(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년06월08일
(11) 등록번호 10-1866163
(24) 등록일자 2018년06월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 2565/125 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0032275
(22) 출원일자 2018년03월20일
심사청구일자 2018년03월20일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020170135340 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
재단법인 전남생물산업진흥원
전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)
(72) 발명자
김영욱
전라남도 장흥군 장흥읍 동교3길 53
최철웅
광주광역시 서구 풍암순환로 10 호반중흥1단지 아파트 105-203
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최석진

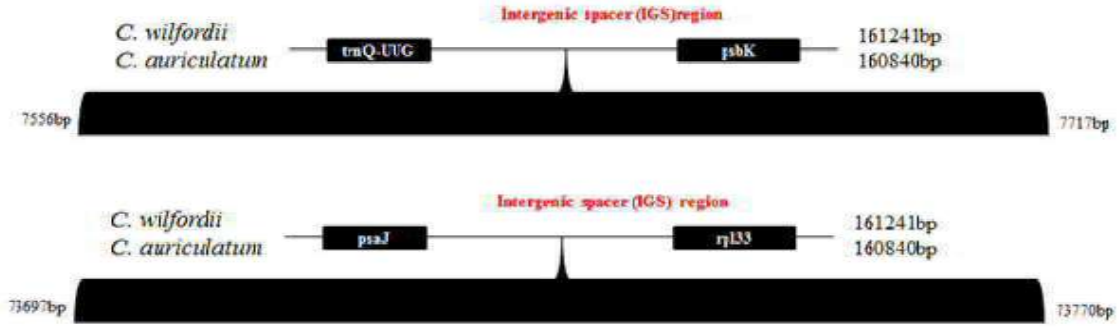
전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 이재영

(54) 발명의 명칭 **백수오와 이엽우피소 감별용 InDel 마커 및 이를 이용한 판별 방법**

(57) 요 약

본 발명은 감별용 분자 마커를 이용하여 백수오와 이엽우피소를 감별하는 마커 및 이를 이용한 감별방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 백수오와 이엽우피소 두 종의 엽록체 내의 InDel 부위를 탐색하여 종 특이적인 InDel 마커와 PCR 증폭을 통하여 두 종을 판별 할 수 있는 백수오와 이엽우피소 감별용 InDel 마커 및 이를 이용한 판별 방법을 제공한다. 이로부터 백수오와 이엽우피소의 원료 혼입시 정확하게 감별이 가능하다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/156 (2013.01)
(72) 발명자
성락선
전라남도 장흥군 장흥읍 북부로 39 (수창아트빌아파트) 203호
최학준
광주광역시 동구 동계로15번길 1-23 (동명동)
조아라
광주광역시 남구 백양로 39번길 7-2, 푸르지오 301호
신자원
전라남도 장흥군 장흥읍 진골목길 4, 리치빌 306호

(56) 선행기술조사문헌
JU HEE KIM ET AL. APPL BIOL CHEM VOL.60 NO.1 PP.79_86
EUN_HEUI HAN ET AL. MOL BIOL REP VOL.43 PP.232_332, 2016
KYU_HEON KIM ET AL. J. FOOD. HYG. SAF. VOL.30 NO.3 PP.289_294 (2015)
MIN_KYEOUNG KIM ET AL. JOURNAL OF MEDICINAL PLANTS RESEARCH VOL.7 NO.35 PP.2584_2589
KR1020170024388 A
RONG LI ET AL. PLOSONE 8(10):E78568

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트 또는 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트로 이루어지는 것을 특징으로 하는 백수오(*Cynanchum. wilfordii*)와 이엽우피소(*Cynanchum. auriculatum*)를 판별하기 위한 InDel 프라이머 세트

청구항 2

서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트 또는 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트와 증폭반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 것을 특징으로 하는 백수오(*Cynanchum. wilfordii*)와 이엽우피소(*Cynanchum. auriculatum*)를 감별하기 위한 InDel 프라이머 세트 조성물

청구항 3

대상 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계(가);

상기 (가)단계의 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 청구항 제1항의 프라이머 세트를 이용하여 중합효소연쇄반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계(나);

상기 증폭 산물을 겔 전기영동하여 DNA 단편의 크기를 확인하는 단계(다)로 이루어지는 것을 특징으로 하는 백수오(*Cynanchum. wilfordii*)와 이엽우피소(*Cynanchum. auriculatum*) 감별방법

청구항 4

청구항 제2항의 백수오(*Cynanchum. wilfordii*)와 이엽우피소(*Cynanchum. auriculatum*)를 감별하기 위한 InDel 프라이머 세트 조성물을 포함하는 것을 특징으로 하는 백수오(*Cynanchum. wilfordii*)와 이엽우피소(*Cynanchum. auriculatum*) 감별용 키트

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 판별용 분자 마커를 이용하여 백수오와 이엽우피소를 판별하는 마커 및 이를 이용한 판별방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 백수오와 이엽우피소 두 종의 엽록체 내의 InDel 부위를 탐색하여 종 특이적인 InDel 마커와 PCR 증폭을 통하여 두 종을 판별 할 수 있는 백수오와 이엽우피소 감별용 InDel 마커 및 이를 이용한 판별 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 백수오(Cynanchum wilfordii Hemsley)는 한국 중국 이남의 산이나 들의 양지바른 풀밭, 바닷가 경사지에 나는 박주가리과(또는 협죽도와 박주가리아과) 백미꽃속의 덩굴성 여러해살이풀로 백수오, 큰조롱, 은조롱이라고도 한다. 백수오는 동의보감이나 동의수세보원 등 많은 한의학 책에 약재로서 등록되어 있다. 특히, 동의수세보원에서는 약제할 때 하수오 대용으로 쓸 수 있다 라고 기록되어 있다.

[0004] 독성이 없고 갱년기 여성에게 좋다고 알려져 있는데 이는 백수오에 다량 함유되어 있는 프라그난(백수오 효능의 지표물질) 등의 항산화물질이 포함되어 있기 때문이다. 또한 백수오를 포함하는 복합추출물에는 퇴행성 관절염 개선, 유방암, 자궁내막암 등의 에스트로겐 활성에 따른 부작용이 없다는 사실이 과학적으로 입증되어 있을 뿐

만 아니라 그 효능에 대한 메커니즘이 규명되고 있다.

[0005] 한편, 백수오와 이엽우피소 모두 박주가리과(Asclepiadaceae) 백미꽃속(Cynanchum) 에 속하는 덩굴성 여러해살이 식물로 국내에서는 백수오 뿌리를 중국에서는 이엽우피소 뿌리를 약용으로 사용하며, 같은 백미꽃속에 속하는 친척이지만 종에서는 차이가 난다. 이엽우피소는 하수오(*Fallopia multiflora* Thunb. Haraldson)의 대체용 약재를 국내로 들어오기 시작했으며, 백수오와 혼용되면서 문제가 되었는데 그 원인은 다음과 같다.

[0006] 첫째, 국가에 따라 그 식물의 기원을 다르게 규정하여 사용하고 있다. 백수오의 기원식물로 중국의 중약대사전에는 은조롱, 이엽우피소 및 대근우 피소로 규정되어 있으나 우리나라의 대한 약전의 한약 규정집에는 기원식물로 은조롱 만이 규정되어 있다. 둘째, 국가마다 서로 다른 명칭을 사용하고 있다. 셋째, 백수오와 이엽우피소는 재배 단계에서는 꽃받침과 꼬투리의 형태적 차이를 육안으로 구분할 수 있지만, 건조·절단된 것은 육안으로 식별이 어렵기 때문이다. 특히, 백수오는 약용작물의 건조한 덩이 뿌리가 혼재되어 한약재로 유통되기 때문에 전문가들도 쉽게 구분이 어려워 한국의 유통시장에서는 혼,오용이 심각하다.

[0007] 최근에는 유통 중인 백수오 제품 중, 중국에서 수입되는 이엽우피소가 혼입되어 백수오 사용자와 공급자가 모두 피해를 입는 사건이 발생하였다. 백수오와 이엽우피소를 구분하기 위한 기술로 광학현미경을 이용하여 외부 및 내부 형태를 비교하여 구분하였으나 시중에 유통되고 있는 건조한 뿌리에 적용하는 경우 형태적 특성으로는 구분하기 어려운 점이 있다.

[0008] 이에 따라 분자생물학 분야의 급진적인 발전과 더불어 식물의 속, 종간 또는 종내 품종간 분류에 분자생물학적인 방법들이 다양하게 사용되고 있으며, 이를 위하여 핵산(DNA) 수준에서 유전자원의 다양성(genetic diversity) 연구를 가능케 하는 핵산 지문 분석 방법 및 다양한 DNA 마커들이 개발되고 있다. 분자생물학 수준에서의 DNA 분석에 의한 변종의 감별은 그 변종의 양적 수준과 더불어 다수의 특성을 파악할 수 있으며 환경의 영향을 배제할 수 있는 장점이 있다.

[0009] 분자생물학적 기술을 이용한 약용작물에 관한 연구는 초기에는 Random amplified ploymorphic DNA(RAPD), Sequence characterized amplified regions (SCARs) 기술을 이용하여 많은 연구가 진행되어 왔다.

[0010] RFLP(제한효소 단편 장다형, Restriction Fragment Length Polymorphism)는 일련의 DNA 사슬을 제한효소로 처리했을 때 생기는 DNA 단편들이 개체간의 유전적 조성의 차이, 즉 염기 서열상의 차이에 따라서 그 수나 길이가 서로 다르게 나타난다는 사실에 기초한 것으로써 다양하게 이용되고 있다. 그러나 RFLP는 순도가 높은 DNA가 다량으로 필요하며 시간과 노력과 비용이 많이 소요될 뿐 아니라 시험과정이 복잡하고 방사성 동위원소를 이용해야 하는 단점이 있다.

[0011] 이를 보완하기 위하여 SCARs 기술을 적용하여 하수오, 백수오와 이엽우피소의 판별용 마커를 개발하여 보고한 바 있다. 이 기술은 먼저 RAPD기술을 이용하여 하수오, 백수오와 이엽우피소에 특이적으로 나타나는 밴드를 클론하여 유전자 염기서열을 결정한 후 이들 유전자를 특이하게 증폭시킬 수 있는 프라이머를 제작하여 PCR로 판별이 가능하다.

[0012] 그러나 상기 방법들은 백수오와 이엽우피소를 판별하는 데 비특이적이거나 불특정한 염기서열을 포함하고 있어 불분명한 결과를 도출할 우려가 있어 보다 백수오와 이엽우피소의 판별에 특이적인 마커 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) 국내 공개특허공보 제10-2017-0024388호에는 단일염기다형성(Single Nucleotide Polymorphism)을 이용한 하수오, 백수오 및 이엽우피소의 판별을 마커에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 엽록체에 존재하는 TrnL, TrnF, matK 유전자 단편 유래의 특정 프라이머 세트를 이용하여 하수오, 백수오 및 이엽우피소의 판별마커 및 이의이용에 관하여 개시하고 있다.

(특허문헌 0002) 국내 등록특허번호 제10-1821040호에는 육안으로 구별하기 힘든 백수오(Cynanchum wilfordii Max. Hemsl.)와 이엽우피소(Cynanchum auriculatum Royle ex Wight)의 품종 판별용 바이오마커에 관한 것으로, 본 발명을 통하여 개발된 백수오와 이엽우피소 판별용 프라이머 세트를 포함하는 조성물은 실시간 분석법을 통하여 주형 DNA의 적은 양에서도 증폭이 가능한 것을 입증하였고, 프라이머 세트의 각 대상종의 짧은 단편을 증폭함으로써 DNA 손상을 유발하는 열처리와 같은 가공이 이루어진 식품에서도 적용이 가능할 것으로 예상되며, 이는 식품에 들어있는 백수오와 이엽우피소의 잘못된 표기와 혼입에 대한 대비가 가능한 백수오와 이엽우피소

판별용 바이오마커에 관하여 개시하고 있다.

(특허문헌 0003) 국내 등록특허번호 제10-1823340호에는 백수오(Cynanchum wilfordii Max. Hemsl.) 및 이엽우피소 (Cynacum auriculatum Royle ex Wight)의 종 판별용 대사체 마커에 관한 것으로, 구체적으로 백수오 및 이엽우피소에서 종 특이적으로 존재하는 대사체를 분석하여 선별된 백수오 및 이엽우피소의 종 판별용 대사체 마커 및 대사체 마커를 이용하여 백수오 및 이엽우피소의 종 판별이 가능한 백수오와 이엽우피소의 감별용 대사체 마커 및 이를 이용한 감별 방법에 관하여 개시하고 있다.

(특허문헌 0004) 국내 등록특허번호 제10-1300845호에는 백수오 및 이엽우피소의 감별 방법 및 그 키트는 백수오의 ITS에 존재하는 XcmI 제한효소 인식 부위와 이에 대한 이엽우피소의 대립 서열을이용하거나 백수오와 이엽우피소의 ITS 서열을 이용함을 특징으로 하는 백수오와 이엽우피소의 감별 방법 및 그 키트에 관하여 개시하고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 기존에 식품의약품안전처가 제공하는 식품 중 백수오와 이엽우피소 원료판별 시험법(제2018-26호) 및 선행 기술들은 백수오와 이엽우피소를 판별하는데 비특이적이거나 불특정한 염기서열을 포함하고 있어 이로 인해 원료 혼입시 불분명한 결과를 도출할 우려가 있는 문제점이 있어 본 발명은 백수오와 이엽우피소의 엽록체 전체 지놈 염기서열을 비교함으로써 두 종간의 차이를 명확하게 구분하여 InDel 마커를 제작과 이를 이용한 감별 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서 본 발명은 서열번호 1 및 서열번호 2 로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 프라이머 세트를 포함하는 것을 특징으로 하는 백수오(*Cynanchum. wilfordii*)와 이엽우피소(*Cynanchum. auriculatum*)를 판별하기 위한 InDel 프라이머 세트를 제공한다.

[0018] 또한 서열번호 1 및 서열번호 2 로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 프라이머 세트 및 증폭반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 것을 특징으로 하는 백수오(*Cynanchum. wilfordii*)와 이엽우피소(*Cynanchum. auriculatum*)를 판별하기 위한 InDel 프라이머 세트를 포함하는 조성물을 제공한다.

[0019] 또 다른 방법으로 대상 시료에서 게놈 DNA를 분리하는 단계; 상기 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고, 상기 제1항의 프라이머 세트를 이용하여 증폭반응을 수행하여 표적 서열을 증폭하는 단계; 및 상기 증폭 산물을 동정하는 단계로 이루어지는 것을 특징으로 하는 백수오(*Cynanchum. wilfordii*)와 이엽우피소(*Cynanchum. auriculatum*) 감별방법을 제공하며, 서열번호 1 및 서열번호 2 로 이루어진 프라이머 세트 또는 서열번호 3 및 서열번호 4로 이루어진 프라이머 세트 및 증폭반응을 수행하기 위한 시약을 포함하는 백수오(*Cynanchum. wilfordii*)와 이엽우피소(*Cynanchum. auriculatum*) 감별용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0021] 백수오와 이엽우피소 간의 SNP를 활용한 HRM 분석은 두 종간에 염기서열 차이가 없는 경우에 활용하는데 본 발명에서와 같이 백수오와 이엽우피소 엽록체 염기서열 간에 Insert/Deletion 영역을 통해 충분히 원료 혼입 시 정확하게 판별이 가능한 분자 마커를 개발 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 백수오와 이엽우피소 간에 차이를 보이는 Insert/Deletion 영역의 모식도를 나타낸다.

도면 2는 백수오(Cw1,2,3)와 이엽우피소(Ca1,2,3) 뿌리에서 추출한 genomic DNA를 주형으로 하여 서열번호 1과 2를 프라이머 세트로 PCR 증폭하여 염기서열을 분석한 결과를 나타낸다.

도면 3은 360bp 크기의 백수오 염기서열 정보이다.

도면 4는 250bp 크기의 이엽우피소 염기서열 정보이다.

도면 5는 백수오(Cw1,2,3)와 이엽우피소(Ca1,2,3)를 서열번호 1과 2를 프라이머 세트로 하여 아가로스 겔 전기영동 상의 PCR증폭한 결과이다.

도면 6은 백수오(Cw1,2,3)와 이엽우피소(Ca1,2,3) 뿌리에서 추출한 genomic DNA를 주형으로 하여 서열번호 3과 4를 프라이머 세트로 PCR 증폭하여 염기서열을 분석한 결과를 나타낸다.

도면 7은 249bp 크기의 백수오 염기서열 정보이다.

도면 8은 419bp 크기의 이엽우피소 염기서열 정보이다.

도면 9는 백수오(Cw1,2,3)와 이엽우피소(Ca1,2,3)를 서열번호 3과 4를 프라이머 세트로 하여 아가로스 겔 전기영동 상의 PCR증폭한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명에 따른 InDel (insertion/deletion) 마커는 생물의 DNA의 염기배열에서 일부 염기가 중간에 삽입되거나(insertion) 결실된(deletion) 변이를 총칭하는 용어로, 서로 다른 종 또는 품종 간에 유전체 정보를 비교하여 염기가 삽입(insertion) 또는 결실(deletion)된 영역을 찾고, 그 정보를 바탕으로 프라이머를 제작한 뒤 PCR 기술을 이용하여 DNA를 증폭시키고 그 패턴을 분석함으로써 특정 품종을 식별할 수 있다.

[0025] 통상적으로 식물의 엽록체 게놈은 한 개의 세포에 동일한 엽록체 게놈이 수백 개 이상 존재하여 핵 게놈에 비해 상대적으로 분석이 용이하고, 양친 유전자간의 교잡 없이 모계 유전을 통해서만 후대로 전이되어 종내 변이가 거의 없기 때문에 특정 종 혹은 동일 종내 특정 계통을 구분하는 마커로서 가장 신뢰할 수 있으면서도 신속하게 분석할 수 있는 마커이다.

[0026] 본 발명은 서열번호 1 및 2의 프라이머 세트 또는 서열번호 3 및 4의 프라이머 세트로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 백수오와 이엽우피소 감별용 InDel 프라이머 세트를 제공한다. 이하, 하기의 실시예를 통하여 본원발명을 보다 상세히 설명하고자 한다.

[0028] **실시예1. 백수오(*C. wilfordii*)및 이엽우피소(*C. auriculatum*) 감별용 프라이머 디자인 및 마커선발**

[0029] 본 발명을 위하여 NCBI의 genebank에 등록되어 있는 백수오와 이엽우피소의 전체 엽록체 지놈인 약 160Mbp 크기의 염기서열들을 Mega 7.0 소프트웨어로 재배열하여 두 종간에 구분이 되는 Insert/Deletion 영역을 탐색하였다. 하기의 표 1은 NCBI Genebank에 등록되어 있는 백수오와 이엽우피소 엽록체 지놈 정보를 나타낸다.

표 1

[0030] NCBI Genebank에 등록되어 있는 백수오와 이엽우피소 엽록체의 지놈 정보

No.	Species	Source	Accession number Chloroplast genome
1	*C. wilfordii*	*Lab. of Functional Crop Genomics & Biotechnology, Department of Plant Sciences College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Korea*	*NC029459*
2			*KT220733*
3	*C. auriculatum*	*Lab. of Functional Crop Genomics & Biotechnology, Department of Plant Sciences College of Agriculture and Life Sciences, Seoul National University, Korea*	*NC029460*
			KT220734
4		*Department of Herbal Crop Research, National Institute of Horticultural and Herbal Science, Rural Development Administration, Eumseong, Korea*	*KU900231*

[0031] 두 종간에 구분이 되는 Insert/Deletion 영역을 탐색한 결과, 도 1에 도시된 바와 같이, 엽록체 내 trnQ-UGG와 psbK 유전자 사이의 IGS 영역에서 백수오와 이엽우피소 간에 170bp의 차이를 보이는 InDel 영역과 psaJ와 rpl33 유전자 사이의 IGS 영역에서 백수오와 이엽우피소 간에 93bp의 차이를 보이는 InDel 영역이 존재함을 확인하였다.

[0032] 하기의 표 2는 백수오와 이엽우피소에 특이적인 프라이머 세트를 나타낸다. 본 발명에 따른 '프라이머'는 그 서열과 상보적인 염기서열을 갖는 주형과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 상기 본 발명의 프라이머 세트는 InDel 마커의 증폭을 위하여

각각 정방향(forward) 및 역방향(reverse) 프라이머로 구성되어 있다.

표 2

[0033] 백수오와 이엽우피소에 특이적인 프라이머 세트

서열번호	타겟부위	방향	서열
1	intergenic spacer (IGS) region (Chloroplast trnQ-UUG-psbK)	정방향	5 '-CACCGTTATTTCCTCCGTTGATA-3'
2		역방향	5 '-CCTTACCGAGCATTTGCGA-3'
3	intergenic spacer (IGS) region(Chloroplast psaJ-rpl33)	정방향	5 '-AAACCCGTTGCCTTACC-3'
4		역방향	5 '-AGATTGGAGTTGACAAATAACG-3'

[0034] 생물정보학적 분석을 통해 확인한 InDel 부위에서 백수오와 이엽우피소를 감별할 수 있는 분자마커를 개발하기 위해 종 특이적인 프라이머 세트를 NCBI에서 제공하는 PrimerBLAST tool을 이용하여 이론적 검증을 실시하였고, 각 InDel 부위에 종 특이적인 프라이머 세트를 제작하였다 .

[0036] **실시예 2. PCR을 이용한 DNA 증폭 및 백수오와 이엽우피소의 판별**

[0037] 강원약초로부터 구입한 말린 백수오(Cynanchum. wilfordii)및 이엽우피소(Cynanchum. auriculatum)의 뿌리를 액체질소를 이용하여 분말화 하였고, Qiagen사의 DNeasy Plant Mini Kit를 사용하여 매뉴얼에 따라 Genomic DNA를 추출하였다.

[0038] PCR은 상기 표 2의 프라이머 세트 서열번호 1 및 2 또는 3 및 4를 한 세트로 하여 genomic DNA PCR을 실시하였으며, PCR 증폭 조건은 총 50㎕에 0.25㎕의 Taq polymerase (5 units/㎕) (Ex taq™, TaKaRa, Japan), 5㎕의 10X Ex Taq buffer, 4㎕의 dNTP Mixture (2.5mM), 30 ng의 genomic DNA와 1㎕ (10pM)의 프라이머 세트를 혼합하여 나머지는 멸균된 증류수를 분주하였다.

[0039] 95℃에서 5분간 초기 변성 후, 95℃에서 30초, 55℃에서 20초, 72℃에서 30초간 40회 반응시킨 후 72℃에서 5분간 신장 반응을 PCR thermal cycler(BIORAD, USA)에서 진행하였다. 증폭된 DNA 단편을 확인하기 위해 PCR 증폭 산물은 1.5% agarose gel에 40분간 loading하여 UV illuminator로 확인하였다.

[0041] **가) 서열번호 1, 2를 이용한 백수오와 이엽우피소의 감별**

[0042] 도 2는 백수오(Cw1,2,3)와 이엽우피소(Ca1,2,3) 뿌리에서 추출한 genomic DNA를 주형으로 하여 서열번호 1 및 2를 프라이머 세트로 PCR 증폭하여 염기서열을 분석한 결과를 나타낸다. 도 3은 엽록체 DNA 중 trnQ와 psbK 사이의 intergenic spacer (IGS) 영역인 7556bp와 7717bp 사이의 360bp 크기의 백수오 염기서열 정보를 나타내고 도 4는 250bp 크기의 이엽우피소 염기서열 정보를 나타낸다.

[0043] 도 5는 백수오(Cw1,2,3)와 이엽우피소(Ca1,2,3)를 서열번호 1과 2를 프라이머 세트로 하여 아가로스 겔 전기영동 상의 PCR증폭한 결과이다. 도 2 내지 도 5를 살펴보면 multiple alignment하였을 때 백수오는 342 또는 360bp, 이엽우피소는 249 또는 250bp의 증폭산물을 확인할 수 있었다. 이는 백수오와 이엽우피소 간에 93에서 111bp의 InDel 영역에 의한 크기 차이를 나타낸다는 것으로 사료된다.

[0045] **나) 서열번호 3, 4를 이용한 백수오와 이엽우피소의 감별**

[0046] 도 6은 백수오(Cw1,2,3)와 이엽우피소(Ca1,2,3) 뿌리에서 추출한 genomic DNA를 주형으로 하여 서열번호 3과 4를 프라이머 세트로 PCR 증폭하여 염기서열을 분석한 결과를 나타낸다. 도 7은 엽록체 DNA 중 psaJ와 rpl33 사이의 intergenic spacer (IGS) 영역인 73697bp와 73770bp 사이의 249bp 크기의 백수오 염기서열 정보를 나타내고 도 8은 419bp 크기의 이엽우피소 염기서열 정보이다. 도 9는 백수오(Cw1,2,3)와 이엽우피소(Ca1,2,3)를 서열번호 3과 4를 프라이머 세트로 하여 아가로스 겔 전기영동 상의 PCR 증폭한 결과이다.

[0047] 도 6 내지 9를 종합하면 multiple alignment하였을 때 백수오는 249bp, 이엽우피소는 419bp의 증폭산물을 확인할 수 있었다. 이는 백수오와 이엽우피소 간에 170bp의 InDel 영역에 의한 크기 차이를 나타낸다는 것을 볼 수 있다.

[0048] 상기 결과를 통해 백수오와 이엽우피소를 종 특이적인 InDel 마커를 통해 PCR 기법으로 간편하고 정확하게 감별이 가능함을 확인하였으며, 본 발명의 방법을 통해서 백수오 시료에서 이엽우피소의 원료 내 혼입여부를 간편하고 정확하게 판별이 가능하다.

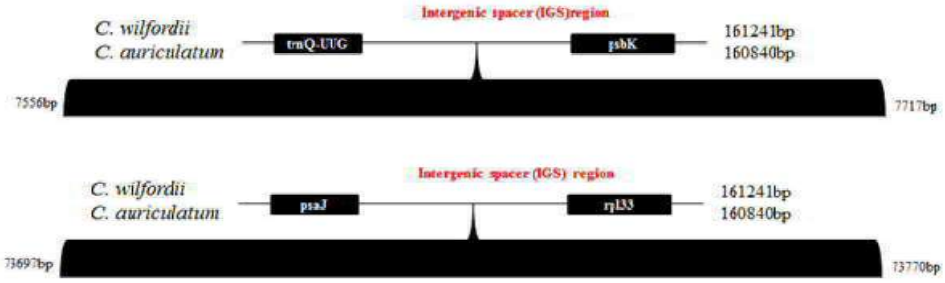
[0049]

산업상 이용가능성

[0050] 기존에 백수오와 이엽우피소가 혼입되면서 발생한 소비자들의 구매 불안을 해결함과 동시에 공급자가 구매되어 혼입된 백수오와 이엽우피소를 보다 간편하고 정확하게 감별할 수 있어 감별에 따른 시간소요 및 수고를 줄일 수 있으므로 이를 이용한 식품, 제품 개발에 대한 노력을 증가시킬 수 있으므로 산업상 이용가능성이 있다.

도면

도면1



도면2

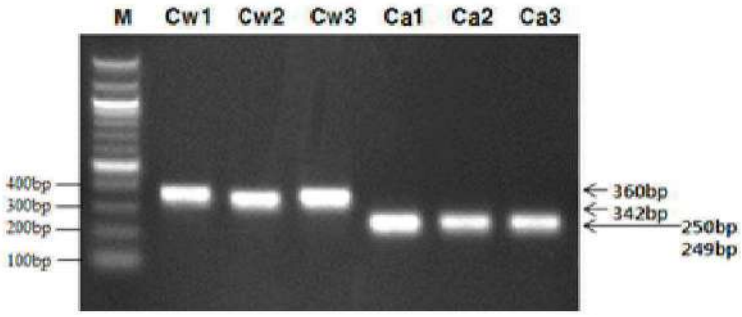
도면3

CACCGTTATTTCCTCCGTTGATATACACAATTTTCTGCCCAGTTCATCTTTTTTTTTTGTCTCATTTAACAGATCAT
ATAATAAACATATATCATATAATAAACATATATTAACATATAATAATATATAATTAATATATAATATATAATTAATATATA
ATATATAATTAATATATAATATATAATAATAGTTAAAATATAATATATAAAATATAATATATAAAATATAATATATAATAATATA
ATAATATTAGTTAAATAATAATATAACATATATTAACATATAATAATAGTAAAAGCCTTGTATACATATAAATATACAT
ATAAAAAAAGAAATGAGTATTTTTCGCAAATGCTCGGTAAGG

도면4

CACCGTTATTTCCTCCGTTGATATACACAATTTTCTGCCCAGTTCATCTTTTTTTTTTGTCTCATTTAACATTTAAC
AGATCATATAATAAACATATATTAACATATAACATATAATAATATATAATAATTAATAATAGTTAAATAATAATATAAC
ATATATTAACATATAATAATAGTAAAAGCCTTGTATACATATAAATATACATATAAAAAAAGAAATGAGTATTTTTC
GCAAATGCTCGGTAAGG

도면5



도면6

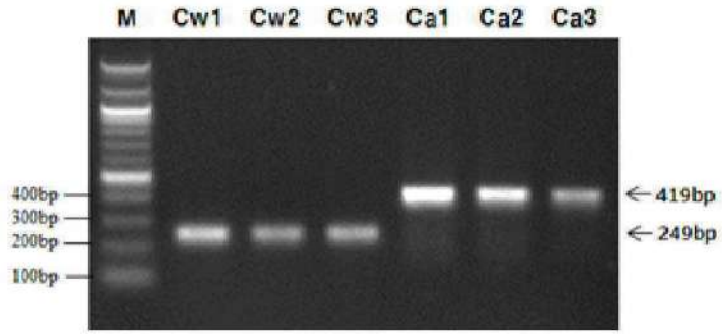
도면7

AAACCCGTTGCCTTACCACTTGGCCACGCCCCATTTCGATTTCTATTCGATACTACTTTCGATACTACTAAATAAA
GTATAATTATAAAGTATAATTAATTAGTATATAATTATATAATTAATTATAATTAGTAATTACTATTTAATATTTAAATA
TTTTTTGAAATATTTTTCATTTAAAATTTTAATTAATTAAAATTTTAATTAATATAAATTAATATAATATTCGTTATTT
GTCAACTCCAATCT

도면8

AAACCCGTTGCCTTACCACTTGGCCACGCCCCATTTCGATTTCTATTCGGTACTACTTTCGTAGTACTAAATTTTC
GATACTACTAAATAAAGTAAATTAAATAAATAAATAAAGTAAATTAAATAAAGTATAATTAATTATTATATTAATTA
TTATATAATTAATTTATATAATAAATTAGTATATATAGTATATATATAGTATATATATATATAAATATATAATTAATTATAA
TTAGTAATTATAATTACTATAATTACTATTTAATATTTTATTAATTAATATTTTATTAATTTTAATTTAATTTAAAAAAATTA
AAAATTAAATAGTGAAATTTAGAGTTATAAATTTCTAGTTATTAGTTATTAATATAATATATTATTATTATATTATAAT
ATTCGTTATTTGTCAACTCCAATCT

도면9



서 열 목 록

<110> JEONNAM BIOINDUSTRY FOUNDATION

<120> InDel markers for discrimination of Cynanchum wilfordii Mas. Hemsley. and Cynanchum auriculatum Royle ex Wight and method for use thereof

<130> p18-009

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 1

caccgttatt tcctccgttg ata 23

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 2

ccttaccgag catttgcga 19

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 3

aaacccgttg ccttacc 17

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 4

agattggagt tgacaaataa cg 22