



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월12일

(11) 등록번호 10-1481723

(24) 등록일자 2015년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

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

(21) 출원번호 10-2013-0106675

(22) 출원일자 2013년09월05일

심사청구일자 2013년09월05일

(56) 선행기술조사문헌

Journal of Medicinal Plants Research 2011,
5(18):4487-4492.

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스
내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

양덕춘

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

김연주

경기 화성시 영통로27번길 53, 212동 505호 (반월
동, 신영통현대2차아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 5 항

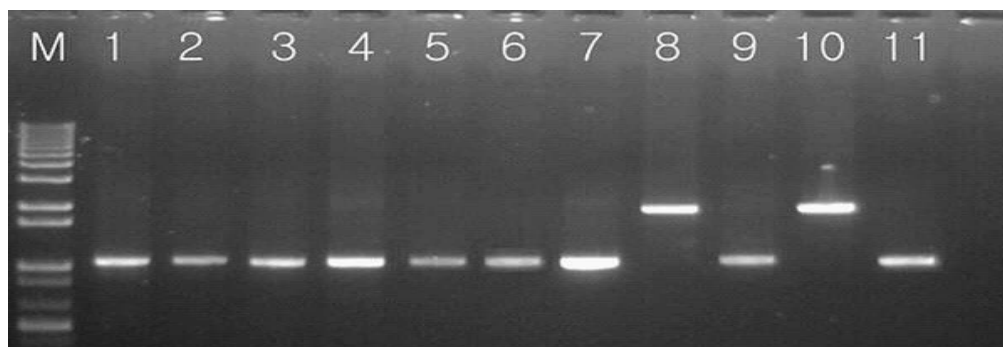
심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 **고려인삼 K-1 품종 선별용 프라이머 세트 및 이를 이용한 K-1 품종 선별방법**

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 고려인삼 K-1 품종 선별용 프라이머를 제공한다. 본 발명에 따른 프라이머 세트는 K-1 품종을 선택적으로 선별해 낼 수 있으므로, 고려인삼에서 K-1 신품종의 구별에 효과적으로 이용될 수 있고, 이를 통해 인삼산업에 있어서 품종에 대한 신뢰도를 확보할 수 있어 인삼산업의 발전에 크게 이바지할 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

권우생

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

김유진

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

김민경

경기 수원시 장안구 창훈로20번길 13, 3층 (연무동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 312064-03-1-HD040

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물식품기술기획평가원

연구사업명 수출전략 기술개발사업

연구과제명 안정성 및 특성기능성성분이 강화된 신제품 및 계통 육성

기 여 율 50/100

주관기관 경희대학교 한방재료가공학과

연구기간 2012.12.18 ~ 2015.12.17

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ00952903

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물식품기술기획평가원

연구사업명 차세대바이오그린

연구과제명 유용 진세노사이드 대량생산을 위한 트리터펜 생합성 회로의 리모델링 및 DNA scaffold system

기 여 율 50/100

주관기관 경희대학교 기술지주회사 한방바이오

연구기간 2013.02.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 고려인삼 K-1 품종 선별용 프라이머 세트.

청구항 2

제1항에 따른 프라이머 세트를 포함하는 고려인삼 K-1 품종 선별용 키트.

청구항 3

제1항에 따른 프라이머 세트를 포함하는 고려인삼 K-1 품종 선별용 조성물.

청구항 4

제1항에 따른 프라이머 세트를 이용하여 고려인삼 K-1 품종의 폴리뉴클레오티드의 증폭을 측정하는 단계를 포함하는 고려인삼 K-1 품종 선별방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드의 증폭은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction), 다중 중합효소연쇄반응(multiplex Polymerase Chain Reaction, multiplex PCR), 경쟁적 중합효소연쇄반응(competitive Polymerase Chain Reaction), 실시간 중합효소연쇄반응(real-time Polymerase Chain Reaction), 정량적 중합효소연쇄반응(Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction), DNA 칩(DNA chip), 등온증폭법(Loop-mediated isothermal amplification) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 방법을 이용하는 것인 고려인삼 K-1 품종 선별방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 고려인삼 K-1 품종 선별용 프라이머 세트 및 이를 이용한 K-1 품종 선별방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인삼(*Panax ginseng* Meyer)은 동양의 주요 약재 중의 하나로서 피로와 허약함을 개선하기 위한 일차적인 치료제로서 오래도록 사용되어 왔다. 한국과 중국 동북부에서 자생하는 이 식물은 일반적으로 고려인삼(Korean ginseng)이라고 불리며 현재 동북아를 중심으로 전세계적으로 재배되고 있다. 인삼의 약리성분은 1854년 서양삼 뿌리에서 일종의 사포닌 혼합물인 무정형 물질을 분리하면서 인삼의 유효성분에 대한 과학적 연구가 시작되었고 인삼의 화학적 활성 성분 연구가 본격적으로 시작된 것은 1957년 소련의 브레이크만(Brekhman)에 의해 사포닌 배당체(glycoside)가 인삼의 약효 성분을 강조함으로써 사포닌에 대한 집중적인 연구가 이루어져 1960년대에 이르러 생화학적 분야에서 많은 연구가 활발히 수행되었다. 대부분의 인삼에서는 진세노사이드(ginsenoside), 다당류(polysaccharides), 펩타이드류(peptides), 폴리아세틸렌계 알콜류(polyacetylenic alcohols) 및 지방산류(fatty acids)를 포함하는 다양한 활성성분이 발견된다.

[0003] 고려인삼의 약리학적 효능으로는 뇌기능 개선, 통증 감소 효과, 항종양 활성을 비롯한 암 예방 효과, 면역 기능의 향상, 항당뇨 효과, 간기능 향상, 혈압의 조절, 항피로와 항스트레스 효과, 갱년기 장애와 성기능의 개선, 항산화력을 비롯한 항노화 효과 등이 있음이 현대 과학에 의하여 밝혀졌다. 이러한 이유로 고려인삼은 전세계적으로 가장 주목 받는 식물성 치료제가 되었다.

[0004] 인삼은 기원(origin)과 경작(cultivation)에 따라 다양한 이름으로 불린다. 파낙스 속(*Panax* genus)은 17 종(species)으로 구성되며, 이 중 고려인삼(*P. ginseng* C.A.Meyer), 중국삼(*P. notoginseng*) 및 미국삼(*P. quinquefolium*)은 그 약효가 알려져 있다.

[0005] 고려인삼은 크게 세 종류의 계(系)인 자경계, 청경계 및 황숙계로 구분된다. 현재까지 순계 분리육종 방법(pure-line selection method)에 의하여 총 12개 품종이 세 종류의 순계로부터 육성되었고, 자경계는 연풍(Yunpoong), 고평(Gopoong), 선풍(Sunpoong), 선운(Sunwun), 선원(Sunweon), 선향(Sunhyang), K-1, 천일, 천녕이며, 청경계는 천풍(Chunpoong), 청선(Chungsun) 그리고 황숙계는 금풍(Gumpoong)이다.

[0006] 현재까지 인삼 품종 선별을 위해 사용되고 있는 분자생물학적 방법으로서 RAPD(random amplified polymorphic DNA), ISSR(inter-simple sequence repeats), RFLPs(restriction fragment length polymorphism) 및 SSR(simple sequence repeats)을 포함하는, 고려인삼 품종간의 유전학적 다형성(polymorphism)을 규명하기 위한 몇 가지 접근이 시도되고 있다. 그러나 이러한 방법은 재현성과 신뢰성이 부족하여 단일 품종 확인을 위한 분자 마커(molecular marker)로 개발되어 실용화되지는 못하고 있어, 품종을 명확히 선별하기 위한 단일 품종별 분자마커의 개발 및 농가에서 일반품종을 K-1 신품종으로 둔갑시켜 고가로 판매하는 시장질서를 어지럽히는 행위를 신속히 방지할 필요성이 절실히 요구되고 있다.

[0007] 이에 본 발명은 K-1 신품종을 선별할 수 있는 특이적 프라이머 및 선별방법을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) KR 10-2010-0106414 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 K-1 품종을 선별할 수 있는 프라이머 세트, 선별용 키트, 선별용 조성물 및 이를 이용한 K-1 품종 선별방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호2의 염기서열로 이루어진 고려인삼 K1 품종 선별용 프라이머 세트, 상기 프라이머 세트를 포함하는 키트 및 상기 프라이머 세트를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 고려인삼 K-1 품종의 폴리뉴클레오티드의 증폭을 측정하는 단계를 포함하는 고려인삼 K-1 품종 선별방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, '선별'이란 같은 계통의 품종을 골라내는 것을 의미하고, 본 발명의 목적상 K-1 품종을 확인하는 모든 행위를 의미한다.

[0013] 본 발명의 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, '프라이머(primer)'란 특정 유전자 서열에 대하여 상보적인 염기쌍을 형성할 수 있고, 주형(template)과 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 상기 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 본 발명의 프라이머는 고려인삼 K-1 품종의 뉴클레오티드에 대하여 특이적인 프라이머이고, DNA 합성의 개시점으로 작용하는 프라이머의 기본 성질을 변화시키지 않는 추가의 특징을 혼입한 것을 모두 포함한다.

[0014] 본 발명의 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, '폴리뉴클레오티드 증폭의 측정'이란 K-1 품종을 선별하기 위하여 시료에서 K-1 품종의 폴리뉴클레오티드의 존재여부를 확인하는 과정으로 폴리뉴클레오티드의 양을 측정하는 것을 모두 포함하는 것이다.

[0015] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 고려인삼 K-1 품종 선별용 프라이머 세트를 제공한다.

- [0017] 상기 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트는 K-1 품종의 폴리뉴클레오티드를 증폭할 수 있다. 따라서 상기 프라이머 세트를 이용하여 폴리뉴클레오티드 증폭 수준을 측정하는 방법으로 고려인삼 품종 중에서 K-1 신품종을 신속하고 정확하게 선별해 낼 수 있다.
- [0018] 상기 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트는 K-1 품종 선별용 마커일 수 있다.
- [0019] 상기 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프라이머는 정방향 프라이머(Forward primer)이고, 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머는 역방향 프라이머(reverse primer)일 수 있다.
- [0020] 상기 K-1 품종은 고려인삼(*Panax ginseng* Meyer)에 속하는 신품종으로, 2010년 04월 07일에 국립종자원에 품종보호 출원하여, 2012년 03월 28일 제 3949호로 품종보호권 설정등록이 되었다. K-1 품종은 다른 고려인삼 품종 중 천풍과 비교하여 출아가 더 빠르고, 줄기, 엽면 및 꽃대색이 진한 자색이며 잎은 진녹색의 윤기가 있고 잎몸의 가로 자른 모양이 볼록하며 세균 발달이 대비 품종보다 왕성하며, 천풍에 비해 내병성이 강한 특성이 있다.
- [0021] 상기 K-1 품종의 경우 당뇨병을 유발한 10개월령 랫트에 대한 실험에서, 정상 랫트와 비교하여 공복혈당이 상승하는 것을 확인할 수 있는데, 천풍 품종의 추출물을 처리한 경우 공복혈당 수치의 상승을 예방하거나 개선하는 효과를 확인할 수 없었으나, K-1 품종 추출물을 처리한 경우 당뇨병 유발한 랫트의 공복혈당이 낮아지는 것을 실험적으로 확인하였다. 또한 K-1 품종 추출물로 처리한 랫트의 경우 글루코오스 저항성이 현저하게 개선되는 것을 확인하여, K-1의 품종의 경우 당뇨병의 치료, 예방 또는 개선에 있어서 비교 품종인 천풍 품종보다 현저히 우수한 것을 확인하였다. 따라서 신품종인 K-1 품종을 신속하고 정확하게 선별해 낼 필요가 있다.
- [0022] 상기 프라이머는 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 상기 표지는 일 예로, 호스레디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타아제 등과 같은 효소, 33P 등과 같은 방사성 동위원소, 바이오틴 등과 같은 화학그룹 및 형광성 분자일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 또한 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 고려인삼 K-1 품종 선별용 조성물 또는 키트를 제공한다.
- [0024] 상기 조성물에 포함된 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 K-1 품종을 선별할 수 있는 마커로 이용하여, K-1 품종의 폴리뉴클레오티드 증폭 수준을 측정하는 방법으로 고려인삼 품종 중에서 K-1 신품종을 신속하고 정확하게 선별해 낼 수 있다.
- [0025] 상기 K-1 품종 선별용 조성물은 본 발명이 속하는 분야에서 널리 사용되는 다른 구성 성분 또는 장치를 추가로 포함하여 K-1 품종을 선별하는 키트로 응용, 제작될 수 있다.
- [0026] 상기 키트의 일 예로 PCR용 키트, DNA 칩용 키트, 단백질 칩용 키트 또는 K-1 품종의 유전자를 검출할 수 있는 래피드 진단 키트의 형태로 제작될 수 있으나, 상기 형태에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 상기 K-1 품종 선별용 키트는 상기 프라이머 세트 외에도 DNA 폴리머라제, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), 반응 완충액, DNase 억제제, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 비롯하여 폴리뉴클레오티드의 증폭을 통하여 K-1 품종을 선별하는데 필요한 모든 생물학적 또는 화학적 시약, 사용설명서 등을 포함할 수 있다. 이러한 키트의 다른 구성은 상기 키트의 형태에 따라서 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의하여 적절히 선택될 수 있다.
- [0028] 또한 본 발명은, 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 고려인삼 K-1 품종의 폴리뉴클레오티드의 증폭을 측정하는 단계를 포함하는 고려인삼 K-1 품종 선별방법을 제공한다.
- [0029] 상기 K-1 품종 선별방법은 상기 프라이머 세트를 이용하여 폴리뉴클레오티드를 증폭하고, 상기 증폭을 수행한 결과 생성물의 생성이 확인되면 고려인삼 K-1 품종으로 선별할 수 있다.
- [0030] 상기 폴리뉴클레오티드 증폭의 방법은 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR), 다중 중합효소연쇄반응(multiplex Polymerase Chain Reaction, multiplex PCR), 경쟁적 중합효소연쇄반응(competitive

Polymerase Chain Reaction), 실시간 중합효소연쇄반응(real-time Polymerase Chain Reaction, RT PCR), 정량적 중합효소연쇄반응(Real-time Quantitative, RQ PCR Polymerase Chain Reaction), DNA 칩(DNA chip), 등온증폭법(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 일 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에서 상기 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 다중 중합효소연쇄반응을 실시한 결과, 한 결과 K-1 품종에서만 PCR 생성물이 검출됨을 확인하였다.

[0032] 상기 시료로부터 DNA를 추출하는 단계 및 상기 프라이머 세트를 이용하여 일반 PCR 증폭을 수행한 결과 PCR 생성물이 생성되면 이는 고려인삼 K-1 품종으로 구별할 수 있으며, 상기 PCR 생성물의 형광량을 측정함으로써 PCR 생성물의 생성이 확인되면 이를 고려인삼 K-1 품종으로 구별할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 있어서, 서열번호 1 및 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 이용하여 프라이머 세트를 이용하여 PCR 증폭을 수행한 결과, K-1 시료에서만 700bp의 PCR 생성물이 검출됨을 확인하였다.

발명의 효과

[0033] 본 발명에 따른 프라이머 세트는 K-1 품종을 선택적으로 선별해 낼 수 있으므로, 고려인삼에서 신품종의 구별에 효과적으로 이용될 수 있고, 이를 통해 인삼산업에 있어서 품종에 대한 신뢰도를 확보할 수 있어 인삼산업의 발전에 크게 이바지 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 유전자 공간(intergenic spacer, IGS)의 염기서열 중에서 K-1에 특이적인 프라이머의 위치를 확인하는 것을 나타내는 도이다.

도 2는 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트를 이용한 중합효소연쇄반응의 생성물의 전기영동 결과를 나타내는 도이다. M은 1kb DNA 마커를 나타내고, 1은 연풍, 2는 고풋, 3은 선풍, 4는 금풍, 5는 천풍, 6은 선원, 7은 선운, 8 및 10은 K-1 품종, 9는 선향 그리고 11은 청선 품종을 나타낸다.

도 3은 프라이머 세트의 염기서열을 나타내는 것으로, 도 3a는 서열번호 1의 프라이머의 염기서열을 나타내는 도이고, 도 3b는 서열번호 2의 프라이머의 염기서열을 나타내는 도이다.

도 4는 케이원(K-1) 품종을 나타내는 도로, 도 4a는 열매가 성숙하기 이전의 케이원(K-1) 품종을 나타내는 도이고, 도 4b는 열매가 성숙하여 대가 자색을 나타내는 케이원(K-1) 품종을 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[실시예 1] DNA 추출

[0036] 경희대학교 인삼소재은행으로부터 K-1 품종, 연풍, 고풋, 선풍, 금풍, 천풍, 선원, 선운, 선향 및 청선 품종의 고려 인삼을 분양받고, 각각의 품종에 대하여 DNA를 추출하였다.

[0038] DNA의 추출은 식물의 잎을 액체 질소에 넣어 막사사발로 마쇄한 후, 식물 DNA 추출키트(SV mini, GeneAll, 한국)를 사용하여 genomic DNA를 분리 및 정제하였다.

[실시예 2] 고려인삼 K-1 품종 선별용 프라이머 설계

2-1. PCR 증폭

[0041] EST 데이터베이스에 기초하여 과발현, 스트레스, 색채 및 사포닌 관련 유전자들 중에서 총 44개의 EST 서열을 임의로 선별하였다. DNA 레벨에서 길이 다형성(Length Polymorphism)의 발견 가능성을 높이기 위하여 인트론-측면(intron-flanking) 프라이머를 설계하였다. Primer3(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) 및 Primer Premier

5.0 소프트웨어(Premier, Canada)를 이용하여 1 쌍의 프라이머 세트를 설계하였다.

[0042] 이 때 이용된 파라미터들은 다음과 같다: 최적 어닐링 온도 58 °C, GC 함량 45% 최적. 상기 프라이머들은 Genotech Co. Ltd.(Daejeon, Korea)에서 합성하였다.

[0043] PCR 증폭은 Corbett PCR(Corbett Research, 시드니, 호주, 모델: CG1-96)을 이용하여 수행하였다. 각 PCR은 20 ng의 주형 DNA, 0.5 μM의 각 프라이머, 200 μM dNTPs, 1.5mM MgCl₂, 1X PCR 버퍼 및 1 U의 DNA 폴리머라제 (Enzynomics TM, Korea)를 포함하여 총 부피 20 μl로 수행하였다. 표준 PCR 증폭은 94 °C에서 5 분 동안 미리 변성시킨 후, 94 °C에서 30초, 58 °C에서 30초 동안 어닐링 및 72 °C에서 30초 동안 신장시키는 증폭 사이클을 35회 반복하고, 마지막으로 72 °C에서 7분간 유지하여 수행하였다. PCR 생성물은 1.0 % 아가로스 겔 상에서 전기영동하고, 브롬화 에티듐(Ethidium bromide, Et-Br)으로 염색하여 UV(DNR MiniBIS Pro Bio-Imaging System, Israel)하에서 관찰하였다. PCR 밴드의 사이즈가 예상한 것보다 큰 경우 PCR 생성물을 시퀀싱하여 확인하였다.

[0044] 2-2. DNA 염기서열 분석

[0045] 직접염기서열순서결정(direct-sequencing)법으로 시퀀싱한 DNA 서열은 SeqManII를 이용하여 분석하였다. 서열 정렬(sequence alignments)은 ClustalW2 및 Kalign 2.0 프로그램 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sequence.html>)을 이용하여 수행하였다. 정렬된 서열은 BioEdit 7.0 소프트웨어를 사용하여 엑손 영역, SNP 및 InDels 서열 위치를 분석하였다.

[0046] 2-3. 프라이머 위치 결정 및 프라이머 설계

[0047] 상기 위치 분석에 기초하여 K-1 품종에 특이적인 프라이머의 위치를 결정하였고, 도 1에 나타내었다.

[0048] 도 1에 나타낸 바와 같이 유전자 공간(intergenic spacer, IGS)의 염기서열 중 K-1 품종에 특이적인 SNP 프라이머의 위치를 보여준다. 도 1는 IGS의 엑손 영역에 있는 SNP 프라이머의 위치를 나타내며, SNP 위치에서 K-1과 다른 품종간 염기 서열의 차이를 나타낸다.

[0049] 상기 프라이머의 위치에 기초하여, 고려인삼 K-1 품종을 특이적으로 검출할 수 있는 대립유전자-특이적 프라이머 26S-IGS 및 18S-IGS 를 설계하였다. 18S-IGS 프라이머의 3'말단에 추가적인 불일치(additional mismatch)를 도입함으로써 K-1 품종에 대한 특이성을 확실하게 유도하기 위하여, 3'말단 뉴클레오티드(SNP 위치)로부터 두 번째에 위치한 염기 G를 C로 치환하였고, 상기에서 설계한 프라이머를 하기 표 1과 도 3에 각각 나타내었다.

표 1

서열번호		서열
1	Forward	5'-GGATT GTTCA CCCAC CAATA GGGAA CGTGA GCTG-3'
2	reverse	5'-GAGAC AAGCA TATGA CTACT GGCAG GATCA ACCAG-3'

[0051] [시험예 1] 설계된 프라이머를 이용한 K-1 품종의 선별시험

[0052] 상기 실시예 1 내지 3에서 추출한 K-1 품종의 DNA 및 설계한 프라이머 세트의 K-1 품종 선별을 위한 마커로 이용될 수 있는지를 확인하기 위하여, K-1 품종 선별시험을 실시 하였다.

[0053] K-1 품종(8, 10), 연풍(1), 고풍(2), 선풍(3), 금풍(4), 천풍(5), 선원(6), 선운(7), 선향(9) 및 청선(11) 품종의 genomic DNA에 대하여 상기에서 설계한 1쌍의 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0054] PCR 증폭은 총량 20 μl로 수행하였고(Corbett Research, 시드니, 호주, 모델: CG1-96), 반응 믹스는 주형(template) DNA 20 ng, 각각의 프라이머 0.5 μM, 200 μM dNTPs, 1.5mM MgCl₂, 1X PCR 버퍼 및 1 U의 DNA 폴리머라제(Enzynomics TM, Korea)로 구성되었다. 증폭은 94 °C에서 4 분 동안 미리 변성 (pre-denaturation)시키는 단계를 거치고, 94 °C에서 30 초 동안 변성, 70 °C에서 30 초 동안 어닐링 및 72 °C에서 90 초 동안 증폭하는 증폭사이클 단계를 35회 반복 한 다음 72 °C에서 7 분 동안 신장(final extension)하여 완결시켰다. PCR

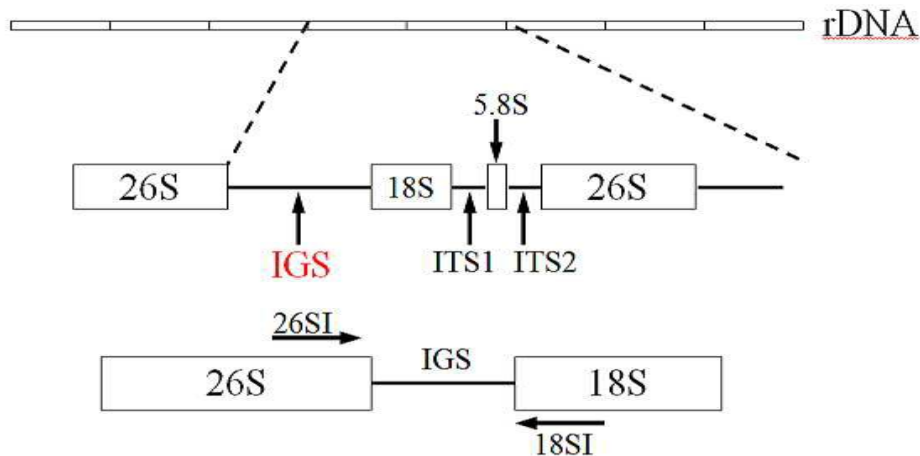
생성물은 0.1 % 아가로오스 겔 상에서 전기영동하고, 브롬화 에티뮴(Et-Br)으로 염색하여 UV(DNR MiniBIS Pro Bio-Imaging System, Israel)하에서 관찰하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0055]

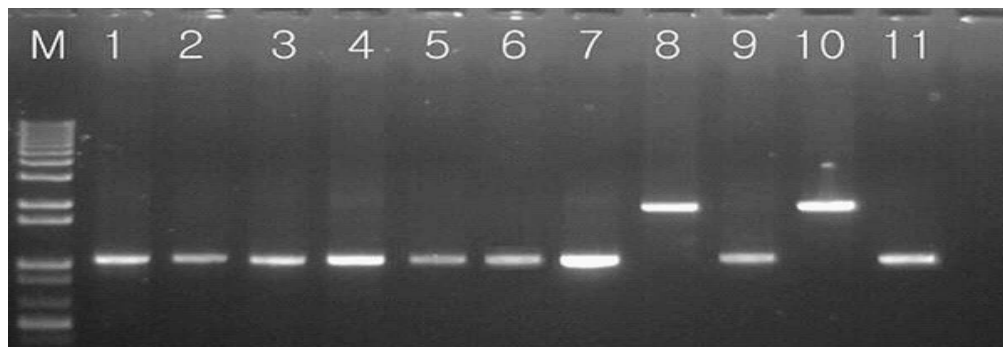
도 2에 나타난 바와 같이, 서열번호 1의 염기서열 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 프라이머 세트에 의해 K-1 품종에서만 밴드가 형성되었고(8, 10번 시료), 다른 품종에서는 밴드가 형성되지 않았다. 상기 실험은 실제에서 준비한 다양한 인삼 샘플에 대하여 여러 차례 수행하여 상기 프라이머의 마커로서의 효과를 검증하였다.

도면

도면1



도면2



도면3a

F: GGATTGTTCACCCACCAATAGGGAACGTGAGCTG

도면3b

R: GAGACAAGCATATGACTACTGGCAGGATCAACCAG

도면4a



도면4b



서열목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> PRIMER SET FOR SELECTING KOREAN GINSENG K-1 AND METHOD FOR
SELECTING K-1 USING THE SAME
- <130> GKH13P-0149-KR
- <160> 2
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> K-1 Primer

<400> 1

ggattgttca cccaccaata gggaacgtga gctg

34

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> K-1 Primer

<400> 2

gagacaagca tatgactact ggcaggatca accag

35