



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0001801
(43) 공개일자 2016년01월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0079143

(22) 출원일자 2014년06월26일

심사청구일자 2014년06월26일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

양덕춘

경기 용인시 기흥구 용구대로 1842, 111동 301호 (보라동, 현대모닝사이드2차아파트)

김연주

경기 화성시 영통로27번길 53, 212동 505호 (반월동, 신영통현대이차아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 17 항

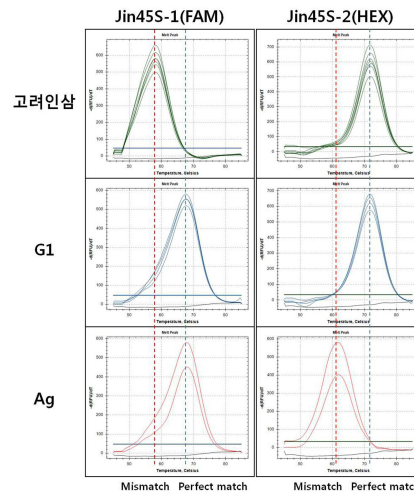
(54) 발명의 명칭 인삼 품종 판별용 PNA 프로브 세트 및 이를 이용한 인삼 품종 판별 방법

(57) 요약

본 발명은 2개의 PNA 프로브로 구성된 인삼 품종 판별용 PNA 프로브 세트 및 표적 유전자를 증폭하기 위한 프라이머에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 PNA 프로브 세트 및 프라이머를 포함하는 인삼 품종 판별용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트, 상기 PNA 프로브 세트 및 프라이머를 사용한 인삼 품종 판별방법 및 인삼 품종 판별용 SNP(single nucleotide polymorphism) 마커에 관한 것이다.

본 발명에 따른 인삼의 45S rRNA 지역의 염기변이 검출용 PNA 프로브와 FMCA방법은 인삼 45S rRNA의 2곳에 해당하는 염기변이를 간단하고 신속하며 정확하게 판별할 수 있는 편리함을 제공하며, 인삼의 G1품종과 고려인삼, 미국인삼의 판별에 유용하다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

권우생

경기 수원시 영통구 권광로260번길 36, 111동 301호 (매탄동, 매탄현대힐스테이트)

김민경

경기 수원시 장안구 수원천로442번길 32, 3층 (연무동)

김유진

경기 수원시 팔달구 권광로317번길 12, 2동 1301호 (인계동, 선경1차아파트)

장규환

경기 안산시 상록구 화랑로 528, 316동 207호 (성포동, 주공3단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	313038-03-1-CG000
부처명	농림수산식품부
연구관리전문기관	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	생명산업기술개발
연구과제명	한국형 토종 미생물을 활용한 고부가가치 제품 개발
기 여 율	1/2
주관기관	경희대학교
연구기간	2013.12.01 ~ 2016.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	PJ00952903
부처명	농림수산식품부
연구관리전문기관	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린
연구과제명	Probiotic(LAB)을 이용한 신규 유용사포닌의 합성 및 핵심 GT유전자 pool구축
기 여 율	1/2
주관기관	경희대학교
연구기간	2013.02.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(i) 서열번호 2에서 86번째 염기를 포함하는 10 내지 30개의 연속적인 염기서열 또는 이의 상보적인 염기서열을 포함하는 PNA 프로브; 및

(ii) 서열번호 2에서 205번째 염기를 포함하는 10 내지 30개의 연속적인 염기서열 또는 이의 상보적인 염기서열을 포함하는 PNA 프로브로 구성된, 인삼 품종 판별용 PNA 프로브 세트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (i)의 PNA 프로브는 서열번호 5의 염기서열 또는 이의 상보적인 염기서열을 포함하고, 상기 (ii)의 PNA 프로브는 서열번호 4의 염기서열 또는 이의 상보적인 염기서열을 포함하는 것인, 인삼 품종 판별용 PNA 프로브 세트.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 PNA 프로브는 형광으로 표지된 것인, 인삼 품종 판별용 PNA 프로브 세트.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 인삼 품종 판별은 인삼의 G1품종, 고려인삼 및 미국인삼의 판별인 것인, 인삼 품종 판별용 PNA 프로브 세트.

청구항 5

서열번호 2에서 86번째 염기 및 205번째 염기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된, 인삼 품종 판별용 프라이머.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 프라이머는 서열번호 6 또는 서열번호 7의 염기서열로 구성되는, 인삼 품종 판별용 프라이머.

청구항 7

제1항의 PNA 프로브 세트를 포함하는 인삼 품종 판별용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 조성물은 제5항의 프라이머를 추가로 포함하는 것인, 인삼 품종 판별용 조성물.

청구항 9

제7항의 조성물을 포함하는 인삼 품종 판별용 키트.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 키트는 제5항의 프라이머를 추가로 포함하는 것인, 인삼 품종 판별용 키트.

청구항 11

(a) 시료로부터 추출된 표적 유전자를 제1항의 PNA 프로브 세트와 혼성화시키는 단계; 및

(b) 상기 혼성화된 산물을 이용하여 서열번호 2에서 86번째 염기 또는 이의 상보적인 염기의 변이; 및 205번째 염기 또는 이의 상보적인 염기의 변이를 검출하는 단계를 포함하는, 인삼 품종 판별방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 (a) 단계는 제5항의 프라이머로 시료로부터 추출된 표적 유전자를 증폭시키는 단계를 더 포함하는 것인, 인삼 품종 판별방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 (b) 단계는 상기 혼성화된 산물을 융해시켜 얻은 융해곡선을 분석하여 상기 염기의 변이를 검출하는 것인, 인삼 품종 판별방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 (b) 단계는 융해곡선에서 표적 유전자가 제1항의 (i)의 PNA 프로브와 퍼펙트 매치(perfect match)를 나타내고, 제1항의 (ii)의 PNA 프로브와 미스 매치(mismatch)를 나타내면 고려인삼으로 판별하는 것인, 인삼 품종 판별방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 (b) 단계는 융해곡선에서 표적 유전자가 제1항의 (i)의 PNA 프로브와 퍼펙트 매치를 나타내고, 제1항의 (ii)의 PNA 프로브와 퍼펙트 매치를 나타내면 G1 품종으로 판별하는 것인, 인삼 품종 판별방법.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 (b) 단계는 용해곡선에서 표적 유전자가 제1항의 (i)의 PNA 프로브와 미스 매치를 나타내고, 제1항의 (i)의 PNA 프로브와 퍼펙트 매치를 나타내면 미국인삼으로 판별하는 것인, 인삼 품종 판별방법.

청구항 17

서열번호 2로 구성된 폴리뉴클레오티드에서, SNP(single nucleotide polymorphism) 위치인 86번째 염기 또는 205번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드로 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 인삼 품종 판별용 SNP 마커.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 2개의 PNA 프로브로 구성된 인삼 품종 판별용 PNA 프로브 세트 및 표적 유전자를 증폭하기 위한 프라이머에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 PNA 프로브 세트 및 프라이머를 포함하는 인삼 품종 판별용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 키트, 상기 PNA 프로브 세트 및 프라이머를 사용한 인삼 품종 판별방법 및 인삼 품종 판별용 SNP(single nucleotide polymorphism) 마커에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

인삼(*Panax ginseng* Meyer)은 동양의 주요 약재 중의 하나로서 피로와 허약함을 개선하기 위한 일차적인 치료제로서 2000년 동안 사용되어 왔다. 한국과 중국 동북부에서 자생하는 이 식물은 일반적으로 고려인삼(Korean ginseng)이라고 불리며 현재 동북아를 중심으로 전세계적으로 재배되고 있다. 인삼의 약리성분은 1854년 서양삼 뿌리에서 일종의 사포닌 혼합물인 무정형 물질을 분리하면서 인삼의 유효성분에 대한 과학적 연구가 시작되었고 인삼의 화학적 활성 성분 연구가 본격적으로 시작된 것은 1957년 소련의 브레이크만(Brekman)에 의해 사포닌 배당체(glycoside)가 인삼의 약효 성분임을 강조함으로써 사포닌에 대한 집중적인 연구가 이루어져 1960년대에 이르러 생화학적 분야에서 많은 연구가 활발히 수행되었다. 대부분의 인삼에서는 진세노사이드(ginsenoside), 다당류(polysaccharides), 펩타이드(peptides), 폴리아세틸렌계 알콜류(polyacetylenic alcohols) 및 지방산류(fatty acids)를 포함하는 다양한 활성성분이 발견된다.

[0003]

고려인삼의 약리학적 효능으로는 뇌기능 개선, 통증 감소 효과, 항종양 활성을 비롯한 암 예방 효과, 면역 기능의 향상, 항당뇨 효과, 간기능 향상, 혈압의 조절, 항피로와 항스트레스 효과, 갱년기 장애와 성기능의 개선, 항산화를 비롯한 항노화 효과 등이 있음이 현대 과학에 의하여 밝혀졌다. 이러한 이유로 고려인삼은 전세계적으로 가장 주목 받는 식물성 치료제가 되었다.

[0004]

인삼은 기원(origin)과 경작(cultivation)에 따라 다양한 이름으로 불린다. 파낙스 속(*Panax* genus)은 17 종(species)으로 구성되며, 이 중 고려인삼(*P. ginseng* C.A.Meyer), 중국삼(*P. notoginseng*) 및 미국삼(*P. quinquefolium*)은 그 약효가 알려져 있다.

[0005]

고려인삼은 크게 세 종류의 계(系)인 자경계, 청경계 및 황숙계로 구분된다. 현재까지 순계 분리육종 방법(pure-line selection method)에 의하여 총 13개 품종이 세 종류의 순계로부터 육성되었고, 자경계는 연풍(Yunpoong), 고평(Gopoong), 선풍(Sunpoong), 선운(Sunwun), 선원(Sunweon), 선향(Sunhyang), K1, G1, 천일, 천녕이며, 청경계는 천풍(Chunpoong), 청선(Chungsun) 그리고 황숙계는 금풍(Gumpoong)이다.

[0006]

G1 품종은 2013년 신품종 등록된 것으로, 진세노사이드를 다량으로 포함하고 있고, 내병성이 우수한 특성을 갖

는다. 그러나 이러한 신제품 인삼의 경우 다른 품종과 섞여서 재배 및 판매되고 있는 실정이다. 따라서 재배 농가와 소비자의 권리를 보호하기 위해서 재배 품종을 확인할 수 있는 방법을 개발할 필요가 있다.

[0007]

또한 인삼의 약학적 요소 및 효과에 대해서는 많은 연구가 진행되고 있으나, 고려인삼의 유전적인 정보에 대한 연구는 거의 없어, 상이한 품종의 식별분자를 만드는데 어려움이 따른다. 현재까지 인삼 품종 선별을 위해 사용되고 있는 분자생물학적 방법으로 RAPD(random amplified polymorphic DNA), ISSR(inter-simple sequence repeats), RFLPs(restriction fragment length polymorphism), SCAR(sequence characterized amplified region), SSCP(single strand conformation polymorphism), AFLP(amplified fragment length polymorphism), DALP(direct amplification of length polymorphism) 및 SSR(simple sequence repeats)을 포함하는, 고려인삼 품종간의 유전학적 다형성(polymorphism)을 규명하기 위한 몇 가지 접근이 시도되었다. 그러나 이러한 방법은 재현성과 신뢰성이 부족하여 단일 품종 확인을 위한 분자 마커(molecular marker)로 개발되어 실용화되지는 못하고 있다.

[0008]

따라서, 품종을 명확히 선별하기 위한 단일 품종별 분자 마커의 개발 및 농가에서 일반품종을 G1 신제품으로 둔갑시켜 고가로 판매하는 시장질서를 어지럽히는 행위를 신속히 방지할 필요성이 절실히 요구되고 있다.

[0009]

PNA는 peptide nucleic acids의 약자로 LNA(Locked nucleic acid), MNA(Morpholino nucleic acid)처럼 유전자 인식 물질의 하나로 인공적으로 합성하며 기본 골격이 폴리아마이드(polyamide)로 구성되어 있다. PNA는 친화도(affinity)와 선택성(selectivity)이 매우 우수하며, 핵산분해효소에 대한 안정성이 높아 현존하는 제한 효소(restriction enzyme)로 분해되지 않는다. 또한 열/화학적으로 물성 및 안정성이 높아 보관이 용이하고 쉽게 분해되지 않는 장점이 있다.

[0010]

DNA-DNA 결합력보다 PNA-DNA 결합력이 매우 우수하여 1개의 뉴클레오타이드(nucleotide) 미스매치(mismatch)에도 10~15℃ 가량 차이가 난다. 이러한 결합력의 차이를 이용하여 SNP(single nucleotide polymorphism) 및 InDel의 뉴클레오타이드의 변화를 탐색할 수 있게 된다.

[0011]

PNA 프로브와 이에 상보적으로 결합하는 DNA의 뉴클레오타이드의 차이에 따라서도 Tm 값의 변화를 나타내어 이를 이용한 개발이 용이하다. PNA 프로브는 TaqMan 프로브의 hydrolysis method와는 다른 hybridization method를 이용하여 분석하며 비슷한 역할을 하는 프로브로는 molecular beacon 프로브, scorpion 프로브가 있다.

[0012]

Hybridization method의 분석 방법으로는 FMCA(Fluorescence Melting Curve Analysis)가 있으며, FMCA는 PCR 반응이 끝나고 난 후 만들어진 산물과 넣어준 프로브간의 결합력의 차이를 용해온도(Melting Temperature, Tm) 값으로 구분하여 분석한다. 다른 SNP 탐색 프로브와는 다르게 프로브 설계가 매우 간편하여 SNP를 포함하는 11~18 개의 염기서열을 이용하여 제작한다. 따라서 원하는 Tm 값을 가지는 프로브를 설계하기 위해서는 PNA 프로브의 길이에 따라 Tm 값을 조절하거나 같은 길이의 PNA 프로브라도 프로브에 변화를 주어 Tm 값을 조절할 수 있다. PNA는 DNA보다 결합력이 우수하여 기본적인 Tm 값이 높기 때문에 DNA보다 짧은 길이로 설계 가능하여 가깝게 이웃한 SNP라도 탐색이 가능하다. 기존의 HRM(High resolution melting) method는 Tm 값의 차이가 약 0.5℃로 매우 작아 추가적인 분석 프로그램이나 세밀한 온도변화가 요구되어 2개 이상의 SNP가 나타날 경우 분석이 어렵게 되는 반면 PNA 프로브는 프로브 염기서열 이외의 SNP에 대해서는 영향을 받지 않아 분석이 가능하다.

[0013]

PNA 프로브를 이용한 SNP 분석을 위해서는 우선 SNP를 포함하는 부분의 염기를 이용한 프로브와 PCR을 위한 Forward/Reverse primer 세트이면 충분하다. PCR 조건은 기존의 사용하던 그대로 사용가능하며 PCR이 끝난 후 용해(melting) 과정이 필요하고 온도가 0.5℃ 증가할 때마다 형광의 세기를 측정하여 Tm 값을 얻는다. 일반적인 real-time PCR 장치는 모두 가지고 있으며 HRM과 같이 부가적인 프로그램 구입이나 세밀한 온도변화를 요구하지 않는 장점이 있다.

[0014] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 인삼의 G1 품종, 고려인삼 및 미국인삼을 판별할 수 있는 2개의 SNP 마커를 개발하여, 이를 이용한 프로브 서열 및 프라이머를 설계하고, 상기 프로브를 PNA 형태로 합성한 다음, 이를 포함하는 키트를 사용할 경우, 통상적인 PCR 조건에 의해 숙련된 실험자 없이도 시료로부터 인삼의 품종을 판별할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 (i) 서열번호 2에서 86번째 염기를 포함하는 10 내지 30개의 연속적인 염기서열 또는 이의 상보적인 염기서열을 포함하는 PNA 프로브; 및 (ii) 서열번호 2에서 205번째 염기를 포함하는 10 내지 30개의 연속적인 염기서열 또는 이의 상보적인 염기서열을 포함하는 PNA 프로브로 구성된, 인삼 품종 판별용 PNA 프로브 세트를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 서열번호 2에서 86번째 염기 및 205번째 염기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된, 인삼 품종 판별용 프라이머를 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 PNA 프로브 세트를 포함하는 인삼 품종 판별용 조성물을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 인삼 품종 판별용 키트를 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 시료로부터 추출된 DNA를 제1항의 PNA 프로브 세트와 혼성화시키는 단계; 및 (b) 상기 혼성화된 산물을 이용하여 서열번호 2에서 86번째 염기 또는 이의 상보적인 염기의 변이; 및 205번째 염기 또는 이의 상보적인 염기의 변이를 검출하는 단계를 포함하는, 인삼 품종 판별방법을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 2로 구성된 폴리뉴클레오타이드에서, SNP(single nucleotide polymorphism) 위치인 86번째 염기 또는 205번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오타이드로 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 인삼 품종 판별용 SNP 마커를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0021] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 (i) 서열번호 2에서 86번째 염기를 포함하는 10 내지 30개의 연속적인 염기서열 또는 이의 상보적인 염기서열을 포함하는 PNA 프로브; 및

[0022] (ii) 서열번호 2에서 205번째 염기를 포함하는 10 내지 30개의 연속적인 염기서열 또는 이의 상보적인 염기서열을 포함하는 PNA 프로브로 구성된, 인삼 품종 판별용 PNA 프로브 세트를 제공한다.

[0023] 본 발명의 용어 "PNA(Peptide Nucleic Acid)"란 DNA의 리보오스 링과 포스페이트를 N-(2-아미노에틸)글리신(N-(2-aminoethyl)glycine)으로 대체한 DNA 유사체를 의미하는데, 음(-)전하를 띠는 DNA와는 달리 전하를 띠지않아 PNA/DNA 및 PNA/RNA 상보결합이 DNA/DNA 또는 DNA/RNA 상보결합의 친화력보다 더 크고, 통상적인 DNA 분해효소에 의해 분해되지 않을 뿐만 아니라 강산 또는 강염기의 조건하에서도 매우 안정하다는 특징이 있다. 이에 따라, PNA가 세균 또는 바이러스의 유전자와 결합할 경우 유전자의 전사 및 복제가 수행되지 않아 해당 세균 또는 바이러스가 사멸하게 된다. 이러한 특징을 활용하여 DNA 대신에 PNA를 사용하여 제조한 PNA 칩은 상온에서 장시간 동안 보관하여도 그의 성능이 저하되지 않을 뿐만 아니라 짧은 시간 내에 검출 반응을 수행할 수 있고, 그의 높은 결합친화도로 말미암아 표적 핵산의 검출 신뢰도가 매우 우수하다는 장점이 있다.

- [0024] 본 발명에서 용어 "프로브(probe)"란 시료의 DNA 또는 RNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 PNA 등의 핵산 단편을 의미하며 특정 DNA 또는 RNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 본 발명의 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 PNA(single stranded PNA) 프로브, 이중쇄 PNA(double stranded PNA) 프로브 등의 형태로 제작될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 프로브는 포스포르아미다이트 고체지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다.
- [0025] 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, "캡화", 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0026] 상기 서열번호 2의 86번째 염기 또는 205번째 염기는 품종별로 다르므로, 상기 두 개의 SNP(Single Nucleotide Polymorphism) 부위의 염기 변이를 검출하면 인삼의 품종을 판별할 수 있으며, 특히 고려인삼, G1 품종, 미국인삼을 판별할 수 있다. 따라서 상기 PNA 프로브는 서열번호 2의 86번째 염기 또는 205번째 염기를 필수적으로 포함하면서 인삼 품종을 판별할 수만 있다면 각각 SNP 위치의 앞뒤로 적절한 크기의 염기서열을 더 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 PNA 프로브의 염기서열의 크기는 10 내지 30개의 염기일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 11 내지 20개의 염기, 더더욱 바람직하게는 12 내지 18개의 염기, 더더욱 바람직하게는 13 내지 16개의 염기일 수 있다.
- [0027] 바람직하게는 상기 PNA 프로브의 염기서열은 서열번호 4 또는 5일 수 있다. 서열번호 4는 서열번호 2의 199번째부터 212번째까지의 염기서열에 해당하며, 서열번호 5는 서열번호 2의 79번째부터 93번째까지의 염기서열에 해당한다.
- [0028] 본 발명에 따른 상기 PNA 프로브 세트는 상기 (i)의 PNA 프로브는 서열번호 5의 염기서열 또는 이의 상보적인 염기서열을 포함할 수 있고, 상기 (ii)의 PNA 프로브는 서열번호 4의 염기서열 또는 이의 상보적인 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0029] 그에 따라, 본 발명의 PNA 프로브 세트는 인삼의 G1품종, 고려인삼 및 미국인삼을 판별하는데에 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명에서 G1 품종은 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)에 속하는 신품종으로, 2012년 03월 19일에 국립종자원에 품종보호 출원하여, 2013년 01월 17일 제 05-0005-32호로 품종보호권 설정등록이 되었다. G1 품종은 다른 고려인삼 품종 중 선종과 비교하여 출아가 느리고, 줄기의 색이 더 진한 자색을 띄며, 타원형의 소엽을 가지고, 꽃대의 길이가 선종과 비교해서 짧은 특성을 가지고 있다. 또한 진세노사이드를 높은 함량으로 포함하고 있고, 내병성이 강하다.
- [0031] 또한, 상기 G1 품종의 형태학적 특성으로, 줄기의 길이는 평균 35cm이고, 줄기수는 1경(1.5대)이며 줄기 안토니아색은 전체적으로 분포하고 있다. 잎 줄기당 소엽수는 평균 27.6매이고, 잎자루의 길이는 평균 5.3cm 이며, 잎자루 각도는 평균 60도 이다. 잎 탁엽의 발생은 중간이고, 표면 주름 정도는 중간보다 강한 경향을 갖는다. 소엽의 모양은 타원형으로 평균길이는 17.1cm, 평균 너비는 6.5cm 이며 거치는 중간이다. 개화기는 중간이며 꽃대 길이는 평균 22.6cm 이고, 꽃송이 모양은 단형이며, 소화경의 자세는 반직립이다. 열매의 성숙기는 중간이고, 모양은 신장형으로 붉은색을 띄며 잎 노화 시 빨간색으로 띄고, 뿌리색은 미색이며, 몸통의 지름은 평균 1.9cm, 길이는 평균 6.5cm(4근 기준)이다.
- [0032] 본 발명에서 서열번호 2는 인삼 G1 품종의 45S rRNA(ribosomal RNA)의 DNA 염기서열의 일부이며, 서열번호 4는 서열번호 2에서 205번째 염기를 포함하는 14개의 염기로 구성된 염기서열이고, 서열번호 5는 서열번호 2에서 86번째 염기를 포함하는 15개의 염기로 구성된 염기서열이다.

- [0033] 인삼 품종 판별에 중요한 SNP 염기는 서열번호 4에서 7번째 염기이자 서열번호 2에서는 205번째 염기로 G1 품종과 미국인삼에서는 G이고, 고려인삼에서는 A일 수 있다. 또 다른 인삼 품종 판별에 중요한 SNP 염기는 서열번호 5에서 8번째 염기이자 서열번호 2에서는 86번째 염기로 G1 품종과 고려인삼에서는 A이고, 미국인삼에서는 C일 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 용어 "고려인삼(Korean ginseng)"은 한국에서 생산되는 인삼을 말하는 것으로 대표적인 약용식물로서 떡잎식물 사형화목 두릅나무과 여러해살이풀이다. 인삼의 자생지는 한반도를 비롯하여 만주, 연해주 일대이며, 당시에는 고구려 영토였던 관계로 인삼의 학명이 *Panax ginseng* C.A. Meyer가 되어 오늘날에도 한국산 인삼을 지칭하는 동시에 인삼의 대명사로 사용하고 있다. 서열번호 1의 염기서열은 고려인삼의 45S rRNA(ribosomal RNA)의 DNA 염기서열의 일부이다.
- [0035] 본 발명에서 용어 "미국인삼(American ginseng)"은 *Panax quinquefolius*를 말하는 것으로서 미국삼(美國蔘) 또는 화기삼(花旗蔘)이라고도 부른다. 미국의 동북지역이 원산지이며, 중국 등지에서 재배된다. 서열번호 3의 염기서열은 미국인삼의 45S rRNA(ribosomal RNA)의 DNA 염기서열의 일부이다.
- [0036] 또한, 바람직하게는 상기 PNA 프로브는 형광으로 표지될 수 있으며, 상기 형광으로 표지된 프로브를 사용하여 FMCA(Fluorescence Melting Curve Analysis)를 수행할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일 실시예에서는 서열번호 4 또는 5의 염기서열의 5'말단에 Dabcyl을 연결하고, 3'말단에 링커, 라이신 및 형광물질(FAM 또는 HEX)을 연결하여 PNA 프로브를 설계한 후(표 1), 파나진(Panagene, 한국)에서 HPLC 정제 방법을 통해 합성하였으며, 합성된 모든 프로브의 순도는 질량분석법을 이용하여 확인하였으며, 표적핵산과의 더 효과적인 결합을 위해 프로브의 불필요한 이차구조는 피하였다.
- [0038] 다른 하나의 양태로서 본 발명은 서열번호 2에서 86번째 염기 및 205번째 염기를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 인삼 품종 판별용 프라이머를 제공한다.
- [0039] 본 발명에서 사용되는 용어, "프라이머"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free
- [0040] 3' hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머라아제 또는 역전사 효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 프라이머는 포스포르아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, "캡화", 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 또한, 상기 프라이머는 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 상기 표지는 일 예로, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타아제 등과 같은 효소, 33P 등과 같은 방사성 동위원소, 바이오틴 등과 같은 화학그룹 및 형광성 분자 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 상기 프라이머를 사용하여 증폭된 폴리뉴클레오타이드가 서열번호 2에서 SNP 부위인 86번째 염기 및 205번째 염기를 포함하고 있지만 하면 인삼 품종을 판별할 수 있으므로, 상기 프라이머는 상기 2개의 SNP 부위를 포함한

폴리뉴클레오타이드 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있는 것이라면 염기서열과 크기에 제한 없이 설계될 수 있다.

[0044] 바람직하게는 상기 프라이머는 서열번호 6 또는 서열번호 7의 염기서열로 구성된 것일 수 있다.

[0045] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 상기 PNA 프로브 세트를 포함하는 인삼 품종 판별용 조성물을 제공한다. 바람직하게, 상기 조성물은 상기 프라이머를 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 인삼 품종 판별용 키트를 제공한다.

[0047] 바람직하게 상기 키트는 표적 핵산을 증폭하기 위해 상기 프라이머를 추가로 포함할 수 있으며, 보다 바람직하게는 서열번호 6의 프라이머와 서열번호 7의 프라이머를 모두 포함할 수 있다.

[0048] 또한 상기 키트는 상기 PNA 프로브 세트와 상기 프라이머 이외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 (a) 시료로부터 추출된 표적 유전자를 상기 PNA 프로브 세트와 혼성화시키는 단계; 및,

[0050] (b) 상기 혼성화된 산물을 이용하여 서열번호 2에서 86번째 염기 또는 이의 상보적인 염기의 변이; 및 205번째 염기 또는 이의 상보적인 염기의 변이를 검출하는 단계를 포함하는 인삼 품종 판별방법을 제공한다.

[0051] 바람직하게 상기 (a) 단계는 상기 프라이머로 시료로부터 추출된 표적 유전자를 증폭시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 표적 유전자의 증폭은 중합효소연쇄반응(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 방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 이 중에서, PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있고, 상업적으로 이용 가능한 키트를 사용할 수도 있다.

[0052] 바람직하게는 표적 유전자의 증폭을 위해 비대칭 PCR(asymmetric PCR)을 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 본 발명에서 용어 "비대칭 PCR(asymmetric PCR)"이란 2중 가닥 DNA의 한쪽 사슬에 대응하는 시발체를 과잉으로 가한 조건에서 PCR 반응을 하여 한쪽의 DNA 사슬만을 대량으로 증폭하는 방법을 말한다. 한쪽 시발체만을 과잉(수십 배)으로 하면 한쪽의 시발체가 먼저 소비되고 나머지 반응은 과한 쪽 시발체로만 진행하여 한쪽DNA 사슬이 대량으로 생산된다.

[0054] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 리버스 프라이머(reverse primer)와 포워드 프라이머(forward primer)를 10:1의 비율로 비대칭 PCR을 수행하였다.

[0055] 본 발명에서 사용되는 용어, "혼성화"란 PNA 프로브와 표적 유전자의 상보적 가닥이 조합하여 이중 가닥 분자(혼성체)를 형성하는 과정을 말한다.

[0056] 또한 바람직하게는 상기 (b) 단계는 상기 혼성화된 산물을 용해시켜 얻은 용해곡선을 분석하여 상기 염기의 변이를 검출할 수 있다.

[0057] 상기 표적 유전자와 PNA 프로브 세트가 혼성화된 산물의 용해곡선을 얻기 위해 당업계에 알려진 임의의 기타 적당한 방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 바람직하게는 FMCA(Fluorescence Melting Curve Analysis)를 이용할

수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 융해곡선에서 측정된 융해온도(melting temperature, T_m)는 상기 각각의 PNA 프로브와 표적 유전자 각각의 SNP 위치의 염기가 일치하면, 일치하지 않은 경우보다 높게 측정된다. 따라서 T_m 값을 비교하면 2개의 SNP 위치의 염기 변이를 검출할 수 있다.

[0059] 즉, 각각의 융해온도를 측정하는 조건 또는 기계나 방법에 따라 측정된 융해온도에 차이가 있을 수는 있으나, 한 종류의 프로브에 대한 두 가지의 온도를 비교하였을 때, 상대적으로 높은 온도를 나타내는 경우에는 PNA 프로브와 표적 유전자의 염기서열 전체가 완전히 일치하는 것, 즉 퍼펙트 매치(perfect match)로 판단할 수 있고, 상대적으로 낮은 온도를 나타내는 경우 일부의 염기, 즉 SNP 위치의 염기가 PNA 프로브와 표적 유전자가 서로 일치하지 않는 것, 즉 미스매치(mismatch)로 판단할 수 있다. 즉 각각의 PNA 프로브에 대한 융해온도의 고저에 따라서, 상기 퍼펙트 매치 및 미스매치의 여부를 확인할 수 있고, 두 개의 PNA 프로브에 대한 결과에 따라 각각의 인삼 품종을 판별할 수 있게 되는 것이다.

[0060] 본 발명에서 용어 "퍼펙트 매치(perfect match)"는 PNA 프로브와 표적 유전자 각각의 SNP 위치의 염기가 완전히 일치하는 것을 말하며, "미스 매치(mismatch)"는 PNA 프로브와 표적 유전자 각각의 SNP 위치의 염기가 일치하지 않는 것을 말한다.

[0061] 또한 구체적으로 표적 유전자가 (i)서열번호 2에서 86번째 염기를 포함하는 10 내지 30개의 연속적인 염기서열 또는 이의 상보적인 염기서열을 포함하는 PNA 프로브와 퍼펙트 매치를 나타내고, (ii) 서열번호 2에서 205번째 염기를 포함하는 10 내지 30개의 연속적인 염기서열 또는 이의 상보적인 염기서열을 포함하는 PNA 프로브와 미스 매치를 나타내면 고려인삼으로 판별할 수 있다.

[0062] 상기 (i)의 PNA 프로브와 퍼펙트 매치를 나타내고, 상기 (ii)의 PNA 프로브와 퍼펙트 매치를 나타내면 G1 품종으로 판별할 수 있으며, 상기 (i)의 PNA 프로브와 미스 매치를 나타내고, 상기 (ii)의 PNA 프로브와 퍼펙트 매치를 나타내면 미국인삼으로 판별할 수 있다.

[0063] 본 발명의 일 실시예에서는 단일가닥 표적핵산을 생성하기 위한 비대칭 PCR을 리얼타임 PCR로 총 볼륨이 20 μ l이 되도록 1X 시선바이오 리얼타임 FMCA 버퍼(SeaSunBio Real-Time FMCA buffer, 시선바이오, 한국), 0.05 μ M 포워드 프라이머(forward primer) 및 0.5 μ M 리버스 프라이머(reverse primer)에 0.5 μ l 프로브 2종(Jin45S-1과 Jin45S-2를 동시에 사용), 1 μ l 인삼 gDNA를 첨가한 다음 실시하였다. 리얼타임 PCR 과정은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 53 $^{\circ}$ C에서 30초, 78 $^{\circ}$ C에서 45초 동안 반응시켰다. 이는 인삼의 45S rDNA가 정확하게 증폭되도록 하기 위함이다. 이를 40 사이클(cycle) 반복하였고, 실시간으로 형광을 측정하였다. 융해곡선 분석은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성 단계를 거친 다음, 85 $^{\circ}$ C에서 1분, 65 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 45 $^{\circ}$ C에서 1분간 혼성화시킨 후, 45 $^{\circ}$ C에서 85 $^{\circ}$ C까지 0.5 $^{\circ}$ C씩 상승시키며 형광을 측정하는 융해곡선 분석을 수행하였다. 각 단계 사이마다 5초간 정지 상태를 유지하였다(도 2).

[0064] 또 다른 하나의 양태로서 본 발명은 서열번호 2로 구성된 폴리뉴클레오티드에서, SNP(single nucleotide polymorphism) 위치인 86번째 염기 또는 205번째 염기를 포함하는 5 내지 100개의 연속적인 염기로 구성되는 폴리뉴클레오티드로 또는 이의 상보적인 폴리뉴클레오티드를 포함하는 인삼 품종 판별용 SNP 마커를 제공한다. 상기 SNP 마커에 대해서는 진술한 바와 같으며, 이를 이용하여 고려인삼, G1품종 및 미국인삼을 판별할 수 있다.

발명의 효과

[0065] 본 발명에 따른 인삼의 45S rRNA 지역의 염기변이 검출용 PNA 프로브와 FMCA방법은 인삼 45S rRNA의 2곳에 해당 하는 염기변이를 간단하고 신속하며 정확하게 판별할 수 있는 편리함을 제공하며, 인삼의 G1품종과 고려인삼, 미국인삼의 판별에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0066]

도 1은 인삼 품종에 따른 45S 염기변이와 프로브 및 프라이머의 염기서열을 나타내는 도이다.

도 2는 인삼 품종 판별을 위한 PCR 조건과 FMCA(Fluorescence Melting Curve Analysis)를 위한 용해조건을 나타내는 도이다.

도 3은 인삼 3개 품종에 대한 2개 PNA 프로브(Jin45S-1, Jin45S-2) 별 FMCA 용해곡선을 나타낸 도이다.

도 4는 고려인삼, G1품종, 미국인삼 개체의 PNA 용해곡선을 나타낸 도로서, 초록색 실선은 고려인삼, 파란색 실선은 G1품종, 붉은색 실선은 미국인삼을 각각 나타내며, 파란색 점선은 PNA 프로브와 퍼펙트 매치(perfect match)를 붉은색 점선은 미스매치(mismatch)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067]

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0068]

실시예 1. 인삼 45S rRNA 염기변이 검출용 프라이머 및 프로브의 제조

[0069]

인삼에서 2개의 SNP(single nucleotide polymorphism) 부위를 확인하기 위해 도 1에 나타낸 고려인삼의 45S 리보조명 RNA의 염기서열 중 일부는 서열번호 1에, G1 품종의 45S 리보조명 RNA의 염기서열 중 일부는 서열번호 2에, 미국인삼(Ag)의 45S 리보조명 RNA의 염기서열 중 일부는 서열번호 3에 나타내었다.

[0070]

인삼의 45S 리보조명 RNA 염기변이 중에서 서열번호 4 및 5의 염기서열을 포함하는 시료로부터 추출한 DNA를 주형으로 PCR을 수행하기 위해 각각의 프라이머를 제작하였다(도 1).

[0071]

또한 인삼의 2개 45S 리보조명 RNA의 염기변이를 확인하고 확인된 SNP 부위 지역에 해당하는 PNA 프로브를 제작하였다(표 1). 먼저, PNA 프로브는 시전바이오머티리얼스에 의뢰하여 설계하였다. 본 발명에서 사용한 모든 PNA 프로브(FAM, HEX, Texas Red-labeled, Dabcyl)는 파나진(Panagene, 한국)에서 HPLC 정제 방법을 통해 합성하였으며, 합성된 모든 프로브의 순도는 질량분석법을 이용하여 확인하였으며, 표적핵산과의 더 효과적인 결합을 위해 프로브의 불필요한 이차구조는 피하였다.

[0072]

염기의 변이 부분은 보통 표적 핵산과 5℃ 이상 용해온도(Tm)차이가 나도록 PNA 프로브 결합 부위 가운데에 위치하도록 디자인하지만, 용해온도(Tm)의 최적화를 위해 표적핵산과 PNA 프로브와 결합하는 염기서열의 여러 부분에 인삼의 45S 리보조명 RNA 염기서열과 상보적 결합이 일어날 수 있도록 고려하여 제작하였다.

표 1

[0073]

인삼 중 판별을 위한 PNA 프로브와 프라이머 서열

	이름	염기서열
PNA 프로브의 염기서열	서열번호 4	CTCTCGGCAACGGA
	서열번호 5	TGGGTGGATCTCGTC
PNA 프로브의 구조	Jin45S-1	Dabcyl-CTCTCGGCAACGGA-O-K (FAM)
	Jin45S-2	Dabcyl-TGGGTGGATCTCGTC-O-K (HEX)
포워드 프라이머	Jin45S-NF(서열번호 7)	AACACGTTACAATACCGGGTGAG
리버스 프라이머	Jin45S-NR(서열번호 6)	GTATCGCATTTGCTACGTTCTT

[0074]

상기 표 1에서 O는 링커 및 K는 라이신(lysine)을 의미한다.

실시예 2. 인삼 45S 리보조멸 RNA의 염기변이에 따른 융해곡선 분석

실시예 2-1. 인삼 품종 판별을 위한 PCR 및 FMCA(Fluorescence Melting Curve Analysis)

상기에서 합성한 이중가닥 DNA 및 PNA 프로브를 이용한 융해곡선 분석을 위한 PCR은 CFX96 Real-Time 시스템(BIO-RAD 사, 미국)을 이용하여 수행하였으며, 모든 실험 조건은 단일 가닥 표적핵산을 생성하기 위해 비대칭 PCR(asymmetric PCR)을 이용하였다. 비대칭 PCR의 조건은 다음과 같다; 총 볼륨이 20 μ l이 되도록 1X 시선바이올리얼타임 FMCA 버퍼(SeaSunBio Real-Time FMCA buffer, 시선바이오, 한국), 0.05 μ M 포워드 프라이머(forward primer) 및 0.5 μ M 리버스 프라이머(reverse primer)에 0.5 μ l 프로브 2종(Jin45S-1과 Jin45S-2를 동시에 사용), 1 μ l 인삼 gDNA를 첨가한 다음 리얼타임 PCR을 실시하였다. 2개의 PNA 프로브는 하나의 튜브 또는 웰(well)에 첨가한다.

리얼타임 PCR 과정은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성시킨 다음, 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 53 $^{\circ}$ C에서 30초, 78 $^{\circ}$ C에서 45초 동안 반응시켰다(도 2). 이는 인삼의 45S rDNA가 정확하게 증폭되도록 하기 위함이다. 이를 40 사이클(cycle) 반복하였고, 실시간으로 형광을 측정하였다.

융해곡선 분석은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 변성 단계를 거친 다음, 85 $^{\circ}$ C에서 1분, 65 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 45 $^{\circ}$ C에서 1분간 혼성화 시킨 후, 45 $^{\circ}$ C에서 85 $^{\circ}$ C까지 0.5 $^{\circ}$ C씩 상승시키며 형광을 측정하는 융해곡선 분석을 수행하였다. 각 단계 사이마다 5초간 정지 상태를 유지하였다(도 2).

실시예 2-2. 인삼 품종에 따른 융해온도(T_m) 차이

인삼 gDNA를 주형으로 하여 PCR 수행 후, 융해곡선 분석을 수행한 결과, 인삼 45S 리보조멸 RNA의 염기 변이에 따라 제작한 PNA 프로브와 완전한 혼성화를 보이는 퍼펙트 매치(perfect match)와 그렇지 않은 미스매치(mismatch)의 융해온도(Melting Temperature, T_m) 차이가 발생하는 것을 확인하였다(도 3 및 4).

도 3에서는 Jin45S-1과 Jin45S-2 형광 프로브의 융해곡선을 따로 나타내었으며, 도 4에서는 품종 및 원산지별로 나누어 융해곡선을 확인하였다. 도 4의 점선은 퍼펙트와 미스매치의 융해곡선의 최고점인 T_m 값을 나타낸 것으로, 각 개체별 T_m 값이 정확하게 일치함을 보여주었다. 융해곡선의 높낮이는 반응 시작시 개체의 gDNA 농도에 비례하여 나타나며, 농도의 차이에 따른 T_m 값의 변화는 전혀 나타나지 않았다.

FMCA를 통해 얻어진 융해온도(T_m)는 하기 표 2에서와 같이 나타났으며, 한 프로브에서 상대적으로 높은 T_m 값은 퍼펙트 매치를, 상대적으로 낮은 T_m 값은 미스매치를 나타낸다. 하기 표2에 미스매치 뉴클레오타이드의 수도 함께 표시하였다. 0은 미스매치의 뉴클레오타이드가 없어 퍼펙트 매치를 보이는 것이고 1은 미스매치 뉴클레오타이드의 수를 나타낸 것이다.

표 2

인삼 45S 리보조멸 RNA의 SNP 개수와 융해온도 분포

	Jin45S-1		Jin45S-2	
고려인삼	1	58 $^{\circ}$ C	0	72 $^{\circ}$ C
G1	0	68 $^{\circ}$ C	0	72 $^{\circ}$ C
미국인삼(Ag)	0	68 $^{\circ}$ C	1	62 $^{\circ}$ C

고려인삼의 경우 Jin45S-1 프로브와 완전한 혼성화(퍼펙트 매치)를 만들 수 없으므로, 상기 프로브와 완전한 혼성화를 만드는 G1 품종 및 미국인삼보다 낮은 T_m 값(미스매치)을 보였다. 또한 Jin45S-2 프로브와 미국인삼은

완전한 혼성화를 만들 수 없으므로, 상기 프로브와 완전한 혼성화(퍼펙트 매치)를 만드는 G1 품종 및 고려인삼보다 낮은 Tm 값(미스매치)을 보였다.

[0086]

따라서 Jin45S-1 및 Jin45S-2 PNA 프로브 세트를 사용하여 인삼 시료의 표적 유전자와 혼성화 시킨 후 측정된 각각의 융해곡선의 Tm 값을 비교하여, 상기 프로브 세트에 대해 미스매치 및 퍼펙트 매치를 보이면 고려인삼으로, 모두 퍼펙트 매치를 보이면 G1 품종으로, 퍼펙트 매치 및 미스매치를 보이면 미국인삼으로, 인삼을 판별할 수 있음을 확인하였다.

[0087]

실시에 3. 인삼 품종 판별

[0088]

상기 프라이머와 PNA 프로브 세트를 이용하여 PCR 및 FMCA를 통해 확인된 인삼 품종 6종과 품종 K1의 융해곡선 분석 결과를 하기 표 3에 나타내었다. 정확히 상기 사용된 모든 인삼 품종은 G1(2개 프로브와 모두 퍼펙트 매치)과 다른 Tm 값을 나타내었으며, Tm 값에 따라 Jin45S-1 프로브를 이용한 경우 고려인삼은 미스매치(MM)를 나타내었으며, Jin45S-2 프로브를 사용할 경우 사용된 품종 모두 퍼펙트 매치(PM)를 보이는 것으로 확인되었다. 따라서 본 발명의 PNA 프로브 세트를 사용할 경우 7 품종은 모두 고려인삼 품종으로 판별되었다. 이를 통해 본 발명의 PNA 프로브 세트는 G1 품종, 고려인삼 및 미국인삼을 판별하는데 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

표 3

보유하고 있는 고려인삼 품종별 판별 결과

[0089]

	선풍	연풍	선원	청선	뉴천	선운	K1
Jin45S-1	MM	MM	MM	MM	MM	MM	MM
Jin45S-2	PM	PM	PM	PM	PM	PM	PM
판정	고려인삼	고려인삼	고려인삼	고려인삼	고려인삼	고려인삼	고려인삼

도면

도면1

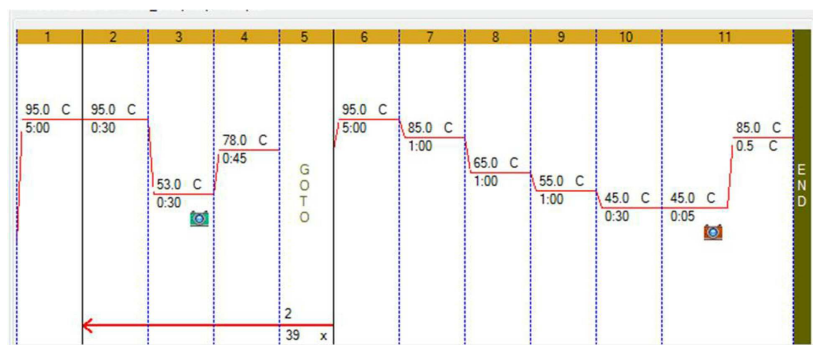
Jin45S-2 (HEX)

고려인삼 AACACGTTACATACCGGTGAGGGACGAGGGGTGCGCAAGCTCCCAAGTTGCAAAACCATGGTCGGGGACCAACCTTGGGTGGATCTCGTCCGAACACGACCCCCCGGCGCGGAATGCGCCAAAGGA
 G1 AACACGTTACATACCGGTGAGGGACGAGGGGTGCGCAAGCTCCCAAGTTGCAAAACCATGGTCGGGGACCAACCTTGGGTGGATCTCGTCCGAACACGACCCCCCGGCGCGGAATGCGCCAAAGGA
 Ag AACACGTTACATACCGGTGAGGGACGAGGGGTGCGCAAGCTCCCAAGTTGCAAAACCATGGTCGGGGACCAACCTTGGGTGGATCTCGTCCGAACACGACCCCCCGGCGCGGAATGCGCCAAAGGA

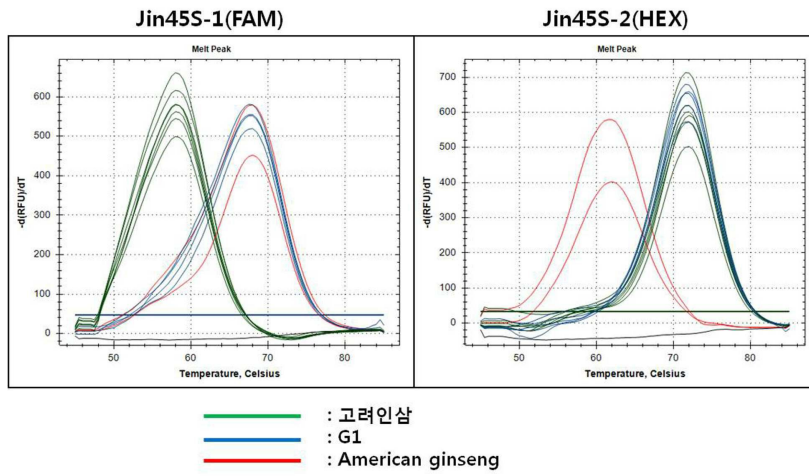
Jin45S-1 (FAM)

고려인삼 AATCAAACTGAAGTGCACGCGTCCCCCGGTTTGGGGGCGGCGAAGCGTCTTTCTAAACACAAACGACTCTGCACACGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGACGTAGCGAAATGCGATAC
 G1 AATCAAACTGAAGTGCACGCGTCCCCCGGTTTGGGGGCGGCGAAGCGTCTTTCTAAACACAAACGACTCTGCACACGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGACGTAGCGAAATGCGATAC
 Ag AATCAAACTGAAGTGCACGCGTCCCCCGGTTTGGGGGCGGCGAAGCGTCTTTCTAAACACAAACGACTCTGCACACGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGACGTAGCGAAATGCGATAC

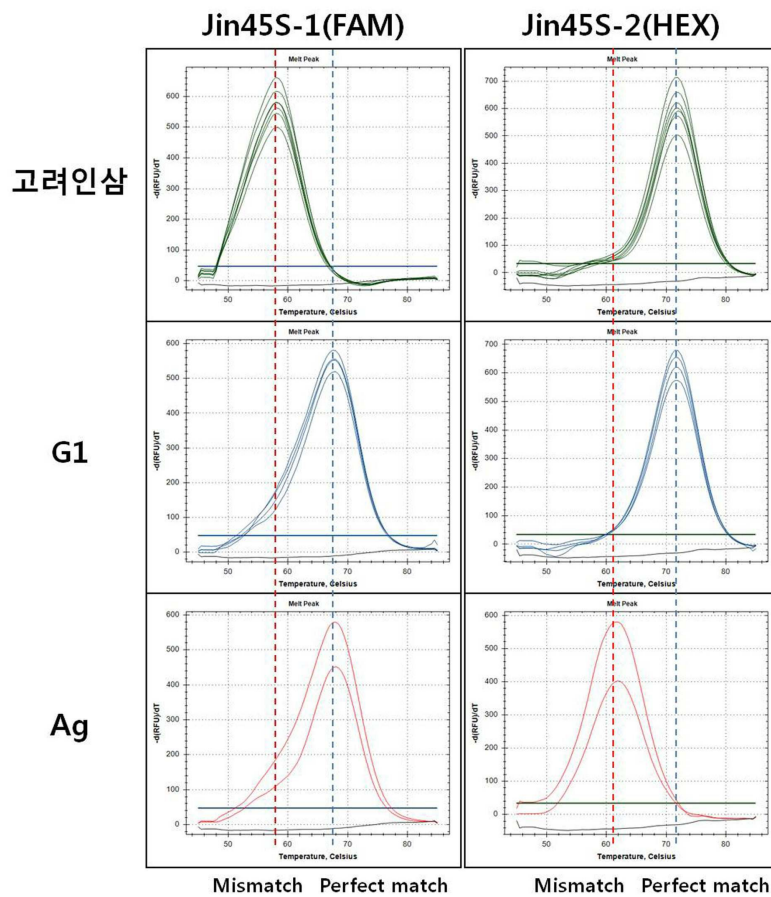
도면2



도면3



도면4



서열목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> PNA probe set for identifying ginseng cultivars and method for

identifying ginseng cultivars using the same

<130> KPA140457KR

<160> 7

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 257

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> korean ginseng 45s ribosomal RNA

<400> 1

aacacgttac aataccgggt gagggacgag ggggtgcgcaa gctccccaag ttgcaaaccc 60

atggtcgggg accacccttg ggtggatctc gtccgaacaa cgaccccccg gcgcggaatg 120

cgccaaggaa atcaaaactga actgcacgcg tcccccccg ttgcgggcgg cggaagcgtc 180

tttctaaaac acaaacgact ctcgacaacg gatatctcgg ctctcgcatc gatgaagaac 240

gtagcgaaat gcgatac 257

<210> 2

<211> 257

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> G1 45s ribosomal RNA

<400> 2

aacacgttac aataccgggt gagggacgag ggggtgcgcaa gctccccaag ttgcaaaccc 60

atggtcgggg accacccttg ggtggatctc gtccgaacaa cgaccccccg gcgcggaatg 120

cgccaaggaa atcaaaactga actgcacgcg tcccccccg ttgcgggcgg cggaagcgtc 180

tttctaaaac acaaacgact ctcggaacg gatatctcgg ctctcgcatc gatgaagaac 240

gtagcgaaat gcgatac 257

<210> 3

<211> 257

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> American ginseng 45s ribosomal RNA

<400> 3

aacacgttac aataccgggt gagggacgag ggggtgcgcaa gctccccaag ttgcaaaccc 60

atggtcgggg accacccttg ggtggctctc gtccgaacaa cgaccccccg gcgcggaatg 120

cgccaaggaa atcaaaactga actgcacgcg tcccccccg ttgcgggcgg cggaagcgtc 180

tttctaaaac acaaacgact ctcggcaacg gatatctcgg ctctcgcatc gatgaagaac 240

gtagcgaaat gcgatac 257

<210> 4

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Jin45S-1 PNA probe

<400> 4

ctctcggcaa cgga 14

<210> 5

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Jin45S-2 PNA probe

<400> 5

tgggtggatc tcgtc 15

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Jin45S-NR(reverse primer)

<400> 6

gtatcgcatc tcgctacgtt ctt 23

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Jin45S-NF(foward primer)

<400> 7

aacacgttac aataccgggt gag 23