(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0060717
(43) 공개일자 2017년06월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2013.01)
C12Q 2600/13 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0165205
(22) 출원일자 2015년11월25일
심사청구일자 2015년11월25일
기술이전 희망 : **기술양도**

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
대한민국(환경부 국립생물자원관장)
인천 서구 환경로 42, 종합환경연구단지 국립생물자원관 (경서동)
(72) 발명자
김영동
강원도 춘천시 지석로 97, 101동 802호(석사동, 현진에버빌 1차)
이정훈
강원도 춘천시 우석로101번길 86, 105동 1204호(석사동, 대우아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

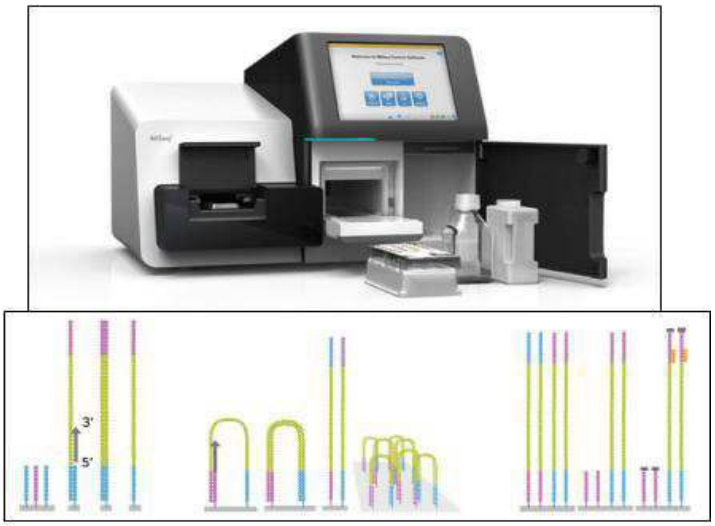
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **매자나무와 매발톱나무를 구분하는 엽록체 유전체 유래 유전자 마커**

(57) 요 약

본 발명은 엽록체 유전체 유래 유전자 마커로부터 매자나무와 매발톱나무를 판별하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 프라이머를 이용하면 매자나무와 매발톱나무를 적은 양의 시료를 가지고도 쉽고, 정확하게 구별할 수 있는 효과가 있다. 또한, 본 발명의 방법에 의해 개발된 종 특이 프라이머를 이용 시 한국 특산물인 매자나무의 구분이 가능해져 우리의 소중한 유전자원을 보호할 수 있는 효과가 있다. 또한 종 구분이 되지 않은 채 섞여서 유통되고 있는 한약재(매자나무, 매발톱나무)의 원재료를 파악하여 원료의 신뢰성을 회복하는데 큰 역할을 할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/158 (2013.01)
C12Q 2600/16 (2013.01)
(72) 발명자
양태진
경기도 안양시 동안구 흥안대로223번길 16, 208동 1801호(호계동, 샘마을 쌍용아파트)
김경희
경기도 안양시 동안구 귀인로 210, 105동 806호(귀인동, 현대홈타운아파트)
김순옥
경기도 안양시 동안구 평촌대로211번길 21, 306동 706호(호계동, 목련아파트)
임채은
서울특별시 마포구 상암산로1길 92, 712동 1402호(월드컵파크아파트)
김창무
경기도 고양시 일산서구 대화1로 61, 502동 101호(대화동, 대화마을 5단지)
여주홍
경기도 수원시 영통구 인계로 165, 523동 1203호(매탄동, 주공5단지 아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NIBR20153201
부처명 환경부
연구관리전문기관 국립생물자원관
연구사업명 2015 연구용역
연구과제명 야생 자원식물의 유전자(체) 다양성 연구_1년차
기 여 율 1/1
주관기관 국립생물자원관
연구기간 2015.04.01 ~ 2015.11.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 *ndh*F-*rpl*32 프라이머 세트;

서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 *rbc*L-*acc*D 프라이머 세트;

서열번호 5 및 서열번호 6로 이루어진 *pet*N-*psb*M 프라이머 세트; 또는

서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 *acc*D 프라이머 세트를 포함하는, 매자나무와 매발톱나무의 판별용 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 *ndh*F-*rpl*32 프라이머 세트는 1,500bp, *rbc*L-*acc*D 프라이머 세트는 900bp, *pet*N-*psb*M 프라이머 세트는 770bp 또는 *acc*D 프라이머 세트는 1,000bp의 DNA 단편을 증폭하는 것을 특징으로 하는, 매자나무와 매발톱나무의 판별용 프라이머 세트.

청구항 3

(a) 매자나무 또는 매발톱나무의 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계;

(b) 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항 또는 제2항의 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및

(c) 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 매자나무와 매발톱나무를 판별하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 증폭 산물의 검출은 겔 전기영동, 모세관 전기영동, DNA 칩, 방사선 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행하는 것을 특징으로 하는, 매자나무와 매발톱나무를 판별하는 방법.

청구항 5

(a) 매자나무 또는 매발톱나무의 시료에서 분리한 게놈 DNA을 주형으로 하고, 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 *ndh*F-*rpl*32 프라이머 세트; 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 *rbc*L-*acc*D 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6로 이루어진 *pet*N-*psb*M 프라이머 세트; 또는 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 *acc*D 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및

(b) 생성된 PCR 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, 매자나무와 매발톱나무 판별을 위한 정보 제공 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 *ndh*F-*rpl*32 프라이머 세트로 PCR을 수행하여 서열번호 9의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매발톱나무로 판별하고, 서열번호 10의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매자나무로 판별하는 것을 특징으로 하는 매자나무와 매발톱나무 판별을 위한 정보 제공 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 *rbc*L-*acc*D 프라이머 세트로 PCR을 수행하여 서열번호 11의 DNA 증폭산물

을 수득한 경우 매발톱나무로 판별하고, 서열번호 12의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매자나무로 판별하는 것을 특징으로 하는 매자나무와 매발톱나무 판별을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

서열번호 5 및 서열번호 6로 이루어진 *petN-psbM* 프라이머 세트로 PCR을 수행하여 서열번호 13의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매발톱나무로 판별하고, 서열번호 14의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매자나무로 판별하는 것을 특징으로 하는 매자나무와 매발톱나무 판별을 위한 정보 제공 방법.

청구항 9

제5항에 있어서,

서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 *accD* 프라이머 세트로 PCR을 수행하여 서열번호 15의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매발톱나무로 판별하고, 서열번호 16의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매자나무로 판별하는 것을 특징으로 하는 매자나무와 매발톱나무 판별을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 매자나무와 매발톱나무를 구분하는 엽록체 유전체 유래 유전자 마커 및 이를 이용한 매자나무와 매발톱나무를 판별할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 매자나무과(Berberidaceae)는 미나리아재비목(Ranunculales)에 속하며 전세계적으로 15~17 속에 약 500~650 종이 분포하는 것으로 알려졌다(Heywood, 1985). 한반도의 매자나무과 식물은 8속이 분포하며 그 중 매자나무속(*Berberis*)에는 6분류군이 자생하고 있다(Park, 2007). 매자나무과는 다년생 초본 또는 관목식물로 이루어져 있으며, 잎은 호생하고, 낙엽성 또는 상록성이다. 꽃은 양성화로 방사상이고, 화서는 취산화서나 총상화서를 이룬다. 대부분의 종은 꽃잎과 꽃받침이 뚜렷하게 구분되며, 하나의 심피로 된 암술과 판개하는 약이 특징이다(Heywood, 1985).

[0003] 특히 매자나무속의 매자나무(*Berberis koreana* Palib.)와 매발톱나무(*Berberis amurensis* Rupr.)는 줄기와 뿌리에서 노란색의 염료를 추출할 수 있고, 다양한 알카로이드를 포함하고 있는 것으로 알려져 있다. 또한 이들 분류군은 소벽(小檗)과 황염목(黃染木)이라 불리며 한약재로 많이 이용되고 있고, 특히 항염효과가 뛰어나기 때문에 구내염, 관절염, 간염, 위염 등에 효과적인 것으로 알려졌다.

[0004] 최근 연구에서는 이들 분류군의 뿌리와 수피부에서 폴리페놀(polyphenol)과 베르베린(berberine) 함량이 매우 높게 나타났다. 이 성분들은 항산화 및 항균 활성에 영향을 미치며(Jung et al., 2007), 이뿐만 아니라 암세포의 생육을 억제하고(Syed Abdul et al., 2009) NK 세포의 활성을 증진시켜 면역력 향상(Jin et al., 2008)에도 도움을 준다는 연구 보고가 있다.

[0005] 그러나, 매자나무와 매발톱나무는 형태학적으로 매우 유사하기 때문에 구분이 쉽지 않으며, 이러한 이유 때문에 매자나무와 매발톱나무가 구분되지 않은 채 무차별적으로 채취되고 있다. 채취된 두 분류군은 혼합된 상태에서 약재시장에서 거래되고 있다. 또한 매발톱나무는 동북아시아 즉, 중국, 러시아, 한국, 일본에 넓게 분포하지만 매자나무는 한반도 특산식물로 한국에만 분포하는 것으로 알려져있다.

[0006] 따라서, 매자나무와 매발톱나무를 쉽고 간단하게 구별할 수 있는 방법의 개발이 절실히 필요하나 아직까지 그에 대한 연구가 미미한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0720864호

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-0884915호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 형태학적으로 매우 유사하여 쉽게 구분할 수 없었던 매자나무와 매발톱나무를 쉽고 간단하게 구별할 수 있는 방법을 연구하던 중, 두 종의 완전한 엽록체 게놈을 차세대 염기서열 분석(NGS)을 이용하여 확인한 후 이를 기초로 염기서열을 비교 분석하였다. 그 결과, 상기 두 종을 쉽고 간단하게 구별할 수 있는 종특이 프라이머를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 *ndh*F-*rpl*32 프라이머 세트; 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 *rbc*L-*acc*D 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6로 이루어진 *pet*N-*psb*M 프라이머 세트; 또는 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 *acc*D 프라이머 세트를 포함하는, 매자나무와 매발톱나무의 판별용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 목적은 (a) 매자나무 또는 매발톱나무의 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; (b) 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항 또는 제2항의 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 (c) 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 매자나무와 매발톱나무를 판별하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 나아가 본 발명의 목적은 (a) 매자나무 또는 매발톱나무의 시료에서 분리한 게놈 DNA을 주형으로 하고, 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 *ndh*F-*rpl*32 프라이머 세트; 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 *rbc*L-*acc*D 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6로 이루어진 *pet*N-*psb*M 프라이머 세트; 또는 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 *acc*D 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및 (b) 생성된 PCR 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, 매자나무와 매발톱나무 판별을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 *ndh*F-*rpl*32 프라이머 세트; 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 *rbc*L-*acc*D 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6로 이루어진 *pet*N-*psb*M 프라이머 세트; 또는 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 *acc*D 프라이머 세트를 포함하는, 매자나무와 매발톱나무의 판별용 프라이머 세트를 제공한다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 *ndh*F-*rpl*32 프라이머 세트는 1,500bp, *rbc*L-*acc*D 프라이머 세트는 900bp, *pet*N-*psb*M 프라이머 세트는 770bp 또는 *acc*D 프라이머 세트는 1,000bp의 DNA 단편을 증폭할 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 (a) 매자나무 또는 매발톱나무의 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; (b) 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항 또는 제2항의 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 (c) 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 매자나무와 매발톱나무를 판별하는 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 증폭 산물의 검출은 겔 전기영동, 모세관 전기영동, DNA 칩, 방사선 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행할 수 있다.

[0016] 나아가 본 발명은 (a) 매자나무 또는 매발톱나무의 시료에서 분리한 게놈 DNA을 주형으로 하고, 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 *ndh*F-*rpl*32 프라이머 세트; 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 *rbc*L-*acc*D 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6로 이루어진 *pet*N-*psb*M 프라이머 세트; 또는 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 *acc*D 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및 (b) 생성된 PCR 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, 매자나무와 매발톱나무 판별을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 *ndh*F-*rpl*32 프라이머 세트로 PCR을 수행하여 서열번호 9의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매발톱나무로 판별하고, 서열번호 10의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매자나무로 판별할 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 *rbc*L-*acc*D 프라이머 세트로 PCR을 수행하여 서열번호 11의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매발톱나무로 판별하고, 서열번호 12의 DNA 증폭산물을 수득한

경우 매자나무 로 판별할 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 서열번호 5 및 서열번호 6로 이루어진 *petN-psbM* 프라이머 세트로 PCR을 수행하여 서열번호 13의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매발톱나무로 판별하고, 서열번호 14의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매자나무 로 판별할 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 *accD* 프라이머 세트로 PCR을 수행하여 서열번호 15의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매발톱나무로 판별하고, 서열번호 16의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매자나무로 판별할 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 프라이머를 이용하면 매자나무와 매발톱나무를 적은 양의 시료를 가지고도 쉽고, 정확하게 구별할 수 있는 효과가 있다. 또한, 본 발명의 방법에 의해 개발된 종 특이 프라이머를 이용 시 한국 특산식물인 매자나무의 구분이 가능해져 우리의 소중한 유전자원을 보호할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 Illumina Miseq 기기 분석 방법을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 실험에 사용한 Miseq 시스템 수행 파라미터를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 엽록체 염기서열 타당성 검증 방법을 나타낸 모식도이다.

도 4는 매자나무의 엽록체 유전체 지도를 나타낸 것이다.

도 5는 매발톱나무의 엽록체 유전체 지도를 나타낸 것이다.

도 6은 *ndhF-rpl32* 마커를 이용한 매자나무와 매발톱나무 두 종의 염기서열을 비교한 결과이다.

도 7은 *rbcL-accD* 마커를 이용한 매자나무와 매발톱나무 두 종의 염기서열을 비교한 결과이다.

도 8은 *petN-psbM* 마커를 이용한 매자나무와 매발톱나무 두 종의 염기서열을 비교한 결과이다.

도 9는 *accD* 마커를 이용한 매자나무와 매발톱나무 두 종의 염기서열을 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 매자나무과에 속하는 식물은 전 세계적으로는 14속 650종이 주로 북반구 온대지역에 분포하고 있으며, 우리나라에는 8속 12종 2변종 총 14분류군이 분포하고 있다. 이중 매자나무속은 4종 2변종 6분류군으로 매발톱나무, 왕매발톱나무, 섬매발톱나무, 매자나무, 당매자나무, 일본매자나무가 있으며 매자나무는 산림청지정 특산식물, 섬매발톱나무는 희귀, 특산식물로 유전자원 현재 내· 외 보존방안 수립 및 자원화를 위한 연구의 수행이 시급한 실정이다.

[0024] 한편, 매발톱나무는 동북아시아 즉, 중국, 러시아, 한국, 일본에 넓게 분포하지만 매자나무는 한반도 특산식물로 한국에만 분포하는 것으로 알려져있다. 그러나, 매자나무와 매발톱나무는 형태학적으로 매우 유사하기 때문에 구분이 쉽지 않으며, 이러한 이유 때문에 매자나무와 매발톱나무가 구분되지 않은 채 무차별적으로 채취되고 있다. 채취된 두 분류군은 혼합된 상태로 약재시장에서 거래되고 있으나, 이를 구분하기는 쉽지가 않다.

[0025] 이에 본 발명자들은 형태학적으로 매우 유사하여 쉽게 구분할 수 없었던 매자나무와 매발톱나무를 쉽고 간단하게 구별할 수 있는 방법을 연구하던 중, 두 종의 완전한 엽록체 유전체를 차세대 염기서열 분석(NGS)을 이용하여 확인하고, 이 두 종의 엽록체 유전체를 면밀히 검토하여 쉽고 간단하게 구별할 수 있는 종 특이 프라이머를 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0026] 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 *ndhF-rpl32* 프라이머 세트;서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 *rbcL-accD* 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6로 이루어진 *petN-psbM* 프라이머 세트; 또는 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 *accD* 프라이머 세트를 포함하는, 매자나무와 매발톱나무의 판별용 프라이머 세트를 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 (a) 매자나무 또는 매발톱나무의 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; (b) 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 제1항 또는 제2항의 프라이머 세트를 이용하여 증폭 반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하

는 단계; 및 (c) 증폭 산물을 검출하는 단계를 포함하는, 매자나무와 매발톱나무를 판별하는 방법을 제공한다.

[0028] 본 발명에서 상기 증폭산물의 검출은 겔 전기영동, 모세관 전기영동, DNA 칩, 방사선 측정, 형광 측정 또는 인광 측정을 통해 수행할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 가장 바람직하게는 겔 전기영동 할 수 있다.

[0029] 본 발명에서 상기 '프라이머'란 용어는 PCR에서 증폭시킬 표적 DNA 지역에 부착하여 DNA 복제를 유도하는 짧게 합성된 단일 DNA 조각이다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다.

[0030] 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 *ndh*F-*rpl*32, *rbc*L-*acc*D, *pet*N-*psb*M 또는 *acc*D 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 바람직하며, 이에 제한되지는 않으나, 가장 바람직하게는 *ndh*F-*rpl*32의 경우, 서열번호 1 및 2의 프라이머 쌍일 수 있으며, *rbc*L-*acc*D의 경우, 서열번호 3 및 4의 프라이머 쌍일 수 있고, *pet*N-*psb*M의 경우, 서열번호 5 및 6의 프라이머 쌍일 수 있으며, *acc*D의 경우, 서열번호 7 및 8의 프라이머 쌍일 수 있다.

[0031] 상기 증폭 반응은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자의 증폭 반응들에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있고, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR), 리가아제 연쇄반응(LCR), 전자 중재 증폭(TMA), 핵산 염기서열 기판 증폭(NASBA) 등이 포함될 수 있다.

[0032] 본 발명의 매자나무와 매발톱나무 판별용 마커가 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 마커는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, Thermus aquaticus (Taq), Thermus thermophilus(Tth), Thermus filiformis, Thermis flavus, Thermococcus literalis 또는 Pyrococcus furiosus(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다.

[0033] 나아가, 본 발명은 (a) 매자나무 또는 매발톱나무의 시료에서 분리한 게놈 DNA을 주형으로 하고, 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 *ndh*F-*rpl*32 프라이머 세트; 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 *rbc*L-*acc*D 프라이머 세트; 서열번호 5 및 서열번호 6로 이루어진 *pet*N-*psb*M 프라이머 세트; 또는 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 *acc*D 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및 (b) 생성된 PCR 산물을 검출하는 단계;를 포함하는, 매자나무와 매발톱나무 판별을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0034] 본 발명에서 상기 "매자나무와 매발톱나무 판별을 위한 정보 제공 방법"은 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 *ndh*F-*rpl*32 프라이머 세트로 PCR을 수행하여 서열번호 9의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매발톱나무로 판별하고, 서열번호 10의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매자나무로 판별할 수 있으며, 보다 구체적으로 설명하면 *ndh*F-*rpl*32 프라이머를 이용 시 서열번호 9의 671번째 서열에서 G인 경우, 916번째 서열에서 A인 경우, 1077번째 서열에서 C인 경우 및 787번째에서 799번째까지 CTAAAAATATCTA 서열이 삽입되어 있으면 매발톱나무, 서열번호 1의 671번째 서열에서 A인 경우, 916번째 서열에서 C인 경우 및 1077번째 서열에서 A인 경우이면 매자나무로 판단할 수 있다.

[0035] 또한, 상기 정보 제공 방법은 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 *rbc*L-*acc*D 프라이머 세트로 PCR을 수행하여 서열번호 11의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매발톱나무로 판별하고, 서열번호 12의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매자나무로 판별할 수 있으며, 보다 구체적으로 설명하면 *rbc*L-*acc*D 프라이머를 이용 시 서열번호 2의 456번째 서열에서 T인 경우 및 459번째 서열에서 C인 경우이면 매발톱나무, 서열번호 2의 456번째 서열에서 G 및 459번째 서열에서 A인 경우이면 매자나무로 판단할 수 있다.

[0036] 또한, 상기 정보 제공 방법은 서열번호 5 및 서열번호 6로 이루어진 *pet*N-*psb*M 프라이머 세트로 PCR을 수행하여 서열번호 13의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매발톱나무로 판별하고, 서열번호 14의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매자나무로 판별할 수 있으며, 보다 구체적으로 설명하면 *pet*N-*psb*M 프라이머를 이용 시 서열번호 3의 66번째 서열에서 C인 경우 및 512번째 서열에서 G인 경우이면 매발톱나무, 서열번호 3의 66번째 서열에서 T 및 512번째 서열에서 C인 경우이면 매자나무로 판단할 수 있다.

[0037] 상기 정보 제공 방법은 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 *acc*D 프라이머 세트로 PCR을 수행하여 서열번호 15의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매발톱나무로 판별하고, 서열번호 16의 DNA 증폭산물을 수득한 경우 매자나무로 판별할 수 있으며, 보다 구체적으로 설명하면 *acc*D 프라이머를 이용 시 서열번호 4의 440번째에서 469번째까

지 GTGATTTCGAGGAAGGTGATTCCCAAGAAA 서열이 없으면 매발톱나무, 440번째에서 469번째까지 GTGATTTCGAGGAAGGTGATTCCCAAGAAA 서열이 있으면 매자나무로 판단할 수 있다.

[0038] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0039] **<실시예 1>**

[0040] **엽록체 유전체 해독 방법을 이용한 매자나무와 매발톱나무를 식별할 수 있는 분자 마커 개발**

[0041] 본 발명자들은 매자나무와 매발톱나무 선별을 위한 종 식별 마커를 개발하기 위하여 하기와 같은 실험을 진행하였으며, 본 발명 실험에 사용한 매자나무(*Berberis koreana*)는 강원도 춘천 대룡산에서 수득하였고, 매발톱나무(*Berberis amurensis*)는 강원도 평창군 금대봉에서 수득하였다.

[0042] **<1-1> DNA 추출**

[0043] 매자나무와 매발톱나무의 시료로부터 DNA의 추출은 DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, USA)을 사용하여 추출 또는 CTAB를 이용하여 추출하였다. 추출된 DNA는 Nanodrop Spectrophotometer로 농도를 측정한 후, 일정 농도로 희석하여 -80℃ 초저온 냉동고에 보관하였다.

[0044] **<1-2> PCR 장비를 이용한 표적 DNA 증폭방법 및 PCR 생산물 확인**

[0045] PCR은 주형 DNA 20~50ng, 10X buffer 5ul, 2.5mM dNTPs 4ul, 5pmol primer 각각 1ul, 5U/ul 중합효소(Takara Ex Taq.) 및 증류수가 포함된 총 50ul 반응액을 만들어 98℃에서 5분 동안 DNA 1차 해리 후, 95℃에서 1분 DNA 해리 과정, 55℃에서 1분 primer 결합(annealing) 과정, 72℃에서 1분 DNA 합성(extension) 과정으로 구성된 반응을 30회 반복한 후 최종적으로 72℃에서 10분 간 안정화 단계를 진행하였다(Applied Bio-systems Gene Amp. PCR system 9700 사용).

[0046] 증폭이 완료된 PCR 산물은 1% agarose gel을 이용하여 전기영동을 수행하고 이후 EtBr로 stain과 destain 과정을 거쳐 최종 UV trans-illuminator 장비를 이용하여 PCR 산물의 크기를 확인하였다.

[0047] **<1-3> 증폭된 표적 DNA의 염기서열 결정 과정**

[0048] 표적 DNA의 증폭이 확인되면 염기서열분석 장비인 3730XL DNA sequencer를 이용한다. 일반적으로 DNA 복제는 주형 DNA 가닥에 상보적인 dNTP가 결합하여 이루어지는데, 이 장비는 dNTP 대신 ddNTP를 사용하여 DNA 복제가 중단되는 원리를 이용한 것이다. DNA의 염기서열 분석 과정은 합성된 DNA 조각을 전기영동하여 형광 검출기를 이용하면 염기서열을 읽을 수 있다.

[0049] DNA 염기서열 분석에 필요한 요소로는 표적 DNA의 주형 DNA 단일 가닥, 프라이머, DNA 중합효소, dNTP(dATP, dTTP, dGTP, dCTP), 4종류로 표지된 형광 ddNTP(ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP)가 필요하다. 이 모든 요소들을 섞은 후 PCR을 수행하였다. 그 결과 새로운 DNA 가닥이 합성될 때 dNTP 대신 ddNTP가 결합하면 DNA 합성이 멈추고, 말단에 형광 물질로 표지된 ddNTP가 붙은 다양한 길이의 DNA 조각이 생긴다. 새로 합성된 DNA 조각을 전기영동하면 길이에 따라 DNA 조각이 나열되며, 이를 염기서열분석 장비를 통해 DNA 조각 말단의 형광 표지 색을 순서대로 읽어 분석하고자 하는 DNA 가닥에 상보적인 염기 서열을 알 수 있다.

[0050] **<1-4> 확인된 염기서열 비교 분석 방법**

[0051] 상기 실시예 <1-3>의 방법으로 염기서열이 확인되면 비교할 종과 염기서열 비교 과정이 필요하다. 이때 가장 중요한 부분은 염기서열의 정렬이다. 염기서열 정렬을 도와주는 많은 프로그램들이 있으며, 본 발명에서는

Geneious Pro 6.0.3 프로그램에 플러그인 되어 있는 MUSCLE(Multiple Sequence Comparison by Log-Expcetation) 프로그램을 이용하였다. 정렬이 완료된 염기서열을 통해 변이 정도를 파악할 수 있다.

[0052] **<1-5> 엽록체 서열을 이용한 분자 마커 개발**

[0053] 식물 엽록체는 식물의 DNA 바코딩 시스템(barcoding system)의 가장 효율적인 타겟이다. 엽록체 DNA는 종 내에서 변이가 거의 없지만, 종 간에 나타나는 변이는 종 식별과 그들의 유연관계를 분석하는데 효율적으로 이용된다. 완전히 해독된 2종의 엽록체 DNA를 이용하여 종간의 변이 부분을 탐색하고 탐색된 부분의 프라이머를 디자인하여 여러 개체에 적용할 수 있다.

[0054] 따라서, 본 발명에서는 매자나무와 매발톱나무를 효과적으로 구분할 수 있는 분자 마커의 개발을 위하여 NGS 분석을 통해 얻은 2종의 엽록체 DNA를 비교하여 변이율이 높은 4개 부분을 선정하였으며, 선정된 부분의 프라이머를 디자인하여 여러 개체에 적용하였다.

[표 1] 매자나무와 매발톱나무의 종 구분 마커

Primer Name	Sequence	Base	GC(%)	Tm(℃)
*ndh*F_523F	AAGCATTTGCCGCAATTGGT	20	45	60
*rpl*32_97R	AAAATGCTTTTACCGCCGCC	20	50	60.4
*rbc*L_1369F	GCTGCTTGTGAGGTCTGGAA	20	55	60.3
*acc*D_222R	GAAACTCCCAATGCCCCTGA	20	55	60
*pet*N_11F	TAAGTCTTGCTTGGGCTGCT	20	50	59.6
*psb*M_34R	GCATTGTTCATTCTAATTCCTACT GC	26	38.5	59.1
*acc*D 316F	CATCCTTCGTTTCCGGGTGA	20	55	60
*acc*D 1344R	AACAGCCTCAGTTAACCCCG	20	55	60

[0055]

[표 2] 엽록체 게놈 구조 분석 결과

Species	Chloroplsat genome structural region(bp)			
	LSC	SSC	Each IR	Total genome length
매자나무	73,736	18,718	37,152	166,758
매발톱나무	73,628	18,425	37,155	166,363

[0056]

[0057] **<실시예 2>**

[0058] **본 발명의 방법으로 제조된 분자마커를 이용한 매자나무 및 매발톱나무 종의 비교 결과**

[0059] 본 발명 실시예 1의 방법으로 매자나무와 매발톱나무를 구분할 수 있는 총 4개의 마커를 개발하였으며, 상기 분자마커를 이용하여 2종을 비교 확인한 결과, 3개의 논코딩지역(non-coding region)과 1개의 코딩지역(coding region-CDS)에서 2종을 구분할 수 있는 변이를 확인하였다.

[0060] **<2-1> *ndh*F-*rpl*32 마커를 이용한 확인**

[0061] *ndh*F-*rpl*32 마커는 3개의 점돌연변이를 확인 할 수 있었으며, 매발톱나무에서 13bp의 삽입이 있는 것을 확인하

였다.

[0062] **<2-2> *rbc*L-*acc*D 마커를 이용한 확인**

[0063] *rbc*L-*acc*D 마커는 2개의 점돌연변이를 확인하였다.

[0064] **<2-3> *pet*N-*psb*M 마커를 이용한 확인**

[0065] *pet*N-*psb*M 마커는 2개의 점돌연변이를 확인하였다.

[0066] **<2-4> *acc*D 마커를 이용한 확인**

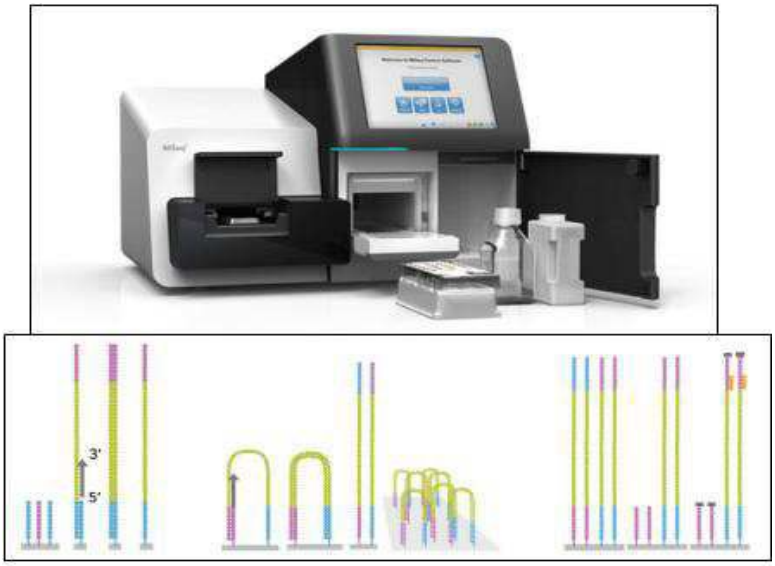
[0067] *acc*D 마커는 매발톱나무에서 30bp 결실을 확인하였다.

[0068] 따라서, 본 발명은 기존 형태학적으로 매우 유사하여 구분이 쉽지 않았던 매자나무와 매발톱나무를 차세대 염기서열분석(NGS) 방법을 통해 얻은 완전한 엽록체 게놈(genome)을 기초으로 두 종의 염기서열을 비교분석하여 이들 종을 판별할 수 있는 4개의 마커(primer)를 개발하였으며, 본 발명의 방법으로 제공된 마커(primer)를 사용하여 매자나무와 매발톱나무의 종을 식별하는데는 DNA 추출에서 종 확인까지 약 1 ~ 2일 소요되며, 분석비용도 1점 당 15,000원 밖에 들지 않아, 기존 방법에 비하여 시간 및 비용을 획기적으로 줄일 수 있는 효과가 있다.

[0069] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



도면2

MiSeq System Performance Parameters

MiSeq Reagent Kit v2

Read Length	Total Time*	Output
1 × 36 bp	~4 hours	540–610 Mb
2 × 25 bp	~5.5 hours	750–850 Mb
2 × 150 bp	~24 hours	4.5–5.1 Gb
2 × 250 bp	~39 hours	7.5–8.5 Gb

Reads Passing Filter†

Single Reads	12–15 M
Paired-End Reads	24–30 M

Quality Scores††

> 90% bases higher than Q30 at 1 × 36 bp
> 90% bases higher than Q30 at 2 × 25 bp
> 80% bases higher than Q30 at 2 × 150 bp
> 75% bases higher than Q30 at 2 × 250 bp

MiSeq Reagent Kit v3

Read Length	Total Time*	Output
2 × 75 bp	~21 hours	3.3–3.8 Gb
2 × 300 bp	~56 hours	13.2–15 Gb

Reads Passing Filter†

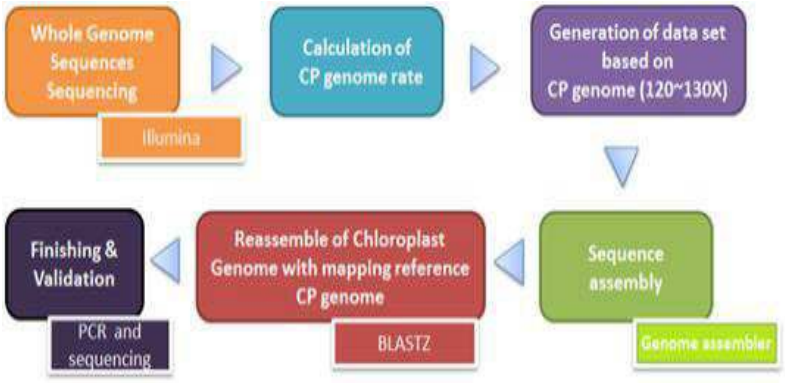
Single Reads	22–25 M
Paired-End Reads	44–50 M

Quality Scores††

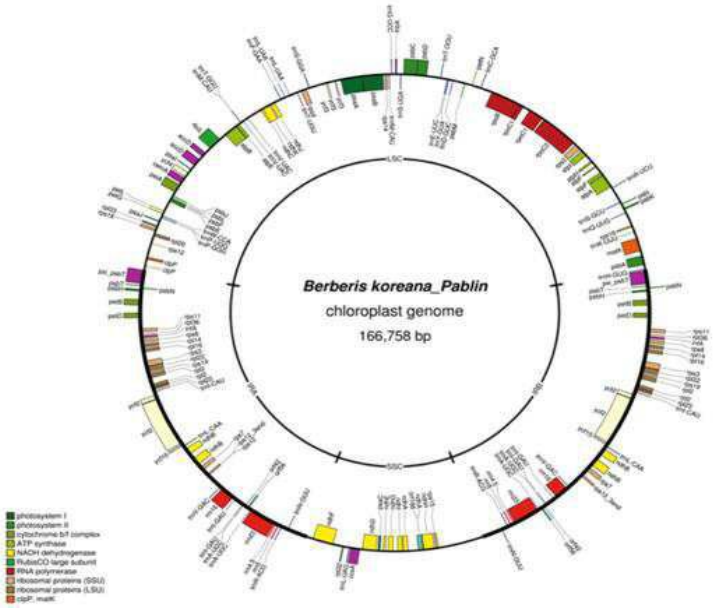
> 85% bases higher than Q30 at 2 × 75 bp
> 70% bases higher than Q30 at 2 × 300 bp

* Total times include cluster generation, sequencing, and base calling on a MiSeq system enabled with dual surface scanning.
† Install specifications based on Illumina PhiX control library at supported cluster densities between 865–965 k/mm² clusters passing filter for v2 chemistry and 1200–1400 k/mm² clusters passing filter for v3 chemistry. Actual performance parameters can vary based on sample type, sample quality, and clusters passing filter.
†† The percentage of bases > Q30 is averaged across the entire run.
bp = base pairs, Mb = megabases, Gb = gigabases, M = millions

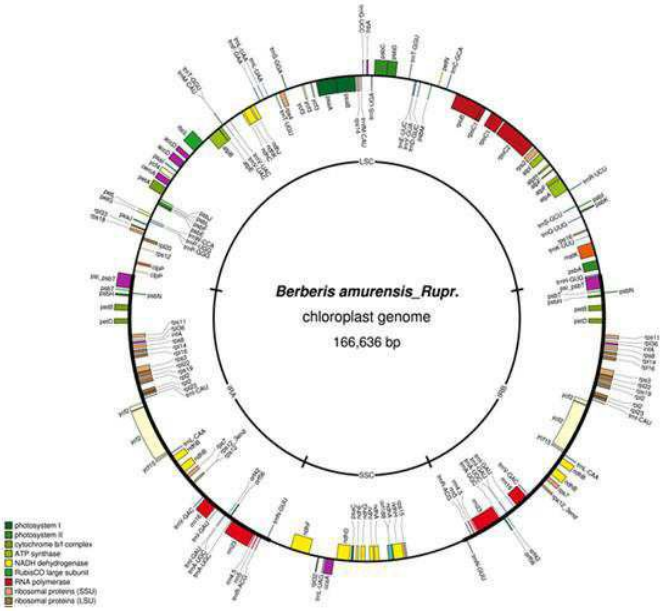
도면3



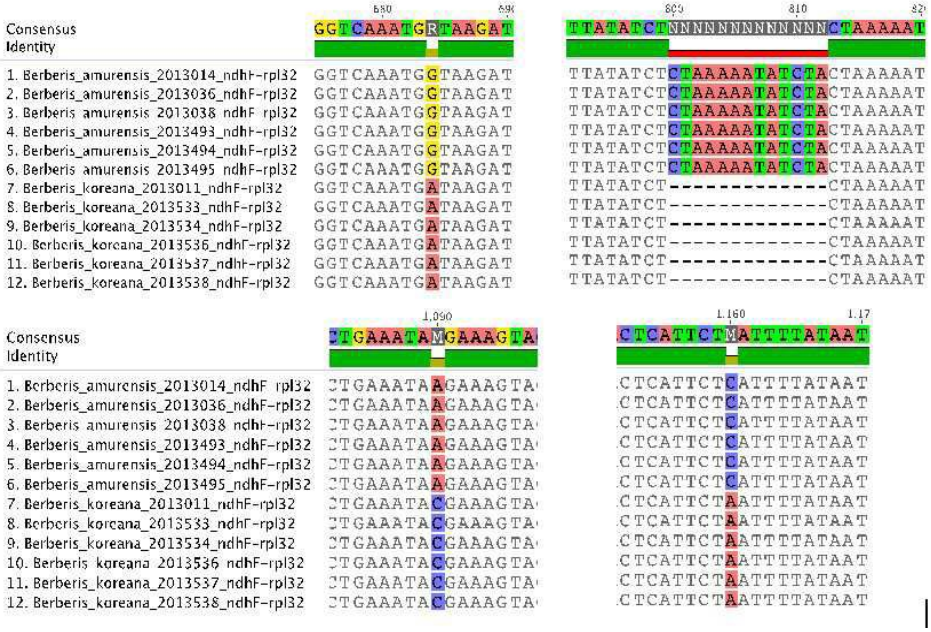
도면4



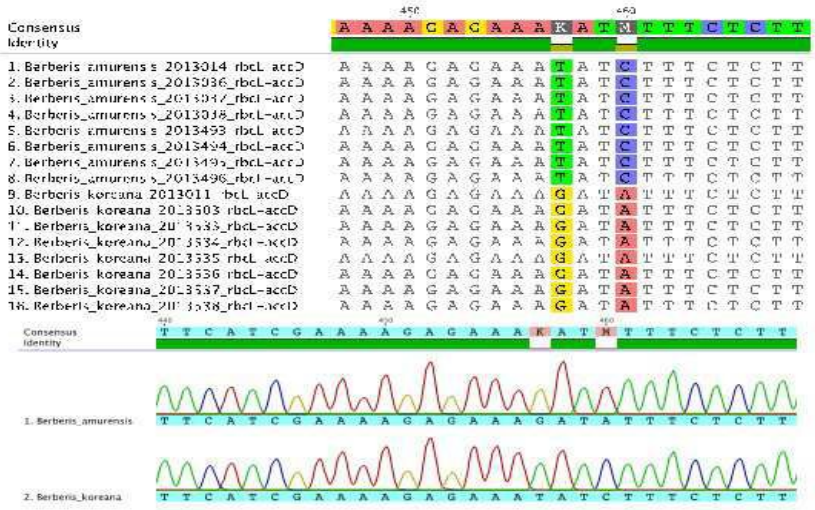
도면5


Berberis amurensis_Rupr.
chloroplast genome
166,636 bp
LSC
IRa
SSC
IRb

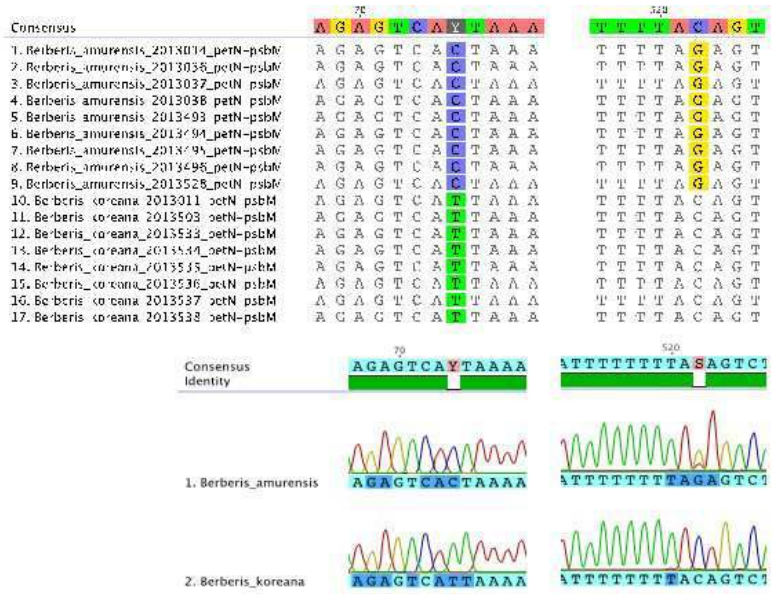
도면6


Consensus
Identity
1. Berberis_amurensis_2013014_ndhF-rpl32
2. Berberis_amurensis_2013036_ndhF-rpl32
3. Berberis_amurensis_2013038_ndhF-rpl32
4. Berberis_amurensis_2013493_ndhF-rpl32
5. Berberis_amurensis_2013494_ndhF-rpl32
6. Berberis_amurensis_2013495_ndhF-rpl32
7. Berberis_koreana_2013011_ndhF-rpl32
8. Berberis_koreana_2013533_ndhF-rpl32
9. Berberis_koreana_2013534_ndhF-rpl32
10. Berberis_koreana_2013536_ndhF-rpl32
11. Berberis_koreana_2013537_ndhF-rpl32
12. Berberis_koreana_2013538_ndhF-rpl32

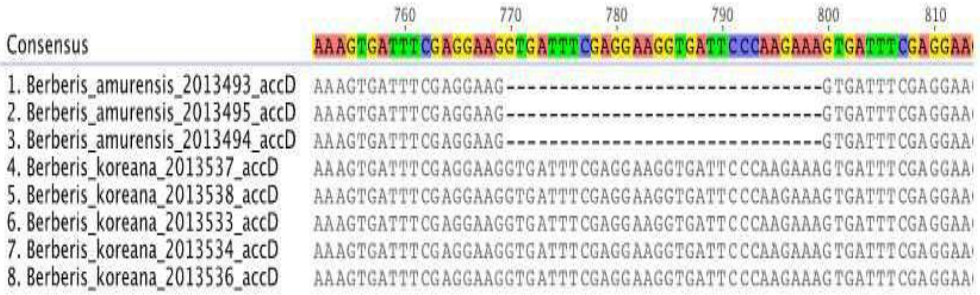
도면7



도면8



도면9



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University

National Institute of Biological Resources

<120> Genetic maker derived chloroplast genome for distinguishing Berberis koreana Palib. or Berberis amurensis Rupr

<130> PN1510-277

<160> 16

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> ndhF-rpl32 forward sequence

<400> 1

aagcatttgc cgcaattggt 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> ndhF-rpl32 reverse sequence

<400> 2

aaaatgcttt taccgccgcc 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> rbcL-accD forward sequence

<400> 3

gctgcttgtg aggtctggaa 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> rbcL-accD reverse sequence

<400> 4

gaaactccca atgcccctga 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> petN-psbM forward sequence

<400> 5

taagtcttgc ttgggctgct 20

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> petN-psbM reverse sequence

<400> 6

gcattgttca ttctaattcc tactgc 26

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> accD forward sequence

<400> 7

catccttcgt ttccgggtga 20

<210> 8

<211> 20

<212

> DNA

<213> accD reverse sequence

<400> 8

aacagcctca gttaaccccg 20

<210> 9

<211> 1533

<212> DNA

<213> Berberis amurensis sequence(ndhF-rpl32)

<400> 9

ttccaaccaa ttcccaaaaa atataaattt gtatcaaatt ggaactagta actaatccca 60

acatggaagc attggaaaaa ctcatataag caaaaaatct caaatagcct tgatcatgag 120

acatataatt gtcactataa ataagaacca ttattccaac agtagtaatt aatattaaca 180

taatggacgt aagtggatcg atcaagtaac caaattctaa agaaaaatca ttatggatag 240

tccaggacca tacgtattga tatataaaac tgccattcat ttgttgaata gacagatcgg 300

ctgaaaaaat cataatgata cttagtaata aaatactagg aaaggcccat atacgacgaa 360

gacttttgc tgctgtaggg acaacgagaa gtccgattcc tattgctata ggaactggaa 420

gtggaaccca aggtatgatc catgcatatt gagatgtata tgccataaga aatttttttt 480

tttttttttat tgtttttttat tgtttccaat tcaccagttt ttctctcttt cggaaagaga 540

aagtaataaa aaaaatcaag atatcaaaga gttcaaatat aattttaaat tgtaatcatt 600

atgatttttt attctttcaa aaaagaaata tttcaactat tcaaatcaag aagttactat 660

tggtcaaatg gtaagataaa gtcattggaa aaaattacta gttagtgatt aactaagata 720

tttagaaaaa tagaaaatat aagattataa accattccat tattacgatt acgaaaattt 780

atatctctaa aaatatctac taaaaatatc tatagaatag ggaaaaataa ttatatcaaa 840

aaggaaaatt aaagtatttg attctagtat gaatcataat atccgccaag aacttaacca 900

gataaacaga aaattattat tttaataaaa ttatccggaa tcattaacta attcgttgtg 960

gaactcattg agttgcttac gctccttcca accaatcaaa gaaattttgt ttatgggaac 1020

tctaggagat ccgtcatttt gttatccttg acctcagttc taatataact gaaataagaa 1080

agtacgaaaa atgttcttta ttttgaagtc agatatctct taaccaatta actactaact 1140

cattctcatt ttataatttt tttttaggta tactttctta atcaattaga attactagaa 1200

atcaatttta aattacaata gattttgtaa aaagtaggta agggttctga aacttttcga 1260

ttaatttttt aaaatgaaat gtaacacgac gagaatatcc ggagatttaa aattaaaacc 1320

tttttgattc ttttattatt attaaataaa aaaagcaatt caatttttat agcagtagaa 1380

cccgctgaaa cagatccgaa taaagagcca taatataatt tatatttcga attttgaaca 1440

atagatgtct ttcacattta actataataa agagtaacct cttcattttt gaatggcagt 1500

tccaaagaaa cgtacttctc tgtcaaaaaa gcg 1533

<210> 10

<211> 1520

<212> DNA

<213> Berberis koreana sequence(ndhF-rpl32)

<400> 10

ttccaaccaa ttcccaaaaa atataaattt gtatcaaatt ggaactagta actaatccca 60

acatggaagc attggaaaaa ctcatataag caaaaaatct caaatagcct tgatcatgag 120

acatataatt gtcactataa ataagaacca ttattccaac agtagtaatt aatattaaca 180

taatggacgt aagtggatcg atcaagtaac caaattctaa agaaaaatca ttatggatag 240

tccaggacca tacgtattga tatataaaac tgccattcat ttgttgaata gacagatcgg 300

ctgaaaaaat cataatgata cttagtaata aaatactagg aaaggcccat atacgacgaa 360

gacttttgc tgctgtaggg acaacgagaa gtccgattcc tattgctata ggaactggaa 420

gtggaaccca aggtatgatc catgcatatt gagatgtata tgccataaga aatttttttt 480

tttttttttat tgtttttttat tgtttccaat tcaccagttt ttctctcttt cggaaagaga 540

aagtaataaa aaaaatcaaa atttcaaaga gttcaaatat aattttaaat tgtaatcatt 600

atgatttttt attctttcaa aaaagaaata tttcaactat tcaaatcaag aagttactat 660

tggtcaaatg ataagataaa gtcattggaa aaaattacta gttagtgatt aactaagata 720

tttagaaaaa tagaaaatat aagattataa accattccat tattacgatt acgaaaattt 780

atatctctaa aaatatctat agaataggga aaaataatta tatcaaaaag gaaaattaaa 840

gtatttgatt ctagtatgaa tcataatatc cgccaagaac ttaaccagat aaacagaaaa 900

tttttatttt aataaaatta tccggaatca ttaactaatt cgttgtggaa ctcattgagt 960

tgcttacgct ccttccaacc aatcaaagaa attttgttta tgggaactct aggagatccg 1020

tcattttgtt atccttgacc tcagttctaa tataactgaa atacgaaagt acgaaaaatg 1080

ttctttattt tgaagtcaga tatctcttaa ccaattaact actaactcat tctaatttta 1140

taatttttttt ttaggtatac tttcttaatc aattagaatt actagaaatc aattttaaat 1200

tacaatagat tttgtaaaaa gtaggtaagg gttctgaaac ttttcgatta atttttttaaa 1260

atgaaatgta acacgacgag aatatccgga gatttaaaat taaaaccttt ttgattcttt 1320

tattattatt aaataaaaaa agcaattcaa tttttatagc agtagaaccc gctgaaacag 1380

atccgaataa agagccataa tataatttat atttcgaatt ttgaacaata gatgtctttc 1440

acatttaact ataataaaga gtaacctctt cattttttgaa tggcagttcc aaagaaacgt 1500

acttctctgt caaaaaagcg 1520

<210> 11

<211> 940

<212> DNA

<213> Berberis amurensis sequence(rbcL-accD)

<400> 11

gaaggaaatc aaatttgaat ttgaagcaat ggatacaatt tgaagcaatg gatactttgt 60

aatccagtaa ttaccgttcg ttctcttaaa ttgaattgca attaaactcg gcccaatctt 120

ttactaaaag gattgagccg aataaataat gaatcaccta atgcatagat tttgcatcta 180

tctatatata tacttgatct agatagacaa gatcttaaat acaagataaa ccactaaaat 240

gcttctattg ttggattcaa aatgaatcct acggatccgc gggattggga ttgggaaatt 300

ttttgatttt gatatttata tcccgtagtt taaaatcatg gattgagcta aagaacacaa 360

cgctttggac ccctcccata ataatgtcct tttcgttccg tgttgcaata gaaaagaaac 420

ttattattct acgaaatttt catcgaaaag agaaatatct ttctcttttc gatgaaaatt 480

tgtatacgac atgagagaaa tatctctttc atattcatat taaaaatatt aaaaatcgaa 540

gaaggggggtc catcatatat agtgaagcga tacctcgatt ccccctaagtc ccccaaggga 600

ctcggttaag tcaatactca cttgttattg gttactgatc ctagtgattg gatctatacg 660

cttattccaa aaggaaatat tcaaatgact attcatatat tgtattttcg ttgaaatagg 720

gggcaggaag gctttatgga aaaagaaaaa aggtggataa attcgatgtt gtttaacagg 780

gagttagaat acaggtgtgc gctaagtaaa tcaatgggcg gtattgagcc cattggaaat 840

actaatggaa gtgaagaccc cattatagat aaaaacattc atagttgggg tgatagcgcc 900

agctctggtt gcgaaaatgt tgagcattta tttggtgtca 940

<210> 12

<211> 940

<212> DNA

<213> Berberis koreana sequence(rbcL-accD)

<400> 12

gaaggaaatc aaatttgaat ttgaagcaat ggatacaatt tgaagcaatg gatactttgt 60

aatccagtaa ttaccgttcg ttctcttaaa ttgaattgca attaaactcg gcccaatctt 120

ttactaaaag gattgagccg aataaataat gaatcaccta atgcatagat tttgcatcta 180

tctatatata tacttgatct agatagacaa gatcttaaat acaagataaa ccactaaaat 240

gcttctattg ttggattcaa aatgaatcct acggatccgc gggattggga ttgggaaatt 300

ttttgatttt gatatttata tcccgtagtt taaaatcatg gattgagcta aagaacacaa 360

cgctttggac ccctcccata ataatgtcct tttcgttccg tgttgcaata gaaaagaaac 420

ttattattct acgaaatttt catcgaaaag agaaagatat ttctcttttc gatgaaaatt 480

tgtatacgac atgagagaaa tatctctttc atattcatat taaaaatatt aaaaatcgaa 540

gaaggggggtc catcatatat agtgaagcga tacctcgatt ccccctaagtc ccccaaggga 600

ctcggttaag tcaatactca cttgttattg gttactgatc ctagtgattg gatctatacg 660

cttattccaa aaggaaatat tcaaatgact attcatatat tgtattttcg ttgaaatagg 720

gggcaggaag gctttatgga aaaagaaaaa aggtggataa attcgatgtt gtttaacagg 780

gagttagaat acaggtgtgc gctaagtaaa tcaatgggcg gtattgagcc cattggaaat 840

actaatggaa gtgaagaccc cattatagat aaaaacattc atagttgggg tgatagcgcc 900

agctctggtt gcgaaaatgt tgagcattta tttggtgtca 940

<210> 13

<211> 736

<212> DNA

<213> Berberis amurensis sequence(petN-psbM)

<400> 13

ttaatggtag tctttacatt ttccctttca ctcgtagtat ggggaagaag tggactctag 60

agtcactaaa aattgaattg agtaatcaaa ctgtatcaat agtttcagag atcattctgc 120

aaggcgtttt tcattttaat aaaaaagact cccatttcca aattctacag gaattcagta 180

ccagtaaaag tagagtaata tatgaagaat aacctttcaa ttaaacaaaa atttcaatga 240

ttcccatgtt cgtattttca aagtaaaagg gatatacatg aaattttcga aaaaaaaaaa 300

tgattccgaa gagtaaaagt ggacattcga ttatcggatt gatggaatca cgacaaatca 360

aatggatgta gcaaagaatt agactaaaat tgaggggctc cttccattta tatgtactta 420

tatgtacatt acacatatgt gatttatgtg tacctggatg aatatacata ttttagatgg 480

atctataata aaaaagccta tatttttttt agagtctaac tttttacaat gatacgatag 540

atagtatggt agaaaggttc cgatatttct ttctaccata ctatcagatc tcctatactg 600

ttgattctaa tccattcatc tcaatcaaga cgtgggattt gaatctcctt tcatttattc 660

cattaattaa ttaattataa gaactgacaa gtcaagcttg attttaattt taatcatttt 720

gactgaccgt ttttac 736

<210> 14

<211> 736

<212> DNA

<213> Berberis koreana sequence(petN-psbM)

<400> 14

ttaatggtag tctttacatt ttccctttca ctcgtagtat ggggaagaag tggactctag 60

agtcattaaa aattgaattg agtaatcaaa ctgtatcaat agtttcagag atcattctgc 120

aaggcgtttt tcattttaat aaaaaagact cccatttcca aattctacag gaattcagta 180

ccagtaaaag tagagtaata tatgaagaat aacctttcaa ttaaacaaaa atttcaatga 240

ttcccatgtt cgtattttca aagtaaaagg gatatacatg aaattttcga aaaaaaaaaa 300

tgattccgaa gagtaaaagt ggacattcga ttatcggatt gatggaatca cgacaaatca 360

aatggatgta gcaaagaatt agactaaaat tgaggggctc cttccattta tatgtactta 420

tatgtacatt acacatatgt gatttatgtg tacctggatg aatatacata ttttagatgg 480

atctataata aaaaagccta tatttttttt acagtctaac tttttacaat gatacgatag 540

atagtatggt agaaaggttc cgatatttct ttctaccata ctatcagatc tcctatactg 600

ttgattctaa tccattcatc tcaatcaaga cgtgggattt gaatctcctt tcatttattc 660

cattaattaa ttaattataa gaactgacaa gtcaagcttg attttaattt taatcatttt 720

gactgaccgt ttttac 736

<210> 15

<211> 879

<212> DNA

<213> Berberis amurensis sequence(accD)

<400> 15

catccttcgt ttccgggtga actaaaaagt tctttttcta gttatctgaa taatgggtct 60

aagagtgacg atcactacta tgatcgttac atgtatgata ctaaatatag ttggaataat 120

cacattaata gttgcattgc caattatctt cattctgaaa tcagtattaa tagtaacttt 180

tcaagtggta gcgacaattg cagtaagggt tacatttata gttacatttg taatgaaagt 240

gatttccctg aacctgaaag tgatccccaa gaaagtgatt tcgacgaaag tgatttcgac 300

gaaagtgatt tcgacgaaag tgatttcgag gaaggtgatt cccaagaaag tgattcccaa 360

gaaagtgatt tcgaggaagg tgatttcgag gaaggtgatt cccaagaaag tgattcccaa 420

gaaagtgatt tcgaggaagg tgatttcgag gaaggtgatt cccaagaaag tgatttcgag 480

gaaggtgatt tcgaggaagg tgattcccaa gaaagtgatt tcgaggaagg tgatttcgag 540

gaaggtgatt cccaagaaag tgattcccat atgccaggag aatctaataa taccggtata 600

aataaaaact acaagctttt gtgggttcaa tgcgaaaaat gtgatgaatt aaattataag 660

aaatttttaa gagcaaaatt aaatatttgt gaacactgtg gagttcattt gaaaatggat 720

agttcagata gaatcgaact ttcgattgat ccgggtactt gggatcctat ggataaatac 780

atggtttctg tagaccccat tgaatttcag tcagaggagg aatcctatac agatcgtatt 840

gattcttatc aaaaagagac ggggttaact gaggctgtt 879

<210> 16

<211> 909

<212> DNA

<213> Berberis koreana sequence(accD)

<400> 16

catccttcgt ttccgggtga actaaaaagt tctttttcta gttatctgaa taatgggtct 60

aagagtgacg atcactacta tgatcgttac atgtatgata ctaaatatag ttggaataat 120

cacattaata gttgcattgc caattatctt cattctgaaa tcagtattaa tagtaacttt 180

tcaagtggta gcgacaattg cagtaagggt tacatttata gttacatttg taatgaaagt 240

gatttccctg aacctgaaag tgatccccaa gaaagtgatt tcgacgaaag tgatttcgac 300

gaaagtgatt tcgacgaaag tgatttcgag gaaggtgatt cccaagaaag tgattcccaa 360

gaaagtgatt tcgaggaagg tgatttcgag gaaggtgatt cccaagaaag tgattcccaa 420

gaaagtgatt tcgaggaagg tgatttcgag gaaggtgatt cccaagaaag tgatttcgag 480

gaaggtgatt cccaagaaag tgatttcgag gaaggtgatt tcgaggaagg tgattcccaa 540

gaaagtgatt tcgaggaagg tgatttcgag gaaggtgatt cccaagaaag tgattcccat 600

atgccaggag aatctaataa taccggtata aataaaaact acaagctttt gtgggttcaa 660

tgcgaaaaat gtgatgaatt aaattataag aaatttttaa gagcaaaatt aaatatttgt 720

gaacactgtg gagttcattt gaaaatggat agttcagata gaatcgaact ttcgattgat 780

ccgggtactt gggatcctat ggataaatac atggtttctg tagaccccat tgaatttcag 840

tcagaggagg aatcctatac agatcgtatt gattcttatc aaaaagagac ggggttaact 900

gaggctgtt 909