

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0125559 (43) 공개일자 2014년10월29일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)		(71) 출원인 부경대학교 산학협력단 부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(21) 출원번호 10-2013-0043476		
(22) 출원일자 2013년04월19일		(72) 발명자
심사청구일자 2013년04월19일		공인수
기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도		부산광역시 해운대구 해운대해변로 83, 101동 204호(우동, 경남마리나아파트)
		조건아
		부산광역시 동구 자성로75번길 50, 2통 3반(범일동)
		(뒷면에 계속)
		(74) 대리인
		위병갑

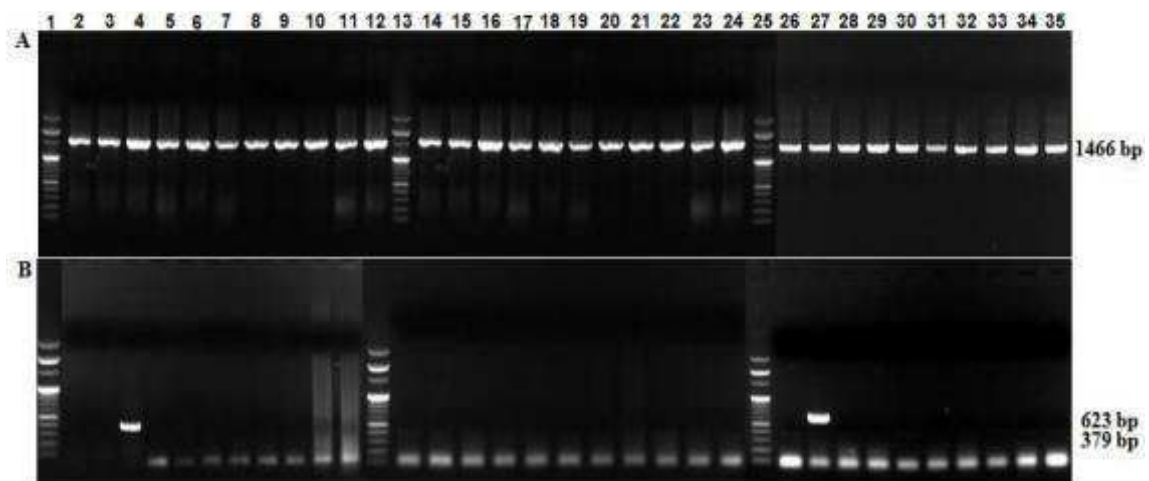
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 비브리오 균 및 에드워드 균의 동시 검출용 프라이머 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 병원성 미생물 검출용 프라이머, 이를 이용한 병원성 미생물의 검출방법 및 검출키트에 관한 것으로서, 보다 구체적으로, 본 발명은 비브리오 균 및 에드워드 균의 동시 검출용 프라이머, 상기 프라이머를 사용한 중합효소연쇄반응을 통해 병원성 미생물들을 검출하는 방법 및 검출키트에 관한 것이다. 본 발명에 따른 상기 프라이머는 미량 농도의 병원성 세균을 검출할 수 있는 특징이 있고, 비브리오 균 및 에드워드 균을 한 번의 PCR 반응으로 정확하고 신속하게 검출할 수 있는 특징이 있어, 본 발명의 프라이머는 병원성 미생물의 감염에 따른 어류 폐사를 방지할 수 있고, 양식 산업의 피해를 예방하여 어류 양식 산업면에서 그 효과가 매우 크다고 할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

권새봄

부산광역시 북구 백양대로 1003, 112동 1108호(구
포동, 현대아파트)

김나경

부산광역시 수영구 남천동로 46, 1동 912호(
남천동, 타워아파트)

무하마드 토파잘 호세인

방글라데시 미덴싱 꼬또알리 바그마라 120

김유리

부산광역시 사상구 강선로 10(덕포1동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C-D-2012-0418

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 부경대학교

연구사업명 학부생연구프로그램지원사업

연구과제명 2012년 학부생연구프로그램-Multiplex PCR을 이용한 어류병원성 미생물들의 동시 검출법의

개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국과학창의재단

연구기간 2012.05.10 ~ 2012.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 비브리오 안구일라움(*Vibrio anguillarum*) 검출용 프라이머 쌍; 및
서열번호 3 및 4의 염기서열로 이루어진 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*) 검출용 프라이머 쌍을 포함하는 병원성 미생물 검출용 프라이머.

청구항 2

제1항의 병원성 미생물 검출용 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)으로 병원성 미생물을 탐지하는 단계를 포함하는 병원성 미생물 검출방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍을 사용하는 경우, 비브리오 안구일라움(*Vibrio anguillarum*) 감염 여부를 확인할 수 있는 379bp의 PCR 증폭산물을 수득하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

서열번호 3 및 4의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍을 사용하는 경우, 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*) 감염 여부를 확인할 수 있는 623bp의 PCR 증폭산물을 수득하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 PCR은 65~70℃의 어닐링 온도 및 1.5~2.5 pmol 농도의 프라이머를 사용하여 수행하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 프라이머는 4ng의 주형 DNA를 이용하여 병원성 미생물을 검출할 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 병원성 미생물을 검출하는 제1항의 프라이머, 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 포함하는 병원성 미생물 검출키트.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 병원성 미생물은 비브리오 안구일라움(*Vibrio anguillarum*) 또는 에드워드시엘라 타르다(*Edwardsiella tarda*)인 것을 특징으로 하는 병원성 미생물 키트.

명세서

기술 분야

본 발명은 어류 병원성 미생물인 비브리오 균 및 에드워드 균을 동시에 신속하게 검출할 수 있는 프라이머 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 어류 병원성 미생물인 *Vibrio anguillarum*은 그람-음성 박테리아로 어류와 어패류에 비브리오증과 패혈증을 유발하며, *V. anguillarum*에 감염된 어류의 경우 입과 지느러미에 변색과 홍반이 나타나고, 복부 근육의 괴사가 일어나는 것으로 잘 알려져 있다. 특히, 양식 어류의 경우 이 미생물에 감염되면 30~100%의 높은 폐사율을 유발하여 다양한 양식 산업에 경제적으로 막대한 손실을 야기한다.
- [0003] 또한 에드워드병(edwardsiellosis)를 유발하는 *Edwardsiella tarda*도 어류에 세균성 질병을 유발하는 대표적인 미생물로서, 피부출혈, 복부궤양, 항문 돌출 등의 증상을 보이며 결국 어류의 대량 폐사를 일으키는 주요 원인이다.
- [0004] 한편, 식량자원의 고갈에 따라서 해양 생물의 중요성이 증대되고, 나아가 양식 어류의 수요가 해마다 증가함에 따라서 양식어류에 세균성 질병을 유발하는 병원성 균주의 모니터링이 필수적인데, 현재 병원성 미생물을 검출하기 위한 많은 생화학적 방법들이 사용되고 있지만, 많은 시간이 소비되고 노동집약적이며 다양한 생물의 배양이 불가능하다는 문제점이 있다.
- [0005] 또한, 최근에는 유전자를 이용한 분자생물학적인 방법으로 정확하고 신속한 병원성 미생물의 검출이 가능해짐에 따라 어류 병원성 감염 여부를 신속하게 검출하려는 연구가 시도되고 있다.
- [0006] 그러나 아직까지 *V. anguillarum* 및 *E. tarda*의 감염 여부를 동시에 신속하게 검출할 수 있는 방법에 대해서는 연구가 미비한 실정이다.
- [0007] 이에 본 발명자들은 어류 병원성 세균인 *V. anguillarum* 과 *E. tarda*을 동시에 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 프라이머를 고안하였고, 고안된 프라이머를 사용하여 상기 2종류의 병원성 미생물을 한번의 PCR로 검출 가능한 조건을 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 따라서 본 발명의 목적은 비브리오 안구일라움(*V. anguillarum*) 검출용 프라이머 쌍; 및 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*) 검출용 프라이머 쌍을 포함하는 병원성 미생물 검출용 프라이머를 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 병원성 미생물 검출용 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)으로 병원성 미생물을 탐지하는 단계를 포함하는 병원성 미생물 검출방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 병원성 미생물을 검출하는 상기 본 발명에 따른 프라이머, 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 포함하는 병원성 미생물 검출키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 비브리오 안구일라움(*V. anguillarum*) 검출용 프라이머 쌍; 및 서열번호 3 및 4의 염기서열로 이루어진 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*) 검출용 프라이머 쌍을 포함하는 병원성 미생물 검출용 프라이머를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 병원성 미생물 검출용 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)으로 병원성 미생물을 탐지하는 단계를 포함하는 병원성 미생물 검출방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍을 사용하는 경우, 비브리오

안구일라움(*V. anguillarum*) 감염 여부를 확인할 수 있는 379bp의 PCR 증폭산물을 수득할 수 있다.

- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 서열번호 3 및 4의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍을 사용하는 경우, 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*) 감염 여부를 확인할 수 있는 623bp의 PCR 증폭산물을 수득할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 PCR은 65~70℃의 어닐링 온도 및 1.5~2.5 pmol 농도의 프라이머를 사용하여 수행하는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 프라이머는 4ng의 주형 DNA까지 검출할 수 있다.
- [0018] 나아가 본 발명은 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 병원성 미생물을 검출하는 상기 본 발명에 따른 프라이머, 반응완충액, dNTP 및 DNA 중합효소를 포함하는 병원성 미생물 검출키트를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 병원성 미생물은 비브리오 안구일라움(*V. anguillarum*) 또는 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*)일 수 있다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명에 따른 병원성 미생물 검출용 프라이머는 어류에 유해한 병원성 세균인 비브리오 안구일라움(*V. anguillarum*) 및 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*)를 동시에 신속하고 정확하게 검출할 수 있으므로, 병원성 미생물의 감염에 따른 어류 폐사를 방지할 수 있고, 양식 산업의 피해를 예방하여 어류 양식 산업면에서 그 효과가 매우 크다고 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명에서 고안한 프라이머가 비브리오 안구일라움(*V. anguillarum*) 및 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*) 세균을 특이적으로 검출할 수 있다는 것을 PCR 방법을 통해 수행한 결과로서, A는 대조군으로서 16S rRNA 프라이머를 사용한 것이고, B는 비브리오 안구일라움(*V. anguillarum*) 및 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*)를 포함하여 다양한 병원성 미생물을 대상으로 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 본 발명에서 고안한 프라이머의 최적 PCR 반응 조건을 확립한 결과를 나타낸 것으로서, 주형 DNA의 각 농도별에 따른 PCR 반응산물을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 실제 넙치에 비브리오 안구일라움(*V. anguillarum*) 및 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*) 세균을 감염시키고, 넙치로부터 수득한 내장, 신장, 간 및 비장 유래의 DNA를 대상으로 본 발명에 따른 프라이머를 이용하여 세균 감염 여부를 PCR 방법으로 검출한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 본 발명은 병원성 미생물을 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 프라이머 및 상기 프라이머를 이용하여 병원성 미생물을 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [0023] 본 발명에서 상기 병원성 미생물이란 어류를 감염시켜 어류에 대해 각종 질환을 유발시킬 수 있는 어류 유해 병원성 미생물을 의미하며, 바람직하게는 비브리오 안구일라움(*V. anguillarum*) 및 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*)일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 병원성 미생물 검출용 프라이머는 각각의 병원성 미생물의 특이 유전자를 탐지하여 병원성 미생물을 검출할 수 있는 프라이머를 말하며, 바람직하게는 상기 병원성 미생물의 특이 유전자를 탐지하여 병원성 미생물의 특이 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍일 수 있다.
- [0025] 특히 본 발명의 경우, 병원성 미생물의 특이 유전자로서 GroEL protein을 coding하는 *groEL* gene을 타겟 유전자로 하였다.
- [0026] 이는 종래의 경우, 16S rRNA, hemolysin, *recA* 유전자 등이 PCR을 이용한 병원성 미생물 검출에 이용되고 있지만, 16S rRNA의 경우에는 종 수준의 유연관계만 알 수 있으며 높은 서열 유사도로 인하여 그 결과의 신뢰도가 낮다는 문제점이 제기되고 있고, virulence gene의 경우에는 mutation의 빈도가 높기 때문에 다른 sero-type을 구분하지 못하거나 virulence factor가 매우 다양하여 다른 유전자에 의한 병원성이 존재할 수 있다는 문제점이 있다.

- [0027] 따라서 이들 이외에 병원성 미생물 검출을 위한 새로운 타겟 유전자를 발굴하려는 연구가 필요한 실정에서, 본 발명자들은 GroEL protein을 coding하는 *groEL* gene을 타겟으로 하였고, 이를 기반으로 본 발명의 검출용 프라이머를 제작하였다.
- [0028] 본 발명자들이 주목한 *groEL* gene은 house keeping gene로서, chaperonin으로 잘 알려져 있는데, 이러한 chaperonin은 heat shock에 의해 과발현하기 때문에 heat shock protein으로도 불리며 heat shock 뿐만 아니라 temperature, pH, salinity, bile salt, osmotic pressure 등과 같은 환경적인 stress에 의해서 더 많이 발현되고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 어류 체내와 같은 환경에 대해 병원성 세균이 감염되었을 때 감염 여부를 용이하게 판별할 수 있는 대상이 될 수 있을 것으로 판단하였다.
- [0029] 따라서 이러한 점에 근거하여 본 발명에서 제공하는 병원성 미생물을 신속하고 정확하게 검출할 수 있는 프라이머는 바람직하게, 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 비브리오 안구일라움(*V. anguillarum*) 검출용 프라이머 쌍; 및 서열번호 3 및 4의 염기서열로 이루어진 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*) 검출용 프라이머 쌍을 포함하는 것일 수 있다.
- [0030] 특히, 본 발명의 병원성 미생물 검출용 프라이머 쌍 중에서 하기에 기재된 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍은 비브리오 안구일라움(*V. anguillarum*)의 특이 유전자를 약 379bp로 증폭시킬 수 있다.
- [0031]
- [0032] 서열번호 1(*V. anguillarum* F primer) : 5' -AGGTGAAGAGCAAGCCATTAAAGGT-3'
- [0033] 서열번호 2(*V. anguillarum* R primer) : 5'-ATCCTCTTCGCCCCGCTTTTTCAC-3'
- [0034] 또한, 하기 기재된 서열번호 3 및 4의 염기서열로 이루어진 프라이머 쌍은 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*)의 특이 유전자를 약 623bp로 증폭시킬 수 있다.
- [0035] 서열번호 3(*E. tarda* F primer) : 5' -TGACTCTAAAGCCATTGCGCAGGTA-3'
- [0036] 서열번호 4(*E. tarda* R primer) : 5' -TAACACGACCCTGAARGGCAGACTC-3'
- [0037] 상기 기술된 서열번호 1~4의 염기서열로 이루어진 프라이머들의 경우, 많은 병원성 미생물 들 중, 비브리오 안구일라움(*V. anguillarum*) 및 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*)를 특이적으로 검출할 수 있으며, 이들 2종의 세균에 대해서는 미생물별로 특이 유전자를 서로 다른 크기로 증폭할 수 있기 때문에 2가지 미생물을 동시에 검출할 수 있는 특징이 있다.
- [0038] 그러므로 본 발명은 본 발명에 따른 상기 병원성 미생물 검출용 프라이머를 이용한 중합효소연쇄반응(Polymerase chain reaction, PCR)으로 병원성 미생물을 탐지하는 단계를 포함하는 병원성 미생물 검출방법을 제공할 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 수행하는 상기 PCR은 당업계에 공지된 통상의 PCR 기기를 사용하여 일반적인 PCR 반응 조건에 따라 수행될 수 있거나 또는 일부 변형하여 실시할 수 있다. 상기 PCR을 이용한 병원성 미생물을 탐지하는 방법은 본 발명의 미생물 검출용 프라이머 쌍을 이용하여 각 미생물의 특정 DNA를 증폭시킨 후, 특정 DNA의 증폭여부를 확인하는 단계를 통해 수행될 수 있으며, 상기 특정 DNA의 증폭여부를 확인하는 단계는 PCR 반응산물이 전기영동 등을 통하여 예상되는 DNA 산물의 크기와 일치하는지를 확인함으로써 수행될 수 있다.
- [0040] 또한 상기 미생물 검출방법에 사용되는 주형 DNA의 시료는 병원성 미생물이 발견될 수 있는 모든 물질, 바람직하게는 병원성 미생물 감염이 의심되는 어류, 해수 등이 될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 어류로부터 수득할 수 있다.
- [0041] 상기 주형 DNA는 당업계에서 통상적으로 사용되는 DNA 추출방법을 통해 수득할 수 있으며, 상기 DNA 추출방법은 이에 제한되지는 않으나, 알카라인 추출법, 열수추출법, 컬럼 추출법 및 페놀/클로로포름 추출법 일 수 있고, 바람직하게는 열수추출법일 수 있다.
- [0042] 본 발명의 일실시예에서는 인위적으로 병원성 미생물에 오염된 넙치를 대상으로 넙치로부터 분리한 내장, 신장,

간 및 비장 조직으로부터 총 DNA를 추출한 후, 이를 주형으로 하고 본 발명에 따른 상기 프라이머쌍을 사용하여 PCR을 수행한 다음, 통상적인 PCR 검출 수단인 전기영동을 통해 증폭된 DNA 산물 크기가 사용한 프라이머의 예상 PCR 반응산물의 크기와 일치하는지를 확인함으로써 상기 시료로부터 병원성 미생물의 존재 여부를 확인할 수 있었다.

- [0043] 또한 상기와 같은 본 발명의 방법을 통해 본 발명에서 제공하는 프라이머는 미량의 농도인 4ng의 주형 DNA로도 병원성 미생물도 검출할 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0044] 따라서 본 발명의 병원성 미생물 검출방법은 미생물의 특이 유전자의 증폭 여부만으로도 미생물의 존재 여부를 확인할 수 있기 때문에 시료에 존재하는 미생물을 매우 쉽고 빠르게 검출할 수 있다.
- [0045] 뿐만 아니라, 본 발명에서는 상기 본 발명에서 제공하는 프라이머쌍을 동시에 사용하여 비브리오 안구일라움(*V. anguillarum*) 및 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*)를 한번의 PCR로 확인할 수 있는 PCR 반응 조건을 확립하였는데, 상기 PCR은 65~70℃의 어닐링 온도 및 1.5~2.5 pmol 농도의 프라이머를 사용하여 수행하는 경우, 비브리오 안구일라움(*V. anguillarum*) 및 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*)를 동시에 한번의 PCR로 감별할 수 있음을 확인하였다.
- [0046] 본 발명의 일실시예에서는 상기 PCR을 67℃의 어닐링 온도 및 2.0 pmol의 프라이머 농도로 사용하였다.
- [0047] 나아가 본 발명은 상기 본 발명의 미생물 검출용 프라이머 쌍을 포함하는 병원성 미생물 검출용 검출키트를 제공한다.
- [0048] 상기 검출키트는 상기 미생물 검출용 프라이머 쌍 및 중합효소연쇄반응을 이용한 미생물 검출키트의 통상적인 구성성분을 포함할 수 있으며, 상기 통상적인 구성성분은 반응완충액, DNA 중합효소 및 dNTP 등을 포함할 수 있으며, 상기 검출키트가 검출할 수 있는 병원성 미생물은 비브리오 안구일라움(*V. anguillarum*) 또는 에드워드시엘라 타르다(*E. tarda*)일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일실시예에 따른 병원성 미생물 검출키트는 상기 기술한 본 발명에 따른 병원성 미생물 검출용 프라이머 쌍, 즉, 각 균주별 프라이머 쌍으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 프라이머 쌍, Taq DNA 중합효소, dNTP, 완충용액 및 주형 DNA를 포함한다.
- [0050] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] <실시예 1>

[0052] *Vibrio anguillarum* 및 *Edwardsiella tarda*의 검출용 프라이머 제작

[0053] *V. anguillarum* 및 *E. tarda*을 검출할 수 있는 프라이머의 제작을 위해 NCBI data base로부터 51종의 *Vibrio* 및 13종의 non-*Vibrio*의 *groEL* 유전자 서열정보를 수집하였고, 이를 clustalW alignment program을 통하여 분석하여, *V. anguillarum* 과 *E. tarda*에 특이적 부위를 선별한 후, 상기 특이적 부위를 증폭할 수 있는 후보 프라이머들을 제작하였다. 특히 후보 프라이머들 중에서 하기 서열을 갖는 프라이머가 *V. anguillarum* 및 *E. tarda*을 동시에 검출할 수 있는 프라이머로 정하였고, 이후 PCR 과정을 수행하여 이들 프라이머가 상기 병원성 세균들을 검출할 수 있는지 조사하였다. 이때, 대조군으로는 16S rRNA의 프라이머를 제조하여 사용하였다.

표 1

[0054] 프라이머 서열

프라이머 명	서열	산물크기(bp)	서열번호
V. anguillarum F primer(1008F)	AGGTGAAGAGCAAGCCATTAAGGT	379bp	1
V. anguillarum R primer(1363R)	ATCCTCTTCGCCCgcgTTTTTCAC		2
E. tarda F primer(417F)	TGACTCTAAAGCCATTGCGCAGGTA	623bp	3
E. tarda R primer(1015R)	TAACACGACCCTGAARGGCAGACTC		4
16S rRNA F primer(27F)	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG		5

16S rRNA R primer(1492R)	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	6
--------------------------	------------------------	---

[0055]

<실시예 2>

[0056]

제작된 프라이머의 특이성 확인

[0057]

상기 실시예 1에서 제작한 프라이머 세트가 *V. anguillarum* 및 *E. tarda*를 특이적으로 검출 가능한지 다음과 같은 PCR 반응 조건으로 조사하였다.

[0058]

51종의 *Vibrio* 및 13종의 non-*Vibrio*로부터 chromosomal DNA를 분리하였고, 분리한 DNA는 PCR 반응 시 주형으로 사용하였다. 이때 대조군으로 16s rRNA의 프라이머 세트를 사용하였다. PCR의 조성은 정제된 게놈 DNA, 10x PCR buffer, MgCl₂, dNTP, Ex Taq polymerase (Takara Bio, Japan), 프라이머 및 증류수로 구성되며, 각각의 농도를 달리하여 최적 PCR 조건을 확인하였다. 또한 가장 명확한 결과를 얻을 수 있는 PCR의 반응온도 및 cycle 수를 조사하였고, 확립하였다. PCR 결과물은 1% 아가로스 겔 전기영동을 통해 확인하였다.

[0059]

[0060]

그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 대조군으로 사용한 16s rRNA 증폭용 프라이머의 경우, 모든 세균에서 1466bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었으며, *V. anguillarum* 검출용 프라이머의 경우, 다른 세균에서는 증폭산물을 확인할 수 없었고 오로지 *V. anguillarum* 세균에 대해서만 379bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었으며, *E. tarda* 검출용 프라이머의 경우도 다른 세균에서는 증폭산물을 확인할 수 없었고, 오로지 *E. tarda* 균에서만 623bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었다.

[0061]

또한, 참고로, 도 1에 기재된 각 레인에 대한 설명은 하기 표에 기재된 바와 같다.

표 2

[0062]

레인번호	표시
1, 13, 25	100bp DNA ladder
2~12, 14~24, 26~35	각 레인 번호별 순서; <i>V. aestuarianus</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>V. anguillarum</i> , <i>V. campbellii</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>V. cincinnatiensis</i> , <i>V. damsella</i> , <i>V. diazotrophicus</i> , <i>V. fluvialis</i> , <i>V. furnissii</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. logei</i> , <i>V. mediterranei</i> , <i>V. metschnikovii</i> , <i>V. mimicus</i> , <i>V. natriegens</i> , <i>V. navarrensis</i> , <i>V. nereis</i> , <i>V. ordalii</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. proteolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Edwardsiella tarda</i> , <i>E. ictaluri</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>S. sonnei</i> .

[0063]

따라서 상기 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명에서 고안한 상기 프라이머들이 *V. anguillarum* 및 *E. tarda*를 특이적으로 검출할 수 있음을 알 수 있었다.

[0064]

<실시예 3>

[0065]

멀티플렉스 PCR 반응조건 확립

[0066]

나아가 본 발명자들은 상기 실시예에서 고안한 *V. anguillarum* 및 *E. tarda* 검출용 프라이머 세트를 혼합 사용하여 한번의 PCR 반응을 통해 2가지 균주를 동시에 감별 및 검출할 수 있는 PCR 반응 조건을 구축하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

[0067]

먼저 상기 2종류의 프라이머 세트에 대한 어닐링 온도를 67℃로 정하고, 각각의 프라이머를 2pmol의 농도로 처리하여 PCR을 수행하였으며, 이때 상기 실시예에서 사용한 주형 DNA의 농도를 각각 달리하여(4ug~0.4pg까지 각각 1/10씩 희석한 주형 DNA를 사용함) 검출 가능한 주형 DNA의 농도도 조사하였다.

[0068]

[0069]

그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 상기와 같은 PCR 반응 조건으로 수행한 경우(67℃의 어닐링 온도, 2pmol의 각 프라이머 농도), 4ng 이상의 주형 DNA에 대해 *V. anguillarum* 및 *E. tarda*의 세균을 구별하여 검출할 수 있

음을 알 수 있었다.

[0070] 참고로 도 2에 기재된 각 레인별 표시는 하기 표에 기재된 바와 같다.

표 3

레인번호	표시
1, 5	100bp DNA ladder
2(양성대조군)	<i>Vibrio anguillarum</i> 검출 마커인 PCR 증폭산물 379bp
3(양성대조군)	<i>Edwardsiella tarda</i> 검출 마커인 PCR 증폭산물 623bp
4(양성대조군)	<i>Vibrio anguillarum</i> 및 <i>Edwardsiella tarda</i> 검출마커인 379bp 및 623bp 혼합물
6~13	정제된 chromosomal DNA의 농도별 처리군 6: 4 ug, 7: 0.4 ug, 8: 0.04 ug, 9: 4 ng, 10: 0.4 ng, 11: 0.04 ng, 12: 4 pg, 13: 0.4 pg

[0072] <실시예 4>

[0073] 본 발명에 따른 프라이머의 병원성 미생물 검출 실제 적용분석

[0074] 본 발명에서 고안한 상기 프라이머가 실제 어류 병원성 세균인 *Vibrio anguillarum* 및 *Edwardsiella tarda*를 검출할 수 있는지 확인하기 위해, 4개의 그룹으로 나눈 16 마리의 넙치(flounders; *Paralichthys olivaceus*)를 실험에 사용 하였고, 20℃에서 2주간 15ℓ 탱크에서 실험을 진행하였다. 3개의 그룹은 *V. anguillarum* (2.1×10^8 CFU/ml)과 *E. tarda* (2.1×10^8 CFU/ml)를 각각 혹은 동시에 복강 내에 주입시켰고, 나머지 한 그룹은 대조군으로서 병원성 세균을 접종하지 않았다. 세균 감염 후 48시간 뒤에 각 넙치로부터 장, 간, 비장과 신장을 모아 DNA 추출 키트(NucleoGen Biotech, Siheung, Korea)를 사용하여 총 DNA를 추출하였고, 이를 PCR 주형으로 사용하였다. 이때 PCR의 반응 조건은 앞서 수행한 실시예 3의 PCR 반응 조건과 동일한 조건 하에서 수행하였다. 또한, 해수(seawater)에 *V. anguillarum* (2.1×10^8 CFU/ml)과 *E. tarda* (2.1×10^8 CFU/ml)를 처리하고, 12 시간이 경과한 후, 여과시켜 수득한 펠렛을 주형으로 하여 PCR을 수행하였다.

[0075] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, *V. anguillarum* 및 *E. tarda*를 각각 또는 동시에 감염시킨 넙치의 장, 간, 비장 및 신장으로부터 분리한 chromosomal DNA를 주형으로 하고, 본 발명에서 고안한 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 결과, 1번의 PCR 수행으로 *V. anguillarum* 및 *E. tarda* 감염 여부를 구별할 수 있는 PCR 증폭산물을 확인할 수 있었고, 이러한 결과는 어류가 아닌 해수를 대상으로 한 결과에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다.

[0076] 따라서 본 발명자들은 본 발명에서 고안한 프라이머들의 경우, 어류 또는 해수를 대상으로 병원성 미생물인 *V. anguillarum* 및 *E. tarda*의 감염 여부를 1번의 PCR 방법으로 간단하고 정확하게 검출할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

[0077] 참고로, 도 3에 기재된 각 레인별 표시 사항은 하기 표에 기재된 바와 같다.

표 4

레인	표시	레인	표시
1, 5	100bp DNA ladder	6	<i>V. anguillarum</i> 및 <i>E. tarda</i> 가 함께 감염된 넙치의 장으로부터 분리된 DNA를 주형으로 한 군
2	<i>V. anguillarum</i> 를 처리한 해수의 펠렛을 주형으로 한 군	7	<i>V. anguillarum</i> 및 <i>E. tarda</i> 가 함께 감염된 넙치의 신장으로부터 분리된 DNA를 주형으로 한 군
3	<i>E. tarda</i> 를 처리한 해수의 펠렛을 주형으로 한 군	8	<i>V. anguillarum</i> 및 <i>E. tarda</i> 가 함께 감염된 넙치의 간으로부터 분리된 DNA를 주형으로 한 군

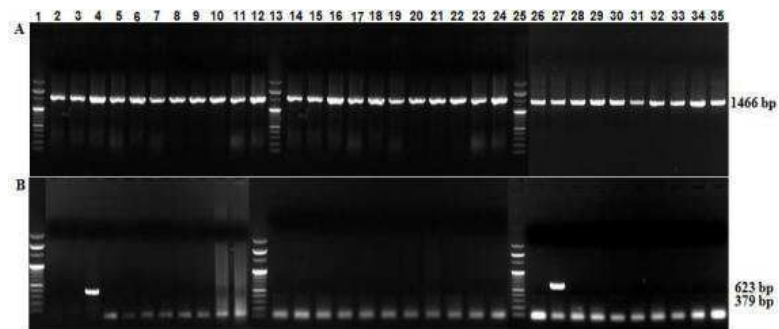
4	<i>V. anguillarum</i> 및 <i>E. tarda</i> 를 함께 처리한 해수의 펠렛을 주형으로 한 균	9	<i>V. anguillarum</i> 및 <i>E. tarda</i> 가 함께 감염된 넙치의 비장으로부터 분리된 DNA를 주형으로 한 균
---	---	---	---

[0079]

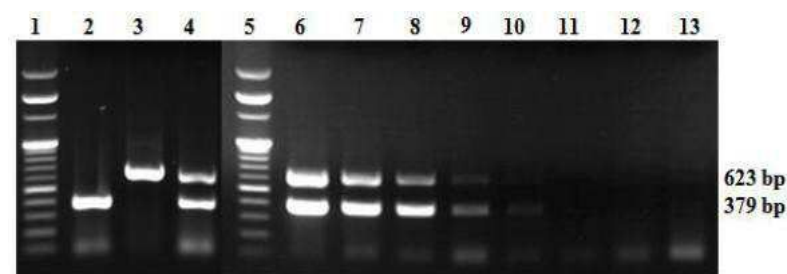
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

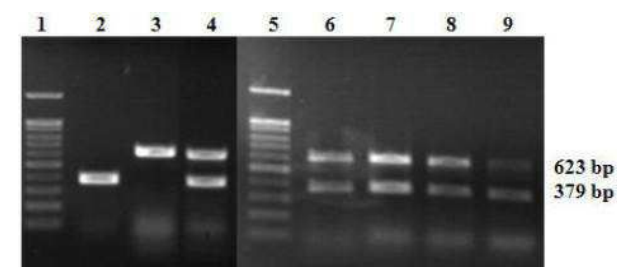
도면1



도면2



도면3



서열목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of Pukyong National University

<120> PCR primer for detecting *Vibrio anguillarum* and *Edwardsiella tarda* and use thereof

<130> PN1303-118

<160> 6

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> V. anguillarum F primer

<400> 1

aggtgaagag caagccatta aaggt 25

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> V. anguillarum R primer

<400> 2

atcctcttcg cccgcgtttt tcac 24

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> E. tarda F primer

<400> 3

tgactctaaa gccattgcgc aggta 25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> E. tarda R primer

<400> 4

taacacgacc ctgaarggca gactc 25

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16S rRNA F primer

<400> 5

agagtttgat cmtggctcag 20

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 16S rRNA R primer

<400> 6

tacggytacc ttgttacgac tt 22