(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년11월13일
(11) 등록번호 10-0775642
(24) 등록일자 2007년11월05일

(51) Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-0052712
(22) 출원일자 2006년06월12일
심사청구일자 2006년06월12일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020050043036 A

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 수원캠퍼스내
(72) 발명자
김해영
경기 용인시 기흥읍 서천리 1번지
김재환
서울 은평구 신사2동 300-131호 삼익빌라 106호
(74) 대리인
이덕록

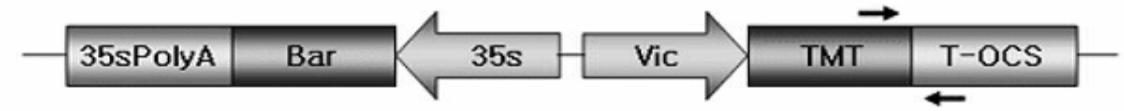
전체 청구항 수 : 총 1 항 심사관 : 신경아

(54) 비타민 E 강화 유전자변형 들깨에 대한 정성 P C R분석법

(57) 요 약

본 발명은 비타민 E 강화 유전자변형 들깨에 대한 정성 PCR 분석법에 관한 것으로, 유전자변형 들깨의 내재유전자 KAS-1과 외래유전자 TMT와 OCS terminator 연결부위를 동시에 증폭시킬 수 있는 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 실시함으로써 유전자변형 들깨를 정성적으로 분석하는 방법을 제공하는 효과가 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

들깨 내재유전자인 KAS-1(β-ketoacyl-ACP synthase I)를 증폭시키기 위한 서열목록 서열번호 1과 2의 프라이머 쌍과 외래유전자인 TMT(γ-tocopherol methyl transferase) 유전자와 OCS(Octopine synthase) 터미네이터의 연결부위를 증폭시키기 위한 서열목록 서열번호 3과 4의 프라이머 쌍을 이용하여 duplex-PCR을 실시하고,

PCR 산물이 상기 내재유전자에 해당하는 95bp와 상기 외래유전자에 해당하는 148bp의 2 종류의 밴드로 나타남을 확인함으로써 들깨의 유전자변형 여부를 분석함을 특징으로 하는 감마-토코페롤 메틸트랜스퍼라아제(γ-tocopherol methyltransferase, TMT)를 코딩하는 유전자, 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*) 유래의 bar 유전자 및 옥토핀 합성효소의 터미네이터를 포함하는 유전자변형 들깨에 대한 정성 PCR 분석방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<6> 본 발명은 비타민 E 강화 유전자변형 들깨에 대한 정성 PCR 분석법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 비타민 E 강화 유전자변형 들깨의 내재유전자 와 외래유전자에 대한 각각의 특이 프라이머 쌍을 제작하여 PCR 증폭시킴으로써 국내에서 개발된 비타민 E 강화 유전자변형 들깨를 정성적으로 분석하는 방법에 관한 것이다.

<7> 전세계 유전자변형 작물 재배 면적은 농업생명공학 국제서비스(ISAAA; International Service for the Acquisition of Agri-biotech Application) 2005년 말 통계에 따르면 21개국에서 9,100만 헥타르로 2004년 17개국 8,100만 헥타르보다 11% 증가하였으며, 1996년 이후 매년 두 자리 수 이상의 증가율을 보이고 있으며, 10년 동안 50배가 증가하였다 또한, 개발이 완료되어 상품화가 허가된 GM작물은 18개 작물 78개 품종으로 옥수수, 유채, 콩, 토마토, 면화, 감자 등이 보고되어 있다(James, C. (2005) *ISAAA Briefs* No. 34. ISAAA: Ithaca, NY).

<8> 우리나라에서도 농촌진흥청을 중심으로 기업 및 대학 연구소에서 제초제와 병충해, 각종 재해에 대한 저항성을 높이거나 기능을 강화한 벼, 토마토, 감자, 콩, 고추, 배추, 들깨 등 18개 작물을 대상으로 다수의 유전자변형 작물들을 개발 중에 있으며 이중 일부는 최종 개발 단계에 있는 것으로 알려져 있다. 특히, 유전자변형 들깨의 경우, 농촌진흥청 농업생명공학연구원과 작물시험장은 생명공학기술을 이용하여 들깨의 형질전환방법을 확립하고, 유용한 유전자를 들깨에 도입함으로써 기능성 들깨 2종류를 육성하였다. 토코페롤합성유전자(γ-tocopherol methyltransferase)를 분리하여 들깨 종자에 형질 전환하여 대량 발현시킴으로써 감마토코페롤을 알파토코페롤로 전환시켜 알파토코페롤 고함유 들깨를 개발하였다(Kim, K. H et al. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 45(4), 203-206; Shigeoka, S. et al. *Biochim Biophys. Acta* 1128, 220-226; Kim, K. H. et al. *Plant Cell Rep.* 23, 386-390). γ-tocopherol methyltransferase는 토코페롤 생합성 대사의 마지막 단계인 감마 토코페롤을 알파 토코페롤로 변환하는데 관여하는 효소이다. 2003년 농림부 보고에 따르면 들깨의 재배 면적이 2.9만 ha이고 종실 생산량은 22.4M/T으로 참깨 다음으로 많이 생산되는 특용작물로서 들깨유는 식용 및 산업용으로 사용되며 깻잎은 연간 1,000억 원 이상이 거래되는 작물이다. 따라서 국내에서 개발된 기능성 유전자변형 들깨도 이용가치가 높을 것으로 기대되며 상업화될 가능성이 높은 작물 중의 하나이다.

<9> 따라서, 본 발명의 목적은 국내에서 개발된 제초제에 내성을 갖고 비타민 E가 강화된 유전자변형 들깨를 정성적

으로 분석하는 방법을 제공하고자 한다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<10> 본 발명의 상기 목적은 유전자변형 들깨의 정성 PCR분석법을 개발하기 위해 들깨의 내재유전자를 선별하고, 들깨의 게놈 내에 싱글 카피(single copy)로 존재하는 것으로 알려져 있는 KAS-I(β-ketoacyl-ACP synthase I; AF026148) 유전자의 염기서열을 기초로 95bp의 PCR 산물을 확인할 수 있는 특이적인 프라이머 쌍을 제작하여 들깨를 포함한 16개 작물에 대해 PCR을 수행하여 들깨에 특이적으로 증폭되는 것을 확인하고, 비타민 E가 강화된 유전자변형 들깨의 경우 TMT(γ-tocopherol methyl transferase) 유전자와 OCS(Octopine synthase) terminator의 연결 부위를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 제작하고, 상기 두 쌍의 프라이머를 이용하여 duplex PCR을 실시하였으며 유전자변형 들깨를 판단할 수 있는 PCR 조건을 확립하고, 상기 조건에서 LOD(Limit of Detection) 값을 측정함으로써 달성하였다.

발명의 구성 및 작용

<11> 본 발명은 유전자변형 들깨의 내재유전자와 외래유전자를 동시에 증폭시킬 수 있는 프라이머 쌍 제작단계; 상기 프라이머 쌍의 특이성 확인 단계; 및, duplex-PCR의 민감도 측정단계로 구성된다.

<12> 본 발명은 들깨 내재유전자인 KAS-1(β-ketoacyl-ACP synthase I)를 증폭시키기 위한 서열목록 서열번호 1과 2의 프라이머 쌍과 외래유전자인 TMT(γ-tocopherol methyl transferase) 유전자와 OCS(Octopine synthase) 터미네이터의 연결부위를 증폭시키기 위한 서열목록 서열번호 3 및 4의 프라이머 쌍을 이용하여 duplex-PCR을 실시함으로써 들깨의 유전자변형 여부를 분석함을 특징으로 하는 비타민 E 강화 유전자변형 들깨에 대한 정성 PCR 분석방법을 제공한다.

<13> 이하 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

<14> [실시예]

<15> **실시예 1: 유전자변형 들깨의 정성 분석을 위한 프라이머 제작 및 상기 프라이머의 특이성 확인**

<16> 유전자변형 들깨에 대해 정성적으로 분석하기 위해 PCR 증폭을 위한 프라이머 쌍을 제작하고, 상기 프라이머 쌍의 특이성을 확인하였다.

<17> 이를 위해, 유전자변형 들깨는 농촌진흥청 농업생명공학연구원 생물안전성과로부터 분양받아 이용하였으며, 유전자변형이 되지 않은 들깨를 포함한 감자, 메밀, 콩, 배추, 오이, 고추, 쌀, 녹두, 해바라기, 보리, 밀, 팥, 옥수수, 유채, 면화 등 16개 작물은 농업생명공학연구원 유전자원과로부터 분양받거나 국내 시장에서 구입하였다.

<18> 들깨의 내재 유전자인 KAS-I(β-ketoacyl-ACP synthase I; AF026148) 유전자의 염기서열을 기초로 하여 특이적인 프라이머 쌍을 제작하여 95bp의 PCR 산물을 얻을 수 있도록 제작하였다.

<19> 또한, 도 1에 도시된 바와 같이, 유전자변형 들깨에 삽입된 TMT(γ-tocopherol methyltransferase) 유전자와 OCS(Octopine synthase) terminator를 증폭시켜 148bp의 PCR 산물을 얻을 수 있도록 특이적인 프라이머 쌍을 제작하였다. 이들 프라이머 쌍에 대한 각각의 염기서열은 표 1과 같다.

표 1

<20> 프라이머 쌍의 서열

프라이머 명칭	서열(5'-3')	표적(target)	증폭 산물의 크기(bp)
Pfu3-F	AGCTTCGATTCCGCCACGCT	내재 유전자(KAS-1)	95
Pfru3-R	GGAGCGGTGGGGTTTGAGAA		
TMTO-F	GGTGATGCCATTGATGATCG	TMT/T-OCS	148
TMTO-R	GGCGTCTCGCATATCTCATT		

<21> 상기에서 제작한 프라이머 쌍의 특이성을 확인하기 위해 PCR을 실시하였다. 이를 위해, 유전자변형 들깨, 유전자변형이 되지 않은 들깨, 그리고 다른 15종의 작물들은 모두 1g 씩의 시료를 준비하여 막자 사발에 넣고 액체

질소를 가하여 분말 형태로 만들어 DNeasy Plant Maxi kit(퀴아젠, 미국)을 이용하여 게놈 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 UV-visible spectrophotometer UV-1700(쉬마쥬, 일본)를 이용하여 260nm와 280nm에서 정량하였으며 260nm/280nm가 1.8~2.0 사이인 것을 이용하였다.

<22> PCR 반응 용액은 한 시료당 25㎕로 만들어 사용하였다. 반응 용액은 2.5㎕의 10×PCR 완충액(어플라이드 바이오시스템스, 미국), 2㎕의 dNTP(각각 2.5mM, 어플라이드 바이오시스템스), 1.5㎕의 1.5mM $MgCl_2$(어플라이드 바이오시스템스), 10μM의 Pfru3-F/R와 4μM의 TMTO-F/R, 그리고 50ng의 주형 DNA가 포함되도록 하였고, 반응은 thermocycler PC808(ASTEC, 일본)를 이용하여 수행하였다.

<23> PCR 조건으로 첫 사이클에서 95℃에서 5분간 수행하였고 나머지 사이클에서는 95℃에서 30초, 63℃에서 30초, 72℃에서 30초간 40 사이클을 수행하였으며, 마지막 단계로 72℃에서 8분간 수행한 후, 4℃에서 PCR 산물을 보관하였다. PCR 산물은 3% 아가로우즈 젤 상에서 전기영동을 수행하였다.

<24> 또한, 상기로부터 유전자변형 들깨에 특이적인 프라이머 쌍을 이용하여 증폭된 PCR 산물들은 Automated DNA Sequencer ABI 3700(어플라이드 바이오시스템스)을 이용하여 두 번 반복하여 염기서열을 분석하였다.

<25> 도 2에 나타난 바와 같이, 들깨(*Perilla frutescens*)을 포함하여 감자(*Solanum tuberosum*), 메밀(*Fagopyrum esculentum*), 콩(*Glycine max* L.), 배추(*Brassica campestris subsp. napus var. pekinensis*), 오이(*Cucumis sativus*), 고추(*Capsicum annuum* L.), 쌀(*Oryza sativa*), 녹두(*Phaseolus radiatus*), 해바라기(*Helianthus annuus*), 보리(*Hordeum vulgare var. hexastichon*), 밀(*Triticum aestivum* L.), 팥(*Phaseolus angularis*), 옥수수(*Zea mays* L.), 유채(*Brassica campestris*), 그리고 면화(*Gossypium spp.*)까지 16종의 작물로부터 분리된 게놈 DNA를 주형으로 하고 들깨의 내재 유전자에 특이적인 프라이머(Pfru3-F/R) 쌍을 이용하여 PCR을 수행한 결과 들깨에서만 PCR 산물을 얻고, 다른 작물에서는 PCR 산물이 검출되지 않았다.

<26> 따라서 본 발명에서 제작한 프라이머 쌍이 유전자변형 들깨의 정성 PCR 분석에 있어서 내재 유전자에 대한 특이적인 프라이머로 적용할 수 있음을 확인하였다.

<27> **실시예 2: 비타민 E 강화 유전자변형 들깨에 대한 Duplex PCR**

<28> 국내에서 개발된 유전자변형 들깨는 TMT(γ-tocopherol methyltransferase) 유전자를 삽입하여 비타민 E 성분을 강화하고 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*) 유래의 bar 유전자를 삽입하여 제초제 내성을 갖도록 개발된 것이다. 또한 OCS(Octopine synthase) terminator가 삽입되어 있어서 본 발명에서는 유전자변형 들깨의 분석을 위해 TMT 유전자와 OCS terminator 연결부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머 쌍을 제작하였다. 이러한 프라이머 쌍과 들깨의 내재유전자를 특이적으로 증폭시킬 수 있는 프라이머(Pfru3-F/R) 쌍을 이용하여 duplex PCR을 실시하였다(도 3).

<29> 또한, 유전자변형 들깨를 검출할 수 있는 특이적인 프라이머(TMTO-F/R) 쌍은 상기 실시예 1에서 제시한 PCR 조건에서 148bp의 PCR 산물을 얻었다. 이러한 PCR 산물은 DNA 시퀀서 기기의 염기서열 분석을 통해서 각각의 염기서열을 확인하였다(도 4).

<30> **실시예 3: Duplex PCR 분석의 민감도 측정**

<31> 100% 유전자변형 들깨의 게놈 DNA 50ng~0.0005ng를 주형으로 하여 duplex PCR를 실시하여 민감도를 측정하였다. 내재유전자를 증폭시켜 95bp의 PCR 산물을 얻을 수 있는 프라이머 쌍과 유전자변형 들깨에 삽입된 외래유전자를 증폭시켜 148bp의 PCR 산물을 얻을 수 있는 프라이머 쌍을 이용하여 하나의 튜브에서 농도별 유전자변형 들깨의 게놈 DNA를 증폭시켰다.

<32> 도 5에 나타난 바와 같이, 0.5ng까지 정확한 PCR 산물이 확인되었다.

<33> 따라서, 본 발명에서 사용한 프라이머 쌍의 특이성과 민감도를 확인함으로써 유전자변형 들깨의 PCR 정성분석법을 확립하였다.

발명의 효과

<34> 상기 실시예를 통해 살펴본 바와 같이, 본 발명은 비타민 E 강화 유전자변형 들깨에 대한 정성 PCR 분석법에 관한 것으로, 유전자변형 들깨의 내재유전자 KAS-1과 외래유전자 TMT와 OCS terminator 연결부위를 동시에 증폭시킬 수 있는 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 실시함으로써 유전자변형 들깨를 정성적으로 분석하는 방법을 제공하는 효과가 있다. 따라서, 본 발명의 목적은 작물의 품질개량에 적용될 수 있어 작물산업상 매우 유용한 발명인

것이다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 유전자변형 들깨의 정성 분석을 위한 PCR 전략에 대한 도식화를 나타낸 것이다.

<2> 도 2는 Pfru3-F/R 프라이머쌍을 이용한 특이성 분석 결과를 도시한 젤 사진도이다. 이때, 레인 1은 들깨, 레인 2는 감자, 레인 3은 메밀, 레인 4는 콩, 레인 5는 배추, 레인 6은 오이, 레인 7은 고추, 레인 8은 쌀, 레인 9는 녹두, 레인 10은 해바라기, 레인 11은 귀리, 레인 12는 밀, 레인 13은 팥, 레인 14는 옥수수, 레인 15는 유채, 레인 16은 면화, 레인 17은 주형을 넣지 않은 것이다.

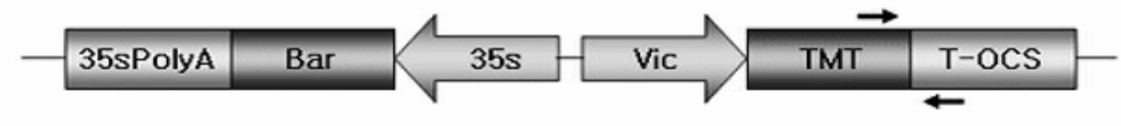
<3> 도 3은 유전자변형되지 않은 들깨와 유전자변형 들깨에서의 PCR 정성 분석 결과를 도시한 젤 사진도이다. 이때, 레인 1은 유전자변형되지 않은 들깨(95bp), 레인 2는 유전자변형 들깨(148bp), 레인 3은 주형을 넣지 않은 시료이다.

<4> 도 4는 유전자변형 들깨에서 TMTO-F/R 프라이머쌍을 이용하여 증폭된 PCR 산물의 시퀀싱 결과를 도시한 것이다.

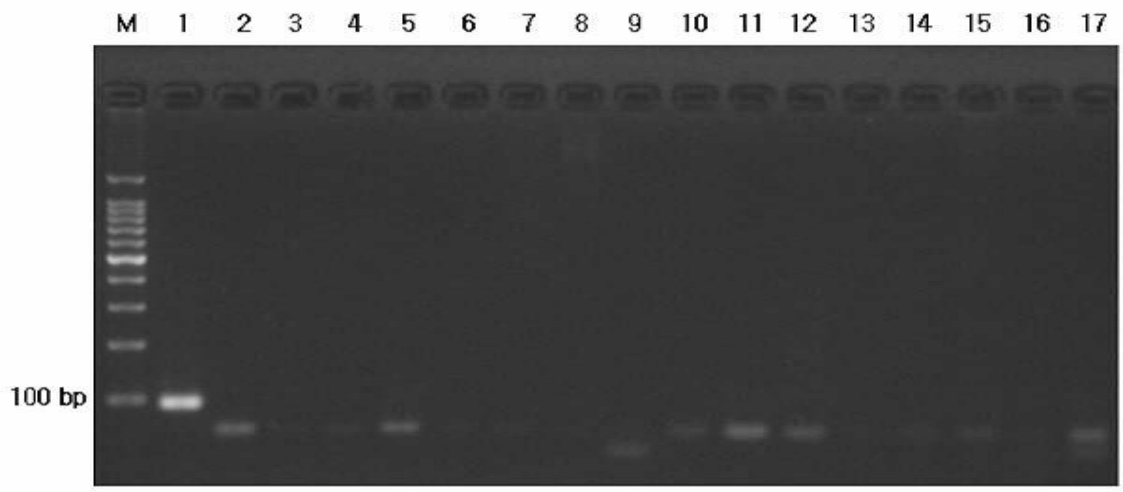
<5> 도 5는 정성 PCR 분석의 민감도를 도시한 젤 사진도이다. 이때, 레인 1-6은 50, 5, 0.5, 0.05, 0.005 및 0.0005 ng의 100% 유전자변형 들깨이다.

도면

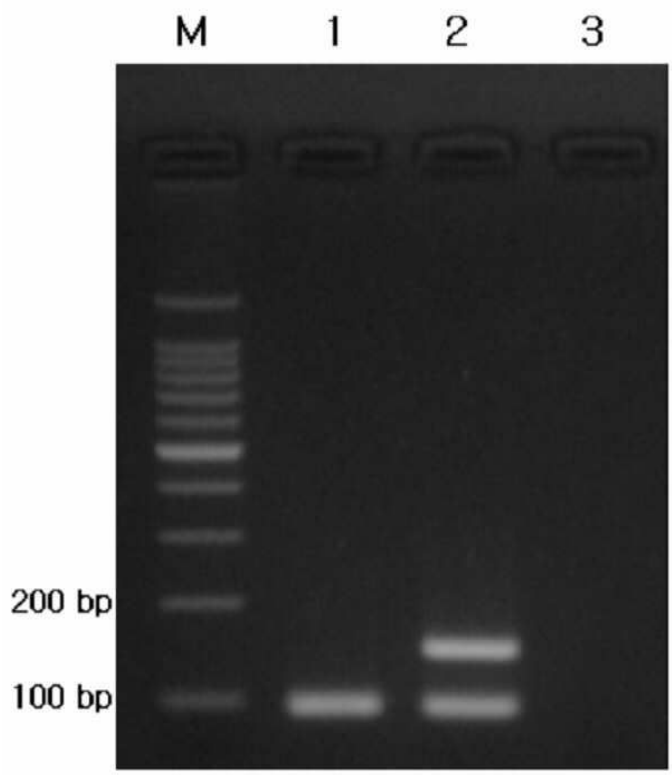
도면1



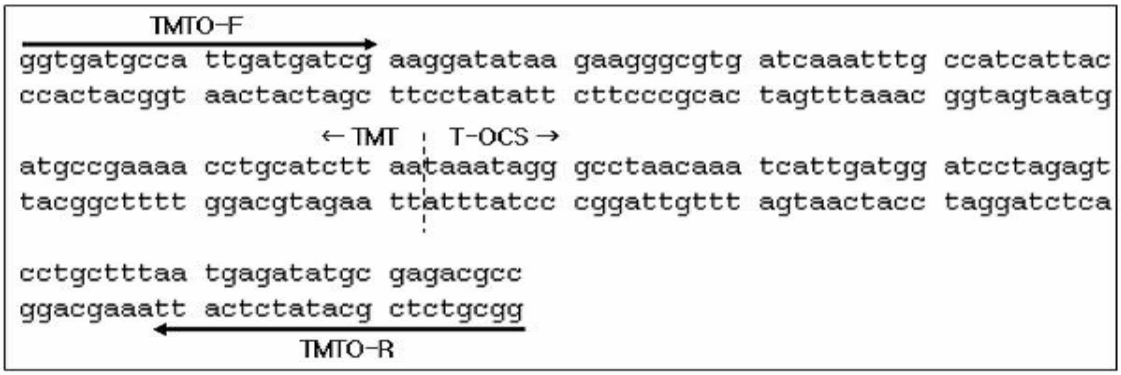
도면2



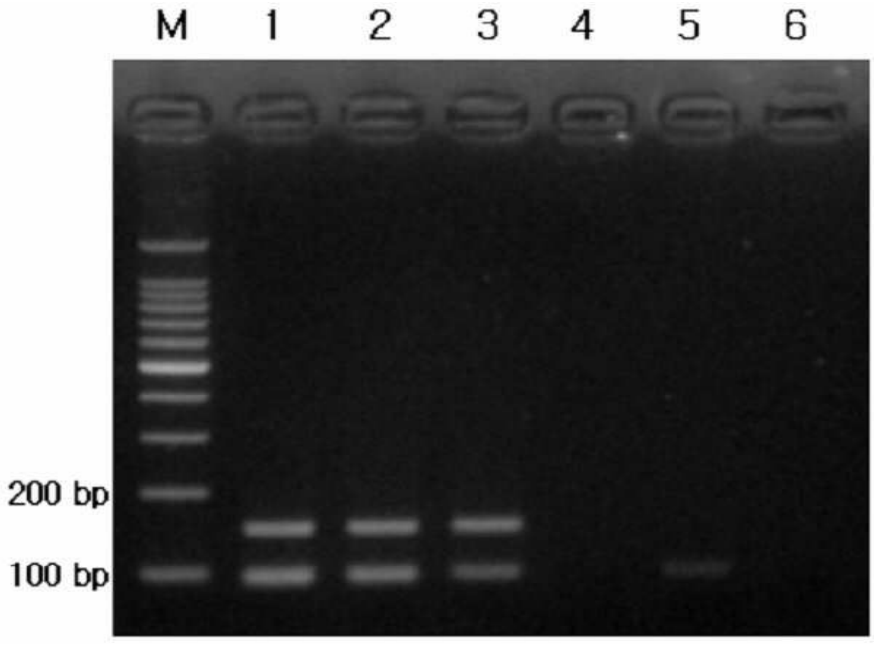
도면3


M
1
2
3
200 bp
100 bp

도면4


TMTO-F
ggtgatgcca ttgatgatcg aaggatataa gaagggcgtg atcaaatttg ccatcattac
ccactacggt aactactagc ttcctatatt cttcccgcac tagtttaaac ggtagtaatg
← TMT
T-OCS →
atgccgaaaa cctgcatctt aataaatagg gcctaacaaa tcattgatgg atcctagagt
tacggctttt ggacgtagaa ttatttatcc cggattgttt agtaactacc taggatctca
cctgctttaa tgagatatgc gagacgcc
ggacgaaatt actctatacg ctctgcgg
TMTO-R

도면5



서 열 목 록

서열목록 전자파일 첨부