

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0107429 (43) 공개일자 2016년09월19일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) (52) CPC특허분류 <i>C12Q 1/6895</i> (2013.01) <i>C12Q 2600/13</i> (2013.01) (21) 출원번호 10-2015-0030127 (22) 출원일자 2015년03월04일 심사청구일자 2015년03월04일		(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교) (72) 발명자 허윤강 서울특별시 마포구 신수로 81 경남아너스빌아파트 201동 106호 문명일 대전광역시 유성구 진잠로42번길 88 진잠타운아파트 204동 506호 노일섭 전라남도 순천시 생목길 1 벽산아파트 101동 140 2호 (74) 대리인 최규환

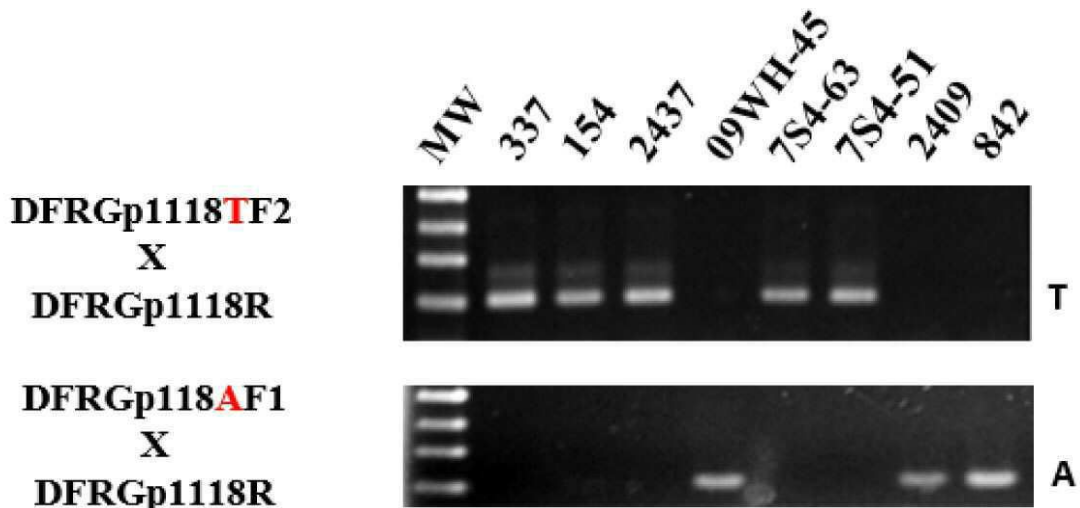
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 품종 판별용 SNP 마커 및 이의 용도

(57) 요 약

본 발명은 서열번호 1의 양배추 *DFR*(Dihydroflavonol 4-reductase) 유전자의 염기서열 중 1118번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 판별하기 위한 SNP 마커 조성물, 프라이머, 프로브 및 마이크로어레이, 상기 프라이머 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 선별하기 위한 키트 및 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종의 선별 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/156 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 213003-04-2-SB230

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 Golden Seed Project (GSP)

연구과제명 양배추 색소 경로 유전체 분석에 의한 자색발현 관련 분자마커 개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2013.07.25 ~ 2017.05.02

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 양배추 *DFR*(Dihydroflavonol 4-reductase) 유전자의 염기서열 중 1118번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 판별하기 위한 SNP 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 연속된 뉴클레오티드는 8 내지 100개의 연속된 뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 판별하기 위한 SNP 마커 조성물.

청구항 3

서열번호 1의 양배추 *DFR*(Dihydroflavonol 4-reductase) 유전자의 염기서열 중 1118번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종 판별용 프라이머.

청구항 4

제3항에 있어서, 서열번호 25 또는 서열번호 27의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종 판별용 프라이머.

청구항 5

서열번호 1의 양배추 *DFR*(Dihydroflavonol 4-reductase) 유전자의 염기서열 중 1118번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종 판별용 프로브.

청구항 6

서열번호 1의 양배추 *DFR*(Dihydroflavonol 4-reductase) 유전자의 염기서열 중 1118번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종 판별용 마이크로레이.

청구항 7

제3항 또는 제4항의 프라이머; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 선별하기 위한 키트.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 선별하기 위한 키트.

청구항 9

양배추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제3항 또는 제4항의 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적

서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 선별하기 위한 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 표적 서열의 증폭은 서열번호 25 및 30의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 및 서열번호 27 및 30의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 중 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 선별하기 위한 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 증폭 산물이 서열번호 1의 양배추 *DFR* 유전자의 염기서열 중 1118번째 염기에 해당하는 SNP(single nucleotide polymorphism) 위치에 T 염기를 갖는 것을 특징으로 하는 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 선별하기 위한 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 품종 판별용 SNP 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 서열번호 1의 양배추 *DFR*(Dihydroflavonol 4-reductase) 유전자의 염기서열 중 1118번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 판별하기 위한 SNP 마커 조성물, 프라이머, 프로브 및 마이크로어레이, 상기 프라이머 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 선별하기 위한 키트 및 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종의 선별 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식물의 색소(pigment)는 광합성에 관여하는 엽록소를 제외하고 3가지 계통(안토시아닌, 카로테노이드, 베타라인)이 존재하며 이 색소들이 수분을 위한 동물유인 및 종자 분산 등을 담당하며, 자외선이나 강한 가시광선에 의한 식물의 손상을 막아준다. 안토시아닌(anthocyanin)은 플라보노이드(flavonoid) 계통의 수용성 색소로 식물의 잎, 꽃 및 과실의 푸른색, 자주색 및 붉은색을 결정하며, 식물의 생장과 발달에도 중요한 역할을 한다. 안토시아닌은 꽃잎에서 곤충 등 화분매개자를 유혹하고, 열매 및 씨앗에서 종자의 분산을 도와 생태적 분포를 마련한다. 안토시아닌을 포함한 플라보노이드 화합물은 곤충 및 외부 스트레스에 대한 식물의 손상을 보호하는 기능을 하고(즉 생물학적 및 비생물학적 스트레스 저항성 부여), 특히 활성산소 등에 의한 손상을 막기 위해 항산화제로서의 기능을 한다. 안토시아닌은 사람에게도 항산화제로 작용하여 세포사멸을 감소시키고, 심혈관 질병, 암, 당뇨, 신경퇴화, 염증, 바이러스 감염 및 비만을 예방할 수 있어, 건강식품으로 각광을 받고 있다. 대사체공학을 통한 과실과 야채의 안토시아닌 함량의 질적 양적 증가는 중요하고 산업적 가치가 있는 연구방향이다.

[0003] 식물에서 안토시아닌 생합성 경로는 일찍이 잘 알려져 있다. 금어초, 페튜니아, 애기장대에서 *CHS*(chalcon synthase), *CHI*(chalcone isomerase), *F3H*(flavanone 3-hydroxylase) 유전자 등은 플라보노이드계 화합물의 초기 합성에 관여하는 EBGs(early biosynthetic genes)로서 다양한 플라보노이드 화합물 생합성 기작에 모두 공통으로 관련되어 있으며 초기에 발현이 이루어진다. 한편, *DFR*(dihydroflavonol 4-reductase), *LDOX*(leucoanthocyanidin oxygenase), *ANR*(anthocyanidin reductase) 및 *UD3GT*(UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase) 유전자 등은 LBGs(late biosynthetic genes)들로 EBG들의 발현이 이루어진 후 나중에 발현하며, 안토시아닌 생합성 경로의 후반부를 담당하고 있다. LBGs의 발현은 MYB-bHLH-WD40 전사복합체에 의해 조절되며, 이 복합체의 활성화는 발달단계신호, 환경신호 및 호르몬신호 등에 의해 조절된다.

[0004] 양배추의 육종방향은 내병성, 내한 및 내서성, 결구형태 및 엽색이 주 방향이며, 특히 엽색의 경우 회녹색 또는 청록색이 아니고 진한 녹색을 선호하는 경향이 있다. 자색 양배추는 건강식품 및 색소추출용으로 시장의 수요가 증대하고 있다. 따라서 양배추 자색 및 녹색을 선별할 수 있는 분자마커의 개발은 시급하다. 자색 또는 적색을 가진 배추과에는 자색양배추, 적색 배추 및 적겨자 등이 대표적이다. 자색 콜리 플라워(또는 꽃양배추)(purple

cauliflower [*B. oleracea* L. var. *botrytis*])에서 *BoMYB2*(*Arabidopsis* *PAP2* 또는 *MYB113* 오솔로그)가 bHLH-WD40와 함께 안토시아닌 합성에 중요한 역할을 한다. 적양배추(*B. oleracea* var. *capitata*)의 엽색도 안토시아닌 축적에 의한 것이며, *BoMYB2*와 *BoTT8*과 같은 전사인자의 발현 증가와 *CHS*, *F3H*, *F3'H*, *DFR*, *ADOX*와 같은 구조유전자의 발현 증가의 결과이다. 자색 케일(purple kale, *B. oleracea* var. *acephala* f. *tricolor*)은 *BoPAP1*(*BoMYB1*)(*AtPAP1* 오솔로그)의 발현 증가와 이에 따른 *DFR* 및 *ANS* 유전자의 발현 증가에 원인이 있으며, 이들 전사인자 및 구조유전자의 발현은 저온에 의해 발현이 크게 증가됨이 보고되었다(Zhang et al., 2012, Plant Cell Rep. 31: 281-289).

[0005] *DFR*(Dihydroflavonol 4-reductase) 유전자는 LBGs의 하나로, 배추에는 12개의 *DFR* 유전자가 존재하며 *BrDFR2*, -4, -8, -9이 저온반응을 보였다. 벼의 종피(pericarp) 색깔도 *DFR* 유전자에 의해 조절되며, 은행에는 3개의 *DFR*(*GbDFR*) 유전자가 있으며, *GbDFR3*이 주로 안토시아닌 합성과 관련이 있고, *GbDFR1*은 스트레스에, *GbDFR2*과 *GbDFR3*는 잎에서 주로 발현됨이 보고되었다(Hua et al., 2013 PLoS One 8(8): e72017). 양배추의 경우는 *BoMYB*에 의해 *DFR* 발현이 증가됨이 보고되었다(Chiu and Li, 2012 Planta 236: 1153-1164). *DFR*과 관련된 특허는 이 유전자의 발현을 조절하는 프로모터에 관한 것이 대부분이다.

[0006] 한국등록특허 제1388950호에서는 '빨간 브라시카 라파 식물 및 이의 육종 방법'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1464247호에서는 '양배추 시들음병 저항성 또는 감수성 품종 선별용 SNP 마커 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 품종 판별용 SNP 마커 및 이의 용도에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 양배추 계통의 *Bo1035269* *DFR*(Dihydroflavonol 4-reductase) 유전자의 게놈 서열인 서열번호 1의 1118번째 염기에 해당하는 SNP(single nucleotide polymorphism) 위치에 T 염기가 존재하여 Leu(T)/His(A) 변화를 유도함으로써 저온에서 안토시아닌을 축적하여 자색을 띄는 양배추 형질이 유발되는 것을 확인하였다. 이러한 사실을 바탕으로, 본 발명에서 개발한 SNP 마커를 이용하여 저온에서 안토시아닌을 축적하여 자색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 조기에 선별하고 제거하여 품질 좋은 녹색 양배추만을 효과적으로 육성하는데 유용하게 사용될 수 있는 점을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 양배추 *DFR*(Dihydroflavonol 4-reductase) 유전자의 염기 서열 중 1118번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 판별하기 위한 SNP 마커 조성물, 프라이머, 프로브 및 마이크로어레이를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 선별하기 위한 키트를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 프라이머를 이용하여 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 선별하기 위한 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 SNP 마커를 양배추 작물에 적용하면, 저온에서 안토시아닌을 축적하여 자색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 육종(또는 육성) 초기에 효율적으로 선별 및 제거할 수 있다. 이를 통해 차후 상품 가치를 떨어뜨리는 자색이 비치는 녹색 양배추를 효과적으로 제거할 수 있어, 육종(또는 육성)에 소요되는 시간, 비용 및 노력을 절감하는데 매우 유용할 것으로 기대된다. 또한, 본 발명의 방법으로 육성한 녹색 양배추 계통 또는 품종의 보급은 재배 농가 및 소비자에게도 고품질의 양배추 생산 및 공급을 가능하게 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 양배추 *DFR* 유전자들의 염기서열(A) 및 이들의 유연관계(B)를 나타낸다.

도 2는 저온 처리에 의한 자색 발현의 양상을 확인하기 위해 8계통 양배추를 온실(20-40℃, 오른쪽)과 온실 밖(최저기온 평균 6.6℃, 왼쪽)에서 각각 3개체씩 30일간 재배한 결과이다. 8계통은 저온에서 안토시아닌이 발현되는 양배추(337, 154, 2437), 저온에서 안토시아닌 축적이 없는 양배추(09WH-45), 자색 양배추(7S4-63, 7S4-51) 및 녹색 양배추(2409, 842)를 각각 나타낸다.

도 3은 8계통의 저온 처리 및 비처리 양배추에서 안토시아닌 함량(상단) 및 *DFR* 유전자에 대한 RT-PCR 결과(하단)이다. 비처리는 20-40℃ 온실, 저온 처리는 최저기온 평균 6.6℃인 옥상을 나타낸다. 도면 상단의 A-H는 순서대로 337, 154, 2437, 09WH-45, 7S4-63, 7S4-51, 2409, 842를 나타내며, A-H 순서대로 도면 하단의 레인 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 및 15는 20-40℃의 온실 양배추, 레인 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 및 16은 최저기온 평균 6.6℃의 옥상 양배추를 나타낸다.

도 4는 8계통 양배추로부터 분리한 *BoDFR* 유전자의 염기서열을 나타낸다.

도 5 및 도 6은 8계통 양배추로부터 분리한 *BoDFR* 유전자의 염기서열을 정렬한 결과를 나타낸다. 음영 영역은 엑손 서열을 나타내고, 녹색은 실험에 의해 확인된 유용한 SNP를 나타낸다. 빨간색 및 파란색은 자색 및 녹색 양배추 사이의 SNP 또는 SSR 영역을 나타낸다. SNP 검출을 위한 프라이머 위치 및 서열은 정렬 위에 표시하였다. 파란색은 정방향 프라이머, 빨간색은 역방향 프라이머를 나타낸다.

도 7은 8계통 양배추를 사용한 *DFR* SNP 확인 결과이다. 상단 및 하단 패널은 저온에서 안토시아닌 축적 및 비축적 양배추를 각각 SNP-T 및 SNP-A로 나타낸 것이다. 8계통은 저온에서 안토시아닌이 발현되는 양배추(337, 154, 2437), 저온에서 안토시아닌 축적이 없는 양배추(09WH-45), 자색 양배추(7S4-63, 7S4-51) 및 녹색 양배추(2409, 842)를 각각 나타낸다.

도 8은 다양한 양배추 및 근계를 이용한 *DFR* SNP 확인 결과이다. T 및 A는 저온에서 안토시아닌 축적 및 비축적 양배추를 각각 나타낸 것이다.

도 9는 HRM 방법으로 *DFR* SNP를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 양배추 *DFR*(Dihydroflavonol 4-reductase) 유전자의 염기서열 중 1118번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 판별하기 위한 SNP 마커 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 저온은 4~10℃일 수 있고, 바람직하게는 4~10℃에서 20~40일 노출하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0015] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 연속된 뉴클레오티드는 8 내지 100개의 연속된 뉴클레오티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 본 발명에서 용어, "뉴클레오티드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드이며, 특별하게 다르게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오티드의 유사체를 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York (1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584 (1990)).

[0017] 본 발명의 SNP는 표현형에 직접적인 영향을 미치는 매우 안정적인 유전자 마커이다. 본 발명의 SNP 마커를 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종의 판별에 사용할 수 있는 것은 양배추 *DFR*(Dihydroflavonol 4-reductase) 유전자인 서열번호 1로 표시되는 유전자의 염기서열 중 SNP 변이 위치인 1118번째 염기가 T로 다르게 나타나는 것에 근거한 것이다. 예를 들어, 서열번호 1의 1118번째 뉴클레오티드에 해당하는 SNP는 T로 염기 다형성을 나타내는데, 이 SNP에서 T/T 동형접합 유전자형을 갖는 계통 또는 품종은 저온에서 안토시아닌을 축적하여 자색을 띄는 양배추 계통 또는 품종으로, A/A 동형접합 유전자형을 갖는 계통 또는 품종은 저온에서 안토시아닌을 축적하지 않는 녹색 양배추 계통 또는 품종으로 판단할 수 있다.

[0018] 한편, 본 발명에서 사용된 용어 SNP 위치에서의 "동형접합 유전자형(homozygotic genotype)"이란 SNP 변이 위치에 해당하는 상동 염색체(homologous chromosome) 상의 대립형 염기(allelic base)가 서로 동일한 염기인

경우를 의미하며, SNP 변이 위치에서의 "이형접합 유전자형 (heterozygotic genotype)" 란 SNP 변이 위치에 해당하는 상동 염색체상의 대립형 염기가 서로 다른 염기인 경우를 의미한다.

- [0019] 본 발명은 상기 서열번호 1의 서열에서 각 SNP 위치의 염기 변이체에 관한 것이나, 이러한 SNP 염기 변이가 이 중 가닥의 gDNA (게놈 DNA)에서 발견되는 경우, 상기 뉴클레오타이드 서열에 대해 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 따라서 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열에서 SNP 위치의 염기도 상보적인 염기가 된다. 이러한 측면에서, 본 명세서에 제시된 모든 서열은, 특별한 언급이 없는 한, 게놈 DNA의 센스 가닥에 있는 서열을 기준으로 한 것이다.
- [0020] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 양배추 *DFR* 유전자의 염기서열 중 1118번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종 판별용 프라이머를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종 판별용 프라이머는 서열번호 25 또는 서열번호 27의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 25 및 27로 표시된 올리고뉴클레오타이드 프라이머는 역방향 프라이머이며, 각 프라이머의 서열 길이에 따라 각 서열 내의 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상, 26개 이상, 27개 이상, 28개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0022] 따라서, 본 발명의 프라이머 세트는 서열번호 25 및 30의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 및 서열번호 27 및 30의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 중 하나 이상의 프라이머 세트를 이용할 수 있다. 이들 모든 프라이머 조합은 SNP 위치의 주변 서열로부터 제작하였으며, PCR로 증폭하고 전기영동을 통해 산물을 확인함으로써 계통 또는 품종을 식별하는 방법에 적용될 수 있다.
- [0023] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도 (complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체 (analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트 (phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산 (peptide nucleic acid)을 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질 (intercalating agent)을 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 본 발명의 프라이머 핵산 서열은 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지의 예로는, 효소 (예를 들어, HRP (horse radish peroxidase), 알칼리 포스파타아제), 방사성 동위원소 (예를 들어, ³²P), 형광성 분자, 화학그룹 (예를 들어, 비오틴 (biotin)) 등이 있다. 프라이머의 적합한 길이는 사용하고자하는 프라이머의 특성에 의해 결정하지만, 통상적으로 15 내지 30bp의 길이로 사용한다. 프라이머는 주형의 서열과 정확하게 상보적일 필요는 없지만 주형과 혼성복합체 (hybrid-complex)를 형성할 수 있을 정도로 상보적이어야만 한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 양배추 *DFR* 유전자의 염기서열 중 1118번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종 판별용 프로브를 제공한다.
- [0026] 본 발명에서 용어 "프로브"는 혼성화 프로브로서, 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연적인 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 본 발명의 프로브는 대립형질 특이적 프로브로서, 같은 종의 두 구성원으로부터 유래한 핵산 단편 중에 다형성 부위가 존재하여, 한 구성원으로부터 유래한 DNA 단편에는 혼성화하나, 다른 구성원으로부터 유래한 단편에는 혼성화하지 않는다. 바람직하게는 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일 가닥, 더 바람직하게는 디옥시리보뉴클레오타이드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 SNP를 포함하는 서열에 완전하게 (perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수

있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로 (substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 프로브는 SNP 뉴클레오타이드인 서열번호 1의 1118번째 뉴클레오타이드를 포함하는 8 내지 100 개의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다. 더 바람직하게는, 상기 프로브의 3'-말단 또는 5'-말단은 상기 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스 (duplex)의 안정성은 말단 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 3'-말단 또는 5'-말단에 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는 프로브에서 말단 부분이 혼성화되지 않으면, 이러한 듀플렉스는 엄격한 조건에서 해체될 수 있다. 혼성화에 적합한 조건은 당업계에 통상적으로 알려진 내용을 참조하여 결정할 수 있다. 혼성화에 이용되는 엄격한 조건 (stringent condition)은 대립형질 중 하나에만 혼성화하도록 충분히 엄격해야 하며, 온도, 이온 세기 (완충액 농도) 및 유기 용매와 같은 화합물의 존재 등을 조절하여 결정될 수 있다. 이러한 엄격한 조건은 혼성화되는 서열에 의존하여 다르게 결정될 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 양배추 *DFR*(Dihydroflavonol 4-reductase) 유전자의 염기서열 중 1118번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오타이드로 구성된 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종 판별용 마이크로어레이를 제공한다.

[0029] 본 발명에서 양배추 자색 계통 또는 품종 판별용 마이크로어레이는 본 발명의 SNP 마커가 고정화되어 있는 기판을 갖는 마이크로어레이를 의미한다. "마이크로어레이"란 기판 상에 폴리뉴클레오타이드의 그룹이 높은 밀도로 고정화되어 있는 것으로서, 상기 폴리뉴클레오타이드 그룹은 각각 일정한 영역에 고정화되어 있다. 이러한 마이크로어레이는 당업계에 잘 알려져 있다. 마이크로어레이는 예를 들면, 미국특허 제5,445,934호 및 제5,744,305호에 개시되어 있으며, 이들 특허의 내용은 참조에 의하여 본 명세서에 포함된다.

[0030] 용어 "기판"은 혼성화 특성을 보유하고, 혼성화의 배경 수준이 낮게 유지되는 조건 하에 마커가 부착될 수 있는 임의의 기판을 말한다. 통상적으로, 상기 기판은 미세역가 (microtiter) 플레이트, 막 (예를 들면, 나일론 또는 니트로셀룰로오스), 미세구 (비드) 또는 칩일 수 있다. 막에 적용하거나 고정하기 전에, 핵산 프로브를 변형시켜 고정화를 촉진시키거나 혼성화 효율을 개선시킬 수 있다. 상기 변형은 단독중합체 테일링 (homopolymer tailing), 지방족기, NH₂기, SH기 및 카르복실기와 같은 상이한 반응성 작용기와 커플링, 또는 비오틴, 합텐 (hapten) 또는 단백질과의 커플링을 포함할 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 프라이머; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 선별하기 위한 키트를 제공한다. 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 및 버퍼를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 dNTPs는 dATP, dCTP, dGTP, dTTP를 포함하며, DNA 폴리머라제는 내열성 DNA 중합효소로서 Taq DNA 폴리머라제, Tth DNA 폴리머라제 등 시판되는 폴리머라제를 이용할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 있어서, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 선별하기 위한 키트는 상기 프로브 또는 상기 마이크로어레이가 포함된 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 또한, 본 발명은 양배추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

[0033] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

[0034] 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 저온에서 자색 또는 녹색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 선별하기 위한 방법을 제공한다.

[0035] 본 발명의 방법은 양배추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 시료에서 게놈 DNA의 추출은 당업계에서 통상적으로 사용되는 페놀/클로로포름 추출법, SDS 추출법, CTAB 분리법 또는 상업적으로 판매되는 DNA 추출 키트를 이용하여 수행할 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에 있어서, 상기 표적 서열의 증폭은 서열번호 25 및 30의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 및 서열번호 27 및 30의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트 중 하나 이상의 프라이머 세트를 이용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소연쇄반응 (PCR), 리가아제 연쇄반응 (ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭 (nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭 시스템 (transcription-based

amplification system), 가닥 치환 증폭 (strand displacement amplification) 또는 Q β 복제효소 (replicase)를 통한 증폭 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법이 있다. 이 중에서, PCR이란 증합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.

[0037] 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에 있어서, 상기 증폭 산물은 서열번호 1 양배추 *DFR* 유전자의 염기서열 중 1118번째 염기에 해당하는 SNP 위치에 T 염기를 가질 수 있다. 해당 SNP 위치에 T 염기를 갖는 경우에는 저온에서 안토시아닌을 축적하여 자색을 띄는 양배추 계통 또는 품종을 나타내며, 해당 SNP 위치에 A 염기를 갖는 경우에는 저온에서 녹색 양배추 계통 또는 품종을 나타낸다.

[0038] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출 가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy-5 또는 Cy-3이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 ³²P 또는 ³⁵S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트는 상기에 기재된 바와 같다.

[0039] 본 발명의 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 서열분석, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 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, 서열분석 방법은 Sanger 방법, 마이크로 전기영동 서열분석, 파이로 서열분석, 나노 포어 단일 DNA 서열분석 등을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행시 ³²P 또는 ³⁵S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기 (Geiger counter) 또는 액체섬광계수기 (liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

[0040] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 양배추 시료

[0042] 발명에 이용한 양배추는 자색의 발현과 연관된 8개 계통을 선별하여 (주)아시아종묘로부터 분양받았다. 양배추 8개 계통은 각각 안토시아닌 발현의 특성이 다른 계통으로서, 저온에서 안토시아닌이 발현되는 양배추(337, 154, 2437), 저온에서 안토시아닌 축적이 없는 양배추(09WH-45), 자색 양배추(7S4-63, 7S4-51) 및 녹색 양배추(2409, 842) 4개 분류로 나뉜다. 양배추 재배는 충남대학교 생명과학동 온실에서 재배하였다. 온도 환경 차이에 의한 자색 발현의 양상을 확인하기 위해 온실과 온실 밖에서 각각 3개체씩 30일간(2014년 10월 13일부터 2014년 11월 12일까지) 재배하였다. 그리고 유전자 발현양상을 확인하기 위한 시료는 지름 0.5 cm 편치를 이용하여 각 개체 당 3개씩 채취하였다. SNP 프라이머 검정을 위한 양배추 시료는 양배추 시험포장에서 수집한 오가네, YR호걸, 마즈모, 하루마타, 동도리, YR히어로, 대월양배추, 대박나, YR호남, 그린햇, 윈스타, 윈스톱, CT-257, CT-254, CT-212, CT-309, JS-249, JS-257, JS-267 총 19개 양배추로, 이를 이용하여 SNP 구별 프라이머 검정을 하였다.

[0043] 염기서열 분석

[0044] 양배추 시료의 DNA 추출은 액체질소와 막자사발을 이용하여 간 분말을 DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN, USA)를 이용하여 추출하였다. PCR 프라이머는 정방향 프라이머 5'-ATGGTAGCTCACAAGAGACCGT-3'(서열번호 34)와 역방향 프라이머 5'-CTAAGCAGACATCTGCTGTGCCG-3'(서열번호 35)이며, 증폭되는 서열의 길이는 약 1.6kbp이다. PCR은

Ex Taq(Takara, Japan)을 이용하여 수행하였고, 조건은 94℃에서 5분 처리하고 94℃에서 30초, 58℃에서 30초, 72℃에서 2분을 30회 반복 후 72℃에서 7분간 반응시켰다. PCR 산물은 1% 아가로스젤로 전기영동하고, 밴드를 절단하여 LaboPass Gel Extraction Kit(COSMOGENETECH, S.Korea)를 이용하여 DNA를 분리하였다. 분리한 DNA는 T&A Cloning Kit(RBC, Taiwan)를 이용하여 벡터에 삽입하고 DH5 α 대장균에 형질전환하였다. 형질전환된 균으로부터 LaBoPass Plasmid Mini kit(COSMOGENETECH, S.korea)를 이용하여 플라스미드 DNA를 분리하였다. 염기서열의 대표성을 위해 6-9개의 클론을 각 계통마다 분석하였고, 염기서열 분석은 양방향으로 읽었다(Macrogen, S.Korea).

RT-PCR

채취한 시료는 액체질소를 이용하여 동결시킨 뒤, 막자와 막자사발을 이용하여 갈았다. 총 RNA는 TRIzol Reagent(Lifetechnologies, USA)를 사용하여 추출하였으며, 1 µg의 총 RNA에 RQ1 RNase-Free DNase(Promega, USA)를 65℃에 10분간 처리하였다. cDNA 합성은 oligo-dT로 Revertra Ace kit(TOYOBO, japan)를 사용하여 42℃에서 20분간 합성하였고, 4배 희석하여 PCR에 사용하였다. PCR은 Premix(Elpisbiotech, S.korea)를 사용하여 수행하였으며, PCR 조건은 94℃에서 5분 처리 후, 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초를 26회 반복하고 72℃에서 5분 처리하였고, 위 조건으로 *BoActin* 유전자의 프라이머로 정량하였다. 그리고 *BoDFR* 유전자는 아래 표 1의 프라이머를 이용하여 어닐링 온도 56℃로 조정하고 30회 반복하여 1.5% 아가로스젤에 5µl 로딩 후, 전기영동하였다.

표 1

RT-PCR에서 사용된 양배추 *DFR*의 프라이머 서열

BoID	RT-PCR용 프라이머	
	프라이머 이름	서열(5'-3')(서열번호)
Bo1028633	Bo1028633F	TGCCGTCATTGCTCATGCGTC(2)
	Bo1028633R	ACCTATAACTTTTGCTCATAAAAGGATC(3)
	Bo1028633-2F	GTCCGGTCATTGCGACATTAAAA(4)
	Bo1028633-2R	ACACCTTGTATGCTACTAAATCAAG(5)
Bo1006592	Bo1006592F	CACACTTCATTCTCCTAACTT(6)
	Bo1006592R	GATGCTTCTTATTAAGTGT(7)
Bo1015141	Bo1015141F	CGTGGACCGATCTCGATTATT(8)
	Bo1015141R	CGTCTCCTTTACCGCATCTT(9)
Bo1024018	Bo1024018F	GGCTTGGAGAATAGCTGAAGAG(10)
	Bo1024018R	GAGCAACCGAACTCGAACATA(11)
Bo1011801	Bo1011801F	CGACATTCGGGTGGTTAAT(12)
	Bo1011801R	GCAAACTCTCAACAGTCTCCT(13)
	Bo1011801-2F	CTGATTTTCAACTCCCTGAGAAG(14)
	Bo1011801-2R	CAGAACTCTGATGAACCCTTTGTC(15)
Bo1042326	Bo1042326F	GAATGGGTTCGATTGGTTTG(16)
	Bo1042326R	TGATGGAAGCATCAATGGTTTG(17)
Bo1029074	Bo1029074F	GTGGCAAGAACCCACATACT(18)
	Bo1029074R	GCAATGCAGTCATCGAACATC(19)
Bo1035269	Bo1035269F	TATTACCGCGCTCTCTCTATC(20)
	Bo1035269R	ATCCCTGGTTCGGTCTTCTTA(21)
BoActin2	BoActin2F	TGCCAATCTACGAGGGTTTC(22)
	BoActin2R	TCTCGATGGAAGAGCTGGTT(23)

SNP 검정

양배추 8개 계통의 게놈 DNA 추출은 동결 보관된 시료를 막자사발을 이용하여 간 후, NucleoSpin Plant II(MACHEREY-NAGEL, Germany) kit를 사용하여 추출하였다. SNP 검정을 위한 프라이머 서열은 표 2와 같이 역방향 프라이머는 공통으로 사용하고, 정방향 프라이머는 3 세트씩을 디자인하였다. PCR은 추출한 gDNA 2µl, rTaq

Premix(Elpisbiotech, S.Korea) 4 μ l, 정방향과 역방향 프라이머(10 pmole) 각각 1 μ l로 하여 전체 20 μ l로 하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94℃에서 5분 처리 후, 94℃에서 10초, 60℃에서 10초, 72℃에서 10초를 30회 반복하고 72℃에서 5분 처리하였다. PCR 후, 1.5%, 2% 아가로스젤에 5 μ l 로딩하고 전기영동하였다.

표 2

[0050]

양배추 *DFR* 유전자에서 SNP를 검출하는데 사용된 프라이머 정보

방향	프라이머					산물크기 (bp)
	SNP	이름	서열(서열번호)	Tm(℃)	길이(bp)	
정방향	T	DFRGp1118TF1	GTTCGTTCTCTCAGATGCAACGATTTT(24)	67.4	29	198
		DFRGp1118TF2	TTTGTTCCTCTCAGATGCAACGATACT(25)	67.2	28	197
		DFRGp1118TF3	TTTGTTCCTCTCAGATGCAACGAATCT(26)	67.2	28	197
	A	DFRGp1118AF1	GTTCGTTCTCTCAGATGCAACGATTTA(27)	67.4	29	198
		DFRGp1118AF2	GTTCCTCTCAGATGCAACGATCCA(28)	67.4	25	194
		DFRGp1118AF3	GTTCCTCTCAGATGCAACGACTCA(29)	67.4	25	194
역방향		DFRGp1118R	CTCTTAGATTCTCATCCACTCTTCAAA(30)	66.2	29	

[0051]

HRM(High Resolution Melting) 검정

[0052]

SNP 대립인자의 동형과 이형을 구분하기 위하여 HRM PCR을 수행하였으며, 이때 이용한 프라이머 정보는 표 3과 같다. HRM은 준비된 주형 gDNA 1 μ l, 정방향, 역방향, 프로브 프라이머(10 pmole) 각각 0.2 μ l, 1 μ l, 1 μ l, 그리고 LightCycle 480 High Resolution Melting Master(Roche) 10 μ l, 25 mM MgCl₂ 2.4 μ l를 Tube에 넣고 전체 20 μ l로 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 95℃에서 10분 전처리 후, 95℃에서 20초, 63℃(회당 -1℃씩 55℃까지 감소)에서 20초, 72℃에서 20초를 50회 반복하였다. 그리고 HRM은 95℃에서 60초 처리하고 38℃에서 2분 처리 후, 97℃까지 1℃당 6회 형광을 감지하였다. LightCycle 96(Roche) 장치를 사용하여 PCR을 수행하였다. 제작한 프라이머와 프로브의 내용은 아래의 표 3과 같다.

표 3

[0053]

유전자	프라이머 이름	서열(서열번호)	길이 (bp)	TM (℃)	산물크기 (bp)
DFR	BoDFR-HRM-aF12	TCCACTGGACGACTTATGCAATGCT(31)	26	66.3	157
	BoDFR-HRM-aR1	ATCTTACGTTGAAGGCAGTTATATTCTG(32)	29	66.2	
	BoDFR-HRM-pF1	GCAACGATTCTACTATCTC(33)	20	54.3	프로브 프라이머

[0054]

실시예 1. 양배추 *DFR* 유전자

[0055]

양배추에는 8개의 *DFR* 유전자가 존재하기 때문에(<http://brassicadb.org/brad/>)(도 1) 이들 중에서 어느 유전자가 안토시아닌 함량과 관계가 있으며, 8개의 *DFR* 유전자 중에서 어느 유전자가 온도에 반응하는지 분석하고자 저온처리 양배추와 비처리 양배추를 대상으로(도 2) RT-PCR을 수행하였다(도 3). 2014년 10월 13일부터 2014년 11월 12일까지 성숙한 양배추를 저온(처리기간 중 최저기온 평균 6.6℃) 처리한 것과 온실(20-40℃)에 유지한 양배추를 조사하였다. 대부분의 양배추가 저온에 노출되었을 경우 자색을 띄었으나 정도의 차이가 있음을 알 수 있었다(즉, 안토시아닌을 합성하여 축적함을 의미).

[0056]

RT-PCR 결과 3개의 *DFR* 유전자(*Bo1006592*, *Bo1015141*, *Bo1024018*)는 모든 조건에서 항상 발현되는 유전자이며, 하나의 *DFR* 유전자(*Bo1035269*)만이 저온에 의해 발현이 유도되고, 안토시아닌 함량과 상관관계를 가지고 발현하였다(도 3). 이후 양배추 8계통으로부터 클로닝하여 분석한 *DFR* 유전자는 *Bo1035269*이다.

[0057]

실시예 2. 양배추 *DFR* 유전자(*Bo1035269*)의 클로닝과 분석

[0058]

양배추 8개 계통의 대표적인 *BoDFR*(*Bo1035269*) 유전자의 염기서열을 분석한 결과 *DFR* 유전자는 6개의 엑손으로 구성되었다(도 4 및 도 5). 대표 서열을 CLUSTAL W 분석(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)을 통해 비교한 결과(도 6) 엑손에 2개의 SNP, 인트론에 3개의 SNP가 존재하며, 엑손에 존재하고 아미노산 서열의 차이

를 보이는 SNP(T/A)가 유전자 좌위 1118bp 위치에 있었으며(녹색), 아미노산 루이신과 히스티딘의 차이를 가져온다. 그리고 이 유전자 다형성은 양배추 8계통을 337, 154, 2437, 7S4-63, 7S4-51과 09WH-45, 2409, 842 계통으로 분류됨을 확인하였다. 이 SNP는 저온에 의해 안토시아닌 함량이 증가되는 것과 일치하는 SNP로 단순 자색을 판별하는 CHS SNP와는 다른 의미를 지닌다. 다른 SNP 부분도 마커로의 개발 가능성이 있다.

[0059] 실시예 3. 양배추 *DFR* SNP의 검정

[0060] 선별한 유전자 다형성 부위(Gp1118)는 유전자 염기서열 T와 A를 주형으로 하는 SNP 구별 프라이머 제작에 이용되었다. SNP 구별 프라이머는 유전자의 5'쪽으로 하여 3개의 정방향 프라이머를 제작하였고, 프라이머의 특이성과 정확성을 높이도록 프라이머의 길이는 28-29 mer(T_m 66-67°C)로 하고, SNP 부위 -2, -3, -4 부위의 서열 변화를 주어 프라이머를 제작하였다. 역방향 프라이머는 PCR 산물의 크기가 200bp 정도의 위치로 제작하였다(표 2). PCR 방법을 수행하여 제작한 3개씩의 SNP 구별 프라이머를 검정하였다. 그 결과 6개 프라이머 모두 337, 154, 2437, 7S4-63, 7S4-51과 09WH-45, 2409, 842 계통의 SNP를 구별하였다. 가장 안정적인 프라이머 조합과 PCR 조건을 확립하여 T를 선별하는 *DFRGp1118TF2*, A를 선별하는 *DFRGp1118AF1* 정방향 프라이머와 *DFRGp1118R* 역방향 프라이머 조합이었다. 도 7에서와 같이 *DFRGp1118* SNP는 자색 양배추와 저온에 의해 안토시아닌이 합성되어 축적되는 양배추 계통 337, 154, 2437, 7S4-63, 7S4-51과 저온에서도 안토시아닌 합성이 잘 이루어지지 않는 양배추 계통 09WH-45, 2409, 842를 구분하는 마커가 된다.

[0061] *DFRGp1118* SNP를 양배추 시험포장에 있는 시험계통 및 재배종을 대상으로 검정하였다(도 8). 검정에 이용된 양배추 시료는 오가네, YR호걸, 마즈모, 하루마타, 동도리, YR히어로, 대월양배추, 대박나, YR호남, 그린햇, 윈스타, 윈스툼, CT-257, CT-254, CT-212, CT-309, JS-249, JS-257, JS-267 총 19개 양배추로 이를 이용하여 SNP 구별 프라이머 검정을 2회 반복하였다. 그 결과, 오가네, YR호걸, 마즈모, 하루마타, 동도리, YR히어로, 대월양배추, 대박나, YR호남, CT-309, JS-249, JS-257는 T-동형접합이고, CT-254는 A-동형접합이다. 그리고 그린햇, 윈스타, 윈스툼, CT-257, CT-212는 T/A-이형접합이었다.

[0062] 실시예 4. 양배추 *DFR* SNP의 HRM 방법으로 검정

[0063] *DFR* 유전자의 T/A 유전자 다형성 구별을 HRM 방식을 통해 구분하고자 하였으며, 각각의 SNP에 따른 피크의 차이와 이형접합의 피크 차이를 통해 양배추 유전자형을 확인하였다. 그 결과, 도 9에서 보듯이 T-동형접합에 해당하는 피크는 파랑색 선으로 나타나고, A-동형접합에 해당하는 피크는 빨강색 선으로 나타났다. 그리고 T/A-이형접합은 노란색 선으로 구분되어 각각의 대립유전자(allele)와 동형, 이형접합을 구분할 수 있는 SNP임을 증명할 수 있었다.

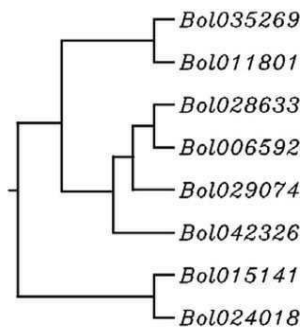
도면

도면1

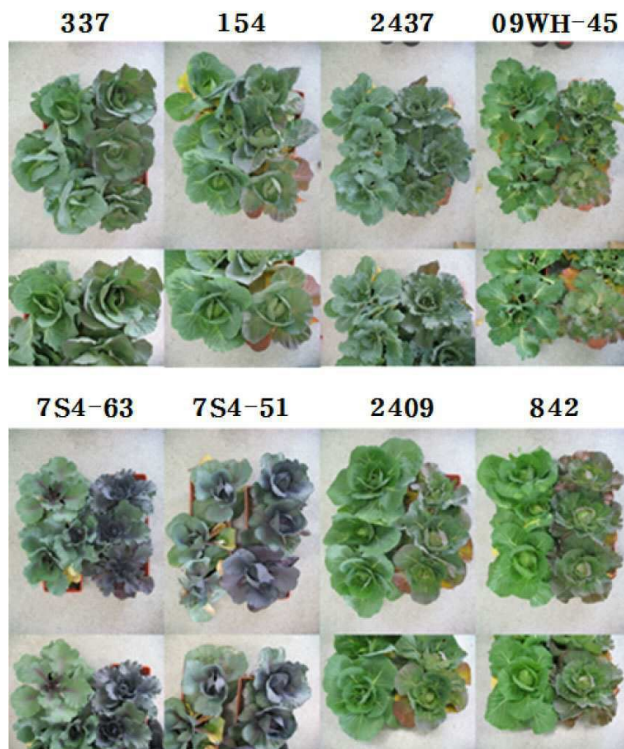
A

[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

B

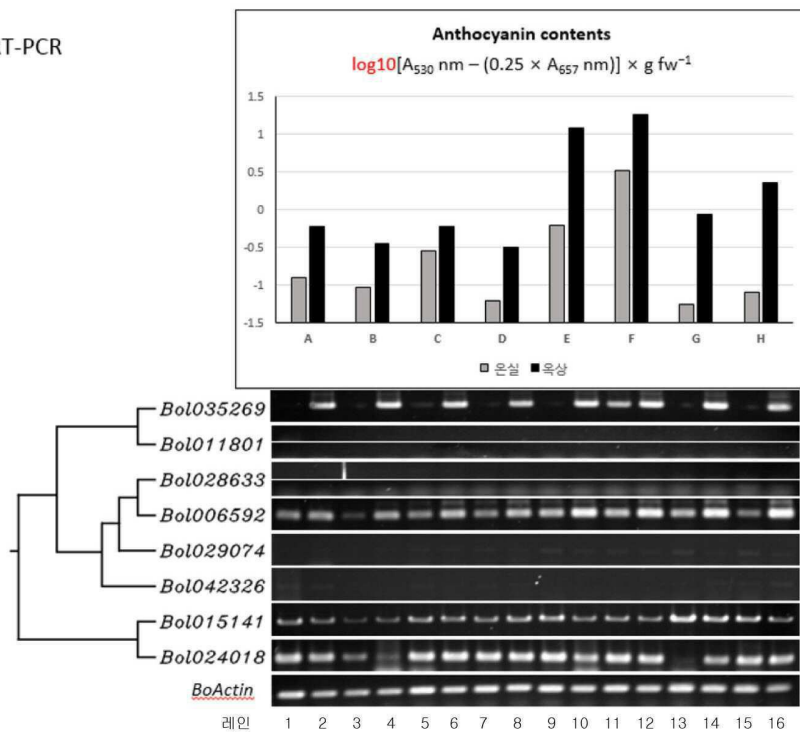


도면2



도면3

BoDFR RT-PCR

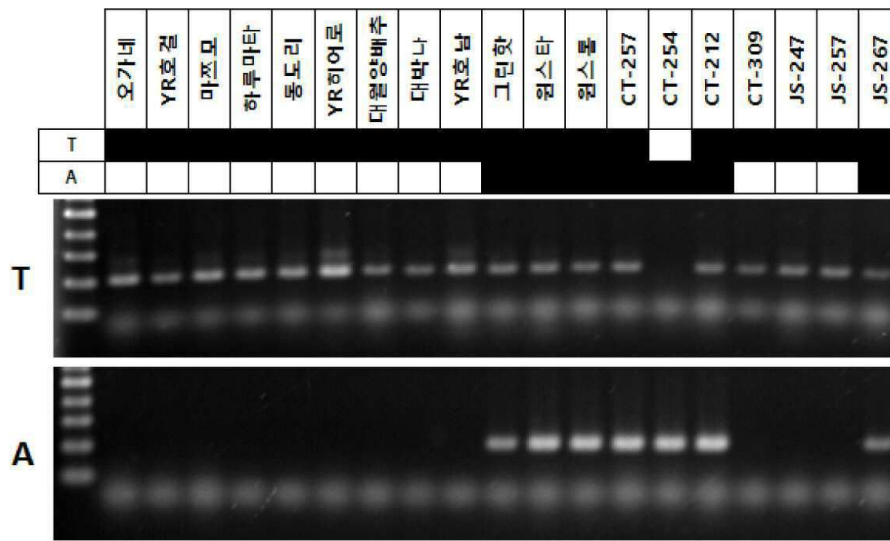


도면4

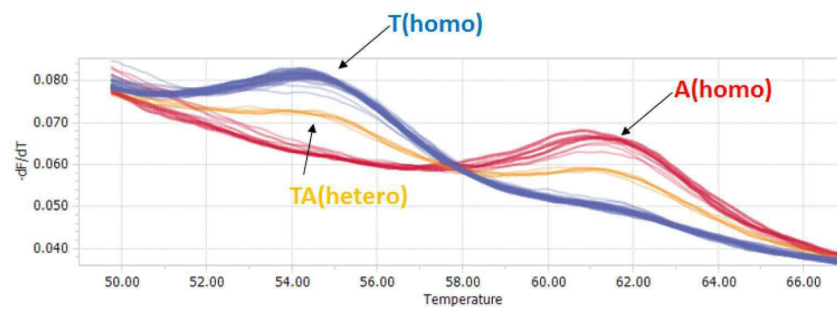
[illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible][illegible]

TTAG

도면8



도면9



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Single nucleotide polymorphism marker for discerning purple or green cabbage cultivar at low temperature and uses thereof
- <130> PN15058
- <160> 35
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1579
- <212> DNA
- <213> Brassica oleracea
- <400> 1

atggtagctc acaaagagac cgtgtgcgta accggcgcat caggattcat tggttcatgg 60

ctcgtgatgc ggctactgga acgtgggttac ttgtccgtg ccactgttcg cgatcctggt 120

acgtatctta caaactcggt aatttctcct aagagtatat gtaatacgt atcactttgt 180

gtgttttaag taacttacga gttttcttgg cctgtaaagg aaatttgaag aaagtgcaac	240
atcttcttga ttgccaac gcgaagacgc aactcacttt atggaaagcc gatttatctg	300
acgaaggaag ctacgatgac gccataaacg gatgcgacgg cgtttttcac atagctactc	360
ccatggattt tgaatccaag gatcccgagg tgagttatac tatgaacctt tttcttatta	420
cataatcaatc ctacaagatt ttgttaaag agtttgtttg aatcagaacg aagtgataaa	480
accaacagtg aatggagtggt tggggataat gaaagcatgt gataaggcaa agaccgtacg	540
aagaattgtg tttacttcgt ctgctggaac ggtaaatgtt gaggaacacc agaaaaatgt	600
ctatgatgaa aacgattgga gtgatcttga ctttatcatg tccaagaaga tgacaggatg	660
ggtatatata ttaaggatca tatataaaaa attaacccga ggttgatctt cttcaaagta	720
atttatgttt ttgataaatt gttggcagat gtatttcatg tcgaaaacgt tagccgagaa	780
agcagcttgg gattacgcta aggaaaaagg aatagatttc attagtatta tcccgcatt	840
ggtgatcggt ccatttataa caacatctat gccgcctagc cttattaccg cgctctctcc	900
tatcactcgt gagtgagcct actttctaata cctctttttt taactaagag gtaatttaa	960
aacggtaaaa atgttttagg taacgaggca cattactcca tcataagaca aggacagtat	1020
gtccacttgg acgacttatg caatgctcat atattcttgt acgaacaagc tgctgccaag	1080
ggacgttatg tttgttcctc tcacgatgca acgattcata ctatctccga gtttctcagg	1140
caaaaatata cagaatataa cgtgccttca acgtaagatt tttatcatta ccggtttaag	1200
ctttttttgc atattcagtt taattttttt tttctgaata tgaactcttt ggaacagggt	1260
tgaaggagtg gatgagaatc taaagagcat tatgttcagt tccaagaagc tgattgatat	1320
gggatttaac ttcaagtata gtctcgagga tatgttggtg gaatcgattg agacatgtcg	1380
tcaaaagggt tttctccctg tcactttacc ggaacatttg aaatctgagg acaaagttcc	1440
gggcagtgat gacaataagg agattaaaaa cggatctgca ggtttaactg atggtatggt	1500
agcttgtaag aagaccgaac cagggatggc cggcgagaaa gccgatagtc acatgtcggc	1560
acagcagatc tgtgcttag	1579
<210> 2	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 2	
tgccgtcatt gctcatgcgt c	21

<210>	3	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	3	
acctataact ttgctcata aaaggatc		28
<210>	4	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	4	
gtccggtcat tgcgacatta aaa		23
<210>	5	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	5	
acaccttgta tgcactaaa tcaag		25
<210>	6	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	6	
cacacttcat tctcctaact t		21
<210>	7	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	

<400>	7	
gatgcttcct attaaaagtg tt		22
<210>	8	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	8	
cgtggaccga tctcgattat t		21
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	9	
cgtctccttt accgcatctt		20
<210>	10	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	10	
ggcttggaga atagctgaag ag		22
<210>	11	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	11	
gagcaaccga actcgaacat a		21
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	12	
	cgacattcgg gtgggttaat	20
<210>	13	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	13	
	gcaaactctc aacagtctcc t	21
<210>	14	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	14	
	ctgattttca actccctgag aag	23
<210>	15	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	15	
	cagaatctga tgaacccttt gtc	23
<210>	16	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	16	
	gaatgggttc gattggttg g	21
<210>	17	
<211>	22	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 17
 tgatggaagc atcaatggtt tg 22

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 18
 gtggcaagaa cccacatact 20

<210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 19
 gcaatgcagt catcgaacat c 21

<210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 20
 tattaccgcg ctctctccta tc 22

<210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 21
 atccctgggtt cggctcttctt a 21

<210>	22	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	22	
	tgccaatcta cgagggtttc	20
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	23	
	tctcgatgga agagctggtt	20
<210>	24	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	24	
	gtttgttcct ctcacgatgc aacgatttt	29
<210>	25	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	25	
	tttgttcctc tcacgatgca acgatact	28
<210>	26	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	26	

tttgttcttc tcacgatgca acgaatct

28

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 27

gtttgttctc ctcacgatgc aacgattta

29

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 28

gttcctctca cgatgcaacg atcca

25

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 29

gttcctctca cgatgcaacg actca

25

<210> 30

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 30

ctctttagat tctcatccac tccttcaaa

29

<210> 31

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 31
 tccacttgga cgacttatgc aatgct 26
 <210> 32
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 32
 atcttacgtt gaaggcacgt tatattctg 29
 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 33
 gcaacgattc atactatctc 20
 <210> 34
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 34
 atggtagctc acaaagagac cgt 23
 <210> 35
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 35
 ctaagcacag atctgctgtg ccg 23