

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0106414
(43) 공개일자 2012년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

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

(21) 출원번호 10-2011-0024511

(22) 출원일자 2011년03월18일

심사청구일자 2011년03월18일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

양덕춘

경기도 용인시 기흥구 용구대로 1842, 현대모닝사이드 111동 301호 (보라동)

왕홍도

경기도 수원시 영통구 덕영대로 1731, 애지원고려인삼명품화사업단 (영통동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 10 항

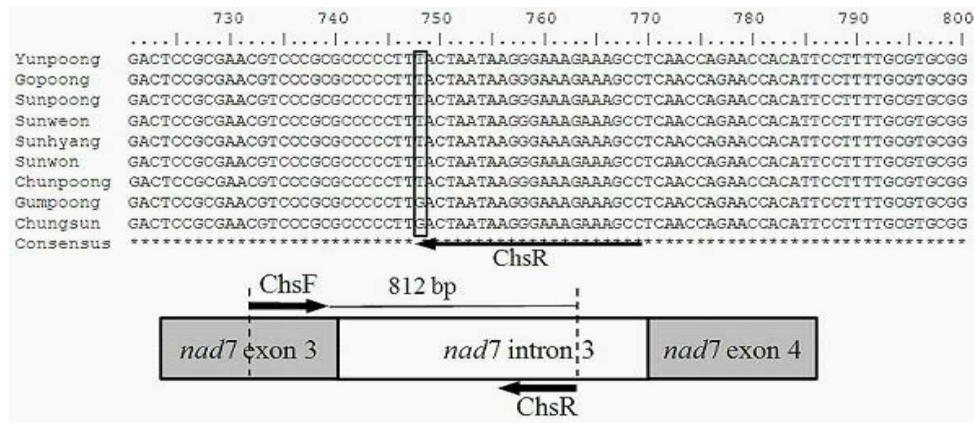
(54) 발명의 명칭 **고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별용 SNP 프라이머 및 이를 이용한 금풍종 또는 청선종 선별방법**

(57) 요약

본 발명은 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별용 SNP 프라이머 및 이를 이용한 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별방법에 관한 것이다.

본 발명에 의하면 개발된 SNP 프라이머를 이용하여 고려인삼 중 금풍종 또는 청선종을 신속하고 정확하게 선별할 수 있다. 따라서 외국인 인삼과 고려인삼 금풍종 또는 청선종을 용이하게 선별할 수 있는 시스템을 개발하여 국내 농가의 권익을 보호하는데 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

권우생

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

김연주

경기도 화성시 반월동 868 신영통 현대이차아파트
212동 505호

이범수

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

김민경

경기도 수원시 장안구 연우동 255-9 3층

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 607002-05-2-SU000

부처명 농림수산식품부

연구사업명 고려인삼 연구사업단

연구과제명 고려인삼의 명품화를 위한 생산과 고부가가치 제품화 및 산업화

주관기관 경희대학교

연구기간 2007.07.30 ~ 2012.07.29

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 748번째 뉴클레오티드 K가 G인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별용 SNP 프라이머.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 SNP 프라이머는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것인 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별용 SNP 프라이머.

청구항 3

서열번호 1의 748번째 뉴클레오티드 K가 G인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 SNP 프라이머를 포함하는 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별용 키트.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 SNP 프라이머는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것인 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별용 키트.

청구항 5

a) 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 및

b) 상기 추출한 DNA에서 서열번호 1의 748번째 뉴클레오티드에 해당하는 SNP 염기 “G”의 존재 여부를 확인하는 단계를 포함하며,

상기 SNP 염기가 “G”인 경우에는 금풍종 또는 청선종으로 판정하는 것을 특징으로 하는 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 단계 b)는 서열번호 1의 748번째 뉴클레오티드 K가 G인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 SNP 프라이머를 이용하여 PCR 증폭함으로써 수행하는 것을 특징으로 하는 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 SNP 프라이머는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

c) 상기 a) 단계에서 추출한 DNA에서 서열번호 4의 1737번째 뉴클레오티드에 해당하는 SNP 염기 “G”의 존재 여부를 확인하는 단계를 추가로 포함하며,

상기 SNP 염기가 “G”인 경우에는 금풍종으로 판정하고, 상기 SNP 염기가 “G”가 아닌 경우에는 청선종으로 판정하는 것을 특징으로 하는 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 단계 c)는 서열번호 6의 1737번째 뉴클레오타이드 S가 G인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 SNP 프라이머를 이용하여 PCR 증폭함으로써 수행하는 것을 특징으로 하는 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 SNP 프라이머는 서열번호 7, 서열번호 8 또는 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별용 SNP 프라이머 및 이를 이용한 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별방법에 관한 것이다.

배경기술

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

[0003] 인삼의 약리성분은 1854년 미국산 인삼(*Panax quinquefolium*) 뿌리에서 일종의 사포닌 혼합물인 무정형 물질을 분리하면서 인삼의 유효성분에 대한 과학적 연구가 시작되었고 인삼의 화학적 활성 성분 연구가 본격적으로 시작된 것은 1957년 소련의 Brekhman에 의해 사포닌 배당체(glycoside)가 인삼의 약효 성분임을 강조함으로써 사포닌에 대한 집중적인 연구가 이루어져 1960년대에 이르러 생화학적 분야에서 많은 연구가 활발히 수행되었다. 대부분의 인삼에서는 진세노사이드(ginsenoside), 다당류(polysaccharides), 펩타이드류(peptides), 폴리아세틸렌계 알콜류(polyacetylenic alcohols) 및 지방산류(fatty acids)를 포함하는 다양한 활성성분이 발견된다.

[0004] 고려인삼의 약리학적 효능으로는 뇌기능 개선, 통증 감소 효과, 항종양 활성을 비롯한 암 예방 효과, 면역기능의 향상, 항당뇨 효과, 간기능 향상, 혈압의 조절, 항피로와 항스트레스 효과, 갱년기 장애와 성기능의 개선, 항산화를 비롯한 항노화 효과 등이 있음이 현대 과학에 의하여 밝혀졌다. 이러한 이유로 고려인삼은 전세계적으로 가장 주목 받는 식물성 치료제가 되었다.

[0005] 인삼은 기원(origin)과 경작(cultivation)에 따라 다양한 이름으로 불린다. *Panax* 속(genus)은 17 종(species)으로 구성되며, 이 중 *P. ginseng* C.A.Meyer(Korean ginseng, 고려인삼), *P. notoginseng*(Chinese ginseng, 중국삼) 및 *P. quinquefolium*(American ginseng, 미국삼)은 그 약효가 미리 알려져 널리 재배되고 있다.

[0006] 고려인삼은 세 종류의 순계 품종: 자경(Jakyung), 청경(Chungkyung) 및 황숙(Hwangsook)을 포함한다. 현재까지, 순계 선택 방법(pure-line selection method)에 의하여 총 9개 품종이 세 종류의 순계 품종 중에서 선택되었고, 이들은 연풍(Yunpoong), 고평(Gopoong), 선풍(Sunpoong), 선운(Sunwun), 선원(Sunweon), 선향(Sunhyang), 천풍(Chunpoong), 청선(Chungsun) 및 금풍(Gumpoong)이다.

[0007] 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 시도되어 왔다. 그러나 이러한 방법은 재현성과 신뢰성이 부족하여 단일 품종 확인을 위한 분자마커(molecular marker)로 개발되어 실용화되지는 못하였다. 즉, 현재 재배되고 있는 인삼 품종들의 선별은 외부 형태적인 특징으로 선별할 뿐 이들을 정확히 선별할 수 있는 분자마커(molecular marker)가 없는 실정이다. 따라서 인삼의 품종육종을 위한 기간 단축과 뿌리 삼의 유통과정에서 품종을 명확히 선별하기 위한

품종별 분자마커의 개발이 절실히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 고려인삼 중 금풍종 또는 청선종을 신속하고 정확하게 선별할 수 있는 분자 마커를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은, 서열번호 1의 748번째 뉴클레오티드 K가 G인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 고려인삼 금풍 및 청선종 선별용 SNP 프라이머를 제공한다.

[0010] 또한 본 발명은 서열번호 1의 748번째 뉴클레오티드 K가 G인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 SNP 프라이머를 포함하는 고려인삼 금풍 및 청선종 선별용 키트를 제공한다.

[0011] 또한 본 발명은 a) 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 및 b) 상기 추출한 DNA에서 서열번호 1의 748번째 뉴클레오티드에 해당하는 SNP 염기 “G”의 존재 여부를 확인하는 단계를 포함하며, 상기 SNP 염기가 “G”인 경우에는 금풍종 또는 청선종으로 판정하는 것을 특징으로 하는 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 의하면 개발된 SNP 프라이머를 이용하여 고려인삼 중 금풍종 또는 청선종을 신속하고 정확하게 선별할 수 있다. 따라서 외국산 인삼과 고려인삼 금풍종 또는 청선종을 용이하게 선별할 수 있는 시스템을 개발하여 국내 농가의 권익을 보호하는데 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 미토콘드리아 *nad* 7 인트론 3 영역 유전자의 염기서열 중 금풍 및 청선에 특이적인 SNP 위치를 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명에 따른 ChsF/ChsR 및 MGF/MGR 프라이머쌍을 이용한 PCR 생성물의 전기영동 결과를 나타낸 사진이다.

도 3은 본 발명에 따른 MGF/MGR 및 MGF/GPR 프라이머쌍의 위치를 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 서열번호 1의 748번째 뉴클레오티드 B가 T인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별용 SNP 프라이머를 제공한다.

[0015] 본 발명자들은 하기 실시예를 통하여 알 수 있는 바와 같이, 미토콘드리아 *nad* 7 인트론 3 영역 (Mitochondrial *nad* 7 intron 3 region) 유전자의 염기서열 중 748번째 뉴클레오티드가 금풍 및 청선은 G인 반면 다른 품종들은 T인 것을 확인하여, 서열번호 1의 미토콘드리아 *nad* 7 인트론 3 영역 유전자의 염기서열 중 748번째 뉴클레오티드를 고려인삼 중 금풍종 또는 청선종을 선별하기 위한 SNP(single nucleotide polymorphism, 단일 염기 다형성) 위치로 결정하였다.

[0016] 따라서 본 발명은 상기 SNP 위치를 분자 마커로 삼아, 고려인삼 중 금풍종 또는 청선종을 특이적으로 선별할 수 있는 SNP 프라이머를 제공한다. 상기 SNP 프라이머를 이용하면 고려인삼 금풍종 또는 청선종을 다른 품종들로부터 신속하고 정확하게 선별해낼 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 SNP 프라이머는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0018] 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 프라이머는 정방향 프라이머(forward primer)이며, 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 프라이머는 역방향 프라이머(reverse primer)이다.

[0019] 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 역방향 프라이머는 3' 말단 뉴클레오티드가 SNP 위치에 해당하며, 금풍종 또는 청선종을 특이적으로 검출할 수 있도록 3' 말단 뉴클레오티드가 C인 것을 특징으로 한다. 또한 서열번호

5의 염기서열로 이루어진 역방향 프라이머는 3' 말단 뉴클레오타이드의 바로 옆에 위치한 염기 T를 A로 치환하였다. 이는 3' 말단에 추가적인 불일치(additional mismatch)를 도입함으로써 금풍종 또는 청선종에 대한 절대적인 특이성을 확실하게 유도하기 위한 것이다.

- [0020] 따라서 상기 서열번호 4 및 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 SNP 프라이머쌍을 이용하여 PCR 증폭을 수행하면, PCR 생성물의 생성 여부를 통해 고려인삼 금풍종 또는 청선종을 특이적으로 선별해낼 수 있다.
- [0021] 또한 본 발명은 서열번호 1의 748번째 뉴클레오타이드 K가 G인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 SNP 프라이머를 포함하는 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별용 키트를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 SNP 프라이머는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명에 따른 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별용 키트는 상기 SNP 프라이머 외에도 DNA 폴리머라제, dNTPs 등을 비롯하여 PCR 증폭을 통하여 고려인삼 연풍종을 선별하는 데에 필요한 모든 생물학적 또는 화학적 시약, 사용설명서 등을 포함할 수 있다. 이러한 키트의 다른 구성은 당업자에 의하여 적절히 선택될 수 있다.
- [0024] 또한 본 발명은 a) 시료로부터 DNA를 추출하는 단계; 및 b) 상기 추출한 DNA에서 서열번호 1의 748번째 뉴클레오타이드에 해당하는 SNP 염기 “G”의 존재 여부를 확인하는 단계를 포함하며, 상기 SNP 염기가 “G”인 경우에는 금풍종 또는 청선종으로 판정하는 것을 특징으로 하는 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단계 b)는 서열번호 1의 748번째 뉴클레오타이드 K가 G인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 SNP 프라이머를 이용하여 PCR 증폭함으로써 수행할 수 있다.
- [0026] 이 때 상기 PCR 증폭은, 이에 한정되는 것은 아니지만, 일반 PCR 증폭, real-time PCR 증폭 또는 multiplex PCR일 수 있다.
- [0027] 상기 SNP 프라이머를 이용하여 일반 PCR 또는 multiplex PCR 증폭을 수행한 결과 PCR 생성물이 생성되면 이는 고려인삼 금풍종 또는 청선종으로 선별할 수 있으며, 상기 SNP 프라이머를 이용하여 real-time PCR 증폭을 수행하여 PCR 생성물의 형광량을 측정함으로써 PCR 생성물의 생성이 확인되면 이를 고려인삼 금풍종 또는 청선종으로 선별할 수 있다.
- [0028] 이 때 상기 SNP 프라이머는 서열번호 4 또는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0029] 하기 실시예에 따르면, 상기 서열번호 4 및 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 SNP 프라이머쌍을 이용하여 PCR 증폭을 수행한 결과, 금풍 및 청선 시료에서만 812bp의 PCR 생성물이 검출됨을 확인하였다(도 2).
- [0030] 또한 본 발명의 한 구체예에 따르면, c) 상기 a) 단계에서 추출한 DNA에서 서열번호 4의 1737번째 뉴클레오타이드에 해당하는 SNP 염기 “G”의 존재 여부를 확인하는 단계를 추가로 포함하며, 상기 SNP 염기가 “G”인 경우에는 금풍종으로 판정하고, 상기 SNP 염기가 “G”가 아닌 경우에는 청선종으로 판정하는 것을 특징으로 하는 고려인삼 금풍종 또는 청선종 선별방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단계 c)는 서열번호 4의 1737번째 뉴클레오타이드 S가 G인 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오타이드를 증폭할 수 있도록 제작된 SNP 프라이머를 이용하여 PCR 증폭함으로써 수행할 수 있다.
- [0032] 이 때 상기 PCR 증폭은, 이에 한정되는 것은 아니지만, 일반 PCR 증폭, real-time PCR 증폭 또는 multiplex PCR일 수 있다. 상기 PCR 증폭은 단계 b)와 별개로 수행할 수도 있으며, multiplex PCR에 의해 단계 b)와 동시에 수행할 수도 있다.
- [0033] 이 때 상기 SNP 프라이머는 서열번호 7, 서열번호 8 또는 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0034] 하기 실시예에 따르면, 상기 서열번호 4 및 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 SNP 프라이머쌍과 함께 서열번호 7 및 서열번호 8의 염기서열로 이루어진 SNP 프라이머쌍을 동시에 이용하여 MARMS PCR 증폭을 수행한 결과, 서열번호 1에서 SNP 위치인 1737번째 뉴클레오타이드가 G인 금풍 시료에서만 574bp의 PCR 생성물이 검출됨을 확인하였다(도 2).
- [0035] 또한 서열번호 7 및 서열번호 9의 염기서열로 이루어진 SNP 프라이머쌍을 이용하여 PCR 증폭을 수행한 결과, 서열번호 1에서 SNP 위치인 1737번째 뉴클레오타이드가 G인 금풍 시료에서만 456 bp의 PCR 생성물이 검출됨을

Wang, et al. (A simplified method for identifying the *Panax ginseng* cultivar Gumpoong based on 26S rDNA, Planta Medica, 76(4): 399-401, 2010)을 통해 확인할 수 있다.

이하 본 발명을 실시예에 의거하여 구체적으로 설명하도록 한다. 그러나 하기 실시예에 의하여 본 발명이 한정되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 실시예는 정상적으로 생육하는 인삼의 여러 조직을 시료로 PCR을 수행하여 부위별 DNA가 개체 내에서 동일함을 확인한 후 수행하였으며, 인삼의 뿌리나 잎에서 얻어지는 DNA 결과는 동일 개체 내에서는 동일하게 나타남을 근거한다. 또한 본 발명의 실시예는 모두 이중 맹검법이 적용되었다.

실시예 1: 실험재료 및 DNA 추출

실험재료

9 품종의 고려 인삼 시료를 수집하여 인삼 분류학자에 의하여 형태학적으로 규명하였다. 표 1에 나타난 모든 시료는 고려인삼센터의 최우수 제품 및 인삼유전자출처은행에 기탁되었다.

표 1

Cultivars	Voucher	Location	GenBank accession numbers of <i>nad7</i> intron 3
Chunpoong	GB001	Kochang, Korea	HQ241271
Yunpoong	GB002	Kochang, Korea	HQ241265
Gopoong	GB003	Kochang, Korea	HQ241266
Sunpoong	GB004	Kochang, Korea	HQ241267
Gumpoong	GB005	Kochang, Korea	HQ241272
Sunwon	GBD048	Daejeon, Korea	HQ241270
Chungsun	GBD073	Daejeon, Korea	HQ241273
Sunweon	GBD043	Daejeon, Korea	HQ241268
Sunhyang	GBD058	Daejeon, Korea	HQ241269

DNA 추출

식물의 잎은 액체 질소에 넣어 막사사발로 마쇄 하였다. 식물 DNA 추출 키트(InvisorbSpin Plant Mini, Invitek)를 사용하여 genomic DNA를 분리 및 정제하였다. 미토콘드리아 *nad 7* 인트론 3 영역(Mitochondrial *nad 7* intron 3 region)의 증폭을 위하여 사용된 프라이머 쌍은 하기 표 2와 같다.

표 2

서열번호	프라이머 명칭	서열 (5'-3')
2	<i>nad 7/3</i> -4F	TCTATGATGGCCAAGAACA
3	<i>nad 7/3</i> -4R	ACACCAAATTCTCCTTAGG

PCR 증폭

PCR 증폭은 총량 20 μ l 으로 수행하였으며, 반응 믹스는 주형(template) DNA 50 ng, 각각의 프라이머 0.5 μ M 및 2X 프리믹스 DNA 폴리머라제 (Genotech, 한국) 10 μ l 로 구성되었다. 증폭은 94℃에서 4분 동안 미리 변성 시키고(pre-denaturation), 94℃에서 30초 동안 변성, 58℃에서 30초 동안 어닐링 및 72℃에서 90초 동안 증폭시키는 증폭사이클을 35회 반복, 마지막으로 72℃에서 7분간 유지(final extension)하여 완결시켰다. PCR 생성물은 1.0% 아가로스 겔 상에서 전기영동하고, Et-Br(ethidium bromide) 염색하여 UV(DNR MiniBIS Pro Bio-Imagining System, Israel)하에서 관찰하였다.

실시예 2: 고려인삼 청선종 선별용 SNP 프라이머의 설계

[0047] 시퀀싱 및 서열 정렬

[0048] 9종류의 고려인삼 품종의 PCR 생성물은 PCR DNA 정제 키트(GeneA11, 한국)에 의하여 정제하였다. DNA는 자동 DNA sequencer(ABI PRISM 3700, USA)에서 BigDye 터미네이터 사이클 시퀀싱 키트(Applied Biosystems)를 사용하여 양쪽 방향으로 시퀀싱하였다. 9종류의 고려인삼 품종의 DNA 서열은 SeqMan 염기서열 분석 소프트웨어를 사용하여 분석하였고, 분석된 DNA 서열은 GenBank에 접근번호 HQ241265-HQ241273으로 등록되었다(표 1 참고). Clustal X 2.0 프로그램(Larkin et al. 2007)을 사용하여 다중 서열 정렬을 수행하였다.

[0049] 분석 결과 얻어진 9가지 품종의 미토콘드리아 *nad 7* 인트론 3 영역의 염기서열(서열번호 1)은 총 1054 bp 길이였다. 상기 염기서열 중에서 금풍 및 청선은 748번 위치에 염기 G를 가지고 있는 반면 나머지 품종들은 T를 가지고 있는 것을 확인하였고, 따라서 748번 위치를 SNP 위치로 결정하였다(도 1).

[0050] SNP 프라이머의 설계

[0051] 미토콘드리아 *nad 7* 인트론 3 영역에서 검색된 SNP 위치에 근거하여, 하기 표 3에 나타난 바와 같이 금풍종 또는 청선종에 특이적인 프라이머쌍 ChsF 및 ChsR을 설계하였다. ChsR 프라이머의 절대적인 특이성을 확실하게 하기 위하여 3' 말단으로부터 두 번째에 위치한 염기 T를 A로 치환함으로써 추가적인 치환(additional mismatch)을 도입하였다. 26S rDNA에 있는 금풍종 특이적인 대립유전자를 검출하기 위한 MGF 프라이머는 5' 말단으로부터 여섯 번째 염기인 C가 A로 치환된 것을 제외하고는 Wang et al. (A simplified method for identifying the *Panax ginseng* cultivar Gumpoong based on 26S rDNA, Planta Medica, 76(4):399-401, 2010)에 보고된 것과 동일하여, MGF 및 MGR 프라이머쌍의 어닐링 온도가 동일하다.

표 3

서열번호	프라이머 명칭	서열 (5'-3')	미토콘드리아 <i>nad 7</i> 인트론 3 영역에서의 위치
4	ChsF	CAAGCAAAGGATTGGGGAT	미토콘드리아 <i>nad 7</i> 엑손 3 영역에 존재
5	ChsR	GGCTTTCTTCCCTTATTAGAC (T→A)	748-769

[0053] MARMS(multiplex amplification refractory mutation system) PCR

[0054] 금풍 및 청선 품종에 대한 동시적인 분자적 인증을 위하여 상기 ChsF 및 ChsR 프라이머쌍을 이용한 MARMS PCR을 수행하였다.

[0055] 또한 최종적으로 금풍과 청선 품종을 선별해 내기 위하여, Wang, et al. (A simplified method for identifying the *Panax ginseng* cultivar Gumpoong based on 26S rDNA, Planta Medica, 76(4):399-401, 2010)에 개시된 인삼의 26S rDNA 영역(서열번호 6) 중 금풍 품종에 특이적인 MGF 및 MGR 프라이머쌍을 이용한 MARMS PCR을 수행하였다(표 4 참고).

표 4

서열번호	프라이머 명칭	서열 (5'-3')	26S rDNA 에서의 위치
7	MGF	CTCAGACGGAGGTAGGATG	1719-1737
8	MGR	TAGATGACGAGGCATTGG	2292-2274

[0057] 총량 20 μ l의 반응믹스는 50ng의 주형(template) DNA 및 2X 프리믹스 DNA 폴리머라제 (Genotech, 한국) 10 μ l로 구성되었다. ChsF, ChsR, MGF 및 MGR의 네 개의 프라이머의 농도는 각각 0.5 μ M, 0.5 μ M, 0.12 μ M 및 0.12 μ M 이었다. 증폭은 94℃에서 4분 동안 미리 변성시키고(pre-denaturation), 94℃에서 30초 동안 변성, 61℃에서 30초 동안 어닐링 및 72℃에서 40초 동안 증폭시키는 증폭사이클을 35회 반복, 마지막으로 72℃에서 7분간 유지(final extension)하여 완결시켰다.

[0058] 그 결과 도 2에 나타난 바와 같이, ChsF 및 ChsR 프라이머쌍에 의해 금풍 및 청선 품종에서 812 bp 크기의 밴드가 형성되었으며, MGF 및 MGR 프라이머쌍에 의해 금풍 품종에서 574 bp 크기의 밴드가 형성되었다. 반면, 다른 품종들에서는 어떠한 밴드도 형성되지 않았다. 상기 실험은 다양한 부위에서 얻은 200개 이상의 인삼 샘플

플에 대하여 여러 차례 수행하여 검증하였다. 본 발명에 도입된 추가적인 염기의 불일치로 인하여 금풍 및 청선 품종에 대한 특이성이 증가하였으며, 그 외의 품종에 대한 비 특이성을 감소시켰다.

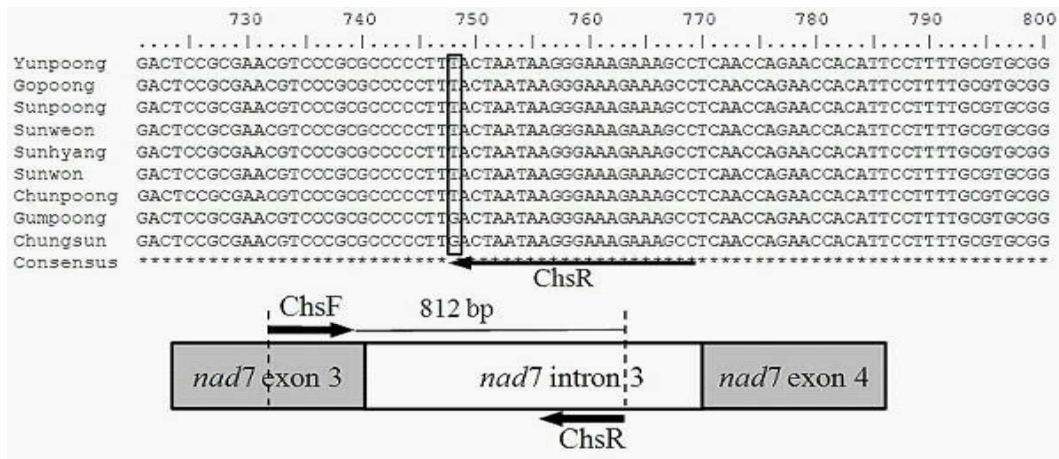
[0059] 또한 상기 서열번호 7의 MGF 정방향 프라이머와 함께, Wang H et al. (A simplified method for identifying the Panax ginseng cultivar Gumpoong based on 26S rDNA, Planta Medica, 76(4):399-401, 2010)에 개시된 하기 표 5의 서열번호 9의 GPR 역방향 프라이머를 이용하여 금풍 품종을 선별하는 것도 가능하다. MGF/GPR 프라이머쌍을 이용하여 PCR 증폭을 수행하는 경우, 금풍 품종의 경우에만 456 bp의 생성물이 얻어짐을 확인할 수 있다(상기 논문 참고).

표 5

서열번호	프라이머 명칭	서열 (5'-3')	26S rDNA 에서의 위치
9	GPR	TAGCATCCGCAGGGACCAT	2174-2156

도면

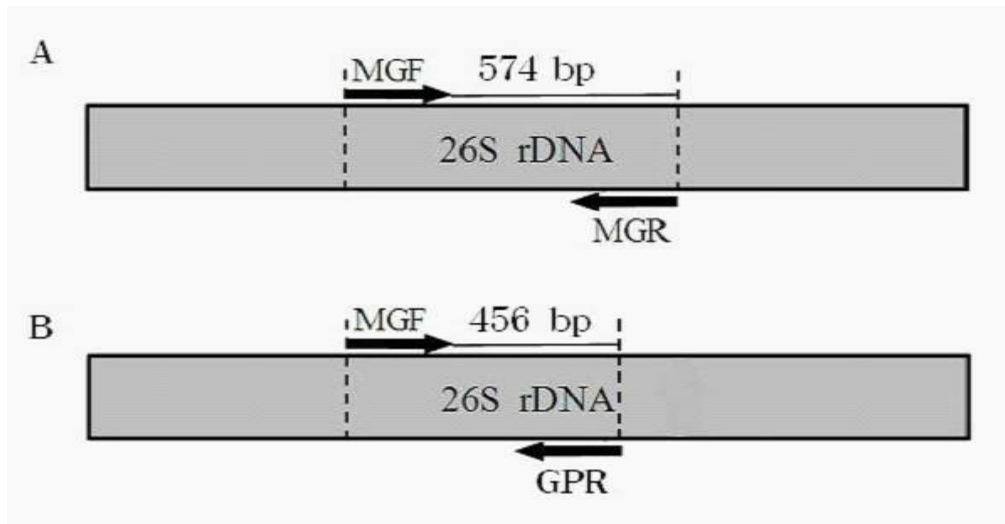
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation of KyungHee University
- <120> SNP Primers for Gumpoong and Chungsun Selection of Korean Ginseng
(Panax ginseng C.A.Meyer) and Method for Gumpoong and Chungsun
Distinction Using the Same
- <130> P110003
- <160> 9
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 1054
- <212> DNA
- <213> Panax ginseng
- <400> 1

```

gtgcgacatg aagacattga tagcaatatg ggggaagtgc ccatcaggca acaacggttc      60
tgctgaccc tactaaagca tgcatattat gtcagtgaag acttggtgtg aagccttgga      120

gcttacgtta gaagagcaaa agggccgggg ctagggtgag ctgagggggg acagcgtaag      180
tgagcgaatg tgtgtaagcc cagtcaaaca tgactgttct aggcggggcg ggccacccac      240
cttcgaatgg tgttggtcct acggaccgtg aacggattcg cctctggcct ctgggcacgt      300
cggaaccgca tgagttcacc gggggtggag cacggtccgc caaaatcggc ataggttagg      360
tgctattgat ggaacatggt aagcctatct tttccatat ggaagtgtg cgggcacata      420
gagatgtggg tagaggagc ctcaaaaagc gaaggccgag ctgtaggtca cgtgacctgc      480
accgagttgg tggtgactg ggctttttat gtgatcaaag cggataagcc cgccttcttg      540
    
```

ttatccaaaa gtaggtcgaa tcgggcgggc cctgccccg gaacgccgaa tgaaataggt 600
ggccgggttc tctttctacg acccttttgt ttgatatgat aggcccgctc ccctatccct 660
tatgttttagg agcgggatcc gcccaagaac gaccattctt gtggtggtac ggaaggcacg 720
gactccgcga acgtcccgcg ccccttkac taataaggga aagaaagcct caaccagaac 780
cacattcctt ttgcgtgcgg atgtagctaa gtgtctgact ctattggtca tagtttcctg 840
ctgttcgggc cgggtgctgt ttgcgcgcgc gtgaaccaac ccaacaaaca aggaaaggat 900
gcctctcggg gcatctgaga atgattcgag ccgtatgaag ggaaactctc acgtacagtt 960

tgtttttttg ggggggaagg agcccgcacag ggtccccca ctgacttggc cgggcctaa 1020
gtgaaagtta agtgggtgggc ctacccatcc caac 1054

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nad 7/3 -4F forward primer

<400> 2

tctatgatgg cccaagaaca 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nad 7/3 -4R reverse primer

<400> 3

acaccaaatt ctcttttagg 20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ChsF forward primer

<400> 4

caagcaaagg attggggat 19

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ChsR reverse primer

<400> 5

ggcttttcttt cccttattag ac 22

<210> 6

<211> 3362

<212> DNA

<213> Panax ginseng

<400> 6

aggtcaggcg ggactaccg ctgagtttaa gcatatcaat aagcggagga aaagaaactt 60

acaaggattc ccctagtaac ggcgagcgaa ccgggaatag ccagcttga aaatcgggcg 120

accccgctcg ccgaattgta gtctggagaa gcgtcctcag cggcggaccg ggcccaagtc 180

ccctggaagg gggcgccaga gaggtgaga gccccgctcg gcccgaccc tgcgcacca 240

cgaggcgctg tctacgagtc gggttgtttg ggaatgcagc cccaatcggg cggtaaattc 300

cgtccaaggc taatactgg cgagagaccg atagcaaca agtaccgca gggaaagatg 360

aaaaggactt tgaaaagaga gtcaaagat gcttgaaatt gtcgggaggg aagcggatgg 420

gggccggcga tgcaccccg tccgatgtgg aacggtgatg agccggtctg ccgatcgact 480

cggggtgtgg acctgtgcgg attggtgcgg cgcccaaagc ccgggctgtt gatatgccg 540

tggagacgcc gtcgcgccga tcgtggttgg cagcacgcgc ctcacggcgt gcttcggcat 600

ctgcgtgctc ctggcactgg cctgcgggta cccattcgg cccgtcttga aacacggacc 660

aaggagtctg acatgtgtgc gagtcaacgg gcgagtaaac ccgtaaggcg taaggaagct 720

gattgttggg atccccctga ggggtgcacc gccgaccgac cttgatcttc tgagaagggt 780

tcgagtgtga gcatgcctgt cgggaccgga aagatgttga actatgcctg agcggggcga 840

agccagagga aactctggtg gagggccgca gcgatactga cgtgcaaacc gtctgtctga 900

cttgggtata ggggcgaaag actaatcgaa ccgtctagta gctggttccc tccgaagttt 960

ccctcaggat agctggagcc cgggtgcgag ttctatcagg taaagccaat gattagaggc 1020

atcgggggcg caacgcctc gacctattct caaacittaa atgggttagga cggcgtggct 1080

gctttgttga gccgcgtcat ggaatcgaga gctccaagt ggccattttt ggtaagcaga 1140

actggcgatg cgggatgaac cggaagccgg gttacggtgc ccaactgcgc gtaaacctag 1200

aaccacaaa ggggtgttgg cgattaagac agcaggacgg tggcatgga agtcgaaac 1260

cgctaaggag tgtgtaaca ctcacctgcc gaatcaacta gccccgaaaa tggatggcgc 1320

ttaagcgcgc gacctatacc cggccgtcgg ggcaagtgc agggcccgat gagtaggagg 1380

gcgcggcggt cgctgcaaaa ccttgggcgt gagcccgggc ggagcggcgg tcggtgcgga	1440
tcttgggtgt agtagcaaat attcaaatga gaactttgaa ggccgaagag gggaaaggtt	1500
ccatgtgaac ggcaattgca catgggttag tcgatcctaa gagacggggg aagcccgta	1560
gatagcgcgt ttgcgcgag cttcgaaagg gaatcggtt aaaattcctg aaccgggacg	1620
tggcggtga cggcaacgtt agggagtcg gagacgtcg cgggggcccc ggaaagagtt	1680
atcttttctg tttaacagcc tgcccacctt ggaaacggct cagccggagg tagggtscag	1740
cggttgaag agcaccgcac gtgcgtgtgt gtccggtgcg ccccgcgcg cccttga	1800
tccggaggac cgagtgcctc ccacgcccgg tcgtactcat aaccgcatca ggtctccaag	1860
gtgaacagcc tctggctgat ggaacaatgt aggcaggga agtcggcaaa atggatccgt	1920
aacctcgga aaaggattgg ctctgagggc tgggcacggg ggtcccagtc ctgaactcgt	1980
cggtgtcgg tggactgctc gagctgcttc cgcggcgaga gcgggtcgcc gcgtgccggc	2040
cgggggacgg actgggaacg gcctcttcgg ggcccttccc cgggcgtcga acagtcgact	2100
cagaactgtt acggacaagg ggaatccgac tgtttaatta aaacaaagca ttgcgatgtt	2160
ccctgcggat gtaacgcaa tgtgatttct gccagtgct ctgaatgtca aagtgaagaa	2220
attcaaccaa gcgcgggtta acggcgggag taactatgac tctcttaagg tagccaaatg	2280
cctcgtcatc taattagtga cgcgcatgaa tggattaacg agattccac tgtccctgtc	2340
tactatccag cgaaccaca gccaaaggga cgggcttggc agaatcagcg gggaaagaag	2400
acctgttga gcttgactct agtcgactt tgtgaaatga cttgagaggt gtaggataag	2460
tgggagccgg aaacggcgaa agtgaaatac cactactttt aacgttattt tacttatcc	2520
gtgaatcgga agcggggcac tgcccctctt tttagaccaa aggcctcgtt gcgggccgat	2580
ccgggcggaa gacattgtca ggtggggagt ttggctgggg cggcacatct gttaaagat	2640
aacgcaggtg tcctaagatg agtcacga gaacagaaat ctcgtgtgga acagaagggt	2700
aaaagctcgt ttgattctga tttccagtac gaatacgaac cgtgaaagcg tggcctaacg	2760
atcctttaga ccttcggaat ttgaagctag aggtgtcaga aaagttacca cagggataac	2820
tggcttgtgg cagccaagcg tccatagcga cgttgctttt tgatccttcg atgtcggctc	2880
ttcctatcat tgtgaagcag aattcaccaa gtgttggtt gttcaccac caataggga	2940
cgtgagctgg gtttagaccg tcgtgagaca ggttagtttt accctactga tgacagtgc	3000
gcaatagtaa ttcaacctag tacgagagga accgttgatt cgcacaattg gtcacgcgc	3060
ttggttgaaa agccagtggc gcgaagctac cgtgcgtggt attatgactg aacgcctcta	3120
agtcagaatc cgggctagaa gcgacgcatg cgcgcgcgc ccgtttgccc accagcagta	3180
ggggccttac ggccccaaa ggcacgtgtc gttggccaag cccgtgcggc ggacgagccg	3240

cacgggtcgc catgaagtac aattcccacc gagcggcggg tagaatcctt tgcagacgac	3300
ttaaatacgc gacgggggat tgtaagaggc agagtggcct tgctgccacg atccactgag	3360
at	3362

<210> 7
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MGF forward primer

<400> 7	
ctcagacgga ggtaggatg	19

<210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MGR reverse primer

<400> 8	
tagatgacga ggcatttgg	19

<210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GPR reverse primer

<400>	
9	
tagcatccgc agggacat	19