(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0084772
(43) 공개일자 2010년07월28일

(51) Int. Cl.
C12N 15/10 (2006.01) *C12N 15/29* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0004095
(22) 출원일자 2009년01월19일
심사청구일자 2009년01월19일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
인준교
경기도 용인시 수지구 풍덕천2동 현대성우아파트 812동 404
이범수
경기도 군포시 산본동 1156-1 한라아파트 408동 1203호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김정현

전체 청구항 수 : 총 7 항

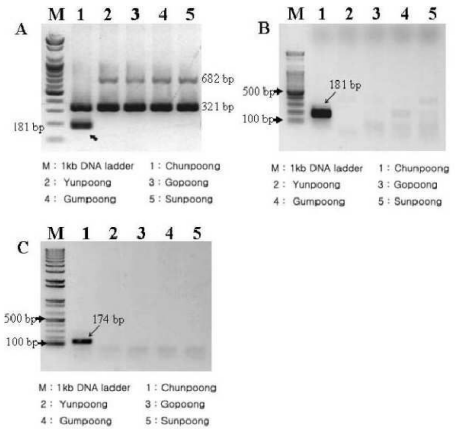
(54) MLP 유전자에 특이적인 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머와 이를 포함하는 키트 및 이를 이용한 고려인삼 천풍 구별방법

(57) 요 약

본 발명은 유사 MLP 유전자에 특이적인 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머와 이를 포함하는 실시간 PCR용 키트 및 이를 이용한 고려인삼 천풍 구별방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 인삼의 발현된 염기서열 태그(expression sequence tags, ESTs)의 3'말단의 비번역 부분(3'untranslated region, 3'UTR)에 위치한 유사 메이저 라텍스 단백질(major latex protein, MLP-like) 유전자를 근거로 하여, 이에 특이적인 SNP 프라이머를 제공한다.

본 발명에 의한 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머는 다양한 PCR 법에 적용한 후 얻어진 PCR 생성물을 확인하는 간단한 방법으로 고려인삼 천풍의 구별을 가능하게 한다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

양덕춘

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 404-102

손화

경기도 용인시 기흥구 서천동 1번지 경희대학교 우정원 2325호

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 mlpmPF 프라이머와 서열번호 2로 표시되는 TSP2R 프라이머로 이루어진 것을 특징으로 하는 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머.

청구항 2

서열번호 2로 표시되는 TSP2R 프라이머와 서열번호 3으로 표시되는 181F 프라이머로 이루어진 것을 특징으로 하는 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머.

청구항 3

서열번호 1로 표시되는 mlpmPF 프라이머, 서열번호 2로 표시되는 TSP2R 프라이머 및 형광표지 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는 고려인삼 천풍 구별용 실시간 PCR 검출 키트.

청구항 4

서열번호 2로 표시되는 TSP2R 프라이머, 서열번호 3으로 표시되는 181F 프라이머 및 형광표지 인자를 포함하는 것을 특징으로 하는 고려인삼 천풍 구별용 실시간 PCR 검출 키트.

청구항 5

청구항 3 또는 청구항 4에 있어서,

상기 형광표지 인자는 EVER green 또는 SYBR green-1 인 것을 특징으로 하는 고려인삼 천풍 구별용 실시간 PCR 검출 키트.

청구항 6

구별대상 시료로부터 추출한 DNA를 주형으로 하고, 청구항 1 또는 청구항 2 의 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 후 얻어진 PCR 생성물을 확인하는 단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 고려인삼 천풍 구별방법.

청구항 7

구별대상 시료로부터 추출한 DNA를 주형으로 하고, 청구항 3 내지 청구항 5 중에서 선택된 어느 하나의 고려인삼 천풍 구별용 실시간 PCR 검출 키트를 사용하여 실시간 PCR을 수행한 후 얻어진 PCR 생성물을 확인하는 단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 고려인삼 천풍 구별방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유사 MLP 유전자에 특이적인 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머와 이를 포함하는 키트 및 이를 이용

한 고려인삼 천풍 구별방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] *Panax* 속은 *Araliaceae* 과에 속하고 GenBank 에 18 종이 포함되어 있다. 파낙스 속 중 3개의 종인 *P. ginseng* C.A. Meyer(Korean ginseng, 고려인삼), *P. quinquefolius* L.(American ginseng, 미국삼) 및 *P. notoginseng*(Chinese ginseng, 중국삼)은 이들의 약효가 미리 알려져 있기 때문에 가장 널리 재배되고 있으며, 동양에서 식물성 치료제로서 사용되어져 왔다.

[0003] 한국은 인삼의 종주국이었으며, 1972년부터 우수한 품질과 높은 생산성을 가지는 많은 새로운 인삼 품종이 개발되어 왔다(Kwon WS et al. 1998). 고려인삼은 '청경종(Chungkyung)', '자경종(Jakyung)', 및 '황숙종(Hwangsook)' 3개의 계통(line)으로 이루어지며, 대부분의 품종은 자경종에서 유래된 것들이다. 새로운 품종은 새롭고, 독특하며, 균일하고, 안정적이어야 한다는 적어도 4 가지의 기본 특성은 가지고 있어야 한다. '천풍'은 '청경종' 계통으로부터 순계법에 의하여 개발된 첫 번째 품종이다. 현재, 고려인삼의 새로운 9개의 품종이 한국종자원(Korea Seed & Variety Service)에 등록되어 있다.

[0004] 고려인삼의 다른 품종의 인증은 전통적으로 형태학적인 기술에 의하여 수행되어 왔다. 가장 많이 사용된 분류학적 기술은 꽃봉오리의 색, 줄기, 줄기와 마디의 색깔, 줄기와 잎의 수를 비교하는 것이다. 육종과정 중에, 종자나 어린 잎의 상태에서 이들을 식별하는 것은 어렵다. 반면, DNA 마커는 효과적이고 신속하게 다른 재배종을 구별할 수 있게 한다.

[0005] 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 현대의 분자생물학 연구와 임상의학 분야에서 사용되는 기본적인 기술이다. 1980년대 초반 이들의 초기에, 이 기술은 광범위하고 정교하게 이루어졌고 반응속도와 특이성을 개선하기 위하여 발전되어 왔다.

[0006] 보통의 분자 생물학적 방법은 RAPD(random amplification of polymorphic DNA)(Partis L and Wells RJ 1996), SCAR(sequence characterized amplified region)(Naqvi NI and Chattoo BB 1996), RFLP(restriction fragment length polymorphisms)(Rajapakse S et al. 1995), SSR(simple sequence repeat) (Zhebentyayeva TN et al. 2003), ISSR(inter simple sequence repeat)(Blair MW et al. 1999), STS(sequence tagged site)(Perry DJ and Bousquet J 1998) 및 AFLP(amplified fragment length polymorphisms)(Aguirre C et al. 2005)이 종(species) 간 또는 개체간의 유전적 분석에 빈번하게 적용되었다. 더욱이, RAPD (Cui XM et al. 2003; Hiroyuki T et al. 2006; Shim YH 2003), PCR-RFLP(Um JY et al. 2001), AFLP(Ha WY et al. 2002), SNP (Park MJ et al. 2006), 및 SSR(Ma KH et al. 2007) 마커는 파낙스 종의 구분을 위하여 개발되었다.

[0007] 최근 수년 간에, 수많은 SNP에 근거한(SNP-based) 마커는 EST 염기서열을 바탕으로 설계된 프라이머에 의하여 개발되어 왔다(Goro I et al. 2007). 최근, 식물을 위한 EST-PCR 마커의 개발을 위한 복잡한 방법론이 보고되었다(Feltus FA et al. 2006; Fredslund J et al. 2006; Wei H et al. 2005; Wu F 2006).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명에서는 인삼의 발현된 염기서열 태그(expression sequence tags, ESTs)의 3'말단의 비번역 부분(3'untranslated region, 3'UTR)에 위치한 유사 메이저 라텍스 단백질(major latex protein, MLP-like) 유전자가 천풍의 인증을 위하여 유용한 것임을 밝히고, 이에 바탕을 둔 천풍 특이적 분자 마커를 개발하고자 하였다.

[0009] 따라서, 본 발명은 고려인삼 천풍 ESTs의 3'UTR의 유사 MLP 유전자 특정 영역에 바탕을 둔, 고려인삼 천풍을 특이적으로 재현가능하고 간단하게 확인할 수 있는 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머를 제공하는데 그 목적이 있다.

[0010] 또한 본 발명은 상기한 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머 쌍을 포함하는 실시간 PCR 검출 키트를 제공하는데 그 목적이 있다.

[0011] 또한 본 발명은 상기한 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머를 이용한 고려인삼 천풍 구별방법을 제공하는데 다

른 목적이 있다.

과제 해결수단

[0012] 상기한 목적을 달성하기 위한 일례로서 본 발명은, 서열번호 1로 표시되는 mlpmPF 프라이머와 서열번호 2로 표시되는 TSP2R 프라이머로 이루어진 것을 특징으로 하는 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머를 특징으로 한다.

[0013] 상기한 목적을 달성하기 위한 일례로서 본 발명은, 서열번호 2로 표시되는 TSP2R 프라이머와 서열번호 3으로 표시되는 181F 프라이머로 이루어진 것을 특징으로 하는 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머를 포함한다.

[0014] 상기한 목적을 달성하기 위한 일례로서 본 발명은, 서열번호 1로 표시되는 mlpmPF 프라이머, 서열번호 2로 표시되는 TSP2R 프라이머 및 형광표지 인자를 포함하는 고려인삼 천풍 구별용 실시간 PCR 검출 키트를 포함한다.

[0015] 상기한 목적을 달성하기 위한 일례로서 본 발명은, 서열번호 2로 표시되는 TSP2R 프라이머, 서열번호 3으로 표시되는 181F 프라이머 및 형광표지 인자를 포함하는 고려인삼 천풍 구별용 실시간 PCR 검출 키트를 포함한다.

[0016] 상기한 목적을 달성하기 위한 다른 일례로서 본 발명은, 구별대상 시료로부터 추출한 DNA를 주형으로 하고, 상기 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머를 사용하여 PCR을 수행한 후 얻어진 PCR 생성물을 확인하는 단계를 포함하여 이루어지는 고려인삼 천풍 구별방법을 포함한다.

[0017] 상기한 목적을 달성하기 위한 다른 일례로서 본 발명은, 구별대상 시료로부터 추출한 DNA를 주형으로 하고, 상기 고려인삼 천풍 구별용 실시간 PCR 검출 키트를 사용하여 실시간 PCR을 수행한 후 얻어진 PCR 생성물을 확인하는 단계를 포함하여 이루어지는 고려인삼 천풍 구별방법을 포함한다.

[0018] 이하 본 발명의 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머를 위주로 하여 본 발명을 구체적으로 설명한다.

[0019] MLP는 유액(latex)에 광범위하게 존재하고(Griffing and Nessler 1989; Nessler et al. 1985) 도관(laticifer)-특이적 유전자 발현의 규칙을 관찰하기 위한 매우 좋은 마커이다(Nessler and Vonder Haar 1990).

[0020] 이 단백질은 최근 복숭아(Ruperti et al. 2002), 대두(Stromvik et al. 1999), 딸기(Nam et al. 1999), 멜론(Aggelis et al. 1997), 피망 (Pozueta-Romero et al. 1995), 양귀비(Nessler 1994; Nessler et al. 1990), 담배(Meeks-Wagner et al. 1989; Neale et al. 1990), 및 애기장대(Arabidopsis thaliana)에서 발견되었다. NCBI의 단백질 데이터베이스에 의하면, 애기장대는 총 15 종의 유사 MLP를 가진다고 한다.

[0021] 본 발명의 천풍 유전자형과 관련된 분자마커의 개발과 관련된 천풍 포지티브 영역(chunpoong positive region, CPR)은 유사 MLP의 다운스트림(downstream)에서 DNA 워킹에 의한 천풍의 게놈 DNA 사용에 의해 밝혀졌다. CPR은 특이 염기서열 구조를 가지며, 삽입/결실(Insertion/Deletion) 영역이 존재하였다.

[0022] 추가적으로, 181bp 절편은, CPR 영역에 속하며, 321bp 절편과 비교했을 때 삽입 서열이 존재한다(도 2). 본 발명에서 설계한 2쌍의 상이한 분자마커 프라이머(mlpmRF 프라이머와 TSP2R 프라이머 쌍, 181F 프라이머와 TSP2R 프라이머 쌍)는 CPR 양상에 의존적이다.

[0023] [서열번호 1] mlpmPF primer, forward

[0024] 5′ -ATC AAT GGG CTC GAT ATA TG- 3′

[0025] [서열번호 2] TSP2R primer, reverse

[0026] 5′ -CCA CCT GCA CCA TAA GTG ACA A- 3′

[0027] [서열번호 3] 181F primer, forward

[0028] 5′ -GGC TCG ATA TAT GTA CGT AC- 3′

[0029] 본 발명의 유사 MLP는 Bet v I 계 단백질에 속하며 다른 것들과 비교하였을 경우 MLP31 및 MLP28 와 가장 높은 상동성을 가진다(표 1). 식물에서의 MLP의 기능은 알려지지 않았는데, IPR(intracellular pathogenesis-

related) 단백질과 유사한 발현 패턴을 보였고, 두 개의 단백질은 관련적이다(Osmark et al. 1998).

[0030] 본 발명의 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머는 다양한 PCR 법에 적용되어 고려인삼(*P. ginseng*) 재배종 중에서 천풍의 검출을 가능하게 하며, PCR 법의 종류에 따라 본 발명의 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머를 적용하여 얻어지는 결과가 달라지지는 않는다.

[0031] 최근, 실시간 PCR 법이 반응 생성물을 실시간에 통제하고, 겔 분석의 필요성을 배제하는 것으로 총체적인 분석 시간을 감소시킬 수 있는 효과를 나타낸다. 실시간 PCR 법은 임상 진단, 농식물공학 및 연구 능력을 포함한 다양한 용도를 위한 생물학적 측정에 널리 사용되었다(Carey et al. 2007; Espy et al. 2006; Lipp et al. 2005; Wolf et al. 2007). 이러한 실시간 PCR 법은 용해 곡선 분석에 의하여 식품 중의 샐러리(celery), (Hupfer et al. 2007), 미니 거베라(Gerbera jamesonii) 의 역병(Phytophthora cryptogea 에 의한 역병)(Minerdi et al. 2008), 와인 숙성(wines age)(Savazzini and Martinelli 2006), 및 GM 파파야(Xu et al. 2008) 의 검출을 위하여 성공적으로 사용되었다.

[0032] 본 발명의 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머를 고려인삼 재배종간에 천풍의 검출을 위한 PCR법과 실시간 PCR 법에 적용하여 70 종의 상이한 시료의 잎 중에서 천풍을 확인하는 데에 두 방법은 100%의 민감성을 보여주었으며 실시간 PCR법은 PCR법을 대체 할 수 있는 가능성을 제시하였다.

[0033] 따라서, 본 발명의 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머는 실시간 PCR 법에 적용할 경우 PCR 법과 비교하여 소요되는 시간이 획기적으로 감소되고, PCR 법 적용을 위한 시료의 사용량이 적어도 충분히 만족스러운 결과를 얻을 수 있는 등의 다양한 잇점을 기대할 수 있다. 더욱이, 실시간 PCR법 중 용해 곡선 분석(melting curve analysis)과 비교하여, 종결점 분석은 쉽게 이해되고 표가 자동적으로 생성되기 때문에 자료의 정렬이 쉽게 이루어진다. 이는 분자 마커에서 다수 시료의 분석을 위하여 매우 유용하다.

[0034] 한편, 본 발명의 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머는 키트로 제조할 경우 고려인삼 천풍의 구별을 위한 적용시 사용상의 편리를 얻을 수 있으며, 특히 실시간 PCR 법을 간단하게 적용하기 위하여 본 발명의 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머는 형광표지 인자와 함께 구성되어 실시간 PCR 검출용 키트로 제조될 수 있다. 본 발명의 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머는 별도의 프로브 사용 없이 형광표지 인자와 함께 사용하더라도 충분히 정확한 결과를 얻을수 있다. 상기 형광표지 인자는 Eva Green 혹은 SYBR Green-1 을 사용할 수 있다. 특히 Eva green는 SYBR Green-1 보다 정밀도가 높은 잇점이다. 천풍마커인 서열번호 1로 표시되는 mlpmPF 프라이머와 서열번호 2로 표시되는 TSP2R 프라이머로 이루어진 세트, 또는 서열번호 2로 표시되는 TSP2R 프라이머와 서열번호 3으로 표시되는 181F 프라이머로 이루어진 세트 중 어느 것을 사용하더라도 모두 정확한 결과를 얻을 수 있으며 다량의 시료에 적용할 수 있어 바람직하다.

[0035] 본 발명은, 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머를 구별대상 시료로부터 추출한 DNA를 주형으로 하여 PCR 을 수행한 후 얻어진 PCR 생성물을 확인하는 간단한 방법으로 고려인삼 천풍을 구별할 수 있는 방법을 제공한다. 또한, 구별대상 시료로부터 추출한 DNA를 주형으로 하고, 본 발명의 고려인삼 천풍 구별용 실시간 PCR 검출 키트를 사용하여 실시간 PCR을 수행한 후 얻어진 PCR 생성물을 확인하는 단계를 포함하여 이루어지는 간단한 방법으로 고려인삼 천풍을 구별하는 방법을 제공한다.

[0036] 본 발명에 의하여 다량의 파낙스(Panax) 속 유전자형을 평가한 후 얻어진 결과는 이 분자 마커의 실행 가능성을 명확하게 나타내며, 육종 프로그램을 위한 적용 가능성을 가짐을 나타낸다. 본 발명은 고려인삼 재배종 중에서 천풍의 구별을 위한 새로운 분자 마커를 제공하는데, 천풍을 구별하기 위한 분자 마커를 사용하는 것은 분석학적 기술 전체에 매력적인 특징을 제공할 수 있다. 첫째, 분석은 식물의 생장 단계의 초기에 수행될 수 있고, 소량의 DNA 만을 필요로 한다. 둘째, 다량의 시료가 조직적으로 적용될 수 있고, 마지막으로, 천풍의 유전자형은 실시간 PCR 방법을 사용할 경우 시간을 더욱 절약할 수 있다. 또한, 유사 MLP 유전자의 다운스트림 영역은 다른

고려인삼 재배종과 다른 종(species)과 관련된 마커의 개발을 계속할 수 있는 새로운 자원으로서의 문을 열 것으로 기대된다.

[0037] 본 발명에서는, 인삼의 발현된 염기서열 태그(expression sequence tags, ESTs)의 3'말단의 비번역 부분(3'untranslated region, 3'UTR)에 위치한 유사 메이저 라텍스 단백질(major latex protein, MLP-like) 유전자가 천풍의 인증을 위하여 유용한 것임을 밝혔다

[0038] 본 발명은, 고려인삼 천풍 ESTs의 3'UTR의 유사 MLP 유전자 특정 영역에 근거한, 고려인삼 천풍을 특이적으로 재현가능하고 간단하게 확인할 수 있는 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머와, 본 발명의 고려인삼 천풍 구별용 SNP 프라이머 쌍을 포함하는 키트 및 이를 적용한 고려인삼 천풍 구별방법을 제공한다.

효 과

[0039] 상기한 본 발명에 의하면 인삼으로부터 마커 유전자의 선발 및 ESTs의 3'UTR의 유사 MLP 유전자 탐색을 통하여 선발된 마커 유전자에 의한 특이 프라이머를 제작하고 이를 통하여 국내에서 재배되는 작물들의 유전자원에 대한 재산권을 확보할 수 있을 것이다.

[0040] 국내에서 확보된 선발마커유전자를 활용하여 외국산과 구별할 수 있는 시스템을 개발하여 국내 농가의 권익을 보호하는데 활용할 수 있을 것이다.

[0041] 또한, 개발된 프라이머를 이용하여 간편하고 신속한 분석법을 개발하고 이를 제품화 하여 일반에 공급함으로써 그 활용성을 높일 수 있을 것이다. 프라이머 및 이의 적용기술이 개발되면 외국에서 밀려오는 모든 농산물을 값싸고 쉽게 구별이 가능하여 자국의 농업을 보호할 수 있을 것이다.

[0042] 특히, 인삼 신품종 천풍의 마커가 확인되었으며 이중맹검법에 의하여 완벽하게 시험되었기 때문에 바로 농가에 적용함으로써 일반 자경종이 천풍으로 둔갑하여 고가로 판매되는 것을 막을 수 있어 유통질서체계를 순기능적으로 확립할 수 있으며, 현재 중국 등으로 유출되어 대량으로 재배되고 있는 천풍이 국내에 무단으로 반입될 경우 사전 방지가 가능할 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0043] 이하, 실시예에 근거하여 본 발명을 구체적으로 설명하겠는바, 다음 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 잎 또는 그 외의 기타 조직이나 세포에서 얻어지는 DNA 결과는 동일 개체 내에서는 동일하게 나타남을 근거한다. 또한, 본 발명의 실시예는 모두 이중맹검법이 적용되었다.

[0044] **실시예 1. 인삼 DNA 추출, 증폭 및 프라이머 제작**

[0045] **[식물 재료]**

[0046] 모든 싱싱한 인삼의 잎과 뿌리는 Ginseng Genetic Resource Bank (KyungHeeUniversity, Korea)에서 습득하여 사용되었다.

[0047] 사용된 고려인삼 재배종(*P. ginseng* cultivars)은 천풍(Chunpoong), 연풍(Yunpoong), 고풍(Gopoong), 금풍(Gumpoong), 선풍(Sunpoong), 선운(Sunwun), 선원(Sunweon), 선향(Sunhyang), 정선(Chungsun), 미마키(Mimaki)이고, 변종은 86044-황숙(86044-Hwangsook)과 김포-황숙(Kimpo-Hwangsook)이며, 미국삼(*P.quinquefolius*) 이었다.

[0048] **[DNA 추출과 PCR 증폭]**

[0049] 총 DNA는 싱싱한 잎과 뿌리로부터 식물 DNA 분리용 키트(Plant SV mini, GeneAll, Korea)를 사용하여 추출하였다. 특이 프라이머(표 1)는 유사 MLP 염기서열과 클론(clone) 염기서열로부터 설계되었다.

[0050] PCR 증폭은 PCR 기기(Corbett Research, Sydney, Australia. Model:CG1-96)에 의하여 수행되었다. 타입-특이적 증폭을 위한 반응 조건은 20 ㎕ 부피의 표준 PCR 반응액(각 프라이머 0.5 μM, 추출된 DNA 50 ng, 각 dNTP 200 μM, $MgCl_2$ 1.5 mM, 10XPCR 버퍼, 및 DNA 폴리머라아제 (EnzynomicsTM) 1 U)으로, 94℃에서 5분간 미리 변성 단계(denaturation step), 94℃에서 30초, 58℃에서 30초, 72℃에서 30초간 신장시키는 과정을 35회 반복시키는 단계, 마지막으로 72℃에서 7분간 신장을 유지시키는 단계에 따라 수행되었다.

[0051] [표 1]

Primer Name	Sequence (5'-3')	AT (°C)
TSP2	TTG TCA CTT ATG GTG CAG GTG G	58
mlpmR	CAT ATA TCG AGC CCA TTG AT	58
mlpmRF	ATC AAT GGG CTC GAT ATA TG	58
TSP2R	CCA CCT GCA CCA TAA GTG ACA A	58
181F	GGC TCG ATA TAT GTA CGT AC	58

[0052]

[0053] **[실시간 PCR 증폭]**

[0054] 각각의 실시간 PCR(최종부피 10 ㎕)은 정방향 프라이머(mlpmRF)와 역방향 프라이머(TSP2R)(각각의 최종농도 500 nM), 2X마스터믹스(SensiMixPlus SYBR, Quantace Ltd, Australia), 20 ng DNA(in TE buffer)를 포함한다.

[0055] 실시간 PCR을 위하여, 열순환(thermocycling) 및 형광(fluorescence) 모니터링이 로터-진 6000(Rotor-Gene 6000, Corbett Research, Sydney,Australia) 상에서 수행되었다. 각각의 반응챔버는 센트럴 로터(central rotor), 팬, 공기 유입을 조장하는 흡입구(intake) 및 반응 튜브로 대류적 열전달 극대화기(maximise)로 이루어진다. 공급자가 권고한 바와 같이, 로터 내의 모든 튜브 홀더는 모든 실험 중에 완전히 채워진 상태로 유지되었고, 챔버 내부 및 튜브와 튜브 간의 열적인 기하학적(geometry) 조합과 온도의 균일성 양자를 극대화시켰다. 로터 진 6000은 피크 램프 가열속도(heating ramp rate)가 10℃/sec. 이고, 피크 램프 냉각속도가 5℃/sec. 이었다.

[0056] 다른 언급이 없으면, PCR 조건은 95℃에서 10분간 활성기간, 뒤이어 95℃에서 10초간 변성, 58℃에서 15초간 어닐링 및 72℃에서 20초간 신장으로 구성되는 3 단계의 열적 프로파일을 40회 반복하는 것으로 구성되었다. SYBR Green-1 유래의 형광을 탐독하고, 각 반복의 신장 단계 완결 후 58℃ 그린 채널(470 nm에서 여기(excitation))에서 얻었다.

[0057] **[용해물 분석 및 종결점 분석]**

[0058] 용해물 분석(melt analysis) 조건은 램프 온도가 72℃ 내지 95℃으로 구성되며, 각 단계는 1℃씩 승온시켰다. 첫 번째 단계에서 90초간 미리 용해시키도록 조건을 만들고, 각각의 다음 단계에서는 5초간 유지시켰다.

[0059] 데이터 분석을 위하여 종결점 분석법(endpoint analysis method)이 고려인삼의 천풍 구별에 적용되었다. 종결점 분석은 실행 종결시에 증폭되지 않은 시료와 구별하기 위하여 시료를 증폭시키는 기술이다. 결과는 정성적(포지티브/네거티브)이고, 정량적이지 않다.

[0060] 종결점 분석은 대립유전자 구분과 유사하며, 결과는 정성적으로 나타나고, 상이한 채널에 걸친 반응의 과변성(permutation)을 확인할 수 있게 한다. 종결점 분석이 구별되는 것은, 각각의 시료를 위하여 각 반복 단계마다 탐독하는 대신 한번의 탐독이 가능하게 하는 것이다. 사용자가 분석의 촉진을 위하여 추가적인 정보, 즉, 구분을 위한 포지티브 또는 네거티브 대조군을 제공하여야 한다.

[0061] **[PCR 생성물의 서열분석(sequencing)]**

[0062] PCR SV 키트(PCR SV kit, GeneAll, Korea)에 의한 PCR 생성물에서 프라이머와 프라이머 이량체(dimers)를 제거하여 PCR 생성물을 정제시켰다. 증폭된 중요한 절편(fragment)은 2% 아가로스 겔에 의하여 절제되고 아가로스 겔 DNA 추출 키트(Agarose Gel DNA extract kit, GeneAll, Korea)에 의하여 정제되었다. 절편은 pGEM-T Easy

벡터(pGEM-T Easy Vector System, Promega, USA) 내로 클론시키고, *E. coli*(*Escherichia coli* XL1-Blue cell) 내로 형질전환시켰다.

[0063] 서열분석 반응은 공급자가 제공한 매뉴얼에 따라 염료(Big Dye, Genotech, Korea)를 사용하여 수행되었으며, 염기서열은 서열분석기(ABI 3700 Genetic Analyzer, Genotech, Korea)를 사용하여 얻었다.

[0064] **[컴퓨터 분석(Computer Analysis)]**

[0065] 총 3,706 개의 EST 염기서열(DC03, 4년근 천풍 뿌리)을 Ginseng Genetic Resource Bank(Kyung Hee University, Korea)로부터 얻었다. EST 분석, 컨티그 어셈블리(contig assembly)와 단일 염기서열 분석은 전문기관(Insilicogen R&D center, Insilicogen, Lnc. Korea)에 의해 수행되었다. SeqManII을 이용한 클론 염기서열의 분석 크로마토그램과 염기서열의 클러스터링은 Kalign 2.0 프로그램(www.ebi.ac.uk/Tools/kalign/index.html)을 사용하여 수행되었다.

[0066] 추가적으로, 로컬 블라스트(blast)를 확인하기 위하여 BioEdit7.0을 사용하였고 CAP3 프로그램을 사용하여 컨티그를 만들었다. PCR 프라이머는 소프트웨어 Primer3(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)을 사용하여 설계되었다.

[0067] **실시예 2. 제작된 프라이머에 의한 고려인삼 천풍의 구별**

[0068] **[상이한 영역의 탐색(Detection of the difference region)]**

[0069] 총 3,706 ESTs(재료 및 방법에 기재)에서 삽입(inserts), 벡터 및 매우 짧은 삽입(100bp 컷오프)을 가지는 염기서열을 제거한, 평균길이 450bp를 가지는 총 3,183의 고품질의 ESTs가 생성되었다.

[0070] 시퀀스된 ESTs의 추정되는 동일성 평가를 위하여, 모든 ESTs는 BLASTX 유사성 조사에 위임하였다. 결과는, 유사 MLP가 모든 ESTs에서 가장 높게 발현되었고 모든 염기서열에서 3 개의 컨디그(contigs)와 하나의 싱글톤(singleton)이 나타났으며, MLP31과 MLP28의 2 개 그룹으로 적절하게 구분하였다(표 2).

[0071] [표 2]

[0072]

EST Contig	Blast X				
	Accession No.	Gene Name	Identities	E-value	Organism
CL1contig4	Q941R6	MLP-like protein 31	69/149 (46%)	4.00E-36	*A. thaliana*
CL1contig3	Q941R6	MLP-like protein 31	64/149 (42%)	4.00E-29	*A. thaliana*
CL22contig1	Q9SSK9	MLP-like protein 28	76/156 (48%)	4.00E-35	*A. thaliana*
DC03045H10	Q9SSK9	MLP-like protein 28	41/106 (38%)	2.00E-18	*A. thaliana*

[0073] 유사 MLP에 대한 더 많은 정보를 얻기 위하여, 유사 MLP 미지 영역(downstream region)에 대하여 DNA 워킹(DNA walking SpeedUp™Premix Kit, Seegene, Korea)을 수행하였다. 게놈 DNA(genomic DNA)에서 DNA 워킹을 확인하기 위하여, 몇 종류의 특이 프라이머가 설계되었다(표 1). PCR 스크리닝 후, 하나의 프라이머 쌍은 천풍과 고풍의 326bp 절편(fragment)에서 차이점을 특별히 보여주었다(도 1c의 (a)).

[0074] 326bp 절편은 천풍으로부터 클론 및 시퀀싱되었다. 염기서열에서, 두 개의 유사한 영역I과 영역II를 발견하였다(도 1a, 서열번호 4). 절편은 CPR(Chunpoong positive region)이라고 명명하였다. 영역I과 영역II 염기서열 사이의 일직선으로 정돈시킨 염기서열은 78.8%의 상동성(homology)을 나타내었다(도 1b).

[0075] mlpmRF 프라이머[서열번호 1]와 TSP2P 프라이머[서열번호 2]를 사용하여 증폭한 후 321bp와 181bp의 절편이 천풍에서 발견되었고, 반면에 321bp와 682bp의 절편이 고풍에서 발견되었다(도 1c의 (b)). 181bp, 321bp 및 682bp 절편은 천풍과 고풍에서 클론 및 시퀀스되었다. 영역I과 영역II 염기서열 사이의, 181bp 절편은, 천풍에서 포지티브 영역이었다(도 1c의 (b)). 일직선으로 정돈시킨 염기서열들은 321bp가 181bp의 대부분의 염기서열을 포함하고 있음을 보여주며, 이들 두 개의 절편 사이에 몇몇의 삽입/결실(insertion/deletions. In/Del)이 있

음을 나타낸다(도 2). 682bp 절편은 천풍의 네거티브 영역을 나타내며, 프라이머를 사용하여 증폭되었을 경우 181bp와 321bp 절편과는 연관성이 없었다.

[0076] 천풍에서 발견된 181bp 절편의 염기서열(gChunpoong-L181(c-3))은 서열번호 5로 나타내었고, 321bp 절편의 염기서열(g1Chunpoong-M321)은 서열번호 6으로 나타내었으며, 고풍에서 발견된 321bp 절편의 염기서열(g2Gopoong-M321)은 서열번호 7로 나타내었다. 321bp 절편은 모든 품종의 고려인삼에 존재하는 것으로 밝혀졌으며, 천풍과 고풍의 321bp 절편의 염기서열을 비교한 결과 100% 일치하는 것으로 확인하였다. 또한, 전문기관(solgent 사)에 의뢰하여 DNA 워킹에 의하여 얻어진 고려인삼 천풍의 MLP의 게놈 서열을 서열번호 8에 나타내었다.

[0077] **[분자마커의 유효성(validation of the molecular marker)]**

[0078] 181bp 영역은 천풍종과 다른 재배종의 구분에 유용하며, 이는 mlpmRF 프라이머[서열번호 1]와 TSP2R 프라이머[서열번호 2]의 프라이머 쌍을 이용한 PCR에 의하여 확인할 수 있었다. 이들 프라이머를 사용하여 증폭시킨 후 321bp와 181bp의 두 개의 절편이 천풍종에서 관찰되고, 321bp와 682bp 절편은 그 외 다른 재배종에서 나타났다(도 3A).

[0079] 신속하고 쉬운 분석 생성물은 mlpmRF 프라이머[서열번호 1] 와 TSP2R 프라이머[서열번호 2] 쌍을 사용한 실시간 PCR 방법에 의하여 확인될 수 있다. PCR 조건은 비 특이적인 증폭을 감소시키기 위하여 조정되었다(재료 및 방법에서 서술함).

[0080] 각 재배종의 PCR 반복 역치(cycle threshold value, Ct value)는 실시간 PCR에 의하여 실험되었고, 역치를 0.0103으로 조절하여 측정한 각 품종간의 역치는 천풍 23.00, 연풍 33.89, 고풍 31.84, 금풍 31.20 및 선풍 32.12 으로 얻어졌다(도 4A). 용해물 분석(melt analysis)은 천풍의 용해 온도가 79.0℃임을 나타내었다(도 4B). 아가로스 겔 전기영동은 181bp 단일 절편이 천풍에서 증폭되었고, 321bp 절편은 다른 품종들에서 엷게 나타남을 도시하였다(도 3B). 특히, 고풍, 금풍 및 선풍은 181bp에서 약간 증폭되었다.

[0081] 보정 근거를 찾기 위하여 특이 프라이머(181F 프라이머[서열번호 3])를 In/Del 영역에 의하여 설계하였고(도 2, 표 1) PCR을 수행하였다. 삽입(AC)은 181bp 절편 염기서열의 26bp 위치에 위치하였다(도 2). 174bp 절편은 천풍에서 181F 프라이머[서열번호 3]와 TSP2R 프라이머[서열번호 2] 조합에 의하여 얻어진 생성물이고, 실시간 PCR의 결과를 아가로스 겔 전기영동한 결과와 일치하였다(도 3C).

[0082] **[천풍을 구분하기 위한 분자마커로서의 적용]**

[0083] 보통의 PCR 법(PCR-based) 와 실시간 PCR 방법은 70 종의 Panax 속 시료에서 천풍종의 분자마커를 평가하기 위하여 이용되었다. 상술한 PCR 방법에서, 가장 짧은 절편인, 181bp 절편은 천풍의 유전자형에서만 증폭되었다(도 5). 321bp 절편은 모든 유전자형에서 증폭되었고, 반면 *P. quinquefolius* 유전자형에서는 321bp 크기 보다 긴 곳에서 밝은 절편을 보였다. PCR 생성물의 682bp 절편 패턴은 다른 것보다 *P. quinquefolius* 에서 매우 강하게 증폭되었고, 소량의 천풍 유전자형은 682bp에서 약하게 증폭되는 것으로 관찰되었다. 즉, 높은 수준의 변이는 3′ 말단 UTR 영역에서 종종 발견되며, 구분된 682bp 절편이 몇몇의 천풍에서 나타나는 것은 그리 놀라운 일은 아니다.

[0084] 실시간 PCR의 경우에서, 천풍의 구별을 위하여 종결점 분석(endpoint analysis)법이 이용되기도 한다. 종결점 분석은 재료 및 방법에서 기술하였다. 종결점 분석의 장점은 이해하기가 간단하고 쉽다는 것이다(도 6A). “반응(Reaction)” 과 “비 반응(Not Reaction)” 은 포지티브 및 네거티브를 각각 지칭한다. 모든 천풍 "반응"에 의하여 구별되고, 다른 것들은 "비반응"으로 나타남을 보여준다(도 6B). 정확성은 PCR-based과 동일하다.

[0085] **[참고문헌]**

[0086] Aggelis A, John I, Karvouni Z, Grierson D (1997) Characterization of two cDNA clones for mRNAs expressed during ripening of melon (Cucumis melo L.) fruits. Plant Mol Biol 33:313-322

[0087] Aguirre C, Alvarado R, Hinrichsen P (2005) Identification of Chilean rice cultivars and breeding lines by means of Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). Agricultura T65:356-369

[0088] Blair MW, Panaud O, McCouch SR (1999) Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (Oryza sativa L.). Theoretical and applied genetics 98:780-792

[0089] Carey CM, Kirk JL, Ojha S, Kostrzynska M (2007) Current and future uses of real-time polymerase chain reaction and microarrays in the study of intestinal microbiota, and probiotic use and effectiveness. Can J Microbiol 53:537-550

[0090] Cui XM, Lo CK, Yip KL, Dong TTX, Tsim KWK (2003) Authentication of Panax notoginseng by 5S-rRNA Spacer Domain and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis. Planta Med 69:584-586

[0091] Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, Yao JD, Wengenack NL, Rosenblatt JE, Cockerill FR, 3rd, Smith TF (2006) Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. Clin Microbiol Rev 19:165-256

[0092] Feltus FA, Singh HP, Lohithaswa HC, Schulze SR, Silva TD, Paterson AH (2006) A comparative genomics strategy for targeted discovery of single-nucleotide polymorphisms and conserved-noncoding sequences in orphan crops. Plant physiology 140:1183-1191

[0093] Fredslund J, Madsen LH, Hougaard BK, Nielsen AM, Bertioli D, Sandal N, Stougaard J, Schauser L (2006) A general pipeline for the development of anchor markers for comparative genomics in plants. BMC genomics 7

[0094] Goro I, Junichi Y, Mika S, Toshiki N (2007) PCR-based landmark unique gene (PLUG) markers effectively assign homoeologous wheat genes to A, B and D genomes. BMC Genomics 8:1-12

[0095] Griffing LR, Nessler CL (1989) Immunolocalization of the major latex proteins in developing laticifers of opium poppy (PapaversomniferumL.).J. Plant Physiol 134:357-363

[0096] Ha WY, Shaw PC, Liu J, Yau FCF, Wang J (2002) Authentication of *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* Using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) and Directed Amplification of Minisatellite Region DNA (DAMD). J Agric Food Chem 50:1871-1875

[0097] Hiroyuki T, Noriko F, Yukihiro S (2006) Identification and Differentiation of Panax Species using ELISA, RAPD and Eastern Blotting. Phytochem Anal 17:4655

[0098] Hupfer C, Waiblinger HU, Busch U (2007) Development and validation of a real-time PCR detection method for celery in food. Eur Food Res Technol 225:329-335

[0099] Kwon WS, Chung CM, Kim YT, Lee MG, KT C (1998) Breeding Process and Characteristics of KG101, a Superior Line of *Panax ginseng* C.A. Meyer. Korean J Ginseng Sci 22:11-17

[0100] Lipp M, Shillito R, Giroux R, Spiegelhalter F, Charlton S, Pinero D, Song P (2005) Polymerase chain reaction technology as analytical tool in agricultural biotechnology. J AOAC Int 88:136-155

[0101] Ma KH, Dixit A, Kim YC, Lee DY, Kim TS, Cho EG, YJ P (2007) Development and characterization of new microsatellite markers for ginseng (Panax ginseng C. A. Meyer). Conserv Genet 8:1507-1509

[0102] Meeks-Wagner DR, Dennis ES, Tran Thanh Van K, Peacock WJ (1989) Tobacco genes expressed during in vitro floral initiation and their expression during normal plant development. Plant Cell 1:25-35

[0103] Minerdi D, Moretti M, Li Y, Gaggero L, Garibaldi A, Gullino ML (2008) Conventional PCR and real time quantitative PCR detection of PhytophthoracryptogeaonGerberajamesonii.EurJPlantPathol122:227-237

[0104] Nam YW, Tichit L, Leperlier M, Cuerq B, Marty I, Lelievre JM (1999) Isolation and characterization of mRNAs differentially expressed during ripening of wild strawberry (Fragaria vesca L.) fruits. Plant Mol Biol 39:629-636

[0105] Naqvi NI, Chattoo BB (1996) Development of a sequence characterized amplified region (SCAR) based indirect selection method for a dominant blast-resistance gene in rice. Genome 39:26-30

[0106] Neale AD, Wahleithner JA, Lund M, Bonnett HT, Kelly A, Meeks-Wagner DR, Peacock WJ, Dennis ES (1990) Chitinase, beta-1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. Plant Cell 2:673-684

[0107] Nessler CL (1994) Sequence analysis of two new members of the major latex protein gene family supports the triploid-hybrid origin of the opium poppy. Gene 139:207-209

[0108] Nessler CL, Allen RD, Galewsky S (1985) Identification and Characterization of Latex-Specific Proteins in Opium Poppy. Plant Physiol 79:499-504

[0109] Nessler CL, Kurz WG, Pelcher LE (1990) Isolation and analysis of the major latex protein genes of opium poppy. Plant Mol Biol 15:951-953

[0110] Nessler CL, Vonder Haar RA (1990) Cloning and expression analysis of DNA sequences for the major latex protein of opium poppy. Planta 180:487-491

[0111] Osmark P, Boyle B, Brisson N (1998) Sequential and structural homology between intracellular pathogenesis-related proteins and a group of latex proteins. Plant Mol Biol 38:1243-1246

[0112] Park MJ, Kim MK, In JG, Yang DC (2006) Molecular identification of Korean ginseng by amplification refractory mutation system-PCR. Food Research International 39:568574

[0113] Partis L, Wells RJ (1996) Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Mol Cell Probes 10:435441

[0114] Perry DJ, Bousquet J (1998) Sequence-tagged-site (STS) markers of arbitrary genes: the utility of black spruce-derived STS primers in other conifers. Theor Appl Genet 97:735743

[0115] Pozueta-Romero J, Klein M, Houlne G, Schantz ML, Meyer B, Schantz R (1995) Characterization of a family of genes encoding a fruit-specific wound-stimulated protein of bell pepper (Capsicum annuum): identification of a new family of transposable elements. Plant Mol Biol 28:1011-1025

[0116] Rajapakse S, Belthoff LE, He G, Estager AE, Scorza R, Verde I, Ballard RE, Baird WV, Callahan A, Monet R, Abbott AG (1995) Genetic linkage mapping in peach using morphological, RFLP and RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics 90:503510

[0117] Ruperti B, Bonghi C, Ziliotto F, Pagni S, Rasori A, Varotto S, Tonutti P, Giovannoni JJ, Ramina A (2002) Characterization of a major latex protein (MLP) gene down-regulated by ethylene during peach fruitlet abscission. Plant Science 163:265-272

[0118] Savazzini F, Martinelli L (2006) DNA analysis in wines: Development of methods for enhanced extraction and real-time polymerase chain reaction quantification. ANALYTICA CHIMICA ACTA:274-282

[0119] Shim YH CJ, Park CD, Lim CJ, Cho JH, Kim HJ (2003) Molecular Differentiation of Panax Species by RAPD Analysis. Arch Pharm Res 26:601-605

[0120] Stromvik MV, Sundararaman VP, Vodkin LO (1999) A novel promoter from soybean that is active in a complex developmental pattern with and without its proximal 650 base pairs. Plant Mol Biol 41:217-231

[0121] Um JY, Chung HS, Kim MS, Na HJ, Kwon HJ, Kim JJ, Lee KM, Lee SJ, Lim JP, Do KR (2001) Molecular Authentication of Panax ginseng Species by RAPD Analysis and PCR-RFLP. Biol Pharm Bull 24:872-875

[0122] Wei H, Fu Y, Arora R (2005) Intron-flanking EST-PCR markers: from genetic marker development to gene structure analysis in Rhododendron. Theoretical and Applied Genetics 111:1347-1356

[0123] Wolf JJ, Wang L, Wang F (2007) Application of PCR technology in vaccine product development. Expert Rev Vaccines 6:547-558

[0124] Wu F ML, Crouzillat D, Petiard V, Tanksley SD (2006) Combining bioinformatics and phylogenetics to identify large sets of single copy, orthologous genes (COSII) for comparative, evolutionary and systematic studies: A test case in the euasterid plant clade. Genetics 174:1407-1420

[0125] Xu WT, Bai WB, Guo F, Luo YB, Yuan YF, Huang KL (2008) A papaya-specific gene, papain,used as an endogenous reference gene in qualitative and real-time quantitative PCR detection of transgenic papayas. Eur Food Res Technol

[0126] Zhebentyayeva TN, Reighard GL, Gorina VM, Abbott AG (2003) Simple sequence repeat (SSR) analysis for assessment of genetic variability in apricot germplasm. Theor Appl Genet 106:435444

도면의 간단한 설명

[0127] 도 1a는 유사 MLP 염기서열, CPR 및 321bp 절편 세 영역의 시그널을 나타낸 것이다.

[0128] 도 1b는 CPR의 영역 I과 영역 II 사이의 높은 상동성을 나타내는 염기서열을 일직선으로 배열한 것이며, 프라이머 위치는 블랙 박스로 표시된 부분이다.

[0129] 도 1c에서 (a)는 TSP2 프라이머와 mlpmR 프라이머에 의하여 증폭된 천풍 내의 326bp 절편을 나타낸 것이고, (b)는 mlpmRF 프라이머와 TSP2R 프라이머를 사용하여 천풍 포지티브 절편인 181 bp 절편을 나타낸 결과로서, 321 bp 절편은 대립유전자 양자에게 일반적인 절편이며 상호간 대조군(internal control)으로 사용되었다[M 1kb DNA ladder; 1 Chunpoong; 2 Gopoong]

[0130] 도 2는 181bp 절편과 321bp 절편을 시퀀싱하여 얻어진 염기서열을 일직선 상에 배치한 것으로, 블랙 박스 내에 밑줄 그은 하얀 문자는 삽입된 SNPs 위치를 나타내고, 갭(gaps)은 3개의 결실을 나타낸다[181 : 181 bp fragment; 321 : 321 bp fragment; 181F 'Chunpoong' SNP primer site of forward; TSP2R reverse primer site].

[0131] 도 3은 천풍과 관련된 분자마커의 아가로스 겔 사진을 나타낸 것으로, A와 C는 PCR-based 생성물이고, B는 실시간 PCR 생성물이다. 181 bp 절편과 174 bp 절편은 천풍의 포지티브 분자마커이다[M 1kb DNA ladder; 1 Chunpoong; 2 Yunpoong; 3 Gopoong; 4 Gumpoong; 5 Sunpoong].

[0132] 도 4는 실시간 분석 결과를 나타낸 것이다[A Ct values. B meting curves. 1 Chunpoong; 2 Yunpoong; 3 Gopoong; 4 Gumpoong; 5 Sunpoong].

[0133] 도 5는 PCR에 바탕을 둔, 천풍과 관련된 분자마커의 아가로스 겔 사진을 나타낸다[*P. ginseng* cv. ('Chunpoong' - 2, 7, 9, 18, 20, 32, 36, 38, 45, 50, 55; 'Yunpoong' - 12, 29, 35, 49, 66; 'Gopoong' - 6, 19, 33, 39, 58; 'Gumpoong' - 3, 21, 41, 53, 63; 'Sunpoong' - 13, 23, 46, 60, 70; 'Sunwun' - 8, 11, 30, 47, 65; 'Sunweon' - 1, 14, 24, 51, 68; 'Sunhyang' - 25, 43, 57, 62, 69; 'Chungsun' - 4, 16, 27, 44, 61); *P. ginseng* var. ('86044 Hwangsock' - 5, 22, 37, 54, 64; 'Kimpo Hwangsock' - 17, 31, 56, 67); 'Mimaki' - 10, 26, 42, 52, 59; '*P. quinquefolius*' - 15, 28, 34, 40, 48].

[0134] 도 6은 70 개 시료의 실시간 PCR의 종결점 분석을 나타낸 것이다. A는 천풍종이 60% 이상의 시그널 수준을 나타내는 점(points)을 나타낸 것이고, B는 반응 결과를 상세하게 나타낸 표로서 'Reaction'은 천풍이며 A에서 시그널 수준이 60^ 이상인 것을 의미하고, 'No Reaction'은 타 품종을 의미한다.

[0135] 도 7은 천풍에서 발견된 326bp의 염기서열을 나타낸 것이다.

[0136] 도 8은 천풍에서 발견된 181bp 절편의 염기서열을 나타낸 것이다.

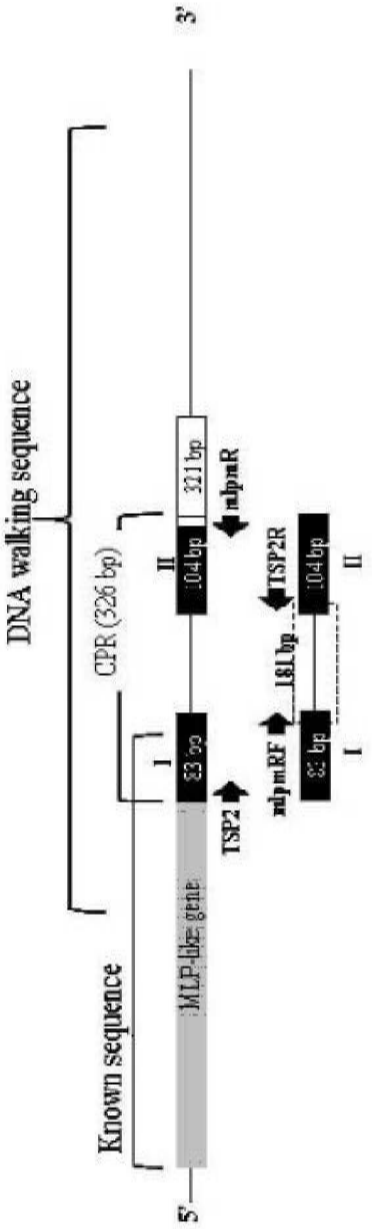
[0137] 도 9는 천풍에서 발견된 321bp 절편의 염기서열을 나타낸 것이다.

[0138] 도 10은 고풍에서 발견된 321bp 절편의 염기서열을 나타낸 것이다.

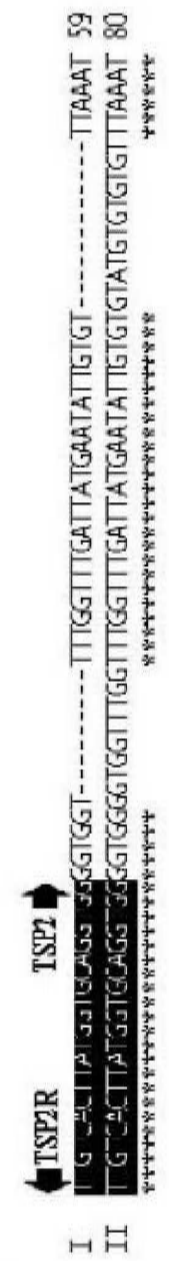
[0139] 도 11은 DNA 워킹에 의하여 얻어진 천풍 MLP의 게놈 서열을 나타낸 것이다.

도면

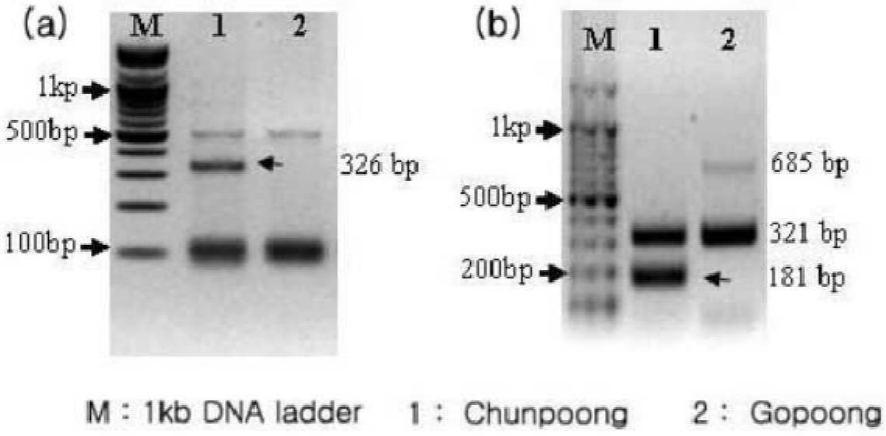
도면1a


DNA walking sequence
CPR (326 bp)
Known sequence
MLP-like gene
5'
3'
I
II
TSP2
mlpmRF
181bp
TSP2R
mlpmR
321bp
104bp

도면1b

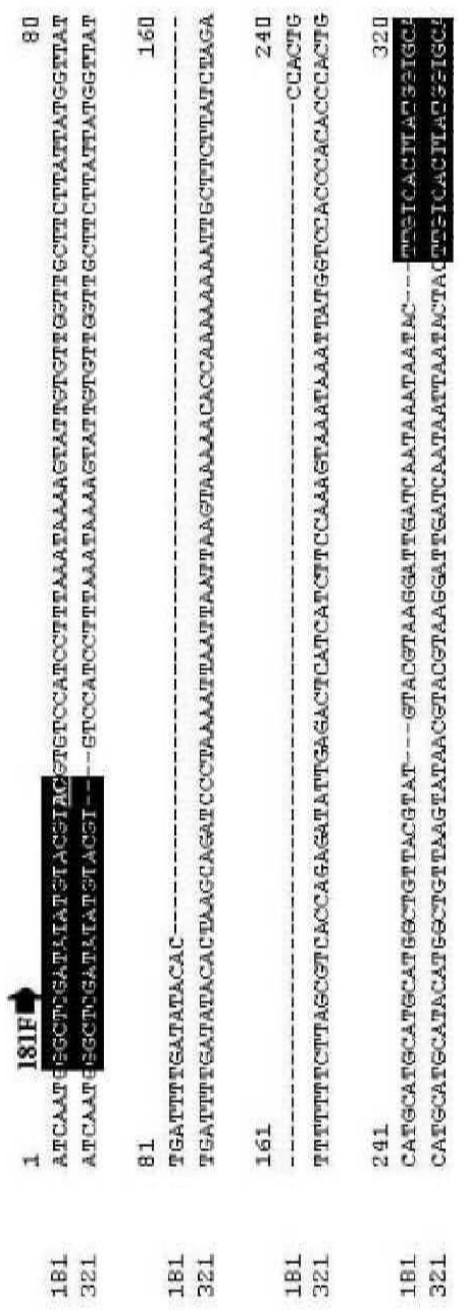


도면1c

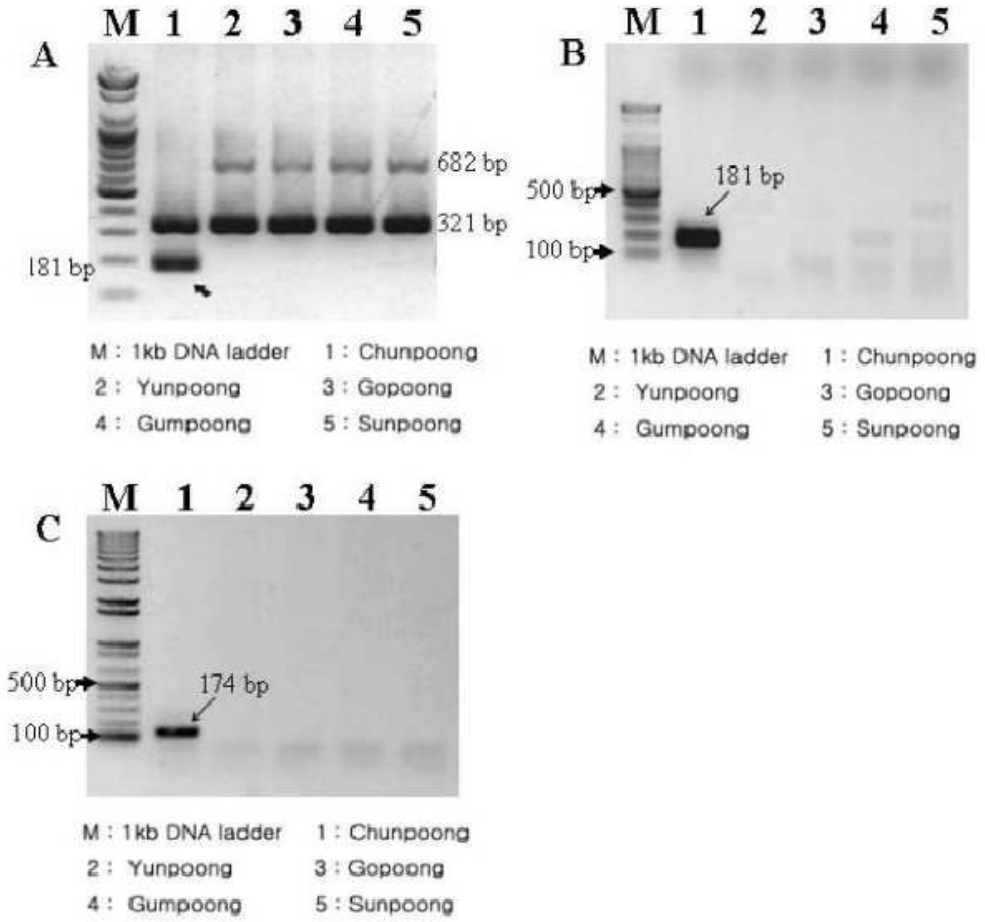


M : 1kb DNA ladder 1 : Chunpoong 2 : Gopoong

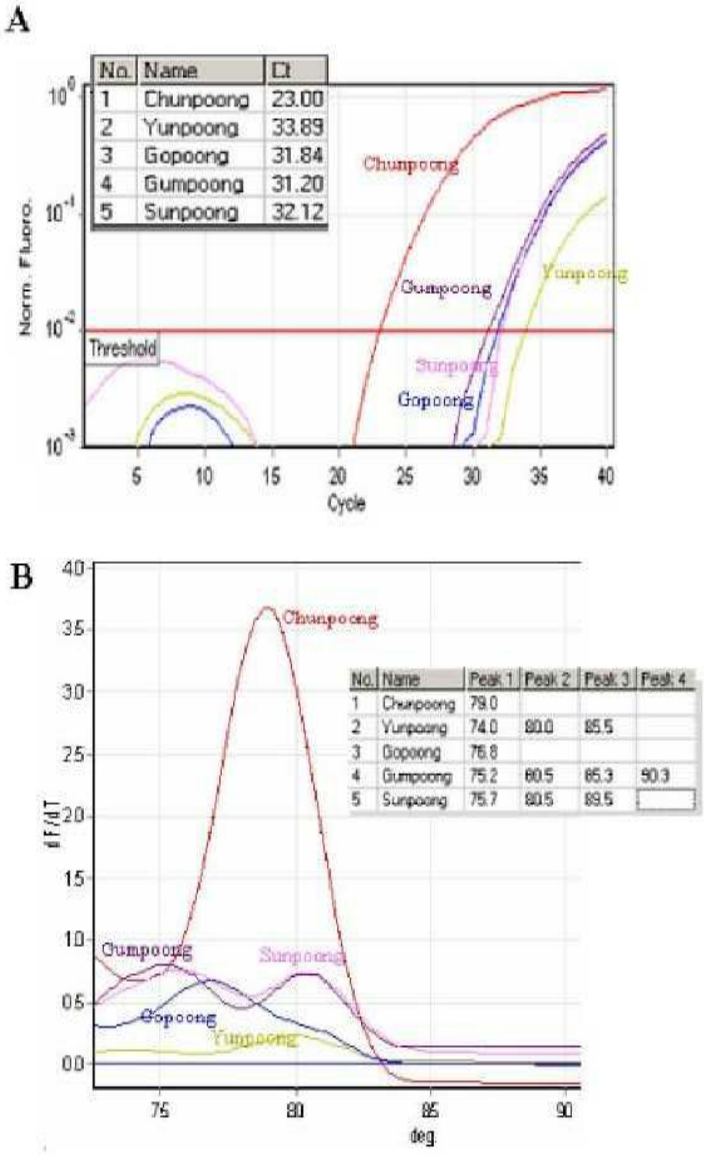
도면2



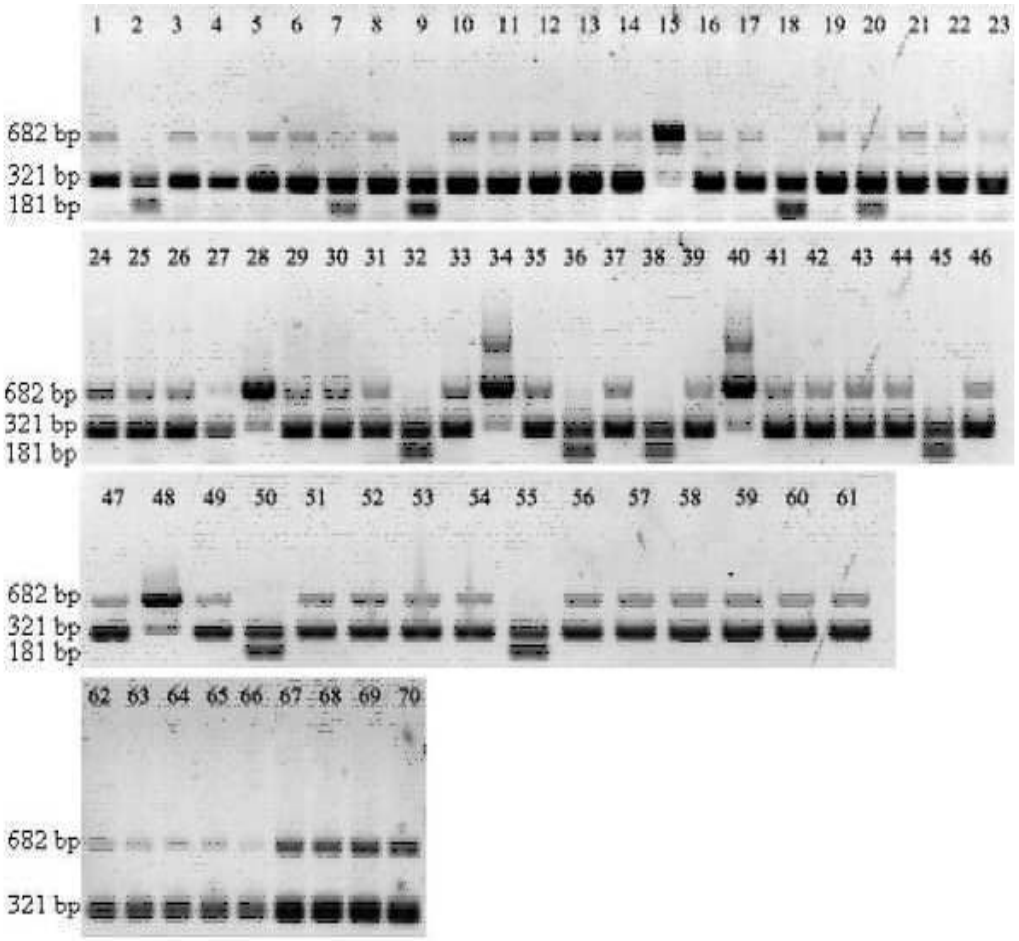
도면3


A
M 1 2 3 4 5
682 bp
321 bp
181 bp
M : 1kb DNA ladder 1 : Chunpoong
2 : Yunpoong 3 : Gopoong
4 : Gumpoong 5 : Sunpoong
B
M 1 2 3 4 5
500 bp
100 bp
181 bp
M : 1kb DNA ladder 1 : Chunpoong
2 : Yunpoong 3 : Gopoong
4 : Gumpoong 5 : Sunpoong
C
M 1 2 3 4 5
500 bp
100 bp
174 bp
M : 1kb DNA ladder 1 : Chunpoong
2 : Yunpoong 3 : Gopoong
4 : Gumpoong 5 : Sunpoong

도면4


A
No. Name Ct
1 Chunpoong 23.00
2 Yunpoong 33.89
3 Gopoong 31.84
4 Gumpoong 31.20
5 Sunpoong 32.12
Norm. Fluoro.
Cycle
Threshold
Chunpoong
Gumpoong
Yunpoong
Sunpoong
Gopoong
B
dF/dT
deg
No. Name Peak 1 Peak 2 Peak 3 Peak 4
1 Chunpoong 79.0
2 Yunpoong 74.0 80.0 85.5
3 Gopoong 76.8
4 Gumpoong 75.2 80.5 85.3 90.3
5 Sunpoong 75.7 80.5 89.5

도면5



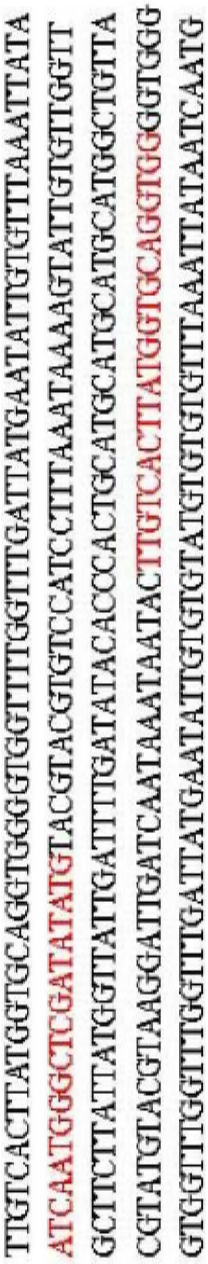
P. ginseng cv.
('Chunpoong'- 2, 7, 9, 18, 20, 32, 36, 38, 45, 50, 55;
'Yunpoong'- 12, 29, 35, 49, 66; 'Gopoong'- 6, 19, 33, 39, 58;
'Gumpoong'- 3, 21, 41, 53, 63; 'Sunpoong'- 13, 23, 46, 60, 70;
'Sunwun'- 8, 11, 30, 47, 65; 'Sunweon'- 1, 14, 24, 51, 68;
'Sunhyang'- 25, 43, 57, 62, 69; 'Chengsun'- 4, 16, 27, 44, 61);

P. ginseng var.
('86044Hwangsock'- 5, 22, 37, 54, 64;
'Kimpor Hwangsock'- 17, 31, 56, 67);
'Mimaki'- 10, 26, 42, 52, 59;
P. quinquefolius'- 15, 28, 34, 40, 48;

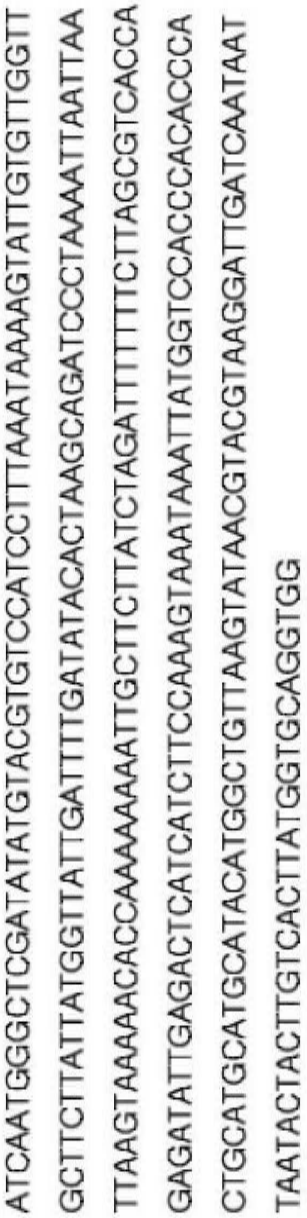
도면6


A
Reaction
Threshold
B
control
Name
Type
Cycling A Sheet
1 Negative Control No Reaction
2 Unknown Reaction
3 Unknown No Reaction
4 Unknown No Reaction
5 Unknown No Reaction
6 Unknown No Reaction
7 Unknown Reaction
8 Unknown No Reaction
9 Unknown Reaction
10 Unknown No Reaction
11 Unknown No Reaction
12 Unknown No Reaction
13 Unknown No Reaction
14 Unknown No Reaction
15 Unknown No Reaction
16 Unknown No Reaction
17 Unknown No Reaction
18 Unknown Reaction
19 Unknown No Reaction
20 Unknown Reaction
21 Unknown No Reaction
22 Unknown No Reaction
23 Unknown No Reaction
24 Unknown No Reaction
25 Unknown No Reaction
26 Unknown No Reaction
27 Unknown No Reaction
28 Unknown No Reaction
29 Unknown No Reaction
30 Unknown No Reaction
31 Unknown No Reaction
32 Unknown Reaction
33 Unknown No Reaction
34 Unknown No Reaction
35 Unknown No Reaction
36 Unknown Reaction
37 Unknown No Reaction
38 Unknown Reaction
39 Unknown No Reaction
40 Unknown No Reaction
41 Unknown No Reaction
42 Unknown No Reaction
43 Unknown No Reaction
44 Unknown No Reaction
45 Unknown Reaction
46 Unknown No Reaction
47 Unknown No Reaction
48 Unknown No Reaction
49 Unknown No Reaction
50 Unknown Reaction
51 Unknown No Reaction
52 Unknown No Reaction
53 Unknown No Reaction
54 Unknown No Reaction
55 Unknown Reaction
56 Unknown No Reaction
57 Unknown No Reaction
58 Unknown No Reaction
59 Unknown No Reaction
60 Unknown No Reaction
61 Unknown No Reaction
62 Unknown No Reaction
63 Unknown No Reaction
64 Unknown No Reaction
65 Unknown No Reaction
66 Unknown No Reaction
67 Unknown No Reaction
68 Unknown No Reaction
69 Unknown No Reaction
70 Unknown No Reaction
ch2 Positive Control Reaction
control

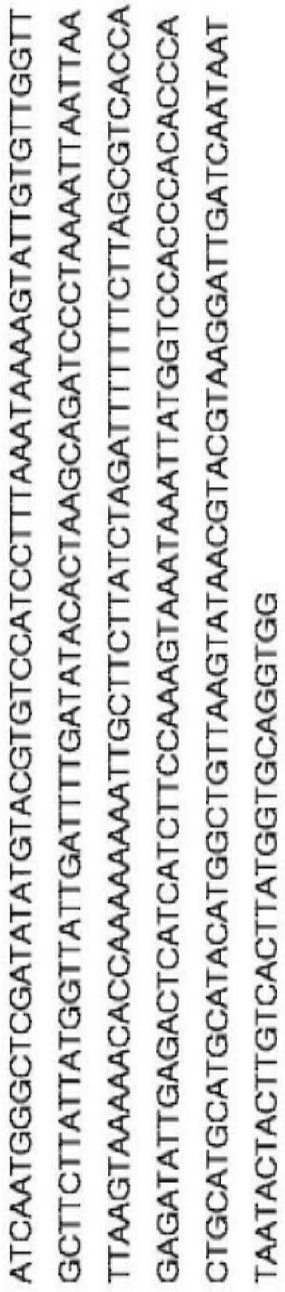
도면7


TTGTCACTTATGGTGCAGGTGGGGTGGTTTGGTTTGATTATGAATATTGTGTTTAAATTATA
ATCAATGGGCTCGATATATGTACGTACGTGTCCATCCTTTAAATAAAAGTATTGTGTTGGTT
GCTTCTTATTATGGTTATTTGATTTTGATATACACCCACTGCATGCATGGCTGTTA
CGTATGTACGTAAGGATTGATCAATAAATAATACTTGTCACTTATGGTGCAGGTGGGGTGGG
GTGGTTTGGTTTGGTTTGATTATGAATATTGTGTGTATGTGTTTAAATTATAATCAATG
GGCTCGATATATG

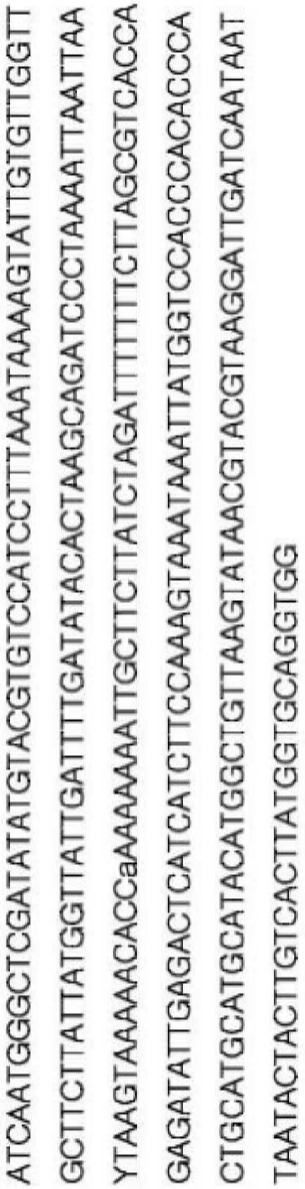
도면8


ATCAATGGGCTCGATATATGTACGTGTCCATCCTTTAAATAAAAGTATTGTGTTGGTT
GCTTCTTATTATGGTTATTTGATTTTGATATACACTAAGCAGATCCCTAAAATTAATTAA
TTAAGTAAAAACACCAAAAAAAATTGCTTCTTATCTAGATTTTTTTTCTTAGCGTCACCA
GAGATATTGAGACTCATCATCTTCCAAAGTAAATAAATTATGGTCCACCCACACCCA
CTGCATGCATACATGGCTGTTAAGTATAACGTACGTAAGGATTGATCAATAAT
TAATACTACTTGTCACTTATGGTGCAGGTGG

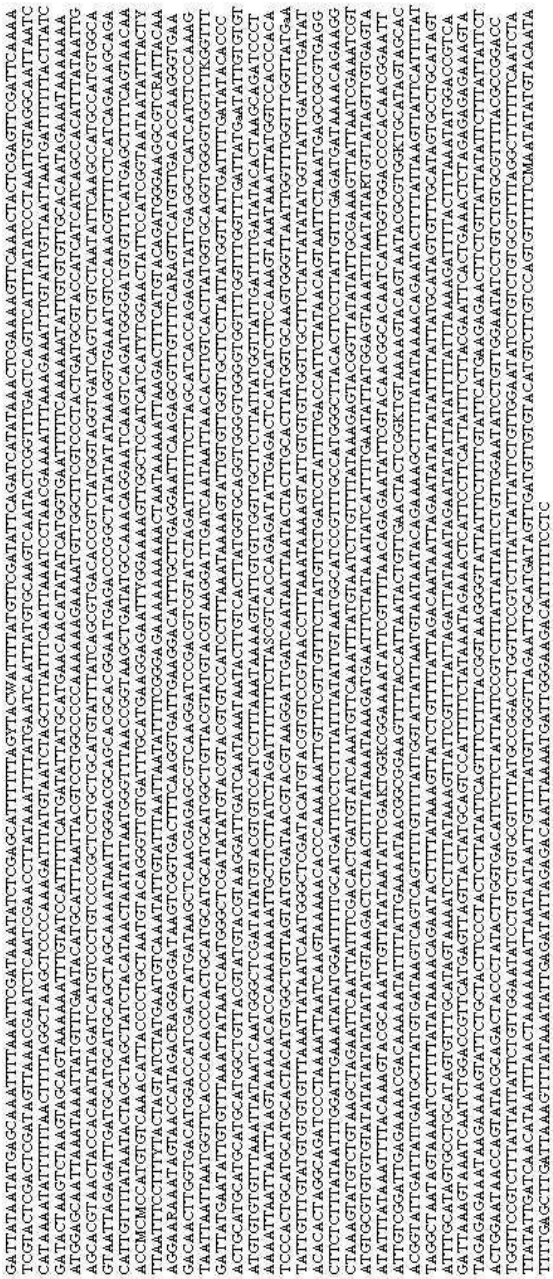
도면9


ATCAATGGGCTCGATATATGTACGTGTCCATCCTTTAAATAAAAGTATTGTGTTGGTT
GCTTCTTATTATGGTTATTTTGATTTTGATATACACTAAGCAGATCCCTAAAATTAATTAA
TTAAGTAAAAAACACCAAAAAAAAATTGCTTCTTATCTAGATTTTTTTCTTAGCGTCACCA
GAGATATTGAGACTCATCATCTTCCAAAGTAAATAAATTATGGTCCACCCACACCCA
CTGCATGCATGCATACATGGCTGTTAAGTATAACGTACGTAAGGATTGATCAATAAT
TAATACTACTTGTCACTTATGGTGCAGGTGG

도면10


ATCAATGGGCTCGATATATGTACGTGTCCATCCTTTAAATAAAAGTATTGTGTTGGTT
GCTTCTTATTATGGTTATTTTGATTTTGATATACACTAAGCAGATCCCTAAAATTAATTAA
YTAAGTAAAAACACCaAAAAAAATTGCTTCTTATCTAGATTTTTTTTCTTAGCGTCACCA
GAGATATTGAGACTCATCATCTTCCAAAGTAAATAAATTATGGTCCACCCACACCCA
CTGCATGCATGCATACATGGCTGTTAAGTATAACGTACGTAAGGATTGATCAATAAT
TAATACTACTTGTCACTTATGGTGCAGGTGG

도면11



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Specific primers for Chungpoong distinction in MLP genes of Panax ginseng C.A. Meyer, analysis kit using its primers, and Chunpoong distinciton method using them

<160> 8

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mlpmPF primer, forward

<400> 1
atcaatgggc tcgatatatg 20

<210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> TSP2R primer, reverse

<400> 2
ccacctgcac cataagtgac aa 22

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

<220>
<223> 181F primer, forward

<400> 3
ggctcgatat atgtacgtac 20

<210> 4
<211> 326
<212> DNA
<213> Panax ginseng

<400> 4
ttgtcactta tggtgcaggt ggggtggttt tggtttgatt atgaatattg tgtttaaatt 60

ataatcaatg ggctcgatat atgtacgtac gtgtccatcc tttaaataaa agtattgtgt 120

tggttgcttc ttattatggt tattgatttt gatatacacc cactgcatgc atgcatgcat 180

ggctgttacg tatgtacgta aggattgatc aataaataat acttgtcact tatggtgcag 240

gtggggtggg gtggtttggt ttggtttgat tatgaatatt gtgtgtatgt gtgtgtttaa 300

attataatca atgggctcga tatatg 326

<210> 5
<211> 181
<212> DNA
<213> Panax ginseng

<400> 5
atcaatgggc tcgatatatg tacgtacgtg tccatccttt aaataaaagt attgtgttgg 60

ttgcttctta ttatggttat tgattttgat atacacccac tgcatgcatg catgcatggc 120

tgttacgtat gtacgtaagg attgatcaat aaataatact tgtcacttat ggtgcaggtg 180

g 181

<210> 6
<211> 321
<212> DNA
<213> Panax ginseng

<400> 6
atcaatgggc tcgatatatg tacgtgtcca tcctttaaat aaaagtattg tgttggttgc 60

ttcttattat ggttattgat tttgatatac actaagcaga tccctaaaat taattaatta 120

agtaaaaaca ccaaaaaaaa ttgcttctta tctagatttt tttcttagcg tcaccagaga 180

tattgagact catcatcttc caaagtaaat aaattatggt ccacccacac ccactgcatg 240

catgcataca tggctgttaa gtataacgta cgtaaggatt gatcaataat taatactact 300

tgtcacttat ggtgcaggtg g 321

<210> 7
<211> 321
<212> DNA
<213> Panax ginseng

<400> 7
atcaatgggc tcgatatatg tacgtgtcca tcctttaaat aaaagtattg tgttggttgc 60

ttcttattat ggttattgat tttgatatac actaagcaga tccctaaaat taattaayta 120

agtaaaaaca ccaaaaaaaa ttgcttctta tctagatttt tttcttagcg tcaccagaga 180

tattgagact catcatcttc caaagtaaat aaattatggt ccacccacac ccactgcatg 240

catgcataca tggctgttaa gtataacgta cgtaaggatt gatcaataat taatactact 300

tgtcacttat ggtgcaggtg g 321

<210> 8
<211> 4183
<212> DNA
<213> Panax ginseng

<400> 8
gattataata tgagcaaatt ttaaattcga taaatatctc gagcattttt tagytacwat 60

tttatgttcg atattcagat catataaact cgaaaagttc aaactactcg agttcgattc 120

aaaatcgtac tcgactcgat agttaaacga atctcaatcg aaccttataa attttatgaa 180

tcaattatgt gcaagtcaat actcggtttg actcagttca tttatatccc taattgtagg 240

caattaatcc ataaaatatt ttttaacttt taggctaagc tccccaaaga tttatgtaat 300

ctagctttat ttcaattaaa tcctaacgaa aatttaaaga aatttgtatt gttaattaat 360

gatttttac ttatcgatac taagtctaag tagcagtaaa aaatttgtat ccatttttca 420

tgatattatg catgaacaac atatatcatg gtgaattttt caaaaaatat tgtgtgttgc 480

acaatagaaa taaaaaaaat ggagcaatta aataaattat gtttgaatac atgcatttaa 540

ttacgtcctg gcccccaaaa aagaaaatgt tggcttcgtc cctactgatg cgtaccatca 600

tcatcagcca catttataat tgagcacgta actaccacaa tatagatcat gtccctgtcc 660

ccgctcctgc tgcatgtatt tatcagcgtg acaccgtcta tggtaggtga tcagtctgtc 720

taatattcaa gccatgccat gtggcagtaa ttagagattg atgcatgcat gcagctagca 780

aaataattgg gacgcagcac gcacggaatg agacccggct atatatataa aggtgaaatg 840

tccaaacgtt ttctcatcag aaagcagaca ttgttttata atactagcta gctatctaca 900

taactaatat taatgggttt aaccggtaag ctgatatgcc aaacaggaat caagtcagat 960

ggggatgtgt ttcatgagct tttcagtaac aaaccmcmcc atgtgtcaaa cattacccct 1020

gctaatgtac agggttgtga tttgcatgaa ggagaattyg gaaaagttgg ctccatcatc 1080

atytggaact attccatcgg taataatatt tactyttaat ttcctttyta ctagtatcta 1140

tgaatgtcaa atattgtatt taattaatat tttcgggaga aaaaaaaaac taataaaaat 1200

taagactttc atgtacagat gggaaggcgt crattacaaa ggaaraaata gtaaccatag 1260

acraggagga taagtcggtg actttcaagg tgattgaagg acatttgctt gaggaattca 1320

agagcgttgt tttcaragtt catgttgaca ccaagggtga agacaacttg gtgacatgga 1380

ccatcgacta tgataagctc aacgagagcg tcaaggatcc gacgtcgtat ctagattttt 1440

ttcttagcat caccagagat attgaggctc atcatctccc aaagtaatta attaatggtt 1500

cacccacacc cactgcatgc atgcatgcat ggctgttacg tatgtacgta aggattgatc 1560

aataattaac acttgtcact tatggtgcag gtggggtggt ttkggtttga ttatgaatat 1620

tgtgtttaaa ttataatcaa tgggctcgat atatgtacgt acgtgtccat cctttaaata 1680

aaagtattgt gttggttgct tcttattatg gttattgatt ttgatataca cccactgcat 1740

gcatgcatgc atggctgtta cgtatgtacg taaggattga tcaataaata atacttgtca 1800

cttatggtgc aggtggggtg gggtggtttg gtttggtttg attatgaata ttgtgtgtat 1860

gtgtgtgttt aaattataat caatgggctc gatatatgta cgtgtccatc ctttaaataa 1920

aagtattgtg ttggttgctt cttattatgg ttattgattt tgatatacac taagcagatc 1980

cctaaaatta attaattaag taaaaacacc aaaaaaaatt gcttcttatc tagatttttt 2040

tcttascgtc accagagata ttgagactca tcatcttcca aagtaaataa attatggtcc 2100

acccacatcc cactgcatgc atgcactaca tgtggctgtt agtatgtgat aacgtacgta 2160

aggattgatc aataattaat actacttgca cttatggtgc aagtgggtta attggtttgg 2220

tttggttatg aatattgttt gtatgtgtgt gtttaaatta taatcaatgg gctcgataca 2280

tgtacgtgtc cgtaaccttt aaataaaagt attgtgtgtt ggttgctttc tattatatat 2340

ggttattgat tttgatatac acactaggca gatccctaaa attaatcaag taaaaacacc 2400

caaaaaattg tttcgttgtt tcttatgttc tgatcctatt ttgaccattc tataacagta 2460

attctaaatg agccgcgtga ggcttctctt tataatttgg attgaaatat atggattttt 2520

gcatgatttc ctctttattt atattgtaat ggcatccgtt tgccatgggc ttacacttcc 2580

ttattgtttg agatgataaa acagaaggct aaagtatgtc tgtaagctag aattcaatta 2640

tttcgacact gatgtatcaa atgttcaaat ttatgtaatc ttgttttata aagagtacgg 2700

ttatatattg cgaaagttat taatcgaaat cgtatgtgcg tgtgtgtata tatatatata 2760

tatgtaagac tctaactttt ataaataaag atgaatttct ataaatatca ttttgaatat 2820

tatggagtaa atttaatata rtgttatagt tgtgagtaat atttataaat tttacaaagt 2880

acgcaaattg ttatataata ttcgaktggk cggaaaatat tcgttttaac agagaatatt 2940

cgtacaacgg cacaatcatt ggtggacccc acaacggaat tattgtcgga ttgagaaaac 3000

gacaaaaata ttttattgaa aataacggcg gaagttttac cattaatact gttgaactac 3060

tcggktgtaa aagtacagta atacgcgtgg ktgcatagta gcacacggta ttgattattg 3120

atgcttatgt gataagtcag tcagttttgt tttattggta ttattaatgt aataatacag 3180

aaaagctttt tatataaaac agaatacttt tattaagtta ttcattttat taggctaata 3240

gtaaaatctt tttatataaa acagaatact tttataaagt tatctgtttt attagacaat 3300

aattagaata tattatattt tattatgcat agtgtttgca tagtgcctgc atagtatttg 3360

catagtgcct gcatagtgtt tgcatagtaa aatcttttat aaagttattc gttttattag 3420

attataaata gaatatatta tattttattt aaaagatttt actttaaata tggaccgtca 3480

gattaaagta aatcaatctg gaccgttcat gagttagtta ctatgcagtc catttttcta 3540

taaatagaaa ctcattcctt cattatttct tacgaattca ctgaaactct agagagagaa 3600

agtatagaga gaaataagaa aagtattctg ctacttccct actcttatat tcagtttctt 3660

ttacggtaag gggtattatt tcttttgtat tcatgaagag aacttctgtt attatattct 3720

ttattattct actggaataa ccagtatacg cagactaccc tatacttggt gacattcttc 3780

tattattccg tctttattat tattctgttg gaatatcctg ttggaatatc ctgtctgtgc 3840

gttttacgcc ggacctggtt ccgtctttat tattattctg ttggaatatc ctgtctgtgc 3900

gttttatgcc ggacctggtt ccgtctttat tattattctg ttggaatatc ctgtctgtgc 3960

gttttaggct tttttcaatc tattatattg atcaacataa tttaactaaa aaaattaata 4020

ataattgttt tatgttgggt tagaattgca tgatagttga tgttgtgtac atgtcttgtc 4080

cagtgttttt cmaatatatg tacaatattt tgagcttgat taaagtttat aaatattgag 4140

atattagaga caattaaaat gattgggaag acatttttc ctc 4183