(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년10월08일
(11) 등록번호 10-2163233
(24) 등록일자 2020년09월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/689 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/689 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-0100078
(22) 출원일자 2019년08월16일
심사청구일자 2019년08월16일
(56) 선행기술조사문헌
CN105255882 B*
GenBank accession No.CP015463 (2016.07.15.)*
Genbank accession No. CP015458 (2016.07.15.)*
WANG et al, Journal of Integrative Agriculture 2019, 18(3): 580-589
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충북대학교 산학협력단
충청북도 청주시 서원구 충대로 1 (개신동)
(72) 발명자
정종욱
충청북도 청주시 서원구 수곡로 88, 102동 807호 (수곡동, 세원홍실아파트)
안혜진
충청북도 청주시 흥덕구 송화로214번길 29, 102동 2102호(송절동, 테크노폴리스우미린)
이화용
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 만수1길 40-15, 202호
(74) 대리인
최규환

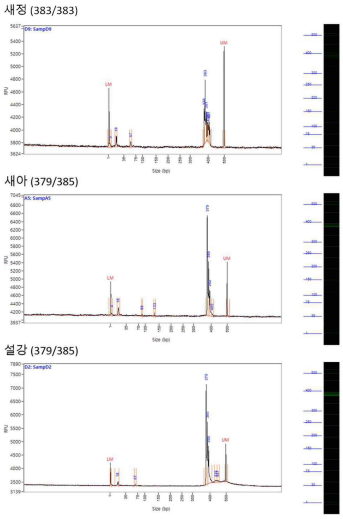
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **양송이 품종 새정, 새아, 설강 구별을 위한 SSR 프라이머 세트 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 양송이 품종 구별을 위한 SSR 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 분자마커는 국내에서 개발된 양송이 신품종 새정, 새아 및 설강을 효과적으로 판별할 수 있으므로, 국산 양송이의 품종 보호 및 불법 유통 방지에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	213007053SBJ30
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	Golden Seed 프로젝트
연구과제명	수입대체형 양송이 품종개발 및 보호를 위한 마커 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충북대학교
연구기간	2017.01.01 ~ 2021.12.31

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 양송이(*Agaricus bisporus*) 품종 새정(Sae Jeong), 새아(Sae-Ah) 및 설강(Seolgang) 구별용 SSR(simple sequence repeat) 프라이머 세트.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항의 SSR 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 양송이 품종 새정(Sae Jeong), 새아(Sae-Ah) 및 설강(Seolgang) 구별용 키트.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것인 키트.

청구항 5

양송이 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항의 SSR 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계를 포함하는 양송이 품종 새정(Sae Jeong), 새아(Sae-Ah) 및 설강(Seolgang)을 구별하는 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 증폭 단계의 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 양송이 품종 새정, 새아, 설강 구별을 위한 SSR 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 분자생물학의 급속한 발전으로 DNA 수준에서 유전자원의 다양성(bio-diversity) 연구를 가능케 하는 핵산 지문 분석 방법 및 다양한 DNA 마커들이 개발되었다. 이를 통해 유용 형질의 탐색, 생물의 종 판별, 품종 분류·동정 및 집단 개체군의 유연관계 분석 등을 간단하고 신속하게 수행할 수 있게 되었다. 지금까지 개발된 PCR(polymerase chain reaction)을 이용한 지문분석법(fingerprinting)에는 RAPD(randomly amplified polymorphic DNA) 방법, AFLP(amplified fragment length polymorphic DNA) 방법, SSR(simple sequence repeat) 방법 등이 있다. 상기 방법 중 RAPD 방법은 비특이적 PCR 산물이 증폭되므로 재현성이 떨어지는 단점이 있고, AFLP 방법은 높은 DNA 다형성(polymorphism) 검출로 각광을 받고 있지만 재현성이 떨어지는 밴드의 출현

과 분석이 복잡하다.

[0003] 이에 반해 SSR(simple sequence repeat) 분석법은 재현성이 매우 뛰어나며, 식물 집단들 내에서 유전자좌(gene locus)마다 많은 대립인자들을 가지고 있고 대립유전자의 특성을 명확하게 나타낼 수 있어 식물의 유전적 다양성, 계통유연관계를 분석하고 지문분석법(fingerprinting)과 분자 맵핑(molecular mapping) 등에 활용되고 있다.

[0004] 양송이(*Agaricus bisporus*)는 전 세계적으로 가장 널리 재배되는 식용버섯으로, 당질, 단백질, 비타민, 무기질 등과 같은 영양소가 골고루 함유되어 있고 독특한 맛과 향을 지니고 있다. 양송이의 성양식은 담자포자(basidiospore)를 형성하여 이루어진다. 양송이의 담자기(basidium)에서 형성되는 담자포자 중 95%는 2개의 담자포자를 형성하고, 4.5%는 3개, 0.5%는 4개를 형성한다. 95%의 2개의 담자포자를 형성하는 개체 중에서 63%는 2개의 이질핵체를 가지고, 32%는 2개의 동질핵체를 가진다. 나머지 5% 중에서 4.5%는 포자의 수가 3개이고 핵을 1개 또는 동질핵체 2개를 가지며, 0.5%만 포자의 수가 4개이고 포자내 핵의 수가 1개인 것으로 알려져 있다. 이처럼 복잡한 양송이 버섯의 성양식은 품종육성에 제한요인이 되고 있으며, 다양한 품종이 육성되어 있는 느타리버섯과 달리 양송이 균사에는 꺽쇠연결(clamp connection)이 존재하지 않기 때문에 교잡 후 균사의 형태에 의한 교잡확인이 쉽지 않아 품종육성속도가 느린편이다.

[0005] 양송이는 느타리, 팽이, 큰느타리(새송이), 표고에 이어 5번째로 많이 재배되고 있고, 국내 버섯 총 생산량의 약 5.3%를 차지한다. 과거에는 미국, 유럽, 호주에 있는 거대 종균회사로부터 종균을 수입하여 국내 농가에서 양송이를 재배하였으나, 농촌진흥청에서 국내 최초로 단포자 교잡방법으로 개발된 새아(Sae-Ah)를 시작으로 새정(Sae Jeong), 새연(Saeyeon), 새도(Saedo), 새한(Saehan)과 같이 우리나라 재배환경에 적합한 국산 양송이 품종을 개발하였고, 특히 새정과 새도 품종은 외국 품종에 비해 품질의 우수함을 인정받고 있다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제0996968호에는 느타리버섯(Oyster Mushroom)에서 유래한 '버섯에서 유래된 SSR 프라이머 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2014-0125912호에는 '새송이 버섯 변이균주 검출용 프라이머 및 이를 이용한 검출 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 양송이 품종 새정, 새아, 설강 구별을 위한 SSR 프라이머 세트 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 양송이 신품종 새정(Sae Jeong), 새아(Sae-Ah), 설강(Seolgang)의 게놈 서열을 분석하여 2개의 SSR(simple sequence repeat) 마커를 발굴하고, 상기 SSR 마커를 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 제작하여 DNA 시료들을 분석한 결과, 본 발명의 SSR 분자마커가 양송이 품종 새정, 새아 및 설강을 명확하게 구별할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 양송이(*Agaricus bisporus*) 품종 구별용 SSR(simple sequence repeat) 프라이머 세트를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 SSR 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 양송이 품종 구별용 키트를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 SSR 프라이머 세트를 이용하여 양송이 품종을 구별하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 양송이 품종 구별용 SSR 분자마커는 저비용, 고효율로 국내에서 개발된 양송이 신품종 새정, 새아 및 설강을 효과적으로 판별할 수 있을 뿐만 아니라 양송이의 품종 보호 및 분자육종 연구 등에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명의 프라이머 세트 AB-gSSR-0238(서열번호 1 및 2)를 이용하여 양송이 품종 새정, 새아 및 설강을

구별한 DNA 단편 분석(fragment analyzer) 결과이다.

도 2는 본 발명의 프라이머 세트 AB-gSSR-1142(서열번호 3 및 4)을 이용하여 양송이 품종 새정, 새아 및 설강을 구별한 DNA 단편 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 양송이(*Agaricus bisporus*) 품종 구별용 SSR(simple sequence repeat) 프라이머 세트를 제공한다.

[0014] 본 발명의 프라이머 세트에 있어서, 상기 양송이 품종은 국내에서 개발된 새정(Sae Jeong; 품종 등록번호 5567), 새아(Sae-Ah; 품종 등록번호 4013) 및 설강(Seolgang; 품종 등록번호 4378)일 수 있다.

[0015] 본 발명에 따른 상기 2개의 SSR 프라이머 세트를 동시에 이용하면 양송이 품종 새정, 새아 및 설강을 모두 구별할 수 있다.

[0016] 상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라 서열번호 1, 2, 3 및 4의 서열 내의 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1의 프라이머(22개 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 1의 서열 내의 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 서열번호 1 내지 4의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다. 상기 서열번호 중 홀수 번호의 올리고뉴클레오티드는 프라이머는 정방향 프라이머이며, 짝수 번호의 올리고뉴클레오티드 프라이머는 역방향 프라이머이다.

[0017] 본 명세서에 있어서, 용어 "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복합도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.

[0018] 본 발명에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 SSR 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 양송이 품종 구별용 키트를 제공한다.

[0020] 본 발명의 키트에서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 버퍼 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨 및 키트를 포함하는 패키지의 표면상에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

[0021] 본 발명의 양송이 품종 구별용 키트에 있어서, 상기 양송이 품종은 바람직하게는 새정(Sae Jeong; 품종 등록번호 5567), 새아(Sae-Ah; 품종 등록번호 4013) 및 설강(Seolgang; 품종 등록번호 4378)일 수 있다.

[0022] 본 발명은 또한, 상기 SSR 프라이머 세트를 이용하여 양송이 품종을 구별하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 구체적으로는,

[0023] 양송이 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;

[0024] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 SSR 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

[0025] 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 방법에 있어서, 상기 양송이 품종은 국내에서 개발된 새정(Sae Jeong; 품종 등록번호 5567), 새아(Sae-Ah; 품종 등록번호 4013) 및 설강(Seolgang; 품종 등록번호 4378)일 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명의 SSR 프라이머 세트 2개를 동시에 이용하면 양송이 품종 새정, 새아 및 설강을 모두 구별할 수

있다.

[0028] 본 발명의 방법은 양송이 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 양송이 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, CTAB 방법을 이용할 수도 있고, Wizard prep 키트(Promega 사)를 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 SSR 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy-5 또는 Cy-3이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 올리고뉴클레오티드 프라이머 조합은 상기에 기재된 바와 같다.

[0030] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 양송이 품종을 구별하는 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하며, 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 모세관 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 모세관 전기영동을 수행할 수 있다. 모세관 전기영동은 예를 들면, ABI Sequencer를 이용할 수 있다. 또한, 겔 전기영동을 수행할 수 있으며, 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

[0031] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0032] **재료 및 방법**

[0033] **1. 양송이 균사체의 DNA 추출**

[0034] 퇴비 추출 배지(compost dextrose agar; CDA)의 상면에 셀로판을 깔고 배양한 양송이 품종 새정, 새아 및 설강의 균사체를 수확하여 액체질소에 얼린 후 막자사발로 곱게 갈아 GeneAll® GenEx™ Plant 키트(GeneAll, 한국)로 게놈 DNA를 추출하였다.

[0035] 우선, 튜브에 옮겨 담은 균사에 PL 버퍼 500 ㎕를 넣어 65℃에서 10분간 가열하여 파이펫으로 섞어주고, 13,000 rpm으로 1분간 원심분리하고 상층액을 분리하여 새 튜브로 옮겨준 후 PP 버퍼를 상층액의 1/3만큼 넣고 볼텍서(vortexer)로 혼합하였다. 상기 혼합물을 얼음에서 5분간 방치한 후 13,000 rpm으로 5분간 원심분리하고, 상층액을 분리하여 새 튜브로 옮겨준 다음 동량의 PCI(phenol:chloroform:isoamylalcohol=25:24:1)를 첨가하여 흔들어 섞어주었으며, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 분리하여 새 튜브에 옮기고 동량의 아이소프로판올(isopropanol)을 넣어 흔들어 섞은 후 얼음에서 10분간 방치하고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 70% 에탄올 1 ㎖을 넣어 DNA 펠렛을 살짝 띄우고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리한 후 상층액을 다시 제거하고 13,000 rpm에서 1분간 한번 더 원심분리하였다. 남은 에탄올은 전부 제거하고 DNA 펠렛을 상온에서 5분간 건조시킨 후 RE 버퍼 100 ㎕를 넣어 DNA 펠렛을 녹여주었다.

[0036] **2. SSR 마커 확보 및 프라이머 디자인**

[0037] 양송이 품종 새정, 새아 및 설강을 구별할 수 있는 마커 염기서열을 확보하기 위하여 양송이 균주 ASI 1038 및 ASI 1346에서 분리된 S1038-211, S1346-110, S1346-15, S1346-17, S1346-20 및 S1346-26(Mycobiology, 2018, 46(4), 421-428)을 Illumina MiSeq platform을 이용하여 분석된 양송이 전장유전체를 이용하였으며, MIcroSAtellite 소프트웨어(http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/)를 사용하여 SSR(simple sequence repeat)을 포함하고 있는 염기서열을 확보하였다(표 1). 상기 확보된 SSR 마커를 증폭하기 위한 프라이머는 Primer 3 Plus(http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi)를 이용하였으며, 프라이머 염기서열의 길이는 22 bp, PCR산물의 크기는 200~300 bp, 최적 결합(annealing) 온도는 55~57℃(최적 56℃), GC

Contents는 50~60%(최적 51%)로 제작되었다(표 2). 농촌진흥청 국립원예특작과학원(http://www.nihhs.go.kr)에서 양송이 품종 새정 및 새아의 교배조합 및 육성 내용을 확인할 수 있으며, 양송이 품종 설강은 단핵균주 CM020913-27과 단핵균주 SSU413-31의 교잡을 통해 육성된 계통임을 알 수 있다(종자원, http://www.seed.go.kr; 품종 등록번호 4378).

표 1

양송이 SSR 염기서열 정보

AB-gSSR-0238의 염기서열 (서열번호 5)
TGATTCGAGATGGAAATTCTTCGAGCCGCGGTGTAGGCGAGATCCCACCCTGACGAAAGATGAATGTGTGTGTGTGTGCGC CACACTGGTAAAAGGCCTCAGTGAAGTTCCTTTTCCTATTGCGTGGCGTTGTTGACCAAACGAATGTTCTGGGTGTACGGG TGCTATTCGGTGTGTGTGTGTGTGATAAGGAAGAACGGATTCTATCGCCGAGTCAGTCGGATGATAGCGATACTCGATACGAG CAAAGTGGGTCGGTGGGAGGAAGAGGAGCTTCCTTATCCATGCGTTGAATCAAGAGAGAAGTGTTCAGCTATGCATATATG AGATCTTGAGAACTCGGACGAGATCTCACCATCAGAACGTACCGTCTTAT
AB-gSSR-1142의 염기서열 (서열번호 6)
GACGCAAGAGGAATTAGATGAGCAACTTGCAAGACGTCTTATGCTTGAAGAACAAGAACAAGCTCAAGAGCTGTGGCAACA GCAACAGCAACAACAACAACAACAGCGACGCCCTCAATTACAAACTCGGGCAGCAGCAGCAGCAGCAACAACAGCAACCGA ATGCTGCAGGTGGCAACGATACTCTGAGCGAAGTTCAAGAGCACTTTAATAGGATTGCAGCGTGTGAGTCTCAGTGCAGTA CGAAATGGTCAGAAGAAACTCATTATGTTGTAGCTGGAAAGAAGACCTTTGGGGCATTCATGGAGAAAGTCAAAGCCAAGA TTCA

파란색 : 정방향 프라이머 위치
빨간색 : SSR 반복 모티프 위치
초록색 : 역방향 프라이머 위치

[0038]

표 2

[0039] 프라이머 서열 정보

프라이머 명칭	프라이머 서열(5'→3') (서열번호)
AB-gSSR-0238	F: TGATTCGAGATGGAAATTCTTC (1)
	R: ATAAGACGGTACGTTCTGATGG (2)
AB-gSSR-1142	F: GACGCAAGAGGAATTAGATGAG (3)
	R: TGAATCTTGGCTTTGACTTTCT (4)

[0040] **3. 중합효소연쇄반응(PCR) 및 유전자 단편분석**

[0041] 상기 추출한 게놈 DNA 20 ng을 주형으로 하고 표 2의 SSR 프라이머 세트를 이용하여 하기 표 3의 조건으로 PCR을 수행하였다. PCR로 증폭된 산물은 Fragment Analyzer(Advanced Analytical Technologies Inc., 미국)를 이용하여 분석하였다.

표 3

[0042] PCR 반응 조건

단계	온도(℃)	시간
전-변성	95	3분
변성	95	30초
결합	56	30초
신장	72	20초
변성 단계로 돌아가 35회 추가 반복		
최종 신장	72	5분
보관	4	∞

[0043] **실시예 1. SSR 분자마커를 이용한 양송이 품종 새정, 새아 및 설강의 구별**

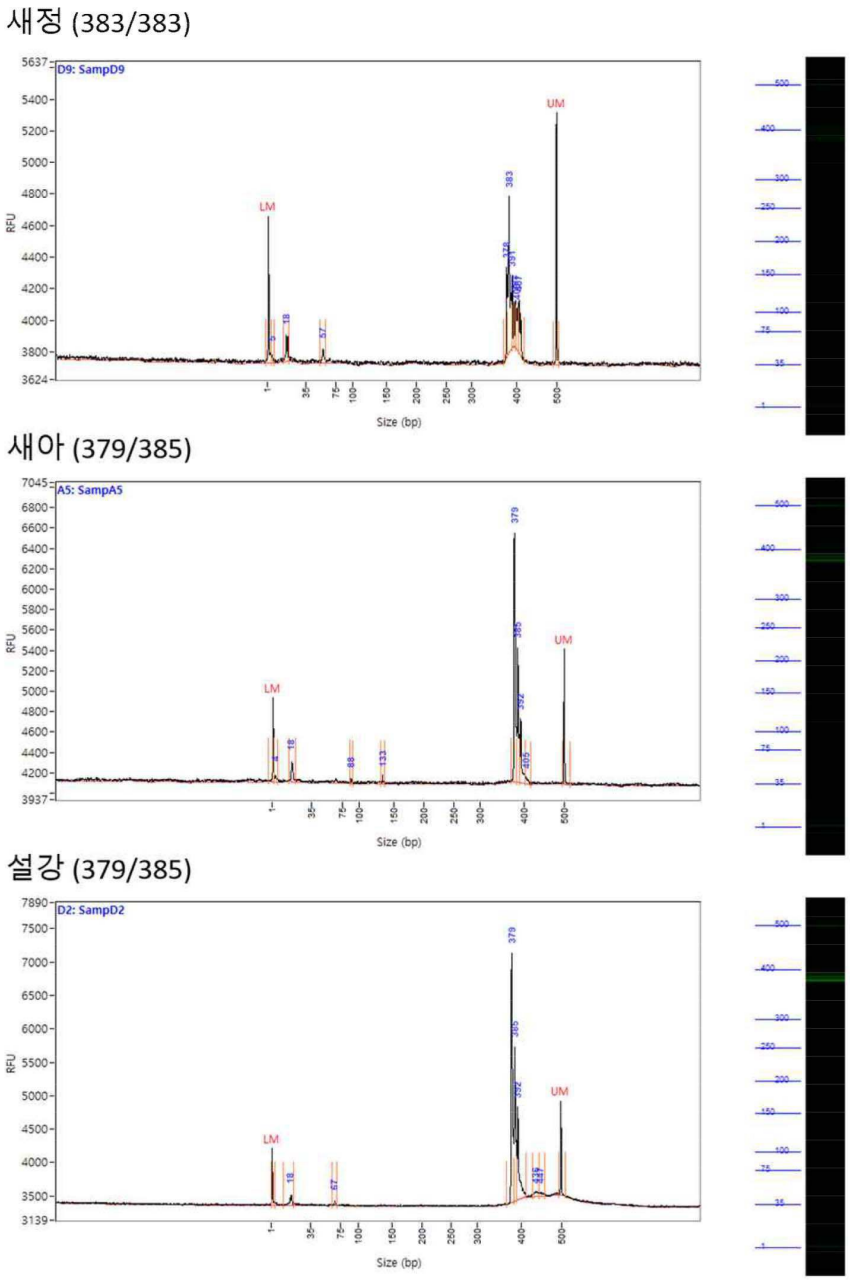
[0044] 상기 표 1의 SSR 프라이머 세트를 이용하여 양송이 품종 새정, 새아 및 설강의 DNA 시료를 주형으로 하여 PCR을

수행하였고, PCR을 통해 증폭된 산물을 유전자 단편분석하여 PCR 산물의 크기를 비교함으로써, 각각의 프라이머 세트가 검출할 수 있는 양송이 품종을 확인하였다.

[0045] 그 결과, 프라이머 세트 AB-gSSR-0238을 이용한 경우 새정은 383/383 bp, 새아는 379/385 bp 및 설강은 379/385 bp 크기로 구별할 수 있었고(도 1), 프라이머 세트 AB-gSSR-1142를 이용한 경우 새정은 336/342 bp, 새아는 331/337 bp 및 설강은 336/342 bp 크기로 구별할 수 있었다(도 2). 다만, 프라이머 세트 AB-gSSR-0238을 이용한 경우에는 새아와 설강의 크기가 동일하게 나타났고, 프라이머 세트 AB-gSSR-1142을 이용한 경우에는 새정과 설강의 크기가 동일하게 나타났으므로, 프라이머 세트 AB-gSSR-0238과 AB-gSSR-1142를 모두 이용해야 국내 양송이 품종 새정, 새아 및 설강을 명확하게 구별할 수 있음을 알 수 있었다. 상기 각 품종의 크기에서 왼쪽과 오른쪽 크기가 같으면 동형접합체(homozygote), 왼쪽과 오른쪽의 크기가 다르면 이형접합체(heterozygote)를 의미한다.

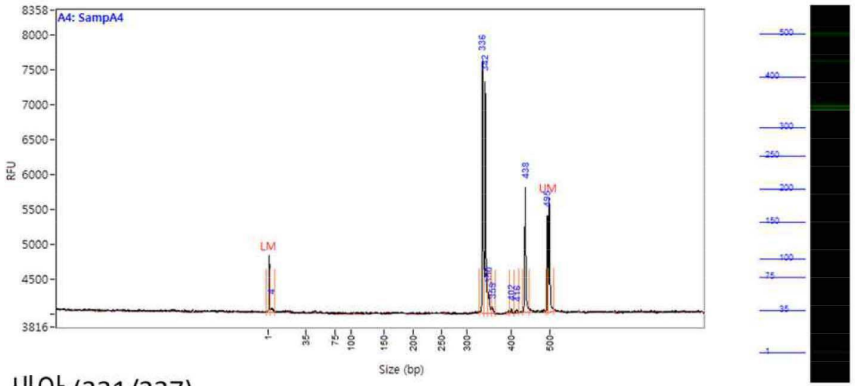
도면

도면1

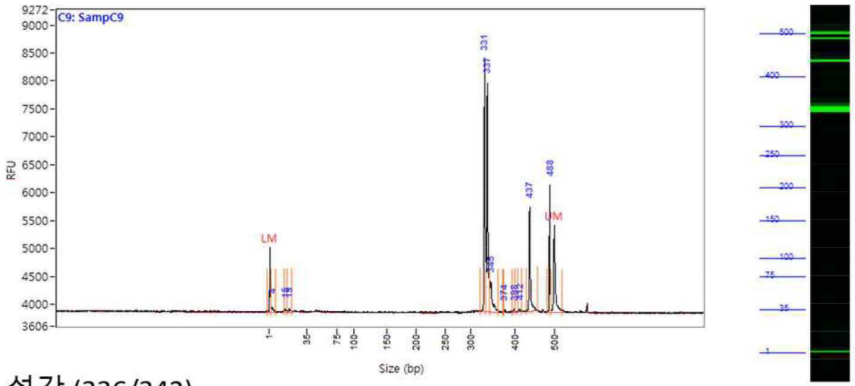


도면2

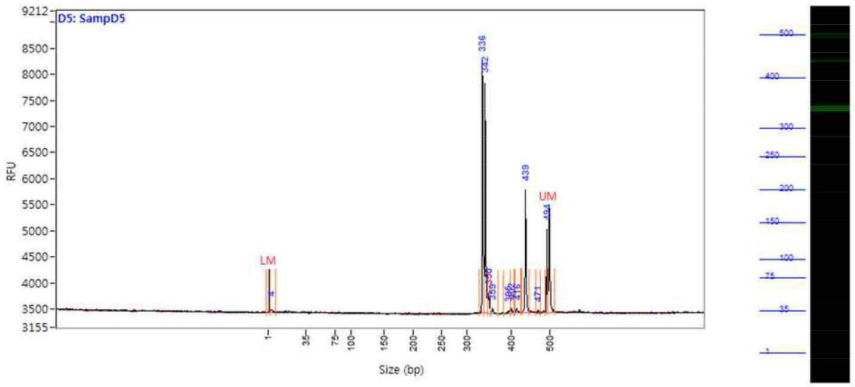
새정 (336/342)



새아 (331/337)



설강 (336/342)



서 열 목 록

<110> Chungbuk National University Industry-Academic Cooperation Foundation

<120> SSR primer set for discriminating Agaricus bisporus cultivar Sae Jeong, Sae-Ah, Seolgang and uses thereof

<130> PN19095

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

tgattcgaga tggaaattct tc 22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ataagacggt acgttctgat gg 22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

gacgcaagag gaattagatg ag 22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

tgaatcttgg ctttgacttt ct 22

<210> 5

<211> 374

<212> DNA

<213> Agaricus bisporus

<400> 5

tgattcgaga tggaaattct tcgagccgcg gtgtaggcga gatcccaccc tgacgaaaga 60

tgaatgtgtg tgtgtgtgcg ccacactggt aaaaggcctc agtgaagttc cttttcctat 120

tgcgtggcgt tgttgaccaa acgaatgttc tgggtgtacg ggtgctattc ggtgtgtgtg 180

tgtgataagg aagaacggat tctatcgccg agtcagtcgg atgatagcga tactcgatac 240

gagcaaagtg ggtcggtggg aggaagagga gcttccttat ccatgcgttg aatcaagaga 300

gaagtgttca gctatgcata tatgagatct tgagaactcg gacgagatct caccatcaga 360

acgtaccgtc ttat 374

<210> 6

<211> 328

<212> DNA

<213> Agaricus bisporus

<400> 6

gacgcaagag gaattagatg agcaacttgc aagacgtctt atgcttgaag aacaagaaca 60

agctcaagag ctgtggcaac agcaacagca acaacaacaa caacagcgac gccctcaatt 120

acaaactcgg gcagcagcag cagcagcaac aacagcaacc gaatgctgca ggtggcaacg 180

atactctgag cgaagttcaa gagcacttta ataggattgc agcgtgtgag tctcagtgca 240

gtacgaaatg gtcagaagaa actcattatg ttgtagctgg aaagaagacc tttggggcat 300

tcatggagaa agtcaaagcc aagattca 328