



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년04월07일
(11) 등록번호 10-1724372
(24) 등록일자 2017년04월03일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/68 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류 C12Q 1/6895 (2013.01) C12Q 2600/13 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0011082</p> <p>(22) 출원일자 2016년01월29일 심사청구일자 2016년01월29일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌 Go-Eun Yi et al. Molecules 2015, 20, 13089-13111 Shengyi Liu et al. Nature Communication 5:3930 US20050223431A1 KR1020140130273 A</p> | <p>(73) 특허권자 한국생명공학연구원 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)</p> <p>(72) 발명자 김혜란 대전광역시 유성구 과학로 125 이정여 대전광역시 유성구 과학로 125</p> <p>(74) 대리인 최규환</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 10 항

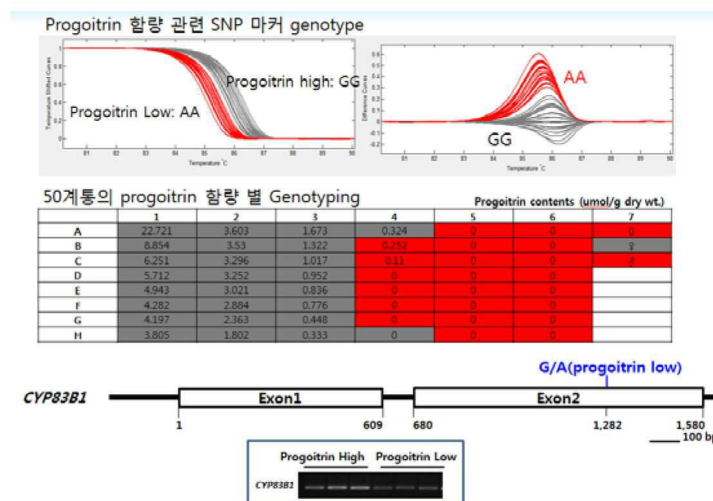
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 프로고이트린 저함량 양배추 선별용 SNP 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1의 양배추 *CYP83B1* 유전자의 염기서열 중 1,282 번째 염기에 위치한 SNP를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 프로고이트린(progoitrin) 저함량 양배추를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물, 프라이머, 프로브 및 마이크로어레이, 상기 프라이머 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 프로고이트린 저함량 양배추를 선별하기 위한 키트 및 상기 프라이머를 이용하여 프로고이트린 함량이 낮은 양배추를 선별하기 위한 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 SNP 마커를 양배추 작물에 적용하면, 프로고이트린의 함량이 낮은 양배추를 효율적으로 판별 및 육성할 수 있어 육종에 소요되는 시간, 비용 및 노력을 절감하는데 매우 유용할 것으로 기대된다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/156 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 213003-04-3-SB330

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 Golden Seed 프로젝트

연구과제명 양배추 고기능성 물질 (glucosinolate 및 antioxidants) 관련 분자 마커 개발

기여율 9/10

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2015.05.03 ~ 2016.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM4731612

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 국가과학기술연구회

연구사업명 주요사업(2015-2018)

연구과제명 식물기반 기후변화 대응 글로벌 녹색기술개발사업

기여율 1/10

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2016.01.01 ~ 2016.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 양배추 *CYP83B1* 유전자의 염기서열 중 1,282 번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 프로고이트린(progoitrin) 저함량 양배추를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 연속된 뉴클레오티드는 8개 내지 100개의 연속된 뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 프로고이트린 저함량 양배추를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물.

청구항 3

서열번호 1의 양배추 *CYP83B1* 유전자의 염기서열 중 1,282 번째 염기에 위치한 SNP를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진, 프로고이트린 저함량 양배추 판별용 프라이머.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드인 것을 특징으로 하는 프로고이트린 저함량 양배추 판별용 프라이머.

청구항 5

서열번호 2 및 서열번호 3의 올리고뉴클레오티드로 이루어지는 프라이머쌍을 포함하는 프로고이트린 저함량 양배추 판별용 프라이머 세트.

청구항 6

서열번호 1의 양배추 *CYP83B1* 유전자의 염기서열 중 1,282 번째 염기에 위치한 SNP를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진, 프로고이트린 저함량 양배추 판별용 프로브.

청구항 7

서열번호 1의 양배추 *CYP83B1* 유전자의 염기서열 중 1,282 번째 염기에 위치한 SNP를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 프로고이트린 저함량 양배추 판별용 마이크로어레이.

청구항 8

제3항 또는 제4항의 프라이머; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 프로고이트린 저함량 양배추를 선별하기 위한 키트.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는 프로고이트린 저함량 양배추를 선별하기 위한 키트.

청구항 10

양배추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제3항 또는 제4항의 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적

서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 프로고이트린 저함량 양배추를 선별하기 위한 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 프로고이트린 저함량 양배추 선별용 SNP 마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 양배추류(*Brassica oleracea*)는 양배추(cabbage), 브로콜리(broccoli), 케일(kale), 콜라비(kohlrabi), 콜리플라워(cauliflower), 방울 양배추(brussels sprouts) 등 다양한 경제적 작물들을 포함하고 있다. 양배추류 작물들은 전 세계적으로 2010년 기준 7,600 톤이 생산되었고, 그 가치는 약 140억 달러에 달한다. 양배추의 경우, 전세계적으로 식용되고 있는 작물로서 시장규모가 월등히 크며, 재배면적 기준으로 세계 4대 채소에 들어갈 만큼 많이 소비되고 있다. 영양학적 관점에서의 양배추는 칼슘, 칼륨, 마그네슘 등 다양한 미네랄과 비타민(A, B1, B2, C) 및 엽산을 상당량 함유하고 있으며, 식물 화학물질과 항체, 효소 및 호르몬을 생성하는데 필요한 필수 아미노산의 일종인 라이신(lysine)을 함유하고 있어 영양가치가 높다. 특히 항암작용에 효과가 있는 글루코시놀레이트(glucosinolate)를 많이 함유하고 있어 최근 암을 예방하는 대표적인 식품으로 여겨지고 있다.

[0003] 글루코시놀레이트는 아미노산과 당으로부터 만들어지는 황을 함유하는 이차 대사 산물로서, 가수분해에 의해 배추과 작물의 특정한 향과 맛을 내는데 기여하는 물질이다. 지금까지 공통적인 구조를 가진 100개 이상의 글루코시놀레이트 성분이 자연상태에 존재하고, 현재 식용으로 이용되는 식물에는 16 종류(시니그린(sinigrin), 글루코나핀(gluconapin), 글루코브라시카나핀(glucobrassicinapin), 프로고이트린(progoitrin), 글루코베르버린(glucoiberin), 글루코에루신(glucoerucin), 글루코라파사틴(glucoraphasatin), 글루코이베린(glucoiberin), 글루코라파닌(glucoraphanin), 글루코라페닌(glucoraphenin), 글루코알신(glucoalyssin), 글루코나스투르티인(gluconasturtiin), 글루코브라시신(glucobrassicin), 네오글루코브라시신(neoglucobrassicin), 4-히드록시글루코브라시신(4-hydroxyglucobrassicin), 4-메톡시글루코브라시신(4-methoxyglucobrassicin))의 글루코시놀레이트 성분이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.

[0004] 지금까지 밝혀진 대부분의 글루코시놀레이트 성분들은 인간에게 이로운 기능성 물질로 인식되어 왔으며, 특정 글루코시놀레이트 성분을 증가시키거나 해로운 글루코시놀레이트 성분을 감소시킨 품종을 개발하기 위한 연구가 지속적으로 수행되어 왔다. 브로콜리에 야생종인 *Brassica villosa*의 높은 글루코라파닌(glucoraphanin) 함량 형질을 도입하기 위해 전통적인 육종방법으로 약 20년에 걸쳐 글루코라파닌 함량이 기존 브로콜리보다 3배 많이 함유된 benefote 품종이 개발되었고, 해로운 물질로 알려진 프로고이트린 함량이 종자에서 감소된 유체가 장기간에 걸쳐 개발되었다. 하지만, 전통적인 육종 방법은 작물을 유전적으로 고정시키고 계통을 육성시키는 기간이 대략 6년 이상 소요되고, 생산력을 검정하고 지역 적응시험을 거쳐 품종화하는 기간까지 합하면 총 10~20년을 필요로 한다.

[0005] 하지만 분자마커 개념이 도입된 분자 육종에서는 선발의 효율성과 정확성으로 인해 육종 연한을 기존 육종에 비해 1/3이상 단축할 수 있으며, 환경에 의한 영향도 없고, 조기에 정밀 검정을 통해 비용을 절감시킬 수 있는 이점이 있다. 분자마커는 신뢰할 수 있고 효율적으로 시간 및 비용을 절약할 수 있는 도구로서, 농업경제학에 있어 부작용없이 전통적인 육종 능력과 작물의 품질과 특성을 향상을 위해 사용하는 도구로 사용하고 있다. 따라서 분자마커와 같은 육종기술을 육종도구로 이용하면, 단기간 안에 좋은 품질을 만들 수 있을 뿐만 아니라 한 품종이 여러 가지 우수 형질을 함유할 수 있도록 육성할 수 있기 때문에 고부가가치 품종을 개발할 수 있다.

[0006] 분자마커의 효율적인 개발을 위해서는 유전체 정보를 필요로 한다. 최근 양배추류의 표준유전체로서 *Brassica oleracea* var. *acephala* (T01000) 와 *Brassica oleracea* var. *capitata* (양배추)의 전체 유전체 정보가 보고되었다. 총 447Mb와 385Mb의 유전체 정보가 각각 T01000와 양배추에서 해독이 되었으며 59,225개 또는 45,458개의 유전자 정보가 보고되어 분자마커를 개발하는데 있어 중요한 유전체자원으로 활용할 수 있게 되었다.

[0007] 양배추의 글루코시놀레이트 성분 중 유일하게 인간의 건강에 부정적인 프로고이트린(progoitrin) 성분은 생체 내에서 oxazolidine-2-thione으로 전환되어 갑상선종, 또는 갑상선 암을 유발할 수 있다고 보고되고 있다. 이에 본 연구에서는 인간에게 해로운 성분인 프로고이트린의 함량이 낮은 양배추 개발을 효율적으로 하기 위해 프로고이트린 함량 관련 분자마커를 개발하고자 한다.

[0008] 한편, 한국등록특허 제1448074호에는 '석회결핍 둔감형 양배추 품종의 조기 선별을 위한 바이오 마커 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1464247호에는 '양배추 시들음병 저항성 또는 감수성 품종 선별용 SNP 마커 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명의 프로고이트린 저함량 양배추 선별용 SNP 마커 및 이의 용도에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 양배추의 글루코시놀레이트 성분 중 유일하게 인체에 부정적인 성분으로 보고된 프로고이트린의 함량이 낮은 양배추를 판별할 수 있는 분자마커를 개발하기 위해, 프로고이트린 함량이 높은 그룹 및 낮은 그룹의 유전체를 분석하여 SNP 마커를 개발하였고, 상기 SNP 마커를 이용하여 양배추 시료의 유전형을 분석한 결과 프로고이트린 함량이 높은 개체와 낮은 개체를 서로 판별할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1의 양배추 *CYP83B1* 유전자의 염기서열 중 1,282 번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 프로고이트린(progoitrin) 저함량 양배추를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물, 프라이머, 프로브 및 마이크로어레이를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 프라이머 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 프로고이트린 저함량 양배추를 선별하기 위한 키트를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 프라이머를 이용하여 프로고이트린 함량이 낮은 양배추를 선별하기 위한 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 SNP 마커를 양배추 작물에 적용하면, 프로고이트린의 함량이 낮은 양배추를 효율적으로 판별 및 육성할 수 있어 육종에 소요되는 시간, 비용 및 노력을 절감하는데 매우 유용할 것으로 기대된다. 또한, 본 발명의 방법으로 육성한 프로고이트린 저함량 양배추의 보급은 재배 농가 및 소비자에게도 고품질의 양배추 생산 및 공급을 가능하게 할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 프로고이트린 함량이 높은 그룹과 낮은 그룹에서의 글루코시놀레이트 생합성 관련 유전자의 발현양을 비교한 결과이다.

도 2는 차세대염기서열분석(next generation sequencing, NGS) 기반의 분자마커 개발 과정을 도식화한 것이다.

도 3은 본 발명의 *CYP83B1* 유전자의 SNP를 검출할 수 있는 프라이머 세트를 이용한 양배추 TBDH 계통에서의 HRM(high-resolution melting) 분석 수행 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 양배추 *CYP83B1* 유전자의 염기서열 중 1,282 번째 염기에 위치한 SNP(single nucleotide polymorphism)를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 프로고이트린(progoitrin) 저함량 양배추를 판별하기 위한 SNP 마커 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 연속된 뉴클레오티드는 8 내지 100개의 연속된 뉴클레오티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명에서 용어, "뉴클레오티드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드이며, 특별하게 다르게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오티드의 유사체를 포함한다.

[0018] 본 발명의 SNP는 표현형에 직접적인 영향을 미치는 매우 안정적인 유전자 마커이다. 본 발명의 SNP 마커를 양배

추의 프로고이트린 함량 판별에 사용할 수 있는 것은 양배추의 *CYP83B1* 유전자인 서열번호 1로 표시되는 유전자의 염기서열 중 SNP 변이 위치인 1,282번째 염기가 G 또는 A로 다르게 나타나는 것에 근거한 것이다. 예를 들어, 서열번호 1의 1,282번째 뉴클레오티드에 해당하는 SNP는 G 또는 A로 염기다형성을 나타내는데, 이 SNP에서 GG 동형접합 유전자형을 갖는 품종은 프로고이트린의 함량이 높은 품종으로, A/A 동형접합 유전자형을 갖는 품종은 프로고이트린의 함량이 낮은 품종으로 판단할 수 있다.

- [0019] 한편, 본 발명에서 사용된 용어 SNP 위치에서의 "동형접합 유전자형 (homozygotic genotype)" 이란 SNP 변이 위치에 해당하는 상동 염색체 (homologous chromosome) 상의 대립형 염기(allelic base)가 서로 동일한 염기인 경우를 의미한다.
- [0020] 본 발명은 상기 서열번호 1의 서열에서 SNP 위치의 염기 변이체에 관한 것이나, 이러한 SNP 염기 변이가 이중 가닥의 gDNA (게놈 DNA)에서 발견되는 경우, 상기 뉴클레오티드 서열에 대해 상보적인 폴리뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 따라서 상보적인 폴리뉴클레오티드 서열에서 SNP 위치의 염기도 상보적인 염기가 된다. 이러한 측면에서, 본 명세서에 제시된 모든 서열은, 특별한 언급이 없는 한, 게놈 DNA의 센스 가닥에 있는 서열을 기준으로 한 것이다.
- [0021] 본 발명은 또한, 서열번호 1의 양배추 *CYP83B1* 유전자의 염기서열 중 1,282 번째 염기에 위치한 SNP를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진, 프로고이트린 저함량 양배추 판별용 프라이머를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 프라이머는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 2로 표시된 올리고뉴클레오티드는 정방향 프라이머이며, 프라이머의 서열 길이에 따라 각 서열 내의 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드일 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 서열번호 2 및 서열번호 3의 올리고뉴클레오티드로 이루어지는 프라이머쌍을 포함하는 프로고이트린 저함량 양배추 판별용 프라이머 세트를 제공한다.
- [0024] 전술한 바와 같이, 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드는 SNP 위치 염기를 포함하는 정방향 프라이머이며, 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 올리고뉴클레오티드는 역방향 프라이머이다.
- [0025] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고 뉴클레오티드 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.
- [0026] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고 뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입할 수 있다. 본 발명의 프라이머 핵산 서열은 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지의 예로는, 효소(예를 들어, HRP (horse radish peroxidase), 알칼리 포스파타아제), 방사성 동위원소(예를 들어, ³²P), 형광성 분자, 화학그룹(예를 들어, 비오틴 (biotin)) 등이 있다. 프라이머의 적합한 길이는 사용하고자하는 프라이머의 특성에 의해 결정하지만, 통상적으로 15 내지 30bp의 길이로 사용한다. 프라이머는 주형의 서열과 정확하게 상보적일 필요는 없지만 주형과 혼성복합체 (hybrid-complex)를 형성할 수 있을 정도로 상보적이어야만 한다.
- [0027] 본 발명은 또한, 서열번호 1의 양배추 *CYP83B1* 유전자의 염기서열 중 1,282 번째 염기에 위치한 SNP를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드로 이루어진, 프로고이트린 저함량 양배추 판별용 프로브를 제공한다.
- [0028] 본 발명에서 용어 "프로브"는 혼성화 프로브로서, 핵산의 상보성 가닥에 서열 특이적으로 결합할 수 있는 디옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함하는 자연적인 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 본 발명의 프로브는 대립형질 특이적 프로브로서, 같은 종의 두 구성원으로부터 유래한 핵산 단편 중에 다형성 부위가 존재하여, 한 구성원으로부터 유래한 DNA 단편에는 혼성화하나, 다른 구성원으로부터

부터 유래한 단편에는 혼성화하지 않는다. 바람직하게는 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일 가다, 더 바람직하게는 디옥시리보뉴클레오티드일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0029] 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 SNP를 포함하는 서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 바람직하게는, 본 발명에 이용되는 프로브는 SNP 뉴클레오티드인 서열번호 1의 1,282번째 뉴클레오티드를 포함하는 8 내지 100 개의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 서열에 혼성화될 수 있는 서열을 포함한다. 더 바람직하게는, 상기 프로브의 3'-말단 또는 5'-말단은 상기 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 3'-말단 또는 5'-말단에 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는 프로브에서 말단 부분이 혼성화되지 않으면, 이러한 듀플렉스는 엄격한 조건에서 해체될 수 있다. 혼성화에 적합한 조건은 당업계에 통상적으로 알려진 내용을 참조하여 결정할 수 있다. 혼성화에 이용되는 엄격한 조건(stringent condition)은 대립형질 중 하나에만 혼성화하도록 충분히 엄격해야 하며, 온도, 이온 세기(완충액 농도) 및 유기 용매와 같은 화합물의 존재 등을 조절하여 결정될 수 있다. 이러한 엄격한 조건은 혼성화되는 서열에 의존하여 다르게 결정될 수 있다.
- [0030] 본 발명은 또한, 서열번호 1의 양배추 *CYP83B1* 유전자의 염기서열 중 1,282 번째 염기에 위치한 SNP를 포함하는 8개 이상의 연속된 뉴클레오티드로 구성된 폴리뉴클레오티드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 프로고이트린 저함량 양배추 판별용 마이크로어레이를 제공한다.
- [0031] 본 발명에서 프로고이트린 저함량 양배추 판별용 마이크로어레이는 본 발명의 SNP 마커가 고정화되어 있는 기판을 갖는 마이크로어레이를 의미한다. "마이크로어레이"란 기판 상에 폴리뉴클레오티드의 그룹이 높은 밀도로 고정화되어 있는 것으로서, 상기 폴리뉴클레오티드 그룹은 각각 일정한 영역에 고정화되어 있다. 이러한 마이크로어레이는 당업계에 잘 알려져 있다. 마이크로어레이는 예를 들면, 미국특허 제5,445,934호 및 제5,744,305호에 개시되어 있으며, 이들 특허의 내용은 참조에 의하여 본 명세서에 포함된다.
- [0032] 용어 "기판"은 혼성화 특성을 보유하고, 혼성화의 배경 수준이 낮게 유지되는 조건 하에 마커가 부착될 수 있는 임의의 기판을 말한다. 통상적으로, 상기 기판은 미세역가(microtiter) 플레이트, 막(예를 들면, 나일론 또는 니트로셀룰로오스), 미세구 (비드) 또는 칩일 수 있다. 막에 적용하거나 고정하기 전에, 핵산 프로브를 변형시켜 고정화를 촉진시키거나 혼성화 효율을 개선시킬 수 있다. 상기 변형은 단독중합체 테일링(homopolymer tailing), 지방족기, NH₂기, SH기 및 카르복실기와 같은 상이한 반응성 작용기와와 커플링, 또는 비오틴, 합텐(hapten) 또는 단백질과의 커플링을 포함할 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명은 상기 프라이머; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 프로고이트린 저함량 양배추를 선별하기 위한 키트를 제공한다.
- [0034] 본 발명의 키트에서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 및 버퍼를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 dNTPs는 dATP, dCTP, dGTP, dTTP를 포함하며, DNA 폴리머라제는 내열성 DNA 중합효소로서 Taq DNA 폴리머라제, Tth DNA 폴리머라제 등 시판되는 폴리머라제를 이용할 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. 또한, 본 발명에 있어서, 프로고이트린 저함량 양배추를 선별하기 위한 키트는 상기 프로브 또는 상기 마이크로어레이가 포함된 키트일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0036] 양배추 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;
- [0037] 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 프라이머를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및
- [0038] 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 프로고이트린 저함량 양배추를 선별하기 위한 방법을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 방법은 양배추 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(Promega, 미국)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 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 이용 가능한 키트를 이용할 수도 있다.

[0040] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출 가능한 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 6-FAM (6-Carboxyfluorescein), NED, VIC, PET 또는 ROX이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 6-FAM, NED, VIC, PET 또는 ROX를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한 상기 표지 물질에는 Cy-5 또는 Cy-3가 포함될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 ³²P 또는 ³⁵S 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 프라이머는 상기에 기재된 바와 같다.

[0041] 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 Genetic Analyzer를 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 형광염료를 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 수행시 ³²P 또는 ³⁵S 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.

[0042] 본 발명의 일 구현예에 따른 방법에 있어서, 상기 증폭산물은 서열번호 1의 양배추 *CYP83B1* 유전자의 염기서열 중 1,282 번째 뉴클레오티드에 해당하는 SNP 위치에 G 또는 A의 염기를 가질 수 있으며, 해당 SNP 위치에 G 염기를 갖는 경우에는 프로고이트린의 함량이 높은 양배추로, A 염기를 갖는 경우에는 프로고이트린의 함량이 낮은 양배추로 판단할 수 있다.

[0043] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] **재료 및 방법**

[0045] **1. TBDH 집단 의 글루코시놀레이트 성분 분석**

[0046] TBDH 집단 50 계통 종자를 0.5X MS 배지에 파종하여 약 20일 정도 자란 유묘기 샘플을 수확하여 동결 건조하였고, 각 샘플 당 파우더 100mg씩을 사용하여 글루코시놀레이트를 추출하였다. 글루코시놀레이트는 메탄올을 사용하여 추출하고 HPLC로 분석을 하였으며, 0.1mg/1mℓ 시니그린을 표준시료로 사용하여 정량에 사용하였다.

[0047] **2. 글루코시놀레이트 생합성 경로 주요 유전자의 발현양 비교를 위한 RT-PCR**

[0048] 이전에 보고된 글루코시놀레이트 생합성 경로를 조사하여 각 물질 합성에 중요한 주요 유전자를 선별하였다. 양배추 염기서열 데이터베이스에서 염기서열 상동성을 이용해서 양배추의 주요 유전자를 확보한 후 발현양 검정을 위한 RT-PCR용 프라이머를 제작하였다. 글루코시놀레이트 함량 분석을 수행한 TBDH 집단에서 총 RNA를 분리한 후 RT-PCR을 수행하여 유전자 발현양을 비교하였다.

- [0049] **3. 프로고이트린(progoitrin) 함량이 높은 계통 및 낮은 계통의 NGS 분석**
- [0050] 글루코시놀레이트 성분 분석 결과를 통해 프로고이트린 함량이 높거나 낮은 6계통의 TBDH를 선별하여 HiSeq2500을 이용하여 전체 게놈 리시퀀싱(whole genome resequencing)을 수행하였다.
- [0051] **4. 프로고이트린 함량 관련 SNP(single nucleotide polymorphism) 발굴 및 검증**
- [0052] 6계통의 유전체를 분석한 NGS(next generation sequencing) 결과로부터 SNP를 발굴하고, 상기 RT-PCR 결과에서 프로고이트린 함량이 차이나는 형질에서 그 발현양에 차이가 있는 유전자 부위(upstream, exon 및 intron)의 SNP를 따로 선별하였다. 선별된 SNP를 HRM 기반 유전형분석(genotyping) 할 수 있는 프라이머 세트를 제작하였다.
- [0053] 상기 선별된 프로고이트린 함량 관련 마커의 검증을 위해, TBDH의 6 계통에서 HRM을 수행하였고, 최종적으로 선별된 마커를 이용하여 50 계통의 유전형분석을 수행하였고, 이 결과와 상기 글루코시놀레이트 성분 분석 결과를 비교하여 최종 검증을 수행하였다.
- [0054] PCR 반응은 총 반응혼합물 양을 10 μ l로 하였고, 0.4 μ M 프라이머, 250 μ M dNTP, 0.1 unit Taq 중합효소와 주형 DNA 10ng 및 0.5x LCgreen을 이용하였다. 증폭을 위한 조건은 사이클을 시작하기 전 시료를 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 전변성(pre-denaturation)하였고, 94 $^{\circ}$ C에서 45초, 프라이머 별 적정 결합(annealing) 온도에서 45초, 72 $^{\circ}$ C에서 45초 간 합성을 1 사이클로 하여 총 35 사이클을 수행하였고, 35 사이클 증폭 후에는 완전한 DNA 확장(extension)을 위해 72 $^{\circ}$ C에서 7분간 최종신장(final elongation)을 수행하였다. 증폭단편의 다형성은 LightScanner(Idaho Technology Inc. 미국)를 이용하여 분석하였다.
- [0055] **실시예 1. TBDH 집단의 글루코시놀레이트 성분 분석**
- [0056] TBDH 집단 50 계통의 글루코시놀레이트를 추출하여 HPLC 분석한 결과, 평균 글루코시놀레이트 함량이 17.54 μ mol/g dry wt로 확인되었다(표 1 및 표 2). TBDH 집단의 계통 간 글루코시놀레이트 평균차이를 검정하기 위해서 ANOVA test를 시행하였으며, 사후 검정으로는 Duncan' test를 이용하였고, 통계의 유의 수준은 P < 0.05로 하였다.
- [0057] 프로고이트린은 TBDH 집단 50 계통에서 함량이 전혀 없는 것부터 최대 22.721 μ mol/g dry wt까지 다양하게 분포하였고, 그 중 22.721 μ mol/g dry wt, 8.854 μ mol/g dry wt 및 6.251 μ mol/g dry wt으로 프로고이트린의 함량이 높은 3개의 계통 TBDH187, TBDH053 및 TBDH049를 선발하였으며, 프로고이트린의 함량이 0인 계통 TBDH095, TBDH251 및 TBDH099를 선발하여, 상기 총 6 계통의 NGS 유전체 분석을 수행하였다(표 3).

표 1

TBDH 집단 50 계통의 글루코시놀레이트(glucosinolate) 함량 분석

| Sample | Glucob erin | Progoit rin | Glucora phanin | Sinigrin | Glucon apin | Glucoib erverin | 4-hydroxy glucobrass icin | Unknown | Glucoer ucin | Glucobr assicin | 4-methoxy glucobrass icin | Neogluco brassicin | Total glucosino late |
|---------|----------------|----------------|-------------------|----------|----------------|--------------------|---------------------------------|---------|-----------------|--------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| TBDH100 | 0.000 | 0.000 | 8.552 | 0.045 | 0.210 | 0.000 | 0.000 | 0.034 | 0.625 | 1.659 | 3.912 | 0.757 | 15.794 |
| TBDH102 | 0.000 | 4.282 | 0.171 | 0.058 | 23.695 | 0.000 | 0.000 | 0.043 | 0.036 | 3.874 | 3.862 | 1.033 | 37.053 |
| TBDH105 | 0.000 | 1.802 | 5.515 | 0.181 | 5.067 | 0.000 | 0.000 | 0.037 | 0.035 | 2.788 | 4.889 | 0.541 | 20.854 |
| TBDH112 | 0.000 | 0.000 | 7.337 | 0.057 | 0.075 | 0.000 | 0.000 | 0.159 | 0.228 | 3.838 | 6.463 | 0.582 | 18.739 |
| TBDH122 | 4.340 | 0.000 | 5.671 | 0.064 | 0.085 | 0.931 | 0.027 | 0.092 | 0.406 | 5.413 | 4.747 | 1.122 | 22.899 |
| TBDH125 | 0.000 | 1.017 | 0.077 | 0.065 | 5.918 | 0.000 | 0.000 | 0.021 | 0.000 | 2.821 | 4.593 | 0.349 | 14.861 |
| TBDH127 | 0.000 | 4.197 | 0.341 | 0.092 | 0.228 | 0.151 | 0.016 | 0.077 | 0.088 | 2.374 | 4.140 | 0.447 | 12.153 |
| TBDH137 | 0.000 | 0.000 | 0.338 | 0.127 | 0.161 | 0.000 | 0.000 | 0.043 | 0.058 | 2.651 | 3.593 | 0.723 | 7.694 |
| TBDH147 | 0.617 | 4.943 | 18.468 | 0.254 | 15.117 | 0.000 | 0.000 | 0.092 | 0.129 | 2.545 | 5.405 | 0.536 | 48.108 |
| TBDH164 | 0.044 | 0.000 | 3.360 | 0.052 | 0.215 | 0.000 | 0.000 | 0.038 | 0.138 | 1.945 | 6.766 | 0.568 | 13.126 |
| TBDH176 | 0.345 | 0.000 | 0.460 | 0.086 | 0.159 | 0.000 | 0.000 | 0.064 | 0.058 | 7.331 | 7.752 | 1.174 | 17.429 |
| TBDH187 | 0.000 | 22.721 | 1.134 | 0.080 | 6.799 | 0.000 | 0.000 | 0.154 | 0.208 | 3.521 | 5.072 | 0.996 | 40.685 |
| TBDH197 | 0.000 | 0.000 | 0.405 | 0.153 | 0.064 | 0.000 | 0.000 | 0.045 | 0.078 | 4.302 | 6.015 | 0.908 | 11.970 |
| TBDH221 | 0.000 | 3.805 | 0.146 | 0.062 | 0.328 | 0.000 | 0.000 | 0.086 | 0.058 | 1.334 | 1.715 | 0.371 | 7.906 |
| TBDH245 | 0.000 | 0.836 | 0.039 | 0.054 | 2.627 | 0.000 | 0.000 | 0.051 | 0.018 | 2.084 | 3.192 | 0.571 | 9.471 |
| TBDH248 | 0.000 | 0.324 | 0.000 | 0.048 | 2.503 | 0.000 | 0.000 | 0.037 | 0.016 | 0.878 | 2.067 | 0.428 | 6.301 |
| TBDH251 | 0.000 | 0.000 | 1.249 | 0.181 | 0.232 | 0.477 | 0.019 | 0.064 | 0.129 | 2.530 | 3.918 | 0.829 | 9.627 |
| TBDH256 | 2.793 | 0.000 | 8.290 | 0.116 | 0.081 | 0.000 | 0.000 | 0.079 | 0.389 | 1.901 | 4.215 | 0.804 | 18.668 |
| TBDH260 | 0.000 | 3.296 | 0.125 | 0.101 | 0.868 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.045 | 1.174 | 2.342 | 0.275 | 8.225 |
| TBDH264 | 0.156 | 0.448 | 3.892 | 0.086 | 4.447 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.015 | 1.274 | 2.308 | 0.317 | 12.942 |

[0058]

표 2

TBDH 집단 50 계통의 글루코시놀레이트 함량 분석 (continued)

| Sample | Glucob erin | Progoit rin | Glucora phanin | Sinigrin | Glucon apin | Glucoib erverin | 4-hydroxy glucobrass icin | Unknown | Glucoer ucin | Glucobr assicin | 4-methoxy glucobrass icin | Neogluco brassicin | Total glucosinol ate |
|----------|----------------|----------------|-------------------|----------|----------------|--------------------|---------------------------------|---------|-----------------|--------------------|---------------------------------|-----------------------|----------------------------|
| TBDH266 | 0.000 | 0.252 | 1.588 | 0.070 | 1.066 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.036 | 1.517 | 2.842 | 0.452 | 7.825 |
| TBDH267 | 1.511 | 0.110 | 2.040 | 0.058 | 0.040 | 0.000 | 0.000 | 0.043 | 0.208 | 3.365 | 4.256 | 0.857 | 12.486 |
| TBDH269 | 0.052 | 2.884 | 0.166 | 0.026 | 12.159 | 0.000 | 0.000 | 0.025 | 0.017 | 3.652 | 4.267 | 0.969 | 24.217 |
| TBDH27 | 4.732 | 0.000 | 5.637 | 0.106 | 0.147 | 0.657 | 0.000 | 0.152 | 0.129 | 5.101 | 5.502 | 0.678 | 22.841 |
| TBDH275 | 0.576 | 0.000 | 1.064 | 0.060 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.069 | 0.065 | 7.555 | 5.794 | 0.614 | 15.797 |
| TBDH285 | 0.876 | 0.000 | 1.574 | 0.045 | 0.109 | 0.000 | 0.000 | 0.053 | 0.093 | 3.054 | 4.238 | 0.718 | 10.760 |
| TBDH298 | 0.000 | 3.021 | 0.111 | 0.068 | 0.131 | 0.000 | 0.000 | 0.020 | 0.020 | 2.939 | 3.315 | 0.993 | 10.618 |
| TBDH3 | 0.000 | 3.252 | 0.067 | 0.145 | 8.867 | 0.210 | 0.461 | 0.157 | 0.105 | 3.934 | 6.992 | 0.995 | 25.185 |
| TBDH303 | 0.083 | 5.712 | 11.820 | 0.231 | 11.933 | 0.000 | 0.000 | 0.067 | 0.068 | 3.309 | 5.495 | 0.541 | 39.258 |
| TBDH307 | 0.789 | 0.000 | 1.242 | 0.082 | 0.138 | 0.000 | 0.000 | 0.026 | 0.158 | 2.058 | 3.040 | 0.491 | 8.025 |
| TBDH31 | 0.000 | 3.530 | 0.217 | 0.209 | 28.854 | 0.000 | 0.000 | 0.136 | 0.061 | 8.837 | 6.142 | 0.625 | 48.612 |
| TBDH310 | 0.304 | 0.000 | 0.465 | 0.071 | 0.080 | 0.000 | 0.000 | 0.033 | 0.053 | 2.128 | 2.873 | 0.785 | 6.791 |
| TBDH314 | 0.000 | 1.673 | 0.055 | 0.047 | 4.873 | 0.000 | 0.000 | 0.035 | 0.032 | 2.060 | 4.273 | 0.486 | 13.533 |
| TBDH334 | 1.474 | 0.000 | 1.778 | 0.130 | 0.088 | 0.000 | 0.000 | 0.039 | 0.091 | 1.896 | 5.999 | 0.491 | 11.986 |
| TBDH342 | 0.000 | 0.952 | 0.623 | 0.058 | 4.462 | 0.000 | 0.000 | 0.056 | 0.058 | 1.755 | 3.521 | 0.372 | 11.857 |
| TBDH345 | 0.000 | 1.322 | 2.335 | 0.070 | 2.549 | 0.000 | 0.000 | 0.031 | 0.034 | 3.863 | 3.912 | 0.752 | 14.868 |
| TBDH36 | 2.820 | 0.000 | 5.287 | 0.069 | 0.000 | 0.137 | 0.000 | 0.054 | 0.202 | 6.786 | 8.757 | 1.185 | 25.296 |
| TBDH37 | 0.000 | 0.000 | 4.965 | 0.114 | 0.147 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.240 | 1.279 | 3.814 | 0.405 | 10.964 |
| TBDH4 | 0.782 | 0.000 | 1.578 | 0.082 | 0.220 | 0.327 | 0.016 | 0.138 | 0.136 | 3.859 | 5.483 | 0.827 | 13.448 |
| TBDH46.2 | 0.000 | 0.000 | 12.822 | 0.094 | 0.060 | 0.000 | 0.000 | 0.018 | 0.758 | 1.509 | 5.392 | 1.298 | 21.952 |
| TBDH49 | 0.000 | 6.251 | 0.000 | 0.000 | 0.782 | 0.252 | 0.015 | 0.079 | 0.087 | 2.394 | 3.559 | 0.637 | 14.057 |
| TBDH5 | 0.930 | 0.000 | 1.408 | 0.099 | 0.172 | 0.488 | 0.060 | 0.200 | 0.188 | 3.571 | 7.557 | 0.899 | 15.571 |
| TBDH51 | 0.000 | 3.603 | 0.064 | 0.070 | 13.305 | 0.000 | 0.000 | 0.040 | 0.030 | 1.806 | 3.622 | 0.631 | 23.171 |
| TBDH52 | 0.000 | 0.776 | 0.085 | 0.139 | 1.270 | 0.000 | 0.000 | 0.233 | 0.048 | 2.591 | 3.232 | 0.594 | 8.968 |
| TBDH53 | 0.000 | 8.854 | 0.476 | 0.127 | 17.413 | 0.999 | 0.025 | 0.259 | 0.131 | 3.584 | 5.604 | 0.584 | 38.055 |
| TBDH61 | 0.000 | 0.333 | 0.039 | 0.068 | 1.480 | 0.000 | 0.000 | 0.034 | 0.019 | 1.311 | 2.095 | 0.343 | 5.722 |
| TBDH81.2 | 1.755 | 0.000 | 1.618 | 0.052 | 0.310 | 0.875 | 0.024 | 0.071 | 0.101 | 4.627 | 5.484 | 0.596 | 15.514 |
| TBDH95 | 0.000 | 0.000 | 3.943 | 0.042 | 0.042 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.149 | 1.254 | 4.076 | 0.244 | 9.750 |
| TBDH96 | 0.159 | 2.363 | 1.895 | 0.116 | 0.212 | 0.000 | 0.000 | 0.024 | 0.045 | 1.670 | 3.640 | 0.198 | 10.321 |
| TBDH99 | 0.000 | 0.000 | 14.057 | 0.082 | 0.162 | 0.742 | 0.015 | 0.048 | 0.284 | 3.206 | 5.439 | 0.940 | 24.976 |

[0059]

표 3

[0060]

프로고이트린 함량에 따른 TBDH 계통 선발

| 그룹 | TBDH 계통 | 프로고이트린 함량(μmol/g dry wt) |
|------------|---------|--------------------------|
| 프로고이트린 고함량 | TBDH187 | 22.721 |
| | TBDH049 | 6.251 |
| | TBDH053 | 8.854 |
| 프로고이트린 저함량 | TBDH095 | 0 |
| | TBDH099 | 0 |
| | TBDH251 | 0 |

[0061] **실시예 2. 글루코시놀레이트 생합성 경로의 주요 유전자 발현 분석**

[0062] 글루코시놀레이트 합성에 관여하는 유전자는 기존에 보고되었던 논문들을 기준으로 33개를 선별하였다. 프로고이트린 함량이 높은 그룹(TBDH187, TBDH053, TBDH049) 3개 계통과 프로고이트린 함량이 없는 그룹(TBDH095, TBDH251, TBDH099) 3개 계통에서 총 RNA를 추출한 후, RT-PCR을 통해 유전자 발현 차이를 비교하였다.

[0063] 그 결과 33개 유전자 중 프로고이트린 함량이 높거나 없는 계통에서의 발현양 차이를 보인 유전자는 *MAM1*, *CYP79F1*, *CYP83A1*, *SUR1*, *GSL-OH*, *CYP83B1*, *GSTF9*, *CYP81 F2* 및 *SOT16*이었다. 이들은 프로고이트린의 함량이 없는 계통보다 높은 계통에서 그 발현량이 높은 것으로 확인되었다(도 1).

[0064] **실시예 3. NGS 분석**

[0065] 프로고이트린 함량 관련 분자마커 발굴을 위하여 함량이 높은 그룹과 낮은 그룹에서 3 계통의 TBDH를 선별하여, 전체 게놈 리시퀀싱을 수행한 결과 평균 25M의 리드를 생산하였다. 프로고이트린 함량이 높은 그룹(TBDH187, TBDH053, TBDH049)의 SNP와 낮은 그룹(TBDH099, TBDH251, TBDH095)의 SNP를 비교하여 프로고이트린 함량을 구분 지을 수 있는 분자마커를 도 2와 같은 방법으로 분석하였다.

[0066] 그 결과 프로고이트린의 함량이 높은 그룹에 특이적인 SNP 50,786개, 낮은 그룹에 특이적인 SNP 54,352개를 발굴하였고, 이들이 각각 445개 유전자 및 691개 유전자에 연관된 SNP임을 확인하였다. 이 결과와 글루코시놀레이트 생합성에 관여하는 유전자들의 발현 비교 결과를 통합 분석하여 후보군을 선발한 후, HRM 분석을 할 수 있는 프라이머의 개발이 가능한 9개의 SNP를 최종적으로 선발하였다.

[0067] **실시예 4. 선별된 SNP 마커의 검증**

[0068] 프로고이트린 함량과 관련된 마커의 검증을 위하여 HRM 프라이머 9개를 제작하였다. 이 중 9번 염색체의 프라이머 세트를 이용하여(표 4) 프로고이트린의 함량이 높거나 낮은 TBDH 계통에서 HRM 분석을 수행한 결과, *CYP83B1*의 2번째 엑손 부분(1,282 번째)의 SNP를 탐지하는 프라이머 세트를 이용할 경우 프로고이트린 함량이 1μmol/g dry wt 이하일 때 'AA' 염기를 갖는다는 결과를 확인하였다. *CYP83B1*의 발현양도 프로고이트린 함량이 낮은 계통보다 높은 계통에서 더 높은 것으로 확인되었다(도 3).

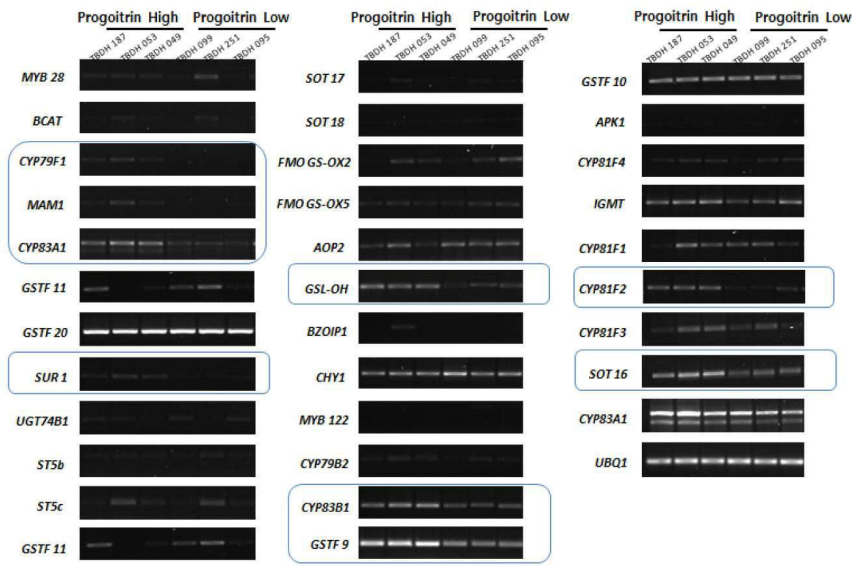
표 4

[0069] 프로고이트린 함량 관련 *CYP83B1*의 SNP 마커를 위한 HRM용 프라이머 정보

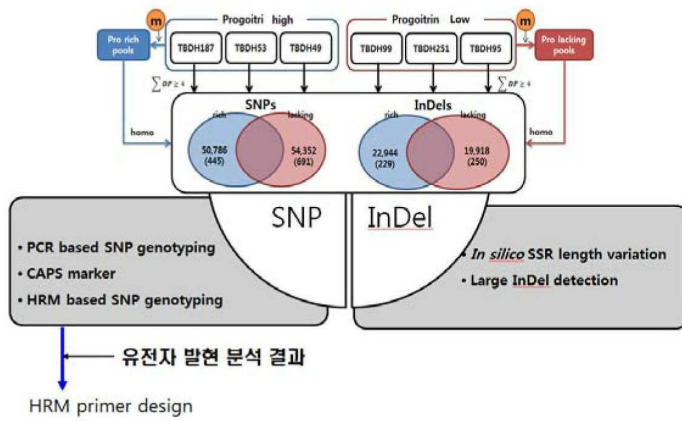
| | 서열정보(5'→3') |
|----------|-------------------------------|
| 정방향 프라이머 | AGAAAAGGTCTGCATGCCGA (서열번호 2) |
| 역방향 프라이머 | TCATCGAGTGAAGCAGCTGA (서열번호 3) |

도면

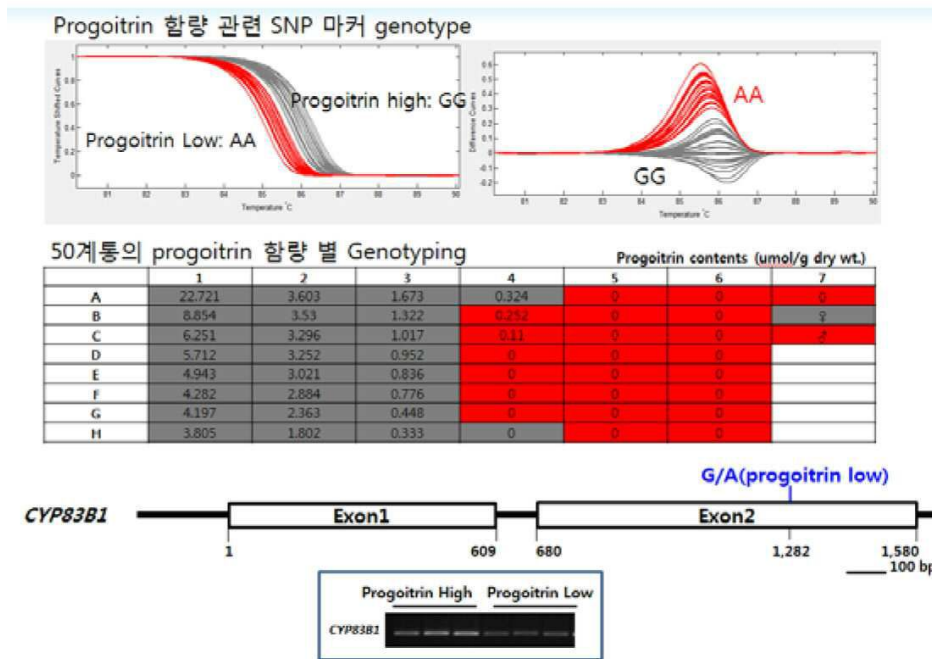
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
 - <120> Single nucleotide polymorphism marker for selecting cabbage of low content progoitrin and uses thereof
 - <130> PN16018
 - <160> 3
 - <170> Kopatent In 2.0
 - <210> 1
 - <211> 1500
 - <212> DNA
 - <213> Brassica oleracea
 - <400> 1
- ```

atggatctct tcttgattat tgccccatg gtagcagtcg cagccttctt ctctctccgg 60
agctccacga agaaatctct ccggctgcct ccggggccaa aaggtcttcc tattattgga 120
aacctccacc agatggagaa atttaaccc caacacttcc tctttcgtct ctccaagctc 180

tacggtccaa tttcacaat gaaaatcggg ggacgccgcc ttgcagtgat ctcatcggct 240
aagttagcca aggaactcct caagaccag gacctcaatt tcaccgctcg tcctctcctg 300
aaggggcaac aaacgatgct atatcaaggt cgtgagcttg gtttcggaca gtacacagcg 360

```

tactatcgtg agatgaggaa gatgtgatg gttaacctat tcagcccaaa tcgctgcga 420  
 agtttccgac ccgtagaga agaagagtgc caacgtatga tggaaaagat ctacaaagcc 480  
 gctgatcaat caggaccgt tgatttaagt gagcttctct tgtcattcac caactgtgtc 540  
 gtctgtagac aagcttttgg taagcgggat aacgagtacg gaaccgagat gaagagattc 600

ataaacatct tgtacgagac tcaagccctt ttgggcactc tgtttttctc cgaccttttc 660  
 ccttatttcg gatttcttga caatctcact ggtcttagtg cgcgtctcaa gagagctttc 720  
 aaggagctcg acattacct tcaagaactc ctcgatgaga ctcttgacct tagccgcctt 780  
 aaactgaga cggagagttt cattgatctt ttgatgcaga tctacaaaga tcaacctttc 840  
 tccatcaaat ttaccacga aaatgtcaag gccatgatat tggatattgt tgtaccggga 900  
 actgacactg cggcagcagt ggtcgtatgg gccatgactt acctataaa gtaccctgaa 960  
 gcaatgaaga aagctcaaga tgaagtgagg aatgtggtcg gtgacaaagg atacgtctcc 1020

gaagaagaca tcccaatct cccttatctg aaggccgtca tcaaggagtc actccgtctc 1080  
 gaaccagtca tcccaattct tctacataga gaaacatag cagacgcaaa gataggtggc 1140  
 tatgatattc cggcgaagac catcattcag gtgaacgcat gggcggtttc tcgtgacaca 1200  
 gccgcctggg gagacaacc taatgagttc attccagaga ggttcatgaa cgagcagaaa 1260  
 ggagtggact tcaaggggca agattttgag ctctacctt tcgggtcagg cagaagaatg 1320  
 tgcccgccta tgcatcttgg agtcgcaatg gtagagatac cttttgctaa ctttctctac 1380  
 cgattcgatt ggagcctacc gacagggatt aaacctgagg acataaagat ggacgtcatg 1440

accggactcg ctatgcataa gaaagatcac ctgcctcttg caccaaggac gcacatttga 1500  
 1500

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

agaaaaggtc tgcattgccga 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

tcatcgagtg aagcagctga

20