(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년06월26일
(11) 등록번호 10-1160095
(24) 등록일자 2012년06월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 1/00* (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0125389
(22) 출원일자 2009년12월16일
심사청구일자 2009년12월16일
(65) 공개번호 10-2011-0068431
(43) 공개일자 2011년06월22일
(56) 선행기술조사문헌
US20030165543 A1
KR1020040087094 A
KR1020070007582 A
US20030204864 A1
전체 청구항 수 : 총 7 항

(73) 특허권자
경기도
경기도 수원시 팔달구 효원로 1 (매산로3가)
(72) 발명자
소호섭
경기도 화성시 진안동 935번지 월드메르디앙APT 104-807
한영희
경기도 수원시 팔달구 세지로314번길 73 (지동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
신명건, 권경희

심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **설사병 백신활성 유전자를 발현하는 형질전환 벼 및 그의 생산방법**

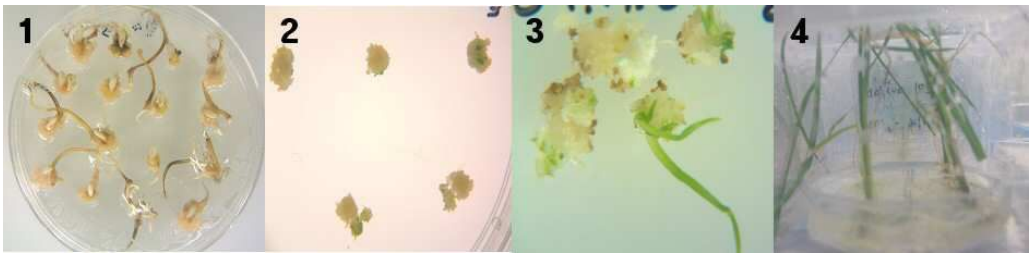
(57) 요 약

본 발명은 설사병 백신활성 유전자를 발현하는 형질전환 벼 및 그의 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 설사병의 주된 원인세균인 콜레라균과 대장균으로 부터 유래된 유전자를 유전자 재조합 방법에 의해 벼에 삽입하여서 제조되는 형질전환 벼의 생산 방법, 상기 방법으로 얻어지는 형질전환 벼, 상기 형질전환 벼로 부터 얻어지는 설사병의 백신으로 유용한 융합단백질 및 그의 수득방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 설사병 백신활성 유전자를 발현하는 형질전환 벼를 생산하여 이를 식물성 사료로써 가축에게 제공함으로써 축산산업에서 항생물질의 사용을 현저하게 감소시켜 농가의 축산 비용을 줄이는 경제적인 효과를 얻을 수 있다.

이러한 항생물질 사용량의 감소는 경제적인 효과 이외에 소비자 건강에도 기여할 수 있다.

대 표 도 - 도4



(72) 발명자

이지영

서울특별시 관악구 솔밭로7길 16, 302동 1004호 (봉천동, 낙성대 현대홈타운)

임재욱

경기도 수원시 권선구 권중로 31, 신안 303동 1002호 (권선동, 풍림아파트)

박경열

경기도 화성시 석우동 55번지 동탄예당마을 롯데캐슬아파트 145동 1803호

김영호

경기도 수원시 영통구 청명북로 33, 삼성레미안 433동 1204호 (영통동)

홍순성

경기도 수원시 권선구 매실로 70, LG삼익아파트 113동 605호 (호매실동)

양문식

전라북도 전주시 덕진구 솔내로 120, 현대4차아파트 402동 504호 (송천동1가)

김율호

경기도 수원시 권선구 매실로 70, LG삼익아파트 107동 1803호 (호매실동)

한범수

경기도 수원시 팔달구 화양로50번길 30, 벽산블루밍APT 121동 404호 (화서동)

특허청구의 범위

청구항 1

1) 서열번호 1로 표시되는 *Vibrio cholerae*의 무독성 B 서브유니트 유전자, 서열번호 2로 표시되는 *Escherichia coli*의 무독성 B 서브유니트 유전자 및 *bar* 유전자를 pMJ103 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계;

2) 상기 pMJ103 재조합 벡터를 아그로박테리움에 삽입하여 형질전환 균주를 얻는 단계;

3) 캘러스 유도된 벼 종자에 상기 단계 2)에서 얻어진 형질전환된 아그로박테리움을 접종하여 공동 배양하는 단계;

4) 상기 단계 3)으로부터 생존 캘러스를 선별하여 2차 배양한 후, 2차 배양 캘러스를 선별하는 단계;

5) 선별된 2차 배양 캘러스를 명배양하여 재분화된 식물체를 MSO 배지에서 발근시키는 단계;

6) 상기 단계 5)에서 얻어진 발근 식물체를 순화시켜서 토양에 이앙하여 벼 형질전환체를 수확하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 설사병 백신활성 유전자를 발현하는 형질전환 벼의 생산방법.

청구항 2

제 1항에 따른 방법으로 생산되는 설사병 백신활성 유전자를 발현하는 형질전환 벼.

청구항 3

제 2항에 따른 벼에서 추출되는 융합단백질.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 융합단백질이 설사병 백신활성을 가지는 것인 융합단백질.

청구항 5

제 3항 또는 제 4항에 있어서, 상기 융합단백질이 가축용 설사병 백신활성을 가지는 것인 융합단백질.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 융합단백질이 돼지 또는 소의 설사병 백신활성을 가지는 것인 융합단백질.

청구항 7

제 3항에 따른 융합단백질을 유효성분으로 하는 설사병 백신 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 설사병 백신활성 유전자를 발현하는 형질전환 벼 및 그의 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 설사병의 주된 원인세균인 콜레라균과 대장균으로 부터 유래된 유전자를 유전자 재조합 방법에 의해 벼에 삽입하여서 제조되는 형질전환 벼의 생산 방법, 상기 방법으로 얻어지는 형질전환 벼, 상기 형질전환 벼로 부터 얻어지는 설사병의 백신으로 유용한 융합단백질 및 그의 수득방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 예방접종(Vaccination)에 사용되는 물질을 백신이라 하며, 최근에는 열에 안정하고 경구 투여가 가능할 뿐만 아니라 보다 광범위하게 보급될 수 있는 백신 개발 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0003] 현재의 백신 개발 시스템이 가지고 있는 몇 가지 문제점은 고가의 생산설비, 수송과 저장 시에 요하는 냉장설

비의 경제적 부담 및 백신 투여의 어려움, 주사를 맞는 것에 대한 사람들의 보편적인 거부감 등이 있다. 따라서, 상기와 같은 문제점을 해결하고, 예방 접종의 혜택을 거의 누리지 못하고 있는 저개발국의 어린이를 위해서라도 대체백신의 개발이 요구되고 있는 것이 세계적인 추세이다.

[0004] 이러한 대체백신 개발연구 중에서 형질전환 작물을 통한 경구용 식물백신이 그 가능성을 인정받아 백신개발의 새로운 방향으로 자리 매김을 하고 있다. 경구용 식물백신은 재조합 백신의 안전성과 경구백신의 접종에 있어서의 수월성과 효율성을 접목시킨 방법으로서 항원유전자를 식물체 발현벡터를 이용, 식물체에 형질전환시켜 식품을 섭취하듯이 경구투여를 시행함으로써 면역반응을 유도하게 된다.

[0005] 백신은 제조방법 혹은 접종방법에 따라 여러 가지 형태로 구분할 수 있는데, 병원체에서 항원으로 작용하는 부위만을 유전자 조작하여 대장균이나 효모, 식물에서 생산하는 재조합 백신이 가장 진보된 형태의 백신으로 간주되고 있다(장용석 1999).

[0006] 식물백신에 관한 연구에 의해 담배에서 B형 간염 바이러스 백신 (Mason 등 1992, Thanavala 등 1995), 감자와 담배에서 세균성 설사병 백신 (Haq 등 1995), 바이러스성 설사병 백신(Mason 등 1998) 등을 생산하였다.

[0007] 본 발명자들은 설사의 발병에 주된 원인세균은 콜레라균인 *Vibrio cholerae* (CTB)와 장내독소를 가진 대장균(ETEC, enterotoxigenic *E. coli*)으로부터 독성이 없이 면역반응의 유도가 가능한 B 서브유니트(subunit)인 정제된 콜레라독소(CTB)와 대장균의 열 가변성 장내독소 B 서브유니트(LTB)를 과발현(over expression)하는 pMJ103 벡터에 삽입시켜 벼를 형질전환하여 설사병 백신활성 융합단백질을 발현할 수 있는 형질전환 벼를 생산하기 위해 본 발명을 수행하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 설사병의 주된 원인세균인 콜레라균과 대장균으로부터 면역반응의 유도가 가능한 유전자를 유전자 재조합 방법으로 벼에 형질전환시켜서 제조되는 설사병 백신활성 유전자를 발현하는 형질전환 벼의 생산방법을 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 목적은 상기 방법으로 생산되는 설사병 백신활성 유전자를 발현하는 형질전환 벼를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기한 형질전환 벼로부터 추출되는 설사병 백신활성이 있는 융합단백질을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또다른 목적은 상기한 융합단백질을 유효성분으로 하는 설사병 백신 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0012] 이하, 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0013] 본 발명은

[0014] 1) 서열번호 1로 표시되는 *Vibrio cholerae*의 무독성 B 서브유니트 유전자, 서열번호 2로 표시되는 *Escherichia coli*의 무독성 B 서브유니트 유전자 및 *bar* 유전자를 pMJ103 벡터에 삽입하여 재조합 벡터를 제조하는 단계;

[0015] 2) 상기 pMJ103 재조합 벡터를 아그로박테리움에 삽입하여 형질전환 균주를 얻는 단계;

[0016] 3) 캘러스 유도된 벼 종자에 상기 단계 2)에서 얻어진 형질전환된 아그로박테리움을 접종하여 공동 배양하는 단계;

[0017] 4) 상기 단계 3)으로부터 생존 캘러스를 선별하여 2차 배양한 후, 2차 배양 캘러스를 선별하는 단계;

[0018] 5) 선별된 2차 배양 캘러스를 명배양하여 재분화된 식물체를 MS0 배지에서 발근시키는 단계;

[0019] 6) 상기 단계 5)에서 얻어진 발근 식물체를 순화시켜서 토양에 이앙하여 벼 형질전환체를 수확하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 설사병 백신활성 유전자를 발현하는 형질전환 벼의 생산방법인 것이다.

[0020] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0021] 본 발명에 있어서는, 설사병 원인세균인 콜레라균과 대장균의 무독성 B 서브유니트인 CTB(Kang 등 2004a)와 LTB(Kang 등 2004b) 유전자를 전북대학교에서 분양받았으며 이들 유전자가 삽입될 형질전환용 바이너리 벡터에는 *CaMV 35S* 프로모터, *Nos* 터미네이터 및 *npt*Ⅱ 유전자가 있는 pMY 벡터와 *Glb* 프로모터, *pin*Ⅱ 터미네이터 및 *bar* 유전자가 있는 pMJ103 벡터를 이용하였다. 본 발명에 이용 가능한 벡터는, 바람직하기로는 pMJ103이다.

[0022] 도 2는 서열번호 1로 표시되는 CTB 유전자와 서열번호 2로 표시되는 LTB 유전자를 포함하는 본 발명에 따른 형질전환 벼를 제조하기 위한 바이너리 벡터 pMJ103의 구조를 나타낸 것이다.

[0023] 바이너리 벡터 pMJ103에 상기한 CTB 유전자와 LTB 유전자가 삽입된 것을 PCR 검정으로 확인하였다.

[0024] 본 발명에서는 식물의 형질전환체를 작성하는데 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterim tumefaciens*)를 이용하였다. 식물의 형질전환체를 작성하는데 주로 이용되는 아그로박테리움 튜메파시엔스는 Ti 플라스미드(tumor-inducing plasmid)를 가지고 있다. 이 Ti 플라스미드 때문에 아그로박테리아가 식물에 감염되면 crown gall이라고 하는 일종의 튜머(tumor)가 발생하게 된다. Ti 플라스미드를 좀 더 자세히 살펴보면, T-DNA라는 부위가 있으며, 이 부위는 식물의 게놈 DNA에 동종성 재조합(homologous recombination)에 의해 잘 끼어들어가는 부위이다. 따라서 이 부위에 식물에 도입하고자 하는 유전자를 넣고, Ti 플라스미드를 아그로박테리아에 삽입하여 아그로박테리아를 식물의 캘러스에 감염시켜 키우면 형진전환 식물이 만들어진다.

[0025] 본 발명에 있어서 '기내배양'이란 무균 상태의 배양조건이 갖추어진 배양용기 내에서 식물을 배양하는 것을 의미한다.

[0026] CTB 유전자와 LTB 유전자를 포함하는 벡터 pMJ103이 삽입된 아그로박테리아에 의해 벼 캘러스를 감염시켜서 형질전환 벼를 유도, 선별하였으며, 선별된 형질전환 벼에 대하여 써던 블럿(Southern Blot)을 실시한 결과, 벼의 게놈 내에 도입된 LTB 유전자와 CTB 유전자의 삽입상태를 확인하였다.

[0027] 또한, T-DNA 주변 염기서열 분석(Flanking Region Analysis) 결과로부터 LTB 유전자와 CTB 유전자가 벼의 염색체 특정부위에 삽입되었음을 확인하였다.

[0028] 이렇게 형질전환된 벼의 발아율은 대조구가 87.5%인데 비하여 최소 62.0%의 발아율을 나타내었으나, 대부분 80% 이상의 발아율을 나타내어 형질전환이 도입된 벼의 일정비율 이상의 생산량을 확보할 수 있다.

[0029] 면역 스트립(Immuno Strip) 처리와 격리온실 내에서 이앙 및 재배후 바스타 처리에 의한 생물검정을 통하여 본 발명에 따른 설사병 백신 활성 유전자를 발현하는 형질전환 벼가 형질전환체로 고정되었음을 확인하였다.

[0030] 본 발명에 따른 모든 형질전환 계통에 대한 GM1 강글리오사이드(ganglioside) 반응 결과, 모든 형질전환 계통이 설사병에 대한 백신 역할을 하는 pentamer 구조를 가지는 백신으로 나타났다. 따라서 본 발명의 방법으로 생산되는 설사병 백신활성 유전자를 발현하는 형질전환 벼로부터 설사병 백신활성 융합단백질을 생산할 수 있으며, 본 발명에 따라 제조된 형질전환 벼는 그 자체로써 또는 융합단백질을 추출하여 백신으로 사용할 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기한 형질전환 벼를 유효성분으로 함유하는 경구용 설사병 예방 백신 조성물로 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 방법으로 제조되는 형질전환 벼 또는 융합단백질을 포함하는 설사병 예방 백신 또는 백신 조성물은 그 투여대상에 제한이 없으나, 바람직하기로는 가축, 더욱 바람직하기로는 돼지, 소, 자돈, 또는 송아지에게 투여될 수 있다.

[0033] 상기 백신 조성물은 본 발명에 따른 형질전환 벼를 그대로 사용하거나 건조시킨 후 분말형태로 사용할 수 있으며, 또한 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분으로서 형질전환 벼의 혼합량은 사용목적에 따라 적당하게 임의로 결정될 수 있다.

효 과

[0034] 설사병 백신활성 유전자를 발현하는 형질전환 벼를 생산하는 본 발명의 방법에 따르면 안전한 방법에 의해 설사병 백신활성 단백질을 얻을 수 있다.

[0035] 본 발명에 따르면, 설사병 백신활성 유전자를 발현하는 형질전환 벼를 생산하여 이를 식물성 사료로써 가축에

게 제공함으로써 축산산업에서 항생물질의 사용을 현저하게 감소시켜 농가의 축산 비용을 줄이는 경제적인 효과를 얻을 수 있다.

[0036] 이러한 항생물질 사용량의 감소는 경제적인 효과 이외에 소비자 건강에도 기여할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0038] **실시예 1 형질전환용 벡터의 제작**

[0039] 식물 형질전환에 이용하기 위하여 *CTB*와 *LTB* 유전자는 pMJ103 벡터와 HB101 벡터와 같은 헬퍼 플라스미드와 함께 트리페런탈메이팅(tri parental mating) 방법으로 아그로박테리움에 이들 유전자를 함께 재조합시켰다.

[0040] pMJ103 벡터에 삽입된 균주의 콜로니는 스트렙토마이신 100mg L^{-1} 첨가된 액체 YEP 배지 3 ml에 접종하여 28℃에서 250rpm으로 2일간 진탕 배양하여 증식하였으며 플라스미드 DNA 추출 키트(AccuPrep, 바이오니아)를 이용하여 플라스미드 DNA를 추출하였다.

[0041] 프라이머는 *LTB* 유전자 292bp 조각, *CTB* 유전자 298bp 조각, *bar* 유전자 302bp DNA 조각을 디자인한 후 인공합성하였다.

[0042] 96 ℃에서 10 분 동안 변성 전처리하고, 변성반응 96℃ 30초, 프라이머 접합 54℃ 30 초, 프라이머 확장 72℃ 2 분, 35 회 등 과 같은 PCR 프로그램으로 반응시킨 후 1% 아가로스에 의한 전기영동에 의해 아그로박테리움에 삽입되었는지를 확인하였다.

[0043] 도 3은 pMJ103벡터를 아그로박테리움에 전이시킨 후 LTB 유전자와 CTB 유전자의 전이를 확인한 PCR 전기영동 사진이다. 도 3에서 아그로박테리움에 LTB 유전자와 CTB 유전자의 전이를 확인할 수 있다.

[0044] **실시예 2 벼의 형질전환 및 형질전환체의 기내 선발**

[0045] 2-1) 캘러스의 유도

[0046] 일미벼와 녹양벼 종자를 까서 상태가 양호한 것만을 선별하였다. 선별된 종자를 50 ml 팔콘 튜브에 넣고 100% 에탄올에 30초간 진탕하였다. 진탕기를 이용하여 1/2 락스에 40분간 진탕한 후, 멸균수로 3회 이상 10분 동안 세척하여 종이(3M사 제품) 위에서 물기가 완전히 마를 때까지 건조시켰다.

[0047] 2N6 배지에 배(씨눈)이 위로 향하게 플레이트 당 10 내지 13개를 치상한 후 27 ℃에서 3 내지 4주간 암배양하였다. 3주가 되면 1 내지 2 mm 크기의 둥글고 갈변이 되지 않은, 연노랑색 또는 아이보리색을 띠는 잘 부서지는 것들만 선발하여 2N6 배지에서 다시 3일간 증식 배양하였다.

[0048] 2-2) 공동배양

[0049] 아그로박테리움을 AB-SpT 배지에 접종하여 28℃에서 4 내지 5일 동안 암배양하였다. 상기 아그로박테리움 균주를 AAM 배지에 부운 후 50ml 팔콘 튜브에 옮긴 다음 660nm의 O.D.값이 1.5 내지 2.0이 되게 희석하였다. 캘러스를 튜브에 적당히 담고 20 내지 30분간 접종하였다. 접종 후에 용액은 잘 따라내고 종이 위에서 살짝 건조한 다음, 건조된 캘러스를 1/2 2N6-AS 배지에 치상하고, 캘러스 위에 멸균된 3M 여과지를 덮어주었다. 여과지를 덮은 상태로 26.5 ℃에서 1일, 23.5 ℃에서 4일 내지 8일간 상기 캘러스를 공동 배양하였다.

[0050] 2-3) 형질전환 캘러스 선발

[0051] 5일 이상 배양된 캘러스를 멸균된 시험관에 담고 멸균수로 세척해서 세폭탁심 (Cefotaxime) 250 ug을 첨가한 멸균수 50 ml로 10회 이상 세척하였다. 이를 거름종이 위에 살포하여 건조한 후, 2N6-CP 배지에 옮겨 27 ℃ 암조건에서 3주간 배양하였다. 살아남은 캘러스를 2N6-CP 배지에서 동일조건으로 2주 동안 배양하여 2차 선발하였다.

[0052] 2-4) 형질전환 캘러스의 재분화 식물체 유도 및 발근

[0053] 2차 선발된 캘러스는 MSR-CP 배지에 치상후 25 ℃에서 명배양하고, 재분화 식물체는 MS0 배지에 옮겨 발근시켰다.

[0054] 2-5) 형질전환 식물체 순화 및 온실재배

[0055] 상기 2-4에서 얻어진 발근 식물체를 1,000배 hyponex 용액에 7 내지 10일간 침지 순화하고, 14일간 침지 순화한 식물체를 60 × 40 cm 바닥이 막힌 두부상자 안에 있는 32공 트레이에 이식하여 온실에서 관리하여 이앙 후 14일 부터 시비 재배하였다.

[0056] 상기한 벼 캘러스의 유도(1) 및 증식(2), 형질전환 캘러스의 재분화(3) 그리고 형질전환체 계대배양(4)을 도 4에 나타내었다.

[0057] **실시예 3 PCR에 의한 형질전환체 검정**

[0058] K3030(바이오니아) 추출키트를 이용하여 식물체 DNA를 추출하였다.

[0059] 상기 실시예 2에서 재분화된 벼의 gDNA 20 pM 4 ul와 멸균수 4 ul, 센스 프라이머 4 ul, 안티센스 프라이머 4 ul를 Toptaq PCR premix (코아바이오텍)에 첨가한 후 혼합하여 PCR을 수행하였다.

[0060] PCR 반응은 변성 전처리를 96 ℃에서 10 분, 변성반응을 96 ℃에서 30 초, 프라이머 어닐링(annealing)을 54 ℃에서 30 초, 프라이머 연장을 72 ℃에서 2 분 동안 35 회 반응시키고, 72 ℃에서 15 분 반응시킨 후 반응을 마쳤다.

[0061] 얻어진 PCR 반응물을 1% 아가로스에 의한 전기영동으로 확인하고 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0062] 도 5에서 보이는 바와 같이, 형질전환 벡터 pMJ103으로부터 유래한 LTB 유전자와 CTB 유전자가 형질전환된 벼 T01 내지 T25에서 확인되었다.

[0063] **실시예 4 써던 블롯에 의한 형질전환체 DNA 발현 검정**

[0064] 4-1) 제한효소에 의한 게놈 DNA의 절단

[0065] 분석하고자 하는 벼 게놈 DNA 10 ug과 반응완충용액 및 증류수를 혼합하여 총 18 ul를 제조하여 4 ℃에서 2시간 정도 방치하였다. 제한효소(ug/20unit)를 가하고 조심스럽게 혼합하여 37 ℃에서 12시간 동안 보관한 후, 반응액 중 1 ul를 1% 전기영동으로 확인하였다.

[0066] 4-2) 블로팅을 위한 전기영동

[0067] 겔판을 3차 멸균수, 70% 에탄올, 3차 멸균수로 세척한 후, 제한효소로 절단된 게놈 DNA 시료를 0.8% (0.64g/80ml) 아가로스 겔에 로딩하였다. 50mA (30V)의 전압으로 12시간동안 로딩하였다.

[0068] 4-3) 겔 모세관 전이

[0069] 1×TAE 완충용액은 4 ℃ 냉장 보관하고, fiber pad, 여과지, 겔, 멤브레인을 상기 완충용액에 15분에서 1시간 동안 침지하였다. 전기영동이 끝난 겔을 조심스럽게 유리판에 옮기고, 겔의 좌측 아래쪽 모서리를 절단하여 방향을 설정하여 변성 용액에 45분간 교반하였다.

[0070] 교반된 겔은 플라스틱 통에 옮겨 멸균수에서 5분간 세척하고 중화 용액에서 30분간 교반한 후, 중화 용액을 교체한 후 다시 15분 동안 교반하였다.

[0071] Trans-Blot (Bio-Rad사 제품) 이용 겔을 옮겨서 카세트를 잠그고 트랜스퍼 완충액(1×TAE)으로 탱크를 가득 채운 후, super cooling coil과 교반용 자석바를 넣은 후 교반기 위에 올려놓고 15 V, 0.2 A에서 12시간 전이

시켰다.

[0072] 다음날 전이장치(transfer-blot)를 해체하여 겔과 멤브레인을 뒤집은 후 컴(comb)과 멤브레인에 연필로 이름을 표시하고 10X SSC로 5분간 세척하였다. 이 멤브레인을 30분 동안 압착 건조하였다.

[0073] UV 크로스 링커(XL-1000)에 멤브레인을 DNA 부착면을 위로하여 올려놓은 후 DNA를 고정시키고, 이 멤브레인을 하이브리다이제이션에 사용하였다.

[0074] 4-4) 표지화된 프로브 DNA 제조

[0075] 삽입 유전자를 특이 프라이머로 PCR한 후 정제키트에서 분리하여 전기영동 및 정량 확인을 실시하였다.

[0076] 프로브 DNA 2 ul, TE(8.0) 완충액 43 u를 100 ℃에서 5분간 끓인후 얼음에서 5분간 방치한 다음, 이 프로브 DNA를 Primer labeling kit 반응용액 (Amersham RPN 1633)에 혼합하고, P^{32} 방사선 동위원소 5 ul를 반응용액 혼합물에 첨가하여 혼합한 후, 다시 모았다. 이 용액을 37 ℃에서 30분 동안 반응시킨 후 얼음에 보관하였다.

[0077] 반응을 멈추기 위해 스핌컬럼 (illustra ProbeQuant G-50 MicroColumn)을 준비하여 1.5 ml 미세 튜브에 컬럼을 삽입하고 동위원소로 표지된 DNA를 첨가하였다. 3,000 rpm에서 30초간 원심분리한 후 컬럼을 제거하고, 상기 동위원소 표지된 DNA 용액을 100 ℃에서 5분간 방치하고 얼음에 5분간 저장한 후 하이브리다이제이션을 실시하였다.

[0078] 4-5) 프리하이브리다이제이션(pre-hybridization) 및 하이브리다이제이션

[0079] 100 ug/ml 연어정자 DNA를 100 ℃에서 5 분간 끓인 후 다시 얼음에 5 분간 보관하여 프리하이브리다이제이션 용액으로 하였다. 사각용기를 에탄올과 3차 멸균수로 세척하여 여기에 프리하이브리다이제이션 용액 50 ml를 첨가하였다. 전이된 Hybond-N^{+} 멤브레인을 용액에 침지하여 65 ℃에서 40 rpm의 진탕 인큐베이터로 2시간 동안 반응시키고, 2시간 후 프리하이브리다이제이션 용액을 제거하였다.

[0080] 표지화된 단일가닥 프로브 DNA를 하이브리다이제이션 용액 50 ml에 첨가하고, 프리하이브리다이제이션된 멤브레인을 프로브가 첨가된 하이브리다이제이션 용액에 투입하여 65 ℃에서 40 rpm으로 진탕 인큐베이터에서 16시간 이상 반응시켰다.

[0081] 4-6) 검출

[0082] 하이브리다이제이션 용액을 버리고 1차로 세척 완충액으로 5분간 5회 정도 세척하고, 2차 세척 완충액으로 세척 후 상온에서 15분간 40 rpm으로 세척, 3차 세척 완충액으로 세척 후 37 ℃에서 30분간 40 rpm으로 세척, 3차 세척 완충액으로 2회 세척 후 68℃에서 30분간 40rpm으로 세척, 4차 세척 완충액으로 세척하였다.

[0083] 멤브레인을 여과지(3MM)에 올린 후 눌러서 건조시키고, X-ray 필름 카세트를 연 후 2중 멸균비닐을 올려놓고 비닐 사이에 멤브레인을 넣고 덮은 후 고정시켰다.

[0084] 상기 X-선 필름을 카세트에 장착한 후 -70 ℃에서 5일후 현상하여, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0085] **실시예 5 RT-PCR에 의한 형질전환체의 mRNA발현 검정**

[0086] 5-1) 전체 RNA 분리 : easy-spin™ (Intron 17221)

[0087] 종자 20 내지 50 mg을 마쇄한 후, 세포용출 완충액 1 ml를 넣고 강하게 10 초 동안 교반하고, 클로로포름 200 ul를 첨가하여 13,000 rpm, 4℃에서 10 분간 원심분리하였다. 상등액 400 ul를 새로운 1.5 ml 튜브에 옮겨서 결합 완충액 400 ul를 부드럽게 2 내지 3회에 나누어 혼합하여 상온에서 1분간 방치하였다.

[0088] 컬럼에 상기 용액을 로딩하여 13,000 rpm에서 30 초간 원심분리한 후 용액을 흘려보내고, 세척용 완충액 A 700 ul를 넣고 13,000 rpm에서 30 초간 원심분리 후 용액을 버렸다. 여기에 세척용 완충액 B 700 ul를 넣고

13,000 rpm에서 30 초간 원심분리 후 용액을 버렸다.

[0089] 13,000 rpm에서 1 내지 2분간 원심분리한 후 용출 완충액 50 ul를 넣고 상온에서 1분간 방치하고 13,000 rpm에서 1분간 원심분리하였다.

[0090] 5-2) RT-PCR 반응

[0091] 프라이머는 LTB 유전자의 292bp 조각을 디자인한 후 인공 합성하였다.

[0092] 추출된 식물체 전체 RNA 20 pM 4 ul와 멸균수 4 ul, 센스프라이머 4 ul, anti-sense primer 4 ul를 Toptaq RT-PCR premix (코아바이오텍)에 첨가한 후 교반하여 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR 반응은 50 ℃에서 1 시간 동안 역전사 반응시킨 후, 변성 전처리을 94 ℃에서 5 분, 변성 반응을 94 ℃에서 30 초, 프라이머 접합을 55 ℃에서 30 초, 프라이머 확장을 72 ℃에서 1 분하고, 30 회 반응시킨 후 72 ℃에서 7 분 추가 반응한 후 반응을 마쳤다.

[0093] PCR 반응물은 1% 아가로스에 의한 전기영동으로 확인하고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0094] **실시예 6 스트립 바(Strip bar)에 의한 형질전환체 단백질 발현 검정**

[0095] 형질전환된 벼의 잎이나 종자를 SEB4 시료 추출버퍼(기산바이오텍)에 넣고 분쇄하여 30초 동안 상온에 보관하였다.

[0096] 시료 추출물을 미세튜브에 옮긴 후, 스트립 키트의 상단부위를 잡고 미세튜브에 수직으로 담가서 3 내지 5분 경과 후 결과를 확인하였다.

[0097] 그 결과, 도 9에서 보이는 바와 같이 대조구를 제외한 모든 T1 형질전환체가 PAT 단백질이 발현하여 제초제 저항을 나타내었다.

[0098] **실시예 7 제초제 처리에 의한 형질전환체 선발**

[0099] 물 1L에 스포탁 유제 0.5 ml를 조제한 후 벼 종자를 24시간 침종한 후 건져서 세척하였다. 증류수 100 ml에 25 ℃에서 2 내지 3일간 침지하고 하루에 1회씩 물을 교환하였다. 거름종이를 깐 페트리 디쉬에 상기한 벼 종자를 올려놓고 30 내지 33 ℃에서 2 내지 3일 동안 다습하게 하여 발아시켰다. 싹이 나면 건져내어 칼라포트에 12cm 정도 용토를 채운 후 정식하였다.

[0100] 정식 후 20일과 27일에 Basta 제초제 0.3%(3mL/L)를 2회 살포하여 3일에서 10일 사이의 고사율을 조사하였다.

[0101] **실시예 8 플랭킹 영역 분석(Flanking region analysis)에 의한 형질전환체 검정**

[0102] 형질전환된 식물의 gDNA (2ug/20ul)를 특정 제한효소로(HaeIII) 절단하고, 어댑터를 이용하여 잘려진 DNA조각을 라이게이션(ligation)하였다.

[0103] 어댑터의 A1 프라이머와 T-DNA의 오른쪽 보더(RB1) 프라이머 세트와 A2 프라이머와 오른쪽 보더(RB2) 프라이머를 사용하여 PCR 증폭을 실시하고, PCR 산물에 대하여 오른쪽 보더(RB2) 프라이머를 사용하여 2차 PCR을 수행한 후 직접 염기서열 분석(Direct sequencing, GG바이오)을 실시하였다.

[0104] 시퀀싱 결과를 분석하여 삽입유전자 인접서열 부분을 확인하였다.

[0105]

계통 번호	유전자삽입 염색체번호	삽입 유전자수	삽입유전자 및 위치	계통 번호	유전자삽입 염색체번호	삽입 유전자수	삽입유전자 및 위치
대조구	-	-	-	T13	5, 9	2	-
T01	3, 5	2	-	T14		2	-
T02		3	플라스미드	T15		2	플라스미드
T03	8	1	인트론	T16		2	-
T04	7	2이상	-	T17	3	1	인트론
T05	3	1	엑손	T18	1	1	인트론

T06	3	1	인트론	T19		미검출	플라스미드
T07	6	1	유전자사이	T20		미검출	-
T08	3, 9	2	-	T21		5	플라스미드
T09		1	-	T22		5	-
T10	2	1	B	T23		2	-
T11	12	1	B	T24		1이상	-
T12		미검출	-	T25	8	1	플라스미드

[0106] **실시예 9 G_{M1}-강글리오사이드(ganglioside) ELISA에 의한 형질전환체의 백신 단백질 발현 검정**

[0107] 9-1) G_{M1}-강글리오사이드 코팅

[0108] G_{M1}-강글리오사이드(860065P) 3 ul/ml (스탁 1 mg/ml)를 카보네이트 코팅 완충액(기산과학) 15 ml에 용해하였다. 상기 용액을 4 ℃의 냉장고에서 16시간 동안 방치한 후, PBST 완충액으로 3회 완벽하게 세척하였다.

[0109] 9-2) 블로킹

[0110] 4%의 지방이 제거된 건조 밀크 200 ul를 웰에 로딩하여 G_{M1}이 결합되지 않은 곳을 블로킹하였다. 37 ℃ 인큐베이터에서 2시간 동안 반응시킨 후, PBST 완충용액으로 3회 세척하였다.

[0111] 9-3) 시료 조제

[0112] 세균으로부터 정제된 LTB 0.2?12.8 ng과 백신 벼에서 추출한 단백질(100 μg)을 IdSEB 완충액 100 ul에 용해하여 96 웰 플레이트에 로딩하였다.

[0113] ※ IdSEB 완충액 : 1.6 ml 6.25 × PVP40 + 8.6 ㎖ 카보네이트 코팅 완충액 (기산과학)

[0114] 상기 용액을 4 ℃의 냉장고에서 16시간 동안 방치한 후, PBST 완충액으로 3회 완벽하게 세척하였다.

[0115] 9-4) 1차 항체 (Anti-Rabbit LTB, 1/5,000, Abcam) 첨가

[0116] 카보네이트 코팅 완충액 (기산과학)에 1차 항체를 첨가(2ul/10ml)하였다. 37 ℃의 인큐베이터에서 2시간 동안 반응시킨 후, PBST 완충용액 200 ul로 3회 반복하여 완벽하게 세척하였다.

[0117] 9-5) 2차 항체 (Goat Anti Rabbit IgG-AP, 1/1,000, SantaCruz) 및 기질 첨가

[0118] ECI 완충액 (기산과학)에 2차 항체를 첨가하여 (1 ul/ml), 37 ℃의 인큐베이터에서 2시간 동안 반응시켰다. PBST 완충용액 200 ul로 3회 완벽하게 세척하고, PNP 기질 완충용액을 첨가(1개 PNP/5ml)한 다음, 37 ℃의 인큐베이터에서 30분에서 1시간 동안 반응시켰다.

[0119] ELISA 검출기를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0120] 상술한 실시예 및 도면은 발명의 내용을 상세히 설명하기 위한 목적일 뿐, 발명의 기술적 사상의 범위를 한정하고자 하는 목적이 아니며, 이상에서 설명한 본 발명은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능하므로 상기 실시예 및 첨부된 도면에 한정되는 것이 아님은 물론이며, 후술하는 청구범위 뿐만이 아니라 청구범위와 함께 균등범위를 포함하여 판단되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0121] 도 1은 서열번호 1로 표시되는 콜레라톡신 B 서브유닛을 코딩하는 유전자 CTB의 염기서열과 서열번호 2로 표시되는 *E. coli* Heat-Labile 엔테로톡신 B 서브유닛 유전자 LTB의 염기서열을 함께 나타낸 것이다.

[0122] 도 2는 본 발명에 따른 벼 형질전환체를 제조하기 위한 바이너리 벡터 pMJ103의 구조를 나타낸 개략도이다.

[0123] 도 3은 본 발명에 따라 제조된 pMJ103 벡터를 아그로박테리움에 전이시킨 후 LTB 유전자와 CTB 유전자의 전이를 확인한 PCR 전기영동 사진이다.

[0124] 도 4는 본 발명의 pMJ103 벡터로 형질전환된 아그로박테리움을 이용한 벼 종자에 의한 캘러스 유도(1) 및 증식(2), 형질전환 캘러스의 재분화(3) 그리고 형질전환체 계대배양(4)을 나타낸 사진이다.

[0125] 도 5는 벼에 도입된 LTB 유전자와 CTB 유전자를 확인하기 위한 PCR 반응 결과를 나타낸 전기영동사진이다. 여기에서 M은 1kb 크기의 마커이고, C는 pMJ103 바이너리 벡터이며, W는 형질전환되지 않은 벼이고, T01 내지 T25는 형질전환된 벼이다.

[0126] 도 6은 벼에 도입된 LTB 유전자와 CTB 유전자가 감자 게놈 내로 도입된 개수를 확인하기 위한 서던 블롯 결과를 나타낸 전기영동 사진이다.

[0127] 도 7은 벼에 도입된 LTB 유전자와 CTB 유전자의 전사 여부를 확인하기 위하여, 상기 유전자의 mRNA의 RT-PCR 결과를 나타낸 전기영동 사진이다.

[0128] 도 8은 형질전환된 벼 T1 종자에 대한 바스타 스트립 검정결과를 나타낸 전기영동 사진이다.

[0129] 도 9는 형질전환된 벼 T1에 대한 G_{M1}-ganglioside ELISA에 의한 백신 단백질 함량 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[0130] 도 10은 설사병 백신 활성 유전자를 발현하는 형질전환 벼의 수용성 단백질과 LTB 백신 단백질 함량 조성 표이다.

[0131] 도 11은 본 발명에 따른 설사병 백신활성 유전자를 발현하는 형질전환 벼를 생산하기 위한 배지 조성물들의 성분 표이다.

도면

도면1

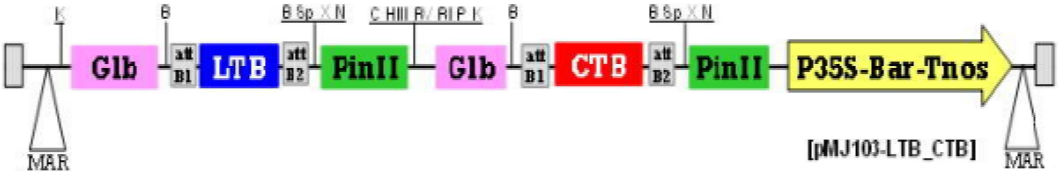
서열번호 1

ATG GTG AAG CTC AAG TTC GGA GTG TTC TTC ACA GTT CTC CTC TCC TCC GCT
TAC GCT CAT GGA ACA CCA CAG AAC ATT ACT GAT TTG TGC GCT GAG TAC CAC
AAC ACA CAA ATT CAT ACT CTC AAC GAT AAG ATC TTC TCC TAC ACA GAG TCC
CTC GCT GGA AAG AGG GAG ATG GCT ATC ATT ACT TTC AAG AAC GGA GCT ACT
TTC CAA GTT GAG GTT CCA GGA AGC CAA CAT ATT GAT TCC CAG AAG AAG GCT
ATT GAG AGG ATG AAG GAT ACC CTC AGG ATT GCT TAC CTC ACT GAG GCT AAG
GTG GAG AAG TTG TGC GTT TGG AAC AAC AAG ACT CCA CAT GCT ATT GCT GCT
ATT AGC ATG GCT AAC TAC TCT GAG AAA GAT GAG CTA TAA

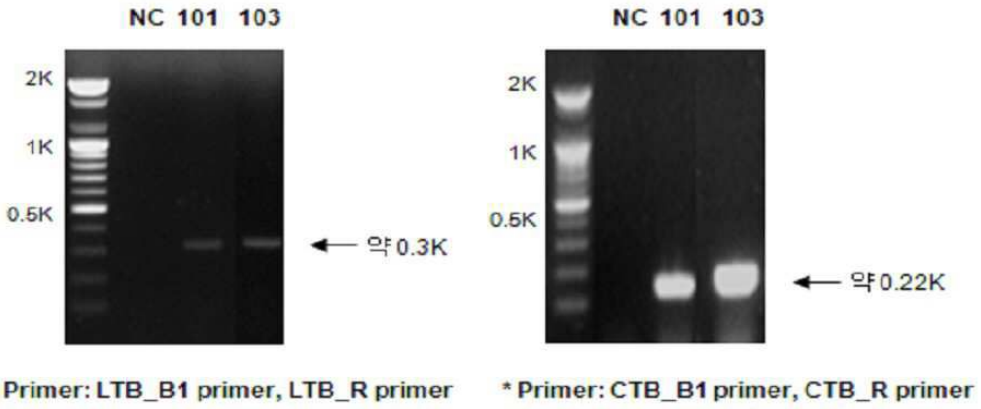
서열번호 2

ATG GTG AAG GTG AAG TGC TAC GTT TTG TTC ACC GCT TTG CTC TCC TCT CTC
TGC GCT TAC GGA GCT CCA CAG TCC ATT ACA GAG CTC TGC TCC GAG TAC AGG
AAC ACA CAA ATC TAC ACC ATC AAC GAT AAG ATC CTC TCC TAC ACC GAG TCC
ATG GCT GGA AAG AGG GAG ATG GTT ATC ATT ACA TTC AAG AGC GGA GCT ACA
TTC CAG GTG GAG GTG CCA GGA AGC CAA CAT ATT GAT TCC CAG AAG AAG GCT
ATT GAG AGG ATG AAG GAT ACA TTG AGG ATC ACA TAC CTC ACC GAG ACC AAG
ATT GAT AAG TTG TGC GTG TGG AAC AAC AAG ACC CCA AAC TCC ATT GCT GCT
ATC AGC ATG GAG AAC TAC TCT GAG AAA GAT GAG CTA TAA

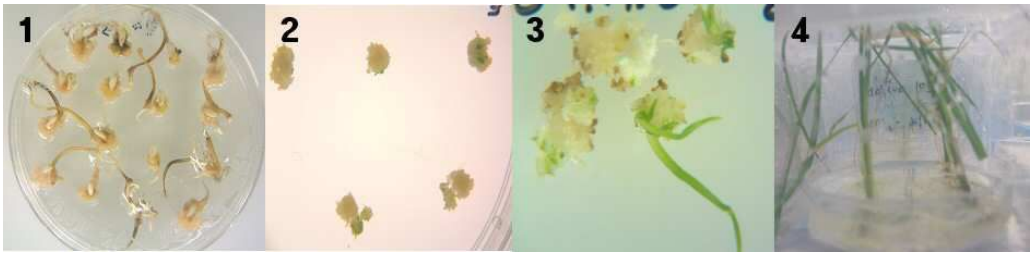
도면2


K
B
B Sp X N
C HIII R/ RI P I
B
B Sp X N
Glb
att B1
LTB
att B2
PinII
Glb
att B1
CTB
att B2
PinII
P35S-Bar-Tnos
MAR
[pMJ103-LTB_CTB]
MAR

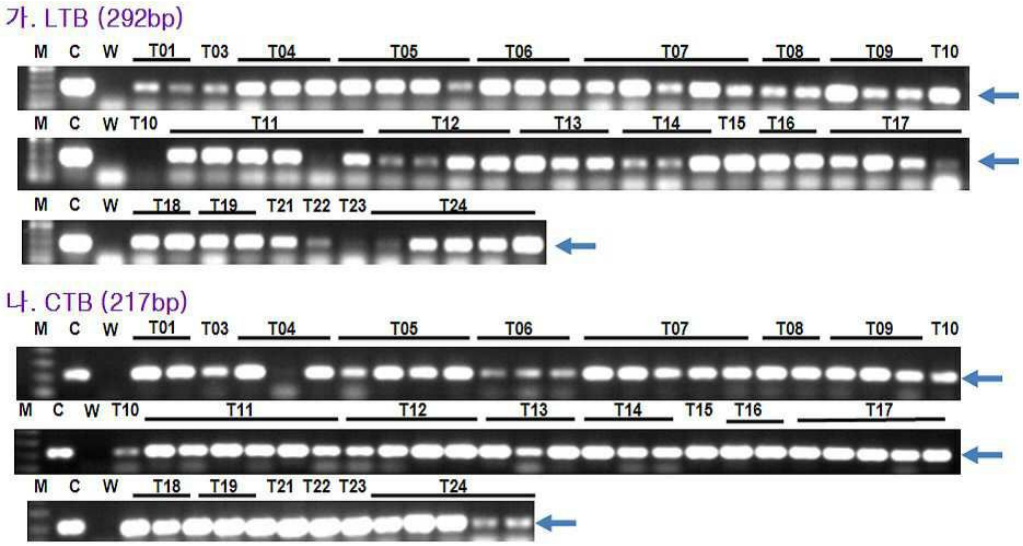
도면3


NC 101 103
2K
1K
0.5K
약 0.3K
* Primer: LTB_B1 primer, LTB_R primer
NC 101 103
2K
1K
0.5K
약 0.22K
* Primer: CTB_B1 primer, CTB_R primer

도면4

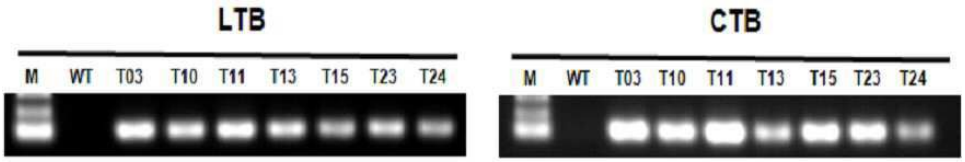

1
2
3
4

도면5

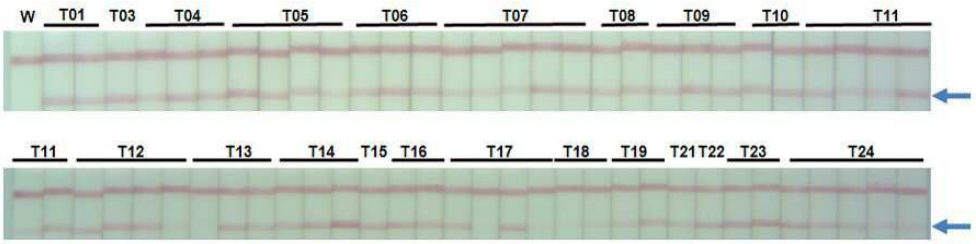


도면6

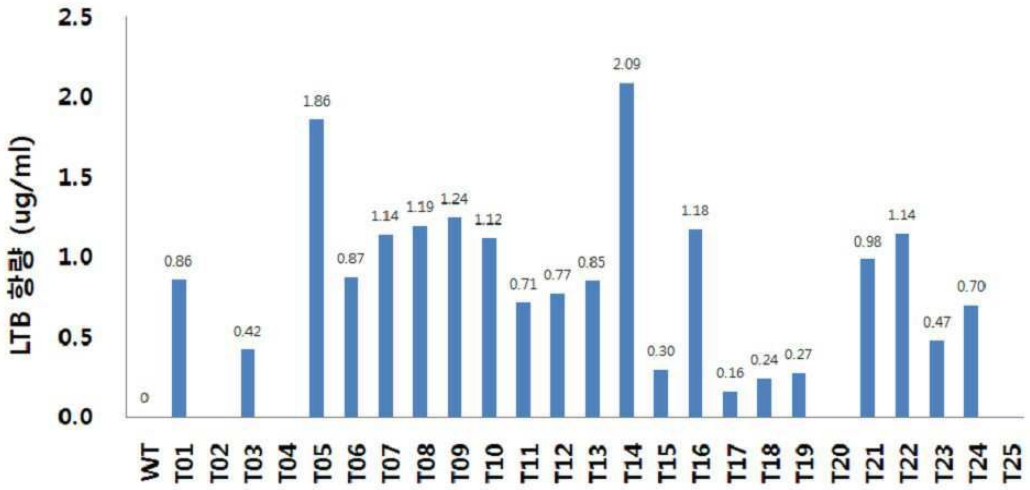
도면7



도면8



도면9



도면10

계통 번호	수용성단백질 (TSP)함량(%)	LTB 함량 (%TSP)	계통 번호	수용성단백질 (TSP)함량(%)	LTB 함량 (%TSP)
WT	0.3	0	T13	0.4	0.03
T01	0.3	0.08	T14	0.3	0.18
T02	-	-	T15	0.4	0.03
T03	0.3	0.07	T16	0.3	0.1
T04	0.3	0	T17	0.3	0.02
T05	0.3	0.21	T18	-	-
T06	0.3	0	T19	0.4	0.03
T07	0.4	0.07	T20	-	-
T08	0.5	0.07	T21	0.3	0.1
T09	0.4	0.09	T22	0.3	0.1
T10	0.4	0.09	T23	0.4	0.04
T11	0.5	0.02	T24	0.3	0.05
T12	0.4	0.07	T25	-	-

도면11

○ 2N6 medium (pH 5.8)

배지성분	농도
N6 salts & vitamins	4.0 g/L
Sucrose	30 g/L
Casamino acid	0.3 g/L
Proline	500 mg/L
Glutamin	500 mg/L
2,4-D	2.0 mg/L
Gelrite (Phytagel)	2.5 g/L

○ AB-SpT medium (pH 7.0)

배지성분	농도
AB carbon	900 ㎖
AB salts	50 ㎖
AB buffer	50 ㎖
Glucose	5 g/L
Bacto-agar	15 g/L
Spectinomycine	50 mg/L
Tetracycline	10 mg/L

○ AAM medium (pH 5.8)

배지성분	농도
MS 기본배지	4.43 g/L
EDTA	36.7 mg/L
Casamino acid	0.5 g
Sucrose	65.8 g
Glucose	36 g
	autoclave
Acetosiringon	1 ㎖
(stock 20mg/㎖ DMSO)	(100 μM)

○ 1/2 2N6-AS medium (pH 5.2)

배지성분	농도
N6 salts & vitamins	2.0 g/L
Glucose	10 g/L
L-Cysteine	10.5 mg/L
Sodium thiosulfate	1 mM
Dithiothreitol	1 mM
Silver nitrate	5 mg/L
2,4-D	2 mg/L,
Gelrite (Phytagel)	3 g/L
	autoclave
Acetosiringon	1㎖
(stock 20mg/㎖)	(100 μM)

○ 2N6-CP medium (pH 5.8)

배지성분	농도
N6 salts & vitamins	4.0 g/L
Sucrose	30 g/L
Casamino acid	0.3 g/L
Proline	500 mg/L
Glutamin	500 mg/L
2,4-D	2 mg/L,
Gelrite (Phytagel)	2.5 g/L
	autoclave
Cefotaxime	250 mg/L
L-phosphinotricine	6 mg/L

○ MSR-CP medium (pH 5.8)

배지성분	농도
MS basal media	4.43 g/L
NAA	1 mg/L
Kinetine	5 mg/L
Sorbitol	30 g/L
Maltose	20 g/L
Gelrite (Phytagel)	4 g/L
	autoclave
Cefotaxime	250 mg/L
L-phosphinotricine	3 mg/L

○ MS0 medium (pH 5.8)

배지성분	농도
MS 기본배지	4.43 g/L
Sucrose	30 g/L
Gelrite (Phytagel)	2.5 g/L

서 열 목 록

<110> GyeongGi-Do

<120> TRANSFORMED RICE FOR EXPRESSING GENES HAVING VACCINE ACTIVITY OF DIARRHEA AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 396

<212> DNA
<213> Vibrio cholerae

<400> 1
atggtgaagc tcaagttcgg agtgttcttc acagttctcc tctcctccgc ttacgctcat 60

ggaacaccac agaacattac tgatttgtgc gctgagtacc acaacacaca aattcatact 120

ctcaacgata agatcttctc ctacacagag tccctcgctg gaaagaggga gatggctatc 180

attactttca agaacggagc tactttccaa gttgaggttc caggaagcca acatattgat 240

tcccagaaga aggctattga gaggatgaag gataccctca ggattgctta cctcactgag 300

gctaaggtgg agaagttgtg cgtttggaac aacaagactc cacatgctat tgctgctatt 360

agcatggcta actactctga gaaagatgag ctataa 396

<210> 2
<211> 396
<212> DNA
<213> Escherichia coli

<400> 2
atggtgaagg tgaagtgcta cgttttgttc accgctttgc tctcctctct ctgcgcttac 60

ggagctccac agtccattac agagctctgc tccgagtaca ggaacacaca aatctacacc 120

atcaacgata agatcctctc ctacaccgag tccatggctg gaaagaggga gatggttatc 180

attacattca agagcggagc tacattccag gtggaggtgc caggaagcca acatattgat 240

tcccagaaga aggctattga gaggatgaag gatacattga ggatcacata cctcaccgag 300

accaagattg ataagttgtg cgtgtggaac aacaagaccc caaactccat tgctgctatc 360

agcatggaga actactctga gaaagatgag ctataa 396