



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0002013
(43) 공개일자 2012년01월05일

(51) Int. Cl.

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

(21) 출원번호 10-2010-0062682

(22) 출원일자 2010년06월30일

심사청구일자 2010년06월30일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 종암로 1 (안암동5가, 고려대역)

(72) 발명자

장효일

서울특별시 서초구 나루터로4길 49, 332동 105호 (잠원동, 신반포아파트)

장준형

서울특별시 성북구 화랑로24길 22-19 (석관동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

구현서

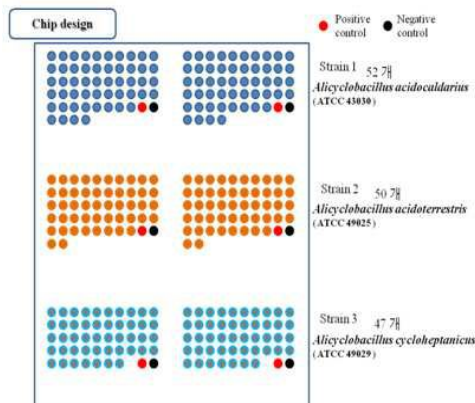
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 식품부패 원인균 신속 동시검출을 위한 진단 DNA 칩

(57) 요약

본 발명은 식품부패 및 품질 저하를 유발시키는 원인 미생물을 신속하게 검출 가능한 DNA 마이크로어레이 및 그 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김선중

대전광역시 대덕구 동춘당로 160, 101동 305호 (법동, 삼익소월아파트)

윤보현

서울특별시 성북구 인촌로13길 26, 반석빌딩 406호 (안암동2가)

구만복

서울특별시 동대문구 천장산로9가길 25-3 (이문동)

류지훈

서울특별시 성북구 안암로 145, 생명과학대학 녹지캠퍼스 434호 식품미생물연구실 (안암동5가, 고려대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201003010611970010500

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 바이오 그린 21

연구과제명 농축산식품에서 식품부패원인균 신속 동시검출을 위한 진단 프로토콜 개발

기여율

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010년 01월 01일 ~ 2010년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

- a) Alicyclobacillus 속 균주로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;
- b) 추출한 게놈 DNA를 절단하여서 100 ~ 1500 bp 크기의 DNA 절편을 분리하는 단계;
- c) 라이브러리용 벡터와 상기 절단된 게놈 DNA를 연결시켜 콜로니를 획득하는 단계;
- d) 획득한 콜로니에서 플라스미드를 추출 후 PCR을 수행한 후 PCR 산물로부터 프로브를 정제하는 단계; 및
- e) 상기 정제된 프로브를 서포트에 고정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 Alicyclobacillus 속 균주는 Alicyclobacillus acidoterrestris, Alicyclobacillus cycloheptanicus, 및 Alicyclobacillus acidocaldarius로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 균주인 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 b)단계의 절단은 추출한 게놈 DNA를 서로 다른 종류의 제한효소 쌍으로 잘라내어서 수행되는 것을 특징으로 하는 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이의 제조방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 서로 다른 종류의 제한효소 쌍은 EcoRI/BamHI, HindIII/XhoI, 및 HindIII/SacII로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 제한 효소 쌍인 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이의 제조방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 c) 단계의 라이브러리용 벡터와 상기 절단된 게놈 DNA의 연결은 양옆에 T3/T7 시퀀스가 위치되도록 하여 수행하는 것을 특징으로 하는 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이의 제조방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 T3/T7 시퀀스는 서열번호 1 및 서열번호 2에 기재된 염기서열을 가지는 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이의 제조방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 PCR은 T3/T7 프라이머를 사용하여 수행되는 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이의 제조방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 T3/T7 프라이머는 서열번호 1 및 서열번호 2에 기재된 염기서열을 가지는 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이의 제조방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 PCR 산물로부터 프로브를 정제하는 단계는 b)단계에 적용된 제한효소 쌍을 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이의 제조방법.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 라이브러리용 벡터는 도 7에 기재된 개열지도를 가지는 식품부패 원인균 동시 검출용

DNA 마이크로어레이의 제조방법.

청구항 11

제 1항에 있어서, 상기 서포트는 규소, 유리, 게르마늄, 세라믹, 규소, 반도체 재료, PTFE, 탄소, 폴리카르보네이트, 운모, 플라스틱, 석영, 폴리스티렌, 갈륨 아세나이드, 금속, 금속 합금, 및 직물로 구성된 군으로부터 선택된 물질인 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이의 제조방법.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항의 제조방법에 의하여 제조된 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 마이크로 어레이는 포지티브 컨트롤과 네가티브 컨트롤을 더욱 포함하는 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 포지티브 컨트롤은 박테리오파아지의 MJ1 서열을 사용하였고, 네가티브 컨트롤은 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체(Peroxisome proliferator activated receptor;PPAR)-감마를 사용한 것을 특징으로 하는 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 박테리오파아지의 MJ1 서열은 서열번호 3 및 4 중에서 선택된 하나 이상의 염기서열을 가지고, 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체(PPAR)- 감마 서열은 서열번호 5 및 6 중에서 선택된 하나 이상의 염기서열을 가지는 것을 특징으로 하는 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이.

청구항 16

제 12항 내지 제15항 중 어느 한 항의 마이크로어레이를 이용하여 랜덤(Random) 프라이밍법과 하이브리다이제이션을 통하여 식품부패 원인균의 존재 유무를 한번에 판별하는 식품 부패 원인 미생물 탐지방법.

청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 식품 부패 원인 미생물은 Alicyclobacillus 속 균주인 것을 특징으로 하는 식품 부패 원인 미생물 탐지방법.

청구항 18

제 17항에 있어서, 상기 Alicyclobacillus 속 균주는 Alicyclobacillus acidoterrestris, Alicyclobacillus cycloheptanicus, 및 Alicyclobacillus acidocaldarius로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 균주인 식품 부패 원인 미생물 탐지방법.

청구항 19

제 16항 내지 제 18항 어느 한 항에 있어서, 상기 식품은 과일 주스인 식품 부패 원인 미생물 탐지방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 식품부패 및 품질 저하를 유발시키는 원인 미생물을 신속하게 검출 가능한 DNA 마이크로어레이 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 식품의 품질 저하 개선 및 안전성을 고려한 연구는 계속해서 진행되어 왔으며, 이와 관련된 식품에서 미생물을 검출하는 방법에는 식품의 미생물학적 품질을 평가하기 위한 지표미생물을 진단하는 방법과 특정 균이 발생하였

을 경우 역학조사를 위한 특정 원인 균을 동정하기 위한 검사가 있다. 그에 따른 일반적인 확인 방법으로 미생 물배양법의 단점을 극복하기 위하여 Fluorescent antibody, ELISA나 agglutination assay와 같은 면역학적 방법 또는 Polymerase chain reaction (PCR) 등을 이용한 분자유전학적인 방법 등을 이용하였다.

[0003] 그러나 PCR은 사용하는 프라이머의 숫자에 제한이 있으므로 다중의 식중독균의 검출에 문제점을 가지고 있다. 또한 비슷한 속 균주들 사이에서 DNA 서열의 유사성이나 다양성에 의한 위양성(false-positive)이나 위음성(false-negative)을 나타낼 수 있는 가능성이 있다. DNA 서열에 중점을 둔 마이크로어레이 실험 방법은 유전자 발현, 지노타이핑(genotyping) 및 단일염기다형성(singlenucleotide polymorphism) 등의 실험에 사용되어 왔다 (Chizhikov et al. 2002. J. Clin. Microbiol. 40: 2398-2407). 또한 마이크로어레이 실험방법은 한 번의 실험으로 다수의 식중독균을 검출할 수 있는 잠재능력 때문에 새로운 식중독균 검출 방법으로 제안되었다 (Alkhalidi et al. 2002. J. AOAC Int. 85: 906-910).

[0004] 현재 다양한 미생물을 동시에 진단하는 진단 kit는 개발이 미미하며, 멀티플렉스 PCR을 이용하는 경우에도 조건이 까다로워서 5종류 이상의 균주를 동시에 진단하지 못하고 있다.

[0005] 또한 현재 개발된 대부분의 신속진단법은 미생물의 특이유전자를 증폭시키는 과정을 포함하고 있으며, 이는 방대한 양의 미생물 유전자에 대한 정보가 있어야 가능하다.

[0006] 기존의 DNA chip 기술은 기능 유전체학의 실험 도구중 하나로 염기서열이 알려져 있는 DNA 분자를 이용하여, 총체적인 유전자 발현 양상을 검색하는 획기적인 기술로 세계적으로 다양한 연구 분야에 활용되고 있다. 하지만 국내에서는 DNA chip의 연구가 주로 대량의 유전자 발현 양상에만 적용되고 있는 실정이며, DNA chip기술을 활용한 미생물 진단 응용 연구는 미미한 상태이다.

[0007] 최근 들어, cDNA 및 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이 기술이 병원성 미생물의 분석에 적용되어 왔으며 (Burton et al. 2005. Molecular and Cellular Probes. 19: 349-357), 하나의 칩으로 4종의 식중독균을 검출할 수 있는 연구가 보고되었다 (Sergeev et al. 2004. Biosensors and Bioelectronics. 20: 684-698). 이러한 기존의 연구들에서 제작된 프로브들은 미생물의 flagellin 유전자나 독성 유전자 (병원성 관련 유전자 포함), 16S rRNA 또는 23S rRNA 서열에서 제작되었다. 그러나 이러한 표적 유전자들은 같은 속의 미생물들 간에 그 서열을 공유하고 있으며, 이는 cross-hybridization의 결과를 초래할 가능성이 높다. 또한, 이러한 연구들에서 혼성화 전에 PCR을 수행하는데, 이 방법은 사용 가능한 프로브의 수가 제한적일 수밖에 없으며 이는 다수의 병원균을 검출하는데 무리가 있다 (Chizhikov et al. 2001. Appl. Environ. Microbiol. 67: 3258-3263).

[0008] 대부분의 DNA chip을 이용한 미생물 진단법들도 특정미생물의 검출을 목적으로 연구되어왔기 때문에 여전히 다양한 미생물의 동시진단이 불가능하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 식품의 부패 및 품질을 저하시키는 미생물 존재 여부를 specific하게 작동하여, 빠르게 균을 검출 할 수 있는 DNA chip을 개발하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은

[0011] a) Alicyclobacillus 속 균주로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;b) 추출한 게놈 DNA를 절단하여서 100 ~ 1500 bp 크기의 DNA 절편을 분리하는 단계;c) 라이브러리용 벡터와 상기 절단된 게놈 DNA를 연결시켜 콜로니를 획득하는 단계;d) 획득한 콜로니에서 플라스미드를 추출 후 PCR을 수행한 후 PCR 산물로부터 프로브를 정제하는 단계; 및 e) 상기 정제된 프로브를 서포트에 고정하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이의 제조방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 Alicyclobacillus 속 균주는 Alicyclobacillus acidoterrestris, Alicyclobacillus cycloheptanicus, 및 Alicyclobacillus acidocaldarius로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 균주인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0013] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 b)단계의 절단은 추출한 게놈 DNA를 서로 다른 종류의 제한효소 쌍으로

잘라내어서 수행되는 것이 바람직하고, 상기 서로 다른 종류의 제한효소 쌍은 EcoRI/BamHI, HindIII/XhoI, 및 HindIII/SacII로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 제한 효소 쌍인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 구현예에 있어서, 상기 c) 단계의 라이브러리용 벡터와 상기 절단된 게놈 DNA의 연결은 양옆에 T3/T7 시퀀스가 위치되도록 하여 수행하는 것이 바람직하고, 상기 T3/T7 시퀀스는 (T3 : ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA;서열번호 1, T7 : TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG;서열번호 2)

[0015] 상기 서열번호 1 및 서열번호 2에 기재된 염기서열을 가지는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 있어서 상기 PCR은 T3/T7 프라이머를 사용하여 수행되는 것이 바람직하고, 상기 T3/T7 프라이머는 상기 서열번호 1 및 서열번호 2에 기재된 염기서열을 가지는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 PCR 산물로부터 프로브를 정제하는 단계는 b)단계에 적용된 제한효소 쌍을 이용하여 수행되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 라이브러리용 벡터는 도 7에 기재된 개열지도를 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0019] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 서포트는 규소, 유리, 게르마늄, 세라믹, 규소, 반도체 재료, PTFE, 탄소, 폴리카르보네이트, 운모, 플라스틱, 석영, 폴리스티렌, 갈륨 아세나이드, 금속, 금속 합금, 및 직물로 구성된 군으로부터 선택된 물질인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0020] 또한 본 발명의 상기 본 발명의 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이의 제조방법에 의하여 제조된 식품부패 원인균 동시 검출용 DNA 마이크로어레이를 제공한다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 마이크로 어레이는 포지티브 컨트롤과 네가티브 컨트롤을 더욱 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 포지티브 컨트롤은 박테리오파아지의 MJ1 서열을 사용하였고, 네가티브 컨트롤은 Peroxisome proliferator activated receptor(PPAR)- 감마를 사용한 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 박테리오파아지의 MJ1 서열은 서열번호 3 및/또는 4에 기재된 염기서열을 가지고, 네가티브 컨트롤 서열은 서열번호 5 및/또는 6에 기재된 염기서열을 가지는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

표 1

[0024]	Positive ctrl. MJ1	5'-cgggatccatgaaacgtgcagcattg-3'(서열번호 3)
		5'-cggggaattcaccgaatgcattgttcgta-3'(서열번호 4)
	Negative ctrl. PPAR-감마	F 5'- CATTCTGGCCCACTTTGG - 3'(서열번호 5)
		R 5'- TGGAGATGCAGGCTCCACTTG - 3'(서열번호 6)

[0025] 표 1은 포지티브 컨트롤과 네가티브 컨트롤 및 그 서열에 대한 표이다.

[0026] 또한 본 발명은 상기 본 발명의 마이크로어레이를 이용하여 Random 프라이밍법과 하이브리다이제이션을 통하여 식품부패 원인균의 존재 유무를 한번에 판별하는 식품 부패 원인 미생물 탐지방법을 제공한다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 식품 부패 원인 미생물은 Alicyclobacillus 속 균주인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 식품은 과일 주스인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0029] 이하 본 발명을 설명한다.

[0030] 본 발명은 검출하고자 하는 식품부패 및 품질 저하 원인 미생물의 유전자 염기서열에 대한 정보 없이 미생물의 순수 배양으로부터 Genomic DNA를 추출하고 이에 따른 random genomic DNA library를 구축하고, library의 product로 DNA chip을 제작하여 random priming 및 hybridization 방법을 통하여, 특정 미생물 검출 가능 여부

를 확인하며, 유통되고 있는 식품에 특정 미생물을 검출하거나 분석하는데 유용한 DNA micro array 개발에 관한 것이다.

- [0031] 본 발명은 부패를 유발하거나 식품의 품질을 저하시킨다고 알려져 있는 특히 과일 주스에서 많이 확인되는 *Alicyclobacillus* spp. 균을 이용하였으며, 유통되고 있는 식품에 특정 미생물을 specific하게 작동하여, 검출하거나 분석하는데 유용한 유전자 칩을 개발하였다.
- [0032] 본 발명은 일반적으로 genomic DNA 미생물 분석에 광범위하게 활용되어짐을 고려할 때, 제한 효소 쌍으로 잘라져 단편화된 random genomic DNA 역시 해당 미생물에 대한 특정 정보로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 다양한 부패 원인균들을 동시에 진단할 수 있다면, 개별적인 미생물 진단에 드는 수많은 시간, 노동력, 비용, 그리고 노력을 절감할 수 있다.
- [0033] 또한 Random Genomic DNA의 단편을 통해 특정 미생물을 DNA chip 상에서 탐지할 수 있을 경우 기존의 특정 염기서열을 갖고 있는 DNA 만을 사용해야 한다는 DNA chip 제작 관점을 바꿔놓는 계기가 될 수 있다고 판단되며, 시료에 존재하는 DNA를 PCR을 이용한 증폭 없이 바로 hybridization 반응을 활용하여 진단에 걸리는 시간을 단축시킬 수 있을 뿐만 아니라, 본 발명으로 개발하려는 DNA chip은 특이적 프로브를 제작하기 위한 시퀀스 정보가 필요 없기 때문에 염기서열 분석에 필요한 시간과 비용을 절감할 수 있다.
- [0034] 또한 기존의 16S rDNA를 프로브로 활용했던 방식에서 나타나던 잠재적인 비 특이적 hybridization에 의한 문제를 다수의 random probe의 조합을 이용하여 해결할 수 있으므로 교차 반응에 의한 오류를 줄일 수 있다.
- [0035] 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [0036] 본 발명은 탐지하고자 하는 부패 원인 미생물의 유전자 염기서열에 대한 정보 없이 미생물의 순수 배양으로부터 Genomic DNA를 추출하고, Random Genomic DNA fragments probe를 이용하여, DNA chip을 제작한다.
- [0037] 그 후 random priming과 일반적인 hybridization 방법을 통해 특정 미생물의 존재 유무를 판별함으로써 생체 시료에서 특정 미생물을 검출하거나 분석하는데 유용한 DNA micro array의 제작 방법에 관한 것이다.
- [0038] 먼저, 본 발명에 따른 식품 부패 원인 미생물 탐지용 DNA micro-array를 제작하는 과정은 다음과 같다.
- [0039] 1) 탐지하고자 하는 부패 원인 미생물을 순수 배양시켜 이로부터 genomic DNA를 추출한다.
- [0040] 2) 추출한 genomic DNA를 세 쌍의 제한효소로 double digestion 한 후, gel extraction 방법을 이용하여, 100~500bp, 500bp~1kb, 1kb~1.5kb로 분리한다.
- [0041] 3) 2)번과정에서 얻은 random genomic DNA fragments 사용하여, T3/T7 시퀀스가 포함 되어 있는 vector를 이용하여, Random Genomic DNA library를 구축한다.
- [0042] 4) 구축한 library에서 획득한 colony를 이용하여, colony pcr를 진행하며, 얻은 products를 QC한 후 DNA chip 제작을 진행한다.
- [0043] 5) 깨끗하게 정제가 된 products로 목적하는 미생물이 spotting 되어 있는 DNA chip이 제작 및 완성된다.
- [0044] 제작 된 DNA chip에는 부패 원인 미생물 세 종류 *Alicyclobacillus acidocaldarius* (ATCC 43030), *Alicyclobacillus acidoterrestris* (ATCC 49025), *Alicyclobacillus cycloheptanicus* (ATCC 49029)로 구성 되어 있다.
- [0045] 이와 같이 제작된 DNA chip을 사용하여 일반적으로 사용되는 random priming 및 Hybridization 방법을 통하여, 제작된 DNA chip에서 부패 원인 미생물의 검출 유무를 확인한다.

발명의 효과

- [0046] 본 발명을 통하여 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 랜덤 게놈 프로브를 이용한 부패 원인 미생물 탐지용 DNA Microarray는 식품의 품질 저하 및 부패 원인이 되는 미생물을 정확하게 탐지할 수 있으며, 개별적인 미생물의 특이 유전자 뿐만 아니라 비특이적 유전자 단편을 이용함으로써 미생물 유전자에 대한 세세한 분석과정이 필요치 않게 될 것이다. 또한 바로 하이브리다이제이션 반응에 활용하여 진단에 걸리는 시간을 단축시키고, 교차 반응에 의한 오류를 걱정할 필요가 없게 된다. 그러므로 본 발명으로 인하여, 경제적인 측면과 국민 보건에 많은 기여를 할 수 있을 것으로 보여진다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1은 본 발명에 따른 Random Genomic DNA의 Probe를 이용하여, 제작 한 DNA micro-array design을 나타낸다.
- 도 2는 본 발명에 따른 DNA micro-array를 이용한 Alicyclobacillus acidocaldarius (ATCC 43030)의 탐지 결과이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 DNA micro-array를 이용한 Alicyclobacillus acidoterrestris (ATCC 49025)의 탐지 결과이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 DNA micro-array를 이용한 Alicyclobacillus cycloheptanicus (ATCC 49029)의 탐지 결과이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 DNA micro-array를 이용하여 number가 다른 동일 균주 및 다른 Genus에 DNA를 사용하여 탐지 한 결과이다. 도 5a는 Alicyclobacillus acidoterrestris ATCC 49027 , 도 5b는 Alicyclobacillus cycloheptanicus ATCC 49028, 도 5c는 Alicyclobacillus acidocaldarius ATCC 27009 , 도 5d는 Bacillus cereus F381284, 도 5e는 Bacillus subtilis ATCC 6633 균주에 대한 탐지 결과를 나타낸다.
- 도 6은 본 발명에 따른 DNA micro-array에 오렌지 주스에서 부패 원인 균인 Alicyclobacillus spp. 을 Genomic DNA를 추출하여 탐지한 결과이다. 도 6a는 Alicyclobacillus acidocaldarius ATCC 43030 , 도 6b는 Alicyclobacillus acidoterrestris ATCC 49025, 도 6c는 Alicyclobacillus cycloheptanicus ATCC 49029에 대한 탐지 결과를 나타낸다.
- 도 7은 라이브러리용 벡터의 개열지도를 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

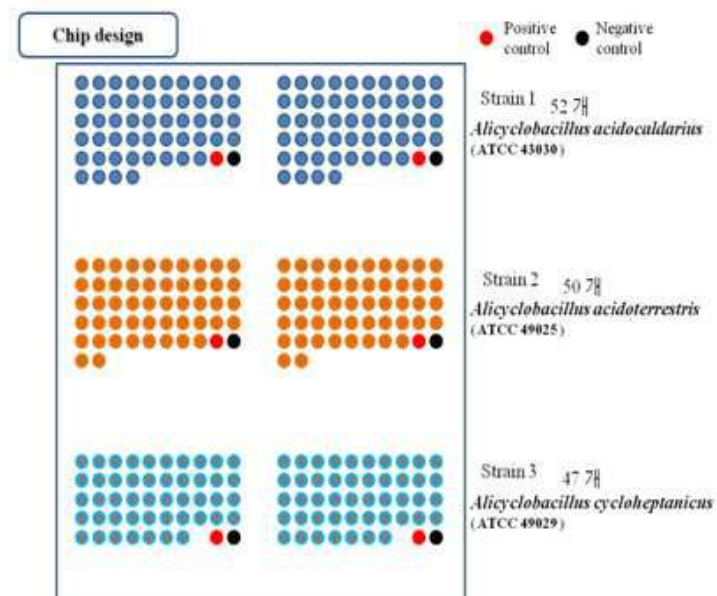
- [0048] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위하여 기재한 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.
- [0049] 실시예 1
- [0050] 본 발명을 확인하기 위하여 특히 과일 주스에서 품질 저하 및 부패 원인균으로 알려져 있는 Alicyclobacillus acidocaldarius (ATCC 43030), Alicyclobacillus acidoterrestris (ATCC 49025), Alicyclobacillus cycloheptanicus (ATCC 49029) 에 탐지 가능 여부 실험을 다음과 같이 수행하였다.
- [0051] 3종의 미생물을 순수 배양하고 다음과 같은 방법으로 Random Genomic DNA library를 구축하였다.
- [0052] 첫 번째로 순수배양을 통해 얻어진 미생물로부터 Genomic DNA를 Nucleogen Genomic DNA flexible kit를 이용하여 추출하였다. 추출한 genomic DNA 2ug을 서로 다른 세 쌍의 다른 제한효소로 (EcoRI/BamHI, HindIII/XhoI, HindIII/SacII) double digestion하였다. 각각의 제한효소 쌍으로 잘려진 genomic DNA를 1% agarose gel로 전기영동 50v로 gel loading 한 후 100 bp size marker 기준으로 하여 100~500bp, 500bp~1kb, 1kb~1.5kb 사이즈를 갖는 부분을 gel에서 잘라내고, RBC gel extraction kit를 이용하여 회수하였다. Random Genomic DNA library 구축하기 위해 상기와 동일한 제한효소 쌍으로 double digestion 된 pPCR-Script Amp vector [STRATAGENE, USA]를 준비하였다. 이때, 제한효소로 잘려진 vector의 양 옆 부분은 T3 시퀀스와 T7 시퀀스가 위치하도록 한다. 또한 cloning 시 vector의 self ligation을 막기 위해 S.A.P 처리하였다. 제한효소로 잘라 회수한 Random Genomic DNA fragments와 역시 동일한 제한효소 쌍으로 잘라 준비한 vector와 ligation시켰다.
- [0053] Ligation 후 competent cell (E.coli DH5α)로 형질전환시킨 후 엠포실린 항생제가 포함된 LB agar plate에 IPTG + X-gal로 미리 screen 처리한 된 아가배지에 비드를 이용하여, 잘 깔아 준 후 배양 시켜 white, blue selection하여 형질 전환이 된 순수 콜로니를 얻었다. 대략적으로 하나의 제한효소 쌍으로부터 잘라 구성된 random genomic DNA fragments에서는 30 ~ 수백 개의 콜로니가 얻어지는데, 이 중 white, blue selection로 구분된 순수 콜로니를 랜덤하게 선별하였으며, T3/T7 primer을 이용하여 Colony PCR을 수행하였다. (95 ℃에서 5분간 예열하고, 94 ℃에서 30초, 57 ℃에서 30초, 72 ℃에서 30초로 30 사이클을 수행한 후, 72 ℃에서 5분간 정지한다. PCR 후 PCR 산물을 정제하였다.

- [0054] 이렇게 정제되어 구축 한 probe는 Alicyclobacillus acidocaldarius (ATCC 43030) 52개, Alicyclobacillus acidoterrestris (ATCC 49025) 50개, Alicyclobacillus cycloheptanicus (ATCC 49029) 47개를 아민 (amine)으로 코팅된 유리 슬라이드 글라스 위에 집적시켰다. 한편, Positive control probe는 bacteriophage의 MJ1 시퀀스를 사용하였다. [도 1 참조].
- [0055] 각각의 미생물의 특이적 탐지 가능성을 확인하기 위해 탐지하고자 하는 미생물의 Genomic DNA (50ng) 를 Cy3-dCTP를 이용 random priming하였다. Random priming은 Roche사의 Random Primed DNA Labeling kit를 사용하였으며, Random priming 반응 용액에는 랜덤 헥사머, dNTPs, Klenow 단편들, 버퍼가 포함되어 있으며, 총 20 μ l 반응에 25 nM Cy3-dCTP 1 μ l를 포함하였다.
- [0056] Reference signal을 얻기 위해 Alicyclobacillus acidocaldarius (ATCC 43030), Alicyclobacillus acidoterrestris (ATCC 49025) 그리고 Alicyclobacillus cycloheptanicus (ATCC 49029) 그리고 Alicyclobacillus cycloheptanicus 3종의 미생물에서 Genomic DNA(50 ng)를 Cy5-dCTP를 이용하여 priming하였다. Positive control은 Test 와 Reference에 각각 10ng 첨가하였다.
- [0057] Random priming 반응은 98℃에서 10분, 37 ℃에서 2시간 진행시킨 후 65℃에서 10분간 가열하였다. 여기서 얻어진 각각의 형광 표지된 랜덤 프로브 반응액(Cy3-dCTP, Cy5-dCTP)을 섞은 후 PCR 정제 kit로 정제하여 형광 표지된 프로브를 확보하였다. 2.5 μ l의 Hybridization 용액(6 X SSC, 0.2% SDS, 5 X Denhardt's solution, 0.1 mg/ml의 변성 salmon sperm DNA)을 만든 후, 100 ℃에서 2분간 가열하였다. DNA micro array는 prehybridization 용액(1.75 X SSC, 0.1% SDS, 10 mg/ml of bovine serum albumin)은 65℃에서 30분간 예열을 시킨 용액에 DNA micro array를 30분간 담근 후 증류수에 5분간에 담귀 세척하였다. 세척 후 3500 rpm에서 3분간 원심분리하여 DNA micro array를 건조하였다. DNA micro array 위에 커버 슬라이드 글라스를 덮은 후 커버글라스와 칩 사이의 틈새로 12.5 μ l의 probe가 용해된 용액을 주입한 다음 65 ℃ hybridization chamber에서 16시간 반응시켰다.
- [0058] 반응이 끝난 DNA micro array는 2 X SSC에 담귀 커버글라스를 제거하고, 65 ℃로 미리 데워진 2 X SSC와 0.2% SDS 용액 으로 10분, 0.05 X SSC 용액으로 5분간 2번 세척하였고, 건조과정은 3500 rpm에서 3분간 진행하였다. 건조된 DNA micro array는 스캐너(GenePix 4000B)로 스캐닝한 후 Hybridization 결과를 확인하였다.
- [0059] DNA micro array 실험 결과, Cy3-dCTP로 Alicyclobacillus acidocaldarius (ATCC 43030)의 Genomic DNA만을 포함한 샘플의 Hybridization 결과에서 목적으로 한 Alicyclobacillus acidocaldarius (ATCC 43030) 가 확인되었다. 따라서 특이적으로 목적하는 미생물의 genomic DNA에서만 특이적으로 Hybridization된 것을 확인할 수 있었다. [도 2 참조]
- [0060] 실시예 2
- [0061] 상기 실시 예 1과 동일한 방법으로 Alicyclobacillus acidoterrestris (ATCC 49025) 균주를 이용하여 진행하였다. 목적하는 미생물의 Genomic DNA를 추출하고 50ng의 Genomic DNA를 random priming하여 탐지한 결과이며, Alicyclobacillus acidoterrestris (ATCC 49025) probe가 심어져 있는 부분에서만 특이적으로 검출되는 점을 확인하였다. [도 3 참조].
- [0062] 실시예 3:
- [0063] 상기 실시 예 1,2과 동일한 방법으로 Alicyclobacillus cycloheptanicus (ATCC 49029) 균주를 이용하여 진행하였다. 목적하는 미생물의 Genomic DNA를 추출하고 50ng의 Genomic DNA를 random priming하여 탐지한 결과이며, Alicyclobacillus cycloheptanicus (ATCC 49029) probe가 심어져 있는 부분에서만 특이적으로 검출되는 점을 확인하였다. [도 4 참조].
- [0064] 실시예 4:
- [0065] 제작된 DNA micro array가 specific하게 작동하는지 확인하기 위하여, DNA micro array 심어져 있는 기존 3종의 Alicyclobacillus spp. 미생물 이외에 Alicyclobacillus acidocaldarius (ATCC 27009), Alicyclobacillus acidoterrestris (ATCC 49027), Alicyclobacillus cycloheptanicus (ATCC 49028)) 균주 번호가 다른 것 각각 한가지 와 DNA chip에 심어져 있는 Alicyclobacillus spp.가 아닌 두 종류의 Bacillus spp. (Bacillus subtilis ATCC 6633, Bacillus cereus F3812) 균을 이용하여, 상기 실시 예 1과 동일한 방법으로 실험을 진행하였다.

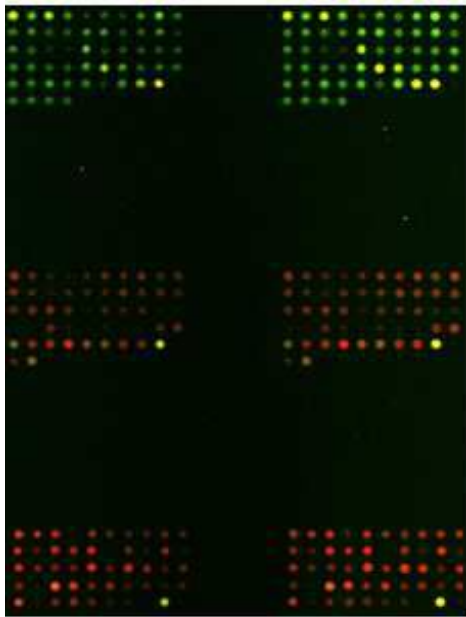
- [0066] 동일하게 순수 배양하여 5종의 미생물에서 Genomic DNA를 추출하였고,
- [0067] 실험하고자 하는 Genomic DNA 50 ng를 Cy3-dCTP로 랜덤 프라이밍하였다. [도 5 참조].
- [0068] 도 5를 통하여 본 발명에 의하여 제조된 검출용 chip이 목적하는 특정 미생물만을 검출 가능하다는 것을 알 수 있다.
- [0069] 실시예 5:
- [0070] 본 발명에 따른 DNA micro-array을 이용하여, 유통되고 있는 식품 중 오렌지 주스에서 부패 원인 균인 *Alicyclobacillus* spp. 의 Genomic DNA를 추출하여 탐지한 결과이다.[도 6 참조]
- [0071] 도 6에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 의하여 제조된 부패미생물 검출 chip이 실제 식품(주스)에 적용시에도 검출 가능하다는 것을 알 수 있다.

도면

도면1



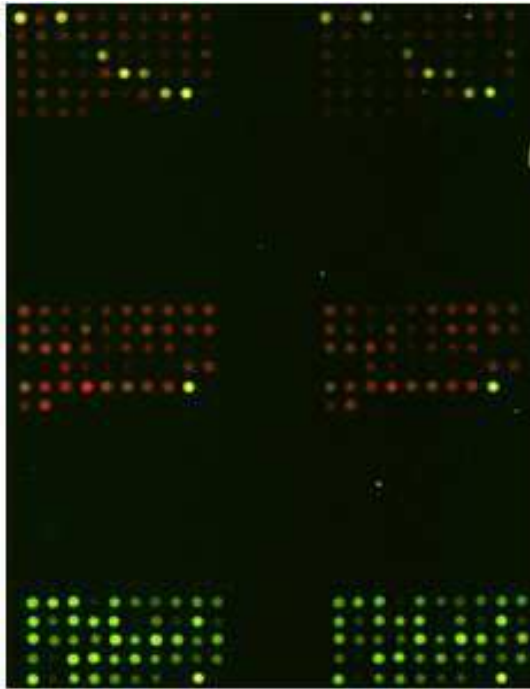
도면2



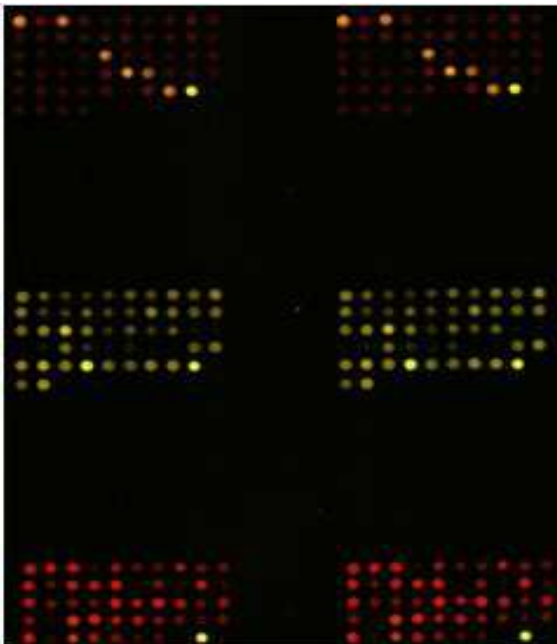
도면3



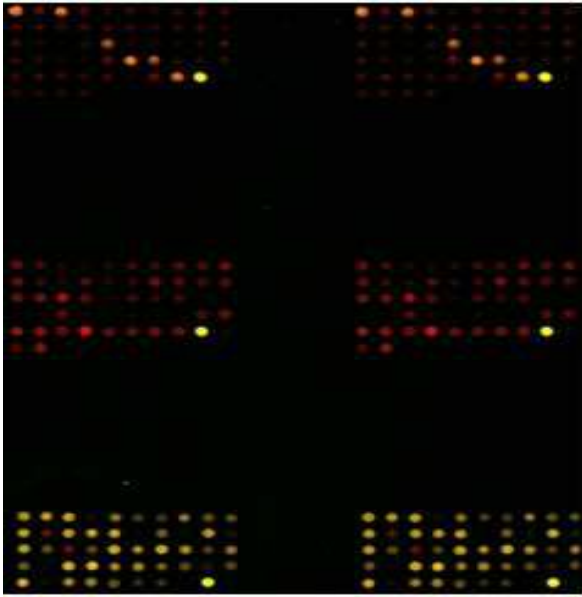
도면4



도면5a



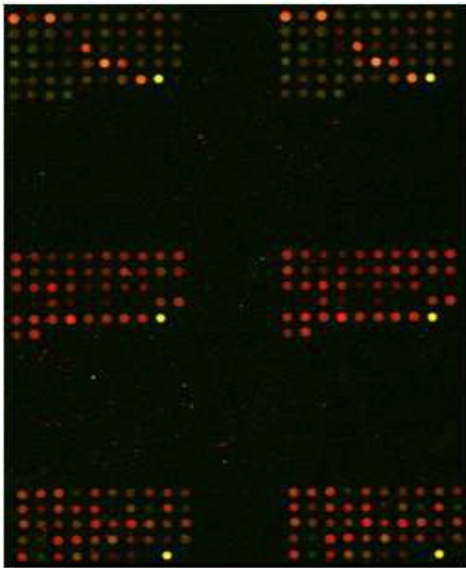
도면5b



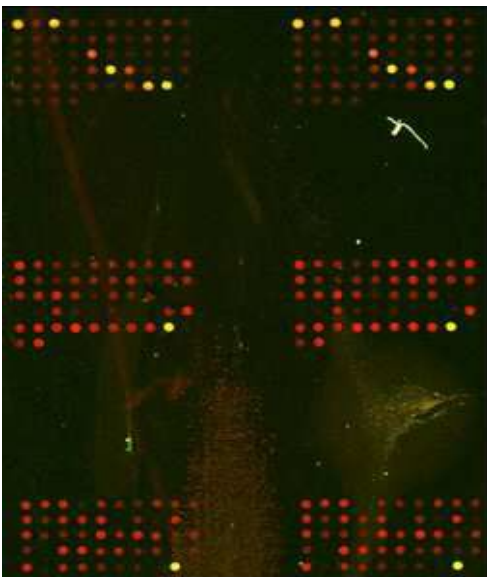
도면5c



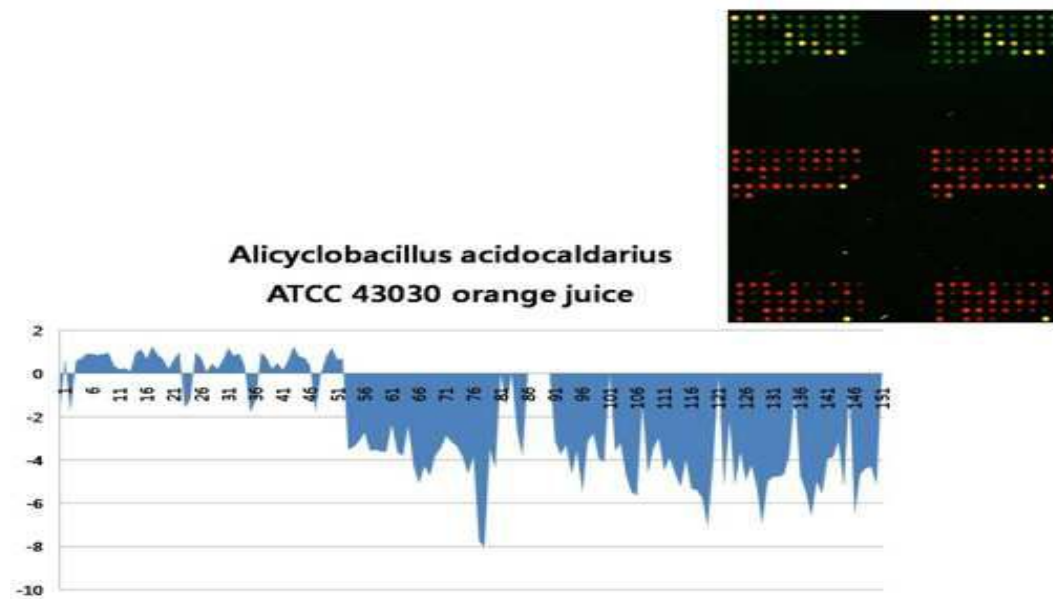
도면5d



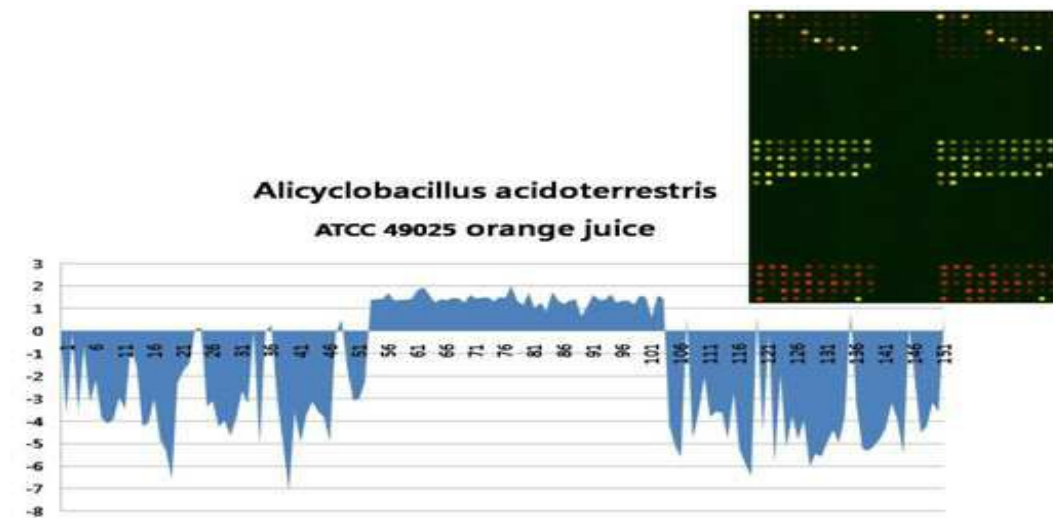
도면5e



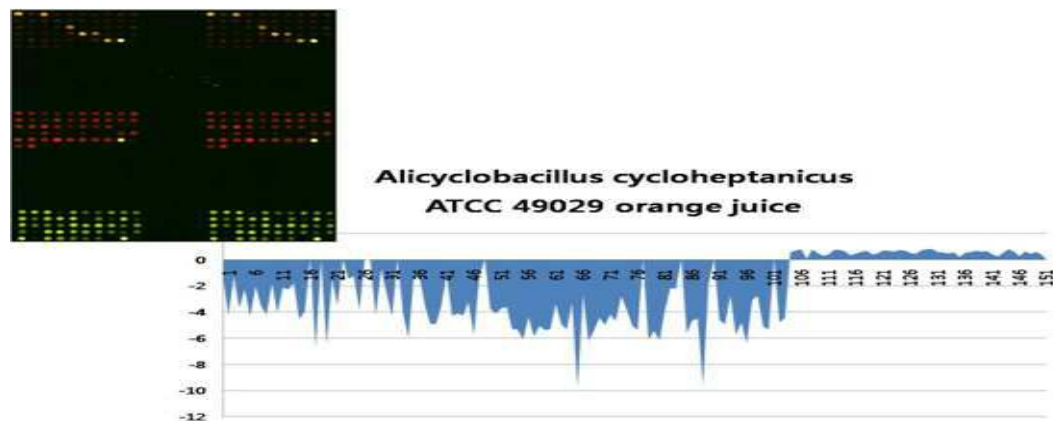
도면6a



도면6b

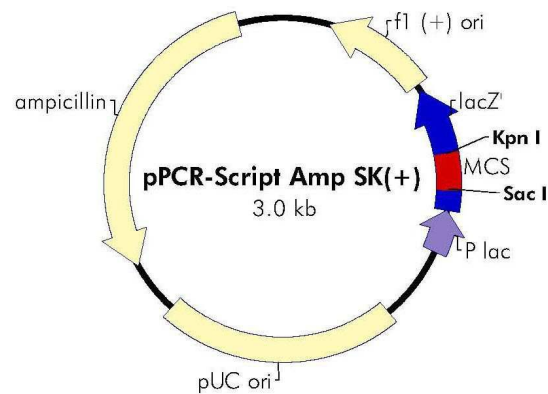


도면6c

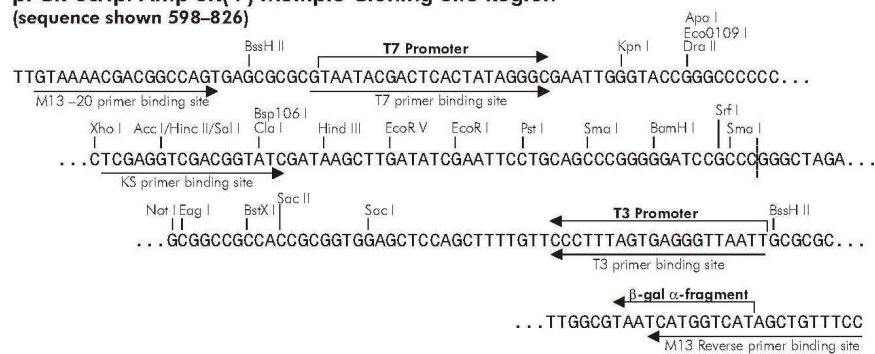


도면7

f1 (+) origin 135-441
 β -galactosidase α -fragment 460-816
 multiple cloning site 653-760
 lac promoter 817-938
 pUC origin 1158-1825
 ampicillin resistance (*bla*) ORF 1978-2833



pPCR-Script Amp SK(+) Multiple Cloning Site Region (sequence shown 598-826)



서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> A DNA micro-array Chip-based method for rapid and specific
detection of spoilage bacteria
- <160> 6
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> T3
- <400> 1
- attaaccctc actaaaggga
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> T7

<400>	2	
taatacgact cactataggg		20
<210>	3	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MJ1	
<400>	3	
cgggatccat gaaacgtgca gcattg		26
<210>	4	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MJ1	
<400>	4	
cgggaattca ccgaatgcat gttcgta		27
<210>	5	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PPAR-gamma	
<400>	5	
cattctggcc caccaacttt gg		22
<210>	6	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PPAR-gamma	
<400>	6	
tggagatgca ggctccactt tg		22