

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0106410 (43) 공개일자 2012년09월26일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 15/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0024506 (22) 출원일자 2011년03월18일 심사청구일자 2011년03월18일	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내 (서천동, 경희대학교) (72) 발명자 양덕춘 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1842, 현대모닝사이드 111동 301호 (보라동) 김연주 경기도 화성시 반월동 868 신영통 현대이차아파트 212동 505호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 특허법인다나	

전체 청구항 수 : 총 7 항

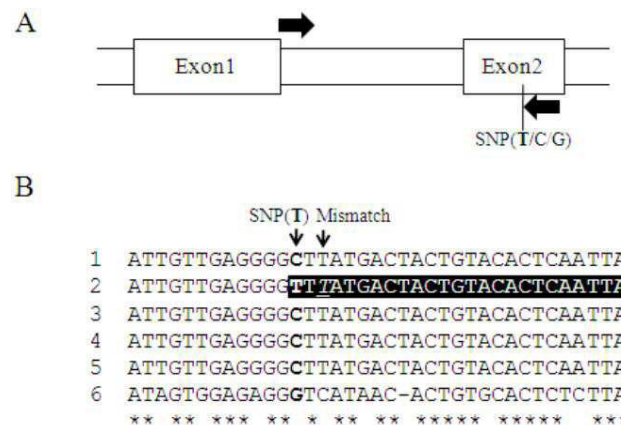
(54) 발명의 명칭 **고려인삼 연풍 품종 구별용 SNP 프라이머 및 이를 이용한 연풍 품종 구별방법**

(57) 요약

본 발명은 고려인삼 연풍 품종 구별용 SNP 프라이머 및 이를 이용한 고려인삼 연풍 품종 구별방법에 관한 것이다.

본 발명에 의하면 개발된 SNP 프라이머를 이용하여 고려인삼 중 연풍 품종을 신속하고 정확하게 구별할 수 있다. 따라서 외국산 인삼과 고려인삼 연풍 품종을 용이하게 구별할 수 있는 시스템을 개발하여 국내 농가의 권익을 보호하는데 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

권우생

경기도 수원시 영통구 권광로260번길 36, 111동
301호 (매탄동, 현대힐스테이트아파트)

손화

경기도 수원시 영통구 덕영대로 1731, 애지원 고
려인삼명품화사업단 (영통동)

이범수

경기도 수원시 영통구 봉영로1517번길 73, 9단지
삼성태영아파트 925동 1501호 (영통동)

김민경

경기도 수원시 장안구 연우동 255-9 3층

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 607002-05-2-SU000

부처명 농림수산식품부

연구사업명 고려인삼 연구사업단

연구과제명 고려인삼의 명품화를 위한 생산과 고부가가치 제품화 및 산업화

주관기관 경희대학교

연구기간 2007.07.30 ~ 2012.07.29

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 811번째 뉴클레오타이드 B가 T인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 고려인삼 연풍 품종 구별용 SNP 프라이머.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 SNP 프라이머는 서열번호 2, 서열번호 3 또는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것인 고려인삼 연풍 품종 구별용 SNP 프라이머.

청구항 3

서열번호 1의 811번째 뉴클레오타이드 B가 T인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 SNP 프라이머를 포함하는 고려인삼 연풍 품종 구별용 키트.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 SNP 프라이머는 서열번호 2, 서열번호 3 또는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것인 고려인삼 연풍 품종 구별용 키트.

청구항 5

a) 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 및

b) 상기 추출한 DNA에서 서열번호 1의 811번째 뉴클레오타이드에 해당하는 SNP 염기 “T”의 존재 여부를 확인하는 단계를 포함하는 고려인삼 연풍 품종 구별방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 단계 b)는 서열번호 1의 811번째 뉴클레오타이드 B가 T인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 SNP 프라이머를 이용하여 PCR 증폭함으로써 수행하는 것을 특징으로 하는 고려인삼 연풍 품종 구별방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 SNP 프라이머는 서열번호 2, 서열번호 3 또는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 고려인삼 연풍 품종 구별방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 고려인삼 연풍 품종 구별용 SNP 프라이머 및 이를 이용한 고려인삼 연풍 품종 구별방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인삼(Panax ginseng C.A.Meyer)은 동양의 주요 약재 중의 하나로서 피로와 허약함을 개선하기 위한 일차적인 치료제로서 오래도록 사용되어 왔다. 한국과 중국 동북부에서 자생하는 이 붉은 장과 모양의 식물은 일반적으로 고려인삼(Korean ginseng)이라고 불리며 현재 전세계적으로 재배되고 있다.

- [0003] 인삼의 약리성분은 1854년 미국산 인삼(*Panax quinquefolium*) 뿌리에서 일종의 사포닌 혼합물인 무정형 물질을 분리하면서 인삼의 유효성분에 대한 과학적 연구가 시작되었고 인삼의 화학적 활성 성분 연구가 본격적으로 시작된 것은 1957년 소련의 Brekhman에 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), 펩타이드류(peptides), 폴리아세틸렌계 알콜류(polyacetylenic alcohols) 및 지방산류(fatty acids)를 포함하는 다양한 활성성분이 발견된다.
- [0004] 고려인삼의 약리학적 효능으로는 뇌기능 개선, 통증 감소 효과, 항종양 활성을 비롯한 암 예방 효과, 면역기능의 향상, 항 당뇨 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.
- [0005] 인삼은 기원(origin)과 경작(cultivation)에 따라 다양한 이름으로 불린다. *Panax* 속(genus)은 17 종(species)으로 구성되며, 이 중 *P. ginseng* C.A.Meyer(Korean ginseng, 고려인삼), *P. notoginseng* (Chinese ginseng, 중국삼) 및 *P. quinquefolium* (American ginseng, 미국삼)은 그 약효가 미리 알려져 널리 재배되고 있다.
- [0006] 고려인삼은 세 종류의 순계 품종: 자경(Jakyung), 청경(Chungkyung) 및 황숙(Hwangsook)을 포함한다. 현재까지, 순계 선택 방법(pure-line selection method)에 의하여 총 9개 품종이 세 종류의 순계 품종 중에서 선택되었고, 이들은 연풍(Yunpoong), 고풍(Gopoong), 선풍(Sunpoong), 선운(Sunwun), 선원(Sunweon), 선향(Sunhyang), 천풍(Chunpoong), 청선(Chungsun) 및 금풍(Gumpoong)이다.
- [0007] 현재까지 인삼 품종 구별을 위해 사용되고 있는 분자생물학적 방법으로서 RAPD(random amplified polymorphic DNA), ISSR(inter-simple sequence repeats), RFLPs(restriction fragment length polymorphism) 및 SSR(simple sequence repeats)을 포함하는, 고려인삼 품종간의 유전학적 다형성(polymorphism)을 규명하기 위한 몇 가지 접근이 시도되어 왔다. 그러나 이러한 방법은 재현성과 신뢰성이 부족하여 단일 품종 확인을 위한 분자 마커(molecular marker)로 개발되어 실용화되지는 못하였다. 즉, 현재 재배되고 있는 인삼 품종들의 구별은 외부 형태적인 특징으로 구별할 뿐 이들을 정확히 구별할 수 있는 분자 마커(molecular marker)가 없는 실정이다. 따라서 인삼의 품종육종을 위한 기간 단축과 뿌리삼의 유통과정에서 품종을 명확히 구별하기 위한 품종별 분자마커의 개발이 절실히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 고려인삼 중 연풍 품종을 신속하고 정확하게 구별할 수 있는 분자 마커를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은, 서열번호 1의 811번째 뉴클레오티드 B가 T인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 고려인삼 연풍 품종 구별용 SNP 프라이머를 제공한다.
- [0010] 또한 본 발명은 서열번호 1의 811번째 뉴클레오티드 B가 T인 것을 특징으로 하는 폴리 뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 SNP 프라이머를 포함하는 고려인삼 연풍 품종 구별용 키트를 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은 a) 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 및 b) 상기 추출한 DNA에서 서열번호 1의 811번째 뉴클레오티드에 해당하는 SNP 염기 “T”의 존재 여부를 확인하는 단계를 포함하는 고려인삼 연풍 품종 구별방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명에 의하면 개발된 SNP 프라이머를 이용하여 고려인삼 중 연풍 품종을 신속하고 정확하게 구별할 수 있다. 따라서 외국산 인삼과 고려인삼 연풍 품종을 용이하게 구별할 수 있는 시스템을 개발하여 국내 농가의 권익을 보호하는데 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 GAPDH 유전자의 염기서열 중 연풍에 특이적인 SNP 위치를 나타낸 도면이다. A는 GAPDH 유전자의 엑손 2 영역에 위치한 SNP를 보여주며, B는 SNP 위치에서 연풍과 다른 품종간 염기 서열의 차이를 보여준다(1: 천풍, 2: 연풍, 3: 고평, 4: 금풍, 5: 선풍, 6: 미국삼).
- 도 2는 본 발명에 따른 yunF/yunR1 프라이머 쌍을 이용한 PCR 생성물의 전기영동 결과를 나타낸 사진이다(A: 1: 천풍, 2: 연풍, 3: 고평, 4: 금풍, 5: 선풍, 6: 미국삼, M: 1kb DNA 마커; B: 1: 천풍, 2: 연풍, 3: 고평, 4: 금풍, 5: 선풍, 6: 선운, 7: 선원, 8: 선향, 9: 청선, 10: 황숙종, 11: 미마키-일본삼 품종, 12: 미국삼, M: 1kb DNA 마커).
- 도 3은 real-time PCR 결과 및 녹는 곡선을 나타낸 도면이다(A: yunF/yunR1 프라이머 쌍을 이용한 real-time PCR 증폭 결과, B: yunF/yunR1 프라이머 쌍을 이용한 녹는 곡선 분석 결과, C: yunF/yunR2 프라이머 쌍을 이용한 real-time PCR 증폭 결과, D: yunF/yunR2 프라이머 쌍을 이용한 녹는 곡선 분석 결과)
- 도 4는 yunF/yunR2 프라이머 쌍을 이용한 녹는 곡선 분석 결과를 나타낸 도면이다(A: SYBR Green I 염료, B: Eva Green 염료).
- 도 5는 천풍 품종의 GAPDH 유전자의 염기서열을 나타낸 것이다.
- 도 6은 연풍 품종의 GAPDH 유전자의 염기서열을 나타낸 것이다.
- 도 7은 고평 품종의 GAPDH 유전자의 염기서열을 나타낸 것이다.
- 도 8은 금풍 품종의 GAPDH 유전자의 염기서열을 나타낸 것이다.
- 도 9는 선풍 품종의 GAPDH 유전자의 염기서열을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명은 서열번호 1의 811번째 뉴클레오타이드 B가 T인 것을 특징으로 하는 폴리 뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 고려인삼 연풍 품종 구별용 SNP 프라이머를 제공한다.
- [0015] 본 발명자들은 하기 실시예를 통하여 알 수 있는 바와 같이, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 유전자의 염기서열 중 811번째 뉴클레오타이드가 연풍은 T인 반면 다른 품종들은 C 및 G인 것을 확인하여, 서열번호 1의 GAPDH 유전자의 염기서열 중 811번째 뉴클레오타이드를 고려인삼 중 연풍 품종을 구별하기 위한 SNP(single nucleotide polymorphism, 단일 염기 다형성) 위치로 결정하였다.
- [0016] 따라서 본 발명은 상기 SNP 위치를 분자 마커로 삼아, 고려인삼 중 연풍 품종을 특이적으로 구별할 수 있는 SNP 프라이머를 제공한다. 상기 SNP 프라이머를 이용하면 고려인삼 연풍 품종을 다른 품종들로부터 신속하고 정확하게 구별해낼 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 SNP 프라이머는 서열번호 2, 서열번호 3 또는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0018] 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머는 정방향 프라이머(forward primer)이며, 서열번호 3 및 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 프라이머는 역방향 프라이머(reverse primer)이다.
- [0019] 서열번호 3 및 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 역방향 프라이머는 3' 말단 뉴클레오타이드가 SNP 위치에 해당하며, 연풍 품종을 특이적으로 검출할 수 있도록 3' 말단 뉴클레오타이드가 A인 것을 특징으로 한다. 또한 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 역방향 프라이머는 3' 말단 뉴클레오타이드로부터 두 번째에 위치한 염기 A를 C로 치환하였으며, 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 역방향 프라이머는 3' 말단 뉴클레오타이드의 바로 옆에 위치한 염기 A를 G로 치환하였다. 이는 3' 말단에 추가적인 불일치(additional mismatch)를 도입함으로써 연풍품종에 대한 절대적인 특이성을 확실하게 유도하기 위한 것이다.
- [0020] 따라서 상기 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 SNP 프라이머쌍 또는 상기 서열번호 2 및 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 SNP 프라이머쌍을 이용하여 PCR 증폭을 수행하면, PCR 생성물의 생성 여부를 통해 고려인삼 연풍종을 특이적으로 구별해낼 수 있다.
- [0021] 또한 본 발명은 서열번호 1의 811번째 뉴클레오타이드 B가 T인 것을 특징으로 하는 폴리 뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 SNP 프라이머를 포함하는 고려인삼 연풍품종 구별용 키트를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 실시예에 따르면, 상기 SNP 프라이머는 서열번호 2, 서열번호 3 또는 서열번호 4의 염기서열로 이

루어져 있다.

- [0023] 본 발명에 따른 고려인삼 연풍 품종 구별용 키트는 상기 SNP 프라이머 외에도 DNA 폴리머라제, dNTPs 등을 비롯하여 PCR 증폭을 통하여 고려인삼 연풍품종을 구별하는 데에 필요한 모든 생물학적 또는 화학적 시약, 사용 설명서 등을 포함할 수 있다. 이러한 키트의 다른 구성은 당 업자에 의하여 적절히 선택될 수 있다.
- [0024] 또한 본 발명은 a) 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 및 b) 상기 추출한 DNA에서 서열번호 1의 811번째 뉴클레오티드에 해당하는 SNP 염기 “T”의 존재 여부를 확인하는 단계를 포함하는 고려인삼 연풍품종 구별방법을 제공한다. 시료로부터 추출한 DNA에서 서열번호 1의 811번째 뉴클레오티드에 해당하는 SNP 염기 “T”의 존재가 확인되면 이는 고려인삼 연풍품종으로 구별할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단계 b)는 서열번호 1의 811번째 뉴클레오티드 B가 T인 것을 특징으로 하는 폴리 뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 SNP 프라이머를 이용하여 PCR 증폭함으로써 수행할 수 있다.
- [0026] 이 때 상기 PCR 증폭은, 이에 한정되는 것은 아니지만, 일반 PCR 증폭 또는 real-time PCR 증폭일 수 있다.
- [0027] 상기 SNP 프라이머를 이용하여 일반 PCR 증폭을 수행한 결과 PCR 생성물이 생성되면 이는 고려인삼 연풍 품종으로 구별할 수 있으며, 상기 SNP 프라이머를 이용하여 real-time PCR 증폭을 수행하여 PCR 생성물의 형광량을 측정함으로써 PCR 생성물의 생성이 확인되면 이를 고려인삼 연풍 품종으로 구별할 수 있다.
- [0028] 이 때 상기 SNP 프라이머는 서열번호 2, 서열번호 3 또는 서열번호 4의 염기 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0029] 하기 실시예에 따르면, 상기 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 SNP 프라이머쌍 또는 상기 서열번호 2 및 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 SNP 프라이머쌍을 이용하여 PCR 증폭을 수행한 결과, 연풍 시료에서만 159bp의 PCR 생성물이 검출됨을 확인하였다(도 2).
- [0030] 또한 상기 서열번호 2 및 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 SNP 프라이머쌍 또는 상기 서열번호 2 및 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 SNP 프라이머쌍을 이용하여 real-time PCR 증폭을 수행한 결과, 연풍 시료의 사이클 곡선 및 녹는 곡선이 다른 품종들과 구별되는 차별적인 피크가 만들어지는 것을 확인하였다(도 3 및 도 4).
- [0031] 이하 본 발명을 실시예에 의거하여 구체적으로 설명하도록 한다. 그러나 하기 실시예에 의하여 본 발명이 한정되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 실시예는 정상적으로 생육하는 인삼의 여러 조직을 시료로 PCR을 수행하여 부위별 DNA가 개체 내에서 동일함을 확인한 후 수행하였으며, 인삼의 뿌리나 잎에서 얻어지는 DNA 결과는 동일 개체 내에서는 동일하게 나타남을 근거한다. 또한 본 발명의 실시예는 모두 이중 맹검법이 적용되었다.

[0032] 실시예 1: 실험재료 및 DNA 추출

- [0033] 모든 인삼의 잎과 뿌리는 경희대학교 인삼소재은행으로부터 얻었다. 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 본 실시예에서는 고려인삼(*P. ginseng*)(천풍, 연풍, 고평, 금풍, 선풍, 선운, 선원, 선향, 청선), 일본삼(미마키)과 변종(황숙종), 그리고 미국삼(*P. quinquefolius*)을 사용하였다.

표 1

[0034]

번호	명칭	분류	조직	총 개수
1	천풍(Chunpoong)	Korean cultivar	Leaf	9
2	연풍(Yunpoong)	Korean cultivar	Leaf	10
3	고풍(Gopoong)	Korean cultivar	Leaf	7
4	금풍(Gumpoong)	Korean cultivar	Leaf	5
5	선풍(Sunpoong)	Korean cultivar	Leaf	5
6	선운(Sunwoon)	Korean cultivar	Leaf	5
7	선원(Sunweon)	Korean cultivar	Leaf	5
8	선향(Sunhyang)	Korean cultivar	Leaf	5
9	청선(Chungsun)	Korean cultivar	Leaf	5
10	황숙종(Hwangsookjong)	Korean variety	Leaf	9

11	미마키(Mimaki)	Japanese cultivar	Leaf	5
12	미국삼 (<i>P. quinquefolius</i>)	American ginseng	Leaf	2

[0035] 상기 인삼의 DNA는 두 가지 방법으로 추출하였다.

[0036] a. DNA 키트 방법

[0037] 식물 DNA 분리 SV mini 키트(GeneAll, 한국)를 이용하여 식물 잎으로부터 genomic DNA를 추출하였다.

[0038] b. 변형된 NaOH-Tris 방법

[0039] 어린잎(캘러스 또는 태반엽)을 뜯어 1.5 ml 튜브에 넣고 4 M NaOH 50 μ l 를 첨가하였다. 그 후 Tissue Lyser II (QIAGEN; 5-mm bead, 60 sec, 30 Hz)를 이용하여 잎을 마쇄 하였다. 295 μ l 의 100 mM Tris (pH 8.0)를 포함하는 새 튜브에 마쇄물 5 μ l 를 재빨리 옮기고 잘 혼합한 후, 혼합물 1 μ l 을 전체부피 10 μ l 가 되도록 만들어 real-time PCR 반응에 사용하였다.

[0040] **실시예 2: SNP 위치 결정**

[0041] **EST 서열 분석**

[0042] 20,000개의 EST를 위한 식물 소재로서 털이 많은 뿌리 (DC01), 14년 된 뿌리 (DC02), 4년 된 뿌리 (DC03), 꽃눈 (DC04), 잎 (DC05) 및 인삼 캘러스 (DC06)를 사용하였다(인삼소재은행, 경희대학교, 한국). Basecalling을 위하여 서열 크로마토그램 파일을 PHRED 프로그램으로 옮겼다. 그 후 Vector NTI Advance™ 10을 사용하여 벡터 서열, 어댑터 영역 및 poly(A) tail을 정리하였다. 100개 이하의 염기를 갖는 서열은 제거하였다. CAP3 소프트웨어를 이용하여 EST를 콘티그(contiguous sequence)로 조합하여 처리하였다. 각 콘티그 및 싱글톤(singleton)의 공통서열(consensus sequence)은 GenBank 데이터베이스에 비교해 독특한 서열로 이루어졌다. 그 결과, EST를 3개의 군으로 나눴다: Known(스코어 80 이상, E-밸류 10-14 미만), unknown(스코어 40 이상 80 미만, E-밸류 10-14 미만 10-2 이상), no hit(스코어 40 미만, E-밸류 10-2 초과).

[0043] **PCR 증폭**

[0044] 상기 EST 데이터베이스에 기초하여 과 발현, 스트레스, 색채 및 사포닌 관련 유전자들 중에서 총 44개의 EST 서열을 임의로 선발하였다. DNA 레벨에서 길이 다형성(Length Polymorphism)의 발견 가능성을 높이기 위하여 intron-flanking 프라이머를 설계하였다. Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) 및 Primer Premier 5.0 소프트웨어(Premier, Canada)를 이용하여 44 쌍의 프라이머 세트를 설계하였다. 이 때 이용된 파라미터들은 다음과 같다: 프라이머 길이 20-26 뉴클레오티드 (22 뉴클레오티드가 최적), PCR 생성물 크기 150-1200 bp, 최적 어닐링 온도 58° C, GC 함량 30-50% (45% 최적). 상기 프라이머들은 Genotech Co. Ltd.(Daejeon, Korea)로 합성하였다.

[0045] 천풍, 연풍, 고풍, 금풍, 선풍 및 미국삼(*P. quinquefolius*)의 genomic DNA에 대하여 상기 44쌍의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 증폭은 Corbett PCR (Corbett Research, 시드니, 호주, 모델: CG1-96)을 이용하여 수행하였다. 각 PCR은 20 ng 의 template DNA, 0.5 μ M 의 각 프라이머, 200 μ M dNTPs, 1.5mM MgCl₂, 1X PCR 버퍼 및 1 U 의 DNA 폴리머라제(Enzynomics TM, Korea)를 포함하여 총 부피 20 μ l로 수행하였다. 표준 PCR 증폭은 94° C 에서 5 분 동안 미리 변성시킨 후, 94° C 에서 30초, 58° C 에서 30초 동안 어닐링 및 72° C 에서 30초 동안 신장시키는 증폭 사이클을 35회 반복하고, 마지막으로 72 ° C 에서 7분간 유지하여 수행하였다. PCR 생성물은 1.0% 아가로스 겔 상에서 전기영동하고, Et-Br(ethidium bromide) 염색하여 UV(DNR MiniBIS Pro Bio-Imaging System, Israel)하에서 관찰하였다. PCR 밴드의 사이즈가 예상한 것보다 큰 경우 PCR 생성물을 시퀀싱하여 확인하였다.

[0046] **DNA 염기서열 분석**

[0047] direct-sequencing 방법으로 시퀀싱한 DNA 서열은 SeqManII를 이용하여 분석하였다. 서열 정렬(sequence

alignments)은 ClustalW2 및 Kalign 2.0 프로그램 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sequence.html>)을 이용하여 수행하였다. 정렬된 서열은 BioEdit 7.0 소프트웨어를 사용하여 엑손 영역, SNP 및 InDels 서열 위치를 분석하였다.

[0048] SNP 위치 결정

[0049] DNA 서열의 시퀀싱 및 정렬을 통하여, 염기서열의 총 길이가 2321 bp인 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)의 엑손 영역에 있는 811번 위치에서 연풍은 뉴클레오티드 T를 가지고 있었으나 다른 품종들 및 미국삼은 동일 위치에서 뉴클레오티드 C 및 G를 가지고 있는 것을 확인하였다. 따라서 이를 SNP 위치로 결정하였다.

[0050] 도 1은 GAPDH 유전자의 염기서열 중 연풍에 특이적인 SNP 위치를 보여준다. A는 GAPDH의 엑손 2 영역에 있는 SNP 마커 프라이머의 위치를 나타내며, B는 SNP 위치에서 연풍과 다른 품종간 염기 서열의 차이를 보여준다 (1: 천풍, 2: 연풍, 3: 고평, 4: 금풍, 5: 선풍, 6: 미국삼). SNP 위치는 붉은 글씨로, 불일치(mismatch) 영역은 이탤릭체와 밑줄로 표시하였다.

[0051] 실시예 3: 고려인삼 연풍 품종 구별용 SNP 프라이머의 설계

[0052] 실시예 2에서 결정한 SNP 위치에 기초하여, 고려인삼 연풍 품종을 특이적으로 검출하기 위하여 대립유전자-특이적 프라이머 yunR1 및 yunR2를 설계하였다. yunR1 은 3' 말단 뉴클레오티드(SNP 위치)로부터 두 번째에 위치한 염기 A 를 C 로 치환하였으며, yunR2 는 3' 말단 뉴클레오티드(SNP 위치)의 바로 옆에 위치한 염기 A 를 G 로 치환하였다(표 2, 도 1). 이는 yunR1 및 yunR2 프라이머의 3' 말단에 추가적인 불일치(additional mismatch)를 도입함으로써 연풍종에 대한 특이성을 확실하게 유도하기 위함이다.

표 2

서열 번호	프라이머 명칭	서열 (5'-3')	GAPDH에서의 위치
2	yunF	CAA AGG TAT TTT ATT ATC TCT GCT G	676-700
3	yunR1	TAA TTG AGT GTA CAG TAG TCA TCAA	811-835
4	yunR2	TAA TTG AGT GTA CAG TAG TCA TAGA	811-835

[0054] 실험예 1: 고려인삼 연풍 품종 구별용 SNP 프라이머 검증

[0055] PCR 증폭

[0056] 연풍 품종의 대립유전자 다형성의 검증은 실시예 3에서 제조한 고려인삼 연풍 품종 구별용 SNP 프라이머쌍 yunF/yunR1를 이용한 PCR을 통해 확인하였다. PCR 증폭은 Corbett PCR (Corbett Research, 시드니, 호주, 모델: CG1-96)을 이용하여 수행하였다. 각 PCR은 20 ng 의 template DNA, 0.5 μ M 의 각 프라이머, 200 μ M dNTPs, 1.5mM MgCl₂, 1X PCR 버퍼 및 1 U 의 DNA 폴리머라제(Enzynomics TM, Korea)를 포함하여 총 부피 20 μ l로 수행하였다. 표준 PCR 증폭은 94° C 에서 5 분 동안 미리 변성시킨 후, 94° C 에서 30초, 58° C 에서 30초 동안 어닐링 및 72° C 에서 30초 동안 신장시키는 증폭 사이클을 35회 반복하고, 마지막으로 72° C 에서 7분간 유지하여 수행하였다. Gradient-PCR 반응 조건은 다음과 같다: 94° C 에서 5 분 동안 변성시킨 후, 94° C 에서 30 초, 55° -64° C 에서 30 초, 72° C 에서 30 초 수행하는 사이클을 35회 반복하고, 마지막으로 72° C 에서 7분간 유지하였다.

[0057] PCR 생성물은 1.0% 아가로스 겔 상에서 전기영동하고, Et-Br(ethidium bromide) 염색하여 UV(DNR MiniBIS Pro Bio-Imaging System, Israel)하에서 관찰하였다. 어닐링 온도(gradient-PCR)를 포함하는 PCR 조건은 비 특이적인 증폭을 감소시킬 수 있도록 조절하였다. 어닐링 온도 58° C 에서 연풍은 다른 품종들과 구별되었다.

[0058] 도 2는 PCR 생성물의 전기영동 결과를 보여준다. A 및 B 모두 연풍 품종에 해당하는 2번 레인에서만 160 bp의 생성물이 생성됨을 확인하였다(A: 1: 천풍, 2: 연풍, 3: 고평, 4: 금풍, 5: 선풍, 6: 미국삼, M: 1kb DNA 마커; B: 1: 천풍, 2: 연풍, 3: 고평, 4: 금풍, 5: 선풍, 6: 선운, 7: 선원, 8: 선향, 9: 청선, 10: 황숙종, 11: 미마키-일본삼 품종, 12: 미국삼, M: 1kb DNA 마커).

[0059] Real-time PCR 증폭

[0060] real-time PCR을 위하여 Rotor-Gene™ 6000 (Corbett Life Science, 호주)으로 열순환(thermocycling) 및 형광 모니터링을 수행하였다.

[0061] SYBR Green I 조건: 반응믹스는 9-16 ng DNA, 5 µM 의 각 프라이머, 100 µM 의 각 dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 2X mastermix (SensiMixPlus SYBR, Quantace Ltd, 호주), TE 버퍼가 총 부피 10 µl로 구성되었다. PCR 사이클 프로파일은 다음과 같다: 95° C 에서 10분 동안 활성화한 후, 95° C 에서 10초 동안 변성, 60° C 에서 15초 동안 컴바인드 어닐링(combined annealing) 및 72° C 에서 20초 동안 신장(그린 채널 세팅 'On')시키는 3단계 열 프로파일을 총 40 사이클 수행. 녹는 곡선 분석은 65° C 에서 85° C 까지 각 단계마다 1° C 씩 올리면서 수행하였다.

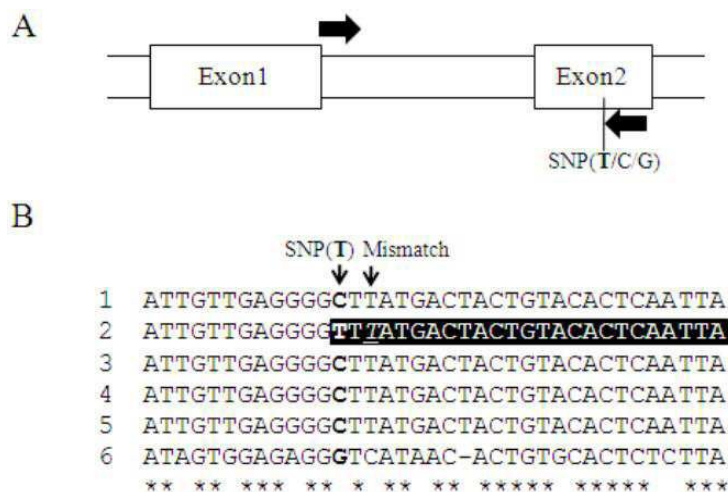
[0062] Eva Green 조건: 반응믹스는 9-16 ng DNA, 5 µM 의 각 프라이머, 200 µM 의 각 dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 2X mastermix (SensiMix HRMTM, Quantace Ltd, 호주), 0.4 ul Eva Green, TE 버퍼가 총 부피 10 µl로 구성되었다. PCR 사이클 프로파일은 다음과 같다: 95° C 에서 10분 동안 활성화한 후, 95° C 에서 15초 동안 변성, 60° C 에서 20초 동안 컴바인드 어닐링(combined annealing) 및 72° C 에서 10초 동안 신장(그린 채널 세팅 'On')시키는 3단계 열 프로파일을 총 40 사이클 수행. 녹는 곡선 분석은 65° C 에서 85° C 까지 각 단계마다 0.1° C 씩 올리면서 수행하였다.

[0063] 표 1에 개시된 개체들로부터 얻은 DNA 추출물에 대하여 yunF/yunR1 프라이머를 이용한 Real-time PCR 분석을 수행하였다. 형광 신호는 다른 샘플들이 다른 사이클 수에서 다른 증폭 농도를 갖는 것을 보여준다(도 3A). 녹는 곡선(melting curve)은 79° C 에서 최대 녹는점을 나타낸다(도 3B). 마커의 특이성을 향상시키기 위하여, 3' 말단으로부터 두번째에 위치한 염기 A를 G로 치환하고 이를 yunR2라 명명하였다(표 2). 변형된 마커(yunF/ yunR2)는 녹는 곡선 분석에서 yunF/yunR1 보다 효율적인 것으로 나타났다 (도 3C-D).

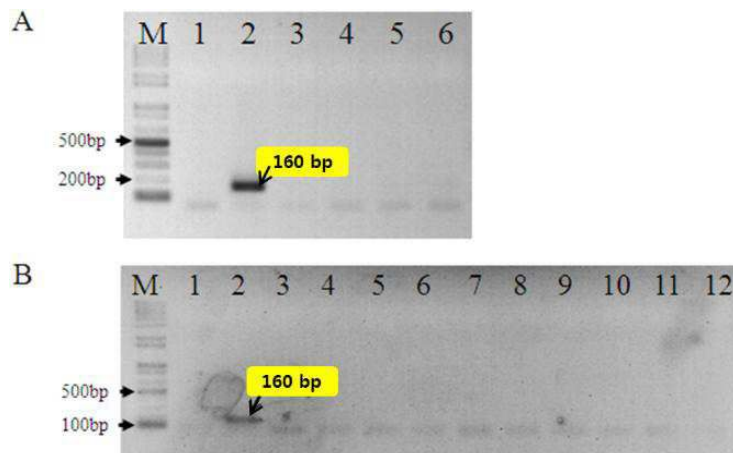
[0064] SYBR Green I 및 Eva Green을 이용하여 72 개의 샘플에 대한 재현성을 시험한 결과, 두 염료 모두 매우 분명한 피크를 만들어냈으며, 녹는 곡선 분석에서 연봉을 쉽게 찾아낼 수 있었다(도 4A-B).

도면

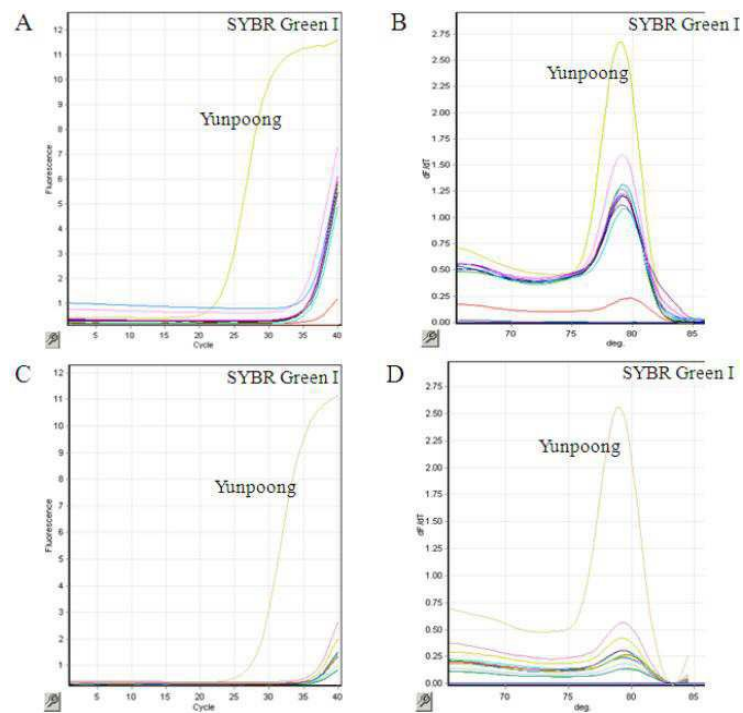
도면1



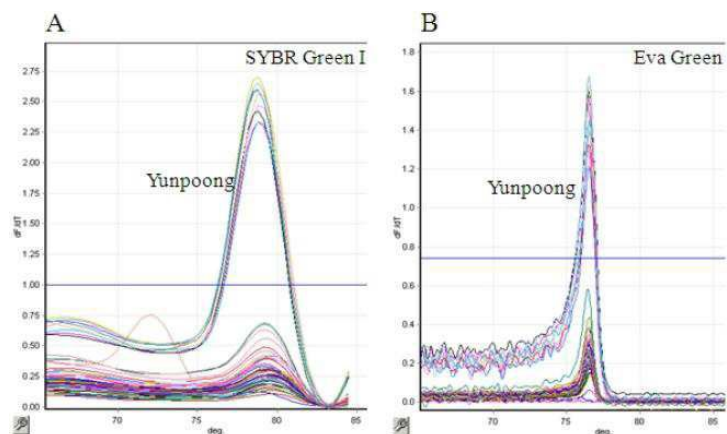
도면2



도면3



도면4



도면5

TTTCGTGATTGTTCTCTTTGCTTATAGGATTAGGTTTTGATTGTTCTTCATTCTTAGATTAGGTAT
 TGATTGTCCTTCATTACTTAGATTAGGTATTGATTGTTCTTCATTACTGATACCTGATGGGATCAGG
 TATTGCTACATCCTAAACTTTATTAGTACCTGTTTTCTCTTTATTCTGGTAGGTTTTAGGAGTGCAATGT
 TTCATGCTGGAAAAATGTTGTCATTCTTCCAATTGCCACGGAAAGATGAATAATTGCATGATGCAGTTT
 TGTTTTACCATGTTATTGTTGACATTTCTCTTTATTAATGACATGGTTGGAGTAGAGATTGTTATGT
 ACGGATGTAATGGTGAGAGTTCTAGTCCGTCAGATTTATTGTACAGTTTTTGCAGTAAAGTCATGTTA
 GTTTTTATTAAATGTTAATAATACTTTATTGGTTGGACTCTGTTGGTTTATTGTATCCTATAAAAAATC
 TCTTGCATTTTCTTGATTGGTGGTAATTTCTTGTGCTTTTCAGGGTGGAGCAAGAAGGTCAATTTCT
 GCCCCAAGTAAGGATGCTCCCATGTTTGTGTGGTGTCAATGAGAAGGAATACACACCTGACCTTCATA
 TTATTCTAATGCTAGCTGCACTACTAAGCTGCTTGTCTCCCTTGCAAAGGTATTTATTATCTCTGCTG
 CTAAGCTTATAATATGTTTTTTTTGAGCAATTCGGGAGGGCTCAAATTTTCTAAGGTTTCTCCTCTTAA
 TATCAAGGTGATCAACGACAGATTCCGCATTGTTGAGGGCTTATGACTACTGTACACTCAATTACTGGT
 GGGTTTTGGGTAGTAGTTTGTATTATTTATCTGTCTTGATTATAAACAATGTACTGCCATTGTTAAATGCA
 AACGTGTTCCATGTTGATTCAGCCACAAAAAAGCTGTTGATGGACATCAGCAAAGGACTGGAGAGGGG
 AAGAGCTGCATCATTCAATATCATTCTAGCAGTACTGGGGCTGCCAAGGTAATTGTGAACCTATTTTGT
 TTTTTATCGATAGAGGACCAAAATTTCTTGTCTGTTGTGCAAAAAGCCTATTCTTTCTTGGCTGGTG
 GACTTGACATTTTTTCATGAACCTAATTCATTTTTTATATGTTACTAATTGATGCATGCTGTTTCAAATT
 TTGGTGTGTGGTTTGGTGGTAGGCTGTTGGGAAAGTCTACCTGCATTAAATGGGAAATTGACTGGAAT
 GGCCTTCAGAGTTCCCACTGTGGATGCTCAGTGGTTGATCTCACTGTCAGGTTGGAAAAGAAGGCCAGC
 TATGAGGAAATTAAGCTGTTATTAAGTAAGGATTGAAAACTACTGTGATTTTTATGTTTGTCTTCAT
 TCACAAAAACTATGTTTGGATCATGCTTTGAATTATAGAGGAGATTTAATGTCTCTGCATGCTATTAAC
 TTCTAAGTTTCACAAAAACCTCACTGTAGTGCAGTTTACTTTTCTTTTCTATTGATTCATTATTTCTTT
 TCTTTTACTTTTTGTTAGGGAGGAGTGGGAGGAAAGCTCAAGGGAATCTTGGGTTACACTGAAGATGATG
 TAGTCTCCACTGACTTTCTGGGCGACAGCAGGTAAGGATTGATACAGGAAGTCTTTTGTGGTTGTTTTG
 TTGTTTCTCTCTCACTTTTCTCTCTCCAACCTGGTGCATGGTCACTATTATAATTGGACCAATCA
 ACCTGTTTTACCTGGTGCATGGGTCAAATTGTCTTAATGGGACATCAACCTTTTTATTACTTGATTT
 GGAGTGGACTTGCTTGTGCAAGTTGGGTAGCTCTTTAACAACCACTTGAACCTTTTTATTACTTGATTA
 GGACTTGCTGTGCAAGTTGGTTTCAACCTTTTTAACCACATCAACCTTTTAACTATTAAATTCATGG
 TTGACAAGGCTTTCTAATTCAGGTCAGCATCTTCGATGCAAGGCAGGAATTGCTCTAAATGAAAAC
 TTGTGAAGCTGTTACCTGGTATGACAATGAGTGGGATACAGTAAAGCACTATACTTGTCAATGACTG
 GTAGCAATAGTTTCTAATTTGGTAGACATTTTGTAAAGCATGATAATAATAGAGTATACCTATTTTCAAT
 TTTAATTGTACCACATGATAAATGATGAGATCATCTTACTGACCTTTTGGTGTGGCTATTGCAGCAC
 ACGTGTGGTTGACTTGATCGTTCATATTGCATCTGTTCACTCACTCCTTTTGTGCGAGTTGCAGC
 ACCAGGTGTTT

도면6

TTTCGTGATTTGTTCTCTTTGCTTATAGGATTAGGTTTTGATTTGTTCTTCATTCTTAGATTAGGTAT
 TGATTTGTCCTTCATTACTTAGATTAGGTATTGATTTGTTCTTCATTACTGATAGCCTGATGGGATCAGG
 TATTGCTACATCCTAACTTTATTAGTACCTGTTTTCCCTTTTATTCTGGTAGGTTTTAGGAGTGCATGT
 TTCATGCTCGAAAAATGTTGTGCATTTCTTCCAATTGCCACGGAAAGATGAATAATTGCATGATGCAGTTT
 TGTTTTACCATGTTATTGTGGTACATTTCTCTTTATTAATGACATGGTTTGGAGTAGAGATTGATATGT
 ACGGATGTAATGGTGAGACTTCTAGTCCGTCAGATTTATTGTACAGTTTTCAGTAAGTAAAGTCATGTTA
 GTTTTTATTAAATGTTAATAACTTTATTGGTTGGACTCTGTGGTTTATTGTATCCTATAAAAAATC
 TCTTGCAATTTCTTGATTGGTGGTAATTTCTTGCTTTTCAGGGTGGAGCAAGAAGGTCACTATTCT
 GCCCCAAGTAAGGATGCTCCATGTTTGTGTGGGTGCAATGAGAAGGAATACACACCTGACCTTCATA
 TTATTCTAATGCTAGCTGCACTACTAAGTCCCTTGCTOCCCTTGCAAAGGTATTTATTATCTCTGCTG
 CTAAGTTATAATATGTTTTTTTTGAGCAATTCGGAGGGCTCAAAATTTTCTAAGGTTTCTCCTTCTTAA
 TATCAAGGTGATCAACGACAGATTCCGCTGTTGAGGGGTTTATGACTACTGTACACTCAATTACTGGT
 GGGTTTTGGGTAGTAGTTGTTTATTTATCTGTCTTGATTATAACAATGTACTGCATTGTAAATGCA
 AACGTGTTCCATGATTCACCCACACAAAAACTGTTGATGGACCATCAGCAAAGGACTGGAGAGGGG
 AAGAGCTGCATTCATATCATCTAGCAGTACTGGGGTCCCAAGGTAATGTGAAGTTATTTTGT
 TTTTTATTCGATAGAGGGACAAATTTCTTGTTCTGTTGTGCAAAAAGCCTATTCTTTTCTTGGCTGGTG
 GACTTGACATTTTTCATGAAGTTAATTCATTTTTTATATGTTACTAATTGATGCATGCTGTTCAAATT
 TTGGTGTGTGGTTTGGTGGTAGCTGTTGGGAAAGTGCTACCTGCATTAATGGGAAATTGACTGGAAT
 GGCCTTCAGAGTTCCACTGTGGATGCTCAGTGGTGTCTCAGTGTCAAGTTGGAAAAGAAGGCCAGC
 TATGAGGAAATTAAGCTGTTATTAAGTAAGGATTGAAAACTACTGTGATTTTTATGTTTGTCTTCAT
 TCACAAAACTATGTTTGCATCAGCTTTGAATTATAGAGGAGATTTAATGTCCTGCATGCTATTAACT
 TTCTAAGTTTCACAAAACTCAGTGTAGTGCAGTTTAGTTTTCTTTTCATTGATTCATTATTTCTTT
 TCTTTTACTTTTGTAGGAGGAGTGGAGGAAAGCTCAAGGGAATCTTGGTTTACACTGAAGATGATG
 TAGTCTCCACTGACTTTGTGGGACAGCAAGTAAGGATTGATACAGGAAGTCTTTGTGGTTGTTTTG
 TTGTTTCCCTTCACTTTTCTCTCTCAAACTGGTGCATGGGTCACTATTATAATTGGACACCCATCA
 AACTGGTTTTAOCCTGGTGCATGGGTCAAATTGCTTAATGGGACATCAAACTTTTTATTTACTTGATTT
 GGAGTGGACTTGCTTGTGCAAGTTGGGTAGCTCTTTAACAACCACTTGAACCTTTTTATTTACTTGATTA
 GGACTTGCTGTGCAAGTTGGTTTCAACCTTTTTAACCAGATCAACCTTTTAACTATTAAATTCATGG
 TTGACAAGGCTTTCTAATTCCAGGTCAAGCATCTTCGATGCAAGGCAGGAATTGCTCTAAATGAAAAT
 TTGTGAAGCTGGTTACCTGGTATGACAATGAGTGGGATACAGGTAAGCACTATCTTGTCATGACTG
 GTAGCAATAGTTTCTTAATTGGTAGACATTTTGTAGCATGATAATAAGAGTATAOCTATTTTCAAT
 TTTAATTGTACCACATGATAAATGATGATCATACTTACTGACCCCTTTGGTGTGGCCTATTGCAGCAC
 ACGTGTGGTTGACTTGATGTTTCATATTGCATCTGTTCACTAAGTCACTCCTTTTGCTGGGAGTTGCAGC
 AGCAGGTGTTT

도면7

TTTCGTGATTGTCTCTCTTGGCTTATAGGATTAGGTTTTGATTGTCTTCATTCTTAGATTAGGTAT
TGATTGTCTTCATTACTTAGATTAGGTATTGATTGTCTTCATTACTGATAGCCTGATGGGATCAGG
TATTGCTACATCTAACTTTATTAGTAOCTGTTTTCTTTTATTCTGGTAGGTTTTAGGAGTGCATGT
TTCATGCTGGAAAAATGTTGTGCATTCTTCCAATTGCCACGGAAAGATGAATAATTGCATGATGCAGTTT
TGTTTTACCATGTTATTGTGGTACATTCTCTTTATTAATGACATGGTTTGGAGTAGAGATTTGTATGT
ACGGATGTAATGGTGAGAGTTCTAGTGGTCAGATTATTGTACAGTTTTTGCAGTAAAGTCATGTTA
GTTTTTATTAATGTTAATAACTTTATTGGTTGGACTCTGTTGGTTTATTGTATCCTATAAAAAATC
TCTTGCATTTTCTTGATTGGTGGTAATTTCTTGCTTTTCAGGTGGAGCAAGAAAGGTCATCATTCT
GCCCCAAGTAAGGATGCTCCCATGTTTGTGTGGTGTCAATGAGAAGGAATACACACCTGACCTTCATA
TTATTCTAATGCTAGCTGCACTACTAAGTGGCTTGTCCCTTGCAGAAAGTATTTATTATCTCTGCTG
CTAAGTTATAATATGTTTTTTTTGAGCAATTCGGGAGGGCTCAAATTTTCTAAGGTTTCTCCTCTTAA
TATCAAGGTGATCAACGACAGATTCCGCATTGTTGACGGGCTTATGACTACTGTACACTCAATTACTGCT
GGGTTTTGGGTAGTAGTTGTTTTATTTATCTGTCTTGATTATAAACAATGTACTGCATTGTAAATGCA
AACGTGTCCATGTGATTACGCCACACAAAAACTGTTGATGGACCATCAGCAAAGGACTGGAGAGGGGG
AAGACTCGCATTCATATCATCTAGCAGTACTGGGGCTGCCAAGGTAATTGTGAAGTTATTTTGT
TTTTTATCGATAGAGGACCAAAATTTCTGTCTGTTGTGCAAAAAGCCTATTCTTTCTGGCTGGTG
GACTTGACATTTTTTCATGAACCTAATTCATTTTTTATATGTTACTAATTGATGCATGCTGTTTCAAATT
TTGGTGTGTGGTTTTGGTGGTAGGCTGTTGGGAAAGTCTACCTGCATTAATGGGAAATTGACTGGAAT
GCCCTTCAGAGTTCCCACTGTGGATGCTCAGTGGTTGATCTCACTGTCAGGTTGGAAAAGAAGGCCAGC
TATGAGGAAATTAAGCTGTTATTAAGTAAGGATTGAAAACACTGTGATTTTTATGTTTGTCTTCAT
TCACAAAAACTATGTTGGATCATGCTTTGAATTATAGAGGAGATTTAATGTCTCTGCATGCTATTAAC
TCTAAGTTTCACAAAAACCTCACTGTAGTGCAGTTTTAGTTTTCTTTTTCATTGATTCATTATTTCTTT
TCTTTTACTTTTTGTTAGGGAGGAGTCGGAGGGAAAGCTCAAGGGAATCTTGGGTTACACTGAAGATGATG
TAGTCTCCACTGACTTTGTGGGCGACAGCAGGTAAGGATTGATACAGGAAGTCTTTTGTGGTTGTTTTG
TTGTTTCTCTCTCACTTTTCTCTCTCCAACCTGGTGCATGGGTCAGTATTATAATTGGACACCCATCA
ACCTGGTTTTACCTGGTGCATGGGTCAAATTGTCTTAATGGGACATCAACCTTTTTATTACTTGATTT
GGAGTGGACTTGCTTGTCGAAGTTGGGTAGCTCTTTAACAACCACTTGAACCTTTTTATTACTTGATTA
GGACTTGCTGTGCAAGTTGGTTTCAACCTTTTTAACCACATCAACCTTTTTAACTATTAAATTCATGG
TTGACAAGGCTTTCTAATTCAGGTCAGCATCTTCGATGCAAGGCAGGAATTGCTCTAAATGAAAAC
TTGTGAAGCTGGTTACCTGGTATGACAAATGAGTGGGATACAGTAAAGCACTATCTTGCAATGACTG
GTAGCAATAGTTTCTTAATTGGTAGACATTTTGTAAAGCATGATAATAATAGAGTATACCTATTTTCAAT
TTTAATTGTACCACATGATAAATGATGAGATCATACTTACTGACCCCTTTGGTGTGGCCTATTGCAGCAC
ACGTGTGGTTGACTTGATCGTTTCAATTGCATCTGTTCACTAAGTCACTCCTTTTGTCTGGAGTTGCAGC
AGCAGGTGTTT

도면8

TTTCGTGATTGTTCTCTCTTGGCTTATAGGATTAGGTTTTGATTGTTCTTCATTCTTAGATTAGGTAT
TGATTGTCCTTCATTACTTAGATTAGGTATTGATTGTTCTTCATTACTGATAGCCTGATGGGATCAGG
TATTGCTACATCCTAACTTTATTAGTAOCTGTTTTCTTTTTATTCTGGTAGGTTTTAGGAGTGCATGT
TTCATGCTGGAAAAATGTTGTGCATTCTTCCAATTGCCACGGAAAGATGAATAATTGCATGATGCAGTTT
TGTTTTACCATGTTATTGTTGTACATTCTCTTTATTAATGACATGGTTTGGAGTAGAGATTTGTATGT
ACGGATGTAATGGTGAGAGTTCTAGTGCGTCAGATTTATTGTACAGTTTTTGCAGTAAAGTCATGTTA
GTTTTTATTAATGTTAATAACTTTATTGGTTGGACTCTGTTGGTTTATTGTATCCTATAAAAAATC
TCTTGCATTTTCTTGATTGGTGGTAATTTCTTGCTTTTCAGGTGGAGCAAGAGGTCATCATTCT
GCCCCAAGTAAGGATGCTCCCATGTTTGTGTGGTGTCAATGAGAAGGAATACACACCTGACCTTCATA
TTATTCTAATGCTAGCTGCACTACTAAGTGCCTTGCTCCCTTGCAAAGTATTTATTATCTCTGCTG
CTAAGTTATAATATGTTTTTTTTGAGCAATTCGGGAGGGCTCAAATTTTCTAAGGTTTCCTCTCTTAA
TATCAAGGTGATCAACGACAGATTCCGCATTGTTGACGGGCTTATGACTACTGTACACTCAATTACTGCT
GGGTTTTGGGTAGTAGTTGTTTTATTTATCTGTCTTGATTATAAACAATGTACTGCATTGTAAATGCA
AACGTGTTCCATGTGATTACGCCACACAAAAACTGTTGATGGACCATCAGCAAAGGACTGGAGAGGGGG
AAGAGCTGCATCATTCAATATCATTCTAGCAGTACTGGGGCTGCCAAGGTAATTGTGAAGTTATTTGT
TTTTTATCGATAGAGGACCAAAATTTCTTGTTCTGTTGTGCAAAAAGCCTATTCTTTCTGGCTGGTG
GACTTGACATTTTTTCATGAACCTTAATTCATTTTTTATATGTTACTAATTGATGCATGCTGTTCAAATT
TTGGTGTGTGGTTTTGGTGGTAGGCTGTTGGGAAAGTGCTACCTGCATTAATGGGAAATTGACTGGAAT
GCCCTTCAGAGTTCCCACTGTGGATGCTCAGTGGTTGATCTCACTGTCAAGTTGGAAAAGAAGGCCAGC
TATGAGGAAATTAAGCTGTTATTAAGTAAGGATTGAAAACACTGTGATTTTTATGTTTGTCTTCAT
TCACAAAAACTATGTTGGATCATGCTTTGAATTATAGAGGAGATTTAATGTCTCTGCATGCTATTAAC
TTCCTAAGTTTCACAAAAACCTCACTGTAGTGCAGTTTTAGTTTTCTTTTCATTGATTCATTATTTCTTT
TCTTTTACTTTTTGTTAGGGAGGAGTCGGAGGGAAAGCTCAAGGGAATCTTGGGTTACACTGAAGATGATG
TAGTCTCCACTGACTTTGTGGGCGACAGCAGGTAAGGATTGATACAGGAAGTCTTTTGTGGTTGTTTTG
TTGTTTCTCTCTCACTTTTCTCTCTCCAACCTGGTGCATGGTCAAGTATTATAATTGGACACCCATCA
ACCTGGTTTTACCTGGTGCATGGGTCAAATTGCTTAATGGGACATCAACCTTTTTATTACTTGATTT
GGAGTGGACTTGCTTGTCGAAGTTGGGTAGCTCTTTAACAACCACTTGAACCTTTTTATTACTTGATTA
GGACTTGCTGTGCAAGTTGGTTTCAACCTTTTTAACCACATCAACCTTTTTAACTATTAAATTCATGG
TTGACAAGGCTTTCTAATTCAGGTCAGCATCTTCGATGCAAGGCAGGAATTGCTCTAAATGAAAAC
TTGTGAAGCTGGTTACCTGGTATGACAAATGAGTGGGATACAGTAAAGCACTATCTTGCAATGACTG
GTAGCAATAGTTTTCTTAATTGGTAGACATTTTGTAAAGCATGATAATAATAGAGTATACCTATTTTCAAT
TTTAATTGTACCACATGATAAATGATGAGATCATACTTACTGACCCCTTTGGTGTGGCCTATTGCAGCAC
ACGTGTGGTTGACTTGATCGTTTCATATTGCATCTGTTCACTAAGTCACTCCTTTTGTCTGGAGTTGCAGC
AGCAGGTGTTT

도면9

TTTCGTGATTGTCTCTCTTGGCTTATAGGATTAGGTTTTGATTGTCTTCATTCTTAGATTAGGTAT
TGATTGTCTTCATTACTTAGATTAGGTATTGATTGTCTTCATTACTGATAGCCTGATGGGATCAGG
TATTGCTACATCTAACTTTATTAGTAOCTGTTTTCTTTTATTCTGGTAGGTTTTAGGAGTGCATGT
TTCATGCTGGAAAATGTTGTGCATTCTTCCAATTGCCACGGAAAGATGAATAATTGCATGATGCAGTTT
TGTTTTACCATGTTATTGTGGTACATTCTCTTTATTAATGACATGGTTTGGAGTAGAGATTTGTATGT
ACGGATGTAATGGTGAGAGTTCTAGTGGTCAGATTATTGTACAGTTTTTGCAGTAAAGTCATGTTA
GTTTTTATTAATGTTAATAACTTTATTGGTGGACTCTGTTGGTTTATTGTATCCTATAAAAAATC
TCTTGCATTTTCTTGATTGGTGGTAATTTCTTGTGCTTTTCAGGTGGAGCAAGAAAGGTCATCTTTCT
GCCCCAAGTAAGGATGCTCCCATGTTTGTGTGGGTCTCAATGAGAAGGAATACACACCTGACCTTCATA
TTATTCTAATGCTAGCTGCACTACTAAGCTGCTTGTCCCTTGCAGAAAGTATTTTATTATCTCTGCTG
CTAAGTTATAATATGTTTTTTTTGAGCAATTCGGGAGGGCTCAAATTTTTCTAAGGTTTCTCCTTCTTAA
TATCAAGGTGATCAACGACAGATTCCGCATTGTTGAGGGCTTATGACTACTGTACACTCAATTACTGCT
GGGTTTTGGGTAGTAGTTGTTTTATTTATCTGTCTTGATTATAAACAATGTACTGCAATTGTAAATGCA
AACGTGTCCATGTGATTACGCCACACAAAAACTGTTGATGGACCATCAGCAAGGACTGGAGAGGGGG
AAGAGCTGCATCATTCAATATCATTCTAGCAGTACTGGGGCTGCCAAGGTAATTGTGAACCTATTTTGT
TTTTTATCGATAGAGGACCAATTTCTTGTCTGTTGTGCAAAAAGCCTATTCTTTCTGGCTGGTG
GACTTGACATTTTTCATGAACCTTAATTCATTTTTTATATGTTACTAATTGATGCATGCTGTTTCAAATT
TTGGTGTGTGGTTTTGGTGTAGGCTGTTGGGAAAGTCTACCTGCATTAATGGGAAATTGACTGGAAT
GCCCTTCAGAGTTCCACTGTGGATGCTCAGTGGTTGATCTCAGCTGTGAGGTTGAAAAGAGGCCAGC
TATGAGGAAATTAAGCTGTTATTAAGTAAGGATTGAAAACACTGTGATTTTTATGTTTGTCTTCAT
TCACAAAAACTATGTTGGATCATGCTTTGAATTATAGAGGAGATTTAATGTCTCTGCATGCTATTAAC
TTCTAAGTTTCACAAAAACCTCACTGTAGTGCAGTTTTAGTTTTCTTTTCATTGATTCATTATTTCTTT
TCTTTTACTTTTTCTTAGGGAGGAGTCCGAGGGAAAGCTCAAGGGAATCTTGGTTACACTGAAGATGATG
TAGTCTCCACTGACTTTGTGGGCGACAGCAGGTAAGGATTGATACAGGAAGTCTTTTGTGGTTGTTTTG
TTGTTTCTCTCTCACTTTTCTCTCTCCAACCTGGTGCATGGGTGAGTATTATAATTGGACACCCATCA
ACCTGGTTTTACCTGGTGCATGGGTCAAATTGCTTAAATGGGACATCAACCTTTTTATTACTTGATTT
GGAGTGGACTTGCTTGTCAGATTGGGTAGCTCTTTAACAACCACTTGAACTTTTTATTACTTGATTA
GGACTTGCTGTGCAAGTTGGTTTCAACCTTTTTAACCACATCAACCTTTTTAACTATTAAATTCATGG
TTGACAAGGCTTTCTAATTCAGGTCAGCATCTTCGATGCAAGGCAGGAATTGCTCTAAATGAAAAC
TTGTGAAGCTGGTTACCTGGTATGACAAATGAGTGGGATACAGTAAAGCACTATCTTGCAATGACTG
GTAGCAATAGTTTTCTTAATGGTAGACATTTTGTAAAGCATGATAATAATAGAGTATACCTATTTTCAAT
TTTAATTGTACCACATGATAAATGATGAGATCATACTTACTGACCCCTTTGGTGTGGCCTATTGCAGCAC
ACGTGTGGTTGACTTGATCGTTTCATATTGCATCTGTTCACTAAGTCACTCTTTTGTGCGAGTTGCAGC
AGCAGGTGTTT

서열목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of KyungHee University
- <120> SNP Primers for Yunpoong Distinction of Korean Ginseng (Panax
ginseng C.A.Meyer) and Method for Yunpoong Distinction Using the
Same
- <130> P110002
- <160> 4
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 2321
- <212> DNA
- <213> Panax ginseng
- <400> 1

tttcgtgatt tgttcttctt tgcttatagg attaggtttt gatttgttct tcatttctta 60

gattaggtat tgatttgtcc ttcttactt agattaggta ttgatttgtt ctcttact 120

gatagcctga tgggatcagg tattgctaca tcctaaactt tattagtacc tgttttcctt	180
ttatttcttg taggttttag gagtgcattg ttcattgctgg aaaatgttgt gcatttcttc	240
caattgccac ggaagatga ataattgcat gatgcagttt tgttttacca tgttattgtg	300
gtacatttct cttattataa tgacatgggt tggagtagag atttgtatgt acggatgtaa	360
tggtagaggt tctagtgcgt cagatttatt tgtacagttt ttgcaagtaa agtcattgta	420
gtttttattt aatgttaata atactttatt ggttggactc tgttggttta ttgtatccta	480
taaaaaatc tcttgattt tcttgattgg tggtaatttc ttgtgctttt cagggtggag	540
caaagaaggc catcatttct gcccacagta aggatgctcc catgtttgtt gtgggtgtca	600
atgagaagga atacacacct gacctcata ttatttctaa tgctagctgc actactaact	660
gccttgctcc ccttgcaag gtattttatt atctctgctg ctaacttata atatgttttt	720
tttgagcaat tgggaggggc tcaattttt ctaaggtttc tccttcttaa tatcaagggtg	780
atcaacgaca gattcggcat tgttgagggg ttatgacta ctgtacactc aattactggt	840
gggttttggg tagtagtttg tttattttat ctgtcttgat tataaacaat gtactgcatt	900
tgtaatgca aacgtgttcc atgtgattca gccacacaaa aaactgttga tggacatca	960
gcaaaggact ggagaggcgg aagagctgca tcattcaata tcattctag cagtactggg	1020
gctgccaagg taatttgaa cttattttgt tttttattcg atagaggac caaatttctt	1080
gttctgttgt gcaaaaagcc tattcttttc ttggctgggt gacttgacat tttcatgaa	1140
cttaattcat tttttatat gttactaatt gatgcattgt gtttcaaatt ttgggttgtt	1200
ggtttgggtg taggctgttg ggaagtgcct acctgcatta aatgggaaat tgactggaat	1260
ggccttcaga gttccactg tggatgtctc agtggttgat ctactgtca ggttggaata	1320
gaaggccagc tatgaggaaa ttaaagctgt tattaagtaa ggattgaaaa actactgtga	1380
ttttttatgt ttgtcttcat tcacaaaaac tatgtttgga tcattgcttg aattatagag	1440
gagattttta tgctctgca tgctattaac ttctaagttt cacaaaaacc tctactgagt	1500
gcagtttttag ttttctttc attgattcat tattttcttt tctttactt ttgttaggga	1560
ggagtccggg ggaagctca agggatctt gggttacact gaagatgat tagtctccac	1620
tgactttgtg ggcgacagca ggtaaggatt gatacaggaa gtcttttgtg gttgttttg	1680
ttgtttctc cttactttt ctctctcaa cctggtgcat gggtcagtat tataattgga	1740
ccacccatca acctggtttt acctggtgca tgggtcaaat tgtcttaatg gggacatcaa	1800
cttttttatt tacttgattt ggagtggact tgcttggtga agttgggtg ctctttaaca	1860
accacttgaa cttttttatt tacttgatta ggacttgcct gtgcaagttg gtttcaacct	1920
ttttaaccac atcaaccttt taaactatta aattcatcgg ttgacaaggc tttctaattc	1980

cagggtcaagc atcttcgatg caaaggcagg aattgctcta aatgaaaact ttgtgaagct 2040
 ggttacctgg tatgacaatg agtggggata caggtaaagc actatacttg tcaatgactg 2100
 gtagcaatag tttcttaatt ggtagacatt tttgtaagca tgataataat agagtatacc 2160
 tattttcaat ttttaattga ccacatgata aatgatgaga tcatacttac tgaccctttt 2220

gggtgtggcct attgcagcac acgtgtgggt gacttgatcg ttcataattgc atctgttcag 2280
 taactcactc cttttgctcg gagttgcagc agcagggtgt t 2321

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> yunF forward primer

<400> 2

caaaggtatt ttattatctc tgctg 25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> yunR1 reverse primer

<400> 3

taattgagtg tacagtagtc atcaa 25

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> yunR2 reverse primer

<400> 4

taattgagtg tacagtagtc ataga 25