



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0139815
(43) 공개일자 2017년12월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6888 (2013.01)
C12Q 1/686 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0072215

(22) 출원일자 2016년06월10일
심사청구일자 2016년06월10일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자
김현우

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교 자원생물
학과 (대연동)

윤태호

부산광역시 북구 금곡대로 268, 408동 2101호 (화
명동, 화명대림타운)

강혜은

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교 자원생물
학과 (대연동)

(74) 대리인
김순용

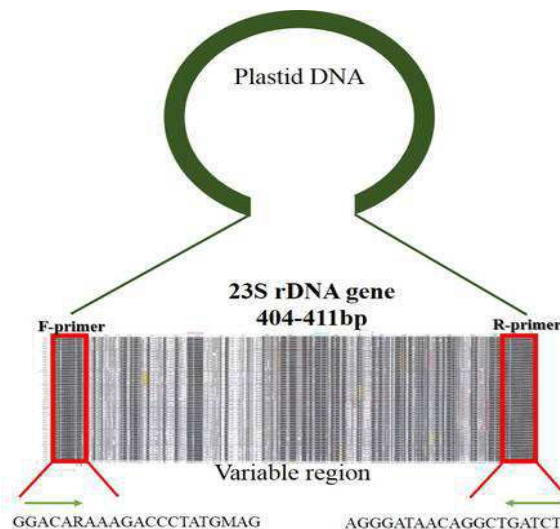
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 식물 플랑크톤 분류군 분석용 프라이머 세트 및 이를 이용한 분석 방법

(57) 요약

본 발명은 신규한 식물 플랑크톤의 분류군(taxa) 분석용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 식물 플랑크톤의 분류군 분석용 키트 및 이를 이용한 식물성 플랑크톤의 분류군 분석 방법에 관한 것이다. 본 발명의 식물 플랑크톤 분류군(taxa) 분석용 프라이머 세트를 이용 시, 기존의 시퀀싱 시스템에 비하여 대량으로 경제적이고 신속하게 식물 플랑크톤의 분류군(taxa)을 정성적 및 정량적으로 분석할 수 있는 효과가 있다. 또한, 종래 프라이머 세트 보다 박테리아의 증폭을 억제하여 과량 증폭 및 허위 증폭을 방지하여 정확하게 식물 플랑크톤 분류군을 분석할 수 있다. 따라서, 해양 생태계 조사, 적조 경보 모니터링, 해양 생태계의 1차 생산력 조사, 주요 해양생물의 먹이 생물 분석, 생태계 교란 및 외래 유입종에 대한 분석 등과 같은 해양 생물 및 자원 모니터링 사업과 가공식품의 원재료 분석 사용에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 1/6869 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 식물 플랑크톤의 분류군(taxa) 분석용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 식물 플랑크톤은 사족충류(cercozoa), 녹조류(chlorophyta), 은편모조류(cryptophyta), 남세균(cyanobacteria), 착편모조류(haptophyte), 홍조류(rhodophyta), 와편모조류(Dinophyta), 스트렙토티류(Streptophyta) 및 대롱편모조류(Ochrophyta)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 식물 플랑크톤의 분류군 분석용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 색소체 DNA(Plastid DNA)의 23s rDNA 유전자에서 유래된 것을 특징으로 하는, 식물 플랑크톤의 분류군 분석용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 프로테오박테리아(proteobacteria)의 검출 비중이 낮은 것을 특징으로 하는, 식물 플랑크톤의 분류군 분석용 조성물.

청구항 5

제1항의 조성물을 포함하는 식물 플랑크톤의 분류군 분석용 키트.

청구항 6

(1) 식물 플랑크톤의 DNA를 추출하는 단계;

(2) 상기 (1)의 DNA를 주형으로 하고 서열번호 1 및 2으로 표시되는 프라이머 세트를 이용하여 증폭을 수행하는 단계;

(3) 상기 (2)의 증폭 산물에 대한 서열을 분석하고 식물 플랑크톤을 분석하는 단계; 를 포함하는 식물 플랑크톤의 분류군 분석 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 (2) 단계의 증폭은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction), Nested-중합효소연쇄반응(Nested-Polymerase Chain Reaction), 다중 중합효소연쇄반응(multiplex Polymerase Chain Reaction, multiplex PCR), 경쟁적 중합효소연쇄반응(competitive Polymerase Chain Reaction), 실시간 중합효소연쇄반응(real-time Polymerase Chain Reaction), 정량적 중합효소연쇄반응(Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction), DNA 칩(DNA chip) 및 등온증폭법(Loop-mediated isothermal amplification)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 방법인 것을 특징으로 하는, 식물 플랑크톤의 분류군 분석 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

(3) 단계의 분석은 차세대 염기서열 시퀀싱(Next-generation sequencing), 생어 시퀀싱(Sanger sequencing), 단일-분자 실시간 분석법(Single-molecule real-time sequencing), 이온 반도체 분석(Ion semiconductor), 파이로 시퀀싱(Pyrosequencing), SBS(Sequencing by synthesis), SBL(Sequencing by ligation) 및 연쇄 정지반응(Chain termination)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 방법인 것을 특징으로 하는, 식물 플랑크톤의 분류군 분석 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 식물 플랑크톤의 분류군(taxa) 분석용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 식물 플랑크톤의 분류군 분석용 키트 및 이를 이용한 식물성 플랑크톤의 분류군 분석 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 플랑크톤(plankton)은 수중생물 중에서 운동능력이 전혀 없거나 매우 약해 물에 떠돌며 생활하는 생물 군이며 부유(浮遊)생물이라고도 한다. 플랑크톤 이외의 생물군도 그 대부분은 번식의 한 시기를 플랑크톤으로 지내는데, 이것을 유생(幼生)플랑크톤이라고 하며 어미와 전혀 다른 형태를 보인다. 플랑크톤은 분류학적으로 식물플랑크톤과 동물플랑크톤으로 구별할 수 있다. 식물 플랑크톤은 체내에 클로로필 등의 색소를 갖고 광합성 하는 것으로 독립영양을 하고, 규조류, 남조류, 녹조류 및 편모조류 등이 포함되고, 동물에서는 요각류, 모악류 및 살파류 등이 포함된다.

[0003] 생물학의 발전에 따라 생물 분류 체계에도 변화가 뒤따랐으며, 현미경이 발명됨에 따라 생물을 분류할 수 있는 방법이 발전되어 왔다. DNA 염기서열을 중심으로 한 분자 형질을 이용하여 생물의 계통을 연구하는 분야를 분자 계통학(molecular systematics)라고 하며 이는 전체 생물의 분류체계에 큰 변화를 가져왔다. 그 중 DNA 기반 종 분석은 노동 또는 시간 소비 형태분석법과 비교하여 볼 때 유용하고 유망한 도구이다. 또한, DNA 바코딩 프로젝트는 약 20년 전에 시작되었다. 식물 바코드는 미토콘드리아 시토크롬 산화 효소뿐만 아니라 광합성을 하는 생물들이 고유하게 가지는 색소체 DNA(Plastid DNA)나 엽록체 DNA(Chloroplast DNA)내 유전자를 표적으로 한다. 종래에는 기본적으로 모든 시퀀서(sequencer)는 Sanger의 dideoxyribonucleotide analog를 이용한 방식이었는데, 최근 새로운 기법의 시퀀싱 기술이 급속도로 보급되었으며, 그 중 Sanger 방식과 달리 대량의 병렬 데이터 생산이 가능한 차세대 또는 제2세대 시퀀서(Next Generation Sequencer, 2nd Generation Sequencer)가 개발되었다. 상기 NGS 기술은 종 분석을 위한 바코드의 이용이 가능할 수 있도록, 더 많은 양의 바코드 데이터를 생산할 수 있게 만들어졌다. 현재 NGS 시퀀싱 시스템을 사용한 종 분석은 454 파이로시퀀싱(454 pyrosequencing) 전략에 의해 이루어지고 있다(Roche). 상기 454 파이로시퀀싱 전략은 더 긴 서열을 판독할 수 있지만(700 bp), 유사한 시퀀스 데이터 양을 얻기 위해 상대적으로 고비용이 드는 것이 문제로 대두되고 있다. 최근 Illumina사의 HiSeq 또는 MiSeq을 이용한 유전자 분석방법이 나왔으나, 454 파이로시퀀싱을 이용하여 분석 가능한 서열(~700bp)에 비해 상대적으로 짧은 서열(~300 bp)을 분석할 수 있기 때문에, 상기 Illumina사의 HiSeq 또는 MiSeq을 이용한 유전자 분석 방법은 바코드 분석에는 고려되고 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 이에 본 발명자들은 차세대 시퀀서(NGS)를 이용하여 식물 플랑크톤의 분류군(taxa)을 분석하기 위해 연구하였다. 신규한 식물 플랑크톤 분류군(taxa) 분석용 프라이머 세트를 디자인하였고 이를 이용하여 증폭된 DNA 서열을 Illumina MiSeq sequencer로 분석한 결과, 기존의 시퀀싱 시스템에 비하여 박테리아의 증폭을 억제하여 과량 증폭 및 허위 증폭을 방지하여 정확하게 식물 플랑크톤 분류군을 분석할 수 있음을 확인하였다. 또한, 경제적이고 신속하게 대량으로 식물성 플랑크톤에 대한 분류군(taxa)을 정성적 및 정량적으로 분석할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0005] 본 발명의 목적은 식물 플랑크톤의 분류군(taxa) 분석용 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 또한 본 발명의 목적은 상기 조성물을 포함하는 식물 플랑크톤의 분류군 분석용 키트를 제공하는 것이다.

[0007] 또한 본 발명의 목적은 상기 조성물을 이용한 식물 플랑크톤의 분류군 분석 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1 및 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 식물 플랑크톤의 분류군(taxa) 분석용 조성물을 제공한다.

[0009] 또한 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 식물 플랑크톤의 분류군 분석용 키트를 제공한다.

[0010] 또한 본 발명은 (1) 식물 플랑크톤의 DNA를 추출하는 단계; (2) 상기 (1)의 DNA를 주형으로 하고 서열번호 1 및 2으로 표시되는 프라이머 세트를 이용하여 증폭을 수행하는 단계; (3) 상기 (2)의 증폭 산물에 대한 서열을 분석하고 식물 플랑크톤을 분석하는 단계; 를 포함하는 식물 플랑크톤의 분류군 분석 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 식물 플랑크톤 분류군(taxa) 분석용 프라이머 세트를 이용 시, 기존의 시퀀싱 시스템에 비하여 대량으로 경제적이고 신속하게 식물 플랑크톤의 분류군(taxa)을 정성적 및 정량적으로 분석할 수 있는 효과가 있다. 또한, 종래 프라이머 세트 보다 박테리아의 증폭을 억제하여 과량 증폭 및 허위 증폭을 방지하여 정확하게 식물 플랑크톤 분류군을 분석할 수 있다. 따라서, 해양 생태계 조사, 적조 경보 모니터링, 해양 생태계의 1차 생산력 조사, 주요 해양생물의 먹이 생물 분석, 생태계 교란 및 외래 유입종에 대한 분석 등과 같은 해양 생물 및 자원 모니터링 사업과 가공식품의 원재료 분석 사용에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 식물 플랑크톤의 샘플링 영역을 표시한 도이다.

도 2는 23S rDNA 핵산 서열의 410-417bp 가변 영역 및 본 발명의 프라이머 영역을 나타낸 도이다.

도 3은 end-pairing을 이용한 p23 조립 서열(contiguous sequences)을 모식화한 도이다.

도 4는 본 발명의 식물 플랑크톤의 분류군 분석용 프라이머 세트를 이용하고 각 상동성(%)을 확인하여 식물 플랑크톤 분류군을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 식물 플랑크톤의 분류군 분석용 프라이머 세트를 이용하여 주요 식물 플랑크톤의 문(phylum)의 비율을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 식물 플랑크톤의 분류군 분석용 프라이머 세트를 이용하여 규조류 중 채토세로스 심플렉스(*Chaetoceros simplex*)의 단상형을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 식물 플랑크톤의 분류군 분석용 프라이머 세트를 이용하여 규조류 중 캐토세로스 심플렉스(*Chaetoceros simplex*)의 단상형에 대한 구체적인 비율을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 서열번호 1 및 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 식물 플랑크톤의 분류군(taxa) 분석용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 디제너레이트(degenerate) 프라이머로서, 한 종류의 아미노산이 복수의 코돈(codon)에 대응하는 "디제너러시(degeneracy)" 현상을 이용하여 제작한 프라이머이다. 디제너러시 현상으로 인하여 어떤 특이한 아미노산 서열을 코드하는 유전자의 염기서열은 결정할 수 없지만, 가능성이 있는 염기서열 모두를 포함하는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)를 합성할 수 있다. 예를 들어 프롤린-시스테인-알지닌(Pro-Cys-Arg)의 트리펩타이드(tripeptide)를 생각해 보면, 이 아미노산 서열에 대응하는 코돈은 프롤린이 4종류, 시스테인이 2종류, 알지닌이 6종류로 $4 \times 2 \times 6 = 48$ 종류이다. 실제로 48 종류의 코돈의 조합으로 디제너레이트 올리고뉴클레오타이드를 합성할 때는 복수의 뉴클레오타이드에 대응하는 위치에서는 해당 아미디티(amidite)를 혼합하여 합성한다. 따라서, 디제너레이트 올리고뉴클레오타이드의 조합의 종류는 코돈의 조합보다 많아 질 수도 있지만, 이 올리고뉴클레오타이드 혼합물 중 한 종류는 트리펩타이드를 코드하는 유전자와 완전히 일치한다. 만일 조합의 수가 그다지 많지 않고 적당한 길이의 디제너레이트 올리고뉴클레오타이드를 디자인할 수 있다면, 이 올리고뉴클레오타이드는 비교적 특이성 높은 프라이머로서 작용한다. 이와 같은 디제너레이트 올리고뉴클레오타이드를

프라이머로 사용하여 중합효소연쇄반응을 수행 시 아미노산 서열정보를 바탕으로 그 단백질을 코드하는 유전자의 DNA 단편이 얻어질 가능성이 있다.

- [0015] 본 발명에 있어서 상기 "분석"은 분석 대상 생물학적 시료에 있는 식물 플랑크톤이 각각 어떠한 분류군(taxa)에 속하는지를 판별하는 것을 의미한다.
- [0016] 상기 분석은 "정량적 분석" 및 "정성적 분석"으로 나눌 수 있으며, 상기 "정량적 분석"은 혼합된 샘플상에서 식물 플랑크톤의 특정 분류군이 어떤 비율을 차지하는지를 알아내는 것을 말한다. "정성적 분석"은 혼합된 샘플상에서 어떠한 생물종이 있는지 확인할 수 있음을 뜻한다.
- [0017] 본 발명에 있어서 상기 "식물 플랑크톤"은 수중에서 부유생활을 하고 있는 단세포조류(單細胞藻類)의 총칭으로, 식물 플랑크톤은 체내에 클로로필 등의 색소를 갖고 광합성에 의해 독립영양을 한다.
- [0018] 상기 식물 플랑크톤은 사족충류(cercozoa), 녹조류(chlorophyta), 은편모조류(cryptophyta), 남세균(cyanobacteria), 착편모조(haptophyte), 홍조류(rhodophyta), 와편모조류(dinophyta) 및 대롱편모조류(ochrophyta)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 상기 프라이머 세트는 색소체 DNA(Plastid DNA)의 23s rDNA 유전자에서 유래될 수 있다.
- [0020] 상기 조성물은 프로테오박테리아(proteobacteria)의 검출 비중이 낮으나 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 상기 "프로테오박테리아(proteobacteria)"는 16S rRNA 서열 분석에 의해 계통발생학적으로 관련이 있다고 보이는 1차적으로는 그람 음성균인 세균의 큰 그룹을 지칭한다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 식물 플랑크톤의 분류군(taxa) 분석용 프라이머 세트를 제작하였다(표 1). 본 발명의 식물 플랑크톤 분석용 프라이머 세트는 1) Illumina MiSeq sequencer를 이용할 수 있는 최대의 길이를 확보하였다. MiSeq 분석 시스템의 최대 관독 서열은 600 bp (300 + 300)이기 때문에, 약 410 bp로 증폭하는 프라이머 세트에 대한 보존 영역을 찾아 수정 및 변형 과정을 거쳐 디자인 하였다. 2) 본 발명의 식물 플랑크톤 분석용 프라이머 세트는 디제너레이트(degenerate) 프라이머이므로 여러종류의 서열이 혼재되어 있으며 각각의 최적 증폭 조건이 상이하여 전체 식물 플랑크톤 중 특정 종의 과다 증폭이나 억제이 일어나기 쉽다. 따라서, 증폭을 위한 1개의 프라이머 세트를 이용하여 특정 프라이머의 증폭을 막고 최소한의 PCR 반복(15 cycles)을 통해 과다 증폭이나 억제를 최소화하였다.
- [0023] 상기 프라이머 세트를 이용하여 식물 플랑크톤의 DNA를 증폭한 후 DNA 라이브러리를 구축하였다. 그 후, Illumina MiSeq sequencer를 이용하여 식물성 플랑크톤의 DNA 서열을 분석하여 데이터를 구축하였다. 그 후 바코드 데이터 및 상기 데이터로 생성된 조립 서열(366bp 내지 373bp)를 사용하여 23S rDNA 데이터를 기반으로 하는 BLASTn search(상동성 $\geq 97\%$)를 수행하여 식물 플랑크톤의 분류군을 분석하였다. 본 발명의 식물 플랑크톤의 분류군(taxa) 분석용 프라이머 세트를 이용 시 식물성 플랑크톤이 아닌 프로테오박테리아의 검출 비중이 낮고, 종래 프라이머 세트보다 은편모조류 및 스트랩토류를 포함한 식물성 플랑크톤을 효과적으로 검출함을 확인하여, 과량 증폭 및 허위 증폭을 방지하고 효과적으로 식물성 플랑크톤 분류군 분석에 이용할 수 있음을 확인하였다.
- [0024] 또한, 기존의 시퀀싱 시스템에 비하여 식물 플랑크톤의 분류군을 정성적 및 정량적으로 분석하고, 경제적이고 신속하며 대량으로 분류할 수 있는 효과가 있다.
- [0026] 또한 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 식물 플랑크톤의 분류군 분석용 키트를 제공한다.
- [0027] 본 발명의 키트는 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함할 수 있으며, 내열성 DNA 중합효소, dNTPs, 버퍼 등을 포함할 수 있다. 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 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.
- [0029] 또한 본 발명은 (1) 식물 플랑크톤의 DNA를 추출하는 단계; (2) 상기 (1)의 DNA를 주형으로 하고 서열번호 1 및 2으로 표시되는 프라이머 세트를 이용하여 증폭을 수행하는 단계; (3) 상기 (2)의 증폭 산물에 대한 서열을 분

석하고 식물 플랑크톤을 분석하는 단계; 를 포함하는 식물 플랑크톤의 분류군 분석 방법을 제공한다.

- [0030] 상기 (2) 단계의 증폭은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction), Nested-중합효소연쇄반응(Nested-Polymerase Chain Reaction), 다중 중합효소연쇄반응(multiplex Polymerase Chain Reaction, multiplex PCR), 경쟁적 중합효소연쇄반응(competitive Polymerase Chain Reaction), 실시간 중합효소연쇄반응(real-time Polymerase Chain Reaction), 정량적 중합효소연쇄반응(Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction), DNA 칩(DNA chip) 및 등온증폭법(Loop-mediated isothermal amplification)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 방법이고, 바람직하게는, 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 본 발명에 있어서, 상기 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)은 PCR 반응에 필요한 당업계에 공지된 여러 성분을 포함하는 PCR 반응 혼합액을 이용하여 수행될 수 있다. 상기 PCR 반응 혼합액에는 분석하고자 하는 식물 플랑크톤에서 추출된 게놈 DNA와 본 발명에서 제공되는 프라이머 세트 이외에 적당량의 DNA 중합효소, dNTP, PCR 완충용액 및 물(dH_2O)을 포함한다. 상기 PCR 완충용액은 Tris-HCl, MgCl_2 , KCl 등을 포함한다. 이 때 MgCl_2 농도는 증폭의 특이성과 수량에 크게 영향을 준다. 바람직하게는 1.5-2.5 mM의 범위로 사용될 수 있다. 일반적으로 Mg^{2+} 가 과량인 경우는 비특이적인 PCR 증폭산물이 증가하고, Mg^{2+} 가 부족한 경우 PCR 산물의 산출율이 감소한다. 상기 PCR 완충용액에는 적당량의 Triton X-100이 추가로 포함될 수도 있다.
- [0032] 상기 (2) 단계의 증폭은 PCR을 수행하며, 총 10~20회 반복하여 수행할 수 있고, 초기 변성은 90~96℃에서 1~5분; 변성은 90~96℃에서 20~60초, 52~58℃에서 20~60초, 68~75℃에서 20~60초씩 15~25회 반복 수행하였고, 최종 연장은 68~75℃에서 1~5분간 수행하였으나, 바람직하게는, 상기 1차 증폭의 PCR은 총 15회 반복하여 수행할 수 있고, 초기 변성은 94에서 3분; 변성은 94에서 30초, 55에서 30초, 72에서 30초씩 15회 반복 수행하였고, 최종 연장은 72에서 3분간 수행할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 상기 (3) 단계의 분석은 차세대 염기서열 시퀀싱(Next-generation sequencing), 생어 시퀀싱(Sanger sequencing), 단일-분자 실시간 분석법(Single-molecule real-time sequencing), 이온 반도체 분석(Ion semiconductor), 파이로 시퀀싱(Pyrosequencing), SBS(Sequencing by synthesis), SBL(Sequencing by ligation) 및 연쇄 정지반응(Chain termination)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 방법을 이용하고, 바람직하게는 차세대 염기서열 시퀀싱(Next-generation sequencing)을 이용하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 본 발명에 있어서, "차세대 염기서열 시퀀싱(Next-generation sequencing)"은 Massive parallel sequencing, 대용량 염기서열 분석법, 또는 대규모 병렬형 염기서열 분석법이라고 한다. 하나의 유전체를 무수히 많은 조각으로 분해하여 각 조각을 동시에 읽어낸 뒤, 얻은 데이터를 생물 정보학적 기법을 이용하여 조합함으로써 방대한 유전체 정보를 빠르게 해독하는 분석법을 의미한다. 기존의 Sanger 방식과 달리 대량의 병렬 데이터 생산이 가능하고, DNA 서열에 대한 증폭을 하고 그 후 형광 표식 등을 카메라로 찍어 이미지 처리를 하는 과정을 거쳐 염기를 읽어내는 분석법이다.
- [0035] 상기 차세대 염기서열 시퀀싱의 분석 장비는 사용하는 화학 반응 및 염기서열 검출 원리 등 세부 기술에 따라 고유의 특성 및 장단점에 따라 다양한 플랫폼이 출시되었고, 그 예로, Illumina MiSeq sequencer, Illumina의 HiSeq sequencer, Roche 454 GS FLX+ sequencer, Thermo Fisher사의 Ion Torrent PGM sequencer 또는 Illumina Genome Analyser IIX sequencer 등이 있다.
- [0036] 본 발명의 목적 상, Illumina MiSeq sequencer를 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명에 있어서 상기 "Illumina MiSeq sequencer"는 고체상 증폭(solid-phase amplification)을 사용한다. 본 발명의 Illumina MiSeq sequencer는 기존 대용량 시퀀서인 Illumina HiSeq sequencer의 기법(chemistry)을 그대로 유지하되 장비의 크기가 작고 가격이 낮아 경제적이다. 기존의 454 sequencer를 이용했을 때 하나의 23S rDNA 서열을 읽는데 드는 비용이 1센트 정도이라면 본 발명에서 적용하는 Illumina MiSeq sequencer는 2 x 300bp 에서 0.02 센트의 비용이 들어 약 50배 정도의 가격 경쟁력이 있으며 경제적이다.
- [0039] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 자세히 설명하도록 한다. 하기 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0041] 실시예 1. 식물 플랑크톤 채집 및 DNA 추출

[0042] 식물 플랑크톤의 분류군을 정성적 또는 정량적으로 분석하기 위하여, 식물 플랑크톤 채집하고 DNA 추출하였다.

[0043] 동해 남부해역 2지역을 선정하고(도 1), CTD(Conductivity, Temperature, Depth)를 통하여 정점의 수온, 염분 등 해수의 특징 관측하였다. 세키 디스크(Secchi disk)를 이용하여 해수의 투명도를 확인한 뒤 니스킨 보틀(Niskin bottle)을 이용하여 식물 플랑크톤을 채집하고 알코올로 고정하였다.

[0044] 상기 채집된 식물 플랑크톤은 멤브레인 필터(0.47 μ m)를 이용하여 필터링한 뒤 생물체량(g) 및 엽록소(chlorophyll)(μ g/L)를 측정하였다. 그 후, 액체 질소 및 막자 사발을 이용하여 균질화한 뒤 식물성 플랑크톤으로부터 DNA를 추출하였다.

[0046] 실시예 2. 식물 플랑크톤의 분류군(taxa) 분석용 프라이머 제작

[0047] 식물 플랑크톤의 분류군을 정성적 또는 정량적으로 분석하기 위하여, 하기와 같이, 프라이머 세트를 디자인하였다. 본 발명의 식물 플랑크톤의 분류군(taxa) 분석용 프라이머 세트는 디제너레이트(degenerate) 프라이머이다.

[0048] 구체적으로, MiSeq 분석 시스템의 최대 판독 서열은 600 bp(300 + 300)이기 때문에, 약 410 bp로 증폭하는 식물 플랑크톤의 분류군(taxa) 분석용 프라이머 세트를 제작하기 위하여 식물 플랑크톤의 색소체 DNA의 보존 영역을 찾았으며, 구체적으로는 전장 23S rDNA 유전자의 핵산 시퀀스를 비교하기 위해 배열하였다. 상기 시퀀스는 8개의 문(phylum), 47 종(species)으로 이루어져 있다: 남세균(cyanobacteria)-5, 착편모조류(haptophyte)-8, 홍조류(rhodophyta)-5, 은편모조류(cryptophyta)-6, 와편모조류(dinophyta)-3, 규조류(Diatom)-8, 녹조류(chlorophyte)-6, 유글레나류(euglenozoa)-6. 기존의 프라이머 보다 PCR 산물의 사이즈가 6bp 길며, 디제너레이트(degenerate)를 포함하고 있어 기존 프라이머의 약점을 보완할 수 있게 디자인하였다(도 2, 표 2). 디자인된 식물 플랑크톤 분석용 프라이머(서열번호 1 및 2)를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

Primer Name	서열번호	Sequences 5'-3'
NGSPHYTOF1	서열번호 1	GGA CAR AAA GAC CCT ATG MAG
NGSPHYTOR1	서열번호 2	AGA TCA GCC TGT TAT CCC T

표 2

Current study	PhytoF	5'	G	G	A	C	A	R (A/G)	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	T	G	M (A/C)	A	G	3'
Alison&Gemot(2007)	P23Rv _f1	5'	G	G	A	C	A	G	A	A	A	G	A	C	C	C	T	A	T	G	A	A	-	3'
Phylum	Total																							
Chlorophyta	113		113	113	113	113	113/0	113	113	113	113	113	113	113	113	113	113	113	113	113	113/0	113	113	
Cryptophyta	54		54	54	54	54	0/54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54	54/0	54	54	
Euglenophyta	141		141	141	141	141	0/141	141	141	141	141	141	141	141	141	140 /1*	141	141	141	141	137/4	141	141	
Ochrophyta	26		26	26	26	26	0/26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26	26/0	26	26	
Streptophyta	198		198	198	198	198	0/198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198/0	198	198	
Dinophyta	13		13	13	13	13/13	13	1/12	13	13	13	13	12 /1**	13	13	13	13	13	13	13	13/0	13	12/1*	
Cyanobacteria	195		195	195	195	195	0/195	195	195	195	195	195	195	195	195	195	194 /1*	195	195	195	195/0	195	195	
Proteobacteria -alpha	198	*	198	198	198	1	0/197**	0/198	198	198	198	196/ 2*	198	198	198	198	96 /102*	109 /89**	198	198	98/100	198	198#	
Proteobacteria -beta	198	*	198	198	198	198**	0/198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198*	198	198	198/0	198	198#		
Proteobacteria -gamma	198	*	198	198	198	198**	0/198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198*	1/ 197**	198	198	181/17	198	198*	
Proteobacteria -delta	151	*	151	147 /4**	147 /4*	21 /126**	0/151	147 /4**	151	151	147 /4*	147 /4**	147 /4*	151	151	32 /119*	15 /132**	142 /9**	142 /5*/ 7**	90/54 /7**	143 /8*	147* /4*		
Proteobacteria -Epsilon	198	*	198	198	198**	198**	0/198	196 /2**	190 /8**	198	198	198	198	198	198	198	198*	198**	198	198	0/48/15 0**	198	198*	

[0051]

[0053] 실시예 3. 식물 플랑크톤의 분류군(taxa) 분석용 프라이머 세트를 이용한 DNA 증폭 및 라이브러리 구축

[0054] 상기 실시예 2에서 제작한 프라이머 세트를 이용하여 식물 플랑크톤의 DNA를 증폭한 후 각 DNA 라이브러리를 구축하였다.

[0056] 3-1. 식물성 플랑크톤의 분류군(taxa) 분석용 프라이머 세트를 이용한 식물성 플랑크톤의 DNA 증폭

[0057] DNA 증폭 시, 전체 식물 플랑크톤 중 특정 종의 과다 증폭 및 억제 방지하기 위하여, 최소한의 사이클 수로 단 한번의 증폭을 수행하였다.

[0058] 구체적으로, 증폭은 상기 표 1의 서열번호 1 및 2로 표시되는 NGSPHYTOF1 및 NGSPHYTOR1 프라이머를 이용하여 수행하였다. PCR 반응액은 10ng의 식물 플랑크톤 DNA 샘플, 2 μ l의 NGSPHYTOF1(서열번호 1) 및 NGSPHYTOR1(서열번호 2) 프라이머(200pM), 4 μ l의 dNTPs (10 mM), 0.4 μ l의 Ex Taq Hot Start Version (2U)(Takara Bio Inc. Japan) 및 4 μ l의 10X buffer를 혼합하여 총 40 μ l로 맞추어 이용하였다. PCR은 총 15회 반복하고 하기와 같은 조건으로 수행하였다: 초기 변성(initial denaturation)은 94에서 3분; 변성은 94에서 30초, 55에서 30초, 72에서 30초씩 15회 반복 수행; 최종 연장은 72에서 3분간 수행하였다. PCR 산물은 AccuPrep® Gel Purification Kit(Bioneer, Republic of Korea)를 이용하여 정제한 후, 20 μ l의 용해 버퍼로 용해하였다. 그 후, 전기영동 장치를 이용하여 PCR 산물의 사이즈를 선별하여 PCR 과정 중 변성 단계에서 생긴 비 표적 유전자를 제거하였다. 이 후, 예상되는 사이즈(약 410 bp)를 포함하는 증폭 산물(Amplicons)을 an AccuPrep® Gel Purification Kit(Bioneer, Republic of Korea)를 이용하여 정제하였다. 그 후 정제된 증폭 산물은 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA)을 이용하여 정성 및 정량 분석하였다.

[0060] 3-2. DNA 라이브러리 구축 및 Illumina MiSeq sequencer를 이용한 서열 분석

[0061] DNA 라이브러리는 TruSeq® Sample Preparation kit V2 (Illumina, USA)를 이용하여 제작하였다. 구체적으로, 상기 실시예 3-1 식물성 플랑크톤 DNA(약 410 bp)를 포함하는 증폭 산물(Amplicons)의 말단-복구(End-repair)를 수행하였다. DNA 단편의 각 3' 말단에 단일 A 염기를 삽입하였다, 그 후, 어댑터 라이게이션(Adaptor ligation)을 통하여 다른 인덱스(index)를 지닌 어댑터를 5' 과 3' 말단에 붙여 한번에 24개 샘플을 시퀀싱할 수 있도록 하였다. PCR 강화(PCR enrichment) 후 샘플의 농도를 일정하게 맞추었다. 이후, 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA)를 이용하여 라이브러리 정량을 확인하였고, 시퀀싱은 Illumina MiSeq sequencer(2 * 300 bp pair-ends)를 이용하여 식물 플랑크톤의 DNA 서열 분석을 수행하였다.

[0063] 실시예 4. 데이터 분석을 통한 식물 플랑크톤의 분석

[0064] 상기 실시예 3의 Illumina MiSeq sequencer를 이용하여 분석한 데이터를 토대로 구체적인 식물 플랑크톤의 분류군을 분석하였다.

[0065] 상기 실시예 3에서 Illumina MiSeq sequencer를 이용하여 얻은 데이터 중 하기도 3에 나타난 바와 같이, 어댑터/인덱스 및 QV 20미만 서열은 CLC Genomics Workbench v8.0(CLC Bio, USA)를 이용하여 잘라내었다. Mothur software package v1.35.0(Schloss, Westcott et al. 2009)을 이용하여 6 bp를 초과하는 오버랩핑(overlapping) 서열에 미스매치가 없을 시에만 정방향 및 역방향으로 조립하였다. 조립 서열(contig)은 pdiffs=0 옵션 조건으로 Mothur software package v1.35.0을 이용하여 프라이머를 트리밍(trimming) 하였다. 최종적으로 얻어진 약 3백 만개 이상의 식물 플랑크톤 조립서열은(약 370bp) NCBI(National Center for Biotechnology Information)에서 데이터베이스를 기반으로 하여 BLASTn search(상동성 $\geq$ 97%)를 실시하였다. 특정 조립 서열의 상동성이 97% 이상인 대상이 없을 때는, 그 서열은 "기타"로 표기하였다. 그 결과를 도 4 내지 도 7 및 표 3에 나타내었다.

[0066] 도 4에서 나타난 바와 같이 본 발명의 식물성 플랑크톤의 분류군 분석용 프라이머 세트를 이용하여 식물성 플랑크톤 분류군을 분석한 결과, 상동성이 97% 이상으로 확인된 조립 서열이 약 122여 종임을 확인하였다.

[0067] 또한 도 5에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 식물성 플랑크톤의 분류군 분석용 프라이머 세트를 이용하여 식물성 플랑크톤 분류군을 분석한 결과, 여섯 정점에서 95%이상으로 나오는 분류군이 175개(사족충류(cercozoa), 녹주류(chlorophyta), 은편모조류(cryptophyta), 남세균(cyanobacteria), 착편모조(haptophyte), 프로테오박테리아(proteobacteria), 홍조류(rhodophyta), 육지식물, 와편모조류(dinophyta), 대롱편모조류(ochrophyta) 등)임을 확인하였다.

[0068] 또한, 도 6 및 표 3에 나타낸 바와 같이 본 발명의 식물성 플랑크톤 분류군 분석용 프라이머 세트를 이용하여 규조류 중 채토세로스 심플렉스(*Chaetoceros simplex*)의 275,272개의 조립 서열을 분석한 결과 총 51개의 단상형(haplotype)이 있음을 확인하였다.

[0069] 또한, 도 7에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 식물성 플랑크톤 분류군 분석용 프라이머 세트를 이용하여 채토세로스 심플렉스(*Chaetoceros simplex*)의 단상형을 분석한 결과, 주요 단상형의 약 68% 이상이 ChSi-E1(35%), ChSi-E51(17%), ChSi-E49(9%), ChSi-E50(7%) 이며 나머지 47개의 단상형은 약 32% 임을 확인하였다.

표 3

[0070]

Haplytype Name	Contig수	백분율(%)
ChSi-E1	96652	35.11%
ChSi-E2	617	0.22%
ChSi-E3	160	0.06%
ChSi-E4	2292	0.83%
ChSi-E5	1054	0.38%
ChSi-E6	1043	0.38%
ChSi-E7	296	0.11%
ChSi-E8	127	0.05%
ChSi-E9	187	0.07%
ChSi-E10	188	0.07%
ChSi-E11	2162	0.79%
ChSi-E12	8622	3.13%
ChSi-E13	7114	2.58%
ChSi-E14	860	0.31%
ChSi-E15	5621	2.04%
ChSi-E16	1535	0.56%
ChSi-E17	1248	0.45%
ChSi-E18	683	0.25%
ChSi-E19	430	0.16%
ChSi-E20	2394	0.87%
ChSi-E21	791	0.29%
ChSi-E22	972	0.35%
ChSi-E23	1222	0.44%
ChSi-E24	108	0.04%
ChSi-E25	3826	1.39%
ChSi-E26	3684	1.34%
ChSi-E27	439	0.16%
ChSi-E28	2035	0.74%
ChSi-E29	5647	2.05%
ChSi-E30	641	0.23%
ChSi-E31	265	0.10%
ChSi-E32	2074	0.75%
ChSi-E33	1185	0.43%
ChSi-E34	509	0.18%
ChSi-E35	2226	0.81%
ChSi-E36	1833	0.67%
ChSi-E37	1308	0.48
ChSi-E38	2546	0.92
ChSi-E39	12859	4.67
ChSi-E40	1341	0.49
ChSi-E41	811	0.29

ChSi-E42	1278	0.46
ChSi-E43	432	0.16
ChSi-E44	855	0.31
ChSi-E45	284	0.10
ChSi-E46	629	0.23
ChSi-E47	686	0.25
ChSi-E48	1356	0.49
ChSi-E49	23699	8.61
ChSi-E50	18354	6.67
ChSi-E51	48092	17.47
합계	275272	100

[0072] 실시예 5. 본 발명의 프라이머 및 종래 프라이머 세트를 이용한 식물성 플랑크톤 분류군 분석

[0073] 본 발명의 프라이머 및 종래 프라이머 세트를 비교하여 식물성 플랑크톤 분류군을 분석하고, 식물성 플랑크톤이 아닌 프로테오박테리아(Proteobacteria) 검출 비중을 확인하였다.

[0074] 보다 구체적으로, 상기 표 1의 본 발명의 프라이머 세트와 종래 식물성 플랑크톤 분류를 위한 유니버설 프라이머 세트(Sherwood and Presting (2007))를 이용하여 식물성 플랑크톤을 분류하고, 식물성 플랑크톤이 아닌 프로테오박테리아 검출 비중을 확인하여, 식물성 플랑크톤이 아닌 다른 종류에 대한 허위 증폭 또는 과다 증폭이 되는지 여부를 확인하였다. 또한, 종래 프라이머 세트를 이용할 때보다 본 발명의 프라이머 세트를 이용 시, 효과적으로 식물성 플랑크톤에 속하는 문(Phylum)을 분류하는지 여부를 확인하였다. 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

[0075] 도 4에 나타난 바와 같이, 종래의 프라이머 세트를 이용할 때보다, 본 발명의 프라이머 세트를 이용 시, 프로테오박테리아의 조립 서열(Contigs)이 약 5배 이상 낮음을 확인하였다. 또한, 양(ration)(%)은 약 9배 이상 차이가 남을 확인하였다. 또한, 종래 프라이머 세트는 은편모조류(Cryptophyta) 및 스트렙토포류(Streptophyta)를 검출하지 못함을 확인하였으나, 본 발명의 프라이머 세트는 상기 은편모조류 및 스트렙토포류를 검출함을 확인하였다. 또한, 대룡편모조류, 와편모조류, 착편모조류 및 녹조류 등은 종래의 프라이머 세트보다 본 발명의 프라이머 세트를 이용 시, 조립서열 값 및 양(ration)(%)이 현저히 높음을 확인하였다.

[0076] 따라서, 본 발명의 프라이머 세트는 식물성 플랑크톤이 아닌 프로테오박테리아의 검출 비중이 낮고, 종래 프라이머 세트보다 은편모조류 및 스트렙토포류를 포함한 식물성 플랑크톤을 효과적으로 검출함을 확인하여, 과량 증폭 및 허위 증폭을 방지하고 효과적으로 식물성 플랑크톤 분류군 분석에 이용할 수 있음을 확인하였다.

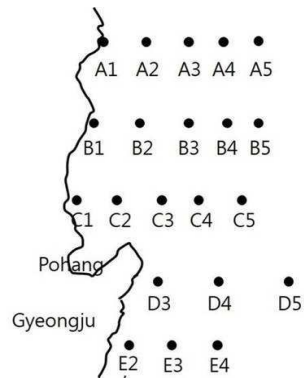
표 4

[0077]

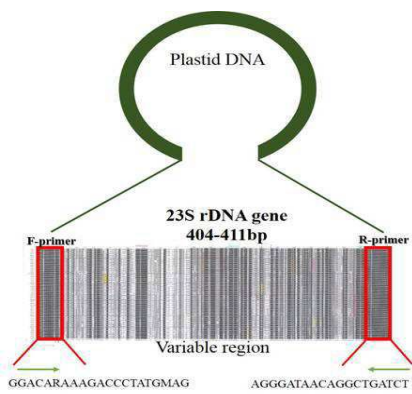
문(Phylum)	본 발명 프라이머 세트		종래 프라이머 세트	
	조립서열 (Contigs)	양(ration) (%)	조립서열 (Contigs)	양(ration) (%)
대룡편모조류(Ochrophyta)	188,987	65.66	25,881	13.95
기타(Others)	56,267	19.55	88,604	47.76
프로테오박테리아 (Proteobacteria)	12,497	4.34	65,014	35.04
와편모조류(Dinophyta)	9,697	3.37	1,605	0.87
착편모조류(Haptophyta)	19,235	6.68	3,855	2.08
녹조류(Chlorophyta)	1,038	0.36	536	0.29
은편모조류(Cryptophyta)	21	0.01	-	-
스트렙토포류(Streptophyta)	49	0.02	-	-
남세균류(Cyanobacteria)	26	0.01	33	0.02
사족충류(Cercozoa)	1	0	-	-
Total	287,818	100	185,528	100

도면

도면1



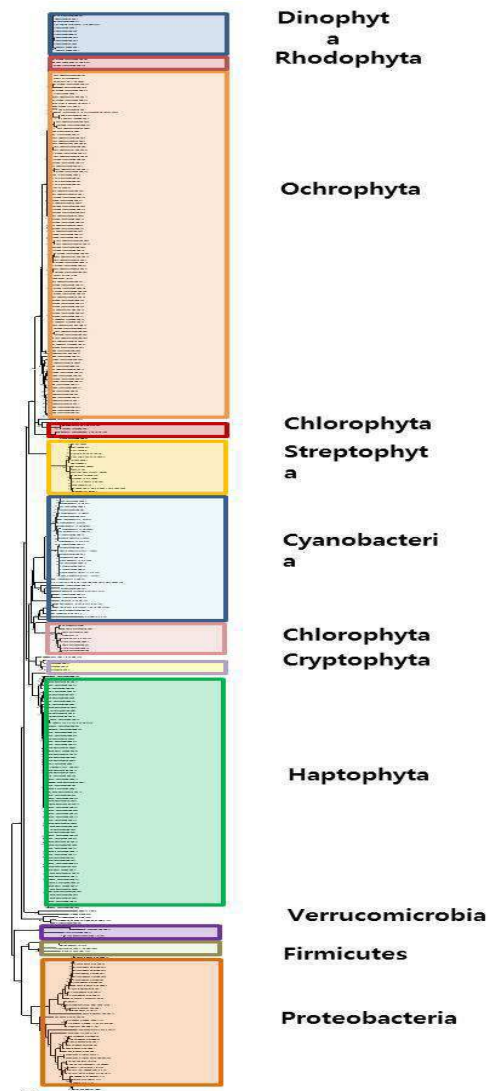
도면2



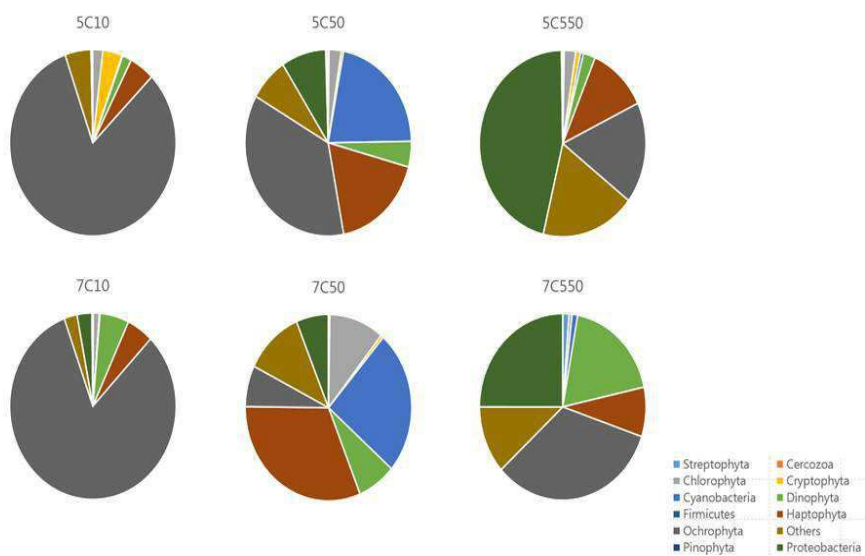
도면3



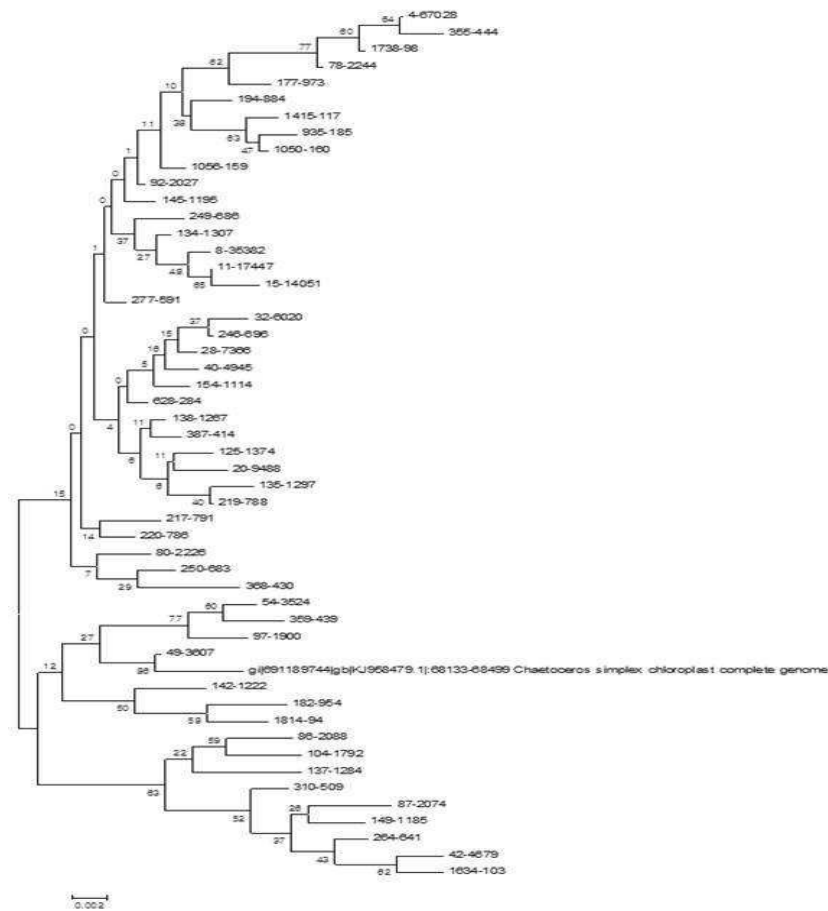
도면4



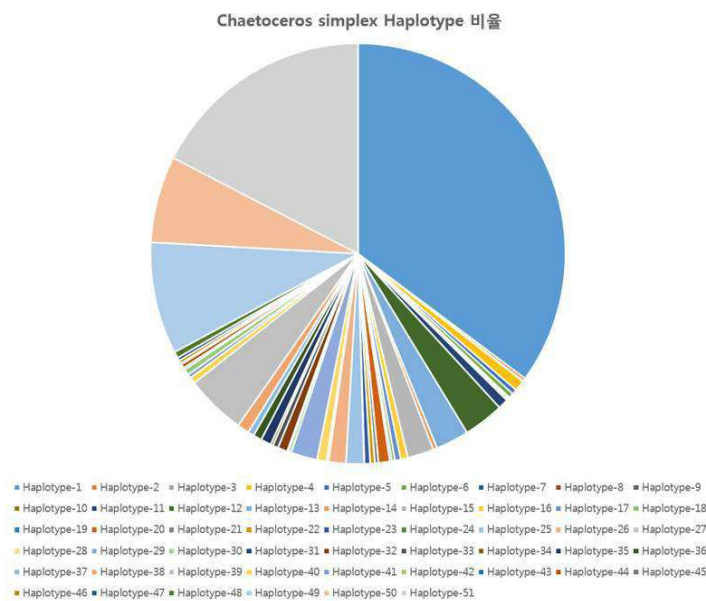
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> The primer set for analysis of phytoplankton taxa and method of

analyzing thereof	
<130> 1-39	
<160> 2	
<170> Kopatent In 2.0	
<210> 1	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NGSPHYTOF1 primer	
<400> 1	
ggacaaaaag accctatgma g	21
<210> 2	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NGSPHYTOR1 primer	
<400> 2	
agatcagcct gttatccct	19