(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년04월26일
(11) 등록번호 10-2525535
(24) 등록일자 2023년04월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6888 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6888 (2018.05)
C12Q 2531/113 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0012983
(22) 출원일자 2023년01월31일
심사청구일자 2023년01월31일
(56) 선행기술조사문헌
Park, GM. 『Karyotypes of Korean Endemic Land Snail, Koreanohadra koreana(Gastropoda: Bradybaenidae)』 Korean J. Malacol. (2011) 27(2): 87-90
KR102366536 B1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
국립생태원
충청남도 서천군 마서면 금강로 1210 ()
(72) 발명자
차덕재
경상북도 영양군 영양읍 낙원로 60, 501호(신아아파트)
김진영
경상북도 안동시 경동로 951, 102동 203호(용상동, 용상 화성파크드림)
김영중
경상북도 영양군 일월면 주실길 25-2
(74) 대리인
특허법인이룸리온

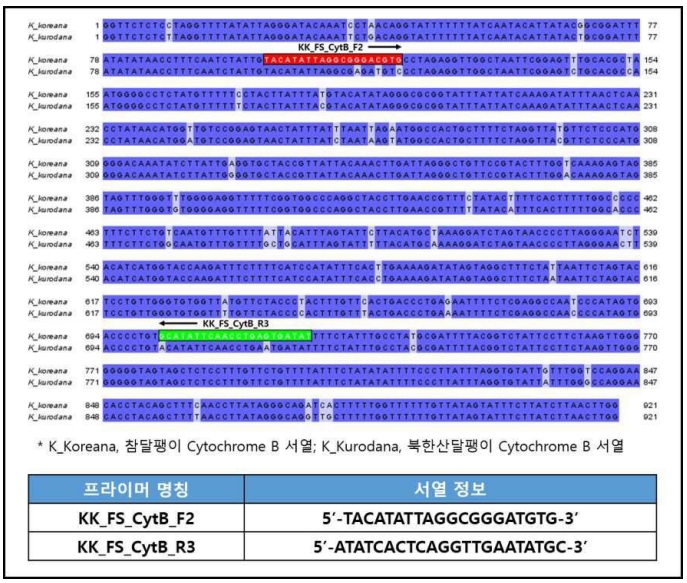
전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **참달팽이 동정용 프라이머 세트 및 이를 이용한 종 동정 방법**

(57) 요 약

본 발명은 참달팽이(Koreanohadra koreana) 동정용 프라이머 세트 및 이를 이용한 참달팽이의 동정 방법에 관한 것으로, 본 발명의 프라이머 세트는 참달팽이를 위해하지 않으면서 형태적인 종 동정이 어려운 근연종인 북한산 달팽이와 참달팽이를 동정할 수 있는 프라이머 세트 및 종 동정 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



* K_Koreana, 참달팽이 Cytochrome B 서열; K_Kurodana, 북한산달팽이 Cytochrome B 서열

프라이머 명칭	서열 정보
KK_FS_CytB_F2	5′-TACATATTAGGCGGGATGTG-3′
KK_FS_CytB_R3	5′-ATATCACTCAGGTTGAATATGC-3′

(52) CPC특허분류
C12Q 2600/124 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 정방향 프라이머; 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 역방향 프라이머;를 포함하는 참달팽이(Koreanohadra koreana) 동정용 프라이머 세트로서,

상기 프라이머 세트는 참달팽이의 배설물 및 점액질을 시료로 하는, 참달팽이 배설물 및 점액질 동정용 프라이머 세트.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 배설물 및 점액질은 참달팽이 체외로 분리된 상피세포를 포함하는, 참달팽이 배설물 및 점액질 동정용 프라이머 세트.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항 또는 제3항의 프라이머 세트를 포함하는, 참달팽이 배설물 및 점액질 동정용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 키트는 증폭 반응용 DNA 중합효소, dNTPs, 및 반응 버퍼를 추가로 더 포함하는 것을 특징으로, 참달팽이 배설물 및 점액질 동정용 키트.

청구항 7

i) 배설물 및 점액질로부터 gDNA를 분리하는 단계;

ii) 상기 단계 i)에서 분리한 gDNA를 주형으로 하고 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 정방향 프라이머; 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 프라이머 세트를 이용하여 표적 서열의 증폭 반응을 수행하는 단계;

iii) 상기 단계 ii)의 증폭된 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 참달팽이 배설물 및 점액질의 동정 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 단계 ii)에서 표적 서열은 참달팽이 cytochrome B 인, 참달팽이 배설물 및 점액질의 동정 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 iii) 단계 이후 iv) PCR 증폭 산물의 비교를 통한 참달팽이와 육상달팽이와의 종 동정 확인 단계를 추가로 포함하는, 참달팽이 배설물 및 점액질의 동정 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 육상달팽이는 북한산달팽이, 충무띠달팽이, 내장산띠달팽이, 명주달팽이, 동양달팽이 및 아프리카왕달팽이로 이루어진 군에서 선택되는 어느 1종 이상인, 참달팽이 배설물 및 점액질의 동정 방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 iii) 단계의 검출은 전기영동을 통한 DNA 밴드 형성여부 또는 발광물질을 이용한 형광발색 여부를 확인하는, 참달팽이 배설물 및 점액질의 동정 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 참달팽이의 종 특이적 프라이머 세트와 이를 이용한 비-손상 종 동정 방법에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 대상종인 참달팽이에 위해를 가하지 않고, 유전학적인 방법을 사용하여 참달팽이와 근연종을 동정할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 참달팽이(Koreanohadra Koreana)는 환경부가 지정한 멸종위기 야생생물 II급으로 전라남도 신안군 일부 섬에만 서식하는 한국 고유종이다. 주로 바다에 인접한 마을 주변 돌담 또는 초지에서 발견되며, 신선한 풀잎, 이끼류 등을 섭식한다. 참달팽이는 중형종에 속하며, 패각 외부에 1줄 색대가 있거나 없다. 참달팽이의 근연종인 북한산달팽이(Koreanohadra Kurodana)는 강원도, 경기도 중북부에 서식하는 것으로 알려져 있으나 참달팽이와 형태가 비슷하여 육안상 구분이 매우 어렵다. 이에 따라 대상종 분류전문가들도 참달팽이와 북한산달팽이를 동정할 때 채집지 정보에 의존하게 되므로 오동정이 발생할 수 있다. 이러한 근연종의 구분을 위해 계통분류학적 연구에서는 종 특이 프라이머(또는 마커) 및 PCR (Polymerase Chain Reaction), LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), RPA (Recombinase Polymerase Amplification) 등 특정 유전서열 증폭 방법을 사용한 유전학적 분류 방법을 통해 형태학적으로 구분하기 어려운 문제를 해결해왔다. 다만, 유전서열을 확보하기 위해서는 부득이하게 대상종 생물 조직의 일부를 채취해야 한다.'멸종위기 야생생물의 인공증식에 관한 규정(환경부예규 제621호)'에서는 1회 포획시 최대 20마리로 제한하고 있으며, 동일 지역에서는 3년간 재포획을 금지하고 있다. 따라서 상기 기술한 유전서열 증폭 방법을 이용한 일반적인 동정 기법은 멸종위기종을 대상으로 하기에 적합하지 않다.

[0004] 이에, 참달팽이에 위해를 가하지 않고 특정 유전서열을 증폭할 수 있는 방법의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 참달팽이 동정용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 프라이머 세트를 이용한 참달팽이 동정 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 참달팽이의 유전서열 중 상대적으로 변이가 많이 존재한 미토콘드리아 내 전자전달계 단백질 중 하나인 Cytochrome b 유전자 내 서열 중 참달팽이의 유전서열에 선택적으로 반응하여 증폭되는 종 특이 프라이머를 개발하였으며 그 증폭 방법에 대해 정립하였다. 또한, 참달팽이 배설물 및 점액질 내 잔류하는 유전물질을

추출하여 대상종에 물리적으로 위해를 가하지 않으면서 종 동정할 수 있는 방법을 적용하였다. 본 발명을 통해 멸종위기종인 참달팽이를 물리적으로 가해하지 않으면서 근연종인 북한산달팽이와 유전학적으로 종 동정할 수 있게 되었으며, 또한 많은 개체 조직 시료가 필요한 집단-유전학적 연구의 접근을 용이하게 할 수 있는 발판을 마련하였다.

[0011] 따라서, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 정방향 프라이머; 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 역방향 프라이머;를 포함하는 참달팽이(Koreanohadra koreana) 동정용 프라이머 세트를 제공한다.

[0012] 서열번호는 하기와 같다.

표 1

[0013]

프라이머 명칭	서열정보(5'->3')	서열번호
KK_FS_CytB_F2	TACATATTAGGCGGGATGTG	1
KK_FS_CytB_R3	ATATCACTCAGGTTGAATATGC	2

[0014] 일 실시예에 있어서, 상기 프라이머 세트는 참달팽이의 배설물 및 점액질을 시료로 할 수 있다. 본 발명의 프라이머 세트가 시료로 하는 상기 배설물 및 점액질을 사용하는 경우, 멸종 위기종인 참달팽이의 포획이나 물리적인 피해를 가하지 않으면서 효과적인 멸종위기종 서식지 발굴을 가능하게 할 수 있다.

[0015] 일 실시예에서 상기 배설물 및 점액질은 참달팽이 체외로 분리된 상피세포를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0016] 일 실시예에 있어서, 상기 프라이머 세트는 참달팽이 유생 또는 참달팽이 성체를 동정할 수 있다.

[0017] 본 발명은 또한, 상기의 프라이머 세트를 포함하는, 참달팽이 동정용 키트를 제공한다.

[0018] 일 실시예에 있어서, 상기 키트는 증폭 반응용 DNA 중합효소, dNTPs, 및 반응 버퍼를 추가로 더 포함할 수 있으며, 통상적으로 종의 동정에 이용되는 시판되는 시약 및 반응에 필요한 고형 지지체 등을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명은 또한, 하기 단계를 포함하는, 참달팽이 동정 방법을 제공한다.

[0021] i) 참달팽이의 시료로부터 gDNA를 분리하는 단계;

[0022] ii) 상기 단계 i)에서 분리한 gDNA를 주형으로 하고 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 정방향 프라이머; 및 서열명칭 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 역방향 프라이머를 이용하여 표적 서열의 증폭 반응을 수행하는 단계;

[0023] iii) 상기 단계 ii)의 증폭된 산물을 검출하는 단계.

[0024] 일실시예에 있어서, 상기 i) 단계에서 참달팽이의 시료는 배설물 및 점액질일 수 있다. 상기 프라이머 세트에서 전술한 바와 마찬가지로, 시료를 배설물 및 점액질을 사용하여, 멸종 위기종인 참달팽이의 포획이나 물리적인 피해를 가하지 않으면서 효과적인 멸종위기종 서식지 발굴을 가능하게 할 수 있다.

[0025] 일실시예에 있어서, 상기 단계 ii)에서 표적 서열은 참달팽이 cytochrome B 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 참달팽이와 그 근연종인 북한산달팽이를 유전학적 방법을 통해 종 동정할 수 있는 본 발명자들은 참달팽이와 북한산달팽이 유전서열 중 상대적으로 변이가 많이 존재한 미토콘드리아 내 전자전달계 단백질 중 하나인 Cytochrome b 유전자 내 서열 중 참달팽이의 유전서열에 선택적으로 반응하여 증폭되는 종 특이 프라이머를 개발하였으며 그 증폭 방법에 대해 정립하였다.

[0026] 참달팽이 종 특이 프라이머 및 배설물을 활용한 종 동정 방법은 우리나라에서의 참달팽이와 북한산달팽이의 오동정이 발생할 수 있는 문제를 해결하고 멸종위기종인 참달팽이 서식지 추가 발굴에 기여할 수 있다.

[0027] 일실시예에 있어서, 상기 iii) 단계 이후 iv) PCR 증폭 산물의 비교를 통한 참달팽이와 육상달팽이와의 종 동정 확인 단계를 추가로 포함할 수 있다. 도 1에 나타난 바와 같이, 참달팽이와 북한산달팽이는 형태학적으로 유사한 바, 유전자의 서열 비교를 통해 종 동정을 명확히 할 수 있다.

[0028] 일실시예에 있어서, 상기 육상달팽이는 북한산달팽이, 충무띠달팽이, 내장산띠달팽이, 명주달팽이, 동양달팽이 및 아프리카왕달팽이로 이루어진 군에서 선택되는 어느 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 북한산달팽이일 수

있다.

[0029] 일실시예에 있어서, 상기 iii) 단계의 검출은 전기영동을 통한 DNA 밴드 형성여부 또는 발광물질을 이용한 형광 발색 여부를 확인하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어 본 발명은 PCR 증폭하여 생성된 증폭 산물을 육안으로 확인하기 위한 발광 물질을 첨가하는 단계를 더 실시할 수 있다. 즉, 본 발명의 프라이머 세트를 포함하는 반응액을 만들고, 여기에 시료를 첨가하여 DNA 합성을 진행한 후 발광물질을 첨가하는 것이 가능하다. 상기 발광물질은 일반적으로 사용되는 것을 적용할 수 있으나, 바람직하게는 사이버 그린 (SYBR green), 피코그린(Picogreen) 또는 프로피디움 요오드화물(Propidium iodide)을 사용하는 것이 가능하다.

[0030] 이에 따라, 본 발명은 참달팽이의 배설물 및 점액질을 대상으로 분자생물학적 방법인 PCR을 사용하여 참달팽이를 근연종과 구분할 수 있는 종 동정이 가능함을 확인하였으며, 참달팽이 집단구조분석을 위한 유전학적 기초자료를 획득하는 데에 효과적으로 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0032] 본 발명의 참달팽이 동정용 프라이머 세트 및 동정 방법을 이용하면, 참달팽이와 형태적으로 구분하기 어려운 북한산달팽이를 유전학적인 방법을 통해 구별할 수 있다. 따라서 북한산달팽이를 참달팽이로 오동정하는 문제를 바로잡을 수 있으며 멸종위기종인 참달팽이 서식지를 추가 발견하는데 기여할 수 있다. 더 구체적으로 본 발명은 참달팽이 조직 내 gDNA를 요구하지 않는 바, 멸종위기종인 참달팽이를 죽이거나 물리적인 피해를 가하지 않으면서 개체 간 유전적인 비교가 가능하여 혈통관리 및 집단-유전학적 연구가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본 발명의 대상인 참달팽이와 북한산달팽이의 형태학적 유사정도를 나타낸 것이다(도 1에서 왼쪽 : 참달팽이, 오른쪽 : 북한산달팽이)

도 2는 본 발명의 대상인 육상달팽이류 배설물 및 점액질 채취방법에 대한 묘사를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 참달팽이의 Cytochrome b 유전서열 증폭 및 종 동정용 프라이머의 서열을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 전기영동을 이용하여 참달팽이 gDNA를 PCR하여 표적 서열을 증폭한 산물을 확인한 결과이다. (*Mk: 100 base pair DNA marker, K: 참달팽이, B: 북한산달팽이, C: 충무띠달팽이, N: 내장산띠달팽이, M: 명주달팽이, D: 동양달팽이, A: 아프리카왕달팽이, 검은색 삼각형: 약 624 base pair 크기의 증폭 PCR 증폭 산물)

도 5는 본 발명의 전기영동을 이용하여 참달팽이 배설물 gDNA를 PCR하여 표적 서열을 증폭한 산물을 확인한 결과이다. (*Mk: 100 base pair DNA marker, BFD: DAP 버퍼로 추출된 북한산달팽이 배설물 gDNA, KFD: DAP 버퍼로 추출된 참달팽이 배설물 gDNA, BFQ: Proteinase K 방법으로 추출된 북한산달팽이 배설물 gDNA, KFQ: Proteinase K 방법으로 추출된 참달팽이 배설물 gDNA, BTQ: Proteinase K 방법으로 추출된 북한산달팽이 발판 조직 gDNA, KTQ: Proteinase K 방법으로 추출된 참달팽이 발판 조직 gDNA, 검은색 삼각형: 약 624 base pair 크기의 증폭 PCR 증폭 산물)

도 6은 본 발명의 전기영동을 이용하여 참달팽이 점액질 gDNA를 PCR하여 표적 서열을 증폭한 산물을 확인한 결과이다. (*Mk: 100 base pair DNA marker, BMD: DAP 버퍼로 추출된 북한산달팽이 점액질 gDNA, KMD: DAP 버퍼로 추출된 참달팽이 점액질 gDNA, BMQ: Proteinase K 방법으로 추출된 북한산달팽이 점액질 gDNA, KMQ: Proteinase K 방법으로 추출된 참달팽이 점액질 gDNA, BTQ: Proteinase K 방법으로 추출된 북한산달팽이 발판 조직 gDNA, KTQ: Proteinase K 방법으로 추출된 참달팽이 발판 조직 gDNA, 검은색 삼각형: 약 624 base pair 크기의 증폭 PCR 증폭 산물)

도 7은 본 발명의 전기영동을 이용하여 참달팽이 배설물 gDNA를 PCR하여 표적 서열을 증폭한 산물을 반복 확인한 결과이다. (*Mk: 100 base pair DNA marker, 1-8: 참달팽이 배설물 표적 서열 증폭 PCR 증폭 산물, 검은색 삼각형: 약 624 base pair 크기의 증폭 PCR 증폭 산물)

도 8은 본 발명의 전기영동을 이용하여 참달팽이 점액질 gDNA를 PCR하여 표적 서열을 증폭한 산물을 반복 확인한 결과이다. (*Mk: 100 base pair DNA marker, 1-8: 참달팽이 점액질 표적 서열 증폭 PCR 증폭 산물, 검은색 삼각형: 약 624 base pair 크기의 증폭 PCR 증폭 산물)

도 9는 본 발명의 참달팽이 개체별 Cytochrome b의 유전서열 내 변이를 나타내는 유전서열 비교 모식도이다.

(K-B2: 참달팽이 개체번호 HOHA-F1-B2, K-A2: 참달팽이 개체번호 HA-F1-A2, BK: 북한산달팽이, 붉은색 삼각형: 참달팽이 개체 간 Cytochrome b 서열 변이 7개)

도 10은 본 발명의 표적 서열을 증폭하는 PCR 증폭 산물의 시퀀싱을 분석한 결과, CytB 유전자 서열임을 보여주는 결과이다. (K-A2: 참달팽이 개체번호 HA-F1-A2, K-B2: 참달팽이 개체번호 HOHA-F1-B2, K-B7: 참달팽이 개체번호 HOHA-F1-B7, K-B23: 참달팽이 개체번호 HOHA-F1-B23)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0036] 상술한 바와 같이, 참달팽이와 북한산달팽이는 형태적으로 매우 유사하여 대상 분류군 전문가도 형태적으로 분류하기는 매우 어려우며 유전학적 분류 방법에 대하여 보고된 바가 없다.

[0037] 본 발명의 프라이머 세트는 참달팽이에 특이적이고 민감도가 우수하기 때문에 북한산달팽이에는 반응하지 않아 참달팽이만을 특이적으로 동정할 수 있다. 또한 참달팽이 배설물 및 점액질 내 잔존하는 상피세포 내 gDNA를 이용함에 따라 종 동정을 위해 멸종위기종인 참달팽이에게 물리적으로 위해를 가하지 않을 수 있다. 이에 본 발명은 참달팽이 배설물 및 점액질에서 gDNA를 추출하여, 상기 gDNA를 PCR 방법을 이용하여 증폭하여 참달팽이를 특이적으로 동정할 수 있다.

[0038] 본 발명은 참달팽이를 동정하기 위해 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 이용하였다. 본 발명의 구체적인 실시예서는, 참달팽이와 북한산달팽이를 외형적 특징으로 분류할 수 없어 (도 1), 참달팽이 배설물 및 점액질에서 QIAgen사의 DNeasy Blood & Tissue kit을 이용하여 gDNA를 추출하였고 (도 2), 상기 gDNA를 증폭 및 동정할 수 있는 프라이머 세트를 제작하였다 (도 3). 상기 증폭 프라이머는 서열명칭 KK_FS_CytB_F2(서열번호 1)의 염기서열로 이루어진 정방향 프라이머; 및 서열명칭 KK_FS_CytB_R3(서열번호 2)의 염기서열로 이루어진 역방향 프라이머;를 포함하는 프라이머 세트로, 배설물 내 미약하게 존재하는 참달팽이 CytB 유전자를 최대한 증폭하기 위해, 참달팽이 미토콘드리아 DNA (Mitochondrial DNA; mtDNA)의 CytB (Cytochrome b)에 특이적인 프라이머를 이용하였다. 상기 증폭 프라이머를 이용하여 각각 참달팽이 조직, 배설물, 점액질에서 추출한 gDNA를 PCR하여 증폭한 결과, 약 624 base pair 크기의 최종 증폭 산물이 전기영동 상에서 확인되는 것을 확인하였다 (도 4, 도 5, 도 6). PCR 증폭 산물이 참달팽이 특이적인 CytB 유전자 증폭 산물인지 확인하기 위해서 시퀀싱 분석한 결과 PCR 증폭 산물은 약 600 base pair 크기의 참달팽이 CytB 유전자임을 확인할 수 있었다(도 9).

[0040] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실 시 예 1

[0042] **참달팽이 배설물 및 점액질 내 잔존 gDNA의 추출**

[0043] 참달팽이 배설물 및 점액질 내 잔존 gDNA를 추출하는 방법은 도 2와 같다. 첫 번째로 배설물 내 잔존 gDNA 추출 방법은 다음과 같다.

[0044] QIAgen 사의 DNeasy Blood & Tissue Kit을 사용한 추출방법은 참달팽이로부터 유래된 배설물 40mg을 1.5 mL EP Tube에 넣은 뒤, 180 uL의 ATL 버퍼, 20 uL의 Proteinase K 용액을 넣었다. 상기 배설물 및 버퍼 혼합물을 플라스틱 막자를 이용하여 분쇄한 후 56℃에서 60분간 반응시키면서 20분마다 배설물 시료와 버퍼가 섞일 수 있도록 혼합해주었다. 반응 후, 200 uL의 AL Lysis 버퍼를 넣어주고 섞어 준 후 56℃에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 혼합물에 200 uL의 99% 에탄올을 넣고 섞었다. 그 후, 혼합물이 든 1.5 mL EP Tube를 7,000 rpm의 속도로 3분간 원심분리한 후 600 uL의 상층액을 DNeasy Mini spin column에 넣고 7,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리한 후 걸러진 용액을 버린다. 상기 DNeasy Mini spin column에 650 uL의 AW1 버퍼를 넣고 7,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리한 후 걸러진 용액을 버린다. 그 후, 상기 DNeasy Mini spin column에 650 uL의 AW2 버퍼를 넣고 7,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리한 후 걸러진 용액을 버리고 7,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리한다. 상기 원심분리가 끝난 DNeasy Mini spin column을 새로운 1.5 mL EP Tube에 옮긴다. 마지막으로 25 uL의 AE 용액을 상기 DNeasy Mini spin column에 넣고 1분간 흡수시킨 후 7,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리한다. 추출된 25 uL의 추출물 중 5 uL를 PCR 반응물로 사용하였다. 상기 DNeasy Blood & Tissue Kit를 사용한 배설물 내 잔존 gDNA 추출방법과 비교하기 위해 DAP 버퍼를 사용한 배설물 내 잔존 gDNA 추출방법을 비교 실험으로 진행하였다. DAP 버퍼를 사용한 배설물 내 잔존 gDNA 추출방법은 참달팽이 유래의 배설물 40mg을 1.5 mL EP Tube

에 넣은 뒤, 200 uL의 DAP 버퍼(20 mM Sodium Hydroide, 5% Polyethylene glycol 200, 5% Dimethyl Sulfoxide)를 넣고 플라스틱 막자를 이용하여 분쇄하였다. 상기 혼합물이 들어 있는 1.5 mL EP Tube는 상온에서 10분 동안 정치하였다. 10분 뒤 혼합물의 상층액 5 uL를 PCR 반응물로 사용하였다.

[0045] 두 번째로, 점액질 내 잔존 gDNA 추출방법은 다음과 같다. QIAgen 사의 DNeasy Blood & Tissue Kit을 사용한 추출방법은 멸균 면봉을 사용하여 참달팽이 발판을 20회 문지른 후 멸균 면봉 머리 부분만 잘라 1.5 mL EP Tube에 넣은 뒤, 180 uL의 ATL 버퍼, 20 uL의 Proteinase K 용액을 넣었다. 상기 멸균 면봉 및 버퍼 혼합물을 섞어 준 후 7,000 rpm의 속도로 3분간 원심분리한다. 상기 혼합물을 56℃에서 60분간 반응시키면서 20분마다 멸균 면봉에 붙은 점액질 시료와 버퍼가 섞일 수 있도록 혼합해주었다. 반응 후, 200 uL의 AL Lysis 버퍼를 넣어주고 섞어 준 후 56℃에서 10분간 반응시켰다. 반응이 끝난 혼합물에 200 uL의 99% 에탄올을 넣고 섞었다. 그 후, 혼합물이 든 1.5 mL EP Tube를 7,000 rpm의 속도로 3분간 원심분리한 후 600 uL의 상층액을 DNeasy Mini spin column에 넣고 7,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리한 후 걸러진 용액을 버린다. 상기 DNeasy Mini spin column에 650 uL의 AW1 버퍼를 넣고 7,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리한 후 걸러진 용액을 버린다. 그 후, 상기 DNeasy Mini spin column에 650 uL의 AW2 버퍼를 넣고 7,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리한 후 걸러진 용액을 버리고 7,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리한다. 상기 원심분리가 끝난 DNeasy Mini spin column을 새로운 1.5 mL EP Tube에 옮긴다. 마지막으로 25 uL의 AE 용액을 상기 DNeasy Mini spin column에 넣고 1분간 흡수시킨 후 7,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리한다. 추출된 25 uL의 추출물 중 5 uL를 PCR 반응물로 사용하였다. 상기 DNeasy Blood & Tissue Kit를 사용한 점액질 내 잔존 gDNA 추출방법과 비교하기 위해 DAP 버퍼를 사용한 점액질 내 잔존 gDNA 추출방법을 비교 실험으로 진행하였다. DAP 버퍼를 사용한 점액질 내 잔존 gDNA 추출방법은 멸균 면봉을 사용하여 참달팽이 발판을 20회 문지른 후 멸균 면봉 머리 부분만 잘라 1.5 mL EP Tube에 넣은 뒤, 200 uL의 DAP 버퍼(20 mM Sodium Hydroide, 5% Polyethylene glycol 200, 5% Dimethyl Sulfoxide)를 넣고 흔들어 준 후 7,000 rpm의 속도로 1분간 원심분리하였다. 상기 혼합물이 들어 있는 1.5 mL EP Tube는 상온에서 10분 동안 정치하였다. 10분 뒤 혼합물의 상층액 5 uL를 PCR 반응물로 사용하였다.

실 시 예 2

[0047] **참달팽이 배설물 및 점액질 내 잔존 gDNA의 증폭 및 동정**

[0048] 참달팽이 배설물 및 점액질 내에 미약하게 존재하는 참달팽이 미토콘드리아 DNA (Mitochondrial DNA; mtDNA)의 CytB(Cytochrome b) 유전자를 최대한 증폭하기 위해 PCR 방법을 사용하였다. PCR tube에 50 uL의 PCR 반응물 [10 pmol/uL의 KK_FS_CytB_F2 프라이머(서열번호 1, TACATATTAGGCGGGATGTG), 10 pmol/uL의 KK_FS_CytB_R3 프라이머(서열번호 2, ATATCACTCAGGTTGAATATGC), 1 tube의 AccuPower® PCR PreMix (Bioneer) 및 상기 실시예 1로 추출한 잔존 gDNA의 최종 추출 산물 5 uL, Nuclease free water 45 uL] 을 넣고 잘 섞어 주었다. 상기 PCR 반응물이 담긴 PCR tube를 PCR 기계 상에서 94℃ 3분 처리 뒤, 94℃ 30초, 57℃ 30초, 72℃ 1분의 반응을 50회 처리 후, 마지막으로 72℃ 3분 반응하여 PCR 반응을 종료하였다. 약 624 base pair 크기의 PCR 반응의 증폭 유무를 판단하기 위해 전기 영동을 수행하였다.

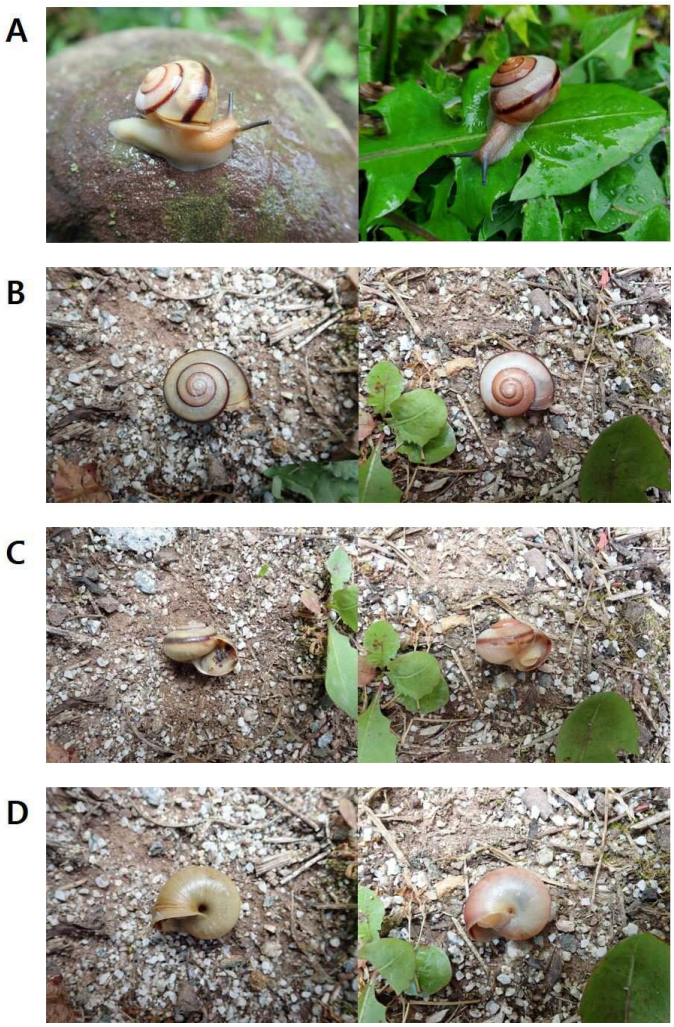
[0049] 그 결과, 참달팽이의 잔존 DNA가 증폭된 것을 확인할 수 있었다 (도 4의 K, 도 5의 KFQ 및 KTQ, 도 6의 KMQ 및 KTQ, 도 7의 1-8, 도 8의 1-8). 하지만, 형태적으로 구분이 어려운 북한산달팽이의 CytB는 본 발명의 프라이머 세트로 PCR 증폭이 되지 않았으며 (도 4의 B, 도 5의 BFQ 및 BTQ, 도 6의 BMQ 및 BTQ), 또한, 참달팽이를 제외한 충무띠달팽이, 내장산띠달팽이, 명주달팽이, 동양달팽이, 아프리카왕달팽이 (도 4의 C, N, M, D, A) 모두에서 CytB 증폭은 확인되지 않았다.

[0050] 상기 PCR 증폭 산물이 참달팽이 특이적인 CytB 유전자 증폭 산물인지 확인하기 위해서 시퀀싱 분석한 결과 PCR 증폭 산물은 약 580 base pair 크기의 참달팽이 CytB 유전자임을 확인할 수 있었다(도 10). 이와 더불어 각 개체별 CytB 유전자 증폭 산물의 시퀀싱을 수행한 결과 참달팽이 내 개체군의 다양성이 있음을 확인할 수 있었다 (도 9).

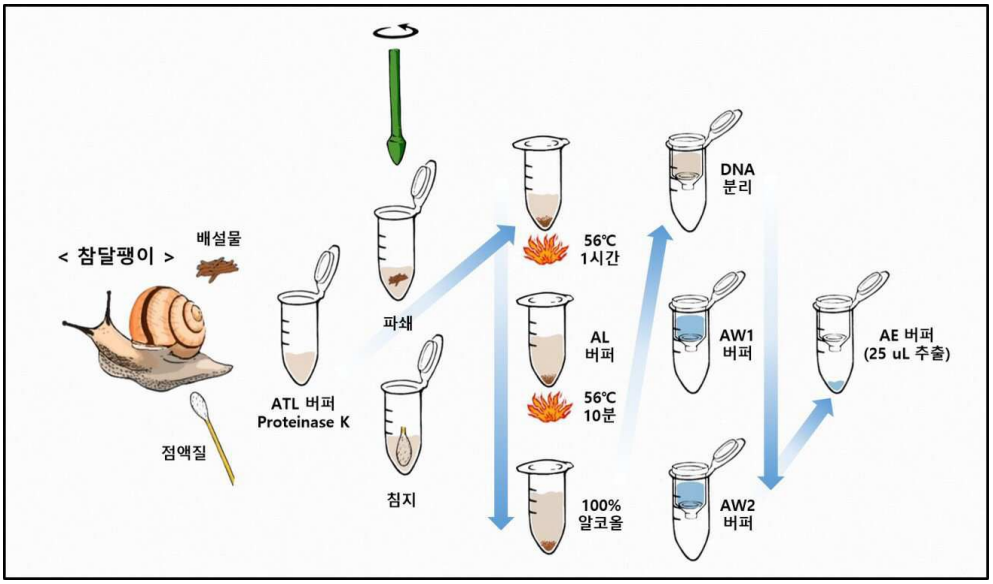
[0051] 따라서, 본 발명에서는 참달팽이의 배설물 및 점액질을 대상으로 분자생물학적 방법인 PCR을 사용하여 참달팽이를 북한산달팽이와 구분할 수 있는 종 동정이 가능함을 확인하였으며, 또한, 참달팽이 집단구조분석을 위한 유전학적 기초자료를 획득할 수 있음을 확인하였다.

도면

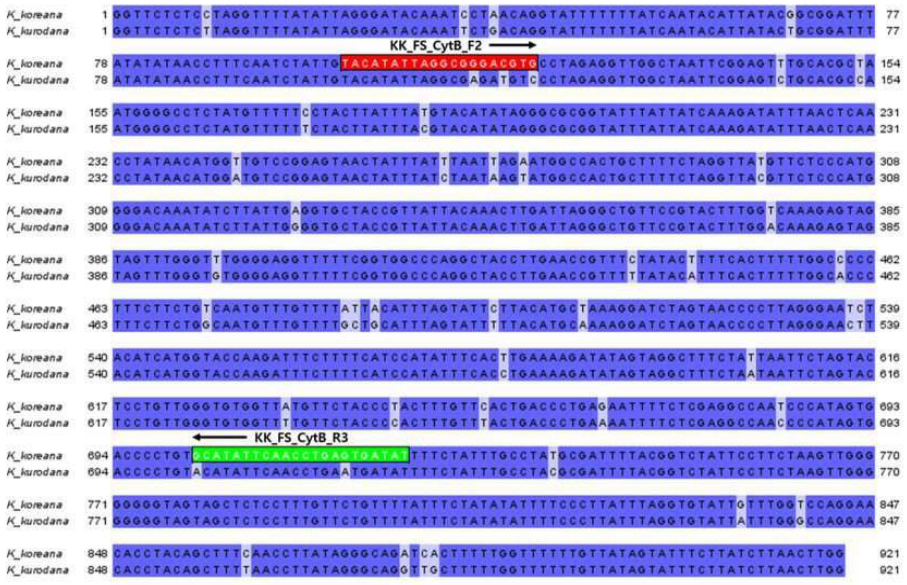
도면1


A
B
C
D

도면2


< 참달팽이 >
배설물
점액질
ATL 버퍼
Proteinase K
파쇄
침지
56℃
1시간
AL
버퍼
56℃
10분
100%
알코올
DNA
분리
AW1
버퍼
AW2
버퍼
AE 버퍼
(25 uL 추출)

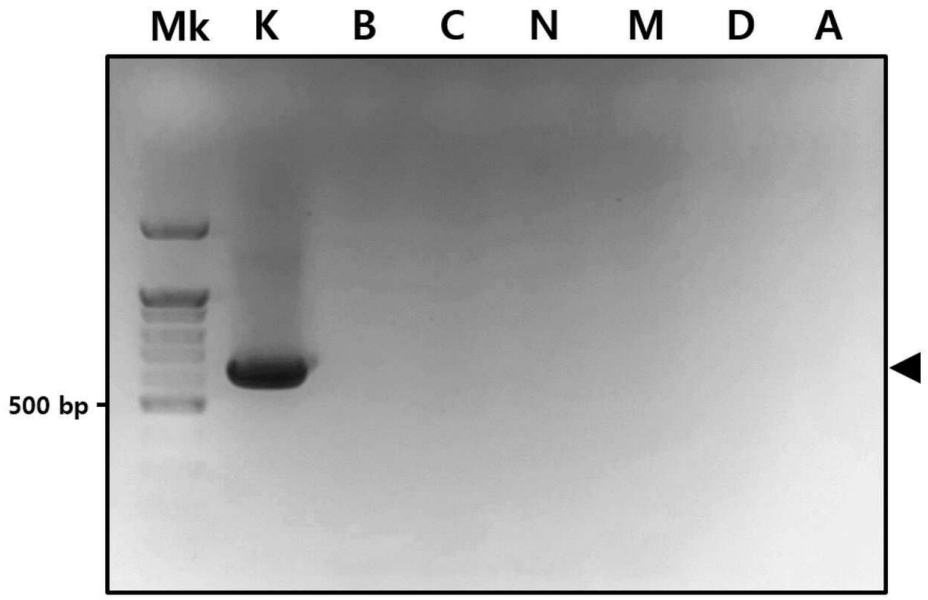
도면3



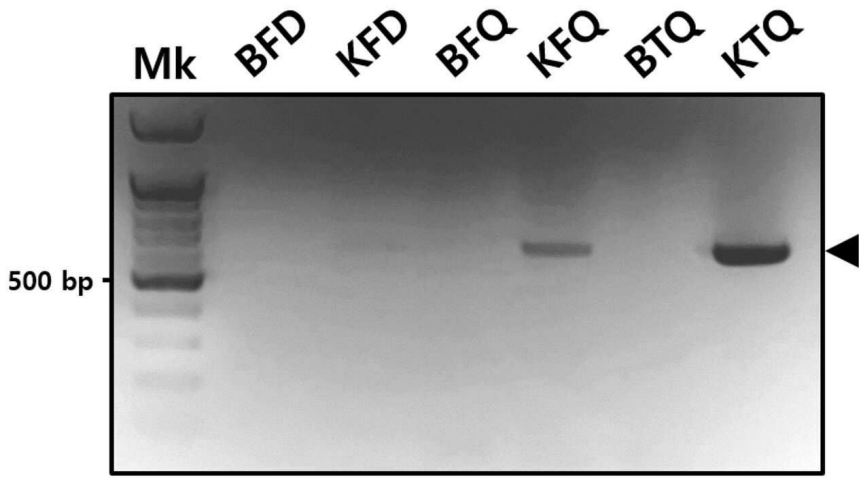
* K_Koreana, 참달팽이 Cytochrome B 서열; K_Kurodana, 북한산달팽이 Cytochrome B 서열

프라이머 명칭	서열 정보
KK_FS_CytB_F2	5′-TACATATTAGGCGGGATGTG-3′
KK_FS_CytB_R3	5′-ATATCACTCAGGTTGAATATGC-3′

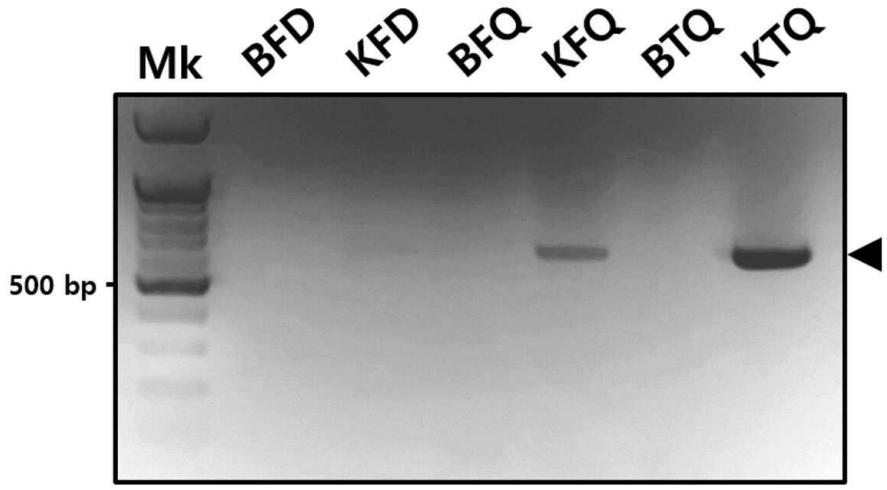
도면4



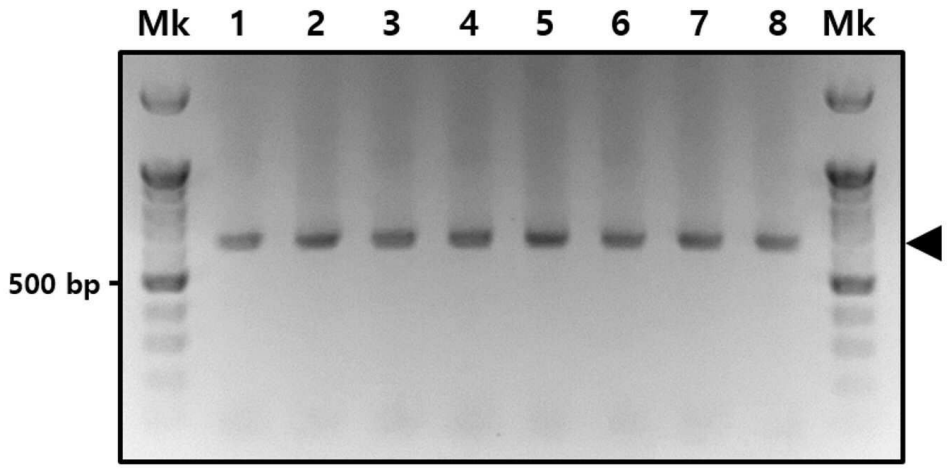
도면5


Mk
BFD
KFD
BFQ
KFQ
BTQ
KTQ
500 bp

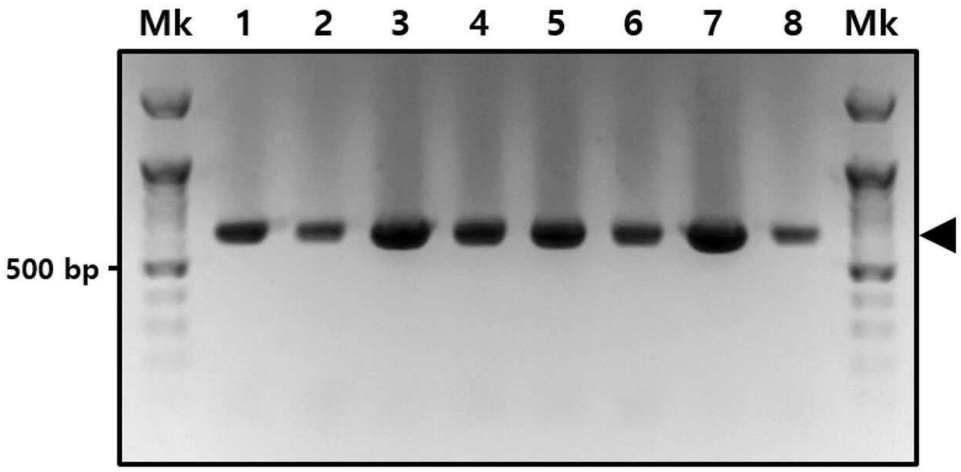
도면6


Mk
BFD
KFD
BFQ
KFQ
BTQ
KTQ
500 bp

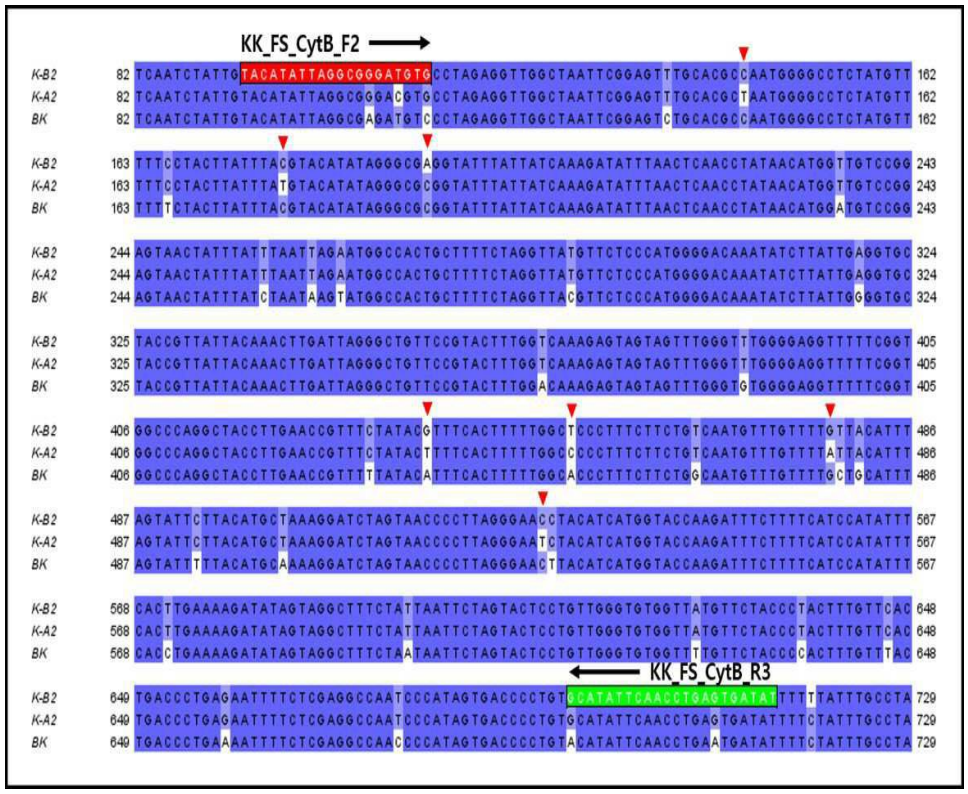
도면7



도면8



도면9



도면10

>K-A2-CytB
CCTAGAGGTTGGCTAATTCGGAGTTTGCACGCTAATGGGGCCTCTATGTTTTTCCTACTTATTTATGTACATATAGGGCGCGGT
ATTTATTATCAAAGATATTTAACTCAACCTATAACATGGTTGTCCGGAGTAACTATTTATTTAATTAGAATGGCCACTGCTTTTCT
AGGTTATGTTCTCCCATGGGGACAAATATCTTATTGAGGTGCTACCGTTATTACAAACTTGATTAGGGCTGTTCCGTACTTTGGT
CAAAGAGTAGTAGTTTGGGTTTGGGGAGGTTTTTCGGTGGCCCAGGCTACCTTGAACCGTTTCTATACTTTTCACTTTTTGGCCC
CCTTTCTTCTGTCAATGTTTGTTTTATTACATTTAGTATTCTTACATGCTAAAGGATCTAGTAACCCCTTAGGGAATCTACATCAT
GGTACCAAGATTTCTTTTCATCCATATTTCACTTGAAAAGATATAGTAGGCTTTCTATTAATTCTAGTACTCCTGTTGGGTGTGGT
TATGTTCTACCCTACTTTGTTCACTGACCCTGAGAATTTTCTCGAGGCCAATCCCATAGTGACCCCTGT

>K-B2-CytB
CCTAGAGGTTGGCTAATTCGGAGTTTGCACGCCAATGGGGCCTCTATGTTTTTCCTACTTATTTACGTACATATAGGGCGAGGT
ATTTATTATCAAAGATATTTAACTCAACCTATAACATGGTTGTCCGGAGTAACTATTTATTTAATTAGAATGGCCACTGCTTTTCT
AGGTTATGTTCTCCCATGGGGACAAATATCTTATTGAGGTGCTACCGTTATTACAAACTTGATTAGGGCTGTTCCGTACTTTGGT
CAAAGAGTAGTAGTTTGGGTTTGGGGAGGTTTTTCGGTGGCCCAGGCTACCTTGAACCGTTTCTATACGTTTCACTTTTTGGCT
CCCTTTCTTCTGTCAATGTTTGTTTTGTTACATTTAGTATTCTTACATGCTAAAGGATCTAGTAACCCCTTAGGGAACCTACATCA
TGGTACCAAGATTTCTTTTCATCCATATTTCACTTGAAAAGATATAGTAGGCTTTCTATTAATTCTAGTACTCCTGTTGGGTGTGG
TTATGTTCTACCCTACTTTGTTCACTGACCCTGAGAATTTTCTCGAGGCCAATCCCATAGTGACCCCTGT

>K-B7-CytB
CCTAGAGGTTGGCTAATTCGGAGTTTGCACGCCAATGGGGCCTCTATGTTTTTCCTACTTATTTACGTACATATAGGGCGAGGT
ATTTATTATCAAAGATATTTAACTCAACCTATAACATGGTTGTCCGGAGTAACTATTTATTTAATTAGAATGGCCACTGCTTTTCT
AGGTTATGTTCTCCCATGGGGACAAATATCTTATTGAGGTGCTACCGTTATTACAAACTTGATTAGGGCTGTTCCGTACTTTGGT
CAAAGAGTAGTAGTTTGGGTTTGGGGAGGTTTTTCGGTGGCCCAGGCTACCTTGAACCGTTTCTATACGTTTCACTTTTTGGCT
CCCTTTCTTCTGTCAATGTTTGTTTTGTTACATTTAGTATTCTTACATGCTAAAGGATCTAGTAACCCCTTAGGGAACCTACATCA
TGGTACCAAGATTTCTTTTCATCCATATTTCACTTGAAAAGATATAGTAGGCTTTCTATTAATTCTAGTACTCCTGTTGGGTGTGG
TTATGTTCTACCCTACTTTGTTCACTGACCCTGAGAATTTTCTCGAGGCCAATCCCATAGTGACCCCTGT

>K-B23-CytB
CCTAGAGGTTGGCTAATTCGGAGTTTGCACGCCAATGGGGCCTCTATGTTTTTCCTACTTATTTACGTACATATAGGGCGAGGT
ATTTATTATCAAAGATATTTAACTCAACCTATAACATGGTTGTCCGGAGTAACTATTTATTTAATTAGAATGGCCACTGCTTTTCT
AGGTTATGTTCTCCCATGGGGACAAATATCTTATTGAGGTGCTACCGTTATTACAAACTTGATTAGGGCTGTTCCGTACTTTGGT
CAAAGAGTAGTAGTTTGGGTTTGGGGAGGTTTTTCGGTGGCCCAGGCTACCTTGAACCGTTTCTATACGTTTCACTTTTTGGCT
CCCTTTCTTCTGTCAATGTTTGTTTTGTTACATTTAGTATTCTTACATGCTAAAGGATCTAGTAACCCCTTAGGGAACCTACATCA
TGGTACCAAGATTTCTTTTCATCCATATTTCACTTGAAAAGATATAGTAGGCTTTCTATTAATTCTAGTACTCCTGTTGGGAGTG
GTTATGTTCTACCCTACTTTGTTCACTGACCCTGAGAATTTTCTCGAGGCCAATCCCATAGTGACCCCTGT

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 **Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.**