



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월09일
(11) 등록번호 10-2121145
(24) 등록일자 2020년06월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 2521/301 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0026213
(22) 출원일자 2019년03월07일
심사청구일자 2019년03월07일
(56) 선행기술조사문헌
KR101790769B1
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
충북대학교 산학협력단
충청북도 청주시 서원구 충대로 1 (개신동)
(72) 발명자
류호진
충청북도 청주시 서원구 신율로 43, 306동 801호
(개신동, 청주개신3주공아파트)
문수윤
경기도 광명시 연서로 23(철산동)
이화용
대전광역시 유성구 관들5길 15-4(관평동)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 6 항

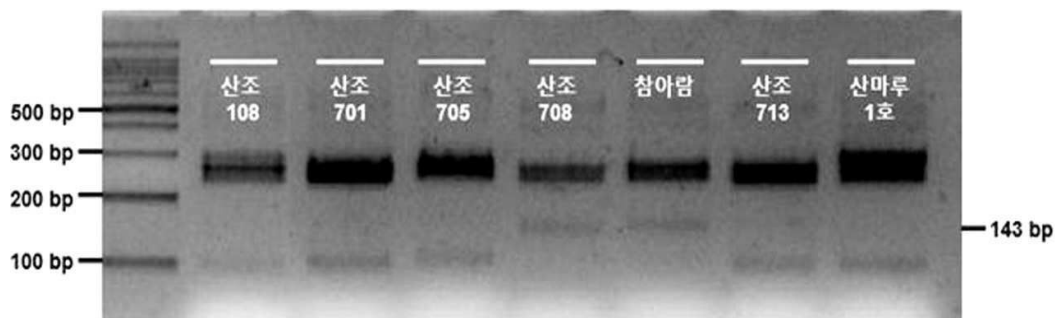
심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 표고버섯 배지 갈변 관련 유전자 ABL과 ABL 유전자의 변이를 구별하는 CAPS 마커 및 이의 용도

(57) 요약

표고버섯 배지 갈변 관련 유전자 ABL과 ABL 유전자의 변이 그리고 이 변이를 구분할 수 있는 CAPS 마커 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명은 표고버섯 품종 중 배양기간 중 배지표면의 갈변 이상 현상을 보이는 산조 708호 또는 참아람을 빠르고 간편하게 확인할 수 있다. 상기 프라이머를 이용하여 PCR로 분리된 CAPS 마커를 이용해 상기 표고 균주를 구분할 수 있다는 것이다. 이에 따라 마커서열 RL-LE-178과 제한효소 BsaJI을 이용하여 표고버섯 육종 중 배지의 갈변에 이상 현상을 가지고 있는 균주를 미리 선별할 수 있어 육종 효율을 증대시킬 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/156 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌
KR101834565B1
GenBank accession no. BDGU01000742
Yoo et al, BMC Genomics. 2019 Feb 8;20(1):121
KR101906037B1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	213007053SBH20
부처명	농림축산식품부
연구관리전문기관	농림식품기술기획평가원
연구사업명	GoldenSeed프로젝트(R&D)(농림부)
연구과제명	품종보호/수입대체용 표고 신품종 개발을 위한 분자마커
기여율	1/1
주관기관	충북대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 3의 115번째 뉴클레오타이드 위치에 아데닌(adenine, A)을 가지는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism) 부위를 포함하는 10-30개의 연속 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트를 포함하는 표고버섯 갈변 이상 품종 산조 708호 또는 참아람 판별용 조성물.

청구항 2

제 1항의 조성물, 제한효소, 및 증폭반응수행시약을 포함하는 표고버섯 갈변 이상 품종 산조 708호 또는 참아람 판별용 키트.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 제한효소는 BsaJI인 것인 키트.

청구항 4

다음의 단계를 포함하는 표고버섯 갈변 이상 품종 산조 708호 또는 참아람의 감별 방법:

- (a) 표고버섯으로부터 핵산분자를 분리하는 단계;
- (b) 상기 핵산분자의 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)의 염기 타입을 검출하는 단계로서, 상기 SNP는 서열번호 3의 115번째 뉴클레오타이드 위치에 존재하는 SNP인 단계; 및
- (c) 상기 검출한 SNP 위치의 염기 타입으로부터 표고버섯 갈변 이상 품종을 감별하는 단계로, 상기 SNP 위치의 염기가 아데닌(adenine, A)인 경우에 표고버섯 갈변 이상 품종 산조 708호 또는 참아람으로 판정한다.

청구항 5

다음의 단계를 포함하는 표고버섯 갈변 이상 품종 산조 708호 또는 참아람의 감별 방법:

- (a) 표고버섯으로부터 핵산 분자를 분리하는 단계;
- (b) 상기 핵산 분자를 주형으로 사용하고, 서열번호 1 및 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 프라이머 세트를 사용하여 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)을 실시하는 단계;
- (c) 상기 중합효소연쇄반응의 증폭산물을 서열번호 3의 115번째 뉴클레오타이드를 포함하는 4-20개의 연속 뉴클레오타이드 서열을 인식하는 제한효소 처리하는 단계; 및
- (d) 단계 (c)의 결과물을 분석하는 단계로, 상기 결과물이 제한효소에 의해 143 bp의 단편이 나타나면 표고버섯 갈변 이상 품종 산조 708호 또는 참아람으로 판정한다.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 제한효소는 BsaJI인 것인 표고버섯 갈변 이상 품종 산조 708호 또는 참아람의 감별 방법.

발명의 설명

기술 분야

표고버섯 배지 갈변 관련 유전자 *ABL*과 *ABL* 유전자의 변이 그리고 이 변이를 구분할 수 있는 CAPS 마커 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 표고버섯은 세계 버섯 생산의 약 17%를 차지하고 있다. 이 버섯은 한국, 중국, 일본 등 아시아국가에서 일반적으로 재배되는 버섯이며, 미국, 캐나다, 네덜란드, 폴란드 등의 서구국가에서도 상업적으로 재배되고 있다. 그리고 향암 효과를 보이는 레티난 등이 있어 식품뿐만 아니라 약학적인 용도로도 사용이 늘어나고 있다.
- [0003] 우리나라에서 표고버섯은 2014년 국내 임산 버섯 생산량의 약 91%, 약 1,858억 원을 차지하고 있고, 그 독특한 맛과 향기 때문에 동서양의 요리 재료로 사용될 뿐만 아니라 항종양효과, 항바이러스 효과 등 의학적 가치가 입증되고 있다. 국내의 표고버섯의 생산량과 생산액은 그동안 꾸준히 증가해 왔으며, 2011년에는 37,000여 톤 생산으로 약 2,220여억 원의 생산액을 기록하였다. 그리고 수입의 비중이 높아 2015년 수입량은 수출량에 비하여 약 21배 많았고 수입액은 약 7배 많았다.
- [0004] 표고버섯 톱밥재배 과정은 표고버섯 종균 접종 후, 균사의 활착, 균사 생장, 배지의 갈변 그리고 자실체 생산의 과정으로 이루어진다. 배지표면의 갈변은 배지 내 균사체 보호와 버섯 발생을 위하여 매우 중요한 과정이다.
- [0005] 분자마커는 작물의 품종 구분 또는 형질분석 등에 이용할 수 있다. 이 분자마커의 종류로는 AFLP, RFLP, RAPD, SSR, STS, CAPS 등이 있다. 그 중 CAPS는 유전체 내 하나의 염기서열이 치환된 변이인 SNP나 하나 이상의 염기서열이 삽입 또는 결실된 변이인 Indel의 검출이 가능한 마커로, PCR 산물에 제한효소를 처리하여 DNA 단편의 크기 차이를 확인하는 방법이다. 대부분의 CAPS 마커는 공우성(co-dominant)이고, 쉽게 결과를 해석할 수 있다는 장점을 가지고 있다.
- [0006] 본 발명자들은 표고버섯의 게놈 염기서열을 이용하여 표고버섯 품종에서 배양기간 중 배지 표면 갈변의 이상 현상의 원인이 되는 유전자인 ABL을 동정하였고, ABL 유전자의 갈변 이상 현상의 보이는 변이를 확보하였으며 이를 이용하여 CAPS 마커를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) (0001) 대한민국 등록 특허 KR 10-1906037

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명자들은 표고버섯 품종 중 배양기간에 따라 배지표면에 갈변 이상을 보이는 품종인 산조 708호와 참아람을 신속하고 정확하게 판별할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다.
- [0009] 그 결과, 표고버섯 갈변 이상 품종 산조 708호 또는 참아람의 특이적인 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism) 부위를 규명하고 이를 판별할 수 있는 CAPS(Cleaved Amplification Polymorphic Sequence) 마커를 이용한 증합효소연쇄반응 및 제한효소 처리를 통해 표고버섯 갈변 이상 품종 산조 708호 또는 참아람을 판별할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0010] 따라서 본 발명은 서열번호 3의 115번째 뉴클레오타이드 위치에 아데닌(adenine, A)을 가지는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism) 부위를 포함하는 10-30개의 연속 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트를 포함하는 표고버섯 갈변 이상 품종 판별용 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 조성물, 제한효소, 및 증폭반응수행시약을 포함하는 표고버섯 갈변 이상 품종 판별용 키트를 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 제한효소는 BsaJI일 수 있다.
- [0013] 또한, 본 발명은 다음의 단계를 표고버섯 갈변 이상 품종의 감별 방법:
- [0014] (a) 표고버섯으로부터 핵산분자를 분리하는 단계;

- [0015] (b) 상기 핵산분자의 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)의 염기 타입을 검출하는 단계로서, 상기 SNP는 서열번호 3의 115번째 뉴클레오타이드 위치에 존재하는 SNP인 단계; 및
- [0016] (c) 상기 검출한 SNP 위치의 염기 타입으로부터 표고버섯 갈변 이상 품종을 감별하는 단계로, 상기 SNP 위치의 염기가 아데닌(adenine, A)인 경우에 표고버섯 갈변 이상 품종 산조 708호 또는 참아람으로 판정한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 표고버섯 갈변 이상 품종의 감별 방법:
- [0018] (a) 표고버섯으로부터 핵산 분자를 분리하는 단계;
- [0019] (b) 상기 핵산 분자를 주형으로 사용하고, 서열번호 1 및 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 프라이머 세트를 사용하여 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)을 실시하는 단계;
- [0020] (c) 상기 중합효소연쇄반응의 증폭산물을 서열번호 3의 115번째 뉴클레오타이드를 포함하는 4-20개의 연속 뉴클레오타이드 서열을 인식하는 제한효소 처리하는 단계; 및
- [0021] (d) 단계 (c)의 결과물을 분석하는 단계로, 상기 결과물이 제한효소에 의해 143 bp의 단편이 나타나면 표고버섯 갈변 이상 품종 산조 708호 또는 참아람으로 판정한다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 제한효소는 BsaJI일 수 있다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명은 표고버섯 품종 중 배양기간 중 배지표면의 갈변 이상 현상을 보이는 산조 708호 또는 참아람을 빠르고 간편하게 확인할 수 있다. 상기 프라이머를 이용하여 PCR로 분리된 CAPS 마커를 이용해 상기 표고 균주를 구분할 수 있다는 것이다. 이에 따라 마커서열 RL-LE-178과 제한효소 BsaJI을 이용하여 표고버섯 육종 중 배지의 갈변에 이상 현상을 가지고 있는 균주를 미리 선별할 수 있어 육종 효율을 증대시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 톱밥 배지의 정상 갈변 그리고 갈변 이상의 표현형과 이 표현형이 나타난 균주들의 가계도 및 정상 갈변과 갈변 이상을 나타낸 사진이다.
- 도 2는 표고버섯 갈변 이상 변이를 가지고 있는 단핵균주 P37-5의 전장유전체 분석결과 및 SNP 분석 결과를 나타낸 도면이다:
synonymous SNP와 12개의 missense SNP가 존재.
- 도 3은 표고버섯 품종 참아람의 가계분석을 통하여 동정된 유전자 ABL(Abnormal Browning related Light)를 확인한 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 4는 ABL 유전자의 마커 서열인 RL-LE-178의 염기서열(서열번호 4)을 나타낸 도면이다.
- 도 5는 본 발명의 CAPS 마커를 이용하여 표고버섯 갈변 이상 품종을 판별한 결과를 나타낸 도이다:
표고버섯 품종 산조 108호, 산조 701호, 산조 705호, 산조 708호, 참아람, 산조 713호, 산마루 1호.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0027] 본 발명은 표고버섯 품종에서 배양기간 중 배지표면 갈변의 이상 현상을 판별하고자 표고버섯 품종 참아람의 가계분석을 통하여 동정된 유전자 ABL(Abnormal Browning related Light)과 이 유전자의 변이인 18개의 synonymous SNP, 12개의 missense SNP, ABL 유전자의 마커 서열인 RL-LE-178을 중합효소 연쇄 반응(PCR)으로 증폭시킬 수 있는 프라이머 서열, 상기 마커 서열과 그 프라이머 서열, 및 제한효소 BsaJI을 이용한 CAPS 마커로 상기 현상을 쉽고 빠르게 확인하는 방법에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명은 서열번호 3의 115번째 뉴클레오타이드 위치에 아데닌(adenine, A)을 가지는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism) 부위를 포함하는 10-100개의 연속 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 결합하는 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머 세트를 포함하는 표고버섯 갈변 이상 품종 판별용 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 서열번호 3은 표고 균주 P37-5의 ABL 서열이고, 서열번호 4는 표고 균주 B17의 ABL 서열이며, 두 서

열을 비교하였을 때 서열번호 3의 115번째 뉴클레오타이드 위치에 아데닌(A)으로 변이가 일어난 것을 확인하여 이 부분을 구별하는 CAPS 마커를 제작하였다(도 2 참조).

- [0030] 또한, 본 발명은 상기 조성물, 제한효소, 및 증폭반응수행시약을 포함하는 표고버섯 갈변 이상 품종 관별용 키트를 제공한다.
- [0031] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 제한효소는 BsaJI일 수 있다.
- [0032] 본 명세서에서 용어, “뉴클레오타이드”는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드이며, 다르게 특별하게 언급되어 있지 않은 한 자연의 뉴클레오타이드의 유사체를 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990))
- [0033] 본 명세서에서, 용어 “단일염기다형성(SNP)”은 게놈에서 단일염기(A, T, C 또는 G)가 종의 멤버들 간 또는 한 개체(individual)의 쌍 염색체 간에 다른 경우에 발생하는 DNA 서열의 다양성을 의미한다. 단일염기는 폴리뉴클레오타이드 서열에 변화(대체), 제거(결실) 또는 첨가(삽입)될 수 있다. SNP는 번역 프레임의 변화를 유발할 수 있다. 단일염기다형성은 유전자의 코딩 서열, 유전자의 비-코딩 부위 또는 유전자 사이의 내부 지역(intergenic regions)에 포함될 수 있다. 유전자의 코딩 서열 내의 SNP는 유전암호의 중복성(degeneracy)으로 인해 반드시 타겟 단백질의 아미노산 서열 상에 변화를 일으키지는 않는다. 동일한 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP는 동의적(synonymous)이라 하고(침묵 돌연변이라고도 불림), 다른 폴리펩타이드 서열을 형성하는 SNP의 경우 비-동의적(non-synonymous)이라고 한다. 비-동의적 SNP는 미스센스 또는 넌센스일 수 있으며, 미스센스 변화는 다른 아미노산을 발생시키는 반면에 넌센스 변화는 비성숙 종결코돈을 형성한다. 단백질-코딩부위가 아닌 곳에 존재하는 SNP는 유전자 사일런싱, 전사인자 결합 또는 비-코딩 RNA 서열을 유발시킬 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서, 용어 “프라이머”는 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합체의 존재, 그리고 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용할 수 있다. 구체적으로는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드이며 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 또한, 프라이머는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 이용되는 프라이머로서, 상기 SNP를 포함하는 서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 구체적으로는, 본 발명에 이용되는 프로브는 본 발명의 SNP를 포함하는 10-30개의 연속 뉴클레오타이드 잔기를 포함하는 서열에 혼성화 될 수 있는 서열을 포함한다. 보다 구체적으로는, 상기 프로브의 3' -말단 또는 5' -말단은 상기 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 3' -말단 또는 5' -말단에 SNP 염기에 상보적인 염기를 갖는 프로브에서 말단 부분이 혼성화되지 않으면, 이러한 듀플렉스는 엄격한 조건에서 해체될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 키트가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우에는, 본 발명의 키트는 선택적으로 PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대 완충액, DNA 중합효소, DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0037] 본 명세서에서 사용되는 제한효소 자리에 위치하는 SNP를 CAPS 마커라고 한다.
- [0038] 본 발명에 있어서, “CAPS 마커”는 SNP처럼 한 개의 염기서열이 변하거나 InDel에 의해 발생하는 제한효소의 해 잘리는 부위의 변화를 해석할 수 있는 마커이다. CAPS 마커는 유전자좌에 특이적인 프라이머로 PCR 증폭을 한 후 제한효소로 잘라준 뒤 나타나는 다형성을 분석하는 방법이다.
- [0040] 또한, 본 발명은 다음의 단계를 표고버섯 갈변 이상 품종의 감별 방법:
- [0041] (a) 표고버섯으로부터 핵산분자를 분리하는 단계;
- [0042] (b) 상기 핵산분자의 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism, SNP)의 염기 타입을 검출하는 단계로서, 상기 SNP는 서열번호 3의 115번째 뉴클레오타이드 위치에 존재하는 SNP인 단계; 및
- [0043] (c) 상기 검출한 SNP 위치의 염기 타입으로부터 표고버섯 갈변 이상 품종을 감별하는 단계로, 상기 SNP 위치의

염기가 아데닌(adenine, A)인 경우에 표고버섯 갈변 이상 품종 산조 708호 또는 참아람으로 판정한다.

[0044] 또한, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 표고버섯 갈변 이상 품종의 감별 방법:

[0045] (a) 표고버섯으로부터 핵산 분자를 분리하는 단계;

[0046] (b) 상기 핵산 분자를 주형으로 사용하고, 서열번호 1 및 2의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지는 프라이머 세트를 사용하여 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction)을 실시하는 단계;

[0047] (c) 상기 중합효소연쇄반응의 증폭산물을 서열번호 3의 115번째 뉴클레오타이드를 포함하는 4-20개의 연속 뉴클레오타이드 서열을 인식하는 제한효소 처리하는 단계; 및

[0048] (d) 단계 (c)의 결과물을 분석하는 단계로, 상기 결과물이 제한효소에 의해 143 bp의 단편이 나타나면 표고버섯 갈변 이상 품종 산조 708호 또는 참아람으로 판정한다.

[0049] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 제한효소는 BsaJI일 수 있다.

[0050] 본 발명의 방법은 상기 조성물/키트와 동일한 방식, 프라이머 및/또는 제한효소를 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0052] <실시예 1> 표고버섯의 갈변 이상 분석

[0053] 표고의 톱밥재배는 균사의 영양생장이 일어나는 일정 기간의 암배양, 명배양 과정, 그리고 자실체를 형성하는 생식생장기(reproductive stage)를 포함한다. 암배양에서 명배양을 거치는 동안 균사체 표면에 빛 자극에 의한 갈변층이 형성된다. 참아람의 경우 암배양 기간 동안 균사체가 빛에 노출되면 어두운 노란색을 띠는 이상 갈변층을 형성한다. 표고의 톱밥재배에서 균사의 갈변층은 톱밥배지의 수분유지 및 여러 병원성 인자에 대한 물리적인 1차 방어선 역할을 한다. 이상 갈변층의 표면에서는 자실체가 발생하지 않기 때문에, 자실체 생산량의 감소를 초래하게 된다.

[0054] 참아람은 정상 갈변을 보이는 산조 701호의 포자로부터 제작된 단핵균주 산조 701호-51와 갈변 이상의 표현형을 가지고 있는 단핵균주 P37-5의 교잡으로 개발되었으며, 톱밥배양 시 빛의 소개로 인하여 갈변 이상의 표현형을 가지고 있다. 이 참아람에서 포자를 받아 단핵균주를 제작하여 자간교배하여 제작한 균주 중 정상 갈변의 표현형을 가진 산조 713호가 개발되었다. 따라서 빛의 소개로 인한 갈변 이상 현상을 우성임을 확인할 수 있었다.

[0055] 톱밥 배지의 정상 갈변 그리고 갈변 이상의 표현형과 이 표현형이 나타난 균주들의 가계도를 나타내었다(도 1).

[0057] <실시예 2> 표고버섯의 갈변 이상을 일으키는 유전자 분리 및 SNP 분석

[0058] 표고버섯에서 갈변 이상의 변이를 가지고 있는 단핵균주 P37-5에서 Genomic DNA를 추출하여 전장유전체를 분석하였고, 표고버섯의 표준유전체 균주인 B17과 비교하여 갈변 이상 현상을 일으키는 1002bp 크기의 유전자를 동정하였으며, 이 유전자는 ABL(Abnormal Browning related Light)이라 명명하였다. 그리고 B17과 P37-5균주에서 각각 증폭한 ABL 유전자의 서열을 sanger sequencing한 결과를 alignment하여 비교함으로써 ABL 유전자 내의 SNP를 분석하였다.

[0059] 구체적으로, ABL 유전자의 DNA 추출방법은 다음과 같다. PDB 배지에서 배양한 표고버섯 균사체를 미라클로스에 여과시킨 후 PBS 버퍼(NaCl 135mM, KCl 2.7mM, Na₂HPO₄ 4.3mM, KH₂PO₄ 1.4mM)를 부어 씻어내고 키친타올로 물기를 제거한다. 건조된 균사를 액체질소에 얼려 막사사발로 곱게 갈은 후 GeneA11® GenEx™ Plant kit를 이용해 Genomic DNA를 추출하였다. 튜브에 옮겨 담은 균사에 PL버퍼 500ul를 넣고 65℃에서 10분간 가열해준 후 파이펫을 이용해 잘 섞어준다. 13000rpm으로 1분간 원심분리한 후 상층액을 분리하여 새 튜브로 옮겨준 후 PP 버퍼를 상층액의 1/3만큼 넣고 볼텍서를 이용해 잘 섞어준다. 얼음에서 5분간 방치 후 13000rpm으로 5분간 원심분리한다. 상층액을 분리하여 새 튜브로 옮기고 동량의 PCI(phenol : Chloroform : isoamylalcohol = 25 : 24 : 1)를 넣어준 후 뒤집어 섞어준다. 13000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 분리하여 새 튜브에 옮기고, 동량의 isopropanol을 넣어준 후 뒤집어 섞어 준다. 얼음에 10분간 방치 후 13000rpm에서 1분간 원심분리한다. 상층액을 제거한 후 70% 에탄올 1ml를 넣어 DNA 펠렛을 살짝 띄우고 13000rpm에서 1분간 원심분리한다. 상층액을 제거한 후 13000rpm에서 1분간 한 번 더 원심분리한다. 남은 에탄올을 전부 제거하고 DNA 펠렛을 상온에서 5분간 건조시킨 후, RE버퍼 100ul를 넣어 DNA 펠렛을 녹인다.

[0060] 그 결과, ABL 유전자에는 18개의 synonymous SNP와 12개의 missense SNP가 존재하고 있는 것을 확인하였다(도 2)

[0062] <실시예 3> ABL 유전자 분석

[0063] 이 부위가 유전자임을 확인하기 위하여 갈변 이상이 보이는 배지표면에서 시료를 채취하여 RNA를 추출하고, 이 RNA로부터 cDNA를 합성하여 PCR을 하였을 때 증폭이 되어 유전자임을 확인하였다.

[0065] <실시예 4> ABL 유전자 내 마커 분석

[0066] 표고버섯 품종 중 배양기간 중 배지표면의 갈변에 이상 현상을 보이는 품종에서 증폭되는 ABL 유전자 내 마커 염기서열을 나타낸 것이다(도 4). 표고버섯의 계능 서열에서 배양기간 중 배지표면 갈변에 이상 현상을 보이는 특이적인 변이가 생긴 염기서열을 찾았고, 이를 이용하여 프라이머를 제작하여 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

이름	서열번호	서열
RL-LE-178 F	1	TCGGTCGGGATCTTTATCGT
RL-LE-178 R	2	AACAGCCGGTGTCTCGATAT

[0070] <실시예 5> ABL 유전자의 변이를 구별하는 CAPS 마커를 이용한 갈변의 이상 현상을 보이는 표고버섯 분석

[0071] 상기 표 1의 프라이머 서열을 이용하여 PCR을 수행하고 제한효소 BsaJI을 이용하여 구분한 결과이다. 배양기간 중 배지 표면에 정상적인 갈변 현상을 보이는 표고버섯 품종 산조 108호, 산조 701호, 산조 705호, 산조 713호, 산마루 1호, 그리고 갈변의 이상 현상을 보이는 산조 708호와 참아람에서 Genomic DNA를 추출하여 20 ng의 DNA를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0072] 구체적으로, PCR은 95℃에서 3분, 다시 95℃에서 30초, 56℃에서 30초, 72℃에서 20초로 35 사이클을 증폭한 후, 추가로 72℃에서 5분간 반응시킴으로써 수행되었다. 제한효소 BsaJI에 의하여 배양기간 중 배지표면 갈변에 이상 현상을 보이는 산조 708호와 참아람이 다른 품종들과 구분되는 것을 확인할 수 있었다.

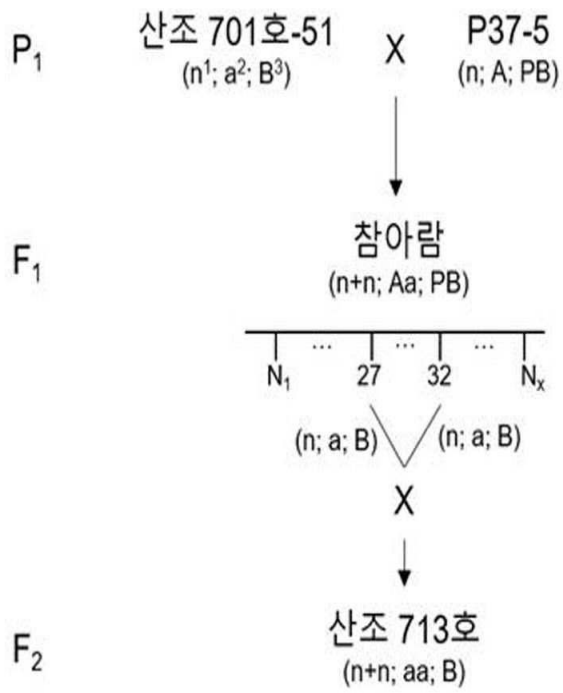
[0073] 그 결과, 표고버섯 품종 중 갈변에 이상을 보이는 품종 산조 708호와 참아람은 마커서열 RL-LE-178에 제한효소 BsaJI를 처리하였을 때, 143 bp의 단편이 나타나, 정상적인 갈변 현상을 보이는 산조 108호, 산조 701호, 산조 705호, 산조 713호 그리고 산마루 1호와 구분되었다(도 5).

[0075] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 구체적인 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다.

[0076] 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



정상 갈변 (B)



갈변 이상 (PB)

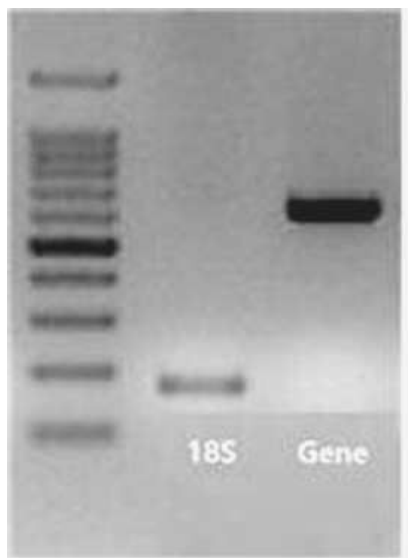
¹ Monokaryon (n), dikaryon (n+n)
² 유전자형
³ 배지표면 표현형 : 정상 갈변 (B), 갈변 이상 (PB)

도면2

```

B17      ATGACTTTTGGTCCCTG TCTCGGTTCGGGATCTTTA TCGTCG TATCATCGTTA TGGACCATC
P37-E    ATGACTTTTGGTCCCTG TCTCGGTTCGGGATCTTTA TCGTCG TATCATCGTTA TGGACCATC
*****
B17      GGCACCTCCA AACCACA ACGAGAACCTTCGCCTCCA CCACCACACTCCTCCTTG CCG CCAGGA
P37-E    GGCACCTCC TACCACA ACGAGAACCTTCGCCTCCA CCACCACACTCCTCCTTG CCG CCAGGA
*****
B17      TCG ACTTTCCTCCGCC TCCGCATCCGC STCCAAC CACACCCCCCGGCTCTG CAAGAAGAA
P37-E    TCG ACTTTCCTCCGCC TCCGCATCCGC STCCAAC CACACCCCCCGGCTCTG CAAGAAGAA
*****
B17      AAAACCCGAGCC ATAC TACGCTGACGACTCGTAC AAAGACCCCGCC TCCGCCG GCACACGT C
P37-E    AAAACCCGAGCC TTAC TACGCTGACGACTCGTAC AAAGACCCCGCC CCCGCCG GCACACGT G
*****
B17      CTC CTT SAGITTT GGAGTGAAGATTAGAGAT TTCGCCGATGAGAAGGGC GGGGTGGAG
P37-E    CTC CTT SAGITTT GGAGTGAAGATTAGAGAT TTCGCCGATGAGAAGGGC GGGGTGGAG
*****
B17      GTGAGGAGGGGTG AAG AAGTACGTGAGGCCAGAG GGACAGGGAAATAGGGAGG AGAAGAGAA
P37-E    GTGAGGAGGGGTG AAG AAGTACGTGAGGCCAGAG GGACAGGGAAATAGGGAGG AGAAGAGAA
*****
B17      CCGGTGTTGGTGCAG AGACAACCCGACCCCGCCG GGGCAGAGGGGGTGGATG TGGGGTGTG
P37-E    CCGGTGTTGGTGCAG AGACAACCCGACCCCGCCG GGGCAGAGGGGGTGGATG TGGGGTGTG
*****
B17      GGTGTGGGTG SGGT CGGGTGGGG STT TGAG AATGCAGAAGCTTTCGACA TC TAGTGGG
P37-E    GGTGTGGGTG SGGT CGGGTGGGG STT TGAG AATGCAGAAGCTTTCGACA TC TAGTGGG
*****
B17      TTAACTCGCCAGAGAGTGGTTTCAGGATATCGAG GATTTGGAGTTCCATTCC CAGTCACAG
P37-E    TTAACTCGCCAGAGAGTGGTTTCAGGATATCGAG GATTTGGAGTTCCATTCC CAGTCACAG
*****
B17      TCACAG TCA ACAATCT CAATC ACAATCCAGCCG CAGTCGTTACCGGCC TTC GAACACATA
P37-E    TCACAG TCA ACAATCT CAATC ACAATCCAGCCG CAGTCGTTACCGGCC TTC GAACACATA
*****
B17      SCGTTCTCAGA STCAGATGGTGAGCCGTATATC GAGACACCCGGCTGTTACC CCGAATGGG
P37-E    SCGTTCTCAGA STCAGATGGTGAGCCGTATATC GAGACACCCGGCTGTTACC CCGAATGGG
*****
B17      TCCTTACAGTGG AAG ACGGAC TACGGCAGAGGAA GAGTTGACTCTTCCITCA TTACACAA S
P37-E    TCCTTACAGTGG AAG ACGGAC CACGGCAGAGGAA GAGTTGACTCTTCCITCA TTACACAA T
*****
B17      CTCCTTTCCTCAAAG CGAGCATTCCACCCAGAC GACGA-----GCAGGCAC
P37-E    CTCCTTTCCTCAAAG CGAGCATTCCACCCAGAC GACGA-----GCAGGCAC
*****
B17      CACACTACTCCTCCA CAGCCCCCAACCAAGAAA CAGGGCGTGGTCTCTCCA ATCAAAGCC
P37-E    CACACTACTCCTCCA CAGCCCCCAACCAAGAAA CAGGGCGTGGTCTCTCCA ATCAAAGCC
*****
B17      TACAACCTCCGGGAA CGACGTCCACCC SCAACC AC S-----CTC TTACC SCC
P37-E    TACAACCTCCGGGAA CGACGTCCACCC SCAACC AC S-----CTC TTACC SCC
*****
B17      TCACG SCTGAGAAAC AT SCTCTCCGGT SAATCT TCGCAGTCTCAGCTGTCC ACCGGGGCC
P37-E    TCACG SCTGAGAAAC AT SCTCTCCGGT SAATCT TCGCAGTCTCAGCTGTCC ACCGGGGCC
*****
B17      AAAGGGAGACG AAAA GGAAAGGGCAGGACTACG AGGGTTTGA
P37-E    AAAGGGAGACG AAAA GGAAAGGGCAGGACTACG AGGGTTTGA
*****
S : synonymous SNP
S : missense SNP
    
```

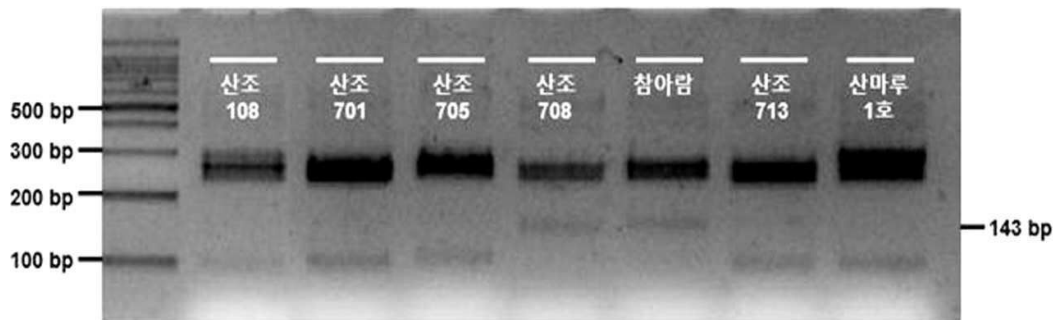
도면3



도면4

TCGGTCGGGATCTTTATCGTCTATATCATCGTTATCGACCATCGCCACTCCAACCACAACGAGAACTTCGCCTCCAC
 CACCACACTCCTCCTTGCCC---C---CAGGATGTACTTCTCCGCCCTCCGCATCCGCCTCCAACCACACCCCCGGC
 CTCTGCAAGAAGAAAAACCGAGCCATACTACGCTGACGACTCGTACAAAGACCCGCCTCCGCCGGCACACGTC
 CTCGCTTCGGAGTTTGGAGTGAAGATTAGAGATTTCCGCTATGAGAAGGGCGGGGTGGAGGTGAGGAGGGTGAA
 GAAgtactgtgagccagaggacaggaataggaggagaagagaaccggtgtggtgcagAGACAACCGACGCCCGGGGCA
 GAGGGGTGGATGTGGGGTGTGGGTGTGGGTGGGGTGGGTGGGGTTATGAGAATGCAGAAGCTTCGACATCT
 AGTGGGTTAACTCGCCAGAGAGTGGTTCAGGATATCGAGGATTTGGAGTTCATTCCAGTCACAGTCACAGTCAC
 AATCTCAATCTCAATCCCAGCCGAGTCGTTACCGCCCTTCGAACACATAACGTTCTCAGACTCAGATGGTGAGCC
 GTATATCGAGACACCGGCTGT (629 bp)

도면5



서열 목록

- <110> Chungbuk National University Industry-Academic Cooperation Foundation
- <120> Development of CAPS marker for discrimination of ABL and its mutation for mycelial browning and use thereof
- <130> PN1902-079
- <160> 4
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> RL-LE-178 Forward primer
- <400> 1
- tcggtcggga tctttatcgt 20
- <210> 2
- <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RL-LE-178 Reverse primer

<400> 2

aacagccggt gtctcgatat 20

<210> 3

<211> 1002

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Lentinula edodes

<400> 3

atgactttgg tcctgtctcg gtcgggatct ttatcgtcgt tatcatcggt atcgaccatc 60

gccactccta ccacaacgag aacttcgctt ccaccaccac actcctcctt gcccacagga 120

tgcaattcct ccgctcgcgc atccgcatcc aaccacaccc cccggcctct gcaagaagaa 180

aaaaccgagc cttactacgc tgacgactcg tacaagacc cgccccgcc ggcacacgtg 240

ctcactgggg agtttggagt gaagattaga gatttcgctg atgagaaggg cggggtggag 300

gtgaggaggg tgaagaagta cgtgaggcca gagggacagg gaataggag gagaagagaa 360

ccggtgttgg tgcagagaca accgacgccg ccggggcaga gggggtggat gtggggtgtg 420

ggtgtgggtg tgggtggggg tggggctgtg gagaatgcag aagcttcgac atccagtggg 480

ttaactgcc agagagtggg tcaggatata gaggatttgg agttccattc ccagtcacag 540

tcacaatctc aatctcaatc acaatcccag ccgcatcgt taccgccctt cgaacacata 600

tcgttctcag aatcagatgg tgagccgtat atcgagacac cggctgttac cccgaatggg 660

tccttacagt ggaagacgac cacggcagag gaagagtga ctcttccttc attacacaat 720

ctccttctct caaagcgagc attccacca gacgacgacg acgaggacga cgagcagcac 780

cacactactc ctccacagcc cccaaccaag aaacagcgcg tcgtctctcc aatcaaacgc 840

tacaactcgc gcgaacgacg tccaccgcc accaccacca ccaccagct cttaccgccc 900

tcacgcctga gaaacatcct ctccgtgcaa tcttcgagc ctcagctgtc gacggggccc 960

aaaggagac gaaaaggaaa ggcgaggact acgagggttt ga 1002

<210> 4

<211> 975

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Lentinula edodes

<400> 4

atgactttgg tctgtctcg gtcgggatct ttatcgtcta tatcatcgtt atcgaccatc	60
gccactccaa ccacaacgag aacttcgctt ccaccaccac actcctcctt gccccagga	120
tgtacttctt ccgcctccgc atccgcctcc aaccacacce cccggcctct gcaagaagaa	180
aaaaccgagc catactacgc tgacgactcg tacaaagacc cgcctccgcc ggcacacgtc	240
ctcgcttcgg agtttgagtg gaagattaga gatttcgctt atgagaaggg cgggggtggag	300
gtgaggaggg tgaagaagta cgtgaggcca gagggacagg gaataggag gagaaagaa	360
ccggtgttgg tgcagagaca accgacgccg ccggggcaga ggggggtggat gtgggggtgtg	420
ggtgtgggtg ggggtgtggg tgggggttat gagaatgcag aagcttcgac atctagtggg	480
ttaactcgcc agagagtggg tcaggatata gaggatttgg agttccattc ccagtcacag	540
tcacagtcac aatctcaatc tcaatcccag ccgcagtcgt taccgccctt cgaacacata	600
acgttctcag actcagatgg tgagccgtat atcgagacac cggtctgttac cccgaatggg	660
tccttacagt ggaagacgac tacggcagag gaagagtga ctcttccttc attacacaac	720
ctccttctt caaagcgagc attccacca gacgacgagc agcaccacac tactcctcca	780
cagcccccaa ccaagaaaca gcgcgtcgtc tctccaatca aacgtataaa cctccgcgaa	840
cgacgtccac ccaccaccac tctcttacc ccttcacgtc tgagaaacat tctctccgtg	900
gaatcttcgc agtctcagct gtcgacgggg ccgaaagga gacgaaaagg aaaggcgagg	960
actacgaggg ttgga	975