(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0033920
(43) 공개일자 2023년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6888 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6888 (2018.05)
C12Q 2527/101 (2019.08)
(21) 출원번호 10-2021-0116903
(22) 출원일자 2021년09월02일
심사청구일자 2021년09월02일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
고영호
서울특별시 영등포구 버드나루로 55, 1005C호(한림대학교 도헌연구센터)
김아영
인천광역시 남동구 호구포로739번길 82-1, 3동 202 (구월동, 롯데환타빌)
(74) 대리인
김남혁

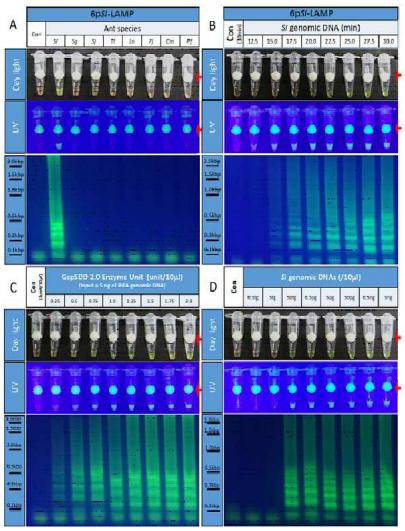
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **고리매개 등온 증폭법을 이용하여 외래 침입 붉은불개미를 신속하고 정확하게 실험실과 현장에서 진단하는 분자진단법**

(57) 요 약

본 발명은 고리매개등온증폭법(Loop-mediated isothermal amplification)을 이용하여 Solenopsis invicta 11977 유전자를 검출하는 제제를 포함하는 붉은불개미 진단 내지 검출용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 붉은불개미 검출용 키트 및 상기 조성물 또는 키트를 이용하는 붉은불개미 검출을 위한 정보 제공방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545020239
과제번호	APQA-2018-02
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림축산검역본부
연구사업명	생물다양성 위협 미유입 외래생물 사전예방기술개발
연구과제명	외래 붉은불개미의 현장 진단용 간이 키트 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.27 ~ 2019.11.15

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 5의 염기서열을 포함하는 프라이머; 및

서열번호 6의 염기서열을 포함하는 프라이머;를 포함하는 프라이머 세트를 포함하는, 붉은불개미(*Solenopsis invicta*) 검출용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는, 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 프라이머; 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 프라이머;를 더 포함하는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는, 서열번호 7의 염기서열을 포함하는 프라이머; 및 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 프라이머;를 더 포함하는 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 핵산을 검출하기 위한 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는, 등온증폭반응(LAMP)용인, 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 붉은불개미(*Solenopsis invicta*) 검출용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서,

DNA 중합효소, dNTPs 및 완충액을 더 포함하는, 키트.

청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물; 및 내부에 상기 조성물을 포함하고 62℃ 내지 68℃를 유지시키는 컨

테이너;를 포함하는 붉은불개미(*Solenopsis invicta*) 검출 장치.

청구항 9

목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 핵산을 검출하는 단계를 포함하는, 붉은불개미(*Solenopsis invicta*) 검출을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 검출하는 단계는, 서열번호 5의 염기서열을 포함하는 프라이머; 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 프라이머;를 포함하는 프라이머 세트에 의해 수행되는 것인, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 프라이머 세트는, 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 프라이머; 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 프라이머;를 더 포함하는 것인, 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 검출하는 단계는, 상기 시료 및 상기 프라이머 세트가 62℃ 내지 68℃에서 등온증폭반응(LAMP)하는 것인, 방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 검출하는 단계는, 상기 시료 및 상기 프라이머 세트가 3분 내지 40분 동안 등온증폭반응(LAMP)하는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 고리매개등온증폭법(Loop-mediated isothermal amplification; LAMP)을 이용하여 Solenopsis invicta 11977 유전자를 검출하는 제제를 포함하는 붉은불개미 진단 내지 검출용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 붉은불개미 검출용 키트 및 상기 조성물 또는 키트를 이용하는 붉은불개미 검출을 위한 정보 제공방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 붉은불개미(Red imported fire ants, *Solenopsis invicta*; Si)는 남아메리카 대륙의 저지대가 원산지이고, 공격성이 매우 강한 해충으로서, 국제자연보존 연맹(International Union for Conservation of Nature; IUCN)이 지정한 세계 100대 침입외래종으로 지정되어 있다. 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 피해

는 자연환경 및 농축산물의 파괴에 한정되지 않고, 인간을 공격하여 의료문제와 건축물 및 사회기반시설을 파괴하는 심각한 문제들을 일으키고 있다.

[0003] 미국의 경우 1932년에 앨라배마주와 미시시피주에서 처음으로 침입이 발견된 후, 플로리다주와 텍사스주에서 메릴랜드주까지 서식범위를 넓혀 왔고, 미 서해안에서는 1990년대에 캘리포니아에서도 발견되었다. 미국에서 매년 외래침입 붉은불개미에 의하여 나타나는 피해액이 70억불에 달한다고 알려져 있다. 또한, 호주의 경우는 2001년 브리스베인 항구에서 처음으로 군체가 발견이 된 후, 지속적으로 항구와 공항에서 군체가 발견이 되고 있다. 대부분의 군체는 박멸이 되었지만, 2001년도에 브리스베인과 NSW 경계지역에서는 붉은불개미가 넓은 지역에 정착을 하였고 현재도 방제가 진행 중에 있다. 2016년 중반까지 호주는 붉은불개미 방제를 위하여 총 330백만달러를 사용하였고, 호주 퀸즈랜드 주 정부에 의한 모델링 연구결과 퀸즈랜드 남부 지역만의 붉은불개미의 방제를 위해서는 향후 30년간 45억 달러에 비용을 사용해야 할 것이라고 예측하였다. 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 완전 박멸이 불가능하므로, 붉은불개미 방제에서 가장 중요한 단계는 초기에 붉은불개미의 침입을 발견하여 정착 전에 제거하는 것이다.

[0004] 현재 해충을 감별하기 위해 분자 마커를 이용한 방법이 널리 이용되고 있으며(대한민국 공개특허 제10-2008-0036944호), 붉은불개미의 경우에도 붉은불개미 특이적 유전자 또는 단백질을 검출하여 확증하는 방법을 이용하고 있으나, 민감도가 낮다는 문제점과 고가의 정밀 기계가 필요하므로 현장에서 신속 진단에 활용되기 어렵다는 문제점을 가진다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2008-0036944호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자들은 붉은불개미 검출을 효율적이고 손쉽게 할 수 있는 방법을 개발하고자 노력한 결과, 붉은불개미 독선에서 특이적으로 발현되는 신규 유전자를 발굴하고, 상기 유전자의 발현 수준을 측정하여 붉은불개미를 검출할 수 있는 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 따르면, 서열번호 5의 염기서열을 포함하는 프라이머; 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 프라이머;를 포함하는 프라이머 세트를 포함하는, 붉은불개미(*Solenopsis invicta*) 검출용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한 본 발명에서, 상기 프라이머 세트는, 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 프라이머; 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 프라이머;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0010] 또한 본 발명에서, 상기 프라이머 세트는, 서열번호 7의 염기서열을 포함하는 프라이머; 및 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 프라이머;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0011] 또한 본 발명에서, 상기 프라이머 세트는, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 핵산을 검출하기 위한 것일 수 있다.

[0012] 또한 본 발명에서, 상기 프라이머 세트는, 등온증폭반응(LAMP)용일 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물을 포함하는 붉은불개미(*Solenopsis invicta*) 검출용 키트를 제공하는 것일 수 있다.

[0014] 또한 본 발명에서,DNA 중합효소, dNTPs 및 완충액을 더 포함하는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물; 및 내부에 상기 조성물을 포함하고62℃ 내지 68℃를 유지시키는 컨테이너;를 포함하는 붉은불개미(*Solenopsis invicta*) 검출 장치를 제공하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 핵산을 검출하는 단계를 포함하는, 붉은불개미(*Solenopsis invicta*) 검출을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것일 수 있다.

[0017] 또한 본 발명에서, 상기 검출하는 단계는, 서열번호 5의 염기서열을 포함하는 프라이머; 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 프라이머;를 포함하는 프라이머 세트에 의해 수행되는 것일 수 있다.

[0018] 또한 본 발명에서, 상기 프라이머 세트는, 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 프라이머; 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 프라이머;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0019] 또한 본 발명에서, 상기 검출하는 단계는, 상기 시료 및 상기 프라이머 세트가 62℃ 내지 68℃에서 등온증폭반응(LAMP)하는 것일 수 있다.

[0020] 또한 본 발명에서, 상기 검출하는 단계는, 상기 시료 및 상기 프라이머 세트가 3분 내지 40분 동안 등온증폭반응(LAMP)하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명의 붉은불개미 검출용 조성물, 붉은불개미 검출용 키트 및 붉은불개미 검출을 위한 정보 제공 방법에 따르면, Sinv11977 유전자를 확인하여 적은 양의 시료를 통해서도 상기 시료가 붉은불개미 시료인지 여부를 확인할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 Sinv11977 유전자에 대한 4pSi-LAMP 반응을실시한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 Sinv11977 유전자에 대한 6pSi-LAMP 반응을 실시한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 개미 시료에 대한 6pSi-LAMP 반응을 실시하여 Sinv11977 유전자 검출을 한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[0024] 한편, 본 명세서에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속하고, 일 구현예에서 생략된 기재는 다른 구현예에서 기재된 바와 같은 방식으로 해석될 수 있다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0025]

[0026] 본 발명에서, 용어, "붉은불개미(*Solenopsis invicta,* Red imported fire ants; Si)"는 개미의 종 중 하나로서, 국내에서는 붉은독개미, 외래 붉은불개미 또는 붉은열마디개미로 불리고 있다. 머리는 구리 빛 갈색을 띠고 몸은 짙은 적갈색을 띠고 있다. 크기는 3~6mm이며, 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, 심박수 증가, 호흡곤란, 혈압저하, 의식장애 등 과민성 쇼크 증상이 나타나기도 하며, 이 경우 치료받지 않으면 결국 사망하기도 한다.

[0027] 본 발명에서, "Sinv11977(*Solenopsis invicta* 11977) 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.

[0028] 본 발명에서, 용어 "검출"은 특정 유전자 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질의 발현 여부 또는 발현 정도를 측정하여, 상기 유전자 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질이 유래된 시료에서 대상의 분류 동정 또는 확증을 의미하는 것이며, 본 발명의 목적 상 상기 검출은 임의의 개미 개체 내지 시료가 붉은불개미인지 여부를 판별하여 붉은불개미 분류 동정 또는 붉은불개미 확증을 의미할 수 있다. 구체적으로는, 임의의 개미 개체에 대하여, 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 15종의 개미 중 붉은불개미를 특이적으로 진단하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명에서, 상기 조성물은 Sinv11977 유전자의DNA, cDNA, mRNA 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질의 발현 수준을 측정하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에서, 상기 DNA, cDNA 또는 mRNA 수준을 측정하는 방법은 중합효소반응(PCR), 등온증폭반응(Loop-mediated isothermal amplification; LAMP), 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.

[0031] 본 발명에서, 상기 "등온증폭반응(Loop-mediated isothermal amplification; LAMP)"은 "고리매개등온증폭법"이라고도 하며, 종래 PCR과 달리 PCR 사이클이 필요 없는 Bst, Gsp 등의 중합효소를 이용하여 등온 조건에서 증폭반응을 수행하는 방법으로서, 기본적으로 네 개의 프라이머를 이용하여 양 말단을 고리 구조로 합성하여 유전자의 특정 부위를 무한대로 증폭하고, 증폭된 DNA 산물을 형광 검출 시약을 이용하거나 침전 반응시켜 증폭 유무를 확인하는 방법으로서, 바람직하게는 형광 검출용 시약을 더 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 LAMP 분석은 그 특이성으로 인하여 변이된 개체의 시료를 분석한 경우, 그 결과가 위음성이 될 경우가 있으나, 본 발명의 서열번호 3 내지 8의 프라이머를 포함하는 프라이머 세트, 특히 서열번호 5 내지 8의 프라이머를 포함하는 프라이머 세트는 붉은불개미 변종에도 적응할 수 있는 효과를 가질 수 있다.

[0032] 본 발명에서 "프라이머"란 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 시작점으로 작용 가능한 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미할 수 있다. 적절한 완충액 중 적절한 조건, 예컨대 네 개의 서로 다른 뉴클레오사이드 트리포스페이트, DNA, RNA 폴리머레이즈, 역전사 효소와 같은 중합효소 및 적당한 온도에서 주형 지시 DNA 합성의 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 통상 15개 내지 30개 뉴클레오타이드로 이루어진다. 짧은 프라이머는 일반적으로 주형과 안정적인 하이브리드를 형성하기 위해서는 온도가 낮아야 한다. 프라이머 서열은 주형과 완전히 상보적일 필요는 없으나 주형과 혼성화 가능할 정도로 충분히 상보적이어야 한다.

[0033] 본 발명의 프라이머는 예컨대 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법과 같이 본 발명이 속하는 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 화학적인 합성이 가능하다. 그 외에도 공지된 방법으로 프라이머를 메틸화, 캡핑 등으로 변형시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 프라이머는 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단으로 직접 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지로는 예컨대 호스래디쉬 퍼옥시데이즈, 알칼라인 포스파테이즈, 방사성 동위원소, 형광 분자, 바이오틴 등을 들 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서 "내부 프라이머"는 주형 DNA에 결합하여 새로운 DNA 사슬 합성의 시작점으로 기능할 수 있는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미하며, 내부 프라이머가 주형 DNA에 결합하여 DNA 사슬이 연장된 이후, 외부 프라이머와 주형 RNA의 결합으로 사슬 변위가 발생하여 먼저 형성된 사슬이 떨어져 나온다.

[0035] 본 발명에서, 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 있

는 올리고뉴클레오타이드와 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 없애 주는 물질을 결합)를 사용할 수 있다. TaqMan 프로브에 사용될 수 있는 형광물질은Biosearch 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 없애 주는 물질은Black 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.

[0036] 본 발명에서, 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.

[0037] 본 발명에서, 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.

[0038] 본 발명에서, 용어 “키트”는 본 발명의 유전자 또는 단백질에 특이적으로 결합하는 프로브 또는 항체를 검출 가능한 표지로 표지하여 본 발명의 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 평가할 수 있는 도구를 말한다. 프로브 또는 항체 관련하여 검출 가능한 물질을 기질과의 반응에 의해서 직접적으로 표지하는 것뿐만 아니라, 직접적으로 표지된 다른 시약과의 반응성에 의한 발색하는 표지체가 접합된 간접적 표지도 포함한다. 상기 표지체와 발색 반응할 발색 기질 용액, 세척액 및 기타 다른 용액 등을 포함할 수 있으며, 사용되는 시약 성분을 포함하여 제작될 수 있다.

[0039] 본 발명에서, 상기 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있으며, 본 발명의 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소, 역전사효소, DNase, RNase 억제제, 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 예후 예측용 유전자를 검출하기 위한 키트일 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판을 포함하고 기판은 정량 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 당 업계에 공지되어 있는 것이라면, 이에 제한되지 않는다.

[0040] 본 발명에서, 상기 키트는 RT-PCR 키트 또는 DNA 칩 키트일 수 있으나, DNA를 분석하기 위한 것이라면 제한없이 포함될 수 있다.

[0041] 본 발명의 상기 키트는 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명에서 상기 키트는 역전사 중합효소반응을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 더 포함할 수 있다. 역전사 중합효소반응 키트는 본 발명의 프라이머 세트에 더하여, 테스트 튜브 또는 다른 적절한 용기, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제 DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명의 상기 키트는 DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 키트는 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)가 부착되어 있는 기판, 및 형광표지 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한 기판은 대조군 유전자 또는 그의 단편

에 해당하는 cDNA 또는 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명의 상기 키트는 고정체를 더 포함할 수 있고, 상기 고정체로는 니트로셀룰로오즈 막, PVDF 막, 폴리비닐(polyvinyl) 수지 또는 폴리스티렌(polystyrene) 수지로 합성된 웰 플레이트(Well plate), 유리로 된 슬라이드 글래스 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 또한, 본 발명의 상기 키트에서 2차 항체의 표지체는 발색 반응을 하는 통상의 발색제가 바람직하며, HRP(horseradish peroxidase), 염기성 탈인산화효소(alkaline phosphatase), 콜로이드 골드(coloid gold), FITC(폴리 L-라이신-플루오르세인 아이소티오시아네이트), RITC(로다민-B-아이소티오시아네이트) 등의 형광물질(fluorescein) 및 색소(dye) 등의 표지체가 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 또한, 본 발명의 상기 키트에서 발색을 유도하기 위한 발색 기질은 발색 반응을 하는 표지체에 따라 사용하는 것이 바람직하며, TMB(3,3',5,5'-테트라메틸 베지딘), ABTS[2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)], OPD(o-페닐렌다이아민) 등을 사용할 수 있다. 이때, 발색 기질은 완충 용액(0.1 M NaAc, pH 5.5)에 용해된 상태로 제공되는 것이 더욱 바람직하다. TMB와 같은 발색기질은 이차 항체 접합체의 표지체로 사용된 HRP에 의해 분해되어 발색 침적체를 생성하고, 이 발색 침적체의 침적 정도를 육안으로 확인함으로써 상기 본 발명의 단백질들의 존재 유무를 검출한다.

[0046] 본 발명의 상기 키트에서 세척액은 인산염 완충 용액, NaCl 및 트윈 20을 포함하는 것이 바람직하며, 0.02 M 인산염 완충용액, 0.13 M NaCl, 및 0.05% 트윈 20으로 구성된 완충 용액(PBST)이 더욱 바람직하다. 세척액은 항원-항체 결합 반응 후 항원-항체 결합체에 2차 항체를 반응시킨 다음 적당량을 고정체에 첨가하여 3 내지 6회 세척한다. 반응 정지 용액은 황산 용액(H_2SO_4)이 바람직하게 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명에서, 용어 "개체"는 붉은불개미로 의심되는 모든 생물체를 의미하며, 구체적인 예로, 임의의 개미 개체일 수 있다.

[0048] 본 발명에서, 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.

[0049] 본 발명에서, "생물학적 시료"는 붉은불개미일 가능성이 있는 개체로부터 유래한 물질을 의미하며, 구체적으로 기관, 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액 및 알에서 선택된 어느 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 생물학적 시료는 복부 또는 다리에서 유래된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 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.

[0050]

[0051] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 서열번호 5의 염기서열을 포함하는 프라이머; 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 프라이머;를 포함하는 프라이머 세트를 포함하는, 붉은불개미(*Solenopsis invicta*) 검출용 조성물을 제공한다.

[0052] 본 발명에서, 상기 프라이머 세트는, 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 프라이머; 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 프라이머;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0053] 본 발명에서, 상기 프라이머 세트는, 서열번호 7의 염기서열을 포함하는 프라이머; 및 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 프라이머;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0054] 본 발명에서, 상기 프라이머 세트는, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 핵산을 검출하기 위한 것일 수 있다.

[0055] 본 발명에서, 상기 프라이머 세트는, 등온증폭반응(LAMP)용일 수 있다.

[0056]

[0057] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물을 포함하는 붉은불개미(*Solenopsis invicta*) 검출용 키트를

제공하는 것일 수 있다.

[0058] 본 발명에서, 상기 키트는 DNA 중합효소, dNTPs 및 완충액을 더 포함할 수 있다.

[0059]

[0060] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물; 및 상기 조성물과 시료가 반응할 수 있도록 내부에 상기 조성물을 포함하고 62℃ 내지 68℃의 온도 범위를 유지시키는 컨테이너;를 포함하는 붉은불개미(*Solenopsis invicta*) 검출 장치를 제공하는 것일 수 있다.

[0061] 본 발명에서, 상기 컨테이너는 내부에 500rpm 내지 1500rpm으로 회전할 수 있는 혼합수단을 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 혼합수단이 회전하여 상기 조성물과 검출 대상 시료를 혼합할 수 있다.

[0062] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 목적하는 개체로부터 분리된 생물학적 시료로부터, 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 핵산을 검출하는 단계를 포함하는, 붉은불개미(*Solenopsis invicta*) 검출을 위한 정보 제공 방법을 제공할 수 있다.

[0063] 본 발명에서, 상기 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 핵산이 검출되는 경우, 상기 개체를 붉은불개미(*Solenopsis invicta*)로 확인하는 단계를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0064] 본 발명에서, 상기 검출하는 단계는, 서열번호 5의 염기서열을 포함하는 프라이머; 및 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 프라이머;를 포함하는 프라이머 세트에 의해 수행되는 것일 수 있다.

[0065] 본 발명에서, 상기 프라이머 세트는, 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 프라이머; 및 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 프라이머;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0066] 본 발명에서, 상기 프라이머 세트는, 서열번호 7의 염기서열을 포함하는 프라이머; 및 서열번호 8의 염기서열을 포함하는 프라이머;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0067] 본 발명에서, 상기 검출하는 단계는, 상기 시료 및 상기 프라이머 세트가 62℃ 내지 68℃에서 등온증폭반응(LAMP)하는 것일 수 있고, 바람직하게는 64℃ 내지 66℃에서 등온증폭반응(LAMP)하는 것일 수 있다.

[0068] 본 발명에서, 상기 검출하는 단계는, 상기 시료 및 상기 프라이머 세트가 3분 내지 40분 동안 등온증폭반응(LAMP)하는 것일 수 있고, 바람직하게는 11분 내지 22분 동안 등온증폭반응(LAMP)하는 것일 수 있다.

[0069] 본 발명에서, 상기 검출하는 단계는, 상기 시료 및 상기 프라이머 세트가 혼합되는 것을 포함할 수 있고, 바람직하게는 500rpm 내지 1500rpm으로 1초 내지 5초 동안 혼합되는 것일 수 있다.

[0070]

[0071] **[실시예]**

[0072]

[0073] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

[0074]

[0075] **실시예 1: 붉은불개미(Si) 및 7개의 다른 종의 개미 수집**

[0076]

[0077] 검출 대상인 붉은불개미(*Solenopsis invicta*; Si) 및 다른 종의 개미들은 다음과 같은 과정을 통하여 수집되었다. Solenopsis geminata(Sg)는 베트남과 라오스에서 채취한 후 -50℃에서 냉동 수입하여 보관하였다. S. japonica(Sj) 및 Pheidole fevida(Pf)는 강원도 원주시 치악산에서 채집하여 즉시 동결하였다. Tetramorium tsushimae(Tt), Lasius niger(Ln), Formica japonica(Fj), Crematogaster matsumurai(Cm)는 경기도 안양시 동안구 중앙공원에서 채집하였다. 모든 개미는 처리 전에 -50℃에서 보관되었다.

[0078] DNeasy Blood & Tissue kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 이용하여 살아있거나 냉동 보관된 개미시료에서 genomic DNA를 추출하였다. 추출된 게놈 DNA의 농도는 에폭시 마이크로플레이트 판독기(BioTek, Winooski, VT)로 측정한 다음 농도를 10ng/㎕로 조정하였다. 복제 실시 횟수는 각각 3회씩이었다.

[0079]

[0080] **실시예 2: 프라이머 설계**

[0081]

[0082] 본 발명의 출원 시점에서, 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.

[0083]

[0084] 먼저, Sinv11108 유전자의 경우, 하기 표 1과 같이 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 것을 확인하였다.

[0085]

표 1

[0086]

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

[0087] 또한, Sinv11977 유전자의 경우, 하기 표 2와 같이 붉은불개미를 제외한 9종의 개미에서 상동성이 높은 유전자(E value < 10^{-5}) 영역이 존재하지 않는 것을 확인하였다.

[0088]

표 2

[0089]

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

[0090] 상기 결과를 토대로, 본 발명의 Sinv11108 및 Sinv11977 유전자는 붉은불개미에서만 특이적으로 발현되는 유전자로서, 상기 유전자의 발현 여부를 확인하여 붉은불개미를 진단할 수 있다는 것을 알 수 있다.

[0091]

[0092] 상기 Sinv11108 및 Sinv11977 유전자 중 붉은불개미 특이적 LAMP 분석에 적합한, 하기 표 3의 서열을 가지는 Sinv11977 유전자를 선정하였다.

[0093]

표 3

[0094]

종류	서열	서열번호
DNA	ATGGGCAAGGAGAGAAGGAAGCGCGGAAAACGGGCTGGCCGTAAGGTCTTTTTAAAAGGATTAAAAAAGGAACTACATGCGGCCGGCGAATTCGATCCATCGACCGTATTCCCTAAAACCCCACGCCACTCACCACCGGTCGAACGCGCAACCACCGTTCATCCGGATCGACGACTGAGACGGGATCCTTCCCCCAAACAAAGGAAACCCGCCAATCCTAAAGACACTTTCGTCCCTGCGCGGATCCTGACGAGGCCCATTCCGATGCAAGTGTATGTGCGAAAACCATTGTCGGCAACTTCTCCGAAACCAAAAATTCGATACAATATTTCTGTAAAGCTTAAATTATCAATAACCCCCTCAGGGATAATACGTATCAAGCACTAG	1
단백질	MGKERRKRGKRAGRKVFLKGLKKELHAAGEFDPSTVFPKTPRHSPPVERATTVHPDRRLRRDPSPKQRKPANPKDTFVPARILTRPIPMQVYVRKPLSATSPKPKIRYNISVKLKLSITPSGIIRIKH	2

[0095] 상기 Sinv11977 유전자를 검출하기 위하여, 하기 표 4와 같은 프라이머를 설계하였다.

[0096]

표 4

[0097]

프라이머	서열	서열번호
*Si*11977-F3	CTA AAA CCC CAC GCC ACT CAC C	3
*Si*11977-B3	TTC GGA GAA GTT GCC GAC AAT GG	4
*Si*11977-FIP	CGG GTT TCC TTT GTT TGG GGG ACG CAA CCA CCG TTC ATC	5
*Si*11977-BIP	AAG ACA CTT TCG TCC CTG CGC TCG CAC ATA CAC TTG CAT CG	6
*Si*11977-LF	GAT CCC GTC TCA GTC GTC GAT	7
*Si*11977-LB	ATC CTG ACG AGG CCC ATT C	8

[0098] 상기 표 4의 프라이머 중 4pSi-LAMP를 위해서 Si11977-FIP 및 Si11977-BIP가 포함된 프라이머 세트를 설계하였고, 6pSi-LAMP를 위해서 Si11977-FIP, Si11977-BIP, Si11977-LF 및 Si11977-LB가 포함된 프라이머 세트를 설계하였다.

[0099]

[0100] **실시예 3: 4pSi-LAMP 분석**

[0101]

[0102] 3-1. 사용 시약 및 반응 조건

[0103] 4pSi-LAMP 반응을 위하여, 표 4와 같이 Si11977-FIP 및 Si11977-BIP를 포함하는 프라이머 세트를 사용하였다. 시약 혼합물은 1X I buffer 5(Optigene, Horsham, England), 0.2 unit/㎕ GspSSD2.0 DNA 중합효소(Optigene),

1.6M 베타인(Merck, Kenilworth, NJ, USA), 각 0.4mM dNTP(Enzynomics, 대전, 한국), 10mM $MgSO_4$(Optigene), 0.2M 트레할로스(대정화학, 시흥, 한국)을 사용하였고, 프라이머는 0.2 μM *Si*11977-F3 and *Si*11977-B3 oligomers, 0.8 μM *Si*11977-FIP and *Si*11977-BIP oligomers 0.8 μM *Si*11977-FIP 및 *Si*11977-BIP oligomers를 사용하였으며, 개미 게놈 DNA 시료는 0.5 ng/㎕ 농도로 사용하였다. 반응 혼합물은 1.5% 아가로스 겔로 분리하였다.

[0104] 이때, ds-DNA 삽입 형광단[예: SYBR green I(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)]을 LAMP 혼합물과 혼합하면 반응을 완료하기 위해 배양 시간이 연장되는 문제점이 나타났다. 상기 문제점을 피하기 위해 0.45㎕의 SYBR green I이 포함된 형광단 염료 전달 장치(Primer4Dia, 안양, 한국)를 LAMP 튜브 안에 넣었고, 인큐베이션이 완료된 후, 상기 SYBR 그린 I을 PCR 튜브 마이크로 원심분리기(CF-5, 대한사이언스, 서울, 한국)를 사용하여 1,000rpm에서 2초 동안 빠르게 회전시켜 PCR 튜브의 LAMP 혼합물과 혼합하였다.

[0105]

[0106] 3-2. 반응 튜브 관리

[0107] 또한, 성공적인 LAMP 반응은 많은 양의 DNA 단편을 생성했기 때문에 이러한 증폭된 DNA 단편은 에어로졸로 퍼질 수 있고 반응 튜브가 열려 있는 실험실을 오염시킬 수 있다. 오염으로 인한 오염 물질 유입은 위양성 반응을 일으킬 수 있으므로, 반응 튜브의 밀폐가 필요하였다.

[0108]

[0109] 3-3. 양성 반응 확인

[0110] 양성 반응 신호는 대낮에 육안으로 감지하고 카메라로 촬영하였다. 더 강한 양성 형광 신호는 LAMP 형광 관찰 상자(Primer4Dia)로 감지하고 카메라로 촬영하였다.

[0111]

[0112] 3-4. 4pSi-LAMP 반응 특이성 확인

[0113] 도 1A에서 나타난 것처럼, Si11977-F3 및 Si11977-B3 프라이머 쌍은 Si 게놈 DNA의DNA 단편을 특이적으로 증폭된 것을 확인할 수 있었다. Si에서는 강력한 196bp 밴드가 감지되었지만 다른 7개 개미에서는 감지되지 않았다.

[0114] 또한 도 1B에서 나타난 것처럼, 4pSi-LAMP 분석을 수행했을 때, 일광 또는 자외선 아래에서 강한 형광 신호는 Si 게놈 DNA가 포함된 튜브에서만 감지되는 것을 확인할 수 있었다.

[0115]

[0116] 3-5. 최적의 4pSi-LAMP 반응 조건 확인

[0117] 상기 LAMP 분석의 최적 온도를 확인하기 위하여, 60℃, 65℃ 및 70℃에서4pSi-LAMP 분석을 수행한 결과, 65℃가 최적의 온도임을 확인하였다.

[0118] 또한, 4pSi-LAMP 분석을 위한 최적의 인큐베이션 기간을 결정하기 위하여, Si 게놈 DNA가 있는 Con 및 8개의 4pSi-LAMP 튜브로 실험을 수행하였다. 상기 Con 튜브는 65℃에서 30분 동안 배양되었고, 8개의 튜브는 65℃에서 2.5분 간격으로 12.5분에서 30분 동안 배양되었다. 여기서 배양 간격을 2.5 분으로 두고 확인한 결과를 도 1C에 나타내었다. 단, 여기서 빨간색 화살표는 중앙에 짧고 얇은 튜브가 있는 흰색 둥근 구슬인 형광 염료 전달 장치를 나타낸다.

[0119] 도 1C 에 나타난 것처럼, 일광 또는 UV 조명 하에서의 형광 신호는 20분 후에 감지되는 것을 확인할 수 있었다.

[0120]

[0121] **실시예 4: 6pSi-LAMP 분석**

[0122]

[0123] 4-1. 6pSi-LAMP 반응 특이성 확인

[0124] 배양 기간 단축을 위하여, 표 4와 같이 4pSi-LAMP에 루프 포워드(LF) 및 루프 백워드(LB) 프라이머를 추가한 6개의 프라이머를 이용하여 6pSi-LAMP 분석을수행하였다. 구체적으로는 0.4μM 루프 포워드 프라이머(LF) 및 루프 백워드 프라이머(LB)를 4pSi-LAMP 혼합물에 첨가하고 65℃에서 배양하였고, 상기 6pSi-LAMP 분석의 특이성을

조사하기 위해 8개 개미의 0.5ng/ ㎕ 게놈 DNA를 사용한 Con 및 8개의 6pSi-LAMP 시약을 혼합한 것을 65℃에서 30분 동안 배양하여, 그 결과를 도 2A에 나타내었다.

[0125] 도 2A에 나타난 것처럼, Si와 7개의 다른 개미의 게놈 DNA로 6pSi-LAMP 분석을 수행했을 때, 강한 형광 신호는 Si 게놈 DNA에서만 검출되었고, 대조군에서는 신호가 관찰되지 않았다. 특히 LAMP 반응이 1.5% 아가로즈 겔로 분리되었을 때 사다리 모양의 DNA 밴드가 명확하게 감지되었는 바, 본 발명의 6pSi-LAMP 분석이 Si에 특이적임을 확인하였다.

[0126]

[0127] 4-2. 6pSi-LAMP 반응에 소요되는 배양 시간 비교

[0128] 6pSi-LAMP 분석을 위한 최적의 배양 기간을 결정하기 위해 5ng의 Si 게놈 DNA를 포함하는 LAMP 혼합물을 65℃에서 2.5분 간격으로 12.5~30분 동안 배양한 결과를 도 2B에서 나타내었다.

[0129] 도 2B에서 나타난 것처럼, 일광 또는 UV 조명 하에서 형광 신호는 12.5분 후에 감지되었다. 1.5% 아가로스 겔로 반응을 분리했을 때, 15분 이상 배양한 튜브에서 사다리 모양의 DNA 밴드가 감지되었다. 따라서 본 발명의 LF 및 LB 프라이머를 포함하는 6pSi-LAMP 분석을 실시하는 경우, 4pSi-LAMP 분석에 비해 배양 시간을 5분가량 단축할 수 있음을 알 수 있었다.

[0130]

[0131] 4-3. 6pSi-LAMP 반응 시약 농도 결정

[0132] 6pSi-LAMP 분석을 위한 GspSDD 2.0 DNA 중합효소의 최적량을 결정하기 위해, 다양한 양의 중합효소를 첨가하였다. 구체적으로는 6pSi-LAMP 반응에 포함된 GspSDD 2.0 DNA 중합효소의 양을0.25 unit/10㎕의 비율로 0.25unit/10㎕ 내지 2.0unit/10㎕까지 증가시켜, 그 결과를 도 2C에 나타내었다.

[0133] 도 2C에 나타난 것처럼, 6pSi-LAMP assay 결과를 보면 0.25 unit/10 ㎕를 포함하는 반응에서도 일광 또는 UV하에서 매우 약한 형광 신호가 관찰되었다. 동시에 1.5% 아가로스 겔 분석으로 6pSi-LAMP 반응을 분리했을 때 약하거나 강한 형광과 사다리 모양의 밴드는 각각 0.25unit/10㎕ 또는 1.0unit/10㎕에서 감지되기 시작하였고, 1.0unit/10㎕ 이상의 반응에서는 강한 형광과 밴드가 관찰되었다. 따라서 6pSi-LAMP 분석을 위한GspSDD 2.0 DNA 중합효소의 최적량은 1.0unit/10㎕인 것으로 확인되었다.

[0134]

[0135] 4-4. 6pSi-LAMP 반응 민감도 확인

[0136] 6pSi-LAMP 분석의 검출 한계를 결정하기 위해, 다양한 양의 Si 게놈 DNA를 6pSi-LAMP으로 분석하여, 그 결과를 도 2D에 나타내었다. 단, 빨간색 화살표는 튜브 내부의 형광 염료 전달 장치의 위치를 나타낸 것이다.

[0137] 도 2D에 나타난 것처럼, 강한 형광 신호와 사다리 모양의 DNA 밴드는 50fg/10㎕ 이상의 농도에서 검출되었다.

[0138] 또한, Si 게놈 DNA에 대한6pSi-LAMP 분석의 검출 한계를 결정하기 위해 다양한 Si 게놈 DNA 농도를 포함하는 6pSi-LAMP 분석하였다. 구체적으로는 각각의 Con x에 Si 게놈 DNA를 0.5fg/10㎕ 내지 5ng/10㎕까지 10배 농도 간격으로 첨가하고 30분 동안 배양하여, 그 결과를 도 2D에 나타내었다.

[0139] 도 2D에 나타난 것처럼, 강한 형광 신호와 사다리 모양의 DNA 밴드를 나타내는 Si 게놈 DNA의 양 50 fg/10 ㎕ 이상인 것으로 확인된 바, 본 발명의 6pSi-LAMP 분석이 Si 게놈 DNA에 대해 매우 높은 민감도를 갖는다는 것을 확인하였다.

[0140]

[0141] 4-5. 신속 게놈 DNA 추출 용액을 사용한 6pSi-LAMP 반응

[0142] 방역 현장에서 수득한 개미 표본으로부터6pSi-LAMP 반응이 가능한지 여부를 확인하였다. 시판되는 신속 게놈 DNA 추출 용액을 사용하여Si의 다리(Si-L) 및 복부(Si-A) 부분에서 게놈 DNA를 3분만에 추출하였다. 그 중 다리에서 추출한 Q 게놈 DNA 또는 Si 또는 QGDES를 사용한 Sg를 사용하여 6pSi-LAMP 분석을 수행하여, 그 결과를 도 3A에 나타내었다.

[0143] 도 3A에 나타난 것처럼, Si 시료가 포함된 튜브에서만 20분 배양 후 강한 형광 신호와 사다리 모양의 DNA 밴드 패턴이 관찰되었다. 특히 Si 또는 Sg의 다리(Si-L, Sg-L) 또는 복부(Si-A, Sg-A)의 게놈 DNA를 6pSi-LAMP

assay에 사용하였을 때, Si에서 유래된 시료에서만 강한 형광 신호와 사다리 모양의 DNA 밴드가 검출된 바, 본 발명에 따른 6pSi-LAMP 분석을 사용할 경우, 방역 현장에서 수득한 개미 표본이 Si인지 여부를 신속히 검출할 수 있음을 확인하였다.

[0144]

[0145] 4-6. 6pSi-LAMP 분석을 위한 배양 시간 결정 및 현장 진단 프로토콜 설정

[0146] 도 3B와 같이 3분 동안 추출한 Sg, Si 또는 Cm의 복부에서 수득한 게놈 DNA를, 6pSi-LAMP 분석 혼합물과 1:20 비율로 튜브에서 혼합한 후, 상기 튜브를 도 3C와 같은 휴대용 가열 용기에서 20분 동안 배양하였다. 다음으로 각 튜브에 SYBR green을 첨가한 후, 도 3D와 같이 휴대용 배터리로 구동되는 LAMP 관찰 상자에서 형광 신호를 감지하고 촬영한 결과를 도 3E에 나타내었다. 단, 빨간색 화살표는 형광단 전달 장치를 나타낸 것이다.

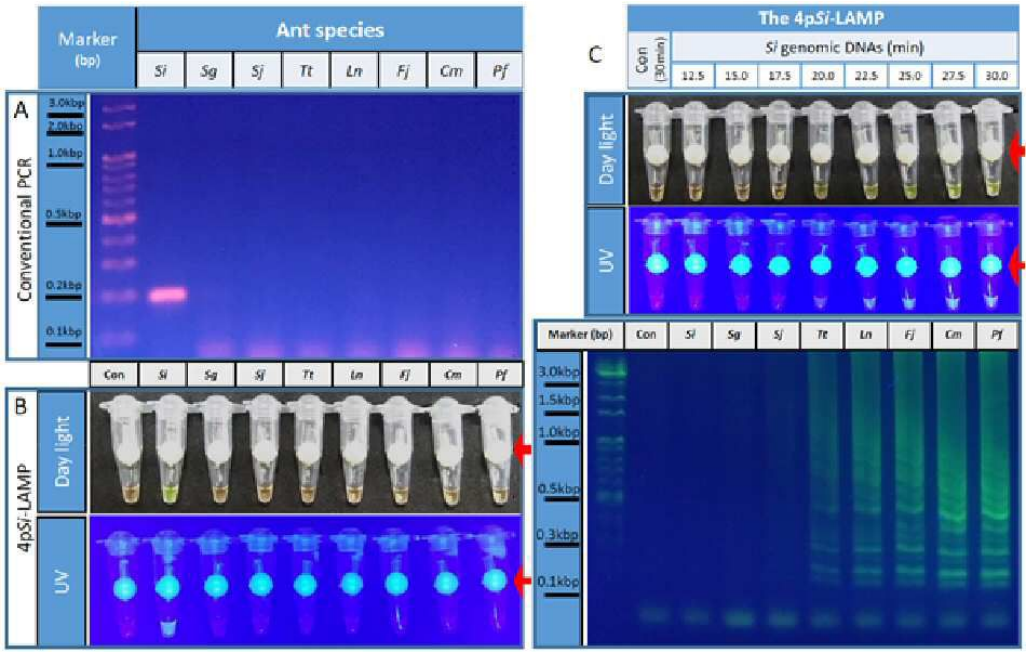
[0147] 도 3E에 나타난 것처럼, 수득된 시료의 게놈 DNA를 20분 동안 배양한 결과 Si에서 수득된 시료만이 양성으로 확인된 바, 본 발명의 6pSi-LAMP 분석을 통하여 Si를 현장에서 30분 이내에 진단할 수 있는 것을 확인하였다.

[0148]

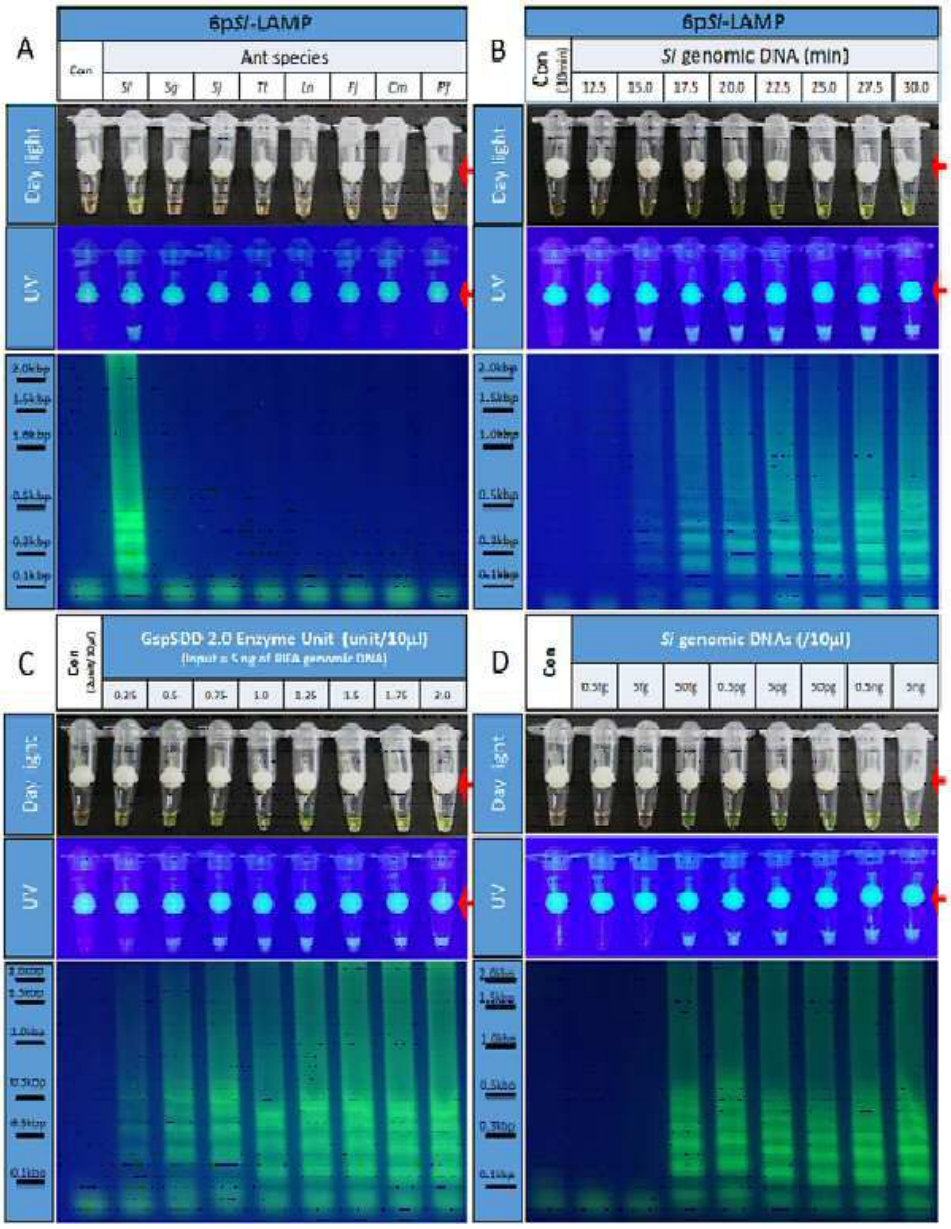
[0149] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

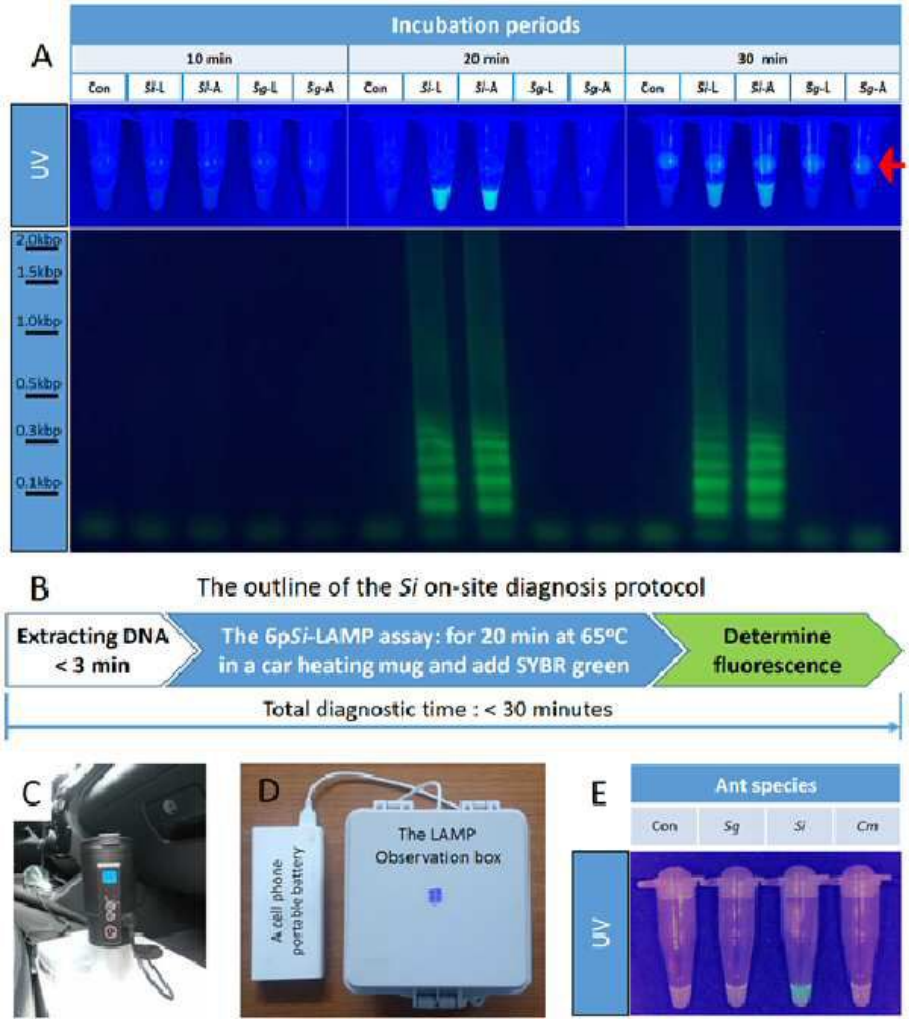
도면1



도면2


A
6pSI-LAMP
Con
Ant species
SI
Sg
Sj
Tt
Ln
Fj
Cm
Pf
Day light
UV
B
6pSI-LAMP
Con
SI genomic DNA (min)
12.5
15.0
17.5
20.0
22.5
25.0
27.5
30.0
Day light
UV
C
Con
GspSDD 2.0 Enzyme Unit (unit/10μl)
0.25
0.5
0.75
1.0
1.25
1.5
1.75
2.0
Day light
UV
D
Con
SI genomic DNAs (/10μl)
Day light
UV

도면3



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> P212550

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 387

<212> DNA

<213> Solenopsis invicta

<400> 1

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 aataacccccc 360

tcagggataa tacgtatcaa gcactag 387

<210> 2

<211> 128

<212> PRT

<213> Solenopsis invicta

<400> 2

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> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Si11977-F3

<400> 3

ttcggagaag ttgccgacaa tgg 23

<210> 4

<211

> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Si11977-B3

<400> 4

ttcggagaag ttgccgacaa tgg 23

<210> 5

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Si11977-FIP

<400> 5

cgggtttcct ttgtttgggg gacgcaacca ccgttcatc 39

<210> 6

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Si11977-BIP

<400> 6

aagacacttt cgtccctgcg ctcgcacata cacttgcatc g 41

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Si11977-LF

<400> 7

gatcccgtct cagtcgtcga t 21

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Si11977-LB

<400> 8

atcctgacga ggcccattc 19