(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년01월20일
(11) 등록번호 10-2491088
(24) 등록일자 2023년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6888 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6888 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2021-0096892
(22) 출원일자 2021년07월23일
심사청구일자 2021년07월23일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020170122599 A
KR1020180029802 A
KR102206211 B1

기술이전 희망 : **기술양도**

(73) 특허권자
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
(주)더모아젠
대전광역시 유성구 대학로76번안길 19-12 ,4층402호(궁동)
(72) 발명자
김군도
부산광역시 남구 분포로 113, 225동 704호(용호동, 엘지메트로시티)
최미진
부산광역시 사하구 비봉로 37, 102동 909호 (신평동, 삼창강변아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 이효진

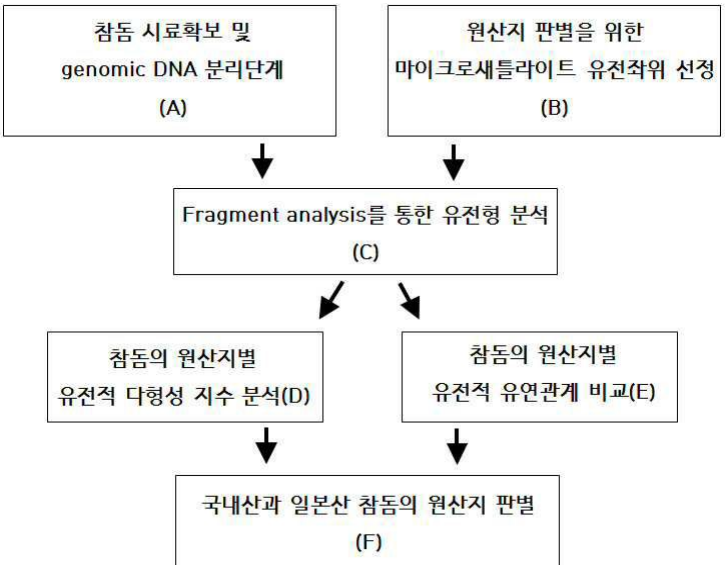
(54) 발명의 명칭 **참돔 원산지 판별용 마이크로새틀라이트 마커 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 국내에서 유통되는 일본산, 국내산 참돔의 원산지 식별을 위한 마이크로새틀라이트 마커의 개발과 이를 이용한 원산지 판별에 관한 방법에 관한 것이다. 본 발명은 효과적인 참돔의 원산지 판별을 위해 genotyping by sequencing 방법을 토대로 새롭게 개발된 마이크로새틀라이트 마커의 조합을 이용하여 참돔 집단별 유전형분석을 수행하는 것을 특징으로 하는 국내산과 일본산 참돔 판별 방법에 관한 것이다.

본 발명은 마이크로새틀라이트 마커와 원산지별 집단 유연관계 분석 방법을 포함하며 이를 통하여 국내에서 유통되는 국내산과 일본산 참돔의 원산지 판별할 수 있는 새로운 9개의 마이크로새틀라이트 마커와 이를 이용한 국내산과 일본산 참돔의 원산지 판별 방법을 제공하는데 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김종오

부산광역시 기장군 정관읍 정관3로 52, 103동 504호(정관신도시 롯데캐슬)

유승현

경상남도 양산시 물금읍 신주로 40, 109동 803호(우남퍼스트빌)

서용배

부산광역시 남구 용호로216번가길 10, 107동 1104호(용호동, 용호예가)

양지영

부산광역시 남구 수영로 345, 106동 1701호(대연동, 대연힐스테이트푸르지오)

김무상

부산광역시 동구 자성로116번길 2, 103동 2602호(범일동, 두산위브포세이돈Ⅱ)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525010911
과제번호	202004252
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	차세대수산물품질관리및검역시스템구축(R&D)
연구과제명	수산생물 원산지 판별기술 및 현장단속 키트개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교산학협력단
연구기간	2021.01.07 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

PmMS28, PmMS31, PmMS32, PmMS37, PmMS53, PmMS54, PmMS76, PmMS78 및 PmMS97로 이루어진 국내산과 일본산 참돔 판별용 마이크로새틀라이트 마커 세트.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 PmMS28은 서열번호 19로 표시되는 것이고, PmMS31은 서열번호 20으로 표시되는 것이며, PmMS32는 서열번호 21로 표시되는 것이고, PmMS37은 서열번호 22로 표시되는 것이며, PmMS53은 서열번호 23으로 표시되는 것이고, PmMS54는 서열번호 24로 표시되는 것이며, PmMS76은 서열번호 25로 표시되는 것이고, PmMS78은 서열번호 26으로 표시되는 것이며, PmMS97은 서열번호 27로 표시되는 것을 특징으로 하는, 국내산과 일본산 참돔 판별용 마이크로새틀라이트 마커 세트.

청구항 3

PmMS28 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 1 내지 2로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS31 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 3 내지 4로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS32 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 5 내지 6로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS37 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 7 내지 8로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS53 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 9 내지 10으로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS54 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 11내지 12로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS76 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 13 내지 14로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS78 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 15 내지 16으로 표시되는 프라이머 쌍; 및

PmMS97 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 17 내지 18로 표시되는 프라이머 쌍으로 이루어진 국내산과 일본산 참돔 판별용 프라이머 세트.

청구항 4

제 3항의 프라이머 세트를 포함하는 국내산과 일본산 참돔 판별용 키트.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 키트는 완충용액 및 DNA 중합효소를 포함하는 것인 키트.

청구항 6

(a) 분석하고자 하는 참돔의 핵산 시료를 제 3항의 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계에서 증폭된 산물의 각 좌위의 대립유전자를 분석하여 참돔의 유전적 다양성을 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 국내산과 일본산 참돔 판별 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 유전적 다양성을 분석하는 단계는 참돔 시료의 유전자좌당 대립유전자수, 관측이형접합률, 기대이형접합률, 다형정보지수, 대립유전자 풍부도 및 근친교배계수 중에서 선택된 하나 이상을 분석하는 것을 특징으로 하는 국내산과 일본산 참돔 판별 방법.

청구항 8

(a) 분석하고자 하는 참돔의 핵산 시료를 제 3항의 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계에서 증폭된 산물의 각 좌위의 대립유전자를 분석하여 참돔의 원산지별 유전적 유연관계를 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 국내산과 일본산 참돔 판별 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 원산지별 유전적 유연관계를 비교하는 단계는 Pairwise Fst 값 및 genotype likelihood matrix 값 중에서 선택된 하나 이상을 비교하는 것을 특징으로 하는 국내산과 일본산 참돔 판별 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 참돔(*Pagrus major*) 국내산과 일본산 판별이 가능한 마이크로새틀라이트 마커(microsatellite marker) 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 참돔(*Pagrus major*)은 농어목(*Perciformes*) 도미과(*Sparidae*)에 속하는 어종으로 한국, 일본, 중국, 대만, 베트남 등에 걸친 북서 태평양 연안 10-200m의 수심에 서식한다. 또한 참돔은 우리나라 제주도 남방 해역에서 월동 후 봄이 되면 중국 연안과 한국의 서해안으로 이동을 하는 회유성 어종이며 등쪽은 붉은색 배쪽은 흰색을 띈다. 참돔은 고급 식재료로서 한국, 일본, 중국 등에서 회, 구이, 찜 등으로 소비되며 경제적으로 높은 가치를 지니는 어종이다.

[0003] 우리나라는 2000년에 1,398톤의 생산량으로부터 2009년에는 11,090톤을 기록하면서 최대 생산량을 기록하였다. 최근 2019년의 생산량은 7,712톤으로 기록되었다. 생산 금액으로는 2009년에 약 950억원의 최대 생산금액을 기록하였으며 2019년에는 약 803억원을 기록하여 총 어류 생산 금액의 2.7%를 차지하였다(대한민국 통계청).

[0004] 현재 우리나라의 수입산 참돔은 일본으로부터 2017년에는 2,302톤, 2018년에는 3,449톤, 2019년에는 2,504톤의 양으로 꾸준히 수입되고 있다(식품의약품안전처). 하지만 현재 모든 식용 수입수산물 품종에 대한 정밀검사의 비율은 6%로 매우 낮은 상태며 국내산과 일본산 참돔은 육안으로 식별이 불가하기 때문에 국내의 일본산 어류에 대한 우려와 안전한 수산물 먹거리에 대한 수요가 증가하고 있다. 또한 일부 부도덕한 유통업자들이 일본산을 국내산으로 둔갑시켜 유통하려는 사례가 발생하고 있기 때문에 부정 유통을 방지하기 위한 수입, 검역, 유통과정에서의 객관적인 원산지 감식 기준과 기법이 필요한 실정이다.

[0005] 전 세계적으로 DNA의 유전자 정보를 활용한 수산물 품종 판별 또는 집단 유전적 유연관계 분석에 쓰이는 방법으로는 마이크로새틀라이트(Microsatellite, MS) 마커, restriction fragment length polymorphism(RFLP), allozyme, mitochondrial DNA, random amplified polymorphic DNA(RAPD), amplified fragment length polymorphism(AFLP), single nucleotide polymorphism(SNP)등이 개발되어 왔다.

[0006] 본 연구에서는 DNA 유전정보를 이용하여 체계적으로 국내산과 일본산 참돔의 원산지를 구분하기 위해 마이크로새틀라이트 마커를 활용하였다.

[0007] 마이크로새틀라이트 마커는 1990년대부터 유전학에서 유전적 유연관계 분석에 널리 사용되는 분자마커로서 1에서 6개의 짧은 염기쌍(base pair, bp) 서열이 여러 번 반복되어 나타나는 DNA상 좌위로서 simple sequence repeat(SSR)이라고도 한다. 마이크로새틀라이트 마커는 멘델의 유전법칙을 따르며 높은 다형성(polymorphism)과 재현성(reproductivity)을 가지기 때문에 1990년대부터 포유류, 식물 등을 포함하는 다양한 생물체를 대상으로 한 혈통, 집단 유전적 관계 분석, 친자확인, 개체식별을 위한 유전형(genotyping) 분석 기술로서 이용되고 있으며 2000년 이후부터 소, 돼지, 연어 등의 동물에서 품종식별, 원산지 판별에 적용되는 유용한 분자마커이다.

[0008] 본 발명자들은 국내산, 일본산 참돔을 판별하기 위한 분자마커로서 GBS 정보를 활용하여 새로운 9개의 마이크로새틀라이트 마커를 개발하였으며 이를 통해 일본산, 국내산 참돔의 유전형을 분석하여 유전적 다양성, 유전적 거리를 비교하는 방법을 개발하여 효율적으로 원산지를 판별 할 수 있는 방법을 제공한다. 또한 경제적인 면을 고려하여 9개의 마커(PmMS28, PmMS31, PmMS32, PmMS37, PmMS53, PmMS54, PmMS76, PmMS78, PmMS97) 가운데 5개(PmMS32, PmMS54, PmMS78, PmMS37, PmMS97) 또는 3개(PmMS32, PmMS54, PmMS97)의 마이크로새틀라이트를 이용하였을 경우에도 마찬가지로 충분히 원산지 판별이 가능함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) KR 20150089655 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 국내에서 유통되는 국내산 참돔과 일본산 참돔을 판별하기 위한 새로운 마이크로새틀라이트 마커와 이를 활용한 유전형 분석을 통하여 원산지를 효과적으로 판별할 수 있는 방법을 제공하는 것을 특징으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 PmMS28, PmMS31, PmMS32, PmMS37, PmMS53, PmMS54, PmMS76, PmMS78 및 PmMS97로 이루어진 군에서 선택된 1개 이상의 참돔 원산지 판별용 마이크로새틀라이트 마커를 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 실시예에 있어서, “마이크로새틀라이트 마커”는 PmMS28은 서열번호 19로 표시되는 것이고, PmMS31은 서열번호 20으로 표시되는 것이며, PmMS32는 서열번호 21로 표시되는 것이고, PmMS37은 서열번호 22로 표시되는 것이며, PmMS53은 서열번호 23으로 표시되는 것이고, PmMS54는 서열번호 24로 표시되는 것이며, PmMS76은 서열번호 25로 표시되는 것이고, PmMS78은 서열번호 26으로 표시되는 것이며, PmMS97은 서열번호 27로 표시되는 것을 특징으로 한다.

[0013] 또한 본 발명은 PmMS28 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 1 내지 2로 표시되는 프라이머 세트; PmMS31 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 3 내지 4로 표시되는 프라이머 세트; PmMS32 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 5 내지 6로 표시되는 프라이머 세트; PmMS37 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 7 내지 8로 표시되는 프라이머 세트; PmMS53 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 9 내지 10으로 표시되는 프라이머 세트; PmMS54 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 11내지 12로 표시되는 프라이머 세트; PmMS76 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 13 내지 14로 표시되는 프라이머 세트; PmMS78 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 15 내지 16으로 표시되는 프라이머 세트; 및 PmMS97 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 17 내지 18로 표시되는 프라이머 세트로 구성되는 군으로부터 선택되는 1쌍 이상의 참돔 원산지 판별용 프라이머 세트를 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 상동의 프라이머 세트를 포함하는 참돔 원산지 판별용 키트를 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, “참돔 원산지 판별용 키트”는 완충용액 및 DNA 중합효소를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 또한 본 발명은 분석하고자 하는 참돔의 핵산 시료를 상동의 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭하는 단계; 상기 단계에서 증폭된 산물의 각 좌위의 대립유전자를 분석하여 참돔의 유전적 다양성을 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 참돔 원산지 판별 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, “참돔 원산지 판별 방법”은 유전적 다양성을 분석하는 단계에 있어서 참돔 시료의 유전자좌당 대립유전자수, 관측이형접합률, 기대이형접합률, 다형정보지수, 대립유전자 풍부도 및 근친교배계수 중에서 선택된 하나 이상을 분석하는 것을 특징으로 하는 것 일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 또한 본 발명은 분석하고자 하는 참돔의 핵산 시료를 상동의 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭하는 단계; 상기 단계에서 증폭된 산물의 각 좌위의 대립유전자를 분석하여 참돔의 원산지별 유전적 유연관계를 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 참돔 원산지 판별 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, “참돔 원산지 판별 방법”은 참돔의 원산지별 유전적 유연관계를 비교하는 단계에 있어서 Pairwise Fst 값 및 genotype likelihood matrix 값 중에서 선택된 하나 이상을 비교하는 것을 특징으로 하는 것 일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에서 제공하는 마이크로새틀라이트 개발과 이를 이용한 원산지 판별 방법은 소량의 지느러미 조직을 이용하여 효과적이고 경제적인 방법으로 일본산, 국내산 참돔의 유전적 거리 및 집단 분석을 수행하는 것으로서 원산지 판별이 가능함을 나타낸다. 따라서 본 발명을 이용해 유통 과정상 발생하는 부정행위를 단속할 수 있을 뿐만 아니라 수산물 원산지 관리에 대한 국민의 신뢰도 상승 및 어가 소득 증대에 도움을 줄 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 마이크로새틀라이트 마커를 이용하여 국내산 참돔과 일본산 참돔을 판별하기 위한 방법을 설명하기 위한 도이다.

도 2는 GBS 데이터를 통해 새롭게 개발된 100개의 마이크로새틀라이트 마커의 적합성을 확인하고자 국내산 참돔 및 일본산 참돔 각 1 개체의 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR 반응을 수행하고 그 산물을 아가로즈 겔 전기영동 방법으로 확인한 결과에 대한 도이다.

도 3은 실시예3(B)를 통해 선정된 9개의 마이크로새틀라이트 마커를 이용해 국내산 참돔 및 일본산 참돔 내의 각 유전자 좌위를 증폭하고 그 PCR 산물의 DNA fragment 크기를 분석한 결과에 대한 도이다.

도 4는 DNA fragment 모세관전기영동법(capillary electrophoresis)을 통해 분석된 각각 9개의 마이크로새틀라이트 마커 좌위에 대한 국내산 참돔 및 일본산 참돔의 유전자형의 allele frequency를 나타낸 결과에 대한 도이다.

도 5는 9개의 각 마이크로새틀라이트에 대한 국내산 참돔 및 일본산 참돔의 유전적 변이 분포 및 관계를 나타내는 PCoA분석 결과에 대한 도이다.

도 6은 9개의 마이크로새틀라이트 마커 분석 결과를 바탕으로 Arlequin을 통해 국내산 참돔 및 일본산 참돔의 유전적 유연관계를 나타내는 genotype likelihood 산출값과 PCoA분석 결과를 도표화한 결과에 대한 도이다.

도 7은 Fst 값이 가장 높은 5개의 마이크로새틀라이트 마커 조합(PmMS32, PmMS54, PmMS78, PmMS37, PmMS97) 분석 결과를 바탕으로 Arlequin을 통해 국내산 참돔 및 일본산 참돔의 유전적 유연관계를 나타내는 genotype likelihood 산출값과 pCoA분석 결과에 대한 도이다.

도 8은 선정된 3개의 마이크로새틀라이트 마커 조합(PmMS32, PmMS54, PmMS97) 분석 결과를 바탕으로 Arlequin을 통해 국내산 참돔 및 일본산 참돔의 유전적 유연관계를 나타내는 genotype likelihood 산출값과 PCoA분석 결과에 대한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 PmMS28, PmMS31, PmMS32, PmMS37, PmMS53, PmMS54, PmMS76, PmMS78, PmMS97로 이루어진 군에서 선택된 1개 이상의 참돔 원산지 판별용 마이크로새틀라이트 마커 제공을 목적으로 한다.

[0023] 본 발명의 용어 ‘마이크로새틀라이트 마커’는 유전학에서 유전적 유연관계 분석에 널리 사용되는 분자마커로서 1에서 6개의 짧은 염기쌍(base pair, bp) 서열이 여러 번 반복되어 나타나는 DNA상 좌위로서 simple sequence repeat(SSR)이라고도 한다. 높은 다형성(polymorphism)과 재현성(reproductivity)을 가지기 때문에 다양한 생물체를 대상으로 한 혈통, 집단 유전적 관계 분석, 친자확인, 개체식별을 위한 유전형(genotyping) 분석 기술로서 이용되고 있으며 2000년 이후부터 소, 돼지, 연어 등의 동물에서 품종식별, 원산지 판별에 적용되는 유용한 분자마커이다.

[0024] 본 발명은 마이크로새틀라이트 마커의 특이적인 서열번호 1 및 2, 3 및 4, 5 및 6, 7 및 8, 9 및 10, 11 및 12, 13 및 14, 15 및 16, 17 및 18의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍으로 구성되는 군으로부터 선택되는 1

쌍 이상의 참돔 원산지 판별용 프라이머 제공을 목적으로 한다.

[0025] 본 발명의 용어 '프라이머(primer)'란 짧은 염기서열로 구성된 단일 가닥의 핵산 서열로 PCR 또는 DNA 합성에 있어서 주형(template)가닥에 상보적인 수소결합을 하여 시작점을 제공하는 역할을 한다.

[0026] 또한 상기 9개의 마이크로새틀라이트 마커를 표적으로 한 PCR 산물들의 크기를 모세관전기영동법을 통해 결정함으로서 국내산과 일본산 참돔의 유전자형을 분석하는 것을 특징으로 한다.

[0027] 상기 9개의 마이크로새틀라이트 마커를 활용하여 유전형을 분석하고 참돔의 원산지를 판별하는 방법에는 PmMS28를 증폭하는 서열번호 1 및 2의 프라이머, PmMS31를 증폭하는 서열번호 3 및 4의 프라이머, PmMS32를 증폭하는 서열번호 5 및 6의 프라이머, PmMS37를 증폭하는 서열번호 7 및 8의 프라이머, PmMS53를 증폭하는 서열번호 9 및 10의 프라이머, PmMS54를 증폭하는 서열번호 11 및 12의 프라이머, PmMS76를 증폭하는 서열번호 13 및 14의 프라이머, PmMS78를 증폭하는 서열번호 15 및 16의 프라이머, PmMS97를 증폭하는 서열번호 17 및 18의 프라이머가 포함된다.

[0028] 또한, 본 발명의 프라이머는 형광물질로 표지될 수 있으며 서열번호 1부터 18까지의 프라이머가 추가 또는 제외될 수도 있다.

[0029] 본 발명은 마이크로새틀라이트 마커의 특이적인 서열번호 1 및 2, 3 및 4, 5 및 6, 7 및 8, 9 및 10, 11 및 12, 13 및 14, 15 및 16, 17 및 18의 정방향 프라이머 및 역방향 프라이머 쌍으로 구성되는 군으로부터 선택되는 1 쌍 이상의 참돔 원산지 판별용 프라이머를 포함하는 참돔 원산지 판별용 키트 제공을 목적으로 한다.

[0030] 본 발명은 분석하고자 하는 참돔의 핵산 시료를 PmMS28, PmMS31, PmMS32, PmMS37, PmMS53, PmMS54, PmMS76, PmMS78, PmMS97로 이루어진 마이크로새틀라이트 마커 조성물에 특이적이며 서열번호 1 내지 18로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하는 단계; 상기 단계에서 증폭된 산물의 각 좌위의 대립유전자를 분석하여 참돔의 유전적 다양성을 분석하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 참돔 원산지 판별 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0031] 마지막으로 본 발명은 분석하고자 하는 참돔의 핵산 시료를 PmMS28, PmMS31, PmMS32, PmMS37, PmMS53, PmMS54, PmMS76, PmMS78, PmMS97로 이루어진 마이크로새틀라이트 마커 조성물에 특이적이며 서열번호 1 내지 18로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머를 이용하여 PCR 증폭하는 단계; 상기 단계에서 증폭된 산물의 각 좌위의 대립유전자를 분석하여 참돔의 원산지별 유전적 유연관계를 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 참돔 원산지 판별 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0032] 즉, 9개의 마이크로새틀라이트를 바탕으로 하여 유전적 다형성 지수를 분석하는 방법과 유전적 거리 계산 프로그램을 통한 유전적 거리를 비교하여 원산지를 판별하는 방법을 포함한다.

[0033] 또한 9개 마이크로새틀라이트 마커 중 경제적인 면을 고려하여 5개의 마이크로새틀라이트 마커(PmMS32, PmMS54, PmMS78, PmMS37, PmMS97) 조합과 3개의의 마이크로새틀라이트 마커(PmMS32, PmMS54, PmMS97) 조합을 이용한 유전자형을 분석할 수 있다.

[0034] 상기 5개의 마이크로새틀라이트 마커를 이용해 참돔의 원산지를 판별하는 방법에는 PmMS32를 증폭하는 서열번호 5, 6의 프라이머, PmMS37를 증폭하는 서열번호 7, 8의 프라이머, PmMS54를 증폭하는 서열번호 11, 12의 프라이머, PmMS78를 증폭하는 서열번호 15, 16의 프라이머, PmMS97를 증폭하는 서열번호 17, 18의 프라이머가 포함된다.

[0035] 3개의 마커를 이용해 참돔의 원산지를 판별하는 방법에는 PmMS32를 증폭하는 서열번호 5, 6의 프라이머, PmMS54를 증폭하는 서열번호 11, 12의 프라이머, PmMS97를 증폭하는 서열번호 17, 18의 프라이머가 포함된다.

[0036] 또한 상기 5개와 3개의 마이크로새틀라이트 마커 조합을 바탕으로 하여 유전적 다형성 지수를 분석하는 방법과 유전적 거리 계산 프로그램을 통한 유전적 관계를 비교 분석하는 방법을 통하여 원산지를 판별하는 방법을 포함한다.

[0038] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0040] **실시예 1. 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 국내산, 일본산 참돔의 원산지 판별 방법 개발**

[0041] 본 발명에 따른 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 국내산, 일본산 참돔의 원산지 판별 방법은 참돔 시료 확보 및 genomic DNA 분리(A), genotyping by sequencing을 통한 참돔 원산지 판별용 마이크로새틀라이트 유전좌위 선정(B), 상기 (B)에서 선정된 9개의 마이크로새틀라이트 마커를 이용하여 fragment analysis 후 참돔 개체별 유전형 분석(C), 상기 (C)에서 확보한 정보를 토대로 하여 참돔의 원산지별 유전적 다형성 지수 분석(D), 참돔의 원산지별 유전적 유연관계 비교(E), 국내산, 일본산 참돔의 원산지 판별(F)로 이루어진다(도 1).

[0043] **실시예 2. 참돔 시료 확보 및 genomic DNA 분리(A)**

[0044] 원산지 판별을 위한 유전형(genotyping) 분석에 쓰인 국내산 참돔 90마리는 부산 자갈치, 통영, 포항의 어시장에서 구입하였으며 일본산 참돔 90마리는 수산물 전문 수입업체를 통해 구입하였다. 참돔의 각 개체별 지느러미 또는 근육 조직을 샘플링 하여 분석 전까지 -80° C에서 보관하였다. 절단된 약 0.5cm의 지느러미 또는 근육으로부터 지느러미 또는 근육으로부터 genomic DNA를 추출, 정제하기 위해 AccuPrep® Genomic DNA Extraction 키트(Bioneer, Korea)를 이용하였으며 사용 전 이를 희석하여 10ng/㎕의 농도로 일정하게 조정하였다.

[0046] **실시예 3. 참돔 원산지판별을 위한 마이크로새틀라이트 유전좌위 선정(B)**

[0047] GBS(Genotyping by sequencing) 라이브러리 구축을 통한 새로운 마이크로새틀라이트 마커 후보군을 확보하기 위해서 NCBI(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)의 GCA_002897255.1(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_002897255.1/) assembly를 레퍼런스로 이용하여 96개체(국내산 참돔 48개체, 일본산 참돔 48개체)를 분석하였다. GBS reads로부터 얻은 데이터베이스로부터 1974개의 마커를 확보하였으며 이 가운데 국내산과 일본산 참돔 판별을 위한 100개의 후보 마이크로새틀라이트 마커를 선정하였다. 선별된 100개의 마이크로새틀라이트 마커의 적합성을 확인하기 위하여 PCR를 통한 1차 확인을 하였다.

[0048] 구체적인 PCR 반응조건으로, 주형 genomic DNA(10ng/㎕) 1 ㎕, forward 프라이머(10 pmol) 1 ㎕, reverse 프라이머 (10 pmol) 1 ㎕, Genetbio사의 Prime Taq Premix(2X) 10 ㎕를 혼합한 조성에 증류수를 첨가하여 최종 부피를 20 ㎕로 조정하였다. PCR 기기는 SimpliAmp™ Thermal Cycler(Applied biosystems)를 이용하였으며, PCR 반응의 온도 조건으로는 95° C에서 5분간 반응시킨 후, 94° C에서 30초, 60° C에서 30초, 72° C에서 1분간으로 구성된 반응조건을 1 사이클로 설정하여 40회 반복하였다. 그 후 72° C에서 7분간 연장(extension) 반응 후 PCR 산물 2㎕를 2% 아가로즈 겔에 전기영동하여 확인하였다(도 2). 전기영동 결과를 통해 PCR 산물의 크기 차이가 확인된 9개의 마이크로새틀라이트 유전좌위가 선정되었으며 이를 fragment analysis (C)에 이용하였고 각 프라이머 및 마커에 대한 정보는 표 1 및 표 2에 요약하였다.

표 1

[0050]

Locus	서열번호	프라이머 서열
PmMS28	1	F: 5’ - TGGAAACTGGGAGAAACGGG
	2	R: 5’ - CATGCAGATTAAACAAAGAGAAGAAAT
PmMS31	3	F: 5’ - TCCACTGAGTTAAAGGGTCCA
	4	R: 5’ - ACAAGGCGGATCTAATGCGT
PmMS32	5	F: 5’ - CAGCCTGACAGCTCTCACAT
	6	R: 5’ - ATTGGGAAATGGCAGCGCAT
PmMS37	7	F: 5’ - ACTTTGAACCCTGAGCCACA
	8	R: 5’ - TCTTCAATGTGTGAGTGGGCT
PmMS53	9	F: 5’ - TGAGATCATCCTCCTCCCAGA
	10	R: 5’ - AGGTTCTCATCATTTCCCTGGG
PmMS54	11	F: 5’ - GCGGCAGCAACAACGATTTT
	12	R: 5’ - TGCCTGTTTTTCGTTTGATTTTGT
PmMS76	13	F: 5’ - ACGGCTCACCTTGGATTTGA
	14	R: 5’ - CCACGAGTGAATGTGTTCCC
PmMS78	15	F: 5’ - TGCATGTACCTCTCTGTGCC
	16	R: 5’ - TGCAGGATTCAGAACCAGATGT
PmMS97	17	F: 5’ - GCCAGGACAGAAAATGAAGCA
	18	R: 5’ - GCAGCATCTTCAAAGGCACC

표 2

[0052]

Locus	ID	Repeat motif	서열번호	염기서열	Size(bp)	Tm	Ta
PmMS28	Seq_104664974	$(AC)_{20}$	19	TGGGAGAAACGGGTACCCTGGGTCCGTCTG(AC)nATATATATATACTGTATATGTATTTCTTCT	95-121	57.36	60
PmMS31	Seq_21359525	$(TAA)_8$	20	CAACTTTTCACCCACTAAGTCATAATCCTC(TAA)$_n$TATATGACGCATTAGATCCGCCTTGTTCCA	100-145	59.82	60
PmMS32	Seq_16597448	$(AC)_6$tcacgcgt$(AC)_6$	21	CCCCGTGCCATGAAGCCACGCACATACTGT(AC)$_n$TCACGCGT(AC)$_n$GCAAATGCGCTGCCATTTCCCAATGCCAGA	96-106	61.33	60
PmMS37	Seq_67108515	$(TG)_6$	22	ATTTTGCTGTTTTATGTGTGTGTGAGTTTA(TG)$_n$TCGCCAGCCCACTCACACATTGAAGAGGTT	96-102	59.58	60
PmMS53	Seq_101487188	$(GA)_{10}$	23	GTTTGAGATCATCCTCCTCCCAGAGCCTCT(GA)$_n$AAAAACAGAATCCAATAAATTGGCTGCAA	92-101	59.76	60
PmMS54	Seq_30817975	$(CAA)_7$	24	AGATGCTTTGGTACGCTACAGAGAACACCT(CAA)$_n$CAGAAAGAAAACAAAATCAAACGAAAAACA	123-129	59.07	60
PmMS76	Seq_81269849	$(AC)_{10}$	25	TCCCCAGGCCGCTTTGTCCTGAACACGAAA(AC)$_n$AGTTAGAGAAACTGGGAACACATTCACTCG	120-146	58.84	60
PmMS78	Seq_29115048	$(AC)_8$	26	TCTCTGTGCCTCACAGACACACAGACACAG(AC)$_n$ATTCCAACACACACGTGCTGACAGCCATGA	92-123	59.69	60
PmMS97	Seq_79278127	$(GT)_8$	27	CAGGACAGAAAATGAAGCATGCCAGAGAAA(GT)$_n$GGAAAGTGAATGAGTAACCTCCTCTCGCCA	109-123	60.12	60

[0054] **실시예 4. Fragment analysis를 통한 유전형 분석(C)**

[0055] 실시예 3에서 선정된 9개의 마이크로새틀라이트 마커를 이용해 국내산 참돔 90개체, 일본산 참돔 90개체의 집단별 유전적 다양성을 확인하기 위한 fragment analysis를 진행하였다. 각 마커에 특이적인 5'-Fam(6-FAM)이 표지된 프라이머를 합성하여 PCR에 이용하였으며 PCR 산물은 capillary array가 장착된 ABI3730xL Genetic Analyzer(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 유전자형을 분석하였으며 GeneMapper software 5(Applied Biosystems, CA, USA)를 이용하여 대립유전자들의 크기를 산출하였다. 증폭된 산물을 모세관전기영동법(capillary electrophoresis)을 이용하여 크기별로 분리하여 DNA fragment의 크기를 결정하였다 (도 3). 증폭된 산물의 크기에 따라 각 개체의 유전자형을 결정하여 비교하였으며 결정된 유전자형은 국내산(KR, n=90), 일본산(JP, n=90) 집단별로 9개의 좌위에 대한 대립유전자빈도(allele frequency)를 막대그래프로 도 4에 나타내었다.

[0057] **실시예 5. 참돔의 원산지별 유전적 다형성 지수 분석(D)**

[0058] 대립유전자수(Na, number of alleles per locus), 관측이형접합률(Ho, observed heterozygosity), 기대이형접합률(He, expected heterozygosity), 다형정보지수(PIC, polymorphic information content)는 Cervus version 3.0.7 (Marshall et al., 1998)를 이용하여 계산하였다. 대립유전자 풍부도(Ar, allelic richness) 및 근친교배계수(Fis, inbreeding coefficient)는 FSTAT 2.9.4 program(Goudet 1995)을 이용하였다. 하디-바인베르크 평형 테스트 기댓값에 대한 p-value(pHWD)는 Arlequin 3.5.2.2(Excoffier et al., 2005)을 이용하여 산출하였다 (표 3).

[0059] 9개의 마이크로새틀라이트 마커를 이용하여 국내산(KR, n=90), 일본산(JP, n=90) 총 180개체를 한 population으로 설정하여 genetic variability를 분석하였을 경우 총 70개의 대립유전자가 검출되었으며 유전자 좌당 전체 평균 대립 유전자의 수는 4에서 11개로 평균 7.8개로 나타났다. 좌위별로 보았을 때 PmMS54, PmMS37에서 각각 4개, 5개로 가장 적은 대립유전자가 나타났으며 PmMS31에서는 13개로 가장 많은 수가 관찰되었다. 이와 마찬가지로 대립유전자 풍부도(Ar)의 전체 평균은 7.322이며 PmMS31(Ar: 12.03)이 가장 높은 값을 보였으며 PmMS54(Ar: 3.999)와 PmMS37(Ar: 3.978)에서 낮은 값을 보였다.

[0060] 각 집단별 He값은 유전적 평형 상태에 있는 집단으로 가정하였을 때 예상되는 이형 접합도를 타나내며 Ho값은 실제로 관측된 이형접합상태에 있는 개체들의 이형 접합도를 나타낸다. 본 연구에서 분석된 180개체의 9개 locus에 대한 전체 평균 He값은 0.694, 전체 평균 Ho는 0.617였으며 모든 집단에서 Ho와 He값이 크게 차이가 나지 않았다. 또한 locus별로 보았을 때 분석된 모든 참돔 개체에서 PmMS28로 분석할 경우 Ho(0.85) 및 He(0.865)

값이 최대인 것으로 보이며 PmMS76로 분석할 경우 Ho(0.378)와 He(0.431)가 최소의 값을 가지는 것으로 나타났다.

[0061] PIC 값은 2개의 population내에서 0.848(PmMS28) 내지 0.411(PmMS76) 사이의 값으로 나타났다. Hardy-Weinberg 평형의 이탈은 국내산과 일본산 집단의 9개 locus 가운데, 일본산 집단에서의 4개의 좌위(PmMS28, PmMS53, PmMS54, PmMS78)에서 관찰되었다($p<0.0001$). Fis는 평균 0.112로 9개의 모든 좌위에 대한 Fis는 KR에서는 0.054, JP는 0.063였으며 참돔 원산지별 집단에서 다소의 근친교배가 일어났음을 시사한다. 9개의 마커를 이용하여 종합적으로 본 유전적인 다양성 지수는 두 원산지 그룹들 사이에서 유의한 차이를 보이지 않았다.

표 3

[0063]

Populations		PmMS28	PmMS31	PmMS32	PmMS37	PmMS53	PmMS54	PmMS76	PmMS78	PmMS97	Mean
KR (n=90)	Na	11	13	3	4	6	4	7	9	6	7
	Ar	11	13	3	3.989	6	4	6.989	9	5.989	6.996
	Ho	0.889	0.787	0.522	0.722	0.667	0.478	0.467	0.697	0.756	0.665
	He	0.875	0.821	0.557	0.658	0.730	0.669	0.464	0.790	0.761	0.703
	PIC	0.856	0.799	0.492	0.583	0.685	0.595	0.436	0.754	0.717	0.657
	HWE	0.134	0.015	0.439	0.507	0.543	0.001	0.061	0.084	0.110	0.210
	Fis	-0.016	0.042	0.062	-0.098	0.087	0.287	-0.005	0.119	0.008	0.054
JP (n=90)	Na	9	9	5	4	5	4	5	7	5	5.9
	Ar	9	8.978	4.978	3.978	4.977	4	5	7	5	5.879
	Ho	0.811	0.822	0.667	0.667	0.622	0.333	0.289	0.307	0.600	0.569
	He	0.824	0.758	0.528	0.524	0.578	0.567	0.388	0.628	0.643	0.604
	PIC	0.796	0.725	0.465	0.457	0.514	0.507	0.364	0.597	0.575	0.556
	HWE	0.000	0.335	0.013	0.003	0.000	0.000	0.001	0.000	0.420	0.086
	Fis	0.016	-0.085	-0.264	-0.275	-0.077	0.413	0.256	0.513	0.067	0.063
All poplulations (n=180)	Na	11	13	7	5	7	4	7	10	6	7.8
	Ar	10.721	12.030	6.489	3.978	6.322	3.999	6.930	9.492	5.933	7.322
	Ho	0.850	0.804	0.594	0.694	0.644	0.406	0.378	0.503	0.678	0.617
	He	0.865	0.797	0.769	0.607	0.666	0.649	0.431	0.741	0.722	0.694
	PIC	0.848	0.775	0.732	0.538	0.619	0.584	0.411	0.711	0.677	0.655

[0065] **실시예 6. 참돔의 원산지별 유전적 유연관계 비교(E)**

[0066] 국내산과 일본산 참돔의 유전적인 변이 분포를 이용하여 원산지 집단별 기하학적 관계를 2차원적으로 나타내기 위해 GenAlEx program (Peakall and Smouse 2006)을 이용하여 Principal Coordinate (PCoA) 분석을 수행하였다. 또한, 9개의 loci를 이용한 집단간 유전학적 유연관계를 분석하기 위해, Arlequin 3.5.2.2(Exocoffier et al., 2005)을 이용하여 Pairwise Fst 값 및 genotype likelihood matrix 값을 산출하였으며 이를 OriginPro 8.5 소프트웨어(OriginLab, USA)를 이용하여 도표화하였다.

[0067] 원산지 집단간 Fst값은 PmMS32, PmMS54, PmMS78, PmMS37, PmMS97, PmMS53, PmMS28, PmMS76, PmMS31 순으로 높게 나타났으며 PmMS53($p=0.02703$)을 제외한 모든 마커에서 국내 및 일본산 집단 사이의 유의적인 차이가 나타났다($p<0.00001$)(표 4). 본 분석에 사용된 모든 9개의 마이크로새틀라이트 마커를 적용하였을 경우 Fst값은 0.11078이였으며(표 5), Fst값이 가장 높게 나온 5개의 마이크로새틀라이트 마커(PmMS32, PmMS54, PmMS78, PmMS37, PmMS97)를 적용하였을 경우 0.1711($p<0.00001$) 값의 Fst 값을 기록하였다(표 6). 3개의 마이크로새틀라이트 마커(PmMS32, PmMS54, PmMS97)를 적용하였을 경우 Fst값은 0.22956($p<0.00001$)로 더 높은 값을 보였다(표 7).

[0068] 9개의 마커별 PCoA분석을 각각 수행한 결과 Fst값이 가장 높았던 PmMS32의 경우 국내산(K), 일본산(J) 참돔의 개체별로 cluster를 형성하며 84.80%의 변이도를 보이는 것으로 나타났다(도 5).

표 4

[0070]

Locus	Fst	P value
PmMS28	0.03595	p<0.00001
PmMS31	0.01848	p<0.00001
PmMS32	0.45457	p<0.00001
PmMS37	0.05258	p<0.00001
PmMS53	0.0365	p<0.00001
PmMS54	0.09181	p<0.00001
PmMS76	0.02095	0.02703
PmMS78	0.08199	p<0.00001
PmMS97	0.05441	p<0.00001

표 5

[0072]

Locus	Fst	P value
Total 9 markers	0.11078	p<0.00001

표 6

[0074]

Locus	Fst	P value
5 markers (PmMS32, PmMS54, PmMS78, PmMS37, PmMS97)	0.1711	p<0.00001

표 7

[0076]

Locus	Fst	P value
3 markers (PmMS32, PmMS54, PmMS97)	0.22956	p<0.00001

[0078] **실시예 7. 국내산, 일본산 참돔의 원산지 판별(F)**

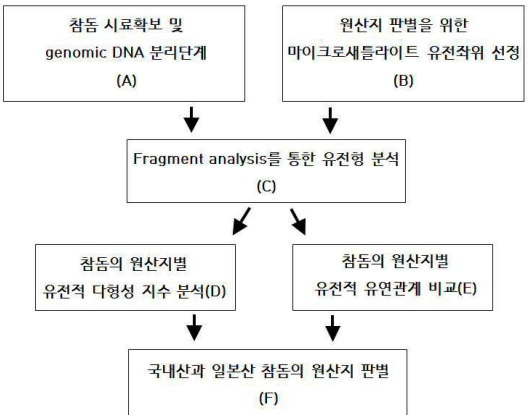
[0079] 분석에 사용된 9개의 마이크로새틀라이트 마커 분석 결과를 바탕으로 Arlequin을 통해 genotype likelihood 산출값을 도표화한 결과는 도 6에 나타내었으며 일본산과 국내산 참돔 집단이 개체별로 명확하게 그룹화 되는 것을 볼 수 있다. PCoA 결과에서는 몇 개체들은 구분이 모호하지만 전체적으로 보았을 때 29.31%의 변이율(성분별: 14.69%, 8.2%, 6.42%)을 보이는 것으로 나타났다.

[0080] Fst 값이 높은 5개의 마이크로새틀라이트 마커(PmMS32, PmMS54, PmMS78, PmMS37, PmMS97)를 적용하였을 경우에도 마찬가지로 PCoA 결과(총 43.5%의 변이율, 성분별: 22.5%, 12.08%, 8.92%)보다는 genotype likelihood 비교에서 명확한 원산지별 차이를 볼 수 있다(도 7). 마찬가지로 3개의 마커(PmMS32, PmMS54, PmMS97)를 사용하였을 때 genotype likelihood 분석 결과에서 더 뚜렷한 차이가 관찰되는 것을 보였으며 PCoA 분석에서 가장 높은 58.56%의 변이율을 볼 수 있다(28.61%, 16.85%, 13.11%)(도 8).

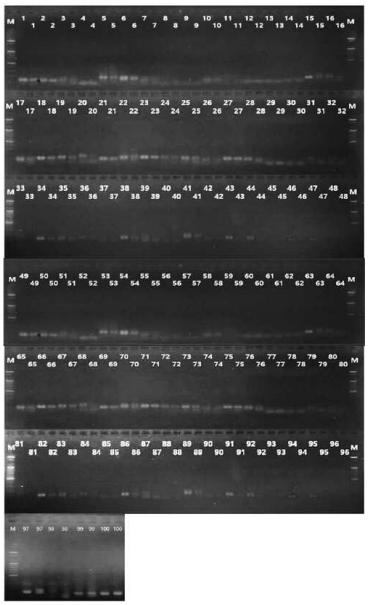
[0081] 상기 결과로부터, genotyping by sequencing 데이터를 통하여 새롭게 개발된 9개의 마커를 이용하여 국내산 및 일본산 참돔의 pairwise Fst 값, PCoA 결과 및 genotype likelihood matrix 분석에 근거하였을 경우 원산지 집단 간 나타나는 변이를 효과적으로 그룹화할 수 있었다. 경제적인 면을 고려하였을 때 5개(PmMS32, PmMS54, PmMS78, PmMS37, PmMS97) 내지 3개(PmMS32, PmMS54, PmMS97)의 마커를 이용하여 동일한 분석을 수행하였을 경우, 원산지별 genotype likelihood matrix 비교 및 PCoA분석을 이용해서 국내산과 일본산 참돔을 충분히 판별할 수 있음을 확인하였다.

도면

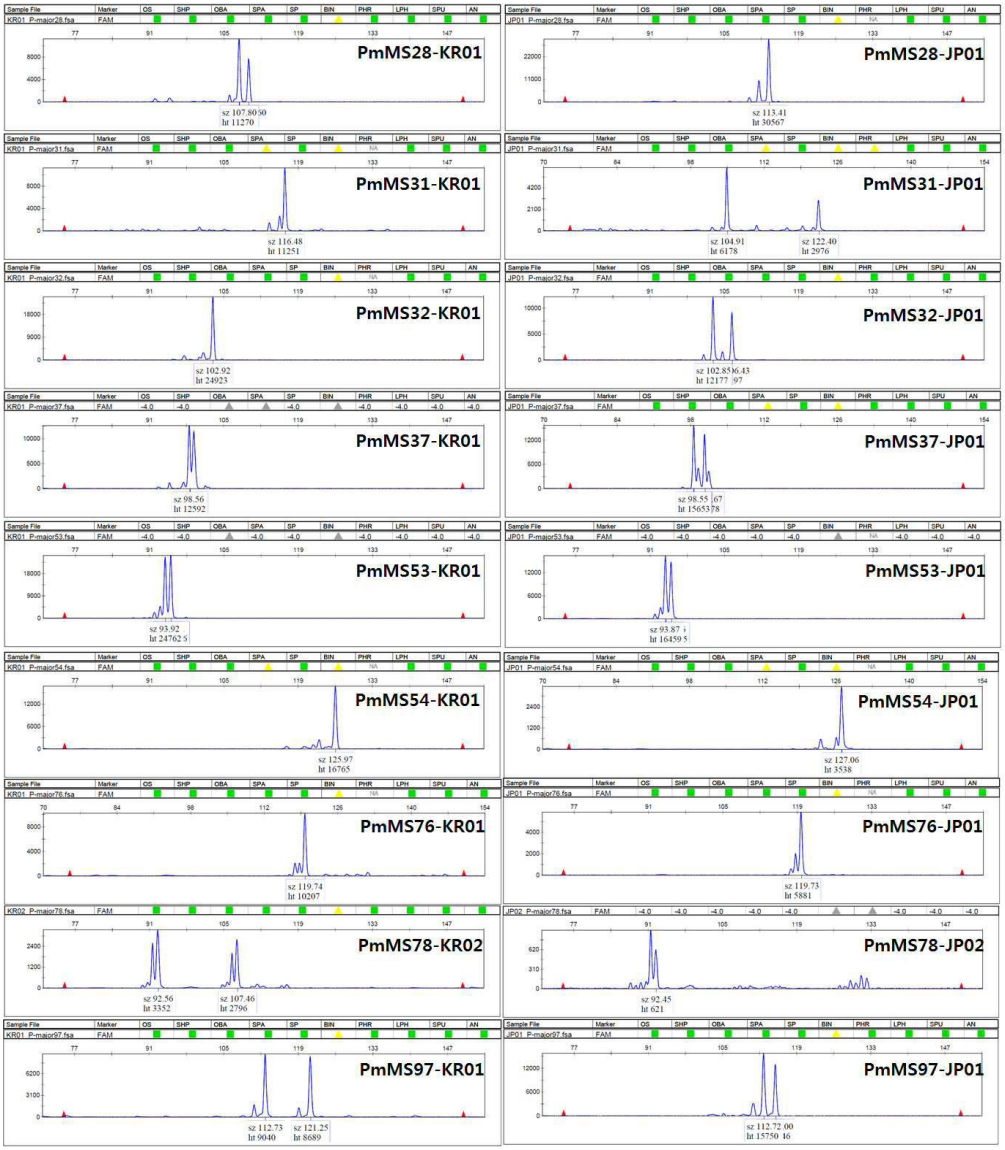
도면1


참돔 시료확보 및
genomic DNA 분리단계
(A)
원산지 판별을 위한
마이크로새틀라이트 유전좌위 선정
(B)
Fragment analysis를 통한 유전형 분석
(C)
참돔의 원산지별
유전적 다형성 지수 분석(D)
참돔의 원산지별
유전적 유연관계 비교(E)
국내산과 일본산 참돔의 원산지 판별
(F)

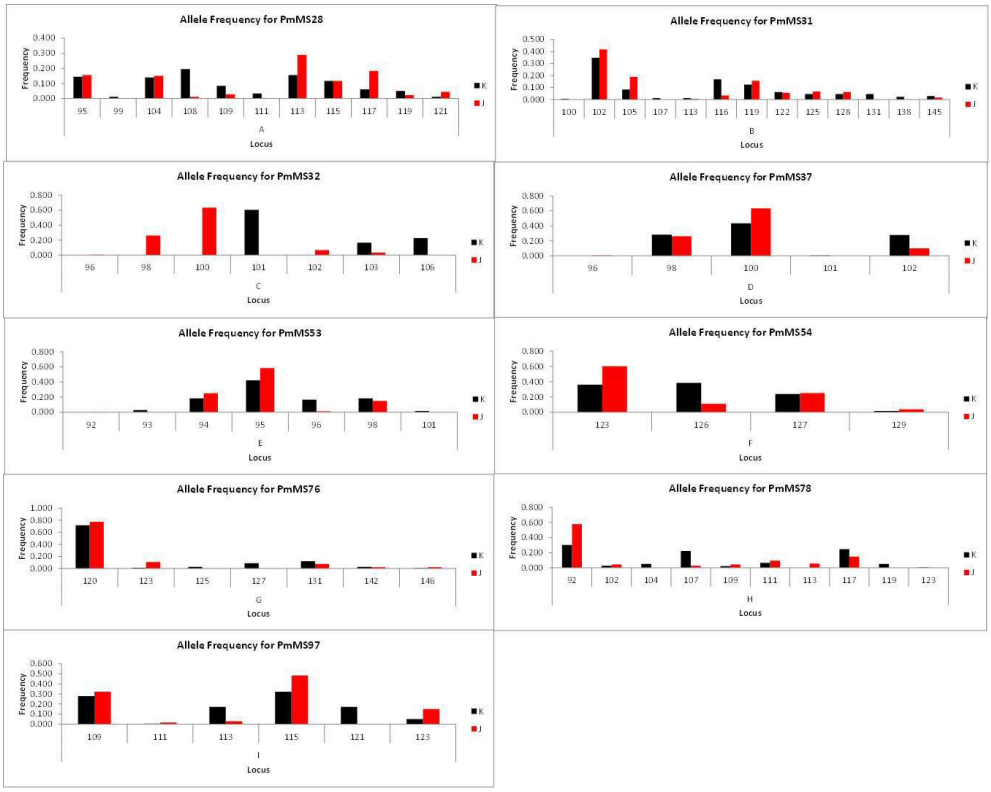
도면2



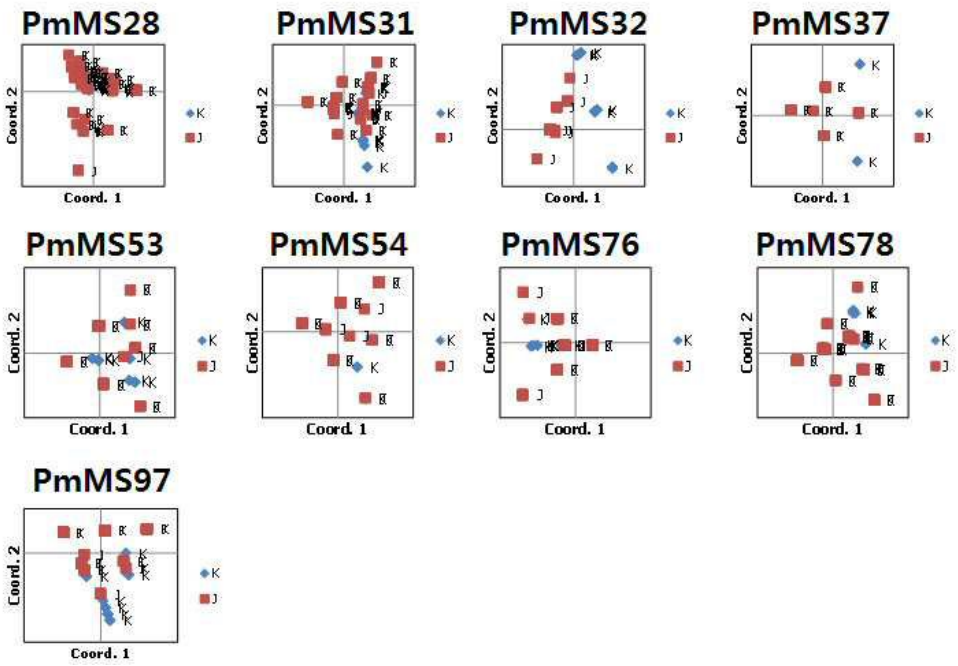
도면3


PmMS28-KR01
PmMS28-JP01
PmMS31-KR01
PmMS31-JP01
PmMS32-KR01
PmMS32-JP01
PmMS37-KR01
PmMS37-JP01
PmMS53-KR01
PmMS53-JP01
PmMS54-KR01
PmMS54-JP01
PmMS76-KR01
PmMS76-JP01
PmMS78-KR02
PmMS78-JP02
PmMS97-KR01
PmMS97-JP01

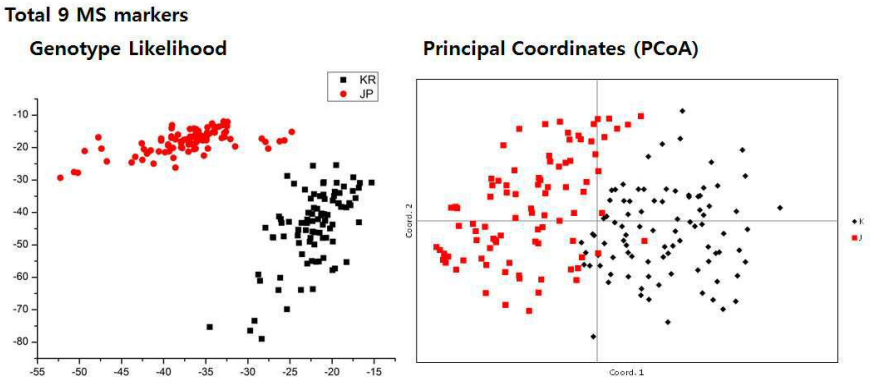
도면4


Allele Frequency for PmMS28
Allele Frequency for PmMS31
Allele Frequency for PmMS32
Allele Frequency for PmMS37
Allele Frequency for PmMS53
Allele Frequency for PmMS54
Allele Frequency for PmMS76
Allele Frequency for PmMS78
Allele Frequency for PmMS97
Frequency
Locus

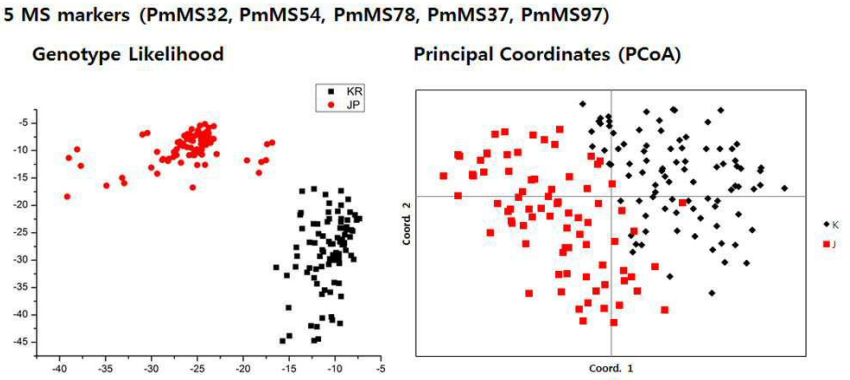
도면5


PmMS28
PmMS31
PmMS32
PmMS37
PmMS53
PmMS54
PmMS76
PmMS78
PmMS97
Coord. 1
Coord. 2
K
J

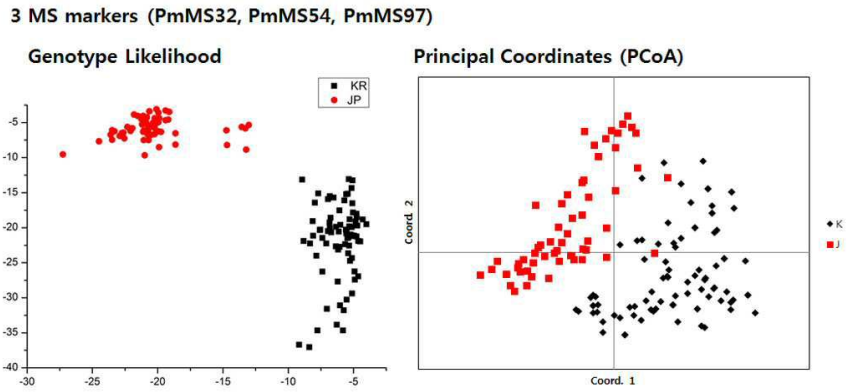
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> microsatellite marker for identification of geographical origin of Pagrus major and its use

<130> PN2106-299

<160> 27

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS28_primer_F

<400> 1

tggaaactgg gagaaacggg 20

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS28_primer_R

<400> 2

catgcagatt aaacaaagag aagaaat 27

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS31_primer_F

<400> 3

tccactgagt taaagggtcc a 21

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS31_primer_R

<400> 4

acaaggcgga tctaatgcgt 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS32_primer_F

<400> 5

cagcctgaca gctctcacat 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS32_primer_R

<400> 6

attgggaaat ggcagcgcat 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS37_primer_F

<400> 7

actttgaacc ctgagccaca 20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS37_primer_R

<400> 8

tcttcaatgt gtgagtgggc t 21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS53_primer_F

<400> 9

tgagatcatc ctcctcccag a 21

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS53_primer_R

<400> 10

aggttctcat catttccctg gg 22

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS54_primer_F

<400> 11

gcggcagcaa caacgatttt 20

<210> 12

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS54_primer_R

<400> 12

tgcctgtttt tcgtttgatt ttgt 24

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS76_primer_F

<400> 13

acggctcacc ttggatttga 20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS76_primer_R

<400> 14

ccacgagtga atgtgttccc 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS78_primer_F

<400> 15

tgcatgtacc tctctgtgcc 20

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS78_primer_R

<400> 16

tgcaggattc agaaccagat gt 22

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS97_primer_F

<400> 17

gccaggacag aaaatgaagc a 21

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS97_primer_R

<400> 18

gcagcatctt caaaggcacc 20

<210> 19

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS28

<400> 19

tgggagaaac gggtaccctg ggtccgtctg acacacacac acacacacac acacacacac 60

acacacacac atatatatat actgtatatg tatttcttct 100

<210> 20

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS31

<400> 20

caacttttca cccactaagt cataatcctc taataataat aataataata ataatatatg 60

acgcattaga tccgccttgt tcca 84

<210> 21

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS32

<400> 21

ccccgtgcca tgaagccacg cacatactgt acacacacac actcacgcgt acacacacac 60

acgcaaatgc gctgccattt cccaatgcca ga 92

<210> 22

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS37

<400> 22

attttgctgt tttatgtgtg tgtgagttta tgtgtgtgtg tgtcgccagc ccactcacac 60

attgaagagg tt 72

<210> 23

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS53

<400> 23

gtttgagatc atcctcctcc cagagcctct gagagagaga gagagagaga aaaaaacaga 60

atccaataaa ttggctgcaa 80

<210> 24

<211> 81

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS54

<400> 24

agatgctttg gtacgctaca gagaacacct caacaacaac aacaacaaca acagaaagaa 60

aacaaaatca aacgaaaaac a 81

<210> 25

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS76

<400> 25

tccccaggcc gctttgtcct gaacacgaaa acacacacac acacacacac agttagagaa 60

actgggaaca cattcactcg 80

<210> 26

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS78

<400> 26

tctctgtgcc tcacagacac acagacacag acacacacac acacacattc caacacacac 60

gtgctgacag ccatga 76

<210> 27

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PmMS97

<400> 27

caggacagaa aatgaagcat gccagagaaa gtgtgtgtgt gtgtgtggaa agtgaatgag 60

taacctcctc tcgcca 76

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 3

【변경전】

PmMS28 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 1 내지 2로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS31 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 3 내지 4로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS32 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 5 내지 6로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS37 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 7 내지 8로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS53 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 9 내지 10으로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS54 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 11내지 12로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS76 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 13 내지 14로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS78 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 15 내지 16으로 표시되는 프라이머 쌍; 및

PmMS97 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 17 내지 18로 표시되는 프라이머 쌍으로 이루어진 국내산과 일본산 참돔 판별용 프라라이머 세트.

【변경후】

PmMS28 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 1 내지 2로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS31 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 3 내지 4로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS32 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 5 내지 6로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS37 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 7 내지 8로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS53 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 9 내지 10으로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS54 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 11내지 12로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS76 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 13 내지 14로 표시되는 프라이머 쌍;

PmMS78 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 15 내지 16으로 표시되는 프라이머 쌍; 및

PmMS97 마이크로새틀라이트 마커를 특이적으로 증폭할 수 있는 서열번호 17 내지 18로 표시되는 프라이머 쌍으로 이루어진 국내산과 일본산 참돔 판별용 프라이머 세트.