(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0103707
(43) 공개일자 2021년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6888 (2018.01) *C12Q 1/6844* (2018.01)
C12Q 1/6876 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6888 (2018.05)
C12Q 1/6844 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2020-0018217
(22) 출원일자 2020년02월14일
심사청구일자 2020년02월14일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
(72) 발명자
김현우
부산광역시 남구 용소로 45, 해양과학공동연구소(C13) 222호
김아란
부산광역시 남구 용소로 45, 해양과학공동연구소(C13) 222호
이수린
부산광역시 남구 용소로 45, 해양과학공동연구소(C13) 222호
(74) 대리인
김순웅

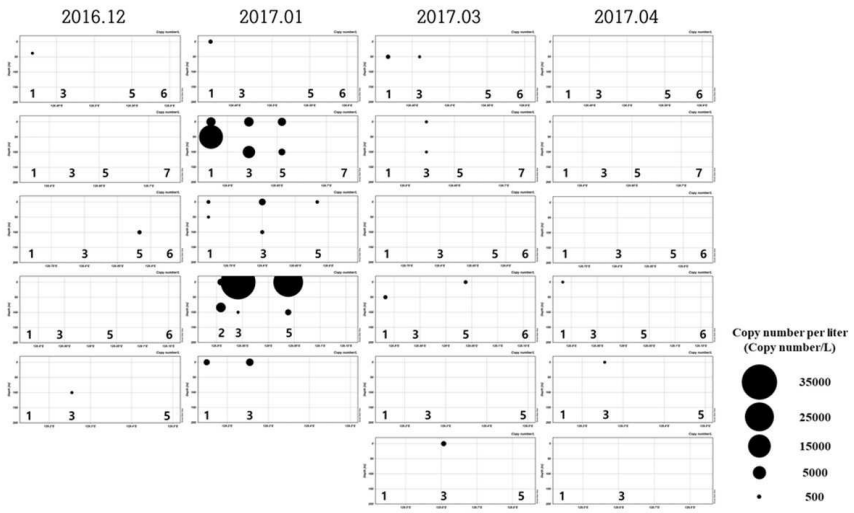
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **환경 DNA로부터 명태를 검출하기 위한 특이적 프라이머 세트**

(57) 요 약

본 발명은 환경 DNA로부터 명태를 검출하기 위한 특이적 프라이머 세트에 관한 것으로, 본 발명의 명태 검출용 프라이머 세트는 혼재된 DNA 내에서 높은 특이성과 민감도로 명태의 DNA를 증폭 및/또는 정량분석 할 수 있다. 따라서, 본 발명의 프라이머 세트는 해양 생태계 내 명태 분포 조사 및 가공식품 내 명태의 함량 분석에도 사용이 가능하다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
C12Q 1/6876 (2018.05)
C12Q 2561/113 (2019.08)
C12Q 2600/124 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525008325
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	수산실용화기술개발사업
연구과제명	MICT기반 명태 수산자원 회복 · 관리기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	강릉원주대학교 산학협력단
연구기간	2018.12.24 ~ 2019.12.23

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 핵산서열로 이루어진 정방향 프라이머 (Forward Primer) 및 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진 역방향 프라이머 (Reverse Primer)를 포함하는 명태 검출용 프라이머 세트.

청구항 2

제1항의 프라이머 세트를 포함하는 명태 검출용 키트.

청구항 3

시료의 지노믹(genomic) DNA를 제1항의 프라이머 세트로 증폭시키는 단계(a);를 포함하는 명태의 검출방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 단계 (a) 이후,

단계 (a)에서 확인된 검량곡선을 이용하여 정점별 명태 DNA의 카피수(copy number)를 계산하는 단계 (b);를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 명태의 검출방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 시료는,

생체시료, 식품시료 또는 환경시료인 것을 특징으로 하는 명태의 검출방법.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 단계 (b)의 증폭은,

워킹볼륨 (working volume) 20㎕에 대해, 서열번호 1의 핵산서열로 이루어진 정방향 프라이머와 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진 역방향 프라이머가 혼합된 프라이머 혼합물(priner mix)이 1 내지 5㎕만큼 첨가되어 사용되는 것을 특징으로 하는 명태의 검출방법.

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 단계 (b)의 증폭은,

90~95℃, 1~10분을 한 세트로 1 사이클(cycle)의 조건으로 반응을 진행하고, 순차적으로 90~95℃에서 5~60초,

60~70℃에서 5~45초, 68~75℃에서 10~45초를 한 세트로 40 사이클(cycle)의 조건으로 반응을 진행하며, 68~75℃, 1~10분을 한 세트로 1 사이클(cycle)의 조건으로 반응을 진행하는 것을 특징으로 하는 명태의 검출방법.

청구항 8

시료의 지노믹(genomic) DNA를 서열번호 1의 핵산서열로 이루어진 정방향 프라이머 (Forward Primer) 및 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진 역방향 프라이머 (Reverse Primer)를 포함하는 프라이머 세트로 증폭시키는 단계 (a); 및

단계 (a)에서 확인된 검량곡선을 이용하여 정점별 명태 DNA의 카피수(copy number)를 계산하는 단계 (b);를 포함하는 해양 생태계 내 명태분포 조사 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 환경 DNA로부터 명태를 검출하기 위한 특이적 프라이머 세트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 명태(*Gadus chalcogrammus*)는 대구목(Gadiformes) 대구과 (Gadidae)에 속하는 어종으로 우리나라 동해의 대표적인 냉수성 수산자원이었으나, 1980년대 후반 어획량이 급감하여, 2008년의 어획량이 1톤 이하로 나타나 명태 수산자원의 고갈로 이어졌다.

[0004] 우리나라 명태 수산자원의 급감은 기후변화에 따른 해양 환경 변화 또는 어획강도의 증가에 따른 남획 등이 원인으로 추정되고 있다. 이러한 자원 변동의 원인 규명을 위해서는 기본적인 생태학적 특성에 대한 충분한 연구결과가 바탕이 되어야 한다.

[0005] 이는 현장조사를 통해서도 수행이 가능하지만, 해수로부터 환경 DNA를 추출하여, 리얼타임 PCR (real-time PCR, 실시간 중합효소 연쇄반응)을 통한 표적 종의 검출 및 정량 분석으로도 수행이 가능하다. 리얼타임 PCR을 통한 분석을 수행하기 위해서는, 유전적으로 가까운 종들과의 구분이 가능한 프라이머 위치를 정함과 동시에 표적 종만을 증폭 가능한 프라이머의 제작이 필수적이다.

[0006] 그러나 현재는 식품 내 혼합되어 있는 명태를 검출하기 위한 기술 개발이 이루어졌을 뿐, 아직까지 유전적으로 가까운 종들과의 특이적 구분이 가능한 프라이머 세트에 관하여 개발된바 없고, 수많은 종이 함께 어우러져 있는 해수에서 명태를 검출하기 위한 방법도 개발되지 않은 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1916677호(2018.11.02.)에는 혼합어육 내 명태의 정량용 PCR 키트 및 이를 이용한 검출 또는 정량방법에 관하여 개시되어 있다.

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1767423호(2017.08.07.)에는, 식품 내 어육 검출용 PCR 프라이머 세트 및 이를 이용한 어육 검출에 관하여 개시되어 있다.

(특허문헌 0003) 한국등록특허 제10-1219763호(2013.01.02.)에는, 식품원료 내 어류 원료의 혼입여부를 판별하는 방법에 관하여 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명에서는 명태 특이적인 프라이머를 개발하였고, 대구과 어류 내에서 구분이 가능한 프라이머 위치를 지정하여, 프라이머의 3' 말단 부위의 불일치 (mismatch)를 통해 명태에 대한 특이성을 높임으로써, 환경 DNA로부터 명태를 검출하기 위한 특이적 프라이머 세트를 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 서열번호 1의 핵산서열로 이루어진 정방향 프라이머 (Forward Primer) 및 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진 역방향 프라이머 (Reverse Primer)를 포함하는 명태 검출용 프라이머 세트를 제공한다.

[0012] 본 발명은 서열번호 1의 핵산서열로 이루어진 정방향 프라이머 (Forward Primer) 및 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진 역방향 프라이머 (Reverse Primer)로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 명태 검출용 키트를 제공한다.

[0013] 본 발명은 시료의 지노믹(genomic) DNA를 제1항의 프라이머 세트로 증폭시키는 단계(a);를 포함하는 명태의 검출방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 명태의 검출방법에 있어, 상기 단계 (a) 이후, 바람직하게 단계 (a)에서 확인된 검량곡선을 이용하여 정점별 명태 DNA의 카피수(copy number)를 계산하는 단계 (b);를 더 포함하는 것이 좋다.

[0015] 본 발명의 명태의 검출방법에 있어, 상기 시료는, 일 예로 생체시료, 식품시료 또는 환경시료일 수 있다.

[0016] 본 발명의 명태의 검출방법에 있어, 상기 단계 (b)의 증폭은, 바람직하게 워킹볼륨 (working volume) 20㎕에 대해, 서열번호 1의 핵산서열로 이루어진 정방향 프라이머와 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진 역방향 프라이머가 혼합된 프라이머 혼합물(priner mix)이 1 내지 5㎕만큼 첨가되어 사용되는 것이 좋다.

[0017] 본 발명의 명태의 검출방법에 있어, 상기 단계 (b)의 증폭은, 바람직하게 90~95℃, 1~10분을 한 세트로 1 사이클(cycle)의 조건으로 반응을 진행하고, 순차적으로 90~95℃에서 5~60초, 60~70℃에서 5~45초, 68~75℃에서 10~45초를 한 세트로 40 사이클(cycle)의 조건으로 반응을 진행하며, 68~75℃, 1~10분을 한 세트로 1 사이클(cycle)의 조건으로 반응을 진행하는 것이 좋다.

[0018] 한편, 본 발명은 시료의 지노믹(genomic) DNA를 서열번호 1의 핵산서열로 이루어진 정방향 프라이머 (Forward Primer) 및 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진 역방향 프라이머 (Reverse Primer)를 포함하는 프라이머 세트로 증폭시키는 단계 (a); 및 단계 (a)에서 확인된 검량곡선을 이용하여 정점별 명태 DNA의 카피수(copy number)를 계산하는 단계 (b);를 포함하는 해양 생태계 내 명태분포 조사 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 명태 검출용 프라이머 세트는 혼재된 DNA 내에서 높은 특이성과 민감도로 명태의 DNA를 증폭 및/또는 정량분석 할 수 있다. 따라서, 본 발명의 프라이머 세트는 해양 생태계 내 명태 분포 조사 및 가공식품 내 명태의 함량 분석에도 사용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명 명태 특이적인 프라이머의 특이성과 민감도를 평가한 결과이다((A) 명태의 10배수 희석 농도 별 증폭 패턴 (B) 대구의 10배수 희석 농도 별 증폭 패턴).

도 2는 본 발명 명태 특이적 프라이머를 이용한 용융곡선 (melting curve) 분석 결과이다.

도 3은 명태 특이적 프라이머의 검량 곡선을 나타낸 결과이다.

도 4는 리얼타임 PCR을 이용한 시기별 동해연안 환경 시료에서 명태 분포를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명은 서열번호 1의 핵산서열로 이루어진 정방향 프라이머 (Forward Primer) 및 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진 역방향 프라이머 (Reverse Primer)를 포함하는 명태 검출용 프라이머 세트를 제공한다.

[0024] 본 발명에서 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 핵산의 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고, 핵산 주형의 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 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.

[0025] 상기 프라이머 설계시, 프라이머의 A, G, C, T 함량비, 프라이머 결합체(dimer) 형성 방지, 같은 염기서열의 3회 이상 반복금지 등 여러 가지 제약이 따르며, 그 외에 단독 PCR 반응조건에 있어서 주형(template) DNA의 양, 프라이머의 농도, dNTP의 농도, Mg^{2+}의 농도, 반응온도, 반응시간 등의 조건이 적정해야 한다.

[0026] 상기의 프라이머는 기본 성질을 변화시키지 않은 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 즉 핵산 서열이 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형될 수 있다. 이러한 변형의 예로는 메틸화, 캡화, 뉴클레오타이드의 하나 이상의 동족체로의 치환 및 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트 또는 카바메이트 등의 하전되지 않은 연결체나 포스포로티오에이트 또는 포스포로디티오에이트 등의 하전된 연결체로의 뉴클레오타이드의 변형이 가능하다. 또한 핵산은 뉴클레아제, 독소, 항체, 시그날 펩타이드, 폴리 L 리신 등의 단백질, 아크리딘 또는 프소랄렌 등의 삽입제, 금속, 방사성 금속, 철 산화성 금속 등의 킬레이트화제 및 알킬화제 등의 하나 이상의 부가적인 공유 결합된 잔기를 가질 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명의 프라이머 서열은 검출 가능한 시그날을 직접적 또는 간접적으로 제공할 수 있는 표지를 이용하여 변형시킬 수 있다. 상기 프라이머는 분광학, 광화학, 생화학, 면역화학 또는 화학적 수단을 이용하여 검출될 수 있는 표지를 포함할 수 있다. 유용한 표지는 32P, 형광 염료, 전자 밀집 시약, 효소(일반적으로 ELISA 에 이용되는 것), 바이오틴 또는 합텐 및 항혈청 또는 단일클론성 항체가 이용가능한 단백질을 포함한다.

[0028] 본 발명의 프라이머들은 적절한 서열의 클로닝 및 제한효소 분해 및 나랭(Narang)등의 포스포트리에스테르 방법(1979, Meth, Enzymol. 68:90-99), 보카지(Beaucage)등의 디에틸포스포라미다이트 방법(1981, Tetrahedron Lett. 22: 1859-1862), 및 미국 특허 제 4458066호의 고형물 지지 방법과 같은 직접적인 화학적 합성법을 포함하는 임의의 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.

[0029] 본 발명의 명태 검출용 프라이머 세트는 혼재된 DNA 내에서 높은 특이성과 민감도로 명태의 DNA를 증폭할 수 있다. 또한, 혼재된 DNA 내에서 높은 특이성과 민감도로 명태의 DNA를 정량분석할 수 있는 효과를 발휘한다.

[0031] 한편, 본 발명은 서열번호 1의 핵산서열로 이루어진 정방향 프라이머 (Forward Primer) 및 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진 역방향 프라이머 (Reverse Primer)로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 명태 검출용 키트를 제공한다.

[0032] 본 발명의 키트는 상기 조성물을 동결 건조된 형태로 플라스틱 튜브에 담아 제조될 수 있다. 상기 키트는 조성물 외에, 분석에 사용되는 적절한 시약 및 도구를 더 포함할 수 있으며, 이러한 시약 및 도구로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제 등이 포함된다.

[0033] 상기 적합한 담체로는, 이에 제한되지는 않으나, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 덱스트란, 폴리사카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.

[0035] 한편, 본 발명은 시료의 지노믹(genomic) DNA를 본 발명의 프라이머 세트로 증폭시키는 단계(a);를 포함하는 명태의 검출방법을 제공한다. 이때, 바람직하게 단계 (a)에서 확인된 검량곡선을 이용하여 정점별 명태 DNA의 카피수(copy number)를 계산하는 단계 (b);를 더 포함하는 것이 좋다.

[0036] 본 발명의 명태의 검출방법에 있어, 상기 시료는, 일 예로 생체시료, 식품시료 또는 환경시료일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 환경시료로 해수를 이용하여 본 발명의 방법을 통해 동해 연안의 명태 분포를 특이적으로 검출하였다.

[0037] 본 발명의 명태의 검출방법에 있어, 상기 단계 (b)의 증폭은, 바람직하게 워킹볼륨 (working volume) 20㎕에 대해, 서열번호 1의 핵산서열로 이루어진 정방향 프라이머와 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진 역방향 프라이머가 혼합된 프라이머 혼합물(priner mix)이 1 내지 5㎕만큼 첨가되어 사용되는 것이 좋고, 더 바람직하게는 2~3㎕만큼 첨가되어 사용되는 것이 좋으며, 더욱 바람직하게는 2㎕만큼 첨가되어 사용되는 것이 좋다.

[0038] 본 발명의 명태의 검출방법에 있어, 상기 단계 (b)의 증폭은, 바람직하게 90~95℃, 1~10분을 한 세트로 1 사이클(cycle)의 조건으로 반응을 진행하여 변성을 수행하고, 순차적으로 90~95℃에서 5~60초, 60~70℃에서 5~45초, 68~75℃에서 10~45초를 한 세트로 40 사이클(cycle)의 조건으로 반응을 진행하며, 68~75℃, 1~10분을 한 세트로 1 사이클(cycle)의 조건으로 반응을 진행하여 신장을 수행하는 것이 좋다. 더욱 바람직하게는 93~95℃, 3~7분을 한 세트로 1 사이클(cycle)의 조건으로 반응을 진행하고, 순차적으로 93~95℃에서 15~30초, 63~67℃에서 20~40초, 70~74℃에서 20~30초를 한 세트로 40 사이클(cycle)의 조건으로 반응을 진행하며, 70~74℃, 3~7분을 한 세트로 1 사이클(cycle)의 조건으로 반응을 진행하는 것이 좋다.

[0039] 상기 변성을 수행하는 과정에서 1분 미만의 반응시간에서는 변성이 원활하게 이루어지지 않으며, 10분이 초과하면 과도한 변성이 일어나 다음 단계의 증폭 반응을 수행하는데 부적합하게 된다. 상기 신장을 수행하는 과정에서 90~95℃에서 5~60초간 반응시킨 다음, 반응 온도가 60℃ 미만이라면 충분히 원하는 서열이 증폭되지 않아 시료 내 명태의 존재를 검출할 수 없게 되며, 70℃를 초과하면 과도한 증폭이 일어날 수 있다. 또한, 마지막 1 사이클에서 68℃, 1분 미만의 반응시간에서는 원하는 서열의 신장이 충분히 이루어지지 않으며, 75℃, 10분 초과인 경우에는 과도한 서열의 신장이 발생할 수 있다. 따라서, 상기 조건은 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 혼재된 DNA 속에서 명태를 증폭하여 진단, 검출하기 위한 최적의 조건인 것이다. 상기 수치 범위를 벗어나는 경우, 시료 내 명태의 증폭이 원활하게 이루어지지 않아, 시료 내 존재하는 명태의 존재를 진단하는데 어려움이 있을 수 있다.

[0041] 한편, 본 발명은 시료의 지노믹(genomic) DNA를 서열번호 1의 핵산서열로 이루어진 정방향 프라이머 (Forward Primer) 및 서열번호 2의 핵산서열로 이루어진 역방향 프라이머 (Reverse Primer)를 포함하는 프라이머 세트로 증폭시키는 단계 (a); 및 단계 (a)에서 확인된 검량곡선을 이용하여 정점별 명태 DNA의 카피수(copy number)를 계산하는 단계 (b);를 포함하는 해양 생태계 내 명태분포 조사 방법을 제공한다. 시료인 해수에서 비특이적 산물(Non-specific product)이 확인되었거나, 멜팅커브(melting curve) 분석에서 어떠한 피크(peak)도 확인되지 않는 경우, 해당 정점에 명태의 환경 DNA가 없다고 판단하였다. 본 발명에서는 상기 방법을 이용하여, 하기 실험을 통해, 동해연안 내 명태분포를 정확하게 조사할 수 있었다.

[0043] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 또는 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하기로 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0045] **[실시예 1: 명태 특이적 검출용 프라이머 세트 설계]**

[0046] 명태(*Gadus chalcogrammus*)에 특이적인 프라이머의 개발을 위하여 대구과 어류 내에서 구분이 가능한 프라이머 지역을 지정하였다. 충분한 종간 염기서열 차이를 보이는 지역인 사이토크롬 B(cytochrome B)를 선정하고, 대구과 어류의 사이토크롬 B 서열을 정렬(alignment)하여 제작하였으며, 프라이머의 3' 말단 부위의 불일치(mismatch)를 통해 명태에 대한 특이성을 높였다. 최종 PCR 산물은 리얼타임 PCR 분석에 적절한 137bp의 크기를 가졌으며, 프라이머 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0048]

		서열(5'→3')
서열번호 1	명태 특이적 프라이머 F1	GCTTGGAGATCCAGATAATTTTACG
서열번호 2	명태 특이적 프라이머 R1	GGAGTGCAAGTACACCGCCTAG

[0050] **[실험예 1: 명태 특이적 프라이머 세트의 특이성과 민감도 평가]**

[0051] 실시예 1에서 제작한 프라이머의 명태에 대한 특이성과 민감도를 확인하기 위하여, 명태와 유전적으로 가까운 대구를 대상으로 PCR을 실시하였다. PCR에 사용된 키트의 조성과 조건은 하기 표 2 내지 3에 나타내었다. 실시간중합효소연쇄반응은 명태와 대구의 근육에서 추출한 지노믹(genomic) DNA를 1ng부터 1×10^{-5}ng까지 10배수로 연속 희석한 후, 각 농도를 주형으로 사용하였으며, 10μM의 명태 특이적 프라이머 세트, 2㎕의 dNTPs (10mM), 2㎕의 10X Ex Taq buffer(Takara Bio Inc. Japan), 0.2㎕의 Ex Taq Hot Start Version (Takara Bio Inc. Japan)를 섞고, 3차 증류수로 최종 볼륨 20㎕을 맞춰 수행하였다. PCR 산물은 1.5% 아가로오스 겔(Agarose gel; Promega, USA)에 전기영동을 수행한 후, UV transilluminator를 이용하여 확인하였다. 명태 특이적인 프라이머의 특이성과 민감도를 평가한 결과를 도 1에 나타내었다.

표 2

[0052] PCR 조성

Template (환경 DNA)	1㎕
명태 특이적 프라이머 F1 (10μM)	1㎕
명태 특이적 프라이머 R1 (10μM)	1㎕
2X Luna Universal qPCR Master Mix	10㎕
D/RNase Free Water	7㎕
Total	20㎕

표 3

[0053] PCR 조건

94℃	5:00	1 cycle
94℃	0:30	40 cycles
65℃	0:30	
72℃	0:30	
72℃	5:00	1 cycle
60℃ to 95℃	read every 0.4 ℃	

[0055] 실험 결과, 명태에서 정상적인 증폭 산물을 확인할 수 있었으나, 유전적으로 가까운 대구에서는 어떤 농도에서도 증폭 산물이 확인되지 않았다. 이는 실시예 1에서 제작한 프라이머가 명태를 특이적으로 분석하는데 적합하다는 것을 보여주는 결과이다. 또한, 명태와 대구의 근육에서 추출한 지노믹(genomic) DNA를 1ng부터 $1X10^{-5}$ng까지 6단계로 희석하여 민감도를 확인한 결과, $1X10^{-4}$ng의 농도까지 명태 시료의 증폭이 가능함을 확인할 수 있었다. 이는, 본 발명의 프라이머 세트가 명태에 특이적인 프로브를 추가적으로 제작하지 않고도, 높은 민감도를 가지는 것을 보여주는 결과이다.

[0057] **[실험예 2: 명태 특이적 프라이머 세트를 이용한 동해 연안의 명태 분포 확인]**

[0058] 2016년 12월부터 2017년 4월까지 한국 동해 연안에서 수심별 (0, 20, 50, 100m)로 500㎖의 해수를 채집하여 GN-6 막 필터(GN-6 membrane filter; Pall, USA)에 여과한 후, 균질화하여 환경 DNA를 추출하였다. 실시예 1에서 제작한 명태 특이적 프라이머를 이용하여 동해 환경 DNA에 대한 리얼타임 PCR을 수행하였다. 리얼타임 PCR에 사용된 키트의 조성과 조건은 하기 표 4 내지 5에 나타내었다.

표 4

[0059] real-time PCR 조성

Template (환경 DNA)	1㎕
명태 특이적 프라이머 F1 (10μM)	1㎕

명태 특이적 프라이머 R1 (10μM)	1㎕
2X Luna Universal qPCR Master Mix	10㎕
D/RNase Free Water	7㎕
Total	20㎕

표 5

[0060] real-time PCR 조건

94℃	5:00	1 cycle
94℃	0:15	40 cycles
65℃	0:30	
72℃	0:20	
72℃	5:00	1 cycle
60℃ to 95℃	read every 0.4 ℃	

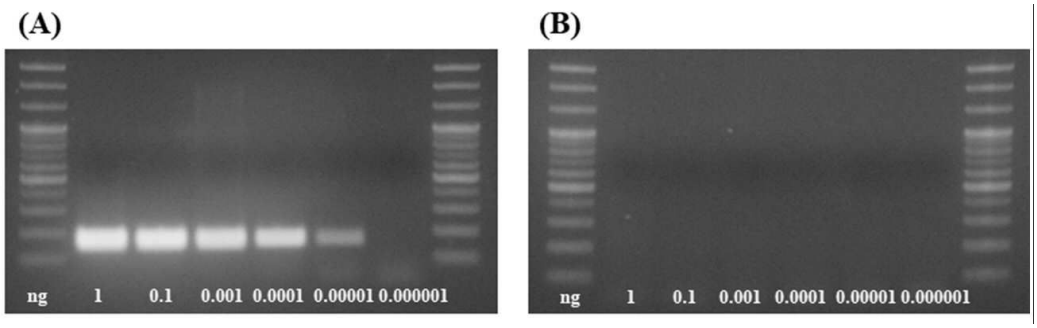
[0062] 리얼타임 PCR 결과를 분석하기 위하여, 정점별 Ct값과 용융곡선을 확인하였다. 용융곡선 분석을 통해 도 2와 같은 명태 증폭산물의 그래프가 확인되는 경우, 리얼타임 PCR 검량곡선을 이용하여 정점별 명태 DNA의 카피수(copy number)를 계산하여 도 3에 나타내었다. 비특이적 산물(Non-specific product)이 확인되었거나, 멜팅커브(melting curve) 분석에서 어떠한 피크(peak)도 확인되지 않는 경우, 해당 정점에 명태의 환경 DNA가 없다고 판단하였다.

[0063] 실험 결과, 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, 2017년 아야진 및 주문진 해역에서 15,000 카피수(copy number)/L 이상의 명태 환경 DNA가 검출되었다. 또한, 2016년 12월과 2017년 3월에는 매우 미량의 명태 환경 DNA가 검출되었으며, 4월부터는 거의 발견되지 않는 것을 확인할 수 있었다.

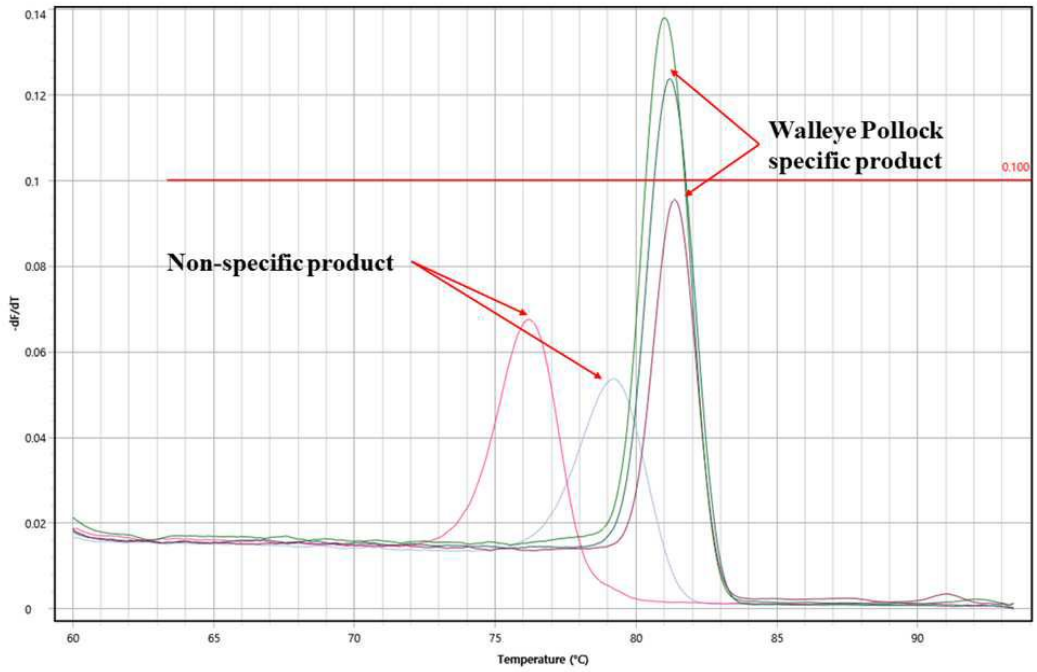
[0065] 이상을 종합하면, 본 발명에서 개발한 명태 특이적 프라이머 세트를 이용한 리얼타임 PCR을 통해 환경 DNA와 같은 혼재된 DNA 내에서 명태의 DNA만을 특이적이고 민감하게 검출이 가능했으며, 특히 한국 동해에서 명태의 어획량이 급감한 상태에서도 단지 500㎖의 해수에서 얻어진 환경 DNA에서부터 명태의 DNA를 확인할 수 있음을 확인하였다. 이에 본 발명의 프라이머 세트는 명태의 난/자치어 및 성어의 분포조사, 해양 생태계 조사 및 가공식품의 원재료 분석에서 이용이 가능하다.

도면

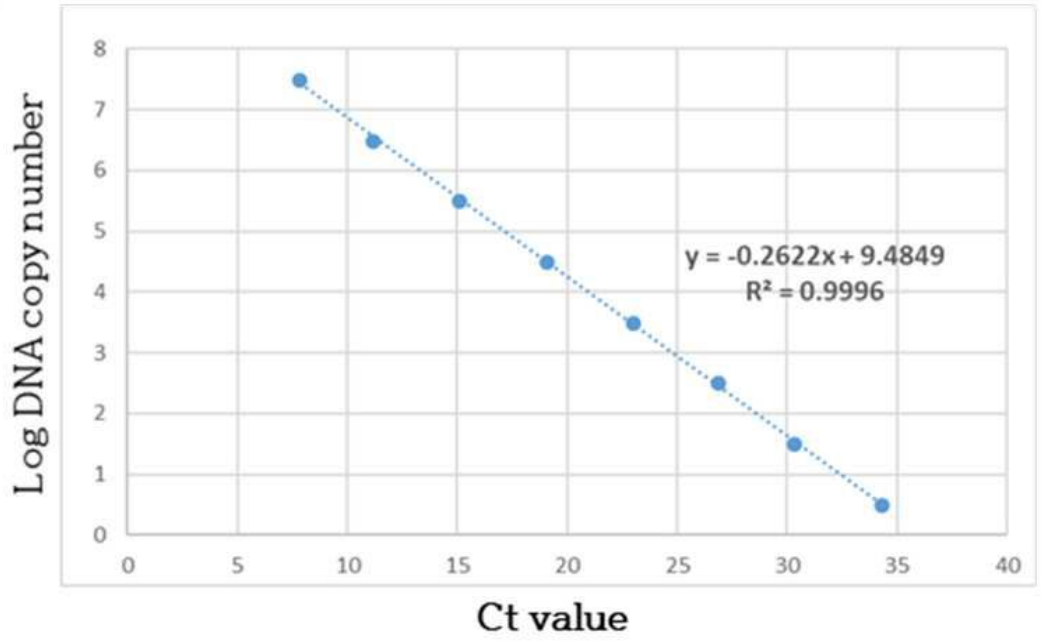
도면1



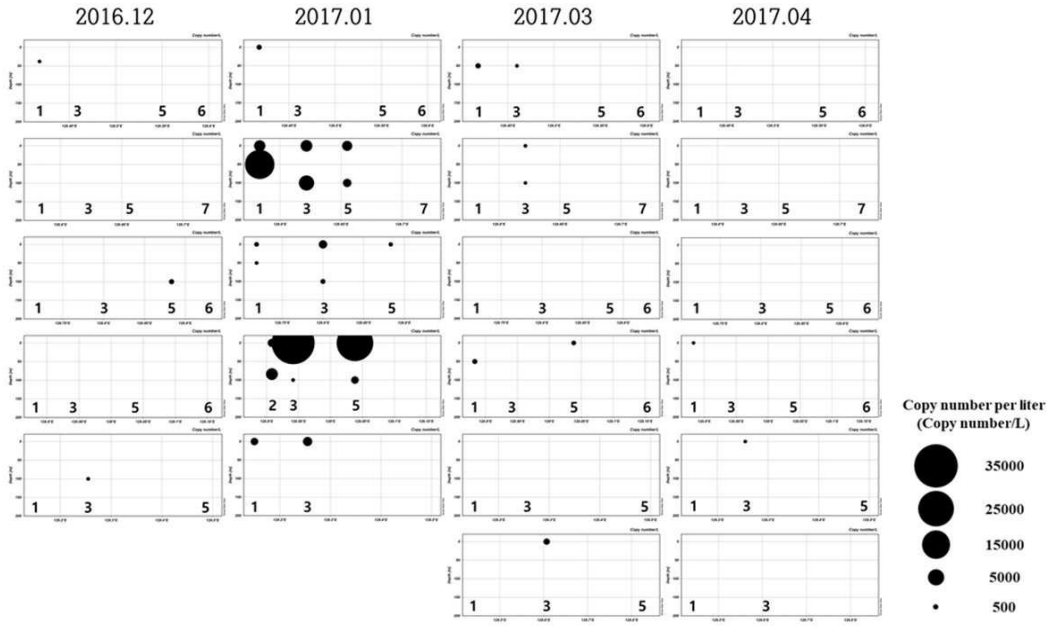
도면2


Walleye Pollock
specific product
0.100
Non-specific product
-dF/dT
Temperature (°C)

도면3


Log DNA copy number
Ct value
y = -0.2622x + 9.4849
R² = 0.9996

도면4



서 열 목 록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> species-specific primer set for detecting walleye pollock (Gadus chalcogrammus) from environmental DNA

<130> PUUCF1.57P

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward Primer

<400> 1

gcttggagat ccagataatt ttacg 25

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse Primer

<400> 2

ggagtgcaag tacaccgcct ag 22