

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0051478 (43) 공개일자 2014년05월02일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)		(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(21) 출원번호 10-2012-0109940	(22) 출원일자 2012년10월04일	(72) 발명자 박영두 경기도 용인시 수지구 성북2로 220, 305동 1404호 (성북동, 버들치마을 힐스테이트3차)
심사청구일자 2012년10월04일		오규동 경기도 수원시 영통구 청명로 25, 304호 (영통동)
		(74) 대리인 유수미

전체 청구항 수 : 총 8 항

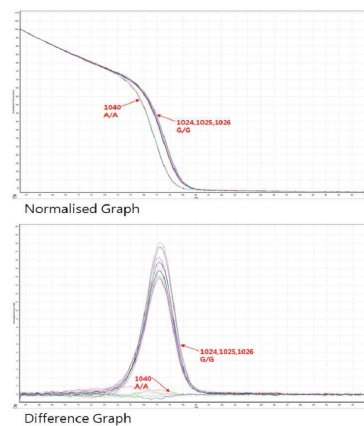
(54) 발명의 명칭 당근 무모 종자 형질 관련 SNP 분자마커

(57) 요약

본 발명은 종자모 형성 유무와 연관된 SNP를 포함하는 당근의 무모 종자 계통 선발용 마커에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 상기 SNP 마커를 이용하여 당근 식물체의 생육초기에 종자모 형성 유무를 간편하게 확인할 수 있으며, 이를 토대로 품질이 우수한 당근 품종을 개량하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 108097-05-4-SB010

부처명 농림수산식품부

연구사업명 수출전략기술개발사업

연구과제명 수출용 무모(無毛)계 당근 종자 품종 육성 및 분자 마커 개발

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2008.12.20 ~ 2013.12.19

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열의 291번째 SNP(single nucleotide polymorphism) 뉴클레오타이드를 포함하는 8-200 개의 연속 뉴클레오타이드 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열의 285번째 SNP(single nucleotide polymorphism) 뉴클레오타이드를 포함하는 8-200 개의 연속 뉴클레오타이드로 구성되는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 당근의 무모 종자 계통 선발용 마커.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 SNP(single nucleotide polymorphism) 뉴클레오타이드는 구아닌(G) 또는 아데닌(A)인 것을 특징으로 하는 마커.

청구항 3

제1항의 당근의 종자 계통 선발용 마커를 증폭하기 위한 프라이머 쌍.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 프라이머 쌍은 서열번호 3의 5' 프라이머 및 서열번호 4의 3' 프라이머인 것을 특징으로 하는 HRM(high resolution melting) 분석용 프라이머 쌍.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 프라이머 쌍은 서열번호 5의 5' 프라이머 및 서열번호 7의 3' 프라이머, 또는 서열번호 6의 5' 프라이머 및 서열번호 7의 3' 프라이머로 각각 구성된 것을 특징으로 하는 AS-PCR(Allele-Specific PCR) 분석용 프라이머 쌍.

청구항 6

하기의 (a) 내지 (f) 중 어느 하나의 염기 서열을 가지고, 당근의 무모 종자 계통 선발을 위한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 검출하기 위한 프라이머 또는 프로브로서 사용할 수 있는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드:

(a) 서열번호 1로 표시되는 염기 서열의 291번째 SNP 뉴클레오타이드를 포함하는 8-200 개의 연속 뉴클레오타이드로 구성되는 염기 서열;

(b) 상기 (a)의 염기 서열과 상보적인 염기 서열;

(c) 상기 (a) 또는 (b)의 염기 서열에 있어서, SNP 이외의 1 내지 수개의 염기가 결실, 치환 또는 부가되어 있는 염기 서열이며, 해당 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가, 상기 (a) 또는 (b)의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드와 엄격한 조건하에서 혼성화 될 수 있는 염기 서열;

(d) 서열번호 2로 표시되는 염기 서열의 285번째 SNP 뉴클레오타이드를 포함하는 8-200 개의 연속 뉴클레오타이드로 구성되는 염기 서열;

(e) 상기 (d)의 염기 서열과 상보적인 염기 서열;

(f) 상기 (d) 또는 (e)의 염기 서열에 있어서, SNP 이외의 1 내지 수개의 염기가 결실, 치환 또는 부가되어 있는 염기 서열이며, 해당 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가, 상기 (d) 또는 (e)의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드와 엄격한 조건하에서 혼성화 될 수 있는 염기 서열.

청구항 7

제6항의 폴리뉴클레오타이드 서열로 이루어진 프로브를 포함하는 당근 종자모의 형성 유무를 진단할 수 있는 마이크로 어레이.

청구항 8

다음의 단계를 포함하는 당근의 종자모 형성 진단 방법:

(a) 당근으로부터 핵산분자를 분리하는 단계; 및

(b) 서열번호 1의 291번째 뉴클레오타이드 또는 서열번호 2의 285번째 뉴클레오타이드에 해당하는 SNP(single nucleotide polymorphism)의 염기타입을 상기 분리된 핵산분자에서 확인하는 단계.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 당근(*Daucus carota* var. *sativa*)의 SNP 분자마커에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 종자모 형성 유무와 관련된 SNP를 포함하는 당근의 무모 종자 계통 선발용 마커에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 당근(*Daucus carota* var. *sativa*)은 세계적으로 재배되는 주요한 채소 중에 하나이다. 당근은 산형화과 식물로써 분리과(Schizocarp) 형태의 종자가 생성되며 종자에는 표피세포(epidermal cell)가 연장되는 형태로 생성된 종자모가 존재한다. 당근의 종자모는 파종 시에 서로 엉켜 파종을 어렵게 하고, 파종 후에는 토양과의 밀착 정도를 떨어뜨리고, 수분흡수를 방해하여, 종자발아율을 낮추는 요인이 되며(Park 등, 2002), 종자모에 있는 캐로톨(carotol) 성분으로 인하여 발아율이 저해된다.

[0003] 이러한 이유로 당근 종자의 상품화시 종자모를 기계적인 방법을 이용하여 제거한 후 시판하고 있으나, 기계적 처리 과정을 거치면서 당근 종자는 물리적인 손상을 입게 된다. 손상된 종자들은 불규칙한 발아율을 보이게 되며 종자수명이 짧아지는 부작용이 발생하게 된다. 또한 이러한 처리 과정들은 추가적인 시간, 노동력, 생산비의 증가를 야기하게 된다.

[0004] 종래 육종 분야에서는 원하는 형질의 계통을 선발하기 위해 형태학적 마커를 사용하여 왔으나, 이러한 방법은 그 수에 있어서 매우 제한적이고 환경적인 요인이 작용하기 때문에 불확실하다는 단점이 있었다.

[0005] 따라서 최근에는 목적 형질과 연관되어 있는 DNA 마커를 이용하여 육종에 이용하는 분자 육종에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. DNA 마커의 이용은 육종 초기 세대에 선발 가능성, 환경영향 배제 및 양적 형질 분석 등을 가능하게 만들어 육종에 있어서 매우 유용하게 사용되고 있다. 실제로 많은 작물에서 이러한 DNA 마커 개발이 활발하게 이루어지고 있으며 육종의 새로운 기술로서 선발 효율을 증대시키고 있다.

[0006] 식물 육종에 있어서 분자마커의 유용성은 이미 검증되었으나, 기존의 분자마커 보다 경제적이고, 대용량으로 신속하게 시료를 검증할 수 있는 분자마커의 개발이 지속적으로 연구되고 있다. 분자마커 기술이 발달됨에 따라 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 및 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism) 등 다양한 형태의 분자마커가 개발되었으나, 이러한 분자마커들은 비교적 비용이 많이 들고 대량으로 시료를 분석해 내기에는 많은 한계가 있다.

[0007] 따라서 최근에는 보다 경제적이고 대량 분석이 가능한 SSR(Simple Sequence Repeat) 및 SNP(Single Nucleotide Polymorphism) 마커의 개발이 활발히 이루어지고 있다. 특히, SNP 마커의 경우에는 형광기법(Fluorescent technology) 및 모세관식 전기영동법(capillary electrophoresis)의 발달로 시료 검출을 자동화할 수 있고 대량으로 분석할 수 있기 때문에 육종에 있어서 효율적으로 사용할 수 있다는 장점이 있다.

[0008] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 종자모가 없는 고품질의 당근을 육종하기 위해서 단모, 무모 종자 표현형 당근 자원을 수집한 후, 이들 유전자원의 특성을 규명하고, 짧은 시간 내에 간편하게 당근 종자의 종자모 형성 유무를 판별 가능한 분자마커를 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 무모형 종자 표현형 개체와 유모형 종자 표현형 개체의 EST sequence들을 비교분석하여 SNP 분자마커를 개발하고, HRM 분석(High Resolution Melting analysis) 및 AS PCR(Allele-Specific PCR) 프라이머를 통해 상기 SNP를 확인하는 경우, 당근 종자의 종자모 형성 유무를 간편하게 진단할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 당근 종자의 종자모 형성 유무를 간편하게 진단할 수 있는 SNP 분자마커를 제공하고, 상기 SNP 분자마커를 이용하여 무모 종자 당근 품종의 육종에 이용하고자 함에 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 당근 종자모 형질 관련 SNP(Single Nucleotide Polymorphism Site)를 확인하고, 이를 바탕으로 HRM 분석(High Resolution Melting analysis) 및 AS PCR(Allele-Specific PCR) 프라이머를 통해 상기 SNP를 확인하여 당근 종자의 종자모 형성 유무를 간편하게 진단하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 291번째 SNP(single nucleotide polymorphism) 뉴클레오타이드를 포함하는 8-200 개의 연속 뉴클레오타이드 또는 서열번호 2로 표시되는 염기서열의 285번째 SNP(single nucleotide polymorphism) 뉴클레오타이드를 포함하는 8-200 개의 연속 뉴클레오타이드로 구성되는 폴리뉴클레오타이드, 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 당근의 무모 종자 계통 선발용 마커를 제공한다.
- [0012] 본 명세서에서 용어, "뉴클레오타이드"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)).
- [0013] 본 발명의 다형성(polymorphism)은 단일 유전자 좌위에 두 가지 이상의 대립 유전자가 존재하는 경우를 말하며 개체간의 유전적 차이는 이들 다형성에 의해 결정된다. 다형성 부위 중에서, 개체에 따라 단일 염기만이 상이한 것을 "단일 뉴클레오타이드 다형성", 즉 SNP(single nucleotide polymorphism)라고 한다.
- [0014] 상기 서열번호 1의 291번째 SNP 및 서열번호 2의 285번째 SNP는 각각 무모 종자와 유모 종자의 EST sequence를 분석한 결과 발굴되었으며, 이들 SNP는 당근 종자의 종자모 형성 유무와 관련된 표현형과 강한 연관관계를 보인다.
- [0015] 본 발명자들은 당근의 종자모 형성 유무를 진단할 수 있는 분자마커를 개발하기 위해 예의 노력하였으며, 그 결과, 무모형 종자 표현형 당근 개체와 동일한 라인에서 유래된 유모형 종자 표현형 당근 개체의 EST sequencing 결과를 바탕으로 무모형 종자 표현형 개체와 유모형 종자 표현형 개체의 EST sequence들을 비교분석하여 SNP Site를 확인하였고, 후술하는 실시예 3 내지 5의 결과로부터 명백하게 확인된 바와 같이, 무모 종자인 경우에는 구아닌(G) 염기만을, 유모 종자인 경우 아데닌(A) 염기만을 보이므로, 상기 서열번호 1의 291번째 SNP 및 서열번호 2의 285번째 SNP는 당근의 종자모 형성 유무를 진단할 수 있는 유전자 마커로서 유용하다.
- [0016] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 당근의 무모 종자 계통 선발용 마커를 증폭하기 위한 프라이머 쌍을 제공한다.
- [0017] 본 발명자들은 상기 SNP Site의 당근 종자모 형성 유무에 대한 관련성을 검증하고자, 무모형 종자 및 유모형 종자의 자가수분 후대 라인에서 선발된 개체들을 대상으로 HRM 분석(High Resolution Melting analysis)과 AS PCR(Allele-Specific PCR)을 수행하고, 이를 통해 상기 SNP Site를 포함하는 유전자 서열을 무모 종자 당근 품종의 육성에 활용할 수 있는 분자마커로 개발하였다.
- [0018] 본 발명에서 상기 HRM(high resolution melting) 분석은 서열번호 3의 5' 프라이머 및 서열번호 4의 3' 프라이머 쌍을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0019] 또한, 상기 AS-PCR(Allele-Specific PCR) 분석은 서열번호 5의 5' 프라이머 및 서열번호 7의 3' 프라이머 쌍을 사용할 수 있고, 서열번호 6의 5' 프라이머 및 서열번호 7의 3' 프라이머 쌍을 사용하여 수행될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기의 (a) 내지 (f) 중 어느 하나의 염기 서열을 가지고, 당근의 무모 종자 계통 선발을 위한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 검출하기 위한 프라이머 또는 프로브로서

사용할 수 있는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다: (a) 서열번호 1로 표시되는 염기 서열의 291번째 SNP 뉴클레오타이드를 포함하는 8-200 개의 연속 뉴클레오타이드로 구성되는 염기 서열; (b) 상기 (a)의 염기 서열과 상보적인 염기 서열; (c) 상기 (a) 또는 (b)의 염기 서열에 있어서, SNP 이외의 1 내지 수개의 염기가 결실, 치환 또는 부가되어 있는 염기 서열이며, 해당 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가, 상기 (a) 또는 (b)의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드와 엄격한 조건하에서 혼성화 될 수 있는 염기 서열; (d) 서열번호 2로 표시되는 염기 서열의 285번째 SNP 뉴클레오타이드를 포함하는 8-200 개의 연속 뉴클레오타이드로 구성되는 염기 서열; (e) 상기 (d)의 염기 서열과 상보적인 염기 서열; (f) 상기 (d) 또는 (e)의 염기 서열에 있어서, SNP 이외의 1 내지 수개의 염기가 결실, 치환 또는 부가되어 있는 염기 서열이며, 해당 염기 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가, 상기 (d) 또는 (e)의 염기서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드와 엄격한 조건하에서 혼성화 될 수 있는 염기 서열.

- [0021] 본 발명에서 용어 “프라이머(primer)”는 단일가닥의 올리고뉴클레오타이드로서, 적합한 조건(4 가지의 상이한 뉴클레오사이드 트리포스페이트 및 DNA 또는 RNA 폴리머라아제와 같은 중합효소의 존재), 적합한 온도 및 적합한 버퍼 하에서 주형 지시적 DNA 합성을 개시할 수 있는 개시점으로 작용하는 것을 의미한다.
- [0022] 프라이머의 적합한 길이는 사용하고자 하는 프라이머의 특성에 의해 결정하지만, 통상적으로 15 내지 30bp의 길이로서 사용할 수 있다. 프라이머는 주형의 서열과 정확하게 상보적일 필요는 없지만 주형과 혼성복합체(hybrid-complex)를 형성할 수 있을 정도로 상보적이어야만 한다.
- [0023] 본 발명에서, 용어 “프로브”는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화 될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 바람직하게는, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이고, 디옥시리보뉴클레오타이드이다.
- [0024] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 당근의 무모 종자 계통 선발을 위한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 검출하기 위한 프로브를 포함하는 당근 종자모의 형성 유무를 진단할 수 있는 마이크로 어레이를 제공한다.
- [0025] 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 프로브는 SNP 뉴클레오타이드인 서열번호 1의 291번째 뉴클레오타이드, 또는 서열번호 2의 285번째 뉴클레오타이드를 포함하는 8-200 개의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 서열에 혼성화 될 수 있는 서열을 포함한다. 보다 바람직하게는, 상기 프로브의 3'-말단 또는 5'-말단은 상기 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는다.
- [0026] 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 3'-말단 또는 5'-말단에 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는 프로브에서 말단 부분이 혼성화 되지 않으면, 이러한 듀플렉스는 엄격한 조건에서 해체될 수 있다. 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다. 혼성화에 이용되는 엄격한 조건(stringent condition)은 온도, 이온세기(완충액 농도) 및 유기 용매와 같은 화합물의 존재 등을 조절하여 결정될 수 있다. 이러한 엄격한 조건은 혼성화 되는 서열에 의존하여 다르게 결정될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 당근으로부터 핵산분자를 분리하는 단계, 및 (b) 서열번호 1의 291번째 뉴클레오타이드 또는 서열번호 2의 285번째 뉴클레오타이드에 해당하는 SNP(single nucleotide polymorphism)의 염기타입을 상기 분리된 핵산분자에서 확인하는 단계를 포함하는 당근의 종자모 형성 진단 방법을 제공한다.
- [0028] 상기 단계 (a)에서 핵산은 당근의 종자의 어떠한 조직 세포에서도 분리될 수 있으며, 바람직하게는 종자 발생 초기에 분리될 수 있다. 상기 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있으며, 바람직하게는 DNA일 수 있다. 상기 단계 (a)에서 해당 세포로부터 핵산을 추출하는 방법은 특별히 한정되지 않으며, 당업계에서 공지된 기술 또는 시판되고 있는 핵산 추출용 키트를 사용할 수 있다. 예를 들면, 페놀 클로로포름 추출법 및 프로테아제 K 처리방법을 사용할 수 있다. DNA 또는 RNA 추출용 키트는 Qiagen, Inc, 및 Stratagene에서 구입할 수 있다. 상기에서 RNA를 추출하여 사용하는 경우에는 역전사를 통해 cDNA를 제조하여 사용할 수 있다.

[0029] 상기 단계 (b)에서 서열분석은 당업계에서 공지된 방법을 모두 이용할 수 있다. 예를 들면, 자동염기서열분석기를 사용하거나, 파이로시퀀싱(pyrosequencing), PCR-RFLP법(restriction fragment length polymorphism), PCR-SSCP법(single strand conformation polymorphism), PCR-SSO법(specific sequence oligonucleotide), PCR-SSO 법과 도트 하이브리드화법을 조합한 ASO(allele specific oligonucleotide) 하이브리드화법, TaqMan-PCR법, RCA법(rolling circle amplification), HRM(high resolution melting) 분석법, 프라이머 신장법, 서던 블롯 하이브리드화법, 도트 하이브리드화법 등의 공지의 방법을 사용할 수 있다. 상기 여러 종류의 서열분석방법을 조합하여 사용할 수도 있다.

발명의 효과

[0030] 이상에서 상세하게 설명된 바와 같이, 본 발명은 당근 종자모 형성 유무의 진단에 유용한 SNP 마커, SNP 마커를 증폭하기 위한 프라이머 쌍, 및 SNP를 검출하기 위한 폴리뉴클레오타이드를 제공하고, 이를 사용하여 당근의 종자 계통에서 종자모 형성 여부를 진단하는 방법을 제공하며, 당근의 종자모 형성 유무를 진단할 수 있는 마이크로 어레이를 제공한다. 본 발명의 SNP 마커를 사용하여 당근 식물체의 생육초기에 종자모 형성 유무를 간편하게 확인할 수 있으며, 이를 토대로 품질이 우수한 당근 품종을 개량하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 당근 종자모 형질 관련 분자마커 개발을 위해 수행한 cDNA library 작성 및 EST sequence 확보를 위한 무모형 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 659-1 개체 및 유모형 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 677-14 개체의 종자 사진 및 현미경 사진이다.

도 2는 무모형 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 659-1 개체 및 유모형 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 677-14 개체를 이용한 cDNA library 과정에서 추출된 RNA를 human total RNA control과 함께 전기영동한 사진이다.

도 3은 무모형 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 659-1 개체 및 유모형 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 677-14 개체를 이용한 cDNA library 과정에서 추출된 mRNA를 EcoRI와 XhoI을 이용한 Insertion check를 위한 전기영동 사진이다.

도 4는 무모형 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 659-1 개체 및 유모형 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 677-14 개체를 이용한 cDNA library 및 EST sequence를 비교분석하여 확보한 659-1_09-E02-R EST(서열번호 1)와 677-14_03-B01-R EST(서열번호 2)간의 659-677-6 Single Nucleotide Polymorphism Site이다.

도 5는 당근 종자모 형질 관련 분자마커 개발을 위해 작성된 HRM 프라이머를 이용해 무모형 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 라인과 유모형 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1040 라인을 이용한 High Resolution Melting 실험을 수행한 결과이다.

도 6은 당근 종자모 형질 관련 분자마커 개발을 위해 작성된 AS-PCR 프라이머를 이용해 무모형 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 라인과 유모형 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1040 라인을 이용한 Allele-Specific PCR 실험을 수행한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

[0033] 본 발명자들은 영농법인 캐로톱씨드로부터 제공받은 무모 종자 표현형 당근(Daucus carota var. sativa) 개체와 유모 종자 표현형 당근 개체의 종자를 종자 발생 초기의 자방이 부풀어 올라 종자모가 생성되기 시작하는 시기에 채취하였다.

[0034] 채취된 종자의 RNA를 분리하여 cDNA library를 작성하고 EST 서열분석을 실시하였으며, 무모 종자 표현형 당근 개체와 유모 종자 표현형 당근 개체를 클러스터링(clustering) 한 결과, 대조되는 EST 서열을 비교분석하여 SNP 위치를 확인하였다. 각각의 개체 자가수분 라인을 이용하여 DNA를 채취하여 SNP를 확인하는 과정을 HRM 분석(High Resolution Melting analysis) 및 AS PCR(Allele-Specific PCR)을 수행하여 당근 종자모 형질 관련 분자마커로 개발하였다.

[0035] **실시예 1. 무모 종자 표현형 개체 및 유모 종자 표현형 개체 확인**

[0036] 무모 종자 표현형 개체가 확인된 CT-SMR 616 라인을 형매 교배하여 육성된 CT-SMR 616 OP 389 라인에서 무모 종자 표현을 보인 3개의 개체(CT-SMR 616 OP 389-1, CT-SMR 616 OP 389-2, CT-SMR 616 OP 389-3)를 선발하였다. 그 중 CT-SMR 616 OP 389-1 개체를 다시 자가수분 하여 CT-SMR 616 OP 659 라인을 육성하였다.

[0037] 한편, CT-SMR 616 라인을 형매 교배하여 육성된 유모 종자 표현형 라인에서 CT-SMR 616 OP 616-33 개체를 선발하였다. 선발된 개체를 자가수분 하여 유모 종자 표현형을 갖는 CT-SMR 616 OP 677 라인을 육성하였다. 육성된 CT-SMR 616 OP 677 라인 중 CT-SMR 616 OP 677-14 개체를 이용하여 무모 종자 표현형 개체의 대조군으로 사용하였다.

[0038] 상기 선발된 무모 종자 및 유모 종자 개체의 종자 표현형은 육안과 현미경을 통해 확인하였다(도 1).

[0039] **실시예 2. 선발된 당근 개체들의 cDNA library 작성 및 EST sequencing**

[0040] 선발된 무모 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 659-1 개체와 유모 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 677-14 개체의 cDNA library를 작성하기 위해 각 개체가 수정 후 자방이 부풀어 오르기 시작하고, 종자모가 생성되는 초기에 종자를 채취하여 RNA를 추출하였다.

[0041] 추출된 RNA의 상태와 농도를 분광광도계(UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop® ND-1000)와 전기영동을 통해 확인하였다(표 1, 도 2).

표 1

Name	Conc.(ng/ul)	A260/A280	Total vol.(ul)	Total quantity
CT-SMR 616 OP 659-1	2536	1.99	400	1000ug
CT-SMR 616 OP 677-14	2172	1.94	450	1000ug

[0043] 상기 추출된 RNA에서 mRNA를 분리한 후 농도를 확인하였다(표 2).

표 2

Name	Conc.(ng/ul)	A260/A280	Total vol.(ul)	Total quantity
CT-SMR 616 OP 659-1	111.5	1.94	40	4.5ug
CT-SMR 616 OP 677-14	72.7	1.92	40	2.9ug

[0045] 상기 분리된 mRNA를 이용하여 cDNA library를 작성하기 위하여 Oligo(dT) linker-primer, reverse transcriptase, DNA polymerase I, 및 adopter를 이용하여 cDNA를 조합하였다. 조합된 cDNA는 Gel filtration을 통해 phagemid type cDNA library로 작성되었다. 이 때 SOLR strain E.coli 및 pBluescript SK- vector를 사용하였다. 이 후 EcoRI 과 XhoI 제한효소를 이용하여 삽입 체크(insertion check)를 수행하였다(도 3).

[0046] 작성된 cDNA library를 이용하여 각 개체별 EST 서열분석을 실시하였다. 무모형 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 659-1 개체와 유모형 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 677-14 개체에서 각각 1248개의 EST를 서열분석 하였다.

[0047] 그 결과, CT-SMR 616 OP 659-1 개체에서는 총 797,105bp를 sequencing 하였으며, sequence cleaning 단계와 clustering 단계를 거친 결과, 84,126bp의 98개 contig와 478,697bp의 761개 singleton을 확인하였다.

[0048] 한편, CT-SMR 616 OP 677-14 개체에서는 총 954,718bp를 sequencing 하였으며, sequence cleaning 단계와 clustering 단계를 거친 결과 85,680bp의 90개 contig와 651,535bp의 827개 singleton을 확인하였다.

[0049] **실시예 3. 무모 종자 표현형 개체와 유모 종자 표현형 개체의 EST sequence 결과 비교 분석을 통한 SNP 위치 확인**

[0050] 무모 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 659-1 개체와 유모 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 677-14 개체의 EST sequencing

을 통해 확인된 contig와 singleton 결과를 Sequencher ver 4.10.1 program을 이용하여 다시 clustering 하여, 비교 분석을 실시하였고, 이를 통해 SNP(Single Nucleotide Polymorphism site)를 확인하였다.

[0051] 무모 종자 표현형 개체에서 서열번호 1의 서열(659-1_09-E02-R EST sequence)과 유모 종자 표현형 개체에서 서열번호 2(677-14_03-B01-R EST sequence)의 서열을 비교한 결과, 서열번호 1의 291bp와 서열번호 2의 285bp에서 G/A SNP 위치를 확인할 수 있었다(도 4). 확인된 SNP site를 659-677-6으로 명명하였다.

[0052] 실시예 4. HRM 분석을 통한 당근의 무모 종자 계통 선발용 SNP 검증 및 SNP 확인을 위한 HRM 분자마커의 개발

[0053] 실시예 3에서 확인된 당근의 무모 종자 계통 선발용 SNP의 검증 및 SNP 확인을 위한 분자마커의 개발을 위하여 HRM 분석(High Resolution Melting Analysis)을 수행하였다.

[0054] HRM 분석은 EST sequence를 이용하였고, 효과적인 분석을 위해 생성물 사이즈 범위(product size range)를 60-90으로 설정하여 프라이머 3 소프트웨어를 이용해 HRM 분석을 위한 프라이머를 작성하였다. 작성된 프라이머는 659-677-6-HRM-F(서열번호 3) 및 659-677-6-HRM-R(서열번호 4)로 명명하였다(표 3).

표 3

프라이머	염기서열
659-677-6-HRM-F (서열번호 3)	5'-GGG GCC TTT CGG AAC AAT-3'
659-677-6-HRM-R (서열번호 4)	5'-AAG TCC ATT GTT GGC AGC AT-3'

[0056] HRM 분석을 통한 당근 종자도 형질 관련 SNP 분자마커의 검증을 위해, cDNA library 작성 및 EST 서열분석에서 사용되었던 무모 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 659-1 개체를 비롯하여 CT-SMR 616 OP 659-2, CT-SMR 616 OP 659-3 개체의 자가 수분 후대 라인인 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 라인에서 각각 6개체씩을 선발하였다.

[0057] 또한 cDNA library 작성 및 EST 서열분석에 사용되었던 유모 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 677-14 개체의 자가 수분 후대 라인인 CT-SMR 616 OP 1040 라인에서 6개체를 선발하였다.

[0058] 이렇게 선발된 총 12개체에 대하여 서열번호 3 및 서열번호 4의 프라이머로 HRM 분석을 수행하여 상기 실시예 3에서 발굴한 SNP의 당근 무모 종자 계통 선발용 분자마커로의 활용가능성에 대해 검증하였다.

[0059] HRM 분석은 Qiagen Type-it HRM PCR kit를 이용하여 12.5ul 2x HRM PCR Master Mix, 각각 1.78ul 10p primer, 8ul RNase free water, 개체별 DNA 1ul의 조성으로 수행하였고, Corbett Rotor-Gene 6000을 통해 95℃에서 5분간 Hold 후 95℃에서 10초, 60℃에서 35초 45cycle을 진행한 후 65℃에서 95℃까지 2초에 0.1℃씩 올라가며 진행하였다.

[0060] 그 결과, 무모 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 라인과 유모 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1040 라인의 용해 곡선(Melting Curve)에서 뚜렷한 차이를 보임을 알 수 있었고, 이를 통해 659-677-6 SNP site는 당근의 종자도 형성과 유의하게 연관된 SNP(Single Nucleotide Polymorphism) 위치임을 확인할 수 있었다(도 5).

[0061] 또한, 상기 결과를 바탕으로 659-677-6 SNP site의 서열번호 3 및 서열번호 4의 HRM 프라이머가 당근 종자도 형질 선발에 분자마커로 유용하게 사용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0062] 실시예 5. AS PCR 분석을 통한 당근의 무모 종자 계통 선발용 마커 검증

[0063] 상기 실시예 4에서 개발된 HRM 분자마커와 더불어 더욱 간단한 방법으로 659-677-6 SNP site를 확인할 수 있는 분자마커를 개발하기 위하여 AS(Allele-Specific) PCR 분석을 수행하였다.

[0064] AS PCR 분석을 위하여, 무모 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 라인과 유모 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1040 라인에서 각각 6개체씩, 총 12개체를 선발하여 분석하였다.

[0065] AS PCR 분석에 사용된 프라이머는 659-677-6 SNP 위치의 G/A 특이적 다형성을 프라이머의 3' 말단에 배치하여 PCR을 통해 확인할 수 있도록, 유모 종자 특이적 FRONT 프라이머(5' 프라이머)와 무모 종자 특이적 FRONT 프라

이머(5' 프라이머), 동일한 REVERSE 프라이머(3' 프라이머)를 작성하였다. 작성된 프라이머는 659-677-6-AS-HF(서열번호 5), 659-677-6-AS-HLF(서열번호 6) 및 659-677-6-AS-R(서열번호 7)로 명명하였으며 표 4와 같다.

표 4

프라이머	염기서열
659-677-6-AS-HF (서열번호 5)	5'-TTT CGG AAC AAT GAG GAA GAA A-3'
659-677-6-AS-HLF (서열번호 6)	5'-TTT CGG AAC AAT GAG GAA GAA G-3'
659-677-6-AS-R (서열번호 7)	5'-TTC GAC AGC AAC AAC TCC AG-3'

이렇게 선발된 총 12개체에 대하여 서열번호 5 및 서열번호 7의 프라이머로 AS PCR 분석을 수행하여 659-677-6 SNP site의 당근 무모 종자 계통 선발용 분자마커로의 활용가능성에 대해 검증하였다.

AS PCR 분석은 iNtRON Maxime PCR PreMix(i-taq)를 이용하여, 각각 1ul 10p primer, 개체별 DNA 1ul의 조성으로 수행하였으며, PCR machine을 통해 95℃에서 5분 Hold 후 97℃에서 45초, 64.5℃에서 45초간 Annealing, 72℃에서 45초간 35cycle을 수행하였다.

AS PCR 분석 결과, 유모 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1040 라인에서 뚜렷한 밴드를 확인할 수 있었고, 무모 종자 표현형 CT-SMR 616 OP 1024, 1025, 1026 라인에서 밴드를 관찰할 수 없었다(도 6).

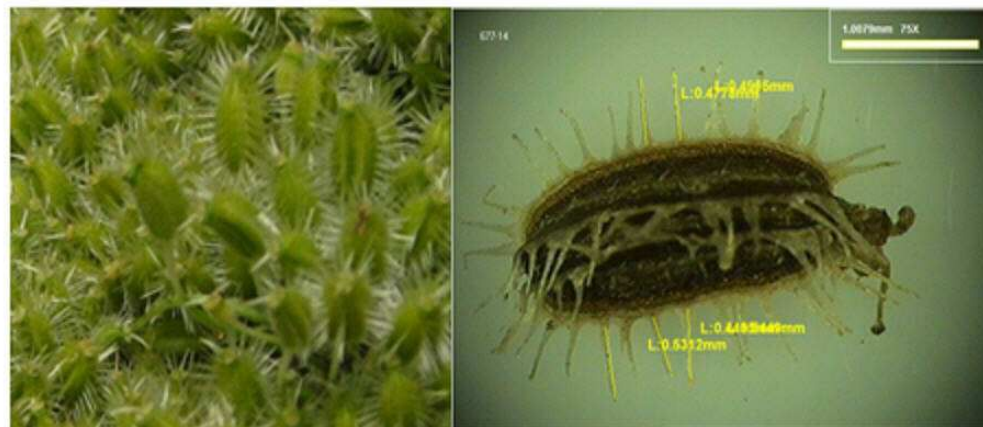
이러한 결과를 통해, 659-677-6 SNP site는 당근의 종자모 형질과 관련하여 유의하게 연관된 분자마커임을 다시 한번 확인할 수 있었고, HRM 분자마커와 더불어 간단한 AS PCR 방법을 통하여 당근의 무모 종자 계통을 선발하기 위하여 상기 서열번호 5 내지 서열번호 7의 프라이머를 유용하게 활용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면

도면1

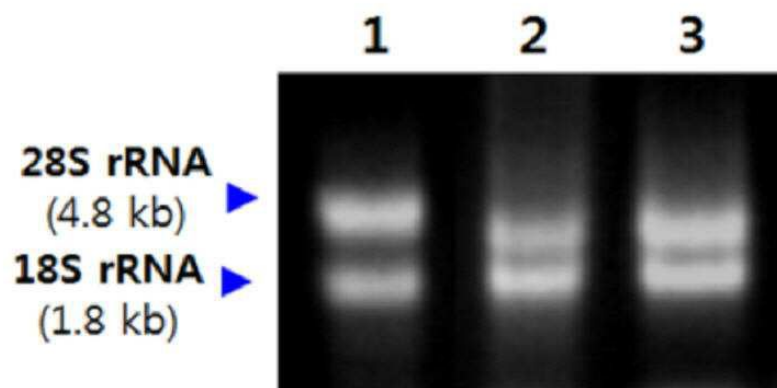


CT-SMR 616 OP 659-1



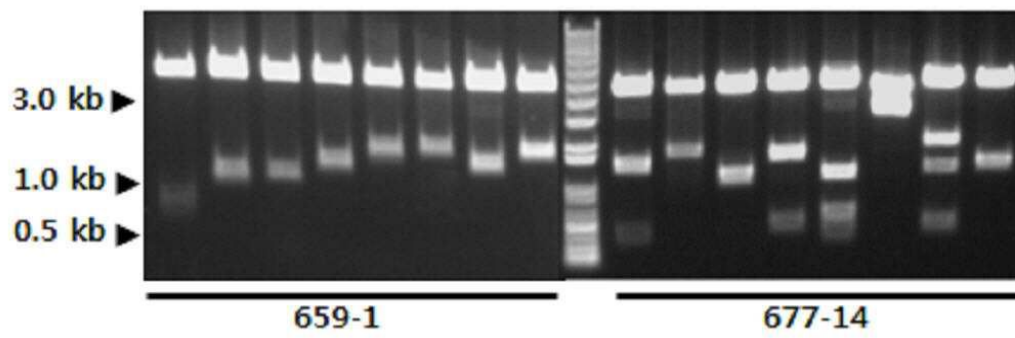
CT-SMR 616 OP 677-14

도면2



- 1: Control(human total RNA)
- 2: CT-SMR 616 OP 659-1
- 3: CT-SMR 616 OP 677-14

도면3



도면4

```

>1c1|61417
Length=1236
Score = 1838 bits (99%), Expect = 0.0
Identities = 1027/1040 (99%), Gaps = 11/1040 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 14 GC8GTGGCGGCCCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGAGGG 73
Sbjct 13 GC8GTGGCGGCCCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGGCACGA-GG 71

Query 74 TATCATTTCATACACATCTATTTTCAGCCATGGGAAAGTGCTACCCAACAGTGAGCGAGG 133
Sbjct 72 ----ATTTCATACACATCTATTTTCAGCCATGGGAAAGTGCTACCCAACAGTGAGCGAGG 127

Query 134 AGTACAAGGTTGCTGTGACAAATGCAGGAGGAAGCTCAGAGGATTTCATCGCTGAGAAGA 193
Sbjct 128 AGTACAAGGTTGCTGTGACAAATGCAGGAGGAAGCTCAGAGGATTTCATCGCTGAGAAGA 187

Query 194 ATTGTGCTCCTCTTATGCTTTCGCTTGGCTGGCAGTCAGCTGGTACTTATGATGTTAAGA 253
Sbjct 188 ATTGTGCTCCTCTTATGCTTTCGCTTGGCTGGCAGTCAGCTGGTACTTATGATGTTAAGA 247

Query 254 CCAAGACTGGGGGGCCTTTCGGAACAATGAGGAAGAGTTTGAAGCAGTCTCATGCTGCCA 313
Sbjct 248 CCAAGACTGGGGGGCCTTTCGGAACAATGAGGAAGAGTTTGAAGCAGTCTCATGCTGCCA 307

Query 314 ACAATGGACTTGATATTGCTGTTAGGCTGTTGGAGCCTTTTAAGGAGCAGTTCCCATCA 373
Sbjct 308 ACAATGGACTTGATATTGCTGTTAGGCTGTTGGAGCCTTTTAAGGAGCAGTTCCCATCA 367

Query 374 TCTCTTATGGTGATTTGTATCAGTTGGCTGGAGTTGTTGCTGTGCGAATTACTGGAGGTC 433
Sbjct 368 TCTCTTATGGTGATTTGTATCAGTTGGCTGGAGTTGTTGCTGTGCGAATTACTGGAGGTC 427

Query 434 CTGATGTTCCGTTCCACCCAGGAAGGCCGACAAAGAGGAGCCACCACAGGAAGGCCGCT 493
Sbjct 428 CTGATGTTCCGTTCCACCCAGGAAGGCCGACAAAGAGGAGCCACCACAGGAAGGCCGCT 487

Query 494 TGCCCTAATGCTACTTTGGGAAATGATCATTTGAGAAATGTGTTTGTGAAACAATGGGAC 553
Sbjct 488 TGCCCTAATGCTACTTTGGGAAATGATCATTTGAGAAATGTGTTTGTGAAACAATGGGAC 547

Query 554 TTTGTGACAAGGATATCGTTACCCCTCTCTGGTGGCCACACCCCTGGGACGCGCTCATAAAG 613
Sbjct 548 TTTGTGACAAGGATATCGTTACCCCTCTCTGGTGGCCACACCCCTGGGACGCGCTCATAAAG 607

Query 614 AGCGTTCTGGGTTTGAAGGACCCCTGGACAAACCAATCCTCTCATCTTTGATAACTCCTACT 673
Sbjct 608 AGCGTTCTGGGTTTGAAGGACCCCTGGACAAACCAATCCTCTCATCTTTGATAACTCCTACT 667

Query 674 TCAAGGAACCTCTTGACCCGAGAGAAGGAAGGGCTTCTTCAACTCCCAACTGACAAGTCTC 733
Sbjct 668 TCAAGGAACCTCTTGACCCGAGAGAAGGAAGGGCTTCTTCAACTCCCAACTGACAAGTCTC 727

Query 734 TTCTTGAAGACCCCTGTCTTCCCTCCCTTGTGACAAATATGCTGCTGATGAGGATGCCT 793
Sbjct 728 TTCTTGAAGACCCCTGTCTTCCCTCCCTTGTGACAAATATGCTGCTGATGAGGATGCCT 787

Query 794 TCTTTGCCGACTATGCAGAACTCTCAGATGAAGCTTTCTGAACTTGGGTTTGCTGAGGCTT 853
Sbjct 788 TCTTTGCCGACTATGCAGAACTCTCAGATGAAGCTTTCTGAACTTGGGTTTGCTGAGGCTT 847

Query 854 AAGCTCTGAGAAACAAGACAGCTTTCTCAATATGAGTGTTCATGTTTATGTTTACAAAGTT 913
Sbjct 848 AAGCTCTGAGAAACAAGACAGCTTTCTCAATATGAGTGTTCATGTTTATGTTTACAAAGTT 907

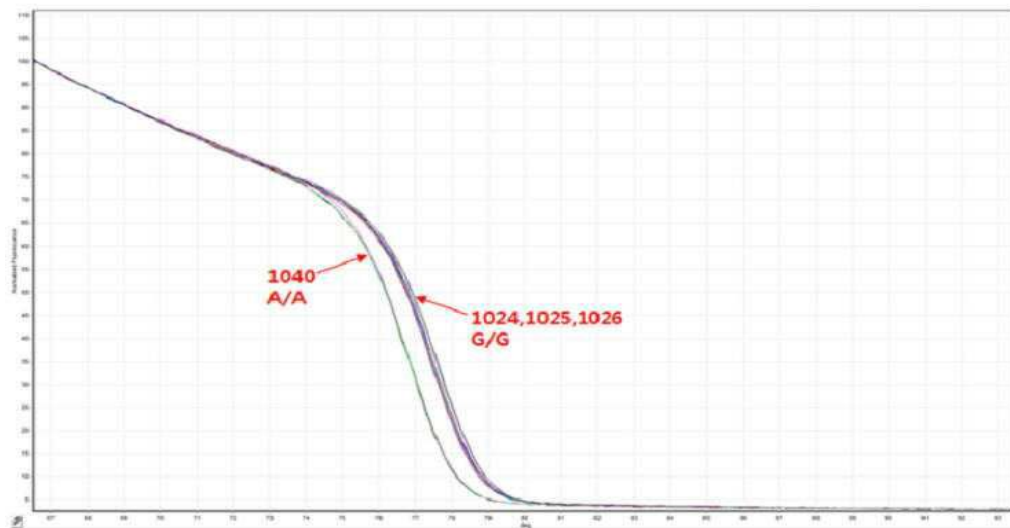
Query 914 GTAGTTTATTATGATGAAAGAGTTGCTGTAGCTACCCATTTTGTCAATTTACCCGCATAA 973
Sbjct 908 GTAGTTTATTATGATGAAAGAGTTGCTGTAGCTACCCATTTTGTCAATTTACCCGCATAA 967

Query 974 TAATCGATTGAACCTTTTCCACCTTTGGGTTTTATAAACAGCCCAGTATCTGCATCGCGC 1033
Sbjct 968 TAATCGATTGAACCTTTTCCACCTTTGGGTTTTATAAACAGCCCAGTATCTGCATCGCGC 1022

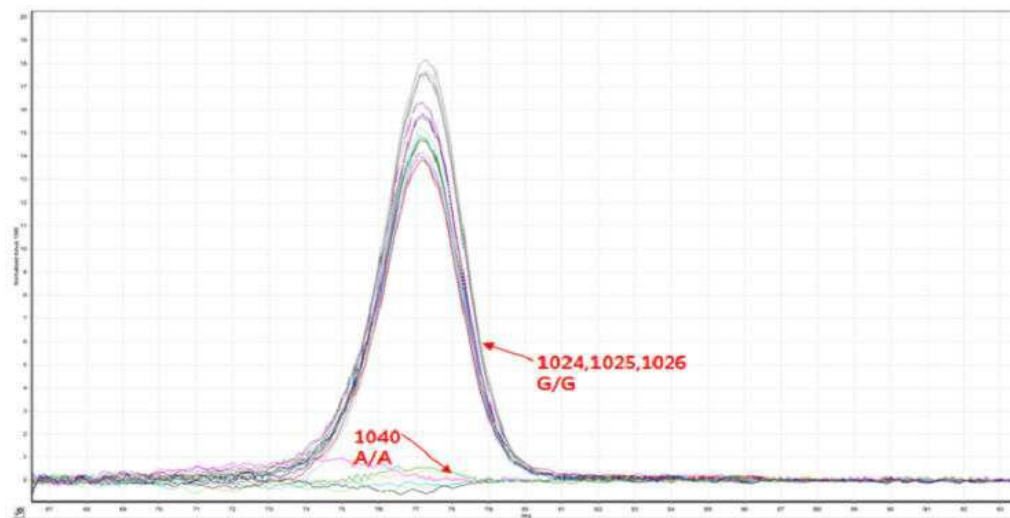
Query 1034 AACTTATGTGGTTATTTGCC 1053
Sbjct 1023 AACT-ATGTGGTTATTTGCC 1041

```

도면5

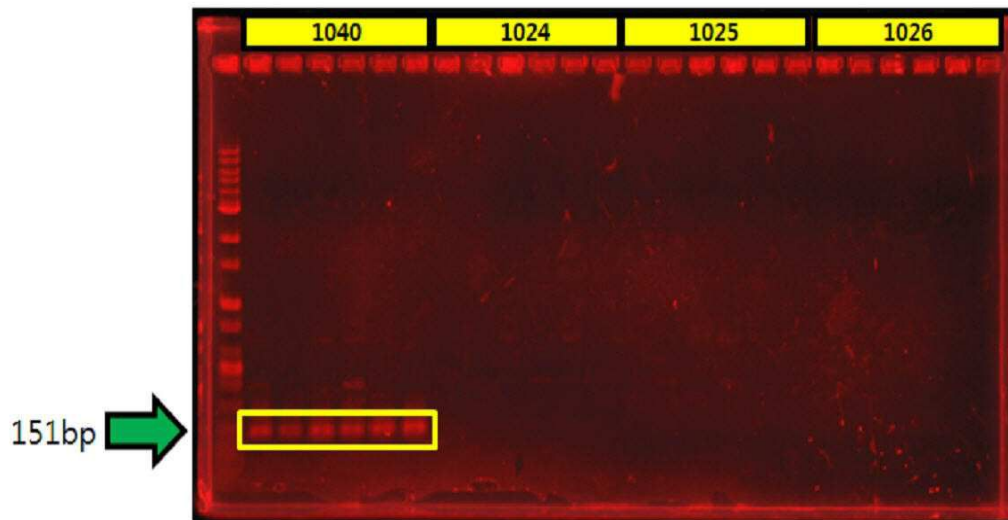


Normalised Graph



Difference Graph

도면6



서열 목록

<110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY

<120> Single Nucleotide Polymorphism Molecular Marker Related to
Hairless-Seed Characteristic in Carrot

<130> SDP50410

<160> 7

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 1157

<212> DNA

<213> Daucus carota var. sativa

<400> 1

```

ggactgaact cacgcggtgg cggccgctct agaactagtg gatcccccg gctgcaggaa      60
ttcggcacga gggatcatt tcatacacat ctattttcag ccatgggaaa gtgctacca      120
acagtgagcg aggagtacaa ggttgctgtc gacaaatgca ggaggaagct cagaggattc      180

atcgtgaga agaattgtgc tcctcttatg ctctgtcttg cgtggcactc agctggtact      240
tatgatgta agaccaagac tggggggcct ttcggaacaa tgaggaagaa gcttgagcag      300
tctcatgctg ccaacaatgg acttgatatt gctgttaggc tgttgagacc ttttaaggag      360
cagttcccca tcattcttta tgggtatttg tatcagttgg ctggagttgt tgctgtcgaa      420
attactggag gtctgatgt tccgttccac ccaggaaggc cggacaaaga ggagccacca      480
caggaaggcc gcttgcctaa tgctactttg ggaaatgac attgagaaa tgtgtttgtt      540
    
```

gaaacaatgg gactttgtga caaggatatac gttaccctct ctgggtggcca caccctggga	600
cgcgctcata aagagcgttc tgggtttgaa ggaccctgga caaccaatcc tctcatcttt	660
gataactcct acttcaagga actcttgacc ggagagaagg aagggttct tcaactccca	720
actgacaagt ctcttcttga agaccctgtc ttccgtcccc ttgtcgacaa atatgtgct	780
gatgaggatg ccttctttgc cgactatgca gaatctcaca tgaagcttcc tgaacttggg	840
tttgctgagg ctttaagctct ggagaacaag acagctttct caatatgagt gtcattgttt	900
agtttataaa gttgtagttc attatgatga aagagttgct gtagctaccc attttgcatt	960
tttaccgcga taataatcga ttgaactctt tccacctttg gggtttataa acagcccagt	1020
atctgcatcg cgcaacttat gtggttattt gcccataaaa ataagacaca taaataaaga	1080
aaagaacat aaaatctcga ggggggcccgg taccaatcgc ctataagtga gtcgtattac	1140
aattccactg gccgtcg	1157
<210> 2	
<211> 1236	
<212> DNA	
<213> Daucus carota var. sativa	
<400> 2	
agacgggact atgcggtggc ggccgctcta gaactagtgg atccccggg ctgcaggaat	60
tcggcacgag gatttcatac acatctattt tcagccatgg gaaagtgcta cccaacagtg	120
agcaggaggt acaaggttgc tgtcgacaaa tgcaggagga agctcagagg attcatcgct	180
gagaagaatt gtgctcctct tatgcttcgt ctgctgtggc actcagctgg tacttatgat	240
gttaagacca agactggggg gcctttcgga acaatgagga agaaacttga gcagtctcat	300
gtgccaaca atggacttga tatttctgtt aggtctgttg agcctttcaa ggagcagttc	360
cccatcatct ctataggta ttgtatcag ttggctggag ttgttctgt cgaaattact	420
ggaggtcctg atgttccgtt ccaccagga aggccgaca aagaggagcc accacaggaa	480
ggccgcttgc ctaatgttac ttgggaaat galcatttga gaaatgtgt tgttgaacaa	540
atgggacttt gtgacaagga tatcgttacc ctctctggtg gccacacct gggacgcgct	600
cataaagagc gttctgggtt tgaaggaccc tggacaacca atcctctcat ctttgataac	660
tcctacttca aggaactctt gaccggagag aaggaagggc ttcttcaact cccaactgac	720
aagtctcttc ttgaagaccc tgtcttccgt ccccttctcg acaaatatgc tgctgatgag	780
gatgccttct ttgccgacta tgcagaatct cacatgaagc ttctgaact tgggtttgct	840
gaggcttaag ctctggagaa caagacagct ttctcaatat gagtgtcatg ttttagttta	900

caaagtgtga gttcattatg atgaaagagt tgctgtagct acccattttg tcattttacc 960
cgcataataa tcgattgaac tctttcacct tgggttttat aacagcccag tatctgcatc 1020

gcaactatgt ggttatttgc ctgtggtgtc acatatatta cagtagtagt agtttgctat 1080
gctttaaaaa aaaaaaaaaa actcgagggg gggccggtac ccatcgcta tattgagtcg 1140
tatacatcac tgggcgtcgt tacacgtctg actgggacac ctgcgttacc actatgcctt 1200
gcagacattc ctttgcacac ttgcgcttaa tatgcg 1236

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> FRONT PRIMER FOR HRM-PCR
<400> 3
ggggcctttc ggaacaat 18

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> REVERSE PRIMER FOR HRM-PCR
<400> 4
aagtcattg ttgcagcat 20

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> FRONT PRIMER FOR AS-PCR
<400> 5
tttcggaaca atgaggaaga aa 22

<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> FRONT PRIMER FOR AS-PCR

<400>	6	
tttcggaaca atgaggaaga ag		22
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	REVERSE PRIMER FOR AS-PCR	
<400>	7	
ttcgacagca acaactccag		20