(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0092001
(43) 공개일자 2011년08월17일

(51) Int. Cl.
C12N 15/11 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0011405
(22) 출원일자 2010년02월08일
심사청구일자 2010년02월08일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
전진태
서울 서초구 방배2동 436-13번지 401호
임현태
울산 중구 약사동 800-33번지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 7 항

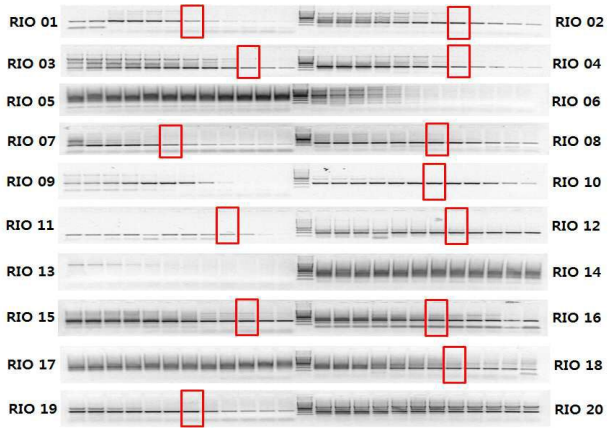
(54) 국내 서식 수달 (Lutra lutra)의 개체식별을 위한 마이크로새틀라이트 마커 및 이를 이용한 개체 식별 방법

(57) 요 약

본 발명은 국내 서식 수달(*Lutra lutra*)의 개체를 식별할 수 있는 마이크로새틀라이트 마커 및 이를 이용한 수달의 개체식별 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 효과적인 수달의 개체식별을 위해 선발된 마이크로새틀라이트 마커 및 이에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하는 것을 특징으로 하는 수달의 개체식별 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 수달의 개체식별을 위한 마커 및 이를 이용한 개체식별 방법을 통해 신속하고 효과적으로 국내 서식 수달 개체를 식별할 수 있을 뿐만 아니라 혈통분류가 가능하여 DNA 분석을 통해 과학적이고 객관적인 서식 실태결과를 도출할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

박문성

경상남도 마산시 회성동 442-21번지

서보영

경상남도 진주시 칠암동 509-9번지

정은지

경상남도 사천시 사천읍 평화리 2-22번지 평화맨션 201호

유채경

경상남도 통영시 도천동 281-23 2통 2반

이길주

경상남도 창원시 서상동 서문무학마을아파트 508호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 109177-03-1-SB010

부처명 농림수산식품부(농림수산식품기술기획평가원)

연구관리전문기관

연구사업명 농림기술개발사업(일반(자유응모)과제)

연구과제명 주요 가축/반려/멸종위기동물의 개체특성 확인용 종합 DNA 마커세트 상용화

기여율

주관기관 경상대학교 산학협력단

연구기간 2009년 4월 10일~2010년 4월 9일

특허청구의 범위

청구항 1

RIO_01, RIO_02, RIO_03, RIO_04, RIO_07, RIO_08, RIO_10, RIO_11, RIO_12, RIO_15, RIO_16, RIO_18 및 RIO_19 마이크로새틀라이트로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 국내 서식 수달(*Lutra lutra*)의 개체 식별을 위한 마이크로새틀라이트 마커.

청구항 2

제1항의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 서열번호 1 및 2, 3 및 4, 5 및 6, 7 및 8, 9 및 10, 11 및 12, 13 및 14, 15 및 16, 17 및 18, 19 및 20, 21 및 22, 23 및 24 및, 25 및 26의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 한 쌍 이상의 프라이머 세트.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 역방향 프라이머에는 5`말단에 GTTTCT 염기가 추가되는 것을 특징으로 하는 프라이머 세트.

청구항 4

제2항 또는 제3항의 프라이머 세트를 포함하는 국내 서식 수달(*Lutra lutra*) 개체 식별용 키트.

청구항 5

(a) 분석하고자 하는 핵산 시료를 RIO_01, RIO_02, RIO_03, RIO_04, RIO_07, RIO_08, RIO_10, RIO_11, RIO_12, RIO_15, RIO_16, RIO_18 및 RIO_19 마이크로새틀라이트로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR로 증폭하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 증폭된 산물을 전기영동장치를 통해 검출하여 대립유전자(allele)를 검출하고 유전자형을 결정하는 단계를 포함하는 국내 서식 수달(*Lutra lutra*) 개체의 식별 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 (a) 단계의 프라이머는 서열번호 1 및 2, 3 및 4, 5 및 6, 7 및 8, 9 및 10, 11 및 12, 13 및 14, 15 및 16, 17 및 18, 19 및 20, 21 및 22, 23 및 24 및, 25 및 26의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 1쌍 이상의 프라이머임을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 역방향 프라이머에는 5`말단에 GTTTCT 염기가 추가되는 것을 특징으로 하는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 국내 서식 수달(*Lutra lutra*)의 개체를 식별할 수 있는 마이크로새틀라이트 마커 및 이를 이용한 수달의 개체식별 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 효과적인 수달의 개체식별을 위해 선발된 마이

크로새틀라이트 마커 및 이에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하는 것을 특징으로 하는 수달의 개체 식별 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현재 남한에 서식하는 수달(*Lutra lutra*)은 1982년 천연기념물 제330호와 2005년 멸종위기 야생동물급으로 지정되어 국가의 보호를 받고 있는 야생동물로서, 내륙지역 수 환경생태계 먹이사슬의 최상위층에 해당되며, 하천 생태계의 건강도를 나타내는 지표 종으로서 중요한 위치에 있다(낙동강유역환경청, 2006). 최근 수달의 서식지인 강, 하천 또는 해안지역 등의 무분별한 개발·정비 사업으로 수달의 서식지가 훼손되거나 감소되고 있으며, 동일 지역 수달개체군 간의 서식지 중복으로 먹이 경쟁과 장거리 이동에 의한 로드킬(Road-Kill) 등의 사고가 빈번하게 발생하고 있다. 하천 등 서식지 개발에 따른 먹이부족으로 인한 번식력의 저하는 곧 개체 수 감소로 이어져 지속적인 생존이 어려울 것으로 판단되고, 장기적으로 종 보존에 부정적 결과가 나타날 것으로 예상된다.

[0003] 우리나라 수달의 경우 국제적으로는 멸종위기에 처한 종으로 규정하고 상업적 목적을 위한 국제거래를 금지하고 있다. 수달에 대한 국내외의 보호노력에도 불구하고 전국적으로 개체수가 현저히 줄어들고 있으며, 새로운 보호관리 방안을 모색해야 하는 필요성이 제기되고 있다. 단순히 수달 개체에 대한 위협요인만을 제거해서는 감소하고 있는 개체수의 자연적 번식이 불가능해짐에 따라 보다 근원적이고 적극적인 방안들이 세계적으로 수립되고 있다.

[0004] 여러 나라에서 수달에 대한 다양한 복원계획이 이루어지고 있으며 또한 아시아 각국의 수달 복원노력도 고무적으로 진행되고 있다. 그리고 일본에서는 서식지 복원에 노력하고 있으며, 지금은 외국에서 수달을 수입하여 멸종된 수달을 복원하려 하고 있다.

[0005] 우리나라도 수달의 보호 관리에 관한 구체적이고 적극적인 복원과 보존 노력이 필요하다. 이를 위해서는 영국처럼 보호계획의 기초적 자료를 축적하기 위하여 개체군에 대한 조사가 필요하다. 그러나 지금까지 우리나라 수달에 대한 연구는 주로 수달배설물에 의한 서식과 식이습성을 확인한 연구(Ando et al., 1985), 수달의 식이물 및 서식상황에 대한보고(Son et al., 1992; Son et al., 1994), 섬진강의 수달서식실태 및 복원 계획(환경부, 1997), 한국 수달의 생태에 관한 연구(한, 1997), 천연기념물 수달의 서식실태 및 보호방안 연구(문화재청, 2001), 한국산 수달의 두개골에 대한 해부학적 연구(김, 2002), 수달 서식환경과 식이물 분석에 관한 연구(민, 2002), 지리산국립공원 하천 수계에 서식하는 족제비과 수달과 족제비의 식이활동에 관한 연구(이 등, 2003) 등으로 대부분의 연구가 배설물의 분석 및 지역적 분포에 치우쳐 있어 수달 개체군의 보전 및 관리를 위한 과학적 자료를 제공하지 못하고 있다. 이와 같이 수달의 행태에 관한 연구가 빈약하고 수달의 서식지 환경을 파악하지 못하여 수달의 보호와 종 보존에 제대로 대처하지 못하고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 유전자분석을 통한 흔적조사방식과 조사자의 지식과 경험에 의하여 조사결과가 도출되는 기존의 조사방식에서 탈피하여, 수달 개체에 대한 직접적인 접촉 없이 서식지 현장에서 야생동물의 유전자가 포함된 시료를 채집하고, 이것의 DNA 분석을 통해 과학적이고 객관적인 서식실태결과를 도출하는 것이 필요하다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 야생동물의 시료를 분석하여 수달의 개체식별을 할 수 있는 마커 및 이를 이용한 개체식별 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명자들은 국내에 서식하고 있는 수달(*Lutra lutra*)을 대상으로 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 대립유전자형 분석에 관한 방법을 연구하던 중, 국내 수달에 적용 가능한 마이크로새틀라이트 마커를 선발하고 이에

특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하면 신속하고 효과적으로 수달 개체를 식별할 수 있음을 발견하였다.

[0009] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 13개의 마이크로새틀라이트로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 국내 서식 수달(*Lutra lutra*) 개체 식별용 마커 및 이 마커에 특이적인 프라이머 세트, 그리고 상기 프라이머 세트를 포함하는 국내 서식 수달의 개체 식별용 키트를 제공한다.

[0010] 또한 본 발명은 상기 13개의 마이크로새틀라이트로 구성되는 1종 이상의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하는 것을 특징으로 하는 국내 서식 중인 수달(*Lutra lutra*) 개체의 식별방법을 제공한다.

[0011] 이하, 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.

[0012] 본 명세서에서 사용된 용어 "마이크로새틀라이트(Microsatellite)"란 진핵세포(eukaryotes) 유전자 전역에 걸쳐 분포하는 모노-, 디-, 트리- 및 테트라뉴클레오타이드 형태의 짧은 반복 염기서열을 의미한다. 일반적으로 이러한 반복 서열은 염색체 내에서 10 내지 40 번 정도 단순반복(tandem repeat)된 형태로 존재한다.

[0013] 본 명세서에서 사용된 용어 "마이크로새틀라이트 마커"란 마이크로새틀라이트를 이용한 DNA 다형 검출 마커를 말한다.

[0014] 본 명세서에서 사용된 용어 "DNA 다형(Polymorphism)"이란 동일종간 생물개체의 특이적 DNA 구조의 다양성을 말한다.

[0015] 본 명세서에서 사용된 용어 "프라이머"는 본 발명에서 선발한 마이크로새틀라이트의 핵산서열을 특이적으로 증폭할 수 있는 올리고뉴클레오타이드(oligonucle tide)를 의미하는 것으로, 본 발명에서 선발한 마이크로새틀라이트 마커의 핵산서열을 증폭할 수 있는 것이라면 당업자가 디자인할 수 있는 모든 프라이머가 이에 해당된다.

[0016] 본 명세서에서 사용된 용어 "PCR 반응 혼합물"이란 DNA 폴리머라제 및 완충용액을 포함하여 PCR를 수행하기 위해 사용되는 분자생물학적 시약(molecular biological reagent)을 의미한다.

[0017] 본 발명자들은 국내 서식 중인 수달(*Lutra lutra*)의 개체 식별용 마이크로새틀라이트 마커를 찾기 위해서 미국 국립생물정보센터에 등록되어 있는 20개의 수달 다형성 분석용 마이크로새틀라이트에 대하여 프라이머를 제작하고 국내 서식 수달 9마리의 생체 조직에서 분리한 DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행했다. 그 결과 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이 RIO_01, RIO_02, RIO_03, RIO_04, RIO_07, RIO_08, RIO_10, RIO_11, RIO_12, RIO_15, RIO_16, RIO_18 및 RIO_19 마이크로새틀라이트가 국내에서 서식 중인 *Lutra lutra* 수달의 DNA와 매칭됨을 발견했다.

[0018] 따라서 본 발명의 국내 서식 수달의 개체 식별을 위한 마커는 RIO_01, RIO_02, RIO_03, RIO_04, RIO_07, RIO_08, RIO_10, RIO_11, RIO_12, RIO_15, RIO_16, RIO_18 및 RIO_19 마이크로새틀라이트로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 마이크로새틀라이트 마커이다.

[0019] 또한 본 발명은 상기 13개의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머 쌍들로 구성된 그룹으로부터 선택되는 1쌍 이상의 프라이머 세트를 제공한다. 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머로는 마이크로새틀라이트 DNA의 3' 및 5' 부위에 인접한 50 내지 300 bp 부위에 위치한 10 내지 50 bp의 연속된 각 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0020] 바람직하게는 상기 프라이머 세트는 서열번호 1 및 2, 3 및 4, 5 및 6, 7 및 8, 9 및 10, 11 및 12, 13 및 14, 15 및 16, 17 및 18, 19 및 20, 21 및 22, 23 및 24 및, 25 및 26의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 1쌍 이상의 프라이머 세트이다. 본 발명의 역방향 프라이머는 5' 말단에 특정 서열이 추가된 것일 수 있다. 상기 역방향 프라이머의 5' 말단에 특정 서열의 추가는 스터터 밴드(stutter band)로 인한 증폭산물의 분석 오류를 제거함으로써 신속하고 효과적으로 수달 개체를 식별할 수 있도록 해준다. 더욱 바람직하게는, 상기 역방향 프라이머에는 5' 말단에 GTTTCT 염기가 추가된다.

[0021] 상기 프라이머의 염기서열의 일부를 다른 염기로 치환, 삭제하거나 일부 염기서열의 위치와 방향이 바뀐 염기서열도 본 발명에 따른 프라이머의 범위에 속한다.

[0022] 또한, 본 발명의 프라이머는 생물학적 분석용 형광물질로 표지될 수 있다. 예를 들면 FAM, VIC, NED, PET 등으로 표지될 수 있으나 이에 한정되지는 않는다.

[0023] 한편, 멀티플렉스 PCR의 경우 PCR 증폭시 여러 개의 프라이머가 사용되므로 각각의 프라이머가 증폭될 때 서로 간에 간섭이 발생하여 각각의 프라이머가 완전하게 아데노신을 합성할 수 없게 하여 완전한 스터터 밴드를 제거한 증폭산물을 획득하기가 어렵다. 그로 인해 개체식별을 위한 유전자형의 결정 단계에서 오류가 발생할 수 있으며, 이 단계에서 오류는 개체식별의 의미를 퇴색시키는 결과를 가져오게 된다. 이에 본 발명자들은 이러한 오류를 최소화하기 위해 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머 중 역방향 프라이머의 5' 말단에 GTTTCT 염기를 추가하였다. 이와 같이 특정 염기서열을 포함한 역방향 프라이머를 사용하는 경우, 피크모양이 안정적이며 스터터 밴드(stutter band)가 제거되어 유전자형 결정에 적합한 모양을 나타낸다. 유전자형 결정시 전기영동상의 피크 값 0.1 차이로 다른 유전자형을 가질 수 있는데 이때 전기영동상의 피크 면적은 유전자형을 결정하는 피크 값에 영향을 미치기 때문에 이는 개체의 고유한 유전자형이 실험 단계에서의 오류로 변형될 수 있다는 것을 의미한다. 본 발명에서는 역방향 프라이머의 5' 말단에 GTTTCT 염기를 추가함으로써 이러한 오류를 최소화한 것이다.

[0024] 다른 관점에서 본 발명은 국내 서식 수달의 개체 식별용 키트를 제공하는데, 상기 키트에는 RIO_01, RIO_02, RIO_03, RIO_04, RIO_07, RIO_08, RIO_10, RIO_11, RIO_12, RIO_15, RIO_16, RIO_18 및 RIO_19 마이크로새틀라이트로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머 세트가 포함된다. 바람직하게는 상기 프라이머 세트는 서열번호 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 및 25의 정방향 프라이머 및 서열번호 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 및 26의 역방향 프라이머로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 1쌍 이상의 프라이머 세트이며, 더욱 바람직하게는 상기 역방향 프라이머의 5`말단에 GTTTCT 염기가 추가된다.

[0025] 또 다른 관점에서 본 발명은 (a) 분석하고자 하는 핵산 시료를 RIO_01, RIO_02, RIO_03, RIO_04, RIO_07, RIO_08, RIO_10, RIO_11, RIO_12, RIO_15, RIO_16, RIO_18 및 RIO_19 마이크로새틀라이트로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 1종 이상의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR로 증폭하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 증폭된 산물을 전기영동장치를 통해 검출하여 대립유전자(allele)를 검출하고 유전자형을 결정하는 단계를 포함하는 국내 서식 수달(*Lutra lutra*) 개체의 식별 방법을 제공한다. 바람직하게는 상기 (a) 단계의 프라이머는 서열번호 1 및 2, 3 및 4, 5 및 6, 7 및 8, 9 및 10, 11 및 12, 13 및 14, 15 및 16, 17 및 18, 19 및 20, 21 및 22, 23 및 24 및, 25 및 26의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 1쌍 이상의 프라이머 세트이다. 더욱 바람직하게는 상기 역방향 프라이머에는 5`말단에 GTTTCT 염기가 추가된다.

[0026] 상기 (a) 단계에서 분석하고자 하는 핵산 시료는 생물학적 시료로부터 분리될 수 있다. 상기 생물학적 시료로는 혈액, 근육조직 및 생물학적 기원의 기타 액상 샘플, 생검 표본, 모발, 모근, 조직 배양과 같은 고형 조직 샘플 또는 이로부터 유래된 세포 및 그 자손이 포함된다. 또한, 상기 샘플들은 시약처리, 가용화된 샘플 또는 배양세포, 세포 상등액 및 세포 용해물도 포함한다.

[0027] 상술한 생물학적 시료로부터의 핵산의 분리는 당업계에 공지된 방법에 따라 수행할 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서와 같이 시판되는 게놈 DNA 추출 키트를 사용하여 분리하는 것도 가능하다.

[0028] 상기 (a) 단계에서의 멀티플렉스 PCR은 당업계에 공지된 방법에 따라 각 유전자를 증폭하기에 적합한 조건으로 수행될 수 있고, 어닐링(Annealing) 온도, 증폭산물의 크기 등을 고려하여 수행할 수 있다. 예를 들면 본 발명의 일 실시예에서는 95℃에서 15분간 처리한 후 94℃에서 60초, 58℃에서 75초, 72℃에서 60초를 1 사이클로 하여 4회 반복하고, 94℃에서 60초, 57℃에서 75초, 72℃에서 60초를 1 사이클로 하여 4회 반복 후, 94℃에서 60초, 56℃에서 75초, 72℃에서 60초를 1 사이클로 하여 24회 반복한 다음 65℃에서 30분간 신장(extension)하고 4℃에서 종료하였다.

[0029] 상기 (b) 단계에서의 증폭된 PCR 산물의 크기 분석은 증폭된 산물을 자동 유전자 분석 장비를 이용하여 분리하고, 각 좌위별 대립유전자(allele)의 크기를 분석함으로써 수행할 수 있다. 예를 들면, 증폭 산물의 크기는 통상의 방법, 예컨대 아가로즈 젤 또는 아크릴아마이드 젤을 이용한 전기영동으로 실시한 후, 전개된 DNA 단편을 형광 염색 등을 하여 확인가능하다. 예를 들면 Applied Biosystems사의 염기 서열 분석 장치에 대립유전자분석

모드를 이용하여 전기영동을 실시해 프라이머의 형광물질 및 PCR 산물의 크기별로 분류하는 방법을 통하여 확인할 수 있다. 상기 단계에서의 PCR 산물의 크기 분석 방법은 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자라면 용이하게 실시가능하며, 상기 일예로 설명한 방법 이외에 통상의 모든 방법으로 수행할 수 있다.

발명의 효과

[0030] 본 발명에 따른 국내 서식 수달의 개체식별을 위한 마이크로새틀라이트 마커 및 이를 이용한 개체 식별 방법을 통해 신속하고 효과적으로 국내 서식 수달의 개체를 식별할 수 있을 뿐만 아니라 혈통분류가 가능하여 DNA 분석을 통해 과학적이고 객관적인 서식실태결과를 도출할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 본 발명의 실시예 1에 따른 국내 서식 수달(*Lutra lutra*)의 DNA와 20종의 수달 프라이머의 PCR 증폭 결과를 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0033] **<실시예 1>**

[0034] **국내 서식 수달(*Lutra lutra*)에 특이적인 마커의 선별**

[0035] **1.1 DNA 시료 및 프라이머의 준비**

[0036] 경상남도의 진주 인근지역에서 로드 킬된 수달(*Lutra lutra*) 9마리의 근육조직시료를 (사)수달생태연구센터의 협조를 통해 채취하여, 게놈 DNA 추출 키트(Promega, USA)를 이용하여 게놈 DNA를 분리하였다.

[0037] 수달의 개체식별에 효과적으로 사용될 수 있는 마이크로새틀라이트 마커를 선발하기 위해, NCBI(National Center for Biotechnology Information, 미국국립생물정보센터)에 보고되어 있는 수달의 다형성 분석용 마이크로새틀라이트(20개)에 특이적인 프라이머를 (주)바이오니아에 의뢰하여 주문 제작하였다. 사용한 프라이머 염기서열은 표 1에 나타냈다.

표 1

[0038] 수달의 다형성 분석용 마이크로새틀라이트의 프라이머

locus	Genbank Accession No.	프라이머 서열	PCR 산물(bp)
RIO01	AY268051	F:AAAAAGGGCACCTCGAGACAAT R:CATGCTTGACCTTGAGCAAC	264-280
RIO02	AY268052	F:GTAGAGTGGGGCGCCTAAG R:TGACCTTGGAAGAGACATGC	184-198
RIO03	AY268053	F:ATCAGCCTGAGTCCCTGAAC R:ACAGCCAGAACCAAAAGACA	194-218
RIO04	AY268054	F:CAAGCACCAACTCCTCAAT R:CCACAAGCCAGATTCCTCTC	255-273
RIO05	AY268055	F:GGGTTAAAGCCTCTGCCTTC R:AGGGGATACCGGATCATTTC	316-354
RIO06	AY268056	F:GCCAAGATGGCAACTACTCC R:GAAGCACATTCTCTCTCCATCA	252-264

RIO07	AY268057	F:AAGCACTTCCAGATATCAGTTGC R:CCCAACTTGAGTGGGACTTT	167-177
RIO08	AY268058	F:TTTCCAGAGCCAATTTGTCA R:CTTGCCTGCTGCTGACATTGAAG	204-214
RIO09	AY268059	F:GCTCTATTATTAGGAGCAAACCA R:AGCTGGCTTGGAATTCTCTC	252-256
RIO10	AY268060	F:CATTCGTGGACATTCGGTAA R:GGCAAGGAATCCTGGTTATG	243-259
RIO11	AY833262	F:TCTTCCACTTTCAATTTAGGTA R:GCCCAAGGTTCACTATCAG	156-168
RIO12	AY833263	F:GTATCGTCCAGGCTGCTCTC R:CCACAGCCAGCTCTGAATAA	207-213
RIO13	AY833264	F:GCTCAGCTGTGCAGAATGAT R:GCACACGTGGTAAGATGAGC	254-274
RIO14	AY833265	F:CTACCAGCCGTTTGTGTGAG R:GCTTGTCCCTCTACCTCTGC	286-294
RIO15	AY833266	F:AGTGCACAGTGGTGGTCTTG R:TCCTGATTCTGCTTGGTTCA	253-261
RIO16	AY833267	F:GGTGCTTCTTAAGGAACTGAGC R:ATTTATTGGGCATGGAAGCA	266-280
RIO17	AY833268	F:GGTTGCGAAGATAAGCAAGG R:CAAGTGTTTAAAGTGTGTGTGTGT	172-178
RIO18	AY833269	F:TTCCATTGTCTCTTGGCTTG R:CCCTCTCCACACTTGTGCTC	140-165
RIO19	AY833270	F:GGTCCCAGGTGCAAATCTTA R:GATTTGGGTCTTCCAATGGTT	273-285
RIO20	AY833271	F:CTAGCTCTGCCACCTAACCAG R:ACAGCGTGGTCCTGACCTT	245-259

[0039] **1.2 국내 수달에 특이적인 마커 선별을 위한 PCR**

[0040] 상기 실시예 1.1의 DNA 시료를 주형으로 하여 국내에서 서식하고 있는 수달의 대립유전자형 가능성을 확인하기 위해 상기 20 종류의 프라이머로 다음의 조건에서 PCR을 수행하였다.

[0041] 주형 DNA 1㎕(50ng/㎕)㎍, 프라이머 2㎕, Taq DNA 중합효소 0.5 유닛((주)GenetBio), 10ㅅ완충용액 1.5㎕, dNTP 1.2㎕의 조성에 증류수를 첨가하여 최종 부피를 15㎕로 하였다. PCR 조건은 95℃에서 5분간 처리한 후 94℃에서 60초, 50~65℃에서 60초, 72℃에서 60초를 1 사이클로하여 30회 반복하였다. 그 후 72℃에서 5분간 신장시킨 후 4℃에서 종료하였다. PCR 산물은 아가로즈 겔 전기영동법을 이용하여 PCR 증폭여부를 확인하였다(도 1).

[0042] **<실시예 2>**

[0043] **멀티플렉스 PCR**

[0044] 실시예 1을 통해 국내에서 서식하는 수달(Lutra lutra)의 대립유전자형 분석이 가능한 것으로 13개의 마이크로새틀라이트(RIO_01, RIO_02, RIO_03, RIO_04, RIO_07, RIO_08, RIO_10, RIO_11, RIO_12, RIO_15, RIO_16, RIO_18 및 RIO_19)를 최종 선발하였다.

[0045] 이에 특이적인 프라이머 쌍(서열번호 1 및 2, 서열번호 3 및 4, 서열번호 5 및 6, 서열번호 7 및 8, 서열번호 9 및 10, 서열번호 11 및 12, 서열번호 13 및 14, 서열번호 15 및 16, 서열번호 17 및 18, 서열번호 19 및 20, 서열번호 21 및 22, 서열번호 23 및 24, 서열번호 25 및 26)은 ABI(Applied Biosystems, USA)에 주문 제작하였으며, 한 쌍의 프라이머 중 정방향 프라이머 한쪽에 FAM, VIC, NED, PET 중 하나의 형광물질로 표지(Label)하였다. 마이크로새틀라이트의 명칭과 표지한 형광물질은 표 2에 기재하였다.

[0046] 선별된 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 13쌍의 프라이머 중 역방향 프라이머의 5' 말단에 GTTTCT 염기를

추가하여 다음의 방법으로 멀티플렉스 PCR을 수행하였다.

[0047] 실시예 1에서 준비한 주형 DNA 2㎕(50ng/㎕), 13개의 프라이머 쌍 8㎕, Hot starte Taq DNA 중합효소 2 유닛((주)바이오니아), 10×완충용액 1.5㎕, dNTP 1.2㎕, $MgCl_2$ 1.1㎕의 조성에 증류수를 첨가하여 최종 부피를 15㎕로 하였다. PCR 조건은 95℃에서 15분간 처리한 후 94℃에서 60초, 58℃에서 75초, 72℃에서 60초를 1 사이클로 하여 4회 반복하고, 94℃에서 60초, 57℃에서 75초, 72℃에서 60초를 1 사이클로 하여 4회 반복 후 94℃에서 60초, 56℃에서 75초, 72℃에서 60초를 1 사이클로 하여 24회 반복하였다. 그리고 65℃에서 30분간 신장(extension) 후 4℃에서 종료하였다.

표 2

[0048] 국내에 서식하고 있는 수달의 대립유전자 분석용 13개의 마이크로새틀라이트에 특이적인 프라이머

locus	Genbank Accession No.	라벨	프라이머 서열	서열번호
RIO01	AY268051	FAM	F:AAAAAGGGCACCTCGAGACAAT	1
			R:CATGCTTGACCTTGAGCAAC	2
RIO02	AY268052	VIC	F:GTAGAGTGGGGCGCCTAAG	3
			R:TGACCTTGGAAGAGACATGC	4
RIO03	AY268053	NED	F:ATCAGCCTGAGTCCCTGAAC	5
			R:ACAGCCAGAACCAAAAGACA	6
RIO04	AY268054	VIC	F:CAAGCACCAACTCCTCAAT	7
			R:CCACAAGCCAGATTCCTCTC	8
RIO07	AY268057	PET	F:AAGCACTTCCAGATATCAGTTGC	9
			R:CCCAACTTGAGTGGGACTTT	10
RIO08	AY268058	FAM	F:TTTCCAGAGCCAATTTGTCA	11
			R:CTTGCCTGCTGCTGACATTGAAG	12
RIO10	AY268060	NED	F:CATTCGTGGACATTCGGTAA	13
			R:GGCAAGGAATCCTGGTTATG	14
RIO11	AY833262	VIC	F:TCTTCCACTTTCAATTTAGGTA	15
			R:GCCCAAGGTTCACTATCAG	16
RIO12	AY833263	PET	F:GTATCGTCCAGGCTGCTCTC	17
			R:CCACAGCCAGCTCTGAATAA	18
RIO15	AY833266	PET	F:AGTGCACAGTGGTGGTCTTG	19
			R:TCCTGATTCTGCTTGGTTCA	20
RIO16	AY833267	NED	F:GGTGCTTCTTAAGGAACTGAGC	21
			R:ATTTATTGGGCATGGAAGCA	22
RIO18	AY833269	FAM	F:TTCCATTGTCTCTTGGCTTG	23
			R:CCCTCTCCACACTTGTGCTC	24
RIO19	AY833270	PET	F:GGTCCCAGGTGCAAATCTTA	25
			R:GATTTGGGTCTTCCAATGGTT	26

[0049] 멀티플렉스 PCR 산물은 ABI-3130 자동염기서열 분석장치(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 크기별로 분류되도록 전기영동하고, GeneMapper version 4.0(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 크기와 표식자의 종류별로 분류한 후 마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel, Microsoft, USA)을 이용하여 자료를 취합하였다. 취합한 결과는 표 3에 나타내었다.

표 3

[0050] 13개의 마이크로새틀라이트를 이용한 로드 킬된 수달 9 마리에 대한 대립유전자형 분석결과

No.	RIO_01		RIO_02		RIO_03		RIO_04		RIO_07		RIO_08		RIO_10		RIO_11		RIO_12		RIO_15		RIO_16		RIO_18		RIO_19	
1	244	244	200	209	181	181	261	261	151	151	207	207	234	234	160	160	209	209	250	250	268	281	187	191	280	288

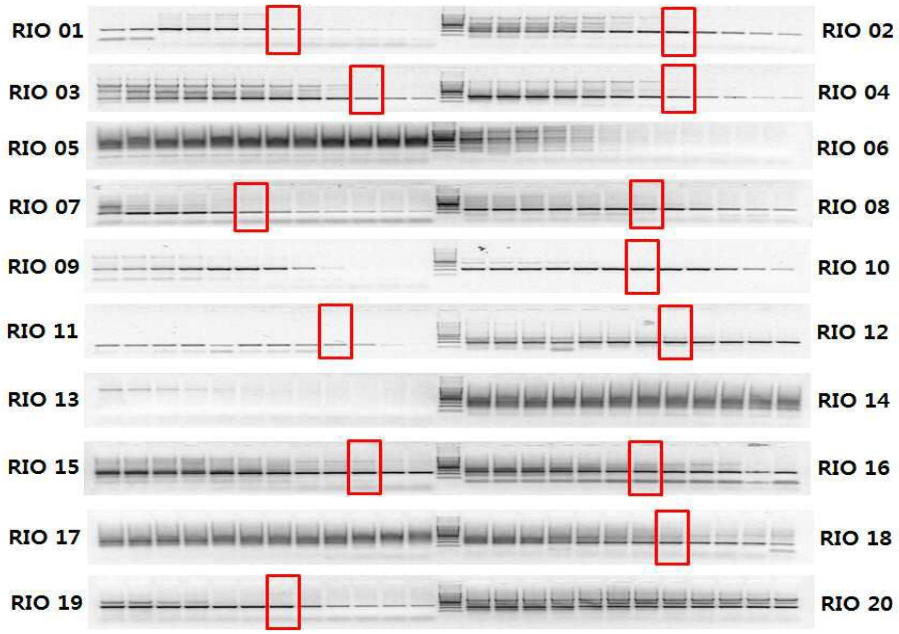
2	244	244	200	202	181	181	261	281	151	151	207	207	232	234	160	160	209	209	247	250	281	287	187	191	271	280
3	244	244	177	202	182	182	261	261	151	151	207	207	232	232	160	160	209	209	247	250	280	280	187	191	275	279
4	-	-	202	209	181	187	-	-	151	151	-	-	232	234	160	160	209	209	247	250	281	287	191	191	-	-
5	244	244	200	209	181	181	261	261	151	151	205	207	232	234	160	160	209	209	247	250	281	281	187	191	275	280
6	244	244	202	209	181	181	260	264	151	151	205	208	232	232	160	160	209	209	247	250	278	295	191	191	279	279
7	244	244	202	202	181	181	265	275	151	151	205	205	232	234	160	160	209	209	247	250	281	285	187	191	284	288
8	244	244	200	202	181	187	261	275	151	151	205	207	232	234	160	160	208	208	247	250	281	281	191	191	276	288
9	244	244	202	209	181	187	261	261	151	151	207	207	232	234	160	160	209	209	247	247	281	281	191	191	280	284

[0051] 표 3의 결과를 통해 본 발명의 마이크로새틀라이트 마커를 이용하면 국내 서식 중인 수달 개체를 효과적으로 식별할 수 있음을 알 수 있다.

[0052] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

도면1



서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Microsatellite Markers for Individualization in Otter and

Individualizing Method Using the Same

<160> 26

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_01 forward primer

<400> 1

aagggcacct cgagacaat 19

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_01 reverse primer

<400> 2

gtttctcatg cttgaccttg agcaac 26

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_02 forward primer

<400> 3

gtagagtggg gcgcctaag 19

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_02 reverse primer

<400> 4

gtttcttgtc cttggaagag acatgc 26

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_03 forward primer

<400> 5

atcagcctga gtccctgaac 20

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_03 reverse primer

<400> 6

gtttctacag ccagaaccaa aagaca 26

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_04 forward primer

<400> 7

caagcaccaa ctcctcaat 19

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_04 reverse primer

<400> 8

gtttctccac aagccagatt cctctc 26

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_07 forward primer

<400> 9

aagcacttcc agatatcagt tgc 23

<210> 10

<

211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_07 reverse primer

<400> 10

gtttctccca acttgagtgg gacttt 26

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_08 forward primer

<400> 11

tttccagagc caatttgtca 20

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_08 reverse primer

<400> 12

gtttctcttg cctgctgaca ttgaag 26

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_10 forward primer

<400> 13

cattcgtgga cattcggtaa 20

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_10 reverse primer

<400> 14

gtttctggca aggaatcctg gttatg 26

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_11 forward primer

<400> 15

tcttccactt ttcaatttag gta 23

<210> 16

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_11 reverse primer

<400> 16

gtttctgccc aaggttcact atcaag 26

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_12 forward primer

<400> 17

gtatcgtcca ggctgctctc 20

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_12 reverse primer

<400> 18

gtttctccac agccagctct gaataa 26

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_15 forward primer

<400> 19

agtgcacagt ggtggtcttg 20

<210> 20

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_15 reverse primer

<400> 20

gtttcttcct gattctgctt ggttca 26

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_16 forward primer

<400> 21

ggtgcttctt aaggaactga gc 22

<210> 22

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_16 reverse primer

<400> 22

gtttctattt attgggcatg gaagca 26

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_18 forward primer

<400> 23

ttccattgtc tcttggcttg 20

<210> 24

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_18 reverse primer

<400> 24

gtttctccct ctccacactt gtgctc 26

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_19 forward primer

<400>

25

ggtcccaggt gcaaatctta 20

<210> 26

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RIO_19 reverse primer

<400> 26

gtttctgatt tgggtcttcc aatggtt 27