(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0098793
(43) 공개일자 2013년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0020596
(22) 출원일자 2012년02월28일
심사청구일자 2012년02월28일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
김연주
경기도 화성시반월동 868번지 신영통 현대이차아파트 212동 505호
양덕춘
경기도 용인시 기흥구서천동 1번지 경희대학교 생명과학대학
김민경
경기도 수원시 장안구 연무동 225-9번지 3층
(74) 대리인
특허법인다나

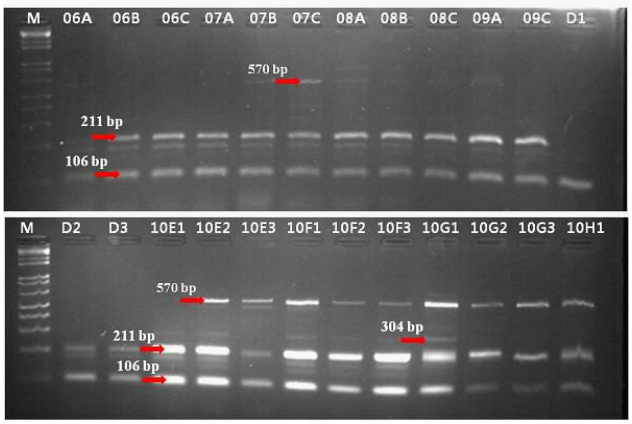
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **인삼 병원균 검출용 동시다중 유전자 증폭용 검출 방법**

(57) 요 약

본 발명은 인삼에 병을 유발하는 토양 병원성 곰팡이 4종을 검출할 수 있는 종(species) 및 속(genus) 특이적 프라이머 및 상기 프라이머를 이용하여 토양 병원성 곰팡이 4종을 동시에 진단할 수 있는 multiplex PCR 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



특허청구의 범위

청구항 1

정방향 프라이머로 서열번호 1 또는 서열번호 2중 어느 하나가 선택되고, 역방향 프라이머로 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6인 프라이머 세트를 포함하는 인삼 병원균을 검출하는 multiplex PCR 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 병원균은 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 피시움 울티멈(*Pythium ultimum*) 및 실린드로카폰 더스트럭턴스(*Cylindrocarpon destructans*)인 것을 특징으로 하는 인삼 병원균을 검출하기 위한 multiplex PCR 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 multiplex PCR 방법은 94℃에서 4분간 초기화 반응, 94℃에서 30초간 변성, 56℃에서 30초간 어닐링, 72℃에서 40초간 연장하는 반응을 33회 반복한 뒤, 72℃에서 7분간 반응하는 것을 포함 하는 방법.

청구항 4

병원균을 포함하는 시료로부터 병원균 DNA를 추출하는 단계 및 추출된 DNA를 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 방법을 수행하는 단계를 포함하는 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 피시움 울티멈(*Pythium ultimum*) 및 실린드로카폰 더스트럭턴스(*Cylindrocarpon destructans*) 병원균 존재 유무를 검출하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 multiplex PCR 산물의 크기를 분석하는 단계를 더 포함하는 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 피시움 울티멈(*Pythium ultimum*) 및 실린드로카폰 더스트럭턴스(*Cylindrocarpon destructans*) 병원균 존재 유무를 검출하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인삼에 병을 유발하는 토양 병원성 곰팡이 4종을 검출할 수 있는 종(species) 및 속(genus) 특이적 프라이머 및 상기 프라이머를 이용하여 토양 병원성 곰팡이 4종을 진단할 수 있는 multiplex PCR 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인삼(*Panax ginseng*)은 다년생의 반음지성 숙근초로 오가피과에 속하며 생육적온은 20℃전후로 주로 북반구의 극동지방에 자생하거나 재배되며 우리나라의 주산지는 경기 북부지역과 풍산 및 금산 지방이다. 인삼의 주 약리성분은 사포닌으로서 자양강장, 면역증강, 피로회복, 중추신경계 조절, 항스트레스, 항당뇨, 항종양활성 등의 우수한 효능이 밝혀짐에 따라 그 소비가 증가추세에 있으며 특히 고려인삼의 우수함이 밝혀짐에 따라 그 소비 또한 꾸준히 늘어날 것으로 전망된다.

[0003] 그러나 인삼의 이러한 뛰어난 효능과 소비 욕구에도 불구하고 인삼의 특성상 한 장소에서 4 ~ 6년을 재배해야 하기 때문에 병충해의 영향을 크게 받고 뿌리썩음병 등으로 인한 연작장해가 심하여 한번 재배한 후에는 그 장소에서의 재작 연한이 적어도 7년 이상이나 된다. 이 때문에 한번 인삼을 재배한 곳에서는 연작장해로 인해 더 이상 인삼을 재배하지 않고 인삼 재배지를 옮기게 되며 이로 인해 현재 인삼 재배지가 부족한 실정이다. 또한

2004년 한국식물병리학회의 발표에 따르면 우리나라에서 재배되고 있는 작물중 인삼의 병해가 총 38종으로 가장 많은 것으로 보고되기도 하였다.

[0004] 인삼의 가장 대표적인 병에는 모잘록병, 뿌리썩음병, 역병, 탄저병, 점무늬병, 회색곰팡이병, 균핵병, 줄기속무름병 등이 있으며 모잘록병을 유발하는 미생물 중 라이족토니아 솔라니 또는 피시움 울티멈, 뿌리썩음병을 유발하는 미생물 중 푸사리움 솔라니 또는 실린드로카폰 더스트럭턴스 등은 시간이 경과할수록 병원균 밀도가 증가되어 모잘록병 또는 뿌리썩음병에 의한 피해 발생이 크다. 따라서 재배농가는 상기 병원균의 감염을 막기 위해 인삼을 한번도 재배하지 않은 초작지를 선호하게 되나 병원균의 감염여부를 신속히 진단하기 곤란하여 초작지 선정에 어려움을 겪고 있다.

[0005] 이를 해결하기 위해 종래에는 연속적으로 희석한 재배 예정지의 토양시료를 선택배지에 생성되는 병원균 총수를 측정함으로써 토양내의 병원균을 검출하는 방법이 사용되었다. 그러나 토양내에 존재하는 병원균, 특히 실린드로카폰 더스트럭턴스의 후벽포자는 발아율이 현저히 낮아 병원균의 검출이나 정확한 밀도측정이 곤란하다. 또한 균 배양과 검출에 많은 시간과 인력이 소요되고 감염여부 판단의 정확도가 떨어진다는 문제점이 있다. 또한 현재까지 개발된 PCR 키트를 이용한 진단 방법으로는 거의 모두 한 종류의 바이러스의 감염여부만을 판독할 수 있을 뿐, 이들 바이러스를 한꺼번에 다중 PCR 방법으로 진단할 수 있는 진단키트는 아직까지 개발되지 있다. 그 이유는 다수의 바이러스를 한번의 다중 PCR 방법으로 검출하기 위해서는 그 PCR 시 각 사이클링 온도, 시간, 완충액의 조건 등이 일치하여야 하나 이러한 특정한 조건을 동시에 충족시키기에는 여러 가지 어려움이 있기 때문이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 국내 공개특허 제10-2010-0053831호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 인삼에 병을 유발하는 토양 병원성 곰팡이 4종인 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 피시움 울티멈(*Pythium ultimum*) 및 실린드로카폰 더스트럭턴스(*Cylindrocarpon destructans*)를 동시에 진단할 수 있는 multiplex PCR 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 정방향 프라이머로 서열번호 1 또는 서열번호 2중 어느 하나가 선택되고, 역방향 프라이머로 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6인 프라이머 세트를 포함하는 인삼 병원균을 검출하는 multiplex PCR 프라이머 세트를 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한 병원균을 포함하는 시료로부터 병원균 DNA를 추출하는 단계 및 추출된 DNA를 상기 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 multiplex PCR을 수행하는 단계를 포함하는 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 피시움 울티멈(*Pythium ultimum*) 및 실린드로카폰 더스트럭턴스(*Cylindrocarpon destructans*) 병원균 존재 유무를 검출하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 multiplex PCR 방법은 토양에서 병원균의 유무를 확인하고, 인삼 재배에 있어 적합하지 않은 토양을 선별하며, 인삼 병의 감염 예방 및 신속하고 정확한 진단이 가능하게 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 각 프라이머 세트의 전기영동사진이다.

도 2는 인삼 병원균 4종의 multiplex PCR 전기영동사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 정방향 프라이머로 서열번호 1 또는 서열번호 2중 어느 하나가 선택되고, 역방향 프라이머로 서열번호 3, 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6인 프라이머 세트를 포함하는 인삼 병원균을 검출하는 multiplex PCR 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 상기의 프라이머 세트로 이루어진 군에서 두 세트 이상을 선택한 인삼 병원균 검출용 multiplex PCR 방법도 포함된다. 예를 들면, 서열번호 1 및 3의 프라이머 세트, 서열번호 1 및 4의 프라이머 세트를 포함하는 인삼 병원균을 검출하기 위한 multiplex PCR용 프라이머 세트일 수 있다.

[0014] 상기 병원균은 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 피시움 울티멈(*Pythium ultimum*) 및 실린드로카폰 더스트럭턴스(*Cylindrocarpon destructans*)일 수 있다.

[0015] 본 발명에 있어서 "특이적"이라는 용어는 다른 병원균에 결합하지 않고 상기 인삼 병원균에만 특이적으로 결합하는 것을 의미한다.

[0016] 본 발명의 multiplex PCR 방법을 이용하여 인삼 모잘록병 및 뿌리썩음병의 병원균인 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 피시움 울티멈(*Pythium ultimum*) 및 실린드로카폰 더스트럭턴스(*Cylindrocarpon destructans*)의 유무를 진단 및 예방할 수 있으나, 모잘록병 및 뿌리썩음병이 발병되는 식물은 인삼에 한정되지 않으며, 또한 상기 병원균이 유발하는 식물병 및 토양에서의 상기 병원균의 유무를 진단하기 위하여서 이용될 수 있다.

[0017] 본 발명의 정방향 프라이머는 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머이다. 상기 서열번호 1 및 서열번호 2는 상기 4종의 병원성 곰팡이에 공통적으로 존재하는 염기서열이다. 역방향 프라이머는 서열번호 3 내지 6의 프라이머이다. 상기 역방향 프라이머에서 서열번호 3의 프라이머는 라이족토니아 솔라니의 역방향 프라이머이다. 상기 역방향 프라이머에서 서열번호 4의 프라이머는 푸사리움 솔라니의 역방향 프라이머이다. 상기 역방향 프라이머에서 서열번호 5의 프라이머는 피시움 울티멈의 역방향 프라이머이다. 상기 역방향 프라이머에서 서열번호 6의 프라이머는 실린드로카폰 더스트럭턴스의 역방향 프라이머이다.

[0018] 본 발명은 상기의 프라이머 세트로 이루어진 군에서 두 세트 이상을 선택한 인삼 병원균 검출용 multiplex PCR 방법도 포함된다. 본 발명은 보다 구체적으로, 서열번호 2 및 3의 프라이머 세트, 서열번호 2 및 4의 프라이머 세트, 서열번호 2 및 5의 프라이머 세트, 서열번호 2 및 6의 프라이머 세트를 포함하는 인삼 병원균 4종을 동시에 검출하는 multiplex PCR 방법일 수 있다.

[0019] 상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 1 내지 서열번호 5의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개, 23개 이상, 24개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1의 프라이머 (21개 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 1의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 서열번호 3의 프라이머(21개 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 3의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어서, 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.

[0022] 본 발명에 있어서 상기 multiplex PCR 방법은 94℃에서 30초간 변성, 56℃에서 30초간 어닐링, 72℃에서 40초간 연장하는 반응을 33회 사이클을 반복하는 것 포함할 수 있다. 상기 변성 단계 전에 94℃에서 4분간 초기화하는 단계를 포함할 수 있다. 또한 상기 사이클 반복 후 72℃에서 7분간 반응 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 상기 multiplex PCR 방법에 있어서의 온도 및 시간은 인삼 병원균인 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 피시움 울티멈(*Pythium ultimum*) 및 실린드로카폰 더스트럭턴스(*Cylindrocarpon destructans*)를 동일한 조건에서 서로 다른 프라이머를 이용하여 동시에 검출하기

위한 최적의 조건일 수 있다.

[0024] 본 발명은 또한 병원균을 포함하는 시료로부터 병원균 DNA를 추출하는 단계 및 추출된 DNA를 상기 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 multiplex PCR을 수행하는 단계를 포함하는 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*), 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*), 피시움 울티멈(*Pythium ultimum*) 및 실린드로카폰 더스트럭턴스(*Cylindrocarpon destructans*) 병원균 존재 유무를 검출하는 방법을 제공한다.

[0025] 본 발명은 또한 상기 multiplex PCR 산물의 크기를 분석하는 단계를 더 포함할 수 있다. Multiplex PCR 산물의 크기의 분석은 당업계에 알려진 임의의 방법이 사용될 수 있다. 예를 들면, 아가로즈 또는 폴리아크릴아미드 젤 전기영동에 의하여 표적 크기 마커와의 비교를 통하여 증폭 산물의 크기를 알 수 있다. 정방향 프라이머로 서열번호 1을 선택한 경우, 상기 multiplex PCR 산물의 크기가 85bp인 경우 푸사리움 솔라니, 190bp인 경우 실린드로카폰 더스트럭턴스, 283bp인 경우 라이족토니아 솔라니, 549bp인 경우 피시움 울티멈이 존재하는 것으로 판별할 수 있다. 또한 정방향 프라이머로 서열번호 2 를 선택한 경우, 상기 multiplex PCR 산물의 크기가 106bp인 경우 푸사리움 솔라니, 211bp인 경우 실린드로카폰 더스트럭턴스, 304bp인 경우 라이족토니아 솔라니, 570bp인 경우 피시움 울티멈이 존재하는 것으로 판별함을 특징으로 하여 병원균의 존재 유무를 검출할 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기의 "PCR" 은 당업계에 잘 알려져 있는 것으로 표적 핵산을 주형으로 사용하고, 상기 표적 핵산에 특이 적인 프라이머를 사용하여, 변성, 어닐링 및 연장 반응의 과정을 반복함으로써 표적 핵산을 증폭하는 과정을 의미한다. 또한, "Multiplex PCR" 이란 PCR에 사용되는 프라이머 두 세트 이상이 하나의 증폭 반응에 사용되는 것을 의미한다.

[0027] 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. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0028] **<실시예>**

[0029] 실시예 1. 인삼 병원균의 DNA 수집, DNA 추출, 시퀀싱

[0030] 인삼 병원균 중 몇 가지를 선정하여 분양받았다. 상기 병원균은 토양 병원균이면서 인삼 병해 중 심각한 연작장해를 일으키는 뿌리썩음병 원인균들인 푸사리움 솔라니(*Fusarium solani*, 수탁번호 KACC 41092), 실린드로카폰 더스트럭턴스(*Cylindrocarpon destructans*, 수탁번호 KACC 41077)와 모잘록병을 일으키는 피시움 울티멈(*Pythium ultimum*, 수탁번호 KACC 42265), 라이족토니아 솔라니(*Rhizoctonia solani*, 수탁번호 KACC 40123)를 농촌진흥청에서 운영하는 KACC(한국농업미생물자원센터)와 KCTC(생명연구자원본부)에서 분양받았다.

[0031] 분양받은 미생물은 25℃에서 약 1주일간 배양하여 어느 정도 균사가 자라면 일부를 떼서 DNA를 추출했다. DNA 추출은 solgent(주)사의 Fungi prep. kit를 이용하거나 논문 (Lee, M., S. Park, et al.(2009). "A Quick and Safe Method for Fungal DNA Extraction")을 이용하여 수행하였다.

[0032] 추출한 DNA는 ITS 1, 4 영역을 ITS 1, ITS 4 primer로 PCR을 수행하여 증폭하고 시퀀싱하였다.

[0033] 또한 NCBI(미국 국립생물공학정보센터) 홈페이지에서도 다른 연구자들이 기존에 시퀀싱하였던 병원균의 ITS 1, 4 영역을 다운로드 받아 직접 시퀀싱한 결과와 비교하고 프라이머를 제작하는데 참고하였다.

[0034] 실시예 2. 프라이머 제작

[0035] 프라이머 제작은 시퀀싱한 DNA염기서열을 Bioedit 프로그램을 이용하여 정렬하고 Primer Premier 5 프로그램을 이용하여 각 병원균 별 특이적인 DNA 영역을 찾아 프라이머로 제작하였다.

표 1

[0036] 프라이머 제작

병원균	Forward	Reverse	크기
리족토니아 솔라니(Rhizoctonia solani)	서열번호 1 5' - GAA TCA TCG AAT YTT TGA ACG -3' 서열번호 2 5' - AAT GTG AAT TGC AGA ATT CAG T -3	서열번호 3 5' GAA TGG ACT ATT AGA AGC GGT 3'	283bp 304bp
푸자리움 솔라니(Fusarium solani)		서열번호 4 5' GCC TGA GGG TTG TAA TGA CG 3 '	85bp 106bp
피시움 울티멈(Pythium ultimum)		서열번호 5 5' TTA GCG GGT AGT CT GTC TGC 3'	549bp 570bp
실린드로카폰 더스트럭턴스(Cylindrocarpon destructans)		서열번호 6 5' TGC GAG GTG TGC TAC TAC G 3'	190bp 211bp

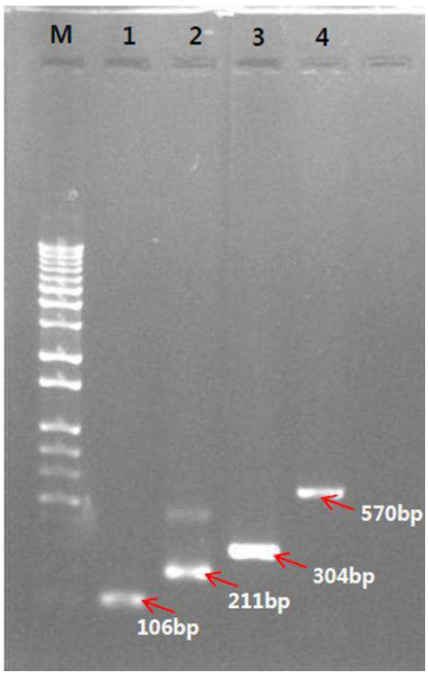
[0037] 실시예 3. Multiplex PCR 수행, 단일밴드 확인 및 적용

[0038] 제작한 프라이머를 이용하여 multiplex PCR을 수행하고 전기영동으로 밴드를 확인하며 가장 밴드가 명확하게 나오는 조건을 설정하였다. Multiplex PCR을 수행하기 위하여 프라이머(5 pmol) 정방향 프라이머 2 ㎕, 역방향 프라이머 2 ㎕에 각 병원균의 DNA가 같은 비율로 혼합된 DNA 2 ㎕, 증류수 4 ㎕, 2x Premix(Accupower Gold, Bioneer Corporation) 10 ㎕가 혼합된 키트를 제조하여 수행하였다. 인삼 병원균 4종을 검출하기 위한 최적의 조건은 94℃에서 4분간 초기화 반응, 94℃에서 30초간 변성, 56℃에서 30초간 어닐링, 72℃에서 40초간 연장하는 반응을 33회 반복한 뒤, 72℃에서 7분간 반응으로 설정되었다. 또한 프라이머 제작시 의도했던 DNA 증폭물의 길이와 전기영동상의 밴드 위치가 그 길이에 맞는 적절한 위치에 있는지 확인하였다.

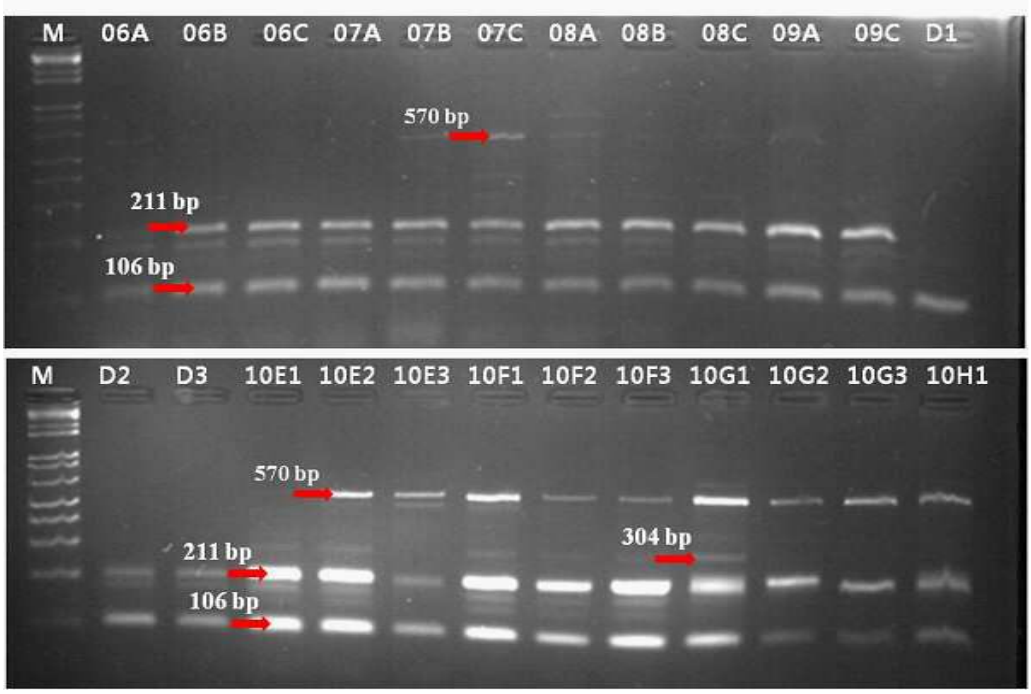
[0039] 도 2는 15종 토양시료(파주, 연천 지역 인삼재배지 토양시료)를 이용하여 전기영동을 수행한 전기영동사진을 나타낸다. 그 결과 토양시료에 존재하는 병원성 곰팡이 4종을 동시에 존재 유무를 진단할 수 있었다.

도면

도면1



도면2



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Method for detecting ginseng pathogenic fungi using multiplex PCR

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer No.1 for amplifying PCR conserved region from pathogenic fungi

<400> 1

gaatcatcga atytttgaac g 21

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer No.2 for amplifying PCR conserved region from

pathogenic fungi

<400> 2

aatgtgaatt gcagaattca gt 22

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer No.1 for amplifying PCR conserved region from pathogenic fungus

<400> 3

gaatggacta ttagaagcgg t 21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer No.2 for amplifying PCR conserved region from pathogenic fungus

<400> 4

gcctgagggt tgtaatgacg 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer No.3 for amplifying PCR conserved region from pathogenic fungus

<400> 5

ttagcgggta gtctgtctgc 20

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer No.4 for amplifying PCR conserved region from pathogenic fungus

<400> 6

tgcgaggtgt gctactacg 19