



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2017년03월30일  
 (11) 등록번호 10-1721477  
 (24) 등록일자 2017년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/82* (2006.01) *A01H 1/02* (2006.01)  
*A01H 5/00* (2006.01) *A01H 5/10* (2006.01)  
*GO1N 33/18* (2006.01) *GO1N 33/24* (2006.01)  
*GO1N 33/50* (2017.01)  
 (52) CPC특허분류  
*C12N 15/8241* (2013.01)  
*A01H 1/02* (2013.01)  
 (21) 출원번호 10-2016-0050427  
 (22) 출원일자 2016년04월25일  
 심사청구일자 2016년04월25일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 The plant journal. Vol. 24, No. 2, 페이지  
 265-273 (2000.08.01.)

(73) 특허권자  
**세종대학교 산학협력단**  
 서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)  
 (72) 발명자  
**황성빈**  
 서울특별시 송파구 송파대로28길 27, 102동 910호  
 (가락동, 송파성원쌍떼빌)  
**김동관**  
 서울특별시 강남구 논현로 213, 107동 104호 (도  
 곡동, 역삼럭키아파트)  
 (74) 대리인  
**한윤호**

전체 청구항 수 : 총 12 항

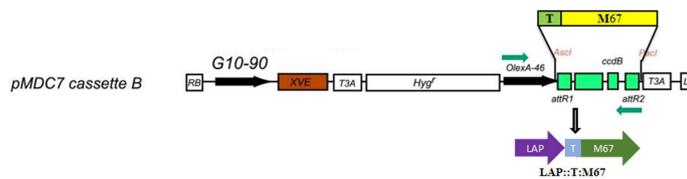
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 **환경호르몬 검출용 지표식물**

**(57) 요약**

본 발명은 보다 효율적이고 간편한 토양 또는 환경수 내의 환경호르몬 오염 여부를 판별할 수 있도록 서열번호 7로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 환경호르몬을 인식하는 XVE 융합전사인자를 암호화하는 유전자 및 서열번호 8로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 안토시아닌 생합성 효소를 암호화하는 유전자로 형질전환된, 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물을 제공한다.

**대표도** - 도1



(52) CPC특허분류

- A01H 5/00 (2013.01)
- A01H 5/10 (2013.01)
- G01N 33/18 (2013.01)
- G01N 33/24 (2013.01)
- G01N 33/5082 (2013.01)
- C07K 2319/20 (2013.01)
- C07K 2319/40 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711029585
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	사회문제해결형 기술개발
연구과제명	내분비계 장애물질 대체소재의 내분비 교란 활성 평가
기 여 율	1/1
주관기관	세종대학교 산학협력단
연구기간	2015.06.13 ~ 2016.04.30

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

서열번호 7로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 환경호르몬을 인식하는 XVE 융합전사인자를 암호화하는 유전자 및 서열번호 8로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 안토시아닌 생합성 전사인자를 암호화하는 유전자가 상기 XVE 융합전사인자에 의해 그 발현이 조절되는 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 카세트로 형질전환된, 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물.

**청구항 2**

제1항에 있어서,

상기 환경호르몬은 에스트라디올, 비스페놀 A, 노닐페닐 및 프탈레이트인, 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물.

**청구항 3**

제1항에 있어서,

상기 프로모터는 서열번호 9로 기재되는 핵산서열로 구성되는 *OlexA-46* 프로모터인, 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물.

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

제1항에 있어서,

상기 안토시아닌 생합성 전사인자는 분리-정제를 위한 태그 펩티드(tag peptide)를 추가로 포함하는, 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물.

**청구항 6**

제5항에 있어서,

상기 태그 펩티드는 친화성 태그(affinity tag) 또는 에피토프 태그(epitope tag)인, 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물.

**청구항 7**

제6항에 있어서,

상기 친화성 태그(affinity Tag)는 히스티딘 태그(histidine tag), 글루타치온 전이효소(glutathione s transferase, GST), 인테인(Intein) 또는 말토스 결합단백질(maltose binding protein, MBP)인, 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물.

**청구항 8**

제6항에 있어서,

상기 에피토프 태그(epitope tag)는 플래그 태그(FLAG tag), Myc, V5 또는 HA인, 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물.

**청구항 9**

제1항의 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물의 형질전환된 종자.

**청구항 10**

제1항의 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물을 부분 또는 모본으로 하여 교배되어 생성된, 환경호르몬 검출능을 보유한 자손 식물.

**청구항 11**

제1항의 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물을 포함하는, 환경호르몬 검출용 키트.

**청구항 12**

제1항의 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물을 토양 또는 환경수에 접촉시킨 후, 안토시아닌의 축적 여부를 육안으로 관찰하는 단계를 포함하는, 상기 토양 또는 환경수에서의 환경호르몬 검출방법.

**청구항 13**

제12항에 있어서,

잎 뒷면이 적색으로 변하면 상기 토양 또는 환경수 내에 환경호르몬이 포함된 것으로 판정하는 단계를 추가로 포함하는, 검출방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 검출용 지표식물에 관한 것으로서, 더 상세하게는 환경호르몬 검출용 지표식물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 환경호르몬은 내분비 교란물질(endocrine disruptor)로서, 생체 내분비계의 기능을 방해하거나 혼란을 야기하는 화학물질로 정의된다. 1997년 일본에서 "환경에 배출된 화학물질이 생물체내에 유입되어 마치 호르몬처럼 작용한다"고 하여 '환경호르몬'이라 명명하였고, 생태계 및 인간의 호르몬계에 악영향을 미쳐 전 세계적으로 생물종에 위협이 될 수 있는 가능성 때문에 오존층파괴, 지구온난화 문제와 함께 세계 3대 환경문제로 부각되었다. 환경호르몬은 생체 내 수용단백질과 결합하여 신호전달을 통해 비정상적인 유전자 발현을 유도할 수 있기 때문에 국외의 연구에서는 지난 50년간 인간의 정자수가 반으로 줄어들었고(1992년 덴마크의 스카케백 교수), 야생동물의 생식기 이상/생식 불능 개체수 급증하였으며(세계자연보호기금) 국내의 경우, 어린이집과 유치원의 환경호르몬 수치가 미국 등지의 최대 11배 수준으로 증가하였다는 여러 피해사례가 보고되고 있다. 환경호르몬으로 분류되는 화학물질들은 대표적으로 프탈레이트, 비스페놀A, 노닐페놀 등으로 이를 포함하는 국내 제조량은 대폭 증가하고 있으며 환경호르몬이 동물 및 인체에 미치는 영향은 많이 연구되고 있으나, 생태계의 근본이 되고 인체유입의 통로가 되는 식물에 대한 연구는 특히 부족한 실정이고 식물(채소, 식량작물 등)의 환경호르몬 흡수, 축적 및 전환에 관한 연구, 환경호르몬 축적 식물을 동물이 섭취함에 따른 영향 연구가 매우 부족한 실정이다. 이와 관련하여 대한민국 공개특허 제2011-0130648호는 염분토양에서 지표식물로 사용 가능한 유전자 및 형질전환체 제조방법을 개시하고 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0003] 그러나, 상기 선행기술의 경우, 항생제 저항성 마커를 포함하고 있고 육안으로 쉽게 확인할 수 있는 마커(색 변화)가 없는 문제점이 있다.

[0004] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 환경호르몬 존재 시 이를 인식하여 모니터링이 가능한 여성 환경호르몬 검출용 지표식물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

**과제의 해결 수단**

- [0005] 본 발명의 일 관점에 따르면, 서열번호 7로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 환경호르몬을 인식하는 XVE 융합전사인자를 암호화하는 유전자 및 서열번호 8로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 안토시아닌 생합성 전사인자를 암호화하는 유전자가 상기 XVE 융합전사인자에 의해 그 발현이 조절되는 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 카세트로 형질전환된, 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물이 제공된다.
- [0006] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물의 종자가 제공된다.
- [0007] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물을 부분 또는 모본으로 하여 교배되어 생성된 환경호르몬 검출능을 보유한 자손이 제공된다.
- [0008] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물을 포함하는, 환경호르몬 검출용 키트가 제공된다.
- [0009] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물을 토양 또는 환경수에 접촉시킨 후, 안토시아닌의 축적 여부를 육안으로 관찰하는 단계를 포함하는, 상기 토양 또는 환경수에서의 환경호르몬 검출방법이 제공된다.

**발명의 효과**

- [0010] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 형질전환 식물체를 제작하여 실시간 모니터링이 가능한 여성 환경호르몬 검출효과를 구현할 수 있다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

**도면의 간단한 설명**

- [0011] 도 1은 포플러 유래 안토시아닌 합성 M67 유전자를 이용한 게이트웨이 클로닝 과정을 나타내는 개요도이다.
- 도 2는 본 발명의 T\_M67 유전자의 증폭과 게이트웨이 클로닝 과정을 나타내는 개요도이다.
- 도 3은 여성 환경호르몬을 인식하는 XVE 유전자의 증폭과정을 나타내는 개요도이다.
- 도 4는 여성 환경호르몬을 인식하는 XVE 도메인을 삽입하고 안토시아닌을 식물체에 축적시키는 마커 시스템(M67)을 게이트웨이 시스템으로 클로닝하여 제작된 벡터 컨스트럭트를 나타내고 있는 개요도이다.
- 도 5는 본 발명의 형질전환 식물체를 BASTA selection을 이용하여 선발하는 과정을 나타내는 사진이다.
- 도 6은 본 발명의 형질전환 식물체 T1 세대에서 환경호르몬 BPA를 처리하였을 때 색 변이 양상을 확인한 사진이다.
- 도 7은 본 발명의 형질전환 식물체 T2 세대에서 환경호르몬 BPA를 처리하였을 때 색 변이 양상을 확인한 사진이다.
- 도 8은 본 발명의 형질전환 식물체 T2 세대에서 환경호르몬 BPA를 농도를 달리하여 처리하였을 때 색 변이 양상을 확인한 사진이다.
- 도 9는 본 발명의 형질전환 식물체 T2 세대에서 환경호르몬 노닐페놀을 농도를 달리하여 처리하였을 때 색 변이 양상을 확인한 사진이다.
- 도 10은 본 발명의 형질전환 식물체의 안토시아닌 관련 전사인자인 M67의 발현양상을 시간대별로 분석한 그래프이다.
- 도 11은 본 발명의 형질전환 식물체의 안토시아닌 합성 조절효소인 UFGT의 발현양상을 시간대별로 분석한 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0012] **용어의 정의:**
- [0013] 본 문서에서 사용되는 용어 "환경호르몬(endocrine disruptor)"은 내분비 장애물질이라고도 하며 사람이나 동물의 내분비 호르몬과 비슷하게 작용하는 외인성 화학물질로 사람이나 동물의 내분비계에 영향을 미쳐 인간이나 동물의 번식장애 등 건강에 위해를 주는 물질을 말한다.

- [0014] 본 문서에서 사용되는 용어 "비스페놀 A(bisphenol-A, BPA)"는 1950년대부터 플라스틱제품 제조에 널리 사용돼 온 화학물질로 동물이나 사람의 체 내로 유입될 경우 내분비계의 정상적인 기능을 방해하거나 혼란시키는 환경 호르몬의 일종으로, 주로 합성수지 원료, 콤팩트디스크(CD), 식품저장용 캔 내부 코팅 재료 등으로 쓰이는 물질이다.
- [0015] 본 문서에서 사용되는 용어 "에스트라디올(estradiol)"은 여성에 주로 존재하는 성호르몬인 동시에 에스트로겐이며 여성에 주로 나타나는 호르몬이나 여성에서만 나타나는 것은 아니며, 남성에서는 테스토스테론의 대사산물로 생성된다.
- [0016] 본 문서에서 사용되는 용어 "안토시아닌(anthocyanin)"은 꽃이나 과일 등에 포함되어 있는 안토시아닌의 색소 배당체(色素配當體: 색소 글리코시드)로 가수분해에 의해 하나 또는 둘의 단당류와 아글리콘으로 분류된다.
- [0017] **발명의 상세한 설명:**
- [0018] 본 발명의 일 관점에 따르면, 서열번호 7로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 환경호르몬을 인식하는 XVE 융합전사인자를 암호화하는 유전자 및 서열번호 8로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 안토시아닌 생합성 전사인자를 암호화하는 유전자가 상기 XVE 융합전사인자에 의해 그 발현이 조절되는 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자 카세트로 형질전환된, 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물이 제공된다.
- [0019] 상기 형질전환 지표식물은 환경에 존재하는 BPA와 같은 여성 환경호르몬과 상기 XVE 융합전사인자가 반응한 후, 상기 XVE 융합전사인자에 의해 발현이 조절되는 프로모터에 결합하여 상기 프로모터를 활성화시키면 안토시아닌 생합성을 촉진하는 M67 전사인자의 발현을 유도함으로써 식물체 내부에서 적색소인 안토시아닌의 축적을 육안으로 관찰할 수 있다. 특히 상기 형질전환 지표식물의 경우 초기 유묘를 환경호르몬이 포함되어 있는 것으로 추정되는 환경수 또는 토양에 담근 후 48시간 이내에 색소의 축적으로 인한 색상의 변화를 육안으로 관찰할 수 있기 때문에, 대량으로 신속한 환경호르몬 오염 여부를 판정할 수 있다. 더구나, 본 발명의 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물은 대표적인 여성 환경호르몬인 비스페놀 A(BPA)의 경우 10 ppb라는 매우 낮은 농도에서도 검출이 가능하였기 때문에, 특별한 지시약 없이도 초고감도 BPA 검출이 가능하다.
- [0020] 따라서, 상기 형질전환 지표식물에 있어서, 상기 환경호르몬은 에스트라디올, 비스페놀 A, 노닐페놀 및 프탈레이트일 수 있고, 바람직하게는 비스페놀 A(BPA)일 수 있다.
- [0021] 상기 성질전환 지표식물에 있어서, 상기 프로모터는 *OlexA-46* 프로모터일 수 있고, 상기 *OlexA-46* 프로모터는 서열번호 9로 기재되는 핵산서열로 구성될 수 있다.
- [0022] 상기 형질전환 지표식물에 있어서, 상기 안토시아닌 생합성 전사인자는 분리-정제를 위한 태그 펩티드(tag peptide)를 추가로 포함할 수 있고, 상기 태그 펩티드는 친화성 태그(affinity tag) 또는 에피토프 태그(epitope tag)일 수 있으며, 상기 친화성 태그(affinity Tag)는 히스티딘 태그(histidine tag), 글루타치온 전이효소(glutathione s transferase, GST), 인테인(Intein) 또는 말토스 결합단백질(maltose binding protein, MBP)일 수 있고, 상기 에피토프 태그(epitope tag)는 플래그 태그(FLAG tag), Myc, V5 또는 HA일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물의 종자가 제공된다.
- [0024] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물을 부분 또는 모본으로 하여 교배되어 생성된 환경호르몬 검출능을 보유한 자손 식물이 제공된다.
- [0025] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물을 포함하는, 환경호르몬 검출용 키트가 제공된다.
- [0026] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 상기 환경호르몬 검출용 형질전환 지표식물을 토양 또는 환경수에 접촉시킨 후, 안토시아닌의 축적 여부를 육안으로 관찰하는 단계를 포함하는, 상기 토양 또는 환경수에서의 환경호르몬 검출방법이 제공된다.
- [0027] 상기 검출방법은 잎 뒷면이 적색으로 변하면 상기 토양 또는 환경수 내에 환경호르몬이 포함된 것으로 판정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0028] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다.

[0029] **실시예 1: M67 유전자 클로닝**

[0030] 본 발명의 일 실시예에 따라 포플러 유래의 안토시아닌 합성 M67 유전자를 클로닝하였다.

[0031] 구체적으로, 안토시아닌 색소 발현 M67 유전자의 증폭은 본 발명자들의 선행연구를 통하여 분리한 포플러 유래 안토시아닌 합성 유전자 M67(834 bp, 서열번호 10)를 주형으로 사용하였고 상기 단백질 발현의 안정성과 분리를 위한 FLAG tag(T: 27 bp, 서열번호 11)를 M67 유전자와의 융합하기 위한 게이트웨이 클로닝(gateway cloning)을 위하여 attB1 염기서열을 포함하는 프라이머를 디자인하였다. 상기 디자인한 T\_M67\_F 정방향 프라이머(서열번호 1), 및 M67\_GW\_R 역방향 프라이머(서열번호 2)를 이용하여 수득한 PCR 반응물을 GW T M67 F 정방향 프라이머(서열번호 3) 및 상기 M67\_GW\_R 역방향 프라이머(서열번호 2)로 다시 증폭하여 생성된 PCR 산물을 록펠러 대학교(Rockefeller University)의 Chua 교수 실험실로부터 분양받은 pMDC7 벡터(Curtis and Grossniklaus, *Plant Physiol.* 133(2): 462-469, 2003)에 서브클로닝(subcloning)하였다(도 1). 상기 클로닝에 사용된 프라이머를 포함한 모든 프라이머에 대한 정보를 하기 표 1에 표시하였다.

표 1

[0032]

프라이머	서열(5'→3')	크기	서열번호
T M67 F	AAGGATGACGACGATAAGGTAGGCTCATTAGGAGTAAGG	39 bp	1
M67 GW R	agaaagctgggtTTACAACATTATAGACTGAAGTCCTTCAGG	42 bp	2
GW T M67 F	aaaagcaggtccATGGATTACAAGGATGACGACGATAAG	41 bp	3
LAP F GW	AAAAAGCAGGCTttgcatgccagcttgggctgcagg	36 bp	4
XVE F	TTT ACTAGT ATGAAAGCGTTAACGGCCAG	29 bp	5
XVE R	TTT ACTAGT TCAGACTGTGGCAGGGAAACC	30 bp	6

[0033] \* 상기 표 1에서 밑줄친 부분은 FLAG 태그를 암호화하는 핵산서열 부분이고, 굵은 글씨는 전체 융합단백질의 개시코돈을 나타낸다.

[0034] 그런 다음 본 발명자들은 상기에서 클로닝된 T M67 유전자를 증폭하고 게이트웨이 클로닝을 수행하였다.

[0035] 구체적으로, pMDC7 벡터에 서브클로닝된 T M67 유전자 앞부분에 존재하는 *OlexA-46* 프로모터 영역(269 bp, 서열번호 9)인 최소 프로모터 영역(minimal promoter region)을 함유하는 LAP\_T\_M67 유전자는 LAP\_F\_GW 정방향 프라이머(서열번호 4) 및 M67\_GW\_R 역방향 프라이머(서열번호 2)(표 1 참조)를 이용하여 증폭하였다(도 1). 상기 PCR 반응물은 최종 환경호르몬 유도 발현 벡터로 사용되는 pB2GW7 벡터(Karimi *et al.*, *Trends Plant Sci.* 7(5): 193-195, 2002)로 게이트웨이 클로닝으로 서브클로닝하였다(도 2).

[0036] **실시예 2: XVE 유전자의 증폭**

[0037] 본 발명의 일 실시예에 따라 본 발명자들은 여성호르몬 및 유사 환경호르몬을 인식할 수 있는 XVE 유전자를 증폭하였다.

[0038] 구체적으로, 여성호르몬 유사 환경 호르몬을 인식 할 수 있는 XVE 전사인자를 암호화하는 유전자 부분은 종래 주형이 되는 pMDC7 벡터에 존재하는 XVE(estradiol inducible) 유전자를 사용하였다(Ishige, F. *et al. Plant J.* 18: 443-448, 1999).

[0039] 상기 XVE 전사인자는 DNA-바인딩 도메인을 포함하고 있는 leXA의 전사 활성 도메인(transcription activation domain, 잔기 1-87), VP16 부분(잔기 403-479), 및 인간 에스트로젠 수용체(estrogen receptor, NP\_000116.2) 부분 중 에스트로젠 수용체 부분인 잔기 282-595 부분을 포함하는 융합단백질로 전체 483 aa로 구성되어 있다(서열번호 7). 상기 융합단백질을 암호화하는 유전자(서열번호 12)을 증폭하기 위하여 사용한 프라이머는 *Spe* I 효소 연결 사이트(enzyme linker site)를 포함하도록 디자인하였고 상기 디자인한 XVE F 정방향 프라이머(서열번호 5) 및 XVE R 역방향 프라이머(서열번호 6, 표 1 참조)를 사용하여 PCR 증폭하였다. 이후 PCR 반응물(1,446 bp)을 제한효소 *Spe* I으로 절단하고 상기 pB2GW7 벡터로 서브클로닝하였고(도 3) 여성호르몬이나 유사 환경호르몬을 인식할 수 있는 XVE 조절 프로모터 영역(*OlexA-46*, 서열번호 9) 및 지표가 되는 안토시아닌 합성 M67 유전자를 포함하는 식물형질전환용 pB2GW7 벡터를 최종 완성하였다(도 4).

[0040] **실시예 3: 형질전환 식물체 제작**

[0041] 본 발명의 일 실시예에 따라 여성 환경호르몬 존재에 특이적으로 반응하여 적색 색소를 축적하는 고감도 형질전

환 식물체 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)를 제작하였다.

[0042] 구체적으로, 상기 제작한 XVE\_M67 유전자 재조합 벡터를 식물체로 형질전환시키기 위하여 아그로박테리움(*Agrobacterium* GV3101) 균주를 이용하여 야생형 애기장대에 형질전환시키고 이후 수확된 씨앗에 제초제인 Basta를 처리하여 형질전환된 개체들을 선별하였다(도 5). 상기 선별된 형질전환 개체들에 환경호르몬인 BPA(bisphenol-A)를 10 ppm 농도로 포함된 한천 배지에서 10일 정도 배양하여 적색 발현이 일어나는 개체들을 일차 선별(T1 generation)하였고(도 6), 상기 1차 선별된 개체들로부터 다음세대(T2 generation)를 얻어 지속적으로 색 변이가 유발된 형질전환 개체들을 선별하였다(도 7). 이는 본 발명의 일 실시예에 따른 형질전환 식물이 안정적으로 후대로 유전됨을 나타내는 것이다.

[0043] 아울러, 본 발명자들은 상기 형질전환 식물의 BPA 검출 한계를 확인하기 위해 10 ppm 외에 10 ppb의 농도의 BPA 함유 배지에 상기 T2 세대 형질전환 식물을 노출시키는 실험을 수행하였다(도 8). 그 결과 도 8에서 나타난 바와 같이, 10 ppm 뿐만 아니라 10 ppb의 BPA에서도 잎 뒷면에서 적색을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명의 일 실시예에 따른 형질전환 식물이 매우 낮은 농도의 BPA를 검출할 수 있어, 수질 검사 등에 매우 효율적으로 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[0044] 한편, 본 발명자들은 본 발명의 일 실시예에 따른 형질전환 식물이 다양한 환경호르몬을 검출할 수 있는지 확인하기 위해, 10 ppb와 10 ppm의 노닐페놀을 대상으로 동일한 실험을 수행하였다(도 9). 그 결과 도 9에서 나타난 바와 같이, 노닐페놀(nonyl phenol)의 경우 10 ppm의 농도에서는 안토시아닌의 축적을 확인할 수 있었으나, 10 ppb의 저농도에서는 색소의 축적을 관찰할 수 없었다. 이는 본 발명의 일 실시예에 따른 형질전환 식물이 환경호르몬 중에서도 BPA에 대하여 보다 검출감도가 높음을 시사하는 것이다.

[0045] **실시예 4: 유전자 발현 확인**

[0046] 본 발명자들은 상기 실시예 3의 실험결과가 실제 본 발명에서 사용한 M67 유전자의 과발현에 따른 현상인지 확인하기 위해, 상기 선별된 형질전환 개체들로부터 BPA 노출 시간에 따른 M67 유전자 및 그의 하위 단계에 있는 유전자의 발현의 변화를 조사하였다.

[0047] 구체적으로, 상기 선별된 형질전환 식물체들이 색 변이를 일으키기 이전에 삽입된 M67 유전자의 발현을 시간대 별로 확인하기 위하여 10 ppm 농도의 BPA를 처리 후 각 시간대 별로 샘플링(sampling)하고 상기 식물체들로부터 RNA를 추출하여 cDNA를 만든 후 Real-time PCR로 M67 유전자의 발현을 확인하였다. 또한 M67의 경우 안토시아닌 생합성 경로 상의 전사인자이고 실제 세포내에서 안토시아닌 색소를 합성하는 전환효소 UFGT(UDP-Glucose flavonoid glucosyl transferase)가 발현되어야 색소로 전환되기 때문에 UFGT 유전자의 발현도 확인하였다.

[0048] 그 결과, BPA 처리 후 12시간을 전 후로 하여 M67 유전자의 발현이 가장 높게 나타남을 확인하였고(도 10), UFGT 발현의 경우는 M67에 이어서 약 12시간에서 24시간 사이에 가장 높은 발현을 나타내었다(도 11). 도 10 및 도 11에서 각각 나타난 네 개의 그래프는 T2 세대의 네 가지 라인별로 해당 유전자 발현 정도를 분석한 결과이다. 라인에 따라 다소 변이가 있기는 하나, 일정 시간 까지 발현이 증가하다가 시간이 더 경과하면 발현이 감소하는 양상은 동일하게 나타났다.

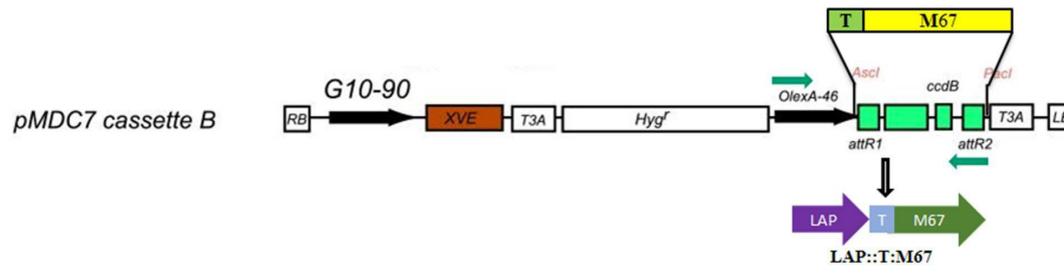
[0049] 따라서, BPA가 처리되어 에스트로젠 수용체(estrogen receptor)에 결합하면 12-24 시간 경과 시점에서 M67 유전자(안토시아닌 색소 합성 전사인자)가 발현되고, 이어서 색소 생합성 마지막 효소인 UFGT가 M67 유전자와 비슷하거나 약간 더 이후인 12-48시간 경과 시점에 발현되므로, 육안으로 확인할 수 있는 색변이는 UFGT에 의해 생합성된 안토시아닌이 육안으로 확인 가능할 정도로 축적된 48시간 이후 가능함을 알 수 있다. 상기 결과는 형질전환체의 색깔 변화가 명확히 BPA에 대하여 반응하여 나타난 결과라는 것을 입증하는 것이다.

[0050] 결론적으로, 여성 환경호르몬(에스트라디올) 존재를 특이적으로 인식하여 적색 발현을 하는 M67 유전자가 도입된 항생제 저항성 마커가 없는 클린 형질전환 지표식물을 이용하여 여성 환경호르몬에 대해 실시간 모니터링이 가능하며 광범위한 지역을 경제적이고도 신속하게, 지속적으로, 친환경적 분석에 따른 위기대응 및 관리가 가능하다.

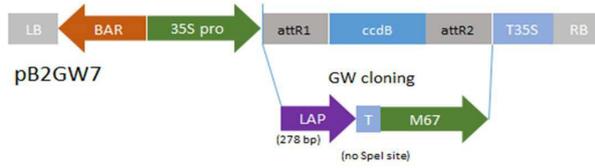
[0051] 본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

도면1

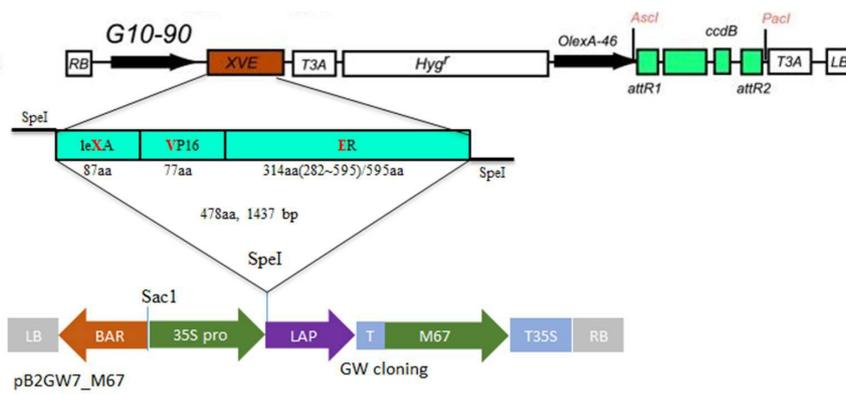


도면2



도면3

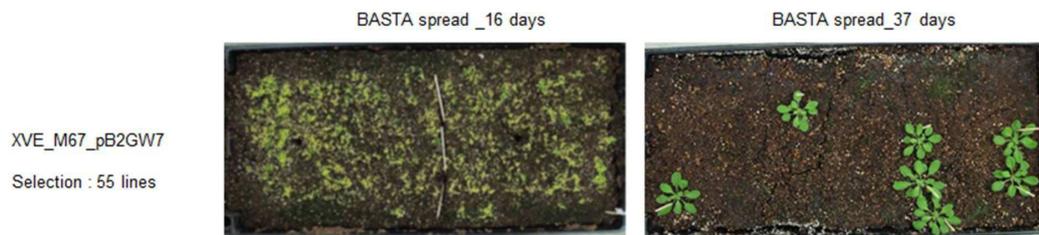
B. pMDC7 cassette B



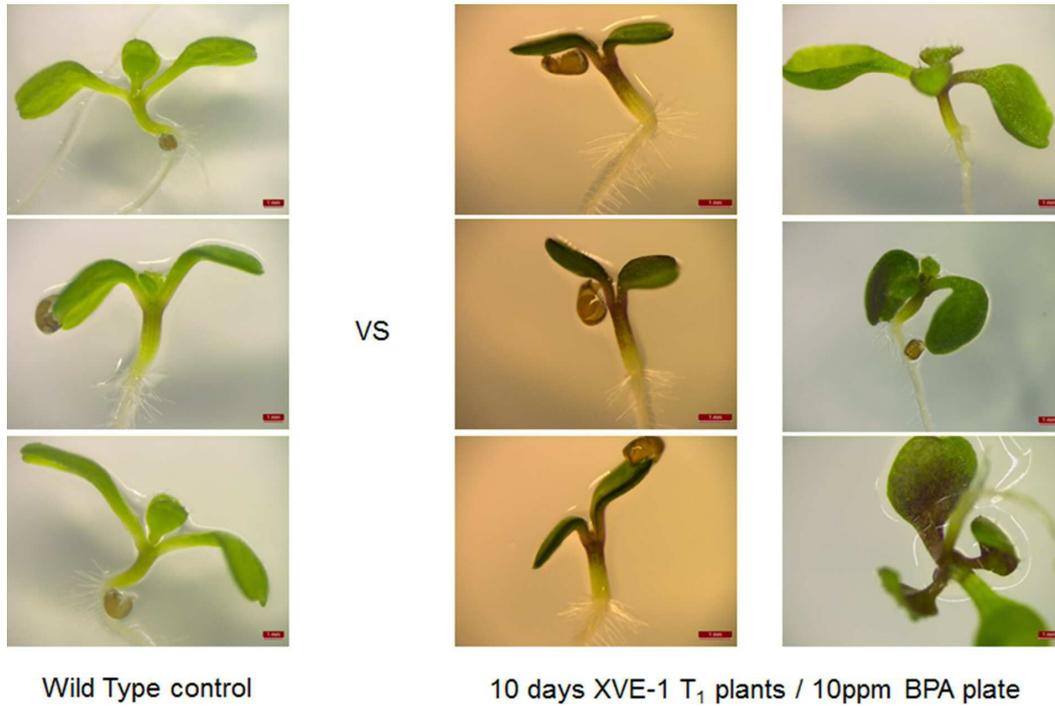
도면4



도면5

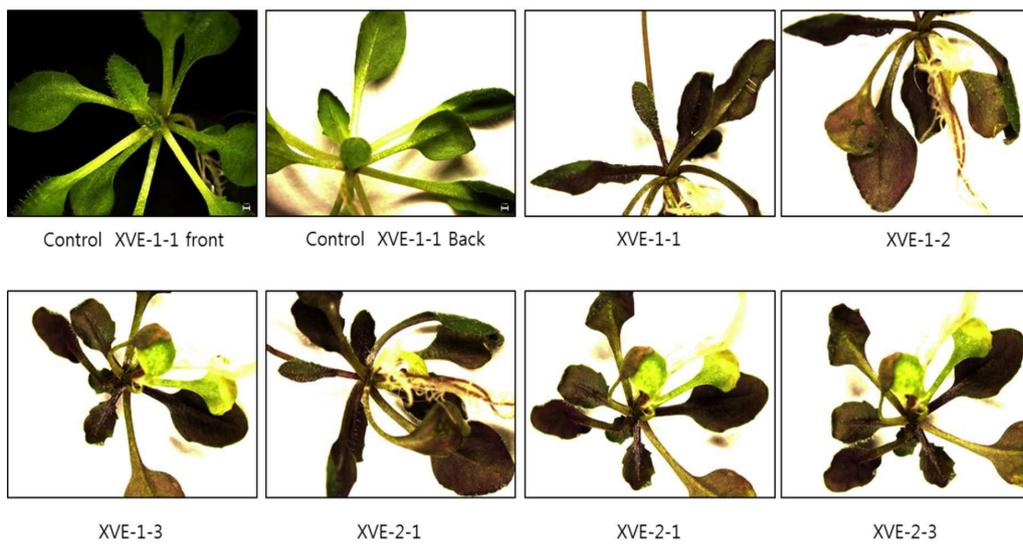


도면6



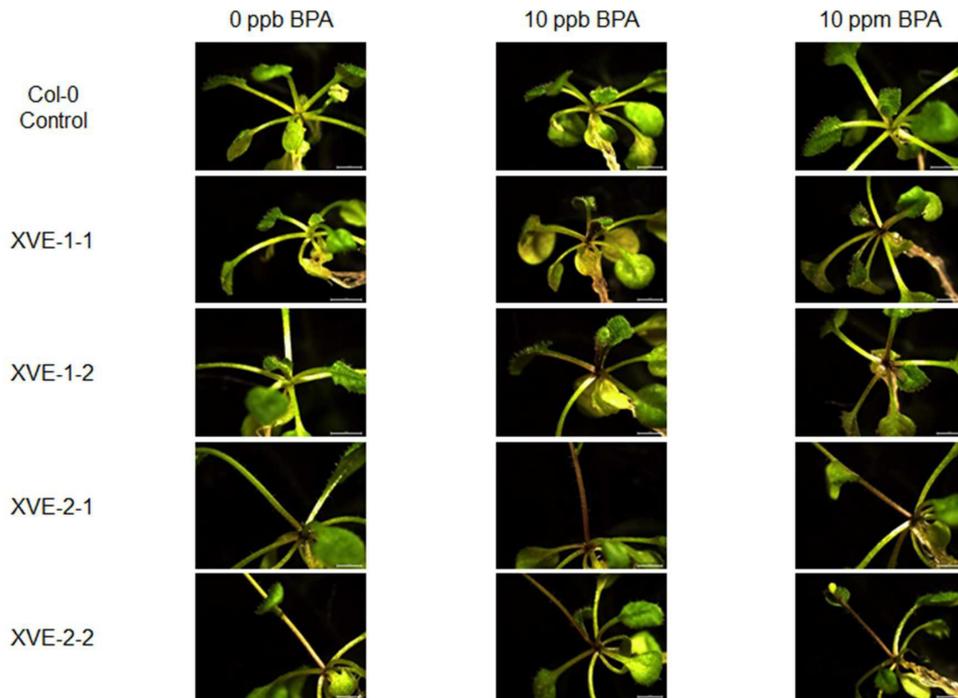
도면7

2 weeks Old Vertical Plate grown plant Dipping test in 10ppm BPA 48hours



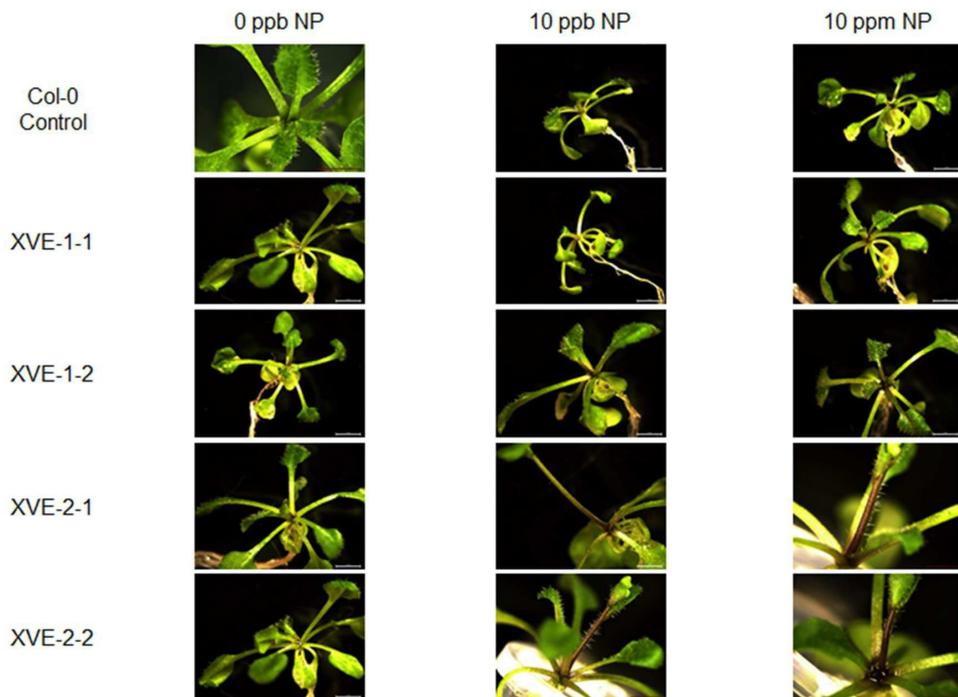
도면8

2 weeks Old Vertical Plate grown plant Dipping test in BPA solution, 48hours

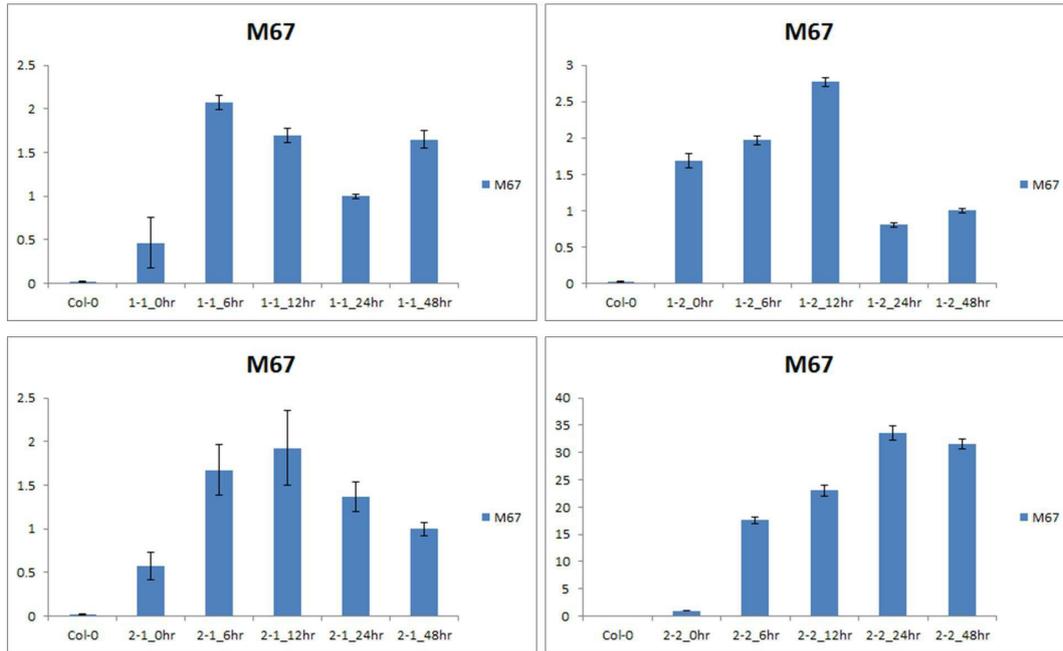


도면9

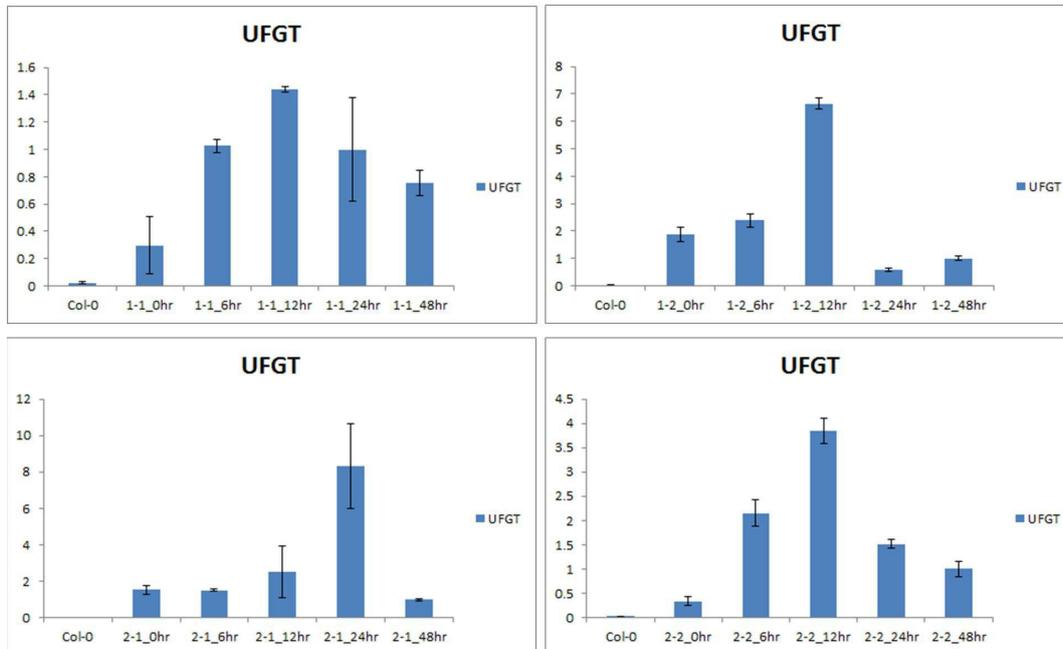
2 weeks Old Vertical Plate grown plant Dipping test in NP solution, 48hours



도면10



도면11



서열목록

<110> INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION OF SEJONG UNIVERSITY  
 <120> Indicator plant for detecting endocrine disruptors  
 <130> PD16-5365  
 <160> 12  
 <170> KoPatentIn 3.0  
 <210> 1  
 <211> 39  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> T M67 F  
 <400> 1  
 aaggatgacg acgataaggt aggctcatta ggagtaagg 39  
 <210> 2  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> M67 GW R  
 <400> 2  
 agaaagctgg gttacaaca ttatagactg aagtccttca gg 42  
 <210> 3  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> GW T M67 F  
 <400> 3  
 aaaaagcagg ctccatggat tacaaggatg acgacgataa g 41  
 <210> 4  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> LAP F GW  
 <400> 4  
 aaaaagcagg ctttgcacgc cagcttgggc tgcagg 36  
 <210> 5  
 <211> 29

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> XVE F  
 <400> 5  
 tttagtagta tgaagcggtt aacggccag 29

<210> 6  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> XVE R  
 <400> 6  
 tttagtagtt cagactgtgg cagggaaacc 30

<210> 7  
 <211> 483  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> XVE transcription factor  
 <400> 7  
 Met Lys Ala Leu Thr Ala Arg Gln Gln Glu Val Phe Asp Leu Ile Arg  
 1 5 10 15  
 Asp His Ile Ser Gln Thr Gly Met Pro Pro Thr Arg Ala Glu Ile Ala  
 20 25 30  
  
 Gln Arg Leu Gly Phe Arg Ser Pro Asn Ala Ala Glu Glu His Leu Lys  
 35 40 45  
 Ala Leu Ala Arg Lys Gly Val Ile Glu Ile Val Ser Gly Ala Ser Arg  
 50 55 60  
 Gly Ile Arg Leu Leu Gln Glu Glu Glu Gly Leu Pro Leu Val Gly  
 65 70 75 80  
 Arg Val Ala Ala Gly Glu Pro Ser Ser Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser  
 85 90 95  
 Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His  
 100 105 110

Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp  
 115 120 125

Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala  
 130 135 140

Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu  
 145 150 155 160

Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly Asp Pro Ser Ala Gly Asp Met Arg Ala  
 165 170 175

Ala Asn Leu Trp Pro Ser Pro Leu Met Ile Lys Arg Ser Lys Lys Asn  
 180 185 190

Ser Leu Ala Leu Ser Leu Thr Ala Asp Gln Met Val Ser Ala Leu Leu  
 195 200 205

Asp Ala Glu Pro Pro Ile Leu Tyr Ser Glu Tyr Asp Pro Thr Arg Pro  
 210 215 220

Phe Ser Glu Ala Ser Met Met Gly Leu Leu Thr Asn Leu Ala Asp Arg  
 225 230 235 240

Glu Leu Val His Met Ile Asn Trp Ala Lys Arg Val Pro Gly Phe Val  
 245 250 255

Asp Leu Thr Leu His Asp Gln Val His Leu Leu Glu Cys Ala Trp Leu  
 260 265 270

Glu Ile Leu Met Ile Gly Leu Val Trp Arg Ser Met Glu His Pro Val  
 275 280 285

Lys Leu Leu Phe Ala Pro Asn Leu Leu Leu Asp Arg Asn Gln Gly Lys  
 290 295 300

Cys Val Glu Gly Met Val Glu Ile Phe Asp Met Leu Leu Ala Thr Ser  
 305 310 315 320

Ser Arg Phe Arg Met Met Asn Leu Gln Gly Glu Glu Phe Val Cys Leu  
 325 330 335

Lys Ser Ile Ile Leu Leu Asn Ser Gly Val Tyr Thr Phe Leu Ser Ser  
 340 345 350

Thr Leu Lys Ser Leu Glu Glu Lys Asp His Ile His Arg Val Leu Asp  
 355 360 365

Lys Ile Thr Asp Thr Leu Ile His Leu Met Ala Lys Ala Gly Leu Thr  
 370 375 380

Leu Gln Gln Gln His Gln Arg Leu Ala Gln Leu Leu Leu Ile Leu Ser

385 390 395 400

His Ile Arg His Met Ser Asn Lys Gly Met Glu His Leu Tyr Ser Met  
 405 410 415

Lys Cys Lys Asn Val Val Pro Leu Tyr Asp Leu Leu Leu Glu Met Leu  
 420 425 430

Asp Ala His Arg Leu His Ala Pro Thr Ser Arg Gly Gly Ala Ser Val  
 435 440 445

Glu Glu Thr Asp Gln Ser His Leu Ala Thr Ala Gly Ser Thr Ser Ser  
 450 455 460

His Ser Leu Gln Lys Tyr Tyr Ile Thr Gly Glu Ala Glu Gly Phe Pro  
 465 470 475 480

Ala Thr Val

<210> 8

<211> 277

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Poplar M67 protein

<400> 8

Met Val Gly Ser Leu Gly Val Arg Lys Gly Ala Trp Thr Glu Glu Glu  
 1 5 10 15

Asp Ile Leu Leu Arg Lys Cys Val Glu Lys Tyr Gly Glu Gly Arg Trp  
 20 25 30

His Glu Val Pro Ser Arg Ala Gly Leu Asn Arg Cys Arg Lys Ser Cys  
 35 40 45

Arg Met Arg Trp Leu Asn Tyr Leu Lys Pro Asn Val Lys Arg Gly Gln  
 50 55 60

Phe Ser Val Asp Glu Val Asp Leu Ile Ile Arg Leu His Lys Leu Leu  
 65 70 75 80

Gly Asn Arg Trp Ser Leu Ile Ala Gly Arg Leu Ser Gly Arg Thr Ala  
85 90 95

Asn Asp Val Lys Asn Tyr Trp Asn Ser Asn Gln Arg Lys Lys Val Ile  
100 105 110

Ser Ser Thr Asp Glu Val Arg Ser Lys Pro Glu Ala Lys Ser Ile Thr  
115 120 125

Arg Asp Asn Ile Ile Lys Pro Gln Pro Trp Lys Phe Arg Ser Leu Phe  
130 135 140

Trp Leu Arg Gly Lys Ser Thr Pro Leu Ile Asn Val Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Tyr Gly Asn Asp Leu Cys Lys Ser Cys Tyr Ser Thr Val Ser Pro Pro  
165 170 175

Ser Asp Ile Asn Glu Val Glu Ser Leu Trp Trp Glu Ser Ser Leu Asp  
180 185 190

Asp Lys Glu Ile Asn Gln Thr Ile Asn Ser Ser Cys Leu Gly Ser Val  
195 200 205

Ser Ala Ala Ala Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Ser Glu Ser His Phe  
210 215 220

Val Lys Asn Asn Ala Pro Gly Gly Ile Lys Thr Gly Asp Val Phe Tyr  
225 230 235 240

Glu Gln Gly Gln Asn Cys Trp Ser Asp Ile Ser Leu Asp Ala Asp Leu  
245 250 255

Trp Asn Leu Ile Asn Thr Glu Leu Asp Gln Gln Gln Pro Glu Gly Leu  
260 265 270

Gln Ser Ile Met Leu  
275

<210> 9  
<211> 269  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> OlexA-46 promoter  
<400> 9

ttgcatgcc a gcttgggctg caggctcgagg ctaaaaaact aatcgatta tcatccctc 60  
gacgtactgt acatataacc actggtttta tatacagcag tactgtacat ataaccactg 120  
gttttatata cagcagtcga cgtactgtac atataaccac tggttttata tacagcagta 180

ctgtacatat aaccactggt tttatataca gcagtcgagg taagattaga tatggatag 240  
tatatggata tgtatatggt ggtaatgcc 269

<210> 10  
<211> 834  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Poplar M67 cDNA

<400> 10  
atggtaggct cattaggagt aaggaaaggt gcatggacgg aggaggaaga tatacttcta 60  
aggaagtgcg tcgagaaata tggatgaagga agatggcatg aagttccttc cagagcaggc 120  
ttgaatcgat gcaggaaaag ctgcagaatg aggtgggtga attatcttaa gccaaatgtc 180

aagagaggac agttttcggg ggacgaagtg gacttgatta tcagactaca caagttgctt 240  
ggcaataggt ggtcattgat agctggtaga ctttcaggaa gaacagcgaa tgatgtcaag 300  
aattattgga actcaaacca gcgtaagaag gtgatttcta gcactgatga agttcgatca 360  
aaaccagaag caaatcaat cacaagagac aacataataa agcctcaacc ttggaagttc 420  
agaagtttat tctggttaag aggaaaaagt actccactta ttaatgttgg taattctcaa 480  
tatgggaacg atctttgtaa gtcatgttat tcaacagtat cgccaccttc cgacattaat 540  
gaagttgaaa gtttatggtg ggaaagctcg ttagatgaca aagaattaa tcaaacgatc 600

aacagcagtt gtctgggttc tgtttcagca gcagcagcag cagcttacc agagtccagc 660  
gaaagtcatt ttgtaaagaa caacgacca ggagggataa aaactgggga cgtgttctat 720  
gaacaaggac aaaattgttg gactgacatt tctttgatg cagacctttg gaatctaate 780  
aatacagaac tagatcaaca acaacctgaa ggacttcagt ctataatggt gtaa 834

<210> 11  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> FLAG tag

<400> 11  
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys

1                    5

<210>    12

<211

>    1452

<212>    DNA

<213>    Artificial Sequence

<220><223>    XVE cDNA

<400>    12

atgaaagcgt taacggccag gcaacaagag gtgtttgata tcatacctga tcacatcagc            60

cagacaggta tgccgccgac gcgtgctgaa atcgcgcagc gtttggggtt cgttcccca            120

aacgcggctg aagaacatct gaaggcctg gcacgcaaag gcgtattga aattgtttcc            180

ggcgcatac gcgggattcg tctgttgca gaagaggaag aagggttgc gctggtaggt            240

cgtgtggctg ccggtgaacc gtcgagcgc cccccaccg atgtcagcct gggggacgag            300

ctccacttag acggcgagga cgtggcgatg gcgcatgcc acgcgctaga cgatttcgat            360

ctggacatgt tgggggacgg ggattccccg ggtccgggat ttacccccca cgactccgcc            420

ccctacggcg ctctggatat ggccgacttc gagtttgagc agatgtttac cgatgcctt            480

ggaattgacg agtacgggtg ggatccgtct gctggagaca tgagagctgc caacctttgg            540

ccaagcccgc teatgatcaa acgctctaag aagaacagcc tggccttgc cctgacggcc            600

gaccagatgg tcagtgcctt gttggatgct gagccccca tactctattc cgagtatgat            660

cctaccagac ccttcagtga agcttcgatg atgggcttac tgaccaacct ggcagacagg            720

gagctggttc acatgatcaa ctgggcgaag aggggtgccag gctttgtgga ttgaccctc            780

catgatcagg tccaccttct agaatgtgcc tgctagaga tcctgatgat tggctctgctc            840

tggcgtcca tggagcacc agtgaagcta ctgtttgctc ctaacttget cttggacagg            900

aaccagggaa aatgtgtaga gggcatggtg gagatcttcg acatgctgct ggctacatca            960

tctcggttcc gcatgatgaa tctgcaggga gaggagtgtg tgtgcctcaa atctattatt            1020

ttgcttaatt ctggagtgta cacatttctg tccagcacc tgaagtctct ggaagagaag            1080

gaccatatcc accgagtctt ggacaagatc acagacactt tgatccacct gatggccaag            1140

gcaggcctga cctgcagca gcagcaccag cggctggccc agctcctcct catcctctcc            1200

cacatcaggc acatgagtaa caaaggcatg gagcatctgt acagcatgaa gtgcaagaac            1260

gtggtgcccc tctatgacct gctgctggag atgctggacg cccaccgcct acatgcgccc            1320

actagccgtg gaggggcatc cgtggaggag acggaccaaa gccacttggc cactgcgggc            1380

tctacttcat cgcattcctt gcaaaagtat tacatcacgg gggaggcaga gggtttccct            1440

gccacagtct ga

1452