

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0093994 (43) 공개일자 2016년08월09일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/68 (2006.01)	(71) 출원인 계명대학교 산학협력단 대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)	
(52) CPC특허분류 C12Q 1/689 (2013.01) C12Q 1/686 (2013.01)	(72) 발명자 유민 대구광역시 남구 봉덕로 135, 105동 1602호(강변 효성백년가약아파트)	
(21) 출원번호 10-2015-0014991	(74) 대리인 특허법인태백	
(22) 출원일자 2015년01월30일 심사청구일자 2015년01월30일		

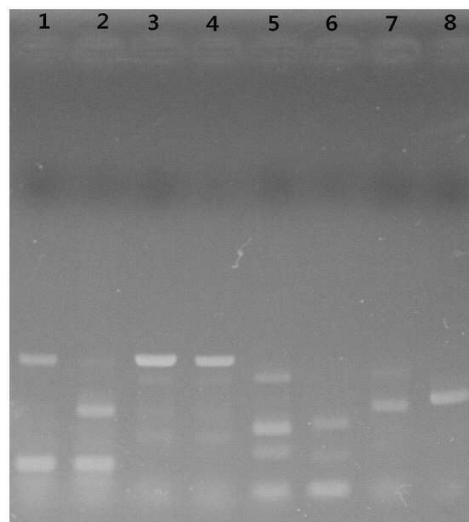
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 유산균 및 병원균 구별용 RAPD 프라이머 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규한 RAPD(randomly amplified polymorphic DNA) 프라이머 및 이를 이용한 유산균 및 병원균 구별 방법에 관한 것으로, 본 발명의 신규한 RAPD 프라이머는 각 균의 특이적인 유전자를 안정적으로 증폭하고, 높은 반복성을 나타낼 수 있는 것이 확인됨에 따라, 본 발명의 신규한 RAPD 프라이머 및 이를 이용한 유산균 및 병원균 구별 방법은 다양한 균주를 신속하고 정확하게 구별하는데 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12Q 2535/139 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 염기서열 중 하나 또는 둘 이상을 포함하는 유산균 및 병원균 구별용 RAPD(Random amplified polymorphic DNA) 프라이머.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 유산균은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*; *L. casei*) 및 락토바실러스 부흐너(*Lactobacillus buchneri*)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 유산균 및 병원균 구별용 RAPD 프라이머.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 병원균은 대장균, 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 및 스트렙토코쿠스 무탄스(*Streptococcus mutans*)로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 유산균 및 병원균 구별용 RAPD 프라이머.

청구항 4

서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 구성된 RAPD(Random amplified polymorphic DNA) 프라이머를 하나 또는 둘 이상 포함하는 것을 특징으로 하는 유산균 및 병원균 구별용 PCR 검출 키트.

청구항 5

균주로부터 염색체 DNA를 분리하는 단계(제1단계);

상기 제1단계에서 분리된 염색체 DNA와 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 구성된 RAPD(Random amplified polymorphic DNA) 프라이머를 하나 또는 둘 이상 혼합하여 PCR을 수행하는 단계(제2단계); 및

상기 제2단계의 PCR로 증폭된 시료를 전기영동하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 유산균 및 병원균 구별 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 RAPD(randomly amplified polymorphic DNA) 프라이머 및 이를 이용한 유산균 및 병원균 구별 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유산균은 자연적인 발효에 관여하거나 산업적으로 요구르트, 치즈 등의 스타터로 널리 이용되고 있다. 특히 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*; *L. casei*)는 유용 발효제품에 널리 쓰이고 있으며, 이에 따라, 발효능이 우수하고, 발효취가 우수한 새로운 종(strain)으로 신속한 분리가 연구의 주된 주제가 되고 있다. *L. casei*는 장내에서 안정한 군총을 형성하여 유해한 다른 균들의 서식을 저해함으로써 장내 환경을 건강한 상태로 유지시켜 주고, 동시에 항암성 물질을 분비하는 것으로 알려져 있다. 이러한 특성과 함께 산성에서 강한 생존력 때문에 위에서도 사멸하지 않고 장에까지 안전하게 도달할 수 있는 것은 *L. casei*의 또 다른 장점이다. 그러나 자연계에 존재하는 *Lactobacillus* 균주들은 그 종류가 워낙 다양한 만큼 여러 생리적 특성들이 또한 다양하다. 때문에 우수한 균주만을 신속하게 선별하고자 하는 오랜 숙원에도 불구하고 대상 균주들의 생리, 생화학적 정보 가 충분하게 축적되지 못하고 있어 체계적인 분류가 아직 어려운 실정이다.

[0003] 최근에 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)의 발달과 함께 random primer를 사용한 randomly

amplified polymorphic DNA (RAPD)의 연구가 가능하게 되었다. RAPD 방법은 정확하면서도 많은 균주를 한 번에 비교할 수 있는 장점이 있어 이미 여러 식물 및 미생물들의 유전적 관계를 비교하기 위한 수단으로 이용되고 있다. 따라서 RAPD를 이용하여 유용한 유산균주를 유전자 차원에서 선별하는 것도 당연히 가능할 것으로 예상되나, 현재까지는 실험조건을 맞추는 어려움 때문에 적용되지 못하고 있는 실정이며, RAPD 실험을 위해서는 특수한 염기서열의 프라이머가 필요하지만 산업체에서 이를 독자적으로 개발하고 적용하기가 어렵다는 단점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2011-0007543호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 RAPD(randomly amplified polymorphic DNA) 방법으로 유산균 및 병원균을 구별하기 위해 사용될 수 있는 신규한 RAPD 프라이머를 제작하고, 이를 이용하여 유산균 및 병원균을 신속하고 정확하게 구별할 수 있는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 염기서열 중 하나 또는 둘 이상을 포함하는 유산균 및 병원균 구별용 RAPD(Random amplified polymorphic DNA) 프라이머를 제공한다.

[0007] 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 구성된 RAPD(Random amplified polymorphic DNA) 프라이머를 하나 또는 둘 이상 포함하는 것을 특징으로 하는 유산균 및 병원균 판별용 PCR 검출 키트를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 균주로부터 염색체 DNA를 분리하는 단계(제1단계); 상기 제1단계에서 분리된 염색체 DNA와 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 구성된 RAPD(Random amplified polymorphic DNA) 프라이머를 하나 또는 둘 이상 혼합하여 PCR을 수행하는 단계(제2단계); 및 상기 제2단계의 PCR로 증폭된 시료를 전기영동하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 유산균 및 병원균 판별방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따르면, 본 발명의 신규한 RAPD 프라이머는 각 균의 특이적인 유전자를 안정적으로 증폭하고, 높은 반복성을 나타낼 수 있는 것이 확인됨에 따라, 본 발명의 신규한 RAPD 프라이머 및 이를 이용한 유산균 및 병원균 구별 방법은 다양한 균주를 신속하고 정확하게 구별하는데 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 분리된 염색체 DNA의 밴드를 확인한 전기영동 결과로, 레인 1은 대장균주인 JM109에서 분리된 염색체 DNA이며, 레인 2는 대장균주인 BL21에서 분리된 염색체 DNA이며, 레인 3은 실험실에 저장된 유산균주인 *L. casei* YA-90에서 분리된 염색체 DNA이며, 레인 4는 시중에서 판매된 유산균주인 *L. casei* YA-90에서 분리된 염색체 DNA이며, 레인 5는 유산균주인 *L. buchneri* JCM 1115에서 분리된 염색체 DNA이며, 레인 6은 병원균인 *Listeria monocytogenes*에서 분리된 염색체 DNA이며, 레인 7인 병원균인 *Staphylococcus aureus*에서 분리된 염색체 DNA이며, 레인 8은 병원균인 *Streptococcus mutans*에서 분리된 염색체 DNA이다.

도 2는 rp1(random primer 1)으로 PCR 수행하여 확인한 randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) 결과이다.

도 3은 rp2(random primer 2)으로 PCR 수행하여 확인한 randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) 결과이다.

도 4는 rp3(random primer 3)으로 PCR 수행하여 확인한 randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 염기서열 중 하나 또는 둘 이상을 포함하는 유산균 및 병원균 구별용 RAPD(Random amplified polymorphic DNA) 프라이머를 제공할 수 있다.
- [0012] 본 발명의 유산균은 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 부흐너(*Lactobacillus buchneri*), 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) 및 락토바실러스 락티스(*Lactobacillus lactis*)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 보다 바람직하게는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*; *L. casei*)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0013] 또한, 본 발명의 병원균은 대장균, 리스테리아균(*Listeria monocytogenes*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 및 스트렙토코쿠스 무탄스(*Streptococcus mutans*)로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0014] 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 구성된 RAPD(Random amplified polymorphic DNA) 프라이머를 하나 또는 둘 이상 포함하는 것을 특징으로 하는 유산균 및 병원균 구별용 PCR 검출 키트를 제공할 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명은 균주로부터 염색체 DNA를 분리하는 단계(제1단계); 상기 제1단계에서 분리된 염색체 DNA와 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 구성된 RAPD(Random amplified polymorphic DNA) 프라이머를 하나 또는 둘 이상 혼합하여 PCR을 수행하는 단계(제2단계); 및 상기 제2단계의 PCR로 증폭된 시료를 전기영동하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 유산균 및 병원균 구별방법을 제공할 수 있다.
- [0016] 보다 상세하게는 상기 염색체 DNA를 분리하는 단계는 변형된 알칼라인 용해 미니프렙 방법으로 수행될 수 있다. 상기 미니프렙 방법은 라이소자임을 추가로 처리할 수 있으며, DNA가 물리적인 힘에 의해 분해되는 것을 예방하기 위해 페놀처리를 20초 내지 30초간 신속하게 수행할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명에 사용된 모든 균에서 프라이머별로 1 내지 2개의 DNA 밴드가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. rp1의 경우, 표 3 및 도 2와 같이 2번 레인의 대장균(BL21)과 3 및 4번 레인의 유산균(*L. casei* YA-90)의 구별이 RAPD 결과만으로 구별이 어려웠으나, 다른 균들에서는 특이적인 DNA 밴드가 확인되었으며, rp2의 결과인 표 4 및 도 3과 rp3의 결과인 표 5 및 도 4를 참고하면, 모든 실험대상 균주를 하나의 프라이머만으로도 충분히 구별해 낼 수 있었으며, 동일한 유산균주인 3 및 4번 레인에서 동일한 위치의 밴드가 확인됨에 따라, 본 발명에 따른 프라이머들의 특이적인 유전자의 증폭 및 높은 반복성이 확인되었다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머를 이용한 경우, 같은 유산균이라도 *L. casei*와 *L. buchneri*를 명확하게 구별할 수 있었다.
- [0018] 따라서, 본 발명의 rp2 및 rp3을 단독으로 사용하거나, rp1과 적절하게 조합하여 사용하면 다양한 시료로부터 유산균 및 병원균들을 명확하게 구별해 낼 수 있다.
- [0019] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0020] <참고예 1> 시약 및 기기
- [0021] Taq DNA polymerase와 dNTP는 Promega(USA)의 제품을 사용하였으며, lysozyme, SDS, NaOH, isopropyl alcohol 등은 Sigma Co. (USA)의 제품을 사용하였다. 프라이머(Primer)는 Macrogen(Korea)에 의뢰하여 제작하였다. 배지용 시약은 pre-mixture 상태로 판매되는 것을 Difco Laboratories (USA)에서 구입하였다. 전기영동 시약, 일반시약 및 초자기구(Glassware)들은 시중에서 구입 가능한 최상의 제품을 사용하였다.
- [0022] Gradient PCR은 Takara PCR thermal Cyclor Dick Gradient machine (Japan)을 사용하였으며, 일반 PCR은 Primus MWG-AG Biotec thermal cyclor (USA)를 사용하였다.
- [0023] <실시예 1> 균주 배양
- [0024] 1. 사용균주
- [0025] 실험에 사용된 균주는 총 8종으로, 이중 *L. casei* YA-90는 두 가지로서, 본 실험실에서 기존에 동정하여 보존해 온 것과 (주)비락에서 판매되는 제품을 구입하여 분리해 낸 것을 사용하였다. 이론상으로는 이 두 가지가 유전적으로 동일해야 하는데 RAPD를 통해 이 또한 재확인하고자 하였다. 만약 이 두 가지가 항상 같은 패턴을 보인

다면 이는 실험이 안정되게 반복성을 보인다는 증거이기도 하다. 그 외 대장균주인 JM109와 BL21는 실험실에서 기존에 동정, 보관중인 것, 유산균주인 *L. buchneri* JCM 1115는 제주 지역 늪지대에서 분리하여 동정한 것, 병원성균인 *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*는 실험실에서 기존에 동정, 보관중인 것을 사용하였다.

2. 균주의 배양 및 저장

표 1에 기재된 바와 같이 균주별로 적절한 배지에 각 균액을 0.1% 접종하여 15시간 배양한 후 최종 농도 50%가 되도록 글리세롤(glycerol)을 첨가하여 스타크로 만들어 장기 보존용으로 -70℃에 보관하였다. 또한, 2 주일 이하의 단기 보존을 위해서는 균을 아가 플레이트(agar plate)에 콜로니(colony) 상태로 배양하여 4℃에 보관하였다.

유산균의 경우, 10% 탈지유(skim milk)에서 배양한 균액을 -20℃에 냉동 보관하면서 필요할 때마다 MRS(full name)배지(Difco Laboratories, USA)에 0.1% 배양하여 활성화시킨 후 사용하였으며, 균의 활성화 상태를 높은 상태로 유지하기 위해 MRS 배지를 연속적으로 2-3회 계대 배양한 후 사용하였다.

표 1

균주명	배지
JM109	LB
BL21	LB
<i>L. casei</i> YA-90 (실험실)	MRS
<i>L. casei</i> YA-90 (시중제품)	MRS
<i>L. buchneri</i> JCM 1115	MRS
<i>Listeria monocytogenes</i>	BHI
<i>Staphylococcus aureus</i>	BHI
<i>Streptococcus mutans</i>	TS

<실시예 2> PCR 프라이머 제작

RAPD(randomly amplified polymorphic DNA)를 이용해 대장균, 유산균, 병원성균들을 신속하게 구별하기 위한 3 종류의 random primer를 새로 디자인하였다. primer는 하기와 같은 기준으로 디자인하고 Macrogen (Korea)에 의뢰하여 제조하였다.

1) primer의 염기서열이 세균의 게놈(genome)에서 적어도 10회 이상 나타날 것, 2) GC와 AT의 분포를 고르게 하여 Tm 값을 생육 조건에 가깝게 구성할 것(40℃), 3) annealing 온도를 Tm 값보다 조금 낮은 30℃ ~ 38℃ 사이로 결정할 것.

또한, DNA 밴드가 지나치게 많이 증폭되는 것을 예방하고자 degeneracy는 부여하지 않았다.

그 결과, 표 2와 같은 3 종류의 random primer가 제조되었다.

표 2

primer 이름	서열	길이	Tm(℃)	풀림온도 (Annealing temperature)
rp1	GCC CTC AGG CG(서열번호1)	11	40	30 ℃
rp2	GCG CCA GGT GG(서열번호2)	11	40	30 ℃
rp3	CAG GCT TCG ACC(서열번호3)	12	40	30 ℃

이론상으로 rp1과 rp2의 염기서열은 $4^{11} = 4,194,303$ bp 마다 한번 나타나고, rp3의 염기서열은 1.7×10^7 마다 나타나므로 세균의 게놈을 약 3×10^9 bp로 간주한다면, RAPD 결과 최소 10 여개 이상의 밴드가 증폭될 것으로 예상되었으며, 실제로 degeneracy를 부여하지 않았기 때문에 수 개 정도의 DNA 밴드가 확인되었다. 상기 제작된 primer 원액을 -20 ℃에 저장 및 보관하고 실험 직전에 TE 버퍼로 희석하여 사용하였다.

<실시예 3> 염색체 DNA(Chromosomal DNA) 순수 분리

- [0038] PCR 반응에 적합한 염색체 DNA(Chromosomal DNA)를 미니프렙(miniprep)으로 분리하기 위해 알칼라인 용해 미니프렙(alkaline lysis miniprep)방법을 변형하여 수행하였다. *L. casei*의 세포벽을 제거하기 위해서 라이소자임(lysozyme)을 추가로 사용하고 처리 과정 중에 DNA가 물리적인 힘에 의해 분해되는 것을 최소한으로 줄이기 위하여 phenol 처리를 가능한 온화한 조건에서 신속하게 수행하였다. 효소 반응 버퍼(Enzyme reaction buffer)는 0.2M sucrose 및 0.5M Tris-Cl (pH 8.0) 용액이었다. Chromosomal DNA 분리를 위한 전체 과정은 하기와 같다.
- [0039] 먼저, 각 균주별로 적절한 배지 3 ml에 0.5% 글리신(glycine)을 첨가하고 0.1% 균액을 각각 접종한 후, 37℃에서 15시간 이상 배양하고 균액을 microfuge tube로 옮겨 담고 12,000g에서 3분간 원심분리하였다.
- [0040] 세포침전물을 ST 버퍼[0.2M sucrose, 0.5M Tris-Cl (pH 8.0)]로 세척하고, 세척된 세포침전물을 400 μ l의 효소 반응 버퍼에 재 혼탁시킨 후, 라이소자임(lysozyme) 10 μ M을 첨가한 후 실온에서 10분간 반응시켰다.
- [0041] 그 후, 10% 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate; SDS)를 25 μ l, 단백질가수분해효소 K(10mg/ml) 5 μ l 및 RNAase A(10mg/ml) 5 μ l를 첨가하여 부드럽게 혼합한 뒤 37℃에서 15분간 반응시킨 뒤, Tris-saturated phenol/chloroform/isoamyl alcohol(25:24:1) 혼합용액 450 μ l를 첨가하여 20초간 교반한 후, 12,000g에서 5초간 원심분리하였다.
- [0042] 원심분리 후 상층액을 새로운 microfuge tube로 옮기고 아이소프로필 알콜 450 μ l를 첨가하고 12,000g에서 5초간 원심분리하여 DNA를 회수하였다.
- [0043] 회수된 DNA를 70% 알콜로 세척하고, 멸균수 100 μ l에 DNA를 용해시켜 4℃에서 보관하였다. 이때 DNA의 최종농도는 10 ng/ μ l 였다.
- [0044] 상기 방법과 같이 8 종류의 균주로부터 분리된 염색체 DNA를 전기영동하여 확인하였다.
- [0045] 그 결과, 도 1과 같이 이들 모두 20kb 정도의 밴드를 형성하였는데 7 및 8 레인의 *Staphylococcus aureus*와 *Streptococcus mutans*의 DNA는 아주 약한 band로 확인되었다. 상기 결과는 두 균주의 세포벽이 상대적으로 두꺼워 염색체 DNA의 회수율이 낮기 때문으로 예상되나, 이후 수행한 PCR 결과에서 RAPD 밴드의 증폭이 잘 이루어졌기 때문에 본 연구에서 변형시킨 chromosomal DNA 분리 방법이 대장균, 유산균, 병원성균 등 거의 모든 균에 적용될 수 있음이 확인되었으며, 전체 과정은 약 1시간 미만으로 소요되었다.
- [0046] <실시예 4> PCR 반응 및 RAPD(randomly amplified polymorphic DNA) 분석
- [0047] 1. PCR 반응
- [0048] PCR 반응액을 하기와 같이 준비하였다.
- [0049] 분리된 염색체 DNA 50 ng(5 μ l), dNTP 125 μ M(2.5 μ l), 반응버퍼(200mM Tris-Cl (pH 8.0), 15mM MgCl₂, 1mg/ml gelatin) 2.5 μ l 및 각각의 프라이머 100 pmoles(2.5 μ l)를 microfuge tube에 혼합하였다. 상기 혼합액에 Taq DNA polymerase 0.2-0.5 unit 및 H₂O를 첨가하고 전체 반응액을 25 μ l로 준비하였다.
- [0050] PCR 반응은 post-denaturation을 95℃에서 30초, denaturation을 95℃에서 15초, annealing을 30℃~38℃에서 30초, extension을 72℃에서 30초, post-extension을 72℃에서 15초간 실시하였으며, 반응 횟수는 총 40 사이클이었다.
- [0051] annealing온도는 Tm값보다 낮게 설정하여 rp1과 rp2는 30℃에서 rp3는 38℃에서 수행되었다.
- [0052] 그 후, PCR 반응 결과를 전기영동으로 확인하였다.
- [0053] 전체 반응액의 1/2에 해당하는 12.5 μ l에 로딩버퍼[0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 15% Ficoll (type 400)] 2.5 μ l를 혼합하고 1.2% 아가로스 겔 상에서 8V/cm로 전기영동한 후, 0.5 μ g/ml의 에티듐 브로마이드(ethidium bromide) 용액으로 염색하고 UV transilluminator위에서 육안으로 밴드의 크기와 강도를 확인하였다. 사진 촬영이 필요한 경우에는 겔을 H₂O로 45분간 destaining하여 촬영 및 보관하였다.
- [0054] 2. RAPD 결과 확인
- [0055] 2-1. rp1 프라이머에 의한 RAPD 결과 확인
- [0056] rp1 프라이머를 이용한 RAPD 결과, 표 2 및 도 2와 같이 7번 레인에 해당하는 *Staphylococcus aureus* 이외에는

모든 균에서 DNA 밴드가 증폭되 것을 확인하였다. 증폭된 밴드는 1 내지 2 개로 대체로 단순한 편이었다. 3, 4 번은 동일한 *L. casei* YA-70이기에 RAPD 결과가 동일할 것으로 예상되었고, 확인 결과에서도 예상처럼 동일하게 나타났다.

[0057] 상기 결과로부터 동일한 균에 대해 rp1이 안정성있게 반복적으로 작용한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0058] 그러나, 1 및 2번 레인은 대장균주(JM109, BL21)로 밴드의 크기만으로는 *L. casei* YA-70와 구별이 어려웠다. 따라서, DNA 밴드의 크기로 구별하는 RAPD 목적을 위해서는 또 다른 프라이머를 추가적으로 사용해야 할 필요성을 확인하였다.

표 3

[0059]

레인	균주명	증폭된 밴드 수	밴드 크기(bp)
1	JM109	2	980, 250
2	BL21	1	650
3	<i>L. casei</i> YA-90 (실험실)	1	650
4	<i>L. casei</i> YA-90 (시중제품)	1	650
5	<i>L. buchneri</i> JCM 1115	1	200
6	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	660
7	<i>Staphylococcus aureus</i>	없음	-
8	<i>Streptococcus mutans</i>	1	480

[0060] 2-2. rp2 프라이머에 의한 RAPD 결과 확인

[0061] rp2 프라이머를 이용한 RAPD 결과, 표 3 및 도 3과 같이 8개의 모든 균주에서 DNA 밴드가 증폭되었으며, 그 개수는 1 내지 2개로 다양하였다. 4번 레인의 *L. casei* YA-90(시중제품)의 밴드는 다소 흐릿하였지만 3번 레인의 *L. casei* YA-90 (실험실)와 동일한 밴드가 육안으로 확인되었다.

[0062] 상기 결과와 같이 3, 4번의 DNA 밴드가 같은 위치에서 확인됨에 따라, *L. casei* YA 90에 대한 rp2 프라이머 실험 결과가 특이적이면서도 안정성있게 반복되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 다른 균주들에서 나타난 밴드의 양상이 모두 서로 다르게 나타났기 때문에 rp2 프라이머를 단독으로 사용하더라도 대장균, 유산균, 기타 병원균들을 구별하는데 효과적으로 사용될 수 있음이 확인되었다. 8번 레인인 *Streptococcus mutans*에서 발견된 50여 bp의 아주 작은 밴드는 primer dimer로 확인되었다.

표 4

[0063]

레인	균주명	증폭된 밴드 수	밴드 크기(bp)
1	JM109	1	520
2	BL21	2	520, 480
3	<i>L. casei</i> YA-90 (실험실)	1	240
4	<i>L. casei</i> YA-90 (시중제품)	1	240
5	<i>L. buchneri</i> JCM 1115	2	600, 250
6	<i>Listeria monocytogenes</i>	2	180, 90
7	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	200
8	<i>Streptococcus mutans</i>	1	140

[0064] 2-3. rp3 프라이머에 의한 RAPD 결과 확인

[0065] rp2 프라이머를 이용한 RAPD 결과, 표 5 및 도 4와 같이 3번과 4번 레인의 *L. casei* YA-90은 rp1 및 rp2의 결과와 같이 동일하게 나타났다.

[0066] 상기 결과로부터 동일한 균에 대해서 rp3가 안정된 반복성을 나타내는 것이 확인되었다.

[0067] 또한, 다른 모든 균주에서 다른 양상의 밴드들이 나타나는 것을 확인하였으며, 그 개수도 1 내지 2개로 다양하였다.

[0068] 상기 결과로부터 rp3 역시 단독으로 대장균, 유산균, 기타 병원균을 구별하는 데에 충분한 것으로 확인되었다.

[0069] 모든 레인의 아래쪽에서 발견되는 작은 밴드(약 50 bp)는 primer dimer로 확인되었으며, 5번 레인인 *L. buchneri* JCM 1115에서 약 460bp의 흐린 밴드가 추가적으로 발견되었지만 그 아래에 있는 200bp 밴드보다 더 흐린 것으로 보아 비특이적으로 증폭된 DNA 밴드(non-specific amplified DNA band)로 확인되었다.

표 5

레인	균주명	증폭된 밴드 수	밴드 크기(bp)
1	JM109	2	480, 140
2	BL21	2	220, 140
3	<i>L. casei</i> YA-90 (실험실)	1	490
4	<i>L. casei</i> YA-90 (시중제품)	1	490
5	<i>L. buchneri</i> JCM 1115	2	200, 170
6	<i>Listeria monocytogenes</i>	1	210
7	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	230
8	<i>Streptococcus mutans</i>	1	250

[0071] 상기 결과들로부터 본 발명에 사용된 모든 균에서 프라이머별로 1 내지 2개의 DNA 밴드가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 또한, rp1의 경우, 2번 레인의 대장균(BL21)과 3 및 4번 레인의 유산균(*L. casei* YA-90)의 구별이 RAPD 결과만으로 구별이 어려웠으나, 다른 균들에서는 특이적인 DNA 밴드가 확인되었다.

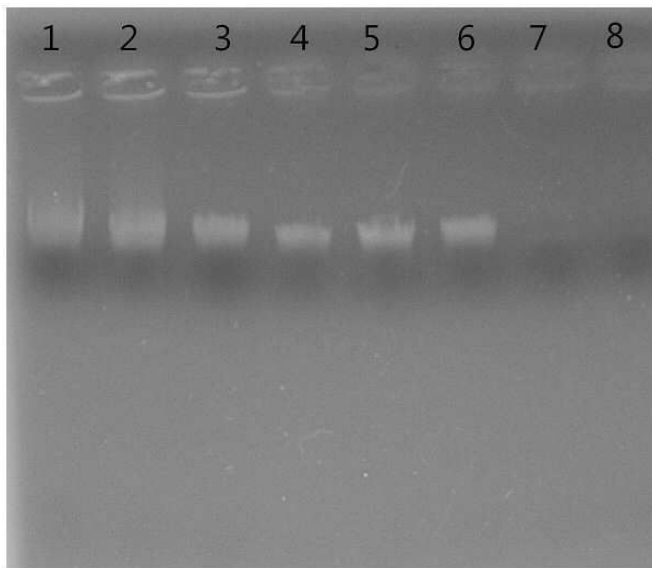
[0072] rp2 및 rp3 프라이머의 경우, 모든 실험대상 균주를 하나의 프라이머만으로도 충분히 구별해 낼 수 있었으며, 동일한 유산균주인 3 및 4번 레인에서 동일한 위치의 밴드가 확인됨에 따라, 본 발명에 따른 프라이머들의 특이적 증폭 및 높은 반복성이 확인되었다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머를 이용한 경우, 같은 유산균이라도 *L. casei*와 *L. buchneri*를 명확하게 구별할 수 있었다.

[0073] 따라서, 본 발명의 rp2 및 rp3을 단독으로 사용하거나, rp1과 적절하게 조합하여 사용하면 다양한 시료로부터 *L. casei*와 병원균들을 구별해 낼 수 있다.

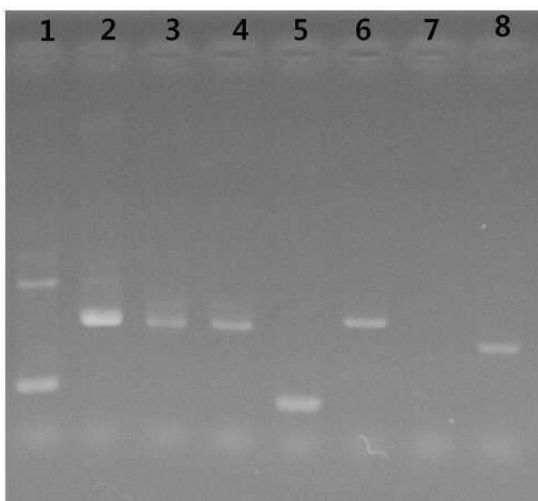
[0074] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

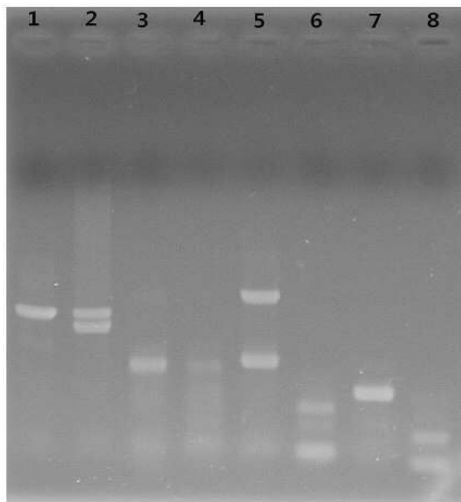
도면1



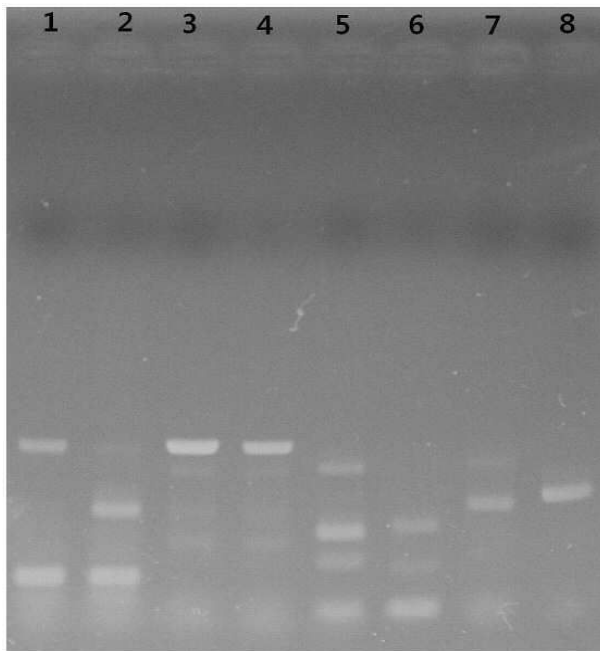
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록

- <110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY
- <120> RAPD primer for discrimination of lactic acid bacteria and pathogenic bacteria and uses thereof
- <130> ADP-2015-0024
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 11

<212>	DNA	
<213>	random primer 1	
<400>	1	
gccctcaggc g		11
<210>	2	
<211>	11	
<212>	DNA	
<213>	random primer 2	
<400>	2	
gcgccaggtg g		11
<210>	3	
<211>	12	
<212>	DNA	
<213>	random primer 3	
<400>	3	
caggcttcga cc		12