



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0147293
(43) 공개일자 2014년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0070292
(22) 출원일자 2013년06월19일
심사청구일자 2013년06월19일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이궁주
세종특별자치시 조치원읍 섭골길 59, 112동 1103호 (e편한세상 세종 아파트)
정성진
대전광역시 유성구 문화원로 13, 104동 1401호 (장대동, 드림월드아파트)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 한국잔디 신품종 장성샛별을 구분하기 위한 특이 SCAR 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 한국잔디 신품종 장성샛별을 구분하기 위한 특이 SCAR 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 특이 SCAR 마커를 통하여 한국잔디 신품종 장성샛별의 효율적인 품종 식별, 품종보호 및 1대 잡종의 순도검정이 가능하다. 또한, 생육이 빠르고 피복속도가 빠르면서도 밀도가 높고 마디간 길이가 짧은 고품질 한국잔디 계통인 장성샛별 품종의 분자육종연구 및 잔디육종산업상 매우 유용하게 응용될 수 있다.

대표도 - 도2

```

10      20      30      40      50      60      70
AATCGGGCTGGCGGTGACCGGAGCGCTCTGTTGCTGCCATGCGGCCTCCAGCTTTTGCAGCATGCTGACA

80      90      100     110     120     130     140
ATCCGCGACTCCTGGTAAGTTTCAGAATATAGTCAAACGCCCTCCAGTTCGAAGGCCTCAACGGCATGCT

150     160     170     180     190     200     210
CTTTCAGGCGGTAACGAACACAATAAACGGCTTATGGGCAAACTGATTGATGTTTTGCGCCAGCAAGAC

220     230     240     250     260     270     280
GCCGTCAGCGAAGGAATATTAATATCCAGAAAAATGGCGTCGACCCGGTTATGCTGCAGAAATTTACGC

290     300     310     320     330     340     350
ACGTCCAGCCCATCGTCAAAGGTACCCACAATCTCCATCTGCCTGTGGGTTTTGATGAGCCAGGTGAGCT

360     370     380     390     400     410     420
CCTGTTGAGCCAGAATTTTCATCTTCAACGATAATGACTTTTCATATTACTACCCCTGAGGTAACAGTGATG

430     440     450     460     470     480     490
CCGTCGCATGAACAGGGGAGCGTTTCATTCGGGACGTAAAAAGCGATTTCAGTGCCGGGTTCAAGACGGTG

500     510     520     530     540     550
AATATGCAGCCCATCGCGTAGAGCAGCTTGACCCCTGTGATGCACATTCAGCAGCCCGATT
    
```

(72) 발명자

최준수

충청남도 천안시 동남구 동면 동산광덕길 628

양근모

충청남도 천안시 서북구 백석3로 91 백석그린빌2차
아파트 201동 903호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ0090812012

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 식물분자유종사업단

연구사업명 차세대바이오그린21 사업

연구과제명 식물기반 유전자가위의 변이유도 시스템 구축

기 여 율 1/2

주관기관 충남대학교

연구기간 2012.05.01 ~ 2014.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ0081312012

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 식물분자유종사업단

연구사업명 차세대바이오그린21 사업

연구과제명 억제 EST 기반 바이오매스 증가 품종 육성을 위한 분자마커 개발 및 활용

기 여 율 1/2

주관기관 충남대학교

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2의 염기서열로 이루어진, 재배종 한국잔디 품종으로부터 장성샛별(*Zoysia japonica*) 품종을 구분하기 위한 마커.

청구항 2

제1항의 재배종 한국잔디 품종으로부터 장성샛별(*Zoysia japonica*) 품종을 구분하기 위한 마커를 증폭하기 위한 SCAR(Sequence Characterized Amplified Region) 프라이머 세트.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 것을 특징으로 하는 SCAR 프라이머 세트.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 재배종 한국잔디 품종은 야지(*Zoysia japonica*), 갯잔디(*Zoysia sinica*), 고려잔디(*Zoysia matrella*) 또는 중지(*Zoysia japonica*)인 것을 특징으로 하는 SCAR 프라이머 세트.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 SCAR 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 재배종 한국잔디 품종으로부터 한국잔디 장성샛별 품종을 구분하기 위한 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것인 키트.

청구항 7

- (a) 잔디에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- (b) 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 SCAR 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- (c) 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 재배종 한국잔디 품종으로부터 한국잔디 장성샛별 품종을 구분하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 겔 전기영동, 모세관 전기영동, DNA 칩, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것인 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 한국잔디 신품종 장성샛별을 구분하기 위한 특이 SCAR 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진, 재배종 한국잔디 품종으로부터 장성샛별(*Zoysia japonica*) 품종을 구분하기 위한 마커, 상기 마커를 증폭하기 위한 SCAR 프라이머 세트, 상기 SCAR 프라이머 세트를 포함하는 장성샛별 품종을 구분하기 위한 키트 및 상기 SCAR 프라이머 세트를 이용하여 장성샛별 품종을 구분하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0001]

[0002] 한국잔디는 다년생 초본류로 화본과에 속하며, 포복경 및 지하경을 가지고 번식하는데 지역에 따라 형태나 특성에 있어 많은 변이를 나타내고 있다. 지금까지의 연구에 의하면 한국에는 들잔디(*Zoysia japonica*), 금잔디(*Z. matrella*), 비로드잔디(*Z. tenuifolia*), 갯잔디(*Z. sinica*) 및 왕잔디(*Z. macrostachya*) 등 5~6종의 잔디가 분포되어 있는 것으로 보고되고 있다. 한국잔디는 난지형 잔디로서 한국을 포함한 극동아시아에 널리 자생하고 있으며 정원, 공원, 경기장, 골프장, 도로비탈면, 간척지 및 공항 등 거의 모든 장소에서 이용되고 있다. 특히, 한국잔디는 우리나라 기후에 있어 가장 적합한 잔디로, 한지형 양잔디 및 다른 난지형 잔디보다도 환경적응성이 뛰어나다. 특히 내건성, 내담압성, 내한성, 내서성 및 내염성 등이 강한 것으로 알려져 있다. 그러나, 잔디 조성이 늦고, 녹색기간이 짧은 단점을 가지고 있어 이를 극복하기 위한 우수 품종 육종이 요구되고 있다. 본 발명의 한국잔디 신품종 장성샛별은 유전자원으로 수집한 한국형 잔디인 중지류 잔디로, 생육이 빠르고 피복속도가 빠르면서도 밀도가 높고 마디간 길이가 짧은 고품질 계통으로 선발되었다(Asian Journal of Turfgrass Science, 26(1):1-7, 2012). 최근 분자 생물학의 발달로 인하여 마커 시스템들을 이용하여 특정 식물체에 대하여 품종선별을 하는 방법들이 널리 이용되고 있다.

[0003] RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 마커는 최초의 PCR을 기초로 한 마커라고 할 수 있는데, 게놈 DNA 상에서 약 10mer로 구성된 프라이머와 일치된 부분을 PCR에 의해 증폭하고, 증폭된 DNA를 분석하는 마커이다. 이는 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) 마커와 달리 증폭된 DNA량이 충분하여 방사선동위원소 혹은 화학적으로 라벨된 프로브를 필요로 하지 않고, 분리된 겔 상에 브롬화 에티듐(ethidium bromide)를 처리하여 혼성(hybridization) 과정 없이 DNA 변이를 분석할 수 있는 기술이다.

[0004] SCAR(Sequence Characterized Amplified Region) 마커는 RAPD나 AFLP (amplification fragment length polymorphism) 마커를 이용하여 증폭된 밴드의 염기서열을 분석하여 제작한 것으로 보다 정확하고 세밀한 프라이머로 사용이 가능하다. 따라서 SCAR 마커는 다른 PCR 마커에 비하여 연구소의 환경에 영향을 받지 않는 공용으로 이용 가능한 마커이다. 제한효소를 이용하여 염기서열의 다형성을 보는 방법을 CAPS(cleaved amplified polymorphic sequence)라고 하며, 단일 마커로 많은 다형성을 보는 방법으로 각광받고 있다. SCAR 분자마커는 RAPD 분자마커에 비하여 증폭환경에 비교적 둔감하고, 유전정보가 풍부한 공우성(co-dominant) 마커로 전환 가능하고, 제작과정에서 인트론(intron)에 영향을 받지 않는 장점을 가지고 있다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제0977045호에서는 '한국 잔디 신품종 용천(Dragon Sky) 특이 분자유전학적 마커'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제0363723호에서는 '잔디 신품종 베네스트 윈 및 동래고려지 특이 STS 마커'가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 한국잔디 신품종 장성샛별을 구분하기 위한 특이 SCAR 마커 및 이의 용도에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명에서는 고품질 계통인 한국잔디 신품종 장성샛별을 보호하고자, RAPD 분석을 통하여 품종 특이적 염기서열을 분석한 후 이 염기서열을 기초로 장성샛별 품종식별 및 품종보호 등에 유용한 SCAR 프라이머를 개발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 2의 염기서열로 이루어진, 재배종 한국잔디 품종으로부터 장성샛별(*Zoysia japonica*) 품종을 구분하기 위한 마커를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 마커를 증폭하기 위한 SCAR 프라이머 세트를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 SCAR 프라이머 세트를 포함하는 재배종 한국잔디 품종으로부터 장성샛별 품종을 구분하기 위한 키트를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 SCAR 프라이머 세트를 이용하여 재배종 한국잔디 품종으로부터 장성샛별 품종을 구분하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 특이 SCAR 마커를 통하여 한국잔디 신품종 장성샛별의 효율적인 품종 식별, 품종보호 및 1대 잡종의 순도검정이 가능하다. 또한, 생육이 빠르고 피복속도가 빠르면서도 밀도가 높고 마디간 길이가 짧은 고품질 한

국잔디 계통인 장성셋별 품종의 분자육종연구 및 잔디육종산업상 매우 유용하게 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 RAPD 프라이머(N8021 프라이머)를 이용한 한국형 잔디의 RAPD 분석 결과를 나타낸 그림이다. M: DNA 래더, Ya: 야지(*Zoysia japonica*), Si: 갯잔디(*Z. sinica*), Ma: 고려잔디(*Z. matrella*), Ju: 중지(*Z. japonica*), 6069: 장성셋별(*Z. japonica*).

도 2는 RAPD 프라이머(N8021 프라이머)를 이용하여 확인된 특이 밴드의 염기서열 정보를 나타낸 그림이다.

도 3는 본 발명의 SCAR 분자 마커를 이용한 PCR 분석 결과를 나타낸 그림이다. M: DNA 래더, Ya: 야지(*Zoysia japonica*), Si: 갯잔디(*Z. sinica*), Ma: 고려잔디(*Z. matrella*), Ju: 중지(*Z. japonica*), 6069: 장성셋별(*Z. japonica*).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 2의 염기서열로 이루어진, 재배종 한국잔디 품종으로부터 장성셋별(*Zoysia japonica*) 품종을 구분하기 위한 마커를 제공한다.

[0014] 본 발명의 마커에서, 상기 장성셋별(*Zoysia japonica*) 품종은 한국잔디 신품종이며 유전자원으로 수집한 한국형 잔디인 중지류 잔디로, 생육이 빠르고 피복속도가 빠르면서도 밀도가 높고 마디간 길이가 짧은 고품질 계통으로 선발되었다(Asian Journal of Turfgrass Science, 26(1):1~7, 2012). 또한, 상기 장성셋별 품종을 2013년 1월 9일자로 품종보호출원하였다. (품종보호 출원번호: 2013-4).

[0015] 상기 마커는 서열번호 2의 염기서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 2의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 마커를 증폭하기 위한 SCAR 프라이머 세트를 제공한다. 상기 SCAR 프라이머 세트는 상기 마커를 증폭하면서 재배종 한국잔디 품종으로부터 장성셋별(*Zoysia japonica*) 품종을 구분할 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 서열번호 3 및 서열번호 4의 올리고뉴클레오티드로 이루어질 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 구현 예에 따른 SCAR 프라이머 세트에서, 상기 재배종 한국잔디 품종은 야지(*Z. japonica*), 갯잔디(*Z. sinica*), 고려잔디(*Z. matrella*) 또는 중지(*Z. japonica*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0018] 상기 SCAR 프라이머는 서열번호 3 내지 서열번호 4의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 SCAR 프라이머는 서열번호 3 내지 서열번호 4의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.

[0020] 본 발명에 있어서, "SCAR 프라이머"는 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)나 AFLP(Amplification Fragment Length Polymorphism) 마커 밴드의 염기서열을 분석하여 제작한 것이며, ASAP(Alele-Specific Associated Primer) 방식으로 밴드의 유무를 확인하는 방식으로 이용된다. SCAR 마커는 다른 분자 마커에 비해 증폭 환경에 비교적 둔감하고, 용이하게 결과를 판독할 수 있기 때문에, 재현성, 보편성 및 간편성을 갖춘 효율적인 품종구별용 분자 마커로 인식되고 있다. 즉, 보다 정확하고 세밀한 프라이머로 사용이 가능하다.

[0021] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)을 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수 있다.

- [0022] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0023] 본 발명에 따른 SCAR 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 재배종 한국잔디 품종으로부터 한국잔디 장성샛별 품종을 구분하기 위한 키트를 제공한다.
- [0024] 본 발명의 키트에서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 버퍼 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0026] (a) 잔디에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [0027] (b) 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명에 따른 SCAR 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0028] (c) 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 재배종 한국잔디 품종으로부터 한국잔디 장성샛별 품종을 구분하는 방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 방법은 잔디 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, CTAB 방법을 이용할 수도 있고, wizard prep 키트(프로메가사)를 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 SCAR 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소연쇄반응(PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭 시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Q β 복제효소(replicase)를 통한 증폭 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법이 있다. 이 중에서, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.
- [0030] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy-5 또는 Cy-3이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 SCAR 프라이머 세트는 상기에 기재된 바와 같다.
- [0031] 본 발명의 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 겔 전기영동, 모세관 전기영동, DNA 칩, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 겔 전기영동을 수행할 수 있으며, 겔 전기영동은 증폭산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 모세관 전기영동을 수행할 수 있다. 모세관 전기영동은 예를 들면, ABi Sequencer를 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.
- [0032] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시에 1. 한국잔디 장성샛별 품종 구분을 위한 RAPD 마커 분석

유전자원으로 수집한 한국형 잔디인 중지류 잔디에서 우수형질을 갖는 장성샛별(*Zoysia japonica*) 계통의 선별체와 양성 대조구로 야지(*Z. japonica*), 갯잔디(*Z. sinica*), 고려잔디(*Z. matrella*) 및 중지(*Z. japonica*) 4품종의 게놈 DNA를 CTAB 방법을 이용하여 추출하였다. 한국잔디 신품종 장성샛별 SCAR 마커를 개발하기 위하여 표 1의 RAPD 프라이머(서열번호 1)를 이용하여 RAPD-PCR을 수행하였다. PCR 반응은 94℃에서 5분간 1차 변성 후, 94℃에서 30초간 변성(denaturation), 36℃에서 1분간 어닐링(annealing), 72℃에서 2분간 연장(extension)의 과정을 총 35회 반복하여 수행하였다. 최종적으로 PCR 산물의 안정화를 위하여 72℃에서 7분간 연장하였다.

표 1

본 발명의 SCAR 마커 개발을 위한 RAPD 분석용 프라이머

	프라이머명	염기서열
서열번호 1	N8021	5'-AATCGGGCTG-3'

PCR 반응에 의해 생성된 PCR 산물들은 1.5% 아가로스 겔에 100V에서 2시간 동안 전기영동을 수행하여 각각의 특이적 밴드양상은 도 1과 같이 확인하였다. N8021(서열번호 1)를 이용한 PCR 반응 결과, 한국잔디 신품종 장성샛별에서만 증폭된 약 600bp의 특이 밴드를 관찰하였다(도 1).

실시에 2. 한국잔디 장성샛별 품종 구분을 위한 특이 SCAR 마커 제작

RAPD 분석을 통해 확인된 특이 밴드는 밴드위치의 겔 부위를 절단 후 TA-클로닝 벡터에 삽입하였다. 벡터에 삽입된 특이 밴드의 염기서열을 확인하기 위해 42℃에서 열 충격(heat-shock) 방법을 이용하여 대장균(*E. coli*, DH5 α)에 형질전환을 실시하였다. 대장균들은 옴피실린이 포함된 LB 한천 배지에 도말 후 37℃에서 15시간 동안 배양하여 형질전환된 대장균의 증식 여부를 확인하였다. 증식된 대장균 콜로니 중 최초의 RAPD 특이 밴드 삽입 여부를 확인하기 위해 임의로 선택한 각각의 콜로니와 벡터에 포함된 M13 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94℃에서 5분간 1차 변성 후, 94℃에서 30초간 변성(denaturation), 55℃에서 30초간 어닐링(annealing), 72℃에서 50초간 연장(extension)의 과정을 총 25회 반복하여 수행하였고, 최종적으로 PCR 산물의 안정화를 위하여 72℃에서 7분간 연장하였다. PCR 완료 후 1% 아가로스 겔을 이용한 전기영동을 통해 특이 밴드의 삽입 여부를 확인하였다. 특이 밴드가 삽입된 것으로 확인된 대장균 콜로니 중 3개의 콜로니를 선별한 후 옴피실린이 포함된 각각의 액체 LB 배지에 넣고 37℃에서 15시간 동안 진탕배양 후 대장균에 포함된 플라스미드 DNA를 추출하였다. 이렇게 추출된 플라스미드 DNA는 염기서열 분석 장치(ABI 3130XL)를 이용하여 염기서열 분석을 실시하였다. 염기서열 분석에 필요한 프라이머는 M13 프라이머를 사용하였다. 염기서열 분석 결과 N8021 프라이머의 RAPD 결과에서 확인된 특이 밴드의 경우 551bp의 염기서열 정보(서열번호 2)가 도 2와 같이 확인되었다.

RAPD 분석 결과로 획득한 염기서열 정보를 바탕으로 P21_6069_600F(서열번호 3)와 P21_6069_600R(서열번호 4)을 한 쌍으로 하는 한국잔디 신품종 장성샛별을 구분할 수 있는 특이 SCAR 프라이머를 표 2와 같이 제작하였다.

표 2

본 발명의 SCAR 프라이머

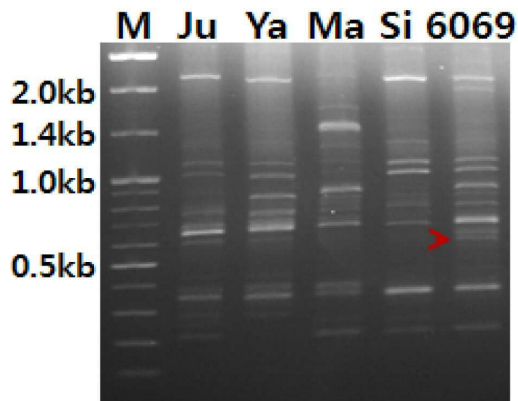
	프라이머명	염기서열	산물 크기
서열번호 3	P21_6069_600F	AATCGGGCTGGCGGTGACCGGAG	551bp
서열번호 4	P21_6069_600R	AATCGGGCTGCTGAATGTGCATC	

SCAR 프라이머를 이용한 특이적 밴드의 패턴 여부는 PCR 방법을 이용하여 검정하였다. PCR 조건은 94℃에서 5분간 1차 변성 후, 94℃에서 30초간 변성(denaturation), 58℃에서 30초간 어닐링(annealing), 72℃에서 40초간 연장(extension)의 과정을 총 25회 반복하여 수행하였고, 최종적으로 PCR 산물의 안정화를 위하여 72℃에서 7분간 연장하였다. PCR 완료 후 1% 아가로스 겔을 이용한 전기영동을 통해 PCR 반응 결과를 확인하였다. 그 결과

한국잔디 신품종 장성샛별에서만 RAPD 분석 결과와 일치하는 약 600bp의 특이적인 밴드가 확인되었다(도 3).

도면

도면1



도면2

```

10      20      30      40      50      60      70
AATCGGGCTGGCGGTGACCGGAGCGCTCTGTTGCTGCCATGCGGCCTCCAGCTTTTCAGCATGCTGACA

80      90      100     110     120     130     140
ATCCGCGACTCCTGGTAAGGTTTCAGAATATAGTCAAACGCCCTCCAGTTCGAAGGCCTCAACGGCATGCT

150     160     170     180     190     200     210
CTTTCAGGCGGTAACGAACACAATAAACGGCTTATGGGCAAACTGATTGATGTTTTCGCCAGCAAGAC

220     230     240     250     260     270     280
GCCGTCAGCGAAGGAATATTAATATCCAGAAAAATGGCGTCGACCCGGTTATGCTGCAGAAATTCAGC

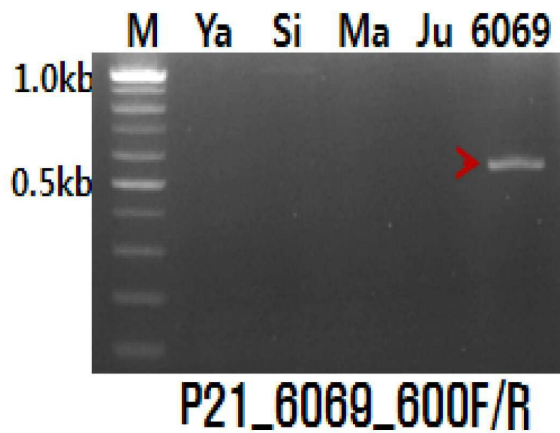
290     300     310     320     330     340     350
ACGTCCAGCCCATCGTCAAAGGTACCCACAATCTCCATCTGCCTGTGGGTTTTGATGAGCCAGGTGAGCT

360     370     380     390     400     410     420
CCTGTTGAGCCAGAATTTTCATCTTCAACGATAATGACTTTCATATTACTCACCTGAGGTAACAGTGATG

430     440     450     460     470     480     490
CCGTGCGATGAACAGGGGAGCGTTCATTGGGACGTAAAAAGCGATTTCAGTGCCGGGTTCAAGACGGTG

500     510     520     530     540     550
AATATGCAGCCCATCGCCGTAGAGCAGCTTGACCCTGTGATGCACATTCAGCAGCCCGATT
    
```

도면3



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Specific SCAR marker for discriminating novel Korean Zoysia japonica 'Jangseonsaetbyul' and uses thereof

<130> PN13182

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

aatcgggctg 10

<210> 2

<211> 551

<212> DNA

<213> Zoysia japonica

<400> 2

aatcgggctg gcggtgaccg gagcgctctg ttgctgcat gcggcctcca gcttttgag 60

catgctgaca atccgcgact cctggtaagg tticagaata tagtcaaacg cctccagttc 120

gaaggcctca acggcatgct ctttccaggc ggtaacgaac acaataaacg gcttatgggc 180

aaactgattg atgttttgcg ccagcaagac gccgtccagc gaaggaatat taatatccag 240

aaaaatggcg tcgacccggt tatgctgcag aaatttcagc acgtccagcc catcgtcaaa 300
 ggtacccaca atctccatct gcctgtgggt ttgatgagc caggtgagct cctgttgagc 360
 cagaatttca tcttcaacga taatgacttt catattactc accctgaggt aacagtgatg 420

ccgtcgcatg aacaggggag cgttcattcg ggacgtaaaa agcgatttca gtgccgggtt 480
 caagacggtg aatatgcagc ccatcgccgt agagcagctt gacctgtga tgcacattca 540
 gcagcccgat t 551

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

aatcgggctg gcggtgaccg gag 23

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

aatcgggctg ctgaatgtgc atc 23