



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0090278  
(43) 공개일자 2023년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**C12Q 1/6888** (2018.01)

(52) CPC특허분류  
**C12Q 1/6888** (2018.05)  
**C12Q 2531/113** (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0174205

(22) 출원일자 2022년12월13일

심사청구일자 2022년12월13일

(30) 우선권주장

1020210177898 2021년12월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

국립공원공단

강원도 원주시 혁신로 22 (반곡동)

(72) 발명자

임현태

경상남도 진주시 새평거로 111, 308동 1204호(평거동, 평거휴먼시아3단지)

명철현

경상남도 창원시 성산구 신촌로 63, 206동 508호(신촌동, 동성아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인정진

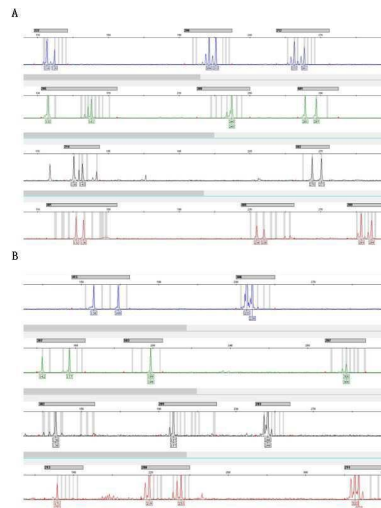
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 반달가슴곰 개체 식별용 조성물

(57) 요약

본 발명은 반달가슴곰 개체 식별용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 초위성체 마커를 포함하는 조성물, 상기 초위성체 마커에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 조성물은 신속하고 정확하게 반달가슴곰 개체를 식별할 수 있을 뿐만 아니라 반달가슴곰의 유전적 다양성 및 유전적 유연 관계를 효과적으로 분석하여 과학적이고 객관적인 서식 관리 및 유전자원 보존의 효과를 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2537/143 (2013.01)

C12Q 2600/124 (2013.01)

C12Q 2600/156 (2013.01)

C12Q 2600/16 (2013.01)

(72) 발명자

**강호찬**

경상남도 진주시 대신로475번길 16-5, 107동 402호(초전동, 청구타운)

**김은호**

경상남도 진주시 가호로 26, 208동 1205호(가좌동, 진주가좌주공아파트)

**김지영**

경상남도 진주시 예나로228번길 10, 1002동 102호(충무공동, 혁신도시엔에이치에프10단지)

**한상현**

제주특별자치도 제주시 도남로10길 37, 501호(도남동, 한솔아파트)

**김태욱**

서울특별시 은평구 진관1로 77-8, 405동 602호(진관동, 은평뉴타운 폭포동)

**장정재**

경기도 고양시 덕양구 충장로 118-30, 226동 1904호(행신동, 샘터마을2단지아파트)

**박중섭**

전라남도 순천시 해룡면 신대로 66, 208동 1002호(중흥에스-클래스2단지)

**남성열**

인천광역시 계양구 황어로 139, 203동 602호(이화동, 이화신동아파밀리에)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

ABB222, ABB206, ABB212, ABB205, ABB308, ABB601, ABB401, ABB209, ABB214, ABB502 및 ABB408으로 이루어진 초위성체 마커 세트 1; 및

ABB413, ABB306, ABB307, ABB503, ABB207, ABB201, ABB203, ABB302, ABB213, ABB208 및 ABB211으로 이루어진 초위성체 마커 세트 2; 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 초위성체 마커세트를 포함하는 반달가슴곰 개체 식별용 초위성체 마커 조성물.

#### 청구항 2

ABB222, ABB206, ABB212, ABB205, ABB308, ABB601, ABB401, ABB209, ABB214, ABB502 및 ABB408으로 이루어진 초위성체 마커 각각에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트; 및

ABB413, ABB306, ABB307, ABB503, ABB207, ABB201, ABB203, ABB302, ABB213, ABB208 및 ABB211으로 이루어진 초위성체 마커 각각에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트; 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는, 반달가슴곰 개체 식별용 조성물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, ABB222에 특이적인 서열번호 1 및 2로 표시되는 프라이머 세트, ABB206에 특이적인 서열번호 3 및 4로 표시되는 프라이머 세트, ABB212에 특이적인 서열번호 5 및 6으로 표시되는 프라이머 세트, ABB205에 특이적인 서열번호 7 및 8로 표시되는 프라이머 세트, ABB308에 특이적인 서열번호 9 및 10으로 표시되는 프라이머 세트, ABB601에 특이적인 서열번호 11 및 12로 표시되는 프라이머 세트, ABB401에 특이적인 서열번호 13 및 14로 표시되는 프라이머 세트, ABB209에 특이적인 서열번호 15 및 16으로 표시되는 프라이머 세트, ABB214에 특이적인 서열번호 17 및 18로 표시되는 프라이머 세트, ABB502에 특이적인 서열번호 19 및 20으로 표시되는 프라이머 세트 또는 ABB408에 특이적인 서열번호 21 및 22로 표시되는 프라이머 세트를 포함하는, 반달가슴곰 개체 식별용 조성물.

#### 청구항 4

제2항에 있어서, ABB413에 특이적인 서열번호 23 및 24로 표시되는 프라이머 세트, ABB306에 특이적인 서열번호 25 및 26으로 표시되는 프라이머 세트, ABB307에 특이적인 서열번호 27 및 28로 표시되는 프라이머 세트, ABB503에 특이적인 서열번호 29 및 30으로 표시되는 프라이머 세트, ABB207에 특이적인 서열번호 31 및 32로 표시되는 프라이머 세트, ABB201에 특이적인 서열번호 33 및 34로 표시되는 프라이머 세트, ABB203에 특이적인 서열번호 35 및 36으로 표시되는 프라이머 세트, ABB302에 특이적인 서열번호 37 및 38로 표시되는 프라이머 세트, ABB213에 특이적인 서열번호 39 및 40으로 표시되는 프라이머 세트, ABB208에 특이적인 서열번호 41 및 42로 표시되는 프라이머 세트 또는 ABB211에 특이적인 서열번호 43 및 44로 표시되는 프라이머 세트를 포함하는, 반달가슴곰 개체 식별용 조성물.

#### 청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 반달가슴곰 개체 식별용 키트.

## 청구항 6

제5항에 있어서,  
상기 키트는 PCR 키트인 것인, 반달가슴곰 개체 식별용 키트.

## 청구항 7

- a) 생물학적 시료에서 추출된 게놈 DNA와 제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 이용하여 PCR 반응을 수행하는 단계; 및
- b) PCR 반응의 증폭 산물을 분석하는 단계; 를 포함하는, 반달가슴곰 개체 식별 방법.

## 청구항 8

제7항에 있어서,  
상기 단계 a)의 PCR 반응은 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 다중 중합효소연쇄반응(Multiplex PCR), 터치다운 중합효소연쇄반응(Touchdown PCR), 경쟁적 중합효소연쇄반응(Competitive PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), 실시간 정량적 중합효소연쇄반응(Real-time Quantitative-PCR), DNA 칩 및 등온증폭법(LAMP PCR)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 이용하는 것인, 반달가슴곰 개체 식별 방법.

## 청구항 9

제7항에 있어서,  
상기 단계 b)의 PCR 반응의 증폭 산물의 분석은 겔 전기영동, 모세관 전기영동, DNA 칩, 방사선 측정, 형광 측정 및 인광 측정으로 이루어진 군에서 선택되는 선택되는 1종 이상을 이용하는 것인, 반달가슴곰 개체 식별 방법.

## 청구항 10

제7항에 있어서,  
상기 반달가슴곰은 우수리아종(Ursus thibetanus ussuricus)인 것인, 반달가슴곰 개체 식별 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 반달가슴곰 개체 식별용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 반달가슴곰 개체 식별용 초위성체 마커 또는 이에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트를 포함하는 반달가슴곰 개체 식별용 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 반달가슴곰(Asiatic Black Bear)은 중간 크기의 곰으로 아프가니스탄과 파키스탄에서부터 인도와 중국을 가로질러 한국, 일본까지 아시아 남부 지역에 널리 분포하고 있으며, 국제자연보전연맹(IUCN; International Union for Conservation of Nature)이 지정한 적색목록에 따르면 현재 야생에서 높은 절멸 위험에 처해있는 취약(Vulnerable)종이다.

[0003] 국내의 반달가슴곰은 일제 강점기와 한국 전쟁 그리고 경제 발전으로 서식지가 파괴되고 밀렵과 남획 등으로 인해 개체 수가 급감하였다. 그에 따라 환경부에서 1982년에 천연기념물 제329호, 2012년에 멸종위기야생생물 1급으로 지정하여 법적으로 보호하고 있다.

[0004] Garshelis 및 Steinmetz(2020)에 따르면 반달가슴곰은 세계적으로 7종의 아종이 확인되었으며, 한국, 북한, 중국 북부, 러시아 극동 지역에 서식하는 개체들은 반달가슴곰 우수리아종(*Ursus thibetanus ussuricus*)에 속한다(Han et al., 2019). 반달가슴곰은 넓은 행동권을 가진 종으로서 서식지를 보존하는 것이 같은 공간 내의 다른 종들을 함께 보호하는 효과를 가지는 우산종이기에 생태계 보전에 활용 가치가 크다. 따라서 2004년부터 지리산 국립공원을 중심으로 복원사업이 진행되었으며, 동일 아종인 북한, 중국 북부, 러시아 연해주 지역의 야생 반달가슴곰이 재도입되었다.

[0005] Bae와 Oh(2021)에 따르면 복원사업이 시작된 후 개체군이 빠르게 성장하여 2019년 기준 67 개체가 야생에서 활동 중인 것으로 확인되었으며, 이는 지리산에서 포용할 수 있는 적정 개체수의 범위에 속한다(Han et al., 2020). 그러나 2017년 지리산 국립공원 내에 추적이 불가능한 개체가 28마리로 확인되었으며, 지리산 국립공원에 방사된 반달가슴곰이 멀리 떨어진 지역에서 발견되는 등의 사례가 수 차례 발생한 바 있다. 이는 인간과 반달가슴곰 사이에 서식지가 겹치는 등의 혼란을 일으킬 수 있기에 반달가슴곰은 VHF 주파수 발신기와 수신기, MS 마커(초위성체 마커; Microsatellite marker)를 이용하여 상호보완적으로 추적 및 관리되고 있다. MS 마커는 1~6 bp의 염기서열이 반복되는 부분으로 상대적으로 높은 다형성을 나타내며, PCR 기법을 통한 증폭된 결과로 대립유전자형을 쉽게 분석할 수 있어 친자 감별, 계통 분류, 유전적 유연관계 분석에 있어서 효율적인 분자표지자로 활용되고 있다.

[0006] 하지만 자연교배를 통해 증식되는 미확인 개체의 출현으로 기존에 구축된 MS 마커를 이용한 개체 식별에 어려움이 발생하고 있어 보다 정확한 추적과 관리를 위해 새로운 MS 마커 세트의 개발이 필요한 상황이다. 또한, 기존의 반달가슴곰 연구는 개체 밀도, 식이 습성, 서식지 이용, 행동권 분석 등에 집중되어 있으며 유전적 다양성과 유전 관계에 대한 분석은 미비한 실정하기에 유전학적 연구가 필요하다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 상술한 기술적 배경하에, 본 발명의 목적은 반달가슴곰의 개체 식별을 위한 새로운 MS 마커 세트를 개발하고 유전적 유전 관계를 분석하여 반달가슴곰 개체 관리 및 유전자원을 보전하기 위한 기초 자료를 제공하는 것에 있다.

[0008] 따라서 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 반달가슴곰의 개체 식별용 마커 조성물, 상기 마커에 특이적인 프라이머를 이용한 반달가슴곰의 개체 식별용 조성물 및 이를 이용한 반달가슴곰의 개체 식별 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제(들)로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제(들)는 이하의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해 본 발명은 ABB222, ABB206, ABB212, ABB205, ABB308, ABB601, ABB401, ABB209, ABB214, ABB502 및 ABB408으로 이루어진 초위성체 마커 세트 1; 및 ABB413, ABB306, ABB307, ABB503, ABB207, ABB201, ABB203, ABB302, ABB213, ABB208 및 ABB211으로 이루어진 초위성체 마커 세트 2; 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 초위성체 마커 세트를 포함하는, 반달가슴곰 개체 식별용 초위성체 마커 조성물을 제공한다.

[0011] 또한 본 발명은 ABB222, ABB206, ABB212, ABB205, ABB308, ABB601, ABB401, ABB209, ABB214, ABB502 및 ABB408으로 이루어진 초위성체 마커 각각에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트; 및 ABB413, ABB306, ABB307, ABB503, ABB207, ABB201, ABB203, ABB302, ABB213, ABB208 및 ABB211으로 이루어진 초위성체 마커 각각에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트; 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는, 반달가슴곰 개체 식별용 조성물을 제공한다.

[0012] 상기 프라이머 세트는 ABB222에 특이적인 서열번호 1 및 2로 표시되는 프라이머 세트, ABB206에 특이적인 서열번호 3 및 4로 표시되는 프라이머 세트, ABB212에 특이적인 서열번호 5 및 6으로 표시되는 프라이머 세트, ABB205에 특이적인 서열번호 7 및 8로 표시되는 프라이머 세트, ABB308에 특이적인 서열번호 9 및 10으로 표시되는 프라이머 세트, ABB601에 특이적인 서열번호 11 및 12로 표시되는 프라이머 세트, ABB401에 특이적인 서열번호 13 및 14로 표시되는 프라이머 세트, ABB209에 특이적인 서열번호 15 및 16으로 표시되는 프라이머 세트,

ABB214에 특이적인 서열번호 17 및 18로 표시되는 프라이머 세트, ABB502에 특이적인 서열번호 19 및 20으로 표시되는 프라이머 세트 또는 ABB408에 특이적인 서열번호 21 및 22로 표시되는 프라이머 세트일 수 있다.

[0013] 상기 프라이머 세트는 ABB413에 특이적인 서열번호 23 및 24로 표시되는 프라이머 세트, ABB306에 특이적인 서열번호 25 및 26으로 표시되는 프라이머 세트, ABB307에 특이적인 서열번호 27 및 28로 표시되는 프라이머 세트, ABB503에 특이적인 서열번호 29 및 30으로 표시되는 프라이머 세트, ABB207에 특이적인 서열번호 31 및 32로 표시되는 프라이머 세트, ABB201에 특이적인 서열번호 33 및 34로 표시되는 프라이머 세트, ABB203에 특이적인 서열번호 35 및 36으로 표시되는 프라이머 세트, ABB302에 특이적인 서열번호 37 및 38로 표시되는 프라이머 세트, ABB213에 특이적인 서열번호 39 및 40으로 표시되는 프라이머 세트, ABB208에 특이적인 서열번호 41 및 42로 표시되는 프라이머 세트 또는 ABB211에 특이적인 서열번호 43 및 44로 표시되는 프라이머 세트일 수 있다.

[0014] 또한 본 발명은 상기 조성물을 포함하는, 반달가슴곰 개체 식별용 키트를 제공한다.

[0015] 상기 키트는 PCR 키트일 수 있다.

[0016] 또한 본 발명은 a) 생물학적 시료에서 추출된 게놈 DNA 및 상기 반달 가슴곰 개체 식별용 조성물을 이용하여 PCR 반응을 수행하는 단계; 및 b) PCR 반응의 증폭 산물을 분석하는 단계; 를 포함하는, 반달가슴곰 개체 식별 방법을 제공한다.

[0017] 상기 단계 a)의 PCR 반응은 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 다중 중합효소연쇄반응(Multiplex PCR), 터치다운 중합효소연쇄반응(Touchdown PCR), 경쟁적 중합효소연쇄반응(Competitive PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), 실시간 정량적 중합효소연쇄반응(Real-time Quantitative-PCR), DNA 칩 및 등온증폭법(LAMP PCR)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 이용하는 것일 수 있다.

[0018] 상기 단계 b)의 PCR 반응의 증폭 산물의 분석은 겔 전기영동, 모세관 전기영동, DNA 칩, 방사선 측정, 형광 측정 및 인광 측정으로 이루어진 군에서 선택되는 선택되는 1종 이상을 이용하는 것일 수 있다.

[0019] 상기 반달가슴곰은 우수리아종(*Ursus thibetanus ussuricus*)일 수 있다.

### 발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 초위성체 마커를 포함하는 조성물, 상기 초위성체 마커에 특이적인 프라이머 세트를 포함하는 조성물은 신속하고 정확하게 반달가슴곰 개체를 식별할 수 있을 뿐만 아니라 반달가슴곰의 유전적 다양성 및 유전적 유연 관계를 효과적으로 분석하여 과학적이고 객관적인 서식 관리 및 유전자원 보존의 효과를 제공할 수 있다.

[0021] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

### 도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 MS 마커 세트의 22개 초위성체 마커에 특이적인 프라이머를 이용한 PCR 산물 전기영동 결과 및 대립유전자 결정을 나타낸 것이다. A: MS 마커 세트 1, B: MS 마커 세트 2.

도 2는 MS 마커 세트를 이용하여 작성된 반달가슴곰 개체의 계통수(Phylogenetic tree)를 나타낸 도이다. A: MS 마커 세트 1, B: MS 마커 세트 2, C: MS 마커 세트 1+ MS 마커 세트 2.

도 3은 MS 마커 세트를 이용한 반달가슴곰 우수리아종 개체별 요인대응분석의 3차원 좌표를 나타낸 도이다. A: MS 마커 세트 1, B: MS 마커 세트 2, C: MS 마커 세트 1+ MS 마커 세트 2.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0024] 본 발명은 일 관점에서 ABB222, ABB206, ABB212, ABB205, ABB308, ABB601, ABB401, ABB209, ABB214, ABB502 및 ABB408으로 이루어진 초위성체 마커 세트 1; 및 ABB413, ABB306, ABB307, ABB503, ABB207, ABB201, ABB203, ABB302, ABB213, ABB208 및 ABB211으로 이루어진 초위성체 마커 세트 2; 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상

의 초위성체 마커 세트를 포함하는, 반달가슴곰 개체 식별용 초위성체 마커 조성물에 관한 것이다.

- [0025] 본 발명에서 용어 "초위성체(Microsatellite; MS)"는 진핵세포(eukaryotes) 유전자 전역에 걸쳐 분포하는 '모노-', '디-', '트리-' 및 '테트라-' 뉴클레오타이드 형태의 짧은 반복 염기서열(SSR; Simple sequence repeat)을 의미한다. 일반적으로 이러한 반복 서열은 염색체 내에서 10 내지 40 번 정도 단순반복(Tandem repeat)된 형태로 존재하며 특히 non-coding DNA에 주로 존재한다.
- [0026] 본 발명에서 용어 "초위성체 마커"는 상기 초위성체 반복 단위의 반복수에 변이가 존재하여 발생하는 DNA 다형을 검출하는 마커를 의미하며, 상기 'DNA 다형(Polymorphism)'이란 동일종간 생물 개체의 특이적 DNA 구조의 다양성을 의미한다.
- [0027] 본 명세서에서는 상기 용어 '초위성체 마커' 또는 'MS 마커'를 혼용하여 사용할 수 있다.
- [0028] Botstein, et al(1980)에 따르면, MS 마커의 다형성에 대하여 기대 이형접합률( $H_{exp}$ ) 값이 0.6 이상이고, 다양성 지수 및 다형정보량( $PIC$ ) 값이 0.5 이상일 경우 높은 다형성을 갖는 마커임을 보고하였다.
- [0029] 본 발명에서는 이형접합률 및 증폭 산물의 크기를 모두 고려하여, 동일 개체 출현 가능성을 낮추고 반달가슴곰의 개체 식별이 가능한 초위성체 마커 세트를 규명하였다.
- [0030] 상기 ABB222, ABB206, ABB212, ABB205, ABB308, ABB601, ABB401, ABB209, ABB214, ABB502 및 ABB408으로 이루어진 MS 마커 세트 1은 기대 이형접합률( $H_{exp}$ ) 평균값이 0.728,  $PIC$  평균값이 0.681로 나타났고, ABB413, ABB306, ABB307, ABB503, ABB207, ABB201, ABB203, ABB302, ABB213, ABB208 및 ABB211을 포함하는 MS 마커 세트 2는 기대 이형접합률( $H_{exp}$ ) 평균값이 0.721,  $PIC$  평균값이 0.671로 나타나 본 발명에 따른 초위성체 마커 세트는 높은 개체 식별력을 갖는 것으로 확인하였다.
- [0031] 구체적으로, 본 발명에 따른 초위성체 마커 세트는 개체 또는 종에 따라 초위성체 반복 단위의 반복수가 다양할 수 있으므로, 초위성체가 반복되는 부분의 양쪽 염기쌍 중에 계승상에서 독특한 서열을 프라이머 서열로 디자인하고 PCR 증폭을 수행한 다음, 수득하는 산물의 크기를 비교하여 개체 또는 종을 식별할 수 있다.
- [0032] 본 발명은 다른 관점에서 ABB222, ABB206, ABB212, ABB205, ABB308, ABB601, ABB401, ABB209, ABB214, ABB502 및 ABB408으로 이루어진 초위성체 마커 각각에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트; 및 ABB413, ABB306, ABB307, ABB503, ABB207, ABB201, ABB203, ABB302, ABB213, ABB208 및 ABB211으로 이루어진 초위성체 마커 각각에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트; 로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 포함하는, 반달가슴곰 개체 식별용 조성물에 관한 것이다.
- [0033] 본 발명에서 용어 "프라이머(Primer)"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(Template)과 염기쌍을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다.
- [0034] 상기 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 본 발명의 프라이머는, 각 마커 유전자에 특이적인 프라이머로 7 내지 50개의 뉴클레오타이드 서열을 가진 센스 및 안티센스 핵산일 수 있으며, 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 가질 수 있다.
- [0035] 본 발명의 프라이머는 포스포라미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체 (예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체 (예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다. 핵산은 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기, 예를 들면, 단백질 (예: 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그널 펩타이드, 폴리-L-리신 등), 삽입체 (예: 아크리딘, 프소랄렌 등), 킬레이트화제 (예: 금속, 방사성 금속, 철, 산화성 금속 등), 및 알킬화제를 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 핵산 서열은 또한 검출 가능한 시그널을 직접적으로 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 표지의 예로는 방사성 동위원소, 형광성 분자 및 바이오틴 등이 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 프라이머 세트는 본 발명에서 선발한 초위성체의 핵산 서열을 특이적으로 증폭할 수 있는 올리

고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로 본 발명의 초위성체 마커에 특이적으로 결합하여 핵산 증폭 산물을 생산할 수 있는 프라이머 세트라면 본 발명의 범주에 모두 포함될 수 있다.

[0037] 바람직하게는 상기 프라이머 세트는 ABB222에 특이적인 서열번호 1 및 2로 표시되는 프라이머 세트, ABB206에 특이적인 서열번호 3 및 4로 표시되는 프라이머 세트, ABB212에 특이적인 서열번호 5 및 6으로 표시되는 프라이머 세트, ABB205에 특이적인 서열번호 7 및 8로 표시되는 프라이머 세트, ABB308에 특이적인 서열번호 9 및 10으로 표시되는 프라이머 세트, ABB601에 특이적인 서열번호 11 및 12로 표시되는 프라이머 세트, ABB401에 특이적인 서열번호 13 및 14로 표시되는 프라이머 세트, ABB209에 특이적인 서열번호 15 및 16으로 표시되는 프라이머 세트, ABB214에 특이적인 서열번호 17 및 18로 표시되는 프라이머 세트, ABB502에 특이적인 서열번호 19 및 20으로 표시되는 프라이머 세트 또는 ABB408에 특이적인 서열번호 21 및 22로 표시되는 프라이머 세트일 수 있다.

[0038] 또한 상기 프라이머 세트는 ABB413에 특이적인 서열번호 23 및 24로 표시되는 프라이머 세트, ABB306에 특이적인 서열번호 25 및 26으로 표시되는 프라이머 세트, ABB307에 특이적인 서열번호 27 및 28로 표시되는 프라이머 세트, ABB503에 특이적인 서열번호 29 및 30으로 표시되는 프라이머 세트, ABB207에 특이적인 서열번호 31 및 32로 표시되는 프라이머 세트, ABB201에 특이적인 서열번호 33 및 34로 표시되는 프라이머 세트, ABB203에 특이적인 서열번호 35 및 36으로 표시되는 프라이머 세트, ABB302에 특이적인 서열번호 37 및 38로 표시되는 프라이머 세트, ABB213에 특이적인 서열번호 39 및 40으로 표시되는 프라이머 세트, ABB208에 특이적인 서열번호 41 및 42로 표시되는 프라이머 세트 또는 ABB211에 특이적인 서열번호 43 및 44로 표시되는 프라이머 세트일 수 있다.

[0039] 본 발명은 다른 관점에서 상기 반달가슴곰 개체 식별용 조성물을 포함하는, 반달가슴곰 개체 식별용 키트에 관한 것이다.

[0040] 상기 키트는 PCR 키트일 수 있다.

[0041] 본 발명에서 용어, "PCR(Polymerase chain reaction)"은 DNA의 원하는 부분을 복제 및 증폭시키는 분자생물학적 기술이다. 구체적으로, PCR은 일련의 세 개의 단계를 포함한다. PCR의 첫 번째 단계는 DNA를 변성(Denaturation)시키는 것으로, 두 가닥의 DNA를 가열함으로써 분리시킬 수 있다. 분리된 각각의 DNA는 주형(Template)으로서 역할을 하게 된다. 이때, 변성 온도는 DNA 내에 있는 G+C의 양과 길이에 따라 달라진다.

[0042] PCR의 두 번째 단계는 결합(Annealing)으로, 이 단계에서 초위성체 마커에 대한 프라이머들이 주형 DNA에 결합을 하게 된다. 결합(Annealing) 온도는 반응의 정확성을 결정하는 중요한 요소인데 만약 온도를 너무 높게 하면 프라이머가 주형 DNA에 너무 약하게 결합되어서 증폭된 DNA의 산물이 매우 적어진다. 또 만약 온도를 너무 낮게 하면 프라이머가 비특이적으로 결합하기 때문에 원하지 않는 DNA가 증폭될 수 있어, 사용하는 프라이머들의 종류 등에 따라 온도는 적절히 조절되어야 한다.

[0043] PCR의 세 번째 단계는 DNA 신장(Elongation) 단계이다. 이 단계에서 주형에 프라이머가 결합한 경우에는 열에 강한 DNA 중합효소가 주형 DNA에서 새로운 DNA를 만들게 된다. 상기 새로운 DNA 즉, PCR 증폭 산물의 크기 및 이를 통해 각 대립유전자에 포함된 반복단위를 분석해 개체 식별이 가능하다.

[0044] 본 발명은 다른 관점에서 a) 생물학적 시료에서 추출된 게놈 DNA 및 상기 반달 가슴곰 개체 식별용 조성물을 이용하여 PCR 반응을 수행하는 단계; 및 b) PCR 반응의 증폭 산물을 분석하는 단계; 를 포함하는, 반달가슴곰 개체 식별 방법에 관한 것이다.

[0045] 본 발명에서 용어, "생물학적 시료"는 본 발명의 초위성체 마커를 증폭할 수 있는, 반달가슴곰의 DNA를 포함하는 시료를 의미한다. 상기 생물학적 시료는 반달가슴곰의 모근, 혈액, 각종 체액, 분리된 조직, 분리된 세포 또는 타액과 같은 시료 등을 포함하며, 이에 한정되지 않는다.

[0046] 상기 단계 a)의 PCR 반응은 중합효소연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 멀티플렉스 중합효소연쇄반응(Multiplex PCR), 터치다운 중합효소연쇄반응(Touchdown PCR), 경쟁적 중합효소연쇄반응(Competitive PCR), 실시간 중합효소연쇄반응(Real-time PCR), 실시간 정량적 중합효소연쇄반응(Real-time Quantitative-PCR), DNA 칩 및 등온증폭법(LAMP PCR)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상을 이용하는 것일 수 있다.

[0047] 본 발명의 일실시예에 따르면 10개 이상의 초위성체 마커에 대한 분석을 수행하기 위해 멀티플렉스 PCR 및 터치다운 PCR을 수행하였다.

[0048] 상기 멀티플렉스 PCR은, 하나의 주형 DNA에 대한 한 개의 유전자를 증폭하는 단일 PCR과 달리 여러 개의 유전자

를 동시에 증폭하는 PCR 기법을 의미한다. 멀티플렉스 PCR에서는 단일 PCR 혼합물에 여러 프라이머 세트를 포함 시키는데, 이때 서로 다른 DNA 서열에 대해서는 각각에 특이적인 증폭 산물의 크기 범위를 나타내어 크기가 서로 중첩되지 않도록 하는 것이 바람직하다. 멀티플렉스 PCR 기법에서는 여러 종류의 다른 프라이머 세트를 한 튜브에 넣고 반응시키기 때문에, 프라이머 간에 억제(Inhibition)가 발생할 수 있으므로, 멀티플렉스 PCR에 적용할 때에는 증폭하고자 하는 유전자들에 대한 프라이머들의 선정이 중요하다. 또한 포함되는 여러 프라이머마다 적합한 결합 온도가 다를 수 있으므로, 멀티플렉스 PCR 적용시에는 단일 PCR 반응에서 포함되는 PCR 프라이머 세트 모두가 효과적으로 결합할 수 있도록 멀티플렉스 PCR에 적합한 결합 온도의 최적화가 요구된다.

[0049] 이 때 터치다운 방식을 이용할 수 있다. 터치다운 PCR은 처음 몇번의 사이클에서는 annealing 온도를 highest melting temperature(Tm)보다 높게 조정하는 것이다. 높은 annealing 온도는 프라이머 중첩 및 프라이머의 비특이적 결합을 방지할 수 있다. 그러나 높은 온도는 프라이머의 목적 서열에 대한 결합도 방해할 수 있으므로 annealing 온도를 사이클이 진행될 때마다 1도씩 낮추는 방식으로 optimal 온도에 도달하게 함으로써 목적하는 핵산 서열을 보다 정확하게 증폭할 수 있다.

[0050] 상기 단계 b)의 PCR 반응의 증폭 산물의 분석은 겔 전기영동, 모세관 전기영동, SDS-PAGE, DNA 칩, 방사선 측정, 형광 측정 및 인광 측정으로 이루어진 군에서 선택되는 선택되는 1종 이상을 이용하는 것일 수 있다.

[0051] 구체적으로, 전기영동법 등으로 PCR 증폭 산물을 크기별로 분류하여 이의 크기 결정을 통하여 각 대립유전자에 얼마나 많은 반복단위가 포함되어 있는지 알 수 있다. 따라서, 검증된 반달가슴곰의 유전자형 데이터가 기록된 데이터베이스 또는 규명된 정보를 이용하여, 실험을 통해 확인된 데이터를 서로 비교하여 개체를 식별할 수 있다.

[0052] 본 발명에 따른 초위성체 마커 세트에 대한 PCR 반응 수행 후, 동일개체출현률을 확인한 결과 초위성체 마커 세트 1을 이용한 경우 무작위 교배집단에서  $1.59 \times 10^{-11}$ , 반형매 교배집단 및 전형매 교배집단에서 각각  $5.78 \times 10^{-9}$  및  $3.44 \times 10^{-5}$ 의 빈도로 출현하였으며, 초위성체 마커 세트 2를 이용한 경우 무작위 교배집단에서  $2.46 \times 10^{-11}$ , 반형매 교배집단 및 전형매 교배집단에서 각각  $8.35 \times 10^{-9}$  및  $4.11 \times 10^{-5}$ 의 빈도로 출현한 결과에서 국내 야생에서 활동하는 반달가슴곰 개체수를 고려할 때 동일개체출현 가능성이 없는 것으로 판단할 수 있다.

[0053] 따라서 본 발명에 따른 초위성체 마커 세트를 이용하면 높은 정확도로 반달가슴곰 개체를 식별할 수 있다.

[0054] 상기 반달가슴곰은 우수리아종(*Ursus thibetanus ussuricus*)일 수 있다.

[0055] 본 발명의 일실시예에 따르면, 반달가슴곰 개체 간의 유전적 유연관계를 확인하기 위해 본 발명에 따른 MS 마커 세트를 이용한 계통수(Phylogenetic tree) NJ(Neighbor joining)를 확인한 결과 반달가슴곰 우수리아종 복원사업을 위해 도입한 북한, 중국, 러시아 개체들이 동일 아종으로서 하나의 군집을 이루고 있어 본 발명의 초위성체 마커 세트를 이용하여 식별된 반달가슴곰 우수리아종 개체들이 서로 유전적 유연관계에 있는 것으로 확인하였다.

[0056] 이러한 결과로 본 발명에 따른 초위성체 마커 세트를 활용한다면 향후 반달가슴곰의 개체가 증가하더라도 개체 식별이 가능할 것이며, 반달가슴곰에 대한 직접적인 접촉 없이 서식지에서 반달가슴곰의 유전자가 포함된 시료를 채집하고 DNA 분석을 통해 신속하고 정확한 서식 관리 및 유전자원의 보존이 가능할 것으로 확인하였다.

[0057]

[0058] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

#### [0060] 실시예 1: MS 마커 선발 및 프라이머 제작

[0061] 국립공원공단 국립공원연구원 생태보전실로부터 반달가슴곰 150마리의 gDNA를 제공받았으며 중복과 결측값을 지닌 개체를 제외한 90마리를 본 발명에 이용하였다.

[0062] NGS(Next Generation Sequencing)로 결정한 전장 유전체 서열 정보를 토대로 22개의 초위성체 마커(Microsatellite marker; 이하, MS 마커)를 선발한 다음, 상기 마커에 특이적인 프라이머를 제작하였다(Applied Biosystems, USA). 형광물질은 한 쌍의 증폭 프라이머 중 정방향 프라이머 끝에 FAM, VIC, NED, PET 물질 중 하나를 이용하여 표지하였다.

[0063] 22개의 MS 마커는 크기와 Multiplex PCR의 효율성을 고려하여 11개씩 총 2개 세트로 분류하고 각각 표 1 및 표 2에 정리하였다.

표 1

[0064]

|      | 표지<br>형광물질 | 좌위     | 크기 범위<br>(bp) | 프라이머 서열(5' ~ 3' )             | 서열<br>번호 |
|------|------------|--------|---------------|-------------------------------|----------|
| 세트 1 | FAM        | ABB222 | 108~128       | F : GCATGGTTGCACCAACTACA      | 1        |
|      |            |        |               | R : CAGGGGAAAAACATAAAAGTGA    | 2        |
|      |            | ABB206 | 193~213       | F : CCATTGTTTGAAGGCCTGAC      | 3        |
|      |            |        |               | R : CCAGAGAATCATCCCAAAAGA     | 4        |
|      |            | ABB212 | 245~263       | F : GGCAGAGTGTCTGGGCTTTA      | 5        |
|      |            |        |               | R : TGGAAATCGCCTTGATCTTT      | 6        |
|      | VIC        | ABB205 | 132~162       | F : CAGTGAGCCCAAAAAACATT      | 7        |
|      |            |        |               | R : TGGCTGACCACATGTTTCATT     | 8        |
|      |            | ABB308 | 222~240       | F : CTTAGGAGGCTGCTGTGAGC      | 9        |
|      |            |        |               | R : CCAGTGAAGCTATCTGGTTCTG    | 10       |
|      |            | ABB601 | 275~287       | F : TGGACAACAGCAGTGCAGTAA     | 11       |
|      |            |        |               | R : GAAAACCAACAGGCATCCAT      | 12       |
|      | NED        | ABB401 | 111~139       | F : GCCAAGACATAGAAACAATGTGG   | 13       |
|      |            |        |               | R : TGGCAGGATTTCTCTCTTTT      | 14       |
|      |            | ABB209 | 283~293       | F : ATCCACTTTTCTCCGTGGA       | 15       |
|      |            |        |               | R : TGGCAATATCATTCATCTTTGTT   | 16       |
|      | PET        | ABB214 | 129~147       | F : CTGCAACAGTCAAGACATGGA     | 17       |
|      |            |        |               | R : TTGTCATAAATGGCAAAATTCA    | 18       |
|      |            | ABB502 | 261~271       | F : PETAACACGACCACCAAGATTC    | 19       |
|      |            |        |               | R : GTTCTACGAATGCCAACCAAGGATA | 20       |
|      |            | ABB408 | 230~250       | F : ACATGCCAAAAATGCCTCAAG     | 21       |
|      |            |        |               | R : TCCATGCAAACATTCTTTTG      | 22       |

표 2

[0066]

|      | 표지<br>형광물질 | 좌위     | 크기 범위<br>(bp) | 프라이머 서열(5' ~ 3' )             | 서열<br>번호 |
|------|------------|--------|---------------|-------------------------------|----------|
| 세트 2 | FAM        | ABB413 | 149~165       | F : TCTCTGCATTCTTTCCAGCA      | 23       |
|      |            |        |               | R : GGAAAGCGTTCGATGTCATT      | 24       |
|      |            | ABB306 | 229~244       | F : CCTATGTGGCAATGTCTGCT      | 25       |
|      |            |        |               | R : CAAATGAAGATTTTAGGCCTCT    | 26       |
|      | VIC        | ABB307 | 137~155       | F : AAAGTGAAGATCTGGGCTGGA     | 27       |
|      |            |        |               | R : TCGCATTTCCATTCTTAGCA      | 28       |
|      |            | ABB503 | 183~198       | F : TTTTGCCATCAGGACTCTCC      | 29       |
|      |            |        |               | R : ATTCAACTTTCCAGGCTCCA      | 30       |
|      |            | ABB207 | 292~306       | F : GAAAAGACAAGCCACGGAATG     | 31       |
|      |            |        |               | R : TGTCGCAGTTCCAGATTTTGA     | 32       |
|      | NED        | ABB201 | 189~205       | F : TGTTCCTCATGTTTCACAA       | 33       |
|      |            |        |               | R : GTTCTAAGGTGGGAAACCAAC     | 34       |
|      |            | ABB203 | 238~258       | F : TTTTTCAGGTATGTGTGAGCA     | 35       |
|      |            |        |               | R : GTTCTAAAGCAGCAGTATGGCAAAA | 36       |
|      | PET        | ABB302 | 129~156       | F : TGGATTGTCCTAAGAAGAAA      | 37       |
|      |            |        |               | R : TTTCCACACTTCTTGCTA        | 38       |
|      |            | ABB213 | 163~173       | F : AATGCAAGCATGGACAGTG       | 39       |
|      |            |        |               | R : TGCCTATTCTACACAAATGGAAA   | 40       |
|      |            | ABB208 | 211~231       | F : CACAAATTCCTGTGGCCAAT      | 41       |
|      |            |        |               | R : CCAAGACATGGAAGCAACCT      | 42       |
|      |            | ABB211 | 320~334       | F : GCCAATTATTTGCATTCTCCA     | 43       |
|      |            |        |               | R : CGCACAAACAAGGAAAACAA      | 44       |

[0068] 실시예 2: PCR 수행

[0069] 실시예 1의 선발된 22개의 게놈 DNA 시료 및 프라이머 세트를 사용하여 멀티플렉스 중합효소연쇄반응(Multiplex PCR)을 하기 조건으로 수행하였다.

[0070] 각 주형 DNA 100 ng, 1  $\mu$ l, 10 X 완충용액 2.5  $\mu$ l, 10 mM dNTP 2  $\mu$ l, MS 마커 프라이머 양방향 혼합액 6  $\mu$ l, Prime Taq DNA 중합효소 0.3 Unit (Genetbio, 한국)에 증류수를 조성하여 최종 부피(volume) 25  $\mu$ l로 반응시켰다.

[0071] 프라이머의 중첩 및 비특이적 결합을 방지하고 목적 핵산 서열에 대한 정확한 증폭을 위해 Touchdown 방식으로 진행하였다.

[0072] 구체적으로, 95℃에서 10분간 최초 변성(Predenaturation)을 실시한 후 변성(Denaturation), 결합(Annealing), 증폭(Extension) 반응을 94℃에서 60초, 61℃에서 75초, 72℃에서 60초를 5회 반복, 94℃에서 60초, 60℃에서 75초, 72℃에서 60초를 5회 반복, 끝으로 94℃에서 60초, 59℃에서 75초, 72℃에서 60초를 25회 반복한 후 65℃에서 30분간 최종 증폭(Elongation)하고 8℃에서 종료하였다.

[0073] PCR 증폭산물을 ABI-3730 자동염기서열 분석장치(Applied Biosystems, 미국)를 이용하여 크기별로 분류되도록 전기영동을 실시하고 이후 GeneMapper version 5(Applied Biosystems, 미국)를 이용하여 대립유전자형을 표식자별로 결정한 후(도 1) 마이크로소프트 엑셀(Microsoft, 미국)을 이용하여 자료를 취합하고 하기 실시예 3의 통계 분석에 이용하였다.

[0074] ABI-3730을 이용한 multiplex PCR의 형광 마커 결과 MS 마커 세트 1을 이용한 PCR 증폭 산물은 도 1의 A에 나타내고 MS 마커 세트 2를 이용한 PCR 증폭 산물은 도 1의 B에 나타냈다.

[0076] 실시예 3: MS 마커의 다형지수 및 F-통계량 추정

[0077] MS 마커의 대립유전자 수(No. of Allele), 기대 이형접합율(Expected Heterozygosity; 이하,  $H_{exp}$ ), 관찰 이형접합율(Observed Heterozygosity; 이하,  $H_{obs}$ ), 다양성 지수 및 다형정보량(Polymorphism Information Content; 이하,  $PIC$ )을 계산하기 위해 CERVUS version 3.0.7(Marshall et al., 1998)을 이용하였다.

[0078] 근친 교배 계수(Inbreeding coefficient; 이하,  $F_{is}$ ) F-통계량(F-statistics)은 GENEPOP Ver. 4.7.3 (Raymond and Rousset, 1995)에서 가공된 값을 FSTAT Ver. 2.9.4 (Goudet, 2001)을 이용하여 추정하였고, F-통계량 추정치에 대한 유의성 검정은 Goudet, 2001)의 방법으로 permutation test를 1,000회 수행하였으며, 계산된 값(P)은 제1종 오류를 줄이기 위하여 Bonferroni 보정법을 적용하였다.

[0079] 표 3에 MS 마커 세트 1 및 MS 마커 세트 2에 대한 대립유전자 수,  $H_{exp}$ ,  $H_{obs}$ ,  $PIC$  및  $F_{is}$ 의 분석값을 정리하였다.

표 3

[0080]

|      | 좌위     | 대립유전자수 | $H_{obs}$ | $H_{exp}$ | $PIC$ | $F_{is}$ |
|------|--------|--------|-----------|-----------|-------|----------|
| 세트 1 | ABB222 | 6      | 0.656     | 0.742     | 0.696 | 0.117    |
|      | ABB206 | 7      | 0.689     | 0.760     | 0.720 | 0.094    |
|      | ABB212 | 7      | 0.789     | 0.783     | 0.744 | -0.007   |
|      | ABB205 | 10     | 0.778     | 0.749     | 0.711 | -0.039   |
|      | ABB308 | 7      | 0.778     | 0.783     | 0.745 | 0.006    |
|      | ABB601 | 3      | 0.733     | 0.657     | 0.579 | -0.117   |
|      | ABB401 | 8      | 0.744     | 0.712     | 0.671 | -0.046   |
|      | ABB209 | 6      | 0.778     | 0.754     | 0.718 | -0.032   |
|      | ABB214 | 5      | 0.911     | 0.716     | 0.673 | -0.274   |
|      | ABB502 | 3      | 0.689     | 0.654     | 0.577 | -0.054   |
|      | ABB408 | 5      | 0.261     | 0.702     | 0.643 | 0.631    |

|            |        |     |       |       |       |        |
|------------|--------|-----|-------|-------|-------|--------|
| 세트 2       | ABB413 | 6   | 0.644 | 0.704 | 0.649 | 0.085  |
|            | ABB306 | 6   | 0.689 | 0.716 | 0.662 | 0.037  |
|            | ABB307 | 7   | 0.678 | 0.677 | 0.614 | -0.002 |
|            | ABB503 | 4   | 0.811 | 0.695 | 0.629 | -0.168 |
|            | ABB207 | 6   | 0.900 | 0.802 | 0.767 | -0.124 |
|            | ABB201 | 9   | 0.756 | 0.755 | 0.714 | -0.001 |
|            | ABB203 | 6   | 0.333 | 0.683 | 0.637 | 0.513  |
|            | ABB302 | 8   | 0.830 | 0.750 | 0.707 | -0.108 |
|            | ABB213 | 6   | 0.622 | 0.690 | 0.647 | 0.099  |
|            | ABB208 | 9   | 0.744 | 0.738 | 0.698 | -0.009 |
|            | ABB211 | 4   | 0.600 | 0.717 | 0.661 | 0.163  |
| 세트 1의 평균값  |        | 6.1 | 0.710 | 0.728 | 0.681 | 0.025  |
| 세트 2의 평균값  |        | 6.1 | 0.691 | 0.721 | 0.671 | 0.044  |
| 22 마커의 평균값 |        | 6.1 | 0.701 | 0.722 | 0.675 | 0.035  |

[0082] MS 마커 세트 1에서 대립유전자 수가 가장 많은 마커는 ABB205로 10개가 측정되었고, MS 마커 세트 2에서 대립유전자 수가 가장 많은 마커는 ABB201 및 ABB208로 각 9개가 측정되었다.

[0083] MS 마커의 다형성에 대하여  $H_{exp}$  값이 0.6 이상이고,  $PIC$  값이 0.5 이상일 경우 높은 다형성을 가진 마커임을 Botstein 등(1980)이 보고한 바 있다. MS 마커 세트 1의  $H_{exp}$  평균값은 0.728, MS 마커 세트 2의  $H_{exp}$  평균값은 0.721로 확인되었으며,  $PIC$  평균값은 MS 마커 세트 1 및 MS 마커 세트 2 각각 0.681 및 0.671로 확인되어 본 발명에 따른 MS 마커 세트는 높은 식별력을 가지고 있는 것으로 확인하였다.

[0084]  $F$ -통계량은 수치가 높을수록 집단 내 상관도가 높음을 의미하며 수치가 낮을수록 집단 내 상관도가 낮음을 의미한다.  $F_{is}$ 는 각 집단별 이형접합체 감소정도를 나타내는 수치로 집단 내에서 유전적 고정 정도에 따른 근친도를 파악하는데 사용된다. MS 마커 세트 1의  $F_{is}$  최소값은 ABB214 마커에서 -0.274, 최대값은 ABB408 마커에서 0.631로 확인되었다. MS 마커 세트 2의  $F_{is}$  최소값은 ABB503 마커에서 -0.168, 최대값은 ABB203 마커에서 0.513로 확인되었다. 이처럼 1과 -1 중 어느 쪽에 치우치지 않는 결과에 따라 근친의 위험은 낮게 나타난 것으로 확인하였다.

#### [0086] 실시예 4: 동일개체출현율

[0087] 본 발명에 따른 MS 마커 세트를 바탕으로 전체 반달가슴곰 개체군에서 동일개체출현율을 추정하였다.

[0088] 구체적으로 실시예 3의  $F$ -통계량 추정을 통한  $F_{is}$ 값을 대입하여 API-CALC version 1.0 (Ayres and Overall, 2004)을 사용하여 무작위 교배집단( $PI_{random}$ ), 반형매 교배집단( $PI_{half-sibs}$ ) 및 전형매 교배집단( $PI_{sibs}$ )으로 가정했을때의 동일개체출현율을 추정한 결과를 표 4에 나타냈다.

표 4

| MS 마커       | $PI_{sibs}$           | $PI_{half-sibs}$       | $PI_{random}$          | $PE_{pu}$ | $PE$     |
|-------------|-----------------------|------------------------|------------------------|-----------|----------|
| 세트 1        | $3.44 \times 10^{-5}$ | $5.78 \times 10^{-9}$  | $1.59 \times 10^{-11}$ | 0.999999  | 0.999999 |
| 세트 2        | $4.11 \times 10^{-5}$ | $8.35 \times 10^{-9}$  | $2.46 \times 10^{-11}$ | 0.999959  | 0.999999 |
| 세트 1 + 세트 2 | $2.77 \times 10^{-9}$ | $1.33 \times 10^{-16}$ | $1.34 \times 10^{-21}$ | 0.999999  | 0.999999 |

[0091] MS 마커 세트 1을 기준으로 무작위 교배집단으로 가정했을 때,  $1.59 \times 10^{-11}$ 의 빈도로 출현하는 것을 확인하였으

며, 반형매 교배집단과 전형매 교배집단으로 가정했을 때, 각각  $5.78 \times 10^{-9}$ ,  $3.44 \times 10^{-5}$ 의 빈도로 출현하는 것을 확인하였다.

[0092] MS 마커 세트 2를 기준으로 무작위 교배집단으로 가정했을 때,  $2.46 \times 10^{-11}$ 의 빈도로 출현하는 것을 확인하였으며, 반형매 교배집단과 전형매 교배집단으로 가정했을 때, 각각  $8.35 \times 10^{-9}$ ,  $4.11 \times 10^{-5}$ 의 빈도로 출현하는 것을 확인하였다.

[0093] 또한, 22개의 MS 마커 전체(세트 1 + 세트 2)를 기준으로 무작위 교배집단으로 가정했을 때,  $1.34 \times 10^{-21}$ 의 빈도로 출현하는 것을 확인하였으며, 반형매 교배집단, 전형매 교배집단을 가정하였을 때, 각각  $1.33 \times 10^{-16}$ ,  $2.77 \times 10^{-9}$ 의 빈도로 출현하는 것을 확인하였다.

[0094] 이러한 결과는 현재 야생에서 활동하고 있는 반달가슴곰의 교배 특성을 무작위 교배집단으로 가정하면 본 발명에 따른 MS 마커 세트가 개체식별 및 친자확인에 있어서 충분히 활용 가능하고 또한 인위적인 증식을 위해 반형매 그리고 전형매 교배집단으로 교배를 수행하더라도 본 발명에 따른 MS 마커 세트의 개체식별 및 친자확인 빈도는 국내 반달가슴곰을 대상으로 하기에는 충분히 활용 가능함을 나타낸다.

[0095] **실시예 5: 반달가슴곰 개체 간의 유연관계**

[0096] 계통수 분석

[0097] 반달가슴곰 개체 간의 유전적 유연관계를 확인하기 위해 본 발명에 따른 MS 마커 세트를 이용하여 계통수(Phylogenetic tree) NJ(Neighbor joining)를 도 2에 나타내었다.

[0098] MS 마커 세트 1를 이용한 도 2A, MS 마커 세트 2를 이용한 도 2B 및 22개의 MS 마커 전체(세트 1 + 세트 2)를 이용한 도 2C를 살펴보면, 반달가슴곰 우수리아종 복원사업을 위해 도입된 북한, 중국, 러시아 개체들이 동일아종으로서 하나의 군집을 이루는 것으로 확인되었다.

[0099] Kim 등(2011)에 따르면 mtDNA를 이용하여 반달가슴곰 계통의 유전적 유연관계를 분석했을 때, 러시아와 북한의 계통군이 하나의 계통군으로 분류되며, 일본과 동남아시아 계통군과는 구별되는 것으로 보고하였다. 또한, 한국에 도입된 개체들은 단계통군으로 보이며, 동남 아시아의 반달가슴곰 계통군이 동북 아시아 반달가슴곰 계통군에 비해 높은 유전적 다양성을 보이는 것으로 보고하였다.

[0100] 따라서 본 발명에 따른 MS 마커 세트를 이용한 반달가슴곰 우수리아종 개체간의 유전적 유연관계는 상기 선행 보고에 부합하는 것으로 확인하였다.

[0102] 요인대응분석

[0103] 실시예 3에서 확인된 대립유전자의 빈도를 바탕으로 반달가슴곰 우수리아종 개체별 요인대응분석을 수행하였다.

[0104] MS 마커 세트 1를 이용한 분석 결과 총 분산치는 23.89%(Axe 1 (10.42%), Axe 2 (7.032%), Axe 3 (6.44%))로 확인되었고 MS 마커 세트 2를 이용한 분석 결과는 총 분산치가 30.27%(Axe 1 (14.41%), Axe 2 (8.74%), Axe 3 (7.12%))로 확인되었다. 또한 22개의 MS 마커 전체(세트 1 + 세트 2)를 이용한 분석 결과는 총 분산치가 24.79%(Axe 1 (11.66%), Axe 2 (7.0%), Axe 3 (6.13%))로 확인되었다.

[0105] 상기 결과를 3차원 좌표로 도 3에 나타냈다.

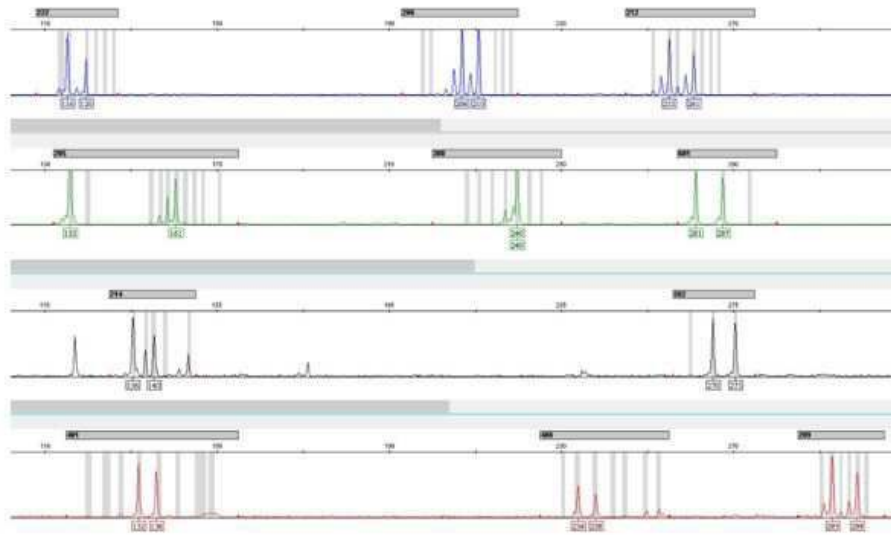
[0106] 도 3의 A ~ C를 살펴보면, 상대적으로 많은 개체들이 하나의 군집을 형성하는 경향을 보였으며, 이는 단계통을 가지는 국내 반달가슴곰 개체군 특성상의 결과로 판단할 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 MS 마커 세트를 이용하여 식별된 반달가슴곰 우수리아종 개체들이 서로 유전적 유연관계에 있는 것으로 확인하였다.

[0107] 이러한 결과로 미루어보아 본 발명에 따른 MS 마커 세트를 활용한다면 향후 반달가슴곰의 개체가 증가하더라도 개체 식별이 가능할 것으로 확인하였다.

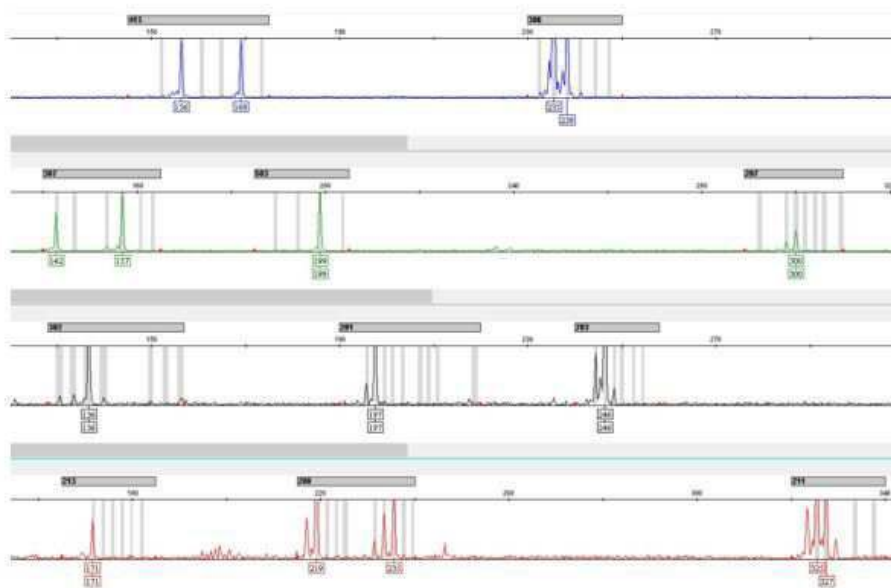
도면

도면1

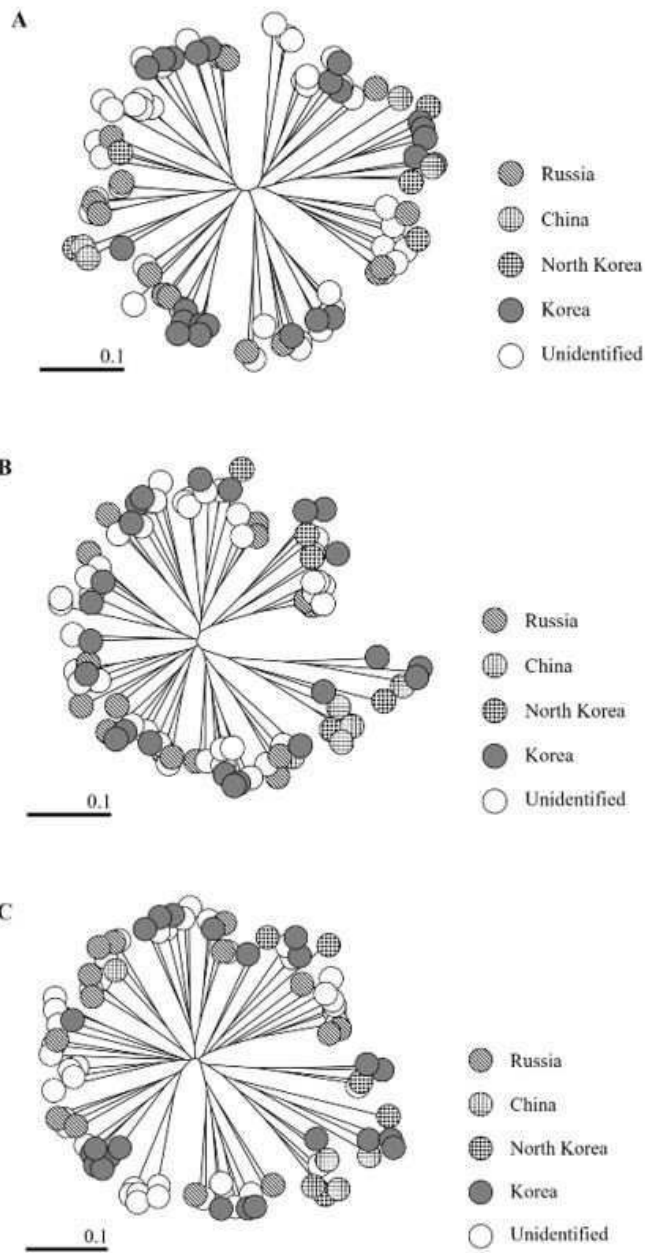
A



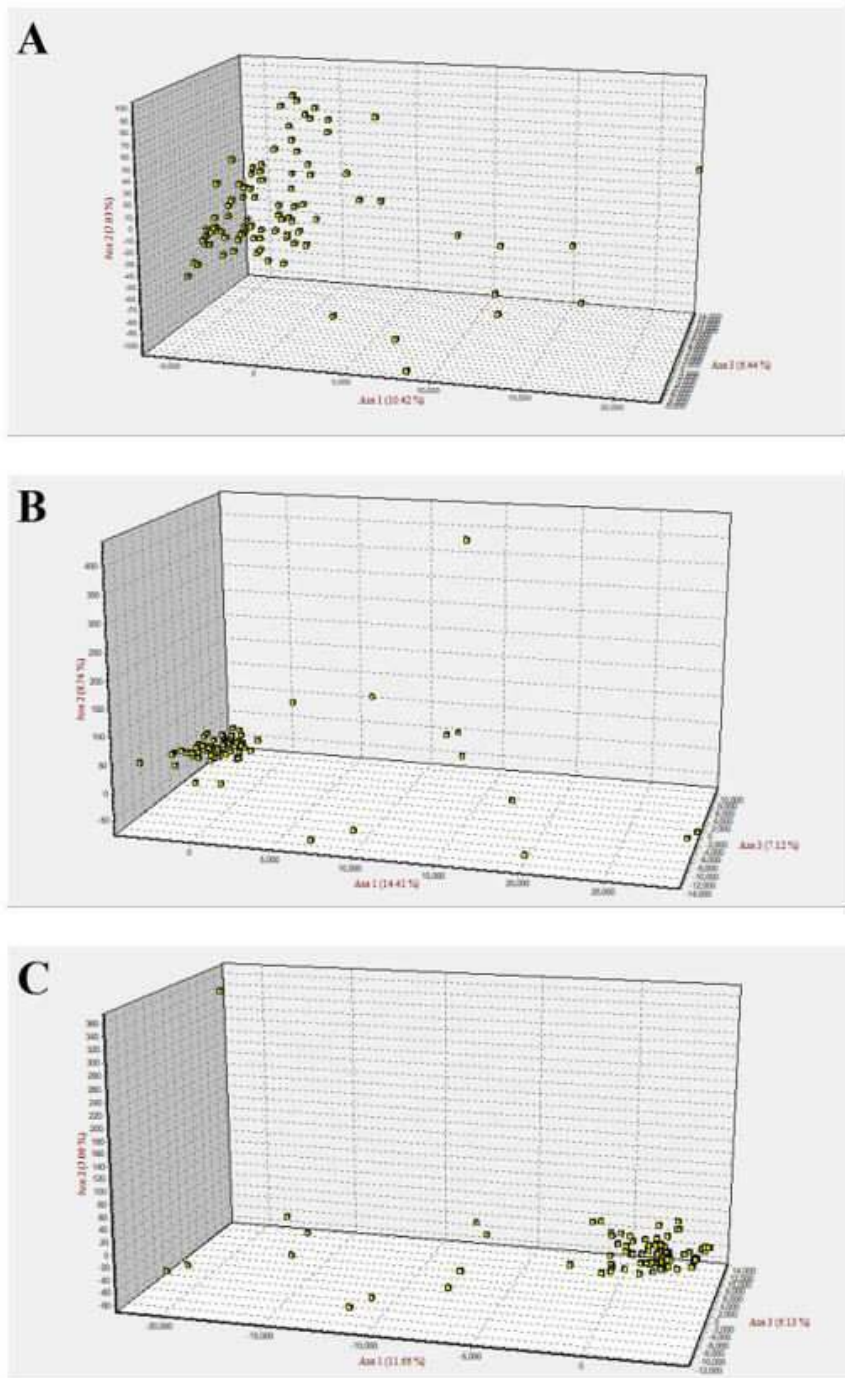
B



도면2



도면3



서열 목록 (첨부)



**아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.**

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.