

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0140317 (43) 공개일자 2014년12월09일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/68 (2006.01) C12Q 1/02 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)	(71) 출원인 부경대학교 산학협력단 부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)	
(21) 출원번호 10-2013-0061018	(72) 발명자 김동수 부산 남구 분포로 113, 214동 1002호 (용호동, 엘 지메트로시티아파트)	
(22) 출원일자 2013년05월29일 심사청구일자 2013년05월29일	남윤권 부산 남구 분포로 113, 223동 903호 (용호동, 엘 지메트로시티아파트) (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 최규팔, 이하연	

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 해양수산생물의 DNA 추출 방법

(57) 요약

본 발명은 방대한 유전적 다양성을 보유하고 있는 해양수산생물로부터 채취된 미량의 조직 및 세포들을 대상으로 PCR 분석에 사용될 수 있는 양질의 순수한 DNA를 신속하고 손쉽게 추출할 수 있는 조직 용해용 완충액을 이용한 새로운 DNA 추출 방법에 관한 것으로, 해양수산생물로부터 채취한 조직을 비이온성 계면활성제와 비드를 포함하

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



는 DNA 추출용 용해 버퍼에서 배양하고, 단백질을 분해 효소를 불활성화시키는 단계를 포함하는 DNA 추출 방법에 의하면, 살아있는 어류의 조직 시료 및 동식물 플랑크톤, 연체동물의 조직 시료 등 다양한 해양수산 동식물들로부터 최대 7 분 이내에 신속하고 간편하게 PCR에 이용할 수 있는 양질의 순수한 DNA를 제공할 수 있으며, 신선한 조직 뿐 아니라 장기간 보관되었던 조직을 대상으로도 잘 적용될 수 있으며, 본 발명에 따라 추출된 DNA 용액을 장기간 보관한 후에도 처리 직후와 동일 수준의 PCR 결과를 보여주므로 안정적으로 유전자의 반복 확인이 가능하며 해양수산생물의 다양한 유전자 정보를 확보하는데 이바지할 수 있을 것으로 기대된다.

(72) 발명자

박철홍

경남 함양군 백전면 내천길 18-1, 디노빌영어조합
법인

김연경

부산 금정구 금강로 502, 203동 702호 (구서동, 롯데캐슬골드1단지)

특허청구의 범위

청구항 1

해양수산생물로부터 채취한 조직 또는 세포를 비이온성 계면활성제, 비드(bead) 및 단백질 분해효소를 포함하는 조직 용해용 완충액 중에서 배양하고,

90 내지 100 °C에서 단백질 분해효소를 불활성화시키는 단계를 포함하는, 해양수산생물의 DNA 추출 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 비이온성 계면활성제는 NP40(Nonidet P-40; Octylphenoxy polyethoxy ethanol) 및 Tween 20 인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, NP40(Nonidet P-40; Octylphenoxy polyethoxy ethanol) 및 Tween 20를 1:1의 비율로 사용하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 비드는 직경 1.0 내지 50.0 μm 인 글라스 비드인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 비드는 완충액 중에 0.5 내지 1.0 %(v/v)의 양으로 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 완충액 중에 단백질 분해효소 K를 50 내지 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 배양 중에 1,400 내지 3,200 rpm에서 5 내지 10 초 동안 비드비팅을 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

비이온성 계면활성제로서 1:1 비율의 NP40(Nonidet P-40; Octylphenoxy polyethoxy ethanol) 및 Tween 20, 비드(bead) 및 단백질 분해효소를 필수 구성성분으로 하는 해양수산생물의 DNA 추출용 완충액 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 10 mM Tris-Cl; pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 1.0% NP 40, 1.0% Tween 20, 비드 및 단백질 분해효소 K를 포함하는 것을 특징으로 하는 해양수산생물의 DNA 추출용 완충액 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 해양수산생물의 DNA 추출 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 방대한 유전적 다양성을 보유하고 있는 해양수산생물로부터 채취된 미량의 조직 및 세포들을 대상으로 PCR 분석에 사용될 수 있는 양질의 순수한 DNA를 신속하고 손쉽게 추출할 수 있는 조직 용해용 완충액을 이용한 새로운 DNA 추출 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 해양수산생물은 인류의 중요한 단백질 공급원인 동시에 방대한 유전적 다양성을 보유하여 미래 유용 유전자 자원을 발굴할 수 있다는 측면에서 매우 중요시된다. 이러한 점에서, 해양수산생물의 멸종을 예방하고 육상에서

발굴할 수 없는 특수 기능 단백질 및 유전자를 발굴, 이용하기 위한 해양수산생물 유전자 소재의 대량 발굴 작업이 요구되고 있다.

- [0003] 이들 연구를 위해 처음 실시되는 분자생물학적 방법으로는 PCR(polymerase chain reaction)이 가장 일반적으로 사용되고 있으며, 이는 순수 분리된 DNA 뿐만 아니라 부분적으로 간단히 추출된 DNA 역시 사용 가능하다는 장점을 갖는다. 따라서, 다량의 시료로부터 DNA의 큰 손상 없이 신속하고 간편하게 DNA를 추출하는 기술이 요구되며, 특히 고가 및 희귀어종의 경우 어체를 살려둔 채로 최소한의 조직 시료만을 이용하여 DNA를 추출할 수 있는 기술이 필수적이다.
- [0004] 해양수산생물로부터 DNA를 추출하는 방법으로는, 종래 사람이나 포유동물에서 사용되는 방법인 페놀과 클로로포름을 사용하는 과정이 포함되는 DNA 추출 방법이 일반적으로 사용되고 있으며, 미세조류는 식물에서 사용되는 DNA 추출법을 사용하고 있다. 이러한 전통적인 방법은 많은 단계로 인해 장시간이 소요되고 집중을 필요로 하며, DNA 회수율도 작업자의 노련성에 따라 크게 좌우되므로, 경험이 없는 작업자의 수작업에 의해 잘못된 결과가 유발될 수 있다.
- [0005] 기존의 페놀/클로로포름 혹은 페놀/클로로포름/아이소아밀 알콜(phenol/chloroform/isoamyl alcohol)을 사용하여 DNA를 추출하는 방법은, DNA를 회수하기 위한 에탄올(혹은 아이소프로판올) 침전 등의 과정을 포함하여 많은 단계와 시간을 필요로 할 뿐 아니라, 인체에 유해한 페놀과 클로로포름을 사용한다는 문제가 있다. 또한, 종래의 식물 DNA 추출법은 식물세포를 효소 또는 복잡한 시약 등을 이용하는 화학 처리 방법(Holm, C., D.W. Meeks-Wagner, W.L. Fangman and D. Bostein. 1986. A rapid, efficient method for isolating DNA from yeast. *Gene*. 42;169-173; Lippke, J.A., Strzempko, M.N., Raia, F.F., Simon, S.L. and French, C.K. 1987. Isolation of intact high-molecular weight DNA by using guanidine isothiocyanate. *Applied and Environmental Microbiology*. 53; 2588-2589; Verma, A. and Kwon-Chung, K.J. 1991. Rapid Method to extract DNA from *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Clinical Microbiology*. 29(4); 810-812)이나, 비드비팅을 이용한 물리적 처리 방법(Cardinali, G., Liti, G. and Martini, A. 2000. Non-radioactive dot-blot DNA reassociation for unequivocal yeast identification. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 50;931-936)으로 세포를 파쇄한 후, DNA가 부착되는 막을 이용하여 DNA를 분리하는 단계를 거친다. 그러나 이러한 방법은 미세조류를 완전히 액화시키는 데 약 10분 내지 1시간 정도 소요되고, 그 후의 추출과정이 복잡하여 많은 시약들과 한 시간 반 이상의 시간이 소요되는 등 많은 단점을 가지고 있다.
- [0006] 따라서 대량의 시료를 처리해야 하는 실험을 반복적으로 수행할 때 재현성 있는 결과를 얻을 수 있고, 다양한 체구성요소를 가진 해양수산생물로부터 DNA를 추출하는 경우 더욱 간단하고 광범위하게 적용할 수 있는 방법에 대한 요구가 증가하고 있으며, 이에 따라 해양수산생물의 특성에 적합하도록 DNA를 추출할 수 있는 방법들이 고안되어 왔다(Banerjee, S.K., Makdisi, W.F., Weston, A.P., Mitchell, S.M. and Campbell, D.R. 1995. Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. *Biotechnology*. 18;768; Estoup, A., Largiader, C.R., Perrot, E. and Chourrout, D. 1996. Rapid one-tube DNA extraction for reliable PCR detection of fish polymorphic markers and transgenes. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 5;295-298; Nelson, R.J., Beacham, T.D. and Small, M.P. 1998. Microsatellite analysis of the population structure of a Vancouver Island sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stock complex using nondenaturing gel electrophoresis. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 7;312-319; Taris, N., Baron, S., Sharbel, T.F., Sauvage, C. and Boudry, P. 2005. A combined microsatellite multiplexing and boiling DNA extraction method for high throughput parentage analyses in the Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture Research*. 36;516; Aranishi, F. and Okimoto, T. 2006. A simple and reliable method for DNA extraction from bivalve mantle. *Journal of Applied Genetics*. 47;251-254).
- [0007] 또한, 최근에는 해양수산생물이 지닌 독특한 조직 시료를 대상으로 DNA 추출 연구가 진행되고 있는데, 특히 어류를 살려둔 채로 지느러미, 피, 비늘, 구강상피세포, 정자, 알로부터 DNA를 추출하는 방법이 고안되어 있다(Cummings, A.S. and Thorgaard, G.H. 1994. Extraction of DNA from fish blood and sperm. *Biotechniques*. 17;426; Adcock, G.L., Ram, B. Hauser, Smith, L.P. and Carvalho, G.R. 2000. Screening of DNA polymorphisms in samples of archived scales from New Zealand snapper. *Journal of Fish Biology*. 56;1283-1287; Sire, J.Y., Girondot, M. and Babiari, O. 2000. Marking zebrafish, *Danio rerio*(Cyprinidae), using scale regeneration. *Journal of Experimental Zoology*. 286;297-304; Yue, G.H. and Orban, L. 2001. Rapid Isolation of DNA from Fresh and Preserved Fish Scales for Polymerase Chain Reaction. *Marine Biotechnology*. 3;199-204; Nam, Y.K., Park, J.E., Kim, K.K. and Kim, D.S. 2003. A

rapid and simple PCR-based method for analysis of transgenic fish using a restricted amount of fin tissue. *Transgenic Research*. 12;523-525; Wasko, A.P., Martins, C., Oliveira, C. and Foresti, F. 2003. Nondestructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas*. 138;161-165; Aranishi, F. 2006. Single fish egg DNA extraction for PCR amplification. *Conservation Genetics*. 7;153-156; Aranishi, F., Okimoto, T. and Ohkubo, M. 2006. A short-cut DNA extraction from cod caviar. *Journal of the science of Food and Agriculture*. 86;425-428; Livia, L., Antonella, P., Hovirag, L., Mauro, N. and Panara, F. 2006. A nondestructive, rapid, reliable and inexpensive method to sample, store and extract high-quality DNA from fish body mucus and buccal cells. *Molecular Ecology Notes*. 6;257-260; Lopera-Barrero, N.M., R.P. Ribeiro, R.N. Sirol, J.A. Povh, P.C. Gomes, L. Vargas and D.P. Streit Jr. 2006. Genetic diversity in piracanjuba populations(*Brycon orbignyanus*) with the RAPD(Random Amplified Polimorphic DNA) markers. *Journal Animal Science*. 84;170; Kumar, R., Singh, P.J., Nagpure, N.S., Kushwaha, B., Srivastava, S.K. and Lakra, W.S. 2007. A non-invasive technique for rapid extraction of DNA from fish scales. *Indian journal of experimental biology*. 45;992-997).

[0008] 그러나, 이러한 DNA 추출 방법은 특정 종의 조직 시료에만 한정적으로 사용이 가능하며, 고가의 특정 시약을 사용함에도 불구하고 재현성이 낮아 결과의 신뢰도가 낮다는 단점을 가지고 있다. 또한, 이들 방법 중 일부는 복잡한 과정을 거치기 때문에 소요되는 시간이 많을 뿐 아니라, 오염원으로 인해 DNA의 순수도에 영향을 받을 수 있다는 문제도 있다.

[0009] 이에 본 발명자들은 상술한 종래 기술의 단점을 해결하고자 예의 노력한 결과, DNA 추출에 사용하기 위한 새로운 조직 용해용 완충액을 고안하였으며, 이 완충액을 이용하여 다양한 해양수산생물 시료를 대상으로 광범위하게 적용하여 시험한 결과, 단시간에 짧은 단계를 거쳐 재현성 높게 DNA를 추출할 수 있음을 확인함으로써 본 발명의 완성에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 유전적 다양성을 보유한 해양수산생물로부터 극소량의 조직 및 세포들만을 사용하여 신속하고 간편하게 순수한 DNA를 추출하는 방법을 제공함으로써, 이들에 대한 PCR 분석을 효율적으로 수행할 수 있도록 하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 해양수산생물로부터 PCR 분석에 사용할 수 있는 DNA를 신속하고 간편하게 추출하는 방법에 사용 가능한 조직 용해용 완충액 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에서는,

[0013] 해양수산생물로부터 채취한 조직 또는 세포를 비이온성 계면활성제, 비드(bead) 및 단백질 분해효소를 포함하는 조직 용해용 완충액 중에서 배양하고,

[0014] 90 내지 100 °C에서 단백질 분해효소를 불활성화시키는 단계를 포함하는, 해양수산생물의 DNA 추출 방법을 제공한다.

[0015] 여기에서, 비이온성 계면활성제로는 NP40(Nonidet P-40; Octylphenoxy polyethoxy ethanol) 및 Tween 20이 바람직하고, 이들을 각각 0.5 내지 9.0 %(v/v) 농도로 1:1의 비율로 사용할 수 있다. 비드는 직경이 1.0 내지 50.0 μm 인 글라스 비드가 바람직하고, 완충액 중에 0.5 내지 1.0 %(v/v)의 양으로 사용할 수 있다. 또한, 완충액 중에는 단백질 분해효소 K를 50 내지 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 사용하는 것이 바람직하다.

[0016] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위한 해양수산생물의 DNA 추출용 완충액 조성물은, 비이온성 계면활성제로서 1:1 비율의 NP40(Nonidet P-40; Octylphenoxy polyethoxy ethanol) 및 Tween 20, 비드(bead) 및 단백질 분해효소를 필수 구성성분으로 하고, Tris-Cl, KCl 및 MgCl_2 를 추가로 포함할 수 있다. 완충액의 산성도를 유지하기 위한 Tris-Cl은 5 내지 90 mM 농도이고, 신속하고 효율적인 PCR 분석에 적합한 완충액을 조성하기 위하여 25 내지 450 mM 농도의 KCl과 0.75 내지 135 mM 농도의 MgCl_2 를 포함하는 것이 바람직하다.

- [0017] 본 발명에 따른 바람직한 완충액 조성물은 10 mM Tris-Cl; pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.0% NP 40, 1.0% Tween 20, 비드 및 단백질 분해효소 K를 포함한다.
- [0018] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명한다.
- [0019] 본 발명에 따른 DNA 추출용 완충액에 첨가하여 사용할 수 있는 비드는 비드비팅(bead beating)에 이용되는 통상의 비드를 의미하는데, 비드의 소재는 특별히 제한되지 않지만 글라스 비드가 바람직하게 사용된다. 본 발명의 완충액에서 비드(bead)는 시료가 효과적으로 용해되는 데 소요되는 시간을 줄이기 위한 것으로, 완충액 중에 포함되는 비드의 양은 5 내지 10 μg 이 바람직하고, 0.5 %가 가장 바람직하다. 비드의 크기는 특별히 제한되지 않으나 직경이 1.0 내지 50 μm 인 것이 바람직하고, 특히 직경 30 μm 의 비드를 혼합하여 사용하는 것이 가장 바람직하다.
- [0020] 여기에서 비드비팅(bead beating)이란 용어는, 비드와 볼텍스(vortex) 기계를 이용하여 비드를 회전시켜서 회전된 비드의 충격으로 조직 및 세포벽 등을 물리적으로 파쇄하는 방법을 의미한다. 비드비팅에서 비드의 회전속도는 특별히 제한되지 않지만, 1,400 내지 3,200 rpm에서 5 내지 10 초 동안 수행할 수 있다. 본 발명의 비드비팅은 단순히 세포막에 약간의 손상을 가하여 detergent가 세포막에 빠르게 용해 작용을 할 수 있도록 돕기 위한 것으로, 3,200 rpm에서 30 초 이상 수행하여도 DNA의 물리적 손상은 없다.
- [0021] 본 발명에 따른 해양수산생물의 DNA 추출 방법 및 DNA 추출용 완충액에는 단백질 분해효소가 포함되는데, 특히 DNA나 RNA 분리에 매우 효과적인 것으로 광범위하게 사용되고 있는 단백질 분해효소 K를 50 내지 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 사용하는 것이 바람직하고, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도가 가장 바람직하다. 본 발명에 따른 DNA 추출방법에서 단백질 분해효소를 비활성화시키는 단계는 90 내지 100 $^{\circ}\text{C}$, 바람직하게는 약 95 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 배양하는 것에 의해 수행될 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 해양수산생물이라는 용어는 해양 및 담수 생태계에 서식하는 소형 동식물을 의미하며, 여기에는 담수어종인 잉어(*Cyprinus carpio*), 붕어(*Carassius carassius*), 메기(*Silurus asotus*), 미꾸라지(*Misgurnus mizolepis*), 기수어종이며 소형 어류(finfish)인 바다 송사리(*Oryzias dancena*) 및 초록 복어(*Tetraodon nigroviridis*), 해수어종인 넙치(*Paralichthys olivaceus*), 동물 플랑크톤인 아르테미아 프란시스카나(*Artemia franciscana*), 연체동물문(phylum mollusca) 중 복족강(class gastropoda)인 대수리(*Reishia clavigera*), 애기삿갓조개(*Cella toreuma*), 테두리 고둥(*Patelloida saccharina lanx*), 눈알고둥(*Turbo coronata coreensis*), 밤고둥(*Chlorostoma lischkei*), 명주고둥(*Chlorostoma xanthostigma*), 보말고둥(*Omphalius rusticus rusticus*), 개울타리고둥(*Monodonta labio confusa*), 둥근입얼룩고둥(*Cantharidus jessoensis*), 갈고둥(*Nerita japonica*), 둥다리(*Cerithidea rhizophorarum*), 비틀이고둥(*Cerithideopsisilla cingulata*), 갯고둥(*Batillaria multiformis*), 땡가리(*Batillaria cumingii*), 좁쌀무늬총알고둥(*Nodilittorina radiata*), 맵사리(*Cratostoma roriflum*), 털겍질돼지고둥(*Cantharus cecillii*), 타래고둥(*Japeuthria ferrea*), 검은줄좁쌀무늬고둥(*Hima fratercula fratercula*), 꽃고랑따개비(*Siphonaria sirius*), 고랑따개비(*Siphonaria Japonica*), 다판강(class Polyplacophora)인 군부(*Acanthopleura japonica*), 전새아강(prosobranchia)인 참전복(*Haliotis discus hannai*), 이매패강(class Bivalvia)인 피조개(*Scapharca broughtonii*), 새꼬막(*Scapharca subcrenata*), 새조개(*Fulvia mutica*), 동죽(*Macra veneriformis*), 개조개(*Saxidomus purpurata*), 아기바지락(*Ruditapes bruguieri*) 등을 예로 들 수 있고, 미세조류에는 두날리엘라 살리나(*Dunaliella salina*), 두날리엘라 터티오렉타(*Dunaliella tertiolecta*), 테트라셀미스 수에시카(*Tetraselmis suecica*), 파에도닥틸룸 트리코르누툼(*Phaeodactylum tricornutum*), 파보바 루테리(*Pavova lutheri*), 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*), 아이소크라이시스 갈바나(*Isochrysis galbana*) 등을 예로 들 수 있다.
- [0023] 이하, 본 발명에 따른 조직 용해용 완충액을 이용한 DNA 추출 방법을 어류를 예로 들어, 어류의 조직 시료 채취, 시료의 용해, 그리고 얻어진 DNA의 PCR 분석에 대하여 구체적으로 설명한다.
- [0024] 살아있는 어류를 대상으로, 예를 들어 꼬리지느러미로부터 가로, 세로 각각 약 0.4 cm 정도의 신선한 조직을 채취한다. 본 발명의 방법에서는 어류로부터 채취하는 모든 조직 시료가 적용 가능하지만, 알, 비늘, 꼬리지느러미 등의 조직을 이용한다면 소형의 어체도 살려둔 채로 분석할 수 있어 바람직하다. 또한, 본 발명에 따른 DNA 추출 방법은 최소 전장 2 cm 크기의 어체로부터 채취한 조직에 적용하는 것이 바람직하다.
- [0025] 채취한 꼬리지느러미 조직을 0.5%의 농도의 비드와 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 단백질 분해효소 K를 포함하는 DNA 추출용 완충액 약 100 μl 중에 넣고 55 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 3 분 동안 1 차 배양한다. 이때, 시료 파쇄의 효율을 일정하게 유지하기 위해 튜브 밑 부분을 가볍게 두드려서 비드 침전물을 완전히 풀어준 뒤 와이드 팁을 이용하여 완충액

을 첨가하는 것이 바람직하다.

- [0026] 한편, 전체 처리 시간을 단축시키기 위하여 약 10 초 동안 실온에서 비드비팅을 이용한 시료의 물리적 파쇄를 수행한 후, 55 ℃에서 3 분 동안 2 차 배양한다. 이때, 시료의 형체가 불분명하며 완충액의 탁도가 높아지는 것이 바람직하다.
- [0027] 배양이 완료되면, 단백질 분해효소를 비활성화시키기 위하여 90 내지 100 ℃, 바람직하게는 약 95 ℃의 온도에서 1 분 동안 3 차 배양하고 원심분리(약 13,000 rpm, 1 분)를 수행한 후, 추출된 DNA를 포함하고 있는 상등액을 새 튜브로 옮겨 1 내지 2 μ l, 바람직하게는 2 μ l를 취하여 바로 PCR 분석에 사용할 수 있다.
- [0028] 이상에서 설명한 바와 같이, 해양수산생물로부터 채취한 조직을 비이온성 계면활성제, 비드 및 단백질 분해 효소를 포함하는 DNA 추출용 완충액에서 배양한 후 단백질 분해 효소를 불활성화하는 단계를 포함하는 본 발명의 DNA 추출 방법에 따르면, 살아있는 어류의 작은 지느러미 조직으로부터 PCR 분석에 이용할 수 있는 DNA를 7 분 이내에 신속하고 간편하게 확보할 수 있다. 또한, 어류의 조직 시료 이외에도 동식물 플랑크톤 및 연체동물의 조직 시료 등 다양한 해양수산 동식물들로부터 안정적으로 신속하게 DNA를 추출하여 PCR 분석에 이용할 수 있다.
- [0029] 한편, 본 발명에 따른 조직 용해용 완충액을 이용한 DNA 추출 방법은 신선한 조직뿐 아니라 3 년까지 냉동 보관 및 알콜 중에 고정되어 보관된 조직 시료를 대상으로도 잘 적용될 수 있으며, 이는 어류의 조직 시료 뿐 아니라 동식물 플랑크톤이나 연체동물의 조직 시료에 대해서도 마찬가지이다.
- [0030] 또한, 본 발명에 따른 DNA 추출 방법으로 얻어진 DNA 용액은 장기간 냉동, 냉장 및 실온 보관한 후에도 처리 직후와 동일 수준의 PCR 결과를 보여주는데, 이로써 본 발명에 따른 방법은 안정성이 매우 높다고 할 수 있다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명의 DNA 추출 방법에 따르면 해양수산생물의 소량의 조직 및 세포들로부터 최대 7 분 이내에 신속하고 간편하게 PCR에 이용할 수 있는 양질의 순수한 DNA를 제공할 수 있어, 종래 기술에서 요구되는 복잡한 DNA 추출 단계와 그에 따라 소요되는 시간을 줄일 뿐 아니라 대량의 시료 처리도 가능하여 신속성과 경제성을 향상시킬 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 DNA 추출 방법은 신선한 조직 뿐만 아니라 장기간 보관되었던 조직을 대상으로도 잘 적용될 수 있으며, 본 발명에 따라 추출된 DNA 용액을 장기간 냉동 보관하면서 유전자의 반복 확인이 가능하므로, 해양수산생물의 다양한 유전자 정보를 확보하는데 이바지할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0032] 도 1은 본 발명의 방법에 따라, 살아있는 바다 송사리의 지느러미의 조직으로부터 PCR 분석에 충분한 양질의 DNA를 추출하는 과정을 보여주는 개요도이다.
- 도 2는 본 발명의 방법에 따라, 바다 송사리의 신선한 꼬리지느러미로부터 추출한 DNA를 주형으로 PCR 분석을 수행한 전기영동 사진이다.
- 도 3은 본 발명의 방법에 따라, 동물플랑크톤인 아르테미아로부터 추출한 DNA를 주형으로 PCR 분석을 수행한 전기영동 사진이다.
- 도 4는 본 발명의 방법에 따라, 적정 세포 수의 두날리엘라 살리나로부터 추출한 DNA를 주형으로 PCR 분석을 수행한 전기영동 사진이다.
- 도 5는 본 발명의 방법에 따라, 복족강인 대수리로부터 추출한 DNA를 주형으로 PCR 분석을 수행한 전기영동 사진이다.
- 도 6은 장기간 보관된 해양생물 시료에 대하여 본 발명의 방법을 적용한 결과를 보여주는 전기영동 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하, 본 발명에 따른 DNA 추출용 완충액을 사용한 DNA 추출 방법을 실시예에 의해 구체적으로 설명한다. 단, 이들 실시예는 본 발명의 예시일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [0034] 이하의 실시예에서는 구체적으로,
- [0035] (1) 어류의 신선한 지느러미로부터 DNA를 추출하는 방법;

- [0036] (2) 동물플랑크톤(zoo plankton)으로부터 DNA를 추출하는 방법;
- [0037] (3) 미세조류(microalgae)로부터 DNA를 추출하는 방법;
- [0038] (4) 연체동물로부터 DNA를 추출하는 방법; 그리고
- [0039] (5) 장기간 알콜 중에 냉동 보관된 어류의 조직 시료로부터 DNA를 추출하는 방법을 시험하였으며,
- [0040] (6) 비교예에서는 종래 해양수산생물을 대상으로 한 연구와 본 발명의 결과를 비교하여, 본 발명에 따른 방법의 신속성과 우수성을 평가하고 있다.
- [0041] 실시예 1: 어류의 신선한 지느러미로부터 DNA 추출
- [0042] 얼음 마취를 이용하여 전장 약 3 cm의 바다 송사리(*O. dancena*)를 순간적으로 기절시켜 살려둔 채로 꼬리지느러미로부터 가로세로 약 0.4 cm 정도의 신선한 조직을 채취하였다. 채취한 시료는 3 차 증류수에 2 회 수세하여 물기를 최대한 제거한 후, 1.5 ml microfuge tube 내에 넣었다. 100 µg/ml 농도의 단백질 분해효소 K를 포함하는 본 발명에 따른 DNA 추출용 완충액(10 mM Tris-Cl; pH 8.0, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.0 % NP 40, 1.0% Tween 20, 0.5 % 비드) 약 100 µl를 시료에 첨가하였다. 본 발명의 조직 용해용 완충액과 시료의 반응을 위하여 55 °C로 조정된 항온 용기에서 3 분 동안 1 차 배양한 후, 실온에서 30 초 동안 비드비팅을 수행하고, 55 °C의 온도에서 3 분 동안 2 차 배양하였다. 2 차 배양이 완료된 후 95 °C의 온도에서 1 분 동안 3 차 배양하였다. 본 반응액을 원심분리(약 13,000 rpm, 1 분)한 후, 상등액을 새로운 1.5 ml microfuge tube로 옮겼다.
- [0043] 도 1은 본 발명의 방법에 따라, 살아있는 바다 송사리의 지느러미의 조직으로부터 PCR 분석에 충분한 양질의 DNA를 추출하는 과정을 보여주는 개요도이다.
- [0044] 본 발명에 따른 용해 버퍼를 사용하여 추출한 DNA가 PCR 반응에 이상이 있는지 여부를 확인하기 위해, 원심분리 상등액 2 µl를 취하여 다음 조건에서 PCR을 수행하였다. 바다 송사리의 내재 유전자 중 cytoskeletal β-actin 유전자의 일부분을 증폭시킬 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프라이머(primer) 쌍(OD gb-act FW1 5'-CAGCTGTCTCTCGCAGACA-3'/OD gb-act RV1 5'-AGGAAATAGGAGCCTGTGTG3')을 이용하였으며, PCR 반응은 94 °C에서 2 분 동안 DNA를 변성시키고, 94 °C 20 초, 60 °C 20 초, 72 °C 20 초의 조건으로 30 회 반복 실시하였다. PCR 산물의 4 µl를 이용하여 1.5% 아가로스 젤에서 전기영동시킨 후 관찰하였다.
- [0045] 또한, 살아있는 바다 송사리의 지느러미의 조직을 대상으로 하여, 본 발명에 따른 DNA 추출용 완충액에서 비드를 제외한 나머지 성분들을 각각 0.5 내지 9 배까지 농도를 변화시키고 단백질 분해효소 K를 포함하는 조성물 약 100 µl를 시료에 첨가하여 DNA를 추출하였다. 완충액의 농도별로 추출한 DNA가 PCR 반응에 이상이 있는지 여부를 확인하기 위하여 실시예 1과 동일한 프라이머 쌍을 이용하여 PCR 분석을 수행하여 관찰하였다.
- [0046] 도 2는 본 발명의 방법에 따라, 바다 송사리의 신선한 꼬리지느러미로부터 추출한 DNA를 주형으로 PCR 분석을 수행한 전기영동 사진이다.
- [0047] 도 2에서 보듯이, 본 발명의 DNA 추출용 완충액을 사용하여, 바다 송사리가 생존한 상태에서 채취한 꼬리지느러미로부터 추출한 DNA를 주형으로 PCR 분석을 수행하였을 때 예상 밴드에서 정확히 PCR 반응이 일어난 것을 확인하였다. 이에 따라, 본 발명의 DNA 추출 방법으로 확보한 DNA는 아무 이상 없이 PCR 반응을 수행할 수 있을 정도의 품질임을 알 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 DNA 추출용 완충액의 구성 성분을 다양하게 희석 또는 농축하여 사용한 경우에도 충분한 DNA를 확보할 수 있음이 확인된다.
- [0048] 실시예 2: 동물플랑크톤인 아르테미아(artemia)로부터 DNA 추출
- [0049] 아르테미아 프란시스카나(*A. franciscana*)를 사용하여 증류수로 수세한 후 물기를 최대한 제거하고 1.5 ml microfuge tube 내에 준비된 본 발명의 용해 버퍼(실시예 1에서 사용한 것과 동일) 약 40 µl 중에 넣었다. 55 °C로 조정된 항온 용기에서 3 분 동안 1 차 배양한 후, 실온에서 30 초 동안 비드비팅을 수행하고, 55 °C의 온도에서 2 분 동안 2 차 배양하였다. 이후 95 °C의 온도에서 1 분 동안 3 차 배양을 완료하여 DNA를 포함한 상등액을 확보하였다.
- [0050] 본 발명의 용해 버퍼를 사용하여 추출한 DNA가 PCR 반응에 충분한 양질의 것인지 여부를 확인하기 위해, 원심분리 상등액을 취하여 이 종의 18s rRNA 유전자 증폭을 위한 프라이머 쌍(18s 1F 5'-TCGTCCTCTGGTGA-CTCTGA-

3'/18s 1R 5'-AAGACCGAGGTCCTATTCCA3')을 이용한 PCR을 수행하였다. PCR 반응은 94 °C에서 2 분 동안 DNA를 변성시키고, 94 °C 30 초, 58 °C 30 초, 72 °C 30 초의 조건으로 30 회 반복 실시하였다. PCR 산물을 이용하여 1.5% 아가로스 젤에서 전기영동시킨 후 관찰하였다.

[0051] 도 3은 본 발명의 방법에 따라, 동물플랑크톤인 아르테미아로부터 추출한 DNA를 주형으로 PCR 분석을 수행한 전기영동 사진이다. 도 3에서 A는 시료가 본 발명의 용해 버퍼에 충분히 반응하는데 필요한 최적 배양시간에 따른 PCR 반응 결과이고, B는 시료의 크기에 따라 DNA 추출이 가능한지 확인한 결과이다. 여기에서, 배양시간은 1, 2 차 배양시간을 모두 합한 시간으로, 5분부터 시작해서 30분까지 배양한 결과 PCR 생성물의 양이 유사한 것을 알 수 있었다. 이에 따라, 아르테미아로부터 충분한 DNA 추출을 위한 최적 배양 시간은 신속한 배양을 위해 5 분으로 확인되었으며, 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 미량의 아르테미아 조직으로부터 충분한 DNA를 확보할 수 있음이 관찰되었다. 또한, 시료의 크기는 1.0 mm 이하의 극미량의 조직에서도 4.0 mm 이상의 조직과 마찬가지로 충분히 DNA 추출이 가능한 것도 확인된다.

[0052] 실시예 3: 적정 세포 수의 미세조류로부터 DNA 추출

[0053] 본 발명에 따른 용해 버퍼가 세포벽을 가진 미세조류의 DNA 추출에 이용 가능한 지를 확인하기 위하여, 부경대학교 대연캠퍼스에 위치한 미세조류은행에서 미세조류인 두날리엘라 살리나(*Dunaliella salina*)을 구입하여 사하였다.

[0054] 두날리엘라 살리나를 배양한 후, 1.5 ml microfuge tube에서 1 ml 당 각각 1×10^6 개 정도의 세포가 있는 혼탁액을 원심분리(약 9,000 rpm, 5 분)하여 배지를 완전히 제거해 주었다. 회수한 세포들에 본 발명의 용해 버퍼(실시예 1에서 사용한 것과 동일)를 100 μ l 첨가하여, 실시예 2와 동일한 방법으로 DNA를 추출하였다.

[0055] 다음에, 이 종의 18s rRNA 및 28s rRNA 유전자 증폭을 위한 프라이머 쌍(ITS F 5'-GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3'/ITS R 5'-TCCTCCCTTATTGATATGC-3')을 이용하여 PCR 반응을 수행해 보았다. PCR 반응은 94 °C에서 4 분 동안 DNA를 변성시키고, 94 °C 1 분, 50 °C 45 초, 72 °C 2 분의 조건으로 35 회 반복 실시한 후, 72 °C 10 분간 최종 신장하여 반응을 완료하였다.

[0056] 도 4는 본 발명의 방법에 따라, 적정 세포 수의 두날리엘라 살리나로부터 추출한 DNA를 주형으로 PCR 분석을 수행한 전기영동 사진이다. 도 4에서 보듯이, 미세조류로부터 DNA를 추출하기 위한 최소 적정 세포 수인 1 ml 당 1×10^6 개 세포를 대상으로 한 용해 버퍼의 반응 시간은 5 분 이상이 필요하고, 최적 배양 시간은 10 분이 바람직한 것으로 확인되었다.

[0057] 실시예 4: 연체동물인 대수리(*Reishia clavigera*)로부터 DNA 추출

[0058] 본 발명의 용해 버퍼를 연체동물문인 해양동물의 DNA 추출에 이용 가능한 지를 확인하기 위하여, 뽕소라과 대수리(*R. clavigera*) 3개체의 일부 근육 조직을 대상으로 하여 본 발명의 용해 버퍼(실시예 1에서 사용한 것과 동일)를 100 μ l 첨가한 후, 실시예 2와 동일한 방법으로 DNA를 추출하였다.

[0059] 다음에, 이 종의 사이토크롬 C 옥시다제 서브유닛 I(COI) 유전자 증폭을 위한 프라이머 쌍(Rc-COI 1F 5'-GGTACTGCTCTAAGTCTCCT-3'/Rc-COI 1R 5'-AGCCAATGGAGGATACACAG-3')을 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응은 94 °C에서 2 분 동안 DNA를 변성시키고, 94 °C 20 초, 58 °C 20 초, 72 °C 20 초의 조건으로 30 회 반복 실시하였다.

[0060] 도 5는 본 발명의 방법에 따라, 복족강인 대수리로부터 추출한 DNA를 주형으로 PCR 분석을 수행한 전기영동 사진이다. 도 5에서 1, 2 및 3은 각각의 대수리 개체에서의 결과를 나타낸 것으로, 여기에서 보듯이, 연체동물의 근육 조직으로부터 본 발명의 용해 버퍼 100 μ l를 사용하여 5 분간의 항온 반응을 통해 DNA가 추출되었음을 알 수 있다.

[0061] 실시예 5: 장기간 보관된 어류의 시료로부터 DNA 추출

[0062] 본 발명에 따른 DNA 추출 방법이 신선한 지느러미 조직 뿐 아니라 장기간 에탄올을 첨가하여 냉동 보관 중이던

어류의 다양한 조직 시료를 대상으로도 잘 적용될 수 있는지를 시험하였다.

[0063] 시료들을 20 ℃에서 2 년간 보관한 후, 바다 송사리 3 마리로부터 각 개체별로 가로, 세로 각 약 0.4 cm 정도씩 3개의 꼬리지느러미 조직과 근육 조직을 채취하여 본 발명의 용해 버퍼 100 μ l를 첨가한 후, 실시예 2에 따라 DNA를 추출하고 PCR을 수행하였다.

[0064] 또한, 본 발명의 방법에 따라 확보된 DNA 추출물이 장기간 냉동 보관에도 안정한지를 확인하기 위해, 실시예 1에서와 같이 준비된 상등액 시료를 20 ℃에서 2 년간 보관한 후, 실시예 1에 따라 PCR을 수행하였다.

[0065] 도 6은 장기간 보관된 해양생물 시료에 대하여 본 발명의 방법을 적용한 결과를 보여주는 전기영동 사진이다. 도 6에서 A, B, D 및 E는 2 년간 알콜 중에 냉동 보관하였던 바다 송사리 꼬리지느러미 조직 및 근육 조직 시료, 갯 부화한 자어의 전어체, 대수리의 근육 조직 시료에 대하여 본 발명의 방법에 따라 추출한 DNA를 주형으로 PCR 분석을 수행한 전기영동 사진이고, C는 신선한 지느러미 시료에 대하여 본 발명의 방법에 따라 추출한 DNA를 2 년간 냉동 보관한 후 실시한 PCR 결과를 보여준다. 여기에서 보듯이, 대조구로 사용한 장기간 냉동 보관된 DNA 추출물에 대한 PCR 결과와 2 년까지 냉동 보관되었던 조직에 대한 PCR 결과 모두 정확도와 효율에 있어 큰 차이가 없다는 것이 확인되었다.

[0066] 따라서, 본 발명에 따른 DNA 추출 방법은 신선한 조직 뿐만 아니라 2 년까지 알콜 중에 냉동 보관되었던 조직을 대상으로도 잘 적용될 수 있음을 알 수 있다. 또한, 본 발명에 따라 추출된 DNA 용액을 장기간 냉동 보관함으로써 유전자의 반복 확인이 가능하고, 이밖에 다른 PCR 분석에도 활용 가능한 것이 확인된다.

[0067] 비교예: 본 발명과 종래 DNA 추출 방법의 비교

[0068] 본 발명에 따른 DNA 추출 방법을 종래의 방법과 비교하였다. 다음 표 1은 해양수산생물의 PCR 분석을 위해 사용되는 14 종의 종래의 DNA 추출 방법과 본 발명의 방법에 사용되는 시약의 종류, 시료의 종류 및 사용량, 필수 추출 단계의 횟수, 시료 준비 후의 총 소요 시간 등을 비교하여 나타낸 것이다.

표 1

[0069]	시약 종류	시료 종류 (용량)	추출단계	시료 준비 후 총 소요시간
방법 1	-조직 용해용 완충용액 (Tris, EDTA, SDS) -단백질 분해효소 -DNA 순수 분리용 시약 (페놀, 70% 에탄올, 페놀:클로로포름, 클로로포름:이소아밀알콜, 100% 에탄올 또는 이소프로판올) -DNA 용해 용액 (H ₂ O 또는 TE 완충용액)	지느러미 (0.5g 이상)	-조직 용해 -유기용매 혼합 -원심분리 및 상등액 회수 -DNA 침전 -DNA wash 및 건조 -DNA 용해	12 시간 이상
방법 2	-조직 용해용 완충용액 (Tween 20, MgCl ₂ , Tris, KCl) -단백질 분해효소	지느러미 (0.5g 이상)	-조직 용해 -단백질 분해효소 불활성화 -원심분리 및 상등액 회수	1-3 시간
방법 3	-조직 용해용 완충 용액 (NaOH, EDTA, SDS) -중화용액 (Tris, MgCl ₂ , NP40, Tween 20)	지느러미 (0.3~0.5g)	-조직 용해 및 중화 -원심 분리 및 상등액 회수	20분 이내
방법 4	-조직 용해용 완충용액 (KCl, Tris, MgCl ₂ , Triton X-100) -단백질 분해효소	어류 수정란 (100 배체)	-조직 파쇄 -조직 용해 -단백질 분해효소 불활성화 -원심 분리 및 상등액 회수	75 분 이상

방법 5	-조직 고정액 (에탄올 또는 4% 포름알데히드) -조직 용해용 완충용액 (Chelex 100, NaI, silica) -단백질 분해 효소 -DNA 순수 분리용 시약 (Tris, EDTA, NaCl, 에탄올) -DNA 용해 용액 (H ₂ O 또는 TE 완충용액)	어류 비늘 (4개 이상)	-조직 용해 -조직 파쇄 -DNA 순수 분리 단계 -DNA 침전 -DNA wash 및 건조 -DNA 용해	83 분 이상
방법 6	-조직 용해용 완충용액 (Urea, Tween 20, NP 40, Chelex 100)	어류 수정난 (약 602 μ g)	-조직 용해 및 파쇄 -원심분리 및 상등액 회수	15 분
방법 7	-조직 용해용 완충용액 (Chelex 100 resin, TE 완충용액) -단백질 분해효소	조개 근육 조직 (25mg)	-조직 용해 -단백질 분해효소 불활성화 -원심분리 및 상등액 회수	95 분 이상
방법 8	-조직 용해용 완충용액 (Tris-HCl, EDTA, NaCl, SDS) -단백질 분해효소 -DNA 순수 분리용 시약 (5M NaCl 에탄올) -TE 완충용액 -RNA 분해 효소	지느러미 어류 자어	-조직 용해 -DNA 순수 분리 단계 -원심분리 및 상등액 회수 -DNA 침전 -DNA wash 및 건조 -DNA 용해	12 시간 이상
방법 9	-조직 용해용 완충용액 (Tris-HCl, EDTA, NaCl, SDS) -단백질 분해효소 -DNA 순수 분리용 시약 (페놀, 100% 에탄올, 클로로포름:이소아밀알콜) -DNA 용해 용액 (H ₂ O 또는 TAE 완충용액)	알테미아 성체	-조직 용해 -DNA 순수 분리 단계 -원심분리 및 상등액 회수 -DNA 침전 -DNA wash 및 건조 -DNA 용해	5 시간 이상
방법 10	-조직 용해용 완충용액 (NaOH, disodium EDTA) -중화용액 (Tris-HCl)	알테미아 내구란	-조직 용해 및 중화 -원심 분리	35 분
방법 11	-조직 용해용 완충용액 (Chelex 100)	알테미아 내구란	-조직 용해 및 중화	43 분
방법 12	-조직 용해용 완충용액 (SDS, Tris-HCl, NaCl, EDTA) -DNA 순수 분리용 시약 (페놀:클로로포름, 100% 에탄올, 70% 에탄올) -DNA 용해 용액 (TE 완충용액)	1 $\times 10^7$ 세포	-조직 용해 -유기용매 혼합 -원심분리 및 상등액 회수 -DNA 침전 -DNA wash 및 건조 -DNA 용해	2 시간 이상
방법 13	-조직 용해용 완충용액1 (Tris-Cl, EDTA, NaCl) -조직 용해용 완충용액2 (SDS, NaCl, EDTA, Tris-Cl) -DNA 순수 분리용 시약 (페놀:클로로포름:이소아밀알콜, 100% 에탄올) -DNA 용해 용액 (TE 완충용액)	3-8 $\times 10^7$ 세포	-조직 용해 -유기용매 혼합 -원심분리 및 상등액 회수 -DNA 침전 -DNA wash 및 건조 -DNA 용해	34 분 이상

본 발명	-조직 용해용 완충용액 (Tris-Cl, KCl, MgCl ₂ , NP 40, Tween 20, 비드) -단백질 분해효소	해양수산생물	-조직 용해 -단백질 분해효소 불활성화 -원심분리 및 상등액 회수	7 분 이내
---------	---	--------	--	-----------

- [0070] 위 표 1에서 보듯이, 종래의 DNA 추출 방법은 대부분 어류로부터 획득할 수 있는 조직 시료들을 대상으로 국한되어 연구되어 왔으며, 이를 바탕으로 점차적으로 다양한 해양수산 동식물에 대하여 시료의 폭을 넓혀온 것을 알 수 있다. 대부분의 방법에서는 시료 준비 후 DNA를 추출하기까지 소요되는 시간이 60 분 이상 소요되는 것이 확인된다. 즉, 종래의 DNA 추출 방법으로는 DNA 시료를 확보한 후 PCR 분석을 수행하여 전기영동 결과를 확인하기까지 130 분 이상의 시간이 소요될 것으로 예상된다.
- [0071] 반면, 본 발명의 DNA 추출 방법에 따르면 다양한 해양수산생물에 대한 DNA 추출이 7분 이내에 이루어지고, 이후 특정 해양수산생물을 대상으로 개발된 PCR 분석 키트를 이용할 경우 PCR 분석을 수행하는데 소요되는 시간도 월등히 단축될 수 있다.
- [0072] 한편, 종래의 방법 6의 경우에는 다른 방법들에 비해 소요시간이 15 분 이내로 짧은 대신에, DNA 추출을 위해서는 고가의 특정 시약(Chelex 100 resin)과 고농도의 urea 완충액, 그리고 끓는 물이 필요하다는 문제가 있다. 더욱이, 방법 6의 특정 시약은 단백질과 결합하기 위해 사용되지만, 원심분리를 수행한 후에도 상층액 내에 남아 있을 수 있으며 용해 완충액의 산성도에 따라 결합이 불가능한 단백질도 있고, 이러한 단백질로 인해 실험의 재현성이 낮아져 결과에 대한 신뢰도가 낮아질 수 있다는 단점도 있다.
- [0073] 이에 반해, 본 발명에 따른 DNA 추출 방법에서는 실험실에서 일반적으로 사용하는 종류의 시약으로 구성되는 완충액을 사용하고, 경제성과 안정성을 고려하여 최소한의 적정 농도와 분자생물학 실험에서 일반적으로 사용하는 배양 온도를 이용하고 있다. 특히, 본 발명의 DNA 추출용 완충액의 구성 성분인 Tris-HCl은 완충액의 산성도를 유지하며, DNA 추출을 방해하는 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharides)를 주성분으로 하는 점액을 체외로 생산하는 연체동물군의 DNA 추출에 주로 이용되는 시약으로, 해수 및 담수에 서식하는 어류 이외에도 다양한 연체동물군으로부터 신속하고 간편하게 순수한 DNA를 추출하여 유용 유전자의 대량 발굴 작업이 가능할 것으로 기대된다.
- [0074] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 DNA 추출 방법에 따르면 해양수산생물의 소량의 조직 및 세포들로부터 최대 7 분 이내에 신속하고 간편하게 PCR에 이용할 수 있는 양질의 순수한 DNA를 제공할 수 있으며, 이에 따라 종래 기술에서 요구되는 복잡한 DNA 추출 단계와 그에 따라 소요되는 시간을 줄일 뿐 아니라 대량의 시료 처리도 가능하여 신속성과 경제성을 향상시킬 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 DNA 추출 방법은 신선한 조직 뿐만 아니라 장기간 보관되었던 조직을 대상으로도 잘 적용될 수 있으며, 본 발명에 따라 추출된 DNA 용액을 장기간 냉동 보관하면서 유전자의 반복 확인이 가능하고, 다른 PCR 분석에도 활용할 수 있다. 이에 따라, 본 발명의 방법은 해양수산생물의 다양한 유전자 정보를 확보하는 데 이바지할 수 있을 것이다.

도면

도면1

1. 시료 준비 단계

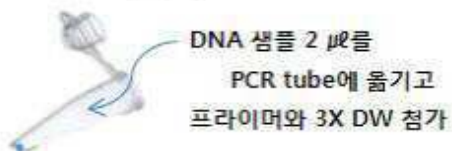


꼬리 지느러미 채취 → 세척 및 건조

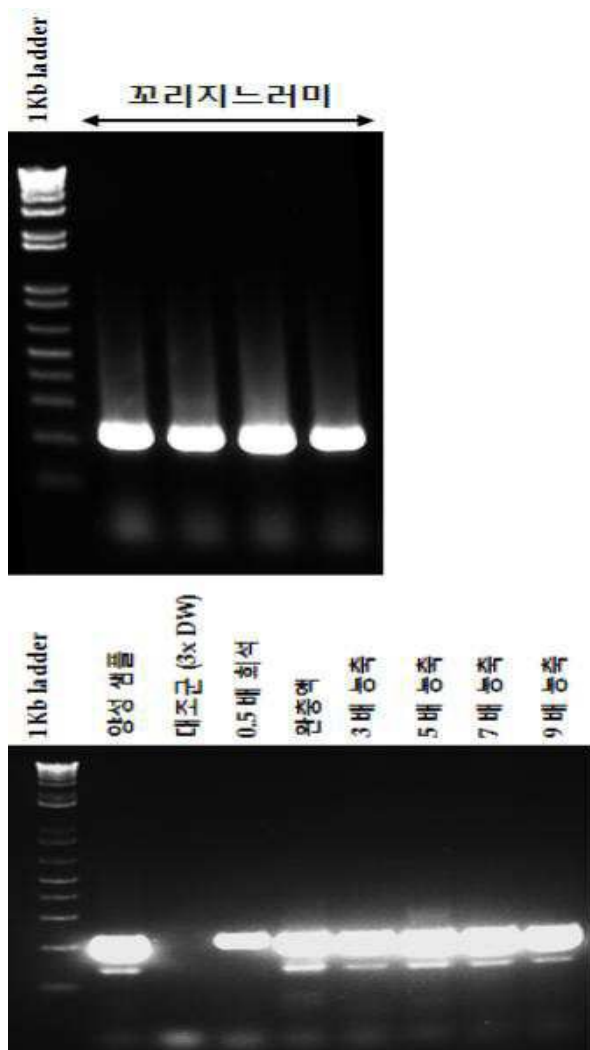
2. 용해 단계



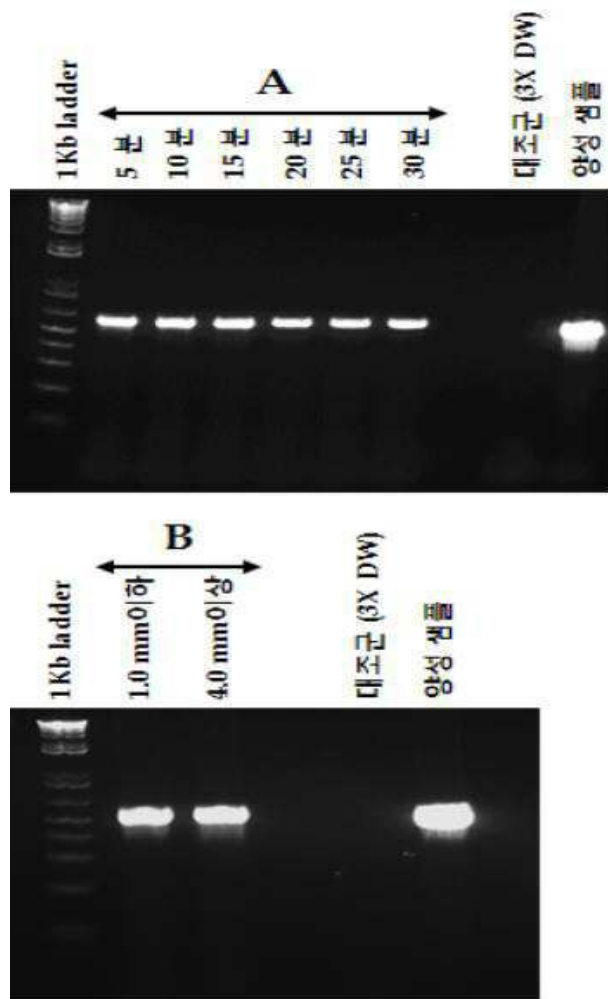
3. PCR 단계



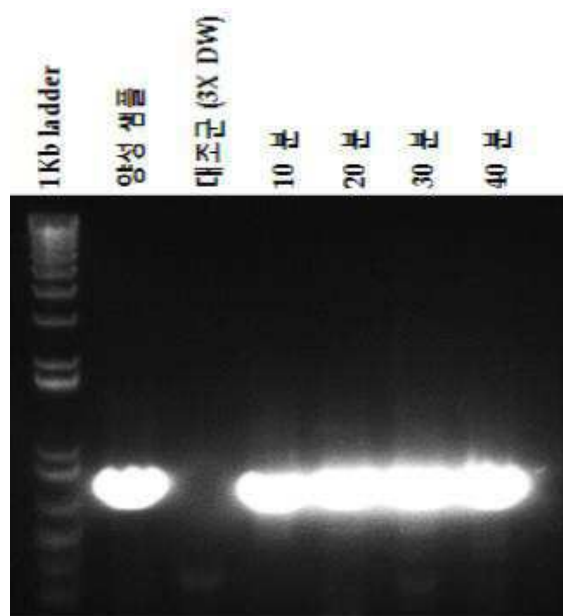
도면2



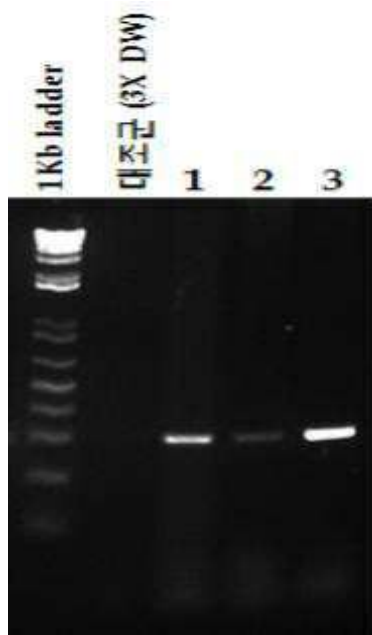
도면3



도면4



도면5



도면6

