

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국(43) 국제공개일
2013년 7월 4일 (04.07.2013)(10) 국제공개번호
WO 2013/100495 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/04 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2012/011245
- (22) 국제출원일: 2012년 12월 21일 (21.12.2012)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2011-0144486 2011년 12월 28일 (28.12.2011) KR
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 151-742 서울시 관악구 신림동 산 56-1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 권혁준 (KWON, Hyuk-Joon); 151-780 서울시 관악구 인현동 은천아파트 102동 201호, Seoul (KR). 김태은 (KIM, Tae-Eun); 448-534 경기도 용인시 수지구 신봉동 911 LG 자이 2차아파트 205동 1803호, Gyeonggi-do (KR). 김재홍 (KIM, Jae-Hong); 151-742 서울시 관악구 관악로 599 서울대학교 수의과대학 조류질병실, Seoul (KR). 박미선 (PARK, Mi-Sun); 151-742 서울시 서초구 반포동 2-1 신반포아파트 3동 206

호, Seoul (KR). 이덕용 (LEE, Deog-Yong); 361-858 충청북도 청주시 흥덕구 비하동 계룡리슈빌 204동 403호, Chungcheongbuk-do (KR).

(74) 대리인: 유미특허법인 (YOU ME PATENT AND LAW FIRM); 135-080 서울시 강남구 역삼동 649-10 서림빌딩, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

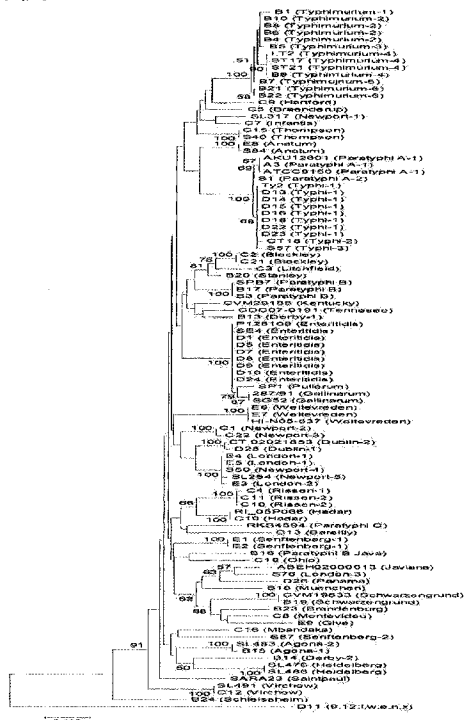
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PRIMER FOR MOLECULAR IDENTIFICATION OF *SALMONELLA* SEROTYPE, AND IDENTIFICATION METHOD OF *SALMONELLA* SEROTYPE USING SAME

(54) 발명의 명칭: 살모넬라 혈청형의 분자적 동정을 위한 프라이머 및 이를 이용한 살모넬라 혈청형 동정 방법

[Fig. 1]





ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를
접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙
48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 살모넬라 혈청형의 분자적 동정을 위한 프라이머 및 이를 이용한 살모넬라 혈청형 동정 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 RNA중합효소 베타 서브유닛 (rpoB) 유전자의 전체 염기서열을 이용하여 식중독의 주요 원인인 살모넬라의 혈청형을 동정하는 기술에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 살모넬라 속 미생물의 rpoB 유전자의 전체 염기서열을 분석하여 살모넬라 속 미생물의 혈청형을 동정하는 방법, 살모넬라 속 미생물의 rpoB 유전자의 전체 염기서열을 증폭하기 위한 프라이머 및 염기서열을 결정하기 위한 프라이머, 상기 프라이머를 포함하는 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 조성물 및 키트, 그리고 주요 살모넬라 속 미생물의 혈청형에 특이적인 rpoB 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 본 발명은 기존의 항혈청을 이용한 살모넬라 혈청형 동정법을 대체할 수 있는 분자 동정법으로 유용하게 사용될 수 있다.

배경기술

- [2] 살모넬라는 국내외에서 가장 빈발하는 식중독 원인균 중 하나로, 최근 단체급식의 증가로 인해 건당 환자수가 증가하면서, 공중보건학적으로 중요한 병원체로 인식되고 있다. 살모넬라 속 균은 DNA-DNA 교잡법에 의해 단일한 균을 이루고 있으며, 대장균과는 99%의 상동성을 보이며, 현재 세계보건기구 (WHO) 협력 센터의 제안에 따라 두 개의 종 (species) [*Salmonella enterica*와 *Salmonella bongori* (V)] 및 여섯 개의 아종 (subspecies) [*Salmonella enterica* subsp. *enterica* (I), *Salmonella enterica* subsp. *salamae* (II), *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* (IV), *Salmonella enterica* subsp. *indica* (VI)] 으로 분류되고 있다.
- [3] 살모넬라의 혈청형은 현재까지 균체항원 (Somatic antigen; O)과 편모항원 (Phase I, II flagellin; H)에 기초한 Kaufmann-White 분류법에 의해 O 혈청형 46개와 H 혈청형 114개가 확인되었고, 총 2,523개의 다양한 혈청형이 동정되었다. 살모넬라 혈청형의 동정은 역학 연구에 있어 가장 기본이 되는데, 전통적인 혈청학적 방법을 적용하기 위해서는 혈청형 동정을 위한 모든 혈청을 확보하고 있어야 하며 새로운 혈청형이 출현하는 경우 그에 대한 항혈청을 확보해야 하므로, 소수의 공인된 실험실에서만 동정이 이루어지며 발현되는 표현형에 따라 결과가 다르게 나타날 수 있다 (Andrews WH, et al., 1992, *Salmonella*, in FDA Bacteriological Analytical Manual ed. Tomlinson, L. pp.51-69. Arlington, VA :AOAC International.; Desmonts C., et al., 1990, *Appl Environ Microbiol* 56:1448-1452.). 또한, 동정이 안 되는 분리주의 경우 파스퇴르 연구소에 의뢰하여 혈청형을 동정해야 하는 번거로움이 있다.

- [4] 이에, 기존의 항혈청에 의한 동정법을 대체할 수 있는 살모넬라 혈청형 동정법을 개발하기 위한 다양한 연구가 이루어지고 있다. 일 예로, LPS (Lipopolysaccharide)에 대한 ELISA 검출법이 소개되었으며 (Rigby CE. 1984. Appl Environ Microbiol 47:1327-1330), 여러 가지 O 항원에 대한 단클론항체를 이용한 동정법도 소개되었으나 (Araj GF, et al., 1987, J Clin Microbiol 25: 2150-2153; Lee HA, et al., 1990, Appl Environ Microbiol 56: 1541-1546.; Torensma R, et al., 1992. Appl Environ Microbiol 58:3868-3872.), 다수의 단클론항체가 요구되며 교차반응이 나타나는 경우도 있어 기존의 혈청형 검사법 대비 차별성이 없는 문제가 있다.
- [5] 최근에는 분자생물학적 기술의 발달로, 생화학적 성상에 기초한 기존의 분류법 외에도 유전자 염기서열에 기초한 분자 분류법이 대두되고 있는데, 대표적으로 세균부터 동식물의 세포까지 모두 존재하는 리보솜 RNA (rRNA)가 연대기적 분자 표지로서 널리 사용되고 있으며, 16S/18S rDNA (ribosomal DNA)의 염기서열 분석 작업이 미시간 대학의 리보솜 데이터베이스 계획 (RDP II)을 통해 이루어지고 있다. 현재 20,000 종의 16S/18S rDNA 염기서열이 확보되어 생물의 분류 및 진화 연구에 중요한 자료가 되고 있으나, 기존의 혈청형 동정법에 비해 구분 능력이 떨어진다는 한계가 지적되고 있다.
- [6] 16S/18S rDNA 외에도 다양한 분자 표지들이 살모넬라 혈청형 동정을 위해 제안되었다. 일 예로, fliC (H1-항원) 및 fljB (H2-항원) 유전자를 PCR로 증폭하여 각각 HhaI 및 HphI 제한효소로 절단한 후 그 분획을 분석하는 PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)법이 보고되었으나, fliC는 195개의 혈청형이 74개의 제한형 (restriction pattern; 38%)으로 분류되고, fljB는 134개 혈청형이 47개의 유전형 (35%)으로 분류되어 분별능력이 낮았고, 표준형 Typhi와 변이형 Typhi가 다른 유전형으로 분류되고 Salmonella Dublin과 Salmonella Enteritidis는 구분이 되지 않았다 (Dauga 등., 1998, JCM. 2835-2843). 다른 분자 표지의 예로, atpD (ATP 합성 효소 베타소단위유전자)가 Salmonella Typhimurium과 Salmonella Dublin 사이의 상동성이 99.2%로 비교적 높은 것으로 보고되었다 (Christensen & Olsen, 1998, FEMS Microbiol Lett. 161:89-96).
- [7] 또한, 자동 리보타이핑 시스템 (automated ribotyping system: RiboPrinter)이 소개되었으나, 117개 분리주 중 34주 (29%)는 혈청형 수준에서, 11주 (9%)는 균주 수준에서, 46주 (39%)는 종 수준에서 동정되었고, 나머지 26주 (22%)는 동정되지 않았다 (Oscar, 1998. J Food Prot. 61:519-524).
- [8] 또한, 16S-23S rRNA spacer RFLP 법에 의한 경우 58개 혈청형 101주에 대해 10개 (17%) 혈청형만이 특이적인 유전형을 보이고 나머지는 구분이 안 되었다 (Christensen 등., 2000, J Appl Microbiol. 89:130-136). 또한, tyv, wzx multiplex PCR을 이용하여 10종의 프라이머를 32개 혈청형 69주에 대해 적용한 결과 혈청형 특이적인 반응을 얻었으며, 선행 연구에 사용한 multiplex 방법과 같이 사용 시 84.9% (423/500주)의 정확성을 보였다는 보고가 있었다 (Silvia

- Herrera-Leon 등., 2007, Res. Microb., 122-127). 또한, *Salmonella enterica* 균주 간 염기서열의 차이를 보이는 하우스키핑 유전자 및 혈청 특이적인 병원성 유전자 (virulence gene)의 검출 (panB, fimA, aceK, mdh, icdA, manB, and spaN)을 통해 25균주로부터 8가지 MLST (multilocus sequence typing) 타입을 얻어내었고 이것은 혈청형과 연관성이 있는 것으로 보고되었다 (Sharinne Sukhnand 등., 2005, JCM. 3688-3698).
- [9] 또한, 33가지 혈청형에 대해 hin 유전자 PCR 법을 사용하여 단상 편모 살모넬라를 동정하는 방법이 보고되었으나, 단상 편모/이상 편모 살모넬라 간의 구분만 가능할 뿐, 같은 그룹 내의 살모넬라 혈청형들 간에는 구분 안 되었다 (김성훈 등., 2005, J. of Bac. and Virol. 4:291-297). 또한, Allele specific rfb의 allele specific PCR에 의한 경우 살모넬라 serogroup D내 *Salmonella gallinarum*과 *Salmonella pullorum*의 분류가 가능하였으나, *Salmonella Pullorum*과 *Salmonella Enteritidis* 및 *Salmonella Dublin*, *Salmonella Typhi* 등 *Salmonella* serogroup D내의 다른 혈청형 간에는 구분이 안 되었다 (Devendra 등. J. Microbial Methods. 60:169-177, 2005).
- [10] 또한, 혈청형 분류의 정확도를 높이기 위해 *Salmonella Enteritidis*와 *Salmonella Derby*를 구분하는 프라이머 세트 및 *Salmonella Saint Paul*와 *Salmonella Anatum*, *Salmonella Branderup*, *Salmonella Ohio*를 구분하는 프라이머 세트를 추가시킨 경우 혈청학적 방법을 기준으로 할 때 97% 정확성을 보였으나, 실험에 사용한 1,024가지 조합의 amplicon codes로 알려져 있는 1,478개 혈청형 모두를 구분하지는 못하였다.
- [11] 따라서, 보다 많은 실험실에서 수행할 수 있고, 결과가 객관적이고 명확하며, 모든 살모넬라의 혈청형을 동정할 수 있는 기술이 요구되고 있다.
- [12] 한편, RNA 중합효소 베타 서브유닛 (RNA polymerase beta subunit)을 코딩하는 rpoB 유전자가 모든 생물에 보존되어 있음이 알려지면서, rpoB 유전자 내 리팜피신 내성을 유발하는 분절(rif)을 표적으로 하는 PCR 을 사용하여 다양한 병원균들의 동정과 분류하는 기술이 개발되었다. 예를 들어, *Mycobacterium* (Kim 등, J Clin Microbiol 37:1714-1720, 1999), *Borrelia* (Lee 등, J Clin Microbiol 38:2557-2562, 2000), *Bartonella* (Renesto 등, Research in Microbiology 151:831-836, 2000), *Bacteroides* (Ko, Kuwahara 등, Clin Microbiol Infect 13:48-54, 2007), 및 *Legionella* (Ko 등, J Clin Microbiol 40:2653-2658, 2002) 속 미생물의 분류와 동정에 rpoB 유전자가 사용된 바 있다. 상기 rpoB 유전자를 이용한 동정법의 경우 대부분 고변이 부분을 포함하는 부분 염기서열을 사용하였다.
- [13] 살모넬라 혈청형 동정에 있어서도 rpoB 유전자의 부분 염기서열을 사용한 시도가 있었으나, 이는 *Salmonella enterica* subsp. enteric 의 계통분석을 위하여 rpoB 유전자 중 고변이 부위를 포함하는 부분 염기서열(612-937)을 사용한 것으로, 살모넬라의 일부 아종에 대해서만 동정이 가능한 한계가 있다 (Kwon 등, Veterinary Microbiology, 2001, 82: 121- 129). 이와 같이, 지금까지 살모넬라

혈청형 동정에 특이적인 유전자는 전무하고, *rpoB*의 부분 염기서열을 사용한 살모넬라 혈청형 동정의 가능성이 제시되었으나 부분 서열을 사용하여 구분 능력이 상대적으로 낮아 적용성이 낮은 문제가 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 이에, 본 발명자들은 모든 살모넬라 혈청형의 *rpoB* 유전자 전체를 증폭할 수 있는 프라이머 및 상기 전체 유전자 염기서열을 결정할 수 있는 프라이머를 설계하였으며, 이 프라이머들을 사용하여 전 세계적으로 빈발하는 살모넬라 혈청형들에 특이적인 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하였다. 또한, 식중독 환자나 주변 환경으로부터 살모넬라로 의심되는 미지의 균(목적 균주)이 분리되었을 때, 상기 프라이머를 사용하여 목적 균주의 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 증폭 및 결정하고, 이를 이미 확보된 데이터베이스 상의 살모넬라 혈청형들의 *rpoB* 유전자의 염기서열과 비교함으로써, 목적 균주의 혈청형을 정확하게 판단할 수 있음을 확인하였다. 또한, 상기 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 이용한 살모넬라 혈청형 동정법이 모든 살모넬라 균주에 광범위하게 적용될 수 있으며 보다 신속하고 정확한 판단에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하여, 기존의 항혈청을 이용한 살모넬라 혈청형 동정법을 대체할 수 있는 분자적 동정법으로서 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [15] 본 발명은 RNA중합효소 베타 서브유닛 (*rpoB*) 유전자의 전체 염기서열을 이용하여 살모넬라의 혈청형을 동정하는 기술을 제공한다. 또한, 본 발명은 살모넬라 혈청형의 전체 *rpoB* 유전자를 증폭 및 결정할 수 있는 프라이머, 그리고 상기 프라이머를 사용하여 확인된 주요 살모넬라 혈청형 균주들의 *rpoB* 폴리뉴클레오티드 및 이의 염기서열 정보를 이용하여 효과적으로 살모넬라의 혈청형을 동정하는 기술을 제공한다.
- [16] 보다 구체적으로, 본 발명의 하나의 목적은 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 증폭하는 단계를 포함하는 살모넬라 속 미생물의 혈청형을 동정하는 방법을 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 하나의 목적은 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 증폭하기 위한 프라이머를 제공하는 것이다.
- [18] 본 발명의 또 하나의 목적은 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 결정하기 위한 프라이머를 제공하는 것이다.
- [19] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 프라이머를 포함하는 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 조성물을 제공하는 것이다.
- [20] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 키트를 제공하는 것이다.
- [21] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 프라이머를 사용하여 확인된, 주요 살모넬라

- 속 미생물의 혈청형들에 특이적인 *rpoB* 폴리뉴클레오티드를 제공하는 것이다.
- [22] 본 발명의 또 하나의 목적은 주요 살모넬라 속 미생물의 혈청형들에 특이적인 *rpoB* 폴리뉴클레오티드를 포함하는 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 조성물을 제공하는 것이다.

도면의 간단한 설명

- [23] 도 1은 살모넬라 혈청형들의 *rpoB* 유전자 코딩 부분의 전체 염기서열을 사용하여 계통분석 (Neighbor-joining method; Tamura-Nei distance; bootstrapping 100 repeats) 한 결과를 나타낸다.
- [24] 도 2는 본 발명의 증폭용 프라이머를 사용하여 *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Pullorum*, *Salmonella Typhimurium*의 *rpoB* 전체 염기서열을 증폭한 후 *StyI*, *FspI*, *MnII*을 처리하여 한천 겔에서 전기영동 함으로써 감별진단 한 PCR-RFLP 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [25] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 RNA 중합효소 베타 서브유닛 (*rpoB*) 유전자의 전체 염기서열을 증폭하는 단계를 포함하는 살모넬라 속 미생물의 혈청형을 동정하는 방법에 관한 것이다.
- [26] 이를 위한 바람직한 양태로서, 본 발명은
- [27] (1) 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 증폭하는 단계;
- [28] (2) 상기 증폭된 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 결정하는 단계;
- [29] (3) 상기 단계 (2)에서 얻어진 염기서열을 표준 균주의 *rpoB* 유전자의 염기서열과 비교하여 혈청형을 결정하는 단계를 포함하는,
- [30] 살모넬라 속 미생물의 혈청형을 동정하는 방법에 관한 것이다.
- [31] 바람직하게, 상기 단계 (1) 및 단계 (2)는 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 염기서열(서열번호 15) 중에서 표 1에 기재된 보존 부분의 염기 서열에 상보적이며 7 내지 50 bp의 연속된 염기서열을 가지는 프라이머를 사용하여 수행하는 것일 수 있다.
- [32] 표 1

[Table 1]

보존부분의 염기 위치			
1-139	1174-1202	2275-2306	3151-3206
146-251	1291-1367	2404-2447	3223-3260
268-341	1403-1472	2470-2522	3283-3326
343-380	1501-1559	2536-2558	3331-3362
394-422	1561-1583	2581-2616	3385-3416
460-491	1621-1652	2641-2660	3424-3443
493-524	1681-1709	2683-2718	3457-3486
526-587	1729-1754	2720-2749	3488-3506
628-647	1756-1796	2751-2783	3562-3608
685-707	1798-1844	2785-2835	3646-3756
709-739	1849-1895	2837-2889	3790-3821
751-770	1906-1940	2902-2933	3833-3854
799-818	1966-2006	2945-2984	3865-3896
842-878	2047-2066	2986-3028	3907-3926
919-971	2089-2186	3035-3059	3928-3947
994-1061	2188-2231	3088-3111	3949-3986
1079-1100	2239-2261	3113-3149	3988-4019
1102-1130			

- [33] 또한 바람직하게, 상기 단계 (1) 은 서열번호 1 및 2, 또는 서열번호 3 및 4의 염기서열을 가지는 프라이머 쌍을 사용하여 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 증폭하는 것일 수 있다.
- [34] 또한 바람직하게, 상기 단계 (2) 는 서열번호 5 내지 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열을 가지는 1종 이상의 프라이머를 사용하여 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 결정하는 것일 수 있다.
- [35] 또한 바람직하게, 상기 단계 (3) 에서 표준 군주의 *rpoB* 유전자의 염기서열은 서열번호 15 내지 서열번호 75의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [36] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 염기서열 (서열번호 15) 중에서 표 1에 기재된 보존 부분의 염기 서열에 상보적이며 7 내지 50 bp 의 연속된 염기서열을 가지는 프라이머에 관한 것이다.
- [37] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 1 및 2, 또는 서열번호 3 및 4의

염기서열을 가지는, 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열 증폭용 프라이머에 관한 것이다.

[38] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 5 내지 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열을 가지는, 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열 결정용 프라이머에 관한 것이다.

[39] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 프라이머들 중 어느 하나 이상을 포함하는 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 조성물에 관한 것이다.

[40] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 조성물을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[41] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 15 내지 서열번호 75의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열을 가지는 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 조성물에 관한 것이다.

[42] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 38, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 47, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 70, 서열번호 74 및 서열번호 75의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열을 가지는 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.

[43] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[44] 본 발명자들은 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 분석하여 살모넬라 속 미생물의 혈청형을 동정하는 방법을 확립하기 위하여, GenBank에 등록된 살모넬라 혈청형 균주 44 주의 *rpoB* 게놈 서열을 다중배열하여 혈청형 간 차이를 보이는 *rpoB* 유전자의 변이 부분과 프라이머 설계에 유용하게 사용할 수 있는 보존된 부분을 확인하였고, 이를 토대로 *rpoB* 전체를 증폭할 수 있는 프라이머 2개쌍을 설계하였고, 염기서열 결정을 위한 프라이머를 보존된 부분에서 설계하였다. 또한, 이 프라이머들을 이용하여 질병관리본부 국립보건원 장내세균팀으로부터 제공받은 살모넬라 균주들의 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하였다. 또한, 동정하고자 하는 목적 균주의 *rpoB* 전체 염기서열을 증폭 및 결정하고 상기 데이터베이스의 염기서열과 비교 분석함으로써 살모넬라 혈청형을 동정하는 새로운 방법을 개발하게 되었다.

[45] 어떤 유전자가 세균의 계통적 관계를 잘 반영하는 연대기적 분자 표지가 되기 위해서는, 표적 유전자가 모든 세균에서 기능적으로 필수적이고 보존되어야 하고, 후천적 영향에 의한 균 중간 염기서열의 변이가 일어나지 않으며, 계통

관계를 나타내기 위해 적절한 종 간 다양성 (interspecies variation)과 같은 속 내의 균종 사이의 보존성 (intraspecies conservation)을 보여야 한다. *rpoB* 유전자의 경우 세균의 전사에 관여하는 필수 효소를 코딩하므로 모든 균주에 필수적이고 보존되어 있으며, 균 종간 염기서열의 변이가 잘 일어나지 않고, 다른 속 균주들에서 다양성과 보존성이 보고되어 있으므로 (Kim 등, J Clin Microbiol 37:1714-1720, 1999; Lee 등, J Clin Microbiol 38:2557-2562, 2000), 분자 표지로 적절하다. 또한, 종래에 *rpoB* 유전자의 염기서열 중에서 고변이 부위에 해당하는 약 300bp 정도의 부분적 염기서열을 사용하여 살모넬라 아종을 구분하는 것이 보고되었으나 (Kwon 등, Veterinary Microbiology, 2001, 82: 121- 129), 살모넬라의 일부 아종의 구분에만 적용 가능하고 구분 능력이 상대적으로 낮아 적용성이 낮은 문제가 있었다. 즉 상기의 *rpoB*의 일부분을 사용하는 경우 *Agona*와 *Derby*; *Paratyphi A*와 *Typhi*; *Blockley*와 *Paratyphi B*; *Braenderup*, *Hadar* 와 *Infantis*; *Enteritidis*와 *Gallinarum*; *Kentucky*와 *Senftenberg*; *Give*와 *Montevideo*가 구분되지 않는 문제점이 있다.

- [46] 본 발명과 같이 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 분석하여 혈청형 동정에 사용할 경우, 보존된 부분에서 유래된 프라이머를 사용하므로 지금까지 알려진 모든 살모넬라 균주들에 적용가능하며, 도 1 및 표 3에 나타난 바와 같이 정확히 혈청형을 구분할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서 볼 수 있듯이, 본 발명에서는 기존의 방법으로는 혈청형을 동정할 수 없었던 균주들의 혈청형 동정이 가능하였고 (예, B21, B22 균주), 기존 방법에 의한 혈청형 동정법으로는 구분이 되지 않는 균주들에서 염기서열의 차이를 확인하여 아군(subtype)으로 세부 분류가 가능하였다 (예, S1 및 A3; B1, B4, B5, B9, B7 및 B21; B13 및 B14; SL317, C1, C22, S50, 및 SL254; E3, E4 및 E5; E1, E2 및 S87).
- [47] 따라서, 본 발명은 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 증폭 또는 결정할 수 있는 프라이머를 제공한다.
- [48] 본 발명에서 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 증폭 또는 결정할 수 있는 프라이머는, 살모넬라 속 균주의 *rpoB* 유전자 전체를 증폭 또는 결정할 수 있는 프라이머로서, 바람직하게는 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 염기서열 (서열번호 15)중에서 표 1에 기재된 보존 부분의 염기 서열에 상보적이며 7 내지 50 bp의 연속된 염기서열을 가지는 프라이머일 수 있다.
- [49] 보다 바람직하게, 본 발명에서 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 증폭할 수 있는 프라이머는, 모든 살모넬라 속 균주의 *rpoB* 유전자 전체를 증폭시킬 수 있는 프라이머로서, 바람직하게는 서열번호 1 (Sal-*rpoB*-preF) 및 서열번호 2 (Sal-*rpoB*-postR)의 염기서열을 가지는 프라이머 쌍, 또는 서열번호 3 (Sal-*rpoB*-F) 및 서열번호 4 (Sal-*rpoB*-R)의 염기서열을 가지는 프라이머 쌍일 수 있다.
- [50] 또한, 보다 바람직하게, 본 발명에서 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 결정하기 위한 프라이머는, 모든 살모넬라 속 균주의 *rpoB* 유전자 전체를 결정할 수 있는

프라이머로서, 서열번호 5 (salrpoB-PIR), 서열번호 5 (salrpoB-PIR), 서열번호 6 (salrpoB-P2), 서열번호 7 (salrpoB-P3), 서열번호 8 (salrpoB-P4), 서열번호 9 (salrpoB-P5), 서열번호 10 (salrpoB-P6), 서열번호 11 (salrpoB-P7), 서열번호 12 (salrpoB-PN3), 서열번호 13 (salrpoB-PN4) 및 서열번호 14 (salrpoB-PN5) 의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열을 가지는 프라이머일 수 있다.

- [51] 본 발명의 프라이머는 살모넬라 혈청형들의 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 증폭하고 염기서열을 결정하기 위한 최초의 프라이머들로, GenBank에 등록된 살모넬라 혈청형 균주 44 주의 *rpoB* 게놈 서열을 다중배열하여 확인한 보존 부분을 토대로 하여 *rpoB* 전체 염기서열을 증폭 및 결정할 수 있도록 고도로 계산되어 제조된 프라이머이다. 즉, 본 발명에서는 살모넬라 혈청형들 사이에서 *rpoB* 유전자의 보존된 부분을 최초로 확인하고 (표 1) 이를 토대로 하여 프라이머를 설계하였으며, 본 발명의 프라이머는 지금까지 알려진 모든 살모넬라 혈청형들에 적용할 수 있다.
- [52] 또한, 본 발명은 전세계적으로 빈발하는 살모넬라 속 미생물의 혈청형들에 특이적인 *rpoB* 의 전체 염기서열을 가지는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [53] 바람직하게, 본 발명에서 제공하는 *rpoB* 폴리뉴클레오티드는, 서열번호 15내지 서열번호 75의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열을 가지는 것이다. 상기 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 *rpoB* 유전자의 증폭 및 결정용 프라이머들을 사용하여 확인된 것으로, 독자적인 살모넬라 혈청형 동정용 데이터베이스를 구축할 수 있다.
- [54] 특히, 이 중에서 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 38, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 47, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 70, 서열번호 74 및 서열번호 75의 염기서열은 Genbank 검색 상에서 새로운 염기서열로 밝혀졌다.
- [55] 따라서, 보다 바람직하게, 본 발명에서 제공하는 *rpoB* 폴리뉴클레오티드는 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 38, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 47, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 70, 서열번호 74 및 서열번호 75의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열을 가지는 살모넬라 속 미생물의 *rpoB*

폴리뉴클레오티드이다.

- [56] 본 발명에서 분석된 서열번호 15 내지 75의 염기서열을 다중배열하여 서로의 염기서열을 비교해본 결과, 모두 다른 염기서열을 가지고 있어 종간 염기서열 다양성(interspecies variation)을 나타내었으며, 모두 다중배열 상에서 염기서열의 삽입이나 결실 없이 4029bp의 염기를 코딩하고 있었으므로, *rpoB*의 전체 염기서열이 연대기적 분자 표지로 적합함을 확인할 수 있다. 또한, 상기 폴리뉴클레오티드의 전체 염기서열 및 이를 포함하는 해당 균주의 혈청형을 미리 알고 있으므로, 이 염기서열을 기준으로 하여 분석 대상 균주의 *rpoB* 염기서열과 비교함으로써 분석 대상 균주의 혈청형을 결정하고 계통 관계를 분석하는 데 사용될 수 있다.
- [57] 따라서, 본 발명은 상기 프라이머 및 *rpoB* 폴리뉴클레오티드 염기서열을 이용하여 살모넬라 속 미생물의 혈청형을 동정하는 방법을 제공한다.
- [58] 구체적으로, 상기 살모넬라 속 미생물의 혈청형을 동정하는 방법은 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 증폭하는 단계를 포함한다.
- [59] 바람직하게, 상기 살모넬라 속 미생물의 혈청형을 동정하는 방법은 다음의 단계를 포함한다:
- [60] (1) 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 증폭하는 단계;
- [61] (2) 상기 증폭된 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 결정하는 단계;
- [62] (3) 상기 단계 (2)에서 얻어진 염기서열을 표준 균주의 *rpoB* 유전자의 염기서열과 비교하여 혈청형을 결정하는 단계.
- [63] 상기 단계 (1)은 동정하고자 하는 미지의 살모넬라 균주, 즉 목적 균주의 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 증폭하는 단계이다.
- [64] 바람직하게, 상기 단계는 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 증폭할 수 있는 프라이머로서, 표 1에 기재된 *rpoB* 유전자 보존 부분의 염기 서열에 상보적이며 7 내지 50 bp의 연속된 염기서열을 가지는 프라이머를 이용한 PCR 증폭에 의하여 수행할 수 있다.
- [65] 보다 바람직하게, 상기 단계는 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 증폭할 수 있는 프라이머로서, 서열번호 1 (Sal-*rpoB*-preF) 및 서열번호 2 (Sal-*rpoB*-postR)의 염기서열을 가지는 프라이머 쌍, 또는 서열번호 3 (Sal-*rpoB*-F) 및 서열번호 4 (Sal-*rpoB*-R)의 염기서열을 가지는 프라이머 쌍을 이용한 PCR 증폭에 의하여 수행할 수 있다. PCR 증폭은 본 기술분야의 전문가에게 알려진 분석법을 모두 사용할 수 있다.
- [66] 상기 단계 (2)는 상기 단계 (1)에서 증폭된 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 결정하기 위한 프라이머로서, 바람직하게는 표 1에 기재된 *rpoB* 유전자 보존 부분의 염기 서열에 상보적이며 7 내지 50 bp의 연속된 염기서열을 가지는 프라이머를 사용하여 수행할 수 있으며, 보다 바람직하게는, 서열번호 5 내지 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열을 가지는 1종 이상의 프라이머를 이용한 PCR 증폭산물 정제 키트 등에 의하여 수행할 수

있다.

- [67] 상기 단계 (3)은 상기 단계 (2)에서 얻어진 염기서열을 표준 균주의 *rpoB* 유전자의 염기서열과 비교하여 혈청형을 결정하는 단계로, 바람직하게, 상기 표준 균주의 *rpoB* 유전자의 염기서열은 서열번호 15 내지 서열번호 75의 염기서열로 이루어진 균으로부터 선택되는 것이다. 상기 서열번호 15 내지 서열번호 75의 염기서열을 가지는 폴리뉴클레오티드는 본 발명의 *rpoB* 유전자의 증폭 및 결정용 프라이머들을 사용하여 확인된 것으로, 그 전체 염기서열 및 해당 균주의 혈청형을 미리 알고 있으므로, 상기 염기서열을 기준으로 하여 목적 균주의 *rpoB* 염기서열과 비교함으로써 목적 균주의 혈청형을 결정하고 계통 관계를 분석할 수 있다. 표준 균주와 목적 균주의 *rpoB* 전체 염기서열의 차이를 이용한 분자 생물학적 방법은 모두 본 발명에 적용할 수 있다.
- [68] 바람직한 일례로, 목적 균주의 *rpoB* 염기서열을 분석한 후에 이를 표준 균주의 *rpoB* 염기서열 비교하여 목적 균주의 혈청형을 결정하기 위하여, 미리 구축된 표준 균주의 *rpoB* 염기서열이 정렬된 데이터베이스에 동정하고자 하는 균의 *rpoB* 염기서열을 추가시키고, 다시 염기서열 정렬을 수행하여 계통도를 완성할 수 있다. 계통도가 완성되면 해당되는 균종에 근접하여 가지를 형성하게 되므로 계통도로 혈청형을 결정할 수 있다. 상기 계통도를 완성하기 위하여, *Mega* 소프트웨어 등을 이용한 Neighbor-joining 방법을 사용할 수 있으며, 계통 가지의 지지도는 부트스트랩 분석(bootstrap replications)을 100회 내지 1000회 반복 시행하여 결정할 수 있다.
- [69] 상기 혈청형 동정 방법에 의하여, 식중독 환자 또는 주변 환경으로부터 살모넬라로 의심되는 미지의 균이 분리되었을 때, 특이적 프라이머로 *rpoB* 전체 염기서열을 증폭 및 결정하고, 이를 이미 확보한 표준 균주들의 염기서열과 비교함으로써 균종을 판별할 수 있으며, 종래의 균종 동정 방법에 비해 보다 정확하게 이루어지게 되어 살모넬라에 감염된 환자의 치료 방침이 신속하게 결정될 수 있다.
- [70] 본 발명은 또한, 상기 기술한 프라이머를 포함하는 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 조성물을 제공한다.
- [71] 바람직하게, 본 발명은 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 염기서열 (서열번호 15)중에서 표 1에 기재된 보존 부분의 염기 서열에 상보적이며 7 내지 50 bp의 연속된 염기서열을 가지는 프라이머를 포함하는, 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 조성물을 제공한다.
- [72] 또한 바람직하게, 본 발명은 서열번호 1 및 2, 또는 서열번호 3 및 4의 염기서열을 가지는, 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열 증폭용 프라이머를 포함하는 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 조성물을 제공한다. 보다 바람직하게, 상기 조성물은 서열번호 5 내지 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 균으로부터 선택되는 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열 결정용

프라이머를 추가로 포함할 수 있다.

- [73] 또한 바람직하게, 본 발명은 서열번호 5 내지 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열 결정용 프라이머를 포함하는 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 조성물을 제공한다.
- [74] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 포함하는 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 키트를 제공한다. 바람직하게, 상기 키트는 PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 키트, allele-specific PCR 키트, 실시간 PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 서던 블랏팅 키트일 수 있다. 상기 키트는 상기 프라이머 외에도, DNA 증합효소, DNA 염색 시약 또는 적합한 담체를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

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

[76]

[77] 실시예 1. 프라이머의 설계 및 살모넬라 혈청형의 동정

- [78] 1-1. 살모넬라 혈청형의 전체 *rpoB* 증폭용 및 염기서열 결정용 프라이머의 설계
- [79] GenBank에 등록되어 있는 살모넬라 균주 44주의 *rpoB* 염기서열 Typhimurium LT2(NC 003197), Paratyphi B SPB7 (NC_010102), Paratyphi A ATCC9150 (NC 006511), Typhi Ty2 (NC 004631), Enteritidis P125109 (NC 011294), Gallinarum 287/91 (NC 011274), Paratyphi A AKU-12601 (NC_011147), Typhi CT18 (NC 003198), Paratyphi C RKS4594 (NC 012125), Dublin CT-02021853 (NC 011205), Agona SL483 (NC_011149), Schwarzengrund CVM19633 (NC 011094), Heidelberg SL476 (NC_011083), Newport SL254 (NC 011080), Tennessee CDC07-0191 (NZ ACBF01000033), Pullorum SP12 (FJ797633), Enteritidis SE4 (FJ797617), Enteritidis SE14 (FJ797618), Enteritidis SE38 (FJ797619), Enteritidis SE40 (FJ797620), Enteritidis SE43 (FJ797621), Gallinarum SG52 (FJ797622), Gallinarum SG60 (FJ797623), Gallinarum SG101 (FJ797624), Gallinarum SG4041 (FJ797625), Gallinarum SG4160 (FJ797626), Gallinarum SG5132 (FJ797627), Gallinarum SG6039 (FJ797628), Pullorum SP1 (FJ797629), Pullorum SP4 (FJ797630), Pullorum SP5 (FJ797631), Pullorum SP11 (FJ797632), Typhimurium ST17 (FJ797634), Typhimurium ST18 (FJ797635), Typhimurium ST19 (FJ797636), Typhimurium ST21 (FJ797637), Javiana (ABEH02000013), Hadar RI-05P066 (NZ ABFG01000019), Weltevreden HI-N05/537 (NZ ABFF01000047), Heidelberg SL486 (NZ ABEL01000038), Virchow SL491 (NZ ABFH02000001), Saintpaul SARA23 (NZ ABAM02000001), Newport SL317 (NZ_ABEW01000017) 및 Kentucky CVM29188 (NZ ABAK02000001)을 다중배열 하여, 혈청형 간 차이를 보이는 *rpoB* 유전자의 변이 부분과 보존된 부분을 확인하였으며, 이를 표 1 및 표 2에 나타내었다.

- [80] 표 2

[Table 2]

보존부분	염기서열 돌연변이	보존부분	염기서열 돌연변이
1-139	A140G, C145T	2275-2306	A2307G, T2310C, G2313A, A2334G, C2343T, C2345T, T2358C, T2376C, C2380T, G2385A, C2388A, G2394C
146-251	A252G, C267T	2404-2447	T2448C, T2454A/C, T2466G, C2469T
268-341	A342T	2470-2522	T2623C, G2535A
343-380	T381C, C393T	2536-2558	T2559C, T2580G
394-422	T423C, C435T, C445T, C456T, T459G	2581-2616	A2617C, C2619T, C2622T, G2631A, A2634C/T, T2640C
460-491	C492T	2641-2660	G2661A, C2679G, G2682A
493-524	C525T	2683-2718	G2719C
526-587	A588G, C594T, T606C, A612G, A619C, A622T, C624T, C627T	2720-2749	C2750T
628-647	C648T, C660T, A665T, C684G/T	2751-2783	T2784G
685-707	A708G	2785-2835	C2836T
709-739	G740T, T741C, C750T	2837-2889	C2890T, G2895A, C2901T
751-770	T771G, C774T, A780G, C798T	2902-2933	G2934A, C2935T, T2940G, A2944G
799-818	C819T, C829T	2945-2984	C2985T
842-878	G841T, A879G, T882C, C891T, C909T, T915C,	2986-3028	A3029C, A3036G

	T918A		
919-971	G972A, C973T, C984T, G993A	3035-305 9	A3060G, A3081G, T3087G
994-1061	C1062T, T1068C, C1078T	3088-311 1	C3112A
1079-110 0	C1101T	3113-314 9	G3150T
1102-113 0	A1131T, C1134T, G1140A, T1155C, C1170T, C1173G	3151-320 6	T3207C, T3222G
1174-120 2	T1203G, G1212A, C1228T, C1233T, C1251T, A1264G, C1275T, C1284T, G1290A	3223-326 0	C3261T
1291-136 7	G1380A, C1402T	3283-332 6	C3327T, C3330T
1403-147 2	T1473C, C1485T, C1500G	3331-336 2	G3363A, T3372C, C3378T, T3384C
1501-155 9	T1584C	3385-341 6	G3417C, G3423A
1561-158 3	C1608T, C1617T, C1620T	3424-344 3	C3444T, C3456A
1621-165 2	C1653T, G1659T, T1668G, A1674G, T1680A	3457-348 6	A3487T
1681-170 9	T1710C, C1716T, C1722G, C1728T	3488-350 6	G3507T, A3519T, C3531T, A3533T, T3546C, C3549A, A3552G, T3561C
1729-175 4	C1755T	3562-360 8	C3609T, C3618A/T, C3634T, G3636C, C3645T
1756-179 6	T1797C	3646-375 6	C3757T, G3771A, G3789C
1798-184 4	T1845C, C1848T	3790-382 1	A3822G, C3832T
1849-189 5	T1896C, T1897C, G1902A/T, C1905G	3833-385 4	C3855T
1906-194	C1941T, C1953T, T1965A	3865-389	T3897C, T3900C, C3906T

0		6	
1966-2006	G2007A, C2025T, C2028T, A2037G, T2046G	3907-3926	G3927A
2047-2066	C2082T, C2088T	3928-3947	A3948G
2089-2186	G2187A	3949-3986	G3987A
2188-2231	C2232T, G2238A	3988-4019	A4020G, G4021A
2239-2261	C2262T, C2268T, C2274T		

[81]

[82]

본 발명자들이 제공한 표 1 및 표 2의 정보를 토대로 하여, 상기 돌연변이 부분은 DNA 칩, allele-specific PCR, RFLP 및 서던 블랏팅 등을 이용한 혈청형 동정에 유용하게 활용될 수 있고, 보존된 부분은 다양한 혈청형 균주의 염기서열 증폭과 염기서열 결정(sequencing)을 위한 새로운 프라이머 설계에 활용할 수 있다. 본 발명자들은 *rpoB* 전체 유전자를 증폭할 수 있는 최적의 프라이머로 Sal-*rpoB*-preF (*rpoB* 개시 코돈의 업스트림 비코딩 영역, 서열번호 1) 및 Sal-*rpoB*-postR (*rpoB* 종결 코돈의 다운스트림 비코딩 영역, 서열번호 2), Sal-*rpoB*-F (서열번호 3) 및 Sal-*rpoB*-R (서열번호 4) 의 프라이머 쌍을 설계하였고, 상기 보존 부분을 토대로 하여 염기서열 결정용 프라이머로 Sal-*rpoB*-P1R (서열번호 5), Sal-*rpoB*-P2 (서열번호 6), Sal-*rpoB*-P3 (서열번호 7), Sal-*rpoB*-P4 (서열번호 8), Sal-*rpoB*-P5 (서열번호 9), Sal-*rpoB*-P6 (서열번호 10) 및 Sal-*rpoB*-P7 (서열번호 11)을 설계하였으며, 질병관리본부 국립보건원 장내세균팀에서 제공한 살모넬라 72주에 대한 염기서열을 결정하면서 Sal-*rpoB*-P3 (서열번호 7), Sal-*rpoB*-P4 (서열번호 8) 및 Sal-*rpoB*-P5 (서열번호 9) 프라이머를 개선한 Sal-*rpoB*-P3N (서열번호 12), Sal-*rpoB*-P4N (서열번호 13) 및 Sal-*rpoB*-P5N (서열번호 14) 을 설계하였다.

[83]

[84]

1-2. 살모넬라 혈청형의 전체 *rpoB* 염기서열 결정 및 혈청형 동정

[85]

질병관리본부 국립보건원 장내세균팀에서 제공한 살모넬라 73주를 LB 육즙배지에서 종야 배양하여 1ml를 1.5ml microcentrifuge 튜브에 분주하여 3,500xg에서 10분간 원심분리 한 후 배지를 제거하였고, 남은 세균 펠렛으로부터 전체 DNA를 BioPOA의 GenomEx 키트를 사용하여 추출한 후 *rpoB*를 PCR을 이용하여 증폭하였다. PCR 반응액은 10 X buffer 5 μ l, dNTPs (2.5mM each) 1 μ l, Sal-*rpoB*-preF (서열번호 1) 및 Sal-*rpoB*-postR (서열번호 2) 각각 (10pmol/ul) 1.0 μ l,

Taq DNA polymerase(5U/ μ l; MACROGEN Co., Seoul, ROK) 0.5 μ l, DW 40.5 μ l, template DNA (50ng/ μ l) 1 μ l 이었고, 온도는 94 -4분, (94°C-30초, 54°C-20초, 72°C-4분30초)x40회, 72°C-5min 반응하였다. 그 결과 모든 살모넬라 혈청형에서 4,029bp의 특이적인 증폭산물이 확인되었고, 이들을 PCR 증폭산물 정제키트(BioPOA Co., 용인)를 사용하여 염기서열을 결정(MACROGEN Co.) 하였다. 염기서열 결정을 위한 프라이머로는 Sal-rpoB-P1R (서열번호 5), Sal-rpoB-P2 (서열번호 6), Sal-rpoB-P3N (서열번호 12), Sal-rpoB-P4N (서열번호 13), Sal-rpoB-P5N (서열번호 14), Sal-rpoB-P6 (서열번호 10) 및 Sal-rpoB-P7 (서열번호 11) 이 최적이었다. 결정된 염기서열을 MEGA 5 프로그램을 사용하여 다중배열 한 후 Neighbor-joining method(Tamura-Nei distance; 100 repeats of bootstrapping)로 계통분석 하였으며, 그 결과를 도 1 및 표 3에 나타내었다.

[86] 하기 표 3은 각 균주들에 대하여 기존의 혈청학적 방법에 의하여 동정한 혈청형과, 본 발명의 방법에 의한 rpoB 타이핑으로 동정한 혈청형을 나타내며, 본 발명에서 확인한 균주들의 rpoB 염기서열은 서열번호 15내지 서열번호 75로 표시하였다.

[87] 본 발명자들이 제공한 표 1 및 표 2의 정보를 토대로 하여, 상기 돌연변이 부분은 DNA 칩, allele-specific PCR, RFLP 및 서던 블랏팅 등을 이용한 혈청형 동정에 유용하게 활용될 수 있고, 보존된 부분은 다양한 혈청형 균주의 염기서열 증폭과 염기서열 결정(sequencing)을 위한 새로운 프라이머 설계에 활용할 수 있다. 본 발명자들은 rpoB 전체 유전자를 증폭할 수 있는 최적의 프라이머로 Sal-rpoB-preF (rpoB 개시 코돈의 업스트림 비코딩 영역, 서열번호 1) 및 Sal-rpoB-postR (rpoB 종결 코돈의 다운스트림 비코딩 영역, 서열번호 2), Sal-rpoB-F (서열번호 3) 및 Sal-rpoB-R (서열번호 4) 의 프라이머 쌍을 설계하였고, 상기 보존 부분을 토대로 하여 염기서열 결정용 프라이머로 Sal-rpoB-P1R (서열번호 5), Sal-rpoB-P2 (서열번호 6), Sal-rpoB-P3 (서열번호 7), Sal-rpoB-P4 (서열번호 8), Sal-rpoB-P5 (서열번호 9), Sal-rpoB-P6 (서열번호 10) 및 Sal-rpoB-P7 (서열번호 11)을 설계하였으며, 질병관리본부 국립보건원 장내세균팀에서 제공한 살모넬라 72주에 대한 염기서열을 결정하면서 Sal-rpoB-P3 (서열번호 7), Sal-rpoB-P4 (서열번호 8) 및 Sal-rpoB-P5 (서열번호 9) 프라이머를 개선한 Sal-rpoB-P3N (서열번호 12), Sal-rpoB-P4N (서열번호 13) 및 Sal-rpoB-P5N (서열번호 14) 을 설계하였다.

[88]

[89] **1-3. 살모넬라 혈청형의 전체 rpoB 염기서열 결정 및 혈청형 동정**

[90] 질병관리본부 국립보건원 장내세균팀에서 제공한 살모넬라 73주를 LB 육즙배지에서 종야 배양하여 1ml를 1.5ml microcentrifuge 튜브에 분주하여 3,500xg에서 10분간 원심분리 한 후 배지를 제거하였고, 남은 세균 펠렛으로부터 전체 DNA를 BioPOA의 GenomEx 키트를 사용하여 추출한 후 rpoB를 PCR을 이용하여 증폭하였다. PCR 반응액은 10xbuffer 5 μ l, dNTPs (2.5mM each) 1 μ l,

Sal-rpoB-preF (서열번호 1) 및 Sal-rpoB-postR (서열번호 2) 각각 (10pmol/ul) 1.0 μ l, Taq DNA polymerase(5U/ μ l; MACROGEN Co., Seoul, ROK) 0.5 μ l, DW 40.5 μ l, template DNA (50ng/ μ l) 1 μ l 이었고, 온도는 94 -4분, (94°C-30초, 54°C-20초, 72°C-4분30초)x40회, 72°C-5min 반응하였다. 그 결과 모든 살모넬라 혈청형에서 4,029bp의 특이적인 증폭산물이 확인되었고, 이들을 PCR 증폭산물 정제키트(BioPOA Co., 용인)를 사용하여 염기서열을 결정(MACROGEN Co.) 하였다. 염기서열 결정을 위한 프라이머로는 Sal-rpoB-P1R (서열번호 5), Sal-rpoB-P2 (서열번호 6), Sal-rpoB-P3N (서열번호 12), Sal-rpoB-P4N (서열번호 13), Sal-rpoB-P5N (서열번호 14), Sal-rpoB-P6 (서열번호 10) 및 Sal-rpoB-P7 (서열번호 11) 이 최적이었다. 결정된 염기서열을 MEGA 5 프로그램을 사용하여 다중배열 한 후 Neighbor-joining method(Tamura-Nei distance; 100 repeats of bootstrapping)로 계통분석 하였으며, 그 결과를 도 1 및 표 3에 나타내었다.

[91] 하기 표 3은 각 균주들에 대하여 기존의 혈청학적 방법에 의하여 동정한 혈청형과, 본 발명의 방법에 의한 rpoB 타이핑으로 동정한 혈청형을 나타내며, 본 발명에서 확인한 균주들의 rpoB 염기서열은 서열번호 15 내지 서열번호 75로 표시하였다.

[92] 표 3

[Table 3]

균주	혈청형(기존의 방법)	<i>rpoB</i> type(본 발명의 방법)	<i>rpoB</i> subtype(본 발명의 방법)	서열번호	출처
B1	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium-1	서열번호 15	질병관리본부
B4	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium-2	서열번호 16	질병관리본부
B6	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium-2		질병관리본부
B8	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium-2		질병관리본부
B10	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium-2		질병관리본부
B5	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium-3	서열번호 17	질병관리본부
B9	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium-4	서열번호 18	질병관리본부
ST17	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium-4		GenBank
ST21	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium-4		GenBank
LT2	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium-4		GenBank
B7	Typhimurium	Typhimurium	Typhimurium-5	서열번호 19	질병관리본부
B21	Untypable	Typhimurium	Typhimurium-6	서열번호 20	질병관리본부
B22	Untypable	Typhimurium	Typhimurium-6		질병관리본부
C9	Hartford	Hartford		서열번호 21	질병관리본부
C5	Braenderup	Braenderup		서열번호 22	질병관리본부

SL317	Newport	Newport	Newport-1	서열번호 23	GenBank
C7	Infantis	Infantis		서열번호 24	질병관리본 부
C15	Thompson	Thompson		서열번호 25	질병관리본 부
S40	Thompson	Thompson			질병관리본 부
E8	Anatum	Anatum		서열번호 26	질병관리본 부
S84	Anatum	Anatum			질병관리본 부
A3	Paratyphi A	Paratyphi A	Paratyphi A-1	서열번호 27	질병관리본 부
AKU12601	Paratyphi A	Paratyphi A	Paratyphi A-1		GenBank
ATCC9150	Paratyphi A	Paratyphi A	Paratyphi A-1		GenBank
S1	Paratyphi A	Paratyphi A	Paratyphi A-2	서열번호 28	질병관리본 부
D13	Typhi	Typhi	Typhi-1	서열번호 29	질병관리본 부
D14	Typhi	Typhi	Typhi-1		질병관리본 부
D15	Typhi	Typhi	Typhi-1		질병관리본 부
D16	Typhi	Typhi	Typhi-1		질병관리본 부
D18	Typhi	Typhi	Typhi-1		질병관리본 부
D22	Typhi	Typhi	Typhi-1		질병관리본 부
D23	Typhi	Typhi	Typhi-1		질병관리본 부

Ty2	Typhi	Typhi	Typhi-1		GenBank
CT18	Typhi	Typhi	Typhi-2	서열번호 30	GenBank
S57	Typhi	Typhi	Typhi-3	서열번호 31	질병관리본 부
C2	Blockley	Blockley		서열번호 32	질병관리본 부
C21	Blockley	Blockley			질병관리본 부
C3	Litchfield	Litchfield		서열번호 33	질병관리본 부
B20	Stanley	Stanley		서열번호 34	질병관리본 부
B17	Paratyphi B	Paratyphi B		서열번호 35	질병관리본 부
S3	Paratyphi B	Paratyphi B			질병관리본 부
SPB7	Paratyphi B	Paratyphi B			GenBank
CVM2918 8	Kentucky	Kentucky		서열번호 36	GenBank
CDC07-01 91	Tennessee	Tennessee		서열번호 37	GenBank
B13	Derby	Derby	Derby-1	서열번호 38	질병관리본 부
D1	Enteritidis	Enteritidis		서열번호 39	질병관리본 부
D5	Enteritidis	Enteritidis			질병관리본 부
D7	Enteritidis	Enteritidis			질병관리본 부
D8	Enteritidis	Enteritidis			질병관리본 부
D9	Enteritidis	Enteritidis			질병관리본 부

D10	Enteritidis	Enteritidis			질병관리본부
D24	Enteritidis	Enteritidis			질병관리본부
SE4	Enteritidis	Enteritidis			GenBank
P125109	Enteritidis	Enteritidis			GenBank
SP1	Pullorum	Pullorum		서열번호 40	GenBank
SG52	Gallinarum	Gallinarum		서열번호 41	GenBank
287/91	Gallinarum	Gallinarum			GenBank
E6	Weltevreden	Weltevreden		서열번호 42	질병관리본부
E7	Weltevreden	Weltevreden			질병관리본부
HI-N05-53 7	Weltevreden	Weltevreden			GenBank
C1	Newport	Newport	Newport-2	서열번호 43	질병관리본부
C22	Newport	Newport	Newport-3	서열번호 44	질병관리본부
D25	Dublin	Dublin	Dublin-1	서열번호 45	질병관리본부
CT020218 53	Dublin	Dublin	Dublin-2	서열번호 46	GenBank
S50	Newport	Newport	Newport-4	서열번호 47	질병관리본부
SL254	Newport	Newport	Newport-5	서열번호 48	GenBank
E4	London	London	London-1		질병관리본부
E5	London	London	London-1		질병관리본부

E3	London	London	London-2	서열번호 49	질병관리본 부
C4	Rissen	Rissen	Rissen-1	서열번호 50	질병관리본 부
C10	Rissen	Rissen	Rissen-2	서열번호 51	질병관리본 부
C11	Rissen	Rissen	Rissen-2		질병관리본 부
C19	Hadar	Hadar		서열번호 52	질병관리본 부
RI05P066	Hadar	Hadar			GenBank
RKS4594	Paratyphi C	Paratyphi C		서열번호 53	GenBank
C13	Bareilly	Bareilly		서열번호 54	질병관리본 부
E1	Senftenberg	Senftenberg	Senftenberg-1	서열번호 55	질병관리본 부
E2	Senftenberg	Senftenberg	Senftenberg-1		질병관리본 부
B16	Paratyphi B Java	Paratyphi B Java		서열번호 56	질병관리본 부
C18	Ohio	Ohio		서열번호 57	질병관리본 부
ABEH020 00013	Javiana	Javiana		서열번호 58	GenBank
S76	London	London	London-3	서열번호 59	질병관리본 부
D26	Panama	Panama		서열번호 60	질병관리본 부
B18	Muenchen	Muenchen		서열번호 61	질병관리본 부
B19	Schwarzengru nd	Schwarzengru nd		서열번호 62	질병관리본 부
CVM1963	Schwarzengru	Schwarzengru			GenBank

3	nd	nd			
B23	Brandenburg	Brandenburg		서열번호 63	질병관리본부
C8	Montevideo	Montevideo		서열번호 64	질병관리본부
E9	Give	Give		서열번호 65	질병관리본부
C16	Mbandaka	Mbandaka		서열번호 66	질병관리본부
S87	Senftenberg	Senftenberg	Senftenberg-2	서열번호 67	질병관리본부
B15	Agona	Agona	Agona-1	서열번호 68	질병관리본부
SL483	Agona	Agona	Agona-2	서열번호 69	GenBank
B14	Derby	Derby	Derby-2	서열번호 70	질병관리본부
SL476	Heidelberg	Heidelberg		서열번호 71	GenBank
SL486	Heidelberg	Heidelberg			GenBank
SARA23	Saintpaul	Saintpaul		서열번호 72	GenBank
C12	Virchow	Virchow		서열번호 73	질병관리본부
SL491	Virchow	Virchow			GenBank
B24	Scheleissheim	Scheleissheim		서열번호 74	질병관리본부
D11	9,12:l,w:enx	9,12:l,w:enx		서열번호 75	질병관리본부

[93]

[94]

상기 표 3에 나타난 바와 같이, 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 Typhimurium으로 분류된 B1, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10과 혈청학적으로 동정할 수 없었던 B21, B22는 GenBank에 등록된 Typhimurium인 LT2, ST17, ST21과 같은 클러스터를 형성하여 Typhimurium으로 분류되었으며 미세한 염기서열의

- 차이로 6개 아군, Typhimurium-1 (B1), Typhimurium-2 (B4=B6=B8=B10;), Typhimurium-3 (B5), Typhimurium-4 (B9=LT2=ST17=ST21), Typhimurium-5 (B7), Typhimurium-6 (B21=B22)로 세분되었다.
- [95] 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 Paratyphi A로 분류된 S1과 A3는 GenBank에 Paratyphi A로 등록된 AKU12601과 ATCC9150과 클러스터를 형성하여 Paratyphi A-1로 분류되었으며 S1은 나머지와 미세한 염기서열 차이를 보여 Paratyphi A-2로 분류하였다.
- [96] 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 Typhi로 분류된 S57, D13, D14, D15, D16, D18, D22, D23은 GenBank에 Typhi로 등록된 Ty2와 CT18과 클러스터를 형성하여 Typhi로 분류되었으며 미세한 염기서열의 차이로 3개의 아군 Typhi-1 (D13=D14=D15=D16=D18=D22=D23=Ty2), Typhi-2 (CT18), Typhi-3 (S57)으로 분류되었다.
- [97] 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 Enteritidis로 분류된 D1, D5, D7, D8, D9, D10, D24는 GenBank에 Enteritidis로 등록된 P125109와 SE4와 클러스터를 형성하여 Enteritidis로 분류되었으며 이들은 모두 동일한 염기서열을 보였다.
- [98] 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 Paratyphi B로 동정된 B17과 S3은 GenBank에 Paratyphi B로 등록된 SPB7과 클러스터를 형성하여 Paratyphi B로 분류되었으며 이들은 모두 동일한 염기서열을 보였다.
- [99] 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 Weltevreden으로 동정된 E6과 E7은 GenBank에 Weltevreden로 등록된 SPB7과 클러스터를 형성하여 Weltevreden로 분류되었으며 이들은 모두 동일한 염기서열을 보였다.
- [100] 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 Dublin으로 동정된 D25는 GenBank에 Dublin으로 등록된 CT 02021853과 클러스터를 형성하여 Dublin으로 분류되었으며 미세한 염기서열의 차이로 2개 아군 Dublin-1(D25)과 Dublin-2(CT02021853)로 세분되었다.
- [101] 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 Newport로 동정된 C1과 C22은 같은 클러스터를 형성하였으나 S50은 GenBank에 Newport로 등록된 SL254와 함께 C1과 C22와 다른 클러스터를 형성하였고, GenBank에 Newport로 등록된 SL317은 이들과는 다른 클러스터를 형성하였으며 염기서열의 차이를 보여 Newport-1(SL317), Newport-2(C1), Newport-3(C22), Newport-4(S50), Newport-5(SL254)로 분류하였다.
- [102] 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 Hadar로 동정된 C19는 GenBank에 Hadar로 등록된 RI 05P066와 클러스터를 형성하여 Hadar로 분류되었으며 이들은 모두 동일한 염기서열을 보였다.
- [103] 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 Schwarzengrund로 동정된 B19는 GenBank에 Schwarzengrund로 등록된 CVM19633과 클러스터를 형성하여 Schwarzengrund로 분류되었으며 이들은 모두 동일한 염기서열을 보였다.
- [104] 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 Agona로 동정된 B15는 GenBank에 Agona로

- 등록된 SL483과 클러스터를 형성하여 Agona로 분류되었으며 미세한 염기서열의 차이를 보여 Agona-1(B15)과 Agona-2(SL483)로 분류되었다.
- [105] 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 Derby로 동정된 B13과 B14는 서로 다른 클러스터를 형성하여 Derby-1(B13)과 Derby-2(B14)로 분류되었다.
- [106] 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 London으로 동정된 E4, E5, E3 및 S76 중 E4, E5,는 같은 E3는 같은 클러스터를 형성하나 미세한 염기서열 차이를 보여 London-1(E4, E5)과 London-2(E3)로 세분되었고, 다른 클러스터를 형성한 S76은 London-3로 분류되었다.
- [107] 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 Rissen으로 동정된 C4, C10, C11은 같은 클러스터를 형성하였으나 미세한 염기서열의 차이를 보여 Rissen-1(C4)과 Rissen-2(C10, C11)로 세분되었다.
- [108] 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 Senftenberg로 동정된 E1, E2, 및 S87 중 E1, E2는 같은 클러스터를 형성하고, 동일한 염기서열을 보여 Senftenberg-1(E1, E2)으로 세분되었고, 다른 클러스터를 형성한 S87은 Senftenberg-2(S87)로 분류되었다. 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 Virchow로 동정된 C12는 GenBank에 Virchow로 등록된 SL491과 클러스터를 형성하여 Virchow로 분류되었으며 이들은 모두 동일한 염기서열을 보였다.
- [109] 기존의 혈청학적 방법에 의할 때 Thompson으로 동정된 C15와 S40; Anatum으로 동정된 E8과 S84; 및 Blockley로 동정된 C2와 C21 은 동일한 염기서열을 가지고 있었다.
- [110] C9(Hartford), C5(Braenderup), C7(Infantis), C3(Litchfield), B20(Stanley), C13(Bareilly), B16(Paratyphi B Java), C18(Ohio), D26(Panama), B18(Muenchen), B23(Brandenburg), C8(Montevideo), E9(Give), C16(Mbandaka), B24(Schleissheim) 및 D11(9,12:l,w:enx)은 특유의 염기서열을 가지고 있어 다른 살모넬라 혈청형들과 구분되었다.
- [111] GenBank에 등록된 살모넬라 혈청형 균주 중 Kentucky로 분류된 CVM29188; Tennessee로 분류된 CDC07-0191; Pullorum으로 분류된 SP1; Gallinarum으로 분류된 287/91과 SG52; Paratyphi C로 분류된 RKS4594; Javiana로 분류된 ABEH 02000013; Heidelberg로 분류된 SL476과 SL486; 및 Saintpaul로 분류된 SARA23은 본 발명에서 비교한 어떠한 살모넬라 혈청형과도 다른 고유의 염기서열을 가지고 있었다.

산업상 이용가능성

- [112] 본 발명인 rpoB 유전자의 전체 염기서열을 분석하여 살모넬라 혈청형을 동정하는 기술은, 기존의 항혈청을 이용한 복잡한 혈청형 결정법과 비교하여 보다 객관적이고 정확한 결과를 얻을 수 있고, 모든 살모넬라 균주에 광범위하게 적용할 수 있으며, 과정이 단순하고 시간과 비용을 절약할 수 있어 살모넬라 혈청형 동정에 유용하게 사용될 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] RNA 중합효소 베타 서브유닛 (*rpoB*) 유전자의 전체 염기서열을 증폭하는 단계를 포함하는, 살모넬라 속 미생물의 혈청형을 동정하는 방법.
- [청구항 2] (1) 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 증폭하는 단계;
(2) 상기 증폭된 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 결정하는 단계;
(3) 상기 단계 (2)에서 얻어진 염기서열을 표준 균주의 *rpoB* 유전자의 염기서열과 비교하여 혈청형을 결정하는 단계를 포함하는,
살모넬라 속 미생물의 혈청형을 동정하는 방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 단계 (1) 및 단계 (2) 는 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 염기서열 (서열번호 15) 중에서 표 1에 기재된 보존 부분의 염기 서열에 상보적이며 7 내지 50 bp 의 연속된 염기서열을 가지는 프라이머를 사용하여 수행하는 것인 방법.

[표 1]

보존부분의 염기 위치			
1-139	1174-1202	2275-2306	3151-3206
146-251	1291-1367	2404-2447	3223-3260
268-341	1403-1472	2470-2522	3283-3326
343-380	1501-1559	2536-2558	3331-3362
394-422	1561-1583	2581-2616	3385-3416
460-491	1621-1652	2641-2660	3424-3443
493-524	1681-1709	2683-2718	3457-3486
526-587	1729-1754	2720-2749	3488-3506
628-647	1756-1796	2751-2783	3562-3608
685-707	1798-1844	2785-2835	3646-3756
709-739	1849-1895	2837-2889	3790-3821
751-770	1906-1940	2902-2933	3833-3854
799-818	1966-2006	2945-2984	3865-3896
842-878	2047-2066	2986-3028	3907-3926
919-971	2089-2186	3035-3059	3928-3947
994-1061	2188-2231	3088-3111	3949-3986
1079-1100	2239-2261	3113-3149	3988-4019
1102-1130			

- [청구항 4] 제2항에 있어서, 상기 단계 (1) 은 서열번호 1 및 2, 또는 서열번호 3 및 4의 염기서열을 가지는 프라이머 쌍을 사용하여 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 증폭하는 것인 방법.
- [청구항 5] 제2항에 있어서, 상기 단계 (2) 는 서열번호 5 내지 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열을 가지는 1종 이상의 프라이머를 사용하여 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 결정하는 것인 방법.
- [청구항 6] 제2항에 있어서, 상기 단계 (3) 에서 표준 균주의 *rpoB* 유전자의

염기서열은 서열번호 15 내지 서열번호 75의 염기서열로 이루어진 균으로부터 선택되는 것인 방법.

[청구항 7]

제2항에 있어서, 상기 단계 (3) 은 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열을 표준 균주의 *rpoB* 유전자의 염기서열에 대입하여 다중배열한 후 계통도를 완성하여 결정하는 것인 방법.

[청구항 8]

살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 염기서열 (서열번호 15) 중에서 표 1에 기재된 보존 부분의 염기 서열에 상보적이며 7 내지 50 bp 의 연속된 염기서열을 가지는 프라이머.

[표 1]

보존부분의 염기 위치			
1-139	1174-1202	2275-2306	3151-3206
146-251	1291-1367	2404-2447	3223-3260
268-341	1403-1472	2470-2522	3283-3326
343-380	1501-1559	2536-2558	3331-3362
394-422	1561-1583	2581-2616	3385-3416
460-491	1621-1652	2641-2660	3424-3443
493-524	1681-1709	2683-2718	3457-3486
526-587	1729-1754	2720-2749	3488-3506
628-647	1756-1796	2751-2783	3562-3608
685-707	1798-1844	2785-2835	3646-3756
709-739	1849-1895	2837-2889	3790-3821
751-770	1906-1940	2902-2933	3833-3854
799-818	1966-2006	2945-2984	3865-3896
842-878	2047-2066	2986-3028	3907-3926
919-971	2089-2186	3035-3059	3928-3947
994-1061	2188-2231	3088-3111	3949-3986
1079-1100	2239-2261	3113-3149	3988-4019
1102-1130			

[청구항 9]

서열번호 1 및 2, 또는 서열번호 3 및 4의 염기서열을 가지는, 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열 증폭용 프라이머 쌍.

[청구항 10]

서열번호 5 내지 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 균으로부터 선택되는 염기서열을 가지는, 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 유전자의 전체 염기서열 결정용 프라이머.

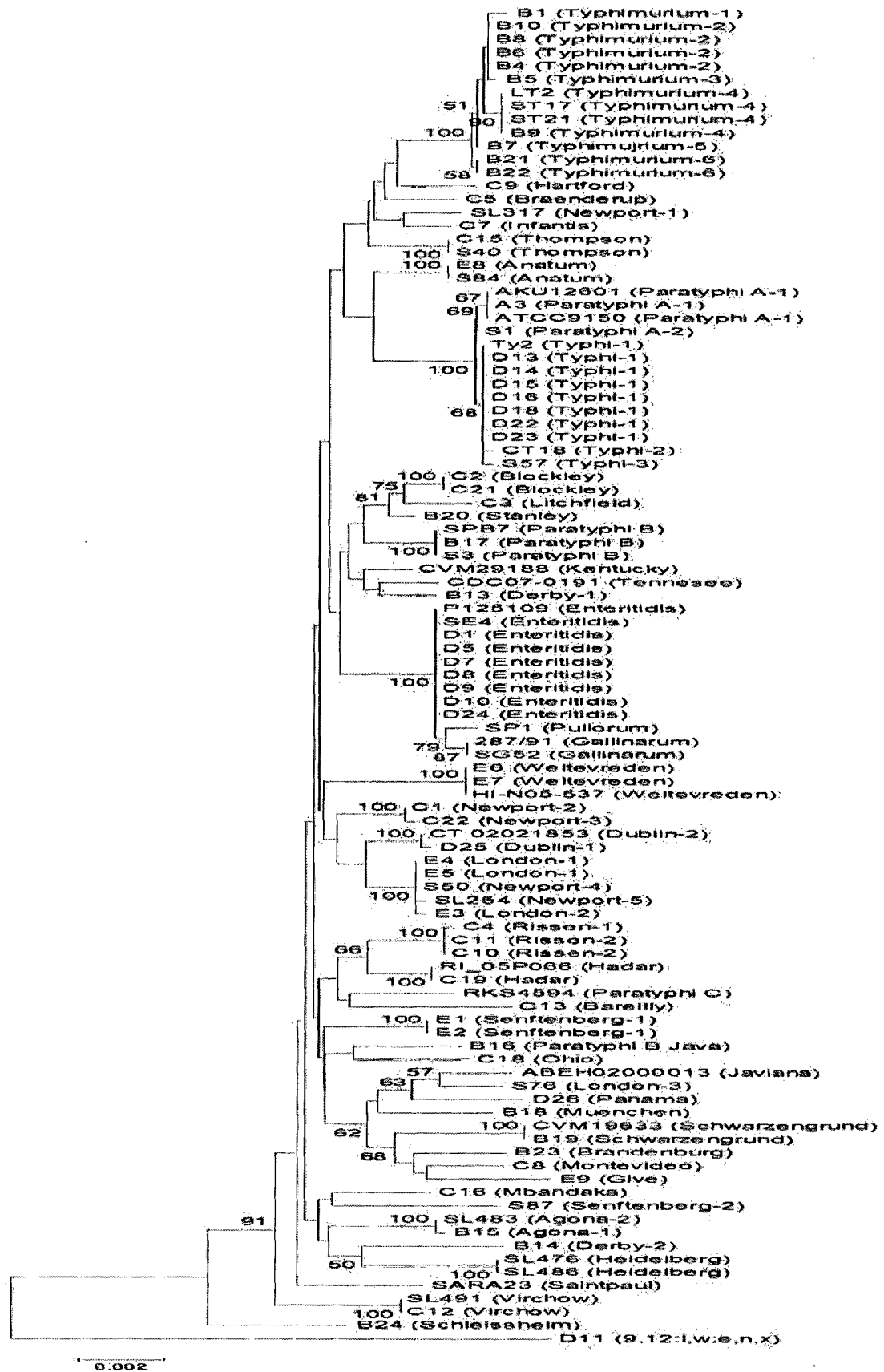
[청구항 11]

제8항의 프라이머를 포함하는 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 조성물.

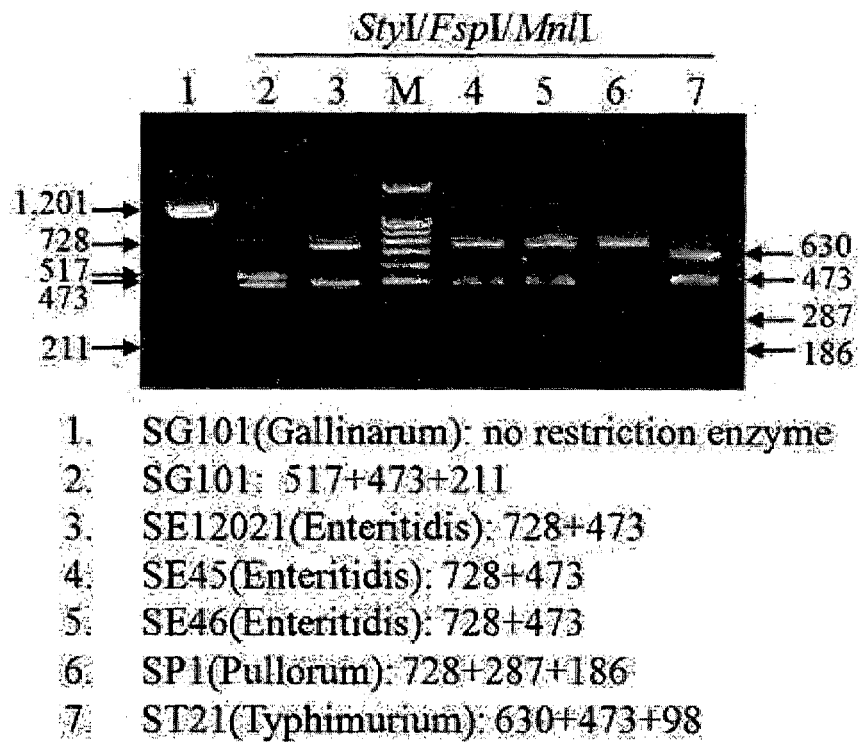
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 서열번호 5 내지 서열번호 14의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열을 가지는 1종 이상의 프라이머를 추가로 포함하는 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 조성물.
- [청구항 13] 제9항의 프라이머 쌍을 포함하는 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 조성물.
- [청구항 14] 제10항의 프라이머를 포함하는 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 조성물.
- [청구항 15] 제11항 내지 제14항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 살모넬라

- 속 미생물의 혈청형 동정용 키트.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 키트는 PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 키트, allele-specific PCR 키트, 실시간 PCR 키트, DNA 칩 키트 또는 서던 블랏팅 키트인 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 키트.
- [청구항 17] 서열번호 15 내지 서열번호 75의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열을 가지는 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 살모넬라 속 미생물의 혈청형 동정용 조성물.
- [청구항 18] 서열번호 15, 서열번호 16, 서열번호 17, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 24, 서열번호 25, 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 31, 서열번호 32, 서열번호 33, 서열번호 34, 서열번호 38, 서열번호 43, 서열번호 44, 서열번호 45, 서열번호 47, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 54, 서열번호 55, 서열번호 56, 서열번호 57, 서열번호 59, 서열번호 60, 서열번호 61, 서열번호 63, 서열번호 64, 서열번호 65, 서열번호 66, 서열번호 67, 서열번호 68, 서열번호 70, 서열번호 74 및 서열번호 75의 염기서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열을 가지는 살모넬라 속 미생물의 *rpoB* 폴리뉴클레오티드.

[Fig.1]



[Fig.2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2012/011245**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12Q 1/04(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: salmonella, serotype, rpoB gene

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Kwon, H. J. et al. Application of nucleotide sequence of RNA polymerase beta-subunit gene (rpoB) to molecular differentiation of serovars of Salmonella enterica subsp. enterica. Veterinary Microbiology, 20 September 2001, Vol. 82, No. 2, pages 121-129 -Abstract and page 127, paragraph 2	1-18
A	Bustamante, V. H. et al. Identification of Campylobacter jejuni and C. coli using the ropB gene and a cryptic DNA fragment from C. jejuni. Gene, 07 November 1995, Vol. 165, No. 1, pages 1-8 -See the entire document.	1-18
A	Mshana, S. E. et al. Outbreak of a novel Enterobacter sp. carrying blaCTX-M-15 in a neonatal unit of a tertiary care hospital in Tanzania. International Journal of Antimicrobial Agents, Epub 12 July 2011, Vol. 38, No. 3, pages 565-269 -See the entire document.	1-18
A	Adékambi, T. et al. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. Trends in Microbiology, January 2009, Vol. 17, No. 1, pages 37-45 -See the entire document.	1-18



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 APRIL 2013 (29.04.2013)

Date of mailing of the international search report

29 APRIL 2013 (29.04.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2012/011245

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) <i>C12Q 1/04(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i</i>																	
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/04 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: salmonella, serotype, rpoB gene																	
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>Kwon, H. J. et al. Application of nucleotide sequence of RNA polymerase beta-subunit gene (rpoB) to molecular differentiation of serovars of Salmonella enterica subsp. enterica. Veterinary Microbiology, 20 September 2001, Vol. 82, No. 2, pages 121-129 -요약 및 페이지 127, 문단 2</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Bustamante, V. H. et al. Identification of Campylobacter jejuni and C. coli using the rpoB gene and a cryptic DNA fragment from C. jejuni. Gene, 7 November 1995, Vol. 165, No. 1, pages 1-8 -전체 문헌 참조.</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Mshana, S. E. et al. Outbreak of a novel Enterobacter sp. carrying blaCTX-M-15 in a neonatal unit of a tertiary care hospital in Tanzania. International Journal of Antimicrobial Agents, Epub 12 July 2011, Vol. 38, No. 3, pages 565-269 -전체 문헌 참조</td> <td>1-18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Ad&eacute;kambi, T. et al. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. Trends in Microbiology, January 2009, Vol. 17, No. 1, pages 37-45 -전체 문헌 참조</td> <td>1-18</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	A	Kwon, H. J. et al. Application of nucleotide sequence of RNA polymerase beta-subunit gene (rpoB) to molecular differentiation of serovars of Salmonella enterica subsp. enterica. Veterinary Microbiology, 20 September 2001, Vol. 82, No. 2, pages 121-129 -요약 및 페이지 127, 문단 2	1-18	A	Bustamante, V. H. et al. Identification of Campylobacter jejuni and C. coli using the rpoB gene and a cryptic DNA fragment from C. jejuni. Gene, 7 November 1995, Vol. 165, No. 1, pages 1-8 -전체 문헌 참조.	1-18	A	Mshana, S. E. et al. Outbreak of a novel Enterobacter sp. carrying blaCTX-M-15 in a neonatal unit of a tertiary care hospital in Tanzania. International Journal of Antimicrobial Agents, Epub 12 July 2011, Vol. 38, No. 3, pages 565-269 -전체 문헌 참조	1-18	A	Adékambi, T. et al. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. Trends in Microbiology, January 2009, Vol. 17, No. 1, pages 37-45 -전체 문헌 참조	1-18
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항															
A	Kwon, H. J. et al. Application of nucleotide sequence of RNA polymerase beta-subunit gene (rpoB) to molecular differentiation of serovars of Salmonella enterica subsp. enterica. Veterinary Microbiology, 20 September 2001, Vol. 82, No. 2, pages 121-129 -요약 및 페이지 127, 문단 2	1-18															
A	Bustamante, V. H. et al. Identification of Campylobacter jejuni and C. coli using the rpoB gene and a cryptic DNA fragment from C. jejuni. Gene, 7 November 1995, Vol. 165, No. 1, pages 1-8 -전체 문헌 참조.	1-18															
A	Mshana, S. E. et al. Outbreak of a novel Enterobacter sp. carrying blaCTX-M-15 in a neonatal unit of a tertiary care hospital in Tanzania. International Journal of Antimicrobial Agents, Epub 12 July 2011, Vol. 38, No. 3, pages 565-269 -전체 문헌 참조	1-18															
A	Adékambi, T. et al. The rpoB gene as a tool for clinical microbiologists. Trends in Microbiology, January 2009, Vol. 17, No. 1, pages 37-45 -전체 문헌 참조	1-18															
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																	
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																	
국제조사의 실제 완료일 2013년 04월 29일 (29.04.2013)		국제조사보고서 발송일 2013년 04월 29일 (29.04.2013)															
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 김남경 전화번호 481-5591 															

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음