(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0058077
(43) 공개일자 2009년06월09일

(51) Int. Cl.
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 15/90* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0124701
(22) 출원일자 2007년12월04일
심사청구일자 2007년12월04일

(71) 출원인
충북대학교 산학협력단
충청북도 청주시 흥덕구 개신동 12
강원대학교산학협력단
강원 춘천시 효자동 192-1 강원대학로 42
(72) 발명자
김명동
강원 춘천시 석사동 727-5(22/7)
엄현주
충북 청원군 오창면 각리 중앙하이츠 209-804
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 생물체 정보의 염색체 내 표지 방법 및 그 정보가 표지된생물체

(57) 요 약

본 발명은 생물체의 다양한 정보를 생물체에 삽입하여 표지하는 방법, 그 방법에 의해 정보가 삽입된 생물체 및 그 정보의 가독 방법에 관한 것으로, 생물체의 고유 정보가 DNA 염기 서열 또는 RNA 염기 서열로 암호화되어 유전자 전달 시스템을 통해 생물체의 염색체 DNA 내에 삽입되어 표지되는 것을 특징으로 하는데, 생물체 고유 정보가 생물체 내의 염색체 DNA에 삽입됨으로 말미암아, 발효에 의해서 또는 인위적 수단에 의해 소실이 되지 않고, 호스트-벡터 시스템이 구비되어 있지 않은 미생물에 대해서도 범용적으로 사용될 수 있어, 생물체의 고유 정보를 생물체 자체로부터 명확하게 제공할 수 있고, 각고의 노력으로 개발한 생물체를 도난당하였을 경우, 이를 추적하여 확인할 수 있으며, 생물체가 오·남용되어 심각한 문제를 발생하였을 때 그 책임 출처를 명확히 밝힐 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

박은희

강원 춘천시 우두동 1060-10 서울주방3층

한남수

충북 청주시 흥덕구 가경동 대우푸르지오 아파트 503동 1802호

특허청구의 범위

청구항 1

생물체의 고유 정보가 DNA 염기 서열 또는 RNA 염기 서열로 암호화되어 유전자 전달 시스템을 통해 생물체의 염색체 DNA 내에 삽입되는 것을 특징으로 하는 생물체 정보의 표지 방법

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 유전자 전달 시스템은,

트랜스포존 시스템인 것을 특징으로 하는 생물체 정보의 표지 방법

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 생물체의 고유 정보는,

생물체의 개개 정보가 서로 독립적인 복수 개의 DNA 염기 서열 또는 RNA 염기 서열로 암호화되어 있는 것을 특징으로 하는 생물체 정보의 표지 방법

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 생물체는,

세균, 곰팡이, 곤충, 동물세포, 동물, 식물세포 및 식물 중 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 생물체 정보의 표지 방법

청구항 5

제1항의 방법에 의해 생물체의 고유 정보가 DNA 염기 서열로 염색체 DNA 내부에 삽입된 생물체

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 생물체는,

세균, 곰팡이, 곤충, 동물세포, 동물, 식물세포 및 식물 중 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 생물체

청구항 7

제1항의 방법에 의해 생물체 고유 정보가 DNA 염기 서열로 암호화되어 염색체 DNA 내부에 삽입된 생물체로부터 PCR을 통해 암호화된 DNA 염기 서열을 증폭하여 PCR 산물을 획득하는 단계(a);

증폭된 PCR 산물의 염기서열을 분석하는 단계(b);

분석된 염기서열을 인식표와 비교하여 암호를 해독하는 단계(c);를 포함하는 것을 특징으로 하는 생물체의 정보가 표지된 생물체로부터 생물체 정보를 가독하는 방법

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 PCR은,

프라이머로 서로 독립적으로 작용하는 복수 개의 정방향 및 역방향 프라이머 세트를 사용하는 것을 특징으로 하는 표지된 생물체로부터 생물체 정보를 가독하는 방법

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 단계(c)의 암호 해독은,

컴퓨터 프로그램을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는 표지된 생물체로부터 생물체 정보를 가독하는 방법

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 생물체의 고유 정보를 생물체에 삽입하여 표지하는 방법, 그 방법에 의해 고유 정보가 삽입된 생물체 및 그 정보의 가독 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 생명공학이 발달함에 따라, 종래의 사용되던 생명체에 비해 좋은 특성들이 부여된 생명체들이 최근에 많이 개발되고 있다. 생명체의 예로는 세포 단위인 미생물, 동물세포, 식물세포 및 세포들의 집합체인 고등 미생물, 동물, 식물 등이 있다.

<3> 미생물은 종래부터 전통적인 발효식품에 많이 활용되어 왔는데, 근자에는 폐수처리, 의약 단백질의 생산, 각종 유용 물질의 생산 등에 광범위하게 활용되고 있다.

<4> 동물세포는 미생물이 아우를 수 없는 인체를 대상으로 하는 단백질의 생산 및 항체의 생산 등에 많이 사용되고 있으며, 쥐를 비롯한 여러 실험 동물은 암 등의 인간 질병에 대한 연구에 많이 활용되고 있다.

<5> 식물세포는 생리활성이 우수한 식물 유래의 여러 화합물의 생산에 활용되고 있으며, 유전자 재조합 방법에 의해 잡초에 대한 내성 또는 냉해에 대한 내성이 부여된 식물들도 많이 개발되고 있다.

<6> 그런데, 이와 같이 형질이 전환된 여러 생물체들은 그 특성상 모 생물체에 대해 외관상 식별이 용이하지 않은데, 이로 말미암아 실질적으로 형질 전환 생물체인지 여부(identity)에 대해 신속하고 명확하게 결정할 수 없는 난점이 있다. 이와 같은 난점은 여러 문제를 야기하는데, 그 예로는 다음과 같은 것이 있다.

<7> 첫째, 각고의 노력으로 개발한 생물체를 도난당하였을 경우, 이를 추적하기가 용이하지 않고, 설사 해당 생물체로 의심이 가는 생물체를 찾았다 하더라도 이것이 도난당한 것인지 여부를 용이하게 확인할 수 없다.

<8> 둘째, 생물체가 오·남용되어 심각한 문제를 발생하였을 때 그 책임 출처를 명확히 밝힐 수 없다.

<9> 셋째, 생물체를 정상적으로 입수하여 사용하고자 하는 자에 대해서 심각한 타격을 입힐 수 있다. 즉, 공급처의 착오로 사용자가 원했던 생물체가 아니라, 유사한 형질의 생물체가 대체 지급되었을 경우, 그 생물체가 실질적으로 본인이 원한 생물체인지 여부를 명확히 확인할 수가 없는 관계로, 사용자에게 시간적 및 경제적으로 심각한 타격을 입힐 수 있다.

<10> 이와 같은 문제로 인하여, 생물체의 내부에 생물체의 고유 정보를 담을 수 있는 방법의 개발이 요구되나, 생물체라는 특성상 생물체의 정보를 표지할 수 있는 방법이 그리 용이한 것은 아니다.

<11> 한편, 대한민국 공개특허 특1999-0074315(공개일자: 1999년10월05일)호에 "DNA 염기 서열을 이용한 미생물에의 표지 부착방법에 관한 것으로, 원하는 이름표의 영문 문자열에 해당하는 DNA 염기 서열을 제작하는 단계; 제작된 문자열 염기 서열을 리게이션시켜 일련의 문자열을 만드는 단계; 문자열의 양쪽에 PCR(Polymerase Chain Reaction)용 프라이머(primer)를 부착하고 그 바깥쪽에 적당한 벡터와 리게이션할 수 있는 리스트릭션 사이트(restriction site)를 붙이는 단계; 이를 제한 효소로 처리하여 스티키 엔드(sticky end)를 만드는 단계 ; 이를 동일한 제한 효소로 처리된 벡터에 삽입하는 단계; 벡터를 원하는 미생물에 형질전환시키는 단계를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하여, 생물학적 오염물질의 해당 생물 폐기물에 이름표를 부착하게 하거나 개발한 기관의 영문 명칭을 표지할 수 있게 함으로써 해당 영문 명칭을 알아낼 수 있어 폐기물 등의 책임소재를 밝힐 수 있을 뿐만 아니라, 새로운 유전자를 클로닝한 플라즈미드나 벡터를 개발하였을 때에도 이름표를 부착하여 그 소유권을 명시할 수 있어 미생물 이용과 관련된 분쟁의 소지를 미연에 방지할 수 있는 DNA 염기 서열을 이용한 미생물

에의 표지 부착방법"이 개시되어 있다.

<12> 상기 공개특허의 핵심은 원하는 이름표의 영문 문자열에 해당하는 DNA 염기서열을 벡터에 삽입한 후, 이를 미생물에 삽입하여 형질전환하는 것을 특징으로 한다.

<13> 그런데, 상기 공개특허는 다음과 같은 치명적인 문제를 안고 있다.

<14> 첫째, 벡터(플라스미드)가 세포질 내에 내포된 형태로 형질전환된 미생물들은 발효가 진행됨에 따라 벡터가 빠져버리는 현상이 나오는데, 이와 같이 발효에 의해서, 더 이상 표지가 미생물에 존재하지 못하게 되는 문제가 발생한다.

<15> 둘째, 내부에 존재하는 벡터를 악의적으로 빼고 미생물을 사용할 경우, 그 미생물의 소유처를 밝힐 수 없다.

<16> 셋째, 상기 공개특허의 방법과 같이 벡터(플라스미드)를 이용하여 미생물을 형질전환하는 경우, 해당 미생물에서 작동할 수 있는 벡터 시스템이 구비되어 있어야 하는데, 이와 같이 호스트-벡터 시스템이 구비되어 있는 미생물은 자연계에 몇 종이 안 되기 때문에 범용적으로 사용할 수 없는 문제가 있다.

<17> 넷째, 실질적으로 산업적으로 유용한 균주들은 돌연변이를 통해 이루어진 것들이 많이 있고, 이와 같이 돌연변이를 통해 형질이 전환된 균주들은 대부분 벡터 시스템이 개발되어 있지 않는데, 상기 공개특허의 방법은 이와 같이 종래에 존재하는 유용한 균주들에 대해서는 적용이 될 수 없는 문제가 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<18> 이에 본 발명은 모든 미생물에 대해서 범용적으로 적용이 가능하고, 인위적으로 생물 정보 표지를 뺄 수 없는 새로운 방법을 개발하여 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

<19> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 생물체의 고유 정보가 DNA 염기 서열 또는 RNA 염기 서열로 암호화되어 유전자 전달 시스템을 통해 생물체의 염색체 DNA 내에 삽입되는 것을 특징으로 하는 생물체 정보의 표지 방법을 제공한다(도 1 참조).

<20> 본 발명의 방법은 생물체의 고유 정보가 DNA 염기 서열 또는 RNA 염기 서열로 암호화되어 생물체의 염색체 DNA 내에 삽입되는 것에 특징이 있다. 생물체의 염색체 DNA 내에 생물체 고유 정보가 삽입되면, 염색체 DNA에 염기서열로 암호화 된 생물체 정보가 도입되므로, 플라스미드를 이용한 기존의 유전자 형질전환기술에 비하여 도입된 유전자가 배양 중 소실되지 않고 안정적으로 유지되는 장점이 있다. 즉, 플라스미드 셔틀벡터 시스템의 경우는 세포증식과정에서 안정성(segregational stability)이 떨어지는 문제점이 발생되어 세대가 반복되면 벡터가 소실되는 치명적인 문제점이 발생되는데, 본 발명의 방법은 특정 염기 서열이 숙주세포의 염색체 DNA 내로 삽입되기 때문에 이와 같은 문제점이 발생되지 않는 중요한 장점이 발휘되는 것이다.

<21> 또한, 플라스미드 벡터 형태인 경우 고의적으로 해당 플라미스미드 벡터를 균주 밖으로 뺄 수가 있는데, 본 발명에서와 같이 생물체의 염색체 DNA 내에 특정 염기 서열로 암호화된 생물체 정보를 삽입하면, 이와 같은 악의적 행위를 방어할 수 있다.

<22> 한편, 본 발명은 생물체의 고유 정보를 DNA 염기 서열 또는 RNA 염기 서열로 암호화하여 생물체의 염색체 DNA 내에 삽입하는데, DNA 염기 서열의 경우는 별도의 고려 없이 통상의 유전자 전달 수단을 통해 염색체 DNA 내부로 삽입할 수 있으나, RNA 염기 서열을 사용하는 경우에는 이를 DNA로 전환해 주는 역전사 효소의 사용 등을 별도로 고려해 주어야 하는데, 이와 같은 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 사용할 수 있다.

<23> 한편, 본 발명에 있어서 생물체의 고유 정보는 생물체 내에 대한 각종 유용한 정보들이 될 수 있는데, 일 예로는 기탁자 또는 권리자, 발명자, 기탁일자, 주요 형질전환 요소, 취급시 주의사항 등이 있을 수 있다.

<24> 한편, 본 발명에 있어서 유전자 전달 시스템은, 본 발명이 염색체 DNA 내에 특정 염기 서열로 암호화된 생물체 정보를 표지하는 것에 특징이 있으므로, 호스트(숙주, 균주) 내의 염색체 DNA 내에 외래 유전자를 삽입할 수 있는 방법이라면, 유전공학적인 방법으로 널리 알려진 어느 방법을 사용하여도 무방하나, 바람직하게는 트랜스포존 시스템을 사용하는 것이 좋다. 트랜스포존 시스템은 특정 유전자를 숙주의 염색체 내에 무작위로 도입할 수 있는 방법으로, 미생물, 동물세포, 식물세포에 모두 적용 가능하다(Insect Molecular Biology (2007), **16**(1),

37-47; Plant Physiology Preview. Published on November 9, 2007, as DOI:10.1104/pp.107.111427, the American Society of Plant Biologists; 형질전환 누에를 이용한 락토페린의 생산 및 기능성 연구, 농림부, 2005)

<25> 본 발명에서와 같이 트랜스포존 시스템을 사용하면, 실험자라 하더라도 삽입 염기 서열이 염색체 DNA 내의 어디에 삽입되는지를 알 수가 없는 특징이 있다. 이와 같이 염기 서열로 암호화된 특정 정보의 삽입 위치가 노출되지 않으면, 누구도 삽입 위치를 알 수 없기 때문에 임의로 삭제할 수 없는 장점이 발생한다.

<26> 한편, 염색체 DNA에 염기 서열을 삽입한 자는 PCR시 특정 프라이머가 붙을 수 있는 주형(template)의 특정 염기 서열을 인식하고 있기 때문에 PCR을 통해 염기 서열로 암호화된 생물체 정보의 도출에는 전혀 문제가 없다. 이때, 생물체의 고유 정보를 공개가 가능한 것과 공개가 불가능한 것으로 나누어, 서로 독립적인 복수 개의 DNA 염기 서열 또는 RNA 염기 서열로 암호화하여, 생물체의 염색체 DNA 내부에 삽입하면, 공개의 대상 및 수위를 조절할 수 있다. 즉, 공개가 되어도 무방한 정보들을 PCR할 수 있는 PCR 프라이머는 공개하고, 공개가 절대 불가한 정보들에 대한 PCR 프라이머는 절대 공개하지 않아 공개의 대상 및 수위를 조절할 수 있는 것이다.

<27> 한편, 본 발명의 트랜스포존 시스템을 이용하는 표지 방법은 대부분의 숙주세포 염색체 DNA에 무작위로 삽입되기 때문에, 그 활용범위가 생화학적 또는 유전학적 정보가 알려지지 않은 미지의 대상 미생물을 포함하는 거의 모든 숙주세포를 대상으로 할 수 있고, 특히 유전자 재조합 시스템이 구축되지 않은 균주에 사용할 수 있는 강력한 장점이 있다.

<28> 한편, 본 발명에 있어서, 상기 생물체는 세균, 곰팡이, 곤충, 동물세포, 동물, 식물세포 및 식물 중 선택되는 어느 것에도 적용이 가능하다. 이들 생물체는 전부 염색체 DNA를 가지고 있고, 이 염색체 DNA에 특정 염기 서열을 무작위로 삽입할 수 있는 유전자 전달 시스템(일 예로서, 트랜스포존 시스템)이 공지되어 있기 때문이다. 이때, 동물 또는 식물은 특정 염기 서열로 암호화된 생물 정보가 도입된 동물세포 또는 식물세포를 이식하는 방법으로 특정 염기 서열로 암호화된 생물 정보를 도입할 수 있다.

<29> 한편, 본 발명은 본 발명의 특허청구범위 제1항에 기재된 방법에 의해 생물체의 고유 정보가 염색체 DNA 내부에 삽입된 생물체를 제공하는데, 이 생물체의 바람직한 예로는 세균, 곰팡이, 곤충, 동물세포, 동물, 식물세포 및 식물 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

<30> 한편, 본 발명은 본 발명의 특허청구범위 제1항에 기재된 방법에 의해 생물체 고유 정보가 DNA 염기 서열로 암호화되어 염색체 DNA 내부에 삽입된 생물체로부터 PCR을 통해 암호화된 DNA 염기 서열을 증폭하여 PCR 산물을 획득하는 단계(a); 증폭된 PCR 산물의 염기서열을 분석하는 단계(b); 분석된 염기서열을 인식표와 비교하여 암호를 해독하는 단계(c);를 포함하는 것을 특징으로 하는 생물체의 정보가 표지된 생물체로부터 생물체 정보를 가독하는 방법을 제공한다.

<31> 본 발명의 가독 방법은 본 발명의 특허청구범위 제1항에 기재된 방법에 의해 생물체 고유 정보가 DNA 염기 서열로 암호화되어 염색체 DNA 내부에 삽입된 생물체로부터 PCR을 통해 암호화된 DNA 염기 서열을 가독하는 것이다.

<32> PCR시에 사용될 프라이머는 정방향 및 역방향의 프라이머로 구성되는데, 생물체 고유 정보를 DNA 염기 서열로 암호화할 경우, 5'말단 및 3'말단 부분에 존재하는 염기서열의 상보적 시퀀스이다. 이 프라이머 시퀀스는 생물체 고유 정보를 염기 서열로 디자인할 경우에 인지 가능한 것으로, 생물체 고유 정보를 DNA 서열로 디자인하는 자 또는 그로부터 지득한 자는 인지하고 있는 사항이다.

<33> 특정 주형에 대한 정방향 및 역방향의 프라이머 제작은 당업계의 프라이머 제작 기술로부터 용이하게 수행할 수 있으므로 그에 관한 구체적인 설명은 생략한다(Dieffenbach CW ,Dveksler GS. 1995. PCR primer: a laboratory manual, New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; New England Biolabs Inc., 2007-08 Catalog & Technocal Reference).

<34> 한편, 본 발명의 가독 방법에 있어서, PCR은 프라이머로 서로 독립적으로 작용하는 복수개의 정방향 및 역방향 프라이머 세트를 사용하는 것이 좋다. 이와 같은 경우에 특정 프라이머는 비공개로 하여 특정의 자 외에는 PCR이 불가능하게 하여 특정 정보를 가독하지 못하게 할 수 있고, 특정 프라이머는 공개로 하여 누구든지 PCR이 가능하게 하여 특정 정보를 가독할 수 있게 하는 등 정보의 종류에 따라 공개의 대상 및 수위를 조절할 수 있기 때문이다.

<35> 한편, 본 발명의 가독 방법은 PCR 산물을 획득하는 단계(a) 후, 증폭된 PCR 산물의 염기서열을 분석하는 단계

(b)를 포함하는데, 단계(b)는 증폭된 PCR 산물의 염기서열을 분석(소위 '시퀀싱')하는 단계이다. 시퀀싱은 유전공학적으로 널리 알려진 방법을 통해 수행되며, 현재 이에 관한 기술은 외주 처리를 받아 시퀀싱을 해주는 업체가 많이 존재하는 등 널리 알려져 있다.

<36> 한편, 본 발명의 가독 방법은 증폭된 PCR 산물의 염기서열을 분석하는 단계(b) 후, 분석된 염기 서열을 인식표와 비교하여 암호를 해독하는 단계(c)를 포함하는데, 단계(c)는 분석된 염기 서열을 별도 제공된 인식표와 대비하여 그 암호를 해독한다. 이때, 바람직하게 단계(c)의 암호 해독은 컴퓨터 프로그램을 통해 수행되는 것이 좋다.

효 과

<37> 이상 상기에서 살펴본 본 발명은, 생물체 고유 정보가 생물체 내의 염색체 DNA에 삽입됨으로 말미암아, 발효에 의해서 또는 인위적 수단에 의해 소실이 되지 않고, 호스트-벡터 시스템이 구비되어 있지 않은 미생물에 대해서도 범용적으로 사용될 수 있는 특징이 있다.

<38> 이와 같은 특징으로 말미암아 본 발명은 생물체의 고유 정보를 카다로그 등 별도의 매체가 아닌 생물체 자체로부터 명확하게 제공할 수 있고, 각고의 노력으로 개발한 생물체를 도난당하였을 경우, 이를 추적하여 확인할 수 있으며, 생물체가 오·남용되어 심각한 문제를 발생하였을 때 그 책임 출처를 명확히 밝힐 수 있는 효과가 발휘된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<39> 이하, 본 발명의 내용에 대해 하기 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

<40> **실시예 1: 생물체 정보가 삽입된 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*) 균주의 제조**

<41> **① 특정 DNA 염기 서열 결정**

<42> 먼저 생물체 고유 정보를 도 2에 기재된 암호표(인식표)에 따라 DNA 염기 서열로 암호화하여 총 39×3=117bp의 염기서열을 결정하고, 합성하였다.

<43> **· 균주명: *Ln. citreum***

<44> GGC GTT TAG TCT GAA TTC GGG ATA AAG ATC TCC

<45> (서명개시) (균주이름) (Ln. citreum)

<46> **· 특허등록번호: 560160**

<47> CAT CAC CTC TGT CAC CTC

<48> (560160)

<49> **· 권리자: CBNU**

<50> GTG TTC TCA TCT ATC

<51> (권리자) (CBNU)

<52> **· 발명자: HAN NS**

<53> GCA AGG ACC TCT TCT ACG

<54> (발명자) (HAN NS)

<55> **· 기탁한 곳과 기탁번호: KACC 91035**

<56> TAC ACC TTC TTC GTC CTT TGT CTC TGG CAT TAA

<57> (KACC) (기탁번호) (91035) (종료)

<58> **② 트랜스포존 시스템 구축**

<59> 트랜스포존 시스템 구축용 벡터에 상기에서 결정된 117bp의 염기서열(이하, 균주정보서열'이라 함)을

선택마커 유전자와 함께 삽입하였다.

<60> 사용된 pMOD-2<MCS> 벡터는 'Epicentre(Madison, WI, USA)'사에서 구입하여 사용하였다. 이 벡터는 pUC-ori를 기본으로 가지며 MCS(Multiple cloning site)에 트랜스포지션하고자 하는 목적 유전자를 클로닝하고 PCR을 하거나 특이적인 제한효소(*Pvu* II 또는 *Psh*AI, 이 두 가지 제한효소로 클로닝한 단편이 잘리지 않을 경우 사용 가능)를 사용하여 모자이크 양 말단(ME)을 포함한 단편을 얻을 수 있는 특징이 있다.

<61> 본 실험에서는 김치 회사에서 우수 스타터 균주로 분리한 균주로 현재 김치 제조시 스타터로 쓰이고 있는 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*) (기탁번호 KACC 91035)를 숙주세포로 선택하였고, 유산균에 내성이 있는 클로람페니콜 내성 유전자(CAT)를 선택마커 유전자로 선택하였다.

<62> 먼저 pLeuCM(류코노스톡과 대장균에서 상호 복제가 가능한 셔틀벡터; 대한민국 등록특허 제0721140호)에 *Pst*I과 *Xba*I 제한효소를 처리하고, 아가로스 겔을 통해 정제함으로써 클로람페니콜 내성 유전자(CAT)를 얻었다.

<63> 다음으로 pMOD-2<MCS> 벡터도 동일한 제한효소 *Pst*I과 *Xba*I으로 처리하고, 상기에서 얻은 콜로람페니콜 내성 유전자(CAT)와 합성시켜 산물을 회수한 후, 대장균(*E. coli*) Top10에 삽입하여 형질전환시키고, 분리과정을 거쳐 pMODCm 벡터를 얻었다.

<64> 그 후, 상기에서 합성한 균주정보서열을 pMODCm 벡터의 양 ME 사이트 사이의 클로닝 사이트에 삽입하였다.

<65> 상기에서 설명한 실험의 전반적인 내용은 도 3과 같았다.

<66> **③ 트랜스포지션(transposition)**

<67> 상기 실험 ①에서 얻은 pMODCm 벡터는 'Epicentre'사가 판매하는 트랜스포자제(transposase)가 인식하여 트랜스포지션을 일으킬 수 있는 ME(19 bp Mosaic Ends)사이트를 포함하고 있으며, PCR 또는 *Pvu*II 제한효소를 처리하면 ME 사이트를 포함한 DNA 조각을 얻을 수 있다.

<68> 본 발명자는 pMODCm 벡터에 *Pvu*II 제한효소를 처리하여 DNA 조각을 얻을 수 있었다. 이 DNA 조각(클로람페니콜 내성 유전자(CAT), 와 ME 사이트를 포함하는) 2㎕[100mg/ml in TE Buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.5), 1mM EDTA], EZ::TN 트랜스포자제(Epicentre, Madison, WI, USA) 4㎕ 및 글리세롤 2㎕를 섞어 상온에서 30분간 반응을 시키고, 그 중 1㎕씩을 형질전환 할 때 사용하였다.

<69> 호스트인 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*) 균주는 컴페턴트 셀을 만들어(40㎕) 앞에서 얻은 DNA와 큐벳에 옮기고 5분간 얼음에 방치하였다. 25㎌, 8kV/cm, 400ohms 조건에서 전기 펄스를 준 후, 즉시 1ml MRS 액체배지를 첨가하고 30℃에서 1시간 가량 배양하였다. 그 후, 10㎍/ml 클로람페니콜이 포함된 MRS 배지에 도말한 후, 48시간 동안 30℃에서 배양하면서 형질전환 된 것을 선별하고자 하였다.

<70> **④ 트랜스포지션 확인**

<71> 상기 실험 ③으로부터 클로람페니콜(CM) 내성을 지닌 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*)의 콜로니를 다수 얻을 수 있었고, 클로람페니콜을 포함하는 MRS 배양배지에 각각 하루 동안 정치 배양하였다.

<72> DRC 균주의 염색체 DNA에 무작위로 클로람페니콜 내성 유전자(CAT)가 삽입되는 것을 확인하기 위해, 각각의 균주들로부터 염색체 DNA를 분리하여 클로람페니콜 내성 유전자의 일부분을 프라이머를 이용하여 PCR을 통해 확인하고자 하였다.

<73> 염색체 DNA 분리는 바이오니아사의 'AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit'의 일부분 변형하여 이용하여 하기와 같이 수행하였다. 먼저, 대조군인 야생형의 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*)는 MRS 배지에, 본 실시예에서 선별한 균주는 클로람페니콜 항생제가 포함된 MRS 배지에 각각 접종하였고, 13,000rpm에서 2분간 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수한 세포는 TES (30mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 5mM EDTA, pH 8.0) 용액으로 씻어준 후, 6.7% 수크로오스(50mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) 용액 100㎕를 첨가하여 현탁하였고, 37℃에서 30분간 배양하였다. 여기에 라이소자임(lysozyme 10mg/ml lysozyme in 25mM Tris(pH 8.0)) 용액 100㎕을 첨가하고, 다시 37℃에서 30분간 배양하였다. 이 후의 과정은 프로토콜의 내용대로 실험하였고, 최종 50㎕의 정제물을 얻을 수 있었다.

<74> 정제된 각각의 염색체 DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행하였고, 반응 혼합물(50㎕)은 Taq DNA 중합효소

0.5㎕, 10X buffer, 250㎛M dNTPs, 프라이머 CM-For: 5'-CATATCAAATGAACTTTAAT-3', CM-Re: 5'-ATCTCATATTATAAAAGCCA-3')으로 구성되었다. PCR 조건은 변성 94℃, 5분, 표준 PCR 30주기(94℃, 30초, 55℃, 30초, 72℃, 1분) 및 최종반응 72℃, 5분이었다.

<75> 실험 결과, 선별한 균주의 염색체 DNA에 클로람페니콜 내성 유전자가 적절하게 끼어들어 갔음을 확인할 수 있었다.

<76> **⑤ PCR을 이용하여 균주정보서열 정보의 증폭 및 시퀀싱**

<77> 상기 선별 균주의 염색체 DNA를 회수한 후, PCR을 수행하였다. 이때, 프라이머는 정방향 프라이머로 주형(template) 중 5'-GGC GTT TAG TCT GAA TTC-3' 위치에 결합할 수 있는 것을 상보적으로 디자인하여 사용하였으며, 역방향 프라이머로 주형 중 5'-CTT TGT CTC TGG CAT TAA-3'에 결합할 수 있는 것을 상보적으로 디자인하여 사용하였다.

<78> PCR을 수행한 결과, 120bp 내외의 염기서열을 갖는 PCR 산물을 얻을 수 있었고, 이를 시퀀싱하였다. 그 결과, 상기의 균주정보서열과 정확히 일치함을 확인할 수 있었다.

<79> 이를 다시 도 2에 기재된 인식표와 비교하여 해독하였는데, 그 결과 초기에 표지하고자 했던 사항과 정확히 일치함을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

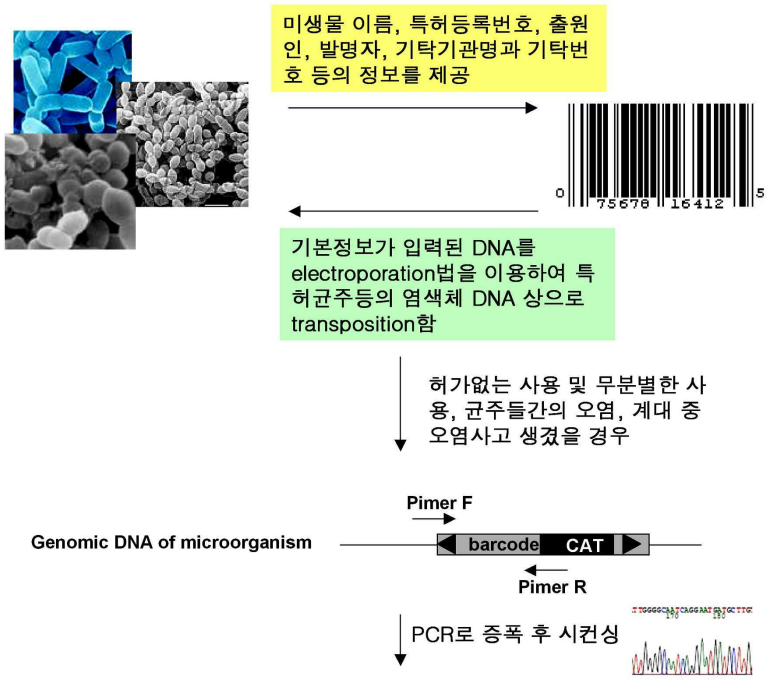
<80> 도 1은 본 발명의 개요를 간단하게 나타낸다.

<81> 도 2는 본 발명의 인식표의 일 예를 나타낸다.

<82> 도 3은 본 발명의 DNA 염기 서열로 암호화된 생물체의 고유 정보를 트랜스포존 시스템을 통해 생물체의 염색체 DNA 내부에 삽입하는 과정을 보여준다.

도면

도면1



도면2

AAA	Q ㅃ ㅂ	AAT	W ㅉ ㅈ	AAC	E ㄸ ㄷ	AAG	R ㄲ ㄱ
ATA	T ㅆ ㅅ	ATT	Y ㅛ	ATC	U ㅕ	GGG	I ㅑ
ACA	O ㅒ ㅐ	ACT	P ㅖ ㅔ	ACC	A ㅁ	ACG	S ㄴ
AGA	D ㅇ	GGT	F ㄹ	AGC	G ㅎ	AGG	H ㅗ
TAT	J ㅓ	TAC	K ㅏ	TAG	L ㅣ	TTA	Z ㅋ
TTT	X ㅌ	TTC	C ㅊ	TTG	V ㅍ	TCA	B ㅠ
TCT	N ㅜ	TCC	M ㅡ	TCG	~ `	TGT	! 1
TGC	@ 2	TGG	# 3	CAA	$ 4	CAT	% 5
CAC	^ 6	CAG	& 7	CTA	* 8	CTT	(9
CTC	) 0	CTG	_ -	CCA	+ =	CCT	{ [
CCC	}]	CCG	| ₩	CGA	: ;	CGT	" '
CGC	⇧ shift	CGG	< ,	GAA	> .	GAT	? /
GAC	한	GAG	영	GTA	Caps Lock		
GGC	서명정보 개시	GTT	균주이름	GTC	기탁번호	GTG	권리자
GCA	제조자	GGA	기탁일자	GCT	℄	GCC	△
GCG	X	TGA	줄바꿈	TAA	서명정보 종료	GGT	이탤릭체

도면3

