

발간등록번호

11 1541000 000481-01

STS 프라이머 세트를 이용한 벼 품종판별용
DNA 판정 시스템 및 판정기 개발

Development of an identification system and an
identification device of rice varieties by
STS primers sets

(주)케이엔유라이즈벌

농림수산물식품자료실



0004559

농림수산물식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “STS 프라이머 세트를 이용한 벼 품종판별용 DNA 판정 시스템 및 판정기 개발”에 관한 연구과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 5월 29일

주관연구기관명 : (주)케앤유라이스밀

주관연구책임자 : 홍 동 혁

세부연구책임자 : 안 덕 종

세부연구책임자 : 박 경 규

연 구 원 : 하 유 신

연 구 원 : 김 경 남

연 구 원 : 문 선 미

연 구 원 : 손 철 민

요 약 문

I. 제 목

STS 프라이머 세트를 이용한 벼 품종판별용 DNA 판정 시스템 및 판정기 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구의 필요성

우리 주식인 쌀은 고품질 다수성 품종 육성과 재배기술의 발전과 최근 쌀 소비량의 감소, 세계자유무역협정의 FTA 협상에 따른 쌀의 수입량 증대 등으로 국내 쌀 산업은 큰 위기에 처한 실정이다.

이러한 국내 쌀 산업의 경쟁력 제고를 위하여 고품질 벼 품종 선정과 고품질 쌀 생산을 위한 재배기술 개선을 통해 고품질 쌀 생산을 위한 연구가 강화되고 있으며, 쌀의 생산, 가공, 유통에 이르기까지 투명성과 소비자에 대한 신뢰도 증대를 위한 생산 이력제 및 품종표시의 의무화 등이 추진되고 있다.

그러나 국내에 유통되고 있는 브랜드 쌀은 1,232종이나 되나 소비자의 고품질 쌀에 대한 인식 부족과 정보제공 미흡으로 유통되는 브랜드 쌀간에 품질 차별화가 되지 않고 있으며, 특정 지역의 소수 품종의 인지도에 의하여 가격 차별화가 이루어지고 있는 실정이다. 이 또한 특정지역의 생산량을 고려했을 때 년 중 유통되는 현상은 불가능하며, 결과적으로 다른 지역에서 생산된 벼를 혼합 도정하여 특정 브랜드 쌀로 유통시킴으로서 품질저하와 국내산 쌀의 경쟁력을 떨어뜨리고 있다.(작물과학원 조영찬)

따라서 혼합미에 의한 부정을 방지하고 포장의 표시와 내용물이 일치하는지 여부를 과학적 근거에 기반을 두고 쉽지만 고정밀도로 판정하는 기술의 개발이 요구되어 지고 있다. 또한 품종 보급에 있어서도 품종의 작물학적 특성, 자연환경 및 사회적 요인이 복잡하게 관여되어 주요품종들에 대한 품종판별은 각 품종들 간의 구별성 뿐만 아니라 품종의 순도 유지를 위해서도 매우 중요하다.

현재 국내 양곡법에서는 품질표시 의무사항이 적용돼 품종명, 산지, 정미년월일, 판매자, 내용량을 표시하는 것이 의무화 되어 있으나, 혼합미에 의한 부정을 방지하고, 포장의 표시와 내용물이 일치하는지 여부를 과학적 근거에 기반을 두고 쉽지만 고정밀도로 판정하기에는 어려움을 가지고 있어 실제 적용과 확인에는 어려움이 있다. 실제적으로 국내에서 벼의 품종개량의 노력으로 인하여 현재 약 163종의 많은 품종이 개발되었으며, 2006년 장려품종으로 고시된 품종만도 113개 품종(농림부 2006)에 이른다.

이에 국내에서는 벼의 품종 판정을 위한 다양한 연구가 있어 왔으며, 종래에 벼의 품종판별에는 ①식물체나 곡립의 형태, 출수기 등의 특성에 착안한 판별이나, 화학해석을 이용한 곡형의 차이에 의한 판별, ②알콜용해성 단백질을 capillary electrophoresis로 분석하고 품종간 단백질 패턴의 차이를 비교 분석하는 방법, ③쌀이나 밥의 향을 휘발성 물질과 가스센서가 반응하여 검출된 전기저항변화를 주성분 분석이나 판별분석 등의 패턴 인식 소프트웨어를 이용해 향기패턴의 차이로 품종을 구별하는 방법 등이 있었으나, 이들은 기후나 재배조건에 의한 영향을 받으며, 전체 품종 판별에 대한 신뢰할 수 있는 결과물을 가지지 못하는 등의 문제점이 있어 실용화되기에는 어려웠다.

최근 국내에는 품종간의 판별에 기후나 재배조건에 의한 영향을 받지 않고 보다 미세한 DNA서열의 차이에도 그 차이를 알아낼 수 있는 PCR을 이용한 DNA 판정 기술이 도입 연구되고 있다. 하지만 품종 육성자의 권리보호와 품질의 고위 안정화를 위한 품종 판별 기술의 확립이 강하게 요구되는 실정에도 불구하고 분자마커에 의한 작물의 품종확인과 순도유지를 위한 기술개발은 미흡한 실정이다. 현재 국내에서는 농업진흥청 작물과학원과 국립 농산물품질관리원에서 각각 SSR방식(반복염기서열분석법)과 SNP방식(단일염기다형성 분석법)의 유전자 분석 방법을 사용하여 벼의 품종 판별을 위한 분자마커를 개발해 사용하고 있다. SSR방식은 품종판별을 위하여 찾아진 6개의 microsatellite마커를 염색체 번호순서대로 조합하므로 품종별 열한자리수의 고유코드번호가 부여되는 것을 특징으로 하며, 품종 판별 및 유연 관계 분석에 효율적으로 이용 가능하다. SNP방식은 전체 DNA 중에서 하나의 돌연변이 염기를 표시인자로 이용하는 것으로 SNP 마커를 이용하여 검정업무 시 작업이 편리하고 품종별 구분이 명확하며, 유전자칩을 이용하여 다량의 시료를 속성으로 분석하는데 이용할 수 있다.

그러나 이러한 앞의 유전자 판별기법은 6개의 마커로 판별이 가능하지만 증폭이 안정되지 않는 문제점이 있다고 보고되고 있다.

또한 이들 유전자분석 방법은 시료를 ①분쇄하여 ②DNA 추출 buffer를 이용하

여 단백질과 RNA 등을 제거하고 순수한 DNA를 추출한(Extraction buffer를 이용 DNA 추출 → 단백질 제거 → 에탄올을 이용하여 salt 제거 → DNA 추출 상태 확인 → DNA 농도조절) 다음 ③ 시약과 혼합 후 PCR을 이용하여 DNA 증폭 후 ④ 전기영동기에서 DNA를 분리하고 ⑤DNA 염색 후 확인한다. 이 후에 ⑥마커별 실험결과를 종합하여 혼입율을 계산하는 일련의 과정을 거쳐야 하므로 전문적인 지식 뿐만 아니라 여러 가지 필요한 고가의 유전자 분석 장비를 사용하여야 하므로 전문 기술 인력이 필요하며, 현장의 실제적인 적용에 어려움이 있다.

반면 최근 일본에서는 일본 국내 쌀(211품종)을 판별할 수 있는 STS(Sequence-Tagged Sites) 프라이머 세트를 개발하고, 이를 이용하여 신뢰성 있는 결과를 도출할 수 있는 DNA 판별 시스템 개발하여 현재 일본 내 컨트리엘리베이터 등에 보급하는 등 실용화를 시도하고 있다. STS 프라이머 4세트를 이용하여 품종을 판별 할 수 있는 방법으로 판정시간 및 비용을 단축할 수 있는 장점이 있다.

본 연구는 기존의 국내에서 개발된 국내산 벼 품종 판별에 대한 문제점을 해결하기 위하여 ①국내산 벼 품종에 대한 고유의 유전자 마커를 찾아내고, 공정을 자동화 내지는 단순화 시키고 측정 시 발생하는 인적 오차를 최소화 시킬 수 있으며, 검사기관, RPC, 유통기관 등 다양한 현장에서 누구라도 정확하고 신속하게 품종을 판정할 수 있는 ②유전자 마커를 이용한 벼 품종 판정 시스템 및 DNA 판정기를 개발하는 것이 필요하다.

2. 연구의 목적

현재 국내에서 시장에 유통되고 있는 다양한 벼의 품종에 대한 기존에 연구된 판정방법은 실용적인 측면에서는 아직은 매우 미흡한 수준이다. 최근에는 혼합비에 의한 부정을 방지하고 포장의 표시와 내용물이 일치하는지 여부를 과학적 근거에 기반을 두고 있는 고정밀도로 판정하는 기술의 개발이 요구되고 있지만 벼 품종 판정에 있어서 대부분의 경우 전문적인 지식이나 기술이 요구될 뿐 아니라 고가의 정밀한 기자재가 구비되어있는 전문 검사기관에 위탁 시킬 수밖에 없고, 따라서 판정에 소요되는 시간도 오래 걸릴 수밖에 없는 실정이다. 본 연구는 이러한 문제점을 해결 하기위하여 국내에서 생산되는 벼 품종별 고유의 유전자 마커를 STS(Sequence-Tagged Site) 프라이머 세트를 이용하여 찾아내고, 국내산 벼 품종 판별에 대한 작업 공정을 자동화 내지는 단순화 시키고, 측정 시 발생하는 인적 오차를 최소화 시킬 수 있으며, 검사기관, RPC, 유통기관 등 다양한 현장에서 누구라도 정확하고 신속하게 품종을

판정할 수 있는 벼의 품종 DNA판정 시스템 및 판정기를 개발하는데 목적이 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

국내산 벼의 품종 DNA 판정 시스템 및 판정기를 개발하기 위하여 본 연구에서는 1. DNA 판정 시스템 및 DNA 판정장치의 개발,
2. 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트의 개발,
3. DNA 데이터베이스 구축, 판정 알고리즘 개발 및 전용 소프트웨어 개발의 연구를 수행하였다.

(1)의 “DNA 판정 시스템 및 DNA 판정장치의 개발”에서는 다양한 품종의 벼가 가지고 있는 DNA를 분석하기 위하여 DNA를 추출하고, PCR 방법을 이용하여 DNA를 증폭한 다음 품종을 판정하는 효율적인 DNA 판정 시스템을 개발하기 위하여 ①분쇄, 교반하는 전처리 공정과 ②DNA를 추출하는 공정 및 DNA 농도를 조절하는 공정, ③ 추출된 DNA를 증폭하는 공정, ④DNA를 확인하여 품종을 판별하는 공정으로 나누고, 각 공정에 필요한 최적의 유전자 분석기기들로 구성된 DNA 판정시스템을 개발하였으며, 샘플의 DNA를 분석하여 데이터베이스화 된 품종과 비교하여 DNA를 판정하는 벼 품종 판별용 DNA 판정기를 개발하였다.

(2)의 “멀티플렉스 PCR 프라이머 세트의 개발“에서는 본 연구는 전국에서 재배되고 있는 163개의 벼 품종(2007, 농림부)에 대하여 STS 프라이머 세트를 이용하여 벼의 DNA 데이터를 확보하는 것으로 다음의 방법으로 연구가 수행 되었다.

① 품종 간에서 다양한 형태의 DNA 단편 염기서열을 결정해 수십조(15조 예상)의 STS화 프라이머 세트를 설계하고, ② PCR 프라이머 세트를 이용하여 전 품종 각각에 관해 PCR을 행하고, 품종 특유의 밴드를 확인하였다. ③ 설계한 수십조의 프라이머가 서로 간섭하지 않도록 염기서열과 프라이머를 조합하고, PCR 조건 등을 검토하여 4개의 세트로 집약하였다. ④집약된 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트를 이용 PCR을 실행해 각각의 품종에 있어서 이변이 발생하지 않음을 확인하였으며, ⑤이를 통하여 국내에서 재배되고 있는 모든 벼의 품종을 판별할 수 있는 STS 프라이머 세트를 개발하고, 품종 고유의 밴드를 확보할 수 있었다.

(3) “DNA 데이터베이스 구축, 판정 알고리즘 개발 및 전용 소프트웨어 개발”에 있어서는 본 연구는 개발된 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트를 이용하여 ① 전 품종에 대하여 품종별 고유코드를 확보하였으며, ②이를 데이터베이스화 한 뒤에, 샘플의 DNA와 비교하여 품종을 판정하는 판정 알고리즘 개발하였다. 이후 ③이들을 통합하여

며 품종 판별용 전용 소프트웨어를 개발하였다.

최적의 DNA DB 구축을 위하여 품종과 품종별 고유코드를 테이블로 작성하고, 새로운 품종의 고유밴드 입력 및 수정을 쉽게 할 수 있도록 DB를 구축하고, 샘플의 품종 판별은 DNA 판정기에서 데이터를 전송받아, 구축된 DB와 비교하여 판정을 할 수 있도록 개발 하였다.

IV. 연구개발결과

본 연구에서는 다양한 품종의 벼가 가지고 있는 고유의 DNA를 분석하여 쌀 품종을 판정할 수 있는 STS 프라이머 세트를 개발하고, 이를 이용하여 쉽고 효율적인 DNA 판정 시스템을 개발하기 위하여 본 연구가 수행되었다.

DNA 판정 시스템으로는 ①분쇄, 교반하는 전처리 공정과 ②DNA를 추출하는 공정 및 DNA 농도를 조절하는 공정, ③추출된 DNA를 증폭하는 공정, ④DNA를 확인하여 품종을 판별하는 공정으로 나누어 져 있으며, 본 연구에서는 각 공정에 필요한 최적의 유전자 분석기기들을 구성하였다. 또한 최종적으로는 본 연구에서 개발한 STS 유전자 마커를 이용하여 각 품종의 고유밴드를 확보하고, 이를 데이터베이스화 하여 샘플의 DNA를 비교 분석하여 벼의 품종을 판정 할 수 있는 벼 품종 판별용 DNA 판정기 시스템을 개발하였다.

본 연구에서 수행된 종합 결과는 다음과 같이 요약할 수 있다.

1. 본 연구에서는 벼 품종 판정을 위하여 10bp 정도의 길이를 가지는 매우 짧은 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 하고 이 결과를 전기영동에서 확인하였으며, ① RAPD(Random Amplified Polymorphic DNAs)법을 이용하여 DNA 단편 염기서열을 결정한 다음 여러 개의 STS 프라이머를 설계하고, ②설계한 수십 개의 프라이머가 서로 간섭하지 않도록 프라이머를 조합하기 위해서 PCR 조건 등을 검토하여 최소의 세트로 집약한 멀티플렉스 STS 프라이머 세트를 개발하였다.

2. 이 결과 15개의 STS화 프라이머를 4키트로 집약 가능해져, Annealing온도는 4키트 전부 60℃로 통일하였으며, 프라이머 1,2,3,4(키트1), 프라이머 5,6,7,8(키트2), 프라이머 9,10,11,12(키트 3), 프라이머 13,14,15(키트4)를 4개의 키트로 묶었다.

3. 개발 된 STS 유전자 마커를 이용하여 국내 143개 품종들에 대한 STS Primer 반응

을 조사하였으며, 4개의 키트에 대한 각각의 Primer에서 품종마다 서로 다른 상이한 반응을 보여 본 연구에서 개발한 Primer는 품종 판별에 적합하다고 할 수 있었다.

4. 본 연구에서는 STS 유전자 마크를 이용하여 143종의 각 품종별 반응에 대한 데이터를 확보하였으며, 이를 근거로 하여 판정 알고리즘을 개발하고, 품종별 D/B를 DNA 판정기를 통하여 입수된 정보와 비교 분석하여 최종적으로 품종을 판정하는 판정기 및 전용 소프트웨어를 개발하였다.

6. 본 연구에서 개발된 품종 자동 판정기의 판정 소프트웨어를 범용의 자동전기영동장치와 연결하여, 전기영동장치에서 읽은 DNA 피크 신호를 받아 데이터베이스와 비교 분석하여 자동으로 벼 품종을 판정할 수 있도록 함으로써 범용기기와의 호환이 가능하도록 하였다.

7. 기존의 방법에 의한 유전자 판별법에 의한 오차의 범위는 $-12.8\% < \varepsilon < +12.8\%$ 였으며, 본 연구에서 확립된 방법에 의한 오차의 범위는 $-1.6\% < \varepsilon < +1.6\%$ 로 나타났다. 이 경우 최악의 경우라도 우리나라의 단일 품종의 판정기준이 되는 80%를 만족하려면 81.6% 이상이면 95% 신뢰 수준에 의하여 이 벼는 어느 특정의 품종이 80% 이상이라고 말 할 수 있다.

8. 본 연구에서 개발된 시스템을 이용하여 현장 적용 시험을 실시하였으며, 경상북도의 브랜드쌀을 조사한 결과 대부분이 순도 80% 이상인 것으로 나타났으며, 탑라이스의 경우 순도율에서 모두 95% 이상으로 높은 값을 나타내었다.

종합적인 결론으로 본 연구에서 개발된 시스템은 우리나라에서 생산되는 벼의 품종 판정에 적용 가능한 것으로 판단된다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

가. 특허 출원

- 출 원 일 자 : 2009.02.03
- 특 기 사 항 : 심사청구(유) 공개신청(무)
- 출 원 번 호 : 10-2009-0008483(접수번호 1-1-2009-0066750-63)
- 출원인 명칭 : (주)케엔유라이스밀(1-2008-057601-1)
- 대리인 성명 : 최규환(9-2005-001504-0)
- 발 명 명 칭 : 벼 품종을 구분하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도
- 발명자 성명 : 홍동혁, 안덕중

나. 시연회 개최

- 행 사 명 : DNA 품종 판정 장치
- 기 간 : 2009년 2월 10 - 11일
- 장 소 : (주)케엔유라이스밀 인증센터
- 주 최 : (주)케엔유라이스밀
- 주 관 : 경북대학교 생물산업기계공학과

다. 홍보실적

- 홍보유형 : 신문, 인터넷 신문
- 매 체 명 : 대구 경북 Break News(국내)
- 홍보일자 : 2010년 3월 29일
- 제 목 : 벼 DNA 판정 시스템 개발
- 홍보내용 : (주)케엔유라이스밀과 경북도농업기술원과 공동으로 개발한 DNA 판정 시스템인 전문가에 의해서 수작업으로 진행되는 것을 자동화를 통하여 사용자가 쉽게 사용할 수 있도록 하였으며, 현장에서 수집된 벼의 DNA 검사를 통하여 품종의 진위 여부를 판별해 오고 있다.

2. 활용계획

가. 인증기관 등록

본 연구는 연구과제와 관련하여 2008년 국립농산물 품질관리원에서 인증하는 쌀 품종 인증기관으로 인증허가를 받아 현장에서 수집된 벼의 DNA 검사를 통하여 품종의 진위 여부를 판별해 오고 있으며, 이번의 연구의 성과를 통하여 기존의 DNA 검사법에 비하여 뛰어난 본 연구의 검사법을 도입할 계획이다.

나. 학회지 논문 투고

본 연구의 결과로 파생한 국내산 벼를 판정할 수 있는 유전자 마커에 대하여 유전자 자료로 등록하고, 현재 SCI 논문에 게재될 수 있도록 논문 투고를 준비 중이며, 이를 통하여 기술의 신뢰성을 높일 예정이다.

다. 사업화

현재 본 연구에서 개발된 DNA 판정 시스템의 국내 판매를 위하여 준비 중에 있으며, 검사기관 및 RPC 현장의 2개소에 설치를 할 예정으로 있다.

라. 시책건의

현재 국내에서는 양곡법을 개정하여 품종의 표시를 의무화 하고 있으며, RPC 등에서 품종 제한 수매제를 통하여 단일품종에 대한 가공을 할 수 있도록 유도하고 있다. 이러한 품종의 혼입을 방지하고 고품질 벼의 생산과 가공을 추구하는 정책이 실현되고 있으나, 이를 검증할 수 있는 검사기관 및 현장에서의 검사능력은 이를 뒷받침하지 못하고 있는 실정이다. 현재 약 30개소의 인증기관이 있어 대부분의 생산자, 가공 및 유통 업체들이 검사료를 지불하고 검사를 진행하고 있으나, 가공업체나 유통 업체들의 경우 매일 생산되는 각 상품들에 대한 검사의 진행이 어려워 실제적으로는 많은 어려움을 겪고 있다. 본 연구에서는 비 숙련자라도 1일 정도의 교육을 받고 자동화된 시스템을 통하여 빠른 시간에 검사할 수 있는 시스템을 개발하였으며, 현장에서 신속, 정확하게 판정할 수 있어 현장에 개발된 시스템을 설치할 수 있도록 시책 건의를 할 예정이다.

마. 후속연구

개발된 STS 유전자 마커 및 DNA 판정시스템을 활성화하기 위해서는 새롭게 고시되는 품종에 대한 지속적인 연구와 현재 시장에서 인기를 끌고 있는 일본산 품종의 검사 및 미국산 및 중국산 품종에 관한 검사까지도 원활히 할 수 있도록 지속적인 연구가 진행되어야 하며, DNA 판정 시스템을 처음부터 마지막까지 완전 자동화할 수 있는 기계 및 장비의 개발에 대한 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

SUMMARY

I. Title

Development of an identification system and an identification device of rice varieties by STS primers sets

II. Results and conclusion of the research

In order to develop a new decision making method to identify domestic rice varieties cultivated in Korea, 143 varieties of rice DNA which represent its characteristics were analyzed by PCR method. For the study, 15 sets of STS(Sequence-Tagged Sites) Primers were developed to identify gene arrangement to distinguish each characteristics of rice varieties.

Also, DNA bands which are unique to each variety can be developed based on the STS DNA marker developed in this study. These DNA bands were stored as the data base.

Based on these results, a decision making system which can be identified rice variety was developed.

The obtained results can be summarized as follows;

1. The short length primer having 10 bp could be amplified by PCR and these results could be examined by electrophoresis.
2. Also, DNA genomic sequences of domestic rice varieties can be determined and then these multiple sets of STS primer could be designed by RAPD(Random Amplified Polymorphic DNAs) method.
3. By combining of genomic sequences and primers which are not interfere each other and by considering of PCR conditions, multiplex primer sets which combination of minimum number primers were developed. As results of the study, 15 sets of STS primers can be integrated into four kits as Kit 1, Kit 2, Kit 3 and Kit 4.

4. Also, annealing temperature of all four Kits can be used uniformly as 60°C
5. Reactions of STS Primer on 143 domestic rice varieties were evaluated by STS DNA marker developed. Every domestic rice variety showed different reaction to this four Kits developed. Therefore it is possible to make a conclusion that Primer developed in this study is suitable for identifying the domestic rice variety.
6. Data enable to identify 143 domestic rice varieties can be obtained based on STS DNA marker. Also, evaluating algorithm to find out rice variety could be developed. Consequently a software enable to identify the variety was developed based on the data and information from DNA data base studied and DNA identification instrument.
7. These DNA decision making system consists of four stages as follows;
 - ① grinding and mixing process of the samples
 - ② DNA extraction and its density controlling process
 - ③ amplifying process of extracted DNA
 - ④ decision making process by identifying the DNA of its variety.
8. Error range of the existence identification method is $-12.8\% < \varepsilon < +12.8\%$. However, the error range of the method developed in this study is $-1.6\% < \varepsilon < +1.6\%$ based on 95% confidence interval. Therefore the method developed in this study has more accuracy than the existence method.
9. The result tested as an application of the system developed to the rice produced in Kyungpook region turned out positive.
In case of Top Rice, it has more than 95% purity rate.

CONTENTS

Chapter I. Introduction	19
Section 1. Necessity and Objectives	19
1. Necessity	19
2. Objectives	19
Section 2. Objectives and Contents	23
1. Objectives	23
2. Contents	23
3. Methods	27
Chapter II. Present conditions and points	32
Section 1. World level	32
Section 2. Domestic level	32
Section 3. Present conditions and points	33
Chapter III. Results of the research	36
Section 1. Development of a Mutiplex PCR primers sets	36
1. Introduction	36
2. Material and Methods	39
3. Results	42
4. Conclusions	67
Section 2. Development of an identification system of rice varieties	69
1. Introduction	69
2. Material and Methods	69
Section 3. Development of a decision algorism and software	82
1. Development of a decision algorism	82
2. Development of a software	86
3. analysis of sampling error	87
Section 4. Result and conclusion	89
Section 5. Performance test	91
1. Material and Methods	91

2. Results	92
Section 6. Overall Conclusion	98
Chapter IV. Achievement and Contribution	100
Section 1. Achievement	100
Section 2. Contribution	101
Chapter V. Plan of application use	103
Section 1. Outcome of research	103
Section 2. Plan of application use	105
Chapter VI. Information from abroad	107
Chapter VII. References	108

목 차

제 출 문	1
요 약 문	3
SUMMARY	11
CONTENTS	15
목 차	16
제 1 장 연구개발과제의 개요	19
제1절 연구개발 목적 및 필요성	19
1. 연구의 배경	19
가. 국내 쌀 산업 환경	19
나. 국내 벼 품종 판정의 형태	19
다. 유전자 검사법을 이용한 벼 품종의 판정	20
라. 기존 유전자 검사법의 문제점	20
2. 연구의 필요성	21
3. 연구의 목적	22
제2절 연구개발 목표 및 내용	23
1. 연구개발의 목표 및 내용	23
가. 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트의 개발	24
나. DNA 데이터베이스 구축, 판정 알고리즘 개발 및 벼 품종 판별용 전용 소프트웨어 개발	25
다. DNA 판정 시스템 및 벼 품종 판정기 개발	25
2. 연구개발의 방법	27
가. 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트의 개발	27
나. DNA 데이터베이스 구축, 판정 알고리즘 개발 및 벼 품종 판별용 전용 소프트웨어 개발	28
다. DNA 판정 시스템 및 벼 품종 판정기 개발	29
라. 전체 시스템 완성	30
마. 현장적응시험	30
바. 사업화	30

사. 연구의 추진체계	30
제 2 장 국내외 기술개발 현황	32
제1절 세계적 수준	32
제2절 국내수준	32
1. 반복염기서열 분석법	33
2. 단일염기다형성 분석법	33
제3절 국내·외의 연구현황	33
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	36
제1절 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트의 개발	36
1. 서론	36
2. 재료 및 방법	39
가. PCR 프라이머 세트의 개발	40
3. 결과 및 고찰	42
가. 멀티플렉스 PCR 프라이머의 개발	42
나. 변형된 STS primer의 개발	45
다. 20개 품종에 대한 SSR 마커를 이용한 검증	47
라. STS 프라이머 세트의 검토	56
마. 품종 판정을 위한 STS 프라이머 반응에 대한 데이터베이스화	62
4. 결론 및 요약	67
제2절 DNA 판정 시스템 및 DNA 판정 장치의 개발	69
1. 서론	69
2. 재료 및 방법	69
가. 벼 품종 판정 시스템의 개발	69
나. 모세관 전기 영동방식의 DNA 판정 장치 개발	74
다. 범용 DNA 판정기	81
제3절 DNA 판정 알고리즘 및 판정 소프트웨어 개발	82
1. DNA 판정 알고리즘 개발	82
2. 판정 소프트웨어 개발	86
3. 샘플링 오차에 대한 확률 분석	87
제4절 결과 및 고찰	89

제5절 현장 성능 시험	91
1. 재료 및 방법	91
가. 브랜드쌀의 수집	91
2. 결과 및 고찰	92
가. 브랜드쌀의 분석	92
제6절 종합 결론	98
제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도	100
제1절 목표달성도	100
제2절 관련분야의 기여도	101
1. 기술적 측면	101
가. 신속·정확한 쌀 DNA 판정을 위한 유전자 분석법의 개발	101
나. 신속·정확한 쌀 DNA 판정 시스템의 개발	101
2. 경제적·산업적 측면	102
가. 쌀 DNA 판정비용 및 노력비용 절감	102
나. 국내산 쌀의 경쟁력 향상	102
다. 쌀 유통질서 확립	102
라. 소비자 신뢰도 증대	102
마. 연구 투자비 회수	102
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	103
제1절 연구성과	103
1. 특허 출원	103
2. 시연회 개최	103
3. 홍보실적	104
제2절 활용계획	105
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	107
제 7 장 참고문헌	108

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절 연구개발 목적 및 필요성

1. 연구의 배경

가. 국내 쌀 산업 환경

최근 국내 쌀 산업은 고품질 품종 육성과 재배기술의 발전 등으로 안정된 쌀 공급이 이루어지고 있으나, 인스턴트 식품의 증가와 고기 소비량 증대 등의 서구식 식습관 형태로의 전환으로 쌀의 소비량이 감소하고 있으며, 최근에는 세계자유무역협정의 FTA 협상에 따른 쌀의 수입량 증대 등으로 큰 위기에 처한 실정이다.

이러한 국내 쌀 산업의 경쟁력 제고를 위하여 고품질 벼 품종 선정과 고품질 쌀 생산을 위한 재배기술 개선을 통해 고품질 쌀 생산을 위한 연구가 강화되고 있으며, 쌀의 생산, 가공, 유통에 이르기까지 투명성과 소비자에 대한 신뢰도 증대를 위한 생산 이력제 및 품종 표시의 의무화 등이 추진되고 있다.

그러나 국내에 유통되고 있는 브랜드 쌀은 1,232종이나 되지만 소비자의 고품질 쌀에 대한 인식 부족과 정보제공 미흡으로 유통되는 브랜드 쌀 간에 품질 차별화가 이루어지지 않고 있으며, 특정 지역의 소수 품종만이 브랜드 인지도에 의하여 가격 차별화가 이루어지고 있는 실정이다. 이 또한 특정지역의 생산량을 고려했을 때 년 중 계속해서 유통되는 현상은 불가능하며, 결과적으로 다른 지역에서 생산된 벼를 혼합 도정하여 특정 브랜드 쌀로 유통시킴으로써 쌀의 품질저하 및 국내산 쌀의 경쟁력을 떨어뜨리고 있다.(2005, 작물과학원)

따라서 혼합미에 의한 부정을 방지하고, 포장의 표시와 내용물이 일치하는지 여부를 과학적 근거에 기반하여 고정밀도로 판정하는 기술의 개발이 요구되어 지고 있다. 또한 품종 보급에 있어서도 품종의 작물학적 특성, 자연환경 및 사회적 요인이 복잡하게 관여되어 주요품종들에 대한 품종판별은 각 품종들 간의 구별성 뿐만 아니라 품종의 순도 유지를 위해서도 매우 중요하다.

나. 국내 벼 품종 판정의 형태

현재 국내 양곡법에서는 품질표시 의무사항이 적용돼 품종명, 산지, 정미년월일, 판매자, 내용량을 표시하는 것이 의무화 되어 있으나, 실제 적용과 확인에는 어려움이 있다. 실제적으로 국내에서 벼의 품종개량의 노력으로 인하여 현재 약 163종의 많은 품

종이 개발되었으며, 2006년 장려품종으로 고시된 품종만도 113개 품종(2006, 농림부)에 이른다.

이에 국내에서는 벼의 품종 판정을 위한 다양한 연구가 있어 왔으며, 종래에 벼의 품종판별에는 ①식물체나 곡립의 형태, 출수기 등의 특성에 착안한 판별이나, 화학해석을 이용한 곡형의 차이에 의한 판별, ②알콜 용해성 단백질을 capillary electrophoresis로 분석하고 품종 간 단백질 패턴의 차이를 비교 분석하는 방법, ③쌀이나 밥의 향을 휘발성 물질과 가스센서가 반응하여 검출된 전기저항변화를 주성분 분석이나 판별분석 등의 패턴 인식 소프트웨어를 이용해 향기패턴의 차이로 품종을 구별하는 방법 등이 있었으나, 이들은 기후나 재배조건에 의한 영향을 받으며, 전체 품종 판별에 대한 신뢰할 수 있는 결과물을 가지지 못하는 등의 문제점이 있어 실용화되기에는 어려웠다.

다. 유전자 검사법을 이용한 벼 품종의 판정

최근 국내에는 품종간의 판별에 기후나 재배조건에 의한 영향을 받지 않고 보다 미세한 DNA서열의 차이에도 그 차이를 알아낼 수 있는 PCR을 이용한 DNA 판정 기술이 도입 연구되고 있다. 하지만 품종 육성자의 권리보호와 품질의 고위 안정화를 위한 품종 판별 기술의 확립이 강하게 요구되는 실정에도 불구하고 분자마커에 의한 작물의 품종확인 및 순도유지를 위한 기술개발은 미흡한 실정이다. 현재 국내에서는 농업진흥청 작물과학원과 국립 농산물품질관리원에서 각각 SSR방식(반복염기서열분석법)과 SNP방식(단일염기다형성 분석법)의 유전자 분석 방법을 사용하여 벼의 품종 판별을 위한 분자마커를 개발해 사용하고 있다. SSR방식은 품종판별을 위하여 찾아진 6개의 microsatellite마커를 염색체 번호순서대로 조합하므로 품종별 열한자리수의 고유코드번호가 부여되는 것을 특징으로 하며, 품종 판별 및 유연 관계 분석에 효율적으로 이용 가능하다.

SNP방식은 전체 DNA 중에서 하나의 돌연변이 염기를 표시인자로 이용하는 것으로 SNP 마커를 이용하여 검정업무 시 작업이 편리하고 품종별 구분이 명확하며, 유전자 칩을 이용하여 다량의 시료를 속성으로 분석하는데 이용할 수 있다.

라. 기존 유전자 검사법의 문제점

전자의 유전자 판별기법은 증폭이 안정되지 않는 등의 문제점이 있다고 보고되고 있다. 또한 이들 유전자분석 방법은 시료를 ①분쇄하여 ②DNA 추출 buffer를 이용

하여 단백질과 RNA 등을 제거하고 순수한 DNA를 추출한(Extraction buffer를 이용 DNA 추출 → 단백질 제거 → 에탄올을 이용하여 salt 제거 → DNA 추출 상태 확인 → DNA 농도조절) 다음 ③ 시약과 혼합 후 원하는 DNA 부분을 증폭할 수 있는 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 DNA 증폭 후 ④전기 영동기에서 DNA를 분리하고 ⑤DNA 염색 후 확인한다. 이 후에 ⑥마커별 실험결과를 종합하여 혼입율을 계산하는 일련의 과정을 거쳐야 하므로 전문적인 지식뿐만 아니라 여러 가지 필요한 고가의 유전자 분석 장비를 사용하여야 하므로 전문기술 인력이 필요하며, 현장의 실제적인 적용에 어려움이 있다.

2. 연구의 필요성

국내에 유통되고 있는 브랜드 쌀은 1,232종이나 되나 소비자의 고품질 쌀에 대한 인식 부족과 정보제공 미흡으로 유통되는 브랜드 쌀간에 품질 차별화가 되지 않고 있으며, 특정 지역의 소수 품종의 인지도에 의하여 가격 차별화가 이루어지고 있는 실정이다. 이 또한 특정 지역의 생산량을 고려했을 때 년 중 유통되는 현상은 불가능하며, 결과적으로 다른 지역에서 생산된 벼를 혼합 도정하여 특정 브랜드 쌀로 유통시킴으로서 품질저하와 국내산 쌀의 경쟁력을 떨어뜨리고 있다. 따라서 혼합미에 의한 부정을 방지하고 포장의 표시와 내용물이 일치하는지 여부를 과학적 근거에 기반을 두고 쉽지만 고정밀도로 판정하는 기술의 개발이 요구되어 지고 있다. 또한 품종 보급에 있어서도 품종의 작물학적 특성, 자연환경 및 사회적 요인이 복잡하게 관여되어 주요품종들에 대한 품종판별은 각 품종들 간의 구별성 뿐만 아니라 품종의 순도 유지를 위해서도 매우 중요하다.

품종 판정의 정확성을 위하여 최근에는 유전자 분석 방법을 사용하고 있으나, 시료를 ①분쇄하여 ②DNA 추출 buffer를 이용하여 단백질과 RNA 등을 제거하고 순수한 DNA를 추출한(Extraction buffer를 이용 DNA 추출 → 단백질 제거 → 에탄올을 이용하여 salt 제거 → DNA 추출 상태 확인 → DNA 농도조절) 다음 ③ 시약과 혼합 후 PCR을 이용하여 DNA 증폭 후 ④전기영동기에서 DNA를 분리하고 ⑤ DNA 염색 후 확인한다. 이 후에 ⑥마커별 실험결과를 종합하여 혼입율을 계산하는 일련의 과정을 거쳐야 하므로 전문적인 지식뿐만 아니라 여러 가지 필요한 고가의 유전자 분석 장비를 사용하여야 하므로 전문기술 인력이 필요하며, 현장의 실제적인 적용에 어려움이 있다.

이를 위해서는 ①국내산 벼 품종에 대한 고유의 유전자 마커를 찾아내고, 국내산 벼 품종 판별에 대한 작업 공정을 자동화 내지는 단순화 시키고 측정 시 발생하는 인적 오차를 최소화 시킬 수 있으며, 검사기관, RPC, 유통기관 등 다양한 현장에서

누구라도 정확하고 신속하게 품종을 판정할 수 있는 ②유전자 마커를 이용한 벼 품종 판정 시스템 및 DNA 판정기 개발에 대한 연구가 필수적으로 수행되어야 한다.

3. 연구의 목적

본 연구의 목적은 쌀에 대해서 품종 등을 확인할 필요가 있을 시 누구라도 간단 정확 신속하게 품종을 판정할 수 있도록 일련의 작업공정 대부분을 자동화한 “벼 품종 판별을 위한 STS 프라이머 세트를 이용한 DNA 품종 판정 시스템 및 DNA 판정기”를 개발함에 있다. 본 연구에서 개발된 “STS 프라이머 세트를 이용한 DNA 품종 판정 장치를 이용하여 DNA를 판정하는 과정은 다음과 같다.

- ①원료빈에서 샘플을 채취하여 분쇄한 다음, 시약에 용해시킨 가루를 혼합 한다.
- ②DNA 추출기에서 DNA를 추출하고,
- ③추출한 DNA를 증폭한 다음,
- ④DNA 판정기에서 DNA를 판정하는 것으로,
- ⑤한 번에 6개의 샘플을 동시에 작업이 가능하여 원료의 샘플링 오차를 줄일 수 있으며,
- ⑥모든 일련의 과정은 자동화 처리되어 진행됨으로써,
- ⑦일련의 과정이 간단하여 누구라도 쉽게 DNA 판정을 할 수 있으므로 교종, 생산, 도매, 가공, 소비의 모든 단계에서 이용할 수 있다.

제2절 연구개발 목표 및 내용

1. 연구개발의 목표 및 내용

구분	세부과제별	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차 년도 (2007- 2008)	DNA 판정 시스템 및 DNA 판정장치 의 개발	○벼 품종 판별용 DNA 분석기 설계 및 제작(I)	○효율적인 DNA 판정 시스템 설 계 ○판정용 칩 설계 및 제작 ○칩 셋팅부 설계 및 제작
	멀티플렉스 PCR 프라이머 세트의 개발	○멀티플렉스 PCR 프 라이머 세트 개발 및 PCR 프라이머 세트를 이용한 전 품종 고유 밴드의 확보(I)	○DNA 단편 염기서열을 결정해 수십조의 STS 프라이머 세트의 설계 ○품종 판별을 위한 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트의 집약 ○STS 프라이머 세트를 이용하 여 전 품종 고유 밴드 이변을 확 인
	DNA 데이터베이 스 구축, 판정 알 고리즘 개발 및 전용 소프트웨어 개발	○DNA 데이터베이스 구축 및 판정 알고리 즘 개발	○20개 품종에 대한 품종별 고유 밴드 확보 ○데이터베이스 구축 및 판정 알 고리즘 개발
2차 년도 (2008- 2009)	DNA 판정 시스템 및 DNA 판정장치 의 개발	○벼 품종 판별용 DNA 분석기 설계 및 제작(II)	○반도체 레이저를 이용한 검출 부 설계 및 제작 ○A/D 변환부 설계 및 제작 ○인터페이스 장치부 설계 및 제 작 ○DNA판정기 외장 설계 및 제작 ○통합 시스템 성능시험
	멀티플렉스 PCR 프라이머 세트의 개발	○PCR 프라이머 세 트를 이용한 전 품종 고 유밴드의 확보(II)	○80개 품종에 대한 품종별 고유 밴드 확보
	DNA 데이터베이 스 구축, 판정 알 고리즘 개발 및 전용 소프트웨어 개발	○DNA 데이터베이스 구축 및 전용 소프트 웨어 개발(I)	○데이터베이스 구축 ○벼 품종 판별용 전용 소프트웨 어 설계 및 개발

3차 년도 (2009- 2010)	DNA 판정 시스템 및 DNA 판정장치 의 개발	○DNA 판정기의 현 장 테스트 및 DNA 판정기의 양산품 설 계·제작	○RPC에 설치하여 현장 테스트 ○문제점 분석 및 수정보완 ○제품분석 및 양산설계 및 제작
	멀티플렉스 PCR 프라이머세트의 개 발	○PCR 프라이머 세트를 이용한 전 품종 고 유밴드의 확보(Ⅲ)	○63개 품종에 대한 품종별 고유 밴드 확보 ○유통 브랜드의 혼합을 조사
	DNA 데이터베이스 구축, 판정 알고리즘 개발 및 전용 소프트웨어 개발	○DNA 데이터베이스 구축 및 전용 소프트 웨어 개발(Ⅱ)	○데이터베이스 구축 ○벼 품종 판별용 전용 소프트웨어 설계 및 개발 ○문제점 분석 및 수정보완

본 연구는 다음과 같이 3가지의 세부과제로 나누어 진행되었다.

- ①멀티플렉스 PCR 프라이머 세트를 찾아내고,
- ②찾아진 세트를 통하여 국내에서 재배되는 벼 전 품종에 대한 DNA 판정 데이터베이스의 구축과 판정 알고리즘 및 판정 소프트웨어를 개발하고,
- ③최종적으로 DNA를 판독하여 데이터베이스와 비교하여 최종적으로 결과를 출력해주는 STS 프라이머 세트 이용한 DNA 판정 시스템 및 판정기를 개발하였다.

이들 모두는 3년의 연구 수행에 의해서 이루어졌으며, 세부적인 목표 및 내용을 서술하면 다음과 같다.

가. 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트의 개발

본 연구는 경상북도 농업기술원과 협동과제로 3년에 걸쳐 수행하였으며, 전국에서 재배되고 있는 143개 품종(2006, 농림부)의 STS 프라이머 세트를 이용하여 품종의 유전자 정보를 확보하는 것으로 본 연구의 세부적인 내용은 다음과 같다.

- ①DNA 단편 염기서열을 결정해 여러 조의 STS 프라이머를 설계하였으며,
- ②설계한 수십조의 프라이머가 서로 간섭하지 않도록 염기서열과 프라이머를 조합하고, PCR 조건 등을 검토하여 4개의 세트로 집약하고,
- ③집약된 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트를 이용하여 각각의 품종에 있어서 이변이 발생하지 않음을 확인하였다.
- ④이를 이용하여 국내에서 재배되고 있는 모든 벼의 품종을 판별할 수 있는 STS 프라이머 세트를 개발 완료 하였으며,
- ⑤최종적으로 이를 이용하여 벼의 품종을 판별할 수 있는 데이터베이스 구축을 위한

품종 특유의 밴드를 확보하고, 품종별 데이터를 확인하였다.

확보된 프라이머 세트를 이용하면 모든 품종이 판별 가능하므로 시료 1알의 품종을 특정할 수 있게 된다. 따라서 미곡종합처리장이나 양곡 유통업자 등과 같이 취급하는 품종이 한정되어 있는 경우 이들 세트 전부를 사용하는 것이 아니라 일부의 세트만을 이용하여 품종판별이 가능하기 때문에 판별을 원하는 품종에만 세트의 조합을 선택하여 사용하면 검사비용의 절감과 편리한 이용이 가능하다. 본 연구의 결과를 통하여 모든 품종의 판별이 가능하므로 범용성이 넓고, 실용수준에의 이용이 가능할 것으로 예상된다.

나. DNA 데이터베이스 구축, 판정 알고리즘 개발 및 벼 품종 판별용 전용 소프트웨어 개발

본 연구에서는 DNA 판정기 개발에 필수적인 벼의 품종별 유전자 정보에 대한 데이터베이스 구축과 판정에 대한 알고리즘 및 소프트웨어를 개발하였다. 이 연구는 경북대학교 바이오시스템공학연구소에서 위탁연구로 수행되었으며, 본 연구의 세부적인 내용은 다음과 같다.

- ①멀티플렉스 PCR 프라이머 세트를 이용하여 전 품종에 대하여 품종별 고유밴드를 확보하고,
- ②데이터베이스 구축 및 판정 알고리즘 개발하였으며,
- ③이들을 통합하여 벼 품종 판별용 전용 소프트웨어를 개발하였다.

DNA 데이터베이스 구축은 새로운 품종의 고유밴드의 입력 및 수정을 쉽게 할 수 있도록 개발하였으며, 판정은 기존의 데이터베이스와 샘플의 고유밴드를 비교하여 정확한 품종을 판별할 수 있도록 하고, 이들의 모든 결과는 윈도우용 벼 품종 판별 전용 소프트웨어를 통하여 누구나 쉽게 결과를 확인·출력할 수 있도록 개발하였다.

다. DNA 판정 시스템 및 벼 품종 판정기 개발

주관 연구기관인 (주)케엔유라이스에서 수행한 본 연구는 경북농업기술원에서 수행되는 “멀티플렉스 PCR에 의한 STS 마커 개발”과 경북대학교에서 수행하는 “DNA 데이터베이스 구축, 판정 알고리즘 개발 및 벼 품종 판별용 전용 소프트웨어 개발”과 동시에 진행 되었다.

다양한 품종의 벼가 가지고 있는 DNA를 분석하기 위하여 DNA를 추출하고, PCR

방법을 이용하여 DNA를 증폭한 다음 이를 전기적 신호에 의하여 이동되는 것을 수치적으로 나타내어 품종을 판정하는 것으로, 본 연구의 목표는 다음과 같다.

- ① 효율적인 DNA 판정 시스템을 개발하고,
- ② 판정 시스템에 필요한 핵심 장치 및 DNA의 정량분석 및 정성분석이 가능한 벼 품종 판별용 DNA 판정기를 개발하는 것이다.

본 연구의 목적을 달성하기 위하여 본 연구에서는 DNA 판정 시스템 및 개발의 세부내용을 다음과 같이 정하였다.

- ① 분쇄, 혼합하는 전처리 공정과 ② DNA를 추출하는 공정 및 DNA 농도를 조절하는 공정, ③ 추출된 DNA를 증폭하는 공정, ④ DNA를 확인하여 품종을 판별하는 공정으로 구성하고, 개발된 시스템에서는 인력에 의한 실수를 최소화 할 수 있도록, 작업자가 공정 사이에서 샘플을 옮겨 주기만 하면 자동으로 모든 것이 이루어 질 수 있도록 분석 장치들을 구성하였다. 그림 1은 벼 품종 판정 시스템을 간단하게 나타낸 것이다.

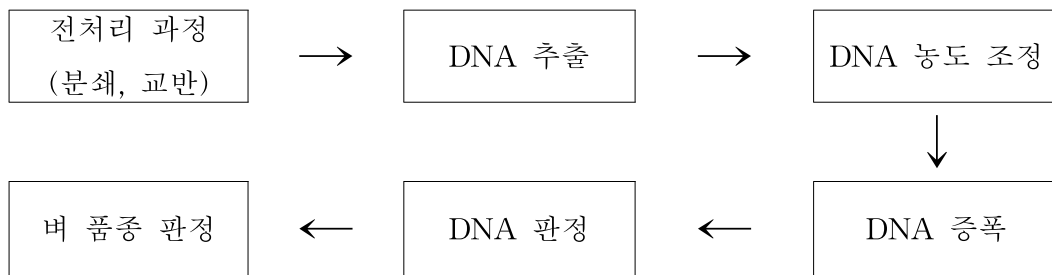


Fig. 1 DNA analysis system

기존의 DNA 판정 시스템에서는 분쇄, 혼합, DNA 농도측정 등의 공정에 필요한 다양한 기기 및 장치들이 필요하다. 본 연구에서 개발된 DNA 판정기는 품종별 고유밴드를 확보하고 이를 데이터베이스화하고, 판정 알고리즘에 의하여 벼 품종을 판별할 수 있는 전용 소프트웨어를 탑재한 벼 품종 판별용 DNA 판정기이며 이것은 판정시스템에 필요한 여러 기기 중에서 가장 핵심적인 장치가 된다. 판정기의 개발에서 수행될 세부 내용은 다음과 같다.

- ① 판정용 칩 설계 및 제작,
- ② 칩 셋팅부 설계 및 제작,
- ③ 반도체 레이저를 이용한 검출부 설계 및 제작,
- ④ A/D 변환부 설계 및 제작,

- ⑤ 인터페이스 장치부 설계 및 제작,
- ⑥ DNA 판정기 외장 설계 및 제작,
- ⑦ DNA 판정기 성능시험 및 보완.

본 연구의 최종년도인 3차년 도에는 앞의 2년간에 수행된 연구의 결과를 수정 및 보완하여 실용화 내지는 산업화 하기위한 마무리 단계의 연구로 주 내용은 다음과 같다.

- ① 2차년도에 이어 새로운 품종 특유의 밴드를 계속 확인하여 데이터베이스를 구축하고,
- ② 설계된 벼 판별 전용 소프트웨어의 문제점을 수정 보완하여 완성하고,
- ③ 개발된 DNA 판정기의 현장적응 시험과 발생되어지는 문제점을 수정보완하고,
- ④ 제품분석을 통하여 양산설계 및 제작이며, 최종적으로 연구를 완성하였다.

2. 연구개발의 방법

국내에서 유통되는 다양한 벼의 품종 등을 확인할 필요가 있을 시 누구라도 간단 정확 신속하게 판정할 수 있도록 일련의 작업공정 대부분을 단순화 내지는 자동화한 “벼 품종 판별을 위한 STS 프라이머 세트를 이용한 DNA 품종 판정 시스템 및 장치”를 개발을 위하여 본 연구는 ①STS 프라이머 세트를 찾아내고, ②찾아진 마커를 통하여 국내에서 재배되는 벼 전 품종에 대한 DNA 판정 데이터베이스의 구축과 판정 알고리즘 개발, ③DNA를 추출하여 판독한 다음, 데이터베이스와 비교하여 최종적으로 결과를 출력해 주는 DNA 판정 시스템 및 DNA 판정기의 개발, ④성능시험, 분석 및 수정 보완, ⑤현장 테스트 ⑥사업화의 6단계로 추진하였다.

가. 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트의 개발

본 연구는 전국에서 재배되고 있는 143개의 벼 품종에 대하여 STS 프라이머 세트를 이용하여 벼의 DNA 데이터를 확보하는 것으로 다음의 방법으로 연구를 수행하였다.

- ① 품종 간에서 다양한 형태의 DNA 단편 염기서열을 결정해 수십조의 STS화 프라이머 세트를 설계하고,
- ② PCR 프라이머 세트를 이용하여 전 품종 각각에 관해 PCR을 행하고, 품종 특유의 밴드를 확인한다.
- ③ 설계한 수십조의 프라이머가 서로 간섭하지 않도록 염기서열과 프라이머를 조합하

고, PCR 조건 등을 검토하여 최소의 세트로 집약한다.

⑤ 집약된 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트를 이용 PCR을 실행해 각각의 품종에 있어서 이변이 발생하지 않음을 확인한다.

⑥이를 통하여 국내에서 재배되고 있는 모든 벼의 품종을 판별할 수 있는 STS 프라이머 세트를 개발하고, 품종 고유의 밴드를 확보할 예정이다.

특히 프라이머의 혼합비율에 관해서는 우선 각 프라이머를 같은 양으로 혼합해 PCR을 실행하되 전기영동의 결과 식별밴드가 불분명 또는 소실한 프라이머에 관해서는 혼합비율을 높이고, 비특이적 증폭이 일어난 프라이머에 관해서는 혼합비율을 내린 후 멀티플렉스 PCR을 검토하여, 여러 조의 STS 프라이머 세트를 수 개의 세트로 집약을 하고, 이들 세트의 어닐링온도 또한 전부 동일하게 만들어 분석시간의 단축과 시약비용의 절감하고, 1대의 PCR장치로 여러 개의 검체의 동시 처리될 수 있도록 하였다. 또한 판별을 원하는 품종에 대해서 세트의 조합을 선택하는 것으로 모든 품종의 판별이 가능하므로, 범용성이 넓고 실용수준에의 사용이 가능할 것으로 예상된다.

본 연구는 벼의 유전자 분석에 대한 많은 연구 노하우를 가지고 있는 경상북도 농업기술원과 협동과제로 하여 진행하였다.

나. DNA 데이터베이스 구축, 판정 알고리즘 개발 및 벼 품종 판별용 전용 소프트웨어 개발

본 연구는 개발되는 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트를 이용하여,

- ① 전 품종에 대하여 품종별 고유코드를 확보하고,
- ② 이를 데이터베이스화 하며, 샘플의 DNA와 비교하여 품종을 판정하는 판정 알고리즘 개발한 후 ③ 이들을 통합하여 벼 품종 판별용 전용 소프트웨어를 개발하였다.

최적의 DNA DB 구축을 위하여 품종과 품종별 고유코드를 테이블로 작성하고, 새로운 품종의 고유밴드 입력 및 수정을 쉽게 할 수 있도록 DB를 구축하고, 샘플의 품종 판별은 DNA 판정기에서 데이터를 전송받아, 구축된 DB와 비교하여 판정을 할 수 있도록 개발하였으며, 전용 S/W 개발은 DNA 판정기에서 송출되는 데이터를 받아 구축된 DB와 비교 판정 후 출력을 할 수 있도록 개발되어질 예정으로 판정기와 PC와의 데이터 교환을 효율적으로 할 수 있는 통신 인터페이스방식을 선택하고, 저사양의 PC에서도 무리 없이 작동할 수 있도록 설계하고, 윈도우 환경에서 작동되어 어떤 PC에서도 작동이 간편하고 누구나 쉽게 사용할 수 있도록 개발할 예정이다. 또한 그래픽 화

면에서의 출력뿐만 아니라 일반 프린터에서도 결과 값을 출력할 수 있도록 하여 현장에서 편리하게 사용할 수 있도록 하였으며, 판정 데이터는 저장하여 항상 확인 가능하도록 개하였다. 이는 많은 연구 노하우를 가지고 있는 경북대학교 바이오시스템 공학 연구실에서 진행하였다.

다. DNA 판정 시스템 및 벼 품종 판정기 개발

본 연구에서는 다양한 품종의 벼가 가지고 있는 DNA를 분석하기 위하여 DNA를 추출하고, PCR 방법을 이용하여 DNA를 증폭한 다음 품종을 판정하는 효율적인 DNA 판정 시스템을 개발하기 위하여 ①분쇄, 교반하는 전처리 공정과 ②DNA를 추출하는 공정 및 DNA 농도를 조절하는 공정, ③추출된 DNA를 증폭하는 공정, ④DNA를 확인하여 품종을 판별하는 공정으로 나누고, 각 공정에 필요한 최적의 유전자 분석기기를 구성하였으며, 본 연구에서는 샘플의 DNA를 분석하여 데이터베이스화 된 품종과 비교하여 DNA를 판정하는 벼 품종 판별용 DNA 판정기는 새롭게 개발하였다.

DNA 판정 시스템에서는 다양한 기계들이 필요하나 분쇄, 혼합, DNA 농도측정 공정에 필요한 기계는 유전분석학에서 일반화 된 기계들을 제외한 즉, 벼 판정에 가장 핵심이 되는 벼 품종 판별용 DNA 판정기를 개발하였으며, 그림 2는 DNA 판정기의 식별 원리를 나타낸 것이다.

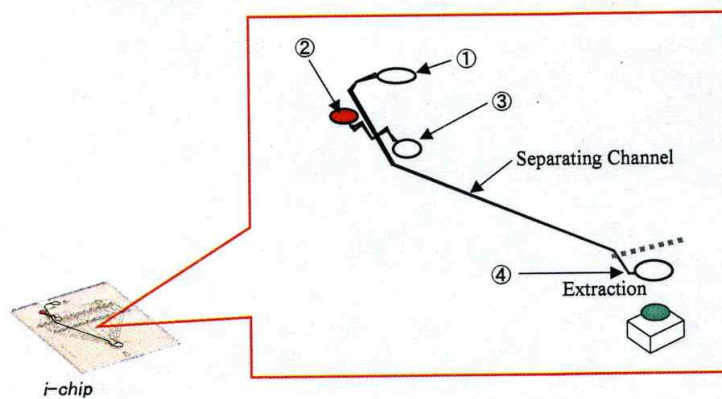


Fig. 2 Principle of DNA discrimination

벼 품종 판별용 DNA 판정기는 칩의 ④에 영동 겔을 충전한 다음 ②에서 증폭한 DNA 용액과 시약을 적하하고, ②-③ 사이에 전압을 가하여 검사물을 도입하고, ①-④ 사이에 전압을 가하여 분리시킨 후 ④방향에서 유도 된 DNA패턴을 판정기에서 받도

체 레이저로 판단해낸 후 디지털 데이터를 연결된 PC로 송출하고, 품종에 대한 DB와 비교하여 품종판정 소프트웨어로 해석하여 결과치를 출력하는 메카니즘을 가진다.

벼 품종 판별용 DNA 판정기의 구성은 ①칩의 각 부분에 전압을 걸어 DNA 패턴을 만드는 칩 셋팅부, ②유도된 DNA 패턴을 반도체 레이저를 이용하여 검출하는 검출부와 ③검출된 신호를 디지털 데이터로 변환하여 전용 소프트웨어가 탑재된 PC로 송출하여 전용 소프트웨어에서 품종을 판정하는 구조로 개발되었으며, 이는 (주)케엔유라이스밀에서 연구를 진행하였다.

라. 전체 시스템 완성

본 연구의 최종 연구는 연구 개발된 결과를 종합하여 성능을 시험하고, 최종적으로 벼 품종 판정을 위한 DNA 판정 시스템 및 DNA 판정기를 완성하고, 실제 현장에 설치하여 발생되어지는 여러 가지의 문제점을 수정보완 하였다.

마. 현장적용시험

본 연구에서 개발된 “STS 프라이머 세트를 이용한 벼 품종판별용 DNA 판정 시스템 및 판정기 개발”의 현장적용 시험은 경상북도에서 생산되는 브랜드 쌀에 대하여 실제 품종 판정을 통하여 실시하였으며, 실제로 현장에 적용을 할 경우에는 발생되어지는 여러 문제를 분석하였다.

바. 사업화

본 연구에서는 연구의 결과를 통하여 주관 연구기관인 (주)케엔유라이스밀에서 국립 농산물품질관리원에서 인증하는 쌀 품종 검사기관으로 등록하여, 주변 RPC 등에서 검사해야 하는 쌀의 품종 검사를 진행하였으며, 사업의 종료시점에서 개발된 판정 시스템의 판매를 실시하였다.

사. 연구의 추진체계

위의 연구의 내용은 3년에 걸쳐서 연구가 진행되었으며, 연구의 추진체계는 그림 3과 같다.

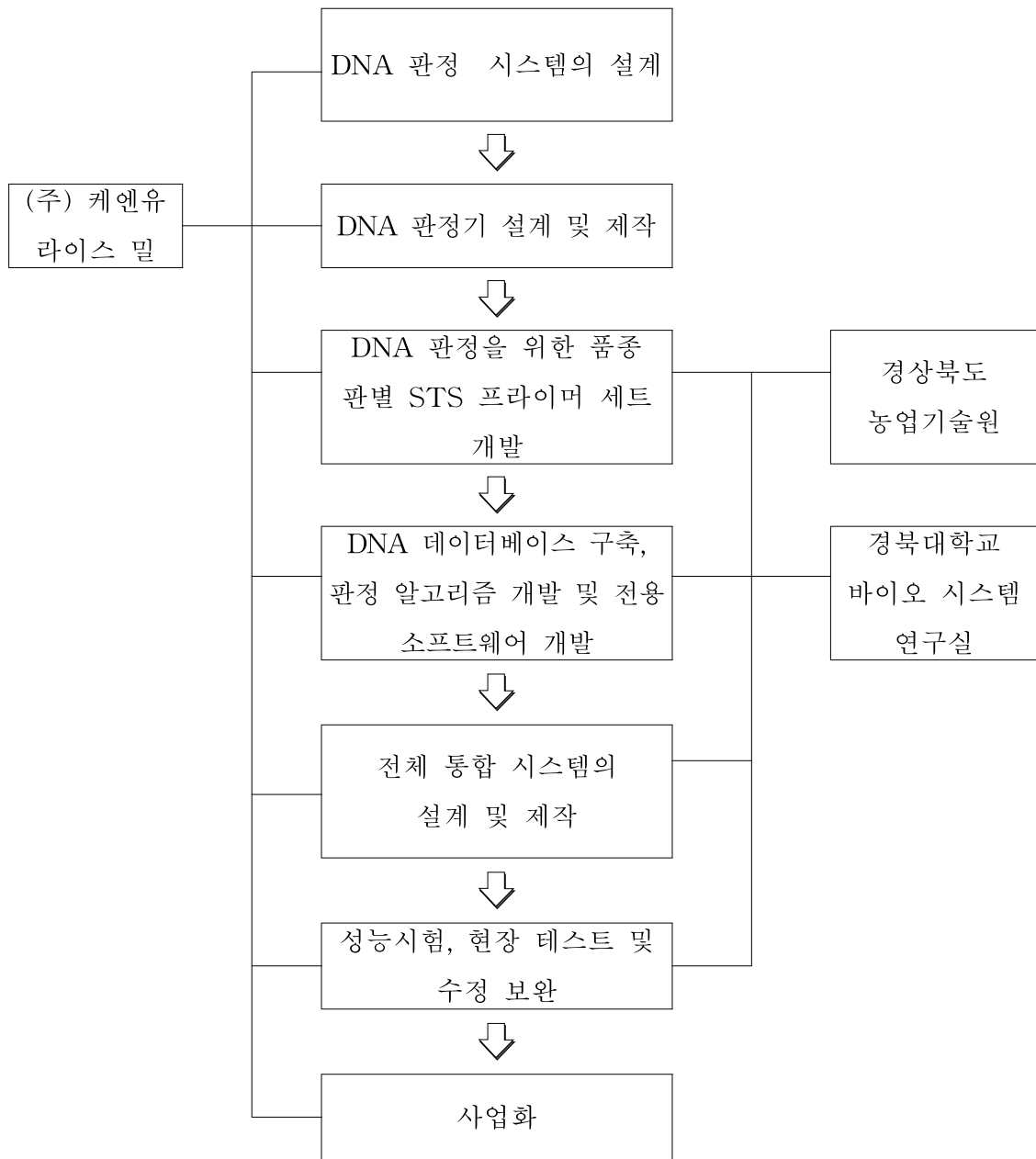


Fig. 3 Organization of research

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절 세계적 수준

외국의 쌀산업 환경은 국내와 큰 차이를 가지고 있으며, 국내와 유사한 형태의 쌀 산업은 일본만이 거의 유일한 실정이다. 대부분의 동남아시아 등에서는 장립종의 쌀을 재배하고 있으며, 한국, 일본, 중국 등이 단립종의 쌀을 재배하고 있으며, 현재 일본과 한국에서 재배되는 쌀의 품종에 대하여 유전자 검사를 실시하고 있으며, 최근 일본에서는 일본 국내 쌀(211품종)을 판별할 수 있는 STS 프라이머 세트를 개발하고, 이를 이용하여 신뢰성 있는 결과를 도출할 수 있는 DNA 판별 시스템 개발하여 일본 내 컨트리엘리베이터 등에 보급하는 등 실용화를 시도하고 있다.

제2절 국내수준

현재 국내 양곡법에서는 품질표시 의무사항이 적용돼 품종명, 산지, 정미년월일, 판매자, 내용량을 표시하는 것이 의무화 되어 있으나, 혼합미에 의한 부정을 방지하고, 포장의 표시와 내용물이 일치하는지 여부를 과학적 근거에 기반을 두고 쉽지만 고정밀도로 판정하기에는 어려움을 가지고 있어 실제 적용과 확인에는 어려움이 있다. 실제적으로 국내에서 벼의 품종개량의 노력으로 인하여 현재 약 163종의 많은 품종이 개발되었으며, 2006년 장려품종으로 고시된 품종만도 113개 품종(농림부 2006)에 이른다.

이에 국내에서는 벼의 품종 판정을 위한 다양한 연구가 있어 왔으며, 종래에 벼의 품종판별에는 ①식물체나 곡립의 형태, 출수기 등의 특성에 착안한 판별이나, 화학해석을 이용한 곡형의 차이에 의한 판별, ②알콜용해성 단백질을 capillary electrophoresis로 분석하고 품종간 단백질 패턴의 차이를 비교 분석하는 방법, ③쌀이나 밥의 향을 휘발성 물질과 가스센서가 반응하여 검출된 전기저항변화를 주성분 분석이나 판별분석 등의 패턴 인식 소프트웨어를 이용해 향기패턴의 차이로 품종을 구별하는 방법 등이 있었으나, 이들은 기후나 재배조건에 의한 영향을 받으며, 전체 품종 판별에 대한 신뢰할 수 있는 결과물을 가지지 못하는 등의 문제점이 있어 실용화되기에는 어려웠다.

최근 국내에는 품종간의 판별에 기후나 재배조건에 의한 영향을 받지 않고 보다 미세한 DNA서열의 차이에도 그 차이를 알아낼 수 있는 PCR을 이용한 DNA 판정

기술이 도입 연구되고 있다. 하지만 품종 육성자의 권리보호와 품질의 고위 안정화를 위한 품종 판별 기술의 확립이 강하게 요구되는 실정에도 불구하고 분자마커에 의한 작물의 품종확인과 순도유지를 위한 기술개발은 미흡한 실정이다.

1. 반복염기서열 분석법

현재 국내에서는 농업진흥청 작물과학원에서 SSR방식(반복염기서열분석법)의 유전자 분석 방법을 사용하여 벼의 품종 판별을 위한 분자마커를 개발해 사용하고 있다. SSR방식은 품종판별을 위하여 찾아진 6개의 microsatellite마커를 염색체 번호순서대로 조합하므로 품종별 열한자리수의 고유코드번호가 부여되는 것을 특징으로 하며, 품종 판별 및 유연 관계 분석에 효율적으로 이용 가능하다.

2. 단일염기다형성 분석법

국립 농산물 품질관리원은 SNP방식(단일염기다형성 분석법)의 유전자 분석 방법을 사용하여 벼의 품종을 판별하기 위한 분자마커를 개발하였다. SNP방식은 전체 DNA 중에서 하나의 돌연변이 염기를 표시인자로 이용하는 것으로 SNP 마커를 이용하여 검정업무 시 작업이 편리하고 품종별 구분이 명확하며, 유전자 칩을 이용하여 다량의 시료를 속성으로 분석하는데 이용할 수 있다.

제3절 국내·외의 연구현황

앞에서 잠시 언급한 바와 같이 쌀의 품종 검사를 위해서 유전자 검사법을 도입해서 사용하고 있는 곳은 단립종의 경우 한국과 일본 등의 일부 국가에서만 사용되고 있다. 따라서 이러한 연구는 다양한 외국의 사례를 확인하는 것보다 국내와 일본 정도에서만 확인하여도 될 것으로 판단된다. 본 연구를 시작하였던 2007년 경우에는 벼 품종 구분에 대한 인식이 낮은 형편이었지만 최근 들어 쌀 소비량의 감소와 소비자의 고품질 쌀에 요구가 늘면서 쌀 품종의 표기가 의무화 되면서 유전자 검사법이 활발하게 연구되고 있다.

류, 김(1998, 한국식품개발연구원) 등은 모세관 전기영동을 이용한 국내산 쌀의 품종 판별을 위하여 재배 면적이 비교적 넓은 국내산 벼 10 품종의 백미의 알콜 용해성 단백질을 모세관 전기영동으로 분석하고 품종 간 단백질 패턴의 차이를 비교 분석함으로써 신속한 품종 판별법으로서의 적용 가능성을 검토하였다. 이 결과 동진벼 그룹, 추청벼 그룹, 일품벼 그룹

의 3그룹으로 분류할 수 있었으며, 각 그룹에서의 차이가 나타나 구분이 가능하였으며, 일 품벼, 오대벼 등의 일부 품종은 단독으로 구분이 가능하였으며, 각 그룹 내에서도 미미하기는 하나 구성 피크들을 면밀히 비교 분석함으로써 품종에 따른 특성을 도출할 수 있었다고 보고 하였다.

정(2004, 농산물품질관리원) 등은 전체 DNA 중에서 하나의 염기변이를 표지인자로 이용하는 것으로 생물체에서 출현 빈도가 높아 최근에 많은 연구가 이루어지고 있는 유전적 표지인자를 이용하여 쌀 품종의 검정업무 적용 시 작업이 편리하고 품종별 구분이 명확하여 유전자 칩을 이용하여 다량의 시료를 속성으로 분석하는데 이용할 수 있는 장점을 가진 SNP(Single Nucleotide Polymorphism:단일염기다형성분석법) 유전자 마커를 개발하여 쌀의 품종 구분을 가능하도록 하였다고 보고하였다. 그림 4는 SNP 마커들의 전기영동 사진의 모습이다. 각각의 벼 품종이 10개의 SNP 유전자 마커에 대하여 반응하는 것을 나타내었으며, 남평의 경우 Dk2401, DK721, DK34, DK17-1 유전자 마커에서 반응하는 모습을 보였다.

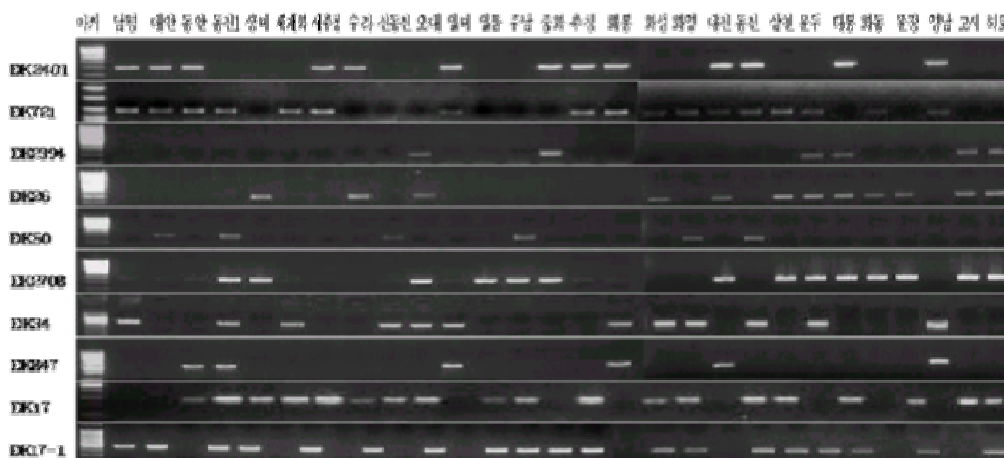


Fig. 4 bend of discrimination of varietie used for SNP marker

최, 황(2001, 농촌진흥청) 등은 벼 게놈에 반복되는 염기서열(SSR)을 PCR 기술을 이용하여 증폭 후 벼 품종의 유전자형을 동정하는 6개의 마커로 구성된 마커조합을 개발하고, 국내에서 육성된 자포니카 벼 117 품종과 통일형 31 품종을 포함하는 148 품종의 판별이 가능한 DNA 마커조합 및 그에 의해 각 품종별로 부여되는 고유코드 번호를 개발하고 보고하였다. 벼 품종의 동정에 적용 가능한 것으로 선발된 RM48, RM249, RM209, RM70, RM257 및 OSR20의 microsatelite마커로 구성되며, 이들은 각각 벼 염색체 2번, 5번, 6번, 7번, 9번과 12번에 위치하고 모두 높은 재현성과 높은 다형화 현상을 가지는 것을 특징으로 하는 마커들로 각각의 마커에 대해 PCR 증폭된 대립 유전자(allele)의 각 품종별 두 자리 수의 고유번호

를 가지는 것을 특징으로 하여 품종관별을 할 수 있도록 하였다. 마이크로새틀라이트(microsatellite)는 1~5bp길이의 짧은 염기서열이 반복되는 부위를 말한다. 마이크로새틀라이트는 유전체 내에 상당히 높은 빈도로 존재한다. 일례로 인간의 유전체에 서는 매 6kb마다 이런 마이크로새틀라이트가 하나씩 존재한다고 한다. 이런 이유로 마이크로새틀라이트는 유전체 염기서열 결정사업(genome project)이나 유전체학(genomics)에서 매우 중요한 분자마커로 활용되고 있다.

쿠보라(2000, 일본) 등은 5종류의 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA) 마커를 이용해 일본형수도(무논에 심는 벼) 20품종을 관별가능하다고 보고 하였지만 RAPD법은 증폭의 불안정함으로부터 실현성의 문제가 있고, 식별신뢰성을 높이기 위해서는 많은 마커를 이용해야만 한다는 문제점이 있다고 하였다.

오오츠보(2002, 일본) 등은 한 「코시히카리」 간에는 같은 밴드패턴을 나타내고, 다른 품종에서는 밴드패턴이 다르게 나타나는 「코시히카리 관별용 포지키트」 또는 「코시히카리 관별용 네가키트」를 개발하였다고 보고하였으며, 같은 방법으로 오가사와라 등은(2002, 일본) 아키타현의 브랜드 품종인 「아키타코마치」를 시작으로 하는 아키타현 장려품종이 관별가능하다고 보고 하였다. 하지만 이 논문에서는 재현성이 극히 높고, 품종관별에 유효한 방법이지만, 「코시히카리」나 아키타현 장려품종에 한정된 품종 관별로서, 다른 타 품종에 관해서는 언급되어 있지 않다.

현재 국내 양곡법에 따라 가공된 쌀의 품종을 표시하도록 되어 있어, 품종 표시를 위한 DNA 검사가 일반화 되어 있다. 국립농산물품질관리원에서는 쌀 품종을 검사할 수 있는 검사 기관에 대한 인증을 하고 있으며, 현재 약 30여개 기관이 국립농산물품질관리원의 인증을 통해 쌀의 품종을 검사하고 있는 실정이며, 앞으로 더 확대될 것으로 판단 된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절. 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트의 개발

1. 서론

유전자 검사를 통한 품종 구분에 대한 기술은 PCR을 통하여 2가닥의 DNA를 주형으로 하여 특정영역을 사이에 두는 두 개의 프라이머 가닥을 DNA polymerase에 의해 신장을 반복함으로써 프라이머 사이의 DNA 단편을 증폭하는 것이다. 이러한 기술은 아주 소량의 DNA만 있으면 타겟 유전자의 상태를 알 수 있게 해주는 혁명적인 것이라 할 수 있다. 유전자는 A, G, C, T의 네 가지 염기가 무작위로 배열되어 2가닥의 상보가닥으로 꼬여진 구조로 되어 있다.

PCR의 원리는 두 가닥의 DNA를 주형으로 하여 특정영역을 사이에 두고 짧은 DNA 단편인 프라이머를 각 상보가닥에 hybridize하여 기질이 되는 4종류의 deoxy nucleotide triphosphate의 존재 하에서 DNA polymerase를 작용시키면 이 프라이머의 3' 말단에 주형의 염기서열에 따라서 nucleotide가 첨가되어 가닥이 신장한다. 이 반응으로 형성된 새로운 두 가닥 DNA를 가열하여 상보가닥으로부터 분리하고 과잉으로 존재하는 프라이머를 해당 위치에 결합시켜 DNA polymerase로 새로운 DNA 가닥을 합성하는 것이다. 이 반응을 반복함으로써 목적 영역을 함유하는 DNA 단편을 대량으로 얻을 수 있다.

유전자 검사를 위해 농촌진흥청 및 국립농산물품질관리원에서 각각 품종의 구분이 가능한 SSR 유전자 마커와 SNP 유전자 마커를 개발하였고, 이들 유전자 마커를 이용하여 유전자 검사를 진행하고 있으며, 다음은 이들 유전자 마커를 사용하여 벼의 품종을 판정하는 방법에 대하여 설명하였다.

검사에 필요한 벼는 백미상태의 완전립을 사용할 수 있도록 볍씨 상태의 벼를 제현작업을 한 후 현미상태에서 백미상태로 만들어 실험에서 발생할 수 있는 오차를 줄일 수 있도록 ①시료를 준비한다. 아래의 그림 5는 시료를 준비하는 모습이다.



Fig. 5 Preparation of rice sample

시료가 준비되면 종이 가운데에 완전립 2립을 넣고 종이를 접어 망치로 두드려 최대한 고운 ②가루로 만들어 튜브에 담는다. 시료의 변성을 막기 위해서 튜브 아래에 얼음을 깔아두어야 하며, 이 시료를 바로 사용하지 않고 보관해야 할 경우 냉동 보관하여야 한다. 그림 6은 시료를 가루로 만들어 튜브에 담고 있는 모습의 사진이다.



Fig. 6 Crush the polished rice

③DNA추출은 아래의 순서로 진행한다. 백미 가루 시료의 각각의 튜브에 Extraction buffer(상온보관 가능) $350\mu\text{l}$ 와 Proteinase K(효소, -20°C 보관) $2\mu\text{l}$ 를 넣어 37°C 에서 30분간 반응시킨 이후, 2% CTAB(상온보관 가능) $350\mu\text{l}$ 를 넣어 65°C 에서 15분간 반응시킨다. 이후 5분 간격으로 시료를 꺼내어 섞어준다. 2% CTAB는 고정 피펫을 사용하며 이때 처음에 피펫을 사용하여 뽑은 것은 관내의 공기 등의 변수가 있을 수 있으므로 실험의 정확성을 위해 사용하지 않고 다음 것부터 사용한다. 이후 후드 안에서 PCI용액 $350\mu\text{l}$ 를 넣어 준 후 10분간 섞어준다. 이 용액을 원심분리기에 넣어 2000rpm에서 10분간 원심분리 한다.

다음으로 맨 위의 DNA층 550 μ l를 아래층과 혼합되지 않도록 주의하면서 피펫을 사용하여 분리해낸다. 아래의 그림 7은 튜브 속에서 분리된 DNA 층을 나타낸 그림이다.

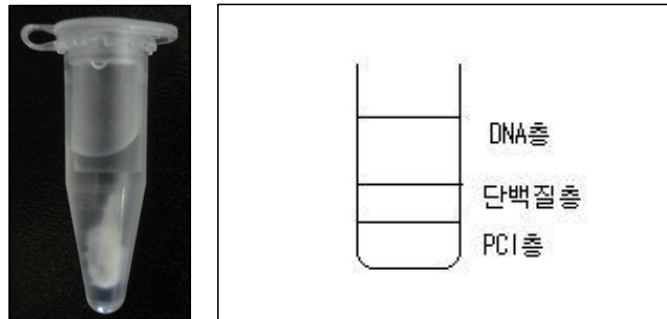


Fig. 7 Separation of DNA

이후 분리한 상등액 550 μ l에 Isopanol 370 μ l를 넣어 inverting 시킨 후 10분간 냉동실에 보관한 다음 다시 원심분리 한 후 상등액을 버리고 EtOH를 넣어 세척한 후 원심분리하고 EtOH를 제거한 후 건조한다. 상등액을 버릴 때 DNA추출물이 EtOH와 같이 제거되지 않도록 주의하고, 건조는 시료위에 휴지를 덮은 후 상온에서 건조한다.

추출한 DNA는 PCR(증폭)과정을 거쳐야 하며 ④PCR과정은 건조시켜 놓은 시료에 증류수 200 μ l를 넣고 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 녹여준 후, 개발된 유전자 마커(Primer)를 넣어준다. 사용되는 유전자 마커는 아래의 비율로 넣어준다.

OSR20(Blue) : RM249(Green) : RH206(Yellow) : RH207(Red) = 0.4 : 0.2 : 0.6 : 0.4 이후, Taq polymerase 0.1 μ l \times 시료수의 양을 넣고, 멸균수를 11.1 μ l \times 시료수의 양을 넣어준다. Buffer를 2 μ l \times 시료수의 양을 넣어주고, dNTP를 1.6 μ l \times 시료수의 양만큼 넣어주어 PCR master mixture를 만들어 준다. 다음으로 DNA 2 μ l에 3의 PCR master mixture 18 μ l를 넣어준 후 유전자증폭장치에 넣어 PCR 과정을 진행시킨다.

PCR과정의 조건은 아래와 같이 설정하여 증폭하도록 한다.

- ①Denaturation(변성) 94 $^{\circ}$ C: 주형 DNA를 single stand로 한다.
- ②Annealing(결합) 55 $^{\circ}$ C: 상하 DNA 프라이머를 표적 배열의 양단에 결합시킨다.
- ③Extension(신장) 72 $^{\circ}$ C: Taq polymerase가 주형 DNA로부터 상보적인 DNA사슬을 합성하도록 한다.

각각의 과정에 필요한 온도와 시간은 아래의 표 1과 같다.

Table 1. PCR condition

94℃	94℃	55℃	72℃	60℃	4℃
5min	30sec	30sec	1min	30min	∞
35 cycles					

증폭된 DNA는 ⑤전기영동을 이용하여 시료를 확인하는 작업을 하게 되며, 전기영동에 사용되는 젤은 Agarose gel을 사용한다. 젤은 먼저 EtBr 0.5 μ l 정도 gel에 넣어준 후 DNA : marker(기준물질) : 멸균수 = 1 : 2.5 : 2.5 (Total V=6 μ l)의 비율로 섞어준 다음, 전해질 TBE Buffer를 사용하여 전기영동 시킨다.

최종적으로 ⑥Genotyping 분석을 통하여 결과를 확인하는 작업을 하는데 PCR과정을 거친 시료에 멸균수 180 μ l를 넣어서 희석시켜준 후 그 시료의 1 μ l를 사용하고, Hi-Di 9 μ l \times 시료수의 양에 Liz500 0.05 μ l \times 시료수의 양을 혼합하여 9 μ l를 각각의 시료에 넣어 준 다음 94℃에서 2분간 넣어둔 후 Running시킨다. 이후 Primer에 따라 나타나는 색깔을 보고 이를 분석한다.

2. 재료 및 방법

본 연구는 경상북도 농업기술원의 도움을 받아 전국에서 재배되고 있는 143개 품종의 유전자 정보를 확보하기 위하여, 다음과 같은 연구를 진행하였다.

먼저 10bp 정도의 길이를 가지는 매우 짧은 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 하고, 이 결과를 전기영동에서 확인하는 기법인 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNAs)법을 이용하여 ①DNA 단편 염기서열을 결정된 다음 여러 조의 STS(sequence tagged-site) 프라이머를 설계하고, ②설계한 수십 조의 프라이머가 서로 간섭하지 않도록 염기서열과 프라이머를 조합하고, PCR 조건 등을 검토하여 최소의 세트로 집약하고, ③집약된 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트를 이용하여 각각의 품종에 있어서 이변이 발생하지 않음을 확인하고, ④국내에서 재배되고 있는 모든 벼의 품종을 판별할 수 있는 STS 프라이머 세트를 개발한 다음, ⑤최종적으로 이를 이용하여 벼의 품종을 판별할 수 있는 데이터베이스 구축을 위한 품종 특유의 밴드를 확인하였다. 이는 기존의 SSR 마커나 SNP 마커를 사용한 검사법에 비하여 프라이머의 설계가 용이하고, 프라이머를 혼합이 가능하고(멀티 플렉스 용이) 결과 판정이 신속

하고, 품종이 많이 혼합되어도 판별이 가능한 장점을 가지고 있다.

또한 확보된 프라이머 세트를 이용하면 모든 품종이 판별 가능하므로 시료 1립의 품종을 특정할 수 있게 된다. 따라서 미곡종합처리장이나 양곡 유통업자 등과 같이 취급하는 품종이 한정되어 있는 경우 개발된 세트 전체를 사용하는 것이 아니라 일부의 세트만을 이용하여도 품종의 판별이 가능하기 때문에 판별을 원하는 품종에만 세트의 조합을 선택하여 사용하면 매우 편리하게 이용할 수 있으므로, 사용되는 품종에 따른 전문 세트의 조합을 사용할 수 있어 범용성과 실용수준에의 사용이 가능하도록 개발하였다.

또한 현재의 1립 판정의 방법뿐만 아니라 50g(2000립 이상)을 한꺼번에 분쇄하여 DNA를 추출하고 증폭하여 증폭된 DNA의 양을 측정함으로써 혼합된 품종의 혼합율을 계산할 수 있어, 기존의 방법인 1립의 벼를 이용하여 24립을 하나하나 DNA 검사를 하여 혼합율을 검사하는 방식에 비하여 오랜 검사시간 및 판정에 필요한 반복 검사, 특히 벼 전체의 양에 비하여 너무나 부족한 샘플의 채취로 발생하는 샘플링 오차를 줄일 수 있어 보다 정확한 판정을 할 수 있도록 개발하였다.

사이즈가 작은 프라이머를 무작위로 선택하여 PCR을 진행하였을 때 특정한 이변을 보이는 프라이머를 선택하고 이들의 염기서열 정보를 확인하여 만든 마커를 RAPD 마커라고 하며, 본 연구를 위하여 먼저 특이한 반응을 보이는 RAPD 마커의 염기 배열 결정을 실시하고, 이들 배열정보를 기본으로 STS(sequence tagged-site) 프라이머를 설계하고, 최적의 PCR 조건의 검토를 실시하였다. 본 연구에서는 STS 마커를 통한 장래 품종의 판별이 보다 간편 명확하게 이루어질 수 있는 새로운 벼 품종 판별용 DNA 판정시스템 개발에 적용하도록 하였다. 또한 STS 마커와 더불어 SSR 마커를 동시에 개발하여 비교 검토를 진행하였다.

본 시험에 이용된 벼 품종은 식량작물과학원에서 분양받은 원원종급의 순수한 벼를 사용하였다. DNA를 추출하기 위하여 조곡상태의 벼에서 왕겨를 제거한 다음 현미를 만들고, 그 현미에서 호분층을 제거한 후 백미상태로 만든 다음 Genomic DNA를 추출하였다.

가. PCR 프라이머 세트의 개발

①DNA 추출

DNA 종자 또는 백미 1-2립을 유산지에 넣어서 곱게 분쇄한 후, 1.5ml 또는 2ml 튜브에 넣고, 냉동 보관하였다. 추출 버퍼 (350 μ l)를 첨가하고, 2 μ l proteinase K(25

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$)를 첨가 후 잘 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 동일 부피의 2% CTAB ($350\mu\text{l}$)를 첨가 후 잘 혼합하였다. 상기 혼합물을 65°C 항온수조에서 15분간 반응시키면서 5분마다 가볍게 inverting 하여 잘 섞이게 하였다.

여기에, PCI 용액 (phenol:chloroform:isoamylalcohol = 25:24:1)을 $350\mu\text{l}$ 첨가한 후, 10분간 inverting하면서 잘 혼합하고, 12,000rpm, 4°C에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 새로운 튜브에 옮기고, 옮긴 상등액의 2/3 부피의 이소프로판올 ($500\mu\text{l}$)이나 2배 부피의 EtOH를 첨가하고 천천히 잘 섞어서 DNA를 응축시키며, 가능한 한 많은 DNA를 회수하기 위하여 -20°C 냉동실에 2~3시간 두었다가 4°C, 12,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 DNA를 침전시켰다. 원심 분리 후, 상등액을 버리고 70% cold EtOH ($300\text{--}500\mu\text{l}$)로 세척 후 12,000rpm에서 3~5분간 원심 분리하고 EtOH를 제거한 후, DNA 펠렛을 건조시키고, $100\mu\text{l}$ TE 버퍼 또는 멸균수에 DNA를 녹여, -20°C, 95% EtOH을 $200\mu\text{l}$ 를 넣어 DNA를 엉기게 하고, 4°C, 12,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 DNA를 침전시켰다. EtOH를 버리고 DNA 덩어리를 70% EtOH에 한번 세척 후, DNA 덩어리를 말린 후, $200\mu\text{l}$ 의 TE 버퍼 또는 멸균수를 넣고 DNA를 녹인 후, DNA 양을 점검하여 $10\text{--}15\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 농도로 희석하여 PCR에 사용하였다. 쌀에서 DNA 추출은 sodium acetate 법과 CTAB 법을 병행 적용하였으며, 단백질을 분해를 위하여 Protenase K (Promega Co.)를 이용하였다.

Table 2. Buffer and final concentration for DNA extraction from brown or milled rice

stock solution	Extraction buffer		2%CTAB	
	Volume	Final con.	Volume	Final con.
1M Tris-HCl, pH8.0	2ml	200mM	1ml	100mM
0.5M EDTA, pH8.0	500ul	25mM	400ul	200mM
5M NaCl	400ul	200mM	2.8ml	1.4M
20% SDS	250ul	0.5%	-	-
CTAB	-	-	0.2g	-
PVP	-	-	0.1g	-
ddH2O	6.85ml	-	5.8ml	-
Sodium bisulfite	0.038g	-	-	-
Total	10ml		10ml	

② RAPD 마커의 추출·정제

RAPD 반응액 전량을 6배 Blue-Orange Loading Dye (프로 메가사)에서 처리

후, 2% Agarose Gel에 첨가해, 100V, 60분간 흘려 보냈다. DNA를 에치지움브로마이드로 염색 후, 트랜스이르미네이타 (후나코시사) 상에서 목적의 RAPD 밴드만을 포함한 Agarose Gel 을 잘랐다. Agarose Gel 로부터의 DNA 추출에는 Gene Clean II (BI0101사후나코시사)를 이용했다.

③ RAPD Marker Cloning과 Sequencing

정제한 각각의 RAPD Marker를 pGEM-T쿠타(프로 메가사)에 삽입했다(DNA Ligation Kit Ver. II ;Takara). plasmid DNA는 알칼리-SDS법, PEG 침전법에 의해 정제 해, Sequencing에 이용했다.

④ STS 프라이머의 작성과 PCR

앞서의 DNA 시퀀서에 의해 염기 배열을 결정하고, 결정된 염기서열 정보를 기본으로 하여 표 3에 나타낸 것과 같이 15개의 STS 프라이머를 작성했다.

표 3의 1번 프라이머는 5'에서 3' 방향으로 포워드인 경우 CAAGTGGCGCG AGCATT이고, 리버스의 경우 CGGTGTGCCGATTACA ACTG 로 구성되어진 프라이머 이며, 총 15개의 프라이머를 작성하였다.

PCR 방법은 Chen et al.(1997)의 방법을 다소 변형하여 실시하였는데, 20ul PCR 반응액은 주형 DNA 25ng, 2ul 10x PCR buffer, 1.6ul 2.5mM (5U/ul, Neurotics Inc. Korea)을 포함하였다. PCR cycle은 초기 DNA 변형을 위해 95°C 5분의 1 cycle, DNA 단편 합성은 95°C 1분, 60°C 1분, 72°C 2분의 35 cycles과 최종 합성은 72°C 10분 1 cycle이었으며, 모든 PCR은 Px2 Thermal Cycler(ABi)를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 멀티플렉스 PCR 프라이머의 개발

STS 프라이머를 단독으로 이용해 PCR을 실행한 결과, 16개 밴드에서 20품종이 판별 되었다. 여기서 DNA단편의 길이가 근접하지 않는 프라이머를 선정해 멀티플렉스화를 시도하였다. 단독 프라이머에서 PCR을 실행한 전기영동 패턴을 기초로 해, 멀티플렉스 PCR의 각 프라이머 Dimer를 형성한다든지, 서로 간섭을 하는가를 전기영동 도표로 관찰함으로써 확인했다.

프라이머 세트의 적정 Annealing온도는 그림 5에 나타난 Annealing온도의 최소치와 최대치의 범위 안에서 검토했다. 즉, 54~64℃ 사이에서 1℃씩 단계적으로 Annealing온도를 바꿔 PCR을 실행했다.



Fig. 8 DNA band according to annealing temperature

(①54℃,②55℃ ③56℃ ④57℃ ⑤58℃ ⑥59℃ ⑦60℃ ⑧61℃ ⑨62℃ ⑩63℃ ⑪64℃)

Annealing온도가 너무 높으면 전혀 증폭산물은 확인되지 않고, 너무 낮으면 비 특이적인 반응이 일어나기 쉬워진다. 또한 Extension 시간이 너무 짧으면, 전혀 증폭산물은 확인되지 않거나 짧은 비 특이적 산물이 우선적으로 증폭되는 경우가 있다. 반대로 너무 길면 전체적으로 Sledge상태가 되어 증폭 DNA밴드의 형성이 확인되지 않을 경우가 있으므로 주의가 필요하다. 그림 8에서 나타난 바와 같이 60℃ 근처에서 가장 밝은 밴드를 확인할 수 있었다.

프라이머의 혼합비율에 관해서는 우선 각 프라이머(10pmol/μl)를 같은 양으로 혼합해 PCR을 실행하되 전기영동의 결과 식별밴드가 불명료 또는 소실된 프라이머에 관해서는 혼합비율을 높이고, 비 특이적 증폭이 일어난 프라이머에 관해서는 혼합비율을 내렸다.

멀티플렉스 PCR을 검토할 때, 프라이머 자체의 2차 구조 및 프라이머 Annealing을 피하고, Self Dimer와 Cross Dimer의 형성을 방지할 필요가 있어, Annealing온도와 혼합비율의 밸런스가 굉장히 중요하게 된다.

15조의 STS화 프라이머의 멀티플렉스화를 위하여 한꺼번에 처리할 수 있는 프라이머끼리 조합을 실시하였으며, 이 결과 4개 키트로 집약 가능해졌으며, Annealing온도는 4 키트 전부 60℃로 통일할 수 있었다. 조합이 가능한 프라이머는 다음과 같다. 프라이머 1,2,3,4(키트1), 프라이머 5,6,7,8(키트2), 프라이머 9,10,11,12(키트 3), 프라이머 13,14,15(키트4)의 4개의 키트로 묶었다.

4개의 키트로 집약되므로 인해 분석시간의 단축과 시약비용의 감소가 가능해졌다. 또한, Annealing 온도를 60℃로 통일함으로 인해 1대의 PCR장치로 여러 개의 샘플의 동시처리가 가능해 졌다.

Table 3. Annealing Temperature and DNA sequence of STS primer

Primer No.	Annealing(°C)	Sequence
1 Forward	55	CAAGTGGCGCGAGCATT
Reverse		CGGTGTGCCGATTACAACCTG
2 Forward	62	CTCAGTGACAACCAAAGAAATTTAAAATC
Reverse		AACTAGGTACGGCGGCATTG
3 Forward	59	CTCAGTGACAACCAAAGAAATTTAAAATC
Reverse		CAACTAGGTACGGCGGCATT
4 Forward	62	CTCAGTGACAACCAAAGAAATTTAAAATC
Reverse		CAACTAGGTACGGCGGCATT
5 Forward	58	CTCAGTGACAACCAAAGAAATTTAAAATC
Reverse		CAACTAGGTACGGCGGCATT
6 Forward	60	CTCAGTGACAACCAAAGAAATTTAAAATC
Reverse		AACTAGGTACGGCGGCATTG
7 Forward	62	TGCTCATTGTTTTTTTCCAGTTGTA
Reverse		AACAACCCTTCCCTAAGCACATAT
8 Forward	59	GCTCATTGTTTTTTTCCAGTTGTAATC
Reverse		AACAACCCTTCCCTAAGCACATAT
9 Forward	59	AGGTCTCAGTGACAACCAAAGAAATTA
Reverse		AACTAGGTACGGCGGCATTG
10 Forward	60	AGGTCTCAGTGACAACCAAAGAAATTA
Reverse		AACTAGGTACGGCGGCATTG
11 Forward	64	AGGTCTCAGTGACAACCAAAGAAATTA
Reverse		CAACTAGGTACGGCGGCATT
12 Forward	59	AGGTCTCAGTGACAACCAAAGAAATTA
Reverse		CAACTAGGTACGGCGGCATT
13 Forward	59	AGGTCTCAGTGACAACCAAAGAAATTA
Reverse		CAACTAGGTACGGCGGCATT
14 Forward	60	AGGTCTCAGTGACAACCAAAGAAATTA
Reverse		CAACTAGGTACGGCGGCATT
15 Forward	59	AGGTCTCAGTGACAACCAAAGAAATTA
Reverse		AACTAGGTACGGCGGCATTG

Table 4. Reaction of 20 varieties for STS primer

Variet y No.	Primer														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1		+			+		+	+	+	+	+		+		+
2	+	+		+	+	+		+		+		+	+	+	+
3		+	+		+			+		+	+	+	+	+	
4	+	+		+			+	+	+			+			+
5		+		+					+				+		+
6		+			+		+		+	+	+		+		+
7		+			+	+		+	+			+	+		
8		+		+		+		+	+	+	+	+			
9	+	+		+	+		+	+	+	+	+				
10		+		+	+			+	+						+
11		+		+		+			+	+			+	+	+
12		+	+			+			+	+		+	+		+
13		+	+	+	+			+	+	+			+		
14	+	+						+	+		+	+	+		
15		+			+	+		+	+	+	+			+	+
16	+		+			+			+	+					
17	+		+	+					+		+		*		+
18	+			+	+					+	+		*	+	+
19		+		+						+	+		*	+	
20		+		+						+	+				+

표 4는 개발된 15개의 프라이머에 대한 20개 품종의 반응표를 나타낸 것으로 1번 품종의 경우 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15 번 프라이머에서 반응을 나타내었고, 5번 품종의 경우는 2, 4, 9, 13, 15 번 프라이머에서 반응을 나타내었다. 따라서 15개의 프라이머를 이용하여 20여 품종의 반응을 확인하면 각 품종의 특성을 확인 할 수 있다.

나. 변형된 STS primer의 개발

Fukuoka-S(1994)등이 설계했던 STS 마커들을 가지고 primer를 design할 수 있는 program “primer 3 v.0.3.0”을 이용하여 새로운 primer를 설계하였다. 그림 9는 변형된 프라이머이며, Forward primer는 T37 primer에 대해 푸른색으로 표시되어진 5-end 에 c의 1bp를 추가하였고, 3'-end에 TGG를 추가하여 24-mer primer를

개발하였다. 이들 새로운 primer 조합의 PCR은 20개 국내 japonica 품종들에 대해 특이 alleles를 생산하였으며, sledge 현상도 개선되는 결과를 가져왔으며, 이들 마커는 T37S로 명명하였다. 또한 그림 10에서 보는 것과 같이 T33 primer에서도 Forward primer에 대해 푸른색으로 표시되어진 GC를 추가하여 24-mer primer를 개발하여 sledge 현상을 개선 시켰으며, 이들 마커는 T33S로 명명하였다. 하지만 이들 마커에 대한 품종판별 DNA분석에서 충분히 사용할 수 있을 것으로 판단되었다.

```

1   ACATACACCATTGTTAACCAGGGATCTACTTCAAAGGTATCATGCTGGTGGCCTGCTACC
61  ATCTTTAGCTACTATGAAGTATTGCTTAAAATCTGGCACAAAACATTTTCATCCTATCTC
121 CATTTTGGAATTAATGTAGTGCCACCATGCCACCCCTACTATACTCAATTCATTATAATG
181 CTGCATCAGATTTTATCTCACTCTAACCCCTTTTGTTCGCCGAAAGTTCTGTTGCTCCAAA
241 ATCCGAGAAATGTAGAATGTGGTGAATCTCATGTTACTGTTATTAATGTATATTGCATTC
301 TGTCATAAACCTTTCCCGTTGGTCATATACTTCCTCCAGTAGCCCTTATAATCATGTAT
    (T37S-F)
361 GCCCAAATCAAGCCAAGGTTTCATGACACCATTGTAGTGTAGAGTAACAGACCTTTTTTAT
421 ATCGGTTTGACTAACTCCATAATCATGTCCAAGACCTGATTGGACCCATGAATCTTCCAA
481 AGGATATATCAAATCTTGAAAAGACAAGTAAGCTTATGGGAAGTACTTTAAGTGGAAATGA
541 TGTCACACTGTCCTTTTGCAACTACAAAGACAAAGGCAGTGCATGAGAATACTGCTCTCA
601 TTGGGACACAATTAATAAATGAAGTTATGGAAGGATAACTAGGGCTACTAGAAAGGAATT
661 CAGATATCTCTATGATAAAAAGTTACAATCGAATGTAAGATCTTAGGGATAGGAGTACTA
721 ACCTTTTGAAGCAATTGTTTCATACCGACTGGTAATGTGGAGATCCCTCCATTTTTTTCAGT
781 TCAACAACATTCAGACCAGATAACCACACACATGAATTGTTGTCAAAAATTACGTTCCCTCG
841 GTGTAAGCCTTCAATTGTCCTAATTTAACTTACAGAACTGAATAGCTCCCACTTTTA
901 CCACCCATATTGAGGTTCCACAGAGATGACAAGTCTTTCTGGACAATCAAATCATCATCT
961 AGAACTACAACCTCTATTCAAGCTAGGAAGAAGGTCAGGCAGGAGGAAATGTGAATGGCCA

```

Fig. 9 Genomic sequences of T37S primer on chromosome 12.

```

1   TGTCAGTTACATAGTGAGGTCAACAATTGATCTCTTAACACAAACAGCAACATGGAAACC
61  AAGCTAAGGTACCAGATCATAATGTAAGAATGCTTGATCAGATCATTATAGTACTAACTT
121 GAAAAACTGGGATAGTAAAGCAAAATTTTGGGCATGCAAAGAAAATACTAGCTGGCTCGT
181 AAAGCAATCAACGGTACAATCAAGTGATCAACTGCAAAGCATATAATAGCTCACGATAAG
241 TCACTTGCATTATATCAAATTCATGGAAGTGTGCAGCAAAATAGTGATAACTTAGCCACT
301 GAGGCATTTCGCTAAGTAATAAGCTACAAAAC TCCAATCACATAGAGACCAGGACACAAAAG
    (T33S-F)
361 ACTACTGCAGCACCTAACTTAGATGATGCCAATCTTGTTGGCCACGTCGAGAGCATCGT
421 AGTCTGGTGTTCAGCTTCACGTAAGCCTTCTTCTTCCCATCAGGCCTGGAAGACAAGTAGG
481 GTCAGTTAACTACACTACCTAGCAAATCAAGCGATAAAAATGAAGTATGAAGGAAAGTGCT
541 AACCTGATCAGAGTGTTCACCTTCTTTCCTTGCCTGGATGTCGTACATCTTCTTGACAGCAGCC
601 TTGATCTTCTTCTTGTTCAGCCTTAAGGTCAACAATGAAGACCAGAGTGTGTTGTCTTCG
661 ATCTTCTTCATTGCGGATTCAGTGGTAAGGGGATACTTAAGGATCTGGTACTGATCAAGC
721 TTGTTCTCCAGGGTACTGACTCTTGGGTACTTGGGGTCCCTAGACTTCTTCAAGGTC
781 TTGGGGCGGTGAAATGTCACGGATGTGCGGATCTTCTTGGTCGTCTTCTTGGCTGTCCCA
841 GACTTAACAGCCTTGGCTGCCTTCAAGGCTTGGGCCTTGGCATCACCCCTTCTTGGCAGGA
901 GCAGCTAGACACAAAATAAAAACAATCAGTTCATGCATCTTAATTAAGCACCAAGCTGAGG
961 TTAATAAAGCCAGGCAGAAATGGATTATAGACTAATTATACAACCCGACTACAGGAATA
1021 CACTCATTTCCAATGGACCATATTCATCAATGCTTAGCAATTCATACTTATTTAAACA
1261 AATATGCATAAAAGAACTTATTCAGTACTAAGACCTTATATAGTGCAAGCGAGACTACAT
1321 AATAATATGATGTACAAAAC TAGAAATAGTTAAAAACAACCAATATGAAGCAATTTGCAC
1381 ATGGTCTGAAATCAAAAGAACATGTAACATGATCCAGCAATATCATCTGTGTACCTTTA
1441 GGAGCCATTGGAGCTTCACAGGGCTGCCTCTTGAACATGCACACAAAGAGAACAGTGATAT

```

Fig. 10 Genomic sequences of T33S primer on chromosome 4.

다. 20개 품종에 대한 SSR 마커를 이용한 검증

표 5는 국내 품종 판별에 사용된 SSR Marker이며, 염색체 상의 위치와 alleles의 수를 표시한 것으로, OSR20, RM207, RM249 의 마커는 각각 염색체 1, 2, 5번에 위치하였으며 20개 자포니카 품종들에 대해 5개의 다형성 alleles를 생산하였다. RM206은 염색체 11번에 위치하면서 4개의 alleles를 가지고 있었다. RM 5914는 염기 3개가 반복되는 SSR 마커이다.

Table 5. Number of Chromosome and alleles of Markers used for discrimination of varieties.

Markers	Chromosome	Start	Finish	No. of alleles
RM207	2	35369238	35370057	5
RM206	11	21979138	21979957	4
OSR20	1	40494432	40495257	5
RM249	5	10755667	10756286	5
RM5914	1	31836888	31837907	2

표 6은 4가지 SSR 프라이머의 염기서열을 나타낸 것으로 osr20의 경우 포워드가 GGAAGAGGAGAGAAAGATGTGTGTCG가 되며, 리버스는 TCAACAGA CACACCGCCACCGC로 구성된 프라이머이다.

Table 6. DNA sequence of SSR primer

Primer		Sequence
OSR20	Forward	GGAAGAGGAGAGAAAGATGTGTGTCG
	Reverse	TCAACAGACACACCGCCACCGC
RM249	Forward	GGCGTAAAGGTTTTGCATGT
	Reverse	ATGATGCCATGAAGGTCAGC
RM206	Forward	CCCATGCGTTTAACTATTCT
	Reverse	CGTTCCATCGATCCGTATGG
RM207	Forward	CCATTTCGTGAGAAGATCTGA
	Reverse	CACCTCATCCTCGTAACGCC

(1). PCR product sequencing

PCR product sequencing은 크게 ①PCR product precipitation, ②Sequencing PCR, ③DNA precipitation 의 3가지 단계로 나누어 실시하였다.

① PCR product precipitation

Genomic DNA에 원하는 primer를 넣고 PCR을 수행한 후 Shrimp alkaline

phosphatase와 Exonuclease I 을 이용해 dNTP와 primer를 제거해야 한다. Primer가 남아 있다면 sequencing할 때 원하지 않는 Peak가 나타날 요인이 있다.

1/5ml 튜브에 PCR product $15\mu\text{l}$, $10\times\text{SAP}$ buffer $2.5\mu\text{l}$, Exonuclease I $0.3\mu\text{l}$, Phosphatase $0.3\mu\text{l}$, dH₂O $1.9\mu\text{l}$ 를 넣고 Total $20\mu\text{l}$ 로 맞춘 후 원심 분리하여 37°C 1hour, 80°C 15min 방치한 후 4°C 로 샘플을 유지하였다.

② Sequencing PCR

Precipitation후 각 well에 $20\mu\text{l}$ dH₂O를 넣고 2배 희석한 후 그 중 $6\mu\text{l}$ 만 취하여 template로 사용한다. 이때 Primer는 Forward와 Reverse중 한쪽만 넣어준다. Template DNA $6\mu\text{l}$, $5\times\text{buffer}$ $1\mu\text{l}$, Primer F $0.65\mu\text{l}$ ($3.2\mu\text{M}$), Big-dye $0.2\mu\text{l}$, dH₂O $2.15\mu\text{l}$ 를 넣어 Total volume을 $10\mu\text{l}$ 로 맞춘다.

PCR cycle은 초기 DNA 변형을 위해 95°C 2분의 1 cycle, DNA 단편 합성은 94°C 20sec, 55°C 20sec, 60°C 20sec의 35 cycles과 최종 합성은 60°C 4분 1 cycle이었으며, PCR이 끝난 후 4°C 로 샘플을 유지 보관 하였다.

③ DNA precipitation

남아있는 Big-dye를 제거해주기 위한 방법으로 Ethanol precipitation을 실시하였다.

95% EtOH $62.5\mu\text{l}$, dH₂O $24.5\mu\text{l}$, 3M sodium acetate $0.3\mu\text{l}$ 를 섞어 각 well당 $87.3\mu\text{l}$ 를 넣고 vortex한 후 실온에서 10분 반응시켰다. 12000rpm , 20분, 4°C centrifuge한 후 상층액 버리고, 다시 70% EtOH $100\mu\text{l}$ 씩 넣었다. Tapping한 후 12000rpm 10분, 4°C centrifuge한 후 상층액을 버린 후 65°C 에서 10분간 건조 시킨 후, $10\mu\text{l}$ hi-di formamide넣고 tapping한 후 실온에서 10분 방치한 후 Sequencing을 위한 샘플로 사용하였다. 각각의 마커별로 Sequencing 한 결과를 그림 11, 12, 13, 14, 15에 나타내었으며, 염색체의 염기서열 중 붉은 색으로 표시한 부분이 각각의 프라이머의 염기서열이며, 표 6에 나타낸 각각 프라이머의 염기서열과 동일한 것을 알 수 있다.

```

1   TGTACTAGAGTTGTGGAGCTGGGTTTAGGCAGCTCCACAACCTCCACTCCAGACTCAACTC
61  CTGGAGTTATATTTAGGAGTTGGAGTTGTACCAAACAGGCCCTTAATTTAGTTTGAGCTG
121 GAACCTTAATTGGACAGATTAAGGTGATCACAAAACCTGATATAAAAATAGATTTTAAAGAA
181 AAGGTTATATATTTCAATTGAGGCGTAAAGGTTTTGCATGTTTGAGAGAGAGAGAAAGAGA
241 GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAAAACATTAAAAGGCATATATACTTGTGACT
301 GAAATGAGGCTGACCTTCATGGCATCATACCAAGGGTACCAACTAACAGTAGTTGGAAGG
361 CCGAGAGCATCGATGGAGTATCTGGTTGCTGTCAAGGGGACGACAGCGTCCGTGTCTCCA
421 CTGCCAATAAACATAAACACATATATTCTTGCAATCTTCTACATTATTAGAGTAACAT
481 CGTTGCATAGTTGGCAGGACGGATTTTGTAGAAAATACATAGTAAGTTTTATTATAAAAA
541 AATATAAAAACAAATGGAATATGTTTTTTATATAATTTGATTGGATGTCTGAGAACCATAT
601 ATACTTATATAGTTGGTTGT

```

Fig. 11 Genomic sequences of RM249 primer on chromosome 5.

```

1   CCAATGAGCATAACTATGGGAACATGGTTACAAAGAACGGCAAATAATCGTCTCCTTTTT
61  GGGGAAAGCACACAACAATTATCAAGATTCCTTTAGGAATCCTAGTGGATAAGGCACAGA
121 CTGGCAAGCGAGGACTATAGTTGCCAATTACTTGCAGTATTCGATAACCGTGGTTAAACC
181 AAAATGTGCAGTTATAGATAGTTCCTTCCTGTTTGTGCTAGTCAATCAAGCTAACAGAT
241 CAGGCTAACCTAAGATGGTTGAATTATACGCTCGCTAGTAAAGAAACAACCATGAAATAA
301 CCATTCGTGAGAAGATCTGATTGAACAAAAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG
361 AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGGGAAAGGGATTGGGCGGTTACGAGGATGAGG
421 TGAAGAGCAAGGGGAGGGCGTTGACGACGGGATCAAGAAGAGGGGAAGCAAGCACGCG
481 AGGCAAACCTGTACATGGAGCACAAATCGAATCAGATGTTTCATCAGTAATCAGTACAA
541 GAGGGGGGAGCAGACATAATAATAATCAGATCAGAGCAAAAGTTGCTGGATTAGAACAG
601 GGAATACGCACCATGTCGCCGATCGAGTCGCCTTCGCGGGATGGCTGGCTGCTCGCCT
661 TGCCCTTGACTTGGAAGCTGGAAGTAGGAGAACTCTTCTTCTGAATCGGAATGGGGAAT
721 TGGAGATTTGGAGGAAGGAAGGAAGCAAGTGCAAATCTCTCCGAGGGGACGGGGG

```

Fig. 12 Genomic sequences of RM207 primer on chromosome 2.

```

1   CCAATCTTATGTGGAAGAATGAAGAGTCACGCATTAATATGAGAAAATCATTAAAGATGA
61  TAGGTTGTTGGATTGAAATATGCGTAGCAAAAATAAAATTTTCAGATTTAGAAATATGAC
121 TATCAAAAGTAGATGAATGGAGTAAATTAACAGAAAGAGTGTACTGAACCTCTATCAAT
181 CATAAACTCCATTTAATGCTCCATTTCCCTCGAAAAAATAATGCTCCATTTCCCTCGAA
241 AAAATAATGCTCCATTTATGTGCTAAAATGAACATAAGTAATGGAATCTCAAAAAATTA
301 CCCATGCGTTTAACTATTCTAAGCAAATATTTTTTTCCAGAGAGAGAGAGAGAGAGA
361 GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATGTGGTCACGTGCA
421 AGTTGCAACTATACGTTGCTAGCTAGCTAGAACCCATACGGATCGATGGAACGAATTTAA
481 AGAGGTCATCCGCCACCAGCACGTACATAGCTACACGTTTGTGACCGCCCCCTTGACCT
541 TCAACGAATTCACCGGTTTTAGATAGACATGGTTAGATGTATTAGTCACTTCGTTAGTT
601 TACTCTAAAGTTTATATCGATAATGCTATATATAAATGTAGTATTATATACCGTATGTTT
661 CAAATCTCATTTCCACAGCTTTGATTTTTTCCCAAACACATAAAATAATTGCATGTCAA
721 TATACTAGGAGAGCAATATTTAGTACACAATGTTACACAGCTCTAACAAATAGATTGT

```

Fig. 13 Genomic sequences of RM206 primer on chromosome 11.

```

1   TCTATATAATATCCGATGTGGCTTGCCAAAACGCCGCTGGAATTTAAAAGCCCCAAAATG
61  CTGCAAAAGCCAAAACCGTCTCTAGTTACACCCGTGGGGCCCGTCCACATCCACAACG
121 GCCCAAAATGAGAGCATGACAGCCCGGGCCACGCGCTACTCCAGTAAAGAAACACACT
181 CTCCCCTCTCTCCTCTCCTCTGTCCCTCTTCTTCTCTCTCTCCCAAGAACTCTCTCCTC
241 TCTCTCTACTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTTTTGTGCTTCCATTTCTCGTTCTTGCACGG
301 GGAAGAGGAGAGAAAGATGTGTGTCGCTGTGGTTTGAAAAAGGTTGGGTGTGAGAGGAGA
361 GAGAAAGTGGAGTGGAGGGGAGAGAGAGAGAGAGATGGGTTCTTGCCTTCGGTTCAC
421 AAGGACCTCGGGTCCCCAAGAAGCTGTTTCTTGCGTCGTCGCCTACCAAGGAGAAGAAG
481 GCCGCGAACGGGAAGGGTGGCGGTGGCGGTGTCTGTGATCTCAAGCGAAAGGAGCAG
541 CAGCAGGCGGCGCGGCAGGGTTGGCGTCAGGAGCCCCGGTTCTGGTAGGATTCGTTGA
601 TCTTGGCTCTCTTGGGTCTTTTTCTGAAGTGAGTTTCAGTTTCAGATGGTTGTTTATTG
661 ATCAGTTTGGTTGCTTAGCTAGGTAAGTCTATTCTTGAAAGGTTAAAGAGGGAGATGAGT
721 AGATGACTTGGCTGATCTTTCTGTGAAAAAAGAAGAAGAAAAGAGGCCTTTTGGGTT

```

Fig. 14 Genomic sequences of OSR20 primer on chromosome 1.

```

1   GGTATAAAATTATTTAAAGAAATATTGAATTTGATCTAAGGCTCTTGATGTCATTGACTA
61  TCTTGCTAAAGTGGTCATACATATGTTGCTCGGGCTTTTAGCATTTCACACAACAAATCAC
121 TCGAATTGTCCCTTCAAGATTCTCCACATTTGACTCACGGACGCTATCAATTTAGTTTGTG
181 AAAAAAAAAACGCCAACATGACATATCAATTTTGGCTTCCAAGTGGCTAATTTTTCATTAT
241 TATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTAT
301 TATTATTATGCACATAATGGCTCAAGTGCATCCCTTATCACACCGTTAGAGAGATGGAGG
361 CCAACCGTAAATCCCTAATTTTAAGGGAACCATAAATTTGTAAGAAAAATGGACAGAGGCC
421 TGTTTAGATTCCAACCTTTTATTCAAACCTTTTAACTTTTCCGTCACATCAAACCTTCCCTA
481 CACACAAATTTTAACTTTTCCATCGCATCGTTCTAATCTCTTCAAACCTTCAATTTTGGC
541 TGGAACTAAACACAGCCAGAGTAATGCGCCACAAATGCCACAAGTATGATCAGTAGATCA
601 CTCATTGCTTGTGCTCACATTTTCAGAACCGTGCCAAAGCATGAAAGGGAAT

```

Fig. 15 Genomic sequences of RM5914 primer on chromosome 1.

(2). 품종 특이 Alleles에 대한 Genotyping 반응

국내 20개 품종에 대한 고유 그래프를 확보하기 위하여 사용된 마커들을 염색하였다. 마커들의 염색은 DS-33 Dye Set을 사용하여 G5 Filter Set으로 하였다. RM249는 VIC(green), OSR20은 FAM(blue), RM206은 NED(yellow) 및 RM207은 PET(red)의 형광 dye labelling을 하였다. NED의 Yellow색은 그래프 상에서 눈에 잘 띄지 않아서 검정색으로 표시를 하였다.

이들 형광 labeling된 마커들은 20개 자포니카 벼 품종에 대해 ABi Sequencer로 품종 특이 allele에 대한 size(bp)를 평가하였으며, 반복시험에서 각 alleles에 대한 size 변이는 0.5bp로 매우 안정된 결과를 보였다.

그림 16, 17, 18, 19는 각각 품종에 대하여 SSR 프라이머에 대한 크기를 나타낸 것으로, 그림 16의 남평벼의 경우에는 염기의 사이즈가 OSR20에서는 206bp, RM249에서 126bp, RM207에서는 119를 나타내었으며, RM206에서는 반응이 검출되지 않는 특성을 보였으며, 그림 19의 태봉벼의 경우에는 염기의 사이즈가 OSR20에서는 193bp, RM249에서 126bp, RM207에서는 130bp를 나타내었으며, RM206에서는 174bp로 나타났다.

SSR 마커는 그림16, 17, 18, 19 등과 같이 각 마커마다 나타나는 품종에 따른 염기의 크기 차이를 이용하여 품종을 구분할 수 있다.

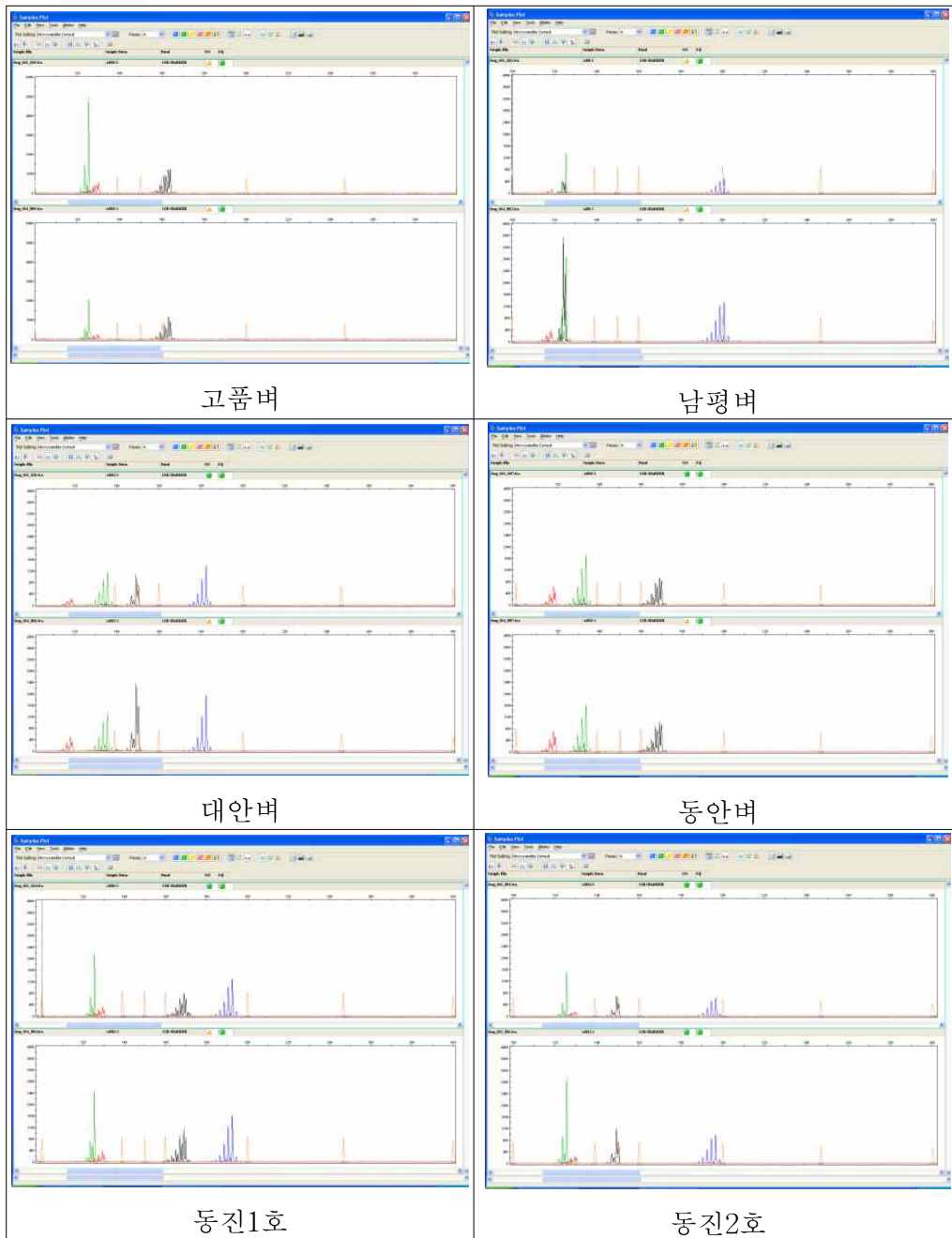


Fig. 16 Genotyping of primers used for discrimination of varieties.
 RM249-VIC(green), OSR20-FAM(blue), RM206-NED(black), RM207-PET(red)

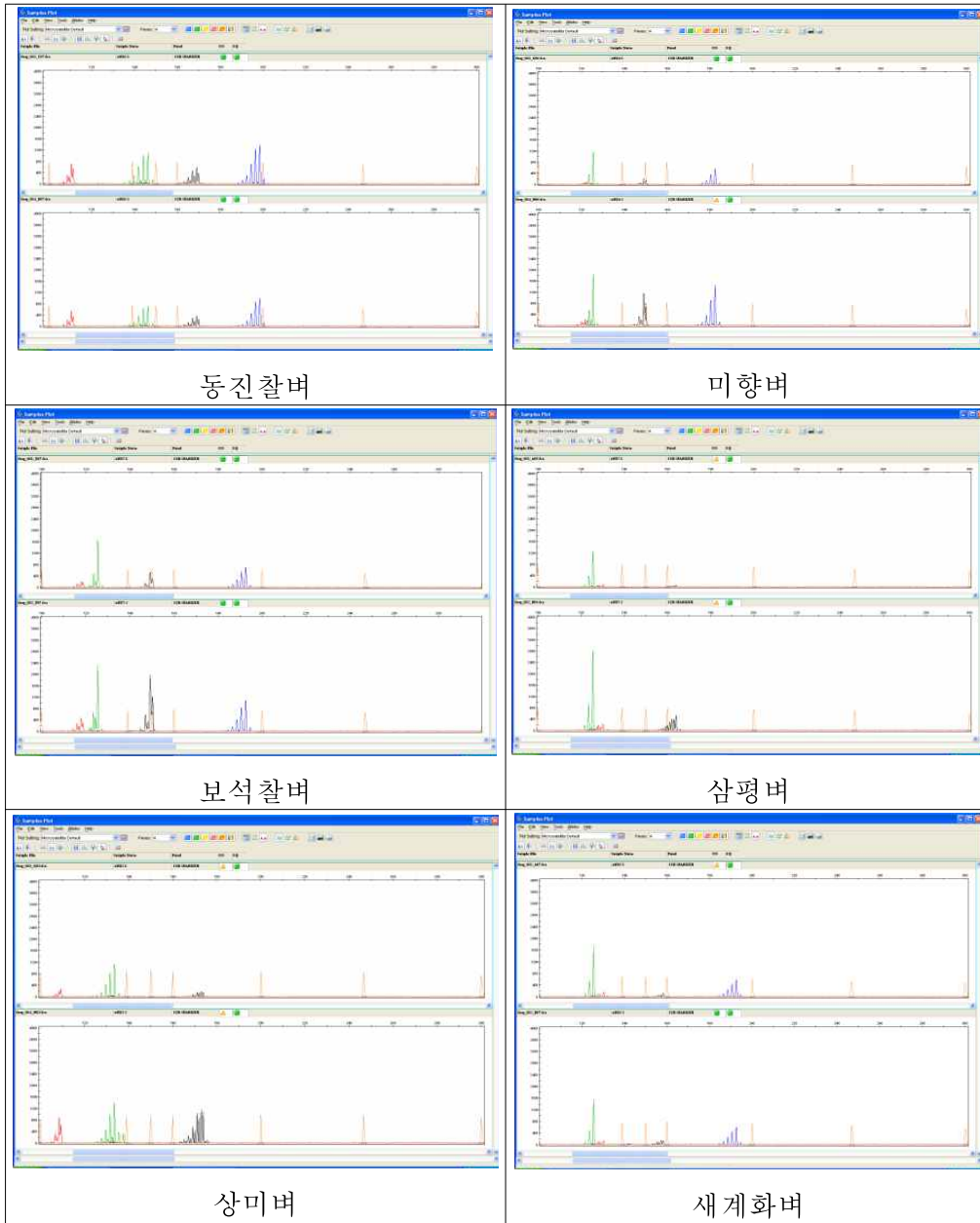


Fig. 17 Genotyping of primers used for discrimination of varieties.
 RM249-VIC(green), OSR20- FAM(blue), RM206-NED(black), 207-PET(red)

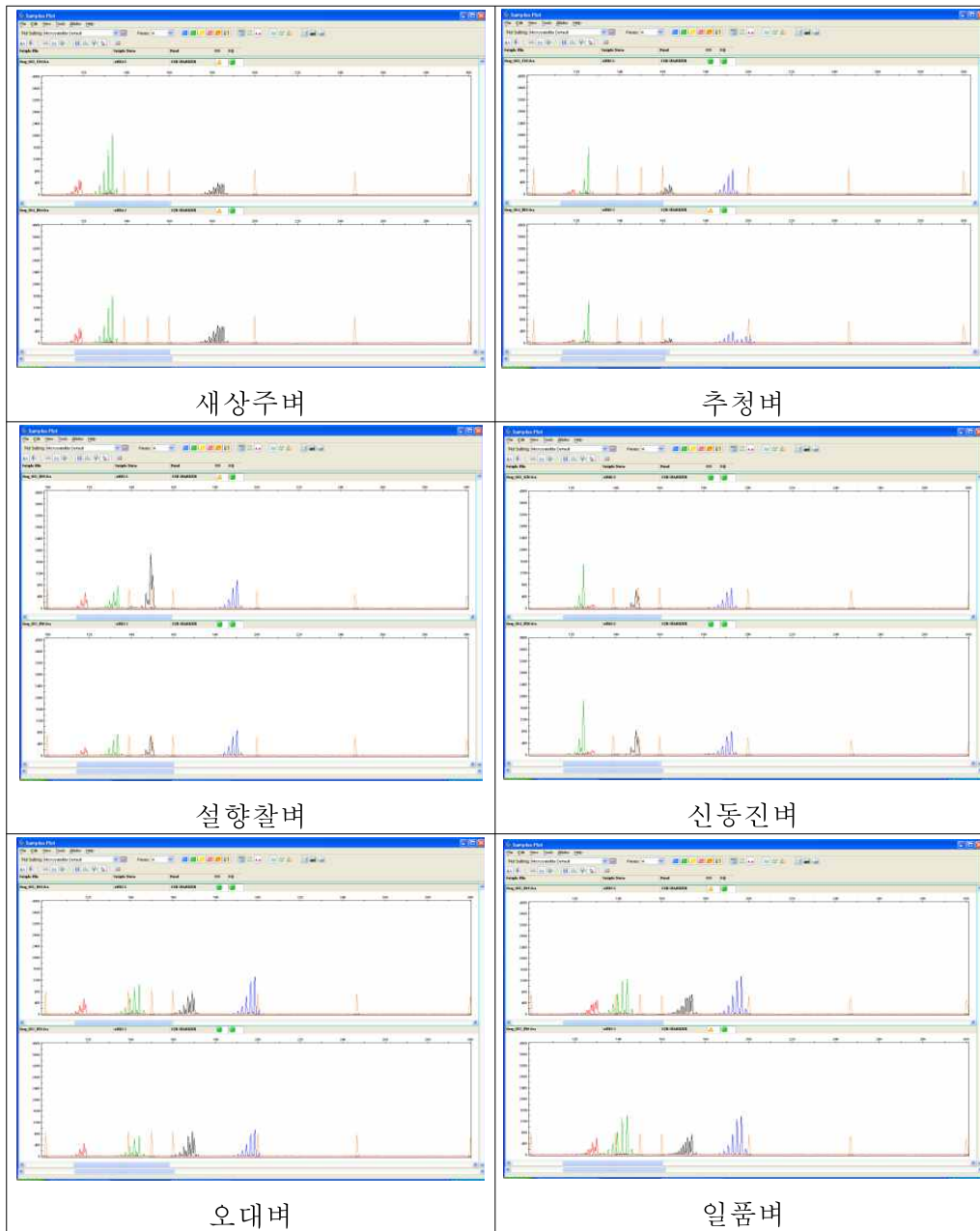


Fig. 18 Genotyping of primers used for discrimination of varieties.
 RM249-VIC(green), OSR20-FAM(blue), RM206-NED(black), RM207-PET(red)

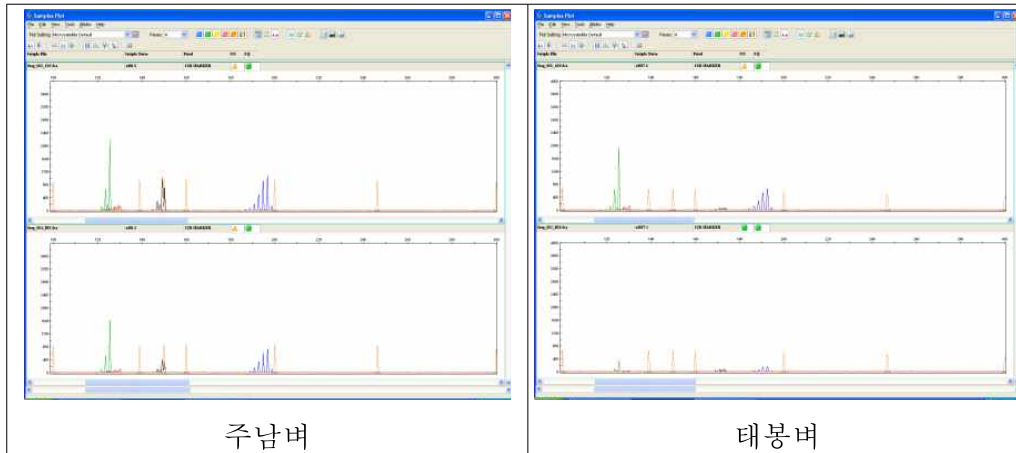


Fig. 19 Genotyping of primers used for discrimination of varieties.

RM249-VIC(green), OSR20-FAM(blue), RM206-NED(black), RM207-PET(red)

본 연구에서는 RAPD 마커의 염기 배열 결정을 실시해, 수십조의 프라이머를 개발하였으며, 이를 통하여 STS 프라이머의 설계와 20여 품종에 대한 실험을 실시하였으며, 위의 결과와 같이 품종의 구분을 확인할 수 있었다.

라. STS 프라이머 세트의 검토

본 연구에서는 개발된 염기 배열을 기본으로 STS 프라이머의 설계와 PCR 조건의 검토를 실시하였으며, 그 결과를 토대로 국내외 육성 80개의 품종에 대한 STS 마커의 적용 가능성을 검토하였다. 이를 통하여 STS 마커를 통한 장려 품종의 판별이 보다 간편하고 정확하게 이루어 질 수 있도록 하였다.

(1). PCR 반응

PCR 반응에서 최종 부피는 $20\mu\text{l}$ 로 조정하였으며, Genomic DNA $2\mu\text{l}$, PCR Buffer $2\mu\text{l}$, dNTPs $1.6\mu\text{l}$, Taq polymerase $0.1\mu\text{l}$, 3쌍의 Forward 및 Reverse Primer를 하나의 Kit로 만들었다. 사용된 Primer 양은 각각 $0.4\mu\text{l}$ 씩 넣었으며, 나머지는 증류수로 보충하였다. PCR cycle은 초기 DNA 변형을 위해 95°C 5분의 1 cycle, DNA 단편 합성은 95°C 1분, 60°C 1분, 72°C 2분의 35 cycles과 최종 합성은 72°C 10분 1 cycle이었으며, 모든 PCR은 Px2 Thermal Cycler(ABi)를 사용하였다.

(2). STS 프라이머의 Genotyping

본 연구에서 STS 프라이머의 개발과 동시에 DNA 판정 시스템의 품종 분석기를 동시에 개발하였으며, 이를 이용하여 국내 주요 10개 품종에 대한 각각의 Genotyping을 그래프로 확인하였다.

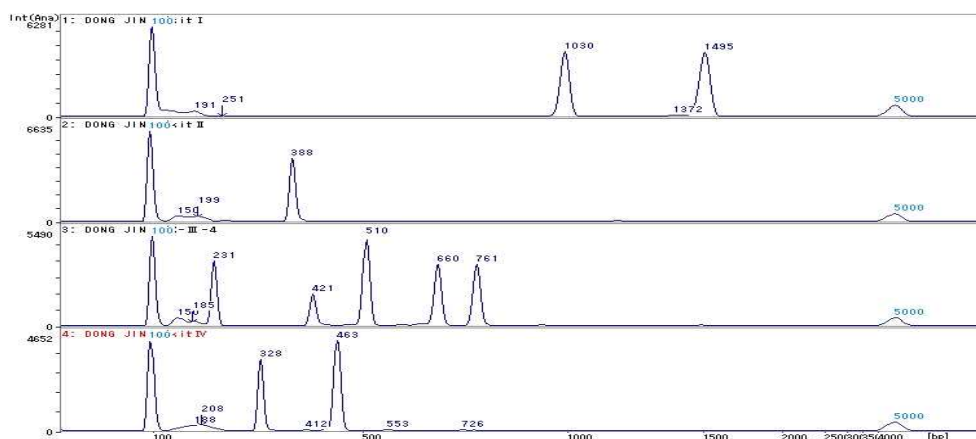


Fig. 20 Genotyping of primers for discrimination of rice variety; Dong Jin 1.

(Size marker:100bp~5,000bp.)

그림 20은 동진1호의 STS 프라이머 키트의 반응을 나타낸 것으로 키트 1에서 1,030bp와 1,495bp 위치에 2개의 피크가 나타났으며, 키트 2에서는 388bp에서 1개의 피크가 나타났고, 키트 3에서는 421bp, 510bp, 660bp, 761bp에서 4개의 피크가 나타났다. 그리고, 키트 4에서는 328bp, 463bp에서 2개의 피크가 나타났다. 프라이머별로 해석을 하면, 키트 1,2,3,4에서 각각 2개, 1개, 4개, 2개의 프라이머에서 PCR 반응을 보인 것이다. 이것은 다른 품종들과 구별되는 동진1호만의 고유한 반응으로 품종 구분에 유용하게 사용되었다.

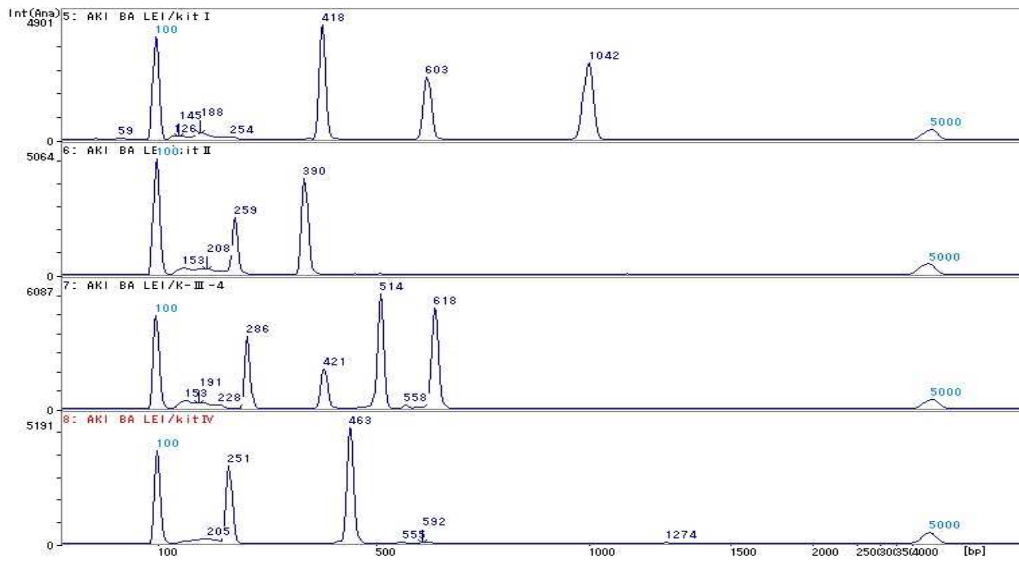


Fig. 21 Genotyping of primers for discrimination of rice variety; Chucheongbyeo (Size marker:100bp~5000bp.)

그림 21은 추청벼에서 고유한 Genotyping을 나타내었다. 그림 17의 동진1호와 다르게 키트 1에서는 프라이머 3개에서 모두 피크를 나타내었고, 키트 2에서는 2개, 키트 3에서는 3개의 피크를 나타내었으며, 키트 4에서는 2개의 피크를 나타내었다.

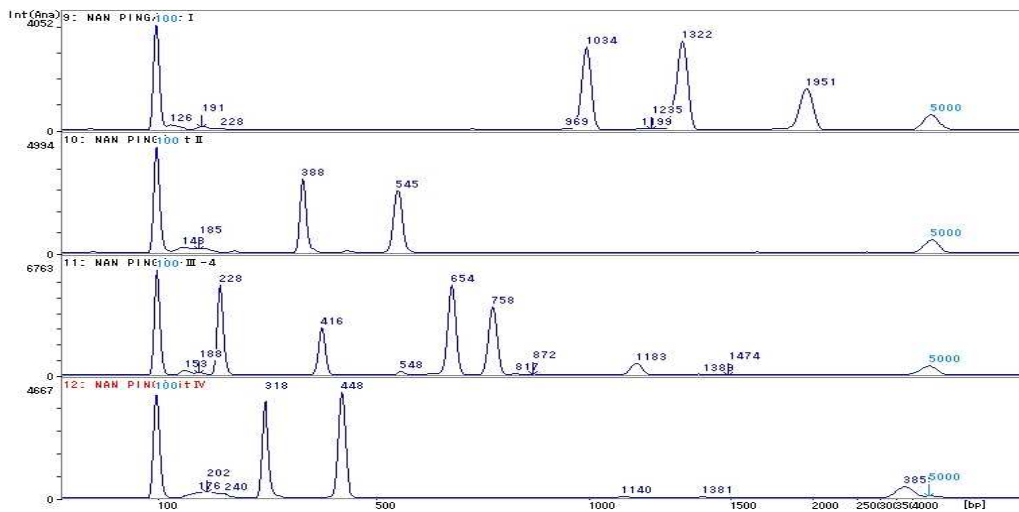


Fig. 22. Genotyping of primers for discrimination of rice variety; Nampyeongbyeo (Size marker:100bp~5000bp.)

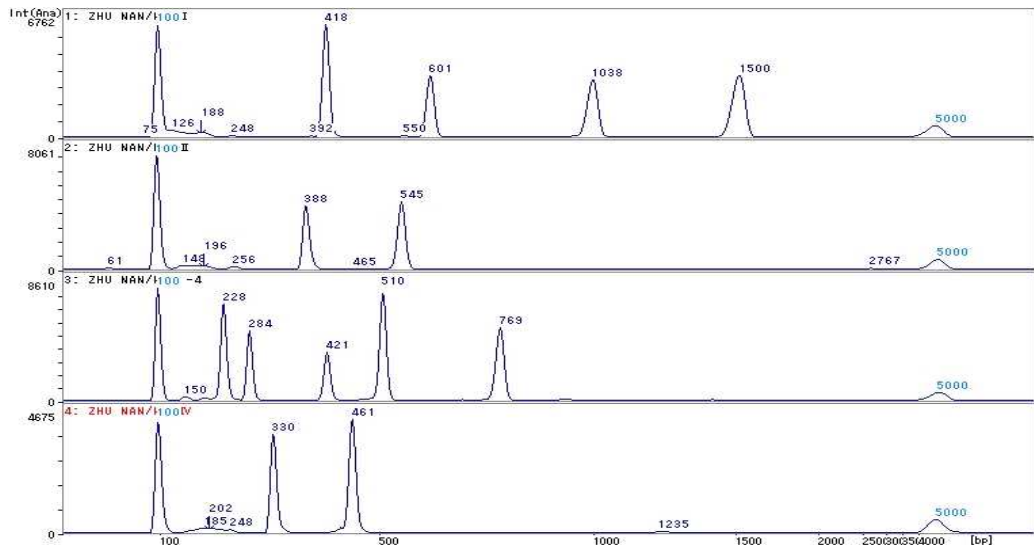


Fig. 23 Genotyping of primers for discrimination of rice variety; Junambyeo
(Size marker:100bp~5000bp.)

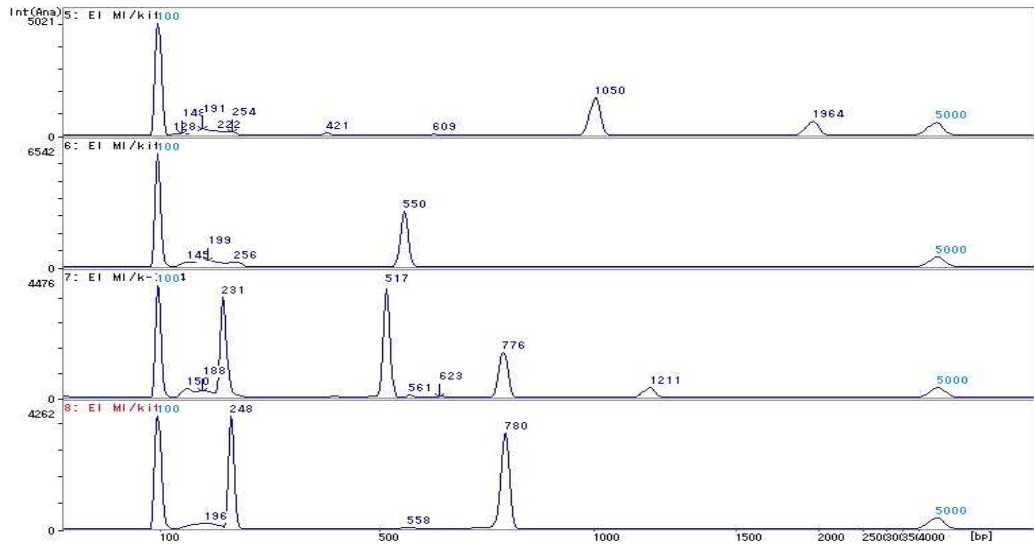


Fig. 24 Genotyping of primers for discrimination of rice variety; Ilmibyeco
(Size marker:100bp~5000bp.)

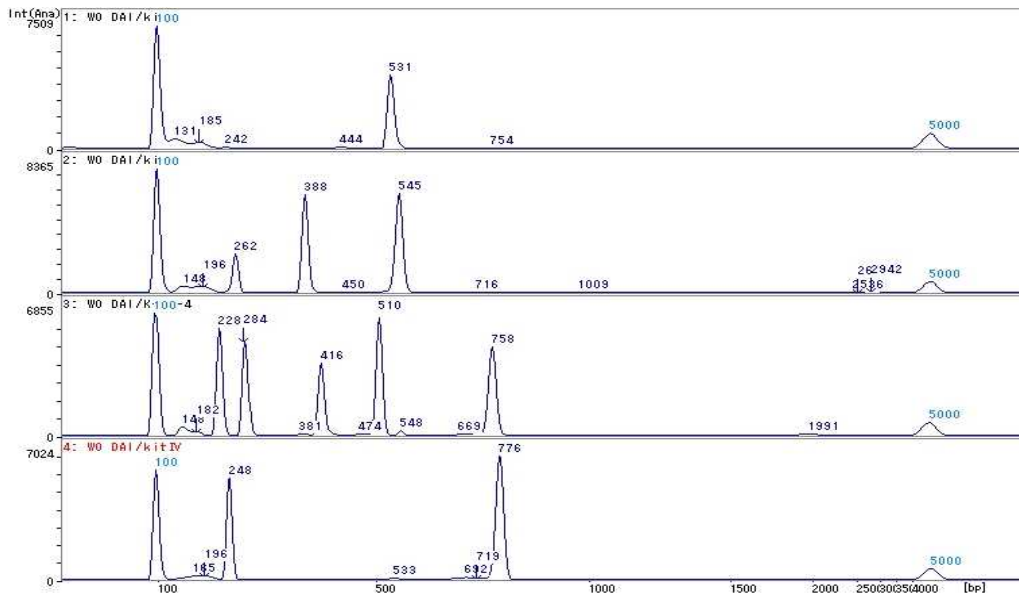


Fig. 25 Genotyping of primers for discrimination of rice variety; Odaebyeo
(Size marker:100bp~5000bp.)

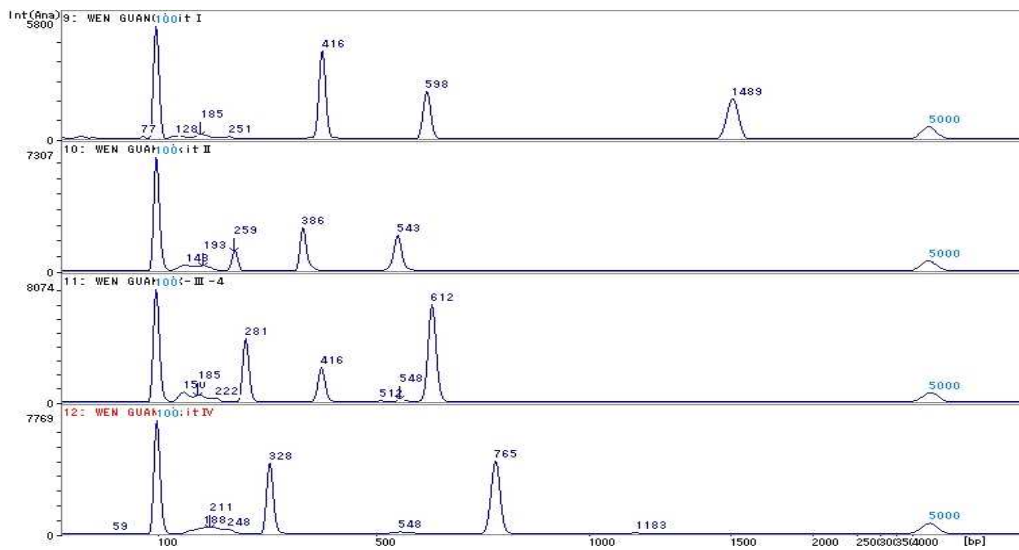


Fig. 26 Genotyping of primers for discrimination of rice variety; Unkwangbyeo
(Size marker:100bp~5000bp.)

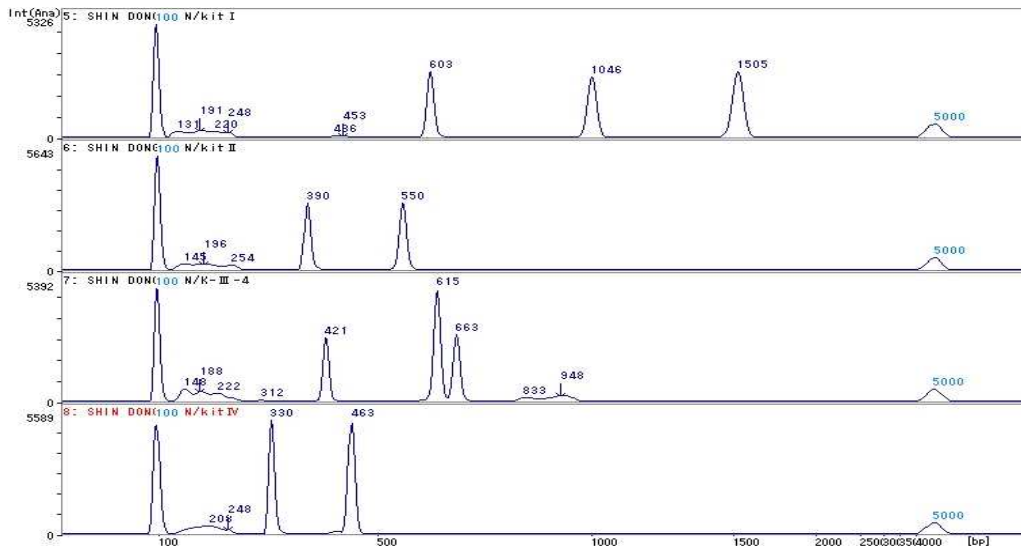


Fig. 27 Genotyping of primers for discrimination of rice variety; Shindongjinbyeo
(Size marker:100bp~5000bp.)

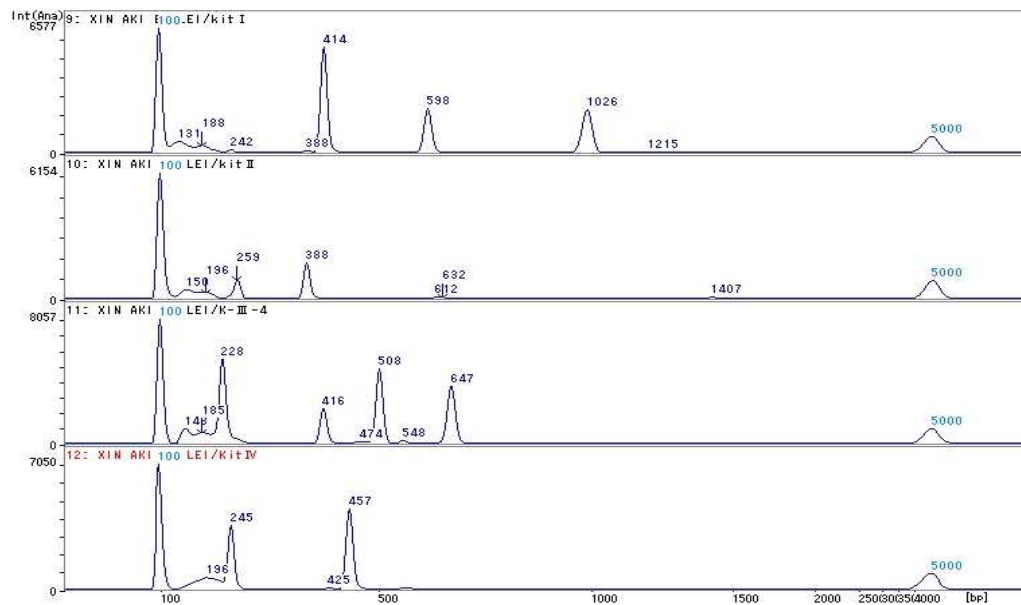


Fig 28. Genotyping of primers for discrimination of rice variety; echuchenogbyeo
(Size marker:100bp~5000bp.)

그림 22에서 28은 각각 남평벼, 주남벼, 일품벼, 오대벼, 운광벼, 신동진벼, 새 추청벼에 대한 Genotyping을 나타내었다. 그림에서 알 수 있듯이 이들 품종들은 키트 4개에 대하여 서로서로 특이한 반응을 보여 품종을 구분할 수 있는 중요한 마커로서의 역할을 하였다.

마. 품종 판정을 위한 STS 프라이머 반응에 대한 데이터베이스화

본 연구에서 국내산 벼의 품종을 판정하기 위해서는 최종적으로 DNA 판정기에서 반도체 Laser 센서로 판독한 Data를 얻고 중앙처리부에서 처리된 신호는 RS-232포트로 전송되어 각 품종별 데이터베이스와 비교되어 분석용 프로그램에서 최종 판정된다. 개발된 STS 유전자 마커를 이용하여 143종의 각 품종별 반응에 대한 데이터를 확보하였으며, 이를 데이터베이스화 하였다.

(1). 국내산 벼 품종의 STS Primer 반응

본 연구에서는 벼 품종 판정을 위하여 품종의 구분이 가능한 STS 유전자 마커를 개발하였으며, 국내외 육성 143개 품종들에 대한 STS Primer 반응을 표 7과 표 8에 나타내었다. 표 7에서 80개 품종에 대한 반응을 나타내었으며, 표 8에서 63개 품종에 대하여 검토하였다. 표 7에서 1번 품종은 1-2, 2-1, 2-3, 3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 4-2번 프라이머에서 반응하였고, 5번 품종의 경우에는 1-2, 1-4, 3-2, 4-2번 프라이머에서 반응이 나타났다. 이와 같이 143개 품종에 대하여 반응을 검토하고 표시하였으며, 이 결과 개발된 4개의 키트에 대한 각각의 Primer에 대한 반응은 품종마다 서로 다른 상이한 반응을 보여 본 연구에서 개발한 Primer가 국내산 벼의 품종을 판정하기에 무리가 없다고 판단하였다.

Table 7. Reaction of 80 varieties for STS primer

Variety No.	Kit I				Kit II			Kit III				Kit IV		
	I-1	I-2	I-3	I-4	II-1	II-2	II-3	III-1	III-2	III-3	III-4	IV-1	IV-2	IV-3
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	+		+	+		+			+	+			+	
38	+			+			+			+	+		+	+
39		+		+				+		+	+		+	+
40		+		+	+	+		+		+	+		+	

Variety No.	Kit I				Kit II			Kit III				Kit IV		
	I-1	I-2	I-3	I-4	II-1	II-2	II-3	III-1	III-2	III-3	III-4	IV-1	IV-2	IV-3
41	+			+	+		+		+	+	+		+	
42	+		+	+		+	+	+	+	+		+	+	+
43		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
44	+		+	+			+	+				+		
45	+		+	+	+		+		+				+	
46	+		+	+	+		+		+	+	+		+	
47			+	+	+			+	+			+	+	
48		+	+	+				+		+	+	+		
49	+	+	+	+	+		+			+	+			
50	+	+		+	+		+		+	+			+	+
51		+		+		+	+		+	+			+	+
52		+			+		+	+	+	+		+	+	
53					+				+	+			+	
54					+			+	+		+	+	+	
55		+	+			+	+			+	+			+
56		+								+				
57		+	+		+		+		+		+		+	
58		+	+			+	+		+	+	+		+	+
59		+	+			+			+	+	+			+
60		+	+				+			+	+		+	
61		+			+		+			+	+		+	
62	+	+		+	+	+	+		+	+		+	+	+
63		+	+		+			+	+	+	+	+		+
64	+	+		+			+			+			+	+
65		+		+			+		+		+		+	
66		+			+		+	+	+		+		+	
67		+			+	+	+			+	+			+
68		+		+		+	+	+	+	+				+
69	+	+		+	+		+	+	+					
70		+		+	+		+	+					+	
71		+		+		+	+				+	+	+	
72		+	+			+	+	+		+	+		+	+
73		+	+	+	+		+	+			+			
74	+	+					+		+	+	+			+
75		+			+	+		+	+			+	+	
76	+		+			+		+						
77	+		+	+				+	+		+		+	
78	+			+	+			+	+		+	+	+	
79		+		+				+	+		+	+		
80		+		+				+	+				+	

Table 8. Reaction of 63 varieties for STS primer.

Variety No.	Kit I				Kit II				Kit III				Kit IV		
	I-1	I-2	I-3	I-4	II-1	II-2	II-3	III-1	III-2	III-3	III-4	IV-1	IV-2	IV-3	
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		+	+			+	+	+	+			+	+		

Variety No.	Kit I				Kit II			Kit III				Kit IV		
	I -1	I -2	I -3	I -4	II-1	II-2	II-3	III-1	III-2	III-3	III-4	IV-1	IV-2	IV-3
31	+			+	+		+		+		+	+	+	
32	+		+			+	+		+	+		+	+	+
33		+		+	+	+		+		+	+	+	+	
34	+	+	+	+		+	+	+				+		
35	+		+		+	+			+				+	
36	+		+	+	+	+	+		+	+	+		+	
37			+		+			+	+			+	+	
38		+	+	+				+	+	+		+	+	
39	+	+		+	+		+			+	+		+	
40		+		+	+		+			+	+			
41	+	+		+	+		+	+	+	+			+	+
42		+	+	+		+	+		+	+			+	+
43	+	+			+	+	+	+	+	+		+	+	
44	+		+		+	+			+	+			+	
45	+		+		+			+	+		+	+	+	
46	+	+			+	+				+	+			+
47	+	+								+				
48	+	+	+		+		+		+		+		+	
49	+	+	+		+	+			+	+	+		+	+
50		+	+		+	+			+	+	+			+
51			+				+			+	+		+	
52		+		+	+		+	+		+	+		+	
53	+			+	+	+	+		+	+		+	+	+
54	+	+	+		+		+	+	+		+	+		+
55	+			+			+			+			+	+
56	+	+		+			+		+		+		+	
57		+		+	+		+	+	+		+		+	
58		+		+	+	+	+		+	+	+			+
59		+		+		+	+	+		+		+		+
60	+	+		+	+		+	+						
61	+	+		+	+		+	+					+	
62	+	+		+		+	+		+		+	+	+	
63	+	+	+			+	+	+	+	+	+		+	+

(2). 새추청벼와 추청벼의 구분

새추청벼는 도열병 다계 품종으로써 추청벼와 유전적인 구분이 어려운 품종 중의 하나이다. 새로 개발한 STS 프라이머를 통하여, 새추청벼와 추청벼를 구분한 것을 그림 26에 나타내었다.

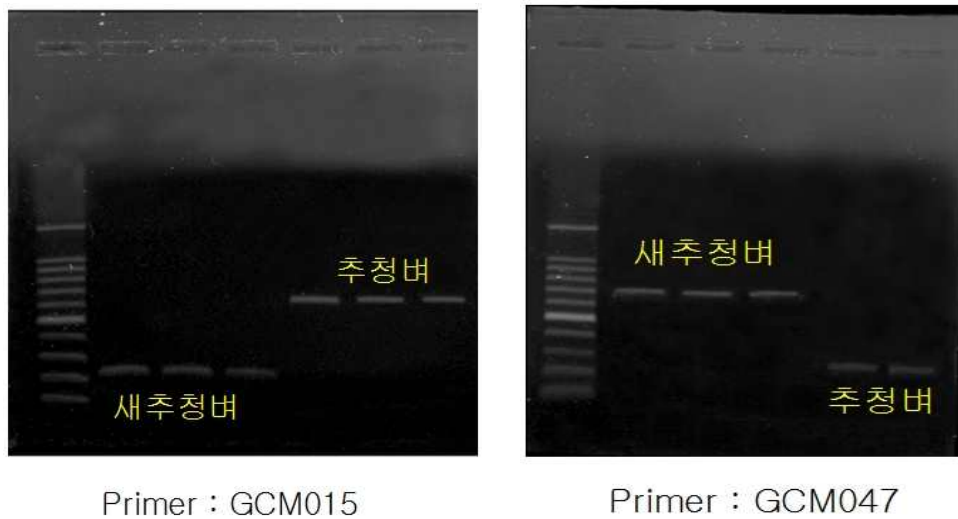


Fig. 29 DNA band of Saechucheongbyeo and huheongbyeo as affected by different Primers. Left : GCM015, Right : GCM047, Size marker : 100bp.

그림 29는 좌측이 Primer GCM015로 전기영동을 하였을 때 나타나는 추청벼와 새추청벼의 밴드모습이며, 새추청벼가 200bp부근에서 밴드를 보였고, 추청벼는 700bp부근에서 밴드를 형성하여 뚜렷한 차이점을 나타내었다. 우측의 Primer GCM047은 전기영동을 했을 경우, 새추청벼가 700bp, 추청벼가 200bp로 GCM015와는 정반대 되는 결과를 나타내었다. 따라서 본 연구에서 구분이 힘들었던 새추청벼와 추청벼의 구분은 프라이머 GCM015와 GCM047의 사용으로 품종 구분이 가능해 졌다.

4. 결론 및 요약

본 연구는 RAPD 마커의 염기배열 결정을 실시해, 배열정보를 기본으로 STS(sequence tagged-site) 프라이머의 설계와 PCR 조건의 검토를 실시하였다. 그 결과를 토대로 키트제작을 통하여 국내외 육성 143개의 품종에 대한 STS마커의 적용 가능성을 검토한 결과 최소 4개 프라이머 키트만으로도 국내 육성 품종을 구분

할 수 있게 되었다. 향후 국내 품종 이외의 수입품종에 관한 4개의 프라이머 키트에 대한 전기영동을 통하여 유전자 정보를 얻어, 국내 품종과 구분을 위한 데이터베이스를 구축할 수 있을 것이다. 또한 멀티플렉스 PCR을 통하여 PCR 시간을 단축하고, 모세관 전기영동을 통하여 유전자 분석의 정확성을 제고할 수 있었다. 벼 품종 판별용 DNA 판독 시스템에 맞추어 STS 마커를 통한 장래 품종의 판별이 보다 간편하고 정확하게 이루어 질 수 있을 것으로 기대된다. 개발된 STS 마커는 본 연구를 통해 개발된 STS 판정 시스템상의 혼잡미의 판정을 위해서도 사용될 것이며, 이는 보다 빠른 혼잡미의 품종별 비율을 판정하는데, 시간 단축을 가져옴으로써 많은 도움이 될 것으로 생각된다.

본 연구에서 첫 번째로 개발된 STS 프라이머 키트의 품종별 반응과 DB 구축을 위한 확인을 위해서 143개 품종에 대한 실험을 통해 구분이 가능한 것을 확인하였으며, 특히 관행의 방법에서 구분이 어려웠던 추청과 새추청 또한 구분이 가능한 것으로 나타났다.

본 실험은 개발된 키트의 검증을 위해서 관행의 전처리 방법을 사용하였으나, 개발된 판정 시스템에서는 모든 전처리 과정(분쇄, 교반, 추출)이 기계화 되어 있어, 작업자의 실험 오차 없이 DNA의 추출이 가능하다.

본 연구의 STS 프라이머의 개발에 대한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. RAPD(Random Amplified Polymorphic DNAs)법을 이용하여 DNA 단편 염기서열을 결정된 다음 15개의 STS(sequence tagged-site) 프라이머를 개발하였다.
2. 설계한 STS 프라이머가 서로 간섭하지 않도록 염기서열과 프라이머를 조합하고, PCR 조건 등을 검토하여 4개의 키트로 집약하였다.
3. 개발된 STS 프라이머를 이용하여 각 품종에 대한 구분을 확인하였으며, 이를 검증하기 위하여 개발되어 사용하고 있는 SSR 마커를 이용한 검증한 결과 이변이 없음을 확인하였다.
4. 개발된 STS 프라이머를 이용하여 143개 품종에 대한 반응표를 제작하였으며, 이를 데이터베이스화 하여 품종의 구분이 가능하도록 하였다.

제 2 절. DNA 판정 시스템 및 DNA 판정 장치의 개발

1. 서 론

본 연구에서는 앞선 연구로 국내산 벼의 품종을 판정할 수 있는 STS 유전자 마크를 찾고, 이들을 조합하여 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트를 최종적으로 개발 완료하고 검증까지 마쳤다.

본 연구에서는 이를 토대로 STS 유전자 마커를 이용한 효율적인 벼 품종 판정 시스템의 개발에 대하여 연구하였으며, 기존의 유전자 검사 방법인 SSR, SNP 방식에서 1립의 DNA 판정에 대한 결과만을 가지므로, 샘플링 오차의 발생이 높고, 또한 유전자 검사를 위한 숙련된 전문가가 검증을 실시하고, 판정을 진행해야 함으로써 기존 RPC나 유통기관 등에서 실용화가 어려운 부문을 해소하기 위하여 혼합되어진 약 50g(2000립 정도)의 벼를 한꺼번에 분쇄하여 검사를 할 수 있으며, 비 숙련자라도 쉽게 벼 품종 판정을 할 수 있는 시스템을 개발하였다.

2. 재료 및 방법

가. 벼 품종 판정 시스템의 개발

관행의 유전자분석 방법은 1립의 시료를 하나씩 ①분쇄하여 ②DNA 추출 buffer를 이용하여 단백질과 RNA 등을 제거하고 순수한 DNA를 추출한(Extraction buffer를 이용 DNA 추출 → 단백질 제거 → 에탄올을 이용하여 salt 제거 → DNA 추출 상태 확인 → DNA 농도조절) 다음 ③시약과 혼합 후 PCR을 이용하여 DNA를 증폭한 후에 ④전기 영동기에서 DNA를 분리하고 ⑤DNA 염색 후 확인한다. 이후에 ⑥마커별 실험결과를 종합하여 혼입율을 계산하는 일련의 과정을 거쳐야 한다. 따라서 이러한 관행의 유전자 분석 방법은 전문적인 지식과 숙련된 기술을 가진 전문가에 의해서 분석이 가능하며, 이것 또한 분석가의 실수에 의한 인적 오류가 발생할 수 있다. 아울러 다양한 고가의 유전자 분석 장비를 사용해야하므로 RPC 등의 현장에서의 실제적인 적용에 어려움이 있어왔다.

본 연구에서는 일련의 작업 공정을 대부분 자동화하여 인적 오류를 배제하고, 여러 현장에서 누구라도 간단하고 정확하며 신속하게 품종을 판정하는 것을 궁극적인 목표로 하였다.

벼 품종 판정을 위한 공정은 ①분쇄, 혼합하는 전처리 공정과 ②DNA를 추출하는

공정 및 DNA 농도를 조절하는 공정, ③추출된 DNA를 증폭하는 공정, ④DNA를 확인하여 품종을 판별하는 공정으로 나누어진다. 그림 30은 벼 품종 판정 시스템의 공정을 간단하게 나타낸 것이다.

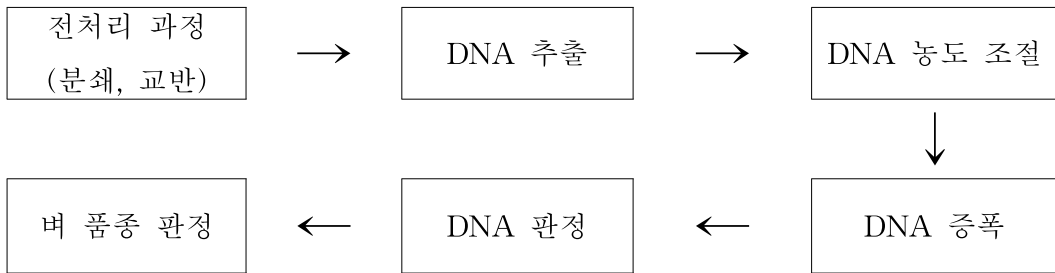


Fig. 30 DNA analysis system

기존의 DNA 판정 시스템에서는 분쇄, DNA 추출 등의 전처리 공정은 주로 수작업을 통하여 진행한 다음 DNA 농도조절 및 증폭은 범용 기기 및 장치들을 사용하였다. 본 연구에서는 STS 유전자 마커를 이용하여 품종별 고유밴드를 확보하고 이를 데이터베이스화하고, 판정 알고리즘에 의하여 벼 품종을 판별할 수 있는 전용 소프트웨어를 탑재한 벼 품종 판별용 모세관 전기영동 방식의 DNA 판정기를 사용하여 최종적으로 판정이 이루어지도록 하였으며, 각 공정은 모두 자동화하여 인력에 의한 오차 등을 최소화하도록 하였다. 이를 위하여 본 연구에서는 그림 31과 같은 DNA 판정 시스템을 설계하였다. 기존의 분쇄, 추출, 농도조정 등의 전처리에서 증폭까지 단계의 기기는 현재 진행하고 있는 STS 유전자 분석방식에 적합한 시판 중인 기기들을 검토 적용하고, 최종 단계에서는 개발된 STS 유전자 마커를 이용한 각 품종별 데이터베이스가 되어 있어 비교 분석하여 품종을 단시간에 알 수 있는 DNA 판정 장치를 구성하여 전문적인 기술을 가진 전문가에 의해서 앞서 관행의 과정을 기술한 것과 같이 분쇄에서부터 추출, 증폭, 전기영동 및 최종확인 마이크로 피펫 등을 이용하여 하나하나 수작업으로 진행되는 것을 자동화를 통하여 비전문가라도 쉽게 사용가능한 효율적인 DNA 판정 시스템을 구성하였다.

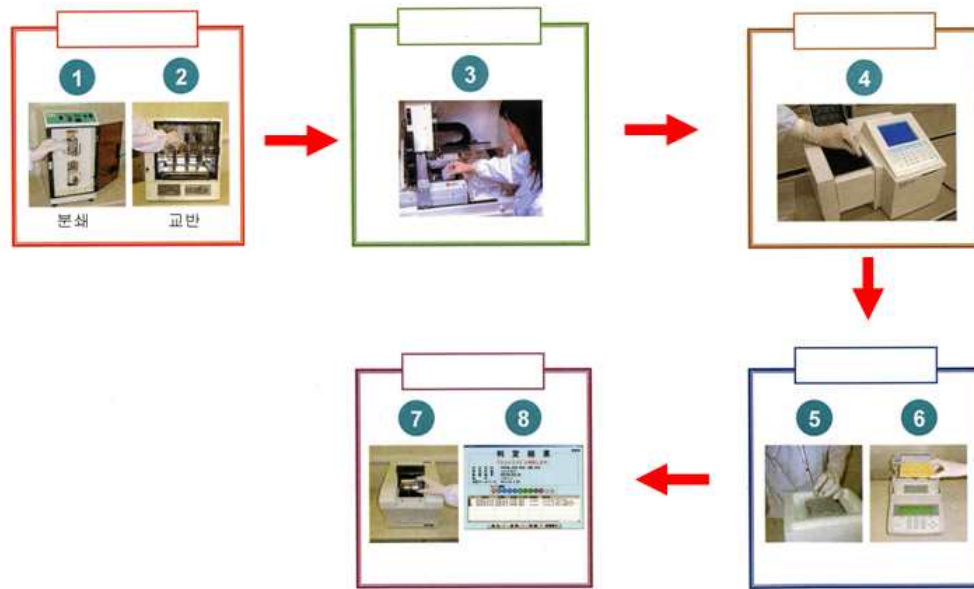


Fig. 31 Develop of DNA analysis system

(1). 분쇄기

현재 사용 중인 SNP 방식과 SSR 방식에서 사용하는 방식은 쌀 1립씩을 분쇄하여 DNA를 추출하는 방식으로 일반적으로 무작위로 채취한 약 100립의 쌀을 하나씩 분석하여 100립 중 혼입립의 갯수를 파악하여 혼입율을 나타낸다. 이는 1립의 쌀을 수작업으로 분쇄하고 튜브에 담는 작업으로 샘플 당 100립을 분석한다면 위와 같은 작업을 수작업으로 작업하기에 상당히 긴 시간과 분쇄입자의 일관성이 결여된다. 이와 같은 문제점으로 인하여 대부분의 분석은 한 샘플 당 24립을 분석하여 혼입율을 계산하고 있다.

기존의 분쇄 방법은 유산지에 쌀알을 놓고, 유산지를 4번 접어 작은 망치 등을 이용하여 두드려 분쇄하는 방법을 주로 사용하거나 튜브에 쌀알을 넣은 다음 작은 봉을 이용하여 두드려 분쇄하는 방법 등 수작업을 통하여 주로 분쇄 하였다.

본 연구에서는 샘플과 구슬을 전용 Tube에 넣고 Cap을 씌운 다음에 분쇄기에 넣으면 진동에 의해서 구슬과 쌀알이 부딪치며 짧은 시간동안에 자동으로 분쇄하는 방식의 분쇄기를 사용하였다.

(2). DNA 자동 추출기

본 연구에서 DNA 추출은 sodium acetate 법과 CTAB 법을 병행 적용하였으며, 이를 수행할 수 있는 자동 추출기가 필요하다. DNA 자동 추출장치는 원심분리기

의 기술과 피펫, 로봇 기술성을 접합하여 고수확량, 고순도, 낮은 러닝 코스트 등의 특징을 가져야 하며, 컴퓨터 제어로 알기 쉽게 조작이 간단하여 비전문가라도 쉽게 자동운전, 재시동 작동이 가능하여야 한다. 아래 그림 32, 33, 34는 본 연구의 DNA 판정 시스템에 도입한 DNA 자동 추출기의 간략한 내부 구조와 처리 공정에 대하여 나타내었다.

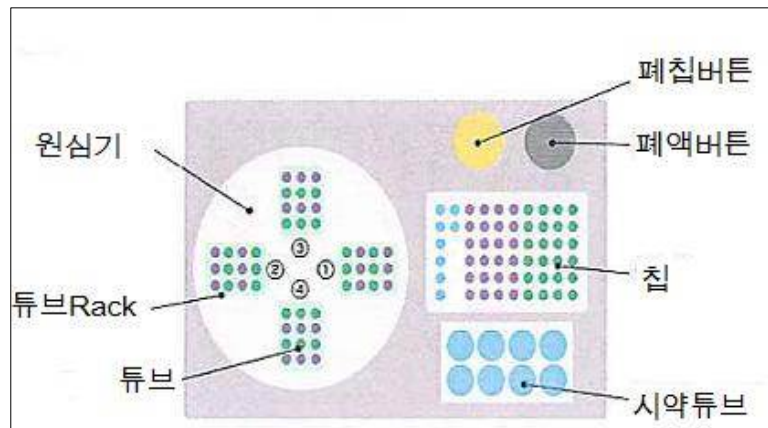


Fig. 32 DNA extraction Layout

그림 32에서는 DNA 자동 추출기의 내부 모습이며, 왼쪽에 둥글게 표시된 부분이 원심분리기이며, 원심분리기에는 튜브를 고정할 수 있는 튜브 랙이 설치되어 있으며, 오른쪽에는 추출에 필요한 각종 시약을 담아두는 시약튜브와 칩을 꽂을 수 있는 부분 폐액 등을 수거할 수 있는 3개의 부분으로 이루어져 있으며, 이들 위쪽에서 각 시약 및 튜브를 자동으로 움직이며, 작업하는 마이크로 피펫이 설치되어 있다. 추출에 필요한 모든 공정을 컴퓨터로 자동 제어되면서 최종 추출까지 인위적인 조작 없이 자동으로 진행되도록 되어 있다.

(가). Plasmid 처리 공정 Flow Chart

그림 33과 34는 Plasmid 처리 공정의 flow chart를 나타낸 것으로 시료용 마이크로 튜브와 보존용 마이크로 튜브에서의 과정을 보여준다. DNA 자동추출기는 원심분리기가 내장되어 있어 필요시에 언제든지 자동으로 원심분리 작업을 할 수 있으며, 추출에 필요한 각종 시약 등을 마이크로 피펫이 지정된 장소로 자동으로 움직이며, 지정된 튜브에서 작업할 수 있도록 구성되어 있다.

① 시료용 MicroTube

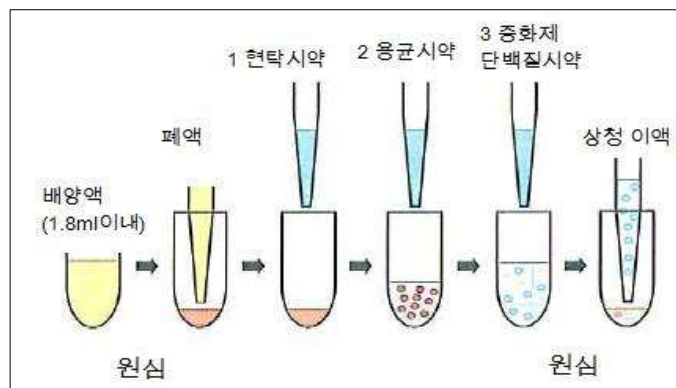


Fig. 33 Flow Chart

② 보존용 MicroTube

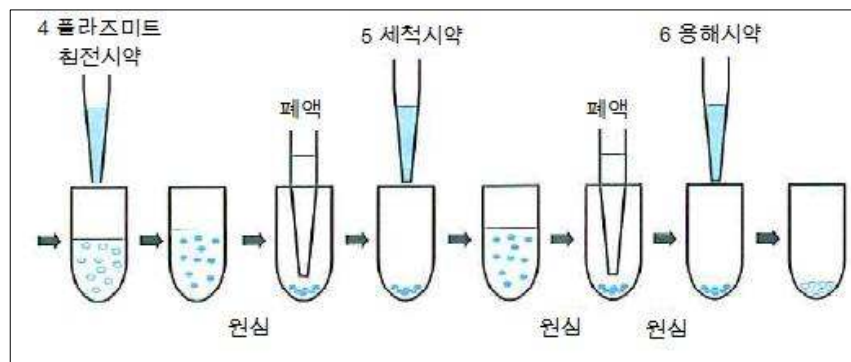


Fig. 34 Flow Chart

그림 33과 34는 시료용 마이크로 튜브와 보존용 마이크로 튜브에서의 처리공정을 보여주는 것으로 각 단계별로 필요한 시약을 자동으로 제어되는 피펫에 의하여 시약용 튜브에서 자동으로 투입되고, 필요시에는 폐액을 자동으로 제거하고, 각 단계 중에서 원심 분리가 필요할 때에는 자동으로 원심 분리과정을 진행하여 최종적으로 DNA를 추출하는 공정을 보여준다.

(3). DNA 농도 조정기 및 증폭기

본 연구의 DNA 농도 조정과 PCR의 조건은 앞선 STS 프라이머 세트의 개발 편에 나타내었으며, 본 연구에서는 개발을 위해 DNA의 염기서열을 알 수 있는 고가의 장비를 사용했으나, 실용화를 위하여 PCR 조건을 만족시키기 위하여 온도와 시간을 제어할 수 있는 저렴한 증폭기를 선정하였다. 또한 농도 조정기는 반복적인

DNA 추출이 이루어지면 거의 일정한 농도의 DNA를 안정적으로 얻을 수 있기 때문에 거의 사용하지 않지만, 본 연구에서는 실험의 조건을 테스트하기 위하여 항상 공정에 넣어서 실험을 진행하였다.

나. 모세관 전기 영동방식의 DNA 판정 장치 개발

전체 시스템 중에서 전 처리한 DNA 샘플을 최종적으로 분석하여 판정하는 장치로서 숙련된 전문가가 있다면 수작업으로 젤을 만들고 추출한 유전자를 넣어 전기 영동장치를 사용하여 전기 영동한 다음 영상을 카메라로 찍어 그 결과를 비교 분석하여 판정을 하거나 그렇지 않다면, 리얼타임 분석기 등의 고가의 범용 유전자 분석기를 사용하여 분석결과를 검토하여 품종의 판정을 하고 있으나, 본 연구에서는 개발된 STS 유전자 마커를 이용한 각 쌀 품종의 고유한 값을 데이터베이스화하고 이를 품종 판정 전용 소프트웨어를 이용하여 자동으로 품종을 판정해 주는 모세관 전기영동 방식의 DNA 판정기를 개발하였다.

(1). DNA 판정기의 원리

본 연구에서는 DNA 판정을 위하여 일반적으로 사용하는 전기 영동기는 전기를 흘리면 DNA가 시편의 사이즈에 따라 Gel을 이동하는 양이 달라지는 것을 이용하여 젤 상에 이동된 DNA를 촬영을 통해 DNA 사이즈를 분석하는 원리를 사용하나, 좀 더 정확하고 편리하며 빠르게 정보를 확인할 수 있는 DNA 판정기를 개발하기 위하여 본 연구에서는 모세관 형태의 DNA 판정용 칩을 이용하여 이동된 DNA를 확인할 수 있는 DNA 판정 장치를 개발하였다.

판정용 칩에 영동 Gel 및 시액, 추출한 DNA를 세팅하고, 결과를 센서를 통해 읽은 다음에 데이터를 D/B와 비교 분석하여 품종을 판정할 수 있도록 하였다. DNA 판정기의 식별 원리는 그림 35와 같다.

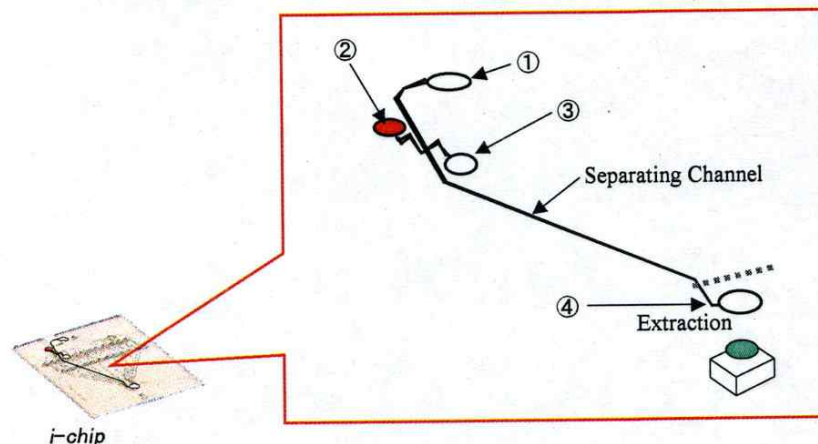


Fig. 35 Principle of DNA discrimination

그림 35의 왼쪽 편이 판정용 칩이며, 칩의 12개의 라인 중에 하나의 라인을 확대한 모습이 오른쪽의 모습이다. 베타 품종 판별용 모세관 전기영동 방식의 DNA 판정기는 칩의 ④에 영동 Gel을 충전한 다음 ②에서 증폭한 DNA 용액과 시약을 적하하고, ② -③ 사이에 전압을 가하여 검사물을 도입하고, ① -④ 사이에 전압을 가하여 분리시킨 후 ④ 방향에서 유도 된 DNA패턴을 판정기에서 반도체 레이저 센서로 인식한 후에 디지털 데이터를 연결된 PC로 송출하고, 품종에 대한 D/B와 비교하여 품종판정 소프트웨어로 해석하여 결과치를 출력하는 판정 메카니즘을 가진다. 본 연구에서는 이를 위하여 DNA 판정을 위한 칩과 이를 고정할 수 있는 지그와 칩에 Gel 및 시약 및 DNA를 세팅하는 방법을 설계하였다.

(2). DNA 판정용 Chip 및 DNA 세팅 방법

① DNA 판정 Chip의 개발

본 연구에서 사용된 판정용 칩은 아크릴수지(PMMA(Poly Methyl Methacrylate))를 이용하여 제작되었으며, 샘플의 DNA를 한꺼번에 확인이 가능하도록 12열로 구성되어 있다. 크기는 91.5(L)mm×66(W)×1.6(H)mm이며, 홀의 크기는 100(Φ)μm×30(D)μm으로 하였다.

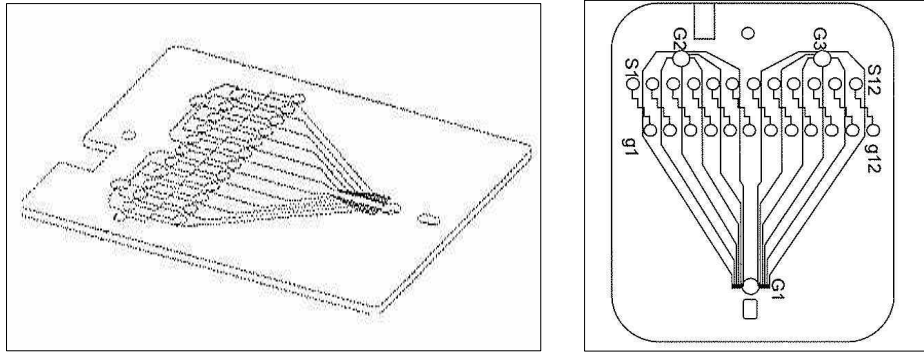


Fig. 36 DNA chip

DNA 판정을 위한 Chip은 그림 36에 나타난 것과 같이 지그 및 판정기에 고정할 수 있는 구멍과 Gel을 충전하는 구멍, 조사할 DNA를 충전하는 구멍으로 나누어진다.

그림 37은 실제로 제작된 DNA 칩의 모습이며, 한꺼번에 12개의 샘플을 검사할 수 있도록 하였다. 판정용 칩의 구성은 크게 판정용 칩을 지그에 고정하는 구멍과 젤을 넣을 수 있는 홈 G1과 젤과 Dye의 혼합액을 넣는 G2, G3 홈과 g1-g12의 홈이 있으며, 추출된 DNA를 넣는 S1-S12까지의 홈이 있다.

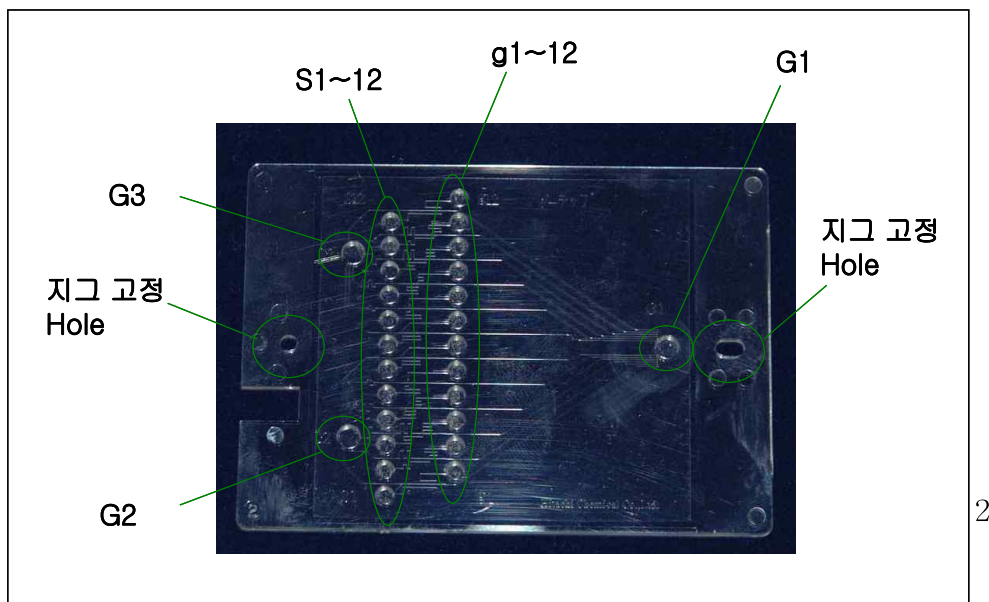


Fig. 37 DNA chip

② DNA 세팅 방법 설계

본 연구의 DNA 판정용 Chip에는 Gel, 시약, 샘플의 DNA를 동시에 충전하여 최

종적으로 DNA 판정기에서 전기를 걸어 DNA를 분리하고, 이를 센서를 통하여 읽은 다음 Data를 전송하므로, Chip에 정확한 재료의 세팅이 아주 중요하다. 이를 위하여 본 연구에서는 다음과 같은 순서로 재료를 세팅하였다.

(가) 재료의 준비

DNA Chip에 사용되는 Gel과 Dye를 혼합하여야 하므로 먼저 ①Gel 300 μ l, Dye 3 μ l, 1.5ml Tube 및 마이크로 피펫(20 μ l, 200 μ l 각 1개 준비)를 준비하고, ②Gel 150 μ l 흡입 후, Tube에 주입한 다음 ③Dye 3 μ l 흡입 후, Tube에 주입한다. 다시 ④Gel 150 μ l 흡입 후, Tube에 주입하고 ⑤혼합이 잘 되도록 Tube를 10여회 흔들어 준다. 이때 기포가 발생하면 Gel 충전시 회로에 균일하게 확산되지 않으므로 주의를 하여야 한다.

(나) Gel 주입 단계

Chip의 G1 Hole에 Gel과 Dye의 혼합액을 20 μ l 주입한다.

(다) Gel 가압 단계

Gel이 각각의 선로에 잘 채워질 수 있도록 가압기를 이용하여 약 20여초간 천천히 가압하여 기포의 발생이 없도록 한다.

(라) Gel 충전 단계

G1에 Gel과 Dye의 혼합액을 5~10 μ l 주입하고, G2와 G3에 혼합액을 20 μ l 주입, 그리고 g1~g12에 혼합액을 10 μ l 주입한다.

(마) Internal standard 주입 단계

100~5,000bp의 Internal standard를 S1~S12에 9 μ l씩 주입한다.

(바) 전처리된 DNA 주입 단계

전처리된 DNA 샘플을 S1~S12에 1 μ l 주입한다.

위와 같은 순서로 DNA Chip에 Gel과 시약, 판정해야 할 샘플의 DNA 충전이 끝나면 모세관 전기영동 방식의 DNA 판정기에 Chip을 고정하고 DNA를 분리하여 샘플의 품종 판정을 최종적으로 하게 된다.

(3). Gel 충전기

본 연구에 사용된 chip의 회로상에 Gel을 충진을 쉽게 하기 위하여 아래의 충전기를 사용하였다. 그림 38은 충전기의 모습과 Syringe의 모습이다. 원리는 chip의 G1 부에 Gel을 넣고, 아래쪽의 지그에 판정용 칩을 고정한 다음 충전기의 레버를 내리면 Syringe내의 공기압이 G1부에 전달되고, 그 압력에 의해 Gel은 칩의 회로를 타고 이동하게 된다.

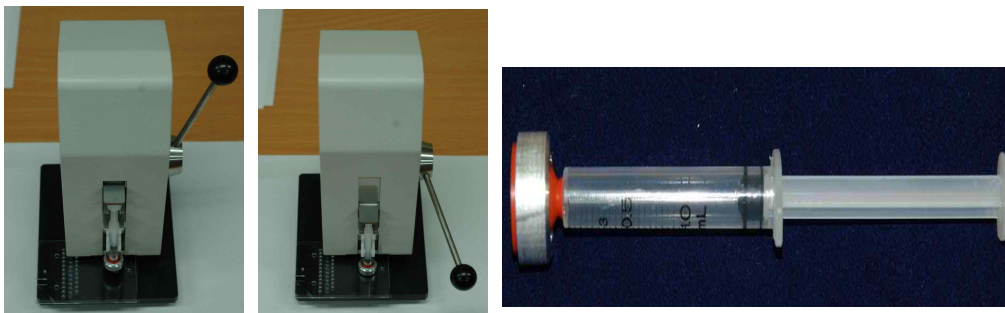


Fig. 38 Device of Gel charge

상세하게 설명하면, DNA Chip에 영동젤을 충전하기 위하여 충전기에 주사기를 끼운 다음 충전기에 설치된 Chip 고정용 지그에 Chip을 설치하여 충전기에 고정시키고 오른쪽의 레버를 아래로 누르면 먼저 주사기의 아래쪽 고무패드가 Chip의 G1 구멍에 밀착이 되고, 주사기의 피스톤이 아래쪽으로 내려오면서 G1에 채워진 영동 Gel이 Chip의 회로를 따라 충전하게 된다.

(4). 모세관 전기 영동 방식 DNA 판정 장치의 구조

모세관 전기 영동 방식의 DNA 판정기는 판정용 Chip의 회로에 충전된 재료에 전기를 흘려 DNA를 분리하고, 분리된 DNA를 센서를 통하여 읽은 다음에 D/B와 비교하기 위하여 Data를 컴퓨터로 송신하고, 이를 D/B와 비교하여 품종을 판정한다. 따라서 본 연구에서 개발된 판정기는 크게 전원공급부, 아날로그/디지털부, 검출부, 중앙처리장치부 등으로 나눌 수 있으며, 먼저 판정용 칩의 도입부와 CPU, RAM, 신호입출력단자, 전원단자, 외부통신을 할 수 있는 RS-232단자로 구성된 DNA 판정기의 중앙처리장치부를 설계 개발하였으며, 이후 칩의 회로에 충전된 젤에서 이동된 DNA를 반도체 센서를 통하여 읽을 수 있는 검출부와 전원공급부, 아

날로그/디지털 변환부 및 본체의 프레임 및 외장부를 설계 제작하였다.

그림 39는 메인보드의 모습이며, 개발된 보드의 1과 2번은 센서부와 신호를 주고 받을 입출력 단자이며, 3과 8번은 각각 아날로그 디지털 변환 보드와 신호를 주고 받을 입출력 단자이다. 4번은 중앙처리장치인 CPU이며, 그 오른쪽으로 5번 RAM이 위치하고 있다. 6번은 전원 단자이며, 7번은 Computer와 통신하기 위한 RS-232 포트이다.

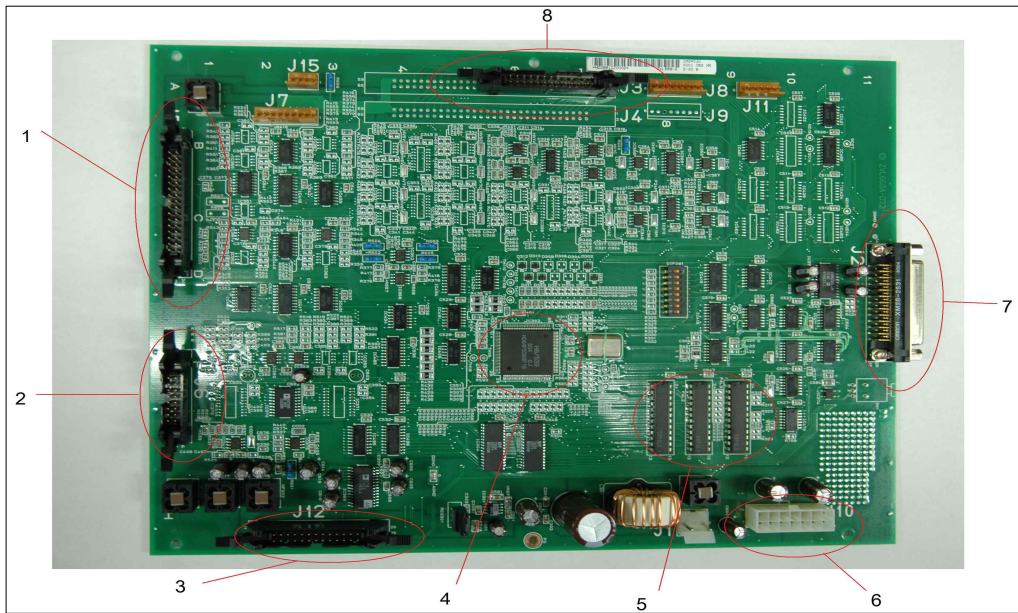


Fig 39. Central processing unit

그림 40은 DNA Chip을 고정한 다음 전기를 흘려 DNA를 Size에 따라 분리하고 반도체 센서를 이용하여 개발된 메인보드에 신호를 보내주는 검출부의 모습이다.

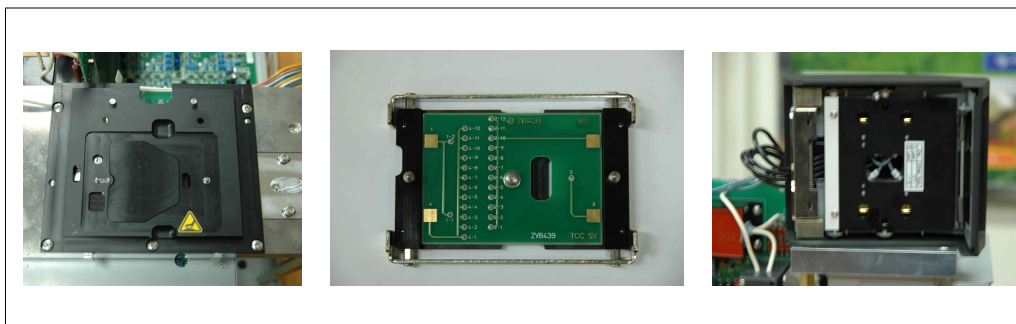


Fig 40. semiconductor sensor unit

그림 40의 첫 번째 사진은 DNA 판정기에서 DNA Chip을 고정하는 동시에 아래쪽에 있는 반도체 센서에서 칩의 회로에 분리되어진 DNA를 확인하도록 되어 있다. 충전된 DNA Chip이 사진의 고정장치에 고정이 되면, 두 번째 사진의 Chip용 덮개의 각 돌기들은 DNA Chip에 충전된 영동 젤 부분에 전기를 흘려 DNA를 분리할 수 있도록 한다. DNA 판정용 Chip은 1회 사용 후 폐기하지만 Chip 용 덮개는 계속해서 사용해야 하므로 세척 및 청소가 쉽게 하기 위하여 세 번째 사진의 본체에 탈부착이 가능하도록 제작하였다. 청소 후 본체에 부착 후에 사용이 가능하며, 전기를 흘려 DNA가 칩의 회로에 따라 분리되면 첫 번째 그림의 아래쪽에 설치된 반도체 센서를 이용하여 분리된 DNA의 신호를 검출하도록 설계 제작하였다.

그림 41은 DNA 판정기에 전원을 공급하기 위한 전원공급장치의 제작 모습이며, 전체 판정기의 제일 하단에 설치하였다. 전원공급장치에서 발생하는 열을 식히기 위하여 후면부에 팬을 설치하였다.

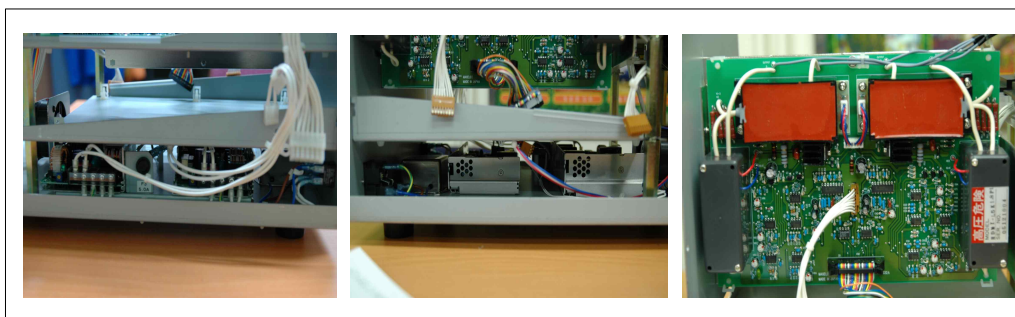


Fig 41. power supply

그림 41의 세 번째 사진은 반도체 센서를 사용하는데 필요한 고압의 전기를 발생시키는 장치로서 전원공급장치의 바로 위쪽 부분에 세워서 설치하여 전체적인 DNA 판정기의 크기를 줄일 수 있도록 하였다.

그림 42의 사진은 A/D 변환기 회로의 모습 및 판정기 외장부의 모습이다.

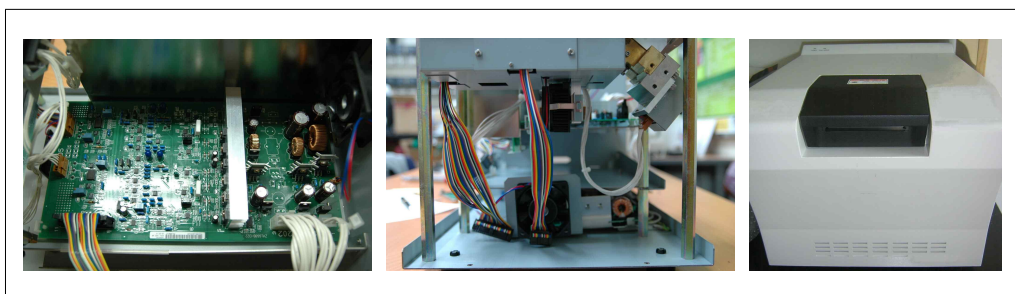


Fig 42. A/D converter and exterior

그림 42의 두 번째 그림과 같이 DNA 판정기의 본체는 가장 아래 부분이 전원공급부, 그 위쪽이 증양처리장치부, 그 위쪽이 A/D 변화부의 3단계로 구성을 하였으며, 전면 상단부에 검출기를 설치하여 전체적으로 직사각형의 모습을 가지도록 설계 제작 하였다. 제작된 모세관 전기 영동방식의 DNA 판정기를 이용하여, 원원종의 벼를 농업기술센터를 통하여 공급받아 성능시험을 실시하였다.

다. 범용 DNA 판정기

사용된 DNA 판정 시스템에서는 대부분의 작업 공정이 기기에 의해서 이루어지므로 인력을 거치지 않고 진행되나, 최종 판정 단계의 벼 품종 전용 판정기의 투입에 앞서 DNA 판정 Chip에 Gel 및 시약, 추출한 DNA 단편을 충전하는 작업이 인력에 의해서 이루어져야 한다는 단점으로 인하여, 전용 판정기의 개발과 동시에 범용으로 사용하고 있는 자동전기영동장치를 이용하여, 본 연구에서 개발한 D/B를 사용할 수 있는 지에 대하여 실험하였으며, 최종적으로 자동 전기 영동장치에서 읽은 DNA 피크 신호를 받아 개발된 STS 유전자 마커의 데이터베이스와 비교 분석하여 자동으로 판정할 수 있도록 하여 범용 DNA 판정기에서도 쌀의 품종을 판정할 수 있도록 하였다.

(1). 시마즈 Multina 자동전기영동장치

본 연구에서 마지막 단계인 DNA 판정을 위한 판정기 개발을 진행 중에 그림 43은 일본에서 생산되는 자동 전기 영동장치의 모습이며, 장치를 통해서 검출되는 DNA 신호를 받아 품종의 데이터가 포함되어 있는 소프트웨어에서 비교하여 품종을 판정할 수 있도록 하였다. 그림 44는 자동 전기 영동장치의 내부 모습이며, DNA 자동 추출기와 같이 자동으로 마이크로 피펫이 움직이며, 지정된 튜브의 DNA 단편과 Gel, 시약 등을 자동으로 취출하여 최종적으로 전기영동을 하고, 최종적으로 DNA 검출 신호를 데이터화 하여 연결된 컴퓨터로 전송하도록 되어 있다. 전송된 신호는 본 연구에서 개발된 STS 마커를 이용한 품종별 데이터베이스와 비교하여 최종적으로 품종을 판단하도록 하였으며, 이를 통하여, 유전자 분석을 통한 벼 품종 판정에 있어서 인력의 힘으로 분석하는 모든 과정을 제거하고, 전 공정을 자동화 할 수 있도록 하였다.



Fig. 43 Auto Electrophoresis



Fig. 44 Inner part of Electrophoresis

또한 본 연구에서는 벼 품종을 판정하기 위하여 개발한 모세관 전기 영동방식의 DNA 판정기와 범용의 자동 전기 영동장치에 개발된 데이터베이스를 연결하고, 동시에 실험을 진행하였으며, 결과는 동일하게 나오는 것을 확인하였다.

제 3 절. DNA 판정 알고리즘 및 판정 소프트웨어 개발

1. DNA 판정 알고리즘 개발

본 연구에서 개발된 DNA 판정기는 반도체 Laser 센서로 Data를 얻고 중앙처리부에서 처리된 신호는 RS-232포트로 전송되어 각 품종별 데이터베이스와 비교되어 분석용 프로그램에서 최종 판정된다. 본 연구에서는 STS 유전자 마커를 이용하여 143종의 각 품종별 반응에 대한 데이터를 확보하였으며, 이를 근거로 하여 그림 45와 같이 판정 알고리즘을 개발하고, 품종별 D/B를 DNA 판정기를 통하여 입수된 정보와 비교 분석하여 최종적으로 품종을 판정하는 전용 소프트웨어를 개발하였다.

그림 45에서 보는 것과 같이 판정 알고리즘은 DNA 판정 chip에서 센서로 전달된 정보가 본체에서 처리된 신호로 RS-232포트를 통해 computer로 전달되는데, 추출된 DNA는 칩의 S1-S12에 각각 주입되므로, 12개의 샘플을 검사할 수 있다. 따라서 12열 chip에서 생성된 정보는 1~12로 구분하였고, 구분된 15개의 Primer를 M=1~15로 하였다. 1번 Sample(N=1)과 1번 Primer(M=1)이 (+) 반응이 나타나면(Yes), 기록 후 다음 Primer(M=M+1)로 이동하는 작업을 반복한다. (-) 반응이 나타나면(No), 바로 다음 Primer로 이동한다. Primer의 최종 (M=15)인 단계 이후, D/B에 저장된 기 확보된 품종의 정보와 비교 판단하여 동일 여부를 판

단한다. 만약 동일한 모델이 없다면 다시 처음의 단계부터 재작업을 수행하며, 동일한 모델을 찾았을 경우, 시각화하여 작업자에게 품종 정보를 전달하고, 다음 Sample(N=N+1)로 동일한 작업을 계속 수행하게 된다. 그리고 마지막으로 12열의 Sample(N=12)을 마지막으로 작업은 종료하게 된다.

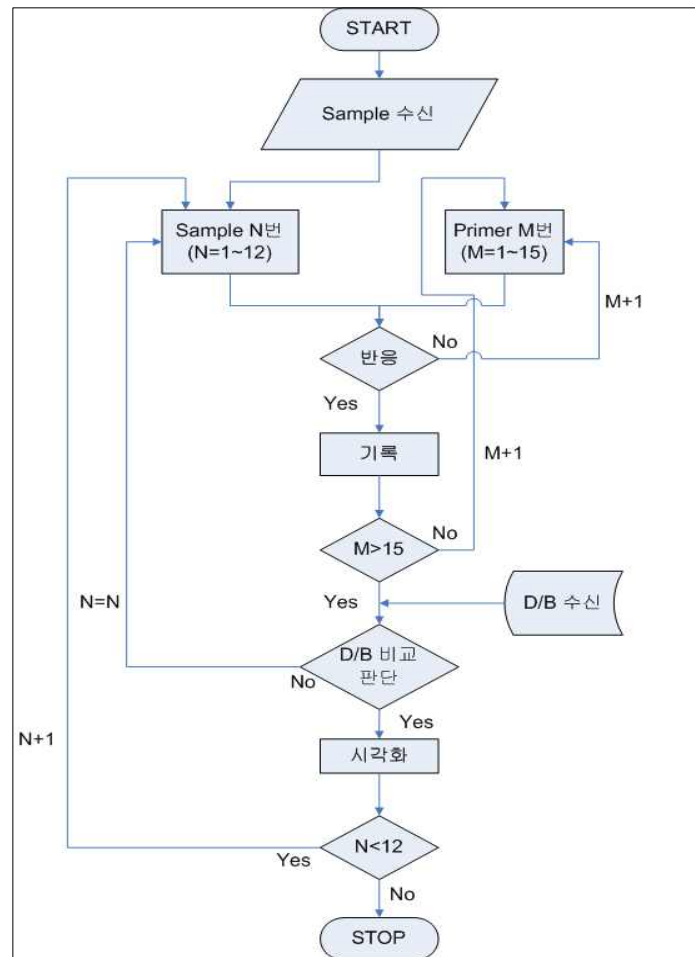


Fig. 45 Decision algorithm blockdiagram

그림 46은 각 품종에 따라서 STS 프라이머의 반응표의 일부분을 나타내었으며, 1번 품종의 경우 2, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 15번 프라이머에서 반응하였음을 나타내고 있다. 그림 47은 품종과 각각의 프라이머에 대한 코드를 부여하고, 품종별 프라이머 반응에 대하여 품종과 프라이머의 코드를 조합하여 데이터베이스화 하는 것을 나타내고 있다.

devserver, TEMP - SQLQuery4.sql devserver, TEMP - SQLQuery3

```

SELECT * FROM TB_VARIETY_PRIMER
WHERE VARIETY_NO = '01'

SELECT * FROM TB_VARIETY_PRIMER
WHERE VARIETY_NO = '02'

```

결과 메시지

	VARIETY_NO	PRIMER_CD	REG_ID	REG_DATE
1	01	02	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
2	01	05	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
3	01	07	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
4	01	08	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
5	01	09	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
6	01	10	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
7	01	11	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
8	01	13	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
9	01	15	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000

	VARIETY_NO	PRIMER_CD	REG_ID	REG_DATE
1	02	01	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
2	02	02	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
3	02	04	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
4	02	05	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
5	02	06	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
6	02	08	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
7	02	10	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
8	02	12	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
9	02	13	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
10	02	14	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000
11	02	15	SYSTEM	2008-03-26 17:50:50.000

Fig. 46 Decision of 20 varieties for STS primer

```

=====
-- . 품종
CREATE TABLE dbo.TB_VARIETY (
    VARIETY_NO          U_VarietyNumber
                        CONSTRAINT PK_VARIETY_NO PRIMARY KEY NONCLUSTERED
(VARIETY_NO),
    VARIETY_NM          U_CodeName50,
    REG_ID              U_UserID,
    REG_DATE            U_LongDate
)
GO
=====

=====
-- . 프라이머
CREATE TABLE dbo.TB_PRIMER (
    PRIMER_CD          U_PrimerCode
                        CONSTRAINT PK_PRIMER_CD PRIMARY KEY NONCLUSTERED
(PRIMER_CD),
    PRIMER_NM          U_CodeName50,
    REG_ID              U_UserID,
    REG_DATE            U_LongDate
)
GO
=====

=====
-- . 품종별 프라이머 관리
CREATE TABLE dbo.TB_VARIETY_PRIMER (
    VARIETY_NO          U_VarietyNumber
                        CONSTRAINT FK_VARIETY_PRIMER_VARIETY_NO FOREIGN KEY
(VARIETY_NO) REFERENCES TB_VARIETY (VARIETY_NO),
    PRIMER_CD          U_PrimerCode
                        CONSTRAINT FK_VARIETY_PRIMER_PRIMER_CD FOREIGN KEY
(PRIMER_CD) REFERENCES TB_PRIMER (PRIMER_CD),
    REG_ID              U_UserID,
    REG_DATE            U_LongDate
)
GO
CREATE UNIQUE INDEX IDX_01 ON TB_VARIETY_PRIMER (VARIETY_NO, PRIMER_CD)
GO
=====

```

Fig. 47 Design of D/B

2. 판정 소프트웨어 개발

위의 판정 알고리즘을 바탕으로 판정 소프트웨어를 개발하였으며, 누구나 쉽게 조작할 수 있도록 하였다. 그림 48의 첫 번째 사진은 개발된 측정 소프트웨어의 메인화면이며, 두 번째 그림은 센서부에서 읽은 정보를 그래프화 하여 DNA의 사이즈를 나타낸 것이다. 개발된 판정 전용 소프트웨어는 최적의 DNA D/B 구축을 위하여 품종과 품종별 고유코드를 테이블로 작성하고, 새로운 품종의 고유밴드 입력 및 수정을 쉽게 할 수 있도록 하였으며, 샘플의 품종 판별은 DNA 판정기에서 데이터를 전송받아, 구축된 D/B와 비교하여 판정을 할 수 있도록 하였다.

전용 S/W는 DNA 판정기와 PC와의 데이터 교환을 효율적으로 할 수 있는 통신 인터페이스방식을 선택하고, 저사양의 PC에서도 무리 없이 작동할 수 있도록 설계하고, 윈도우 환경에서 작동되어 어떤 PC에서도 작동이 간편하고 누구나 쉽게 사용할 수 있도록 하였다. 또한 그래픽 화면에서의 출력뿐만 아니라 결과를 프린터로 바로 출력하여 현장에서 편리하게 사용할 수 있도록 하였으며, 판정 데이터는 저장하여 항상 확인 가능하도록 개발하였다. 그림49는 판정 소프트웨어의 DNA 판정 모습이다.

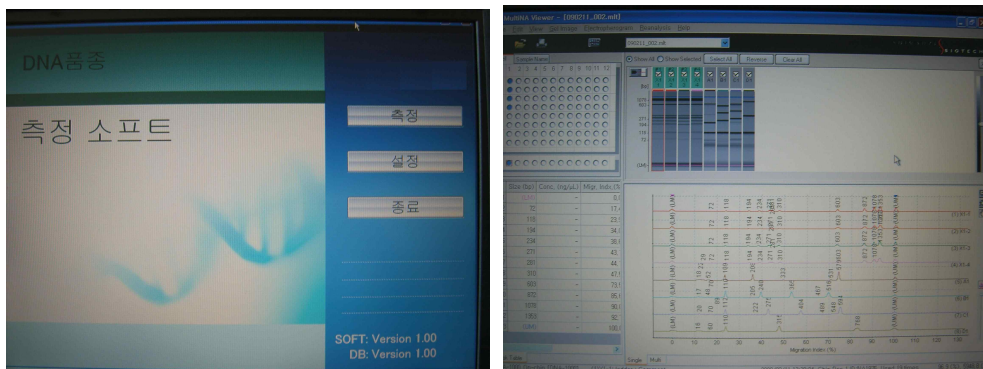


Fig. 48 Decision software

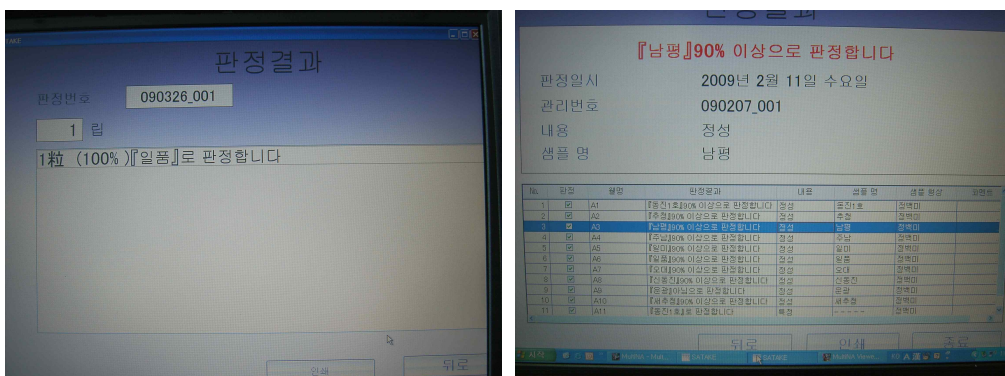


Fig. 49 Result of DNA Decision

DNA 판정기에 검출된 신호는 그림 48에서와 같이 DNA의 사이즈를 전기영동 사진과 그래프를 통하여 쉽게 확인할 수 있도록 나타낼 뿐만 아니라, 그림 49와 같이 D/B와 비교하여 쌀의 품종을 나타낼 수 있도록 하였다.

3. 샘플링 오차에 대한 확률 분석

기존의 DNA 판정 방식의 경우 사일로 등에서 채취한 벼를 1립씩 분쇄하여 각각의 쌀의 DNA를 분석하고 이를 통하여 분석한 벼의 품종을 판정하게 된다. 일반적으로 기존의 방식은 채취한 벼에서 30립을 골라 각각 1립의 품종을 판단한 다음 30립 중 다른 품종의 혼입율을 계산하여 전체 샘플에 대한 품종의 혼입율을 계산하는 방식이다.

이 경우 판정 결과에 대한 참값(true value)의 범위는 Binomial 분포에 의해 설명이 가능하다. 일반적으로 조사 샘플에 대한 어느 특정한 품종에 대한 분포가 \hat{p} (소수)라면, 특정한 품종이 아닌 다른 품종의 분포는 $1-\hat{p}$ 가 된다. 만약 조사된 샘플사이즈가 n 이라면 이에 대한 참값의 범위는 다음의 식으로 표시된다.

$$\hat{p}_- = \frac{z\sqrt{\hat{p}(1-\hat{p})}}{\sqrt{n}} \leq P \leq \hat{p}_+ = \frac{z\sqrt{\hat{p}(1-\hat{p})}}{\sqrt{n}}$$

여기에서

p = 특정 품종의 참값 분포(true value, 소수)

\hat{p} = 샘플에서 조사된 어느 특정 품종의 분포(소수)

$1-\hat{p}$ = 샘플에서 조사된 어느 품종이 아닌 기타 품종의 분포(소수)

z = 표준 정규분포 값, 95% 신뢰수준에서 $z=1.96$ 이고 다음의 식으로 표시된다.

$$z = \frac{x - \mu}{\sigma\sqrt{n}}$$

n = 샘플 사이즈

따라서 기존의 방식에 의한 샘플의 수가 30개인 경우에 조사된 어느 특정 벼의 분포가 85%로 나타났다면 신뢰 수준이 95%에서 이에 대한 오차의 범위는 다음과 같다.

$$0.85 - \frac{1.96 \sqrt{0.85(1-0.85)}}{\sqrt{30}} \leq p \leq 0.85 + \frac{1.96 \sqrt{0.85(1-0.85)}}{\sqrt{30}}$$

$$0.722 \leq p \leq 0.978$$

±

다시 말하면 이 경우 오차의 범위는 $-12.8\% < \epsilon < +12.8\%$ 가 되는데, 극단적인 경우에 참값은 72.2% 일수도 있게 된다. 다시 말하면 이 샘플은 80%이상 이라고 말할 수 없다. 또한 이 방법으로 조사된 어느 특정 샘플의 분포가 70%로 나타났더라도 실제로는 82.8%가 될 수도 있다는 말이 된다.

그러나 본 연구에서 채택한 STS 방법은 본 연구에서는 각각 1립씩의 검사를 할 수 있는 정성 검사와 약 50g(2000립)정도를 한 번의 검사를 통해서 품종을 판정할 수 있는 정량 검사를 진행할 수 있어 샘플 수가 2000개가 되므로 오차의 범위를 많이 줄일 수 있다. 예를 들어 본 연구의 정량 방법에 의하여 약 2000립을 한꺼번에 분쇄하여 DNA를 검사한 결과 한 품종의 량이 85%라고 한다면 참값인 범위는 95% 신뢰 수준에서 다음과 같이 계산된다.

$$0.85 - \frac{1.96 \sqrt{0.85(1-0.85)}}{\sqrt{2000}} \leq p \leq 0.85 + \frac{1.96 \sqrt{0.85(1-0.85)}}{\sqrt{2000}}$$

$$0.834 \leq p \leq 0.866$$

즉, 오차의 범위는 $-1.6\% < \epsilon < +1.6\%$ 로 나타난다. 이 경우 최악의 경우라도 우리나라의 단일 품종의 판정기준이 되는 80%를 만족하려면 81.6% 이상이면 95% 신뢰 수준에 의하여 이 벼는 어느 특정의 품종이 80% 이상이라고 말할 수 있다.

따라서 30립의 샘플을 검사하는 검사법에 비하여 샘플링에서 발생할 수 있는 오차를 줄이고, 한 번에 많은 립의 검사를 할 수 있으므로, 시간 및 비용을 줄일 수 있다. 실제적으로 품종 확인을 위한 DNA 검사를 진행함에도 불구하고, 샘플링 오차에 의하여 양곡표시법 위반으로 불이익을 당하는 사례가 많이 발생하고 있으며, 또한 30립에 대한 검사를 진행해서 혼입율을 계산하는 방식에서는 각 1립씩을 분쇄하여 각각의 DNA 검사를 진행하므로 30번의 검사가 진행되므로 시간 및 비용이 상당히 많이 발생한다. 본 연구에서는 1립씩 검사하는 정성검사와 동시에 50g을 한꺼번에 분쇄하여 품종을 판정할 수 있는 정량 검사를 할 수 있으므로 기존 30립의 검사법에 비하여 샘플링에서 발생할 수 있는 오차를 줄이고, 한 번에 검사를 할 수 있으므로 시간 및 비용을 절약할 수 있다.

제 4 절. 결과 및 고찰

본 연구에서는 비전문가라도 현장에서 쉽게 사용할 수 있는 그림 50과 같은 DNA 판정 시스템을 개발하였다. 개발된 판정 시스템은 기존의 분쇄, 추출, 농도조정 등의 전처리에서 증폭까지 단계의 기기는 현재 진행하고 있는 STS 유전자 분석방식에 적합한 시판 중인 기기들을 검토 적용하였으며, 최종 개발 대상인 모세관 전기 영동 방식의 DNA 판정 장치를 개발하여 전문적인 기술을 가진 전문가에 의해서 수작업으로 진행되는 것을 자동화를 통하여 누구나 쉽게 사용가능하도록 하였다.



Fig. 50 Device of DNA analysis system

본 연구에서는 개발된 판정 시스템의 성능을 시험하기 위하여 농산물품질관리원의 SNP 방식 및 농촌진흥청의 SSR 방식도 동시에 진행하며, STS 방식의 비교 검사를 통하여 본 시스템의 성능을 수정 보완하는 작업을 수행하였다.

본 연구의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. 국내산 벼 품종의 판정을 위하여 분쇄기, DNA 추출기, DNA 농도 조절기, DNA 판정기로 구성되는 DNA 판정 시스템을 개발하였다.

2. DNA 판정용 칩에 젤을 충전하고, 추출된 DNA를 투입하여, 전기를 흘리면 칩의 회로를 따라 DNA가 분리되며, 이를 반도체 센서를 읽어 국내산 벼의 D/B가 구축된 전용 소프트웨어를 통하여 품종을 판정할 수 있는 모세관 전기 영동방식의 DNA 판정 장치를 개발 하였다.

3. DNA 판정용 칩을 사용하기 위하여 칩의 회로에 Gel과 추출된 DNA를 충전할 수 있는 세팅방법을 개발하고, 충진을 위하여 주사기를 이용하여 가압하여 칩의 회로에 Gel등을 쉽게 충전할 수 있는 충전기를 개발하였다.

4. 개발된 STS 마커에 따른 벼 품종의 D/B와 비교하여 품종을 판정할 수 있는 판정 알고리즘을 개발하고, 벼 품종의 D/B를 포함하고 샘플의 신호를 분석하여 최종적으로 품종을 판정할 수 있는 판정 전용 소프트웨어를 개발하였다.

5. 판정 결과에 대한 참값(true value)의 범위를 Binomial 분포에 의해서 샘플링 오차에 대한 확률을 구하였으며, 본 연구에서 개발된 정량분석의 경우 국내 품종 순도율인 80%를 만족하는 것으로 나타났다.

제 5 절. 현장 성능 시험

본 연구에서는 RAPD 마커의 염기 배열 결정을 실시해, 수십조의 프라이머를 개발하였으며, 이를 통하여 STS 프라이머의 설계와 품종에 대한 실험을 실시하였으며, 개발된 염기 배열을 기본으로 STS(sequence tagged-site) 프라이머의 설계하고, 이들 프라이머의 조합으로 4가지 키트를 제조하였으며, PCR 조건의 검토를 실시하고, 그 결과를 토대로 국내외 육성 143개의 품종에 대한 STS마커의 적용 가능성을 검토하였다.

또한 인적 오류를 배제하고 빠른 시간에 판정결과를 알 수 있도록 벼 품종 판정을 위한 데이터베이스를 구축하고, 판정 알고리즘에 의해서 확인된 품종의 신호를 비교 분석하여 확인할 수 있는 소프트웨어를 개발하여 최종적으로 벼 품종 판정을 할 수 있는 시스템을 확립하였다. 본 연구에서는 개발된 시스템을 통하여 현장 적용 시험을 실시하였다.

1. 재료 및 방법

가. 브랜드쌀의 수집

경북지역에서 생산되는 브랜드쌀은 농협RPC가 전체 쌀 브랜드의 47.5%를 생산하고 있고, 생산자단체가 16.2%, 민간RPC가 13.1%를 차지하고 있었다. 생산자별 평균 브랜드 수는 1.7개였으며, 1개의 브랜드를 생산하는 생산자가 64.4%로 가장 많았고, 다음이 2개(16.9%), 3개(10.2%) 순이었다. 브랜드쌀의 주요 품종은 일품(40.0%), 추청(12.8%), 화영(10.4%), 일미(8.8%) 순이었으며, 생산자의 브랜드별 취급 품종 수는 1개가 49.2%로 가장 많고, 다음이 2개(23.0%), 3개(13.1%), 4개(8.2%), 5개(6.6%)순이었다.

고품질 쌀이란 “쌀알이 맑고 균일하며 식품으로서의 안전성과 영양가가 높고 이쁜바 밥맛이 좋은 쌀” 이라고 규정짓고 있다. 한편, 쌀의 품질은 품종 · 산지 · 기상조건 · 재배방법 · 수확방법 · 건조 등을 포함하는 생산 단계에서부터 저장 · 유통 및 취반을 포함하는 최종적인 소비 단계에 이르기까지 각 단계에서 직 · 간접적으로 영양을 받아 결정 (Kido & Yanatori, 1965; Chamura et al., 1979; Tashiro & Ebata, 1979; Tashiro et al., 1980) 되기 때문에 쌀 시장 개방에 대비한 국제 경쟁력을 확보하기 위해서는 품질을 차별화 할 수 있는 쌀 등급 기준이 제시

되어야 하며, 이를 기초로 하는 유통 기반도 구축하여야 할 것이다. 이러한 의미에서 정부 및 각 지자체에서는 브랜드 쌀을 선정함으로써 고품질 쌀의 생산 및 유통을 유도하고 있다.

또한 지정된 브랜드 쌀의 품종 순도율 규정에서도 현행법으로 80%이상을 규정하고 있으며, 이를 위반할 경우 1,000만원 이하의 과태료를 부과하도록 명명되어있다.

브랜드쌀의 수집은 시군 농업 기술센터의 협조를 받아 수집하였고, 일부는 시중에서 직접 구매하였다.

2. 결과 및 고찰

가. 브랜드쌀의 분석

① 고령옥미

고령옥미는 경상북도 고령군에서 삼광벼를 원료로 대단위의 삼광벼 재배 단지를 만든 후 파종에서 수확까지 전 과정에 걸쳐 재배관리를 하고 있다. 고령군의 중점 프로젝트로 브랜드 명 “고령 옥미”로 출시되고 있는 브랜드 쌀이다. 고령 옥미 재배 단지에 참가한 110 농가에 대한 샘플을 11월 16일과 12월 12일 두 번에 나눠서 수집하였다. 한 샘플당 벼 50g씩 분쇄하여 DNA추출한 후, 품종 특이 Alleles에 대한 Genotyping반응을 통하여 삼광벼의 순도율을 검증하였으며, 그 결과는 표 8에 나타내었다.

Table 9. Purity rate of Goryeongokmi designated as a rice brand by Goryeong county.

No.	Farmer	Sampling date	Variety	Purity(%)	Remark
1	Choi Y.G.	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
2	kim S.T	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
3	Lee K.T	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
4	Ryu H.Y	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
5	Lee C.H	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
6	Lee C.G	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
7	Bae D.H	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
8	Park p.k	Nov.16	Samgwoang byeo	Less than 70%	
9	Chong M.D	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
10	Lee Y.C	Nov.16	Samgwoang byeo	Less than 70%	
11	Kim S.B	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
12	Choi K.C	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
13	Jeon C.H	Nov.16	-	0.0	Junambyeo
14	Kang J.S	Nov.16	-	0.0	Junambyeo
15	Park K.K	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
16	Byeon M.K	Nov.16	Samgwoang byeo	Less than 70%	
17	Lee H.C	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
18	Do B.K	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
19	Park L.B	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
20	Kang C.S	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
21	Kim J.Y	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
22	Kim S.J	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
23	Ha H.T	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
24	Cho N.J	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
25	Cho H.C	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
26	Cho J.C	Nov.16	Samgwoang byeo	Less than 10%	
27	Lee K.C	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
28	Kang Y.S	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
29	Kim Y.D	Nov.16	Samgwoang byeo	100	
30	Sin C.K	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
31	Lee S.J	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
32	Lee S.Y	Dec.12	Samgwoang byeo	0.0	Ungwoang byeo
33	Lee K.H	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
34	Lee S.K	Dec.12	Samgwoang byeo	95.0	
35	Kim H.B	Dec.12	Samgwoang byeo	95.0	
36	Hong C.K	Dec.12	Samgwoang byeo	95.0	
37	Hong M.Y	Dec.12	Samgwoang byeo	0.0	Junambyeo
38	Un P.K	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
39	Cho C.J	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
40	Kang B.Y	Dec.12	Samgwoang byeo	100	

No.	Farmer	Sampling date	Variety	Purity(%)	Remark
41	Lee J.Y	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
42	Park J.Y	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
43	Hong T.Y	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
44	Lee K.J	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
45	Park Y.C	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
46	Kim K.S	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
47	Kim J.K	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
48	Mun I.S	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
49	Jeong D.Y	Dec.12	Samgwoang byeo	95.0	
50	Kim J P	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
51	Kim Y.S	Dec.12	Samgwoang byeo	Less than 50%	
52	Gweon B.J	Dec.12	Samgwoang byeo	Less than 10%	
53	Kim Y.H	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
54	Kim D.H	Dec.12	Samgwoang byeo	83.3	
55	Ki S.K	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
56	Yu S.C	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
57	Kim Y.K	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
58	Lee K.D	Dec.12	Samgwoang byeo	95.0	
59	Park J.S	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
60	Kim T.H	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
61	Kim S.D	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
62	Lee S.C	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
63	Han S.C	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
64	Han J.H	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
65	Jeong D.S	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
66	Kim M.H	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
67	Lee D.T	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
68	Gu D.M	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
69	Park J.J	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
70	Jeon H.S	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
71	Lee H.T	Dec.12	Samgwoang byeo	95.0	
72	Yang J.C	Dec.12	Samgwoang byeo	Less than 70%	
73	Lee S.H	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
74	Jo M	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
75	Kim Y.H	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
76	Lee J.H	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
77	Lee H.J	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
78	Sel H.D	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
79	Lee S.M	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
80	Min S.K	Dec.12	Samgwoang byeo	100	

No.	Farmer	Sampling date	Variety	Purity(%)	Remark
81	Jeon H.H	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
82	Jeon M.H	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
83	O B.H	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
84	Park H.K	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
85	Jeon Y.H	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
86	Bae J.T	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
87	Lee K.C	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
88	Sin H.K	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
89	Jeong C.S	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
90	Kim J.M	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
91	Oh J.M	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
92	Oh H.K	Dec.12	Samgwoang byeo	83.3	
93	Im K.S	Dec.12	Samgwoang byeo	Less than 50%	
94	Kim K.H	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
95	Lee Y.J	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
96	Lee J.G	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
97	Gang I.Y	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
98	Gi K.S	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
99	Kim D.S	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
100	Hwang J.C	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
101	Bae Y.K	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
102	Kim N.S	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
103	Yu I.S	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
104	Bae D.S	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
105	Jeon S.K	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
106	Kim I.J	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
107	Bae C.H	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
108	Bae J.S	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
109	Jeong S.Y	Dec.12	Samgwoang byeo	100	
110	Yu S.D	Dec.12	Samgwoang byeo	100	

표 9에서 브랜드 쌀의 순도율 선정 기준 80% 이상에 해당하는 농가는 총 110농가 중 98 농가였다. Kang 등 12 농가는 순도율 80%에 미달하였으며, 이들 중 4 농가에서는 삼광벼가 전혀 발견되지 않았으며, 이들은 운광벼와 주남벼인 것으로 나타났다.

② 경상북도 대표 우수 브랜드 쌀 조사

경상북도에서는 해마다 지역 우수 브랜드를 선정하여 완전립 비율, 단백질 함량, 순도율을 조사한 후 가장 우수한 브랜드에 대하여 시상을 하고 있다. 표 9는 경북의 대표적인 우수 브랜드 쌀에 대한 유전적 순도율을 조사한 결과표이며, 순도율에서 95% 이상인 것은 100점으로 점수를 주었으며, 95% 이하인 것은 그 비율에 따라 차등 점수를 나타내었다. 품종별로는 일품벼가 5개로 가장 많았으며, 새추청벼가 2개, 히포메보레, 추청, 삼광벼가 각각 1개씩이다. 0101번과 0112번을 제외하고 모두 95.8%의 높은 순도율을 나타내었다.

Table 10. Purity rate of excellent rice brands in Gyeongbuk province.

Brand No.	Variety	Purity(%)	Grade
0101	Ilpum	70.8	86
0102	Ilpum	95.8	100
0103	Hitomebore	95.8	100
0104	Ilpum	95.8	100
0106	Saechucheong	95.8	100
0108	Saechucheong	95.8	100
0109	Ilpum	95.8	100
0112	Ilpum	87.5	96
0116	Chucheong	95.8	100
0118	Samgwoang	95.8	100

③ 탐라이스 순도율 조사

산업화 및 사회·경제적 여건 변화에 따른 식생활 다양화 추세 때문에 우리의 주식인 쌀 및 밥의 위상이 저하되고 있으며, 농업인구의 양적·질적인 감소(양, 2000) 및 쌀 재배면적이 급격히 줄어들고 있는 실정이다. 또한 세계무역기구(WTO) 체제의 출범으로(김, 2000) 값싼 외국쌀이 의무적으로 수입되고 있는데다가 설상가상으로 쌀 소비가 감소하는 추세에 있어 쌀 생산 농민들의 소득이 상대적으로 감소되고 있다. 우리 정부에서도 이에 발맞추어 최근 쌀 생산에 대한 정부정책이 지속적인 쌀 수량 증대에서 품질 고급화 쪽으로 바뀌어 가고 있다. 2005년에는 전국 19개소에 탐라이스 단지를 선정하였으며, 2006년에 33개소 2007년에는 48개소로 늘어났다(농촌진흥청, 2007). 경상북도에서는 2005년 의성과 상주지역에 2개소가 선정되었으며, 2006년도에는 경주, 예천, 안동이 추가되어 총 5개소로 늘어났으며, 2009년도에는 11개소로 늘어났다. 탐라이스 재배단지의 면적도 2005년도 210 ha에서 2006년도에는 400 ha로 늘어났으며, 현재도 계속 늘어나고 있는 추세이다.

Table 11. Purity rate of excellent rice brands in Gyeongbuk province.

Region	protein (%)	Head (%)	Broken (%)	Chalky (%)	Damaged (%)	Dead (%)	Cracked (%)	DNA Purity (%)
Andong	6.0	95.3	1.7	2.7	0.3	0.0	29.6	98.3
Kimcheon	5.9	95.0	1.5	2.8	0.7	0.0	30.6	95.8
Kyeongju	5.9	93.6	2.0	3.9	0.6	0.0	29.5	96.2
Yongju	5.9	95.3	1.7	2.5	0.5	0.0	29.9	98.7
Sangju	5.7	96.3	2.7	1.1	0.0	0.0	38.8	98.7
Yecheon	6.0	96.5	2.0	1.4	0.1	0.0	41.6	98.8
Uiseong	5.8	96.3	2.6	1.2	0.0	0.0	39.8	97.5

표 11은 안동 등 7개 지역의 탐라이스를 수거한 후 쌀의 단백질 및 완전립 비율, DNA분석을 통한 순도율을 분석하였다. 단백질 함량은 모두 6.0% 이하로 양호하였으며, 완전립 비율도 전 지역에서 95%이상의 높은 값을 나타내었다. DNA분석을 통한 순도율에서도 모두 95%이상으로 높은 값을 나타내었다.

제 6 절 종합 결론

다양한 품종의 벼가 가지고 있는 고유의 DNA를 분석하여 쌀 품종을 판정할 수 있는 STS 프라이머 세트를 개발하고, 이를 이용하여 쉽고 효율적인 DNA 판정 시스템을 개발하기 위하여 본 연구가 수행되었다.

DNA 판정 시스템으로는 ①분쇄, 교반하는 전처리 공정과 ②DNA를 추출하는 공정 및 DNA 농도를 조절하는 공정, ③추출된 DNA를 증폭하는 공정, ④DNA를 확인하여 품종을 판별하는 공정으로 나누어져 있으며, 본 연구에서는 각 공정에 필요한 최적의 유전자 분석기기들을 구성하였다. 또한 최종적으로는 본 연구에서 개발한 STS 유전자 마커를 이용하여 각 품종의 고유밴드를 확보하고, 이를 데이터베이스화 하여 샘플의 DNA를 비교 분석하여 벼의 품종을 판정 할 수 있는 벼 품종 판별용 DNA 판정기 시스템을 개발하였다.

본 연구에서 수행된 종합 결과는 다음과 같이 요약할 수 있다.

1. 본 연구에서는 벼 품종 판정을 위하여 10bp 정도의 길이를 가지는 매우 짧은 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 하고 이 결과를 전기영동에서 확인하였으며, ①RAPD(Random Amplified Polymorphic DNAs)법을 이용하여 DNA 단편 염기서열을 결정한 다음 여러 개의 STS 프라이머를 설계하고, ②설계한 수십 개의 프라이머가 서로 간섭하지 않도록 프라이머를 조합하기 위해서 PCR 조건 등을 검토하여 최소의 세트로 집약한 멀티플렉스 STS 프라이머 세트를 개발하였다.
2. 이 결과 15개의 STS화 프라이머를 4키트로 집약 가능해져, Annealing온도는 4키트 전부 60℃로 통일하였으며, 프라이머 1,2,3,4(키트1), 프라이머 5,6,7,8(키트2), 프라이머 9,10,11,12(키트 3), 프라이머 13,14,15(키트4)를 4개의 키트로 묶었다.
3. 개발 된 STS 유전자 마커를 이용하여 국내 143개 품종들에 대한 STS Primer 반응을 조사하였으며, 4개의 키트에 대한 각각의 Primer에서 품종마다 서로 다른 상이한 반응을 보여 본 연구에서 개발한 Primer는 품종 판별에 적합하다고 할 수 있었다.
4. 본 연구에서는 STS 유전자 마커를 이용하여 143종의 각 품종별 반응에 대한 데이터를 확보하였으며, 이를 근거로 하여 판정 알고리즘을 개발하고, 품종별 D/B를 DNA 판정기를 통하여 입수된 정보와 비교 분석하여 최종적으로 품종을 판정하는

판정기 및 전용 소프트웨어를 개발하였다.

6. 본 연구에서 개발된 품종 자동 판정기의 판정 소프트웨어를 범용의 자동전기영동장치와 연결하여, 전기영동장치에서 읽은 DNA 피크 신호를 받아 데이터베이스와 비교 분석하여 자동으로 벼 품종을 판정할 수 있도록 함으로써 범용기기와의 호환이 가능하도록 하였다.

7. 기존의 방법에 의한 유전자 판별법에 의한 오차의 범위는 $-12.8\% < \varepsilon < +12.8\%$ 였으며, 본 연구에서 확립된 방법에 의한 오차의 범위는 $-1.6\% < \varepsilon < +1.6\%$ 로 나타났다. 이 경우 최악의 경우라도 우리나라의 단일 품종의 판정기준이 되는 80%를 만족하려면 81.6% 이상이면 95% 신뢰 수준에 의하여 이 벼는 어느 특정의 품종이 80% 이상이라고 말 할 수 있다.

8. 본 연구에서 개발된 시스템을 이용하여 현장 적용 시험을 실시하였으며, 경상북도의 브랜드쌀을 조사한 결과 대부분이 순도 80% 이상인 것으로 나타났으며, 탐라이스의 경우 순도율에서 모두 95% 이상으로 높은 값을 나타내었다.

제 1 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

제1절 목표달성도

목 표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
○벼 품종 판별용 DNA 분석기 설계 및 제작(I)	○효율적인 DNA 판정 시스템 설계 ○판정용 칩 설계 및 제작 ○칩 셋팅부 설계 및 제작	100
○멀티플렉스 PCR 프라이머 세트 개발 및 PCR 프라이머 세트를 이용한 전 품종 고유 밴드의 확보(I)	○DNA 단편 염기서열을 결정해 수십조의 STS 프라이머 세트의 설계 ○품종 판별을 위한 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트의 집약 ○STS 프라이머 세트를 이용하여 전 품종 고유 밴드 이변을 확인	100
○DNA 데이터베이스 구축 및 판정 알고리즘 개발	○20개 품종에 대한 품종별 고유 밴드 확보 ○데이터베이스 구축 및 판정 알고리즘 개발	100
○벼 품종 판별용 DNA 분석기 설계 및 제작(II)	○반도체 레이저를 이용한 검출부 설계 및 제작 ○A/D 변환부 설계 및 제작 ○인터페이스 장치부 설계 및 제작 ○DNA판정기 외장 설계 및 제작 ○통합 시스템 성능시험	100
○PCR 프라이머 세트를 이용한 전 품종 고유밴드의 확보(II)	○80개 품종에 대한 품종별 고유 밴드 확보	100
○DNA 데이터베이스 구축 및 전용 소프트웨어 개발 (I)	○데이터베이스 구축 ○벼 품종 판별용 전용 소프트웨어 설계 및 개발	100
○DNA 판정기의 현장 테스트 및 DNA 판정기의 양산품 설계·제작	○RPC에 설치하여 현장 테스트 ○문제점 분석 및 수정보완 ○제품분석 및 양산설계 및 제작	100
○PCR 프라이머 세트를 이용한 전 품종 고유밴드의 확보(III)	○63개 품종에 대한 품종별 고유 밴드 확보 ○유통 브랜드의 혼합을 조사	100
○DNA 데이터베이스 구축 및 전용 소프트웨어 개발 (II)	○데이터베이스 구축 ○벼 품종 판별용 전용 소프트웨어 설계 및 개발 ○문제점 분석 및 수정보완	100

제2절 관련분야의 기여도

1. 기술적 측면

국내산 벼 품종을 판별할 수 있는 STS(Sequence Tagged Sites) 프라이머 세트를

개발하였으며, 이를 이용하여 신뢰성 있는 결과를 도출할 수 있는 DNA 판정 시스템을 개발하였다. 쌀 품종 판정을 위한 유전자 검사법은 전문가에 의해서 작업이 진행되었으나, 본 연구에서는 판별에 대한 작업공정을 자동화와 단순화시킬 수 있고, 측정시 발생하는 인적오차를 최소화시킬 수 있으며, 검사기관, RPC, 유통기관 등 현장에서 누구라도 신속하고 정확하게 품종을 판정할 수 있게 되었다.

가. 신속·정확한 쌀 DNA 판정을 위한 유전자 분석법의 개발

RAPD(Random Amplified Polymorphic DNAs)법을 이용하여 ①DNA 단편 염기서열을 결정된 다음 여러 조의 STS(sequence tagged-site) 프라이머를 설계하고, ②설계한 수십 조의 프라이머가 서로 간섭하지 않도록 염기서열과 프라이머를 조합하고, PCR 조건 등을 검토하여 최소의 세트로 집약하고, ③집약된 멀티플렉스 PCR 프라이머 세트를 이용하여 각각의 품종에 있어서 이변이 발생하지 않음을 확인하고, ④국내에서 재배되고 있는 모든 벼의 품종을 판별할 수 있는 STS 프라이머 세트를 개발한 다음, ⑤최종적으로 이를 이용하여 벼의 품종을 판별할 수 있는 데이터베이스 구축을 위한 품종 특유의 밴드를 확인하였다. 이는 기존의 SSR 마커나 SNP 마커를 사용한 검사법에 비하여 프라이머의 설계가 용이하고, 프라이머를 혼합이 가능하고(멀티플렉스 용이) 결과 판정이 신속하고, 품종이 많이 혼합되어도 판별이 가능한 장점을 가지고 있다.

나. 신속·정확한 쌀 DNA 판정 시스템의 개발

본 연구에서는 비전문가라도 현장에서 쉽게 사용할 수 있는 그림 47과 같은 DNA 판정 시스템을 개발하였다. 개발된 판정 시스템은 기존의 분쇄, 추출, 농도조정 등의 전처리에서 증폭까지 단계의 기기는 현재 진행하고 있는 STS 유전자 분석방식에 적합한 시판 중인 기기들을 검토 적용하였으며, 최종 개발 대상인 모세관 전기 영동 방식의 DNA 판정 장치를 개발하여 전문적인 기술을 가진 전문가에 의해서 수작업으로 진행되는 것을 자동화를 통하여 누구나 쉽게 사용가능하도록 하였다.

2. 경제적·산업적 측면

가. 쌀 DNA 판정비용 및 노력비용 절감

기존의 1품종에 대한 DNA 판정은 30립의 쌀을 각각 검사한 다음 혼입율을 계산하는 방식으로 최종 판정까지의 시간이 오래 걸리고, 30회의 DNA 검사를 반복해야 하는 것에 비하여, 개발된 판정 시스템은 50g을 동시에 분쇄하여 품종을 검사함으

로써 판정에 소요되는 비용 및 시간이 기존에 비하여 훨씬 절약된다. 또한, 개발될 시스템은 운영이 쉽고 편리하며 운영자의 교육도 1일 정도면 충분하기 때문에 노력 비용도 절감이 가능하다.

나. 국내산 쌀의 경쟁력 향상

정확한 쌀 DNA 판정기술에 따른 효율적인 품질 관리로 쌀 품질의 우수성과 균일성이 향상되고, 고품질 쌀의 품질관리 기반이 구축되어 결국 쌀 수입개방 확대에 대응한 국내산 쌀의 경쟁력이 향상될 것이다.

다. 쌀 유통질서 확립

저질의 쌀을 혼합한 포장의 표시와 내용물이 일치하는지 여부를 신속하게 판정이 가능하고, 벼의 품종 판별 뿐 아니라 주 품종의 혼합율도 측정이 가능하기 때문에 중국산 수입쌀과의 혼합 유통되는 부정확한 상거래를 근절시킬 수 있다. 아울러 고품질쌀로 차별화하여 쌀의 유통질서를 확립할 수 있다.

라. 소비자 신뢰도 증대

생산 이력제 및 품종표시의 의무화 등이 추진되고 있는데 쌀의 생산, 가공, 유통에 이르기까지 쌀 품질에 대한 투명성과 소비자에 대한 신뢰도가 증대될 것이다.

마. 연구 투자비 회수

현재 국내의 쌀 품종 인증기관 및 다양한 검사기관, 그리고 실제 현장에서 가장 필요할 것으로 판단되는 RPC 등 설치가 요구되어지는 기관이 상당히 많고, 개발되어진 판정 시스템을 판매하는 것뿐만 아니라 검사에 필요한 각종 시약 등의 판매도 발생할 것으로 예상되어, 본 연구를 통하여 저렴한 보급가격으로 많은 수익을 올릴 수 있을 것으로 판단된다.

제 4 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 연구성과

1. 특허 출원

- 출 원 일 자 : 2009.02.03
- 특 기 사 항 : 심사청구(유) 공개신청(무)
- 출 원 번 호 : 10-2009-0008483(접수번호 1-1-2009-0066750-63)
- 출원인 명칭 : (주)케엔유라이스밀(1-2008-057601-1)
- 대리인 성명 : 최규환(9-2005-001504-0)
- 발 명 명 칭 : 벼 품종을 구분하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도
- 발명자 성명 : 홍동혁, 안덕중

2. 시연회 개최

- 행 사 명 : DNA 품종 판정 장치
- 기 간 : 2009년 2월 10 - 11일
- 장 소 : (주)케엔유라이스밀 인증센터
- 주 최 : (주)케엔유라이스밀
- 주 관 : 경북대학교 생물산업기계공학과

No.	판정	샘플명	판정결과	내용	샘플명
1	<input checked="" type="checkbox"/>	A1	『종진1호』80% 이상으로 판정합니다	정성	종진1호
2	<input checked="" type="checkbox"/>	A2	『추경』80% 이상으로 판정합니다	정성	추경
3	<input checked="" type="checkbox"/>	A3	『한남』80% 이상으로 판정합니다	정성	한남
4	<input checked="" type="checkbox"/>	A4	『주남』80% 이상으로 판정합니다	정성	주남
5	<input checked="" type="checkbox"/>	A5	『일미』80% 이상으로 판정합니다	정성	일미
6	<input checked="" type="checkbox"/>	A6	『일필』80% 이상으로 판정합니다	정성	일필
7	<input checked="" type="checkbox"/>	A7	『오대』80% 이상으로 판정합니다	정성	오대
8	<input checked="" type="checkbox"/>	A8	『신종진』80% 이상으로 판정합니다	정성	신종진
9	<input checked="" type="checkbox"/>	A9	『문광』이름으로 판정합니다	정성	문광
10	<input checked="" type="checkbox"/>	A10	『새추경』80% 이상으로 판정합니다	정성	새추경
11	<input checked="" type="checkbox"/>	A11	『종진1호』로 판정합니다	특정	----



3. 홍보실적

- 홍보유형 : 신문, 인터넷 신문
- 매 체 명 : 대구 경북 Break News(국내)
- 홍보일자 : 2010년 3월 29일
- 제 목 : 벼 DNA 판정 시스템 개발
- 홍보내용 : (주)케엔유라이스밀과 경북도농업기술원과 공동으로 개발한 DNA 판정 시스템인 전문가에 의해서 수작업으로 진행되는 것을 자동화를 통하여 사용자가 쉽게 사용할 수 있도록 하였으며, 현장에서 수집된 벼의 DNA 검사를 통하여 품종의 진위 여부를 판별해 오고 있다.



제2절 활용계획

1. 본 연구는 연구과제와 관련하여 2008년 국립농산물 품질관리원에서 인증하는 쌀 품종 인증기관으로 인증허가를 받아 현장에서 수집된 벼의 DNA 검사를 통하여 품종의 진위 여부를 판별해 오고 있으며, 이번의 연구의 성과를 통하여 기존의 DNA 검사법에 비하여 뛰어난 본 연구의 검사법을 도입할 계획이다.

제 2007-21호

쌀·현미 품종 검정기관 지정서

대표자 : 홍동혁(생년월일 : 1973.07.08.)

업체(기관)명 : (주)케이엔유라이스밀 부설 검정센터

(사업자등록번호 : 513-81-35440)

소재지 : 대구광역시 북구 산격동 1370번지

경북대학교 농대3호관 123호

지정년월일 : 2008년 09월 10일

「쌀·현미의 품종 검정기관 지정요령(국립농산물품질관리원 고시 제2007-1호)」 제6조의 규정에 의하여 쌀·현미의 품종검정 기관으로 지정합니다.

2008 년 09 월 10 일

국립농산물품질관리원장



2. 본 연구의 결과로 파생한 국내산 벼를 판정할 수 있는 유전자 마커에 대하여 유전자 자원으로 등록하고, 현재 SCI 논문에 게재될 수 있도록 논문 투고를 준비 중이며, 이를 통하여 기술의 신뢰성을 높일 예정이다.
3. 현재 본 연구에서 개발된 DNA 판정 시스템의 국내 판매를 위하여 준비 중에 있으며, 검사기관 및 RPC 현장의 2개소에 설치를 할 예정으로 있다.
4. 현재 국내에서는 양곡법을 개정하여 품종의 표시를 의무화 하고 있으며, RPC 등에서 품종 제한 수매제를 통하여 단일품종에 대한 가공을 할 수 있도록 유도하고 있다. 이러한 품종의 혼입을 방지하고 고품질 벼의 생산과 가공을 추구하는 정책이 실현되고 있으나, 이를 검증할 수 있는 검사기관 및 현장에서의 검사능력은 이를 뒷받침하지 못하고 있는 실정이다. 현재 약 30개소의 인증기관이 있어 대부분의 생산자, 가공 및 유통 업체들이 검사료를 지불하고 검사를 진행하고 있으나, 가공업체나 유통 업체들의 경우 매일 생산되는 각 상품들에 대한 검사의 진행이 어려워 실제적으로는 많은 어려움을 겪고 있다. 본 연구에서는 비 숙련자라도 1일 정도의 교육을 받고 자동화된 시스템을 통하여 빠른 시간에 검사할 수 있는 시스템을 개발하였으며, 현장에서 신속, 정확하게 판정할 수 있어 현장에 개발된 시스템을 설치할 수 있도록 시책 건의를 할 예정이다.
5. 개발된 STS 유전자 마커 및 DNA 판정시스템을 활성화하기 위해서는 새롭게 고시되는 품종에 대한 지속적인 연구와 현재 시장에서 인기를 끌고 있는 일본산 품종의 검사 및 미국산 및 중국산 품종에 관한 검사까지도 원활히 할 수 있도록 지속적인 연구가 진행되어야 하며, DNA 판정 시스템을 처음부터 마지막까지 완전 자동화 할 수 있는 기계 및 장비의 개발에 대한 추가 연구가 필요하다고 판단된다.

제 5 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
가부시키가이샤 쇼쿠부츠 게놈 센터 (일본)	일본에서 작물심기 면적이 많은 24품종에서의 SNPs 부위를 탐색하여 DNA 레벨에서 유사 품종의 식별까지도 품종을 간단하고도 신속하게 감별할 수 있는 다형성 마커를 작성함으로써 벼 품종 판별법을 개발	
오오츠보 외(2002)	일본국내에서 경작되는 50품종 중에서 코시히카리와 그 외의 49 품종과의 품종 판별이 가능한 코시히카리포지티브킷트와 코시히카리네가티브킷트를 개발했다.	연구 개발 한정
아카기(1997)	마이크로세트라이트 방법을 이용하여 일본에서 재배되는 유사한 59품종을 판별 가능한 판별 마커를 개발	연구 개발 한정
Kett corp. (일본)	일본 쌀 원종 데이터(211품종)을 바탕으로 일본의 주요 20품종을 감정가능 품종으로 설정, SSR법을 이용하여 식품 DNA 분석 시스템 개발	농림수산성, 도쿄도 등으로부터 DNA 감정을 위탁 분석 시스템 판매 중
Satake corp. (일본)	일본 쌀(211품종)을 판별할 수 있는 유전자 마커를 개발하고, 이를 이용한 DNA 판별 시스템 개발	RPC 등 관련기관으로 판별 시스템 판매 진행 중

제 6 장 참고문헌

1. 양승모. 2000. 쌀의 고고학적 고찰. 동아시아 식생활학회지 춘계학술회지 초록집. pp. 9-24.
2. 김길한. 2000. 쌀 가공식품의 개발 현황과 발전방향. 동아시아식생활학회지 춘계학술회지 초록집. pp. 27-50.
3. 농촌진흥청. 2007. 개방화 · 소비자시대의 쌀 산업 발전방향. 심포지엄 pp. 81-99
4. Chamura, S., H. Kanrko, and Y. Saeto. 1979. Effect of Temperature at Ripening Period on the Eating Quality of Rice. Japan Jour. Crop Sci. 48(4) : 475-482.
5. Kido, M. and S. Yanatori. 1965. Histochemical studies of protein accumulation process in rice grain. proc. Crop Sci. japan 34 : 204-209
6. Seo, S. W. and S. Chamura. 1979. Studies on the characters of the improved semi-dwarf, high-yielding indica rice varieties (II). Shape and quality of rice kernel, especially occurrence of white belly kernel. Japan Jour. Crop Sci. 48(3) : 418-424
7. Tashiro, T and M. Ebata. 1976. Studies on white-belly rice kernel. V. On the occurrence of white belly during the development of rice kernel, with special reference to the moisture content of kernel. Proc. Crop Sci. Soc. Japan 45(4) : 616-623.
8. Tashiro, T. and M. Ebata. 1979. Studies on white-belly rice kernel. VI. Effect of nitrogen top dressing at heading stage on the occurrence of white-belly kernel.

Japan Jour. Crop Sci. 48(1) : 99-106.

9. Tashiro, T., M. Ebata, and M. Ishikawa. 1980. Studies on white-belly rice kernel. VII. The most vulnerable stages of kernel development for the occurrence of white belly. Japan Jour. Crop. Sci, 49(3) : 482-488

10. 조영찬. 2005. 작물과학원. 고품질 쌀 유통체계 확립을 위한 시중 유통쌀 품종 확인 및 혼합을 분석. 시험보고서.

11. Akagi, H, Y. Yokozeki, A. Inagaki and T. Fujimura. 1996. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. Theor. Appl. Genet. 93:1071-1077

12 Akagi, H, Y. Yokozeki, A. Inagaki and T. Fujimura. 1997. Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats and a classification of closely related cultivars with these microsatellite Loci. Theor. Appl. Genet. 94:61-67.

13. Olufowote, J.O., Y. Xu, X. Chen, W.D. Park, H.M. Beachell, R.H. Dilday, M. Goto and S.R. McCouch. 1997. Genome 40:370-378.

14. Wang, Z.Y. and S.D. Tanksley. 1989 Genome 32:1113.

15. Nakano, M., A. Yoshimura and N. Iwata. 1992. Rice Genet. New J. 9:132.

16. 류미라, 김은영 등 1998. Capillary Electrophoresis를 이용한 국내산 쌀의 품종 판별. Korean J. Food SCI. Technol. Vol. 30, No. 6, PP. 1252-1258

17. 송진, 손종록 등 2005. 전자코를 이용한 자포니카벼 품종의 쌀과 밥 향기패턴 분류. Korean J. Crop SCI. 50(6):447-452

18. 김상숙, 이상효 등 1998. 현미 세면(윗면, 측면, 앞면)의 화상을 이용한 품종 판별.
Korean J. Food SCI Technol. Vol. 30, No. 3, PP. 473-479.

[부 록]

1. 특허 출원

【요약서】

【요약】

본 발명은 벼 품종을 구분하기 위한 특이 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 서열번호 1 내지 12의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트로 이루어진 균으로부터 선택되는 2 이상의 프라이머 세트를 포함하는 벼 품종을 구분하기 위한 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 벼 품종을 구분하기 위한 키트, 및 상기 프라이머 세트를 이용하여 벼 품종을 구분하는 방법에 관한 것이다.

【색인어】

벼 품종, 구분, 올리고뉴클레오티드, 프라이머, 키트

【명세서】

【발명의 명칭】

벼 품종을 구분하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도{Primer sets for discriminating rice cultivars, and uses thereof}

【발명의 상세한 설명】

【기술분야】

본 발명은 벼 품종을 구분하기 위한 프라이머 세트 및 이의 용도에 관한 것이다.

【배경기술】

벼는 밀 다음으로 세계 제2의 식량작물이며 세계 인구의 절반 이상이 쌀을 주식으로 하고 있는 작물로서 아시아에서 90%이상 생산되고 대부분이 아시아에서 소비되고 있다. 한국도 다른 아시아 국가들과 같이 쌀을 주식으로 하고 있으며 또한 해마다 15~20 품종씩 신품종이 육성, 보급되고 있으나 국내에 보급되고 있는 품종들은 대부분이 특정 품종(일품벼, 주남벼, 동진1호 등)으로 소개되고 있어 국내 소비자의 대부분은 이들 품종에 대한 확인이 불가능한 실정이다. 또한 수출입 개방에 따라 일부 유통업자들은 수입 쌀을 국내산으로 또는 국내산에 수입 쌀을 혼합하여 공급하고 있으며 이러한 불법 유통을 방지하기 위하여 정부에서는 원산지 표기를 제도화하고 있으나 실제 원산지 허위 표기의 적발에는 유통경로의 추적 및 원산지 확인 등의 복잡한 절차를 거쳐야 하는 등 매우 어려움을 겪고 있는 실정이다. 더구나 최

근 일부 농촌지역에서 발생하는 수확물의 도난사건 등 벼 품종과 관련된 고소, 고발 사건에 대한 보다 과학적인 수사기법이 필요한 실정이므로 국내에서 육성되어 재배되고 있는 벼 품종들을 신속하고 간편하게 판별할 수 있는 방법이나 기술의 확립이 절실하다고 하겠다.

최근 벼 유전자원은 유용 형질 보존 및 신품종 창출에 매우 중요한 재료로 이용되고 있는 바 국내 고유 자원과 국외 자원의 수집과 함께 수집된 유전자원의 신속한 종간 및 아종간 품종 판별은 정확한 유전자원관리 및 보호를 위하여 매우 중요하다.

최근에 여러 가지 DNA 마커를 이용하여 벼 품종을 식별하기 위한 많은 연구가 진행되었다. 지금까지, RAPD(random amplified polymorphic DNA), AFLP(amplified fragment length polymorphism)와 마이크로세틀라이트(microsatellite) 방법이 품종을 식별하는데 사용되어 왔다. 예를 들어, Wang 등은 RFLP(restricted fragment length polymorphism) 마커를 이용하여 품종을 식별하였고(Wang, Z.Y., Tanksley, S.D. 1989 L. Genome. 32, 1113-1118), Ryu는 단백질 모세관 전기영동 방법을 이용하여 품종을 식별하였다 (Ryu, D.J. 1998 J. food science and nutrition. 3, 43-347). 또한, 6개의 마이크로세틀라이트 마커를 사용하여 유전자 지도에서 위치를 확인하는 방법으로 자포니카 벼 51개 품종을 식별하였다(Ji, H.S. et al., 1998 Korean J. Breed. 30, 350-360). RAPD, 마이크로세틀라이트, STS(sequence tagged site), 그리고 PCR (polymerase chain reaction) 방법으로 국내산 40개 품종을 식별하고, 각 방법의 장단점을 비교하여 보고된 바가 있다(Jeong O.Y. et al., Korean 1998 J. Breed. 30, 136-137). RAPD와 마이크로세틀라이트를 이용하여 31개 벼 품종의 식별을 보여주었고(Kwon, S.J. et al., 1999 Korean J Crop Science 44, 112-116), 화상분석기술을 이용한 벼 품종의 식별 방법을 보고하였다(Kwon, S.J. et al., 1998 Korean J Crop Science 43, 33-34). 그러나 이러한 식별 방법과 이미지 기술은 특이적 단일 밴드를 형성할 수 없으므로 혼합된 품종들로부터 각각의 품종을 식별하기가 어렵고, 분석 결과를 논의하기가 어렵다.

한국특허등록 제10-0453568호에는 품종판별을 위한 마이크로세틀라이트 마커조합이 개시되어 있으며, 한국특허등록 제10-0736152호에는 벼에서의 아종 감별용 STS 마커 세트가 개시되어 있으나, 본 발명의 프라이머 세트와는 상이하다.

【발명의 내용】

【해결하고자 하는 과제】

본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명은 재현성이 높으며

한국내에서 육성된 대다수 벼 품종, 재래종 및 일부 도입 품종의 판별에 손쉽게 적용할 수 있는 최소의 프라이머 조합을 선별하고 이를 각 품종별 구분에 적용시킴으로서 한국 내에서 재배되는 벼 품종의 구분을 보다 확실히 하고자 한다.

【과제 해결 수단】

상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 서열번호 1 내지 12의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트에 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상의 프라이머 세트를 포함하는 벼 품종을 구분하기 위한 프라이머 세트를 제공한다.

본 발명은 또한, 상기 프라이머 세트를 포함하는 벼 품종을 구분하기 위한 키트를 제공한다.

본 발명은 또한, 상기 프라이머 세트를 이용하여 벼 품종을 구분하는 방법을 제공한다.

【효과】

본 발명에 따르면, 쌀 품종인 동진1호, 추청, 남평, 주남, 일미, 일품, 운두, 신동진, 운광, 새추청 등의 10개의 국내에서 생산되는 벼를 개발한 STS 프라이머를 이용한 DNA 분석을 통하여 유전양상을 구분할 수 있었다. 이를 통하여 유통되는 쌀의 혼입률을 보다 빠르고 정확하게 확인할 수 있게 되었다.

【발명의 실시를 위한 구체적인 내용】

본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 9 및 10의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 서열번호 11 및 12의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트에 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상의 프라이머 세트를 포함하는 벼 품종을 구분하기 위한 프라이머 세트를 제공한다.

본 발명의 프라이머 세트는 바람직하게는 상기 프라이머 세트에 이루어진 군으로부터 선택되는 3개 이상의 프라이머 세트를 포함하며, 더욱 바람직하게는 4개 이상의 프라이머 세트를 포함하며, 더욱 바람직하게는 5개 이상의 프라이머 세트를 포함하며, 가장 바람직하게는 6개의 프라이머 세트, 즉, 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 9 및 10의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 서열번호 11 및 12의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함할 수 있다. 서

열번호 1 내지 서열번호 12의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 동시에 이용하면 비 품종을 더욱 효율적으로 구분할 수 있다.

상기 프라이머는 각 프라이머의 서열 길이에 따라, 서열번호 1 내지 서열번호 12의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상, 26개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1의 프라이머는 서열번호 1의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있으며, 서열번호 2의 프라이머는 서열번호 2의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상의 연속 뉴클레오티드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또한, 상기 프라이머는 서열번호 1 내지 서열번호 12의 염기서열의 부가, 결실 또는 치환된 서열도 포함할 수 있다.

본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 서열을 말하며, 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시점으로서 작용할 수 있다. 상기 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 시작하도록 허용해야 한다. 프라이머의 구체적인 길이 및 서열은 요구되는 DNA 또는 RNA 표적의 복잡도(complexity)뿐만 아니라 온도 및 이온 강도와 같은 프라이머 이용 조건에 의존할 것이다.

본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오티드는 또한 뉴클레오티드 유사체(analogue), 예를 들면, 포스포로티오에이트(phosphorothioate), 알킬포스포로티오에이트 또는 펩티드 핵산(peptide nucleic acid)를 포함할 수 있거나 또는 삽입 물질(intercalating agent)를 포함할 수 있다.

본 발명의 일 구현예에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트에서, 상기 비 품종은 동진1호, 추청, 남평, 주남, 일미, 일품, 운두, 신동진, 운광 및 새추청으로부터 선택될 수 있으나, 상기 품종에 제한되지 않는다.

본 발명의 일 구현예에 따른 프라이머 세트는 멀티플렉스 (multiplex) PCR에 이용되는 것이 바람직하다. 멀티플렉스 PCR이란 복수의 프라이머 세트를 사용하여 동시에 1개의 반응 튜브 내에서 PCR 증폭하는 방법을 말한다. 각각의 프라이머 세트를 이용하여 각각의 PCR 반응을 수행한 후에, PCR 산물을 합하여 전기영동을 하는 것도 가능하지만, PCR 시간 및 반응을 단축하기 위해 멀티플렉스 PCR을 수행하는 것이 더욱 바람직하다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 벼 품종을 구분하기 위한 키트를 제공한다.

본 발명의 키트에서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs, 버퍼 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, PCR 완충액 제조 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

벼에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 벼 품종을 구분하는 방법을 제공한다.

본 발명의 방법은 벼 시료에서 게놈(genomic) DNA를 분리하는 단계를 포함한다.

상기 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 방법은 당업계에 공지된 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면, CTAB 방법을 이용할 수도 있고, wizard prep 키트(Promega 사)를 이용할 수도 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 중합효소 연쇄반응(PCR), 리가아제 연쇄반응(ligase chain reaction), 핵산 서열 기재 증폭(nucleic acid sequence-based amplification), 전사 기재 증폭 시스템(transcription-based amplification system), 가닥 치환 증폭(strand displacement amplification) 또는 Q β 복제효소(replicase)를 통한 증폭 또는 당업계에 알려진 핵산 분자를 증폭하기 위한 임의의 기타 적당한 방법이 있다. 이 중에서, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.

상기 표적 서열 또는 핵산의 증폭은 멀티플렉스 (multiplex) PCR을 통해 수행될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 형광 프라이머를 이용한 멀티플렉스 PCR을 수행할 수 있다. 멀티플렉스 PCR을 수행하면 PCR 시간 및 반응을 단축할 수 있는 장점이 있

다.

본 발명의 방법에 있어서, 상기 증폭된 표적 서열은 검출가능한 표지 물질로 표지될 수 있다. 일 구현예에서, 상기 표지 물질은 형광, 인광 또는 방사성을 발하는 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 상기 표지 물질은 Cy-5 또는 Cy-3이다. 표적 서열의 증폭시 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지될 수 있다. 또한, 방사성 물질을 이용한 표지는 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하면 증폭 산물이 합성되면서 방사성이 증폭 산물에 혼입되어 증폭 산물이 방사성으로 표지될 수 있다. 표적 서열을 증폭하기 위해 이용된 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트는 상기에 기재된 바와 같다.

본 발명의 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 모세관 전기영동, DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 모세관 전기영동을 수행할 수 있다. 모세관 전기영동은 예를 들면, ABI Sequencer를 이용할 수 있다. 또한, 겔 전기영동을 수행할 수 있으며, 겔 전기영동은 증폭 산물의 크기에 따라 아가로스 겔 전기영동 또는 아크릴아미드 겔 전기영동을 이용할 수 있다. 또한, 형광 측정 방법은 프라이머의 5'-말단에 Cy-5 또는 Cy-3를 표지하여 PCR을 수행하면 표적 서열이 검출가능한 형광 표지 물질로 표지되며, 이렇게 표지된 형광은 형광 측정기를 이용하여 측정할 수 있다. 또한, 방사성 측정 방법은 PCR 수행시 ^{32}P 또는 ^{35}S 등과 같은 방사성 동위원소를 PCR 반응액에 첨가하여 증폭 산물을 표지한 후, 방사성 측정기구, 예를 들면, 가이거 계수기(Geiger counter) 또는 액체섬광계수기(liquid scintillation counter)를 이용하여 방사성을 측정할 수 있다.

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

재료 및 방법

1. DNA 추출

본 발명에 이용된 벼 품종은 농촌진흥청에서 보관중인 10가지 품종의 벼를 사용하였다. DNA를 추출하기 위하여 조곡상태의 벼에서 외영과 내영을 제거한 다음 현미를 만들고, 그 현미에서 호분층을 제거한 후 백미상태로 만든 다음 게놈(genomic) DNA를 추출하였다. DNA 추출은 하기와 같이 실시하였다. 종자 또는 백미 1-2립

을 유산지에 넣어서 곱게 마쇄한 후, 1.5ml 또는 2ml 튜브에 넣고, 냉동 보관하였다. 추출 버퍼 (350 μ l)를 첨가하고, 2 μ l proteinase K(25 μ g/ μ l)를 첨가 후 잘 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 여기에 동일 부피의 2% CTAB (350 μ l)를 첨가 후 잘 혼합하였다. 상기 혼합물을 65 $^{\circ}$ C 항온수조에서 15분간 반응시키면서 5분마다 가볍게 inverting 하여 잘 섞이게 하였다. 여기에, PCI 용액 (phenol:chloroform:isoamylalcohol = 25:24:1)을 350 μ l 첨가한 후, 10분간 inverting 하면서 잘 혼합하고, 12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 새로운 튜브에 옮기고, 옮긴 상등액의 2/3 부피의 이소프로판올 (500 μ l)이나 2배 부피의 EtOH를 첨가하고 천천히 잘 섞어서 DNA를 응축시키며, 가능한 한 많은 DNA를 회수하기 위하여 -20 $^{\circ}$ C 냉동실에 2~3시간 두었다가 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 원심분리 후, 상등액을 버리고 70% cold EtOH (300-500 μ l)로 세척 후 12,000rpm에서 3~5분간 원심분리하고 EtOH를 제거한 후, DNA 펠렛을 건조시키고, 100 μ l TE 버퍼 또는 멸균수에 DNA를 녹여, -20 $^{\circ}$ C, 95% EtOH을 200 μ l를 넣어 DNA를 영기게 하고, 4 $^{\circ}$ C, 12,000rpm에서 10분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. EtOH를 버리고 DNA 덩어리를 70% EtOH에 한번 세척 후 DNA 덩어리를 말린 후, 200 μ l의 TE 버퍼 또는 멸균수를 넣고 DNA를 녹인 후 DNA 양을 점검하여 10-15 μ g/ μ l 농도로 희석하여 PCR에 사용하였다.

2. PCR 반응

PCR 반응에서 최종 부피는 20 μ l로 조정하였으며, 게놈 DNA 2 μ l, PCR 버퍼 2 μ l, dNTPs 1.6 μ l, Taq polymerase 0.1 μ l, 6쌍의 정방향 및 역방향 프라이머(서열번호 1 내지 12) 및 양성대조구 프라이머 (서열번호 13 및 14)를 각각 0.4 μ l씩 넣었으며, 나머지는 증류수로 보충하였다. PCR 사이클은 초기 DNA 변성을 위해 95 $^{\circ}$ C 5분의 1 사이클, DNA 증폭은 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 1분의 35 사이클과 최종 연장 (Extension)은 60 $^{\circ}$ C 30분 1 사이클로 하였으며, 반응후 4 $^{\circ}$ C에서 저장하였다. 모든 PCR은 Px2 Thermal Cycler(ABi)를 사용하였다.

PCR에 사용된 프라이머의 서열 정보는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1. 사용된 프라이머의 서열

프라이머명	서열번호	프라이머 서열(5'-3')
test13-F	1	catgccacatcgtcagagcactcg
test13-R	2	gtgcaatccattgctgaataag
test4-F	3	gcgacaactcagcctttatc
test4-R	4	gcatcgatctaactactccg
015-F	5	atcgggatagggaacaaaagctaggag
015-R	6	tggagatctgagcgagtttgggtgtg
047-F	7	cagctcctaacaggtacctataggac
047-R	8	acccttgttccatttttactattcc
test7-F	9	agccccgaggtacttaatttggc
test7-R	10	agcaatgcattactccatccgt
test15-F	11	gcagctgattcaaaggtagg
test15-R	12	gtgtggagacaaggcaggag
Positive Control-F (100bp)	13	ggactaccaaccccagctac
Positive Control-R (100bp)	14	ccagctgggtatcctaggaga

실시예 1: 본 발명의 프라이머 세트의 디자인

인터넷 Database(<http://www.gramene.org/>)에서 여러 마커들의 서열 정보를 획득하고, 해당 품종을 스크리닝하면서 allele 가 특이적으로 많은 마커들로 축소하였다. Gradient PCR을 통하여 55℃에서 Annealing이 잘 일어나는지를 검사하였다 (이는 멀티플렉스 PCR을 하기 위하여 Annealing 온도를 하나로 고정해야 하기 때문이다). "Primer-3" 프로그램을 이용하여 서열을 약간 변형하였다 (55℃에서 반응이 잘 일어날 수 있도록). 각 프라이머에 형광을 붙여서 최종적으로 품종 구분에 가장 적합한 6개의 프라이머 세트를 선발하였다.

실시예 2: 본 발명의 프라이머 세트를 이용한 벼 품종별 멀티플렉스 PCR 분석

상기 실시예 1에서 디자인한 프라이머 세트를 이용하여 국내 육성 일반벼 품종 10개에 대해 멀티플렉스 PCR을 수행하였다.

하기 표 2는 6개의 프라이머 세트를 이용한 10개의 한국 벼 품종에 대한 PCR 결과이다.

표 2. 6개의 프라이머 세트를 이용한 10개의 한국 벼 품종에 대한 PCR 증폭 결과

		test 13	test 4	015		047		test15		test7	
				015Hi	015Lo	047Hi	047Lo	test1 5Hi	test1 5Lo	test7 Hi	test7 Lo
1	동진1 호	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
2	추청	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
3	남평	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-
4	주남	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
5	일미	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
6	일품	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-
7	운두	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
8	신동진	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-
9	운광	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-
10	새추청	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+

상기 표 2에서, '+'라고 표시한 것은 PCR 밴드가 생성된 것이며, '-'라고 표시한 것은 PCR 밴드가 생성되지 않은 것을 나타낸다. test13 및 test4 프라이머 세트의 경우에는 PCR 산물이 각각 하나의 밴드를 나타내는 반면, 015, 047, test15 및 test7 프라이머 세트의 경우에는 PCR 산물이 각각 하나가 아니라, 각각 크기가 약간 다른 2개의 산물이 생성된다. Hi라고 표시된 것은 크기가 약간 큰 밴드이고, Lo라고 표시된 것은 크기가 약간 작은 밴드를 나타낸다.

상기 표 2에서 알 수 있는 바와 같이, 이들 품종간에는 서로 간섭 현상이 없어서 6개의 프라이머 세트를 동시에 혼합하여 분석가능하고, 이로 인한 시간과 비용을 줄인 신속한 품종구분이 가능하였다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 9 및 10의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 서열번호 11 및 12의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트에 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상의 프라이머 세트를 포함하는 벼 품종을 구분하기 위한 프라이머 세트.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 서열번호 1 및 2의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 3 및 4의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 5 및 6의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 7 및 8의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 서열번호 9 및 10의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 서열번호 11 및 12의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함하는 베타 품종을 구분하기 위한 프라이머 세트.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 상기 베타 품종은 동진1호, 추청, 남평, 주남, 일미, 일품, 운두, 신동진, 운광 및 새추청으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 베타 품종을 구분하기 위한 프라이머 세트.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 멀티플렉스 (multiplex) PCR에 이용되는 것을 특징으로 하는 베타 품종을 구분하기 위한 프라이머 세트.

【청구항 5】

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트; 및 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는, 베타 품종을 구분하기 위한 키트.

【청구항 6】

제5항에 있어서, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 DNA 폴리머라제, dNTPs 및 버퍼를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

【청구항 7】

베타에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

상기 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 베타 품종을 구분하는 방법.

【청구항 8】

제7항에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 모세관 전기영동, DNA 칩, 젤 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행되는 것인 방법.

【청구항 9】

제7항에 있어서, 상기 표적 서열의 증폭은 멀티플렉스 (multiplex) PCR을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

주 의

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