

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【참조번호】	PN200375
【출원구분】	특허출원
【출원인】	
【명칭】	경북대학교 산학협력단
【특허고객번호】	2-2004-001684-4
【대리인】	
【명칭】	특허법인피씨알
【대리인번호】	9-2014-100081-1
【지정된변리사】	박혜숙, 조희래, 박혁
【포괄위임등록번호】	2017-074508-5
【발명의 국문명칭】	왕지네 원산지 구별을 위한 미토콘드리아 DNA 마커 세트
【발명의 영문명칭】	MITOCHONDRIA DNA MARKER SET FOR ORIGIN IDENTIFICATION OF SCOLOPENDRA SUBSPINIPES MUTILAN
【발명자】	
【성명】	황의욱
【성명의 영문표기】	HWANG, Ui Wook
【주민등록번호】	681205-1XXXXXX
【우편번호】	42107
【주소】	대구광역시 수성구 범어로 13, 경남타운 8동 402호
【발명자】	

【성명】 백수연

【성명의 영문표기】 BAEK, Su Youn

【주민등록번호】 730219-2XXXXXX

【우편번호】 42078

【주소】 대구광역시 수성구 달구벌대로522길 33, 101동 302호

【발명자】

【성명】 최은화

【성명의 영문표기】 CHOI, Eun Hwa

【주민등록번호】 820320-2XXXXXX

【우편번호】 41203

【주소】 대구광역시 동구 신암로16길 25, 107동 2003호

【출원언어】 국어

【임시 명세서(청구범위제출유예)] 제출

【핵산염기 서열목록 또는 아미노산 서열목록】

【서열개수】 13

【서열목록 전자파일】 미첨부

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1711120241

【과제번호】 관리-1

【부처명】 과학기술정보통신부

【과제관리(전문)기관명】 (재단)과학기술일자리진흥원

【연구사업명】 지역연구개발혁신지원(R&D)

【연구과제명】 지역산업연계 대학 Open-Lab 육성지원 사업

【기여율】 80/100

【과제수행기관명】 경북대학교 산학협력단

【연구기간】 2020.03.01 ~ 2020.12.31

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1711115107

【과제번호】 2020R1A2C1011010

【부처명】 과학기술정보통신부

【과제관리(전문)기관명】 한국연구재단

【연구사업명】 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

【연구과제명】 주요 약용 절지동물 자원들의 유전체학적 분석 및 계통적
기원 탐색

【기여율】 20/100

【과제수행기관명】 경북대학교

【연구기간】 2020.03.01 ~ 2021.02.28

【취지】 위와 같이 특허청장에게 제출합니다.

대리인 특허법인피씨알

(서명 또는 인)

【수수료】

【출원료】 0 면 56,000 원

【가산출원료】 1 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】	0	항	0	원
【합계】	56,000			원
【감면사유】	전담조직(50%감면)[1], 특별재난지역 출원인 등(30% 감면)[1]			
【감면후 수수료】	19,600			원

【임시명세서】

[임시 명세서 파일 첨부\(PN200375 임시명세서.HWP\)](#)

왕지네 원산지 구별을 위한 미토콘드리아 DNA 바코드

○ 연구 개요

본 발명은 분자마커를 이용하여 주요약용 절지동물인 왕지네의 원산지를 판별하는 방법에 관한 것으로, 상세하게는 미토콘드리아 유전체 내의 원산지별 왕지네 개체의 특이적인 서열을 확인함으로써 위품종을 판별할 수 있는 판별방법에 관한 것이다. 개발된 원산지별 특이서열은 한국 전통 의학에 맞춘 왕지네의 명확한 분류학적 기준 설정하고, 성분 및 효과 등의 차이 비교와 타국 기원종과의 진화적 근연 관계 확립하여 한국 자생 약용 생물자원의 효율적 보전 전략수립에 유용하게 사용될 수 있다.

○ 연구 배경

약제 및 식용으로 사용되는 다양한 유용 절지동물류는 가공 후 유통되기 때문에 근연종 혹은 위품종의 무분별한 사용이 우려되며 이에 정밀한 유전(체)학적 감별법 확립이 요구되는 실정이다. 한국, 중국, 일본의 공정서에서는 동일 품목 생약으로 규정하지만 기원종이 다른 경우가 많아 한국 전통 의학에 맞춘 명확한 분류학적 기준 설정이 절실하며, 성분 및 효과 등의 차이 비교와 타국 기원종과의 진화적 근연 관계 확립이 요구되며 국내 유통 생약의 경우 동일 품목명에 해당하는 종이 여러 개에 해당하는 경우도 있어 이에 대한 정확한 기준이 필요하다. 국가 공정서의 다양한 기원종, 근연종, 위품종들 간 진화적 계통 유연관계 확립이 요구되며 비교유전체학(comparative genomics)적 방법론을 이용하여 이들 간 성분 약효의 차이에 대한 기원 및 생물학적 원인 규명이 필요하다.

현재까지 동물 기원 한약재 감별을 위해서 활용될 수 있는 유전 정보는 거의 전무한 실정이며 따라서 최신 유전자 분석 기법인 대용량 유전체 분석기술을 접목한 유전체 연구와 이에 기반을 둔 유전학적 감별방법(Super-DNA-Barcode)의 개발이 필요하다.

▶ 오공(蜈蚣; 왕지네; *Scolopendra subspinipes mutilans*)

- 왕지네는 절지동물문(Arthropoda), 순각강(또는 지네강, Chilopoda), 왕지네목(Oligostigmata 혹은 Scolopendromorpha), 왕지네과(Scolopendridae)에 속하며, 국내산 지네강은 총 4목, 9과 44종이 있으나, 전 세계적으로는 8,000종이 넘는다.

- 왕지네는 예로부터 “오공(蜈蚣)”이라 한방에서 중풍, 관절염 등 민간약제로 이용 되었으며 현재에도 한약재로 가장 많이 활용되고 있다.
 - 민간요법: ‘오공’이라 하여 한방에서 중풍, 해독, 파상풍 등에 주로 이용
 - 동의보감: 중풍, 경간, 관절염, 림프선염, 암종 등에 효과가 있음
 - 대한물리치료학회지: 왕지네 독이 근육통의 통증을 감소시킴
- 한국과 북한, 중국의 공정서에 오공의 기원종이 소개되어 있으며 모두 왕지네(*S. s. mutilans*)로 기재되어 있다. 하지만 전문 분류학적 종 판별과 검증이 이루어진 기록은 없으며, 중국과 북한의 오공이 한국의 왕지네와 동일종인지도 아직 확실히 알 수 없다.
- 왕지네는 국내산이 훨씬 높은 상품 가치를 가지는 것으로 알려져 있으나 최근 중국산 지네 국내 수입량이 지속적으로 증가되고 있음
 - 8,005kg(약 110만 마리)/2009년,
 - 8,824kg/2010년(한국의약품수출입협회, 2011.12.5.)
 - 서울시약령시 건조지네 판매 가격 현황(50마리 기준):
괴산산(150,000원), 제주산(40,000원), 북한산(20,000~25,000원), 중국산(15,000~20,000원)

▶ 한반도 자생 생약자원 연구의 필요성

- 유전자원 접근과 발생 이익 공유(ABS: Access to genetic resources and Benefit-Sharing)에 관한 나고야 의정서 등 생물자원의 이용을 둘러싼 국제협약 발효 이후 해외 약용 자원 활용에 제약이 발생하며 국내 약용 자원의 활용가치가 증가할 것으로 예상된다. 우리 고유 생물자원-생약자원의 유전(체)학적 자료를 축적함으로써 분류학적 기원을 명확히 하고 이를 통한 생물자원의 주권을 확보해야 한다.
- 곤충자원 연구의 필요성
 - 동서양을 막론하고 절지동물의 가장 큰 부분을 차지하는 곤충은 고대부터 식용 및 약용으로 활용되어 온 천연자원으로 미래의 식량 및 약용 신물질 자원으로 활용하려는 시도는 이미 세계적인 흐름이다.
 - 선진국을 중심으로 국가 간 생물자원 확보차원에서 곤충자원 확보경쟁이 치열하며, 곤충의 활용범위는 무척 넓고 다양해서 의약, 애완, 관광, 화분매개, 환경정화, 식품, 사료, 화장품 등 유용소재 및 수출산업으로 부상할 수 있다. 따라서, 새로운 형태의 자원으로 기존 기술과의 접목을 통한 융합연구로 새로운 산업분야 창출의 돌파구를 마련할 수 있다고 판단

되며, 전 세계적으로도 초기 단계인 만큼 곤충산업의 조기정착 및 유용곤충 산업화 방안을 모색하는 것은 무척 중요하며 시의적절하다고 할 수 있다.

○ 연구 방법

본 발명에 따른 왕지네(*Scolopendra subspinipes mutilans*)의 원산지를 구별하기 위한 미토콘드리아 유전체 내 염기서열 분석은 아래와 같이 이루어진다.

(1) 표본확보

지역별(중국, 일본, 안마도, 괴산, 사천, 진도, 제주)시료를 채집 또는 구입을 통해 확보하였다.

(2) DNA 시료추출 및 genomic library 구축

NucleoSpin Plant II(Macherey-Nagel)를 이용하여 각 시료로부터 total genomic DNA를 추출 및 정제하였다. 추출 및 정제된 시료 별 DNA 상태는 전기영동으로 확인하였고, DNA 양은 Qubit dsDNA BR Assay Kit (invitrogen)를 이용하여 측정하였다. NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB)을 이용하여 각 시료별로 NGS 분석 라이브러리를 제작하였다. 시료별로 구분되는 색인 어댑터를 사용하였고, 세부적인 라이브러리 제작과정은 제품 매뉴얼을 따랐다. 제작된 각 라이브러리는 TapeStation HSD5000 (Agilent)을 이용하여 상태를 분석하고 NGS 분석 적합성을 판정하였다.

(4) NGS를 이용한 Genome 서열해독 및 생물정보학적 분석 수행

NGS를 이용한 대량의 유전체 염기서열 데이터 생산은 Illumina platform (HiSeq 2500 & NovaSeq)을 이용하였고 분석 리드 형태와 길이는 Pair-end, 151 방식으로 분석하였다. 시료 당 NGS 분석 데이터 확보 목표량은 1 Gb이며, 1 차 분석 결과 데이터 량이 부족하거나 미토콘드리아 유전체 조립이 어려운 경우 추가 분석을 시행하여 충분한 양의 NGS raw 데이터를 확보하였다.

(5) 미토콘드리아 유전체서열의 어셈블리 수행

정리된 미토콘드리아 유전체는 MITObim v1.9.1을 이용하여 반복적으로

reading하여 mapping을 재구성하였다. 미토콘드리아 유전체를 assembly 한 후, Bowtie2를 이용하여 짧은 reads 들을 remapping 하였고, assembled된 미토콘드리아 시퀀스의 에러를 감소시키기 위해 GATK를 사용하였다. 그리고 manual curation을 수행하였다. 마지막으로, 미토콘드리아 유전체의 단백질 암호화 유전자와 tRNA, rRNA의 Annotation은 MITOS 웹 서버를 이용하여 수행하였다.

(6) 유사분류군 유전체 서열과 비교

유전체 서열의 어셈블리 수행 후 BLAST 미토콘드리아 유전체서열의 추출 및 어셈블리 수행(이미 연구된 미토콘드리아 유전체서열(MN317490)을 이용하여 raw data에서의 미토콘드리아 유전체서열의 분포를 추정)을 통한 contig 및 scaffold 작성하였다.

(7) 집단/원산지 구별용 유전자 표지개발

집단간 미토콘드리아 유전체 서열 간 다양성 정보의 비교분석을 통한 마커 개발하였다.

○ 연구 결과

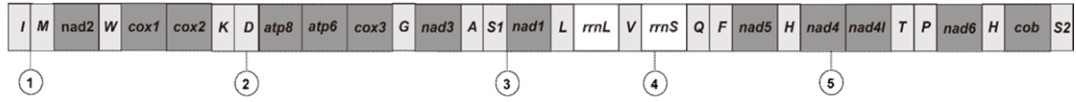
도면 1(A)는 왕지네의 미토콘드리아 유전자 배열도이며, 본 연구에서 개발한 DNA 바코드 서열의 위치를 번호로 표시하였다.

도면 1(B)는 원산지별 왕지네 개체의 미토콘드리아 염기서열을 비교하여 특이적인 패턴을 나타내는 서열들이다. (Anma; 한국 안마도, Jeju; 한국 제주도, Jindo; 한국 진도, Goesan; 한국 괴산, Sachun; 한국 사천, China; 중국, Japan; 일본)

도면 2는 각 원산지별 특이적인 패턴의 발현 여부를 표로 정리한 것이다.

도면 1

(A) 황지네(*Scolopendra subspinipes mutilans*) mitochondrial gene order (■; Protein coding regions □; tRNA)



(B)

①	Anma F1	AAATTATTTTATAATA	ATAATA
	Anma F3		
	Anma M1		
	Anma M2		
	Jeju	TAATAATAATAATA	
	Jindo	TAATAATAATAATA	
	Goesan	TAATAATAATAATA	
	Sachun		
	China F1		
	China F3		
	China F4		
	China M1		
	China M5		
	MN317390.1		
	China SM4		
	Japan		
②	Anma F1	TAATAT	ATATATATATA
	Anma F3		
	Anma M1		
	Anma M2		
	Jeju	TTCTATAAATTATTTTAATATATAT	
	Jindo	TTCTATAAATTATTTTAATATATAT	
	Goesan	TTCTATAAATTATTTTAATATATAT	
	Sachun		
	China F1		
	China F3		
	China F4		
	China M1		
	China M5		
	MN317390.1		
	China SM4		
	Japan	TTCTATAAATTATTTTAATATATAT	
③	Anma F1	ATATATATAT	TAATTAATCA
	Anma F3		
	Anma M1		
	Anma M2		
	Jeju	AT	
	Jindo	AT	
	Goesan		
	Sachun		
	China F1		
	China F3		
	China F4		
	China M1		
	China M5		
	MN317390.1		
	China SM4		
	Japan	ATATATATATATAAATAAATAT	
④	Anma F1	CTAAATAACGAGAGTGACGGGCGATGTGTACATACCAACAGTACCTATTCATAAAAA	
	Anma F3		
	Anma M1		
	Anma M2		
	Jeju	A.C.A.T	T.G.A.T
	Jindo	A.C.A.T	T.G.A.T
	Goesan	A.C.A.T	T.G.A.T
	Sachun	A.C.A.T	T.G.A.T
	China F1	A.C.A.T	T.G.A.T
	China F3	A.C.A.T	T.G.A.T
	China F4	A.C.A.T	T.G.A.T
	China M1	A.C.A.T	T.G.A.T
	China M5	A.C.A.T	T.G.A.T
	MN317390.1	A.C.A.T	T.G.A.T
	China SM4	A.C.A.T	T.G.A.T
	Japan	A.C.A.T	T.G.A.T
⑤	Anma F1	AATATATGT	TAATAAAAAAT
	Anma F3		
	Anma M1		
	Anma M2		
	Jeju		
	Jindo		
	Goesan		
	Sachun		
	China F1		
	China F3		
	China F4		
	China M1		
	China M5		
	MN317390.1		
	China SM4	A.ATATATATATATATATATAT	
	Japan		

도면 2

원산지 \ 서열번호	1	2	3	4	5
South Korea					
안마도(Anma)	X	X	X	○	X
괴산	○	○	X	X	X
진도	○	○	X	X	X
제주	○	○	X	X	X
China	X	X	X	X	X
Japan	X	○	○	X	○

서열목록

서열번호 1:

AAATTATTATTTATAATAATAATA

서열번호 2:

AAATTATTATTTATAATATAATAATAATAATAATA

서열번호 3:

TAATATATATATATATATA

서열번호 4:

TAATATTTCTATAAAATTATTATTTAATATATATATATATATATA

서열번호 5:

TAATATTTCTATAAAATTATTATTTATATATATATATATATATA

서열번호 6:

ATATATATATTAATTAATTCA

서열번호 7:

ATATATATATATTAATTAATTCA

서열번호 8:

ATATATATATATATATATATATATAAATAAATATTAATTAATTCA

서열번호 9:

CTAAATAACGAGAGTGACGGGCGATGTGTACATACAACAGTACCTATTCATAAAA

서열번호 10:

CAACAAAATGAGAGTGACGGGCGATGTGTACATACTACAGTAGCAATTCATAATAA

서열번호 11:

CTAAATAACGAGAGTGACGGGCGATGTGTACATACAACAGTAGCTATTCATAAAAA

서열번호 12:

AATATATGTTAATAAAAAATT

서열번호 13:

AATATATATATATATATATATATATATATTAATAAAAAATT