(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0124021
(43) 공개일자 2009년12월03일

(51) Int. Cl.
C12N 15/10 (2006.01) *C07H 21/04* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0050011
(22) 출원일자 2008년05월29일
심사청구일자 2008년05월29일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
김해영
경기도 용인시 기흥구 서천동 1번지 경희대학교 우정원 2366호
김현중
서울특별시 동대문구 이문2동 삼성래미안2차아파트 103동 201호
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 7 항

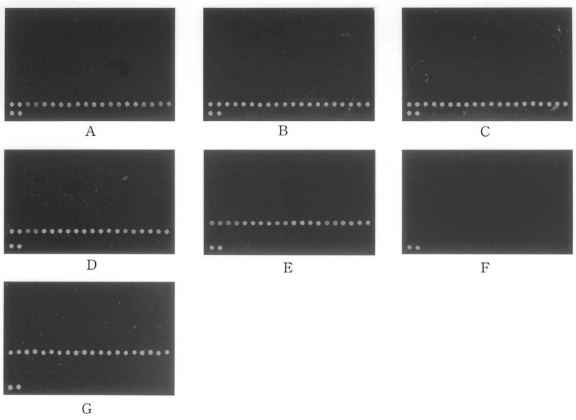
(54) 엔테로박테리아 속 식중독균 검출용 올리고뉴클레오티드프로브 세트 및 상기 프로브 세트를 포함하는마이크로어레이

(57) 요 약

본 발명은 엔테로박테리아 속 (Genus *Enterobacteria*) 식중독균 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브 세트, 상기 올리고뉴클레오티드 프로브 세트를 포함하는 마이크로어레이, 상기 올리고뉴클레오티드 프로브 세트를 이용하여 엔테로박테리아 속 식중독균을 검출하는 방법, 상기 올리고뉴클레오티드 프로브 세트를 포함하는 엔테로박테리아 속 식중독균 검출 키트에 관한 것이다.

본 발명의 프로브는 식품 산업에서 문제가 되고 있는 식중독균에 대한 빠른 검출 및 동정에 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 71 내지 80의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 여시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브;

서열번호 81 내지 90의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*) O157:H7 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브;

서열번호 91 내지 100의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 살모넬라 엔테리카 세로바 티피무리움(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브; 및

서열번호 101 내지 110의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 살모넬라 엔테리카 세로바 티피(*Salmonella enterica* serovar Typhi) 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브;로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프로브를 포함하는 엔테로박테리아 속 (Genus *Enterobacteria*) 식중독균 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브 세트.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 71 내지 110의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 엔테로박테리아 속 (Genus *Enterobacteria*) 식중독균 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브 세트.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프로브 세트가 고정화되어 있는 기판을 갖는 마이크로어레이.

청구항 4

시료의 게놈 DNA를 제1항 또는 제2항에 따른 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프로브 세트와 접촉시켜 상기 시료 중의 표적 서열과 프로브 서열을 혼성화시키는 단계; 및

상기 프로브와 시료 중의 표적 서열 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계를 포함하는, 엔테로박테리아 속 (Genus *Enterobacteria*) 식중독균을 검출하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 표적 서열은 검출 가능한 표지 물질로 표지되어 있는 것인 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 프로브 세트는 마이크로어레이의 기판 상에 고정화되어 있는 것인 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 따른 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프로브 세트를 포함하는, 엔테로박테리아 속 (Genus *Enterobacteria*) 식중독균 검출 키트.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 엔테로박테리아 속 식중독균 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브 세트, 상기 프로브 세트를 포함하는 마이크로어레이 및 키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 식중독균은 세계적으로 인간의 건강에 주요한 문제점을 일으키고 있으며 식품산업, 공공 건강 증진, 미생물 테러 등의 분야에서 식중독균의 빠른 검출이 필요한 실정이다. 인간에 질병을 일으키는 균들 중 주요한 식중독균들은 다음과 같다: 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 리스테리아 모노시토게네스(*Listeria monocytogenes*), 스태필로코커스 오레우스(*Staphylococcus aureus*), 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 비브리오 파라해모리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 여시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*) O157:H7 및 살모넬라 엔테리카 세로바 티피무리움(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium). 이러한 식중독균의 검출은 인간의 건강과 식품 산업에서 매우 중요시되고 있으며, 식중독 검출에 있어서 민감도 (sensitivity), 검출 시간 (rapidity) 및 특이적인 검출(specificity)이 가장 중요한 요건이다. 기존에 알려져 있는 생화학적인 식중독균의 진단 방법은 일반적으로 2-3일 정도의 시간이 필요하며 한 번의 실험으로 다중의 병원균의 검출에는 무리가 있었다.

<3> 몇몇의 DNA를 이용한 식중독균의 검출방법이 보고되었으나, 이 방법들 중 PCR (polymerase chain reaction, 중합효소연쇄반응)은 가장 일반적으로 사용된 방법이다. 그러나 PCR은 사용하는 프라이머의 숫자에 제한이 있으므로 다중의 식중독균의 검출에 문제점을 가지고 있다. 또한 비슷한 속 균주들 사이에서 DNA 서열의 유사성이나 다양성에 의한 위양성(false-positive)이나 위음성(false-negative)을 나타낼 수 있는 가능성이 있다. DNA 서열에 중심을 둔 마이크로어레이 실험 방법은 유전자 발현, 지노타이핑(genotyping) 및 단일염기다형성(single-nucleotide polymorphism) 등의 실험에 사용되어 왔다(Chizhikov et al. 2002. J. Clin. Microbiol. 40: 2398-2407). 또한 마이크로어레이 실험방법은 한 번의 실험으로 다수의 식중독균을 검출할 수 있는 잠재능력 때문에 새로운 식중독균 검출 방법으로 제안되었다 (Al-khaldi et al. 2002. J. AOAC Int. 85: 906-910).

<4> 최근 들어, cDNA 및 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이 기술이 병원성 미생물의 분석에 적용되어 왔으며 (Burton et al. 2005. Molecular and Cellular Probes. 19: 349-357), 하나의 칩으로 4종의 식중독균을 검출할 수 있는 연구가 보고되었다 (Sergeev et al. 2004. Biosensors and Bioelectronics. 20: 684-698). 이러한 기존의 연구들에서 제작된 프로브들은 미생물의 flagelline 유전자나 독성 유전자 (병원성 관련 유전자 포함), 16S rRNA 또는 23S rRNA 서열에서 제작되었다. 그러나 이러한 표적 유전자들은 같은 속의 미생물들 간에 그 서열을 공유하고 있으며, 이는 cross-hybridization의 결과를 초래할 가능성이 높다. 또한, 이러한 연구들에서 혼성화 전에 PCR을 수행하는데, 이 방법은 사용 가능한 프로브의 수가 제한적일 수밖에 없으며 이는 다수의 병원균을 검출하는데 무리가 있다 (Chizhikov et al. 2001. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3258-3263).

<5> 2006년 1월을 기준으로 약 270개 이상의 미생물에 대한 게놈 서열이 National Center for Biotechnology information (NCBI, http://www.ncbi.nih.gov/genomes/lproks.cgi)에 공개되어 있으며, 대부분의 식중독균에 대한 게놈 염기서열 분석 작업이 끝났거나 진행 중에 있다.

<6> 한국특허등록 제10-611056호에는 병원성 미생물 검출을 위한 올리고뉴클레오티드마이크로칩 및 이를 이용한 병원성 미생물 검출방법이 개시되어 있으며, 한국특허등록 제10-671501호에는 식중독 검출용 프라이머 및 이를 이용한 세균성 식중독 검출방법이 개시되어 있으나, 본 발명의 프로브 서열과는 상이하다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<7> 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명에서는 각각의 식중독균의 게놈 서열로부터 각각의 식중독균에 특이적인 70-mer 올리고뉴클레오티드 프로브들을 선별하였으며, 선별된 프로브들을 이용하여 "FBP-1"이라고 명명한 식중독균 검출용 마이크로어레이 칩을 제작하였다. 이 제작한 칩을 이용하여 다양한 식중독균 및 비병원성 균들의 게놈 DNA와 반응시켜 그 특이성을 증명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결수단

<8> 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 신속하고 정확한 검출이 가능한 엔테로박테리아 속 (Genus *Enterobacteria*) 식중독균 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브 세트를 제공한다.

<9> 또한, 본 발명은 상기 올리고뉴클레오티드 프로브 세트를 포함하는 마이크로어레이를 제공한다.

<10> 또한, 본 발명은 상기 올리고뉴클레오티드 프로브 세트를 이용하여 엔테로박테리아 속 식중독균을 검출하는 방법을 제공한다.

<11> 또한, 본 발명은 상기 올리고뉴클레오티드 프로브 세트를 포함하는 엔테로박테리아 속 식중독균 검출 키트를 제공한다.

효 과

<12> 본 발명에 따르면, 본 발명의 프로브는 식품 산업에서 문제가 되고 있는 식중독균에 대한 빠른 검출 및 동정에 활용될 수 있을 것이라 사료되며, 또한 게놈 서열 비교 방법 및 DNA 칩을 이용한 마이크로어레이 실험 방법이 미생물 병원균에 대한 안전성 연구에 적용될 수 있는 가능성을 보여주었다. 또한, 비교 유전체학의 미생물 분류 연구에 대한 새로운 적용방법을 제시하였다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<13> 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

<14> 서열번호 71 내지 80의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 여시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브;

<15> 서열번호 81 내지 90의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*) O157:H7 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브;

<16> 서열번호 91 내지 100의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 살모넬라 엔테리카 세로바 티피무리움(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브; 및

<17> 서열번호 101 내지 110의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함하는, 살모넬라 엔테리카 세로바 티피(*Salmonella enterica* serovar Typhi) 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 프로브를 포함하는 엔테로박테리아 속 (Genus *Enterobacteria*) 식중독균 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브 세트를 제공한다.

<18> 본 발명의 일 구현예에 따른 엔테로박테리아 속 (Genus *Enterobacteria*) 식중독균 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브 세트에서, 여시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*) 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브는 서열번호 71 내지 80의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 71 내지 80의 올리고뉴클레오티드 모두를 포함할 수 있다.

<19> 본 발명의 일 구현예에 따른 엔테로박테리아 속 (Genus *Enterobacteria*) 식중독균 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브 세트에서, 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*) O157:H7 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브는 서열번호 81 내지 90의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 81 내지 90의 올리고뉴클레오티드 모두를 포함할 수 있다.

<20> 본 발명의 일 구현예에 따른 엔테로박테리아 속 (Genus *Enterobacteria*) 식중독균 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브 세트에서, 살모넬라 엔테리카 세로바 티피무리움(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브는 서열번호 91 내지 100의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 91 내지 100의 올리고뉴클레오티드 모두를 포함할 수 있다.

<21> 본 발명의 일 구현예에 따른 엔테로박테리아 속 (Genus *Enterobacteria*) 식중독균 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브 세트에서, 살모넬라 엔테리카 세로바 티피(*Salmonella enterica* serovar Typhi) 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브는 서열번호 101 내지 110의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 101 내지 110의 올리고뉴클레오티드 모두를 포함할 수 있다.

<22> 본 발명의 일 구현예에 따른 엔테로박테리아 속 (Genus *Enterobacteria*) 식중독균 검출용 올리고뉴클레오티드 프로브 세트는 가장 바람직하게는 서열번호 71 내지 110의 올리고뉴클레오티드 모두를 포함할 수 있다.

<23> 본 명세서에 있어서, "프로브"란 상보적인 단일가닥 표적 서열과 혼성화하여 이중가닥 분자 (혼성체)를 형성하는 단일가닥 핵산 서열을 말한다.

<24> 본 명세서에 있어서, 프로브로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic

acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.

<25> 본 발명은 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프로브 세트가 고정화되어 있는 기판을 갖는 마이크로어레이를 제공한다.

<26> 본 발명의 마이크로어레이에 있어서, "마이크로어레이"란 기판 상에 올리고뉴클레오티드의 그룹이 높은 밀도로 고정화되어 있는 것으로서, 상기 올리고뉴클레오티드 그룹은 각각 일정한 영역에 고정화되어 있는 마이크로어레이를 의미한다. 이러한 마이크로어레이는 당업계에 잘 알려져 있다. 마이크로어레이에 관하여는 예를 들면, 미국특허 제5,445,934호 및 제5,744,305호에 개시되어 있으며, 이들 특허의 내용은 참조에 의하여 본 명세서에 포함된다. 상기 올리고뉴클레오티드 프로브 세트에 대하여는 상기 기재한 바와 같다.

<27> 용어 "기판"은 혼성화 특성을 보유하고, 혼성화의 배경 수준이 낮게 유지되는 조건하에 올리고뉴클레오티드 프로브가 부착될 수 있는 임의의 기판을 말한다. 통상적으로, 상기 기판은 미세역가(microtiter) 플레이트, 막(예를 들면, 나일론 또는 니트로셀룰로오스) 또는 미세구(비드) 또는 칩일 수 있다. 막에 적용 또는 고정 전에, 핵산 프로브를 변형시켜 고정화를 촉진시키거나 혼성화 효율을 개선시킬 수 있다. 상기 변형은 단독중합체 테일링(homopolymer tailing), 지방족기, NH_2 기, SH 기 및 카르복실기와 같은 상이한 반응성 작용기와의 커플링, 또는 바이오틴, 합텐 또는 단백질과의 커플링을 포함할 수 있다.

<28> 본 발명은 또한,

<29> 시료의 게놈 DNA를 본 발명의 일 실시예에 따른 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프로브 세트와 접촉시켜 상기 시료 중의 표적 서열과 프로브 서열을 혼성화시키는 단계; 및

<30> 상기 프로브와 시료 중의 표적 서열 사이의 혼성화 정도를 검출하는 단계를 포함하는, 엔테로박테리아 속(Genus *Enterobacteria*) 식중독균을 검출하는 방법을 제공한다.

<31> 상기 엔테로박테리아 속 (Genus *Enterobacteria*) 식중독균은 엔테로박테리아 속에 속하는 임의의 균일 수 있으나, 바람직하게는 여시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*) O157:H7, 살모넬라 엔테리카 세로바 티피무리움(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium) 및 살모넬라 엔테리카 세로바 티피(*Salmonella enterica* serovar Typhi)이다.

<32> 본 명세서에 있어서, "혼성화"란 핵산의 2개의 상보적 가닥이 조합하여 이중가닥 분자 (혼성체)를 형성하는 과정을 말한다.

<33> 본 발명의 일 구체예는, 본 발명의 방법에 있어서 상기 혼성화는 높은 엄격도 혼성화 조건하에서 수행될 수 있다. 본 구체예에서, 상기 높은 엄격도 혼성화 조건은 바람직하게는 65℃에서 동일한 몰의 Na_2HPO_4 및 NaH_2PO_4, 1mM EDTA 및 0.02% 소듐 도데실 설페이트를 포함하는 0.12 M 포스페이트 버퍼를 포함하는 것이다.

<34> 또한, 본 명세서에 있어서, "엄격도 (stringency)"란 혼성화 및 그 후의 처리 단계 동안 존재하는 온도 및 용매 조성을 기술하기 위하여 사용되는 용어이다. 높은 엄격도 조건하에서는 고도로 상동적인 핵산 혼성체가 형성될 것이다. 즉, 충분한 정도의 상보성이 없는 혼성체는 형성되지 않을 것이다. 따라서 분석 조건의 엄격도는 혼성체를 형성하는 2 핵산 가닥 사이에 필요한 상보성의 양을 결정한다. 엄격도는 표적과 비표적 핵산과 형성된 혼성체 사이의 안정성의 차이를 최대화하기 위하여 선택된다.

<35> 상기 시료는 식중독균이 의심되는 미생물을 포함하는 임의의 시료일 수 있으며, 상기 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 통상적으로 이용되는 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)을 이용하여 게놈 DNA를 추출할 수 있다.

<36> 본 발명의 방법에 있어서, 상기 표적 서열은 검출 가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy-5 또는 Cy-3이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 Klenow fragment를 이용하여 핵산을 합성하거나 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출 가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 핵산 합성 또는 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 핵산 합성 또는 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다.

<37> 본 발명의 방법에 있어서, 상기 프로브 세트는 마이크로어레이의 기판 상에 고정화될 수 있다. 마이크로어레이

기판 상에 고정화되는 올리고뉴클레오티드 프로브 세트에 대하여는 상기 기재한 바와 같다.

<38> 본 발명의 방법에 있어서, 상기 엔테로박테리아 속 (Genus *Enterobacteria*) 식중독균의 검출은 검출 가능한 신호를 발생시키는 물질로 상기 시료의 게놈 DNA를 표지하고, 이를 상기 올리고뉴클레오티드 프로브와 혼성화시키고, 그로부터 발생하는 신호를 검출하여 이루어질 수 있다. 상기 검출 가능한 신호는 예를 들면, 광학적 신호 또는 전기적 신호가 될 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 상기 광학적 활성 물질은 형광 또는 인광을 발생시키는 물질일 수 있다. 상기 형광 물질은 예를 들면, 플루오로레신(fluorescein), Cy-5 및 Cy-3 일 수 있다. 또한, 상기 게놈 DNA는 혼성화 전 또는 후에 검출 가능한 신호를 발생시키는 물질로 표지되거나, 표지되어 있지 않을 수 있다. 표지되어 있지 않은 경우의 상기 게놈 DNA와 올리고뉴클레오티드 프로브의 혼성화 결과는 예를 들면, 전기적 신호를 통하여 검출할 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

<39> 본 발명은 또한,

<40> 본 발명의 일 실시예에 따른 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프로브 세트를 포함하는, 엔테로박테리아 속 (Genus *Enterobacteria*) 식중독균 검출 키트를 제공한다. 올리고뉴클레오티드 프로브 세트는 전술한 바와 같다. 상기 키트는 또한 혼성화 반응에 필요한 시약을 필요로 하는데, 이는 당업계에 통상적으로 이용되는 것을 이용할 수 있으며, 특별히 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 설명서를 추가로 포함할 수 있다.

<41> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<42> **실시예**

<43> **실험 방법**

<44> **사용한 미생물 균주**

<45> 본 발명에서 사용한 미생물은 표 1 과 같이 ATCC (the American Type Culture Collection) 균주들을 수집하여 사용하였다.

<46> 표 1. 본 발명에 이용된 균주.

<47>

종	균주	종	균주
Salmonella serovar Typhimurium	ATCC 19585	*Listeria monocytogenes*	ATCC 19118
Salmonella serovar Typhimurium	ATCC 14028	*Listeria monocytogenes*	ATCC 7644
Salmonella serovar Typhimurium	ATCC 13311	*Listeria monocytogenes*	ATCC 15313
Salmonella serovar Typhi	ATCC 6539	*Listeria ivanovii*	ATCC 19119
Salmonella serovar Typhi	ATCC 33459	*Listeria welshimeri*	ATCC 35897
Salmonella serovar Paratyphi B	ATCC 13428	*Listeria inocua*	ATCC 33090
Salmonella serovar Paratyphi C	ATCC 10719	*Listeria grayi*	ATCC 25401
Salmonella serovar Enteritidis	ATCC 4931	*Listeria seeligeri*	ATCC 35967
Salmonella bongori	ATCC 43975	*Staphylococcus aureus*	ATCC 25923
Salmonella enterica salamae	ATCC 15793	*Staphylococcus aureus*	ATCC 6538P
Salmonella enterica arizonae	ATCC 13314	*Staphylococcus aureus*	ATCC 6538
Salmonella enterica diarizonae	ATCC 43973	*Staphylococcus aureus*	ATCC 29737
Salmonella enterica houtenae	ATCC 43974	*Stapylococcus haemolyticus*	ATCC 29970
Salmonella enterica indica	ATCC 43976	*Stapylococcus epidermidis*	ATCC 14990
Salmonella serovar Choleraesuis	ATCC 13312	*Vibrio parahaemolyticus*	ATCC 27969
Salmonella serovar Gallinarum	ATCC 9184	*Vibrio parahaemolyticus*	ATCC 33844
Salmonella serovar Pullorum	ATCC 9120	*Vibrio parahaemolyticus*	ATCC 17802
Escherichia coli O157:H7	ATCC 43894	*Vibrio cholerae*	ATCC 14547
Escherichia coli	ATCC 27325	*Vibrio vulnificus*	ATCC 33815
Escherichia coli	ATCC 23736	*Campylobacter jejuni*	ATCC 43429
Escherichia coli	ATCC 25922	*Campylobacter jejuni*	ATCC 33291

Escherichia coli	ATCC 11775	*Clostridium botulinum*	ATCC 3502
Yersinia enterocolitica	ATCC 23715	*Clostridium perfringens*	ATCC 3624
Bacillus cereus	ATCC11778	*Citrobacter frenudii*	ATCC 8090
Bacillus cereus	ATCC14579	*Enterobacter aerogenes*	ATCC 13048
Bacillus cereus	ATCC10876	*Enterobacter cloacae*	ATCC 13047
Bacillus subtilis	ATCC 6633	*Enterobacter sakazakii*	ATCC 29544
Bacillus subtilis	ATCC 6051	*Enterococcus faecalis*	ATCC 19433
Bacillus thuringiensis	ATCC 35646	*Kelbsiella pneumoniea* subsp. *pneumoniae*	ATCC 8724
Bacillus thuringiensis	ATCC 10792	*Proteus vulgaris*	ATCC 29905
Bacillus anthracis	ATCC 14578	*Rahnella aquatilis*	ATCC 15552
Listeria monocytogenes	ATCC 19111	*Shigella boydii*	ATCC 8700
Listeria monocytogenes	ATCC 19113	*Shigella flexneri*	ATCC 12022
Listeria monocytogenes	ATCC 19114	*Shigella sonnei*	ATCC 25931
Listeria monocytogenes	ATCC 19115		

<48> 총 69개의 균주들이 사용되었으며 식중독균들 및 비 식중독균들로 이루어져 있다. 사용되어진 식중독균들은 다음과 같다: 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 리스테리아 모노시토게네스(*Listeria monocytogenes*), 스태필로코커스 오레우스(*Staphylococcus aureus*), 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 클로스트리디움 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 비브리오 파라해모리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*), 여시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 에세리키아 콜라이(*Escherichia coli*) O157:H7, 살모넬라 엔테리카 세로바 티피(*Salmonella enterica* serovar Typhi) 및 살모넬라 엔테리카 세로바 티피무리움(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium). 각각의 미생물들은 각각의 배지와 조건에서 배양하였으며, *Bacillus anthracis* ATCC 14578와 *Clostridium botulinum* ATCC 3502 의 경우는 한국국립보건원 (the Korea Center for Disease Control and Prevention, KCDC)에서 게놈 DNA를 얻었다.

<49> **게놈 DNA 추출**

<50> 각각의 키운 미생물들을 원심 분리하여 균체를 모은 뒤 DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)을 이용하여 게놈 DNA를 추출하였다. 추출한 게놈 DNA의 농도는 UV-spectrophotometer (Model UV-1700, Shimadzu, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였으며 흡광도의 비 (A_{260}/A_{280})가 1.8에서 2 사이의 DNA 들만을 본 발명에 사용하였다.

<51> **식중독균들의 게놈 DNA 서열**

<52> 본 발명에서 사용된 게놈 DNA 서열들은 표 2와 같다.

<53> 표 2. 본 발명에 이용된 게놈 서열.

<54>

박테리아 균주	Ref. seq	Genbank	Total base(bp)	단백질 코딩 유전자	병원성
Bacillus cereus ATCC 14579	NC_004722	AE016877	5,411,809	5234	병원균
Listeria monocytogenes strain EGD	NC_003210	AL591824	2,944,528	2846	병원균
Listeria inocua	NC_003212	AL592022	3,011,208	2989	비병원균
Stapylococcus aureus N315	NC_002745	BA000018	2,814,816	2594	병원균
Stapylococcus aureus Mu50	NC_002758	BA000017	2,878,529	2714	병원균
Stapylococcus aureus MW2	NC_003923	BA000033	2,820,462	2632	병원균
Clostridium botulinum Hall strain A (ATCC 3502)	CB.dbs		3,886,916		병원균
Clostridium perfringens str. 13	NC_003366	BA000016	3,031,430	2660	병원균
Campylobacter jejuni subsp. jejuni NCTC 11168	NC_002163	AL111168	1,641,481	1634	병원균

Vibrio parahaemolyticcus RIMD 2210633	NC_004603	BA000031	3,288,558	3080	병원균
	NC_004605	BA000032	1,877,212	1752	
Yersinia enterocolitica	YE.dbs		4,615,899		병원균
Escherichia coli O157:H7 EDL933	NC_002655	AE005174	5,528,445	5324	병원균
Escherichia coli O157:H7	NC_002695	BA000007	5,498,450	5361	병원균
Escherichia coli K12	NC_000913	U00096	4,639,221	4279	비병원균
Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2	NC_003197	AE006468	4,857,432	4451	병원균
Salmonella enterica serovar Typhi CT18	NC_003198	AL513382	4,809,037	4395	병원균

<55> 본 발명에 사용된 대부분의 식중독균 서열 파일 (ffn file (코딩 영역 서열), fna file (전체 게놈 서열))들은 NCBI에서 얻었으며, *Yersinia enterocolitica*과 *Clostridium botulinum* Hall strain A (ATCC 3502)의 게놈 DNA 서열들은 Sanger Institute (http://www.sanger.ac.uk/Projects/Y_enterocolitica/, http://www.sanger.ac.uk/Projects/C_botulinum/) 에서 얻었다. 식중독균들과 관련이 있는 비병원성의 균들의 게놈 DNA 서열들도 사용되었으며, 총 16개의 게놈 DNA 서열들이 본 발명에서 사용되었다.

<56> **비교 유전체학을 이용한 식중독균 특이적인 프로브 선별 작업**

<57> 각 식중독균에 특이적인 70-mer 올리고뉴클레오티드들의 선별 작업에 대한 모식도는 도 1과 같다. 16개의 박테리아의 게놈 DNA 서열들의 데이터베이스를 만들었으며, 각각의 11개의 식중독균들의 코딩 영역 서열들은 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 프로그램을 이용하여 게놈 DNA 서열들의 데이터베이스에 비교하였다. *Clostridium botulinum* 과 *Yersinia enterocolitica* 의 게놈 DNA의 경우에는 유전자 서열 부분이 아직까지 분석이 되어있지 않기 때문에 전체 게놈 서열들을 800bp 크기로 400bp씩 중복되도록 자른 뒤 800bp 크기의 DNA 조각들을 게놈 DNA 서열들의 데이터베이스와 비교하였다.

<58> BLAST 결과물 중, 각각의 유전자 (혹은 각각의 DNA 조각들)에 대하여 유사도가 가장 높은 결과물들을 선택하였으며, 이 결과들에 기초하여 각각의 식중독균에 특이적일 것으로 생각되는 유전자 (혹은 DNA 조각)들을 선별하였으며, 다시 BLAST 프로그램을 이용하여 NCBI의 nr 데이타베이스와 비교하였다. 이 방법을 통하여 각각의 식중독균에 특이적일 것으로 생각되는 유전자들을 선별하였으며 (표 3), 선별된 유전자들은 시작 서열부터 1 base pair의 간격으로 이동하며 70-mer 크기의 DNA 조각들로 나누었다. 이들 70-mer DNA 조각들 중 Tm (melting temperature) 값이 78±0.5℃인 서열들을 다시 선별하였으며 데이타베이스 들과 다시 비교하여 각각의 식중독균에 특이적인 70-mer DNA 서열들을 최종적으로 선별하였다.

<59> 표 3. 11가지 식중독균의 게놈 DNA 서열로부터 선발된 70-mer 프로브 및 구축된 70-mer 올리고뉴클레오티드의 수.

<60>

	Bacillus cereus ATCC 14579	*Listeria monocytogenes* EGD	*Stapylococcus aureus* Mu50	*Clostridium botulinum* Hall strain A	*Clostridium perfringens* str. 13	*Campylobacter jejuni NCTC 11168*
유전자 수 (단편)	5,234	2,846	2,714	9758[a]	2,660	1,634
1차 선발된 유전자 수	2,508	136	1,422	3402[a]	1,414	935
2차 선발된 유전자 수	2,004	113	333	38[a]	916	722
2차 선발된 유전자에서 70mer DNA 단편 수	1,110,015	81,919	252,300	27,778	637,562	524,884
70mer DNA 단편 수 Tm.=78℃	10,873	805	1,988	251	1,201	2,410

BLAST 결과를 이용하여 선발된 단편 수	49	152	364	44	228	238
최종 선발된 단편 수	36	106	126	17	103	122
구축된 70-mer 올리고뉴클레 오티드 수	19	30	20	15	30	30
FBP-1 구축에 이용된 70mer 프로브 수	10	10	10	10	10	10

<61> (계속)

<62>

	Vibrio parahaemolyticus RIMD	*Yersinia enterocolitica*	*Escherichia coli* O157:H7 EDL933	*Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2	*Salmonella enterica* serovar Typhi CT18
유전자 수 (단편)	4,831	11539[a]	5,323	4,451	4,395
1차 선발된 유전자 수	2,653	2948[a]	848	196	290
2차 선발된 유전자 수	1,669	87[a]	336	138	210
2차 선발된 유전자에서 70mer DNA 단편 수	1,069,484	63,771	166,599	97,850	97,875
70mer DNA 단편 수 Tm.=78℃	8,864	332	1,114	518	598
BLAST 결과를 이용하여 선발된 단편 수	1,571	67	141	124	166
최종 선발된 단편 수	26	24	62	91	102
구축된 70-mer 올리고뉴클레 오티드 수	20	20	15	41	35
FBP-1 구축에 이용된 70mer 프로브 수	10	10	10	10	10

<63> **양성 대조군 및 음성 대조군의 제작**

<64> 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 putative tubulin beta-4 chain (accession number AY059075)과 actin 3 (accession number AY093784) 유전자의 일부분을 PCR을 이용하여 하기 프라이머로 증폭하였다: Actin3-f 5'-CTCTTGACTACGAGCAGGAA-3'(서열번호 113) 및 Actin3-r 5'-AGTCCTTCCTGATGTCGACA-3'(서열번호 114); Tb4-f 5'-AAGAGGTTGACGAGCAGATG-3'(서열번호 115) 및 Tb4-r 5'-GCCTTTCTCCTGAACATAGC-3'(서열번호 116). 증폭된 DNA 조각은 Perfect-T 클로닝 키트 (TaKaRa, Shiga, Japan)을 이용하여 pMD18-T 벡터에 삽입되었으며 제작된 플라스미드 DNA는 -20℃에 저장하였다.

<65> 양성 대조군 및 음성 대조군으로 사용하기 위한 프로브의 서열은 각각*Arabidopsis thaliana*의 putative tubulin beta-4 chain (accession number AY059075)과 actin 3 gene (accession number AY093784)으로부터 특이적인 서열을 선별하였다: 5'-AAGTCCAGTGTCTGTGATATTGCACCAAAGGGTTTGAAAATGGCGTCTACTTTCATTGGTAACTCAACCT-3'(서열번호 111) 및 5'-AGGTTCTTTACCAGCCATCTATGATTGGTATGGAGAATGCTGGTATCCATGAAACCACCTATAACTCCAT-3'(서열

번호 112).

<66> **올리고뉴클레오티드 마이크로어레이 제작**

<67> 112개의 프로브들(224 올리고뉴클레오티드 DNA 스팟)로 구성된 올리고뉴클레오티드 DNA 칩을 제작하였다. 5'말단을 아민으로 변환시킨 70-mer 올리고뉴클레오티드들은 Illumina 사(Illumina Inc., San Diego, CA)에서 제작하였으며, 50pmol의 농도로 혼성화 용액에 녹인 후, CMT-GAPS II 실란 슬라이드 글라스 위에 pixsys 5500 arrayer (Cartesian Technologies, USA)를 이용하여 DNA 칩을 제작하였다. 제작이 끝난 뒤에는 하나의 칩을 Syto61으로 염색한 후, GenePix 4100A scanner (Axon Instruments, Redwood City, CA)로 스캔하여 칩의 제작을 확인하였다. 칩 위의 각각의 블록은 혼성화 바로 전에 CoverWell perfusion chamber (PC8R-0.5, Grace-Bio Labs, Inc., Bend, OR)로 덮어서 구역을 구분하였다.

<68> **시료 DNA의 Cy3 형광물질 표지 및 혼성화**

<69> 미생물의 게놈 DNA들은 BioPrime DNA labeling System (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 Cy3 형광물질로 표지하였다. 500ng 의 게놈 DNA 와 1ng 의 양성 대조군을 eppendorf 튜브에 넣고 3차 증류수를 넣어 20 ㎕까지 채운 뒤 20 ㎕의 2.5X Random Primers Solution을 넣고 끓는 물에 5분 동안 넣은 뒤, 곧바로 얼음 속에 넣어 온도를 낮추었다. 6 ㎕의 3차 증류수, 1 ㎕의 dNTP 용액 (10 mM dATP, dGTP 및 dTTP; 3 mM dCTP), 2 ㎕의 Cy3-dCTP (1 mM, GeneChem Inc., Daejeon, Korea), 40 유닛의 Klenow fragment를 넣은 뒤, 37℃에서 2시간 동안 반응을 진행하였다. 반응이 끝난 뒤, Cy3 형광물질로 표지된 DNA는 소듐 아세테이트 (3M, pH 5.2)와 100% 에탄올로 침전시킨 뒤, 45 ㎕ 혼성화 용액으로 녹였다. 이 용액은 2분간 끓는 물에서 끓인 뒤, 상온에서 식히고 마이크로어레이 칩의 각각의 챔버에 넣고 60℃에서 8시간 동안 혼성화하였다. 혼성화가 끝난 뒤, DNA 칩을 1차 세정액 (2X SSC, 0.1% SDS)으로 60℃에서 5분간 세정하고, 2차 세정액 (1X SSC)으로 실온에서 3분간 세정한 후, 3차 세정액 (0.2X SSC)으로 실온에서 3분간 반응하고 원심 분리하여 건조시켰다.

<70> **스캔, 이미지 분석 및 분류**

<71> 혼성화가 끝난 칩은 Axon Instruments GenePix 4100A scanner (Axon Instruments, Redwood City, CA)를 이용하여 5 ㎛의 해상도로 스캔을 하였으며, 스캔한 이미지는 GenePix Pro 6.0 (Axon Instruments, Redwood City, CA) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 이미지 분석된 파일들은 MS excel 파일로 저장하였다. 각각의 미생물에 대한 분석 MS excel 파일들은 GeneSpring 7.2 (Silicon Genetics, Palo Alto, CA) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 사용된 알고리즘은 Pearson correlation에 기본을 두어 분석하였다.

<72> **실시예 1: 비교 유전체학을 통한 11개 식중독균에 대한 특이적인 프로브 선별 및 FBP-1의 제작**

<73> 비교유전체학을 통하여 11개 식중독균에 특이적인 70-mer 올리고뉴클레오티드들을 선별하였으며, 그 과정이 표 3에 나타나 있다. 11개의 식중독균에서 총 275개의 70mer의 프로브들이 제작되었다. 이 프로브들은 슬라이드 글라스에 고정되었으며, 다양한 미생물의 게놈 DNA로부터 준비된 시료들과 반응하였다. 275개의 프로브들 중 최종적으로 110개의 프로브들(각각의 식중독균에 대하여 10개의 프로브)이 선발되었으며, 도 2와 같이 FBP-1이라고 명명한 마이크로어레이 칩을 제작하였다. 제작된 FBP-1은 총 8개의 블록으로 나누어져 있으며, 각각의 블록은 110개의 식중독균 특이적 프로브들이 2번씩 반복으로 찍혀있으며, 양성 대조군 및 음성 대조군이 찍혀 있다. 그러므로 제작된 FBP-1은 한 번의 실험으로 총 8개의 시료를 반응할 수 있으며, 각각의 블록은 12줄로서 각 줄은 20개의 스팟(10 개의 프로브)으로 이루어져 있다.

<74> 표 4. FBP-1의 구축을 위한 70-mer 올리고뉴클레오티드 프로브 서열.

표적 박테리아	프로브명	프로브 서열 (5' 아민화된 70mer 올리고뉴클레오티드)
Bacillus cereus	BC1312	TACACTTCGCGTTGTGGCAGAGGTTATTAAGAAGCGTGATGATA AAAAAATCATTACGCTGCAAACAAAC (서열번호 1)
	BC1501	TTGCATGGGGATCGCATATTACGATTATGTTCTCTATATGTAGG GATGTTACAAGCAGAGCTGCTAGTCA (서열번호 2)
	BC1801	TTTATCGTAGTGAAAAATCACGTAGTTCTCATACTGGTGGGAAA GGAATGGGGCTTGCAATTTCGAAAAG (서열번호 3)
	BC2098	TGAGGAGTTTTTTTCCTCAACGTTATATGCACGTACGAAACAAG ATTGGGCATATGCACCAAACATGTAT (서열번호 4)
	BC2140	CTCCCTTTACATCCAGTCCCTTTTAACGGAGAAGTCATCTCCTC TCAAACAGGAGAATATCGAATTCGTA (서열번호 5)
	BC2393	AATGGTGGCACCTCAAATAAGACACCGATTTGACTCTGTAAAAA AATTTGCAGAGGAGGAATCTATTCCG (서열번호 6)
	BC3742	TTGCTGAGAAACAATTAACTGCTATCCATGGTATAGGACCATGG ACTGCCAACTATGTTTTAATGCGTTG (서열번호 7)
	BC4039	GATGTTTCAGCACGTCGAGGTTATAAAGCACATGATGTAATCTC ACTTTCAAGTAGCACACCTAACCTTG (서열번호 8)
	BC4292	AAAATTGTGCAAGTTGGAGCGGAATTTCATGTCGGAATTTTGTT TGTCGCATCATATGCTCATCCTTTAA (서열번호 9)
	BC4598	TGTATTTGTAGGAGGTATTCTCTTAGTGCTTCCTGGGTATGTGA CAGATATGCTAGGGTTTATCTGCGTG (서열번호 10)
Listeria monocytogenes	lmo0754	GGAACTTAATTCTGACGCCAAATTAGTGACACGAGTAGAACGAA TCGATGGCAAATGGTACATTAATGCA (서열번호 11)
	lmo2443	TGCATTTTTTGGAATAGCAGTAATTTGTTTGTTATTCCCTTGGA TGTCTAGCGGGATAGATGCAGCAACA (서열번호 12)
	lmo2732	ATTCGTTTAGGAATTGAGCAACTTCCAAAAAAAGAAATTGAGCA AGTTGCGACAAGAATTGCTTATGCGC (서열번호 13)
	lmo1030	GCAACCAACAGCAGGCCTTATTTTACTTGGCACTAATTTAAACG CTGAAGAAATTAACCGAATACAGCAA (서열번호 14)
	lmo1033	GTTAGTTATGGTGCACTTGGTATGAGCCATCATTCGCTTCAAGA TATTGCTGTTACTAGAGCGATTCCTA (서열번호 15)
	lmo1036	GTCAGTTAGAGCCAATCAAGCCAGTTATCAATTCAGAACCGTGT TACGAATTGATGGGATATAGTCGACA (서열번호 16)
	lmo2821	GACATATGTGTATACTAAAAACATCGAAGCAGCAGAGCCGATAA CAGTGAATTACGTGGATGCTAATGGC (서열번호 17)
	lmo0017	CTAAGCCAAAAAAGAAAACCGTCGCTGCTGTTAAAAAGAAAAAA GAGACACCTCCAAAACCAAAAGAACC (서열번호 18)
	lmo0257	AAGATAAAATTGTACCGAATTTGGTTGGAGTGGACATCGGTTGT GGGTTGTATGTAGTGAAGCTAAAACC (서열번호 19)
	lmo0459	GCAGTTTAAAGTAGCCCTATATAAGGCTTGCACCGAGGAGTCTA AGAAATCAGAGAGTGCGTTCATTAAA (서열번호 20)
Staphylococcus aureus	SAV0020	AGAAGGCTCTAATCAAATTCAAGTCACTTGGGGTGAAAAAGGCG TCTTTGATTATCGTCGTTCGTTATTG (서열번호 21)
	SAV0021	AGCCCACAGATGGTGCAGATAAGAAGCATCAAGTTATTGGAGTG AGAAAAGCAATCGAGGCATTATATTA (서열번호 22)
	SAV0089	ACAATCAATTGCAGAAGCACGAGCACTTCTAGATGAATTTGAAG

<75>

		CCCAAATGGACGAAGACGTTAAAATA (서열번호 23)
	SAV0101	ATCCGTACTTAGCGTTGGACAATCAAATGAATATGCGTGCAACG GAAATGATCCATTTGAACATTAATGC (서열번호 24)
	SAV0110	GGTCCAGAACTAGCAGACATTATTCCATCACTAGCAACAATGGT GGTGTTAGCATTTGTTTGTCGTAAAT (서열번호 25)
	SAV0149	TATCTAAAGCAGACGGTACAGCAGTTAAAGTCGCACCAAAAACT GTAGTGAATCTAATCGGTGCATTCTT (서열번호 26)
	SAV0155	TTCCCTGGTGTCCTTATTCGAACTTCCACAGAAAGACCGGAAGT ACTAGATAAAGGTACGGTTATTGTAG (서열번호 27)
	SAV0178	TTTGGTTACCTCAAGACCGAAATCAAGTAAAGCAAAGTGATGAC AAGAGGCATGCAAGTCGTTATCAAAA (서열번호 28)
	SAV0182	ATGATTCCCAAAGTGCTAGATGCCAAAAATGCGATTGAAAATGG CTGTCCTAAAGTTATCATTGCATCAG (서열번호 29)
	SAV0190	CGTTGATAATTTGAATAACGGACGTTATCAAGGCGAAATGCAAA TTGTGAGACAAACGCTTAGTGCACAT (서열번호 30)
Clostridium botulinum	CB0001	GGCGGTATACTTTGTGGGAATCTAAACACATTCTCAGAATCGTA TTTGACCTTAACTTGGGCCAGTAGAT (서열번호 31)
	CB0002	ACGATGTTATAGATATCCTCCGGTACTCCGATATTTTTACAGGC TTTCATATTAACGGGCAAGGTAGCCA (서열번호 32)
	CB0004	AATTGAACGGCGAGAATATGGAGTTGCACACAATAAGGCATCCG CTTTTGGATATTTAAGTTCTGTCATT (서열번호 33)
	CB0007	TCTGTTATCTTGAAAACCTTACCAGATACACTGCTATGAATTCT AGCCCCCAATCCATTAGGCTCTGCTA (서열번호 34)
	CB0008	TGGAAGCCCTCATCTGTATCTTTATCCACTATATCTGCATCACC ATTTGTGTTTATGCGAGCTTCTTCTC (서열번호 35)
	CB0009	CGCAGCTGTTTGGATAGGTAATGACAATTCTTCTACAGTGGATG GGGTATATAGTAGTACTGCAGCTAGA (서열번호 36)
	CB0011	GAACAGTTAGCTGTACCTCCTCTCATTTCTGGTCCATAAGATGG TAACCATGAAACTTCCATATTTGCGT (서열번호 37)
	CB0012	CTCGTGATATATCCTTCCAATCTAAGTTGATCATAGGCATTTTC TACCGAGTTTCTGCCGACCTGCAATT (서열번호 38)
	CB0013	ACCCGCTGCAAAACAATTAAAGGAGCGATTTGGAACTCCATATT TATTGGCTAGACCCTATGGAATTAAG (서열번호 39)
	CB0017	AAAGCCTGCTAGTCCCATTACAACATTAAGTCGGGTTACTCCTA ATGCATGATCATGATACCACAAAGTT (서열번호 40)
Clostridium perfringens	CPE0192	GGTGGTCTTACTACTCTTGGAGCTAATACTTTTTCAATGGCTGT AGTTGGGCCTTTAGTATCATACGGAC (서열번호 41)
	CPE0590	CTTAGTTTTCTTTGGAACAGTTGTAACTCACTTTTTTGGAGGAT CAGCAGGTAGGGAAGGAACTGGAGTA (서열번호 42)
	CPE0638	CAACTAATATAGCCTTAGAAATGGGGTATGCATTTGGAACTCAC CAAGAAATGCTATTTGCAACAGGGGT (서열번호 43)
	CPE1030	AGTTGGGCTTACGGAAACTTATTTGATACTTACGTTTTAGATAG CGACCCAGCAGATAAATGGGATGCTT (서열번호 44)
	CPE1094	CATTTACTGGAGCTATGTACACATTAGGAATGCCACCTGAACTT ATGGGAATGGGTAGAGCATTAAACGA (서열번호 45)
	CPE2193	CTTGCACCTCCTACTCAAGATTTAAGTGTTGCAGTGGCATTAGC AATTACTTCCTTTGTTGTTGTTCATG (서열번호 46)

<76>

	CPE2318	ATGGGAAATCAAGTATGTCCACTTCCAACAGCAGTATTGTCAAC ACATACAGATGGATTTGGAAAACCAG (서열번호 47)
	CPE2505	GTATGACTGCATATTCAATAGCCTATGCTAGAATAGGAACAAAC GCTGTTGCTAGCATGCAGATTGCTAC (서열번호 48)
	CPE2577	GAGGTAGACGGGGCTAGAAGCTTAATAGAAAAAGCGTCAATGCA ATTAGGCAAAGCTCATAAATCACAAA (서열번호 49)
	CPE2609	ATCTACTAGGAGGAGCAATTGGTGTTGTTATAACCTATACTGTT ATGGCTGCTGTAGGAAGCTTAGGACC (서열번호 50)
Campylobacter jejuni	Cj0150c	TTCCAAATTATGTTTTCGCAGAAGTAAATGCGATAAAAATGGCA GCAAGACGTGCTGGAGAGGATATCAT (서열번호 51)
	Cj0933c	TCCACTTATTCCTTTTTCTCCTATGCCAGGAGGAGCTTTAACGG CAAATACACAAATGATGAGGGATAAT (서열번호 52)
	Cj1170c	GTGGGCCTGTACTTTATGTAGATAGAGCTTATCTTGACTACTAT ATCACACCTGAGTGGATTGCAACCGT (서열번호 53)
	Cj0921c	GGAGTGGCTCAAGCTGCAACTACAAAAAAAGCTATAGGTGAAGC TGCTAAAAAAATTGGCATTGATGTTA (서열번호 54)
	Cj0998c	TAAAGGATTTGGCAAGTTATCTTAAAGGCGCTAAAGCTACCATA AAGCCAAGCAATGCTTTTATGGGTGA (서열번호 55)
	Cj1134	AAGGCGGCATAAGACAAATGCTAAGCGCTCTAAAAAAAGGGAGA ACTTTGGGAATTTTAACTGATCAAGA (서열번호 56)
	Cj1444c	AAAGAGCTTGAAACTCTAGCTTTAACTAGTGGTTCTGTTACAGC TCAAGGTGCAGCTATAAGAGCTCAAC (서열번호 57)
	Cj0116	TTTGCTTTAGGGCATTCTTTGGGAGAATTTTCAGCCTTAGCTGT CAATGGTGCTTTTGATTTTTTAGAGG (서열번호 58)
	Cj0190c	AAATCACTATCAATCTTAGTCCTTCAGGCATCCCAAAAAAGGGA TCGCATTTTGATTTGGCTATCGCTTT (서열번호 59)
	Cj1347c	ATCAGGGTATGTTTGCACTTTTTTGGCTTATCATTATCGTTGCA GCTTGTGATAGTGGGGCGTATTTTAT (서열번호 60)
Vibrio parahaemolyticus	VP0434	GATACCTTGGGTAAGGATTACACTAAACTCTACCAACATATGGC GAAGACCTCTTCAGAACTTCTGCCTA (서열번호 61)
	VP0626	AGAGACCGTCCATTCGGGATTCCAAACTACGTTCTATTCTATGA GAAAAGGTCTAACTCGTTTTCTTCGT (서열번호 62)
	VP0656	TAGAACGGTTGCCTTGAGCGATCTTAGTCGAATTCAACTTGAAC TAGAGACATCTTATGATGGTGGGTAT (서열번호 63)
	VP0753	ACATGATTATCGGCTCCGTACATGTCGGTGATAAAAGCATGTAT CCACTTCCGAAAAACATCACTAAGTT (서열번호 64)
	VP0948	TACTGATTTCCGATTCAGGTAACGACTTATATCTACCTAAGCAA GTTCGTGCAACCGTGACATTGTATGC (서열번호 65)
	VP0953	ATAACTTAACTGGATTGAGGAATCGTCGCTCTTTGCAAGTTAAG TATCGCCAAGGGGTGAATAAGGATTT (서열번호 66)
	VP1284	CCGCTGTACTACAGCTACGCAGAAAACTCGAAGTTAAACGATAA GTACACCGAGATAATCAAAGAGCAAA (서열번호 67)
	VP1365	CAGATGTTTACACGATTACGGCAATTCAGTTGGAGAATACAACA GAGTTTGAAGGTTTCCATGGTGTGAA (서열번호 68)
	VP1386	GTATGGTGCATTGCTTACTGCATACTCTTCTTACTCTTATGACA TGATCCAAAGGTACGGTCAATCCGAA (서열번호 69)
	VP1517	TCGGTCGATTAGTCGAGCAGCAATGGTCAGGTAGAGAAAAAAAA

<77>

		TACATATACAATGCACAGAACCGAAT (서열번호 70)
Yersinia enterocolitica	YE0005	GATATTGATTACTGTGCTTAATATCAGGATAGAGCATACGGGCC AGTTTTAGCGTGCAAATCCATTGACC (서열번호 71)
	YE0007	GCTCACCCGACTTCATCAGCATTATGGCTATCTCTGTGAACAGA TCGAAGAAATCGAAAGAGAGTTAAAA (서열번호 72)
	YE0009	TTTAGTTCGTTCAGCGCTGGTGCCTGATAGTCTTCCGGAACATA TTGTTAATACTATCATGTCTGCATTT (서열번호 73)
	YE0011	AAATACAGGAATGAGACACGGCGAGATATGCGCATTAAGTTGGG AAGATATCGACACTAAAAATTGGACT (서열번호 74)
	YE0013	TTTTAACTCTCTTTCGATTTCTTCGATCTGTTCACAGAGATAGC CATAATGCTGATGAAGTCGGGTGAGC (서열번호 75)
	YE0014	TTGCAGATCAAAGACATTCTTTCAGAGAACCCGGCAGTCTTCAG TATTTCGGTGCCATAATACATAATCA (서열번호 76)
	YE0015	GATTGTCTTGCCAACTAATTGCTTCAATTGACAAGATCGGTTGT AGTGAGTTTTCATTTGGCGTGTATCC (서열번호 77)
	YE0016	TACTCAAAAAAAGAAGTACCAAAAACCTGATTAAAAGCACAATG ACCACGCACACTGTCGGCAACTAAAC (서열번호 78)
	YE0017	TCTTCAACCTGCCTTCACCTTGCAAGATCGAGTTTTTGAGGTTT GTCAGCAGTCTGATATTAATCTTACT (서열번호 79)
	YE0020	TGATATTGGAAATGTTGTTCACCCAACATAAAAGGGAGATTCAG TGAAGCGGTCAAATTAATCAGTCGGG (서열번호 80)
Escherichia coli O157:H7	Z0146	AGATTGCGTCATGGTATATAGGTACCAATGACCAGCCGTGGATC AACTTTTACATTGACAATGACTCTTT (서열번호 81)
	Z0152	CTGAAGTTCAGGAACTGACATTAGACGCAGAAGGTAAAGGCCAG TACGTATTTAACGCATCTTACGTTAA (서열번호 82)
	Z0372	CAATAGGTGGAGTGACATTTATTCGTCGTCCAACTTTTAACGAT CGCTTCATCGTGGAAGATGGAAATAC (서열번호 83)
	Z0502	GATTTCTTCATCCGGATACGTATCTGCCGATAAACTGCACAAAC TCTATAAGACAAATTTGGAAGACGCG (서열번호 84)
	Z1019	GTACTGATACATACAAACAGTAAAAGATCTGTTAACGCAATTAA CTGATGGCATGGAGCTCTTCGCGCTG (서열번호 85)
	Z1139	TGCATTCTGGTTCTGTCAGCACTGATAATATCCTTTTGGCTGGA TGTTGACTCTGTTACTCGAGTATTAC (서열번호 86)
	Z1140	TATGTTTTTAGTTGTCGGGGAGACAGCAAGAAGTCAAAACTATG CTCTGAATGGATATTCTCGTGGTACC (서열번호 87)
	Z1535	TAGGTCAAACTGAAGATGGTCGGACAGCGCTTATTGAGTTCGGA AAAATTAATATGACCGACACCTATTT (서열번호 88)
	Z1543	GCGATCGTTGGAGTATTCGCGGGTTTGAAAATAGCGTAGGTTTG TCAGGGAATGATGGTTTTTATATAAA (서열번호 89)
	Z1554	TTTATAAAAACCAGTAACCCGGAATTGATTTGGGTGACGGTGGT ATTACCTATTTTGACAGCAACAGGTG (서열번호 90)
Salmonella enterica serovar Typhimurium	STY0201	TGAAAAGTAGTTCGAGCGCCCAGATGGTACTCAAACCTAACGAC TCAAGCTCAATTTATAAAGATACCAC (서열번호 91)
	STY0322	ACGATGTTGATACTATCGGTTTTCAGGGGAAAGGGCTATTTTTT TCTGACAGACTGATCGATGCAATACA (서열번호 92)
	STY1076	ATTTTTTAAATATGTCGACCACATCATTTTCCAATAACAGTCAG GAGTTAGCAGCCCACAGTTCACCAGG (서열번호 93)

<78>

	STY1607	GCATTTCTTAAGAGTGCGTTTGAACACTTACATGCACTAAGTAA GGCTGGTGAACCACTTAGTCTTGAAA (서열번호 94)
	STY2020	ATAATTGTTTTCTCGAATTAGCCAGAGAATCATTGCAGCACAAT GGTGAGCAATGGACACGTAATGCTAT (서열번호 95)
	STY3673	TTATGTAAATTATCAGGAGTACTAAGCCAAGCCTGTCAATCGAC GCTGATTCCTCAGGATGAGTTTGAAC (서열번호 96)
	STY3922	GAAATGTACCGGAATGTTGGATGAGAATATCGTCTATTCGACAT TTAATGCTGATCCCGTTGATTCCAGC (서열번호 97)
	STY0314	AAGCGGTTGTATCTGAATTTAATTTGTCAGATATAAATCGCGGT GGAATGACGAAAGCACAGGCAGAAAA (서열번호 98)
	STY1891	AAATATCTGGACCTATCCGCTTTTTGTTAATACCTTTTCAGCAA ATGCTCTTGTGGGACTATCATCGTGC (서열번호 99)
	STY2356	AAATAAAACGGGTGATTTTTATAAGCCCAGGCAGGCTTATGGTG ATTTGGCATCGGTAAACATGGTTATA (서열번호 100)
***Salmonella enterica* serovar Typhi**	STM0159	CCGGTGAGCACAGAATATTGAAAACTGACTTTGCATTACTTTGC CCAAATTGTCACAAAGCTGTTCATAT (서열번호 101)
	STM2743	TGACGGAGTTCGCTTTGAGGACTTGTTTTCAAAAATAATGTACT ATAAGTCGCCAGATTTTCAGCAGGTG (서열번호 102)
	STM2747	GAATCCATTATGATTCGCCGTGTAGTGGTAAACCAGAAGTAATA AATGCTGTGCAATTATTGCGCTCTCA (서열번호 103)
	STM2754	TGATTTAATAGGCAAAAAAAGCGAAGAATATGCATTAAACTGGG AAAAAAACCGCCTAATCGGTCTCGGC (서열번호 104)
	STM2761	TAAGCAAGATTGAGCTGTTAGAGTTAGTTCGACGTGGACGTATA AAATTCGTCGCATTCCAAAATCTCCA (서열번호 105)
	STM2762	CGTAGCTAATACGAAAAAAGAAACAGAAAAAATCGGAGCGACGA TAAAGGTAGTGCTAGGCGTTTTCGTT (서열번호 106)
	STM0654	TTATTACATCGGAAAAGGTATCAAACAAGATTACCAGCAGGCAA TATACTGGTTTCGAAAAGCGGCAGAC (서열번호 107)
	STM0762	TATGCAAAAAAAGAACAACTTGCATGCTGCCATGATACCGGCAC TTGTATCGTTATAATGGAAATTGGAC (서열번호 108)
	STM0763	GCATTTCCGAGAGATTTATCCAGAGATGGAACTCTCTCTTGTTG AAGAGGGGACTTTTGGTTTACATGAT (서열번호 109)
	STM0764	AAACAACCCAGTCTTGTTTTTTCAGCAACGCATGCTTTGTCTTT CTCTTTTGTACCGCATTTGTTAAAAC (서열번호 110)
양성 대조군	tubulin bete-4 chain	AAGTCCAGTGTCTGTGATATTGCACCAAAGGGTTTGAAAATGGC GTCTACTTTCATTGGTAACTCAACCT (서열번호 111)
음성 대조군	actin 3	AGGTTCTTTACCAGCCATCTATGATTGGTATGGAGAATGCTGGT ATCCATGAAACCACCTATAACTCCAT (서열번호 112)

<79>

<80> 식중독균들의 확보된 프로브 (70mer)를 이용하여 DNA 칩을 도 2와 같이 제작하였다. 각각의 식중독균에 대하여 10개씩의 70mer 프로브 (5'-아민 변형)를 제작하였으며, 제작된 프로브의 농도를 50uM로 맞추어서 아민-실란 코팅된 슬라이드 (corining) 위에 프린트하여 일차적으로 DNA 칩을 제작하였다.

<81> 제작된 DNA 칩은 식중독균 10 종류에 대한 특이적인 프로브들이 프린트되어 있으며, 인간에게 특이적으로 질병을 일으키는 S. typhi에 특이적인 프로브 10개를 프린트하여 총 110개의 스팟과 2개의 양성 대조군 스팟 및 2개의 음성 대조군 스팟을 포함하고 있다.

<82> 선별한 각 식중독균에 특이적인 프로브들과 실험결과를 토대로 하여 최종적으로 110개의 스팟 (각 식중독균에 대하여 10개씩의 특이적인 프로브를 선별하였음)이 찍혀있는 도 2와 같은 마이크로어레이 칩을 제작하였으며, FBP-1 (Food Borne Pathogen)이라고 명명하였다.

<83> 최종적으로 제작된 DNA 칩은 총 8개의 블록으로 이루어져 있으며, 각 블록은 110개의 프로브들이 두 번 반복으로 찍혀 있으며, 양성 대조군 및 음성 대조군 용으로 각각 식물에 존재하는 Tubulin beta-4 chain과 Actin 3 유전자의 서열을 사용하였다.

<84> 게놈 DNA는 Bioprime DNA labeling kit을 사용하였으며 Cy3로 표지하였다. 양성 대조군 DNA로는 식물체의 Tubulin beta-4 chain 유전자를 플라스미드 DNA에 삽입하여 사용하였다.

<85> **실시예 2: 엔테로박테리아(Enterobacteriae)에 속하는 식중독균들의 마이크로어레이 결과**

<86> Salmonella, *Escherichia coli* O157:H7 및 *Yersinia enterocolitica* 는 Enterobacteriae에 속해 있는 식중독균으로 알려져 있다. 이러한 식중독균들은 Enterobacteriae에 속하는 다른 미생물들과의 게놈 DNA 서열의 유사도가 높기 때문에 특이적인 검출이 힘든 것으로 알려져 있다. 최근에 *Escherichia coli*, *Shigella* 및 *Salmonella*

를 동정하기 위하여 gyrB 유전자로부터 제작된 10개의 프로브들이 평가되었다 (Kakinuma et al. 2003. Biotechnology and Bioengineering. 83: 721-728). 그러나 몇몇의 프로브들은 다른 종류의 미생물들과 반응하는 결과를 나타내었으며, 그러므로 Enterobacteriae 내에 속하는 미생물들과 구분할 수 있는 충분한 결과를 보여주지 못하였다. 본 발명에서는 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Escherichia coli* O157:H7 와 *Yersinia enterocolitica*에 특이적인 프로브들을 제시하였으며, 각각의 10개의 프로브들은 도 3과 같이 각각의 식중독균에 특이적인 것을 확인하였다. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium은 도 3 (A, B, C)과 같이 10 개의 선별된 프로브에 특이적으로 반응하는 것을 확인하였다.

<87> 10개의 *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 특이적인 프로브들 중 4개의 프로브는 포유동물이나 조류에 특이적으로 질병을 일으키는 것으로 알려진 *Salmonella* subspecies I 에 속하는 serovar들에도 특이적으로 반응하는 것을 확인할 수 있었다 (도 7, *Salmonella* serovar Choleraesuis, Enteritidis, Pullorum, Gallinarum, Paratyphi C and Paratyphi B). *Salmonella* subspecies I 에 속하는 않는 Salmonella의 경우에는 어떠한 프로브와도 반응하지 않는 것을 확인할 수 있었다. *Salmonella* serovar Typhi에 특이적인 프로브의 경우, *Salmonella* serovar Typhi ATCC 33459와 ATCC 6539가 도 3 과 도 7과 같이 특이적으로 반응하는 것을 확인할 수 있었다. *Salmonella* serovar Paratyphi A 는 인간에 특이적으로 질병을 일으키는 것으로 알려져 있는 균주로서 역시 serovar Typhi에 특이적인 프로브들 가운데 3개의 프로브와 반응하는 것을 확인할 수 있었으며 이는 기존에 보고되어진 것과 같이 serovar Typhi 와 Paratyphi A의 유전적인 형질이 가까운 것을 확인할 수 있는 결과였다(데이타 미제시). *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715와 *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894의 경우에도 도 3 (G 및 E)과 같이 각각의 특이적인 프로브들과 반응하는 것을 확인할 수 있었다.

<88> 특히, 도 3 (F) 및 도 7과 같이 비병원성 균인 *Escherichia coli* 들이 반응하지 않는 것을 확인함으로써, 본 발명에서 선별한 프로브들은 병원성의 *Escherichia coli* O157:H7 균주와 비병원성 *Escherichia coli*를 선별할 수 있는 능력을 갖고 있는 것을 확인할 수 있었다. Enterobacteriae에 속하는 다수의 비병원성 균들과 반응한 결과, 도 7과 같이 식중독균에 특이적인 것을 확인할 수 있었다.

<89> *E. coli* O157:H7: *E. coli* O157:H7 ATCC 43894의 대하여 특이적으로 반응하는 것으로 확인하였으며, 병원성을 갖지 않는 *E. coli* 균주들에 대하여는 반응하지 않는 것을 확인하였다.

<90> *Salmonella typhimurium, Salmonella typhi*: *Salmonella typhimurium, Salmonella typhi*에 대하여 특이적으로 반응하였으나, 다양한 *Salmonella* 균주들과 반응한 결과 *Salmonella serovar*에 따라 다양한 패턴의 마이크로어레이 실험결과가 나왔다.

<91> 장내 미생물에 해당하는 식중독균들에 대하여 실험을 수행한 결과, *Salmonella typhimurium*에 특이적인 프로브들은 *Salmonella* spp.에서 반응하는 것으로 확인할 수 있었으며, *Salmonella typhi* 에 특이적인 프로브들은 인간에 특이적으로 질병을 일으키는 것으로 알려져 있는 *Salmonella typhi* 및 paratyphi A에 특이적인 것을 확인할 수 있었다.

<92> *E. coli* O157:H7에 특이적인 프로브들도 식중독균인 *E. coli* O157:H7에만 특이적인 것이 확인되었으며, 제작되어진 *Yersinia enterocolitica*의 프로브들도 특이적으로 반응하는 것으로 확인되었다.

<93> 음성 대조군 시료 DNA로 다양한 장내미생물들과 반응시킨 결과 제작된 DNA 칩은 비병원성 장내미생물 (비식중독균)에는 반응하지 않는 것을 확인하였다.

<94> **실시예 3: 바실랄레스(Bacillales)에 속하는 식중독균의 마이크로어레이 결과**

<95> Bacillales에 속하는 식중독균들에 대한 결과는 도 4와 같다. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923는 도 4의 A 및 도 7와 같이 특이적인 결과를 나타내었다. *Staphylococcus haemolyticus* ATCC 29970와 *Staphylococcus epidermis* ATCC 14990도 FBP-1과 반응한 결과, 도 4 (B, C)와 같이 반응하지 않는 결과를 나타냄으로서 *Staphylococcus aureus*에서 제작된 10개의 프로브들은 *Staphylococcus aureus* 와 특이적으로 반응하는 것을 확인할 수 있었다. *Listeria monocytogenes*의 경우, 도 4 (D-G)와 도 7과 같이 총 7개의 *Listeria monocytogenes*의 균주가 프로브들과 특이적으로 반응하는 것을 확인할 수 있었으며, 7개의 균주들의 반응 패턴이 각각의 균주에 따라서 다른 것을 확인할 수 있었다. 이 결과는 *L. monocytogenes* 균주들 사이에서도 유전적인 형질이 다르다는 것을 의미한다. 일반적으로 동물에 대하여 병원성 균으로 알려졌으며 게놈 DNA 서열이 *L. monocytogenes*와 거의 비슷하다고 알려진 *Listeria ivanovii*도 도 4 와 도 7과 같이 10개의 프로브들과 반응하는 것을 확인할 수 있었다. *Bacillus* cereus 에 특이적으로 제작된 10개의 프로브들은 도 4 (H-K)와 같이 *B. cereus* ATCC 10778 및 ATCC 14579 뿐만 아니라 *Bacillus anthracis* ATCC 14578 와 *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792 와도 반응

하는 것을 확인하였다. 이 세 개의 균주들은 병원성 균인 *Bacillus cereus* 그룹으로 간주되고 있으며, 음성 대조군 균주로 반응했던 비병원성 균인 *Bacillus subtilis*와는 반응하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

<96> *Bacillus cereus*: 총 3종의 *Bacillus cereus* 균주들에 대하여 특이적으로 발색하는 것을 확인하였으며, *Bacillus subtilis, Bacillus thuringiensis*의 균주들에 대하여는 발색하지 않았으므로 제작된 프로브가 특이적인 것으로 확인하였다.

<97> *Staphylococcus aureus*: 보유하고 있는 5종의 *Staphylococcus aureus*에 대하여 반응하였으며, *Stapylococcus haemolyticus, Stapylococcus epidermidis*에 대하여는 반응하지 않는 것을 확인하였다.

<98> *Listeria monocytogenes*: 총 7개의 *Listeria monocytogenes* 균주들과 *Listeria ivanovi* 등의 균주들과 실험한 결과로 *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 및 ATCC 19113의 경우 10개의 스팟에서 모두 발색을 하였지만, ATCC 19111, ATCC 19114의 경우에는 각각 다른 패턴으로 발색하는 것을 확인하였다. *Listeria welshimeri, Listeria inocua, Listeria grayi, Listeria seeligeri* 의 대조구 균들은 발색하지 않는 것으로 확인되었다.

<99> *Staphylococcus aureus*에 특이적으로 제작된 프로브들은 *Staphylococcus aureus*에만 특이적으로 반응하는 것을 확인할 수 있었다.

<100> *Listeria*의 경우는 제작된 10개의 프로브들에 대한 결과 패턴의 차이는 있으나 *Listeria monocytogenes*에 반응하는 것으로 확인되었으며, 병원성 균으로 알려진 *Listeria ivanovi*에도 반응하는 것을 확인할 수 있었다.

<101> *Bacillus cereus*의 경우 대부분의 프로브들이 *Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis, Bacillus anthracis* 에만 특이적으로 반응하는 것을 확인하였다. 근래 들어 이 세 종의 미생물은 *Bacillus cereus* 그룹으로 간주되고 있으며 병원성균으로서 게놈 DNA의 유사도가 상당히 높은 것으로 알려져 있다.

<102> **실시예 4: 비브리오나시애(Vibrionaceae)에 속하는 식중독균에 대한 마이크로어레이 결과**

<103> *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802와 ATCC 33844는 FBP-1 과의 반응 결과, 도 5 와 도 7에 나타난 것과 같이 선별된 10개의 프로브와 특이적으로 반응하는 것을 확인할 수 있었다. 병원성 균으로 알려져 있는 *Vibrio cholerae* ATCC 14547 과 *Vibrio vulnificus* ATCC 33815는 프로브들과 반응하지 않았다.

<104> *Vibrio parahemolyticus*: 3종의 *Vibrio parahemolyticus*에 대하여 특이적이었으며 *Vibrio cholerae* 및 *Vibrio vulnificus*에 대하여는 반응하지 않는 것을 확인하였다.

<105> **실시예 5: *Clostridium perfringens, Clostridium botulinum* 및 *Campylobacter jejuni* 의 마이크로어레이 결과**

<106> *Campylobacter* spp.는 병원성 균으로 알려져 있으며 *C. jejuni* ATCC 33291 및 ATCC 43429를 반응한 결과, 도 6과 같이 특이적인 결과를 나타내었다. *Clostridium botulinum*과 *Clostridium perfringens*에서 특이적으로 제작한 각각 10 개의 프로브들도 *C. botulinum* ATCC 3502 및 *C. perfringens* ATCC 3624 와 반응한 결과 도 6과 같이 특이적인 결과를 나타내었다.

<107> * *Clostridium botulinum, Clostridium perfringens, Yersinia enterocolitica*: 각각의 *Clostridium botulinum* ATCC 3502, *Clostridium perfringens* ATCC 3624, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715 에 대하여 특이적인 것을 확인하였다.

<108> * *Campylobacter jejuni*: 총 2종의 *Campylobacter jejuni* ATCC 43429는 10개의 스팟이 발색하였으나 대조구에서는 그 발색 패턴이 다르게 나타났으므로 추가적인 프로브의 실험 및 *Campylobacter jejuni* 다양한 균주들과의 결과를 확인해야 한다.

<109> * *Clostridium perfringens, Clostridium botulinum, Camphylobacter jejuni*에 대하여도 역시 특이적으로 반응한 결과를 확인하였다.

<110> **실시예 6: 다양한 미생물들의 게놈 DNA 들과의 마이크로어레이 결과**

<111> 식중독균 및 비병원성 균들을 포함하여 총 69개의 미생물들을 FBP-1 칩과 반응을 하였으며 그 결과는 도 7과 같다. 본 발명에 사용된 균주들은 각각의 식중독균에 선별된 프로브들에 대하여 양성 및 음성 대조군 균주로서 FBP-1 칩과 반응하였다. 그 전체적인 결과는 도 7 에 나타나 있으며 본 발명에서 선별된 각 식중독균에 특이적인 프로브들과 제작된 FBP-1 칩이 식중독균을 구분할 수 있는 능력을 보유하였음을 확인하였다.

<112> 현재 일차적으로 제작된 마이크로어레이 칩에 대하여 확보해왔던 10종의 식중독 미생물들과 대조구 미생물들을 이용하여 게놈 DNA를 추출하였고 마이크로어레이 실험을 수행하여 제작된 대다수의 프로브들이 각각의 식중독균

들에 특이적인 것을 확인하였다.

<113> 실험을 수행한 식중독균들은 각각의 특이적인 프로브와 반응하는 것을 확인할 수 있었으며 비식중독균들의 경우 본 발명에서 제작한 마이크로어레이 칩 (FBP-1)과 반응하지 않는 결과를 나타내었다. 본 dendrogram은 본 발명에서 제작된 마이크로어레이 칩 식중독균 및 병원성 균들에 특이적으로 반응함을 보여주었다.

도면의 간단한 설명

<114> 도 1은 게놈 서열 및 비교 유전체학을 이용하여 11가지 식중독균으로부터 70-mer 올리고뉴클레오티드 프로브 선발의 작업 흐름도를 보여준다.

<115> 도 2는 Syto 61 테스트 후의 FBP-1 마이크로어레이의 레이아웃을 보여준다. 각 슬라이드는 8개의 블록으로 이루어져 있으며, 각 블록은 110개 프로브, 양성 대조군 및 음성 대조군으로 이중 스팟팅되어 있다.

<116> 도 3은 Enterobacteriae 식중독균의 마이크로어레이 결과이다.

<117> A, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 19585; B, serovar Typhimurium ATCC 13311; C, serovar Typhimurium ATCC 14028; D, *Salmonella enterica* serovar Typhi ATCC 33459; E, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC 43894; F, *E. coli* ATCC 11775; G, *Yersinia enterocolitica* ATCC 23715.

<118> 도 4는 Bacillales 식중독균의 마이크로어레이 결과이다.

<119> A, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; B, *S. haemolyticus* ATCC 29970; C, *S. epidermis* ATCC 14990; D, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115; E, *L. monocytogenes* ATCC 19118; F, *L. ivanovii* ATCC 19119; G, *L. inoccua* ATCC 33090; H, *Bacillus cereus* ATCC 10778; I, *B. cereus* ATCC 14579; J, *B. thuringensis* ATCC 10792; K, *B. antharacis* ATCC 14578.

<120> 도 5는 Vibrionaceae 식중독균의 마이크로어레이 결과이다.

<121> A, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802; B, *V. parahaemolyticus* ATCC 33844; C, *V. cholerae* ATCC 14547; D, *V. vulnificus* ATCC 33815.

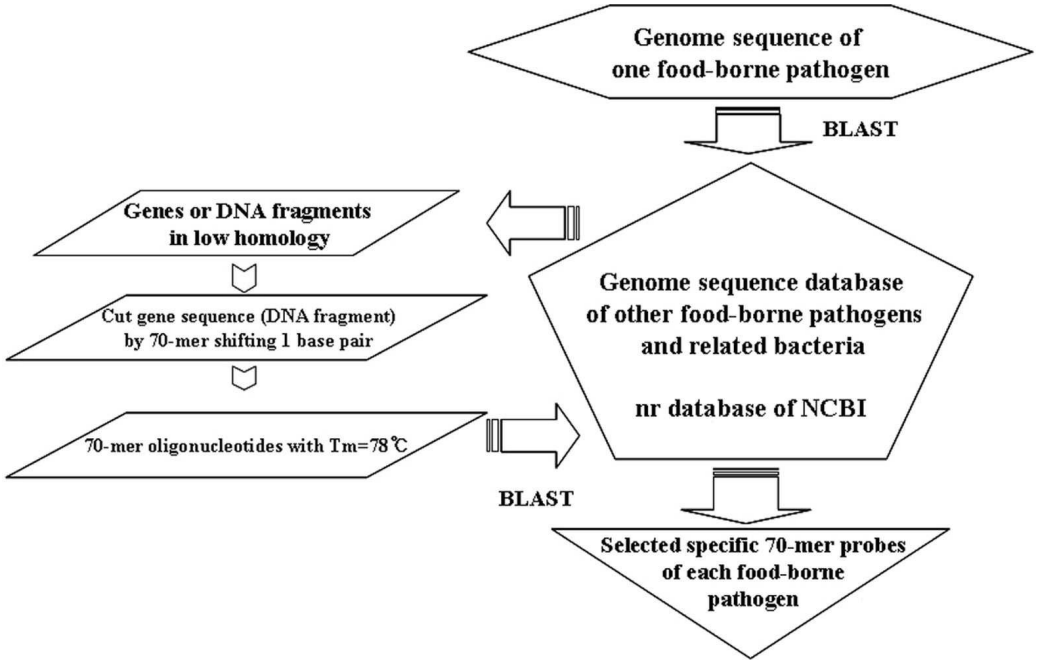
<122> 도 6은 *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* 및 *Campylobacter jejuni*의 마이크로어레이 결과이다.

<123> A, *Clostridium perfringens* ATCC 3624; B, *Clostridium botulinum* ATCC 3501; C, *Camphylobacter jejuni* ATCC 43429; D, *C. jejuni* ATCC 33291.

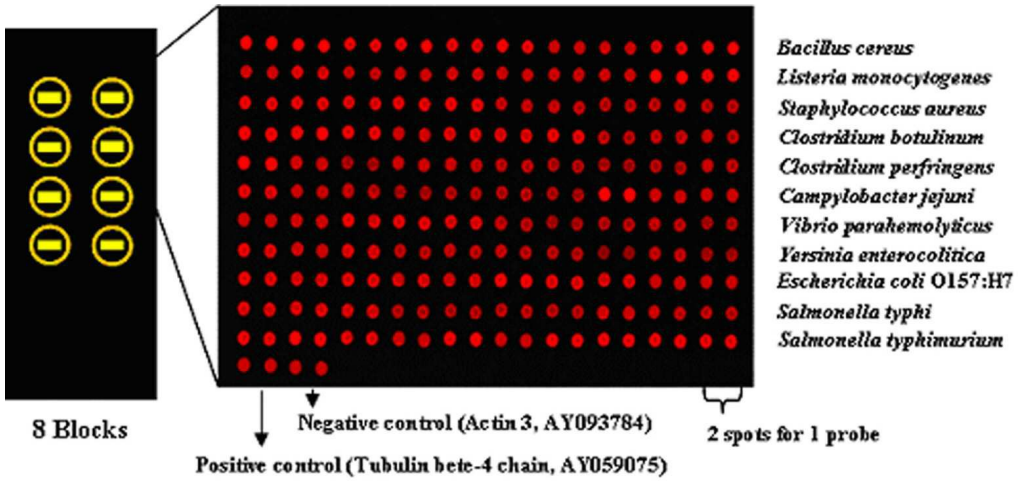
<124> 도 7은 Genespring 프로그램을 이용한 다양한 박테리아 게놈 DNA의 마이크로어레이 데이터 세트를 이용하여 분석된 계통수(dendrogram)이다.

도면

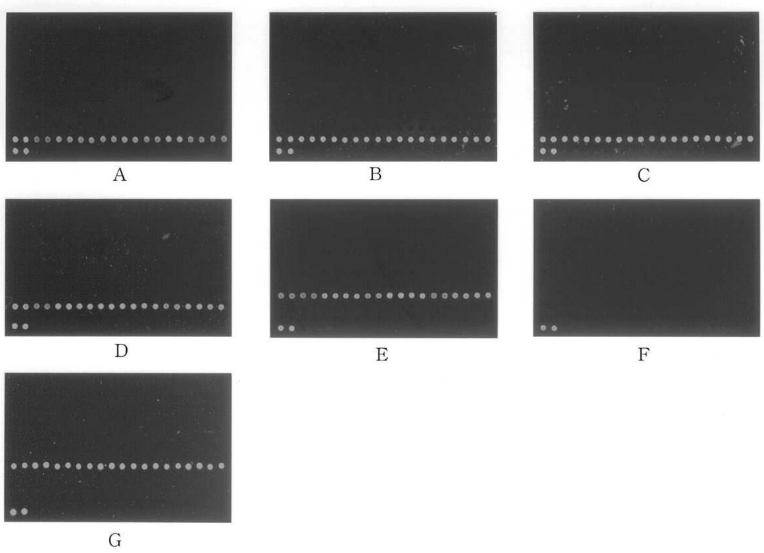
도면1


Genome sequence of one food-borne pathogen
BLAST
Genes or DNA fragments in low homology
Cut gene sequence (DNA fragment) by 70-mer shifting 1 base pair
70-mer oligonucleotides with Tm=78℃
Genome sequence database of other food-borne pathogens and related bacteria
nr database of NCBI
BLAST
Selected specific 70-mer probes of each food-borne pathogen

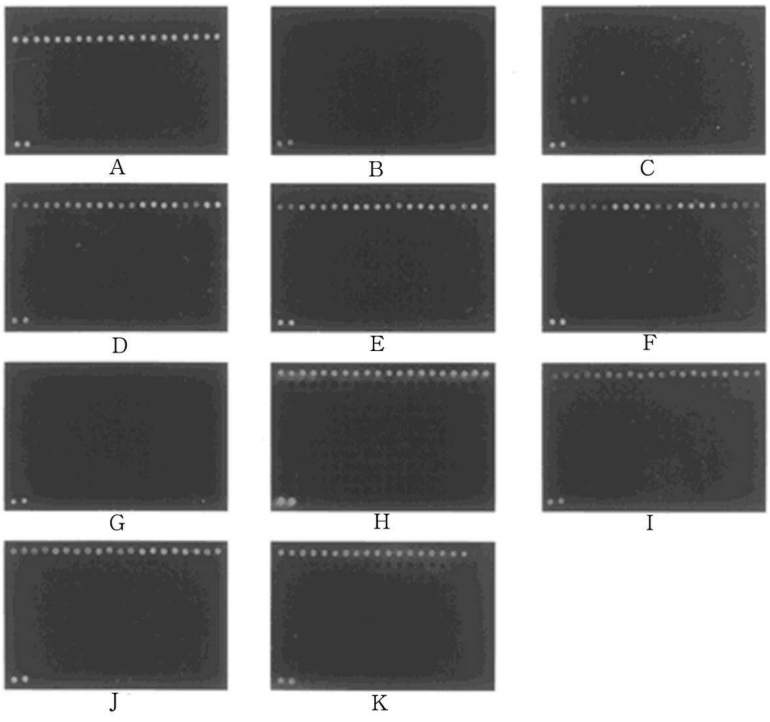
도면2


Bacillus cereus
Listeria monocytogenes
Staphylococcus aureus
Clostridium botulinum
Clostridium perfringens
Campylobacter jejuni
Vibrio parahemolyticus
Yersinia enterocolitica
Escherichia coli O157:H7
Salmonella typhi
Salmonella typhimurium
8 Blocks
Negative control (Actin 3, AY093784)
Positive control (Tubulin bete-4 chain, AY059075)
2 spots for 1 probe

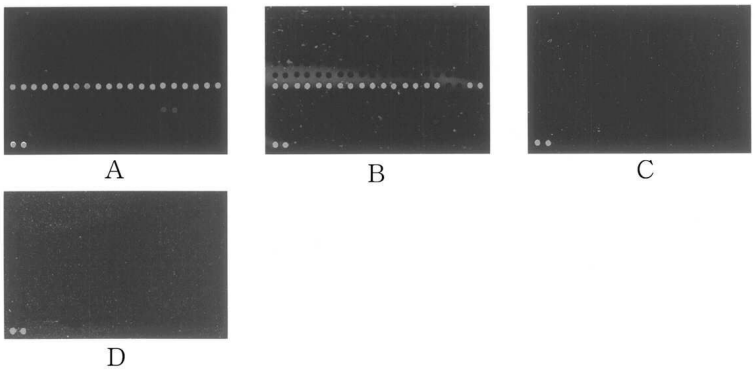
도면3



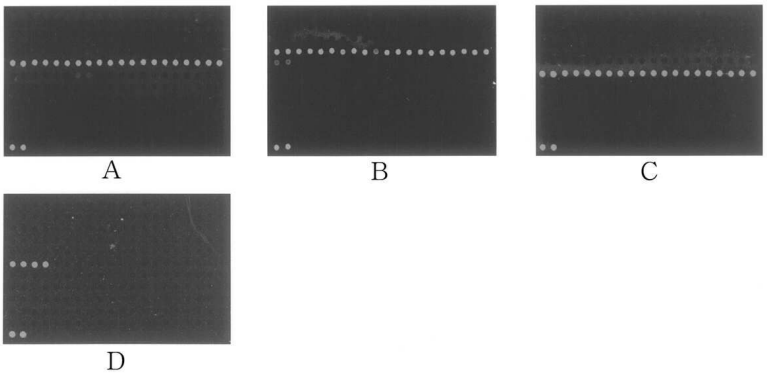
도면4



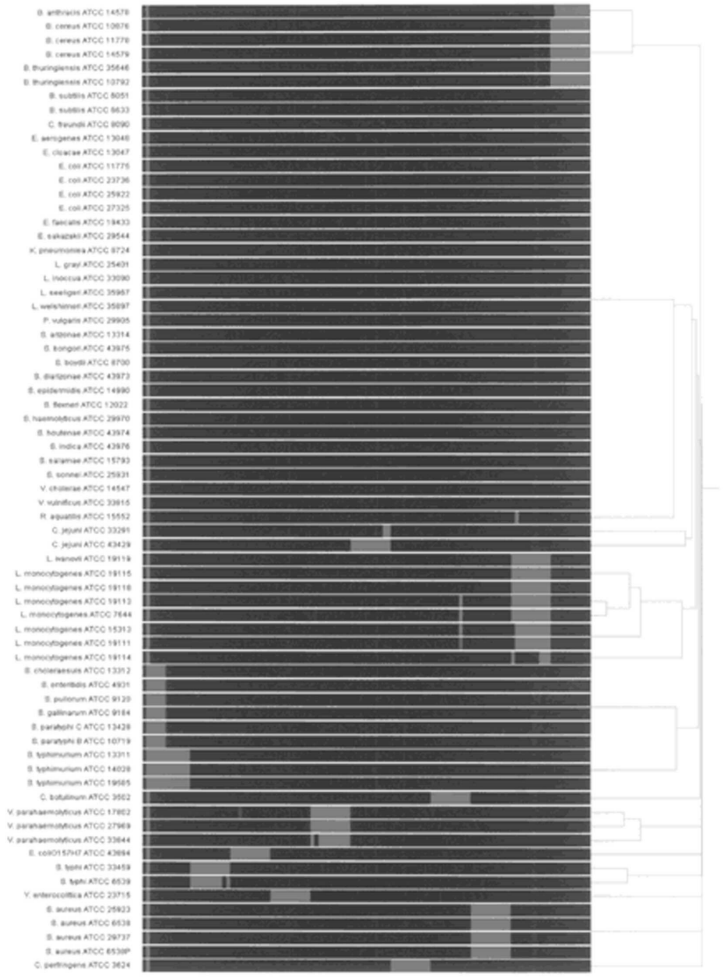
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
<120> Oligonucleotide probe set for dectecting Genus Enterobacteria food-borne pathogens and microarray containing the probe set

<130> PN08107

<160> 116

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BC1312 probe

<400> 1
tacacttcgc gttgtggcag aggttattaa gaagcgtgat gataaaaaaa tcattacgct 60

gcaaacaaac 70

<210> 2
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BC1501 probe

<400> 2
ttgcatgggg atcgcatatt acgattatgt tctctatatg tagggatgtt acaagcagag 60

ctgctagtca 70

<210> 3
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BC1801 probe

<400> 3
tttatcgtag tgaaaaatca cgtagttctc atactggtgg gaaaggaatg gggcttgcaa 60

tttcgaaaag 70

<210> 4
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BC2098 probe

<400> 4
tgaggagttt ttttcctcaa cgttatatgc acgtacgaaa caagattggg catatgcacc 60

aaacatgtat 70

<210> 5
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BC2140 probe

<400> 5
ctccctttac atccagtccc ttttaacgga gaagtcatct cctctcaaac aggagaatat 60

cgaattcgta 70

<210> 6
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BC2393 probe

<400> 6
aatggtggca cctcaaataa gacaccgatt tgactctgta aaaaaatttg cagaggagga 60

atctattccg 70

<210> 7
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BC3742 probe

<400> 7
ttgctgagaa acaattaact gctatccatg gtataggacc atggactgcc aactatgttt 60

taatgcgttg 70

<210> 8
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BC4039 probe

<400> 8
gatgtttcag cacgtcgagg ttataaagca catgatgtaa tctcactttc aagtagcaca 60

cctaaccttg 70

<210> 9
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BC4292 probe

<400> 9
aaaattgtgc aagttggagc ggaatttcat gtcggaattt tgtttgtcgc atcatatgct 60

catcctttaa 70

<210> 10
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BC4598 probe

<400> 10
tgtatttgta ggaggtattc tcttagtgct tcctgggtat gtgacagata tgctagggtt 60

tatctgcgtg 70

<210> 11
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> lmo0754 probe

<400> 11
ggaacttaat tctgacgcca aattagtgac acgagtagaa cgaatcgatg gcaaatggta 60

cattaatgca 70

<210> 12
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> lmo2443 probe

<400> 12
tgcatttttt ggaatagcag taatttgttt gttattccct tggatgtcta gcgggataga 60

tgcagcaaca 70

<210> 13
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> lmo2732 probe

<400> 13
attcgtttag gaattgagca acttccaaaa aaagaaattg agcaagttgc gacaagaatt 60

gcttatgcgc 70

<210> 14
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> lmo1030 probe

<400> 14
gcaaccaaca gcaggcctta ttttacttgg cactaattta aacgctgaag aaattaaccg 60

aatacagcaa 70

<210> 15
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> lmo1033 probe

<400> 15
gttagttatg gtgcacttgg tatgagccat cattcgcttc aagatattgc tgttactaga 60

gcgattccta 70

<210> 16
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> lmo1036 probe

<400> 16
gtcagttaga gccaatcaag ccagttatca attcagaacc gtgttacgaa ttgatgggat 60

atagtcgaca 70

<210> 17
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> lmo2821 probe

<400> 17
gacatatgtg tatactaaaa acatcgaagc agcagagccg ataacagtga attacgtgga 60

tgctaatggc 70

<210> 18
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> lmo0017 probe

<400> 18
ctaagccaaa aaagaaaacc gtcgctgctg ttaaaaagaa aaaagagaca cctccaaaac 60

caaaagaacc 70

<210> 19
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> lmo0257 probe

<400> 19
aagataaaat tgtaccgaat ttggttggag tggacatcgg ttgtgggttg tatgtagtga 60

agctaaaacc 70

<210> 20
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> lmo0459 probe

<400> 20
gcagtttaaa gtagccctat ataaggcttg caccgaggag tctaagaaat cagagagtgc 60

gttcattaaa 70

<210> 21
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SAV0020 probe

<400> 21
agaaggctct aatcaaattc aagtcacttg gggtgaaaaa ggcgtctttg attatcgtcg 60

ttcgttattg 70

<210> 22
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SAV0021 probe

<400> 22
agcccacaga tggtgcagat aagaagcatc aagttattgg agtgagaaaa gcaatcgagg 60

cattatatta 70

<210> 23
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SAV0089 probe

<400> 23
acaatcaatt gcagaagcac gagcacttct agatgaattt gaagcccaaa tggacgaaga 60

cgttaaaata 70

<210> 24
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SAV0101 probe

<400> 24
atccgtactt agcgttggac aatcaaatga atatgcgtgc aacggaaatg atccatttga 60

acattaatgc 70

<210> 25
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SAV0110 probe

<400> 25
ggtccagaac tagcagacat tattccatca ctagcaacaa tggtggtgtt agcatttgtt 60

tgtcgtaaat 70

<210> 26
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SAV0149 probe

<400> 26
tatctaaagc agacggtaca gcagttaaag tcgcaccaaa aactgtagtg aatctaatcg 60

gtgcattctt 70

<210> 27
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SAV0155 probe

<400> 27
ttccctggtg tccttattcg aacttccaca gaaagaccgg aagtactaga taaaggtacg 60

gttattgtag 70

<210> 28
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SAV0178 probe

<400> 28
tttggttacc tcaagaccga aatcaagtaa agcaaagtga tgacaagagg catgcaagtc 60

gttatcaaaa 70

<210> 29
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SAV0182 probe

<400> 29
atgattccca aagtgctaga tgccaaaaat gcgattgaaa atggctgtcc taaagttatc 60

attgcatcag 70

<210> 30
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SAV0190 probe

<400> 30
cgttgataat ttgaataacg gacgttatca aggcgaaatg caaattgtga gacaaacgct 60

tagtgcacat 70

<210> 31
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CB0001 probe

<400> 31
ggcggtatac tttgtgggaa tctaaacaca ttctcagaat cgtatttgac cttaacttgg 60

gccagtagat 70

<210> 32
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CB0002 probe

<400> 32
acgatgttat agatatcctc cggtactccg atatttttac aggctttcat attaacgggc 60

aaggtagcca 70

<210> 33
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CB0004 probe

<400> 33
aattgaacgg cgagaatatg gagttgcaca caataaggca tccgcttttg gatatttaag 60

ttctgtcatt 70

<210> 34
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CB0007 probe

<400> 34
tctgttatct tgaaaacctt accagataca ctgctatgaa ttctagcccc caatccatta 60

ggctctgcta 70

<210> 35
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CB0008 probe

<400> 35
tggaagccct catctgtatc tttatccact atatctgcat caccatttgt gtttatgcga 60

gcttcttctc 70

<210> 36
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CB0009 probe

<400> 36
cgcagctgtt tggataggta atgacaattc ttctacagtg gatggggtat atagtagtac 60

tgcagctaga 70

<210> 37
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CB0011 probe

<400> 37
gaacagttag ctgtacctcc tctcatttct ggtccataag atggtaacca tgaaacttcc 60

atatttgcgt 70

<210> 38
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CB0012 probe

<400> 38
ctcgtgatat atccttccaa tctaagttga tcataggcat tttctaccga gtttctgccg 60

acctgcaatt 70

<210> 39
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CB0013 probe

<400> 39
acccgctgca aaacaattaa aggagcgatt tggaactcca tatttattgg ctagacccta 60

tggaattaag 70

<210> 40
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CB0017 probe

<400> 40
aaagcctgct agtcccatta caacattaag tcgggttact cctaatgcat gatcatgata 60

ccacaaagtt 70

<210> 41
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CPE0192 probe

<400> 41
ggtggtctta ctactcttgg agctaatact ttttcaatgg ctgtagttgg gcctttagta 60

tcatacggac 70

<210> 42
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CPE0590 probe

<400> 42
cttagttttc tttggaacag ttgtaactca ctttttgga ggatcagcag gtagggaagg 60

aactggagta 70

<210> 43
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CPE0638 probe

<400> 43
caactaatat agccttagaa atggggtatg catttggaac tcaccaagaa atgctatttg 60

caacaggggt 70

<210> 44
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CPE1030 probe

<400> 44
agttgggctt acggaaactt atttgatact tacgttttag atagcgaccc agcagataaa 60

tgggatgctt 70

<210> 45
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CPE1094 probe

<400> 45
catttactgg agctatgtac acattaggaa tgccacctga acttatggga atgggtagag 60

cattaaacga 70

<210> 46
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CPE2193 probe

<400> 46
cttgcacctc ctactcaaga tttaagtgtt gcagtggcat tagcaattac ttcctttgtt 60

gttgttcatg 70

<210> 47
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CPE2318 probe

<400> 47
atgggaaatc aagtatgtcc acttccaaca gcagtattgt caacacatac agatggattt 60

ggaaaaccag 70

<210> 48
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CPE2505 probe

<400> 48
gtatgactgc atattcaata gcctatgcta gaataggaac aaacgctgtt gctagcatgc 60

agattgctac 70

<210> 49
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CPE2577 probe

<400> 49
gaggtagacg gggctagaag cttaatagaa aaagcgtcaa tgcaattagg caaagctcat 60

aaatcacaaa 70

<210> 50
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CPE2609 probe

<400> 50
atctactagg aggagcaatt ggtgttgtta taacctatac tgttatggct gctgtaggaa 60

gcttaggacc 70

<210> 51
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cj0150c probe

<400> 51
ttccaaatta tgttttcgca gaagtaaatg cgataaaaat ggcagcaaga cgtgctggag 60

aggatatcat 70

<210> 52
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cj0933c probe

<400> 52
tccacttatt ccttttctc ctatgccagg aggagcttta acggcaaata cacaaatgat 60

gagggataat 70

<210> 53
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cj1170c probe

<400> 53
gtgggcctgt actttatgta gatagagctt atcttgacta ctatatcaca cctgagtgga 60

ttgcaaccgt 70

<210> 54
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cj0921c probe

<400> 54
ggagtggctc aagctgcaac tacaaaaaaa gctataggtg aagctgctaa aaaaattggc 60

attgatgtta 70

<210> 55
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cj0998c probe

<400> 55
taaaggattt ggcaagttat cttaaaggcg ctaaagctac cataaagcca agcaatgctt 60

ttatgggtga 70

<210> 56
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cj1134 probe

<400> 56
aaggcggcat aagacaaatg ctaagcgctc taaaaaaagg gagaactttg ggaattttaa 60

ctgatcaaga 70

<210> 57
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cj1444c probe

<400> 57
aaagagcttg aaactctagc tttaactagt ggttctgtta cagctcaagg tgcagctata 60

agagctcaac 70

<210> 58
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cj0116 probe

<400> 58
tttgctttag ggcattcttt gggagaattt tcagccttag ctgtcaatgg tgcttttgat 60

tttttagagg 70

<210> 59
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cj0190c probe

<400> 59
aaatcactat caatcttagt ccttcaggca tcccaaaaaa gggatcgcat tttgatttgg 60

ctatcgcttt 70

<210> 60
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cj1347c probe

<400> 60
atcagggtat gtttgcactt ttttggctta tcattatcgt tgcagcttgt gatagtgggg 60

cgtattttat 70

<210> 61
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VP0434 probe

<400> 61
gataccttgg gtaaggatta cactaaactc taccaacata tggcgaagac ctcttcagaa 60

cttctgccta 70

<210> 62
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VP0626 probe

<400> 62
agagaccgtc cattcgggat tccaaaactac gttctattct atgagaaaag gtctaactcg 60

ttttcttcgt 70

<210> 63
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VP0656 probe

<400> 63
tagaacggtt gccttgagcg atcttagtcg aattcaactt gaactagaga catcttatga 60

tggtgggtat 70

<210> 64
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VP0753 probe

<400> 64
acatgattat cggctccgta catgtcggtg ataaaagcat gtatccactt ccgaaaaaca 60

tcactaagtt 70

<210> 65
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VP0948 probe

<400> 65
tactgatttc cgattcaggt aacgacttat atctacctaa gcaagttcgt gcaaccgtga 60

cattgtatgc 70

<210> 66
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VP0953 probe

<400> 66
ataacttaac tggattgagg aatcgtcgct ctttgcaagt taagtatcgc caaggggtga 60

ataaggattt 70

<210> 67
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VP1284 probe

<400> 67
ccgctgtact acagctacgc agaaaactcg aagttaaacg ataagtacac cgagataatc 60

aaagagcaaa 70

<210> 68
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VP1365 probe

<400> 68
cagatgttta cacgattacg gcaattcagt tggagaatac aacagagttt gaaggtttcc 60

atggtgtgaa 70

<210> 69
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VP1386 probe

<400> 69
gtatggtgca ttgcttactg catactcttc ttactcttat gacatgatcc aaaggtacgg 60

tcaatccgaa 70

<210> 70
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VP1517 probe

<400> 70
tcggtcgatt agtcgagcag caatggtcag gtagagaaaa aaaatacata tacaatgcac 60

agaaccgaat 70

<210> 71
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> YE0005 probe

<400> 71
gatattgatt actgtgctta atatcaggat agagcatacg ggccagtttt agcgtgcaaa 60

tccattgacc 70

<210> 72
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> YE0007 probe

<400> 72
gctcacccga cttcatcagc attatggcta tctctgtgaa cagatcgaag aaatcgaaag 60

agagttaaaa 70

<210> 73
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> YE0009 probe

<400> 73
tttagttcgt tcagcgctgg tgcctgatag tcttccggaa catattgtta atactatcat 60

gtctgcattt 70

<210> 74
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> YE0011 probe

<400> 74
aaatacagga atgagacacg gcgagatatg cgcattaagt tgggaagata tcgacactaa 60

aaattggact 70

<210> 75
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> YE0013 probe

<400> 75
ttttaactct ctttcgattt cttcgatctg ttcacagaga tagccataat gctgatgaag 60

tcgggtgagc 70

<210> 76
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> YE0014 probe

<400> 76
ttgcagatca aagacattct ttcagagaac ccggcagtct tcagtatttc ggtgccataa 60

tacataatca 70

<210> 77
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> YE0015 probe

<400> 77
gattgtcttg ccaactaatt gcttcaattg acaagatcgg ttgtagtgag ttttcatttg 60

gcgtgtatcc 70

<210> 78
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> YE0016 probe

<400> 78
tactcaaaaa aagaagtacc aaaaacctga ttaaaagcac aatgaccacg cacactgtcg 60

gcaactaaac 70

<210> 79
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> YE0017 probe

<400> 79
tcttcaacct gccttcacct tgcaagatcg agtttttgag gtttgtcagc agtctgatat 60

taatcttact 70

<210> 80
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> YE0020 probe

<400> 80
tgatattgga aatgttgttc acccaacata aaagggagat tcagtgaagc ggtcaaatta 60

atcagtcggg 70

<210> 81
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Z0146 probe

<400> 81
agattgcgtc atggtatata ggtaccaatg accagccgtg gatcaacttt tacattgaca 60

atgactcttt 70

<210> 82
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Z0152 probe

<400> 82
ctgaagttca ggaactgaca ttagacgcag aaggtaaagg ccagtacgta tttaacgcat 60

cttacgttaa 70

<210> 83
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Z0372 probe

<400> 83
caataggtgg agtgacattt attcgtcgtc caacttttaa cgatcgcttc atcgtggaag 60

atggaaatac 70

<210> 84
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Z0502 probe

<400> 84
gatttcttca tccggatacg tatctgccga taaactgcac aaactctata agacaaattt 60

ggaagacgcg 70

<210> 85
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Z1019 probe

<400> 85
gtactgatac atacaaacag taaaagatct gttaacgcaa ttaactgatg gcatggagct 60

cttcgcgctg 70

<210> 86
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Z1139 probe

<400> 86
tgcattctgg ttctgtcagc actgataata tccttttggc tggatgttga ctctgttact 60

cgagtattac 70

<210> 87
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Z1140 probe

<400> 87
tatgttttta gttgtcgggg agacagcaag aagtcaaaac tatgctctga atggatattc 60

tcgtggtacc 70

<210> 88
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Z1535 probe

<400> 88
taggtcaaac tgaagatggt cggacagcgc ttattgagtt cggaaaaatt aatatgaccg 60

acacctattt 70

<210> 89
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Z1543 probe

<400> 89
gcgatcgttg gagtattcgc gggtttgaaa atagcgtagg tttgtcaggg aatgatggtt 60

tttatataaa 70

<210> 90
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Z1554 probe

<400> 90
tttataaaaa ccagtaaccc ggaattgatt tgggtgacgg tggtattacc tattttgaca 60

gcaacaggtg 70

<210> 91
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STY0201 probe

<400> 91
tgaaaagtag ttcgagcgcc cagatggtac tcaaacctaa cgactcaagc tcaatttata 60

aagataccac 70

<210> 92
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STY0322 probe

<400> 92
acgatgttga tactatcggt tttcagggga aagggctatt tttttctgac agactgatcg 60

atgcaataca 70

<210> 93
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STY1076 probe

<400> 93
atttttaaa tatgtcgacc acatcatttt ccaataacag tcaggagtta gcagcccaca 60

gttcaccagg 70

<210> 94
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STY1607 probe

<400> 94
gcatttctta agagtgcgtt tgaacactta catgcactaa gtaaggctgg tgaaccactt 60

agtcttgaaa 70

<210> 95
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STY2020 probe

<400> 95
ataattgttt tctcgaatta gccagagaat cattgcagca caatggtgag caatggacac 60

gtaatgctat 70

<210> 96
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STY3673 probe

<400> 96
ttatgtaaat tatcaggagt actaagccaa gcctgtcaat cgacgctgat tcctcaggat 60

gagtttgaac 70

<210> 97
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STY3922 probe

<400> 97
gaaatgtacc ggaatgttgg atgagaatat cgtctattcg acatttaatg ctgatcccgt 60

tgattccagc 70

<210> 98
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STY0314 probe

<400> 98
aagcggttgt atctgaattt aatttgtcag atataaatcg cggtggaatg acgaaagcac 60

aggcagaaaa 70

<210> 99
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STY1891 probe

<400> 99
aaatatctgg acctatccgc tttttgttaa tacctttca gcaaatgctc ttgtgggact 60

atcatcgtgc 70

<210> 100
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STY2356 probe

<400> 100
aaataaaacg ggtgattttt ataagcccag gcaggcttat ggtgatttgg catcggtaaa 60

catggttata 70

<210> 101
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STM0159 probe

<400> 101
ccggtgagca cagaatattg aaaactgact ttgcattact ttgcccaaat tgtcacaaag 60

ctgttcatat 70

<210> 102
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STM2743 probe

<400> 102
tgacggagtt cgctttgagg acttgttttc aaaaataatg tactataagt cgccagattt 60

tcagcaggtg 70

<210> 103
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STM2747 probe

<400> 103
gaatccatta tgattcgccg tgtagtggta aaccagaagt aataaatgct gtgcaattat 60

tgcgctctca 70

<210> 104
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STM2754 probe

<400> 104
tgatttaata ggcaaaaaaa gcgaagaata tgcattaaac tgggaaaaaa accgcctaat 60

cggtctcggc 70

<210> 105
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STM2761 probe

<400> 105
taagcaagat tgagctgtta gagttagttc gacgtggacg tataaaattc gtcgcattcc 60

aaaatctcca 70

<210> 106
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STM2762 probe

<400> 106
cgtagctaat acgaaaaaag aaacagaaaa aatcggagcg acgataaagg tagtgctagg 60

cgttttcgtt 70

<210> 107
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STM0654 probe

<400> 107
ttattacatc ggaaaaggta tcaaacaaga ttaccagcag gcaatatact ggtttcgaaa 60

agcggcagac 70

<210> 108
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STM0762 probe

<400> 108
tatgcaaaaa aagaacaact tgcatgctgc catgataccg gcacttgtat cgttataatg 60

gaaattggac 70

<210> 109
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STM0763 probe

<400> 109
gcatttccga gagatttatc cagagatgga actctctctt gttgaagagg ggacttttgg 60

tttacatgat 70

<210> 110
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> STM0764 probe

<400> 110
aaacaaccca gtcttgtttt ttcagcaacg catgctttgt ctttctcttt tgtaccgcat 60

ttgttaaaac 70

<210> 111
<211> 70
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> tubulin bete-4 chain probe

<400> 111
aagtccagtg tctgtgatat tgcaccaaag ggtttgaaaa tggcgtctac tttcattggt 60

aactcaacct 70

<210> 112
<211> 70
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> actin 3 probe

<400> 112
aggttcttta ccagccatct atgattggta tggagaatgc tggtatccat gaaaccacct 60

ataactccat 70

<210> 113
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Actin3-f primer

<400> 113
ctcttgacta cgagcaggaa 20

<210> 114
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Actin3-r primer

<400> 114
agtccttcct gatgtcgaca 20

<210> 115
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Tb4-f primer

<400> 115
aagaggttga cgagcagatg 20

<210> 116
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Tb4-r primer

<400> 116
gcctttctcc tgaacatagc 20