



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월22일
(11) 등록번호 10-1737353
(24) 등록일자 2017년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C12Q 1/44 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6816 (2013.01)
C12Q 1/44 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0083484
(22) 출원일자 2015년06월12일
심사청구일자 2015년06월12일
(65) 공개번호 10-2016-0147175
(43) 공개일자 2016년12월22일
(56) 선행기술조사문헌
Harmful algae. 2008, 제7권, 제347-359면*
Harmful Algae. 2006, Volume 5, Pages
300-309.*
Harmful Algae. 2010, 9, 59-65
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국해양과학기술원
경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동)
(72) 발명자
이택견
경기도 안성시 중앙로 274-7 107동 301호 (석정동, 한빛마을우남퍼스트빌아파트)
서승석
경상남도 거제시 장목면 장목4길 8, 3동 301호 (뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영호, 박지호

전체 청구항 수 : 총 3 항

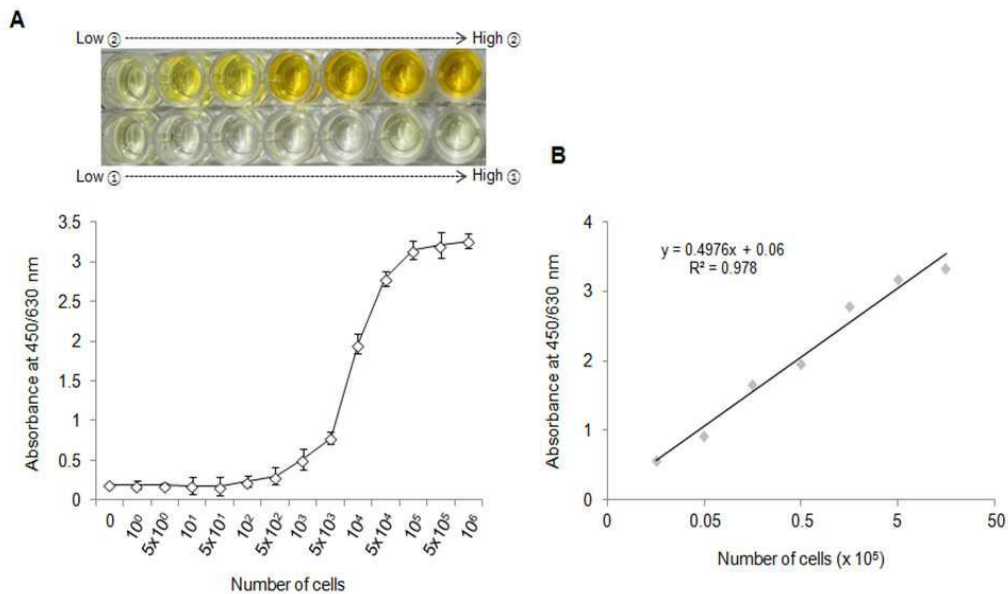
심사관 : 이예리

(54) 발명의 명칭 뉴클레아제 보호 분석 통합 샌드위치 혼성을 사용하는 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출방법 및 검출용 키트

(57) 요약

본 발명은 뉴클레아제 보호 분석 통합 샌드위치 혼성을 사용하는 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출방법 및 검출용 키트에 관한 것으로, 구체적으로 뉴클레아제 보호 분석 탐침(nuclease protection assay probe), 포획 탐침(capture probe) 및 신호 탐침(signal probe)을 사용하여 뉴클레아제 보호 분석 통합 샌드위치 혼성(sandwich (뒷면에 계속))

대표도 - 도4



hybridization integrated with nuclease protection assay, NPA-SH)을 수행함으로써 시료에 함유된 코클로디니움 폴리클리코이데스를 검출하는 방법과 이를 위한 키트에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 코클로디니움 폴리클리코이데스를 샘플로부터 매우 정확하게 다른 미세조류에 구분되도록 검출해 낼 수 있으며, 정량적인 검출도 가능하다. 따라서 코클로디니움 폴리클리코이데스의 대발생 가능성을 예측할 수 있으며, 이에 대비함으로써 안정한 해양생태계를 유지하는데 큰 도움이 될 수 있을 뿐만 아니라 어업, 양식업 등의 예측하지 못한 피해를 줄이는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6834 (2013.01)
 C12Q 2521/307 (2013.01)
 C12Q 2537/125 (2013.01)
 C12Q 2565/50 (2013.01)

이주연

경기도 안산시 단원구 고잔로 57-9 809호

정승원

경남 거제시 제산로 51 힐스테이트아파트 105동 1002호

(72) 발명자

황진익

경상남도 거제시 고현로4길 14-1

박미혜

경상북도 영천시 모란2길 9 (야사동)

장만

경기도 안산시 상록구 해안로 454(사동) 한국해양과학기술원

손민식

대전광역시 대덕구 대덕대로 1555, 105동 405호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PN66020
부처명	과학기술부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	해양 유해조류 자동관별시스템 개발 및 방제 적용기술 타당성 분석
연구과제명	해양 유해조류 자동관별시스템 개발 및 방제 적용기술 타당성 분석
기여율	1/1
주관기관	한국해양과학기술원
연구기간	2014.08.01 ~ 2015.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

서열번호 1의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 뉴클레아제 보호 분석 탐침(nuclease protection assay probe)으로 사용하고,

서열번호 2의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포획탐침(capture probe)으로 사용하며,

서열번호 3의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 신호탐침(signal probe)으로 사용하여 뉴클레아제 보호 분석 통합 샌드위치 혼성(sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay, NPA-SH)을 수행하는 것을 특징으로 하는 코클로디니움 폴리클리코이데스(*Cochlodinium polykrikoides*) 검출방법.

청구항 3

- a) 시료에 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 제1올리고뉴클레오티드 탐침을 첨가하는 단계;
- b) 시료를 90 내지 99℃로 가열하여 시료 내 뉴클레오티드의 변성(denaturation)을 유도하는 단계;
- c) 40 내지 50℃에서 제1올리고뉴클레오티드 탐침의 혼성(hybridization)을 유도하는 단계;
- d) 상기 c)단계를 거친 시료에 S1 뉴클레아제(S1 nuclease)를 첨가하여 S1 뉴클레아제 반응을 유도하는 단계;
- e) S1 뉴클레아제 반응을 중지하는 단계;
- f) 상기 e)단계를 거친 시료를 90 내지 99℃로 가열하여 시료 내 뉴클레오티드의 변성을 유도하는 단계;
- g) 상기 f)단계를 거친 시료를 서열번호 2의 염기서열을 포함하며 지지체에 고정된 제2올리고뉴클레오티드 탐침과 접촉시키는 단계;
- h) 45 내지 55℃에서 제1올리고뉴클레오티드 탐침과 제2올리고뉴클레오티드 탐침의 혼성(hybridization)을 유도하는 단계;
- i) 상기 지지체를 상기 시료로부터 분리하고 세척하여 제2올리고뉴클레오티드 탐침에 혼성되지 않은 미혼성물을 제거하는 단계;
- j) 상기 i)단계를 거친 지지체를 서열번호 3의 염기서열을 포함하며 표지물질로 표지된 제3올리고뉴클레오티드 탐침과 접촉시키는 단계;
- k) 45 내지 55℃에서 제1올리고뉴클레오티드 탐침과 제3올리고뉴클레오티드 탐침의 혼성(hybridization)을 유도하는 단계;
- l) 상기 k)단계를 거친 지지체를 세척하여 제1올리고뉴클레오티드 탐침과 혼성되지 않은 미혼성물을 제거하는 단계; 및
- m) 제1올리고뉴클레오티드 탐침 및 제2올리고뉴클레오티드 탐침을 매개체로 상기 지지체에 연결된 제3올리고뉴클레오티드 탐침에 표지된 표지물질을 검출하는 단계;를 포함하는 코클로디니움 폴리클리코이데스(*Cochlodinium polykrikoides*) 검출방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

서열번호 1의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 2의 염기서열을 포함하며 지지체에 고정된 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 3의 염기서열을 포함하며 표지물질로 표지된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 코클로디니움 폴리클리코이데스(*Cochlodinium polykrikoides*) 검출용 키트.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 뉴클레아제 보호 분석 통합 샌드위치 혼성을 사용하는 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출방법 및 검출용 키트에 관한 것으로, 구체적으로 뉴클레아제 보호 분석 탐침(nuclease protection assay probe), 포획 탐침(capture probe) 및 신호 탐침(signal probe)을 사용하여 뉴클레아제 보호 분석 통합 샌드위치 혼성(sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay, NPA-SH)을 수행함으로써 시료에 함유된 코클로디니움 폴리클리코이데스를 검출하는 방법과 이를 위한 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미세조류는 태양광, 온도, 미량원소, 영양염 및 인 등과 같은 환경요인이 충분할 때 빠르게 성장할 수 있다. 그러나 일부 해양미세조류의 빠른 증식은 해양생태계에 심각한 피해를 야기할 수 있다. 특히 이러한 유해조류의 대발생은 해수로 독성물질을 분비하여 많은 해양생물의 사멸을 일으키기도 한다. 지금까지 알려져 있는 해양미세조류의 5000종 중 300종이 대발생을 일으키고, 약 80종이 독신(toxin)을 생산하여 어류, 패류 및 인간에게 악영향을 준다.

[0003] 이들 유해조류 중 코클로디니움 폴리클리코이데스(*Cochlodinium polykrikoides*)는 전세계 연안에서 대발생을 일으키는 쌍편모조류이며, 아시아에서 양식업에 심각한 영향을 미쳐, 막대한 경제적 손실을 유발하고 있다. 2004년 이후 인도양, 동서 태평양, 서대서양 등지에서 대발생이 보고되고 있으며, 막대한 어패류의 사멸을 유발하고 있다. 이러한 이유로 유해조류 대발생을 유발하는 미세조류를 정확하게 검출할 수 있는 기술은 매우 중요하다. 대발생을 유발하는 미세조류의 전통적인 검출방법과 정량적인 분석방법은 형태학적 특징을 관찰하는 방법이지만, 이러한 방법은 시간이 많이 들고, 정확하고 많은 경험이 요구된다. 또한 미세조류의 여러 가지 모양과 크기는 환경요인에 따라 변화하며, 성장단계에 따라 변화되기도 한다. 이러한 이유로 지난 20여년간 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism), Real-time PCR, FISH(Fluorescent In Situ Hybridization), FlowCAM(Flow Cytometry And Microscopy) 및 NASBA(Nucleic Acid-based Sequence Amplification) 등 분자생물학적 방법을 통한 미세조류 검출기법이 개발되어 왔다.

[0004] 이러한 방법 중 올리고뉴클레오티드 탐침(probe)에 기초한 방법들이 미세조류 검출을 위해 가장 널리 사용되어 왔다. rRNA-표적화 샌드위치 혼성 분석법(rRNA-targeted sandwich hybridization assay, SHA)는 *Psuedonitzschia pungens*, *Heterosigma akashiwo*, *Fibrocapsa japonica* 및 *Alexandrium fundyense* 등을 포함하는 여러 미세조류의 정성적 검출에 사용되어 왔다. 그럼에도 불구하고 RNA 분자의 불안정성과 혼성화(hybridization)의 비정교함 때문에 원하는 만큼의 특이성과 재연성에 도달하기 어려웠다.

[0005] 최근에 뉴클레아제 보호 분석법(nuclease protection assay, NPA)과 통합된 샌드위치 혼성법(sandwich hybridization, SH)이 SHA에 기반하여 개발되었다. 이 기술은 캡처 프로브, NPA 프로브 및 신호 프로브 등 3개의 다른 프로브를 사용하며, 또한 단일사슬핵산을 분해하는 S1 뉴클레아제(S1 nuclease)를 사용한다. 이 뉴클레

아제 보호 분석 통합 샌드위치 혼성(sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay, NPA-SH) 기술은 *Prorocentrum micans*, *Skeletonema costatum* 및 *Phaeocystis globosa* 등을 포함하는 여러 미세 조류의 검출에 성공적으로 적용된 바 있다.

[0006] 본 발명자들은 이제까지 적용된 바 없는 코클로디니움 폴리클리코이데스에 NPA-SH 기법을 적용하고자 하였으며, 유해조류인 코클로디니움 폴리클리코이데스를 샘플로부터 정확하게 검출할 수 있고 유사한 다른 미세조류들로부터 명확하게 구분되도록 함으로써 검출오류를 최소화할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다.

[0007] 위에서 설명한 바와 같이 생물의 종판별 또는 특정 세포를 검출하기 위한 다양한 기술들이 개발되어 있으나, 생물체 또는 세포의 특성, 샘플의 상태, 유사 세포의 분포, 유전체의 특성 등 여러 가지 변수로 인하여 상황에 맞는 효율적인 방법을 찾는 것은 매우 까다로운 일이다. 본 발명자들은 다년간의 수많은 연구를 거쳐 쌓은 경험을 바탕으로 코클로디니움 폴리클리코이데스의 검출에 효율적인 뉴클레아제 보호 분석 통합 샌드위치 혼성 검출방법을 개발할 수 있었다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Cai, Q.S., Li, R.X., Zhen, Y., Mi, T.Z., Yu, Z.G., 2006. Detection of two *Prorocentrum* species using sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay. *Harmful Algae* 5 (3), 300-309.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서 본 발명의 주된 목적은 코클로디니움 폴리클리코이데스를 샘플로부터 정확하게 검출할 수 있는 방법을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기와 같은 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출을 용이하게 수행할 수 있도록 하는 키트를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 시료 내 뉴클레오티드와 혼성(hybridization)하고, 혼성물을 검출하는 것을 특징으로 하는 코클로디니움 폴리클리코이데스 (*Cochlodinium polykrikoides*) 검출방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 뉴클레아제 보호 분석 탐침(nuclease protection assay probe)으로 사용하고, 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 포획탐침(capture probe)으로 사용하며, 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 신호탐침(signal probe)으로 사용하여 뉴클레아제 보호 분석 통합 샌드위치 혼성(sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay, NPA-SH)을 수행하는 것을 특징으로 하는 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 a) 시료에 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 제1올리고뉴클레오티드 탐침을 첨가하는 단계; b) 시료를 90 내지 99℃로 가열하여 시료 내 뉴클레오티드의 변성(denaturation)을 유도하는 단계; c) 40 내지 50℃에서 제1올리고뉴클레오티드 탐침의 혼성(hybridization)을 유도하는 단계; d) 상기 c) 단계를 거친 시료에 S1 뉴클레아제(S1 nuclease)를 첨가하여 S1 뉴클레아제 반응을 유도하는 단계; e) S1 뉴클레아제 반응을 중지하는 단계; f) 상기 e) 단계를 거친 시료를 90 내지 99℃로 가열하여 시료 내 뉴클레오티드의 변성을 유도하는 단계; g) 상기 f) 단계를 거친 시료를 서열번호 2의 염기서열을 포함하며 지지체에 고정된 제2올리고뉴클레오티드 탐침과 접촉시키는 단계; h) 45 내지 55℃에서 제1올리고뉴클레오티드 탐침과 제2올리고

뉴클레오티드 탐침의 혼성(hybridization)을 유도하는 단계; i) 상기 지지체를 상기 시료로부터 분리하고 세척하여 제2올리고뉴클레오티드 탐침에 혼성되지 않은 미혼성물을 제거하는 단계; j) 상기 i) 단계를 거친 지지체를 서열번호 3의 염기서열을 포함하며 표지물질로 표지된 제3올리고뉴클레오티드 탐침과 접촉시키는 단계; k) 45 내지 55°C에서 제1올리고뉴클레오티드 탐침과 제3올리고뉴클레오티드 탐침의 혼성(hybridization)을 유도하는 단계; l) 상기 k) 단계를 거친 지지체를 세척하여 제1올리고뉴클레오티드 탐침과 혼성되지 않은 미혼성물을 제거하는 단계; 및 m) 제1올리고뉴클레오티드 탐침 및 제2올리고뉴클레오티드 탐침을 매개체로 상기 지지체에 연결된 제3올리고뉴클레오티드 탐침에 표지된 표지물질을 검출하는 단계; 를 포함하는 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출방법에 있어서, 상기 제2올리고뉴클레오티드 탐침은 뉴클레오티드를 다른 물질에 부착하여 고정하기 위해 사용하는 통상적인 방식으로 지지체에 고정할 수 있다. 예를 들어, 항원/항체 단백질 결합 방식 등을 사용할 수 있으나, 본 발명에서 사용되는 탐침들의 길이가 상대적으로 짧기 때문에 높은 검출효율을 기대하기 위해서는 비오틴(biotin)과 스트렙타비딘(streptavidin)의 결합을 통해 지지체에 고정되는 것이 바람직하다. 비오틴은 비타민의 일종으로 작은 분자량을 갖기 때문에 포획탐침에 대한 간섭을 최소화할 수 있다. 특히 비오틴-스트렙타비딘은 일반적인 항원/항체 반응에 비해 결합력이 우수하다는 장점이 있어 본 발명에서와 같이 뉴클레오티드 혼성 이후 세척을 통해 비특이적인 결합을 제거하는 경우에 매우 효과적이다. 본 발명에서는 지지체에 스트렙타비딘을 코팅하고 비오틴이 결합된 제2올리고뉴클레오티드 탐침을 처리함으로써 비오틴-스트렙타비딘 결합을 통해 제2올리고뉴클레오티드 탐침을 지지체에 고정시킬 수 있다. 본 발명에서는 용기 형태의 지지체를 사용할 수 있다. 용기 형태의 지지체에 제2올리고뉴클레오티드 탐침을 고정하면 제1올리고뉴클레오티드 탐침 혼성화 샘플을 용기에 투여하는 방법으로 제1올리고뉴클레오티드 탐침과 제2올리고뉴클레오티드 탐침의 접촉을 용이하게 수행할 수 있으며, 이후 세척, 제3올리고뉴클레오티드 탐침의 접촉 및 검출(detection)도 용이하게 수행할 수 있다.

[0015] 본 발명의 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출방법에 있어서, 상기 제3올리고뉴클레오티드 탐침의 표지물질로는 플루오레세인(fluorescein), BODIPY, 로다민(rhodamine), 사이아닌(cyanine) 등 통상적으로 뉴클레오티드의 표지에 사용되는 화합물을 사용할 수 있다. 하지만 본 발명에서 사용되는 탐침들의 길이가 상대적으로 짧기 때문에 높은 검출효율을 기대하기 위해서는 플루오레세인(fluorescein)과 같이 상대적으로 작은 분자량을 갖는 화합물을 사용하는 것이 바람직하다.

[0016] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드, 서열번호 2의 염기서열을 포함하며 지지체에 고정된 올리고뉴클레오티드 및 서열번호 3의 염기서열을 포함하며 표지물질로 표지된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출용 키트를 제공한다.

[0017] 본 발명의 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출용 키트에는 상기 올리고뉴클레오티드 이외에 뉴클레아제 보호 분석 통합 샌드위치 혼성(sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay, NPA-SH)을 수행하기 위해 필요한 시약, 기구 등이 더 포함될 수 있다. 예를 들어, lysis buffer, S1 nuclease, nuclease stop solution, 에펜도르프 튜브, 마이크로플레이트 등이 포함될 수 있다.

[0018] 본 발명의 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출용 키트에 있어서, 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드는 뉴클레오티드를 다른 물질에 부착하여 고정하기 위해 사용하는 통상적인 방식으로 지지체에 고정할 수 있다. 예를 들어, 항원/항체 단백질 결합 방식 등을 사용할 수 있으나, 본 발명에서 사용되는 탐침들의 길이가 상대적으로 짧기 때문에 높은 검출효율을 기대하기 위해서는 비오틴(biotin)과 스트렙타비딘(streptavidin)의 결합을 통해 지지체에 고정되는 것이 바람직하다. 비오틴은 비타민의 일종으로 작은 분자량을 갖기 때문에 포획탐침에 대한 간섭을 최소화할 수 있다. 특히 비오틴-스트렙타비딘은 일반적인 항원/항체 반응에 비해 결합력이 우수하다는 장점이 있어 본 발명에서와 같이 뉴클레오티드 혼성 이후 세척을 통해 비특이적인 결합을 제거하는 경우에 매우 효과적이다. 본 발명에서는 지지체에 스트렙타비딘을 코팅하고 비오틴이 결합된 올리고뉴클레오티드를 처리함으로써 비오틴-스트렙타비딘 결합을 통해 올리고뉴클레오티드를 지지체에 고정시킬 수 있다. 본 발명에서는 용기 형태의 지지체를 사용할 수 있다. 용기 형태의 지지체에 제2올리고뉴클레오티드 탐침을 고정하면 제1올리고뉴클레오티드 탐침 혼성화 샘플을 용기에 투여하는 방법으로 제1올리고뉴클레오티드 탐침과 제2올리고뉴클레오티드 탐침의 접촉을 용이하게 수행할 수 있으며, 이후 세척, 제3올리고뉴클레오티드 탐침의 접촉 및 검출(detection)도 용이하게 수행할 수 있다.

[0019] 본 발명의 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출용 키트에 있어서, 상기 표지물질로는 플루오레세인(fluorescein), BODIPY, 로다민(rhodamine), 사이아닌(cyanine) 등 통상적으로 뉴클레오티드의 표지에 사용되

는 화합물을 사용할 수 있다. 하지만 본 발명에서 사용되는 탐침들의 길이가 상대적으로 짧기 때문에 높은 검출 효율을 기대하기 위해서는 플루오레세인(fluorescein)과 같이 상대적으로 작은 분자량을 갖는 화합물을 사용하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따르면 코클로디니움 폴리클리코이데스를 샘플로부터 매우 정확하게 다른 미세조류에 구분되도록 검출해 낼 수 있으며, 정량적인 검출도 가능하다. 따라서 코클로디니움 폴리클리코이데스의 대발생 가능성을 예측할 수 있으며, 이에 대비함으로써 안정한 해양생태계를 유지하는데 큰 도움이 될 수 있을 뿐만 아니라 어업, 양식업 등의 예측하지 못한 피해를 줄이는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 코클로디니움 폴리클리코이데스의 rRNA 유전자 염기서열에서 본 발명의 뉴클레아제 보호 분석(nuclease protection assay, NPA) 탐침 서열에 대응하는 부위 및 다른 미세조류의 rRNA 유전자 염기서열을 비교하여 나타낸 것이다.

도 2는 코클로디니움 폴리클리코이데스의 rRNA와 본 발명의 NPA 탐침의 결합 및 NPA 탐침과 포획탐침 및 신호탐침의 결합을 도식화한 것이다.

도 3은 여러 종류의 미세조류를 대상으로 본 발명의 검출방법을 실시하여 특이성을 검사한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 다양한 세포농도 상에서 본 발명의 검출방법을 실시하여 민감도를 검사한 결과(A) 및 이 결과를 바탕으로 결정한 회귀곡선(B)을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0023] < 실시예 >

[0024] 1. 미세조류 배양

[0025] 코클로디니움 폴리클리코이데스(*Cochlodinium polykrikoides*)는 한국해양과학기술원 해양시료도서관으로부터, *Heterocapsa triquetra* 및 *Chattonella marina*는 한국해양과학기술원 남해연구소로부터, *Heterosigma akashiwo*, *Prorocentrum minimum* 및 *Scrippsiella trochoidea*는 한국해양과학기술원 안산으로부터 분양받았다.

[0026] 상기 각 미세조류를 멸균된 30psu의 f/2 배지에 접종하여 20℃에서 12시간 명반응 및 12시간 암반응 조건으로 배양하였다.

[0027] 2. 준비된 각 미세조류의 rRNA 유전자 염기서열 결정

[0028] Trizol을 이용하여 각 미세조류의 RNA를 추출한 다음 reverse transcription system kit(Promega, USA)를 이용하여 각각에 대한 cDNA를 합성하였다. 준비된 cDNA를 주형으로 하고 large subunit RNA 및 small subunit RNA에 대한 PCR primer(표 1)로 PCR을 수행한 후, 증폭된 PCR 산물을 pGEM-T-easy vector(Promega, USA)에 클로닝하였다.

[0029] 클로닝된 유전자를 *Escherichia coli* DH-5a에 형질전환한 다음 바이오니아 사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 염기서열 분석을 수행하였다.

[0030] 염기서열 분석 결과를 바탕으로 NCBI blast search를 통해 각 종에 맞는 서열인지 확인하였다.

표 1

rRNA 유전자 증폭을 위한 PCR 프라이머

Target gene	PCR 프라이머	
Large subunit RNA	정방향	5'-CGGAGGAAAAGAACTAAC-3'
	역방향	5'-AGCTACTAGATGGTTCGAT-3'
Small subunit RNA	정방향	5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'
	역방향	5'-TCACCTACGGAAACCTTGT-3'

[0031]

[0032]

3. 탐침 디자인

[0033]

11종의 미세조류(*C. polykrikoides*, *C. fulvescens*, *P. minimum*, *H. akashiwo*, *S. trochoidea*, *C. marina*, *H. triquetra*, *C. curvisetus*, *S. marinoi*, *T. nordenskioldii*, *L. danicus*)의 large subunit rRNA 유전자를 Mega 5.05 프로그램을 통해 정렬하여 *C. polykrikoides*와 비교해 가장 유전자 서열 변화가 큰 구간을 선별하였고, 60개 뉴클레오티드의 뉴클레아제 보호 분석(nuclease protection assay, NPA) 탐침을 디자인하였다(서열번호 1 : GGGCTACCATGCTTTGCAGGTATCCTCGGCCACCAATCACCAATGACCCACGGCAAG)(도 1 참조).

[0034]

NPA 탐침의 3'말단 서열로부터 비오틴(biotin)이 결합된 25개 뉴클레오티드의 포획탐침(capture probe)(biotin-CTTGCCGTGGGGTCATTGGTGATT)을 디자인하고, 5'말단 서열로부터는 플루오레세인(fluorescein)이 결합된 25개 뉴클레오티드의 신호탐침(signal probe)(GATACCTGCAAAGGCATGGTAGCCC-fluorescein)을 디자인하였다(도 2 참조).

[0035]

4. 뉴클레아제 보호 분석 통합 샌드위치 혼성(sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay, NPA-SH)

[0036]

NPA-SH는 2006년 Cai et al.의 논문을 참조하여 진행하였고 실험 과정은 다음과 같다.

[0037]

4-1. 포획탐침 고정

[0038]

PBS에 녹인 50nM의 포획탐침을 스트렙타비딘(streptavidin)이 코팅된 마이크로플레이트(microplate)에 넣고 37℃에서 2시간 반응한 후, PBST(0.5% tween-20)로 세척하여 사용할 때까지 4℃에서 보관하였다.

[0039]

4-2. Cell lysis

[0040]

0.5mg의 yeast tRNA가 포함된 lysis buffer(80% formamide, 450mM NaCl, 5mM Na₂EDTA, 1% SDS, pH 6.4)에 미세조류를 넣고 10초간 sonication(50% duty cycle 및 450W output)(Ultrasonic Cell Disrupter, model JY-92 II, Ningbokesheng Inc. Zhejiang, China)한 다음 4℃에서 1분 동안 13,000rpm으로 원심분리하여 cell debris를 제거하였다.

[0041]

4-3. NPA 탐침의 hybridization 및 S1 nuclease 반응

[0042]

NPA 탐침과 용해한 미세조류를 잘 섞어 97℃에서 15분간 denaturation한 다음, 42℃에서 2시간 동안 hybridization을 유도하였다. 이후 S1 nuclease를 첨가하여 42℃에서 1시간 반응시키고, nuclease stop solution(62.5mM NaOH, 30mM Na₂EDTA, 0.5M PBS, pH 7.2)으로 반응 종료시켰다.

[0043]

4-4. 포획탐침의 hybridization

[0044]

S1 nuclease 반응이 종료된 용액을 97℃에서 15분간 denaturation한 다음, 상온에서 식히고 포획탐침이 결합된 마이크로플레이트에 주입한 후 130rpm의 shaking incubator에서 50℃, 한 시간 동안 혼성화(hybridization)하였다.

[0045]

4-5. 신호탐침의 hybridization 및 detection

[0046]

그 후 50nM의 신호탐침을 첨가하여 130rpm의 shaking incubator에서 50℃, 30분간 반응시킨 다음 anti-fluorescein-POD(1:6,000), 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution을 37℃에서 차례로 반응시켜 마지막에 2M H₂SO₄로 반응종료 시키고, FLUOstar를 이용하여 450nm와 630nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0047] 5. 특이성 검사

[0048] 각 미세조류 배양액 1ml를 루골용액으로 1분간 고정한 후 100 μ l씩 개체수를 현미경으로 3번 반복 측정하여 평균값으로 *C. polykrikoides* 10⁴ cells, 그밖에 *H. akashiwo*, *H. triquetra*, *C. marina*, *P. minimum*, *S. trochoide*를 각각 10⁵ cells 씩 e-tube에 모았다.

[0049] 이후 0.5mg의 yeast tRNA가 포함된 lysis buffer(80% formamide, 450mM NaCl, 5mM Na₂EDTA, 1% SDS, pH 6.4)를 넣고 10초간 sonication(50% duty cycle 및 450W output)한 후 상기 항목 4와 동일한 방법으로 NPA-SH를 실시하였다.

[0050] 이의 결과 도 3에서와 같이, 본 발명의 검출방법은 *H. akashiwo*, *H. triquetra*, *C. marina*, *P. minimum*, *S. trochoide*와 같은 다른 미세조류와 구분하여 *C. polykrikoides*만을 특이적으로 검출할 수 있는 것으로 나타났다.

[0051] 6. 민감도 검사

[0052] *C. polykrikoides* 배양액 1ml를 루골용액으로 1분간 고정한 후 개체수를 현미경으로 3번 반복 측정하였고, 그 평균값을 기준으로 f/2 배지에 연속희석(serial dilution)하거나 부피를 증가시키는 방법으로 각각 10⁰ ~ 10⁶ cells를 e-tube에 모았다.

[0053] 이후 0.5mg의 yeast tRNA가 포함된 lysis buffer(80% formamide, 450mM NaCl, 5mM Na₂EDTA, 1% SDS, pH 6.4)를 넣고 10초간 sonication(50% duty cycle 및 450W output)한 후 상기 항목 4와 동일한 방법으로 NPA-SH를 각각 3회 반복 실시하였다.

[0054] 이의 결과, 도 4에서와 같이 샘플 내 세포수에 의존적으로 검출강도가 변화하는 것으로 나타났으며, 이 결과를 바탕으로 도 4의 B와 같은 회귀곡선을 도출하였다.

[0055] 따라서 본 실시예에서와 같은 방법을 사용하여 NPA-SH를 수행하고 이의 결과로 나타난 흡광도 수치를 바탕으로 샘플 내 *C. polykrikoides*의 세포수를 정확하게 판단할 수 있다는 것을 확인하였다.

도면

도면1

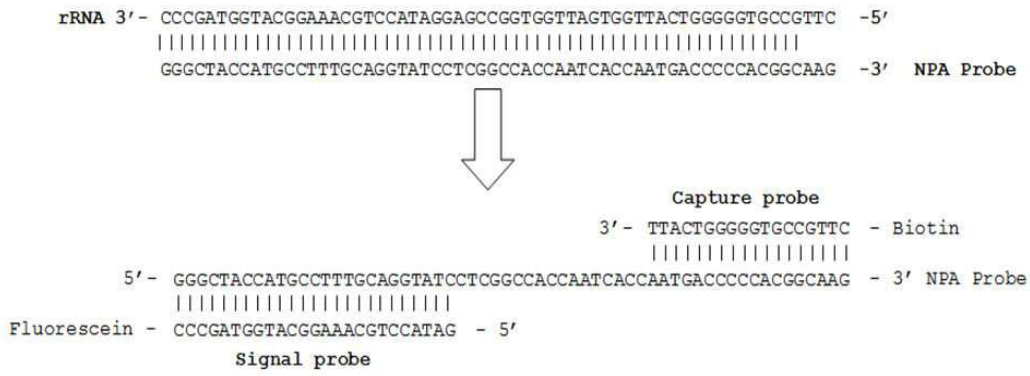
```
TCAGATTGTATATCGGGGCTCTGGCTTCGAATTGTAGTCTCGAAATGCAACGCCAACGGAGGCGCAGATTTAAGCCCTTGAAAAGAGAGCGCCGACGAG
GGTGAGAGTCCCGTTTGTCAATCTGCAGCCCTCCGTACACGGCTTGCACTTGCAGAGTCAAGTTCCTCGGGATTGGAGCGCAAAGTGGTGGTAAATTTCA
TCTAAGCTAAATACGTGTTGAGACCGATAGCACA CAAGTACCATGAGGGAAAAGATGAAAAGGACTTTGAAAAGAGAGTAAAAGTGCCTGAAATTGCT
GCAAGGGAAAGCGGATGGAACCAAGTCCA CACGGTGAGATTGTTGGTGGAGGCGAAGGGAGTTGCACTTCAACGCAAGTGTGAGTGTGAGTTCGTGCG
TCTCTCGCCCGTGGTCTTGGCGTGGGGTATTGGTGGCGGAGGATACCTGCAAAGGCATGGTAGCCGCTCTCGGGTGGGTGAACGCGT
TGTTAGTACTCGGCCGCTGATCATGTGA GTGGTGTCCGGTAACCGGCGAAGCACTTCGGTGGCCAGCCGCTTGGGTTGATCGTGGGTCCTGACACAGT
CTACGACCAAAATGGTTCCTCCGACCCGTCCTTGAACACGGACCAAGGAGTCTAGCATATGTGCGAGTGCTTGGCTGCAAACCCATGCGCGCAACGAAA
GTGACTGCTGAG -712bp
```

Primer site

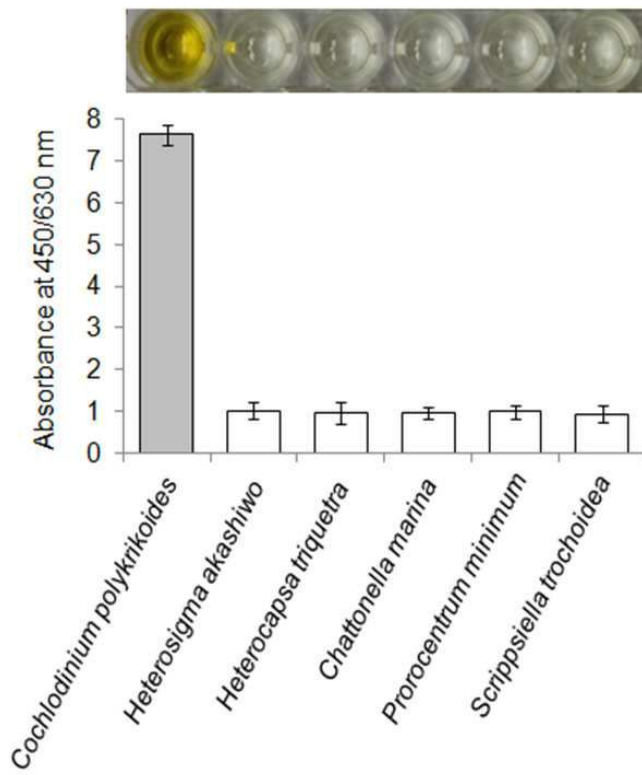
Species/Abbrv	Group Name
1. Cochlodinium polykrikoides	
2. Cochlodinium fulvescens	
3. Prorocentrum minimum	
4. Heterosigma akashiwo	
5. Scrippsiella trochoidea	
6. Chattonella marina	
7. Heterocapsa triquetra	
8. Chaetoceros curvisetus	
9. Skeletonema marinoi	
10. Thalassiosira nordenskioldii	
11. Leptocylindrus danicus	

Mega 5.05

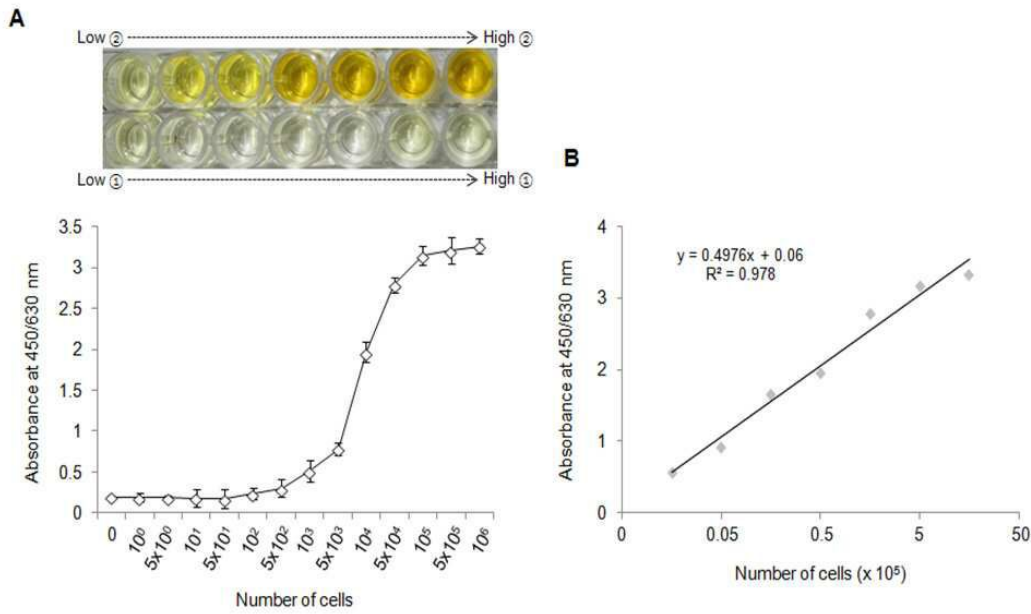
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Korea Institute of Ocean Science & Technology
 - <120> Method for detection of Cochlodinium polykrikoides by sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay and kit therefor
 - <130> PA-D15098
 - <160> 3
 - <170> KoPatentIn 3.0
 - <210> 1
 - <211> 60
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> Nuclease protection assay probe for Cochlodinium polykrikoides
 - <400> 1
- gggctaccat gcctttgcag gtatctctgg ccaccaatca ccaatgaccc ccacggcaag 60
- 60
- <210> 2
 - <211> 25
 - <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Capture probe for Cochlodinium polykrikoides

<400> 2

cttgccgtgg gggtcattgg tgatt

25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Signal probe for Cochlodinium polykrikoides

<400> 3

gatacctgca aaggcatggt agccc

25