

Microsatellite marker를 이용한 품종 판별

책임연구원 박성환, 주임연구원 황경훈 / 다카라코리아 연구개발센터

개요

현재 품종 분류는 전통적인 멘델의 법칙을 적용한 표현형 위주의 형태학적 형질 이외에 생화학적 특성인 동위 효소 변이, 저장 단백질 변이와 심미 등이 주로 이용되어져 왔다. 그러나 이러한 기존의 방식들은 변이의 빈도가 낮고, 전 작물에 대한 적용에는 한계가 있는 등 보편적인 특성으로서 품종 분류 방식에 적용되기보다는 종자의 순도 검증, 종자 혼종 구분에 제한적으로 이용될 수 있었다. 따라서 품종 식별에 직접 적용 가능한 보다 효과적인 기법을 도입 활용할 필요성이 부각되었으며, 최근 DNA 마커 특성을 활용한 특성 조사가 신품종의 구별성 검증에 도입되어 품종 보호권 부여에 효과적으로 활용될지 여부가 관심사로 떠오르게 되었다.

DNA 마커는 품종의 유전적 특성을 본질적으로 반영할 뿐만 아니라, 생물체의 보편적 특성으로서 전 작물에 대하여 개발 및 적용이 가능하며, 이론적으로 거의 무한대의 마커를 확보하여 품종 특성화 할 수 있다는 측면에서 그 이상성을 발견할 수 있다. 더욱이 DNA 마커를 품종 식별 목적으로 사용할 경우 품종 및 품종간 구별성을 계량화하여 정의할 수 있으며, 환경의 영향을 받지 않고, 품종 구별성에 대한 기여도가 동일하여 구별성 정의에 왜곡이 없는 등 활용도가 매우 높다고 할 수 있다.

현재 DNA genotyping 기법으로 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism), PCR을 기반으로하여 marker를 적용한 RAPD(random amplified polymorphic DNA), amplified fragment length polymorphism(AFLP) 및 SSR(Simple Sequence Repeat) 등의 다양한 유전자 마커를 이용하여 식물의 유연관계 추정이나, 저항성 유전자와 연관된 마커 탐색 및 유전자 지도 작성 등 그 응용의 폭이 매우 광범위하게 활용되고 있다. 대표적인 작물들로는 벼, 보리, 콩, 비름과, 밀, 대두 등이 있으며 microsatellite 마커는 RFLP보다 품종 또는 개체 간에 훨씬 높은 polymorphism을 보여주며 근연간의 품종 간 차이를 검증하는데 RAPD보다 효율적이라고 보고 되고 있다(참고문헌 1).

Microsatellite marker 원리

Microsatellite DNA는 1~5개의 SSR(simple sequence repeat)로서 대부분의 진핵생물 genome에 골고루 분포되어 있다(참고문헌 3). 또한 동물 genome에 (CA)_n repeat가 가장 많은데 비해 식물에서는 (AT)_n repeat, (GA)_n repeat가 주종을 이루고 microsatellite DNA의 빈도가 동물의 1/10로 적은 것으로 보고 되었다(참고문헌 2).

Microsatellite는 ATATATAT와 같이 반복되는 서열을 가진 짧은 DNA 단편으로 VNTRs나 tandem repeats의 variable number로서 언급되는 경우도 있으며 non-coding DNA에서 나타나는 경향이 있다. 어떤

microsatellites는 각 개체 별로 반복 단위(e.g. AT)가 다양하게 나타나는 경우도 있으며, 한 예로, 부계쪽에 12반복(repeat)과 19반복의 genotypes을 갖고 있고 모계쪽에 18반복과 15반복을 가지고 있다면 1차 자손은 12와 15반복을 가지고 있을 수 있다. 반복서열이 복제되면서 계속해서 자손에게 전달된다. 이와 같은 현상이 오랜 기간동안 진행되면서 개체들 간에 microsatellites가 재조합되고 보존되면서 다양성이 나타나는 한편 교배되지 않은 다른 집단사이에는 좀더 다양한 polymorphism에 따른 특성화가 이뤄질 것이다.

일반적으로 microsatellites를 확인하는 방법은 반복되는 부분의 양쪽 base pair 중에 genome상에서 독특한(unique) 서열을 PCR primers로 디자인하여 분석을 한다(그림 1). 그러므로 한 쌍의 PCR primers는 종내 모든 개체에 반응이 가능하고 각각의 다른 길이의 microsatellites에 대해 다양한 길이(different size)의 products를 만들어 낼 수 있어야 한다.

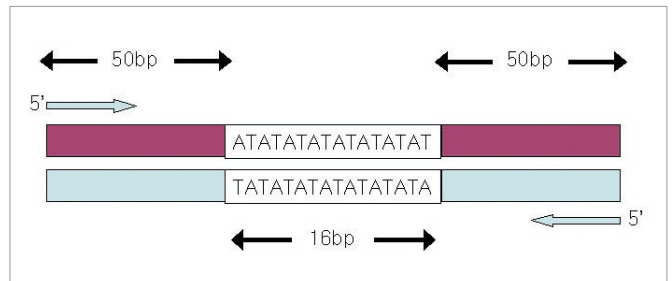


그림1. Genomic DNA로부터 microsatellites의 발견. 두개의 PCR primers(하늘색 화살표로 표시됨)는 microsatellite 부분의 양쪽 측면에서 설계된다. 만약 반복되는 부분이 없다면 PCR product는 100bp로 증폭이 될 것이다. 그러나 각각의 PCR product의 길이는 microsatellite(이 샘플에서는 8 AT 반복)의 수에 따라 달라지며 이를 이용하여 내부에 얼마나 많은 AT 반복이 있는지 셀 수 있다.

PCR product는 SDS-PAGE나 capillary electrophoresis에 의해 각 fragment의 길이에 따라 분리 분석할 수 있다. 이 방법을 통해 각 fragment의 길이 결정을 통해 각 allele에 얼마나 많은 AT가 반복되는지 확인할 수 있다.

실험예

Genomic DNA 추출

각 품종 별로 액체 질소를 이용하여 파쇄한 후 DNA추출한다.

CTAB method로 추출하거나 genomic DNA추출 kit(TaKaRa Code, 9092)를 이용하여 추출할 수 있다.

PCR 수행

- Perfect PreMix ver 2,0(TaKaRa Code R512)
- PCR Condition
 - 95℃ 5 min
 - 95℃ 30 sec
 - 50℃ 30 sec
 - 72℃ 1 min
 - 72℃ 5 min

30 cycle

전기영동

Capillary Electrophoresis

- MegaBACE 1000, Genetic Profiler ver1.1(Amersham Biosciences, USA)
- MegaBACE ET550-R Size Standard(Amersham Biosciences, USA)

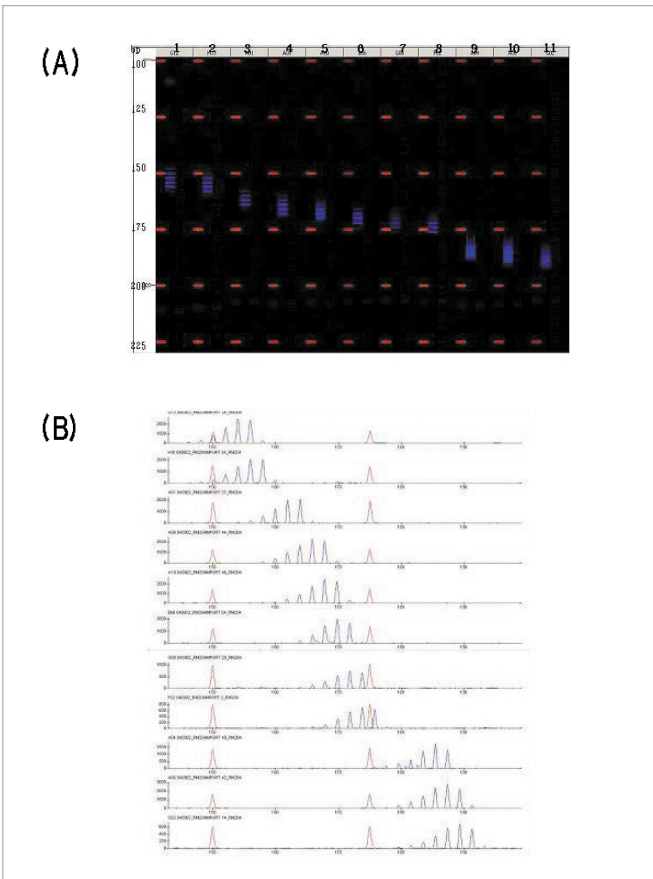


그림 2. 국내 육성벼 11종 판별을 위해 SSR marker를 이용하여 분석한 데이터 국내 육성되고 있는 고품질 벼 품종 중 오대벼 외 10종의 품종 판별을 위해 각 품종에 대한 polymorphism을 가진 SSR marker로 genotyping을 실시하였다. 사용된 SSR marker는 (CT)_n repeat sequence를 가지고 있으며 예상 증폭 길이는 106~194bp로, 11개 품종에 대한 실험 결과, 154bp에서 188bp로 각각 11개의 길이로 측정되어 졌다. 상단의 그림 A는 gel형태로 분석된 데이터이며 각 Lane별로 왼쪽의 빨간색은 bp로 길이를 측정할 수 있는 size standard이며 오른쪽의 파란색의 밴드가 증폭된 fragment를 나타낸다. 하단의 그림 B는 gel 형태의 데이터를 electropherogram으로 전환하여 분석된 데이터로 Y축은 peak의 높이를 나타내고 X축은 각 fragment의 길이를 나타낸다.

실험에 사용된 SSR 부위는 CT, 2bp 반복 부위를 가지고 있으며 증폭된 산물의 예상 길이는 106bp~194bp으로 2bp차이를 나타낼 것으로 예상되었다. 분석은 신속하고 정확성을 높이기 위해 capillary electrophoresis(CE)를 이용하였고 이를 위해 marker의 forward primer에 FAM으로 표식하였

다. 또한 각 capillary 마다 시료와 함께 size standard를 전기영동함으로써 capillary마다의 나타날 수 있는 편차에 의한 변이를 줄이고 증폭산물의 길이를 정확한 base pair로 분석할 수 있었다. Size standard는 60~310bp로 대략적으로 25bp정도 간격이고 22개의 band를 포함하고 있다. 증폭산물은 각기 다른 길이의 11개의 band로 154bp에서 188bp까지 154bp, 156bp, 164bp, 166bp, 168bp, 170bp, 172bp, 174bp, 184bp, 186bp, 188bp로 측정되었다. 여러 번의 반복 실험을 통해 각 band의 측정된 길이의 변이가 0.5이하로 유의성 있는 결과임을 알 수 있었다. microsatellite marker를 이용하여 분석시엔 위 데이터에서 볼 수 있는 것과 같이 multippeak가 나타나는 경향이 많고 이로인하여 데이터 분석시 오류가 나타날 수 있다. microsatellite marker를 이용한 가장 보편적인 실험 방법은 Taq polymerase를 이용한 PCR 반응이다. 그러나 Taq polymerase의 특성상 증폭되는 3'말단에 A를 첨부하는 현상이 나타나는데 이는 증폭된 산물이 Adenin이 첨부되어 [true peak+1bp]의 길이로 측정되어진다는 점이 있다. A 첨부 현상도 말단의 base가 Adenin보다는 Cytosin일 경우 더 잘 일어나는 것으로 알려져 있다. 그 외 작은 peak가 나타나는데 이를 stutter라고 말하고 일반적으로 major peak보다는 낮은 peak로 나타난다. stutter가 나타나는 빈도는 특정 STR locus에서 allele 길이에 따라 비례하여 증가하며 mono>di>tri>tetra 순으로 stutter 빈도가 증가하는 경향이 있다. Fragment 길이= 양쪽 primer의 길이+ SSR부위를 제외한 인접된 서열+(반복서열의 bp×반복 횟수)

Microsatellite marker의 응용 및 적용

Microsatellite locus [(TAA)_n]을 이용한 유전자 변이에 관한 연구는 다양성에 관한 연구에 사용되어, 유전자원을 평가할 수 있으며 이러한 결과는 작물의 유전적 다양성을 검토하여 육종 간 계통을 분류하는 한편 궁극적으로는 중요한 유전자의 개발 및 농업적 형질 연구와 새로운 품종의 육성을 위해 응용 될 수 있다.

최근에 유럽의 품종 보호기관을 중심으로 오이, 밀과 토마토, 유채, 고추, 밀 등 국가별 주요 관심 작물에 대하여 다양한 DNA 마커를 적용한 품종의 구별성 및 안정성 검정과 품종보호 분야의 적용 가능성에 대한 결과들이 발표되고 있으며 식물 신품종 보호가 의무조항이 됨에 따라 종자산업법이 제정되고 품종 보호 및 품종 판별이 중요한 문제로 대두되고 있다. 일부 유전적 마커에 의한 자료가 표현형적인 특성과 반드시 일치하는 것은 아니나 현재 시행되고 있는 품종 보호제도에서 표현형질과 함께 직접적인 자료로 제공되어야 할 것이며 이러한 DNA profiling에 대한 자료를 축적하여 다양한 육종에 대한 이를 적용하여 국내 고품질 작물에 대한 보호와 육성을 통해 국제 경쟁력을 갖추어야 할 것으로 생각된다.

참고문헌

- 1) Kwon YS, Moon JY, Kwon YS, Park DY, Yoon WM, Song IH, Yi SI 2003. AFLP analysis for cultivar discrimination in radish and chinese cabbage. *Korean J. Breed.* **35**(5):319~328
- 2) Morgante M, Olivieri AM 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* **3**(1):175~182
- 3) Hamada H, Petrino MG, Kakunaga T 1982. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**:6465~6469
- 4) Tautz D, Renz M 1984. Simple sequence are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* **12**:4127~4138

유전자검사의 모든 것!

01 GMO 검사

콩, 옥수수, 감자 등의 농산물이나 이를 이용한 다양한 가공품을 대상으로 유전자재조합 성분이 포함되어있는지, 포함되어있다면 어느 정도 비율로 포함되어있는지를 분석해드립니다.



02 한우판별 검사

소의 모색(毛色)관련 유전자 분석을 통해 소고기 및 가공품에 사용된 원료 소고기의 한우 진위판별 검사를 해드립니다.



03 PSE돈육 검사

돼지 스트레스 증후군(PSS)은 육질이 나쁜 PSE 돈육, 일명 물돼지의 원인이 됩니다. PSS 유전자 분석을 통해 저질의 PSE 돈육여부를 확인해드립니다.



04 동물성 성분 검사

육류 및 가공품에 사용된 원료 육류의 종류를 확인해드립니다. 종 특이적인 유전자확인을 통해 소, 돼지, 닭, 양, 말, 염소의 함유여부를 확인해드립니다.



<한국유전자검사센터>는...

- 국내는 물론 일본 등 식품안전에 까다로운 선진국의 유전자검사시장에 진출. 서비스를 제공하고 있습니다.
- 국제공인 기관들의 숙련도테스트(Ring test)에 주기적으로 참여, 세계 정상급의 성적을 거두고 있습니다.
- 식품관련 유전자검사외에 인간의 건강과 행복을 위한 유전자검사를 연구·개발하고 있습니다.

가족확인 유전자검사



- FBI에서 사용하는 13CODIS를 적용. 친자가능성 99.9999% 이상 도출!
- 고통스러운 채혈 없이 타액, 머리카락 등을 이용하는 검체활용의 유연성!
- 최단 24시간 이내에 법적활용가능한 검사결과의 제공!

한국유전자검사센터의 가족확인유전자검사로 다양한 혈연관계를 확인하실 수 있습니다.

친부모확인 유전자 검사

부모와 아이,
1세대간
친가족여부의 확인

부계혈통확인 유전자검사

증조할아버지, 할아버지,
아버지, 아이로 이어지는
부계혈통의 확인

모계혈통확인 유전자검사

외할머니, 어머니,
아이로 이어지는
모계혈통의 확인