



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년06월09일  
(11) 등록번호 10-0834587  
(24) 등록일자 2008년05월27일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2004-0022793

(22) 출원일자 2004년04월02일

심사청구일자 2004년04월02일

(65) 공개번호 10-2004-0086612

(43) 공개일자 2004년10월11일

(30) 우선권주장

JP-P-2003-00099452 2003년04월02일 일본(JP)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

FEMS Microbiology Letters, VOL.213(2),  
pp.175-182

전체 청구항 수 : 총 3 항

(73) 특허권자

캐논 가부시끼가이샤

일본 도쿄도 오오따꾸 시모마루쵸 3쵸메 30방 2고

(72) 발명자

야마모토노부코

일본국도쿄도오오따꾸시모마루쵸3쵸메30방2고캐논  
가부시끼가이샤나이

오구라마사야

일본국도쿄도오오따꾸시모마루쵸3쵸메30방2고캐논  
가부시끼가이샤나이

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

신중훈, 임옥순

심사관 : 신경아

(54) 감염증 병원체 검출용 프로브 세트, 담체 및 유전자 확인방법

(57) 요약

감염증 병원체 유전자를 검출하는 감염증 병원체 검출용 프로브 세트는, 서열번호 1 내지 14의 염기서열 및 그의 상보적 서열을 포함하는 제 1군과, 서열번호 15 내지 24의 염기서열 및 그의 상보적 서열을 포함하는 제 2군과, 서열번호 25 내지 36의 염기서열 및 그의 상보적 서열을 포함하는 제 3군과, 서열번호 37 내지 47의 염기서열 및 그의 상보적 서열을 포함하는 제 4군과, 서열번호 48 내지 57의 염기서열 및 그의 상보적 서열을 포함하는 제 5군과, 서열번호 58 내지 68의 염기서열 및 그의 상보적 서열을 포함하는 제 6군과, 서열번호 69 내지 77의 염기서열 및 그의 상보적 서열을 포함하는 제 7군과, 서열번호 78 내지 85의 염기서열 및 그의 상보적 서열을 포함하는 제 8군과, 서열번호 86 내지 97의 염기서열 및 그의 상보적 서열을 포함하는 제 9군과, 서열번호 98 내지 106의 염기서열 및 그의 상보적 서열을 포함하는 제 10군으로부터 선택된 복수군의 각각으로부터 선택된 염기서열을 지닌 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 복수 종류의 프로브를 포함한다.

(72) 발명자

**카와구치마사히로**

일본국도쿄도오오따꾸시모마루쵸3쵸메30방2고캐논  
가부시끼가이샤나이

**츠카다마모루**

일본국도쿄도오오따꾸시모마루쵸3쵸메30방2고캐논  
가부시끼가이샤나이

**요시이히로토**

일본국도쿄도오오따꾸시모마루쵸3쵸메30방2고캐논  
가부시끼가이샤나이

**스즈키토모히로**

일본국도쿄도오오따꾸시모마루쵸3쵸메30방2고캐논  
가부시끼가이샤나이

**이시이미에**

일본국도쿄도오오따꾸시모마루쵸3쵸메30방2고캐논  
가부시끼가이샤나이

**후쿠이토시후미**

일본국도쿄도오오따꾸시모마루쵸3쵸메30방2고캐논  
가부시끼가이샤나이

(30) 우선권주장

|                    |             |        |
|--------------------|-------------|--------|
| JP-P-2003-00099453 | 2003년04월02일 | 일본(JP) |
| JP-P-2003-00099454 | 2003년04월02일 | 일본(JP) |
| JP-P-2003-00099455 | 2003년04월02일 | 일본(JP) |
| JP-P-2003-00099456 | 2003년04월02일 | 일본(JP) |
| JP-P-2003-00099457 | 2003년04월02일 | 일본(JP) |
| JP-P-2003-00099458 | 2003년04월02일 | 일본(JP) |
| JP-P-2003-00099459 | 2003년04월02일 | 일본(JP) |
| JP-P-2003-00099460 | 2003년04월02일 | 일본(JP) |
| JP-P-2003-00099461 | 2003년04월02일 | 일본(JP) |
| JP-P-2003-00099462 | 2003년04월02일 | 일본(JP) |
| JP-P-2003-00099463 | 2003년04월02일 | 일본(JP) |
| JP-P-2004-00077045 | 2004년03월17일 | 일본(JP) |

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

서열번호 15 내지 24의 염기서열 및 그의 상보적 서열 중 어느 하나를 지닌 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 감염증 검출용 프로브를 포함하는, 표피 포도상 구균(*Staphylococcus epidermidis*) 유래의 유전자를 검출가능한 프로브 세트.

### 청구항 2

제 1항에 기재된 프로브 세트에 포함되는 감염증 검출용 프로브가 화학적으로 고정되어 있는 담체.

### 청구항 3

제 2항에 기재된 담체를 이용해서, 샘플로부터 표피 포도상 구균 유래의 유전자의 존재 유무를 확인하는 방법.

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

삭제

### 청구항 6

삭제

### 청구항 7

삭제

### 청구항 8

삭제

### 청구항 9

삭제

### 청구항 10

삭제

### 청구항 11

삭제

### 청구항 12

삭제

### 청구항 13

삭제

### 청구항 14

삭제

### 청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

## 청구항 48

삭제

## 청구항 49

삭제

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 발명의 목적

#### 발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <1> 본 발명은, 감염증 환자의 병원체(etiological agent)(즉, 병 혹은 염증 등을 유발하는 원인균으로서의 병원균 혹은 기생균(起生菌) 등)로서의 감염증 병원체의 검출 및/또는 동정에 관한 것으로, 특히, 감염증 환자의 병원체의 검출 및 동정에 유용한 감염증 병원체에 유래하는 프로브 세트, 그리고 담체, 나아가서는 유전자 확인 방법에 관한 것이다.
- <2> 본 발명은, 또한, 감염증 병원체의 검출 및/또는 동정에 적합한 감염증 병원체의 PCR증폭처리에 관한 것이다.
- <3> 근년, DNA칩(이하, "DNA 마이크로어레이(microarray)"라고도 함)을 이용한 유전자 발현해석이약품 개발을 포함한 각종 영역에서 행해지고 있다. 그것은, 각종 유전자세트(프로브)가 배치된 DNA 마이크로어레이에, 각각 다른 검체 DNA를 반응시키고, 각 검체에 존재하는 각각의 유전자량을 비교해서, 각 스테이지에서 대량으로 존재하는(발현량이 높은) 유전자, 혹은 역으로 불활성화하고 있는(발현량이 낮은) 유전자를 분류해서, 기능과 관련해서 해석하는 것이다.
- <4> 감염증 병원체의 검사는, 그 일례이며, 예자키 등의 일본국 공개특허 제 2001-299396호에 있어서, DNA프로브로서 염색체 DNA가 고정화된 DNA칩을 이용하는 미생물동정법을 제안하고 있다. 이 방법에 의하면, 서로 GC함량이 다른 복수의 기지의 미생물 유래의 염색체 DNA와, 검체중의 미지의 미생물 유래의 염색체 DNA를 반응시켜, 생성된 하이브리다이제이션 복합체를 검출함으로써 검체중의 미지의 미생물을 검출하는 것이 가능하다.
- <5> 또, 오노 등은 감염증 병원체 검사를 위한 DNA칩에 이용하는 프로브로서, 일본국 공개특허 평 6-133798호 공보에서 제한효소단편을 이용한 진균의 검출용 프로브를, 일본국 공개특허 평 10-304896호 공보에서 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)의 검출용 프로브를, 일본국 공개특허 평 10-304897호 공보에서 대장균(*Escherichia coli*), 폐렴 간균(*Klebsiella pneumoniae*) 및 엔테로박터 클로아카에균(장구균)(*Enterobacter cloacae*)의 제한효소단편을 이용한 검출용 프로브를 각각 제안하고 있다.
- <6> 또, 상기 마이크로어레이로서는, 예를 들면, 스탠포드법(Stanford method)이라 불리는 스탬핑(stamping)을 이용한 마이크로어레이가 알려져 있고, 예를 들면, 타카라 슈조주식회사로부터, 암과 관련된 인간 유래의 기지의 유전자의 cDNA단편을 스포팅 혹은 스탬핑에 의해 도포한 DNA칩, 인간 유래의 기지의 유전자 약 1,000종류의 cDNA 단편을 슬라이드글라스에 접합시킨 칩이 시판되고 있다.
- <7> 한편, 어피메트릭스(Affymetrix)로부터 입수가 가능한 칩은, 상기 기지의 유전자 cDNA에 의거해서 올리고뉴클레오타이드 프로브 세트를 설계하고, 기관상의 합성에 의해 프로브를 배치한 것으로, 1매의 칩상에 고밀도로 올리고 프로브가 배치되어, 한번에 10,000이상의 유전자의 발현레벨을 해석할 수 있도록 설계되어 있다.
- <8> 그러나, 상기 종래 기술에 표시한 DNA칩은, 염색체 DNA 혹은 제한효소단편 등의 DNA프로브를 이용하는 것이며, 어느 것도 미생물부터 직접 인출한 DNA를 재료로 하고 있다. 이 때문에, 한번에 대량으로 칩을 제조하는 것은 곤란하며, 임상진단용에는 적합하지 않다고 하는 문제가 있었다. 이것을 임상진단용에 이용하기 위해서는, 저렴하고 균일한 DNA칩의 대량 생산이 필요하며, 이 때문에 프로브용액으로서 균일한 DNA의 대량 제조가 불가결하게 되는 바, DNA프로브에서는, 이와 같은 대량 제조가 가능하지 않다. 또, DNA프로브이어도, PCR증폭반응을 이용하면, 해당 DNA의 수를 서서히 증가시키는 것은 가능하나, PCR반응에서는, 한번에 대량 제조하는 것은 곤란하므로, 해당 DNA칩을 임상진단용에 이용하는 것은 곤란하다.
- <9> 또한, DNA프로브의 염기길이가 길므로, 유사한 균종간에 있어서의 하나의 균종의 동정이 곤란하다. 따라서,

이러한 DNA프로브는, 예를 들면, 감염증 검출용에는 적합하지 않다고 하는 문제가 있었다. 이것은, 감염증의 치료에 있어서는 균종의 특성과 그것에 따른 항생제의 선택·투여가 필요하며, 이 때문에, 감염증 검출용 프로브에는, 동종에 속하는 균의 상세한 구별까지는 필요하지 않다고 해도(즉, 동종의 균은 모두 함께 검출할 수 있음), 유사한 다른 종의 세균은 구별해서 검출할 수 있도록 기능이 요구되기 때문이다. 한편, 예를 들면, 일본국 공개특허 평 10-304897호에 표시되어 있는 대장균(*Escherichia coli*), 폐렴 간균(*Klebsiella pneumoniae*) 및 엔테로박터 클로아카에균(*Enterobacter cloacae*)의 제한효소단편을 이용한 DNA칩에서는, 프로브의 염기길이가 길기 때문에, 이들 3균종 상호간에 교차반응이 일어나버려, 유사한 개개의 균종을 구별하는 것은 불가능하므로, 감염증 검출용에 이 DNA칩을 이용하는 것은 곤란하다.

<10> 또, 이상과 같은 마이크로어레이의 용도로서, 감염증의 병원체 검사가 주목되고 있고, 감염증 병원체 검사를 목적으로 한 프로브 세트의 제안도 몇가지 되어 있다.

<11> 마이크로어레이를 이용한 세균검사에 있어서의 중요한 포인트는, 감염증 병원체의 수를 적어도 검출할 수 있다는 점이다. 그 때문에, 예를 들면, 프라이머를 이용한 PCR반응 등에 의한 감염균 병원체의 DNA의 염기서열에 있어서의 특징의 부위를 증폭하는 것이 유효하다. 예를 들면, 16s rRNA유전자배열은 약 1,700 염기쌍의 정보 중에 균종 특유의 서열을 포함하는 바, 그 서열을 이용함으로써 어느 정도의 분류가 가능한 것으로 여겨지고 있다. 따라서, 세균의 검출/동정에 있어서는, 세균의 DNA염기서열중의 16s rRNA부분을 이용하는 것이 바람직하다. 따라서, 이 16s rRNA부분을 증폭하는 것이 요망되고 있다.

<12> 그러나, 각종 균에 대해서, 유전자배열은 부분적으로는 명확하게 되어 있을 뿐, 16s rRNA는 전체적으로 알려져 있지 않으므로, PCR증폭반응의 프라이머의 설계는 용이하지 않다.

### 발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<13> 본 발명은, 상기 상황을 고려해서 이루어진 것으로, 한번에 대량 제조하는 것이 가능하며, 또, 유사균종간에 있어서의 균종의 동정이 가능한 감염증 검출용 프로브를 제공하는 것을 목적으로 한다.

<14> 보다 구체적으로는, 본 발명의 목적은, 감염증의 복수종의 병원체의 종류에 의거한 분류에 적합한 감염증 검출용 프로브를 제공하는 데 있다.

<15> 또, 본 발명의 다른 목적은, 이들 유사균종간의 차이가 DNA칩상에서 정밀도 좋게 평가가능하도록, 감염증 검출용 프로브와 검체와의 하이브리드체의 안정성도 고려한 프로브 세트를 제공하는 데 있다.

<16> 또한, 본 발명의 또 다른 목적은, 이들 감염증 검출용 프로브와 검체와의 반응을 행하도록, 이들 감염증 검출용 프로브가 고정된 담체를 제공하는 데 있다.

<17> 또, 본 발명의 또 다른 목적은, 검체 용액과의 반응 과정에서, 이들 감염증 검출용 프로브가 안정적으로 담체상에 고정되고, 재현성이 높은 검출결과를 얻도록, 화학적으로 고정된 담체를 제공하는 데 있다.

<18> 또한, 본 발명의 다른 목적은, 감염증 병원체의 검출 및/또는 동정을 행하기 위해, 검체중의 병원체의 16s rRNA를 증폭하는 PCR반응용 프라이머를 제공하는 데 있다.

<19> 또, 본 발명의 또 다른 목적은, 복수의 균종에 공통으로 이용가능하고, 균종이 불명인 상태에서도 효과적으로 병원체의 16s rRNA를 증폭가능한 프라이머 세트를 제공하는 데 있다.

<20> 또한, 본 발명의 또 다른 목적은, 복수 종류의 병원체의 16s rRNA를 동일한 PCR조건하에서 증폭가능한 프라이머 세트를 제공하는 데 있다.

<21> 본 발명에 의하면, 혈액 검체에 대해서, 해당 프로브 세트의 모두를 동시에 이용해서, PCR반응을 행함으로써, 인간 게놈 유래의 유전자를 증폭하는 일없이, 상기 균종 전체를 증폭가능한 것을 특징으로 하는 프라이머 세트가 제공된다. 보다 구체적으로는, 인간 게놈유전자와 3염기이상 다른 서열을 지닌 프라이머 세트가 제안된다.

<22> 본 발명의 기타 특징과 이점은 이하의 설명으로부터 명백해질 것이다.

### 발명의 구성 및 작용

<23> 이하, 본 발명의 각종 실시형태에 대해 상세히 설명한다.

<24> 이하의 실시형태에서는, 감염증의 병원체를 동정하기 위한 올리고뉴클레오타이드 프로브, 보다 구체적으로는, 황색 포도상 구균(*Staphylococcus aureus*), 표피 포도상 구균(*Staphylococcus epidermidis*), 대장균

(*Escherichia coli*), 폐렴 간균(*Klebsiella pneumoniae*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 세라티아균(*Serratia marcescens*), 폐렴 연쇄 구균(*Streptococcus pneumoniae*), 인플루엔자균(*Haemophilus influenzae*), 엔테로박터 클로아카에균(*Enterobacter cloacae*) 및 엔테로코커스 페칼리스균(*Enterococcus faecalis*)의 어느 1종 혹은 복수종의 균을 검출하는 데 이용되는 프로브를 설명할 것이다. 즉, 상기 10종류의 감염증 병원체의 유전자중 16s rRNA유전자배열을 적절한 양으로 검출하는 데 이용되는 핵산 프로브 혹은 핵산 프로브 세트가 개시되어 있다.

<25> 본 실시형태에 의하면, 상기 감염증 병원체의 유전자의 핵산서열을 함유하는 검체용액과 반응시키기 위한 상기 올리고뉴클레오타이드 프로브는, 후술하는 표 1에 표시한 제 1군(첨부한 서열목록중의 서열번호 1 내지 14), 표 2에 표시한 제 2군(서열번호 15 내지 24), 표 3에 표시한 제 3군(서열번호 25 내지 36), 표 4에 표시한 제 4군(서열번호 37 내지 47), 표 5에 표시한 제 5군(서열번호 48 내지 57), 표 6에 표시한 제 6군(서열번호 58 내지 68), 표 7에 표시한 제 7군(서열번호 69 내지 77), 표 8에 표시한 제 8군(서열번호 78 내지 85), 표 9에 표시한 제 9군(서열번호 86 내지 97), 표 10에 표시한 제 10군(서열번호 98 내지 106)중 1개의 군에 속하는 1개의 염기서열을 포함한다. 여기서, 제 1군으로부터 선택된 염기서열을 지닌 올리고뉴클레오타이드 프로브는 황색 포도상 구균(*Staphylococcus aureus*)을 검출하고, 제 2군으로부터 선택된 염기서열을 지닌 올리고뉴클레오타이드 프로브는 표피 포도상 구균(*Staphylococcus epidermidis*)을 검출하고, 제 3군으로부터 선택된 염기서열을 지닌 올리고뉴클레오타이드 프로브는 대장균(*Escherichia coli*)을 검출하고, 제 4군으로부터 선택된 염기서열을 지닌 올리고뉴클레오타이드 프로브는 폐렴 간균(*Klebsiella pneumoniae*)을 검출하고, 제 5군으로부터 선택된 염기서열을 지닌 올리고뉴클레오타이드 프로브는 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*)을 검출하고, 제 6군으로부터 선택된 염기서열을 지닌 올리고뉴클레오타이드 프로브는 세라티아균(*Serratia marcescens*)을 검출하고, 제 7군으로부터 선택된 염기서열을 지닌 올리고뉴클레오타이드 프로브는 폐렴 연쇄 구균(*Streptococcus pneumoniae*)을 검출하고, 제 8군으로부터 선택된 염기서열을 지닌 올리고뉴클레오타이드 프로브는 인플루엔자균(*Haemophilus influenzae*)을 검출하고, 제 9군으로부터 선택된 염기서열을 지닌 올리고뉴클레오타이드 프로브는 엔테로박터 클로아카에균(*Enterobacter cloacae*)을 검출하고, 제 10군으로부터 선택된 염기서열을 지닌 올리고뉴클레오타이드 프로브는 엔테로코커스 페칼리스균(*Enterococcus faecalis*)을 검출한다.

<26> 이들 프로브 서열의 상보적인 서열(상기 제 1군의 상보적인 서열은 첨부된 서열목록의 서열번호 113 내지 126, 제 2군의 상보적인 서열은 서열번호 127 내지 136, 제 3군의 상보적인 서열은 서열번호 137 내지 148, 제 4군의 상보적인 서열은 서열번호 149 내지 159, 제 5군의 상보적인 서열은 서열번호 160 내지 169, 제 6군의 상보적인 서열은 서열번호 170 내지 180, 제 7군의 상보적인 서열은 서열번호 181 내지 189, 제 8군의 상보적인 서열은 서열번호 190 내지 197, 제 9군의 상보적인 서열은 서열번호 198 내지 209, 제 10군의 상보적인 서열은 서열번호 210 내지 218임)도 또한, 상기 프로브 서열과 마찬가지로 기능을 지니므로 유효한 프로브 서열로서 이용가능하다.

<27> 각 군의 프로브의 설계는, 16s rRNA를 코딩하고 있는 게놈부분으로부터, 해당 군에 대해서 매우 특이성이 높고, 또, 각각의 프로브 염기서열간의 편차를 방지할 수 있고, 충분한 하이브리다이제이션 감도를 기대할 수 있도록 행하였다.

<28> 이들 올리고뉴클레오타이드 프로브는, 담체상에 결합된 2종이상의 프로브와 검체와의 하이브리다이제이션 반응에 의해서, 안정된 하이브리드체를 형성하여, 양호한 결과를 부여하도록 설계되어 있다.

<29> 또, 본 발명에 관한 감염증 검출용 프로브가 고정된 담체는, 올리고뉴클레오타이드를 BJ프린터를 이용해서 토출하여, 화학적으로 결합시킴으로써 제작하는 것을 특징으로 하고 있다. 이것에 의해, 종래법에 비해서, 프로브가 박리되기 어렵고, 감도가 향상되는 부가적인 효과도 얻어진다. 즉, 일반적으로 광범위하게 사용되는 스탠포드법이라 불리는 스탬핑에 의해 DNA칩을 생성한 경우(예를 들면, 타카라슈조는, 암에 관련된 인간 유래의 기지의 유전자의 cDNA단편을 스포팅 혹은 스탬핑에 의해 도포함으로써 DNA칩을 생성하고 있음), 도포한 DNA가 박리하기 쉽다고 하는 결점이 있었다. 또, 종래와 같이, DNA칩상에서 합성에 의해 프로브를 배치한 경우(예를 들면, 어피메트릭스의 DNA칩 등)는, 각 프로브 서열마다의 합성수량이 다르므로, 정확한 평가가 불가능하다고 하는 결점이 있었다. 본 발명에 관한 담체는, 이들 문제점에 대해서도 고려해서 제작되어 있다. 따라서, 프로브는, 종래에 비해서 안정하게 고정되어 박리되기 어렵고, 고감도와 고정밀도의 검출이 가능한 점을 특징으로 하고 있다. 이하, 본 발명의 바람직한 실시형태에 대해서 상세하게 설명한다.

<30> 본 실시형태의 DNA칩이 검사의 대상으로 하는 검체로서는, 인간, 가축 등의 동물 유래의 혈액, 척수액, 객담, 위액, 질분비물, 구강내 점액 등의 체액, 소변 및 대변 등의 배설물 등 세균이 존재한다고 생각되는 모든 검체



를 대상으로 한다. 또, 식중독의 오염을 일으킬 수 있는 식품, 음료수 및 온천수와 같은 자연환경중의 물, 공기청정기나 정수기의 필터 등, 세균에 의한 오염이 유발될 가능성이 있는 매체 전체를 DNA칩을 이용한 검사대상으로 할 수 있다. 또, 전출입시에 있어서의 검역 등의 동식물도 검체로서 이용된다.

<31> 또, 본 실시형태의 DNA칩에 이용되는 검체로서는, 추출한 핵산 그 자체 뿐만 아니라, 16s rRNA검출용으로 설계된 PCR반응용 프라이머를 이용해서 제작된 증폭검체, 혹은 PCR 증폭산물을 기초로 더욱 PCR반응 등을 행해서 제작된 검체, PCR이외의 증폭방법에 의해 제작된 검체, 가시화를 위해 각종 표식법에 의해 표식된 검체 등, 각종 방법에 의해 제작된 검체도 포함한다.

<32> 또한, 본 실시형태의 DNA칩에 이용되는 담체는, 유리기관, 플라스틱기관, 실리콘 웨이퍼 등의 평면기관, 3차원 패턴이 있는 3차원 구조체, 비즈와 같은 구형상의 것, 봉형상, 코드(cord)형상, 실형상의 구조체 등을 포함한 모든 종류의 담체를 포함한다. 또, 그 기관의 표면을 프로브DNA의 고정화가 가능하도록 처리한 것도 포함한다. 특히, 표면에 화학반응이 가능하도록 작용기를 도입한 담체는, 하이브리다이제이션 반응과정에서 프로브가 안정적으로 결합하고 있으므로, 재현성의 점에서 바람직한 형태이다.

<33> 본 발명에 이용되는 고정화 방법의 예로서는, 말레이미드기와 티올기(-SH)기와의 조합을 이용한다. 즉, 핵산 프로브의 말미에 티올(-SH)기를 결합시켜 놓고, 고상 표면이 말레이미드기를 지니도록 처리해놓음으로써, 고상 표면에 공급된 핵산 프로브의 티올기와 고상 표면의 말레이미드기가 반응해서 핵산 프로브를 고정화한다.

<34> 말레이미드기의 도입방법으로서, 먼저, 유리기관에 아미노실란커플링제를 반응시키고, 다음에 그 아미노기와 EMCS(사(N-(6-말레이미도카프로일옥시)숙신이미드: 도진사 제품)과의 반응에 의해 말레이미드기를 도입한다. DNA에의 SH기의 도입은, DNA자동합성기에서의 DNA를 합성할 때에, 5'-티올-모디파이어 C6(글렌 리서치사 제품)을 이용함으로써 행하는 것이 가능하다.

<35> 고정화에 이용하는 작용기의 조합으로서, 상기한 티올기와 말레이미드의 조합 이외에도, 예를 들면, 에폭시기(고상위)와 아미노기(핵산 프로브말단)의 조합 등을 들 수 있다. 또, 각종 실란커플링제를 이용한 표면처리도 유효하며, 해당 실란커플링제에 의해 도입된 작용기와 반응가능한 작용기를 도입한 올리고뉴클레오타이드가 이용된다. 또, 작용기를 지닌 수지를 코딩하는 방법도 이용가능하다.

<36> 이하, 상술한 10종의 감염증 병원체(즉, 기원균)의 각각을 검출하는 데 이용되는 감염증 병원체 검출용 프로브를 이용한 실시예에 의해, 더욱 상세히 설명한다.

<37> [실시예 1] 1-스텝 PCR법을 이용한 미생물의 검출

<38> [1. 프로브 DNA의 준비]

<39> 상기 10종의 병원체의 검출에 이용되는 프로브로서, 하기 표 1 내지 표 10에 표시한 핵산서열을 설계하였다. 구체적으로는, 각 균의 16s rRNA를 코딩하고 있는 게놈부분으로부터, 이하에 표시한 프로브 염기서열을 선택하였다. 이들 프로브 염기서열군은, 대응하는 균에 대해서 매우 특이성이 높고, 각각의 프로브 염기서열간의 편차를 방지할 수 있고, 충분한 하이브리다이제이션 감도가 기대될 수 있도록 설계되어 있다(또, 표 1 내지 표 10에 표시한 각 프로브 염기서열은 이들과 완전히 일치한 것에 한정될 필요는 없고, 각 프로브 염기서열을 포함하는 20 내지 30정도의 염기길이를 지닌 프로브 염기서열도 각 표에 표시하는 각 프로브 염기서열에 포함되는 것으로 한다. 또, 상기 설명한 바와 같이 각 표에 표시한 염기서열의 상보적인 서열(상보쇄)을 이용해도 된다.).

<40> 이하의 각 표에 있어서, "프로브 번호"는 편의상 할당한 번호이고, 서열번호는 첨부한 서열목록에 있어서의 서열번호와 일치하고 있다. 또, 상술한 바와 같이, 서열번호 1 내지 106에 대응하는 상보쇄 서열은 서열번호 113 내지 218을 지닌다.

## 표 1

<41> 황색 포도상 구균주 검출용 프로브

| 미생물명 | 프로브번호 | 서열번호 | 서열 |
|------|-------|------|----|
|------|-------|------|----|

|                 |       |    |                                  |
|-----------------|-------|----|----------------------------------|
| 황색<br>포도상<br>구균 | PA-1  | 1  | 5' GAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGA 3' |
|                 | PA-2  | 2  | 5' CACTTATAGATGGATCCGCGCTGC 3'   |
|                 | PA-3  | 3  | 5' TGCACATCTTGACGGTACCTAATCAG 3' |
|                 | PA-4  | 4  | 5' CCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG 3'     |
|                 | PA-5  | 5  | 5' AATACAAAGGGCAGCGAAACCGC 3'    |
|                 | PA-6  | 6  | 5' CCGGTGGAGTAACCTTTTAGGAGCT 3'  |
|                 | PA-7  | 7  | 5' TAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTCGA 3'  |
|                 | PA-8  | 8  | 5' TTTAGGAGCTAGCCGTCGAAGGT 3'    |
|                 | PA-9  | 9  | 5' TAGCCGTCGAAGGTGGGACAAAT 3'    |
|                 | PA-10 | 10 | 5' ACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCT 3'    |
|                 | PA-11 | 11 | 5' TGCACTTATAGATGGATCCGCGCT 3'   |
|                 | PA-12 | 12 | 5' TGTAAGTAAGTGTGCACATCTTGACG 3' |
|                 | PA-13 | 13 | 5' ACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCC 3' |
|                 | PA-14 | 14 | 5' GTGGAGTAACCTTTTAGGAGCTAGCC 3' |

표 2

<42>

표피 포도상 구균주 검출용 프로브

| 미생물명            | 프로브번호 | 서열번호 | 서열                                 |
|-----------------|-------|------|------------------------------------|
| 표피<br>포도상<br>구균 | PB-1  | 15   | 5' GAACAGACGAGGAGCTTGCTCC 3'       |
|                 | PB-2  | 16   | 5' TAGTGAAAGACGGTTTGTCTGCTACT 3'   |
|                 | PB-3  | 17   | 5' TAAGTAACATATGCACGTCTTGACGGT 3'  |
|                 | PB-4  | 18   | 5' GACCCCTCTAGAGATAGAGTTTCCCC 3'   |
|                 | PB-5  | 19   | 5' AGTAACCATTGGAGCTAGCCGTC 3'      |
|                 | PB-6  | 20   | 5' GAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGC 3'      |
|                 | PB-7  | 21   | 5' AGCCGGTGGAGTAACCATTGG 3'        |
|                 | PB-8  | 22   | 5' AGACGAGGAGCTTGCTCCTCTG 3'       |
|                 | PB-9  | 23   | 5' AGAACAATGTGTAAGTAAGTATGCACGT 3' |
|                 | PB-10 | 24   | 5' ACCATTGGAGCTAGCCGTCGA 3'        |

표 3

<43>

대장균주 검출용 프로브

| 미생물명 | 프로브번호 | 서열번호 | 서열                                   |
|------|-------|------|--------------------------------------|
| 대장균  | PC-1  | 25   | 5' CTCTTGCCATCGGATGTGCCCA 3'         |
|      | PC-2  | 26   | 5' ATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCG 3'     |
|      | PC-3  | 27   | 5' TTTGCTCATTGACGTTACCCGAG 3'        |
|      | PC-4  | 28   | 5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3'       |
|      | PC-5  | 29   | 5' ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG 3'        |
|      | PC-6  | 30   | 5' CGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGT 3'      |
|      | PC-7  | 31   | 5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3'     |
|      | PC-8  | 32   | 5' TAACAGGAAGAAGCTTGCTTCTTGCTG 3'    |
|      | PC-9  | 33   | 5' TTGCCATCGGATGTGCCAGAT 3'          |
|      | PC-10 | 34   | 5' GGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTC 3'  |
|      | PC-11 | 35   | 5' ATCTTTTGTTGCCAGCGGTCCG 3'         |
|      | PC-12 | 36   | 5' AAGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTG 3' |

표 4

<44> 폐렴 간균주 검출용 프로브

| 미생물명     | 프로브번호 | 서열번호 | 서열                                |
|----------|-------|------|-----------------------------------|
| 폐렴<br>간균 | PD-1  | 37   | 5' TAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGG 3'     |
|          | PD-2  | 38   | 5' TCATGCCATCAGATGTGCCCAGA 3'     |
|          | PD-3  | 39   | 5' CGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAAT 3'   |
|          | PD-4  | 40   | 5' TTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGA 3'   |
|          | PD-5  | 41   | 5' GGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCC 3'  |
|          | PD-6  | 42   | 5' GCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGG 3'    |
|          | PD-7  | 43   | 5' TCATGCCATCAGATGTGCCCAGAT 3'    |
|          | PD-8  | 44   | 5' CGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAA 3'    |
|          | PD-9  | 45   | 5' TTATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGA 3' |
|          | PD-10 | 46   | 5' CATTGCGAACTGGCAGGCTAGAGTC 3'   |
|          | PD-11 | 47   | 5' CCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGC 3'      |

표 5

<45> 녹농균주 검출용 프로브

| 미생물명 | 프로브번호 | 서열번호 | 서열                                |
|------|-------|------|-----------------------------------|
| 녹농균  | PE-1  | 48   | 5' TGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTC 3'    |
|      | PE-2  | 49   | 5' TCAGATGAGCCTAGGTCGATTAGC 3'    |
|      | PE-3  | 50   | 5' GAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGG 3'    |
|      | PE-4  | 51   | 5' GTACGGTAGAGGGTGGTGAATTT 3'     |
|      | PE-5  | 52   | 5' GACCACCTGGACTGATACTGACAC 3'    |
|      | PE-6  | 53   | 5' TGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTC 3'   |
|      | PE-7  | 54   | 5' TTAGTTACCAGCACCTCGGGTGG 3'     |
|      | PE-8  | 55   | 5' TAGTCTAACCGCAAGGGGGACG 3'      |
|      | PE-9  | 56   | 5' TGCATCCAAACTACTGAGCTAGAGTAC 3' |
|      | PE-10 | 57   | 5' GTCGACTAGCCGTTGGGATCCT 3'      |

표 6

<46> 세라티아균주 검출용 프로브

| 미생물명  | 프로브번호 | 서열번호 | 서열                                |
|-------|-------|------|-----------------------------------|
| 세라티아균 | PF-1  | 58   | 5' TAGCACAGGGAGCTTGCTCCCT 3'      |
|       | PF-2  | 59   | 5' AGGTGGTGAGCTTAATACGCTCATC 3'   |
|       | PF-3  | 60   | 5' TCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAG 3'  |
|       | PF-4  | 61   | 5' ACTGCATTTGAACTGGCAAGCTAGA 3'   |
|       | PF-5  | 62   | 5' TTATCCTTTGTGACGCTTCGGCC 3'     |
|       | PF-6  | 63   | 5' ACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGG 3'     |
|       | PF-7  | 64   | 5' GGTAGCACAGGGGAGCTTGCTC 3'      |
|       | PF-8  | 65   | 5' CGAGGAGGAAGGTGGTGAGCTTAATA 3'  |
|       | PF-9  | 66   | 5' TACGCTCATCAATTGACGTTACTCGC 3'  |
|       | PF-10 | 67   | 5' GAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGA 3' |
|       | PF-11 | 68   | 5' TTATCCTTTGTGCCAGCGGTTTCG 3'    |

표 7

<47> 페렴 연쇄구균주 검출용 프로브

| 미생물명           | 프로브번호 | 서열번호 | 서열                                   |
|----------------|-------|------|--------------------------------------|
| 페렴<br>연쇄<br>구균 | PG-1  | 69   | 5' AGTAGAACGCTGAAGGAGGAGCTTG 3'      |
|                | PG-2  | 70   | 5' CTGTCATCACTACCAGATGGACCTG 3'      |
|                | PG-3  | 71   | 5' TGAGAGTGGAAAGTTCACACTGTGAC 3'     |
|                | PG-4  | 72   | 5' GCTGTGGCTTAACCATAGTAGGCTTT 3'     |
|                | PG-5  | 73   | 5' AAGCGGCTCTCTGGCTTGTAAGT 3'        |
|                | PG-6  | 74   | 5' TAGACCCTTTCCGGGGTTTAGTGC 3'       |
|                | PG-7  | 75   | 5' GACGGCAAGCTAATCTCTTAAAGCCA 3'     |
|                | PG-8  | 76   | 5' GACATTTGCTTAAAAGGTGCACTTGCA 3'    |
|                | PG-9  | 77   | 5' GTTGTAAAGAGAAGAACGAGTGTGAGAGTG 3' |

표 8

<48> 인플루엔자균주 검출용 프로브

| 미생물명       | 프로브번호 | 서열번호 | 서열                               |
|------------|-------|------|----------------------------------|
| 인플루<br>엔자균 | PH-1  | 78   | 5' GCTTGGGAATCTGGCTTATGGAGG 3'   |
|            | PH-2  | 79   | 5' TGCCATAGGATGAGCCCAAGTGG 3'    |
|            | PH-3  | 80   | 5' CTGGGAATGTACTGACGCTCATGTG 3'  |
|            | PH-4  | 81   | 5' GGATTGGGCTTAGAGCTTGGTGC 3'    |
|            | PH-5  | 82   | 5' TACAGAGGGAAGCGAAGCTGCG 3'     |
|            | PH-6  | 83   | 5' GGCGTTTACCACGGTATGATTCATGA 3' |
|            | PH-7  | 84   | 5' AATGCCTACCAAGCCTGCGATCT 3'    |
|            | PH-8  | 85   | 5' TATCGGAAGATGAAAGTGCAGGACT 3'  |

표 9

<49> 엔테로박터 클로아카에균주 검출용 프로브

| 미생물명                    | 프로브번호 | 서열번호 | 서열                               |
|-------------------------|-------|------|----------------------------------|
| 엔테로<br>박터<br>클로아<br>카에균 | PI-1  | 86   | 5' CAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGA 3'     |
|                         | PI-2  | 87   | 5' GGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAAC 3' |
|                         | PI-3  | 88   | 5' GGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAA 3' |
|                         | PI-4  | 89   | 5' GCGGTCTGTCAAGTCGGATGTG 3'     |
|                         | PI-5  | 90   | 5' ATTCGAACTGGCAGGCTAGAGTCT 3'   |
|                         | PI-6  | 91   | 5' TAACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3'  |
|                         | PI-7  | 92   | 5' GCAATTGACGTTACCCGAGAAGA 3'    |
|                         | PI-8  | 93   | 5' GTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCG 3'    |
|                         | PI-9  | 94   | 5' CGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTA 3'     |
|                         | PI-10 | 95   | 5' ACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3'    |
|                         | PI-11 | 96   | 5' GAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAAG 3' |
|                         | PI-12 | 97   | 5' AGGCGGTCTGTCAAGTCGGATG 3'     |

표 10

<50> 엔테로코커스 페칼리스균주 검출용 프로브

| 미생물명 | 프로브번호 | 서열번호 | 서열 |
|------|-------|------|----|
|------|-------|------|----|

|                     |      |     |                                    |
|---------------------|------|-----|------------------------------------|
| 엔테로<br>코커스<br>페칼리스균 | PJ-1 | 98  | 5' TTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCA 3'      |
|                     | PJ-2 | 99  | 5' AACACGTGGGTAACCTACCCATCAG 3'    |
|                     | PJ-3 | 100 | 5' ATGGCATAAGAGTGAAGGCGCTT 3'      |
|                     | PJ-4 | 101 | 5' GACCCGCGGTGCATTAGCTAGT 3'       |
|                     | PJ-5 | 102 | 5' GGACGTTAGTAACGAACGTCCCCT 3'     |
|                     | PJ-6 | 103 | 5' CTCAACCGGGAGGGTCATTGG 3'        |
|                     | PJ-7 | 104 | 5' TTGGAGGGTTCCGCCCTTCAG 3'        |
|                     | PJ-8 | 105 | 5' ATAGAGCTTCCCTTCGGGGACAAA 3'     |
|                     | PJ-9 | 106 | 5' CGAGGTCATGCAAATCTCTAAAGCTTCT 3' |

<51> 상기 표중에 표시한 각 프로브는, DNA마이크로어레이에 고정하기 위한 작용기로서, 합성후, 통상의 방법에 따라서 핵산의 5'말단에 티올기를 도입하였다. 작용기의 도입후, 정제하고, 동결건조하였다. 동결건조한 프로브는, -30℃의 냉동고에 보존하였다.

<52> [2. 검체증폭용 PCR프라이머의 준비]

<53> 상기 병원체 검출을 위한 16s rRNA유전자(표적 유전자)증폭용 PCR 프라이머로서 이하의 표 11에 표시한 핵산서열을 설계하였다. 구체적으로는, 16s rRNA를 코딩하고 있는 게놈부분을 특이적으로 증폭하는 프로브 세트, 즉, 약 1,400 내지 1,700의 염기길이의 16s rRNA코딩영역의 양단부분에서, 특이적인 용해점을 가능한 한 균일하게 한 프라이머를 설계하였다. 또, 변이체나, 게놈상에 복수 존재하는 16s rRNA코딩영역도 동시에 증폭하기 위하여, 복수 종류의 프라이머를 설계하였다. 또, 프라이머 세트는, 하기 표 11에 표시한 프라이머 세트로 한정되는 것은 아니다. 또한, 복수 종류의 병원체에 대해서 공통으로 이용할 수 있는 동시에 병원체의 16s rRNA 코딩영역의 거의 전체 길이를 증폭할 수 있는 프라이머 세트도 이용가능하다.

표 11

|             | 프라이머번호 | 서열번호 | 서열                            |
|-------------|--------|------|-------------------------------|
| 포워드<br>프라이머 | F-1    | 107  | 5' GCGGCGTGCCTAATACATGCAAG 3' |
|             | F-2    | 108  | 5' GCGGCAGGCCTAACACATGCAAG 3' |
|             | F-3    | 109  | 5' GCGGCAGGCTTAACACATGCAAG 3' |
| 리버스<br>프라이머 | R-1    | 110  | 5' ATCCAGCCGCACCTTCCGATAC 3'  |
|             | R-2    | 111  | 5' ATCCAACCGCAGGTTCCTTAC 3'   |
|             | R-3    | 112  | 5' ATCCAGCCGCAGGTTCCTTAC 3'   |

<55> 상기 표 11중에 표시한 프라이머는, 합성후, 고속액체크로마토그래피(HPLC)에 의해 정제하고, 포워드 프라이머(Forward Primer)를 3종, 그리고, 리버스 프라이머(Reverse Primer)를 3종 혼합해서, 각각의 프라이머 농도가, 최종농도 10pmol/μl로 되도록 TE완충액에 용해하였다.

<56> [3. 각 병원체 게놈 DNA(모델 검체)의 추출]

<57> [3-1] 미생물의 배양 및 게놈 DNA 추출의 전처리

<58> 먼저, 상기 각 병원체의 표준균주(황색 포도상 구균 표준균주(ATCC12600), 표피 포도상 구균 표준균주(ATCC14990), 대장균 표준균주(ATCC11775), 폐렴 간균 표준균주(ATCC13883), 녹농균 표준균주(ATCC10145), 세라티아균 표준균주, 폐렴 연쇄 구균 표준균주, 인플루엔자균 표준균주, 엔테로박터 클로아카에균 표준균주(ATCC13047) 및 엔테로코커스 페칼리스균 표준균주(ATCC19433))를 통상의 방법에 따라서 배양해서, 미생물 배양액을 생성하였다. 이들 미생물 배양액의 각각을 1.5ml용량의 마이크로튜브에 1.0ml(OD<sub>600</sub> = 0.7) 채취하고, 원심분리에 의해 균체를 회수하였다(8,500rpm, 5분, 4℃). 다음에, 상청액을 버린 후, 효소 완충액(enzyme buffer)(50mM Tris-HCl: pH 8.0, 25mM EDTA) 300μl를 가하고, 이 균액을 믹서를 이용해서 재현탁하였다. 재현탁한 균액으로부터, 재차, 원심분리에 의해 균체를 회수하였다(8,500rpm, 5분, 4℃). 상청액을 버린 후, 회수된 균체에, 이하의 효소용액을 가하고, 해당 균액을, 믹서를 이용해서 재현탁하였다.

<59> 리소자임 50μl(효소 완충액중 20mg/ml)

<60> N-아세틸무라미다제 SG 50μl(효소 완충액중 0.2mg/ml)

- <61> 다음에, 효소용액을 가해서 재현탁한 균액을, 37℃의 인큐베이터내에서 30분간 정치하여, 세포벽을 용해시켰다.
- <62> [3-2] 게놈 추출
- <63> 이하에 표시하는 미생물의 게놈 DNA추출은, 핵산정제키트(MagExtractor-Genome: 토요보사 제품)를 이용해서 행하였다.
- <64> 구체적으로는, 먼저, 전처리한 미생물 현탁액에 용해/흡착액 750 $\mu$ l와 자성 비즈 40 $\mu$ l를 가해서, 튜브믹서를 이용하여, 10분간 격렬하게 교반하였다(스텝 1).
- <65> 다음에, 분리용 스탠드(Magical Trapper)에 마이크로튜브를 세트하고, 30초 정치해서 자성 입자를 튜브의 벽면에 모으고, 해당 마이크로튜브를 스탠드에 세트한 상태에서, 상청액을 버렸다(스텝 2).
- <66> 다음에, 세정액 900 $\mu$ l를 가하고, 믹서로 5초정도 교반해서 재현탁하였다(스텝 3).
- <67> 다음에, 분리용 스탠드(Magical Trapper)에 마이크로튜브를 세트하고, 30초 정치해서 자성 입자를 튜브의 벽면에 모으고, 해당 마이크로튜브를 스탠드에 세트한 상태에서, 상청액을 버렸다(스텝 4).
- <68> 상기 스텝 3 및 4를 반복해서 2번째의 세정처리를 행하였다(스텝 5). 그 후, 70% 에탄올 900 $\mu$ l를 가하고, 믹서로 5초정도 교반해서 재현탁하였다(스텝 6).
- <69> 다음에, 분리용 스탠드(Magical Trapper)에 마이크로튜브를 세트하고, 30초 정치해서 자성 입자를 튜브의 벽면에 모으고, 해당 마이크로튜브를 스탠드에 세트한 상태에서, 상청액을 버렸다(스텝 7).
- <70> 상기 스텝 6 및 7을 반복해서 70%에탄올을 이용한 2번째의 세정처리를 행한(스텝 8) 후, 회수된 자성 입자에 순수 100 $\mu$ l를 가하고, 튜브믹서로 10분간 교반을 행하였다(스텝 9).
- <71> 다음에, 분리용 스탠드(Magical Trapper)에 마이크로튜브를 세트하고, 30초 정치해서 자성 입자를 튜브의 벽면에 모으고, 해당 마이크로튜브를 스탠드에 세트한 상태에서, 상청액을 버렸다.
- <72> [3-3] 회수한 게놈 DNA의 검사
- <73> 회수된 미생물(각 병원체 균주)의 게놈 DNA는, 통상의 방법에 따라서, 아가로스 전기영동과 260/280nm의 흡광도 측정을 행하여, 그 품질(저분자 핵산의 혼입량, 분해의 정도)과 회수량을 검정하였다. 본 실시예에서는, 각각의 균에 대해서, 약 9 내지 10 $\mu$ g의 게놈 DNA가 회수되었고, 게놈 DNA의 테그라데이션(degradation)이나 rRNA의 혼입은 확인되지 않았다. 회수한 게놈 DNA는, 최종 농도 50ng/ $\mu$ l로 되도록 TE완충액에 용해시켜, 이하의 실시예에 사용하였다.
- <74> [4. DNA마이크로어레이의 제작]
- <75> DNA마이크로어레이를, 일본국 공개특허 평 11-187900호 공보에 개시된 방법에 따라서 준비하였다.
- <76> [4-1] 유리기판의 세정
- <77> 합성 실리카로 이루어진 유리기판(크기: 25mm $\times$ 75mm $\times$ 1mm, 이이야마 토쿠슈 유리사 제품)을, 내열, 내알칼리의 랙(rack)에 놓고, 소정의 농도로 조제한 초음파세정용의 세정액에 담갔다. 이 유리기판을 하룻밤 세정액중에 담근 후, 20분간 초음파세정을 행하였다. 이어서 기판을 꺼내어, 가볍게 순수로 행군 후, 초순수중에서 20분 초음파세정을 행하였다. 다음에, 80℃로 가열한 1N수산화나트륨수용액중에 10분간 기판을 담갔다. 제작 순수세정과 초순수세정을 행하여, DNA마이크로어레이용의 석영유리기판을 준비하였다.
- <78> [4-2] 표면 처리
- <79> 실란커플링제 KBM-603(신에츠 실리콘사 제품)을, 1%의 농도로 되도록 순수중에 용해시키고, 2시간 실온에서 교반하였다. 이어서, 먼저 세정한 유리기판을 실란커플링제 수용액에 담그고, 20분간 실온에서 방치하였다. 유리기판을 끌어올려, 가볍게 순수로 표면을 세정한 후, 질소가스를 기판의 양면에 불어넣어 건조시켰다. 다음에, 건조한 기판을 120℃로 가열한 오븐중에서 1시간 베이킹하여, 커플링제 처리를 완결시킴으로써, 기판표면에 아미노기를 도입하였다. 이어서, 도진도연구소사 제품의 N-(6-말레이미도카프로일옥시)숙신이미도(이하, "EMCS"라 약칭함)를, 디메틸설폭사이드와 에탄올의 1:1혼합용매중에 최종농도가 0.3mg/ml로 되도록 용해한 EMCS 용액을 준비하였다.
- <80> 베이킹된 유리기판을 방냉하고, 조제한 EMCS용액중에 실온에서 2시간 담갔다. 이 처리에 의해, 실란커플링제에 의해서 표면에 도입된 아미노기와 EMCS의 숙신이미드기가 반응해서, 유리기판 표면에 말레이미드기가 도입되

었다. EMCS용액으로부터 끌어올린 유리기관을, 전술한 EMCS를 용해시킨 혼합용매를 이용해서 세정하고, 또한 에탄올에 의해 세정한 후, 질소가스분위기하에서 건조시켰다.

<81> [4-3] 프로브 DNA

<82> 실시예 1에서 제작한 미생물 검출용 프로브를 순수에 용해시키고, 각각, 최종농도(잉크용해시) 10  $\mu$ M로 되도록 분주(分注)한 후, 동결건조를 행하여 수분을 제거하였다.

<83> [4-4] BJ프린터에 의한 DNA토출 및 기관에의 결합

<84> 글리세린 7.5중량%, 티오디글리콜 7.5중량%, 요소 7.5중량%, 아세틸레놀 EH(카와켄과인케미컬사 제품) 1.0중량%를 함유하는 수용액을 준비하였다. 이어서, 앞서 준비한 표 1에 표시된 14종류의 프로브 중 9종류의 프로브(PA-1 내지 PA-9)의 각각을 상기 혼합용매에 규정농도로 되도록 용해시켰다. 얻어진 DNA용액을 잉크젯(즉, 버블젯) 프린터(상품명: BJF-850 캐논사 제품)용 잉크탱크에 충전하고, 인자헤드에 장착하였다.

<85> 또, 여기서 이용한 잉크젯 프린터는 평판에의 인쇄가 가능하도록 미리 개조를 실시한 것이다. 또한, 이 잉크젯 프린터는, 소정의 파일작성방법에 따라서 인자패턴을 입력함으로써, 약 5피코리터의 DNA용액을 약 120 $\mu$ m 피치로 스포팅하는 것이 가능하게 되어 있다.

<86> 이어서, 이 개조된 잉크젯 프린터를 이용해서, 1매의 유리기관에 대해서 인자조작을 행하여, DNA마이크로어레이를 제작하였다. 인자가 확실하게 행해지고 있는 것을 확인한 후, 30분간 가온챔버내에 정치하여, 유리기관 표면의 말레이미드기와 핵산 프로브말단의 티올기를 반응시켰다.

<87> [4-5] 세정

<88> 30분간의 반응후, 100mM의 NaCl을 함유하는 10mM의 인산완충액(pH 7.0)에 의해 표면에 잔류한 DNA용액을 세정해서, 유리기관 표면에 1본쇄 DNA가 고정된 유전자칩(DNA마이크로어레이)을 얻었다.

<89> [5. 검체의 증폭과 표식화(PCR증폭 및 형광 표식화)]

<90> 검체로 되는 미생물 유전자의 증폭 및 표식화반응을 이하에 표시한다.

<91> 프리믹스 PCR 시약(TAKARA ExTaq) 25 $\mu$ l

<92> 템플레이트 게놈 DNA 2 $\mu$ l(100ng)

<93> 포워드 프라이머 믹스 2 $\mu$ l(20pmol/tube each)

<94> 리버스 프라이머 믹스 2 $\mu$ l(20pmol/tube each)

<95> Cy-3 dUTP(1mM) 2 $\mu$ l(2nmol/tube)

<96> H<sub>2</sub>O 17 $\mu$ l

<97> 총합 50 $\mu$ l

<98> 상기 조성을 지닌 반응액의 증폭반응을, 이하의 프로토콜에 따라서 시판의 씨멀사이클러를 이용해서 행하였다.

|      |      |
|------|------|
| 95°C | 10 분 |
| 92°C | 45 초 |
| 55°C | 45 초 |
| 72°C | 45 초 |
| 72°C | 10 분 |

35 사이클

<99>

<100> 반응종료후, 정제용 컬럼(퀴아겐사(QIAGEN)제품, QIAquick PCR Purification Kit)을 이용해서 프라이머를 제거(정제)한 후, 증폭산물의 정량을 행하여, 표식화 검체로 하였다.

<101> [6. 하이브리다이제이션]

<102> 상술한 [4. DNA마이크로어레이의 제작]에서 제작한 유전자칩과 [5. 검체의 증폭과 표식화(PCR증폭 및 형광표식화)]에서 제작한 표식화 검체를 이용해서 검출반응을 행하였다.



- <103> [6-1] DNA마이크로어레이의 블로킹
- <104> BSA(소혈청 알부민 Fraction V: 시그마사 제품)를 1중량%용액으로 되도록 100mM NaCl/10mM 인산완충액에 용해시키고, 이 용액에 [4. DNA마이크로어레이의 제작]에서 제작한 유전자칩을 실온에서 2시간 침지해서, 블로킹을 행하였다. 블로킹종료후, 0.1중량% SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)를 함유하는 2xSSC용액(NaCl 300mM, Sodium Citrate(trisodium citrate dihydrate,  $C_6H_5Na_3 \cdot 2H_2O$ ) 30mM, pH 7.0)으로 세정을 행한 후, 순수로 린스하고 나서 스핀드라이장치(회전건조장치)에서 수분추출(hydro-extracted)을 행하였다.
- <105> [6-2] 하이브리다이제이션
- <106> 수분 추출을 행한 유전자 칩을 하이브리다이제이션장치(Genomic Solutions Inc.사 제품, Hybridization Station)에 세트하고, 이하에 표시한 하이브리다이제이션용액 및 조건하에 하이브리다이제이션 반응을 행하였다.
- <107> [6-3] 하이브리다이제이션 용액
- <108> 6xSSPE/10% 포름 아미드/타겟(모두 2차 PCR 산물)
- <109> (6xSSPE: NaCl 900mM,  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  60mM, EDTA 6mM, pH 7.4)
- <110> [6-4] 하이브리다이제이션 조건
- <111> 65℃ 3분 → 92℃ 2분 → 45℃ 3시간 → 2xSSC/0.1중량%SDS, 25℃ 세정 → 2xSSC, 20℃ 세정 → ( $H_2O$ 로 행균: 수동) →회전 건조(65℃에서 3분, 92℃에서 2분, 45℃에서 3시간 하이브리다이제이션 반응시킨 후, 2xSSC/0.1% SDS, 25℃에서 세정, 2xSSC, 20℃에서 세정후, 순수로 린스해서 회전건조하였다).
- <112> [7. 미생물의 검출(형광측정)]
- <113> 상기 하이브리다이제이션 반응종료후의 유전자칩을 유전자칩용 형광검출장치(Axon사 제품, GenePix 4000B)를 이용하여 형광측정을 행하였다. 그 결과, 이하의 표 12 내지 21에 표시한 바와 같이, 각 균에 있어서, 재현성 좋게, 충분한 시그널로 각 균을 검출하는 것이 가능하였다. 또, 다른 균에 대한 하이브리드체는 검출되지 않았다.
- <114> 또, 본 실시예에서는, 각 유전자칩에 대해서 2회씩 형광측정을 실시하고, 각각의 결과를 이하에 표시하였다.

## 표 12

- <115> 황색 포도상 구균

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째  |       | 2회째  |       |
|-----------|----------------------------------|------|-------|------|-------|
|           |                                  | 형광휘도 | S/N   | 형광휘도 | S/N   |
| PA-1      | 5' GAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGA 3' | 3000 | 42.9  | 2900 | 40.8  |
| PA-2      | 5' CACTTATAGATGGATCCGCGCTGC 3'   | 7700 | 110.0 | 7700 | 108.5 |
| PA-3      | 5' TGCACATCTTGACGGTACCTAATCAG 3' | 6400 | 91.4  | 6400 | 90.1  |
| PA-4      | 5' CCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG 3'     | 2500 | 35.7  | 2500 | 35.2  |
| PA-5      | 5' AATACAAAGGGCAGCGAAACCGC 3'    | 7800 | 111.4 | 7800 | 109.9 |
| PA-6      | 5' CCGGTGGAGTAACCTTTTAGGAGCT 3'  | 4800 | 68.6  | 4800 | 67.6  |
| PA-7      | 5' TAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTCGA 3'  | 4500 | 64.3  | 4300 | 60.6  |
| PA-8      | 5' TTTAGGAGCTAGCCGTCGAAGGT 3'    | 4800 | 68.6  | 4800 | 67.6  |
| PA-9      | 5' TAGCCGTCGAAGGTGGGACAAAT 3'    | 5300 | 75.7  | 5200 | 73.2  |

## 표 13

- <116> 표피 포도상 구균

| 프로브<br>번호 | 서열 | 1회째  |     | 2회째  |     |
|-----------|----|------|-----|------|-----|
|           |    | 형광휘도 | S/N | 형광휘도 | S/N |



|      |                                  |      |      |      |      |
|------|----------------------------------|------|------|------|------|
| PB-1 | 5' GAACAGACGAGGAGCTTGCTCC 3'     | 1000 | 14.5 | 1100 | 15.7 |
| PB-2 | 5' TAGTGAAAGACGGTTTTGCTGTCCT 3'  | 1800 | 26.1 | 1800 | 25.7 |
| PB-3 | 5' TAAGTAACATATGCACGCTTGACGGT 3' | 1400 | 20.3 | 1400 | 20   |
| PB-4 | 5' GACCCCTCTAGAGATAGAGTTTTCCC 3' | 1000 | 14.5 | 1100 | 15.7 |
| PB-5 | 5' AGTAACCATTTGGAGCTAGCCGTC 3'   | 1800 | 26.1 | 2000 | 28.6 |
| PB-6 | 5' GAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGC 3'    | 1200 | 17.4 | 1300 | 18.6 |
| PB-7 | 5' AGCCGGTGGAGTAACCATTTGG 3'     | 1100 | 15.9 | 1100 | 15.7 |

표 14

대장균

<117>

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째  |      | 2회째  |      |
|-----------|----------------------------------|------|------|------|------|
|           |                                  | 형광휘도 | S/N  | 형광휘도 | S/N  |
| PC-1      | 5' CTCTTGCCATCGGATGTGCCCA 3'     | 1200 | 17.6 | 1200 | 17.9 |
| PC-2      | 5' ATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCG 3' | 1500 | 22.1 | 1600 | 23.9 |
| PC-3      | 5' TTTGCTCATTGACGTTACCCGAG 3'    | 1100 | 16.2 | 1200 | 17.9 |
| PC-4      | 5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3'   | 2000 | 29.4 | 2100 | 31.3 |
| PC-5      | 5' ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG 3'    | 1500 | 22.1 | 1500 | 22.4 |
| PC-6      | 5' CGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGT 3'  | 2400 | 35.3 | 2600 | 38.8 |
| PC-7      | 5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3' | 1200 | 17.6 | 1200 | 17.9 |

표 15

폐렴간균

<118>

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째  |      | 2회째  |      |
|-----------|----------------------------------|------|------|------|------|
|           |                                  | 형광휘도 | S/N  | 형광휘도 | S/N  |
| PD-1      | 5' TAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGG 3'    | 500  | 7.6  | 600  | 9    |
| PD-2      | 5' TCATGCCATCAGATGTGCCAGA 3'     | 600  | 9.1  | 600  | 9    |
| PD-3      | 5' CGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAAT 3'  | 700  | 10.6 | 700  | 10.4 |
| PD-4      | 5' TTCGATTGACGTTACCCGAGAAGA 3'   | 1000 | 15.2 | 1200 | 17.9 |
| PD-5      | 5' GGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCC 3' | 2700 | 40.9 | 2700 | 40.3 |
| PD-6      | 5' GCAGGCTAGAGTCTTGTAAGGGG 3'    | 3400 | 51.5 | 3300 | 49.3 |

표 16

녹농균

<119>

| 프로브<br>번호 | 서열                              | 1회째  |      | 2회째  |      |
|-----------|---------------------------------|------|------|------|------|
|           |                                 | 형광휘도 | S/N  | 형광휘도 | S/N  |
| PE-1      | 5' TGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTC 3'  | 3500 | 50.0 | 3600 | 50   |
| PE-2      | 5' TCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGC 3' | 1600 | 22.9 | 1400 | 19.4 |
| PE-3      | 5' GAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGG 3'  | 3500 | 50.0 | 3400 | 47.2 |
| PE-4      | 5' GTACGGTAGAGGGTGGTGAATTT 3'   | 3100 | 44.3 | 3100 | 43.1 |
| PE-5      | 5' GACCACCTGGACTGATACTGACAC 3'  | 1600 | 22.9 | 1600 | 22.2 |
| PE-6      | 5' TGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTC 3' | 1200 | 17.1 | 1200 | 16.7 |
| PE-7      | 5' TTAGTTACCAGCACCTCGGGTGG 3'   | 1000 | 14.3 | 1200 | 16.7 |
| PE-8      | 5' TAGTCTAACCGCAAGGGGGACG 3'    | 1100 | 15.7 | 1100 | 15.3 |

표 17

<120> 세라티아균

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째  |      | 2회째  |      |
|-----------|----------------------------------|------|------|------|------|
|           |                                  | 형광휘도 | S/N  | 형광휘도 | S/N  |
| PF-1      | 5' TAGCACAGGGAGCTTGCTCCCT 3'     | 600  | 8.8  | 600  | 8.7  |
| PF-2      | 5' AGGTGGTGAGCTTAATACGCTCATC 3'  | 700  | 10.3 | 600  | 8.7  |
| PF-3      | 5' TCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAG 3' | 2000 | 29.4 | 2200 | 31.9 |
| PF-4      | 5' ACTGCATTTGAACTGGCAAGCTAGA 3'  | 2800 | 41.2 | 2700 | 39.1 |
| PF-5      | 5' TTATCCTTTGTTCAGCTTCGGCC 3'    | 700  | 10.3 | 700  | 10.1 |
| PF-6      | 5' ACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGG 3'    | 3400 | 50.0 | 3300 | 47.8 |

표 18

<121> 폐렴 연쇄구균

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째  |      | 2회째  |      |
|-----------|----------------------------------|------|------|------|------|
|           |                                  | 형광휘도 | S/N  | 형광휘도 | S/N  |
| PG-1      | 5' AGTAGAACGCTGAAGGAGGAGCTTG 3'  | 1000 | 14.9 | 1100 | 16.2 |
| PG-2      | 5' CTTGCATCACTACCAGATGGACCTG 3'  | 1200 | 17.9 | 1300 | 19.1 |
| PG-3      | 5' TGAGAGTGGAAGTTCACACTGTGAC 3'  | 1000 | 14.9 | 1100 | 16.2 |
| PG-4      | 5' GCTGTGGCTTAACCATAGTAGGCTTT 3' | 1800 | 26.9 | 1900 | 27.9 |
| PG-5      | 5' AAGCGCTCTCTGGCTTGTAAC 3'      | 1300 | 19.4 | 1500 | 22.1 |
| PG-6      | 5' TAGACCTTTCCGGGGTTTAGTGC 3'    | 1300 | 19.4 | 1300 | 19.1 |
| PG-7      | 5' GACGGCAAGCTAATCTCTTAAAGCCA 3' | 2000 | 29.9 | 2100 | 30.9 |

표 19

<122> 인플루엔자균

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째  |      | 2회째  |      |
|-----------|----------------------------------|------|------|------|------|
|           |                                  | 형광휘도 | S/N  | 형광휘도 | S/N  |
| PH-1      | 5' GCTTGGAATCTGGCTTATGGAGG 3'    | 3500 | 50.0 | 3600 | 50   |
| PH-2      | 5' TGCCATAGGATGAGCCCAAGTGG 3'    | 600  | 8.8  | 700  | 10.1 |
| PH-3      | 5' CTTGGAATGTACTGACGCTCATGTG 3'  | 600  | 8.8  | 600  | 8.7  |
| PH-4      | 5' GGATTGGGCTTAGAGCTTGGTGC 3'    | 1100 | 16.2 | 1200 | 17.4 |
| PH-5      | 5' TACAGAGGGAAGCGAAGCTGCG 3'     | 700  | 10.3 | 600  | 8.7  |
| PH-6      | 5' GGCGTTTACCACGGTATGATTCATGA 3' | 1300 | 19.1 | 1300 | 18.8 |
| PH-7      | 5' AATGCCTACCAAGCCTGCGATCT 3'    | 2100 | 30.9 | 2200 | 31.9 |
| PH-8      | 5' TATCGGAAGATGAAAGTGCGGGACT 3'  | 700  | 10.3 | 600  | 8.7  |

표 20

<123> 엔테로박터 클로아카에균

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째  |       | 2회째  |       |
|-----------|----------------------------------|------|-------|------|-------|
|           |                                  | 형광휘도 | S/N   | 형광휘도 | S/N   |
| PI-1      | 5' CAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGA 3'     | 2100 | 29.2  | 2200 | 31    |
| PI-2      | 5' GGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAAC 3' | 7900 | 109.7 | 7900 | 111.3 |
| PI-3      | 5' GGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAA 3' | 1000 | 13.9  | 1300 | 18.3  |
| PI-4      | 5' GCGGTCTGTCAAGTCGGATGTG 3'     | 6400 | 88.9  | 6400 | 90.1  |
| PI-5      | 5' ATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCT 3'  | 9400 | 130.6 | 9200 | 129.6 |
| PI-6      | 5' TAACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3'  | 4700 | 65.3  | 4800 | 67.6  |
| PI-7      | 5' GCAATTGACGTTACCCGAGAGA 3'     | 4600 | 63.9  | 4500 | 63.4  |

표 21

<124> 엔테로코커스 페칼리스균

| 프로브<br>번호 | 서열                              | 1회째  |      | 2회째  |      |
|-----------|---------------------------------|------|------|------|------|
|           |                                 | 형광휘도 | S/N  | 형광휘도 | S/N  |
| PJ-1      | 5' TTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCA 3'   | 1500 | 22.1 | 1500 | 20.8 |
| PJ-2      | 5' AACACGTGGGTAACTACCCATCAG 3'  | 2400 | 35.3 | 2700 | 37.5 |
| PJ-3      | 5' ATGGCATAAGAGTGAAAGCGCTT 3'   | 5600 | 82.4 | 5600 | 77.8 |
| PJ-4      | 5' GACCCGCGGTGCATTAGCTAGT 3'    | 2300 | 33.8 | 2300 | 31.9 |
| PJ-5      | 5' GGACGTTAGTAAGTGAACGTCCCCT 3' | 1000 | 14.7 | 1400 | 19.4 |
| PJ-6      | 5' CTCACCGGGGAGGGTCATTGG 3'     | 4400 | 64.7 | 4400 | 61.1 |
| PJ-7      | 5' TTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAG 3'    | 1700 | 25   | 1800 | 25   |

<125> 표 12 내지 표 21의 형광휘도의 수치(광전자증배(photomultiplier) 전압: 400V)는, 화소 평균휘도(해상도: 5  $\mu$ m)를 표시한다. 또, S/N비는, 측정기 부속의 해석소프트웨어(Axon사 제품, GenePix Pro Ver. 3.0)로 측정된 백그라운드 평균치로 형광휘도를 나누어서 얻어진 값을 표시한다.

<126> 표 12 내지 표 21에서 명백한 바와 같이, 재현성 좋고, 충분한 시그널로 각 병원체를 검출하는 것이 가능하다.

<127> [실시예 2] 2스텝 PCR법을 이용한 미생물의 검출

<128> 실시예 1과 마찬가지로, 프로브 DNA, 검체 증폭용 PCR프라이머, 각 병원체의 게놈 DNA 및 DNA마이크로어레이를 준비해서, 이하의 실험을 행하였다.

<129> [1. 검체의 증폭과 표식화(PCR증폭 및 형광표식화)]

<130> 검체로 되는 미생물 유전자의 증폭(1차 PCR) 및 표식화(2차 PCR)반응을 이하에 표시한다.

<131> [2. 증폭반응액 조성: 1차 PCR]

<132> 프리믹스 PCR시약(TAKARA ExTaq) 25 $\mu$ l

<133> 템플레이트 게놈 DNA 2 $\mu$ l(10ng)

<134> 포워드 프라이머 믹스 2 $\mu$ l(20pmol/tube each)

<135> 리버스 프라이머 믹스 2 $\mu$ l(20pmol/tube each)

<136> H<sub>2</sub>O 19 $\mu$ l

<137> 총합 50 $\mu$ l

<138> 상기 조성을 지닌 반응액의 증폭반응을, 이하의 프로토콜에 따라서 시판의 씨멀싸이클러를 이용해서 행하였다.

|     |      |
|-----|------|
| 95℃ | 10 분 |
| 92℃ | 45 초 |
| 55℃ | 45 초 |
| 72℃ | 45 초 |
| 72℃ | 10 분 |

25 사이클

<139>

<140> 반응종료후, 정제용 컬럼(키아젠사 제품, QIAquick PCR Purification Kit)을 이용해서 정제한 후, 증폭산물의 정량을 행하였다.

<141> [3. 표식화 반응액 조성: 2차 PCR]

<142> 효소(QIAGEN Hotstar Taq Polymerase) 0.5 $\mu$ l(2.5u)

- |       |                                |                             |
|-------|--------------------------------|-----------------------------|
| <143> | 템플릿 DNA(1차 PCR 산물)             | 10 $\mu$ l(30ng)            |
| <144> | dNTP 믹스 (Low dTTP)*            | 2 $\mu$ l                   |
| <145> | Cy-3 dUTP(1mM)                 | 2 $\mu$ l(2nmol/tube)       |
| <146> | 리버스 프라이머 믹스                    | 5 $\mu$ l(50pmol/tube each) |
| <147> | 10 $\times$ 버퍼                 | 5 $\mu$ l                   |
| <148> | <u>H025.5<math>\mu</math>l</u> |                             |
| <149> | 총합                             | 50 $\mu$ l                  |
| <150> | *dNTP 믹스 (Low dTTP):           |                             |

|      |      |                                                                                          |
|------|------|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 95°C | 10 분 |  25 사이클 |
| 92°C | 45 초 |                                                                                          |
| 55°C | 45 초 |                                                                                          |
| 72°C | 45 초 |                                                                                          |
| 72°C | 10 분 |                                                                                          |

- <154>
- <155> 반응종료후, 정제용 컬럼(퀴아겐사 제품, QIAquick PCR Purification Kit)을 이용해서 정제하여, 표식화 검체로 하였다.
- <156> [4. 하이브리다이제이션]
- <157> 실시예 1과 마찬가지로 절차에 의해 하이브리다이제이션을 행하였다.
- <158> [5. 미생물의 검출(형광측정)]
- <159> 하이브리다이제이션 반응종료후의 DNA 마이크로어레이를 DNA마이크로어레이용 형광검출장치(Axon사 제품, GenePix 4000B)를 이용해서 형광측정을 행하였다. 측정 결과를 표 22 내지 표 31에 표시한다.
- <160> 또, 본 실시예에 있어서도, 각 DNA마이크로어레이에 대해서 2회씩 형광측정을 실시하고, 각각의 결과를 이하의 표 22 내지 표 31에 표시하였다.

丑 22

- <161> 황색 포도상 구균

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째   |       | 2회째   |       |
|-----------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|           |                                  | 형광휘도  | S/N   | 형광휘도  | S/N   |
| PA-1      | 5' GAACCGCATGGTTCAAAAGTGAAAGA 3' | 14000 | 186.7 | 13000 | 173.3 |
| PA-2      | 5' CACTTATAGATGGATCCGCGCTGC 3'   | 36000 | 480   | 35000 | 466.7 |
| PA-3      | 5' TGCACATCTTGACGGTACCTAATCAG 3' | 31000 | 413.3 | 29000 | 386.7 |
| PA-4      | 5' CCCCTTAGTGCTGCAGCTAACG 3'     | 10000 | 133.3 | 10000 | 133.3 |
| PA-5      | 5' AATACAAAGGCAGCGAAACCGC 3'     | 39000 | 520   | 38500 | 513.3 |
| PA-6      | 5' CCGGTGGAGTAACCTTTTAGGAGCT 3'  | 22000 | 293.3 | 22100 | 294.7 |
| PA-7      | 5' TAACCTTTTAGGAGCTAGCCGTCGA 3'  | 22000 | 293.3 | 21800 | 290.7 |
| PA-8      | 5' TTTAGGAGCTAGCCGTCGAAGGT 3'    | 25000 | 333.3 | 24000 | 320   |
| PA-9      | 5' TAGCCGTCGAAGGTGGGACAAAT 3'    | 26000 | 346.7 | 25500 | 340   |

卣 23

<162> 표피 포도상 구균

| 프로브<br>번호 | 서열                                | 1회째  |       | 2회째  |       |
|-----------|-----------------------------------|------|-------|------|-------|
|           |                                   | 형광휘도 | S/N   | 형광휘도 | S/N   |
| PB-1      | 5' GAACAGACGAGGAGCTTGCTCC 3'      | 4500 | 62.5  | 4700 | 67.1  |
| PB-2      | 5' TAGTGAAAGACGGTTTTGCTGCTACT 3'  | 9000 | 125   | 8900 | 127.1 |
| PB-3      | 5' TAAGTAACATATGCACGTCTTGACGGT 3' | 7100 | 98.6  | 7300 | 104.3 |
| PB-4      | 5' GACCCCTCTAGAGATAGAGTTTCCC 3'   | 4800 | 66.7  | 5200 | 74.3  |
| PB-5      | 5' AGTAACCATTTGGAGCTAGCCGTC 3'    | 9100 | 126.4 | 9300 | 132.9 |
| PB-6      | 5' GAGCTTGCTCCTCTGACGTTAGC 3'     | 5800 | 80.6  | 6300 | 90    |
| PB-7      | 5' AGCCGGTGGAGTAACCATTTGG 3'      | 5400 | 75    | 5500 | 78.6  |

표 24

<163> 대장균

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째   |       | 2회째   |       |
|-----------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|           |                                  | 형광휘도  | S/N   | 형광휘도  | S/N   |
| PC-1      | 5' CTCTTGCCATCGGATGTGCCCC 3'     | 5600  | 76.7  | 6200  | 83.8  |
| PC-2      | 5' ATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCG 3' | 7600  | 104.1 | 7500  | 101.4 |
| PC-3      | 5' TTTGCTCATTGACGTTACCCGAG 3'    | 5600  | 76.7  | 5700  | 77    |
| PC-4      | 5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3'   | 9400  | 128.8 | 9300  | 125.7 |
| PC-5      | 5' ATACAAAGAGAAGCGACCTCGCG 3'    | 7200  | 98.6  | 7200  | 97.3  |
| PC-6      | 5' CGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGT 3'  | 11500 | 157.5 | 11500 | 155.4 |
| PC-7      | 5' GCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAAT 3' | 5600  | 76.7  | 5500  | 74.3  |

표 25

<164> 폐렴 간균

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째   |       | 2회째   |       |
|-----------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|           |                                  | 형광휘도  | S/N   | 형광휘도  | S/N   |
| PD-1      | 5' TAGCACAGAGAGCTTGCTCTCGG 3'    | 2000  | 28.6  | 2100  | 30    |
| PD-2      | 5' TCATGCCATCAGATGTGCCAGA 3'     | 2500  | 35.7  | 2600  | 37.1  |
| PD-3      | 5' CGGGGAGGAAGGCGATAAGGTAAAT 3'  | 2900  | 41.4  | 2900  | 41.4  |
| PD-4      | 5' TTCGATTGACGTTACCCGAGAAGA 3'   | 4500  | 64.3  | 4700  | 67.1  |
| PD-5      | 5' GGTCTGTCAAGTCGGATGTGAAATCC 3' | 9900  | 141.4 | 10100 | 144.3 |
| PD-6      | 5' GCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGG 3'   | 13000 | 185.7 | 13400 | 191.4 |

표 26

<165> 녹농균

| 프로브<br>번호 | 서열                             | 1회째   |       | 2회째   |       |
|-----------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|           |                                | 형광휘도  | S/N   | 형광휘도  | S/N   |
| PE-1      | 5' TGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTC 3' | 17000 | 239.4 | 17300 | 240.3 |
| PE-2      | 5' TCAGATGAGCCTAGGTCGATTAGC 3' | 8300  | 116.9 | 8600  | 119.4 |
| PE-3      | 5' GAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGG 3' | 17400 | 245.1 | 17000 | 236.1 |
| PE-4      | 5' GTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTC 3' | 15000 | 211.3 | 16000 | 222.2 |
| PE-5      | 5' GACCACCTGGACTGATACTGACAC 3' | 8000  | 112.7 | 8300  | 115.3 |
| PE-6      | 5' TGGCCTTGACATGCTGAGAATTTC 3' | 5400  | 76.1  | 5800  | 80.6  |
| PE-7      | 5' TTAGTTACCAGCACCTCGGGTGG 3'  | 5300  | 74.6  | 5100  | 70.8  |
| PE-8      | 5' TAGTCTAACCGCAAGGGGACG 3'    | 5400  | 76.1  | 5000  | 69.4  |

표 27

<166> 세라티아균

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째   |       | 2회째   |       |
|-----------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|           |                                  | 형광휘도  | S/N   | 형광휘도  | S/N   |
| PF-1      | 5' TAGCACAGGGAGCTTGCTCCCT 3'     | 3100  | 43.7  | 3300  | 45.2  |
| PF-2      | 5' AGGTGGTGAGCTTAATACGCTCATC 3'  | 3300  | 46.5  | 3200  | 43.8  |
| PF-3      | 5' TCATCAATTGACGTTACTCGCAGAAG 3' | 10100 | 142.3 | 10000 | 137   |
| PF-4      | 5' ACTGCATTTGAACTGGCAAGCTAGA 3'  | 12000 | 169   | 11800 | 161.6 |
| PF-5      | 5' TTATCCTTTGTGAGCTTCGGCC 3'     | 4100  | 57.7  | 4200  | 57.5  |
| PF-6      | 5' ACTTTCAGCGAGGAGGAAGGTGG 3'    | 14300 | 201.4 | 14300 | 195.9 |

표 28

<167> 폐렴 연쇄구균

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째   |       | 2회째  |       |
|-----------|----------------------------------|-------|-------|------|-------|
|           |                                  | 형광휘도  | S/N   | 형광휘도 | S/N   |
| PG-1      | 5' AGTAGAACGCTGAAGGAGGAGCTTG 3'  | 4500  | 63.4  | 4300 | 60.6  |
| PG-2      | 5' CTGTCATCACTACCAGATGGACCTG 3'  | 5800  | 81.7  | 5600 | 78.9  |
| PG-3      | 5' TGAGAGTGGAAGTTCACACTGTGAC 3'  | 5000  | 70.4  | 4900 | 69    |
| PG-4      | 5' GCTGTGGCTTAACCATAGTAGGCTTT 3' | 8700  | 122.5 | 8800 | 123.9 |
| PG-5      | 5' AAGCGGCTCTCTGGCTGTAACT 3'     | 7200  | 101.4 | 7300 | 102.8 |
| PG-6      | 5' TAGACCCTTTCCGGGGTTTAGTGC 3'   | 6700  | 94.4  | 7000 | 98.6  |
| PG-7      | 5' GACGGCAAGCTAATCTCTTAAAGCCA 3' | 10200 | 143.7 | 9900 | 139.4 |

표 29

<168> 인플루엔자균

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째   |       | 2회째   |       |
|-----------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|           |                                  | 형광휘도  | S/N   | 형광휘도  | S/N   |
| PH-1      | 5' GCTTGGAATCTGGCTTATGGAGG 3'    | 3100  | 44.3  | 3200  | 45.1  |
| PH-2      | 5' TGCCATAGGATGAGCCCAAGTGG 3'    | 3200  | 45.7  | 3200  | 45.1  |
| PH-3      | 5' CTTGGAATGTACTGACGCTCATGTG 3'  | 4900  | 70    | 5600  | 78.9  |
| PH-4      | 5' GGATTGGGCTTAGAGCTTGGTGC 3'    | 3900  | 55.7  | 3800  | 53.5  |
| PH-5      | 5' TACAGAGGGAAGCGAAGCTGCG 3'     | 6700  | 95.7  | 6500  | 91.5  |
| PH-6      | 5' GCGGTTTACCACGGTATGCTTCATGA 3' | 10200 | 145.7 | 11000 | 154.9 |
| PH-7      | 5' AATGCCTACCAAGCCTGCGATCT 3'    | 4200  | 60    | 4100  | 57.7  |
| PH-8      | 5' TATCGGAAGATGAAAGTGCGGGACT 3'  | 3200  | 45.7  | 3500  | 49.3  |

표 30

<169> 엔테로박터 클로아카에균

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째   |       | 2회째   |       |
|-----------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|           |                                  | 형광휘도  | S/N   | 형광휘도  | S/N   |
| PI-1      | 5' CAGAGAGCTTGCTCTCGGGTGA 3'     | 10000 | 133.3 | 9900  | 133.8 |
| PI-2      | 5' GGGAGGAAGGTGTTGTGGTTAATAAC 3' | 38000 | 506.7 | 38000 | 513.5 |
| PI-3      | 5' GGTGTTGTGGTTAATAACCACAGCAA 3' | 4700  | 62.7  | 4700  | 63.5  |

|      |                                 |       |       |       |       |
|------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| PI-4 | 5' GCGGTCTGTCAAGTCGGATGTG 3'    | 31000 | 413.3 | 32000 | 432.2 |
| PI-5 | 5' ATTCGAAACTGGCAGGCTAGAGTCT 3' | 47500 | 633.3 | 45000 | 608.1 |
| PI-6 | 5' TAACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3' | 23600 | 314.7 | 24000 | 324.3 |
| PI-7 | 5' GCAATTGACGTTACCCGCAGAAGA 3'  | 21500 | 286.7 | 22700 | 306.8 |

### 표 31

엔테로코커스 페칼리스균

| 프로브<br>번호 | 서열                              | 1회째   |       | 2회째   |       |
|-----------|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|           |                                 | 형광휘도  | S/N   | 형광휘도  | S/N   |
| PJ-1      | 5' TTCTTTCTCTCCGAGTGTGCA 3'     | 7000  | 98.6  | 7300  | 101.4 |
| PJ-2      | 5' AACACGTGGGTAACCTACCCATCAG 3' | 12300 | 173.2 | 12000 | 166.7 |
| PJ-3      | 5' ATGGCATAAGAGTGAAAGGCGCTT 3'  | 25000 | 352.1 | 27400 | 380.6 |
| PJ-4      | 5' GACCCGCGGTGCATTAGCTAGT 3'    | 10000 | 140.8 | 11000 | 152.8 |
| PJ-5      | 5' GGACGTTAGTAACGAACGTCCCCT 3'  | 5600  | 78.9  | 5200  | 72.2  |
| PJ-6      | 5' CTCACCGGGGAGGGTCATTGG 3'     | 22100 | 311.3 | 22200 | 308.3 |
| PJ-7      | 5' TTGGAGGGTTCCGCCCTTCAG 3'     | 8800  | 123.9 | 9000  | 125   |

표 22 내지 표 31의 형광휘도의 수치(광전자증배 전압: 400V)는, 화소 평균휘도(해상도: 5 $\mu$ m)를 표시한다. 또, S/N비는, 측정기 부속의 해석소프트웨어(Axon사 제품, GenePix Pro Ver. 3.0)로 측정한 백그라운드 평균치로 형광휘도를 나누어서 얻어진 값을 표시한다.

표 22 내지 표 31에서 명백한 바와 같이, 재현성 좋고, 충분한 시그널로 각 병원체를 검출하는 것이 가능하다.

**[실시예 3]** 2스텝 PCR법을 이용한 미생물의 검출

실시예 1 및 실시예 2와 마찬가지로, 프로브 DNA, 검체 증폭용 PCR프라이머, 각 병원체의 게놈 DNA 및 DNA마이크로어레이를 준비해서, 이하의 실험을 행하였다.

[1. 검체의 증폭과 표식화(형광표식을 지닌 PCR증폭의 사용)]

검체로 되는 미생물 유전자의 증폭(1차 PCR) 및 표식화(2차 PCR)반응을 이하에 표시한다.

[2. 증폭반응액 조성: 1차 PCR]

앰플리택 골드(AmpliTaq Gold) LD(50U/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l

템플레이트 DNA 가변

dNTP mis(2.5mM/each) 4.0 $\mu$ l

x10 PCR버퍼 5.0 $\mu$ l

25mM MgCl<sub>2</sub> 7.0 $\mu$ l

포워드 프라이머 믹스 0.25 $\mu$ l

(10  $\mu$ M/each)

리버스 프라이머 믹스 0.25 $\mu$ l

(10  $\mu$ M/each)

H<sub>2</sub>O가변

총합 50 $\mu$ l

<189> 상기 조성을 지닌 반응액의 증폭반응을, 이하의 프로토콜에 따라서 시판의 써멀싸이클러를 이용해서 행하였다.

|     |      |       |
|-----|------|-------|
| 95℃ | 10 분 | 39사이클 |
| 92℃ | 45 초 |       |
| 67℃ | 45 초 |       |
| 72℃ | 45 초 |       |
| 72℃ | 10 분 |       |

<190>

<191> 반응종료후, 정제용 컬럼(키아젠사 제품, QIAquick PCR Purification Kit)을 이용해서 정제한 후, 증폭산물의 정량을 행하였다.

<192> [3. 표식화 반응액 조성: 2차 PCR]

<193> 프리믹스 PCR 시약(TAKARA ExTaq) 25 $\mu$ l

<194> 템플레이트 DNA(1차 PCR 산물) 가변(30ng/tube)

<195> Cy3 표식화 리버스 프라이머 믹스 5 $\mu$ l

<196> H<sub>2</sub>O가변

<197> 총합 50 $\mu$ l

<198> 상기 조성을 지닌 반응액의 증폭반응을, 이하의 프로토콜에 따라서 시판의 써멀싸이클러를 이용해서 행하였다.

|     |      |       |
|-----|------|-------|
| 95℃ | 10분  | 24사이클 |
| 92℃ | 45초  |       |
| 65℃ | 45 초 |       |
| 72℃ | 45 초 |       |
| 72℃ | 10 분 |       |

<199>

<200> 반응종료후, 정제용 컬럼(키아젠사 제품, QIAquick PCR Purification Kit)을 이용해서 정제하여, 표식화 검체로 하였다.

<201> [4. 하이브리다이제이션]

<202> 실시예 1과 마찬가지로 절차에 의해 하이브리다이제이션을 행하였다.

<203> [5. 미생물의 검출(형광측정)]

<204> 하이브리다이제이션 반응종료후의 DNA 마이크로어레이를 DNA마이크로어레이용 형광검출장치(Axon사 제품, GenePix 4000B)를 이용해서 형광측정을 행하였다. 측정 결과를 표 32 내지 표 41에 표시한다.

<205> 또, 본 실시예에 있어서도, 각 DNA마이크로어레이에 대해서, 2회씩 형광측정을 실시하고, 각각의 결과를 이하의 표 32 내지 표 41에 표시하였다.

## 표 32

<206> 황색 포도상 구균

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째   |       | 2회째   |       |
|-----------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|           |                                  | 형광휘도  | S/N   | 형광휘도  | S/N   |
| PA-10     | 5' ACGGACGAGAAGCTTGCTTCTCT 3'    | 247   | 3.4   | 146   | 2.1   |
| PA-11     | 5' TGTCATTATAGATGGATCCGCGCT 3'   | 4177  | 57.9  | 3083  | 43.4  |
| PA-12     | 5' TGTAACTAAGTGTGCACATCTTGACG 3' | 4686  | 64.9  | 3768  | 53.1  |
| PA-13     | 5' ACAACTCTAGAGATAGAGCCTTCCCC 3' | 2612  | 36.2  | 2709  | 38.2  |
| PA-14     | 5' GTGGAGTAACCTTTTAGGAGCTAGCC 3' | 26505 | 367.2 | 17560 | 247.3 |



표 33

<207> 표피 포도상 구균

| 프로브<br>번호 | 서열                                   | 1회째   |       | 2회째   |       |
|-----------|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
|           |                                      | 형광휘도  | S/N   | 형광휘도  | S/N   |
| PB-2      | 5' TAGTGAAAGACGGTTTTGCTGTCACT 3'     | 7000  | 94.1  | 1800  | 25.7  |
| PB-4      | 5' GACCCCTCTAGAGATAGAGTTTCCC 3'      | 3274  | 44.0  | 1100  | 15.7  |
| PB-8      | 5' AGACGAGGAGCTTGCTCCTCTG 3'         | 111   | 1.5   | 59    | 0.8   |
| PB-9      | 5' AGAACAAATGTGTAAGTAACATATGCACGT 3' | 6920  | 93.0  | 4910  | 70.1  |
| PB-10     | 5' ACCATTTGGAGCTAGCCGTCGA 3'         | 15244 | 205.0 | 18136 | 259.1 |

표 34

<208> 대장균

| 프로브<br>번호 | 서열                                    | 1회째  |      | 2회째  |      |
|-----------|---------------------------------------|------|------|------|------|
|           |                                       | 형광휘도 | S/N  | 형광휘도 | S/N  |
| PC-4      | 5' ACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGA 3'        | 5416 | 74.7 | 2100 | 31.3 |
| PC-8      | 5' TAACAGGAAGAAGCTTGCTTCTTTGCTG 3'    | 160  | 2.2  | 112  | 1.7  |
| PC-9      | 5' TTGCCATCGGATGTGCCCAGAT 3'          | 4133 | 57.0 | 4581 | 68.4 |
| PC-10     | 5' GGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTC 3'   | 4194 | 57.8 | 5349 | 79.8 |
| PC-11     | 5' ATCTTTTGTGTGCCAGCGGTCCG 3'         | 6719 | 92.7 | 2594 | 38.7 |
| PC-12     | 5' AAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTG 3' | 3984 | 58.6 | 4021 | 60.0 |

표 35

<209> 폐렴 간균

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째   |      | 2회째  |      |
|-----------|----------------------------------|-------|------|------|------|
|           |                                  | 형광휘도  | S/N  | 형광휘도 | S/N  |
| PD-7      | 5' TCATGCCATCAGATGTGCCCAGAT 3'   | 5414  | 40.0 | 4171 | 62.3 |
| PD-8      | 5' CGGGGAGGAAGGCGATAAGGTAA 3'    | 4096  | 30.2 | 6227 | 93.0 |
| PD-9      | 5' TTATCGATTGACGTTACCCGAGAAGA 3' | 4122  | 30.4 | 3269 | 48.8 |
| PD-10     | 5' CATTGAACTGGCAGGCTAGAGTC 3'    | 9474  | 70.0 | 6486 | 96.9 |
| PD-11     | 5' CCTTTGTGTGCCAGCGGTTAGGC 3'    | 10648 | 78.6 | 2754 | 41.1 |

표 36

<210> 녹농균

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째  |       | 2회째  |       |
|-----------|----------------------------------|------|-------|------|-------|
|           |                                  | 형광휘도 | S/N   | 형광휘도 | S/N   |
| PE-1      | 5' TGAGGGAGAAAGTGGGGGATCTTC 3'   | 6175 | 82.2  | 3600 | 50.0  |
| PE-6      | 5' TGGCCTTGACATGCTGAGAACTTTC 3'  | 8159 | 108.6 | 1200 | 16.7  |
| PE-7      | 5' TTAGTTACAGCACCTCGGGTGG 3'     | 3277 | 43.6  | 1200 | 16.7  |
| PE-9      | 5' TGCATCCAAAATACTAGCTAGAGTAC 3' | 6626 | 88.2  | 7432 | 103.4 |
| PE-10     | 5' GTCGACTAGCCGTTGGGATCCT 3'     | 5734 | 76.3  | 3365 | 46.8  |

표 37

<211> 세라티아균

| 프로브<br>번호 | 서열                                | 1회째   |       | 2회째  |      |
|-----------|-----------------------------------|-------|-------|------|------|
|           |                                   | 형광휘도  | S/N   | 형광휘도 | S/N  |
| PF-7      | 5' GGTAGCACAGGGGAGCTTGCTC 3'      | 4482  | 66.4  | 1040 | 15.1 |
| PF-8      | 5' CGAGGAGGAAGGTGGTGAGCTTAATA 3'  | 6362  | 94.2  | 3199 | 46.3 |
| PF-9      | 5' TACGCTCATCAATTGACGTTACTCGC 3'  | 4569  | 67.7  | 2884 | 41.8 |
| PF-10     | 5' GAAACTGGCAAGCTAGAGTCTCGTAGA 3' | 7905  | 117.1 | 6786 | 98.3 |
| PF-11     | 5' TTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTTCG 3'   | 12787 | 189.4 | 3849 | 55.7 |

표 38

<212> 페렴 연쇄 구균

| 프로브<br>번호 | 서열                                 | 1회째   |      | 2회째  |       |
|-----------|------------------------------------|-------|------|------|-------|
|           |                                    | 형광휘도  | S/N  | 형광휘도 | S/N   |
| PG-1      | 5' AGTAGAACGCTGAAGGAGGAGCTTG 3'    | 10078 | 70.3 | 1100 | 16.2  |
| PG-5      | 5' AAGCGGCTCTCTGGCTTGTAAC 3'       | 4331  | 30.2 | 1500 | 22.1  |
| PG-6      | 5' TAGACCTTTTCCGGGGTTAGTGC 3'      | 4730  | 33.0 | 1300 | 19.1  |
| PG-8      | 5' GACATTTGCTTAAAGGTGCACTTGCA 3'   | 7128  | 49.7 | 7720 | 113.6 |
| PG-9      | 5' GTTGAAGAGAAGAACGAGTGTGAGAGTG 3' | 6665  | 46.5 | 3297 | 48.5  |

표 39

<213> 인플루엔자균

| 프로브<br>번호 | 서열                             | 1회째   |       | 2회째  |      |
|-----------|--------------------------------|-------|-------|------|------|
|           |                                | 형광휘도  | S/N   | 형광휘도 | S/N  |
| PH-1      | 5' GCTTGGGAATCTGGCTTATGGAGG 3' | 11106 | 150.3 | 3600 | 50.0 |
| PH-2      | 5' TGCCATAGGATGAGCCCAAGTGG 3'  | 7056  | 95.5  | 700  | 10.1 |
| PH-4      | 5' GGATTGGGCTTAGAGCTTGGTGC 3'  | 100   | 1.4   | 1200 | 17.4 |
| PH-5      | 5' TACAGAGGGAAGCGAAGCTGCG 3'   | 11237 | 152.1 | 600  | 8.7  |
| PH-7      | 5' AATGCCTACCAAGCCTGCGATCT 3'  | 5054  | 68.4  | 2200 | 31.9 |

표 40

<214> 엔테로박터 클로아카에균

| 프로브<br>번호 | 서열                               | 1회째  |       | 2회째  |      |
|-----------|----------------------------------|------|-------|------|------|
|           |                                  | 형광휘도 | S/N   | 형광휘도 | S/N  |
| PI-8      | 5' GTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCG 3'    | 2221 | 30.1  | 582  | 8.2  |
| PI-9      | 5' CGGGGAGGAAGGTGTTGTGGTTA 3'    | 5484 | 74.2  | 2193 | 30.9 |
| PI-10     | 5' ACCACAGCAATTGACGTTACCCG 3'    | 3325 | 45.0  | 646  | 9.1  |
| PI-11     | 5' GAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAG 3' | 7574 | 102.5 | 3039 | 42.8 |
| PI-12     | 5' AGGCGGTCTGTCAAGTCGGATG 3'     | 5768 | 78.0  | 5701 | 80.3 |

표 41

<215> 엔테로코커스 페칼리스균

| 프로브<br>번호 | 서열                            | 1회째  |      | 2회째  |      |
|-----------|-------------------------------|------|------|------|------|
|           |                               | 형광휘도 | S/N  | 형광휘도 | S/N  |
| PJ-1      | 5' TTCTTTCCTCCCGAGTGCTTGCA 3' | 1012 | 14.9 | 1500 | 20.8 |

|      |                                     |       |       |       |       |
|------|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| PJ-3 | 5' ATGCATAAGAGTGAAAGGCGCTT 3'       | 4266  | 62.6  | 5600  | 77.8  |
| PJ-5 | 5' GGACGTTAGTAACTGAACGTCCCCT 3'     | 652   | 9.6   | 1400  | 19.4  |
| PJ-8 | 5' ATAGAGCTTTCCTTCGGGGACAAA 3'      | 3232  | 47.5  | 810   | 11.2  |
| PJ-9 | 5' CGAGGTCATGCAAATCTCTTAAAGCTTCT 3' | 11411 | 167.6 | 18776 | 260.7 |

- <216> 표 32 내지 41로부터 명백한 바와 같이, 재현성 좋고, 충분한 시그널로 각종 병원체를 검출하는 것이 가능하다.
- <217> 이상 설명한 바와 같이, 본 실시예에 의하면, 황색 포도상 구균, 표피 포도상 구균, 대장균, 폐렴 간균, 녹농균, 세라티아균, 폐렴 연쇄 구균, 인플루엔자균, 엔테로박터 클로아카에균 및 엔테로코커스 페칼리스균의 10종류의 균을 검출가능한 프로브 세트를 각각 별도로, 혹은 조합해서 고정된 마이크로어레이를 사용해서, 감염증 병원체를 동정하는 것이 가능해져, 미생물 유래의 DNA프로브의 문제점을 해결하였다. 즉, 올리고뉴클레오타이드 프로브는, 그 염기수가 적으므로, 화학적으로 대량 합성이 가능하며, 정제나 농도의 조절이 가능하다.
- 또, 세균의 종류에 의한 분류를 목적으로, 마찬가지로 종의 균종은, 일괄 검출이 가능하고, 또한, 다른 종의 세균은 구별해서 검출할 수 있도록 프로브 세트를 제공할 수 있다.
- <218> 또, 종간의 차이가 DNA마이크로어레이상에서 정밀도 좋게 평가될 수 있도록, 프로브와 검체와의 하이브리드체의 안정성도 고려한 프로브 세트를 제공하는 것이 가능하다. 또한, 이들 프로브 DNA와 검체와의 반응을 행하기 위해, 이들 프로브 DNA가 고정된 담체를 제공하는 것이 가능하다. 이 프로브 및 프로브 세트와 검체용액을 반응시키는 과정에서, 이들 프로브 DNA가 안정적으로 담체상에 고정되어, 재현성이 높은 검출결과를 얻을 수 있도록, 화학적으로 고정된 담체를 제공하는 것이 가능하다.
- <219> 또, 상기 실시예에 의하면, 감염증 병원체 유전자의 16s rRNA유전자배열을 적정량 검출할 수 있으므로, 해당 감염증 병원체의 존재를 효율 좋게, 또 높은 정밀도로 판정하는 것이 가능하다.
- <220> **[실시예 4] 프라이머 세트**
- <221> 상기 실시예에 있어서, 황색 포도상 구균, 표피 포도상 구균, 대장균, 폐렴 간균, 녹농균, 세라티아균, 폐렴 연쇄 구균, 인플루엔자균, 엔테로박터 클로아카에균 및 엔테로코커스 페칼리스균의 어느 하나 혹은 복수의 16s rRNA유전자배열을 증폭하는 데 이용된 프라이머 세트(표 11)를 설명한다.
- <222> 본 실시예의 프라이머 세트는, 감염증 병원체 동정을 위해 행해지는 PCR반응에 있어서 양호한 증폭결과를 부여하도록 설계되어 있다. 여기서, "양호한"이란, 목적의 16s rRNA가 충분히 증폭되어 있는 것뿐만 아니라, 16s rRNA이외의 산물이 생성되지 않는 것을 의미한다.
- <223> 또, 여기서 "양호한"이란, 검체중에 포함되는 검체 유래의 인간 게놈유전자를 증폭시키는 일없이, 감염증 병원체 16s rRNA만을 증폭시키는 것도 의미한다.
- <224> 본 실시예에서 이용되는 검체로서는, 인간, 가축 등의 동물 유래의 혈액, 객담, 위액, 질분비물, 구강내 점액 등의 체액, 소변 및 대변 등의 배설물 등 세균이 존재한다고 생각되는 모든 검체를 대상으로 한다. 또, 식중독의 오염을 일으킬 수 있는 식품, 음료수 및 온천수와 같은 자연환경중의 물, 공기청정기나 정수기의 필터 등, 세균에 의한 오염이 유발될 가능성이 있는 매체 전체를 들 수 있다. 또, 전출입시에 있어서의 검역 등의 동식물도 검체로서 이용된다.
- <225> 또, 본 실시예에 이용되는 PCR반응이란, 추출한 핵산 그 자체를 주형으로서 이용한 PCR반응, 혹은 서열번호 107 내지 109(표 11의 F1 내지 F3), 혹은 서열번호 110 내지 112(표 11의 R1 내지 R3)의 한쪽의 프라이머를 이용한 비대칭의 PCR반응, 가시화하기 위해 표식화를 행하는 PCR법 등의 어느 것의 반응도 포함한다.
- <226> [1. 검체 증폭용 PCR프라이머의 준비]
- <227> 병원체 검출을 위한 16s rRNA유전자(표적 유전자) 증폭용 PCR 프라이머로서 표 11에 표시한 핵산 서열을 설계하였다.
- <228> 구체적으로는, 16s rRNA를 코딩하고 있는 게놈부분을 특이적으로 증폭하는 프로브 세트, 즉, 약 1,500의 염기길이의 16s rRNA코딩영역의 양단부분에서, 특이적인 용해점을 가능한 한 균일하게 한 프라이머를 설계하였다. 또, 변이체나, 게놈상에 복수 존재하는 16s rRNA코딩영역도 동시에 증폭할 수 있도록 복수 종류의 프라이머를 설계하였다.
- <229> 표 11중에 표시한 프라이머는, 합성후, 고속액체크로마토그래피(HPLC)에 의해 정제하고, 3종의 포워드 프라이머

와 3종의 리버스 프라이머의 전체를 혼합해서, 각각의 프라이머 농도가, 최종농도  $10\text{pmol}/\mu\text{l}$ 로 되도록 TE완충액에 용해하였다. 또, 본 실시예에서는, 전체의 포워드 프라이머와 리버스 프라이머를 이용하였으나, 포워드 프라이머와 리버스 프라이머의 각각으로부터 1 내지 3종류씩을 사용하도록 해도 된다.

- <230> 이상과 같이 생성한 포워드 프라이머와 리버스 프라이머의 용액(포워드 프라이머 믹스 및 리버스 프라이머 믹스)을 이용해서, [3. 병원체 게놈 DNA(모델 검체)의 추출]에서 설명한 방법으로 추출한 게놈 DNA를, [5. 검체의 증폭과 표식화(PCR증폭 및 형광표식화)]에서 설명한 수법에 의해 증폭하였다.
- <231> 반응종료후, 정제용 컬럼(키아젠사 제품, QIAquick PCR Purification Kit)을 이용해서 프라이머를 제거한 후, 증폭산물을 전기영동에 의해 검토했다. 1,500 염기쌍 영역에 1밴드가 검출되어, 양호하게 PCR증폭이 행해지고 있는 것을 확인할 수 있었다. 또, 부산물은 생성되지 않았다.
- <232> 또한, 표 11의 프라이머를 이용함으로써, 예를 들면, 상술한 10종의 감염증 병원체(황색 포도상 구균, 표피 포도상 구균, 대장균, 폐렴 간균, 녹농균, 세라티아균, 폐렴 연쇄 구균, 인플루엔자균, 엔테로박터 클로아카에균 및 엔테로코커스 페칼리스균)의 모두에 있어서, 양호한 PCR증폭의 증폭결과를 얻는 것이 가능하였다.
- <233> **[실시예 5] 혈액과 균액의 혼합물로부터의 16s rRNA 유전자의 증폭**
- <234> 인간의 혈액  $200\mu\text{l}$ (채혈한 EDTA혈액)에 실시예 1에서 설명한 수순으로 배양한 엔테로박터 클로아카에균을  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  가하고, 균혈중 모델계로 하였다. 이 용액의 각각에 N-아세틸무라미다제용액(효소완충액중  $0.2\text{mg}/\text{ml}$ )을 가하고,  $37^\circ\text{C}$ 에서 30분 가온한 후, Qiaamp Blood mini Kit(키아젠사 제품)을 이용해서 DNA를 추출하여, PCR반응용의 템플레이트로 하였다.
- <235> 이들 DNA에 대해서 실시예 4와 마찬가지로, 표 11의 프라이머를 이용해서 PCR반응을 행하였다.
- <236> 그 결과, 실시예 4와 마찬가지로, 1,500 염기쌍 영역에 1개의 밴드가 검출되어, 양호하게 PCR반응이 행해지고 있는 것을 확인할 수 있었다. 또, 부산물은 생성되지 않았고, 그 밴드로부터 구한 PCR증폭산물의 양은, 가한 균의 양에 비례하고 있었다. 이것은, 이 프라이머 세트를 이용한 때에, 인간 게놈의 PCR산물은 생산되지 않고, 엔테로박터 클로아카에균의 16s rRNA만이 증폭된 것을 나타내고 있다.
- <237> 이상 설명한 바와 같이, 본 실시예에 의하면, 복수 종류의 감염증 병원체의 유전자중의 16s rRNA부분을 효율 좋게, 또 높은 순도로 증폭하는 것이 가능하다. 또, 인간 게놈 DNA존재시에 있어서도 감염증 병원체의 16s rRNA만을 효율 좋게 증폭하는 것이 가능하다.

### 발명의 효과

- <238> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 의하면, 한번에 대량 제조하는 것이 가능하고, 또한, 유사균종간에 있어서의 균종의 동정이 가능한 감염증 검출용 프로브를 제공하는 것이 가능하다. 보다 구체적으로는, 감염증의 복수종의 병원체의 종류에 의거한 분류에 적합한 감염증 검출용 프로브를 제공하는 것이 가능하다.
- <239> 혹은, 감염증의 병원체인 예를 들면, 상기 10종류의 균의 검출에 적합한 감염증 검출용 프로브를 제공하는 것이 가능하다.
- <240> 또, 이들 유사균종간의 차이가 DNA칩상에서 정밀도 좋게 평가가능하도록, 감염증 검출용 프로브와 검체와의 하이브리드체의 안정성도 고려한 프로브 세트를 제공하는 것이 가능하다.
- <241> 또한, 이들 감염증 검출용 프로브와 검체와의 반응을 행하도록, 이들 감염증 검출용 프로브가 고정된 담체를 제공하는 것이 가능하다.
- <242> 또, 검체 용액과의 반응 과정에서, 이들 감염증 검출용 프로브가 안정적으로 담체상에 고정되고, 재현성이 높은 검출결과를 얻도록, 화학적으로 고정된 담체를 제공하는 것이 가능하다.
- <243> 또한, 감염증 병원체의 검출 및/또는 동정을 행하기 위해, 검체중의 병원체의 16s rRNA를 증폭하는 PCR반응용 프라이머를 제공하는 것도 가능하다.
- <244> 또, 본 발명에 의하면, 복수의 균종에 공통으로 이용가능하고, 균종이 불명인 상태에서도 효과적으로 병원체의 16s rRNA를 증폭가능한 프라이머 세트도 제공된다.
- <245> 또한, 본 발명에 의하면, 복수 종류의 병원체의 16s rRNA를 동일한 PCR조건에서 증폭가능한 프라이머 세트가 제

공된다.

<246>

본 발명의 정신과 범위를 일탈함이 없이 본 발명의 다수의 명백하게 광범위한 다른 실시형태를 행할 수 있으므로, 본 발명은, 첨부된 특허청구범위에 규정된 것을 제외하고 그의 구체적인 실시형태로 한정되지 않는다.

## 서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부