



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0074457
(43) 공개일자 2009년07월07일

(51) Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0000249

(22) 출원일자 2008년01월02일

심사청구일자 2008년01월02일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

김해영

경기 용인시 기흥읍 서천리 1번지

지상미

경기 수원시 영통구 영통동 1019-11번지 203호

김재환

서울 은평구 신사2동 300-131호 삼익빌라 106호

(74) 대리인

이덕록

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 해충저항성 유전자변형 배추의 정성분석을 위한 프라이머세트

(57) 요약

본 발명은 국내에서 개발된 해충저항성 유전자변형 배추의 정성분석을 위한 프라이머에 관한 것이다. 배추의 내재 유전자로써 KR 50010-3을 선별하였고, 상기 내재유전자를 특이적으로 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트(Bra F-14, Bra R-14)를 제조하고 유전자변형 배추에 삽입된 Cry1Ac 유전자와 NOS 터미네이터(terminator) 연결부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트(mBT120 F-1, mBT120 R-1)를 제조하여 상기 두쌍의 프라이머 세트를 이용하여 이중 중합연쇄반응으로 국내에서 개발된 해충저항성 유전자변형 배추를 정성분석 할 수 있는 뛰어난 효과가 있다.

대표도 - 도4

```

1.  aagagatgga tgaatagttt tgggatttca tgaagaggtt cttcttggg
   tctctcaact actatcaaa acctaaagt acttgcata gggagaagcg
51.  ctctgggat tccgcacgg ccttaccg cgggtcac cattgaagt
   gggacata aggggttg ggaatggg gggagagtg ggttaattga
101.  cgtcagggt attgttaca aacgctcga gaagctac tatgaatga
   gggatcga taacaaagt ttggggagt cttgcgatg atactgaat
151.  aatcccccc ttcattaat ttaagtgtt agatttttt gttttatga
   ttggggggg agggagtg agttacaa cttagagga ccaaaactt
201.  gttgagtaa tegtgggtg tatgttaac ctgggtctg ttctagtat
   caacatag atcaaacg atcaattg gacagttc agatcata
251.  ggtatggga tccaaagt cttgtgac cttgtctg gtttactt
   cgtatccct aaggttcga acaatgag atcaagac caaatgaa
301.  tttcattgt ttaagtctg ctcaaaagt caaagttg gttgttca
   aaagtgaac atggagag ggttttca gtttgagag ggaacagat
351.  ggtgtgtga atttatgta gaaatcttt tgttgagag ttgagttct
   ctcaaaact taatacgt attagaaa acaactccg aaactcaga
401.  aacataact tttgttgtt caaaaactt attcaattg tgaattttt
   cgtatctga aacaaactt gtttttga gaagtgaat cttgaaga
451.  ctgactttta atgtgttat catgacttt acaatacaa gttgttagt
   gaggaaact tgaacata gtaagaaa ttgttagtt cgaacttc
501.  tctgtgaat ctggaaat gctgaagtg gttttttt tctctgk
   acaactta cgaactta ctatttcc caaagaaa aggaacta
551.  gctgtgatt ataaagact ttgttgtc tctctgk tatcaaat
   cgaactta tttgtga acaaacg aggaacta atcaacta
601.  gaaagaggt ggttggtgt caaagacg acttgagct tcaagagct
   ctctgcaa caaacaca tgttctgg tgaacggca agttctcgg
651.  catgagagt ttttccct aagaaactt atggagtg aatctgtga
   gtaactga aataggga tctgtcga taccctgac ttgtaactg
701.  agagatatt tcaattggg aggaactg gttgagtg c
   ttttatga agtaacaa gttctgac ctactcaac g

```

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1(Bra F-14) 내지 2(Bra R-14)에 기재된 염기서열을 가지며 배추의 내재 유전자 중 121 bp가 특이적으로 증폭됨을 특징으로 하는 중합연쇄반응용 프라이머 세트.

청구항 2

서열번호 3(mBT120 F-1) 내지 4(mBT120 R-1)에 기재된 염기서열을 가지며 해충저항성 유전자변형 배추에서 특이적으로 161 bp가 증폭됨을 특징으로 하는 중합연쇄반응용 프라이머 세트.

청구항 3

제 1항 내지 2항에 기재된 프라이머 세트를 이용하여 이중 중합연쇄반응으로 확인함을 특징으로 하는 해충저항성 유전자변형 배추의 정성분석법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 국내에서 개발된 해충저항성 유전자변형 배추의 정성분석을 위한 프라이머에 관한 것이다. 보다 상세하게는 해충저항성 유전자변형 배추의 정성분석을 위한 배추의 내재유전자 KR 50010-3를 특이적으로 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트(Bra F-14, Bra R-14) 및 유전자변형 배추에 삽입된 Cry1Ac 유전자와 NOS 터미네이터(terminator) 연결부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트(mBT120 F-1, mBT120 R-1)에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 오늘날 미국, 스위스, 독일 등의 거대 종자기업들은 제초제 및 해충저항성 유전자(Cry1Ac, Cry1Ab, Cry3A, Cry9C, Cry1F 등)들을 삽입한 다양한 유전자 변형 작물들을 개발하여 판매함으로써 세계의 종자시장을 장악하고 있다. 중국과 일본 또한 토양으로부터 균주를 분리하여 순수배양한 바실러스 쓰린지엔시스(*Bacillus thuringiensis*; Bt) 균주로 배추 좀나방, 배추흰나비, 왕담배나방에 대한 살충효과를 연구하고 있는 실정이다.
- <3> 이에 국내에서도 농촌진흥청 산하 농업과학기술원에서는 1990년 초부터 국내에서 소비량이 많은 8개 농작물(벼, 고추, 배추, 양배추, 담배, 토마토, 오이, 들깨) 19종의 유전자를 변형시키는 실험을 수행해 왔다. 이 가운데 현재 벼, 고추, 배추, 들깨 등 4가지는 개발이 완료돼 상품화가 임박한 단계다. 특히 유전자변형 배추는 바실러스 쓰린지엔시스(*Bacillus thuringiensis*; Bt)가 생산하는 Bt 단백질의 유전자를 이식하여 증폭시키는 방법을 이용한 것이다.
- <4> Bt 단백질은 전구체 상태로 생합성되어 살충 활성이 없지만, 해충이 먹게 되면 알칼리성인 곤충의 위 속에서 효소에 의해 단백질이 가수분해 됨으로써 곤충의 장세포막에 있는 특이한 수용체와 결합하고 채널을 형성하여 해충의 소화기를 파괴해 죽임으로써 살충 효과를 나타내게 된다. 이와 같이 국내 농작물 유전자변형기술은 세계적인 수준을 갖춘 것으로 평가된다.
- <5> 종래 유전자변형 식물체를 중합연쇄반응을 이용한 분석방법으로는 대한민국 특허출원번호 10-2005-7699호에 공지된 유전자변형 콩의 혼입률 정량분석법, 특허출원번호 10-2005-52089호에 공지된 유전자변형 옥수수에 대한 정량, 정성 분석방법 및 대한민국 특허등록번호 10-0514432호에 공지된 유전자변형 식물체 분석용 프라이머 세트, 프로브 및 표준플라스미드 등이 있다.
- <6> 그러나 해충저항성 유전자변형 배추의 상업화에 앞서 유전자변형 배추에 대한 검증 및 정성분석법에 관한 발명은 미비한 실정이다.
- <7> 이에 본 발명자들은 유전자변형 배추의 검증 및 정성분석법에 관하여 연구를 거듭한 결과 프라이머 세트를 이용한 검증 및 정성분석법에 관한 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <8> 본 발명의 목적은 배추의 내재유전자와 특이적으로 증폭하는 프라이머 및 해충저항성 유전자변형 배추에서 특이적으로 증폭하는 프라이머를 제공하는데 있다.
- <9> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 두 세트의 프라이머를 이용하여 중합연쇄반응으로 국내 해충저항성 유전자변형 배추의 정성분석법을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- <10> 본 발명의 상기 목적은 국내에서 개발한 유전자변형 배추에 대한 정성분석을 위해 배추의 내재유전자 KR 50010-3을 선별하고 상기 내재유전자에서 특이적인 증폭하는 프라이머 세트(Bra F-14, Bra R-14)를 제작한 다음 유전자변형 배추에 삽입된 Cry1Ac 유전자와 NOS terminator의 연결부위를 증폭시킬 수 있는 프라이머 세트(mBT120 F-1, mBT120 R-1)를 제작하고 상기 제작된 두 세트의 프라이머를 이용하여 이중(duplex) 중합연쇄반응을 수행함으로써 해충저항성 유전자변형 배추를 정성분석함으로써 달성하였다.
- <11> 본 발명은 서열번호 1(Bra F-14) 내지 2(Bra R-14)에 기재된 염기서열을 가지며 배추의 내재 유전자 중 121 b p가 특이적으로 증폭되는 중합연쇄반응용 프라이머 세트를 제공함을 특징으로 한다.
- <12> 본 발명은 서열번호 3(mBT120 F-1) 내지 4(mBT120 R-1)에 기재된 염기서열을 가지며 해충저항성 유전자변형 배추에서 특이적으로 161 bp가 증폭되는 중합연쇄반응용 프라이머 세트를 제공함을 특징으로 한다.
- <13> 또한 본 발명은 상기 프라이머 세트를 이용하여 이중 중합연쇄반응으로 확인하는 해충저항성 유전자변형 배추의 정성분석법을 제공함을 특징으로 한다.

효과

- <14> 본 발명은 배추의 내재유전자 KR 50010-3을 이용하여 다른 작물들과 구별할 수 있도록 특이적으로 증폭하는 프라이머 세트 및 해충저항성 유전자변형 배추에서 특이적으로 증폭하는 프라이머 세트를 이용하여 이중 중합연쇄반응을 통하여 유전자변형 배추를 정성분석할 수 있는 뛰어난 효과가 있으므로 식품산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <15> 이하 본 발명이 구체적인 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.
- <16> 본 발명은 해충저항성 유전자변형 배추의 제노믹(genomic) DNA를 농촌진흥청 농업생명공학연구원으로부터 분양받아 사용하였다. 이는 배추의 게놈(genome)에 Cry1AC 유전자와 Nos터미네이터가 삽입된 것으로, 배추의 게놈에 대한 염기서열은 아직까지 밝혀지지 않았다.
- <17> 본 발명은 유전자변형이 되지 않은 배추를 포함한 카놀라, 감자, 면화, 들깨, 옥수수, 보리, 녹두, 콩, 고추, 쌀, 밀, 메밀, 팥 및 오이 등 15개 작물들을 농업생명공학연구원 유전자원과로부터 분양받거나 국내 시장에서 구입하여 사용하였다.
- <18> 본 발명에서 %별 유전자변형 배추는 유전자변형 배추와 일반배추의 상대적인 비율을 의미하며, 0.1% 유전자변형 배추는 나머지 99.9%는 일반배추가 포함되어 있는 것이다.
- <19> 본 발명은 해충저항성 유전자변형 배추에서 특이적으로 증폭하는 프라이머를 제작하는 단계; 작물 15종으로부터 DNA를 추출하는 단계 및 이중 연쇄중합반응으로 해충저항성 유전자변형 배추의 민감도를 측정하는 단계로 구성된다.
- <20> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <21> **실시예 1: 배추에서 특이적으로 증폭하는 프라이머 제작**
- <22> 배추의 내재 유전자인 KR 50010-3 유전자의 염기서열을 기초로 하여 특이적인 프라이머 세트를 제작하여 121 bp의 중합연쇄반응 산물을 얻을 수 있도록 제작하였고, 해충저항성 유전자변형 배추에 삽입된 Cry1Ac 유전자와 NOS terminator를 증폭시켜 161 bp의 중합연쇄반응 산물을 얻을 수 있도록 특이적인 프라이머 세트를 제작하였

다.

<23> [표 1]은 상기 본 발명 프라이머 두 세트에 대한 각각의 염기서열을 나타낸 것이다.

표 1

<24> 본 발명 프라이머의 염기서열

구분	프라이머 명칭	염기서열(5' -3')	대 상	크기(bp)
서열번호 1	Bra F-14	GCTTGCGCTTGTCTAGAGT	배추 내재 유전자	121
서열번호 2	Bra R-14	GGCAGAAGAATGTCATC		
서열번호 3	mBT120 F-1	GCAGGAGTGATCATTGACAG	Cry1Ac	161
서열번호 4	mBT120 R-1	GGCTAGCGTTAACACTAGTCAG	NOS terminator	

<25> 실시예 2: 배추로부 DNA 추출 및 중합연쇄반응

<26> 해충저항성 유전자변형 배추, 유전자변형이 되지 않은 배추, 그리고 카놀라, 감자, 면화, 들깨, 옥수수, 보리, 녹두, 콩, 고추, 쌀, 메밀, 팥 및 오이 등 다른 15종의 작물들로부터 각각 1 g씩의 시료를 각각 준비하여 막자 사발에 넣고 액체질소를 가하여 분말 형태로 만들어 DNeasy Plant Maxi kit(Qiagen, USA)을 이용하여 게놈 DNA를 추출하였다. 상기 추출된 DNA는 UV-visible spectrophotometer UV-1700(Shimadzu, Japan)를 이용하여 260 nm와 280 nm에서 정량하였으며 260 nm/280 nm가 1.8~2.0 사이인 것을 사용하였다.

<27> 중합연쇄반응 용액은 한 시료 당 25 μ l를 사용하였으며 2.5 μ l의 10 X PCR buffer(Applied Biosystems, USA), 2 μ l의 dNTP(2.5 mM each, Applied Biosystems), 1.5 μ l의 1.5 mM MgCl₂(Applied Biosystems), 이중 중합연쇄 반응 일 경우에는 15 uM의 Bra F-14, Bra R-14 프라이머 세트와 10 uM의 mBT 120 F-1, mBT120 R-1 프라이머 세트를 사용하였으며, 배추 내재유전자의 특이성 확인을 위한 단일 중합연쇄반응 일 경우에는 10 uM의 Bra F-14/R-14 프라이머 세트만을 사용하였다.

<28> 각각의 중합연쇄반응은 50 ng의 DNA 주형을 포함하였으며 반응은 thermocycler PC808(ASTECH, Japan)를 이용하여 수행하였다. 중합연쇄반응 조건은 95℃에서 5분간 반응시킨 후 95℃에서 30초, 58℃에서 30초, 72℃에서 30초간 40회 반복 반응시키고 72℃에서 8분간 반응시킨 다음 4℃에서 중합연쇄반응 산물을 보관하였다.

<29> 배추 내재유전자의 특이성을 확인하기 위하여 상기 중합연쇄반응 산물을 3% 아가로스 젤 상에서 전기영동한 결과, [도 1]과 같이 해충저항성 유전자변형 배추 시료에서만 121 bp가 증폭되는 것을 확인할 수 있었다.

<30> 그리고 이중 중합연쇄반응을 수행한 결과, [도 2]와 같이 Cry1Ac 유전자와 NOS terminator 가 삽입되어 있는 유전자변형 배추에서 121 bp와 161 bp가 증폭되는 것을 확인하였다.

<31> 유전자변형 배추를 검출할 수 있는 특이적인 mBT120 F-1, mBT120 R-1 프라이머 세트는 상기 실시예 2에서의 중합연쇄반응 조건에서 161 bp의 중합연쇄반응 산물을 얻을 수 있었으며 상기 중합연쇄반응 산물을 DNA sequencer 분석기를 이용하여 분석한 결과 [도 3]의 염기서열을 확인하였고 본 발명 mBT120 F-1, mBT120 R-1 프라이머 세트의 염기서열이 포함된 것을 확인할 수 있었다.

<32> 또한 특이적인 Bra F-14, Bra R-14 프라이머 세트를 이용한 중합연쇄반응 조건에서 121bp의 중합연쇄반응 산물을 얻을 수 있었으며, 상기 중합연쇄반응 산물을 DNA sequencer 분석기를 이용하여 분석한 결과 [도 4]의 염기서열을 확인할 수 있었다.

<33> 실험예: 이중 중합연쇄반응을 이용한 해충저항성 유전자변형 배추의 정성분석

<34> 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 및 100% 유전자변형 배추의 게놈 DNA 50 ng을 주형으로 본 발명 mBT120 F-1, mBT120 R-1 프라이머 세트 및 Bra F-14, Bra R-14 프라이머 세트를 이용하여 이중 중합연쇄반응으로 해충저항성 유전자변형 배추의 정성분석을 측정하였다. 그 결과 [도 5]와 같이 배추 내재유전자를 증폭시켜 121 bp에서 중합연쇄반응 산물을 얻을 수 있는 프라이머 세트와 유전자변형 배추에 삽입된 외래유전자를 증폭시켜 161 bp의 중합연쇄반응 산물을 얻을 수 있는 프라이머 세트를 이용하여 하나의 튜브에서 %별 유전자변형 배추의 게놈(genomic) DNA를 증폭시킨 결과 1% 이상의 유전자변형 배추에서 중합연쇄반응 산물을 확인할 수 있었다.

도면의 간단한 설명

- <35> 도 1은 본 발명 Bra F-14, Bra R-14 프라이머 세트가 배추에서 특이적으로 증폭된 것을 나타내는 사진이다.
- <36> 도 2는 본 발명 Bra F-14, Bra R-14 프라이머 세트 및 mBT120 F-1, mBT120 R-1 프라이머 세트를 이용하여 해충 저항성 Cry1Ac 유전자가 있는 유전자변형 배추에서 증폭된 것을 나타내는 사진이다.
- <37> 도 3은 본 발명 mBT120F-1, mBT120R-1 프라이머 세트의 염기서열이 포함된 유전자변형 배추의 중합연쇄반응 산물인 161bp의 염기서열을 나타낸 것이다.
- <38> 도 4는 배추 내재 유전자인 KR 50010-3의 염기서열과 본 발명 BraF-14, BraR-14 프라이머 세트의 염기서열이 포함된 유전자 변형 배추의 중합연쇄반응 산물인 121bp의 염기서열을 나타낸 것이다.
- <39> 도 5는 해충저항성 유전자변형 배추를 본 발명 Bra F-14, Bra R-14 프라이머 세트 및 mBT120 F-1, mBT120 R-1 프라이머 세트를 이용하여 이중 연쇄중합반응으로 정성분석한 것이다.

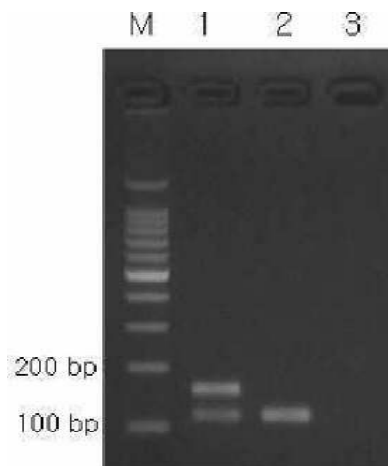
도면

도면1



M: 마커(100 bp DNA 레더), 1: 배추, 2: 유채, 3: 감자, 4: 면화, 5: 들깨, 6: 옥수수, 7: 보리, 8: 녹두, 9: 콩, 10: 고추, 11: 쌀, 12: 밀, 13: 메밀, 14: 팥, 15: 오이 및 16: 대조구(non-template)

도면2



M: 마커(100 bp DNA 래더), 1: 유전자변형 배추(161 bp)
2: 일반배추(121 bp), 3. 대조구(non-template)

도면3

mBT120 F-1				
gcaggagtga	tcattgacag	attcgagttc	attcctgtta	ctgccactct
cgtcctcact	agtaactgtc	taagctcaag	taaggacaat	gacggtgaga
tgaggctgag	tacaatcttt	aaggtaccat	cgaattcctg	cagcccgggg
actccgactc	atgtagaaa	ttccatggta	gcttaaggac	gtcggggccc
gatccccggg	aattctaaga	ggagtccacc	atggtagatc	tgactagtgt
ctagggggccc	ttaagattct	cctcaggtgg	taccatctag	actgacaca
				mBT120 R-1
taacgctagc	c			
attgcgacgc	g			

도면4

```

1  aagagagtgga tgataagttt tgggatttca tgaagcagtt cctcttgggc
   ttctctcact actattcaca accctaaggt acttcgtcaa ggagaagdcg

51  ctctggggat tccgccagcg gcccttaccg ccgggtcgac ccattgaagt
   gagaccccta agggggtcgc cgggaatggg ggcccagctg ggttaactga

101 cgtcagggct attggttaca aacgcctcga gaagcgtac tatgaactga
   gcgagtccga taaccaatgt ttgcggagct cttcgcgatg atactgacat

151 aetccccccc ttccttcaat ttcattgtgt agattcttct gtgtttatga
   tggggggggg aagggaagtga aagtacacaa tctaagaaga cacaaatact

201 gttaggatac tagttggtgc tattgtaatc cttggtcatg ttctagtgat
   caatcctatg atcaaccacg ataacattag gaaccagtac aagatcacta

251 ggtataggga ttccaagctc ttgttgactc ttagtttctg gtgttcaact
   ccgataccct aaggttcgag aacaactgag aatcaagac cacaagtga

301 ttctatctgt ttaagtctg ctcaaaagat ccaagcttgc gcttgttcta
   aagtgagaca atgcaagac ggttttctca ggttcgaacg cgaacagat

351 gagttgttga atttatgcta gaatcctttt tgttgagggc tttagttctt
   ctcaacaact taaatacgat cttaggaaaa acaacctccg aaactcaaga

401 accataacct ttgttttgat caaaaaactb cttaacttga tgaattctb
   tggatttgga aaacaaacta gtgttttgaa gaagtgaact actgtaaaga

451 ctgcctttta atctgtttat catgcgcttt aaataatcaa gcttgtagtg
   gacggaaat tagacaata gtacgcgaaa ttgttaggtt cgaacatcac

501 ttgttgaaat gctggaatat gatgaagtg gttttctttt ttcctttgat
   aacaacttaa cgaccttata ctactttcac caaaagaaa aaggaaacta

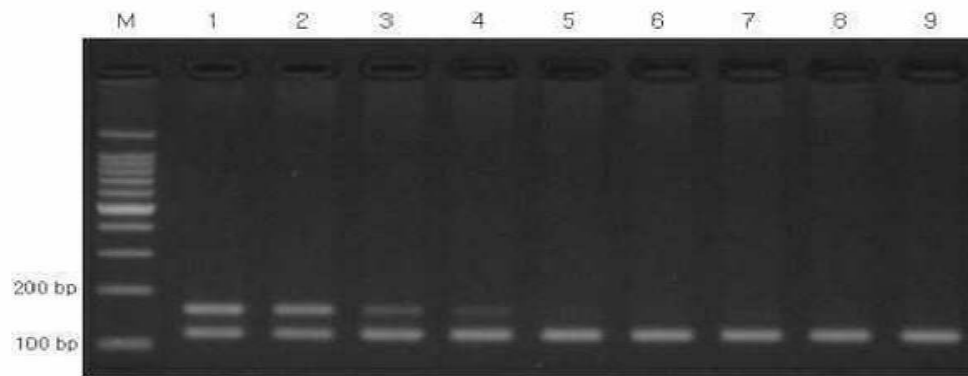
551 ggtgtgtgatt ataagcactt ttgtttgctc tctctgtgat tagtcataat
   cgcacactaa tattcgtgaa aacaaacgag agagacacta atcagtttta

601 gaagacgggt ggttgggtgt acaaggaccg acttggccgt tcaagaggcc
   cttctgccc ccaaccacca tgttctctgg tgaaccggca agttctccgg

651 catgcgagct tattaccctb aagacagctt atggagctgg aatcattgac
   gtacgctcga ataattggaa ttctgtcgaa tacctcgacc ttagtaactg

701 agagataact tcatttgggg cgaaggacat gatgagtggg c
   tctctatgaa agttaaaccac gtctctgtac ctactcaacc g
  
```

도면5



M: 마커(100 bp DNA 래더),
1~9: 100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 및 0.01%
유전자변형 배추

서열 목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation Kyunghee
<120> Primer sets for qualitative analysis of insects resistant
genetically modified Chinese cabbage

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Bra F-14

<400> 1

gcttgcgctt gttctagagt

20

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Bra R-14

<400> 2
ggcagaagaa tgcatc

17

<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mBT120 F-1

<400> 3
gcaggagtga tcattgacag

20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> mBT120 R-1

<400> 4
ggctagcggtt aacactagtc

20