



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0119038
(43) 공개일자 2011년11월02일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0038505

(22) 출원일자 2010년04월26일

심사청구일자 2010년04월26일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전 유성구 궁동 220 충남대학교

(72) 발명자

김홍기

충청남도 공주시 교동 대우아파트 104-502호

최진수

충청남도 공주시 신관동 22-50

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

박창희, 김종관, 권오식

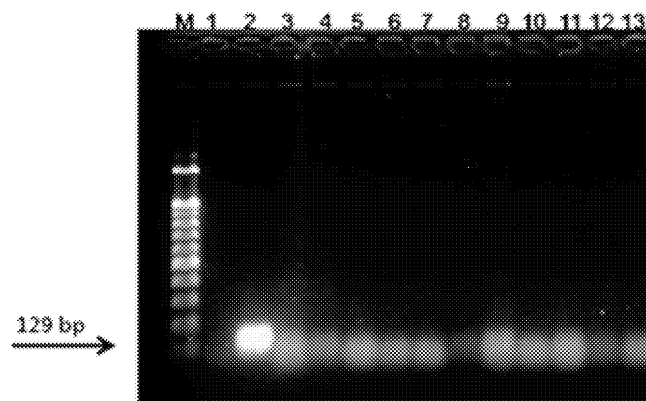
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 뿌리혹 병균 포자에 특이적으로 결합하는 프라이머 및 이를 이용한 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단방법

(57) 요약

본 발명은 뿌리혹 병균 포자에 특이적으로 결합하는 프라이머 및 이를 이용한 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단방법에 관한 것으로, 상기 뿌리혹 병 진단방법은 생물학적 효소 및 물리적인 요소에 매우 안정하고 검출하는 방법으로, 매우 간단하며 또한, 뿌리혹병 균 포자의 검출에 중 특이성을 가지고 있는 프라이머를 이용함으로써 단시간 내에 뿌리혹병 균 포자의 검출이 이루어지므로 조기에 신속하고 정확하게 검사할 수 있어, 조기 뿌리혹병의 진단으로 인한 효율적인 방제를 가능하게 할 것이다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

송정영

대전광역시 중구 옥계동 35-6

임용표

대전광역시 유성구 지족동 894-5 SK허브아파트 914호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 607003053SB230

부처명 응용생물화학식품학부

연구관리전문기관

연구사업명 배추분자마커연구사업단

연구과제명 배추 뿌리혹병 저항성 마커 개발

기여율

주관기관 농림기술관리센터

연구기간 2007년 8월 1일~2012년 7월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

(1) 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*) 균주의 18S rDNA, 5.8S rDNA 및 28S rDNA로부터 선택되는 하나 이상의 리보솜 DNA 오페론 상에 존재하는 ITS(interual transcribed spacer) 유전자를 종 특이적으로 증폭시키는 뿌리혹 병 진단용 프라이머 세트의 존재 하에, 작물 또는 토양으로부터 채취한 뿌리혹 병 균주의 포자로부터 추출한 DNA에 대해 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행하고;

(2) 상기 PCR에 의한 유전자 증폭을 분석하여 십자화과 작물에 발생하는 뿌리혹 병 유무를 결정하는:

단계를 포함하는, 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*) 균주와 종 특이적으로 반응하는 서열번호1, 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7로부터 선택되는 1나 이상의 정방향 프라이머와 서열번호2, 서열번호4, 서열번호6 및 서열번호8로부터 선택되는 하나 이상의 역방향 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 하는 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단방법.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 서열번호1/ 서열번호 2, 서열번호3/ 서열번호 4, 서열번호5/ 서열번호 6 및 서열번호7/ 서열번호 8 중 적어도 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단방법.

청구항 4

제 1 내지 제 3항에서 선택되는 어느 한 항에 있어서,

상기 뿌리혹 병 진단방법은 PCR 반응물에 작물 또는 토양으로부터 채취한 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*) 균주의 포자로부터 추출한 DNA를 포함하는 것을 특징으로 하는 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 포자는 10^{-1} spore/ μ l 이상의 농도인 것을 특징으로 하는 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단방법.

청구항 6

서열번호1/ 서열번호 2, 서열번호3/ 서열번호 4, 서열번호5/ 서열번호 6 및 서열번호7/ 서열번호 8 중 적어도 하나 이상을 포함하는, 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단 프라이머 세트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 뿌리혹 병균 포자에 특이적으로 결합하는 프라이머 및 이를 이용한 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 배추는 경제적 측면에서 우리나라 4대 채소작물 중의 하나로 국내 재배면적은 약 3만 5천 ha에 달하며, 이는 전체 채소 재배면적 중 약 11.3 %를 차지하고 있으며, 생산량은 약 230만 톤으로 시장 규모 또한 약 1조원에 달하

는 것으로 추정되고 있다.

[0003] 이와 같이 소비량이 매우 많고 중요한 작물인 배추에 1990년대 이후 뿌리혹 병(무사마귀병) 발생이 급격히 증가하여 전국적으로 큰 피해를 주고 있으며, 그 대상 기주도 배추는 물론 무, 양배추, 순무, 케일, 갯, 브로콜리, 애기장대, 냉이, 비트, 한련화 및 파파야 등으로 다양하며, 상기 뿌리혹 병의 원인균 역시 토양전염성 병원균으로서 토양 내에서 최고 15년까지도 생존이 가능한 것으로 알려져 있어 초기 진단 및 예방이 어려운 것이 현실이다.

[0004] 이에 뿌리혹병균의 검출을 위해 형광현미경을 이용한 형태 관찰법이 사용되어지고 있으나 검출에 시간이 많이 소요되고 고가의 장비가 필요한 문제하다. 상기 문제점을 해결하기 위하여 최근 식물병원균 검출에 많이 이용되고 있는 신속하고 감도가 높은 분자생물학적 검출법이 필요한 상황이다. 그러나 뿌리혹병균의 검출을 위해 Ito 등(2001)에 의해 특이적 프라이머가 제작되었으나 감도가 떨어지고 토양에 적용된 바가 없었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 따라서, 본 발명자들은 뿌리혹병균을 신속, 정확하게 검출 또는 분리할 수 있는 방법을 개발하고자 노력한 결과, 뿌리혹병균 포자만을 선택적으로 결합할 수 있는 프라이머를 선정 한 후, 상기 프라이머를 이용하여 뿌리혹병균 포자를 신속하고 정확하게 분리할 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0006] 본 발명의 목적은 뿌리혹병균 포자만을 선택적으로 결합할 수 있는 프라이머 를 이용하여 뿌리혹병균 포자를 신속하고 정확하게 분리할 수 있는 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단방법을 제공하고자 한다.

[0007] 본 발명의 목적은 상기 뿌리혹병균 포자를 신속하고 정확하게 분리할 수 있는 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단 방법에 이용되는 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단 프라이머 세트를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 뿌리혹병균 포자만을 선택적으로 결합할 수 있는 프라이머 및 상기 프라이머를 이용하여 뿌리혹병균 포자를 신속하고 정확하게 분리할 수 있는 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단방법을 제공한다.

[0009] 이하 첨부한 도면들을 참조하여 본 발명의 제조방법을 상세히 설명한다. 다음에 소개되는 도면들은 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 예로서 제공되는 것이며 과장되어 도시될 수 있다.

[0010] 이때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.

[0011] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0012] 본 발명은

[0013] (1) 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*) 균주의 18S rDNA, 5.8S rDNA 및 28S rDNA로부터 선택되는 하나 이상의 리보솜 DNA 오페론 상에 존재하는 ITS(intervual transcribed spacer) 유전자를 종 특이적으로 증폭시키는 뿌리혹 병 진단용 프라이머 세트의 존재 하에, 작물 또는 토양으로부터 채취한 뿌리혹 병 균주의 포자로부터 추출한 DNA에 대해 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행하고;

[0014] (2) 상기 PCR에 의한 유전자 증폭을 분석하여 십자화과 작물에 발생하는 뿌리혹 병 유무를 결정하는:

[0015] 단계를 포함하는, 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단방법은 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*) 균주의 18S rDNA, 5.8S rDNA 및 28S rDNA로부터 선택되는 하나 이상의 리보솜 DNA 오페론 상에 존재하는 ITS(intervual transcribed spacer) 유전자의 염기서열을 증폭시키는 뿌리혹 병 진단용 프라이머 세트를 이용하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 보다 상세하게는 발명의 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단방법은 서열번호1/ 서열번호 2, 서열번호3/ 서열번호 4, 서열번호5/ 서열번호 6 및 서열번호7/ 서열번호 8 중 적어도 하나 이상을 포함하는 십자화과 작물의 뿌리혹

병 진단 프라이머 세트를 이용하는 것을 특징으로 한다.

- [0018] 본 발명의 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단방법은 작물 또는 토양으로부터 채취한 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*) 균주를 선택적으로 신속하고 정확하게 분리하는 것을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명은 뿌리혹병균 포자에 선택적으로 결합할 수 있는 염기서열을 선정하기 위하여, 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*) 균주의 18S rDNA, 5.8S rDNA 및 28S rDNA로부터 선택되는 하나 이상의 리보솜 DNA 오페론 상에 존재하는 ITS(interal transcribed spacer) 유전자의 염기서열을 증폭시키기 위한 프라이머를 디자인하였다. 도 1 및 도 2를 참조한다.
- [0020] 상기 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*) 균주의 18S rDNA, 5.8S rDNA 및 28S rDNA로부터 선택되는 하나 이상의 리보솜 DNA 오페론 상에 존재하는 ITS(interal transcribed spacer) 유전자의 염기서열은 뿌리혹병균 포자에 특이적으로 결합하는 중 특이적인 부위이며, 이는 이용한 뿌리혹병균 포자의 검출방법은 본 발명에 있어서 중요한 의미를 가진다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머 세트는 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*) 균주와 종 특이적으로 반응하는 서열번호1, 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 7로부터 선택되는 1나 이상의 정방향 프라이머와 서열번호2, 서열번호4, 서열번호6 및 서열번호8로부터 선택되는 하나 이상의 역방향 프라이머를 포함하는 것으로, 보다 상세하게는 상기 프라이머 세트는 서열번호1/ 서열번호 2, 서열번호3/ 서열번호 4, 서열번호5/ 서열번호 6 및 서열번호7/ 서열번호 8 중 적어도 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 뿌리혹 병 진단방법은 PCR 반응물에 작물 또는 토양으로부터 채취한 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*) 균주의 포자로부터 추출한 DNA를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 보다 상세하게는 알테나리아 소자에(*Alternaria sojae*), 시들음병 균(*Fusarium oxysporum*), 덩굴마름병 균(*Didymella bryoniae*), 감자역병 균(*Phytophthora infestans*), 모썩음병 균(*Pythium ultimum*), 탄저병 균(*Colletotrichum acutatum*), 잣빛곰팡이병 균(*Botrytis cinerea*), 인삼뿌리썩음병 균(*Cylindrocarpon destructans*), 관부썩음병 균(*Rhizoctonia solani*), 뿌리썩음병 균(*Verticillium dahliae*) 및 뿌리혹병 균(*Plasmodiophora brassicae*)의 포자로부터 추출한 DNA를 이용하여 뿌리혹병 균(*Plasmodiophora brassicae*)에 대한 종 특이성을 확인한 결과, 뿌리혹병 균(*Plasmodiophora brassicae*)이 감염된 식물체 이외에는 전혀 증폭이 이루어지지 않고 뿌리혹병 균의 DNA에서만 특이적으로 증폭되는 것을 확인할 수 있었다. 도 4를 참조한다.
- [0024] 또한 본 발명에 있어서, 상기 포자는 10^{-1} spore/ μ l 농도 이상인 것을 특징으로 한다.
- [0025] 보다 상세하게는 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*)의 포자 현탁액을 10^3 spores/ μ l로 조정 한 후, DNA를 분리한 것을 10배씩 희석하고 서열번호 1 및 서열번호 2(ITS1-1/ITS1-2) 프라이머를 이용하여 Real-time PCR을 수행하였다. 그 결과 10^{-1} 까지 검출이 가능하였으며, 기존의 Faggian 등(1999)에 의해 개발된 특이적 프라이머 세트 보다 종 특이성 뿐 아니라 검출 민감도 상당히 향상되는 것을 확인할 수 있었다.도 7을 참고한다.
- [0026] 본 발명은 서열번호1/ 서열번호 2, 서열번호3/ 서열번호 4, 서열번호5/ 서열번호 6 및 서열번호7/ 서열번호 8 중 적어도 하나 이상을 포함하는, 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단 프라이머 세트를 제공한다.
- [0027] 상기 프라이머 세트는 상기 서열번호1/ 서열번호 2, 서열번호3/ 서열번호 4, 서열번호5/ 서열번호 6 및 서열번호7/ 서열번호8를 사용하는 것을 특징으로 하며, 이는 뿌리혹병 균 포자에 특이적으로 결합하는 염기서열을 포함함으로써 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*)의 포자만을 검출할 수 있기 때문이다.

발명의 효과

- [0028] 본 발명에 따른 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단방법은 생물학적 효소 및 물리적인 요소에 매우 안정하고 검출하는 방법이 매우 간단하며 단시간 내에 뿌리혹병 균 포자의 검출이 이루어지므로 조기에 신속하고 정확하게 검사할 수 있어, 조기 뿌리혹병의 진단으로 인한 효율적인 방제를 가능하게 할 것이다.
- [0029] 또한, 본 발명에 따른 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단방법에 포함되어 있는 프라이머 세트는 뿌리혹병 균 포자의 검출에 종 특이성을 가지고 있어 뿌리혹병에 대한 분자생물학적 연구에 크게 기여하여 병원성 균체의 진단, 분리 및 방지에 유용하게 이용될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 본 발명의 뿌리혹병 균에 대한 ITS(interual transcribed spacer) 영역 염기서열 정보를 보여주는 것이고,
- 도 2는 본 발명에 따른 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단 프라이머에 대한 위치 모식도를 보여주는 것이며,
- 도 3은 본 발명에 따른 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단 프라이머를 이용한 뿌리혹병 균에 대한 PCR 증폭결과를 보여주는 것이며,
- 도 4는 본 발명에 따른 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단 프라이머를 이용한 뿌리혹병 균에 대한 종 특이성을 PCR 증폭결과를 보여주는 것이고,
- (1: 무처리, 2: 일반 토양전염성 병원균, 3: 알테나리아 소자에, 4: 시들음 병균, 5: 덩굴마름병 균, 6: 감자역병 균, 7: 모썩음병 균, 8: 탄저병 균, 9: 잿빛곰팡이병 균, 10: 인삼뿌리썩음병 균, 11: 관부썩음병 균, 12: 뿌리썩음병 균, 13: 배주 DNA)
- 도 5는 본 발명의 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단 프라이머를 이용하여 포자 현탁액의 농도에 따른 검출 민감도에 대한 PCR 증폭결과를 보여주는 것이며,
- (1: 10^4 , 2: 10^3 , 3: 10^2 , 4: 10^1 , 5: 10^{-1} , 6: 10^{-2} , 7: 10^{-3} , 8: 10^{-4})
- 도 6은 본 발명의 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단 프라이머에 대한 종 특이성을 real-time PCR로 확인한 결과이고,
- (A: 뿌리혹병 균에 대한 종 특이성 분석, B: A의 결과에 따른 melt peak 값)
- 도 7은 본 발명의 십자화과 작물의 뿌리혹 병 진단 프라이머를 이용하여 포자 현탁액의 농도에 따른 검출 민감도에 대한 real-time PCR 증폭결과를 보여주는 것이다.
- (A: 뿌리혹병 균의 DNA 농도에 따른 분석, B: A의 회석된 DNA 농도에 따른 standard curve 값)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 하지만, 본 발명은 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 사상과 범위 내에서 여러 가지 변형 또는 수정할 수 있음은 이 분야에서 당업자에게는 명백한 것이다.
- [0032] [실시예]
- [0033] (1) 순수한 휴면포자의 분리
- [0034] 공시균주로 사용된 배추뿌리혹병균(*Plasmodiophora brassicae*)은 제주도를 제외한 전국 8개도에서 약 100여 곳의 배추 재배 포장으로부터 500여개의 뿌리혹을 채집하였으며, 상기 채집한 뿌리혹을 흐르는 물로 수차례 씻어 내어 표면에 남아 있는 토양입자와 불순물을 최대한 제거하였다.
- [0035] 상기 불순물이 제거된 뿌리 혹을 멸균된 메스와 가위를 이용하여 잘게 잘라낸 다음, 굵은 시험관에 넣고 멸균수를 첨가하면서 Homogenizer(IKA, 25 μ m)로 잘게 마쇄하여 균질화하였다.
- [0036] 상기 균질화를 통해 마쇄된 뿌리조직 내 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*) 균주의 휴면포자는 나출된 포자를 함께 마쇄된 식물조직 및 토양 잔재물로부터 휴면포자현탁액을 분리하기 위해 8겹의 거즈를 통해 걸러낸 다음, 미세한 식물유래 불순물을 제거하기 위해 셀룰로오스 필터(cellulose nitrate filter)와 실린지 필터(Syringe filter)를 이용한 필터법을 사용하였다.
- [0037] 상기 분리된 휴면포자현탁액을 8 μ m의 셀룰로오스 필터를 연결한 실린지 필터에 넣고 진공펌프를 통해 압력을 가하여 걸러낸 다음, 걸러진 현탁액을 1 μ m의 셀룰로오스 필터를 연결한 실린지 필터에 넣어 휴면포자보다 작은 미세식물체 조직과 세균 등을 분리하였다.
- [0038] 상기 분리된 현탁액을 3,500 rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액을 제거한 후, 수득된 펠릿에 멸균수를 첨가하고 원심분리기에서 15분간 씻어내는 과정을 2차례 반복하여 펠릿형태의 순수한 휴면포자를 수득하였고, -20℃에 보관하였다.

[0039] (2) Genomic DNA 분리

[0040] 상기 DNA는 휴면포자에 50 unit/ml 농도의 DNase I (Sigma, D-4263) 50 μ l를 처리한 다음 스트렙토마이신 300 ppm과 리팜피신 100 ppm을 적용하여 37° C에서 1시간 동안 반응시켰다. DNase I의 불활성화는 5 μ l 프로테이나아제 K(25 μ g/ μ l)를 37° C에서 1 시간 동안 처리한 후, 5 mM EDTA 300 μ l 처리와, 최종적으로 80° C hot block에서 5분간 고열처리 함으로써 마쳤다. DNase I이 불활성화된 포자현탁액은 다시 4,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 동결 건조하여 DNA 추출에 사용하였다.

[0041] 상기 전처리 후 동결건조된 펠릿은 미세한 휴면포자의 세포벽을 효과적으로 파쇄하기 위해 유리 비드(0.09~0.15 mm)를 첨가하여 Pellet Pestle(Sigma)로 마쇄한 다음, 400 μ l의 추출버퍼[200 mM Tris-Cl(pH 8.0), 200mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1% PVP]를 첨가하고 600 μ l의 클로로포름으로 추출하였다. 추출된 DNA는 정제 컬럼(Intron Biotechnology, Korea) 과정을 통해 정제하고 100 μ l의 멸균수에 녹여 사용하였다.

[0042] (3) 종 특이적인 프라이머 디자인

[0043] 상기 실시예 1로부터 수득되는 휴면포자에 대한 검출감도 향상을 위한 종 특이적인 프라이머를 디자인하기 위하여 Genbank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)에 공개된 영역으로부터 얻어진 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*)의 ITS(interual transcribed spacer) 영역 염기서열 정보를 이용하여 EMBL-EBI(<http://www.ebi.ac.uk>)에서 clastralW 프로그램을 이용해 도 1과 같이 분석하였다.

[0044] 상기 분석 결과를 바탕으로 Oligonucleotide PropertiesCalculator (<http://www.basic.northwestern.edu>)를 이용하여 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*)의 종 특이적 프라이머 ITS1-1, ITS1-2와 ITS2-1, ITS2-2, PLF, PLR, PqF, PqR 총 4개의 프라이머 세트를 하기 표 1과 같이 디자인하였다. 프라이머의 합성은 Genotech사에 의뢰하였다.

[표 1]

프라이머		염기서열	크기
서열번호 1	ITS1-1	CTA GCG CTG CAT CCC ATA TC	129 bp
서열번호 2	ITS1-2	TGT TTC GGC TAG GAT GGT TC	
서열번호 3	ITS2-1	CGG CAT AGC TTG AAC GAA G	167 bp
서열번호 4	ITS2-2	GTG TGT GTC GAT CTG CGA TT	
서열번호 5	PLF	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GCT T	548 bp
서열번호 6	PLR	GAA CCT GCG GAA GGA TCA	
서열번호 7	PqF	GCA AGA CAA TGA GCT TTG CTG	131 bp
서열번호 8	PqR	TGT GTG TGT CGA TCT GCG ATT	

[0045] [시험예 1] PCR 증폭을 통한 프라이머의 종 특이성 및 민감도 조사

[0047] (1) Conventional PCR 증폭을 통한 프라이머의 종 특이성 및 민감도 조사

[0048] 상기 표 1의 프라이머에 대하여 3 종류의 이병 배주 뿌리혹으로부터 분리한 휴면 포자의 DNA를 추출하여 PCR 증폭을 실시하였다. PCR 반응 조건은 initial denaturation을 94° C에서 5분 간 실시한 후 denaturation 94° C/30초, annealing 65° C/20초, extension 72° C/20초로 35 cycles을 실시하고 final extension을 72° C/5분 실시하였다.

[0049] 그 결과 도 3의 도면에서도 확인할 수 있듯이, 상기 표 1의 프라이머 세트는 모두 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*)의 DNA를 특이적으로 증폭할 수 있음을 확인하였다.

[0050] 상기 도 3의 결과를 바탕으로 선별된 프라이머 세트를 이용하여 종 특이성을 검정하였다,

[0051] 상기 사용한 프라이머 세트는 서열번호 1(ITS1-1) 및 서열번호 2(ITS1-2)를 이용하였으며, 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*)에 대한 종 특이성을 검정하기 위하여 하기의 토양 내에 존재하는 주요 병원균을 대상으로 조사하였다.

[0052] 알테나리아 소자에(*Alternaria sojae*), 시들음병 균(*Fusarium oxysporum*), 덩굴마름병 균(*Didymella*

bryoniae), 감자역병 균(*Phytophthora infestans*), 모썩음병 균(*Pythium ultimum*), 탄저병 균(*Colletotrichum acutatum*), 잿빛곰팡이병 균(*Botrytis cinerea*), 인삼뿌리썩음병 균(*Cylindrocarpon destructans*), 관부썩음병 균(*Rhizoctonia solani*), 뿌리썩음병 균(*Verticillium dahliae*) 및 뿌리혹병 균(*Plasmodiophora brassicae*)의 포자로부터 DNA를 추출하였다.

[0053] 그 결과, 도 4의 도면에서도 확인할 수 있듯이, 뿌리혹병 균(*Plasmodiophora brassicae*)이 감염된 식물체 이외에는 전혀 증폭이 이루어지지 않고 뿌리혹병 균의 DNA에서만 특이적으로 증폭되는 것을 확인할 수 있었다.

[0054] 상기의 결과로부터 본 발명의 프라이머는 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*)만을 중 특이적으로 검출 가능함을 확인한 결과이기도 하다.

[0055] 또한, 상기 표 1의 프라이머 세트 중 서열번호 1(ITS1-1) 및 서열번호 2(ITS1-2)를 선별하여 중 특이적인 검출에 있어서, 민감도를 검정하였다.

[0056] 검출 민감도 검정을 위해 휴면포자를 혈구측정기를 이용하여 10^4 spore/ μ l로 조정한 후 10배씩 희석한 후 추출한 DNA를 이용하였다.

[0057] 그 결과 도 5의 결과에서도 확인할 수 있듯이, 10개의 포자까지 증폭이 가능한 것을 확인할 수 있으며, 이는 기존의 Faggian 등(1999)에 의해 개발된 특이적 프라이머 세트 보다 중 특이성 뿐 아니라 검출 민감도 상당히 향상되는 것을 확인할 수 있었다.

[0058] (2) real-time PCR 증폭을 통한 프라이머의 중 특이성 및 민감도 조사

[0059] 상기의 PCR 결과를 바탕으로 보다 정확한 중 특이성 및 검출의 민감도를 검정하기 위하여 Real-time PCR을 이용하여 실험을 수행하였다.

[0060] Real-time PCR은 ITS1-1과 ITS1-2 프라이머를 사용하였으며 PCR 반응액의 총량은 20 μ l로 하고 주형 DNA는 1 μ l를 사용하였고 2의 프라이머를 사용하였으며 BIO-RAD사의 iQTM SYBR Green Supermix를 첨가하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 initial denaturation 시킨 후, 95°C/30초, 65°C/20초, 72°C/20초로 40 cycles 반응시킨 다음 72°C에서 5초간 final extraction시킨 후, melt curve 값은 65°C에서 95°C까지 증가시켜 산출하였다.

[0061] 중 특이성 검정을 위해 6개의 다른 토양병원균 DNA와 9개의 뿌리혹병균 DNA를 종특이적 프라이머 ITS1-1/ITS1-2를 이용하여 실험을 수행한 결과, 도 6에서도 확인할 수 있듯이, 6개의 다른 토양전염성 병원균은 PCR 증폭곡선이 나타나지 않았지만 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*)의 DNA만이 증폭되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*)의 균주들에게서만 모두 동일한 84정도의 melt peak 값을 나타내는 것을 확인할 수 있어 PCR 증폭 역시 안정적으로 이루어지는 것을 확인할 수 있었다.

[0062] 또한, 검출의 민감도를 확인하기 위하여 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*)의 포자 현탁액을 10^3 spores/ μ l로 조정한 후, DNA를 분리한 것을 10배씩 희석하고 ITS1-1/ITS1-2 프라이머를 이용하여 Real-time PCR을 수행하였다.

[0063] 그 결과 도 7에서도 확인할 수 있듯이, 10^{-1} 까지 검출이 가능하였으며, 상기 (4)의 Conventional PCR 보다 100배 정도 높은 민감도를 가지는 것을 확인할 수 있었으며, 희석된 DNA의 cycle threshold 값에 의해 작성된 Standard curve값을 통해 여러 샘플 간의 DNA 농도에 대한 상대적인 정량으로, 보다 직관적으로 DNA의 농도를 확인할 수 있었다.

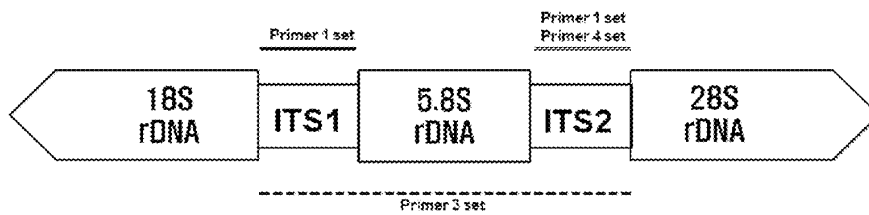
[0064] 상기의 결과로부터 본 발명의 상기 표 1의 중 특이적인 프라이머는 플라스모디오포라 브라시케(*Plasmodiophora brassicae*)만을 중 특이적으로 검출 가능할 뿐 아니라 우수한 검출 민감도로 뿌리혹 병에 대한 분자생물학적 연구에 효과적으로 이용가능함을 확인할 수 있었다.

도면

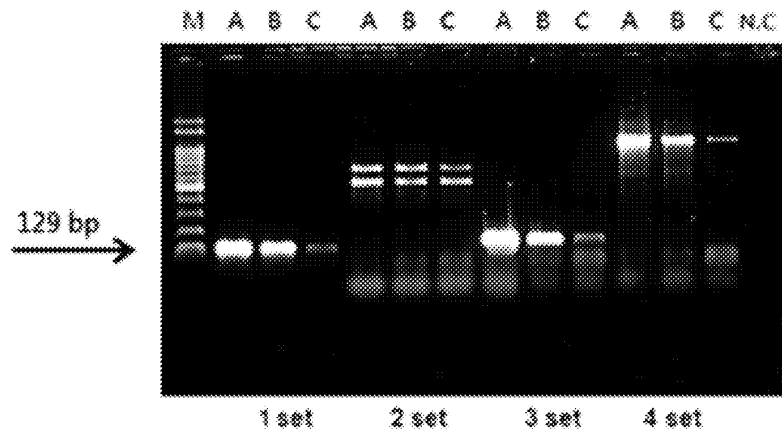
도면1

Spongespora	AGAAAGGAAATGCTGACAAAGCTTTCCTAGCTGAACTGCGAAGGCTTCTTAACTCTG	60
Plasmodiophora	-----TCCTAGCTGAACTGCGAAGGCTTCTTAACTCTG	66
Spongespora	ATGTGAGTTCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	100
Plasmodiophora	-----TCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	94
Spongespora	TTTCTGAGTTCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	134
Plasmodiophora	-----TCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	124
Spongespora	ATGTGAGTTCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	213
Plasmodiophora	-----TCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	216
Spongespora	ATGTGAGTTCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	273
Plasmodiophora	-----TCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	276
Spongespora	ATGTGAGTTCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	333
Plasmodiophora	-----TCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	334
Spongespora	ATGTGAGTTCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	392
Plasmodiophora	-----TCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	393
Spongespora	ATGTGAGTTCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	450
Plasmodiophora	-----TCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	453
Spongespora	ATGTGAGTTCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	509
Plasmodiophora	-----TCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	513
Spongespora	ATGTGAGTTCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	514
Plasmodiophora	-----TCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG	516

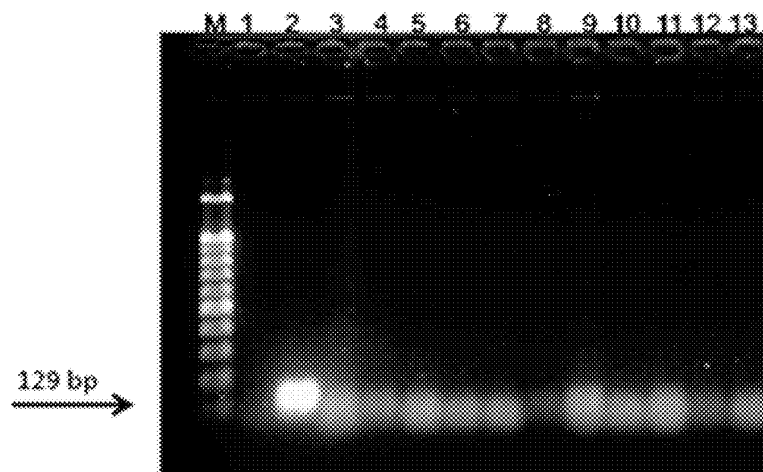
도면2



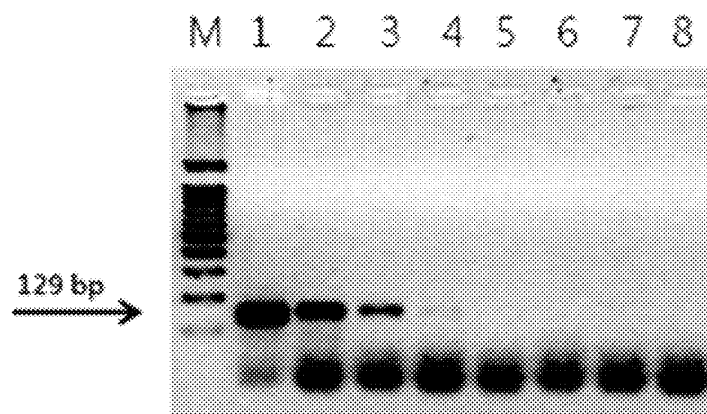
도면3



도면4

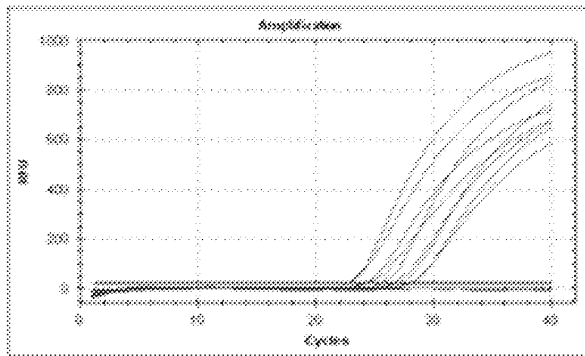


도면5

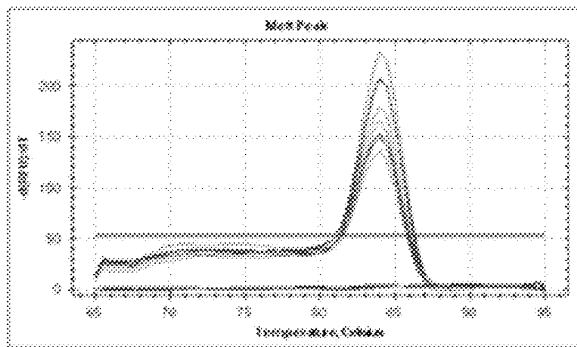


도면6

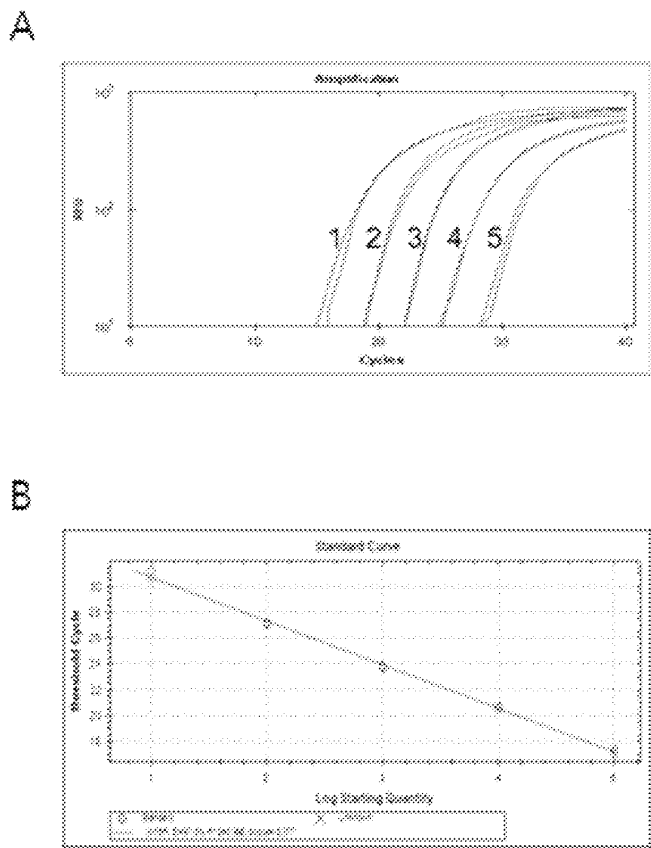
A



B



도면7



서열 목록

- <110> Industry Foundation of Chungnam National University
- <120> Species-specific primers to chinese cabbage clubroot pathogen
spore and method for detecting or separating using thereof
- <160> 8
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> ITS1 forward primer
- <400> 1
- ctagcgctgc atcccatatc
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ITS1 reverse primer

<400> 2

tgtttcggct aggatggttc 20

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ITS2 forward primer

<400> 3

cggcatagct tgaacgaag 19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ITS2 reverse primer

<400> 4

gtgtgtgtcg atctgcgatt 20

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PLF

<400> 5

tcctcgcgtt attgatatgc tt 22

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PLR

<400> 6

gaacctgcgg aaggatca 18

<210> 7

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PqF
<400> 7

gcaagacaat gagctttgct g

21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> PqR
<400> 8

tgtgtgtgtc gatctgcgat t

21