



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0062179
(43) 공개일자 2017년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6895 (2013.01)

C12Q 2563/101 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0167674

(22) 출원일자 2015년11월27일

심사청구일자 2015년11월27일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

대한민국(환경부 국립생물자원관장)

인천 서구 환경로 42, 종합환경연구단지 국립생물
자원관 (경서동)

(72) 발명자

김영동

강원도 춘천시 지석로 97, 101동 802호(석사동,
현진에버빌 1차)

김보윤

강원도 춘천시 별말길 32(석사동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

위병갑

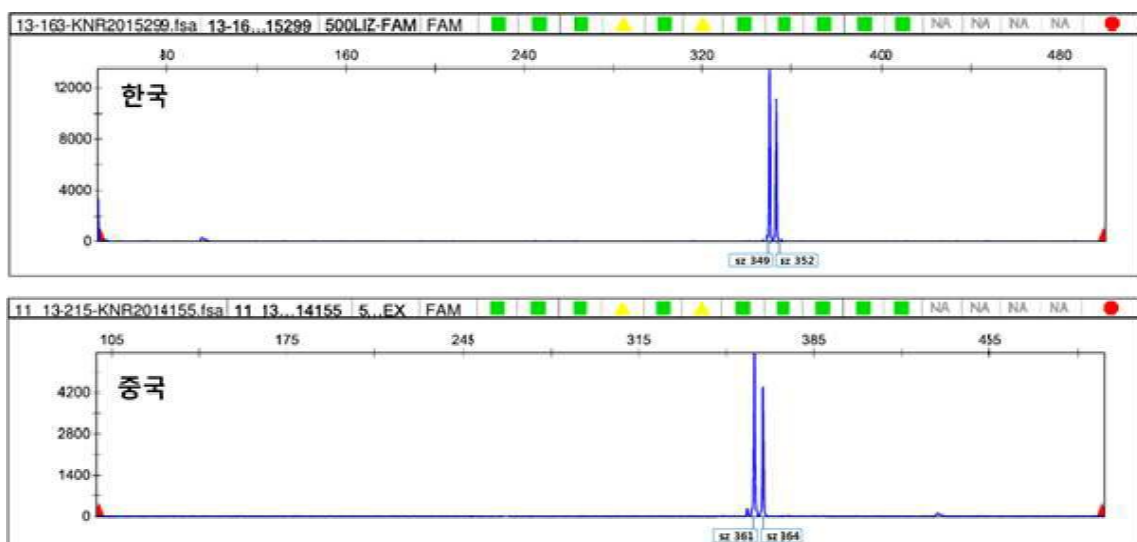
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 겨우살이의 원산지 판별용 마이크로세털라이트 마커

(57) 요약

본 발명은 겨우살이 원산지 판별을 위한 특이 SSR 프라이머 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트를 포함하는 겨우살이 원산지 판별용 EST-SSR(expressed sequence tags-simple sequence repeat) 프라이머 세트, 상기 EST-SSR 프라이머 세트를 포함하는 겨우살이 원산지 판별용 키트 및 겨우살이 DNA와 상기 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하는 단계를 포함하는 겨우살이 원산지 판별방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 겨우살이 원산지 판별 마커는 겨우살이의 원산지를 분석할 수 있는 EST-SSR 프라이머 세트를 이용하여 정확하고 신속하게 국내산 겨우살이를 구분하여, 국내 겨우살이 유전자원의 관리 및 보호와 함께 우리의 소중한 유전자원을 보호할 수 있으며, 국내산과 수입산의 식별이 가능해져 국내 겨우살이 시장의 유통질서를 확립하는데 기여할 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Q 2563/107 (2013.01)

C12Q 2600/13 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

김순옥

경기도 안양시 동안구 평촌대로211번길 21, 306동
706호(호계동, 목련아파트)

임채은

서울특별시 마포구 상암산로1길 92, 712동 1402호
(월드컵파크아파트)

김창무

경기도 고양시 일산서구 대화1로 61, 502동 101호
(대화동, 대화마을 5단지)

여주홍

경기도 수원시 영통구 인계로 165, 523동 1203호(
매탄동, 주공5단지 아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트를 포함하는 겨우살이 원산지 판별용 EST-SSR(expressed sequence tags-simple sequence repeat) 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 반복서열 (CAT)₆를 증폭시키는 것을 특징으로 하는 겨우살이 원산지 판별용 EST-SSR 프라이머 세트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 말단이 방사성 또는 형광물질로 표지된 것을 특징으로 하는 겨우살이 원산지 판별용 EST-SSR 프라이머 세트.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 겨우살이는 한국산 또는 중국산 중 어느 하나인 겨우살이 원산지 판별용 EST-SSR(expressed sequence tags-simple sequence repeat) 프라이머 세트.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 겨우살이는 증폭산물이 349bp 및 352bp 인 경우 한국산으로 판별하는 EST-SSR(expressed sequence tags-simple sequence repeat) 프라이머 세트.

청구항 6

제1항에 따른 겨우살이 원산지 판별용 EST-SSR 프라이머 세트를 포함하는 겨우살이 원산지 판별용 키트.

청구항 7

겨우살이 DNA를 제1항의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하는 단계를 포함하는 겨우살이 원산지 판별방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 판별방법은 PCR 산물이 349bp 및 352bp 인 경우 한국산으로 판별하는 것을 특징으로 하는 겨우살이 원산지 판별방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 겨우살이 원산지 판별을 위한 특이 SSR 프라이머 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 겨우살이(Viscum album L. var. coloratum (Kom.) Ohwi)는 상록성 식물로 토양에 뿌리를 내리지 않고 기주식물의 가지에 일종의 부정근의 형태로 뿌리를 내리고 식물체에 고착하여 기주식물로부터 물과 영양분을 흡수하고 광합성을 하여 살아가는 반기생성 식물이다. 겨우살이의 성장속도는 아주 느려 한 해에 가지 한 마디씩 늘려가며, 씨앗이 숙주에 정착해 첫 가지가 나오기까지만 3년이 걸린다. 어린 가지에 기생한 겨우살이는 숙주 나무에 큰 피해를 주지 않은 채 보통 20~30년 동안 함께 살아가고, 새 동지 형태로 겨우살이가 자라려면 30년은 걸린다. 주로 한국, 중국, 대만, 일본, 러시아에 분포하며, 우리나라 겨우살이의 자생지 고도에 따른 분포는 10-1,200 m 범위내로, 200-400 m에서 가장 흔히 분포한다. 겨우살이는 자웅이주로 3-4월에 가지 끝에 수꽃은 길이 2.5-3 mm로 보통 3개씩, 암꽃은 지름 1.5-2 mm로 3(~5)개씩 모여 달리며, 열매는 지름 6-8 mm의 구형이며 10-11월에 밝은 황색으로 익는다. 종자는 길이 5-6 mm의 납작한 타원형이며 점액질의 과육에 의해 싸여 있다.

[0003] 겨우살이는 유럽과 동양에서 오랜 세월동안 고혈압, 당뇨, 류마티즘, 종양 등을 치료하기 위해 민간요법으로 사용되어져 왔다(약재명: 기생목, 상기생). 미국 국립암화학요법센터(Cancer Chemotherapy National Service Center, CCNSC)에서는 대규모로 세계의 약 12만종의 식물에 대한 약효검색을 실시한 결과, 겨우살이가 암치료를 위한 가장 유력한 식물로 기대된다고 보고한 바 있다. 겨우살이에서 분리된 성분인 렉틴(lectin)은 주요 항암인자로서 연구결과, 한국산 겨우살이(Viscum album var. coloratum)가 유럽산 겨우살이(Viscum album var. album)에 비해 우수한 효능을 보인다. 또한, 유럽산 겨우살이 추출물과 한국산 겨우살이 추출물의 면역증강효과를 비교한 결과 한국산 겨우살이 추출물의 우수성이 보고된 바 있다. 그밖에 한국산 겨우살이 종류에 대한 국내 연구로는 혈압강화 작용, 항암작용, 면역활성 기능 효과, 생장 및 조직해부학적 연구, 겨우살이의 기주식물, 기주별 흡기 특징 등이 있다. 그러나 한국산 겨우살이를 대상으로 수행한 집단 연구나 원산지 구별 유전자 표지 개발에 관한 연구는 없는 실정이다. 현재수준의 채취가 계속된다면 국내에서 겨우살이가 자취를 감출 것으로 예측되어 남획방지 대책이 시급하다. 최근, 겨우살이에 대한 수요가 높아지면서 대량으로 수입되고 있으며, 2000년부터 2012년까지 중국 겨우살이의 수입량은 총 274,661 kg에 달한다. 무분별한 수입으로 국내 겨우살이의 50% 수준의 가격인 중국산 겨우살이가 국내겨우살이로 둔갑되어 유통되고 있으며, 이는 소비자의 피해로 이어지고 있는 실정이다.

[0004] SSR (Simple sequence repeat) 혹은 microsatellite는 유전자좌에서 보이는 다형성으로, 단순 반복 염기서열의 반복 횟수 차이로 관찰된다. 생물의 유전체에 존재하는 많은 수의 simple sequence repeat (SSR) 들을 microsatellite라고 하는데 microsatellite는 2 - 6개의 뉴클레오티드가 단순 반복되어 있는 경우가 많고 이는 DNA 복제시 불균형 교차 등으로 인해 생성되는 것으로 알려져 있으며, 단순반복서열의 반복수는 식물의 종간 혹은 종내에도 다양한 차이를 보이기 때문에 다형성의 수준이 높은 multi-allelic, co-dominant 마커이고 재현성도 뛰어나다. Microsatellite는 그 주위의 DNA 염기서열로부터 고안된 프라이머를 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 증폭시킬 수 있으며, 증폭된 산물은 단순 염기서열 반복수의 차이로부터 다형성을 보인다.

[0005] 이에 본 발명자들은 겨우살이의 군락보호와 공정한 상거래 확립을 위해 중요한 기초자료로서 활용하기 위해 겨우살이 원산지 판별 특정 EST-SSR 마커 개발을 통해 겨우살이의 원산지 판별이 가능함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2011-0111069호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 겨우살이 원산지 판별용 EST-SSR(expressed sequence tags-simple sequence repeat) 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[0008] 또한 본 발명의 다른 목적은 상기 EST-SSR 프라이머 세트를 포함하는 겨우살이 원산지 판별용 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 또한 본 발명의 다른 목적은 겨우살이 DNA를 상기의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하는 단계를 포함하는 겨우살이 원산지 판별방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트를 포함하는 겨우살이 원산지 판별용 EST-SSR(expressed sequence tags-simple sequence repeat) 프라이머 세트를 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에서, 상기 프라이머 세트는 반복서열 (CAT)₆를 증폭시키는 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에서, 상기 프라이머 세트는 말단이 방사성 또는 형광물질로 표지된 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에서, 상기 겨우살이는 한국산 또는 중국산 중 어느 하나일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에서, 상기 겨우살이는 증폭산물이 349bp 및 352bp 인 경우 한국산으로 판별하는 것일 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 겨우살이 원산지 판별용 EST-SSR 프라이머 세트를 포함하는 겨우살이 원산지 판별용 키트를 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 겨우살이 DNA를 상기 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하는 단계를 포함하는 겨우살이 원산지 판별방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일실시예에서, 상기 판별방법은 PCR 산물이 349bp 및 352bp 인 경우 한국산으로 판별하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 겨우살이의 원산지를 분석할 수 있는 EST-SSR 프라이머 세트를 이용하여 정확하고 신속하게 국내산 겨우살이를 구분하여, 국내 겨우살이 유전자원의 관리 및 보호와 함께 우리의 소중한 유전자원을 보호할 수 있으며, 국내산과 수입산의 식별이 가능해져 국내 겨우살이 시장의 유통질서를 확립하는데 기여할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 EST-SSR 마커 선별 과정을 도식화한 것이다.

도 2는 한국과 중국에서 채집한 겨우살이를 대상으로 형광다이를 붙인 SSR 프라이머를 적용하여 PCR증폭한 후 형광분석장치를 이용하여 증폭된 DNA 단편의 크기를 측정한 결과이다.

도 3은 본 발명의 SSR 프라이머(Viscum_SSR_HHU)를 적용하여 관측된 각 집단별 대립유전자 빈도 관측 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트를 포함하는 겨우살이 원산지 판별용 EST-SSR(expressed sequence tags-simple sequence repeat) 프라이머 세트를 제공함에 그 특징이 있다.

[0021] 본 발명에서 상기 ‘겨우살이(Viscum album L. var. coloratum (Kom.) Ohwi)’는 상록성 식물로 토양에 뿌리를 내리지 않고 기주식물의 가지에 일종의 부정근의 형태로 뿌리를 내리고 식물체에 고착하여 기주식물로부터 물과 영양분을 흡수하고 광합성을 하여 살아가는 반기생성 식물이고, 한국·중국·일본 등지에 분포한다.

[0022] 본 발명에서 용어, ‘프라이머’란 상보적인 주형과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 본 발명의 구체적인 실시에서는, 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트를 사용하였다.

[0023] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 프라이머 세트는 반복서열 (CAT)₆를 증폭시킬 수 있다.

[0024] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 프라이머 세트는 말단이 방사성 또는 형광물질로 표지된 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 겨우살이는 한국산 또는 중국산 중 어느 하나일 수 있다.

- [0026] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 겨우살이는 증폭산물이 349bp 및 352bp 인 경우 한국산으로 판별될 수 있다.
- [0027] 또 다른 양태로서, 겨우살이 원산지 판별용 EST-SSR 프라이머 세트를 포함하는 겨우살이 원산지 판별용 키트를 제공한다.
- [0028] 본 발명에 따른 겨우살이 판별용 키트는 상기 EST-SSR 프라이머 외에도 시료 내에서 겨우살이 판별을 위하여 필요한 반응완충용액, 중합효소, dNTP, 안정화제 및 모든 생물학적 또는 화학적 시약, 사용설명서 등을 포함할 수 있다. 이러한 키트의 다른 구성은 당업자에 의하여 적절히 선택될 수 있다.
- [0029] 또 다른 양태로서, 본 발명은 겨우살이 DNA를 제1항의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하는 단계를 포함하는 겨우살이 원산지 판별방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 판별방법은 PCR 산물이 349bp 및 352bp 인 경우 한국산으로 판별할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 상기 개체는 판별하고자 하는 대상 겨우살이이다.
- [0032] 본 발명의 PCR 수행은, 개체로부터 얻어진 핵산 시료를 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트를 포함하는 겨우살이 원산지 판별용 EST-SSR(expressed sequence tags-simple sequence repeat) 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일실시예에 있어서, PCR 수행은 98℃에서 5분간 DNA 1차 해리를 거친 후, 95℃에서 1분 DNA 해리과정, 55℃에서 1분 프라이머 결합(annealing), 72℃에서 1분 DNA 합성(extension)을 30회 실시하고, 최종적으로 72℃에서 10분간 안정화하는 단계를 진행하는 과정을 통해 이루어질 수 있다.
- [0034] 상기 PCR 수행을 통해 증폭된 표적 서열은 검출 가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 하나의 구체적 예로서, 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사선을 발하는 물질일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 바람직하게는 상기 표지 물질은 에티디움브로마이드(Ethidium Bromide: EtBr), Cy-5, Cy-3, FAM, VIC, NED 또는 PET 등으로 제한되지 않는다. 표적 서열의 증폭 시 프라이머의 5' -말단에 Cy-5, Cy-3, FAM, VIC, NED 또는 PET를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출 가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사선 물질을 이용한 표지는 PCR 수행 시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사선 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사선이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사선으로 표지될 수 있다.
- [0035] 상기 증폭된 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사선 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 겔 전기영동을 수행할 수 있다. 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5' -말단에 Cy-5, Cy-3, FAM, VIC, NED 또는 PET를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출 가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사선 측정 방법은 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사선 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사선 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광 계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사선을 측정할 수 있다.
- [0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] <준비예>
- [0040] 겨우살이 샘플 준비
- [0041] 겨우살이 원산지 판별 마커를 개발하기 위해 본 발명의 대상종인 겨우살이 각 집단의 소재지와 개체수는 표 1에 나타낸바와 같다. 각 집단별 20개체의 샘플을 확보하였으며, 이를 대상으로 원산지 구분마커를 적용하였다. 겨우살이의 생식적 특성을 고려하여 각 샘플은 10m 이상 떨어진 숙주에서 수집하였다.

표 1

국명	국가	소재지	개체수
겨우살이	한국	양구	20
겨우살이	한국	가야산	20
겨우살이	한국	소백산	20
겨우살이	한국	덕유산	20
겨우살이	중국	길림성	20

<실시예 1>

RNA 추출

EST-SSR 개발을 위해 RNA-seq이 필요하며 이를 위해 양질의 mRNA를 추출하였다. 이를 위해 상기 준비예를 통해 준비한 겨우살이의 잎을 채취하여 즉각 액체질소에 급속 냉각 시킨 후 70℃ 초저온 냉동고에 보관한 뒤, 생체시료의 RNA 추출을 위해 Rneasy Plant Mini Kit(Qiagen, USA)를 이용하여 추출하였다. 급속 냉각한 겨우살이 잎의 100mg을 Tissue lyser(Qiagen)을 이용하여 분쇄한 후, RNAase-free 용액에 넣어 보관하였다. 이후 버퍼 RLT 450ul을 넣어 잘 섞어주고, cell-debris를 걸러내기 위해 QIAshredder spin column에 샘플 용액을 옮긴 후 원심분리 하였다. 상층액만 분리한 후, 상층액의 0.5배 에탄올(96-100%)을 넣어 즉시 섞어주었다. 샘플 용액은 RNeasy Mini spin column으로 옮긴 후 10,000rpm에서 15초 동안 원심분리 하였다. 이후 버퍼 RW1 700ul를 넣은 후, 10,000rpm에서 15초 동안 원심분리하였다. 다음 단계로 버퍼 RPE 500ul 넣은 후, 10,000rpm에서 15초 동안 원심분리 하였으며, 이 과정을 한번 더 반복하였다. 원심분리 후 column은 1.5ml 튜브로 옮긴 후, RNase-free water 30-50ul를 column membrane에 직접적으로 넣은 후, 1분 동안 원심분리 하였다. 이러한 과정으로 얻어진 RNA의 정량적 분석은 Nanodrop Spectrophotometer로 농도를 측정하고 정성적 분석은 1% 아가로스 겔에서 전기영동을 수행하였다. cDNA library 제작 직전에는 Bioanalyzer로 QC(Quality Control) 테스트를 통해 112.9ug의 RNA 양을 확인하였으며, RIN(RNA Integrity Number)값은 9.1로 적절하였다. RNA 사용 전까지 80℃ 초저온 냉동고에 보관하여 사용하였다.

<실시예 2>

DNA 추출

야외에서 채취한 겨우살이의 잎 시료는 아이스박스에 담아 실험실로 운반한 후 액체질소를 이용하여 실리카겔을 이용하여 건조하여 보관한 다음 사용하였다. 생체시료로부터 DNA의 추출은 DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, USA)방법을 사용하여 추출하였다. 건조 샘플 20mg을 준비하여, Tissue Lyser (Quiagen)을 이용하여 분쇄한 후, 65℃ incubator에 데워둔 버퍼 AP1 5ml과 RNase 10ul을 넣은 뒤 잘 섞어준다. 이후 65℃ 인큐베이터에서 10분 동안 반응 시키며, 이 과정에서 2-3번 튜브를 위아래로 움직여 용액을 섞어준다. 세포의 용해를 위해 버퍼 P3 1.8ml을 넣어주며, 얼음위에서 10분동안 반응시킨다. 이후 실온에서 13,000rpm으로 원심분리한다. Cell-debris를 제외한 상층액은 QIAshredder Maxi spin column에 옮긴 후 5분동안 13,000rpm으로 원심분리하여, column membrane을 이용하여 다시한번 순도 높은 용액을 얻는다. 이후 1.5ml 튜브로 샘플용액을 옮겨, 샘플용액 1.5배 양의 버퍼 AW1을 넣어 잘 섞어준다. 섞은 샘플 용액은 DNeasy Maxi spin column에 옮긴 후 8,000 rpm에서 5분동안 원심분리 한다. Column은 새로운 1.5ml 튜브에 옮겨 버퍼 AW2 12ml을 넣어 워싱한다. 8,000 rpm에서 10분동안 원심분리 후, Column은 다시 1.5ml 새로운 튜브에 옮긴다. 마지막으로 버퍼 AE 0.75-1ml을 넣어 Column membrane으로 부터 DNA를 얻는다. 추출된 DNA는 Nanodrop Spectrophotometer로 농도를 측정 한 후, 일정 농도로 희석하여 -70℃ 초저온 냉동고에 보관하였다.

<실시예 3>

cDNA library 합성

상기 실시예 1에서 추출한 RNA를 주형으로하여 TruSeq Kit (Illumina, USA) 를 사용하여 cDNA library를 만들

었다. 0.1-1 ug Total RNA를 대상으로 Illumina TruSeq RNA sample Preparation v2 LS Workflow를 기준으로 실시하였다. 정제된 mRNA 절편을 대상으로 첫 번째 가닥 cDNA를 합성한다. FSM (First Strand Master Mix) 1튜브에 CDP (cDNA Plate) barcode label, 1 Microseal 'B' adhesive seal, 1 RNase/DNase-free reagent reservoirs, 1튜브 SuperScript II Reverse Trascriptase 를 넣은 뒤 실온에서 반응시켜 첫 번째 가닥 cDNA를 합성한다. 이때, FSM는 -25℃ ~ -15℃에서 보관하고 사용할 때 실온에서 녹여 이용한다. 첫 번째 가닥 cDNA는 두 번째 가닥 cDNA 제작에 이용하였다. 1 튜브 RSB (Resuspension Buffer) , 1/48 튜브 SSM (Second Strand Master Mix), 90ul AMPure XP beads, 400ul EtOH, 4 Microseal 'B' adhesive seals, 4 RNase/DNase-free reagent reservoirs을 잘 섞은 뒤 실온에서 반응하였다. 다음과정은 EndRepair으로써, 1/48 ERP (End Repair Mix), 1 tube RSB (Resuspension Buffer), ALP (Adapter Ligation Plate) barcode labe, 160ul AMPure XP beads, 400ul EtOH, 4 Microseal 'B' adhesive seals, 5 RNase/DNase-free reagent reservoirs을 15℃-30℃에서 반응시켰다. 다음은 말단에 싱글 A 뉴클레오타이드를 붙여주는 과정으로써, 1/48 튜브 ATL (A-Tailing Mix), 1 튜브 RSB (Resuspension Buffer), 1 Microseal 'B' adhesive seals, 3 RNase/DNase-free reagent reservoirs을 섞은 뒤 열음 위에서 반응 시켰다. 당므과정은 cDNA 말단에 어댑터를 Ligation 하기 위해, 1/48 튜브 LIG (Ligation Mix), 1 튜브 RSB (Resuspension Buffer), 1/48 STL (Stop Ligaion Buffer), 92ul AMPure XP beads, 800ul EtOH, 7 Microseal 'B' adhesive seals을 혼합하였다. 다음과정은 PCR 과정을 통해 어댑터가 합성된 DNA 절편을 선별하는 과정으로 1/48 튜브 PMM (PCR Master Mix), 1/48 튜브 PPC (PCR prkmer Cocktail), 1 튜브 Resuspension Buffer, 1 튜브 TSP1 (Tager Sample Plate), 50ul AMPure XP beads, 400ul EtOH, 2 Microseal 'B' adhesive seals을 잘 혼합한 뒤 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94℃에서 2분 반응 후, 94℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 3분으로 35 사이클 증폭하고, 72℃ 10분간 추가로 반응하였다. PCR 산물 중 1ul를 1.0% agarose 겔에 전기영동하고 Ethidium Bromide에 염색한 후, UV transilluminator에서 cDNA 합성을 확인하였다. 확인된 cDNA는 외부염체(마크로젠)의뢰하여 RNA 염기서열을 분석하였으며, 그 결과 RNA 염기서열 정보는 5G 이상으로 얻었다.

[0057] <실시예 4>

[0058] de novo contig assembly 및 EST-SSR identification

[0059] 상기 실시예 3의 RNA 염기서열 분석(RNA-sequencing)으로부터 얻어진 raw reads를 Trinity 프로그램을 이용하여 어셈블리(assembly) 한다. SSR 모티프(SSR motif) 발굴은 MISA 프로그램(<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa>)을 이용하여 수행하고 tri, tetra, penta, hexanucleotide motif가 최소 5 repeats 이상인 것을 선택한다.

[0061] <실시예 5>

[0062] EST-SSR primer 제작

[0063] EST-SSR 마커 선별 과정으로는 먼저, PCR amplicon size가 100~300 bp, annealing temperature는 60℃ 전후가 되도록 제작한다. 프라이머가 해당 분류군에서 증폭되어 적절한 길이의 fragment를 형성하는지 아가로스 겔에서 확인하고 단형성(monomorphism)은 제외한다. 이와 같은 과정을 통해 검출된 마커를 사용하여 2집단 40개체 이상을 대상으로 원산지 구분 마커를 선별하였다(도 1 참조). 선별된 마커 후보 중 겨우살이의 한국/중국 원산지 구분 마커는 아래와 같다(표 2 참조).

표 2

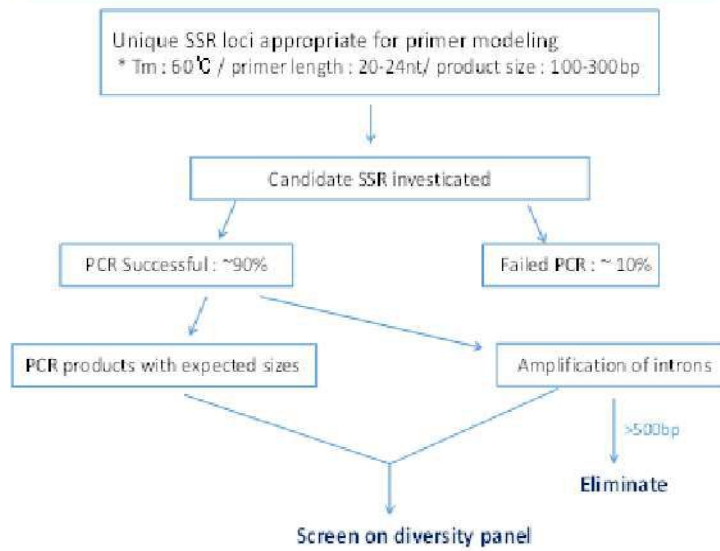
Marker Name	Primer sequence	SSR repeat motif
	forward reverse	
Viscum_SSR_HHU	CGC ACT TTT AGC TTA CCT GAG T (서열번호 1)	(CAT)6
	CAT CGT CTT CCT TTT GAT CTT C (서열번호 2)	

- [0067] 표 2의 서열번호 1 및 2로 증폭된 SSR은 원산지에 따라 다른 반복 횟수를 가진다.
- [0068] PCR은 주형 DNA 20~50ng, 10X buffer 2.5ul, 2.5mM dNTPs 2ul, 형광염료(HEX, FAM, NED 등)가 표지된 5pmol primer 각각 0.5ul, 5U/ul 중합효소(Takara Ex Taq.) 및 증류수가 포함된 총 25ul 반응액을 만들어 98℃에서 5분동안 DNA 1차 해리 후, 95℃에서 1분 DNA 해리 과정, 55℃에서 1분 primer 결합(annealing) 과정, 72℃에서 1분 DNA 합성(extension) 과정으로 구성된 반응을 30회 반복한 후 최종적으로 72℃에서 10분 간 안정화 단계를 진행하였다(Applied Bio-systems Gene Amp. PCR system 9700 사용). 유전자형 분석은 Genemapper 4.0 (ABI PRISM Applied Biosystem)을 이용하였다.
- [0070] <실시예 6>
- [0071] 다형성(polymorphism) 확인
- [0072] 상기 실시예 5에서 개발한 Viscum_SSR_HHU 마커를 5집단 100개체에 적용하여 유전형(대립유전자)을 확인해 본 결과, 한국과 중국의 겨우살이에서 각각 특이적인 유전형이 검출되었다. 한국집단에서는 349bp, 352bp 크기의 유전형, 중국집단에서는 361bp, 364bp 크기의 유전형이 검출되었으며 이는 각 집단내 개체에서 공통적으로 검출되어 원산지 구분마커로서의 유용성이 확인되었다(도 2 참조).
- [0073] 본 발명의 Viscum_SSR_HHU 마커를 적용하여 관측된 각 집단별 대립유전자 빈도는 도 3에 나타난 바와 같이 총 4개의 대립유전자가 관측되었으며, 한국과 중국집단에서 각각 특이 대립유전자가 검출되었다(도 3 참조).
- [0075] 종합적으로 본 발명은 상기의 실시예에 나타낸바와 같이 겨우살이 원산지 구분마커를 개발하였으며, 본 발명에서 개발한 SSR 마커는 겨우살이 원산지에 따른 개체 판별(distinction)이 가능해 졌으며, 균일성(uniformity) 및 유용성(utility)이 확인되었다. 분석시간은 DNA 추출에서 유전형확인까지 약 4-5일 소요되며, 분석비용은 1점당 약 10,000원임(DNA 추출, 프라이머제작, GENESCAN 비용 등)으로 비교적 효율적이다. 이와같이 개발된 SSR 마커는 향후 중국산 겨우살이의 불법 유통 차단 및 국내 겨우살이의 지적 재산권과 표지인자로 활용될 수 있다.
- [0077] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

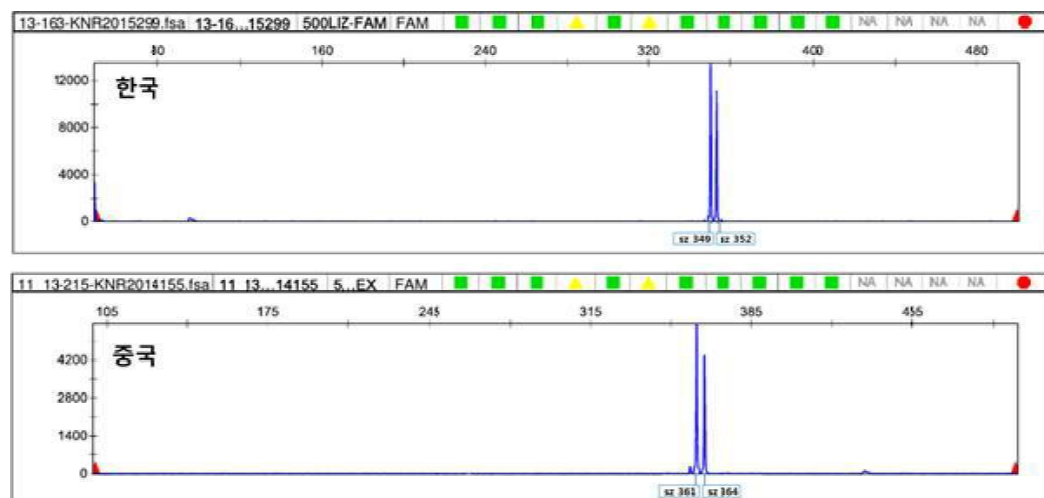
도면

도면1

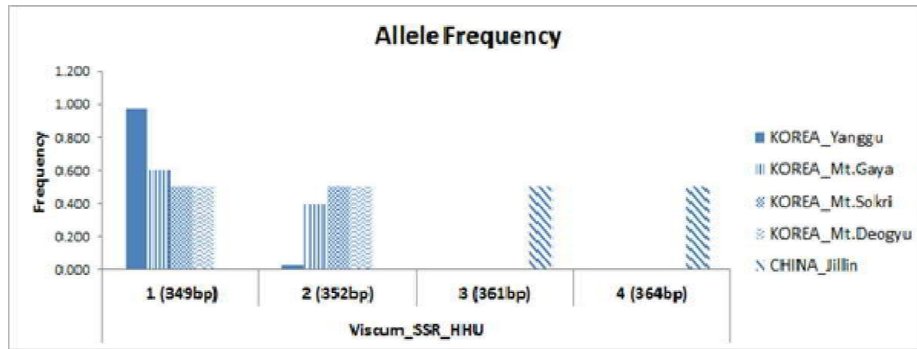
Workflow EST-SSR validation



도면2



도면3



서열 목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

National Institute of Biological Resources

<120> Microsatellite marker for discrimination of *Viscum album* var. *coloratum* L.

<130> pn1510-276

<160> 2

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Viscum_SSR_HHU_F

<400> 1

cgcactttta gcttacctga gt

22

<210> 2

<211> 22

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Viscum_SSR_HHU_R

<400> 2

catcgtcttc cttttgatct tc

22