



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0043525
(43) 공개일자 2013년04월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

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

(21) 출원번호 10-2011-0107734

(22) 출원일자 2011년10월20일

심사청구일자 2011년10월20일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김흥기

충청남도 공주시 교동 대우아파트 104동 502호

송정영

대전광역시 중구 옥계동 35-6

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김종관, 권오식, 박창희

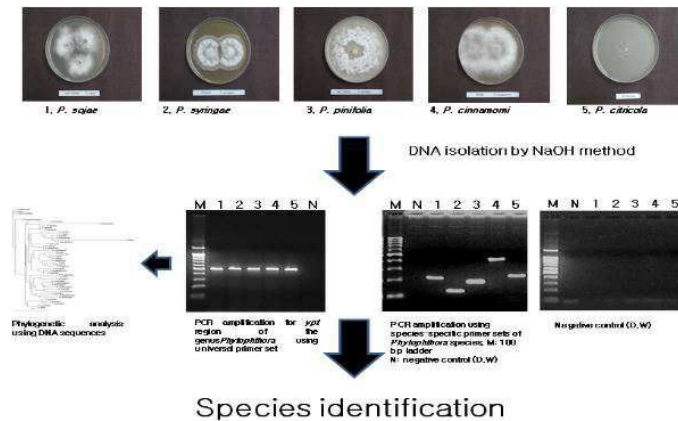
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **파이토프토라속 균주를 검출하기 위한 중합효소연쇄반응의 프라이머, 이를 이용한 검출키트 및 방법**

(57) 요약

본 발명은 파이토프토라속 균주를 검출하기 위한 중합효소연쇄반응의 프라이머, 이를 이용한 검출키트 및 방법에 관한 것으로, 상기 본 발명에 따른 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주 검출용 프라이머 세트는 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주를 매우 낮은 농도까지 신속 정확하게 검출·정량할 수 있을 뿐 아니라 종류까지 확인할 수 있어, 육안적, 형태적 검사법의 한계를 극복하고 병원균의 분류체계에 명확한 기준을 제시해 국내 식물검역의 국제표준화에 맞는 검역용 검사시스템으로 활용할 수 있는 효과가 기대된다.

대표도 - 도8



(72) 발명자

최유리

충청남도 천안시 서북구 두정동 대우1차아파트 10
8동 2404호

나상권

충청남도 금산군 복수면 구례리 344-1

임현섭

대전광역시 유성구 신성동 삼성한울아파트 101동
603호

전낙범

충청남도 예산군 광시면 서초정1구 497-2

서문원

대전광역시 중구 호동 19-7번지 삼영빌라 402호

장찬용

대전광역시 동구 관암동 주공아파트 207동 1206호

이지현

대전광역시 서구 관저동 대자연아파트 101동 505호

양슬기

대전광역시 동구 가양동 85-16번지

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 4 내지 28 중 어느 하나의 염기서열로 구성되는 올리고뉴클레오타이드.

청구항 2

제 1항에 따른 뉴클레오타이드를 포함하는 하는 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균 검출용 프라이머 세트.

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 프라이머 세트는

정방향 프라이머로서 서열번호 4와 역방향 프라이머로서 서열번호 5, 6, 7 및 8 중 어느 하나의 염기서열로 이루어지는 PCNNY 프라이머 세트;

정방향 프라이머로서 서열번호 9와 역방향 프라이머로서 서열번호 10의 염기서열로 이루어지는 PCTIY 프라이머 세트;

정방향 프라이머로서 서열번호 11과 역방향 프라이머로서 서열번호 12의 염기서열로 이루어지는 PLTY 프라이머 세트;

정방향 프라이머로서 서열번호 13과 역방향 프라이머로서 서열번호 14의 염기서열로 이루어지는 PPINY 프라이머 세트;

정방향 프라이머로서 서열번호 15 또는 16과 역방향 프라이머로서 서열번호 17의 염기서열로 이루어지는 PPORY 프라이머 세트;

정방향 프라이머로서 서열번호 18 또는 19와 역방향 프라이머로서 서열번호 20 또는 21의 염기서열로 이루어지는 PRAMY 프라이머 세트;

정방향 프라이머로서 서열번호 22, 23 및 24 중 어느 하나와 역방향 프라이머로서 서열번호 25 또는 26의 염기서열로 이루어지는 PSRYY 프라이머 세트; 및

정방향 프라이머로서 서열번호 27과 역방향 프라이머 서열번호 28의 염기서열로 이루어지는 PSOJY 프라이머 세트;로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 프라이머 세트.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 프라이머는 DNA 삽입(intercalating) 형광, 인광 또는 방사성 물질을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 프라이머 세트.

청구항 5

제 2항 내지 제 3항에서 선택되는 어느 한 항 따른 프라이머 세트; 및

PCR(Polymerase chain reaction), 또는 실시간 PCR(Real-Time PCR)에 필요한 시약;

을 포함하는, 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주 검출용 키트.

청구항 6

1) 이병 식물체로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;

2) 상기 DNA를 주형으로 상기 제 2항 내지 제 3항에서 선택되는 어느 한 항 따른 프라이머 세트를 이용하여 PCR, 또는 실시간 PCR(Real-Time PCR)을 수행하는 단계; 및

3) 상기 DNA 단편의 증폭 및 정량하는 단계;

를 포함하는 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주의 검출방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주는 파이토프토라 시나모미(*Phytophthora cinnamomi*), 파이토프토라 시트리콜라(*Phytophthora citricola*), 파이토프토라 라테라리스(*Phytophthora lateralis*), 파이토프토라 피니폴리아(*Phytophthora pinifolia*), 파이토프토라 포리(*Phytophthora porri*), 파이토프토라 라모룸(*Phytophthora ramorum*), 파이토프토라 소재(*Phytophthora sojae*), 및 파이토프토라 시린개(*Phytophthora syringae*)로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 검출방법.

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 검출방법은 겔 전기영동, DNA 삽입(*intercalating*) 형광, 인광 또는 방사성 물질을 사용하여 유전자 증폭을 분석하는 것을 특징으로 하는 검출방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 파이토프토라속 균주를 검출하기 위한 중합효소연쇄반응의 프라이머, 이를 이용한 검출키트 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 과수, 수목 및 화훼를 비롯한 거의 모든 식물에 병을 일으키는 것으로 알려진 파이토프토라(*Phytophthora*) 속 균은 세계적으로 대략 60여종이 알려져 있고, 국내에는 20여종이 보고되어 있다. 최근 외국에서는 수목류에 피해가 큰 새로운 역병균들이 계속해서 발생하고 있는 실정이다. 파이토프토라(*Phytophthora*) 속 균들은 다른 식물병원균과 달리 공기 또는 물을 통해 매우 빠르게 전파되므로 식물체를 통해 일단 국내에 유입되어 정착되면 방제가 거의 불가능하므로 검역을 통한 새로운 병원균의 국내 유입을 막는 것이 가장 시급하다. 하기 표 1을 참조한다.

[표 1]

Species	기주	발생지역
<i>P. cinnamomi</i>	과수류, 수목류, 묘목, 낙엽송, 단풍나무, 비자나무, 편백, 백합	국내 외
<i>P. citricola</i>	과수류, 수목류 묘목, 화훼류 묘, 대추	국내 외
<i>P. lateralis</i>	수목류	국외
<i>P. megasperma</i> f. sp. <i>glycines</i> (<i>P. sojae</i>)	곡류종자	국내 외
<i>P. pinifolia</i>	소나무	국외
<i>P. porri</i>	구근류	국외
<i>P. ramorum</i>	수목류	국외
<i>P. syringae</i>	과수류 묘목, 과실류	국외

[0003]

[0004] 최근 무분별하게 수입되는 재식 및 생식용 농림산물을 통한 국내 미분포 병원균들의 유입이 더욱 증가 할 것으

로 예상되는데 이들 병원체의 유입 가능성에 대비하여 수입 농림산물에 대한 신속한 진단 및 병원균의 정확한 동정 및 검사법 개발이 필요하다.

[0005] 과거에는 형태학적 관점에서의 연구를 통해 이를 해결하고자 하였다. 그러나 파이토프토라(*Phytophthora*) 속을 포함한 몇몇 속의 경우, 분리 동정을 위한 뚜렷한 형태학적 특징보다는 종내 균주들 간에 발생하는 높은 변이성과 종간에 중복되는 특성 때문에 정확한 동정을 위해서는 많은 시간적 소요와 노력이 수반되어야 하는 문제점이 있었다(Duncan and Cooke, 2002).

[0006] 따라서 상기와 같은 문제점을 개선시키기 위하여, 최근 파이토프토라(*Phytophthora*) 속의 분류 및 계통발생학적 분석과 더불어 분자생물학적인 기법을 이용한 분자유전학적 분석이 매우 활발히 수행되고 있다(Donahoo et al., 2006; Ivors et al., 2004; Kroon et al., 2004). 그러나, 이 방법은 파이토프토라 인페스탄스 뿐 만 아니라 파이토프토라 각토럼에도 반응함을 보여 종 동정과 특이성에서 미흡함을 보였다[참조: Trout et al., USA].

[0007] 또한, 분자생물학적 방법, 즉 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR)법은 크게 일반 PCR법과 정량(quantitative) PCR법으로 나뉜다. 일반 PCR법을 이용하면 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주를 신속하게 종류별로 판단할 수 있지만, 정량을 위해서는 아가로스 젤 전기영동(agarose gel electrophoresis)을 수행하여야 한다. 또한 너무 낮은 농도의 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주는 검출해내지 못하는 한계가 있다.

[0008] 그러나 이 방법은 정량 PCR법을 사용하는 것이 아니어서, 정량을 위해서는 여전히 아가로스 젤 전기영동을 수행하여야 하고 너무 낮은 농도의 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주는 검출해내지 못하는 방법에 불과하였다.

[0009] 한편, 정량 PCR법은 일반 PCR법이 정량성을 갖도록 개발한 것으로, 경쟁(competitive) PCR법과 실시간(Real-Time) PCR법이 있다. 실시간 PCR법은 PCR 증폭산물의 증가를 실시간으로 모니터링하여 해석하는 기술로, DNA와 RNA의 정확한 정량이 가능하며, 전기영동이 필요 없어 신속하고 간편하게 해석할 수 있으며, 오염의 위험성이 적은 이점을 갖고 있다. 현재는 유전자 발현해석과 SNP(Single Nucleotide Polymorphism) 타이핑 등에 있어서 필수적인 기술이 되고 있다. 단계적으로 희석한 표준시료를 사용하여 실시간 PCR 반응을 하면 초기 DNA량이 많은 순서로 같은 간격으로 늘어선 증폭곡선이 얻어지는데, 여기서 적당한 지점에 역치(threshold)를 설정하면 역치와 증폭곡선이 교차하는 지점, Ct값(Threshold Cycle)이 산출되며 Ct값과 초기 주형량 간에는 직선적인 관계가 있어 검량선을 만들 수 있으므로, 미지의 시료에 대해서도 표준시료와 마찬가지로 Ct값을 산출하여 이 검량선과 대조하면 초기 주형량을 구할 수 있다. 이 방법에서는 PCR 증폭산물을 형광을 통해 검출하는데, 검출방법은 크게 인터칼레이팅(intercalating)법과 형광표지 프로브를 이용하는 2가지 방법이 있다.

[0010] 프라이머 설계는 성공적인 실시간 PCR을 위한 가장 중요한 요소로, 표적 DNA 서열에 안정되게 어닐링할 수 있으며(적절한 범위의 Tm 값), PCR 반응효율이 좋고(프라이머 내부 혹은 프라이머 간에 상보적인 서열이 없다), 특이성이 높은(주형 DNA 상에 미스-프라이밍(mis-priming)하는 부위가 없다) 프라이머를 설계하여야 한다.

[0011] 따라서, PCR 및 실시간 PCR 법의 여러 이점을 이용하여, 파이토프토라 속 병원균을 정확하고 신속하게 진단하기 위해 민감도와 특이성을 높혀 조기진단 효율을 높이고 진단에 필요한 소요작업 시간을 단축시켜야 하는 필요성이 절실히 대두되었다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) (비특허 문헌 1) Duncan, et al., Mycologist., 2002, 16: 59-66.

(비특허문헌 0002) (비특허 문헌 2) Kroon et al., Fungal Genet. Biol., 2004, 41: 766782

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 이에 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여, 국내 주요 식물검역관리 7종 이상의 파이토프토라(*Phytophthora*) 속 병원균을 대상으로 신속한 진단 뿐 아니라 병원균의 정확한 종 동정이 가능한 파이토프토라(*Phytophthora*)속 병원균을 검출용 프라이머의 설계하고, 이를 이용하여 PCR 또는 실시간 PCR로 신속하고 높은 민감도를 검출할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0014] 따라서 본 발명의 목적은 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR), 또는 실시간 PCR(real-time PCR)에 의해 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주를 검출하는데 사용될 수 있는 프라이머(primers)를 제공하기 위한 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프라이머를 이용한 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주의 검출 키트를 제공하기 위한 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 검출 키트를 이용한 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주의 검출방법을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 4 내지 28 중 어느 하나의 염기서열로 구성되는 올리고뉴클레오티드를 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 서열번호 4 내지 28 중 어느 하나의 염기서열로 구성되는 올리고 뉴클레오티드를 포함하는 하는 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균 검출용 프라이머 세트를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균 검출용 프라이머 세트; 및

[0020] PCR(Polymerase chain reaction), 또는 실시간 PCR(Real-Time PCR)에 필요한 시약;

[0021] 을 포함하는, 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주 검출용 키트를 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은

[0023] 1) 이병 식물체로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;

[0024] 2) 상기 DNA를 주형으로 상기 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균 검출용 프라이머 세트를 이용하여 PCR, 또는 실시간 PCR(Real-Time PCR)을 수행하는 단계; 및

[0025] 3) 상기 DNA 단편의 증폭 및 정량하는 단계;

[0026] 를 포함하는 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주의 검출방법을 제공한다.

[0027] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0028] 본 발명에 있어서, 용어 '중합효소연쇄반응' 또는 'PCR'은 일반(비정량) PCR과 정량 PCR을 포괄하는 것으로서, 예를 들어, 일반 PCR, 일반 RT-PCR, 실시간 PCR, 실시간 RT-PCR을 모두 포함하는 개념이나, 문맥에 따라 '일반 PCR 또는 일반 RT-PCR'을 가리키거나 '일반 PCR'을 가리키는 개념으로 사용될 수 있다.

[0029] 본 발명은

[0030] 정방향 프라이머로서 서열번호 4와 역방향 프라이머로서 서열번호 5, 6, 7 및 8 중 어느 하나의 염기서열로 이루어지는 PCNNY 프라이머 세트;

[0031] 정방향 프라이머로서 서열번호 9와 역방향 프라이머로서 서열번호 10의 염기서열로 이루어지는 PCTIY 프라이머 세트;

[0032] 정방향 프라이머로서 서열번호 11과 역방향 프라이머로서 서열번호 12의 염기서열로 이루어지는 PLTY 프라이머 세트;

[0033] 정방향 프라이머로서 서열번호 13과 역방향 프라이머로서 서열번호 14의 염기서열로 이루어지는 PPINY 프라이머 세트;

[0034] 정방향 프라이머로서 서열번호 15 또는 16과 역방향 프라이머로서 서열번호 17의 염기서열로 이루어지는 PPORY 프라이머 세트;

[0035] 정방향 프라이머로서 서열번호 18 또는 19와 역방향 프라이머로서 서열번호 20 또는 21의 염기서열로 이루어지는 PRAMY 프라이머 세트;

[0036] 정방향 프라이머로서 서열번호 22, 23 및 24 중 어느 하나와 역방향 프라이머로서 서열번호 25 또는 26의 염기서열로 이루어지는 PSRYY 프라이머 세트; 및

- [0037] 정방향 프라이머로서 서열번호 27과 역방향 프라이머 서열번호 28의 염기서열로 이루어지는 PS0JY 프라이머 세트;로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 프라이머 세트를 제공한다.
- [0038] 보다 상세하게는 파이토프토라(*Phytophthora*) 종들의 다양한 유용유전자 영역에 대한 DNA 염기서열들을 비교하여 유연관계 및 유전적 다양성을 분석하여, 공시균주들 간의 다양한 유전적 차이를 식별한 결과, 이들 중 종간 염기서열 변이는 크게 나타났지만 종내 변이는 매우 작은 *Ypt1* 유전자 영역으로부터 국내 검역관리 대상 파이토프토라(*Phytophthora*) 8종의 종 동정 및 검출을 위한 종 특이적 프라이머들을 선발할 수 있었다. 도 1 및 2를 참고한다.
- [0039] 상기 선발된 종 특이적 프라이머들은 PCR 또는 SYBR green 실시간 RCR(real time PCR)도 가능하도록 각각 70 내지 400 bp의 종 특이적 PCR 증폭산물을 형성시키도록 디자인 하였고, 선발된 프라이머들의 종 특이성을 확인하기 위해 8종의 국내 식물검역 대상의 포함하는 파이토프토라 속 균주와 주요 식물병원 진균들을 대상으로 PCR 및 SYBR green 실시간 RCR을 수행한 결과, 각각 8종의 파이토프토라 종 특이적 프라이머 세트에서만 오로지 예상된 크기의 PCR 증폭산물과 종 특이적인 실시간 PCR 반응 곡선을 확인할 수 있었다. 도3 내지 5를 참고한다.
- [0040] 또한, 상기 선발된 종 특이적 프라이머들에 대한 PCR의 검출 민감도를 확인하기 위해 게놈 DNA를 10배 희석하여 조사한 결과 SYBR green real time PCR의 경우, 1 pg-100 fg으로 1-10 pg의 PCR의 수행결과 보다 10 내지 100 배 정도 민감도가 높았고, 동일한 프라이머를 활용한 2차 PCR 의 경우 검출 민감도가 10 내지 100배 정도 향상된 것을 확인할 수 있었다. 도 6을 참조한다.
- [0041] 본 발명에 있어서, “프라이머”는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 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.
- [0042] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 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.
- [0043] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머는 DNA 삽입(intercalating) 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질을 더 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 VIC, NED, FAM 또는 PET 이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 VIC, NED, FAM 또는 PET를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출 가능한 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. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 상기에 기재된 바와 같다.
- [0044] 본 발명은 상기 서열번호 4 내지 28 중 어느 하나의 염기서열로 구성되는 올리고 뉴클레오타이드를 포함하는 하의 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주 검출용 프라이머 세트; 및
- [0045] PCR(Polymerase chain reaction), 또는 실시간 PCR(Real-Time PCR)에 필요한 시약;
- [0046] 을 포함하는, 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주 검출용 키트를 제공한다.
- [0047] 본 발명의 키트에서, 상기 PCR에 필요한 시약은 예를 들면, 이에 제한되지 않고, 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머, 적당량의 DNA 중합 효소(Taq polymerase), dNTP 혼합물, KCl, Tris-HCl 및 MgCl_2 를 함유한 PCR 완충용액(buffer) 및 물을 포함할 수 있다.
- [0048] 또한, 상기 키트는 안내서를 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, 역전사 완충액 및 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.
- [0049] 본 발명은
- [0050] 1) 이병 식물체로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [0051] 2) 상기 DNA를 주형으로 상기 서열번호 4 내지 28 중 어느 하나의 염기서열로 구성되는 올리고 뉴클레오타이드를

포함하는 하는 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주 검출용 프라이머 세트를 이용하여 PCR, 또는 실시간 PCR(Real-Time PCR)을 수행하는 단계; 및

[0052] 3) 상기 DNA 단편의 증폭 및 정량하는 단계;

[0053] 를 포함하는 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주의 검출방법을 제공한다.

[0054] 본 발명에 있어서, 상기 게놈 DNA는 이병식물체의 종자, 잎, 줄기 또는 이들의 혼합물로부터 분리될 수 있으며, 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, NaOH 분리법을 이용할 수 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 PCR을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다.

[0055] 본 발명의 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주의 검출방법은 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주는 파이토프토라 시나모미(*Phytophthora cinnamomi*), 파이토프토라 시트리콜라(*Phytophthora citricola*), 파이토프토라 라테라리스(*Phytophthora lateralis*), 파이토프토라 피니폴리아(*Phytophthora pinifolia*), 파이토프토라 포리(*Phytophthora porri*), 파이토프토라 라모룸(*Phytophthora ramorum*), 파이토프토라 소재(*Phytophthora sojae*), 및 파이토프토라 시린개(*Phytophthora syringae*)로부터 선택되는 1종 이상을 검출하기 위한 것이다.

[0056] 또한 상기 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주의 검출방법은 상기 서열번호 4 내지 28 중 어느 하나의 염기서열로 구성되는 올리고 뉴클레오티드를 포함하는 하는 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주 검출용 프라이머 세트를 이용하여 파이토프토라(*Phytophthora*)속의 유무 뿐 아니라 종 특이적인 파이토프토라(*Phytophthora*)속의 종류까지 확정할 수 있는 장점이 있다.

[0057] 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용 가능한 키트를 이용할 수도 있다.

[0058] 본 발명의 방법은 상기 증폭 산물을 확인하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 겔 전기영동을 수행할 수 있다.

[0059] 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 VIC, NED, FAM 또는 PET를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출 가능한 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 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

발명의 효과

[0060] 본 발명에 따른 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주 검출용 프라이머 세트 및 이를 이용한 검출방법은 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주를 매우 낮은 농도까지 신속 정확하게 검출·정량할 수 있을 뿐 아니라 종류까지 확정할 수 있어, 육안적, 형태적 검사법의 한계를 극복하고 병원균의 분류체계에 명확한 기준을 제시해 국내 식물 검역의 국제표준화에 맞는 검역용 검사시스템으로 활용할 수 있는 효과가 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 파이토프토라(*Phytophthora*) 종들에 대한 *Ypt1* 유동 유전자의 염기서열들을 비교분석한 결과를 파일로그람(phylogram)으로 보여주는 것이고,

도 2는 본 발명의 파이토프토라 피니폴리아(*Phytophthora pinifolia*)와 파이토프토라 메가퍼마(*Phytophthora megasperma*)의 *Ypt1* gene에 대한 염기서열의 상동성 분석 결과를 보여주는 것이며,

도 3은 파이토프토라(*Phytophthora*) 8종에 있어, 해당 종에 대한 본 발명에 따른 파이토프토라 종 특이적 프라이머의 종 특이적 PCR 증폭산물을 보여주는 것이고,

(M: 100 bp DNA marker, 1, *Phytophthora ramorum*, 2: *P. cinnamomi*, 3: *P. ramorum*, 4: *P. cinnamomi*, 5: *P. citricola*, 6: *P. pinifolia*, 7: *P. lateralis*, 8, *P. porri*, 9: *P. syringae*.)

도 4는 파이토프토라(*Phytophthora*) 4종에 대한 파이토프토라 피니폴리아(*Phytophthora pinifolia*) 프라이머 (PPINY F49/R241)의 종 특이성을 확인한 결과이며,

도 5는 본 발명에 따른 파이토프토라 종 특이적 프라이머를 이용한 실시간 PCR(real time PCR) 반응 곡선을 보여주는 것이고,

도 6은 본 발명에 따른 파이토프토라 종 특이적 프라이머의 PCT 검출 민감도를 보여주는 것이며,

(A: conventional PCR, B: real time PCR)

도 7은 본 발명에 따른 파이토프토라 종 특이적 프라이머의 멀티플렉스 PCR 결과를 보여주는 것이고,

(1: *Phytophthora porri*/ *P. ramorum*, 2: *P. pinifolia*/*P. cinnamomi* primer set, 3: *P. porri*, 4: *P. citricola*, 5: *P. cinnamomi*, 6: *P. porri*/ *P. citricola*/ *P. cinnamomi* primer set, 7: negative control. M: 100 bp ladder)

도 8은 본 발명에 따른 파이토프토라 종 특이적 프라이머를 이용한 신속한 파이토프토라 종의 PCR 동정결과를 보여주는 것이며,

도 9는 본 발명에 따른 파이토프토라 종 특이적 프라이머를 대상으로 파이토프토라 피니폴리아(*Phytophthora pinifolia*)에 대한 검출결과를 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 본 발명은 하기 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0063] 이때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.

[0064] [실시예 1]

[0065] (1) 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주 및 DNA 시료 수집

[0066] 국내에 각종 작물에 발생하는 13개 파이토프토라(*Phytophthora*) 종들을 수집 또는 분양받아 유전자 분석을 위한 DNA 분리를 실시하였으며, 하기 표 2와 같이 전세계적으로 병발생이 보고된 57개 주요 파이토프토라(*Phytophthora*)속 균주들과 genomic DNA는 미국 캘리포니아 대학의 Coffey 교수로부터 분양받아 유전분석에 사용하였다.

[표 2]

<i>Phytophthora</i> species	Source	<i>Phytophthora</i> species	Source
<i>P. arecae</i>	P10213	<i>P. megakarya</i>	P8516
<i>P. boehmeriae</i>	P6950	<i>P. megasperma</i>	P3136
<i>P. botryosa</i>	P3425	<i>P. mirabilis</i>	P3005
<i>P. cactorum</i>	P0714	<i>P. melonis</i>	P10994
<i>P. cajani</i>	P3105	<i>P. mexicana</i>	P0646
<i>P. cambivora</i>	P0592	<i>P. nicotianae</i>	P6303
<i>P. capsici</i>	P0253	<i>P. palmivora</i>	P0255
<i>P. cinnamomi</i>	P2159	<i>P. phaseoli</i>	P10145
<i>P. citricola</i>	P7902	<i>P. porri</i>	P10728
<i>P. citrophthora</i>	P6310	<i>P. ramorum</i>	P10301
<i>P. clandestina</i>	P3943	<i>P. sojae</i>	P3114
<i>P. colocaliae</i>	P6317	<i>P. syringae</i>	P10330
<i>P. cryptogea</i>	P1088	<i>P. siskiyouensis</i>	P1825
<i>P. drechsleri</i>	P10331	<i>P. tropicalis</i>	P10329
<i>P. erythroseptica</i>	P1699	<i>P. vignae</i>	P3019
<i>P. fragariae</i>	P3821	<i>P. cactorum</i>	KACC 40183
<i>P. glovera</i>	P10618	<i>P. cambivora</i>	KACC 40159
<i>P. heveae</i>	P10604	<i>P. capsici</i>	KACC 40180
<i>P. hibernalis</i>	P3822	<i>P. citricola</i>	KACC 40184
<i>P. idaei</i>	P6767	<i>P. citrophthora</i>	KACC 40186
<i>P. ilicis</i>	P3939	<i>P. cryptogea</i>	KACC 40161
<i>P. infestans</i>	P10650	<i>P. drechsleri</i>	KACC 40195
<i>P. inflata</i>	P10341	<i>P. erythroseptica</i>	KACC 40704
<i>P. iranica</i>	P3882	<i>P. infestans</i>	KACC 40718
<i>P. katsurae</i>	P10187	<i>P. melonis</i>	KACC 40489
<i>P. lateralalis</i>	P3888	<i>P. palmivora</i>	KACC 40167
<i>P. meadii</i>	P6128	<i>P. parasitica</i>	CNU phypara
<i>P. medicaginis</i>	P10683	<i>P. sojae</i>	KACC 40412

DNAs and cultures of *Phytophthora* species used in this study were provided by Dr. Coffey. KACC; Korean Agricultural Culture Collection, CNU; Chungnam National University.

[0067]

[0068]

또한, 하기 표 3와 같이 파이토프토라(*Phytophthora*)속 이외의 식물병원균 균주들은 충남대(CNU)에 실험실에서 보관중인 것과 한국농업미생물자원센터(KACC)로부터 분양을 받아 사용하였으며, 분양된 균주들은 원심분리된 20% V8 juice가 첨가된 agar 배지에 계대배양 한 다음 25℃에서 5일간 배양하여 균사선단을 취한 후 실험에 공시균주로 사용하였다.

[표 3]

Isolate	Isolate source
<i>Alternaria alternata</i>	KACC79923
<i>Aspergillus niger</i>	KACC60060
<i>Botrytis cinerea</i>	BC413
<i>Cladosporium cladosporioide</i>	KACC40934
<i>Colletotrichum gloeosporioedes</i>	CG01
<i>Didymella bryoniae</i>	KACC40669
<i>Penicillium digitatum</i>	KACC41828
<i>Phoma cucurbitacearum</i>	KACC41841
<i>Pyricularia grisea</i>	KACC40414
<i>Pythium ultimum</i>	KACC40705
<i>Rhizoctonia solani (RG2)</i>	KACC40119
<i>Rhizopus oryzae</i>	KACC40936
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	KACC40172
<i>Stemphylium versicarium</i>	KACC4113
<i>Trichoderma hazianum</i>	KACC40509

[0069]

[0070]

(2) Genomic DNA 분리

[0071]

공시균주들을 20% V8 juice 배지 상에서 25℃에서 5일간 배양한 후 각 균주들의 균총 가장자리로부터 cork borer를 사용하여 직경 6 mm 균총원판을 4-5조각을 떼어내어 20% V8 broth에 접종하였으며, 암상태의 25℃ 항온 기내에서 5일간 정지배양 후 균사체를 멸균된 2겹의 거즈로 걸러 에펜도르프(effendorf) 튜브에 넣고 -70℃에서 얼린 후 동결건조 하였다.

[0072]

Murray(1980)의 DNA 분리 방법을 변형하여, 동결건조된 균사체를 마쇄한 다음 400 μ l의 extraction buffer[200 mM Tris-HCl(pH 8.0), 200 mM NaCl, 30 mM EDTA, 0.5% SDS]와 proteinase K 50 μ g을 첨가하고 37℃에서 1시간 처리하였으며, 이어서 400 μ l의 2 $\times$ CTAB solution[2% CTAB(w/v), 100 mM Tris-HCl(pH 8.0), 20 mM EDTA(pH 8.0), 1.4M NaCl, 1% PVP(Polyvinylpyrrolidone)]을 첨가하여 잘 섞어준 후, 600 μ l의 클로로포름:이소아밀 알코올(24:1)로 추출하고 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 상등액을 1.5 ml 튜브에 넣었다. 이어서 취해진 상등액에 0.7배량의 이소프로판올을 첨가하고 실온에서 10분간 방치한 후 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리를 하였으며, 70% 에탄올을 이용해 같은 방법으로 세척하고 건조시켜 100 μ l의 3차 증류수에 녹인 다음 아가로스 겔(agarose gel)에 전기영동하여 DNA를 확인 및 정량하였다.

[0073]

(3) PCR 증폭 및 염기서열 분석

[0074]

Ypt1(the ras-related protein gene)를 비롯한 IGS(intergenic spacer), *Cox*(mitochondrial gene), β -tubline 등의 유용유전자들에 대한 DNA 염기서열 정보를 얻고자 파이토프토라(*Phytophthora*) 종들의 각각의 정제된 total genomic DNA에 대한 PCR 증폭을 실시하였다(Chen and Roxby, 1996; Moorman et al., 2002).

[0075]

본 실험에서 종 특이적 프라이머의 디자인을 위해 사용된 *Ypt1* gene 영역을 증폭하기 위하여 Chen and Roxby(1996)에 의해 제작된 유니버설 프라이머(universal primer)를 사용하여 하기 표 4의 PCR 조건으로 PCR을 수행하였다.

[표 4]

Target DNA	Initial Denature	Step Cycle				Final Extention
		Denature	Annealing	Extension	Cycles	
<i>Cox</i> gene	95℃/5 min	94℃/30 sec	50℃/30 sec	72℃/1 min	35	72℃/10 min
<i>Ypt1</i> gene	95℃/5 min	94℃/30 sec	55℃/30 sec	72℃/1 min	35	72℃/10 min
IGS region	95℃/5 min	94℃/30 sec	50℃/30 sec	72℃/1 min	35	72℃/10 min
β -tubline	94℃/5 min	94℃/30 sec	60℃/30 sec	72℃/1 min	35	72℃/5 min

[0076]

[0077]

각각의 프라이머 0.5 pmol, 2 ng의 genomic DNA, 0.2 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 2.5unit의 Taq DNA polymerase에 멸균수를 첨가하여, 최종 부피를 50 μ l로 하여 PCR을 수행하였다. MJ Research사의 PTC-100을 이용하여 PCR 증폭을 하였으며, 증폭된 PCR 산물은 1.2% 아가로스 겔서 100V/30분간 전기영동하여 브롬화 에티디움(ethidium bromide)로 염색한 후 관찰하였다. PCR 증폭 산물은 PCR prep kit(iNtRon Biotechnology)로 정제하고, BigDye terminator cycle sequencing kit(Applied Biosystems, Forster City, CA, U.S.A)를 이용, template 40 ng, 프라이머를 각각 3.2 pmol, terminator ready reaction mixture 8 μ l에 물을 첨가하여 20 μ l 부피로 조절한 뒤 96℃/10초, 50℃/5초, 60℃/4분으로 25회 반복하여 PCR 반응을 수행한 후, ABI prismTM 3730 Genetic Analyzer(PE Applied Biosystems)를 이용하여 시퀀싱(sequencing)을 실시하였다.

[0078]

파이토포토라(*Phytophthora*) 종들에 대한 유용유전자들의 염기서열들을 비교분석한 결과, 도 1에서도 확인할 수 있듯이 universal primer에 의해 대부분의 파이토포토라(*Phytophthora*) 종들에서 400 내지 500 bp 크기의 증폭 산물을 나타냈던 *Ypt1* 유전자 DNA 염기서열은 비교적 높은 유사도를 나타냈지만 다른 유전자들의 분석에서는 나타나지 않았던 근연종들 간의 변이를 확인할 수 있었다.

[0079]

그러나 상기 *Ypt1* 유전자를 제외한 유전자에서는 동일 종 내 균주들간의 분석에 있어, 변이가 나타나 종 특이성을 대표할 수 있는 변이 영역을 찾아 프라이머를 디자인 하기가 매우 어려워 본 실험에서는 국내 식물검역 대상 8종에 대한 종 특이적 프라이머를 선별하기 위해 *Ypt1* 유전자 영역을 선정하고 좀 더 세밀한 DNA 염기서열 분석을 수행하였다.

[0080]

[0081]

(4) 종 특이적 프라이머 선별

[0082]

종 특이적 프라이머의 선발을 위해 사용된 본 연구와 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)를 통해 얻어진 DNA 염기서열 정보는 EMBL-EBI(<http://www.ebi.ac.uk>)에서 clastalW 프로그램과 PHYDIT program version 3.2(Chun, 1995)를 이용하여 파이토포토라(*Phytophthora*) 종들간의 유전적 다양성 및 유전관계 분석을 수행하였다. Neighbor-joining tree는 PHYLIP 3.57c Package를 사용하여 Kimura' s two-parameter model에 의해 작성하였으며 1,000회의 bootstrap 분석을 통해 신뢰도를 평가하였다.

[0083]

한편, 종 특이적 프라이머들을 설계하기 위해 Primer3 프로그램과 Oligonucleotide Properties Calculator(<http://www.basic.northwestern.edu>)를 이용하였다. 하기 표 5 및 표 6의 프라이머는 모두 프라이머 내부에 헤어핀 루프(hairpin loops)를 형성하지 않으면서 프라이머들 사이에서 다이머(dimer)나 인터널 루프(intenal loop)가 형성되지 않으며, conventional PCR과 real-time PCR에서 모두 활용 가능한 70 내지 400 bp 사이의 크기로 설계하였다.

[표 5]

Target species	서열번호	Primer codes	DNA sequences (5'→ 3')	Site
<i>Phytophthora</i> spp.	1	Ypt1F	CGACCATYGGYGTGACTTT	
	2	Ypt4R	TTSACGTTCRCAGGCGTA	
	3	Ypt5R	GCAGCTTGTTTACGTTCTCR	
<i>P. cinnamomi</i>	4	PCNNY F1	CGTCGTTGTTGTTTCTGTGC	59-78
	5	PCNNY R1	CTTCCAACAGGCGAATAGGA	151-170
	6	PCNNY R2	CTCCACGAACAGCTTCCAA	164-182
	7	PCNNY R3	CCCCTACAGCAGCACCATA	198-217
	8	PCNNY R430	GCAAATCATAGCCGCACAAT	411-430
<i>P. citricola</i>	9	PCTIY F2	GCCAGGCTCTGTTTGATAGC	13-32
	10	PCTIY R1	GCACAACCATTAGTCCAGCA	191-210
<i>P. lateralis</i>	11	PLTY F1	CTGATGACGGGATCGTGTCTAG	44-66
	12	PLTY R1	TCCCGCAGACATAACAATCTG	146-165
<i>P. pinifolia</i>	13	PPINY F49	CTCCGTTGATGTCCACTACAAG	29-50
	14	PPINY R241	GGTGTCCCACTACACAAGAGAG	200-221
<i>P. porri</i>	15	PPORY F1	TTGTACGTAGCGACAAATCCTC	49-70
	16	PPORY F3	CAAATTGTACGTAGCGACAAATCCT	45-69
	17	PPORY R1	AGTGTCCCACTGAAAAACAAGA	113-134
<i>P. ramorum</i>	18	PRAMY F1	CAGTGACCTCTCTCTCTCT	9-27
	19	PRAMY F2	ACGAGGGGATCGTGTCTAA	46-65
	20	PRAMY R1	GGGAACGCAGACGTACAATC	147-166
	21	PRAMY R2	AACTCACCCACGAAAGTG	176-195
<i>P. syringae</i>	22	PSRYY F1	TAAGGGTGGGTTGGTTCATC	83-102
	23	PSRYY F2	CTCGTAAGGGTGGGTTGGTT	79-98
	24	PSRYY F3	CAGATTGTACGTACCAGGAGCTT	45-67
	25	PSRYY R1	CCGTGTCCCACTACAACACA	134-153
	26	PSRYY R3	CGTGTCCCACTACAACACAAA	132-152
<i>P. sojae</i>	27	PSOJY F48	CGCTTTAGAGTCCAGGATGG	48-67
	28	PSOJY R234	GAAGCGTACCCACCAGTT	215-234

[0084]

[표 6]

Target species	프라이머 이름	Primer set	Product size (bp)
<i>P. cinnamomi</i>	PCNNY	PCNNY F1/R1	112
		PCNNY F1/R2	124
		PCNNY F1/R3	159
		PCNNY F1/R430	372
<i>P. citricola</i>	PCTIY	PCTIY F2/R1	198
<i>P. lateralis</i>	PLTY	PLTY F1/R1	122
<i>P. pinifolia</i>	PPINY	PPINY F49/R241	193
<i>P. porri</i>	PPORY	PPORY F1/R1	86
		PPORY F3/R1	90
<i>P. ramorum</i>	PRAMY	PRAMY F1/R1	158
		PRAMY F1/R2	186
	PRAMY	PRAMY F2/R2	149
<i>P. sojae</i>	PSOJY	PSOJY F48/R234	187
<i>P. syringae</i>	PSRYY	PSRYY F1/R1	73
		PSRYY F2/R3	74
		PSRYY F3/R1	111

[0085]

[0086]

(5) 종 특이적 프라이머의 특이성 및 민감도 조사

[0087]

상기 표 5 및 표 6에서 설계된 프라이머들의 종 특이성을 조사하고자 파이토프토라(*Phytophthora*) 종들 및 그

이외의 식물병원균들에 대해서 PCR 반응을 실시하였으며, PCR 반응민감도를 알아보기로 genomic DNA를 10배씩 연속적으로 희석시킨 후 PCR 증폭을 실시하였다.

[0088] 상기 genomic DNA는 NaOH 분리법을 이용하여 분리하였다. 식물체의 병든 조직을 1% NaOCl 용액으로 1분간 표면 소독한 후 멸균증류수로 씻어내고 파이토프토라 선택배지(V8 juice agar, Ampicilin 100 ppm, Rifampicin 10 ppm, PCNB 100 mg/ℓ, Hymexazol 25 ppm)에 올려두었다. 이어서 3 내지 5일 후 유도된 병원균의 형태적 특징을 확인하고 군사가 포함된 30 내지 50 mg의 배지조각을 1.5 ml 튜브에 옮겨 0.5 N NaOH 95 μl를 첨가하고 글래스 비드(glass bead)와 함께 마쇄하여 Finemix로 강하게 20분 교반(vortexing)한 후, 13000 rpm에서 1분간 원심분리하고 상층액 5 μl를 새 1.5 ml 튜브에 옮겨 45 μl의 Tris-HCl(pH 8.0)으로 희석하여 PCR 반응에 사용했다.

[0089] 선택배지 상에 병원균이 유도되지 않거나 식물체의 병든 조직으로부터 직접 DNA 분리를 실시할 때는 병든 조직을 약 1.5×2 cm 정도의 크기로 잘라 1.5 ml 튜브에 담고 동결건조를 하거나 액체질소를 이용해 얼린 후 비드와 함께 마쇄한 후, genomic DNA 분리방법과 동일한 변형한 Murray의 방법을 실시하여 DNA를 추출한 후 PCR 반응에 사용했다.

[0090] 상기 genomic DNA를 이용한 Conventional PCR 반응 조건은 최초 변성(initial denaturation)을 95℃에서 5분간 실시한 후 변성(denaturation) 94℃/30초, 어닐링(annealing) 60-65℃/30초, 증폭(extension) 72℃/30초로 35회 반복하여 실시하고 최후 증폭(final extension)을 72℃/5분 실시하였다.

[0091] 상기 본 발명의 선발된 파이토프토라 종 특이적 프라이머를 대상으로 8종의 국내 식물검역대상의 포함하는 14개의 다른 파이토프토라(*Phytophthora*) 종과 주요 식물병원 진균들을 대상으로 PCR 및 SYBR green 실시간 PCR(Real-Time PCR)을 수행하였다. 그 결과 하기 표 7 및 도 3 내지 도 5에서도 확인할 수 있듯이, 파이토프토라(*Phytophthora*) 8종에 대하여 본 발명의 선발된 파이토프토라 종 특이적 프라이머가 모두 해당 종에 대하여 특이적인 것을 확인할 수 있었다.

[표 7]

Target species	Specific primer set														
	PSRY F1/R1	PSRY F2/R3	PSRY F3/R1	PCNNY F1/R1	PCNNY F1/R2	PCNNY F1/R3	PCNNY F59/R430	PRAMY F1/R1	PRAMY F1/R2	PRAMY F2/R2	PC11Y F2/R1	PPORY F1/R1	PPORY F3/R1	PSO1Y F48/R234	PP1NY F49/R241
<i>P. cinnamomi</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. ctricola</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>P. lateralis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. pinifolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>P. porri</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>P. ramorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>P. sojae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>P. syringae</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. alni</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. cajani</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. cambivora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. citrophthora</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. colocasiae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. cryptogea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. fragariae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. heavea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. hibernalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. megasperma</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. quercina</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. vignae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium solani</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria solani</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pythium ultimum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Colletotrichum dimatium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Penicillium digitatum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rhizoctonia solani</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: positive, -: negative of PCR reaction.

또한, PCR 검출 민감도를 높이기 위해 동일한 프라이머를 이용하여 1차 증폭산물의 1 μ l(genomic DNA를 10배 희석)를 template DNA로 하여 위와 동일한 조건으로 2차 PCR을 수행하였다. SYBR green을 이용하는 실시간 PCR(Real-Time PCR)의 경우는 Bio-Rad사의 C1000을 사용하였으며 최초 변성(initial denaturation)을 95℃에서 3분간 실시한 후 변성(denaturation) 94℃/30초, 어닐링(annealing) 65℃/15, 증폭(extension) 72℃/20초로 40 회 반복하여 실시하였다. PCR mixture는 genomic DNA의 *Ypt1* 유전자를 증폭할 때와 동일하게 제조하였다.

그 결과 도 6에서도 확인할 수 있듯이, 1차로 실시한 conventional PCR에 있어서의 검출 민감도는 대부분 대략 1-10 pg이 나타났으며, 각각의 동일한 프라이머를 이용한 2차 PCR 결과에서는 이보다 10-100배 높아 실시간 PCR(real-time PCR)을 수행 시와 유사한 PCR 반응 민감도를 나타내었고, SYBR green 실시간 PCR의 경우 1 pg-100 fg으로 1-10 pg의 conventional PCR의 수행결과 보다 10 내지 100배 정도 민감도가 우수하였다.

즉, conventional PCR에서의 민감도 결정이 젤 상에 보여 지는 밴드의 유무의 판단에 의해 결정되는데 낮은 농도의 증폭산물이 존재할 경우 육안으로 확인하기 어렵다. 따라서 눈으로 확인할 수 없지만 존재하는 증폭산물을 젤 상에 나타나게 하기 위해 2차 PCR의 수행이 요구되어진다. 또한, 2차 PCR 실행 시 우려되는

실험 오염이나 실험상 여러 차례 수행하는 번거로움이 뒤따르는 문제점이 있다.

[0096] 따라서 본 발명에 따른 종 특이적인인 프라이머는 real time PCR을 수행치 못할 경우 추후 식물체에 존재하는 소량의 병원균을 검출하기 위해 유용하게 활용될 수 있는 장점이 있다.

[0097] (6) 멀티플렉스 PCR 기법을 이용한 병원균 검출

[0098] 다양한 크기의 PCR 증폭산물을 생산하는 프라이머들을 동시에 활용하기 위해 8종의 종특이적 프라이머를 개발할 때 70 내지 400 bp의 증폭산물을 생산하는 프라이머들을 만들었으며, 모든 프라이머들이 55 내지 60℃ 사이의 TM 값을 갖도록 하여 PCR에 활용시 그 효율을 높이고자 하였다.

[0099] 이에 2 내지 3 종류의 파이토프토라 종 특이적 프라이머 세트들의 조합을 통해 나타난 젤 상의 밴드형성 유무와 형성되는 PCR 증폭산물의 크기 차이의 식별로 병원균들의 신속한 종의 동정이 가능함을 확인하였다.

[0100] 그 결과 도 7에서도 확인할 수 있듯이, 2가지 조합의 프라이머 세트를 활용하여 2 종류의 병원균들을 각각 동정할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0101] (7) 신속한 파이토프토라(*Phytophthora*) 속 PCR 동정

[0102] 국내 및 미국에서 분양받은 파이토프토라 소재(*Phytophthora sojae*), 파이토프토라 시린개(*Phytophthora syringae*), 파이토프토라 피니폴리아(*Phytophthora pinifolia*), 파이토프토라 시나모미(*Phytophthora cinnamomi*), 파이토프토라 시트리콜라(*Phytophthora citricola*)의 정확한 종 동정을 위하여, 배지 상에 존재하는 병원균들을 대상으로 *Ypt1* universal primer를 이용하여 DNA 시퀀스 분석을 실시한 후, 기존에 확보된 대략 45종의 파이토프토라속 균들에 대한 *Ypt1* DNA sequences data와 phylogenetic tree 분석을 수행하였다. 3일의 기간이 소요되었지만 각각의 종들은 다른 종들과는 별도로 동일한 종들과 완벽하게 한 그룹으로 나타나 정확한 종 동정을 가능하게 했으며, 이들에 대해 종 특이적 프라이머를 이용해 PCR을 수행한 결과, 도 8의 도면에서도 확인할 수 있듯이 각 종들의 종 특이적 증폭산물을 확인 할 수 있었다.

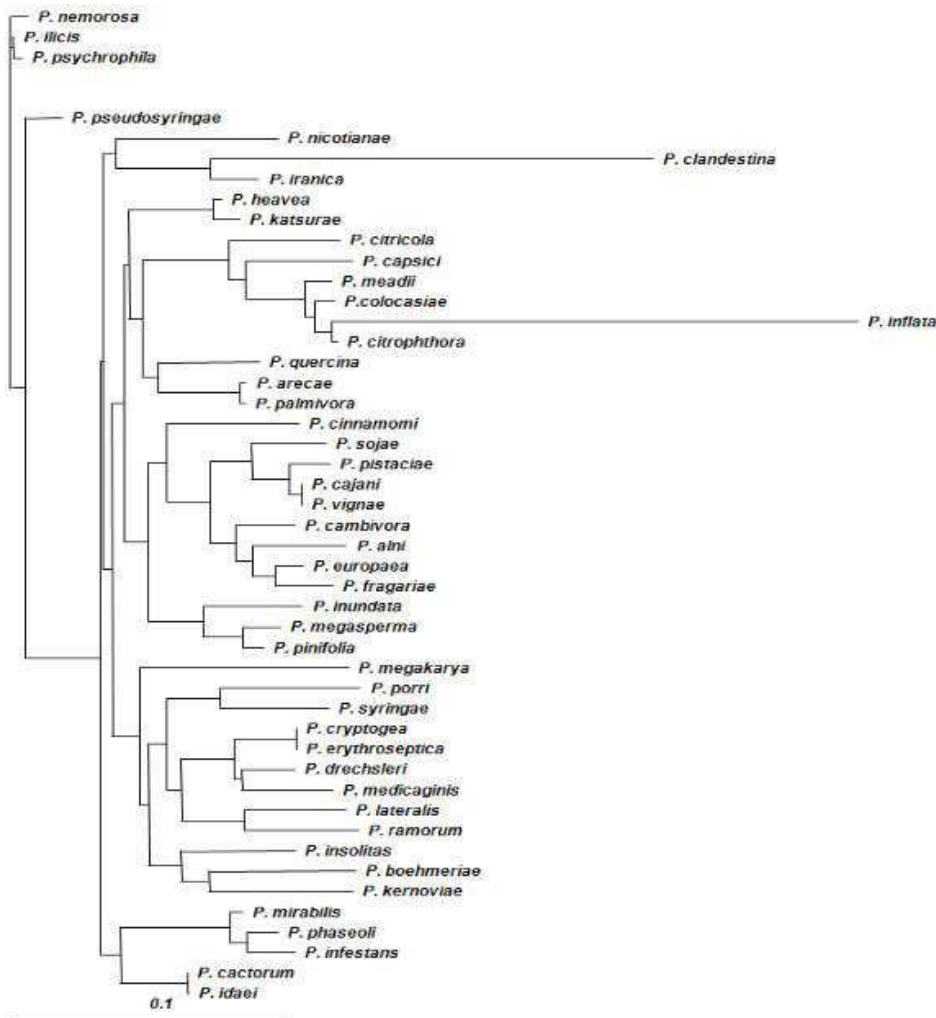
[0103] 또한, 국내 식물 검역 대상 8개의 파이토프토라 종들을 위해 개발된 종특이적 프라이머들의 실용적 활용을 위해, 8개의 연결된 PCR 튜브에 임의적으로 각각 넣은 후, 소나무 역병균 파이토프토라 피니폴리아(*Phytophthora pinifolia*)의 DNA를 모든 튜브에 넣고 PCR을 수행하였다.

[0104] PCR 반응 후 각 튜브의 증폭산물들을 확인한 결과 도 9에서 확인할 수 있듯이, 파이토프토라 피니폴리아의 프라이머가 들어간 튜브에서만 종 특이적 밴드를 확인할 수 있었다.

[0105] 상기의 결과로부터 추후 PCR 반응용 premix와 더불어 이들 병원균들의 검출용 프라이머들을 각 튜브별로 2 내지 3개 프라이머 조합으로 건조해 제조한다면 실제적으로 활용 가능함을 확인할 수 있었다.

도면

도면1



도면2

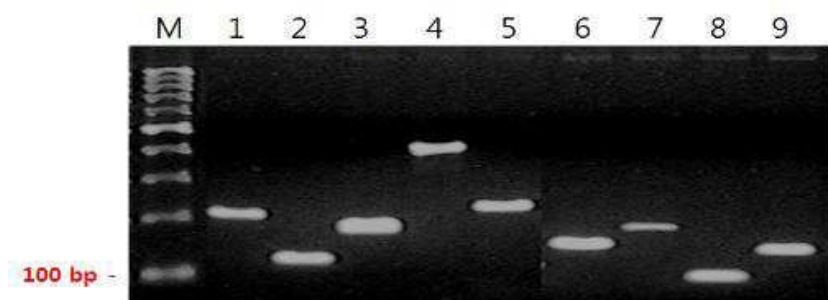
P.megasperma	GACTTGTGAGTGGCTCTGCTCTGCTCTTCCGACTTGGTCCCATTTGGTCCAGTACGG	60
P.pinifolia	-----GCAGGCTG-GATCTGCTCTTCTGGCTGGGCTCCGTTGATGTCCACTACAA	49
	* **** *	
P.megasperma	GCTGATTCTATCAGGATTACTGACGTTGCTCTTGCCCGTGACTTGGGCCAGAAAATCCG	120
P.pinifolia	GCTGATTCTATCAGGATTACTGACGTTGCTCTTGCCCGTGACTTGGGCCAGAAAATCCG	109

P.megasperma	TACGATCGAGCTGGACGGCAAGACCATCAAGCTCCAGATTGTGCGTCGGCTCCATTCT	180
P.pinifolia	TACGATCGAGCTGGACGGCAAGACCATCAAGCTCCAGATTGTGCGTCGGCTCCATTCT	169

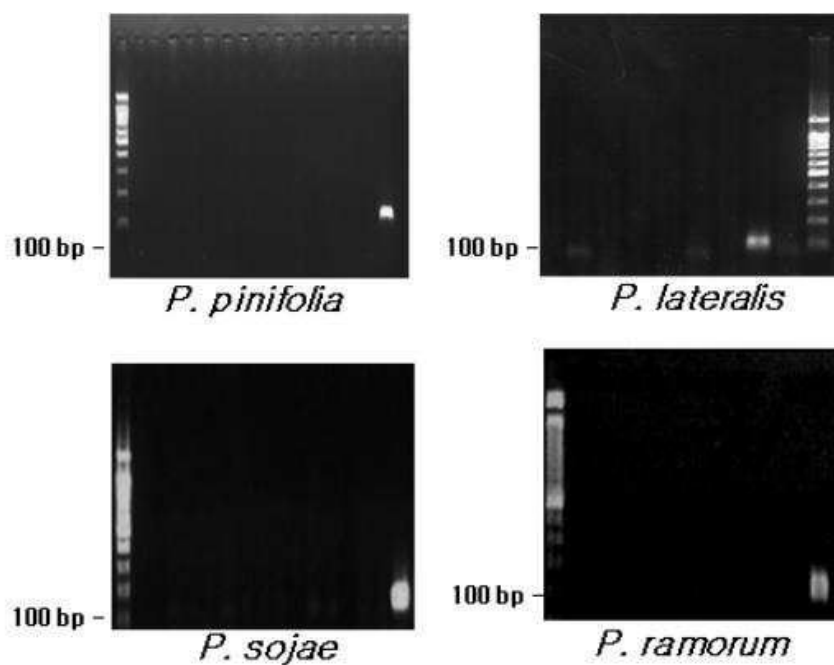
P.megasperma	TT-CITCTTGTGCTGCGGTGGACGAACTAATAATGCCAATCTCTGTGTAGTGGACACCG	239
P.pinifolia	TTTCTTGTGCTGCGGTGGACGAAA---ACTAA---CTCTCT-TGTGTAGTGGACACCG	222
	** **** *	
P.megasperma	CCGCCAGGAGCGTTTCCGACCATCACTAGCAGCTACTACCGCGGCGCGCACGGCATCA	299
P.pinifolia	CTGGCCAGGAGCGTTTCCGACCATCACTAGCAGCTACTACCGCGGCGCGCACGGCATCA	282
	*	
P.megasperma	TCGTGCTGTACGATGTACGGACCGAGTCTGTTCAACAACGTCAGCAGTGGCTGCATG	359
P.pinifolia	TCGTGCTGTACGATGTACGGACCGAGTCTGTTCAACAACGTCAGCAGTGGCTGCATG	342

P.megasperma	AAATCGATAGGTGCGCCCTAGCAGCGGACGCTATATCAGGGAACCGTGGAAAGGAGCT	419
P.pinifolia	AGATCGATAGGTGCGCCCTAGCAGCGGACGCTATATCAGGGAACCGTGGAAAGGAGCT	402
	*	
P.megasperma	GACTTGTGTGCGGCTGTGATTGTCAGATACGCTG-----	454
P.pinifolia	GACTTGTGTGCGGCTGTGATTGTCAGATACGCTGCGGAAACGTCAAAA	452

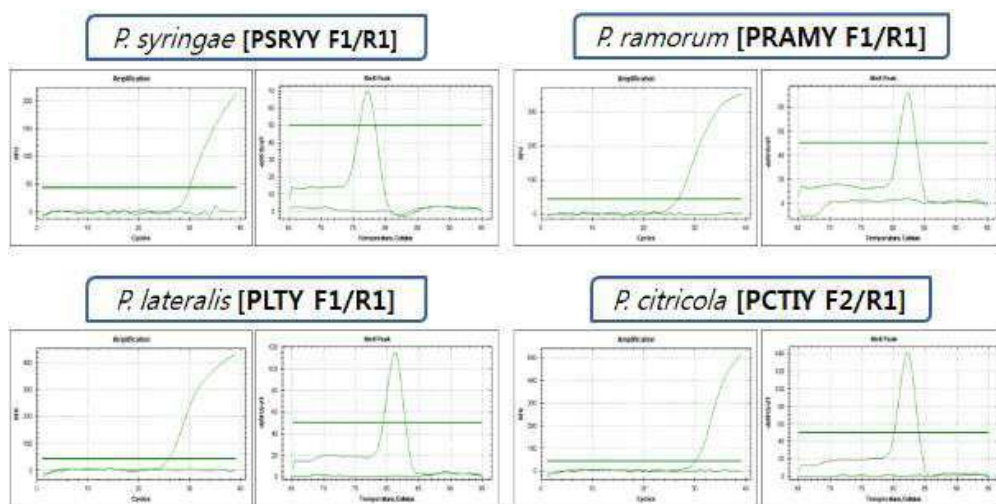
도면3



도면4

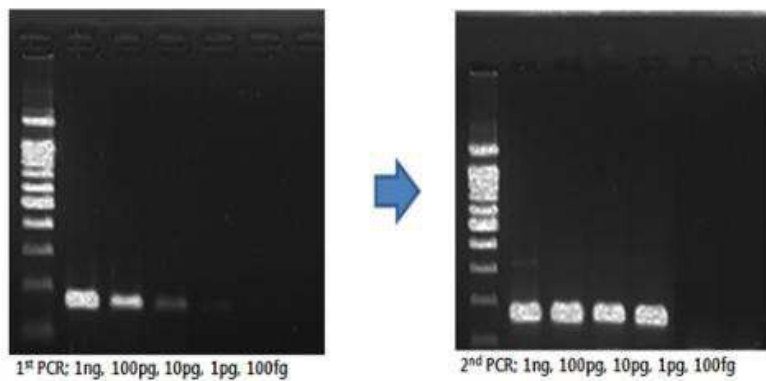


도면5

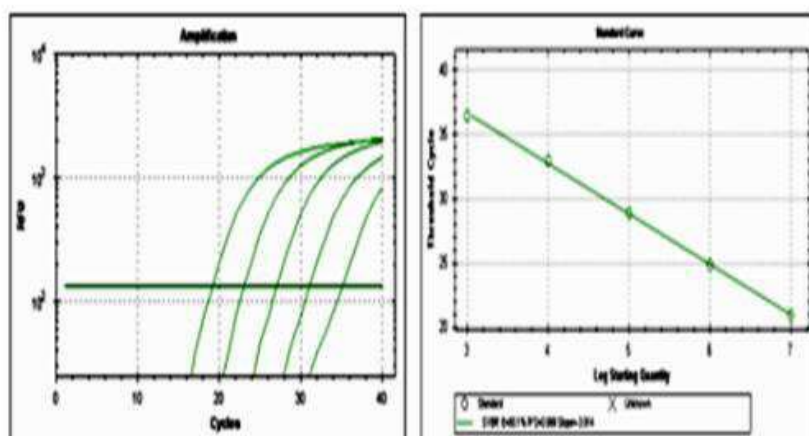


도면6

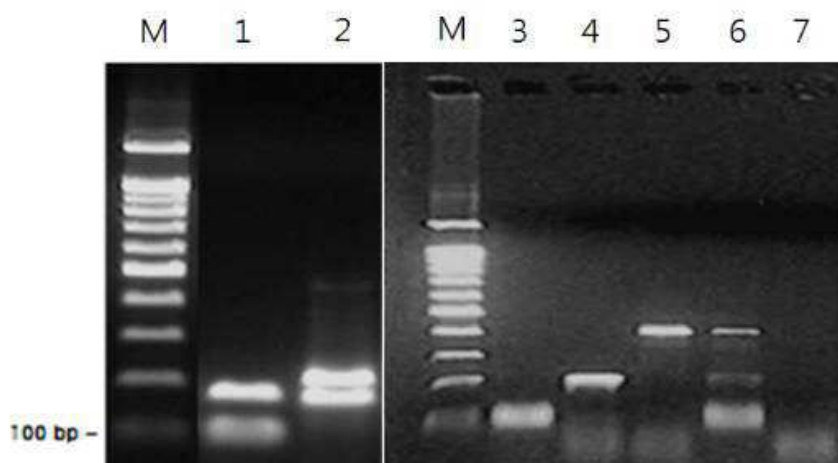
A



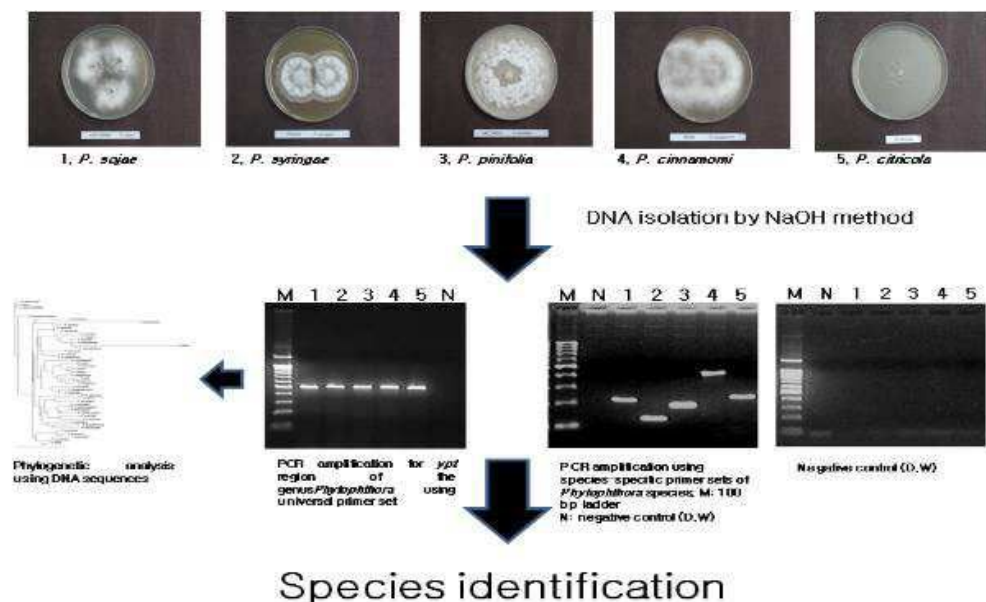
B



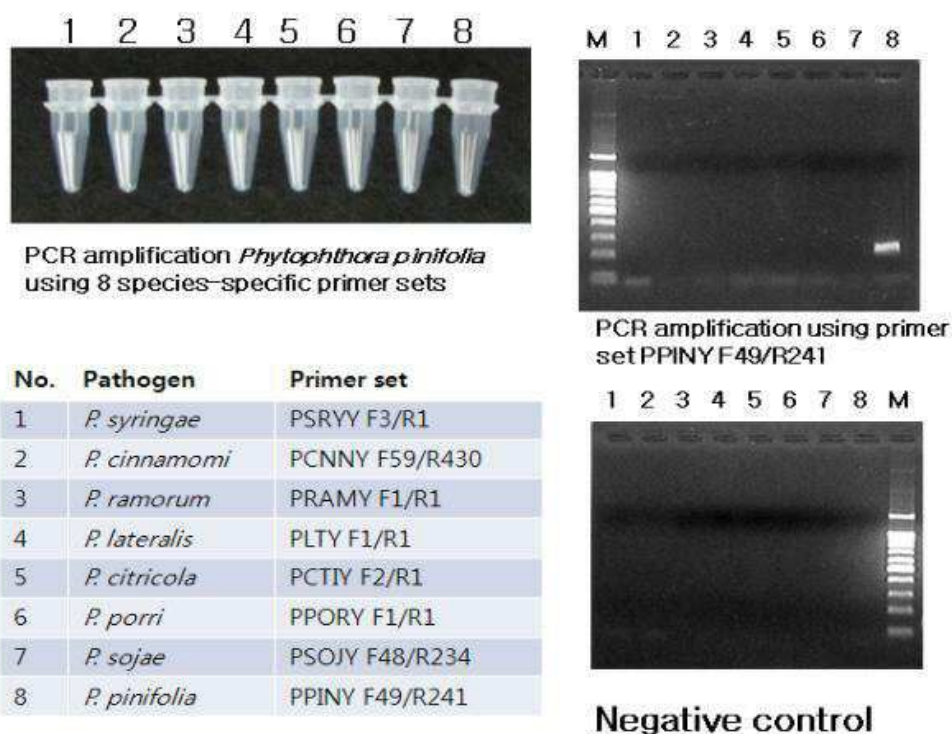
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Primers of polymerase chain reactions for the detection of
Phytophthora species, and detection kits and methods thereof

<160> 28

<170> KopatentIn 1.71
 <210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer
 <400> 1
 cgaccatygg ygtkgacttt 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> reverse primer
 <400> 2
 ttsacgttct crcaggcgta 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 3
 gcagcttggtt sacgttctcr 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer
 <400> 4
 cgtcgttggtt gtttctgtgc 20

 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer
 <400> 5
 cttccaacag gcgaatagga 20
 <210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 6
 ctccacgaac agcttccaa 19
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 7
 ccctactacag cagcaccata 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 8
 gcaaatcata gccgcacaat 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer
 <400> 9
 gccaggctct gtttgatagc 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 10
 gcacaacccat tagtccagca 20

<210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer
 <400> 11
 ctgatgacgg gatcgtgttc tag 23

<210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 12
 tccgcagac atacaatctg 20

<210> 13
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Forward primer
 <400> 13
 ctccgttgat gtccactaca ag 22

<210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 14
 ggtgtccac tacacaagag ag 22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 15

ttgtacgtag cgacaaatcc tc 22

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 16

caaattgtac gtagcgacaa atcct 25

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 17

agtggtccac tgaaaaacaa ga 22

<210> 18

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 18

cagtgcctc tctctctct 19

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 19

acgaggggat cgtgttctaa	20
<210> 20	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer	
<400> 20	
gggaacgcag acgtacaatc	20
<210> 21	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer	
<400> 21	
aaactcaccc acggaagt	20
<210> 22	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward primer	
<400> 22	
taagggtggg ttggttcac	20
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Forward primer	
<400> 23	
ctcgtaaggg tgggttggtt	20
<210> 24	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	Forward primer	
<400>	24	
cagattgtac	gtaccaggag	ctt
		23
<210>	25	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	25	
ccgtgtccca	ctacaacaca	
		20
<210>	26	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	26	
cgtgtccac	tacaacaca	a
		21
<210>	27	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Forward primer	
<400>	27	
cgctttagag	tccaggatgg	
		20
<210>	28	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	reverse primer	
<400>	28	
gaagcgtaca	cccaccagtt	
		20