



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월02일

(11) 등록번호 10-2235659

(24) 등록일자 2021년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/689 (2018.01) C12Q 1/686 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/689 (2018.05)

C12Q 1/686 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2019-0133080

(22) 출원일자 2019년10월24일

심사청구일자 2019년10월24일

(56) 선행기술조사문헌

KR101193410 B1*

CHIEN-HSUN HUANG ET AL., FRONT. MICROBIOL., 2018, Vol.9.*

KR101562491 B1

KR1020040077544 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김해영

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

김이슬

울산광역시 북구 아진로 75, 206동 705호(상안동, 쌍용아진그린타운)

(74) 대리인

특허법인 하나

전체 청구항 수 : 총 7 항

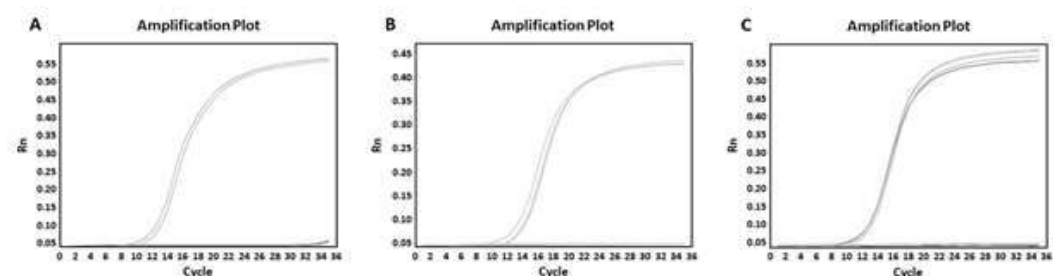
심사관 : 이재영

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

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹에 속하는 카제이(*L. casei*), 파라카제이(*L. paracasei*) 및 람노스(*L. rhamnosus*) 균종을 구별할 수 있는 검출용 조성물, 키트, 이를 이용한 검출방법 및 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2561/113 (2019.08)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 제 1 프라이머 쌍; 서열번호 3의 염기서열 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 제 2 프라이머 쌍; 및 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 제 3 프라이머 쌍;으로 구성되는 프라이머 세트;를 포함하는, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹에 속하는 균종의 구별 검출용 조성물로서,

상기 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹에 속하는 균종은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) 및 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*)로 구성된 군에서 하나 이상 선택된 것인, 검출용 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항의 조성물을 포함하는,

락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹에 속하는 균종의 구별 검출용 키트.

청구항 4

제1항의 조성물을 포함하는,

락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹에 속하는 균종의 구별 검출용 바이오 칩(chip).

청구항 5

대상 시료에 제1항의 조성물을 처리하는 단계;를 포함하는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹에 속하는 균종의 구별 검출 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

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

락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹에 속하는 균종의 구별 검출 방법.

청구항 7

a) 대상 시료에 제1항의 조성물을 처리하는 단계;및

b) 상기 시료 내에 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹에 속하는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) 및 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 포함 여부를 확인하는 단계를 포함하는,

락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹 포함 시료의 스크리닝 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

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

락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹 포함 시료의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹에 속하는 카제이(*L. casei*), 파라카제이(*L. paracasei*) 및 람노서스(*L. rhamnosus*) 균종을 구별할 수 있는 검출용 조성물, 키트, 이를 이용한 검출방법 및 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 락토바실러스(*Lactobacillus*)는 그람양성균의 무포자 간균으로 카탈라아제(catalase) 음성 유산균이다. 유산균과(*Lactobacillaceae*)에 속하는 락토바실러스는 현재까지 170여 종이 알려져 있다. 사람의 위장관에는 장에서 분리된 플랜타룸(*L. plantarum*), 람노서스(*L. rhamnosus*), 퍼멘텀(*L. fermentum*) 및 카제이(*L. casei*)를 비롯한 다양한 유산균이 있으며 이러한 락토바실러스들은 기본적으로 낮은 pH에 생육할 수 있는 능력이 있어 김치, 요구르트, 치즈와 같은 산도가 낮은 식품에 활용되기도 한다. 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)과 함께 락토바실러스는 프로바이오틱 제품에 가장 흔히 쓰이는 유산균으로, 특히 아시도필러스(*L. acidophilus*), 카제이(*L. casei*), 람노서스(*L. rhamnosus*), 플랜타룸(*L. plantarum*) 및 파라카제이(*L. paracasei*)가 종종 단일 형태나 다른 락토바실러스와 혼합된 형태로 프로바이오틱 제품에 사용된다.

[0003] 프로바이오틱스는 숙주에게 건강상 이로움을 주는 살아있는 미생물로 사람에게서는 면역 체계 강화, 혈액 내 콜레스테롤 감소, 장내 균총 균형화, 항암작용 등의 효능을 나타내는 것으로 보고되었다. 최근 몇 년 동안 건강에 대한 관심이 증가하면서 건강 증진에 도움이 되는 프로바이오틱 시장이 급속도로 확장되었고, 프로바이오틱 시장이 확장됨에 따라 프로바이오틱 제품의 기능성과 안전성에 관련하여 소비자들의 우려가 증가되고 있다. 따라서 소비자들에게 안전한 프로바이오틱 제품을 제공하기 위해 라벨에 표기된 유산균의 정보를 정확하게 제공하여 소비자들에게 신뢰성을 부여하는 것은 매우 중요한 일이다. 그러나 프로바이오틱 제품에 실제로 함유된 유산균은 라벨에 표시된 성분과 일치하지 않는 경우가 빈번하다고 보고되고 있다.

[0004] 유산균 동정 또는 프로바이오틱 제품의 미생물 균집을 확인하기 위해 기존에는 미생물의 표현형 특성을 이용한 생화학 방법이 주로 사용되었다. 그러나 이러한 방법들은 시간이 많이 소모되고 유산균들의 발효 패턴에 따라 잘못된 결과가 나타나는 등의 단점이 있었다. 이를 개선하기 위해 분자유전학 분석법이 개발되어 왔고, 가장 유용하게 사용되는 기법이 16S rRNA 유전자를 사용하는 메타지노믹 시퀀싱(metagenome sequencing), PCR-DGGE, 16S rRNA 유전자 시퀀싱(gene sequencing)이다.

[0005] 미생물의 16S rRNA gene은 동일한 종간의 서열이 상당히 보존되어 있어 계통 발생 연구에 유용하게 사용되는 유전자이다. 그러나 락토바실러스의 경우 16S rRNA 유전자 서열이 매우 비슷하여 16S rRNA 유전자를 이용한 기법이나 16S rRNA 유전자 시퀀싱을 이용해서는 일부 락토바실러스를 종 수준까지 동정할 수 없다.

[0006] 특히 락토바실러스 카제이(*L. casei*) 그룹에 속하는 카제이(*L. casei*), 파라카제이(*L. paracasei*), 람노서스(*L. rhamnosus*) 간에는 16S rRNA 유전자 서열이 98.7-99.9% 이상 일치한다. 때문에 16S rRNA 유전자를 이용한 종래의 방법으로는 같은 그룹에 속하는 락토바실러스 종을 구별하기 어렵다는 한계점이 존재한다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1193410호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 락토바실러스 카제이(*L. casei*) 그룹에 속하는 카제이(*L. casei*), 파라카제이(*L. paracasei*), 람노서스(*L. rhamnosus*)의 명확한 구별을 위한 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

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

다.

- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 검출용 조성물을 포함하는 락토바실러스 카제이 그룹 검출용 바이오 칩(chip)을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 검출용 조성물을 이용해 대상 시료내 존재하는 락토바실러스 카제이 그룹을 명확히 구별할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 검출용 조성물을 이용해 락토바실러스 카제이 그룹 포함 시료의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 측면은, 서열번호 1 내지 6의 염기서열을 포함하는 프라이머 쌍으로 이루어진 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹에 속하는 균종의 구별 검출용 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명에서 “프라이머 쌍”은 정방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머를 합쳐 동시에 지칭하는 용어이고, “프라이머 세트”는 상기 제 1 프라이머 쌍 내지 제 3 프라이머 쌍 중에서 선택된 하나 이상으로 구성된 다수의 프라이머 쌍 묶음을 지칭하는 용어로 사용하였다.
- [0015] 프라이머 쌍의 설계는 A, G, C, T 함량비, 프라이머 결합체(dimer) 형성 방지, 같은 염기서열의 3 회 이상 반복 금지 등 여러 가지 제약이 따른다. 그 외에 주형(template) DNA의 양, 프라이머의 농도, dNTP의 농도, Mg²⁺의 농도, 반응온도, 반응시간 등의 조건이 적정해야 한다.
- [0016] 상기 프라이머(primer)는 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 포함하는 짧은 핵산 서열로 상보적인 핵산의 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 핵산 주형의 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능할 수 있다.
- [0017] 상기 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있으며, 표적 물질에 존재하는 핵산과 혼성화 되어 상기 표적 물질의 특정 유전자를 증폭하는데 사용될 수 있다.
- [0018] 상기 프라이머는 증폭의 효율을 고려하여 구체적으로는 단일쇄일 수 있으며, 디옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotide)일 수 있고, 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0019] 상기 혼성화는 2개의 단일 가닥 핵산이 상보적인 염기 서열들의 페어링(pairing)에 의하여 이합체 구조(duplex structure)를 형성하는 것을 의미한다.
- [0020] 상기 혼성화는 단일 가닥 핵산 서열 간의 상보성이 완전할 경우(perfect match) 일어나거나 일부 미스매치(mismatch) 염기가 존재하는 경우에도 일어날 수 있다. 상기 혼성화에 필요한 상보성의 정도는 혼성화 반응 조건에 따라 달라질 수 있으며, 특히 온도에 의하여 제어될 수 있다. 일반적으로, 상기 혼성화 온도가 높으면 완전한 매치일 경우 혼성화가 일어날 가능성이 높으며, 혼성화 온도가 낮으면 일부 미스매치가 존재하더라도 혼성화가 일어날 수 있다.
- [0021] 상기 프라이머 세트는 표적 원료에 존재하는 특정 유전자에 혼성화될 수 있으며, 시료 내에 목적하는 원료가 존재하는 경우 중합효소 연쇄반응에 의해 상기 특징적인 유전자의 염기서열이 증폭 되므로 상기 증폭된 산물(amplicon)을 통해 상기 원료의 존재를 판단할 수 있다.
- [0022] 상기 프라이머는 기본 성질을 변화시키지 않은 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 즉 핵산 서열이 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형될 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 뉴클레오타이드의 하나 이상의 동족체로의 치환 및 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트 또는 카바메이트 등의 하전되지 않은 연결체나 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등의 하전된 연결체로의 뉴클레오타이드의 변형이 가능하다. 또한 핵산은 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그널 펩타이드, 폴리 L 리신 등의 단백질, 아크리딘 또는 프소랄렌 등의 삽입체, 금속, 방사성 금속, 철 산화성 금속 등의 킬레이트화제 및 알킬화제 등의 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기를 가질 수 있다.
- [0023] 또한 상기 프라이머 서열은 검출 가능한 신호를 직접적 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형

시킬 수 있다. 상기 프라이머는 분광학, 광화학, 생화학, 면역화학 또는 화학적 수단을 이용하여 검출될 수 있는 표지를 포함할 수 있다. 유용한 표지는 32P, 형광 염료, 전자 밀집 시약, 효소(일반적으로 ELISA에 이용되는 것), 바이오틴 또는 합텐 및 항혈청 또는 단일클론성 항체가 이용가능한 단백질을 포함한다.

- [0024] 상기 프라이머들은 적절한 서열의 클로닝 및 제한효소 분해 및 나랭(Narang)등의 포스포트리에스테르 방법(1979, Meth, Enzymol. 68:90-99), 보카지(Beaucage)등의 디에틸포스포라미다이트 방법(1981, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862), 및 미국 특허 제 4458066호의 고품질 지지 방법과 같은 직접적인 화학적 합성법을 포함하는 임의의 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.
- [0025] 일 실시예에 있어서, 상기 프라이머 세트는 제 1 프라이머 쌍 내지 제 3 프라이머 쌍으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것일 수 있다.
- [0026] 구체적으로, 상기 프라이머 세트는 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 제 1 프라이머 쌍; 서열번호 3의 염기서열 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 제 2 프라이머 쌍; 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 제 3 프라이머 쌍;으로 이루어진 군에서 하나 이상 선택된 것으로 구성될 수 있다.
- [0027] 본 발명에서, “락토바실러스(*Lactobacillus*)”는 당류를 발효하여 에너지를 획득하여 다량의 유산을 생성하는 세균으로, 다른 세균을 죽이기 위해 젖산(유산)을 분비하는 특성이 있어 '유산균'이라는 이름이 붙었다. 락토바실러스는 유산균과(*Lactobacillaceae*)에 속하고, 현재까지 170여 종이 알려져 있다. 락토바실러스는 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)과 함께 프로바이오틱 제품에 가장 흔히 쓰이는 유산균이며, 장내 유해 세균 증식을 막아 면역력을 정상 수치로 조절해 아토피, 건선 같은 피부질환이나 감염증을 개선하고, 비만과 성인병을 억제하는 효과 등이 있다고 알려져 있다.
- [0028] 특히 락토바실러스에는 여러 그룹이 존재하며, 대표적으로 락토바실러스 애시도필러스(*L. acidophilus*) 그룹에 속하는 애시도필러스(*L. acidophilus*), 헬베티커스(*L. helveticus*), 갈리나룸(*L. gallinarum*); 락토바실러스 카제이(*L. casei*) 그룹에 속하는 카제이(*L. casei*), 파라카제이(*L. paracasei*), 람노서스(*L. rhamnosus*); 락토바실러스 플랜타룸(*L. plantarum*) 그룹에 속하는 플랜타룸(*L. plantarum*), 파라플랜타룸(*L. paraplantarum*), 펜토서스(*L. pentosus*); 락토바실러스 사케이(*L. sakei*) 그룹에 속하는 사케이(*L. sakei*), 그라미니스(*L. graminis*), 커베투스(*L. curvatus*) 등이 이에 해당한다.
- [0029] 구체적으로, 본 발명에서 상기 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹에 속하는 균종은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) 및 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*)로 구성된 군에서 하나 이상 선택된 것을 의미하는 것일 수 있다.
- [0030] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)의 유전자를 검출하는 제 1 프라이머 쌍은 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 구성될 수 있다.
- [0031] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*)의 유전자를 검출하는 제 2 프라이머 쌍은 서열번호 3의 염기서열 및 서열번호 4의 염기서열로 구성될 수 있다.
- [0032] 일 실시예에 있어서, 상기 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)의 유전자를 검출하는 제 3 프라이머 쌍은 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열로 구성될 수 있다.
- [0033] 또한, 상기 프라이머 쌍은 선택된 1 종의 프라이머 쌍이 포함되거나 2 종 이상의 복수 개의 프라이머 쌍이 포함된 형태로 프라이머 세트를 구성할 수 있다.
- [0034] 본 발명 일 실시예에서는 상기 본 발명의 각 프라이머 쌍들이 락토바실러스 카제이 그룹에 속하는 균종 각각에 대해 매우 높은 특이도를 나타냄을 확인하였다.
- [0035] 본 발명의 다른 측면은, 상기 조성물을 포함하는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹에 속하는 균종의 구별 검출용 키트를 제공한다.
- [0036] 상기 검출용 키트는 용액, 동결건조 분말, 냉동 용액, 또는 스트립 형태를 가질 수 있으며, 각각의 형태는 당업계에서 통상적인 방법으로 제제화할 수 있다. 예를 들어, 용액 형태의 검출용 키트는 나트륨-인산, 칼륨-인산, 트리스-염산 및 이외의 여러 종류의 완충액 등의 완충액에 단백질 또는 프라이머 등을 별도로 또는 혼합하여 제제화할 수 있으며, 필요에 따라 냉동시키거나 동결 건조할 수도 있다.
- [0037] 상기 검출용 키트는 면역측방유동 스트립 방식을 이용한 것일 수 있다. 측방유동분석법(lateral flow assay)은

크로마토그래피 방법을 기본으로 하는 단백질 또는 핵산의 검출 방법이다. 이러한 측방유동분석법은 임신진단, 암진단, 기타 특정 단백질 또는 유전자의 존재 여부 또는 미생물탐지 등 다양한 분야에 널리 사용되고 있다. 측방유동분석법은 항원-항체 반응과 같은 두 물질 간의 특이적인 반응을 기본으로 하는 것으로, 민감도와 특이성이 높고, 빠른시간 내에 결과를 확인할 수 있다는 장점이 있어 질병의 진단 및 빠른 예방 조치를 가능하게 한다.

- [0038] 본 발명의 검출용 키트에는 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 락토바실러스 속 균주를 검출하는데 필요한 실험(예: PCR) 및 결과 확인에 필요한 여러 가지 시약들, 예컨대, PCR 조성물, 제한효소, 아가로스, 혼성화 및 전기영동에 필요한 완충용액 등이 추가로 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 PCR 조성물은 역전사 반응에 의해서 합성된 상보적 DNA와 본 발명에서 제공되는 PCR 프라이머 쌍 이외에 적당량의 DNA 중합효소(예, *Thermusaquaticus*(Taq), *Thermusthermophilus*(Tth), *Thermusfiliformis*, *Thermisflavus*, *Thermococcusliteralis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 얻은 열 안정성 DNA 중합효소), dNTP, PCR 완충용액 및 물(dH_2O)을 포함할 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 트리스-HCl(Tris-HCl), MgCl_2 , KCl 등을 포함할 수 있다.
- [0039] 또한, 상기 검출용 키트는 실시간-PCR(RT-PCR) 키트일 수 있다. 구체적으로, RT-PCR 조성물을 동결 건조된 형태로 플라스틱 튜브에 담아 제조될 수 있으며, 상기 키트는 RT-PCR 조성물 외에, 분석에 사용되는 적절한 시약 및 도구를 더 포함할 수 있다. 이러한 시약 및 도구로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제 등이 포함된다. 상기 적합한 담체로는, 이에 한정되지는 않으나, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 조성물을 포함하는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹에 속하는 균종의 구별 검출용 바이오 칩(chip)을 제공한다.
- [0041] 본 발명에서, 상기 “바이오 칩(chip)”은 DNA 칩이라고도 불리우며, 매우 작은 DNA 조각들이 고체 표면에 집적된 것으로, 플라스틱, 유리, 실리콘 등의 투명 또는 반투명한 재질로 이루어진 기판에 시료용액과 시약을 수용할 수 있는 챔버 및 채널을 포함한 형태일 수 있다.
- [0042] 바이오 칩은 두께가 얇고 투명하며 히터블록과의 접촉면적이 넓기 때문에 PCR시간을 크게 단축할 수 있고, 동시에 최소한 수백 개 이상의 유전자를 빠른 시간 안에 검색할 수 있는 장점이 있다. 또한, 고형체를 사용함으로써 아주 적은 양의 유전 물질을 고밀도로 붙일 수 있으며, 동시에 많은 수의 유전자를 검색할 수 있으며, 많은 양의 유전자의 발현 정도를 동시에 측정하거나 계놈의 다양한 부분의 유전자형을 파악하기 위해 사용할 수 있다.
- [0043] 바이오 칩은 붙이는 유전물질의 크기에 따라 cDNA(complementary DNA)칩과 올리고뉴클레오티드 칩(oligonucleotide)으로 분류될 수 있다. cDNA 칩에는 최소한 500bp 이 상의 유전자(full-length open reading frame 또는 EST)가 포함될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 칩에는 약 15 내지 25개의 염기들로 이루어진 올리고뉴클레오티드가 접착될 수 있고, 칩 내에 포함되는 용액에 포함될 수 있으나, 상기 형태에 한정되지 않으며 필요에 따라 적절히 변형할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 측면은, 대상 시료에 상기 조성물을 처리하는 단계;를 포함하는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹에 속하는 균종의 구별 검출 방법을 제공한다.
- [0045] 상기 검출방법에 사용하는 대상 시료는 락토바실러스 속 균이 발견될 수 있는 모든 물질, 바람직하게는 다양한 프로바이오틱 식품에서 수득할 수 있다. 구체적으로, 상기 대상 시료는 당업계에서 통상적으로 사용되는 DNA 추출방법을 통해 수득할 수 있으며, 예컨대 알카라인 추출법, 열수추출법, 컬럼 추출법 및 페놀/클로로포름 추출법 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 상기 검출방법은 대상 시료 내 존재하는 락토바실러스의 DNA를 검출할 수 있는 특정 방법들을 의미하는 것으로, DNA 서열 분석 방법; 프로브 하이브리드화 방법; 구조 특이적인 절단 분석; 효소 mismatch 절단 방법(enzyme mismatch cleavage method); 중합효소 연쇄 반응(PCR); 측쇄 하이브리드화 방법; 롤링 서클 복제(rolling circle replication); 핵산서열기반 증폭(Nucleic acid sequence based amplification, NASBA); 분자 비콘 기술(molecular beacon technology); E-센서 기술(미국 특허 제6,248,229호 등); 사이클링 프로브 기술(cycling probe technology); 데이드 베링(Dade Behring) 시그널 증폭 방법; 리가제 연쇄 반응; 및 샌드위치 하이브리드

화 방법 또는 서던 블로팅(southern blotting)을 이용하는 것일 수 있다.

- [0047] 상기 검출방법은 상기 조성물을 이용하여 특정 DNA를 증폭시킨 후, 특정 DNA의 증폭 반응을 확인하는 단계를 통해 수행될 수 있으며, 상기 특정 DNA의 증폭여부를 확인하는 단계는 검출방법의 반응산물이 전기 영동 등을 통하여 예상되는 DNA 산물의 크기와 일치하는지를 확인함으로써 수행될 수 있다.
- [0048] 구체적으로, 상기 검출방법은 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 수행하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0049] 본 발명에서, 상기 “중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)”은 중합효소를 사용하여 핵산을 연쇄적으로 합성하여 개시 핵산물질을 기하급수적으로 증폭하는 방법으로 당업계에 널리 공지된 것으로, 특정 핵산의 존재 유무를 확인하는 정성분석 PCR, 특정 핵산의 양을 측정하는 정량 PCR 및 PCR 과정을 실시간으로 추적하여 정성 및 정량 분석을 가능하게 하는 실시간 PCR을 모두 포함하는 개념이다.
- [0050] 상기 중합효소 연쇄반응은 당업계에 공지된 통상의 PCR 기기를 사용하여 일반적인 반응 조건에 따라 수행되거나, 또는 일부 변형되어 수행될 수 있다. 또한, 상기 PCR 반응 혼합물은 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 포함할 수 있으며, 이의 수행을 위한 설명서를 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명 일 실시예에서는 1 종 또는 복수의 락토바실러스 카제이 그룹 균주를 검출할 수 있는 프라이머 세트를 구축하였으며, 상기 프라이머 세트는 민감도가 높아 매우 낮은 수준의 타겟 DNA 농도에서도 효과적으로 타겟 DNA를 증폭할 수 있음을 확인하였다.
- [0052] 구체적으로, 상기 중합효소 연쇄반응은 실시간 중합효소연쇄반응(real-time polymerase chain reaction, real-time RCR)일 수 있다. 일반적인 PCR의 경우 반응이 완료된 후 최종산물의 양을 알 수 있는 반면, 실시간 PCR은 PCR이 진행되는 동안 DNA 분자가 증폭되는 과정을 정량적으로 관찰할 수 있는 것을 특징으로 한다.
- [0053] 본 발명에서 상기 실시간 PCR은 형광 탐침을 이용하는 Taqman 방법 또는 SYBR Green을 사용할 수 있고, 구체적으로는 SYBR Green을 이용하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0054] 상기 SYBR Green을 이용하는 실시간 PCR은, 목적하는 서열이 증폭됨에 따라 DNA 양이 증가하고, 이때 이중 가닥(double stranded) DNA에 끼어 들어가는 성질이 있는 형광 염료인 SYBR Green이 이중가닥 DNA에 끼어들어가게 된다. 상기 SYBR은 DNA에 끼어들어 발광하는 성질을 나타내므로, 발광 정도를 측정하여 증폭된 DNA양의 검출이 가능하다. SYBR Green을 이용하는 실시간 PCR법은 프라이머나 탐침에 형광 염료를 부착하지 않아도 되기 때문에 저렴하다는 장점이 있다. 그러나, SYBR Green을 이용하는 실시간 PCR 방법은 한 종류의 PCR 산물만 증폭되는 조건이어야 하고, 통상적인 PCR에서 일어나는 비특이적 산물이나 프라이머간의 다이머(dimer)의 형성이 일어나지 않는 민감한 프라이머 조건을 요구한다.
- [0055] 본 발명의 또 다른 측면은, a) 대상 시료에 서열번호 1 내지 6의 프라이머 쌍을 포함하는 조성물을 처리하는 단계; 및 b) 상기 시료 내에 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹에 속하는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 파라카제이(*Lactobacillus paracasei*) 및 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 포함 여부를 확인하는 단계를 포함하는,
- [0056] 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*) 그룹 포함 시료의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0057] 본 발명에서, 상기 “시료”는 락토바실러스 속 균주의 포함 여부를 확인하고자 하는 대상이 되는 물질을 말한다. 구체적으로 프로바이오틱스 제제, 화장품, 식품, 영양제, 음료, 첨가제, 각종 식이에 포함되는 물질 등을 대상으로 할 수 있으나, 상기 형태에 제한되는 것은 아니며 락토바실러스 속 균주의 포함 여부를 확인하고자 하는 것이라면 모두 대상 시료가 될 수 있다.
- [0058] 상기 스크리닝 방법은 특별한 제한 없이 당업계에 공지된 방법에 의해 수행되는 모든 유전자 스크리닝 방법을 통해 수행되는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0059] 본 발명의 제 1 프라이머 쌍 내지 제 3 프라이머 쌍에서 하나 이상 선택된 것으로 이루어진 락토바실러스 검출용 조성물을 이용하면, 대상 시료 내 존재하는 락토바실러스 카제이 그룹에 속하는 균종(species)을 정확하게 관별할 수 있다.
- [0060] 또한, 본 발명의 제 1 프라이머 쌍 내지 제 3 프라이머 쌍은 한번의 실시간-PCR을 통해 락토바실러스 카제이 그

를 균종을 정확히 검출할 수 있다.

[0061] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 락토바실러스 카제이 그룹(*Lactobacillus casei* group)을 검출하기 위한 프라이머 세트의 특이도 결과를 나타낸 것이다(A: *L. casei* 균주인 *L. casei* KCTC 3109, *L. casei* KACC 12413 및 *L. casei* KCTC 13086; B: *L. paracasei* 균주인 *L. paracasei* KCTC 3165, *L. paracasei* KCTC 5546 및 *L. paracasei* KACC 12427; C: *L. rhamnosus* 균주인 *L. rhamnosus* KCTC 5033, *L. rhamnosus* KCTC 3237, *L. rhamnosus* KCTC 5510 및 *L. rhamnosus* KCTC 13088).

도 2는 락토바실러스 카제이 그룹(*Lactobacillus casei* group)을 검출하기 위한 실시간 PCR의 정확도를 확인한 결과를 나타내었다(A: *L. casei*의 증폭곡선, 멜트 커브 및 표준곡선, B: *L. paracasei*의 증폭곡선, 멜트 커브 및 표준곡선, C: *L. rhamnosus*의 증폭곡선, 멜트 커브 및 표준곡선).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0064] 준비예 1. 락토바실러스 카제이 그룹 표준 균주와 프로바이오틱 제품의 준비

[0065] 10종의 락토바실러스 카제이 그룹 표준 균주는 한국생물자원센터(KCTC) 및 국립 농업과학원 미생물 은행(KACC)으로부터 분양 받았다(표 1).

표 1

순번	락토바실러스 종(Species)	균주 번호
1	락토바실러스 카제이(<i>Lactobacillus casei</i>)	KCTC 3109
2	락토바실러스 카제이(<i>Lactobacillus casei</i>)	KACC 12413
3	락토바실러스 카제이(<i>Lactobacillus casei</i>)	KCTC 13086
4	락토바실러스 파라카제이(<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>)	KCTC 3165
5	락토바실러스 파라카제이(<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i>)	KACC 12427
6	락토바실러스 파라카제이(<i>Lactobacillus paracasei</i>)	KCTC 5546
7	락토바실러스 람노서스(<i>Lactobacillus rhamnosus</i>)	KCTC 5033
8	락토바실러스 람노서스(<i>Lactobacillus rhamnosus</i>)	KCTC 3237
9	락토바실러스 람노서스(<i>Lactobacillus rhamnosus</i>)	KCTC 5510
10	락토바실러스 람노서스(<i>Lactobacillus rhamnosus</i>)	KCTC 13088

[0067] 분양 받은 표준 균주는 모두 MRS 액체 배지에서 30° C, 48시간 동안 혐기적 조건으로 배양하였다. 또한, 본 발명의 검출용 조성물을 이용해 시판되는 프로바이오틱 제품으로부터 락토바실러스 카제이 그룹의 제품 모니터링을 위하여 각각 파우더 11종, 캡슐 12 종 및 요거트 6종의 프로바이오틱 제품을 마켓으로부터 구입하였다.

[0068] 준비예 2. DNA 추출 방법

[0069] 락토바실러스 카제이 그룹 표준 균주의 DNA 추출을 위해 MRS 액체배지에서 30° C, 48시간 동안 혐기적 조건으로 배양하였다. 배양 후 13,600 g에서 5분 동안 원심분리 하였고, 상층액을 제거한 뒤 펠렛을 이용하여 유전체 DNA를 추출하였다. 유전체 DNA 및 프로바이오틱 제품의 DNA는 DNeasy[®] Blood & Tissue kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 추출하였다. 모든 DNA는 MaestroNano[®] 분광광도계를 이용하여 농도와 순도를 측정하였으며, 1% 아가로스 겔에서 전기영동하여 이를 확인하였다.

[0070] 준비예 3. 락토바실러스 카제이 그룹 특이 프라이머 디자인 방법

[0071] 총 42개의 전장 유전자 염기서열을 미국 국립생물공학정보 센터(NCBI)에서 다운로드하였다. 이후 락토바실러스 카제이 그룹에 속하는 균주 간의 상동성 비교는 단백질 레벨에서의 쌍 비교(pairwise) 얼라인먼트를 통해 확인

하였다.

[0072] 락토바실러스 카제이 그룹에 속하는 균주간의 범-유전체(pan-genomes)의 분석은 Anvi'o: an advanced analysis and visualization platform for 'omics data(Eren et al., PeerJ. 2015; 3: e1319)의 방법을 이용하였다.

[0073] USEARCH 9.0 프로그램을 이용한 비교 유전체 분석(identity cut-off=50%)을 통하여 각각의 종이 보유하고 있는 종 특이 유전자를 선별하였다. 타깃 균주의 전장 유전자 염기서열을 바탕으로 모든 타깃 종이 보유하고 있는 유전자를 핵심 유전자(core genes)로 추출하였고, 타깃 종을 제외한 다른 모든 나머지 락토바실러스 종의 유전자를 이용하여 범-유전체(pan-genome)를 형성하였다. 염기서열과 비교하여 타깃 종에만 특이적으로 존재하는 유전자를 선별하였다.

[0074] 핵심 유전자로 선별된 유전자는 NCBI BLASTN을 이용하여 다른 락토바실러스 종에는 존재하지 않는다는 것을 한번 더 재확인하고, 최종적으로 선별된 타깃 종 특이 유전자로부터 프라이머 디자이너(Scientific and Education Software, Durham, NC, USA)을 이용하여 프라이머 디자인을 수행하고, Bionics(Seoul, Korea)에서 이를 합성 주문하였다.

[0075] 준비예 4. Real-time PCR 조건 설정

[0076] 실시간 PCR은 7500 Real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 장비를 사용하였고, 실시간(Real-time) PCR을 수행하기 위한 반응액 조성은 10uL의 2X Thunderbird SYBR[®] qPCR mix(Toyobo, Osaka, Japan)와 20ng의 주형 DNA 및 500nM의 각 프라이머 쌍에 탈이온 증류수를 혼합하여 20uL가 되도록 준비하였다.

[0077] 타겟의 증폭은 95° C에서 2분 동안 변성한 후, 95° C에서 5초 및 60° C에서 30초 반응을 35회 반복 수행하였다. 멜트 커브(Melt curve) 데이터를 얻기 위해 95° C에서 15초, 60° C에서 1분, 95° C에서 30초, 60° C에서 15초 반응을 수행하였다. 실시간 PCR의 정확성을 평가하기 위해, 20~0.0002ng로 연속 희석(serial dilution) 한 각 락토바실러스 카제이 그룹 균주 DNA와 종 특이 프라이머를 사용하여 표준곡선(standard curve)을 그렸다.

[0078] 각 프라이머 쌍의 특이도는 락토바실러스 카제이 그룹 균주를 포함한 56개 락토바실러스 표준 균주 DNA를 사용하여 각각 확인하였다.

[0079] 준비예 5. 프로바이오틱 제품 적용 실험 방법

[0080] 실시간 PCR을 통해 특이도와 정확성이 확인된 프라이머 세트를 이용하여 프로바이오틱 제품으로부터 락토바실러스 카제이 그룹에 속하는 카제이(*L. casei*), 파라카제이(*L. paracasei*) 및 람노서스(*L. rhamnosus*)를 특이적으로 구별할 수 있는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

[0081] 구체적으로, 상기 실험을 위하여 96-웰 플레이트의 각 웰에 종 특이 프라이머 세트와 20ng의 프로바이오틱 제품 DNA를 주입하여 한 번의 실시간 PCR 반응으로 락토바실러스 카제이 그룹에 속하는 균주가 검출되는지 여부를 확인하였다.

[0082] 실시간 PCR은 7500 Real-time PCR system을 이용하였고, 세부조건은 준비예 4의 조건과 동일하게 수행하였다.

[0083] 실시예 1. 종 특이 유전자 선택 및 프라이머 디자인

[0084] 상기 준비예 3에 기재된 유전자 비교 분석 방법을 통해 락토바실러스 카제이 그룹에 속하는 종 각각의 특이 지역을 확인하였고, 해당 지점으로부터 프라이머 디자인을 진행하였다.

[0085] 구체적으로, 락토바실러스 카제이(*L. casei*) 균주들로부터 추출된 종 특이 유전자 16종은 각각 파지 저항 단백질(phage resistance protein), 가수분해효소(hydrolase) 및 가상 단백질(hypothetical proteins) 유전자임을 확인하였다. 상기 유전자들 중에서 크기 및 구아닌-시토신(GC) 함량 등을 고려하여 락토바실러스 카제이(*L. casei*) 균주 특이적인 프라이머 쌍을 디자인하였다.

[0086] 그 결과, 최종적으로 선택된 유전자는 잠정적 글리코시드 가수분해 효소(putative glycoside hydrolase) 유전자로서, 두개의 카제이 유전체 사이에는 97%의 동일성을 보이는 반면, 파라카제이 및 람노서스를 포함한 다른 락토바실러스와는 유사도를 보이지 않는 것을 확인하였다.

[0087] 락토바실러스 파라카제이(*L. paracasei*) 균주들로부터 추출된 특이 유전자는 락탈알데히드 탈수소화 효소(lactaldehyde dehydrogenase) 및 뮤코네이트 사이클로아이스머레이즈(muconate cycloisomerase)였으며, 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*)에서는 잠정적 세포 표면 단백질(putative cell surface protein) 및 수개의

가상 단백질 유전자가 종 특이 유전자로 확인되었다.

[0088] 상기 여러 종 특이 유전자 중에서, 파라카제이(*L. paracasei*) 종에 속하는 균주에서 키는 환원효소 연관 Zn-의존적 산화 환원효소(quinone reductase related Zn-dependent oxidoreductase) 유전자가 94%의 동일성을 보였으며, 람노서스(*L. rhamnosus*) 종에 속하는 균주에서는 잠정적 수송 단백질(putative transport protein) 유전자가 98%의 동일성을 보이는 것을 확인하였다.

[0089] 상기한 결과에 기초하여, 이 유전자들로부터 락토바실러스 카제이 그룹에 속하는 각 종 특이 프라이머를 디자인하고, 이를 표 2에 나타내었다.

[0090] 상기 과정을 통해 디자인된 3쌍의 프라이머 쌍은 증폭 효율 증가와 가공식품 적용에 적합하도록 증폭산물의 크기를 모두 150 bp 이하로 설정하였다.

표 2

세트 번호	타겟 종 (species)	타겟 유전자	생성물 크기(bp)	프라이머	염기서열 (5'-3')	서열 번호
1	<i>L. 카제이</i> (<i>L. casei</i>)	잠정적 글리코시드 가수분해 효소	139	Casei F	CAG TCG TAC ATG CAG ATA CC	1
				Casei R	TGC CAA GCT CCT AAG TCT GA	2
2	<i>L. 파라카제이</i> (<i>L. paracasei</i>)	키논 환원효소 연관 Zn-의존적 산화 환원효소	135	Paracasei F	CAA CCG TGA TGA TGA CAC TG	3
				Paracasei R	CCA ACG TTA ATC CGG TAC TG	4
3	<i>L. 람노서스</i> (<i>L. rhamnosus</i>)	잠정적 수송 단백질	111	Rhamnosus F	GGC GTC CTG CTA GTC CTA AT	5
				Rhamnosus R	GCA GGA TAA GCC GAT ACT TC	6

[0092] 상기 프라이머를 이용한 락토바실러스 카제이 그룹의 구별 방법은 각각 97%, 94% 및 98%의 높은 상동성을 보이는 타겟 유전자를 대상으로 하는 바, 기존에 알려진 *yycH*(78.5%) 또는 *dnaK*(87.8%) 유전자를 기반으로 하는 락토바실러스 카제이 그룹의 구별방법과 비교할 때 그 정확도에 있어서 현저한 차이를 보인다. 즉, 본 발명의 종 특이 프라이머 쌍을 이용하면 추가적인 시퀀싱 단계들이 필요하지 않기 때문에 카제이 그룹에 속하는 균종의 구별에 소요되는 시간 및 비용을 현저히 절감할 수 있다.

[0093] 실시예 2. 실시간(Real-time) PCR의 특이도 및 민감도 확인

[0094] 실시간 PCR의 정확성을 확인하기 위해 카제이 그룹에 속하는 10개 균주 및 카제이 그룹에 속하지 않는 34개 균주를 포함한 총 44개 락토바실러스 속 균주를 대상으로 실시간 PCR을 수행하였다.

[0095] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 유전체 DNA 주형으로부터 타겟 균주(A: 카제이, B: 파라카제이, C: 람노서스) 모두에서 검출 가능한 앰플리콘을 형성하였으나, 타겟이 아닌 락토바실러스 종에서는 아무런 신호 곡선이 나타나지 않는 것을 확인함으로써, 본 발명의 종 특이 프라이머가 카제이 그룹에 속하는 각 락토바실러스 종을 정확히 구별할 수 있음을 확인하였다.

[0096] 또한, 상기 준비예 4에서 설정한 실시간 PCR의 특이도 및 민감도가 적절한 것인지 확인하기 위하여 연속적으로 희석(serial dilution)한 카제이(*L. casei*), 파라카제이(*L. paracasei*) 및 람노서스(*L. rhamnosus*)의 유전체 DNA를 이용하여 실시간 PCR의 정확도를 확인하였다(도 2).

[0097] 도 2에 나타난 바와 같이, 상기 실시간 PCR의 형광 증폭 곡선 결과를 바탕으로 표준 그래프를 작성한 결과, 상기 세 종류의 종 특이적 프라이머 쌍 모두에서 전 범위(0.0002 부터 20ng)에 걸쳐 선형 비례 관계를 나타내는 것을 확인하였다.

[0098] 구체적으로, 표준 그래프의 경사(slope) 및 R^2 값은 표 3에 나타내었다.

표 3

종(species)	경사도(Slope)	R^2 값
<i>L. 카제이</i>	-3.638	≥ 0.998
<i>L. 파라카제이</i>	-3.522	≥ 0.998
<i>L. 람노서스</i>	-3.541	≥ 0.998

[0100] CODEX 가이드라인에 따르면 R^2 값은 0.98 이상일 때 실시간 PCR의 효율성이 우수하다고 제시하고 있는 바, 상기 표 3에 나타난 결과와 CODEX 가이드라인 수치를 비교하였을 때, 모든 값이 가이드라인 안에 들어옴으로써 본 발명의 실시간 PCR 법은 높은 효율성 및 정확도를 갖는 것을 확인하였다.

[0101] **실시예 3. 프로바이오틱 제품에 대한 PCR 적용 실험**

[0102] 개발된 실시간 PCR 법을 이용하여 프로바이오틱 제품의 락토바실러스 카제이 그룹에 속하는 균종의 동정을 위한 적용 실험을 수행하였다.

[0103] 구체적으로, 총 29개의 프로바이오틱 제품에 대해 확인하였으며 실시간 PCR 결과는 제품 라벨과 비교하였다. 그 결과 하기 표 4에 나타난 바와 같이, 23가지 제품에 대해서는 라벨과 실시간 PCR 결과 검출된 락토바실러스 종이 모두 일치하였으나, 6개 제품에 대해서는 라벨과 PCR 결과가 상이하였다.

표 4

제품	라벨에 표시된 균종(species)	PCR 결과 검출된 균종(species)
프로바이오틱 캡슐 1	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 캡슐 2	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 캡슐 3	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 캡슐 4	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 캡슐 5	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 캡슐 6	<i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 캡슐 7	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 캡슐 8	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 캡슐 9	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 캡슐 10	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 캡슐 11	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i>
프로바이오틱 캡슐 12	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 파우더 1	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 파우더 2	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 파우더 3	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 파우더 4	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 파우더 5	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 파우더 6	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 파우더 7	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 파우더 8	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 파우더 9	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 파우더 10	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
프로바이오틱 파우더 11	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
요거트 드링크 1	<i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i>	<i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i>
요거트 드링크 2	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
요거트 드링크 3	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
요거트 드링크 4	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. rhamnosus</i>

요거트 드링크 5	<i>L. casei</i>	<i>L. casei</i>
요거트 드링크 6	<i>L. casei</i>	<i>L. paracasei</i>

[0105] 상기 표 4에 나타난 바와 같이, 라벨링이 잘못된 6개 제품 모두 파라카제이를 카제이로 잘못 라벨링하고 있는 것을 확인하였다. 이는 일반적으로 미생물을 동정하는데 사용하는 16S rRNA가 세포유지(housekeeping) 유전자이므로 카제이와 파라카제이에서의 16S rRNA의 상동성이 98.7% 내지 99%에 이르기 때문에 두 균종을 구별하기 쉽지 않기 때문인 것으로 보이며, 본 발명의 프라이머를 이용하면 실시간 PCR을 통해 상기 두 종의 락토바실러스 균종을 명확히 구별할 수 있음을 확인하였다.

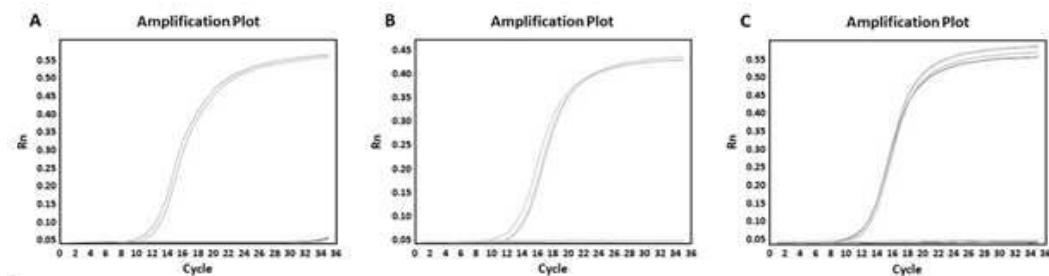
[0106] 본 발명은 락토바실러스 카제이 그룹에 속하는 균종을 빠르고 정확하게 동정할 수 있도록 비교 유전체학을 이용하여 종 특이 프라이머 쌍, 프라이머 세트 및 이들을 포함하는 락토바실러스 검출용 조성물을 제공하고, 이들을 이용하여 락토바실러스를 검출할 수 있는 키트, 바이오 칩 및 검출방법을 제공한다. 또한, 상기 조성물을 이용한 검출방법을 프로바이오틱 제품 모니터링에 적용하여 제품의 라벨에 보고된 락토바실러스의 존재와 보고되지 않은 락토바실러스의 존재 여부도 결정할 수 있는 능력을 확인하였다. 이 방법은 프로바이오틱 제품뿐만 아니라 식품이나 환경 샘플로부터 다양한 락토바실러스를 한 번에 검출할 수 있는 연구에도 적용 가능한 것이다.

[0107] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

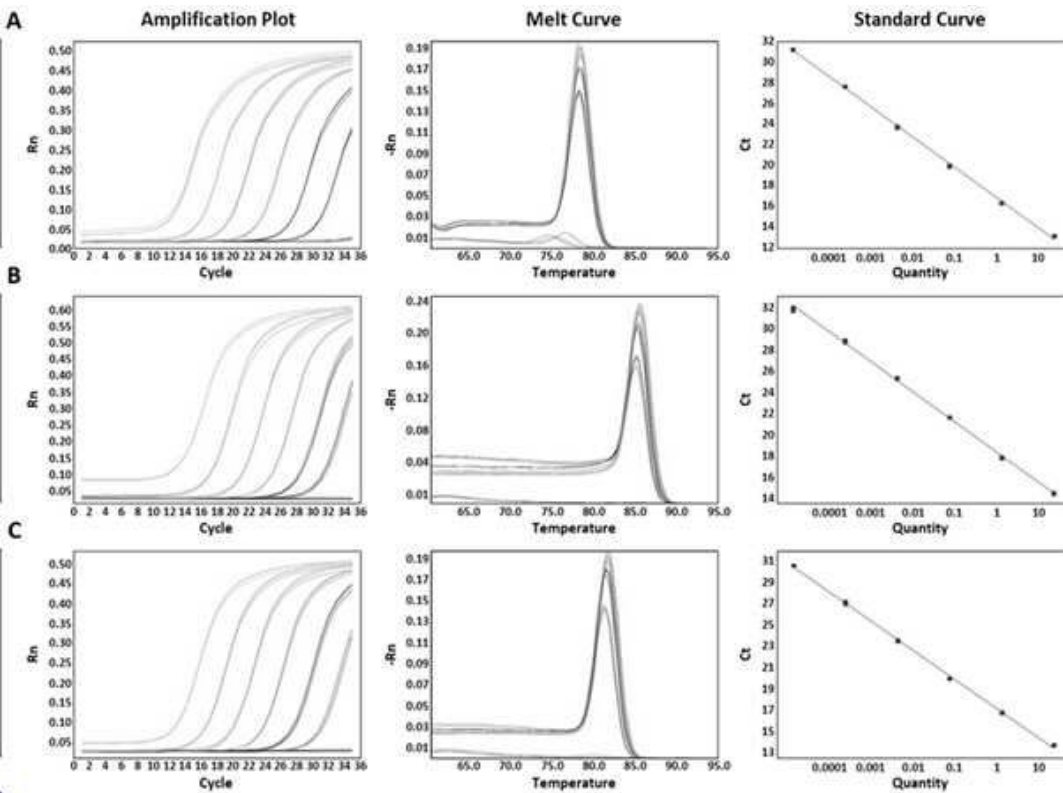
[0108] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> PRIMERS FOR DETECTION OF LACTOBACILLUS CASEI GROUP, AND USE THEREOF
- <130> 19PP31011
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Casei F
- <400> 1
- cagtcgtaca tgcagatacc
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Casei R

<400
> 2
tgccaagctc ctaagtctga 20
<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Paracasei F
<400> 3
caaccgtgat gatgacactg 20
<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Paracasei R
<400> 4
ccaacgttaa tccgtactg 20
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Rhamnosus F
<400> 5
ggcgtcctgc tagtcctaata 20
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Rhamnosus R
<400> 6
gcaggataag ccgatacttc 20