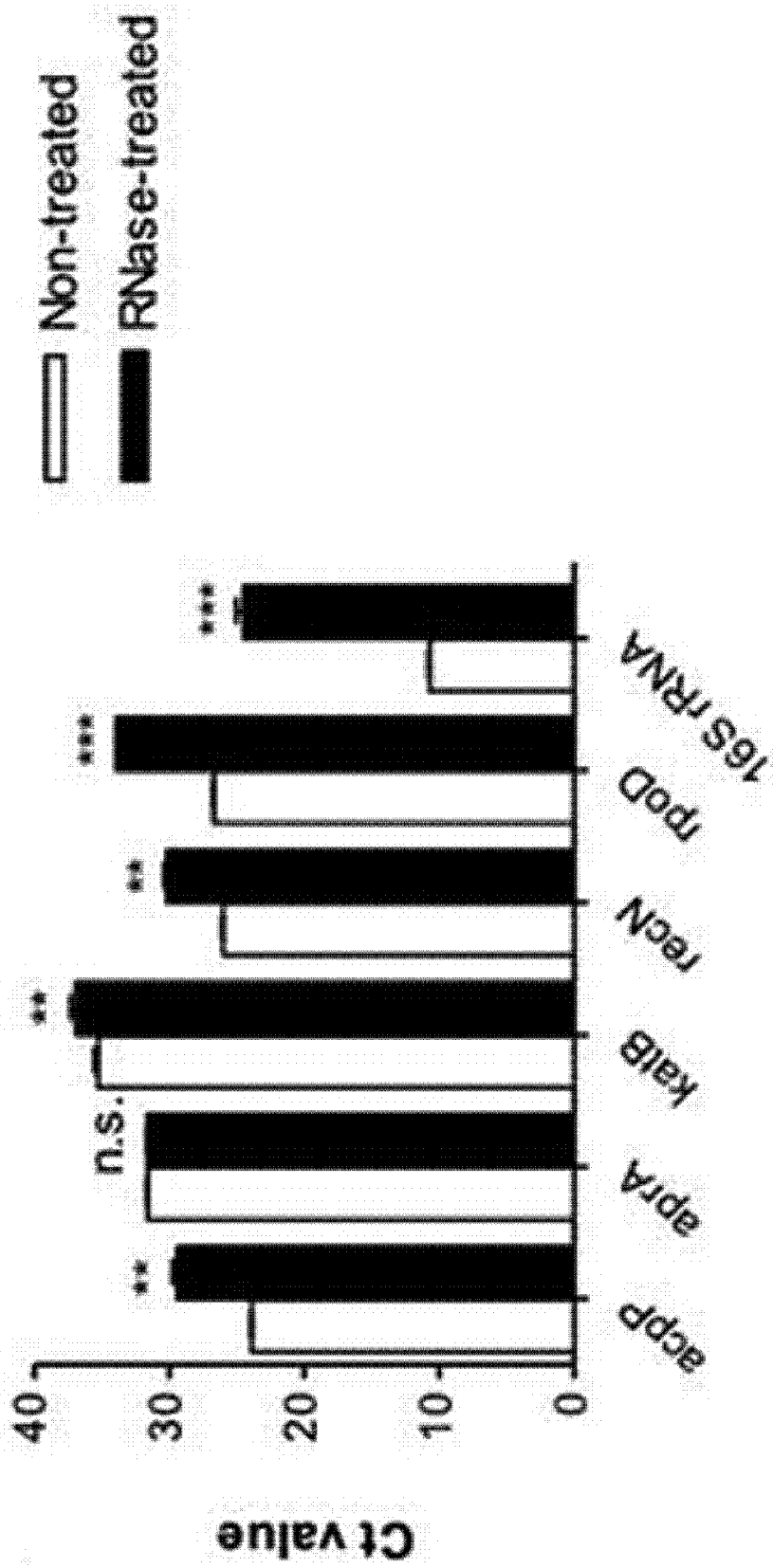
[도3b]



[도3c]



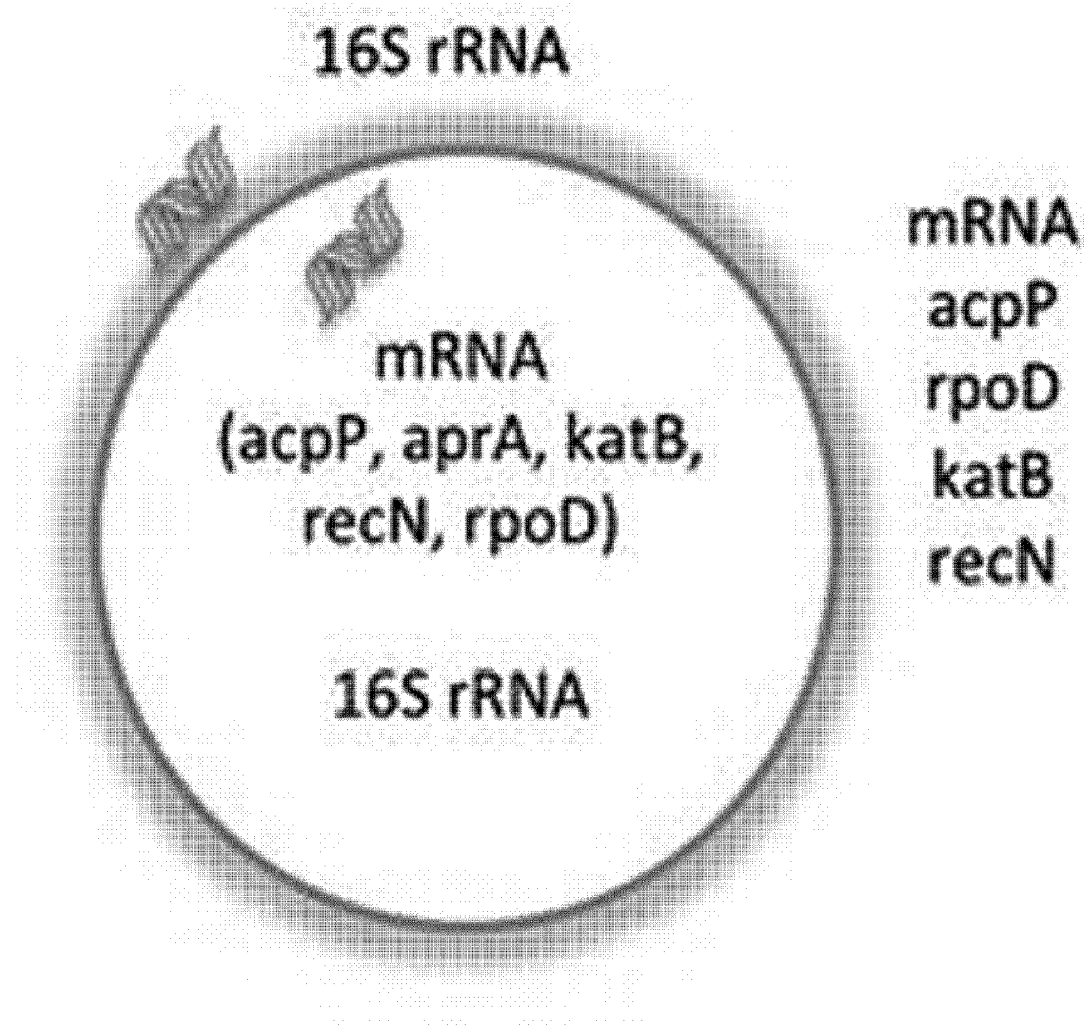
[도4a]



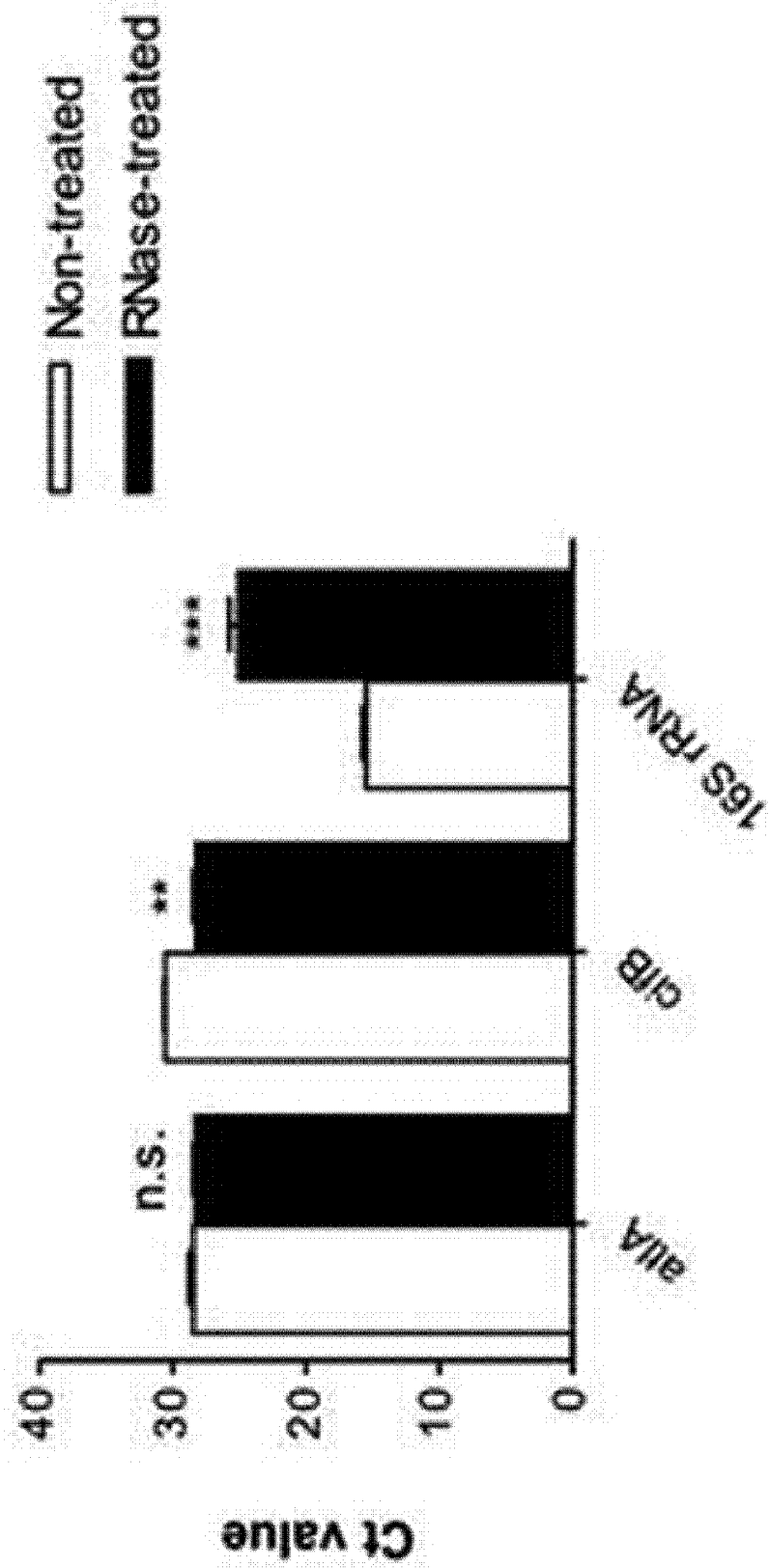
[도4b]

| <i>P. aeruginosa</i> EV |          |             |               |
|-------------------------|----------|-------------|---------------|
| Type                    | Gene     | Non-treated | RNase-treated |
| mRNA                    | acpP     | 23.9 ± 0.08 | 29.4 ± 0.37   |
|                         | apra     | 31.6 ± 0.08 | 31.6 ± 0.08   |
|                         | katB     | 35.3 ± 0.26 | 36.9 ± 0.41   |
|                         | recN     | 26.0 ± 0.10 | 30.2 ± 0.17   |
|                         | rpoD     | 26.7 ± 0.10 | 33.9 ± 0.05   |
| rRNA                    | 16S rRNA | 10.7 ± 0.07 | 24.5 ± 0.55   |

[도4c]



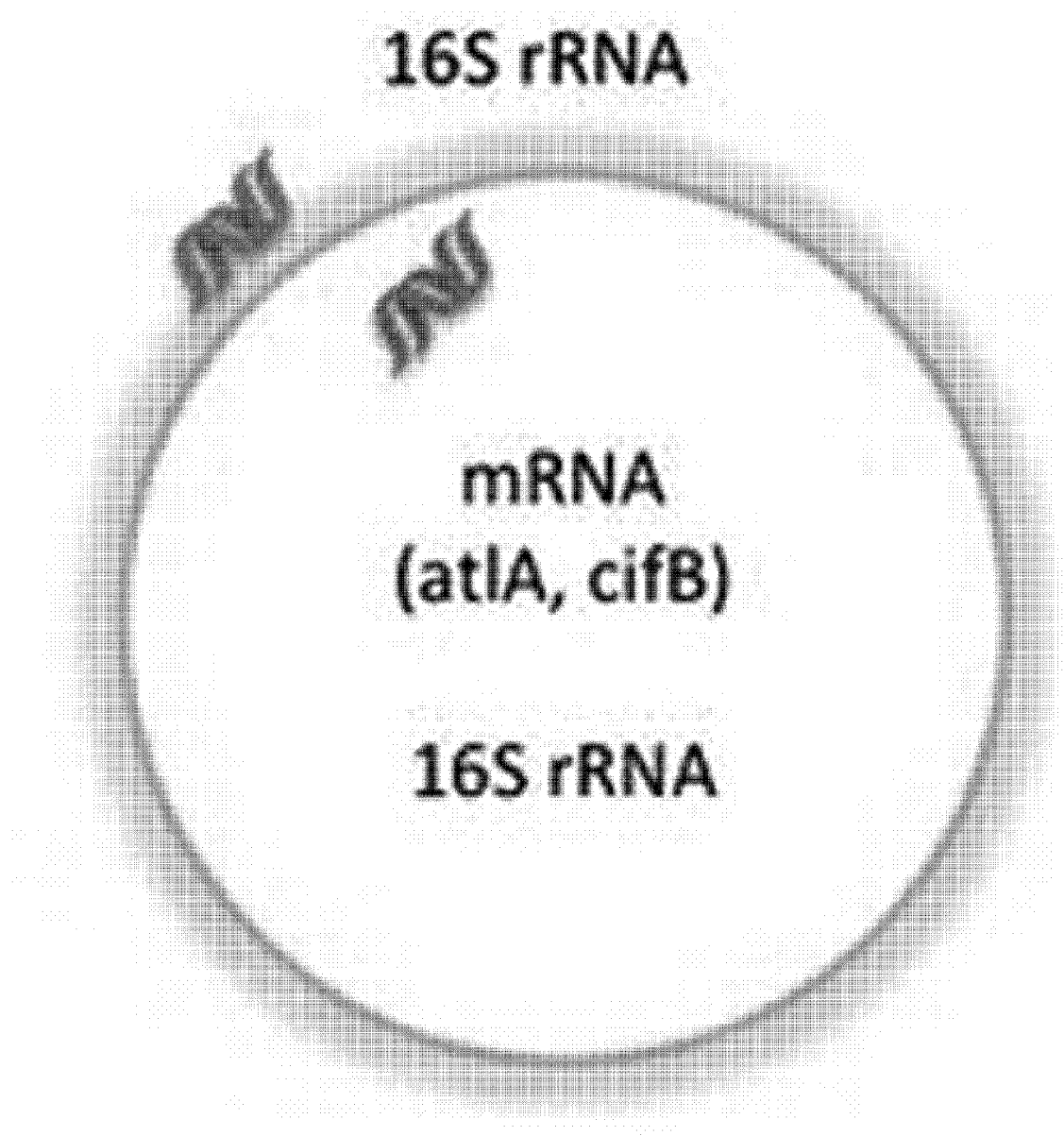
[도5a]



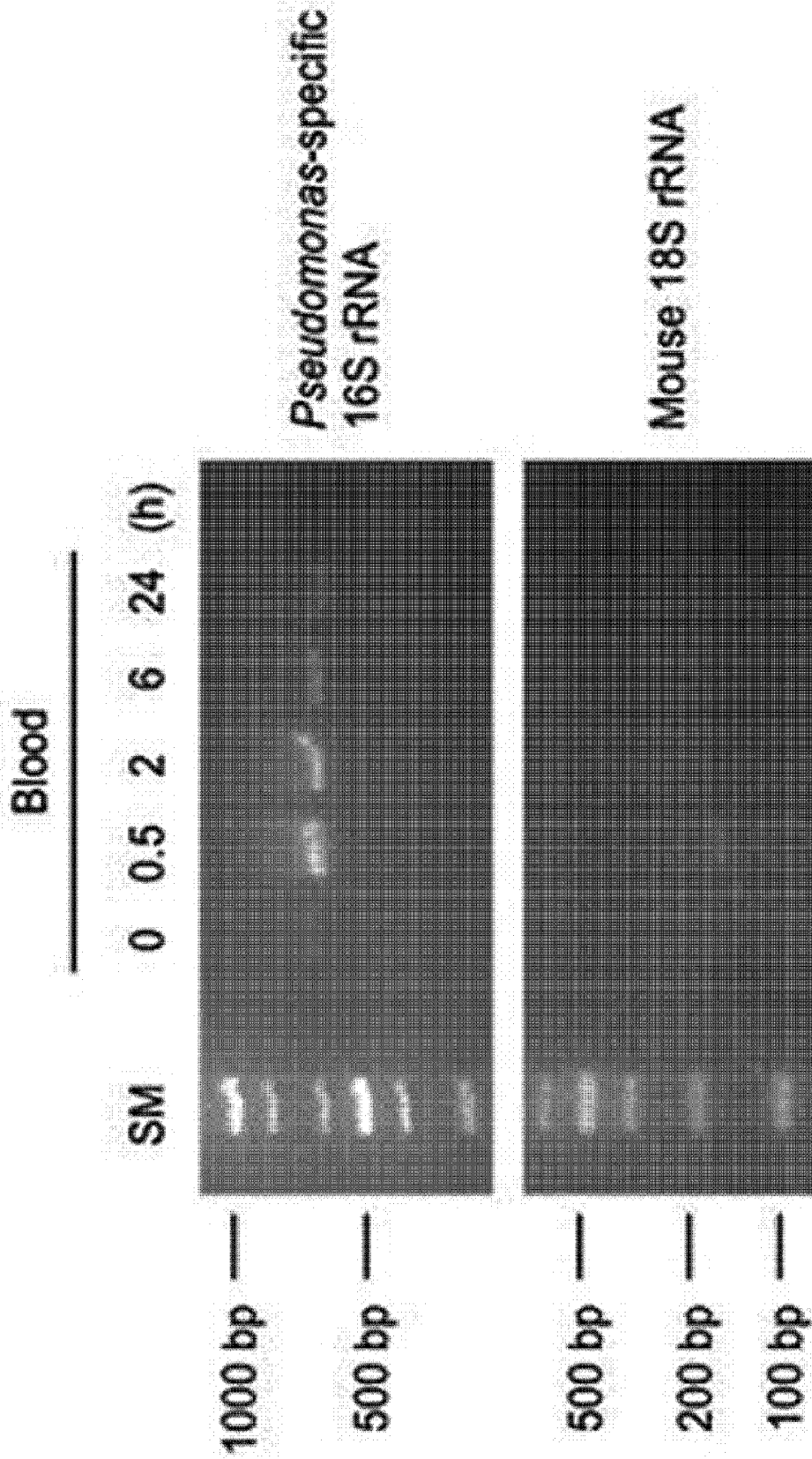
[도5b]

| <i>S. aureus</i> EV |          |             |               |
|---------------------|----------|-------------|---------------|
| Type                | Gene     | Non-treated | RNase-treated |
| mRNA                | atIA     | 28.5 ± 0.27 | 28.4 ± 0.16   |
|                     | clfB     | 30.6 ± 0.08 | 28.3 ± 0.25   |
| rRNA                | 16S rRNA | 15.5 ± 0.29 | 25.1 ± 0.70   |

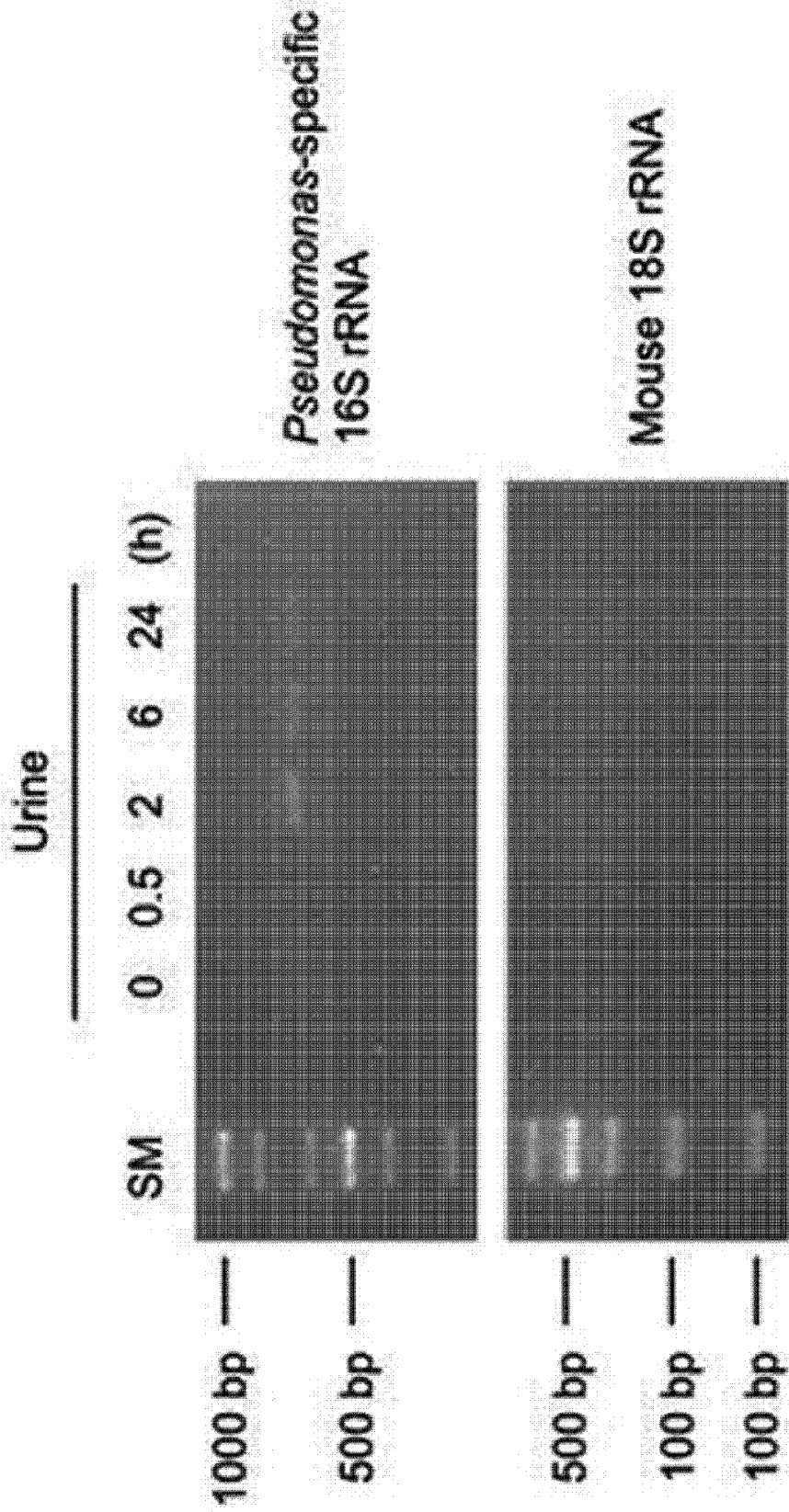
[도5c]



[도6a]



[도6b]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/002165

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12Q 1/68(2006.01)i, C12Q 1/44(2006.01)i*

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)

C12Q 1/68; C12N 1/00; A01K 67/027; G01N 33/68; C12Q 1/44

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: endoplasmic reticulum, germ, identification, nuclease, extracellular, exosome, centrifugation, PCR

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | KR 10-2011-0025603 A (AEON MEDIX INC.) 10 March 2011<br>See abstract; claims 14-26, 121-129; and examples 2, 27.                                                                                                                                  | 1-12                  |
| Y         | MIRANDA et al., "Massively Parallel Sequencing of Human Urinary Exosome/<br>Microvesicle RNA reveals a Predominance of Non-coding RNA"<br>PLoS One, Vol. 9, Issue No.5, e96094 (internal pages 1-9) (2014)<br>See abstract; page 3; and figure 1. | 1-12                  |
| A         | GHOSAL et al., "The Extracellular RNA Complement of Escherichia Coli"<br>MicrobiologyOpen, Vol. 4, No. 2, pp. 252-266 (e-pub. 21 January 2015)<br>See the entire document.                                                                        | 1-12                  |
| A         | HILL et al., "ISEV Position Paper: Extracellular Vesicle RNA Analysis and Bioinformatics"<br>Journal of Extracellular Vesicles, Vol. 2, 22859 (internal pages 1-8) (2013)<br>See the entire document.                                             | 1-12                  |
| A         | KR 10-2012-0111788 A (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION)<br>11 October 2012<br>See the entire document.                                                                                                                                         | 1-12                  |



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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 MAY 2016 (25.05.2016)

Date of mailing of the international search report

01 JUNE 2016 (01.06.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 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/KR2016/002165**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| KR 10-2011-0025603 A                      | 10/03/2011          | CN 102480932 A          | 30/05/2012          |
|                                           |                     | CN 102480932 B          | 14/01/2015          |
|                                           |                     | CN 102549143 A          | 04/07/2012          |
|                                           |                     | CN 102549143 B          | 29/10/2014          |
|                                           |                     | EP 2484752 A2           | 08/08/2012          |
|                                           |                     | EP 2494865 A2           | 05/09/2012          |
|                                           |                     | JP 2013-503857 A        | 04/02/2013          |
|                                           |                     | JP 2013-503858 A        | 04/02/2013          |
|                                           |                     | JP 5785947 B2           | 30/09/2015          |
|                                           |                     | JP 5818793 B2           | 18/11/2015          |
|                                           |                     | KR 10-1430283 B1        | 14/08/2014          |
|                                           |                     | US 2012-0159658 A1      | 21/06/2012          |
|                                           |                     | US 2012-0222142 A1      | 30/08/2012          |
|                                           |                     | US 2015-0017664 A1      | 15/01/2015          |
|                                           |                     | US 2015-0232934 A1      | 20/08/2015          |
|                                           |                     | US 8969653 B2           | 03/03/2015          |
|                                           |                     | US 9201072 B2           | 01/12/2015          |
|                                           |                     | US 9273359 B2           | 01/03/2016          |
|                                           |                     | US 9274109 B2           | 01/03/2016          |
|                                           |                     | WO 2011-027956 A2       | 10/03/2011          |
|                                           |                     | WO 2011-027956 A3       | 28/04/2011          |
|                                           |                     | WO 2011-027971 A2       | 10/03/2011          |
|                                           |                     | WO 2011-027971 A3       | 25/08/2011          |
|                                           |                     | WO 2011-027990 A2       | 10/03/2011          |
|                                           |                     | WO 2011-027990 A3       | 03/11/2011          |
| KR 10-2012-0111788 A                      | 11/10/2012          | NONE                    |                     |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

C12Q 1/68(2006.01)i, C12Q 1/44(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; C12N 1/00; A01K 67/027; G01N 33/68; C12Q 1/44

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: 소포체, 세균, 동정, 뉴클레아제, 세포막, 엑소솜, 원심분리, PCR

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                                   | 관련 청구항 |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Y     | KR 10-2011-0025603 A (주식회사이엔메딕스) 2011.03.10<br>요약; 청구항 14-26, 121-129; 및 실시예 2, 27 참조.                                                                                                                                       | 1-12   |
| Y     | MIRANDA 등, 'Massively parallel sequencing of human urinary<br>exosome/microvesicle RNA reveals a predominance of non-coding RNA'<br>PLoS One, Vol.9, Issue No.5, e96094 (internal pages 1-9) (2014)<br>요약; 페이지 3; 및 도면 1 참조. | 1-12   |
| A     | GHOSAL 등, 'The extracellular RNA complement of Escherichia coli'<br>MicrobiologyOpen, Vol.4, No.2, pp.252-266 (e-pub. 2015.01.21)<br>전체 문헌 참조.                                                                               | 1-12   |
| A     | HILL 등, 'ISEV position paper: extracellular vesicle RNA analysis and<br>bioinformatics'<br>Journal of Extracellular Vesicles, Vol.2, 22859 (internal pages 1-8) (2013)<br>전체 문헌 참조.                                          | 1-12   |
| A     | KR 10-2012-0111788 A (포항공과대학교 산학협력단) 2012.10.11<br>전체 문헌 참조.                                                                                                                                                                 | 1-12   |

☐ 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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 05월 25일 (25.05.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 06월 01일 (01.06.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청  
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



국제조사보고서에서  
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

|                      |            |                    |            |
|----------------------|------------|--------------------|------------|
| KR 10-2011-0025603 A | 2011/03/10 | CN 102480932 A     | 2012/05/30 |
|                      |            | CN 102480932 B     | 2015/01/14 |
|                      |            | CN 102549143 A     | 2012/07/04 |
|                      |            | CN 102549143 B     | 2014/10/29 |
|                      |            | EP 2484752 A2      | 2012/08/08 |
|                      |            | EP 2494865 A2      | 2012/09/05 |
|                      |            | JP 2013-503857 A   | 2013/02/04 |
|                      |            | JP 2013-503858 A   | 2013/02/04 |
|                      |            | JP 5785947 B2      | 2015/09/30 |
|                      |            | JP 5818793 B2      | 2015/11/18 |
|                      |            | KR 10-1430283 B1   | 2014/08/14 |
|                      |            | US 2012-0159658 A1 | 2012/06/21 |
|                      |            | US 2012-0222142 A1 | 2012/08/30 |
|                      |            | US 2015-0017664 A1 | 2015/01/15 |
|                      |            | US 2015-0232934 A1 | 2015/08/20 |
|                      |            | US 8969653 B2      | 2015/03/03 |
|                      |            | US 9201072 B2      | 2015/12/01 |
|                      |            | US 9273359 B2      | 2016/03/01 |
|                      |            | US 9274109 B2      | 2016/03/01 |
|                      |            | WO 2011-027956 A2  | 2011/03/10 |
|                      |            | WO 2011-027956 A3  | 2011/04/28 |
|                      |            | WO 2011-027971 A2  | 2011/03/10 |
|                      |            | WO 2011-027971 A3  | 2011/08/25 |
|                      |            | WO 2011-027990 A2  | 2011/03/10 |
|                      |            | WO 2011-027990 A3  | 2011/11/03 |
| KR 10-2012-0111788 A | 2012/10/11 | 없음                 |            |