(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0020352
(43) 공개일자 2024년02월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6895 (2018.01) *C12Q 1/686* (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6895 (2018.05)
C12Q 1/686 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2022-0097895
(22) 출원일자 2022년08월05일
심사청구일자 2022년08월05일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
박영두
경기도 용인시 수지구 성복2로 220 힐스테이트 3차 305동 1404호 (성복동, 버들치마을 힐스테이트3차)
전영지
경기도 수원시 영통구 삼성로 11, 204동 1304호 (신동, 래미안 영통마크원 2단지)
천수정
경기 수원시 영통구 매영로 417 302호
(74) 대리인
특허법인 다해

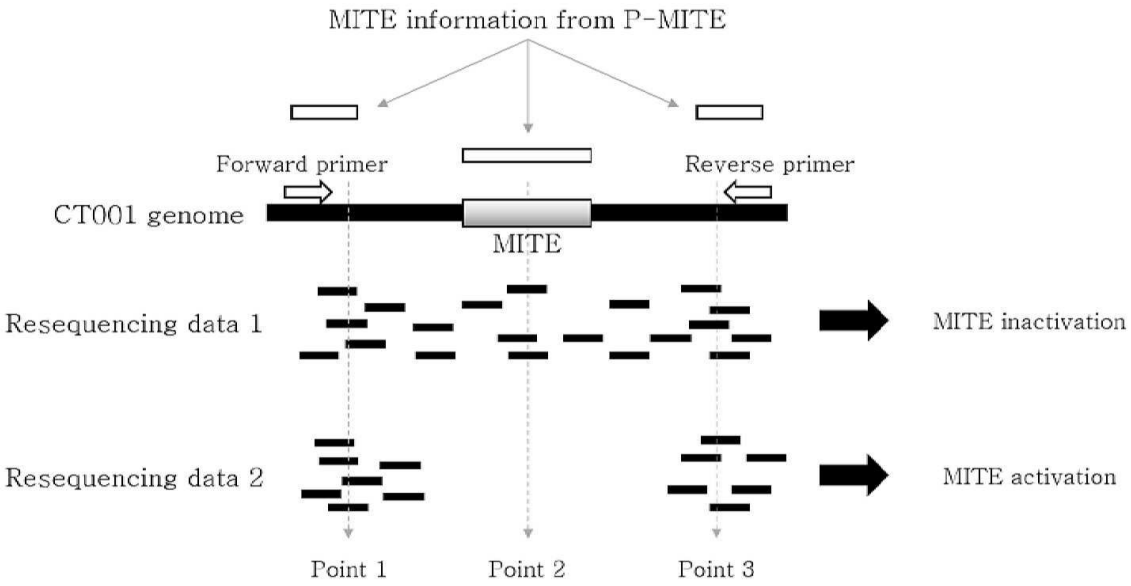
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **배추 형질전환체 특이적 활성 전이인자인 PTE-4 검출용 프라이머 세트**

(57) 요 약

본 발명은 배추 형질전환체 특이적 활성 전이인자인 PTE-4 검출용 프라이머 세트에 관한 것으로, 본 발명에서 규명한 프라이머 세트는 형질전환 과정에 의해 전이인자 PTE-4이 활성된 개체를 PCR을 이용하여 용이하고 신속하게 판별하는데 유용하게 이용될 수 있으며, 나아가 유전적으로 안정된 형질전환체를 개발하는데 유용하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12Q 2600/13 (2013.01)
C12Q 2600/156 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395072287
과제번호 PJ015793012022
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 바이오그린연계농생명혁신기술개발
연구과제명 작물 분자육종소재의 유용성 검증 및 활용을 위한 비의도적 유전체 변이 선발마커 개발 (2/2)
기 여 율 1/1
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2021.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 3의 염기서열로 이루어진 PTE-4 전이인자를 포함하는 배추 전이인자 활성 검출용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 형질전환 또는 조직배양 배추 세포의 전이인자 활성 여부를 검출하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

서열번호 3의 염기서열을 포함하는 영역을 증폭할 수 있는 배추 전이인자 PTE-4 활성화 검정용 프라이머 세트로서,

상기 프라이머 세트는 배추의 1번 염색체에서 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 유전자의 upstream 및 downstream에서 200 내지 300 bp 거리에 위치하는 영역과 상보적인 서열을 갖는 것을 특징으로 하는, PTE-4 활성화 검정용 프라이머 세트.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 프라이머 세트는 서열번호 1 및 2의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, PTE-4 활성화 프라이머 세트.

청구항 5

배추 시료로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계;

게놈 DNA를 주형으로 제3항 또는 제4항의 배추 전이인자 PTE-4 활성 검정용 프라이머 세트를 이용하여 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하는 단계; 및

상기 중합효소연쇄반응으로 수득된 증폭산물을 분석하는 단계;를 포함하는 배추 전이인자 PTE-4 활성 검정 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 PCR은 제4항의 프라이머 세트를 이용하여 수행되었고,

상기 방법은 수득된 증폭산물을 분석한 이후에 그 길이가 793 bp이면 전이인자 PTE-4이 비활성화된 배추이고, 493 bp이면 전이인자 PTE-4이 활성화된 배추인 것으로 판정하는 단계를 추가로 포함하는 배추 전이인자 PTE-4 활성 검정 방법.

청구항 7

제3항 또는 제4항의 프라이머 세트를 포함하는 배추 전이인자 PTE-4 활성 검정용 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) 형질전환 과정에서 전이 활성을 보이는 PTE-4 전이인자의 전이 상태를 검정할 수 있는 프라이머 세트 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물 조직배양은 식물체의 조직이나 세포, 기관 등을 적출하여 기내에서 영양분이 함유된 배지에 무균 배양함으로서 완전한 기능을 가진 식물체로 재생시키는 기술이다. 식물은 전형성능이라는 특성을 가지고 있어, 식물체로부터 적출해낸 절편체(explant)는 탈분화, 재분화 과정을 거쳐서 완전한 식물체가 될 수 있다. 식물 조직배양 기술을 기반으로하는 식물 형질전환은 외래 유전자를 식물체에 도입하여 새로운 형질을 가지는 다양한 식물체를 육성할 수 있는 분자생물학적 기술이다.

[0003] 조직배양을 통해 생성된 자식개체는 모개체의 절편체로부터 체세포분열을 통해 분화된 식물이므로 모개체와 동일한 유전적 배경을 가진다. 그러나 조직배양 과정 중 기내에서 받는 다양한 스트레스에 의해 자식개체의 유전적 배경이 모개체와 달라지는 체세포 영양계 변이가 나타날 수 있다. 체세포 영양계 변이의 원인 중 하나인 전이인자의 활성에 의해 조직배양 식물이나 분자생물학적 기술로 개발된 형질전환 개체에서 모개체와 유전적 및 표현현적 형질이 변화하였다는 보고들이 있으며 전이인자들의 활성 기작이나 조건에 대한 연구가 진행중이다.

[0004] 전이인자(transposable element, transposon)는 염색체상의 새로운 위치로 전이될 수 있는 DNA 조각이다. 전이인자는 식물 유전체에 높은 비율로 존재하고 있으며 염색체 재배열, 유전자 기능 변화에 기여하기 때문에 유전체 연구나 식물 진화 연구에 응용될 수 있다. 전이인자는 두가지 클래스로 분류될 수 있는데, 클래스 I(class I) 전이인자는 RNA 레트로트랜스포존(retrotransposon)이라 하며 RNA를 중간물질(intermediate)로 하여 전이인자가 RNA로 전사된 후 DNA로 역전사되어 새로운 위치에 삽입되는 copy-and-paste 기작을 가지고 있다. LTR(long terminal repeat), DIRS, PLE, LINE(long interspersed nuclear element) 및 SINE(short interspersed nuclear element)이 이에 속한다. 클래스 II(class II) 전이인자는 DNA 트랜스포존(DNA transposon)이라 하며 DNA를 중간물질로 한다. 전이될 때 cut-and-paste 기작을 통해 이동하기 때문에 원래 있던 위치에서 전이인자가 잘려나가고, 잘려나간 조각 자체가 새로운 위치에 삽입되는 종류이다. DNA 트랜스포존은 TIR 트랜스포존, Crypton, Helitron 및 Maverick 등이 있다. 이중 TIR 트랜스포존은 TIR(terminal inverted repeat)이라고 하는 말단 역위 반복 구조를 가지고 있다.

[0005] 전이인자 중에는 내부에 트랜스포사제(transposase)를 암호화하는 유전자 서열이 없는 비자율적 전이인자(non-autonomous transposable element)들이 있다. MITE(miniature inverted repeat transposable element)는 클래스 II DNA 트랜스포존에 속하며 내부에 유전자를 암호화하는 서열이 없는 800 bp 이하의 짧고, 식물 유전체상에 많은 복제수로 존재하는 전이인자이다. MITE는 양 말단에 TIR 구조를 가지고 있으며 유전자 내부나 가까운 위치에 많이 분포하고 있어 유전자 발현에 영향을 줄 것으로 예상된다. MITE 후보를 찾아낼 수 있는 컴퓨터 프로그램인 MITE hunter, MITE digger 및 RSPB를 이용하여 배추를 비롯한 41개의 식물 유전체로부터 획득한 MITE 정보를 제공하는 P-MITE database(plantMITE, http://pmite.hzau.edu.cn/django/mite)를 식물 전이인자 연구에 활용할 수 있다.

[0006] 분자마커는 DNA 수준에서 목적하는 유전자나 유전자 좌를 검정할 수 있는 DNA 서열로서, PCR(polymerase chain reaction) 기술을 이용하여 쉽고 빠르게 유전적 다형성을 검출할 수 있다. PCR 기술을 이용한 분자마커에는 RAPD(random amplification of polymorphic DNA), AFLP(amplified fragment length polymorphism), SCAR(sequence characterized amplified regions) 및 SSR(simple sequence repeat) 마커 등이 있다.

[0007] 따라서 PCR 기술을 기반으로 하여 전이인자의 활성화 여부를 식별할 수 있는 분자마커를 개발한다면, 조직배양 개체 및 형질전환체에서 전이인자 활성에 의한 체세포 영양계 변이를 조기에 예측할 수 있을 것으로 기대된다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 조직배양 과정을 포함한 형질전환 과정에서 전이(transsposition) 활성이 보여지는 전이인

자를 선별하기 위한 연구 결과, 배추(Brassica rapa ssp. pekinensis) 형질전환체에서 전이 활성이 나타나는 전이인자를 확인하였다. 선별된 전이 인자를 PCR 기술을 기반으로 하여 특이적인 다형성을 검출낼 수 있는 프라이머를 개발하였으며 해당 전이인자 활성 검정에 이용할 수 있음을 밝혀, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) KR 10-1998526

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 프라이머로 이루어진 배추 전이인자 PTE-4 활성 검정용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 배추 전이인자 PTE-4 활성 검정 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프라이머 세트를 포함하는 배추 전이인자 PTE-4 활성 검정용 키트를 제공하는 것이다.

[0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명자들은 형질전환체 특이적으로 활성이 변화하는 전이인자를 발굴하고자 예의 연구 노력한 결과, 배추 형질전환체의 유전체 중 서열번호 3의 서열을 가지는 전이인자 내부 또는 그 인접영역에서 고빈도로 다형성이 발생되고 있는 것을 발견하였다.

[0015] 이에, 본 발명은 상기 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 영역의 전이인자를 PTE-4으로 명명하고, 상기 PTE-4 전이인자를 배추의 형질전환체에서 전이인자 활성화 여부를 검출하기 위한 바이오마커로 제공한다.

[0016] 본 발명의 바이오마커는 형질전환 배추 제작에 있어서 목적하는 형질전환이 발생한 배추 선정을 위한 것으로, 형질전환 이후에 PTE-4 활성화 여부를 확인하고, 비활성화 개체를 선정하여 예측 밖에 유전적 변이가 발생하지 아니하여 게놈 안정성이 확보된 개체를 선별하는 것에 이용될 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 배추 전이인자 PTE-4 인접영역의 염기서열을 이용하여 이를 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 설계하고, 상기 프라이머 세트를 이용한 PCR 증폭 산물의 길이를 분석하여 형질전환 배추의 PTE-4 전이인자의 활성화 여부를 검정하는 방법을 제공할 수 있다.

[0018] 이에, 본 발명은 상기 PTE-4 전이인자를 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 배추 전이인자 PTE-4의 활성화 검정의 용도에 제공할 수 있다.

[0019] 본 발명이 발굴한 바이오마커인 PTE-4 전이인자는 배추의 1번 염색체 상에 위치하는바, 상기 PTE-4 전이인자를 증폭할 수 있는 프라이머는 배추 1번 염색체에서 PTE-4 전이인자를 포함하는 영역을 증폭할 수 있는 것이며, 구체적으로 PTE-4 전이인자의 200~300bp upstream과 상보적인 20~23 mer 길이의 올리고뉴클레오티드와 200~300bp downstream과 상보적인 20~23 mer 길이의 올리고뉴클레오티드로 이루어진 프라이머 세트일 수 있다.

[0020] 보다 구체적으로 상기 프라이머 세트는 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열로 이루어지거나 이를 포함하는 것일 수 있으며, 본 발명은 상기 프라이머 세트를 포함하는 배추 전이인자 PTE-4 활성 검정용 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 배추 전이인자 PTE-4은 서열번호 3의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 (1) 배추 시료로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계;

[0023] (2) 게놈 DNA를 주형으로 상기 배추 전이인자 PTE-4 활성 검정용 프라이머 세트를 이용하여 중합효소연쇄반응

(PCR)을 수행하는 단계; 및

[0024] (3) 상기 중합효소연쇄반응으로 수득된 증폭산물을 분석하는 단계;를 포함하는 배추 전이인자 PTE-4 활성 검정 방법을 제공한다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 방법은 (4) 수득된 증폭산물의 길이가 700bp 이상 900 bp 미만인 경우 전이인자 PTE-4가 비활성화된 배추이고, 수득된 증폭산물의 길이가 700bp 미만인 경우 전이인자 PTE-4가 활성화된 배추인 것으로 판정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (1) 단계의 배추는 형질전환된 배추인 것이다.

[0027] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 방법은 (4) 단계 이후에 PTE-4이 비활성화된 배추로 판정되는 경우 상기 배추는 예측밖의 비-의도적 변이의 발생 가능성이 낮은 것으로 선별하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 반면, (4) 단계 이후에 PTE-4이 활성화된 배추로 판정되는 경우 상기 배추는 예측밖의 비-의도적 변이의 발생 가능성이 높은 것으로 선별하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 배추에서 PTE-4의 활성 여부를 판별하기 위한 프라이머 세트 및 상기 프라이머 세트를 이용한 판별방법을 제공함으로써, 조직배양 및 형질전환 과정에 의해 전이인자 PTE-4가 활성된 개체를 판별하여, 안정된 형질전환체를 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 본 발명의 전이인자 분석 방법 및 PTE-4의 활성을 특이적으로 판별하는 프라이머 세트 작성 방법의 모식도이다.

도 2는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-4의 활성 검정용 프라이머 세트를 사용한 PCR에 의해 조직배양을 거치지 않은 배추 CT001 개체 및 배추 형질전환체로부터 증폭된 서열의 단편을 전기영동한 사진이다:

M: 100bp size marker, CT001, COPB2 17-24, COPB2 44-20 배추.

도 3은 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-4의 활성 검정용 프라이머 세트를 사용한 PCR에 의해 조직배양을 거치지 않은 배추 CT001 개체 및 배추 형질전환체로부터 증폭된 서열의 단편의 염기서열을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-4의 활성 검정용 프라이머 세트를 조직배양을 거치지 않은 배추 CT001 개체들에 적용하여 증폭 여부를 전기영동하여 확인한 결과를 나타낸 것이다:

M: 100bp size marker, 1-11 조직배양을 거치지 않은 배추 CT001 개체.

도 5는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-4의 활성 검정용 프라이머 세트를 조직배양을 거친 다양한 배추 형질전환체 계통에 적용하여 증폭 여부를 전기영동하여 확인한 결과를 나타낸 것이다:

M: 100bp size marker, N: CT001(대조군), 1-15 배추 형질전환체.

도 6은 서열번호 5 및 서열번호 6로 표시되는 전이인자 SQ043028018의 활성 검정용 프라이머 세트를 조직배양을 거친 다양한 배추 형질전환체 계통에 적용하여 증폭 여부를 전기영동하여 확인한 결과를 나타낸 것이다:

M: 100bp size marker, N: CT001(대조군), 1-15 배추 형질전환체.

도 7은 서열번호 7 및 서열번호 8로 표시되는 전이인자 SQ043000133의 활성 검정용 프라이머 세트를 조직배양을 거친 다양한 배추 형질전환체 계통에 적용하여 증폭 여부를 전기영동하여 확인한 결과를 나타낸 것이다:

M: 100bp size marker, N: CT001(대조군), 1-15 배추 형질전환체.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해

되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0031] **[실시예]**

[0032] **실시예1 : 배추 형질전환체에서 활성화된 전이인자 탐색**

[0033] "P-MITE Database"와 형질전환체의 유전체 재분석 데이터 (resequencing data)를 바탕으로 MITE의 활성을 비교한 후 MITE가 활성화되었다고 판단되는 곳을 선발한 후, 활성 여부를 확인하기 위해 프라이머 세트를 작성하였다(도 1).

[0034] 구체적으로, P-MITE(plant MITE database)를 참고하여 *Brassica rapa*(Chiffu계통)의 MITE superfamily DTA, DTC, DTH, DTM, DTT group의 염기서열 정보를 획득하였다. BLAST를 활용하여 MITE의 염기서열을 형질전환체에 이용된 배추 CT001 계통의 유전체에 맵핑을 실시하여 CT001 유전체 상의 MITE 위치를 확인하였다. 그 후 배추 형질전환체 T2 세대(COPB2 17-24, COPB2 44-20)의 유전체 재분석 데이터를 CT001 유전체와 맵핑 및 정렬하여 MITE의 활성 여부를 분석하였다. 이때 MITE 영역과 해당 MITE의 양쪽 인접 영역으로 reads를 3구역으로 나누어 맵핑하였다. MITE 및 MITE 양쪽 인접 영역의 read가 모두 맵핑되는 경우에는 MITE가 비활성화된 것으로 판단하였으며, MITE 양쪽 인접 영역의 read는 충분히 맵핑되면서 MITE 영역이 최소 3 reads 이하의 depth로 맵핑된 경우에는 MITE가 활성화된 것으로 판단하였다. Inbred line인 CT001과 형질전환체 T2 세대(COPB2 17-24, COPB2 44-20)의 유전체 재분석 데이터를 활용하여 비교 분석하였다.

[0036] **실시예 2: 프라이머 세트 제작**

[0037] 분석 결과 형질전환체 COPB2 17-24와 COPB2 44-20에서 활성화된 MITE를 선별하였다. 선별된 MITE는 CT001의 7번 염색체에 위치한 DTA_Brr73 family에 속하는 MITE로 분석되었으며, 이후 PTE-4로 명명하였다. 해당 MITE 및 MITE 양쪽 인접 영역의 염기서열을 확인한 후 MITE 영역에서 200-300 bp 정도 떨어진 곳에 길이 20-24 mer로 구성된 세 쌍의 프라이머를 제작하였고, 그 서열을 하기 표 1에 나타내었다. PTE-4 F와 PTE-4 R 프라이머를 사용하여 PCR 수행 시 MITE가 활성되지 않은 경우는 757 bp, 활성된 경우는 586 bp의 산물(product)을 가진다. SQ043028018_F와 SQ043028018_R 프라이머를 사용하여 PCR 수행 시 MITE가 활성되지 않은 경우는 642 bp, 활성된 경우는 384 bp의 산물을, SQ043000133_F와 SQ043000133_R 프라이머로 PCR 수행시 MITE가 활성되지 않은 경우는 807 bp, 활성된 경우는 399 bp의 산물을 가질 것으로 예상하였다.

표 1

[0038]

프라이머	염기서열	MITE 비활성	MITE 활성
PTE-4 F(서열번호 1)	5'-CACTGTCTGATTGATGCGATATG-3'	757 bp	586 bp
PTE-4 R(서열번호 2)	5'-AACTCGTCAGTGCTGTAGGAG-3'		
SQ043028018_F(서열번호 5)	5'-GTCAACATACTAACCATTTC-3'	642 bp	384 bp
SQ043028018_R(서열번호 6)	5'-CTCAACAGACTATATCGGA-3'		
SQ043000133_F(서열번호 7)	5'-TGACTTGGTATTAGATGTAGC-3'	807 bp	399 bp
SQ043000133_R(서열번호 8)	5'-GGCTGTTGGAGGTGCTAC-3'		

[0039] **실시예 3: 본 발명의 프라이머세트 검정**

[0040] 본 발명의 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-4의 활성 검정용 프라이머 세트가 조직배양 과정을 거친 배추 형질전환체에서 전이인자 PTE-4의 활성 여부를 판별할 수 있는지 확인하는 과정을 수행하였다.

[0041] 구체적으로, 조직배양을 거치지 않은 배추 CT001 개체와 전이인자 탐색에 이용된 배추 형질전환체 COPB2 17-24, COPB2 44-20 개체로부터 샘플을 채취하여 DNA 시료를 준비하였다. 배추의 DNA는 SDS buffer를 이용하여 각 샘플의 잎으로부터 추출하였다. 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 잎을 액체 질소를 이용하여 파쇄하고, 800 ㎕ SDS 완충용액을 첨가하여 잘 섞어준 후, 60℃에서 30분 동안 반응시켰다. 800㎕의 PCI 용액(Phenol:Chloroform:Isoamyl Alcohol 25:24:1)을 넣고 섞어준 다음, 상온에서 10분간 혼합하였다. 20℃에서 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하고, 그 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 에탄올 880 ㎕과 3M 아세트산나트륨(sodium acetate) 40 ㎕를 넣고 DNA를 침전시킨 뒤, 침전물을 75% 에탄올로 세척하였다. 그 다음, 에탄올이 없

도록 잘 건조시키고, TE 완충용액(Tris-EDTA buffer)에 녹여 사용하였다.

[0042] 조직배양을 거치지 않은 배추 CT001 개체 및 배추 형질전환체 COPB2 17-24, COPB2 44-20 개체를 대상으로 PTE-4의 활성여부를 확인하기 위하여, 추출한 DNA를 사용하여 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-4의 활성 검정용 프라이머 세트와 태그 중합효소(Taq polymerase)로 PCR 검정을 수행하였다. PCR 프로그램은 94℃에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 94℃에서 30초, 59℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 40회 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후, 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다. 증폭된 산물은 1% 아가로오스 젤에서 1시간 동안 분리하여 UV illuminator로 관찰하였다.

[0043] 또한, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-4의 활성 검정용 프라이머 세트를 사용한 PCR에 의해 배추로부터 증폭된 산물을 전기영동한 사진이며, 조직배양을 거치지 않은 개체에서는 757 bp에 해당하는 PCR 산물을 확인하였고, 형질전환체 COPB2 17-24, COPB2 44-20에서는 586 bp에 해당하는 PCR 산물을 확인하였다(도 2).

[0044] **실시예 4: 증폭된 PCR 산물 내 전이인자 PTE-4의 서열포함 여부 확인**

[0045] 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-4의 활성 검정용 프라이머 세트로 증폭된 757 bp 및 586 bp PCR 산물의 염기서열을 분석하기 위해 PCR 산물을 염기서열 분석용 벡터 pTA-TOPO vector에 클로닝하여 재조합 벡터를 구축하였다. 염기서열 분석용 pTA-TOPO vector 내부에 클로닝된 PCR 단편의 염기서열은 삽입된 자리에 근접한 M13F 및 M13R 프라이머를 이용하여 조사하였으며, 확인된 염기서열에 MITE 염기서열의 포함 여부를 GenBank BLAST 프로그램을 사용하여 분석하였다.

[0046] 그 결과, 757 bp 산물의 염기서열에는 PTE-4의 염기서열이 포함된 것을 확인하였고, 586 bp 산물의 염기서열에는 PTE-4의 염기서열이 포함되지 않은 것을 확인하였으며, 확인된 서열은 서열번호는 4로 표시하였다(도 3b).

[0047] 이와 같은 결과를 통해, 본 발명의 방법에 의하여 배추에서 PTE-4의 활성을 특이적으로 확인할 수 있는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-4의 활성 검정용 프라이머 세트를 제조할 수 있음을 확인하였다.

[0049] **실시예5: 본 발명의 프라이머 세트를 이용한 배추 형질전환체에서의 다형성 분석**

[0050] 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-4의 활성 검정용 프라이머 세트를 이용하여 실제적으로 배추 형질전환체에서도 PTE-4의 활성 여부를 구분할 수 있는지 확인하는 과정을 수행하였다.

[0051] 구체적으로, 조직배양을 거치지 않은 배추 CT001 개체들로부터 gDNA를 상기 실시예 3에 기재된 방법으로 분리하였고, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-4의 활성 검정용 프라이머 세트들을 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0052] 그 결과, 조직배양을 거치지 않은 배추 전체에서 PTE-4가 활성되지 않음을 확인하였다(도 4).

[0053] 또한, PPi, BT, BTTP 등 다양한 계통의 배추 형질전환체로부터 gDNA를 상기 실시예 3에 기재된 방법으로 분리하였고, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-4의 활성 검정용 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0054] 그 결과, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-4의 활성 검정용 프라이머 세트를 이용하는 경우에만 PCR 산물의 크기로 형질전환체에서의 전이인자 활성여부를 구분할 수 있음을 알 수 있었다(도 5). 반면, 전이인자의 활성을 확인하기 위한 서열번호 5 내지 서열번호 8의 다양한 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행한 결과 어떠한 형질전환체에서도 전이인자 활성여부를 특이적으로 구분할 수 없었다. 따라서 상기 실시예4의 방법으로 전이인자 염기서열 포함여부의 분석이 가능함에 따라 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 조직배양을 거친 형질전환체에서 빈번하게 활성화되는 PTE-4의 활성 여부를 검정할 수 있음을 확인하였다.

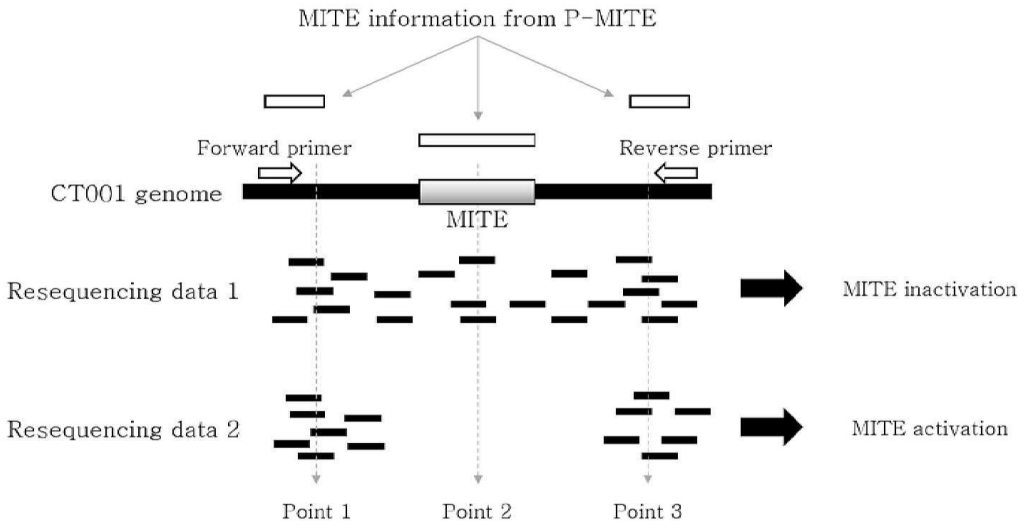
[0055] 따라서, 본 발명의 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-4의 활성 검정용 프라이머 세트를 이용하여 조직배양 및 형질전환에 의한 체세포 영양계 변이체를 조기에 선발함으로써 안정적인 유전체를 가지는 형질전환체를 개발하는데 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

[0056] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서

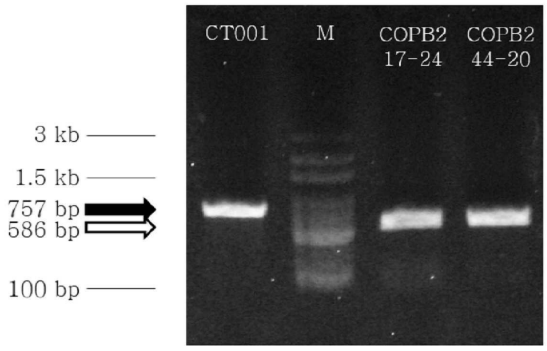
기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

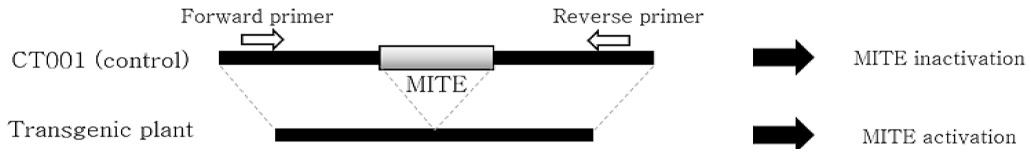
도면1



도면2



도면3a



도면3b

MITE inactivated (757 bp)

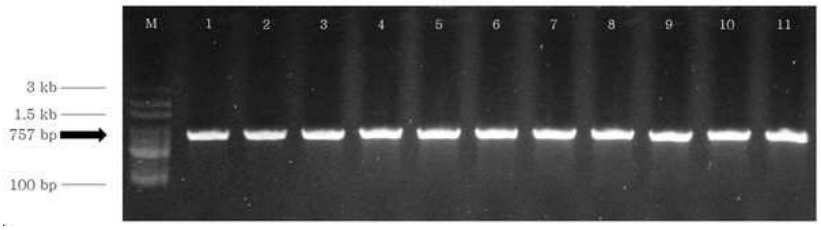
CACTGTCTGATTGATGCGATATGTTGGTTTTGTGAGT
TGACCTTCTAAGCTTTGGTTCAATCTTTATGGATTCT
TCTTTCAGAATGATTGTTATCGTTGTGTCTGATAATC
CTTTGGTCAACCATATGTGTAGCTAACATGAATAAAG
ATGATAAAGTTTGTAACTTTCTTGTGCTTTGTATTAA
TTATTTTATAAAAGATTTCATTTTTCTTACTTCTGTT
GACGATTCAAATGATGGGTCTTTCGTTGTATTCATGA
GTTTTATCTTATGATTCTGCCTTTCTGGATCACTATC
TATTAGGGGCGGTCCTGGGCACAGCGGACTGAAACAC
CGGCTTAGGGCCCCCAAATTTTTTTAAAAAATTTACA
TAAGAAGGGGCCCCTAAATTTGTAAAAAAAAAATTTT
TTATAAAACCCTTACTAAATTGTTTTAGGCCCCCAGC
ATCTCAGGGACGGCCCTGCTATCTAACCACTTAGTGG
ACACTCTTTGAATTGCTTGCAGTATACAGATACGGCA
CTAGATGGCTTTCTTAAGTAAAGTTGGAAAGATATTT
AGGCAGACCAGCGCCCATGTCACTGCCTCTAACTCGA
TGCTACAGAGCATCCGTTGCATGTCTTCCTCTAAAAT
CTTTGTTGGAGGTGACAATAAATAACTCCAATACGGC
TGTCTGAGAGAGTACTCTCTTTTTTCTTTGCTTCTGT
TTGTCTCAGAACTGTCTATGTTGCTTCAGGTATCTCC
TACAGCACTGACGAGTT

MITE activated (586 bp)

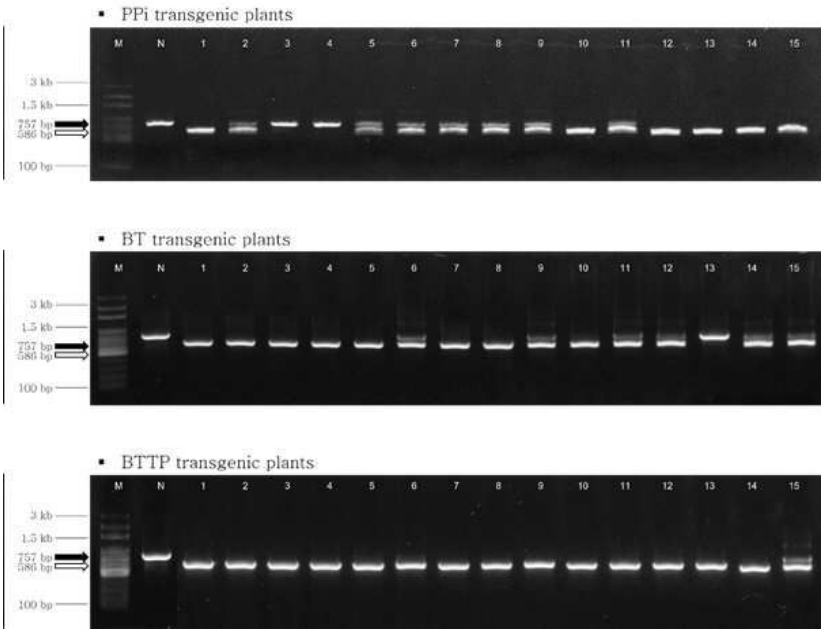
CACTGTCTGATTGATGCGATATGTTGGTTTTGTGAGT
TGACCTTATAAGCTTTGGTTCAATCTTTATGGATTCT
TCTTTCAGAATGATTGTTATCGTTGTGTCTGATAATC
CTTTGGTCAACCATATGTGTAGCTAACATGAATAAAG
ATGATAAAGTTTGTAACTTTCTTGTGCTTTGTATTAA
TTATTTTATAAAAGATTTCATTTTTCTTACTTCTGTT
GACGATTCAAATGATGGGTCTTTCGTTGTATTCATGA
GTTTTATCTTATGATTCTGCCTTTCTGGATCACTATC
TAACCACTTAGTGGACACTCTTTGAATTGCTTGCAGT
ATACAGATACGGCACTAGATGGCTTTCTTAAGTAAAG
TTGGAAAGATATTTAGGCAGACCAGCGCCCATGTCAC
TGCCTCTAACTCGATGCTACAGAGCATCCGTTGCATG
TCTTCCTCTAAAATCTTTGTTGGAGGTGACAATAAAT
AACTCCAATACGGCTGTCTGAGAGAGTACTCTCTTTT
TTCTTTGCTTCTGTTTGTCTCAGAACTGTCTATGTTG
CTTCAGGTATCTCCTACAGCACTGACGAGTT

- PTE-4 F primer
- PTE-4 R primer
- CT001 sequence
- PTE-4 sequence
- **SNP sequence**

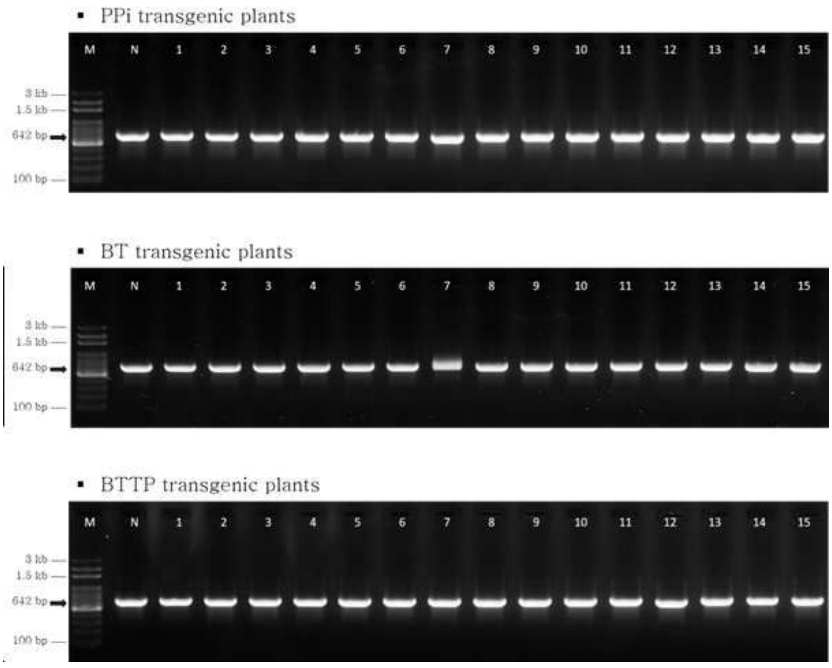
도면4



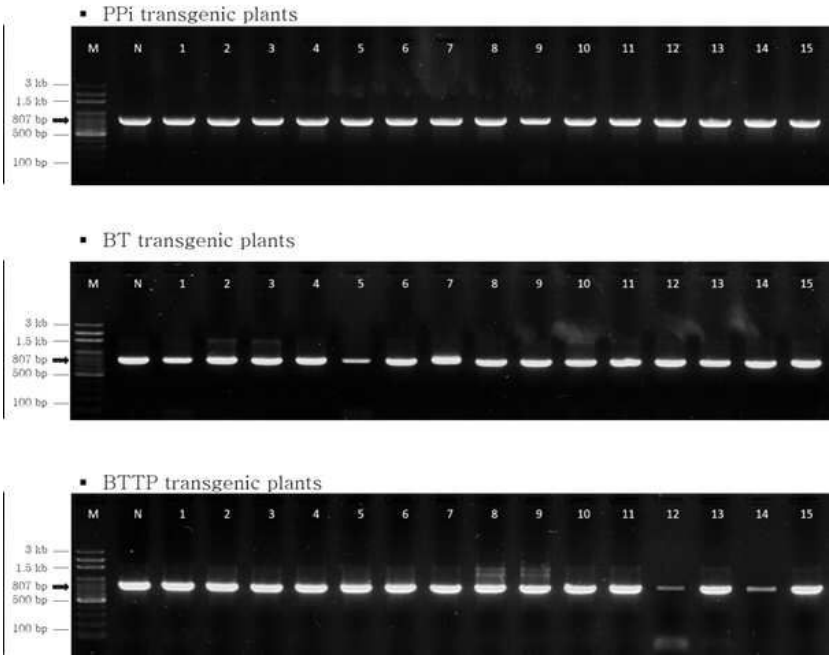
도면5



도면6


▪ PPi transgenic plants
M N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
3 kb
1.5 kb
642 bp
100 bp
▪ BT transgenic plants
M N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
3 kb
1.5 kb
642 bp
100 bp
▪ BTTP transgenic plants
M N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
3 kb
1.5 kb
642 bp
100 bp

도면7


▪ PPi transgenic plants
M N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
3 kb
1.5 kb
807 bp
500 bp
100 bp
▪ BT transgenic plants
M N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
3 kb
1.5 kb
807 bp
500 bp
100 bp
▪ BTTP transgenic plants
M N 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
3 kb
1.5 kb
807 bp
500 bp
100 bp

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.