



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0051023
(43) 공개일자 2017년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6895 (2013.01)

C12Q 1/686 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0153323

(22) 출원일자 2015년11월02일

심사청구일자 2015년11월02일

(71) 출원인

주식회사 한국인삼공사

대전광역시 대덕구 벚꽃길 71 (평촌동)

(72) 발명자

조혜선

대전광역시 유성구 신성동 가정로 22번지 KGC 중앙연구원

김재현

대전광역시 유성구 신성동 가정로 22번지 KGC 중앙연구원

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태평양

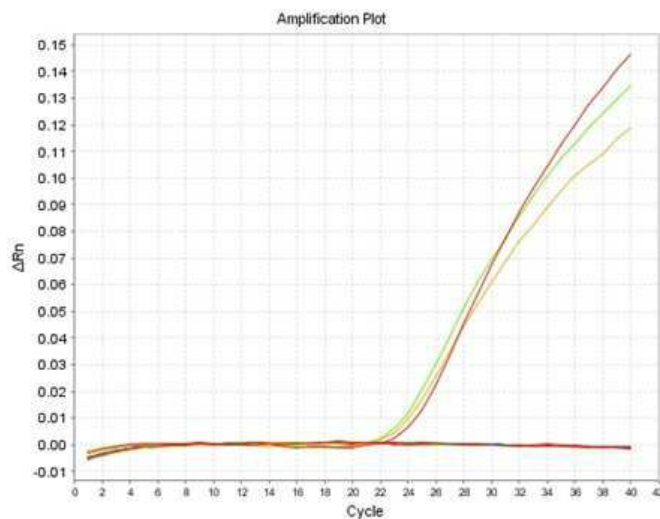
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 인삼 뿌리썩음병균 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 인삼 뿌리썩음병균 진단용 프라이머 세트에 관한 것으로, 본 발명에 따른 인삼 뿌리썩음병균 진단용 프라이머 세트를 이용함으로써 식물체 및 토양에서 극미량의 인삼 뿌리썩음병균도 효율적으로 검출이 가능하며, 인삼 뿌리썩음병균 감염 여부를 확인할 수 있으므로, 인삼 뿌리썩음병의 조기진단을 필요로 하는 인삼 재배지에 서 용이하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



- (52) CPC특허분류
C12Q 2561/113 (2013.01)
(72) 발명자

신정섭

대전광역시 유성구 신성동 가정로 22번지 KGC 중앙
연구원

홍태균

대전광역시 유성구 신성동 가정로 22번지 KGC 중앙
연구원

박철수

대전광역시 유성구 신성동 가정로 22번지 KGC 중앙
연구원

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 프라이머 및 서열번호 2의 프라이머를 포함하는 인삼 뿌리썩음병균 진단용 프라이머 세트.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 인삼뿌리썩음병균은 실린드로카폰 데스트럭탄스(*Cylindrocarpon destructans*), 실린드로카폰 칸디덤(*Cylindrocarpon candidum*), 실린드로카폰 알BUM(*Cylindrocarpon album*), 실린드로카폰 헤테로네마(*Cylindrocarpon heteronema*)로 이루어진 균으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 세트.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 인삼뿌리썩음병균은 실린드로카폰 데스트럭탄스(*Cylindrocarpon destructans*)인 세트.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 프라이머 세트는 서열번호 3의 프로브를 추가로 포함하는 세트.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 프라이머 세트 및 프로브는 실시간 PCR(real time polymerase chain reaction)에 사용하기 위한 것인 세트.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 프라이머 세트는 PCR에 사용하기 위한 것인 세트.

청구항 7

청구항 1의 프라이머 세트를 포함하는 인삼 뿌리썩음병균 검출용 조성물.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 검출용 조성물은 서열번호 3의 프로브를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 9

청구항 7의 검출용 조성물을 포함하는 인삼 뿌리썩음병균 검출용 키트.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 키트는 서열번호 3의 프로브를 추가로 포함하는 키트.

청구항 11

1) 인삼 식물체 또는 인삼 재배 토양 시료로부터 유래한 주형 DNA와 청구항 1의 프라이머 세트를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; 및

2) 상기 혼합 결과물을 PCR 증폭시키는 단계;를 포함하는 인삼 뿌리썩음병균을 검출하는 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서,

상기 단계 1)의 혼합물에 서열번호 3의 프로브를 추가로 첨가하는 방법.

청구항 13

청구항 11에 있어서,

상기 PCR은 실시간 PCR인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인삼 뿌리썩음병균 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 우리나라의 인삼은 오가과(Araliaceae)에 속하는 다년생 숙근초로 의약품의 원료이자 건강식품으로써 널리 알려져 있다. 하지만 인삼은 동일장소에서 장기간 재배되는 작물로 예정지관리부터 수확에 이르기까지 자연환경의 영향을 많이 받고, 많은 자본이 소요될 뿐만 아니라 여전히 전통적인 재배양식이 답습되고 있다.

[0003] 최근 인삼 재배지는 연작장해로 인해 강원도, 경기 북부, 전북, 전남 등의 지역으로 재배지가 확대되고 있는 실정이다. 이는 다시 과도한 임차료와 방법비, 교통비는 물론 병해충 방제 등 생산비를 높이는 요인으로 작용하고 있다. 따라서 예정지 관리에서 병해충 방제 및 수확에 이르기까지 저렴한 비용으로 고품질 안전인삼을 생산하는 새로운 시스템 구축이야말로 가격 경쟁력을 높이기 위한 시급한 과제라 할 수 있다.

[0004] 전국적으로 인삼에 발생하는 주요 병해충은 병해 11종, 해충 18종이 보고되어 있어 단일 작물로는 병해충이 많고 발생양상도 특이하고, 병해충 피해에 의하여 매년 약 10%씩 6년생까지는 약 50% 빈 포기(결주)가 발생한다. 또한 인삼 재배지역에 따라 병해충 발생양상 및 발생시기에 현저한 차이가 있어 지역별 발생 병해충의 종류 및 발생 시기 등에 관한 정밀조사와 지역에 알맞은 방제 체계 수립이 시급히 요구되고 있다.

[0005] 방제 체계 수립의 일환으로 인삼에 병을 일으키는 미생물을 진단하는 방법들이 연구되고 있으며, 예를 들면 특허문헌 1에는 인삼점무늬병을 일으키는 알타나리아 파낙스(*Alternaria panax*)를 검출할 수 있는 특이적 프라이머가 개시되어 있다.

[0006] 인삼을 한번 재배하여 수확한 곳에 다시 인삼을 심게 되면 연작 장해로 인해 뿌리썩음병이 발생하게 되는데 이러한 연작 장해의 주원인이 실린드로카폰 데스트럭탄스임이 보고되어 있다. 이 병원균은 토양전염성 곰팡이로서 후벽포자를 형성하여 토양 내에 장기간 생존이 가능하기 때문에 한번 재배하여 수확한 곳에 다시 인삼을 심게 되면 연작 피해가 발생하게 되고 방제하기가 매우 어려우며, 이 병원균은 배지상에서 생장 속도가 매우 느리기 때문에 형태적, 배양적 특성에 의한 균 동정 및 진단시에 많은 시간이 소요되는 단점이 있다.

[0007] 인삼의 병을 방제하여 농약의 사용을 최소화하고, 인삼의 품질을 높이기 위해서는 인삼 뿌리썩음병을 일으키는 곰팡이인 실린드로카폰 데스트럭탄스를 조기 진단하여 미리 예방하는 것이 필요한 실정이나, 이에 대해서는 아직까지 구체적으로 연구되지 않은 실정이다.

[0008] 따라서, 본 발명자들은 미량의 실린드로카폰 데스트럭탄스를 효율적으로 검출할 수 있고, 인삼 재배 기간 중에 식물체를 채취하여 감염 여부를 확인할 수 있는 방법에 대하여 연구하였으며, 실린드로카폰 데스트럭탄스에 특이적인 프로브 및 프라이머를 설계하여 실린드로카폰 데스트럭탄스를 진단할 수 있는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국 등록특허 10-0744699

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 인삼 뿌리썩음병균을 진단할 수 있는 프로브 및 프라이머 세트를 제공함으로써 인삼 뿌리썩음병균을 진단할 수 있도록 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은 서열번호 1의 프라이머 및 서열번호 2의 프라이머를 포함하는 인삼 뿌리썩음병균 진단용 프라이머 세트를 제공한다.

[0012] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 측면은 상기 프라이머 세트를 포함하는 인삼 뿌리썩음병균 검출용 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 측면은 상기 검출용 조성물을 포함하는 인삼 뿌리썩음병균 검출용 키트를 제공한다.

[0014] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 다른 측면은 1) 인삼 식물체 또는 인삼 재배 토양 시료로부터 유래한 주형 DNA와 청구항 1의 프라이머 세트를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; 및 2) 상기 혼합 결과물을 PCR 증폭시키는 단계;를 포함하는 인삼 뿌리썩음병균을 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 인삼 뿌리썩음병균 진단용 프라이머 세트를 이용함으로써 식물체 및 토양에서 극미량의 인삼 뿌리썩음병균도 효율적으로 검출이 가능하며, 인삼 뿌리썩음병균 감염 여부를 확인할 수 있으므로, 인삼 뿌리썩음병의 조기진단을 통한 발병 확산을 억제할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 인삼 뿌리썩음병균 실린드로카폰 데스트릭탄스 특이적 프로브 및 프라이머 세트의 민감도를 확인한 결과이다.

도 2는 주형 DNA의 양에 따른 인삼 뿌리썩음병균 실린드로카폰 데스트릭탄스 특이적 프로브 및 프라이머 세트의 표준 곡선(standard curve)를 나타낸 것이다.

도 3은 인삼 뿌리썩음병균 실린드로카폰 데스트릭탄스와 인삼 주요 병원균으로부터 분리된 DNA를 주형으로 하여 실시간 PCR(real time PCR)한 결과이다.

도 4는 인삼 뿌리썩음병균에 감염된 식물조직으로부터 DNA를 분리하고 CY-R-TM 프로브 및 CY-R-F/CY-R-R 프라이머 세트로 증폭시킨 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 먼저, 본 발명에서 사용된 용어를 설명한다.

[0018] 본 명세서에 사용된 용어 "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 하기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 하도록 설계된다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 따라 결정될 수 있다.

- [0019] 본 명세서에 사용된 용어 "상보적(complementary)"은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다.
- [0020] 본 명세서에 사용된 용어 "PCR"은 표적 핵산을 주형으로 사용하고, 상기 표적 핵산에 특이적인 프라이머를 사용하여, 변성, 어닐링 및 연장 반응의 과정을 반복함으로써 표적 핵산을 증폭하는 과정을 의미한다.
- [0021] 본 명세서에 사용된 용어 "특이적"은 다른 병원균에 결합하지 않고 상기 인삼 병원균에만 특이적으로 결합하는 것을 의미한다.
- [0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0023] 본 발명의 일 측면은 서열번호 1의 프라이머 및 서열번호 2의 프라이머를 포함하는 인삼 뿌리썩음병균 진단용 프라이머 세트를 제공한다.
- [0024] 상기 인삼 뿌리썩음병균은 실린드로카폰(*Cylindrocarpon*) 속일 수 있고, 바람직하게는 실린드로카폰 데스트럭탄스(*Cylindrocarpon destructans*), 실린드로카폰 칸디덤(*Cylindrocarpon candidum*), 실린드로카폰 알BUM(*Cylindrocarpon album*), 실린드로카폰 헤테로네마(*Cylindrocarpon heteronema*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 실린드로카폰 데스트럭탄스(*Cylindrocarpon destructans*)이다.
- [0025] 본 발명에서 이용되는 프라이머는 타겟 핵산에 상보적인 혼성화 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 1 또는 서열번호 2의 서열 내의 14개 이상, 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1의 프라이머(21개 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 1의 서열 내의 14개 이상, 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 서열번호 2의 프라이머(21개 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 2의 서열 내의 14개 이상, 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를 들면 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수 있다.
- [0027] 상기 프라이머 세트는 서열번호 3의 프로브를 추가로 포함할 수 있으며, 이에 한정되지 아니한다.
- [0028] 상기 프로브의 5' 말단에는 리포터(Reporter)로서 Joe가 부착되어 있을 수 있고, 형광을 나타내는 다른 형광 물질이 부착될 수 있으며, 이에 한정되지 아니한다. 예를 들면, 상기 리포터는 플루오레신(fluorescein), 플루오레신 클로로트리아지닐(fluorescein chlorotriazinyl), 로다민 그린(rhodamine green), 로다민 레드(rhodamine red), 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine), FITC, 오레곤 그린(Oregon green), 알렉사 플루오로(Alexa Fluor), FAM, ROX, HEX, 텍사스 레드(Texas Red), TET, TRITC, TAMRA, 시아닌(Cyanine) 계열 염료 및 씨아디카르보시아닌(thiadicarbocyanine) 염료로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0029] 상기 프로브의 3' 말단에는 퀀처(Quencher)로서 블랙홀 퀀처-1(Black Hole Quencher-1, BHQ-1)이 부착되어 있을 수 있고, 퀀처로서 사용될 수 있는 다른 물질이 부착될 수 있으며, 이에 한정되지 아니한다. 예를 들면, 상기 퀀처는 답실(Dabcyl), TAMRA, Eclipse, DDQ, QSY, 블랙베리 퀀처(Blackberry Quencher), Qx1, 아이오와 블랙(Iowa black) FQ, 아이오와 블랙 RQ 및 IRDye QC-1로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0030] 상기 프라이머 세트 및 프로브는 실시간 PCR(real time polymerase chain reaction)에 사용할 수 있고, 상기 프라이머 세트는 PCR에 사용할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 다른 측면은 프라이머 세트를 포함하는 인삼 뿌리썩음병균 검출용 조성물을 제공한다. 상기 검출용 조성물은 서열번호 3의 프로브를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.
- [0032] 본 발명의 다른 측면은 상기 검출용 조성물을 포함하는 인삼 뿌리썩음병균 검출용 키트를 제공한다. 상기 검출용 키트는 서열번호 3의 프로브를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.
- [0033] 본 발명의 키트는 상기한 성분 이외에도, 다른 성분들을 추가적으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우에는, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대 완충

액, DNA 중합효소 (예컨대, *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus literalis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징으로 제작될 수 있다.

[0034] 본 발명의 다른 측면은 1) 인삼 식물체 또는 인삼 재배 토양 시료로부터 유래한 주형 DNA와 청구항 1의 프라이머 세트를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; 및 2) 상기 혼합 결과물을 PCR 증폭시키는 단계;를 포함하는 인삼 뿌리썩음병균을 검출하는 방법을 제공한다.

[0035] 상기 단계 1)의 혼합물에 서열번호 3의 프로브를 추가로 첨가하여 실시간 PCR로 인삼 뿌리썩음병균을 검출할 수 있으나, 이에 한정되지 아니한다.

[0036] PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있으며, 예를 들면 PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR, DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends, RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction, IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR 및 TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR)이 특정한 응용을 위해 사용될 수 있다.

[0037] 상기 PCR을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공될 수 있다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg^{2+} 와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 소망하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공될 수 있다. 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 제조되어 첨가될 수 있다.

[0038] 상기 방법은 상기 단계 2) 후에 상기 증폭 산물을 검출하는 단계;를 추가로 포함할 수 있다. 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사선 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0039] 본 발명의 한 실시예에서, 본 발명에 따른 프라이머(서열번호 1, 2) 및 프로브(서열번호 3)를 사용하고 실린드로카폰 테스트리칸스와 인삼 주요 병원균으로 알려진 스크레로티니아 니발리스(*Sclerotinia nivalis*), 리족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani* AG2-1), 보트리티스 시네레아(*Botrytis cinerea*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 푸사리움 옥시스포럼(*Fusarium oxysporum*), 알터나리아 파낙스(*Alternaria panax*), 콜렉트트리컴 파나시콜라(*Collectotrichum panacicola*)에서 추출한 DNA를 각각 주형으로 하여 실시간 PCR하였을 때 실린드로카폰 테스트리칸스에 특이적이다(도 3 참조).

[0040] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

[0041] 인삼 뿌리썩음병균 및 공시균주로부터 DNA 추출

[0042] 본 발명에 사용한 인삼 뿌리썩음병균 및 인삼 주요 병원균으로 알려진 공시균주는 KGC 인삼공사 한국인삼연구원에서 분리, 보관 중인 공시균주를 사용하였다. 공시균주의 genomic DNA를 분리하기 위하여 감자 덱스트로즈 아가(potato dextrose agar, Difco)에 각 균주를 접종하여 20℃에서 배양하였다. DNA 분리는 MACHEREY-NAGEL의 NucleoSpin plant II 프로토콜에 준하였으며, 분리된 DNA는 -20℃에 보관하였다. 하기 표 1에 본 발명에 사용한 실린드로카폰 테스트리칸스(*Cylindrocarpon destructans*) 균주 및 인삼 주요 병원균을 나타낸다.

표 1

병원균	균주번호	분리지역
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	KGC-CY9801	경기도 수원시
	KGC-CY1405	충남 당진시
	KGC-CY1412	전남 장수군
<i>Sclerotinia nivalis</i>	KGC-S0680	강원도 홍천군
	KGC-S0707	강원도 철원군
	KGC-S1001	강원도 양구군

<i>Rhizoctonia solani</i> AG2-1	KGC-RH9801	경기도 수원시
	KGC-RH0203	충남 예산시
	KGC-RH0702	경기도 화성시
<i>Botrytis cinerea</i>	KGC-BC0407	경기도 수원시
	KGC-BC0725	경기도 여주군
	KGC-BC0736	충남 예산시
<i>Fusarium solani</i>	KGC-F0503	경기도 수원시
<i>Fusarium oxysporum</i>	KGC-F1410	강원도 홍천군
<i>Alternaria panax</i>	KGC-AP0507	경기도 수원시
<i>Collectotrichum panacicola</i>	KGC-C1040	강원도 원주시

실시예 2

[0044] 실린드로카폰 테스트릭탄스 특이적 프로브 및 프라이머 설계

[0045] 상기 실시예 1에서 수득한 각 균주의 DNA를 주형으로 하고, 프라이머쌍 fRPB2-7F(서열번호 4) 및 fRPB2-11aR(서열번호 5)을 사용하여 RNA 폴리머라제 II 영역을 균주별로 증폭하였다.

[0046] fRPB2-7F: ATG GG(C/T) AA(A/G) CAA GC(C/T) ATG GG)

[0047] fRPB2-11aR: GC(A/G) TGG ATC TT(A/G) TC(A/G) TC(C/G) ACC)

[0048] 각 균주별로 염기서열 분석을 수행하였으며, Beacon Designer Program(Premier Biosoft)을 이용한 인삼 뿌리썩음병균 실린드로카폰 테스트릭탄스 특이적 TaqMan 프로브 CY-R-TM 및 프라이머 CY-R-F/CY-R-R을 설계하였다.

표 2

프로브 및 프라이머 이름	염기서열(5'→3')	서열번호
CY-R-F	GTCTGGTGAGGACATAATC	1
CY-R-R	CAGCGTTAACCGTCATAA	2
CY-R-TM	Joe-ACAATGCCGTTCTCAGTGCTCCT-BHQ-1	3

실시예 3

[0050] 프로브 및 프라이머의 민감도 확인

[0051] 상기 실시예 2에서 설계된 프로브 및 프라이머 세트가 실린드로카폰 테스트릭탄스에 대하여 민감한 정도를 알아보기 위하여 pBHA 벡터에 상기 실시예 2에서 실린드로카폰 테스트릭탄스에 대하여 증폭된 RNA 폴리머라제 II 영역 염기서열을 삽입하여 플라스미드를 제작하였다. 다음으로 합성한 플라스미드 DNA의 카피 수를 다음과 같이 계산하였다(<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>에 게시된 프로그램을 이용함, Andrew Staroscik, 2004).

[0052] 카피 수 = $(\text{amount} \times 6.022 \times 10^{23}) / (\text{length} \times 1 \times 10^9 \times 650)$

[0053] 플라스미드 DNA를 1 μ l당 10ng에서 1fg까지 ($4.28 \times 10^9 \sim 4.28 \times 10^2$ copies/ μ l) 8단계로 연속 희석하여 PCR 반응에 사용하였다. 설계된 프로브 및 프라이머 세트의 실시간 PCR 반응 조성물은 real time master mix(Toyobo, Japan) 10 μ l, 프로브(10pmol) 1 μ l, 프라이머(20pmol) 각각 0.5 μ l, DNA 1 μ l에 멸균수를 첨가하여 총 20 μ l로 수행하였다. 95℃에서 1분 초기 변성 후, 95℃에서 15초 변성, 60℃에서 1분 결합하는 과정을 40회 반복하였다. 실시간 PCR 분석시에는 ABI 7500 Fast Real Time PCR System 장치를 이용하였다.

[0054] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, 상기 프로브 및 프라이머 세트를 이용하였을 때 1fg(4.28×10^2 copies/ μ l) 플라스미드 DNA 농도까지 반응이 나타났으며, 각각의 Ct (Threshold cycle) 값은 표 3과 같다. 표준 곡선은 도 2와 같다(slope: -3.325, Y-inter: 15.998, R²: 1, Efficiency: 99.872%).

표 3

[0055]

Copies/ $\mu\ell$	Ct $\pm$ SD(n=3)
4.28×10^9	12.78 $\pm$ 0.09
4.28×10^8	15.92 $\pm$ 0.03
4.28×10^7	19.27 $\pm$ 0.01
4.28×10^6	22.69 $\pm$ 0.06
4.28×10^5	25.80 $\pm$ 0.04
4.28×10^4	29.35 $\pm$ 0.06
4.28×10^3	32.82 $\pm$ 0.21
4.28×10^2	35.85 $\pm$ 0.16

[0056]

이와 같은 결과로부터 실시예 2에서 제작된 프로브 및 프라이머 세트가 실린드로카폰 데스트럭탄스에 특이적이며 극미량의 실린드로카폰 데스트럭탄스도 탐지할 수 있는 것을 알 수 있었다.

실시예 4

[0057]

인삼 주요 병원균 DNA에 대한 프로브 CY-R-TM 및 프라이머 CY-R-F/CY-R-R의 특이성 확인

[0058]

개발된 프로브 및 프라이머 세트의 인삼 주요 병원균에 대한 특이성을 확인하고자, 상기 실시예 1에서 분리해낸 공시균주들의 DNA를 이용하였다. 공시균주들의 DNA를 1 $\mu\ell$ 당 1ng 사용한 것 이외에는 실시예 3과 동일하게 하여 실시간 PCR을 실시하여 결과를 분석하였다.

[0059]

그 결과, 실시예 2에서 상기 표 1에 나타난 공시균주들에 비해서 실린드로카폰 데스트럭탄스에 대해 특이적으로 반응이 나타나는 것을 확인하였다(도 3).

실시예 5

[0060]

인삼 뿌리썩음병에 감염된 식물조직을 직접 이용한 실린드로카폰 데스트럭탄스의 진단 방법

[0061]

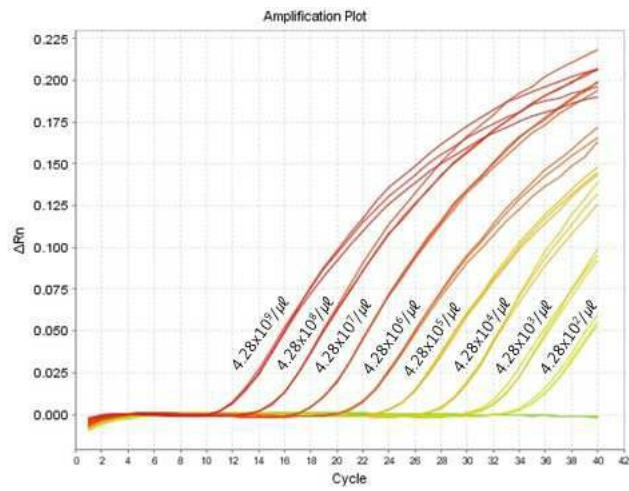
개발된 프로브 및 프라이머 세트를 이용하여 이병(罹病) 식물체의 뿌리썩음병균 감염 여부를 진단하기 위해서 인삼 뿌리썩음병 이병 뿌리 및 건전 뿌리로부터 MACHEREY-NAGEL의 NucleoSpin plant II 프로토콜에 준하여 DNA를 분리하였다. 인삼 뿌리썩음병 이병 뿌리 및 건전 뿌리로부터 얻어진 각각의 DNA를 1 $\mu\ell$ 당 1ng 사용한 것 외에는 실시예 3의 방법과 동일하게 하여 실시간 PCR을 실시하고, 결과를 분석하였다.

[0062]

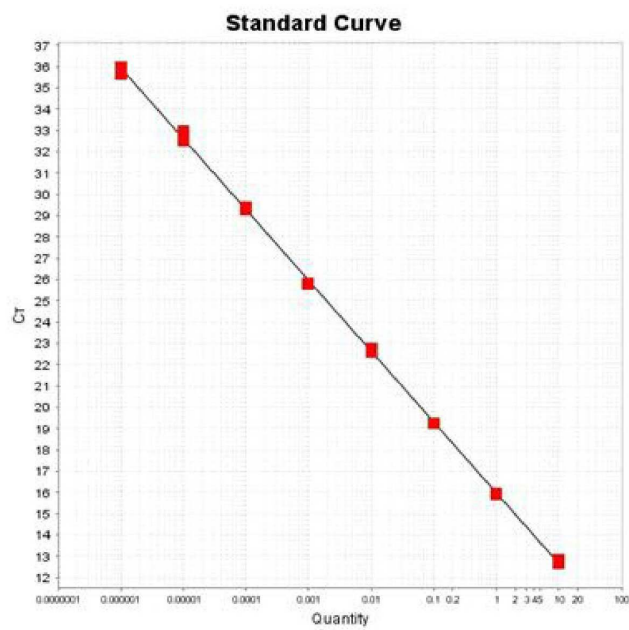
그 결과, 도 4에 나타내는 바와 같이 인삼 뿌리썩음병 이병 조직에서만 반응이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명의 프로브 및 프라이머 세트를 이용하여 실시간 PCR을 수행함으로써 실린드로카폰 데스트럭탄스에 의한 감염 여부를 알 수 있다.

도면

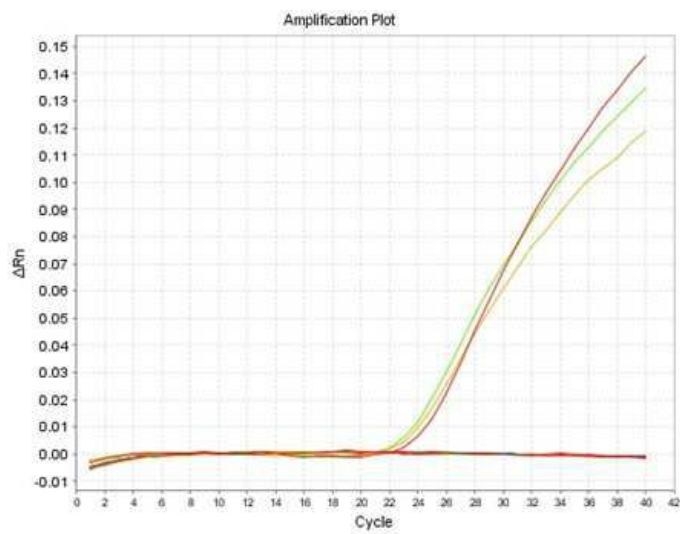
도면1



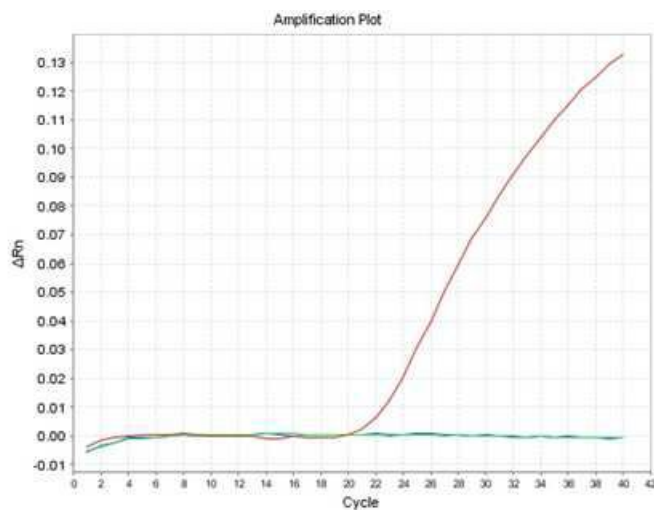
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> KOREA GINSENG CORP.
- <120> Diagnosis method for Cylindrocarpon destructans
- <130> 2015-DPA-1105
- <160> 5
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> CY-R-F

<400>	1	
gtctggtgag	gacataatc	19
<210>	2	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CY-R-R	
<400>	2	
cagcgttaac	cgtcataa	18
<210>	3	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	CY-R-TM	
<400>	3	
acaatgccgt	tctcagtgt cct	23
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	frPB2-7F	
<400>	4	
atgggyaarc	aagcyatggg	20
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	frPB2-11aR	
<400>	5	
gcrtggatct	trtcrtsac c	21