



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0012319
(43) 공개일자 2010년02월08일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0073642

(22) 출원일자 2008년07월28일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

주식회사 씨젠

서울특별시 송파구 방이동 65-5 태원빌딩 8층,9층

(72) 발명자

천종윤

서울 송파구 방이동 89번지 올림픽선수기자촌아파트 319-1301

김종기

경기도 수원시 장안구 정자동 한라비발디아파트 636동 1404호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

전체 청구항 수 : 총 34 항

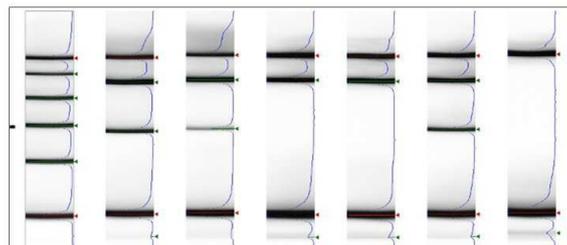
(54) 패혈증-유발 미생물의 분류 및 동정 방법

(57) 요약

본 발명은 패혈증-유발 미생물의 분류 및 동정 방법에 관한 것으로서, 멀티플렉스 증폭 방식으로 패혈증-유발 미생물을 분류 및 동정하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 다양한 패혈증 유발 미생물을 멀티플렉스 증폭 방식으로 동시에 분류 및 동정할 수 있다. 본 발명에 따르면, 패혈증 유발 미생물을 고속으로 보다 간편한 방식으로 분류 및 동정할 수 있고, 60 여종이 넘는 패혈증 유발 미생물을 분류 및 동정할 수 있다. 또한, 본 발명에 따르면 위음성 및 위양성과 같은 오류 데이터 없이 멀티플렉스 증폭 방식으로 패혈증 유발 미생물을 고속으로 분류 및 동정할 수 있다.

대표도 - 도1

Sample ID	1	2	3	4	5	N
Internal control	-	-	-	-	-	-
Fungi	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus	-	-	-	-	-	-
Enterococcus	-	-	-	-	-	-
Unidentified	0	0	0	0	0	0



(72) 발명자

이대훈

서울시 노원구 공릉2동 동신아파트 104동 1801호

이영조

서울시 송파구 오금동 상아아파트 9동 1206호

특허청구의 범위

청구항 1

다음의 단계를 포함하는 패혈증-유발 미생물의 분류 및 검출의 동시 방법:

- (a) 생물학적 시료로부터 핵산 분자를 획득하는 단계;
- (b) 균류(fungi), 스태필로코커스(*Staphylococcus*) 속 박테리아, 엔테로코커스(*Enterococcus*) 속 박테리아, 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 박테리아 및 그람 음성 박테리아로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 3개의 패혈증-유발 미생물군 각각에 속하는 최소 3종의 미생물종, 총 최소 9종의 미생물종의 핵산 분자에 혼성화되는 최소 9개의 미생물군 분류용 프라이머쌍을 상기 핵산 분자에 접촉시키는 단계로서, 상기 동일한 미생물군의 분류에 이용되는 미생물군 분류용 프라이머쌍은 동일 크기의 증폭산물(amplicon)을 생성하며 다른 미생물군의 분류에 이용되는 미생물군 분류용 프라이머쌍은 서로 다른 크기의 증폭산물을 생성하고;
- (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 이용하여 상기 생물학적 시료로부터 획득한 핵산 분자를 멀티플렉스 방식으로 증폭시키는 단계; 그리고,
- (d) 상기 증폭산물의 크기를 분석하여 생물학적 시료에 포함된 패혈증-유발 미생물의 분류(classifying) 및 검출(detecting)을 동시에 하는 단계.

청구항 2

다음의 단계를 포함하는 패혈증-유발 미생물의 검출방법:

- (a) 생물학적 시료로부터 핵산 분자를 획득하는 단계;
- (b) 균류(fungi), 스태필로코커스(*Staphylococcus*) 속 박테리아, 엔테로코커스(*Enterococcus*) 속 박테리아, 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 박테리아 및 그람 음성 박테리아로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 3개의 패혈증-유발 미생물군 각각에 속하는 최소 3종의 미생물종, 총 최소 9종의 미생물종의 핵산 분자에 혼성화되는 최소 9개의 미생물군 분류용 프라이머쌍을 상기 핵산 분자에 접촉시키는 단계로서, 상기 동일한 미생물군의 분류에 이용되는 미생물군 분류용 프라이머쌍은 동일 크기의 증폭산물(amplicon)을 생성하며 다른 미생물군의 분류에 이용되는 미생물군 분류용 프라이머쌍은 서로 다른 크기의 증폭산물을 생성하고;
- (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 이용하여 상기 생물학적 시료로부터 획득한 핵산 분자를 멀티플렉스 방식으로 증폭시키는 단계;
- (d) 상기 증폭산물의 크기를 분석하여 생물학적 시료에 포함된 패혈증-유발 미생물을 분류(classifying)하는 단계;
- (e) 상기 패혈증-유발 미생물군에 속하는 최소 3종의 미생물종의 핵산분자와 혼성화 되는 최소 3개의 미생물종 동정용 프라이머쌍 및 상기 생물적 시료로부터 얻은 핵산분자를 이용하여 상기 핵산분자를 멀티플렉스 방식으로 증폭시키는 단계로서, 상기 최소 3개의 미생물종 동정용 프라이머쌍은 서로 다른 크기의 증폭산물을 생성하며; 그리고,
- (f) 상기 증폭산물의 크기를 분석하여 생물학적 시료에 포함된 패혈증-유발 미생물의 종을 동정(identify)하는 단계.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 전혈, 혈장 또는 혈청인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 생물학적 시료로부터 핵산 분자는 DNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 최소 4개의 패혈증-유발 미생물군 각각에 속하는 최소 3종의

미생물종의 핵산분자에 혼성화 되는 최소 3개의 미생물군 분류용 프라이머쌍을 이용하여 실시되며, 상기 최소 3개의 미생물군 분류용 프라이머쌍은 동일 크기의 증폭산물을 생성시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 단계 (b)는 최소 5개의 패혈증-유발 미생물군 각각에 속하는 최소 3종의 미생물종의 핵산분자에 혼성화 되는 최소 3개의 미생물군 분류용 프라이머쌍을 이용하여 실시되며, 상기 최소 3개의 미생물군 분류용 프라이머쌍은 동일 크기의 증폭산물을 생성시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 패혈증-유발 미생물군에 속하는 균류는 칸디다 알비칸스, 칸디다 트로피칼리스, 칸디다 파라프실로시스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이, 아스페길루스 퍼미게터스 또는 이의 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 단계 (d)는 칸디다 알비칸스, 칸디다 트로피칼리스, 칸디다 파라프실로시스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이 및 아스페길루스 퍼미게터스로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 4종의 미생물종이 균류로 분류되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 패혈증-유발 미생물군에 속하는 스태필로코커스 속 박테리아는 스태필로코커스 아우레우스, 스태필로코커스 에피더미디스, 스태필로코커스 헤모라이티쿠스, 스태필로코커스 파스테리, 스태필로코커스 와르네리, 스태필로코커스 코나이 아종, 우레아리티쿠, 스태필로코커스 카프래, 스태필로코커스 에쿠오럼, 스태필로코커스 시물란스, 스태필로코커스 알레테, 스태필로코커스 클루사이, 스태필로코커스 갈리나럼, 스태필로코커스 아우리쿨라리스, 스태필로코커스 크로모제넨스, 스태필로코커스 델피니, 스태필로코커스 인터메디우스 또는 이의 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 단계 (d)는 스태필로코커스 아우레우스, 스태필로코커스 에피더미디스, 스태필로코커스 헤모라이티쿠스, 스태필로코커스 파스테리, 스태필로코커스 와르네리, 스태필로코커스 코나이 아종, 우레아리티쿠, 스태필로코커스 카프래, 스태필로코커스 에쿠오럼, 스태필로코커스 시물란스, 스태필로코커스 알레테, 스태필로코커스 클루사이, 스태필로코커스 갈리나럼, 스태필로코커스 아우리쿨라리스, 스태필로코커스 크로모제넨스, 스태필로코커스 델피니 및 스태필로코커스 인터메디우스로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 4종의 미생물종이 스태필로코커스 속 박테리아로 분류되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 패혈증-유발 미생물군에 속하는 엔테로코커스 속 박테리아는 엔테로코커스 페에시움, 엔테로코커스 페칼리스, 엔테로코커스 아비움, 엔테로코커스 두란스 또는 이의 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 단계 (d)는 엔테로코커스 페에시움, 엔테로코커스 페칼리스, 엔테로코커스 아비움 및 엔테로코커스 두란스가 엔테로코커스 속 박테리아로 분류되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 패혈증-유발 미생물군에 속하는 스트렙토코커스 속 박테리아는 스트렙토코커스 뉴모니아, 스트렙토코커스 아갈라티에, 스트렙토코커스 피오게네스, 스트렙토코커스 미티스, 스트렙토코커스 안기노시스, 스트렙토코커스 고르도나이, 스트렙토코커스 인터메디우스, 스트렙토코커스 오랄리스, 스트렙토코커스 파라산구이니스, 스트렙토코커스 베스티볼라리스, 스트렙토코커스 알락토티티쿠스, 스트렙토코커스 크리세티, 스트렙토코커스 다운에이, 스트렙토코커스 페루스, 스트렙토코커스 갈리나세우스, 스트렙토코커스 하이오인테스티날리스, 스트렙토코커스 루테티엔시스, 스트렙토코커스 마가새, 스트렙토코커스 파라우베리스, 스트

렙토코커스 소브리너스, 스트렙토코커스 수이스 또는 이의 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 단계 (d)는 스트렙토코커스 뉴모니에, 스트렙토코커스 아갈락티에, 스트렙토코커스 피오게네스, 스트렙토코커스 미티스, 스트렙토코커스 안기노서스, 스트렙토코커스 고르도나이, 스트렙토코커스 인터메디우스, 스트렙토코커스 오랄리스, 스트렙토코커스 파라산구이니스, 스트렙토코커스 베스티볼라리스, 스트렙토코커스 알락토리티쿠스, 스트렙토코커스 크리세티, 스트렙토코커스 다운에이, 스트렙토코커스 페루스, 스트렙토코커스 갈리나세우스, 스트렙토코커스 하이오인테스티날리스, 스트렙토코커스 루테티엔시스, 스트렙토코커스 마카세, 스트렙토코커스 파라우베리스, 스트렙토코커스 소브리너스 및 스트렙토코커스 수이스로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 4종의 미생물종이 스트렙토코커스 속 박테리아로 분류되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 패혈증-유발 미생물군에 속하는 그람 음성 박테리아는 *E. coli*, 프로테우스 미라빌리스, 슈모모나스 에어루기노사, 아시네토박터 바우마니, 스테노트로포모나스 말토피리아, 클렙시엘라 뉴모니에, 클렙시엘라 옥시토카, 세라티아 마르세스센스, 엔테로박터 클로아카이, 엔테로박터 에어로게네스 또는 이의 조합인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 단계 (d)는 *E. coli*, 프로테우스 미라빌리스, 슈모모나스 에어루기노사, 아시네토박터 바우마니, 스테노트로포모나스 말토피리아, 클렙시엘라 뉴모니에, 클렙시엘라 옥시토카, 세라티아 마르세스센스, 엔테로박터 클로아카이 및 엔테로박터 에어로게네스로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 4종의 미생물종이 그람 음성 박테리아로 분류되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 분류되는 패혈증-유발 미생물 미생물군은 항생제 내성 미생물군을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 항생제 내성 미생물군의 분류는 *bla*SHV, *mecA*, *vanA* 및 *vanB* 유전자로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 2개의 항생제 내성 유전자에 혼성화 되는 최소 2개의 미생물군 분류용 프라이머쌍을 이용하여 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제 2 항에 있어서, 상기 단계 (e)는 최소 5종의 미생물종의 핵산분자와 혼성화 되는 최소 5개의 미생물종 동정용 프라이머쌍을 이용하여 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 미생물군 분류용 프라이머, 미생물종 동정용 프라이머 또는 이 둘 모두는 다음의 일반식 I로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법:

$$5'-Xp-Yq-Zr-3' \quad (I)$$

상기 일반식에서, Xp는 혼성화되는 타겟 서열과 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 가지는 5'-제1차 프라이밍 부위(5'-first priming portion)이고, Yq는 최소 3개 이상의 유니버설 염기를 포함하는 분할 구역(separation portion)이며, Zr은 혼성화되는 타겟 서열과 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 가지는 3'-제2차 프라이밍 부위(3'-second priming portion)이고, p, q 및 r은 뉴클레오타이드의 개수를 나타내며, X, Y 및 Z는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이고, 5'-제1차 프라이밍 부위의 Tm은 3'-제2차 프라이밍 부위의 Tm보다 높으며, 상기 분할 부위는 상기 세 구역 중에서 가장 낮은 Tm을 가지고, 상기 분할 부위는 혼성화 특이성 측면에서 5'-제1차 프라이밍 부위가 3'-제2차 프라이밍 부위로부터 분할되도록 하며, 이러한 특이성 분할은 프라이머 전체 구조의 혼성화 특이성이 5'-제1차 프라이밍 부위와 3'-제2차 프라이밍 부위에 의해 이중적으로 결

정도록 하고, 이는 결국 상기 프라이머 전체 구조의 혼성화 특이성을 향상시킨다.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 상기 유니버설 염기는 디옥시이노신, 이노신, 1-(2 '-디옥시-베타-D-리보푸라노실)-3-니트로피롤 또는 5-니트로인돌인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 상기 유니버설 염기는 디옥시이노신인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 20 항에 있어서, 상기 분할 부위는 유니버설 염기를 가지는 연속된 뉴클레오타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제 20 항에 있어서, 상기 5'-제1차 프라이밍 부위의 길이는 3'-제2차 프라이밍 부위보다 긴 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제 20 항에 있어서, 상기 5'-제1차 프라이밍 부위는 15-40 뉴클레오타이드의 길이를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제 20 항에 있어서, 상기 3'-제2차 프라이밍 부위는 3-15 뉴클레오타이드의 길이를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제 20 항에 있어서, 상기 분할 부위는 3-10 뉴클레오타이드의 길이를 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제 20 항에 있어서, 상기 5'-제1차 프라이밍 부위는 40-80°C의 T_m을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제 20 항에 있어서, 상기 3'-제2차 프라이밍 부위는 10-40°C의 T_m을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제 20 항에 있어서, 상기 분할 부위는 3-15°C의 T_m을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

서열목록 제1서열 내지 제61서열로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 프라이머를 포함하는 패혈증-유발 미생물의 분류용 키트.

청구항 32

서열목록 제62서열 내지 제115서열로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 프라이머를 포함하는 패혈증-유발 미생물종의 동정용 키트.

청구항 33

제 32 항에 있어서, 상기 키트는 서열목록 제116서열 내지 제123서열로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 항생제 내성 유전자 증폭용 프라이머를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 패혈증-유발 미생물종의 동정용 키트.

청구항 34

제 31 항 또는 제 32 항에 있어서, 상기 키트는 서열목록 제124서열 및 제125서열의 내부대조군 증폭용 프라이머를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 패혈증-유발 미생물의 분류 및 동정 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 패혈증은 독성-생성 미생물의 감염에 의한 전신 염증 상태로 특징되는 심각한 질환이며, 전신성 염증 반응증(systemic inflammatory response syndrome: SIRS)이라 불린다(Levy MM, et al., *Crit. Care Med.* 31(4):12506(2003); Bone RC et al., *Chest* 101(6):164455(1992)).

[0003] 미생물, 특히 박테리아에 의한 감염의 주요한 위치는 폐, 배, 요로, 피부/연질 조직 및 중추신경계 등이다. 패혈증의 증상은 일반적으로 감염 과정과 관련이 있다. 감염에 의해 패혈증이 유발되면, 빈맥, 빈호흡, 열 및 /또는 감소된 배뇨와 같은 증상이 나타난다. 패혈증을 유발하는 면역반응은 염증 반응 및 혈액응고 과정의 전신성 활성화를 초래하는 전신성 염증 반응이다. 이러한 증상은 순환계의 이상을 초래하며 다수의 기관 이상 및 궁극적으로 사망을 야기한다.

[0004] 패혈증의 진단은 전통적으로 혈액 시료의 배양을 통하여 실시되는 것이 일반적이며, 이러한 진단은 시간이 많이 소모되는 작업이다.

[0005] 미국 특허출원 공개 제20080146455호는 E. coli의 특정 서열에 특이적으로 혼성화되는 프라이머를 이용하여 패혈증을 검출하는 방법을 개시하고 있다. WO 2007/083852는 패혈증-유발 박테리아를 검출할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 서열을 개시하고 있다.

[0006] 미국 특허출원 공개 제20050214820호는 미토콘드리아 핵산 분자의 상대적인 양을 측정하여 패혈증이 있는 환자를 진단하는 방법을 개시하고 있다. 미국 특허출원 공개 제20080114576호는 RT-PCR 및 유세포 분석기를 이용하여 패혈증의 초기 단계를 진단하는 방법을 기재하고 있다.

[0007] 현재까지 패혈증을 진단하거나 패혈증-유발 미생물을 검출하는 많은 방법들이 소개되었으나, 패혈증을 유발하는 미생물의 종류가 매우 많고 이용되는 기술의 한계 때문에 여전히 시간 및 비용이 많이 소모되고, 정확도 측면에서도 개선하여야 하는 측면이 있다.

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하고자하는 과제

[0009] 본 발명자들은 패혈증 유발 미생물을 보다 개선된 효율성, 재현성 및 정확성으로 검출할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 멀티플렉스 증폭 방법을 기초로 하여 패혈증 유발 미생물을 분류 및 동정하는 방식으로 패혈증 유발 미생물을 검출하는 신규한 방법을 개발하였고, 이 방법을 이용하는 경우에는 오류 데이터(위양성 또는 위음성 데이터) 없이 패혈증 유발 미생물을 분류 및 동정할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 패혈증-유발 미생물의 분류 및 검출의 동시 방법을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 패혈증-유발 미생물의 검출방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 패혈증-유발 미생물의 분류용 키트를 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 패혈증-유발 미생물종의 동정용 키트를 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제 해결수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 패혈증-유발 미생물의 분류 및 검출의 동시 방법을 제공한다:

[0016] (a) 생물학적 시료로부터 핵산 분자를 수득하는 단계;

[0017] (b) 균류(*fungi*), 스태필로코커스(*Staphylococcus*) 속 박테리아, 엔테로코커스(*Enterococcus*) 속 박테리아, 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 박테리아 및 그람 음성 박테리아로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 3개의 패혈증-유발 미생물군 각각에 속하는 최소 3종의 미생물종, 총 최소 9종의 미생물종의 핵산 분자에 혼성화되는 최소 9개의 미생물군 분류용 프라이머쌍을 상기 핵산 분자에 접촉시키는 단계로서, 상기 동일한 미생물군의 분류에 이용되는 미생물군 분류용 프라이머쌍은 동일 크기의 증폭산물(*amplicon*)을 생성하며 다른 미생물군의 분류에 이용되는 미생물군 분류용 프라이머쌍은 서로 다른 크기의 증폭산물을 생성하고;

[0018] (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 이용하여 상기 생물학적 시료로부터 수득한 핵산 분자를 멀티플렉스 방식으로 증폭시키는 단계; 그리고,

[0019] (d) 상기 증폭산물의 크기를 분석하여 생물학적 시료에 포함된 패혈증-유발 미생물의 분류(*classifying*) 및 검출(*detecting*)을 동시에 하는 단계.

[0020] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 패혈증-유발 미생물의 검출방법을 제공한다:

[0021] (a) 생물학적 시료로부터 핵산 분자를 수득하는 단계;

[0022] (b) 균류(*fungi*), 스태필로코커스(*Staphylococcus*) 속 박테리아, 엔테로코커스(*Enterococcus*) 속 박테리아, 스트렙토코커스(*Streptococcus*) 속 박테리아 및 그람 음성 박테리아로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 3개의 패혈증-유발 미생물군 각각에 속하는 최소 3종의 미생물종, 총 최소 9종의 미생물종의 핵산 분자에 혼성화되는 최소 9개의 미생물군 분류용 프라이머쌍을 상기 핵산 분자에 접촉시키는 단계로서, 상기 동일한 미생물군의 분류에 이용되는 미생물군 분류용 프라이머쌍은 동일 크기의 증폭산물(*amplicon*)을 생성하며 다른 미생물군의 분류에 이용되는 미생물군 분류용 프라이머쌍은 서로 다른 크기의 증폭산물을 생성하고;

[0023] (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 이용하여 상기 생물학적 시료로부터 수득한 핵산 분자를 멀티플렉스 방식으로 증폭시키는 단계;

[0024] (d) 상기 증폭산물의 크기를 분석하여 생물학적 시료에 포함된 패혈증-유발 미생물을 분류(*classifying*)하는 단계;

[0025] (e) 상기 패혈증-유발 미생물군에 속하는 최소 3종의 미생물종의 핵산분자와 혼성화 되는 최소 3개의 미생물종 동정용 프라이머쌍 및 상기 생물학적 시료로부터 얻은 핵산분자를 이용하여 상기 핵산분자를 멀티플렉스 방식으로 증폭시키는 단계로서, 상기 최소 3개의 미생물종 동정용 프라이머쌍은 서로 다른 크기의 증폭산물을 생성하며; 그리고,

[0026] (f) 상기 증폭산물의 크기를 분석하여 생물학적 시료에 포함된 패혈증-유발 미생물의 종을 동정(*identifying*)하는 단계.

[0027] 본 발명자들은 패혈증 유발 미생물을 보다 개선된 효율성, 재현성 및 정확성으로 검출할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 멀티플렉스 증폭 방법을 기초로 하여 패혈증 유발 미생물을 분류 및 동정하는 방식으로 패혈증 유발 미생물을 검출하는 신규한 방법을 개발하였고, 이 방법을 이용하는 경우에는 오류 데이터(위양성 또는 위음성 데이터) 없이 패혈증 유발 미생물을 분류 및 동정할 수 있음을 확인하였다.

[0028] 본 발명의 방법은 크게 두 가지로 나눌 수 있다: 패혈증 유발 미생물의 분류(*classifying*) 및 동정(*identifying*).

[0029] 본 명세서에서 용어 “분류”는 분석 대상의 생물학적 시료에 있는 패혈증 유발 미생물이 균류, 스태필로코커스 속 박테리아, 엔테로코커스 속 박테리아, 스트렙토코커스 속 박테리아 및 그람 음성 박테리아, 총 5종류의 미생물군 중에서 어떠한 미생물군에 속하는 지를 판별하는 것을 의미한다.

- [0030] 본 명세서에서 용어 “동정”은 분석 대상의 생물학적 시료에 있는 패혈증 유발 미생물이 어떠한 미생물종(species)에 속하는지를 판별하는 것을 의미한다.
- [0031] 본 발명의 방법에 따르면, 우선 생물학적 시료로부터 핵산 분자를 수득한다. 본 발명에 이용되는 생물학적 시료는 다양한 동물로부터 얻을 수 있으며, 가장 바람직하게는 인간으로부터 얻는다. 본 발명에 이용될 수 있는 생물학적 시료는 바람직하게는, 조직, 세포, 혈액, 림프, 골수액, 타액, 소변, 분변, 안구액, 정액, 뇌 추출물, 척수액, 관절액, 흉선액, 복수 및 양막액이며, 가장 바람직하게는 혈액이다. 생물학적 시료로서 혈액은 전혈, 혈장, 또는 혈청이다.
- [0032] 생물학적 시료로부터 얻는 핵산 분자는 DNA(예컨대, gDNA) 또는 RNA(예컨대, mRNA)이다.
- [0033] 생물학적 시료로부터 DNA를 얻는 방법에 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 실시할 수 있다(Peter B. Kaufman, et al., *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, CRC Press, Inc (1995) and Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press (2001)). 예를 들어, 페놀/클로로포름 혼합물물에 의한 추출 및 침전, 그리고 스핀 칼럼을 이용한 분리 방법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. RNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* 162:156(1987)). 예컨대, Trizol을 이용하여 용이하게 세포내의 총 RNA를 분리할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 멀티플렉스 방식으로 증폭되는 핵산 분자는 생물학적 시료로부터 얻은 DNA 시료이다.
- [0035] 본 발명의 가장 큰 특징 중 하나는, 멀티플렉스 증폭 방식으로 생물학적 시료에 포함된 패혈증 유발 미생물을 분류하는 것이다. 이 경우, 균류, 스태필로코커스 속 박테리아, 엔테로코커스 속 박테리아, 스트렙토코커스 속 박테리아 및 그람 음성 박테리아로 구성된 균으로부터 선택되는 최소 3개의 패혈증-유발 미생물군 각각에 속하는 최소 3종의 미생물종, 총 최소 9종의 미생물종의 핵산 분자에 혼성화되는 최소 9개의 미생물군 분류용 프라이머쌍(primer pairs for classifying)을 동시에 이용하여 멀티플렉스 증폭을 한다.
- [0036] 분류를 위한 멀티플렉스 증폭에서 동일한 미생물군의 분류에 이용되는 미생물군 분류용 프라이머쌍은 동일 크기의 증폭산물(amplicon)을 생성하며 다른 미생물군의 분류에 이용되는 미생물군 분류용 프라이머쌍은 서로 다른 크기의 증폭산물을 생성한다. 즉, 미생물군의 분류는 멀티플렉스 증폭산물의 크기에 의해 결정된다.
- [0037] 본 발명자들이 아는 한(to our best knowledge), 최소 9개의 미생물군 분류용 프라이머쌍을 동시에 이용하여 멀티플렉스 증폭을 하여, 최소 3개의 패혈증-유발 미생물군으로 분류하는 것은 본 발명자들에 의해 처음으로 제안된 것이다.
- [0038] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단계 (b)는 최소 4개의 패혈증-유발 미생물군 각각에 속하는 최소 3종의 미생물종의 핵산분자에 혼성화 되는 최소 3개의 미생물군 분류용 프라이머쌍, 즉 총 12개의 미생물군 분류용 프라이머쌍을 이용하여 실시된다. 보다 바람직하게는, 단계 (b)는 최소 5개의 패혈증-유발 미생물군 각각에 속하는 최소 3종의 미생물종의 핵산분자에 혼성화 되는 최소 3개의 미생물군 분류용 프라이머쌍, 즉 총 15개의 미생물군 분류용 프라이머쌍을 이용하여 실시된다.
- [0039] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에 의해 패혈증-유발 균류로 분류될 수 있는 미생물은 칸디다 알비칸스, 칸디다 트로피칼리스, 칸디다 파라프실로시스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이 및 아스퍼길루스 퍼미게터스로 구성된 균으로부터 선택되는 최소 3종, 보다 바람직하게는 최소 4종, 보다 더 바람직하게는 최소 5종, 가장 바람직하게는 6종 모두이다.
- [0040] 예를 들어, 상기 균류 6종 모두를 패혈증-유발 균류로 분류하는 멀티플렉스 증폭에서 총 6개의 프라이머쌍이 이용될 수 있으며, 이 경우 총 6개의 프라이머쌍은 서로 다른 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있으나, 이로부터 나오는 증폭산물은 동일 크기를 갖도록 디자인된다.
- [0041] 패혈증-유발 균류의 분류에 이용되는 가장 바람직한 프라이머가 서열목록 제1서열 내지 제12서열에 예시되어 있다.
- [0042] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에 의해 패혈증-유발 스태필로코커스 속 박테리아로 분류될 수 있는 미생물은 스태필로코커스 아우레우스, 스태필로코커스 에피더미디스, 스태필로코커스 헤모라이티쿠

스, 스타필로코커스 파스테리, 스타필로코커스 와르네리, 스타필로코커스 코나이 아종, 우레아리티쿠, 스타필로코커스 카프래, 스타필로코커스 에쿠오럼, 스타필로코커스 시물란스, 스타필로코커스 알레태, 스타필로코커스 클루사이, 스타필로코커스 갈리나럼, 스타필로코커스 아우리쿨라리스, 스타필로코커스 크로모제넨스, 스타필로코커스 텔피니 및 스타필로코커스 인터메디우스로 구성된 균으로부터 선택되는 최소 4종, 보다 바람직하게는 최소 5종, 보다 더 바람직하게는 최소 10종, 가장 바람직하게는 18종 모두이다.

[0043] 예를 들어, 스타필로코커스 속 박테리아 18종 모두를 패혈증-유발 스타필로코커스 속 박테리아로 분류하는 멀티플렉스 증폭에서 총 18개의 프라이머쌍이 이용될 수 있으며, 이 경우 총 18개의 프라이머쌍은 서로 다른 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있으나, 이로부터 나오는 증폭산물은 동일 크기를 갖도록 디자인된다. 또한, 이용되는 프라이머쌍의 개수를 줄이기 위하여 스타필로코커스 속 박테리아에서 공통적으로 발견되는 보존성 서열 (conserved sequence)에 혼성화 되는 프라이머쌍을 제작할 수 있다. 하기 실시예에 기재된 바와 같이, 스타필로코커스 속 박테리아 18종 모두를 패혈증-유발 스타필로코커스 속 박테리아로 분류하기 위하여, 전방향 프라이머 총 11개 및 역방향 프라이머 총 6개를 이용하고 있다.

[0044] 패혈증-유발 스타필로코커스 속 박테리아의 분류에 이용되는 가장 바람직한 프라이머가 서열목록 제13서열 내지 제29서열에 예시되어 있다.

[0045] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에 의해 패혈증-유발 엔테로코커스 속 박테리아로 분류될 수 있는 미생물은 엔테로코커스 페에시움, 엔테로코커스 페갈리스, 엔테로코커스 아비움 및 엔테로코커스 두란스, 총 4종 모두이다.

[0046] 예를 들어, 엔테로코커스 속 박테리아 4종 모두를 패혈증-유발 엔테로코커스 속 박테리아로 분류하는 멀티플렉스 증폭에서 총 4개의 프라이머쌍이 이용될 수 있으며, 이 경우 총 4개의 프라이머쌍은 서로 다른 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있으나, 이로부터 나오는 증폭산물은 동일 크기를 갖도록 디자인된다. 또한, 이용되는 프라이머쌍의 개수를 줄이기 위하여 엔테로코커스 속 박테리아에서 공통적으로 발견되는 보존성 서열에 혼성화 되는 프라이머쌍을 제작할 수 있다. 하기 실시예에 기재된 바와 같이, 엔테로코커스 속 박테리아 4종 모두를 패혈증-유발 엔테로코커스 속 박테리아로 분류하기 위하여, 2개의 프라이머쌍이 이용되고 있다.

[0047] 패혈증-유발 엔테로코커스 속 박테리아의 분류에 이용되는 가장 바람직한 프라이머가 서열목록 제30서열 내지 제33서열에 예시되어 있다.

[0048] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에 의해 패혈증-유발 스트렙토코커스 속 박테리아로 분류될 수 있는 미생물은 스트렙토코커스 뉴모니아, 스트렙토코커스 아갈락티에, 스트렙토코커스 피오게네스, 스트렙토코커스 미티스, 스트렙토코커스 안기노서스, 스트렙토코커스 고르도나이, 스트렙토코커스 인터메디우스, 스트렙토코커스 오랄리스, 스트렙토코커스 파라산구이니스, 스트렙토코커스 베스티볼라리스, 스트렙토코커스 알락토리티쿠스, 스트렙토코커스 크리세티, 스트렙토코커스 다운에이, 스트렙토코커스 페루스, 스트렙토코커스 갈리나세우스, 스트렙토코커스 하이오인테스티날리스, 스트렙토코커스 루테티엔시스, 스트렙토코커스 마카새, 스트렙토코커스 파라우베리스, 스트렙토코커스 소브리너스 및 스트렙토코커스 수이스로 구성된 균으로부터 선택되는 최소 4종의 미생물종, 보다 바람직하게는 최소 10종, 보다 더 바람직하게는 최소 15종, 가장 바람직하게는 22종 모두이다.

[0049] 예를 들어, 스트렙토코커스 속 박테리아 22종 모두를 패혈증-유발 스트렙토코커스 속 박테리아로 분류하는 멀티플렉스 증폭에서 총 22개의 프라이머쌍이 이용될 수 있으며, 이 경우 총 22개의 프라이머쌍은 서로 다른 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있으나, 이로부터 나오는 증폭산물은 동일 크기를 갖도록 디자인된다. 또한, 이용되는 프라이머쌍의 개수를 줄이기 위하여 스트렙토코커스 속 박테리아에서 공통적으로 발견되는 보존성 서열(바람직하게는, *tuf* 서열)에 혼성화 되는 프라이머쌍을 제작할 수 있다. 하기 실시예에 기재된 바와 같이, 스트렙토코커스 속 박테리아 22종 모두를 패혈증-유발 스트렙토코커스 속 박테리아로 분류하기 위하여, 전방향 프라이머 총 3개 및 역방향 프라이머 총 5개를 이용하고 있다.

[0050] 패혈증-유발 스트렙토코커스 속 박테리아의 분류에 이용되는 가장 바람직한 프라이머가 서열목록 제54서열 내지 제61서열에 예시되어 있다.

[0051] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 방법에 의해 패혈증-유발 그람 음성 박테리아로 분류될 수 있는 미생물은 *E. coli*, 프로테우스 미라빌리스, 슈모모나스 에어루기노사, 아시네토박터 바우마니, 스테노트로포모나스 말토펠리아, 클렙시엘라 뉴모니아, 클렙시엘라 옥시토카, 세라티아 마르세스센스, 엔테로박터 클로아카이 및 엔테로박터 에어로게네스로 구성된 균으로부터 선택되는 최소 4종의 미생물종, 보다 바람직하게는 최소 6

중, 보다 더 바람직하게는 최소 8종, 가장 바람직하게는 10종 모두이다.

- [0052] 예를 들어, 그람 음성 박테리아 22종 모두를 패혈증-유발 그람 음성 박테리아로 분류하는 멀티플렉스 증폭에서 총 10개의 프라이머쌍이 이용될 수 있으며, 이 경우 총 10개의 프라이머쌍은 서로 다른 뉴클레오타이드 서열을 가질 수 있으나, 이로부터 나오는 증폭산물은 동일 크기를 갖도록 디자인된다. 또한, 이용되는 프라이머쌍의 개수를 줄이기 위하여 그람 음성 박테리아에서 공통적으로 발견되는 보존성 서열에 혼성화 되는 프라이머쌍을 제작할 수 있다.
- [0053] 패혈증-유발 그람 음성 박테리아의 분류에 이용되는 가장 바람직한 프라이머가 서열목록 제34서열 내지 제53서열에 예시되어 있다.
- [0054] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에 의해 분류되는 패혈증-유발 미생물 미생물군은 항생제 내성 미생물군을 추가적으로 포함한다. 보다 바람직하게는, 항생제 내성 미생물군의 분류는 blaSHV, mecA, vanA 및 vanB 유전자로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 2개의 항생제 내성 유전자에 혼성화 되는 최소 2개의 미생물군 분류용 프라이머쌍을 이용하여 실시된다.
- [0055] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 패혈증 유발 미생물종을 동정하는 단계 (e)는 최소 5종의 미생물종의 핵산분자와 혼성화 되는 최소 5개의 미생물종 동정용 프라이머쌍을 이용하여 실시되며, 보다 바람직하게는 최소 6종의 미생물종의 핵산분자와 혼성화 되는 최소 6개의 미생물종 동정용 프라이머쌍, 가장 바람직하게는 최소 7종의 미생물종의 핵산분자와 혼성화 되는 최소 7개의 미생물종 동정용 프라이머쌍을 이용하여 실시된다.
- [0056] 가장 바람직하게는, 패혈증-유발 미생물종을 동정하기 위한 프라이머의 서열은 서열목록 제62서열 내지 제115서열에 예시되어 있다.
- [0057] 가장 바람직하게는, 항생제 내성 유전자를 동정하기 위한 프라이머의 서열은 서열목록 제116서열 내지 제123서열에 예시되어 있다.
- [0058] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 분류 및/또는 동정을 하기 위한 멀티플렉스 증폭 과정에서 분류용 프라이머 및 동정용 프라이머 이외에 내부 대조군(internal control)을 생성하기 위한 프라이머 한 쌍을 추가적으로 이용하여 실시된다. 이러한 내부 대조군은 증폭 반응 자체가 제대로 이루어졌는지를 체크할 수 있도록 한다. 예를 들어, 하기의 실시예에 예시된 바와 같이, 인간의 하우스키핑 유전자인 MTHFR(methylenetetrahydrofolate reductase) 유전자를 내부 대조군으로 사용할 수 있다. MTHFR 유전자 이외에, GAPDH(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) 유전자, β-액틴 유전자, PGK1(phosphoglycerate kinase 1) 유전자, β-글로빈 유전자 또는 28S RNA 유전자 등이 하우스키핑 유전자로 이용될 수 있다. MTHFR 유전자를 증폭하기 위한 프라이머는 서열목록 제124서열 및 제125서열에 예시되어 있다.
- [0059] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 미생물군 분류용 프라이머(primers for classifying microbe groups), 미생물종 동정용 프라이머(primers for identifying microbe species) 또는 이들 모두는 다음의 일반식 I로 표시된다:
- [0060]
$$5'-Xp-Yq-Zr-3' \quad (I)$$
- [0061] 상기 일반식에서, Xp는 혼성화되는 타겟 서열과 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 가지는 5'-제1차 프라이밍 부위(5'-first priming portion)이고, Yq는 최소 3개 이상의 유니버설 염기를 포함하는 분할 구역(separation portion)이며, Zr은 혼성화되는 타겟 서열과 실질적으로 상보적인 혼성화 서열을 가지는 3'-제2차 프라이밍 부위(3'-second priming portion)이고, p, q 및 r은 뉴클레오타이드의 개수를 나타내며, X, Y 및 Z는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이고, 5'-제1차 프라이밍 부위의 T_m은 3'-제2차 프라이밍 부위의 T_m보다 높으며, 상기 분할 부위는 상기 세 구역 중에서 가장 낮은 T_m을 가지고, 상기 분할 부위는 혼성화 특이성 측면에서 5'-제1차 프라이밍 부위가 3'-제2차 프라이밍 부위로부터 분할되도록 하며, 이러한 특이성 분할은 프라이머 전체 구조의 혼성화 특이성이 5'-제1차 프라이밍 부위와 3'-제2차 프라이밍 부위에 의해 이중적으로 결정되도록 하고, 이는 결국 상기 프라이머 전체 구조의 혼성화 특이성을 향상시킨다.
- [0062] 본 발명의 미생물군 분류용 프라이머 및 미생물종 동정용 프라이머가 가지는 기본적인 구조는 본 발명자에 의해 최초로 제안되는 것이고(참조: WO 2006/095981), 이중 프라이밍(dual priming) 구조라 명명할 수 있고, 이러한 구조를 가지는 올리고뉴클레오타이드는 이중 프라이밍 올리고뉴클레오타이드(dual priming oligonucleotide: DPO)라 명명된다. DPO는 본 발명자에 의하여 개발된 신 개념의 올리고뉴클레오타이드로서, 분할 구역에 의해 분리된 5'-제1차 프라이밍 부위와 3'-제2차 프라이밍 부위에 의해 이중적으로 혼성화가 결정되기 때문에 크게

향상된 혼성화 특이성을 나타낼 수 있다.

- [0063] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 분할 구역에 위치하는 유니버설 염기는 디옥시이노신, 이노신, 7-디아자-2'-디옥시이노신, 2'-아자-2'-디옥시이노신, 2'-OME 이노신, 2'-F 이노신, 디옥시 3-니트로피롤, 3-니트로피롤, 2'-OME 3-니트로피롤, 2'-F 3-니트로피롤, 1-(2'-디옥시-베타-D-리보푸라노실)-3-니트로피롤, 디옥시 5-니트로피롤, 5-니트로인돌, 2'-OME 5-니트로인돌, 2'-F 5-니트로인돌, 디옥시 4-니트로벤즈이미다졸, 4-니트로벤즈이미다졸, 디옥시 4-아미노벤즈이미다졸, 4-아미노벤즈이미다졸, 디옥시 네블라린, 2'-F 네블라린, 2'-F 4-니트로벤즈이미다졸, PNA-5-인트로인돌, PNA-네블라린, PNA-이노신, PNA-4-니트로벤즈이미다졸, PNA-3-니트로피롤, 모르포리노-5-니트로인돌, 모르포리노-네블라린, 모르포리노-이노신, 모르포리노-4-니트로벤즈이미다졸, 모르포리노-3-니트로피롤, 포스포라미데이트-5-니트로인돌, 포스포라미데이트-네블라린, 포스포라미데이트-이노신, 포스포라미데이트-4-니트로벤즈이미다졸, 포스포라미데이트-3-니트로피롤, 2'-0-메톡시에틸이노신, 2'-0-메톡시에틸 네블라린, 2'-0-메톡시에틸 5-니트로인돌, 2'-0-메톡시에틸 4-니트로-벤즈이미다졸, 2'-0-메톡시에틸 3-니트로피롤 및 상기 염기의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되며, 보다 바람직하게는, 디옥시이노신, 이노신, 1-(2'-디옥시-베타-D-리보푸라노실)-3-니트로피롤 또는 5-니트로인돌이고, 가장 바람직하게는 디옥시이노신이다.
- [0064] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 분할 구역은 유니버설 염기를 가지는 연속된 뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0065] 바람직하게는, 상기 5'-제1차 프라이밍 부위의 길이는 3'-제2차 프라이밍 부위보다 길다. 상기 5'-제1차 프라이밍 부위는 바람직하게는, 15-40 뉴클레오타이드의 길이를 갖는다. 상기 3'-제2차 프라이밍 부위는 바람직하게는, 3-15 뉴클레오타이드의 길이를 갖는다. 상기 분할 구역은 3-10 뉴클레오타이드의 길이를 갖는 것이 바람직하다.
- [0066] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 5'-제1차 프라이밍 부위는 40-80℃의 T_m을 갖는다. 바람직하게는, 상기 3'-제2차 프라이밍 부위는 10-40℃의 T_m을 갖는다. 상기 분할 구역은 바람직하게는 3-15℃의 T_m을 갖는다.
- [0067] DPO 형태로 디자인한 패혈증 유발 미생물의 분류 및 동정용 프라이머는, 위음성, 위양성 및 배경 산물 (backgrounds)의 문제 없이 60종이 넘는 패혈증 유발 미생물을 멀티플렉스 증폭 방식으로 분류 및 동정할 수 있도록 한다.
- [0068] 본 발명에서 이용되는 프라이머는 서열목록 제1서열부터 제123서열까지 뿐만 아니라 상기 서열과 상보적인 서열 및 실질적으로 동일한 서열을 포함한다. 본 명세서에서 용어 “실질적으로 동일한 서열”은 프라이머가 상기한 DPO의 구조를 가지면서 타깃 서열에 특이적으로 혼성화되는 능력을 보유하는 범위 내에서, 서열목록 제1서열부터 제123서열에 기재된 서열의 일부 염기가 결실, 부가 및/또는 치환된 서열을 의미한다. 이러한 실질적으로 동일한 서열이 본 발명의 청구범위에 속한다는 것은 균등론의 원칙 하에 명확하게 인식된다.
- [0069] 본 발명에 있어서, 용어 “타깃 서열(target sequence)”은 주어진 혼성화 조건 하에서 사용되는 프라이머와 혼성화되는 것이 소망되는 서열을 의미한다.
- [0070] 예를 들어, 프라이머의 서열과 완벽하게 일치하는 서열에만 혼성화시키는 것을 소망하여, 고염격조건 하에서 혼성화를 실시하는 경우, 프라이머의 서열과 완벽하게 일치하는 서열은 “타깃 서열”이 되지만, 프라이머 또는 프로브의 서열과 하나의 염기라도 다른 서열은 “비-타깃 서열” 또는 “비-특이적 서열”이 된다. 그리고, 비-타깃 서열과 혼성화의 결과로 얻어지는 산물은 “비-타깃 산물” 또는 “비-특이적 산물”이 된다.
- [0071] 한편, 프라이머의 서열과 완벽하게 일치하는 서열뿐만 아니라 일부 미스매치가 있는 서열에도 혼성화시키는 것을 소망하여, 낮은 염격조건 하에서 혼성화를 실시하는 경우, 프라이머의 서열과 완벽하게 일치하지 않더라도 주어진 조건에서 사용되는 프라이머와 혼성화되는 것이 소망되는 서열은 “타깃 서열”이 되지만, 그 이외의 서열은 “비 타깃-서열”이 된다.
- [0072] 본 명세서에서 용어 “프라이머”는 합성 또는 자연의 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머는 주형에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합체의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용한다. 증폭의 최대 효율을 위하여, 바람직하게는 프라이머는 단일체이다. 바람직하게는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명의 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP (즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명

의 올리고뉴클레오타이드는 골격 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 펩타이드 핵산(PNA)(M. Egholm et al., *Nature*, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 핵소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에틸-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린 (치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

- [0073] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다.
- [0074] 본 발명에서 이용되는 프라이머는 패혈증 유발 미생물의 핵산에 매우 높은 특이성으로 혼성화되어 패혈증 유발 미생물종의 분류 및 동정을 하는 데 매우 유용하다.
- [0075] 본 발명에서 상기 프라이머를 생물학적 시료로부터 수득한 핵산 분자와 혼성화시켜 증폭하는 과정은 통상의 증폭 방법에 따라 실시될 수 있다.
- [0076] 본 발명에서 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 올리고뉴클레오타이드의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, *Nucleic Acid Hybridization*, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다.
- [0077] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 혼성화 온도는 50℃ 내지 70℃이고 보다 바람직하게는 55℃ 내지 68℃이고, 가장 바람직하게는 60℃ 내지 63℃이다.
- [0078] 패혈증 유발 미생물의 핵산 서열을 증폭하는 본 발명의 방법은 당업계에 공지된 다양한 프라이머-관련 핵산 증폭 방법들에 따라 실시될 수 있다.
- [0079] 핵산 서열을 증폭하기 위한 본 발명의 방법은 소망하는 어떠한 박과 식물의 종자감염 바이러스의 핵산 분자의 증폭에도 이용될 수 있다. 이러한 핵산 분자는 DNA 또는 RNA이다. 상기 핵산 분자는 이중쇄 또는 단일쇄일 수 있고, 바람직하게는 이중쇄이다. 출발물질로서 핵산이 이중쇄인 경우, 두 쇠를 단일쇄로, 또는 부분적인 단일쇄 형태로 만드는 것이 바람직하다. 쇠를 분리하는 방법은, 열, 알카리, 포름아미드, 우레아 및 글리톡살 처리, 효소적 방법(예, 헬리카아제 작용) 및 결합 단백질질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 쇠 분리는 80-105℃의 온도로 열 처리하여 달성될 수 있다. 상술한 처리의 일반적인 방법은 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001)에 개시되어 있다.
- [0080] RNA가 출발물질로 이용되는 경우, 역전사 단계가 증폭 전에 필요로 하며, 역전사 단계의 상세한 내용은 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Noonan, K. F. et al., *Nucleic Acids Res.* 16:10366 (1988)에 개시되어 있다. 역전사 단계는 RNase H 활성을 갖는 역전사 효소에 의해 이루어질 수 있다. RNase H 활성을 갖는 효소를 이용하는 경우, 반응조건을 주의하여 선택하면 개별적인 RNase H 절단 과정을 피할 수 있다.
- [0081] 본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중쇄 구조를 형성한다. 이러한 이중쇄 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., 등, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.
- [0082] 다양한 DNA 증합효소가 본 발명의 증폭 단계에 이용될 수 있으며, *E. coli* DNA 증합효소 I의 “클레나우” 단편, 열안정성 DNA 증합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 증합효소를 포함한다. 바람직하게는, 증합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 증합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus*

thermophilus(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis*, 및 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)를 포함한다. 상기 중합효소 대부분은 박테리아 그 자체로부터 분리될 수 있고 또는 상업적으로 구입할 수 있다. 또한, 본 발명에 이용되는 중합효소는 중합효소를 암호화하는 클로닝 유전자의 높은 레벨을 발현하는 세포로부터 수득할 수 있다.

- [0083] 중합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg²⁺와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 소망하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 소망된다.
- [0084] 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서, 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.
- [0085] 본 발명에 있어서 어닐링 또는 혼성화는 타겟 뉴클레오타이드 서열과 프라이머 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건(즉, 분할 구역이 타겟 서열에 수소결합을 할 수 없는 조건) 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격조건은 서열- 의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다. 바람직하게는, 어닐링 온도는 50°C 내지 70°C이고 보다 바람직하게는 55°C 내지 68°C이고, 가장 바람직하게는 60°C 내지 63°C이다.
- [0086] 본 발명의 가장 바람직한 구현예에서, 멀티플렉스 증폭 과정은 멀티플렉스 PCR 방법에 따라 실시되며, 이는 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001)에 상세히 설명되어 있다.
- [0087] 멀티플렉스 PCR은 PCR의 다른 변형 형태로서, 동일한 반응물에서 둘 이상의 프라이머쌍을 이용하여 하나 이상의 타겟 서열을 동시에 증폭할 수 있다. 그러나, 멀티플렉스 PCR로부터 얻은 결과는, 증폭 과정의 인위적 요소 때문에 종종 복잡하게 나오며, 이러한 오류의 결과는 반응 실패에 의한 위음 결과 그리고 위양 결과를 포함한다. 따라서 이러한 오류를 줄이기 위하여 멀티플렉스 PCR 반응 조건을 최적화하는 데 인력과 시간을 많이 소비하지만, 만족할만한 결과를 얻기는 극히 힘들다. 본 발명의 방법은 이러한 종래의 멀티플렉스 PCR의 문제점을 극복하여, 하나의 PCR 반응 세트에서 다양한 종류의 패혈증 유발 미생물을 오류 없이 증폭하고 분류 및 동정할 수 있다.
- [0088] 증폭 반응 이후, 증폭산물의 크기를 분석하여 생물학적 시료에 포함된 패혈증-유발 미생물의 분류 및 검출을 동시에 할 수 있다. 본 발명의 분류 방법에 이용되는 프라이머는 소정(predetermined)의 크기를 갖는 증폭산물을 생성하도록 디자인 된 것이다. 따라서 증폭산물의 크기를 분석함으로써 생물학적 시료에 있는 패혈증-유발 미생물의 분류를 할 수 있고 동시에 검출하게 된다.
- [0089] 한편, 본 발명의 동정 방법에 따르면 증폭 반응 이후, 증폭산물의 크기를 분석하여 생물학적 시료에 포함된 패혈증-유발 미생물의 종을 동정한다. 본 발명의 동정에 이용되는 프라이머는 소정의 크기를 갖는 증폭산물을 생성하도록 디자인 된 것이다. 따라서 증폭산물의 크기를 분석함으로써 생물학적 시료에 있는 패혈증-유발 미생물의 종을 정확하게 규명할 수 있다.
- [0090] 소정의 크기를 갖는 증폭 산물의 형성 여부를 확인하는 것은, 전기영동 예컨대, 아가로스 젤 전기영동을 통해 쉽게 실시할 수 있다. 또는, 증폭산물의 확인은 테이프 방식의 전기영동으로 확인할 수 있으며, 이는 WO 2003/045557 및 WO 2006/085071, 그리고 Buck AH, et al., *J. Virol.* 81(24):13761-70(2007)에 개시되어 있으며, LAB901 Ltd.에서 ScreenTapeTM으로 상업적으로 구입 가능하다.
- [0091] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제1서열 내지 제61서열로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 프라이머를 포함하는 패혈증-유발 미생물의 분류용 키트를 제공한다.
- [0092] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열목록 제62서열 내지 제115서열로 구성된 군으로부터 선택되는 최소 1종의 프라이머를 포함하는 패혈증-유발 미생물종의 동정용 키트를 제공한다.
- [0093] 본 발명의 키트는 선택적으로 PCR 반응에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합효소 조인자 및 디옥시리보뉴클레오타이드-5'-트리포스페이트를 포함할 수 있다. 선택적으로, 본 발명의 키트는 다양한 폴리뉴

클레오타이드 분자, 역전사 효소, 다양한 완충액 및 시약, DNA 중합효소의 활성을 억제하는 저해제를 포함할 수 있다. 특정 반응에서 이용되는 시약의 최적양은 본 명세서의 내용을 파악한 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 본 발명의 키트는 분리된 패키지 또는 컴팩트먼트에 상술한 성분들을 포함한다.

효 과

- [0094] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0095] (i) 본 발명은 다양한 패혈증 유발 미생물을 멀티플렉스 증폭 방식으로 동시에 분류 및 동정할 수 있다.
- [0096] (ii) 본 발명에 따르면, 패혈증 유발 미생물을 고속으로 보다 간편한 방식으로 분류 및 동정할 수 있다.
- [0097] (iii) 본 발명에 따르면, 60 여종이 넘는 패혈증 유발 미생물을 분류 및 동정할 수 있다.
- [0098] (iv) 본 발명에 따르면, 위음성 및 위양성과 같은 오류 데이터 없이 멀티플렉스 증폭 방식으로 패혈증 유발 미생물을 고속으로 분류 및 동정할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0099] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

[0101] **실시예 I: 패혈증-유발 미생물의 분류 검출용 프라이머 디자인 및 제조**

[0102] 본 발명의 기본적인 전략에 따라 분석 대상의 시료에 존재하는 패혈증-유발감염 미생물 총 60종을 멀티플렉스 PCR 방식으로 균류(fungi), 엔테로코커스(*Enterococcus* spp), 그람 음성 박테리아, 스태필로코커스 및 스트렙토코커스로 분류 검출할 수 있는 프라이머를 디자인 하였다. 이러한 분류(classifying)는 증폭산물의 크기의 차이에 의해 된다.

[0103] **I-1: 균류의 분류 검출용 프라이머 디자인 및 제조**

[0104] 균류에 속하는 칸디다 알비칸스, 칸디다 트로피칼리스, 칸디다 파라프실로시스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이 및 아스피길루스 퍼미게투스 등 총 6종의 미생물을 균류로 분류할 수 있는 프라이머는 580 bp의 증폭산물이 생성되도록 디자인 하였다.

[0105] **칸디다 알비칸스 핵산 증폭용 프라이머**

[0106] 칸디다 알비칸스의 *phr1* 유전자 서열에서 발굴된 서열 중 DSO(dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 580 bp의 증폭산물이 나오도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.

[0107] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.

[0108] CA-F AGCCAAGTTTGAATCGTCCACCI I I I IAGTTGAAGTT

[0109] CA-R TTCGTCATCATTGGATGAATAACCI I I I IGAATTTGTCT

[0110] **칸디다 트로피칼리스 핵산 증폭용 프라이머**

[0111] 칸디다 트로피칼리스의 *erg11* 유전자에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 580 bp의 증폭산물이 나오도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다. 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.

[0112] CTr-F GATACTGCCATTGATGGCATCI I I I I TTTCTTATCC

[0113] CTr-R AAATAGTGATTCTGGTTGAGI I I I IATAACACTAG

[0114] **칸디다 파라프실로시스 핵산 증폭용 프라이머**

[0115] 칸디다 파라프실로시스의 *met2*에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 580 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향

(reverse) 프라이머를 디자인하였다. 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.

[0116] CPa-F CAAATCAACAGTTGTGCTGTIIIIAAGATCCAAG

[0117] CPa-R CTTGTAAAGAGTCCAAGATCIIIIITGTATACCC

[0118] **칸디다 글라브라타 핵산 증폭용 프라이머**

[0119] 칸디다 글라브라타의 ssk2에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 580 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다. 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.

[0120] CG-F CCACTTCTAAAGAACCAGIIIIICAATTCGGAT

[0121] CG-R GAGGCCCTTCGACTAGACCTIIIIATGTGCTAGT

[0122] **칸디다 크루세이 핵산 증폭용 프라이머**

[0123] 칸디다 크루세이의 sdh1 유전자에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 580 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다. 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.

[0124] CKr-F ATTATATGACCAGAGAAGCTCIIIIITCGATTATCG

[0125] CKr-R TGTGGAGCATATCTTCCATAIIIIITTCACCTTCA

[0126] **아스퍼길루스 퍼미게터스 핵산 증폭용 프라이머**

[0127] 아스퍼길루스 퍼미게터스의 tyr1 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 580 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.

[0128] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.

[0129] AF-F ACCATACATGCTCCTGTTGIIIIAGTCATTTGA

[0130] AF-R GTTTGGCCGGTACCATGGATIIIIITTC AAGGCTA

[0131] **I-2: 스타필로코커스의 분류 검출용 프라이머 디자인 및 제조**

[0132] 패혈증을 유발하는 그람 양성 박테리아인 스타필로코커스에 속하는 총 18종의 미생물, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticu*, *Staphylococcus hominis* subsp. *hominis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus arlettae*, *Staphylococcus kloosii*, *Staphylococcus gallinarum*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus chromogenes*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus intermedius*을 스타필로코커스 속으로 분류할 수 있는 프라이머는 458 bp의 증폭산물이 생성되도록 디자인 하였다.

[0133] 스타필로코커스의 gap 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO(dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 458 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다. 또한, 사용되는 프라이머의 개수를 줄이기 위하여, 스타필로코커스의 gap 서열에서 보존성 서열을 이용하였다.

[0134] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.

[0135] Staphyl-F1 TGCAAAAAGTTTAAAGTGACGAAIIIIITTTAGTTGA

[0136] Staphyl-F2 TGCTAAAGTATTAATGACGAAIIIIITTTAGTTGA

[0137] Staphyl-F3 TGCTAAAGTTTAAATGATGAGIIIIITTTAGTTGA

[0138] Staphyl-F4 TGCTAAAGTATTAACGATGACIIIIITTTAGTTGA

[0139] Staphyl-F5 TGCTAAAGTTTAAATGATGAAIIIIITTTAGTTGA

- [0140] Staphyl-F6 TGCTAAAGTTTTAAATGGTGACIIIICTTAATCGA
- [0141] Staphyl-F7 TGCTAAAGTACTTAACGATGAAIIIIITTTAGTAGA
- [0142] Staphyl-F8 AGCAAAAACTTTAAATGATGAAIIIIITTTAGTTGA
- [0143] Staphyl-F9 AGCGAAAACATTACACGATGAAIIIIITATTGTTGA
- [0144] Staphyl-F10 TGCAAAAACTTTACACGACGAAIIIIITATTGTTGA
- [0145] Staphyl-F11 TGCAAAAACTTTACAAGACAACIIIIITATCGTTGA
- [0146] Staphyl-R1 GACATTCGTTATCATACTTGCIIIICTTTAACTAA
- [0147] Staphyl-R2 CCCCACTCTTTGTCGTACCTTGCIIIICTTTAACTAA
- [0148] Staphyl-R3 GACATTCGTTATCATACTTGCIIIICTTTAACCAT
- [0149] Staphyl-R4 GACATTCGTTATCATACTTGCIIIICTTTGATTAA
- [0150] Staphyl-R5 CCCCATCTTTGTCGTACCTTGCIIIICTTTAACTAA
- [0151] Staphyl-R6 GACATTCGTTATCATACTTGCIIIIITTTAACTAA

[0152] **I-3: 엔테로코커스의 분류 검출용 프라이머 디자인 및 제조**

[0153] 엔테로코커스에 속하는 *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus avium*, 및 *Enterococcus durans* 등 총 4종의 미생물을 엔테로코커스 속으로 분류할 수 있는 프라이머는 350 bp의 증폭산물이 생성되도록 디자인 하였다. 하기의 2종의 프라이머 세트를 이용하면 *Enterococcus avium* 및 *Enterococcus durans*의 ddl 서열도 증폭된다.

[0154] **엔테로코커스 페에시움 핵산 증폭용 프라이머**

[0155] 엔테로코커스 페에시움의 ddl 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 350 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.

[0156] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.

[0157] EfcI-F CTGAACGATTTAGAATACAGIIIIICAACTTTTG

[0158] EfcI-R TTCCATCTTCCCGTTGGCIIIIITAAAACGTGA

[0159] **엔테로코커스 페칼리스 핵산 증폭용 프라이머**

[0160] 엔테로코커스 페칼리스의 ddl 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 350 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.

[0161] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.

[0162] EfcA-F CGGAAGAAGAAAATCCAGATGIIIIIGAAACGTTAG

[0163] EfcA-R TTGGGAAGTTCTCGTTGCCIIIIICTTCATTAA

[0164] **I-4: 그람 음성 박테리아의 분류 검출용 프라이머 디자인 및 제조**

[0165] 패혈증을 유발하는 그람 음성 박테리아인 *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* 등 총 10 종의 미생물을 그람 음성 박테리아로 분류할 수 있는 프라이머는 200 bp의 증폭산물이 생성되도록 디자인 하였다.

[0166] ***E. coli* 핵산 증폭용 프라이머**

[0167] *E. coli*의 lamB 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 200 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향

(reverse) 프라이머를 디자인하였다.

- [0168] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0169] EC-F GATGATTACTCTGCGCAAACIIIIICTGGCGGTTG
- [0170] EC-R CAGCATAAGTTTCACATTCGIIIIAAGACGGTAT
- [0171] **아시네토박터 바우마니 핵산 증폭용 프라이머**
- [0172] 아시네토박터 바우마니의 trpE 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 200 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0173] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0174] Aba-F GATTGAGCGCTATTCACATGTIIIIATATTGTTTC
- [0175] Aba-R AATAACCAACAGCCCGCCAIIIITCCTCTTTTC
- [0176] **스테노트로포모나스 말토필리아 핵산 증폭용 프라이머**
- [0177] 스테노트로포모나스 말토필리아의 ITS 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 200 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0178] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0179] Sma-F GTACCTGCATTCAGAGAATCIIIIIGGCCAGGCCG
- [0180] Sma-R AGTGCTTTTTCAAAAAGTACGCIIIIGATGTGCGG
- [0181] **슈도모나스 에어루기노사 핵산 증폭용 프라이머**
- [0182] 슈도모나스 에어루기노사의 oprL 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 200 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0183] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0184] Pae-F GTCGAGCTGAAGAAGTAAGAIIIIIITTATGCCAA
- [0185] Pae-R GTTGTCACCCACCTCCGGTIIIIICGCCGCCG
- [0186] **프로테우스 미라빌리스 핵산 증폭용 프라이머**
- [0187] 프로테우스 미라빌리스의 ureR 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 200 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0188] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0189] Pmi-F GTCACCACTAATCTCACGTTGAIIIIIICCTAAATATA
- [0190] Pmi--R GATAGATGATAATCTGGAAGATGIIIIITAATCGGCGC
- [0191] **세라티아 마르세스센스 핵산 증폭용 프라이머**
- [0192] 세라티아 마르세스센스의 gyrB 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 200 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0193] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0194] Smar-F TTAACGCCCTGTCGGAGAAAIIIIIIGCTGGTGATC
- [0195] Smar-R CTGGCCAGAATGTCGTACTIONIIIIITCGGTCACAT

- [0196] **엔테로박터 에어로게네스 핵산 증폭용 프라이머**
- [0197] 엔테로박터 에어로게네스의 ompX 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 200 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0198] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0199] Eae-F GCCGTTGTTCTGGCTGCATCIIIIIGTACTACTGC
- [0200] Eae-R TTGCTGGTGTGTCTTTTTTCGGIIIIIGTGAAGGAAC
- [0201] **엔테로박터 클로아카이 핵산 증폭용 프라이머**
- [0202] 엔테로박터 클로아카이의 ompX 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 200 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0203] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0204] Ecl-F ACGGACTTACTTGAAGCACAI III IGGTGGTTATG
- [0205] Ecl-R GTCTTGCTCGTAACGGTACTII III ITTGAACCGT
- [0206] **클렙시엘라 옥시토카 핵산 증폭용 프라이머**
- [0207] 클렙시엘라 옥시토카의 mdh 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 200 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0208] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0209] Kox-F GGATATTATCCGCTCGAATAI III IGGTGGCGGAAC
- [0210] Kox-R CTCAACGACTTCAGTACCGI III ITTGAATACGT
- [0211] **클렙시엘라 뉴모니에 핵산 증폭용 프라이머**
- [0212] 클렙시엘라 뉴모니에의 lamb 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 200 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0213] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0214] Kpn-F CTAACGTTGCCTATTCCTGII III IGGGAAGATGAC
- [0215] Kpn-R ACCTGCACCCGGCCGAGAI III ICAGTAGTAGA
- [0216] **I-5: 스트렙토코커스의 분류 검출용 프라이머 디자인 및 제조**
- [0217] 폐혈증을 유발하는 스트렙토코커스인 스트렙토코커스 뉴모니에, 스트렙토코커스 아갈락티에, 스트렙토코커스 피오게네스, 스트렙토코커스 미티스, 스트렙토코커스 안기노서스, 스트렙토코커스 고르도나이, 스트렙토코커스 인터메디우스, 스트렙토코커스 오랄리스, 스트렙토코커스 파라산구이니스, 스트렙토코커스 베스티볼라리스, 스트렙토코커스 알락토리티쿠스, 스트렙토코커스 크리세티, 스트렙토코커스 다운에이, 스트렙토코커스 페루스, 스트렙토코커스 갈리나세우스, 스트렙토코커스 하이오인테스티날리스, 스트렙토코커스 루테티엔시스, 스트렙토코커스 마카새, 스트렙토코커스 파라우베리스, 스트렙토코커스 소브리너스, 스트렙토코커스 수이스 등 총 22 종의 미생물을 스트렙토코커스 속으로 분류할 수 있는 프라이머는 145 bp의 증폭산물이 생성되도록 디자인 하였다.
- [0218] 스트렙토코커스의 tuf 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 145 bp의 증폭산물이 생성되도록 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0219] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.

- [0220] Str-F1 CGTGAACACATTCTTCTTTCACI I I I I GTTGGTGTTA
- [0221] Str-F2 CGTGAACATATCCTTCTTTCACI I I I I GTTGGTGTTA
- [0222] Str-F3 CGTGAACACATCTTGCTTTCACI I I I I GTTGGTGTTA
- [0223] Str-R1 CTGGGAAATCATATTCTGAAAGI I I I I CACGGATTTC
- [0224] Str-R2 CTGGGAAGTCATATTCTGACAAI I I I I CACGGATTTC
- [0225] Str-R3 CTGGGAAGTCATATTCTGTAAGI I I I I CACGGATTTC
- [0226] Str-R4 CTGGGAAGTCATATTCTGAAAGI I I I I CACGGATTTC
- [0227] Str-R5 CTGGGAAGTCATATTCTGAAAGI I I I I CACGAATTTC
- [0228] **실시예 II: 패혈증-유발 미생물의 동정용 프라이머 디자인 및 제조**
- [0229] **칸디다 알비칸스 동정용 프라이머**
- [0230] 칸디다 알비칸스 의 phr1 유전자 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0231] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0232] CAI-phr1-F1 AGGTTACAAGGACAGAACTG I I I I I ATCAAGAACT
- [0233] CAI-phr1-R1 GCTATTGATTGAAGCACTGCI I I I I AAATCACAAAG
- [0234] **칸디다 트로피칼리스 동정용 프라이머**
- [0235] 칸디다 트로피칼리스 의 erg11 유전자에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다. 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0236] CTr-erg11-F2 TGAGAATGCACATGCCATTG I I I I I TATTTTCAGA
- [0237] CTr-erg11-R2 AATAATGGGATTTTTCTAGCI I I I I CATGGTGATC
- [0238] **칸디다 파라프실로시스 동정용 프라이머**
- [0239] 칸디다 파라프실로시스의 met2 및 top2 에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0240] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0241] CPa-met2-F1 GTGGGGTCGATTGAACAAACI I I I I AACAACACAT
- [0242] CPa-met2-R1 CTCTGGCTGAAGTCCGTAACI I I I I TACTGTTTTC
- [0243] CPa-top2-F1 GACATCTCCAATTATGACGI I I I I CAAAAAAGG
- [0244] CPa-top2-R1 CCTCTCCTTGATTGCTTTAAI I I I I IATTTCACAT
- [0245] Par-643F-1 GCATTTGCAGTGAGTGATGGI I I I I TTAACCAAGT
- [0246] Par-1061R-1 GCTTCCTACTCCGTCAACTI I I I I CAATGCCTTA
- [0247] **칸디다 클라브라타 동정용 프라이머**
- [0248] 칸디다 클라브라타의 ssk2에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다. 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0249] CG-ssk2-F1 AGCTGTACAGATGAAGTTCAI I I I I ATAAGTTATT

- [0250] CG-ssk2-R2 TTGTTGTAACAAGTAAGAATIIIIICTATGCACCA
- [0251] **칸디다 크루세이 동정용 프라이머**
- [0252] 칸디다 크루세이의 top2 유전자에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다. 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0253] CKr-F1 GTGGAAGAAACGGTTATGGCGIIIIICTTTGTAAC
- [0254] CKr-R1 ACTTTTCATGCCAAACTTGGIIIIITCGGGTTTG
- [0255] **아스퍼길루스 퍼미케터스 동정용 프라이머**
- [0256] 아스퍼길루스 퍼미케터스의 tyr1 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0257] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0258] AF-F2 CTTTATGAGAGACAGGAGTGIIIIACCTAGGAAA
- [0259] AF-tyr1-R1 GAAGGTAGTGCAGCATAATCIIIIITCACGTCGAA
- [0260] **엔테로코커스 페에시움 동정용 프라이머**
- [0261] 엔테로코커스 페에시움의 ddl 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0262] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0263] Efm-F ATCGAAATGCAGATTCCAGCIIIIITGCCAGAAGA
- [0264] Efm-R GATTGACGCTGATGGTATCGIIIIITTCCTAACTG
- [0265] **엔테로코커스 페칼리스 동정용 프라이머**
- [0266] 엔테로코커스 페칼리스의 ace 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0267] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0268] Efs-F AAACAAGTGAAGACAGACACIIIIIAAACCGTAGA
- [0269] Efs-R GATTTGTAGATAACTTACACCTAAAACGGCAAATGTAC
- [0270] **스타필로코커스 에피더미디스 동정용 프라이머**
- [0271] 스타필로코커스 에피더미디스의 fmhB 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0272] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0273] Sep-F CTCGTTTAAAGCCCAACIIIIATGTTCTGAA
- [0274] Sep-R CTCTTCCTGTAAATTAGAIIIIIAGCCAGTATT
- [0275] **스타필로코커스 헤모라이틱쿠스 동정용 프라이머**
- [0276] 스타필로코커스 헤모라이틱쿠스의 fmhA 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.

- [0277] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0278] Sha-F AAACGGATACGTTCTTTGAATTIIIIIAAATGGCCGA
- [0279] Sha-R AAGCGGCAGCTAGATTGAGTGTIIIIICTTCTTCAGC
- [0280] **스타필로코커스 아우레우스 동정용 프라이머**
- [0281] 스타필로코커스 아우레우스의 nuc 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0282] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0283] SA-F GAAGTCGAGTTTGACAAAGGIIIIIGAAGTATAA
- [0284] SA-R TGTCTTCGCTCCAAATATTTIIIIICTCTTTTTTC
- [0285] **엔테로박터 에어로게네스 동정용 프라이머**
- [0286] 엔테로박터 에어로게네스의 ompX 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0287] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0288] Eae-to1C-X CTGCTGAAGGAAGCGAAAACCGCAACCIIIICTGCTGCAGG
- [0289] Eae-to1C-X CGTGTGTTCAGCGCATCAGATCCTGCIIIICAGCGTGCCG
- [0290] **세라티아 마르세스센스 동정용 프라이머**
- [0291] 세라티아 마르세스센스의 chiC 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0292] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0293] Smar-chiC-X CTTTATTGCGCCGCAATATTACAACIIIIICGGCGACGGT
- [0294] Smar-chiC-X CAGTTTCAGCGAGGTGGCGCCAGCIIIIIGACCGTCAGC
- [0295] **클렙시엘라 뉴모니애 동정용 프라이머**
- [0296] 클렙시엘라 뉴모니애의 lamB 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0297] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0298] Kpn-lamB-X TCTCTCTGGCGGCTACCCGTAIIIIIIGAAAGCGGCG
- [0299] Kpn-lamB-X GTTGTATCGATGCTGGTCCCCTGAGIIIIICCGCTGTTC
- [0300] **엔테로박터 클로아카이 동정용 프라이머**
- [0301] 엔테로박터 클로아카이의 ompX 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0302] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0303] Eclo-ompX-X GTTCAACCTTAAGTACCGTTAIIIIIAAGATAACAA
- [0304] Eclo-ompX-X GATCGGGTTGAACTGCATACCAGIIIIITAAGAGAAAC
- [0305] **클렙시엘라 옥시토카 동정용 프라이머**

- [0306] 클렙시엘라 옥시토카의 mdh 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0307] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0308] Kox-mdh-X AATACCACCGTGGCGATTGCI III IAAGTGCTGAA
- [0309] Kox-mdh-X TGTGATAATAAAGGAAGAATAGTTA III ICGCCTGAGTG
- [0310] **슈도모나스 에어루기노사 동정용 프라이머**
- [0311] 슈도모나스 에어루기노사의 algD 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0312] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0313] Paeru-F TATTTGCGAGCGGGACAAACG III IAACTTCCCTC
- [0314] Paeru-R AGTCCAGCACAGCCTTCTG III IGGTGGTGCC
- [0315] **E. coli 동정용 프라이머**
- [0316] E. coli의 lamB 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0317] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0318] Ecol-F TCGACTGCATAAGGAGCCGG III IITAAGCACCCC
- [0319] Ecol-R GGTAGAAGCGCTTACCTG III IATGGTGGAGC
- [0320] **프로테우스 미라빌리스 동정용 프라이머**
- [0321] 프로테우스 미라빌리스의 ureR 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0322] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0323] Pmir-F TTGCTGGCGGTTTATCACGAAG III IGATATCTTA
- [0324] Pmir-R TATTTACGTTTAAATGCGTCI III IAATAAGCATT
- [0325] **스테노트로포모나스 말토필리아 동정용 프라이머**
- [0326] 스테노트로포모나스 말토필리아의 ITS 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0327] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0328] Smal-F TGAGCAAAGACAGCATCGTCI III IGGGCGTCTTC
- [0329] Smal-R TTCGAAAGGGACTTCGGTATACI III IGAACATGGTG
- [0330] **아시네토박터 바우마니 동정용 프라이머**
- [0331] 아시네토박터 바우마니의 trpE 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0332] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0333] Abau-F CGCGTGACGTAATACTGGTGAI III ICACGTCCTAA

- [0334] Abau-R TAAACGTGACTTATCGTATTGIIIIICTTCCACCAC
- [0335] **스트렙토코커스 뉴모니에 동정용 프라이머**
- [0336] 스트렙토코커스 뉴모니에의 ply 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0337] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0338] Spne-F GATACTGTAACGGTAGAGGAIIIIIAACAGAGAGG
- [0339] Spne-R GTTTTTTCATAAACCGTACGCIIIIIITCCCAGGCA
- [0340] **스트렙토코커스 피오게네스 동정용 프라이머**
- [0341] 스트렙토코커스 피오게네스의 rpoB 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0342] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0343] Spyo-F CGATTAACAAGTTTGTGGTGIIIIICTCACTAGGC
- [0344] Spyo-R ACCATCTCAATAAAGCAAGACTIIIIAATGAACATAC
- [0345] **스트렙토코커스 미티스 동정용 프라이머**
- [0346] 스트렙토코커스 미티스의 gyrB 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0347] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0348] Smit-F ATGGTGAAATGGATGATATCAIIIIIGAAGTAGCCATG
- [0349] Smit-R GGAAATCAGAAAAGGCATCACTIIIIIGGCGATTGGT
- [0350] **스트렙토코커스 아갈라티에 동정용 프라이머**
- [0351] 스트렙토코커스 아갈라티에 의 cfa 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0352] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0353] Saga-F TTATTCGCATTTTAGATCCATTIIIIICAGTTGATTC
- [0354] Saga-R TGTGATTGCTTTATTTAAAGTIIIIIAAACTTTAAATTC
- [0355] **실시예 III: 항생제 내성 유전자 동정용 프라이머의 디자인 및 제작**
- [0356] **항생제 내성 유전자 blaSHV 동정용 프라이머**
- [0357] blaSHV 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.
- [0358] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.
- [0359] blaSHV-F GCAGATAAAAATTATAACCACIIIIIAAATCAGCAA
- [0360] blaSHV-R GGGTAGTGGTGTGCGGGCGIIIIIGGGAAGCGCC
- [0361] **항생제 내성 유전자 mecA 동정용 프라이머**
- [0362] mecA 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.

[0363] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.

[0364] mecA-F GCGATAATGGTGAAGTAGAAIIIIITGAACGTC

[0365] mecA-R TAACTGGAACGAAGGTATCATCIIIIICCCAATTTTG

[0366] **항생제 내성 유전자 vanA 동정용 프라이머**

[0367] vanA 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인 하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.

[0368] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.

[0369] vanA-F CCATGTTGATGTAGCATTTTCIIIIITGCATGGCAA

[0370] vanA-R CCTGCTCAATTAAGATTTTGTIIIIATATTGTCTT

[0371] **항생제 내성 유전자 vanB 동정용 프라이머**

[0372] vanB 서열에서 발굴된 서열 중 본 발명의 DSO (dual specificity oligonucleotide) 개념의 프라이머를 디자인 하는데 적합한 서열을 사용하여 전방향 (forward) 및 역방향 (reverse) 프라이머를 디자인하였다.

[0373] 서열에서 I는 디옥시이노신을 나타낸다.

[0374] vanB-F GCTATGCAAGAAGCCATGTIIIIATGGGAAGCC

[0375] vnaB-R AGGCCAGTGATTTGCCATGIIIIITGCGGAGCTT

[0376] **실시예 IV: 병원체 시료의 준비**

[0377] NucleoSpin Blood Prep kit (MACHEREY-NAGEL)을 사용하여 환자의 혈액 2 ml로부터 200 µl DNA를 얻었다.

[0378] **실시예 V: 내부 대조군 (internal control)**

[0379] MTHFR(methylenetetrahydrofolate reductase) 유전자를 내부 대조군으로 사용하였다. MTHFR 유전자의 증폭에 사용하는 프라이머 서열은 다음과 같으며, 증폭 산물의 크기는 904 bp이다.

표 1

[0380]	명칭	서열(5'→3')
	MT-F	TCTCCTCTCAGGTCCAGAACIIIIICAGCGTTGCT
	MT-R	GCCACTGGCCAGAAGCTCCTIIIIAAGGCTCACGG

[0381] **실시예 VI: 패혈증-유발 미생물의 분류용 멀티플렉스 PCR**

[0382] 우선, 환자 혈액에 있는 패혈증-유발 미생물을 분류 검출하기 위한 멀티플렉스 PCR을 실시하였다. 상기 실시예에서 제조된 프라이머 중에서 다음과 같이 프라이머 세트 I 및 II를 준비하였다. 그리고 실시예에서 얻은 환자의 병원체 DNA 시료를 사용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하였다(각 프라이머 세트는 실시예 V의 내부 대조군 증폭용 프라이머를 포함한다).

표 2

[0383] 프라이머 세트 I

병원체 분류	프라이머 쌍	PCR 산물 크기(bp)
균류	<i>Candida albicans</i>	CA-F/CA-R
	<i>Candida tropicalis</i>	CTr-F/CTr-R
	<i>Candida parapsilosis</i>	CPa-F/CPa-R
	<i>Candida glabrata</i>	CG-F/CG-R
	<i>Candida krusei</i>	CKr-F/CKr-R
	<i>Aspergillus fumigatus</i>	AF-F/AF-R

<i>Staphylococcus</i> 속	(Staphyl-F1/Staphyl-F2/Staphyl-F3/Staphyl-F4/Staphyl-F5/Staphyl-F6/Staphyl-F7/Staphyl-F8/Staphyl-F9/Staphyl-F10/Staphyl-F11)/(Staphyl-R1/Staphyl-R2/Staphyl-R3/Staphyl-R4/Staphyl-R5/Staphyl-R6)	458
<i>Enterococcus</i> 속	<i>E. faecium</i>	Efci-F/Efci-R
	<i>E. faecalis</i>	Efca-F/Efca-R

표 3

프라이머 세트 II

병원체 분류	프라이머 쌍	PCR 산물 크기(bp)
그람 음성 박테리아	<i>E. coli</i>	EC-F/EC-R
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Aba-F/Aba-R
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Sma-F/Sma-R
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pae-F/Pae-R
	<i>Proteus mirabilis</i>	Pmi-F/Pmi-R
	<i>Serratia marcescens</i>	Smar-F/Smar-R
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Eae-F/Eae-R
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Ecl-F/Ecl-R
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Kox-F/Kox-R
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kpn-F/Kpn-R
<i>Streptococcus</i> 속	(Str-F1/Str-F2/Str-F3)/(Str-R1/Str-R2/Str-R3/Str-R4/Str-R5)	145

[0385] DNA 시료, dNTP, MgCl₂ 및 Taq 중합효소를 함유하는 25 μl의 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN) 반응 완충액, 10 μl의 프라이머 세트 (I-II)를 포함하는 최종 50 μl의 반응혼합물을 사용하여 멀티플렉스 PCR을 실시하였다. 반응혼합물을 포함하는 튜브를 전가열 (95℃) 된 온도 사이클러 (thermal cycler)에 넣고, 95℃ 15분에서 변성반응시킨 후, 94℃ 30초, 63℃ 1.5분 및 72℃ 1.5분의 40 사이클 처리하고 이어 72℃에서 10분 반응시켰다. PCR 산물은 Screentape System(Lab901)에서 최종 확인하였다.

[0386] 도 1 및 도 2는 환자로부터 얻은 병원체 시료에 본 발명의 프라이머 세트를 사용하여 실시한 패혈증-유발 미생물의 분류용 멀티플렉스 PCR(multiplex PCR) 결과를 나타낸다. 도 1에서 볼 수 있듯이, 환자 1, 2 및 5번에 감염된 미생물은 *Staphylococcus* 속에 박테리아라는 분류를 할 수 있었다. 또한, 도 2에서 볼 수 있듯이, 환자 1, 4 및 5에 감염된 미생물은 그람 음성 박테리아라는 분류를 할 수 있었다.

[0387] 실험 결과, 본 발명에 따르는 경우에는 멀티플렉스 PCR의 조건에서도 위-양성 오류 없이 환자의 시료로부터 패혈증 유발 병원체의 분류를 정확히 할 수 있음을 알 수 있다.

실시예 VII: 패혈증-유발 미생물의 동정용 멀티플렉스 PCR

[0389] 상기 실시예 VI에서 분류된 환자의 패혈증-유발 미생물을 동정하기 위하여, 프라이머 세트 III-VIII을 이용하여 멀티플렉스 PCR를 수행하였다(각 프라이머 세트는 실시예 V의 내부 대조군 증폭용 프라이머를 포함한다).

표 4

[0390] 프라이머 세트 III

병원체	프라이머 쌍	PCR 산물 크기(bp)
<i>Candida albicans</i>	CA1-phr 1-F1/CA1-phr 1-R1	649
<i>Candida tropicalis</i>	CTr-erg11-F2/CTr-erg11-R2	513
<i>Candida parapsilosis</i>	CPa-met2-F1/CPa-met2-R1	410
	CPa-top2-F1/CPa-top2-R1	
	Par-643F-1/Par-1061R-1	
<i>Candida glabrata</i>	CG-ssk2-F1/CG-ssk2-R2	313
<i>Candida krusei</i>	CKr-F1/CKr-R1	216
<i>Aspergillus fumigatus</i>	AF-F2/AF-tyr1-R1	152

표 5

[0391] 프라이머 세트 IV

병원체	프라이머 쌍	PCR 산물 크기(bp)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Efs-F/Efs-R	650
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Sep-F/Sep-R	430
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Sha-F/Sha-R	351
<i>Enterococcus faecium</i>	Efm-F/Efm-R	281
<i>Staphylococcus aureus</i>	SA-F/SA-R	214

표 6

[0392] 프라이머 세트 V

병원체	프라이머 쌍	PCR 산물 크기(bp)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Eae-to1C-F/Eae-to1C-R	603
<i>Serratia marcescens</i>	Smar-chiC-F/Smar-chiC-R	466
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kpn-lamB-F/Kpn-lamB-R	350
<i>Enterobacter cloacae</i>	Ec1o-ompX-F/Ec1o-ompX-R	284
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Kox-mdh-F/Kox-mdh-R	200

표 7

[0393] 프라이머 세트 VI

병원체	프라이머 쌍	PCR 산물 크기(bp)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Paeru-F/Paeru-R	655
<i>Escherichia coli</i>	Ecol-F/Ecol-R	496
<i>Proteus mirabilis</i>	Pmir-F/Pmir-R	335
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Sma1-F/Sma1-R	200
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Abau-F/Abau-R	137

표 8

[0394] 프라이머 세트 VII

병원체	프라이머 쌍	PCR 산물 크기(bp)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Spne-F/Spne-R	683
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Spyo-F/Spyo-R	445

<i>Streptococcus mitis</i>	Smit-F/Smit-R	351
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Saga-F/Saga-R	239

표 9

프라이머 세트 VIII

항생제 내성 타겟 유전자	프라이머 쌍	PCR 산물 크기(bp)
blaSHV	blaSHV-F/blaSHV-R	643
mecA	mecA-F/mecA-R	480
vanA	vanA-F/vanA-R	359
vanB	vanB-F/vanB-R	256

[0395] DNA 시료, dNTP, MgCl₂ 및 Taq 중합효소를 함유하는 25 μl의 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN) 반응 완충액, 10 μl의 프라이머 세트 (III-VIII)를 포함하는 최종 50 μl의 반응혼합물을 사용하여 멀티플렉스 PCR을 실시하였다. 반응혼합물을 포함하는 튜브를 전가열 (95℃) 된 온도 사이클러 (thermal cycler)에 넣고, 95℃ 15분에서 변성반응시킨 후, 94℃ 30초, 63℃ 1.5분 및 72℃ 1.5분의 40 사이클 처리하고 이어 72℃에서 10분 반응시켰다. PCR 산물은 Screentape System(Lab901)에서 최종 확인하였다.

[0397] 도 3은 균류에 속하는 칸디다 알비칸스, 칸디다 트로피칼리스, 칸디다 파라프실로시스, 칸디다 글라브라타, 칸디다 크루세이 및 아스퍼길루스 퍼미게터스 등 총 6종의 미생물을 정확하게 동정할 수 있는 프라이머 8쌍을 이용하여 멀티플렉스 PCR을 한 결과이다. 실험 결과, 도 3에서는 어떠한 균류 밴드도 관찰되지 않았으며, 이는 도 1의 실험 결과와 일치하는 것이다.

[0398] 도 4는 스태필로코커스에 속하는 *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, 및 *Staphylococcus haemolyticus*, 엔테로코커스에 속하는 *Enterococcus faecium* 및 *Enterococcus faecalis* 등 총 5종의 미생물을 정확하게 동정할 수 있는 프라이머 5쌍을 이용하여 멀티플렉스 PCR을 한 결과이다. 실험 결과, 도 4에서 1번 환자의 경우 *Staphylococcus epidermidis*에 감염이 되어 있고, 5번 환자의 경우 *Enterococcus faecalis* 및 *Staphylococcus aureus*에 감염이 되어 있음을 알 수 있다. 즉, 도 1의 실험 결과에서 1번 환자의 경우 감염 미생물이 *Staphylococcus* 속 미생물로 분류 되었고, 도 4의 실험 결과 이 *Staphylococcus* 속 미생물은 정확하게 *Staphylococcus epidermidis*임이 동정되었다. 또한, 도 1의 실험 결과에서 5번 환자의 경우 감염 미생물이 *Staphylococcus* 속 미생물로 분류 되었고, 도 4의 실험 결과 이 *Staphylococcus* 속 미생물은 정확하게 *Staphylococcus aureus*임이 동정되었다.

[0399] 도 5는 그람 음성 박테리아에 속하는 *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, 등 총 5종의 미생물을 정확하게 동정할 수 있는 프라이머 5쌍을 이용하여 멀티플렉스 PCR을 한 결과이다. 실험 결과, 도 5에서 1번 환자의 경우 *Enterobacter cloacae*에 감염이 되어 있음을 알 수 있다. 즉, 도 2의 실험 결과에서 1번 환자의 경우 감염 미생물이 그람 음성 박테리아로 분류 되었고, 도 5의 실험 결과 이 그람 음성 박테리아가 정확하게 *Enterobacter cloacae*임이 동정되었다.

[0400] 도 6은 그람 음성 박테리아에 속하는 *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acinetobacter baumannii* 등 총 5종의 미생물을 정확하게 동정할 수 있는 프라이머 5쌍을 이용하여 멀티플렉스 PCR을 한 결과이다. 실험 결과, 도 6에서 1번 환자의 경우 *Acinetobacter baumannii*에 감염 되었고, 5번 환자의 경우 *Pseudomonas aeruginosa*에 감염 되었음을 알 수 있다. 즉, 도 2의 실험 결과에서 1번 및 5번 환자의 경우 감염 미생물이 그람 음성 박테리아로 분류 되었고, 도 6의 실험 결과 이 그람 음성 박테리아가 정확하게 각각 *Acinetobacter baumannii* 및 *Pseudomonas aeruginosa*임이 동정되었다.

[0401] 도 7은 스트렙토코커스에 속하는 *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus mitis* 등 총 4종의 미생물을 정확하게 동정할 수 있는 프라이머 4쌍을 이용하여 멀티플렉스 PCR을 한 결과이다. 실험 결과, 도 7에서는 어떠한 균류 밴드도 관찰되지 않았으며, 이는 도 2의 실험 결과와 일치하는 것이다.

[0402] 도 8은 항생제 내성 유전자인 blaSHV, mecA, vanA 및 vanB를 동정할 수 있는 프라이머 4쌍을 이용하여 멀티플렉스 PCR을 한 결과이다. 실험 결과, 1-3번 및 5번 환자의 병원체는 mecA 내성 유전자, 4번 환자의 병원체는

blaSHV 내성 유전자를 갖는다는 것을 알 수 있다.

[0403] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0404] 도 1은 5명의 환자로부터 얻은 병원체 시료에 본 발명의 패혈증-유발 미생물군 분류용 프라이머 세트 I를 사용하여 실시한 멀티플렉스 PCR(multiplex PCR) 결과를 나타낸다. 위쪽 패널은 SreenTape™의 소프트웨어로 분석된 멀티플렉스 PCR 결과를 보여주며, “+”는 증폭이 되었다는 표시이다. 아래쪽 패널은 SreenTape™에서 전기영동한 결과를 보여주며, 화살표 머리는 밴드가 형성된 가리킨다. 1-5: 환자 번호, N: 음성 대조군.

[0405] 도 2는 5명의 환자로부터 얻은 병원체 시료에 본 발명의 패혈증-유발 미생물군 분류용 프라이머 세트 II를 사용하여 실시한 멀티플렉스 PCR(multiplex PCR) 결과를 나타낸다. 1-5: 환자 번호, N: 음성 대조군.

[0406] 도 3은 5명의 환자로부터 얻은 병원체 시료에 본 발명의 패혈증-유발 미생물군 동정용 프라이머 세트 III을 사용하여 실시한 멀티플렉스 PCR(multiplex PCR) 결과를 나타낸다. 1-5: 환자 번호, N: 음성 대조군.

[0407] 도 4는 5명의 환자로부터 얻은 병원체 시료에 본 발명의 패혈증-유발 미생물군 동정용 프라이머 세트 IV을 사용하여 실시한 멀티플렉스 PCR(multiplex PCR) 결과를 나타낸다. 1-5: 환자 번호, N: 음성 대조군.

[0408] 도 5는 5명의 환자로부터 얻은 병원체 시료에 본 발명의 패혈증-유발 미생물군 동정용 프라이머 세트 V을 사용하여 실시한 멀티플렉스 PCR(multiplex PCR) 결과를 나타낸다. 1-5: 환자 번호, N: 음성 대조군.

[0409] 도 6은 5명의 환자로부터 얻은 병원체 시료에 본 발명의 패혈증-유발 미생물군 동정용 프라이머 세트 VI을 사용하여 실시한 멀티플렉스 PCR(multiplex PCR) 결과를 나타낸다. 1-5: 환자 번호, N: 음성 대조군.

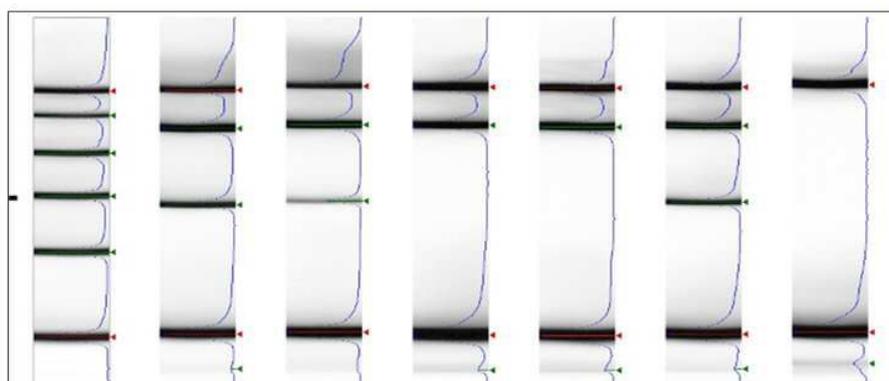
[0410] 도 7은 5명의 환자로부터 얻은 병원체 시료에 본 발명의 패혈증-유발 미생물군 동정용 프라이머 세트 VII을 사용하여 실시한 멀티플렉스 PCR(multiplex PCR) 결과를 나타낸다. 1-5: 환자 번호, N: 음성 대조군.

[0411] 도 8은 5명의 환자로부터 얻은 병원체 시료에 본 발명의 항생제 내성 유전자를 증폭하기 위한 프라이머 세트 VIII을 사용하여 실시한 멀티플렉스 PCR(multiplex PCR) 결과를 나타낸다. 1-5: 환자 번호, N: 음성 대조군.

도면

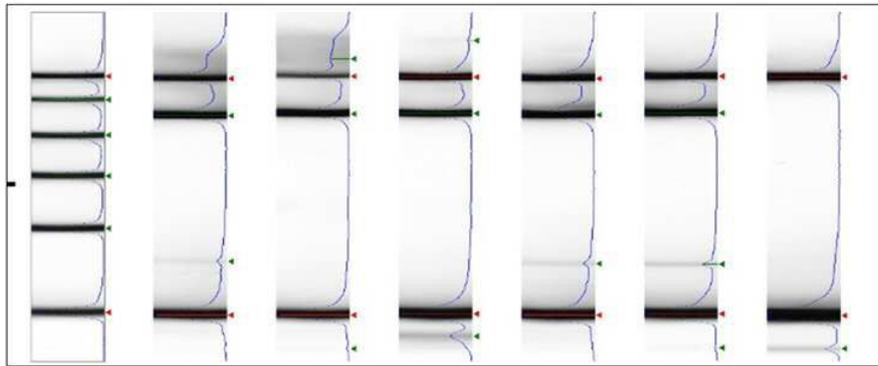
도면1

Sample ID	1	2	3	4	5	N
Internal control	+	+	+	+	+	
Fungi						
Staphylococcus	+	+			+	
Enterococcus						
Unidentified	0	0	0	0	0	0



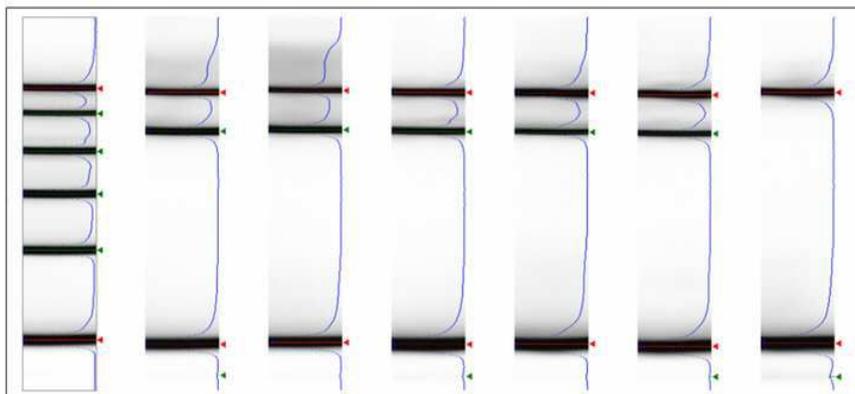
도면2

Sample ID	1	2	3	4	5	N
Internal control	+	+	+	+	+	+
Gram (-) bacteria	+	-	-	+	+	-
Streptococcus	-	+	+	-	-	+
Unidentified	0	0	0	0	0	0

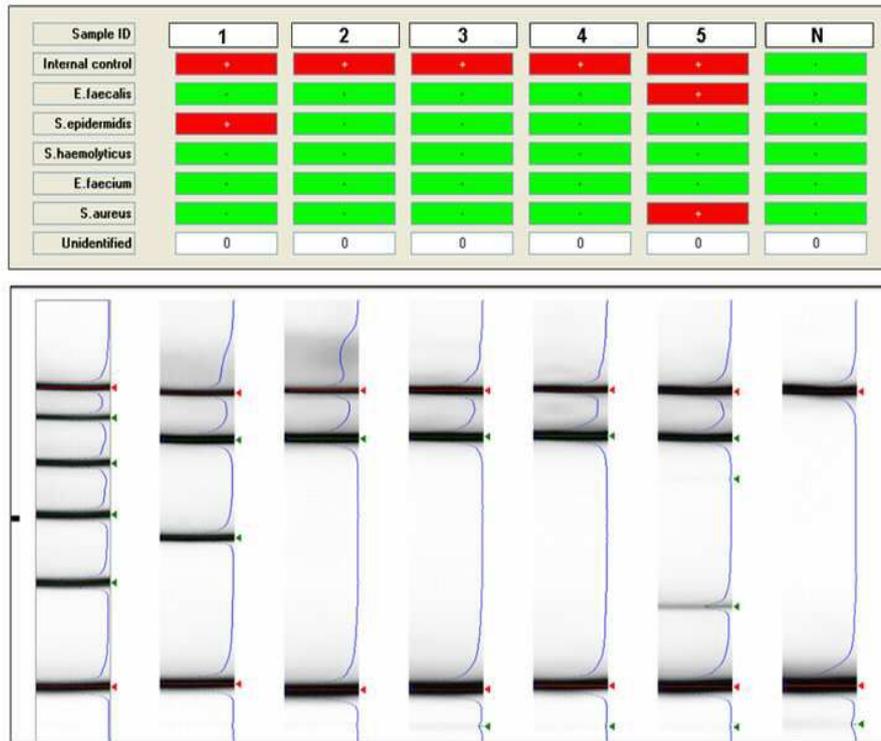


도면3

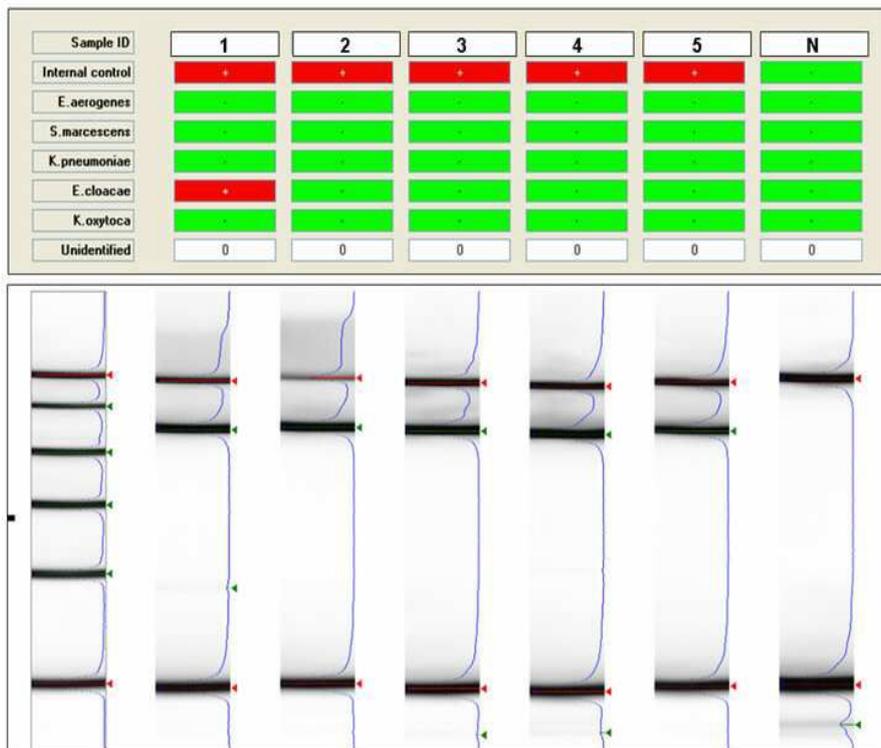
Sample ID	1	2	3	4	5	N
Internal control	+	+	+	+	+	+
C. albicans	-	-	-	-	-	-
C. tropicalis	-	-	-	-	-	-
C. parapsilosis	-	-	-	-	-	-
C. glabrata	-	-	-	-	-	-
C. krusei	-	-	-	-	-	-
A. fumigatus	-	-	-	-	-	-
Unidentified	0	0	0	0	0	0



도면4



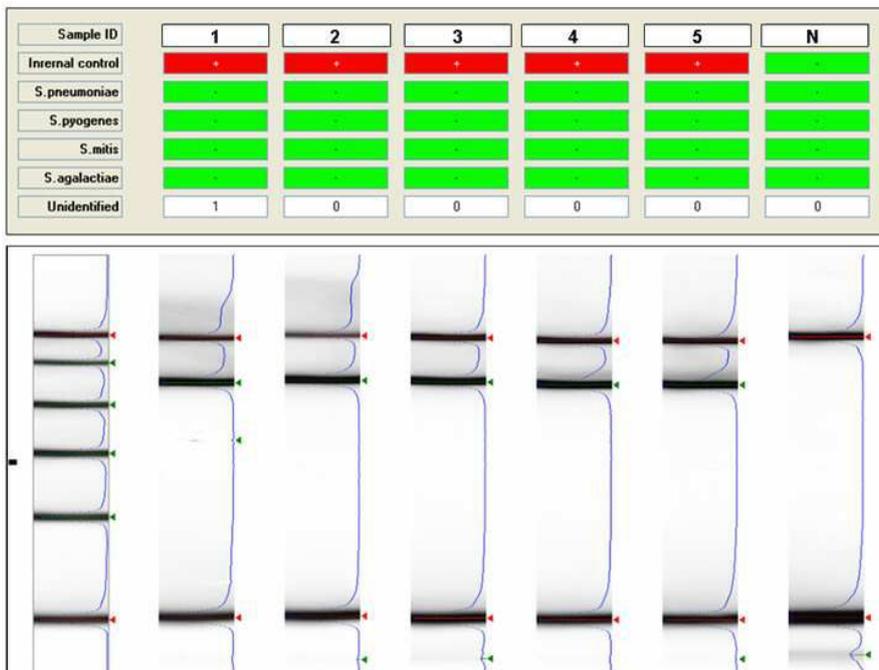
도면5



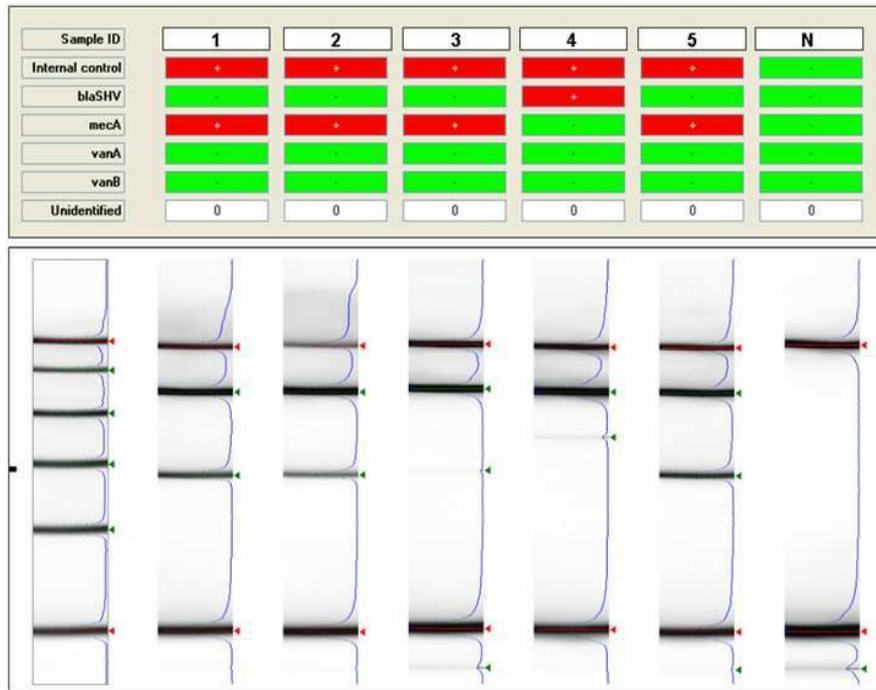
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Seegene, Inc.
- <120> Methods for Classifying and Identifying Sepsis-Causing Microorganisms

- <160> 125

- <170> KopatentIn 1.71

- <210> 1
- <211> 37
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

- <220>
- <223> CA-F

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (23)..(27)
- <223> n denotes deoxyinosine

<400> 1
 agccaagttt gaatcgtcca ccnnnnnagt tgaagtt 37

<210> 2
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CA-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (25)..(29)
 <223> n denotes deoxinosine

<400> 2
 ttcgtcatca ttgatgaat aaccnnnng aattgtct 39

<210> 3
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CTr-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(26)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 3
 gatactgcca ttgatggcat cnnnnnttc ttatcc 36

<210> 4
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CTr-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(26)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 4
 aaatagtgat ttctggttga gnnnnataa cactag

36

<210> 5
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CPa-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 5
 caaatcaaca gttgtgctgt nnnnaagat ccaag

35

<210> 6
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CPa-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 6
 cttgtaaaga gtccaagatc nnnnnttgta taccc 35

<210> 7
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CG-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 7
 ccacttctaa agaacaccag nnnncaatt cggat 35

<210> 8
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CG-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 8
 gaggccttc gactagacct nnnnatgtg ctagt 35

<210> 9
 <211> 36
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CKr-F

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(26)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 9

attatatgac cagagaagct cnnnntcga ttatcg

36

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CKr-R

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(26)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 10

tgtggagcat atctttccat amnnnttca cttca

36

<210> 11

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AF-F

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(25)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 11

accatacatg ctctgtttg nnnnagtca ttga

35

<210> 12

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AF-R

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(25)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 12

gtttggccgg taccatggat nnnnttcaa ggcta

35

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Staphyl-F1

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(27)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 13

tgcaaaagtt ttaagtgacg aannnnttt agttga

36

<210> 14

<211> 36

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Staphyl-F2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 14
 tgctaaagta ttaatgacg aannnnttt agtga

36

<210> 15
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Staphyl-F3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 15
 tgctaaagtt ttaatgatg agnnnnnttt agtga

36

<210> 16
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Staphyl-F4

<220>
 <221> misc_feature

<222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 16
 tgctaaagta ttaaacgatg acnnnnnttt agttga

36

<210> 17
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Staphyl-F5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 17
 tgctaaagtt ttaatgatg aannnnttt agttga

36

<210> 18
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Staphyl-F6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 18
 tgctaaagtt ttaatggtg acnnnncttt aatcga

36

<210> 19

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

<220>
 <223> Staphyl-F7

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 19
 tgctaaagta cttaacgatg aannnnttt agtaga

36

<210> 20
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Staphyl-F8

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 20
 agcaaaaact ttaatgatg aannnnttt agttga

36

<210> 21
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Staphyl-F9

<220>

<221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 21
 agcgaaaaca ttacacgatg aannnntat tgttga

36

<210> 22
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Staphyl-F10

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 22
 tgcaaaaact ttacacgacg aannnntat tgttga

36

<210> 23
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Staphyl-F11

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 23
 tgcaaaaact ttacaagaca acnnnntat cgttga

36

<210> 24
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Staphyl-R1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(28)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 24
 gacatttcgt tatcatacct tgcnnnnct ttaactaa

38

<210> 25
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Staphyl-R2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(28)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 25
 cccactctt tgtctacct tgcnnnnct ttaactaa

38

<210> 26
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Staphyl-R3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(28)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 26
 gacatttcgt tatcatacct tgcnnnnct ttaacat

38

<210> 27
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Staphyl-R4

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(28)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 27
 gacatttcgt tatcatacct tgcnnnnct ttgattaa

38

<210> 28
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Staphyl-R5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(28)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 28
 cccattctt tgtcgtacct tgcnnnnct ttaactaa

38

<210> 29
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Staphyl-R6

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(28)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 29
 gacatttcgt tatcatacct tgcnnnmntt ttaactaa

38

<210> 30
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Efcf-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 30
 ctgaacgatt tagaatacag nnnncaatc ttttg

35

<210> 31
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Efcf-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 31
 ttccatcttc cccgtttggc nnnnntaaaa ctgga

35

<210> 32
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Efca-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(26)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 32
 cggaagaaga aaatccagat gnnnnngaaa cgtag

36

<210> 33
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Efca-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 33

ttgggaagtt ctcgttgcc nnnncttca tttaa

35

<210> 34
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> EC-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 34
 gatgattact ctgcgcaaac nnnnctggc ggttg

35

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

<220>
 <223> EC-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 35
 cagcataagt ttcacattcg nnnnaagac ggtat

35

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

<220>

<223> Aba-F

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(26)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 36

gattgagcgc tattcacatg tnnnnnatat tgtttc

36

<210> 37

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Aba-R

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(25)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 37

aataaccaac agccccgcca nnnntcctc ttttc

35

<210> 38

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sma-F

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(25)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 38
gtacctgcat tcagagaatc nnnnnggcca ggccg 35

<210> 39
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sma-R

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(27)
<223> n denotes deoxyinosine

<400> 39
agtgcttttt caaaaagtac gcnnnngat gtgcgg 36

<210> 40
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Pae-F

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(25)
<223> n denotes deoxyinosine

<400> 40
gtcgagctga agaagtaaga nnnnnttatg cccaa 35

<210> 41
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Pae-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 41
 gttgtcacc cactcggg nnnncccg ccg

33

<210> 42
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Pmi-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 42
 gtcaccacta atctcagtt gannnncct aatatata

37

<210> 43
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Pmi--R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (24)..(28)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 43
gatagatgat aatctggaag atgnnnnnta atcggcgc 38

<210> 44
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Smar-F

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(25)
<223> n denotes deoxyinosine

<400> 44
ttaacgcct gtcggagaaa nnnnngctgg tgatc 35

<210> 45
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Smar-R

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(25)
<223> n denotes deoxyinosine

<400> 45
cttgccaga atgtctact nnnntcggc cacat 35

<210> 46
<211> 35
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Eae-F

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(25)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 46

gccgttggtc tggctgcac nnnnngtact actgc

35

<210> 47

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Eae-R

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(27)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 47

ttgctggtgt tgccttttc gnnnnngtg aaggaac

37

<210> 48

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Ecl-F

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(25)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 48
acggacttac ttgaagcaca nnnnnggtgg ttatg

35

<210> 49
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Ecl-R

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(25)
<223> n denotes deoxyinosine

<400> 49
gtcttgctcg taacgtact nnnnttgaa accgt

35

<210> 50
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Kox-F

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(25)
<223> n denotes deoxyinosine

<400> 50
ggatattatc cgctcgaata nnnnngtggc ggaac

35

<210> 51
<211> 35

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Kox-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 51
 cttcaacgac ttcagtaccg nnnnnttgaa tacgt

35

<210> 52
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Kpn-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 52
 ctaacgttgc ctattccgtg nnnnnggaag atgac

35

<210> 53
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Kpn-R

<220>
 <221> misc_feature

<222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 53
 acctgcaccc gggccggaga nnnnncagta gtaga 35

<210> 54
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Str-F1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 54
 cgtgaacaca ttcttctttc acnnnnngtt ggtgta 37

<210> 55
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Str-F2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 55
 cgtgaacata tccttctttc acnnnnngtt ggtgta 37

<210> 56

<211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Str-F3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 56
 cgtgaacaca tcttgcttc acnnnngtt ggtgta

37

<210> 57
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Str-R1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 57
 ctgggaaatc atattctgaa agnnnnncac ggatttc

37

<210> 58
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Str-R2

<220>

<221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 58
 ctgggaagtc atattctgac aannnnncac ggatttc

37

<210> 59
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Str-R3

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 59
 ctgggaagtc atattctgta agnnnnncac ggatttc

37

<210> 60
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Str-R4

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 60
 ctgggaagtc atattctgaa agnnnnncac ggatttc

37

<210> 61
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Str-R5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 61
 ctgggaagtc atattctgaa agnnnnncac gaatttc

37

<210> 62
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CA1-phr1-F1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 62
 aggttacaag gacagaactg nnnnatcaa gaact

35

<210> 63
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CA1-phr1-R1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 63
 gctattgatt gaagcactgc nnnnnaaatc acaag

35

<210> 64
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CTr-erg11-F2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 64
 tgagaatgca catgccattg nnnntattt tcaga

35

<210> 65
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CTr-erg11-R2

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 65
 aataatggga tttttctagc nnnnncatgg tgatc

35

<210> 66
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CPa-met2-F1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 66
 gtggggtcga ttgaacaac nnnnaacaa cacat

35

<210> 67
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CPa-met2-R1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 67
 ctctggctga agtccgtaac nnnntactg ttttc

35

<210> 68
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CPa-top2-F1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 68
 gacatcttc aattatgacg nnnncaaaa aaagg

35

<210> 69
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CPa-top2-R1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 69
 cctctccttg attgctttaa nnnnatttc aacat

35

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

<220>
 <223> Par-643F-1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 70

gcatttcag tgagtgatgg nnnnttaac caagt

35

<210> 71
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Par-1061R-1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 71
 gcttcctact tccgtcaact nnnncaatg cctta

35

<210> 72
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> CG-ssk2-F1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 72
 agctgtacag atgaagtca nnnnataag ttatt

35

<210> 73
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> CG-ssk2-R2

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(25)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 73

ttgttgtaac aagtaagaat nnnnctatg cacca

35

<210> 74

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CKr-F1

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(26)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 74

gtggaagaaa cgttatggc gnnnncttt gtaac

35

<210> 75

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CKr-R1

<220>

<221> misc_feature

<222> (22)..(26)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 75
acttttccat gccaaacttg gnnnnntcgg gtttg 35

<210> 76
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AF-F2

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(25)
<223> n denotes deoxyinosine

<400> 76
ctttatgaga gacaggagtg nnnnaccta ggaaa 35

<210> 77
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AF-tyr1-R1

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(25)
<223> n denotes deoxyinosine

<400> 77
gaaggtagtg cagcataatc nnnntcagc tcgaa 35

<210> 78
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Efm-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 78
 atcgaaatgc agattccagc nnnnntgcca gaaga

35

<210> 79
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Efm-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 79
 gattgacgct gatggtatcg nnnnnttcct aactg

35

<210> 80
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Efs-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 80
aaacaagtga aaagacagac acnnnnnaaa ccgtaga 37

<210> 81
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Efs-R

<400> 81
gatttgtaga taacttacac ctaaacggc aatgtac 38

<210> 82
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sep-F

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(25)
<223> n denotes deoxyinosine

<400> 82
ctcgtttaa agcccacaac nnnnatggt ctgaa 35

<210> 83
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sep-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 83
 ctcttccttg ttaaattaga nnnnagcca gtatt

35

<210> 84
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sha-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 84
 aaacggatac gttctttgaa tnnnnnaaa tggccga

37

<210> 85
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Sha-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 85
 aagcgcagc tagattgagt gtnnnnctt cttcagc

37

<210> 86
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SA-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 86
 gaagtcgagt ttgacaaagg nnnnngaact gataa

35

<210> 87
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> SA-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 87
 tgtcttcgct ccaaataatt nnnnctctt ttttc

35

<210> 88
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Eae-tolC-X

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(33)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 88
 ctgctgaagg aagcggaaaa cgcgaaccnn nnctgctgc agg

43

<210> 89
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Eae-toIC-X

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(33)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 89
 cgtgttgttc agcgcgatca gatcctgcnn nncagcgtg ccg

43

<210> 90
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Smar-chiC-X

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(30)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 90

ctttattgcg ccgcaatatt acaacnnnnn cggcgacggt

40

<210> 91
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Smar-chiC-X

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(30)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 91
 cagtttcagc gagtggcgc ccagcnnnnn gaccgtcagc

40

<210> 92
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Kpn-lamB-X

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(26)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 92
 tctctctggc ggctaccgt annnnngaaa gcggcg

36

<210> 93
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Kpn-lamB-X

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)..(31)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 93

gttggtatcg atgctgggcc cctgagnnnn nccgtgttc c

41

<210> 94

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Eclo-ompX-X

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(27)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 94

gtttcaacct taagtaccgt tannnnaag ataaca

37

<210> 95

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Eclo-ompX-X

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(28)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 95
gatcgggttg aactgcatac cagnnnnnta agagaaac 38

<210> 96
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Kox-mdh-X

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(25)
<223> n denotes deoxyinosine

<400> 96
aataccaccg tggcgattgc nnnnaagtg ctgaa 35

<210> 97
<211> 40
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Kox-mdh-X

<220>
<221> misc_feature
<222> (26)..(30)
<223> n denotes deoxyinosine

<400> 97
tgtgataata aaggaagaat agttannnnn cgctgagtg 40

<210> 98
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Paeru-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 98
 tatttcgca ggggacaaa cgmnnaac ttcctc

37

<210> 99
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Paeru-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 99
 agtcagcac agccttcttg nnnnggtg tgcc

34

<210> 100
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Ecol-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 100
tcgactgcat aaggagccgg nnnnntaagc acccc 35

<210> 101
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Ecol-R

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)..(23)
<223> n denotes deoxyinosine

<400> 101
ggtagaagcg cttacctgmn nnnatggtgg agc 33

<210> 102
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Pmir-F

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(27)
<223> n denotes deoxyinosine

<400> 102
ttgctggcgg tttatcacga agnnnnngat attctta 37

<210> 103
<211> 35
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Pmir-R

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(25)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 103

tatttacggt taaatgcgtc nnnnaataa gcatt

35

<210> 104

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Smal-F

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(25)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 104

tgagcaaaga cagcatcgtc nnnnngggcg tcttc

35

<210> 105

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Smal-R

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(27)

<223> n denotes deoxyinosine

<400> 105
ttcgaaggg acttcggtat acnnnnngaa catggtg

37

<210> 106
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Abau-F

<220>
<221> misc_feature
<222> (23)..(27)
<223> n denotes deoxyinosine

<400> 106
cgcgtgtacg taatactggt gannnnncac gtcttaa

37

<210> 107
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Abau-R

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(26)
<223> n denotes deoxyinosine

<400> 107
taaactgac ttatctgatt gnnnnncttc caccac

36

<210> 108
<211> 35

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Spne-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 108
 gatactgtaa cggtagagga nnnnaacag agagg

35

<210> 109
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Spne-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(26)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 109
 gtttttcat aaaccgtacg cnnnnttcc caggca

36

<210> 110
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Spyo-F

<220>
 <221> misc_feature

<222> (22)..(26)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 110
 cgattaaaca agtttgggt gnnnnctca ctaggc

36

<210> 111
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Spyo-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 111
 accatctcaa taaagcaaga ctnnnnaat gaacatac

38

<210> 112
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Smit-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(26)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 112
 atggtgaaat ggatgatatc annnnngaag tagccatg

38

<210> 113

<211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Smit-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 113
 ggaaatcaga aaagcatca ctnnnnggc gattggt

37

<210> 114
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Saga-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 114
 ttattcgcat ttagatcca ttnnnncag ttgattc

37

<210> 115
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Saga-R

<220>

<221> misc_feature
 <222> (22)..(26)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 115
 tgtgattgct ttatttaaag tnnnnnaaac tttaaattc

39

<210> 116
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> blaSHV-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 116
 gcagataaaa ttataaccac nnnnnaaatc agcaa

35

<210> 117
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> blaSHV-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 117
 gggtagtggg gtcgcgggcg nnnnngggaa gcgcc

35

<210> 118
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mecA-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 118
 gcgataatgg tgaagtagaa nnnnntgaac gtccg

35

<210> 119
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> mecA-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (23)..(27)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 119
 taactggaac gaaggtatca tcnnnnccc aatattg

37

<210> 120
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> vanA-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(26)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 120
 ccatgttgat gtagcatttt cnnnnntgca tggcaa

36

<210> 121
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> vanA-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (22)..(26)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 121
 cctgctcaat taagattttt gnnnnnatat tgtctt

36

<210> 122
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> vanB-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(24)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 122
 gctatgcaag aagccatgtn nnnnatggga agcc

34

<210> 123
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> vnaB-R

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 123
 aggccagtga tttgtccatg nnnnmtgcgg agctt

35

<210> 124
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> MT-F

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(25)
 <223> n denotes deoxyinosine

<400> 124
 tctcctctca ggtccagaac nnnnncagcg ttgct

35

<210> 125
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> MT-R

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(25)
<223> n denotes deoxyinosine

<400> 125
gccactggcc agaagctcct nnnnnagget cacgg

35