



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/02 (2006.01)

(11) 공개번호

10-2007-0062798

(43) 공개일자

2007년06월18일

(21) 출원번호 10-2005-0122609

(22) 출원일자 2005년12월13일

심사청구일자 2005년12월13일

(71) 출원인 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
김동헌
경기 수원시 권선구 서둔동 250번지
류태훈
경기 수원시 장안구 조원동 한일타운 109-1901호

(74) 대리인 류창희
이덕록

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 유전자변형 쌀의 정성 분석방법

(57) 요약

본 발명은 쌀의 내재 유전자와 유전자 변형 쌀 내 삽입된 삽입 유전자 각각에 특이적인 프라이머 쌍을 이용한 PCR을 통해 유전자 변형 쌀을 정성분석하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 간단하고 용이한 방법으로 신속하게 유전자변형 쌀을 모니터링할 수 있으므로 유전자변형 쌀의 상업화에 크게 기여할 수 있다는 점에서 신품종의 작물개발을 위한 농업발전상 매우 유용한 발명인 것이다.

대표도

도 4

특허청구의 범위

청구항 1.

서열번호 1의 염기서열로 나타내어지는 쌀의 내재 유전자 분석을 위한 프라이머 OsSAMDC1-5'.

청구항 2.

서열번호 2의 염기서열로 나타내어지는 쌀의 내재 유전자 분석을 위한 프라이머 OsSAMDC1-3'.

청구항 3.

서열번호 3의 염기서열로 나타내어지는 밀양 204호의 삽입 유전자 분석을 위한 프라이머 Os204-5'.

청구항 4.

서열번호 4의 염기서열로 나타내어지는 밀양 204호와 익산 483호의 삽입 유전자 분석을 위한 프라이머 OsNos-3'.

청구항 5.

서열번호 5의 염기서열로 나타내어지는 익산 483호의 삽입 유전자 분석을 위한 프라이머 Os483-5'.

청구항 6.

쌀의 내재 유전자 분석을 위한 청구항 1과 2의 프라이머 OsSAMDC1-5'(서열번호 1)과 프라이머 OsSAMDC1-3'(서열번호 2) 및 유전자변형 쌀 내 삽입 유전자의 분석을 위한 청구항 3과 4의 프라이머 Os204-5'(서열번호 3)과 프라이머 OsNos-3'(서열번호 4)을 이용한 중합효소연쇄반응(PCR)을 실시하는 단계를 포함하는 유전자변형 쌀인 밀양 204호의 정성분석법.

청구항 7.

쌀의 내재 유전자 분석을 위한 청구항 1과 2의 프라이머 OsSAMDC1-5'(서열번호 1)과 프라이머 OsSAMDC1-3'(서열번호 2) 및 유전자변형 쌀 내 삽입 유전자의 분석을 위한 청구항 5와 4의 프라이머 Os483-5'(서열번호 5)과 OsNos-3'(서열번호 4)을 이용한 중합효소연쇄반응을 실시하는 단계를 포함하는 유전자변형 쌀인 익산 483호의 정성분석법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 중합효소연쇄반응 기법을 이용한 유전자 변형 쌀의 정성분석법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 쌀 특이적인 내재 유전자 분석과 유전자 변형 쌀 내 삽입된 삽입 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 이용한 중합효소연쇄반응을 통해 유전자 변형 쌀을 정성분석하는 방법에 관한 것이다.

1994년 미국의 칼젠(Calgene)사에서 개발한 보존성이 향상된 토마토가 상품화되어 시판된 이후, 전 세계적으로 콩, 옥수수, 면화, 카놀라 등 상품화된 유전자변형 농작물들이 2004년 말까지 16개 작물, 약 80여종에 달하며 개발이 완료되어 각 나라별로 환경위해성 및 인체안전성 평가를 받은 후 시판되고 있다. 우리나라의 경우 국내에서 개발되어 유전자변형

(genetically modified, GM) 작물로서 상품화된 것은 없으나, 국내 주요 농산물을 중심으로 농촌진흥청 산하의 연구기관, 대학 및 산업체 등에서 제초제 내성 및 해충 저항성 등을 갖는 GM 작물들의 개발이 활발하게 이루어지고 있으며, 일부 작물들에 대해 환경위해성에 대한 평가가 진행 중이어서 머지않아 상업화가 가능할 것으로 예상된다.

그 중에서 쌀의 경우는 미국, 일본, 중국, 인도 및 우리나라에서 GM 쌀에 대한 개발이 활발히 이루어지고 있으나, 아직까지 전 세계적으로 상업화되어 재배된 GM 쌀은 없는 것으로 보고되고 있다. 그러나, 2005년인 올해 그린피스(Greenpeace; 국제환경보호단체)에서 중국 후베이성 지역 내의 종자회사, 농가, 기타 여러 시장 등에서 판매되고 있는 쌀을 수거하여 시험 분석한 결과, 해충저항성 유전자가 삽입된 GM 쌀이 검출되었다고 보고된 바 있는 만큼 GM 쌀의 상업화는 가까운 미래에 이루어질 것으로 예상된다. 국내에서 개발된 제초제 저항성을 갖는 GM 쌀(밀양 204호, 익산 483호)도 곧 상업화가 이루어질 전망이다, 이에 따라 이들의 모니터링을 위한 정성, 정량 분석법이 필수적으로 요구되고 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

이에, 본 발명자들은 GM 쌀의 모니터링을 위한 분석방법을 개발하고자 국내 개발된 GM 쌀인 밀양 204호와 익산 483호 품종을 대상으로 연구 노력한 결과, 쌀의 내재 유전자와 밀양 204호 및 익산 483호에 삽입된 제초제 저항성 유전자를 확인할 수 있는 특이적인 프라이머와 그를 이용한 GM 쌀의 정성 분석법을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 구성

오늘날 농업생명공학 기술은 생산성의 향상, 환경 보전, 식품의 안전성 및 품질 향상에 기여함은 물론 농업의 경쟁력을 높일 수 있는 유일한 대안으로 인식되고 있다. 유전자변형(GM) 농산물의 개발은 미국, 캐나다 등의 선진국이 주도하고 있지만 우리나라의 기술도 선진국과 격차가 그다지 크지 않아 앞으로 유망산업으로 각광받을 전망이다. 특히, 우리나라를 비롯하여 동남아시아 지역의 여러 나라들의 주요 농산물 중에 하나인 쌀은 재배 면적이나 생산량 및 소비량에 있어서 가장 우위에 있다. 이에, 국내에서도 밀양 204호와 익산 483호 같은 GM 쌀의 개발을 이미 10년 전부터 시작해 오고 있으며, 국내 상업화를 목적으로 한 최초 GM 작물인 만큼 삽입유전자의 이동성, 재배 기간 중에 우점 토착미생물의 변화 양상, 시험포장 내 무척추동물의 다양성에 미치는 영향, 생산성 및 영양성분 비교 등의 포괄적인 환경위해성 평가가 진행중에 있다. 따라서, 이러한 GM 쌀의 예기치 못한 개발 중의 관리 소홀로 인한 주변 지역의 방출 또는 앞으로 상업화에 따른 GM 쌀에 대한 관리 체계 확립을 위한 검정법 마련의 필요성이 대두되고 있는 실정이다.

이에, 본 발명에서는 비교적 간단한 방법으로 신속하고 용이하게 GM 쌀을 모니터링하고 분석할 수 있는 방법으로서 PCR을 이용한 정성 분석법을 착안하고, PCR을 통해 증폭할 대상으로서 쌀에서만 특이적으로 발현되는 쌀 특이적 내재유전자와 유전자 변형 쌀에 삽입된 삽입 유전자의 두 종류의 유전자를 선택하여 프라이머를 제작하였다.

이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

국내에서 개발된 유전자 변형 쌀인 밀양 204호와 익산 483호는 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*) 유래의 PAT (Phosphinotricin acetyl transferase)를 암호화하는 *bar* 유전자가 삽입되어 있어, 제초제의 주성분인 PPT(Phosphinotricin)를 아세틸화하여 제초제 내성을 갖도록 개발된 것이다. 각 쌀에 삽입된 삽입 유전자의 구조는 도 1에 나타내었다. 도 1에서 보는 바와 같이, 밀양 204호는 *bar* 유전자와 *NOS* terminator가 삽입되어 있고, 익산 483호는 *bar* 유전자와 *NOS* terminator 그리고 *GUS* 유전자가 삽입되어 있다.

본 발명에서는 차후 GM 쌀의 정량분석법 개발에도 활용하고자 쌀의 게놈(genome)상 단일카피(single copy)로 존재하는 내재 유전자들을 NCBI(National center for biotechnology information)와 같은 각종 데이터베이스와 기존에 발표되었던 논문들을 참고하여 선정하고, 그 중에서 본 발명을 위하여 *SAMDC1*(S-adenosylmethionine decarboxylase) 유전자를 최종 선택하였다. *SAMDC1*는 쌀의 내재 유전자이지만, 쌀에만 특이적으로 존재하는 유전자는 아니고 다른 식물체 내에도 존재하는 유전자로, 각 식물마다 염기서열에 약간씩의 차이가 있다. 따라서, 쌀의 *SAMDC1*와 다른 식물체의 유사 유전자의 염기서열을 모두 비교하고, 그 중에서 쌀의 *SAMDC1* 유전자만을 증폭할 수 있도록, 각 염기서열에서 서로 차이가 있는 부분을 이용하여 여러 쌍의 프라이머를 제작하였다. 그리고, 이렇게 제작한 프라이머를 이용하여 다양한 식물체의 게놈 DNA를 주형으로 하는 PCR을 수행해 본 결과, 쌀에서만 증폭산물이 확인되는 경우에만 그 프라이머가 쌀에만 특이적인 것으로 간주하였다. 이러한 방법으로 쌀의 내재 유전자 *SAMDC1*에 특이적인 프라이머 OsSAMDC1-5'과 OsSAMDC1-3'를 획득하였다. 한편, 밀양 204호의 분석을 위해서는 *GUS* 유전자와 *NOS* 터미네이터(terminator) 부위를 대상으로 프라이머 Os204-5'과 OsNos-3'를 제작하였고, 익산 483호의 분석을 위해서는 *bar* 유전자와 *NOS* 터미네이터 부위를 대상으로 프라이머 Os483-5'과 OsNos-3'를 제작하였다.

먼저, 쌀을 비롯하여 무순, 상치, 시금치, 돌나물 등의 총 20 종류의 작물로부터 추출한 게놈 DNA를 주형으로 하고, 프라이머 OsSAMDC1-5'과 OsSAMDC1-3'을 프라이머 쌍으로 하는 PCR을 실시하여 PCR 산물을 확인하였다. 그 결과, 프라이머 OsSAMDC1-5'과 OsSAMDC1-3'에 의하여 오직 쌀에서만 110bp의 PCR 산물이 생성되었고, 생성된 PCR 산물이 SAMDC1의 DNA 단편임을 확인하였다.

다음으로, 유전자변형 쌀인 밀양 204호와 익산 483호, 비-유전자변형 쌀인 동진벼로부터 추출한 게놈 DNA를 주형으로 하고, 쌀의 내재 유전자에 특이적인 프라이머 OsSAMDC1-5'과 OsSAMDC1-3', 그리고 각 유전자변형 쌀을 위해 상기에 서 제작한 프라이머 Os204-5'/OsNos-3' 또는 프라이머 Os483-5'/OsNos-3'의 두 쌍의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, SAMDC1의 110bp의 DNA 단편과 각 유전자변형 쌀에서 목적하던 172bp와 161bp의 DNA 단편을 확인할 수 있었다.

일반적으로, 유전자변형 농산물의 PCR 분석을 위해 개발되는 프라이머는 증폭산물이 특이성을 가지면서도 최소한의 크기를 갖도록 제작된다. 이는 유전자변형 농산물을 원료로 한 가공식품의 분석을 위한 것으로, 가공식품의 경우 공정상 열, 산, 기타 물리적, 화학적 처리 등에 의해 게놈 DNA가 작은 크기로 절단되게 되기 때문에, 원 재료 뿐만 아니라 가공된 유전자변형 농산물까지도 분석하기 위해서는 작은 크기로 존재하는 DNA 단편을 증폭할 수 있는 프라이머가 필요하게 된다. 이러한 점에서 본 발명의 프라이머는 모두 200bp 이내의 작은 단편을 증폭할 수 있고, 그것으로 삽입 유전자를 분석할 수 있다는 점에서 큰 유용성을 가진다고 할 수 있다.

따라서, 본 발명은 쌀의 내재 유전자 분석을 위한 특이적인 프라이머 OsSAMDC1-5'와 OsSAMDC1-3', 밀양 204호와 익산 483호의 삽입 유전자 분석을 위한 프라이머 Os204-5', Os483-5' 그리고 OsNos-3' 각각을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 프라이머를 이용한 PCR 분석을 통해 밀양 204호와 익산 483호를 모니터링할 수 있는 정성분석법을 제공한다.

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명이 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 쌀의 내재 유전자에 특이적인 프라이머의 선정

중합효소연쇄반응(PCR)을 통해 쌀을 선택적으로 확인할 수 있도록 하기 위해, 쌀의 내재 유전자로서 SAMDC1(S-adenosylmethionine decarboxylase)을 선정하고, 그 유전자의 염기서열(참고: Li, J. Y. and Chen, S. Y., Theor. Appl. Genet. 100:782-788(2000))을 기초로 하여 프라이머 OsSAMDC1-5'(서열번호 1)과 프라이머 OsSAMDC1-3'(서열번호 2)을 제작하였다.

그리고, 시험작물로서 농촌진흥청 농업생명공학연구원 생물안전성과에서 분양받은 GM 쌀인 밀양 204호와 익산 483호, 비 GM 쌀인 동진벼(*Oryza sativa* L.)를 포함하여, 농업생명공학연구원 유전자원과로부터 분양받거나 국내 시장에서 구입한 비타민(*Hippophae rhamnoides*), 무순(*Raphanus sativus*), 상치(*Lactuca scariola* L. var. *sativa* Bisch), 적근대(*Beta vulgaris* L. var. *flavescens* DC.), 파(*Allium fistulosum* L.), 딸기(*Fragaria Ananassa* Duchesne), 콩(*Glycine max* L.), 고추(*Capsicum annuum* L.), 돌미나리(*Oenanthe javanica*(Blume)DC.), 해바라기(*Helianthus annuus*), 밀(*Triticum aestivum* L.), 갯잎(*Perilla frutescens*), 시금치(*Spinacia oleracea* L.), 돌나물(*Sedum sarmentosum* Bunge), 파슬리(*Petroselinum crispum*), 쪽갯(*Chrysanthemum coronarium* L.), 옥수수(*Zea mays* L.), 면화(*Gossypium* spp.) 및 유채(*Brassica campestris*)를 준비하고, 각 작물로부터 각 1g씩의 시료를 채취하여 막자사발에 넣고 액체질소를 가하여 분말형태로 만든 다음, DN이지 플랜트 맥시키트(DNeasy Plant Maxi kit, Qiagen, U.S.A.)를 이용하여 게놈 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA를 분광광도계(UV-visible spectrophotometer UV-1700, Shimadzu, Japan)를 이용하여 260nm와 280nm에서 정량하였으며, 260nm/280nm가 1.8~2.0 인 것을 이용하였다. 추출된 DNA를 0.8%의 아가로스 겔에서 100 볼트로 15분 동안 전기영동하여 분석하였다. 도 2는 GM 쌀인 밀양 204호와 익산 483호, 비 GM 쌀인 동진벼로부터 추출한 게놈 DNA의 전기영동 결과를 나타내는 사진으로, 1은 표준 분자량 마커는 λ /HindIII, 2는 비 GM 쌀, 3은 밀양 204호, 4는 익산 483호를 나타낸다.

각 작물에서 추출된 DNA를 주형으로 하는 PCR 반응을 수행하였다. PCR 반응용액은 1.5 mM MgCl₂를 포함하는 10x PCR 버퍼(TaKaRa, Japan) 2.5 μ l, 각 10 μ M씩의 프라이머 OsSAMDC1-5'과 프라이머 OsSAMDC1-3', 2 μ l dNTP(2.5 mM each, TaKaRa, Japan) 및 50ng의 주형 DNA를 포함하여 한 시료당 총 25 μ l가 되도록 하였다. PCR은 처음 1회를

95℃에서 5분간, 다음 40회를 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초로 반복하였으며, 마지막 1회를 72℃에서 8분간 수행하였다. PCR 반응의 결과는 3% 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인하고, 도 3에 나타내었다. 도 3에서 M은 표준 분자량 마커로서의 100bp DNA ladder, 1은 쌀, 2에서 20은 상기 기재 순서의 비타민에서 유체까지를 나타낸다. 도 3에서 확인할 수 있듯이, 프라이머 OsSAMDC1-5'과 OsSAMDC1-3'을 이용한 PCR 결과 다른 작물에서는 PCR 반응산물이 생성되지 않았지만, 쌀에서만 110bp의 PCR 반응산물이 수득되었다. 따라서, 상기 제작한 프라이머 쌍이 쌀의 정성 PCR 분석에 있어서 쌀에 특이적인 프라이머로서 적합하다고 판단되었다.

실시예 2: GM 쌀의 PCR 정성분석

밀양 204호의 선별을 위해서는 삽입된 *GUS* 유전자(참고: McElroy, D. et al., Mol. Gen. Genet. 231:150-160(1991))와 *NOS* 터미네이터를 증폭시킬 수 있는 특이적인 프라이머로서, 프라이머 Os204-5'(서열번호 3)과 프라이머 OsNos-3'(서열번호 4)을 제작하였다. 한편, 익산 483호의 선별을 위해서는 삽입된 *bar* 유전자와 *NOS* 터미네이터를 증폭시킬 수 있는 특이적인 프라이머로서, 프라이머 Os483-5'(서열번호 5)과 OsNos-3'(서열번호 4)을 제작하였다. 각 프라이머가 결합되는 위치와 각 쌀에 삽입된 유전자 구조를 도 1에 나타내었다. 도 1에서 Pubi는 유비퀴틴 프로모터를 나타낸다.

다음으로, 밀양 204호와 익산 483호 각각을 위한 프라이머 쌍과 실시예 1에서 제작한 프라이머 OsSAMDC1-5'과 OsSAMDC1-3'을 이용하여 실시예 1에서와 동일한 조건으로 듀플렉스 PCR(duplex PCR)을 실시하였다. PCR 반응의 결과는 3% 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인하고, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4에서 1은 사이즈 마커(100bp DNA ladder), 2는 비 GM 쌀, 3은 밀양 204호, 4는 익산 483호를 나타낸다. 도 4에서 보듯이, 비 GM 쌀과 GM 쌀 모두에서 쌀의 내재 유전자 *SAMDC1*에 의한 산물로 판단되는 110bp의 DNA 단편이 수득되었고, GM 쌀의 경우는 그 외에도 대략 160~170bp 정도의 DNA 단편이 수득되었다. 이에 GM 쌀에 대해 수득된 DNA 단편들을 추출하여 자동염기서열분석기(Automated DNA sequencer ABI 3700, Applied Biosystems, USA)를 이용하여 두 번 반복하여 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 밀양 204호에 대해서는 172bp, 익산 483호에 대해서는 161bp의 DNA 단편의 염기서열이 분석되었으며, 이 DNA 단편이 각 GM 쌀 분석을 위해 목적하던 산물임을 확인하였다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명하고 입증한 바와 같이, 본 발명은 쌀의 내재 유전자와 유전자 변형 쌀 내 삽입된 삽입 유전자 각각에 특이적인 프라이머 쌍을 이용한 PCR을 통해 유전자 변형 쌀을 정성분석하는 방법을 제공한다. 본 발명에 의하면, 간단하고 용이한 방법으로 신속하게 유전자변형 쌀을 모니터링할 수 있으므로 유전자변형 쌀의 상업화에 크게 기여할 수 있다는 점에서 식품종의 작물개발을 위한 농업발전상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 밀양 204호와 익산 483호의 삽입 유전자 구조와 본 발명의 프라이머의 위치를 나타내는 그림이다.

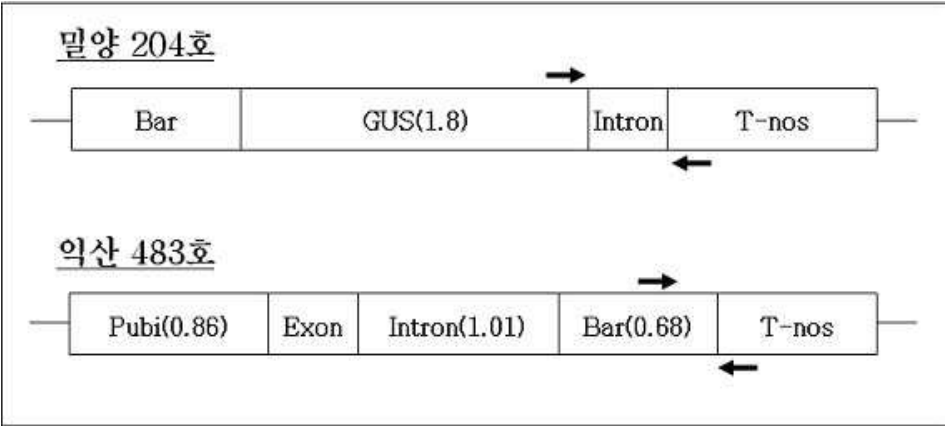
도 2는 밀양 204호와 익산 483호, 비-유전자변형 쌀인 동진벼로부터 추출한 게놈 DNA의 전기영동 결과를 나타내는 사진이다.

도 3은 20종류의 각기 다른 작물의 게놈 DNA를 주형으로 한 PCR 반응산물을 전기영동한 결과를 나타내는 사진이다.

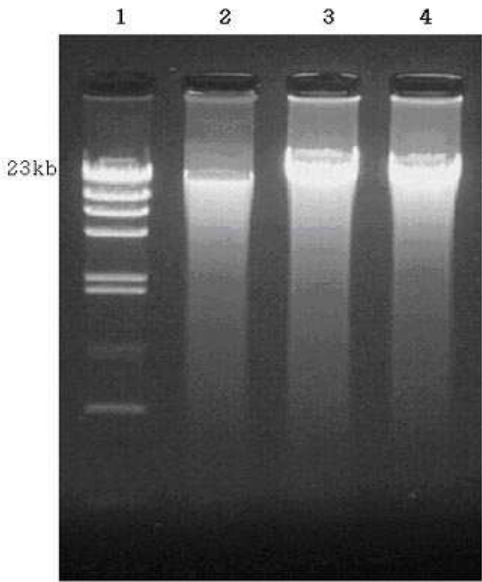
도 4는 밀양 204호와 익산 483호 및 비-유전자변형 쌀의 게놈 DNA를 주형으로 한 PCR 반응산물을 전기영동한 결과를 나타내는 사진이다.

도면

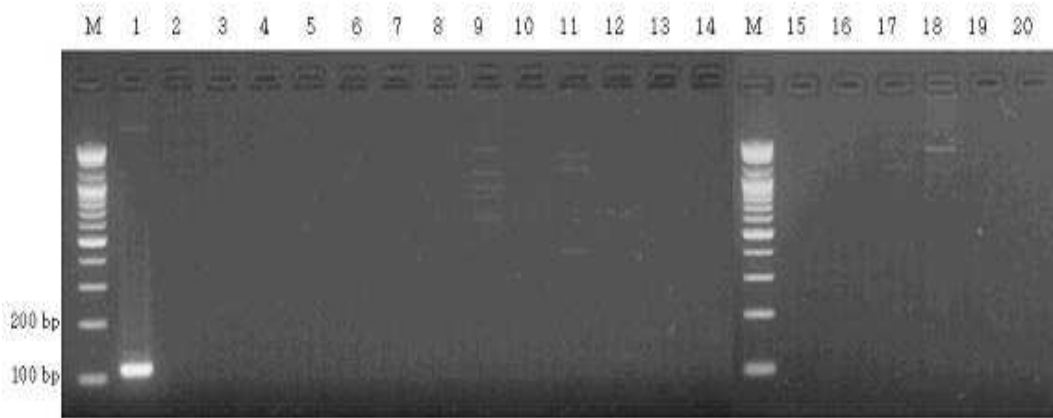
도면1



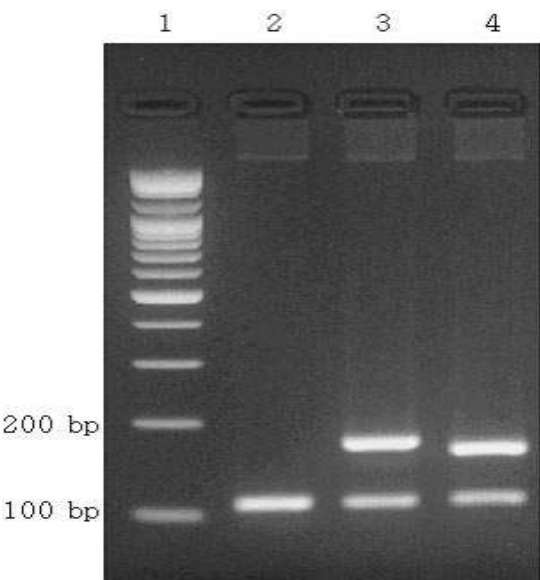
도면2



도면3



도면4



서열목록

<110>	Industry Academic Cooperation Foundation of KyungHee University	
<120>	Qualitative analysis for genetically modified rice	
<160>	5	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	primer OsSAMDC1-5'	
<400>	1	
	ggatgctaag aaagctgagg	20
<210>	2	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	primer OsSAMDC1-3'	
<400>	2	
	ccatctcagg gatgatttca ga	22
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	primer Os204-5'	

<400> 3
acgctggact ggcataaact 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> primer OsNos-3'

<400> 4
aagaccggca acaggattca 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> primer Os483-5'

<400> 5
gggaactcat cgaactcaac 20