



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년10월31일
(11) 등록번호 10-0769368
(24) 등록일자 2007년10월16일

(51) Int. Cl.

C12N 15/10(2006.01) C12N 15/29(2006.01)

C12Q 1/68(2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0094922

(22) 출원일자 2006년09월28일

심사청구일자 2006년09월28일

(56) 선행기술조사문헌

KR10-2005-0024321(2005.03.10)

(73) 특허권자
대한민국

(72) 발명자

박용진

경기도 수원시 영통구 매탄1동 897 주공5단지
515-201

마경호

경기도 수원시 권선구 권선동 1304 주공아파트
333-1501

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김석현, 이희숙

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 조경주

(54) 조에서 유래한 S S R 프라이머 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 조에서 분리한 SSR 프라이머 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 서열번호 1 내지 서열번호 46로 이루어진 군에서 선택되는 2개의 염기서열을 갖는 SSR 프라이머쌍 및 이를 이용하여 PCR을 수행하는 것을 포함하는 조의 DNA 다형성 검출 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공되는 SSR 프라이머쌍은 조의 DNA 다형성을 효과적으로 검출할 수 있으며, 조의 DNA 프로파일을 작성하는데 매우 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 이를 통해 조의 유전자원을 효과적으로 평가함으로써 신규 유전자원 도입시 기존 보유자원과의 중복성 분석 및 신규성 확립을 효과적으로 수행할 수 있다.

(72) 발명자

이정로

경기도 수원시 권선구 권선동 1305 대우아파트
321-303

이석영

경기도 화성시 비봉면 쌍학리3리 644-3

곽재균

경기도 수원시 권선구 구운동 466 선경아파트
2-902

김태산

경기도 수원시 장안구 정자동 두견마을 벽산 3차
353-1003

조은기

경기도 수원시 권선구 서둔동 17-396

이길복

경기도 수원시 권선구 평동 121번지 동남아파트
106-1201

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20050401034738

부처명 농촌진흥청

연구사업명 바이오그린 21사업

연구과제명 국가핵심유전자원 DNA Bank 구축

주관기관 농촌진흥청

연구기간 2005년 6월 24일 ~ 2007년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 46로 이루어진 군에서 선택되는 2개의 염기서열을 갖는 SSR(simple sequence repeat) 프라이머쌍.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 1과 2로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 3과 4로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 5와 6으로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 7과 8로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 9와 10으로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 11과 12로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 13과 14로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 15와 16으로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 17과 18로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 19와 20으로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 21과 22로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 23과 24로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 25와 26으로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 27과 28로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 29와 30으로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 31과 32로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 33과 34로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 35과 36로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 37과 38로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 39과 40로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 41과 42로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 43과 44로 표시되는 프라이머쌍; 및 서열번호 45과 46로 표시되는 프라이머쌍으로 이루어진 군에서 선택되는 SSR 프라이머쌍.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 조(*Setaria italica* (L.) Beauv.)로부터 유래된 것을 특징으로 하는 SSR 프라이머쌍.

청구항 4

- (a) 조로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;
- (b) 추출된 게놈 DNA를 주형으로 하고 제1항 또는 제2항의 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및
- (c) PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계를 포함하는 조의 DNA 다형성 검출 방법.

청구항 5

- (a) 조 및 대조군 조 품종으로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;
- (b) 추출된 각 게놈 DNA를 주형으로 하고 제1항 또는 제2항의 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계;
- (c) 각 PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계; 및
- (d) 상기 조 및 대조군 조 품종의 크기별 분리 결과를 비교하는 단계를 포함하는 조의 품종 동정 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항의 SSR 프라이머쌍을 포함하는 조의 DNA 다형성 검출용 키트.

청구항 7

제1항 또는 제2항의 SSR 프라이머쌍을 포함하는 조의 품종 동정용 키트.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<1> 본 발명은 조(Italian millet; *Setaria italica* (L.) P. Beauv.)에서 분리한 SSR 프라이머 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 서열번호 1 내지 서열번호 46로 이루어진 군에서 선택되는 2개의 염기서열을 갖는

SSR 프라이머쌍 및 이를 이용하여 PCR을 수행하는 것을 포함하는 조의 DNA 다형성 검출 방법에 관한 것이다.

- <2> 육종에 이용되고 있는 대부분의 주요 작물 및 소재배 작물에서 해마다 많은 양의 유전자원이 수집되고 있다. 그러나, 이에 반해 유전자원에 대한 평가는 충분히 이루어지지 않고 있는 실정이다. 수집된 유전자원의 종간 및 아종간 품종의 신속한 판별은 정확한 유전자원의 관리 및 보호를 위하여 매우 중요하다. 또한 품종의 판별과 함께 유전자원의 유형 형질 탐색과 분류, 그리고 유연관계의 규명은 유전자원의 보존이나 신품종의 창출 및 작물의 개량에 있어서 매우 중요하다.
- <3> 최근 분자생물학의 급속한 발전으로 핵산(DNA) 수준에서 유전자원의 다양성(bio-diversity) 연구를 가능케 하는 핵산 지문 분석 방법 및 다양한 DNA 마커들이 개발되었다. 이를 통해 유용 형질 탐색, 생물의 종 판별, 품종 분류·동정 및 집단 개체군의 유연관계 분석을 외부환경 등에 대하여 거의 영향을 받지 않고 간단하고 신속하게 수행할 수 있게 되었다. 지금까지 개발된 PCR(polymerase chain reaction)을 이용한 지문분석법(fingerprinting)에는 RAPD(randomly amplified polymorphic DNAs) 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 검출로 각광받고 있지만 재현성이 떨어지는 밴드의 출현과 분석이 복잡하다는 단점이 있다. 이에 반해, SSR 방법은 DNA 반복 배열인 초위성체(microsatellite) 영역의 염기 배열 정보를 근거로 PCR 프라이머를 제작하여 이용하는 방법으로서, 초위성체 분석이 용이하고 높은 재현성을 가지는 장점으로 인하여 생물종의 동정에 자주 사용되고 있다. 특히 SSR 방법은 외부 환경의 영향을 전혀 받지 않는다는 장점이 있다. 이와 같은 SSR 방법의 우수성으로 인해 여러 주요 작물 및 소재배 작물에서 SSR 마커를 개발하려는 연구가 한창 진행 중에 있다.
- <4> 벼에서는 벼 게놈에 반복되는 SSR을 PCR 기술로 증폭하여 벼 품종의 유전자형을 동정하는 초위성체 마커들이 개발되었다(대한민국 특허출원번호 제2001-34003호). 미국의 Tang 박사팀은 879개의 SSR 마커들을 개발하여 해바라기의 유전자 지도를 발표한 바 있다(Tang *et al.*, *Theor. Appl. Genet.*, 105: 1124-1136, 2002). 이외에도 보리, 콩 등에서 많은 SSR 마커들이 개발되었다. 그러나, 조에서는 SSR 마커가 아직 국내에서 전혀 개발된 바 없으며, 외국에서도 이와 관련된 연구가 거의 이루어지지 않은 실정이다.
- <5> 이에 본 발명자들은 조의 유전자원을 효율적으로 평가할 수 있는 SSR 마커를 개발하기 위하여 연구를 거듭하던 중, 다양한 조 계통들에서 다형성 변이를 많이 나타내는 SSR 프라이머쌍을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <6> 따라서, 본 발명의 목적은 조의 유전자원을 효율적으로 평가할 수 있는 SSR 마커 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <7> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 46로 이루어진 군에서 선택되는 2개의 염기서열을 갖는 SSR 프라이머쌍을 제공한다.
- <8> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 것을 포함하는 조의 DNA 다형성 검출 방법 및 조의 품종 동정 방법을 제공한다.
- <9> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 SSR 프라이머쌍, DNA 중합효소 및 PCR 반응 완충용액을 포함하는 조의 DNA 다형성 검출용 키트 및 조의 품종 동정용 키트를 제공한다.
- <10> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <11> 본 발명은 조의 유전적 다형성을 특이적으로 분석할 수 있는 SSR 마커를 제공하는 것을 특징으로 한다.
- <12> 본 발명에서는 비오틴-스트렙타비딘 포획(biotin-streptavidin capture; Dixit *et al.*, *Mol. Eco. Note*, 5: 736-738) 방법으로 조로부터 SSR 마커를 개발하였다. 조에서 분리된 SSR 마커는 본 발명에 의해 처음으로 제공되는 것이다.
- <13> 구체적으로, 본 발명의 SSR 마커는 다음과 같은 방법으로 개발되었다. 조로부터 추출한 게놈 DNA를 제한효소로 처리해 DNA 단편을 제조한 후 AP11 및 AP12의 2개의 어댑터와 라이게이션하였다.
- <14> 라이게이션 산물을 비오틴이 표지된 SSR 탐침과 혼성화한 후 마그네틱 비드를 이용해 분리하였다. 이를 AP11 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 증폭한 후 서열을 분석함으로써 조의 초위성체를 포함하고 있는 500개의 DNA

단편을 수득하였다.

<15> 상기에서 수득한 DNA단편을 분석함으로써 5개 이상의 반복 유닛을 포함하고 있는 단편만을 선별하고 반복 유닛을 포함하는 부분을 기준으로 초위성체를 증폭 할 수 있는 양방향 프라이머 200쌍을 디자인 하였다. 상기 프라이머쌍을 사용하여 다양한 재배형 조 계통 및 품종들의 PCR을 통한 DNA 프로파일링을 수행함으로써 다형성 변이를 많이 나타내는 23쌍의 SSR 프라이머쌍을 선별하였다.

<16> 본 발명에서 제공하는 SSR 마커는 PCR 프라이머쌍을 말하며, 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 포함한다. 본 발명에서 제공되는 SSR 프라이머쌍은 서열번호 1 내지 서열번호 46로 이루어진 군에서 선택되는 2개의 염기 서열을 가진다. 바람직하게는 GB-Slt-002(서열번호 1과 2로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-012(서열번호 3과 4로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-018(서열번호 5와 6으로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-019(서열번호 7과 8로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-030(서열번호 9와 10으로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-031(서열번호 11과 12로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-039(서열번호 13과 14로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-044(서열번호 15와 16으로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-046(서열번호 17과 18로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-051(서열번호 19와 20으로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-054(서열번호 21과 22로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-056(서열번호 23과 24로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-059(서열번호 25와 26으로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-066(서열번호 27과 28로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-068(서열번호 29와 30으로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-077(서열번호 31와 32으로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-091(서열번호 33와 34으로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-105(서열번호 35와 36로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-108(서열번호 37과 38로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-113(서열번호 39와 40로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-117(서열번호 41과 42로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-130(서열번호 43과 44로 표시되는 프라이머쌍) 및 GB-Slt-135(서열번호 45과 46로 표시되는 프라이머쌍)로 이루어진 군에서 선택된다. 본 발명에서 제공되는 프라이머쌍 및 이들에 의해 증폭되는 초위성체에 존재하는 반복 모티프(repeat motif), 증폭되는 초위성체의 크기, Tm(℃) 및 초위성체가 존재하는 염색체 대립인자에 대한 정보를 하기 표 1에 기재하였다.

표 1

<17> 본 발명의 SSR 프라이머쌍 및 이로부터 증폭되는 초위성체의 특성

프라이머명	서열	서열 번호	반복 모티프	증폭되는 초 위성체의 크 기의 범위(bp)	Tm(℃)	대립 인자 의 수
GB-Slt-002	^a F : AGCTCCCGGAAGAACAAG	1	(AGG) _n	272-275	55	2
	^b R : GCAGAGACAATGGTGGGA	2				
GB-Slt-012	F : TACCAACATCGCGAAAC	3	(AG) _n	216-248	55	9
	R : GCTCCAGTGGGGTAGGAC	4				
GB-Slt-018	F : GCGACCTTGAGACAGCAG	5	(CCG) _n	155-227	58	3
	R : AACATAGGAGGAAGCCGC	6				
GB-Slt-019	F : TTGCCCGGCATCATC	7	(AG) _n	159-165	55	4
	R : CAGCAGCCCTCGAACTTA	8				
GB-Slt-030	F : AGCAAAACCCAGTCAGCA	9	(AGCC) _n , (AG) _n	293-355	55	9
	R : GCAACGGCAACAAGGTTA	10				
GB-Slt-031	F : TCAATCTCCTCCTCGTCG	11	(CCG) _n	231-261	55	3
	R : ACCCTACTCTCCCTCCC	12				
GB-Slt-039	F : CTCCTGCGCAACCTACAA	13	(CCG) _n	178-190	55	3
	R : GGCTGGGTATGGAGAGG	14				
GB-Slt-044	F : TTGCGTTTGGGACATAGG	15	(AG) _n	237-241	55	2
	R : ATCACCTTCTCCTCGCGT	16				
GB-Slt-046	F : TCACCAACAAAGCAACCC	17	(AGC) _n	167-173	55	2
	R : GGTAGCAAGCCTACCGCT	18				
GB-Slt-051	F : TGAACCCCTCGCTAAT	19	(AGC) _n	221-224	55	2
	R : GAGGCCAGAGAGAGGGAA	20				

GB-Slt-054	F : CCATCTTCCCTTGCATCA	21	(AGC) _n	303-333	55	3
	R : AACAGATGCAACCCATGC	22				
GB-Slt-056	F : GTGGTGGAGGATGCTACG	23	(CCG) _n	187-193	55	3
	R : CAATACAACCCCTCGCTG	24				
GB-Slt-059	F : GGGAGGTAGACGAATGGG	25	(AT) _n	256-264	55	2
	R : TGTTTAGGTTGCCAGCGT	26				
GB-Slt-066	F : ACCCTTCTTTTAGGGGC	27	(AG) _n	117-175	55	2
	R : ATGGAAGAAAAGCGACCC	28				
GB-Slt-068	F : CGTCAGCTTCCTTGTGC	29	(AGGG) _n	135-319	55	7
	R : AAACCAACGCACGCTAA	30				
GB-Slt-077	F : CCACTCCGATCCATAGCA	31	(AGC) _n , (AAGC) _n	266-269	55	2
	R : CACTCCTGTGCTCCTTGC	32				
GB-Slt-091	F : TCGAATCCAACCAAGGTG	33	(AAG) _n	136-232	55	7
	R : ACCTTCCCTTCTCCTCCC	34				
GB-Slt-105	F : ATGGTTGTGGAGGACGTG	35	(ACC) _n	261-270	55	3
	R : ATAAGCACCACCAGCAGC	36				
GB-Slt-108	F : CAGCAGGAGCCTGAATTG	37	(AGCAGG) _n	297-309	55	2
	R : TCAGCAAGCAGCCATCTT	38				
GB-Slt-113	F : TACGTCAGCCCCATGAAC	39	(AC) _n	267-301	55	5
	R : TGTTGACACGTCATCCGA	40				
GB-Slt-117	F : TGGAGGTCGATTGGTTTG	41	(AG) _n , (AGG) _n	261-263	55	2
	R : TGTGGTTTGCTTGTGCTG	42				
GB-Slt-130	F : TGCAGGTTGAGCTTGCTT	43	(AC) _n , (ACCC) _n	246-250	55	3
	R : CGGCGAACTGACTAGGGT	44				
GB-Slt-135	F : TCACCCCAAATTCAGCAC	45	(AGC) _n , (AGG) _n	231-234	55	2
	R : ACTGCTGTGACGGACACC	46				

<18> ^aF: 정방향 프라이머 ^bR: 역방향 프라이머

<19> 본 발명에서 제공되는 SSR 프라이머쌍은 조에서 DNA 다형성을 검출하고 유전적 다양성을 분석하는데 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 SSR 프라이머를 이용하여 조의 유전자원을 효율적으로 평가 및 보존할 수 있다. 따라서 본 발명은 상기 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 것을 포함하는 조의 DNA 다형성 검출 방법을 제공한다.

<20> 구체적으로 조의 DNA 다형성 검출 방법은

<21> (a) 조로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;

<22> (b) 추출된 게놈 DNA를 주형으로 하고 본 발명에서 제공하는 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및

<23> (c) PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계를 포함한다.

<24> 상기 (a) 단계에서 게놈 DNA의 추출은 당업계에서 통상적으로 사용되는 페놀/클로로포름 추출법, SDS 추출법 (Tai *et al.*, *Plant Mol. Biol. Reporter*, 8: 297-303, 1990), CTAB 분리법(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide; Murray *et al.*, *Nuc. Res.*, 4321-4325, 1980) 또는 상업적으로 판매되는 DNA 추출 키트를 이용하여 수행할 수 있다.

<25> 또한 상기 (b) 단계에서 PCR은 PCR 반응에 필요한 당업계에 공지된 여러 성분을 포함하는 PCR 반응 혼합액을 이용하여 수행될 수 있다. 상기 PCR 반응 혼합액에는 분석하고자 하는 조에서 추출된 게놈 DNA와 본 발명에서 제공되는 SSR 프라이머쌍 이외에 적당량의 DNA 중합효소, dNTP, PCR 완충용액 및 물(dH₂O)을 포함한다. 상기 PCR 완충용액은 트리스-HCl(Tris-HCl), MgCl₂, KCl 등을 포함한다. 이 때 MgCl₂ 농도는 증폭의 특이성과 수량에 크

게 영향을 주며, 바람직하게는 1.5-2.5 mM의 범위로 사용될 수 있다. 일반적으로 Mg^{2+} 가 과량인 경우는 비특이적인 PCR 증폭산물이 증가하고, Mg^{2+} 가 부족한 경우 PCR 산물의 산출율이 감소한다. 상기 PCR 완충용액에는 적당량의 트리톤 X-100(Triton X-100)이 추가로 포함될 수도 있다. 또한 PCR은 94-95℃에서 주형 DNA를 전변성시킨 후, 변성(denaturation); 결합(annealing); 및 증폭(extension)의 사이클을 거친 후, 최종적으로 72℃에서 연장(elongation)시키는 일반적인 PCR 반응 조건에서 수행될 수 있다. 상기에서 변성 및 증폭은 94-95℃ 및 72℃에서 각각 수행될 수 있으며, 결합시의 온도는 프라이머의 종류에 따라 달라질 수 있다. 바람직하게는 52-57℃이며, 보다 바람직하게는 55℃이다. 각 단계의 시간과 사이클 수는 당업계에 일반적으로 행해지는 조건에 따라 정해질 수 있다. 본 발명에 따른 SSR 프라이머쌍을 이용한 PCR 수행시의 최적의 반응 조건은 다음과 같다: 95℃에서 3분간 주형 DNA를 전변성시킨 후, 95℃에서 30초; 55℃에서 30초; 및 72℃에서 1분 30초를 36 사이클 반복 수행한 후, 최종적으로 72℃에서 5분간 반응시킨다.

- <26> 상기 (c) 단계에서는 당업계에 널리 공지된 방법에 따라 PCR 산물의 DNA를 크기별로 분리할 수 있다. 바람직하게는 아가로스 겔(agarose gel) 또는 폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gel) 전기영동 또는 형광분석장치(ABI prism 3100 genetic analyzer-electropherogram)에 의해 확인할 수 있다. 이 때, 형광분석장치를 이용하기 위해서는 당업계에 공지된 형광 다이(dye)를 붙인 프라이머쌍을 이용하여 상기 (b)단계에서 PCR을 수행한다. PCR 증폭 결과는 바람직하게는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 보다 바람직하게는 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 확인할 수 있다. 전기영동 후 실버 염색(silver staining)으로 전기영동 결과를 분석할 수 있다. 일반적인 PCR 수행 및 그 결과 분석 방법에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있다.
- <27> 아울러, 본 발명은 상기 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 것을 포함하는 조의 품종 동정 방법을 제공한다.
- <28> 구체적으로 조의 품종 동정 방법은
- <29> (a) 조 및 대조군 조 품종으로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;
- <30> (b) 추출된 각 게놈 DNA를 주형으로 하고 본 발명에서 제공하는 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계;
- <31> (c) 각 PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계; 및
- <32> (d) 상기 (c) 단계의 각각의 크기별 분리 결과를 서로 비교하는 단계를 포함한다.
- <33> (a) 내지 (c) 단계의 게놈 DNA 추출, PCR 수행 및 PCR 산물의 크기별 분리는 상기에서 기재한 바와 같으며, 상기 (d) 단계에서 조 및 대조군 조 품종에 대한 비교는 동일한 조합의 SSR 프라이머쌍에 대한 시료가 되는 조와 대조군 조 품종의 각각의 PCR 산물의 크기를 서로 비교하는 방법으로 수행된다. 각 SSR 프라이머쌍에 대한 크기 비교 결과를 종합하여 시료가 되는 조와 대조군 조 품종의 결과와 모두 일치하면 시료가 되는 조는 대조군 조 품종과 동일한 품종으로 동정할 수 있다. 이와 같은 품종의 동정 방법은 신규 유전자원 도입시 중복여부 판단 및 원산지 확인을 통한 원산지 표시 위반 여부의 판정 등 품종의 동정이 필요한 경우에 유용하게 이용될 수 있다.
- <34> 대조군 조 품종에 대한 게놈 DNA 추출, PCR 수행 및 PCR 산물의 크기별 분리는 시료가 되는 조와 동시에 수행될 수도 있으나, 시료가 되는 조 보다 이전에 수행되어 동정의 기준표(reference)로 작성될 수도 있다. 이러한 기준표를 이용하면 시료가 되는 조에 대한 게놈 DNA 추출, PCR 수행 및 PCR 산물의 크기별 분리만을 수행하여 기준표와 비교할 수 있어 유용하게 이용할 수 있다.
- <35> 또한 본 발명은 본 발명에 따른 SSR 프라이머쌍을 포함하는 조의 DNA 다형성 검출용 키트를 제공한다. 이외에 PCR 반응을 용이하게 수행할 수 있기 위해 DNA 중합효소 및 상기에서 기재한 조성의 PCR 반응 완충용액이 추가로 포함될 수 있으며, PCR 산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성성분들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.
- <36> 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 SSR 프라이머쌍을 포함하는 조의 품종 동정용 키트를 제공한다. 품종 동정 방법은 상기에서 기재한 바와 같다. 이외에 PCR 반응을 용이하게 수행할 수 있기 위해 DNA 중합효소 및 상기에서 기재한 조성의 PCR 반응 완충용액을 추가로 포함될 수 있으며, PCR 산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성성분 또는 공지된 품종에 대한 동정 기준표들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.

<37> 본 발명에 적용될 수 있는 조는 *Setaria italica* (L.)P.Beauv. 및 이들의 변종일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 *Setaria italica* (L.)P.Beauv. 일 수 있다.

<38> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<39> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<40> <실시예 1> 계놈 DNA 추출

<41> 재배종 조(농업생명공학연구원 유전자원과, 보존번호 : 103176)로부터 SDS를 이용한 방법(Tai et al., *Plant Mol. Biol. Reporter*, 8: 297-303, 1990)에 따라 계놈 DNA를 추출하였다. 이를 상세히 설명하면 다음과 같다. 생육 1개월째의 어린 조 식물체로부터 0.5 g의 잎 조직을 채취하여 1.5 ml 튜브에 넣고 액체질소로 급냉시켰다. 이후, 즉시 플라스틱 막대로 잎을 곱게 마쇄하였다. 마쇄된 잎이 녹기 전에 추출 완충용액(200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) 750 μ l를 첨가하고, 혼합액을 65℃에서 30분간 보관하였다. 여기에 동량의 페놀(phenol):클로로포름(chloroform):이소아밀알코올(isoamylalcohol) (25:24:1) 용액을 추가로 첨가한 후, 약 15분간 교반하였다. 이를 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 새 튜브에 옮겼다. 상기 튜브에 동량의 이소프로판올(-20℃)을 첨가하고, -20℃에서 1시간 보관하였다. 이후, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 버린 후 침전된 DNA를 70% 에탄올로 세척하였다. DNA를 건조시킨 후, 약 300 μ l의 RNase (50 μ g/ml)를 함유하는 TE 완충용액(10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.4)을 첨가하여 충분히 녹인 후, 37℃에서 1시간동안 보관하였다.

<42> <실시예 2> 어댑터와의 라이게이션(ligation)

<43> 상기 실시예 1에서 얻은 계놈 DNA 500 ng을 각 제한효소 제조사의 지침에 따라 *EcoRV*, *DraI*, *SmaI*, *PvuI*, *AluI*, *HaeIII* 및 *RsaI*로 절단하였다. 절단된 DNA를 1.2% 아가로스 겔에 전기영동한 후, 약 300-1500 bp 크기의 DNA 단편만을 겔로부터 일루션(elution)하여 수득하였다. 이후, 수득된 DNA 단편을 2개의 어댑터(adapter; AP-11 및 AP-12, 각 50ng)와 T4 DNA 라이게아제(ligase; Promega, 미국)를 이용하여 12℃에서 하룻밤 동안 라이게이션시켰다. 이 때 라이게이션 효율을 높이기 위해 AP-12 어댑터는 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, Promega, 미국)로 5' 말단을 인산화하였으며, 라이게이션시의 반응용액의 조성은 다음과 같다: 1X 라이게이션 버퍼(Promega, 미국), 50ng AP11 어댑터, 50ng AP12 어댑터, 150ng DNA 단편, 3 Unit T4 라이게아제(Promega, 미국).

표 2

<44> 본 발명에서 사용한 어댑터

어댑터 명	염기서열	서열번호
AP-11	5'-CTCTTGCTTAGATCTGG ACTA-3'	47
AP-12	5'-TAGTCCAGATCTAAGCA AGAGCACA-3'	48

<45> <실시예 3> 초위성체를 포함하고 있는 DNA 단편의 선별 및 분리

<46> <3-1> 마그네틱 비드 준비

<47> 마그네틱 비드(magnetic bead; SA-PMPs, Promega, 미국; 1 mg/ml) 0.6 ml를 마그네틱 분리기(magnetic stand; Promega, 미국)로 수집한 후 용액을 제거하였다. 여기에 0.5x SSC(Saline-Sodium Citrate) 버퍼 0.6 ml를 넣어 세척을 하고 다시 마그네틱 분리기로 수집한 후 용액을 제거하였다. 0.5x SSC 버퍼를 이용한 세척은 3회 반복하여 실시하였다. 세척한 마그네틱 비드에 0.5x SSC 버퍼 100 μ l를 넣은 후 30분 이내에 사용하였다.

<48> <3-2> 혼성화

<49> 상기 실시예 2에서 제조한 라이게이션 산물에 증류수를 넣어 500 μ l가 되도록 한 후 65℃에서 10분간 변성(denature)시켰다. 여기에 바로 비오틴(biotin)이 표지된 SSR 탐침 1.5 μ l(20ng)와 20x SSC 버퍼 13 μ l를 넣고 상온에서 10분간 방치하여 결합을 유도하였다. 혼성화에 사용된 8개의 SSR 탐침은 하기 표 3에 기재하였으며, SSR 탐침은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 비오틴으로 표지하였다.

표 3

<50> 조의 초위성체를 분리하기 위한 탐침의 서열

서열	서열번호
Biot in-(GA) ₂₀	49
Biot in-(AT) ₂₀	50
Biot in-(CA) ₂₀	51
Biot in-(AGC) ₁₅	52
Biot in-(GGC) ₁₅	53
Biot in-(AAG) ₁₅	54
Biot in-(AAC) ₁₅	55
Biot in-(AGG) ₁₅	56

<51> 혼성화 반응을 통하여 게놈 DNA 단편 중 상기 반복염기서열을 가지고 있는 DNA 단편들은 비오틴이 표지된 SSR 탐침들과 상보적 결합을 할 것이고, 이를 SSR 탐침-템플릿(template) 혼성체(hybrid)라고 한다.

<52> <3-3> 템플릿의 분리

<53> <3-1>에서 제조한 마그네틱 비드 용액을 <3-2>에서의 SSR 탐침-템플릿 혼성체 용액에 넣고 상온에서 10분간 방치시킨다. 반응용액에서 마그네틱 분리기로 SSR 탐침-템플릿 혼성체가 결합된 마그네틱 비드를 수집하고 상등액을 제거하였다. 상기 SSR 탐침-템플릿 혼성체가 결합된 마그네틱 비드를 0.1x SSC 300 μ l로 4회 세척한 후 증류수 50 μ l를 넣고 90℃에서 5분간 가열하여 하기 템플릿을 분리하였다.

<54> <3-4> PCR 반응

<55> <3-3>에서 분리한 템플릿에 대해 AP-11 어댑터를 프라이머로 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응 혼합물(20 μ l)의 조성은 다음과 같다: 250 ng 어댑터-라이게이션된 DNA, 10 pmol AP11 프라이머, 2 mM dNTP, 2 units Taq DNA 중합효소, 5 μ l 10 $\times$ 완충용액. PCR 반응은 72℃에서 2분, 94℃에서 3분동안 가열한 후 94℃에서 30초; 56℃에서 30초; 및 72℃에서 1분을 24 사이클(cycle)로 반복 수행하고, 마지막으로 72℃에서 10분의 조건으로 수행하였다.

<56> 이와 같은 방법으로 본 발명에서는 초위성체를 함유하고 있는 500개의 DNA 단편을 분리하였다.

<57> <실시예 4> 분리된 DNA 단편의 서열분석 및 프라이머 디자인

<58> 상기 실시예 3에서 분리된 초위성체를 함유하고 있는 DNA 단편들을 pGEM T-easy vector 벡터(Promega, 미국)에 클로닝하여 이들의 서열을 분석하였다. 염기서열 분석은 (주)제노텍에 의뢰하여 수행하였다. 분석된 서열을 기초로 하여 5개 이상의 반복 유닛(repeat unit)을 포함하고 있는 단편만을 선발하였다. 반복 유닛을 포함하는 부분을 기준으로 하여 초위성체를 증폭할 수 있는 양 방향의 프라이머를 디자인하였다. 총 200쌍의 프라이머쌍을 디자인하였다(결과미도시).

<59> <실시예 5> SSR 마커의 선발

<60> 상기 실시예 4에서 디자인된 프라이머쌍 중에서 다양한 조 계통에서 다형성 변이를 많이 나타내는 SSR 프라이머 조합을 선발하기 위하여, 하기 표 4에 기재된 16점의 재배형 조 또는 조 품종에 대하여 PCR을 통한 DNA 프로파일링(profiling) 분석을 수행하였다.

표 4

<61> SSR 분석에 사용된 조

기탁번호	기탁기관	수집국 (원산지)	형 (Type)
103176	농촌진흥청	대한민국	<i>Setaria italica</i>
900073	농촌진흥청	대한민국	<i>Setaria italica</i>

195052	농촌진흥청	대한민국	<i>Setaria italica</i>
195362	농촌진흥청	대한민국	<i>Setaria italica</i>
109449	농촌진흥청	네팔	<i>Setaria italica</i>
108799	농촌진흥청	대한민국	<i>Setaria italica</i>
123861	농촌진흥청	인도	<i>Setaria italica</i>
137683	농촌진흥청	태국	<i>Setaria italica</i>
185961	농촌진흥청	대한민국	<i>Setaria italica</i>
153475	농촌진흥청	중국	<i>Setaria italica</i>
153488	농촌진흥청	러시아	<i>Setaria italica</i>
911130	농촌진흥청	대한민국	<i>Setaria italica</i>
113255	농촌진흥청	대한민국	<i>Setaria italica</i>
201807	농촌진흥청	대한민국	<i>Setaria italica</i>
195381	농촌진흥청	대한민국	<i>Setaria italica</i>
214844	농촌진흥청	우즈베키스탄	<i>Setaria italica</i>

<62> 각각의 PCR 반응 혼합물 (20 μ l)의 조성은 다음과 같다: 실시예 1의 방법에 의해 분리한 조 주형 DNA 40ng, 정방향 프라이머 0.2 μ M, 역방향 프라이머 0.6 μ M, 형광물질이 표지된 M13 프라이머(TGTAAAACGACGGCCAGT, 서열번호 57) 0.6 μ M, 1X PCR 반응액 (10mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1 unit DNA 중합효소. PCR 반응은 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 주형 DNA를 전변성시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초; 각 프라이머의 Tm(표 1 참조)에 해당하는 온도에서 30초; 및 72 $^{\circ}$ C에서 45초의 조건으로 35회 반복한 후, 다시 94 $^{\circ}$ C에서 30초; 53 $^{\circ}$ C에서 45초; 및 72 $^{\circ}$ C에서 45초의 조건으로 15회 반복한 후, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 15분의 조건으로 수행하였다.

<63> 각기 다른 형광물질로 증폭된 PCR 산물 단편의 크기를 분석하기 위해 자동 염기서열 분석 장치 (ABI 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, 미국)를 이용하였다. 분석을 위하여, PCR 산물 1.5 μ l, Hi-di 포름아미드(formamide) 9.2 μ l, 내부 크기 표준시약(Internal Size Standard; Genescan-500 ROX) 0.3 μ l을 혼합한 후 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 변성하여 분석에 사용하였다.

<64> 그 결과, 국내 및 국외에서 수집된 조 재배형 및 조 품종들에서 다형성을 나타내는 SSR 프라이머쌍 23쌍을 확인하여 GB-Slt-002(서열번호 1과 2로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-012(서열번호 3과 4로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-018(서열번호 5와 6으로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-019(서열번호 7과 8로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-030(서열번호 9와 10으로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-031(서열번호 11과 12로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-039(서열번호 13과 14로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-044(서열번호 15와 16으로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-046(서열번호 17과 18로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-051(서열번호 19와 20으로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-054(서열번호 21과 22로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-056(서열번호 23과 24로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-059(서열번호 25와 26으로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-066(서열번호 27과 28로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-068(서열번호 29와 30으로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-077(서열번호 31와 32으로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-091(서열번호 33와 34으로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-105(서열번호 35와 36로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-108(서열번호 37과 38로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-113(서열번호 39와 40로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-117(서열번호 41과 42로 표시되는 프라이머쌍), GB-Slt-130(서열번호 43과 44로 표시되는 프라이머쌍) 및 GB-Slt-135(서열번호 45와 46로 표시되는 프라이머쌍)을 선별하였다(표 1 참조). 상기 23쌍의 프라이머에 의해 증폭된 PCR 단편의 각각의 크기는 다음 표 5와 같다.

표 5

<65> 프라이머에 따른 증폭된 초위성체의 종류 및 크기(bp) (단위 : bp)

기탁번호 프라이머	103176	900073	195052	105362	109449	108799	123861	137683
GB-Slt-002	275	275	275	275	275	275	275	275
GB-Slt-012	234	238	242	244	248	246	236	236
GB-Slt-018	227	218	227	227	227	218	227	218

GB-Slt-019	-	159	161	-	161	165	165	159
GB-Slt-030	351	-	349	345	349	295	355	295
GB-Slt-031	231	261	231	231	261	261	231	261
GB-Slt-039	187	187	178	178	187	187	178	190
GB-Slt-044	241	237	237	237	237	237	237	237
GB-Slt-046	173	173	173	173	167	173	167	173
GB-Slt-051	-	224	221	-	224	-	-	224
GB-Slt-054	306	306	306	306	303	-	306	306
GB-Slt-056	187	193	187	187	187	-	187	190
GB-Slt-059	-	264	264	256	264	264	264	-
GB-Slt-066	175	175	175	175	175	175	175	175
GB-Slt-068	271	-	291	-	135	299	-	175
GB-Slt-077	266	269	266	269	269	269	269	269
GB-Slt-091	136	232	232	232	148	139	139	139
GB-Slt-105	261	261	261	264	264	264	264	261
GB-Slt-108	297	297	309	309	309	297	309	297
GB-Slt-113	269	271	267	267	267	271	271	273
GB-Slt-117	263	263	263	263	263	261	263	263
GB-Slt-130	248	250	248	248	248	248	248	246
GB-Slt-135	231	234	231	231	231	231	231	231

<66>

기탁번호 프라이머	185961	153475	153488	911130	113255	201807	195381	214844
GB-Slt-002	275	275	275	272	275	275	275	275
GB-Slt-012	240	216	242	244	240	236	236	246
GB-Slt-018	218	-	218	218	227	227	155	227
GB-Slt-019	159	-	159	-	161	163	159	-
GB-Slt-030	293	351	303	305	297	345	295	345
GB-Slt-031	261	231	261	234	231	231	231	231
GB-Slt-039	187	178	187	187	178	187	178	178
GB-Slt-044	237	241	237	237	237	237	237	237
GB-Slt-046	173	167	173	173	167	167	167	167
GB-Slt-051	-	221	-	-	224	224	-	224
GB-Slt-054	306	306	306	333	306	306	306	303
GB-Slt-056	187	193	187	187	187	187	187	-
GB-Slt-059	264	264	264	264	264	264	-	264
GB-Slt-066	117	175	175	175	175	175	175	175
GB-Slt-068	-	-	223	-	-	319	175	175
GB-Slt-077	269	269	266	269	269	269	269	266
GB-Slt-091	163	160	157	232	232	139	232	232
GB-Slt-105	261	264	264	261	264	270	264	264
GB-Slt-108	297	309	297	297	297	297	297	309
GB-Slt-113	271	-	271	271	271	269	-	301
GB-Slt-117	263	263	263	263	263	263	263	263
GB-Slt-130	248	248	248	248	248	248	248	248
GB-Slt-135	231	-	231	231	231	231	231	231

<67>

상기 표 5에서와 같이 본원발명의 프라이머쌍에 의해 증폭된 SSR을 포함하는 부위의 크기가 16점의 조샘플에서

다형성을 보였으며 이에 본원발명의 프라이머쌍에 의해 증폭된 부위에 위치하는 SSR은 다형성을 가짐을 알 수 있었다. 이 때 각각의 SSR의 반복모티프는 표 1에 기재된 바와 같으며 다형성을 보이는 대립인자 수 역시 표 1에 기재된 바와 같다.

발명의 효과

<68>

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 조에서 처음으로 SSR 마커를 개발하였다. 본 발명에서 제공되는 SSR 프라이머쌍은 조의 DNA 다형성을 효과적으로 검출하여 조의 DNA 프로파일을 작성하는데 매우 유용하게 이용될 수 있다. 이를 통해 조의 유전자원을 효율적으로 평가함으로써 신규 유전자원 도입시 기존 보유자원과의 중복성 분석 및 신규성 확립을 효과적으로 수행할 수 있으며, 조의 품종을 판별할 수 있다.

서 열 목 록

[서열목록 전자파일 첨부](#)