

발간등록번호

11-1543000-000168-01

쌀 가공품의 품종식별을 위한 SNP DNA 칩 기술 개발
(Development of DNA chip technology for SNP genotyping to
identify rice (*Oryza sativa* L.) cultivar of processed rice food)

KAIST 생명화학공학과

농림축산식품부

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 첨단생산기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “쌀 가공품의 품종식별을 위한 SNP DNA 칩 기술 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2013 년 9 월 30 일

주관연구기관명 : KAIST

주관연구책임자 : 박현규

세부연구책임자 : 박현규

협동연구기관명 : 충남대학교

협동연구책임자 : 안상낙

협동연구기관명 : 국립농산물품질관리원

협동연구책임자 : 이성훈

협동연구기관명 : (주) 솔젠트

협동연구책임자 : 명현균

요 약 문

I. 제 목

쌀 가공품의 품종 식별을 위한 SNP DNA 칩 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 쌀 시장의 개방화로 인해 특히 쌀 가공품의 외래 품종 혼재 여부를 판별하는 기술 개발이 시급한 시점에서, 유전자 마커 (SNP, SSR)를 이용한 DNA chip 시스템을 개발한다면 불법 품종이 혼재되어 있는 것을 신속하고, 저비용이며, 신뢰성 있게 판별할 수 있을 것이다. DNA chip 기술을 이용하여 수십 종 이상의 품종을 대상으로 혼재 여부를 식별하는 기술은 아직 국내외에서 개발, 적용된 바가 없으므로 본 과제는 유전자 마커를 이용한 DNA chip 시스템을 이용하여 쌀 가공품의 품종 식별을 효율적으로 판별하기 위해 수행되었다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 쌀 가공품의 품종식별용 유전자 마커의 분석, 쌀 가공품의 품종식별용 유전자 마커 발굴 및 유용성 확인, 쌀 가공품의 품종식별용 DNA chip 시스템 개발, 쌀 가공품의 품종식별용 DNA chip의 검증 및 상용화의 네 가지 단계로 이루어졌다.

본 연구에서 사용된 쌀 가공품은 떡이며, 국내산 쌀과 중국산 쌀의 품종식별이 이루어졌다.

IV. 연구개발결과

우선 국내산 쌀과 중국산 쌀의 품종식별을 위한 유전자 마커의 분석 및 발굴이 이루어져, 국내산 5품종과 중국산 9품종간의 원산지 판별을 할 수 있는 SNP 마커 7개가 최종 선별되었다. 최종 선별된 SNP 마커 7개를 본 연구진에서 개발한 LS-PCR (Ligation Separation-PCR) 기술과 RAH (RecA Assisted Hybridization) 기술을 이용하여 국내산 쌀과 중국산 쌀의 품종을 구분하는 SNP DNA chip 시스템을 개발하는데 성공하였으며, 실제 국내 품종의 쌀과 중국 품종의 쌀에서 가공한 떡에서 추출한 DNA 샘플을 바탕으로 검증 하는데 성공하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구과제를 통해서 본 연구진은 현재까지 SCI 논문 4편과 비SCI 논문 1편을 발표하였으며, 국내특허 1개와 국제특허 2개를 출원하였다. 본 연구결과는 아직까지 상용화 되어있지 않은 쌀 품종 구별을 위한 DNA chip 시장을 선도할 수 있을 것으로 기대되는 만큼, 정확도 및 민감도 확인과 KFDA 승인을 통한 신뢰성을 확보하여 국내외적으로 기술의 안정성과 검사의 유용성을 인정받을 계획이다.

SUMMARY (영문요약문)

I. Title

Development of DNA chip technology for SNP genotyping to identify rice (*Oryza sativa* L.) cultivar of processed rice food product

II. Goal and Necessity of this project

Nowadays, it is necessary to develop the technology of identifying rice cultivar of processed rice food product due to the globalization of rice trade market. In this situation, if we develop the DNA chip system which utilizing gene marker such as SNP (Single Nucleotide Polymorphism) or SSR (Simple Sequence Repeat) we could identify the rice cultivar with fast, low-cost and reliable manner. So far, it has been not developed or applied in Korea and/or worldwide for the identification of mixed foreign species among the tens of species. Hence, this project was developed for the effective identification of rice cultivar of processed rice food product with DNA chip system utilizing gene marker.

III. Content and scope of this project

This project consists of four steps: i) analysis of gene marker for the identification of rice cultivar of processed rice food product, ii) discovering and confirming the usefulness of the gene marker for the identification of rice cultivar of processed rice food product, iii) development of DNA chip system for the identification of rice cultivar of processed rice food product and iv) validation and application of DNA chip system. In this project, rice cake was used for the processed rice food product. We identified Korean and Chinese rice cultivar in this research.

IV. Result of this project

First, we discovered and analyzed the gene marker for the identification of rice cultivar of Korea and China. Then, 7 SNP markers were selected in this step. Utilizing this gene markers, we successfully developed the DNA chip system utilizing LS-PCR (Ligation Separation-PCR) and RAH (RecA Assisted Hybridization) technologies. Finally we validated this DNA chip system with DNA samples extracted from rice cake made from rice cultivar in Korea and China.

V. Product and application of this project

We published 4 SCI and 1 non-SCI papers and applied 1 domestic and 2 international patents from this project. The result of this project is expected to lead the DNA chip market of identification of rice cultivar. Hence, we will confirm specificity and sensitivity of this system. Moreover, we will take KFDA approval for the confirmation of stability and usefulness of this DNA chip system.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Outline of this project

Chapter 2. Current developments of related domestic and/or international technologies

Chapter 3. Result and content of this project

Chapter 4. Achievement and contribution of this project

Chapter 5. Product from this project and plan for application

Chapter 6. Collected international information during this project

Chapter 7. Facilities and equipments from this project

Chapter 8. References

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 연구시설·장비 현황
- 제 8 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 기술 개발의 배경

- 정부는 국내 쌀 시장의 활성화를 위해 **쌀 가공식품 시장을 확대하는 방안을 적극적으로 추진**하고 있다. 현재 국내 쌀 가공식품의 시장규모는 1조원 가량으로 전체 식품매출액의 2% 수준이나, 2014년까지 이를 2조원 규모로 성장시키는 것을 목표로 하여 제품개발 및 품질향상을 위한 R&D 확대, 가격경쟁력을 높이기 위한 가격인하 및 안정적 원료 공급, 조세감면 등을 추진하고 있다.
- 정부의 농산물 수입자유화 계획에 따라 **값싼 외국산 농산물이 무분별하게 수입되고, 이들 농산물이 국산으로 둔갑 판매되는 등 부정 유통 사례가 늘어나고 있다.**
- 시중에 유통되는 쌀의 신뢰성을 확보하고, 우리 쌀의 고품질화 및 밥쌀용 수입산 쌀에 대한 대책으로서 원산지 표시제도, 지리적 표시제도, GAP, 친환경 인증제도, 이력서 추천관리 제도를 2005년부터 추진하고 있다.
- 이렇듯 강화되는 농산물 표시제도에 대응하여 **쌀 가공품 및 부산물에서도 품종을 식별할 수 있는 연구의 필요성이 대두되고 있다.**
- 특히 쌀로 만든 가공식품의 경우 사용된 쌀의 원산지를 모르고 구매하는 일이 빈번하게 발생하고 있고, 중국산 등 수입산 쌀의 혼합여부를 알기 어려운 문제점이 있다.
- 현재 국내와 국외에도 **쌀 가공품에서 품종을 식별할 수 있는 기술은 없는 실정이다. 따라서 소비자들의 안전과 신뢰를 확보하기 위해 관련 기술 개발이 필요한 시점이다.**
- 대부분의 국내 쌀 가공식품들이 미확인된 여러 품종을 이용하여 제조되며, 국산 품종이라고 하여도 외국에서 재배되어 다시 수입될 경우 품종확인 검사가 어려운 점 등을 고려할 때 이에 대한 연구의 필요성이 더욱 부각되고 있다.

제 2 절 연구의 필요성 및 중요성

- 쌀 시장 개방화에 대응하여 **국내외 쌀 품종 판별 체계 구축 및 분석 기술의 개발이 시급한 실정이다.**
- 쌀 가공품에 사용된 쌀의 품종판별에 대한 중요성에 대한 인식은 크지 않은 점을 고려할 때, 이에 대한 기술 개발의 홍보가 더욱 필요하다.
- 쌀은 품종별로 가공적성이 달라 특정 제품에 특정 쌀 품종을 쓰고 있으므로 기술이 개발 된다면 수입 품종 판별에 도움이 될 것으로 사료된다.
- DNA chip을 이용한 유전자 진단의 경우 다수의 probe를 집적할 수 있기 때문에 다수의 SNP 마커 분석을 통한 품종 식별에 매우 이상적인 기술이다.
- SNP 및 SSR을 이용한 유전자 마커를 이용하여 DNA chip 분석 시스템을 구현할 경우, **신속하고, 저비용이며, 신뢰성 있게 품종을 식별할 수 있게 될 것이며, 향후 치열하게 진행될 DNA chip을 통한 품종 검정 시장에서 선도적인 제품으로 자리 잡을 수 있을 것으로 기대된다.**

- 수십 종의 품종을 대상으로 외래 품종의 혼재 여부를 식별할 수 있는 세계 최초의 기술이 될 것이다.
- DNA chip 기술의 핵심 요소인 높은 신뢰성 (reliability)과 초고속 스크리닝 (HTS)을 통해 기존의 기술보다 높은 가격경쟁력 확보가 가능하며, 민감도, 특이도, 재현성 및 활용도 측면에서 월등한 우위가 예상된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 쌀 품종 현황 정보와 리스트

- 국가목록에 등재된 농촌진흥청 육성 209개 벼 품종 중 최고품질 품종은 7개이며, 고품질 품종은 74개로 일반지역 적응 품종 52개, 특수지역 적응품종 22개이다¹ (표 1).

< 표 1. 우리나라 고품질 벼품종의 특성별 분류 >

구분	조생종 (30)	중생종(19)	중만생종 (32)
최고품질 (7)	운광 (1)	고품, 하이아미* (2)	삼광, 호품, 칠보, 진수미 (4)
고 품질 품종 (74)	일반 지역 (52)	고운, 보석, 산들진미, 상미, 새상주, 오대, 운미, 조아미, 중화, 대봉, 평원, 한들, 호반, 황금보라 (14)	화성, 화영, 수라, 화봉, 삼덕, 상옥, 풍미, 풍미1호, 청아, 해찬물결, 청안, 보라미, 해오르미 (13)
	특수 지역 (22)	추청, 일품, 대안, 일미, 동안, 남평, 신동진, 새추청, 주남, 동진1호, 호평, 평안, 청호, 온누리, 주안1호, 동진2호, 다미, 말그미, 청담, 황금누리, 새누리, 황금노들, 진백, 청청진미, 다청 (25)	금오벼2호, 만풍, 서안1호, 해평 (4)

- 지금까지 7개 최고품질 품종이 개발되었으며, 이들의 주요 특성은 표 2와 같다.

< 표 2. 최고품질 벼 품종 현황 및 주요 특성 >

품종명	개발년도	숙기	주요 특성
삼광벼	2003	중만생종	· 외관 품질과 밥맛이 매우 양호 · 도열병, 흰잎마름병, 줄무늬잎마름병 복합저항성
운광벼	2004	조생종	· 조생종 중 밥맛이 가장 뛰어난, 내도복성, 내병성
고품벼	2004	중생종	· 쌀 외관 품질이 특히 뛰어나며, 밥맛 극히 양호 · 도열병 및 흰잎마름병에 저항성
호품벼	2006	중만생종	· 외관 품질과 밥맛이 매우 양호 · 내도복 직파 적응성 · 도열병, 흰잎마름병, 줄무늬잎마름병 복합저항성
칠보벼	2007	중만생종	· 고품위 및 고식미 · 단간, 내도복성 및 줄무늬마름병 저항성
하이아미	2008	중생종	· 쌀 외관, 밥 윤기 및 식미양호, 필수아미노산 고함유 · 도열병 중도저항성, 바이러스병 저항성 · 저항성, 내도복성, 내냉성
진수미	2008	중만생종	· 쌀 외관이 매우 양호, 밥맛이 우수 · 도열병, 흰잎마름병, 줄무늬잎마름병 복합저항성

제 2 절 국내 대표적인 쌀 가공품 리스트, 유통 현황과 시장상황

1. 가공 품목별 쌀 소비량

- 일본과 우리나라 가공용 품목을 비교해보면 가공밥류, 주류, 장류, 과자류 등에서는 일본의 가공용 쌀 사용 비율이 훨씬 높고, 우리나라는 떡류의 소비량이 일본보다 월등히 높다 (표 3). 일본의 쌀 가공 분야에 소비하는 사용량은 104 만톤 규모이고, 우리는 27 만톤 정도 소비되고 있다. 쌀 소비 형태로 보면, 한국이 가공용으로 6% 정도를 소비하고 일본은 주류 (청주) 제조용 27 만톤, 그 밖의 가공식품 제조용으로 77만톤 등 104 만톤을 소비하여 전체 소비량의 14% 를 차지하고 있다 (표 4).

< 표 3. 쌀 가공 분야별 쌀 사용량 >

(단위 : 천톤)

품목별	계	가공밥류	떡류	주류	장류	면류	과자류	빵류	기타
한국	270	19	169	43	10	10	9	2	8
(%)	(100)	(7.1)	(62.6)	(15.9)	(3.7)	(3.7)	(3.3)	(0.7)	(3.0)
일본	1,040	167	32	270	222	-	129	-	220
(%)	(100)	(16.1)	(3.1)	(26.0)	(21.3)	(-)	(12.4)	(-)	(21.2)

(자료 : 농식품부)

2. 시장규모 및 가공용 쌀 소비 현황

- 쌀 가공식품이란 일반적으로 쌀을 이용하여 밥 이외의 목적으로 가공한 식품이라고 할 수 있지만 무균밥이나 냉동밥은 가공식품으로 분류하고 단순한 순수 식용 도시락은 가공식품으로 분류하지 않는 경향이다. 표 4와 같이 2007년 우리나라의 가공식품의 규모는 1조 8천억원 수준이며 이중 가장 비중이 높은 것이 떡류이고 그 중 떡볶이용 떡 매출액이 2,262억원 규모이다. 1천억원대 이상의 시장을 형성하고 있는 제품군은 우리나라에서 떡류>주류>가공밥류>죽류>면류의 순이나 일본에서는 주류>장류>가공밥류>과자류의 비중이 높다.

< 표 4. 쌀 가공식품 시장 규모 >

제품군	시장규모(억원)	비 고
총시장규모	18,315	
떡류	11,000	일반떡(8,738) 떡볶이떡 등(2,262)
주류	1,870	소주, 막걸리 등
가공밥류	1,600	무균밥(1,200) 냉동밥(400)
죽류	1,400	죽전문점(900) 즉석죽(540)
면류	1,165	생면(50), 건면(라면, 국수115) *베트남 쌀국수 1,000억원
쌀가루	500	생미분, 습식미분, 침지전분 등
과자류	400	쌀과자, 한과, 누룽지 등
음료수	380	곡류음료 등

(자료 : 농식품부, '07년)

- 한편 2003년 이후 연도별 가공용 쌀 사용량은 표 5와 같고, 2008년 현재 약 27만톤이 소비되고 있는 것으로 파악되고 있다. 그러나 이 통계에 주정용 처리물량으로 쓰인 쌀 (07년 약 21만톤)이 빠져있는 것을 감안하면 실제 밥쌀용도 이외로 사용된 쌀은 더 되는 것으로 알려지고 있다. (표 5)

< 표 5. 연도별 가공용 쌀 사용량 현황 >

(단위 : 천톤)

업 종 명	2003년	2004년	2005년	2006년	2007년	2008년
소비량(합계)	125,547	210,091	191,674	171,173	182,902	278,270
곡물가공품 ^{a)}	8,887	9,907	11,256	10,302	8,133	15,315
기타식품 ^{b)}	90,463	172,010	139,622	118,766	126,279	219,566
음료제조 ^{c)}	26,197	28,174	40,796	42,105	48,490	43,389

(자료 : 농식품부, ^{a)} 제과용 분말, 죽, 당류, 사료 등; ^{b)} 빵, 떡, 면류, 조미료, 장류, 차류 등; ^{c)} 소주, 탁주, 청주 등)

제 3 절 유전자를 이용한 쌀 품종식별 기술의 현황 및 문제점

- DNA 분석은 동물·의학 분야에서는 이미 실용화가 가능한 단계에 도달했지만, 식물 분야에서는 식물체의 복잡한 유전체계 때문에 아직은 상당한 연구와 과학적 논의가 필요한 것으로 인식되고 있다. 그러나 현대의 눈부신 과학기술의 진보에 힘입어 식물에 대한 유전정보가 속속 밝혀지고 있고, 이를 이용한 실용화 사례도 증가하고 있는 실정이다.
- 실제로 농촌진흥청에서 유전자 분석을 통한 벼 품종 식별 기술을 개발하여 수입쌀과 우리쌀의 판별에 활용하는 것은 좋은 예다.
- 지금까지는 유통 중인 쌀에서만 품종 확인이 필요했던 것에 비해 식당 등 소비처에서도 원산지를 표시해야 됨에 따라 점차 원료미를 가공한 제품 즉, 밥이나 가공식품에서도 품종을 판별하는 기술이 절실하다. 쌀에서의 유전자 추출방법에 관한 연구로는 벼 반립종자에서 유전자 추출과 시리얼 등 상업적 쌀 가공품에서의 유전자 추출 등이 있다.
- 분자생물학적 기법을 이용한 품종 판별 방법은 가장 정확하고 신뢰도가 높은 방법으로 국제식품 신제품 보호동맹 (UPOV, Union for the protection of new varieties of plants)의 생화학 및 분자생물학적 기술 실무 작업반 (BMT) 회의에서도 품종을 구분하기 위한 방법에 대한 분자생물학적 기법 이용 가능성에 대하여 검토가 논의 중에 있다.
- 일반적으로 품종 식별에 사용되는 분자생물학적 방법으로는 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; 최초로 개발된 유전적 표지 인자로 전체 DNA를 절단효소로 자르고, 그 결과 나타나는 DNA 단편의 크기를 전기영동을 통하여 분석하여 식별하는 방법), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA; 전체 DNA에서 primer를 사용하여 증폭된 DNA 단편을 분석하는 방법으로 전기영동으로 단순히 분석할 수 있는 장점이 있으나, 재현성이 낮다는 단점이 있음), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism; PCR을 이용하는 방법으로 전체 DNA에서 특이한 부분을 찾아내어 이것을 표지인자로 사용하여 분석하는 방법), SSCP (Simple Sequence Length Polymorphism; 전체 DNA의 특정부위에 단순히 반복되는 염기서열이 개체마다 다른 것을 이용하는 방법) 등이 있으나, 이러한 방법들은 증폭된 DNA 를 전기영동한 후 패턴을 분석하는 등 분석과정이 복잡하고, 고비용과 긴 분석시간을 요구하며, 혼합된 품종에서 개별 품종을 확인하지 못하는 단점을 가지고 있다.
- 최근 쌀의 품종 확인 방법으로는 SSR (Simple Sequence Repeat)을 이용한 핵산 지문법이 많이 사용되고 있다. 이는 전체 DNA의 특정부위에 단순히 반복되는 염기서열이 개체마다 다른 것을 이용하는 방법으로 표지 인자로서 이용가치가 높다.
- SNP (Single Nucleotide Polymorphism)를 이용한 분석 방법은 전체 DNA 중에서 하나의 염기 변이를 표지 인자로 이용하는 것으로, 가장 최근 개발된 방법으로 많은 발전 가능성을 지니고 있다. 현재 다양한 농축산물의 원재료 및 가공품과 유전자변형 (GM) 식품의 판별 등의 연구에도 많이 이용되고 있다.
- 기존의 유전자 마커는 정확한 품종 식별을 위한 유전자 정보가 매우 제한되어 있으며, 수입 품종에 대한 식별 능력이 떨어지기 때문에 정확한 DB 구축을 위해 SNP 및 SSR을 이용한 새로운 유전자 마커의 발굴이 요구된다.
- DNA chip을 이용한 유전자 분석법은 1990년대 말에 개발되어 유전자 발현 조사와 유전자형 결정 등을 위하여 연구용으로 사용되고 있는 융합 기술이다.
- DNA chip의 시장규모는 매년 100 %를 상회하는 높은 성장률을 보이고 있으며, 현재 시

장은 제약회사를 주요 고객으로 하는 연구용이 주종을 이루고 있으나 향후 보건 의약분야의 유전병 진단 등 실제 진단 분야에서의 수요가 증가할 것으로 예상된다.

- SNP를 DNA chip 기법을 통하여 대규모로 genotyping한 최초의 시도는 1996년 미국 NIH에서 Francis Collins 박사의 연구그룹에 의하여 이루어졌다². 이후 SNP의 유전자형 관찰을 위한 DNA chip으로는 Affimetrix사의 GeneChip Microarray와 Illumina사의 Sentrix Array Chip과 Sentrix BeadChip 등이 있다.

- KAIST 연구팀은 DNA chip을 이용한 SNP 분석 분야에 있어서 세계적인 기술력을 보유하고 있으며 최근 소아 당뇨병과 유방암 관련 유전자 변이를 정확하게 진단하는 DNA chip 기술을 개발하여 저명한 국제 논문을 다수 게재한 바 있다.

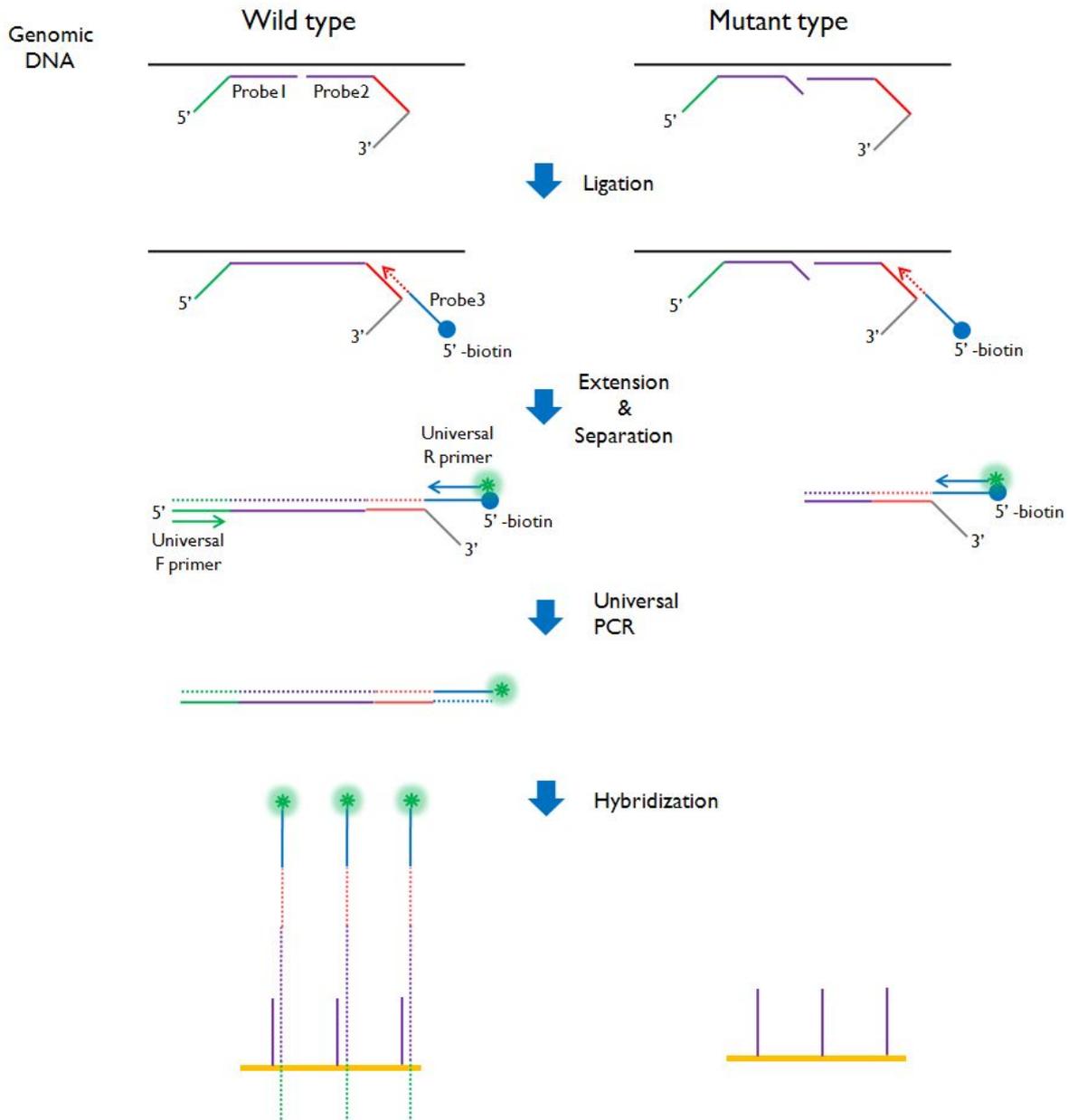
- DNA chip 기술을 이용하여 수십 종 이상의 품종을 동시에 식별하는 기술은 아직 국내외에서 개발, 적용된 바 없다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 1차년도 연구개발수행 내용 및 결과

1. 제1세부

가. Multiplex PCR 방법을 사용하지 않고 한 쌍의 primer로 다양한 유전자 마커 (SNP)를 동시에 분석할 수 있는 LS-PCR (Ligation Separation-PCR) 기술 개발



< 그림 1. LS-PCR 방법을 통한 DNA chip SNP 마커 분석 기술 >

(1) LS-PCR 기술 개발

(가) LS-PCR 기술 과정

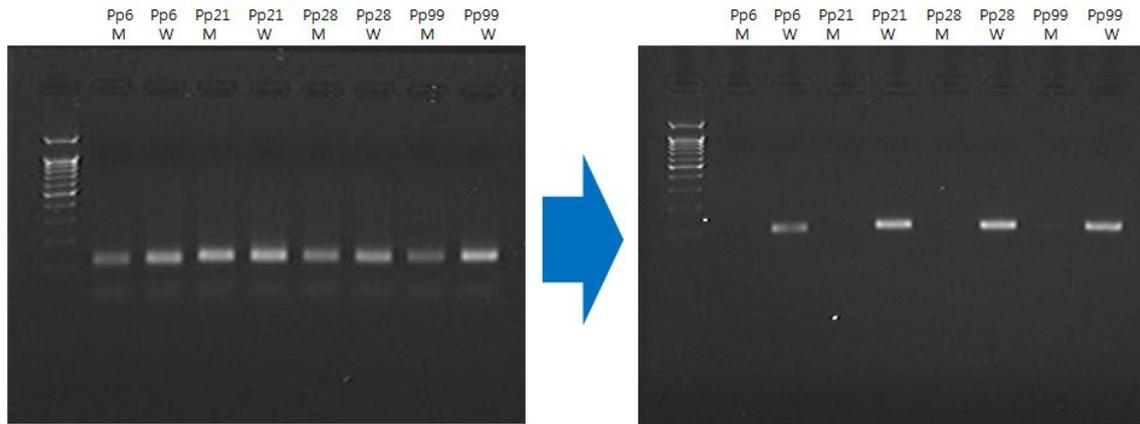
(그림 1)은 LS-PCR (Ligation Separation-PCR) 기술의 원리를 나타낸 것이다. 먼저 분석하고자 하는 genomic DNA의 특정 SNP 마커가 wild type인지 mutant type인지 구분하기 위해 wild type일 경우에 두 개의 LS-PCR 탐침 1, 2가 DNA ligation이 되도록 디자인한다. DNA ligation 반응을 보낸 이후에 LS-PCR 탐침 2의 적색 부분과 혼성화 반응이 되는 LS-PCR 탐침 3을 용액에 추가로 넣어준다. Displacement activity가 있는 중합효소로 연장을 한 이후에 LS-PCR 탐침 3의 5'-biotin을 이용하여 streptavidin-coated magnetic bead로 정제한다. 정제 과정에서 genomic DNA와 함께 DNA ligation 반응이 일어나지 않은 LS-PCR 탐침 1이 제거된다. 정제 과정을 통해서 이후 공통 PCR의 비특이적 증폭을 획기적으로 감소시킬 수 있다. LS-PCR 탐침 1의 녹색 부분, LS-PCR 탐침 3의 청색 부분과 각각 동일한 염기서열을 갖는 공통 F 프라이머와 공통 R 프라이머를 용액에 넣고 PCR을 수행한다. DNA ligation 반응이 일어난 wild type 샘플은 LS-PCR 탐침 3가 LS-PCR 탐침 1의 끝부분까지 연장이 일어났기 때문에 증폭이 이루어지고, DNA ligation 반응이 일어나지 않은 mutant type 샘플은 PCR 증폭이 이루어지지 않는다. Cy3 형광이 표지된 공통 F 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하고 DNA chip에 혼성화한 이후에 형광 스캐너로 결과를 확인한다. 본 연구진이 개발할 LS-PCR 반응에 사용되는 probe 1, 2, 3에서 보라색 부분 (그림 1)만 특정 SNP site에 specific한 유전자 서열이고, 그 이외의 부분들은 모두 universal한 유전자 서열로 디자인한다.

(나) LS-PCR 기술 장점

매우 다양한 SNP site를 단 하나의 튜브 반응을 통해 분석 가능하며 (ligation과 separation 반응, 그리고 마지막 PCR 반응 또한 universal primer를 사용하여 하나의 튜브에서 진행), SNP 마커의 분석 방법의 가격을 결정하는 가장 중요한 요인인 효소의 양을 최소화했기 때문에 기존의 기술들에 비해서 가격경쟁력 면에서 매우 뛰어나다. 마지막으로 multiplex PCR method를 사용하지 않기 때문에 primer들의 nonspecific amplification이 발생하지 않는다.

(다) LS-PCR 실시

앞서 합성한 probe 들을 이용하여 LS-PCR을 실시하였다. 먼저 LS-PCR이 제대로 실행되는지 확인하기 위하여 4종류의 형질에 대하여 LS-PCR을 실행하고 2% agarose gel electrophoresis를 통하여 확인하였다. 이때, 각각의 형질에 대한 wild/mutant set를 2개를 준비하여 하나의 세트는 separation 과정을 거치게 하였고, 나머지 하나는 separation 과정을 하지 않은 상태로 universal PCR을 진행하였다. 다음 사진은 separation 과정을 거친 세트와 separation 과정을 거치지 않은 세트를 각각 gel electrophoresis를 실행한 뒤 얻은 사진이다 (그림 2).

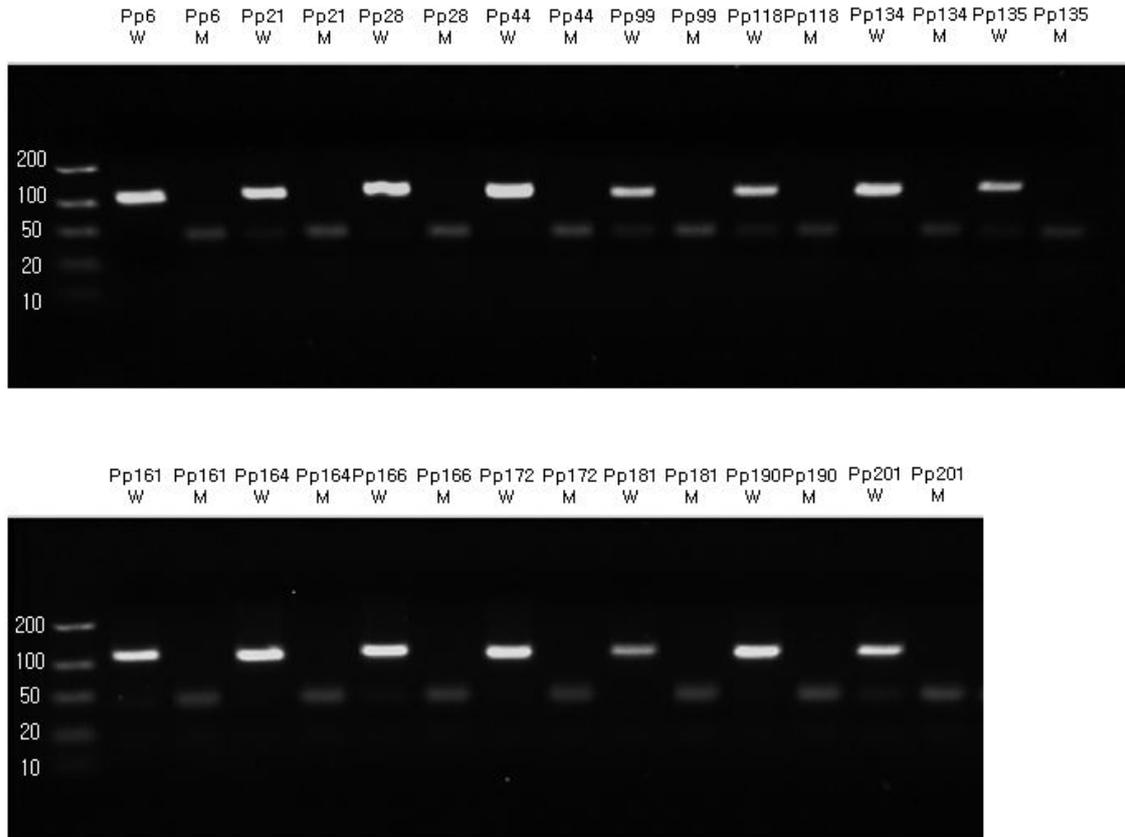


< 그림 2. Separation 여부에 따른 결과차이(좌: Separation (X) 우: Separation (O)) >

각 형질에 대하여 위의 밝은 band들은 PCR을 통하여 얻어진 PCR product이고, 밑의 상대적으로 희미한 band는 처음에 넣어주었던 primer이다. Separation 과정을 거치지 않은 세트의 sample 들의 경우, 모든 형질에서 wild target과 mutant target의 구분 없이 밝은 band가 생겼다. 반대로, separation 과정을 거친 세트의 sample들에서는 모든 형질에서 wild target을 넣어주었던 sample에서만 band가 뜨는 것을 확인할 수 있었다. 이처럼 separation 과정을 거친 sample들을 separation 과정을 거치지 않은 sample들의 사진과 비교함으로써, LS-PCR 기술에서 separation 과정의 필요성을 확인할 수 있었다. 또한 LS-PCR이 제대로 일어나는 것을 확인할 수 있었다.

LS-PCR이 제대로 이루어지는 것을 확인한 후에는, 12종의 다른 sample에 대하여 LS-PCR을 수행하였다. 12가지 sample에 대한 LS-PCR 결과는 다음과 같다 (그림 3).

2% agarose gel electrophoresis를 통해 확인한 결과, 이처럼 12개의 sample에 대하여서도 LS-PCR이 제대로 이루어짐을 알 수 있었다.



< 그림 3. 12개 Sample에 대한 LS-PCR 결과 >

나. LS-PCR (Ligation Separation-PCR) 반응 조건 최적화 및 DNA chip 테스트

(1) Separation 반응의 최적화

LS-PCR 방법에서, separation 과정은 상당히 중요한 역할을 차지한다. 그림 2에서 볼 수 있듯이, separation 과정을 거치지 않을 경우 mutant target에서도 nonspecific한 signal이 생기게 된다. 따라서 제대로 된 실험결과를 얻기 위해서는 separation 과정이 필수적이다. 하지만 separation 과정을 거칠 경우 그 과정에서 유실이 생길 수 있다는 점이 존재한다. 이에 streptavidin-coated bead와 extension product의 binding time, 그리고 washing의 횟수를 조절함에 따라서 최상의 separation이 이루어질 수 있는 조건을 찾고자 하였다.

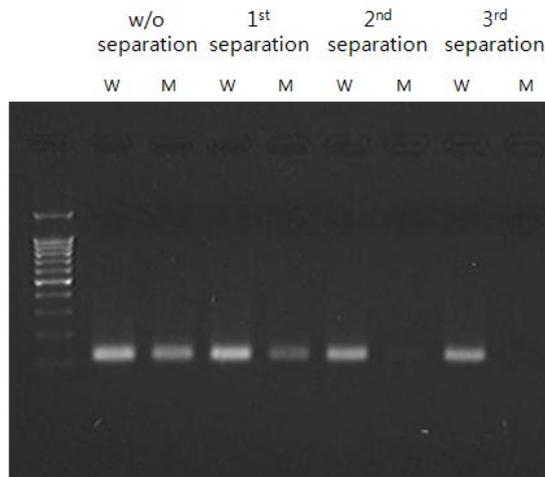
(가) Washing 횟수에 따른 separation

먼저, washing의 횟수를 조절해 본 결과, 2번 이상의 washing 과정을 거쳤을 때 mutant target에서의 signal이 사라지는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 4).

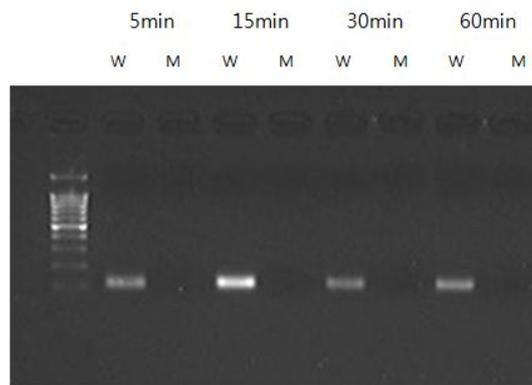
(나) Binding 시간에 따른 separation

Streptavidin-coated bead와 extension product의 binding time을 조절하였을 때에는, 시간에

따라 큰 차이는 보이지 않았으나 15분간 binding을 시켰을 때 결과가 가장 좋은 것을 확인할 수 있었다 (그림 5). 이에 15분간 binding time과 2번의 washing으로 separation 과정을 확립하였다.



< 그림 4 Washing 횟수에 따른 separation 결과 >

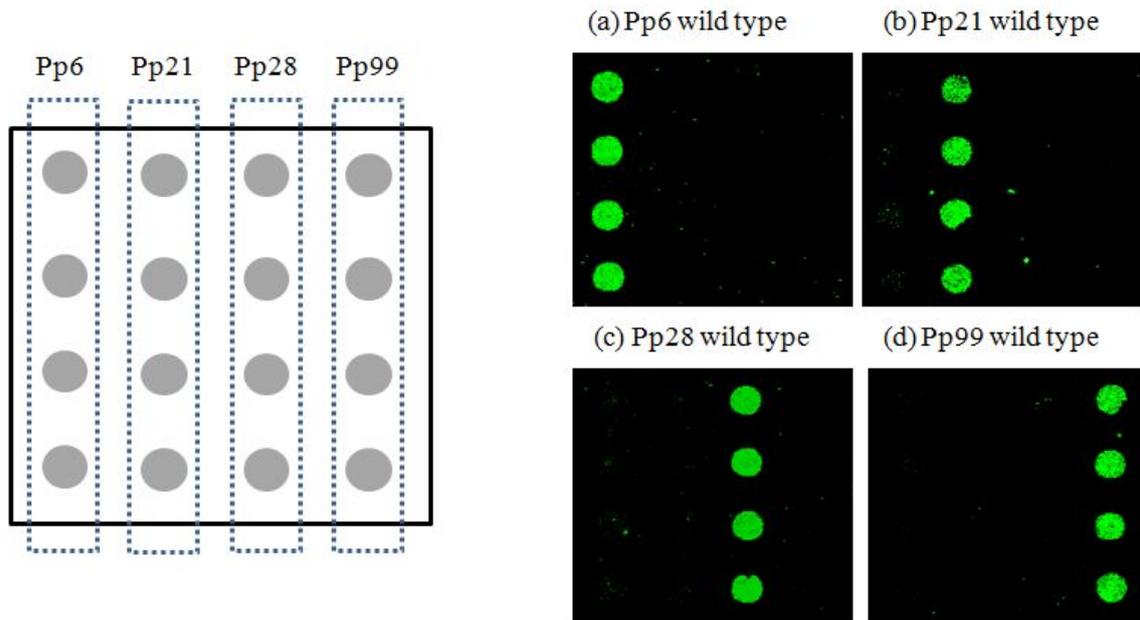


< 그림 5 Binding time에 따른 separation 결과 >

(2) DNA chip test를 통한 최종 검증

(가) DNA chip 테스트

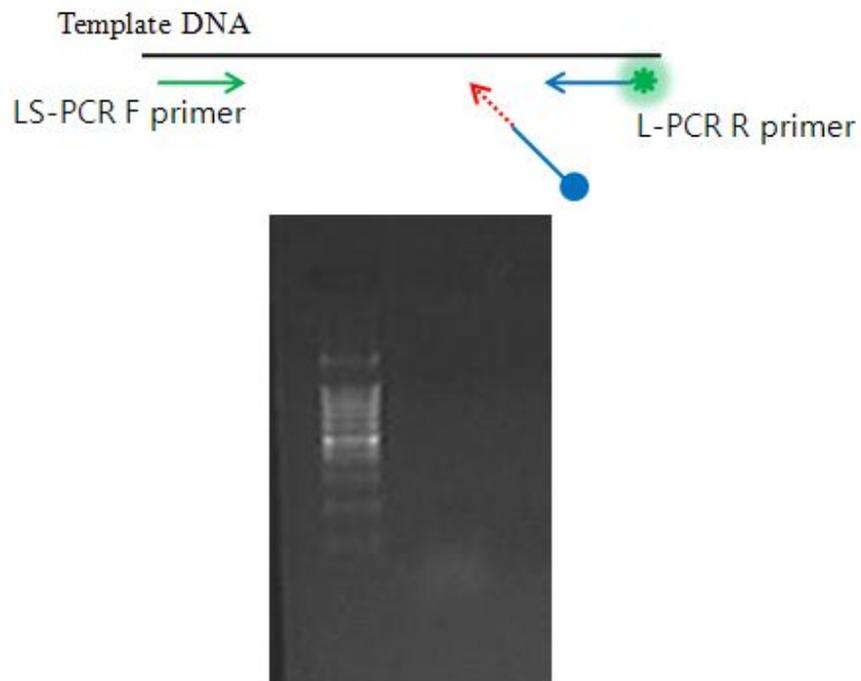
최종적으로 LS-PCR 기술을 사용한 SNP 분석법을 만들 때, DNA chip 형태로 SNP site가 진단이 되게 된다. 이에 LS-PCR 방법이 실제로 칩에서 진행되는 것이 가능한지에 대한 확인을 하기 위해 chip assay를 진행하였다. DNA chip은 한 번에 여러 개의 SNP site를 포함할 수 있도록 설계되었다. Chip assay에 사용한 chip 디자인은 다음과 같다. 테스트를 위해 4종의 샘플을 가지고 chip assay를 실시하였다 (그림 6).



< 그림 6. DNA chip 테스트 >

(나) Universal primer와 probe 테스트

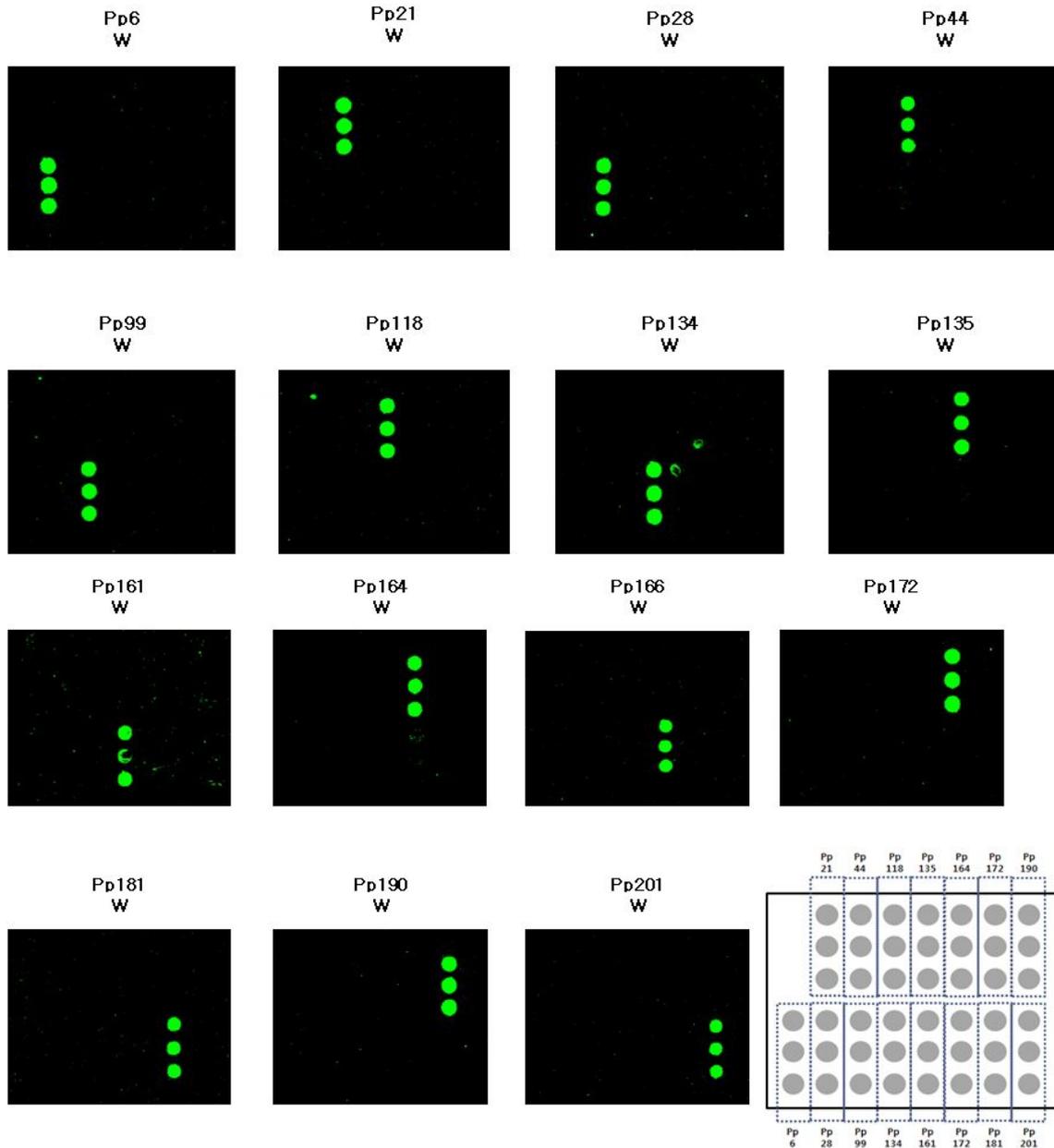
실제 샘플을 가지고 실험하기 전에 비특이적 반응이 일어나지 않는지 확인하기 위해 다음과 같이 universal primer와 probe 테스트를 하였다. 그림 7에서와 같이 probe 1과 probe 2가 없는 조건에서는 비특이적 증폭이 일어나지 않음을 확인하였다.



< 그림 7. Universal primer와 probe 비 특이적 반응 테스트 >

(다) 실제 샘플 DNA chip 테스트

실제 샘플을 가지고 DNA chip 테스트를 실시하였다. 각각의 15종의 샘플을 DNA chip 실험을 통해 확인하였다 (그림 8).



< 그림 8. 실제 샘플 DNA chip 테스트 >

(라) 4종 실제 샘플 DNA chip 테스트

15개의 SNP 마커를 가지고 있는 4종의 샘플을 가지고 DNA chip 테스트를 수행하였다. 4종의 샘플의 유전자형은 다음과 같다 (표 1).

	Pp 6	Pp 21	Pp 28	Pp 44	Pp 99	Pp 118	Pp 134	Pp 135	Pp 161	Pp 164	Pp 166	Pp 172	Pp 181	Pp 190	Pp 201
<i>C. annuum</i> (Perennial)	W	W	M	W	W	W	M	W	M	W	W	W	W	M	M
<i>C. annuum</i> (Demsey)	M	M	W	M	M	M	W	M	W	M	M	M	M	W	W
<i>C. frutescense</i> (Tabasco)	M	W	M	M	M	W	M	W	W	M	M	W	W	M	M
<i>C. chinense</i> (PI 159234)	W	W	M	M	M	W	M	W	M	M	M	M	W	M	M

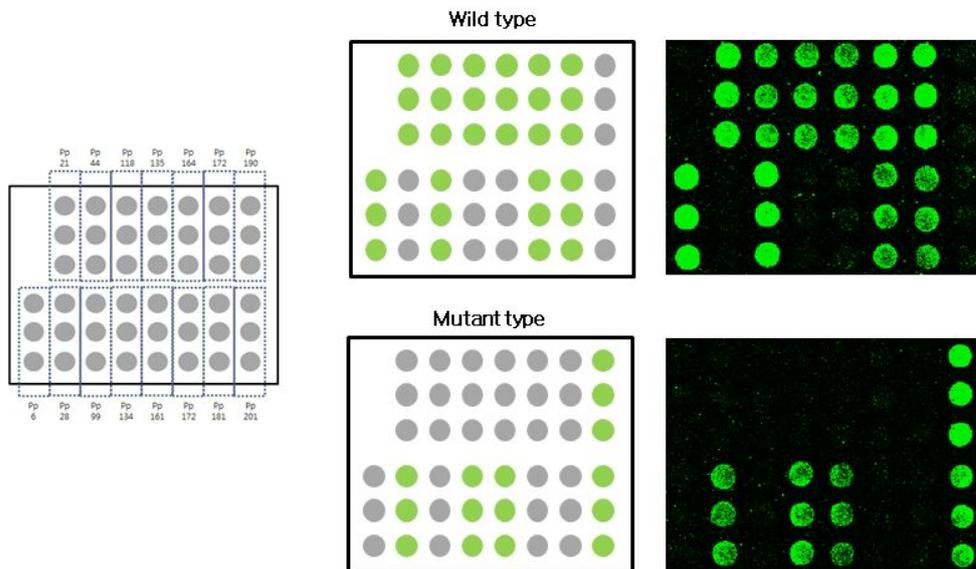
< 표 1. 15개의 단일염기다형성 (SNP)을 가지는 4종의 유전자형 >

① *C. annuum* (Perennial)

C. annuum (Perennial) 샘플을 이용해 DNA chip 실험을 수행한 결과 wild type과 mutant type이 잘 구분됨을 확인할 수 있다 (그림 9-1).

	Pp 6	Pp 21	Pp 28	Pp 44	Pp 99	Pp 118	Pp 134	Pp 135	Pp 161	Pp 164	Pp 166	Pp 172	Pp 181	Pp 190	Pp 201
<i>C. annuum</i> (Perennial)	W	W	M	W	W	W	M	W	M	W	W	W	W	M	M

(a) *C. annuum* (Perennial)



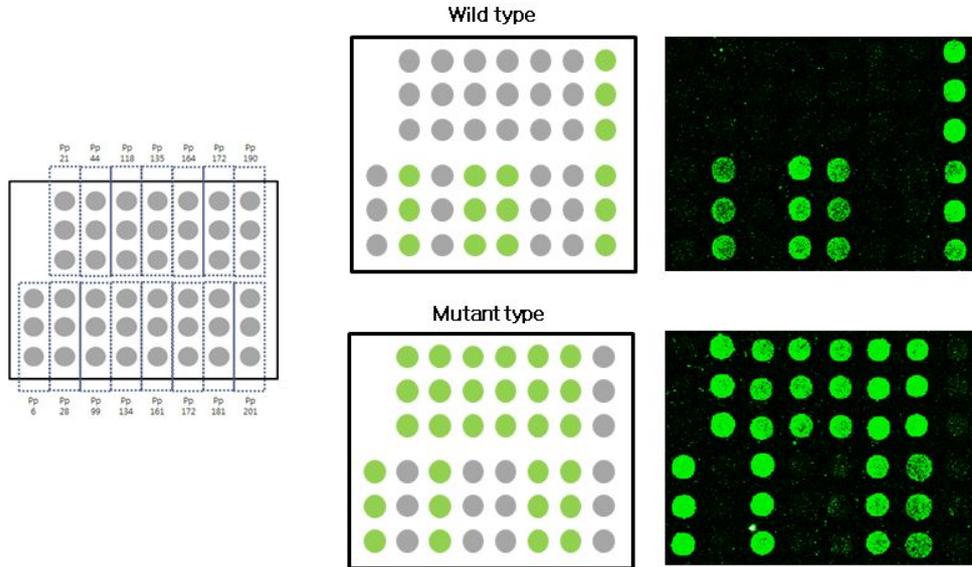
< 그림 9-1. *C. annuum* (Perennial) 샘플 DNA chip 결과 >

② *C. annuum* (Demsey)

C. annuum (Demsey) 샘플을 이용해 DNA chip 실험을 수행한 결과 wild type과 mutant type이 잘 구분됨을 확인할 수 있다 (그림 9-2).

	Pp 6	Pp 21	Pp 28	Pp 44	Pp 99	Pp 118	Pp 134	Pp 135	Pp 161	Pp 164	Pp 166	Pp 172	Pp 181	Pp 190	Pp 201
<i>C. annuum</i> (Demsey)	M	M	W	M	M	M	W	M	W	M	M	M	M	W	W

(b) *C. annuum* (Demsey)



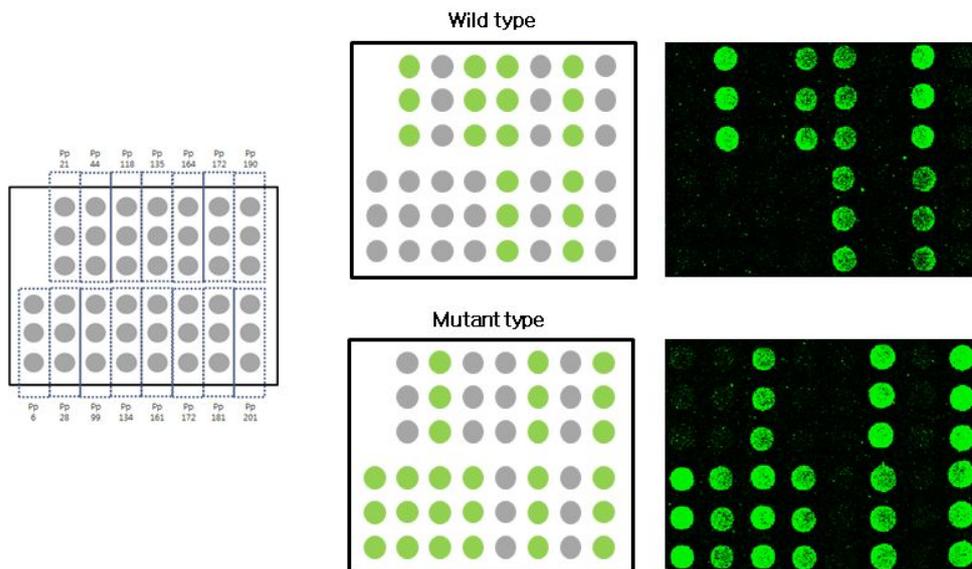
< 그림 9-2. *C. annuum* (Demsey) 샘플 DNA chip 결과 >

③ *C. frutescense* (Tabasco)

C. frutescense (Tabasco) 샘플을 이용해 DNA chip 실험을 수행한 결과 wild type과 mutant type이 잘 구분됨을 확인할 수 있다 (그림 9-3).

	Pp 6	Pp 21	Pp 28	Pp 44	Pp 99	Pp 118	Pp 134	Pp 135	Pp 161	Pp 164	Pp 166	Pp 172	Pp 181	Pp 190	Pp 201
<i>C. frutescense</i> (Tabasco)	M	W	M	M	M	W	M	W	W	M	M	W	W	M	M

(c) *C. frutescense* (Tabasco)



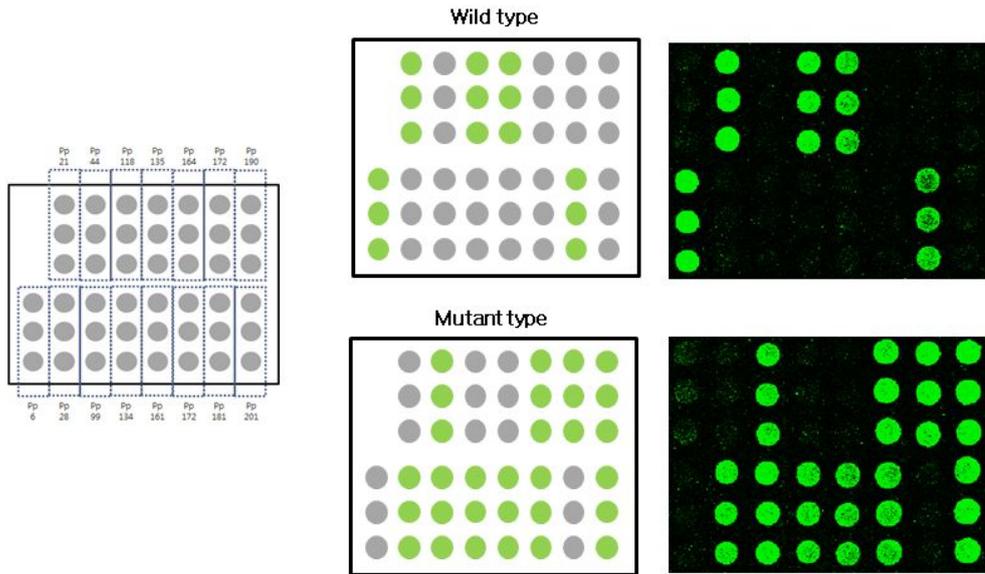
< 그림 9-3. *C. frutescense* (Tabasco) 샘플 DNA chip 결과 >

④ *C. chinense* (PI 159234)

C. chinense (PI 159234) 샘플을 이용해 DNA chip 실험을 수행한 결과 wild type과 mutant type이 잘 구분됨을 확인할 수 있다 (그림 9-4).

	Pp 6	Pp 21	Pp 28	Pp 44	Pp 99	Pp 118	Pp 134	Pp 135	Pp 161	Pp 164	Pp 166	Pp 172	Pp 181	Pp 190	Pp 201
<i>C. chinense</i> (PI 159234)	W	W	M	M	M	W	M	W	M	M	M	M	W	M	M

(d) *C. chinense* (PI 159234)



< 그림 9-4. *C. chinense* (PI 159234) 샘플 DNA chip 결과 >

이 결과는 LS-PCR로 다양한 SNP site에 대한 유전자형 검사가 가능함을 증명한다.

2. 제1협동

가. 국내 쌀 가공품의 외래 품종 혼재 식별을 위한 품종 선정 및 확보

(1) 재료 및 방법

(가) 시험재료

- ① 품종 선정을 위해 국내외 주요 37 품종 (표 1)을 선정하고 이들의 유전적 다양성을 DNA 마커를 이용하여 검정하였다.
- ② 본 시험에 공시된 중국 품종들은 농촌진흥청, 국립품질관리원 등을 통해 수집하였으며 종자 증식이 가능한 품종을 우선적으로 선정하였다.

(나) 유전적 다양성 검정

- ① 식물체 DNA 추출 : CTAB 방법
- ② 분자마커: RM5 등 SSR 마커 35개 , SNP 마커 13점 (표 2)
- ③ PCR 및 유전자형 검정: Panaud et al. (1996)³ 방법 변형 이용

(다) 자료 분석

- ① 분석: 분자마커 별 대립유전자수, 마커별 PIC (polymorphism information content) 값, 품종 간 유전적 거리 (Nei's 방법), UPGMA 방법을 이용한 dendrogram 작성

No.	품종명	원산지	생태형	비고	No.	품종명	원산지	생태형	비고
1	화성벼	한국	자포니카	양질미	20	길생202호	중국	자포니카	
2	일품벼	한국	자포니카	양질미	21	길갱81호	중국	자포니카	
3	주남벼	한국	자포니카	양질미	22	요갱294호	중국	자포니카	
4	호품벼	한국	자포니카	양질미	23	연갱25호	중국	자포니카	
5	화영벼	한국	자포니카	양질미	24	연갱294호	중국	자포니카	
6	삼광벼	한국	자포니카	양질미	25	길갱88호	중국	자포니카	
7	보람찬	한국	자포니카	초다수성	26	통 88-7	중국	자포니카	
8	한아름	한국	자포니카	초다수성	27	요염214	중국	자포니카	
9	드래찬	한국	자포니카	초다수성	28	송갱6호	중국	자포니카	
10	밀양23호	한국	인디카	초다수성	29	요갱8호	중국	자포니카	
11	태백벼	한국	인디카	초다수성	30	공육131	중국	자포니카	
12	다산벼	한국	인디카	초다수성	31	간감도8호	중국	자포니카	
13	안다벼	한국	인디카	초다수성	32	409	중국	자포니카	
14	다산2호	한국	인디카	초다수성	33	용도8호	중국	자포니카	
15	세계진미	한국	인디카	초다수성	34	용갱21호	중국	자포니카	
16	아름	한국	인디카	초다수성	35	오우도4호	중국	자포니카	
17	IR66	IRRI	인디카	인디카	36	동농423호	중국	자포니카	
18	IR64	IRRI	인디카	인디카	37	동농7007호	중국	자포니카	
19	IR72	IRRI	인디카	인디카					

< 표 1. 다양성 검정에 이용된 공시품종 목록 >

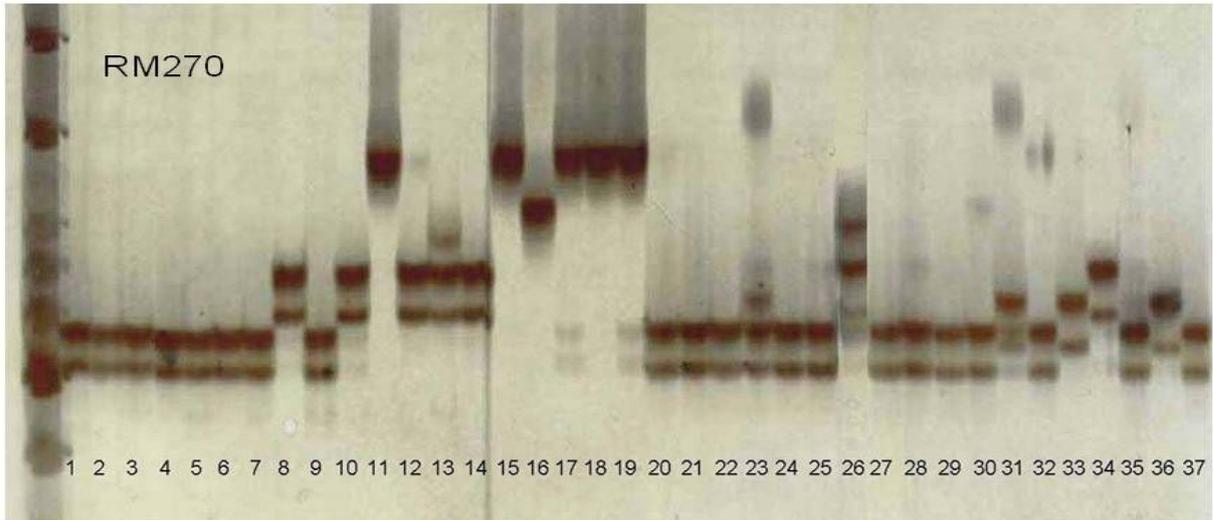
No.	Marker	Chr.	No. of allele	PIC	No.	Marker	Chr.	No. of allele	PIC
1	RM5	1	3	0.35	25	RM258	10	3	0.44
2	RM9	1	6	0.81	26	RM244	10	4	0.49
3	RM81A	1	2	0.31	27	RM271	10	3	0.49
4	RM243	1	5	0.63	28	RN167	11	2	0.38
5	RM259	1	4	0.74	29	RM209	11	4	0.62
6	RM23	1	2	0.42	30	RM332	11	5	0.61
7	RM265	1	3	0.47	31	RM287	11	4	0.53
8	RM315	1	3	0.62	32	RM235	12	6	0.51
9	RM262	2	4	0.66	33	RM20B	12	3	0.45
10	RM207	2	5	0.65	34	RM309	12	2	0.15
11	RM240	2	3	0.41	35	RM270	12	5	0.61
12	RM251	3	2	0.46	36	DK34	1	2	0.39
13	RM135	3	4	0.20	37	DK-63	3	2	0.39
14	RM317	4	3	0.42	38	DK-17	8	2	0.50
15	RM307	4	4	0.40	39	DK-2171	6	2	0.48
16	RM334	5	4	0.53	40	S-5	-	2	0.50
17	RM253	6	5	0.69	41	DK1412	7	2	0.05
18	RM340	6	5	0.55	42	DK2401	7	2	0.34
19	RM180	7	4	0.54	43	DK2708	12	2	0.37
20	RM126	8	4	0.37	44	DK50	11	2	0.27
21	RM223	8	3	0.63	45	DK560	12	2	0.31
22	RM264	8	4	0.71	46	DK2394	7	2	0.31
23	RM278	9	3	0.43	47	S-12	-	2	0.46
24	RM228	10	2	0.35	48	S-13	-	2	0.49
Mean								3.2	0.469

< 표 2. Characteristics of DNA markers used in the study >

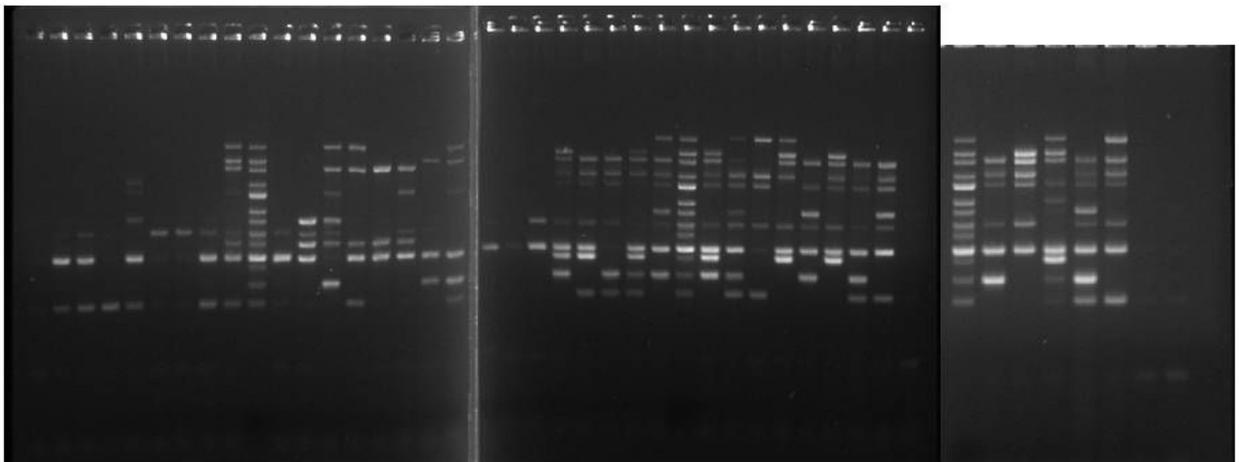
(2) 결과 및 고찰

(가) 품종의 유전적 다양성 검정

공시품종의 DNA를 유묘기에 추출하여 Panaud et al. (1996)³ 방법으로 PCR을 수행하고 silver staining 하여 밴드를 관찰하였다 (그림 1). SNP 마커를 이용하여 PCR을 수행하고 품종간 특이 밴드의 형성 여부를 관찰하였다 (그림 2). SSR 마커의 경우 대립유전자의 수는 2-6개의 분포를 보였고, 이 중 RM9가 품종 판별에 효과적이었는데 6개의 대립유전자를 발생시켰고 PIC 값도 0.81로 가장 높았다. 13개의 SNP 마커는 모두 밴드의 유무로 품종의 판별이 가능하였고 PIC 값은 0.05에서 0.50의 분포를 보였다.



< 그림 1. SSR 마커(RM270)를 이용한 품종의 다형성 탐색 결과 >



1* 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37

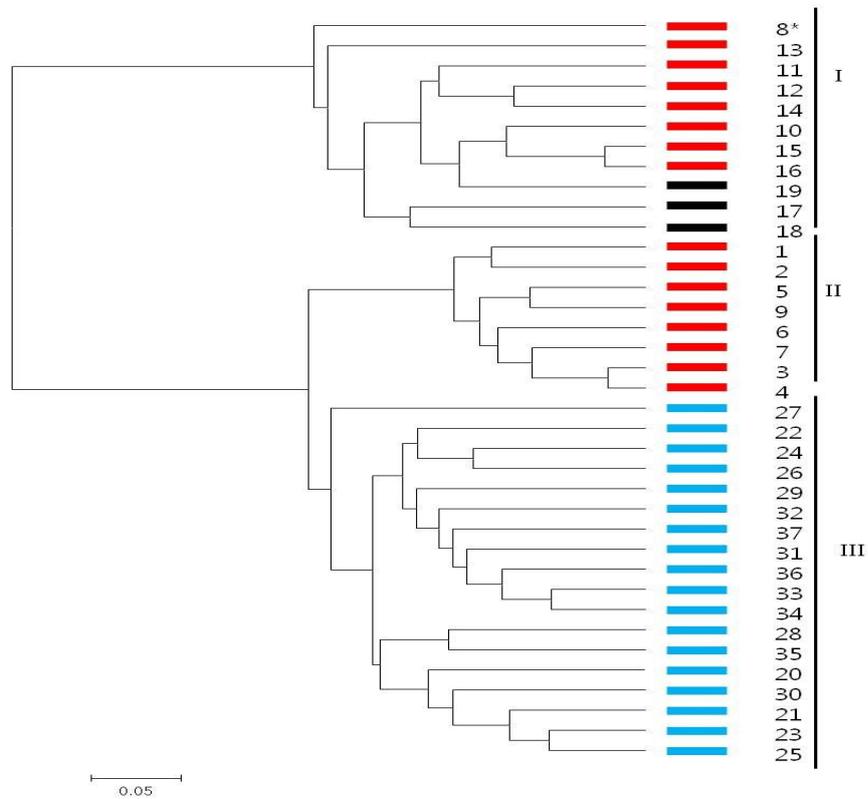
< 그림 2. 13개의 SNP마커를 이용한 품종의 SNP 탐색 결과 *:품종번호 >

(나) 유전적 거리를 이용한 품종군 분류

마커별 밴드의 크기와 유무에 따라 품종을 코드화하고, 이 자료를 이용하여 품종간 유전적 거리를 계산하였다. 품종간 유전적 거리를 이용하여 37개 품종을 분류한 결과, 이들은 크게 3개의 군으로 분류되었다 (그림 3).

I 군에는 안다벼, 다산벼 등 통일형 품종, 초다수성 품종인 한아름, 그리고 IRRI 육성 3품종 등 11품종이 속하였다. II 군에는 국내육성 자포니카 8 품종이 속했으며, 제 III 군에는 중국에서 도입된 18 품종이 속하였다. 중국에서 도입된 18 품종은 국내육성 자포니카 품종과 유사하였고, 인디카 품종들이 속한 I 군과는 다른 양상을 보인 것으로 보아 이들 모두 자포니카 품종으로 판단된다. 그림 3에서와 같이 중국품종들이 국내 육성 양질 자포니카 품종들과 구분이 되는 것으로 보아 중국품종들은 국내 품종과 구별되는 밴드 양상을 보이는 것으로 판단할 수 있으며, 이들 밴드를 이용하여 중국 품종과 국내 품종을 구별할 수 있는 마커 개발이 가능할 것으

로 판단된다. 본 시험에 공시된 중국품종들이 중국의 전체품종을 대표할 수 있는지에 대해서는 추가적인 검토가 필요하다.



< 그림 3. UPGMA법을 이용한 37 품종의 분류. 크게 3개의 군으로 분류됨
*: 품종번호 (품종명은 표 2 참고) >

(다) 품종 판별용 마커 개발

품종 판별에 이용된 마커들 중에서 일부 마커는 중국품종 특이적인 밴드를 발생시켰다. RM315는 몇몇 예외적인 품종을 제외하고 중국품종 특이적 밴드를 그리고 국내육성종 중에서 통일형과 자포니카 품종에 각각 특이적인 밴드를 발생시켰다. SNP 마커 중에서도 SNP-4는 1~2 품종의 예외는 있지만 중국 품종 특이적인 밴드를 발생시켰다. 이들 마커들을 적절하게 조합함으로써 중국품종들의 판별이 가능할 것으로 판단된다.

중국품종과 국내품종의 판별이 가능한 SSR, SNP 마커를 추가적으로 탐지하기 위한 검정을 수행 중에 있다.

나. 선정된 품종의 종자증식

(1) 재료 및 방법

(가) 시험재료

① 선정된 품종 20점: 국내외 품종 각 10점

(나) 포장배치

① 파종기: 2011. 04. 28

② 이앙기(예정): 2011. 05. 30

③ 재식거리 및 재식본수: 30 x 15 cm, 주당 1본

④ 재배관리: 농촌진흥청 표준재배관리법에 준함

⑤ 특성조사: 출수기, 간장, 수장 등 주요 농업적 특성

3. 제2협동

가. 국내산 품종별 SNP 마커 선정을 위한 염기서열 분석

쌀 가공품에서 품종판별용 분석기법을 확립하기 위하여 쌀의 품종 식별을 위한 유전적 다형성을 확보하는 것이 중요하였다. 본 연구에서는 기존에 발표된 쌀 품종식별용 SNP 마커를 활용하였다⁴. 기 발표된 마커들 중 선발된 9개의 국내재배 품종에 대한 polymorphic level 정도를 확인하여 9개의 SNP 마커를 선정하였다 (표 1).

Name		Sequence (5'-3')
DK50	F	TTCAATTCTTACGAACACAACG
DK50	R	AACACCTGTCAAACATCTGATTTA
DK63	F	AATGAGTGTGGCAGTGTGGATT
DK63	R	ACTGCGATGCTCAGGAGTGG
DK1412	F	AGGCTTACCGGATTGGATC
DK1412	R	TAATAGTTGGAGAGTCGAGATATACG
DK2394	F	ATAGATCTTTGTAACCTCAGAAACACA
DK2394	R	AAATGCTCAACAAGTGCTTGG
DK2401	F	CGCTGAACCTAAACACAACCTATCTA
DK2401	R	CCAATTCCTGCGTTTTTCC
DK34	F	ATGTCATGTGGCTTGTCTGG
DK34	R	GCTGCCTATCCAAGAGAACG
DK2171	F	TATGGGACAATGGTTCAAAGG
DK2171	R	CCTTCAACTATATTGATTCCTTCACTACAGAC
DK601	F	GAACCGTTTTACCCCTAGC
DK601	R	ACGACTGGCAAAAACACTGC
DK2511	F	AAGCTCAAGTATAACAATATTGTGGATAC
DK2511	R	TGTTTTAAGCGTGCTGAATCG

< 표 1. 가공농산물의 품종판별을 위한 SNP 마커의 선발 >

(1) 선발된 SNP 마커의 재현성 및 활용도 검증

선발한 9개의 SNP 마커를 이용하여 가공농산물에 대한 품종판별능력을 test하기 위하여 SNP 마커의 primer를 합성하여 PCR 분석을 실시하였다.

(가) 쌀 DNA 추출

시료의 오염을 방지하기 위해, 기름종이에 올려놓고 쌀 1립을 망치를 이용하여 아주 작은 조각으로 분쇄하였다. 분쇄한 시료 (약 30 mg)를 1.5 ml 튜브에 넣고, CTBA 용액 500 μ l를 첨가하여 잘 섞은 후, 65 $^{\circ}$ C 항온 수조에 30분간 담가 둔다. CTAB 용액의 조성은 다음과 같다: DNA 추출 완충액 (Sorbitol 63.75 g, Tris-base 12.1 g, EDTA-Na₂ 1.68 g/1 l)과 핵 용해 완충액 (CTAB 20 g, 1 M Tris (pH 8.0) 200 ml, 0.25 M EDTA 200 ml, 5 M NaCl 400 ml/1 l)을 1:1로 섞고, 0.2 부피 10 % 사르코실, 0.2 부피 식염수, 1 % 2-머르캅토에탄올을 65 $^{\circ}$ C 항

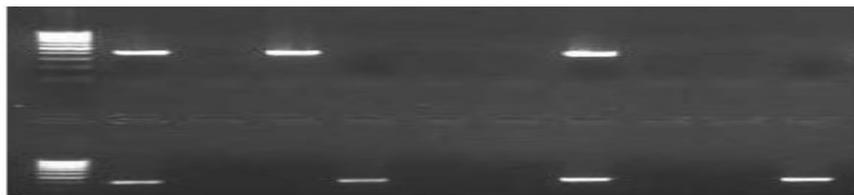
은 수조에서 혼합하였다. 14,240 xg (15,000 rpm)에서 10분 동안 원심분리한 후, 상등액에 3.8 g/l 소듐 바이실레이트 1 부피와 페놀 : 클로로포름 : 이소아밀알콜 (25:24:1) 1 부피를 섞어서 상온에서 5분 동안 방치한 후, 14,240 xg에서 5분 동안 원심분리 한다. 상등액을 1.5 ml 튜브로 옮기고 클로로포름: 이소아밀알콜 (24:1) 1 부피를 섞어서 상온에서 5분 동안 회전시켜 섞어주었다. 14,240 xg에서 5분 동안 원심분리를 하여, 상등액을 1.5 ml 튜브로 옮긴다. 상기의 절차를 경계면이 투명해질 때까지 반복하였다. 동량의 이소프로판올을 넣고 5분 동안 잘 섞어 주고, -20 °C에 20분간 넣어두었다가 4 °C에서 15분 동안 원심분리를 실시하였다. 상등액을 버리고 DNA 펠렛을 70 % 에탄올 200 μ l를 넣어서 4 °C에서 5분 동안 원심분리를 실시하였다. 상등액을 버리고 남은 에탄올을 바람이나 진공 건조기로 건조시켰다. 여기에 멸균 증류수 65 μ l와 RNase A(1 mg/ml) 15 μ l를 넣어 37 °C 수조에 15분 동안 넣어둔 후 DNA를 회수하여 Real-time PCR 반응에 사용하였다.

(나) PCR 분석

PCR 전용 200 μ l-튜브 또는 96 well plate에 검사시료로부터 추출한 template DNA (10 ng/ μ l)를 1 μ l씩 분주 후, PCR 혼합액 (Master mix)을 14 μ l씩 분주하였다. PCR 반응은 94 °C에서 10분간의 DNA 변성(pre-denaturation) 반응 후, 94 °C에서 30초, 각 60 °C에서 30초, 72 °C에서 30초의 일련의 반응을 32 사이클 반복하였다.

(다) PCR 분석 결과

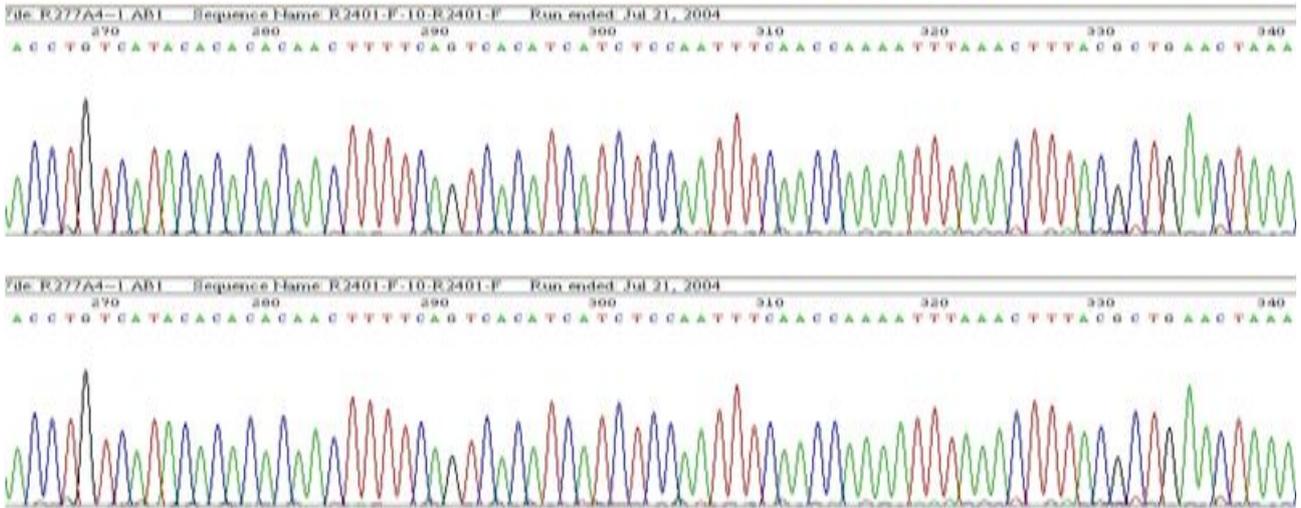
PCR 분석 결과 선발된 마커는 국내 품종식별에 적합한 결과를 보여 주었으며, 밴드의 양상도도 분석이 확연하게 분리됨을 알 수가 있었다 (그림 1).



< 그림 1. 선발된 SNP마커를 이용한 국내품종에 대한 PCR 결과 (DK600 예시) >

(2) 선발된 SNP 마커 염기서열 분석을 통한 검증

기 선발된 마커의 유전정보의 확인을 위하여 염기서열 분석을 실시하였다. AB3730xl(미국) 기기를 사용하여 direct sequencing을 실시하였으며 (그림 2), 염기서열 분석결과를 DNASTAR software를 사용하여 alignment후 마커를 이용한 품종간의 염기서열변화를 확인하였다 (그림 3). 염기서열 분석 결과 품종간의 polymorphism을 보이는 SNP위치를 확인할 수 있었으며, 각 마커의 염기서열 정보를 확인할 수 있었다.



< 그림 2. Direct sequencing 결과(DK2401 예시) >



< 그림 3. 염기서열 분석 후 data의 alignment로 SNP위치 확인 결과(DK2401 예시) >

나. 선정된 SNP마커의 품종간 상동성, 특이성 및 연관성 분석

(1) 선발된 SNP 마커의 Blast search를 통한 homology test

SNP 마커의 염기서열 분석 결과를 NCBI의 Blast search를 통하여 NCBI 데이터베이스의 쌀 계통 염기서열 정보를 확인하였으며 (그림 4), 각각의 마커별 BAC clone위치와 존재하는 염색체 번호 및 유전적 거리(cM)를 확인하였다 (표 2).

(3) SNP 마커를 이용한 품종별 유전적 연관성 분석

(가) 선발된 마커의 polymorphic level 분석

선발된 9개의 마커별 polymorphic 수준을 확인하기 위하여 GeneAlex program을 이용하여 마커별 다형성 수준을 분석하였다. 분석결과 Shannone's information index가 0.202에서 0.337의 결과를 보여 주었으며 평균적으로 0.277의 결과를 보여주었다. 시료의 size, allele 균등성등을 고려하여 Dominant allele값을 가지는 biodiversity 측정에 유용하게 사용되는 Shannone's information index (I)결과 선발된 마커는 향후 유전적 다형성분석에 용이하게 사용될 수 있는 결과치를 보여 주었다.

$$I = - \sum p_i \ln p_i$$

No. Loci 9
 No. Samples 9
 No. Pops. 1

Locus	Band Fre	p	q	N	Na	Ne	I	He	UHe
DK2394	0.100	0.051	0.949	10.000	2.000	1.108	0.202	0.097	0.102
DK50	0.200	0.106	0.894	10.000	2.000	1.233	0.337	0.189	0.199
DK2401	0.200	0.106	0.894	10.000	2.000	1.233	0.337	0.189	0.199
DK1412	0.200	0.106	0.894	10.000	2.000	1.233	0.337	0.189	0.199
DK34	0.200	0.106	0.894	10.000	2.000	1.233	0.337	0.189	0.199
DK63	0.100	0.051	0.949	10.000	2.000	1.108	0.202	0.097	0.102
DK2171	0.100	0.051	0.949	10.000	2.000	1.108	0.202	0.097	0.102
DK601	0.200	0.106	0.894	10.000	2.000	1.233	0.337	0.189	0.199
DK2511	0.100	0.051	0.949	10.000	2.000	1.108	0.202	0.097	0.102

	N	Na	Ne	I	He	UHe
Mean	10.000	2.000	1.177	0.277	0.148	0.156
SE	0.000	0.000	0.022	0.024	0.016	0.017

Na = No. of Different Alleles
 Ne = No. of Effective Alleles = 1 / (p² + q²)
 I = Shannon's Information Index = -1 * (p * Ln(p) + q * Ln(q))
 He = Expected Heterozygosity = 2 * p * q
 UHe = Unbiased Expected Heterozygosity = (2N / (2N-1)) * He
 Where for Diploid Binary data and assuming Hardy-Weinberg Equilibrium, q = (1 - Band Freq)^{0.5} and p = 1 - q.

< 표 3. 마커별 Allele frequency와 Shannone's information index 결과 >

(나) 선발된 마커의 Genetic distance 분석

선발한 품종의 유전적 연관성을 분석하기 위하여 Jaccard 분석법을 사용한 genetic distance와 Phylogenetic tree 분석을 실시하였다. Phylogenetic tree는 1-Jaccard 값을 이용하여 UPGMA 프로그램을 사용하였으며 bootstrap value는 1,000을 실시하였다.

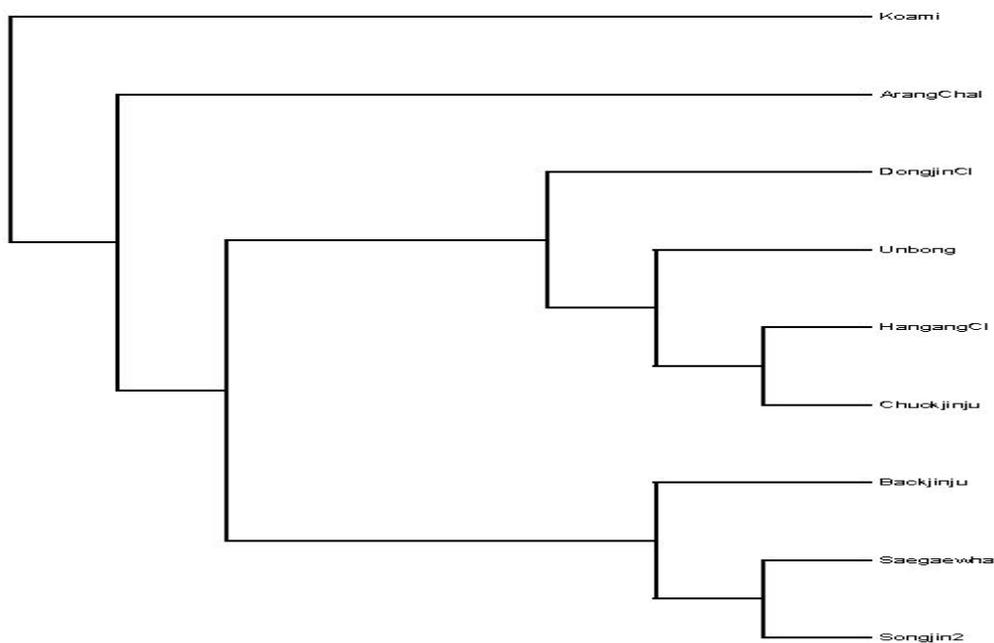
Jaccards coefficient (SJ)⁵ ; SJ(ij) = A/(A+B+C)

Jaccard 분석법을 사용한 품종간의 유전적 연관 분석에서 동진찰과 고아미에서 0.66%의 유전적 유사성을 보여 주었으며, 아랑향찰과 고아미 사이에서는 0.33%의 유사성을 보여주었다. 나머지 품종간에는 유전적 유사성이 나타나지 않았다 (표 4).

Phylogenic tree 결과는 고아미와 다른 품종간에 확연한 다른 결과를 보여 주었으며, 고아미를 제외한 품종에서 아랑향찰이 유전적 거리가 차이가 있음을 알 수가 있었다 (그림 5).

	Koami	Songjin2	Dongjinchal	Backjinju	Saegaewha	Aranghyangchal	Unbong	Chuckjinju	Hangangchal
Koami	1.000000								
Songjin2	0.000000	1.000000							
Dongjinchal	0.666667	0.000000	1.000000						
Backjinju	0.000000	0.000000	0.000000	1.000000					
Saegaewha	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	1.000000				
Aranghyangchal	0.333333	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	1.000000			
Unbong	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	1.000000		
Chuckjinju	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	1.000000	
Hangangchal	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	0.000000	1.000000

< 표 4. 각 품종별 Genetic distance 분석 >



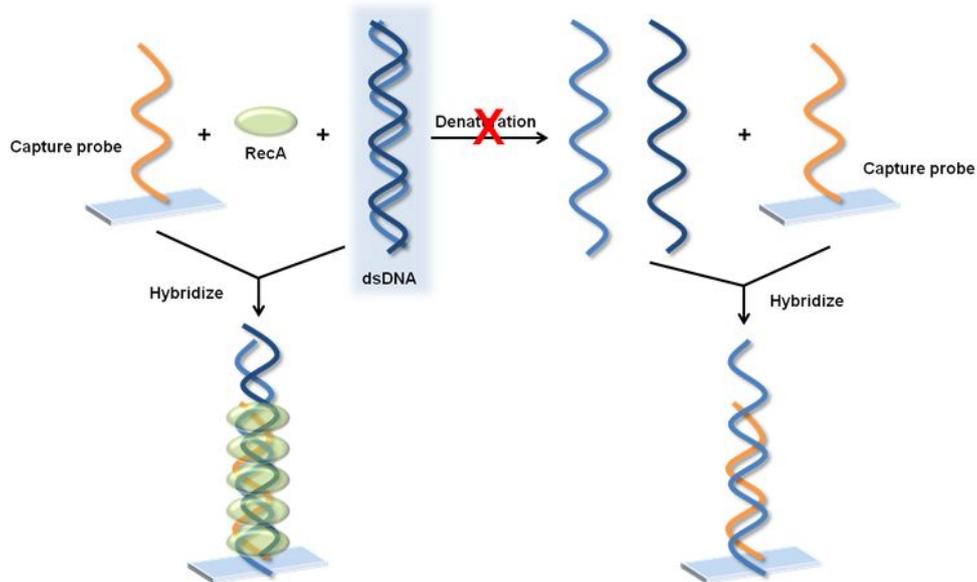
< 그림 5. 품종별 유전적 연관분석을 위한 Phylogenic tree 결과 >

제 2 절 2차년도 연구개발수행 내용 및 결과

1. 제1세부

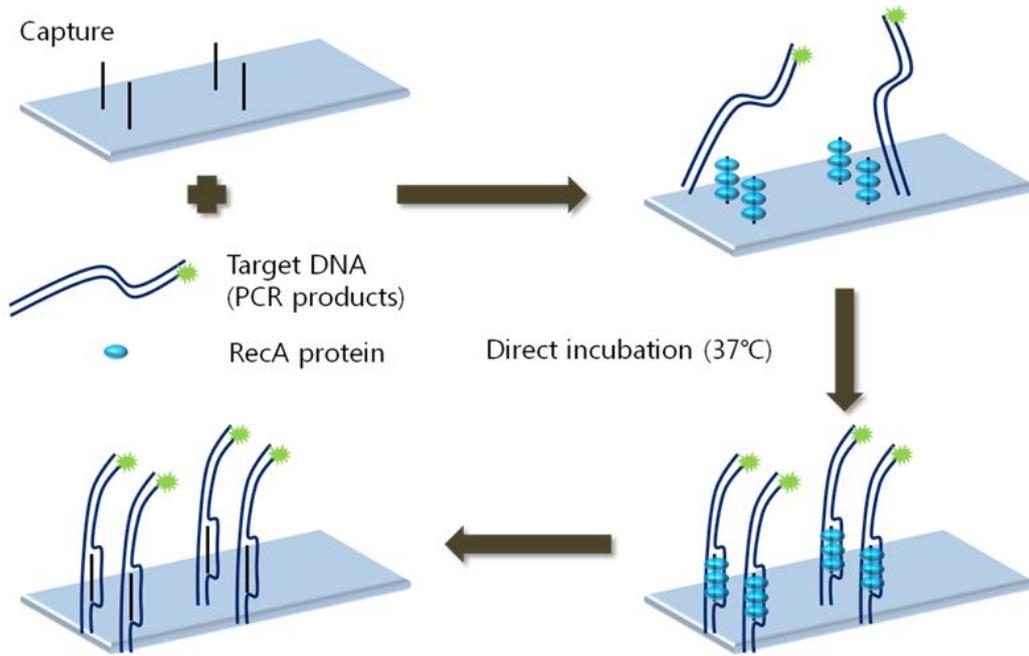
가. DNA chip의 hybridization 조건 최적화

(1) RecA Assisted Hybridization (RAH) 기술 개요



<그림 1. RecA를 사용한 dsDNA 혼성화 방법과 변성과정 (denaturation)을 필요로 하는 기존의 혼성화 방법 비교>

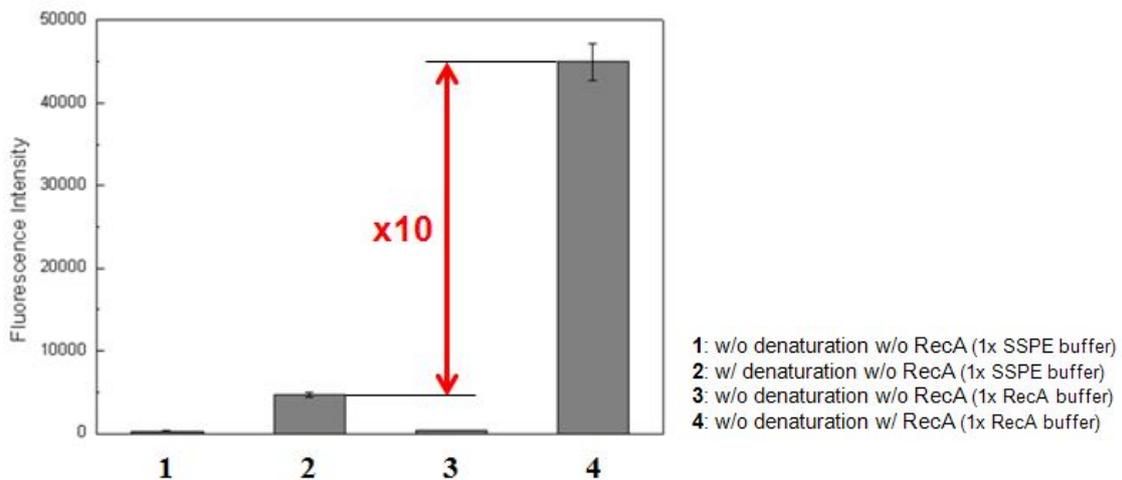
본 연구에서는 변성단계를 거치지 않고 이중가닥 목적 DNA를 탐침에 혼성화 시키기 위해서 RecA 단백질을 사용하였다. RecA 단백질은 이중가닥 목적 DNA를 단일가닥으로 만들어서 탐침과 혼성화 시키는 것이 아니라 RecA 단백질이 단일가닥으로 되어있는 탐침과 결합함으로써, 탐침과 상보적인 DNA 가닥을 가진 목적 DNA와 혼성화 결합할 수 있도록 하는 것이다. 이러한 특성을 가지고 있는 RecA 단백질을 사용하게 되면 변성과정을 거치는 기존의 혼성화 방법과는 달리 온도를 높여주고 낮춰주는 과정을 생략할 수 있기 때문에 분석 시간이 단축되고 분석 절차가 간편하다는 장점이 있다 (그림 1).



< 그림 2. RecA Assisted Hybridization (RAH) 개략도 >

그림 2는 RecA 단백질이 단일가닥 탐침 DNA와 결합함으로써 상보적인 목적 DNA의 변성과 정 없이 이중가닥 형태에서도 목적 DNA를 혼성화 결합하는 과정을 보여주는 개략도이다. RecA 단백질을 목적 DNA와 섞어서 슬라이드글라스 위에 가한 후 1시간 정도 포획탐침 DNA와 결합할 수 있도록 한다. 목적 DNA의 혼성화 정도를 확인하기 위해서 목적 DNA에 형광을 달아 형광의 세기를 측정해 혼성화 정도를 확인했다.

(2) RecA Assisted Hybridization (RAH) 기술과 기존의 hybridization 기술 비교



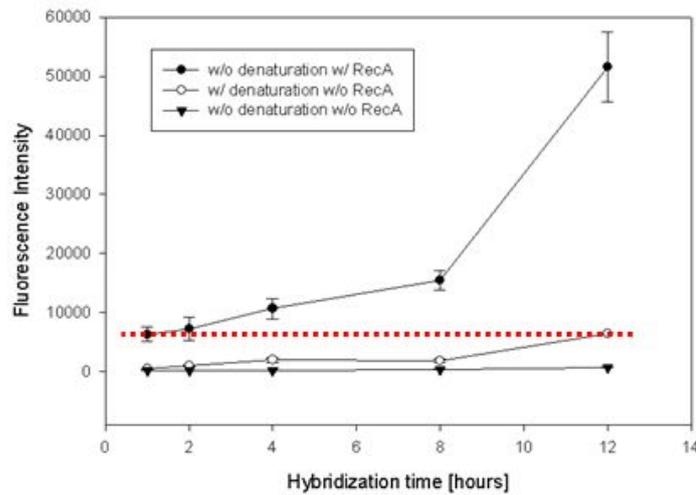
< 그림 3. RAH 기술과 기존의 혼성화 기술 비교 >

RAH 기술과 기존의 혼성화 방법을 비교하기 위한 실험을 수행하였다. PCR을 수행한 목적 DNA를 4가지 조건으로 DNA chip에서 12시간 동안 혼성화 반응을 보냈다. 그림 3의 1번과 3 번은 두 종류의 buffer에서 변성과정을 거치지 않고 RecA 단백질도 존재하지 않는 경우의 결

과이고, 2번은 변성 과정을 거쳐 목적 DNA를 혼성화시키는 기존의 DNA chip 혼성화 방법을 사용한 결과이다. 그리고 4번은 변성과정을 거치지 않고 RecA 단백질을 사용해서 목적 DNA를 DNA chip에 혼성화시킨 결과이다. 그림 3에서 볼 수 있듯이 본 연구진이 개발한 혼성화 기술을 기존의 DNA Chip 혼성화 기술보다 약 10배 정도 향상된 형광 신호를 나타냈다. 따라서 RAH 기술을 사용하면 보다 짧은 시간동안 목적 DNA를 혼성화시키더라도 기존의 방법과 비슷한 신호의 세기를 관찰 할 수 있을 것으로 판단하여 혼성화 시간에 대한 최적화 실험을 수행하였다.

(3) RecA Assisted Hybridization (RAH) 기술 최적화

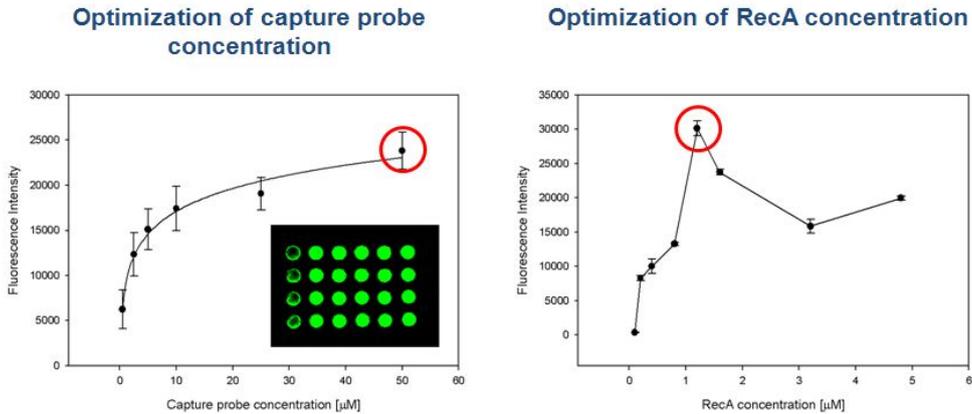
(가) 혼성화 시간 최적화



< 그림 4. 혼성화 시간 최적화 실험 >

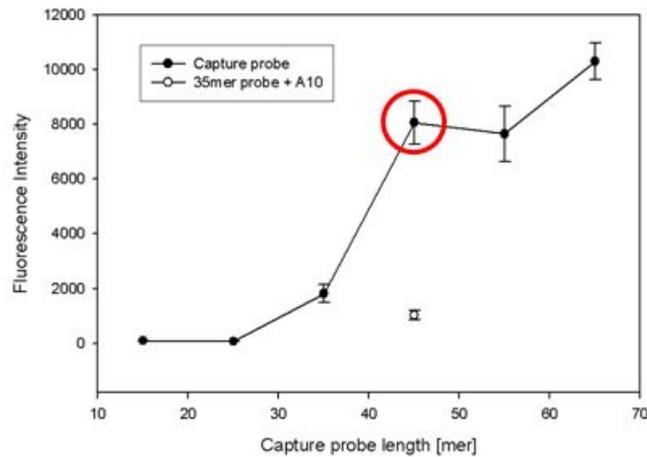
그림 4에 나타난 바와 같이, 기존의 혼성화 기술로 12시간동안 혼성화 반응을 진행했을 때 관찰된 형광 신호의 세기와 비슷한 세기의 형광 신호가 RecA 단백질을 사용하여 1시간 동안 반응시켰을 경우에도 관찰되었다. 결론적으로, 혼성화 시간을 기존의 12시간에서 1시간으로 획기적으로 단축함으로써 DNA chip 기술의 가장 큰 단점이라고 할 수 있는 분석시간 문제를 해결할 수 있게 되었다. 또한 RAH 기술은 민감도를 크게 향상시킬 수 있기 때문에 소량의 DNA를 분석해야 하는 실험에도 적용할 수 있으며 혼성화 반응을 필요로 하는 모든 기술에 광범위하게 사용될 수 있다.

(나) RecA 농도 및 캡처 탐침 최적화



< 그림 5. RecA 및 Capture probe 농도 최적화 실험 >

RecA 단백질이 기능을 하기 위해서는 입체장애 (steric hindrance)를 최소화 하는 것이 좋다고 판단하여 캡처탐침의 농도를 일반적으로 사용되는 50 uM부터 2 uM까지 낮추어서 실험을 수행하였다. 하지만 그림 5의 왼쪽 그래프에서 보듯이 일반적으로 사용되는 50 uM농도에서 가장 좋은 효율을 보였으며, 입체장애는 큰 문제가 되지 않았다. 따라서 캡처탐침의 농도는 일반적으로 사용되는 50 uM 농도로 정했다. 또한 RecA 단백질의 농도에 따른 형광 신호의 세기도 측정하였으며 적정 농도는 가장 높은 형광 신호의 세기를 보인 1.2 uM로 결정되었다.

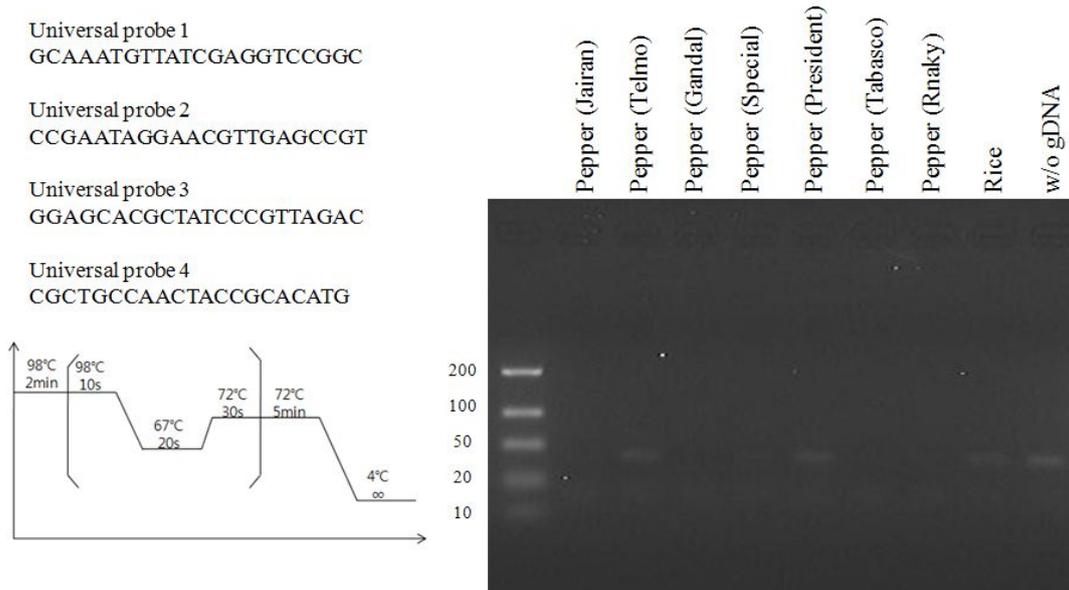


< 그림 6. Capture probe 길이 최적화 >

마지막으로 캡처탐침의 길이에 따른 형광신호를 측정하였다. RecA 단백질은 30 mer이상의 단일가닥 DNA에서 필라멘트를 형성하는 것으로 알려져 있다. 따라서 15 mer, 25 mer의 캡처탐침을 사용했을 경우 혼성화 반응이 잘 되지 않는 것을 알 수 있다. 35 mer 부터는 RecA 단백질이 기능을 수행하여 혼성화 반응이 잘 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 45 mer 이상에서는

비슷한 효율을 보였기 때문에 캡처탐침의 길이를 45 mer로 결정하였다. 흥미로운 점은 35 mer의 캡처탐침 끝에 poly A를 달아서 실험을 했을 경우에는 RecA 단백질의 효과가 현저히 떨어지는 결과를 보였다는 것이다. 이를 통해 RecA 단백질이 단일가닥 DNA와 필라멘트를 잘 형성하더라도 형성된 필라멘트 전체 부분이 목적 DNA와 상보적이지 않으면 혼성화 반응이 잘 이루어지지 않는다는 것을 알 수 있었다.

나. 유전자 마커 분석에 사용될 universal primer 선정

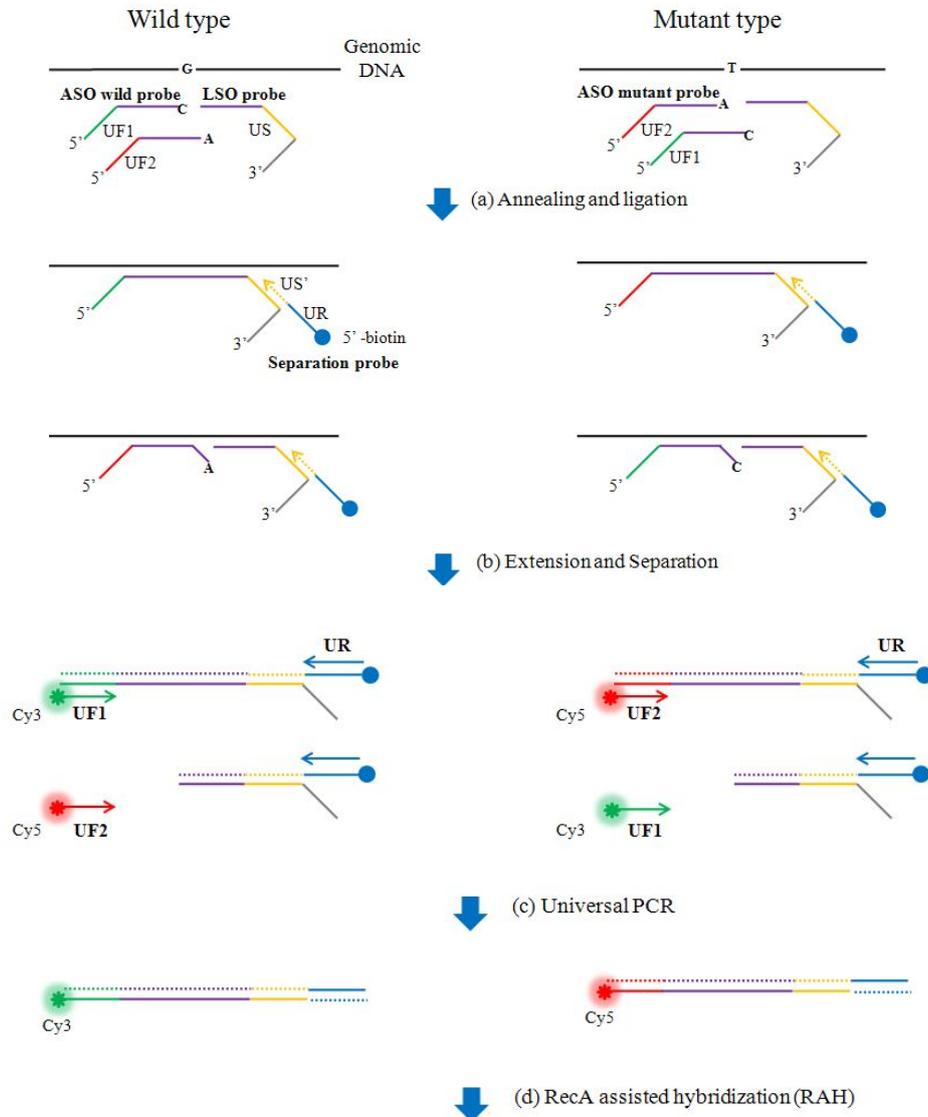


< 그림 7. Universal probe들의 비특이적 증폭 실험 >

1차년도에 사용한 세 종류의 universal sequence에 한 종류를 추가해서 네 종류의 universal probe를 넣고 PCR을 수행하였다. 결과에서 보듯이 고추와 쌀에서 비특이적으로 증폭된 PCR 산물이 관찰되지 않았으며, primer dimer 또한 거의 발생하지 않았다. 따라서 이상 4 종류의 universal sequence를 사용해 쌀 품종 식별을 위한 probe를 제작하기로 결정했다.

다. 각각의 SNP site에 해당하는 probe 디자인

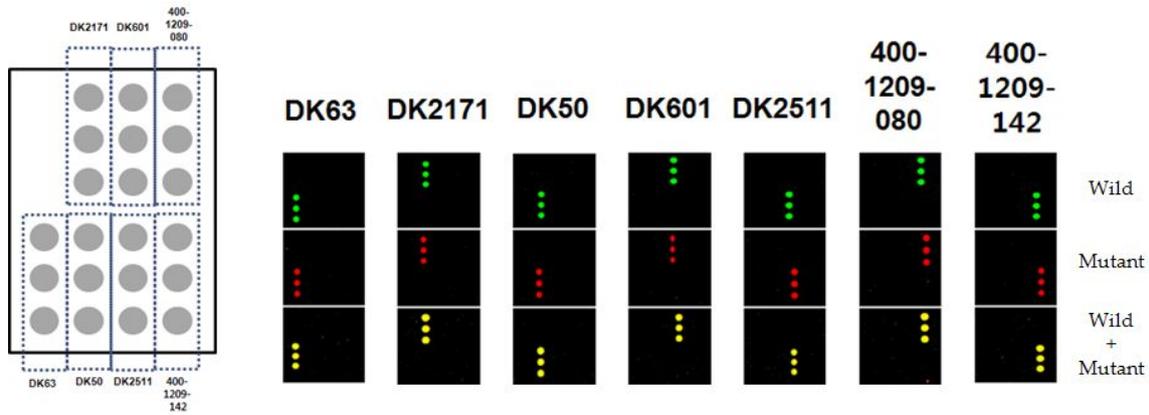
(1) LS-PCR 기술 단점 보완



< 그림 8. 기존 LS-PCR 기술의 단점 보완을 통한 DNA Chip SNP 마커 분석 기술 >

1차 년도에 개발한 LS-PCR 기술은 실제 샘플을 분석하기 위해서 두 개의 튜브에서 LS-PCR 을 수행하고 두 개의 DNA chip에서 실험을 수행해야 했다. 만약 wild type과 mutant type의 목적 DNA를 하나의 튜브와 하나의 DNA chip에서 분석할 수 있다면 비용을 절반으로 줄일 수 있다. 이에 본 연구진은 기존의 LS-PCR 기술을 수정하여 하나의 튜브와 하나의 DNA chip 에서 동시에 두 종류의 genotype을 분석할 수 있도록 했다. 수정된 실험 방법에서는 universal forward 프라이머1 (UF1)을 포함하고 있는 ASO wild probe와 universal forward 프라이머2 (UF2)를 포함하고 있는 ASO mutant probe를 하나의 튜브에서 LSO probe와 동시에 반응시킨다. 만약 목적 DNA가 wild type일 경우에는 ASO wild probe가 LSO probe과 ligation되어 결과적으로 Cy3가 표지된 PCR 산물이 만들어지고, 반대로 목적 DNA가 mutant type일 경우에

는 ASO mutant probe가 LSO probe와 ligation되어 Cy5가 표지된 PCR 산물이 만들어진다. 목적 DNA의 genotype에 따라 각기 다른 형광 물질이 표지된 PCR 산물이 생성되기 때문에 하나의 DNA chip으로 분석이 가능하다. 또한 1차 년도와는 다르게 2차 년도에 개발한 RAH 기술을 사용해 DNA chip 혼성화 반응을 수행하였다.



< 그림 9. DNA Chip을 통해 최종 선정된 probe 검증 >

제1협동과 제2협동의 연구를 통해 최종적으로 선정된 7개의 SNP 마커에 대한 probe를 제작하고 1차년도와 마찬가지로 DNA chip을 통해 최종적으로 검증하였다. 목적 DNA가 wild type인 경우에는 Cy3신호, mutant type인 경우에는 Cy5 신호, wild type과 mutant type이 혼재되어 있는 경우에는 Cy3와 Cy5 신호가 동시에 나와서 노란색인 결과를 관찰할 수 있었다. 2차년도에는 7개의 SNP 마커에 대한 genotype 분석에 필요한 probe들을 성공적으로 선정하였으며, 이를 토대로 3차년도에 실제 쌀 가공품의 genotype을 분석하는 실험을 수행 할 계획이다.

2. 제1협동

가. 국내 쌀 가공품의 외래 품종 혼재 식별을 위한 품종 선정 및 확보

(1) 재료 및 방법

(가) 시험재료

- ① 품종 선정을 위해 국내 및 중국. 주요 38 품종 (Table 1)을 선정하고 이들의 유전적 다양성을 DNA 마커를 이용하여 검정하였다.
- ② 본 시험에 공시된 중국 품종들은 농촌진흥청, 국립품질관리원 등을 통해 수집하였다.

(나) 유전적다양성 검정

- ① 식물체 DNA 추출 : CTAB 방법
- ② 분자마커: RM5 등 SSR 마커 47개 (Table 2) , SNP 마커 13점 (Table 3)
- ③ PCR 및 유전자형 검정: Panaud et al. (1996)³ 방법 변형 이용

(다) 자료 분석

- ① 분석 : 분자마커 별 대립유전자수, 마커별 PIC (polymorphism information content) 값, 품종간 유전적거리 (Nei's 방법), UPGMA 방법을 이용한 dendrogram 작성

< Table 1. List of rice accessions used in this study. >

No.	Accession	Origin	Group*	No.	Accession	Origin	Group*
1	Hwaseongbyeo	Korea	II-1	20	Jisheng 202	China(Jilin)	II-2
2	Ilpumbyeo	Korea	II-1	21	Jijing 81	China(Jilin)	II-2
3	Joonambyeo	Korea	II-1	22	Liaojing 294	China(Liaoning)	II-1
4	Hopumbyeo	Korea	II-1	23	Yanjing 25	China(Jilin)	II-2
5	Hwayeongbyeo	Korea	II-1	24	Yanjing 294	China(Jilin)	II-3
6	Samgwangbyeo	Korea	II-1	25	Jijing 88	China(Jilin)	II-2
7	Boramchan	Korea	II-1	26	Tong 88-7	China(Jilin)	II-3
8	Hanareum	Korea	I	27	Songjing 10	China(Jilin)	II-2
9	Deurecham	Korea	II-1	28	Liaoyan 214	China(Liaoning)	II-1
10	Milyang23	Korea	I	29	Songjing 6	China(Heilongjiang)	II-2
11	Taebaegbyeo	Korea	I	30	Liaojing 8	China(Liaoning)	II-2
12	Dasanbyeo	Korea	I	31	Kongyu 131	China(Heilongjiang)	II-2
13	Andabyeo	Korea	I	32	Kenjiandao 8	China(Heilongjiang)	II-2
14	Dasan2	Korea	I	33	Dongnong 409	China(Heilongjiang)	II-3
15	Segyejinmee	Korea	I	34	Longdao 8	China(Heilongjiang)	II-2
16	Areum	Korea	I	35	Longjing 21	China(Heilongjiang)	II-5
17	IR66	IRRI	I	36	Wuyoudao 4	China(Heilongjiang)	II-6
18	IR64	IRRI	I	37	Dongnong 423	China(Heilongjiang)	II-4
19	IR72	IRRI	I	38	Dongnong 7007	China(Heilongjiang)	II-4

* Refer to Fig. 2 for group.

< Table 2. Allele number and PIC value of microsatellite markers in 38 accessions. >

No.	Marker	Chr.	Allele no.	PIC	No.	Marker	Chr.	Allele no.	PIC
1	RM84	1	3	0.4	25	RM274	5	2	0.13
2	RM240	2	3	0.3	26	RM265	1	2	0.35
3	RM180	7	2	0.35	27	RM5	1	4	0.5
4	RM253	6	5	0.62	28	RM81A	3	3	0.22
5	RM270	12	5	0.57	29	RM345	6	3	0.45
6	RM223	8	5	0.66	30	RM231	3	5	0.43
7	RM264	8	5	0.68	31	RM495	1	2	0.37
8	RM258	10	3	0.36	32	RM444	9	4	0.41
9	RM278	9	3	0.36	33	RM629	7	4	0.56
10	RM332	11	5	0.52	34	RM434	9	2	0.33
11	RM263	2	5	0.62	35	RM502	8	3	0.43
12	RM6	2	3	0.27	36	RM234	7	6	0.59
13	RM13	5	3	0.4	37	RM146	5	2	0.35
14	RM153	5	3	0.55	38	RM228	10	3	0.58
15	RM237	1	4	0.48	39	12LESSR-1*	12	6	0.76
16	RM185	4	2	0.14	40	RM409	9	2	0.05
17	RM127	4	3	0.38	41	RM571	3	4	0.48
18	RM291	5	2	0.36	42	RM210	8	4	0.41
19	RM211	2	3	0.33	43	RM247	12	4	0.46
20	RM177	4	2	0.37	44	RM232	3	3	0.15
21	RM341	2	4	0.48	45	RM220	1	4	0.6
22	RM169	5	2	0.37	46	RM17	12	4	0.48
23	RM266	2	9	0.79	47	RM1	1	4	0.61
24	RM261	4	5	0.1					
Total			169	20.6	Mean			3.6	0.44

* 12LESSR-1: Chromosome 12 딸단 AL928780 BAC clone에 속함.

Forward: 5'CTATCTTAGGTGTTATGGTGTAT3',

Reverse: 5'AAGCAGCAGCAGAAGCAGCAC3'

< Table 3. Characteristics of SNP markers used in the study. >

No.	Marker	Chr.	No. of allele	PIC	No.	Marker	Chr.	No. of allele	PIC
1	DK-34	1	2	0.39	8	DK2708	12	2	0.37
2	DK-63	3	2	0.39	9	DK50	11	2	0.27
3	DK-17	8	2	0.50	10	DK560	12	2	0.31
4	DK-2171	6	2	0.48	11	DK2394	7	2	0.31
5	S-5	-	2	0.50	12	S-12	-	2	0.46
6	DK1412	7	2	0.05	13	S-13	-	2	0.49
7	DK2401	7	2	0.34	Mean		11	3.2	0.469

(2) 결과 및 고찰

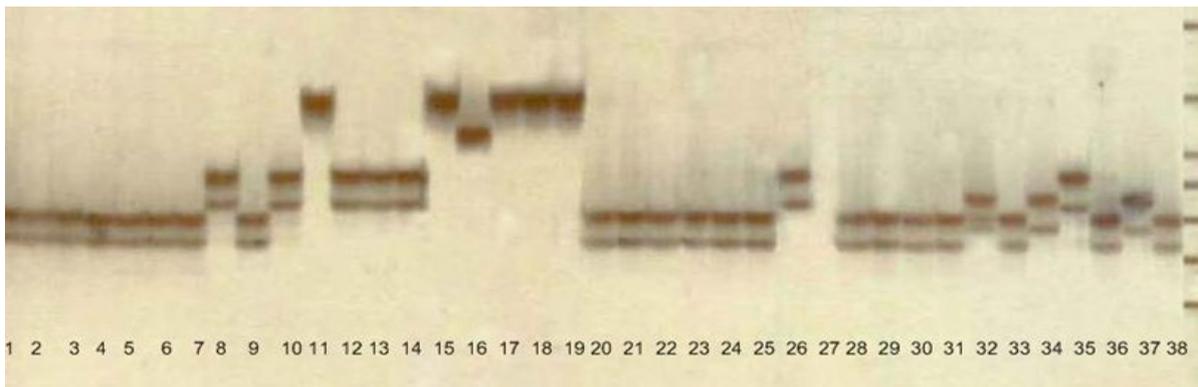
(가) 품종의 유전적 다양성 검정

공시품종의 DNA를 유표기에 추출하여 Panaud et al. (1996)³ 방법으로 PCR을 수행하고 silver staining 하여 밴드를 관찰하였다. 그리고 SNP 마커를 이용하여 PCR을 수행하고 품종간 특이 밴드의 형성 여부를 관찰하였다 (Fig. 1). SSR 마커의 경우 전체 169개의 allele이 탐지되었고 마커별로 allele이 2-9개 분포를 보였으며, 평균 allele 수는 3.6개임을 확인하였다. RM266는 9개의 allele을, RM234, 12LESSR-1는 6개, RM180, RM169 등 11개 마커는 2개의 allele을 발생시킨다는 사실을 밝혀냈다. 38개 품종에서 가장 많은 allele (9개)과 높은 PIC 값 (0.79)을 갖는 RM266는 품종 판별에 유용한 마커로 이용될 수 있을 것이라 여겨진다 (Table 2). 13개의 SNP 마커는 모두 밴드의 유무로 품종의 판별이 가능하였고 PIC 값은 0.05에서 0.50의 분포를 보였다 (Table 3).

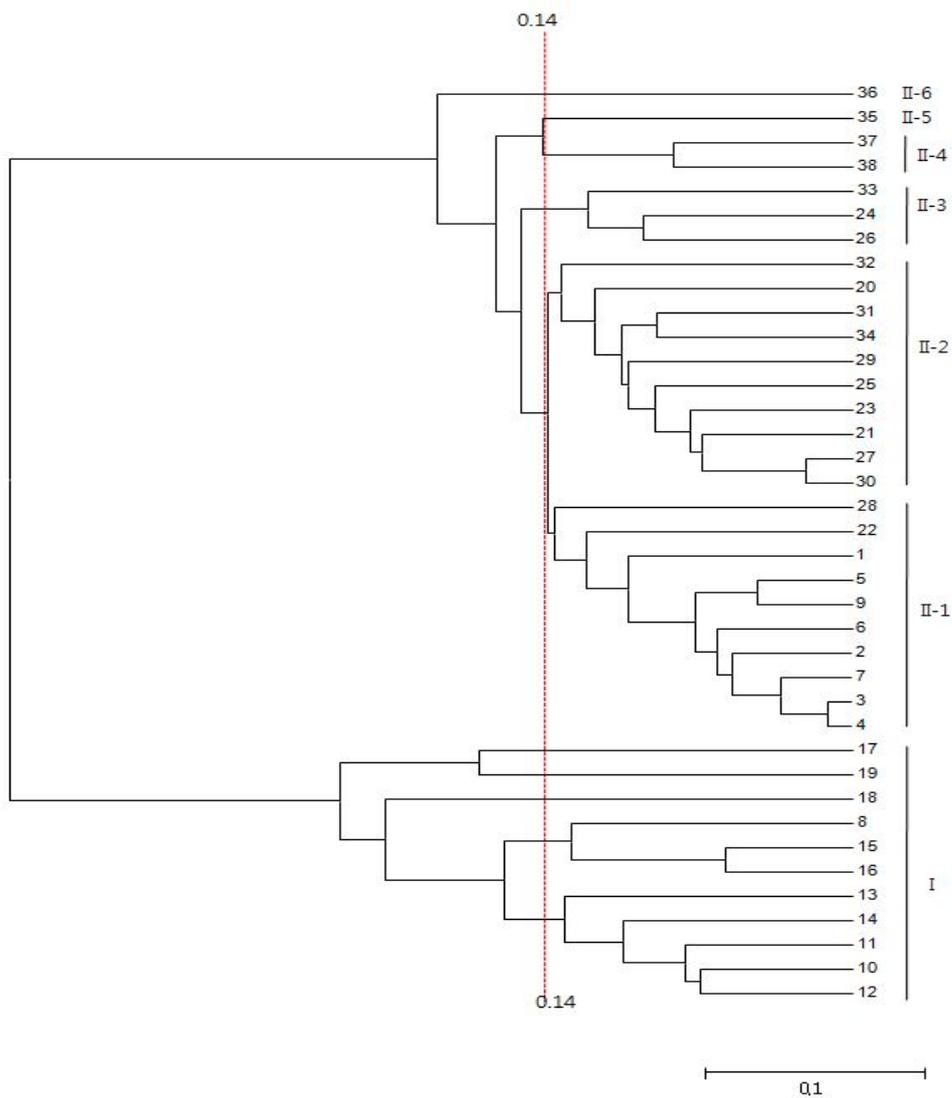
(나) 유전적 거리를 이용한 품종군 분류

① 마커별 밴드의 크기와 유무에 따라 품종을 코드화하고, 이 자료를 이용하여 품종간 유전적 거리를 계산하였다. 품종간 유전적거리를 이용하여 38개 품종을 분류한 결과, 이들은 크게 2개의 군 (*japonica*, *indica*)으로 분류되었다. 이들 중 자포니카 그룹은 약 0.14의 유전적거리에서 다시 6개의 소그룹으로 구분되었다 (Fig. 2).

② *Indica* 군에는 안다벼, 다산벼 등 통일형 품종, 초다수성 품종인 한아름, 그리고 IRRI 육성 3품종 등 11 품종이 속하였다.



< Fig. 1. Polymorphic pattern of an SSR marker, RM270. Refer to the Table 1 for the lane designation. The DNA ladder is shown on the right. >



< Fig. 2. Dendrogram showing the relationship among 38 rice accessions based on genetic distance. Refer to the Table 1 for the lane designation. Vertical dashed lines indicate similarity values used for the sub-group classification in group II. >

(다) 품종 판별용 마커 개발

Fig. 1은 38품종의 RM270 유전자좌에서의 밴드 양상을 보여주고 있다. 이용된 47개의 마커 중 RM223, RM253, RM278, RM6, RM444, RM234, RM228, RM571 등 8개 마커는 *indica*와 *japonica* 품종을 특이적으로 구분하는 특성을 보인다 (자료 미제시). 중국품종과 국내품종을 판별하는 마커를 탐색한 결과, RM266이 국내품종과 중국품종을 판별하는데 효과적이었다. RM266은 국내 품종 중에서 2품종 (화성벼와 삼광벼)과 중국품종 중에서 4품종 (Kenjiandao 8 등)으로 전체 6품종이 동일한 밴드를 보였고, Dongnong 409가 국내의 자포니카 품종들과 동일한 밴드를 보였지만, 중국품종들은 국내 자포니카품종과 서로 다른 밴드를 보였다. RM223은 중국 19 품종 내에서 3개의 밴드를 보였는데, 이들 3개의 밴드는 국내 *japonica* 품종이 보인 밴드와는 달랐지만 국내육성 *indica* 품종들이 보인 밴드와 크기가 일치하였다. 본 연구에서 사용한 47개의 마커 중에서는 한 개의 마커로 국내품종과 중국품종을 구분하는 것은 불가능하였다. 국내품종과 중국품종을 구별하기 위해서는 2개의 마커 (RM223과 RM266)와 아종 특이적 마커의 조합을 이용하면 가능할 것으로 판단된다.

나. 선정된 품종의 종자증식

(1) 재료 및 방법

(가) 시험재료

① 공시 품종 : 일품벼 등 40점 (Table 4)

(나) 포장배치

- ① 파종기 : 2011. 04. 28
- ② 이앙기 : 2011. 05. 30
- ③ 재식거리 및 재식분수: 30 x 15 cm, 주당 1본
- ④ 재배관리: 농촌진흥청 표준재배관리법에 준함
- ⑤ 특성조사: 출수기, 간장, 수장 등 주요 농업적 특성

(다) 종자 수확현상

① 품종별 종자 수확량은 2-3 kg이었으며, 40개 품종 중에서 DNA chip 개발을 위한 14개 품종을 선정하였다 (Table 4).

< Table 4. List of rice accessions for used in the seed multiplication experiment. >

No.	Accession	Origin	Quantity (kg)	No.	Accession	Origin	Quantity (kg)
1	Hwaseongbyeo	Korea	3	21	IR72	IRRI	2
2	Ilpumbyeo*	Korea	3	22	Jisheng 202*	China(Jilin)	2
3	Joonambyeo*	Korea	3	23	Jijing 81*	China(Jilin)	2
4	Hopumbyeo	Korea	3	24	Liaojing 294*	China(Liaoning)	2
5	Hwayeongbyeo	Korea	3	25	Yanjing 25*	China(Jilin)	2
6	Samgwangbyeo	Korea	3	26	Yanjing 294	China(Jilin)	2
7	Boramchan	Korea	3	27	Jijing 88*	China(Jilin)	2
8	Hanareum	Korea	3	28	Tong 88-7	China(Jilin)	2
9	Deurecham	Korea	3	29	Songjing 10	China(Jilin)	2
10	Milyang23	Korea	3	30	Liaoyan 214*	China(Liaoning)	2
11	Taebaegbyeo	Korea	3	31	Songjing 6	China(Heilongjiang)	2
12	Dasanbyeo	Korea	3	32	Liaojing 8	China(Liaoning)	2
13	Andabyeo*	Korea	3	33	Kongyu 131*	China(Heilongjiang)	2
14	Dasan2	Korea	3	34	Kenjiandao 8	China(Heilongjiang)	2
15	Segyejinmee	Korea	3	35	Dongnong 409	China(Heilongjiang)	2
16	Areum	Korea	3	36	Longdao 8*	China(Heilongjiang)	2
17	Junganbyeo*	Korea	3	37	Longjing 21	China(Heilongjiang)	2
18	Jeoginjubyeo*	Korea	3	38	Wuyoudao 4	China(Heilongjiang)	2
19	IR66	IRRI	2	39	Dongnong 423*	China(Heilongjiang)	2
20	IR64	IRRI	2	40	Dongnong 7007	China(Heilongjiang)	2

* DNA Chip 개발을 위해 최종적으로 선정된 14개 품종(국내 5, 중국 9품종)

다. 쌀 가공품의 DNA 추출

(1) 재료 및 방법

쌀 가공품 (떡)의 품종 확인을 위하여 국내품종인 일품, 밀양23호와 중국품종인 길생202호, 동농423호를 이용하였다. 떡은, 각 품종의 종자를 제영 후 물에 침수시켜 12 시간 불린 후, 가정용 분쇄기로 분쇄하였다. 분쇄된 쌀가루는 일반적으로 떡 제작에 이용되는 찜기와 비슷한 환경의 고압멸균기를 이용, 떡을 제작하였다.

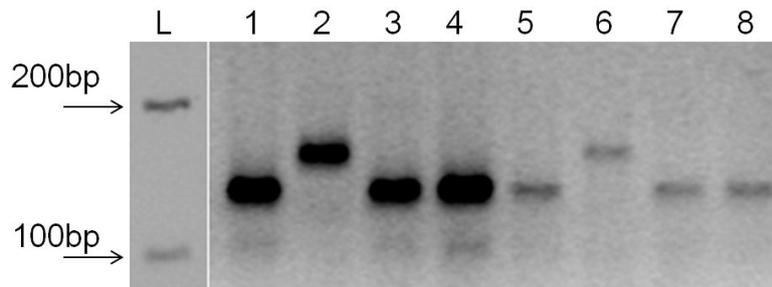
대조구로서 각각 4품종의 일 DNA는 일반적인 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 추출법을 이용하여 추출하였다. 떡으로부터 DNA 추출을 위하여 시료 1.5 g을 준비하여 CTAB extraction buffer (2.0 % (w/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl) 를 5ml 첨가한 후 약수저로 시료를 으깨서 균질화하여 잘 섞어준다. 65 °C 수조에서 20분 정치 후 chloroform : isoamyl alcohol (24:1)을 buffer와 동량으로 처리 후 3500 rpm으로 15분 원심분리하고 상층액을 새 튜브로 옮긴 후, 다시 상층액과 동량의 buffer를 첨가하여 위의 과정을 반복하였다. 옮겨진 상층액 부피의 1/10 3 M sodium acetate, 2 volume의 100 % EtOH를 첨가하여 에탄올 침전을 시켰다. 침전된 DNA pellet을 70 % EtOH로 washing 하고 건조시킨 후 TE buffer에 녹여서 사용하였다.

떡에서의 품종 확인을 위하여 추출된 DNA는 정량 후 PCR에 이용하였다. PCR 조건으로서 denaturation 94 °C 30 sec, annealing 55 °C 30 sec, extension 72 °C 40 sec 과정을 35 cycle

반복하였으며, HiPi Taq polymerase (ELPIS-Biotech, Daejon, Korea)를 이용하였다. PCR 산물은 3 %의 metaphore agarose에 영동하여 확인하였다.

(2) 결과

떡에서 추출된 DNA의 흡광도를 조사한 결과, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 값이 2.0±0.2 로 PCR에는 문제가 없는 DNA라 판단되었다. 이들 DNA는 품종판별을 위해 선발된 SSR marker RM240을 이용하여 PCR한 결과는 그림 2와 같다. 잎이나 떡에서 뽑은 DNA 모두 각각의 marker에서 같은 밴드 양상을 보였다. 이를 통해 떡에서 직접 DNA를 추출, 품종판별 marker을 이용하여 품종 확인이 가능하리라 사료된다. 하지만 떡에서 추출된 DNA가 잎에서 추출된 DNA보다 PCR 밴드의 강도가 약했는데 (그림 2) 이는 떡에서 추출된 DNA에는 전분이 많이 함유되어 있어 PCR 증폭에 문제가 되었을 것으로 판단된다. 추후, 이러한 점을 개선하기 위하여 추출 buffer 이용 시 α-amylase도 함께 처리하여 전분을 가수 분해시킨 후 추출하는 방법을 이용해야 할 것으로 사료된다.



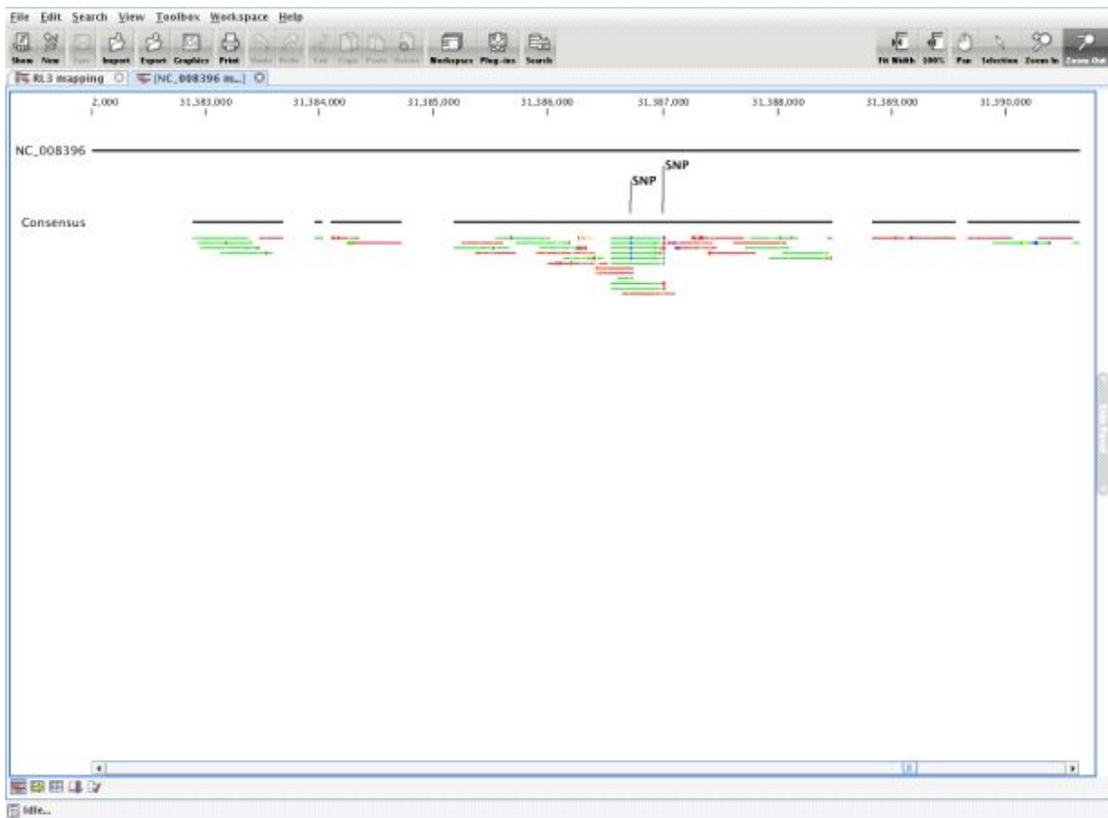
< 그림 2. 벼 잎 (1-4) 과 떡 (5-8) 에서 추출된 DNA로 PCR한 결과
L; ladder, 1, 5; 일품벼 DNA, 2, 6; 밀양23호, 3, 7; 동농202호, 4, 8; 길생423호 >

3. 제2협동

가. Sequencing된 염기서열의 evaluation

(1) NCBI Rice D/B를 사용한 국내산 품종과 중국산 품종간의 SNP position 확인

NCBI에 등록된 *Oryza sativa* genome sequence (NC_008394~NC_008405)를 reference sequence로 사용하여 NGS 염기서열 분석 데이터를 mapping 하였다. Reference mapping 결과를 기반으로 variation detection을 진행하였으며, 이때 NCBI dbSNP를 활용하여 약 500만 개의 SNP 정보를 함께 비교 하였다. 그 결과 국내산 품종과 중국산 품종 간의 SNP 마커로 사용 가능할 것으로 판단되는 후보군을 정리했다.



< 그림 1. SNP 구간 확인 >

Oryza sativa genome sequence를 reference sequence로 사용하여 NGS 염기서열 분석 데이터를 mapping 한 후, NCBI dbSNP와 비교 확인과정을 통해 SNP 위치 정보를 확인 하였다.

Rows: 18,769 SNP Detection Table

Mapping	Reference Position	Consensus Position	Variation Type	Reference	Variants	Allele Variations	Frequencies	Counts	Coverage	Overlapping Annotations	Amino Acids
NC_008396 mapping	30051095	14815025 SNP	G			2 G/T	50.0/50.0	2/2	4		
NC_008396 mapping	30723873	15168896 Complex SNP	A			2 C/T	50.0/50.0	2/2	4	Gene: Os03g0732000, Repeat re...	
NC_008396 mapping	30807466	15208946 SNP	A			2 A/G	50.0/50.0	2/2	4		
NC_008396 mapping	31234504	15423085 SNP	G			2 A/C	50.0/50.0	2/2	4		
NC_008396 mapping	31234688	15423469 SNP	C			2 C/T	50.0/50.0	2/2	4		
NC_008396 mapping	31386713	15522210 SNP	T			2 T/C	58.3/41.7	7/5	12		
NC_008396 mapping	31426112	15591252 SNP	T			2 C/T	50.0/50.0	2/2	4		
NC_008396 mapping	31452192	15595886 SNP	A			2 A/T	50.0/50.0	2/2	4	Gene: Os03g0746600	
NC_008396 mapping	32080142	15847481 SNP	T			2 C/T	50.0/50.0	2/2	4		
NC_008396 mapping	32086238	15849782 SNP	C			2 C/T	60.0/40.0	3/2	5	Repeat region, detected by Repea...	
NC_008396 mapping	32200823	15897890 SNP	G			2 A/G	50.0/50.0	2/2	4	Gene: Os03g0758300, CDS: Os0...	Arg471Gh
NC_008396 mapping	32280379	15942259 SNP	T			2 C/T	50.0/50.0	2/2	4	Repeat region, detected by Repea...	
NC_008396 mapping	32355062	16282381 SNP	G			2 A/G	50.0/50.0	2/2	4		
NC_008396 mapping	33054827	16548018 SNP	G			2 A/C	60.0/40.0	3/2	5	Repeat region, detected by Repea...	
NC_008396 mapping	33480002	16571520 SNP	C			2 C/T	50.0/50.0	3/3	6	Gene: Os03g0786100	
NC_008396 mapping	33952342	16815336 SNP	G			2 G/C	60.0/40.0	3/2	5		
NC_008396 mapping	34122330	16898050 SNP	G			2 A/G	50.0/50.0	2/2	4	Gene: Os03g0798200	
NC_008396 mapping	34328235	17022466 SNP	G			2 A/G	50.0/50.0	2/2	4		
NC_008396 mapping	34766283	17240616 SNP	T			2 T/C	60.0/40.0	3/2	5		
NC_008396 mapping	34838314	17314046 SNP	A			2 A/C	50.0/50.0	3/3	6	Gene: Os03g0812500	
NC_008396 mapping	35203154	17459165 SNP	T			2 C/T	60.0/40.0	3/2	5		
NC_008396 mapping	36221156	18368149 SNP	G			2 T/C	62.5/37.5	5/3	8		
NC_008396 mapping	36932954	18375200 SNP	C			2 C/G	50.0/50.0	2/2	4		
NC_008396 mapping	36932975	18375201 SNP	C			2 C/T	50.0/50.0	2/2	4		
NC_008396 mapping	36932961	18375207 SNP	A			2 A/C	50.0/50.0	2/2	4		
NC_008396 mapping	36932977	18375223 SNP	T			2 C/T	50.0/50.0	2/2	4		
NC_008396 mapping	36933159	18375405 SNP	A			2 A/G	50.0/50.0	2/2	4	Gene: Os03g0855700, mRNA: Os...	
NC_008396 mapping	36973099	18406483 SNP	T			2 C/T	60.0/40.0	3/2	5		
NC_008396 mapping	36977393	18406546 SNP	T			2 C/T	50.0/50.0	4/4	8	Gene: Os03g0856400	
NC_008397 mapping	429107	295805 SNP	G			2 A/C	50.0/50.0	3/3	6		
NC_008397 mapping	797592	352563 SNP	C			2 A/C	50.0/50.0	2/2	4	Repeat region, detected by Repea...	
NC_008397 mapping	797594	352565 SNP	G			2 A/G	50.0/50.0	2/2	4	Repeat region, detected by Repea...	
NC_008397 mapping	802562	362248 SNP	C			2 T/C	60.0/40.0	3/2	5		
NC_008397 mapping	803863	383009 SNP	T			2 A/T	50.0/50.0	4/4	8		
NC_008397 mapping	803879	383025 SNP	G			2 A/C	60.0/50.0	4/4	8		
NC_008397 mapping	923053	400150 SNP	A			2 A/C	50.0/50.0	2/2	4		
NC_008397 mapping	923143	400240 SNP	C			2 T/C	60.0/40.0	3/2	5		
NC_008397 mapping	923166	400263 SNP	T			2 C/T	60.0/40.0	3/2	5		
NC_008397 mapping	923220	400317 SNP	G			2 A/G	60.0/40.0	3/2	5		
NC_008397 mapping	923116	409382 SNP	A			2 A/C	50.0/50.0	2/2	4		
NC_008397 mapping	939160	409426 SNP	G			2 C/G	50.0/50.0	2/2	4		
NC_008397 mapping	939670	409943 SNP	C			2 C/T	60.0/40.0	3/2	5		
NC_008397 mapping	988073	426701 SNP	G			2 C/G	50.0/50.0	2/2	4	Gene: Os04g0116900	
NC_008397 mapping	988087	426715 SNP	T			2 C/T	50.0/50.0	2/2	4	Gene: Os04g0116900	
NC_008397 mapping	988297	426925 SNP	T			2 T/C	57.1/42.9	4/3	7	Gene: Os04g0116900	

< 표 1. SNP 위치 정보 정리 >

그림 1에서 얻어진 SNP 위치에 해당하는 세부 정보를 표로 정리하여 나타냈다. 이 중 NCBI dbSNP에 등록 된 정보와 일치하는 위치를 마커후보로 선택했으며, 목록을 정리하여 표 1로 나타냈다.

(2) SNP validation을 위한 PCR 프라이머 제작

Oryza sativa genome sequence에서 reference mapping과 SNP D/B를 기준으로 선발된 후보 SNP 목록의 위치를 기준으로 190 조합의 candidate SNP 프라이머를 제작하였으며, PCR validation 실험 과정에 맞추어 순차적으로 합성을 진행하였다. 프라이머 제작 조건은 (주) 슬 쉐트의 제작 프로그램을 사용하였으며 세부 조건은 다음과 같다.

Parameter	Value
Product size	700 ~ 1500 bp
Primer length	20 ~ 24 mer
Melting temperature	54 ~ 68 °C
GC contents	40 ~ 60 %
Similarity threshold	80 %

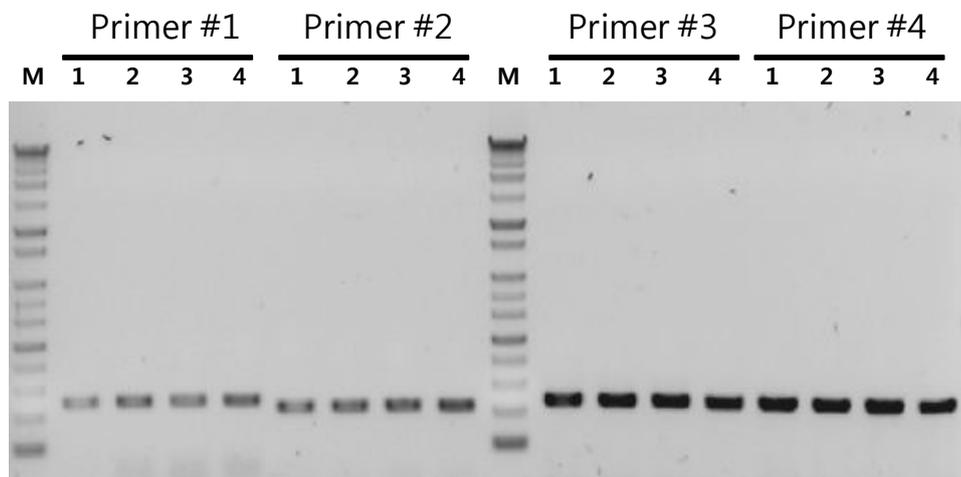
< 표 2. SNP validation 프라이머를 합성하기 위한 조건 >

SNP validation을 확인하기 위한 프라이머는 PCR amplicon size, T_m 등의 조건을 충족시키는 경우에만 만들어지도록 하였다.

(3) PCR 프라이머를 사용한 품종간 SNP validation 실험 수행

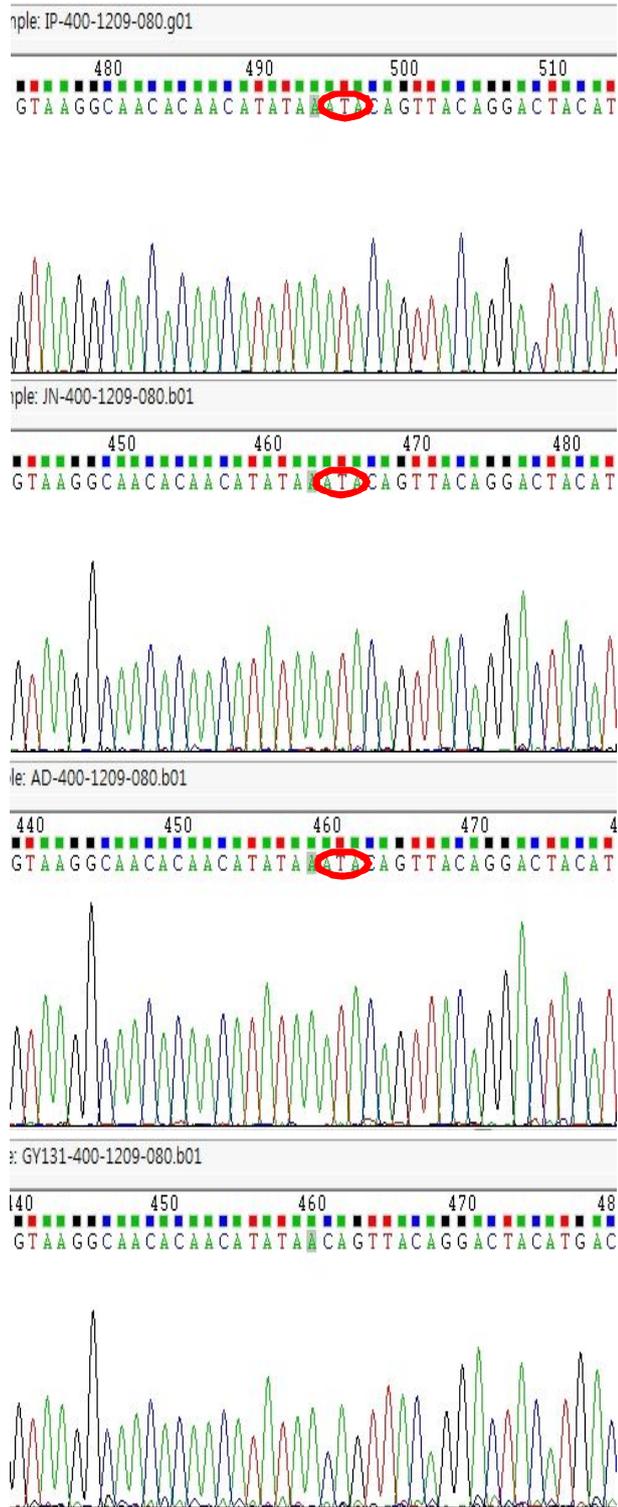
대표적인 품종으로 국내산 3품종 (일품, 주남, 안다), 중국산 1 품종 (공육131)을 선택하여 PCR validation 실험을 진행하였다. PCR 반응 용액의 조건은 2X Multiplex PCR Pre-Mix with dye (h-taq, Solgent) 12.5 μ l, 10 pmole each primer 1 μ l, genomic DNA 20 ng을 사용하여 최종 반응액을 25 μ l로 맞췄다. PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C 15분 pre denaturation 1 cycle, 95 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분 과정을 35 cycles, 72 $^{\circ}$ C 5분 post elongation 1 cycle, 10 $^{\circ}$ C store (Veriti™ 96-Well Thermal Cycler, Applied Biosystems)으로 프로그래밍 하였다.

PCR 반응이 끝난 결과물은 전기영동 과정을 수행했으며, 예상 PCR 산물의 크기와 일치 여부를 확인하였다.



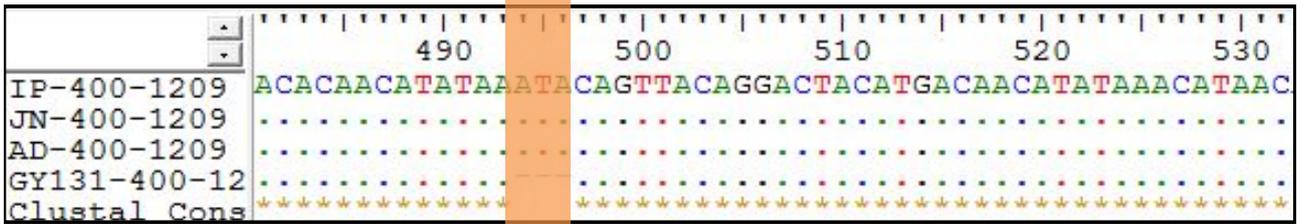
< 그림 2. 제작된 프라이머를 사용하여 국내산 품종과 중국산 품종 증폭. >

제작된 190 조합의 프라이머 중 무작위적인 방법으로 선발하여 국내산 품종 3개와 중국산 품종 1개의 genomic DNA를 증폭했다 (1 lane 일품, 2 lane 주남, 3 lane 안다, 4 lane 공육131). 증폭이 확인 된 DNA amplicon은 PCR product 정제과정을 거친 후 Sanger method sequencing (ABI 3730XL DNA Analyzer)을 수행하였다. Sequencing 결과 데이터를 DNASTAR seqMan (DNASTAR Inc, UK) 프로그램을 사용하여 multiple alignment하여 variation 여부를 확인하였다. 그 결과 중국산 품종인 공육131 품종에서만 특이적인 SNP position을 나타내는 프라이머 조합을 확인 할 수 있었다. 확인 된 프라이머 조합을 대상으로 국내산 9개 품종과 중국산 22개 품종을 추가하여 PCR 및 sequencing 과정을 반복하였다. 이 과정은 국내산 5개 품종과 중국산 9개 품종에서 변별력이 있는 특이적 SNP position을 포함하는 프라이머를 찾을 때까지 지속적으로 수행되었다.



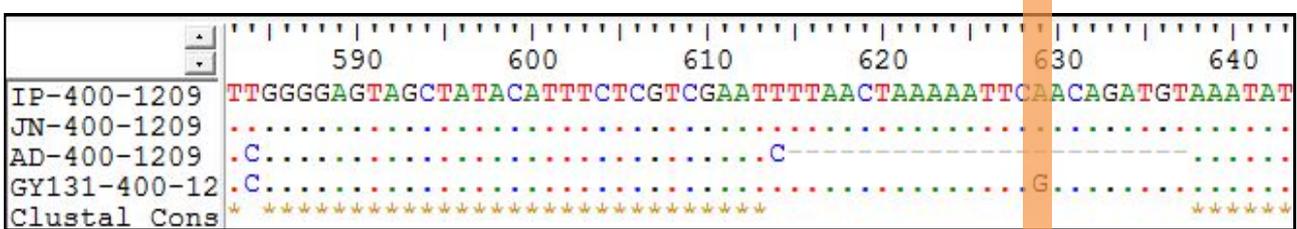
< 그림 3. Chromatogram파일을 통해 확인한 염기서열 분석 결과. >

염기서열을 분석하면 그림파일 (chromatogram)과 염기서열파일 (sequence) 결과를 얻을 수 있다. 그림파일은 염기서열 분석 결과의 질을 확인 할 수 있는 파일이다. 400-1209-080 프라이머 조합을 사용하여 염기서열을 분석하였으며, 공육131 품종에서 ATA 염기서열이 결손된 것을 chromatogram 파일 결과를 통해 확인 하였다 (IP : 일품, JN : 주남, AD :안다, GY131 : 공육131).



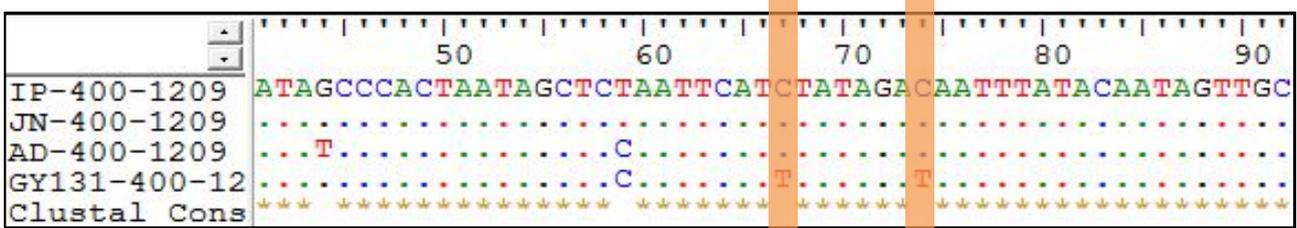
< 그림 4. 프라이머 400-1209-080 프라이머를 사용한 염기서열 분석 결과. >

제작된 프라이머를 이용해 국내산 3품종, 중국산 1품종을 PCR 증폭한 후 염기서열 분석을 수행하였다. 실험결과 분홍색 박스로 표시된 영역에서 중국산 품종인 공육131 품종에서 ATA염기가 결손된 것을 확인 하였다 (IP :일품, JN : 주남, AD : 안다, GY131 : 공육131).



< 그림 5. 프라이머 400-1209-096 프라이머를 사용한 염기서열 분석 결과. >

제작된 프라이머를 이용해 국내산 3품종, 중국산 1품종을 PCR 증폭한 후 염기서열 분석을 수행하였다. 실험결과 분홍색 박스로 표시된 영역에서 중국산 품종인 공육131 품종에서 reference sequence와 달리 A가 G로 치환된 것을 확인 하였다 (IP :일품, JN : 주남, AD : 안다, GY131 : 공육131).



< 그림 6. 프라이머 400-1209-142 프라이머를 사용한 염기서열 분석 결과. >

제작된 프라이머를 이용해 국내산 3품종, 중국산 1품종을 PCR 증폭한 후 염기서열 분석을 수행하였다. 실험결과 분홍색 박스로 표시된 영역에서 중국산 품종인 공육131 품종에서 reference sequence와 달리 C가 T로 치환된 부분 C가 T로 치환된 부분을 확인 하였다 (IP :일품, JN : 주남, AD : 안다, GY131 : 공육131).

나. 탐색한 SNP 위치에 대한 품종별 유전자 대립형 확인

국립농산물품질관리원 시험연구소와 충남대 안상낙 교수님 연구실 (국내산, 중국산 포함 22개 품종)에서 보유하고 있는 품종을 추가로 확보하여 국내산, 중국산 품종을 다양화 하였다. 국내산 총 9 품종, 중국산

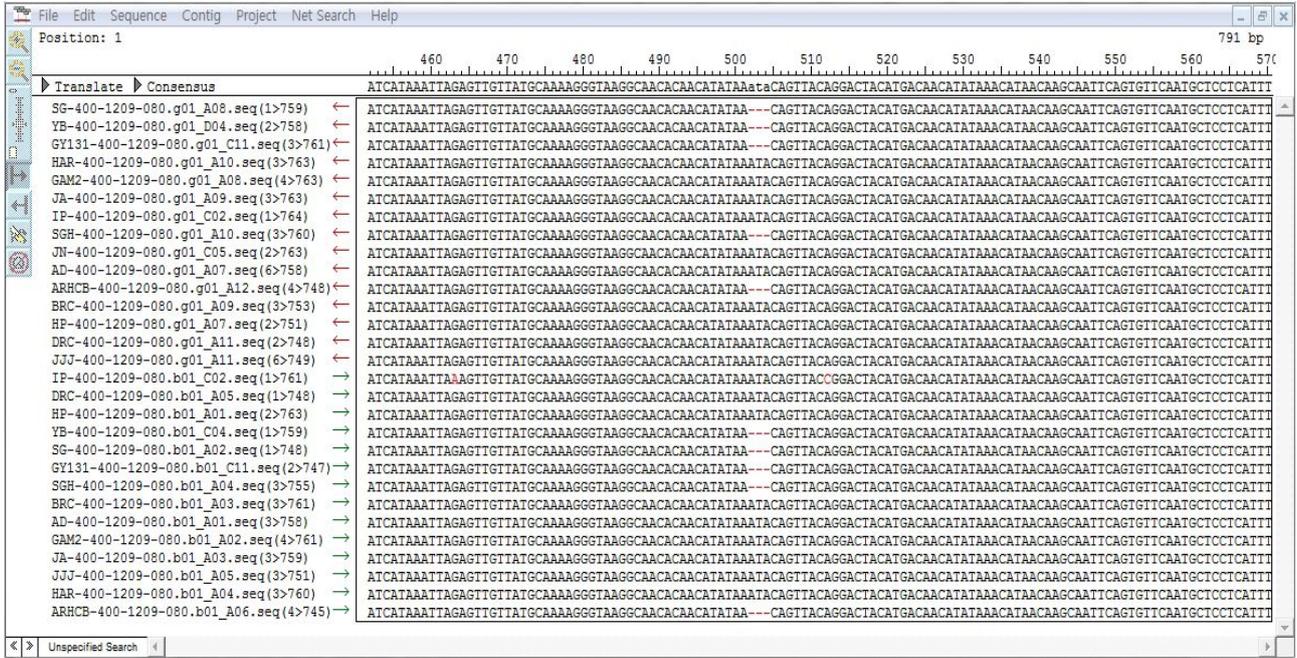
22 품종, 총 31 가지 품종의 DNA를 확보하였다.

이전 실험과정 중 공육131에서 변별력이 나타났던 프라이머 조합을 사용하여 PCR validation을 진행 하였다. PCR 반응 조건은 이전 실험과 동일한 조건을 적용하였다.

#	품종	#	품종	#	품종
1	일품	12	IR72	23	요경8호
2	주남	13	길성202호	24	공육131
3	안다	14	길경81호	25	간감도8호
4	고아미2	15	요경294호	26	409
5	적진주	16	연경25호	27	용도8호
6	중안	17	연경294호	28	용경21호
7	아랑향찰벼	18	길경88호	29	오우도4호
8	새겨와	19	통88-7	30	동농423호
9	운봉	20	송경10호	31	동농7007
10	IR66	21	요염214		
11	IR64	22	송경6호		

< 표 3. 품종별 대립유전자를 찾기 위해 사용한 국내산, 중국산 쌀 품종 리스트. >

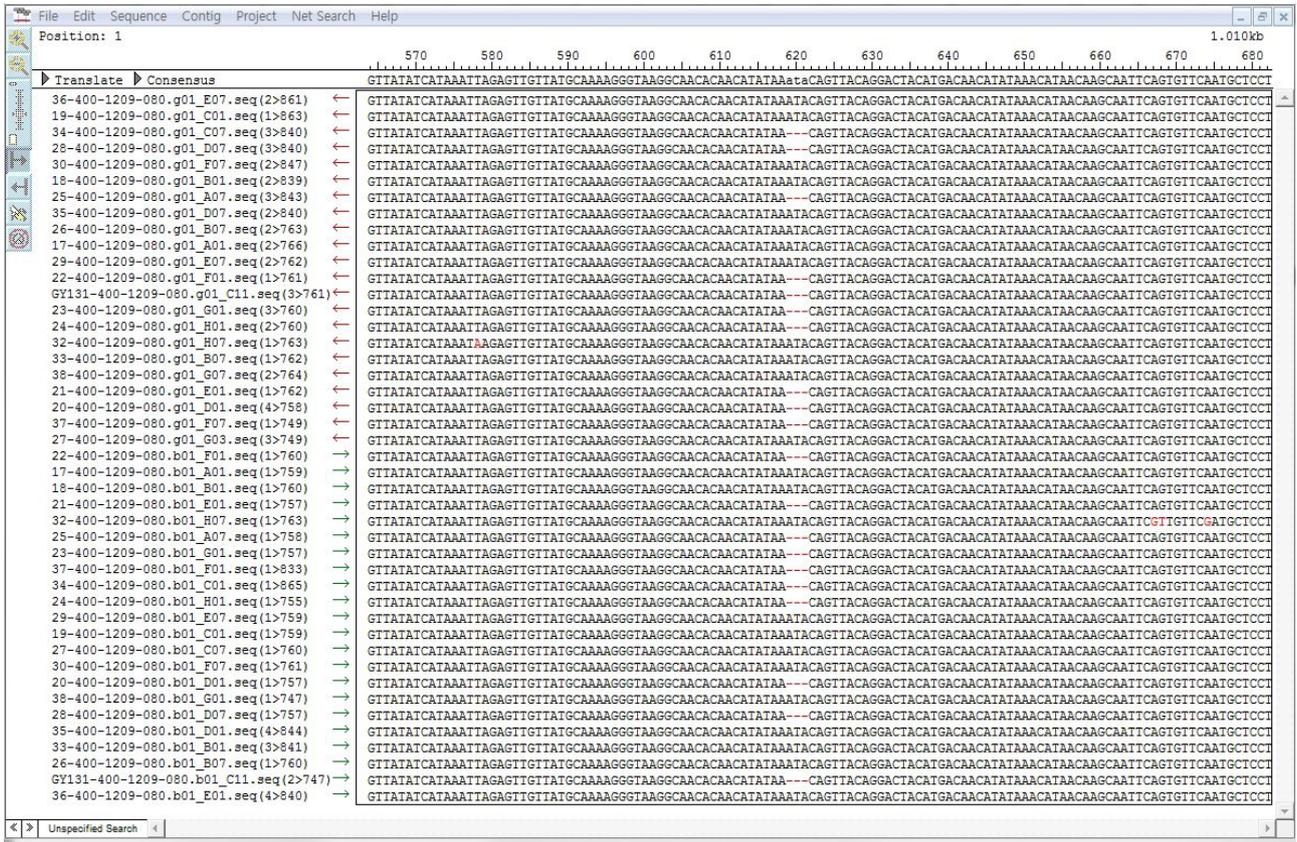
400-1209-080 프라이머 조합을 사용하였을 때 운봉, 새겨와, 아랑향찰벼 (국산), 공육131 (중국산) 간에는 변별력이 보이지 않았지만, 국내산 (한아름, 고아미2, 중안, 일품, 주남, 안다, 보람찬, 호품, 적진주, 드레찬) 품종과 공육131 (중국산) 품종 간에는 변별력이 있는 것을 확인할 수 있었다.



< 그림 7. SNP 프라이머 400-1209-080을 사용하여 국산 14품종과 중국산 1품종간의 염기서열 변이 확인 >

국내산 3품종과 중국산 1품종에서 차이를 나타내는 프라이머를 사용하여 국내산 14품종, 중국산 1품종에 대한 염기서열 분석을 수행했으며, 품종 간의 염기서열을 비교했다 (SG : 삼광, YB : 운봉, GY131 : 공육131, HAR : 한아름, GAM2 : 고아미2호, JA : 중안, IP : 일품, SGH : 새계화, JN : 주남, AD : 안다, ARHCB : 아량향찰벼, BRC : 보람찬, HP : 호품, DRC : 드래찬, JJJ : 적진주, → : forward direction, ← : reverse direction).

400-1209-080 프라이머를 사용하였을 때 1차년도 연차보고서에서 9개 국내산 (고아미, 송진2, 동진찰벼, 백진주, 새계화, 아량향찰벼, 운봉, 적진주, 한강찰벼) 품종으로 선발한 품종 중 중국산 품종과 SNP 변별력에서 차이는 품종을 많이 확인하지 못했다. 따라서 추가적으로 국내산 품종을 확인하기 위해 더 다양한 품종에 대한 SNP 분석을 수행하였으며, 최종적으로 국내산(한아름, 고아미2, 중안, 일품, 주남, 안다, 보람찬, 호품, 적진주, 드래찬) 10품종은 중국산 품종인 공육131과 염기서열에서 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다. 공육131 이외의 다른 중국산 품종과 염기를 비교하기 위하여 중국산 22 품종에 대한 실험을 진행하였다. 그 결과 IR66, IR64, IR72, 통88-7, 송갱10호, 송갱6호, 요갱8호, 간감도8호, 409, 용갱21호, 오우도4호, 동농7007의 12 품종에서 선발된 국내산 품종과 변별력이 없음을 확인하였다.



< 그림 8. SNP 프라이머 400-1209-080을 사용하여 중국산 22품종간의 염기서열 변이 확인 >

국내산 3품종과 중국산 1품종에서 차이를 나타내는 프라이머를 사용하여 중국산 22품종에 대한 염기서열 분석을 수행했으며, 품종 간의 염기서열을 비교했다 (36 : 오우도4호, 19 : IR72, 34 : 용도8호, 28 : 요염 214호, 30 : 요갱8호, 18 : IR64, 25 : 길갱88호, 35 : 용갱21호, 26 : 통88-7, 17 : IR66, 29 : 송갱6호, 22 : 요갱294호, GY131 : 공육131, 23 : 연갱25호, 24 : 연갱294, 32 : 간감도8호, 33 : 409, 38 : 동농7007, 21 : 길갱81호, 20 : 길생202호, 37 : 동농423호, 27 : 송갱10호, → : forward direction, ← : reverse direction).

400-1209-080 프라이머를 사용한 실험 결과 국내산 (일품, 주남, 안다, 고아미2호, 적진주, 중안, 보람찬, 드레찬, 한아름, 호품) 품종과 중국산 (길생202호, 길갱81호, 요갱294호, 연갱25호, 연갱294호, 길갱88호, 요염214, 공육131, 용도8호, 동농423호) 품종에서 'ATA' 염기서열의 차이를 확인할 수 있었다.

프라이머 400-1209-080에서 품종 간 유전자 변이를 확인 한 방법과 같은 방식으로 SNP 후보 위치를 확인하는 실험을 반복 수행하였다.

다. SNP 유전자 마커의 품종별 분석을 통한 마커조합 분석

국내산 5품종 (주남, 일품, 적진주, 중안, 안다)과 중국산 9품종 (공육131, 길생202, 길갱81, 요갱294, 연갱 25, 길갱88, 요염214, 용도8, 동농423)에 대해 변별력이 있을 것이라고 생각되는 프라이머를 선발한 후, 염기서열 분석 실험을 통해 국내산과 중국산 품종간의 변별력이 있는 프라이머 3 조합을 확인하였다. 후보

균이라고 생각하고 실험을 진행했던 400-1209-096 프라이머 조합은 안다 품종에서 공육131과 같은 형태의 SNP를 보였다. 따라서 중국산과 국내산을 판별할 수 있는 SNP마커를 최종적으로 3개 선발하였으며, 이 선발된 SNP 부위는 염기서열 분석을 통해 확인하였다.

SNP 후보 positions

	품종명			
국내산	일품	ATA	C	C
	주남	ATA	C	C
	안다	ATA	C	C
	적진주	ATA	C	C
	종안	ATA	C	C
중국산	김생202호	-	T	T
	길갱81호	-	T	T
	요갱294호	-	T	T
	연갱25호	-	T	T
	연갱294호	-	T	T
	길갱88호	-	T	T
	요염214	-	T	T
	공육131	-	T	T
	용도8호	-	T	T
	동농423호	-	T	T
	PCRprimer_name	400-1209-090	400-1209-142	400-1209-142

< 표 4. 국내산과 중국산 품종을 구별할 수 있는 마커 종류 및 염기서열 변이. >

국내산 5품종과 중국산 9품종간 염기서열 변이를 확인할 수 있는 프라이머 조합을 3개 확인 할 수 있었으며, 국내산과 중국산 품종간의 차이를 상기 표에 정리하였다.

따라서 1차년도 연구결과인 국내산 9품종에 대한 SNP마커 개발을 통하여 국내산 품종 판별 DNA chip 제작이 가능할 것이며, 또한 2차년도 SNP마커 3개 추가 개발을 통하여 국내산 5품종과 중국산 9품종간의 원산지 판별 DNA chip을 새로운 기술인 LS-PCR (Ligation Separation-PCR)과 결합시켜 제작, 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

제 3 절 3차년도 연구개발수행 내용 및 결과

1. 제1세부

가. 다양한 DNA chip의 capture probe 고정화 기술 최적화

(1) Glass slide의 coating 화합물의 특성

o Amine slide

- Functional amine group으로 coating된 slide의 경우 amine group과 DNA capture probe가 UV-crosslinking에 의해 연결됨으로서 capture probe가 고정된다.

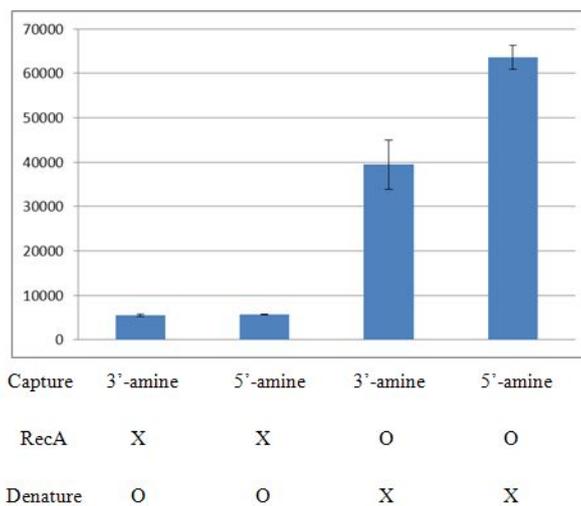
- 하지만 capture probe의 DNA base가 amine group과 연결되기 때문에, 2차 년도에 개발한 RecA Assisted Hybridization (RAH) 기술을 사용할 경우 RecA 단백질이 capture probe와 DNA-protein filament를 형성할 수 없다.

o Aldehyde or epoxy slide

- 반면, functional aldehyde group이나 functional epoxy group으로 coating된 slide의 경우 amine group을 DNA 말단에 포함한 capture probe와 반응시키면 dehydration이 발생하면서 capture probe의 말단과 slide의 functional group이 연결되기 때문에, 2차 년도에 개발한 RecA Assisted Hybridization (RAH) 기술을 사용할 수 있다.

- epoxy slide는 aldehyde slide와는 다르게 capture probe 고정화 이후의 blocking 과정이 필요하지 않기 때문에 epoxy slide를 최종적으로 선정했다.

(2) Capture probe의 linker 종류 및 농도 설정

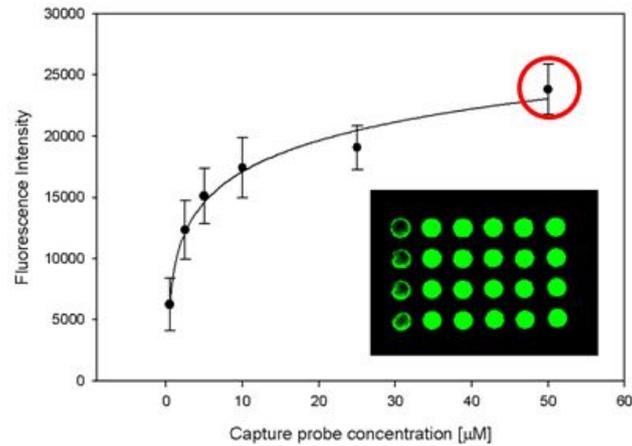


< 그림 1. Capture probe linker 실험 >

Capture probe의 3' 말단과 5' 말단에 각각 C6-amine을 linker로 달아서 실험을 수행했다. 결과

에서 보듯이 5' 말단에 링커를 달았을 경우 3' 말단에 링커를 달았을 경우보다 RecA Assisted Hybridization (RAH) 반응이 더 잘 일어나는 것을 확인했다.

Optimization of capture probe concentration



< 그림 2. Capture probe 농도 최적화 실험 >

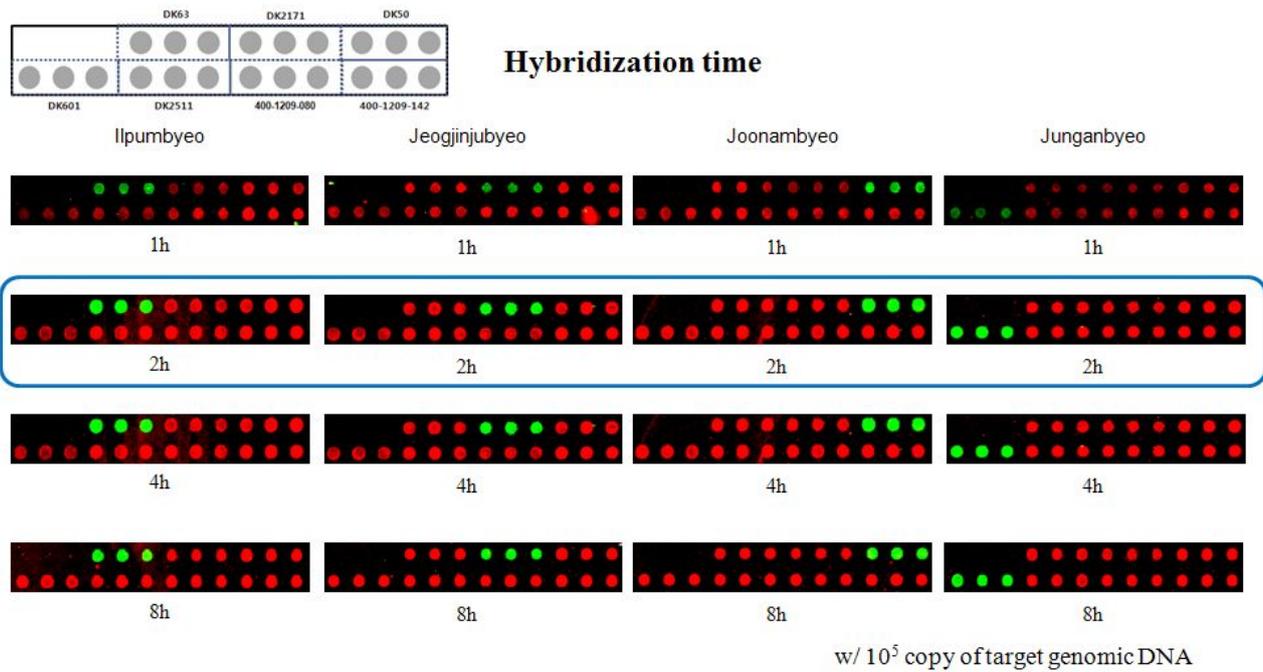
Capture probe 농도의 최적화 실험은 2차 년도에 수행했다. RecA 단백질이 기능을 하기 위해서는 입체장해 (steric hindrance)를 최소화 하는 것이 좋다고 판단하여 캡처탐침의 농도를 일반적으로 사용되는 50uM부터 2uM까지 낮추어서 실험을 수행했으며, 일반적으로 사용되는 50uM 농도를 최종적으로 선정했다.

나. DNA chip 반응 조건 최적화 및 개발된 DNA chip의 실제 샘플 테스트를 통한 성능 검증

(1) DNA chip의 혼성화 반응 시간 최적화

< 표 1. 품종별 SNP genotype >

	DK63	DK2171	DK50	DK601	DK2511	400-1209-080	400-1209-142
Ilpum	W	M	M	M	M	M	M
Jeogjinju	M	W	M	M	M	M	M
Joonam	M	M	W	M	M	M	M
Jungan	M	M	M	W	M	M	M
Anda	M	M	M	M	W	M	M
Jisheng 202	W	W	M	M	M	W	W
Jijing 81	M	W	M	M	M	W	W
Kongyu 131	W	W	M	W	M	W	W

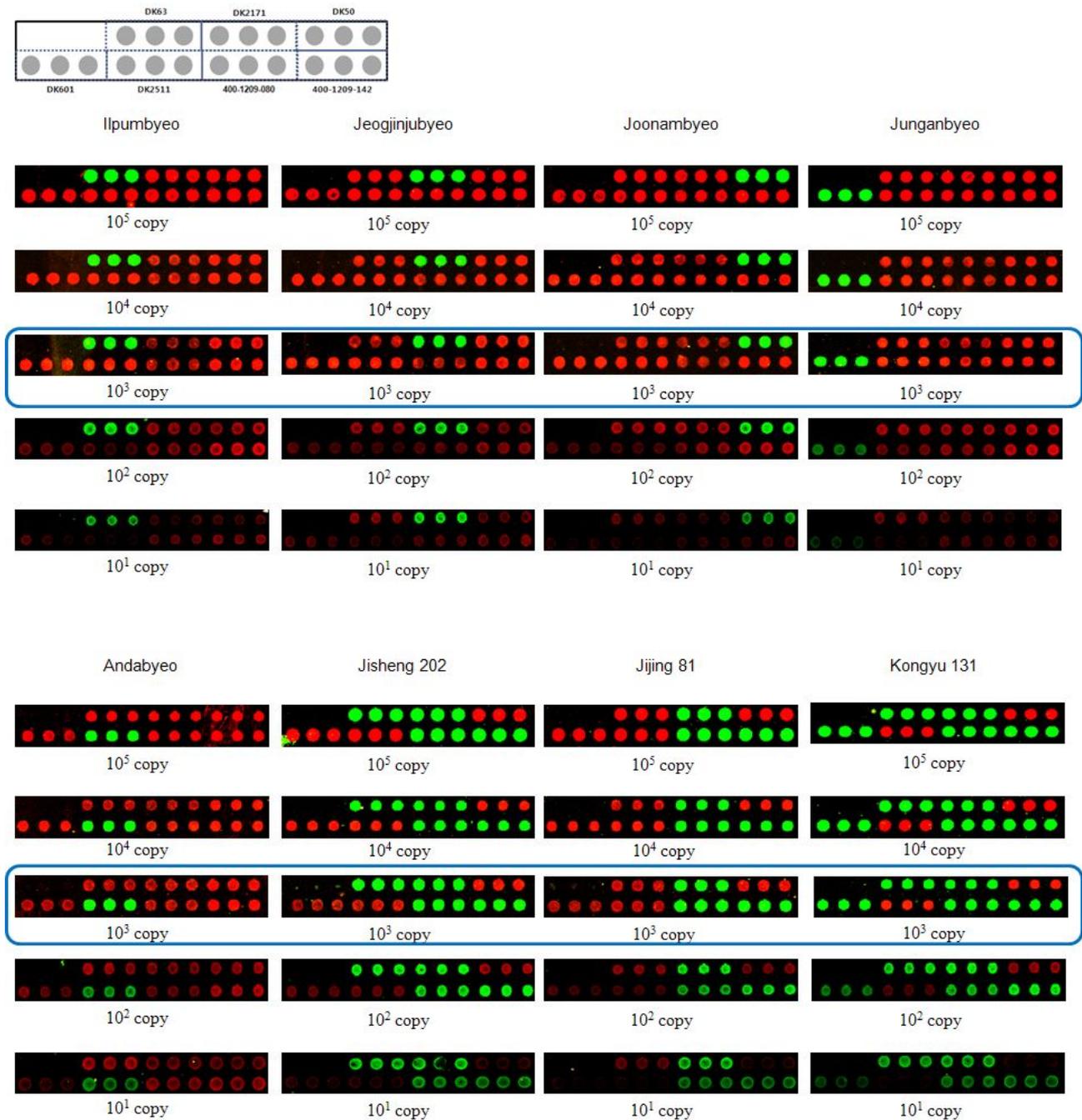


< 그림 3. DNA chip의 혼성화 반응 시간 최적화 >

개발된 DNA chip을 이용해 실제 샘플로 혼성화 반응 시간 최적화 실험을 수행했다. 실제

genomic DNA 샘플의 농도는 10^5 copy 로 고정시키고 LS-PCR을 수행한 PCR product를 DNA chip과 1시간, 2시간, 4시간, 8시간 혼성화 반응을 수행했다. 네 종류의 실제 샘플을 사용한 결과에서 보듯이 2시간 이후부터 매우 신뢰할 수 있는 형광신호를 관찰할 수 있었으며, 표 1의 SNP genotype와 일치하는 정확한 결과를 얻을 수 있었다. 따라서 혼성화 반응의 최적 시간은 2시간으로 설정하고 추후 실험을 수행했다.

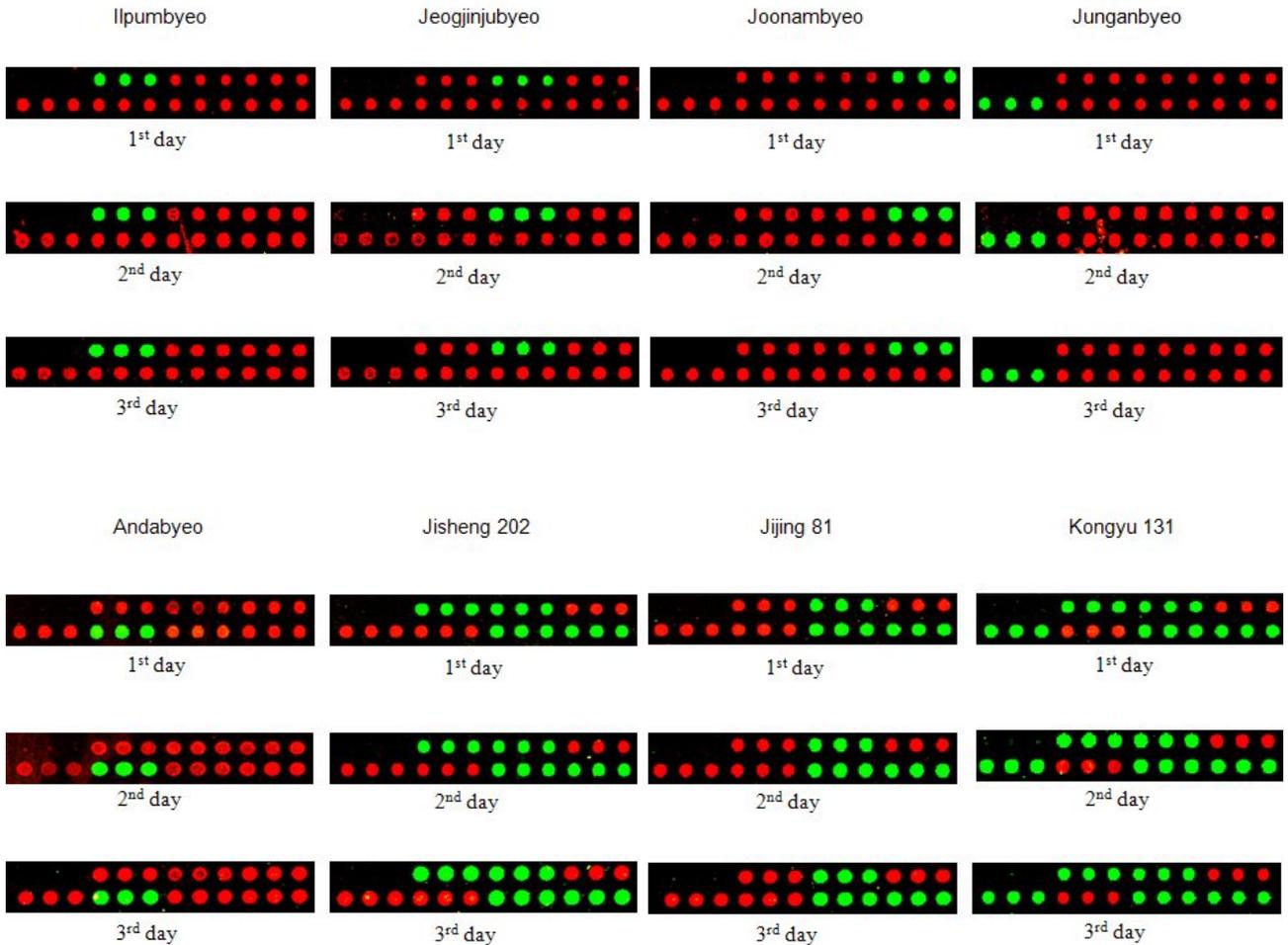
(2) DNA chip의 민감도와 특이도 테스트 및 컷오프 농도 설정



< 그림 4. DNA chip의 민감도와 특이도 테스트 및 컷오프 농도 설정 >

실제 genomic DNA 샘플 8종에 대한 민감도와 특이도 테스트를 컷오프 농도 설정 실험과 함께 수행했다. 10³ copy 이상의 농도를 사용했을 경우 매우 신뢰할 수 있는 형광 신호를 측정할 수 있었다. 또한 이러한 조건에서 표 1의 SNP genotype과 정확히 일치하는 결과를 얻었다. 즉, 본 실험에서는 민감도와 특이도에 대해서 각각 100%의 결과를 얻었다.

(3) DNA chip의 재현성 테스트



< 그림 5. DNA Chip의 재현성 테스트 >

제2협동에서 기획한 Ring test를 통해 재현성을 확인했다. 3일에 걸쳐 3명의 실험자가 동일 PCR product로 실험을 수행한 결과 동일한 실험 결과를 얻을 수 있었다. DNA chip 혼성화 반응 실험은 LS-PCR 반응이 잘 일어난 경우에는 매우 정확한 재현성을 보였다.

(4) DNA chip의 실제 샘플 테스트를 통한 성능 검증 결과

이상의 실험 결과에서 보듯이 3차 년도에 제작된 DNA chip의 실제 샘플 테스트를 통한 성능 검증은 성공적으로 수행되었으며 민감도, 특이도, 재현성에서 매우 우수한 성능을 보임을 입증했다. 본 결과를 바탕으로 제3협동에서 시제품을 제작하고 혼합 샘플을 통한 성능 검증을 성공적으로 수행했다.

2. 제1협동

가. 국내 쌀 가공품의 외래 품종 혼재 식별을 위한 품종 판별용 신규 SSR 마커 탐지

(1) 재료 및 방법

o 시험 재료

DNA chip 개발을 위해 과제에서 최종적으로 선발된 14 품종 (국내 5, 중국 9품종) 중에서 국내 및 중국 5품종씩 총 10품종을 선정하고, 이들의 판별이 가능한 SSR 마커를 탐지하였다. 본 시험에 공시된 중국 품종들은 농촌진흥청으로부터 분양받았다 (Table 1).

- 유전적 다양성 검정

국내, 중국 품종 판별을 위한 SSR 마커 탐지를 위하여 선발된 10개 품종의 DNA는 품종별 식물체 잎으로부터 CTAB buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl)을 이용하여 추출되었다.

본 연구에서 사용된 SSR (HvSSR) 마커는 사전에 보고된 마커로써⁶ 국립종자원에서 품종 판별을 위해 사용하고 있다 (Table 1). PCR 반응은 HiPi Taq polymerase (ELPIS-Biotech, Daejeon, Korea)를 이용하여 denaturation 94 °C 30 sec, annealing 55 °C 30 sec, extension 72 °C 40 sec 과정을 35 cycle 반복하였다. PCR 산물은 좀더 정확한 다양성을 확인하기 위하여 agarose gel이 아닌 4% polyacrylamide gel을 사용하고 silver staining kit (Bioneer, Daejeon, Korea)로 염색하여 분석하였다.

< Table 1. List of rice accessions used in this study >

No.	Accession	Origin
1	Ilpumbyeo	Korea
2	Joonambyeo	Korea
3	Andabyeo	Korea
4	Jeogjinjubyeo	Korea
5	Junganbyeo	Korea
6	Jisheng 202	China(Jilin)
7	Yanjing 25	China(Jilin)
8	Jijing 88	China(Jilin)
9	Jijing 81	China(Jilin)
10	Kongyu 131	China(Heilongjiang)

< Table 2. SSR markers used in this study >

No.	HvSSR marker	Chr.	SSR motif	SSR length (bp)	Forward Primer	Reverse Primer	Expected product size (bp)
1	HvSSR01-32	1	CTT	57	AAACTGGAGATGAACTCGAA	GTAACGAACTAGAGCATGGG	250
2	HvSSR01-71	1	CT	69	TCATCTTACCTCCCTTGIG	GAGAGCTAACCATGAGCAAC	194
3	HvSSR01-84	1	CT	65	TCTCTCGTCGATCTTAGCAG	TCGTTAATGAAAGTCGTTCGT	232
4	HvSSR02-12	2	GA	59	TCTCCAATTCTCCATCAAAC	CTTGCTTGAGCGAGTCTAAT	329
5	HvSSR02-62	2	CT	56	GGTCGTCACCTGTCAGTAGT	ACGAAACAACACACAGCATA	370
6	HvSSR02-86	2	AAC	68	CTGCATCAATATAATTGCGA	GCTACTTACACCACCACCAT	280
7	HvSSR03-62	3	AG	56	ACATGGCCTGTAGTAGACG	GAAGGAATCCAATGTGTGT	300
8	HvSSR03-68	3	AAT	69	CTCTATCAATACAAAGGCGG	CCTGTACTTGCTTTAATCGG	208
9	HvSSR04-17	4	TA	55	GCTGATCAGTGCTGTAACAA	TAGAGATCGGCCAGAGATTA	355
10	HvSSR05-43	5	GA	63	GTGCATTTGCAACTTAAACA	GGGAGATCAAGAAGAGGTTT	286
11	HvSSR05-49	5	TCT	64	GCTTAGTACTTGGCGTAAA	CCATCTTACATGTCTCACC	194
12	HvSSR05-57	5	CT	65	GACCTCTCTCGCCCTAC	CAGAGAGCACTTCTGAATC	253
13	HvSSR05-63	5	TG	61	GTTATGCGCTTCTGCTTATT	AGTTGGCTTCTGGATTACAA	215
14	HvSSR06-03	6	GAA	67	CTAGGGAATCAGCGGTTAG	GCTCTCTTGCTTCTTCTTC	212
15	HvSSR06-19	6	TTA	56	CACTGACAAAGCTTCCGTAT	ATAGTTGCGGAGTGGATAGA	302
16	HvSSR06-29	6	TTA	52	GCGATTCAAAGTGACTGATT	CGCATGTGCAATATGCTA	349
17	HvSSR06-56	6	TC	56	GAATAATCTGCTGACCTGG	CCTATACTGGTAATGGCAGC	334
18	HvSSR06-63	6	TC	63	GTGTGGCAATTAACATCCT	TTGTTGCTTGTCTTCACTG	302
19	HvSSR06-75	6	AAT	56	TTTAGAGATCATGCCGAGTT	GACGGAGGGAATAACACTTT	170
20	HvSSR08-19	8	AG	64	CATCTCTGAGAAATCTGCC	TGTGCATTTCTCTTTCATA	221
21	HvSSR08-35	8	AT	57	CTGCAACGTTTATAGCTCAA	TGTTTGTGAACAGATCGTGA	357
22	HvSSR09-40	9	CT	60	AACTTAAATCCAAACAGGCA	GATCTTTAGTCCCGGATTCT	275
23	HvSSR10-08	10	ATG	51	CAAGAAAGCCGAGTTAAAGA	TCCTCAAAGATGGTATGAC	350
24	HvSSR10-35	10	AG	62	AGCTTGTGGCAGTTGTAT	ACACTAAGTGGGCAATCAG	287
25	HvSSR11-23	11	CTT	66	GGTTCCTCAATGCAGTATAGA	CACTAACGACCAAGGTAAGG	146

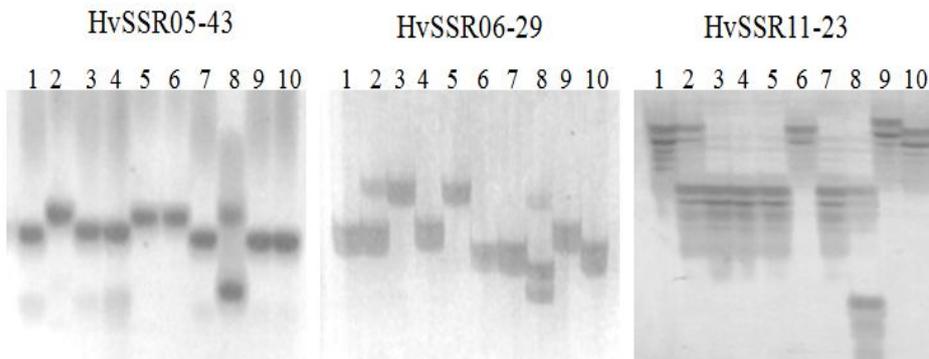
(2) 결과 및 고찰

선발된 10 품종의 DNA를 25개의 HvSSR 마커를 이용하여 PCR하여 품종 특이적인 밴드의 다양성을 관찰하였다. 25개 중 PCR 결과가 잘 보이지 않는 4개 마커를 제외한 21개의 마커에서 전체 82개의 allele가 탐지되었고 마커별로 1에서 7개까지 다양한 allele을 나타냈다. 전체 allele의 평균은 3.9개로 HvSSR01-71은 7개의 allele를 보이고, HvSSR02-12는 6개 allele을 나타냈다. HvSSR01-32와 HvSSR06-03, HvSSR06-29, HvSSR11-23은 5개의 allele를 발생시켰다 (Table 3).

또한 21개의 마커 중 HvSSR06-29는 중국, 한국 품종 (각각 5 품종) 간의 다양성을 가장 많이 보였는데, 중국 5품종은 국내 품종인 적진주를 제외한 국내 품종과는 다른 밴드 양상을 보여 중국 품종의 판별 가능성이 높을 것으로 보인다 (Fig. 1).

< Table 3. Number of alleles of SSR marker in 10 accessions. >

No.	HvSSR marker	Chr.	Allele no.	No.	HvSSR marker	Chr.	Allele no.
1	HvSSR01-32	1	5	12	HvSSR05-63	5	2
2	HvSSR01-71	1	7	13	HvSSR06-03	6	5
3	HvSSR02-12	2	6	14	HvSSR06-19	6	4
4	HvSSR02-62	2	1	15	HvSSR06-29	6	5
5	HvSSR02-86	2	3	16	HvSSR06-56	6	4
6	HvSSR03-62	3	4	17	HvSSR06-63	6	3
7	HvSSR03-68	3	4	18	HvSSR06-75	6	4
8	HvSSR04-17	4	2	19	HvSSR08-19	8	3
9	HvSSR05-43	5	4	20	HvSSR08-35	8	4
10	HvSSR05-49	5	4	21	HvSSR11-23	11	5
11	HvSSR05-57	5	3				



< Fig. 1. Polymorphic pattern of an HvSSR markers, HvSSR05-43, HvSSR06-29 and HvSSR11-23 with 10 Korean and Chinese cultivars. lane 1: Jisheng202, lane 2: Yanjing25, lane 3: Jijing88, lane 4: Jijing81, lane 5: Kongyu131, lane 6: Ilpumbyeo, lane 7: Joonambyeo, lane 8: Andabyeo, lane 9: Jeonjinjubyeo, lane 10: Junganbyeo. >

나. 쌀 가공품 DNA 추출

(1) 재료 및 방법

- 시험 재료

쌀 가공품에서의 DNA 추출을 위하여 물에 불린 일품벼 현미의 쌀가루와 시중에서 판매되고 있는 쌀과자 (미왕 쌀과자), 누룽지 가루를 시료로 이용하였다. 대조구는 일품벼 유식물체 앞에

서 추출한 DNA를 사용하였다.

쌀가루는 일품벼 종자를 제영 후 물에 침수시켜 2시간 불린 후, 가정용 곡물 분쇄기로 분쇄하여 사용하였다. 쌀과자와 누룽지는 막자사발로 마쇄하여 분말로 만들어 사용하였다.

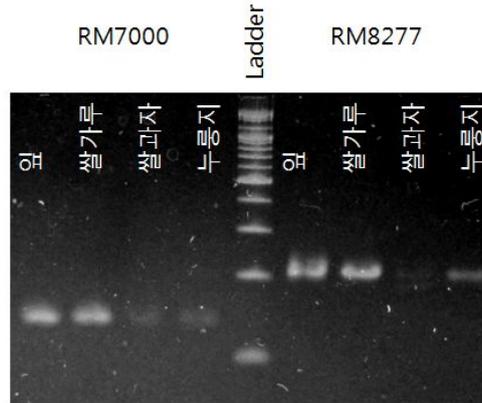
- DNA 추출 방법 및 PCR 반응

쌀 가공품으로부터 DNA 추출을 위하여 일반적인 CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) 추출법에 α -amylase를 이용하여 추출하였다. 시료 0.2 g을 준비하여 CTAB extraction buffer (2.0 % (w/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 1.4 M NaCl) 를 5 ml 첨가한 후 시료와 buffer을 잘 섞어 준다. 상온에서 5분 정치 후 20 ul α -amylase (A3306, Sigma)를 첨가하여 65 °C에서 2시간 반응시킨다. 상온에서 5분 정도 cooling 시킨 후 상층액과 동량의 chloroform : isoamyl alcohol (24:1)을 처리 후 4000 rpm으로 10분 원심분리하고 상층액을 새 튜브로 옮긴 후, 다시 상층액과 동량의 buffer을 첨가하여 위의 과정을 반복하였다. 옮겨진 상층액에 상층액 부피의 1/10 3 M sodium acetate (pH 5.2)와 2.5 volume의 100% EtOH를 첨가하여 4000 rpm으로 10분 에탄올에 침전시켰다. 침전된 DNA pellet을 70 % EtOH로 washing 하고 건조시킨 후 TE buffer에 녹여 사용하였다.

각각의 쌀가공품에서 추출된 DNA는 정량 후 PCR 반응에 사용하였다. PCR 반응은 HiPi Taq polymerase (ELPIS-Biotech, Daejeon, Korea)을 이용하여 denaturation 94 °C 30 sec, annealing 55 °C 30 sec, extension 72 °C 40 sec 조건으로 35 cycle 반복하였다. 이 때 사용된 SSR 마커는 이전의 다른 연구에서 PCR 반응을 잘 보이는 RM7000과 RM8277을 사용하였다. PCR 산물은 3 %의 metaphore agarose에 110 V로 1시간 영동하였다.

(2) 결과 및 고찰

쌀가루, 쌀과자 그리고 누룽지에서 추출된 DNA 흡광도는 OD_{260}/OD_{280} 값이 1.9 ± 0.1 , OD_{260}/OD_{230} 값이 1.21 ± 0.2 로 polysaccharide의 함량이 조금 높지만 PCR 반응에는 문제가 없을 것으로 판단되어 PCR을 진행하였다. 이들 DNA는 PCR 선발된 SSR 마커 RM7000과 RM8277을 이용하여 PCR한 결과는 Fig. 2와 같았다. 잎과 쌀가루에서 추출된 DNA는 PCR 반응이 잘 진행되어 PCR 산물이 많이 생성, band의 발색 강도가 높았으나 쌀과자와 누룽지가루의 경우는 PCR이 되었으나 대조구인 잎의 PCR 산물에 비하여 증폭률이 낮았다. 추후 DNA 정제 과정을 개선하여 PCR 반응의 효율성을 높일 수 있을 것으로 사료된다. 본 연구에서는 쌀과자, 누룽지와 같이 많은 가공 과정을 거치고 건조된 시료에서 DNA가 추출되고 PCR 반응이 가능하다는 것을 증명하였다.



< Fig. 2. 다양한 시료를 이용한 PCR 결과 >

다. 품종 판별용 탐지 마커 확인

(1) 재료 및 방법

- 시험 재료

쌀 가공품인 떡에서 실제로 SSR을 이용한 품종 판별이 가능한지 확인하기 위하여 위의 10 품종 중, 국내 3품종, 중국 3 품종을 선발하여 떡을 제조하고 DNA를 추출하였다. 사용된 중국 품종은 Jisheng202, Yanjing25, Jijing88이고, 국내 품종은 일품 (Ilpumbyeo), 주남 (Joonambyeo), 안다 (Andabyeo)를 이용하였다. 떡은 각 품종의 종자를 제형한 후 물에 담귀 2시간 불린 후, 가정용 분쇄기로 분쇄하였다. 분쇄된 쌀가루는 일반적으로 백설기 떡 제작에 이용되는 고압멸균기를 이용하여 떡을 제작하였다. 또한 3품종의 현미를 혼합하여 마쇄하여 떡을 제작, 마커 분석에 이용하였다.

- DNA 추출 및 PCR 반응

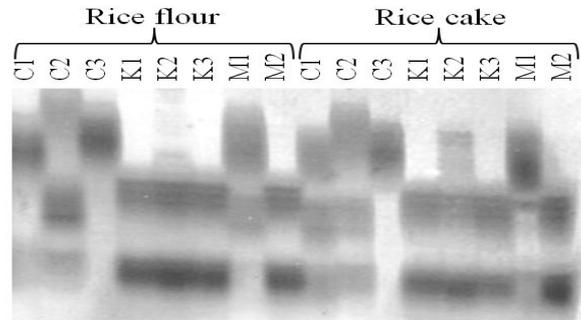
떡으로 부터 DNA 추출은 앞에 소개된 CTAB buffer와 α -amylase를 이용한 방법으로 추출하였다. PCR 반응 역시 앞에 소개된 반응 조건과 같은 조건으로 실시하였다. 사용된 SSR 마커는 이전의 연구 결과에서 품종 판별용으로 적합하다고 선발된 RM266을 이용하여 반응시켰다.

(2) 결과 및 고찰

품종 판별용으로 탐지된 SSR 마커가 쌀 가공품인 떡에서 실제로 품종 판별이 가능한지 확인하기 위하여 떡을 제조하고 DNA를 추출한 후 PCR 반응을 시켰다. 대조구로 떡을 하기 전인 쌀가루에서도 DNA를 추출하여 실험하였다.

쌀가루와 떡에서 추출된 DNA는 OD_{260}/OD_{280} 값이 1.2 ± 0.32 였다. PCR 결과는 그림 3과 같았다. 중국 3품종 (C1, C2, C3)과 한국 3품종 (K1, K2, K3) 각각의 쌀가루와 떡의 DNA는 모두 PCR 밴드가 확실히 보였고, 3 품종의 쌀가루와 떡을 각각 합쳐서 뽑은 DNA PCR products (M1, M2) 역시 각각 품종이 보이는 band pattern을 모두 보였다. 이번 연구를 통하여 떡에서

RM266으로 품종 판별이 가능한 것을 확인하였다. 단지 RM266이 국내 3품종에서 동일한 밴드를 보였기 때문에 품종 간에 다형성을 보이는 마커를 이용하였을 때 차이를 보이는 밴드들이 발생하는지에 대한 연구가 요구된다.



< Fig. 3. 떡에서 추출된 DNA를 이용한 PCR 결과. C1: Jisheng202, C2: Yanjing25, C3: Jijing88, K1: Ilpumbyeo, K2: Joonambyeo, K3: Andabyeo, M1: 중국 3품종 Jisheng202, Yanjing25, Jijing88의 DNA를 섞은 것 M2: 국내 3품종 Ilpumbyeo, Joonambyeo, Andabyeo DNA를 섞은 것. >

3. 제2협동

가. 쌀 품종에 대한 DNA chip의 SNP 마커 효용성 분석

< 표 1. 최종 선정된 쌀 품종 SNP 마커 >

	Marker	DK63	DK2171	DK50	DK601	DK2511	400-1209-080	400-1209-142
	품종	일품	적진주	주남	증안	안다	중국	중국
1	길생202호	○	○				○	○
2	길갱 81호		○				○	○
3	요갱 294호		○				○	○
4	연갱 25호	○	○				○	○
5	길갱 88호	○	○				○	○
6	요염 214호		○				○	○
7	공육 131호	○	○		○		○	○
8	용도 8호		○				○	○
9	동농 423호		○				○	○
1	일품	○						
2	주남			○				
3	안다					○		
4	증안				○			
5	적진주		○					

최종적으로 선정된 쌀 품종 식별용 SNP 마커의 효용성 분석을 수행했다. DK63, DK2171, DK50, DK601, DK2511 다섯 종류의 SNP 마커는 국내 5개 품종 (일품, 주남, 안다, 증안, 적진주)에 각각 특이적이기 때문에 국내 쌀로 제작된 쌀 가공품에 어떤 품종이 혼합되어있는지 판단하고자 할 때 유용하게 사용될 수 있다. 반면 400-1209-080, 400-1209-142 두 종류의 SNP 마커는 중국산 9개 품종에 특이적인 마커이기 때문에 국내산 품종에 중국산 품종을 섞어 만든 쌀 가공품을 정확하게 찾아낼 수 있다. 하지만 중국산 품종 9개 중 어떤 품종이 섞여있는지는 정확히 판단할 수 없다. 또한 국내산 품종과 중국산 품종이 섞여있을 경우 국내산 어떤 품종이 중국산과 섞여 있는지 정확한 판단을 하기는 힘들다. 결론적으로 본 연구를 통해서 최종적으로 선정된 7개의 SNP 마커는 다음과 같은 두 가지 상황에서 유용하게 사용될 수 있다.

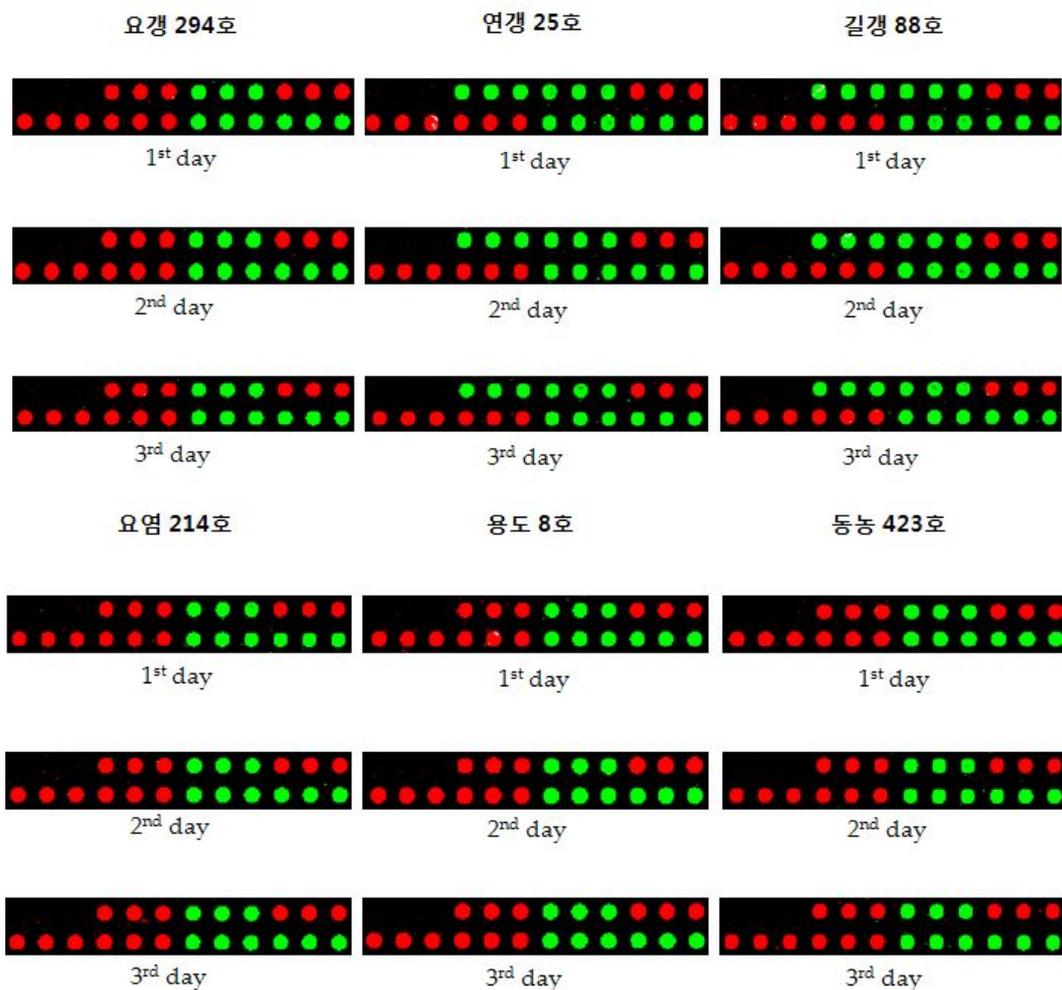
- 국내산 품종으로만 쌀 가공품을 만들었을 때 국내산 5개 품종 중 어떤 품종이 사용되었는지 알고자 할 때
- 중국산 쌀을 사용해서 만든 것으로 추정되는 쌀 가공품에서 9개의 중국산 품종을 사용하였는지 여부를 판단하고자 할 때

본 연구를 통해서 선정한 7개의 SNP 마커는 국내산 5개 품종과 중국산 9개 품종의 총 14개 품종에 대해 제한적으로 사용할 수밖에 없는 단점이 있다. 본 연구 과제의 연구비에 한계가 있

있기 때문에 국내에 유통되는 모든 쌀 가공품에 사용되는 쌀 품종에 대해 whole genome sequencing을 할 수 없었고, 이러한 상황 때문에 기존 연구에서 발표된 염기서열을 토대로 SNP 마커를 선정해야했기 때문에 이러한 한계가 발생하게 되었다. 하지만 충분한 연구비가 뒷받침 되고 국내에 유통되는 쌀 가공품에 사용되는 모든 쌀 품종에 대한 whole genome sequencing에 의해 전체 유전자 정보를 얻을 수 있다면, 본 연구에서 마커를 선정했던 방식으로 새로운 SNP 마커를 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

나. 개발된 검정 시스템에 대한 실험실간, 분석자간 Ring test 주관

Reproducibility test

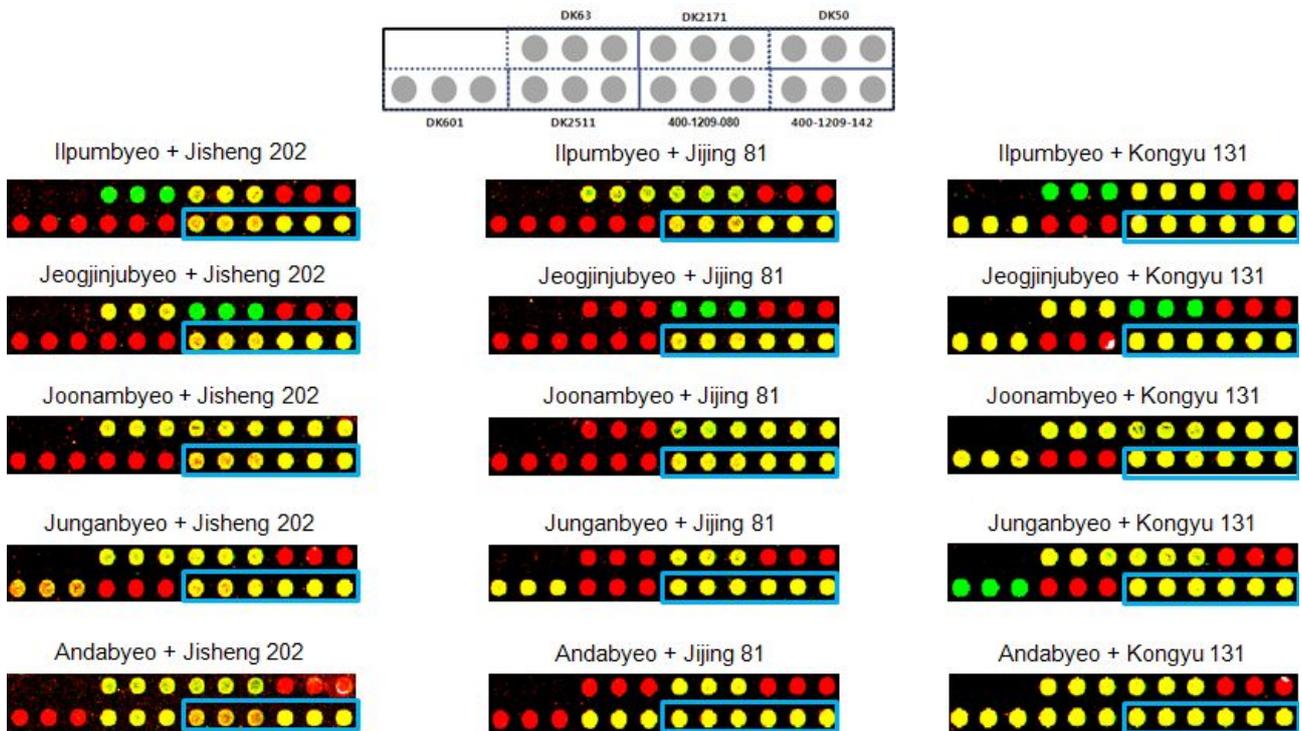


< 그림 1. DNA chip의 재현성 테스트 >

본 연구진이 기획한 Ring test를 통해 제1세부에서 실험실간, 분석자간 재현성을 확인했다. 3일에 걸쳐 3명의 실험자가 중국산 6종의 LS-PCR product로 실험을 수행한 결과 동일한 실험 결과를 얻을 수 있었다.

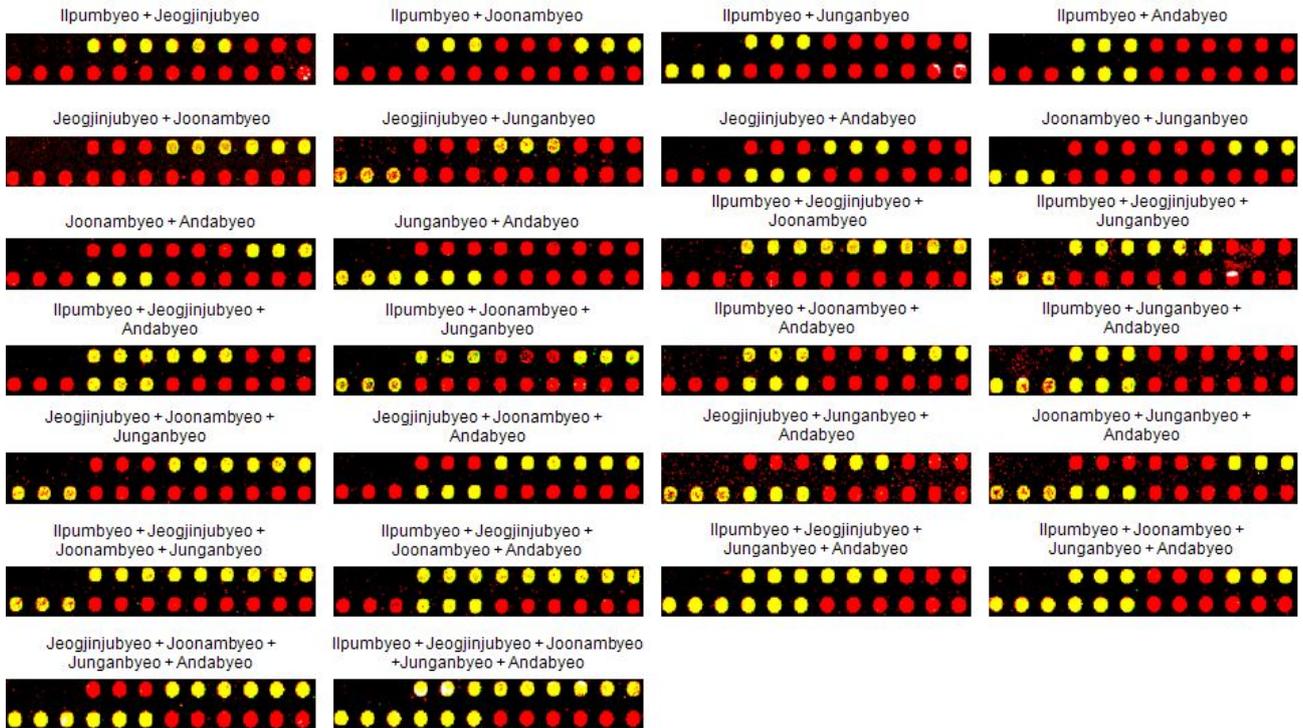
4. 제3협동

가. 개발된 DNA chip 기술을 이용해 쌀 가공품에 대한 성능 검증



< 그림 1. 국내산과 중국산 혼합 샘플 테스트 >

제1협동에서 제공받은 실제 샘플을 사용해 혼합된 쌀 가공품에 대한 테스트를 수행했다. 국내산 5개 품종 중 1개의 품종과 중국산 품종이 혼합되어 있는 경우 발생할 수 있는 모든 경우의 수에 대한 테스트를 수행한 결과 그림의 같이 중국산 품종에 해당하는 마커에 Cy3와 Cy5 형광 신호가 동시에 관찰되는 것을 발견할 수 있었다.



< 그림 2. 국내산 혼합 샘플 테스트 >

제1협동에서 제공받은 실제 샘플을 사용해 혼합된 쌀 가공품에 대한 테스트를 수행했다. 국내산 5개 품종이 혼합되어 있는 경우 발생할 수 있는 모든 경우의 수에 대한 테스트를 수행한 결과 그림의 같이 각각의 경우에 따라 다른 신호가 관찰되는 것을 발견할 수 있었다.

개발된 DNA chip으로 분석이 가능한 혼합 샘플에 대해 성능 검증을 수행한 결과,

- 국내산과 중국산 품종이 혼합되어 있는 경우 15개 * 2회 반복 = 30회
- 국내산 품종이 혼합되어 있는 경우 26개 * 2회 반복 = 52회

총 82회 실험을 수행한 결과 false negative와 false positive가 각각 1회 씩 관찰되었다. 따라서 개발된 DNA chip의 민감도 및 특이도는 각각 98.78%로 측정되었다.

나. 쌀 가공품 검정 kit 상용화

본 연구를 통해 쌀 가공품 품종 식별용 DNA chip 기술이 성공적으로 개발되었으며, 현재 시제품을 제작해서 성능 검증을 수행하는데 성공했다. 시제품의 구성 성분은 다음과 같다.

- Probe mixture1 (7개의 SNP 마커의 genotyping에 필요한 ASO wild probes + ASO mutant probes + LSO probes)
- Probe mixture2 (separation probe),
- Primer mixture (Cy3-labeled forward primer 1 + Cy5-labeled forward primer 2 + reverse primer)

- Enzyme1 (Thermostable ligase)
- Enzyme2 (DNA polymersase for extension)
- Enzyme3 (DNA polymerase for PCR)
- Enzyme4 (RecA)
- Solution1 (Thermostable ligase buffer)
- Solution2 (Extension buffer)
- Solution3 (PCR buffer)
- Solution4 (RecA buffer)
- Solution5 (DNA Chip washing buffer)
- (주)지노믹트리에 주문 제작한 inkjetting 기술을 이용한 DNA chip
- Magnetic bead



< 그림 3. 완성된 시제품의 DNA chip 모습 >

또한 본 시제품 구성성분을 이용한 프로토콜은 다음과 같다.

1. Probe mixture1 (7개의 SNP 마커에 해당하는 ASO wild probes, ASO mutant probes, LSO probes 각각 $10 \text{ amol}/\mu\text{l}$) $1 \mu\text{l}$, Enzyme1 ($0.5 \text{ U}/\mu\text{l}$) $1 \mu\text{l}$, Solution1 $48 \mu\text{l}$ 를 섞고 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5분, $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 15분 반응시킨다.
2. Probe mixture2 (sepaeration probe $1 \text{ pmol}/\mu\text{l}$) $1 \mu\text{l}$, Enzyme2 ($0.5 \text{ U}/\mu\text{l}$) $1 \mu\text{l}$, Solution2 $3 \mu\text{l}$ 을 추가로 넣어주고 $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 5분, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 30초 반응시킨다.
3. Magnetic bead $1 \mu\text{l}$ 를 넣고 15분간 실온에서 반응시킨다.
4. 자석위에 tube를 놓고 magnetic bead가 자석에 완전히 끌려오면 magnetic bead를 제외한 상층액을 제거한다. 그리고 남아있는 magnetic bead에 DW를 $50 \mu\text{l}$ 넣고 살짝 vortexing 해준 이후에 마찬가지로 자석위에 놓고 DW를 제거해준다. 마지막으로 DW를 $50 \mu\text{l}$ 넣고 vortexing 해준 이후에 마찬가지로 자석위에 놓고 DW를 제거해준다.
5. 남아있는 magnetic bead에 Enzyme3 ($2 \text{ U}/\mu\text{l}$) $1 \mu\text{l}$, Primer mixture (Cy3-labeled forward

primer 1, Cy5-labeled forward primer 2, reverse primer 각각 10 pmol/ μ l) 1 μ l, Solution3 48 μ l를 넣어주고 PCR을 수행한다. (PCR 조건 : 95 °C 2분, 40cycle (95 °C 20초, 65 °C 10초, 72 °C 20초), 72 °C 5분)

6. 시중에 판매하는 PCR purification kit를 이용해 PCR 산물을 정제한다.

7. 정제한 PCR 산물 24 μ l, Enzyme4 (5 μ g/ μ l) 1 μ l, Solution4 20 μ l를 섞어 42 μ l를 제작된 DNA chip well에 넣어주고 37 °C humidity chamber에서 2시간 반응시킨다.

8. Solution5 (6x SSPE buffer w/ 0.005 % Triton X-100)를 이용해 DNA chip을 15분간 washing 해주고 마지막으로 DW로 10분간 washing해준다.

다. 본 과제의 후속 연구에 대한 고찰

본 과제를 통해 제작한 시제품은 국내산 5개 품종과 중국산 9개 품종을 판별하는 SNP 마커 7개로 한정되어 제작되었기 때문에, 바로 기업화하기에는 어렵지만 수년 내에 기업화가 가능할 것으로 판단된다. 따라서 본 연구 결과물을 실제로 적용하고 산업화하기 위해서 추가적으로 필요한 연구는 다음과 같다.

- 본 연구에서 사용된 총 14개 품종 이외에 시중에 주로 유통되는 쌀 가공품에서 사용되는 국내산과 중국산의 쌀 품종의 whole genome sequencing을 통한 SNP 마커나 SSR 마커의 추가적인 발굴
- 쌀 가공품에서 추출한 DNA의 효율적인 PCR 반응을 위한 정제과정의 확립

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 1차년도 목표달성도

1. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 연도 (2010)	제1세부	LS-PCR (Ligation Separation - PCR) 기술 개발	100	- LS-PCR (Ligation Separation-PCR) 기술 개발
		LS-PCR 반응 조건 최적화 및 DNA Chip 테스트	100	- LS-PCR (Ligation Separation-PCR) 반응 조건 최적화 및 DNA Chip 테스트
	제1협동	국내 쌀 가공품의 외래 품종 혼재 식별을 위한 품종 선정 및 확보	95	- 국내 주요 가공용 품종 등 20종 선정 및 확보
		벼 식물체 및 가공품의 DNA 추출법 확립	95	- 식물체 DNA 추출
		품종 식별용 신규 SSR 마커의 분석과 발굴	95	- 품종 식별용 SSR 마커세트 개발
	제2협동	품종별 유전자 마커 탐색을 위한 염기서열 분석	100	- 국내산 주요 9품종에 대한 특이 마커 탐색을 위한 염기서열 분석 - IRGSP, RGP, Genbank 의 rice genome 서열 정보를 기반으로 염기서열 분석 부위 선정 - rice BAC clone sequence 확보 및 EST region의 polymorphic sequence region 선정
		품종간 상동성 확인, SNP와 SSR 유전자 위치 탐색	100	- 국내 9품종간 특이 SNP 위치 탐색 - 선정된 국내산 품종에 대한 염기서열 분석 (direct sequencing)결과 데이터를 DNASTAR분석 프로그램을 이용하여 염기서열의 alignment
		SNP와 SSR 염기서열의 품종 간 연관성 탐색	100	- 국내 9품종간 SNP 염기서열의 특이성, 연관성 탐색 - 탐색된 SNP를 포함한 염기서열을 blast search를 통한 homology test - 탐색된 SNP의 품종간 연관성분석을 위한 phylogenetic test, genetic distance test - 품종 구분 능력 확인을 위한 polymorphic level test (PIC test등)

2. 연구범위 및 연구수행방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
LS-PCR (Ligation Separation -PCR) 기술 개발	o LS-PCR (Ligation Separation -PCR) 기술 개발	o 다양한 유전자 마커 (SNP를 단 하나의 튜브 반응을 통해 분석 가능한 LS-PCR (Ligation Separation -PCR) 기술 개발
LS-PCR 기술 최적화 및 DNA Chip 테스트	o LS-PCR 기술 최적화 및 DNA Chip 테스트 - Ligation, Separation 반응 최적화 - DNA Chip으로 테스트	o LS-PCR 방법의 비 특이적 반응을 없애기 위한 반응 최적화 o 최적화된 LS-PCR 방법을 이용해 증폭한 DNA를 DNA Chip으로 확인 o 실제 샘플을 가지고 LS-PCR 방법으로 wild type과 mutant type의 구분이 가능한지 DNA Chip으로 확인
국내 쌀 가공품의 외래 품종 혼재 식별을 위한 품종 선정 및 확보	o 국내 주요 가공적성 품종과 중국산 품종의 유전적 다형성 검정 - 중국산 품종의 DNA 분석을 통한 생태형 검정 - DNA 자료를 이용한 생태형 분류 및 품종 선정	o 국내의 주요 37 품종의 다형성 검정 - 재료: 국내, 중국산 등: 삼광벼 등 37점 - DNA 마커: SSR 와 SNP 마커 48점 - 분류방법: UPGMA 방법이용 분류 o 품종 분류 결과에 의거 대표 품종 20 점 선정
벼 식물체 및 가공품의 DNA 추출법 확립	o PCR을 위한 고순도 DNA 분리	o 기존의 방법을 이용한 DNA 추출 - 식물체, 가공품
품종 식별용 신규 SSR 마커의 분석과 발굴	o 국내의 품종의 식별을 위한 SSR 마커 세트 개발	o 품종 판별을 위한 SSR 마커 세트 개발
선정 품종 종자증식	o 선정된 품종의 종자증식	o 선정 품종의 종자증식을 위한 재배
DNA 염기서열 분석	o 염기서열 분석 - Genbank, IRGSP 등 whole genome 염기서열 분석 결과 조사 - 염기서열분석을 위한 EST 염기정보 조사 - 염기서열분석을 위한 primer 합성	o 9개 품종에 대한 특정부위 DNA 염기서열분석 - Genbank, IRGSP 등의 whole genome 염기중 polymorphic BAC clone 선정 - 품종간 다형성을 추정할 수 있는rice EST region 선정 -선정된 BAC clone 및 EST region 분석을 위한 oligo 합성 - ABI 3730 염기서열분석기를 사용한direct sequencing 수행
SNP 탐색 및 선발	o 유전정보 분석 - SNP을 위한 alignment 분석법 및 SNP data editing 방법 확보 - 품종간 특이 SNP의 확보 및 품종구분에 용이한 SNP의 선발	o 염기서열 결과를 토대로 유전자분석을 통한 특이 SNP 탐색 - DNASTAR분석 프로그램을 이용한 sequence의 editing (homo, hetero test) - 탐색된 SNP의 blast search를 통한 기존 rice sequence와 연관성을 확인하기 위한 homology test 및 다른 종과의 연관관계 규명 - 선발된 SNP의 phylogenic test, genetic distance test 및 품종 구분 능력 확인을 위한 polymorphic level test 실시

제 2 절 2차년도 목표달성도

1. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	
2차 연도 (2011)	제1세부	DNA Chip의 Hybridization 조건 최적화	100	- RecA 단백질을 이용한 DNA Chip Hybridization 기술 개발	
		유전자 마커 분석에 사용될 universal primer 선정	100	- 쌀에 존재하지 않는 염기서열을 토대로 universal primer 후보군들을 선별한 후 1차, 2차 선정	
		각각의 SNP site에 해당하는 probe 디자인	100	- 비 특이적 반응이 일어나지 않는 최적의 SNP probe들을 선별	
	제1협동	국내 쌀 가공품의 외래 품종 혼재 식별을 위한 품종 선정 및 확보		100	- 국내 주요 가공용 품종 등 14종 선정 및 확보
		벼 식물체 및 가공품의 DNA 추출법 확립		90	- 쌀 가공품의 DNA 추출법 확립
		품종 식별용 신규 SSR 마커의 분석과 발굴		90	- 품종 식별용 SSR 마커세트 개발
		선정된 품종의 종자 증식		100	- 선정된 품종의 종자증식 및 가공품 제작
		DNA 공급		100	- 선정된 품종의 DNA 공급
	제2협동	SNP마커 개발을 위한 염기서열 분석 및 특이성 실험		100	- SNP 위치 확인을 위한 프라이머 제작 - 염기서열 SNP evaluation을 통해 확인된 프라이머를 사용하여 특이성 실험
		중국산 주요품종에 대한 SNP 탐색		100	- NCBI Rice SNP DB 분석을 통한 국내산, 중국산 candidate SNP 위치 도출 - 2개 이상의 SNP 분석 프로그램을 사용해 품종별 유전자 대립형 확인
		국내산과 중국산 품종간의 원산지 판별 특이성 조사 - SNP마커 발굴		100	- 염기서열 SNP evaluation을 통하여 국내산 품종과 중국산 품종 특이성 조사 - 확인된 SNP 프라이머 특이성 실험 기술지도 - 염기서열 분석 정보를 이용한 SNP 마커 조합 분석

2. 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
DNA chip의 Hybridization 조건 최적화	○ RecA 단백질을 이용한 DNA chip Hybridization 기술 개발	○ RecA 단백질을 사용해서 PCR 산물을 DNA chip에 Hybridization 시키는 새로운 기술 개발 및 최적화
유전자 마커 분석에 사용될 universal primer 선정	○ 쌀에 존재하지 않는 염기서열을 토대로 universal primer 후보군들을 선별한 후 1차, 2차 선정	○ 분석하고자 하는 SNP site들에 해당하는 probe들의 염기서열과 선별된 universal primer들의 염기서열을 비교해서 비 특이적 PCR 반응이 일어나지 않을 후보들을 프로그램 분석을 통해 선별
각각의 SNP site에 해당하는 probe 디자인	○ 비 특이적 반응이 일어나지 않는 최적의 SNP probe들을 선별	○ 디자인된 각각의 probe들에 대하여 LS-PCR을 수행하여 비 특이적 반응이 일어나지 않는 최적의 probe들을 선별한다
국내 쌀 가공품의 외래 품종 혼재 식별을 위한 품종 선정 및 확보	○ 국내 주요 가공적성 품종과 중국산 품종의 유전적 다형성 검정 - 중국산 품종의 DNA 분석을 통한 생태형 검정 - DNA 자료를 이용한 생태형 분류 및 품종 선정	○ 국내의 주요 37 품종의 다형성 검정 - 재료: 국내, 중국산 등: 삼광벼 등 37점 - DNA 마커: SSR 와 SNP 마커 48점 - 분류방법: UPGMA 방법이용 분류 ○ 품종 분류 결과에 의거 대표 품종 20점 선정
벼 식물체 및 가공품의 DNA 추출법 확립	○ PCR을 위한 고순도 DNA 분리	○ 기존의 방법을 이용한 DNA 추출 - 식물체, 가공품
품종 식별용 신규 SSR 마커의 분석과 발굴	○ 국내의 품종의 식별을 위한 SSR 마커 세트 개발	○ 품종 판별을 위한 SSR 마커 세트 개발
선정 품종 종자증식	○ 선정된 품종의 종자증식	○ 선정 품종의 종자증식을 위한 재배
Sequencing된 염기서열의 evaluation	○ NCBI Rice SNP DB를 통해 candidate SNP 후보군 발굴	○ NCBI에 등록된 약 500만개의 SNP 위치가 등록되어 있음. ○ 500만개의 SNP 위치 중 솔젠트가 보유하고 있는 쌀 염기서열 분석 결과와 mapping을 통한 candidate SNP 후보군 선별
탐색한 SNP 위치에 대한 국내산 및 중국산 품종별 유전자 대립형 확인	○ 제작된 프라이머를 사용해 품종간 SNP validation 실험 수행 ○ 31개 품종에 대한 염기서열 분석을 통해 SNP 확인	○ 190 조합의 제작된 프라이머를 사용해 국내산 3품종, 중국산 1품종 염기서열 분석을 통해 SNP 확인 ○ 중국산과 국내산 품종을 포함한 3개 품종을 validation이 확인된 프라이머 조합을 사용하여, PCR 증폭 후 염기서열 분석을 수행
SNP 유전자 마커의 품종간 원산지 판별을 위한 마커 조합 분석	○ 국내산 5품종과 중국산 9품종에 대한 SNP 변이구간 확인	○ 국내산 5품종 (주남, 일품, 적진주, 중안, 안다) 과 중국산 9품종 (공육 131, 길생 202, 길갱 81, 요갱294, 연갱25, 길갱88, 요엽14, 용도8, 동농423)을 구별할 수 있는 SNP변이 염기서열 확인 ○ SNP 변이구간을 사용해 마커 조합 분석

제 3 절 3차년도 목표달성도

1. 연구개발의 목표 및 연구개발 수행내용

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
3차 연도 (2012)	제1세부	다양한 DNA chip의 capture probe 고정화 기술 최적화	100	- Capture probe 고정화의 최적 조건을 coating 화합물의 특성, probe에 존재하는 linker의 종류, probe의 농도 등에 따라 설정
		DNA chip 반응 조건 최적화	100	- DNA chip의 샘플 표지 조건 및 반응시간 최적화
		개발된 DNA chip의 실제 샘플 테스트를 통한 성능 검증	100	- 개발된 DNA chip의 성능을 민감도, 특이도, 컷오프 농도, 재현성, 반응 시간 등으로 나누어 측정
	제1협동	품종 판별용 신규 SSR 마커 탐지	100	- 품종 식별용 SSR 마커 탐색
		벼 특정 가변부위 염기서열 분석 및 SNP와 SSR 유전자형 확인	90	- 품종 식별용 마커 세트 개발 : SNP 및 SSR 개발
		쌀 가공품 DNA 추출	100	- 쌀 가공품으로부터 DNA 추출법 최적화
		선정 품종의 종자 증식	100	- 가공품 (떡 등) 제작용 - DNA chip 검정용 종자 증식
	제2협동	쌀 품종에 대한 DNA chip의 SNP 마커 효용성 분석	100	- 쌀 품종에 대한 DNA chip의 SNP 마커 효용성 분석
		개발된 검정 시스템에 대한 실험실간, 분석자간 Ring test 주관	100	- 개발된 검정 시스템에 대한 Ring test 실시 기획 및 결과분석
	제3협동	쌀 가공품의 품종식별용 DNA Chip의 검증 및 상용화	90	- 개발된 DNA chip 기술을 이용해 국내 유통 쌀 가공품에 대한 성능 검증 - 쌀 가공품 검정 kit 상용화

2. 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
다양한 DNA chip의 capture probe 고정화 기술 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ○ Capture probe 고정화의 최적 조건을 coating 화합물의 특성, probe에 존재하는 linker의 종류, probe의 농도 등에 따라 설정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Glass slide의 coating 화합물의 특성 ○ Capture probe의 linker 종류 및 농도 설정
DNA chip 반응 조건 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ○ DNA chip의 혼성화 반응 시간 최적화 ○ DNA chip의 민감도와 특이도 테스트 및 컷오프 농도 설정 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 실제 genomic DNA 샘플의 농도를 고정시키고 LS-PCR을 수행한 PCR product를 DNA chip과 1시간, 2시간, 4시간, 8시간 혼성화 반응을 수행 ○ 실제 genomic DNA 샘플 8종에 대한 민감도와 특이도 테스트를 컷오프 농도 설정 실험과 함께 수행
개발된 DNA chip의 실제 샘플 테스트를 통한 성능 검증	<ul style="list-style-type: none"> ○ DNA chip의 재현성 테스트 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 3일에 걸쳐 3명의 실험자가 동일 PCR product로 DNA chip 혼성화 반응 실험
품종 판별용 신규 SSR 마커 탐지	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내의 품종의 식별을 위하여 선정 품종을 이용하여 새로운 SSR 마커를 탐색 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선정된 국내의 품종 판별을 위해 다형성이 높은 SSR 마커를 25개 이용하여 품종 판별 가능한 마커를 탐색
벼 특정 가변부위 염기서열 분석 및 SNP와 SSR 유전자형 확인	<ul style="list-style-type: none"> ○ 국내의 품종의 식별을 위해 선발된 마커의 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ SSR 마커를 이용하여 선정된 품종들의 다양성을 검정, 품종 특이적인 유전자형 검정
쌀 가공품 DNA 추출	<ul style="list-style-type: none"> ○ PCR을 위한 고순도 DNA 분리 방법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 쌀가공품인 떡과 쌀과자 시료에서 식물체로 부터의 DNA 추출법을 응용하여 고순도의 DNA 추출
선정 품종의 종자증식	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선정된 품종의 종자증식 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 선정된 품종의 종자 증식
쌀 품종에 대한 DNA chip의 SNP 마커 효용성 분석	<ul style="list-style-type: none"> ○ 쌀 품종에 대한 DNA chip의 SNP 마커 효용성 분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 쌀 품종에 대한 DNA chip의 SNP마커 효용성 분석
개발된 검정 시스템에 대한 실험실간, 분석자간 Ring test 주관	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발된 검정 시스템에 대한 Ring test 실시 기획 및 결과분석 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 3일에 걸쳐 3명의 실험자가 중국산 6종의 LS-PCR product로 실험을 수행
쌀 가공품의 품종식별용 DNA chip의 검증 및 상용화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 개발된 DNA chip 기술을 이용해 국내 유통 쌀 가공품에 대한 성능 검증 ○ 쌀 가공품 검정 kit 상용화 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 실제 샘플을 사용해 혼합된 쌀 가공품에 대한 테스트를 수행 ○ 시제품을 제작해서 성능 검증을 수행 ○ 시제품 구성성분을 이용한 프로토콜 확립

제 4 절 관련분야의 기술 발전에의 기여도

1. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

가. 산업화 방향

- 본 연구 과제를 통해 개발된 단일 primer를 이용하여 수십 혹은 수백 개의 SNP site를 동시에 증폭하는 기술은 **쌀 품종 식별뿐만 아니라 다양한 SNP 분석 분야에 적용될 수 있다.**
- 국산 및 수입산 쌀의 혼입품에서 품종을 구분할 수 있는 SNP 및 SSR 마커에 대한 database가 구축된다면, 시판에 유통되고 있는 **쌀 및 쌀 가공품에 대한 원산지 여부 확인이 훨씬 용이해질 것이다.**
- 기존의 single 분석 방법을 DNA chip 기술로 대체함으로써 **초고속 스크리닝 (High Throughput Screening; HTS)이 가능하고, 기존의 기술보다 높은 가격경쟁력 확보가 가능하며, 민감도, 특이도, 재현성 및 활용도 측면에서 월등한 우위가 예상된다.**
- 본 과제에서 개발할 DNA chip 기반의 SNP 분석 시스템은 신속하고, 저비용이며, 대량으로 품종 식별이 가능하므로, **쌀 품종 식별 및 품질관리를 기업 및 정부가 모니터링 할 수 있는 시스템을 구축 할 수 있게 되어 소비자가 안심하고 제품을 선택할 수 있는 기회를 제공할 수 있을 것이다.**
- 신속, 정확한 쌀 품종 식별 방법의 개발로 **쌀 및 쌀 가공품의 품질 보증 체계를 확립하고, 이를 통해 농가의 생산 증대를 유도하며, 궁극적으로는 국내 쌀 시장 활성화에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.**

나. 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과					500	500
경제적 파급효과				1,000	2,000	3,000
부가가치 창출액				2,000	2,000	4,000
합 계				3,000	4,500	7,500

※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치

※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치

※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발결과의 성과 및 활용목표 대비 실적

1. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		신품종				유전자원 등록	논문		기타
	출원	등록	품종명칭 등록	품종생산 수입 신고	품종보호			SCI	비SCI	
					출원	등록				
1차년도	목표	-						1	1	
	달성	1						1	-	
2차년도	목표	1						1	1	
	달성	-						-	1	
3차년도	목표	2	1					2	1	
	달성	2	-					3	-	
4차년도	목표									
	달성									
5차년도	목표									
	달성									
계	목표	3	1					4	3	
	달성	3	-					4	1	

* 연차별 연구성과 목표는 향후 연차평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

2. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	기타
활용건수	목표	1				
	달성	-			1	

3. 논문게제 성과

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2011	Electrochemical detection of DNA mutations on a PNA-modified electrode utilizing a single-stranded DNA specific endonuclease	신수정	박현규	원병연, 정철희, 신성철, 조대연, 이수석	Chemical Communications	47	국외	SCI
2012	Microsatellite를 이용한 자포니카 벼의 다양성 분석	나소	안상낙	상세티, 양바오로, 이현숙	충남대 농업과학연구	39(1)	국내	학진등재후보
2013	Direct detection of unamplified genomic DNA based on photo-induced silver ion reduction by DNA molecules	정예림	박현규	정철희, 박정훈, 김문일	Chemical Communications	49	국외	SCI
2013	A Novel Colorimetric Immunoassay Utilizing the Peroxidase Mimicking Activity of Magnetic Nanoparticles	우민아	박현규	김문일, 정재환, 박기수, 서태석	International Journal of Molecular Sciences	14	국외	SCI
2013	The ASLP Technology: A Novel Platform for Quick and Noiseless Multiplexed SNPs Genotyping	신성철	박현규	김가희, 양희범, 박관우, 강병철	Biosensors and Bioelectronics	진행중	국외	SCI

4. 학회지게제 성과

가. Sujeong Shin, Byoung Yeon Won, Cheulhee Jung, Sung Chul Shin, Dae Yeon Cho, Soo Suk Lee and Hyun Gyu Park, "Electrochemical detection of DNA mutations on a PNA-modified electrode utilizing single-stranded DNA specific endonuclease", Asian Congress on Biotechnology, Everbright Convention & Exhibition Center, May 11-15, Shanghai, China (2011)

나. Sung Chul Shin, Gahee Kim, Hee-Bum Yang, Byoung-Cheorl Kang and Hyun Gyu Park, "A novel method for multiplexed SNPs genotyping on DNA microarray", The 7th International Conference on Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Applications, Sept. 18-22, Chania Crete, Greece (2011)

다. Sung Chul Shin, Gahee Kim, Hee-Bum Yang, Byoung-Cheorl Kang, and Hyun Gyu Park, "A Novel Platform for Custom-designed SNPs Assay on DNA Microarray", The 5th International

Conference on Sensors (ASIASENSE 2011), Oct. 23-26, The Shilla Jeju, Jeju, Korea (2011)

라. Gahee Kim, Sung Chul Shin, Yun Kyung Jung, and Hyun Gyu Park, "Microarray-based SNP Detection using RecA Protein", The 5th International Conference on Sensors (ASIASENSE 2011), Oct. 23-26, The Shilla Jeju, Jeju, Korea (2011)

마. Sujeong Shin, Byoung Yeon Won, Cheulhee Jung, Sung Chul Shin, Dae-Yeon Cho, Soo Suk Lee, and Hyun Gyu Park, "Electrochemical Detection of DNA Mutations on a PNA-Modified Electrode Utilizing a Single-stranded DNA Specific Endonuclease", The 5th International Conference on Sensors (ASIASENSE 2011), Oct. 23-26, The Shilla Jeju, Jeju, Korea (2011)

바. Gahee Kim, Sung Chul Shin and Hyun Gyu Park, "A Novel One-step Hybridization Method Using RecA Protein", The 24th International Symposium on Chemical Engineering, Dec. 2-4, Hyundai Hotel, Gyeongju, Korea (2011)

사. Sung Chul Shin and Hyun Gyu Park, "A Novel Method for Multiplexed SNPs Genotyping on DNA Microarray", 2012 KSBB Spring Meeting, Apr. 11-13, Changwon Exhibition Convention Center, Changwon, Korea (2012)

5. 특허 성과

출원된 특허의 경우					등록된 특허의 경우				
출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호	등록연도	특허명	등록인	등록국	등록번호
2011	Method for Analyzing Gene using SDL-PCR (SDL-PCR을 이용한 유전자 분석방법)	박현규, 신성철, 김가희, 강병철	한국	10-2011-0019225					
2012	Method for Analyzing gene Using SDL-PCR	Hyun Gyu Park, Sung Chul Shin, Gahee Kim, Byoung-Cheorl Kang	PCT 특허	PCT/KR 2012/000 695					
2013	Gene Analysis Method Using SDL-PCR	Hyun Gyu Park, Sung Chul Shin, Gahee Kim, Byoung-Cherl Kang	미국 특허	14/00266 2					

6. 기술료 징수 현황 : 해당사항 없음

기 징수액	당해연도 징수액	향후 징수액	합계

7. 사업화 현황 : 해당사항 없음

사업화명	사업화내용	사업화 업체 개요				기매출액	당해연도 매출액	매출액 합계
		업체명	대표자	종업원수	사업화형태			

8. 인력활용/양성 성과

가. 인력지원 성과

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
4 (제1세부)	2	2			1	3	1	2	1
2 (제1협동)		2			1	1		1	1
1 (제2협동)		1				1	1		

나. 장·단기 연수지원 성과 : 해당사항 없음

장기 (2월 이상)		단기 (2월 미만)	
국내	국외	국내	국외

다. 산업기술인력 양성 성과 : 해당사항 없음

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원

9. 경제사회 파급효과 : 해당사항 없음

산업지원 성과 (단위 : 건)				고용창출 성과 (단위 : 명)		
기술지도	기술이전	기술평가	합계	창업	사업체 확장	합계

제 2 절 성과 활용 계획

1. 분석결과 향후 연구계획

가. 특허분석 측면

- 기존의 SNP 분석용 DNA 증폭기술에 관한 특허는 여러 primer 쌍을 이용하거나 PCR 후 복잡한 추가 과정을 요구한다. 따라서 본 연구 과제를 통해 단일 primer를 사용하면서, 별도의 추가 과정 없이 separation 방법을 이용하여 비 특이적 증폭을 획기적으로 감소시키는 증폭 기술에 대한 특허를 국내 및 국외에 출원할 계획이다.
- 기존의 DNA chip을 이용한 SNP 분석에 관한 특허는 multiplex-PCR이나 single base extension 등에 의존한다. 따라서 본 연구과제에서는 단일 primer를 이용해 하나의 튜브에서 증폭한 수십 개 DNA의 SNP site를 동시에 대량으로 분석하는 방법을 확립하여 SNP 분석용 DNA chip에 대한 특허를 국내 및 국외에 출원할 계획이다.
- 기존 쌀 품종 구별용 마커에 대한 특허는 쌀 혼입품에서의 품종 구별을 할 수 있는 SNP 및 SSR 마커가 매우 제한되어 있다. 따라서 본 연구 과제를 통해 여러 품종이 혼합된 쌀 혼입품에서도 쌀 품종 구별을 정확히 할 수 있는 SNP와 SSR 마커를 발굴 및 database를 구축하여 국내외에 특허를 출원할 계획이다.
- 쌀 가공품에서의 품종 식별용 DNA chip에 관한 특허는 아직 국내외에서 등록된 바 없다. 따라서 본 연구를 통해 복잡한 과정을 거치지 않고, 각종 효소의 사용을 최소화한 쌀 품종 식별용 DNA chip 특허를 국내외에 출원하여 향후 특허 분쟁 등 기술 및 사업화 경쟁에서 유리한 위치를 선점할 것이다.

나. 논문분석 측면

- 기존의 논문은 다양한 SNP 의 분석을 위하여 multiplex-PCR 방법을 통하여 각각의 SNP 를 증폭한 뒤 genotyping 분석이 이루어진다. 하지만, multiplex PCR 방법을 통한 다양한 SNP site의 증폭은 primer-dimer 형성 및 multiple primer로 인한 cross-reaction으로 인하여 수백, 수천 개의 SNP의 분석은 어렵다⁷.
- 이 외에 microarray 를 이용한 다양한 genome sites 분석의 경우, 정확도와 민감도가 떨어지는 단점을 가지고 있다⁸.
- 이러한 단점을 극복하고자, 다양한 SNP site에 특정한 padlock probes를 넣어주고, 이 probe 를 이용하여 SNP를 구별 지은 뒤, universal primer를 이용하여 증폭하고, chip hybridization 을 통해서 검출하는 기술이 2003 년에 보고되었다⁹. 그러나, 위 논문의 padlock probes를 이용한 SNP 분석은, exonuclease 및 uracil-N-glycosylase의 값비싼 enzyme을 요구하며 그로 인하여 가격경쟁력이 떨어지는 단점을 가지고 있다.
- 본 연구과제에서는 다양한 SNP site 분석을 위해 단 하나의 튜브 반응 개발 및 enzyme 사용 최소화를 위한 magnetic bead 기반 분리 방법의 개발을 목표로 연구를 추진하여 국내 및 국제 학술지에 논문을 게재할 계획이다.
- 그 외에 SNP site 분석을 위하여 whole genome amplification (WGA) 방법과 DNA chip을

기반으로 한 초고속 스크리닝 방법이 개발되었으나, 이 방법은 WGA 다음으로 fragmentation 과정과 chip hybridization 뒤에 allele-specific extension 과정 및 signal amplification 과정을 통한 추가적인 분석 과정이 요구된다¹⁰.

- 본 연구팀은 최근 소아 당뇨병과 유방암 관련 유전자 변이를 정확하게 진단하는 DNA chip 기술을 개발하여 유명 국제 저널에 논문을 다수 게재한 바 있다^{11,12}.

- 그러나, 위 논문의 microarray 기반 유전자 진단 기술은 수백, 수천 개의 SNP sites 분석에는 제한적이다. 본 연구 과제를 통해 개발하려는 **하나의 튜브를 이용한 다양한 SNP sites 분석 기술을 확립한다면 초고속 분석 (high throughput) 이 가능해질 것이다.**

다. 제품 및 시장분석 측면

- 국내에선 (주) 바이오메드랩에 의해 HPV 진단을 위한 DNA chip이 2004년 체외 진단용 의약품으로 KFDA의 허가를 받아 실제 임상검사로 사용되고 있으며, (주) 파나진의 자궁경부암 원인 바이러스(Human Papilloma Virus, HPV)의 유전자진단 PNA칩 (PANArray™ HPV)을 2009 세계 최초로 개발 KFDA 허가를 받았을 뿐, 그 외에는 DNA chip 기술을 통한 검사 방법은 개발되지 않는 상황이다.

- 쌀 품종 구별을 위한 분석법은 기존의 SSR 기반의 검정방법을 대체하여 2007년 국립농산물 품질관리원 시험연구소에 의한 ‘실시간 유전자분석기법을 이용한 쌀 품종 분석법’ 및 ‘Genotyping 을 이용한 쌀 SNP 분석법’ 이 개발되고 있다.

- 위의 분석 방법은 Real-time PCR 장비를 이용하는 방법으로, 고가의 장비와 분석기술이 필요하며, multi-plex PCR에 의존하므로 수백, 수천 개의 SNP 분석에는 적합하지 않다는 단점이 있다.

- 국제적으론 특정질병 진단 및 genotyping을 위한 목적으로 다양한 SNP 진단 칩이 개발되고 있다.

- 다양한 쌀 품종 구별을 위해 한 쌍의 primer로 DNA chip 기술을 이용하여 다양한 SNP 를 동시에 검출하는 기술은 아직 국내외에서 개발, 적용된 바 없는 상황에서, 본 기술 개발을 통하여 정확도 및 민감도 확인과 KFDA 승인을 통한 신뢰성 확보를 통해 국내외적으로 기술의 안정성과 검사의 유용성을 인정받는다면, 아직까지 국제적으로 개발되지 않은 쌀 품종 구별을 위한 DNA chip 시장을 선도할 수 있을 것이다.

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 특허, 논문 제품(시장) 분석보고서

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
단일 primer로 다양한 유전자 마커 (SNP, SSR)를 동시에 대량으로 분석할 수 있는 PCR 기술 개발	미국	70	60	90	SNP 분석을 위한 유전자 증폭기술은 미국 대학 및 기업이 압도적임
DNA chip을 이용한 단일염기다형성 (SNP) 및 반복염기서열 (SSR) 분석법 개발	미국	80	75	95	미국 Affymetrix 사: DNA chip 원천기술 보유, 주요 국가에 특허 등록

- ※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
 2) 현재 기술수준은 선진국 100% 대비 우리나라 및 신청한 연구팀의 기술수준 표시
 3) 기술개발 목표수준은 당해과제 완료 후 선진국 100% 대비 목표수준 제시
 4) 부가설명이 필요한 경우 비고란에 작성

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	WIPS 특허 온라인 검색 (http://search.wips.co.kr/)
검색기간	최근 10년간
검색범위	명칭 + 요약 + 대표청구항

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		단일 primer로 다양한 유전자 마커 (SNP, SSR)를 동시에 대량으로 분석할 수 있는 PCR 기술 개발	DNA chip을 이용한 단일염기다형성 (SNP) 및 반복염기서열 (SSR) 분석법 개발
Keyword		multiplex genotyping, SNP, SSR	DNA chip, SNP
검색건수		275	135
유효특허건수		78	70
핵심특허 및 관련성	특허명	Method to determine single nucleotide polymorphisms and mutations in nucleic acid sequence	Methods for high throughput genotyping
	보유국	미국	미국
	등록년도	2009	2009
	관련성(%)	80	70
	유사점	Universal primer를 사용하여 다양한 SNP site 분석	Microarray를 이용한 high throughput SNP detection
차이점	Universal primer를 사용하여 PCR 후, 칩 위에서 single base extension 함으로써 염기 확인	PCR 후 allele-specific probe 이용	
핵심특허 및 관련성	특허명	벼 품종 식별용 프라이머 조합 및 이를 이용한 식별 방법	Method for detecting DNA point mutations (single nucleotide polymorphism (SNP) analysis) and associated arrangement
	보유국	대한민국	미국
	등록년도	2007 (출원)	2009
	관련성(%)	70	70
	유사점	각각의 벼 품종에 특이적인 SNP를 마커로 사용함	칩 위에서 capture/target DNA hybridization 이용
차이점	단일 PCR 반응물에 10쌍의 프라이머를 동시에 사용, 벼 품종 특이적인 SNP를 각 프라이머 쌍의 PCR 증폭 여부로 확인함	온도 조절에 따른 melting curve analysis로 point mutation 구분, 온도 control 필요	
핵심특허 및 관련성	특허명	국내 및 일본 자포니카 벼 품종판별용 마이크로세틀라이트마커조합 및 이의 코드	Zip - Code 올리고염기 칩을 이용한 단일염기 다형성검사 방법과 검사 키트
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2006 (출원)	2004
	관련성(%)	50	60
	유사점	품종별로 16자릿수의 코드가 부여되게 함으로써 품종 혼입 분석에 이용	단일염기다형성을 대량으로 분석
차이점	Microsatellite marker로 구성된 마커조합에 의해 부여되는 품종 고유 밴드의 크기(bp)를 코드화함	기존의 PCR 및 LCR 방법 이용, 분석용 chip에 zip-code 방식을 적용	

- ※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미
- 2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 특허를 의미
- 3) 핵심특허는 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 특허를 기준으로 분석

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽, 대한민국
논문 DB	pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov)
검색기간	최근 10년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명	단일 primer로 다양한 유전자 마커 (SNP, SSR)를 동시에 대량으로 분석할 수 있는 PCR 기술 개발	DNA chip을 이용한 단일염기다형성 (SNP) 및 반복염기서열 (SSR) 분석법 개발	
Keyword	Multiplexed genotyping	DNA chip technology	
검색건수	128	5201	
유효논문건수	23	121	
핵심논문 및 관련성	논문명	Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes	Diagnosis of HNF-1 mutations on a PNA zip-code microarray by single base extension
	학술지명	Nature Biotechnology	Nucleic Acids Research
	저자	Paul Hardenbol	Jae Yang Song
	게재년도	2003	2005
	관련성(%)	80	60
	유사점	Universal primer 를 이용한 다양한 gene 분석가능	DNA chip 을 이용한 SNP 분석
차이점	Ligation product 분리 시 magnetic bead 를 사용함으로, 비용감소 및 간편화	수백개의 SNP sites 를 동시에 분석하는 것이 어려움	
핵심논문 및 관련성	논문명	Highly multiplexed molecular inversion probe genotyping: Over 10,000 targeted SNPs genotyped in a single tube assay	A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology
	학술지명	Genome Research	Nature genetics

	저 자	Paul Hardenbol	Kevin L Gunderson
	게재년도	2005	2005
	관련성(%)	70	60
	유사점	Universal primer 를 이용한 다양한 gene sequence 분석 가능	Microarray technology를 이용한 gene sequence 분석
	차이점	다양한 enzyme 처리 과정 요구	Chip hybridization 과정 후, 추가적인 allele specific extension 과 signal amplification 과정 요구
핵심 논문 및 관련성	논문명	A comprehensive assay for targeted multiplex amplification of human DNA sequences	Development of a single tube 640-plex genotyping method for detection of nucleic acid variations on microarrays
	학술지명	Proceedings of the National Academy of Sciences	Nucleic Acids Research
	저 자	Sujatha Krishnakumar	Kaarel Krjutkov
	게재년도	2008	2008
	관련성(%)	70	50
	유사점	Universal primer 이용 다양한 gene 분석 가능	Microarray 를 통한 다양한 gene 의 초고속 스크리닝 가능
	차이점	다양한 enzyme 처리과정 요구	Target 의 chip hybridization 과정 후에, single base extension 의 추가적인 분석과정 요구

※ 1) 개발기술명은 본 연구과제 최종 연구개발 목표기술을 의미

2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효논문건수는 검색한 논문 중 핵심(세부)개발기술과 관련성이 있는 논문을 의미

3) 핵심논문은 개발기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 논문을 기준으로 분석

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

(1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내 바이오칩 시장은 '05년 232 억원이며, '05년 이후 '15년까지 연평균 36.5% 성장률로 성장하여 '15년 5,220 억원의 규모가 될 전망이다¹³.

- 현재 진단용 DNA chip은 체외진단용 의약품으로 분류되어 있으며, 2004년 (주) 바이오메드랩에 의해 HPV 진단을 위한 DNA chip이 체외 진단용 의약품으로 KFDA의 허가를 받아 실제 임상검사로 사용되고 있다¹⁴.

- (주) 파나진이 자궁경부암 원인 바이러스(Human Papilloma Virus, HPV)의 유전자진단 PNA칩 (PANArray™ HPV) 을 세계 최초로 개발하여 KFDA 허가를 받았다¹⁵.

- 파나레이™ HBV (PANArray™ HBV)는 PNA capture probe를 사용하여 염기서열에 대한 높은 특이성과 민감도를 나타내며 기존 DNA microarray 에서는 분석이 어려운 SNP (single

nucleotide polymorphism)를 포함하여 point mutation의 분석을 대상으로 한다¹⁵.

- 국립농산물품질관리원 시험연구소는 기존의 쌀 품종식별법을 개선한 ‘실시간 유전자분석기법을 이용한 쌀 품종 분석법’ 및 ‘Genotyping 을 이용한 쌀 SNP 분석법’ 을 (주) 코젠바이오와 공동으로 개발하여 특허를 출원하였다. 이 유전자분석법은 SNP 마커를 이용해 기존의 검정방법 (SSR)에서 식별이 어려웠던 혼입된 품종 명까지 식별할 수 있는 검정방법으로, 종전보다 적은 인력과 비용으로 신속·정확한 분석을 제공한다¹⁶.
- KIAGEN, (주) 코젠바이오 등에서 쌀 품종 구별을 위한 SNP 분석법을 이용하여 혼입율 검정 (품종검정) 및 계통검정을 수행한다¹⁷.
- DNA chip 기술을 이용하여 다수의 쌀 품종을 식별하는 SNP 분석 기술은 아직 국내외에서 개발, 적용된 바 없다.

(2) 국외 제품생산 및 시장 현황

- 세계 바이오칩 시장은 연평균 36.5 %의 성장률로 성장하여 '05년 9억 달러에서 '15년 203억 달러의 시장을 형성할 전망이다¹³.

[바이오칩 분류별 세계 시장 현황 및 전망]

(단위: 백만달러, %)

구 분	'05년	'10년	'15년	연평균 성장률
DNA칩	657	2,075	6,015	25.0
단백질칩	54	858	6,015	60.4
Lap-on-a-chip	194	1,579	8,140	45.3
총 계	905	4,510	20,350	36.5

자료 : 생명공학정책연구센터, 2008

< 표 1. 바이오칩 분류별 세계 시장 현황 및 전망¹³ >

- DNA chip은 Affymetrix, Hyseq, Nanogen, Cepheid 등의 벤처기업을 중심으로 연구가 활발히 진행되고 있으며 최근에는 Agilent Technologies, Motorola, Hitachi사와 같은 대기업이 벤처기업과 연합, 제휴하면서 이 분야에 뛰어들고 있다. 대표적인 예로, Nanogen사는 반도체 MEMS 기술을 이용한 미소진극 어레이와 미소유체제어소자를 결합한 Nanochip 을 개발하였고, 이를 이용하여 DNA 단일염기 다형성 (SNP)을 검출하는 것을 목표로 하고 Hitachi 사와 연합, 제휴하여 시스템 개발을 수행하고 있다¹⁸.
- DNAVision은 high density Affymetrix Mapping arrays를 사용하여 500 ng의 genomic DNA 로부터 1,800,000 SNP 를 분석을 가능하게 한다¹⁹.
- DNAVision은 Affymetrix GeneChip® Application-Specific Fixed Assays를 이용하여 20,000 SNP 분석을 제공한다. 이 assays는 ParAllele Biosciences에 의해 개발된 Molecular Inversion Probe (MIP) 기술에 바탕을 두고 있다¹⁹.
- Affymetrix는 특정 질병의 진단과 genotyping을 위한 MIP technology assays를 제공하고

있다.

- Keygene은 SNP site의 초고속 스크리닝을 위한 multiplexed technology (SNPWave®)을 개발하고, 이 기술을 통하여 인간 유전 질병 진단 및 농작물의 genetic diversity 분석 및 genetic mapping에 사용하고 있다²⁰.
- KeyGene 은 손쉽게 사용가능한 소형의 10-90-plex assays를 개발하였다.

Company	Platform	Throughput
Applied Biosystems Group	TaqMan — 5' nuclease assay with ABI Prism 7700 or 7900 HT sequence detection system	200,000 per day on 7900 HT
Illumina Inc.	BeadArray technology deployed on Sentrix array matrices	More than 1 million genotypes per day (using 7 matrices)
Luminex Corp. (with Tm Bioscience Corp.)	Universal Array platform — xMAP bead system	240,000 genotypes per day
Orchid BioSciences Inc.	SNPstream UHT — SNP-IT tag array technology	800,000 genotypes per day
Pyrosequencing AB	PSQ 96 and PTP systems — sequencing by synthesis	100,000 genotypes per day (Can be increased through multiplexing)
Qiagen Genomics Inc.	Masscode — PCR-based SNP discrimination assay	65,000 genotypes per day
Sequenom Inc.	MassARRAY 7K, 20K, and 200K systems	200,000 genotypes per day on the 200K system
Third Wave Technologies Inc.	Invader — allele-specific hybridization with novel signal-amplification technology	500,000 genotypes per day.

< 표 2. 기업별 SNPs 분석 방법 및 성능 분석²³ >

- Illumina사는 정확한 SNP 발견과 구조 변화의 분석을 위한 sequencing technology를 보유하고 있다²¹.
- Applied Biosystems은 TaqMan® SNP Genotyping Assays를 이용하여 손쉽고 간편한 단일 튜브 형태의 genotyping service를 제공하고 있다²².
- Applied Biosystems은 200,000 validated SNP assays 제공, Sequenom Inc. 는 RealSNP.com Web site를 통하여 400,000 SNP assays 제공, Orchid BioSciences Inc.와 Third Wave Technologies Inc.는 100,000 assays, 그리고 Illumina Inc.는 10,000 assays를 제공하고 있다²³.
- 다수의 농산물 품종에 대한 품종 식별 DNA chip 기술은 아직 국내외 적으로 개발된 사례가 없다.

제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

제 8 장 참고문헌

1. 2010 농식품 신기술 (I) 식량분야-벼. 농촌진흥청 2010
2. J. Hacia et al., *Nat. Genet.* 14, 441-7 (1996)
3. O. Panaud et al., *Mol. Gen. Genet.* 252, 597-607 (1996)
4. J. Jung, 서울대학교 학위논문 (2005)
5. D. Jackson et al., *Am. Nat.* 133, 436-453 (1989)
6. H. Singh et al., *Mol. Breed.* 25, 359-364 (2010)
7. E. M. Elnifro et al., *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 559 - 570 (2000)
8. D. J. Lockhart et al., *Nat. Biotechnol.* 14, 1675 - 1680 (1996)
9. P. Hardenbol et al., *Nat. Biotechnol.* 21, 673 - 678 (2003)
10. K. L. Gunderson et al., *Nature Genet.* 37, 549 - 554 (2005)
11. J. Y. Song et al., *Nucleic Acids Res.* 33, 19-26, (2005),
12. A. Girigoswami et al., *Journal of Nanosci. and Nanotechnology*, 9, 1019 - 1024, (2009)
13. '바이오칩 산업 및 동향', 지식경제부 기술표준원, 2008
14. http://www.bmelab.com/product/product1_view.asp?menu=2_1&pro_key=2
15. <http://www.panagene.com/panarray-hpv-hbv.php>
16. '신속한 쌀 품종식별 DNA분석법 특허 출원' 국립농산물품질관리원, 2007
17. <http://www.kiagen.co.kr/service/service02.asp>
18. Bio-MEMS의 기술동향, 한국과학기술정보연구원
19. <http://www.dnavision.be/pharmacogenetics.php>
20. <http://www.keygene.com/>
21. http://www.illumina.com/applications.ilmn#snp_discovery_and_structural_variation_analysis
22. <http://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab;jsessionid=zy0tLj6Xn54L118NnP tTVZ9mVhDZ1fnxRjxjMpQkWtzpZfRQ212q!-1263767624?cmd=catNavigate2&catID=600769&tab=DetailInfo>
23. http://www.bio-itworld.com/archive/090902/pharma_sidebar_1116.html