



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0025121
(43) 공개일자 2007년03월08일

(21) 출원번호 10-2005-0080906
(22) 출원일자 2005년08월31일
심사청구일자 2005년08월31일

(71) 출원인 인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자 민기식
서울 관악구 신림10동 삼성산 주공아파트 303동 1301호
최중기
서울 양천구 목1동 아파트 701동 203호
김세주
인천 남구 용현4동 81-13 인하마을 A동 B02호

(74) 대리인 이원희

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 섬모충류 특이적 프라이머 및 이를 이용한 섬모충류 검출방법

(57) 요약

본 발명은 섬모충류(Ciliate) 특이적 프라이머, 이를 포함하는 섬모충류 검출용 키트 및 이를 이용한 섬모충류 검출 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 혼합 시료(환경 시료, 생체시료 등)에서 섬모충류 특이적 SNP 부위를 인식하는 섬모충류 특이 프라이머를 이용한 18S 리보솜 DNA의 염기서열분석에 관한 것이다. 본 발명의 프라이머를 이용하면 순배양 과정이 필요없이 다양한 생물이 섞여 있는 혼합시료에서 쉽고 정확하게 섬모충류의 18S 리보솜 DNA만을 특이적으로 증폭하여 다양한 섬모충류를 검출할 수 있으므로, 본 발명의 각 섬모충류 SNP 부위 및 프라이머를 섬모충류 종 식별 DNA 마커로 활용하여 혼합시료 내 섬모충류 군집을 손쉽게 환경 모니터링, 생물 계통연구, 질병 감염 여부 등을 확인할 수 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

서열번호 1로 기재되는 섬모충류 18S 리보솜 DNA 단편의 염기 서열내에서 선택되며 38번째 핵산을 3'-최말단으로 하고 상기 3'-최말단으로부터 두번째 염기가 G 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 섬모충류 특이적 프라이머.

청구항 2.

제 1항에 있어서, **서열번호 2**로 기재되는 것을 특징으로 하는 섬모충류 특이적 프라이머.

청구항 3.

서열번호 1로 기재되는 섬모충류 18S 리보솜 DNA 단편에 상보적인 서열내에서 선택되며 상기 상보적 염기서열의 51번째 핵산을 3'-최말단으로 하고 상기 3'-최말단으로부터 두번째 염기가 Y 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 섬모충류 특이적 프라이머.

청구항 4.

제 3항에 있어서, **서열번호 3**으로 기재되는 것을 특징으로 하는 섬모충류 특이적 프라이머

청구항 5.

서열번호 1로 기재되는 섬모충류 18S 리보솜 DNA 단편의 서열내에서 선택되며 47번째 핵산을 3'-말단으로 하고 상기 3'-말단으로부터 두번째 염기가 G 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 섬모충류 특이적 프라이머.

청구항 6.

제 5항에 있어서, **서열번호 4**로 기재되는 것을 특징으로 하는 섬모충류 특이적 프라이머.

청구항 7.

서열번호 1로 기재되는 섬모충류 18S 리보솜 DNA 단편에 상보적인 서열내에서 선택되며 상기 상보적 염기서열의 42번째 핵산을 3'-최말단으로 하고 상기 3'-최말단으로부터 두번째 염기가 R 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 섬모충류 특이적 프라이머.

청구항 8.

제 7항에 있어서, **서열번호 5**로 기재되는 것을 특징으로 하는 섬모충류 특이적 프라이머.

청구항 9.

서열번호 6으로 기재되는 섬모충류 18S 리보솜 DNA 단편의 서열내에서 선택되며 37번째 핵산을 3'-말단으로 하고 상기 3'-말단으로부터 두번째 염기가 C 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 섬모충류 특이적 프라이머.

청구항 10.

제 9항에 있어서, **서열번호 7**로 기재되는 것을 특징으로 하는 섬모충류 특이적 프라이머.

청구항 11.

서열번호 6으로 기재되는 섬모충류 18S 리보솜 DNA 단편에 상보적인 서열내에서 선택되며 상기 상보적 염기서열의 40번째 핵산을 3'-최말단으로 하고 상기 3'-최말단으로부터 두번째 염기가 T 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 섬모충류 특이적 프라이머.

청구항 12.

제 11항에 있어서, **서열번호 8**로 기재되는 것을 특징으로 하는 섬모충류 특이적 프라이머.

청구항 13.

서열번호 9로 기재되는 섬모충류 18S 리보솜 DNA 단편의 서열내에서 선택되며 47번째 핵산을 3'-말단으로 하고 상기 3'-말단으로부터 두번째 염기가 A 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 섬모충류 특이적 프라이머.

청구항 14.

제 13항에 있어서, **서열번호 10**으로 기재되는 것을 특징으로 하는 섬모충류 특이적 프라이머.

청구항 15.

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항의 프라이머 및 진핵생물 18S 리보솜 DNA 공통 프라이머를 포함하는 섬모충류 검출용 키트.

청구항 16.

제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항의 프라이머 및 진핵생물 18S 리보솜 DNA 공통 프라이머를 이용하여 혼합시료에서 섬모충류를 검출하는 방법.

청구항 17.

제 16항에 있어서,

- i) 원생생물이 함유된 혼합시료로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;
- ii) 상기 단계 i)의 게놈 DNA를 제 1항 내지 제 14항 중 어느 한 항의 프라이머 및 진핵생물 18S 리보솜 DNA의 공통 프라이머를 이용하여 증폭시키는 단계; 및
- iii) 상기 단계 ii)에 의하여 증폭된 밴드가 나타나면 섬모충류가 상기 혼합시료내에 존재하는 것으로 판정하고 밴드가 나타나지 않으면 상기 혼합시료내에 존재하지 않는 것으로 판정하는 단계를 포함하는 섬모충류 검출 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 섬모충류(ciliate) 특이적 프라이머, 이를 포함하는 섬모충류 검출용 키트 및 이를 이용한 섬모충류 검출 방법에 관한 것이다.

섬모충류는 원생동물에서 가장 진화한 분류군으로 1901년 분류학상 문(phylum)으로 설립된 이후 현재 11개의 강, 57개의 목, 280개의 과, 1,484개의 속에 약 10,000 종이 기록되어 있을 정도로 종류상이 다양한데 몸은 하나의 세포로 이루어져 있고 크기는 주로 100 μ m로 이하로 매우 미소한 현미경적 생물이다. 섬모충류는 수분이 함유된 토양이나 수생태계 등 어느 곳에서나 높은 밀도로 존재하여 생태계의 미세생물 먹이망의 중요한 구성원이다. 한편 일부의 기생성 섬모충류는 인간을 비롯한 가축, 어류 등에 질병을 유발하는 것으로도 알려져 있다. 섬모충류와 같은 원생생물은 크기가 매우 미소하므로 오염원 유입 등 환경 변화에 민감하게 반응할 수 있어 환경 모니터링에 매우 적합한 생물군이다. 섬모충류는 이처럼 생태학적으로 매우 중요한 생물이지만 그 크기가 미소하고 형태적 변이성이 심해 종 분류에 어려움이 많아 생태적으로 그 종류상을 파악하기 매우 어려워 중요성에 비해 활용성이 아직은 극히 낮다.

최근에는 18S 리보솜 DNA의 염기서열의 차이에 의거하여 종 분류를 할 수 있다는 것이 알려지면서 섬모충류 수백 종에 대한 염기서열이 밝혀져 있다(Beatriz Diez et al., Applied and Environmental Microbiology, 2001, 2932-2941). 하지만 각 종에 대한 염기서열을 구하기 위해서는 순배양을 통한 단일종 배양이 먼저 수행되어야 하는데, 순배양 과정은 많은 시간을 요하고 또한 종에 따라 배양이 되지 않는 경우가 많아 이 방법의 활용에는 한계가 있었다. 이와 같은 순배양법의 단점을 극복하기 위하여 분자생물학적 방법이 최근에는 도입되어 활용되고 있는데 모든 진핵생물을 공통적으로 증폭할 수 있는 18S 리보솜 DNA 프라이머를 사용하여 현장시료에서 얻은 DNA를 PCR 방법으로 증폭한 후 DNA 단편을 얻고 클로닝하여 클론을 얻은 후 각 클론의 염기서열을 분석하여 시료의 종 다양성을 확인하는 방법이다. 특히 혼합시료에서 섬모충류에 비해 다른 생물의 생물량이 현저히 높거나 섬모충류가 현저히 낮을 경우 상기와 같은 무작위 클론법으로는 다양한 섬모충류상을 밝히는데 많은 노력이 필요했다. 예를 들어, 부유성 해양생물 시료를 분석할 경우 기존 연구 결과에 의거하면 (Seung Yeo Mon-van der Staay et al., Nature, 2001, 409:607-610; Purificacion Lopez-Garcia et al., Nature, 2001, 409:603-607), 전체 클론 중 섬모충류는 5% 이하를 차지하는 경우가 많은 것으로 알려져 있다. 따라서, 산술적으로 생각하면 기존의 방법은 본 발명의 섬모충류 특이선별법에 비해 20배 이상의 노력과 경비를 쏟아야 같은 수의 섬모충류 종을 확인할 수 있다.

dCAPS(derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 방법에 의하면 PCR 프라이머의 3'-말단 부위의 두 염기가 DNA 주형에 상보적이지 않을 경우 PCR이 되지 않는다는 발표가 있다(Michael M. Neff et al., The Plant Journal, 1998, 14(3):387-392).

이에 착안하여, 본 발명자들은 현재까지 알려진 다양한 18S 리보솜 염기서열을 GenBank와 같은 데이터베이스 검색을 통해 정렬하고 분석하여 섬모충류와 같이 큰 생물군(분류학적으로 문 단위)에서도 그 생물군만 가지고 있는 독특한 단일 염기 다형성(Single nucleotide polymorphism, 이하 "SNP"라 약칭함) 부위가 있음을 발견하였으며, 상기 dCAPS 방법을 응용하여 18S 리보솜 서열을 분석함으로써 섬모충류(phylum Ciliophora)만의 특이적인 SNP 부위 및 상기 부위에 대한 특이적 프라이머를 개발하였으며, 이를 이용할 경우 순배양없이 혼합시료에서 섬모충류만을 증폭할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 혼합시료 내에 포함된 섬모충류를 특이적으로 증폭할 수 있는 섬모충류(Ciliate) 특이적 프라이머와 이를 이용한 섬모충류 검출용 키트 및 이를 이용하여 섬모충류 종을 식별하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기 본 발명의 목적을 위하여,

서열번호 1로 기재되는 섬모충류 18S 리보솜 DNA 단편의 염기 서열내에서 선택되며 38번째 핵산을 3'-최말단으로 하고 상기 3'-최말단으로부터 두번째 염기가 G 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 섬모충류 특이적 프라이머를 제공한다.

또한, **서열번호 1**로 기재되는 점모충류 18S 리보솜 DNA 단편에 상보적인 서열내에서 선택되며 상기 상보적 염기서열의 51번째 핵산을 3'-최말단으로 하고 상기 3'-최말단으로부터 두번째 염기가 Y 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 점모충류 특이적 프라이머를 제공한다.

또한, **서열번호 1**로 기재되는 점모충류 18S 리보솜 DNA 단편의 서열내에서 선택되며 47번째 핵산을 3'-말단으로 하고 상기 3'-말단으로부터 두번째 염기가 G 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 점모충류 특이적 프라이머를 제공한다.

또한, **서열번호 1**로 기재되는 점모충류 18S 리보솜 DNA 단편에 상보적인 서열내에서 선택되며 상기 상보적 염기서열의 42번째 핵산을 3'-최말단으로 하고 상기 3'-최말단으로부터 두번째 염기가 R 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 점모충류 특이적 프라이머를 제공한다.

또한, **서열번호 6**으로 기재되는 점모충류 18S 리보솜 DNA 단편의 서열내에서 선택되며 37번째 핵산을 3'-말단으로 하고 상기 3'-말단으로부터 두번째 염기가 C 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 점모충류 특이적 프라이머를 제공한다.

또한, **서열번호 6**으로 기재되는 점모충류 18S 리보솜 DNA 단편에 상보적인 서열내에서 선택되며 상기 상보적 염기서열의 40번째 핵산을 3'-최말단으로 하고 상기 3'-최말단으로부터 두번째 염기가 T 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 점모충류 특이적 프라이머를 제공한다.

또한, **서열번호 9**로 기재되는 점모충류 18S 리보솜 DNA 단편의 서열내에서 선택되며 47번째 핵산을 3'-말단으로 하고 상기 3'-말단으로부터 두번째 염기가 A 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 점모충류 특이적 프라이머를 제공한다.

아울러, 상기 프라이머 및 진핵생물 18S 리보솜 DNA 공통 프라이머를 이용하여 혼합시료에서 점모충류를 검출하는 방법을 제공한다.

더불어, 상기 프라이머 및 진핵생물 18S 리보솜 DNA 공통 프라이머를 포함하는 점모충류 검출용 키트를 제공한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 **서열번호 1**로 기재되는 점모충류 18S 리보솜 DNA 단편의 염기 서열내에서 선택되며 38번째 핵산을 3'-최말단으로 하고 상기 3'-최말단으로부터 두번째 염기가 G 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 점모충류 특이적 프라이머를 제공한다. 이때, 상기 프라이머는 **서열번호 2**로 기재되는 것이 더욱 바람직하다.

또한, 본 발명은 **서열번호 1**로 기재되는 점모충류 18S 리보솜 DNA 단편에 상보적인 서열내에서 선택되며 상기 상보적 염기서열의 51번째 핵산을 3'-최말단으로 하고 상기 3'-최말단으로부터 두번째 염기가 Y 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 점모충류 특이적 프라이머를 제공한다. 이때, 상기 프라이머는 **서열번호 3**으로 기재되는 것이 더욱 바람직하다.

또한, 본 발명은 **서열번호 1**로 기재되는 점모충류 18S 리보솜 DNA 단편의 서열내에서 선택되며 47번째 핵산을 3'-말단으로 하고 상기 3'-말단으로부터 두번째 염기가 G 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 점모충류 특이적 프라이머를 제공한다. 이때, 상기 프라이머는 **서열번호 4**로 기재되는 것이 더욱 바람직하다.

또한, 본 발명은 **서열번호 1**로 기재되는 점모충류 18S 리보솜 DNA 단편에 상보적인 서열내에서 선택되며 상기 상보적 염기서열의 42번째 핵산을 3'-최말단으로 하고 상기 3'-최말단으로부터 두번째 염기가 R 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 점모충류 특이적 프라이머를 제공한다. 이때, 상기 프라이머는 **서열번호 5**로 기재되는 것이 더욱 바람직하다.

또한, 본 발명은 **서열번호 6**으로 기재되는 점모충류 18S 리보솜 DNA 단편의 서열내에서 선택되며 37번째 핵산을 3'-말단으로 하고 상기 3'-말단으로부터 두번째 염기가 C 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 점모충류 특이적 프라이머를 제공한다. 이때, 상기 프라이머는 **서열번호 7**로 기재되는 것이 더욱 바람직하다.

또한, 본 발명은 **서열번호 6**으로 기재되는 섬모충류 18S 리보솜 DNA 단편에 상보적인 서열내에서 선택되며 상기 상보적 염기서열의 40번째 핵산을 3'-최말단으로 하고 상기 3'-최말단으로부터 두번째 염기가 T 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 섬모충류 특이적 프라이머를 제공한다. 이때, 상기 프라이머는 **서열번호 8**로 기재되는 것이 더욱 바람직하다.

또한, 본 발명은 **서열번호 9**로 기재되는 섬모충류 18S 리보솜 DNA 단편의 서열내에서 선택되며 47번째 핵산을 3'-말단으로 하고 상기 3'-말단으로부터 두번째 염기가 A 이외의 염기로 치환된 10 내지 60개 길이를 갖는 섬모충류 특이적 프라이머를 제공한다. 이때, 상기 프라이머는 **서열번호 10**으로 기재되는 것이 더욱 바람직하다.

본 발명자들은 섬모충류만을 대변할 수 있는 단일 염기 다형성(SNP) 부위가 18S 리보솜 DNA 염기서열에 존재함을 발견하였다. 특히 도 1 내지 도 4에 나타난 SNP 부위는 섬모충류 특이적 SNP가 존재하는 부위를 나타내며, 본 발명에서는 이를 바탕으로 섬모충류 특이 프라이머를 제작하였다(표 1 참조). 섬모충류에 속하는 *Tetrahymena canadensis* 중 외에 다른 과에 속하는 섬모충류 9종, 외편모류 5종, 규조류 11종 및 다른 문에 속하는 비섬모충류 23종 등이 SNP 부위 발굴에 이용되었다. 이하 염기서열의 위치를 표시하기 위한 번호는 *Tetrahymena canadensis* 서열번호를 기준으로 하였다.

PCR 프라이머의 3'-말단 부위의 두 염기가 DNA 주형에 상보적이지 않을 경우 PCR이 되지 않는다는 dCAPS(derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 방법에 착안하여 본 발명자들은 18S 리보솜 DNA의 보존 부위에 존재하는 상기 SNP 서열을 이용, 이 부위에 대한 프라이머를 제작하였다(Michael M. Neff et al., The Plant Journal, 1998, 14(3):387-392). 특이적 프라이머는 3'-최말단 염기는 섬모충류 특이적 SNP 염기 서열을 따랐고, 3'-최말단에서 2번째 염기는 어떤 진핵생물에도 없는 염기서열을 따랐으며, 여기에 연결되는 10-60개의 염기는 모든 진핵생물에 공통적으로 존재하는 염기서열을 따랐으며 필요에 따라서는 축퇴염기서열을 사용할 수 있다.

섬모충류인 *Tetrahymena canadensis*의 18S 리보솜 DNA 서열을 기준으로 321번 위치에 존재하는 SNP 서열을 이용하여, 상기 321번째 염기(염기 T)를 3'-최말단으로 하는 두 종류의 섬모충류 특이 프라이머(정방향 및 역방향 프라이머)를 고안하였다. 역방향 프라이머는 PCR 프라이머의 특성상 주형 염기서열에 상보적인 서열을 갖는다. 정방향 프라이머(**서열번호 2**로 기재되는 Cili+ 321F: 표 1 참조)는 상기 3'-최말단에 바로 이어지는 두번째 염기가 *Tetrahymena canadensis*의 320번째 염기서열에 대응하는 염기로, 모든 진핵생물에서는 불일치하는 염기(염기 C)를 사용하였으며 세 번째 염기부터는 모든 진핵생물에 일치하는 염기를 사용하였는데 그 길이는 10 내지 60개를 가질 수 있다. 역방향 프라이머(**서열번호 3**으로 기재되는 Cili-321R: 표 1 참조)는 3'-최말단(염기 A)에 바로 이어지는 두번째 염기는 *Tetrahymena canadensis*의 322번째 염기서열에 대응하는 염기로 모든 진핵생물에서는 불일치하는 염기(염기 G)를 사용하였으며 세 번째 염기부터는 모든 진핵생물에 일치하는 염기를 사용하였는데 그 길이는 10 내지 60개를 가질 수 있다(도 1 참조).

섬모충류인 *Tetrahymena canadensis*의 18S 리보솜 DNA 서열을 기준으로 329번 위치에 존재하는 SNP 서열을 이용하여, 상기 329번째 염기(염기 T)를 3'-최말단으로 하는 두 종류의 프라이머(정방향 및 역방향 프라이머)를 고안하였다. 역방향 프라이머는 PCR 프라이머의 특성상 주형 염기서열에 상보적인 서열을 갖는다. 정방향 프라이머(**서열번호 4**로 기재되는 Cili+ 329F: 표 1 참조)는 상기 3'-최말단에 바로 이어지는 두번째 염기는 *Tetrahymena canadensis*의 328번째 염기서열에 대응하는 염기로 모든 진핵생물에서는 불일치하는 염기(염기 C)를 사용하였으며, 세 번째 염기부터는 모든 진핵생물에 일치하는 염기를 사용하였는데 그 길이는 10 내지 60개를 가질 수 있다. 역방향 프라이머(**서열번호 5**로 기재되는 Cili-329R: 표 1 참조)는 3'-최말단(염기 A)에 바로 이어지는 두번째 염기는 *Tetrahymena canadensis*의 330번째 염기서열에 대응하는 염기로 모든 진핵생물에서는 불일치하는 염기(염기 G)를 사용하였으며 세 번째 염기부터는 모든 진핵생물에 일치하는 염기를 사용하였는데 그 길이는 10 내지 60개를 가질 수 있다(도 2 참조).

섬모충류인 *Tetrahymena canadensis*의 18S 리보솜 DNA 서열을 기준으로 968번 위치에 존재하는 SNP 서열을 이용하여, 상기 968번째 염기(염기 T)를 3'-최말단으로 하는 두 종류의 프라이머(정방향 및 역방향 프라이머)를 고안하였다. 역방향 프라이머는 PCR 프라이머의 특성상 주형 염기서열에 상보적인 서열을 갖는다. 정방향 프라이머(**서열번호 7**로 기재되는 Cili+ 968F: 표 1 참조)는 상기 3'-최말단에 바로 이어지는 두번째 염기는 *Tetrahymena canadensis*의 967번째 염기서열에 대응하는 염기로 모든 진핵생물에서는 불일치하는 염기(염기 G)를 사용하였으며 세 번째 염기부터는 모든 진핵생물에 일치하는 염기를 사용하였는데 그 길이는 10 내지 60개를 갖는다. 역방향 프라이머(**서열번호 8**로 기재되는 Cili-968R: 표 1 참조)는 상기 3'-최말단(염기 A)에 바로 이어지는 두번째 염기는 *Tetrahymena canadensis*의 969번째 염기서열에 대응하는 염기로 모든 진핵생물에서는 불일치하는 염기(염기 G)를 사용하였으며 세 번째 염기부터는 모든 진핵생물에 일치하는 염기를 사용하였는데 그 길이는 10 내지 60개를 가질 수 있다(도 3 참조).

섬모충류인 *Tetrahymena canadensis*의 18S 리보솜 DNA 서열을 기준으로 1643번 위치에 존재하는 SNP 서열을 이용하여, 상기 1643번째 염기(염기 C)를 3'-최말단으로 하는 정방향 프라이머를 고안하였다. 정방향 프라이머는 **서열번호 10**으로 기재되는 Cili+ 1643F로 상기 서열을 3'-최말단에 바로 이어지는 두번째 염기는 *Tetrahymena canadensis*의 1642번째 염기서열에 대응하는 염기로 모든 진핵생물에서는 불일치하는 염기(염기 C)를 사용하였으며 세 번째 염기부터는 모든 진핵생물에 일치하는 염기를 사용하였는데 그 길이는 10 내지 60개를 가질 수 있다(도 4 참조).

서열번호 11, 서열번호 12 및 서열번호 13으로 기재되는 프라이머는 모든 진핵생물에 있어서 18S 리보솜 DNA 서열상 변이성인 없거나 매우 낮은 보존적인 염기서열을 갖는 부위를 기반으로 제작하였으며 통칭하여 공통 프라이머(universal primer)라 칭하였다. 공통 프라이머 부위는 본 발명에 제시된 부위에 한정되지 않으며 필요에 따라 18S 리보솜 DNA 서열상 변이성인 없거나 매우 낮은 보존적인 염기서열을 갖는 부위를 기반으로 추가적으로 만들어 사용할 수 있다.

공통 프라이머는 섬모충류 특이 프라이머(**서열번호 2** 내지 **서열번호 5, 서열번호 7, 서열번호 8 및 서열번호 10**으로 기재되는 프라이머)와 쌍을 이루어 PCR 증폭에 이용될 수 있다. 또한, 상기 공통 프라이머 쌍을 이루어 PCR 증폭에 이용될 수 있는데 이 경우에는 대조군으로서 섬모충류 특이적 프라이머를 검증하는데 이용될 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 프라이머를 이용하여 혼합시료에서 섬모충류를 검출하는 방법을 제공한다. 상기 검출 방법은

- i) 원생생물이 함유된 혼합시료로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;
- ii) 상기 단계 i)의 게놈 DNA를 상기 프라이머 및 진핵생물 18S 리보솜 DNA의 공통 프라이머를 이용하여 증폭시키는 단계; 및
- iii) 상기 단계 ii)에 의하여 증폭된 밴드가 나타나면 섬모충류가 상기 혼합시료내에 존재하는 것으로 판정하고 밴드가 나타나지 않으면 상기 혼합시료내에 존재하지 않는 것으로 판정하는 단계를 포함한다.

또한, 본 발명은 상기 섬모충류 특이적 프라이머 및 진핵생물 18S 리보솜 DNA 공통 프라이머를 포함하는 섬모충류 검출용 키트(kit)를 제공한다.

상기 키트는 전사, 증폭 및 생성물 검출용 시약과 이에 대한 지시 사항을 부가적으로 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 키트는 전사효소, 데옥시뉴클레오타이드, DNA 증폭 반응에 적합한 열안정성 폴리머라제 및 핵산의 표지화 및 검출용 시약을 포함할 수 있다.

본 발명으로 고안된 상기 프라이머들의 섬모충류에 대한 특이성을 확인하기 위한 예로서 Cili-968R(**서열번호 7**)과 공통 프라이머 18S+ 30(**서열번호 13**), Cili-2000(**서열번호 12**)을 사용하여 12종(섬모충류 4종, 와편모충류 4종, 규조류 2종, 후생동물 2종)의 18S DNA 리보솜 클론을 이용하여 DNA를 증폭하였다. 그 결과, 진핵생물 공통 프라이머인 18S+ 30과 Cili-2000에 의하여 1.1kb 정도의 밴드가 형성되었고, 섬모충류 특이 마커 Cili-968R과 공통마커 18S+ 30에 의하여 510bp 정도의 밴드가 섬모충류에서만 형성됨을 확인함으로써 본 발명의 프라이머가 섬모충류 특이성을 가지는 것을 입증하였다(도 5의 A 참조).

본 발명의 프라이머가 혼합시료에서도 유용함을 확인하기 위해, 네트 및 수생 미생물 채집 장치로 채집한 시료에서 추출한 DNA를 특이적 프라이머를 이용하여 18S 리보솜 DNA를 증폭하였다. 그 예로 **서열번호 8**로 기재된 섬모충류 특이적 프라이머 Cili-968R과 **서열번호 13**으로 기재되는 18S+ 30 프라이머를 이용하여 얻은 PCR 산물을 클로닝하여 획득한 118개 클론의 염기서열을 GenBank 데이터와 비교하여 표 3과 같이 유사도가 가장 높은 종을 확인하였다(도 5의 B 참조). 또한, 상기와 같은 방법으로 네트를 이용하여 채집한 현장시료의 DNA에서 207개 18S 리보솜 DNA 염기서열을 얻어 GenBank 데이터를 비교하여 표 2와 같이 유사도가 가장 높은 종을 확인하였다.

본 발명의 18S 리보솜 DNA 서열에 존재하는 SNP 부위와 이를 이용하여 제작한 프라이머들은 현장시료 내의 섬모충류 종 동정과 종구성을 확인하는 DNA 마커로 활용될 수 있어 섬모충류의 종 다양성과 지표종의 출현빈도 확인 등 환경 모니터링의 정확성을 크게 향상시킬 수 있으며, 또한 선박의 벨레스트 워트가 어디서 기원되었는지 등 생물의 기원을 쉽고 빠르게 분석하는데 이용될 수 있을 것으로 예상되며, 환경모니터링에 중요한 다른 생물군과 질병감염 여부 확인 등에도 본 발명은 응용될 수 있을 것이다. 더불어, 본 발명에서 제시한 프라이머는 DNA 키트(kit) 등으로 상품화가 가능하고, 또한 이 기술을 통해 개발된 섬모충류 특이 DNA 마커(marker)는 DNA 칩 등으로 생산되어 판매될 수 있다.

이하 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 섬모충류 18S 리보솜 DNA 클론 제작 및 염기서열 확인

섬모충류 특이 SNP 부위와 섬모충류 특이적 프라이머의 특이성을 확인하기 위하여, 본 발명자들은 단배양된 섬모충류(*Euplotes vannus*, *Euplotes raikovi*, *Uronema* sp., *Strombidium sulchatum*), 와편모충류(*Cochlodinium polykrikoides*, *Isoecrysis galbana*, *Scrippsiella trochoidea*, *Alexandrium* sp.), 규조류(*Skeletonema costatum*, *Navicular* sp.)와 후생동물 요각류(*Eucyclops ohkati*), 후생동물 곤충류(*Anopheles sinensis*)의 DNA를 DNAeasy tissue kit(Promega)를 이용하여 추출하였다.

각 시료의 18S 리보솜 DNA 전체를 포함하는 클론을 제조하기 위하여 진핵생물 18S 리보솜 DNA 공통 프라이머인 **서열번호 14**(EukA)와 **서열번호 15**(EukB)로 기재되는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다(Beatriz Diez et al., Applied and environmental microbiology, 2001, 2932-2941).

PCR은 각 생물의 genomic DNA 50ng, 각각 0.2mM dNTP, 1.5mM MgCl₂, 1X PCR buffer(Promega), 프라이머 각각 20pmol, 5 Unit Taq 효소를 첨가하여 최종 부피 30 μ l로 PCR조성을 맞추고 후 ABI 2700 PCR 기계(Applied biosystems, INC., USA)를 이용하였다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C 2분간 반응시킨 후, 95 $^{\circ}$ C 15초, 55 $^{\circ}$ C 1분, 72 $^{\circ}$ C 3분 단계를 35회 반복 수행한 후 최종적으로 72 $^{\circ}$ C 5분간 반응시켜 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

상기 프라이머를 사용할 경우 약 2,000bp 염기 길이의 PCR 단편이 생긴다. 이를 PCR 클로닝 벡터(pGEM-T vector, Promega, USA)에 제조사의 지침대로 클로닝하였다. 클로닝 후, 클로닝 성공 여부가 확인된 클론을 대상으로 염기서열을 결정하였다. 상기 확인된 염기서열의 섬모충류 특이적 단일 염기형성부위를 확인하였으며, 이 클론들을 이용하여 섬모충류 특이적 프라이머의 특이성을 확인하였다(**도 5의 A** 참조).

GenBank 데이터베이스에 대한 Blast 검색을 수행하여 종을 탐색하였고, 상기에서 분석한 클론 중 섬모충류 특이 염기서열의 비율을 **표 2**에서 나타내었다.

또한, 상기에서 결정된 18S 리보솜 DNA 염기서열을 GenBank와 같은 데이터베이스 검색을 통해 정렬하고 분석하여 섬모충류와 같이 큰 생물군(분류학적으로 문 단위)에서도 그 생물군만 가지고 있는 독특한 단일 염기 다형성(SNP) 부위를 **도 1** 내지 **도 4**에 도시하였다.

<실시예 2> 섬모충류의 SNP를 이용한 특이적 프라이머 제작

본 발명에서는 **실시예 1**의 SNP를 근거로 하여 섬모충류 특이 프라이머를 제작하였다. 특이 프라이머는 3'-최말단의 첫 번째 염기는 섬모충류 특이 SNP 염기를 따랐고(섬모충류만 상보적) 2번째 염기는 어떤 생물에도 없는 염기서열을 따랐다.

섬모충류와 같이 매우 큰 생물군(생물분류체계에서 문에 해당하는 분류군)에도 그 생물군만 대변할 수 있는 SNP가 존재한다는 것을 발견하였으며 이 중 **도 1~4**에 나타낸 부위의 SNP는 18S 리보솜 DNA의 보존 부위에 존재하고 있어 프라이머 제작에 적합한 부위로 판명되어 이 부위에 대한 프라이머를 제작하였다.

PCR 프라이머의 3'-말단 부위의 두 염기가 DNA 주형에 상보적이지 않을 경우 PCR이 되지 않는 dCAPS 방법에 의하여 섬모충류 특이 프라이머를 제작하였다(Michael M. Neff et al., The Plant Journal, 1998, 14(3):387-392).

상기 방법을 통해 디자인된 프라이머들은 하기에 **<표 1>**로 도시하였다.

<표 1> 섬모충류 특이 프라이머

No	프라이머명	프라이머 서열	방향	비고
----	-------	---------	----	----

1	Cili+321F	RCCCTATCARCTYTCGAWGGTACT (서열번호 2)	F	섬모총류 특이 프라이머
2	Cili-321R	ANNGCCATGGTAGKCCAATAGA (서열번호 3)	R	
3	Cili+329F	TYTCGAWGGTAGTGTATTGCA (서열번호 4)	F	
4	Cili-329R	CTYACCCGTNANNGCCATGGTACT (서열번호 5)	R	
5	Cili+968F	ATCAAGAACGAAAGTTAGGGGATGA (서열번호 7)	F	
6	Cili-968R	GACTASGACGGTATCTGATCGTCTGT (서열번호 8)	R	
7	Cili+1643F	CGARTGRTCYGGTGACC (서열번호 10)	F	
8	18S+30	GTCTYAAAGATTAAGCCATGCATG (서열번호 13)	F	공통 프라이머
9	Cili-2000	CGACGGGCGGTGTGTACAAAGGGCAGGG (서열번호 12)	R	
10	Cili+630	GCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTC (서열번호 11)	F	
11	EukA	AAYCTGGTTGATYYTGCCAG (서열번호 14)	F	전체 프라이머
12	EukB	TGATCCTTCYGCAGGTTTC (서열번호 15)	R	

(1) F: 정방향 R: 역방향

(2) 축퇴염기서열(혼합염기서열)

K : 염기 G 또는 T; M : 염기 A 또는 C;

N : 염기 A, T, C 또는 G; R : 염기 A 또는 G;

S : 염기 G 또는 C; W : 염기 A 또는 T;

Y : 염기 C 또는 T

<2-1> 프라이머 Cili+ 321F 및 Cili-321R 제작

*Tetrahymena canadensis*의 18S 리보솜 DNA의 염기서열을 기준으로 297-321번에서 **서열번호 2**로 기재되는 Cili+ 321F 프라이머와 321-341번에서 **서열번호 3**으로 기재되는 Cili-321R 프라이머를 고안(SNP 위치는 321번)하였다. 다른 과에 포함되어 있는 섬모총류 9종, 와편모류 5종, 규조류 12종과 다른 문에 포함되는 비섬모총류 23종을 포함하여 프라이머를 고안하였다(도 1 참조).

섬모총류 서열 5'-RCC CTA TCA RCT YTC GAW GGT AGT-3'

타생물통합서열 5'-RCC CTA TCA RCT YTC GAW GGT AGG-3'

프라이머 Cili+ 321F의 서열 5'-RCC CTA TCA RCT YTC GAW GGT ACT-3'

R은 염기 A 또는 G, Y는 염기 C 또는 T, W은 염기 A 또는 T를 칭함.

3-말단에서 두 번째 서열인 C의 경우에는 어떤 생물에서도 적합성이 없는 서열을 나타낸다(도 1의 순방향 서열).

섬모총류 서열 5'-ANN GCC ATG GTA GKC CAA TAY A-3'

타생물통합서열 5'-ANN GCC ATG GTA GKC CAA TAY C-3'

프라이머 Cili-321R의 서열 5'-ANN GCC ATG GTA GKC CAA TAG A-3'

N는 염기 A, G, C 또는 T, K는 염기 G 또는 T, Y는 염기 C 또는 T를 칭함.

3-말단에서 두 번째 서열인 G의 경우에는 어떤 생물에서도 적합성이 없는 서열을 나타낸다(도 1의 역방향(anti-strand) 서열).

<2-2> 프라이머 Cili+ 329F 및 Cili-329R 제작

*Tetrahymena canadensis*의 18S 리보솜 DNA의 염기서열을 기준으로 309-329번에서 **서열번호 4**로 기재되는 Cili+ 329F 프라이머와 329-352번에서 **서열번호 5**로 기재되는 Cili-329R 프라이머를 고안(SNP위치는 329번)하였다. 다른 과에 속하는 섬모충류 9종, 와편모류 5종, 규조류 11종과 다른 문에 속하는 비섬모충류 23종을 포함하여 프라이머를 고안하였다(도 2 참조).

섬모충류 서열 5'-TYT CGA WGG TAG TGT ATT GGA-3'

타생물통합서열 5'-TYT CGA WGG TAG TGT ATT GGC-3'

프라이머 Cili+ 329F의 서열 5'-TYT CGA WGG TAG TGT ATT GCA-3'

Y는 염기 C 또는 T, W은 염기 A 또는 T를 칭함.

3-말단에서 두 번째 서열인 C의 경우에는 어떤 생물에서도 적합성이 없는 서열을 나타낸다(도 2의 순방향 서열).

섬모충류 서열 5'-CTY ACC CGT NAN NGC CAT GGT ART-3'

타생물통합서열 5'-CTY ACC CGT NAN NGC CAT GGT ARG-3'

프라이머 Cili-329R의 서열 5'-CTY ACC CGT NAN NGC CAT GGT ACT-3'

Y는 염기 C 또는 T, N은 염기 A, G, C 또는 T, R은 염기 A 또는 G를 칭함.

3-말단에서 두 번째 서열인 C의 경우에는 어떤 생물에서도 적합성이 없는 서열을 나타낸다(도 2의 역방향 서열).

<2-3> 프라이머 Cili+ 968F 및 Cili-968R 제작

*Tetrahymena canadensis*의 18S 리보솜 DNA의 염기서열을 기준으로 944-968번에서 **서열번호 7**로 기재되는 Cili+ 968F 프라이머와 968-993번에서 **서열번호 8**로 기재되는 Cili-968R 프라이머를 고안(SNP위치는 968번)하였다. 다른 과에 속하는 섬모충류 9종, 와편모류 5종, 규조류 13종과 다른 문에 속하는 비섬모충류 27종을 포함하여 프라이머를 고안하였다(도 3 참조).

섬모충류 서열 5'-A TCA AGA ACG AAA GTT AGG GGA TCA-3'

타생물통합서열 5'-A TCA AGA ACG AAA GTT AGG GGA TCG-3'

프라이머 Cili+ 968F의 서열 5'-A TCA AGA ACG AAA GTT AGG GGA TGA-3'

3-말단에서 두 번째 서열인 G의 경우에는 어떤 생물에서도 적합성이 없는 서열을 나타낸다(도 3의 순방향 서열).

섬모충류 서열 5'-GAC TAS GAC GGT ATC TGA TCG TCT TK-3'

타생물통합서열 5'-GAC TAS GAC GGT ATC TGA TCG TCT TC-3'

프라이머 Cili-968R의 서열 5'-GAC TAS GAC GGT ATC TGA TCG TCT GK-3'

S는 염기 G 또는 C, K는 염기 G 또는 T를 칭함.

3-말단에서 두 번째 서열인 G의 경우에는 어떤 생물에서도 적합성이 없는 서열을 나타낸다(도 3의 역방향 서열).

<2-4> 프라이머 Cili+ 1643F 제작

*Tetrahymena canadensis*의 18S 리보솜 DNA의 염기서열을 기준으로 1627-1643번에서 **서열번호 10**으로 기재되는 Cili+ 1643F 프라이머를 고안(SNP위치는 1643번)하였다. 다른 과에 속하는 섬모충류 9종, 외편모류 4종, 규조류 13종과 다른 문에 속하는 비섬모충류 28종을 포함하여 프라이머를 고안하였다(도 4 참조).

섬모충류 서열 5'-CGA RTG RTC YGG TGA AC-3'

타생물통합서열 5'-CGA RTG RTC YGG TGA AS-3'

프라이머 Cili+ 1643F의 서열 5'-CGA RTG RTC YGG TGA CC-3'

R은 염기 A 또는 G, Y는 염기 C 또는 T, S는 염기 A 또는 T 또는 G를 칭함.

3-말단 두 번째 서열인 C의 경우에는 어떤 생물에서도 적합성이 없는 서열을 나타낸다(도 4의 순방향 서열).

<2-5> 공통 프라이머 제작

*Tetrahymena canadensis*의 18S 리보솜 DNA의 염기서열을 기준으로 33-52번에서 **서열번호 13**으로 기재되는 18S+ 30, 605-630번에서 **서열번호 11**로 기재되는 Cili+ 630, 2000-2027번에서 **서열번호 12**로 기재되는 Cili-2000 프라이머를 제작하였다. 상기 프라이머는 섬모충류 특이적 프라이머 서열의 대조군으로 사용하였다.

<실시예 3> 섬모충류 특이 프라이머를 이용한 특이성 확인.

본 발명에 의해 고안된 프라이머의 3'-최말단 서열은 섬모충류의 경우에는 3'-최말단에서 두 번째 염기서열만 주형에 상보적이지 않지만(1개의 염기서열) 다른 생물의 경우에는 3'-최말단으로부터 2개의 염기서열이 달라 섬모충류는 증폭이 가능하지만 다른 생물은 증폭되지 않음을 확인하였다(도 5 참조).

<3-1> 클론을 이용한 프라이머의 섬모충류 특이성 확인

섬모충류 특이성을 확인하고자 **실시예 1**의 방법을 이용하여 PCR을 수행하였다. 섬모충류(Euplotes vannus, Euplotes raikovi, Uronema sp., Strombidium sulchatum), 외편모충류(Cochlodinium polykrikoides, Iosocrysis galbana, Scrippsiella trochoidea, Alexandrium sp.), 규조류(Skeletonema costatum, Navicular sp.), 후생동물(요각류, 곤충류)을 통상적인 방법으로 게놈 DNA를 추출하여 18S 리보솜 DNA 클론을 제작한 후 프라이머를 확인해 본 결과 섬모충류의 경우에는 PCR 산물을 얻을 수 있었으나 다른 생물에서는 PCR 산물을 얻을 수 없어 섬모충류 특이성을 확인할 수 있었다.

본 발명으로 고안된 섬모충류 특이 프라이머 중 한 예로서 Cili-968R과 공통 프라이머 Cili+ 630, Cili-2000을 사용하여 12종(섬모충류 4종, 외편모충류 4종, 규조류 2종, 후생동물 2종)의 18S 클론을 증폭시킨 결과 **도 5의 A**에 나타난 바와 같이 1.1kb의 밴드는 Cili+ 630, Cili-2000으로 증폭된 부위, 510bp의 밴드는 Cili-968R과 공통 프라이머 Cili+ 630에 의해 증폭된 섬모충류 특이적 밴드로서, 본 발명의 섬모충류 특이적 프라이머인 Cili-968R의 섬모충류 특이성을 확인할 수 있었다.

<3-2> 현장시료를 이용한 프라이머의 섬모충류 특이성 확인

18S+ 30(**서열번호 13**)과 Cili-968R(**서열번호 8**)의 프라이머를 사용하여 섬모충류 특이마커인 Cili-968R의 특이성을 확인하였다.

<3-2-1> 네트를 이용하여 채집한 현장시료

인천 관공선 부두에서 네트를 이용하여 채집한 시료에서 통상의 방법으로 게놈 DNA를 추출하여 클론을 제작한 후 전체 218개 클론을 확인해 본 결과 이 중 진핵생물로 나온 207개 중 206개가 섬모충류로 확인되어 99%가 정확히 섬모충류 18S 리보솜 염기서열임이 확인되었다.

상기 207개 18S DNA 염기서열의 일부와 Genbank에서 얻은 섬모충류 염기서열 9개, 와편모류 1개, 균류 1개, 후생동물 1개, 규조류 1개의 18S 염기서열을 분석한 결과, 네트를 이용한 현장시료 18S DNA 염기서열과 Genbank 데이터 간에 유사도가 가장 높은 종을 확인하여 하기의 표 2로 도시하였다.

<표 2> 네트 채집법을 이용한 염기서열과 Genbank 데이터 비교

No.	종(Species)	클론번호	비 고
1	<i>Tintinnidium mucicola</i>	K85-104 외 136	섬모충류 (94.5%)
2	<i>Strombidinopsis sp.</i>	K85-115 외 46	
3	<i>Strobilidium caudatum</i>	K85-2 외 10	
4	<i>Metacyclis angulata</i>	K85-108 외 12	
5	<i>Tintinnopsis tubulosoides</i>	K85-15 외 2	
6	<i>Bursaria truncatella</i>	K85-40	
7	<i>Strombidium inclinatum</i>	K85-156	
8	<i>Codonellopsis americana</i>	K85-25	
9	<i>Tintinnopsis fimbriata</i>	K85-113	
10	<i>Chlamyaster sternalis</i>	K96-B15	비섬모충류
11	잘못 증폭 된 염기서열	K96-E2 외 11	

<3-2-2> 수생 미생물 채집장치를 이용하여 채집한 현장시료

인천 관공선 부두에서 수생 미생물 채집장치를 이용하여 채집한 현장시료에서 통상의 방법으로 게놈 DNA를 추출하여 클론을 제작한 후, 전체 118개 클론을 확인하였고, 상기 118개 18S DNA 염기서열의 일부와 Genbank에서 얻은 섬모충류 염기서열 9개, 와편모류 1개, 균류 1개, 후생동물 1개, 규조류 1개의 18S 염기서열을 분석한 결과, 수생 미생물 채집장치를 이용한 현장시료 18S DNA 염기서열과 Genbank 데이터 간에 유사도가 가장 높은 종을 확인하여 하기의 표 3으로 도시하였다.

<표 3> 수생 미생물 채집장치를 이용한 염기서열과 Genbank 데이터 비교

No.	종(Species)	클론 번호	비 고
1	<i>Hemiphrys procera</i>	C1-15 외 1	섬모충류 (100%)
2	<i>Euplotes rariseta</i>	A2-22 외 2	
3	<i>Cyclidium porcatum</i>	C2-56 외 4	
4	<i>Parauronema longum</i>	B1-13 외 2	
5	<i>Hypotrichida sp.</i>	C2-41 외 1	
6	<i>Diophrys appendiculata</i>	C1-29 외 3	
7	<i>Halteria grandinella</i>	C2-54 외 14	
8	<i>Tintinnidium mucicola</i>	C1-25 외 20	
9	<i>Oxytricha granulifera</i>	C2-46	
10	<i>Engelmanniella mobilis</i>	C1-11 외 40	
11	<i>Oxytricha saltans</i>	C1-27 외 18	
12	<i>Urostyla grandis</i>	C2-35 외 1	

발명의 효과

본 발명에 의해 개발된 프라이머를 이용하면 순배양 과정이 필요없이 다양한 생물이 섞여 있는 혼합시료에서 쉽고 정확하게 섬모충류만을 특이적으로 검출할 수 있어 혼합시료 내 섬모충류 군집을 손쉽게 밝혀낼 수 있으며, 또한 본 발명의 SNP를 활용하여 다양한 섬모충류 특이적 마커를 개발할 수 있다. 따라서, 상기 SNP 서열을 바탕으로 섬모충류 특이적 DNA 마커 개발, 상기 프라이머를 이용한 쉽고 정확한 섬모충류 검출 키트 및 검출 방법을 제공하는 본 발명은 환경 모니터링, 생물 계통연구, 질병 감염 확인 등 다양한 분야에서 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1~4는 섬모충류 한 종인 *Tetrahymena canadensis*(GenBank 번호: M98022) 종의 서열에 의거하여 18S 리보솜 DNA 염기서열에 포함되어 있는 섬모충류 특이적 단일 염기 다형성(SNP) 부위를 나타내는 것으로서,

도 1은 18S 리보솜 DNA 염기서열에서 *Tetrahymena canadensis* 종의 321 번째에 해당되는 염기가 T인 섬모충류 특이 SNP 부위를 나타내는 것이고,

도 2는 18S 리보솜 DNA 염기서열에서 *Tetrahymena canadensis* 종의 329 번째에 해당되는 염기가 A인 섬모충류 특이 SNP 부위를 나타내는 것이고,

도 3은 18S 리보솜 DNA 염기서열에서 *Tetrahymena canadensis* 종의 968 번째에 해당되는 염기가 A인 섬모충류 특이 SNP 부위를 나타내는 것이고,

도 4는 18S 리보솜 DNA 염기서열에서 *Tetrahymena canadensis* 종의 1643 번째에 해당되는 염기가 C인 섬모충류 특이 SNP 부위를 나타내는 것이고,

도 5는 섬모충류 특이 마커의 특이성을 확인하는 것으로서, 도 5의 A는 클론을 이용한 섬모충류 특이 마커의 특이성 확인 하는 것이고,

1 줄 : 1kb 마커;

2 줄 : 섬모충류 *Euplotes vannus*;

3 줄 : 섬모충류 *Euplotes raikovi*;

4 줄 : 섬모충류 *Uronema* sp.;

5 줄 : 섬모충류 *Strombidium sulchatum*;

6 줄 : 와편모충류 *Cochlodinium polykrikoides*;

7 줄 : 와편모충류 *Isoecrysis galbana*;

8 줄 : 와편모충류 *Scrippsiella trochoidea*;

9 줄 : 와편모충류 *Alexandrium* sp.;

10 줄 : 규조류 *Skeletonema costatum*;

11 줄 : 규조류 *Navicular* sp.;

12 줄 : 후생동물 요각류 *Eucyclops ohtakai*;

13 줄 : 후생동물 곤충류인 중국얼룩날개모기 *Anopheles sinensis*,

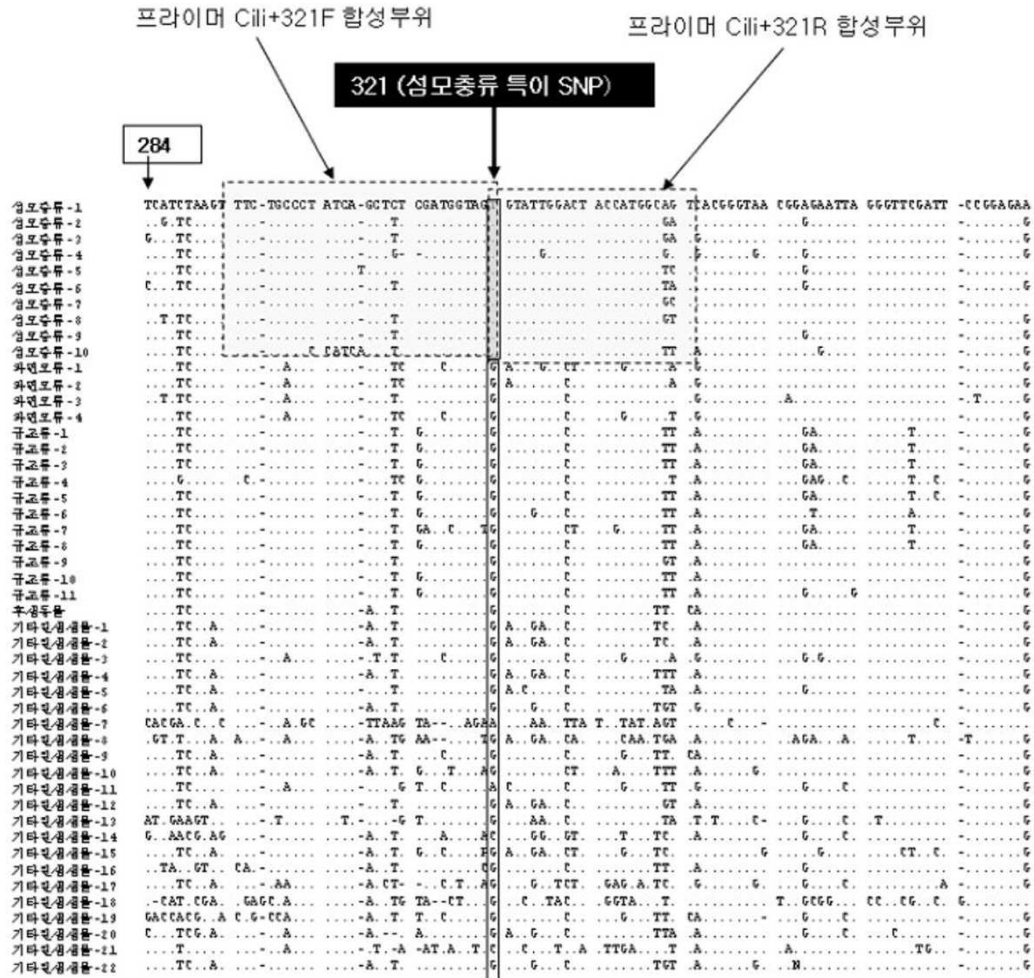
도 5의 B는 18S+ 30(공통 마커)과 Cili-968R(섬모충류 특이 마커)을 이용한 현장시료 증폭 사진이다.

1 줄 : 1kb 마커;

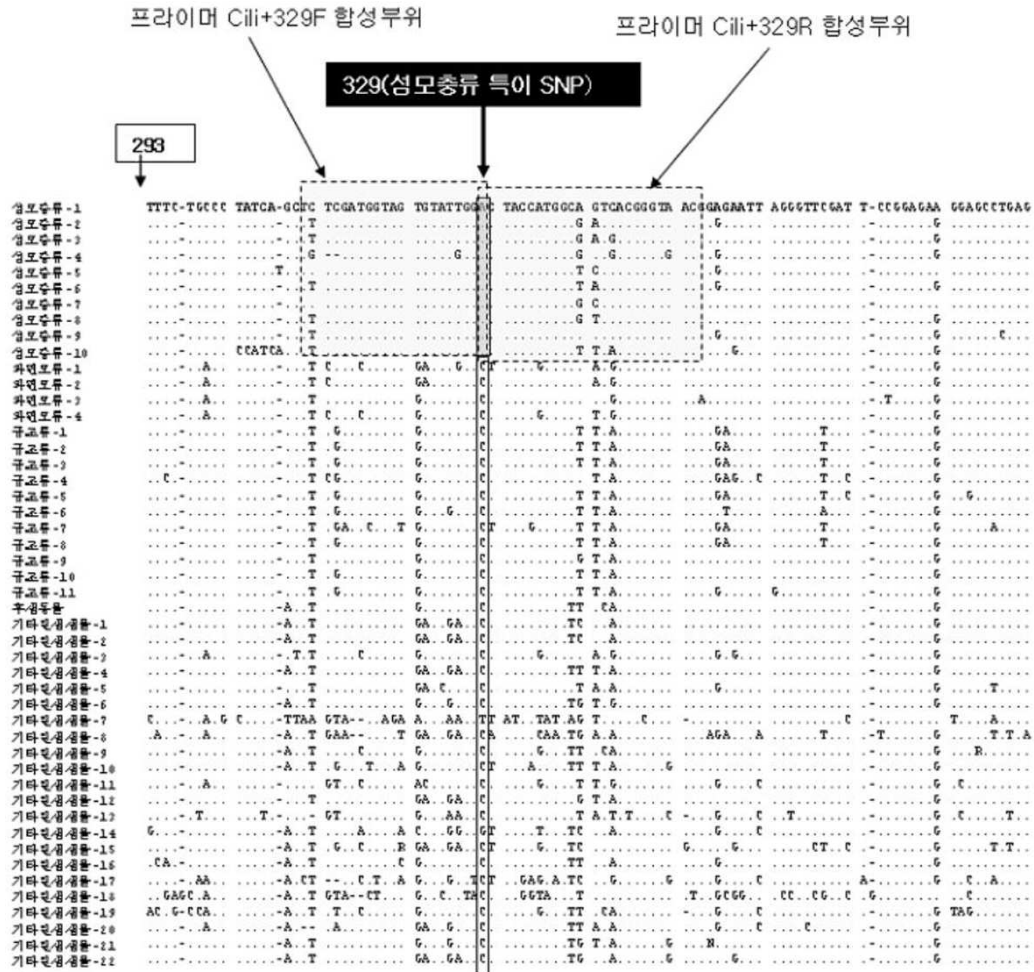
2~3 줄 : 2003년 9월 1일~8일 인천관공선부두에서 수생 미생물 채집 장치로 채집한 시료.

도면

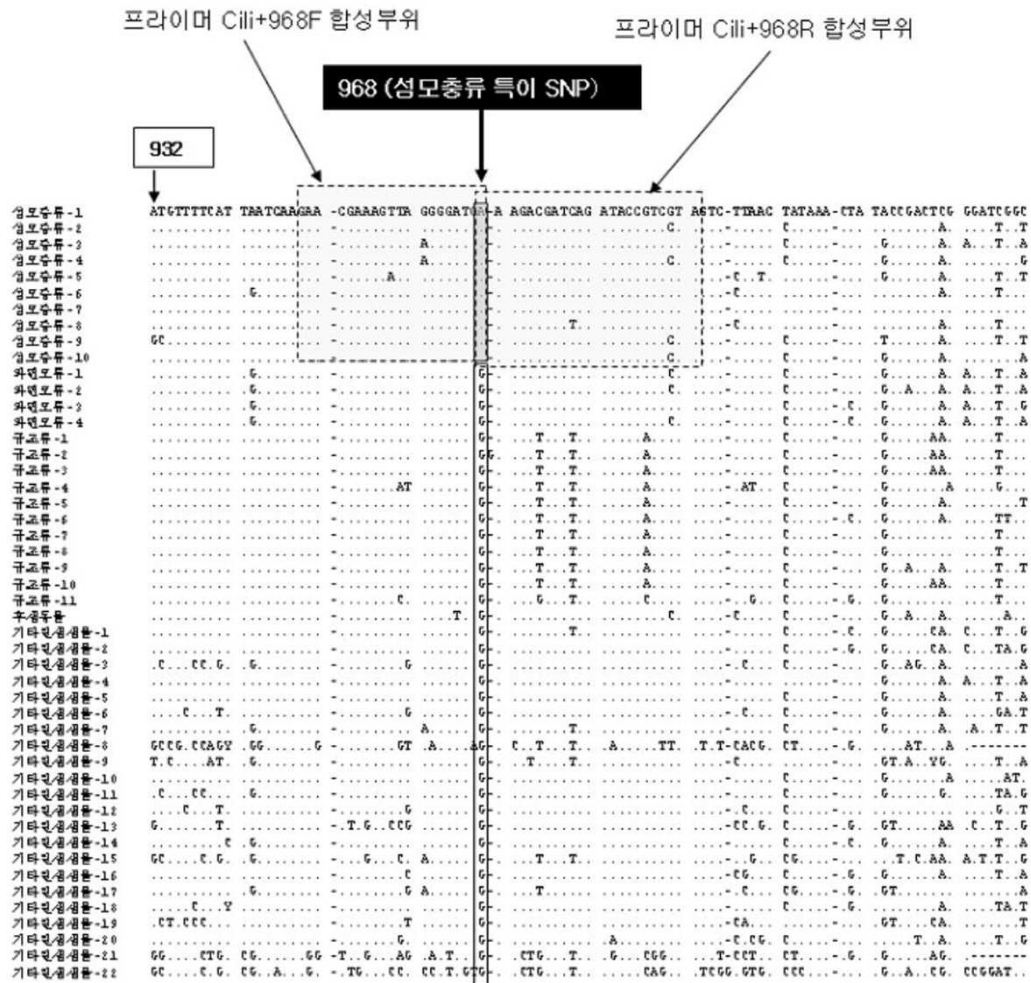
도면1



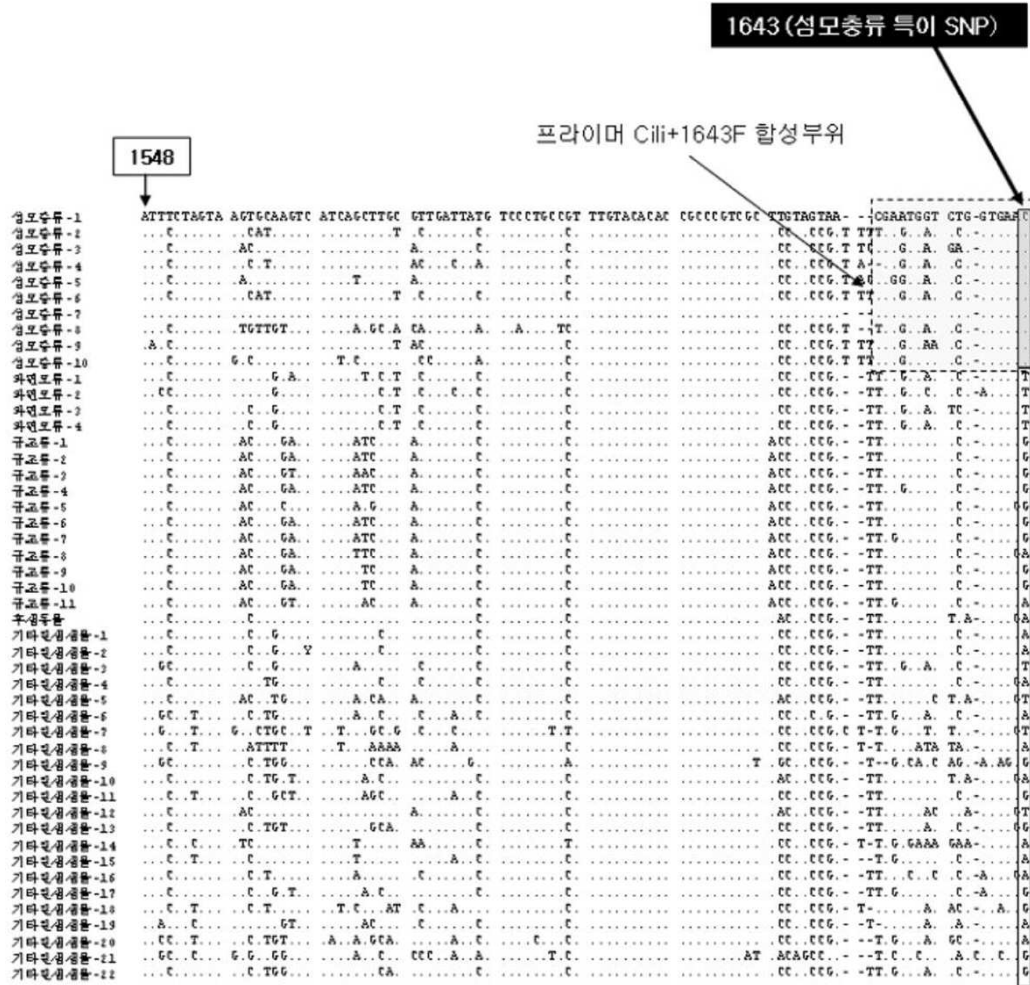
도면2



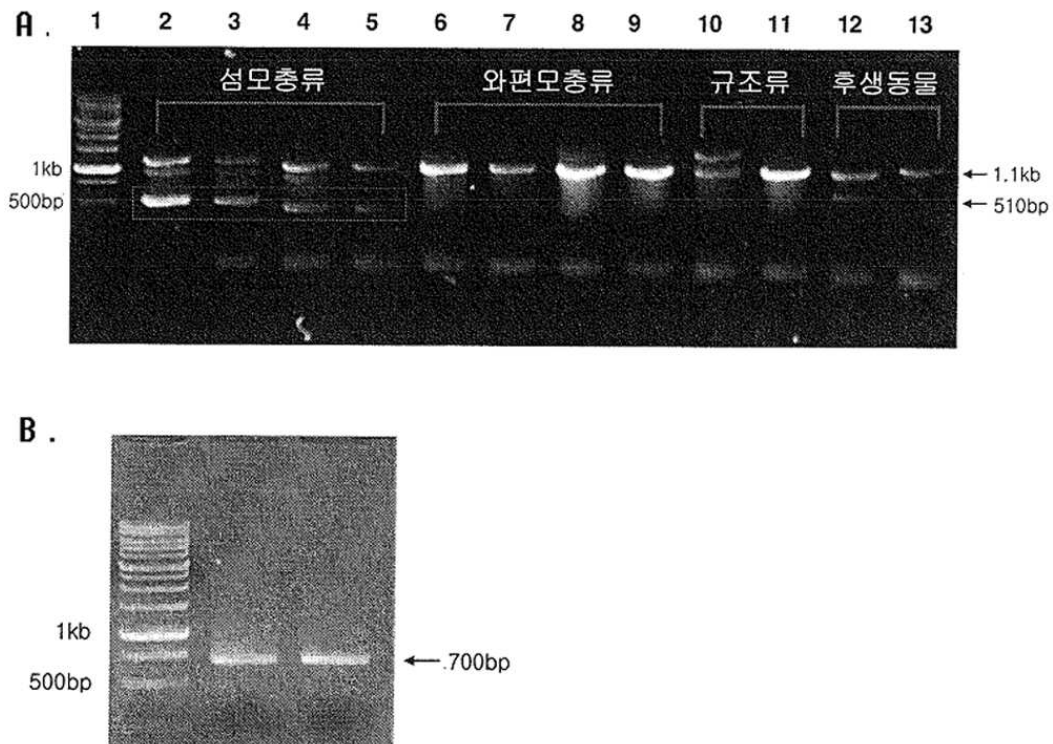
도면3



도면4



도면5



서열목록

<110>	Inha University	
<120>	ciliate-specific single nucleotide polymorphism(SNP) regions, ciliate-specific primers and the method for ciliate identification therefrom	
<130>	5p-06-25	
<160>	15	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	88	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Tetrahymena canadensis 284-371	
<400>	1	
	bcdtyyaagt ttctrcccta tcarctytcg awggtagtgt attggactac catggcnntn	60
	acgggtracg grgmattagg gttcgatt	88
<210>	2	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cili+321F primer	
<400>	2	
	rccctatcar ctytcgawgg tact	24
<210>	3	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Cili-321R primer	

<400> 3
anngccatgg tagkccaata ga 22

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> cili+329F primer

<400> 4
tytcgawggt agtgtattgc a 21

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> cili-329R primer

<400> 5
ctyaccgtn anngccatgg tact 24

<210> 6
<211> 76
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Tetrahymena canadensis 932-1007

<400> 6
rygttttcat tratcaagaa cgaaagtttag gggatcaaag acgatyagat accgtcstag 60

tcytawcyat aaacta 76

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cili+968F primer

<400> 7
atcaagaacg aaagttaggg gatga 25

<210> 8
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cili-968R primer

<400> 8
gactasgacg gtatctgatc gtctgt 26

<210> 9
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Tetrahymena canadensis 1597-1643

<400> 9
tttgtacaca cgcgccgtcg ctystasyra cgartgrtcy ggtgaac 47

<210> 10
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cili+1643F primer

<400> 10
cgartgrtcy ggtgacc 17

<210> 11
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cili+630 primer

<400> 11
gccagcagcc gcggtaatc cagctc 26

<210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Cili-2000 primer

<400> 12
cgacgggcgg tgtgtacaaa gggcaggg 28

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> 18S+30 primer

<400> 13
gtctyaaaga ttaagccatg catg 24

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Euk A primer

<400> 14
aayctggtg atyytgccag 20

<210> 15
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Euk B primer

<400> 15
tgatccttcy gcaggttc

18