(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년07월09일
(11) 등록번호 10-2275692
(24) 등록일자 2021년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 2600/13 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0109962
(22) 출원일자 2020년08월31일
심사청구일자 2020년08월31일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020040022472 A
KR1020010099064 A
KR102087024 B1
JEONG_HUN HAM, KOREAN J PLANT BIOTECHNOL., 2005, VOL.32, NO.4, PP.293_300

(73) 특허권자
충남대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
임용표
대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 농업생명과학대학 원예학과
이소영
대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 농업과학연구소
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

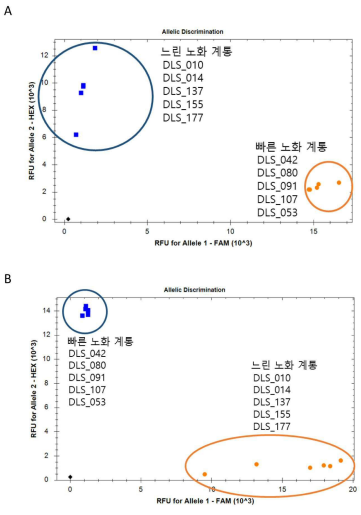
전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **노화지연 배추 판별용 마커 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 노화지연 배추 판별용 마커 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 SNP 마커는 노화가 지연된 배추를 조기에 효율적으로 판별할 수 있어 재배 농가 및 소비자에게도 고품질의 배추 생산 및 공급을 가능하게 할 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/156 (2013.01)
(72) 발명자
이명진
대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 농업과학연구소
오상헌
대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 농업생명과학대학 원예학과

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1545020208
과제번호	710011033HD340
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림식품기술기획평가원
연구사업명	농림축산식품연구센터지원(R&D)
연구과제명	Long shelf-life 특성의 유용 유전자원을 활용한 신품종 육성 및 인력 양성
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교 산학협력단
연구기간	2019.05.01 ~ 2020.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 배추 *BraA01g015150.3C* 유전자의 염기서열 중 559번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 노화지연 배추를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물.

청구항 2

서열번호 2의 배추 *BraA01g015160.3C* 유전자의 염기서열 중 2,457번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 노화지연 배추를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 연속된 뉴클레오티드는 8개 내지 100개의 연속된 뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 노화지연 배추를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물.

청구항 4

서열번호 1의 배추 *BraA01g015150.3C* 유전자의 염기서열 중 559번째 염기에 위치한 SNP; 또는 서열번호 2의 배추 *BraA01g015160.3C* 유전자의 염기서열 중 2,457번째 염기에 위치한 SNP;를 검출하기 위한, 노화지연 배추 판별용 프라이머 세트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 3, 4 및 5의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 또는 서열번호 6, 7 및 8의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트;인 것을 특징으로 하는 노화지연 배추 판별용 프라이머 세트.

청구항 6

제4항 또는 제5항의 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 노화지연 배추 판별용 키트.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 RNase H, DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것인 키트.

청구항 8

배추 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제4항 또는 제5항의 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, 노화지연 배추를 판별하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 증폭 단계의 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 노화지연 배추 판별용 분자마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물의 노화는 식물 발생의 마지막 단계로서 생장 및 발생 단계를 거쳐 치사 단계를 유도한다. 노화 과정의 진행은 식물체의 여러 기관에서 다르게 일어날 수 있는데 잎의 경우 엽록체의 분해에 이어서 지질, 단백질, 핵산의 분해가 순차적으로 일어난다. 세포막과 세포 내 구획 등의 세포 구조물은 마지막까지 유지되며 분해된 산물인 질소와 영양분의 재배치가 일어난 후에 죽음에 이르게 된다. 식물체가 노화를 결정하는 시기는 영양분의 보유상태나 재배치와 연관이 있기 때문에 개화나 종자의 생산은 종종 노화를 촉진하는 요인이 된다.

[0003] 식물의 노화 과정은 여러 유전자의 발현 변화에 따라 진행되는데, 광합성과 기초 대사 관련 유전자의 발현은 감소하고 세포사멸, 스트레스, 가수분해 효소 관련 유전자의 발현은 증가하게 된다. 이러한 식물 노화 관련 유전자(Senescence Associated Genes, SAGs)에 대한 연구는 생물학적인 측면에서 생명 현상의 이해를 위해서 뿐만 아니라 식물의 생산성, 저장성, 수송성 등의 증진을 통한 경제적 이윤 창출 측면에서도 매우 중요하다. 식물 노화 연구를 통해 노화 과정을 지연시킨 식물체를 창출함으로써 소비자들 뿐만 아니라 농가 및 육종 전문가들에게 잠재적인 수혜를 줄 수 있다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제1068895호에는 '배추의 노화 및 해독 작용과 관여하는 머캅토 피루베이트 설퍼트렌스퍼라아제 1을 코딩하는 유전자'가 개시되어 있고, 한국공개특허 제2018-0038717호에는 '식물의 생산성 증대 기능과 노화 지연 기능을 갖는 MtATPG1 단백질과 그 유전자 및 이들의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 노화지연 배추 판별용 마커 조성물 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 배추의 근교계(inbred line) 177개에 암 처리하여 노화를 유도하고 엽록소 함량에 따라 노화가 빠른 8개 계통과 노화가 느린 6개 계통을 선발한 후, 노화가 빠른 DLS(dark induced leaf senescence)-42 계통과 노화가 느린 DLS-177 계통 간에 뚜렷한 발현 차이를 보이는 *BraA01g015150.3C* 또는 *BraA01g015160.3C* 유전자를 선발하였다. 상기 선발된 유전자에서 노화가 빠른 계통과 노화가 느린 계통들 간의 단일염기다형성(SNP)을 확인하고, 상기 SNP를 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 제작하여 노화가 빠른 배추 계통과 노화가 느린 배추 계통을 대상으로 rhAMP(RNase H2 enzyme-based amplification) SNP assay를 수행한 결과, 본 발명의 프라이머 세트가 노화가 빠른 배추와 노화가 느린 배추를 정확하게 구별할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 배추 *BraA01g015150.3C* 유전자의 염기서열 중 559번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 노화지연 배추를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 배추 *BraA01g015160.3C* 유전자의 염기서열 중 2,457번째 염기에 위치한 SNP를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 노화지연 배추를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 배추 *BraA01g015150.3C* 유전자의 염기서열 중 559번째 염기에 위치한 SNP; 또는 서열번호 2의 배추 *BraA01g015160.3C* 유전자의 염기서열 중 2,457번째 염기에 위치한 SNP;를 검출하기 위한, 노화지연 배추 판별용 프라이머 세트를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 노화지연 배추 판별용 키트를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 배추 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 단계의 산물을 검출하

는 단계;를 포함하는, 노화지연 배추를 판별하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 SNP 분자마커는 노화가 지연된 배추를 조기에 효율적으로 판별할 수 있으므로, 재배 농가 및 소비자에게도 고품질의 배추 생산 및 공급을 가능하게 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 배추 근교계(inbred line)에 3일 또는 7일 동안 암 처리한 후 암 처리 전의 엽록소 함량과 비교하여, 노화가 빠른 배추(Accelerate leaf senescence)와 노화가 느린 배추(Delated leaf senescence)를 확인한 결과이다.

도 2는 노화가 지연된 배추 계통 DLS-177의 특성을 규명하고자 교배 집단을 활용하여 유전자 지도를 작성한 후 연관 유전자좌를 탐색한 결과로, 배추 표준 유전체(*Brassica rapa* L. version 2.1; http://brassicadb.org/brad/index.php)의 유전자 지도 A01(왼쪽)와 QTL(quantitative trait loci)을 분석하였고, 본 발명의 노화 특성과 관련된 유전자좌는 빨간색으로 표시하였다.

도 3은 본 발명에 따른 유전자 지도의 Major QTL 영역에서 확인한 972개의 유전자들 중에서 노화가 빠른 계통인 DLS-042와 비교하여 노화 지연 계통인 DLS-177에서 발현이 뚜렷하게 증가하거나 감소하는 특징을 보이는 유전자 29개를 선발한 후, 상기 29개 유전자들의 발현 특성을 재확인하기 위해 DLS-042와 DLS-177 계통에 암 처리 전 0일부터 암 처리 후 1일, 2일, 3일 및 4일째에 semi qRT-PCR(quantitative real time polymerase chain reaction)을 통해 유전자 발현 수준을 확인한 결과이다.

도 4는 semi qRT-PCR을 통해 선발된 후보 유전자 28개를 대상으로 qRT-PCR을 수행하여 DLS-042와 DLS-177 계통 간에 뚜렷한 발현 차이를 보이는 유전자 12개를 선발한 결과이다. 후보 유전자 5의 Gene ID는 *BraA01g015150.3C* 유전자이고, 후보 유전자 6의 Gene ID는 *BraA01g015160.3C*이다.

도 5는 본 발명의 DLS A0_1 마커(A) 및 DLS A0_2 마커(B)를 사용하여 노화가 느린 배추 계통(DLS-010, DLS-014, DLS-137, DLS-155 및 DLS-177)과 노화가 빠른 배추 계통(DLS-042, DLS-080, DLS-091, DLS-107 및 DLS-053)을 대상으로 rhAmp(RNase H2 enzyme-based amplification) SNP assay를 수행한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 배추 *BraA01g015150.3C* 유전자의 염기서열 중 559번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 노화지연 배추를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 서열번호 2의 배추 *BraA01g015160.3C* 유전자의 염기서열 중 2,457번째 염기에 위치한 SNP를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 노화지연 배추를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 연속된 뉴클레오티드는 8개 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.

[0017] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 본 발명의 SNP 마커를 노화지연 배추 판별에 사용할 수 있는 것은 배추의 *BraA01g015150.3C* 유전자인 서열번호 1로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 559번째 염기가 G 또는 A; 또는 배추의 *BraA01g015160.3C* 유전자인 서열번호 2로 표시되는 염기서열 중 SNP 변이 위치인 2,457번째 염기가 A 또는 T;로 다르게 나타나는 것에 근거한 것이다. 구체적으로, 서열번호 1의 559번째 뉴클레오티드에 해당하는 SNP에서 G 염기를 갖는 배추는 노화가 느린 배추, A 염기를 갖는 배추는 노화가 빠른 배추로 판단할 수 있으며; 서열번호 2의 2,457번째 뉴클레오티드에 해당하는 SNP에서 A 염기를 갖는 배추는 노화가 느린 배추, T 염기를 갖는 배추는 노화가 빠른 배추로 판단할 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 노화가 느린 배추는 암 처리 7일 후의 엽록소 함량이 암 처리 전과 비교했을 때 90% 이

상인 것을 의미한다.

[0019] 본 발명의 마커 조성물에 있어서, 상기 서열번호 1은 배추 *BraA01g015150.3C* 유전자의 엑손(exon) 6개로 이루어진 CDS(coding sequence)이고, 상기 서열번호 2는 배추 *BraA01g015160.3C* 유전자의 엑손 6개와 인트론(intron) 6개로 이루어진 게노믹 DNA 서열이다. 상기 *BraA01g015150.3C* 및 *BraA01g015160.3C* 유전자는 Brassica Database version 3에서 확인된 것으로, Brassica Database version 2.1(http://brassicadb.org/brad/index.php)에 개시된 *Bra013793* 및 *Bra013794* 유전자와 각각 동일하다.

[0020] 본 발명은 상기 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열에서 SNP 위치의 염기 변이체에 관한 것이나, 이러한 SNP 염기 변이가 이중 가닥의 gDNA(게놈 DNA)에서 발견되는 경우, 상기 뉴클레오티드 서열에 대해 상보적인 폴리뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 따라서 상보적인 폴리뉴클레오티드 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.

[0021] 본 발명은 또한, 서열번호 1의 배추 *BraA01g015150.3C* 유전자의 염기서열 중 559번째 염기에 위치한 SNP; 또는 서열번호 2의 배추 *BraA01g015160.3C* 유전자의 염기서열 중 2,457번째 염기에 위치한 SNP;를 검출하기 위한, 노화지연 배추 판별용 프라이머 세트를 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 프라이머 세트는 서열번호 3, 4 및 5의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 또는 서열번호 6, 7 및 8의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트;로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 3, 4 및 5의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트는 서열번호 1로 표시되는 염기서열 중 559번째 SNP 변이 위치를 확인할 수 있는 프라이머 세트이고, 서열번호 6, 7 및 8의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트는 서열번호 2로 표시되는 염기서열 중 2,457번째 SNP 변이 위치를 확인할 수 있는 프라이머 세트이다.

[0023] 본 발명의 프라이머 세트는 바람직하게는 상기 2개의 프라이머 세트로 이루어진 군으로부터 선택되는 1개 이상의 프라이머 세트를 포함하며, 2개의 프라이머 세트, 즉 서열번호 3, 4 및 5의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 서열번호 6, 7 및 8의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트;를 모두 포함할 수 있다. 2개의 프라이머 세트를 동시에 이용하면 노화지연 배추를 더욱 효율적으로 구별할 수 있다.

[0024] 본 발명의 상기 프라이머 세트는 rhAMP(RNase H2 enzyme-based amplification) 반응을 수행하기 위해 이용될 수 있다. rhAMP는 DNA/RNA 혼성화 이중 가닥의 RNA만 특이적으로 분해하는 리보핵산가수분해효소 H2(ribonuclease H2, RNase H2)를 이용한 PCR 방법으로, rhAMP 반응용 프라이머 세트는 5'에서 3' 방향으로, SNP 위치 염기에 인접한 서열을 표적하는 DNA 염기서열, SNP 위치 염기 및 상기 SNP 위치 염기에 바로 인접한 표적 서열에 상보적인 RNA 염기의 형태로 제작되는 대립 형질 특이적(allele-specific) 프라이머 1 및 2와, 표적 서열에 상보적인 DNA 염기와 RNA 염기서열로 이루어진 좌 특이적(locus-specific) 프라이머로 이루어질 수 있다. 상기 대립 형질 특이적 프라이머 1 및 2는 SNP 위치 염기만 상이한 프라이머이다.

[0025] rhAMP 기법은, RNase H2가 증폭단계의 프라이머와 주형 DNA 간의 결합(annealing) 과정에서 RNA 염기를 포함하고 있는 대립 형질 특이적인 프라이머와 주형 DNA가 결합된 RNA/DNA 이중가닥을 인식하여 프라이머 상의 RNA 가닥만을 특이적으로 분해하고, RNase H2의 RNA 분해(절단)를 통해 생성된 3' 말단의 하이드록시기(-OH)를 고도로 인식할 수 있는 변형된 중합효소에 의해서 중합반응이 개시되게 된다.

[0026] 본 발명에 따른 프라이머 세트에 있어서, 상기 서열번호 3 및 4; 및 서열번호 6 및 7;의 올리고뉴클레오티드 프라이머는 각각 대립 형질 특이적인 프라이머 1 및 2이고, 서열번호 5 및 서열번호 8의 올리고뉴클레오티드 프라이머는 좌 특이적 프라이머이다.

[0027] 상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 3, 4, 5, 6, 7 및 8의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 3의 프라이머(23개 올리고뉴클레오티드)는 서열번호 1의 서열 내의 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 서열번호 3 내지 8의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고 뉴클레오티드 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 복합도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.

[0029] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 노화지연 배추 판별용 키트를 제공한다.

[0031] 본 발명의 키트는 바람직하게는 rhAMP용 키트일 수 있고, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 RNase H, DNA 폴리머라제, dNTPs, 버퍼 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨 및 키트를 포함하는 패키지의 표면상에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

[0033] 본 발명은 또한,

[0034] 배추 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;

[0035] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적서열을 증폭하는 단계; 및

[0036] 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, 노화지연 배추를 판별하는 방법을 제공한다.

[0037] 본 발명의 방법은 배추 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 배추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, CTAB 방법을 이용할수도 있고, Wizard prep 키트(Promega 사)를 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Qβ 복제효소(replicase)를 통한 증폭 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법이 있다. 이 중에서, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.

[0038] 본 발명의 일 구현 예에 따른 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 모세관 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

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

[0042] **실시예 1. 시료 준비 및 게놈 DNA 추출**

[0043] 177개의 배추 근교계(inbred line)는 충남대학교 원예학과에 보유중인 것을 사용하였으며, 상기 177개의 근교계는 충남대학교에서 수집한 유전자원들 중 유전적으로 고정된 inbred line만을 선발해서 실험에 사용하였다.

[0044] 상기 177개 근교계의 배추 잎을 이용하여 CTAB(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) 방법으로 게놈 DNA를 추출하였다. 구체적으로 라운드-펀칭(leaf disc) 시료를 2.0 ㎖ 튜브에 담아 tissue-lyser를 이용하여 파쇄하였다. 500 ㎕의 CTAB 버퍼를 파쇄된 시료가 있는 2.0 ㎖ 튜브 넣은 후 상기 튜브를 65℃의 항온수조에 20분간 반응시켰다. 상기 튜브를 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 분리하여 1.5 ㎖ 튜브에 옮긴 후 동량의 페놀:클로로포름:이소아밀 알코올(Phenol:Chloroform: Isoamyl alcohol=25:24:1)을 첨가하여 혼합하였다. 상기 튜브를 13,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 수득한 상층액을 1.5 ㎖ 튜브에 옮긴 후 동량의 98% 이소프로판올을 넣어 DNA를 침전시키고, 13,000 rpm으로 10분만 원심분리하였다. DNA 펠렛을 70%의 차가운 에탄올로 세척하고 건조시킨 후 100 ㎕의 증류수를 이용하여 녹였다.

[0046] **실시예 2. 노화지연 배추 계통 선발**

[0047] 식물 노화에 따른 황화 현상은 엽록소 분해(감소)가 직접적인 원인이므로, 본 발명에서는 배추 근교계 177개에

암 처리하고 엽록소 함량을 측정한 후 암 처리 전의 엽록소 함량과 비교하여 엽록소 손실 비율을 노화의 기준으로 정하였다. 구체적으로 근교계를 각 계통별로 10립씩 파종하여 상온 23℃, 65~70% 상대습도, 16시간(명)/8시간(암) 조건에서 4주간 생육 후 7일간 암 처리하고, 암 처리한 잎에서 leaf disc를 분리하여 95% 에탄올에 담가 4℃ 암조건에서 17시간 동안 반응시킨 후 5분 동안 4℃에서 12,000g 원심분리하고 상층액을 취하여 엽록소를 추출한 다음 상기 상층액을 649nm와 664nm에서 각각 흡광도를 측정하여 엽록소 함량을 측정하였다. 엽록소 함량의 계산식은 다음과 같다: 엽록소 함량=$(20.23*OD_{649}+ 8.023*OD_{664})g^{-1}$.

[0048] 암 처리 0일차 대비 3일차 또는 7일차에 감소된 엽록소 함량을 계산한 결과, 엽록소 함량에 따라 전체 177 계통 중 약 57%의 배추 계통들이 포함되어 있는 그룹의 배추들은 7일간의 암 처리 후 60~80%의 엽록소가 감소하였고, 이 그룹을 일반적인 노화 표현형을 보이는 배추들로 간주하였다(도 1).

[0049] 빠른 노화의 특성을 보이는 개체는 암 처리 3일 후에도 60% 이상의 엽록소가 손실되었고, 느린 노화의 특성을 보이는 개체는 암 처리 7일 후에도 90% 이상의 엽록소를 보유하고 있음을 확인하였다. 3일차 및 7일차의 각각 엽록소 함량에 따라 정렬하여 노화가 빠른 8개의 계통과 노화가 느린 6개의 계통을 선발하였고, 노화가 가장 느린 계통으로 DLS-177을 최종 선발하였다(표 1).

표 1

엽록소 함량 측정

계통명	암 처리 3일 후 엽록소 함량	암 처리 7일 후 엽록소 함량	노화 특성
DLS-177	99.7	96.2	
DLS-137	93.5	89.2	
DLS-010	102.1	88.9	
DLS-014	98.7	86.8	Slow
DLS-155	90.8	85.5	
DLS-028	89.3	85.0	
DLS-042	80.4	11.1	
DLS-107	57.9	9.0	
DLS-077	66.0	8.9	
DLS-080	77.7	8.9	
DLS-130	47.1	8.4	Rapid
DLS-053	45.9	6.9	
DLS-070	57.9	5.1	
DLS-091	63.1	3.5	

[0050]

[0052] **실시예 3. 노화 지연 표현형 관련 유전자 탐색**

[0053] **3-1. 배추의 노화 지연을 조절하는 유전자 탐색을 위한 QTL 분석**

[0054] DLS-177 계통의 게놈 DNA를 사용하여 총 74개의 마커로 666.11 cM을 포함하는 유전자 지도를 작성하였고, 표현형 분석 및 Windows Cartographer(Version 2.5)를 이용하여 QTL 분석을 수행한 후 노화지연 표현형과 연관된 유전자좌 영역을 결정하였다(도 2). 유전체 염기서열 분석을 통하여 Major QTL 영역에서 972개의 유전자를 확인하였다.

[0056] **3-2. 배추의 노화 지연을 조절하는 후보 유전자들의 발현 분석**

[0057] 상기 Major QTL 영역에서 확인한 972개의 유전자들의 노화 특성에 따른 발현 수준을 분석하기 위해서, RNA 시퀀싱을 통해 암 처리 전(0일) 대비 암 처리 후 1일 및 4일째에 DLS-042와 DLS-177(노화가 느린 배추 계통) 간에 발현 차이를 보인 유전자들을 선발하였다.

[0058] 그 결과, 노화 특성과 관련하여 발현이 상향 조절(up-regulation)되는 유전자 15개와 하향 조절(down-regulation)되는 유전자 13개를 선발하였다. 상기 선발된 28개의 유전자들은 대조구 배추인 DLS-42와 비교했을 때 노화지연 계통인 DLS-177에서 뚜렷하게 증가하거나 감소하는 특징을 보였다(결과 미제시).

[0059] 상기 28개 유전자들의 발현 특성을 재확인하기 위해 DLS-042와 DLS-177 계통에 암 처리 전 0일부터 암 처리 후 1일, 2일, 3일 및 4일째에 semi qRT-PCR을 통해 유전자 발현을 비교·분석하였다(도 3). 그리고, 상기 semi qRT-PCR 결과를 통해 DLS-042와 DLS-177 계통 사이에 가장 뚜렷한 발현 차이를 보이는 12개의 유전자를 선발하여 qRT-PCR을 수행한 후(도 4), 후보 유전자 5(*BraA01g015150.3C*) 및 6(*BraA01g015160.3C*)을 선발하여 노화지연 특성과 관련된 SNP 마커를 개발하였다.

[0060] 노화지연 배추 판별용 SNP 마커를 개발하기 위해 노화가 빠른 계통인 DLS-042와 노화가 느린 계통인 DLS-177의 *BraA01g015150.3C* 및 *BraA01g015160.3C* 유전자 서열을 비교하여 SNP를 분석한 결과, *BraA01g015150.3C* 유전자의 559번째 위치에서 DLS-042 계통은 A, DLS-177 계통은 G인 SNP를 확인하였고, *BraA01g015160.3C* 유전자의 2,457번째 위치에서 DLS-042 계통은 T, DLS-177 계통은 A인 SNP를 확인하였다. 상기 SNP 종류에 따라 rhAmp SNP assay를 위한 대립 형질 특이적 프라이머(Allele specific primer)와 좌 특이적 프라이머(Locus specific primer)를 디자인하였다(표 2). 각 대립 형질 특이적 프라이머는 SNP 종류에 따라 FAM 또는 HEX가 결되어 반응하도록 하였다.

표 2

본 발명의 프라이머 세트 정보

	서열 정보(5'→3') (서열번호)	
	DLS A0_1	DLS A0_2
Allele Specific Primer 1	AGTTCCTCGTAACTGTATCCAATrACTCC (3)	ACTTCAAAATGAATGATTCAAACAGTATrATCTA (6)
Allele Specific Primer 2	TAGTTCCTCGTAACTGTATCCAACrACTCC (4)	ACTTCAAAATGAATGATTCAAACAGTAArATCTA (7)
Locus Specific Primer	GCAGTAAAACAGAATCCAGACAAAGCrAGAGG (5)	GCGGTTTACAGAGACTTCTTATACGATArCTTTT (8)

밑줄 : SNP 위치

rA 및 rC : RNA 염기(소문자 r 뒤의 base)

[0061]

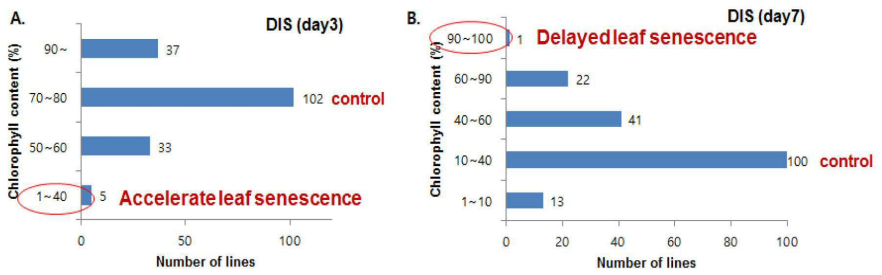
[0063] **실시예 4. rhAmp SNP assay를 통한 SNP 마커 검증**

[0064] 본 발명의 대립 형질 특이적 프라이머와 좌 특이적 프라이머를 사용한 PCR 분석은 rhAmp SNP Assays를 이용하여 제조사의 방법에 따라 실시하였다. 구체적으로 PCR 분석은 IDT사의 rhAmp™ SNP genotyping system을 이용하였다(Integrated DNA Technologies laboratory, 미국). 1 reaction 당 8 ng의 게노믹 DNA, 5.3 ㎕의 combined master mix 및 reporter mix, 0.5 ㎕의 rhAmp SNP assay, 2.2 ㎕의 Nuclease-free water로 이루어진 혼합물로 PCR이 수행되었고, PCR 반응 조건은 다음과 같다: 95℃ 10분 → [95℃ 10초, 60℃ 30초, 68℃ 20초](40회 반복) → 99.9℃ 15분. PCR 산물은 CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System(Bio-rad, 미국)을 통해 확인하였고, 최종적으로 확인된 형광의 종류에 따라 SNP 종류를 구분하였다.

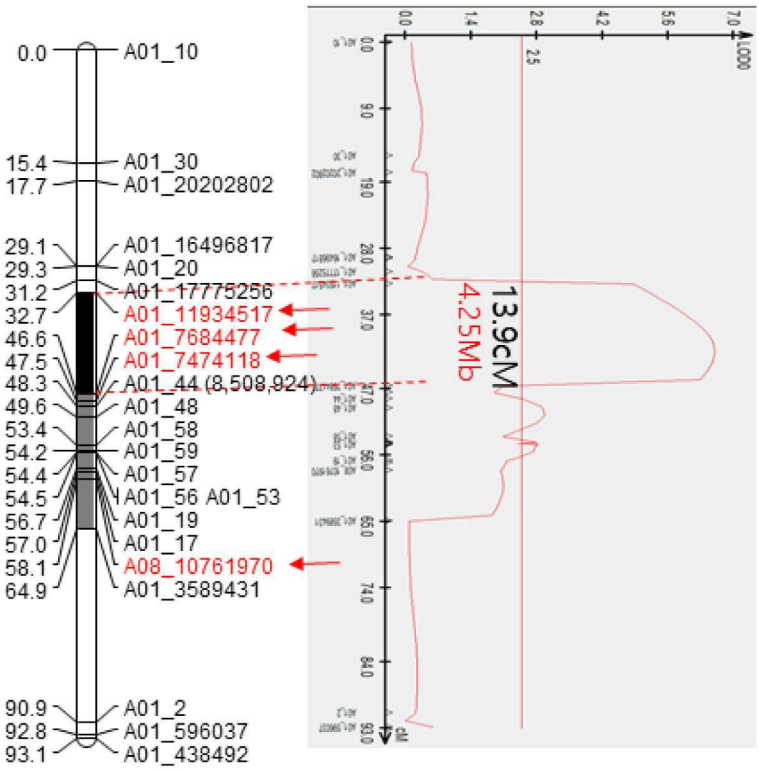
[0065] rhAmp SNP Assays 결과, 하기 도 5에 나타난 바와 같이 본 발명의 DLS A0_1 및 DLS A0_2 마커가 노화가 느린 배추(DLS-010, DLS-014, DLS-137, DLS-155 및 DLS-177)와 노화가 빠른 배추(DLS-042, DLS-080, DLS-091, DLS-107 및 DLS-053)를 정확하게 구별할 수 있음을 확인하였다.

도면

도면1



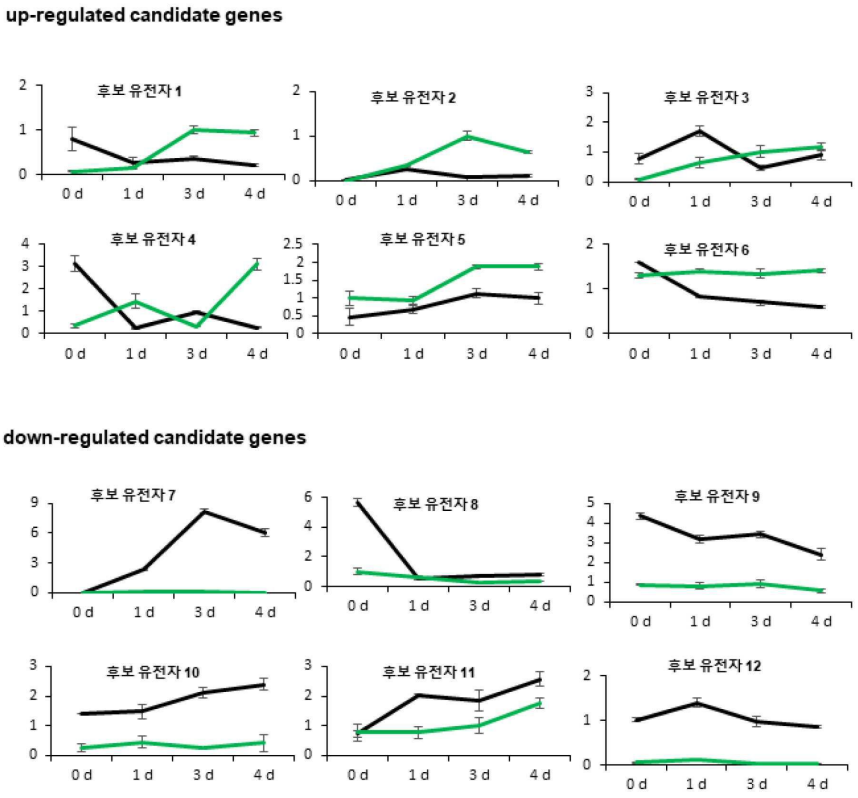
도면2


0.0 A01_10
15.4 A01_30
17.7 A01_20202802
29.1 A01_16496817
29.3 A01_20
31.2 A01_17775256
32.7 A01_11934517
46.6 A01_7684477
47.5 A01_7474118
48.3 A01_44 (8,508,924)
49.6 A01_48
53.4 A01_58
54.2 A01_59
54.4 A01_57
54.5 A01_56 A01_53
56.7 A01_19
57.0 A01_17
58.1 A08_10761970
64.9 A01_3589431
90.9 A01_2
92.8 A01_596037
93.1 A01_438492
13.9cM
4.25Mb
cM

도면3

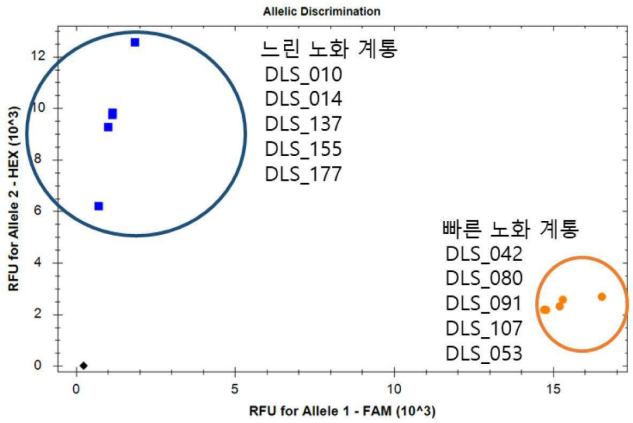

A
Log2FoldChange
Gene id
DLS-042
DLS-177
0 1 2 3 4
BroEF1-a
DLS-01 0.62 4.62 7.46
DLS-02 4.37 4.97 5.52
DLS-03 7.49 3.85 5.22
DLS-04 2.32 3.69 3.83
DLS-05 -0.47 1.00 3.69
DLS-06 0.92 3.47 3.44
DLS-07 1.34 0.04 3.28
DLS-08 0.00 6.94 3.04
DLS-09 -0.11 1.01 2.64
DLS-10 0.97 2.16 2.61
DLS-11 -1.20 -2.99 2.50
DLS-12 0.68 2.03 2.10
DLS-13 2.04 6.51 2.06
DLS-14 -0.09 1.15 1.91
DLS-15 2.06 1.51 1.32
B
Log2FoldChange
Gene id
DLS-042
DLS-177
0 1 2 3 4
BroEF1-a
DLS-16 -4.27 -5.25 -5.60
DLS-17 -4.92 -2.03 -3.81
DLS-18 -0.81 -1.55 -3.29
DLS-19 -3.26 -2.11 -2.73
DLS-20 -2.20 -1.70 -2.15
DLS-21 -0.62 -2.85 -2.62
DLS-22 -2.02 -2.09 -2.02
DLS-23 -0.61 -1.31 -1.24
DLS-24 -5.95 -5.89 -6.77
DLS-25 -1.18 -4.17 -6.65
DLS-26 -5.45 -4.77 -4.00
DLS-27 -1.92 -1.43 -1.34
DLS-28 -1.06 -1.80 -1.18

도면4

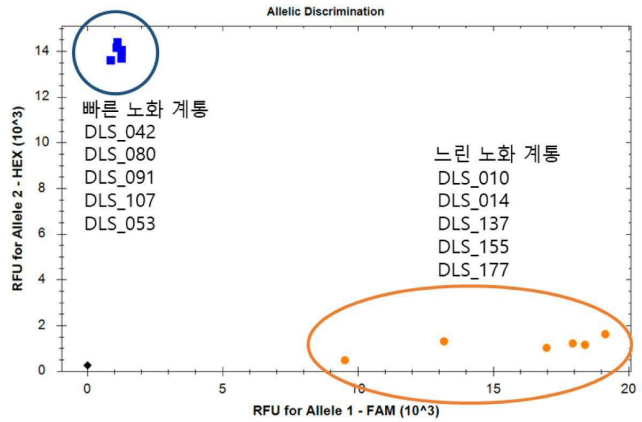

up-regulated candidate genes
후보 유전자 1
후보 유전자 2
후보 유전자 3
후보 유전자 4
후보 유전자 5
후보 유전자 6
down-regulated candidate genes
후보 유전자 7
후보 유전자 8
후보 유전자 9
후보 유전자 10
후보 유전자 11
후보 유전자 12
0 d
1 d
3 d
4 d

도면5

A



B



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Marker composition for discriminating aging retarded Chinese cabbage and uses thereof

<130> PN20192

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1038

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 1

atggcttctc tggaccacat tctctgtctt ctttctcttc tcttcatctc ttccttgcac 60

gttttgcctg cttcagccac accacacaaa ctaaaaaacg ccattaccat ccgagaagtc 120

aaccgaagag gaccttatat cggtctcgtg acggtctttg agacggaaga aaatgctttc 180

ctgggaagtg tagacttcag acccgatcct gctcatccgt tcttggatct ctctggaaga 240

cgttttagga tagggaagat tcatggaaag aaggttgttt atgtcagatg tgggatagga 300

atggtaaacg cagcagcagc aacacaacaa atgatagatg tgttcaatat gaaagggatt 360

gtgcattttg ggattgctgg aaatacaaac aactcaatgt ccataggaga cgtgagcatt 420

cctaagcaaa ttaccaatgc tggcatgtgg gattggctga atccagacaa agcagaggga 480

agtgagtatg cagcatactt agattttggg aagtatactg ttccacaagg ggatggcagc 540

gacagtatgt tagggagtgt tggatacagt tacgaggaac tatattcagt cagtattggt 600

cacaaaaatt cacctaagaa agtattttgg atcaatacaa ctcaagagtg gcttcaactt 660

gcagctggtc tagagaagat ggagctgttg caatgtgtga atgcaacttt gtgtcttcca 720

gagaaaccaa aactggttgt tggattaaaa gcagccactg ctaatacatt tgtggataat 780

gcagcctaca gagacttctt atatgatact tttggtgttt cctcctcaga catggagagt 840

tctgcagtgg ctatgacgtg cgtgtcaaat ggttatcccg tgattgtaat aaggggattg 900

tctgatttag ctggagcaca gacaggagat aatgctgtcc ggaagtttgg atctttggcg 960

gccactaaca ctgctagagc tgttctagag ttcatcaaga agctgccacc aaactacaac 1020

cttaattcct acgcgtag 1038

<210> 2

<211> 2801

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 2

atggcgtcac tggaccacat tcttcgtctt cttcctctgc tcgtcatcat cttcgtcatc 60

tcttccttac atgtttttcc tgcttcagca acatcttcag acaaactaaa aaccgccact 120

accatccgta aagtaaaccg caaaggacct tacgtaggtc tcgtgacggt cattgagaca 180

gaagaagatg ctttcttggc cagtgtcgaa ttcagacccg atcctaatca cccgttcatt 240

gatctctctg gtatctactt agcttaatat tttccacttg aactggtttc tttttcaggc 300

tttatgtggt tgagagattc ttttgtttcg ggtcaatgga agcaagtccc tttgagatgt 360

aaatgtgaat aagtttttga ctgtgtgaga caaatgaaat gattgcaggt agacgttttc 420

ggataggaaa gattcatgca aagaaggtta tgtatgtcag atgtgggaga ggaatggtga 480

gtcactatta gtccattaca gtaaaaaaga gtttattttg ttactgaacn nnnnnnnnnt 540

aaaagaggaa ggctttgatt gttnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 600

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 660

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 720

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 780

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 840

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 900

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 960

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1020

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1080

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1140

nnnnnnnnnn nnnnnnnnga gatgtgacct gatcaacaat attataaata ttcatttatt 1200

tctcagttca atttagcacc accaaannnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1260

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1320

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1380

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1440

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1500

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1560

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1620

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 1680

nnnnnnnaag aaaaatgtgc aggtgaacgc agcagcagca acgcaacaaa tgatagacgt 1740

gttcgatgtg aaggggattg tgcattttgg gattgcagga aatataaaca actcaatgtc 1800

cataggagac gtcagcattc ctaatcaaat caccaatgct ggcttgtggg attggctggt 1860

atataaaaat atactagttt tctattgata taaaatcaat agcttcttct tcacatatat 1920

tattgtctaa tggttgcgtt cgagtgaaac agaatccaga caaagtagag ggaggtgacg 1980

atgaagcgta cttagatatt gggaactata atgttccaca aatagatggc aacaacaaca 2040

tgttagggag tcttagatac ggccacgagc aactgtattc agtcactggt cgcatcaatt 2100

cacctcagaa cgtgttttgg atcaatacaa ctcaagagtg gcttcatctt gcagctgatc 2160

tagaggtttg tttaagaatg atatattgat tagaaaacaa gaacggttcc agtgttaatt 2220

tcagttcctt cttgattatg gttgcagaag atggagctgt tgcagtgtgt gaatgcaagt 2280

ttgtgtcttc cagagaaacc aaaacttgtt gtcggactaa aggcagcaac tgctaatata 2340

tttgtggata atgcggttta cagagacttc ttatacgata cttttgaggt ttcctcctca 2400

gacatggaga gttctgcagt ggctatggta atgtaatata ttcagcgttt atagatatac 2460

tgtttgaatc attcattttg aagtaatagt ttctcatttt gtttgttttc tgctttgaaa 2520

tttatcagac gtgcgtgtcg aatgggtatc cagtaattgt gataaggggg ttatcagatt 2580

tagctggagc acaaacagga accaatgcta ttcgaaagtt tggatctttg gctgccgcta 2640

acactgcaag agctgttcta gagttcatca agaagctacc gtcaaactac aacgttaact 2700

cctaagtgta gccattttat cataatcagt gatttaataa tctgtaattc tcttatatca 2760

aatataagta ttcactgttg tttaaggtga gtttggtctc g 2801

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

agttcctcgt aactgtatcc aatactcc 28

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

tagttcctcg taactgtatc caacactcc 29

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

gcagtaaaac agaatccaga caaagcagag g 31

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

acttcaaaat gaatgattca aacagtatat cta 33

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

acttcaaaat gaatgattca aacagtaaat cta 33

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

gcggtttaca gagacttctt atacgatact ttt 33