



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월06일
(11) 등록번호 10-1834923
(24) 등록일자 2018년02월27일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2013.01)
C12Q 2600/156 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-0063390</p> <p>(22) 출원일자 2017년05월23일
심사청구일자 2017년05월23일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
J. Debode et al. Plant Pathology (2009) 58,
504-514.
(뒷면에 계속)</p> | <p>(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
오상근
대전광역시 서구 관저로 83, 203동 1303호(
관저동, 신선마을아파트)</p> <p>장현아
대전광역시 서구 월평북로 11, 207동 402호(월평
동, 주공아파트)</p> <p>(74) 대리인
최규환</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 5 항

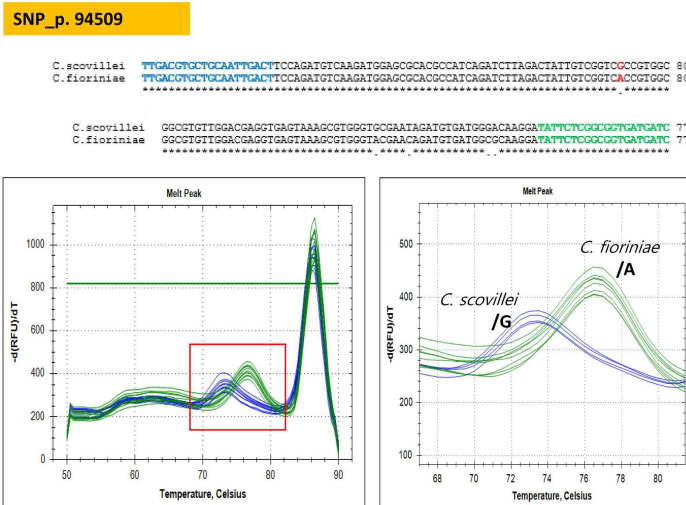
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 콜레토티리쿰 속의 종을 구별하기 위한 마커 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 콜레토티리쿰 피오리니아(*Colletotrichum fioriniae*)와 콜레토티리쿰 스코빌레이(*C. scovillei*)를 구별하기 위한 마커 조성물, 상기 마커 조성물을 포함하는 키트, 및 상기 마커 조성물을 이용한 탄저병 의심 시료로부터 콜레토티리쿰 피오리니아 또는 콜레토티리쿰 스코빌레이를 검출하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 마커 조성물은 탄저병의 분자생물학적 진단 방법에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



(56) 선행기술조사문헌

Zhang, Xiaoyu, Graduate Theses and
Dissertations. 14892. Iowa State
University(2015)
Riccardo Baroncelli et al. PLoS ONE 10(6):
e0129140
iccardo Baroncelli et al. Genome Announc.
2(2):e00112-14.
KR1020160057655 A

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 G02A01540124501

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원

연구사업명 지역주력산업육성사업 창의융합 R&D

연구과제명 계놈 수준의 진단을 위한 GBS 시스템 확립 및 서비스 모델 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)씨더스

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트와 서열번호 13의 올리고뉴클레오타이드 프로브; 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트와 서열번호 14의 올리고뉴클레오타이드 프로브; 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트와 서열번호 15의 올리고뉴클레오타이드 프로브; 서열번호 7 및 서열번호 8의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트와 서열번호 16의 올리고뉴클레오타이드 프로브; 서열번호 9 및 서열번호 10의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트와 서열번호 17의 올리고뉴클레오타이드 프로브; 및 서열번호 11 및 서열번호 12의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트와 서열번호 18의 올리고뉴클레오타이드 프로브로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트와 프로브를 포함하는 콜레토티리쿰 피오리니아에(*Colletotrichum fioriniae*)와 콜레토티리쿰 스코빌레이(*Colletotrichum scovillei*)를 구별하기 위한 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트와 서열번호 13의 올리고뉴클레오타이드 프로브; 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트와 서열번호 14의 올리고뉴클레오타이드 프로브; 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트와 서열번호 15의 올리고뉴클레오타이드 프로브; 서열번호 7 및 서열번호 8의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트와 서열번호 16의 올리고뉴클레오타이드 프로브; 서열번호 9 및 서열번호 10의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트와 서열번호 17의 올리고뉴클레오타이드 프로브; 및 서열번호 11 및 서열번호 12의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트와 서열번호 18의 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하는 콜레토티리쿰 피오리니아에(*Colletotrichum fioriniae*)와 콜레토티리쿰 스코빌레이(*Colletotrichum scovillei*)를 구별하기 위한 마커 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 마커 조성물 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 콜레토티리쿰 피오리니아에(*Colletotrichum fioriniae*)와 콜레토티리쿰 스코빌레이(*Colletotrichum scovillei*)를 구별하기 위한 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 5

탄저병(anthrachnose) 감염 의심 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항 또는 제2항의 마커 조성물을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 콜레토티리쿰 피오리니아에(*Colletotrichum fioriniae*) 또는 콜레토티리쿰 스코빌레이(*Colletotrichum scovillei*)를 검출하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 콜레토티리쿰 속의 콜레토티리쿰 피오리니아에(*Colletotrichum fioriniae*)와 콜레토티리쿰 스코빌레이(*Colletotrichum scovillei*)를 구별하기 위한 마커 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 탄저병(Anthracnose)은 불완전균류인 콜레토티리쿰 속(*Colletotrichum* spp.)의 사상균에 의해 일어나는 식물의 병해로서, 곡류·콩류·야채·과수 및 수목 등 유용식물의 잎, 줄기와 과실 등에 발생하며 갈색의 선명한 병반

을 만들고 때론 검게 패인 피저를 만든다. 대표적으로 고추 탄저병은 국내외에서 고추 재배에 가장 많은 피해를 주는 병 중의 하나로서, 발생이 심한 해에는 연중 생산량의 10% 이상의 감소를 초래하기도 하며, 해외 종자 수출 대상국에서도 많은 피해를 주고 있다. 현재 가장 많은 분포를 나타내는 종은 콜레토틱리쿰 아쿠타툼(*C. acutatum*)으로 보고되어 있으며, 그 외 콜레토틱리쿰 스코빌레이(*C. scovillei*)와 콜레토틱리쿰 글로에오스포리오이데스(*C. gloeosporioides*)가 있다. 고추와 더불어 탄저병의 피해가 가장 큰 작물인 구기자는 콜레토틱리쿰 피오리니아에(*C. fioriniae*)에 의해 주로 발생하는 것으로 알려져 있다. 그러나 아직까지 농가에서는 탄저병 방제를 위해 주로 약제에 의한 화학적 방제가 주로 이루어지고 있고, 이는 농약의 잔류, 인축에 대한 독성, 토양 오염 등을 초래할 수 있다는 위험성이 꾸준히 제기되고 있는 실정이다.

[0003] 식물 병원균의 분자생물학적 분류 체계는 주로 ITS(internal transcribed spacer) 영역의 염기서열을 비교 분석하여 종을 결정하지만, 최근 환경적인 요인의 영향으로 다양한 변이들의 발생과 다양화로 인하여 ITS 영역에 의한 분류에 한계를 보이고 있다. 또한, NGS(next generation sequencing) 분석을 통한 생물정보 분석으로부터 생산되는 SNP(single nucleotide polymorphism) 마커는 Real-time PCR을 이용한 HRM(high resolution melt) 방법을 통해 검증되고 있으나 핵산의 물리적 한계(Tm 값이 너무 작음)로 인하여 HRM 방법으로 충분히 SNP를 검증하지 못하는 경우가 많이 발생하고 있다.

[0004] 본 발명자들은 HRM 방법을 보완한 루나 프로브(Luna probe) 방법을 이용하여 SNP 검증 시스템을 구축하였고, 이를 이용하여 기주로서 각각 구기자와 고추를 감염시키는 콜레토틱리쿰 속의 콜레토틱리쿰 피오리니아에(*C. fioriniae*)와 콜레토틱리쿰 스코빌레이(*C. scovillei*)를 구분할 수 있는 종 특이적 프라이머와 루나 프로브를 개발하였다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제1642772호에는 콜레토틱리쿰 아쿠타툼(*C. acutatum*)의 AUTOPHAGY8 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머와 프로브를 포함하는 '고추 탄저병 검출용 조성물 및 이를 이용한 고추 탄저병 검출 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제0487092호에는 콜레토틱리쿰 글로에오스포리오이데스(*C. gloeosporioides*)를 검출할 수 있는 '단감나무 탄저병 병원균 검출용 DNA 표지인자'가 개시되어 있으나, 본 발명의 콜레토틱리쿰 피오리니아에(*Colletotrichum fioriniae*)와 콜레토틱리쿰 스코빌레이(*Colletotrichum scovillei*)를 구별하기 위한 마커 조성물 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 구기자와 고추로부터 탄저병균인 콜레토틱리쿰 속 병원균을 추출하여, 각 병원균의 게놈 DNA를 기반으로 콜레토틱리쿰 속의 종을 구별할 수 있는 6개의 SNP 마커를 개발하였다. 또한, 상기 SNP 마커를 검증할 수 있도록 PCR 프라이머 세트와 각 SNP 위치 염기를 포함하는 루나 프로브를 제작하여 콜레토틱리쿰 피오리니아에(*Colletotrichum fioriniae*)와 콜레토틱리쿰 스코빌레이(*C. scovillei*)의 게놈 DNA를 주형으로 real-time RCR을 수행한 결과, 본 발명의 SNP 마커, 상기 SNP 마커에 대한 프라이머 세트 및 프로브가, 효과적으로 콜레토틱리쿰 피오리니아에와 콜레토틱리쿰 스코빌레이를 구별할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 정방향 및 역방향 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트와 SNP 위치 염기를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 프로브로 이루어진 총 6 세트의 콜레토틱리쿰 피오리니아에(*Colletotrichum fioriniae*)와 콜레토틱리쿰 스코빌레이(*C. scovillei*)를 구별하기 위한 마커 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 마커 조성물 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 콜레토틱리쿰 피오리니아에와 콜레토틱리쿰 스코빌레이를 구별하기 위한 키트를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 탄저병(anthraco) 감염 의심 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 마커 조성물을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 콜레토틱리쿰 피오리니아에 또는 콜레토틱리쿰 스코빌레이를 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 콜레토티리쿰 속의 종을 구별할 수 있는 마커 조성물 및 검출 방법은 주요 작물의 생장 및 생산성에 큰 피해를 끼치는 탄저병의 원인균 중, 콜레토티리쿰 피오리니아에(*Colletotrichum fioriniae*)와 콜레토티리쿰 스코빌레이(*C. scovillei*)를 효과적으로 구별할 수 있어, 탄저병의 분자생물학적 진단 방법에 유용하게 이용될 수 있을 것이다. 또한, 본 발명은 루나 프로브를 사용함으로써, 기존 방법 대비 저비용 고효율로 유전형 분석을 가능하게 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 SNP_position 94509에 대한 프라이머 세트와 프로브를 이용한 콜레토티리쿰 피오리니아에(*C. fioriniae*)와 콜레토티리쿰 스코빌레이(*C. scovillei*)의 염기서열 얼라인먼트(alignment) 결과와 유전형 분석 결과(melt peak)이다.

도 2는 SNP_position 23316에 대한 프라이머 세트와 프로브를 이용한 콜레토티리쿰 피오리니아에와 콜레토티리쿰 스코빌레이의 염기서열 얼라인먼트 결과와 유전형 분석 결과이다.

도 3은 SNP_position 26688에 대한 프라이머 세트와 프로브를 이용한 콜레토티리쿰 피오리니아에와 콜레토티리쿰 스코빌레이의 염기서열 얼라인먼트 결과와 유전형 분석 결과이다.

도 4는 SNP_position 118638에 대한 프라이머 세트와 프로브를 이용한 콜레토티리쿰 피오리니아에와 콜레토티리쿰 스코빌레이의 염기서열 얼라인먼트 결과와 유전형 분석 결과이다.

도 5는 SNP_position 58206에 대한 프라이머 세트와 프로브를 이용한 콜레토티리쿰 피오리니아에와 콜레토티리쿰 스코빌레이의 염기서열 얼라인먼트 결과와 유전형 분석 결과이다.

도 6은 SNP_position 69645에 대한 프라이머 세트와 프로브를 이용한 콜레토티리쿰 피오리니아에와 콜레토티리쿰 스코빌레이의 염기서열 얼라인먼트 결과와 유전형 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트와 서열번호 13의 올리고뉴클레오티드 프로브; 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트와 서열번호 14의 올리고뉴클레오티드 프로브; 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트와 서열번호 15의 올리고뉴클레오티드 프로브; 서열번호 7 및 서열번호 8의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트와 서열번호 16의 올리고뉴클레오티드 프로브; 서열번호 9 및 서열번호 10의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트와 서열번호 17의 올리고뉴클레오티드 프로브; 및 서열번호 11 및 서열번호 12의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트와 서열번호 18의 올리고뉴클레오티드 프로브로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트와 프로브를 포함하는 콜레토티리쿰 피오리니아에(*Colletotrichum fioriniae*)와 콜레토티리쿰 스코빌레이(*Colletotrichum scovillei*)를 구별하기 위한 마커 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 마커 조성물은 바람직하게는 상기 6개의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트와 프로브로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상, 2개, 3개, 4개, 5개 이상의 프라이머 세트와 프로브를 포함할 수 있고, 6개의 프라이머 세트와 프로브 모두를 포함할 수도 있다.

[0014] 본 발명의 상기 마커 조성물은 콜레토티리쿰 피오리니아에(*C. fioriniae*)와 콜레토티리쿰 스코빌레이(*C. scovillei*)의 게놈 DNA를 분석하여 찾은 6개의 SNP(single nucleotide polymorphism) 마커를 증폭할 수 있는 정방향 및 역방향 프라이머 세트와, 상기 SNP 위치 염기를 포함하고 있는 프로브로 이루어져 있다. 서열번호 1, 3, 5, 7, 9 및 11은 정방향 프라이머이고, 서열번호 2, 4, 6, 8, 10 및 12는 역방향 프라이머이며, 서열번호 13 내지 18은 프로브이다.

[0015] 본 발명에 있어서, 용어 "프로브(probe)"란 상보적인 단일가닥 표적 서열과 혼성화하여 이중가닥 분자(혼성체)를 형성하는 단일가닥 핵산 서열을 말한다.

[0016] 본 발명의 일 구현 예에 따른 마커 조성물에 있어서, 상기 프로브는 3'이 블록킹된(blocked), 비표지된 올리고뉴클레오티드 루나 프로브(luna probe)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 상기 프로브는 각 프로브의 서열 내에 콜레토티리쿰 피오리니아에(*C. fioriniae*)와 콜레토티리쿰 스코빌레이(*C. scovillei*)를 구별할 수 있는 SNP 위치 염기를 포함하여 제작된 것이다.

[0017] 본 발명의 상기 올리고뉴클레오티드 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 1 및 2; 서열번호 3

및 4; 서열번호 5 및 6; 서열번호 7 및 8; 서열번호 9 및 10; 및 서열번호 11 및 12 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상의 연속 뉴클레오타드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1의 프라이머(20개 올리고뉴클레오타드)는 서열번호 1의 서열 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상의 뉴클레오타드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 서열번호 1 및 2; 서열번호 3 및 4; 서열번호 5 및 6; 서열번호 7 및 8; 서열번호 9 및 10; 및 서열번호 11 및 12의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서, 용어 "프라이머"는 복제하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥의 올리고뉴클레오타드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity) 뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.

[0019] 본 발명에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타드는 또한 뉴클레오타드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)을 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명은 또한, 상기 마커 조성물 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 콜레토티리쿰 피오리니아(*C. fioriniae*)와 콜레토티리쿰 스코빌레이(*C. scovillei*)를 구별하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 키트에서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 버퍼 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

[0021] 본 발명은 또한,

[0022] 탄저병(anthrax) 감염 의심 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;

[0023] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 마커 조성물을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 콜레토티리쿰 피오리니아(*C. fioriniae*) 또는 콜레토티리쿰 스코빌레이(*C. scovillei*)를 검출하는 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명의 방법은 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오타드 프라이머 세트와 서열번호 13의 올리고뉴클레오타드 프로브; 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오타드 프라이머 세트와 서열번호 14의 올리고뉴클레오타드 프로브; 서열번호 5 및 서열번호 6의 올리고뉴클레오타드 프라이머 세트와 서열번호 15의 올리고뉴클레오타드 프로브; 서열번호 7 및 서열번호 8의 올리고뉴클레오타드 프라이머 세트와 서열번호 16의 올리고뉴클레오타드 프로브; 서열번호 9 및 서열번호 10의 올리고뉴클레오타드 프라이머 세트와 서열번호 17의 올리고뉴클레오타드 프로브; 및 서열번호 11 및 서열번호 12의 올리고뉴클레오타드 프라이머 세트와 서열번호 18의 올리고뉴클레오타드 프로브로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 올리고뉴클레오타드 프라이머 세트와 프로브를 포함하는 마커 조성물을 이용하여 콜레토티리쿰 피오리니아(*C. fioriniae*) 또는 콜레토티리쿰 스코빌레이(*C. scovillei*)를 효과적으로 검출할 수 있다.

[0025] 본 발명의 방법은 탄저병 감염 의심 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 탄저병 감염 의심 시료는, 탄저병 감염 증상을 보이는 식물체로, 이에 한정하지는 않으나, 구기자 또는 고추일 수 있다. 상기 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, CTAB 방법을 이용할 수도 있고, Wizard prep 키트(Promega 사)를 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 하나 이상의 마커 조성물을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소연쇄반응(PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭 시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Q β 복제효소(replicase)를 통한 증폭 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법이 있다. 이 중에서, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.

[0026] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 상기 표지 물질은

형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따른 증폭된 표적서열은 루나 프로브와 PCR 반응 시약 혼합물 내에 포함된 형광 물질을 통해 표지될 수 있고, 루나 프로브는 상기에 기재된 바와 같다.

[0027] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 형광 측정, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 겔 전기영동을 수행할 수 있다. 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체 섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

[0028] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 재료 및 방법

[0030] 1. 시료의 선별 및 고순도 DNA 분리

[0031] 식물체의 병든 조직을 1% 차아염소산나트륨(NaOCl) 용액으로 1분간 표면 소독한 후 멸균증류수로 씻어내고 V8A(V8 juice agar) 배지에 올려 25℃에서 5일간 배양하였다. 배양된 각 균주들의 균총 가장자리로부터 코르크 보러(cork borer)를 사용하여 직경 6 mm 균총원판을 4-5조각을 떼어내어 20% V8 액체 배지에 접종하였으며, 암상태의 25℃ 항온기내에서 5일간 정치배양 후 균사체를 멸균된 2겹의 거즈로 걸러 에펜도르프(efendorf) 튜브에 넣고 -70℃에서 얼린 후 동결건조시켰다. 동결건조된 균사체를 마쇄한 후, DNeasy Plant mini 키트(Qiagen, 독일)를 이용하여 고순도의 게놈 DNA를 분리하였다. 본 발명에 사용된 균주는 총 18개로써, 구기자로부터 분리한 콜레토틱리쿰 피오리니아(*Colletotrichum fioriniae*) 15개와 고추로부터 분리한 콜레토틱리쿰 스코빌레이(*C. scovillei*) 3개이다.

[0032] 2. 후보 SNP(single nucleotide polymorphism)의 선별

[0033] 분리한 게놈 DNA는 ㈜씨더스(한국)에 분석을 의뢰하여 후보 SNP 및 SNP의 flanking 서열정보(300bp)를 얻었다. 그로부터 Real-time PCR 분석을 위해 최종적으로 총 6개의 SNP를 선별하였다.

[0034] 3. 프라이머 및 프로브 설계

[0035] 콜레토틱리쿰 속(*Colletotrichum* spp.)의 종 특이적 증폭을 위해 약 300bp 길이의 flanking 서열로부터 Primer3 프로그램(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>)을 이용하여 프라이머를 설계하였다. 프라이머는 AT-혹은 GC-rich를 피하고, GC 비율은 약 50%로 하였으며, 최종 PCR 산물의 크기는 후보 SNP 위치 염기를 포함하여 150bp 내외가 되도록 설계하였다(표 1). 또한, 콜레토틱리쿰 속의 종 특이적 루나 프로브를 설계하기 위해 레퍼런스에 해당하는 대립형질을 포함하는 것으로, SNP를 기준으로 좌, 우 15 mer를 포함하는 것으로 제작하였다(표 2).

표 1

[0036] 본 발명에 사용된 프라이머 정보

SNP			프라이머(5'→3') (서열번호)		산물크기 (bp)
No.	스캐폴드	위치	정방향	역방향	
1	10.1	94509	TTGACGTGCTGCAATTGACT (1)	GATCATCACCGCCGAGAATA (2)	157
2	1048.1	23316	CTGCCGAGGTACTGGTTGTT (3)	GGAGCGGCACTACGAGATG (4)	151
3	1034.1	26688	TACAGGCTGCACCCCTTTAT (5)	CAGGCTGAATTTCCCTTCGAT (6)	157
4	933.1	118638	GAGTGTAGGGAGGGCATCCT (7)	GCCTACTCGACATCCTCTGC (8)	141
5	23.1	58206	CAACTGCTAGCTGAGGAGG (9)	CCTTCTTCGTCGGTTCTGGT (10)	148
6	954.1	69645	CGAGCCCAAGGTCCATTCTT (11)	CGAGGAACCTTCTGGTCTCG (12)	148

[0037] 분석에 사용된 계놈은 콜레토티리쿰 피오리니아에(*Colletotrichum fioriniae*) PJ7의 계놈이고, 스캐폴드 수준이므로 accession ID 대신 스캐폴드 번호로 기재하였다. 따라서, 상기 표 1의 SNP 위치는, 일례로, SNP no.1의 위치는 콜레토티리쿰 계놈 내 스캐폴드 10.1의 94,509번째 위치에 있는 염기를 의미한다.

표 2

[0038] 본 발명에 사용된 루나 프로브 정보

SNP			프로브(5'→3') (서열번호)	프로브 길이
No.	위치	allele		
1	94509	A/G	AGA CTA TTG TCG GTC A CC GTG GCG GCG TGT T (13)	31 mer
2	23316	C/G	GCG CCC GAT GAA GAT C AG CTC CTT GGG CCA C (14)	31 mer
3	26688	G/A	GTC GTC AGG GTT GGT G AA CTT GCC CTC GTA C (15)	31 mer
4	118638	T/C	AAC GGC GGG CAG CTG T GT CGT CGC GAT GCT C (16)	31 mer
5	58206	C/T	GCA GGC TGT CCA AGC C AA GAA GAG TCA AAA A (17)	31 mer
6	69645	C/A	ATA TGG TTT CAC CGT C AA CCT GTA CGA CGC G (18)	31 mer

[0039] SNP allele : *C. fioriniae*/ *C. scovillei*

[0040] **4. Real-time PCR 수행**

[0041] 설계된 프라이머들의 중 특이성을 조사하고자 real-time PCR을 실시하였다. 반응 혼합물은 게놈 DNA(25ng/μl) 1μl, 정방향 프라이머(1pmol) 1μl, 역방향 프라이머(10pmole) 0.5μl, 5x Evagreen(HOT FIREPol[®] EvaGreen[®] qPCR Supermix, Solis Biodyne, Estonia) 4μl, 루나 프로브(10pmole) 1μl 및 증류수 12.5μl을 넣어 최종 20μl로 맞추고, 잘 섞어준 후 PCR을 수행하였다. Real-time PCR 조건은 다음과 같이 수행하였다: 초기 변성 95℃, 5분 → 변성 95℃, 20초; 어닐링(annealing) 60℃, 20초; 및 신장(extension) 72℃, 20초;의 과정을 40~45회 반복 → 최종 종결 반응 95℃, 15초/ 40℃, 30초. PCR 반응 종결물은 0.5℃/초 상승 조건으로 50℃에서 90℃까지 온도를 증가시켜 용해(melting) 곡선 분석을 수행하였다. 모든 실험은 각 3회 반복하였으며, 결과는 평균값으로 나타내었다.

[0042] **실시예 1. 유전형 분석**

[0043] 선발한 콜레토티리쿰 피오리니아에(*Colletotrichum fioriniae*)와 콜레토티리쿰 스코빌레이(*C. scovillei*) 샘플에 대하여 표 1 및 표 2에 나타난 프라이머와 프로브 세트를 이용하여 real-time PCR을 수행하고, 유전형 분석(genotyping)을 수행하였다. 유전형 분석은 용해 곡선 분석을 통해 수행하였다.

[0044] 그 결과, 도 1 내지 도 6에서 확인되는 것처럼, 콜레토티리쿰 피오리니아에(*C. fioriniae*)와 콜레토티리쿰 스코빌레이(*C. scovillei*) 샘플의 용해 곡선 피크가 명확히 구별되는 것을 알 수 있었다. 상기의 사실을 통해, 본 발명의 6개의 SNP 마커가 구기자와 고추의 탄저병 주 원인균인 콜레토티리쿰 피오리니아에(*C. fioriniae*)와 콜레토티리쿰 스코빌레이(*C. scovillei*)를 정확하게 구분할 수 있는 신규의 분자 마커임을 확인할 수 있었다.

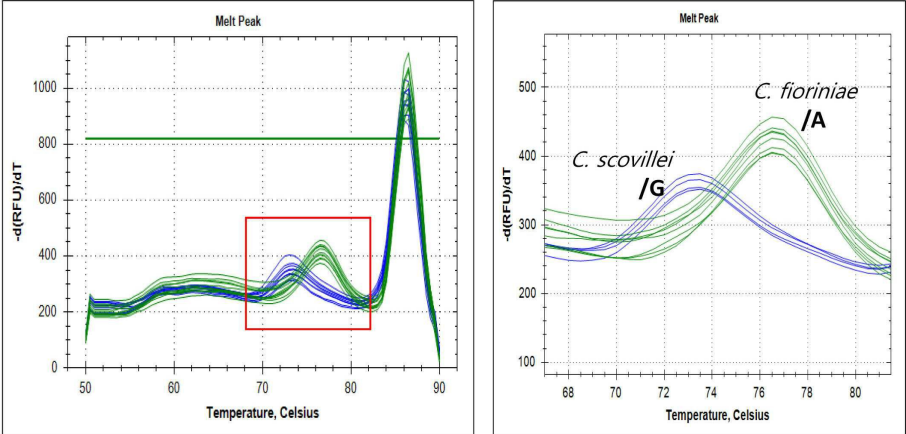
도면

도면1

SNP_p. 94509

```
C.scovillei   TTGACGTGCTGCAATTGACTTCCAGATGTCAGATGGAGGCGCACGCCATCAGATCTTAGACTATTGTGGTCCCGTGGC 80
C.floriniae  TTGACGTGCTGCAATTGACTTCCAGATGTCAGATGGAGGCGCACGCCATCAGATCTTAGACTATTGTGGTCCCGTGGC 80
*****

C.scovillei   GGCGTGTGGACGAGGTGACTAAAGCGTGGGTCCGAATAGATGTGATGGGACACGATATTCTCGGGGGTGATGATC 77
C.floriniae  GGCGTGTGGACGAGGTGACTAAAGCGTGGGTACGAACAGATGTGATGGGACACGATATTCTCGGGGGTGATGATC 77
*****
```

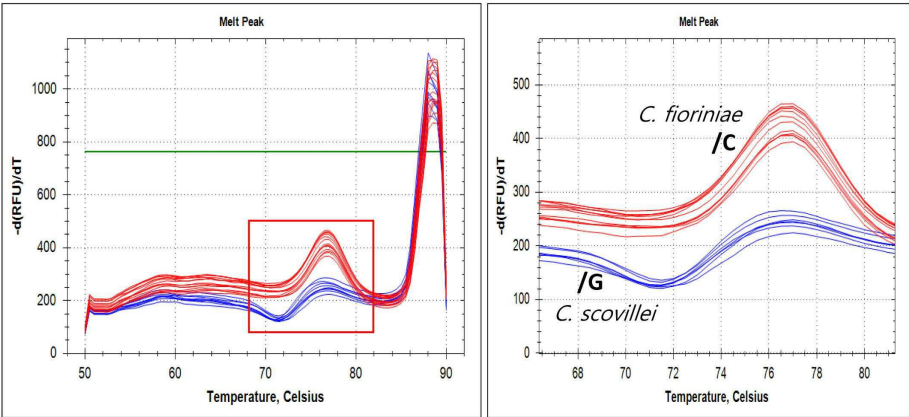


도면2

SNP_p. 23316

```
C.scovillei   CTGCCGAGTACTGCTTGTTCCTGTCACGATGCGCATGTTGCGCCCGAAGAATCAGCTCCTTGGGCCACTTCTCCTC 80
C.floriniae  CTGCCGAGTACTGCTTGTTCCTGTCACGATGCGCATGTTGCGCCCGAAGAATCAGCTCCTTGGGCCACTTCTCCTC 80
*****

C.scovillei   GTGGCCAGCATGTGCGGGATCCCTGCTTCATCCGCTGCTGCATCTGCTAGTGGCGCTGC 61
C.floriniae  GTGGCCAGCATGTGCGGGATCCCTGCTTCATCCGCTGCTGCATCTGCTAGTGGCGCTGC 61
*****
```

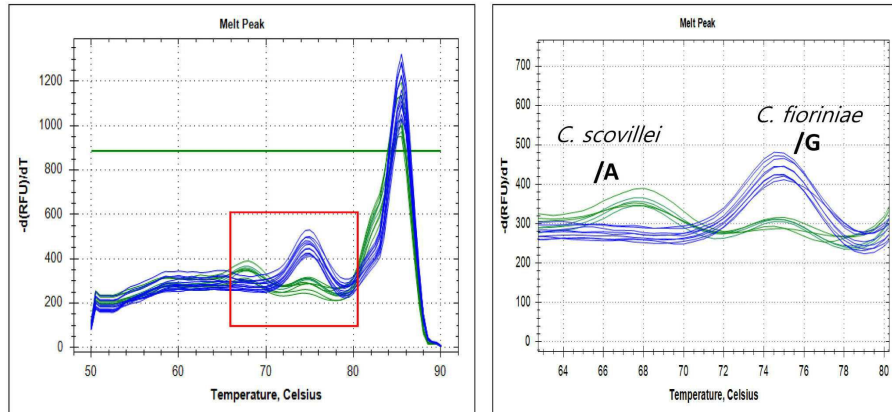


도면3

SNP_p. 26688

C.scovillei TACAGGCTGCACCCCTTTATTTGTTGACTTGGATCAATCCGGGACCTGCCAGGTTGCCCTTGGGAATGTCATCAGGGTTG 80
 C.fiorinia TACAGGCTGCACCCCTTTATTTGTTGACTTGGATCAATCCGGGACCTGCCAGGTTGCCCTTGGGAATGTCATCAGGGTTG 80

 C.scovillei GTAAACTTGCCTCGTACGTAAGTGCAGCGATGGACAGGCCAAACATGCTGTTCTTATCGAAGGGAATTCAGCCTG 77
 C.fiorinia GTAAACTTGCCTCGTACGTAAGTGCAGCAATAGACAGGCCAAACATGCTGTTCTTATCGAAGGGAATTCAGCCTG 77
 ,***

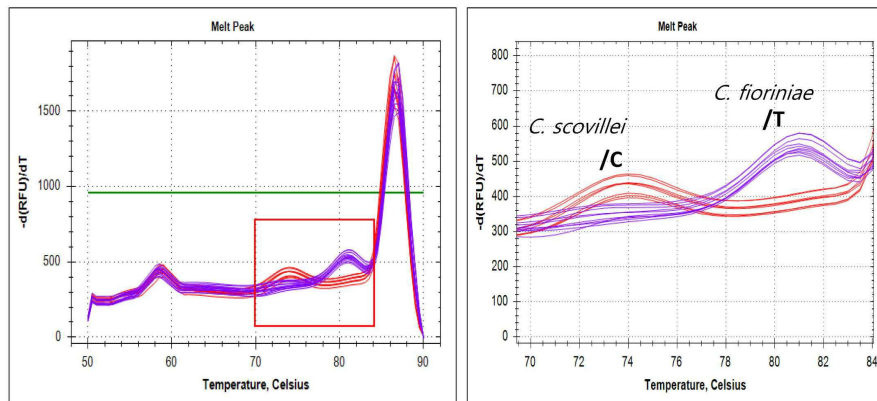


도면4

SNP_p. 118638

C.scovillei GAGTGTAGGGAGGGCATCCTTACGTGTGTTGTCAAAGTCGTAGATGTGCAGAGCCTTGATCTTATCGACGGCGGGTAGCT 80
 C.fiorinia GAGTGTAGGGAGGGCATCCTTACGTGTGTTGTCAAAGTCGTAGATGTGCAGAGCCTTGATCTTATCGACGGCGGGTAGCT 80

 C.scovillei GGTGTGTGCGATGTCCATCTGCTCAATGCAATGCTGCTGCGCAGAGGATGTGAGTAGGC 61
 C.fiorinia GGTGTGTGCGATGTCCATCTGCTCAATGCAATGCTGCTGCGCAGAGGATGTGAGTAGGC 61
 ,***



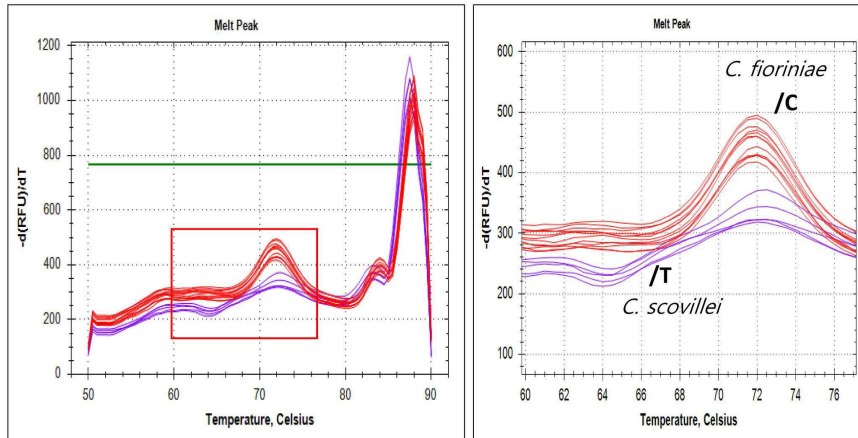
도면5

SNP_p. 58206

```

C.fioriniae  CAACTGCTAGCTGAGGAGGCGCTGCTCGAAGCGACGCAAGCAGGCTGTCCAAGCCTAAGAAGAGTCAAAAAACGCA 80
C.scovillei  CAACTGCTAGCTGAGGAGGCGCTGCTCGAAGCGACGCAAGCAGGCTGTCCAAGCTAAGAAGAGTCAAAAAACGCA 80
*****

C.fioriniae  GGTCAGCCTCATGAATCCGAACCTGACGACGCTGAAGGTCGACAGCAACACAGAACCGACGAAGAAGG 68
C.scovillei  GGTCAGCCTCATGAATCCGAACCTGACGACGCTGAAGGTCGACAGCAACACAGAACCGACGAAGAAGG 68
*****
    
```



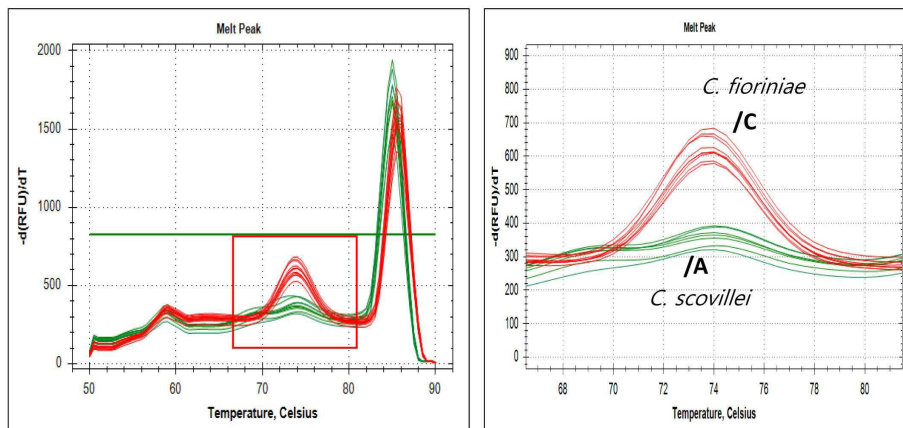
도면6

SNP_p. 69645

```

C.scovillei  CGAGCCCAAGGTCGATTTCCTTTCGCGAGCTTGACTACGATGTCTTCGCTACATGCAGGACACACACAGACATATGGTT 80
C.fioriniae  CGAGCCCAAGGTCGATTTCCTTTCGCGAGCTTGACTACGATGTCTTCGCTACATGCAGGACACACACAGACATATGGTT 80
*****

C.scovillei  TCACCGTAACCTGTACGACGCGCCCAAGTCCATCCCAAGTTGTGGCCCGAGACCAGAAAGTTCTCTCG 69
C.fioriniae  TCACCGTCAACCTGTACGACGCGCCCAAGTCCATCCCAAGTTGTGGCCCGAGACCAGAAAGTTCTCTCG 69
*****
    
```



서열목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Marker composition for discriminating of species of
Colletotrichum spp. and uses thereof
- <130> PN17198
- <160> 18
- <170> Kopatent In 2.0

<210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 1
 ttgacgtgct gcaattgact 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 2
 gatcatcacc gccgagaata 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 ctgccgaggt actggttggt 20
 <210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 ggagcggcac tacgagatg 19
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer

<400> 5
 tacaggctgc acccctttat 20
 <210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 caggctgaat ttcccttcga t 21
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 7
 gagtgtaggg agggcatcct 20

 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 8
 gcctactcga catcctctgc 20
 <210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 9
 caactgctag ctgaggagg 19
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 10
 cctttcttcgt cggttctggt 20

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 11
 cgagcccaag gtccatttct t 21

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 12
 cgaggaactt tctggtctcg 20

<210> 13
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 13
 agactattgt cggtcacctt ggcggcgtgt t 31

<210> 14
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 14
 gcgcccgatg aagatcagct ccttgggcca c 31

<210> 15
 <211> 31

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 15
 gtcgtcaggg ttggtgaact tgcctcgta c 31
 <210> 16
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 16
 aacggcgggc agctgtgtcg tcgcatgct c 31
 <210> 17
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 17
 gcaggctgtc caagccaaga agagtcaaaa a 31
 <210> 18
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> probe
 <400> 18
 atatggtttc accgtcaacc tgtacgacg c 31