

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0125813 (43) 공개일자 2010년12월01일
(51) Int. Cl. <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>C12N 15/11</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0044700 (22) 출원일자 2009년05월21일 심사청구일자 2009년05월21일	(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 공동 220번지 충남대학교 (72) 발명자 임용표 대전광역시 유성구 지족동 SK허브 914호 안인옥 대전광역시 유성구 하기동 545 송림마을 5단지 509동 502호 (74) 대리인 최규환	

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 고려인삼에서 분리된 S S R 프라이머 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 고려인삼(*Panax ginseng*)에서 분리한 SSR 프라이머 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 서열번호 1 내지 서열번호 24로 이루어진 군에서 선택되는 2개의 염기서열을 갖는 SSR 프라이머쌍 및 이를 이용하여 PCR을 수행하는 것을 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공되는 SSR 프라이머쌍은 BAC 말단서열에서 유래한 것으로서, 인삼의 DNA 다형성을 효과적으로 검출할 수 있으며, 인삼의 DNA 프로파일을 작성하는데 매우 유용하게 이용될 수 있다. 이를 통해 인삼의 유전자원을 효율적으로 평가함으로써 신규 유전자원 도입 시 기존 보유자원과의 중복성 분석 및 신규성 확립을 효과적으로 수행할 수 있다. 또한, 인삼의 염색체 지도작성 및 새로운 유용 유전자의 동정은 물론, 유전 육종이나 질병 및 분자생물학적 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 24로 이루어진 군에서 선택되는 2개의 염기서열을 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출용 SSR(simple sequence repeat) 프라이머쌍.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 1과 2로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 3과 4로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 5와 6으로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 7과 8로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 9와 10으로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 11과 12로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 13과 14로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 15와 16으로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 17과 18로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 19와 20으로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 21과 22로 표시되는 프라이머쌍; 및 서열번호 23과 24로 표시되는 프라이머쌍으로 이루어진 군에서 선택되는 프라이머쌍.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 고려인삼(Ginseng; *Panax ginseng* C. A. Meyer)으로부터 유래된 것을 특징으로 하는 프라이머쌍.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 인삼은 고품, 금품, 선품, 선원, 연품, 천품, 치판, 자경, 길림, 추천I, 추천II, 미마끼 또는 화기삼(*Panax quinquefolius*)인 것을 특징으로 하는 프라이머쌍.

청구항 5

인삼으로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;

추출된 게놈 DNA를 주형으로 하고 제1항 또는 제2항의 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및 PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계를 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출 방법.

청구항 6

인삼 및 대조군 인삼 품종으로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;

추출된 각 게놈 DNA를 주형으로 하고 제1항 또는 제2항의 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계;

각 PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계; 및

상기 인삼 및 대조군 인삼 품종의 크기별 분리 결과를 비교하는 단계를 포함하는 인삼의 품종 동정 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항의 SSR 프라이머쌍을 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출용 키트.

청구항 8

제1항 또는 제2항의 SSR 프라이머쌍을 포함하는 인삼의 품종 동정용 키트.

청구항 9

서열번호 1 내지 24로 표시된 12 개의 프라이머쌍을 이용하여 증폭된 서열을 갖는 인삼 다형성 검출용 SSR 마커.

청구항 10

인삼 시료에서 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항 또는 제2항의 프라이머쌍을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 증폭된 서열이 고정화된 기판을 갖는 마이크로어레이.

청구항 11

인삼의 BAC 클론 말단의 염기서열을 분석하는 단계;

BAC 클론 말단 서열로부터 SSR(simple sequence repeat) 모티프를 포함하는 BAC 클론을 선발하는 단계;

SSR 모티프를 포함하는 부분을 기준으로 하여 양 방향의 프라이머쌍을 제작하는 단계; 및

상기 선발된 BAC 클론을 주형으로 하고, 상기 제작된 프라이머쌍을 사용하여 PCR을 수행하여, 인삼에서 다형성을 나타내는 프라이머를 스크리닝하는 단계를 포함하는 인삼의 다형성 검출용 SSR 마커의 동정 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 SSR 모티프는 11-30 개의 일렬 반복 모티프를 포함하는 것을 특징으로 하는 SSR 마커의 동정 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 SSR 모티프는 (TA)₁₉, (TA)₂₆, (TC)₁₁, (TA)₁₉, (TA)₂₄, (GA)₂₀, (TA)₂₈, (TA)₃₀, (TA)₂₃, (TA)₂₉, (TA)₂₆, (TA)₁₅, 또는 (TA)₁₈인 것을 특징으로 하는 SSR 마커의 동정 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 프라이머쌍은 증폭산물의 길이는 100-250 bp이며, 각 쌍의 프라이머 간에 T_m의 차이는 5℃이며, 프라이머의 T_m 범위는 50-60℃인 것을 특징으로 하는 SSR 마커의 동정 방법.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 인삼은 고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)인 것을 특징으로 하는 SSR 마커의 동정 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 인삼 및 인삼 근연종의 DNA 다형성 검출용 프라이머쌍 및 이들의 용도에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로 서열번호 1 내지 24로 표시된 12 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머로 이루어진 군에서 선택되는 2 개의 염기서열을 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출용 SSR(simple sequence repeat) 프라이머쌍, 상기 프라이머쌍을 이용한 인삼의 DNA 다형성 검출 방법 및 인삼의 품종 동정 방법, 상기 프라이머쌍을 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출용 키트 및 인삼의 품종 동정용 키트, 상기 프라이머쌍에 의해 증폭된 서열을 갖는 SSR 마커, 인삼 시료에서 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 프라이머쌍을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 증폭된 서열이 고정화된 기판을 갖는 마이크로어레이, 및 인삼의 다형성 검출용 SSR 마커의 동정 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

두릅나무과(Araliaceae)의 파낙스(*Panax*) 속은 13 개의 종을 포함하며, 그 중 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 및 화기삼(*P. quinquefolium*)이 의약적 가치로 인해 널리 재배되고 있다. 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 동아시아, 특히 한국 및 중국에서 2,000 년 이상 가장 흔히 이용되어온 약초 중 하나이다. 따라서, 인삼에 대한 의학적 및 약학적 효능 (Volger et al., 1999, Eur J Clin Pharmacol 55:567-575; Nam, 2002, J Ginseng Res 26:111-131) 및 유전학적 다양성 (Lim et al., 1993, Korean J Ginseng Sci 17:153-158; Ngan et al., 1999, Phytochemistry 50:787-791)에 관한 연구가 수행되어 왔다.

[0003]

육종에 이용되고 있는 대부분의 주요 작물 및 소재배 작물에서 해마다 많은 양의 유전자원이 수집되고 있다. 그러나, 이에 반해 유전자원에 대한 평가는 충분히 이루어지지 않고 있는 실정이다. 수집된 유전자원의 종간 및 아종간 품종의 신속한 판별은 정확한 유전자원의 관리 및 보호를 위하여 매우 중요하다. 또한 품종의 판별과 함

게 유전자원의 유형 형질 탐색과 분류, 그리고 유연관계의 규명은 유전자원의 보존이나 신품종의 창출 및 작물의 개량에 있어서 매우 중요하다.

[0004] 최근 분자생물학의 급속한 발전으로 핵산(DNA) 수준에서 유전자원의 다양성(biodiversity) 연구를 가능케 하는 핵산 지문 분석 방법 및 다양한 DNA 마커들이 개발되었다. 이를 통해 유용 형질 탐색, 생물의 종 판별, 품종 분류·동정 및 집단 개체군의 유연관계 분석을 외부환경 등에 대하여 거의 영향을 받지 않고 간단하고 신속하게 수행할 수 있게 되었다. 지금까지 개발된 PCR(polymerase chain reaction)을 이용한 지문분석법(fingerprinting)에는 RAPD(randomly amplified polymorphic DNAs) 방법, AFLP(amplified fragment length polymorphic DNA) 방법, 및 SSR(simple sequence repeat) 방법 등이 있다. 상기 방법 중 RAPD 방법은 비특이적 PCR 산물이 증폭되므로 재현성이 떨어지는 단점이 있고, AFLP 방법은 높은 DNA 다형성 검출로 각광받고 있지만 재현성이 떨어지는 밴드의 출현과 분석이 복잡하다는 단점이 있다. 이에 반해, SSR (Simple sequence repeat) 혹은 Microsatellite는 유전자좌에서 보이는 다형성으로, 단순 반복 염기서열의 반복 횟수 차이로 관찰된다. 생물의 유전체에 존재하는 많은 수의 SSR을 Microsatellite라고 하는데, Microsatellite는 2 - 6개의 뉴클레오타이드가 단순 반복되어 있는 경우가 많고 이는 DNA 복제 시 불균형 교차 등으로 인해 생성되는 것으로 알려져 있으며, 단순반복서열의 반복수는 식물의 종간 혹은 종 내에도 다양한 차이를 보이기 때문에 다형성의 수준이 높은 다중대립인자이며, 공우성 마커이고 재현성도 뛰어나다. Microsatellite는 그 주위의 DNA 염기서열로부터 고안된 프라이머를 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 증폭시킬 수 있으며, 증폭된 산물은 단순 염기서열 반복수의 차이로부터 다형성을 보인다. 현재 인간, 생쥐에서 고밀도로 포화된 SSR 유전자지도가 작성되어 있고, 벼와 콩 등의 작물에서도 포화 유전자지도가 작성되어 있으며, 식물에서 가장 많이 발견된 반복염기서열은 AT, AG와 AC의 순으로 그 빈도가 높은 것으로 알려져 있다 (Mogante *et al.*, 2002, Nature Genetics 30: 194-200). 특히, Microsatellite는 분석이 용이하고 높은 재현성을 가지는 장점으로 인하여 생물종의 동정에 자주 사용되고 있으며, 외부 환경의 영향을 전혀 받지 않는다는 장점이 있다. 이와 같은 SSR 방법의 우수성으로 인해 여러 주요작물 및 소재배 작물에서 SSR 마커를 개발하려는 연구가 한창 진행 중에 있다.

[0005] SSR 마커에 대한 연구는 1980년대 인간 게놈 연구에서부터 비롯되었다. 인간의 게놈에는 10만개 이상의 Microsatellite가 존재하는 것으로 알려져 있으며, 높은 다형성을 나타내므로 혈액형, 동위효소(isozyme) 및 단백질 다형에 비해 비교할 수 없을 만큼 높은 식별력과 정보력(informativity)을 갖는다. 따라서 Microsatellite 마커들은 개인 식별이나 친자 확인 등 법의학적 활용은 물론, 염색체 지도 작성 및 질병 관련 유전자들의 탐색에 매우 유용하게 활용되고 있다. 그 후, 마우스의 질병 관련 유전자의 지도 작성 등 다른 동물의 연구에 활용되기 시작하였으며, 현재 소, 돼지, 닭, 양, 사슴, 개, 고양이 등과 같은 주요 가축들에 대한 상당한 Microsatellite 마커들이 개발되어 있다.

[0006] 최근에는 SSR 마커가 식물의 유전 육종이나 질병 및 분자생물학적 연구에 매우 유용한 것으로 확인되었다. 일부 국가에서는 자국의 주요 농작물에 대한 Microsatellite 연구가 상당히 진행되어 있는바, 예를 들면, 미국에서는 옥수수, 독일에서는 보리나 감자, 이탈리아에는 포도에 대한 연구가 이루어져 이에 대한 데이터베이스가 구축되어 있다. 최근 2~3년간 식물에서 Microsatellite를 염색체 지도 작성과 새로운 유용 유전자 동정, 및 유전 육종에 활용하는 연구가 매우 활발히 진행되고 있으며, 세계적인 식량자원으로 중요한 벼와 옥수수 등에 대한 연구가 특히 활발히 수행되고 있다. 혼 등 (2003, Acta Pharmacol Sin 24:841-846)은 인삼을 비롯한 홍콩에서 거래되는 약재에 RAPD, RFLP(restriction fragment length polymorphism), AFLP(amplified fragment length polymorphism) 및 SSR의 유전적 마커를 이용한 동정을 시도한바, SSR로 인삼과 화기삼을 구분할 수 있음을 시사한 바 있다. 이는 게놈의 도처에 산재하는 SSR 마커가 유전 육종을 위한 교배실험이나 염색체 지도 작성뿐만 아니라, 인삼과 같은 약용 작물을 근연종으로부터 엄격히 구분할 수 있는 마커로 사용될 수 있음을 의미하는 것이다.

[0007] 인삼에 있어서, 비록 몇 연구자에 의해 RFLP (Fushimi *et al.*, 1997, Biol Pharm Bull 20:765-769), RAPD (Mihalov *et al.*, 2000, J Agric Food Chem 48:37-44), AFLP (Ha *et al.*, 2002, J Agric Food Chem 50:1871-1875), 및 SSR (Kim *et al.*, 2007, Mol Cells 24:60-68; Ma *et al.*, 2007, Conserv Genet 8:1507-1509)과 같은 분자 마커가 개발되긴 했으나, 유전학적 및 게놈 구조의 연구는 아직 초창기이다. 마커, 특히 공우성(co-dominant), 다중대립인자(multi-allelic), 고도의 다형(polymorphic) 마커, 및 PCR에 근거한 SSR 마커의 수는 불충분하며, 대부분은 비특이적 게놈 DNA로부터 개발된 것이다.

[0008] 물리지도작성, 게놈 구조의 연구, 및 인삼에서 중요한 유전자의 지도작성 및 태깅을 위해서는 염색체 특이적 및/또는 BAC 특이적 SSR 마커의 개발이 필요하다. 게놈 수준에서 인삼의 연구에 박차를 가하기 위해 인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer) 재배종 천풍의 게놈 DNA를 대표하는 106,368 개의 클론이 포함되는 BAC 라이브러리가 제작

되었다. 상기의 라이브러리를 이용하여, 2,167개의 BAC 클론으로부터 2,492 개의 BAC 말단서열이 얻어졌다. 상기의 BAC 말단서열이 분석되어, 338 카피 수를 가진 103 개의 일렬 Microsatellite 반복 모티프가 동정되었다 (Hong et al., 2004, Mol Genet Genomics 276:709-716).

- [0009] 한국특허등록 제10-842434호에는 인삼에서 유래된 SSR 프라이머 및 이의 용도가 개시되어 있으며, 한국특허등록 제10-742712호에는 인삼과 화기삼 간의 중간 다형성을 나타내는 Microsatellite 마커, 및 이를 증폭하기 위한 프라이머가 개시되어 있으나, 본 발명과는 SSR 정보 수집원이 다르다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0010] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명에서는 고려인삼(*Panax ginseng*)의 BAC 말단 서열로부터 SSR 모티프를 찾아내어, 그 주변의 서열로부터 프라이머를 제작하여, PCR하고 전기영동을 통해 다형성을 확인하여, 고려인삼(*Panax ginseng*)의 품종간 및 화기삼(*Panax quinquefolius*)을 대상으로 DNA 다형성을 검출함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결수단

- [0011] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 인삼의 DNA 다형성 검출용 SSR 프라이머쌍을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 프라이머쌍을 이용한 인삼의 DNA 다형성 검출 방법을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 프라이머쌍을 이용한 인삼의 품종 동정 방법을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 프라이머쌍을 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출용 키트를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 프라이머쌍을 포함하는 인삼의 품종 동정용 키트를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 프라이머쌍에 의해 증폭된 서열을 갖는 SSR 마커를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 프라이머쌍을 이용하여 증폭 반응을 수행하여, 증폭된 서열이 고정화된 기판을 갖는 마이크로어레이를 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 인삼의 다형성 검출용 SSR 마커의 동정 방법을 제공한다.

효과

- [0019] 본 발명에서 제공되는 SSR 프라이머쌍은 인삼의 DNA 다형성을 효과적으로 검출하여 인삼의 DNA 프로파일을 작성하는데 매우 유용하게 이용될 수 있다. 이를 통해 인삼의 유전자원을 효율적으로 평가함으로써 신규 유전자원 도입 시 기존 보유자원과의 중복성 분석 및 신규성 확립을 효과적으로 수행할 수 있으며, 인삼의 품종을 판별할 수 있다. 또한, 인삼의 염색체 지도작성 및 새로운 유용 유전자의 동정은 물론, 유전 육종이나 질병 및 분자생물학적 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 24로 이루어진 군에서 선택되는 2개의 염기서열을 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출용 SSR(simple sequence repeat) 프라이머쌍을 제공한다.
- [0021] 상기 서열번호 1 내지 24로 표시된 12 쌍의 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍은 각각 정방향 프라이머와 역방향 프라이머로 이루어져 있으며, 홀수로 표시된 서열번호가 정방향 프라이머이며, 짝수로 표시된 서열번호가 역방향 프라이머이다. 바람직하게는, PGH005F09D (서열번호 1과 2로 표시되는 프라이머쌍), PGH005L15E (서열번호 3과 4로 표시되는 프라이머쌍), PGH005N08D (서열번호 5와 6으로 표시되는 프라이머쌍), PGH006C23D (서열번호 7과 8로 표시되는 프라이머쌍), PGH006D01E (서열번호 9와 10으로 표시되는 프라이머쌍), PGH006D04D (서열번호 11과 12로 표시되는 프라이머쌍), PGH007K22E (서열번호 13과 14로 표시되는 프라이머쌍), PGH007M22E (서열번호 15와 16으로 표시되는 프라이머쌍), PGH009E17E (서열번호 17과 18로 표시되는 프라이머쌍), PGH010B03E (서열번호 19와 20으로 표시되는 프라이머쌍), PGH009E16E (서열번호 21과 22로 표시되는 프라이머쌍), PGH006A05D (서열번호 23과 24로 표시되는 프라이머쌍)로 이루어진 군에서 선택된다. 이들 모든 프라이머 조합은 다형성이 가장 많이 생성되는 단순반복서열 (simple sequence repeat)의 주변서열로부터 제작하였으며, PCR

을 통해 증폭하여 전기영동을 통해 산물을 확인함으로써 품종간 혹은 개체간 혹은 종간 DNA 다형성 검출에 적용될 수 있다. 본 발명의 프라이머는 모두 고려인삼(*Panax ginseng*) 품종 천풍의 BAC 말단 서열 정보에 기반하여 제작되었다.

- [0022] 상기 올리고뉴클레오타이드는 각 프라이머의 서열 길이에 따라 각 서열 내의 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상, 26개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. 예를 들면, 서열번호 1의 프라이머(26개 뉴클레오타이드)는 서열번호 1의 서열 내의 15개 이상, 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드일 수 있으며, 서열번호 2의 프라이머(26개 뉴클레오타이드)는 서열번호 1의 서열 내의 16개 이상, 17개 이상, 18개 이상, 19개 이상, 20개 이상, 21개 이상, 22개 이상, 23개 이상, 24개 이상, 25개 이상의 연속 뉴클레오타이드의 절편으로 이루어진 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 따른 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍은 서열번호 1 내지 24로 표시된 12 쌍의 프라이머쌍을 모두 포함할 수 있다.
- [0024] 상기 인삼은 고품, 금풍, 선풍, 선원, 연풍, 천풍, 치판, 자경, 길림, 추천I, 추천II, 미마끼, 화기삼(*Panax quinquefolius*), 전칠삼(*Panax notoginseng*) 또는 죽절삼(*Panax japonicus*)일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 카피하려는 핵산 가닥에 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드 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.
- [0026] 본 명세서에 있어서, 프라이머로서 이용된 올리고뉴클레오타이드는 또한 뉴클레오타이드 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.
- [0027] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0028] 인삼으로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;
- [0029] 추출된 게놈 DNA를 주형으로 하고 본 발명의 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및
- [0030] PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계를 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출 방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 방법은 인삼 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계를 포함한다. 상기 시료에서 게놈 DNA의 추출은 당업계에서 통상적으로 사용되는 페놀/클로로포름 추출법, SDS 추출법 (Tai et al., Plant Mol. Biol. Reporter, 8: 297-303, 1990), CTAB 분리법(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide; Murray et al., Nuc. Res., 4321-4325, 1980) 또는 상업적으로 판매되는 DNA 추출 키트를 이용하여 수행할 수 있다. 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 일 실시예에 따른 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍을 프라이머로 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭할 수 있다. 표적 핵산을 증폭하는 방법은 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 방법이 있다. 이 중에서, PCR이란 중합효소를 이용하여 표적 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍으로부터 표적 핵산을 증폭하는 방법이다. 이러한 PCR 방법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 키트를 이용할 수도 있다.
- [0032] 상기 인삼의 DNA 다형성 검출 방법에 있어서, 인삼은 고품, 금풍, 선풍, 선원, 연풍, 천풍, 치판, 자경, 길림, 추천I, 추천II, 미마끼, 화기삼(*Panax quinquefolius*), 전칠삼(*Panax notoginseng*) 또는 죽절삼(*Panax japonicus*)일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 방법에 있어서, 상기 PCR 산물 또는 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 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍은 상기에 기재된 바와 같다.

- [0034] 본 발명의 방법은 상기 증폭 산물을 검출하는 단계로서, PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계를 포함한다. 상기 증폭 산물의 검출은 DNA 칩, 겔 전기영동, 방사성 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 증폭 산물을 검출하는 방법 중의 하나로서, 겔 전기영동을 수행할 수 있다. 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.
- [0035] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0036] 인삼 및 대조군 인삼 품종으로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;
- [0037] 추출된 각 게놈 DNA를 주형으로 하고 본 발명의 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계;
- [0038] 각 PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계; 및
- [0039] 상기 인삼 및 대조군 인삼 품종의 크기별 분리 결과를 비교하는 단계를 포함하는 인삼의 품종 동정 방법을 제공한다.
- [0040] 상기 게놈 DNA를 추출하는 단계, PCR을 수행하는 단계, PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계는 상기에 언급한 바와 같다.
- [0041] 상기 인삼의 품종 동정 방법에 있어서, 인삼 및 대조군 인삼은 고품, 금품, 선품, 선원, 연품, 천품, 치판, 자경, 길림, 추천I, 추천II, 또는 미마끼, 또는 화기삼(*Panax quinquefolius*), 전칠삼(*Panax notoginseng*) 또는 죽절삼(*Panax japonicus*)일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 프라이머쌍을 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출용 키트를 제공한다. 상기 키트는 증폭 반응을 수행하기 위한 시약을 포함할 수 있으며, 상기 증폭 반응을 수행하기 위한 시약은 내열성 DNA 중합효소, dNTPs, 및 버퍼를 포함할 수 있다. 상기 dNTP 혼합물은 dATP, dCTP, dGTP, dTTP를 포함하며, 내열성 DNA 중합효소는 Taq DNA 중합효소, Tth DNA 중합효소 등 시판되는 내열성 중합효소를 이용할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 설명서를 추가로 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 프라이머쌍을 포함하는 인삼의 품종 동정용 키트를 제공한다.
- [0044] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 본 발명에 따른 프라이머쌍을 이용하여 증폭된 서열을 갖는 인삼 다형성 검출용 SSR 마커를 제공한다.
- [0045] 본 발명의 일 구현예에 따른 마커에서, 상기 마커는 서열번호 1 및 2의 프라이머쌍, 서열번호 3 및 4의 프라이머쌍, 서열번호 5 및 6의 프라이머쌍, 서열번호 7 및 8의 프라이머쌍, 서열번호 9 및 10의 프라이머세트, 서열번호 11 및 12의 프라이머쌍, 서열번호 13 및 14의 프라이머쌍, 서열번호 15 및 16의 프라이머쌍, 서열번호 17 및 18의 프라이머쌍, 서열번호 19 및 20의 프라이머쌍, 서열번호 21 및 22의 프라이머쌍, 서열번호 23 및 24의 프라이머쌍으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 프라이머쌍을 이용하여 증폭된 서열을 갖는 인삼 다형성 검출용 SSR 마커를 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 마커는 SSR 마커 중에서 각각 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 11개 이상을 포함할 수 있다. 가장 바람직하게는, 상기 마커는 표 1에 기재된 서열번호 1 내지 24로 표시된 12개 쌍의 모든 프라이머쌍을 이용하여 증폭된 서열을 갖는 인삼 다형성 검출용 SSR 마커를 포함할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인삼 시료에서 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 본 발

명에 따른 프라이머쌍을 이용하여 증폭 반응을 수행하여 증폭된 서열이 고정화된 기판을 갖는 마이크로어레이를 제공한다.

- [0048] 본 발명의 명세서에서, "마이크로어레이"란 기판 상에 폴리뉴클레오티드의 그룹이 높은 밀도로 고정화되어 있는 것으로서, 상기 폴리뉴클레오티드 그룹은 각각 일정한 영역에 고정화되어 있는 마이크로어레이를 의미하며, 이는 DNA 칩 또는 PNA 칩일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 마이크로어레이는 당업계에 잘 알려져 있다. 마이크로어레이에 관하여는 예를 들면, 미국특허 제5,445,934호 및 제5,744,305호에 개시되어 있으며, 이들 특허의 내용은 참조에 의하여 본 명세서에 포함된다.
- [0049] 용어 "기판"은 혼성화 특성을 보유하고, 혼성화의 배경 수준이 낮게 유지되는 조건하에 마커가 부착될 수 있는 임의의 기판을 말한다. 통상적으로, 상기 기판은 미세역가(microtiter) 플레이트, 막(예를 들면, 나일론 또는 니트로셀룰로오스) 또는 미세구(비드) 또는 칩일 수 있다. 막에 적용 또는 고정 전에, 핵산 프로브를 변형시켜 고정화를 촉진시키거나 혼성화 효율을 개선시킬 수 있다. 상기 변형은 단독중합체 테일링(homopolymer tailing), 지방족기, NH_2 기, SH 기 및 카르복실기와 같은 상이한 반응성 작용기와와 커플링, 또는 바이오틴, 합텐 또는 단백질과의 커플링을 포함할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0051] 인삼의 BAC 클론 말단의 염기서열을 분석하는 단계;
- [0052] BAC 클론 말단 서열로부터 SSR(simple sequence repeat) 모티프를 포함하는 BAC 클론을 선발하는 단계;
- [0053] SSR 모티프를 포함하는 부분을 기준으로 하여 양 방향의 프라이머쌍을 제작하는 단계; 및
- [0054] 상기 선발된 BAC 클론을 주형으로 하고, 상기 제작된 프라이머쌍을 사용하여 PCR을 수행하여, 인삼에서 다형성을 나타내는 프라이머를 스크리닝하는 단계를 포함하는 인삼의 다형성 검출용 SSR 마커의 동정 방법을 제공한다.
- [0055] 상기 BAC 클론 말단의 염기서열 분석은 당업계에 공지된 방법에 의해 수행할 수 있으며, 특별히 제한되지는 않으나 바람직하게는 자동염기서열분석법 또는 파이로시퀀싱법일 수 있다.
- [0056] 본 발명에 있어서, SSR 모티프를 포함하는 BAC 클론의 선발은 당업계에 공지된 방법에 의해 수행할 수 있으며, 바람직하게는 상기 염기서열 분석한 BAC 클론의 말단서열을 대상으로 TIGR(The Institute for Genomic Research) 전이성 인자 데이터베이스(transposable element database) (ftp://ftp.tigr.org/pub/data/o_sativa/osal/PUBLICATION_RELEASE/) 및 RepeatMasker 소프트웨어 (<http://repeatmasker.genome.washington.edu>)를 이용하여 검색할 수 있다.
- [0057] 상기 SSR 모티프는 $(\text{CA})_n$ 및 $(\text{GT})_n$ 과 같은 디뉴클레오티드 반복단위, 예를 들면 $(\text{AAT})_n$, $(\text{AGC})_n$, $(\text{AGG})_n$, $(\text{CAC})_n$, $(\text{CCG})_n$ 및 $(\text{CTT})_n$ 과 같은 트리뉴클레오티드 반복단위 및 예를 들면 $(\text{CCTA})_n$, $(\text{CTGT})_n$, $(\text{CTTT})_n$, $(\text{TAGG})_n$, $(\text{TCTA})_n$ 및 $(\text{TTCC})_n$ 과 같은 테트라뉴클레오티드 반복단위를 포함하나 이에 한정되지 않으며, $(\text{TAA})_n$, $(\text{YAA})_{11}$, $(\text{CAATAA})_8$, $(\text{GGM})_{10}$, $((\text{T})5\text{A})_5$, $(\text{GAA})_{18}$, $(\text{ATG})_6$, $(\text{GA})_6$, $(\text{ACG})_7$, $(\text{GT})_8$, $(\text{GA})_{14}$, $(\text{AG})_6$, $(\text{GT})_7$, $(\text{GA})_{13}$, $(\text{CCT})_4$, $(\text{GA})_9$, $(\text{A(N)})_9$, $(\text{CT})_{16}$, $(\text{GA(T)})_{21}$, $(\text{TA})_{19}$, $(\text{TA})_{26}$, $(\text{TC})_{11}$, $(\text{TA})_{19}$, $(\text{TA})_{24}$, $(\text{GA})_{20}$, $(\text{TA})_{28}$, $(\text{TA})_{30}$, $(\text{TA})_{23}$, $(\text{TA})_{29}$, $(\text{TA})_{26}$, $(\text{TA})_{15}$, 및 $(\text{TA})_{18}$ 로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 바람직하게는 11-30 개의 일렬 반복 모티프를 포함하는 것을 특징으로 하는 SSR 모티프이며, 더욱 바람직하게는 $(\text{TA})_{19}$, $(\text{TA})_{26}$, $(\text{TC})_{11}$, $(\text{TA})_{19}$, $(\text{TA})_{24}$, $(\text{GA})_{20}$, $(\text{TA})_{28}$, $(\text{TA})_{30}$, $(\text{TA})_{23}$, $(\text{TA})_{29}$, $(\text{TA})_{26}$, $(\text{TA})_{15}$, $(\text{TA})_{18}$ 이다.
- [0058] 상기 "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.
- [0059] 바람직하게는, 상기 프라이머쌍은 증폭산물의 길이가 100-250 bp이며, 각 쌍의 프라이머 간에 T_m 의 차이는 5°C 이며, 프라이머의 T_m 범위는 $50-60^\circ\text{C}$ 인 것일 수 있다.
- [0060] 상기 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.

[0061] 상기 SSR 마커의 동정 방법에 있어서, 인삼은 고품, 금품, 선품, 선원, 연품, 천품, 치판, 자경, 길림, 추천I, 추천II, 미마끼, 화기삼(*Panax quinquefolius*), 전철삼(*Panax notoginseng*) 또는 죽절삼(*Panax japonicus*)일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)이다.

[0062] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0063] 실시예

[0064] 실시예 1.

[0065] 본 발명에서는, 103 개의 SSR 모티프를 포함하는 BAC 말단서열로부터 1130 일렬 반복 모티프를 포함하는 35 개의 Microsatellites를 선발하였다 (표 1). 각 반복 모티프를 플랭킹하는 프라이머쌍은, 증폭산물의 길이는 100-250 bp이며, 각 쌍의 프라이머 간에 Tm의 차이는 5℃이며, 프라이머의 Tm 범위는 50-60℃인 기준 하에서 프라이머 3 프로그램 (<http://frodo.wi.mit.edu/>)을 이용하여 제작되었다. 프라이머는 바이오니아 (대전, 한국)에서 주문 제작되었다.

[0066] 실시예 2.

[0067] 인삼(*P. ginseng*) 및 화기삼(*P. quinquefolium*)의 16 가지의 재배종의 식물체 잎 시료를 한국담배인삼공사로부터 얻었다. 상기 16 재배종 중, 6 가지는 한국산 (고품, 금품, 선품, 선원, 연품, 천품), 3 가지는 중국산 (Chipan, Jakyungjong, Gillim), 3 가지는 일본산 (Chuccheon I, II 및 Mimaki)이며, 미국산 및 캐나다산인 재배종이 하나씩이다. 미국 및 캐나다산 재배종은 화기삼(*P. quinquefolium*)에 속하며, 나머지 재배종은 인삼에 속한다. 게놈 DNA의 추출을 위해서 RBC 게놈 DNA 추출 Kit을 사용하였다 (RBC Korea company, 경기도, 성남시). PCR(Polymerase chain reaction)은 1 U Taq DNA 중합효소 (바이오니아), 1X PCR 반응 버퍼 (10 mM TrisHCl, 50 mM KCl, pH 8.3), 0.25 mM dNTP 믹스, 각 프라이머쌍 5 pM, 2.0 mM MgCl₂, 및 DNA 주형 10 ng을 포함하는 25 μ l 반응액으로 수행되었다. PCR 증폭은 GenAmp 9700 PCR system (Applied Biosystems, Applied Biosystems, Foster City, CA)으로 하기와 같이 수행되었다: 5 분간 94℃에서 초기 변성 후; 30 초간 94℃에서 변성, 45 초간 어닐링 (어닐링 온도는 표 1), 45 초간 72℃에서 연장하는 과정을 35 회 순환 후; 연이어 5 분간 72℃에서 최종 연장. PCR 산물은 2% 아가로스 겔에서 분석된 후, 6% 폴리아크릴아미드 겔에서 분석되어, 은염색 (바이오니아 Company, 대전)으로 가시화되었다. 대립인자의 크기를 결정하기 위해, 25 및 50 bp DNA 래더 (Invitrogen)가 기준 마커로 사용되었다.

[0068] 실시예 3.

[0069] 기대된 및 관찰된 이형성(heterozygosity), 다형(polymorphic) 정보량, 하디디-바인베르그 평형(Hardy-Weinberg equilibrium)에 대한 카이제곱검정(Chi Square test), 및 연관불균형(Linkage disequilibrium)의 분석은 파워마커 소프트웨어 3.0 (PowerMarker software version 3.0, Liu & Muse, 2005)을 사용하여 수행되었다. 35 개의 SSR 프라이머쌍 중, 31 개의 프라이머쌍으로부터 PCR 산물이 생성되었으며, 나머지 4 쌍의 프라이머로부터는 PCR 산물이 생성되지 않았다. PCR 산물이 생성 31 개의 프라이머쌍 중 12 개의 프라이머쌍으로부터 조사된 14 개의 인삼 재배종 간에 다형(polymorphism) 밴드가 생성되었으며, 나머지 19 개의 프라이머쌍으로부터는 단형(monomorphic) 밴드가 생성되었다. 관찰된 대립인자의 수는 4 내지 8개이며, 좌위 당 평균 6 개였다 (표 1). 관찰된 및 기대된 이형성(heterozygosity)은 각각 0.5645 내지 0.7109, 및 0.7500 내지 0.9678이었다. PIC(Polymorphic information content)는 0.5282 내지 0.6903이었다. 카이제곱검정에서는 상기 좌위 중의 어느 것도 하디디-바인베르그 평형(Hardy-Weinberg equilibrium)으로부터 크게 벗어나지 않는 것으로 보였다. 연관불균형 검정에서는 마커 간에 유의한 연관이 없는 것으로 보였다. 인삼의 프라이머쌍 모두는 화기삼(*P. quinquefolium*)으로 종간 이전이 가능한 것으로 보였다. 따라서, 상기 종간 이전이 가능한 마커는 재배종의 동정, 인삼 보존, 중요한 유전자/QTL의 게놈 지도작성 및 태깅, 및 파낙스 속(*Panax*)의 다른 종에서의 관련된 연구에 사용될 수 있다.

[0070] 표 1. 고려인삼 (*Panax ginseng*)의 12 개의 BAC 말단 서열 유래의 다형 Microsatellite좌(polymorphic microsatellite loci)의 특성

[0071]

BAC-ID	정방향 프라이머	역방향 프라이머	반복 모티프	T_A ($^{\circ}C$)	N_A	크기 (bp)	H_0	H_E	PIC	카이제 곱-P값
PGH005F 09D	TTGAGTTTAAATGTTTTA CTGCGAAT (서열번호 1)	AAAATTATCAACTCCAA CATGAAAA (서열번호 2)	(TA) ₁₉	54	4	125163	0.5645	0.7500	0.5282	0.8350
PGH005L 15E	TCGAGCAAGTCCGAGTAA TG (서열번호 3)	CTTGTGAATTCAAAGGA CTCG (서열번호 4)	(TA) ₂₆	52	8	100176	0.7109	0.9678	0.6903	0.9984
PGH005N 08D	CCTTACCTCAGCTATCC TTGC (서열번호 5)	CATGCCGTCAAAAGTGAA TG (서열번호 6)	(TC) ₁₁ , (TA) ₁₉	53	8	113190	0.6289	0.9375	0.5754	0.2556
PGH006C 23D	GGAGATACAGACGACAGA GTTGG (서열번호 7)	CCAATAAGTTGATAAACG GTTCAA (서열번호 8)	(TA) ₂₄	54	6	140176	0.6563	0.9375	0.6201	0.9265
PGH006D 01E	GCTTGACGAGGTATATAT AAAGAGAGA (서열번호 9)	CTTGTGCTGGCTTGAAGCT CT (서열번호 10)	(GA) ₂₀	53	5	138172	0.6406	0.9375	0.5940	0.2556
PGH006D 04D	CACACATGACCACCAA CA (서열번호 11)	ATGCTCATGCATCGTTCA AA (서열번호 12)	(TA) ₂₈	52	6	145180	0.5938	0.8125	0.5545	0.9426
PGH007K 22E	TGAAAATAATTAGAATTT ACCGAAT (서열번호 13)	ACTAAAATCCAAGCCACA AA (서열번호 14)	(TA) ₃₀	50	5	138168	0.6016	0.8125	0.5679	0.9426
PGH007M 22E	TCAGCTCCATGTTTATGT GT (서열번호 15)	CCCTCCACAATAAGAG C (서열번호 16)	(TA) ₂₃	47	6	130190	0.5820	0.7500	0.5601	0.9996
PGH009E 17E	TTGCCAAAACCTTACTTG GT (서열번호 17)	TGTTCTGCTTTTGATAG TG (서열번호 18)	(TA) ₂₉	48	4	130172	0.6543	0.9375	0.6160	0.2557
PGH010B 03E	TCCTAAAGGAGTTTGGAA AT (서열번호 19)	TGCTGGATTGTATTTGTA CG (서열번호 20)	(TA) ₂₆	49	6	143181	0.6231	0.8750	0.5826	0.4691
PGH009E 16E	TCAATATGAGCATTTTGT CT (서열번호 21)	CATTCAATTATGGCTCC AT (서열번호 22)	(TA) ₁₅	44	9	138192	0.6191	0.9375	0.5589	0.0525
PGH006A 05D	CTCCTGATGAAAATTATC TCTCAA (서열번호 23)	TCCCAACAAAAATATTA GACAT (서열번호 24)	(TA) ₁₈	59	5	143186	0.6484	0.9375	0.6064	0.2556
M_A : 대립인자 수, T_A : 어닐링 온도, H_0 : 관찰된 이형성, H_E : 기대된 이형성, PIC: 다형성 정보 함량										

서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
 <120> SSR primers from *Panax ginseng* and uses thereof

<160> 24

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer PGH005F09Df

<400> 1
 ttgagtttaa tgtttttact gcgaat

26

<210> 2
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer PGH005F09Dr

<400> 2
 aaaatttatc aactccaaca tgaaaa

26

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer PGH005L15Ef

<400> 3
 tcgagcaagt ccgagtaatg

20

<210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer PGH005L15Er

<400> 4
ctttgtgaat tcaaaggact cg 22

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer PGH005N08Df

<400> 5
cctttacctc agctatcctt gc 22

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer PGH005N08Dr

<400> 6
catgccgtca aaagtgaatg 20

<210> 7
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer PGH006C23Df

<400> 7
ggagatacag acgacagagt tgg 23

<210> 8
<211> 24

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer PGH006C23Dr

<400> 8
ccaataagtt gataaacggt tcaa 24

<210> 9
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer PGH006D01Ef

<400> 9
gcttgacgag gtatatataa agagaga 27

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer PGH006D01Er

<400> 10
ctttgctggc ttgaagctct 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer PGH006D04Df

<400> 11
cacacatgac cacaccaaca 20

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer PGH006D04Dr

<400> 12
atgctcatgc atcgttcaaa 20

<210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer PGH007K22Ef

<400> 13
tgaaaataat tagaatttac cgaat 25

<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer PGH007K22Er

<400> 14
actaaaatcc aagccacaaa 20

<210> 15
<211> 20
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer PGH007M22Ef

<400> 15

tcagctccat gtttatgtgt

20

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer PGH007M22Ef

<400> 16

ccctccacaa ctaaagagc

19

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer PGH009E17Ef

<400> 17

ttgccaaaac ttacttgg

20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer PGH009E17Er

<400> 18

tggtcgtgct ttgatagtg 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer PGH010B03Ef

<400> 19
 tcctaaagga gttttggaat 20

<210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer PGH010B03Er

<400> 20
 tgctggattg tatttgtacg 20

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer PGH009E16Ef

<400> 21
 tcaatatgag cattttgtct 20

<210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer PGH009E16Er

<400> 22
cattcaatta ttggtccat 20

<210> 23
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer PGH006A05Df

<400> 23
ctcctgatga aaattatctc tccaa 25

<210> 24
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> primer PGH006A05Dr

<400> 24
tcccaaaca aaatattaga cat 23