



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년07월01일
 (11) 등록번호 10-0842434
 (24) 등록일자 2008년06월24일

(51) Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0035742

(22) 출원일자 2007년04월11일

심사청구일자 2007년04월11일

(56) 선행기술조사문헌

KR100742712 B1

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
대한민국

(72) 발명자
마경호

경기 수원시 권선구 권선동 1304 주공아파트
333-1501

박용진

경기 수원시 영통구 매탄1동 897 주공5단지아파트
515-201

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김석현, 이희숙

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 정의준

(54) 인삼에서 유래된 SSR 프라이머 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 인삼에서 분리한 SSR 프라이머 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 서열번호 1 내지 서열번호 44로 이루어진 군에서 선택되는 2개의 염기서열을 갖는 SSR 프라이머쌍 및 이를 이용하여 PCR을 수행하는 것을 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출 방법에 관한 것이다. 본 발명에서 제공되는 SSR 프라이머쌍은 인삼의 DNA 다형성을 효과적으로 검출할 수 있으며, 인삼의 DNA 프로파일을 작성하는데 매우 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 이를 통해 인삼의 유전자원을 효율적으로 평가함으로써 신규 유전자원 도입시 기존 보유자원과의 중복성 분석 및 신규성 확립을 효과적으로 수행할 수 있다.

(72) 발명자

이기안

경기 수원시 권선구 서둔동 27-63 교관아파트 105호

이정로

경기 수원시 권선구 권선동 1305 대우아파트 321-303

이석영

경기 화성시 비봉면 쌍학리 644-3

곽재균

경기 수원시 권선구 구운동 889 청구아파트 102-1804

김태산

경기 수원시 장안구 정자동 두견마을 벽산3차아파트 353-1003

조은기

경기 수원시 권선구 서둔동 17-396

(56) 선행기술조사문헌

KR1020070001402 A

KR1020060056536 A

KR1020060023379 A

KR1020060023378 A

US6733965 B2

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 44로 이루어진 군에서 선택되는 2개의 염기서열을 갖는 SSR(simple sequence repeat) 프라이머쌍.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 1과 2로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 3과 4로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 5와 6으로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 7과 8로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 9와 10으로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 11과 12로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 13과 14로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 15와 16으로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 17과 18로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 19와 20으로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 21과 22로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 23과 24로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 25과 26로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 27과 28로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 29과 30로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 31과 32로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 33과 34로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 35과 36로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 37과 38로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 39과 40로 표시되는 프라이머쌍; 서열번호 41과 42로 표시되는 프라이머쌍 및 서열번호 43과 44로 표시되는 프라이머쌍으로 이루어진 군에서 선택되는 SSR 프라이머쌍.

청구항 3

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

청구항 4

- (a) 인삼로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;
- (b) 추출된 게놈 DNA를 주형으로 하고 제1항 또는 제2항의 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및
- (c) PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계를 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출 방법.

청구항 5

- (a) 인삼 및 대조군 인삼 품종으로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;
- (b) 추출된 각 게놈 DNA를 주형으로 하고 제1항 또는 제2항의 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계;
- (c) 각 PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계; 및
- (d) 상기 인삼 및 대조군 인삼 품종의 크기별 분리 결과를 비교하는 단계를 포함하는 인삼의 품종 동정 방법.

청구항 6

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

청구항 7

제1항 또는 제2항의 SSR 프라이머쌍을 포함하는 인삼의 품종 동정용 키트.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<1> 본 발명은 인삼(*Ginseng*; *Panax ginseng* C. A. Meyer)에서 분리한 SSR 프라이머 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 서열번호 1 내지 서열번호 44로 이루어진 군에서 선택되는 2개의 염기서열을 갖는

SSR 프라이머쌍 및 이를 이용하여 PCR을 수행하는 것을 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출 방법에 관한 것이다.

- <2> 육종에 이용되고 있는 대부분의 주요 작물 및 소재배 작물에서 해마다 많은 양의 유전자원이 수집되고 있다. 그러나, 이에 반해 유전자원에 대한 평가는 충분히 이루어지지 않고 있는 실정이다. 수집된 유전자원의 종간 및 아종간 품종의 신속한 판별은 정확한 유전자원의 관리 및 보호를 위하여 매우 중요하다. 또한 품종의 판별과 함께 유전자원의 유형 형질 탐색과 분류, 그리고 유연관계의 규명은 유전자원의 보존이나 신품종의 창출 및 작물의 개량에 있어서 매우 중요하다.
- <3> 최근 분자생물학의 급속한 발전으로 핵산(DNA) 수준에서 유전자원의 다양성(bio-diversity) 연구를 가능케 하는 핵산 지문 분석 방법 및 다양한 DNA 마커들이 개발되었다. 이를 통해 유용 형질 탐색, 생물의 종 판별, 품종 분류·동정 및 집단 개체군의 유연관계 분석을 외부환경 등에 대하여 거의 영향을 받지 않고 간단하고 신속하게 수행할 수 있게 되었다. 지금까지 개발된 PCR(polymerase chain reaction)을 이용한 지문분석법(fingerprinting)에는 RAPD(randomly amplified polymorphic DNAs) 방법, AFLP(amplified fragment length polymorphic DNA) 방법, SSR(simple sequence repeat) 방법 등이 있다. 상기 방법 중 RAPD 방법은 비특이적 PCR 산물이 증폭되므로 재현성이 떨어지는 단점이 있고, AFLP 방법은 높은 DNA 다형성 검출로 각광받고 있지만 재현성이 떨어지는 밴드의 출현과 분석이 복잡하다는 단점이 있다. 이에 반해, SSR 방법은 DNA 반복 배열인 초위성체(microsatellite) 영역의 염기 배열 정보를 근거로 PCR 프라이머를 제작하여 이용하는 방법으로서, 초위성체 분석이 용이하고 높은 재현성을 가지는 장점으로 인하여 생물종의 동정에 자주 사용되고 있다. 특히 SSR 방법은 외부 환경의 영향을 전혀 받지 않는다는 장점이 있다. 이와 같은 SSR 방법의 우수성으로 인해 여러 주요 작물 및 소재배 작물에서 SSR 마커를 개발하려는 연구가 한창 진행 중에 있다.
- <4> 벼에서는 벼 게놈에 반복되는 SSR을 PCR 기술로 증폭하여 벼 품종의 유전자형을 동정하는 초위성체 마커들이 개발되었다(대한민국 특허출원번호 제2001-34003호). 미국의 Tang 박사팀은 879개의 SSR 마커들을 개발하여 해바라기의 유전자 지도를 발표한 바 있다(Tang *et al.*, *Theor. Appl. Genet.*, 105: 1124-1136, 2002). 이외에도 보리, 콩 등에서 많은 SSR 마커들이 개발되었다. 그러나, 인삼에서는 SSR 마커가 아직 국내에서 전혀 개발된 바 없으며, 외국에서도 이와 관련된 연구가 거의 이루어지지 않은 실정이다.
- <5> 이에 본 발명자들은 인삼의 유전자원을 효율적으로 평가할 수 있는 SSR 마커를 개발하기 위하여 연구를 거듭하던 중, 다양한 인삼 계통들에서 다형성 변이를 많이 나타내는 SSR 프라이머쌍을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <6> 따라서, 본 발명의 목적은 인삼의 유전자원을 효율적으로 평가할 수 있는 SSR 마커 및 이의 용도를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <7> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 44로 이루어진 군에서 선택되는 2개의 염기서열을 갖는 SSR 프라이머쌍을 제공한다.
- <8> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 것을 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출 방법 및 인삼의 품종 동정 방법을 제공한다.
- <9> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 SSR 프라이머쌍, DNA 증합효소 및 PCR 반응 완충용액을 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출용 키트 및 인삼의 품종 동정용 키트를 제공한다.
- <10> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <11> 본 발명은 인삼의 유전적 다형성을 특이적으로 분석할 수 있는 SSR 마커를 제공하는 것을 특징으로 한다.
- <12> 본 발명에서는 비오틴-스트렙타비딘 포획(biotin-streptavidin capture; Dixit *et al.*, *Mol. Eco. Note*, 5: 736-738) 방법으로 인삼로부터 SSR 마커를 개발하였다. 인삼에서 분리된 SSR 마커는 본 발명에 의해 처음으로 제공되는 것이다.
- <13> 구체적으로, 본 발명의 SSR 마커는 다음과 같은 방법으로 개발되었다. 인삼로부터 추출한 게놈 DNA를 제한효소로 처리해 DNA 단편을 제조한 후 AP11 및 AP12의 2개의 어댑터와 라이게이션하였다.
- <14> 라이게이션 산물을 비오틴이 표지된 SSR 탐침과 혼성화한 후 마그네틱 비드를 이용해 분리하였다. 이를 AP11 프

라이머를 이용하여 PCR을 수행하여 증폭한 후 서열을 분석함으로써 인삼의 초위성체를 포함하고 있는 500개의 DNA단편을 수득하였다.

<15> 상기에서 수득한 DNA단편을 분석함으로써 5개 이상의 반복 유닛을 포함하고 있는 단편만을 선발하고 반복 유닛을 포함하는 부분을 기준으로 초위성체를 증폭 할 수 있는 양방향 프라이머 200쌍을 디자인 하였다. 상기 프라이머쌍을 사용하여 다양한 재배형 인삼 계통 및 품종들의 PCR을 통한 DNA 프로파일링을 수행함으로써 다형성 변이를 많이 나타내는 22쌍의 SSR 프라이머쌍을 선발하였다.

<16> 본 발명에서 제공하는 SSR 마커는 PCR 프라이머쌍을 말하며, 정방향 프라이머와 역방향 프라이머를 포함한다. 본 발명에서 제공되는 SSR 프라이머쌍은 서열번호 1 내지 서열번호 44로 이루어진 군에서 선택되는 2개의 염기 서열을 가진다. 바람직하게는 GB-PG-007(서열번호 1과 2로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-009(서열번호 3과 4로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-014(서열번호 5와 6으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-026(서열번호 7와 8으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-033(서열번호 9과 10로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-041(서열번호 11과 12로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-043(서열번호 13과 14로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-057(서열번호 15와 16으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-060(서열번호 17과 18로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-065(서열번호 19과 20로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-075(서열번호 21와 22으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-077(서열번호 23와 24으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-078(서열번호 25와 26으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-114(서열번호 27와 28으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-131(서열번호 29와 30으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-142(서열번호 31와 32으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-150(서열번호 33와 34으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-152(서열번호 35와 36으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-157(서열번호 37와 38으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-169(서열번호 39와 40으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-177(서열번호 41와 42으로 표시되는 프라이머쌍) 및 GB-PG-186(서열번호 43과 44로 표시되는 프라이머쌍)로 이루어진 군에서 선택된다. 본 발명에서 제공되는 프라이머쌍 및 이들에 의해 증폭되는 초위성체에 존재하는 반복 모티브(repeat motif), 증폭되는 초위성체의 크기, T_m ($^{\circ}C$) 및 초위성체가 존재하는 염색체 대립인자에 대한 정보를 하기 표 1에 기재하였다.

표 1

<17> 본 발명의 SSR 프라이머쌍 및 이로부터 증폭되는 초위성체의 특성

프라이머명	서열	서열번호	반복모티브	증폭되는 초위성체의 크기의 범위(bp)	T_m ($^{\circ}C$)	대립인자의 수
GB-PG-007	F : CAGAGCTGGTGGTCAAG	1	(GA) ₇ , (GA) ₈	177-237	52	5
	R : ATTCTTTTCTCCAGCGCC	2				
GB-PG-009	F : GTCGAATGCAGTGGGGTA	3	(AG) ₅ TG(AG) ₃	150-334	52	4
	R : AACTACCGGCCACAC	4				
GB-PG-014	F : CCCAGGTGCACAAACAGT	5	(CCG) ₂ CCT(CCG) ₃	289-301	52	3
	R : TTCCTCCCTTTCTCCGTC	6				
GB-PG-026	F : CTGGAATCGGAAATGGGT	7	(TGG) ₁₀ , (TGG) ₁₀	108-177	52	7
	R : CAGGCGCCCTCTAAC	8				
GB-PG-033	F : CAGCCATTATCCACCA	9	(GCA) ₅ GCC(GCA) ₂	335-371	52	2
	R : ACTCCTCTGCCACGACCT	10				
GB-PG-041	F : CAAGTCTATGCGCTCTCCA	11	(TGC) ₃ (TCC)(TGC) ₃	239-305	52	3
	R : GGCATCTGCAGTCTCTG	12				
GB-PG-043	F : AGCCAGGTGCTTGCTCA	13	(TC) ₃ (CT)(TC) ₅ , (CT) ₉	90-232	52	5
	R : GTCAGACGGATTGCTGCT	14				
GB-PG-057	F : GTTCGAGAGTTCGCGATG	15	(GA) ₃ (CA)(GA) ₃ (CA) (GA) ₃ (CA)(GA) ₃	256-288	52	2
	R : CCAGTTTTCTTCTCGTCC	16				
GB-PG-060	F : CGACTGGAATCGGAAATG	17	(TGG) ₄	163-178	52	3
	R : CGCCCTTCTCAATTCTC	18				
GB-PG-065	F : CCGAGCGCTACAAGAGA	19	(CGC) ₇	136-157	52	5
	R : CCTTCTGCTCAATCGACG	20				

GB-PG-075	F : GCGAGCGAGATAACACAAA	21	(GA) ₆	251-257	52	3
	R : TGCTTAAAGCTTGCCTCCT	22				
GB-PG-077	F : TAGCAGCACAGCAGCAGA	23	(TA) ₅	233-235	52	2
	R : TCTAGACGCGAGCTCTCA	24				
GB-PG-078	F : GTGACGGGTTAAGAGGGC	25	(GTT) ₂ GAG(GTT) ₃ , (GCG) ₂ CTT(GCG) ₄	252-264	52	2
	R : CTCCTTTCCTTCGCCACT	26				
GB-PG-114	F : CCTGGTCGTCATTCTGCT	27	(TGC) ₄	227-239	52	3
	R : AAGGACAAAAAGGGACGC	28				
GB-PG-131	F : TCATGATGAGTTGGCGGT	29	(CAG) ₆ (CA)(CAG) ₃	199-205	52	3
	R : TCTAGGCGCTCTTCATGG	30				
GB-PG-142	F : CTGGTGATGGAACCGACA	31	(TGG) ₃ (CAG)(TGG) ₃ , (GA) ₉	162-261	52	6
	R : AGTCAGCTCGTCTCCCC	32				
GB-PG-150	F : AATGACACCCGACCATCA	33	(GCA) ₅	217-250	52	4
	R : TGTAACGCATCGTCATCCT	34				
GB-PG-152	F : ACCAGGTTGTGTTCTGTTGG	35	(GT) ₈	255-259	52	3
	R : CCCACAAAATCCCAAATG	36				
GB-PG-157	F : GTACAAGGCAGGCGCTC	37	(TGC) ₄	225-282	52	2
	R : AGTCTGATGAGTTGGCG	38				
GB-PG-169	F : TCTAGGCGCTCTTCATGG	39	(TGC) ₂ (TG)(TGC) ₄	231-276	52	4
	R : GGGCATCTGCAGTCTCTG	40				
GB-PG-177	F : TTTGATCCGCAACTGTCC	41	(GCA) ₄	106-286	52	7
	R : AATGAGAGGCACCCGAAT	42				
GB-PG-186	F : TTGGGAGTCCAACAGTG	43	(GA) ₄ (AA)(GA) ₃	174-212	52	2
	R : TCTTCTTCATCGCCTCCTC	44				

<18> ^aF: 정방향 프라이머 ^bR: 역방향 프라이머

<19> 본 발명에서 제공되는 SSR 프라이머쌍은 인삼에서 DNA 다형성을 검출하고 유전적 다양성을 분석하는데 유용하게 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 SSR 프라이머를 이용하여 인삼의 유전자원을 효율적으로 평가 및 보존할 수 있다. 따라서 본 발명은 상기 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 것을 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출 방법을 제공한다.

<20> 구체적으로 인삼의 DNA 다형성 검출 방법은

<21> (a) 인삼로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;

<22> (b) 추출된 게놈 DNA를 주형으로 하고 본 발명에서 제공하는 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계; 및

<23> (c) PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계를 포함한다.

<24> 상기 (a) 단계에서 게놈 DNA의 추출은 당업계에서 통상적으로 사용되는 페놀/클로로포름 추출법, SDS 추출법 (Tai *et al.*, *Plant Mol. Biol. Reporter*, 8: 297-303, 1990), CTAB 분리법(Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide; Murray *et al.*, *Nuc. Res.*, 4321-4325, 1980) 또는 상업적으로 판매되는 DNA 추출 키트를 이용하여 수행할 수 있다.

<25> 또한 상기 (b) 단계에서 PCR은 PCR 반응에 필요한 당업계에 공지된 여러 성분을 포함하는 PCR 반응 혼합액을 이용하여 수행될 수 있다. 상기 PCR 반응 혼합액에는 분석하고자 하는 인삼에서 추출된 게놈 DNA와 본 발명에서 제공되는 SSR 프라이머쌍 이외에 적당량의 DNA 중합효소, dNTP, PCR 완충용액 및 물(dH₂O)을 포함한다. 상기 PCR 완충용액은 트리스-HCl(Tris-HCl), MgCl₂, KCl 등을 포함한다. 이 때 MgCl₂ 농도는 증폭의 특이성과 수량에 크게 영향을 주며, 바람직하게는 1.5-2.5 mM의 범위로 사용될 수 있다. 일반적으로 Mg²⁺가 과량인 경우는 비특이적인 PCR 증폭산물이 증가하고, Mg²⁺가 부족한 경우 PCR 산물의 산출율이 감소한다. 상기 PCR 완충용액에는 적당량의 트리톤 X-100(Triton X-100)이 추가로 포함될 수도 있다. 또한 PCR은 94-95℃에서 주형 DNA를 전변성시킨

후, 변성(denaturation); 결합(annealing); 및 증폭(extension)의 사이클을 거친 후, 최종적으로 72°C에서 연장(elongation)시키는 일반적인 PCR 반응 조건에서 수행될 수 있다. 상기에서 변성 및 증폭은 94-95°C 및 72°C에서 각각 수행될 수 있으며, 결합시의 온도는 프라이머의 종류에 따라 달라질 수 있다. 바람직하게는 52-57°C이며, 보다 바람직하게는 55°C이다. 각 단계의 시간과 사이클 수는 당업계에 일반적으로 행해지는 조건에 따라 정해질 수 있다. 본 발명에 따른 SSR 프라이머쌍을 이용한 PCR 수행시의 최적의 반응 조건은 다음과 같다: 95°C에서 3분간 주형 DNA를 전변성시킨 후, 95°C에서 30초; 55°C에서 30초; 및 72°C에서 1분 30초를 36 사이클 반복 수행한 후, 최종적으로 72°C에서 5분간 반응시킨다.

- <26> 상기 (c) 단계에서는 당업계에서 널리 공지된 방법에 따라 PCR 산물의 DNA를 크기별로 분리할 수 있다. 바람직하게는 아가로스 겔(agarose gel) 또는 폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gel) 전기영동 또는 형광분석장치(ABI prism 3100 genetic analyzer-electropherogram)에 의해 확인할 수 있다. 이 때, 형광분석장치를 이용하기 위해서는 당업계에 공지된 형광 다이(dye)를 붙인 프라이머쌍을 이용하여 상기 (b)단계에서 PCR을 수행한다. PCR 증폭 결과는 바람직하게는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동, 보다 바람직하게는 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동에 의해 확인할 수 있다. 전기영동 후 실버 염색(silver staining)으로 전기영동 결과를 분석할 수 있다. 일반적인 PCR 수행 및 그 결과 분석 방법에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있다.
- <27> 아울러, 본 발명은 상기 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 것을 포함하는 인삼의 품종 동정 방법을 제공한다.
- <28> 구체적으로 인삼의 품종 동정 방법은
- <29> (a) 인삼 및 대조군 인삼 품종으로부터 게놈 DNA를 추출하는 단계;
- <30> (b) 추출된 각 게놈 DNA를 주형으로 하고 본 발명에서 제공하는 SSR 프라이머쌍을 이용하여 PCR을 수행하는 단계;
- <31> (c) 각 PCR 산물을 크기별로 분리하는 단계; 및
- <32> (d) 상기 (c) 단계의 각각의 크기별 분리 결과를 서로 비교하는 단계를 포함한다.
- <33> (a) 내지 (c) 단계의 게놈 DNA 추출, PCR 수행 및 PCR 산물의 크기별 분리는 상기에서 기재한 바와 같으며, 상기 (d) 단계에서 인삼 및 대조군 인삼 품종에 대한 비교는 동일한 조합의 SSR 프라이머쌍에 대한 시료가 되는 인삼과 대조군 인삼 품종의 각각의 PCR 산물의 크기를 서로 비교하는 방법으로 수행된다. 각 SSR 프라이머쌍에 대한 크기 비교 결과를 종합하여 시료가 되는 인삼과 대조군 인삼 품종의 결과와 모두 일치하면 시료가 되는 인삼은 대조군 인삼 품종과 동일한 품종으로 동정할 수 있다. 이와 같은 품종의 동정 방법은 신규 유전자원 도입 시 중복여부 판단 및 원산지 확인을 통한 원산지 표시 위반 여부의 판정 등 품종의 동정이 필요한 경우에 유용하게 이용될 수 있다.
- <34> 대조군 인삼 품종에 대한 게놈 DNA 추출, PCR 수행 및 PCR 산물의 크기별 분리는 시료가 되는 인삼과 동시에 수행될 수도 있으나, 시료가 되는 인삼 보다 이전에 수행되어 동정의 기준표(reference)로 작성될 수도 있다. 이러한 기준표를 이용하면 시료가 되는 인삼에 대한 게놈 DNA 추출, PCR 수행 및 PCR 산물의 크기별 분리만을 수행하여 기준표와 비교할 수 있어 유용하게 이용할 수 있다.
- <35> 또한 본 발명은 본 발명에 따른 SSR 프라이머쌍을 포함하는 인삼의 DNA 다형성 검출용 키트를 제공한다. 이외에 PCR 반응을 용이하게 수행할 수 있기 위해 DNA 증합효소 및 상기에서 기재한 조성의 PCR 반응 완충용액이 추가로 포함될 수 있으며, PCR 산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성성분들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.
- <36> 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 SSR 프라이머쌍을 포함하는 인삼의 품종 동정용 키트를 제공한다. 품종 동정 방법은 상기에서 기재한 바와 같다. 이외에 PCR 반응을 용이하게 수행할 수 있기 위해 DNA 증합효소 및 상기에서 기재한 조성의 PCR 반응 완충용액을 추가로 포함될 수 있으며, PCR 산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성성분 또는 공지된 품종에 대한 동정 기준표들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.
- <37> 본 발명에 적용될 수 있는 인삼은 *Panax ginseng* C. A. Mey 및 이들의 변종일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 바람직하게는 *Panax ginseng* C. A. Mey일 수 있다.
- <38> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<39> 단, 하기 실시예에는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<40> <실시예 1> 게놈 DNA 추출

<41> 재배종 인삼(농업생명공학연구원 유전자원과, 보존번호 : G03004)로부터 SDS를 이용한 방법(Tai et al., *Plant Mol. Biol. Reporter*, 8: 297-303, 1990)에 따라 게놈 DNA를 추출하였다. 이를 상세히 설명하면 다음과 같다. 생육 1개월째의 어린 인삼 식물체로부터 0.5 g의 잎 조직을 채취하여 1.5 ml 튜브에 넣고 액체질소로 급냉시켰다. 이후, 즉시 플라스틱 막대로 잎을 곱게 마쇄하였다. 마쇄된 잎이 녹기 전에 추출 완충용액(200 mM Tris-HCl (pH 8.0), 200 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS) 750 μ l를 첨가하고, 혼합액을 65°C에서 30분간 보관하였다. 여기에 동량의 페놀(phenol):클로로포름(chloroform):이소아밀알코올(isoamylalcohol) (25:24:1) 용액을 추가로 첨가한 후, 약 15분간 교반하였다. 이를 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상등액을 취하여 새 튜브에 옮겼다. 상기 튜브에 동량의 이소프로판올(-20°C)을 첨가하고, -20°C에서 1시간 보관하였다. 이후, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리 하였다. 상등액을 버린 후 침전된 DNA를 70% 에탄올로 세척하였다. DNA를 건조시킨 후, 약 300 μ l의 RNase (50 μ g/ml)를 함유하는 TE 완충용액(10 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7.4)을 첨가하여 충분히 녹인 후, 37°C에서 1시간동안 보관하였다.

<42> <실시예 2> 어댑터와의 라이게이션(ligation)

<43> 상기 실시예 1에서 얻은 게놈 DNA 500 ng을 각 제한효소 제조사의 지침에 따라 *EcoRV*, *DraI*, *SmaI*, *PvuI*, *AluI*, *HaeIII* 및 *RsaI*로 절단하였다. 절단된 DNA를 1.2% 아가로스 겔에 전기영동한 후, 약 300-1500 bp 크기의 DNA 단편만을 겔로부터 일루션(elution)하여 수득하였다. 이후, 수득된 DNA 단편을 2개의 어댑터(adapter; AP-11 및 AP-12, 각 50ng)와 T4 DNA 라이게이즈(ligase; Promega, 미국)를 이용하여 12°C에서 하룻밤 동안 라이게이션시켰다. 이 때 라이게이션 효율을 높이기 위해 AP-12 어댑터는 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase, Promega, 미국)로 5' 말단을 인산화 하였으며, 라이게이션시의 반응용액의 조성은 다음과 같다: 1X 라이게이션 버퍼(Promega, 미국), 50ng AP11 어댑터, 50ng AP12 어댑터, 150ng DNA 단편, 3 Unit T4 라이게이즈(Promega, 미국).

표 2

<44> 본 발명에서 사용한 어댑터

어댑터 명	염기서열	서열번호
AP-11	5'-CTCTTGCTTAGATCTGGACTA-3'	45
AP-12	5'-TAGTCCAGATCTAAGCAAGAGCACA-3'	46

<45> <실시예 3> 초위성체를 포함하고 있는 DNA 단편의 선발 및 분리

<46> <3-1> 마그네틱 비드 준비

<47> 마그네틱 비드(magnetic bead; SA-PMPs, Promega, 미국; 1 mg/ml) 0.6 ml를 마그네틱 분리기(magnetic stand; Promega, 미국)로 수집한 후 용액을 제거하였다. 여기에 0.5x SSC(Saline-Sodium Citrate) 버퍼 0.6 ml를 넣어 세척을 하고 다시 마그네틱 분리기로 수집한 후 용액을 제거하였다. 0.5x SSC 버퍼를 이용한 세척은 3회 반복하여 실시하였다. 세척한 마그네틱 비드에 0.5x SSC 버퍼 100 μ l를 넣은 후 30분이내에 사용하였다.

<48> <3-2> 혼성화

<49> 상기 실시예 2에서 제조한 라이게이션 산물에 증류수를 넣어 500 μ l가 되도록 한 후 65°C에서 10분간 변성(denature)시켰다. 여기에 바로 비오틴(biotin)이 표지된 SSR 탐침 1.5 μ l(20ng)와 20x SSC 버퍼 13 μ l를 넣고 상온에서 10분간 방치하여 결합을 유도하였다. 혼성화에 사용된 8개의 SSR 탐침은 하기 표 3에 기재하였으며, SSR 탐침은 당업계에서 공지된 통상의 방법에 따라 비오틴으로 표지하였다.

표 3

<50> 인삼의 초위성체를 분리하기 위한 탐침의 서열

서열	서열번호
Biot in-(GA) ₂₀	47
Biot in-(AT) ₂₀	48
Biot in-(CA) ₂₀	49
Biot in-(AGC) ₁₅	50
Biot in-(GGC) ₁₅	51
Biot in-(AAG) ₁₅	52
Biot in-(AAC) ₁₅	53
Biot in-(AGG) ₁₅	54

<51> 혼성화 반응을 통하여 계놈 DNA 단편 중 상기 반복염기서열을 가지고 있는 DNA 단편들은 비오틴이 표지된 SSR 탐침들과 상보적 결합을 할 것이고, 이를 SSR 탐침-템플릿(template) 혼성체(hybrid)라고 한다.

<52> <3-3> 템플릿의 분리

<53> <3-1>에서 제조한 마그네틱 비드 용액을 <3-2>에서의 SSR 탐침-템플릿 혼성체 용액에 넣고 상온에서 10분간 방치시킨다. 반응용액에서 마그네틱 분리기로 SSR 탐침-템플릿 혼성체가 결합된 마그네틱 비드를 수집하고 상등액을 제거하였다. 상기 SSR 탐침-템플릿 혼성체가 결합된 마그네틱 비드를 0.1x SSC 300 μl로 4회 세척한 후 증류수 50 μl를 넣고 90℃에서 5분간 가열하여 하기 템플릿을 분리하였다.

<54> <3-4> PCR 반응

<55> <3-3>에서 분리한 템플릿에 대해 AP-11 어댑터를 프라이머로 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응 혼합물(20 μl)의 조성은 다음과 같다: 250 ng 어댑터-라이게이션된 DNA, 10 pmol AP11 프라이머, 2 mM dNTP, 2 units Taq DNA 중합효소, 5 μl 10× 완충용액. PCR 반응은 72℃에서 2분, 94℃에서 3분동안 가열한 후 94℃에서 30초; 56℃에서 30초; 및 72℃에서 1분을 24 사이클(cycle)로 반복 수행하고, 마지막으로 72℃에서 10분의 조건으로 수행하였다.

<56> 이와 같은 방법으로 본 발명에서는 초위성체를 함유하고 있는 500개의 DNA 단편을 분리하였다.

<57> <실시예 4> 분리된 DNA 단편의 서열분석 및 프라이머 디자인

<58> 상기 실시예 3에서 분리된 초위성체를 함유하고 있는 DNA 단편들을 pGEM T-easy vector 벡터(Promega, 미국)에 클로닝하여 이들의 서열을 분석하였다. 염기서열 분석은 (주)제노텍에 의뢰하여 수행하였다. 분석된 서열을 기초로 하여 5개 이상의 반복 유닛(repeat unit)을 포함하고 있는 단편만을 선발하였다. 반복 유닛을 포함하는 부분을 기준으로 하여 초위성체를 증폭할 수 있는 양 방향의 프라이머를 디자인하였다. 총 200쌍의 프라이머쌍을 디자인하였다(결과미도시).

<59> <실시예 5> SSR 마커의 선발

<60> 상기 실시예 4에서 디자인된 프라이머쌍 중에서 다양한 인삼 계통에서 다형성 변이를 많이 나타내는 SSR 프라이머 조합을 선발하기 위하여, 하기 표 4에 기재된 16점의 재배형 인삼 또는 인삼 품종에 대하여 PCR을 통한 DNA 프로파일링(profiling) 분석을 수행하였다.

표 4

<61> SSR 분석에 사용된 인삼

기탁번호	기탁기관	수집국 (원산지)	형(type)
G03004	농촌진흥청	KOR	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer
G03034	농촌진흥청	KOR	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer
G03138	농촌진흥청	KOR	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer

G03146	농촌진흥청	KOR	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer
G03181	농촌진흥청	KOR	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer
G03182	농촌진흥청	JPN	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer
G03184	농촌진흥청	RUS	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer
Gopung	농촌진흥청	KOR	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer
Seonpung	농촌진흥청	KOR	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer
G04056	농촌진흥청	KOR	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer
G04075	농촌진흥청	KOR	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer
G04085	농촌진흥청	KOR	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer
G04093	농촌진흥청	KOR	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer
G04114	농촌진흥청	CHN	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer
G04116	농촌진흥청	USA	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer
G04121	농촌진흥청	KOR	<i>Panax ginseng</i> C. A. Meyer

<62> 각각의 PCR 반응 혼합물 (20 μ l)의 조성은 다음과 같다: 실시예 1의 방법에 의해 분리한 인삼 주형 DNA 40ng, 정방향 프라이머 0.2 μ M, 역방향 프라이머 0.6 μ M, 형광물질이 표지된 M13 프라이머(TGTAACGACGGCCAGT, 서열번호 55) 0.6 μ M, 1X PCR 반응액 (10mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1 unit DNA 중합효소. PCR 반응은 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 주형 DNA를 전변성시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초; 각 프라이머의 T_m(표 1 참조)에 해당하는 온도에서 30초; 및 72 $^{\circ}$ C에서 45초의 조건으로 35회 반복한 후, 다시 94 $^{\circ}$ C에서 30초; 53 $^{\circ}$ C에서 45초; 및 72 $^{\circ}$ C에서 45초의 조건으로 15회 반복한 후, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 15분의 조건으로 수행하였다.

<63> 각기 다른 형광물질로 증폭된 PCR 산물 단편의 크기를 분석하기 위해 자동 염기서열 분석 장치 (ABI 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, 미국)를 이용하였다. 분석을 위하여, PCR 산물 1.5 μ l, Hi-di 포름아미드(formamide) 9.2 μ l, 내부 크기 표준시약(Internal Size Standard; Genescan-500 ROX) 0.3 μ l을 혼합한 후 94 $^{\circ}$ C에서 3분간 변성하여 분석에 사용하였다.

<64> 그 결과, 국내 및 국외에서 수집된 인삼 재배형 및 인삼 품종들에서 다형성을 나타내는 SSR 프라이머쌍 22쌍을 확인하여 GB-PG-007(서열번호 1과 2로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-009(서열번호 3과 4로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-014(서열번호 5와 6으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-026(서열번호 7와 8으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-033(서열번호 9과 10로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-041(서열번호 11과 12로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-043(서열번호 13과 14로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-057(서열번호 15와 16으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-060(서열번호 17과 18로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-065(서열번호 19과 20로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-075(서열번호 21와 22으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-077(서열번호 23와 24으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-078(서열번호 25와 26으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-114(서열번호 27와 28으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-131(서열번호 29와 30으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-142(서열번호 31와 32으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-150(서열번호 33와 34으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-152(서열번호 35와 36으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-157(서열번호 37와 38으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-169(서열번호 39와 40으로 표시되는 프라이머쌍), GB-PG-177(서열번호 41와 42으로 표시되는 프라이머쌍) 및 GB-PG-186(서열번호 43과 44로 표시되는 프라이머쌍)을 선별하였다(표 1 참조). 상기 22쌍의 프라이머에 의해 증폭된 PCR 단편의 각각의 크기는 다음 표 5와 같다.

표 5

<65> 프라이머에 따른 증폭된 초위성체의 종류 및 크기(단위 : bp)

	G03004	G03034	G03138	G03146	G03181	G03182	G03184	Gopung
GB-PG-007	177-233	177-231	177-231	177-231	177-231	231	177-231	177-231
GB-PG-009	170-334	334	170-334	150-334	334	334	170-334	170-334
GB-PG-014	301	301	301	301	301	301	301	301
GB-PG-026	126-162	126-168	126	126-168	126-177	126	126	126-156
GB-PG-033	335	335	335	335	335	335	335	335
GB-PG-041	296	296	296	296	296	296	296	296

GB-PG-043	184-206	184-206	90-182	184-206	184-206	184-206	184-232	184-232
GB-PG-057	288	288	288	288	288	288	288	288
GB-PG-060	163-178	163-178	163-178	163-178	163-178	163-178	163-178	163-178
GB-PG-065	136-148	136-157	139-154	139-154	136-148	136-148	139-154	139-148
GB-PG-075	251-253	251-253	251-253	251-253	251-253	251-253	251-253	251-253
GB-PG-077	235	235	235	235	235	235	235	235
GB-PG-078	264	264	264	264	264	264	264	264
GB-PG-114	230-239	230-239	-	230-239	230-239	230-239	230-239	230-239
GB-PG-131	202-205	202-205	202-205	202-205	202-205	202-205	202-205	202-205
GB-PG-142	162-174	162-174	162-174	162-174	166-174	166-174	162-174	162-174
GB-PG-150	217-241	217-241	217-241	217-241	217-241	217-241	217-241	217-241
GB-PG-152	255	255	255	255	255	255	255	255
GB-PG-157	282	282	282	282	282	282	282	282
GB-PG-169	231	231-276	231	231	231	231	231	231-276
GB-PG-177	238-241	106-238	112-286	112-238	238-241	238-241	241	238
GB-PG-186	174	174	174	174	174	174	174	174

<66>

	Seonpung	G04056	G04075	G04085	G04093	G04114	G04116	G04121
GB-PG-007	177-231	177-233	177-231	177-231	177-231	215-237	215-237	177-231
GB-PG-009	238-334	334	334	170-334	170-334	170	170	334
GB-PG-014	301	301	301	301	301	289-295	289-295	301
GB-PG-026	126	126	126	126	126-168	108	108	126-171
GB-PG-033	335	335	335	335	335	335-371	335-371	335
GB-PG-041	296	296	296	296	296	239-305	239-305	296
GB-PG-043	184-232	184-206	184-206	184-206	184-206	184	182-206	184-232
GB-PG-057	288	288	288	288	288	256-270	256-270	288
GB-PG-060	163-178	163-178	163-178	163-178	163-178	166-178	166-178	163-178
GB-PG-065	136-154	136-154	136-154	139-148	136-154	139	139	139-154
GB-PG-075	251-253	251-253	251-253	251-253	251-253	253-257	253-257	251-253
GB-PG-077	235	235	235	235	235	233-235	233-235	235
GB-PG-078	264	264	264	264	264	252-264	252-264	264
GB-PG-114	230-239	239-245	230-239	239	230-239	227	227	230-239
GB-PG-131	202-205	202-205	202-205	202-205	202-205	199	199	202-205
GB-PG-142	166-174	162-174	166-174	162-174	162-174	213-261	183-261	166-174
GB-PG-150	217-241	217-250	217-241	217-241	217-241	217-223	217-223	217-241
GB-PG-152	255	255	255	255	255	257	259	255
GB-PG-157	282	282	282	282	282	225	225-282	282
GB-PG-169	231	231	231-270	231-270	231-270	231-237	231-237	231-270
GB-PG-177	238-241	238-241	139-235	238-247	238-241	238	139-238	139-238
GB-PG-186	174	174	174	174	174	174-212	174-212	174

발명의 효과

<67>

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에서는 인삼에서 처음으로 SSR 마커를 개발하였다. 본 발명에서 제공되는 SSR 프라이머쌍은 인삼의 DNA 다형성을 효과적으로 검출하여 인삼의 DNA 프로파일을 작성하는데 매우 유용하게 이용될 수 있다. 이를 통해 인삼의 유전자원을 효율적으로 평가함으로써 신규 유전자원 도입시 기존 보유자원과의 중복성 분석 및 신규성 확립을 효과적으로 수행할 수 있으며, 인삼의 품종을 판별할 수 있다.

서열 목록

서열목록 전자파일 첨부