(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 9 월 12 일 (12.09.2014)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2014/137196 A1

(51) 국제특허분류:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2014/001911

(22) 국제출원일: 2014 년 3 월 7 일 (07.03.2014)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2013-0024713 2013 년 3 월 7 일 (07.03.2013) KR

(71) 출원인: **한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY)** [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(72) 발명자: **오희목 (OH, Hee-Mock)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **김용 (JIN, Long)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **안치용 (AHN, Chi-Yong)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **이창수 (LEE, Chang Soo)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **김희식 (KIM, Hee-Sik)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). **이형관 (LEE, Hyung Gwan)**; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).

(74) 대리인: **특허법인 이룸 (ERUUM PATENT LAW FIRM)**; 135-851 서울시 강남구 역삼로 601 (대치동, 보성빌딩 5 층), Seoul (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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.

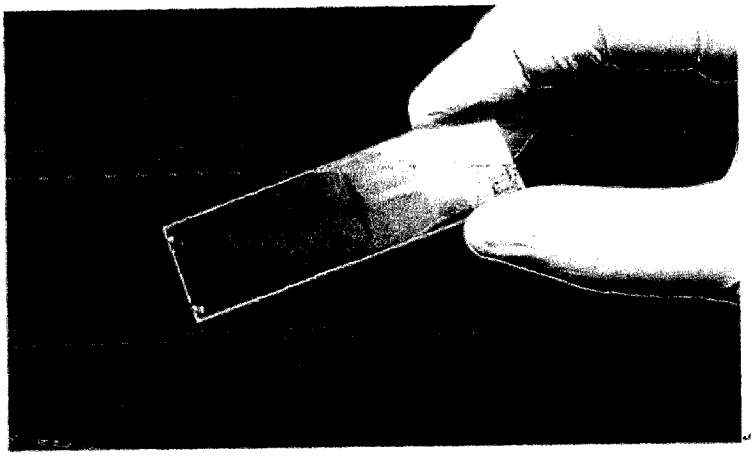
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: DNA CHIP FOR DETECTING AND QUANTITATIVELY MEASURING HARMFUL BLUE-GREEN ALGAE IN KOREAN FRESH WATER SYSTEM

(54) **발명의 명칭** : 한국 담수 수계의 위해성 남조류의 검출과 정량측정을 위한 DNA 칩

[Fig. 1]



(57) **Abstract**: The present invention relates to a DNA chip for detecting and/or quantifying blue-green algae comprising six or more kinds of probes having a base sequence selected from sequence numbers 1 to 78, and a method for detection and/or quantification using the same. According to the present invention, it is possible to obtain enough genetic information of the major six kinds of blue-green algae causing algal bloom in the Korean fresh water system, and to provide a DNA chip capable of specific quantitative analysis by using genetic information and a method for detection and quantification using the DNA chip.

(57) **요약서**: 본 발명은, 서열번호 1 내지 78 에서 선택되는 염기서열로 이루어지는 프로브를 6 종 이상 포함하는 남조류의 검출 및/또는 정량용 DNA 칩, 및 이를 이용한 검출 및/또는 정량방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 한국의 민물 수계에서 녹조를 유발하는 주요 6 종의 남조류 유전자 정보가 충분히 확보가능하며, 이 유전자 정보를 이용하여 특이적 정량적 분석이 가능한 DNA 칩, 및 이를 이용한 검출 및/또는 정량방법의 제공이 가능하다.

WO 2014/137196 A1

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 한국 담수 수계의 위해성 남조류의 검출과 정량측정을 위한 DNA 칩

기술분야

[1] 본 발명은 한국의 담수 수계에 존재하는 위해성 미세조류들을 동시검출할 수 있는 DNA 칩 및 이를 이용한 검출 및/또는 정량방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 한국의 담수에서 녹조를 유발하고 독성을 함유하는 대표적인 위해성 남조류 6종(*Microcystis, Anabaena, Oscillatoria, Phormidium, Aphanizomenon, Nostoc* 속)에 특이적인 유전자의 정보를 이용하여 설계한 DNA 프로브를 포함하는 DNA 칩, 및 이를 이용한 검출 및/또는 정량방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 남조류(blue-green algae, cyanobacteria)는 식물체와 동일한 방식으로 산소발생 광합성을 수행하는 원핵생물(procaryote), 즉 세균(bacteria)의 일종으로 온천에서부터 극지방까지 다양한 환경에 적응하여 살아가고 있는 생물이다. 남조류는 원시지구에 산소를 공급하여 현재의 대기를 만드는데 중요한 역할을 수행하였으며, 현재 지구상에서 일어나는 광합성의 약 25%를 점유하는 중요한 일차생산자 역할을 담당하고 있다.

[4] 그러나 최근 산업의 급속한 발달과 생활수준의 향상으로 인해 증가하는 하수를 통해 오염물질이 과다 배출되고, 이것이 우선적으로 담수에 흘러들어감에 따라, 많은 호수가 부영양화(eutrophication) 되었다. 또한 기후의 변화로 여름철의 이상 고온과 높은 일조량으로 유속이 느린 강과 호수와 같은 정체된 민물수계의 녹조현상(algal bloom)은 전 세계의 공통적인 환경문제로 부각되었다. 녹조가 발생하면 경관의 심미적 가치가 하락할 뿐만 아니라, 정수처리 비용의 증가, 불쾌한 냄새의 발생, 종 다양성의 감소에 의한 생태계의 파괴, 이후 사멸과정에서의 산소고갈로 인한 어류의 폐사, 남조류 독소에 의한 보건상의 위해 등 다양한 환경문제를 일으킨다.

[5] 특히 문제가 되는 것은 남조류가 생산하는 독소인 마이크로시스틴(microcystin)인데, 이는 호수나 늪과 같은 호소에서 가장 자주 검출되는 간독소(hepatotoxin)의 일종으로 포스파타제(phosphatase) type 1과 type 2A를 저해한다. 마이크로시스틴은 일곱 개의 아미노산이 고리 모양으로 연결된 헵타펩티드(heptapeptide) 구조를 하고 있으며, 아미노산의 종류에 따라 microcystin-LR (Leucine, Arginine), microcystin-RR (Arginine, Arginine), microcystin-YR (Tyrosine, Arginine) 등으로 나뉘는데, 지금까지 약 70여 종 이상의 마이크로시스틴이 알려져 있다.

[6] 영국, 호주 등에서는 남조류가 발생한 물을 마신 가축들이 폐사한 사례가 있으며, 브라질에서는 남조류에 오염된 물을 혈액투석에 사용하다 환자가 사망한 사건도 있었다. 마이크로시스틴은 동물뿐만 아니라, 식물, 동물플랑크톤 및 식물플랑크톤에도 저해작용을 나타내는 것으로 보고되었으며, 동일한 남조류 내에서도 마이크로시스틴을 생산하는 독성종이 마이크로시스틴을 생산하지 않는 비독성종을 저해하는 현상이 발견되었다.

[7] 마이크로시스틴은 상수원으로 사용되는 국내 대부분의 대형수원지에서 검출되고 있으나, 아직까지는 세계보건기구(WHO)의 기준인 1 ㎍/L을 초과한 사례는 없었다. 그러나 여름철 일시적으로 이에 근접하기도 하며, 지구온난화에 따른 수온 상승이 남조류에 의한 녹조 및 독소 생산을 더욱 촉진할 것으로 예상된다.

[8] 녹조발생시 수표면에 부유하는 남조류의 덩어리(scum)가 바람에 의해 국지적으로 농축될 수 있는데, 이때에는 마이크로시스틴의 농도가 일시적으로 매우 상승할 수 있다. 특히 여름철 남조류가 증식하면서 녹조가 발생함에 따라, 남조류 내에서 독성종의 비율이 증가하는 것으로 보고되었으며, 이것은 언제든지 상수원이 위협받을 수 있음을 나타낸다.

[9] 이러한 녹조 및 독소 발생에 대하여 효과적으로 대응하고자, 환경부에서는 1996년 대청호에서의 시범실시를 시작으로 2007년에는 17개 호수로까지 확대하여 조류 경보제를 실시하고 있다. 조류 경보제는 남조류의 세포수와 엽록소의 농도를 기준으로 주의보, 경보, 대발생의 3단계로 발령하며, 각 수자원 관리 담당기관과 지자체는 발령 단계에 맞추어 대응조치를 취한다.

[10] 그러나, 남조류의 농도를 확인하기 위하여 세포를 현미경으로 동정, 계수하는 것은 숙련된 전공자에게도 까다롭고 시간이 많이 소요되는 과정이다. 특히 국내에서 주로 발견되는 남조류는 수천 개의 세포가 군체를 이루거나(예, Microcystis), 염주알 또는 환형동물의 체절과 유사한 형태의 필라멘트를 형성하기 때문에(예, *Anabaena, Oscillatoria, Phormidium, Aphanizomenon, Nostoc*), 계수가 매우 어려울 뿐만 아니라 엄밀한 정확도를 기대하기 어려운 실정이다.

[11] 또한, 현행 조류 경보제에서는 녹조 발생 이후에 독소 분석을 실시하는데, 독소분석이 고가의 장비를 필요로 하고 과정 자체가 복잡하여, 현 제도에서는 남조류 독소의 조기 검출과 사전 예방조치가 어려운 문제점이 있다.

[12] 위와 같은 문제점들을 해결하기 위해서는, 누구나 쉽고 정확하게 측정할 수 있고, 한번에 최대한 많은 항목에 대한 검출을 동시에 할 수 있는 방법이 요구된다. 이와 관련하여, 분자생물학적 최신 기법을 활용한 DNA칩 기술은 최근 10년 사이에 많은 발전을 이루어 상당수의 기술적 문제들이 해결되고 있으며 특정 군집 분석에서는 높은 정확도와 실용성을 보여주고 있다. 그러나, 기존의 DNA 칩 기술은 주로 해양의 적조를 발생하는 규조류 (예, *Alexandrium*)를 검출하는 것을 목적으로 개발되었을 뿐, 담수의 녹조를 유발하는 남조류 *Microcystis, Anabaena, Oscillatoria, Phormidium, Aphanizomenon, Nostoc* 속에 모두

특이적인 DNA 칩 기술은 개발되어 있지 않았다.

[13]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[14] 이에, 본 발명자들은 한국 민물 수계에서 주요 위해성 남조류로 간주되는 6종을, DNA 칩을 이용하여 동시에 빠르고 정량적으로 분석하기 위한 방법을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 본 발명을 완성하게 되었다.

[15] 구체적으로, 본 발명의 목적은 조류경보제에서 감시하는 대표적인 위해성 남조류 6종인 *Microcystis, Anabaena, Oscillatoria, Phormidium, Aphanizomenon, Nostoc* 속을 동시에 빠르고 고감도로 정량적 측정이 가능한 프로브를 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 다른 목적은 조류경보제에서 감시하는 대표적인 위해성 남조류 6종인 *Microcystis, Anabaena, Oscillatoria, Phormidium, Aphanizomenon, Nostoc* 속을 동시에 빠르고 고감도로 정량적 측정이 가능한 DNA 칩을 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 DNA 칩을 이용하여, 조류 경보제에서 감시하는 대표적인 위해성 남조류 6종인 *Microcystis, Anabaena, Oscillatoria, Phormidium, Aphanizomenon, Nostoc* 속을 동시에 빠르고도 고감도로, 검출 및/또는 정량적 측정이 가능한 방법을 제공하는 것이다.

[18]

[19] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[20]

과제 해결 수단

[21] 본 발명은, 서열번호 1 내지 78로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열로 구성되는 프로브를 6종 이상 포함하는, 남조류 검출 및/또는 정량용 DNA 칩을 제공한다.

[22] 본 발명의 일 구체예로, 프로브의 표적 유전자는 *mcyE, cpcBA, ITS, rbcS, rbcX* 또는 *nifD*인 것을 특징으로 한다.

[23] 본 발명의 다른 구체예로, 남조류는 *Microcystis* 속, *Anabaena* 속, *Oscillatoria* 속, *Phormidium* 속, *Aphanizomenon* 속 및 *Nostoc* 속인 것을 특징으로 한다.

[24] 본 발명의 또 다른 구체예로, DNA 칩은 *Microcystis* 속의 검출 및/또는 정량용 프로브로서, 서열번호 4-6, 13-15, 22-24, 37-39, 46-48 및 73-75로 이루어진 군에서 선택되는 염기서열을 갖는 하나 이상의 프로브; *Anabaena* 속의 검출 및/또는 정량용 프로브로서, 서열번호 1-3, 10-12, 19-21, 34-36, 43-45, 58-60 및 70-72 로 이루어진 군에서 선택되는 염기서열을 갖는 하나 이상의 프로브; *Oscillatoria* 속의 검출 및 정량용 프로브로서, 서열번호 28-30, 52-54 및 64-66으로 이루어진

군에서 선택되는 염기서열을 갖는 하나 이상의 프로브; *Phormidium* 속의 검출 및/또는 정량용 프로브로서, 서열번호 31-33, 55-57 및 67-69로 이루어진 군에서 선택되는 염기서열을 갖는 하나 이상의 프로브; *Aphanizomenon* 속의 검출 및/또는 정량용 프로브로서, 서열번호 76-78로 이루어진 군에서 선택되는 염기서열을 갖는 하나 이상의 프로브; 및 *Nostoc* 속의 검출 및/또는 정량용 프로브로서, 서열번호 7-9, 16-18, 25-27, 40-42, 49-51 및 61-63으로 이루어진 군에서 선택되는 염기서열을 갖는 하나 이상의 프로브를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[25] 본 발명의 또 다른 구체예로, *Microcystis* 속은 *Microcystis aeruginosa*을 포함하고, 아나베나 속은 *Anabaena flos-aquae, Anabaena variabilis, Anabaena* sp. PCC 7120, *Anabaena* sp. BIR series를 포함하고, 오실라토리아 속은 *Oscillatoria sancta, Oscillatoria tenuis, Oscillatoria* sp. 18R, *Oscillatoria* sp. 19R을 포함하고, 포미디움 속은 *Phormidium* cf. *irriguum, Phormidium ambiguum, Phormidium* sp. 4-19b, *Phormidium* sp. 1-6c, *Phormidium* sp. 2-26b3을 포함하고, 아파니조메논 속은 *Aphanizomenon flos-aquae*을 포함하고, 노스톡 속은 *Nostoc punctiforme, Nostoc linckia, Nostoc spongiaeforme, Nostoc muscorum*을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[26] 본 발명의 또 다른 구체예로, DNA 칩은 프로브 집적부위(well)가 6개로 구획되어 있는 것을 특징으로 한다.

[27] 본 발명은 남조류 샘플에서 게놈 DNA를 추출하는 단계; 상기 추출된 게놈 DNA를 절편화 및 표지하는 단계; 상기 표지된 DNA를 DNA 칩에 혼성화 반응시키는 단계; 및 상기 혼성화 정도에 따라 남조류의 종류 및 양을 판별하는 단계를 포함하여 이루어지는, 남조류의 검출 및/또는 정량방법을 제공한다. 이때, 남조류의 종류는 상기한 바와 같다.

[28]

발명의 효과

[29] 본 발명에 의하면, 한국의 민물 수계에서 녹조를 유발하는 주요 6종의 남조류 유전자 정보가 충분히 확보가능하며, 이 유전자 정보를 이용하여 특이적 정량적 분석이 가능한 프로브 및 DNA 칩의 제공이 가능하며, 1종의 남조류당 3개 이상의 프로브를 설계함으로써 남조류의 종간 구별을 빠르고도 쉽게 통계적으로 가능하게 할 수 있다.

[30] 또한, 본 발명에 의하면, 조류 경보제에서 감시대상이 되는 6종의 남조류를 하나의 DNA 칩에서 동시에 판별할 수 있고, 기존의 현미경법에 비해 시료를 고효율로 대량 분석이 가능하다.

[31] 또한, 본 발명에 의하면, 담수 수계 샘플로부터 추출한 유전자에 대하여 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)이나 기타 증폭과정을 거치지 않기 때문에, 환경 내 유전정보가 편향되지 않은 상태의 정량적 측정이

가능하다는 장점이 있다.

[32] 또한, 본 발명에 의하면, 설계된 프로브가 ITS(Internal Transcribed Spacer)와 같은 구조 유전자와, *rpoB*, *mcyE*, *cpcBA*, *nifD*, *rbcS*, *rbcX*와 같은 기능성 유전자에 기반을 두어 제작되기 때문에, 구조 유전자와 기능성 유전자를 동시에 이용하여 남조류 종류의 정확한 판별 및 동정과 독성물질의 예측 등 수계 건강성을 광범위하게 평가할 수 있다.

[33] 또한, 기존의 DNA 칩을 이용한 특정 생물종의 검출방법이 단일 미생물종을 목적으로 개발되었다면, 본 발명에 의하면, 수계에 우점하는 광범위한 위해성 남조류 6종을 동시에 빠르고도 고감도로, 정량적인 검출이 가능하다는 장점이 있다.

[34] 또한, 기존의 DNA 칩 기술은 주로 해양의 적조를 발생하는 규조류 (예, *Alexandrium*)를 검출하는 것을 목적으로 개발되었다면, 본 발명은 담수의 녹조를 유발하는 남조류 *Microcystis, Anabaena*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Aphanizomenon, Nostoc* 속에 특이적이고 정량적인 측정방법을 제공한다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[35] 도 1은 본 발명의 DNA 칩을 나타내는 사진으로서, 위해성 남조류 6종(*Microcystis, Anabaena, Oscillatoria, Phormidium, Aphanizomenon, Nostoc*)을 동시에 특이적이고 정량적으로 검출할 수 있는 프로브가 6개의 구역에 배열되어 있다.

[36] 도 2a 내지 도 2e는 *Microcystis*의 유전자 (a) *mcyE*, (b) *cpcBA*, (c) ITS, (d) *rbcS*, (e) *rbcX* 에 상보적으로 결합할 수 있는 프로브의 특이성을 나타내는 도표이다.

[37] 도 3a 내지 도 3e는 *Microcystis*의 유전자 (a) *mcyE*, (b) *cpcBA*, (c) ITS, (d) *rbcS*, (e) *rbcX* 에 상보적으로 결합할 수 있는 프로브를 이용한 DNA 칩의 정량성을 나타내는 도표이다.

[38] 도 4a 내지 도 4c는 *Nostoc*의 유전자 (a) *rpoB*, (b) *rbcS*, (c) *rbcX*에 상보적으로 결합할 수 있는 프로브의 특이성을 나타내는 도표이다.

[39] 도 5a 내지 도 5c는 *Nostoc*의 유전자 (a) *rpoB*, (b) *rbcS*, (c) *rbcX*에 상보적으로 결합할 수 있는 프로브를 이용한 DNA 칩의 정량성을 나타내는 도표이다.

[40] 도 6은 *Anabaena*의 *rpoB* 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 프로브의 특이성을 나타내는 도표이다.

[41] 도 7은 *Anabaena*의 *rpo*B 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 프로브를 이용한 DNA 칩의 정량성을 나타내는 도표이다.

[42] 도 8은 *Oscillatoria*의 ITS 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 프로브의 특이성을 나타내는 도표이다.

[43] 도 9는 *Oscillatoria*의 ITS 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 프로브를 이용한 DNA 칩의 정량성을 나타내는 도표이다.

[44] 도 10은 *Phormidium*의 *mcy*E 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 프로브의 특이성을 나타내는 도표이다.

[45] 도 11은 *Phormidium*의 *mcy*E 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 프로브를 이용한 DNA 칩의 정량성을 나타내는 도표이다.

[46] 도 12는 *Aphanizomenon*의 *cpc*BA 유전자에 상보적으로 결합할 수 있는 프로브를 이용한 DNA 칩의 정량성을 나타내는 도표이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[47] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 일례일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 한정된 것은 아니다.

[48]

[49] **[실시예]**

[50] **실시예 1. 타겟 유전자 선정 및 프로브 제작**

[51] 한국의 민물 수계에서 녹조를 유발하는 주요 6종의 남조류에 특이적인 프로브를 제작하기 위하여 먼저 타겟 유전자를 선정하였다. 타겟이 되는 유전자는 프로브로 설계되는 기본적인 염기서열의 정보를 제공할 수 있어야 한다. 또한 타겟 유전자를 기반으로 설계된 프로브는 종 특이성을 보유하고 있어야 하며, 이를 위하여 다른 종과 구별이 되는 유전정보를 갖고 있어야 한다. 다른 종과 구별이 안될 정도로 보전된 유전자 부위는 후보 유전자가 될 수 없으며 종간 유전정보가 너무 다른 유전자 부위도 프로브 설계에 적합하지 않을 수 있다. 타겟 유전자는 또한 데이터베이스에 양질의 정보를 갖고 있을 만큼 충분한 기반 연구가 진행되어 있어야 한다.

[52] 대표적인 데이터베이스인 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)에서 유전자 정보를 얻은 후, Geneious 프로그램(Biomatters Ltd.)으로 다중정렬방법(multiple alignment)을 수행하였다. 그 결과, 본 발명의 타겟인 6종의 남조류를 동시에 특이적으로 구별하기 위한 최적 후보 유전자로서 아래와 같은 유전자를 선정하였다.

[53] *rbcS*는, 남조류가 이산화탄소를 고정하는데 필수적인 RuBisCo 복합체의 소단위(small subunit)를 코딩하는 유전자로, *rbcS* 유전자를 분석하여 *Anabaena, Microcystis, Nostoc* 3개 속(genus)에 특이적인 9개의 프로브를 제작하였다(서열번호 1 내지 9).

[54] *rbcX*는, RuBisCo 복합체의 형성을 보조하는데 필수적인 샤프론(chaperone) 단백질을 코딩하는 유전자로, *rbcX* 유전자를 분석하여 *Anabaena, Microcystis, Nostoc* 3개 속(genus)에 특이적인 9개의 프로브를 제작하였다(서열번호 10 내지 18).

[55] ITS(Internal transcribed spacer)는 rRNA의 코딩부위 사이의 공간으로서, 다양하고 안정된 서열을 가지고 있어서 매우 가까운 연관관계에 있는 미생물이나 매우 먼 연관관계를 갖는 미생물 사이에서도 비교가 가능하여 DNA 칩의 프로브 제작에 강력한 마커로 사용될 수 있기 때문에, ITS 유전자를 분석하여 *Anabaena, Microcystis, Nostoc, Oscillatoria, Phormidium* 5개 속(genus)에

특이적인 15개의 프로브를 제작하였다(서열번호 19 내지 33).

[56] *rpoB*(RNA polymerase beta subunit)는 RNA 중합효소 베타 소단위를 코딩하는 유전자로, *rpoB* 유전자를 분석하여 *Anabaena, Microcystis, Nostoc* 3개 속(genus)에 특이적인 9개의 프로브를 제작하였다(서열번호 34 내지 42).

[57] *mcyE*는 남조류가 생산하는 간독소인 마이크로시스틴(microcystin)을 코딩하는 유전자로, *mcyE* 유전자를 분석하여 독성 남조류(toxin-producing cyanobacteria)인 *Anabaena, Microcystis, Nostoc, Oscillatoria, Phormidium* 5개 속(genus)에 특이적인 15개의 프로브를 제작하였다(서열번호 43 내지 57). 이 프로브 세트는 녹조로 인한 수질 오염의 큰 문제인 남조류 독성의 감시에 있어 중요한 지표가 될 수 있다.

[58] *nifD*는 남조류가 공기중의 질소를 고정하는 데에 필수적인 질소고정효소(nitrogenase)를 코딩하는 유전자로, *nifD* 유전자를 분석하여 *Anabaena, Nostoc, Oscillatoria, Phormidium* 4개 속(genus)에 특이적인 12개의 프로브를 제작하였다(서열번호 58 내지 69).

[59] *cpcBA*는 미세조류의 광합성기구 보조색소인 피코시아닌(phycocyanin)을 코딩하는 유전자로, *cpcBA* 유전자를 분석하여 *Anabaena, Microcystis, Aphanizomenon* 3개 속(genus)에 특이적인 9개의 프로브를 제작하였다(서열번호 70 내지 78).

[60] 프로브의 제작은 OligoWiz 프로그램(http://www.cbs.dtu.dk/services/OligoWiz/)을 이용하였으며, 하기 [표 1]에 나타낸 바와 같이 총 78개의 프로브를 제작하였다. 이를 위해 최근 NCBI에 등록된 *Anabaena*, *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Nostoc* 의 전체 유전자 염기정보(whole genome sequence)와 각 남조류의 유전자 염기정보를 비교하였다.

[61] 하기 표 1은, 조류 경보제로 감시하는 한국 민물 수계의 주요 남조류 6종을 검출하기 위한 특이적인 프로브를 나타낸 것이다.

[62] 표 1

[Table 1]

프로브 명칭	염기서열	타겟 남조류 종명	타겟 유전자
AnarbcS1(서열번호 1)	AATATTAAGCAGTGCCAAATTCTGAGCTTCATCGTTCACAAACCCAG	*Anabaena* sp. PCC 7120	*rbc*S
AnarbcS2(서열번호 2)	TATTGGCAGAAGTTCAATCTTGCCGTTCTCAATATCCTGGTCACTAC	*Anabaena* sp. PCC 7120	*rbc*S
AnarbcS3(서열번호 3)	TTGTTTGGTGCTAAAACATCCCGTGAAGTATTGGCAGAAGTTCAATC	*Anabaena* sp. PCC 7120	*rbc*S
MicrbcS1(서열번호 4)	CCCCCCCTCACCGATCAACAAATTGCTAAACAAATTCAATACATGAT	*Microcystis aeruginosa*	*rbc*S
MicrbcS2(서열번호 5)	TTCTGATTGCTACATCCGCGTTATCGCTTTTGACAACATCAAACAAT	*Microcystis aeruginosa*	*rbc*S
MicrbcS3(서열번호 6)	GTGGAAACTGCCTTTATTCTCTGTTTCTGGTCCCCAAGAAGTTCTTA	*Microcystis aeruginosa*	*rbc*S
NosrbcS1(서열번호 7)	TGATAACATCAAGCAGTGCCAAGTTCTCAGCTTTCTTGTTCACAAAC	*Nostoc punctiforme*	*rbc*S
NosrbcS2(서열번호 8)	TCCAGCGATCGAGTTCAACGAAACTTCTGAGCCAACAGAATTATATT	*Nostoc punctiforme*	*rbc*S
NosrbcS3(서열번호 9)	AGAAGTATTGAGCGAAGTTCAAGGATGCCGTTCTCAATTTAACGGTA	*Nostoc punctiforme*	*rbc*S
AnarbcX1(서열번호 10)	TAGCCTTGCGGATAATGACTGTCAGAGAACATATAGCCGAAGAAGTA	*Anabaena* sp. PCC 7120	*rbc*X
AnarbcX2(서열번호 11)	GAACATATAGCCGAAGAAGTAGCCGAGTTCTTAC	*Anabaena* sp. PCC 7120	*rbc*X

	CAGAAATGGTTCG		
AnarbcX3(서열번호 12)	GTTTATCTAACCCCAGTCCTGAATCAGAACAGCAGACAATTTCCGAT	*Anabaena* sp. PCC 7120	*rbc*X
MicrbcX1(서열번호 13)	AACGGGAATTATTAATGACAATACCGAACATCGTCGGCAACTTTTGG	*Microcystis aeruginosa*	*rbc*X
MicrbcX2(서열번호 14)	TATTGCGGGGTTGATGACTGAGAATAAAGAGTTAGTTTTGCGGATCA	*Microcystis aeruginosa*	*rbc*X
MicrbcX3(서열번호 15)	AGTCTTACAAAGTTACCTAACTTACCAAGCGGTTCGCACGATTATCG	*Microcystis aeruginosa*	*rbc*X
NostrbcX1(서열번호 16)	CGAATCATGACTGTCAGAGAACACATTGCGGAAGAAATTGCAGAATT	*Nostoc punctiforme*	*rbc*X
NostrbcX2(서열번호 17)	AAAAACCAGATTTGGCTTTGCGAATCATGACTGTCAGAGAACACATT	*Nostoc punctiforme*	*rbc*X
NostrbcX3(서열번호 18)	AACACATTGCGGAAGAAATTGCAGAATTTTTACCAGAAATGGTTCGC	*Nostoc punctiforme*	*rbc*X
AnaITS1(서열번호 19)	CTCCACATGAAAAAGCGAAAAGCCAGAAAGGAAGAATTCAGCAACTA	*Anabaena flos-aquae*	ITS
AnaITS2(서열번호 20)	GCAGGATAAGCCAATGAAAAAGTGGTCAAGCTAATAAGGGCTAATGG	*Anabaena flos-aquae*	ITS
AnaITS3(서열번호 21)	GAACCTTGAAAACTGCATAAAAACGCGATTAGATTAGCAGGCAGACA	*Anabaenaflos*-aquae	ITS
MicITS1(서열번호 22)	AGGGAGACCTAATTCAGGTAGGAGACGAAAAAAAGTAGTCCCTACC	*Microcystisaeruginosa*	ITS
MicITS2(서열번	CAAAATTGGCTTTCAAA	*Microcystisaeruginosa*	ITS

호 23)	CTAGGTTCTGGGTTCAC ACAAGACCTGAAT		
MicITS3(서열번호 24)	ACGAAAAAAAAGTAGTC CCTACCAAGAATCAATC CCAAAAGGTCGGA	*Microcystisaeruginosa*	ITS
NosITS1(서열번호 25)	TCCTTTTTAGGGAGACCT ACCCAACTTTAATATCG AGGACACACAGT	*Nostoc linckia*	ITS
NosITS2(서열번호 26)	GGATCACCTCCTTTTTAG GGAGACCTACCCAACTT TAATATCGAGGA	*Nostoc linckia*	ITS
NosITS3(서열번호 27)	ATCACCTCCTTTTTAGGG AGACCTACCCAACTTTA ATATCGAGGACA	*Nostoc linckia*	ITS
OscITS1(서열번호 28)	AGTCAATAGCTAACCAT TTCATGAGGTGCAGAAA GTGGTCAAGTGAT	*Oscillatoria sancta*	ITS
OscITS2(서열번호 29)	ACTAATGTCCAGCCAGA ACCTTGAAAACTGCATA GTCAATCAGTCAA	*Oscillatoria sancta*	ITS
OscITS3(서열번호 30)	AGAGGTTAGTCAATAGC TAACCATTTCATGAGGT GCAGAAAGTGGTC	*Oscillatoria sancta*	ITS
PhoITS1(서열번호 31)	ACCTAGCCCAACTGATG ACCGAAAAGAAAGTTAA TAGGTCACTGTTG	*Phormidium* cf. *irriguum*	ITS
PhoITS2(서열번호 32)	AACGAGAATGGACAGGC TTTCAAACTATTTTCAGG TTGGGAAAATGG	*Phormidium* cf. *irriguum*	ITS
PhoITS3(서열번호 33)	GGCTTTCAAACTATTTTC AGGTTGGGAAAATGGGC TATTAGCTCAGG	*Phormidium* cf. *irriguum*	ITS
AnarpoB1(서열번호 34)	CACCTGTTTAAACCAAA AACCATTGGTGAGAATT GGCGAAAAAGTCG	*Anabaena flos-aquae*	*rpo*B

AnarpoB2(서열 번호 35)	GCAGCCAGTGGTAGCCA AGTTATTGAAAAAGGCC AAGAACTTAAATA	*Anabaena flos-aquae*	*rpo*B
AnarpoB3(서열 번호 36)	TATCAACGTTCCAACCA AGACACCTGTTTAAACC AAAAACCATTGGT	*Anabaena flos-aquae*	*rpo*B
MicrpoB1(서열 번호 37)	AAATATCAACGCTCTAA CCAAGATACCTGCCTAA ATCAGCGTCCTTT	*Microcystis*aeruginosa	*rpo*B
MicrpoB2(서열 번호 38)	GAAATATCAACGCTCTA ACCAAGATACCTGCCTA AATCAGCGTCCTT	*Microcystis*aeruginosa	*rpo*B
MicrpoB3(서열 번호 39)	GGCAAGAGCGAGATCGA GTACGAAATTCAGAAAT ATCAACGCTCTAA	*Microcystis*aeruginosa	*rpo*B
NosrpoB1(서열 번호 40)	TATCAACGATCCAACCA GGATACCTGTTTAAATC AAAAACCCCTCGT	*Nostoc* sp. 152	*rpo*B
NosrpoB2(서열 번호 41)	CCACAGAAATTCGTGTA CGTCCCAAAACCAGTAC CCAAGAAATTAAG	*Nostoc* sp. 152	*rpo*B
NosrpoB3(서열 번호 42)	TGTAGCTACTAGTATGA TTCCCTTTTTGGAACATG ACGACGCTAACC	*Nostoc* sp. 152	*rpo*B
AnamcyE1(서열 번호 43)	GAACAGCTGAACCATTG AGTCTTGGTACACTATC AGGAATGGTTGAA	*Anabaena* spp. BIR series	*mcy*E
AnamcyE2(서열 번호 44)	CAGCTGCTTTAATTTGTG AAATGACAGGTGTAGAA CGAGTCGCTTTT	*Anabaena* spp. BIR series	*mcy*E
AnamcyE3(서열 번호 45)	GGACAAAACGCCAAAA AATTGTGATTTTTGCTGG TTCTTATCACGGT	*Anabaena* spp. BIR series	*mcy*E
MicmcyE1(서열 번호 46)	AGAAGATAAAACCACGG CTCAACCCTTAAGTTTA	*Microcystis aeruginosa*	*mcy*E

	GGCACTCCTTTAG		
MicmcyE2(서열 번호 47)	TCATTGAAGCGGTTCAA GAACAAATGAACCGAGG AATAGGTTTAGGA	*Microcystis aeruginosa*	*mcy*E
MicmcyE3(서열 번호 48)	GAACAAATGAACCGAGG AATAGGTTTAGGAATGC AGTCAAATCTGGC	*Microcystis aeruginosa*	*mcy*E
NosmcyE1(서열 번호 49)	TAAAACCACGACTCAAC CCTTAAGTTTAGGCACT CCTTTAGGAATGG	*Nostoc* sp. 74.2	*mcy*E
NosmcyE2(서열 번호 50)	TAGGAGAAGATAAAACC ACGACTCAACCCTTAAG TTTAGGCACTCCT	*Nostoc* sp. 74.2	*mcy*E
NosmcyE3(서열 번호 51)	TAATTAGTGAAATGGGC CGGGTCGAAAGAGTCGC TTTTAGTAATACG	*Nostoc* sp. 74.2	*mcy*E
OscmcyE1(서열 번호 52)	CCGTAAGTCTGGGTACA CCATCAGGAATGGTTGA AGATGTAATTGTT	*Oscillatoria* sp. 18R *Oscillatoria* sp. 19R	*mcy*E
OscmcyE2(서열 번호 53)	GGGGTAGAAAGGGTGGC TTTTAGTAATACTGGAA CCGAAGCAATTAT	*Oscillatoria* sp. 18R *Oscillatoria* sp. 19R	*mcy*E
OscmcyE3(서열 번호 54)	GGATTGCTCGTTCTCGC ACAAAACGCCCAAAAAT TGTTATATTTTCC	*Oscillatoria* sp. 18R *Oscillatoria* sp. 19R	*mcy*E
PhomcyE1(서열 번호 55)	TGCTATGTTTGCAGGTTC ATATCACGGAACCTTTG ATGGCATTTTAG	*Phormidium* sp. 4-19b *Phormidium* sp. 1-6c *Phormidium* sp. 2-26b3	*mcy*E
PhomcyE2(서열 번호 56)	AGCTGCTTTAATTAGTG AAATGGGAGGAGTAGA ACGGGTTGCTTTTA	*Phormidium* sp. 4-19b *Phormidium* sp. 1-6c *Phormidium* sp. 2-26b3	*mcy*E
PhomcyE3(서열 번호 57)	ACAAAACGCCAAAAAAT TGCTATGTTTGCAGGTTC ATATCACGGAAC	*Phormidium* sp. 4-19b *Phormidium* sp. 1-6c *Phormidium* sp. 2-26b3	*mcy*E
AnanifD1(서열	ATCCGAGACTGGATTTT	*Anabaena variabilis*	*nif*D

번호 58)	CCCAGAATACGACAAGC TGAAGAAAGAAAA		
AnanifD2(서열 번호 59)	TGGATTTTCCCAGAATA CGACAAGCTGAAGAAAG AAAACAGACTCGA	*Anabaena variabilis*	*nif*D
AnanifD3(서열 번호 60)	TTTCCCAGAATACGACA AGCTGAAGAAAGAAAA CAGACTCGACTTCG	*Anabaena variabilis*	*nif*D
NosnifD1(서열번 호 61)	AGAATACGACAAGCTCA AGAAAGAAAACAGACTT GACTTCGAGCCAA	*Nostoc spongiaeforme* Nostoc punctiforme Nostoc muscorum	*nif*D
NosnifD2(서열번 호 62)	TCCCAGAATACGACAAG CTCAAGAAAGAAAACAG ACTTGACTTCGAG	*Nostoc spongiaeforme* Nostoc punctiforme Nostoc muscorum	*nif*D
NosnifD3(서열번 호 63)	ATCCGTGACTGGATTTTC CCAGAATACGACAAGCT CAAGAAAGAAAA	*Nostoc spongiaeforme* Nostoc punctiforme Nostoc muscorum	*nif*D
OscnifD1(서열번 호 64)	GACGACGTTTCAGCCTA CGAGTTTGAGGAGTTCA TTAAAGAACTCAA	*Oscillatoria tenuis*	*nif*D
OscnifD2(서열번 호 65)	TTTCAGCCTACGAGTTTG AGGAGTTCATTAAAGAA CTCAAACCCGAC	*Oscillatoria tenuis*	*nif*D
OscnifD3(서열번 호 66)	GGAGTTCATTAAAGAAC TCAAACCCGACTTAGTA GCTTCTGGCATCA	*Oscillatoria tenuis*	*nif*D
PhonifD1(서열번 호 67)	GTTAATTGGTACAGGCT ACGAGTTCGGTCACAAC GACGATTACAAAC	*Phormidium ambiguum*	*nif*D
PhonifD2(서열번 호 68)	AAAGTTATCGCCAAATA CGAAGCGCAAACGAAA GCTGTAATTGAAAA	*Phormidium ambiguum*	*nif*D
PhonifD3(서열번 호 69)	AAGCTGAATCTAGTTCA CTGCTATCGCTCCATGA ACTATATCAGCCG	*Phormidium ambiguum*	*nif*D

AnacpcBA1(서열번호 70)	GACCTATCTCCTAGCTG GTATGTTGAAGCTCTAA AGCACATCAAAGC	*Anabaenavariabilis*	*cpc*BA
AnacpcBA2(서열번호 71)	GTTTAAGTGGTCAAGCT GCTAACGAAGCTAACAC CTACATCGACTAC	*Anabaenavariabilis*	*cpc*BA
AnacpcBA3(서열번호 72)	AAAGCACATCAAAGCTA ATCATGGTTTAAGTGGT CAAGCTGCTAACG	*Anabaenavariabilis*	*cpc*BA
MiccpcBA1(서열번호 73)	CTAGCTGGTACATCGAA GCTCTCAAATATATCAA AGCCAACCATGGT	*Microcystis aeruginosa*	*cpc*BA
MiccpcBA2(서열번호 74)	CTTCGACCTGTCTCCTAG CTGGTACATCGAAGCTC TCAAATATATCA	*Microcystisaeruginosa*	*cpc*BA
MiccpcBA1(서열번호 75)	CATCGAAGCTCTCAAAT ATATCAAAGCCAACCAT GGTTTAAGTGGCG	*Microcystisaeruginosa*	*cpc*BA
AphcpcBA1(서열번호 76)	AATTCCCTTACACCACA TCTACACCAGGTAATCA ATACGCATCCGAT	*Aphanizomenon flos-aquae*	*cpc*BA
AphcpcBA2(서열번호 77)	CTAGTGTTCTTGATGACC GTTGCTTAAATGGTTTGC GCGAAACATAC	*Aphanizomenon flos-aquae*	*cpc*BA
AphcpcBA3(서열번호 78)	GCCTAACAATTACAAAT AGCTCGAATCTTAATTG AGCTTCTTCCAAC	*Aphanizomenon flos-aquae*	*cpc*BA

[63] **실시예 2. 프로브의 특이성 및 DNA 칩의 정량성 평가**

[64] 제작된 프로브를 DNA 칩에 부착시키기 위해 먼저 프로브의 염기서열 5' 말단에 아민기를 붙이고 시토신 5 분자(CCCCC)를 연결한 뒤, 이 수정된 프로브를 숙신산 무수물(succinic anhydride)로 처리한 아민기 기능성 글라스 슬라이드(amine functional glass side, Nanosc Inc.)에 Proteogen CM-1000을 이용하여 부착시켰다(도 1 참조).

[65] 상기 DNA 칩의 특이성과 정량성을 평가하기 위하여, 먼저 6종의 남조류 *Microcystis, Anabaena, Oscillatoria, Phormidium, Aphanizomenon, Nostoc*에 대하여

10^1~10^6 cells/ml 농도의 샘플을 준비한 후, DNA 칩의 혼성화반응(hybridization)을 위해 다음 과정을 수행하였다.

[66] 각 농도별 남조류 샘플 50 ml에서 게놈 DNA를 추출한 후, 각각의 게놈 DNA 1 ㎍에 제한효소 AluI (20 units, Promega)과 RsaI (20 unit, Promega)을 37℃에서 2시간 동안 처리하여 절편화(digestion) 시켰다. 반응이 끝난 후, 절편화된 DNA 샘플은 QIAQuick PCR clean-up kit (Qiagen)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 정제하였다.

[67] 정제한 DNA는 Invitrogen사에서 제공되는 Bioprime 표지 키트(labeling kit)을 사용하여 표지화 반응을 수행하였다. 총 반응액의 양을 50 ul로 하여 modified dNTP mix (각각 120 uM의 dATP, dGTP, dCTP; 60 uM의 dTTP)와 60 uM의 Cy5-dUTP를 첨가하고 Klenow 효소와 반응 버퍼를 넣고 37℃에서 2시간동안 표지화 반응을 수행하였다. 반응이 끝난 후, 표지화된 DNA는 QIAQuick PCR clean-up kit(Qiagen)을 사용하여 정제하였다. 정제된 DNA는 혼성화반응의 특이성을 높이기 위해, 50 ug의 인간 Cot-1 DNA (Applied Genetics)/ 52 ul 의 10X Blocking reagent (Agilent Technology)를 경쟁자로 각각 혼합하여 준비하고, 이 혼합 샘플은 2X aCGH 혼성화 버퍼(Agilent Technology)와 섞었다.

[68] 혼성화 버퍼와 잘 섞은 DNA 샘플을 95℃에서 3분간 가열한 후, 37℃에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝난 용액을 1분간 원심 분리하여 준비한 후, 게스켓 슬라이드(gasket slide, Agilent Technology)에 주입하고, DNA 칩을 고정하였다. 이 DNA 칩을 혼성화 오븐 (Agilent Technology)에 넣고, 65℃에서 18-20시간 동안 경쟁적 혼성화 반응을 진행하였다. 혼성화 반응이 끝난 DNA 칩은 제조사의 방법에 따라 순서대로 세척하여 건조시켰다.

[69] 건조시킨 DNA 칩은 Axon 스캐너를 이용하여 이미지 스캔을 한 후, GenePix Pro 6.0 (Axon Instruments) 프로그램을 이용하여 각 유전자의 시그널 강도(signal intensity)를 정량화하였다. 각 점의 평균 형광세기와 로컬 백그라운드(local background)의 값을 계산한 후, 각 점의 평균 형광세기에서 백그라운드 값을 제거하여 순수 형광 값을 구하였다. 그리고 이후 진행되는 분석을 위해서 낮은 형광세기를 지니는 점은 제거했다.

[70] 반응시 나타나는 다양성을 보정해주기 위해 강도 기준 표준화 방법(Locally Weighted Scatterplot Smoothing, LOWESS)을 사용하였다. 신호 대 잡음비 (Signal to Noise Ratio, SNR)값은 평균 표준화 신호 채널 강도(normalized signal channel intensity)를 평균 표준화 통제 채널 강도(normalized control channel intensity)로 나누어 계산하였다. 이 비율의 값이 2.0 이상이거나 0.5 이하의 값을 나타내는 유전자를 유전자 카피(copy)수가 유의하게 차이가 나는 것으로 결정하였다.

[71]

[72] 분석 결과, *Microcystis*의 경우, 도 2에 나타낸 바와 같이, *mcy*E, *cpc*BA, ITS, *rbc* S, *rbc*X 유전자를 기반으로 제작된 프로브는 *Microcystis*와 특이적으로 반응하였다. 또한, 도 3에 나타낸 바와 같이, 10^1~10^3 cells/ml 농도구간에서는

*Microcystis*의 농도 변화와 상관없는 SNR값을 보였으나, 10^4~10^6 cells/ml 농도구간에서 *Microcystis*의 농도가 증가함에 따라 SNR값도 비례적으로 증가하는 양의 상관관계(R^2>0.95)를 보여, 제작된 DNA 칩을 이용하여 *Microcystis*를 10^4~10^6 cells/ml까지 정량분석이 가능함을 알 수 있다.

[73] *Nostoc*의 경우, 도 4에 나타낸 바와 같이, *rpo*B, *rbc*X, *rbc*S 유전자를 기반으로 제작된 프로브는 *Nostoc*와 특이적으로 반응하였다. 또한, 도 5에 나타낸 바와 같이, 10^1~10^3 cells/ml 농도구간에서는 *Nostoc*의 농도 변화와 상관없는 SNR값을 보였으나, 10^4~10^6 cells/ml 농도구간(*rpo*B)과 10^3~10^6 cells/ml 농도구간(*rbc*X, *rbc* S)에서 *Nostoc*의 농도가 증가함에 따라 SNR값도 비례적으로 증가하는 양의 상관관계(R^2>0.90)를 보여, 제작된 DNA 칩을 이용하여 *Nostoc*을 10^3 또는 10^4~10^6 cells/ml까지 정량분석이 가능함을 알 수 있다.

[74] *Anabaena*의 경우, 도 6에 나타낸 바와 같이, *rpo*B 유전자를 기반으로 제작된 프로브는 *Anabaena*와 특이적으로 반응하였다. 또한, 도 7에 나타낸 바와 같이, 10^1~10^3 cells/ml 농도구간에서는 *Anabaena*의 농도 변화와 상관없는 SNR값 보였으나, 10^3~10^6 cells/ml 농도구간에서 *Anabaena*의 농도가 증가함에 따라 SNR값도 비례적으로 증가하는 양의 상관관계(R^2>0.95)를 보여, 제작된 DNA 칩을 이용하여 *Anabaena*를 10^3~10^6 cells/ml까지 정량분석이 가능함을 알 수 있다.

[75] *Oscillatoria*의 경우, 도 8에 나타낸 바와 같이, ITS 유전자를 기반으로 제작된 프로브는 *Oscillatoria*와 특이적으로 반응하였다. 또한, 도 9에 나타낸 바와 같이, 10^1~10^3 cells/ml 농도구간에서는 *Oscillatoria*의 농도 변화와 상관없는 SNR값을 보였으나, 10^3~10^6 cells/ml 농도구간에서 *Oscillatoria*의 농도가 증가함에 따라 SNR값도 비례적으로 증가하는 양의 상관관계(R^2>0.95)를 보여, 제작된 DNA 칩을 이용하여 *Oscillatoria*를 10^3~10^6 cells/ml까지 정량분석이 가능함을 알 수 있다.

[76] *Phormidium*의 경우, 도 10에 나타낸 바와 같이, *mcy*E 유전자를 기반으로 제작된 프로브는 *Phormidium*와 특이적으로 반응하였다. 또한, 도 11에 나타낸 바와 같이, 10^1~10^3 cells/ml 농도구간에서는 *Phormidium*의 농도 변화와 상관없는 SNR값을 보였으나, 10^3~10^6 cells/ml 농도구간에서 *Phormidium*의 농도가 증가함에 따라 SNR값도 비례적으로 증가하는 양의 상관관계(R^2>0.95)를 보여, 제작된 DNA 칩을 이용하여 *Phormidium*를 10^4~10^6 cells/ml까지 정량분석이 가능함을 알 수 있다.

[77] *Aphanizomenon*의 경우, 도 12에 나타낸 바와 같이, *cpc*BA 유전자를 기반으로 제작된 프로브는 10^1~10^3 cells/ml 농도구간에서는 *Aphanizomenon*의 농도 변화와 상관없는 SNR값을 보였으나, 10^3~10^6 cells/ml 농도구간에서 *Aphanizomenon*의 농도가 증가함에 따라 SNR값도 비례적으로 증가하는 양의 상관관계(R^2>0.99)를 보여, 제작된 DNA 칩을 이용하여 *Aphanizomenon*를 10^3~10^6 cells/ml까지 정량분석이 가능함을 알 수 있다.

[78]

[79] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해하여야만 한다.

[80]

청구범위

[청구항 1] 서열번호 1 내지 서열번호 78로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열로 구성되는 프로브를 6종 이상 포함하는, 남조류 검출 및/또는 정량용 DNA 칩.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서, 상기 프로브의 타겟 유전자는 mcyE, cpcBA, ITS, rbcS, rbcX 또는 nifD인 것을 특징으로 하는, 남조류 검출 및/또는 정량용 DNA 칩.

[청구항 3] 제 1 항 있어서, 상기 남조류는 마이크로시스티스(*Microcystis*)속, 아나베나(*Anabaena*)속, 오실라토리아(*Oscillatoria*)속, 포미디움(*Phormidium*)속, 아파니조메논(*Aphanizomenon*)속 또는 노스톡(*Nostoc*)속인 것을 특징으로 하는, 남조류 검출 및/또는 정량용 DNA 칩.

[청구항 4] 제 3 항에 있어서, 상기 DNA 칩은
마이크로시스티스속의 검출 및/또는 정량용 프로브로서, 서열번호 4-6, 13-15, 22-24, 37-39, 46-48 및 73-75로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열로 구성되는 하나 이상의 프로브;
아나베나속의 검출 및/또는 정량용 프로브로서, 서열번호 1-3, 10-12, 19-21, 34-36, 43-45, 58-60 및 70-72로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열로 구성되는 하나 이상의 프로브;
오실라토리아속의 검출 및/또는 정량용 프로브로서, 서열번호 28-30, 52-54 및 64-66로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열로 구성되는 하나 이상의 프로브;
포미디움속의 검출 및/또는 정량용 프로브로서, 서열번호 31-33, 55-57 및 67-69로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열로 구성되는 하나 이상의 프로브;
아파니조메논속의 검출 및/또는 정량용 프로브로서, 서열번호 76-78로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열로 구성되는 하나 이상의 프로브; 및
노스톡속의 검출 및/또는 정량용 프로브로서, 서열번호 7-9, 16-18, 25-27, 40-42, 49-51 및 61-63로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기서열로 구성되는 하나 이상의 프로브;
를 포함하는 것을 특징으로 하는, 남조류 검출 및/또는 정량용 DNA 칩.

[청구항 5] 제 3 항에 있어서, 상기 마이크로시스티스 속은 *마이크로시스티스 애루기노사(Microcystis aeruginosa)*를 포함하는 것을 특징으로 하는, 남조류 검출 및/또는 정량용 DNA 칩.

[청구항 6] 제 3 항에 있어서, 상기 아나베나 속은 *아나베나*

프로스-아퀴(Anabaena flos-aquae), *아나베나 바리아빌리스(Anabaena variabilis)*, *아나베나 sp.PCC 7120 (Anabaena sp. PCC 7120)*, 및 *아나베나 BIR 시리즈(Anabaena sp. BIR series)*를 포함하는 것을 특징으로 하는, 남조류 검출 및/또는 정량용 DNA 칩.

[청구항 7] 제 3 항에 있어서, 상기 오실라토리아 속은 *오실라토리아 산크타(Oscillatoria sancta)*, *오실라토리아 테누이스(Oscillatoria tenuis)*, *오실라토리아 sp. 18R(Oscillatoria sp. 18R)*, 및 *오실라토리아 sp. 19R(Oscillatoria sp. 19R)*을 포함하는 것을 특징으로 하는, 남조류 검출 및/또는 정량용 DNA 칩.

[청구항 8] 제 3 항에 있어서, 상기 포미디움 속은 *포미디움 cf. 이리굼(Phormidium* cf. *irriguum)*, *포미디움 암비굼(Phormidium ambiguum)*, *포미디움 sp. 4-19b(Phormidium sp. 4-19b)*, *포미디움 sp. 1-6c(Phormidium sp. 1-6c)*, 및 *포미디움 sp. 2-26b3(Phormidium sp. 2-26b3)*을 포함하는 것을 특징으로 하는, 남조류 검출 및/또는 정량용 DNA 칩.

[청구항 9] 제 3 항에 있어서, 상기 아파니조메논 속은 *아파니조메논 프로스-아퀴(Aphanizomenon flos-aquae)*를 포함하는 것을 특징으로 하는, 남조류 검출 및/또는 정량용 DNA 칩.

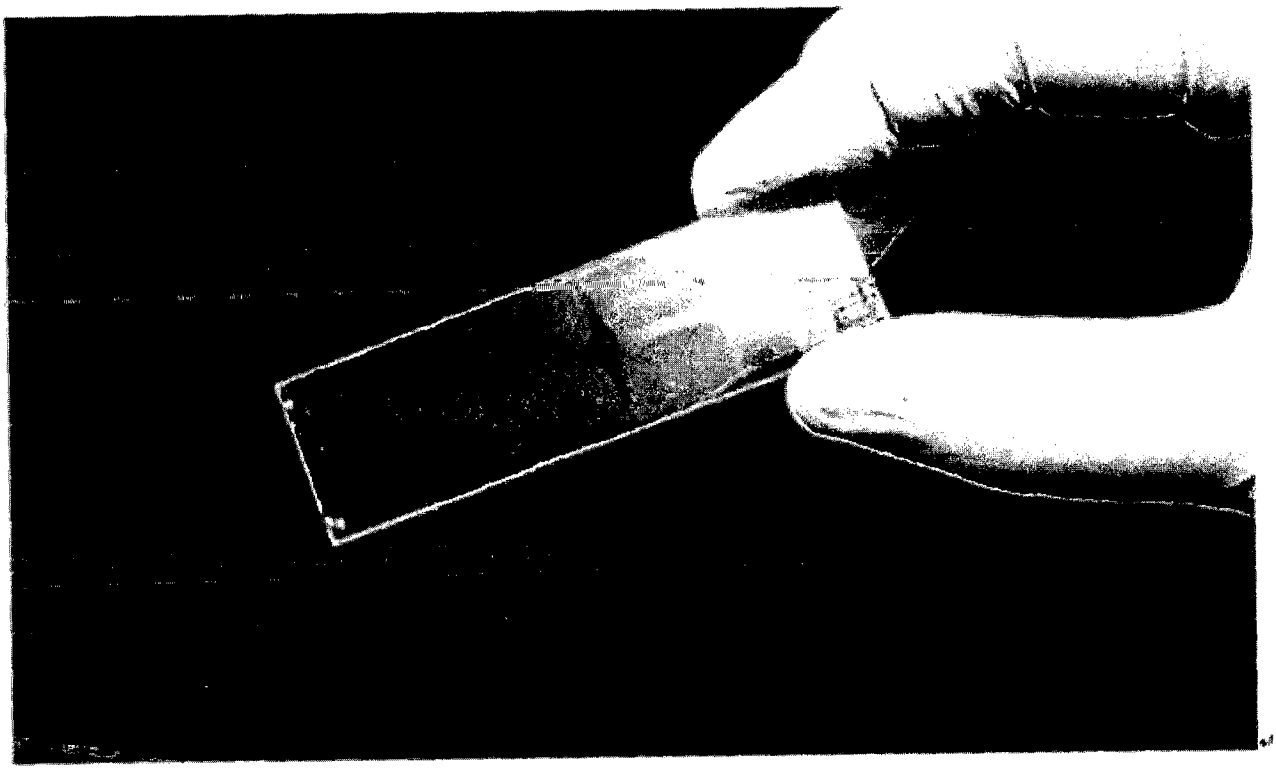
[청구항 10] 제 3 항에 있어서, 상기 노스톡 속은 *노스톡 펑크티포르메(Nostoc punctiforme)*, *노스톡 링키아(Nostoc linckia)*, *노스톡 스폰지포르메(Nostocspongiaeforme)*, 및 *노스톡 무스코룸(Nostoc muscorum)*을 포함하는 것을 특징으로 하는, 남조류 검출 및/또는 정량용 DNA 칩.

[청구항 11] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 DNA 칩은 프로브 집적부위(well)가 6개로 구획되어 있는 것을 특징으로 하는, 남조류 검출 및/또는 정량용 DNA 칩.

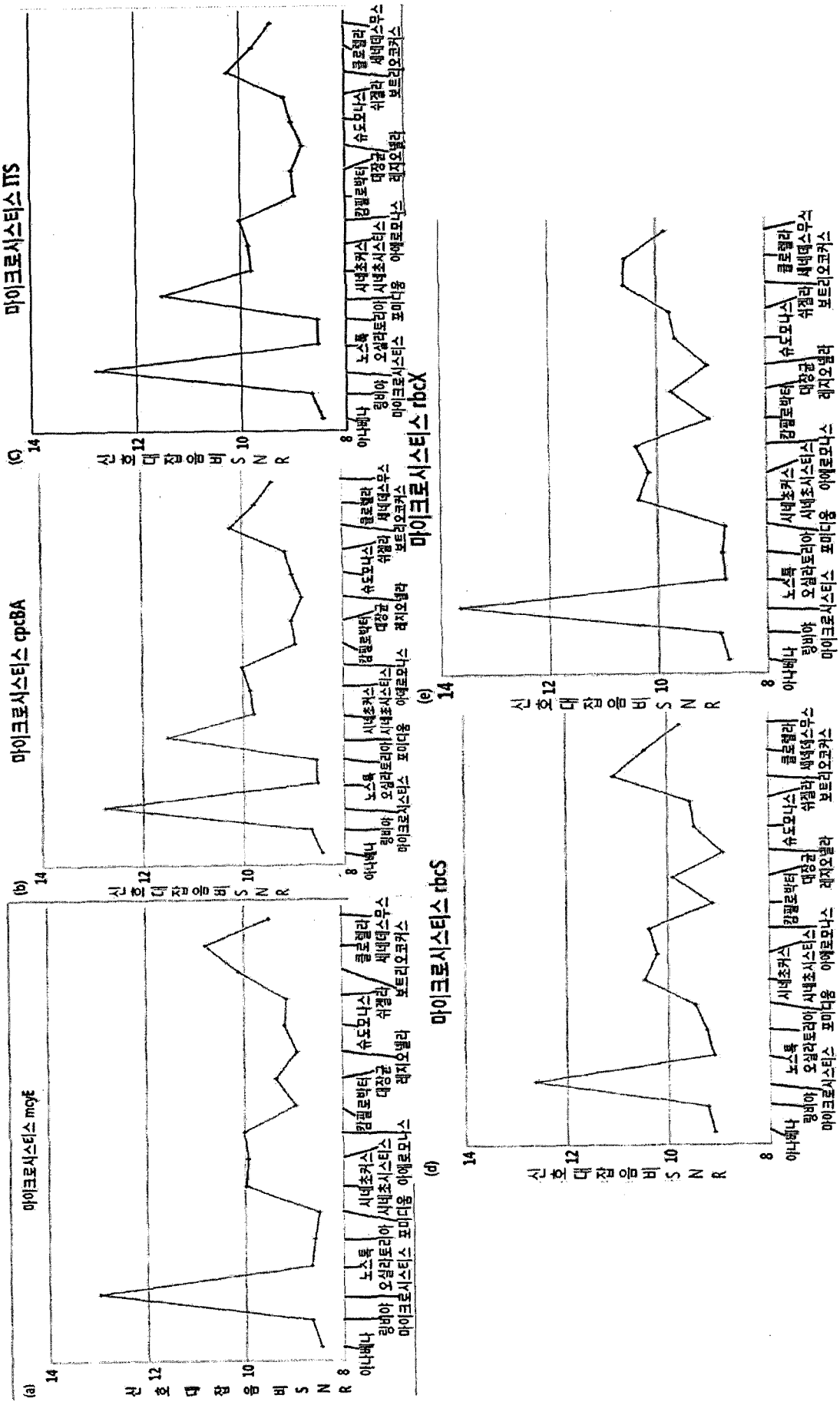
[청구항 12] 하기의 단계를 포함하는, 남조류의 검출 및/또는 정량방법:
남조류 샘플에서 게놈 DNA를 추출하는 단계;
상기 추출된 게놈 DNA를 절편화 및 표지하는 단계;
상기 표지된 DNA를 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 DNA 칩에 혼성화 반응시키는 단계; 및
상기 혼성화 정도에 따라 남조류의 종류 및 양을 판별하는 단계.

[청구항 13] 제 12 항에 있어서, 상기 남조류는 마이크로시스티스(*Microcystis*)속, 아나베나(*Anabaena*)속, 오실라토리아(*Oscillatoria*)속, 포미디움(*Phormidium*)속, 아파니조메논(*Aphanizomenon*)속 또는 노스톡(*Nostoc*)속인 것을 특징으로 하는, 남조류의 검출 및/또는 정량방법.

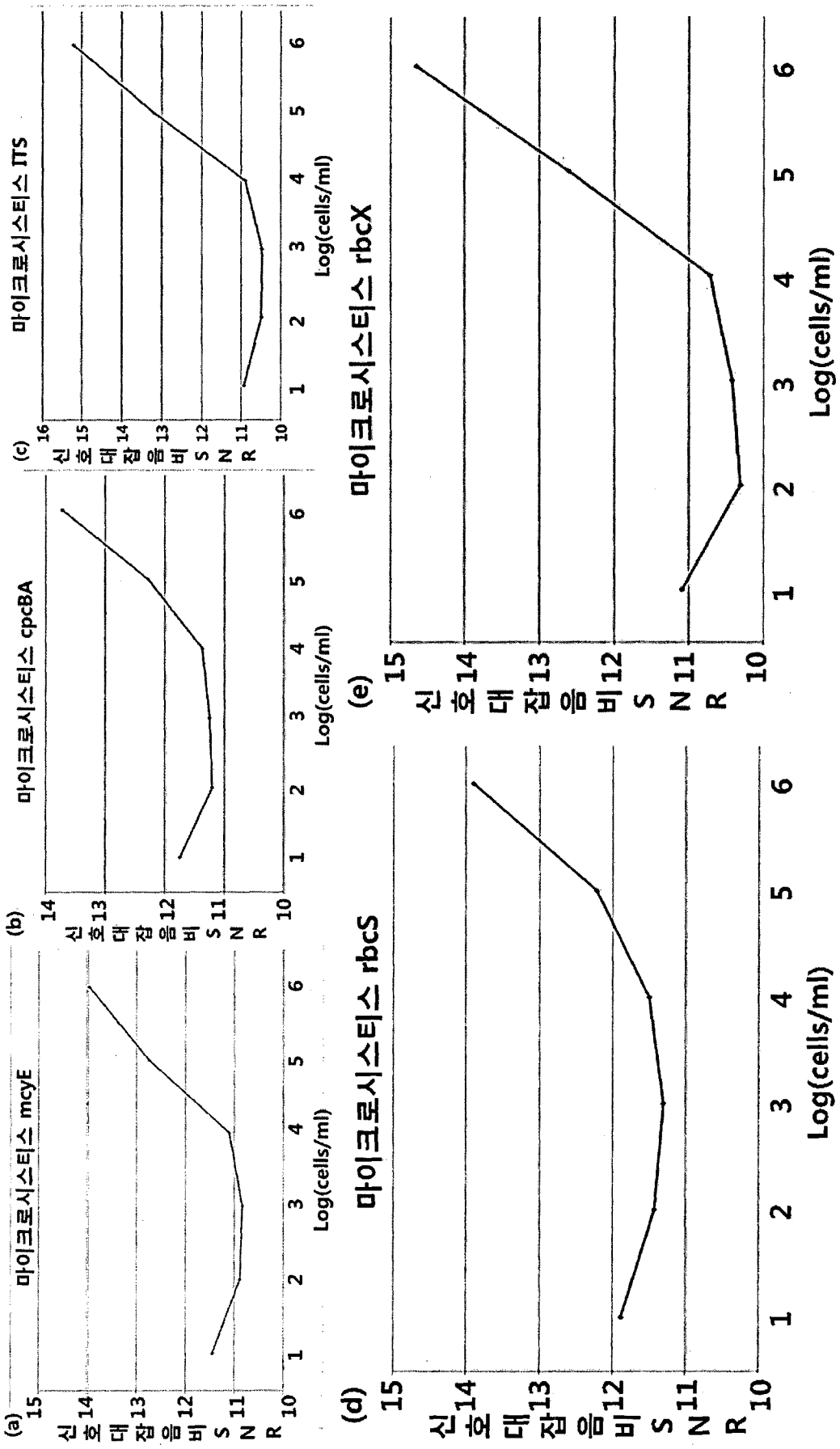
[Fig. 1]



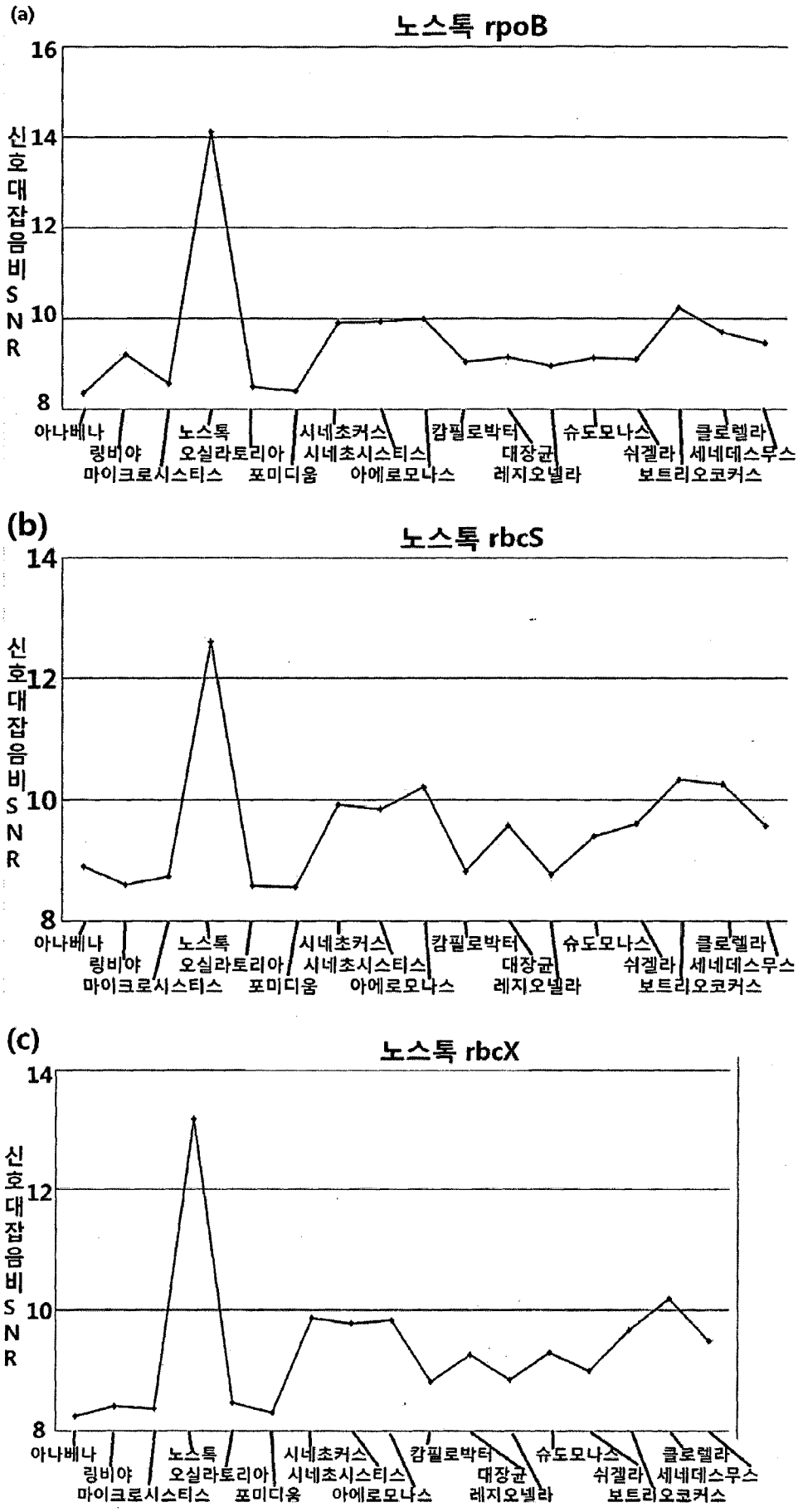
[Fig. 2]


(a)
마이크로시스티스 mcyE
(b)
마이크로시스티스 cpcBA
(c)
마이크로시스티스 ITS
(d)
마이크로시스티스 rbcS
(e)
마이크로시스티스 rbcX
신호대잡음비 S N R
14
12
10
8
아나베나
링비아
마이크로시스티스
오실라토리아
노스톡
포미디움
시네초커스
시네초시스티스
아에로모나스
캄필로박터
대장균
레지오넬라
슈도모나스
쉬겔라
보트리오코커스
세네덱스무스
클로렐라

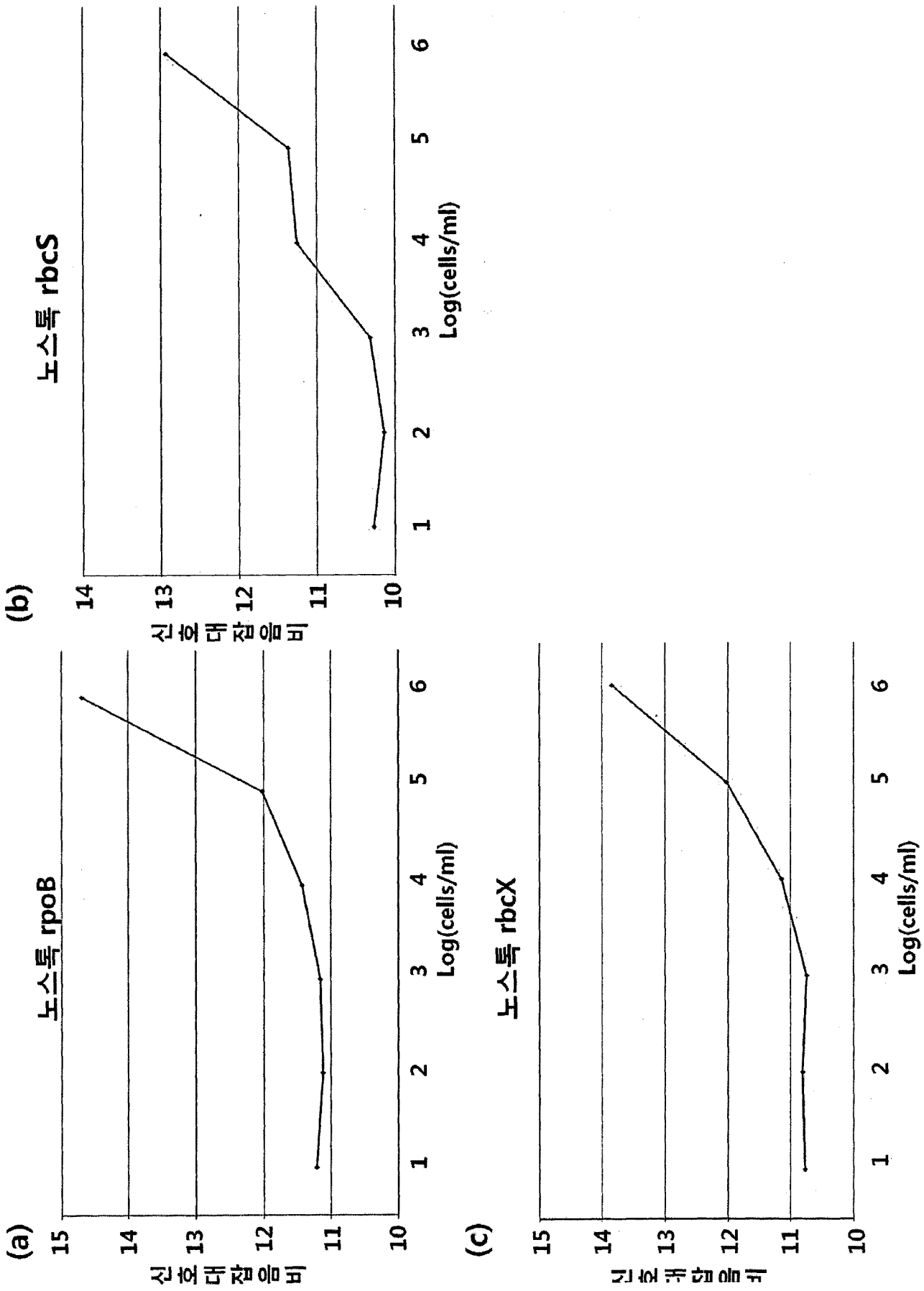
[Fig. 3]


(a)
마이크로시스티스 mcyE
(b)
마이크로시스티스 cpcBA
(c)
마이크로시스티스 ITS
(d)
마이크로시스티스 rbcS
(e)
마이크로시스티스 rbcX
신호
대
잡음
비
S
N
R
Log(cells/ml)

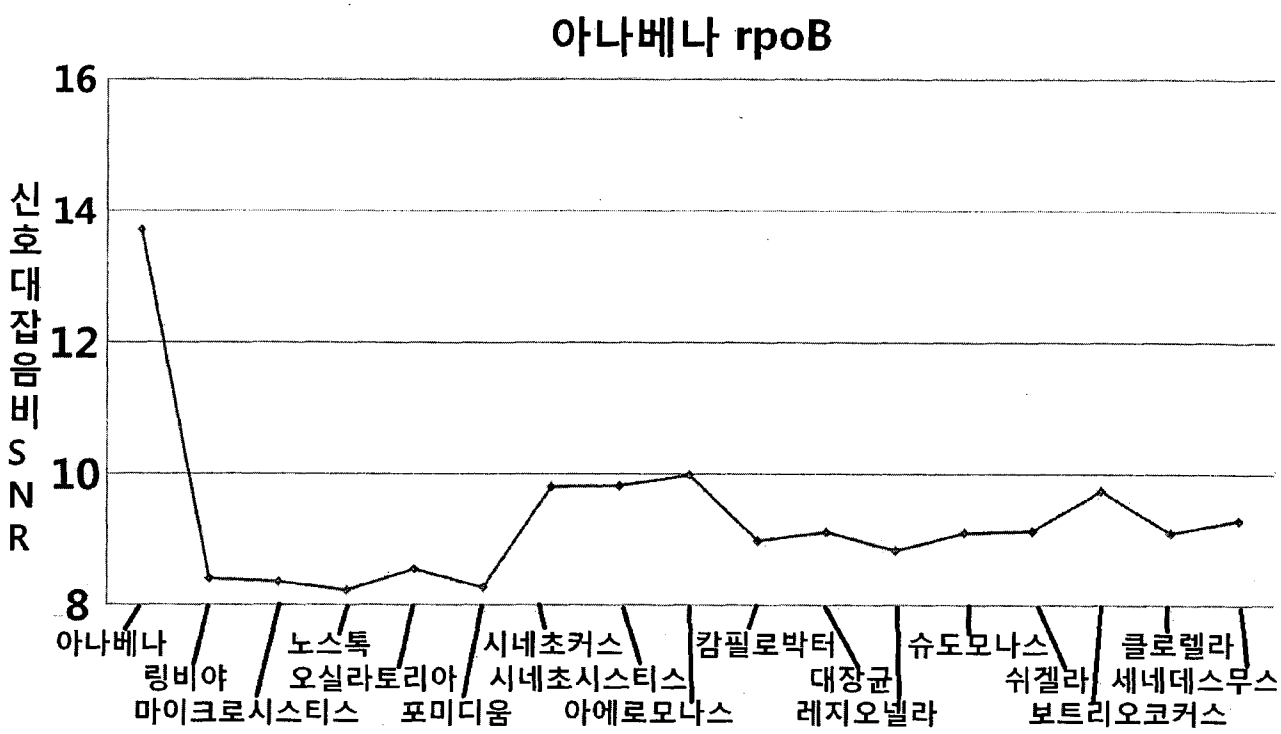
[Fig. 4]


(a)
노스톡 rpoB
신호대잡음비 SNR
16
14
12
10
8
아나베나
링비야
마이크로시스티스
노스톡
오실라토리아
포미디움
시네초커스
시네초시스티스
아에로모나스
캄필로박터
대장균
레지오넬라
슈도모나스
쉬겔라
보트리오코커스
클로렐라
세네데스무스
(b)
노스톡 rbcS
신호대잡음비 SNR
14
12
10
8
아나베나
링비야
마이크로시스티스
노스톡
오실라토리아
포미디움
시네초커스
시네초시스티스
아에로모나스
캄필로박터
대장균
레지오넬라
슈도모나스
쉬겔라
보트리오코커스
클로렐라
세네데스무스
(c)
노스톡 rbcX
신호대잡음비 SNR
14
12
10
8
아나베나
링비야
마이크로시스티스
노스톡
오실라토리아
포미디움
시네초커스
시네초시스티스
아에로모나스
캄필로박터
대장균
레지오넬라
슈도모나스
쉬겔라
보트리오코커스
클로렐라
세네데스무스

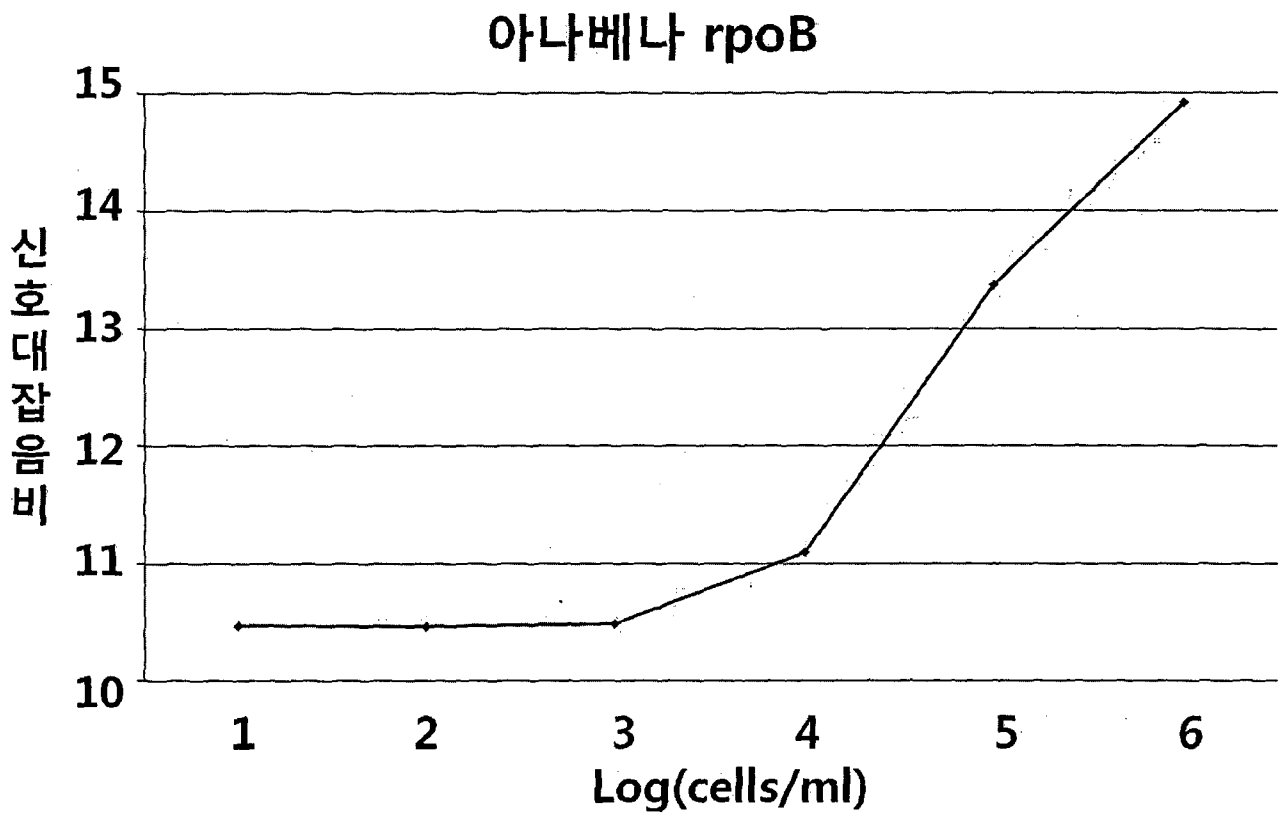
[Fig. 5]


(a)
노스톡 rpoB
신호 대 잡음비
Log(cells/ml)
(b)
노스톡 rbcS
신호 대 잡음비
Log(cells/ml)
(c)
노스톡 rbcX
Log(cells/ml)

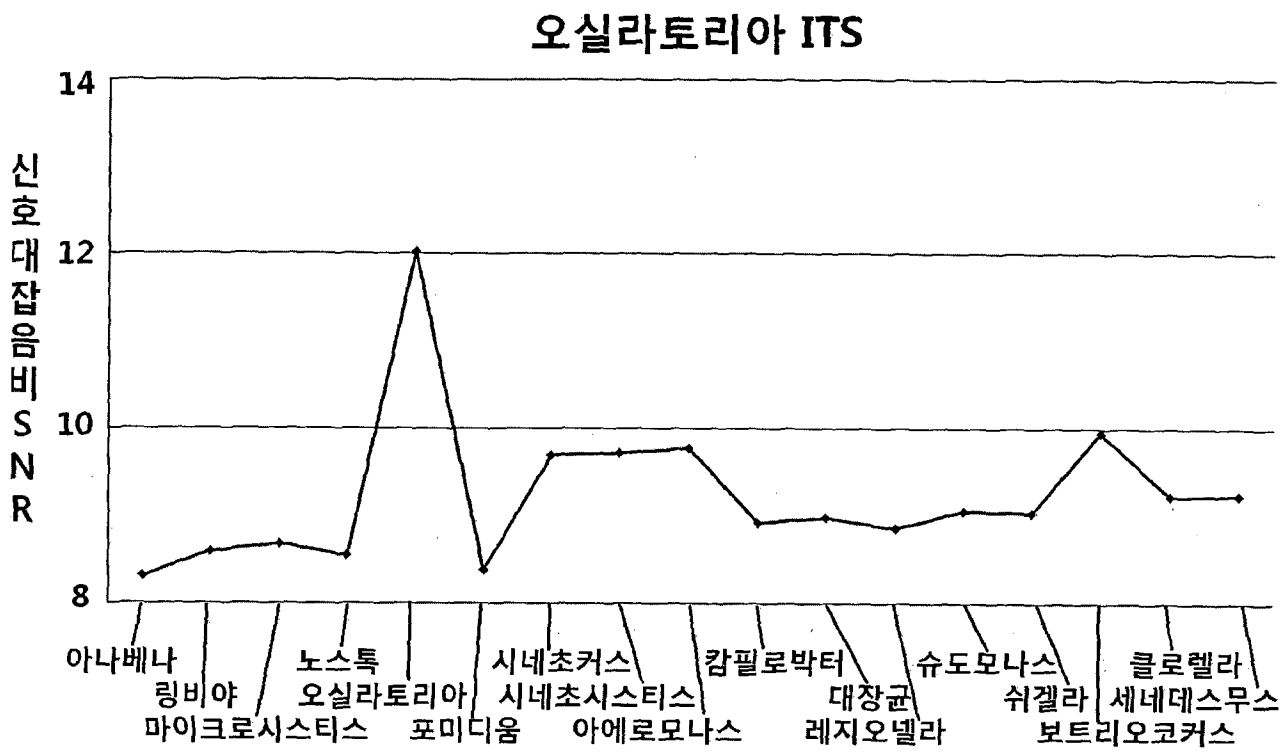
[Fig.6]


아나베나 rpoB
신호대잡음비 SNR
16
14
12
10
8
아나베나
링비야 마이크로시스티스
노스톡 오실라토리아 포미디움
시네초커스 시네초시스티스 아에로모나스
캄필로박터
대장균 레지오넬라
슈도모나스
쉬겔라
클로렐라 세네데스무스 보트리오코커스

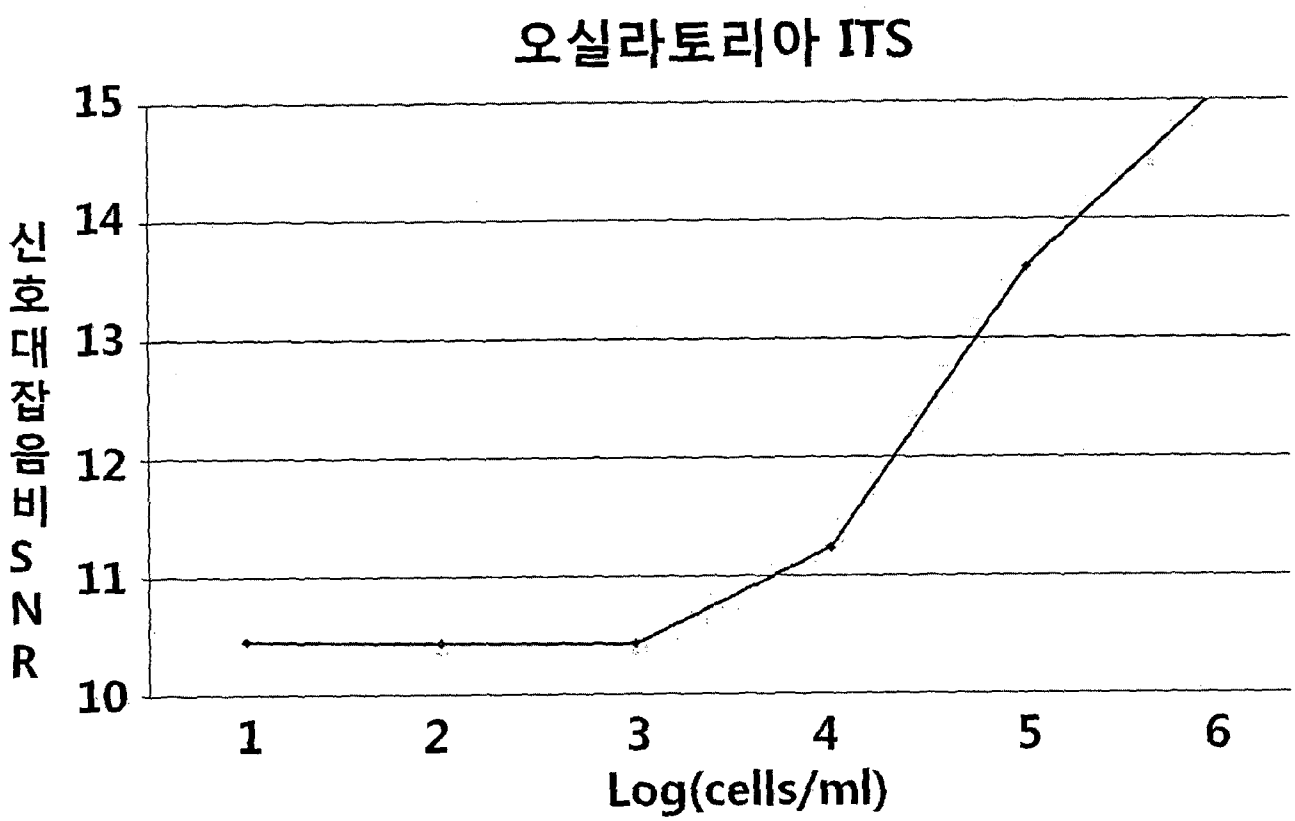
[Fig. 7]



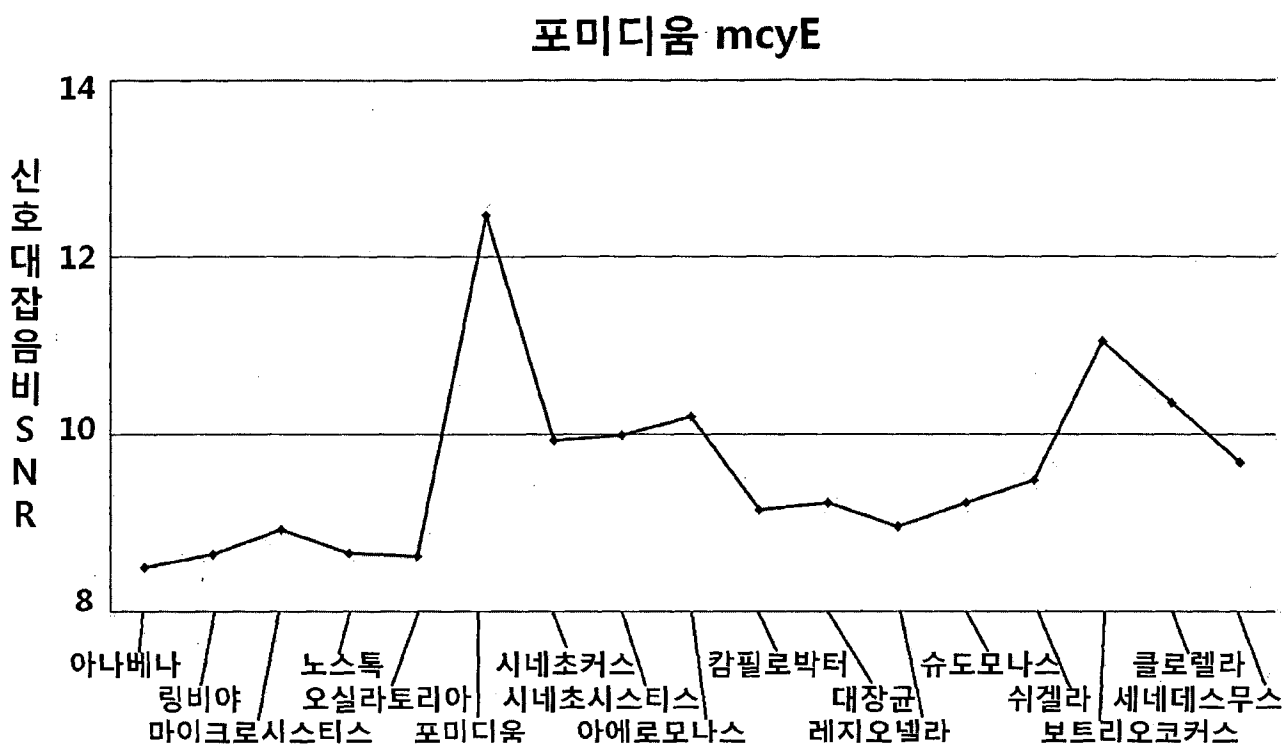
[Fig. 8]


오실라토리아 ITS
신호대잡음비 SNR
14
12
10
8
아나베나
링비야
마이크로시스티스
노스톡
오실라토리아
포미디움
시네초커스
시네초시스티스
아에로모나스
캄필로박터
대장균
레지오넬라
슈도모나스
쉬겔라
보트리오코커스
클로렐라
세네데스무스

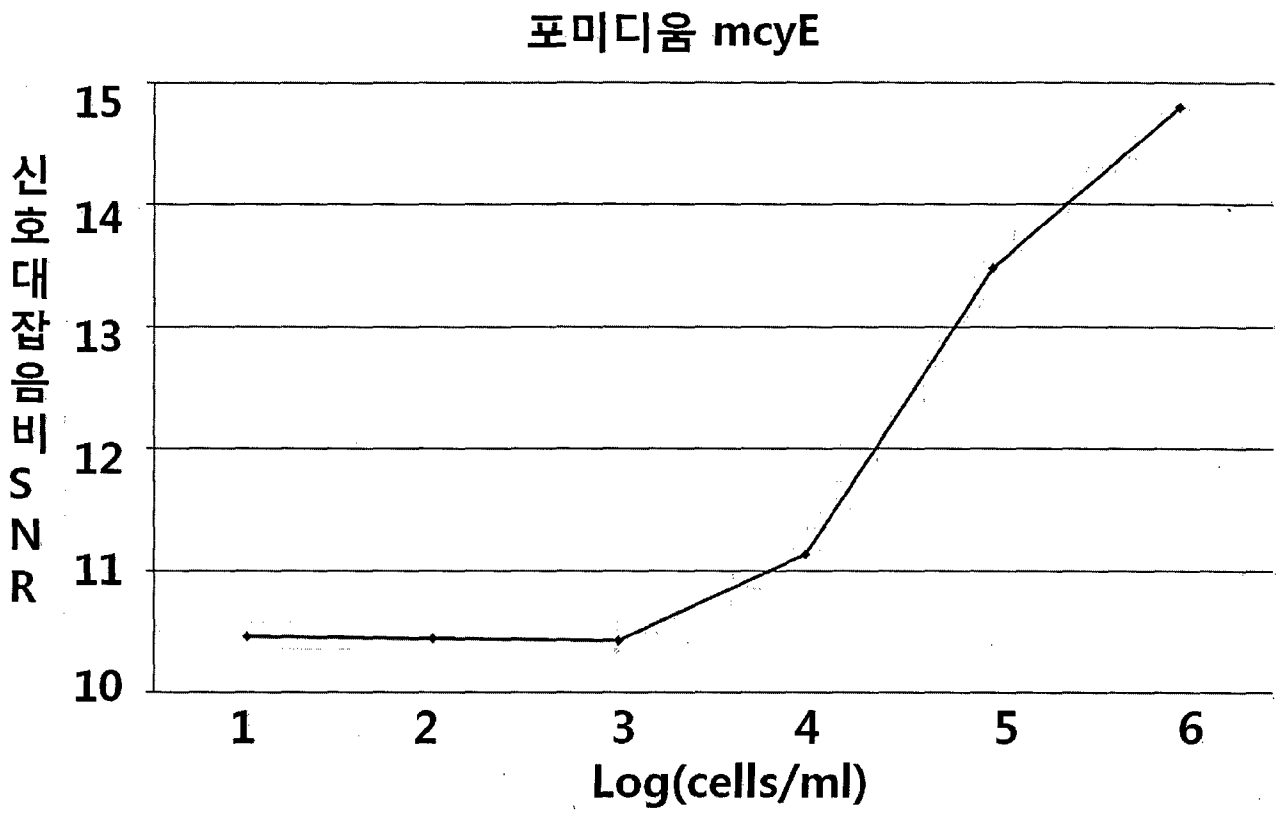
[Fig. 9]



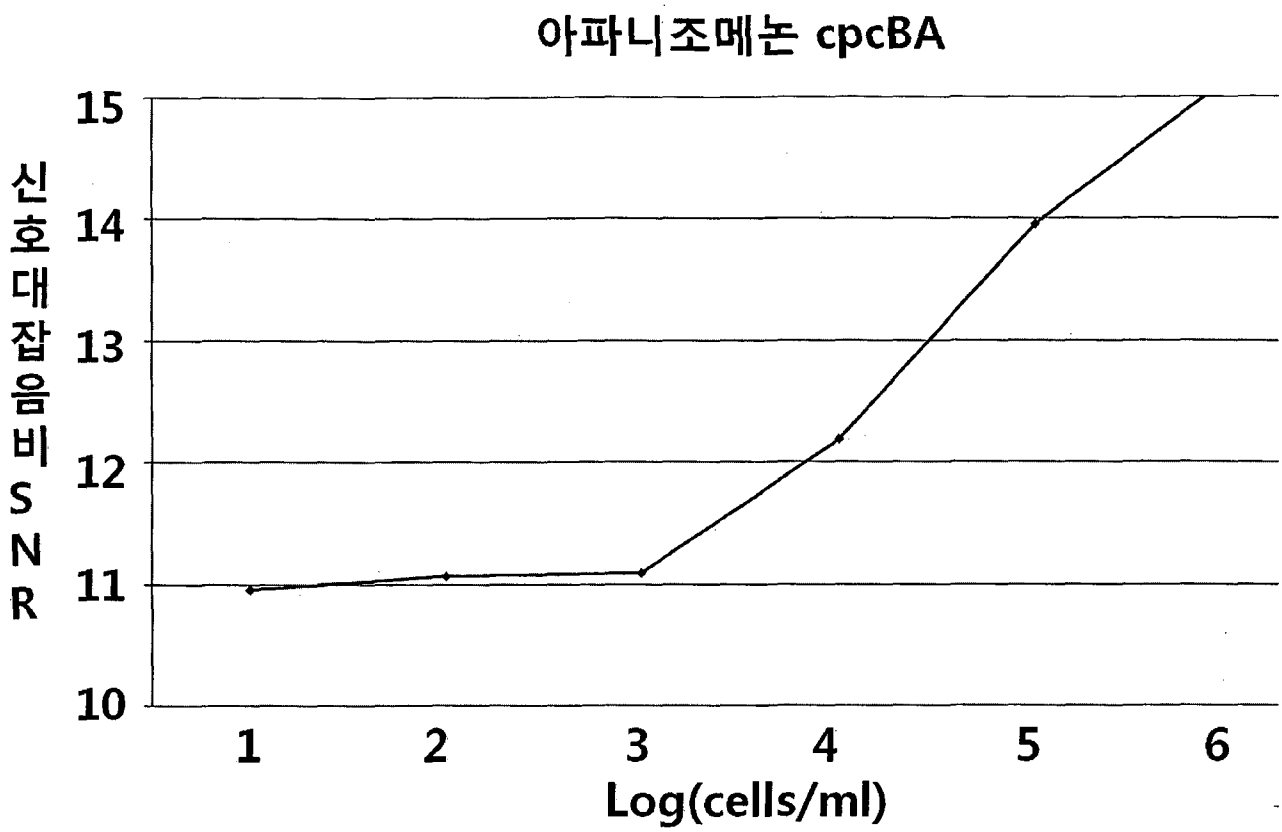
[Fig. 10]


포미디움 mcyE
신호대잡음비 SNR
14
12
10
8
아나베나
링비야
마이크로시스티스
노스톡
오실라토리아
포미디움
시네초커스
시네초시스티스
아에로모나스
캄필로박터
대장균
레지오넬라
슈도모나스
쉬겔라
보트리오코커스
클로렐라
세네데스무스

[Fig. 11]



[Fig. 12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/001911

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2006.01)i, C12Q 1/04(2006.01)i, C12N 15/11(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; C12N 15/11

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: blue-green algae, cyanobacteria, detection, DNA chip, probe

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RANTALA et al., "Identification of hepatotoxin-producing cyanobacteria by DNA-chip" Environmental Microbiology, vol. 10, no. 3, pp. 653-664 (2008) See abstract, pages 660-661 and tables 1-2.	1-13
A	CASTIGLIONI et al., "Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16S rRNA gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria" Applied and Environmental Microbiology, vol. 70, no. 12, pp. 7161-7172 (2004) See abstract, pages 7165-7167 and tables 1-4.	1-13
A	RUDI et al., "Quantification of toxic cyanobacteria in water by use of competitive PCR followed by sequence-specific labeling of oligonucleotide probes" Applied and Environmental Microbiology, vol. 64, no. 7, pp. 2639-2643 (1998) See the entire document.	1-13
A	SIPARI et al., "Development of a chip assay and quantitative PCR for detecting microcystin synthetase E gene expresssion" Applied and Environmental Microbiology, vol. 76, no. 12, pp. 3797-3805 (2010) See the entire document.	1-13

☒ 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	Date of mailing of the international search report
05 JUNE 2014 (05.06.2014)	**05 JUNE 2014 (05.06.2014)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2014/001911

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2008-0088146 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 02 October 2008 See the entire document.	1-13
A	KR 10-2003-0077119 A (HANYANG HAK WON CO., LTD.) 01 October 2003 See the entire document.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2014/001911

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2008-0088146 A	02/10/2008	KR 10-0863325 B1	15/10/2008
KR 10-2003-0077119 A	01/10/2003	KR 10-0431586 B1	17/05/2004

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/001911

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12Q 1/68(2006.01)i, C12Q 1/04(2006.01)i, C12N 15/11(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12Q 1/68; C12Q 1/04; C12N 15/11

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: 남조류, 검출, DNA 칩, 프로브

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	RANTALA 외, 'Identification of hepatotoxin□producing cyanobacteria by DNA□chip' Environmental Microbiology, Vol.10, No.3, pp.653-664 (2008) 요약, 페이지 660-661 및 표 1-2 참조.	1-13
A	CASTIGLIONI 외, 'Development of a universal microarray based on the ligation detection reaction and 16S rRNA gene polymorphism to target diversity of cyanobacteria' Applied and Environmental Microbiology, Vol.70, No.12, pp.7161-7172 (2004) 요약, 페이지 7165-7167 및 표 1-4 참조.	1-13
A	RUDI 외, 'Quantification of toxic cyanobacteria in water by use of competitive PCR followed by sequence-specific labeling of oligonucleotide probes' Applied and Environmental Microbiology, Vol.64, No.7, pp.2639-2643 (1998) 전체 문헌 참조.	1-13
A	SIPARI 외, 'Development of a chip assay and quantitative PCR for detecting microcystin synthetase E gene expression' Applied and Environmental Microbiology, Vol.76, No.12, pp.3797-3805 (2010) 전체 문헌 참조.	1-13

☒ 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

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

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

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

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2014년 06월 05일 (05.06.2014)	2014년 06월 05일 (05.06.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관
김승범
전화번호 +82-42-481-3371

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2014/001911

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2008-0088146 A (한국생명공학연구원) 2008.10.02 전체 문헌 참조.	1-13
A	KR 10-2003-0077119 A (학교법인 한양학원) 2003.10.01 전체 문헌 참조.	1-13

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/001911

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2008-0088146 A	2008/10/02	KR 10-0863325 B1	2008/10/15
KR 10-2003-0077119 A	2003/10/01	KR 10-0431586 B1	2004/05/17