



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년02월17일
 (11) 등록번호 10-1706771
 (24) 등록일자 2017년02월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2013.01)
C12Q 1/6813 (2013.01)
 (21) 출원번호 10-2015-0083483
 (22) 출원일자 2015년06월12일
 심사청구일자 2015년06월12일
 (65) 공개번호 10-2016-0147174
 (43) 공개일자 2016년12월22일
 (56) 선행기술조사문헌
 Harmful Algae 2008, Vol.7, pp.347-359.*
 GenBank: JQ616826.1*
 Harmful Algae 2005, Vol.4, pp.319-328.
 JP2011182650 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국해양과학기술원
 경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동)
 (72) 발명자
이주연
 경기도 안산시 단원구 고잔로 57-9 809호
윤보배
 경기도 성남시 중원구 희망로400번길 33-5 (금광동)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
김영호, 박지호

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 이재영

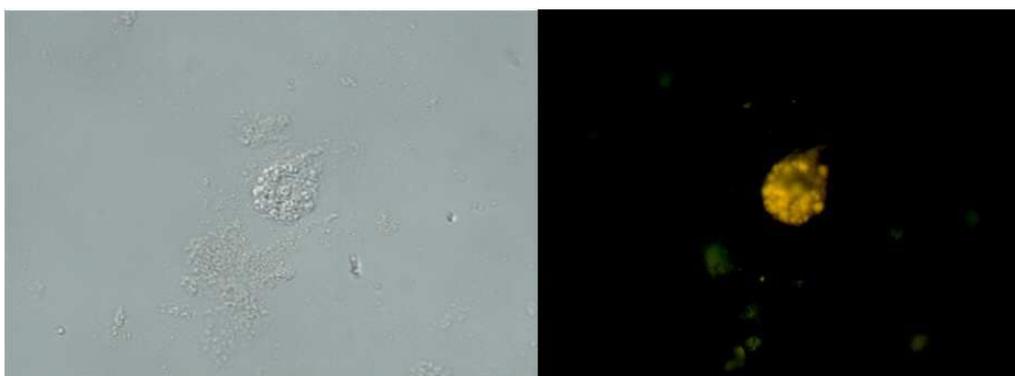
(54) 발명의 명칭 **인시츄 혼성화를 사용하는 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출방법 및 검출용 키트**

(57) 요약

본 발명은 인시츄 혼성화를 사용하는 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출방법 및 검출용 키트에 관한 것으로, 구체적으로 코클로디니움 폴리클리코이데스에 특이적인 탐침을 사용하여 인시츄 혼성화를 수행하는 것을 특징으로 하는 코클로디니움 폴리클리코이데스(*Cochlodinium polykrikoides*) 검출방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 코클로디니움 폴리클리코이데스를 샘플로부터 매우 신속, 정확하게 정량적으로 검출해 낼 수 있고, 또한 현장적용이 가능하며 경제적이다. 따라서 코클로디니움 폴리클리코이데스의 대발생 가능성을 예측할 수 있으며, 이에 대비함으로써 안전한 해양생태계를 유지하는데 큰 도움이 될 수 있을 뿐만 아니라 어업, 양식업 등의 예측하지 못한 피해를 줄이는데 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

장만

경기도 안산시 상록구 해안로 454(사동) 한국해양
과학기술원

이택견

경기도 안성시 중앙로 274-7 107동 301호 (석정
동, 한빛마을우남퍼스트빌아파트)

서승석

경상남도 거제시 장목면 장목4길 8, 3동 301호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PN66020

부처명 과학기술부

연구관리전문기관 재단법인 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 2014.01.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

미세조류 세포를 고정하는 고정단계;

고정된 세포에 서열번호 1의 염기서열로 이루어지며 표지물질로 표지된 탐침을 적용하여 혼성화(hybridization)를 유도하는 혼성화단계;

혼성화하지 않은 탐침을 제거하기 위한 세척단계; 및

탐침에 표지된 표지물질을 검출하는 검출단계;를 포함하고,

상기 표지물질은 Cy3 또는 Cy5인 것을 특징으로 하는 코클로디니움 폴리클리코이데스(*Cochlodinium polykrikoides*) 검출방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 인시츄 혼성화를 사용하는 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출방법 및 검출용 키트에 관한 것으로, 구체적으로 코클로디니움 폴리클리코이데스에 특이적인 탐침을 사용하여 인시츄 혼성화를 수행하는 것을 특징으로 하는 코클로디니움 폴리클리코이데스(*Cochlodinium polykrikoides*) 검출방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 유해조류에 의한 대발생과 관련된 미세조류의 발생을 미리 예측하고 그에 따라 사전 대비를 하는 것은 매우 시급하고 현실적인 문제로 판단되나 국내에서 이루어지고 진단 시스템은 자동화 및 실시간 진단이 어려운 형태학적인 진단을 통해서만이 수행되어지고 있어 적절한 사전 대비책이라 할 수 없다.

[0003] 최근 종관별 기술 개발을 위해 접목되고 있는 기술들은 주로 분자생물학적인 진단법을 기반으로 ribosomal DNA와 같은 분자 마커를 이용한 진단법과 종 특이적인 단백질 및 chemical을 이용한 진단법 등으로 나눌 수 있다.

[0004] 가장 일반적인 분자생물학적인 진단방법인 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 분자생물학을 이용한 가장 강력한 기술 중 하나이다. 그러나 일반적인 PCR 방법인 end point PCR에서는 PCR 반응이 완전히 완료된 이후 증폭된 DNA양을 전기영동 결과를 통해서만 확인할 수 있으며, 그 이후에 데이터 분석이 가능해 현장 적용에 어려울 뿐 아니라 정량 분석에 어려움이 있다.

- [0005] 정량적인 정확성 및 검출의 정확성을 획기적으로 증가시키기 위해 quantitative real-time PCR 방법이 개발되었으며 의학, 약학, 생명과학과 해양학 분야에서 광범위하게 사용되고 있다. 그러나 이 방법의 경우 경제적인 효율성이 낮은 것이 문제이다.
- [0006] 한편, 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. 하지만 아직까지 이 조류에 대해 상업적 활용이 가능한 탐침(probe)의 개발이 이루어지지 않은 상태이다. 따라서 현장 적용이 가능한 경제적인 종특이적 탐침 개발이 필요하다.
- [0007] 이에 상기와 같은 종래기술의 문제점들을 개선하면서 유해조류인 코클로디니움 폴리클리코이데스를 샘플로부터 효과적으로 검출할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다.
- [0008] 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 인시츄 혼성화(In situ Hybridization) 방법을 개발할 수 있었다.

선행기술문헌

- [0009] 대한민국 등록특허 제10-1403351호
- [0010] 대한민국 등록특허 제10-1403353호
- [0011] 대한민국 등록특허 제10-1403359호
- [0012] 대한민국 등록특허 제10-1403362호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 따라서 본 발명의 주된 목적은 국내 연안에서 빈번하게 적조를 일으켜 막대한 경제적 손실을 초래하는 유해조류인 코클로디니움 폴리클리코이데스를 신속, 정확하게 검출할 수 있는 방법을 제공하는데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 상기와 같은 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출을 용이하게 수행할 수 있도록 하는 키트를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 올리고뉴클레오티드를 탐침(probe)으로 사용하여, 인시츄 혼성화(In situ Hybridization)를 수행하는 것을 특징으로 하는 코클로디니움 폴리클리코이데스(*Cochlodinium polykrikoides*) 검출방법을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 미세조류 세포를 고정하는 고정단계; 고정된 세포에 서열번호 1의 염기서열로 이루어지며 표지물질로 표지된 탐침을 적용하여 혼성화(hybridization)를 유도하는 혼성화단계; 혼성화하지 않은 탐침을 제거하기 위한 세척단계; 및 탐침에 표지된 표지물질을 검출하는 검출단계;를 포함하는 코클로디니움 폴리클리코이데스(*Cochlodinium polykrikoides*) 검출방법을 제공한다. 이때 세포의 고정은 슬라이드 글라스 등의 지지체에 통상의 세포 고정방법을 이용하여 수행할 수 있다. 고정된 세포에 상기 탐침을 적용하여 혼성화를 유도하면 세포의 핵산에서 탐침의 서열과 대응되는 부위에 탐침이 혼성화될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 포함하며 표지물질로 표지된 올리고뉴클레오티드를 포함하는 코클로디니움 폴리클리코이데스(*Cochlodinium polykrikoides*) 검출용 키트를 제공한다.

[0018] 본 발명의 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출용 키트에는 상기 올리고뉴클레오티드 이외에 인시츄 혼성화를 수행하기 위해 필요한 시약, 기구 등이 더 포함될 수 있다. 예를 들어, 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, PFA), PBS, 마이크로튜브(microtube), 에탄올, 리액션셀슬라이드글라스(reaction cells slide glass), 혼성화 버퍼(hybridization buffer), 세척 버퍼(washing buffer) 등이 포함될 수 있다.

[0019] 본 발명의 코클로디니움 폴리클리코이데스 검출방법 및 검출용 키트에 있어서, 상기 표지물질로는 플루오레세인(fluorescein), BODIPY, 로다민(rhodamine), Cy3, Cy5, 자성입자(magnetic particles), 방사성 동위원소(radioisotopes), 항체, 바이오틴 등 통상적으로 뉴클레오티드의 표지에 사용되는 화합물을 사용할 수 있으며, 이들 각 표지물질의 특성을 이용하여 형광측정, 방사능측정, 발색측정, 자력, 결합친화도 등의 방법으로 표지물질을 검출할 수 있다. 이 중에서도 특히 본 발명에서는 형광표지물질을 적용하여 형광 인시츄 혼성화(Fluorescence In situ Hybridization, FISH)를 수행하는 것이 바람직하며, 형광검출과장이 짧은 Cy3 및 Cy5를 사용하는 것이 보다 안정적이고 우수한 검출효율을 위해 바람직하다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따르면 코클로디니움 폴리클리코이데스를 샘플로부터 매우 신속, 정확하게 정량적으로 검출해 낼 수 있고, 또한 현장적용이 가능하며 경제적이다. 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 18S rRNA 유전자의 공통 염기서열과 근연종 및 다른 종에는 존재하지 않는 염기서열을 비교하여 나타낸 것이다.

도 2는 코클로디니움 폴리클리코이데스를 대상으로 본 발명의 검출방법을 실시한 결과를 나타낸 광학현미경사진(좌측) 및 형광현미경사진(우측)이다.

도 3은 *Gymnodinium catenatum*을 대상으로 본 발명의 검출방법을 실시한 결과를 나타낸 광학현미경사진(좌측) 및 형광현미경사진(우측)이다.

도 4는 *Gymnodinium impudicum*을 대상으로 본 발명의 검출방법을 실시한 결과를 나타낸 광학현미경사진(좌측) 및 형광현미경사진(우측)이다.

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.

< 실시예 >

1. 미세조류 배양

[0025] 코클로디니움 폴리클리코이데스(*Cochlodinium polykrikoides*)는 한국해양과학기술원 해양시료도서관에서 분양받아 멸균된 32psu의 f/2 배지에 접종하여 20℃에서 12시간 명반응 및 12시간 암반응 조건으로 배양하였다.

2. 인시츄 혼성화 탐침 디자인

[0027] 식물플랑크톤 중 코클로디니움 폴리클리코이데스와 근연종인 *Alexandrium* sp., *Gymnodinium catenatum*, *Gymnodinium impudicum*, *Gymnodinium* sp. 그리고 동속인 *Cochlodinium fulvescens*의 18S ribosomal RNA 서열을 비교하여 코클로디니움 폴리클리코이데스만 특이적으로 검출할 수 있도록 탐침(probe)(서열번호 1)을 디자인하고, 형광표지물질인 Cy3로 tag하였다(표 1 참조).

표 1

18S rRNA-표적화 올리고뉴클레오티드 탐침

표적	탐침서열(5'~ 3')	Tm
<i>Cochlodinium polykirkoides</i> 18S ribosomal RNA	GGACGCTGCTGCAGTCCGAA	67.89

[0028]

[0029]

3. FISH(Fluorescence in situ hybridization)

[0030]

상기 항목 1의 코클로디니움 폴리클리코이데스 배양액 10ml를 15ml 코니컬 튜브(conical tube)에 분주하고 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, PFA)를 이용하여 최종농도 1%로 고정하였다.

[0031]

고정한 시료를 원심분리(3000g/3min)한 후 상등액을 제거하였다. 시료를 1X PBS를 이용하여 재부유시키고 1.5ml 마이크로튜브(microtube)로 옮긴 뒤 원심분리(3000g/3min)하였다.

[0032]

상등액을 제거한 후, 96% 에탄올(ethanol)과 1X PBS를 넣어준 뒤, 10 μ l씩 리액션셀슬라이드글라스(reaction cells slide glass)에 분주한 후 46 $^{\circ}$ C 드라이오븐에서 건조시켰다. 건조된 리액션셀슬라이드글라스를 50%, 80%, 96% 에탄올을 이용하여 각각 3분씩 탈수 과정을 수행하였다.

[0033]

그 후, 혼성화 버퍼(hybridization buffer)(0.9M NaCl, 20mM Tris-HCl, 0.01% SDS, formamide)와 상기 항목 2의 탐침을 혼성화 오븐(hybridization oven)에서 48 $^{\circ}$ C, 2시간 동안 반응시켰다.

[0034]

혼성화가 끝난 후, 46 $^{\circ}$ C로 예열된 세척 버퍼(washing buffer)(112mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 0.01% SDS, formamide)를 이용하여 10분 동안 세척한 다음, 미리 냉각시킨 증류수로 가볍게 헹구어주었다. 그 후, 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0035]

이의 결과, 도 2에서와 같이 전처리 후 세포의 형태가 잘 보존되었으며, 형광표지물질이 세포내로 들어가 염색된 것을 확인 할 수 있었다.

[0036]

< 비교예 >

[0037]

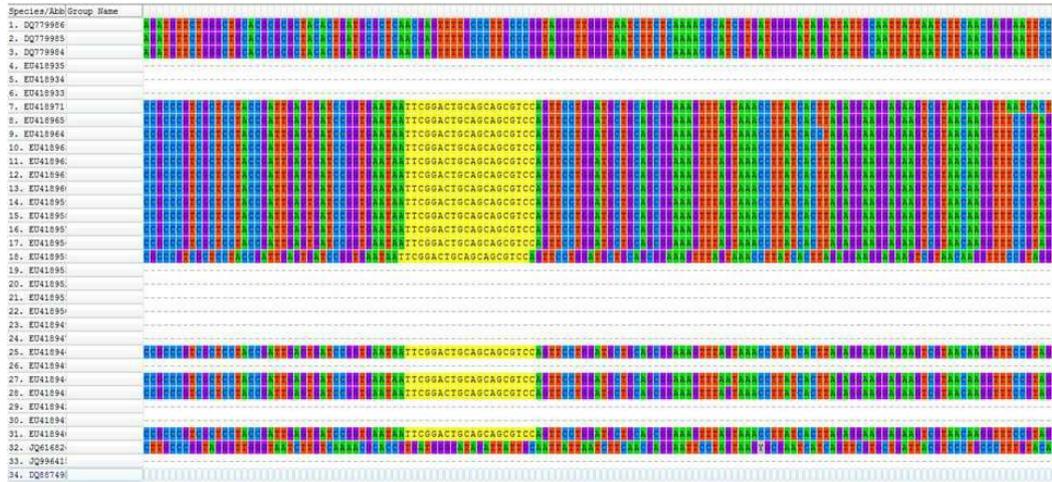
본 발명 검출방법의 특이성, 즉 다른 미세조류와의 선별력을 검증하기 위해 코클로디니움 폴리클리코이데스의 근연종인 *Gymnodinium catenatum*과 *Gymnodinium impudicum*을 대상으로 상기 실시예와 동일한 방법으로 FISH를 수행하였다.

[0038]

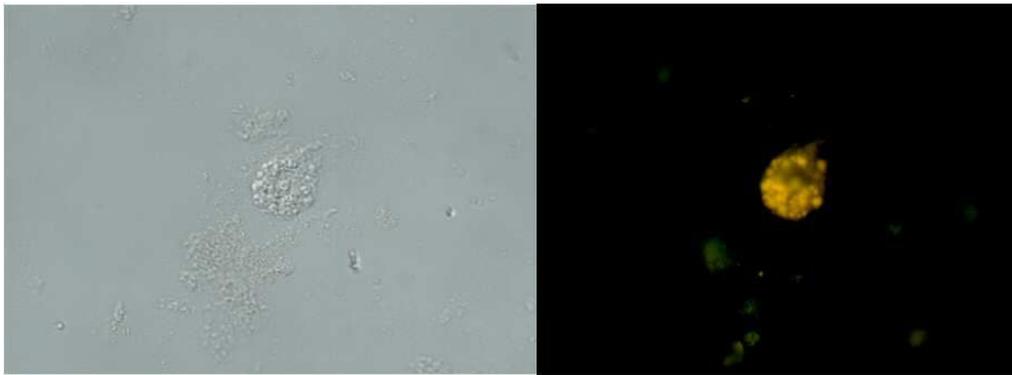
이의 결과, 도 3 및 4에서와 같이 코클로디니움 폴리클리코이데스와는 달리 형광염색이 전혀 이루어지지 않는 것으로 나타났다. 따라서 본 발명의 검출방법은 다른 근연종의 미세조류와 구분하여 코클로디니움 폴리클리코이데스만을 특이적으로 검출할 수 있다는 것을 확인하였다.

도면

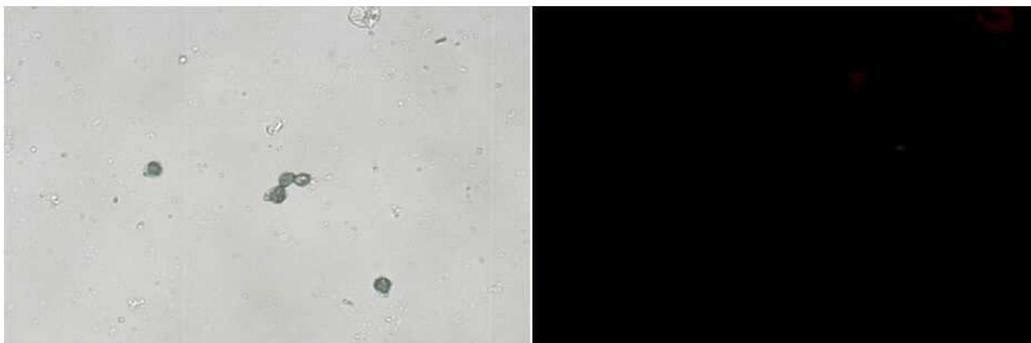
도면1



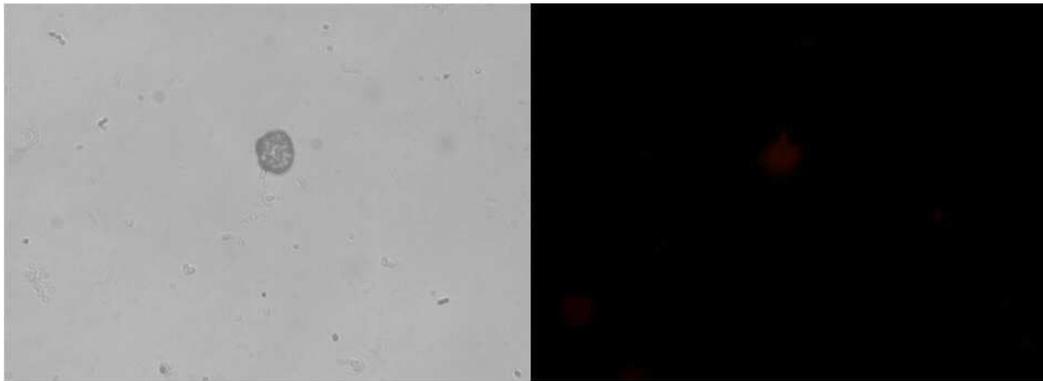
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Korea Institute of Ocean Science & Technology
 - <120> Method for detection of Cochlodinium polykrikoides by in situ hybridization and kit therefor
 - <130> PA-D15097
 - <160> 1
 - <170> KoPatentIn 3.0
 - <210> 1
 - <211> 20
 - <212> DNA
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> In situ hybridization probe for Cochlodinium polykrikoides
 - <400> 1
- ggacgctgct gcagtccgaa

20