(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0034213
(43) 공개일자 2007년03월28일

(21) 출원번호 10-2005-0088637
(22) 출원일자 2005년09월23일
심사청구일자 2005년09월23일

(71) 출원인 경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자 정종일
경남 진주시 하대동 하대현대아파트 106동 203호
김명식
경남 진주시 주약동 349-2번지
박민정
경남 진주시 신안동 707-1 신안2차주공아파트 203동 203호
조수호
경기 고양시 덕양구 동산동 83-4

(74) 대리인 이덕록

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 대두 쿠니츠 트립신 저해제 단백질의 존재 및 부재를 조절하는 T i 유전자에 밀접하게 연관된 S a t t 228 마커

(57) 요약

본 발명은 대두 쿠니츠 트립신 저해제 단백질(SKTI, soybean kunitz tripsin inhibitor protein)의 존재 및 부재를 조절하는 *Ti*유전자에 밀접하게 연관된 Satt228 마커에 관한 것이다. 대두의 쿠니츠 트립신 저해제 단백질은 가열하지 않거나 불완전하게 가열된 대두 식품에서 소화를 억제시키고 영양학적 품질을 저하시키는 물질이다. 대두에서 SKTI 단백질의 존재는 *Ti*유전자에 의해서 조절되며 SKTI 단백질의 존재가 부재에 대해 우성을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 Satt228 마커는 쿠니츠 트립신 저해제 단백질을 조절하는 *Ti*유전자에 밀접하게 연관된 SSR(simple sequence repeat) 마커로서, SKTI 단백질이 결핍된 새로운 대두 품종의 육성에 있어서 본 발명의 Satt228 마커를 이용하여 쉽게 SKTI 단백질이 결핍된 계통을 선발할 수 있어 대두의 신품종 육성 산업에 있어서 유용한 발명이다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

대두 쿠니츠 트립신 저해제 단백질(SKTI, soybean kunitz trypsin inhibitor protein)의 존재 및 부재를 조절하는 *Ti* 유전자에 밀접하게 연관되어 SKTI 단백질이 결핍된 대두 품종을 선발할 수 있는 Satt228 마커.

청구항 2.

어린 대두 식물체로부터 genomic DNA를 추출한 후 제 1항의 Satt228 마커를 이용하여 PCR 반응, 전기영동을 수행하여 대두 쿠니츠 트립신 저해제 단백질이 결핍된 어린 대두 식물체의 선별방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 대두 쿠니츠 트립신 저해제 단백질(SKTI, soybean kunitz tripsin inhibitor protein)의 존재 및 부재를 조절하는 *Ti* 유전자에 밀접하게 연관된 Satt228 마커에 관한 것이다.

유전자 마커는 유전자 자체는 아니지만 유전자와 유전적으로 매우 "가까이 연관"되어 있어서, 그 마커가 존재하면 곧 당해 유전자가 존재한다고 단정할 수 있을 정도의 고도의 개연성이 있는 경우를 말한다. 즉, 마커란 유전자와의 염색체상의 위치가 매우 가까워서 유전자와 동시에 유전될 확률이 높은 경우이다. 여기서 "가까이 연관"되어 있다는 말은 유전자 마커가 유전 또는 육종에 실용상 활용할 수 있는 정도로 염색체상에 물리적 또는 유전적으로 가까이 위치해 있다는 의미로서, "가까이"란 "실용적 이용 가치가 있는 정도"라는 상대적 의미로 쓰인다.

유전자 마커는 표현형 마커(phenotypic marker)와 생화학적 마커(biochemical marker), 분자 마커(molecular marker)로 대별된다.

표현형 마커는 식물체의 외형상 관찰되는 형질이 특정 유전자의 마커로 가능하는 경우로서, 식별이 용이하다는 장점이 있으나 식물체의 외관상 차이로 판단하기 때문에 환경의 영향을 많이 받을 뿐만 아니라, 생장 초기에 관찰될 수 없는 형질의 경우에는 그 형질이 발현될 때까지 오랜 시간 기다려야 하는 문제가 있다.

생화학적 마커는 주로 단백질이나 효소의 아미노산 서열(길이 또는 조성)상의 다형성(polymorphism)을 마커로 이용하는 경우로서 이 중 동위효소마커가 가장 많이 활용된다. 생화학적 마커는 신속 정확하게 판정할 수 있는 장점이 있으나, 전기영동 겔 상에서 판별될 수 있는 다형유전자가 드물어서 실용상 한계가 있다는 문제가 있다. 여기서, 다형유전자란, 예컨대, 전기영동 겔 상의 밴드가 내성 계통과 감수성 계통의 시료간에 차이를 보이는 경우로서, 이러한 밴드상의 다형성이 멘델법칙에 따라 유전하는 경우에는 일반 표현형 유전자와 동일하게 취급될 수 있기 때문에 붙여진 명칭이다.

분자 마커는 대부분의 경우 DNA 염기서열 상의 다형성을 이용하기 때문에 보통 "DNA 마커"라 부른다. DNA 마커는 전기영동 겔 상에 나타나는 DNA 절편상의 다형성에 근거한 것으로서, 동위효소 마커가 갖는 상기의 장점외에도 내병성과 같은 유용 형질에 대한 마커로 활용할 수 있는 다형유전자가 많다는 장점이 있다. 다형 유전자가 많다는 것은 유전자에 대한 마커를 쉽게 찾을 수 있다는 것을 의미하므로 마커로서 매우 유용하게 활용할 수 있음을 의미한다.

DNA 마커는 DNA 절편상의 다형성을 검출하는 방식에 따라, 염기서열간의 상보성을 이용하는 "hybridization-based marker"와 PCR 기법에 의하는 "PCR-based marker"로 대별된다.

hybridization-based marker는 제한효소 절편에 특이적으로 상보적 결합하는 핵산서열 탐침자를 사용하여 검출되는 제한효소 절편의 크기상의 다형성에 기초한 마커로서, RFLP 마커와 VNTR 마커가 여기에 속한다. 이중 RFLP(restriction fragment length polymophism) 마커는 제한효소 인식부위의 다형성 및 제한효소 인식부위 사이의 삽입이나 결실의 존재 여부에 기인하는, 제한효소 절편의 길이의 차이에 기초한 것이고, VNTR(variable number tandem repeats) 마커는 반복서열 상에서의 반복 수의 차이에서 기인하는, 제한효소 절편의 길이의 차이에 기초한 마커이다. VNTR 마커는 core

sequence의 길이에 따라 두 개의 분류로 나누어 진다. 반복 서열의 길이가 15-70 bp인 것을 minisatellite 라 하고 그 길이가 2-6bp인 것을 microsatellite라고 한다. microsatellite는 SSR(simple sequence repeats) 또는 SSLP(simple sequence length polymorphisms)라고도 불리우며 이들은 짧은 tandem repeats sequences unit으로 보통 2-5bp의 sequence가 반복되는 형태로 나타난다. microsatellite는 매우 다형이 심하기 때문에 genome mapping의 마커로서 이상적이다. microsatellite는 전체 genome에 고르게 분포되어 있고 그 수는 100,000개(every 300 to 500kb) 이른다고 한다.

hybridization-based marker는 Southern hybridzation 기법을 이용하여 검출하므로 재현성은 있으나 마커의 검출에 이용되는 장치나 실험과정이 복잡하고 특히 유용 유전자 마커로 활용될 수 있는 다형유전자유전자를 찾는 일이 쉽지 않다는 문제가 있다.

한편, PCR-based marker는 임의의 또는 특이적 프라이머로부터 연쇄중합반응에 의해 증폭되는 DNA 절편을 전기영동 겔 상에 전개하고, 여기서 검출되는 증폭 DNA 절편(amplified DNA fragments)의 길이의 다형성을 마커로 활용하는 방식이다. PCR-based marker의 예로 RAPD 마커와 AFLP 마커가 있다. RAPD(random amplified polymorphic DNA)마커는 한 종류의 짧은 임의의 프라이머 (보통 9 또는 10 염기서열 길)를 사용하여 게놈 서열상의 임의의 특정 위치에서 PCR 증폭되는 증폭DNA절편의 길이상의 다형성에 기초한 마커이다. RAPD에 의한 방식은 마커를 검출하는 실험과정이 간단하여 대량의 시료를 단시간에 검색할 수 있는 장점이 있으나, PCR 반응시 길이가 짧은 임의 프라이머를 사용하기 때문에 온도를 포함하는 실험조건에 민감하여 재현성이 떨어지는 문제가 있었다. 그러나 재현성이 떨어지는 문제는, RAPD 마커인 DNA절편을 전기영동 겔에서 추출하여 클로닝하고, 이 염기서열을 분석하여, 이 서열을 기초로 특이 프라이머를 설계하여 PCR반응을 수행함으로서 해결될 수 있다. 이를 일명 STS(sequence taaged site) 마커라 한다.

AFLP(apmlified fragment length polymophism) 마커는 가장 최근에 개발된 DNA 마커로서, 전기영동 겔 상에 전개된 제한효소 절편 상의 다형성(restriction fragment polymophism 또는 RFP)을 탐침자가 아닌 연쇄중합반응을 이용하여 검출하는 방식이다. AFLP기법은 탐침자에 상보적으로 결합하는 제한효소 절편만이 밴드상의 다형성 탐색 대상이 되는 RFLP 기법과 달리 "selective probe"에 의해 선택된 제한 효소 절편 전체를 대상으로 DNA 마커 탐색을 할 수 있고, 또 RFLP 기법은 시간과 노력이 많이 소모되는 Southern blot 기술을 이용하지만, AFLP기법은 PCR을 이용하므로 DNA 마커를 매우 효과적으로 찾을 수 있는 장점이 있다.

대두는 그 종자 단백질 및 오일 때문에 우선적으로 생산되고, 인류의 식생활에서 그 중요성이 커지고 있다. 트립신 저해 단백질은 가공하지 않은 성숙된 대두에서 발견되는 주요한 항영양학적(antinutritional) 인자 중의 하나로서 제안되어져 왔다(Westfall R.L. and Hauge S.M. The nutritive quality and the trypsin inhibitor content of soybean flour heated at various temperatures., *J. Nutr.* 35, pp379-389, 1948). 적절한 가열 공정은 프로티아제 저해제를 파괴하기 위하여 필요하지만, 과도한 열처리는 아미노산의 이용가능성을 저하시키며, 동물 체중 획득을 감소시킨다. 감소된 프로티아제 저해제를 갖는 대두는 값비싼 가열 처리의 필요를 감소시키거나 제한시킬 수도 있으며, 낮아진 아미노산 이용가능성을 높일 수도 있을 것이다. 몇몇 다른 트립신 저해제들이 대두에 함유되어 있다고 보고되어져 왔으나(Birk Y., Purification and some properties of a highly active inhibitor of trypsin and chymotrypsin from soybeans., *Biochem. Biophys. Acta* 54, pp378-381, 1961; Frattali V. and Steiner R.F., Soybean inhibitor. I. Separations and some properties of three inhibitors from commercial crude soybean trypsin inhibitors., *Biochemistry* 7, pp521-530, 1968; Kunitz M., Crystallization of a soybean trypsin inhibitor from soybean., *Science* 101, pp668-669, 1945), 많은 대두 트립신 저해제(SBTI, soybean trypsin inhibitor)의 활성이 SBTI-A_2 단백질에 의한 것으로 생각되어 지고(Rackis J.J. et al., Soybean trypsin inhibitors: Isolation, purification and physical properties., *Arch. Biochem. Biophys.* 98, pp471-478, 1962), 이는 일반적으로 쿠니츠 트립신 저해제(kunitz trypsin inhibitor)로 알려져 있다. 대두 쿠니츠 트립신 저해제(SKTI, Soybean kunitz trypsin inhibitor)는 181 잔기를 함유한 작은 단량체이며, 비글라이코실화된 단백질이다. 상기 21.5kDa의 비글라이코실화된 단백질은 쿠니츠에 의해 처음으로 분리되고 대두 종자로부터 결정되어 졌다(Kunitz M., Crystallization of a soybean trypsin inhibitor from soybean., *Science* 101, pp668-669, 1945).

SKTI의 5가지의 전기영동(electrophoretic) 형태가 발견되었다. 네개의 형태인 Ti^a, Ti^b, Ti^c, Ti^d의 유전적 조절이 단일 유전자에서의 공동 우성의 복합 대립 유전자 시리즈로서 보고되어져 왔다(Singh L., Wilson C.M. and Hadley H.H., Genetic differences in soybean trypsin inhibitors separated by disc electrophoresis., *Crop Sci.* 9, pp489-491, 1969; Hymowitz T. and Hadley H.H., Inheritance of a trypsin inhibitor variant in seed protein of soybeans., Crop Sci. 12, pp197-198, 1972; Orf J.H. and Hymowitz T., Inheritance of the absence of the Kunitz trypsin inhibitor in seed protein of soybeans., Crop Sci. 19, pp107-109, 1979). Orf 및 Hymowitz는 다섯 가지의 형태가 대두 트립신 저

해제-A_2 밴드를 나타내지 않고, *ti*를 지정하는 열성 대립유전자로서 유전된다는 사실을 밝혀내었다. 또한 대두 트립신 저해제-A_2 밴드가 결실된 종자로부터의 크루드 종자 단백질은 트립신 저해제 활성이 대두 트립신 저해제-A_2밴드를 가진 'Amsoy 71'과 비교해서 30-50% 감소 되었음을 밝혀내었다.

SKTI 유전자는 대두의 고전적 연관지도에서 그룹 9에 위치하고 있으며(Hidebrand D.F., Orf J.H. and Hymowitz T., Inheritance of an acid phosphatase and its linkage with the Kunitz trypsin inhibitor in seed protein of soybeans., *Crop Sci.* 20, pp83-85, 1980; Kiang Y.T., Mapping three protein loci on a soybean chromosome., *Crop Sci.* 27, pp44-46, 1987), 이는 USDA/Iowa State University 대두 분자의 연관지도의 연관 그룹 A2에 통합되었다(Cregan P.B. et al., An integrated genetic linkage map of the soybean genome., *Crop Sci.* 39, pp1464-1490, 1999).

DNA 마커들은 대두 개량 프로그램과 관련된 연구를 위한 필수적인 도구가 되었다. 몇몇 형태학적 형질을 가진 몇몇 분자 지도들은 대두에서 RFLP(restriction fragment length polymorphism), AFLP(amplified restriction fragment length polymorphism) 및 RAPD(random amplified polymorphic DNA) 마커들을 사용하여 완성되었다(Apuya N.R. et al., Restriction fragment length polymorphism as genetic markers in soybean., *Theoretical and Applied Genetics* 75, pp889-901, 1988; Lark K.G. et al., A genetic map of soybean using an intraspecific cross of two cultivars: 'Minsoy' and 'Noir'. *Theoretical and Applied Genetics* 86, pp901-906, 1993; Akkaya M.S. et al., Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132, pp1131-1139, 1995; Shoemaker R.C. and Specht J.E., Integration of the soybean molecular and classical genetic linkage groups., *Crop Sci.* 35, pp436-446, 1995; Keim P.J. et al., A high density soybean genetic map based on AFLP markers. *Crop Sci.* 37, pp537-543, 1997; Cregan P.B. et al., An integrated genetic linkage map of the soybean genome., *Crop Sci.*, 39, pp1464-1490, 1999). Microsatellites 또는 SSR(simple sequence repeat) 마커들은 매우 다형의, 풍부하면서도 널리 분산된 게놈이다(Cregan P.B. et al., An integrated genetic linkage map of the soybean genome., *Crop Sci.*, 39, pp1464-1490, 1999). SSR 프라이머들이 발전되고 공중에 발표되면서, SSR 마커들은 분자적 대두 연관 그룹에서 이용가능하게 되었다(Cregan P.B. et al., An integrated genetic linkage map of the soybean genome., *Crop Sci.*, 39, pp1464-1490, 1999). 만약 타이트한 연관이 마커 유전자와 그 형질을 조절하는 유저적 유전자 사이에 존재한다면 선호되는 형질을 위해 유전자를 운반하는 분리계 집단에서, 식물 재배자들(plant breeders)은 간접적으로 개체를 선별하기 위해 분자 마커를 이용할 수 있다. AP 유전자는 16.2%의 교차율을 가진 쿠니츠 트립신 저해제(*Ti*)에 연관되어 있음이 밝혀졌다(Hidebrand D.F. et al., Inheritance of an acid phosphatase and its linkage with the Kunitz trypsin inhibitor in seed protein of soybeans. *Crop Sci.*, 20, pp83-85, 1980). 김 등은 두개의 flanking RAPD 마커들(OPO12 및 OPC08)은 *Ti* 유전자로부터 16.0cM의 거리에 연관되어져 있음을 밝혔다.그러나 *Ti* 대립유전자에 강하게 연결되어 있는 분자 마커들은 공개되어 있지 않다.

이에 따라, 본 발명자들은 쿠니츠 트립신 저해제가 결핍된 대두 계통을 용이하게 선발할 수 있는 쿠니츠 트립신 저해제를 조절하는 *Ti* 유전자와 밀접히 연관된 DNA 마커들을 찾기 위하여 RAPD 마커, AFLP 마커 및 SSR 마커를 이용하여 gene mapping을 한 결과, SSR 마커 중의 하나인 Satt228 마커가 *Ti* 유전자와 밀접하게 연관된 것을 (0 cM) 확인함으로서 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 대두 쿠니츠 트립신 저해제 단백질(SKTI, soybean kunitz tripsin inhibitor protein)의 존재 및 부재를 조절하는 *Ti* 유전자와 밀접하게 연관된 Satt228 마커를 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 대두 쿠니츠 트립신 저해제 단백질(SKTI, soybean kunitz tripsin inhibitor protein)의 존재 및 부재를 조절하는 *Ti* 유전자와 밀접하게 연관되어 SKTI 단백질이 결실된 대두 품종을 선발할 수 있는 Satt228 마커를 제공한다.

또한, 어린 대두 식물체로부터 genomic DNA를 추출한 후 Satt228 마커를 이용하여 PCR 반응, 전기영동을 수행하여 대두 쿠니츠 트립신 저해제 단백질이 결핍된 어린 대두 식물체의 선별방법을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

대두 쿠니츠 트립신 저해제(SKTI)는 antiparallel β-sheet 단백질의 패밀리에 속하는 21.5 kDa의 알러지 유발 단백질이며, 181 잔기로 구성되어 있는 작은 단량체이며, 비글라이코실화된 단백질로서, SKTI는 비가열 또는 불완전하게 가열된 대두 식품에 있어서 낮은 영양학적 품질의 주원인이다.

본 발명은 쿠니츠 트립신 저해 단백질(kunitz trypsin inhibitor protein)의 존재 또는 부재를 제어하는 *Ti* 유전자에 연결된 DNA 마커를 동정하기 위하여, Jinpumkong2 품종(*TiTi*)과 C242 (*titi*) 사이의 교차로부터 유래된 집단 및 Clark 품종 (*TiTi*) 과 C242사이의 교배로 맵핑 집단을 구성하는 단계; F1 식물로부터의 F2 종자들을 SKTI 단백질 밴드의 존재를 측정하기 위하여 전기영동으로 분석하는 단계; 1000 RAPD 프라이머, 342 AFLD 프라이머 세트, 35 SSR 프라이머를 사용하여 Jinpumkong2 (SKTI 단배질 존재) 와 C242 (SKTI 단백질 부재) 모본, bulked 모본에서 동시에 다형성을 보이는 마커들을 선발하는 단계; 선발 마커들을 이용하여 Jinpumkong2와 C242 집단에서 *Ti* 유전자와 연관된 마커들을 선발하는 단계; *Ti* 유전자와 연관된 마커들을 Clark와 C242에서 확인하는 단계로 구성되어 있다.

Ti 유전자와 연관된 마커들은 1개의 RAPD 마커 (OPAR15), 2개의 AFLP 마커 (CGTATG, CATACG), 3개의 SSR 마커 (Satt409, Satt228, Satt429) 및 1개의 SKTt 마커 였으며 이들 마커들에 대한 염기서열은 하기와 같다.

[표 1]

마커들의 염기서열

OPAR15	5 ' -ACACTCTGCC-3'
CGTATG	EcoRI-GACTGCGTACCAATTCCGT MseI-GATGAGTCCTGAGTAAATG
CATACG	EcoRI-GACTGCGTACCAATTCCAT MseI-GATGAGTCCTGAGTAAACG
Satt409	Forward CCTTAGACCATGAATGTCTCGAAGATA Reverse CTTAAGGACACGTGGAAGATGACTAC
Satt228	Forward TCATAACGTAAGAGATGGTAAAACT Reverse CATTATAAGAAAACGTGCTAAAGAG
Satt429	Forward GCGACCATCATCTAATCACAATCTACTA Reverse TCCCCATCATTTATCGAAAATAATAATT
SKTt	Forward GATGGTTGGTTTAGACTTTAG Reverse ACCACTAACGGTTTGTTCTTAG

SKTI 단백질의 존재는 SKTI 단백질의 존재가 우성이며(dominant), 쿠니츠 트립신 저해 단백질은 *Ti* 단일 유전자에 의해 조절된다. 7개의 DNA 마커들(1 RAPD, 2 AFLP, 3 SSR, SKTt)과 *Ti* 유전자는 94개의 F2 식물들로 구성된 집단 1에서 유전적으로 연관되어져 있다. 3개의 SSR 마커들(Satt409, Satt228, Satt429)는 10 cM 내로 *Ti* 유전자와 연결되어져 있다. Satt228 마커는 *Ti* 유전자와 강하게 연관되어 있다.

또한, 어린 대두 식물체로부터 genomic DNA를 추출한 후 Satt228 마커를 이용하여 PCR 반응, 전기영동을 수행하여 대두 쿠니츠 트립신 저해제 단백질이 결핍된 어린 대두 식물체를 선별하는 방법을 제공한다.

Satt228 마커는 대두에서 SKTI 단백질 유무를 조절하는 *Ti* 유전자와 밀접히 연관되어져 (0 cM) 있다. 콩에서 *TiTi* (우성순종형태) 또는 *Titi* (잡종형태)의 유전자형은 SKTI 단백질이 있는 형태이고, *titi* (열성순종형태)로 된 유전자형은 SKTI 단백질이 결핍된 형태이다. SKTI 단백질이 있는 종자인지 없는 종자인지에 대한 지금까지의 일반적인 판별은 수확후 SDS 단백질 전기영동을 통하여 21.5 kDa에서의 밴드 유무를 보고 판별한다. 이는 SKTI 단백질이 결핍된 신품종 육종시 파종부터 수확까지 많은 노력과 경비를 요하는 문제이다. *Ti* 유전자와 밀접히 연관된 Satt228 마커는 어린 식물체로부터 genomic DNA을 추출하여 Satt228 마커를 이용하여 PCR 한 후 200 - 150 bp 사이에서의 밴드 유무를 보고 *Ti* 유전자의 형태를 쉽게 알수 있다. 즉 이 식물체가 *TiTi*, *Titi*, *titi* 인지를 쉽게 판별 할 수 있어 수확까지 가지 않더라도 *titi* 개체인 것을 선발하면 SKTI 단백질이 결핍된 것을 선발 할 수 있다. 따라서 SKTI 단백질 결핍 품종 육성에서 선발집단의 많은 개체들로부터 어린 잎을 조금씩 절취하여 Satt228 마커를 이용한 PCR 후 밴드의 유무로 SKTI 단배질이 결핍된 개체를 쉽게 조기에 선발할 수 있다.

이하, 하기의 실시예 및 실험예에 의하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 다만, 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명의 예시일뿐 본 발명이 이에 의하여 한정되지는 않는다.

실시예 1. 식물 제노타입

대두 유전자형 C242(clark derived near isogenic line)은 *titi* 유전자를 가지고 있으며, 대두 쿠니츠 트립신 저해제는 결실되어 있다. C242는 미국 Nebraska-Lincoln 대학의 농학과 교수님 J. Specht으로부터 입수되었다. Jinpumkong2 및 Clark 품종은 쿠니츠 트립신 저해제 단백질 밴드(*TiTi*)를 가지고 있다. 두개의 맵핑 집단을 작성하였는 바, 집단 1은 Jinpumkong2 품종과 C242사이의 교배로부터 유래되었고, 집단 2는 Clark 품종과 C242 사이의 교배로 만들었다. 두 집단의 교배로부터 얻어진 F1 식물체가 온실에서 재배되었고 수확 후 F2 종자를 얻었다.

실험예 1. 쿠니츠 트립신 저해제 유전자형의 결정

상기 실시예 1에서 준비한 집단 1을 위한 F1 식물로부터 98개의 F2 종자와 집단 2를 위한 F1 식물로부터 243개의 F2 종자를 밴드의 존재(SKTI-＇+＇) 또는 부재(SKTI-'null')를 결정하기 위해 전기영동으로 분석하였다. 배를 제외한 각 F2 종자들로부터 떡잎 조각들을 분리하고 각 F2 종자들을 F2 맵핑 집단을 위해 발아시키기 위해 비축하였다.

분리된 자엽을 실온에서 1.56% v/v β-멀캡토에탄올(β-mercaptoethanol)을 함유한 pH 8.0의 Tris-HCl 1㎖에서 30분 동안 두었다. 원심분리를 한 후 상층액 50㎕에 샘플 5배의 버퍼(10% w/v SDS(sodium dodecyl sulphate), 50% v/v 글라이세롤, 1.96% β-멀캡토에탄올, 1M Tris-HCl, pH 6.8)를 첨가한 후 5분 동안 97℃에서 가열한 후 원심분리 하였다. 상층액 2㎕를 Owl 분리 시스템(Model : P9DS, Portsmouth, NH USA)에서 12% 아크릴아마이드 SDS-PAGE 배지 겔에서 전기영동하였다. 전기영동은 7시간 동안 120V에서 수행하였다. 겔은 0.25g의 코마쉬 브릴리언트 블루 R250, 10% 아세트산, 45% 메탄올의 수용액에서 하루 동안 염색하고, 탈염색 용액(5% 아세트산, 14% 메탄올)에서 24시간 탈염색하였다. 21.5 kDa 대두 트립신 저해제 단백질을 함유하는 Wide-Range SDS-PAGE molecular mass standard (Sigma MarkerTM, Product Code : M4038)를 쿠니츠 단백질 밴드를 결실시킨 샘플의 확인을 위해 사용하였다.

상기 실험 수행의 결과, Jinpumkong2 품종과 C242 (집단 1)사이의 교배로부터 얻어진 모본 및 F2 종자에서 나타난 쿠니츠 트립신 저해제 단백질(SKTI)의 밴딩 패턴은 도 1에서 보는 바와 같다. Jinpumkong2 모본은 21.5 kDa 위치에서 SKTI 밴드를 보이며 C242 모본은 밴드가 없으며, F2 종자에서는 SKTI 밴드가 분리되고 잇으며 + 는 밴드의 유 -는 밴드의 무를 나타낸다.

실험예 2. DNA 추출 및 DNA 마커 분석

쿠니츠 트립신 저해제 단백질을 지배하는 *Ti* 유전자와 연관된 마커들을 탐색하기 위하여 단백질 전기영동을 한 후 비축된 F2 종자들은 2004년 5월에 포장에 파종하였다. F2 종자들 사이에서 발아시킨 94개의 개개의 F2 식물들 및 집단 1의 모본 식물들로부터 어린잎들을 채집하였다. 집단 2에서, 243개의 F2 종자들 중 임의의 97개의 F2 종자들을 2005년 4월에 비닐하우스에서 파종하였고, 모본 및 94개의 각각의 F2 식물로부터 어린잎을 채집하였다. Genomic DNA를 CTAB 과정(Saghai Maroof M.A. et al., Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81, pp8014-8018, 1984)을 응용하여 잎 조직으로부터 추출하였다.

RAPD(random amplified polymorphic DNA) 마커의 분석을 위해, One-thousand 10-mer oligonucleotide primers를 Operon Technologies (Alameda, U.S.A)로부터 구입하였다. SSR(simple sequence repeat) 마커를 분석하기 위해, 총 35 SSR 프라이머들을 *Ti* 유전자를 포함하고 있는 대두 분자 연관 지도(Cregan P.B. et al., An integrated genetic linkage map of the soybean genome. *Crop Sci.*, 39, pp1464-1490, 1999)의 A2로부터 선택하였다. 선택된 Satt 프라이머들은 Bioneer, Inc. (Korea)에서 합성하였다.

AFLP(amplified fragment length polymorphic) 마커들을 분석하기 위해, 342 프라이머 세트를 사용하였다. 하나의 특정 프라이머(SKTt)는 *Ti* 유전자의 서열에 기초하여 고안하였다. RAPD, SSR 및 AFLP의 증폭 및 전기영동은 김 등의 방법을 응용하여 수행하였다(Kim M.S. et al., Construction of genetic linkage map for korean soybean genotypes using molecular markers. *Korean J. Crop Sci.*, 48(4), pp297-302, 2003). 쿠니츠 트립신 저해제를 위한 F1 종자 유전자형의 결과에 기초를 하여, F2 식물 집단으로부터 present and absent bulk populations을 만들었다(Michelmore R.W., Paran J. and Kesseli R.V., Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A

rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregation populations., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, pp 9828-9832, 1991). Present and absent bulk population은 각각 20개의 F2 개체를 함유하고 있고, 이는 상대적으로 쿠니츠 트립신 저해제 단백질 전기영동에 기초하여 선별되었다. RAPD, SSR, AFLP 마커들을 먼저 집단 1에서 사용하였다. 집단 1에서 *Ti* 유전자와 연관된 마커들만을 집단 2에서 사용하여 연관을 확인 하였다.

상기 실험 수행의 결과, 집단 1 및 2에서 쿠니츠 트립신 저해제 단백질의 존재 또는 부재에 대한 F2 종자에서의 분리는 하기 표 1에서 보는 바와 같다. SKTI 단백질 밴드를 가진 72개의 종자와 SKTI 밴드를 가지고 있지 않은 26개의 종자가 집단 1에서 관찰되어졌다(χ2=0.12, P=0.70-0.80). 집단 2의 경우, SKTI 단백질 밴드를 가진 185개의 종자와 SKTI 단백질 밴드를 가지고 있지 않은 58개의 종자들이 관찰되어졌다(χ2=0.17, P=0.70-0.80). 종합해보면, SKTI 단백질 밴드를 가진 257개의 종자와 SKTI 단백질 밴드를 가지고 있지 않은 84개의 종자들이 관찰되어졌다(χ2=0.02, P=0.90). 상기 관찰은 SKTI 단백질 밴드의 존재 또는 부재가 단일 유전자의 분리비인 3:1과 일치 하였다.

도 1 및 표 1의 결과, F2 종자(집단 1 및 2)에서 관찰된 3:1의 분리 비율과 Chi-square values은 쿠니츠 트립신 저해제 단백질 밴드는 단일 열성 유전자에 의해 조절됨을 확인할 수 있었다.

[표 2]

F2 종자에서 대두 쿠니츠 트립신 저해제 단백질 밴드의 존재 또는 부재의 비율

	F2 종자 번호		F2 전기영동 밴드		X2	probability
			Ti_	titi		
집단 1	98	observed	72	26	0.12	0.70-0.80
		expected	73.5	24.5		
집단 2	243	observed	185	58	0.17	0.70-0.80
		expected	182.25	60.75		
종합	341	observed	257	84	0.02	0.90
		expected	255.75	85.25		

집단 1(Jinpumkong2 and C242)의 두 모본에서 테스트된 1,000개의 RAPD 프라이머들 중에서, 124개의 프라이머가 모본에서 다형성을 보였다. 대략 12%의 프라이머들이 모본에서 다형성을 나타내었다. 124개중에서 35개의 프라이머가 SKTI 단백질을 가진 bulked DNA samples과 SKTI 단백질이 없는 bulked DNA samples사이에서 다형성을 보였다. 단지 16개의 프라이머들이 모본 및 bulked DNA samples사이에서 다형성을 동시에 보여줬다.

AFLP 분석의 342개의 프라이머 세트들 중에서, 오직 10개의 프라이머들이 모본 및 bulked DNA samples에서 동시에 다형성을 보여줬다. 선택된 35개의 SSR 프라이머들 중에서 3개의 SSR 프라이머들(Satt409, Satt228, Satt429)과 SKTt 프라이머가 모본에서 다형성을 보여줬다.

따라서, 총 49 마커들(35 RAPD, 10 AFLP, 3 SSR, and 1 SKTt)이 집단 1의 94 F2 개체로부터 마커 분리 데이터를 얻기 위해 사용되어졌다. 도 2는 모본, bulked samples, F2 집단에서 SSR 마커인 Satt228을 이용한 PCR 결과를 보여주고 있다.

실험예 3. 유전자 연관 분석

선발된 49개의 마커들은 94개의 F2 개체들로 구성된 집단 1에서 분리 데이터가 얻어졌다. *Ti* 유전자를 포함하는 유전자 연관 지도를 구하기 위하여 마커 데이터 및 SKTI 분리 데이터를 MAPMAKER v. 3.0을 사용하였다(Lander E. et al., MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experiment and natural populations., *Genomics* 1, pp174-181, 1987). 마커들은 4.0 LOD와 최고 50cM의 재조합 거리를 가진 "그룹" 커맨드를 사용하여 그룹에 할당되었다. 마커들이 주어진 연관 그룹에 할당되면, 그룹과 가장 연관된 마커 순서를 "Compare" 커맨드로 결정하였다. 각 연관 그룹 내의 마커 순서는 "Ripple" 커맨드를 사용하여 확인하였다. 지도 거리(cM)는 Kosambi mapping function 를 사용하여 측정하였다 (Kosambi D.D., The estimation of map distance from recombination values. *Ann. Eugen.* 12, pp 172-175, 1944).

상기 실험 수행의 결과, 총 7개의 DNA 마커들 (1 RAPD, 2 AFLP, 3 SSR, and SKTt)이 *Ti*유전자와 집단 1에서 유전적으로 연관되어져 있음을 확인할 수 있었다. 집단 1의 경우에는 3개의 SSR 마커들인 Satt409, Satt228 및 Satt429이 10 cM 내에 *Ti*유전자와 연관되어져 있음을 확인할 수 있었다.(도 3 참고). 그 중에서도 Satt228 마커는 0 cM에서 *Ti*유전자와 강하게 연관되어져 있었다. 집단 1에서 *Ti*유전자와 연관된 세개의 SSR 마커중에서 두개의 마커가 (Satt228 및 Satt409) 집단 2에서 *Ti*유전자와 연관되어져 있었다. 집단 1에서 *Ti*유전자와 완전연관 (0 cM)된 Satt228 마커는 집단2에서 *Ti*유전자와 3.7 cM 거리에 있음을 확인할 수 있었다. SSR 마커와 *Ti*유전자의 순서 및 지도 거리는 집단 1 및 2에서 서로 상이하게 나타남을 확인할 수 있었다.

실험예 4. Satt228 SSR 마커를 이용한 SKTI 결핍 선발 실험

Satt228 SSR 마커를 이용하여 SKTI 결핍된 식물의 선발실험은 하기와 같이 수행하였다. 먼저 선발하고자 하는 어린 콩 식물체의 genomic DNA를 추출한 후 Satt228 마커를 이용하여 PCR, 전기영동한 후 EtBr염색을 하여 사진촬영을 하였다.

4-1. Genomic DNA 추출

Genomic DNA 추출은 모본과 94개의 F2 개체로부터 각각 어린 잎을 채취하여 CTAB (Saghai-Maroof etal, 1984)방법을 이용하였다.

먼저 어린 잎 2~3장을 막자사발에 넣고 액화질소(-270℃)를 부어 급속 냉동시킨 다음 미세한 가루로 만들어 15㎖의 폴리프로페닐 투브(polyprophylene tube)에 5㎖의 CTAB 추출 버퍼r[1M Tris · HCl(pH5), 1% Alkyltrimethy ammonium(CTAB), 5M NaCl, 0.5M EDTA, 1% β-mercaptoethanol]와 함께 넣어 60℃의 항온수조(water bath)에 약 1시간 동안 교반하였다. 이를 상온에서 식힌 후 5㎖의 클로로포름: 옥탄올 (24:1)을 첨가하여 3200rpm에서 25분 동안 원심분리하였다.

세 층으로 분리된 액의 상층 부분을 피펫으로 뽑아 새로운 튜브에 옮긴 후 같은 양의 차가운 이소프로필 알콜(cold isoproplyl alcohol)을 분주하여 천천히 교반한 후 실 모양의 DNA를 확인했다. 상기 DNA를 새로운 마이크로 튜브에 옮겨 담고 centrifuse에 quick spin하여 펠릿화 시켰고, 1㎖의 76% EtOH · 0.2M NaOAc, 1㎖의 76% EtOH · 10mM NH4OAc 그리고 70%의 EtOH에 세척한 후, TE[10mM Tris-HCl(pH 7.5) · 1mM EDTA)를 적당량 넣어 Stock으로 보관하였다. Stock DNA는 UV-vis Spectrophotometer를 이용하여 DNA농도를 측정하고, 적절한 TE용액을 더해서 20ng/㎕으로 희석하였다.

4-2. PCR 반응

SSR 마커 Satt228 마커를 이용하여 PCR 총 반응액 10㎕는 genomic template DNA 2㎕(20ng/㎕), 프라이머 2㎕/2uM, 5 unit Taq 폴리머라아제(Fisfer Biotechnology), dNTP[25mM MgCl2, 25mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP], 5X 반응 버퍼 [250mM Tris(pH 8.5), 5mM MgCl2, 100mM KCl, 2.5㎎/㎖ BSA, 12.5% ficoll 400, 1%(W/V) xylene cyanole]와 혼합하여 PCR 튜브(96 well의 MJ Research, INC)에 분주하고 증발 방지를 위해 12㎕의 미네랄 오일을 첨가하였다. PCR 반응은 Thermo-cycler(MJ Reseaech PTC-200)을 사용하여 DNA 2가닥이 한 가닥이 되는 Denaturation 단계 92℃ 45sec, DNA에 Primer sequence가 DNA와 결합하는 Annealing 단계 47℃ 45sec, DNA 복제가 시작되는 Extention 단계 68℃ 45sec를 한 cycle로 39 cycle을 증폭시킨 후, 4℃로 보관하였다. 증폭용액은 4℃ 상태로 보관 후 1.2% TBE 아가로스 겔(23×20cm, Owl separation system) 위에서 반응총량 10㎕의 증폭 액을 겔에 로딩하고 120V의 전압으로 2시간 30분 동안 전기영동 (electrophoresis) 하였다. 분리된 밴드를 EtBr (Ethidium bromide, 70㎕/ℓ)에 40분 염색 후 ddH2O에 15분 동안 세척시켰으며, Image Analyzer System을 이용하여 밴드를 촬영하여 변이를 검색 하였다.

상기 실험 수행의 결과는 도 2에서 보는 바와 같이, F2 밴드의 결과과 SKTI 단백질이 결실된 P2의 밴드와 동일한 위치에 나타난 것이 바로 SKTI 단백질이 결실된 어린 콩 식물체를 의미하는 것이므로, 본 발명의 Satt228 마커를 이용할 경우 손쉽게 SKTI 단백질이 결실된 식물체를 선발할 수 있다.

발명의 효과

본 발명은 대두 쿠니츠 트립신 저해제 단백질(SKTI, soybean kunitz trypsin inhibitor protein)의 존재 및 부재를 조절하는 *Ti*유전자에 밀접하게 연관된 Satt228 마커에 관한 것이다. 대두의 쿠니츠 트립신 저해제 단백질은 가열하지 않거나 불

완전하게 가열된 대두 식품에서 소화 억제 및 영양학적 측면에서 품질을 떨어뜨리는 원인이다. 가장 일반적인 쿠니츠 트립신 저해제 단백질을 불활성화시키는 방법은 가열처리하는 것이다. 그러나 이 방법은 다른 대두 종자 단백질의 용해도를 낮추고 결과적으로 필수 아미노산의 손실을 가져온다.

대두에서 SKTI 단백질의 존재는 단일 유전자인 *Ti* 유전자에 의해 결정되며 SKTI 단백질의 존재가 우성으로 작용한다. 따라서, 본 발명의 Satt228 마커는 쿠니츠 트립신 저해제 단백질을 조절하는 *Ti* 유전자에 밀접하게 연관된 SSR 마커로서, SKTI 단백질이 결핍된 새로운 대두 품종을 육성함에 있어서 본 발명의 Satt228 마커를 이용하여 쉽게 SKTI 단백질이 결핍된 계통을 선발할 수 있어 대두의 신품종 육성 산업에 있어서 유용한 발명이다.

도면의 간단한 설명

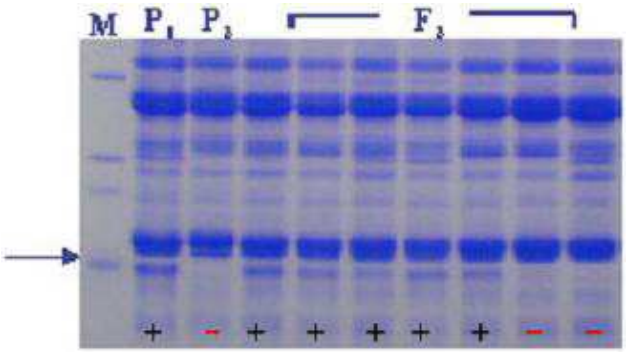
도 1은 부모와 집단 1의 F2 종자들에서 나타나는 SKTI 단백질의 밴딩 패턴을 나타내는 것으로서, P1은 Jinpumkong2 품종을, P2는 C242를, 화살표가 쿠니츠 트립신 저해제 밴드 (21.5kDa)을 나타내며, + 는 SKTI 단백질을 가지고 있는 개체이고 - 는 SKTI 단백질의 부재를 나타내며,

도 2는 부모(P1: Jinpumkong2, *TiTi*, P2: C242, *titi*), bulked 샘플들(B1: KTI 단백질 존재, B2: KTI 단백질 부재), F2 집단에서 SSR 프라이머 Satt228을 위한 분리 DNA fragment의 패턴을 나타내는 도이며,

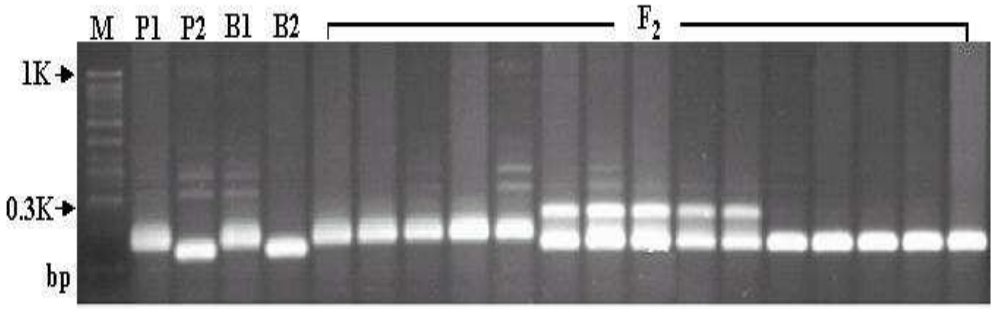
도 3은 집단 1과 집단 2를 이용하여 얻어진 *Ti* 유전자 연관 마커들이며 Ti 유전자는 콩 분자 연관 지도 A2에 위치하고 있으며, 마커 유전자들의 이름은 오른쪽에, Kosambi 지도 거리는 왼쪽에 표시하였고, CLG09는 콩의 고전적 연관 지도 9를 의미한다.

도면

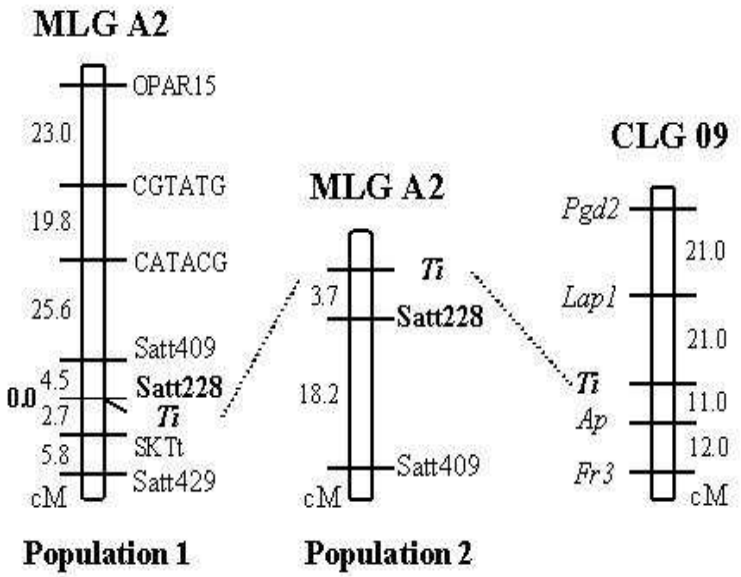
도면1



도면2



도면3


MLG A2
OPAR15
23.0
CGTATG
19.8
CATACG
25.6
Satt409
0.0
4.5
Satt228
2.7
Ti
5.8
SKTt
Satt429
cM
Population 1
MLG A2
Ti
3.7
Satt228
18.2
Satt409
cM
Population 2
CLG 09
Pgd2
21.0
Lap1
21.0
Ti
11.0
Ap
12.0
Fr3
cM