(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년12월16일
(11) 등록번호 10-1687001
(24) 등록일자 2016년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *G01N 15/14* (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/82 (2013.01)
G01N 15/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0089386
(22) 출원일자 2015년06월24일
심사청구일자 2015년06월24일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020140095748 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
하선화
경기도 수원시 장안구 정자천로133번길 26, 554동 1402호 (정자동, 백설마을 동양고속아파트)
유민경
경기도 용인시 기흥구 고매로34번길 31, 205동 1003호 (고매동, 매화마을우림홀인원아파트)
정예솔
경기도 수원시 영통구 신원로 118, 702호 (신동)
(74) 대리인
특허법인 하나

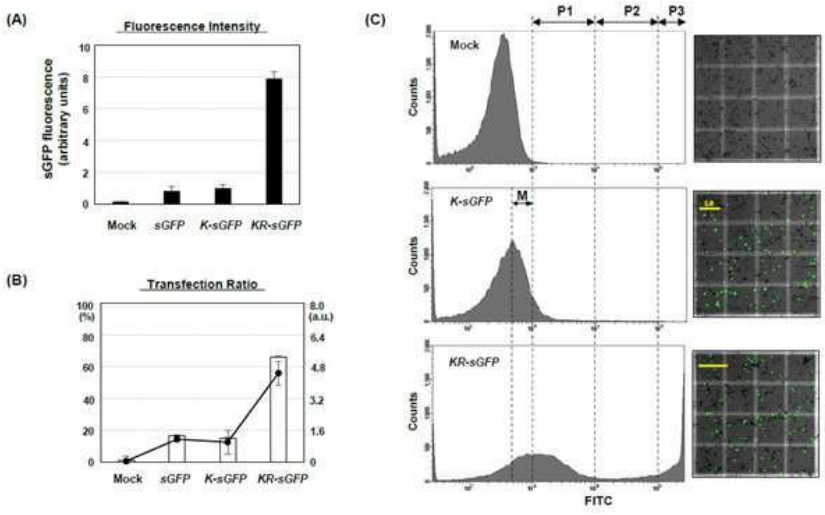
전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **엽록체 적중 배열을 통한 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법**

(57) 요 약

엽록체 적중 배열을 통한 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법이 개시된다. 본 발명에 따른 엽록체 적중 배열을 통한 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법을 이용하는 경우 세포질 적중 배열에 비해 8배 이상 형광 강도가 증가될 수 있다. 본 발명에 따른 엽록체 적중 배열을 통한 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법을 이용하는 경우 세포질 적중 배열에 비해 4.5배 이상 형질전환 비율이 증가할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 엽록체 적중 배열을 통한 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법을 이용하는 경우 종래 DNA(100-130㎍) 사용량의 1/10의 미만의 양으로도 우수한 형광 강도를 나타낼 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
G01N 21/64 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01109401
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대바이오그린 사업
연구과제명 식물 기능성 물질대사 생성기작의 모듈링 연구
기 여 율 1/1
주관기관 농촌진흥청
연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

엽록체 적중 펩티드, 형광 단백질 및 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계;

상기 재조합 발현 벡터를 벼(Oryza sativa L.) 원형질체에 형질전환하는 단계; 및

엽록체 내의 형광 단백질로부터의 형광을 형광유세포분석기를 통해 관측하는 단계를 포함하고,

상기 엽록체 적중 펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 엽록체 적중 배열을 통한 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 형광 단백질은 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP), 황색형광단백질(yellow fluorescent protein, YFP), 적색형광단백질(red fluorescent protein, RFP), 주황형광단백질(orange fluorescent protein, OFP), 청록색형광단백질(cyan fluorescent protein, CFP), 청색형광단백질(blue fluorescent protein, BFP), 원적색형광단백질(far-red fluorescent protein) 또는 테트라시스테인 모티프(tetracystein motif)인 것인, 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 형질전환은 미세사출법, 입자 총 충격법, 실리콘 탄화물 위스커, 초음파 처리, 전기천공, PEG-매개 융합법, 미세주입법, 리포좀 매개법, 인-플란타 형질전환법), 진공 침윤법, 화아침지법 또는 아그로박테리아 분사법(Agrobacteria spraying method)에 의해 수행되는 것인, 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 박현 벡터 DNA는 5-10㎍의 양으로 사용되는 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 엽록체 적중 배열을 통한 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 원형질체(protoplast)는 효소적 방법으로 세포 벽이 제거되어 막 구조로만 둘러싸인 식물 세포를 의미한다. 원형질체의 구조적 특성은 일시적(transient) 발현 시스템의 연구를 용이하게 하고, 일시적 발현 분석의 시간 프레임 내에서 조직-특이적 특징 및 세포-특이적 특징을 보유할 수 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 특징들은 형광 신호 만으로 원형질체를 분류하는 형광물질-활성 세포 분석(fluorescence-activated cell sorting, FACS)과 함께, 국소 조직, 예를 들면 애기장대(*Arabidopsis*) 뿌리 분열지연 중심부 및 정자 세포의 발현 프로파일에 대한 분자 생물학적 연구를 촉진시켜왔다.

[0003] Hagenbeek 및 Rock(2001)는 원형질체를 이용한 프로모터 분석을 위한 FCA 활용의 이점 및 단점을 자세히 기술하고 있다. 주요 단점으로서, 원형질체의 세포질에 존재하는 GFP의 FCA에서 측정되는 평균 형광 강도가 신호의 임계 값만큼 낮고, FCA 상에서 GFP-형광 신호를 발현하는 형질전환된 원형질체 비율이 전체의 4% 미만으로 측정된다는 것이다. 이러한 수치는, 동일한 실험구를 형광현미경와 혈구계를 사용하여 형질전환 비율 측정시 평균 형질전환 비율이 40% 내지 60%로 분석되는 것과 비교해 보면, 실제 형질전환 비율 보다 유세포 분석시에 분석되는 형질전환 비율이 현저히 낮다는 것을 알 수 있다. 다시 말하면, 유세포 분석시 형질전환된 대부분의 원형질체가 유세포 분석기에서 측정되는 형광 강도가 임계값 보다 낮아 분석 결과에서 제외 되어 실제 형질전환 비율보다 현저히 낮은 형질전환 비율로 분석 될 수 밖에 없다는 것이다. 이러한 단점들 때문에 유세포 분석 결과가 사용된 시료의 극히 일부에 제한 된다는 문제점이 발생하여 원형질체 시스템을 이용한 유세포 분석 적용시 큰 장애가 되고 있다. 한편, 상기와 같은 문제를 극복하기 위하여, 유세포 분석시 많은 양의 DNA(10-130㎍)를 사용하고 있으나, FCA 상에서 분석되는 형질전환 비율이 약 6% 로 약 2% 정도 밖에 증진되지 못해 여전히 FCA 상에서 제외된 실험군을 최소화 하는데 큰 효과를 보지 못하고 있는 실정이다. 따라서, 식물 원형질체를 이용한 유세포 분석시 형광도가 임계점 보다 낮게 측정되어 결과 분석치에서 제외 되는 실험군(missing population)에 대한 문제는 여전히 해결해야 할 과제로 남아있다.

[0004] 엽록체(chloroplast)는 외막으로 둘러 싸인 독립된 공간으로 식물 세포 당 10-100개를 포함하고 있기 때문에, 다양한 재조합 단백질을 생산하기 위한 매우 유용한 저장소로 알려져 있다. 엽록체 내에 형광 단백질(fluorescent protein, FP)의 적중을 위해, 벼 RbcS(Rubisco small subunit)의 엽록체 적중 펩타이드가 다양한 재조합 단백질을 엽록체에 적중시키기 위해 사용되어 왔다. 엽록체는 세포질과 비교하여 그들의 스트로마 내에 제한된 단백질 분해 경로를 가지고 있으므로, 외래 단백질이 세포질에서 보다 더욱 안정되게 유지될 수 있어, 세포질에 비해 외래 단백질 생산 효율이 높아 질 수 있다.

[0005] 게다가, Kozak(Kz) 서열은 진핵 mRNA에서 ATG 시작 코돈 앞에 존재하는 공통 서열로서, 라이보좀에 의한 단백질 변역의 효율적 개시를 매개하여 번역 효율을 개선시키는 것으로 알려져 있다. Kz 서열은 척추동물, 효모, 원생동물 및 식물을 포함하는 진핵 생물에 존재한다.

[0006] 선행문헌

[0007] 1. 대한민국 공개특허 제2011-0058715호

[0008] 2. 대한민국 공개특허 제2014-0095748호

발명의 내용

[0009] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로서, 본 발명자들은 유세포 분석시 엽록체 적중 배열을 이용하는 경우 세포질 적중 배열에 비해 8배 이상 형광 강도가 증가함을 확인하였다. 본 발명자들은 엽록체 적중 배열을 이용하는 경우 세포질 적중 배열에 비해 유세포 분석시 낮게 측정되는 형광 강도

때문에 임계값 이하로 분석되어 소실되는 집단(missing population)을 최소화 할 수 있게 되어 유세포 분석시의 근본적인 문제점을 해결하였다. 또한, 본 발명자들은 유세포 분석시 엽록체 적중 배열을 이용하는 경우 종래 DNA(100-130㎍) 사용량의 1/10 미만의 양으로도 우수한 형광 강도를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0010] 본 발명은 엽록체 적중 배열을 통한 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법을 제공하고자 한다.

[0011] 본 발명에 따른 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법에 있어서, 상기 방법은:

[0012] 엽록체 적중 펩티드, 형광 단백질 및 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계;

[0013] 상기 재조합 발현 벡터를 식물 원형질체에 형질전환하는 단계; 및

[0014] 엽록체 내의 형광 단백질로부터의 형광을 유세포분석기를 통해 관측하는 단계를 포함할 수 있다.

[0015] 본 발명에 따른 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법에 있어서, 상기 엽록체 적중 펩티드는 서열번호 1의 아미노산 또는 상기 서열번호 1과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산을 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명에 따른 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법에 있어서, 상기 형광 단백질은 녹색형광단백질(GFP), 황색형광단백질(YFP), 적색형광단백질(RFP), 주황형광단백질(OFP), 시안형광단백질(CFP), 청색형광단백질(BFP), 원적색형광단백질(far-red fluorescent protein) 또는 테트라시스테인 모티프(tetracystein motif)일 수 있다.

[0017] 본 발명에 따른 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법에 있어서, 상기 형질전환은 미세사출법, 입자 총 충격법, 실리콘 탄화물 위스커, 초음파 처리, 전기천공, PEG-매개 융합법, 미세주입법, 리포좀 매개법, 인-플란타 형질전환법, 진공 침윤법, 화아침지법 또는 아그로박테리아 분사법(Agrobacteria spraying method)에 의해 수행될 수 있다.

[0018] 본 발명에 따른 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법에 있어서, 상기 식물은 벼(*Oryza sativa L.*)일 수 있다.

[0019] 본 발명에 따른 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법에 있어서, 상기 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터 DNA는 5-10㎍의 양으로 사용될 수 있다.

[0020] 본 발명에 따른 엽록체 적중 배열을 통한 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법을 이용하는 경우 세포질 적중 배열에 비해 8배 이상 형광 강도가 증가될 수 있다 (실시예 2 참고). 본 발명에 따른 엽록체 적중 배열을 통한 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법을 이용하는 경우 세포질 적중 배열에 비해 측정되는 형질전환 비율이 14.7%에서 65.7%로 4.5배 이상 증가하여 혈구계에서 측정한 실측치를 대변 할 수 있다 (실시예 2 참고). 또한, 본 발명에 따른 엽록체 적중 배열을 통한 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법을 이용하는 경우 종래 DNA(100-130㎍) 사용량의 1/10의 미만의 양으로도 우수한 형광 강도를 나타낼 수 있다 (실시예 3 참고). 따라서, 본 발명에 따르면 유세포 분석시 엽록체 적중 배열의 사용은 측정되는 형광 강도를 증가시킴으로서 적은 양의 DNA로도 임계값 이하로 분석되었던 소실집단(missing population)을 최소화 하여 효율적으로 목적 형질전환 원형질체의 분류 및 분석을 가능하게 한다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 실시예 1에 따른 벼 원형질체에서 형광 단백질의 적중 및 발현 결과를 나타내는 것으로서, 도 1A는 실시예 1에서 제조된 sGFP, K-sGFP 및 KR-sGFP의 재조합 발현 벡터의 모식도를 나타낸다. 도 1B는 상기 재조합 발현 벡터의 적중 장소를 확인한 공초점 현미경 결과를 나타낸다. 도 1C는 sGFP 와 K-sGFP의 발현 효율을 비교하기 위한 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸다.

도 2는 본 발명의 실시예 2에 따른 sGFP의 세포내 적중 장소에 따른 FCA 분석 결과를 비교한 것으로, 도 2A는 sGFP, K-sGFP 및 KR-sGFP의 측정되는 형광 강도를 비교한 그래프이다. 도 2B는 sGFP, K-sGFP 및 KR-sGFP의 FCA에서 분석되는 형질전환 비율을 비교한 그래프이다. 도 2C은 sGFP, K-sGFP 및 KR-sGFP에 대한 유세포 분석의 히스토그램(왼쪽) 및 혈구계를 이용한 형광현미경 관찰 사진 결과(오른쪽)를 나타낸다.

도 3은 본 발명의 실시예 2에 따른 sGFP를 발현하는 원형질체의 FCA에서 측정되는 형광 강도에 따른 상대적인

소집단 분류 비율을 나타낸다.

도 4는 본 발명의 실시예 2에 따른 비-FCA 분석을 기초한 K-sGFP 및 KR-sGFP을 비교한 결과를 나타내는 것으로, 도 4A는 K-sGFP로부터의 sGFP 및 KR-sGFP로부터의 rRTp-sGFP의 mRNA를 비교한 qRT-PCR 결과를 나타낸다. 도 3B는 K-sGFP 및 KR-sGFP로부터의 sGPF의 단백질 발현 수준을 비교한 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸다. 도 3C는 혈구계를 이용하여 형광현미경 하에 측정된 K-sGFP 및 KR-sGFP의 재조합 발현 벡터 형질전환 비율을 나타낸다.

도 5는 본 발명의 실시예 3에 따른 KR-sGFP를 이용한 FCA 분석시 최적의 DNA양을 나타내는 것으로, 도 5A는 DNA 양에 따른 최적의 평균 sGFP 형광 강도를 나타내는 그래프(상단) 및 DNA 양에 따른 최적의 sGFP 형질전환 비율을 나타내는 그래프(하단)을 나타낸다. 도 5B는 DNA 양에 따른 sGFP의 발현 효율을 비교하기 위한 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않은 한, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다. 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사건이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용 가능하다. 비록 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법, 프로토콜 및 시약으로 본 발명을 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

[0023] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 달리 언급되지 않는 한, "또는"은 "및/또는"을 의미한다. 더욱이, 용어 "포함하는" 뿐만 아니라, 다른 형태, 예를 들어, "가지는", "이루어지는" 및 "구성되는"은 제한적이지 않다.

[0024] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다. 본 명세서에 제공된 제목은 다양한 면 또는 전체적으로 명세서의 참조로서, 하기의 구현예를 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다.

[0025] 본 발명은 엽록체 적중 배열을 통한 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법을 제공하고자 한다.

[0026] 본 명세서에서 사용된 용어 "유세포 분석"은 측정하고자 하는 입자나 세포를 흐르는 유액 상태에서 광원으로 사용되는 특정 레이저와 부딪쳐서 발생하는 물리적인 현상을 이용하여 세포에 관련된 여러 가지 정보를 측정하는 방법을 의미한다.

[0027] 본 명세서에서 사용된 용어 "엽록체 적중 펩티드(chloroplast transit peptide: Tp)"는 폴리펩티드의 N-말단에 위치하여 번역과 동시에 또는 번역 후에 진행되는 엽록체 적중 펩티드를 포함하는 폴리펩티드가 엽록체로 이동하도록 유도하는 아미노산 서열을 의미한다. 엽록체 적중 펩티드는 일반적으로 약 40개 내지 약 100개의 아미노산을 포함한다. 엽록체 프로테아제는 상기 엽록체 적중 펩티드를 포함하는 폴리펩티드의 엽록체 내로의 이동 후 상기 폴리펩티드의 나머지 부분으로부터 엽록체 적중 펩티드를 절단할 수 있다.

[0028] 일 구현예에 따르면,

[0029] 상기 본 발명은 엽록체 적중 배열을 통한 유세포 분석의 형광 강도 증진 방법:

[0030] 엽록체 적중 펩티드, 형광 단백질 및 목적 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 제조하는 단계;

[0031] 상기 재조합 발현 벡터를 식물 원형질체에 형질전환하는 단계; 및

[0032] 엽록체 내의 형광 단백질로부터의 형광을 형광유세포분석기를 통해 관측하는 단계를 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 엽록체 적중 펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다. 또한, 상기 염기 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 엽록체 적중 펩티드는 서열번호 1의 아미노산 서열과 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 형광 단백질은 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP), 황색형광단백질(yellow fluorescent protein, YFP), 적색형광단백질(red fluorescent protein, RFP), 주황형광단백질(orange fluorescent protein, OFP), 시안형광단백질(cyan fluorescent protein, CFP), 청색형광단백질(blue fluorescent protein, BFP), 원적색형광단백질(far-red fluorescent protein) 또는 테트라시스테인 모티프(tetracystein motif)를 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 형광 단백질로 sGFP를 사용하였다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 엽록체 적중 펩티드, 형광 단백질 및 목적 단백질은 재조합 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다.

[0036] 본 명세서에서 사용된 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 것을 의미한다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0037] 본 명세서에서 사용된 용어 "재조합 발현 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 임의의 플라스미드 및 벡터가 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 재조합 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소(translation control element)를 가지는 것이다. 상기 엽록체 적중 펩티드 및 목적 단백질을 포함하는 재조합 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함할 수 있다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보좀 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS, 히스톤 프로모터 또는 Clp 프로모터를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 본 명세서에서 사용된 용어 "프로모터"는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서 각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0040] 본 발명에 있어서, 재조합 발현 벡터를 식물 원형질체에 형질전환하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다.

[0041] 본 명세서에서 사용된 용어 "형질전환"은 하나 이상의 핵산 분자들을 세포내로 전달하는 것을 의미한다. 상기 형질전환 방법은 미세사출법(microprojectile bombardment), 입자 총 충격법 (particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공(electroporation), PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection), 리포좀 매개법(liposome-mediated method), 인-플란타 형질전환법(In planta transformation), 진공 침윤법(Vacuum infiltration method), 화아침지법(floral meristem dipping method), 아그로박테리아 분사법(Agrobacteria spraying method)을 포함할 수 있으

나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 실시예에서, 형질전환 방법으로 PEG-매개 융합법을 사용하였다.

[0042] 본 발명에 있어서, 상기 식물은 단자엽 식물 또는 쌍자엽 식물일 수 있다. 상기 단자엽 식물은 예를 들면, 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 또는 양파를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 쌍자엽 식물은 아라비돕시스, 알팔파, 콩류, 브로콜리, 양배추, 당근, 콜리플라워, 셀러리, 배추, 목화, 오이, 가지, 양상치, 멜론, 완두콩, 고추, 땅콩, 감자, 호박, 무, 평지씨, 시금치, 대두, 애호박, 사탕무, 해바라기, 담배, 토마토 또는 수박을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 일 실시예에서, 상기 단자엽 식물로서 벼(*Oryza sativa L.*)가 사용되었다.

[0043] 본 발명에 있어서, 상기 목적 단백질 및 형광 단백질은 식물 원형질체로부터 엽록체로 이동될 수 있다.

[0044] 본 명세서에서 사용된 용어 "수송", "이송" 및 "전달"은 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드의 숙주 세포의 핵으로부터 숙주 세포의 엽록체로의 이동을 용이하게 하는 특정 아미노산의 특성을 의미한다. 상기 아미노산은 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드 중 약 100%, 약 95% 이상, 약 90% 이상, 약 85% 이상, 약 70% 이상, 약 60% 이상을 숙주 세포의 엽록체로 수송할 수 있다.

[0045] 이하, 발명의 이해를 돕기 위해 다양한 실시예를 제시한다. 하기 실시예는 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 발명의 보호범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0046] **<재료 및 방법>**

[0047] 1. 식물 재료

[0048] 본 실험에서 식물은 벼(*Oryza sativa* L.*Japonica* cv. Ilmi)를 사용하였으며, 70% 에탄올 용액에서 1본 동안 1회, 2% 소듐 하이포클로라이트 용액에서 20분 동안 2회 표면 살균 후 멸균수로 5회 세척하고 MS 배지에 치상하였다. 상기 벼 종자를 10일 동안 암실에서 성장시킨 후 20시간 광조건이 유지되도록 하였다.

[0049] 2. 벡터 제작

[0050] 형광단백질 sGFP, Kz 서열 및 sGFP, 및 Kz 서열, 엽록체 적중 펩타이드 rRTp 및 sGFP를 35S 프로모터를 포함하는 pB2GW7 벡터에 게이트웨이 클로닝 방법으로 삽입하였다.

[0051] 3. 원형질체 분리 및 형질전환

[0052] 벼 종자를 MS 배지에서 발아시켜 10일 키운 후 채취하여 셀룰라아제(cellulase) 및 마세로자임(macerozyme)를 처리하여 원형질체를 준비하였다. 상기 sGFP, K-sGFP, 및 KR-sGFP를 각각 포함하는 pB2GW7 벡터를 상기 원형질체에 넣어서 PEG 용액 (40% PEG 3350, 100 mM $CaCl_2$, 0.6 M mannitol)을 이용하여 형질전환시켰다.

[0053]

[0054] **<실시예>**

[0055] 실시예 1: 벼 원형질체에서 형광 단백질의 발현

[0056] 형광단백질 sGFP, Kz 서열 및 sGFP, 및 Kz 서열, 엽록체 적중 펩타이드 rRTp 및 sGFP를 각각 35S 프로모터를 포함하는 pB2GW7 벡터에 게이트웨이 클로닝 방법으로 삽입하여 하기의 3개의 벡터를 제작하였다 (도 1A): sGFP만을 포함하는 벡터 (이하 "sGFP"), Kz 서열(AACAATGGC) 및 sGFP를 포함하는 벡터(이하 "K-sGFP"), 및 상기 Kz 서열, 엽록체 적중 펩티드 rRTp 및 sGFP를 포함하는 벡터(이하 "KR-sGFP").

[0057] 상기 3개의 벡터 sGFP, K-sGFP 및 KR-sGFP를 각각 벼 식물체 잎과 줄기에서 분리된 벼 원형질체에 도입하고 공초점 현미경을 이용하여 형광 신호를 관찰하였다. 그 결과, sGFP 및 K-sGFP는 세포질에서 발현된 반면, KR-sGFP

는 엽록체로 이동하여 발현됨이 확인되었다 (도 1B).

[0058] 한편, sGFP 발현에 Kz 서열이 미치는 효과를 알아보기 위하여 GFP 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과, K-sGFP 단백질이 sGFP 단백질 보다 2.8 배 이상 발현이 증가함을 확인하였다 (도 1C).

[0059] 실시예 2. sGFP의 세포내 적중 장소에 따른 FCA 차이 확인

[0060] sGFP의 세포내 적중 장소에 따른 FCA의 차이를 확인하기 위하여 상기 실시예 1에 따라 sGFP 및 K-sGFP가 발현된 세포질, 및 KR-sGFP이 발현된 엽록체를 이용하여 하기의 실험을 수행하였다.

[0061] 2-1. 유세포 분석(Flow Cytometric Analysis, FCA)

[0062] K-sGFP 평균값으로 형광 강도를 표준화(normalization)하여 유세포 분석을 수행한 결과, KR-sGFP의 형광 강도가 sGFP 및 KR-sGFP의 형광 강도에 비해 약 8배 이상 높은 것으로 확인되었다 (도 2A). FCA를 통해 측정된 형질전환 비율을 비교해본 결과, KR-sGFP의 형질전환 비율은 65.7%로서, sGFP의 형질전환 비율 16.8% 및 KR-sGFP의 형질전환 비율 14.7% 보다 약 4.5배 이상 높음이 확인되었다(도 2B). 또한, FCA의 플롯 데이터를 통해 집단 분배에 큰 차이가 있음이 분석되었다. 임계값(10^3)을 측정하고, 상기 형광 이하를 가상(mock) 대조군을 이용하여 백그라운드 신호로 간주하였다. K-sGFP의 경우, 대부분의 집단(83.3%)이 임계값 이하에 분포된 반면, KR-sGFP의 경우 임계값 보다 형광 강도가 높은 전체 간격(overall interval)에 대부분의 집단(65.7%)이 분포됨이 확인되었다(도 2C). 한편, sGFP와 K-sGFP의 FCA 결과는 별다른 차이를 나타내지 않았다. 즉, Kz 서열이 sGFP의 발현 수준을 증가시키기는 하지만, FCA에서 측정되는 형광 강도에는 영향을 미치지 않음으로써, FCA에서 유효한 요소로 역할을 하지 않음이 확인되었다.

[0063] 상기 형광 강도의 차이를 보다 구체적으로 알아보기 위하여, 형광 강도를 3개의 소집단, P1(10^3-10^4), P2(10^4-105) 및 P3(>10^5)으로 분류하고, 형질전환된 세포의 분포를 상기 소집단에서 비교하였다. 그 결과, 형질전환된 집단 중 sGFP(96%) 및 K-sGFP(88.4%)는 대부분 P1 소집단에 분포된 반면, KR-sGFP의 경우 P1-P3 소집단에 골고루 존재하였으며, 그 중에서도 P2-P3 소집단(>10^4)에 55.9% 이상이 분포되는 것을 관찰되었다. 특히, 10^5 이상의 높은 형광 강도를 갖는 P3 소집단일 비교해 보면, KR-sGFP(29.4%)가 sGFP(0.6%) 및 K-sGFP(2.1%)에 비해 각각 49배 및 14배 증가하였다(도 3).

[0064] 상기 결과로부터 rRTp에 의한 sGFP의 엽록체 적중이 FCA의 임계값 이상의 형광 강도를 갖는 집단을 증가시켜 소실집단(missing population)을 최소화 할 수 있을 뿐 아니라 상기 집단의 평균 형광 강도를 증진시키는데 매우 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다.

[0065] 2-2. 비-FAC-기반 분석

[0066] sGFP 발현 수준 및 형질전환 비율을 비-FCA-기반 분석법을 이용하여 분석하였다. sGFP의 mRNA 전사체의 수준은 실시간 정량 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 이용하여 측정하고, sGFP의 단백질의 수준은 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다.

[0067] K-sGFP로부터의 sGFP의 mRNA 및 KR-sGRP로부터의 rRTp-sGFP의 mRNA를 RT-PCR하여 비교한 결과, KR-sGFP로부터의 rRTp-sGFP의 mRNA 의 수준이 K-sGFP로부터의 sGFP의 mRNA 비해 큰 차이가 없음이 확인되었다(도 4A). KR-sGFP는 rRTp-적중 펩티드의 절단 이후에 생성된 32kDa의 미성숙-폴리펩티드 및 27kDa의 성숙-폴리펩티드의 2개의 단백질 밴드를 형성하였다. KR-sGFP로부터의 상기 작은 27kDa의 성숙-폴리펩티드가 형광체 방사체인 것으로 여겨지며, KR-sGFP로부터의 sGFP단백질 발현 수준이 K-sGFP로부터의 sGFP 단백질 발현 수준에 비해 역시 큰 차이가 없음이 확인 되었다(도 4B).

[0068] 또한, 혈구계(Hemocytometer)를 이용한 형질전환 비율 분석 결과, K-sGFP와 KR-sGFP는 별다른 차이를 나타내지 않았다 (도 4C). 즉, sGFP의 엽록체 적중이 sGFP의 발현 수준 또는 실제 형질전환 효율에 영향을 주는 것이 아니라, FCA 분석시 형광도 측정 효율을 높이는 데에만 큰 영향을 준다는 것을 알 수 있었다. 그리고, FCA 상에서

K-sGFP로 형질전환된 원형질체 비율이 낮게 분석되는 이유는 측정되는 형광 강도가 FCA 상의 임계 값 보다 대부분(83.3%) 낮기 때문에, FCA에서는 K-sGFP로 형질전환된 원형질의 대부분 집단이 백그라운드 신호를 갖는 비-형질전환 집단으로 분석된다는 것을 확인 할 수 있었다. 상기 낮은 형광 강도를 갖는 집단을 "소실 집단(missing population, M)"이라 명명하였다 (도 2C 참고)

[0069] 실시예 3. 플라스미드 DNA의 최적량 확인

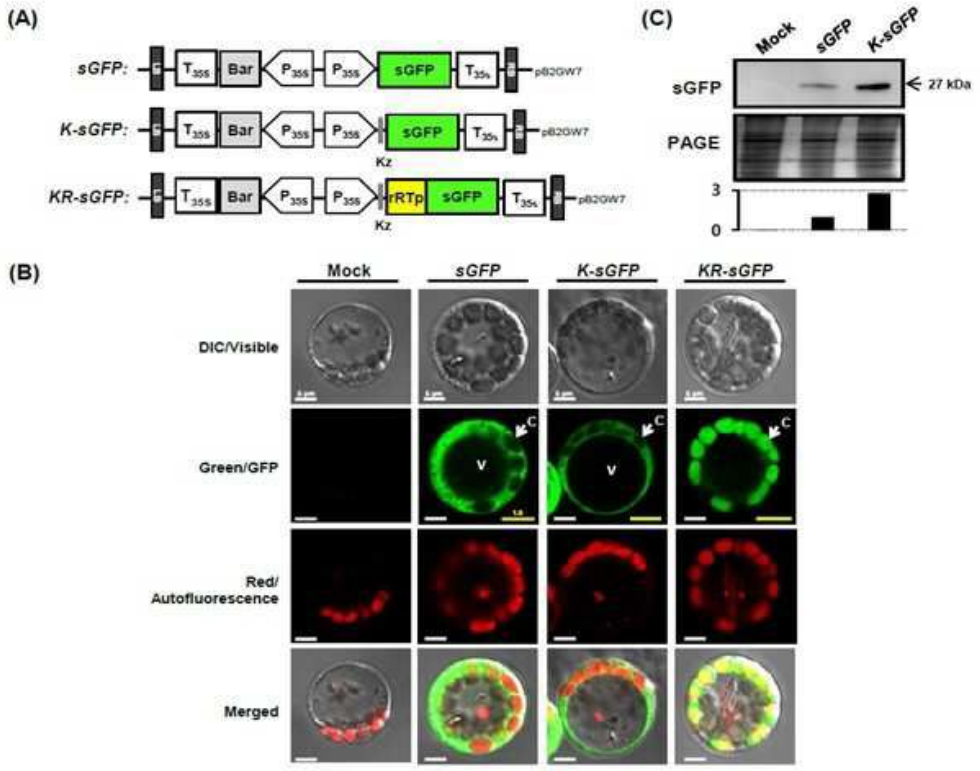
[0070] KR-sGFP 플라스미드 DNA의 양을 달리하여 벼 원형질체 형질전환에 사용하였다. PEG-형질전환 원형질체를 3개의 튜브에 나누어 각각 FCA 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[0071] 그 결과, 2 μg의 DNA를 사용한 경우 가장 낮은 sGFP 형광을 나타낸 반면, 5-10 μg의 DNA를 사용한 경우 우수한 형광 강도를 나타내는 것으로 확인되었다. 특히, 10 μg의 DNA를 사용하는 경우 가장 높은 형광 강도를 나타내었다 (도 5).

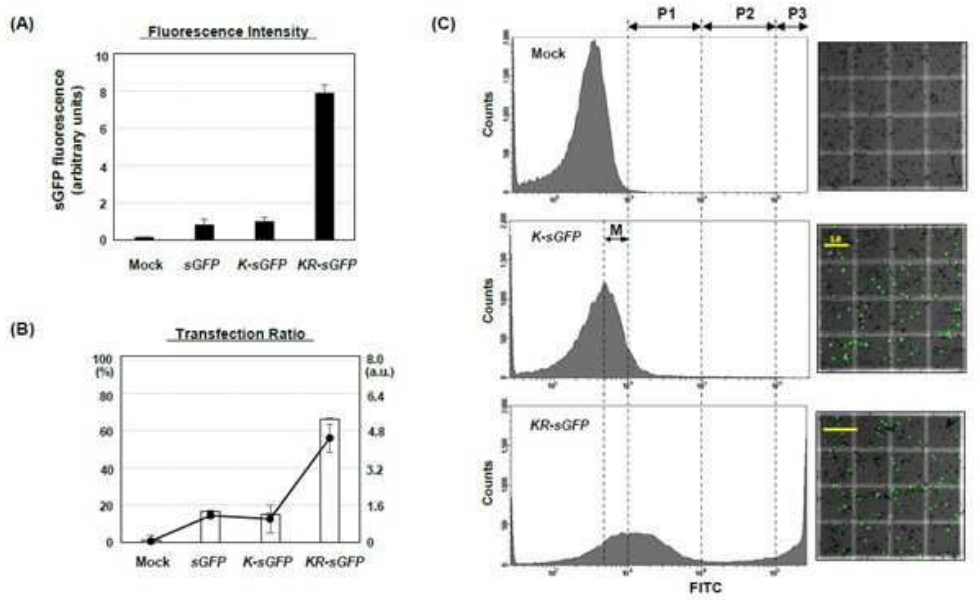
[0072] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

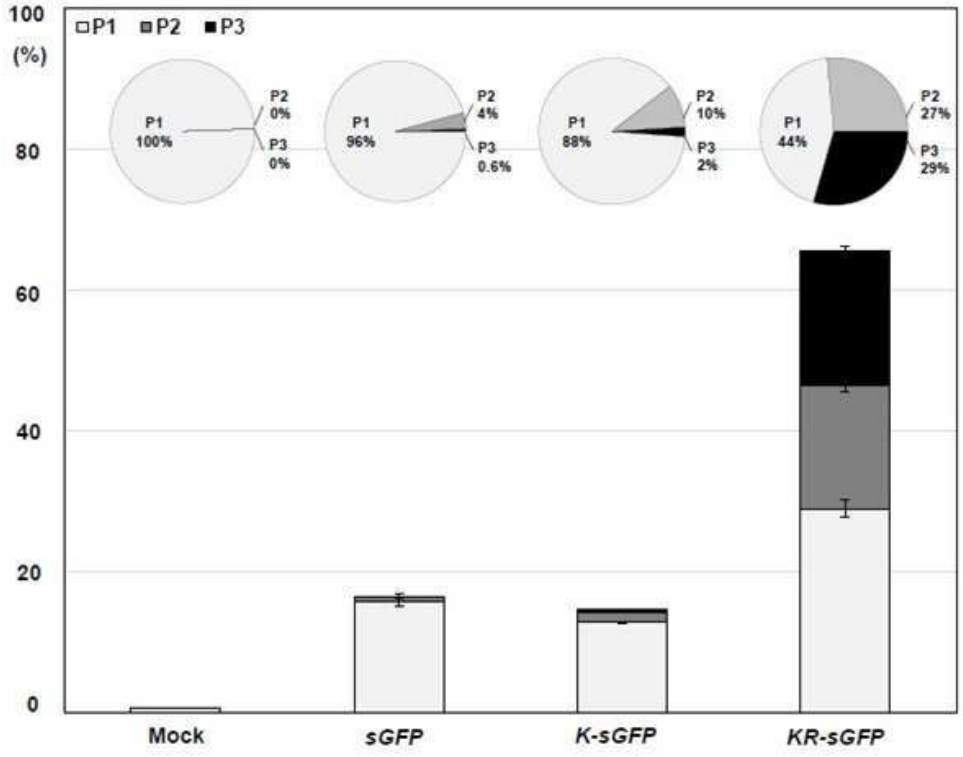
도면1



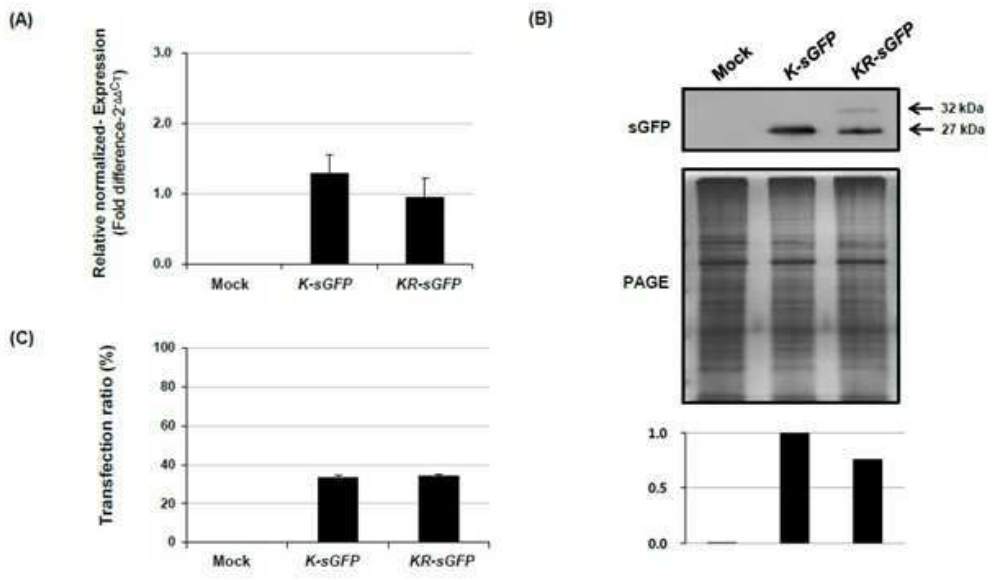
도면2


(A)
Fluorescence Intensity
sGFP fluorescence (arbitrary units)
Mock
sGFP
K-sGFP
KR-sGFP
(B)
Transfection Ratio
(%)
(a.u.)
(C)
P1
P2
P3
Mock
K-sGFP
KR-sGFP
M
Counts
FITC

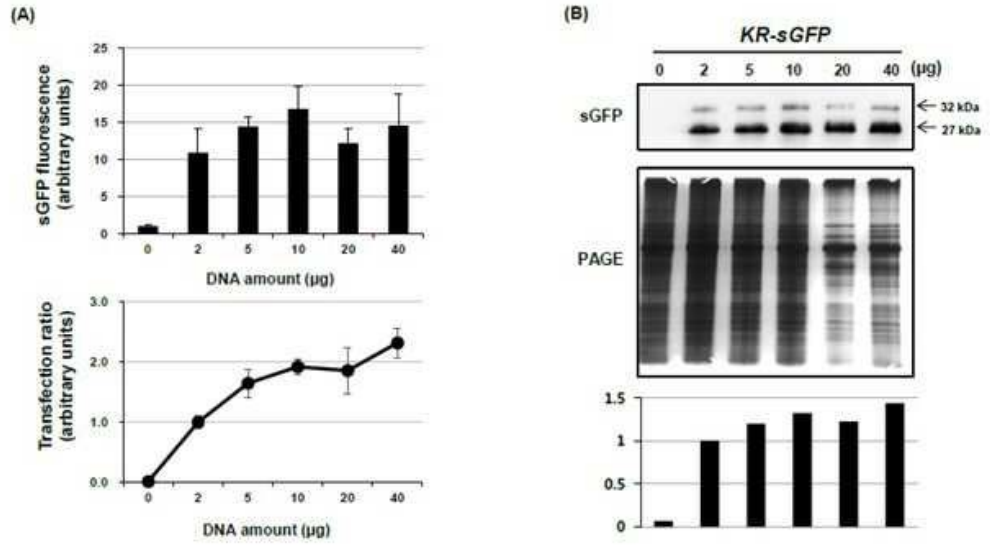
도면3


P1
P2
P3
(%)
P1 100%
P2 0%
P3 0%
P1 96%
P2 4%
P3 0.6%
P1 88%
P2 10%
P3 2%
P1 44%
P2 27%
P3 29%
Mock
sGFP
K-sGFP
KR-sGFP

도면4



도면5



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> METHOD FOR IMPROVING FLUORESCENCE INTENSITY OF FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS BY LOCALIZATION OF A GREEN FLUORESCENT PROTEIN INTO CHLOROPLASTS

<130> GKH15P-0093-KR

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 80

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> chloroplast transit peptide

<400> 1

Met Ala Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Leu Trp Thr Ala Ala Pro His
1 5 10 15

Pro His Gly Ser Cys Ile Arg Ile His Ala Ile Phe His Gln Arg His
20 25 30

Gln Arg Arg Gly Arg Arg Pro Val Val Val Ala Ser Ser Val Arg Pro
35 40 45

Leu Gln Ala Ala Ser Leu Ala Val Ala Thr Ala Pro Val Ala Val Ala
50 55 60

Ser Arg Arg Thr Ala Ala Glu Glu Ala Val Tyr Glu Val Val Leu Arg
65 70 75 80