(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년08월10일
(11) 등록번호 10-2143095
(24) 등록일자 2020년08월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6888 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6888 (2018.05)
C12Q 2600/158 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0064055
(22) 출원일자 2019년05월30일
심사청구일자 2019년05월30일
(56) 선행기술조사문헌
CN100402666C
US20100209395A1
NCBI Reference Sequence: XM_011160875
NCBI Reference Sequence: XM_026140692

(73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
대한민국(농림축산식품부 농림축산검역본부장)
경상북도 김천시 혁신8로 177 (율곡동)
(72) 발명자
박영진
경상북도 김천시 용전로 167(율곡동 969)
이홍식
경상북도 김천시 용전로 167(율곡동 969)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김남혁

전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 이재영

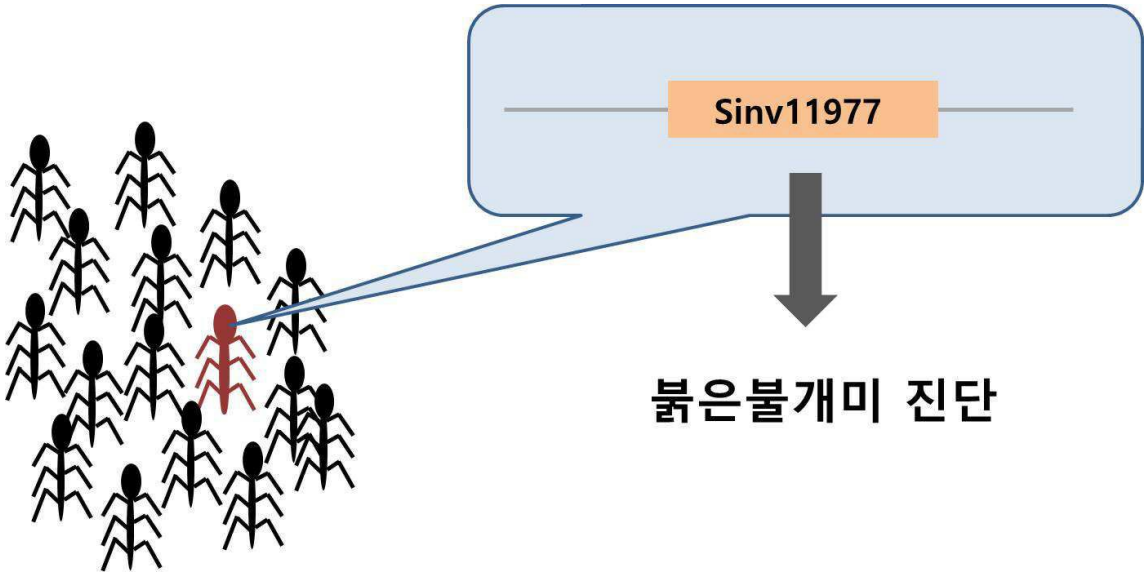
(54) 발명의 명칭 **외래 침입 붉은불개미 독샘 특이 발현 유전자, Solenopsis invicta 11977을 이용한 분자진단 방법**

(57) 요 약

본 발명은 Sinv11977 유전자를 검출하기 위한 붉은불개미 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 붉은불개미 진단용 키트 및 상기 조성물 또는 키트를 이용한 붉은불개미 진단을 위한 정보 제공방법에 관한 발명이다.

본 발명의 붉은불개미 진단용 조성물, 붉은불개미 진단용 키트, 붉은불개미 진단을 위한 정보 제공 방법 및 붉은불개미 진단용 프라이머 세트에 따르면, Sinv11977 유전자를 검출하여, 붉은불개미 진단에 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

고영호

경기도 안양시 관평로 170번길 15 일송빌딩 703

김아영

경기도 안양시 관평로 170번길 15 일송빌딩 703

김지혜

경기도 안양시 관평로 170번길 15 일송빌딩 703

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545018432

부처명 농림축산검역본부

연구관리전문기관 농림축산검역본부 식물검역기술개발센터

연구사업명 식물검역기술개발

연구과제명 외래 붉은불개미의 현장 진단용 간이 키트 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단, 농림축산검역본부

연구기간 2018.06.27 ~ 2019.11.15

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

Sinv11977 (*Solenopsis invicta* 11977) 유전자를 검출하는 것을 특징으로 하는, 붉은불개미(*Solenopsis invicta*) 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 핵산을 검출하는 것인, 붉은불개미 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 서열번호 7의 염기서열 및 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트를 포함하는 것인, 붉은불개미 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 서열번호 12의 염기서열을 및 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트를 포함하는 것인, 붉은불개미 진단용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 조성물은 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 프로브를 추가로 포함하는 것인, 붉은불개미 진단용 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 붉은불개미 진단용 키트.

청구항 8

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, Sinv11977 유전자를 검출하는 단계를 포함하는, 붉은불개미 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 방법은 Sinv11977 유전자가 검출되는 경우, 상기 개체를 붉은불개미로 진단하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 붉은불개미 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

(a) 서열번호 7의 염기서열 및 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트; 및

(b) 서열번호 12의 염기서열 및 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트

로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 붉은불개미 진단용 프라이머 세트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 Sinv11977 유전자를 검출하기 위한 붉은불개미 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 붉은불개미 진단용 키트 및 상기 조성물 또는 키트를 이용한 붉은불개미 진단을 위한 정보 제공방법에 관한 발명이다.

배 경 기 술

[0003] 붉은불개미(영어: red imported fire ant, 학명: Solenopsis invicta)는 개미과에 속하는 개미의 한 종으로 붉은독개미라고도 한다. 독성이 있으며 대부분의 사람에게는 치명적이지 않으나, 노약자나 알레르기가 있는 일부 사람에게는 치명적일 수 있다. 붉은불개미 독의 구성성분은 다른 벌목곤충들의 것과는 커다란 차이점을 가지고 있다. 벌목 곤충들의 독액의 주요한 성분이 아미노산 200개 이하인 펩타이드류 독들인데 비하여 붉은불개미의 독액은 90% 이상이 solenopsin을 포함한 알칼로이드 화합물이다. 따라서, 붉은불개미에 쏘인 사람들은 심한 통증을 느끼고, 심한 경우에는 아나필락시스(심각한 알레르기반응)가 동반되는 경우도 있다.

[0004] 현재 붉은불개미는 미국, 호주, 중국, 대만, 필리핀, 인도, 카리브해, 뉴질랜드 등에 침입을 하여 정착을 하였으며, 최근에는 붉은불개미가 생존하고 번식을 할 수 있는 기후를 가지는 한국과 일본의 항구에서 붉은불개미 개체나 군체의 발견이 매년 보고되고 있다. 그들에 의한 피해는 자연환경 및 농축산물의 파괴에 한정되지 않고, 인간을 공격하여 의료문제와 건축물 및 사회기반시설을 파괴하는 심각한 문제들을 일으키고 있다.

[0005] 침입한 붉은불개미의 방제에는 막대한 비용이 들어가지만, 방제를 하지 않을 경우 나타나는 피해가 더 막대하다고 예측이 되므로, 지속적인 방역과 박멸을 위한 노력이 필요하다. 미국과 호주의 예에서처럼 한번 붉은불개미가 침입하여 정착단계에 들어가면 완전박멸이 불가능하므로, 붉은불개미 방제에서 가장 중요한 단계는 초기에 붉은불개미의 침입을 발견하여 정착 전에 제거하는 것이다.

[0006] 현재 해충을 감별하기 위해 분자마커를 이용한 방법이 널리 이용되고 있으며(대한민국 공개특허 제10-2008-0036944호), 붉은불개미의 경우에도 붉은불개미 특이적 유전자 또는 단백질을 검출하여 확증하는 방법을 이용하고 있으나, 민감도가 낮다는 문제점이 있다.

[0008] 이에 본 발명자들은 붉은불개미 진단을 효율적이고 손쉽게 할 수 있는 방법을 개발하고자 노력한 결과, 붉은불개미 독선에서 특이적으로 발현되는 신규 유전자를 발굴하고, 상기 유전자의 발현 수준을 측정하여 붉은불개미를 진단할 수 있는 진단용 조성물을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2008-0036944호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본원의 제 1 측면은, Sinv11977(*Solenopsis invicta* 11977) 유전자를 검출하는 것을 특징으로 하는, 붉은불개미(*Solenopsis invicta*) 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본원의 제 2 측면은, 상기 붉은불개미 진단용 조성물을 포함하는, 붉은불개미 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0013] 본원의 제 3 측면은, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, Sinv11977 유전자를 검출하는 단계를 포함하는, 붉은불개미 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본원의 제 4 측면은, (a) 서열번호 7의 염기서열 및 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트; 및 (b) 서열번호 12의 염기서열 및 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 붉은불개미 진단용 프라이머 세트를 제공한다.

과제의 해결 수단

[0016] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0018] 본원의 제 1 측면은, Sinv11977(*Solenopsis invicta* 11977) 유전자를 검출하는 것을 특징으로 하는, 붉은불개미(*Solenopsis invicta*, Red imported fire ants) 진단용 조성물을 제공한다.

[0019] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "붉은불개미(*Solenopsis invicta*, Red imported fire ant)"는 개미의 종 중 하나로서, 국내에서는 붉은독개미, 외래 붉은불개미 또는 붉은열마디개미로 불리고 있다. 머리는 구리빛 갈색을 띠고 몸은 짙은 적갈색을 띠고 있다. 크기는 3~6㎜이며, 남미(아르헨티나)가 원산지이다. 세계자연보호연맹(IUCN)이 세계 100대 악성 침입 외래종으로 지정한 침입종이자, 대한민국에서 2018년 1월 3일부로 생태계교란 생물로 지정된 곤충이기도 하다. 붉은불개미의 엉덩이에 있는 독침에 쏘이게 되면 솔레놉신(Solenopsin) 성분 때문에 화상을 입은 듯한 심한 통증이 일어나고 상처 부위가 가렵고, 증상이 더 심해지면 쏘인 부분이 붓기 시작하고 몸에 발진이 나타난다. 0.6%에서 6%의 사람들에게는 아나필락시스(심각한 알레르기 반응)가 일어나는 경우가 있어서, 손이 떨리거나 동공이 좁아지는 증상이나 현기증, 심장박동 빨라짐, 호흡곤란, 혈압저하, 의식장애 등 과민성 쇼크 증상이 나타나기도 하며, 이 경우 치료받지 않으면 결국 사망하기도 한다.

[0020] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "Sinv11977(*Solenopsis invicta* 11977) 유전자"는 붉은불개미의 독샘에서 특이적으로 발현되는 유전자로서, 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 유전자가 번역된 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0021] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 핵산 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 검출하는 것일 수 있다.

[0022] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 핵산 또는 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 검출하는 것일 수 있다.

[0023] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 Sinv11108(*Solenopsis invicta* 11108) 유전자를 검출하기 위한 조성물을 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0024] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "Sinv11108(*Solenopsis invicta* 11108) 유전자"는 붉은불개미의 독샘에서 특이적으로 발현되는 유전자로서, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 유전자가 번역된 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0025] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 핵산 또는 서열번호 2의 아미노

산 서열을 포함하는 단백질을 검출하는 것일 수 있다.

[0026] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 핵산 또는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질을 검출하는 것일 수 있다.

[0027] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "유전자 검출"은 특정 유전자 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질의 발현 여부 또는 발현 정도를 측정하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 Sinv11977 유전자 및/또는 Sinv11108의 DNA, cDNA, mRNA 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질의 발현 수준을 측정하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 DNA, cDNA 또는 mRNA 수준을 측정하는 방법은 중합효소반응(PCR), 실시간 중합효소반응(real time PCR), Taqman 실시간 중합효소반응, 역전사효소 중합반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사효소 중합효소반응(competitive RT-PCR), 실시간 역전사 효소 중합효소반응(real time quantitative RT-PCR), 정량적 중합효소반응(quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RNase protection method), 노던 블랏팅(Nothern blotting) 또는 DNA 칩 방법(DNA chip technology)인 것일 수 있다.

[0030] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 단백질의 수준을 측정하는 방법은 웨스턴 블랏팅(Western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radical immunodiffusion), 오우크테로니면역 확산법(Ouchterlony immunodiffusion), 로케트 면역전기영동(rocket immunoeletrophoresis), 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 면역침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complenent Fixation Assay), 면역형광법(immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(immunochromatography), FACS 분석법(fluorescenceactivated cell sorter analysis) 또는 단백질 칩 방법(protein chip technology)인 것일 수 있다.

[0031] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 Sinv11977 유전자 및/또는 상기유전자에 의해 코딩된 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 것일 수 있다.

[0032] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 Sinv11108 유전자 및/또는 상기유전자에 의해 코딩된 단백질의 발현 수준을 측정할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0033] 본원의 일 구현예에 따르면, "발현 수준을 측정할 수 있는 제제"는 특정 유전자 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질의 발현 수준을 확인하기 위하여 사용될 수 있는 분자를 의미하며, 구체적으로 상기 유전자 또는 상기 단백질을 검출 및/또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "특정 유전자 또는 단백질을 검출할 수 있는 제제”는 상기 특정 유전자 또는 단백질에 특이적으로 결합하여 인식할 수 있도록 하거나, 검출할 수 있는 제제를 의미하고, “특정 유전자 또는 단백질을 증폭할 수 있는 제제”는 상기 특정 유전자 또는 단백질의 복제를 반복하여 그 수를 증가시킬 수 있는 제제를 의미하며, 예를 들어 상기 유전자를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 특이적으로 결합할 수 있는 프로브를 의미하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "프라이머"는, 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 이때, PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

[0036] 상기 유전자의 검출 또는 발현 수준을 측정에 사용되는 프라이머는, 적절한 버퍼 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오시드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도 하에서 주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드가 될 수 있는데, 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 통상 15 내지 30 뉴클레오티드이다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 안정한 혼성체를 형성하기 위해서는 더 낮은 온도를 필요로 한다. 상기 프라이머 서열은 상기 유전자의 발현 수준을 측정하기 위한 영역의 폴리뉴클레오티드와 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 혼성화 할 정도로 충분히 상보적이어야 한다.

[0037] 상기 유전자의 검출 또는 발현 수준을 측정에 사용되는 프로브는 DNA 삽입 형광물질 또는 혼성화 프로브를 의미하는 것일 수 있으며, 상기 혼성화 프로브는 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클

레오티드와 펩타이드 핵산(peptide nucleic acid)을 의미한다. 상기 프로브는 유전자의 발현 수준을 측정하여 붉은불개미를 진단하기 위한 키트나 방법 등에 사용될 수 있으며, 구체적으로 SYBR green와 Cyto 형광물질들과 같이 이중나선DNA에 결합을 할 수 있는 물질 또는 TaqMan 프로브(5' 말단에 형광물질을, 3' 말단에는 형광물질과 결합하여 형광을 없애주는 물질을 결합)를 사용할 수 있다. TaqMan 프로브에 사용될 수 있는 형광물질은 Biosearch Blue, 6-carboxyfluorescien (FAM), TET, CAL Fluor Gold 540, Quasar 570, Cy™3, NED, TAMRA, CAL Fluor Red 610, Cy5, Qusar 670, Cy5.5, Quasar 705, Flamma fluophore, ALEXA flurophore들을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고, 형광을 없애주는 물질은 Black hole quencher 1, Black hole quencher 2, Black hole quencher 3, Zen-Iowa Balck FQ, Iowa Balck RQ, TAO-IOWA Black RQ들을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 중요한 프로브는 검출할 수 있도록 표지 될 수 있으며, 예를 들면 방사선 동위원소, 형광 화합물, 바이오 발광 화합물, 화학 발광 화합물, 금속 킬레이트 또는 효소로 표지될 수 있다. 상기와 같은 프로브를 적당하게 표지하는 것은 당해 분야에서 널리 알려진 기술이며, 통상적인 방법을 통하여 수행할 수 있다.

[0038] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 프라이머 또는 프로브는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 상기 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0040] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 서열번호 7의 염기서열 및 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트를 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 조성물은 Sinv11977 유전자를 PCR 반응 또는 SYBR green 실시간 PCR 반응을 이용하여 검출하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 서열번호 12의 염기서열 및 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 조성물은 Sinv11977 유전자를 TaqMan 실시간 PCR을 이용하여 검출하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 프로브를 추가로 포함하는 것일 수 있고, 상기 프로브는 서열번호 13의 염기서열의 5'말단에 6-carboxyfluorescien (FAM)을, 3'말단에 lack hole quencher 1 (BHQ1)을 결합시킨 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 조성물은 Sinv11977 유전자를 TaqMan 실시간 PCR을 이용하여 검출하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트를 추가로 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 조성물은 Sinv11977 유전자 및/또는 Sinv11108 유전자를 PCR 반응 또는 SYBR green 실시간 PCR 반응을 이용하여 검출하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 서열번호 9의 염기서열 및 서열번호 10의 염기서열을 포함하는 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 추가로 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 조성물은 Sinv11977 유전자 및/또는 Sinv11108 유전자를 TaqMan 실시간 PCR을 이용하여 검출하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 서열번호 11의 염기서열을 포함하는 프로브를 추가로 포함하는 것일 수 있고, 상기 프로브는 서열번호 11의 염기서열의 5'말단에 6-carboxyfluorescien (FAM)을, 3'말단에 lack hole quencher 1 (BHQ1)을 결합시킨 것일 수 있으며, 구체적으로 상기 조성물은 Sinv11977 유전자 및/또는 Sinv11108 유전자를 TaqMan 실시간 PCR을 이용하여 검출하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "진단"은, 임의의 개미 개체가 붉은불개미인지 여부를 판별하는 것을 의미하며, 붉은불개미 분류동정 또는 붉은불개미 확증을 의미하는 것일 수 있다.

[0047] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 임의의 개미 개체 중 붉은불개미만을 특이적으로 진단 또는 확증할 수 있으며, 구체적으로, 붉은불개미(*Solenopsis invicta, S.i.*), 열대불개미(*Solenopsis geminate, S.g.*), 일본열마디개미(*Solenopsis japonica, S.j.*), 고동털개미(*Lasius niger, L.n.*), 곰개미(*Formica japonica, F.j.*), 꼬리치레개미(*Crematogster sp., C.sp.*), 주름개미(*Tetramorium caespitum, T.c.*), *Acromymer echinatior, Atta cephalotes, Camonotus floridanus, Cardiocondyla obscurior, Cerapachys biroi, Harpergnathos saltator, Linepithema humile* 및 *Pogonomyrmex barbtus*를 포함하는 15종의 개미 중 붉은불개미

를 특이적으로 진단하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본원의 일 실시예에 따르면, 붉은불개미의 독샘에서만 특이적으로 발현하는 Sinv11977 유전자 및 Sinv11108 유전자는 열대불개미(*Solenopsis geminate, S.g.)*, 일본열마디개미(*Solenopsis japonica, S.j.)*, 고동털개미(*Lasius niger, L.n.*), 곰개미(*Formica japonica, F.j.*), 꼬리치래개미(*Crematogster sp., C.sp.*) 및 주름개미(*Tetramorium caespitum, T.c.*)에서 전혀 검출되지 않았으며(실험예 2), *Acromymer echinatior, Atta cephalotes, Camonotus floridanus, Cardiocondyla obscurior, Cerapachys biroi, Harpergnathos saltator, Linepithema humile* 및 *Pogonomyrmex barbtus* 개미에서의 유전자 분석 결과 Sinv11977 유전자 및 Sinv11108 유전자와 상동성이 높은 유전자는 발견되지 않았는 바(실험예 3), 붉은불개미에서만 특이적으로 발현되는 Sinv11977 유전자 또는 Sinv11108 유전자를 검출하여 붉은불개미를 진단할 수 있음을 알 수 있다.

[0050] 본원의 제2측면은, 상기 붉은불개미 진단용 조성물을 포함하는, 붉은불개미 진단용 키트를 제공한다. 제1측면과 중복되는 내용은 제2측면의 붉은불개미 진단용 키트에도 공히 적용된다.

[0051] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 키트는 RT-PCR 키트, qRT-PCR 키트, DNA 칩 키트, 웨스턴 블랏 키트, 또는 ELISA 키트 일 수 있으며, 구체적으로, PCR 키트, 실시간 PCR 키트, SYBR green 실시간 PCR 키트 또는 TaqMan 실시간 PCR 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 키트는 본원의 폴리뉴클레오티드, cDNA, mRNA, 폴리펩타이드 등뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0053] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 PCT 키트는 PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. PCR 키트는, 상기 Sinv11977 유전자 및/또는 Sinv11108 유전자에 대한 특이적인 폴리뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액 (pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드 (dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수(DEPC-water) 및 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0054] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 실시간 PCR 키트는 실시간 PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며— 상기 Sinv11977 유전자 및/또는 Sinv11108 유전자에 대한 특이적인 폴리뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브 외에도 SYBR green과 같은 DNA 삽입 형광물질, Taqman 프로브 등을 포함할 수 있다.

[0055] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 DNA 칩 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, DNA 칩 키트는 상기 Sinv11977 유전자 및/또는 Sinv11108 유전자에 대한 특이적인 폴리뉴클레오티드, 프라이머 또는 프로브가 부착되어 있는 기판을 포함하고 기판은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 핵산을 포함할 수 있다.

[0056] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 RT-PCR 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, RT-PCR 키트는, 상기 상기 Sinv11977 유전자 및/또는 Sinv11108 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 디옥시뉴클레오타이드(dNTPs), 디디옥시뉴클레오타이드(ddNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNAse 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0058] 본원의 제3측면은, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, Sinv11977 유전자를 검출하는 단계를 포함하는, 붉은불개미 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다. 제1측면 및 제2측면과 중복되는 내용은 제3측면의 붉은불개미 진단을 위한 정보 제공 방법에도 공히 적용된다.

[0059] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "개체"는 붉은불개미로 의심되는 모든 생물체를 의미하며, 구체적인 예로, 임의의 개미 개체일 수 있다.

[0060] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 목적하는 개체는 붉은불개미(*Solenopsis invicta, S.i.*), 열대불개미(*Solenopsis geminate, S.g.)*, 일본열마디개미(*Solenopsis japonica, S.j.)*, 고동털개미(*Lasius niger, L.n.*), 곰개미(*Formica japonica, F.j.*), 꼬리치래개미(*Crematogster sp., C.sp.*), 주름개미(*Tetramorium caespitum, T.c.*), *Acromymer echinatior, Atta cephalotes, Camonotus floridanus, Cardiocondyla obscurior, Cerapachys biroi, Harpergnathos saltator, Linepithema humile* 및 *Pogonomyrmex barbtus*를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "생물학적 시료"는 붉은불개미일 가능성이 있는 개체로부터 유래한 물질을 의미하며, 구체적으로 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액 등을 포함할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아

니다. 또한, 이들 시료로부터 유전자 시료를 얻을 수 있으며, 유전자 시료는 핵산, 예를 들어, DNA, mRNA, 또는 mRNA로부터 합성되는 cDNA 등을 포함할 수 있으며, 이로부터 특정 유전자/단백질의 발현수준을 확인 또는 검출할 수 있는 한, 그 종류는 이에 제한되는 것은 아니다.

[0062] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 핵산 또는 서열번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 검출하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0063] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 Sinv11977 유전자를 검출하는 단계는 서열번호 7의 염기서열 및 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트를 포함하는 조성물을 이용하는 것일 수 있다.

[0064] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 Sinv11977 유전자를 검출하는 단계는 서열번호 12의 염기서열 및 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트를 포함하는 조성물을 이용하는 것일 수 있으며, 추가적으로 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 프로브를 추가로 이용하는 것일 수 있다.

[0065] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 Sinv11977 유전자를 검출하는 단계는 PCR 반응, 실시간 PCR 반응, SYBR green 실시간 PCR 반응 또는 Taqman 실시간 PCR 반응을 이용하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0066] 본원의 일 구현예에 따르면, Sinv11977 유전자가 검출되는 경우, 상기 개체를 붉은불개미로 진단하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0067] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, Sinv11977 유전자 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 개체 및 상기 대조군의 Sinv11977 유전자 발현 수준을 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0068] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어, "대조군"은 붉은불개미가 아닌 다른 개미 종이 확실한 개체인 음성 대조군 또는 붉은불개미가 확실한 개체인 양성 대조군을 의미하는 것일 수 있다.

[0069] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 상기 목적하는 개체의 Sinv11977 유전자 발현 수준이 상기 음성 대조군의 Sinv11977 유전자 발현 수준보다 높은 경우 또는 상기 양성 대조군의 Sinv11977 유전자 발현 수준과 비슷한 경우, 상기 개체를 붉은불개미로 진단하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0070] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 상기 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, Sinv11108 유전자를 검출하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0071] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 핵산 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 단백질을 검출하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0072] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 Sinv11108 유전자를 검출하는 단계는 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트를 포함하는 조성물을 이용하는 것일 수 있다.

[0073] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 Sinv11108 유전자를 검출하는 단계는 서열번호 9의 염기서열 및 서열번호 10의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트를 포함하는 조성물을 이용하는 것일 수 있으며, 추가적으로 서열번호 11의 염기서열을 포함하는 프로브를 추가로 이용하는 것일 수 있다.

[0074] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 Sinv11108 유전자를 검출하는 단계는 PCR 반응, 실시간 PCR 반응, SYBR green 실시간 PCR 반응 또는 Taqman 실시간 PCR 반응을 이용하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0075] 본원의 일 구현예에 따르면, Sinv11108 유전자가 검출되는 경우, 상기 개체를 붉은불개미로 진단하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0076] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 대조군으로부터 분리된 생물학적 시료로부터, Sinv11108 유전자 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 개체 및 상기 대조군의 Sinv11108 유전자 발현 수준을 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0077] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 방법은 상기 목적하는 개체의 Sinv11108 유전자 발현 수준이 상기 음성 대조군의 Sinv11108 유전자 발현 수준보다 높은 경우 또는 상기 양성 대조군의 Sinv11108 유전자 발현 수준과 비슷한 경우, 상기 개체를 붉은불개미로 진단하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0079] 본원의 제4측면은 (a) 서열번호 7의 염기서열 및 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트; 및 (b) 서

열번호 12의 염기서열 및 서열번호 13의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 프라이머 세트를 포함하는, 붉은불개미 진단용 프라이머 세트를 제공한다. 제1측면 내지 제3측면과 중복되는 내용은 제4측면의 붉은불개미 진단용 프라이머 세트에도 공히 적용된다.

[0080] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 프라이머 세트는 Sinv11977 유전자를 검출하기 위한 것일 수 있다.

[0081] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 프라이머 세트는 서열번호 14의 염기서열을 포함하는 프로브를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0082] 본원의 일 구현예에 따르면, (a) 서열번호 5의 염기서열 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트; 및 (b) 서열번호 9의 염기서열 및 서열번호 10의 염기서열을 포함하는 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 프라이머 세트로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나 이상의 프라이머 세트를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0083] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 프라이머 세트는 서열번호 11의 염기서열을 포함하는 프로브를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0085] 본 발명의 붉은불개미 진단용 조성물, 붉은불개미 진단용 키트, 붉은불개미 진단을 위한 정보 제공 방법 및 붉은불개미 진단용 프라이머 세트에 따르면, Sinv11977 유전자를 검출하여, 붉은불개미 진단에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0087] 도 1은 Sinv11977 유전자를 이용하여 붉은불개미를 진단하는 방법을 설명한 모식도이다.

도 2는 7종 개미의 genomic DNA 및 Sinv11108 유전자 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 수행한 결과를 나타내는 도면이다.

도 3은 7종 개미의 genomic DNA 및 Sinv11977 유전자 프라이머 세트를 이용하여 PCR 반응을 수행한 결과를 나타내는 도면이다.

도 4는 7종 개미의 genomic DNA 및 Sinv11108 유전자 프라이머 세트를 이용하여 SYBR green 실시간 PCR 반응을 수행한 결과를 나타내는 도면이다; 붉은불개미(*Solenopsis invicta, S.i.*) - 검붉은선; 열대불개미(*Solenopsis geminate, S.g.*) - 붉은선; 일본열마디개미(*Solenopsis japonica, S.j.*) - 주황선; 고동털개미(*Lasius niger, L.n.*) - 노란선; 곰개미(*Formica japonica, F.j.*) - 밝은초록선; 꼬리치래개미(*Crematogster sp., C.sp.*) - 초록선; 주름개미(*Tetramorium caespitum, T.c.*) - 밝은파란선.

도 5는 7종 개미의 genomic DNA 및 Sinv11977 유전자 프라이머 세트를 이용하여 SYBR green 실시간 PCR 반응을 수행한 결과를 나타내는 도면이다; 붉은불개미(*Solenopsis invicta, S.i.*) - 검붉은선; 열대불개미(*Solenopsis geminate, S.g.*) - 붉은선; 일본열마디개미(*Solenopsis japonica, S.j.*) - 주황선; 고동털개미(*Lasius niger, L.n.*) - 노란선; 곰개미(*Formica japonica, F.j.*) - 밝은초록선; 꼬리치래개미(*Crematogster sp., C.sp.*) - 초록선; 주름개미(*Tetramorium caespitum, T.c.*) - 밝은파란선.

도 6은 3종 개미의 genomic DNA 및 Sinv11108 유전자 TagMan 프라이머 세트를 이용하여 SYBR green 실시간 PCR 반응을 수행한 결과를 나타내는 도면이다; 붉은불개미(*Solenopsis invicta, S.i.*) - 검붉은선; 열대불개미(*Solenopsis geminate, S.g.*) - 붉은선; 일본열마디개미(*Solenopsis japonica, S.j.*) - 주황선.

도 7은 3종 개미의 genomic DNA 및 Sinv11977 유전자 TagMan 프라이머 세트를 이용하여 SYBR green 실시간 PCR 반응을 수행한 결과를 나타내는 도면이다; 붉은불개미(*Solenopsis invicta, S.i.*) - 검붉은선; 열대불개미(*Solenopsis geminate, S.g.*) - 붉은선; 일본열마디개미(*Solenopsis japonica, S.j.*) - 주황선.

도 8은 3종 개미의 genomic DNA 및 Sinv11108 유전자 TagMan 프라이머 세트및 프로브를 이용하여 TagMan 실시간 PCR 반응을 수행한 결과를 나타내는 도면이다; 붉은불개미(*Solenopsis invicta, S.i.*) - 검붉은선; 열대불개미(*Solenopsis geminate, S.g.*) - 붉은선; 일본열마디개미(*Solenopsis japonica, S.j.*) - 주황선.

도 9는 3종 개미의 genomic DNA 및 Sinv11977 유전자 TagMan 프라이머 세트및 프로브를 이용하여 TagMan 실시간 PCR 반응을 수행한 결과를 나타내는 도면이다; 붉은불개미(*Solenopsis invicta, S.i.*) - 검붉은선; 열대불개미(*Solenopsis geminate, S.g.*) - 붉은선; 일본열마디개미(*Solenopsis japonica, S.j.*) - 주황선.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0088] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0090] **실시예 1: 붉은불개미를 포함하는 7종의 개미 채집 및 genomic DNA 추출**

[0092] 붉은불개미(*Solenopsis invicta, S.i.*)는 부산항과 인천항에서 발견된 개체들을 채집하여 급속냉동 후, -50℃에 보관된 것을 사용하였다. 열대불개미(*Solenopsis geminate, S.g.*)는 필리핀에서 채집된 후, 냉동하여 반입된 개체를 사용하였다. 일본열마디개미(*Solenopsis japonica, S.j.*)는 강원동 원주 근교 야산에서 채집된 개체들을 사용하였다. 고동털개미(*Lasius niger, L.n.*), 곰개미(*Formica japonica, F.j.*), 꼬리치래개미(*Crematogster sp., C.sp.*) 및 주름개미(*Tetramorium caespitum, T.c.*)는 경기도 안양시 동안구 중앙공원에서 채집된 개체를 사용하였다.

[0093] 또한, DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 살아있거나 냉동 보관된 개미시료에서 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 genomic DNA는 분광광도계(Spectrophotometer)를 이용하여 정량하여 농도를 10ng/μl로 조정을 하였다.

[0095] **실시예 2: 붉은불개미 독선 특이적 유전자 검증을 위한 PCR 반응**

[0097] 붉은불개미 특이적 유전자를 검증하기 위하여 유전자 특이적 프라이머 세트를 제작한 후, 상기 실시예 1에서 추출한 붉은불개미를 포함하는 7종 개미의 genomic DNA들을 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 구체적으로, 10 pmole 정방향 프라이머, 10 pmole 역방향 프라이머, 10 ng genomic DNA들을 rTaq plus PCR mixture(ELPIS Biotech, Daejeon, Korea)와 혼합하여 총 20μl 의 혼합물을 제조하였다. 다음으로, 상기 제조한 혼합물을 ABI 2720 PCR 기계(Applied Biosystems)를 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 조건은 95℃ 5분으로 초기 가열 후, 95℃ 10초, 55℃ 10초, 72℃ 10초를 한 사이클로 하여 총 30 사이클로 반응시킨 후, 72℃에서 10분간 보관하여 수행하였다. 다음으로, 상기 PCR 결과물들은 2.0% 아가로스젤에서 전기영동을 실시하여 증폭된 DNA의 존재 여부를 확인하였고, 증폭된 DNA들은 모두 TA cloning kit로 클로닝한 후, DNA 서열을 양 방향에서 읽어 확인하였다.

[0099] **실시예 3: DNA 결합 형광물질을 이용한 실시간(real-time) PCR 반응**

[0101] 붉은불개미 특이적 유전자 증폭을 실시간(real time)으로 확인 하기 위하여 SYBR green을 이용하여 실시간(real time) PCR 반응을 수행하였다. 구체적으로, 10 pmole 정방향 프라이머, 10 pmole 역방향 프라이머, 20 ng genomic DNA, nPfu-Forte polymerase (Enzynomics, Daejeon, Korea), SYBR green, Dntp 및 buffer를 혼합하여 총 20μl 의 혼합물을 제조하였다. 다음으로, 상기 제조한 혼합물을 AriaMX real time PCR (Agilent)를 이용하여 실시간 PCR 반응을 진행하였다. 실시간 PCR 조건은 95℃에서 2분간 초기 가열 후, 95℃ 30초, 63℃ 30초 및 72℃ 1분을 한 사이클로 하여 총 40사이클을 진행하였다. 붉은불개미 특이적 유전자의 증폭 여부에 따라서 변화되는 형광수치는 AriaMX version 1.5 software를 이용하여 그래프로 전환하여 확인하였다.

[0103] **실시예 4: TaqMan 실시간(real-time) PCR 반응**

[0105] TagMan 실시간 PCR 방법은 프라이머 세트와 앰플리콘(amplicon)에 결합하는 형광물질이 결합된 프로브 DNA를 이용하여 목표 유전자의 존재여부와 농도를 확인할 수 있는 방법이다. TaqMan 프로브는 5' 말단에 6-carboxyfluorescien (FAM)를, 3'말단에는 Black hole quencher 1(BHQ1)(Bioneer, DaeJeon, Korea)를 결합시켜서 제작하였다. TagMan 실시간 PCR 반응을 수행하기 위해, 20ng의 genomic DNA, 10 pmole의 정방향 프라이머, 10 pmole의 역방향 프라이머, 5 pmole의 프로브를 TaqMan RT PCR master mix (Enzynomics)와 혼합한 후, 상기 혼합물을 AriaMx RT-PCR system (Agilent Technologies)을 이용하여 수행을 하였다. TaqMan 실시간 PCR 반응 결과는 AriaMx Version 1.5 software (Agilent Technologies)를 이용하여 분석하였다.

[0107] **실험예 1: 붉은불개미 분자진단법 개발을 위한 특이 유전자 발굴**

[0109] 현재 사용하는 붉은불개미(Red imported fire ant, RIFA) 분자진단방법은 진단시간이 길다는 단점이 있는 바, 진단 시간을 단축할 수 있는 새로운 분자진단법을 개발하기 위해 신규한 유전자를 발굴하였다. 구체적으로, 신규한 유전자를 발굴하기 위해, 붉은불개미만의 독선 발현 유전체 분석을 진행하여 후보 유전자 2개를 발굴하였으며, 상기 유전자를 각각 *Solenopsis invicta* 11108 (Sinv11108) 및 *Solenopsis invicta* 11977(Sinv11977)로 명명하였다. Sinv11108은 염기서열 및 아미노산 서열은 서열번호 1 및 2, Sinv11977의 염기서열 및 아미노산 서

열은 서열번호 3 및 4로 각각 기재하였다(표 1).

표 1

[0111]

유전자	DNA/아미노산서열	서열	서열번호
Sinv11108	DNA	ATGTTTATTTTCAATTTATTTGTAATATTTTTAATTCTGATCTATTGGCCTTTTATTACTCTAAATCTA ATTAGGAATAGCATTACATTAGCAATGAAACCACCAAAAAGAGGAATAACAAAACCTGCGAGATATCAA ACTACAGAATCCTCAGATGATGGTGAAAATGTAACTATAGAGAAATACGATTTAACCAAAGACGAAGTT CACAATGAGGTGGAAAGTGATGTACTAGCACTAAGTCAAGTTTTCGTTGAGACACAGCATGTACTGAAT AAAAAAGATGATGAAAATAACTCACTTCTTTTAAATCGTAATCAATTACCAAACAATAAATCATCTATT CGATCTCACGTGATATTAGATTTTCCACTCGAAAATTTAAAAGCTTCATCATCTAGTTATCACAATGAA CCAACAATCTCAAAGCAACATGATATGTCTCATTTCAATGTATTGTACAATGATCCTGTGGCCTCAACG TCTTCAACGGTAATTTCTAATGCTCAATATGAACCAACAAACTCAAGCTTGGTATCTTATCAATCAGAA ACATACAAAGAAGATGAACTTTGTACTAAAAAAAGTGTGAAAAATATTGATAACCAACACTATGATTAC TTGAGCAATAAACGGCCAGAAACCACATTAAAAACTTATGAACGAAATAATACATCAAAGTTACATTTG TACAATAAATTACAAACAGACAATGAAAATGTACCTGAAAAAATATATTACAATTTGGATGCCAAAAAA CTTGTGGACAAACGAACAAAAACAGAAGTTAAGGTTCATTCTCCAGTATATACTCCAGCAGAAAAGAAA GATATTGAATTTACCTCATCTATAGCTGAAGATTTTCGAAGCACTCTCCGAGAATAA	1
	아미노산	M F I F N L F V I F L I L I Y W P F I T L N L I R N S I T L A M K P P K R G I T K P A R Y Q T T E S S D D G E N V T I E K Y D L T K D E V H N E V E S D V L A L S Q V F V E T Q H V L N K K D D E N N S L L L N R N Q L P N N K S S I R S H V I L D F P L E N L K A S S S S Y H N E P T I S K Q H D M S H F N V L Y N D P V A S T S S T V I S N A Q Y E P T N S S L V S Y Q S E T Y K E D E L C T K K S V K N I D N Q H Y D Y L S N K R P E T T L K T Y E R N N T S K L H L Y N K L Q T D N E N V P E K I Y Y N L D A K K L V D K R T K T E V K V H S P V Y T P A E K K D I E F T S S I A E D F R S T L R E Stop	2
Sinv11977	DNA	ATGGGCAAGGAGAGAAGGAAGCGCGGAAAACGGGCTGGCCGTAAGGTCTTTTTAAAAGGATTAAAAAAG GAACTACATGCGGCCGGCGAATTCGATCCATCGACCGTATTCCCTAAAACCCCACGCCACTCACCACCG GTCGAACGCGCAACCACCGTTCATCCGGATCGACGACTGAGACGGGATCCTTCCCCCAAACAAAGGAAA CCCGCCAATCCTAAAGACACTTTCGTCCCTGCGCGGATCCTGACGAGGCCCATTCCGATGCAAGTGTAT GTGCGAAAACCATTGTCGGCAACTTCTCCGAAACCAAAAATTCGATACAATATTTCTGTAAAGCTTAAA TTATCAATAACCCCCTCAGGGATAATACGTATCAAGCACTAG	3
	아미노산	M G K E R R K R G K R A G R K V F L K G L K K E L H A A G E F D P S T V F P K T P R H S P P V E R A T T V H P D R R L R R D P S P K Q R K P A N P K D T F V P A R I L T R P I P M Q V Y V R K P L S A T S P K P K I R Y N I S V K L K L S I T P S G I I R I K H	4

[0113] **실험예 2: 일반 PCR 반응을 이용한 붉은불개미 진단방법**

[0115] 실험예 1에서 발굴한 신규 유전자 Sinv11108 또는 Sinv11977의 발현여부를 통해 붉은불개미의 종 동종을 확인하기 위하여, 각 유전자에 특이적으로 반응하는 프라이머 세트를 제작하였으며, 상기 프라이머 세트 및 7종 개미의 genomic DNA를 이용하여 실시예 2와 같이 PCR 반응을 수행하였다.

[0116] Sinv11108를 증폭하는 프라이머 세트(서열번호 5 및 6)을 이용하여 PCR 반응을 진행한 결과, 붉은불개미에서만 200bp 정도의 PCR로 증폭된 DNA절편이 관찰되었으며(도 2), Sinv11977을 증폭하는 프라이머 세트(서열번호 7 및 8)을 이용하여 PCR 반응을 진행한 결과, 붉은불개미에서만 200bp 정도의 PCR로 증폭된 DNA절편이 관찰되었다(도 3). 또한, 증폭된 유전자는 capillary sequencing을 진행하여 염기서열이 Sinv11108 및 Sinv11977과 동일함을 확인하였다.

[0117] 상기 결과를 토대로, 신규 유전자 Sinv11108 또는 Sinv11977는 붉은불개미에서만 발현되는 것으로 확인되었는바, 상기 유전자의 발현을 확인함으로서 붉은불개미를 진단할 수 있다.

표 2

[0119]

유전자	프라이머 이름	프라이머 서열(5'→ 3')	서열번호
Sinv11108	Sinv11108F1	GCATTACATTAGCAATGAAACC	5
	Sinv11108B1	ATTCAGTACATGCTGTGTCTCA	6
Sinv11977	Sinv11977F1	CTAAAACCCCACGCCACTCACC	7
	Sinv11977B1	TTCGGAGAAGTTGCCGACAATGG	8

[0121] **실험예 3: Sinv11108 및 Sinv11977 유전자의 DNA *in silico* 서열비교분석 결과**

[0123] 현재 전체 유전체 분석이 완료된 개미들은 붉은불개미를 포함하여 총 10종이다. Sinv11108 및 Sinv11977의 염기서열을 이용하여, 붉은불개미를 제외한 9종 개미의 전체 유전체 서열 및 발현유전체 서열과 비교분석 연구를 수행하였다.

[0124] Sinv11108 유전자의 경우, 상동성이 높은 유전자 (E value < 10^{-5})는 *Acromymer echinatior*, *Atta cephalotes*, *Camonotus floridanus*, *Cardiocondyla obscurior*, *Cerapachys biroi*, *Harpergnathos saltator*, *Linepithema humile* 및 *Pogonomyrmex barbtus* 등 8종의 개미의 유전체에서 발견이 되지 않았으며, *Wasmannia auropunctata* 에서는 E value = 1.19 x 10^{-19}인 부분이 genomic DNA상에 존재하였으나, 전체 유전자의 상동성이 71.45%이고 Gap이 10.47%로서 붉은불개미와 전체 유전자의 염기서열 차이가 있는 바, 실험예 2의 Sinv11108 프라이머 세트로는 증폭이 되지 않는 것을 확인하였다(표 3).

표 3

[0126]

개미 종	Maximum Homology
Acromyrmex echinatior (가위개미)	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음
Atta cephalotes(leaf cutter ants, 잎사귀 개미)	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음
Camponotus floridanus (Florida carpenter ant, 플로리다목수개미)	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음
Cardiocondyla obscurior	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음
Cerapachys biroi	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음
Harpegnathos saltator	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음
Linepithema humile	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음
Pogonomyrmex barbtus (red harvester ants, 붉은 수확개미)	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음
Wasmannia auropunctata(little fire ants, 작은 불개미)	Genomic region중에서 E value = 1.19 x 10^{-19} 인 부분 존재함. 그러나, DNA identity가 71.45%에 불과하고 Gap이 10.47%정도로 매우 많아서 증폭될 가능성은 매우 적음

[0128] 또한, Sinv11977 유전자의 경우, 붉은불개미를 제외한 9종의 개미에서 상동성이 높은 유전자 (E value < 10^{-5}) 영역이 존재하지 않는 것을 확인하였다(표 4).

표 4

[0130]

개미 종	Maximum Homology
Acromyrmex echinatior (가위개미)	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음
Atta cephalotes(leaf cutter ants, 잎사귀 개미)	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음
Camponotus floridanus (Florida carpenter ant, 플로리다목수개미)	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음
Cardiocondyla obscurior	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음
Cerapachys biroi	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음
Harpegnathos saltator	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음
Linepithema humile	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음
Pogonomyrmex barbtus (red harvester ants, 붉은 수확개미)	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음
Wasmannia auropunctata(little fire ants, 작은 불개미)	E value < 10^{-5} 의 유전자 없음

[0132] 상기 결과를 토대로, 본원의 Sinv11108 및 Sinv11977 유전자는 붉은불개미에서만 특이적으로 발현되는 유전자로서, 상기 유전자의 발현 여부를 확인하여 붉은불개미를 진단할 수 있다는 것을 알 수 있다.

[0134] **실험예 4: 실시간(real-time) PCR 반응을 이용한 붉은불개미 진단방법**

[0136] 실험예 1에서 발굴한 신규 유전자 Sinv11108 또는 Sinv11977의 발현여부를 통해 붉은불개미의 종 동종을 확인하기 위하여, 실험예 2의 프라이머 세트 및 7종 개미의 genomic DNA를 이용하여 실시예 2와 같이 실시간(real-time) PCR 반응을 수행하였다.

[0137] Sinv11108 유전자에 대한 분석 결과, 붉은불개미의 경우에만 30사이클에서 형광지수가 2,000정도에 도달을 하였고, 35사이클까지 형광지수가 급속하게 증가하였으나, 다른 종의 경우 열대불개미(*S.g.*)만 30 사이클에서 형광지수가 370정도로 붉은불개미의 1/5보다 작았으며, 다른 5종의 경우는 기저수준의 형광지수만을 나타냈다(도 4).

[0138] 또한, Sinv11977 유전자에 대한 분석 결과, 붉은불개미의 경우 25사이클에서 형광지수가 1,700정도에 도달을 하였지만, 다른 6종에서는 기저수치만을 보여주고 있었으며, 30 사이클에서의 결과를 보면 붉은불개미의 경우는 형광지수가 7,000에 가까운 방면, 다른 종들의 경우는 2,000미만으로 붉은불개미 형광지수의 1/3에 미미치 못한 것을 확인하였다(도 5).

[0139] 상기 결과를 토대로, SYBR green 실시간 PCR 반응을 이용하여 Sinv11108 및 Sinv11977 유전자의 발현여부를 토대로 붉은불개미 만을 특이적으로 진단할 수 있다는 것을 알 수 있다.

[0141] **실험예 5: TaqMan 실시간(real-time) PCR 반응을 이용한 붉은불개미 진단방법**

[0143] 실험예 1에서 발굴한 신규 유전자 Sinv11108 또는 Sinv11977의 발현여부를 통해 붉은불개미의 종 동종을 확인하기 위하여, Sinv11108 또는 Sinv11977 유전자에 대한 프라이머 세트 및 프로브를 설계하였으며(표 5), 붉은불개미(*S.i.*), 열대불개미(*S.g.*) 및 일본열마디개미(*S.j.*)의 genomic DNA를 이용하여 실시예 3의 SYBR green 실시간 PCR 반응 및 실시예 4의 TaqMan 실시간(real-time) PCR 반응을 수행하였다.

표 5

[0145]

유전자	프라이머/프로브 이름	프라이머/프로브 서열(5'→ 3')	서열번호
Sinv11108	Sinv11108 F-TM	ACCTGCGAGATATCAAACTACAG	9
	Sinv11108 R-TM	CATGCTGTGTCTCAACGAAAAC	10
	Sinv11108 Probe	CCAAAGACGAAGTTCACAATGAGGTGGA	11
Sinv11977	Sinv11977 F-TM	GACCGTATTCCCTAAAACCCC	12
	Sinv11977 R-TM	ACACTTGCATCGGAATGGG	13
	Sinv11977 Probe	TCCTAAAGACACTTTCGTCCCTGCG	14

[0147] 구체적으로, 먼저 TaqMan(TM)용 프라이머 세트가 특이적으로 목표 유전자만을 증폭하는지를 확인하기 위해 연구를 SYBR RT PCR방법을 이용하여 진행을 하였으며, Sinv11108 유전자의 경우, 25사이클에서 붉은불개미에서만 형광지수가 3600이상이 나왔고, 나머지 2종에서는 800이하의 형광지수만을 나타냈으며(도 6), Sinv11977 유전자의 경우, 27사이클 이후에 붉은불개미에서만 형광신호가 증폭이 되기 시작을 하여 35사이클에 5700이상의 형광지수를 나타냈다(도 7). 이러한 결과는 TM용 프라이머 세트도 붉은불개미만을 특이적으로 진단할 수 있음을 보여준다.

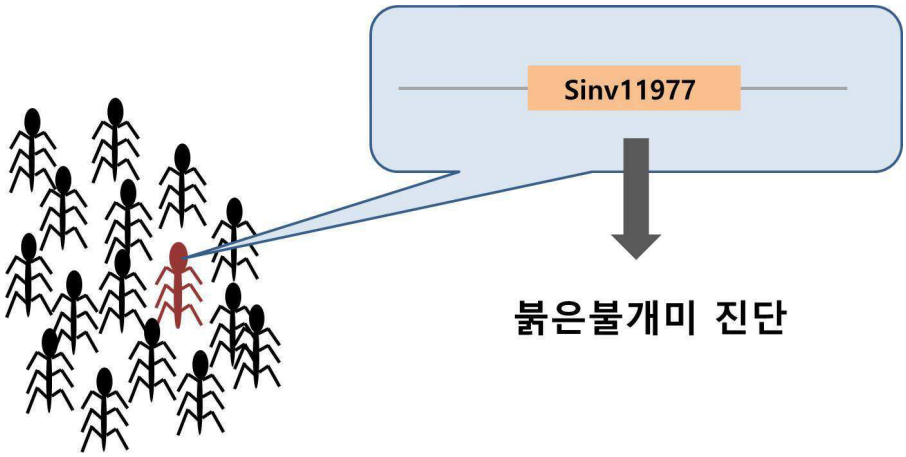
[0148] 다음으로, TM 프라이머 세트 및 프로브를 이용하여 TaqMan 실시간 PCR반응을 진행하였다. Sinv11108 유전자의 경우, 붉은불개미에서는 24사이클 이후에 형광이 증폭되기 시작하여 30사이클에서 900이상의 형광지수를 나타냈으나, 나머지 2종의 경우 35사이클에서도 350미만의 형광신호를 나타냈다(도 8). 또한, Sinv11977 유전자의 경우, 붉은불개미에서만 25사이클 이후 형광신호가 증폭되기 시작하여 30사이클에 500, 35사이클에 1600이상의 형광지수를 나타냈다(도 9). 이러한 결과는 TaqMan 실시간 PCR반응을 이용한 진단 방법은 붉은불개미의 진단에 활용될 수 있음을 보여준다.

[0150] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서

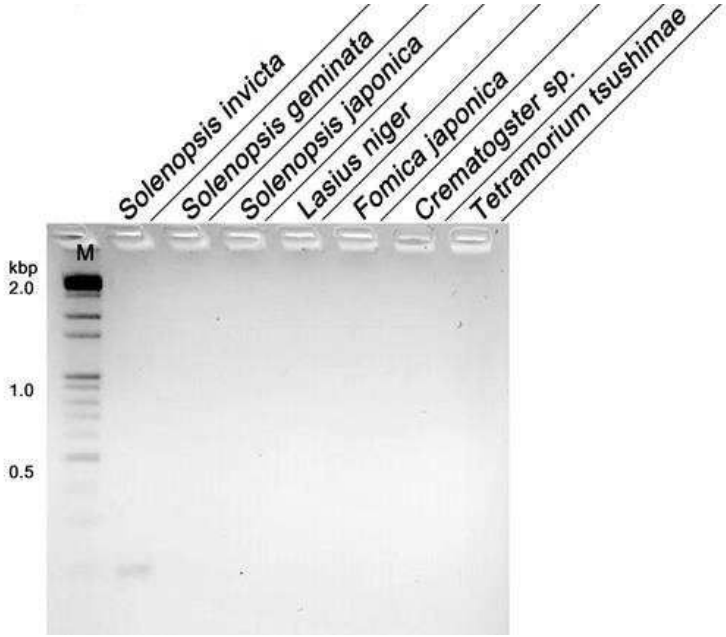
기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

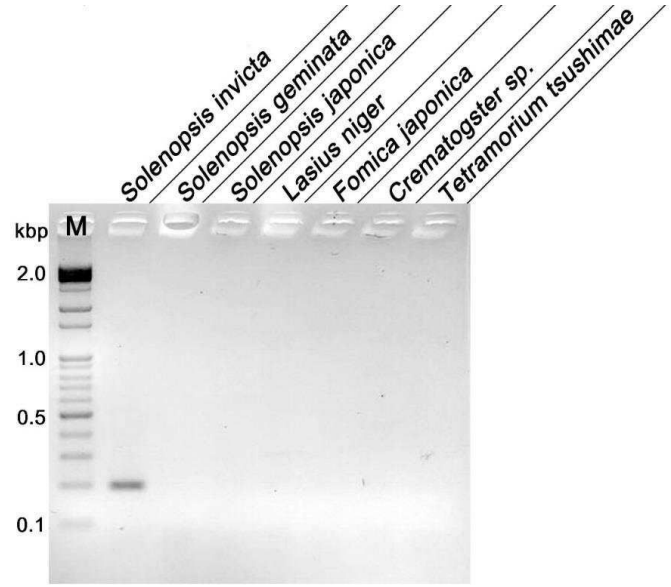
도면1



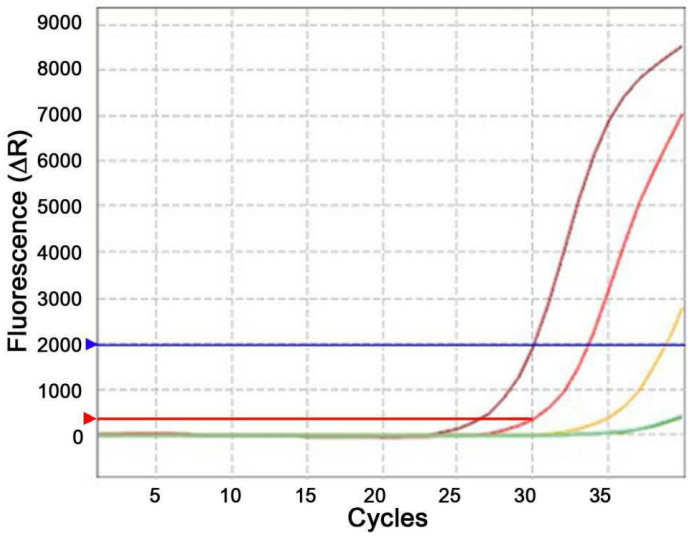
도면2



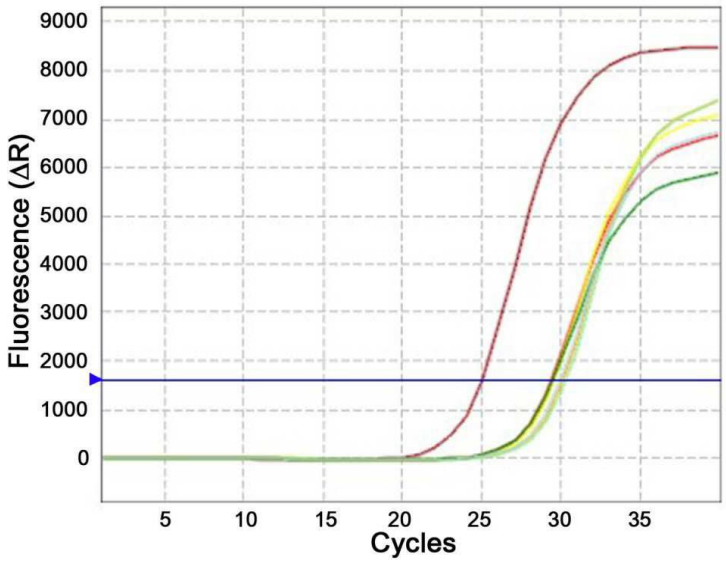
도면3


Solenopsis invicta
Solenopsis geminata
Solenopsis japonica
Lasius niger
Fomica japonica
Crematogster sp.
Tetramorium tsushimae
kbp
M
2.0
1.0
0.5
0.1

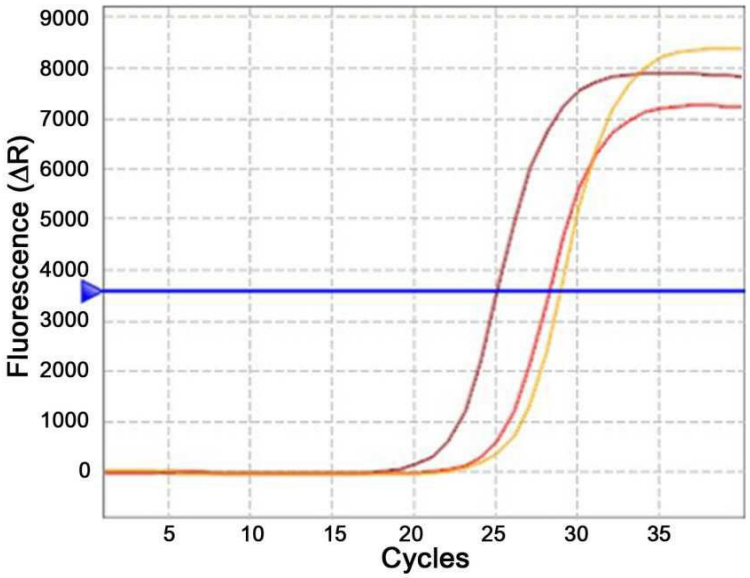
도면4


9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Fluorescence (ΔR)
5
10
15
20
25
30
35
Cycles

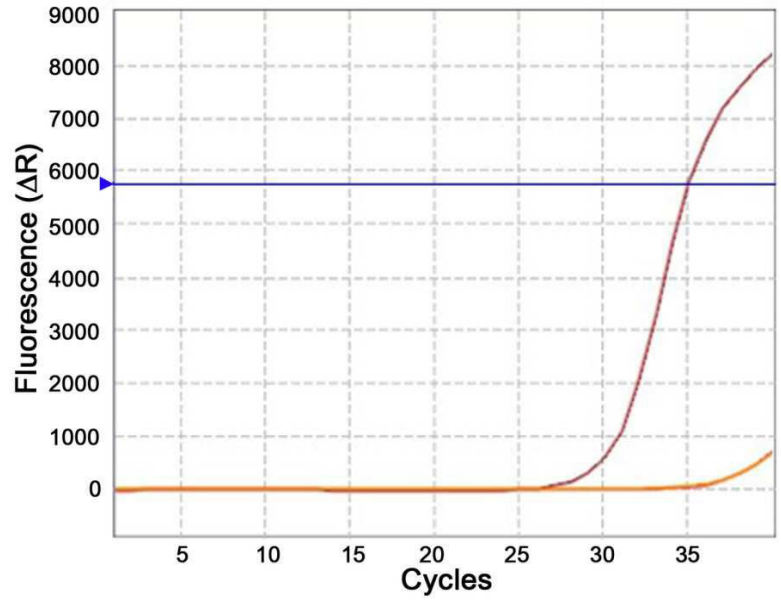
도면5


9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Fluorescence (ΔR)
5
10
15
20
25
30
35
Cycles

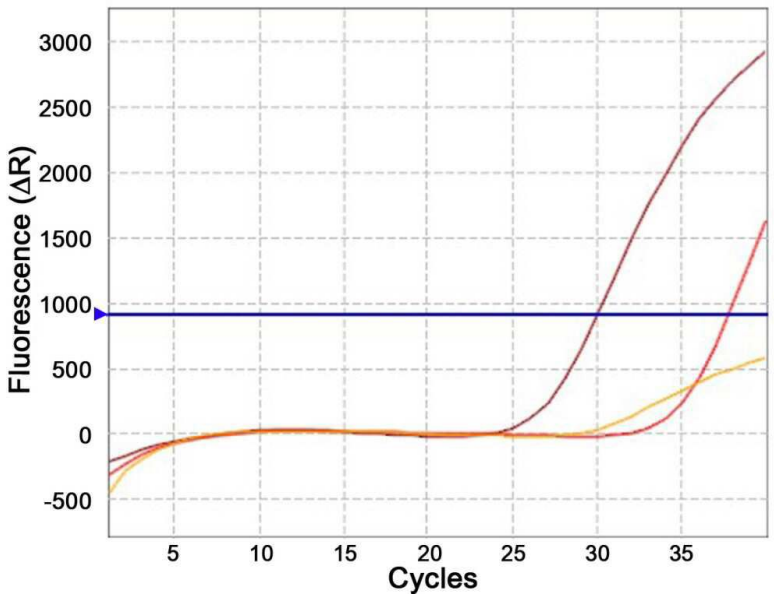
도면6


9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Fluorescence (ΔR)
5
10
15
20
25
30
35
Cycles

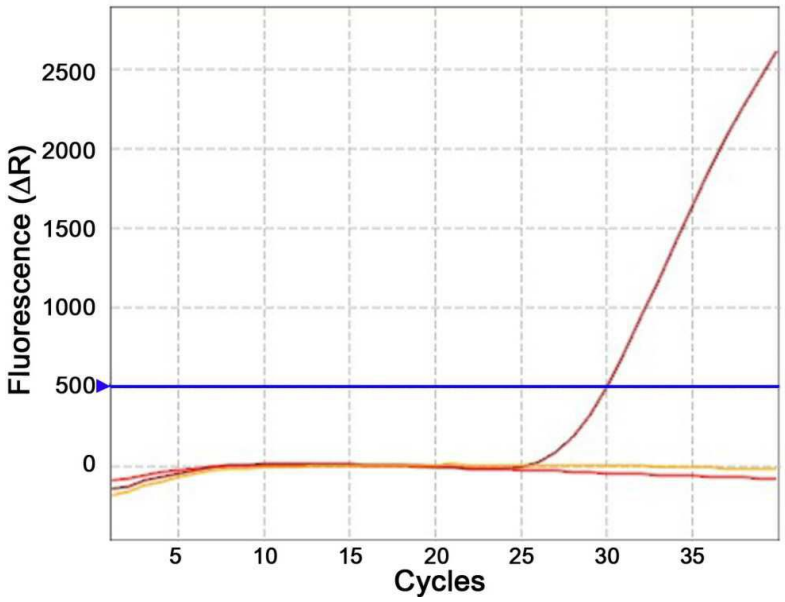
도면7


9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
Fluorescence (ΔR)
5
10
15
20
25
30
35
Cycles

도면8


3000
2500
2000
1500
1000
500
0
-500
Fluorescence (ΔR)
5
10
15
20
25
30
35
Cycles

도면9



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

<120> Molecular diagnostic method using venom gland-specific gene of Red imported fire ant, Solenopsis invicta 11977

<130> 11977

<160> 14

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 885

<212> DNA

<213> Solenopsis invicta

<400> 1

atgtttattt tcaatttatt tgtaatattt ttaattctga tctattggcc ttttattact 60

ctaaatctaa ttaggaatag cattacatta gcaatgaaac caccaaaaag aggaataaca 120

aaacctgcga gatatcaaac tacagaatcc tcagatgatg gtgaaaatgt aactatagag 180

aaatacgatt taaccaaaga cgaagttcac aatgaggtgg aaagtgatgt actagcacta 240

agtcaagttt tcgttgagac acagcatgta ctgaataaaa aagatgatga aaataactca 300

cttcttttaa atcgtaatca attaccaaac aataaatcat ctattcgatc tcacgtgata 360

ttagattttc cactcgaaaa tttaaaagct tcatcatcta gttatcacaa tgaaccaaca 420

atctcaaagc aacatgatat gtctcatttc aatgtattgt acaatgatcc tgtggcctca 480

acgtcttcaa cggtaatttc taatgctcaa tatgaaccaa caaactcaag cttggtatct 540

tatcaatcag aaacatacaa agaagatgaa ctttgtacta aaaaaagtgt gaaaaatatt 600

gataaccaac actatgatta cttgagcaat aaacggccag aaaccacatt aaaaacttat 660

gaacgaaata atacatcaaa gttacatttg tacaataaat tacaaacaga caatgaaaat 720

gtacctgaaa aaatatatta caatttggat gccaaaaaac ttgtggacaa acgaacaaaa 780

acagaagtta aggttcattc tccagtatat actccagcag aaaagaaaga tattgaattt 840

acctcatcta tagctgaaga ttttcgaagc actctccgag aataa 885

<210> 2

<211> 294

<212> PRT

<213> Solenopsis invicta

<400> 2

Met Phe Ile Phe Asn Leu Phe Val Ile Phe Leu Ile Leu Ile Tyr Trp

1 5 10 15

Pro Phe Ile Thr Leu Asn Leu Ile Arg Asn Ser Ile Thr Leu Ala Met

20 25 30

Lys Pro Pro Lys Arg Gly Ile Thr Lys Pro Ala Arg Tyr Gln Thr Thr

35 40 45

Glu Ser Ser Asp Asp Gly Glu Asn Val Thr Ile Glu Lys Tyr Asp Leu

50 55 60

Thr Lys Asp Glu Val His Asn Glu Val Glu Ser Asp Val Leu Ala Leu

65 70 75 80

Ser Gln Val Phe Val Glu Thr Gln His Val Leu Asn Lys Lys Asp Asp

85 90 95

Glu Asn Asn Ser Leu Leu Leu Asn Arg Asn Gln Leu Pro Asn Asn Lys

100 105 110

Ser Ser Ile Arg Ser His Val Ile Leu Asp Phe Pro Leu Glu Asn Leu

115 120 125

Lys Ala Ser Ser Ser Ser Tyr His Asn Glu Pro Thr Ile Ser Lys Gln

130 135 140

His Asp Met Ser His Phe Asn Val Leu Tyr Asn Asp Pro Val Ala Ser

145 150 155 160

Thr Ser Ser Thr Val Ile Ser Asn Ala Gln Tyr Glu Pro Thr Asn Ser
165 170 175
Ser Leu Val Ser Tyr Gln Ser Glu Thr Tyr Lys Glu Asp Glu Leu Cys
180 185 190
Thr Lys Lys Ser Val Lys Asn Ile Asp Asn Gln His Tyr Asp Tyr Leu
195 200 205
Ser Asn Lys Arg Pro Glu Thr Thr Leu Lys Thr Tyr Glu Arg Asn Asn
210 215 220

Thr Ser Lys Leu His Leu Tyr Asn Lys Leu Gln Thr Asp Asn Glu Asn
225 230 235 240
Val Pro Glu Lys Ile Tyr Tyr Asn Leu Asp Ala Lys Lys Leu Val Asp
245 250 255
Lys Arg Thr Lys Thr Glu Val Lys Val His Ser Pro Val Tyr Thr Pro
260 265 270
Ala Glu Lys Lys Asp Ile Glu Phe Thr Ser Ser Ile Ala Glu Asp Phe
275 280 285
Arg Ser Thr Leu Arg Glu

290

<210> 3
<211> 387
<212> DNA
<213> Solenopsis invicta
<400> 3

atgggcaagg agagaaggaa gcgcggaaaa cgggctggcc gtaaggtctt tttaaaagga 60
ttaaaaaagg aactacatgc ggccggcgaa ttcgatccat cgaccgtatt ccctaaaacc 120
ccacgccact caccaccggt cgaacgcgca accaccgttc atccggatcg acgactgaga 180
cgggatcctt cccccaaaca aaggaaaccc gccaatccta aagacacttt cgtccctgcg 240
cggatcctga cgaggcccat tccgatgcaa gtgtatgtgc gaaaaccatt gtcggcaact 300
tctccgaaac caaaaattcg atacaatatt tctgtaaagc ttaaattatc aataaccccc 360

tcagggataa tacgtatcaa gcactag 387

<210> 4
<211> 128

<212> PRT

<213> Solenopsis invicta

<400> 4

Met Gly Lys Glu Arg Arg Lys Arg Gly Lys Arg Ala Gly Arg Lys Val
1 5 10 15

Phe Leu Lys Gly Leu Lys Lys Glu Leu His Ala Ala Gly Glu Phe Asp
20 25 30

Pro Ser Thr Val Phe Pro Lys Thr Pro Arg His Ser Pro Pro Val Glu
35 40 45

Arg Ala Thr Thr Val His Pro Asp Arg Arg Leu Arg Arg Asp Pro Ser
50 55 60

Pro Lys Gln Arg Lys Pro Ala Asn Pro Lys Asp Thr Phe Val Pro Ala
65 70 75 80

Arg Ile Leu Thr Arg Pro Ile Pro Met Gln Val Tyr Val Arg Lys Pro
85 90 95

Leu Ser Ala Thr Ser Pro Lys Pro Lys Ile Arg Tyr Asn Ile Ser Val
100 105 110

Lys Leu Lys Leu Ser Ile Thr Pro Ser Gly Ile Ile Arg Ile Lys His
115 120 125

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sinv11108B1

<400> 5

gcattacatt agcaatgaaa cc 22

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sinv11108B1

<400> 6

attcagtaca tgctgtgtct ca 22

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sinv11977F1

<400> 7

ctaaaacccc acgccactca cc 22

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sinv11977B1

<400> 8

ttcggagaag ttgccgacaa tgg 23

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sinv11108 F-TM

<400> 9

acctgcgaga tatcaaacta cag 23

<210

> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sinv11108 R-TM

<400> 10

catgctgtgt ctcaacgaaa ac 22

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sinv11108 Probe

<400> 11

ccaaagacga agttcacaat gaggtgga 28

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sinv11977 F-TM

<400> 12

gaccgtattc cctaaaaccc c 21

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sinv11977 R-TM

<400> 13

acacttgcat cggaatggg 19

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sinv11977 Probe

<400> 14

tcctaaagac actttcgtcc ctgcg 25