



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0148562
(43) 공개일자 2022년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6895 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6895 (2018.05)

C12Q 2600/13 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0055780

(22) 출원일자 2021년04월29일

심사청구일자 2021년04월29일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

박영두

경기도 용인시 수지구 성북2로 220 힐스테이트 3차 305동 1404호 (성북동, 버들치마을 힐스테이트3차)

전영시

광주광역시 북구 용봉로 77, 공대 5호관 (용봉동)

(74) 대리인

특허법인 다해

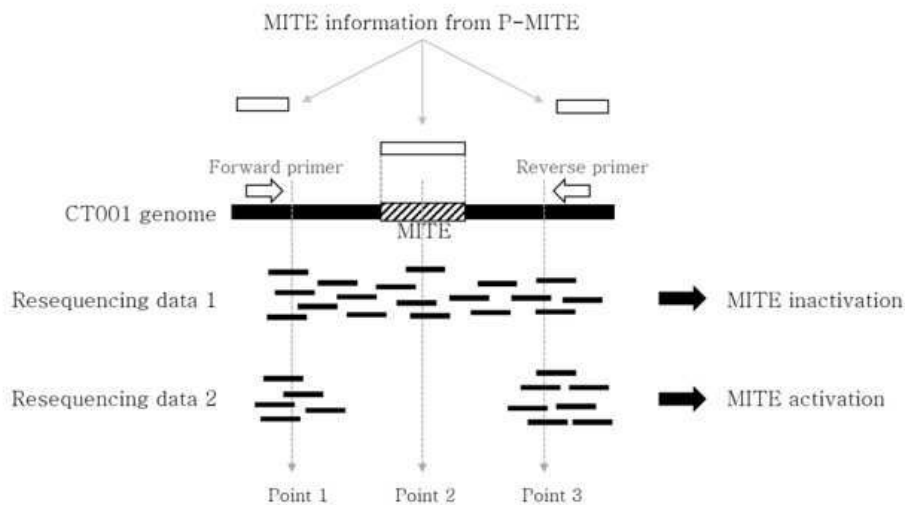
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 배주 형질전환체 특이적 활성 전이인자인 PTE-2 검출용 프라이머 세트

(57) 요약

본 발명은 배주 형질전환체 특이적 활성 전이인자인 PTE-2 검출용 프라이머 세트에 관한 것으로, 본 발명에서 규명한 프라이머 세트는 형질전환 과정에 의해 전이인자 PTE-2가 활성화된 개체를 PCR을 이용하여 용이하고 신속하게 판별하는데 유용하게 이용될 수 있으며, 나아가 유전적으로 안정된 형질전환체를 개발하는데 유용하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395067300
과제번호	20210589
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린연계농생명혁신기술개발(R&D)
연구과제명	작물 분자육종소재의 유용성 검증 및 활용을 위한 비의도적 유전체 변이 선발마커
개발 (1/2)	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 3의 염기서열로 이루어진 PTE-2 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-2 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-2 활성화 검정용 프라이머 세트.

청구항 4

제3항에 있어서,

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

청구항 5

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

게놈 DNA를 주형으로 제3항 또는 제4항의 배추 전이인자 PTE-2 활성 검정용 프라이머 세트를 이용하여 중합효소 연쇄반응(PCR)을 수행하는 단계; 및

상기 중합효소연쇄반응으로 수득된 증폭산물을 분석하는 단계;를 포함하는 배추 전이인자 PTE-2 활성 검정 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 PCR은 제4항의 프라이머 세트를 이용하여 수행되었고,

상기 방법은 수득된 증폭산물을 분석한 이후에 그 길이가 834 bp이면 전이인자 PTE-2가 비활성화된 배추이고, 669 bp이면 전이인자 PTE-2가 활성화된 배추인 것으로 판정하는 단계를 추가로 포함하는 배추 전이인자 PTE-2 활성 검정 방법.

청구항 7

제3항 또는 제4항의 프라이머 세트를 포함하는 배추 전이인자 PTE-2 활성 검정용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) 형질전환 과정에서 전이 활성을 보이는 PTE-2 전이인자의 전이 상태를 검정할 수 있는 프라이머 세트 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 전이인자는 유전체 내에서 다른 곳으로 복제되거나 전이될 수 있는 유전적 구성요소이다. 대부분의 고등 식물의 유전체에서 전이인자는 높은 비율을 차지하고 있으나 그 중 소수의 전이인자만이 전이활성을 나타낸다. 전이인자는 환경적 스트레스나 노화 등의 원인에 의해 전이활성이 나타나거나 억제될 수 있다.

[0004] 식물 조직배양은 식물의 전형성을 이용하여 식물의 단일 세포나 조직으로부터 온전한 개체로 발달시키는 기술이다. 식물의 조직배양은 토양 환경에서 생육하는 식물과 비교할 때 높은 기내 습도, 탈분화와 재분화 과정, 계대배양 등 식물에게 스트레스로 작용하는 환경적 요소를 가지고 있다. 조직배양에 의한 스트레스는 전이인자의 활성을 촉진시켜 체세포영양계변이를 유발할 수 있다. 조직배양에 의한 전이인자의 활성은 벼와 옥수수, 담배 등의 작물에서 확인된 바 있다. 식물 조직배양기술은 식물의 영양번식 수단으로 사용되며 상업적으로 널리 쓰이는 기술이며, 동시에 식물 형질전환 등의 생명공학기술의 기반기술로서 활용된다. 식물 형질전환은 항생제 사용, 아그로박테리움(*Agrobacterium*)에 의한 감염, 더 긴 배양기간 등 일반적인 식물 조직배양보다 더욱 식물에게 스트레스를 유발하는 환경조건을 제공한다. 벼와 배추에서 식물 형질전환에 의한 전이활성을 보이는 전이인자가 보고된 바 있다.

[0005] 전이인자는 전이활성을 나타내는 기작에 따라 두 가지 클래스로 분류된다. 클래스 I-레트로트랜스포존(retrotransposon)은 RNA를 중간물질로 가지며 기존의 전이인자로부터 mRNA가 전사된 후, 다시 cDNA로 역전사되어 새로운 위치에 삽입된다. 반면, 클래스 II-DNA 트랜스포존(transposon)은 DNA를 중간물질로 가지며 전이인자가 기존의 위치로부터 떨어져나온 후 새로운 위치로 삽입되는 기작을 가진다. 각 클래스의 전이인자들은 고유한 서열이나 트랜스포사제(transposase)의 구조에 따라서 하위분류로 나누어질 수 있다.

[0006] Miniature inverted-repeat transposable element (MITE)는 비자율적(non-autonomous) 클래스 II-DNA 트랜스포존이다. MITE는 내부에 트랜스포사제를 암호화하는 서열을 가지고 있지 않기 때문에 외부의 트랜스포사제에 의해 이동한다. MITE는 자율적(autonomous) 전이인자의 내부 서열 삭제에 의해 형성되는데, 따라서 MITE의 기원이 되는 자율적 전이인자로부터 합성된 트랜스포사제가 MITE를 이동시킨다. MITE는 짧은 길이와 양 말단에 TIR(terminal inverted repeat) 서열을 가지며, 두 개의 동일한 TSD(target site duplication) 서열 사이에 존재한다는 특징을 가진다. 이러한 구조적 특징에 의해 컴퓨터 프로그램을 이용하여 유전체 정보로부터 MITE 후보 서열을 찾아낼 수 있다. P-MITE database (plantMITE, <http://pmite.hzau.edu.cn/django/mite>)는 MITE-Digger, MITE-Hunter, RSPB 프로그램을 이용하여 41개 식물종의 유전체에 존재하는 MITE 정보를 제공한다. 그 중 배추는 전장유전체해독(whole genome sequencing)이 완료된 지부(Chiifu) 배추의 유전체 정보를 이용하여 분석된 총 174개 MITE family 정보가 공개되어 있다.

[0007] 유전체 내에서 MITE의 전이 활성을 검정할 수 있는 분자마커로 MIP(MITE insertion polymorphism), IMP(inter-MITE polymorphism), TD(transposon display), TE-TRAP(transposable element-target region amplification polymorphism) 등이 있다. 이 중 MIP 마커는 PCR(polymerase chain reaction) 기술을 이용하여 단시간 내에 빠르게 MITE의 활성 여부를 탐색할 수 있는 방법이다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 조직배양 과정을 포함한 배추의 형질전환 과정에서 전이활성을 보이는 MITE를 선별하기 위한 연구 결과, 배추 형질전환체에서 전이활성을 보이는 MITE를 확인하였다. 선별된 MITE를 PCR 기술을 기반으로 하여 배추 형질전환체 특이적 다형성을 검출할 수 있는 프라이머를 개발하였으며 해당 MITE의 전이 활성 검정에 이용할 수 있음을 밝혀, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) KR 10-1998526

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 서열번호 1 및 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 프라이머로 이루어진 배추 전이인자 PTE-2 활성 검정용 프라이머 세트를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 배추 전이인자 PTE-2 활성 검정 방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프라이머 세트를 포함하는 배추 전이인자 PTE-2 활성 검정용 키트를 제공하는 것이다.
- [0014] 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

- [0016] 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.
- [0017] 이에, 본 발명은 상기 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 영역의 전이인자를 PTE-2로 명명하고, 상기 PTE-2 전이인자를 배추의 형질전환체에서 전이인자 활성화 여부를 검출하기 위한 바이오마커로 제공한다.
- [0018] 본 발명의 바이오마커는 형질전환 배추 제작에 있어서 목적하는 형질전환이 발생한 배추 선정을 위한 것으로, 형질전환 이후에 PTE-2 활성화 여부를 확인하고, 비활성화 개체를 선정하여 예측 밖에 유전적 변이가 발생하지 아니하여 계통 안정성이 확보된 개체를 선별하는 것에 이용될 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 배추 전이인자 PTE-2 인접영역의 염기서열을 이용하여 이를 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 설계하고, 상기 프라이머 세트를 이용한 PCR 증폭 산물의 길이를 분석하여 형질전환 배추의 PTE-2 전이인자의 활성화 여부를 검정하는 방법을 제공할 수 있다.
- [0020] 이에, 본 발명은 상기 PTE-2 전이인자를 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 배추 전이인자 PTE-2의 활성화 검정의 용도에 제공할 수 있다.
- [0021] 본 발명이 발굴한 바이오마커인 PTE-2 전이인자는 배추의 6번 염색체 상에 위치하는바, 상기 PTE-2 전이인자를 증폭할 수 있는 프라이머는 배추 6번 염색체에서 PTE-2 전이인자를 포함하는 영역을 증폭할 수 있는 것이며, 구체적으로 PTE-2 전이인자의 200~300bp upstream과 상보적인 18~23 mer 길이의 올리고뉴클레오타이드와 200~300bp downstream과 상보적인 18~23 mer 길이의 올리고뉴클레오타이드로 이루어진 프라이머 세트일 수 있다.
- [0022] 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-2 활성 검정용 조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 배추 전이인자 PTE-2는 서열번호 3의 염기서열을 포함하거나 이로 이루어진 것일 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 (1) 배추 시료로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 분리하는 단계;
- [0025] (2) 게놈 DNA를 주형으로 상기 배추 전이인자 PTE-2 활성 검정용 프라이머 세트를 이용하여 증합효소연쇄반응

(PCR)을 수행하는 단계; 및

[0026] (3) 상기 중합효소연쇄반응으로 수득된 증폭산물을 분석하는 단계;를 포함하는 배추 전이인자 PTE-2 활성 검정 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 방법은 (4) 수득된 증폭산물이 834 bp이면 전이인자 PTE-2가 비활성화된 배추이고, 669 bp이면 전이인자 PTE-2가 활성화된 배추인 것으로 판정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (1) 단계의 배추는 형질전환된 배추인 것이다.

[0029] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 방법은 (4) 단계 이후에 PTE-2가 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-2가 활성화된 배추로 판정되는 경우 상기 배추는 예측밖의 비-의도적 변이의 발생 가능성이 높은 것으로 선별하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0031] 본 발명은 배추에서 PTE-2의 활성 여부를 판별하기 위한 프라이머 세트 및 상기 프라이머 세트를 이용한 판별방법을 제공함으로써, 조직배양 및 형질전환 과정에 의해 전이인자 PTE-2가 활성화된 개체를 판별하여, 안정된 형질전환체를 개발하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 본 발명의 전이인자 분석 방법 및 PTE-2의 활성을 특이적으로 판별하는 프라이머 세트 작성 방법의 모식도이다.

도 2은 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-2의 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, IGA61 배추.

도 3은 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-2의 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-2의 활성 검정용 프라이머 세트를 조직배양을 거치지 않은 배추 CT001 개체들에 적용하여 증폭 여부를 전기영동하여 확인한 결과를 나타낸 것이다:

M: 100bp size marker, 1-16 조직배양을 거치지 않은 배추 CT001 개체.

도 5는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-2의 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

[0034] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예

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

[0035] [실시예]

[0036] 실시예 1 : 배추 형질전환체에서 활성화된 전이인자 탐색

[0037] "P-MITE Database"와 형질전환체의 유전체 재분석 데이터(resequencing data)를 바탕으로 MITE의 활성을 비교한 후 MITE가 활성화되었다고 판단되는 곳을 선별한 후, 활성 여부를 확인하기 위해 프라이머 세트를 작성하였다(도 1).

[0038] 구체적으로, P-MITE(plant MITE database)를 참고하여 *Brassica rapa*(Chiffu계통)의 MITE superfamily DTA, DTC, DTH, DTC, 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 T0 세대(IGA6, IGA7) 및 T2 세대(IGA634, IGA743)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 CT001, 형질전환체 T0 세대(IGA6, IGA7) 및 T2 세대(IGA634, IGA743)의 유전체 재분석 데이터를 활용하여 동시에 비교 분석하였다.

[0040] 실시예 2: 프라이머 세트 제작

[0041] 분석 결과 형질전환체 T0 세대 중 IGA6에서 MITE가 활성화된 유의적인 차이를 보인 MITE를 선별하였다. 선별된 MITE은 CT001의 1번 염색체에 위치한 DTT_Brr8 family에 속하는 MITE로 분석되었으며, 이후 PTE-2로 명명하였다. 해당 MITE 및 MITE 양쪽 인접 영역의 염기서열을 확인한 후 MITE 영역에서 200-300 bp 정도 떨어진 곳에 길이 18-23 mer로 구성된 세 쌍의 프라이머를 제작하였고, 그 서열을 하기 표 1에 나타내었다. PTE-2 F와 PTE-2 R 프라이머를 사용하여 PCR 수행시 MITE가 활성화되지 않은 경우는 834 bp, 활성화된 경우는 669 bp의 산물(product)을 가진다. SQ043028018_F와 SQ043028018_R 프라이머를 사용하여 PCR 수행시 MITE가 활성화되지 않은 경우는 642 bp, 활성화된 경우는 384 bp의 산물을, SQ043000133_F와 SQ043000133_R 프라이머로 PCR 수행시 MITE가 활성화되지 않은 경우는 807 bp, 활성화된 경우는 399 bp의 산물을 가질 것으로 예상하였다.

표 1

[0043]

프라이머	염기서열	MITE 비활성	MITE 활성
PTE-2 F(서열번호 1)	5'-TATACATGACGAGTATACGAGGG-3'	834 bp	669 bp
PTE-2 R(서열번호 2)	5'-CCACAAGTGATCGTGTGTCTAG-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'-GGCTGTGGAGGTGCTAC-3'		

[0044] 실시예 3: 본 발명의 프라이머세트 검증

[0045] 본 발명의 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-2의 활성 검증용 프라이머 세트가 조직배양 과정을 거친 배추 형질전환체에서 전이인자 PTE-2의 활성 여부를 판별할 수 있는지 확인하는 과정을 수행하였다.

[0046] 구체적으로, 조직배양을 거치지 않은 배추 CT001 개체와 전이인자 탐색에 이용된 배추 형질전환체 IGA6의 후대 IGA61 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 μ l SDS 완충용액을 첨가하여 잘 섞어준 후, 60℃에서 30분 동안 반응시켰다. 800 μ l의 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 μ l과 3M 아세트산나트륨(sodium acetate) 40 μ l를 넣고 DNA를 침전시킨 뒤, 침전물을 75% 에탄올로 세척하였다. 그 다음, 에탄올이 없도록 잘 건조시키고, TE 완충용액(Tris-EDTA buffer)에 녹여 사용하였다.

[0047] 조직배양을 거치지 않은 배추 CT001 개체 및 배추 형질전환체 IGA61 개체를 대상으로 PTE-2의 활성여부를 확인하기 위하여, 추출한 DNA를 사용하여 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-2의 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, 60℃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% 아가로스 젤에서 1시간 동안 분리하여 UV illuminator로 관찰하였다.

[0048] 또한, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-2의 활성 검정용 프라이머 세트를 사용한 PCR에 의해 배추로부터 증폭된 산물을 전기영동한 사진이며, 조직배양을 거치지 않은 개체에서는 834 bp에 해당하는 PCR 산물을 확인하였고, 형질전환체 IGA61에서는 669 bp에 해당하는 PCR 산물을 확인하였다(도 2).

[0050] 실시예 4: 증폭된 PCR 산물 내 전이인자 PTE-2의 서열포함 여부 확인

[0051] 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-2의 활성 검정용 프라이머 세트로 증폭된 834 bp 및 669 bp PCR 산물의 염기서열을 분석하기 위해 PCR 산물을 염기서열 분석용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 재조합 벡터를 구축하였다. 염기서열 분석용 pGEM-T easy vector 내부에 클로닝된 PCR 단편의 염기서열은 삽입된 자리에 근접한 T7 및 SP6 프라이머를 이용하여 조사하였으며, 확인된 염기서열에 MITE 염기서열의 포함 여부를 GenBank BLAST 프로그램을 사용하여 분석하였다.

[0052] 그 결과, 834 bp 산물의 염기서열에는 PTE-2의 염기서열이 포함된 것을 확인하였고, 669 bp 산물의 염기서열에는 PTE-2의 염기서열이 포함되지 않은 것을 확인하였으며, 확인된 서열은 서열번호는 4로 표시하였다(도 3).

[0053] 이와 같은 결과를 통해, 본 발명의 방법에 의하여 배추에서 PTE-2의 활성을 특이적으로 확인할 수 있는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-2의 활성 검정용 프라이머 세트를 제조할 수 있음을 확인하였다.

[0055] 실시예5: 본 발명의 프라이머 세트를 이용한 배추 형질전환체에서의 다형성 분석

[0056] 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-2의 활성 검정용 프라이머 세트를 이용하여 실제적으로 배추 형질전환체에서도 PTE-2의 활성 여부를 구분할 수 있는지 확인하는 과정을 수행하였다.

[0057] 구체적으로, 조직배양을 거치지 않은 배추 CT001 개체들로부터 gDNA를 상기 실시예 3에 기재된 방법으로 분리하였고, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-2의 활성 검정용 프라이머 세트들을 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0058] 그 결과, 조직배양을 거치지 않은 배추 전체에서 PTE-2가 활성화되지 않음을 확인하였다(도 4).

[0059] 또한, PPi, BT 등 다양한 계통의 배추 형질전환체로부터 gDNA를 상기 실시예 3에 기재된 방법으로 분리하였고, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-2의 활성 검정용 프라이머 세트를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0060] 그 결과, 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-2의 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 포함 여부의 분석이 가능함에 따라 본 발명의 프라이머 세트를 이용하여 조직배양을 거친 형질전환체에서 빈번하게 활성화되는 PTE-2의 활성 여부를 검정할 수 있음을 확인하였다.

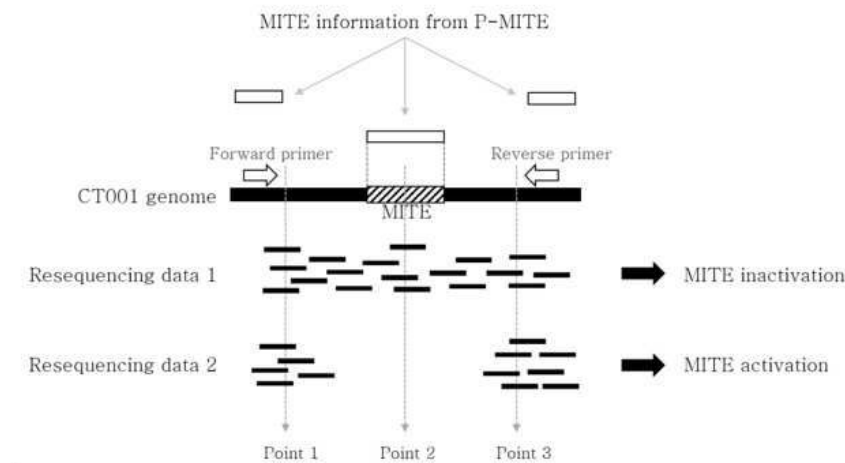
[0061] 따라서, 본 발명의 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 전이인자 PTE-2의 활성 검정용 프라이머 세트를 이용하여 조직배양 및 형질전환에 의한 체세포 영양계 변이체를 초기에 선발함으로써 안정적인 유전체를 가지는 형질전환체를 개발하는데 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

[0063]

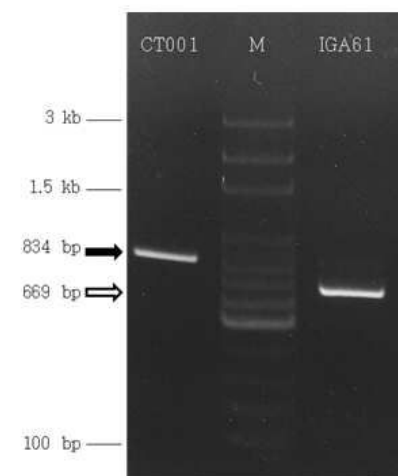
이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

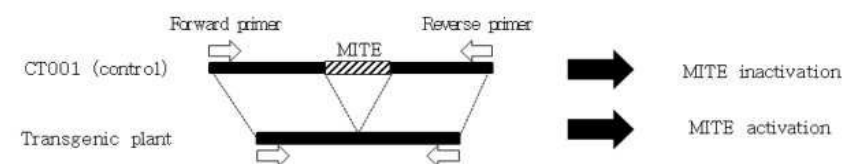
도면1



도면2



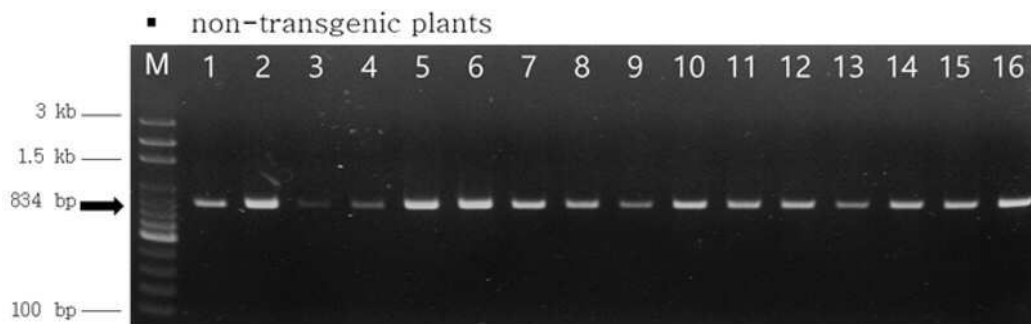
도면3a



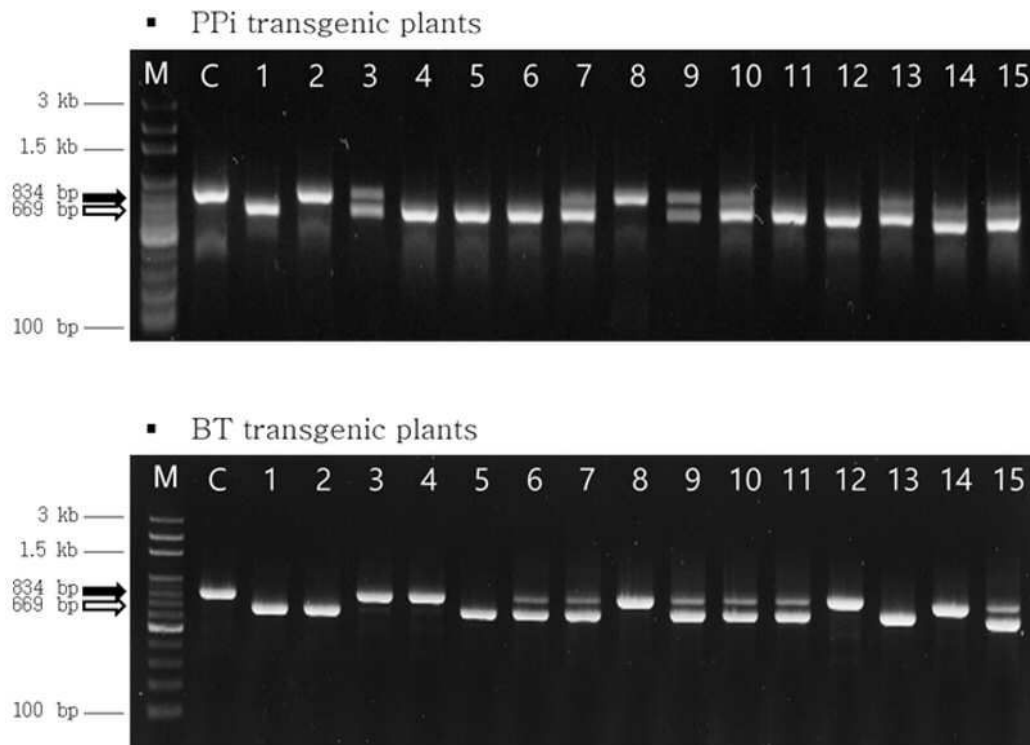
도면3b



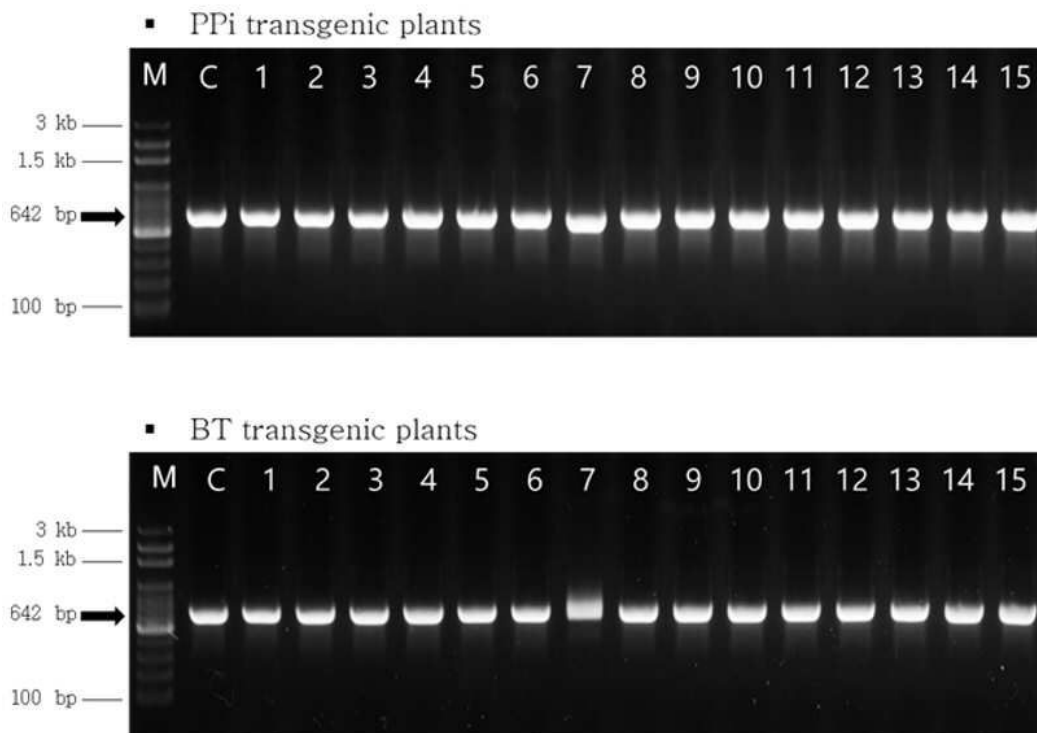
도면4



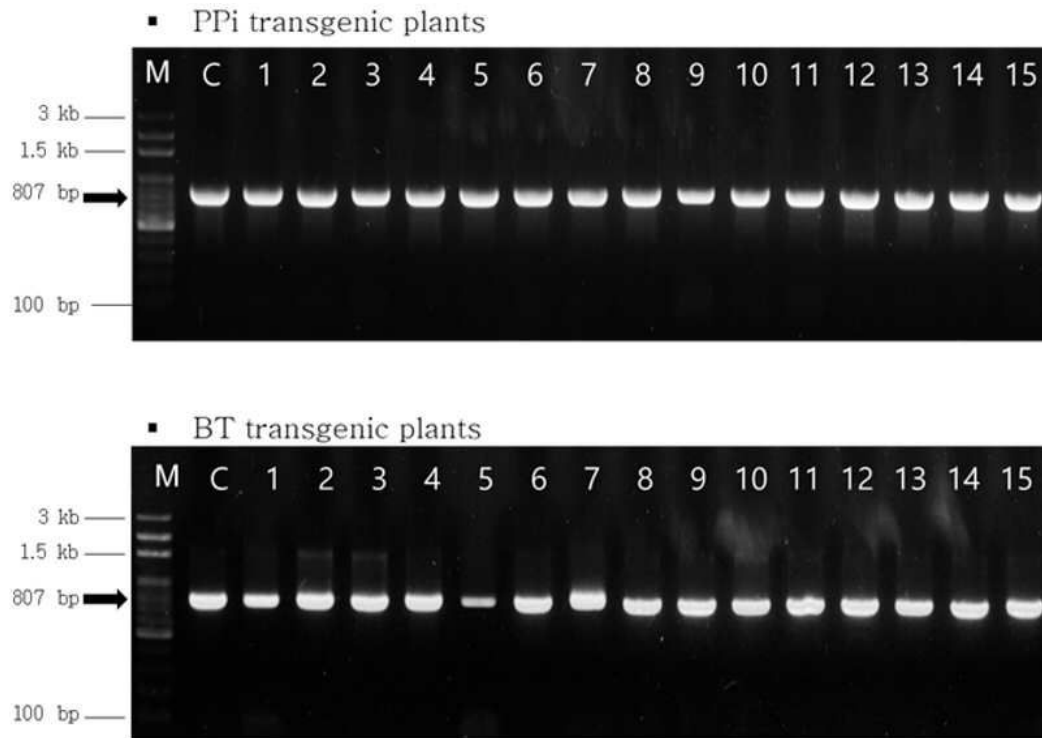
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> A primer set for detecting active transposon PTE-2 in Chinese cabbage transformants
- <130> DHP21-K205
- <160> 8
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> PTE-2 F
- <400> 1
- tatacatgac gagtatacga ggg
- <210> 2
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

23

<220><223> PTE-2 R

<400> 2

ccacaagtga tcgttgtcta g 21

<210> 3

<211> 268

<212> DNA

<213> Brassica rapa_PTE-2

<400> 3

ttcactctgt ttcataataa gtgattaagt gtcattctaa tttttttttt gttacacaaa 60

aaataatcact ttacaatttc aatacaaat atacttactt tcagctaaaa attaatattca 120

gactacattg atattataaa taattttatt catctcaaat actattgatc aaagaagtat 180

aattaataac aactatacat atattttcat cactttctta atttgtgtga aaaatgtcaa 240

agtgacactt atttagaaac gaatgaag 268

<210> 4

<211> 834

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 4

tatacatgac gagtatacga gggttataca taaatcgttt gtattagaag taacgacgca 60

aataaggaat acgatttcgt atttgtcttg acagtaaacc ttttctgaat caatcaacat 120

agagataaaa agaaaatgaa tagtggcaga aagtacaaat acttagtaaa ataataacg 180

taattgataa aacaaaatta atgttgaaga ttagctgatg tcaaaaaaag gttaaagatt 240

agcttaactg actatagata ccagggtgtg catataacaa tgaaaaatat tcactctgtt 300

tcataataag tgattaagtg tcattctaatt tttttttttg ttacacaaaa aatatcactt 360

tacaatttca atacaaatta tacttacttt cagctaaaaa ttaatttcag actacattga 420

tattataaat aattttattc atctcaaata ctattgatca aagaagtata attaataaca 480

actatacata tattttcac cttttcttaa tttgtgtgaa aaatgtcaaa gtgacactta 540

tttagaaacg aatgaaglat atagtaacaa aattaatatt atattacgat ttaattttag 600

atttgataa ttacgagttt tgtttgagac ctcttaataa ccccaaaaat tgaagatcaa 660

acatgtaaat caaaattaat gttcaaacgt ttccatttcg attttagcca tgtttgatac 720

aatgatatta ttatggctct tccagaaact aattataccg tttaaaaaaa aaaacttttt 780

tcaccaatga gatccaaacg tgtatgactt catctagaca acgatcactt gtgg	834
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SQ043028018_F	
<400> 5	
gtcaacatac taaccatttc	20
<210> 6	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SQ043028018_R	
<400> 6	
ctcaacagac tatatcgga	19
<210> 7	
<211> 21	
<212> DNA	
<213>	
> Artificial Sequence	
<220><223> SQ043000133_F	
<400> 7	
tgacttggtg ttagatgtag c	21
<210> 8	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> SQ043000133_R	
<400> 8	
ggctgttgga ggtgctac	18