

기술명 : '대륙 2호' 옥수수 품종을 구분하기 위한 특이 SSR 프라이머 및 이의 용도

요 약

본 발명은 81개의 SSR 프라이머 세트를 포함하는 '대륙 2호' 옥수수 품종을 구분하기 위한 SSR 프라이머 세트, 상기 SSR 프라이머 세트를 포함하는 '대륙 2호' 옥수수 품종을 구분하기 위한 키트 및 상기 SSR 프라이머 세트를 이용하여 '대륙 2호' 옥수수 품종을 구분하는 방법에 관한 것이다. - 도1a (72) 발명자 김해리 강원도 춘천시 강원대학길 1 강원대학교 농업생명 과학대학 오준석 강원도 춘천시 강원대학길 1 강원대학교 농업생명 과학대학 류시환 강원도 홍천군 두촌면 장남길 26 강원도농업기술원 옥수수연구소 최재근 강원도 홍천군 두촌면 장남길 26 강원도농업기술원 옥수수연구소 (56) 선행기술조사문헌 KR1020100096330 A KR1020150025695 A KR1020160093337 A Ana Daniela Lopes et al., Sci. Agric., 72(6), p.513-519, 2015. 이 발명을 지원한 국가연구개발사업 과제고유번호 213009053SB820 부처명 농촌진흥청 과제관리(전문)기관명 농림식품기술기획평가원 연구사업명 Golden Seed 프로젝트(R&D)(농진청) 연구과제명 고위도 지역 적응 수출용 옥수수 품종개발 기여율 1/1 과제수행기관명 강원도농업기술원 옥수수연구소 연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

청구범위

청구항 1

서열번호 9 및 10의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 11 및 12의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 13 및 14의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 15 및 16의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 17 및 18의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 19 및 20의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 21 및 22의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 29 및 30의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 31 및 32의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 35 및 36의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 37 및 38의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 39 및 40의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 41 및 42의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 43 및 44의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 45 및 46의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 51 및 52의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 53 및 54의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 55 및 56의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 61 및 62의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 71 및 72의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 77 및 78의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 83 및 84의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 87 및 88의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 91 및 92의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 95 및 96의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 101 및 102의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 103 및 104의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 105 및 106의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 111 및 112의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 137 및 138의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 141 및 142의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 143 및 144의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 161 및 162의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 171 및 172의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 175 및 176의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 177 및 178의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 183 및 184의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 187 및 188의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 199 및 200의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 203 및 204의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 205 및 206의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 209 및 210의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 213 및 214의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 217 및 218의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 221 및 222의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 227 및 228의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 229 및 230의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 231 및 232의

SSR 프라이머 세트; 서열번호 233 및 234의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 235 및 236의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 239 및 240의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 241 및 242의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 243 및 244의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 245 및 246의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 261 및 262의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 271 및 272의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 273 및 274의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 275 및 276의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 279 및 280의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 281 및 282의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 283 및 284의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 289 및 290의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 291 및 292의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 297 및 298의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 303 및 304의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 307 및 308의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 309 및 310의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 313 및 314의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 319 및 320의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 323 및 324의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 327 및 328의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 331 및 332의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 337 및 338의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 339 및 340의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 345 및 346의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 351 및 352의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 363 및 364의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 369 및 370의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 379 및 380의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 381 및 382의 SSR 프라이머 세트; 및 서열번호 387 및 388의 SSR 프라이머 세트;를 포함하는 '대륙 2호' 옥수수 품종을 구분하기 위한 SSR 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 따른 SSR 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, '대륙 2호' 옥수수 품종을 구분하기 위한 키트.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것인 키트.

청구항 4

옥수수에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항에 따른 SSR 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표 적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, '대륙 2호' 옥수수 품종을 구분하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 겔 전기영동, 모세관 전기영동, DNA 칩, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것인 방법.

기술분야

본 발명은 '대륙 2호' 옥수수 품종을 구분하기 위한 특이 SSR 프라이머 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

옥수수(*Zea mays* L.)는 세계 3대 중요 작물 중 하나이며, 전세계적으로 식용, 간식용, 사료용, 공업용 등 다양 한 용도로 이용되고 있다. 우리나라에서 옥수수 수급 동향을 살펴보면 2016년의 경우 옥수수 수입량은 약 970만 톤이었으며, 이 중에서 사료용 옥수수 수입량이 약 770만 톤으로 대부분 사료용 옥수수는 수입에 의존하고 있는 실정이며, 옥수수 작물의 자급률은 1% 미만으로 확인되었다 (농림축산식품부, 2018). 더욱이 사료용 옥수수 수입 가격은 매년 증가하고 있으며 현재도 매우 높은 가격에 거래되고 있다(농수산식품수출지원정보, <http://www.kati.net>). 최근 우리나라 국민의 생활수준의 향상과 식생활의 서구화로 인하여 육류 소비가 점차 증가하고 있으며, 이에 따른 사료용 옥수수의 수요 및 중요성 또한 증가하고 있다. 작물의 품종 또는 유전자원의 식별은 주로 포장에서 수집 및 육성자원들에 대한 형태특성조사 또는 DNA 분자마 커를 이용한 방법으로 이루어지고 있다. 하지만 형태특성조사의 경우, 여러 제한요소(재배 방법, 조사자의 주관, 연차간 변이 등)로 인하여 품종 및 자원의 식별을 어렵게 한다. 따라서 최근 생물분자학 분야의 발전으로 다양한 DNA 분자마커가 개발되어, 이를 이용한 품종 및 자원의 식별이 표현형에 근거한 형태특성조사보다 객관 적이고 재현성이 높다고 알려져 있다. 따라서 국제식물 신품종보호동맹(UPOV)에서도 품종의 구별성을 평가하기 위하여 분자마커를 활용하고자 하는 논의가 계속되고 있으며, 분자마커 활용기법, 분자마커 선정 기준 등에 대 한 가이드라인을 제시하고 있다. 현재 개발되어 있는 다양한 분자마커들 중에서 특히 본 발명에 이용한 SSR(simple sequence repeat) 분석법은 PCR을 이용하는 분석기법으로 식물 집단 내의 유전자좌(gene locus)마 다 많은 대립인자들(alleles)을 가지고 있으며, 실험에 대한 재현성이 매우 뛰어나며, 대립유전자의 특성을 명 확하게 구분할 수 있어 옥수수, 벼, 밀, 보리 등과 같은 작물의 유전적 다양성, 집단구조, 계통유연관계를 분석 하고 있으며, 핑거프린팅(fingerprinting)과 분자 매핑(molecular mapping) 등에 이용되고 있으며, 많은 작물 에서 품종 식별에 유용한 분자마커로 알려져 있다. 가공용 및 사료용 옥수수의 수입을 대체하고자 강원도농업기술원 옥수수연구소는 다양한 지역에서 수집한 다수의 종실용 옥수수 자식계통들을 고정, 개발 및 보존하고 있다. 최근 수량성이 좋은 종실용 옥수수 품종인 '대륙 2호' 품종을 개발하였다. 따라서 본 발명에서는 강원도 농업기술원 옥수수 연구소에서 개발한 대륙 2호 품종에 대하여 SSR 분자마커를 이용하여 양친 자식계통들에서 다형성을 나타내는 SSR 분자마커를 선발하여 대륙 2호의 품종식별 및 품종보호 그리고 1대 잡종 종자들의 순도검정에 활용하고자 한다. 한편, 한국등록특허 제1861592호에는 '청춘찰옥수수 품종을 구분하기 위한 특이 SSR 프라이머 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1427103호에는 '아리찰옥수수 품종을 구분하기 위한 특이 SSR 프라이머 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 '대륙 2호' 옥수수 품종을 구분하기 위한 특이 SSR 프라이머 및 이의 용도 에 대해서는 기재된 바가 없다.

해결하려는 과제

본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 강원도 농업기술원 옥수수 연구소에서 육성 하여 개발한 종실용 옥수수 품종인 대륙 2호 품종의 교배친 계통인 HF23과 HF20의 자식계통에 대하여, 각 염색 체당 20개씩의 SSR 프라이머를 제작하고, 이를 분석하여 양친 자식계통들에서 공우성을 나타내는 최종 81개의 SSR 프라이머를 선발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

본 발명은 81개의 SSR(simple sequence repeat) 프라이머 세트를 포함하는 '대륙 2호' 옥수수 품종을 구분하기 위한 SSR 프라이머 세트를 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 SSR 프라이머 세트를 포함하는 '대륙 2호' 옥수수 품종을 구분하기 위한 키트를 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 SSR 프라이머 세트를 이용하여 '대륙 2호' 옥수수 품종을 구분하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

본 발명의 SSR 프라이머 세트를 통하여 대륙 2호 옥수수 품종의 효율적인 식별이 가능할 뿐만 아니라, 대륙 2호 옥수수의 품종보호, F 잡종의 순도검정 등에 유용한 정보를 제공할 것으로 기대한다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 81개 SSR 프라이머 세트를 이용하여 대륙 2호 품종의 두 교배친에 대한 SSR 프로파일의 예를 보여주는 결과이다. ♀, HF23; ♂, HF20. 도 2는 SSR 마커에 근거한 대륙 2호 품종의 두 교배친에서의 대립유전자 특성 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 81개의 SSR(simple sequence repeat) 프라이머 세트를 포함하는 '대륙 2호' 옥수수 품종을 구분하기 위한 SSR 프라이머 세트를 제공한다. 본 발명의 SSR 프라이머 세트는 구체적으로 서열번호 9 및 10의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 11 및 12의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 13 및 14의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 15 및 16의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 17 및 18의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 19 및 20의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 21 및 22의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 29 및 30의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 31 및 32의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 35 및 36의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 37 및 38의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 39 및 40의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 41 및 42의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 43 및 44의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 45 및 46의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 51 및 52의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 53 및 54의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 55 및 56의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 61 및 62의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 71 및 72의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 77 및 78의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 83 및 84의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 87 및 88의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 91 및 92의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 95 및 96의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 101 및 102의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 103 및 104의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 105 및 106의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 111 및 112의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 137 및 138의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 141 및 142의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 143 및 144의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 161 및 162의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 171 및 172의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 175 및 176의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 177 및 178의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 183 및 184의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 187 및 188의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 199 및 200의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 203 및 204의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 205 및 206의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 209 및 210의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 213 및 214의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 217 및 218의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 221 및 222의

SSR 프라이머 세트; 서열번호 227 및 228의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 229 및 230의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 231 및 232의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 233 및 234의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 235 및 236의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 239 및 240의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 241 및 242의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 243 및 244의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 245 및 246의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 261 및 262의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 271 및 272의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 273 및 274의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 275 및 276의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 279 및 280의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 281 및 282의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 283 및 284의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 289 및 290의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 291 및 292의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 297 및 298의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 303 및 304의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 307 및 308의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 309 및 310의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 313 및 314의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 319 및 320의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 323 및 324의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 327 및 328의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 331 및 332의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 337 및 338의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 339 및 340의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 345 및 346의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 351 및 352의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 363 및 364의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 369 및 370의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 379 및 380의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 381 및 382의 SSR 프라이머 세트; 서열번호 387 및 388의 SSR 프라이머 세트;로 이루어진 것일 수 있다. 상기 SSR 프라이머는 각 SSR 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 9 및 10; 서열번호 11 및 12; 서열번호 13 및 14; 서열번호 15 및 16; 서열번호 17 및 18; 서열번호 19 및 20; 서열번호 21 및 22; 서열번호 29 및 30; 서열번호 31 및 32; 서열번호 35 및 36; 서열번호 37 및 38; 서열번호 39 및 40; 서열번호 41 및 42; 서열번호 43 및 44; 서열번호 45 및 46; 서열번호 51 및 52; 서열번호 53 및 54; 서열번호 55 및 56; 서열번호 61 및 62; 서열번호 71 및 72; 서열번호 77 및 78; 서열번호 83 및 84; 서열번호 87 및 88; 서열번호 91 및 92; 서열번호 95 및 96; 서열번호 101 및 102; 서열번호 103 및 104; 서열번호 105 및 106; 서열번호 111 및 112; 서열번호 137 및 138; 서열번호 141 및 142; 서열번호 143 및 144; 서열번호 161 및 162; 서열번호 171 및 172; 서열번호 175 및 176; 서열번호 177 및 178; 서열번호 183 및 184; 서열번호 187 및 188; 서열번호 199 및 200; 서열번호 203 및 204; 서열번호 205 및 206; 서열번호 209 및 210; 서열번호 213 및 214; 서열번호 217 및 218; 서열번호 221 및 222; 서열번호 227 및 228; 서열번호 229 및 230; 서열번호 231 및 232; 서열번호 233 및 234; 서열번호 235 및 236; 서열번호 239 및 240; 서열번호 241 및 242; 서열번호 243 및 244; 서열번호 245 및 246; 서열번호 261 및 262; 서열번호 271 및 272; 서열번호 273 및 274; 서열번호 275 및 276; 서열번호 279 및 280; 서열번호 281 및 282; 서열번호 283 및 284; 서열번호 289 및 290; 서열번호 291 및 292; 서열번호 297 및 298; 서열번호 303 및 304; 서열번호 307 및 308; 서열번호 309 및 310; 서열번호 313 및 314; 서열번호 319 및 320; 서열번호 323 및 324; 서열번호 327 및 328; 서열번호 331 및 332; 서열번호 337 및 338; 서열번호 339 및 340; 서열번호 345 및 346; 서열번호 351 및 352; 서열번호 363 및 364; 서열번호 369 및 370; 서열번호 379 및 380; 서열번호 381 및 382; 서열번호 387 및 388;내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상, 26개 이상, 27개 이상, 28개 이상, 29개 이상, 30개 이상의 연속 뉴클레오

티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 9의 SSR 프라이머(20개 올리고뉴클레오타이드)는 서열번호 9의 서열 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 SSR 프라이머는 각 서열번호의 서열 내의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다. 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 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. 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)을 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)을 포함할 수 있다. 본 발명은 또한, 상기 SSR 프라이머 세트를 포함하는 '대륙 2호' 옥수수 품종을 구분하기 위한 키트를 제공한다. 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 진단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다. 본 발명은 또한, 상기 SSR 프라이머 세트를 이용하여 '대륙 2호' 옥수수 품종을 구분하는 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 방법은 구체적으로는, 옥수수에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명에 따른 SSR 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 단계의 산물을 검출하는 단계;를 포함할 수 있다. 본 발명의 방법은 옥수수 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 SSR 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 복제 효소(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. 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 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 P 또는 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 SSR 프라이머 세트는 상기에 기재된 바와 같다. 본 발명의 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 모세관 전기영동, DNA 칩, 겔 전기영동, 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 증폭 산물의 크기에 따라 아크릴아미드 겔 전기영동 또는 아가로스 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, 이 렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행시 P 또는 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. 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

1. 식물재료 - 대륙 2호 품종의 교배친의 자식계통 강원도 농업기술원 옥수수연구소에서 육성하여 개발한 대륙 2호 품종의 교배친 자식계통인 HF23과 HF20 자식계통을 실험재료로 사용하였다 (표 1). 대륙 2호 품종의 두 교배친 정보

2. DNA 추출 옥수수 게놈 DNA는 Dellaporta 등(1983, Mol Biol Rep 1:19-21)의 방법을 약간 수정하여 신선한 어린잎으로부터 추출하였다. 식물체의 어린 잎 조직을 잘라내어 1.5ml 튜브에 액체 질소를 부어넣은 후 막자사발을 이용하여 곱게 갈아주었다. 65°C 항온수조에 미리 넣어 준비한 추출버퍼(1M Tris-HCl pH 8.0, 0.5M EDTA, 5M NaCl, 20% SDS)에 0.16g의 아황산수소나트륨(sodium bisulfate)을 넣은 후 튜브에 600μl를 넣고 탭핑(tapping)하였다. 그리고 그 튜브에 다시 600μl의 바이오 페놀:클로로포름:이소아밀알콜(Bio phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol, 50:24:1)을 첨가하고 탭핑한 후 65°C 항온수조에 15분간 반응시키고, 그 후 바로 13,000rpm에서 20분간 원심분리한 후 상층액은 새 튜브에 옮겼다. 상층액에 클로로포름:이소아밀알콜(24:1) 용액을 600μl를 첨가한 후 탭핑하고 다시 14,500rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상층액을 새 튜브에 옮겨 95% 에탄올 600μl를 넣은 후 인버팅(inverting)하고 14,500rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 침전된 펠렛이 떨어지지 않게 모든 용액을 버린 후 70% 에탄올을 600μl 넣고 가볍게 탭핑한 후, 10,000rpm에 원심분리하고 에탄올을 버린 후 대기 건조시켰다. 그 후 30μl의 증류수로 녹이고, RNAase를 1μl 첨가하여 RNA를 완전히 제거하였다.

3. SSR 프라이머 선발과 PCR 증폭 대륙 2호 품종 교배친 2계통들을 분석하기 위해 선발된 SSR 프라이머는 각 염색체당 약 20개씩 총 200개의 SSR 프라이머를 분석에 사용하였다 (표 2 내지 표 5). PCR 증폭에서 용액의 조성은 총 30μl로 구성되며 20ng의 게놈 DNA와 1x PCR 버퍼, 0.3μM의 프라이머, 0.2mM의 dNTP 그리고 1unit의 Taq 중합효소(Biotools, B&M Labs, Madrid)로 하였다. PCR 반응은 처음 94°C에서 5분간 반응시킨 후, 1 사이클로 94°C에서 1분간 변성 (denaturation), 65°C에서 1분간 결합(annealing), 72°C에서 2분간 신장(extension)을 하고, 2번째 사이클부터 마지막까지 1°C씩 낮추며 최종 55°C까지 낮추었다. 마지막 사이클은 20번 반복하고, 사이클 완료 후 72°C에 10 분간 최종 신장하였다.

4. 전기영동과 은 염색(Silver-staining) 5μl의 PCR 산물을 10μl의 로딩-버퍼(98% formamide, 0.02% BPH, 0.02% Xylene C 및 5 mM of NaOH)와 섞었다. 6% 아크릴아미드:비스아크릴

아미드 겔(19:1)에 0.5x TBE 버퍼를 채운 후 2μl의 시료를 로딩하고, 250V에 30분 전기영동을 하였다. 전기영동이 끝난 겔은 EtBr(Ethidium bromide)을 이용하여 DNA 밴드를 확인하였다. 실시예 1. 대륙 2호의 교배친 자식계통들에서 다형성을 나타내는 SSR 프라이머 선발

대륙 2호 옥수수의 전체 게놈을 대표할 수 있도록 옥수수 10개 염색체에서 확인된 총 200개의 SSR 프라이머 세트들을 선택하여 종실용 옥수수 품종인 대륙 2호의 교배친 자식계통들에서 유전적 다형성을 나타내는 마커를 선 발하였다 (도 1). 그 결과, 분석에 이용된 200개의 SSR 프라이머 세트들 중에서 대륙 2호의 교배친 자식계통인 HF23과 HF20 계통들에서 다형성을 나타내는 SSR 프라이머 세트를 81개를 선발하였다. 나머지 119개 SSR 프라이머 세트들 중에서 18개의 SSR 프라이머 세트들은 두 교배친 자식계통들에서 증폭되지 않았으며 (Null), 81개의 SSR 프라이머 세트들은 자식계통 HF23과 HF20에서 같은 사이즈의 대립단편을 증폭시켜 다형성을 나타내지 못하였다 (Mono). 그리고 20개의 SSR 프라이머 세트들은 두 교배친 자식계통들 중에서 어느 한쪽에서만 DNA 밴드가 증폭되었다 (Dominant). 대륙 2호 품종의 두 교배친에서 200개 SSR 프라이머의 증폭 경향 분석 실시예 2. 대륙 2호의 품종 식별 및 품종보호용 SSR 분자마커 분석에 이용된 200개의 SSR 프라이머 세트들은 대륙 2호의 교배친 자식계통인 HF23과 HF20 계통들에서 총 266개의 대립단편(allele bands)들을 증폭하였다. 그 중에서 92개의 대립단편은 대륙 2호의 모본인 HF23에 특이적으로 나타났으며, 92개의 대립단편은 대륙 2호의 부본인 HF20에 특이적으로 나타나는 것으로 확인되었다. 나머지 81개의 대립단편들은 HF23과 HF20 자식계통 모두에서 확인할 수 있었다 (도 2). 그 결과 분석에 이용된 200개의 SSR 프라이머 세트들 중에서 교배친 자식계통(HF23, HF20)들에서 공우성 마커를 나타내는 81개의 SSR 프라이머 세트(bnlgl1811, umc1515, umc1076, umc1906, umc1396, umc1924, bnlgl1025, umc1397, umc2025, umc1082, umc1681, umc1744, bnlgl1662, umc1065, mmc0111, bnlgl1017, umc1845, bnlgl381, umc1079, umc1776, umc2178, umc2101, umc1167, bnlgl1117, umc2262, umc1273, umc2277, umc2105, umc1742, bnlgl2162, umc1999, umc2287, bnlgl1006, umc1315, umc1792, umc1153, umc1687, umc1537, umc1221, bnlgl238, phi070, umc2318, phi025, umc1143, umc1857, umc2165, umc1753, umc1006, umc1979, umc1020, umc1653, dupssr9, umc1872, umc1378, umc2329, umc1695, umc2327, umc1713, umc1799, umc1139, bnlgl1194, phi115, phi121, umc1309, umc1960, umc1997, phi080, umc1149, umc1741, bnlgl2122, umc2093, umc2337, umc1691, umc1267, umc1120, umc1636, bnlgl1712, phi084, umc2163, umc1054, bnlgl2190)들은 앞으로 대륙 2호 옥수수의 품종 식별 및 품종보호 그리고 1대 잡종 종자들에 대한 순도검정에 유용한 분자마커로 이용될 수 있다. 대륙 2호 품종의 두 교배친에서 공우성 SSR 마커