



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0137749
(43) 공개일자 2016년12월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6895 (2013.01)

C12Q 2600/13 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0070638

(22) 출원일자 2015년05월20일

심사청구일자 2015년05월20일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

박영두

경기도 용인시 수지구 성북2로 220 305동 1404호 (성북동, 버들치마을성북힐스테이트3차)

김대국

경기도 수원시 영통구 영통동 청명로 20 403호

(74) 대리인

손민

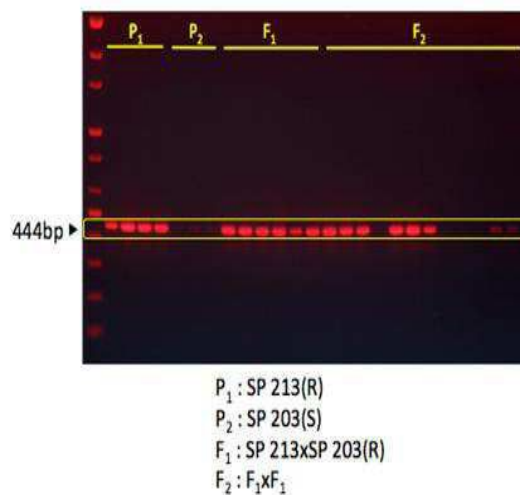
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 수박모자이크바이러스(WMV) 및 주키니누런모자이크바이러스(ZYMV) 저항성 호박 판별용 SCAR 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1로 표시되는 5 내지 444개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드의 서열 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 WMV 및 ZYMV 저항성 호박 판별용 SCAR 마커, 상기 마커를 검출 또는 증폭하기 위한 제제를 포함하는 조성물, 상기 조성물을 포함하는 WMV 및 ZYMV 저항성 호박 판별용 키트 및 WMV 및 ZYMV 저항성 호박 판별방법을 제공할 수 있다. 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 5 내지 444개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드의 서열 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 SCAR 마커를 이용하면, 짧은 시간 내에 간편하게 WMV 및 ZYMV에 대한 호박의 저항성 유무를 판별 가능하다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 111165-05-4-HD120

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발사업

연구과제명 호박 수박모자이크바이러스(WMV), 호박누런모자이크 바이러스(ZYMV) 및 흰가루병 저항성
분자마커 개발

기 여 율 1/1

주관기관 홍익바이오

연구기간 2011.12.26 ~ 2016.12.25

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 5 내지 444개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드의 서열 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 수박모자이크바이러스(Watermelon Mosaic Virus, WMV) 및 주키니누런모자이크바이러스(Zucchini Yellow Mosaic Virus, ZYMV) 저항성 호박 판별용 SCAR 마커.

청구항 2

제1항의 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는, WMV 및 ZYMV 저항성 호박 판별용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 제제는 서열번호 2 및 서열번호 3으로 구성된 폴리뉴클레오타이드로 표시되는 프라이머인 것인 WMV 및 ZYMV 저항성 호박 판별용 조성물.

청구항 4

제2항 또는 제3항의 조성물을 포함하는 WMV 및 ZYMV 저항성 호박 판별용 키트.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 키트는 RT-PCR 키트, 실시간 RT-PCR 키트, 실시간 QRT-PCR 키트 또는 마이크로어레이 칩 키트인 것인 WMV 및 ZYMV 저항성 호박 판별용 키트.

청구항 6

(a) 개체로부터 분리된 시료의 DNA 또는 RNA로부터 서열번호 1로 구성된 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 단계; 및

(b) 상기 (a)단계의 증폭된 산물을 확인하여 WMV 및 ZYMV의 저항성을 판별하는 단계를 포함하는, WMV 및 ZYMV 저항성 호박의 판별방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 호박(*Cucurbita spp.*)과 관련된 품질선별용 SCAR 마커에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 수박모자이크바이러스(Watermelon Mosaic Virus, WMV) 및 주키니누런모자이크바이러스(Zucchini Yellow Mosaic Virus, ZYMV) 저항성을 가진 형질에 대한 호박 품질선별용 SCAR 마커, 상기 SCAR 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트 및 WMV 및 ZYMV 저항성 호박의 판별방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 호박(*Cucurbita spp.*)은 전 세계 박과채소 재배면적 3위, 국내 재배면적 2위를 차지하는 주요 채소작물이다. 호박은 대부분의 농가에서 시설재배로 연작 및 장기 재배하는데, 이는 병해충 피해가 발생할 경우 지속적인 작물의 손상과 수량 감소, 품질의 저하를 일으킨다. 호박에 피해를 입히는 주요 원인 중에는 WMV(Watermelon Mosaic Virus)와 ZYMV(Zucchini Yellow Mosaic Virus)가 있다. WMV와 ZYMV는 많은 박과 작물을 감염시키는 바이러스병으로 국내 호박 농가의 30% 정도가 최대 문제로 선정할 정도로 문제를 일으키고 있다. 이렇듯 WMV와 ZYMV의 피해가 심각하기 때문에 이들을 방제하기 위한 노력이 있어 왔으나, 현재까지는 화학적 방제법 외에 이렇다 할 방법이 없는 상황이다. 화학적 방제법은 처리한 약제의 잔류 문제와 환경오염 문제, 강력한 저항성을 가지는 새로운 병원체의 출현 가능성과 같은 생태계 파괴 문제를 야기할 수 있으며 처리 과정에서 추가적인 비용과 노동력이 필요한 문제점이 있다.
- [0003] 이에 대한 해결방안으로 저항성 형질을 가지는 품종의 육성이 요구되어 왔고, 육종가들은 저항성 계통을 선발하고 육성하기 위해 표현형으로 나타나는 형질을 마커로 이용하여 육종을 진행하여 왔다. 하지만 이 방법은 표현형이 나타나기까지 다양한 환경적 요인들이 변수로 작용하기 때문에 불확실하고 정확한 유전형질을 관찰하기에는 제한적이라는 단점이 있었다.
- [0004] 이러한 단점을 보완하기 위해 저항성 형질과 연관된 DNA 분자 마커를 육종에 도입하는 분자 육종에 대한 연구와 실질적인 적용이 계속적으로 이루어지고 있다. 분자 마커는 식물체의 DNA를 재료로 하기 때문에 환경적 요인의 방해 없이 정확한 유전형질의 분석이 가능하고, 육종 초기에 선발을 가능하게 하며, 표현형으로 드러난 형질과 비교를 통해 보다 확실하게 선발할 수 있게 한다. 이와 같은 유용성이 많은 작물에서 검증됨에 따라 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 및 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)부터 식물체 유전체의 서열 데이터(Sequencing data)를 기반으로 하는 SSR(Simple Sequence Repeat) 및 SNP(Single Nucleotide Polymorphism) 등 여러 종류의 분자 마커가 개발되는 추세이다.
- [0005] 그 중 RAPD 마커는 대상 식물체의 유전체 정보가 없을 때 개발할 수 있는 기술로 10mer 길이의 짧은 프라이머(primer)를 이용하여 식물체 전체 DNA를 증폭시켜 다형성을 분석하는 방법이다. 상기 다형성(polymorphism)이란 단일 유전자 좌위에 두 가지 이상의 대립 유전자가 존재하는 경우를 말하며 개체간의 유전적 차이는 이들 다형성에 의해 결정된다. 상기 RAPD 마커는 실험이 간단하고 결과 확인이 빠른 편인 반면, 짧은 프라이머로 인한 재현성의 문제가 있어 왔다. 이를 보완하기 위해 SCAR(Sequence Characterized Amplified Region) 마커가 개발되었다. 상기 SCAR는 RAPD와 같은 실험의 결과로 나타난 다형성 마커를 시퀀싱(sequencing) 기술을 통하여 염기서열을 분석하고, 프라이머 사이트(primer site)를 포함하는 20mer 정도의 분자 마커로 재작성함으로써 RAPD의 재현성 문제를 해결할 수 있는 기술을 말한다.
- [0006] 최근 분자 생물학의 발달로 인하여 상기 마커 시스템들을 이용하여 특정 식물체에 대하여 품종 선별을 하는 방법들이 널리 이용되고 있으나, 호박에 있어서 분자 유전학적인 마커, 특히, SCAR 마커를 이용하여 WMV 및 ZYMV 모두에 대한 저항성을 판별할 수 있는지에 대해서는 아직 밝혀지지 않았다.
- [0007] 실제로, 선행문헌 *J. AMER. SOC. HORT. SCI. 134(5): 529-534, 2009*에는 수박에서 ZYMV-FL 저항성을 가지는 유전자 및 eIF4E 유전자와 관련된 마커를 맵핑(mapping)하고, eIF4E-CAPS 마커 등이 MAS를 이용한 breeding program에서 유용하다는 것을 확인하고 있으며, 수박에서 ZYMV-FL 저항성을 가지는 PI 595203을 이용하여 ZYRP-SCAR 마커를 제조하는 점에 대해 개시하고 있으나, 상기 선행문헌은 이미 서열이 공지된 ZYMV-FL 저항성 유전자 PI 595203만 이용하고 있으며, ZYMV-FL에 대해서만 저항성을 확인하였을 뿐이다.
- [0008] 또한, 선행문헌 *Theor Appl Genet (2004) 109: 707-712*에서는, ZYMV 바이러스가 박과 식물에 영향을 미치고, 오이와 멜론에서 유전적 부위를 증폭시키기 위한 프라이머 서열로 YCZ-SCAR-1, YCZ-SCAR-2 등의 SCAR 마커의 프라이머를 개시하고 있으나, 호박에서 WMV에 대한 저항성을 판별할 수 있는지와 이의 프라이머에 대해서는 개시하고 있지 않다.
- [0009] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 짧은 시간 내에 간편하게 WMV 및 ZYMV에 대한 호박의 저항성 유무를 판별 가능한 SCAR 마커를 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 저항성 개체와 감수성 개체 사이에 특이적 다형성을 나타내는 RAPD 마커를 이용하여 SCAR 분자마커를 개발하였고, PCR 프라이머를 통해 상기 SCAR를 확인하는 경우, 호박의 WMV 및 ZYMV 저항성 유무를 간편하게 진단할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1로 표시되는 5 내지 444개의 연속 뉴클레오타이드의 서열 또는 상기 서열과 상보적인 서열을 포함하는 WMV 및 ZYMV 저항성 호박 판별용 SCAR 마커를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 SCAR 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는, WMV 및 ZYMV 저항성 호박 판별용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 WMV 및 ZYMV 저항성 호박 판별용 키트를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 WMV 및 ZYMV 저항성 호박의 판별방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명자들은 WMV와 ZYMV에 저항성을 가지는 호박을 육종하기 위하여 두 바이러스에 대해 저항성, 감수성을 가지는 호박 자원을 수집한 후, 그로부터 잎을 채취하여 채취된 잎의 DNA를 분리하여 RAPD 분석을 실시한 후, 저항성 표현형 호박 개체와 감수성 표현형 호박 개체를 비교분석하여 SCAR로 전환할 특이적 증폭부위를 확인하였으며, 증폭부위에서 DNA를 추출하여 염기서열을 확인하는 과정을 거쳐 짧은 시간 내에 간편하게 WMV, ZYMV에 대한 호박의 저항성 유무를 판별 가능한 분자마커를 개발하였고, PCR 프라이머를 통해 상기 SCAR를 확인하는 경우, 호박의 WMV와 ZYMV 저항성 유무를 간편하게 진단할 수 있음을 확인하였다.
- [0015] 따라서, 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시양태로서, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 5 내지 444개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 수박모자이크바이러스(Watermelon Mosaic Virus, WMV) 및 주키니누런모자이크바이러스(Zucchini Yellow Mosaic Virus, ZYMV) 저항성 호박 판별용 SCAR 마커를 제공한다.
- [0016] 본 명세서에서 용어, "폴리뉴클레오타이드"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotide) 또는 리보뉴클레오타이드(ribonucleotide)가 수개 이상 중합한 중합체를 의미하며, 특별히 다르게 언급되어 있지 않은 한 자연의 폴리뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다.
- [0017] 본 명세서에서 용어, "SCAR 마커"는 Sequence Characterized Amplified Region Marker의 줄임말로써, RAPD와 같은 실험의 결과로 나타난 다형성 마커를 시퀀싱(sequencing) 기술을 통하여 염기 서열을 분석하고, 프라이머 사이트(primer site)를 포함하는 20mer 정도의 분자 마커로 재작성함으로써 RAPD의 재현성 문제를 해결할 수 있는 기술을 의미한다.
- [0018] 본 명세서에서 용어, "마커"는 생물학적 현상의 존재와 정량적 또는 정성적으로 연관된 분자를 의미하며, 본 발명의 마커는 5 내지 444개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드를 포함하며, 상기 폴리뉴클레오타이드는 이에 제한되지 않지만 구체적으로, 서열번호 1로 구성된 폴리뉴클레오타이드의 전체 또는 일부일 수 있으며, 상기 서열번호 1의 서열에 있어서 1 내지 수개의 염기가 결실, 치환 또는 부가되어 있는 염기 서열을 포함하고, 상기 서열과 특정 조건하에서 혼성화될 수 있는 염기 서열을 포함한다.
- [0019] 상기 상보적인 폴리뉴클레오타이드는 상기 5 내지 444개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드 서열과 상보적인 염기 서열일 수 있으며, 상기 상보적인 염기 서열에 있어서, 1 내지 수개의 염기가 결실, 치환 또는 부가되어 있는 염기 서열을 포함하고, 상기 서열과 특정 조건하에서 혼성화될 수 있는 염기 서열을 포함한다.
- [0020] 본 명세서에서 용어, "상보적"은 핵산과 관련하여 사용될 때, 그 염기들이 반대의 극성을 갖는 또 다른 핵산의 폴리뉴클레오타이드의 염기들과 결합하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 함유하는 한 방향의 극성을 갖는 핵산을 의미한다. 예를 들면, 5'에서 3' 방향으로 서열 GCAU를 갖는 핵산은 3'에서 5' 방향으로 서열 CGTA를 갖는 핵산과 상보적이다. 본 명세서에서, 상보적이라는 용어는 실질적으로 상보적인 핵산들을 포함하는 것으로 사용된다. 실질적으로 상보적이라는 것은 모든 뉴클레오타이드가 또 다른 핵산의 뉴클레오타이드와 염기쌍을 이루지는 않지

만 그럼에도 불구하고 두 핵산이 특정 조건하에서 안정한 혼성체를 형성할 수 있는 서열을 갖는 것을 의미한다.

[0021] 본 명세서에서 용어, "혼성화"는 실질적으로 상보적인 뉴클레오티드 서열간에 안정한 이중 구조의 형성을 의미하는 것으로 사용된다.

[0022] 본 명세서에서 용어, "WMV"는 수박모자이크바이러스를 의미하는 WMV(Watermelon Mosaic Virus)의 줄임말로써, 박과 식물에 감염하는 RNA를 함유한 바이러스이다. 수박모자이크바이러스에 감염된 식물은 잎에서 모자이크 병징이 나타나고 과피가 그을음이 묻은 것처럼 되어 상품성이 현저히 떨어진다. 종래 미국, 유럽 등에서 문제가 되는 바이러스였으나, 국가간 식물체 이동이 빈번해지면서 최근 국내에서도 발병하여 생산량 감소와 품질 하락 등 피해를 일으키고 있다.

[0023] 본 명세서에서 용어, "ZYMV"는, 주키니누런모자이크바이러스를 의미하는 ZYMV(Zucchini Yellow Mosaic Virus)의 줄임말로써, potyviridae군에 속하여 바이러스 입자의 모양은 사상으로 크기는 750nm이다. 바이러스에 감염된 식물은 잎맥 주위에 주름이 생기고, 잎맥과 잎맥 사이에 담녹색의 모자이크 병반이 나타나며, 그 외 부분은 황색으로 변한다. 또한, 과실에서는 기형과 모자이크 병반을 동반하여 나타난다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에 의하면, WMV 및 ZYMV 저항성 표현형 개체가 확인된 SP213 라인 4개의 개체와 감수성 표현형 개체가 확인된 SP203 라인 3개의 개체를 이용하여 저항성 표현형을 갖는 F1 라인을 육성한 후, F1 라인을 자가교배하여 분리가 일어난 F2 라인 개체를 저항성 표현형 개체의 대조군으로 이용하였다. 상기 선발된 SP213 라인, SP203 라인, F1 및 F2 개체들을 과중하여 잎을 채취한 후 DNA를 추출하였고, 상기 분리된 DNA로 RAPD 분석을 수행하고, PCR을 수행한 후 전기영동하여 확인한 결과, 저항성 형질에 특이적으로 다형성을 보이는 특이밴드인 random primer OPF19를 확인하였다(도 1). 또한, 상기 OPF19 밴드를 추출한 후 시퀀싱을 통하여 서열번호 1의 특이적 서열을 확인하고, OPF19 프라이머 부분을 포함하는 SCAR 프라이머를 작성하였다(도 2). 상기 프라이머로 PCR 분석을 수행하여 SCAR 마커의 WMV 및 ZYMV 저항성 계통 선발용 분자마커로서의 활용가능성에 대해 검증한 결과, 저항성 표현형 SP213, F1라인 및 F2 라인의 일부 개체에서 뚜렷한 밴드를 확인할 수 있었다(도 3). 따라서, 본 발명의 SCAR 마커의 유전자형을 증폭하고, PCR 분석을 수행하여, 상기 SCAR 마커의 유전자형을 판독하면, WMV 및 ZYMV 저항성 호박을 판별할 수 있을 것으로 기대되며, 상기 SCAR 마커는 본 발명자들에 의해 최초로 규명된 것이다.

[0025] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 SCAR 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 WMV 및 ZYMV 저항성 호박 판별용 조성물을 제공한다.

[0026] 상기 마커에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0027] 본 발명의 용어, "SCAR 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제"란, 상기와 같은 WMV 및 ZYMV 저항성 유전자의 다형성 부위를 증폭을 통해 확인하여 WMV 및 ZYMV 저항성 호박을 판별할 수 있는 조성물을 의미하며, 이에 제한되지는 않지만 구체적으로는 상기 SCAR 마커의 폴리뉴클레오티드를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머를 의미한다.

[0028] 상기 SCAR 마커 증폭에 사용되는 프라이머는, 적절한 버퍼 중의 적절한 조건(예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오티드 트리포스페이트 및 DNA, RNA 폴리머라제 또는 역전사 효소와 같은 중합제) 및 적당한 온도 하에서 주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일가닥 올리고뉴클레오티드가 될 수 있는데, 상기 프라이머의 적절한 길이는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 통상 15 내지 30 뉴클레오티드이다. 짧은 프라이머 분자는 일반적으로 주형과 안정한 혼성체를 형성하기 위해서는 더 낮은 온도를 필요로 한다. 상기 프라이머 서열은 상기 SCAR 마커와 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 상기 SCAR 마커와 혼성화 할 정도로 충분히 상보적이어야 하고, 구체적으로는 서열번호 2 및 3으로 구성된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[0029] 본 명세서에서 용어, "프라이머(primer)"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 이때, PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.

- [0030] 본 발명의 프라이머는 포스포르아미다이트 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 비-제한적인 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.
- [0031] 프라이머의 적합한 길이는 사용하고자 하는 프라이머의 특성에 의해 결정하지만, 통상적으로 15 내지 30bp의 길이로서 사용할 수 있다. 프라이머는 주형의 서열과 정확하게 상보적일 필요는 없지만 주형과 혼성복합체(hybrid-complex)를 형성할 수 있을 정도로 상보적이어야만 한다.
- [0032] 상기 서열번호 2 및 서열번호 3으로 구성된 프라이머 쌍은 바람직하게는 서열번호 2 및 서열번호 3으로 기재한 뉴클레오타이드 서열로 정의되는 연속 뉴클레오타이드일 수 있으며, 서열번호 2 및 서열번호 3으로 기재한 뉴클레오타이드 서열뿐만 아니라 상기 서열에 있어서 1 내지 수개의 염기가 결실, 치환 또는 부가되어 있는 염기 서열을 포함하고, 상기 서열과 특정 조건하에서 혼성화될 수 있는 염기 서열을 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 WMV 및 ZYMV 저항성 호박 판별용 키트를 제공한다.
- [0034] 본 발명의 키트는 WMV 및 ZYMV 저항성 호박 판별용 마커인 SCAR 마커의 유전자형 증폭여부를 확인하여, WMV 및 ZYMV 저항성 호박을 판별할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 키트는 WMV 및 ZYMV 저항성 호박을 판별하기 위하여 상기 마커를 검출 또는 증폭할 수 있는 제제를 포함하는 조성물을 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 키트는 WMV 및 ZYMV 저항성 호박을 판별하기 위하여 상기 마커의 발현수준을 확인하기 위한 용도로 사용될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 키트는 RT-PCR 키트, 실시간 RT-PCR 키트, 실시간 QRT-PCR 키트, 또는 마이크로어레이 칩 키트일 수 있다.
- [0038] 본 명세서에서 RT-PCR이란, 역전사를 통해 만들어진 DNA인 cDNA를 주형으로 PCR 하는 것을 의미한다. 여기에서 RT(Reverse Transcription)는, 유전자 발현 양상의 분석연구를 위해 환경 변화 또는 특정 조건에 따라 세포 내 그 양이 달라지는 RNA를 타겟으로 하는 것으로, 단일가닥의 RNA가 이중가닥의 DNA보다 불안정한 물질이고, 시험관에서 RNA 자체를 증폭하여 사용할 수 없다는 한계점 때문에 보다 안정적인 DNA로 역전환하는 과정을 역전사(Reverse Transcription, RT)라 한다.
- [0039] 본 명세서에서 실시간 RT-PCR이란, Real time RT-PCR을 의미하는 것으로 thermal cycler와 분광 형광 광도계가 일치화되어 있어, 실시간으로 PCR 증폭산물의 생성과정을 모니터링하여 target DNA의 양을 분석할 수 있다. 실시간 RT-PCR은 PCR 증폭 산물의 확인을 위한 전기 영동이 필요없으며, 증폭이 지수함수적으로 일어나는 증폭 산물량을 비교하여 보다 정확한 정량이 가능한 신속성과 정량성이 뛰어나다.
- [0040] 본 명세서에서, 실시간 QRT-PCR은 Quantitative real-time PCR로서, 이미 잘 알려져 있는 PCR 기법을 개량한 것이다. 실제 기존 PCR은 극히 적은 양의 시료를 대량으로 증폭할 수 있고 과정이 간단하다는 장점이 있으나, 기하 급수적으로 핵산을 복제하여 증폭하기 때문에 초기에 원래 존재하였던 핵산의 양을 추정하기가 어렵다는 한계점이 있었다. 이러한 한계점을 극복하고자 증폭되는 핵산의 양을 정량적으로 검출하는 qRT-PCR 기법이 개발되었고, 이 기법은 증폭되는 핵산물질에 형광을 붙이고 이 형광을 지속적으로 검출하는 방식으로 이루어진다. 이론적으로 모든 PCR은 증폭의 경우 2^n (n =cycle 수) 배율로 증가하기 때문에, 실시간으로 측정된 증폭값으로 수학적 regression을 수행하면 사이클 수에 따라 시료에 존재하였던 초기 주형 핵산량을 역으로 추정할 수 있게 된 것이다.
- [0041] 본 명세서에서 마이크로어레이 칩이란, 매우 작은 DNA 조각들이 고체 표면에 집적된 것으로, 많은 양의 유전자의 발현 정도를 동시에 측정하거나 게놈의 다양한 부분의 유전자형을 파악하기 위해 사용하는 것을 의미한다.

- [0042] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 개체로부터 분리된 시료의 DNA 또는 RNA로부터 서열번호 1로 구성된 폴리뉴클레오타이드를 증폭시키는 단계; 및 (b) 상기 (a)단계의 증폭된 산물을 확인하여 WMV 및 ZYMV의 저항성을 판별하는 단계를 포함하는, WMV 및 ZYMV 저항성 호박의 판별방법을 제공한다.
- [0043] 상기 서열번호 1로 표시되는 5 내지 444개의 연속 뉴클레오타이드의 서열에 대해서는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0044] 상기 단계 (a)의 시료는 호박의 어떠한 조직에서도 분리될 수 있으며, 구체적으로는 발생 초기의 본엽에서 분리될 수 있다. 상기 단계 (a)에서 시료로부터 DNA 또는 RNA를 추출하는 방법은 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 기술 또는 시판되고 있는 DNA 또는 RNA 추출용 키트를 사용할 수 있다. 예를 들면, 페놀 클로로포름 추출법 및 프로테아제 K 처리방법을 사용할 수 있다. DNA 또는 RNA 추출용 키트는 Qiagen, Inc, 및 Stratagene에서 구입할 수 있다. 상기에서 RNA를 추출하여 사용하는 경우에는 역전사를 통해 cDNA를 제조하여 사용할 수 있다.
- [0045] 상기 서열번호 1로 표시되는 5 내지 444개의 연속 뉴클레오타이드의 서열을 상기 분리된 DNA 또는 RNA로부터 증폭된 산물에서 확인하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 모두 이용할 수 있으며, 예를 들어, 전기영동을 통해 증폭된 산물에 의해 확인되는 경우, WMV 및 ZYMV에 대한 저항성이 있다고 판별할 수 있다.

발명의 효과

- [0046] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 5 내지 444개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드의 서열 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 WMV 및 ZYMV 저항성 호박 판별용 SCAR 마커, 상기 마커를 검출 또는 증폭하기 위한 제제를 포함하는 조성물, 상기 조성물을 포함하는 WMV 및 ZYMV 저항성 호박 판별용 키트 및 WMV 및 ZYMV 저항성 호박 판별방법을 제공할 수 있다. 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 5 내지 444개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드의 서열 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 SCAR 마커를 이용하면, 짧은 시간 내에 간편하게 WMV 및 ZYMV에 대한 호박의 저항성 유무를 판별 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1은 호박 WMV 및 ZYMV 저항성 표현형 SP213 개체 및 감수성 표현형 SP203 개체, F1, F2 개체를 이용한 RAPD 분석 과정에서 OPF19 랜덤(random) 프라이머를 사용한 PCR 증폭 결과 및 다형성 부위를 확인한 것이다.
- 도 2는 호박 WMV 및 ZYMV 저항성 표현형 SP213 개체 및 감수성 표현형 SP203 개체, F1, F2 개체를 이용한 RAPD 분석을 통하여 확보한 SCAR site(서열번호 1) 및 상기 SCAR site를 이용하여 프라이머를 디자인한 것이다.
- 도 3은 호박 WMV 및 ZYMV 저항성 형질 관련 분자마커 개발을 위해 작성된 SCAR 프라이머를 이용해 호박 WMV 및 ZYMV 저항성 표현형 SP213 개체 및 감수성 표현형 SP203 개체, F1, F2 개체를 이용한 PCR 실험을 수행한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0048] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0049] 실시예 1. WMV 및 ZYMV 저항성 표현형 개체 및 감수성 표현형 개체 확보

- [0050] 본 발명자들은 영농법인 홍익바이오로부터 제공받은 WMV 및 ZYMV 저항성 표현형 호박 개체와 감수성 표현형 호박 개체의 종자를 파종하여 본엽이 3매 이상 전개되기 시작하는 시기에 있을 채취하였다.

- [0051] 본 발명자들은 WMV 및 ZYMV 저항성 표현형 개체가 확인된 SP213 라인 4개의 개체와 감수성 표현형 개체가 확인된 SP203 라인 3개의 개체를 이용하였고, SP213 라인과 SP203 라인을 교배하여 저항성 표현형을 갖는 F1 라인을 육성하였다. 육성된 F1 라인을 자가교배하여 분리가 일어난 F2 라인의 개체를 저항성 표현형 개체의 대조군으로

이용하였다.

[0052] 실시예 2. 선발된 호박 개체들의 DNA 추출 및 RAPD screening

[0053] 선발된 WMV 및 ZYMV 저항성 표현형 SP213 개체들과 감수성 표현형 SP203 개체들 및 F1, F2 개체들을 온실에 과중하여 본엽이 3매 이상 전개되는 시기에 잎을 채취하여 DNA를 추출하였다.

[0054] 추출된 DNA의 상태와 농도를 분광광도계(UV-Vis Spectrophotometer, NanoDrop ND-100)를 통해 확인하였다(표 1).

표 1

[0055]

Name	Conc.(ng/ul)	A260/A280	Total vol.(ul)	Total quantity
SP 213-1	3228	1.82	40	129ug
SP 213-2	963	1.87	40	38ug
SP 213-3	1720	1.88	40	68ug
SP 213-4	2211	1.84	40	88ug
SP 203-1	3481	1.83	40	139ug
SP 203-2	2294	1.85	40	91ug
SP 203-3	2462	1.89	40	98ug
F ₁ -1	2230	1.83	40	89ug
F ₁ -2	2754	1.84	40	110ug
F ₁ -3	3701	1.79	40	148ug
F ₁ -4	3584	1.81	40	143ug
F ₁ -5	3332	1.82	40	133ug
F ₁ -6	3347	1.80	40	133ug
F ₂ -1	2354	1.87	40	94ug
F ₂ -2	2911	1.85	40	116ug
F ₂ -3	3015	1.84	40	120ug
F ₂ -4	1762	1.75	40	70ug
F ₂ -5	2438	1.78	40	97ug
F ₂ -6	1608	1.82	40	64ug
F ₂ -7	2809	1.76	40	112ug
F ₂ -8	2391	1.81	40	95ug
F ₂ -9	2491	1.78	40	99ug
F ₂ -10	1224	1.81	40	48ug
F ₂ -11	3246	1.77	40	129ug
F ₂ -12	2892	1.79	40	115ug

[0056] 상기 분리된 DNA를 이용하여 WMV 및 ZYMV 저항성 형질에 특이적인 다형성을 확인하기 위하여 iNtRON Maxime PCR Premix(i-taq)를 이용하여, 10p random primer(OPA, OPF, OPL, OPX, OPAN random primer set, OPERON)를 각각 0.67ul, 개체별 DNA 1ul의 조성으로 RAPD 분석을 수행하였으며, PCR machine을 통해 94℃에서 3분간 진행한 후, 94℃에서 1분간 변성, 37℃에서 1분간 어닐링(Annealing), 72℃에서 1분간 연장 과정을 40 사이클(cycle)을 수행하였다. 수행한 결과는 1.5% agarose gel에 전기영동하여 확인하였으며, 저항성 형질에 특이적으로 다형성을 보이는 특이 밴드인 랜덤 프라이머(random primer) OPF19를 발견하였다(도 1).

[0057] 실시예 3 : 저항성 개체의 특이적 밴드 추출 및 염기서열 분석을 통한 SCAR 마커 검출용 프라이머 설계

[0058] 일부에서만 특이적인 다형성을 보이는 OPF19의 밴드를 추출한 후, 시퀀싱(sequencing)을 통하여, OPF primer site를 포함하는 서열번호 1의 특이적 서열을 확인하였다. 이후, 확인된 서열번호 1의 염기서열을 증폭시키기 위해 Oligo PerfectTM 소프트웨어를 이용해 서열번호 1의 염기서열을 검출할 수 있는 SCAR 프라이머를 디자인하였다(도 2). 상기 프라이머는 서열번호 1의 염기서열 중에서 노란색과 주황색으로 표시된 염기서열에 결합할 수 있는 프라이머로, VirSq-F19-F(서열번호 2) 및 VirSq-F19-R(서열번호 3)로 명명하였다(표 2).

표 2

프라이머	염기서열
VirSq-F19-F (서열번호 2)	5 '-CCT CTA GAC CAA CTA TAA ATT AGA TAG-3'
VirSq-F19-R (서열번호 3)	5' -CCT CTA GAC CCA CAG TAG GTT-3'

[0060] 실시예 4: SCAR 마커 검증

[0061] WMV 및 ZYMV 저항성 형질 관련 SCAR 분자마커의 검증을 위해, RAPD 분석에 사용되었던 표 1에 제시된 저항성 표현형 SP213 4개체를 비롯하여 감수성 표현형 SP203 3개체, F1 라인 6개체 및 F2 라인 12개체를 이용하였다.

[0062] 상기 표 1에 나타난 25개체에 대하여 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머로 PCR 분석을 수행하여 본 실시예 3에서 개발한 SCAR 마커의 WMV 및 ZYMV 저항성 계통 선발용 분자마커로서의 활용가능성에 대해 검증하였다.

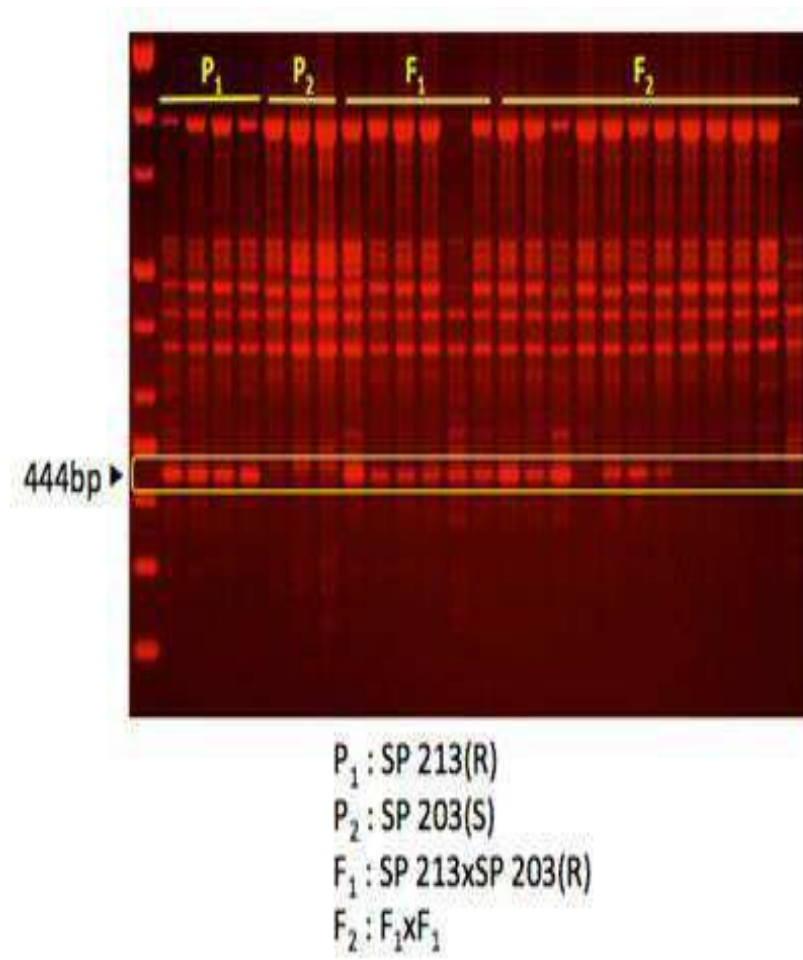
[0063] PCR 분석은 iNtRON Maxime PCR PreMix(i-taq)를 이용하여, 각각 1ul 10p 프라이머(primer), 개체별 DNA 1ul의 조성으로 수행하였으며, PCR 기계를 통해 95℃에서 1분간 진행한 후 95℃에서 30초간 변성, 55℃에서 30초간 어닐링(annealing), 72℃에서 30초간 연장과정을 35 사이클 수행하였다.

[0064] 그 결과, 저항성 표현형 SP213, F1 라인 및 F2 라인의 일부 개체에서 뚜렷한 밴드를 확인할 수 있었고, 감수성 표현형 SP203, F2 라인의 나머지 개체에서는 밴드를 관찰할 수 없었다(도 3).

[0065] 이를 통해 SCAR 증폭 부위가 호박의 WMV 및 ZYMV 저항성 형질과 유의하게 연관된 유전자 부위임을 확인할 수 있었고, 간단한 PCR 방법을 통하여 호박의 WMV 및 ZYMV 저항성 계통을 선발하기 위하여 상기 서열번호 2 내지 서열번호 3의 프라이머를 유용하게 활용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면

도면1



도면2

Sequence Name:

VirSq-F19

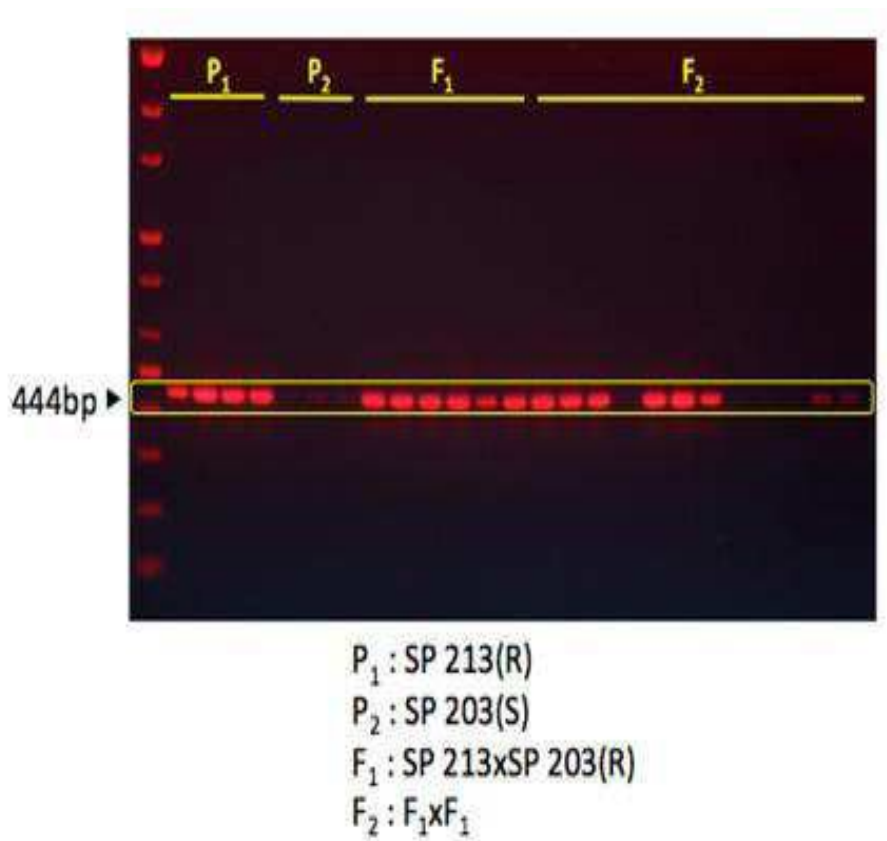
Target Sequence:

```

1   10  20  30  40  50  60  70  80  90
1  CCTCTAGACCAAGTATAAATTAGATAGGCTTCTATATATAAAAGTTATATTAATGGTAAAAAAATATATATATATACTCGAGATGGAATGCT
101 CGTGATTCACTCAATATAGTGATGATATCATGGCTGAACTACAAGGAAGATTTCTAGAATTAGTCCACTTCCATTATTCGACAATAAAATTTACCA
201 CGTGTAATTAAGAGATTATTGAAAGATGACTAAACAAGAGTGCACCGTGAATTAAGGAACCAATGTTATTAAGATACCTGTAGACTCTTATTGCA
301 ACCTTAACCTAGTAGGCATCCATGGGCTTTCTTTAAGCTCTATGAAGTTCAGGTCTAAGTTATAGTTATTCGAGTTCTAGGTAAGCCTCGAAGTTT
401 GAGTGTTTCTATAACCATCACAAACCTACTGTGGGTCTAGAGG
  
```

Rank: 1 Product Length: 444 Product Region: 1 - 444				
Primer Name	%GC	Strand	Size (bases)	Tm (°C)
☐ VirSq-F19 1 F	33.33	FWD	27	53.12
☐ VirSq-F19 1 R	52.38	REV	21	55.01
5' Addition	Primer Sequence			
	 CCTCTAGACCAAGTATAAATTAGATAG			
	 CCTCTAGACCCACAGTAGGTT			

도면3



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Sequence Characterized Amplified Region Molecular Marker Related to WMV and ZYMV resistance Characteristic in Squash and use thereof
- <130> KPA150334-KR
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 444
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> SCAR marker
- <400> 1

cctctagacc aagtataaat tagataggct tcttatatat aaaagttata tattaatggt

60

aaaaaaaaat atatatatat atactcgaga tgtgaatgct cgtgattcac tcaatatagt	120
gatggatatc atggctgaac tacaaggaag attttctaga attagtccac tteccattat	180
tcgacaataa aaattttacca cgtgtaatta aaagagttat tgaaagatga ctaaaacaag	240
agtgaccctgt gtaattaaag gaaccaaag ttattaagat accttagac tcttattgca	300
accttaacct agtaggcac catgggcttt tctttaagct ctatgaagtt caggtctaac	360
tttatagtta ttcgagtttc taggiaagcc tcgaagtttt gagtgtttct tataaccatc	420
acaaacctac tgtgggtcta gagg	444
<210> 2	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VirSq-F19-F	
<400> 2	
cctctagacc aactataaat tagatag	27
<210> 3	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> VirSq-F19-R	
<400> 3	
cctctagacc cacagtaggt t	21