



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년01월23일
(11) 등록번호 10-1940286
(24) 등록일자 2019년01월14일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C12Q 1/68</i> (2018.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>C12Q 1/6895</i> (2018.05)
<i>C12Q 2527/101</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-0157175</p> <p>(22) 출원일자 2017년11월23일
심사청구일자 2017년11월23일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
Journal of Plant Biology (2006) Vol.49 No.6
pp.491-497
Miller C. F. et al. Kor. J. Plant Tax.(2002)
Vol.32 No.4 pp.293-299
Philippe Cuenoud et al. Annals of Botany
(2000) Vol.85 pp.111-122
KR1020170076206 A</p> | <p>(73) 특허권자
대한민국</p> <p>(72) 발명자
이은정
제주특별자치도 제주시 과원로 11, 201동 708호(노형동, 부영아파트)
이양한
강원도 원주시 단구로 416, 403동 108호(단구동, 단관 청솔4차아파트)
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
김순웅</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 6 항

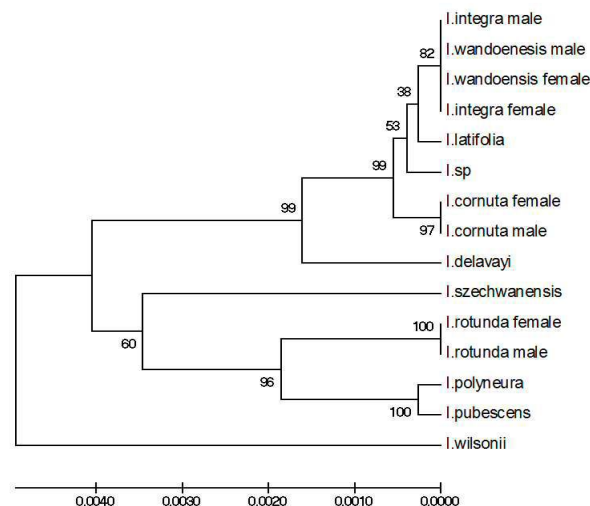
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 완도호랑가시나무의 모계 식별용 프라이머 세트 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 국내산 완도호랑가시나무의 모계 식별용 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, PCR 산물의 길이 차이만으로, 유전적으로 많은 동일성을 지닌 감탕나무속 식물들로부터 완도호랑가시나무의 모계나무를 용이하게 구분할 수 있다. 또한, 기존의 방법들보다 정확하게 모계나무를 식별할 수 있어 품종 보호, 및 종자 분쟁의 해결 등에도 이용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12Q 2531/113 (2013.01)

(72) 발명자

박현철

제주특별자치도 제주시 애월읍 상하귀길 40-26,
201호(참수리빌라)

진강남

광주광역시 광산구 하남대로261번길 27, 102동 20
3호(신가동, 수완진아리채1차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017-유전자-03

부처명 행정안전부

연구관리전문기관 국립과학수사연구원

연구사업명 DNA 감식 및 법생물학 연구개발

연구과제명 실종자 DNA 데이터베이스 및 신원확인체계 구축

기 여 율 1/1

주관기관 국립과학수사연구원

연구기간 2016.01.01 ~ 2017.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 프라이머로 구성된 프라이머 세트; 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 서열번호 4의 염기서열로 표시되는 프라이머로 구성된 프라이머 세트; 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 프라이머로 구성된 프라이머 세트; 및 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 프라이머로 구성된 프라이머 세트;를 포함하는 완도호랑가시나무(*Ilex x wandoensis*)의 모계(Maternal origin) 식별을 위한 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프라이머 세트는 PCR(Polymerase Chain Reaction) 용인 것을 특징으로 하는 프라이머 세트.

청구항 3

제1항의 프라이머 세트를 포함하는 완도호랑가시나무(*Ilex x wandoensis*)의 모계(Maternal origin) 식별용 조성물.

청구항 4

제1항의 프라이머 세트를 포함하는 완도호랑가시나무(*Ilex x wandoensis*)의 모계(Maternal origin) 식별용 키트.

청구항 5

다음 단계를 포함하는 완도호랑가시나무(*Ilex x wandoensis*)의 모계(Maternal origin) 식별 방법:

- (a) 시료에서 DNA를 분리하는 단계;
- (b) 상기 분리된 DNA를 주형으로 하고, 제1항의 프라이머 세트를 이용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 실시하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- (c) 상기 증폭 산물을 검출하는 단계.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 (b) 단계에서 PCR의 프라이머 어닐링 온도(annealing temperature)는 45℃ 내지 55℃인 것을 특징으로 하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 국내산 완도호랑가시나무의 모계 식별용 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 완도호랑가시나무(*Ilex x wandoensis*)는 우리나라 서남부 해안지대에 자생하는 호랑가시나무(*Ilex cornuta*) 및 감탕나무(*Ilex integra*)의 자연 교잡종으로서 잎 가장자리가 두 나무의 중간 형태를 띄고 있어서 그 모양이 특이하고, 가을에 붉게 익는 열매는 겨울에도 달려 있어 관상적 가치가 뛰어나다. 감탕나무속 (*Ilex* genus) 나무들의 붉은 열매는 조류를 유인할 수 있어서 환경수종으로 각광받고 있다.

- [0004] 식물세포는 핵, 엽록체, 미토콘드리아에 게놈(genome)을 가지고 있다. 엽록체는 광합성을 책임지는 주요 기관이며, 일반적으로 모계 유전을 한다. 엽록체 게놈의 크기는 120~217kb로 약 130개의 유전자가 적은 변이로 보존 및 유지되고 있는 반면 유전자와 유전자 사이(IGS, intergenic spacers)에는 비교적 많은 단일염기 다형성(SNP, single nucleotide polymorphism), 삽입-결실(InDel), 역위(inversion), 전이(translocation) 등의 변이를 가지고 있다. 엽록체는 모든 식물세포에 원형으로 존재하며 한 세포 안에 수백 카피가 존재한다.
- [0005] 그러나, 식물의 경우 다양한 종간, 속간 잡종이 빈번히 보고되고 있으며, 복잡한 양상의 배수화로 인해 식물 분류군의 정확한 동정을 위한 모계 계통과 진화를 이해하는데 어려움이 있다. 따라서, 모계의 계통을 파악 가능한 DNA의 개발이 요망되고 있다.
- [0006] 현재, 유전적으로 많은 동일성을 지닌 감탕나무속 식물들로부터 우리나라에서 자생하는 완도호랑가시나무의 모계 수종만을 정확하게 식별할 수 있는 유전자 마커는 개발되지 않은 실정이다.
- [0007] 이러한 핵 DNA 마커 중 rDNA 및 핵내 ITS(intergenic transcribed spacer) 구간이 있으나, rRNA 유전자의 경우 종간 및 속간에 차이가 거의 나타나지 않는 반면, ITS 구간은 단일 유전체당 수천 복제(copy)가 존재하기 때문에 계통학적 분석을 위한 유용한 정보를 가진 특성을 제공할 수 있다.
- [0008] 완도호랑가시나무의 경우 호랑가시나무(*Ilex cornuta*) 및 감탕나무(*Ilex integra*) 등 부모로부터 물려 받은 ITS 염기서열을 모두 지니고 있어 종간 잡종을 확인할 수 있다.
- [0009] 엽록체는 한 세포 안에 수백 카피가 존재하므로 엽록체내 IGS(intergenic spacers) 염기 서열 분석으로 두 나무간의 교잡 확인을 통하여 동일 모계 식별을 위한 진화 연구나 유전적 마커로서 이용될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 이러한 상황 하에서, 본 발명자들은 완도호랑가시나무의 모계 나무를 판별할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 감탕나무속 식물 엽록체 DNA 내 변이가 높은 곳으로 알려진 ycf3-rps4 IGS, rpl16-rps3 IGS, ndhA 및 ndhC-atpB IGS 유전자를 타겟으로 하는 4 종의 엽록체 마커 프라이머를 개발하였고, 분석을 통해서 완도호랑가시나무의 모계나무 식별을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 따라서, 본 발명의 일 목적은 완도호랑가시나무(*Ilex x wandoensis*)의 모계(Maternal origin) 식별을 위한 프라이머 세트를 제공하는 데 있다.
- [0013] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 프라이머 세트를 포함하는 완도호랑가시나무(*Ilex x wandoensis*)의 모계(Maternal origin) 식별용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0014] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프라이머 세트를 포함하는 완도호랑가시나무(*Ilex x wandoensis*)의 모계(Maternal origin) 식별용 키트를 제공하는 데 있다.
- [0015] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 완도호랑가시나무(*Ilex x wandoensis*)의 모계(Maternal origin) 식별 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0019] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 프라이머로 구성된 프라이머 세트; 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 서열번호 4의 염기서열로 표시되는 프라이머로 구성된 프라이머 세트; 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 프라이머로 구성된 프라이머 세트; 및 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 프라이머로 구성된 프라이머 세트;를 포함하는 완도호랑가시나무(*Ilex x wandoensis*)의 모계(Maternal origin) 식별을 위한 프라이머 세트를 제공한다.
- [0020] 본 발명자들은 모계로 전달되는 식물의 엽록체내 유전자를 타겟으로 이용하여 유전자의 염기서열로부터 상응되는 프라이머를 제작하였다.
- [0021] 선정된 타겟 유전자들은 감탕나무속 식물내 변이가 높은 곳으로 알려진 ycf3-rps4 IGS, rpl16-rps3 IGS, ndhA

및 *ndhC-atpB* IGS로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상이다.

- [0022] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프라이머"란, 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 상기 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다.
- [0023] 본 명세서에서 사용되는 용어, "프라이머 세트"는 목적하는 유전자를 중합효소 연쇄반응을 통하여 증폭시키기 위하여 사용되는 정방향 프라이머와 역방향 프라이머로 구성된 세트를 의미하며, 용어 "프라이머 쌍"과 호환된다.
- [0024] 본 발명의 프라이머들은 감탕나무속 식물의 검출에 사용될 수 있도록 하기 위한 본 발명의 목적상 상기 프라이머 세트 중, *ycf3-rps4* IGS에 대한 검출용 프라이머 세트는 넓은잎호랑가시나무 (*Ilex latifolia*)의 엽록체 유전자(NCBI accession number:KX426465)를 토대로 정방향 및 역방향 프라이머로 구성될 수 있고, 5' 말단으로부터 45964번째에서 45983번째까지의 정방향 프라이머 및 동일한 유전자에서 47016번째에서 47035번째까지의 역방향 프라이머로 구성될 수 있으며, 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 프라이머로 구성될 수 있다.
- [0025] 또한, *rpl16-rps3* IGS에 대한 검출용 프라이머 세트는 넓은잎호랑가시나무의 엽록체 유전자(NCBI accession number:KX426465)를 토대로 정방향 및 역방향 프라이머로 구성될 수 있고, 5' 말단으로부터 84725번째에서 84745번째까지의 정방향 프라이머 및 동일한 유전자에서 85588번째에서 85607번째까지의 역방향 프라이머로 구성될 수 있으며, 서열번호 3의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 서열번호 4의 염기서열로 표시되는 프라이머로 구성될 수 있다.
- [0026] 또한, *ndhA*에 대한 검출용 프라이머 세트는 넓은잎호랑가시나무의 엽록체 유전자(NCBI accession number:KX426465)를 토대로 정방향 및 역방향 프라이머로 구성될 수 있고, 5' 말단으로부터 123367번째에서 123387번째까지의 정방향 프라이머 및 동일한 유전자에서 124481번째에서 124498번째까지의 역방향 프라이머로 구성될 수 있으며, 서열번호 5의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 서열번호 6의 염기서열로 표시되는 프라이머로 구성될 수 있다.
- [0027] 또한, *ndhC-atpB* IGS에 대한 검출용 프라이머 세트는 넓은잎호랑가시나무의 엽록체 유전자(NCBI accession number:KX426465)를 토대로 정방향 및 역방향 프라이머로 구성될 수 있고, 5' 말단으로부터 52809번째에서 52828번째까지의 정방향 프라이머 및 동일한 유전자에서 53638번째에서 53658번째까지의 역방향 프라이머로 구성될 수 있으며, 가장 바람직하게는 서열번호 7의 염기서열로 표시되는 프라이머 및 서열번호 8의 염기서열로 표시되는 프라이머로 구성될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 상기 각 특이 프라이머들은 구성염기 서열의 일부가 변경될 수 있다. 이와 같은 변경은 구성염기 서열의 일부결실, 부가, 치환, 또는 이들의 복합적인 것으로 구현될 수 있으나, 이러한 구성염기 서열의 일부 변경은 특이 프라이머들의 주형(cDNA 또는 PCR 증폭산물들)과의 특이적 결합을 훼손할 수 있기 때문에 적용에 있어 상당한 주의를 요한다. 이때에는 반드시 특이성을 훼손하지 않는 범위 내에서 실험적으로 조사되어 변경되어야 한다. 이는 당업자에게는 일반적인 사항이므로 이에 대한 상세한 설명은 생략한다. 본 발명에서 제시된 프라이머들의 서열을 유지하는 것이 가장 바람직하다.
- [0029] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 프라이머 세트는 중합효소연쇄반응(PCR)을 실시하기 위한 프라이머 세트이다.
- [0030] 본 발명에서 제공하는, 상기 프라이머 세트는 PCR 증폭 및 염기서열 분석에 적합하도록 개발된 것으로서, 상기 4 종의 프라이머 쌍들은 완도호랑가시나무의 모계 나무를 알아내는데 사용될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 프라이머 세트는 완도호랑가시나무 (*Ilex x wandoensis*), 호랑가시나무 (*Ilex cornuta*), 감탕나무 (*Ilex integra*), 양호랑가시나무 (*Ilex aquifolium*), 중국호랑가시나무 (*Ilex chinensis*), 팽팽나무 (*Ilex crenata* Thunb. var. *crenata*), 일렉스 데키두아 (*Ilex decidua*), 대팻집나무 (*Ilex macropoda* Miq. for. *macropoda*), 민대팻집나무 (*Ilex macropoda* for. *pseudomacropoda* (Loes.) H.Hara), 미국호랑가시나무 (*Ilex opaca*) 및 마테 (*Ilex paraguariensis*), 개동청나무 (*Ilex pedunculosa*), 먼나무 (*Ilex rotunda* Thunb.), 낙상홍 (*Ilex serrata* Thunb.), 일렉스 베르티킬라타 (*Ilex verticillata*) 및 일렉스 보미토리아 (*Ilex vomitoria*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 감탕나무 속 식물의 모계나무를 식별할 수

있으며, 보다 바람직하게는 완도호랑가시나무 (*Ilex x wandoensis*), 호랑가시나무 (*Ilex cornuta*) 또는 감탕나무 (*Ilex integra*)이며, 가장 바람직하게는 완도호랑가시나무이다.

- [0032] 상기 프라이머 세트의 프라이머 어닐링 온도는 바람직하게는 45℃ 내지 55℃일 수 있고, 가장 바람직하게는 50℃일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 프라이머 세트를 포함하는 완도호랑가시나무(*Ilex x wandoensis*)의 모계(Maternal origin) 식별용 조성물 및 모계(Maternal origin) 식별용 키트를 제공한다.
- [0035] 또한, 본 발명의 조성물 및 키트는, 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 더 포함할 수 있다.
- [0036] 바람직하게는, 상기 조성물 및 키트는 PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 조성물 및 키트는, 검출 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 상보적인 DNA를 증폭하기 위한 DNA 중합효소, 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Hot start Taq-폴리머라아제 및 역전사 효소와 같은 효소, 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 각 튜브에 포함되는 성분들로는 이에 국한되지 않지만, DNA 중합효소, Tris-HCl, MgCl₂, KCl, dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Triton X-100, BSA 등을 제시할 수 있다. 이들은 적절한 농도 범위에서 포함되어야 하는데, 2.5 unit의 DNA 중합효소, 100 mM의 Tris-HCl, 15 mM의 MgCl₂, 500 mM의 KCl, 2 mM의 dATP, 2 mM의 dTTP, 2 mM의 dGTP, 2 mM의 dCTP을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0039] 한편, 각 튜브에 첨가된 성분들은 액상 형태로 제조할 수도 있고, 포함 성분들의 자유도를 낮추어 제품의 안정성(stability)을 제고하기 위해 건조된 형태로 제조할 수도 있다. 이러한 건조된 형태의 제조를 위해서는 건조 단계의 적용이 필요하고, 이에 가온건조, 자연건조, 감압건조, 동결건조 또는, 이들의 복합 공정도 사용될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 조성물 및 키트는 상술한 본 프라이머 세트를 이용하므로, 공통된 내용은 반복 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 완도호랑가시나무(*Ilex x wandoensis*)의 모계(Maternal origin) 식별 방법을 제공한다:
- [0043] (a) 시료에서 DNA를 분리하는 단계;
- [0044] (b) 상기 분리된 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머 세트를 이용하여 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 실시하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0045] (c) 상기 증폭 산물을 검출하는 단계.
- [0046] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 PCR의 프라이머 어닐링 온도는 40℃~60℃일 수 있으며, 바람직하게는 45℃~55℃일 수 있고, 가장 바람직하게는 50℃일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 증폭 산물의 검출은 겔 전기영동, 겔 필터레이션, 모세관 전기영동 또는 형광 측정을 통해 실시될 수 있다.
- [0048] 본 발명에 따르면, 당업계에 공지된 방법에 따라 시료로부터 DNA를 추출한 후, 추출된 DNA를 함유한 추출액에 본 발명의 프라이머 세트, 본 발명의 프라이머 세트가 포함된 조성물 또는 본 발명의 프라이머 세트가 포함된 키트를 이용하여 PCR을 실시한다. PCR을 실시한 후에 얻어진 산물(반응액)에 대하여 통상적인 방법으로 아가로스 겔 전기영동 분석을 실시하여 증폭산물을 주형으로 염기서열 분석을 실시하여 그 염기서열의 차이를 확인하여 모계 여부를 판정한다.
- [0049] 본 발명의 방법은 상술한 본 프라이머 세트를 이용하므로, 공통된 내용은 반복 기재에 따른 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다

발명의 효과

- [0051] 본 발명에 따르면, 염기서열의 차이로 유전적으로 많은 동일성을 지닌 감탕나무속 식물들로부터 완도호랑가시나무의 모계나무를 용이하게 구분할 수 있다. 따라서, 품종 보호, 및 종자 분쟁의 해결 등에도 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0053] 도 1은 완도호랑가시나무의 모계 식별을 위한 전체 실험 흐름도를 보여준다.
- 도 2는 본 발명자들이 직접 실험한 완도호랑가시나무(*Ilex x wandoensis*) 암그루와 수그루, 호랑가시나무(*Ilex cornuta*) 암그루와 수그루, 감탕나무(*Ilex integra*) 암그루와 수그루, 먼나무(*Ilex rotunda*) 암그루와 수그루 각 종에 대해 본 발명의 4 종의 프라이머에 의해 검출된 마커 염기서열 및 NCBI GenBank에서 발췌한 7종(*Ilex latifolia*, *Ilex* sp., *Ilex delavayi*, *Ilex szechwanensis*, *Ilex polyneura*, *Ilex pubescens*, *Ilex wilsoni*)의 동일 지역의 염기서열을 병합해서 유전적 거리를 측정하고, 유전목(또는 계통수)(genetic tree, Phylogenetic tree)(UPGMA; Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)을 도출한 결과를 보여준다.
- 도 3 내지 6은 상기 각 종에 대해 기존 유니버설 마커 *psbA-trnH*(도 3), *trnL-trnF* IGS(도 4), *trnL* intron(도 5) 및 엽록체 *rbcL*(도 6)를 적용하여 유전적 거리를 측정하고, 유전목(genetic tree, UPGMA)을 도출한 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0054] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0056] **실시예 1: 실험 재료 및 염기서열 분석 방법**
- [0057] 완도호랑가시나무(*Ilex x wandoensis*) 암그루(female)와 수그루(male), 호랑가시나무(*Ilex cornuta*) 암그루와 수그루, 감탕나무(*Ilex integra*) 암그루와 수그루, 먼나무(*Ilex rotunda*) 암그루와 수그루는 모두 완도수목원에서 채집하였다. 채집한 식물체의 시료는 사용전까지 -70℃에서 보관하였다.
- [0058] 식물체의 게놈 DNA를 공지된 방법을 이용하여 추출하였다.
- [0059] 모계식별 전 단계 연구로 완도호랑가시나무 게놈 DNA를 주형으로 ITS 증폭하고 벡터에 클로닝해서 염기서열을 분석할 결과, 감탕나무와 유사한 ITS 및 호랑가시나무와 유사 및 동일한 ITS 염기서열이 밝혀졌다.
- [0061] **실시예 2: 프라이머 제작 및 PCR 조건 확립**
- [0062] 본 발명자들은 완도호랑가시나무의 모계 식별을 위하여, 시료 확보 및 목적의 PCR에 적합한 특이 프라이머를 제작하였고, 프라이머 세트의 서열을 하기 표 1에 나타내었다.
- [0063] 먼저, 모계로 전달되는 식물의 엽록체내 유전자를 타겟 유전자로 선정하였다.
- [0064] 상기 타겟 유전자들은 감탕나무속 식물 엽록체 DNA 내 변이가 높은 지역으로 알려진 것 중 *ycf3-rps4* IGS, *rpl16-rps3* IGS, *ndhA* 및 *ndhC-atpB* IGS를 선별하였다. 또한, 이때, 공지된 엽록체 유니버설 마커로서, *psbA-trnH*, *trnL-trnF* IGS, *trnL* intron 및 엽록체 *rbcL*를 대조군으로 이용하였다(표 2).
- [0065] *ycf3-rps4* IGS에 대한 프라이머 세트는 넓은잎호랑가시나무 (*Ilex latifolia*)의 엽록체 유전자(NCBI accession number:KX426465)의 5' 말단으로부터 45964번째에서 45983번째까지의 정방향 프라이머(서열번호 1) 및 동일한 유전자에서 47016번째에서 47035번째까지의 역방향 프라이머(서열번호 2)를 포함하도록 하였다.
- [0066] *rpl16-rps3* IGS에 대한 프라이머 세트는 넓은잎호랑가시나무의 엽록체 유전자(NCBI accession number:KX426465)의 5' 말단으로부터 84725번째에서 84745번째까지의 정방향 프라이머(서열번호 3) 및 동일한 유전자에서 85588번째에서 85607번째까지의 역방향 프라이머(서열번호 4)를 포함하도록 하였다.
- [0067] *ndhA*에 대한 프라이머 세트는 넓은잎호랑가시나무의 엽록체 유전자(NCBI accession number:KX426465)의 5' 말단으로부터 123367번째에서 123387번째까지의 정방향 프라이머(서열번호 5) 및 동일한 유전자에서 124481번째에서 124498번째까지의 역방향 프라이머(서열번호 6)를 포함하도록 하였다.
- [0068] *ndhC-atpB* IGS에 대한 프라이머 세트는 넓은잎호랑가시나무의 엽록체 유전자(NCBI accession number:KX426465)의 5' 말단으로부터 52809번째에서 52828번째까지의 정방향 프라이머(서열번호 7) 및 동일한 유전자에서 53638번째에서 53658번째까지의 역방향 프라이머(서열번호 8)를 포함하도록 하였다.

표 1

마커	크기(bp)	프라이머	서열
ycf3-rps4 IGS	1078	F	5'-ATGGATGTTTGTGTGCCAA-3' (서열번호 1)
		R	5'-GGCCATCTCTCCTACATACT-3' (서열번호 2)
rpl16-rps3 IGS	883	F	5'-GGGCGAATATCTACTCTTTCA-3' (서열번호 3)
		R	5'-TATGGGGTCTTAGGCATCAA-3' (서열번호 4)
ndhA	1132	F	5'-TAAATCTAAGGACCCACTCAC-3' (서열번호 5)
		R	5'-TTTAGGTGGTCTCCGAGC-3' (서열번호 6)
ndhC-atpB IGS	849	F	5'-CCTTTGTTTACTGTGGGGAA-3' (서열번호 7)
		R	5'-TCGTGGATAAATAAACCAACC-3' (서열번호 8)

표 2

Markers	Primer	Oligo sequences	Reference
<i>psbA-trnH</i>	F	5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'	Sang et al, "Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of <i>Paonia</i> (Paeoniaceae)." <i>American Journal of Botany</i> 84.8 (1997): 1120-1120.
	R	5'-CGCGCATGGTGGATTCACAATCC-3'	
<i>trnL</i> intron	F	5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3'	Coissac et al, "Power and limitations of the chloroplast <i>trnL</i> (UAA) intron for plant DNA barcoding." <i>Nucleic Acids Research</i> 3 (35) (2007) e14
	R	5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3'	
<i>trnL-trnF</i> IGS	F	5'-AAAATCGTGAAGGTTCAAGTC-3'	Taberlet et al. "Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA." <i>Plant molecular biology</i> 17.5 (1991): 1105-1109.
	R	5'-GATTTGAACTGGTGACACGAG-3'	
<i>rbcL</i> 446bp	F	5'-AATTCATGAGTTGTAGGGAGGGA-3'	Lee et al. "An assessment of the utility of universal and specific genetic markers for opium poppy identification." <i>Journal of forensic sciences</i> 55.5 (2010): 1202-1208.
	R	5'-AATTCGCAGATCCTCCAGACGT-3'	

[0074] 총 4 쌍의 각 프라이머 세트(각 5 μ l, 20 pmole/ μ l)가 각각 포함되어 있는 튜브에 상업용 GOLD 10X PCR 버퍼 5 μ l, 5 unit AmpliTaq Gold DNA 중합효소 0.5 μ l, 감탕나무속 식물로부터 추출한 DNA 주형 10-100 ng을 포함하는 총 부피 50 μ l가 되도록 조정한 후 증폭 장비 ABI 9700 system (Applied BioSystems)을 이용해서 PCR을 실시하였다

[0075] 먼저, 95℃에서 11 분간 전변성시켰다. 이어서 95℃에서 1 분, 50℃에서 1 분, 72℃에서 1 분 간의 증폭반응을 28회 반복한 후 72℃에서 7분간 반응시켜 유지시켜 PCR을 종료하였다.

[0076] 상기 증폭반응의 양성 대조는 *Papaver somniferum* (10ng) 유전자를 주형으로 사용하였고, 음성대조군으로 증류수를 사용하였다.

[0077] 상기 증폭 결과는 2% (wt/vol) 아가로스 전기영동으로 확인하였다. 증폭된 산물들은 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN)를 이용하여 반응이 일어나지 않은 프라이머들을 정제하였다.

[0078] 상기 정제된 증폭산물은 direct sequencing 방법으로 증폭한 사용한 동일 프라이머를 이용하여 ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied BioSystems)로 염기서열 반응을 실시하였다. 이때, 염기서열 반응에 참여하지 않은 형광물질은 DyeEXTM 2.0 Spin Kit (QIAGEN)로 정제하였다.

[0079] 유전자 염기서열은 ABI 3500 sequencer 및 DNA Sequencing Analysis Software 5.4 (Applied BioSystems)를 이용하여 결정하였다.

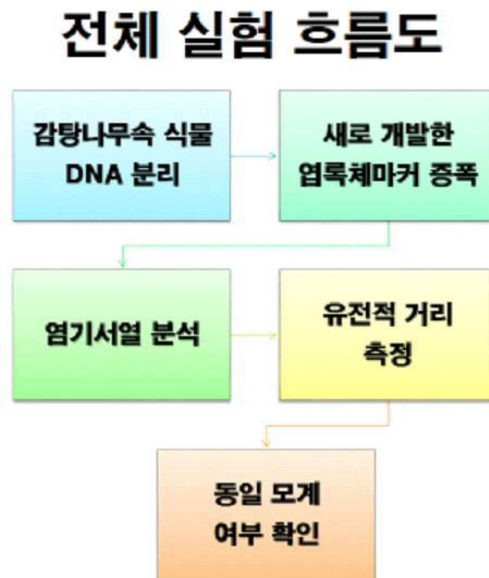
[0080] 분석한 염기서열을 MEGA 7 software (Kumar et al. 2016)를 이용하여 정리 및 비교하였다.

- [0081] NCBI GenBank에 BLAST (basic local alignment search tool)를 이용하여 직접 실험한 4 종의 엽록체 전체 게놈 염기서열이 확보된 7종(*Ilex latifolia*, *Ilex* sp., *Ilex delavayi*, *Ilex szechwanensis*, *Ilex polyneura*, *Ilex pubescens*, *Ilex wilsonii*)을 검색 (Altschul et al. 1997)하여 MEGA 7 software에서 총 11종의 유전목 (genetic tree)을 완성하였다(참고문헌: Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Mol Biol Evol 33(7), 1870-1874. 2016./ Altschul SF, Madden TL, Alejandro AS, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res 25:3389-3402. 1997).
- [0082]
- [0083] **실시예 3: 본 프라이머에 의한 모계 판별**
- [0084] 본 발명자들은 확보된 시료에 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 실시예 1에서 확립된 조건으로 PCR을 실시하여, 감탕나무와 호랑가시나무중 동일모계인 나무 판별 가능성 여부를 확인하였다.
- [0085] 먼저, 이들 프라이머쌍으로 각각 PCR 반응을 실시한 후 아가로스겔 전기영동으로 증폭 산물 유무를 확인하고, 증폭산물을 남아 있는 프라이머들과 dNTP로부터 정제하였다. 상기 정제된 증폭산물은 Sanger 방법으로 염기서열 분석을 실시하였다.
- [0086] 또한, 각 종[완도호랑가시나무(*Ilex x wandoensis*), 호랑가시나무(*Ilex cornuta*), 감탕나무(*Ilex integra*) 및 먼나무(*Ilex rotunda*) 각각의 암그루와 수그루]에 대해 획득한 4 개의 마커 염기서열 및 NCBI GenBank에서 발췌한 7종(*Ilex latifolia*, *Ilex* sp., *Ilex delavayi*, *Ilex szechwanensis*, *Ilex polyneura*, *Ilex pubescens*, *Ilex wilsonii*)의 동일 지역의 염기서열을 병합해서 유전적 거리를 측정하여, 유전목(genetic tree, UPGMA(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean))을 작성하였다.
- [0087] 이 방법은 모든 진화 계통에 대해 뉴클레오타이드 또는 아미노산 치환율이 동일하다고 가정한다. 일정한 비율의 진화를 가정하기 때문에 이 방법은 하나의 rooted tree를 생성한다.
- [0088] 또한, 계통수는 두 개 이상의 생명체가 하나의 종으로 갈라졌던 시간을 추론하기 위해 생체 분자의 돌연변이 속도를 사용한다. 이러한 계산에 사용되는 생체 분자 데이터는 일반적으로 DNA 염기서열 또는 단백질의 아미노산 서열이다. 생물의 공통점과 차이점을 고려하여 진화적 유연관계를 나타내면 생물의 계통을 알 수 있는데, 이 계통을 나뭇가지 모양으로 나타낸 것을 계통수라고 한다. 계통수는 형태적인 특징과 DNA 염기 서열 등을 조사하여 작성한다. 공통점이 많을수록 유연관계가 가까운 종이며, 계통수 그림에서 가까운 곳에 위치한다.
- [0089] 예컨대, DNA 염기서열로서 *Ilex integra*와 *Ilex wandoensis*의 엽록체 염기서열이 동일하여 즉 상동성 높아서 계통수 상에서 가까이 위치하고, 이는 엽록체 DNA 상 유연관계가 가깝다는 것을 알 수 있다.
- [0090] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 감탕나무가 완도호랑가시나무와 동일모계인 것으로 나타났다.
- [0091] 즉, 감탕나무속 식물들로부터 완도호랑가시나무와 동일한 염기서열을 보이는 감탕나무가 동일 모계나무인 것으로 판단할 수 있었다.
- [0092] 반면, 표 2에 기재된 기존 엽록체 유니버설 마커 중 psbA-trnH(도 3)는 완도호랑가시나무의 동일 모계인 나무가 감탕나무임을 판정할 수 있으나 호랑가시나무가 완도호랑가시나무와 2 bp 차이만을 보여서 동일 모계 여부를 정확히 판단하기 곤란하였다. 표 2에 기재된 유니버설 마커 중 trnL-trnF IGS(도 4), trnL intron(도 5) 및 rbcL(도 6)를 적용했을때 감탕나무와 호랑가시나무가 동일한 염기서열을 보여서 완도호랑가시나무의 동일모계인 지를 파악할 수 없었다.
- [0093] 즉, psbA-trnH(492 bp)의 경우 감탕나무와 호랑가시나무 사이에서 2 bp만 차이가 있을 뿐이어서 동일모계를 밝히기에는 한계가 있었다.
- [0094] 또한, 유니버설 마커(trnL-trnF IGS(413 bp), trnL intron(526 bp), rbcL (446 bp)는 세 종간 차이를 보이지 않았다.
- [0095] 본 발명의 마커에 대한 프라이머로 획득한 염기서열의 길이는 다음과 같다:
- [0096] ycf3-rps4 IGS의 경우, 완도호랑가시나무의 암그루 및 수그루에서 973 bp, 감탕나무의 암그루 및 수그루에서 973 bp, 호랑가시나무의 암그루에서 979 bp, 호랑가시나무의 수그루 978 bp, 먼나무의 암그루 및 수그루에서 971 bp를 획득하였다.

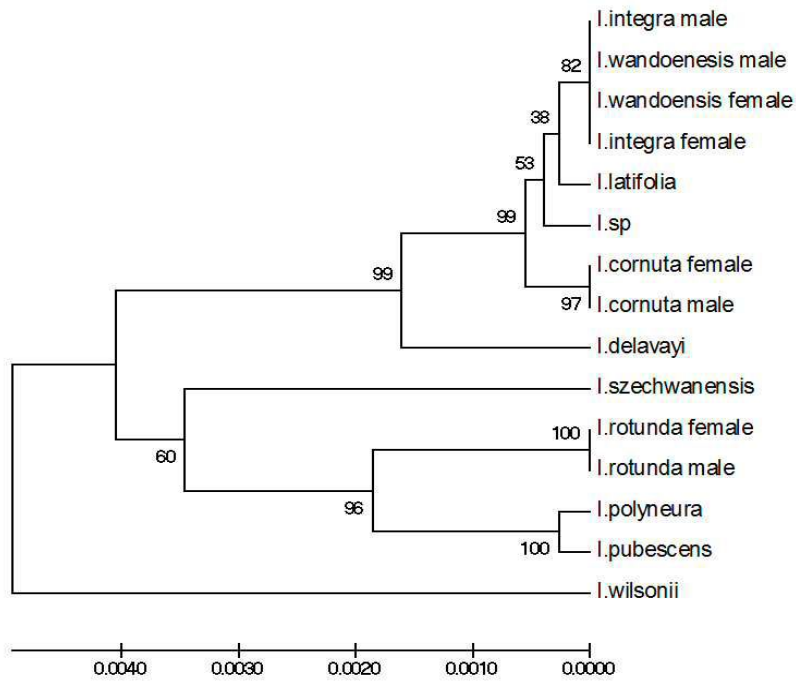
- [0097] rpl16-rps3 IGS의 경우, 완도호랑가시나무의 암그루 및 수그루, 감탕나무의 암그루 및 수그루, 호랑가시나무의 암그루 및 수그루 모두에서 883bp를 획득하였고, 먼나무의 암그루 및 수그루는 893bp를 획득하였다.
- [0098] ndhA의 경우, 완도호랑가시나무의 암그루 및 수그루에서 1087 bp, 감탕나무의 암그루 및 수그루에서 1087 bp, 호랑가시나무의 암그루에서 1089 bp, 호랑가시나무의 수그루에서 1088 bp, 먼나무의 암그루 및 수그루에서 1087 bp를 획득하였다.
- [0099] ndhC-atpB IGS의 경우, 완도호랑가시나무의 암그루 및 수그루, 감탕나무의 암그루 및 수그루, 호랑가시나무의 암그루 및 수그루 모두에서 849bp를 획득하였고, 먼나무의 암그루 및 수그루는 853bp를 획득하였다.
- [0100] 상기의 결과를 통해, 본 발명의 마커에 대한 프라이머 세트는 완도호랑가시나무의 동일모계를 구분할 수 있음을 확인할 수 있었다.

도면

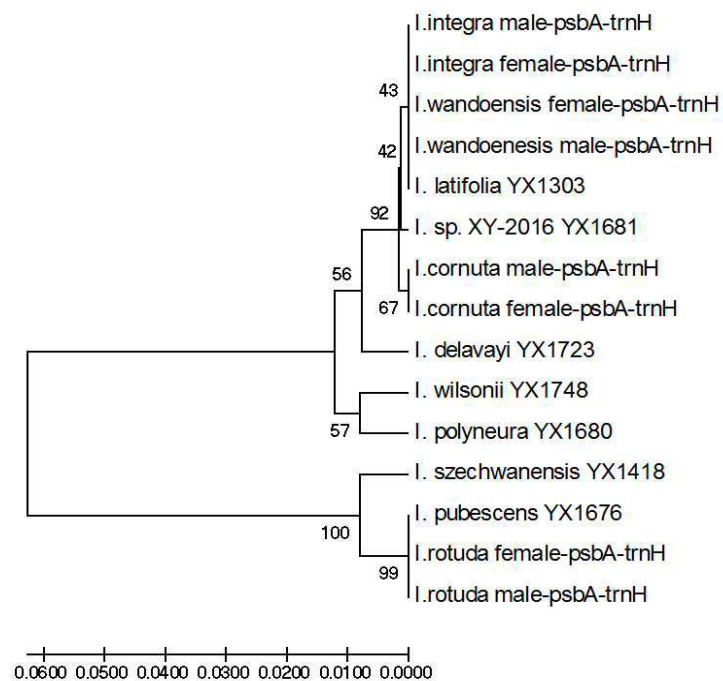
도면1



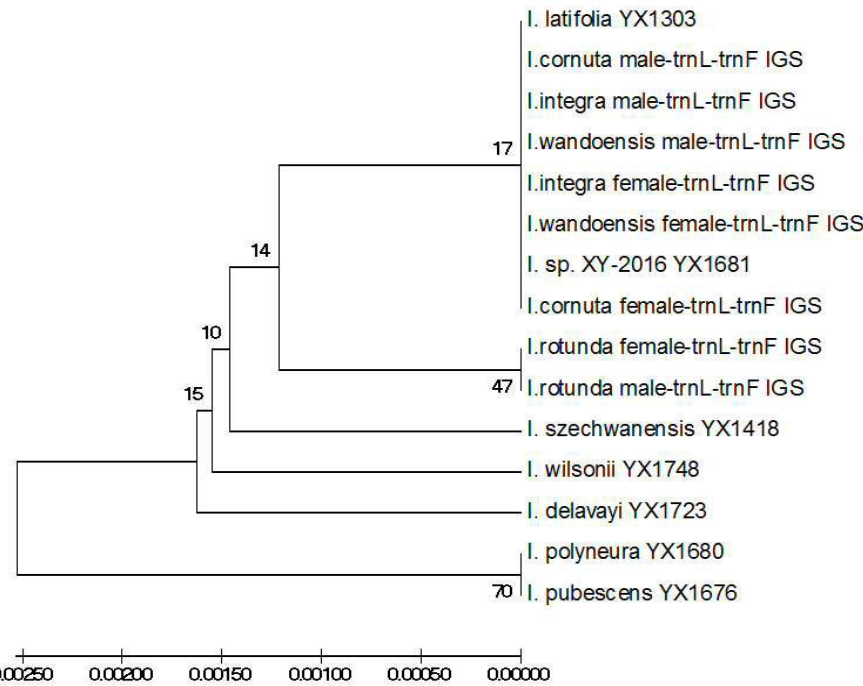
도면2



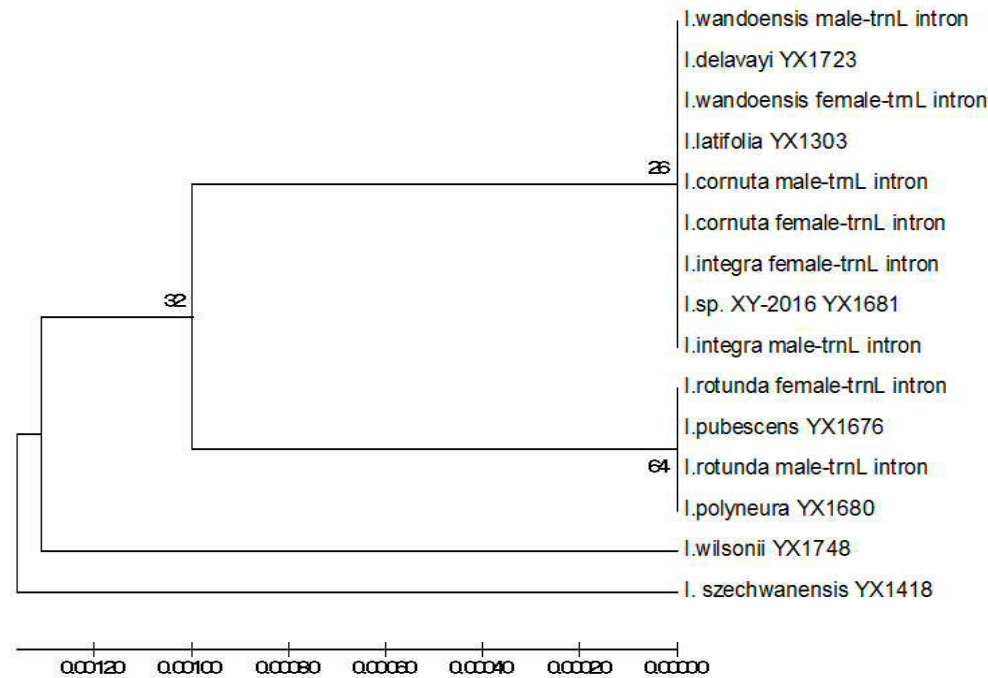
도면3



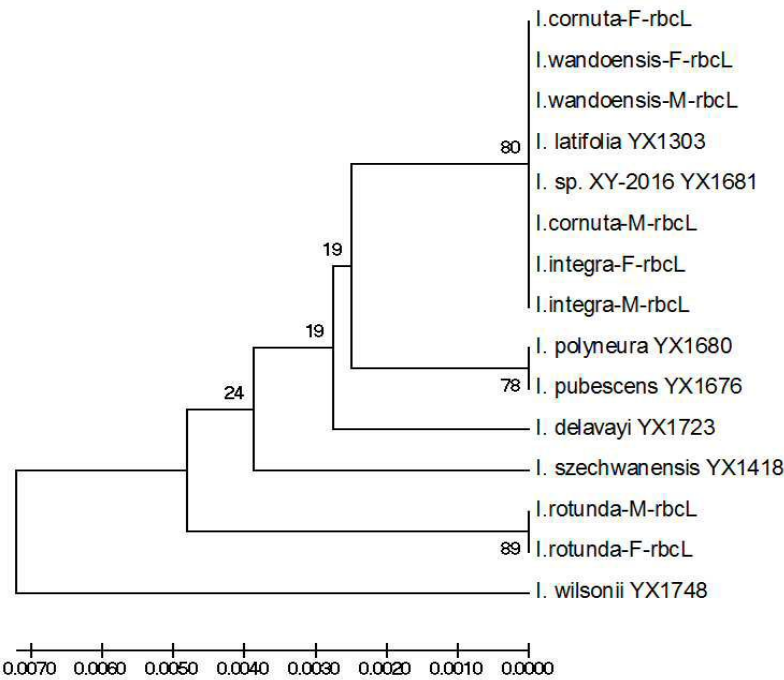
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Republic of Korea(National Forensic Service Director Ministry of Interior and Safety)
- <120> Primer Set for Identifying Maternal origin of Ilex x wandoensis and Uses Thereof
- <130> NFSDM1-8p
- <160> 8
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> ycf3-rps4 IGS primer F
- <400> 1
- atggatgttt gttgtccaa
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> ycf3-rps4 IGS primer R

<400> 2
ggccatctct cctacatact 20
<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> rpl16-rps3 IGS primer F
<400> 3
gggcgaatat ctactctttc a 21
<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> rpl16-rps3 IGS primer R
<400> 4
tatgggtct taggcatcaa 20

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ndhA primer F
<400> 5
taaataaag gaccactca c 21
<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ndhA primer R
<400> 6
tttagtggt ctccgagc 18
<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> ndhC-atpB IGS primer F

<400> 7

cctttgttta ctgtggggaa

20

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ndhC-atpB IGS primer R

<400> 8

tcgtggataa ataaaccaac c

21