



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0028894
(43) 공개일자 2009년03월20일

(51) Int. Cl.

C12N 15/00 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0094016

(22) 출원일자 2007년09월17일

심사청구일자 2007년09월17일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

주식회사 젠다스

대전 유성구 전민동 461-58 대전바이오벤처타운
4층

한경대학교 산학협력단

경기도 안성시 석정동 67

(72) 발명자

전진태

서울 서초구 방배2동 436-13번지 401호

이정규

경남 진주시 이현동 235-1 덕산아파트 407호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순용

전체 청구항 수 : 총 15 항

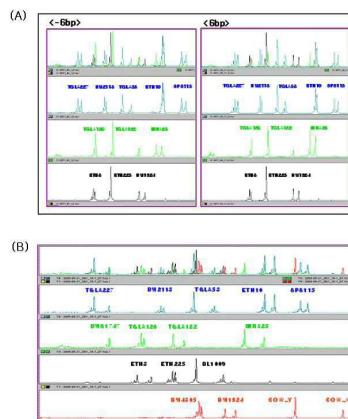
(54) 멀티플렉스 PCR을 이용한 한우 개체의 식별방법

(57) 요약

본 발명은 멀티플렉스 PCR을 이용한 한우 개체의 식별방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 효과적인 한우 개체의 식별을 위해 선발된 마이크로새틀라이트 마커 조합에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하는 것을 특징으로 하는 한우 개체의 식별방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 방법은 높은 개체 식별력을 가지고 있는 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 역방향 프라이머에 특정 서열을 추가하여 멀티플렉스 PCR을 수행함으로써 스터터 밴드(stutter band)로 인한 증폭산물의 분석 오류를 제거함으로써 신속하고 효과적으로 한우 개체를 식별할 수 있을 뿐 만 아니라, 한우의 동일성 검증에도 매우 유용하다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

임현태

울산 중구 약사동 800-33번지

이상호

경남 산청군 신안면 외송리 239번지

이성희

경기 수원시 팔달구 인계동 159 선경아파트
301-1603

최규명

충북 영동군 심천면 장동리 341

이학교

경기 수원시 장안구 천천동 우방아파트 713동 602
호

공홍식

경기 안양시 만안구 석수2동 석수LG빌리지
105-1001

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 .

부처명 농촌진흥청

연구사업명 지역 농업 클러스트 기술 개발 지원사업

연구과제명 경남 명품 한우 육성 System 구축 및 광역브랜드화

주관기관 경남 농업기술원

연구기간 2007년01월01 ~ 2007년12월31일

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 분석하고자 하는 핵산 시료를 TGLA53, TGLA227, TGLA122, BM4305, INRA23, BMS1747, BM2113, ETH3, BL1009, BM1824, ETH10, TGLA126, SPS115, ETH225, ILSTS006, ILSTS013, ILSTS028, ILSTS103, BM1818 및 ETH185로 이루어진 군 중에서 선택된 10개 이상의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR로 증폭하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계에서 증폭된 산물을 전기영동장치를 통해 검출하여 대립유전자를(allele) 검출하고 유전자형을 결정하는 단계를 포함하는 한우 개체의 식별 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 핵산 시료는 분석하고자 하는 소의 혈액 또는 모근임을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 마이크로새틀라이트 마커는 TGLA53, TGLA227, TGLA122, BM4305, INRA23, BMS1747, BM2113, ETH3, BL1009, BM1824, ETH10, TGLA126, SPS115, ETH225, ILSTS006, ILSTS013, ILSTS028, ILSTS103, BM1818 및 ETH185로 이루어진 군 중에서 선택된 11개 이상임을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 마이크로새틀라이트 마커가 TGLA53, TGLA227, TGLA122, BM4305, INRA23, BMS1747, BM2113, ETH3, BL1009, BM1824, ETH10, TGLA126, SPS115 및 ETH225임을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 프라이머는 역방향 프라이머의 5' 말단에 GTTCT 염기가 추가된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 프라이머가 서열번호 1 내지 서열번호 40으로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머 세트 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 (a) 단계의 프라이머가 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 20, 서열번호 22, 서열번호 24, 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 30, 서열번호 32, 서열번호 34, 서열번호 36, 서열번호 38 및 서열번호 40으로 표시되는 염기서열로 이루어진 군 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

TGLA53, TGLA227, TGLA122, BM4305, INRA23, BMS1747, BM2113, ETH3, BL1009, BM1824, ETH10, TGLA126, SPS115, ETH225, ILSTS006, ILSTS013, ILSTS028, ILSTS103, BM1818 및 ETH185로 이루어진 군 중에서 선택된 10개 이상의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 포함하는 한우 개체식별용 키트.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 마이크로새틀라이트 마커는 TGLA53, TGLA227, TGLA122, BM4305, INRA23, BMS1747, BM2113, ETH3, BL1009, BM1824, ETH10, TGLA126, SPS115, ETH225, ILSTS006, ILSTS013, ILSTS028, ILSTS103, BM1818 및 ETH185로 이루어진 군 중에서 선택된 11개 이상임을 특징으로 하는 키트.

청구항 10

제8항에 있어서, 마이크로새틀라이트 마커가 TGLA53, TGLA227, TGLA122, BM4305, INRA23, BMS1747,

BM2113, ETH3, BL1009, BM1824, ETH10, TGLA126, SPS115 및 ETH225임을 특징으로 하는 키트.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 프라이머는 역방향 프라이머의 5' 말단에 GTTCT 염기가 추가된 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 프라이머가 서열번호 1 내지 서열번호 40으로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머 세트 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 키트.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 프라이머가 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 20, 서열번호 22, 서열번호 24, 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 30, 서열번호 32, 서열번호 34, 서열번호 36, 서열번호 38 및 서열번호 40으로 표시되는 염기서열로 이루어진 군 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 키트.

청구항 14

TGLA53, TGLA227, TGLA122, BM4305, INRA23, BMS1747, BM2113, ETH3, BL1009, BM1824, ETH10, TGLA126, SPS115, ETH225, ILSTS006, ILSTS013, ILSTS028, ILSTS103, BM1818 및 ETH185로 이루어진 군 중에서 선택된 마이크로새틀라이트 마커에 특이적이며 역방향 프라이머의 5' 말단에 GTTCT 염기가 추가된 프라이머 서열.

청구항 15

제14항에 있어서, 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 20, 서열번호 22, 서열번호 24, 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 30, 서열번호 32, 서열번호 34, 서열번호 36, 서열번호 38 및 서열번호 40으로 표시되는 염기서열로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 프라이머 서열.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 멀티플렉스 PCR을 이용한 한우 개체의 식별방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 효과적인 한우 개체의 식별을 위해 선발된 마이크로새틀라이트 마커 조합에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하는 것을 특징으로 하는 한우 개체의 식별방법에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 세계 각국에서는 유전자원으로서 재래가축에 대한 보존 및 활용의 가치를 인식하면서(Notter (1999) *J. Anim. Sci.* 77:61-69) 가축들의 품종 형성, 유전적 특성, 유전적 다양성, 타 품종간의 유연관계 등의 분석연구를 수행하여 왔다. 소의 품종집단에 대해서는 혈액단백질, 유단백질, 마이크로새틀라이트(microsatellites), 미토콘드리아 DNA(mitochondrial DNA), 등 다양한 유전적 표지인자들을 활용한 연구들이 수행되어 왔다(MacHugh et al (1998) *Anim. Genet.* 29:333-340; Mannen et al (1998) *Genetics* 150:1169-1175; Edwards et al (2000) *Anim. Genet.* 31:127-130; Troy et al (2001) *Nature* 410:1088-1091; Hanotte et al (2000) *Molecular Ecology* 9:387-396, (2002) *Science* 296:336-339).

<3> 이러한 유전적 표지인자 중 마이크로새틀라이트(microsatellite)는 2 내지 6개 정도의 염기서열이 반복되는 DNA군(repetitive DNA group)으로, 게놈 내에 골고루 분포하고 매우 높은 다형성을 나타내는 비암호화 DNA 서열(non-coding DNA sequence)이다(Zajc I and Sampson J (1999) *J Hered* 90: 104-107). 특정 좌위에서 반복

단위의 반복수에 따라 개체간의 다양성이 인정되는데(Koreth J, O'Leary JJand McGee JO (1996) J Pathol 178: 239-248.), 반복수에 품종 간 다형이 있는 경우에 인접영역에 설계한 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 행하면, PCR 산물 길이에 다형이 관찰되고 DNA 다형을 검출하는 것이 가능해진다. 또한, 마이크로새틀라이트는 다른 유전자들과 마찬가지로 멘델의 유전법칙에 따라 자식에게 전달되며 PCR을 이용하여 증폭할 수 있고, 전기영동을 할 경우 공우성(co-dominant)의 양상을 보인다. 특히, 마이크로새틀라이트는 크기가 작기 때문에 2개에서 최대 8개까지의 프라이머를 동시에 증폭할 수 있으므로(Chamberlain JS et al., (1988) *Nucleic Acids Res* 16: 11141-11156) 유전자의 다형성을 분석하는데 시간과 비용을 줄일 수 있으며 민감성과 정확성이 높은 결과를 얻을 수 있다. 따라서 이와 같은 마이크로새틀라이트는 가축의 분자유종분야에 이용가치가 대단히 높으며 근친교배에 의한 퇴화를 방지하는 데 유용할 뿐만 아니라 특정형질을 선택하는 것에도 이용될 수 있다고 한다.

<4> 한편, 한우(Hanwoo)는 한국 고유의 소품종으로서 수천년간 한국 풍토에 적응하여 그에 적합한 체질로 고정되어 온 주요 가축이다. 이러한 한우는 우리나라의 고유한 유전자원으로서 역용(일소)으로 수백년 동안 유지되어 온 한민족 역사의 산물이며, 1970년 이후부터 농업의 기계화와 농업의 산업적 가치가 위축됨에 따라 한우는 우리나라 소비자들의 입맛에 맞는 쇠고기를 공급하는 육용우로 중요한 역할을 하고 있다. 최근에는 WTO 와 FDA의 국제 시장경제의 변화에 따른 쇠고기 수입개방과 더불어 유전자원의 유지와 보존뿐만 아니라, 우리나라 소비자들의 입맛에 맞는 고급육 생산원으로서 한우의 중요성과 가치는 더욱 높아지고 있다.

<5> 마이크로새틀라이트와 같은 유전적 표지인자를 이용한 한우의 식별 방법으로는 대한민국특허 제527793호에는 MC1R 유전자의 단일염기다형성 부위를 태깅프로브법을 이용하여 분석하는 것을 특징으로 하는 한우육 판별을 위한 프로브 및 이를 이용한 한우육 판별방법이 개시된 바 있으며, 대한민국특허 제0352059호에는 RAPD(random amplified polymorphic DNA)-PCR(polymerase chain reaction) 분석 및 DNA 핑거프린팅에 의거 특정 DNA 마커를 동정하여 순수 한우를 수입 쇠고기와 구별할 수 있는 DNA 프로브 및 이를 이용한 순수 한우 판별법이 개시되어 있다. 그러나 보다 신속하면서도 정확한 한우 개체의 판별기술이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<6> 이에 본 발명자들은 마이크로새틀라이트 마커를 이용한 한우 개체의 판별방법을 연구하던 중 한우 개체에 대한 식별력을 가지고 있는 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 역방향 프라이머에 특정 서열을 추가하여 멀티플렉스 PCR을 수행함으로써 스테터 밴드(stutter band)로 인한 증폭산물의 분석 오류를 제거함으로써 신속하고 효과적으로 한우 개체를 식별할 수 있을 뿐만 아니라 한우의 동일성 검정에도 매우 유용함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

<7> 따라서 본 발명의 목적은 한우의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하는 것을 특징으로 하는 한우 개체의 식별방법을 제공하는 것이다.

<8> 또한, 본 발명의 목적은 한우의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 포함하는 한우 개체 식별용 키트를 제공하는 것이다.

<9> 또한, 본 발명의 목적은 한우의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<10> 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 한우의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하는 것을 특징으로 하는 한우 개체의 식별방법을 제공한다.

<11> 또한, 본 발명은 한우의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 포함하는 한우 개체 식별용 키트를 제공한다.

<12> 또한, 본 발명은 한우의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머 세트를 제공한다.

<13> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<14> 본 발명에서 사용된 용어 "마이크로새틀라이트(Microsatellites)"란 진핵세포(eukaryotes) 유전자 전역에 걸쳐 분포하는 모노-, 디-, 트리- 및 테트라뉴클레오타이드 형태의 짧은 반복 염기서열을 의미한다. 일반적

으로 이러한 반복 서열은 염색체 내에서 10 내지 40 번 정도 단순반복 (tandem repeat)된 형태로 존재한다.

- <15> 본 발명에서 사용된 용어 "마이크로새틀라이트 마커"란 마이크로새틀라이트를 이용한 DNA 다형검출 마커를 말한다.
- <16> 본 발명에서 사용된 용어 "DNA 다형(Polymorphism)"이란 동일종간 생물개체의 특이적 DNA 구조의 다양성을 말한다.
- <17> 본 발명에서 사용된 용어 "프라이머"는 본 발명에서 선발한 14개의 마이크로새틀라이트의 핵산서열을 특이적으로 증폭할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 (oligonucleotide)를 의미한다. 본 발명에서는 본 발명에서 선발한 14개의 마이크로새틀라이트 마커의 핵산서열을 증폭할 수 있는 것이라면 당업자가 디자인할 수 있는 모든 프라이머가 본 발명의 프라이머 범위에 포함된다.
- <18> 본 발명에서 사용된 용어 "PCR 반응 혼합물"은 DNA 폴리머라제 및 완충용액을 포함하여 PCR를 수행하기 위해 사용되는 분자생물학적 시약(molecular biological reagent)을 의미한다.
- <19> 본 발명의 한우 개체의 식별방법은 소의 다형성 분석용 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하는 것을 특징으로 한다.
- <20> 상기 소의 다형성 분석용 마커로는 TGLA53, TGLA227, TGLA122, BM4305, INRA23, BMS1747, BM2113, ETH3, BL1009, BM1824, ETH10, TGLA126, SPS115, ETH225, ILSTS006, ILSTS013, ILSTS028, ILSTS103, BM1818 및 ETH185로 이루어진 군 중에서 선택된 10개 이상, 바람직하게는 11개 이상, 더욱 바람직하게는 14개 이상을 사용할 수 있다.
- <21> 가장 바람직하게는, 소의 다형성 분석용 마커로는 TGLA53, TGLA227, TGLA122, BM4305, INRA23, BMS1747, BM2113, ETH3, BL1009, BM1824, ETH10, TGLA126, SPS115 및 ETH225로 이루어진 14개의 마커를 사용할 수 있다.
- <22> 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머로는 마이크로새틀라이트 DNA의 3' 및 5' 부위에 인접한 5 내지 100 bp 부위에 위치한 10 내지 50 bp의 연속된 각 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- <23> 바람직하게는, 본 발명의 프라이머는 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적이며 5' 말단에 특정 서열이 추가된 역방향 프라이머를 이용할 수 있다. 상기 역방향 프라이머의 5' 말단에 특정 서열의 추가는 스테터 밴드(stutter band)로 인한 증폭산물의 분석 오류를 제거함으로써 신속하고 효과적으로 한우 개체를 식별할 수 있도록 해준다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 프라이머는 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 역방향 프라이머의 5' 말단에 GTTCT 염기를 추가한 것이다.
- <24> 본 발명자들은 한우를 신속하고 효과적으로 식별할 수 있도록 하기 위해 다형성지수가 높은 마이크로새틀라이트 마커를 선발하였다.
- <25> 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 20개의 소의 다형성 분석용 마이크로새틀라이트에 특이적인 프라이머를 각각 제조하고(실시예 2 참조), 이를 이용하여 한우로부터 유래된 DNA 시료(실시예 1 참조)를 멀티플렉스 PCR에 의해 증폭한 다음(실시예 3 참조), 이들의 다형성 지수를 계산하였다(실시예 4 참조). 그 다음 20개의 마이크로새틀라이트 중 *He* 추정치를 근거로 하여 다형성지수가 높은 11개의 마이크로새틀라이트를 선발하였으며, 상기에서 선발한 마이크로새틀라이트에 보편적으로 사용되고 있는 Applied Biosystems사의 StockmarkersTM와 중복되지 않는 3개의 마이크로새틀라이트를 추가하고 14개의 마이크로새틀라이트 마커를 이용하여 무작위교배집단으로 가정한 후 이들의 동일개체 출현확률 및 친자감별확률을 계산하였다(실시예 6 참조). 그 결과, 본 발명에서 선발한 14개의 마이크로새틀라이트 마커가 기존에 수입되고 있는 과점제품에 비해 1000000배 정도 높은 개체 식별력을 가지고 있음을 알 수 있었으며, 나아가 본 발명의 마이크로새틀라이트 마커는 단순한 한우 개체식별 뿐 만 아니라, 한우의 동일성 검정에도 매우 유용함을 알 수 있었다.
- <26> 나아가, 본 발명의 다른 실시예에서는 역방향 프라이머의 5' 말단에 GTTCT 염기를 추가하거나 또는 추가하지 않은 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을 수행하여 비교 분석한 결과, 특정 염기서열을 추가하여 제작한 역방향 프라이머를 사용할 경우 정확한 대립유전자(allele)를 검출하여 유전자형을 결정할 수 있음을 알 수 있었다. 즉, 특정염기서열을 포함하지 않은 역방향 프라이머를 사용한 것에 비하여 피크모양이 안정적이며, 스테터 밴드(stutter band)가 제거되어 유전자형 결정에 적합한 모양을 나타내었다(도 1).
- <27> 따라서 본 발명은 한우의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR을

수행하는 것을 특징으로 하는 한우 개체의 식별방법을 제공한다.

- <28> 바람직하게는, 본 발명에 따른 한우 개체의 식별방법은 (a) 분석하고자 하는 핵산 시료를 TGLA53, TGLA227, TGLA122, BM4305, INRA23, BMS1747, BM2113, ETH3, BL1009, BM1824, ETH10, TGLA126, SPS115, ETH225, ILSTS006, ILSTS013, ILSTS028, ILSTS103, BM1818 및 ETH185로 이루어진 군 중에서 선택된 10개 이상의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 이용하여 멀티플렉스 PCR로 증폭하는 단계; 및
- <29> (b) 상기 (a) 단계에서 증폭된 산물의 크기를 분석하여 대립유전자(allele)를 검출하고 유전자형을 결정하는 단계를 포함한다.
- <30>
- <31> 상기 (a) 단계에서 분석하고자 하는 핵산 시료는 생물학적 시료로부터 분리될 수 있다. 상기 생물학적 시료로는 혈액 및 생물학적 기원의 기타 액상 샘플, 생검 표본, 모근, 조직 배양과 같은 고형 조직 샘플 또는 이로부터 유래된 세포 및 그 자손이 포함된다. 또한, 상기 샘플들은 시약처리, 가용화된 샘플 또는 배양세포, 세포 상등액 및 세포 용해물도 포함한다.
- <32> 상술한 생물학적 시료로부터 핵산의 분리는 당업계에 공지된 방법에 따라 수행할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 한우의 혈액으로부터 게놈 DNA 추출 키트(Promega, USA)를 사용하여 게놈 DNA를 분리하여 사용하였다(실시예 1 참조).
- <33> 상기 (a) 단계에서 마이크로새틀라이트 마커는 10개 이상, 바람직하게는 11개 이상, 보다 바람직하게는 14개 이상을 선택하여 사용할 수 있다.
- <34> 가장 바람직하게는, 소의 다형성 분석용 마커로는 TGLA53, TGLA227, TGLA122, BM4305, INRA23, BMS1747, BM2113, ETH3, BL1009, BM1824, ETH10, TGLA126, SPS115 및 ETH225로 이루어진 14개의 마커를 사용할 수 있다.
- <35> 한편, 멀티플렉스 PCR의 경우 PCR 증폭시 여러 개의 프라이머가 사용되므로 각각의 프라이머가 증폭될 때 서로 간에 간섭이 발생하여 각각의 프라이머가 완전하게 아데노신을 합성할 수 없게 하여 완전한 스테터 밴드를 제거한 증폭산물을 획득하기가 어렵다. 이는 개체식별을 위한 유전자형의 결정이 단계에서 오류가 발생할 수 있으며, 이 단계에서 오류는 개체식별의 의미를 퇴색시키는 결과를 가져오게 된다. 이에 본 발명자들은 이러한 오류를 최소화하기 위해 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머 중 역방향 프라이머의 5' 말단에 GTTCT 염기를 추가하였다.
- <36> 따라서 바람직하게는 본 발명에서 사용되는 프라이머는 역방향 프라이머의 5' 말단에 GTTCT 염기가 추가될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 프라이머로는 서열번호 1 내지 서열번호 40으로 표시되는 염기서열을 가진 것일 수 있다.
- <37> 가장 바람직하게는, 본 발명의 프라이머로는 서열번호 1 및 서열번호 2, 서열번호 3 및 서열번호 4, 서열번호 5 및 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12, 서열번호 13 및 서열번호 14, 서열번호 15 및 서열번호 16, 서열번호 17 및 서열번호 18, 서열번호 19 및 서열번호 20, 서열번호 21 및 서열번호 22, 서열번호 23 및 서열번호 24, 서열번호 25 및 서열번호 26, 서열번호 서열번호 35 및 서열번호 36로 표시되는 염기서열로 이루어진 프라이머 세트일 수 있다.
- <38> 상기 프라이머의 염기서열의 일부를 다른 염기로 치환, 삭제하거나 일부 염기서열의 위치와 방향이 바뀐 염기서열도 본 발명에 따른 프라이머의 범위에 속한다.
- <39> 상기 (a) 단계에서 멀티플렉스 PCR은 당업계에 공지된 방법에 따라 각 유전자를 증폭하기에 적합한 조건으로 수행될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 주형 DNA 6.6 μ g, 각각의 프라이머 세트 8.25 μ l, Hot starte Taq DNA 폴리머라아제 1.8 unit((주)바이오니아), 10 $\times$ 완충용액 1.5 μ l, dNTP 1.5 μ l의 조성에 증류수를 첨가하여 최종 부피가 15 μ l가 되도록 한 다음 상기 반응 혼합물을 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 처리한 후 94 $^{\circ}$ C에서 60초, 58 $^{\circ}$ C에서 75초, 72 $^{\circ}$ C에서 60초를 1 사이클로 하여 4회 반복하고, 94 $^{\circ}$ C에서 60초, 57 $^{\circ}$ C에서 75초, 72 $^{\circ}$ C에서 60초를 1 사이클로 하여 4회 반복 후 94 $^{\circ}$ C에서 60초, 56 $^{\circ}$ C에서 75초, 72 $^{\circ}$ C에서 60초를 1 사이클로 하여 24회 반복하였다. 그리고 65 $^{\circ}$ C에서 30분간 신장시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 종료하였다.
- <40> (b) 단계에서 증폭된 PCR 산물의 크기 분석은 통상의 방법, 예컨대 아가로스 젤 또는 아크릴아마이드 젤을 이용한 전기영동으로 실시한 후, 전개된 DNA 단편을 형광 염색 등을 통하여 확인가능하다. 바람직하게는,

염기서열분석장치(Applied Biosystems사)에 대립유전자분석 모드를 이용하여 전기영동을 실시해 프라이머의 형광물질 및 PCR 산물의 크기별로 분류하는 방법을 통하여 확인할 수 있다. 상기 단계에서의 PCR 산물의 크기 분석 방법은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 모두 실시가능하며, 상기 일례로 설명한 방법 이외 통상의 모든 방법을 포함할 수 있다.

<41> 다른 관점으로서, 본 발명은 한우의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머를 포함하는 한우 개체 식별용 키트를 제공한다. 상기 본 발명에 따른 키트는 한우의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머 및 PCR 반응 혼합물을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 키트는 프라이머, dNTP, Taq DNA 폴리머라아제 등으로 구성될 수 있다. 바람직하게는, 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머는 역방향 프라이머의 5' 말단에 GTTCT 염기가 추가된 것일 수 있다.

<42> 또한, 본 발명은 한우의 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 프라이머 서열을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명의 프라이머 서열은 상기 마이크로새틀라이트 마커에 특이적인 역방향 프라이머의 5' 말단에 GTTCT 염기가 추가된 것이다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 프라이머 서열은 서열번호 2, 서열번호 4, 서열번호 6, 서열번호 8, 서열번호 10, 서열번호 12, 서열번호 14, 서열번호 16, 서열번호 18, 서열번호 20, 서열번호 22, 서열번호 24, 서열번호 26, 서열번호 28, 서열번호 30, 서열번호 32, 서열번호 34, 서열번호 36, 서열번호 38 및 서열번호 40으로 표시된 염기서열로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다.

효 과

<43> 이상, 상기에서 살펴본 바와 같이 본 발명에 따른 방법은 높은 개체 식별력을 가지고 있는 마이크로새틀라이트 마커를 이용하였으며 상기 마커에 대한 역방향 프라이머에 특정 서열을 추가하여 멀티플렉스 PCR을 수행함으로써 스테터 밴드(stutter band)로 인한 증폭산물의 분석 오류를 제거함으로써 신속하고 효과적으로 한우 개체를 식별할 수 있을 뿐 만 아니라, 한우의 동일성 검정에도 매우 유용하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<44> 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에 만 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>

<46> DNA 시료 준비

<47> 경상남도의 24개 지역 한우농가에서 각각 총 480두의 번식우 혈액을 채취하여 공시재료로 사용하였고, 한우의 혈액으로부터 게놈 DNA 추출 키트(Promega, USA)를 사용하여 게놈 DNA를 분리하였다.

<48> <실시예 2>

<49> 마이크로새틀라이트에 대한 특이적인 프라이머 제작

<50> 한우 개체의 효과적인 식별을 위한 마이크로새틀라이트 마커를 선별하기 위해, 국제동물유전학회에서 제안한 소의 다형성 분석용 마이크로새틀라이트에 특이적인 프라이머를 (주)진캡에 의뢰하여 주문 제작하였다(표 1).

표 1

<51> 소의 다형성 분석용 마이크로새틀라이트

위치	염색체	대립유전자 크기 범위(bp)	프라이머 서열		서열번호
TGLA227	18	76~104	F	CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT	1
			R	GTTTCTACAGACAGAACTCAATGAAAGCA	2
TGLA126	20	116~122	F	CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT	3
			R	GTTTCTTTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC	4
TGLA122	21	137~181	F	CCCTCCTCCAGGTAATCAGC	5
			R	GTTTCTAATCACATGGCAAATAAGTACATAC	6
BM1824	1	178~192	F	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC	7
			R	GTTTCTCATTCTCCAAGTCTTCCTTG	8

ETH10	5	212~224	F	GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA	9
			R	GTTTCTCCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC	10
BM2113	2	123~143	F	GCTGCCTTCTACCAAATACCC	11
			R	GTTTCTCTTCTGAGAGAAGCAACACC	12
TGLA53	16	154~188	F	GCTTTCAGAAATAGTTGCATTCA	13
			R	GTTTCTATCTTCACATGATATTACAGCAGA	14
SPS115	15	246~260	F	AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG	15
			R	GTTTCTAACGAGTGCCTAGTTTGGCTGTG	16
INRA23	3	196~222	F	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC	17
			R	GTTTCTTAACTACAGGGTGTAGATGAACT	18
ETH3	19	105~125	F	GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG	19
			R	GTTTCTACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG	20
ETH225	9	141~159	F	GATCACCTTGCCACTATTTCTCT	21
			R	GTTTCTACATGACAGCCAGCTGCTACT	22
BL1009	14	157~179	F	TCTGTGTCAAAGTCCTGAGGG	23
			R	GTTTCTCCTGGCATTCTGCAGTCC	24
BM4305	14	148~168	F	CCAAGACATGAAAGCAATCTG	25
			R	GTTTCTCTCTAGGTACATCCATGTTGCA	26
ILSTS006	7	281~299	F	TGTCTGTATTTCTGCTGTGG	27
			R	GTTTCTACACGGAAGCGATCTAAACG	28
ILSTS013	9	120~126	F	CTTGATCCTTATAGAACTGG	29
			R	GTTTCTACACAAAATCAGATCAGTGG	30
ILSTS028	11	128~160	F	TCCAGATTTTGTACCAGACC	31
			R	GTTTCTGTCTATGTCATACCTTTGAGC	32
ILSTS103	21	218~226	F	CCAGTCTGCCAAAATCTATCG	33
			R	GTTTCTTATCAGGCGTAGTAAACAGC	34
BMS1747	14	81~99	F	TCTAAGCTCCTTGAAGACAGGC	35
			R	GTTTCTGGCTTTGTATTCCCTCTCC	36
BM1818	23	258~272	F	AGCTGGGAATATAACCAAAGG	37
			R	GTTTCTAGTGCTTTCAAGGTCCATGC	38
ETH185	17	221~245	F	TGCATGGACAGAGCAGCCTGGC	39
			R	GTTTCTGCACCCCAACGAAAGCTCCCAG	40

<52> <실시예 3>

<53> 멀티플렉스 PCR

<54> 상기 실시예 1의 DNA 시료를 주형으로 하고, 실시예 2에서 제작한 프라이머를 사용하여 멀티플렉스 PCR을 다음의 조건으로 수행하였다.

<55> 주형 DNA 0.03 μ g, 각각의 프라이머 세트 0.7, 0.4, 0.8 pmol, Taq DNA polymerase 0.5 unit((주)솔젠트), 10 $\times$ 완충용액 1 μ l, 0.25 mM dNTP의 조성예 증류수를 첨가하여 최종 부피가 10 μ l가 되도록 하였으며, PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 15분간 처리한 후 95 $^{\circ}$ C에서 50초, 56 $^{\circ}$ C에서 70초, 72 $^{\circ}$ C에서 70초를 1 사이클(cycle)로 하여 32회 반복하였다. 그리고 65 $^{\circ}$ C에서 1시간, 25 $^{\circ}$ C에서 2시간 신장(extension) 후 4 $^{\circ}$ C에서 종료하였다. PCR 산물은 ABI-310 자동염기서열 분석장치(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 크기별로 분류되도록 전기영동하고, GeneScan version 2.1(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 크기와 표식자의 종류별로 분류한 후 마이크로소프트 엑셀 프로그램(Microsoft Excel, Microsoft, USA)을 이용하여 자료를 취합하였다.

<56> <실시예 4>

<57> 마이크로새틀라이트의 다형성 지수

<58> 실시예 3의 결과로부터 각각의 마이크로새틀라이트 다형성지수인 이형접합률(He, Heterozygosity) 및 다형정보지수(PIC, polymorphic Infomation Content)를 Cervus version 2.0을 이용하여 계산하였다(Marshall et al(1998) *Mol. Ecol.* 7: 639-655).

<59>

그 결과, 각 마이크로새틀라이트의 다형성지수는 표 2에 나타난 바와 같다. 이때 H_e 와 PIC 값의 최상위 마이크로새틀라이트 마커가 다른 것은 대립유전자(allele)의 개수와 빈도에 의한 추정 계산식 차이에 의한 것이라 사료된다.

표 2

<60>

마이크로새틀라이트의 다형성 지수

위치	N	대립유전자 수	크기 범위(bp)	H_e	PIC
TGLA227	163	12	82~112	0.865	0.832
SPS115	163	9	248~270	0.687	0.825
ETH3	163	7	121~133	0.724	0.738
BM1818	163	13	166~278	0.589	0.621
BM4305	163	13	147~171	0.810	0.795
TGLA122	163	20	136~186	0.822	0.848
ETH10	163	12	214~230	0.693	0.857
BM2113	163	15	128~159	0.755	0.852
ILSTS028	163	6	136~164	0.429	0.346
BM1824	162	8	178~198	0.722	0.626
ETH185	163	9	228~244	0.834	0.756
ILSTS006	160	22	198~310	0.625	0.857
BL1009	163	21	159~185	0.724	0.876
ILSTS103	161	15	131~301	0.615	0.830
ILSTS013	159	10	123~143	0.736	0.814
TGLA126	163	6	122~132	0.693	0.613
ETH225	162	8	141~163	0.642	0.724
TGLA53	163	16	156~189	0.914	0.866
INRA23	163	14	126~222	0.785	0.756
BMS1747	162	7	91~105	0.759	0.699

<61>

<실시예 5>

<62>

통계분석

<63>

Weir와 Hill(2002, Annu. Rev. Genet. 36:721-750) 추정법에 의한 F -통계량(F_{st} , F_{it} , F_{is} 및 농장간 pairwise- F_{st})은 FSTAT version 2.9.3(Goudet (2001) Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fatad.html>)과 GENEPOP version 3.4(Raymond와 Rousset (1995) J. Heredity 86:248-249)를 사용하여 계산하였다. F -통계량 추정치에 대한 유의성 검정은 Goudet(2001)이 제안한 방법에 의하여 PT(permutation test)를 실시하여 얻었으며, 마터의 다형성지수인 이형접합률(H_e), 다형정보지수(PIC) 및 배제력(exclusion probability, PE)은 Cervus version 2.0(Marshall 등, 1998)을 이용하였다. 또한 추정된 F_{st} 와 F_{is} 값에 근거하여 무작위 교배집단과 반형매 교배집단에서의 동일개체 출현가능확률은 API-CALC version 1.0(Ayres와 Overall (2004) Molecular Ecology Notes 4:315-318)을 사용하여 계산하였다.

<64>

추정된 F -통계량을 이용하여 무작위 교배집단과 반형매 교배집단을 가정하여 MS 유전자형의 동일한 개체 출현확률(probability of identity; PI 와 probability of identity from half sibs; $PI_{half-sibs}$)과 친자감정 확률(probability of parent exclusion when both parents are unconfirmed; PE_{pu} 와 probability of paternity exclusion; PE)을 API-CALC version 1.0과 Cervus version 2.0을 이용하여 추정하였다.

<65>

그 결과, 전체의 MS를 사용할 경우 무작위 교배집단에서 1.44×10^{-45} 반형매 교배집단에서는 3.08×10^{-26} 으로 나타났다(표 3). 이러한 추정치의 의미는 국내의 한우 집단을 적은 두수의 보증종모우들의 절대적인 유전적 기여에 의한 거대한 반형매 교배집단으로 가정하고 국내 한우의 전체 사육두수 1,666,000두(2004년 12월,

농림부 농업자료실)를 고려해 보더라도 동일개체가 출현할 확률이 없는 것으로 보아도 무방할 것으로 사료된다. 또한 20개의 마이크로새틀라이트를 친자감정에 사용할 경우 부 또는 모의 교배기록과 유전자형이 파악된 경우에는 100% 친자감정이 가능하다.

표 3

통계분석 결과

	H_e	PI	$PI_{\text{half-sibs}}$	PE_{pu}	PE
Total	0.761	1.44×10^{-45}	3.08×10^{-26}	0.999973	1.000000

<실시예 6>

한우 개체 식별을 위한 마이크로새틀라이트 마커의 선발 및 이의 한우 개체 식별력 검증

상기 실시예 4의 20개의 마이크로새틀라이트 중 H_e 추정치를 근거로 하여 다형성지수가 높은 11개의 마이크로새틀라이트 TGLA53, BMS1747, TGLA122, BM1824, TGLA227, BL1009, BM4305, INRA23, ETH3, SPS115, BM2113를 선발하였다.

상기에서 선발한 마이크로새틀라이트에 보편적으로 사용되고 있는 Applied Biosystems사의 StockmarkersTM(TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225, BM1824)와 중복되지 않는 3개의 마이크로새틀라이트(BMS1747, BL1009, BM4305)를 추가하여 14개의 마이크로새틀라이트 마커를 이용하여 무작위교배집단으로 가정한 후 이들의 동일개체 출현확률 및 친자감별확률을 실시예 4와 동일한 방법으로 계산하였다.

그 결과, 14개의 마이크로새틀라이트 마커를 이용하여 무작위교배집단으로 가정하여 분석한 추정치의 경우 H_e 추정치로 선발한 11개의 마이크로새틀라이트 보다 100000000배, Applied Biosystems사의 StockmarkersTM 마이크로새틀라이트 보다 1000000배 정도의 동일개체 출현확률이 낮게 나타났다(표4 참조).

이로부터 본 발명에서 선발한 14개의 마이크로새틀라이트 마커가 기존에 수입되고 있는 과점제품에 비해 1000000배 정도 높은 개체 식별력을 가지고 있음을 알 수 있었으며, 나아가 본 발명의 마이크로새틀라이트 마커는 단순한 한우 개체식별 뿐 만 아니라, 한우의 동일성 검증에도 매우 유용함을 알 수 있었다.

표 4

동일개체 출현확률 및 친자감별확률

	PI	PI_{sibs}	$PI_{\text{half-sibs}}$	PE_{pu}	PE
H_e	1.41×10^{-20}	2.01×10^{-6}	1.58×10^{-14}	0.99767236	0.99995464
ABI	1.31×10^{-23}	1.09×10^{-6}	2.52×10^{-16}	0.99591705	0.99990134
ABI+ H_e	1.12×10^{-29}	2.63×10^{-8}	1.73×10^{-20}	0.99920174	0.99999355

- H_e : H_e 지수가 높은 11개의 마이크로새틀라이트를 이용한 동일개체 출현확률 및 친자감별확률 값을 분석

- ABI : Applied Biosystems사의 StockmarkersTM의 11개 마이크로새틀라이트를 이용한 동일개체 출현확률 및 친자감별확률 값을 분석

- ABI+ H_e : Applied Biosystems사의 StockmarkersTM의 11개 마이크로새틀라이트와 H_e 지수가 높은 11개의 마이크로새틀라이트 중 중복되지 않는 3개의 마이크로새틀라이트를 더하여 14개의 마이크로새틀라이트를 이용한 동일개체 출현확률 및 친자감별확률 값을 분석

<79>

<실시예 7>

<80>

특정 염기서열을 추가한 역방향 프라이머의 효과

<81>

상기 실시예 5에서 선발한 14개의 마이크로새틀라이트 마커 중 11개의 마이크로새틀라이트 마커에 대한 역방향 프라이머 제작시 특정 염기서열(GTTTCT)을 포함하여 제작한 프라이머와 그렇지 않은 프라이머를 각각 사용하여 PCR 증폭을 수행하고 이를 비교분석하였다.

<82>

멀티플렉스 PCR은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 주형 DNA 6.6 μ g, 각각의 프라이머 세트 8.25 μ l, Hot starte Taq DNA 폴리머라아제 1.8 unit((주)바이오니아), 10 $\times$ 완충용액 1.5 μ l, dNTP 1.5 μ l의 조성에 증류수를 첨가하여 최종 부피가 15 μ l가 되도록 하였다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 15분간 처리한 후 94 $^{\circ}$ C에서 60초, 58 $^{\circ}$ C에서 75초, 72 $^{\circ}$ C에서 60초를 1 사이클로 하여 4회 반복하고, 94 $^{\circ}$ C에서 60초, 57 $^{\circ}$ C에서 75초, 72 $^{\circ}$ C에서 60초를 1 사이클로 하여 4회 반복 후 94 $^{\circ}$ C에서 60초, 56 $^{\circ}$ C에서 75초, 72 $^{\circ}$ C에서 60초를 1 사이클로 하여 24회 반복하였다. 그리고 65 $^{\circ}$ C에서 30분간 신장시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 종료하였다. PCR 산물은 ABI-3100 자동염기서열 분석장치(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 크기별로 분류되도록 전기영동하고, Genemapper version 4.0(Applied Biosystems, USA)을 이용하여 크기와 표식자의 종류별로 분류한 후 마이크로소프트 엑셀(Microsoft, USA)을 이용하여 자료를 취합하였다.

<83>

실험 결과, 특정 염기서열을 추가하여 제작한 역방향 프라이머를 사용할 경우 정확한 대립유전자(allele)를 검출하여 유전자형을 결정할 수 있었다. 유전자형을 결정하는 장비인 Applied Biosystems사의 염기서열 분석장비를 통해 얻을 수 있는 전기영동상의 면적을 비교해보면 역방향 프라이머에 특정 염기서열을 추가할 경우, 그렇지 않은 경우보다 피크의 면적이 좁아 정확한 유전자형 값을 얻을 수 있었다(도 1 및 도 2). 특정 염기서열을 포함한 역방향 프라이머를 사용한 마이크로새틀라이트 중 TGLA227과 TGLA53을 제외한 모든 마이크로새틀라이트의 피크 모양이 특정염기서열을 포함하지 않은 역방향 프라이머를 사용한 것에 비하여 피크모양이 안정적이며, 스테터 밴드(stutter band)가 제거되어 유전자형 결정에 적합한 모양을 나타내었다. 유전자형 결정시 전기영동상의 피크 값 0.1 차이로 다른 유전자형을 가질 수 있는데 이때 전기영동상의 피크 면적은 유전자형을 결정하는 피크 값에 영향을 미친다. 이는 개체의 고유한 유전자형이 실험 단계에서의 오류로 변형될 수 있다는 것을 의미한다.

<84>

따라서 본 발명의 방법에 따라 GTTTCT 염기를 역방향 프라이머에 추가함으로써 이러한 오류를 최소화할 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

<85>

도 1의 A에서 <6bp>는 Applied Biosystems사 StockmarkersTM와 동일한 11개의 마이크로새틀라이트를 이용하여 멀티플렉스 PCR 시스템에서 역방향 프라이머에 GTTTCT 염기를 추가하지 않고 반응하여 Applied Biosystems사 염기서열분석장치 ABI3100의 대립유전자분석 모드로 전기영동한 결과이고 <6bp>는 멀티플렉스 PCR 시스템에서 역방향 프라이머에 GTTTCT 염기를 추가하여 <-6bp>와 동일한 방법으로 전기영동한 결과이며, B는 GTTTCT 염기를 추가하여 14개의 마이크로새틀라이트에 성감별 프라이머 2쌍을 추가하여 멀티플렉스 PCR 수행 후 PCR 산물을 이용해 전기영동한 결과를 나타낸 것이다.

<86>

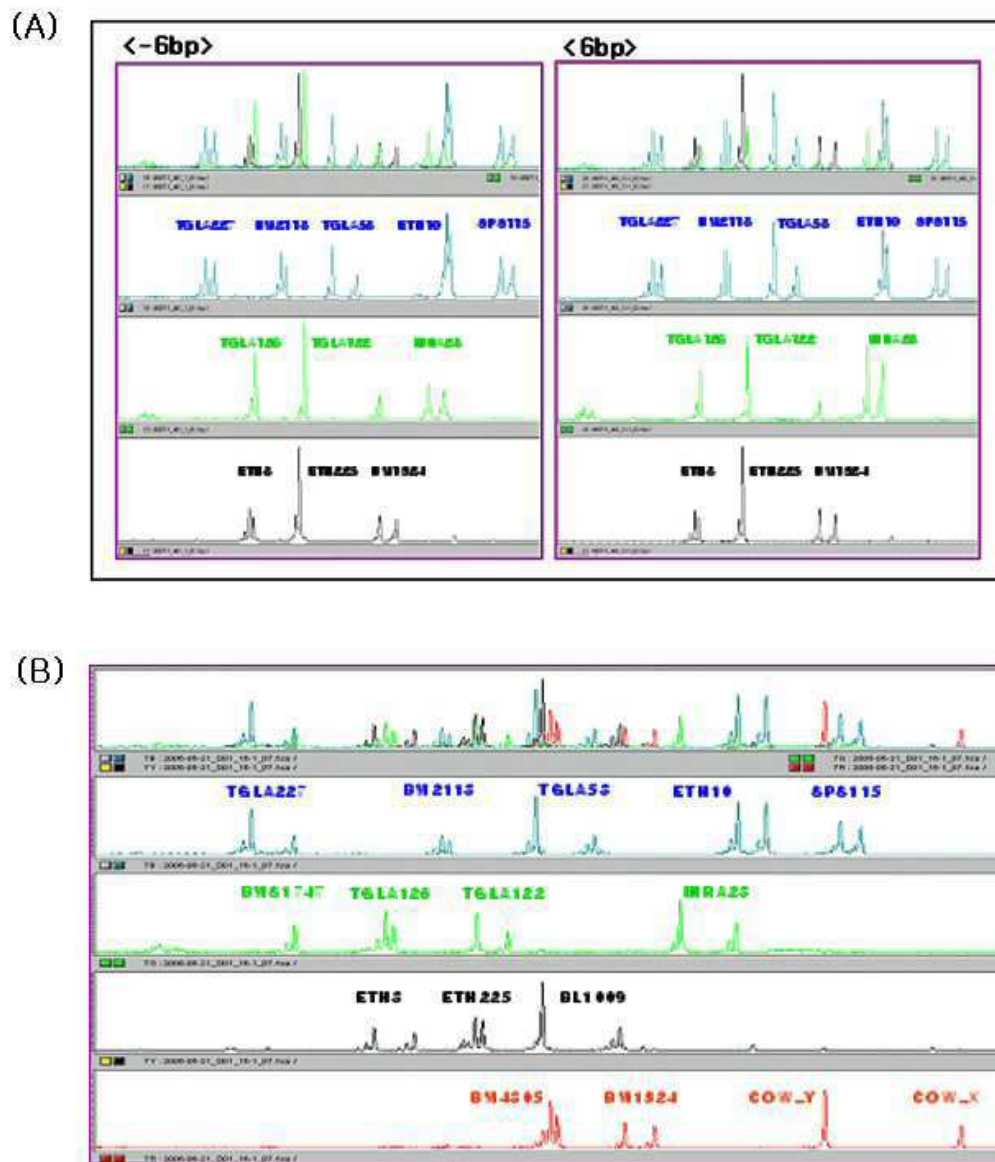
도 2a는 멀티플렉스 PCR 시스템에서 역방향 프라이머에 GTTTCT 염기를 추가하지 않고 반응하여 얻은 산물과 추가하여 반응한 산물의 전기영동상의 면적 및 피크 유형을 비교한 결과이다.

<87>

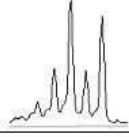
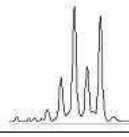
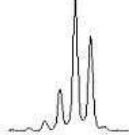
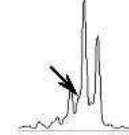
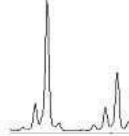
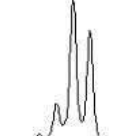
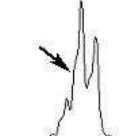
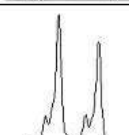
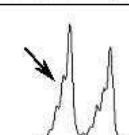
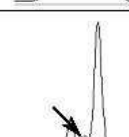
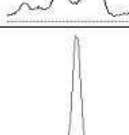
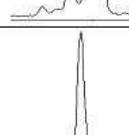
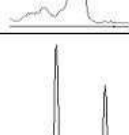
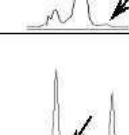
도 2b는 멀티플렉스 PCR 시스템에서 역방향 프라이머에 GTTTCT 염기를 추가하지 않고 반응하여 얻은 산물과 추가하여 반응한 산물의 전기영동상의 면적 및 피크 유형을 비교한 결과이다.

도면

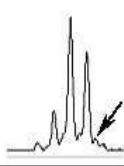
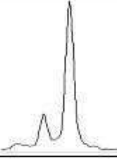
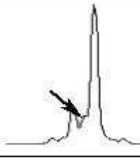
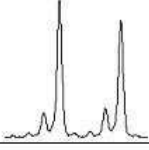
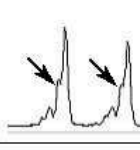
도면1



도면2a

Lable	초위성체	6bp	-6bp	비 고
FAM	TGLA227			- 차이없음
FAM	BM2113			- 피크모양 개선
FAM	TGLA53			- 차이없음
FAM	ETH10			- 피크모양 개선 - 스테터밴드 제거
FAM	SPS115			- 피크모양 개선 - 스테터밴드 제거
VIC	TGLA126			- 스테터밴드 제거
VIC	TGLA122			- 스테터밴드 제거
VIC	INRA23			- 피크모양 개선 - 스테터밴드 제거

도면2b

Lable	초위성체	6bp(A)	-6bp(B)	비고
NED	ETH3			- 스테터밴드 제거
NED	ETH225			- 스테터밴드 제거
NED	BM1824			- 피크모양 개선 - 스테터밴드 제거

서열목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
GenDocs, Inc
Hankyong Industry Academic Cooperation Center

<120> Method for identification korean cattle using multiplex PCR

<160> 40

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGLA227 forward primer

<400> 1

cgaattccaa atctgttaat ttgct

25

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TGLA227 reverse primer

<400> 2
gtttctacag acagaaactc aatgaaagca

30

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TGLA126 forward primer

<400> 3
ctaatttaga atgagagagg cttct

25

<210> 4
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TGLA126 reverse primer

<400> 4
gtttctttgg tctctattct ctgaatattc c

31

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TGLA122 forward primer

<400> 5

ccctcctcca ggtaaatcag c 21

<210> 6
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TGLA122 reverse primer

<400> 6
gtttctaatac acatggcaaa taagtacata c 31

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BM1824 forward primer

<400> 7
gagcaaggtg tttttccaat c 21

<210> 8
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BM1824 reverse primer

<400> 8
gttttcatt ctccaactgc ttccttg 27

<210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ETH10 forward primer

<400> 9
gttcaggact ggccttgcta aca 23

<210> 10
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ETH 10 reverse primer

<400> 10
gtttctctc cagccactt tctctctc 29

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BM2113 forward primer

<400> 11
gctgccttct accaaatacc c 21

<210> 12
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BM2113 reverse primer

<400> 12

gtttctcttc ctgagagaag caacacc

27

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TGLA53 forward primer

<400> 13
gctttcagaa atagtttgca ttca

24

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TGLA53 reverse primer

<400> 14
gtttctatct tcacatgata ttacagcaga

30

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SPS115 forward primer

<400> 15
aaagtgacac aacagcttct ccag

24

<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> SPS115 reverse primer

<400> 16
gtttctaag agtgcctag ttggctgtg 30

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> INRA23 forward primer

<400> 17
gagtagagct acaagataaa cttc 24

<210> 18
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> INRA23 reverse primer

<400> 18
gtttctaag tacagggtgt tagatgaact 30

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ETH3 forward primer

<400> 19

gaacctgcct ctctgcatt gg 22

<210> 20
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ETH3 reverse primer

<400> 20
gtttctactc tgcctgtggc caagtagg 28

<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ETH225 forward primer

<400> 21
gatcaccttg ccactatttc ct 22

<210> 22
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ETH225 reverse primer

<400> 22
gtttctacat gacagccagc tgctact 27

<210> 23
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BL1009 forward primer

<400> 23
tctgtgtcaa agtcctgagg g 21

<210> 24
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BL1009 reverse primer

<400> 24
gtttctcctg gcattctgca gtcc 24

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BM4305 forward primer

<400> 25
ccaagacatg aaagcaatct g 21

<210> 26
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BM4305 reverse primer

<400> 26

gtttctctct aggtacatcc atgttgca

28

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ILSTS006 forward primer

<400> 27
tgtctgtatt tctgctgtgg

20

<210> 28
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ILSTS006 reverse primer

<400> 28
gtttctacac ggaagcgatc taaacg

26

<210> 29
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ILSTS013 forward primer

<400> 29
cttgatcctt atagaactgg

20

<210> 30
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ILSTS013 reverse primer

<400> 30
gtttctacac aaaatcagat cagtgg 26

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ILSTS028 forward primer

<400> 31
tccagatttt gtaccagacc 20

<210> 32
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ILSTS028 reverse primer

<400> 32
gtttctgtca tgcatacct ttgagc 26

<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ILSTS103 forward primer

<400> 33

ccagtctgcc aaaatctatc g 21

<210> 34
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> ILSTS103 reverse primer

<400> 34
 gtttcttatc aggcgtagta aacagc 26

<210> 35
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> BMS1747 forward primer

<400> 35
 tctaagctcc ttgaagacag gc 22

<210> 36
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> BMS1747 reverse primer

<400> 36
 gtttctggct ttgtattccc ctctcc 26

<210> 37
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> BM1818 forward primer

<400> 37
agctgggaat ataaccaaag g 21

<210> 38
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> BM1818 reverse primer

<400> 38
gtttctagtg ctttcaaggt ccatgc 26

<210> 39
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ETH185 forward primer

<400> 39
tgcattggaca gagcagcctg gc 22

<210> 40
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> ETH185 reverse primer

<400> 40
gtttctgcac cccaacgaaa gctcccag 28

