(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0041158
(43) 공개일자 2023년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 2600/13 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0124403
(22) 출원일자 2021년09월16일
심사청구일자 2021년09월16일

(71) 출원인
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
김정구
전라북도 전주시 완산구 척동1길 32-3, 1동 304호 (효자동3가)
이근표
전북 전주시 덕진구 오공로 70 우미린1차 104-1603
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진동

전체 청구항 수 : 총 8 항

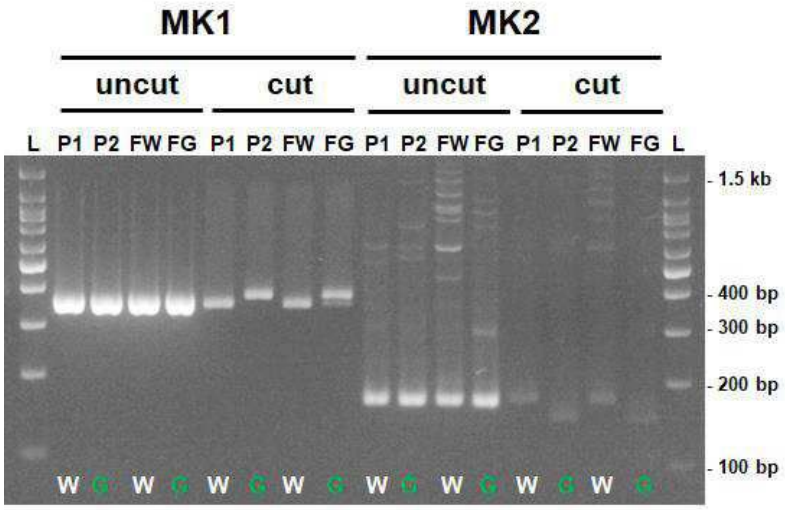
(54) 발명의 명칭 **오이의 과피색 판별용 프라이머 세트 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 오이의 녹색 및 백색 과피색을 판별하는 프라이머 세트 및 이를 이용한 오이의 과피색 판별 방법 관한 것이다.

본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 녹색 또는 백색 과피를 가지는 오이를 종자 및 생육 초기에 판별할 수 있으며, 이에 따라 소비자의 기호 맞춤형 신품종 오이의 분자 육종 개발에 기여할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/156 (2013.01)
(72) 발명자
정진호
전라북도 전주시 완산구 거마평로 93 쌍용모악파크 빌라 503-1312
오은아
전라북도 전주시 완산구 서곡로 34, 105동 1302호 (효자동3가, 서곡청솔아파트)
송기환
서울특별시 성북구 북악산로 813 정릉우성아파트 102-1801

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395067396
과제번호	PJ013432022021
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	포스트게놈신산업육성을위한다부처유전체사업(R&D)(농진청)
연구과제명	국내 고유 오이 유전체해독 및 내병성 관련 유용유전형질 발굴(1주관)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	국립농업과학원
연구기간	2018.01.08 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호1 및 2의 염기서열로 이루어진 제 1 프라이머 세트 또는 서열번호3 및 4의 염기서열로 이루어진 제 2 프라이머 세트를 포함하는,

오이의 과피색 판별용 프라이머 세트.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism; SNP) 증폭용 프라이머 세트인 것인,

오이의 과피색 판별용 프라이머 세트.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 제 1 프라이머 세트는 서열번호5로 표시되는 피루브산 키나제 단백질을 암호화하는 유전자(JEF_Chr3CG52930; pyruvate kinase protein)를 증폭시키고, 상기 제 2 프라이머 세트는 서열번호6으로 표시되는 QWFR 모티프 함유 단백질을 암호화하는 유전자(JEF_Chr3CG53640; QWRF motif-containing protein7)를 증폭시키는,

오이의 과피색 판별용 프라이머 세트.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항의 프라이머 세트를 포함하는,

오이의 과피색 판별용 키트.

청구항 5

제 1항 내지 제 3항의 프라이머 세트를 포함하는,

오이의 과피색 판별용 조성물.

청구항 6

오이 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 서열번호1 및 2의 염기서열로 이루어진 제 1 프라이머 세트 또는 서열번호3 및 4의 염기서열로 이루어진 제 2 프라이머 세트를 이용하여 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행하는 단계;

상기 PCR의 증폭산물을 제한효소로 처리하는 단계; 및

상기 제한효소로 처리한 증폭산물의 크기를 측정하여 오이의 과피색을 판별하는 단계를 포함하는,

오이의 과피색 판별 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 제 1 프라이머 세트를 이용하여 증폭된 산물을 제한효소 DdeI로 절단하고, 상기 절단된 밴드의 크기가 347~357 bp인 경우 녹색 과피, 325~332 bp인 경우 백색 과피로 판단하는 것인,

오이의 과피색 판별 방법

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 제 2 프라이머 세트를 이용하여 증폭된 산물을 제한효소 Bpu10I로 절단하고, 상기 절단된 밴드의 크기가 133~143 bp인 경우 녹색 과피, 158~168 bp인 경우 백색 과피로 판단하는 것인,

오이의 과피색 판별 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 오이(*Cucumis sativus*)의 녹색 및 백색 과피색을 판별하는 프라이머 세트 및 이를 이용한 오이의 과피색 판별 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 오이(*Cucumis sativus*)는 전 세계적으로 재배되고 있는 원예작물로서, 한국과 중국을 포함한 동북아시아 지역에서 많은 양이 생산되고 있다. 국내에서도 오이 재배가 활발하게 이뤄지고 있으며, 국내 시설 원예작물 중 단위면적당 고수익을 보이면서 재배가 늘고 있는 추세이다. 오이는 품종에 따라 특성이 매우 다양하기 때문에 다양한 품종의 장점을 합친 육종 라인의 개발을 위해 많은 투자가 이뤄지고 있고, 근래에는 특히 소비자의 기호에 따라 오이의 과피색이 영향을 미치는 것으로 나타나 선별된 과피색을 가지는 오이의 생산을 위해 빠르게 원하는 형질을 갖는 오이를 육종할 필요가 있다.

[0003] 그러나 현재까지 오이의 과피색과 연관된 변이를 이용하여 백색과 녹색의 과피를 판별할 수 있는 분자표지에 관한 연구 및 선행기술은 전무하다.

[0004] 따라서 오이의 과피색을 생육 초기에 판별하고 오이 분자육종에 기여할 수 있는 분자표지의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2014-0001809호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는, 오이의 과피색 판별용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 과제는 프라이머 세트를 포함하는 키트 또는 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 과제는 프라이머 세트, 키트 또는 조성물을 포함하여 오이의 과피색을 판별하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 실시예는 서열번호1 및 2의 염기서열로 이루어진 제 1 프라이머 세트 또는 서열번호3 및 4의 염기서열로 이루어진 제 2 프라이머 세트를 포함하는, 오이의 과피색 판별용 프라이머 세트이다.

[0010] 상기 프라이머 세트는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism; SNP) 증폭용 프라이머 세트일 수 있다.

[0011] 상기 제 1 프라이머 서열번호5로 표시되는 피루브산 키나제 단백질을 암호화하는 유전자(JEF_Chr3CG52930;

pyruvate kinase protein)를 증폭시키고, 상기 제 2 프라이머 세트는 서열번호6으로 표시되는 QWFR 모티프 함유 단백질을 암호화하는 유전자(JEF_Chr3CG53640; QWRF motif-containing protein7)를 증폭시킬 수 있다.

[0012] 또한 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는, 오이의 과피색 판별용 키트를 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는, 오이의 과피색 판별용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 오이 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 서열번호1 및 2의 염기서열로 이루어진 제 1 프라이머 세트 또는 서열번호3 및 4의 염기서열로 이루어진 제 2 프라이머 세트를 이용하여 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행하는 단계; 상기 PCR의 증폭산물을 제한효소로 처리하는 단계; 및 상기 제한효소로 처리한 증폭산물의 크기를 측정하여 오이의 과피색을 판별하는 단계를 포함하는, 오이의 과피색 판별 방법을 제공한다.

[0015] 상기 제 1 프라이머 세트를 이용하여 증폭된 산물을 제한효소 DdeI로 절단하고, 상기 절단된 밴드의 크기가 347~357 bp인 경우 녹색 과피, 325~332 bp인 경우 백색 과피로 판단하는 것일 수 있다.

[0016] 상기 제 2 프라이머 세트를 이용하여 증폭된 산물을 제한효소 Bpu10I로 절단하고, 상기 절단된 밴드의 크기가 133~143 bp인 경우 녹색 과피, 158~168 bp인 경우 백색 과피로 판단하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 녹색 또는 백색 과피를 가지는 오이를 종자 및 생육 초기에 판별할 수 있으며, 이에 따라 소비자의 기호 맞춤형 신품종 오이의 분자 육종 개발에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 오이 유전체의 염색체상에 과피색 연관 변이가 존재하는 지역을 나타낸 것이다.

도 2는 MK1 프라이머 및 MK2 프라이머 분자표지의 검증 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 MK1 프라이머 분자표지를 38개 genomic DNA에 적용한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 MK2 프라이머 분자표지를 38개 genomic DNA에 적용한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 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.

[0020] 본 발명은 서열번호1 및 2의 염기서열로 이루어진 제 1 프라이머 세트 또는 서열번호3 및 4의 염기서열로 이루어진 제 2 프라이머 세트를 포함하는, 오이의 과피색 판별용 프라이머 세트에 관한 것이다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에서, 백색 과피색을 가지는 백피 라인(P1), 녹색 과피색을 가지는 다다기 라인(P2), 상기 백피 라인과 다다기 라인을 교배하여 얻은 F2 식물체 중 백색 과피 식물체 및 녹색 과피 식물체의 유전체를 분석하였다. 백색 및 녹색 과피 표현형에 특이적인 변이를 탐색하고, 해당 유전자의 단백질 서열 변화를 초래하는 변이를 선발하여 오이의 과피색 판별용 분자표지를 개발하였다.

[0022] 본 발명의 용어 '분자표지'는 DNA 염기서열과 같은 분자들의 차이를 이용하여 특정형질의 표지자로 사용할 수 있는 표지 분자를 말한다. 염색체 상에서 물리적 위치를 나타내고, 특정표현형질을 지시하므로 특정형질을 다른 작물품종에 도입할 때 사용할 수 있는 유전적 표지자로 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명의 분자표지는 서열번호1 및 2의 염기서열로 구성되는 제 1 프라이머 세트 또는 서열번호3 및 4의 염기서열로 구성되는 제 2 프라이머 세트를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 상기 프라이머 세트를 오이의 과피색 판별용 분자표지로 사용하여 백피 품종과 녹피 품종을 구분할 수 있다.

[0025] 상기 프라이머 세트는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism; SNP) 증폭용 프라이머 세트일 수 있다.

[0026] 본 발명의 용어 '단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism; SNP)'은 DNA 염기서열의 한 부분에서 개체에 따라 다른 변이가 나타나는 것으로, 보통 염기 1000개 당 1개의 변이가 나타나며, DNA 복제 과정에서의 발생

한 오류와 생화학적 염기 변형을 수선하지 못함으로써 염기가 바뀌는 것으로부터 비롯된다. SNP는 차세대 염기서열 분석 방법(Next Generation Sequencing, NGS)을 이용하여 분석하고 확인할 수 있다.

[0027] 상기 제 1 프라이머 세트는 서열번호5로 표시되는 피루브산 키나제 단백질을 암호화하는 유전자(JEF_Chr3CG52930; pyruvate kinase protein) 내부의 SNP 주변 서열을 증폭시키고, 상기 제 2 프라이머 세트는 서열번호6으로 표시되는 QWFR 모티프 함유 단백질을 암호화하는 유전자(JEF_Chr3CG53640; QWRF motif-containing protein7) 내부의 SNP 주변 서열을 증폭시키는 것일 수 있다.

[0028] 상기 제 1 프라이머 세트는 서열번호1의 정방향 프라이머 및 서열번호2의 역방향 프라이머로 이루어질 수 있고, 상기 제 2 프라이머 세트는 서열번호3의 정방향 프라이머 및 서열번호4의 역방향 프라이머로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 프라이머 세트를 포함하는, 오이의 과피색 판별용 키트에 관한 것이다.

[0030] 상기 키트는 PCR 키트, 마이크로어레이, 또는 플루이다임 SNP 분석용 키트일 수 있다. 상기 PCR 키트는 상기 단일염기다형성을 검출할 수 있는 프라이머 세트를 포함하는 것일 수 있다. 상기 프라이머 세트 이외에 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함할 수 있으며, 구체적으로 DNA 중합효소, dNTP 혼합물 및 PCR 완충 용액을 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 DNA 중합효소는 예를 들면, *E.coli* DNA 중합효소 I의 클레나우(klenow) 단편, 열안정성 DNA 중합효소 또는 박테리오파아지 T7 중합효소인 것일 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 KCl, Tris-HCl 및 $MgCl_2$를 함유하는 것일 수 있다. 상기 마이크로어레이(microarray)는 기판 표면의 구분된 영역에 상기 단일염기다형성을 검출할 수 있는 폴리뉴클레오티드, 예를 들면 프로브가 높은 밀도로 고정화되어 있는 것일 수 있다. 상기 플루이다임 SNP 분석용 키트는 플루이다임 시스템용 프라이머를 포함할 수 있고, 구체적으로 STA, LSP, 및 ASP 1&2 프라이머를 포함할 수 있다. 플루이다임 SNP 분석용 키트는 DNA 중합효소, dNTP 혼합물 및 PCR 완충 용액을 더 포함하는 것일 수 있다. DNA 중합효소 및 PCR 완충 용액은 상기 PCR 키트에서 설명한 내용을 참조하여 이해될 수 있다.

[0031] 상기 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 표면상 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

[0032] 또한 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는, 오이의 과피색 판별용 조성물에 관한 것이다.

[0033] 본 발명은 또 다른 관점에서, 오이 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 서열번호1 및 2의 염기서열로 이루어진 제 1 프라이머 세트 또는 서열번호3 및 4의 염기서열로 이루어진 제 2 프라이머 세트를 이용하여 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행하는 단계; 상기 PCR의 증폭산물을 제한효소로 처리하는 단계; 및 상기 제한효소로 처리한 증폭산물의 크기를 측정하여 오이의 과피색을 판별하는 단계를 포함하는, 오이의 과피색 판별 방법에 관한 것이다.

[0034] 상기 오이 시료는 오이의 종자, 뿌리, 잎, 줄기 및 열매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 조직일 수 있다.

[0035] 상기 PCR은 당업계에서 PCR 반응에 필요한 것으로 공지된 성분들을 포함하는 PCR 반응 혼합액을 이용하거나 상업적으로 이용 가능한 오이를 이용하여 수행될 수 있다. 상기 PCR 반응 혼합액은 오이에서 추출된 유전체 DNA와 본 발명의 dCAPS 프라이머 세트, 적당량의 DNA 중합효소, dNTP, PCR 완충용액 및 물을 포함할 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 Tris-HCl, $MgCl_2$, KCl 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[0036] 증폭된 표적 서열은 검출 가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 예를 들어, 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 상기 표지 물질은 Cy-5 또는 Cy-3일 수 있으며, 표적 서열의 증폭 시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출 가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행 시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성 동위원소가 증폭산물에 혼입되어 방사성으로 표지될 수 있다. 또는, 증폭 산물은 은염색 키트(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 가시화될 수 있다.

[0037] 증폭된 DNA 산물의 분석은 당업계에서 공지된 통상적인 방법에 의한 것이면 가능하며, 예를 들면 모세관 전기영동, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않

을 수 있다. 예를 들어, 증폭산물을 검출하기 위해 모세관 전기영동을 수행할 수 있으며, ABI Sequencer를 이용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 또한, 겔 전기영동을 수행할 수 있으며, 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 예를 들어, 6% 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 예를 들어, 1 내지 5%, 바람직하게는 3.5% 아가로즈 겔 전기영동을 이용할 수 있다.

[0038] 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출 가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행 시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다. 증폭된 DNA 산물을 겔 전기영동을 사용하여 분석하는 경우, 아가로오스 겔 또는 아크릴 아마이드 겔 상에서 증폭산물을 전기영동하고, 에티디움 브로마이드(EtBr), 실버 염색(silver staining) 등에 의해 밴드를 확인할 수 있다.

[0039] 상기 제 1 프라이머 세트를 이용하여 증폭된 산물을 제한효소 DdeI로 절단하고, 상기 절단된 밴드의 크기가 347~357 bp인 경우 녹색 과피, 325~332 bp인 경우 백색 과피로 판단하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 352 bp인 경우 녹색 과피, 327 bp인 경우 백색 과피로 판단할 수 있다.

[0040] 유전형이 이형(hetero)일 경우 327 bp과 352 bp의 2개 밴드가 동시에 나타나며, 녹색 과피 표현형이 우성이고 백색 과피 표현형이 열성임을 감안하여 이때도 녹색 과피로 판단할 수 있다.

[0041] 상기 제 2 프라이머 세트를 이용하여 증폭된 산물을 제한효소 Bpu10I로 절단하고, 상기 절단된 밴드의 크기가 133~143 bp인 경우 녹색 과피, 158~168 bp인 경우 백색 과피로 판단하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 138 bp인 경우 녹색 과피, 163 bp인 경우 백색 과피로 판단할 수 있다.

[0042] 유전형이 이형(hetero)일 경우 138 bp과 163bp의 2개 밴드가 동시에 나타나며, 녹색 과피 표현형이 우성이고 백색 과피 표현형이 열성임을 감안하여 이때도 녹색 과피로 판단할 수 있다.

[0043] 본 발명의 상기 오이의 과피색 판별 방법은 오이 시료로부터 게놈 DNA를 분리하는 방법으로 DNA 추출 키트를 사용할 수 있으며, 분리된 DNA를 주형으로 하고, 서열번호1 및 2의 염기서열로 이루어진 제 1 프라이머 세트 또는 서열번호3 및 4의 염기서열로 이루어진 제 2 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 것이나 이에 제한되는 것은 아니며, 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭 및 검출하기 위한 임의의 기타 적당한 방법을 사용할 수 있고, 당업계에 공지된 방법을 당업자에 의해 적절하게 변형하여 사용할 수 있다.

[0045] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 구체적인 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.

[0047] **실시예 1: 오이의 과피색 관련 변이 탐색**

[0048] 안성농장에서 수령한 오이의 잎 샘플로부터 genomic DNA를 추출하였다. 백색 과피를 가지는 오이 및 녹색 과피를 가지는 오이의 유전체를 모부본으로 이용하고, 상기 모부본의 F_2 샘플 중, 백피 라인 16개 및 다다기 라인 20개의 genomic DNA를 각각 500ng씩 다운샘플링(Pooled)하였다. 상기 모부본과 다운샘플링한 genomic DNA를 차세대염기서열분석(Next-generation sequencing, NGS) 데이터로 이용하여 분석하였다.

[0049] 각각 29Gb~35Gb의 시퀀싱 데이터로 생산하여 오이의 참조유전체(Reference Genome) 데이터베이스와 대조해 유전자 변이 정보를 확인하였다. 참조유전체(Reference Genome)는 포스터게놈 다부처 사업에서 조립한 JEF 오이 유전체(CucumberJEF.Chr_level.Final_Genome.ragoo.fasta)의 염색체 서열을 이용하였다. 구체적으로, QTL-seq 프로그램(http://genome-e.ibrc.or.jp/home/bioinformaticsteam/mutmap,https://github.com/YuSugihara/QTL-seq)에 입력하여 백피 라인과 다다기 라인을 비교 분석하여 최종적으로 백색과 녹색 과피 간에 통계적으로 유의하게 차이가 나는 변이(p-value<0.05)가 존재하는 염색체 지역을 탐색하였다.

[0050] 그 결과, 하기 표 1과 같이, 염색체 3번과 5번 서열상에 각각 1개씩의 QTL 지역에서 백색과 녹색 과피 간에 유

의적인 차이가 있는 변이가 존재함을 확인하였다(도 1).

표 1

[0051]

염색체(Chr.)	위치(Position)	길이(Size(bp))	변이타입(SNP/InDel nos.)
JEF_Chr3	34100000 - 41679492	7,579,492	11,435
JEF_Chr5	12200000 - 12700000	500,000	743

[0052] 도 1은 오이 유전체의 염색체상에 과피색 연관 변이가 존재하는 지역을 나타낸 것이다. 도 1을 참조하면, 염색체 3번의 7,579,492 bp 길이(34,100,000 - 41,679,492 bp 위치)와 염색체 5번의 500,000 bp 길이(12,200,000 - 12,700,000 bp 위치)에서 12,178개의 변이가 확인되었으며, 이들 중 hetero 변이는 제외하고 유전자의 단백질 서열 변화를 초래할 수 있는 8개 변이를 최종 선발하였고, 2개의 Indel과 6개의 SNP 변이가 7개의 유전자 내에 존재하는 것을 확인하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0053]

Chr	Position	Gene ID	유전자 정보(Gene Description)	Type
JEF_Chr3	34626707	JEF_Chr3CG43770	LSi6 [Cucumis sativus var. sativus], aquaporin NIP	InDel
JEF_Chr3	40443941	JEF_Chr3CG51850	thioredoxin-related transmembrane protein 2 isoform X1 [Cucumis sativus]	SNP
JEF_Chr3	40660199	JEF_Chr3CG52290	inactive poly [ADP-ribose] polymerase RCD1 [Cucumis sativus]	SNP
JEF_Chr3	41075124	JEF_Chr3CG52880	beta-amyrin 11-oxidase [Cucumis sativus], AIT72036.1 cytochrome P450 [Cucumis sativus]	SNP
JEF_Chr3	41075140	JEF_Chr3CG52880	beta-amyrin 11-oxidase [Cucumis sativus], AIT72036.1 cytochrome P450 [Cucumis sativus]	SNP
JEF_Chr3	41102542	JEF_Chr3CG52910	hypothetical protein Csa_013022 [Cucumis sativus], PHT; solute carrier family 15 (peptide/histidine transporter)	InDel
JEF_Chr3	**41106529**	**JEF_Chr3CG52930**	**pyruvate kinase isozyme G, chloroplastic isoform X1 [Benincasa hispida], pyk; pyruvate kinase [EC:2.7.1.40]**	**SNP**
JEF_Chr3	**41641571**	**JEF_Chr3CG53640**	**QWRF motif-containing protein 7 [Cucumis sativus]**	**SNP**

[0054] **실시예 2: 오이의 과피색 판별용 분자표지 설계**

[0055] 표 2의 8개 변이 중 pyruvate kinase 단백질을 암호화하는 유전자(JEF_Chr3CG52930) 서열상에 존재하는 SNP 변이(염색체 3번의 41,106,529 bp 위치)와, QWFR 모티프 함유 단백질을 암호화하는 유전자(JEF_Chr3CG53640) 서열상에 존재하는 SNP 변이(염색체 3번의 41,641,571 bp 위치)를 선택하고, 이를 이용하여 백색과 녹색의 과피색 판별용으로 2종의 dCAPS 분자표지를 설계하여 제 1 프라이머 세트(이하 MK1 프라이머;) 및 제 2 프라이머 세트(이하 MK2 프라이머)를 제작하였다(표 3).

표 3

[0056]

마커 ID	정방향 프라이머	역방향 프라이머	제한효소	Type
MK1 (제1프라이머세트)	서열번호1 AACCTTGTGGACACTCGATGGACTT	서열번호2 ATGCGTGTTCCTCTAGTTTGTT	DdeI	dCAPS
MK2 (제2프라이머세트)	서열번호3 ATGGAAGTCTCTGCTCTAACCTAAG	서열번호4 AAACTAGGCAGTCAACGAGGT	Bpu10I	dCAPS

[0057] MK1 프라이머는 하기의 서열번호5로 표시되는 피루브산 키나제 단백질을 암호화하는 유전자(JEF_Chr3CG52930; pyruvate kinase protein) 내부의 SNP 주변 서열을 증폭하고 상기 유전자는 1013번째에 SNP [c/t] 변이를 포함한다(표 4).

표 4

[0058]

서열번호5	
atggcgacgt ttaatctctc tactggagtt cctctcttga aatctgattc taccagactt	60
gccgatcgcc ttgcttcgtg tagaattgtt tctgatgctt ttggtcttga agtgaagagt	120
ggaaatatgt gtttgcaatc gaaacaaatc ggtttggtta gatgcttgag aatagtggag	180
cagcgggaag ttgcgtccta taatggctct ctggatactg atcaggacgt ttcgaactct	240
acccttgagc ttcagtctaa tgcattccat cgtagcagga cgaagttaac gacaaagtct	300
cgaaggaaaa ctaagatagt atgcacgatt ggcccttcga caagttcacg ggaaatgata	360
tggaaattgg cagagactgg gatgaatgtg gctcgtttaa atatgtcgca tggagaccat	420
tcttcccacc agaaaacaat tgatttggtt aaggaatata acgcccaatt taatgacaaa	480
gttatagcca tcatgcttga tacgaagggt cctgaggttc gaagtggaga tgtacctaaa	540
ccaatcttgc tcaaagaggg acaagaattt aacttcacaa tcaaaagagg agtcagcaca	600
aaagacactg ttagtgtcaa ctacgacgac tttgtaaacg atgtcgaagt tggagatact	660
ttacttgttg atgacaagga ctgggaagat ataaagtttg gggtggataa tcaggttgat	720
ttttatgctg tttcttttgt gaaggatgct agagtggagg atattatcaa aagatgtcgt	780
agcatgcaga aaccagttat tgtggcaaca aacatgctgg aaagcatgat tgatcacccc	840
acaccgacta gagccgaggt ttctgatatt gctattgcag tgcgtgaagg tgctgatgca	900
gtcatgcttt caggagaaac tgctcatggg aaatatccgt tgaaggctgt gaaagtgatg	960
catactgtgg ctttgaggac ggaatctagt ctaccaatta attctactac tc[c/t]aattcca	1020
tcgagtgtcc acaagagcca tatgggagac atgtttgctt tccacgccac cactatggcc	1080
aacaccctta atactcctat cattgttttc acaagaaccg gctccatggc tattctctta	1140
agtcattata ggcccggctc tactatcttt gccttcactg atgacgaaag aattaaacaa	1200
aggctagtgc tttatcatgg ggtcatgcct atctacatgc agttttcaaa tgatgcagaa	1260
gagacgttct ccagagcact cgagtttttg ctggataagg gtcacgtggt agaaggagac	1320
cacgtcacgc ttgtccaaag tggagctcaa ccaatttggc ggaaagaatc cactcaccac	1380
attcaagact cgccggtaaa gaaaaatgaa aactgcgaca ctgagaatgt caaagctgga	1440
catgcttgca gtatccttct accacggttc attgaacagt ccttggcatc aagactgtat	1500
agttcatctc cacttgctgg catcttgacc gttgattttt tagctgcagc aacaatgacc	1560
tggcagaacc ttgagagagg gttgccgctt ggcttgaagt gtctgtacct tgggattcca	1620
caaagaaaca acaccaatgc tgcaaaagct gagccagctg acacccagaa gcccagagcc	1680
cacactcctt catcttcaaa gtaccctaaa atggtgtttg agaagagaga acccaagtta	1740
agcgccaagt aa	

[0059] MK2 프라이머는 하기의 서열번호6으로 표시되는 QWFR 모티프 함유 단백질을 암호화하는 유전자(JEF_Chr3CG53640) 내부의 SNP 주변 서열을 증폭하고 상기 유전자는 511번째에 SNP [g/a] 변이를 포함한다(표 6).

표 5

[0060]

서열번호6	
atggagaaca cacgaatacg ccgaccaaaa acccccgccc ttcctccccc gccgtctccc	60
ggcagcaaaa gccgctcctc ccctgccata accctacccg ataacaactc atgtgccgca	120
aacacaagcc aacgctcaac cattcaccga tcaaaatcag tgacaaagtc aagaaataag	180
aacgacaagg atgaagagaa tttaaacccc ttgaattgta aaaccaaggc aggttttacc	240
aagttcttga agtcctcccc ggcgacttcc ccgtctgcat gggcactgtc acctggccgg	300
tccttgggct ctccccttgt tttgtctccg ctgacggcgg ttgagcacgc ggcgacagat	360
ggacggagag gaaaactagg cagtcaacga ggtggtgcag tgagcggagt tttgaggttt	420
tttaaaccaa agaaagcggc agcgatgatg gaagcagaag agcttcatcg gtttaggatt	480
ttgcagaata ggttgttgca atggaagtat [g/a]ctaacgtta gagcagagac ttccatggct	540
aacgttaaaa cacttgttca ggacagaata ttcagtgtgt ggcttcataa tttgagaatg	600
agaaatcgga tattagaaaa acgaattgaa gttgaaaagt tgagaaagga gatcaagtta	660
tacagaataa tcttccctca agttagtctc ctgaagcaat gggccaagtt agacaaaaga	720
aaccaagaat cagttggcag tttagcctct attctttcaa cattctcact caaactccct	780
ctactccatg gagccaagat tgacacaaag gcttttcaac aagcattaag catggccatg	840
gaggtgatgg tcaaactaga ggcaatgatc accaaacgcg catcccagca actggagaaa	900
acgttgtacg tgctaacgga gcggctaagc atatttaaag aacaggaaga atgcttggaa	960
aagctggagg aggctgtatg ttcggtcatc actttactgg cgaaggagaa tagtattaga	1020
atacaagtca tacaagcaac aaattctacc acgaaggatc atccttttcc tacttgttaa	

[0062] **실시예 3: 오이의 과피색 판별용 분자표지 검증 및 적용**

[0063] 백색 과피색을 가지는 백피 라인(P1), 녹색 과피색을 가지는 다다기 라인(P2), 백피 라인과 다다기 라인을 교배하여 얻은 F_2 식물체 중 백색 과피 식물체 및 녹색 과피 식물체의 다운샘플링(pooled genomic DNA) 등 총 4가지의 genomic DNA 시료를 준비하여 표 3의 MK1 및 MK2 프라이머를 이용해 PCR을 수행하였다.

[0064] 구체적으로, 50ng의 genomic DNA가 사용되었으며, 1x PCR 버퍼(buffer), 0.2 mM dNTP, 1.25 units Taq DNA 폴리머레이즈, 2 pmole 정방향 프라이머, 2 pmole 역방향 프라이머로 구성하여 94℃에서 5분 동안 수행한 뒤, 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 20초의 조건을 37회 반복하여 수행하고, 이후 72℃에서 7분 동안 수행하여 증폭하였다.

[0065] 증폭된 PCR 산물을 해당 SNP에 맞는 제한효소(1.5~2.5 units)로 12시간 정도 처리하고 3.5% 아가로스 겔에서 전기영동 및 EtBr 염색한 후 UV 조명 하에 관찰하여 절단된 밴드의 크기 차이를 확인하였다.

[0066] 구체적으로, MK1 프라이머를 이용하여 증폭한 PCR 산물은 DdeI 제한효소로 절단하고, MK2 프라이머를 이용하여 증폭한 PCR 산물은 Bpu10I 제한효소로 절단하였다.

[0067] 그 결과, 2종의 프라이머 모두 특이적인 단일 크기의 증폭 산물을 생성하였으며, 과피색간에 서로 다른 크기의 DNA 단편을 생성하였다.

[0068] 도 2는 MK1 프라이머 및 MK2 프라이머 분자표지의 검증 결과를 나타낸 것이다. 도 2를 참조하면, 백색 라인(P1), 녹색 라인(P2), F_2 식물체의 백색 과피 식물체(FW) 및 F2 식물체의 녹색 과피 식물체(FG)는 제한효소 처리 후 백색과 녹색 과피색 표현형에서 확연히 다른 밴드 크기 차이를 나타내었다(표 6).

표 6

[0069]

Gene ID	위치	코돈 변화	아미노산 변화	제한 효소	PCR 산물 크기 (bp)	제한효소처리후 녹색 vs 백색 (bp)
JEF_Chr3CG52930	41106529	cCa/cTa	P338L	DdeI	352	352 vs 327
JEF_Chr3CG53640	41641571	Gct/Act	A171T	Bpu10 I	163	138 vs 163

[0071] MK1 프라이머로 증폭한 산물의 크기는 352 bp로, DdeI 제한효소 처리 후 녹색 과피 표현형의 밴드는 352 bp, 백색 과피 표현형의 밴드는 327 bp로 나타났으며, MK2 프라이머로 증폭한 산물의 크기는 163 bp로, Bpu10I 제한효소 처리 후 녹색 과피 표현형의 밴드는 138 bp, 백색 과피 표현형의 밴드는 163 bp로 나타났다.

[0072] 녹색 과피 표현형이 우성이므로 녹색 과피색 유전형과 흰색 과피색 유전형의 이형(hetero)인 식물체는 녹색 과피색 표현형을 나타내지만 MK1 프라이머로 증폭한 산물을 DdeI 제한효소 처리하면 2개의 밴드 (352bp, 327bp)가 나타나며, MK2 프라이머로 증폭한 산물을 Bpu10I 제한효소 처리하면 역시 2개의 밴드 (163bp, 138bp)가 나타났다.

[0073] 따라서, MK1 및 MK2 프라이머를 이용하여 오이의 녹색과 백색 과피색을 구분할 수 있음을 확인하였다.

[0074] 또한, 백색 과피색을 가지는 백피 라인(P1), 녹색 과피색을 가지는 다다기 라인(P2), 백피 라인과 다다기 라인을 교배하여 얻은 F_2 식물체 중 백색 과피 식물체 및 녹색 과피 식물체의 다운샘플링(pooled genomic DNA) 등 총 38가지의 시료를 대상으로 MK1 및 MK2 프라이머 분자표지를 적용한 결과, 백색과 녹색 과피색 표현형에서 서로 다른 크기의 DNA 단편을 생성하였다.

[0075] 도 3은 MK1 프라이머 분자표지를 38개 genomic DNA에 적용한 결과를 나타낸 것이고, 도 4는 MK2 프라이머 분자표지를 38개 genomic DNA에 적용한 결과를 나타낸 것이다.

[0076] 도 3 및 도 4를 참조하면, 백색 육종라인(P1), 녹색 육종라인(P2), 36개의 F_2 식물체(3~38)는 제한효소 처리 후 백색과 녹색 과피색 표현형에서 확연히 다른 밴드 크기 차이를 나타내었다.

[0077] 녹색 과피색 식물체 중 일부의 분자표지 결과가 2개의 DNA 단편이 함께 존재하는 것은 녹색 과피색이 우성 형질임을 고려할 때 이형(hetero) 유전형 타입으로 나올 수 있는 결과로 분석된다.

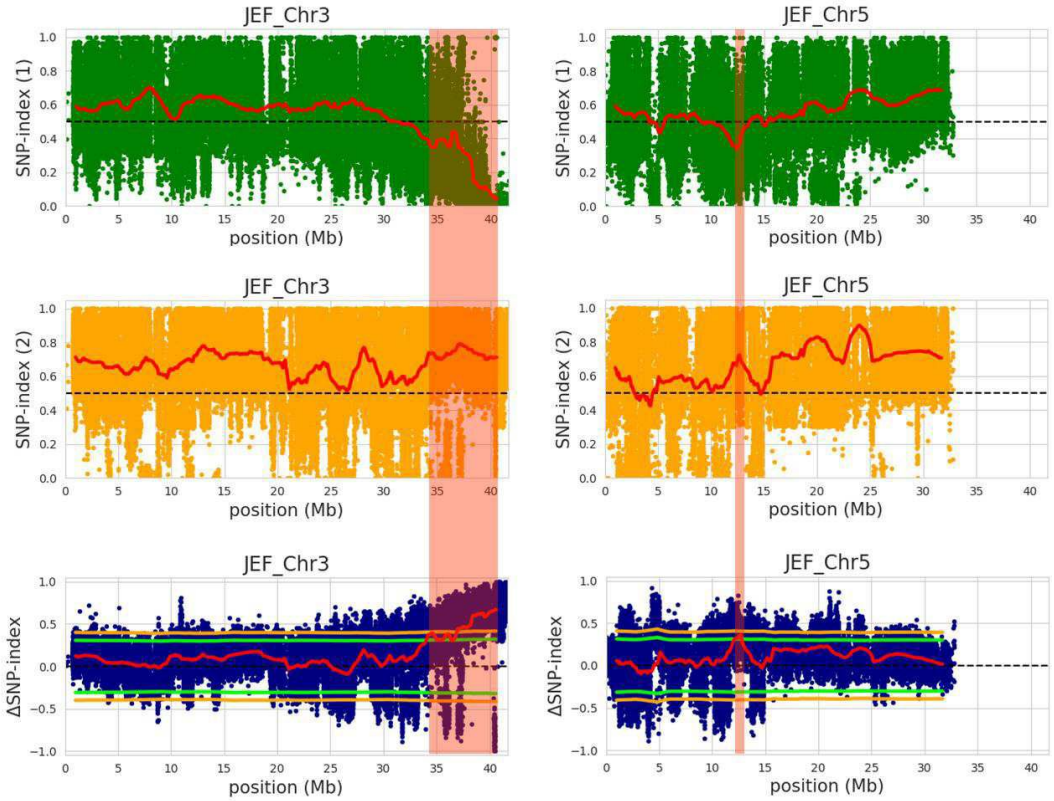
[0078] 따라서, 분자표지 MK1 및 MK2 프라이머를 육종집단에 성공적으로 적용하여 백색과 녹색 과피색을 구분할 수 있음을 확인하였다.

[0080] 이상으로 본 발명에서는 오이 유전체의 차세대염기서열분석(Next-generation sequencing, NCS)을 통해 녹색과 백색의 과피색과 연관된 후보 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism; SNP) 변이 8개를 확인하였다. 이들 중 2개의 SNP 정보를 이용하여 2종의 dCAPS 프라이머 세트를 설계 및 검증하였으며, 최종적으로 오이의 녹색 및 백색 과피를 판별할 수 있는 분자표지를 개발하였다.

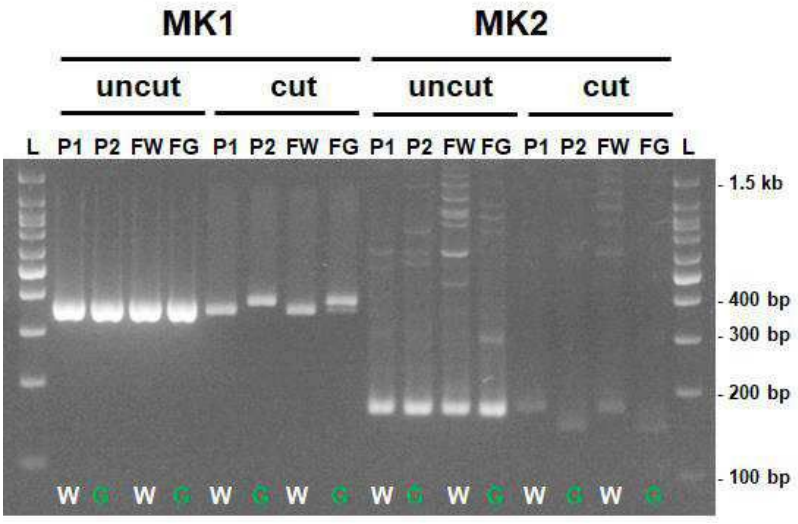
[0081] 본 발명의 오이 과피색 판별용 프라이머 세트를 이용하면 녹색과 백색 과피를 가지고 있는 오이를 종자 또는 생육 초기에 판별하고, 원하는 형질을 가지는 오이의 분자육종에 활용할 수 있다.

도면

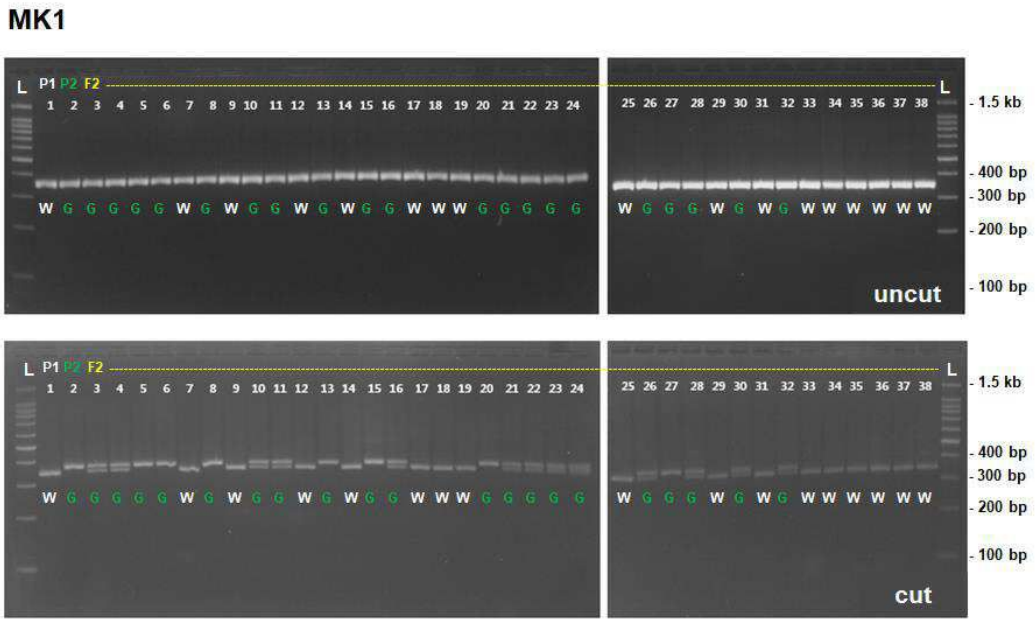
도면1


JEF_Chr3
JEF_Chr5
SNP-index (1)
SNP-index (2)
ΔSNP-index
position (Mb)

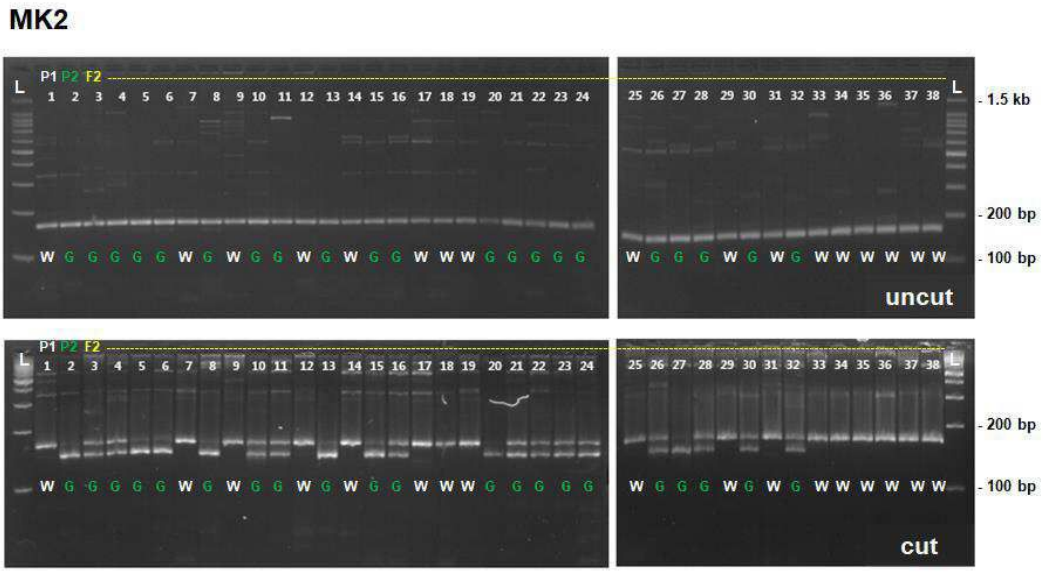
도면2


MK1
MK2
uncut
cut
L P1 P2 FW FG P1 P2 FW FG P1 P2 FW FG P1 P2 FW FG L
1.5 kb
400 bp
300 bp
200 bp
100 bp

도면3



도면4



서 열 목 록

<110> REPUBLIC OF KOREA(MANAGEMENT : RURAL DEVELOPMENT ADMINISTRATION)

<120> Primer set for discriminating cucumber skin color and use thereof

<130> 2021-0242-10-A

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MK1-F

<400> 1

aaccttgtgg acactcgatg gactt 25

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MK1-R

<400> 2

atgcgtgttc ctctagtttg tt 22

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MK2-F

<400> 3

atggaagtct ctgctctaac ctaag 25

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MK2-R

<400> 4

aaactaggca gtcaacgagg t 21

<210> 5

<211> 1752

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JEF_Chr3CG52930

<400> 5

atggcgacgt ttaatctctc tactggagtt cctctcttga aatctgattc taccagactt 60

gccgatcgcc ttgcttcgtg tagaattgtt tctgatgctt ttggtcttga agtgaagagt 120

ggaaatatgt gtttgcaatc gaaacaaatc ggtttggtta gatgcttgag aatagtggag 180

cagcgggaag ttgcgtccta taatggctct ctggatactg atcaggacgt ttcgaactct 240

acccttgagc ttcagtctaa tgcattccat cgtagcagga cgaagttaac gacaaagtct 300

cgaaggaaaa ctaagatagt atgcacgatt ggcccttcga caagttcacg ggaaatgata 360

tggaaattgg cagagactgg gatgaatgtg gctcgtttaa atatgtcgca tggagaccat 420

tcttcccacc agaaaacaat tgatttggtt aaggaatata acgcccaatt taatgacaaa 480

gttatagcca tcatgcttga tacgaagggt cctgaggttc gaagtggaga tgtacctaaa 540

ccaatcttgc tcaaagaggg acaagaattt aacttcacaa tcaaaagagg agtcagcaca 600

aaagacactg ttagtgtcaa ctacgacgac tttgtaaacg atgtcgaagt tggagatact 660

ttacttgttg atgacaagga ctgggaagat ataaagtttg gggtggataa tcaggttgat 720

ttttatgctg tttcttttgt gaaggatgct agagtggagg atattatcaa aagatgtcgt 780

agcatgcaga aaccagttat tgtggcaaca aacatgctgg aaagcatgat tgatcacccc 840

acaccgacta gagccgaggt ttctgatatt gctattgcag tgcgtgaagg tgctgatgca 900

gtcatgcttt caggagaaac tgctcatggg aaatatccgt tgaaggctgt gaaagtgatg 960

catactgtgg ctttgaggac ggaatctagt ctaccaatta attctactac tcnaattcca 1020

tcgagtgtcc acaagagcca tatgggagac atgtttgctt tccacgccac cactatggcc 1080

aacaccctta atactcctat cattgttttc acaagaaccg gctccatggc tattctctta 1140

agtcattata ggcccggctc tactatcttt gccttcactg atgacgaaag aattaaacaa 1200

aggctagtgc tttatcatgg ggtcatgcct atctacatgc agttttcaaa tgatgcagaa 1260

gagacgttct ccagagcact cgagtttttg ctggataagg gtcacgtggt agaaggagac 1320

cacgtcacgc ttgtccaaag tggagctcaa ccaatttggc ggaaagaatc cactcaccac 1380

attcaagact cgccggtaaa gaaaaatgaa aactgcgaca ctgagaatgt caaagctgga 1440

catgcttgca gtatccttct accacggttc attgaacagt ccttggcatc aagactgtat 1500

agttcatctc cacttgctgg catcttgacc gttgattttt tagctgcagc aacaatgacc 1560

tggcagaacc ttgagagagg gttgccgctt ggcttgaagt gtctgtacct tgggattcca 1620

caaagaaaca acaccaatgc tgcaaaagct gagccagctg acacccagaa gcccagagcc 1680

cacactcctt catcttcaaa gtaccctaaa atggtgtttg agaagagaga acccaagtta 1740

agcgccaagt aa 1752

<210> 6

<211> 1080

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> JEF_Chr3CG53640

<400> 6

atggagaaca cacgaatacg ccgaccaaaa acccccgccc ttcctccccc gccgtctccc 60

ggcagcaaaa gccgctcctc ccctgccata accctacccg ataacaactc atgtgccgca 120

aacacaagcc aacgctcaac cattcaccga tcaaaatcag tgacaaagtc aagaaataag 180

aacgacaagg atgaagagaa tttaaacccc ttgaattgta aaaccaaggc aggttttacc 240

aagttcttga agtcctcccc ggcgacttcc ccgtctgcat gggcactgtc acctggccgg 300

tccttgggct ctccccttgt tttgtctccg ctgacggcgg ttgagcacgc ggcgacagat 360

ggacggagag gaaaactagg cagtcaacga ggtggtgcag tgagcggagt tttgaggttt 420

tttaaaccaa agaaagcggc agcgatgatg gaagcagaag agcttcatcg gtttaggatt 480

ttgcagaata ggttgttgca atggaagtat nctaacgtta gagcagagac ttccatggct 540

aacgttaaaa cacttgttca ggacagaata ttcagtgtgt ggcttcataa tttgagaatg 600

agaaatcgga tattagaaaa acgaattgaa gttgaaaagt tgagaaagga gatcaagtta 660

tacagaataa tcttccctca agttagtctc ctgaagcaat gggccaagtt agacaaaaga 720

aaccaagaat cagttggcag tttagcctct attctttcaa cattctcact caaactccct 780

ctactccatg gagccaagat tgacacaaag gcttttcaac aagcattaag catggccatg 840

gaggtgatgg tcaaactaga ggcaatgatc accaaacgcg catcccagca actggagaaa 900

acgttgtacg tgctaacgga gcggctaagc atatttaaag aacaggaaga atgcttggaa 960

aagctggagg aggctgtatg ttcggtcatc actttactgg cgaaggagaa tagtattaga 1020

atacaagtca tacaagcaac aaattctacc acgaaggatc atccttttcc tacttgttaa 1080

1080