



(51) 국제특허분류:

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2017/012510

(22) 국제출원일:

2017년 11월 7일 (07.11.2017)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2017-0105212 2017년 8월 21일 (21.08.2017) KR

(71) 출원인: 경상대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).

(72) 발명자: 좌원식 (KWAK, Youn-Sig); 52667 경상남도 진주시 진주대로 1317, 110동 901호, Gyeongsangnam-do (KR). 홍성원 (HONG, Sungwon); 46223 부산시 금정구 남산로43번길 26, 302호, Busan (KR).

(74) 대리인: 최규환 (CHOL, Kyu Whan); 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, 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 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

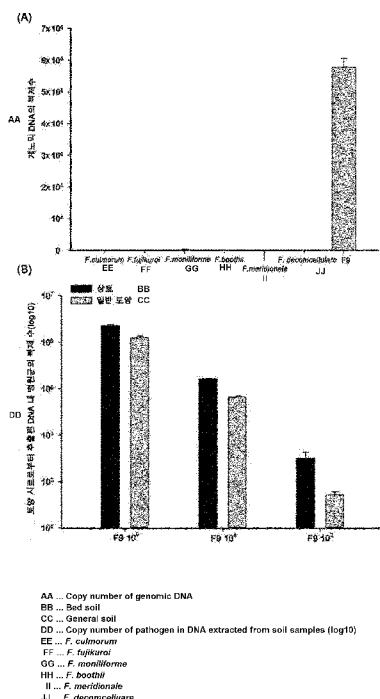
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: PRIMER SET FOR SPECIFICALLY DETECTING *FUSARIUM OXYSPORUM* F. SP *FRAGARIAE* AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 딸기 위황병 병원균을 특이적으로 검출하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도

(57) Abstract: The present invention relates to a primer set for specifically detecting *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* comprising an oligonucleotide primer set of SEQ ID NOs: 1 and 2, a kit comprising the primer set, and a method for specifically detecting *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* by using the primer set.(57) 요약서: 본 발명은 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 딸기 위황병 병원균(*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*)을 특이적으로 검출하기 위한 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 키트 및 상기 프라이머 세트를 이용하여 딸기 위황병 병원균을 특이적으로 검출하는 방법에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 딸기 위황병 병원균을 특이적으로 검출하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 딸기 위황병 병원균을 특이적으로 검출하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*)은 전 세계적으로 많은 종의 식물에 심각한 병을 일으키는 병원균으로 기주 특이성이 높아서 병을 일으키는 기주에 따라 120개 이상의 기주 분화형(formae specialis, 이하 f.sp)으로 구성되어 있다. 딸기에 발생하는 시들음병 또는 위황병에 대한 병원균은 푸사리움 옥시스포룸 f.sp 프라가리아에(*Fusarium oxysporum* f.sp *fragariae*)이다.
- [3] 푸사리움에 의한 병의 발병은 토양 환경과 밀접한 관련이 있는데, 딸기 시들음병은 전염원인 후막포자가 토양 속에 생존하여 전염하는 토양전염성 병해이다. 또한 이병모주로부터 발생하는 런너를 통해 자묘로 침입하여 발병시키는 영양번식전염도 가능하며, 토양 병 방제를 위해 토양 훈증이나 약제 살포 방법을 사용할 경우 토양 미생물상의 파괴와 환경에 큰 영향으로 사용이 쉽지 않은 실정이다. 또한 무병묘를 확보하기 위해서는 조직배양을 통한 건전묘 육성이 되어야 하는데 이에 따른 많은 시간과 노력이 투입되어야 하는 문제점이 있다. 시들음병에 대한 생물학적 방제 연구는 오랜 역사를 가지고 있지만 실용화된 방제방법은 효과적이지 않거나, 처리하기 쉽지 않은 문제점이 있다.
- [4] 본 발명에서는 딸기 재배지에 막대한 경제적 피해를 끼치는 딸기 위황병 병원균에 대해 신속하고 정확한 검출을 위한 진단 프라이머를 개발하고자 하였다. 또한, 토양 내 병원균 밀도에 따른 딸기 위황병 발생의 상관관계를 구명하기 위해, 정량적인 진단이 가능하도록 프로토콜을 구축하고자 하였다.
- [5] 한편, 한국공개특허 제2017-0018209호에는 '양배추 시들음병 저항성 관련 마커를 표지하는 프라이머 세트 및 이를 이용한 저항성 양배추 품종 선별 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1681645호에는 '무에 시들음병을 일으키는 푸자리움 옥시스포룸 라파니 검출용 프라이머 세트 및 이를 이용한 푸자리움 옥시스포룸 라파니 검출 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 딸기 위황병 병원균을 특이적으로 검출하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 딸기 위황병 병원균인 *Fusarium oxysporum* f.sp *fragariae*의 특이적 유전자 영역을

이용하여, 딸기 위황병 병원균을 정확하게 검출할 수 있는 qRT-PCR용 프라이머를 개발하였고, 상기 프라이머 세트가 딸기 위황병 병원균에만 특이적으로 반응하며, 병원균 밀도에 따른 정량적 분석이 가능함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [7] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 딸기 위황병 병원균(*Fusarium oxysporum* f.sp *fragariae*)을 특이적으로 검출하기 위한 프라이머 세트를 제공한다.
- [8] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 딸기 위황병 병원균을 특이적으로 검출하기 위한 키트를 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 이용하여 딸기 위황병 병원균을 특이적으로 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [10] 본 발명의 프라이머 세트를 이용하면 딸기의 육묘 재배 및 본답 재배시에 토양내 존재하는 병원균의 밀도를 상시 체크하여, 딸기 위황병을 조기에 예측 및 진단할 수 있어 딸기 재배지의 위황병 피해로 인한 경제적 손해를 줄일 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [11] 도 1은 딸기 위황병 병원균(*Fusarium oxysporum* f.sp *fragariae*)에 특이적인 유전지역 Han-Skippy의 염기서열 정보와 본 발명의 프라이머 세트의 위치를 보여준다.
- [12] 도 2는 본 발명의 딸기 위황병 병원균 검출용 프라이머 세트를 이용한 qRT-PCR 표준 곡선으로, r^2 값이 0.99 이상으로 표준 곡선을 신뢰할 수 있음을 보여주는 결과이다.
- [13] 도 3은 본 발명의 딸기 위황병 병원균 검출용 프라이머 세트의 특이성 및 민감도를 검증하기 위해, 딸기 위황병 병원균(*Fusarium oxysporum* f.sp *fragariae*) 외의 푸사리움 속 6종의 곰팡이를 이용하여 qRT-PCR을 수행한 결과(A)와, 딸기 위황병 병원균을 처리한 상토(bed soil) 및 일반 토양(soil)으로부터 DNA를 추출하여 qRT-PCR을 수행한 결과(B)이다. F9: *Fusarium oxysporum* f.sp *fragariae*.
- [14] 도 4는 식재된 딸기에 위황병 병원균을 농도별로 접종시킨 후, 총 5주 동안 육안으로 병징을 조사한 결과(A)와 토양 내 위황병 병원균의 밀도를 qRT-PCR로 분석한 결과(B)이다. CK: 위황병 병원균을 접종하지 않은 대조구.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [15] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 딸기 위황병 병원균(*Fusarium oxysporum* f.sp *fragariae*)을 특이적으로 검출하기 위한 프라이머 세트를 제공한다.

- [16] 상기 프라이머는 서열번호 1의 서열 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 서열번호 2의 서열 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 서열번호 1 및 2의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.
- [17] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.
- [18] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.
- [19] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은, 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 딸기 위황병 병원균(*Fusarium oxysporum* f.sp *fragariae*)을 특이적으로 검출하기 위한 키트를 제공한다.
- [20] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [21] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 키트는 또한 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, 역전사 완충액 및 PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.
- [22] 또한, 본 발명은
- [23] 딸기 시료 또는 딸기가 식재된 토양 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [24] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [25] 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 딸기 위황병 병원균(*Fusarium oxysporum* f.sp *fragariae*)을 특이적으로 검출하는 방법을 제공한다.
- [26] 본 발명의 방법은 딸기 시료 또는 딸기가 식재된 토양 시료에서 게놈(genomic) DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은

당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, CTAB 방법을 이용할 수도 있고, Wizard prep 키트(Promega 사)를 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재

증폭시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Q β 복제효소(replicase)를 통한 증폭 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법이 있다. 이 중에서, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.

[27] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy-5 또는 Cy-3이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트는 전술한 것과 같다.

[28] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 딸기 위황병 병원균을 검출하는 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하며, 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 젤 전기영동, 모세관 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 모세관 전기영동을 수행할 수 있다. 모세관 전기영동은 예를 들면, ABi Sequencer를 이용할 수 있다. 또한, 젤 전기영동을 수행할 수 있으며, 젤 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 젤 전기영동 또는 아크릴아미드 젤 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

[29]

[30] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을

예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[31]

[32] 실시예 1. 딸기위황병 병원균에서 Han-Skippy 유전자를 이용한 qRT-PCR용 프라이머 제작 및 표준 곡선 조건

[33] 2016년 2월부터 딸기 위황병 병원균(*Fusarium oxysporum* f.sp *fragariae*)의 특이적 영역으로 알려진 Han-skippy 유전자(서열번호 3)를 이용하여, 딸기 위황병 병원균만 검출되는, PCR 산물의 길이가 72bp 이며 Tm(melting temperature) 값은 51°C인 qRT-PCR(quantitative real time PCR)용 프라이머를 제작하였다(도 1).

[34] 제작된 프라이머 세트는 각각 정방향 Fofra qPCR F : 5'-TTC GCT CCT CCC ATA CAA-3' (서열번호 1) 및 역방향 Fofra qPCR R: 5'-AAA CCA CGC AGA GAG TAA A-3' (서열번호 2)의 프라이머 세트로, 상기 프라이머 세트를 이용하여, DNA 양에 따른 Ct(threshold cycle) 값을 확보하여 절대정량을 파악하고자 표준 곡선(standard curve)을 작성하였다. qRT-PCR 반응물은 Syber-Green Master mix(Toyobo, 일본) 25 μ l, DNA 1~10ng, 프라이머 각각 2 μ l 및 멸균수를 이용하여 총 50 μ l의 용량으로 맞추었으며, qRT-PCR 반응조건은 하기 표 1과 같고, DNA는 100ng 부터 0.01ng 까지 10배씩 희석하여 사용하였다. qRT-PCR 결과, Ct 값은 10배씩 희석된 농도를 처리한 DNA 시료마다 약 3.3 Ct 차이 나는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 본 발명의 프라이머 세트가 주형 시료를 정량적으로 정확하게 검출할 수 있음을 확인할 수 있었다(도 2).

[35] [표1]

qRT-PCR 반응조건

단계	온도 (°C)	시간
전-변성	95	1분
변성	95	30초
결합	51	30초
신장	72	45초
변성 단계로 돌아가 39회 추가 반복		
최종 신장	72	5분
보관	4	∞

[36]

[37] 실시예 2. 프라이머 세트의 특이성 및 민감도 분석

[38] 딸기 위황병 병원균에 특이적인 본 발명의 프라이머 세트가 푸사리움 속(*Fusarium*)의 다른 병원균의 DNA에 비특이적 반응을 보이는지 확인하기 위해, KACC(농업미생물자원센터)에서 6종의 푸사리움 속 병원균을 분양받은 후 상기

실시에 1과 동일한 조건으로 qRT-PCR을 수행하였다. 그 결과, 딸기 위황병 병원균을 제외한 다른 병원균의 DNA 시료에는 본 발명의 프라이머 세트가 반응을 보이지 않는 것을 알 수 있었다(도 3A).

- [39] 또한 일반 토양 및 상토에 딸기 위황병 병원균을 10^6 , 10^4 , 또는 10^2 cfu/ml의 농도로 처리한 후, 각각의 토양 시료로부터 FastDNA SPIN kit for soil(MP Biomedicals, 미국)을 사용하여 DNA를 추출하였다. 간단하게, 채집한 딸기 근권(rhizosphere) 0.5~0.7g를 Lysing matrix E tube에 담은 후, $978\mu\text{l}$ SPB 버퍼와 $122\mu\text{l}$ MT 버퍼를 넣어준 후, 비드비트 기계를 이용하여 스피드 6.0로 10분간 섞어주었다. 상기 시료를 14,000rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상층액을 2ml 튜브에 옮겨준 다음 PPS 버퍼 $250\mu\text{l}$ 를 넣고 10분간 반응시킨 후 14,000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상층액을 15ml 튜브에 옮겨준 후 1ml binding matrix 버퍼를 넣은 후 2분간 교반하고, 3분간 반응시켰다. 반응시킨 용액의 최상층액 $500\mu\text{l}$ 를 버리고, 나머지 용액을 피펫팅(pipetting)하여 잘 섞은 후 spin 튜브에 최대 $700\mu\text{l}$ 씩 옮긴 후 1분간 원심분리한 후 하층액을 버리는 과정을 총 2회 수행하였다. 그 후, $500\mu\text{l}$ prepared sews-m 버퍼를 첨가한 후 1분간 원심분리한 후 하층액을 버리고 원심분리를 한번 더 실시하였다. 하층액이 버려진 샘플은 상온에서 5분간 말린 후 다시 DES 버퍼 50~100 μl 를 넣은 후 55°C에서 5분간 반응시킨 후, 1분간 원심분리하여 하층액을 새로운 튜브에 옮기고, 추후 실험에 이용하였다. 각각의 토양으로부터 추출된 DNA를 이용하여 상기 실시예 1과 동일한 조건으로 qRT-PCR을 수행한 후, Ct 값을 분석하여 표준 곡선에 대응하는 DNA 양을 각각 계산하였다. 그 결과, 각 시료에 대해서 병원균 처리 농도와 유사하게 DNA 양이 상응하게 확인되어, 본 발명의 프라이머 세트가 정량적 검출능이 우수함을 확인할 수 있었다(도 3B).

[40]

[41] 실시예 3. 토양 내 딸기 위황병 병원균 농도와 위황병 발병 정도 실험

- [42] 딸기를 심은 후 딸기 위황병 병원균을 각각 10^1 , 10^3 , 10^5 , 또는 10^7 cfu/ml/토양 g의 농도로 접종하고, 육안상 관찰되는 병 발생 정도와 실제 토양 내 존재하는 병원균 밀도와의 상관관계를 분석하였다. 구체적으로는, 딸기 식재 후 1주일간 딸기를 재배한 후, 딸기 위황병 병원균을 서로 다른 농도로 딸기 뿌리 부분에 상처를 입혀 접종시켰다. 그 후, 총 5주 동안 매 주마다 육안조사를 실시하였으며, 병의 증상에 따라 1~5점 기준을 정하고, 그에 해당되는 증상에 표기하는 방식을 사용하였다. 점수의 기준은 다음과 같다: 1; 1개 잎이 뒤틀리거나 시들음 증상, 2; 3개 잎이 뒤틀리거나 시들음 증상, 3; 전체적으로 시들음 증상, 4; 부분 괴사 증상, 5; 전체 괴사.

- [43] qRT-PCR 분석은 병원균 접종 5주 후, 토양 시료로부터 DNA를 추출하고 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 반응을 수행한 후, 표준 곡선을 이용하여 토양내 병원균 밀도를 계산하였다. 육안조사에서 병징이 뚜렷하게 나타나는 처리구역은 10^5 및 10^7 cfu/ml의 농도로 병원균을 처리한 군이었으며(도 4A), 각

처리군의 토양 내 병원균 밀도를 확인한 결과에서는, 10^5 및 10^7 cfu/ml의 농도로 병원균을 처리한 군에서 무처리 대조군보다 높은 수준의 병원균 밀도가 확인되어, 토양 내에 딸기 위황병 병원균의 밀도가 10^5 cfu/ml 농도 이상 존재할 때 병이 발병한다는 것을 유추할 수 있었다(도 4B).

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 딸기 위황병 병원균(*Fusarium oxysporum* f.sp *fragariae*)을 특이적으로 검출하기 위한 프라이머 세트.
- [청구항 2] 제1항의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 딸기 위황병 병원균을 특이적으로 검출하기 위한 키트.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것인 키트.
- [청구항 4] 딸기 시료 또는 딸기가 식재된 토양 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 딸기 위황병 병원균(*Fusarium oxysporum* f.sp *fragariae*)을 특이적으로 검출하는 방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것인 방법.

[도1]

Han-Skippy 염기서열 정보 및 본 발명의 프라이머 세트의 위치

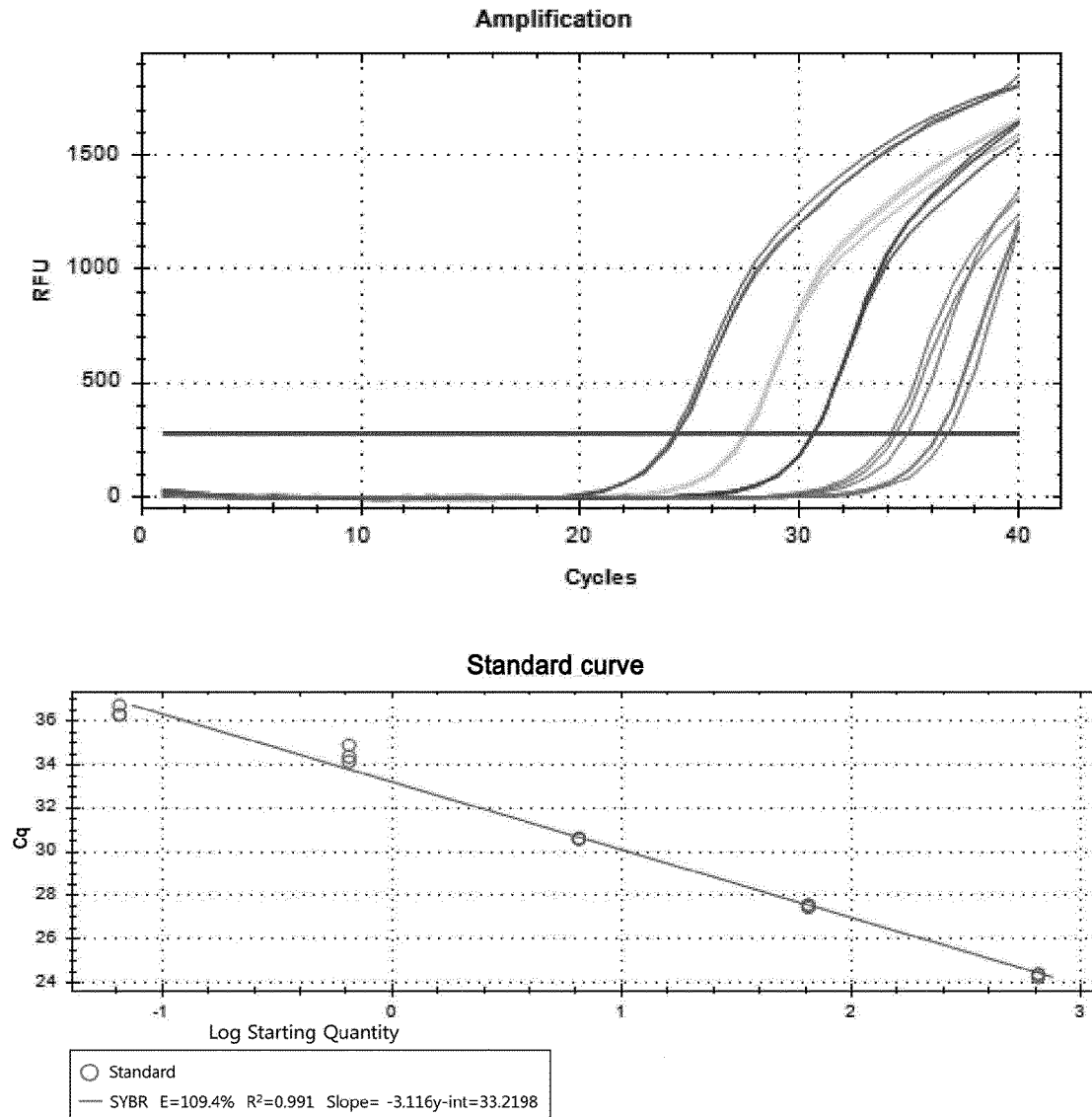
Han-Skippy complete sequence (223bp)

5'-CACCAGACTGGGGTGCTTAAAGTTTATTACCATCCAGGACCACCTAATGCATAACTAAAATTTTCGCTCCT
 CCCATACAAAATCCAAATTTTATGATGCCACAAAAAGGCCCGATTCTCAATTAATAAATGAGACTTTGGAG
 AAAGTTTCTAGAAAATTGCTCAAATTTTACTCTCTGCGTGGTTTTTGACCTCCCGACCGCTGCGTGTGC
 GCTGGCAGTGCTT-3'

Fofra qPCR R

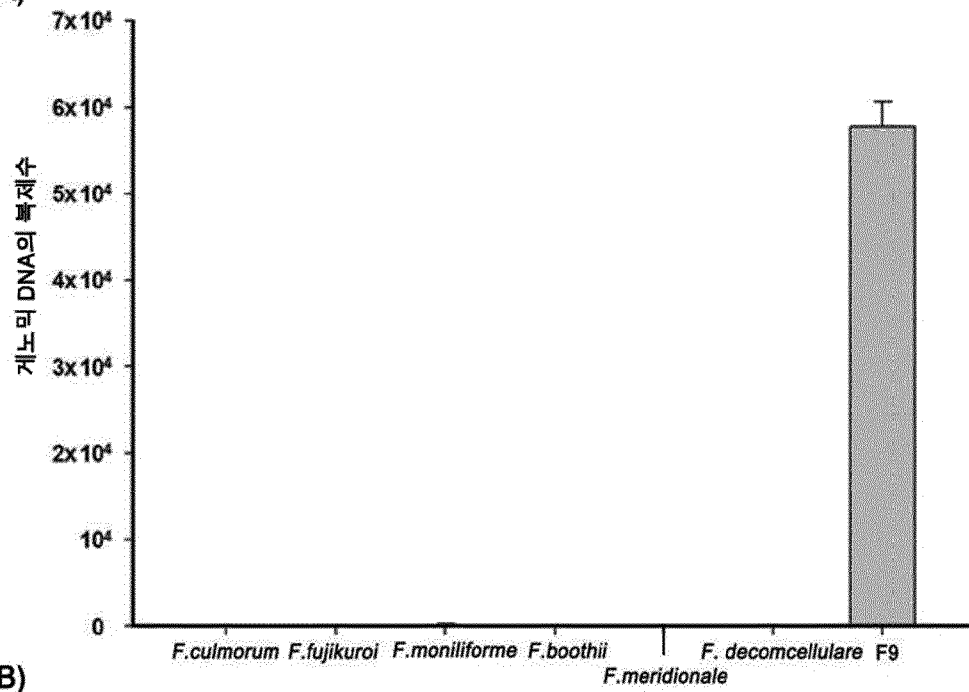
Fofra qPCR F

[도2]

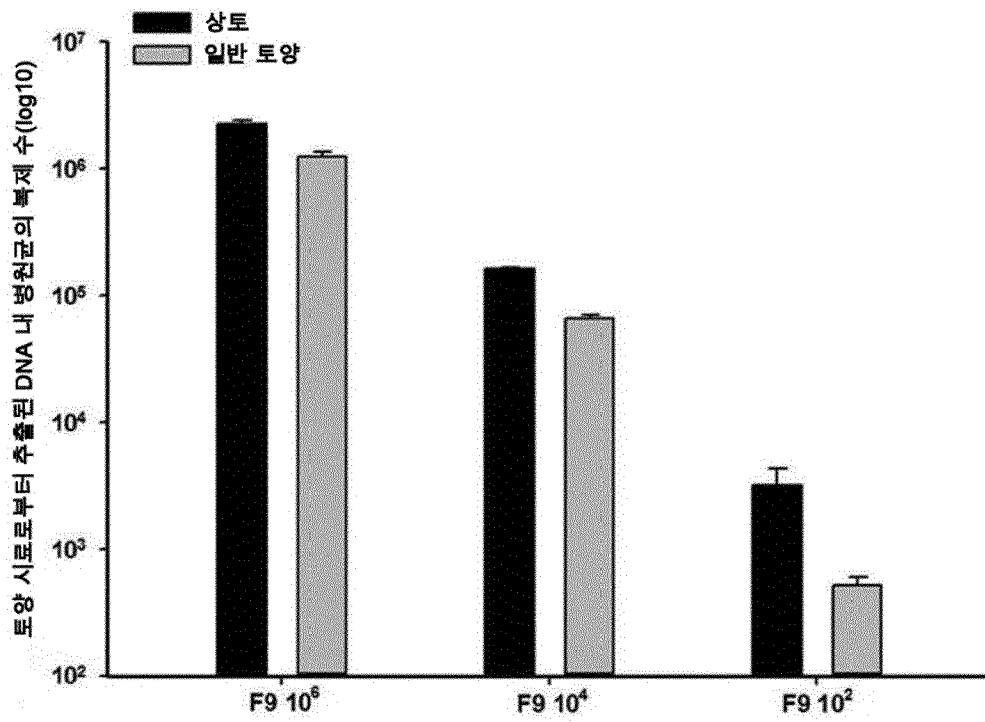


[도3]

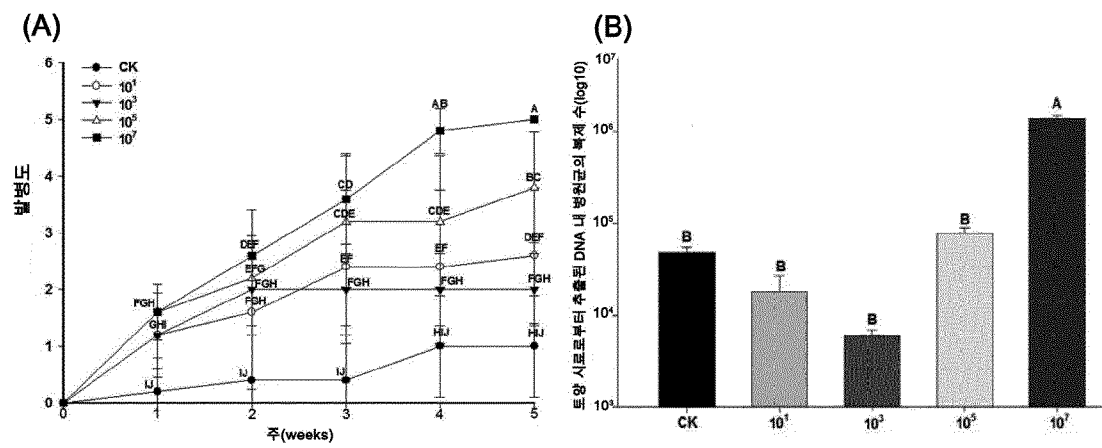
(A)



(B)



[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/012510

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(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 1/68; 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: strawberry, chlorosis, pathogenic bacterium, Fusarium oxysporum f.sp fragariae, detection, primer, reagent, amplification

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SUGA, H. et al., "Development of PCR Primers to Identify Fusarium Oxysporum f. sp. Fragariae", Plant Disease, May 2013, vol. 97, no. 5, pages 619-625 See abstract; page 620, right column, paragraph [2]-page 621, left column, paragraph [1]; table 2; figure 1.	1-5
Y	MIRMAJLESSI, S. M. et al., "PCR-based Specific Techniques Used for Detecting the Most Important Pathogens on Strawberry: a Systematic Review", Systematic Reviews, 2015, vol. 4, document no. 9, pages 1-11 See abstract; page 6, left column, paragraph [1].	1-5
Y	GenBank: JX204304.1 (23 April 2014) See the entire document.	1-5
A	KR 10-1681645 B1 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) 01 December 2016 See paragraph [0050]; claims 1-8.	1-5
A	JP 2010-046038 A (UNIV. OF TOKUSHIMA et al.) 04 March 2010 See claims 1-8.	1-5



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

09 JANUARY 2018 (09.01.2018)

Date of mailing of the international search report

10 JANUARY 2018 (10.01.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/012510

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1681645 B1	01/12/2016	NONE	
JP 2010-046038 A	04/03/2010	JP 5522820 B2	18/06/2014

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12Q 1/68; 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: 딸기, 위황병, 병원균, Fusarium oxysporum f.sp fragariae, 검출, 프라이머, 시약, 증폭

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SUGA, H. 등, 'Development of PCR primers to identify Fusarium oxysporum f. sp. fragariae', Plant Disease, 2013.05, 97권, 5호, 페이지 619-625 초록; 페이지 620, 오른쪽 칼럼, 단락 2 - 페이지 621, 왼쪽 칼럼, 단락 1; 표 2; 도면 1 참조.	1-5
Y	MIRMAJLESSI, S. M. 등, 'PCR-based specific techniques used for detecting the most important pathogens on strawberry: a systematic review', Systematic Reviews, 2015, 4권, 문헌번호 9, 페이지 1-11 초록; 페이지 6, 왼쪽 칼럼, 단락 1 참조.	1-5
Y	GenBank: JX204304.1 (2014.04.23) 전체 문헌 참조.	1-5
A	KR 10-1681645 B1 (한국화학연구원) 2016.12.01 단락 [0050]; 청구항 1-8 참조.	1-5
A	JP 2010-046038 A (UNIV. OF TOKUSHIMA 등) 2010.03.04 청구항 1-8 참조.	1-5

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 01월 09일 (09.01.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 01월 10일 (10.01.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

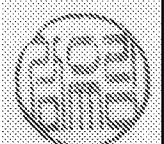
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

감유림

전화번호 +82-42-481-3516



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-1681645 B1

2016/12/01

없음

JP 2010-046038 A

2010/03/04

JP 5522820 B2

2014/06/18