



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0065228
(43) 공개일자 2011년06월15일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0122112

(22) 출원일자 2009년12월09일

심사청구일자 2009년12월09일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

박영두

경기도 용인시 수지구 성북동 성동마을 수지자이 1차아파트 108동 702호

이기호

부산광역시 동래구 온천1동 153-8 SK히브스카이 102동 2206호

(74) 대리인

특허법인다울

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 배추 속 식물의 유전체 기능 분석용 TAIL PCR 방법

(57) 요약

본 발명은 배추 속(*Brassicaceae genus*) 식물에서 외부 유전자의 삽입에 의해 발생한 돌연변이체 게놈을 분석하는 TAIL PCR 분석 방법에 관한 것이다. 본 발명의 TAIL PCR 분석 방법은, 외부 유전자의 삽입에 의해 돌연변이가 발생한 배추 속 식물, 또는 이와 유사한 게놈 구조를 갖는 다른 고등 식물의 돌연변이 발생 부위의 DNA를 소량의 DNA로 짧은 시간에 분석할 수 있어, 기능 유전체 연구에 효과적으로 사용할 수 있다.

대표도 - 도1

InterPro - Protein analysis

Search for species: Search for gene/protein: (0 / 4,298,919 / 10)

Selected species: *A.thaliana* [Change species](#)

InterPro: [Conservation](#) [Domain](#) [GO](#) [Statistics](#)

Select analysis: [Top 25 hits](#) [InterPro](#)

InterPro ID	Protein matched (Protein coverage)	Rank	Term
IPR014038	1558 (1.92%)	1	Protein kinase-like
IPR000799	1325 (1.62%)	2	Protein kinase, cdk
IPR014442	833 (1.02%)	3	Serine/threonine protein kinase-related
IPR002271	833 (1.02%)	4	Serine/threonine protein kinase, active site
IPR014441	582 (0.72%)	5	Protein kinase ATP-binding, conserved site
IPR014993	531 (0.65%)	6	Cyclin-like F-box
IPR014111	519 (0.64%)	7	Leucine-rich repeat
IPR014181	502 (0.62%)	8	Zinc finger, RING-type
IPR015083	500 (0.61%)	9	Zinc finger, RING/VEP-type
IPR003855	483 (0.59%)	10	Protein phosphatase repeat
IPR014048	283 (0.35%)	11	Winged-helix
IPR000057	373 (0.46%)	12	Transcription factor
IPR005093	335 (0.41%)	13	AA+ATPase core
IPR014024	332 (0.41%)	14	Armadillo-type fold
IPR012087	249 (0.31%)	15	Transmembrane domain
IPR004689	323 (0.40%)	16	IG-ILF repeat
IPR004689	288 (0.35%)	17	SAITF, DNA-binding
IPR000004	289 (0.35%)	18	RNA recognition motif, RRM-1
IPR014186	282 (0.35%)	19	IG-ILF repeat
IPR012077	283 (0.35%)	20	Nucleotide-binding, alpha-beta fold
IPR012337	255 (0.31%)	21	Polynucleotide transferase, ribonuclease H fold
IPR012043	255 (0.31%)	22	IG-ILF repeat
IPR014778	272 (0.34%)	23	IG-ILF repeat
IPR001128	272 (0.34%)	24	Cysteine protease

특허청구의 범위

청구항 1

배추 속(*Brassicaceae* genus) 식물에서 외부 유전자의 삽입에 의해 발생한 돌연변이체 지놈을 분석하는 PCR 분석 방법에 있어서,

서열번호 1 내지 서열번호 6에서 선택된 어느 하나의 임의 축퇴 프라이머(arbitrary degenerate primer), 및 제1차 특이적 프라이머를 사용하는 제1차 TAIL(thermal asymmetric interlaced) PCR 반응;

상기 선택된 임의 축퇴 프라이머, 및 제2차 특이적 프라이머를 사용하는 제2차 TAIL(thermal asymmetric interlaced) PCR 반응; 및

상기 선택된 임의 축퇴 프라이머, 및 제3차 특이적 프라이머를 사용하는 제3차 TAIL(thermal asymmetric interlaced) PCR 반응;

을 포함하되,

상기 특이적 프라이머는 상기 배추 속 식물에 삽입된 기지의 외부 유전자 서열에 기반하여 제작되고,

상기 제1차 특이적 프라이머 및 제2차 특이적 프라이머의 3 말단에 있는 3 내지 5bp의 염기서열은, 각각 제2차 특이적 프라이머 및 제3차 프라이머의 5 말단의 서열과 같도록 디자인되며,

상기 제1차 및 제2차 TAIL PCR 반응은,

상기 특이적 프라이머를 변성(denature)된 주형(template) DNA에 어닐링(annealing)한 후, 신장(elongation)시키는 제1차 및 제2차 신장 서브 단계; 및

상기 임의 축퇴 프라이머를 상기 제2차 신장 서브 단계를 마친 변성(denature)된 주형(template) DNA에 어닐링(annealing)한 후, 신장(elongation)시키는 제3차 신장 서브 단계;

를 각각 10 내지 15 사이클로 반복하여 수행되는 것을 특징으로 하는,

배추 속 식물의 유전체 기능 분석용 TAIL PCR 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1차 TAIL PCR 반응을 수행하기 전에,

상기 제1차 특이적 프라이머를 변성된 지놈 DNA(genomic DNA)에 어닐링 하여 신장시키는 반응을 5회 내지 8회 반복하여 수행하는 제1예비 신장 서브 단계; 및

상기 예비 신장 서브 단계를 마치고, 변성된 DNA에 상기 임의 축퇴 프라이머를 어닐링 한 후, 신장하는 제2예비 신장 서브 단계;

로 이루어진 예비 PCR 반응을 더 포함하되,

상기 제1예비 신장 서브 단계에서, 상기 지놈 DNA는 93℃ 내지 95℃에서 1분 내지 5분간 가열하여 변성되고,

상기 제2예비 신장 서브 단계에서, 상기 임의 축퇴 프라이머는 25℃ 내지 30℃에서 65℃ 내지 75℃로 2 내지 5분 동안 온도를 상승시키면서 어닐링 된 것을 특징으로 하는 배추 속 식물의 유전체 기능 분석용 TAIL PCR 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제1차 및 제2차 TAIL PCR 반응에서,

상기 특이 프라이머의 어닐링 온도는 제1 사이클에서 65℃로 시작하되, 이후 사이클이 증가할수록 0.5℃씩 상승되고,

상기 제1차, 제2차, 및 제3차 신장 서브 단계의 상기 어닐링 한 프라이머를 신장시키는 반응 시간은 상기 사이클이 증가될 때 마다 1초씩 연장되는 것을 특징으로 하는 배추 속 식물의 유전체 기능 분석용 TAIL PCR 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제3차 TAIL PCR 반응은

상기 선택된 임의의 축퇴 프라이머, 및 제3차 특이적 프라이머를 동시에 변형된 DNA 주형에 어닐링 한 후, 신장시키는 반응을 30 내지 50 사이클 반복하여 수행하되, 상기 어닐링 한 프라이머를 신장시키는 반응 시간은 상기 사이클이 증가될 때 마다 1초씩 연장되는 것을 특징으로 하는 배추 속 식물의 유전체 기능 분석용 TAIL PCR 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제1차 TAIL PCR 반응의 주형은 지놈 DNA이고,

상기 제2차 TAIL PCR 반응의 주형은 제1차 TAIL PCR 반응 산물이 10 내지 1000배 희석된 DNA이며,

상기 제3차 TAIL PCR 반응의 주형은 제2차 TAIL PCR 반응 산물이 10 내지 1000배 희석된 DNA인 것을 특징으로 하는 배추 속 식물의 유전체 기능 분석용 TAIL PCR 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 제1차 특이적 프라이머, 제2차 특이적 프라이머, 및 제3차 특이적 프라이머는 순차적으로 각각 서열번호 7, 서열번호8, 및 서열번호 9의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 배추 속 식물의 유전체 기능 분석용 TAIL PCR 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 제1차 특이적 프라이머, 제2차 특이적 프라이머, 및 제3차 특이적 프라이머는 순차적으로 각각 서열번호 11, 서열번호12, 및 서열번호 13의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 배추 속 식물의 유전체 기능 분석용 TAIL PCR 방법.

청구항 8

배추 속 식물의 유전체 기능을 분석하는데 이용되고, 서열번호 1 내지 서열번호 6으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 TAIL PCR용 임의의 축퇴 프라이머(arbitrary degenerate primer).

청구항 9

제1항 내지 제7항에 따른 TAIL PCR 방법에 따라 증폭된 단편의 염기 서열을 분석하는 단계;

상기 분석된 염기서열을 배추 속 식물의 지놈 DNA 서열과 비교하여 외부 유전자의 삽입 위치를 결정하는 단계;
및

상기 외부 유전자의 삽입으로 인해 기능에 이상이 있는 배추 속 식물의 유전자를 동정하는 단계;

를 포함하는 TAIL PCR 방법을 사용한 배추 속 식물의 유전체 기능 분석 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 유전체 기능 분석용 PCR 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 외부 DNA가 삽입되어 돌연변이가 발생한 배추 속(*Brassicaceae genus*) 식물의 유전체에 돌연변이가 발생 부위의 염기서열을 효과적으로 확인할 수 있는 TAIL PCR (thermal asymmetric interlaced PCR) 방법 및 이에 사용되는 프라이머에 관한 것이다

배경 기술

- [0002] cDNA 탐침자를 이용하여 지놈 라이브러리(genomic libraries)를 검색하는 방법은 알고 있는 염기서열로부터 미지의 근접 염기서열을 분리해내는 가장 일반적인 방법이다.
- [0003] 여러 생물 종에 대하여 지속적으로 라이브러리(libraries)가 구축되고, 구축된 라이브러리에 대한 연구가 진행됨에 따라, PCR 방법을 기반으로 하여, 외부 유전자가 삽입된 부위에 근접한 부위의 지놈 유전자 염기서열을 확인하고, 외부 유전자의 삽입에 의해 발생한 지놈 유전자의 기능 이상을 연구하여, 지놈 유전자의 기능을 연구하는 방법들이 새롭게 개발되고 있다.
- [0004] 상기 외부 유전자가 삽입된 부위에 근접한 부위의 지놈 유전자 염기서열(TES, tag end sequence)을 확인하는 방법으로 Inverse PCR, ligation-mediated PCR, 또는 rescue cloning 등이 있다.
- [0005] 그러나, 상기 방법들은 제한효소 인식 서열(restriction site)에 의존하는 방식을 채택하여, DNA 단편이 자가결합(self-ligation) 되거나, 동정 대상 DNA의 구조적 문제로 오류가 나타나는 경우에 이를 해결하기 어려운 문제점이 있었다.
- [0006] 특히 고등 식물에서는 제한효소에 의한 절단이 완벽하게 일어나지 않아, 외부 유전자가 삽입된 주변 서열(flanking sequence)의 확인이 용이하지 않음에 대하여 많은 논문에서 보고되고 있다.
- [0007] 현재, 효과적인 주변(flanking) DNA 염기 서열의 분석 기술은 BAC 클론(clone) 또는 YAC 클론이나, 벼, 감자 등의 식물을 대상으로 하여 개발되고 있다.
- [0008] 또한, 아라비도시스(*Arabidopsis*)에서는 T-DNA 삽입 위치 분석에 PCR(polymerase chain reaction) 방식을 이용하되, 기존에 알고 있는 외부 유전자 염기서열을 바탕으로 효과적으로 근접 유전자 염기서열을 확인 할 수 있는 방법인 TAIL(thermal asymmetric interlaced) PCR 방법이 개발되었다 (Liu *et al.*, 1995, *Genomics* 25: 674-681.).
- [0009] 상기 TAIL PCR 방법은 서열을 알고 있는 특이적 네스티드 프라이머(nested primer)와 16bp 정도의 축퇴 프라이머(degenerate primer)를 이용하여 다단계 열 사이클 프로그램(multi step thermal cycling program)을 수행하는 PCR 반응이며, 낮은 스트링젠시(low-stringency)와 높은 스트링젠시(high-stringency)를 반복하여 열 사이클 프로그램(thermal cycling program)을 수행하여, 외부 DNA가 삽입된 부위 주변의 목적 DNA를 증폭시켜주는 방법이다.
- [0010] 그러나, 일반적인 TAIL-PCR은 낮은 스트링젠시(low-stringency)와 높은 스트링젠시(high-stringency)로 이루어진 12 내지 15 TAIL 사이클을 수행하여, 300-700 bp 정도의 목적 DNA를 증폭할 수 있어, 2 kb 이상의 목적 DNA 해석이 필요한 경우에 적용이 힘든 단점이 있다.
- [0011] 또한, 배추 속(*Brassicaceae genus*)와 같이 복잡한 지놈(genome)을 가진 고등 식물체에 TAIL-PCR를 적용하게

되면, 대략 600 bp 이하의 유전자 특이적 산물(gene-specific products)만이 생성되어 그 효율 가치가 낮은 단점이 있으며, PCR 반응의 효율성 측면에서도, 증폭 효율이 낮아 아가로스 EtBr 겔(agarose-EtBr gels) 전기 영동 방식으로 확인이 어렵다는 단점이 있었다.

[0012] 한편, 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)는 한국에서 가장 널리 재배되는 4대 채소 작물 중에 하나이며, 현재 배추 지놈 프로젝트가 완료되어 지놈 라이브러리(genomic libraries)가 구축되어 유전체의 기능을 분석하는 연구가 진행되고 있다.

[0013] 그러나 이러한 배추 유전체의 기능을 분석하려는 연구는, 높은 GC 비율을 갖는 배추 유전체의 특성과 방대한 배추 유전체 크기로 인하여, 일반적인 PCR 효율 뿐만 아니라 근접 유전자 염기서열을 확인하기 위한 인버스 PCR(inverse PCR) 및 플라스미드 회수법(plasmid rescue cloning)의 효율이 낮은 문제점이 있다. 즉 배추 유전자의 경우, 상대적으로 낮은 GC비율 및 유전체 크기를 가지고 있는 애기장대에 비하여 유전자 분석이 어려운 기술적 한계에 직면하고 있다.

[0014] 따라서, 외부 유전자가 도입되어 유전자의 기능을 상실한 배추 속 식물의 도입 유전자 부위 근처의 서열을 효율적으로 손쉽게 분석하여 배추 속 유전자의 기능을 탐구할 수 있는 새로운 방법이 개발될 필요성이 대두되고 있다.

[0015]

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0016] 상술한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위해, 본 발명의 목적은 외부 유전자가 삽입된 배추 속(*Brassicaceae* genus) 식물의 유전체의 염기서열을 효과적으로 증폭하여 분석할 수 있는 새로운 TAIL PCR 방법 및 PCR 파라미터를 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 다른 목적은 배추 속 식물의 유전체 기능을 분석하는 데 이용되는 TAIL(thermal asymmetric interlaced) PCR용 임의 축퇴 프라이머(arbitrary degenerate primer; AD)를 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 TAIL PCR 방법을 이용하여, 배추 속 식물의 유전체에서 외래 유전자의 삽입 위치를 결정하고, 외래 유전자의 삽입에 의해 기능을 상실한 배추 속 식물의 유전자의 기능을 분석하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0019] 위와 같은 과제를 달성하기 위한 본 발명의 한 특징에 따른 배추 속 식물의 유전체 기능 분석용 TAIL PCR 방법은 서열번호 1 내지 서열번호 6에서 선택된 어느 하나의 임의 축퇴 프라이머(arbitrary degenerate primer), 및 제1차 특이적 프라이머를 사용하는 제1차 TAIL(thermal asymmetric interlaced) PCR 반응; 상기 선택된 임의 축퇴 프라이머, 및 제2차 특이적 프라이머를 사용하는 제2차 TAIL(thermal asymmetric interlaced) PCR 반응; 및 상기 선택된 임의 축퇴 프라이머, 및 제3차 특이적 프라이머를 사용하는 제3차 TAIL(thermal asymmetric interlaced) PCR 반응을 포함하여 이루어진다.

[0020] 본 발명의 PCR 반응은 일반적인 TAIL PCR 방법과 달리, 높은 GC비율을 가지고, 유전체의 크기가 방대하여 분석이 어려운 배추 속(*Brassicaceae* genus) 식물에서, 외부 유전자가 삽입된 부위를 효과적으로 분석하기 위하여, 특수하게 제작된 제1차, 제2차, 및 제3차 특이적 프라이머와 임의 축퇴 프라이머를 사용하여 TAIL PCR 반응을 수행한다.

[0021] 본 발명의 TAIL PCR은 일반적인 TAIL PCR과 다르게 어닐링 온도의 증가 및 합성 시간의 증가가 수반되며 프라이머 구성이 다르다. 따라서 본 발명의 TAIL PCR을, “VA(Variable Argument)-TAIL PCR”이라 부르기도 한다.

[0022] 상기 “특이적 프라이머(nested long gene-specific primers 또는 specific primer)” 상기 배추 속 식물에 삽입된 기지의 외부 유전자 서열에 기반하여 제작되거나 기지의 염기서열에 기반하여 제작되고, 상기 외부 유전체가 삽입된 지놈 DNA의 오른쪽 부위(right border) 또는 왼쪽 부위(left border)에 결합하며, 상기 TAIL PCR 반응 수행 시에 변성(denature)된 주형(template) DNA에 어닐링(annealing)된 후, 신장(elongation)될 수 있는

프라이머를 의미한다.

- [0023] 본 발명의 TAIL PCR 반응은 연속된 제1차 내지 제3차 TAIL PCR 반응으로 이루어지며, 각각의 반응에서 서로 다른 특이적 프라이머를 사용하여 TAIL PCR을 수행하게 되는데, 각각의 반응에 순차적으로 사용되는 특이적 프라이머를 편의상 “제1차 내지 제3차 특이적 프라이머” 라고 한다.
- [0024] 이 때, 본 발명의 상기 특이적 프라이머는 적어도 26 뉴클레오타이드(nucleotides) 이상의 염기를 갖도록 디자인 되었으며, 상기 제1차 특이적 프라이머 및 제2차 특이적 프라이머의 3 말단에 있는 3 내지 5bp의 염기서열은, 각각 제2차 특이적 프라이머 및 제3차 프라이머의 5 말단의 서열과 같도록 디자인 되어, 상기 TAIL PCR 반응의 효율을 증가시킬 수 있다.
- [0025] 일반적으로 알려진 TAIL-PCR 방법의 경우, 낮은 어닐링(annealing) 온도에 의하여 비특이적인 결합이 많이 발생한다. 그러나 상기 언급한 본 발명과 같이 말단의 서열이 서로 겹치도록 제작하면 겹치지 않는 프라이머 보다 비특이적 영역이 줄어든다. PCR에 이용되는 프라이머는 3 말단 부분부터 특이적인 부분을 인식하여 결합하는데, 이런 3 말단 부분의 염기서열을 기존에 반응한 산물과 겹치게 디자인하면, 일어날 수 있는 비특이적인 영역이 줄어들게 되어 직접 반응의 연쇄반응에 의한 산물로부터 안정적으로 특이적 영역을 증폭 가능하게 해 준다.
- [0026] 상기 제1차 내지 제3차 특이적 프라이머로는 외부 유전체가 삽입된 지놈 DNA의 오른쪽 부위(right border) 또는 왼쪽 부위(left border)에 결합하여 TAIL PCR 반응 수행 시에 변성(denature)된 주형(template) DNA에 어닐링(annealing)되고, 신장(elongation)될 수 있는 어떠한 프라이머도 될 수 있으며, 바람직하게는 순차적으로 각각 서열번호 7, 서열번호 8, 및 서열번호 9의 염기서열을 갖거나, 각각 서열번호 11, 서열번호12, 및 서열번호 13의 염기서열을 가질 수 있다.
- [0027] 그리고, 상기 제1차 및 제2차 TAIL PCR 반응은 상기 특이적 프라이머를 변성(denature)된 주형(template) DNA에 어닐링(annealing)한 후, 신장(elongation)시키는 제1차 신장 서브 단계; 상기 제1차 신장 서브 단계와 같은 조건에서 수행되는 제2차 신장 서브 단계; 및 상기 임의 축퇴 프라이머를 상기 제2차 신장 서브 단계를 마친 변성(denature)된 주형(template) DNA에 어닐링(annealing)한 후, 신장(elongation)시키는 제3차 신장 서브 단계를 한 사이클로 하여, 이를 반복 수행하여 이루어진다.
- [0028] 이때, 상기 제1차 TAIL PCR 반응에서는 제1차 특이적 프라이머를 사용하게 되고, 상기 제2차 TAIL PCR 반응에서는 제2차 특이적 프라이머를 사용하여야 한다.
- [0029] 이렇게, 특이적 프라이머를 사용하여 신장한 후, 곧바로 임의 축퇴 프라이머를 사용하는 사이클로 구성되는 통상의 TAIL PCR 반응과 달리, 특이적 프라이머를 사용하여 이를 신장시키는 상기 제1차 신장 서브 단계를 수행한 후에 이와 동일한 제2차 신장 서브 단계를 연속하여 반복 수행한 후, 임의 축퇴 프라이머를 사용하여 제3차 신장 서브 단계를 수행하는 사이클을 구성하게 되면, 검출하기 위한 특이적 염기서열에 근접한 미지의 염기서열을 증폭 할 수 있다. 이는 특이적 프라이머에 의한 2번의 증폭으로 기존에 알고 있는 염기서열에 프라이머를 붙일 수 있으며, 3차의 낮은 어닐링(annealing) 온도에서 임의 축퇴 프라이머가 미지의 지역 결합하게 된다. 이렇게 특이적인 프라이머 결합을 2회 반복하고 임의 축퇴 프라이머를 1회 진행하는 이유는, 1 사이클로 진행하면 목적하는 기존에 알고 있는 특이적인 염기서열에 근접하는 미지의 염기서열을 증폭할 수 있는 장점이 있기 때문이다.
- [0030] 상기 제1차 내지 제3차 신장 서브 단계로 이루어진 사이클은 제3차 TAIL PCR 반응을 위한 전처리 과정이므로, 과도한 증폭은 비특이적인 산물을 만들어 내기 때문에, 각각 10 내지 15 사이클로 반복하여 수행되는 것이 바람직하다.
- [0031] 본 발명에서, 상기 제1차 TAIL(thermal asymmetric interlaced) PCR 반응을 수행하기 전에, 상기 제1차 특이적 프라이머를 변성된 게놈 DNA(genomic DNA)에 어닐링 하여 신장시키는 반응을 5회 내지 8회 반복하여 수행하는 제1예비 신장 서브 단계; 및 상기 예비 신장 서브 단계를 마치고, 변성된 DNA에 상기 임의 축퇴 프라이머를 어닐링 한 후, 신장하는 제2예비 신장 서브 단계로 이루어진 예비 PCR 반응을 더 포함하여 수행하는 것이 바람직하다. 본 예비 PCR 반응을 통하여 기존에 알고 있는 특이적인 염기서열에 인접하는 목적인 미지의 염기서열과 어닐링(annealing)할 수 있는 변성(denature)된 주형(template) DNA를 다량 확보 할 수 있는 장점이 있다.
- [0032] 이 때, 상기 제1예비 신장 서브 단계에서, 상기 지놈 DNA(genomic DNA)는 93℃ 내지 95℃에서 1분 내지 5분간 순차적으로 가열하여 변성시킬 수 있으며, 바람직하게는 93℃에서 1분 동안 가열한 후, 95℃에서 5분간 가열하여 변성시킬 수 있다. 이는 초기 93℃의 가열로 식물체의 지놈DNA가 가지고 있는 2차 구조를 효과적으로 제거할 수 있으며, 이후 95℃로 완벽한 변성을 도모하여 큰 지놈을 가지고 있는 고등식물에서 PCR의 효율을 높일 수 있

게 한다.

- [0033] 또한, 상기 제2예비 신장 서브 단계에서, 상기 임의 축퇴 프라이머는 25℃ 내지 30℃에서 65℃ 내지 72℃로 2분 내지 5분 동안 온도를 상승시키면서 어닐링하는 것이 바람직하며, 가장 바람직하게는 25℃에서 75℃까지 3분간 천천히 가열하면서 어닐링하는 것이 바람직하다. 이는 온도를 천천히 올리면서 임의 축퇴 프라이머가 가지고 있는 어닐링 온도보다 낮은 온도에서 비특이적인 결합을 의도적으로 부여하고, 점진적으로 온도를 올리면서 특이적인 지역까지 모두 결합하도록 유도하여, 전체 TAIL PCR의 효율을 증가시켜준다.
- [0034] 한편, 상기 제1차 및 제2차 TAIL PCR 반응에서, 상기 특이 프라이머의 어닐링 온도는 제1 사이클에서 65℃로 시작되, 이후 사이클이 증가할수록 0.5℃씩 상승시키는 것이 PCR 효율을 더욱 증진시키는 측면에서 바람직하다. 이는 상기 특이적인 프라이머의 어닐링 온도가 높게 구성되어 있어서 결합 효율 및 증폭 효율이 떨어지므로, 특이적인 프라이머의 어닐링 온도보다 낮은 온도로 반응을 진행하여 목적하는 단편과 비특이적인 단편을 모두 증폭시키고 점차 어닐링 온도를 증가시켜주면서, 프라이머의 특이성을 높여 특이적인 단편만을 증폭시키기 위함이다. 이를 통하여 높은 GC 및 큰 지놈 크기를 가진 고등 식물(예: 배추 등)에서 TAIL-PCR 반응의 특이성 및 효율을 증가시킬 수 있다.
- [0035] 그리고, 상기 제1차, 제2차, 및 제3차 신장 서브 단계의 상기 어닐링 한 프라이머를 신장시키는 반응 시간은 상기 사이클이 증가될 때 마다 1초씩 연장시키는 것이 증폭 효율을 증가시키는 측면에서 바람직하다. 높은 GC 및 큰 지놈 크기를 가진 고등 식물에서는 PCR 증폭을 통해 긴 목적 단편을 얻기 힘들다. 또한 임의 축퇴 프라이머가 어느 정도 떨어진 곳에 결합하였는지 알 수 없기 때문에 최대의 반응 길이를 도모해야 한다. 이에 따라 사이클이 증가될 때 마다 1초씩 연장시킴으로써 초기 사이클에서 미처 끝까지 증폭되지 못한 증폭된 단편도 충분히 증폭될 수 있는 시간을 부여하게 되므로, 최종적으로 정확한 목적 PCR 산물을 얻을 수 있게 된다.
- [0036] 또한, 상기 제3차 TAIL(thermal asymmetric interlaced) PCR 반응은 상기 선택된 임의 축퇴 프라이머, 및 제3차 특이적 프라이머를 동시에 변형된 DNA 주형에 어닐링 한 후, 신장시키는 반응을 30 내지 50 사이클 반복하여 수행하되, 상기 어닐링 한 프라이머를 신장시키는 반응 시간은 상기 사이클이 증가될 때 마다 1초씩 연장시키는 방식으로 수행될 수 있다.
- [0037] 이때, 상기 제1차 또는 제2차 TAIL PCR 반응과 달리 상기 제3차 TAIL PCR 반응은 임의 축퇴 프라이머, 및 제3차 특이적 프라이머를 동시에 사용하여 PCR 반응을 수행하게 된다. 이는 1차와 2차 TAIL PCR 반응에서 특이적인 단편이 충분히 증폭되었기 때문에, 높은 효율로 PCR을 진행하기 위하여 임의 축퇴 프라이머 및 특이적인 프라이머가 결합하는 낮은 온도의 어닐링 온도에서 PCR을 진행하여 목적하는 단편만을 증폭하기 위함이다.
- [0038] 상기 제1차 TAIL PCR 반응에서는 주형으로 게놈 DNA(genomic DNA)를 사용하여 PCR 반응을 수행하게 되고, PCR 반응이 끝나고 생성된 PCR 산물을 바로 다음 단계의 TAIL PCR 반응의 주형으로 사용하게 된다.
- [0039] 이때, 다음 단계의 TAIL PCR 반응의 주형으로 사용되는 PCR 반응 산물에는 우리가 원하는 특이적 프라이머와 임의 축퇴 프라이머가 신장되어 증폭된 DNA 서열 이외에 다른 DNA 서열을 다수 포함하고 있으므로, 이를 감안하여 전 단계의 TAIL PCR 반응 산물이 10 내지 1000배 희석하여 사용하는 것이 바람직하다.
- [0040] 또한, 본 발명의 다른 특징에 TAIL(thermal asymmetric interlaced) PCR용 임의 축퇴 프라이머(arbitrary degenerate primer)는 서열번호 1 내지 서열번호 6으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 염기서열을 갖는다.
- [0041] 본 발명에서 제공하는 상기 임의 축퇴 프라이머는 EMBL-EBI(The European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute)의 Integr8(<http://www.ebi.ac.uk/integr8>)에서 제공하는 단백질체 분석(proteome analysis) 정보를 바탕으로 하여, 고등 식물 즉, 동일한 배추 속에 속하는 식물인 아라비도시스(*Arabidopsis*)가 가장 많이 가지고 있는 단백질 도메인(domain) 정보를 바탕으로 제작되었으며, NCBI의 단백질 BLAST로 분석하여 배추 속에서 가장 많은 상동성을 갖는 아미노산 서열(amino acids sequence)을 기반으로 하여 디자인 되었다.
- [0042] 상기 임의 축퇴 프라이머는 서열번호 1, 내지 서열번호 6의 염기 서열을 갖는데, 이 서열 중에서, M은 A또는C을 의미하고, R은 A 또는 G을 의미하며, V는 A 또는 C나 G을 의미하고, W는 A 또는 T을 의미하며, D는 A 또는 G나 T을 의미하고, S는 G 또는 C을 의미하며, N은 모든 염기를 의미하고, H는 A 또는 C나 T을 의미하며, Y는 C 또는 T을 의미한다.
- [0043] 상기 서열번호 1 내지 서열번호 6의 임의 축퇴 프라이머는 주형 DNA에 낮은 스트링젠시(stringency)를 가지고

어닐링 한 후, 신장될 수 있으며, 특이적 프라이머와 함께 TAIL PCR 반응을 수행하여 외부 유전자가 삽입된 주변부(flanking region)을 분석하는데 사용될 수 있다.

- [0044] 또한, 본 발명의 다른 특징에 따른 TAIL PCR 방법을 사용한 배추 속 식물의 유전체 기능 분석 방법은 상기 TAIL PCR 방법에 따라 증폭된 단편의 염기 서열을 분석하는 단계; 상기 분석된 염기서열을 배추 속 식물의 게놈 DNA 서열과 비교하여 외부 유전자의 삽입 위치를 결정하는 단계; 및 상기 외부 유전자의 삽입으로 인해 기능에 이상이 있는 배추 속 식물의 유전자를 동정하는 단계;를 포함한다.
- [0045] 본 발명은 식물 지놈 내의 알고 있는 단편의 염기서열을 바탕으로 하여, 근접한 미지의 염기서열을 효과적으로 알아내는 방법을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니며, 배추 속 식물의 미지의 염기서열을 방법을 확인하는 방법도 본 발명의 범주에 포함된다.
- [0046] 상기와 같이 TAIL PCR 방법을 사용하여 외부 유전자가 도입된 배추 속 식물의 DNA의 주변부(flanking region)의 서열을 분석하게 되면, 이렇게 분석된 서열과 배추 속 식물의 DNA 라이브러리의 상동성을 조사함으로써, 외부 유전자의 삽입으로 인해 기능에 이상이 유전자의 종류 및 그 유전자의 유전체 내의 위치를 분석할 수 있어, 유전자의 기능을 연구하는 데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0047] 이하, 본 발명의 TAIL PCR 방법을 단계별로 보다 구체적으로 설명한다.
- [0048] 첫째, 상기 TAIL PCR에 사용되는 임의 축퇴 프라이머를 제작하기 위하여, 배추 속 식물에서 가장 높은 빈도로 관찰되는 단백질 도메인을 1차 분석하였다.
- [0049] 상기 1차 분석을 위해서, EMBL-EBI(The European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute)의 Integr8(<http://www.ebi.ac.uk/integr8>)에서 제공하는 단백질체 분석(proteome analysis) 정보를 사용하였다.
- [0050] 상기 1차 분석된 단백질 도메인의 아미노산 서열을 NCBI의 단백질 BLAST로 2차 분석하여 배추 속에서 가장 많은 상동성을 갖는 아미노산 서열(amino acids sequence)을 찾아 내었다.
- [0051] 상기 상동성 분석은 욱안으로나 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다.
- [0052] 본 발명에서는 상기 2차 분석된 도메인의 아미노산 서열과 특이적으로 결합하는 임의 축퇴 프라이머 서열을 제작하기 위해 180 내지 250가지의 일정한 비율로 무작위성(randomize rate) 갖는 임의 축퇴 프라이머 서열만을 선택하여 이후 진행될 RACE PCR 반응의 반응 특이성을 증가시켰다.
- [0053] 상기 임의 축퇴 프라이머의 길이는 특별히 제한되지 않으며, 18 내지 23, 보다 바람직하게는 15 내지 20개의 염기서열을 가진다.
- [0054] 상기와 같은 방식을 통해 제조되어 RACE PCR 반응에 사용될 수 있는 임의 축퇴 프라이머 중에서 6개의 프라이머를 선택하여 각각 서열번호 1 내지 서열번호 6의 염기서열을 갖는 프라이머로 할당하였다.
- [0055] 둘째, 기지의 염기서열과 결합하는 특이적 프라이머를 제작하였다.
- [0056] 상기 특이적 프라이머는 효과적인 RACE PCR 반응을 도모하기 위해 최소 26 bp 이상으로 구성하여 정확성을 상승시켰으며, 싱글 스텝 어닐링-신장(single-step annealing-extension) PCR 단계를 수행 시, 어닐링 온도를 65 내지 68℃ 조건으로 수행된다.
- [0057] 또한 제1차 및 제2차 특이적 프라이머는 각각의 3' 말단에 있는 3 내지 5bp의 염기 서열을 각각 제2차 및 제3차 특이적 프라이머의 5' 말단과 일치하도록 디자인 하여, 특이적 중합 반응의 정확성을 증가시켰다.
- [0058] 본 발명에서, 프라이머의 길이는 특별히 제한되지 않으며, 26 내지 50, 보다 바람직하게는 26 내지 40개의 염기서열을 가진다.
- [0059] 셋째, 상기 제작된 임의 축퇴 프라이머와 특이적 프라이머를 사용하여 RACE PCR 반응을 수행하였다.
- [0060] 상기 RACE PCR 반응은 서열번호 1 내지 서열번호 6에서 선택된 어느 하나의 임의 축퇴 프라이머(arbitrary degenerate primer), 및 제1차 특이적 프라이머를 사용하는 제1차 TAIL(thermal asymmetric interlaced) PCR 반응; 상기 선택된 임의 축퇴 프라이머, 및 제2차 특이적 프라이머를 사용하는 제2차 TAIL(thermal asymmetric interlaced) PCR 반응; 및 상기 선택된 임의 축퇴 프라이머, 및 제3차 특이적 프라이머를 사용하는 제3차 TAIL(thermal asymmetric interlaced) PCR 반응으로 이루어진다.

[0061] 이때, 제1차 RACE PCR 반응에 사용된 주형 DNA는 배추 속 식물의 유전체에서 지놈 DNA를 추출하는 일반적인 방법에 의해 채취된 지놈 DNA를 사용하였고, 제1차 RACE PCR 반응 후 생성된 PCR 산물을 회석하여 다음 단계의 RACE PCR 반응의 주형으로 사용하였다.

[0062] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0063] 실시예 1: VA-TAIL PCR에 적용 가능한 배추 속 식물에 특이적인 임의 축퇴 프라이머의 제조

[0064] 고등 식물에서 가장 높은 빈도로 보유하고 있는 단백질의 도메인을 선택하기 위하여, EMBL-EBI의 Integr8(<http://www.ebi.ac.uk/integr8>)에서 제공하는 단백질체 분석 정보를 1차 검색하였으며, 검색어는 애기장대(arabidopsis)로 하였다. 획득된 단백질 정보를 NCBI(National Center for Biotechnology Information) Genbank와 protein BLAST로 2차 검색하여 배추 속에서 가장 많은 일치율을 나타내는 염기서열을 수집하였다.

[0065] 수집된 높은 빈도의 도메인 염기서열 가운데, 높은 상동성을 보이는 부분을 BLAST 프로그램으로 찾은 뒤, 그 부분을 중심으로 특이적으로 결합하고, 180 내지 250가지의 일정한 비율로 무작위성(degeneracy)을 제한함으로써, 반응 특이성을 증가시켜 프라이머를 제작하였다. 이렇게 제작된 된 프라이머는 하기 표 1과 같다.

표 1

프라이머	인식 도메인 (Accession No.)	가변 염기서열
AD1 (서열번호 1)	Zinc finger protein LSD1 (IPR005735)	5'-GAM RTG NCT VAM WTT G-3'
AD2 (서열번호 2)	Zinc finger protein LSD1 (IPR005735)	5'-DTA ASA TGN HNT TGC T-3'
AD3 (서열번호 3)	Serine/threonine protein kinase, threonine protein kinase (IPR008271)	5'-ARY CAC YGY GAT MTH A-3'
AD4 (서열번호 4)	Leucine-rich repeat (LRR) protein (IPR012569)	5'-C YTV ACY WSY TTG RAT-3'
AD5 (서열번호 5)	RNA recognition motif domain (IPR001890)	5'-CAY AGR GAT WTD AAA G-3'
AD6 (서열번호 6)	RNA recognition motif domain (IPR001890)	5'-VAY GTT RCY YRS TTT C-3'

[0067] 실시예 2: 특이적 프라이머의 제작

[0068] 기존에 알고 있는 염기서열을 기반으로 하여, 주형 DNA에 특이적으로 결합하는 VA-TAIL PCR용 특이적 프라이머를 제작하였다.

[0069] 특이적 프라이머는 제1차(SP1), 제2차(SP2), 및 제3차(SP3) 프라이머로 이루어졌으며, PCR 반응의 반응 산물의 특이성을 비교하기 위해 SP4 프라이머를 제작하였다. 일반적으로 최종적인 특이적인 산물을 구분하기 위하여 제1차 TAIL-PCR 반응 산물부터 제3차 반응까지 모두 전기영동하여 점차 PCR 산물의 크기가 작아지는 것을 찾는다. 그러나 SP4는 SP3가 결합하는 내부 염기서열에 인접하게 작성되어 있으므로, SP3와 유사한 위치에서 PCR 산물이 나타나게 된다. 이에 SP3 반응과 SP4 반응을 동시에 진행하여 나란히 전기영동을 하게 되면, 동일한 위치에 나타난 PCR 산물이 목적하는 산물임을 쉽게 알 수 있게 된다.

[0070] 특이적 프라이머는 외부 DNA인 T-DNA의 오른쪽(right) 및 왼쪽(left) 방향으로 각각 2세트가 제작되었다.

- [0071] 각각의 프라이머는 효과적인 반응을 도모하기 위해 최소 26 bp 이상으로 구성하여 주형 DNA에 특이적으로 결합하는 정확성을 상승시켰으며, 싱글 스텝 어닐링-신장 PCR 단계에서, 어닐링 온도를 65 내지 68℃로 하였다.
- [0072] 또한 각각의 프라이머의 3' 말단의 3-5bp를 다음 단계에 이용하는 primer의 5' 말단과 일치하도록 구성하여 미지의 영역의 특이적 중합 반응의 정확성을 증가시켰다.
- [0073] 제조된 특이적 프라이머는 1번(SP1)부터 순서대로 SP2, SP3, 및 SP4순으로 사용되며, 이에 따라 3' 말단을 동일하게 일치시켰다. 각각의 염기서열은 하기 표2와 같다.
- [0074] 각 프라이머에 표시된 밑줄은 다음 실시예 3의 반응에서 이용되는 각각의 특이적인 프라이머의 3' 말단이 일치된 지역을 표시한 것이다.

표 2

프라이머	염기서열	Tm(?)
L*-SP1 (서열번호 7)	5'-CTG TGT AGA AGT ACT CGC CGA TAG TGG <u>AAA</u> -3'	71.2
L-SP2 (서열번호 8)	5'- <u>GGA AAC</u> CGA CGC CCC <u>AGC AC</u> -3'	71.3
L-SP3 (서열번호 9)	5'- <u>AGC ACT</u> CGT CCG AGG GCA AAG <u>AAA TA</u> -3'	72.8
L-SP4 (서열번호 10)	5'- <u>GAA ATA</u> GAG TAG ATG CCG ACC GGA TCT G-3'	71.3
R*-SP1 (서열번호 11)	5'-CAG GTA TGG AAT TTC GCC <u>GAT TTT G</u> -3'	70.3
R-SP2 (서열번호 12)	5'- <u>ATT TTG</u> CGA CCT CGC AAG <u>GCA</u> T-3'	70.1
R-SP3 (서열번호 13)	5'- <u>GGC ATA</u> TTG CGC GTT <u>GGC G</u> -3'	69.9
R-SP4 (서열번호 14)	5'- <u>GGC GGT</u> AAC AAG AAA GGG ATC TTC ACT-3'	70.9

- [0076] (L은 T-DNA의 왼쪽 부위(Left-border) 부분, R은 오른쪽 부위(right-border) 부분과 결합하는 특이적인 프라이머를 의미한다.)

[0077] 실시예 3: VA-TAIL PCR을 이용한 배추 속 식물의 유전체 기능 분석

- [0078] 외부 DNA가 도입되어 돌연변이가 유발된 배추 속 식물의 외부 DNA 도입 위치를 동정하기 위하여, 주형이 되는 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 gDNA를 McCouch 등[McCouch SR, Kochert G, Yu ZH, Wang ZY, Khush GS, Coffman WR, Tanksley SD (1998) Molecular mapping of rice chromosomes. Theor. Appl. Genet. 76:815-829]에 의해 제시된 gDNA 분리 방법을 이용하여 분리하였다. 확보된 gDNA를 주형으로 VA-TAIL PCR을 진행하였다.

[0079] 3-1 예비 PCR 반응 및 제1차 TAIL PCR 반응

- [0080] 주형 gDNA는 1 μm을 사용하였고, 상기 실시예 1에서 제조된 6개의 임의 축퇴 프라이머 중에서 선택된 하나의 프라이머, 및 상기 실시예 2에서 제조된 제1차 특이적 프라이머 1번(L-SP1, 또는 R-SP1)를 사용하여 태크 중합효소(tag polymerase)로 하기 프로토콜에 따라 예비 PCR 반응 및 제1차 VA-TAIL PCR 반응을 실시하였다.

[0081] 3-1 a. 예비 PCR 반응

- [0082] a. 1차 예비 변성 단계: 93℃, 1분 → 95℃, 5분

- [0083] b. 1차 특이적 PCR 사이클: 94℃, 30초 → 71℃, 3분 30초(5회 반복)
- [0084] c. 2차 예비 변성 단계: 94℃, 30초
- [0085] d. 임의 축퇴 프라이머의 어닐링: 25℃에서 72℃로 3분간 천천히 가열하면서 어닐링시킴
- [0086] e. 신장 반응: 72℃, 2분 30초
- [0087] 3-1 b. 제1차 TAIL PCR 반응 (15 사이클)
- [0088] ① 1차 변성 단계: 94℃ 20초
- [0089] ② 1차 특이적 프라이머의 어닐링(숙성) 단계: 65℃, 30초(매 사이클 증가 시 마다 0.5℃씩 증가)
- [0090] ③ 신장 단계: 72℃ 2분 (매 사이클 증가 시 마다 1초씩 증가)
- [0091] ④ 2차 변성 단계: 94℃ 20초
- [0092] ⑤ 2차 특이적 프라이머 어닐링(숙성) 단계: 65℃ 30초 (매 사이클 증가 시 마다 0.5℃씩 증가)
- [0093] ⑥ 2차 신장 단계: 72℃ 2분 (매 사이클 증가 시 마다 1초씩 증가)
- [0094] ⑦ 3차 변성 단계: 94℃ 30초
- [0095] ⑧ 임의 축퇴 프라이머의 어닐링(숙성) 단계: 42℃ 1분,
- [0096] ⑨ 3차 신장 단계: 72℃ 2분(매 사이클 증가 시 마다 1초씩 증가)
- [0097] g. 최종 신장 반응 : 72℃ 5분
- [0098] 3-2 제2차 TAIL PCR 반응
- [0099] 1차 TAIL PCR 반응 종료 후 반응 산물을 1/20으로 희석한 후, 희석된 반응 산물을 2차 반응의 주형으로 이용하였다. 2차 반응에서는 1차 반응과 동일한 임의 축퇴 프라이머를 이용하였고, 제2차 특이적 프라이머(L-SP2, 또는 R-SP2)를 이용하여 하기 프로토콜에 따라 제2차 VA-TAIL PCR 반응을 실시하였다.
- [0100] a. 제2차 VA-TAIL PCR 반응(12회 반복)
- [0101] ① 1차 변성 단계: 94℃ 20초
- [0102] ② 1차 특이적 프라이머의 어닐링(숙성) 단계: 65℃, 30초(매 사이클 증가 시 마다 0.5℃씩 증가)
- [0103] ③ 신장 단계: 72℃ 2분 (매 사이클 증가 시 마다 1초씩 증가)
- [0104] ④ 2차 변성 단계: 94℃ 20초
- [0105] ⑤ 2차 특이적 프라이머 어닐링(숙성) 단계: 65℃ 30초 (매 사이클 증가 시 마다 0.5℃씩 증가)
- [0106] ⑥ 2차 신장 단계: 72℃ 2분 (매 사이클 증가 시 마다 1초씩 증가)
- [0107] ⑦ 3차 변성 단계: 94℃ 30초
- [0108] ⑧ 임의 축퇴 프라이머의 어닐링(숙성) 단계: 42℃ 1분,
- [0109] ⑨ 3차 신장 단계: 72℃ 2분(매 사이클 증가 시 마다 1초씩 증가)
- [0110] b. 최종 신장 반응 : 72℃ 5분
- [0111] 3-3 제3차 TAIL PCR 반응
- [0112] 2차 TAIL PCR 반응 종료 후 반응 산물을 1/20으로 희석한 후, 희석된 반응 산물을 3차 반응의 주형으로 이용하였다. 3차 반응에서는 1차 반응과 동일한 임의 축퇴 프라이머를 이용하였고, 제3차 특이적 프라이머(L-SP3, 또

는 R-SP3)를 이용하여 하기 프로토콜에 따라 제3차 VA-TAIL PCR 반응을 실시하였다.

[0113] 반응 산물의 특이성을 비교하기 위하여 대조군으로 L-SP4(서열번호 10) 또는 R-SP4(서열번호 14) 프라이머를 같이 사용하여 제3차 VA-TAIL PCR 반응을 실시하였다.

[0114] a. 변성 단계: 94℃, 30초

[0115] b. 프라이머 숙성 단계: 42℃ 1분,

[0116] c. 신장 반응 : 72℃ 2분(매 반복마다 1초씩 증가)

[0117] d. 상기 a 내지 c의 단계를 40회 반복 실시

[0118] e. 최종 신장 반응 : 72℃, 5분

[0119] 3-4 외부 DNA 도입 위치의 동정

[0120] 외부 DNA가 도입되어 돌연변이가 유발된 배추 속 식물의 외부 DNA 도입된 위치 및 그 주변부(flanking region)을 동정하기 위하여 상기 TAIL PCR 산물의 염기 서열을 분석하였다.

[0121] 염기서열을 분석하기 위해, PCR 산물용 벡터(pGEM-T easy vector)에 클로닝하고, 올바른 유전자가 삽입되었는지 확인하기 위하여 제한효소 인식 서열인 *EcoRI*를 이용하였다. 이후 도입한 PCR 산물이 삽입된 자리에 근접한 T7 프로모터와 SP6 프로모터에 결합하는 T7과 SP6 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석용 pGem-T easy 벡터 내부에 클로닝된 PCR 단편의 염기서열 분석은 GenBank BLAST 프로그램을 사용하여 이루어졌다.

[0122] 상기 방법에 따라 외부 DNA 도입된 위치 및 그 주변부(flanking region)을 DNA 서열을 하기 도 3a 내지 도 3c에 나타내었다.

산업이용 가능성

[0123] 본 발명의 TAIL PCR 방법에 따르면, 높은 GC 비율과 거대한 제놈 크기로 PCR 반응이 잘 일어나지 않는 고등 식물인 배추 속 식물에 적용 가능한 임의 축퇴 프라이머 및 유전자 특이적인 프라이머 세트를 제공하며, 상기 프라이머 세트를 바탕으로 일정한 주기 마다 프라이머 변성 온도 및 신장 시간을 변화 시키는 배추 속 식물에 특이적인 PCR 파라미터를 제공하여, 배추 속 식물에서 효과적으로 TAIL PCR반응을 수행할 수 있다.

[0124] 또한, 본 발명에 따르면, 외부 유전자의 삽입에 의해 돌연변이가 발생한 배추 속 식물, 또는 이와 유사한 게놈 구조를 갖는 다른 고등 식물의 돌연변이 발생 부위의 DNA를 소량의 DNA로 짧은 시간에 분석할 수 있어, 기능 유전체 연구에 효과적으로 사용할 수 있다.

[0125] 또한, 본 발명에 따른 TAIL PCR 방법을 이용한 유전자 염기서열 분석 방법은 배추 속 식물의 유전체 기능 연구 및 기능 연구를 통한 배추 품종 개량에 유용하게 이용될 수 있어, 국내 배추 속 식물 연구의 학문적, 경제적 효용성을 증가시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0126] 도1은 임의 축퇴(arbitrary degenerate) 프라이머를 제작하기 위하여, EMBL-EBI의 Integr8(<http://www.ebi.ac.uk/integr8>)에서 제공하는 아라비도시스(*Arabidopsis*)의 단백질체 분석(proteome analysis) 정보를 바탕으로 배추 속(*Brassicaceae*)에서 가장 많이 발견되는 단백질 도메인 종류의 정보를 나타낸 사진이다.

[0127] 도 2의 사진은 본 발명의 VA-TAIL PCR을 각 단계별로 진행 후 최종적으로 특이적인 산물을 전기영동으로 확인한 사진이다.

[0128] 도 3a, 내지 3c의 사진은 본 발명의 VA-TAIL PCR 방법으로 외부 DNA의 도입 위치 및 그 주변부의 DNA 서열을 대표 분석한 결과를 나타낸다.

도면

도면1

InterPro: Proteome analysis:

Search for species Search for gene/protein in

Selected species *A.thaliana* [Change scope](#)

InterPro [Comparative](#) [Clustal](#) [DQ](#) [Structure](#)

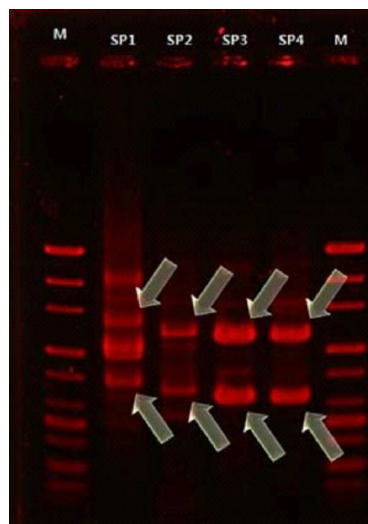
Select analysis:

InterPro

InterPro top 30 entries for *A.thaliana*

InterPro	Proteins matched (Proteome coverage)	Rank*	Name
IPR011009	1145 (1.92%)	1	Protein kinase-like
IPR000719	1125 (1.89%)	2	Protein kinase, core
IPR017442	878 (1.47%)	3	Serine/threonine protein kinase-related
IPR008271	832 (1.4%)	4	Serine/threonine protein kinase, active site
IPR017441	747 (1.25%)	5	Protein kinase ATP-binding, conserved site
IPR001810	701 (1.17%)	6	Cyclin-like F-box
IPR001611	616 (1.03%)	7	Leucine-rich repeat
IPR001841	587 (0.98%)	8	Zinc finger, RING-type
IPR013083	544 (0.91%)	9	Zinc finger, RING/VE/PHD-type
IPR002885	481 (0.81%)	10	Pentatricopeptide repeat
IPR016040	381 (0.66%)	11	NAAD(P) _i -binding
IPR009057	379 (0.63%)	12	Homeodomain-like
IPR003593	335 (0.58%)	13	AAA+ ATPase, core
IPR016024	324 (0.54%)	14	Armadillo-type fold
IPR012287	324 (0.54%)	14	Homeodomain-related
IPR001680	312 (0.52%)	16	WD40 repeat
IPR001005	306 (0.51%)	17	SANT, DNA-binding
IPR000504	299 (0.5%)	18	RNA recognition motif, RBP-1
IPR011046	292 (0.5%)	19	WD40 repeat-like
IPR012677	283 (0.49%)	20	Nucleotide-binding, alpha-beta plat
IPR012337	290 (0.49%)	21	Polynucleotidyl transferase, Ribonuclease H fold
IPR015943	285 (0.48%)	22	WD40/YVTI repeat-like
IPR014778	273 (0.46%)	23	Myb, DNA-binding
IPR001128	272 (0.46%)	24	Cytochrome P450

도면2



도면3a

1) Sequencing Data	
○ Left border	
NNCCATGTGGCTGGTGAGCAATAGAACCTTAGTATGTATTGTATTGTAAAACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAACC AAAAATCCAGTACTAAAATCCAGATCCCCGAATTAATTCGGCGTTAATTGAGTACATTAAAAACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGCTTA AGCGTCAATTTGTTACACCACAAT	
○ Flanking DNA sequence	
AGACTAATTACATAGAGATCCTCTACTATCTATATTTACATATATATACAAATACGCCCTCAAGATGGAGGGCTGTAGTCACTCCAATC TTGCTGCAAGCTTGATGAAAAAGATTCTCGGGAGTGGTTTGGTTAATGCGTCTGCGAGTTGATCTCTAGTGAAAACGTGAGCAACCCGCA ACTGACCAGCTTGATCATGTTACGCGTGAAGTGATAGTCCAATGCCATATGTTTCATACGAGAAATGAAAAACCGGGTTGGCACAGAGATA GGTAGCACCACATTGTCAACGTAATAACCGGTGCAATGATGAAGGTCGAGGAGAGAGACAAAGCAGATGAACCTTTCTTCTGGGGAAATA CGACTAGAGTGGCAAAATTTGATTACTCTGGAAACAGTTCCGATATTAAAGTATAAGAAATCTTGAAGGTGACAGAACAAAAACCAATGACTCTT TCGGTCAGAGAGAGGGTAACGACAGATGATCACGGCACTAGTTAACAGTTCGTTGTGCTGGTTGGTGCACTCACTACTTATAAAAAGGGGA ACAGTTATCCTATTAGGGAAATGGAAACATCATACAGGGAACAAGTCCTGAGAAACCAATTGGGAAAAATCTATATGCAAAATGGGTCCCAAC CTCGCCATTGAAAGAAAGTCAAAGCTGGTC	
2) Blast search : <i>Arabidopsis thaliana</i> copia-like retrotransposon AtRE2-1 gene for polyprotein, complete CDs	
Score = 163 bits (180), Expect = 8e-37 Identities = 198/264 (75%), Gaps = 8/264 (3%) Strand=Plus/Minus	
Query 49	CAATACGCCCTCAAGATGGAGGGCTGTAGTCAC TCCAATCTTGCTGCAAGCTTGATG 108
Sbjct 6501	CAATACGCCCTCAAGATGGAGGGACTTTGATGAC TCCAATCTTGCGAGAGAAGTCTG 6442
Query 109	AAAA-GATTCCCTCGGA--GTGGTTTGGTTAATGCGTCTGCGAGTTGATCTCTAGTGA 165
Sbjct 6441	AAAGCGA---CGGGGACAGAGCTTTGTAAAGTGTCTGCTAATTGATCATGAGTGA 6385
Query 166	AACGTGAGCAACCCCAACTG-ACCAGCTTGTATCATGTTACGCGTGAAGTGATAGTCCA 224
Sbjct 6384	GACATGGACAACAG-AAGTGCAACAGATTGAACCTTGGTTACGGATGAAGTGATAATCCA 6326
Query 225	ATGCCATATGTTTCATACGAGAAATGAAAAACCGGGTTGGCACAGAGATAGGTAGCACTAA 284
Sbjct 6325	ACGGATATGTTTCATCCGAGAAATGAACACCGGATGGCACATAGATAAGTTGCTCCA 6266
Query 285	CATTGTCAACGTAATAACCGGTG 308
Sbjct 6265	CATTGTCAATAGATGACCGGTG 6242

도면3b

1) Sequencing Data

○ Left border

NNNCCTGGTCSTTGGTGAGCAATAGAACCTTAGTATGATTTGATTTGTAATACTTCTATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAACC
AAAAATCCAGTACTAAAAATCCAGATCCCCGAATTAATTCGGCGTTAATTCAGTACATTAAAAACGTCGCAATGTGTATTAAAGTTGCTA
AGCGTCAATTAAGTTTTGATTCATGGAAGTCTGTCCAATCTTGGTCACTGATCCTGCAATG

○ Flanking DNA sequence

GAAGCAG
ACTTTGACTCAAGAGAGAAATTTAGAGAGAGAGAACTAGGAACCTAATTTTACCTGCAGCTCCAGATACCTGTCTGAAATCCTTGATCT
TGTGATCGATACCTCCAGGTAAAGCATTCACTTTATATTTATGCTAAGAAATGAAATCAGTAGAGGGATGTCAGACGTGAATTGATGAG
TTGTGTATGTTAGAAATGGTTGCTAAGCTAGGATATTGCATAGTGTGCTTTTGTGATTAGGACTTTTAAATGTTGGTTGCAAAATTTGTG
AGGAAAGACTTCTATGTTTTTAAATCTTAAGTTCCCAATATTTTAAACCTCTTTCAGAGAGACTGCTGTATGTTTTGCTTGAGGACA
AGCAAAAGGGTAAGTCTGGGGAGTTGATATACCTTGGATTGACCCATTTTATCCATGGTATATTATTTACTATATATATATC
TGCBCCTCCCAATAAAANNNNNNNNNNNNNCTTNTCTTTNNNTNTGNNNTTTCNCTTNTCTTTCCGCCCCCTGCGCTCTGC
CGGGCCGCCCTCCGCTCGTCGGTTCCNCCCTTGTTTGTGGCTTCGGTCTGTTTTGG

2) Blast search : *Brassica rapa* SRK-60, SLG-60 genes for S receptor kinase, S-locus glycoprotein, partial cds

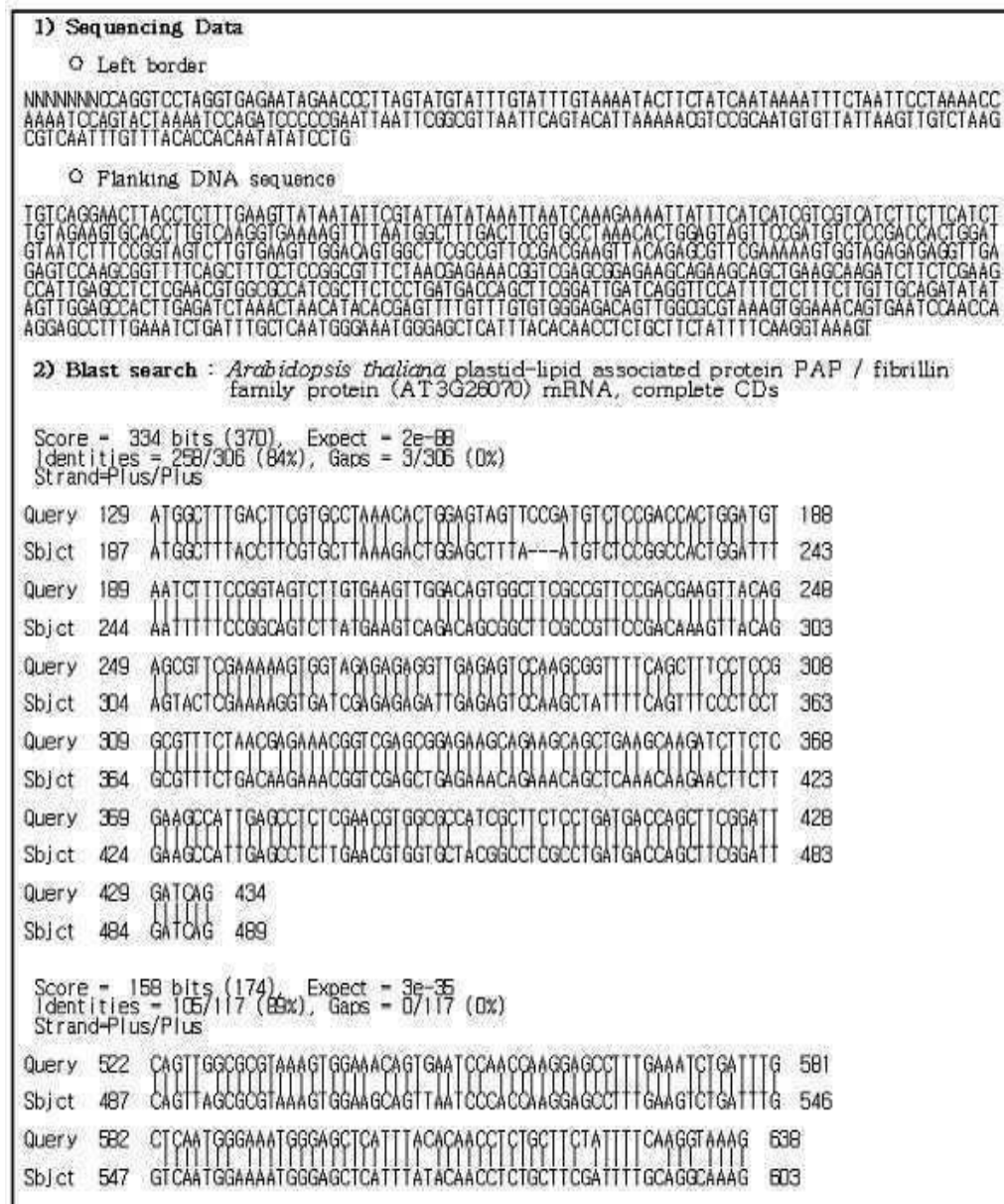
Score = 100 bits (110), Expect = 7e-18
Identities = 100/126 (79%), Gaps = 3/126 (2%)
Strand=Plus/Plus

Query 323 TTTTAAACCTCTTTCAGAGAGACTGCCTGTATGTTTTGCTTGAGGACAAGCAAAAGGGT 362
Sbjct 1779 TTTTAAACCTCTTTCAGAT-GATTGTCC-TATATTTGCTTGAGGAAAAGCAAAAGGAT 1836
Query 383 AAGTCTGGGGAGTTGATATACCTTGGATTGACCCATTTTATCCATGGTATAT-TATT 441
Sbjct 1837 AAGTCTGGGGAGCTGATATGTCATGAATTTATCCAATTTACCATGATTATATATG 1896
Query 442 ATTTTA 447
Sbjct 1897 TTTTAA 1902

Score = 68.0 bits (74), Expect = 4e-08
Identities = 135/196 (68%), Gaps = 13/196 (6%)
Strand=Plus/Plus

Query 31 agagagagagagAACTAGGAACCTAATTTTACCTGCAGCTCCAGATACCTGTCTGAAATCC 90
Sbjct 1488 AGAGAGAGAGAAAAAAGAA---AGGGTTACATGTAGGTCTAGATACCTTGTGAGTTGA 1544
Query 91 TTGCATCTTGT---GATCGATACTCCCAAGGTAAAGCATTCACTTTATATTTATGCTAA 146
Sbjct 1545 TTACATGTGTTCCCTTGATCGATACTCCCAAGATGTAGCCTACACATTACTTTATGC--A 1602
Query 147 GAAATGAAATCAGTAGAGGGG-ATGTCAGACGTGAATTGATGAGTTGTGTTATGTTAGAA 205
Sbjct 1603 GAAATGAAGTCAATAAAGGGGTATGCTGGCGCTATCAGTGGAGTTATGTATG---GTC 1669
Query 206 ATGGTTGCTAAGCTAG 221
Sbjct 1660 ATGATGACTAAGCTAG 1675

도면3c



서열목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> THERMAL ASYMMETRIC INTERLACED PCR METHOD FOR FUNCTIONAL GENOMICS IN BRASSICACEAE GENUS
- <160> 14
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 16
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AD1 Primer

<400> 1

gamrtgntcv amwttg

16

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AD2 Primer

<400> 2

dtaasatgnh nttgct

16

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AD3 Primer

<400> 3

arycacygyg atmtha

16

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> AD4 Primer

<400> 4

cytvacywsy ttgrat 16

<210> 5
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> AD5 Primer

<400> 5
 cayagrgatw tdaaag 16

<210> 6
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> AD6 Primer

<400> 6
 vaygttrcyy rstttc 16

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> L-SP1 Primer

<400> 7
 ctgtgtagaa gtactcgccg atagtggaaa 30

<210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> L-SP2 Primer

<400> 8
ggaaaccgac gccccagcac 20

<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L-SP3 Primer

<400> 9
agcactcgtc cgaggc aaa gaaata 26

<210> 10
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> L-SP4 Primer

<400> 10
gaaatagagt agatgccgac cggatctg 28

<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> R-SP1 Primer

<400> 11

caggtatgga atttcgccga ttttg

25

<210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> R-SP2 Primer

<400> 12
 attttgcgac ctgcaaggc at

22

<210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> R-SP3 Primer

<400> 13
 ggcatattgc gcgttgcg

19

<210> 14
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> R-SP3 Primer

<400> 14
 ggcggtaaca agaaagggat cttcact

27