



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0110593
(43) 공개일자 2016년09월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6888 (2013.01)

C12Q 1/686 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0032471

(22) 출원일자 2015년03월09일

심사청구일자 2015년03월09일

(71) 출원인

제주대학교 산학협력단

제주특별자치도 제주시 제주대학로 102 (아라일동, 제주대학교)

한국해양과학기술원

경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동)

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)

(72) 발명자

한상현

제주특별자치도 제주시 도남로10길 37 501호 (도남동, 한솔아파트)

이영돈

제주특별자치도 제주시 조천읍 함덕5길 19-5 해양과학연구소 (함덕리, 제주대학교)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

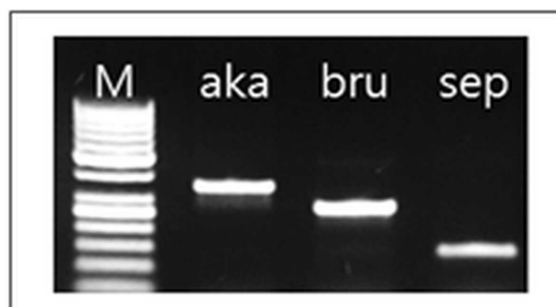
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 붉바리, 자바리, 능성어 종 동시 판별용 P C R 프라이머 세트 및 이를 이용한 붉바리, 자바리, 능성어 종 동시 판별 방법

(57) 요약

본 발명은 붉바리, 자바리 및 능성어 종 판별용 프라이머 세트 및 이를 이용한 붉바리, 자바리 및 능성어 종의 동시 판별 방법에 관한 것이다. 본 발명의 붉바리, 자바리 및 능성어 종 동시 판별용 프라이머 세트를 이용하면 동시에 특이적으로 각각의 종의 판별이 가능하므로, 바리과 어종의 혼·오용을 방지할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2527/101 (2013.01)

C12Q 2531/113 (2013.01)

C12Q 2600/124 (2013.01)

(72) 발명자

오홍식

제주특별자치도 서귀포시 대정읍 글로벌에듀로145
번길 46 104동 301호 (구역리, 캐논스빌리지1단지)

백혜자

부산시 남구 분포로 113 236동 401호

노충환

부산시 동래구 온천3동 아시아드대로 234 107동
1701호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 213004-04-1-CG600

부처명 농림축산식품부, 해양수산부, 농촌진흥청, 산림청

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 Golden Seed Project

연구과제명 수출용 불바리 종자 개발

기 여 율 1/1

주관기관 제주대학교 산학협력단

연구기간 2013.05.02 ~ 2022.05.02

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1, 2, 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머로 이루어지는, 붉바리(*Ephinephelus akaara*), 자바리(*Epinephelus bruneus*) 및 능성어(*Epinephelus septemfasciatus*) 종의 동시 판별용 프라이머 세트.

청구항 2

제1항의 프라이머 세트와 이의 PCR 반응 혼합물을 포함하는 붉바리, 자바리 및 능성어 종의 동시 판별용 PCR 키트.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 PCR 반응 혼합물은 dNTP, DNA 폴리머라아제 및 버퍼를 포함하는 것인 붉바리, 자바리 및 능성어 종의 동시 판별용 PCR 키트.

청구항 4

- 1) 분석시료의 DNA를 추출하는 단계;
- 2) 서열번호 1, 2, 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머를 모두 포함하는 프라이머 세트를 제작하는 단계;
- 3) 상기 단계 1)에서 추출된 DNA를 상기 프라이머 세트를 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하는 단계;
- 4) 상기 단계 3) PCR 산물을 전기영동으로 분리하는 단계; 및
- 5) 상기 단계 4)의 PCR 산물의 크기에 따라 붉바리, 자바리, 또는 능성어 종을 확인하는 단계를 포함하는 붉바리, 자바리 및 능성어 종을 포함하는 군에서 1 이상의 종을 동시에 판별하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 단계 5)의 PCR 산물이 344 bp의 PCR 산물이면 붉바리, 262 bp의 PCR 산물이면 자바리, 또는 130 bp의 PCR 산물이면 능성어임을 확인하는 것을 특징으로 하는 붉바리, 자바리 및 능성어 종을 포함하는 군에서 1 이상의 종을 동시에 판별하는 방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 PCR은 어닐링(annealing) 온도가 54~62℃인 것을 특징으로 하는 붉바리, 자바리 및 능성어 종을 포함하는 군에서 1 이상의 종을 동시에 판별하는 방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 단계 1)의 분석시료는 불바리, 자바리 및 능성어 자체, 또는 상기 불바리, 자바리 및 능성어가 포함된 것으로 예상되는 식품인 것을 특징으로 하는 불바리, 자바리 및 능성어 종을 포함하는 군에서 1 이상의 종을 동시에 판별하는 방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 단계 3)의 PCR은 하나의 반응액에서 증폭하는 것을 특징으로 하는 불바리, 자바리 및 능성어 종을 포함하는 군에서 1 이상의 종을 판별하는 방법.

청구항 9

제4항에 있어서,

상기 단계 4)의 PCR 산물의 전기영동은 하나의 겔에서 구분할 수 있는 것을 특징으로 하는 불바리, 자바리 및 능성어 종을 포함하는 군에서 1 이상의 종을 동시에 판별하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 불바리, 자바리 및 능성어 종 동시 판별용 PCR 프라이머 세트 및 이를 이용한 불바리, 자바리 및 능성어 종 동시 판별 방법에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 최고급 횡감으로 이용되고 있는 바리과 어종들은 자연산 어족자원의 급감으로 고가의 시장을 형성하고 있다. 현재 유통중인 자연산 및 양식산 바리과 어종들은 자바리(제주도에서 일명 '다금바리'로 불림), 능성어, 불바리 등이 대부분이며, 특히 자연산의 경우 훨씬 더 고가로 거래되고 있다. 증가되는 수요를 충족하기 위해 양식에 성공한 능성어가 대량으로 유통되고 있으나, 이 중 다량이 자바리나 불바리의 자연산으로 둔갑되고 있다.

[0003] 자바리와 능성어 종 내에서 표현형의 변이가 많아 체문만으로 이들 두 종을 식별하는 것은 전문적인 지식이 없는 경우 대단히 어려운 실정이다. 또한 자바리와 능성어, 불바리 모두 대부분 회로 제공되어 껍질이 제거된 이후의 판독은 더욱 어려움이 많다. 한편, DNA 판독 기술은 생체, 사후 절개된 조직이나 조리된 음식물 내에서도 원료 종의 판독이 가능한 것으로 보고되어, 동물성 원료 종의 동정을 위해 DNA 정보에 기반한 PCR 기법을 응용한 연구들이 보고된 바 있다. 현재, 불바리가 포함된 바리과 어종 식별용 유전자 진단법은 보고되어 있지 않은 실정이다.

[0004] 미토콘드리아는 세포소기관의 일종으로 세포에 따라 적게는 수십 개에서 많게는 수천 개가 하나의 세포 내에 존재하고, 각각의 미토콘드리아는 적어도 하나 이상의 DNA 분자를 가지고 있어, 아주 적은 양의 시료만으로도 종을 동정할 수 있고, 어느 정도의 부패가 진행되거나 열처리 등에 의해 조직이 변성된 이후에도 확인이 가능하다. 또한 미토콘드리아 DNA의 서열이 종 사이에서 일정 수준 이상의 염기서열의 상동성을 나타내기 때문에, 종 동정 (species identification)을 위해 가장 많이 사용되고 있는 표적 분자이다.

[0005] *COI* 유전자는 종 내에서의 변이가 미토콘드리아 유전체의 다른 영역보다 적고, 범용 프라이머 쌍으로 많은 종을 증폭해 낼 수 있다는 점에서 DNA barcoding에 이용되고 있어, PCR 증폭 상에서 오류가 생기더라도 서열의 확인을 통하여 종을 동정할 수 있다. 특히 본 발명에서 프라이머의 고안에 이용한 서열이 *COI* 유전자의 단백질 암호화 영역 내에 존재하기 때문에 삽입/결실에 의한 프라이머-주형 DNA의 결합 오류(primer-template DNA

misannealing)의 확률이 매우 낮아 종 식별의 정확성이 높다.

- [0006] 이에 본 발명자들은 바리과 어종들을 식별함에 있어 DNA 서열의 특이성을 이용하여 유전적으로 유사한 자바리, 능성어, 붉바리 등에 각각 특이적으로 반응하는 프라이머의 세트를 이용하여 PCR을 수행한 결과를 통해 이들 종을 분별적으로 판독하는 기술을 개발하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 미국 등록특허공보 8614062 (2013.12.24.)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 목적은 붉바리, 자바리 및 능성어 종 동시 판별용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 붉바리, 자바리 및 능성어 종 동시 판별용 PCR 키트를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 붉바리, 자바리 및 능성어 종을 포함하는 군에서 1 이상의 종을 동시에 판별하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 서열번호 1, 2, 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머로 이루어지는, 붉바리(*Ephinephelus akaara*), 자바리(*Epinephelus bruneus*) 및 능성어(*Epinephelus septemfasciatus*) 종의 동시 판별용 프라이머 세트를 제공한다.
- [0012] 상기 프라이머 세트는 붉바리, 자바리 및 능성어 종 각각의 *COI*(cytochrome c oxidase subunit I) 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 것이다.
- [0013] 상기 붉바리(*Ephinephelus akaara*, Red spotted grouper), 자바리(*Epinephelus bruneus*, Longtooth grouper) 및 능성어(*Epinephelus septemfasciatus*, Sevenband grouper)는 바리과(Serranidae)에 속하는 어종이다.
- [0014] 상기 *COI*(cytochrome c oxidase subunit I) 유전자는 세포 소기관인 미토콘드리아의 유전자로, *COI* 유전자의 DNA는 모계로만 유전이 되기 때문에 종 내 보존력이 높아 종을 판별하는 표지로 이용된다.
- [0015] 상기 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 붉바리의 *COI* 유전자의 일부인 344 bp를 증폭시키는 프라이머 쌍일 수 있다.
- [0016] 상기 서열번호 1 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 자바리의 *COI* 유전자의 일부인 262 bp를 증폭시키는 프라이머 쌍일 수 있다.
- [0017] 상기 서열번호 1 및 서열번호 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머 쌍은 능성어의 *COI* 유전자의 일부인 130 bp를 증폭시키는 프라이머 쌍일 수 있다.
- [0018] 상기 서열번호 1, 2, 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머로 이루어지는 프라이머 세트는 붉바리의 *COI* 유전자의 일부인 344 bp, 자바리의 *COI* 유전자의 일부인 262 bp, 능성어의 *COI* 유전자의 일부인 130 bp를 증폭시키는 프라이머 세트일 수 있다.
- [0019] 본 명세서에서 사용된 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 핵산의 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 핵산 주형의 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(즉, DNA 폴리머라아제)의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.

- [0020] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트와 이의 PCR 반응 혼합물을 포함하는 붐바리, 자바리 및 능성어 종의 동시 관별용 PCR 키트를 제공한다.
- [0021] 상기 PCR 반응 혼합물에는 이 기술분야에서 널리 공지된 것은 어느 것이나 포함될 수 있다. 예를 들면, PCR 반응 혼합물은 dNTP, DNA 폴리머라아제 및 버퍼 등이 포함될 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0022] 또한, 본 발명은
- [0023] 1) 분석시료의 DNA를 추출하는 단계;
- [0024] 2) 서열번호 1, 2, 3 및 4의 염기서열로 이루어지는 프라이머를 모두 포함하는 프라이머 세트를 제작하는 단계;
- [0025] 3) 상기 단계 1)에서 추출된 DNA를 상기 프라이머 세트를 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 수행하는 단계;
- [0026] 4) 상기 단계 3) PCR 산물을 전기영동으로 분리하는 단계; 및
- [0027] 5) 상기 단계 4)의 PCR 산물의 크기에 따라 붐바리, 자바리, 또는 능성어 종을 확인하는 단계를 포함하는 붐바리, 자바리 및 능성어 종을 포함하는 군에서 1 이상의 종을 동시에 관별하는 방법을 제공한다.
- [0028] 상기 단계 5)의 PCR 산물이 344 bp의 PCR 산물이면 붐바리, 262 bp의 PCR 산물이면 자바리, 또는 130 bp의 PCR 산물이면 능성어임을 확인할 수 있다.
- [0029] 상기 PCR은 어닐링(annealing) 온도가 54-62℃인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0030] 상기 단계 1)의 분석시료는 어류 자체일 수 있고, 바람직하게는 붐바리, 자바리 및 능성어 종일 것으로 예상되는 어류 자체일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 붐바리, 자바리 및 능성어 자체, 또는 상기 붐바리, 자바리 및 능성어가 포함된 것으로 예상되는 식품일 수 있다.
- [0031] 상기 붐바리, 자바리 및 능성어가 포함된 것으로 예상되는 식품은 붐바리, 자바리, 능성어를 재료로 하여 만들 수 있는 음식물을 모두 포함하며, 예를 들어, 회, 매운탕, 찜 등이 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0032] 상기 단계 1)의 DNA는 1종의 어류의 DNA일 수 있으며, 2종 이상의 어류의 DNA가 혼합되어 있을 수 있다.
- [0033] 상기 단계 3)의 PCR은 하나의 반응액에서 증폭할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0034] 상기 단계 4)의 PCR 산물의 전기영동은 하나의 겔에서 구분할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0035] 상기 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [0036] 본 명세서에서 사용된 용어 "증폭 반응"은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 중합효소 연쇄반응(PCR)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Sambrook 등, Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)(17, 18), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA)(19) (WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication)(20)(WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오티드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CPPCR)(미국 특허 제4,437,975호), 임의적 프라이밍 중합효소 연쇄 반응(arbitrarily primed polymerase chain reaction; AP-PCR)(미국 특허 제5,413,909호 및 제5,861,245호), 핵산 염기서열 기반 증폭(nucleic acid sequence based amplification; NASBA)(미국 특허 제5,130,238호, 제5,409,818호, 제5,554,517호, 및 제6,063,603호), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification)(21, 22) 및 고리-중재 항온성 증폭(loopmediated isothermal amplification; LAMP)(23)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭방법들은 미국특허 제5,242,794, 5,494,810, 4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다.

발명의 효과

[0037] 본 발명의 붐바리, 자바리 및 능성어 종 동시 판별용 프라이머 세트를 이용한 종 판별 방법은 어류의 생체 또는 조리된 음식물 내에서도 원료 종의 판별이 가능하므로 바리와 어종의 혼·오용 및 위품의 유통방지에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 바리와 3종(붐바리, 자바리, 능성어)에 공통으로 작용할 수 있는 공통의 Baris_F 프라이머(서열번호 1)와 개별 종 특이적 프라이머(서열번호 2, 3 및 4)를 모두 첨가한 프라이머 세트를 이용한 개별 종 각각의 PCR 증폭 결과를 나타낸 도이다:

레인 M, 50bp DNA ladder;

레인 aka, 붐바리 DNA(344 bp);

레인 bru, 자바리 DNA(262 bp); 및

레인 sep, 능성어 DNA(130 bp).

도 2는 바리와 3종(붐바리, 자바리, 능성어)에 공통으로 작용할 수 있는 공통의 Baris_F 프라이머(서열번호 1)와 개별 종 특이적 프라이머(서열번호 2, 3 및 4)를 모두 첨가한 프라이머 세트를 이용한 혼합 DNA의 PCR 증폭 결과를 나타낸 도이다:

레인 M, 50bp DNA ladder;

레인 1, 60℃의 어닐링 온도 조건;

레인 2, 55℃의 어닐링 온도 조건;

aka, 붐바리 DNA(344 bp);

bru, 자바리 DNA(262 bp); 및

sep, 능성어 DNA(130 bp).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 본 발명을 하기 실시예에서 보다 상세하게 기술한다. 다만, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아니다. 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[0040] <실시예 1> 붐바리, 자바리, 능성어 종 동시판별 프라이머의 제작

[0041] 붐바리, 자바리, 능성어 종의 특이적 검출을 위해 4개의 프라이머를 제작하였다. 구체적으로, 붐바리, 자바리, 능성어의 *COI*(cytochrome c oxidase subunit I) 유전자(GenBank:NC_011113.1, GenBank:NC_013820.1, GenBank:NC_013829.1)를 타겟으로 하여 Primer3 v.0.4.0(<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>)를 이용하여 프라이머를 설계하였다. 설계된 프라이머는 붐바리, 자바리, 능성어에 공통으로 적용되는 범용 프라이머를 Baris_F(서열번호 1), 붐바리 종에 특이적인 프라이머를 HKG_R1(서열번호 2), 자바리 종에 특이적인 프라이머를 LTG_R1(서열번호 3), 그리고 능성어 종에 특이적인 프라이머를 7BG_R1(서열번호 4)로 명명하였다(표 1). 프라이머는 코스모진텍사(Cosmogenetech, Korea)에 제작을 의뢰하여 사용하였다.

표 1

서열번호	설명	프라이머 명칭	프라이머 방향	서열(5'→3')
서열번호 1	붐바리-자바리-능성어 공통 프라이머	Baris_F	정방향	GATTGGTGGCTTTGGAACCTGA

서열번호 2	붉바리 특이 프라이머	HKG_R1	역방향	GGACAGCCCATACAAACAAG
서열번호 3	자바리 특이 프라이머	LTG_R1	역방향	ATGAGAAGATGGTTAAGTCTACG
서열번호 4	능성어 특이 프라이머	7BG_R1	역방향	TCCAGAAGAAGCAAGAAGAAGT

[0043] <실시예 2> 붉바리, 자바리, 능성어 각각의 종 특이적 판별 실험

[0044] <2-1> 시료의 준비 및 DNA 추출

[0045] 붉바리(*Epinephelus akaara*), 자바리(*Epinephelus bruneus*), 능성어(*Epinephelus septemfasciatus*)는 각각 제주도과 통영, 부산에서 어획되거나, 양식 후 출하된 개체들을 구입하여 준비하였다. 상기 준비한 시료에서 혈액 0.05ml, 꼬리지느러미 0.05mg, 근육 1mg 등을 분리한 후 DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen, USA)를 이용하여 붉바리, 자바리, 능성어 각각의 DNA를 추출하였다.

[0046] <2-2> 프라이머 세트를 이용한 PCR 증폭 시험

[0047] 제작한 프라이머 세트의 붉바리, 자바리, 능성어 종에 대한 각각의 종 특이성을 확인하기 위하여, 붉바리, 자바리, 능성어 시료에서 추출한 DNA를 <실시예 1>에서 제작한 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 각각 수행하였다.

[0048] 구체적으로, <실시예 1>에서 제작한 붉바리, 자바리, 능성어에 공통으로 적용되는 범용 프라이머(Baris_F, 서열번호 1)와 각각의 붉바리 특이 프라이머(HKG_R1, 서열번호 2), 자바리 특이 프라이머(LTG_R1, 서열번호 3) 및 능성어 특이 프라이머(7BG_R1)를 모두 첨가한 프라이머 세트 mix에 <실시예 2-1>에서 추출한 붉바리 DNA, 자바리 DNA, 능성어 DNA를 각각 개별적으로 첨가하여 증폭하였다(도 1). 상기 프라이머 세트 mix 10 nanomole (Baris_F:HKG_R1:LTG_R1:7BG_R1 = 3:1:1:1), 상기 DNA 100ng, DNA 중합효소 0.5unit을 10X PCR buffer(GenetBio, Korea)에 각각 첨가하여 PTC-200 thermal cycler (MJ Research, USA)를 이용하여 증폭하였다.

[0049] 반응조건은 95℃에서 3분간 초기변성한 후 95℃에서 30초 변성, 60℃에서 45초 어닐링, 72℃에서 45초 신장을 35회 수행하고 마지막으로 72℃에서 5분간 최종 신장시키는 조건으로 수행하였다. 이는 붉바리, 자바리, 능성어의 추출 DNA 각각에 대하여 수행되었다. PCR 증폭 산물은 아가로스겔 상에서 50 bp DNA 래더(ladder; Bioneer, Korea)와 함께 전기영동한 후, EtBr로 염색하여 관찰하였다.

[0050] 증폭 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 붉바리 DNA에서 344 bp, 자바리 DNA에서 262 bp, 능성어 DNA에서 130 bp의 PCR 산물이 종 특이적으로 증폭되었으며, 이를 표 2에 나타내었다. 즉, 4가지 프라이머를 모두 첨가하여 PCR 증폭에 이용하더라도 각각의 종 특이적인 유전자 절편만 증폭됨을 확인할 수 있었다(도 1).

[0051] 하기 표 2에 프라이머 조합에 따른 결합 온도, PCR 산물 길이(bp) 및 프라이머에 의해 증폭되는 대상 종을 나타내었다.

표 2

프라이머 조합	결합 온도	PCR 산물 길이(bp)	대상 종
Baris_F+HKG_R1	60℃	344	붉바리, aka
Baris_F+LTG_R1	60℃	262	자바리, bru
Baris_F+7BG_R1	60℃	130	능성어, sep

[0052] <실시예 3> 붉바리, 자바리, 능성어 동시판별 실험

[0053] <실시예 1>에서 제작한 4개의 프라이머가 모두 포함된 프라이머 세트 mix(Baris_F, HKG_R1, LTG_R1, 7BG_R1)에, <실시예 2-1>에서 얻은 바리과 3종(붉바리, 자바리, 능성어)의 DNA를 모두 혼합한 DNA를 주형으로 첨가하여 PCR을 수행하였다.

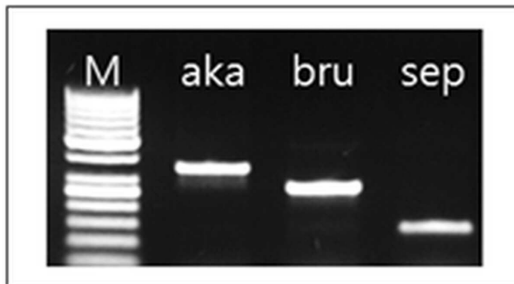
[0054] 구체적으로, 상기 프라이머 세트 mix 30nanomole (Baris_F 15nanomole, HKG_R1 5nanomole, LTG_R1 5nanomole, 7BG_R1 5nanomole), 상기 혼합 DNA 100ng(붉바리 DNA:자바리 DNA:능성어 DNA = 1:1:1), DNA 중합효소 0.5unit을 10X PCR buffer(GenetBio, Korea)에 각각 첨가하여 PTC-200 thermal cycler (MJ Research, USA)를 이용하여 증폭하였다.

[0056] 반응조건은 95℃에서 3분간 초기변성한 후 95℃에서 30초 변성, 60℃에서 45초 어닐링, 72℃에서 45초 신장을 35회 수행하고 마지막으로 72℃에서 5분간 최종 신장시키는 조건으로 수행하였다. 또한, 같은 조건에서 어닐링 온도만 55℃로 바꾸어 수행하였다. PCR 증폭 산물은 아가로스겔 상에서 50 bp DNA 래더(ladder; Bioneer, Korea)와 함께 전기영동한 후, EtBr로 염색하여 관찰하였다.

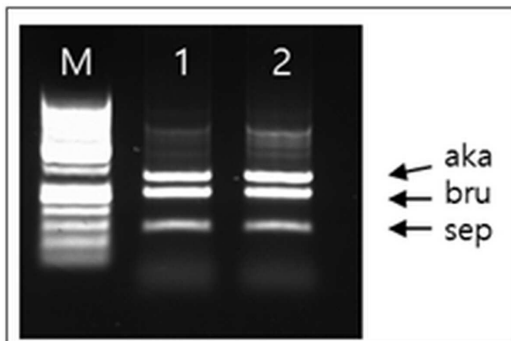
[0057] 증폭 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 PCR 산물에서는 붉바리 344 bp, 자바리 262 bp, 능성어 130 bp의 증폭 절편이 모두 관찰되었다. 또한, 도 2의 '1'은 어닐링 온도가 60℃인 조건, 도 2의 '2'는 어닐링 온도가 55℃인 조건에서 PCR을 수행하여 얻은 결과이며, 어닐링 온도를 60℃와 55℃로 구분하여 증폭할 때에도 각각의 종에 특이적인 PCR 산물이 출현하였다. 따라서 붉바리, 자바리, 능성어의 혼합 DNA 용액을 주형으로 하여도 각각의 종에 특이적인 판별이 동시에 가능함을 확인하였다.

도면

도면1



도면2



서열 목록

- <110> Jeju National University Industry-Academic Cooperation Foundation
Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
Korea Institute of Ocean Science and Technology
- <120> PCR primer set for classification among Red spotted grouper,
Longtooth grouper and Sevenband grouper, and method for
classification using the same
- <130> P14U19D0585
- <160> 4
- <170> KopatentIn 2.0

<210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Baris_F
 <400> 1
 gattggtggc ttggaaact ga 22
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HKG_R1
 <400> 2
 ggacagccca tacaacaag 20
 <210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LTG_R1
 <400> 3
 atgagaagat ggtaagtct acg 23
 <210> 4
 <211> 22

 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 7BG_R1
 <400> 4
 tccagaagaa gcaagaagaa gt 22