



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0097384
(43) 공개일자 2017년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6895 (2013.01)

C12Q 2600/142 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0019045

(22) 출원일자 2016년02월18일

심사청구일자 2016년02월18일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

이궁주

세종특별자치시 조치원읍 섬골길 56, 112동 1103호

하혜정

대전광역시 유성구 대학로 45, 1415호 (봉명동, 스카이뷰로드)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

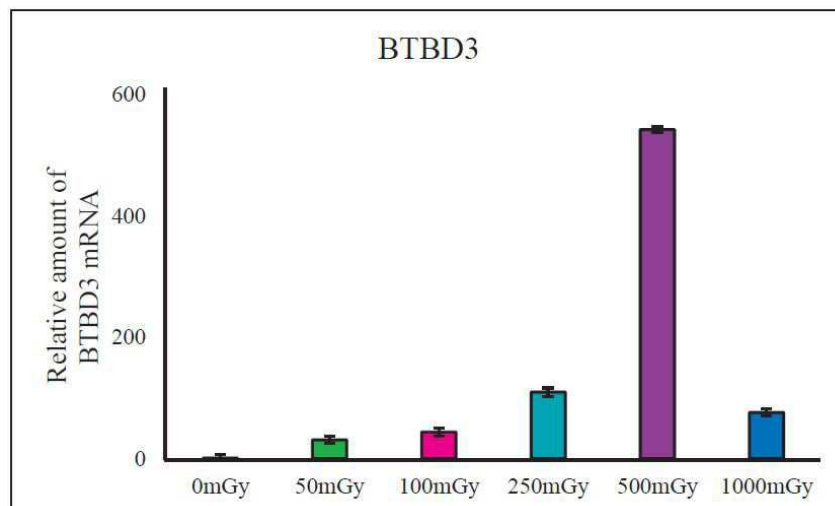
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 식물체에서 BTBD3 유전자의 발현량 변화를 이용한 방사선 노출 여부를 진단하는 방법

(57) 요약

본 발명은 자주달개비 식물체에서 BTBD3 유전자의 발현량 변화를 이용한 방사선 노출 여부를 진단하는 방법에 관한 것으로, 본 발명은 특정 방사선 선량에서 *BTBD3* 유전자의 발현이 현저히 증가하는 것을 확인함으로써, 저선량의 방사선에 민감하게 반응하는 자주달개비를 이용하여 방사선 노출로부터 생물의 영향에 대한 모니터링 즉, 유전자 발현 양상 및 세포의 형태학적 변화를 실시간으로 관측하여 방사선 피해를 사전에 진단하고, 사후 피해복원을 관측하기 위한 '유전자 계측 시스템'으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자

박누리

인천광역시 연수구 용담로 14, 107동 1306호 (청학
동, 하나아파트)

최서희

경기도 평택시 포승읍 서동대로 793

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013M2A2A6043621

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 방사선융합기술개발

연구과제명 지표식물 이용 방사선 피해의 분자세포학적 모니터링 및 복원 시스템 구축

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2013.07.01 ~ 2016.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

식물체 내의 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 BTBD3(BTB/POZ domain-containing protein) 유전자의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하는 방사선 노출 여부를 진단하기 위한 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방사선 노출량은 250~1000mGy인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 물질은 상기 BTBD3 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 세트 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 식물체는 저선량의 방사선에 민감하게 반응하는 식물체인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

방사선에 노출된 것으로 추정되는 지역의 식물체로부터 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 BTBD3(BTB/POZ domain-containing protein) 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

상기 발현 수준을 음성 대조구의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는 방사선 노출 여부를 진단하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 방사선 노출량은 250~1000mGy인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법은 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 칩에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물체에서 BTBD3 유전자의 발현량 변화를 이용한 방사선 조사 여부를 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 자주달개비(*Tradescantia ohiensis* Raf.) 식물은 북아메리카 원산으로 전국에 널리 심어 기르는 여러해살이풀이다. 줄기는 곧추서며, 높이 40~50cm, 청록색을 띤다. 잎은 어긋나며, 넓은 선형으로 길이 25cm쯤이고 끝은 뾰족하며, 밑부분은 줄기를 감싼다. 꽃은 5월에 가지 끝에 여러 개가 모여 달리며, 지름 2~3cm, 자주색이고, 당일에 피었다가 진다. 수술은 6개, 수술대에 자색의 긴 털이 있으며, 염주 모양으로 1열로 세포가 배열한다. 관상용으로 식재하며, 닭의장풀에 비해 키가 보다 크고 꽃이 자주색으로 길어서 구분된다. 자주달개비 식물은 관상용으로 식재하며, 수술대의 털은 세포가 연결되어 있어 식물학 세포 내 원형질 유동 관찰에 쓰인다. 또한, 자주달개비는 방사선처럼 사람과 식물에 해가 되는 물질에 민감한 꽃으로, 방사선에 오염된 곳에 있으면 꽃 색깔이 변하며, 보랏빛을 띤 꽃이 방사선에 노출되면 분홍색을 띠게 되거나 심할 경우 색이 없어지기도 한다.

[0003] 한편, 비생물적 스트레스 인자 중 방사선에 의한 생물학적 영향은 매우 치명적이다. 비록 저선량의 방사선이라 할지라도 생물체에게 미치는 영향은 치명적이며, 저선량에 의해 유발되는 현상은 역치값(Threshold dose)이 없

다. 조사된 방사선 선량의 절대치는 TLD 배치에 의해 절대값으로 측정이 가능하지만, 방사능 오염에 의해 일어나는 생물학적 변화에 대한 표준화된 검증체계는 없다. 이에 따라, 방사선 피해를 사전에 진단이 가능하며, 사후 피해복구를 위한 생물학적 방사선 관측시스템의 개발이 절실하다.

[0004] 한국등록특허 제1294789호에서는 '방사선 표지 유전자 At4g37990의 탐색 및 이를 이용한 형질전환 지표식물'에 대해 기재되어 있고, 한국등록특허 제1451833호에서는 '이온화에너지원 표지 유전자 OsFBX322 및 이를 이용한 형질전환 지표식물'이 기재되어 있으나, 본 발명에서와 같이, '식물체에서 BTBD3 유전자의 발현량 변화를 이용한 방사선 노출 여부를 진단하는 방법'에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 자주달개비를 이용하여 방사선 노출로부터 생물체 영향에 대한 모니터링 즉, 유전자 발현 양상 및 세포의 형태학적 변화를 실시간으로 관측하여 방사선 피해를 사전에 진단하고, 사후 피해복원을 관측하기 위한 '유전자 계측 시스템'을 개발하고자 시도한 것으로, 자주달개비 식물체에 50mGy(방사선 작업중사자 연간 유효선량 한도) 이하의 방사선과 100mGy, 250mGy, 500mGy, 1000mGy에 해당하는 방사선량을 조사한 결과, 특히, 500mGy 조사구에서 BTBD3 유전자의 발현이 현저히 증가하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 식물체 내의 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 BTBD3(BTB/POZ domain-containing protein) 유전자의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하는 방사선 노출 여부를 진단하기 위한 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은

[0008] 방사선에 노출된 것으로 추정되는 지역의 식물체로부터 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 BTBD3(BTB/POZ domain-containing protein) 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0009] 상기 발현 수준을 음성 대조구의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는 방사선 노출 여부를 진단하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 특정 방사선 선량에서 자주달개비의 BTBD3 유전자의 발현이 현저히 증가하는 것을 확인함으로써, 저선량의 방사선에 민감하게 반응하는 자주달개비를 이용하여 방사선 노출로부터 생물체 영향에 대한 모니터링 즉, 유전자 발현 양상 및 세포의 형태학적 변화를 실시간으로 관측하여 방사선 피해를 사전에 진단하고, 사후 피해복원을 관측하기 위한 유전자 계측 시스템으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 자주달개비 식물체를 대상으로 50mGy, 250mGy, 500mGy 및 1000mGy 선량의 방사선 처리군에서 BTBD3 유전자의 DEG 분석 결과를 나타낸다.

도 2는 자주달개비 식물체를 대상으로 50mGy, 250mGy, 500mGy 및 1000mGy 선량의 방사선 조사 후 BTBD3 유전자에 대한 RT-PCR 수행 결과이다.

도 3은 자주달개비 식물체를 대상으로 50mGy, 250mGy, 500mGy 및 1000mGy 선량의 방사선 조사 후 BTBD3 유전자에 대한 qRT-PCR 수행 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 식물체 내의 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 BTBD3(BTB/POZ domain-containing protein) 유전자의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하는 방사선 노출 여부를 진단하기 위한 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에서, 상기 식물체는 저선량의 방사선에 민감하게 반응하는 식물체일 수 있

으며, 바람직하게는 자주달개비(*Tradescantia ohiensis*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0014] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에서, 상기 BTBD3(BTB/POZ domain-containing protein) 유전자 염기 서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교영역에서의 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(즉, 갭)를 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에서, 상기 방사선 노출량은 50~1000mGy일 수 있고, 바람직하게는 250~1000mGy일 수 있고, 더욱 바람직하게는 400~600mGy일 수 있고, 가장 바람직하게는 500mGy일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 본 발명은 방사선에 노출된 것으로 추정되는 지역의 식물체로부터 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, BTBD3 유전자의 발현 수준을 측정하고, 상기 발현 수준을 음성 대조구(negative control)인 방사선에 노출되지 않은 식물체로부터 BTBD3 유전자의 발현 수준과 비교하여, 측정 시료의 발현 수준과 음성 대조구의 발현 수준이 유사하면 그 조사한 지역은 방사선에 노출되지 않았을 가능성이 크고, 측정 시료의 발현 수준이 음성 대조구의 발현 수준보다 높으면 그 조사한 지역은 방사선에 노출되었을 가능성이 크다고 예측할 수 있는 것이다.
- [0017] 본 발명에서, 용어 "BTBD3 유전자의 발현 수준을 측정하는 물질"란 상기와 같이 방사선에 노출된 식물체에서 발현량이 증가하는 BTBD3의 발현 수준을 확인함으로써 BTBD3의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미하며, 바람직하게는 BTBD3에 특이적인 프라이머 또는 프로브를 말한다.
- [0018] BTBD3의 유전자의 발현 수준은 BTBD3 유전자의 mRNA의 발현 수준을 확인함으로써 알 수 있다. 본 발명에서 "mRNA 발현 수준 측정"이란 방사선 노출 여부를 확인하기 위해 BTBD3 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명에서, 용어 "프라이머"는 짧은 자유 3' 말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. 본 발명에서는 BTBD3 폴리뉴클레오타이드의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 방사선 노출 여부를 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0020] 본 발명에서, 용어 "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 BTBD3 폴리뉴클레오타이드와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 식물체의 방사선 노출 여부를 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포로아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, 캡화, 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0022] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 상기 방사선 노출 여부 진단용 조성물은 BTBD3 유전자에 대하여 특이적인 프라이머 쌍을 포함한다.
- [0023] 또한, 본 발명은
- [0024] 방사선에 노출된 것으로 추정되는 지역의 식물체로부터 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 BTBD3(BTB/POZ

domain-containing protein) 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

- [0025] 상기 발현 수준을 음성 대조구의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는 방사선 노출 여부를 진단하는 방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 BTBD3 유전자의 발현 수준은 BTBD3 유전자의 mRNA의 발현 수준을 확인함으로써 알 수 있다. 생물학적 시료에서 mRNA를 분리하는 과정은 공지의 공정을 이용하여 수행할 수 있으며 mRNA 수준은 다양한 방법으로 측정할 수 있다. mRNA 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅, DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 상기 검출 방법들을 통하여, 방사선에 노출된 것으로 추정되는 지역의 식물체 시료에서의 BTBD3의 mRNA 발현을 조사하여 식물체의 방사선 노출 여부를 진단할 수 있다.
- [0028] mRNA 발현수준 측정은 바람직하게는, 식물체의 방사선 노출 여부 진단용 마커로 사용되는 BTBD3 유전자에 특이적인 프라이머를 이용하는 역전사효소 중합효소반응법 또는 DNA 칩을 이용하는 것이다. 한편, DNA 칩은 상기 BTBD3 유전자 또는 그 단편에 해당하는 핵산이 유리 같은 기판에 고밀도로 부착되어 있는 DNA 칩을 이용하는 것으로서, 시료에서 mRNA를 분리하고, 그 말단 또는 내부를 형광 물질로 표지된 cDNA 프로브를 조제하여, DNA 칩에 혼성화시킨 다음 방사선에 노출된 식물체를 판독할 수 있다.
- [0029] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] **실시예 1. 자주달개비 식물체에 방사선의 조사**
- [0031] 자주달개비 식물체에 50mGy(방사선 작업종사자 연간 유효선량 한도) 이하의 방사선과 100mGy, 250mGy, 500mGy, 1000mGy에 해당하는 방사선량을 조사하였다. 감마선 조사는 정음에 위치한 한국원자력연구원 첨단방사선연구소 내에 위치한 감마파이트로톤을 이용하여 상온, 공기 중에서 각각의 선량으로 방사선 조사를 수행하였다.
- [0032] **실시예 2. 방사선이 조사된 자주달개비 식물체로부터 유전자 발현의 변화 조사**
- [0033] 자주달개비의 화기조직으로부터 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA의 추출 방법은 화기조직을 잘라내어 액체질소로 급냉시켜 마쇄한 후, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Seoul, Korea)를 이용하였다. 추출된 총 RNA는 Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)을 이용하여 정량한 후, 총 6ug의 RNA를 주형으로 Super Script II (Life Technologies, Carlsbad, CA)을 사용하여 역전사 반응을 시킨 후, Advantage 2 Polymerase Mix (Clontech, Seoul, Korea)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Seoul, Korea)를 사용하여 정제된 후, 454 library preparation kit (Roche)를 사용하여 454 단일 가닥 cDNA 라이브러리로 제작되었다.
- [0034] 제작된 cDNA 라이브러리로 차세대염기서열분석(NGS) 방법인 Illumina Hi-seq2000을 이용하여 RNA-seq을 수행하였고, 그 결과를 바탕으로 각각의 방사선 조사 조건에서 발현이 상향조절(up-regulation)되거나 하향조절(down-regulation)되는 유전자들을 대량 탐색하기 위해, 선량별로 DEG(differentially expressed gene) 분석을 실행하였다.
- [0035] **실시예 3. 방사선이 조사된 자주달개비 식물체로부터 발현량이 현저히 증가된 BTBD3 유전자의 선발**
- [0036] 방사선을 조사하지 않은 자주달개비 대조군에 비해, 가장 낮은 선량인 50mGy의 방사선에 노출된 처리구에서 2배 이상 상향조절되는 유전자들을 선발하였다. 이 중, BTBD3 (BTBD3_BTBD/POZ domain-containing protein)이라는 유전자의 DEG 분석 결과, 50mGy, 250mGy, 500mGy, 1000mGy 선량의 방사선 처리군에서 대조군에 대비, 각각 0.62배, 2.14배, 3.85배, 1.65배의 수치로 BTBD3 유전자의 발현이 조절됨을 확인하였다(도 1).

[0037] 실시예 4. RT-PCR 방법에 의한 방사선 조사량에 따른 BTBD3 유전자의 발현 변화 조사

[0038] 방사선이 조사된 자주달개비의 화기조직으로부터 추출된 총 RNA로 TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0을 사용하여 RT-PCR을 수행하였다. BTBD3 유전자 부위를 증폭하기 위한 프라이머는 5'에서 3'방향으로 5'-ATGGAACAACATTGTTTCGAC-3'의 염기 서열(서열번호 2)로 제조된 TN_1065_F 프라이머와 5'에서 3'방향으로 5'-TTACAAACGTCTCGCCAATT-3'의 염기 서열(서열번호 3)로 제조된 TN_1065_R 프라이머를 사용하였다. BTBD3 유전자 부위를 증폭할 PCR 온도 조건으로는 95℃에서 5분 동안 열처리로 Taq 폴리머라제의 활성을 유도한 후, 25회의 95℃에서 30초간 변성, 50℃에서 30초간 어닐링, 72℃에서 1분 20초간 확장을 거친 후, 5분간 PCR 산물의 안정화를 실시하여 PCR 산물을 취득하였다(도 2).

[0039] 이때, 사용된 레퍼런스 유전자로 자주달개비의 actin7 유전자를 이용하였고, actin7 유전자를 증폭하기 위한 프라이머는 5'에서 3'방향으로 5'-ATGGTTGGTATGGGRCAAAAG-3'의 염기서열(서열번호 4)로 제조된 Tr_actin7_F 프라이머와 5'에서 3'방향으로 5'-GGGAGCAAGGGCWGTGATC-3'의 염기 서열(서열번호 5)로 제조된 Tr_actin7(pa)_R을 이용하였다. actin7 유전자 부위를 증폭하기 위한 PCR 온도 조건은 95℃에서 5분 동안 열처리로 Taq 폴리머라제의 활성을 유도한 후, 25회의 95℃에서 30초간 변성, 55℃에서 30초간 어닐링, 72℃에서 50초간 확장을 거친 후, 72℃에서 7분간 PCR 산물의 안정화를 실시하여 PCR 산물을 취득하였다. 상기의 PCR 완료 후, 각각 1% 아가로스 겔에서 전기영동을 실시하여 PCR 산물의 증폭 여부를 확인하였다(도 2).

[0040] BTBD3 유전자와 actin7 유전자에 대한 상기 RT-PCR 실험을 독립적으로 3번을 수행한 후, 전기영동한 결과를 바탕으로 ImageJ 프로그램 (<http://imagej.nih.gov/ij/>)을 이용하여, 각각의 DNA 밴드의 정량 및 정성분석을 수행한 결과, 500mGy 조사구에서 비조사구에 비해 BTBD3 유전자의 발현양이 약 14배 이상 상향조절됨을 확인하였다(도 2).

[0041] 실시예 7. qRT-PCR 방법에 의한 방사선 조사량에 따른 BTBD3 유전자의 발현 변화 조사

[0042] 총 RNA로 합성된 cDNA로 2X quantispeed SYBR® Green mix (PhileKorea)와 EcoTM Real Time PCR 151 System (Illumina)를 사용하여, qRT-PCR을 수행하였다. BTBD3 유전자 부위를 증폭하기 위한 프라이머는 5'에서 3'방향으로 5'-CTCCATTGCGGATGAACCT-3'의 염기 서열(서열번호 6)로 제조된 [500mGy]1065_1F 프라이머와 5'에서 3'방향으로 5'-GTTCAGCGGTTTCTGGTGAT-3'의 염기 서열(서열번호 7)로 제조된 [500mGy]1065_1R 프라이머를 사용하였다. 이때, 레퍼런스 유전자로 자주달개비의 actin7 유전자를 이용하였고, Tr_actin7_F 프라이머와 Tr_actin7(pa)_R을 이용하였다. PCR 온도 조건은 95℃에서 10분 동안 열처리로 taq 폴리머라제의 활성 유도한 후, 45회의 95℃에서 10초간 변성, 60℃에서 30초간 어닐링을 거친 후, 95℃에서 15초간 변성, 55℃에서 15초간 반응을 안정화시킨 후, 각 선량별로 BTBD3 유전자의 발현을 확인하였다. 특히, 500mGy 조사구에서 BTBD3 유전자의 발현이 액틴의 발현양 대비 약 500배 이상 상향조절 및 발현됨을 확인하였다(도 3).

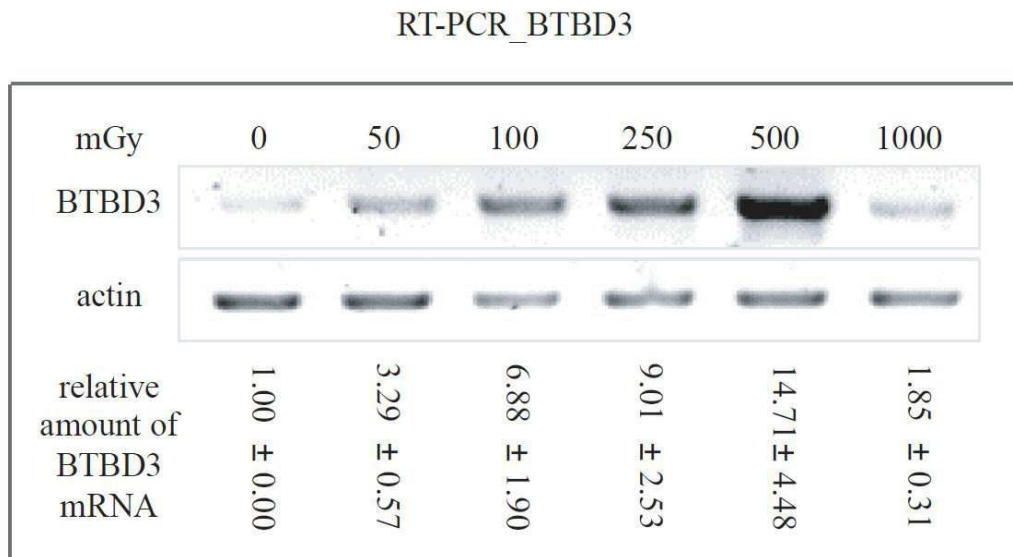
도면

도면1

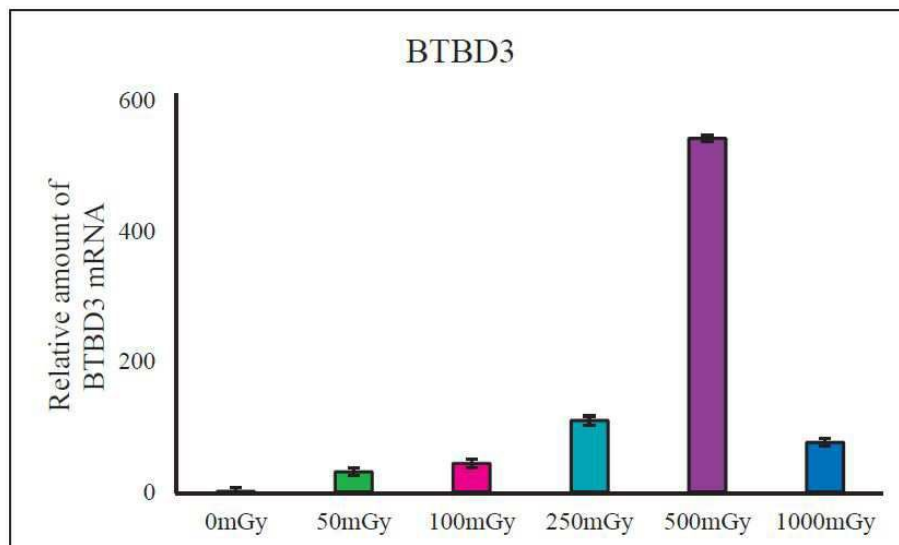
DEG data

mGy	50	250	500	1000
L og2 Fold change	0.62	2.14	3.85	1.65

도면2



도면3



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Method for diagnosing radiation exposure using expression change of BTBD3 gene in plant
- <130> PN16048
- <160> 7
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1

<211> 1338

<212> DNA

<213> Tradescantia ohiensis Raf.

<400> 1

atggaacaac attgttcgac tgagacttgc agctttggtg accaattgac tagtgatgtt	60
atagtttggt tgaacaaaga tcgcatgcct gagcggtttc atctccactc agccattttg	120
aggaaacaaa gcaactatct cgcgaaatgg ttttctgaga accttacttt tacttctgag	180
tccaattggt gcattgatgt taactgcca gtatctgagt atgaacatta catcaagctc	240
ttaaagctat tgiatctctc tgaagagttt gtttcagact tgttggattc tgtcaagtct	300
gcaattggtg ttcttcaggc ttcagttgct cttgaatgtg gagaagttgc taggatttgt	360
attcagtact tggaatctgt atcttgggat gaaaatgaag aggagaaaat tatagaattg	420
gcacctagac tgggcccgaga ggctgctcca ttattggcac ggatacatcc tgctgatacc	480
agtgtctaca aaaaatgtatt cctctctgct atccgttttg ccactactgt cagcacttca	540
tgctctccat ttgcggatga acttaaaatt tcagcacaag aacaagttga gtacatgctt	600
ttagaggacg atgactctgc actaataaca gtggatgatg atgtaatgtc tgaggtgaag	660
atatgccttg ccaaaatggt tacctcacta gagatagcaa tgaaggaact gccctcgaga	720
ttcgatcaat caccagaaac cgctgaacag aaagtattga attgccttgc tgatcttgag	780
tggatcacta atgtacttcc aaaaatggaa atgatgcaag attttgttc catttggaat	840
caaatctcca gtcatatctt gtccgttgct tgcgaagaga aatacagctc aagcttgtgg	900
gcgataaaac taaagttaat tgaactaaca ggaaaggctt tggatgcagt tggttatggc	960
actgtggttc ttccagcatc aactagagtc cagttcttaa atacttggct tccttatatt	1020
agaacaatga agcctatatt agactcgaaa agcttagatg atgaagcgtt tccatacaaa	1080
atggatagtg atttatgcca gaatatgaa ggtgcaatta catcattact atcagcatta	1140
ccatcaaacg accaagcaga catccttgca gaatggatta agatgacaga acagttaaag	1200
tatcctgatt taaccgaggc attcgaagtc tgggtgttata ggaccaaggc agcaaagagg	1260
agaatattga tcttgaaaat tttcaaggcg acggtgttgc ttatcgacca atcttcaaaa	1320
ttggcgagac gtttgtaa	1338

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 2
 atggaacaac attgttcgac 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 ttacaaacgt ctcgccaatt 20
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 atggttggtgta tgggrcaaaa g 21

 <210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 gggagcaagg gcwgtgatc 19
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 ctccatttgc ggatgaactt 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

gttcagcggg ttctggat

20