

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0052964 (43) 공개일자 2016년05월13일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/54 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)	(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)	
(21) 출원번호 10-2014-0148601	(72) 발명자 이상원 경기 수원시 영통구 영통로290번길 25, 504동 203호 (영통동, 신나무실주공아파트)	
(22) 출원일자 2014년10월29일 심사청구일자 2014년10월29일	박종찬 부산 부산진구 복지로 70, 206동 304호 (개금동, 현대아이아파트)	
	안진홍 경기 용인시 기흥구 탑실로 152, 210동 1703호 (공세동, 탑실마을대주피오레2단지)	
	(74) 대리인 손민	

전체 청구항 수 : 총 19 항

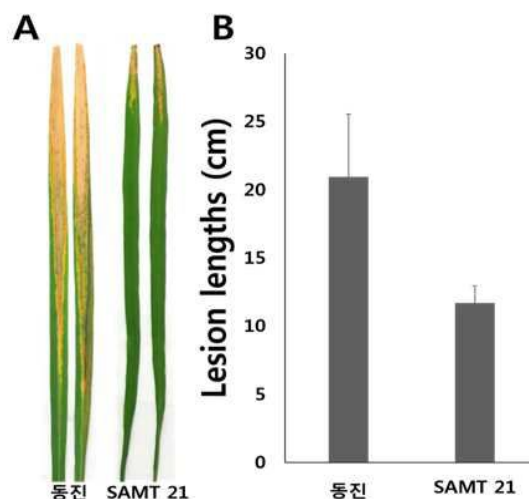
(54) 발명의 명칭 **흰잎 마름병 저항성 메틸전이효소 및 이를 이용한 형질 전환 식물체**

(57) 요약

본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 OC_0s11g15300 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체, 상기 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터 및 상기 식물 형질 전환체의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 상기 OC_0s11g15300 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법에 관한 것이다.

본 발명은 벼에 내재적으로 존재하며 흰잎 마름병에 대한 저항성 유전자, OC_0s11g15300의 발현 조절 부위에 발현 유도 서열을 삽입함으로써, 흰잎 마름병에 대해 강력한 저항성을 갖는 형질전환 벼에 대한 것으로, 본 발명의 형질전환 벼를 이용하면 병 저항성을 통해 농약사용 절감, 생산성 향상 및 안전한 농산물 공급이 가능하게 되어 널리 이용될 수 있다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ009110
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21
연구과제명	벼 메틸전이효소 유전자 연구를 통한 다양한 스트레스 저항성 유전자 발굴 및 활용
기 여 율	1/2
주관기관	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2012.07.01 ~ 2014.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	PJ008098
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21_GM작물실용화
연구과제명	벼 저항성 관련 non-RD Kinase 유전자 발굴 및 활용: nRDA41과 nRDK08
기 여 율	1/2
주관기관	경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 OC_0s11g15300 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 OC_0s11g15300 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 OC_0s11g15300 유전자는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 메틸전이효소로 코딩되는 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 식물은 벼 (*Oryza sp.*)인 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 벼 (*Oryza sp.*)는 동진벼인 식물 형질 전환체.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 활성 강화는 OC_0s11g15300 유전자의 발현 조절 부위에 발현 유도 서열 또는 프로모터를 삽입하여 이루어지는 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 발현 유도 서열은 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 식물 형질 전환체는 흰잎 마름병에 대한 저항성을 갖는 것인, 식물 형질 전환체.

청구항 9

메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 OC_0s11g15300 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 OC_0s11g15300 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것인, 재조합 벡터.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 OC_0s11g15300 유전자는 서열번호 3의 아미노산 서열을 포함하는 메틸전이효소로 코딩되는 것인, 재조합 벡터.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 발현 유도 서열은 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것인, 재조합 벡터.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 식물은 벼 (*Oryza sp.*)인 것인, 재조합 벡터.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 병 저항성은 흰잎 마름병에 대한 저항성인 것인, 재조합 벡터.

청구항 15

(a) 제9항 내지 제14항 중 어느 한 항의 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움으로 식물을 감염시키는 단계; 및
(b) 상기 (a) 단계에서 감염된 식물의 세포를 캘러스(callus)화하여 형질전환된 식물의 세포를 수득하는 단계를 포함하는,

병 저항성이 증진된 식물 형질 전환체의 제조방법.

청구항 16

제15항에 있어서, (c) 상기 (b) 단계에서 제조한 캘러스를 뿌리 및 성체로 분화 유도하는 단계를 추가로 포함하는, 제조방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 식물은 벼 (*Oryza sp.*)인 것인, 제조방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 병 저항성은 흰잎 마름병에 대한 저항성인 것인, 제조방법.

청구항 19

메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 OC_0s11g15300 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 OC_0s11g15300 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체, 상기 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터 및 상기 식물 형질 전환체의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 상기 OC_0s11g15300 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 벼 흰잎마름병은 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 에 의해서 발생하는 세균성 도관병으로, 발병시기는 7월 초~수확기이나 주로 7월 상순~8월 중순에 발병한다. 중간 기주식물인 줄풀 및 겨풀 등의 땅속줄기 또는 뿌리주위나 병든 벼짚 및 벼 그루터기에서 세균의 월동이 가능하다. 세균이 편모(鞭毛)에 의해 물을 따라 전염하고 벼잎의 물구멍과 공기구멍 부위 및 절단된 뿌리로 침입한다. 병 발생은 해마다 발생이 많은 상습발생지 위주로 발생하나 침관수지역이 아닌 지역에서도 발생이 많다.
- [0003] 보통 출수기 전후에 나타나나 상습발생지나 다발생 발생지에는 본답 초기에 발병하며, 드물게는 묘판에서도 발병된다. 국내에서 최초 발병보고는 1930년 전라남도 해남군에서 처음 발견된 이래 1960년까지 남부 일부 지역에 제한적인 발생을 보이다 이병성 품종인 금남풍의 재배 확대로 전국적인 발생을 나타내었으며, 이후 다수계 품종 재배에 의한 밀양 23호에 의해 피해가 확대되어 재배기간 중 후기에 발생하는 잎에서의 발병 뿐만 아니라 이앙 후 분얼기까지 주 전체가 발생하는 금성형 증상을 보여 벼의 3대 병해의 하나로 간주된다.
- [0004] 벼 흰잎마름병균은 그람음성세균으로 분류되고 벼의 세균성 위조병을 유발하는 식물병원세균으로 세계적으로 널리 분포하여 벼에 큰 피해를 주지만, 병원균이 벼의 도관 내에서 증식하므로 약제방제 효과는 매우 낮으며, 현재까지 이 병에 특이적인 살균제 또한 없는 실정이다.
- [0005] 또한, 기존의 작물에 대한 저항성 부여방법은 외래 유전자의 도입을 통해 식물체로 하여금 새로운 형질을 부여하는 기술이 대다수였다.
- [0006] 한편, 동진벼는 내병, 양질, 다수성 신품종육성을 목표로 1975년에 농촌진흥청에서 금남풍과 낙동벼 그리고 사도미노리를 교배하여 개발된 품종으로, 병해 저항성의 경우 줄무늬잎마름병에 강하고, 도열병에는 중간 정도의 저항성을 가지며, 흰잎마름병과 기타 병충해에는 약한 편이다. 이에, 동진벼의 흰잎마름병과 도열병에 대한 저항성 연구와 개량된 품종에 대한 육성 전략이 요구되고 있다.
- [0007] 이에 본 발명자들은 아직 극복되지 못한 벼 흰잎마름병에 대한 저항성 유전자를 동정하기 위해 예의 연구 노력한 결과, 천연 벼 동진의 보유 유전자 중 흰잎마름병에 저항성을 부여하는 메틸전이효소 유전자(OC_0s11g15300)를 동정해내어, 이를 활성화시킨 형질전환체가 흰잎마름병에 저항성을 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 하나의 목적은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 OC_0s11g15300 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체를 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 OC_0s11g15300 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 상기 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움으로 식물을 감염시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 감염된 식물의 세포를 캘러스(callus)화하여 형질전환된 식물의 세포를 수득하는 단계를 포함하는, 병 저항성이 증진된 식물 형질 전환체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 OC_0s11g15300 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 OC_0s11g15300 유전자의 활성이 강화된, 식물 형질 전환체를 제공한다.

[0013] 본 발명에서는 메틸전이효소인 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 OC_0s11g15300 유전자의 활성이 강화되도록, OC_0s11g15300의 발현 조절 부위에 발현 유도 서열을 삽입함으로써, 해당 유전자를 발현하여 흰 잎 마름병에 대해 저항성을 갖춘 형질전환 벼를 제조하였다.

[0014] 보다 상세하게는 본 발명자들은 아그로박테리움(Agrobacterium)을 이용한 형질전환 방법을 통해 만들어진 10만 개통의 벼 돌연변이 집단에서 흰 잎 마름병에 저항성이 있는 식물 형질 전환체를 관찰하였다. 상기 식물 형질 전환체는 아그로박테리움(Agrobacterium)에 의해 유전자를 발현시키는 발현 유도 서열을 포함하는 T-DNA 가 genome 상에 삽입되어 삽입된 지역의 유전자 기능이 활성화된 식물체로, T-DNA의 삽입 위치는 genome DNA PCR과 염기서열 분석을 통해 확인할 수 있으며, 데이터 베이스에서 유전자 locus id를 찾을 수 있다.

[0015] 본 발명에서 용어 “메틸전이효소”는 메틸기전이를 촉매하는 효소의 총칭으로, 메틸기전달효소의 일종으로 기질인 아미노기, 히드록시기, 티올기를 메틸화하여 메틸화효소라고 부르는 경우도 있다

[0016] 본 발명에서 용어, “OC_0s11g15300”는 Oryza sativa 11번째 유전체 (chromosome)에 존재하는 유전자로, 이의 발현물은 단백질 메틸전이효소의 일종이다. 상기 OC_0s11g15300 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 가지며, 상기 염기서열은 서열번호 3의 아미노산 서열로 코딩된다.

[0017] 본 발명에서 상기 식물 형질 전환체 제조에 사용되는 OC_0s11g15300 유전자는 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 유전자 일 수 있으며, 바람직하게는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 유전자 일 수 있으며, 또는 서열번호 3의 아미노산 서열로 코딩되는 유전자 일 수 있다.

[0018] 상기 OC_0s11g15300 (TIGR, 0s11g0259700 (RAP-DB))의 genome DNA 크기는 2000 bp (서열번호 1)이며 대표 coding sequence (OC_0s11g15300.1)의 크기는 1167 bp (서열번호 2)로 5개의 exon과 4개의 intron으로 구성되며, 388 개의 아미노산으로 번역되어 단백질 (서열번호 3)이 만들어진다. 이 단백질은 plant methyltransferase domain (Methyltransf_7)을 암호화 한다 (도 1B).

[0019] 상기 OC_0s11g15300 유전자는 벼에 내재적으로 존재하는 유전자로, 본 발명에서 용어, "내재적"이란 생물이 천연의 상태로 가지고 있는 것을 의미하는데, 본 발명에서는 식물, 바람직하게는 벼(Oryza sp.) 유전체 (chromosome)가 천연적으로 가지고 있는 유전자를 표시할 때 사용한다.

[0020] 본 발명에서 용어, "활성 강화"는 특정 유전자의 활성을 강화시키는 것을 의미하고, 용어 “활성화”와 혼용하여 사용될 수 있다. 또한 불활성화된 유전자를 활성화시키거나 활성이 낮은 유전자의 활성을 높이는 것도 포함한다. 1) 해당하는 유전자를 1 카피 이상 도입, 2) 해당하는 유전자의 발현 조절 부위에 발현을 유도하는 서열을 삽입, 3) 활성이 강화된 형태로 변형시키는 방법으로 강화, 또는 4) 이의 조합에 의해 활성이 강화되도록 변형시킬 수 있다. 본 발명에서는 바람직하게는 OC_0s11g15300의 발현 조절 부위에 발현을 유도하는 서열 또는 프로모터(promoter)를 삽입할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 4로 기재되는 발현 유도 서열을 포함하는 서열을 삽입할 수 있다.

[0021] 본 발명에서 용어, "활성이 낮은 유전자"는 DNA, 즉 유전자 상으로는 존재하나 RNA로 전사(transcription)되는 비율이 낮거나, 단백질로 번역(translation) 되는 비율이 낮아서 본연의 기능을 발휘하지 못하는 것을 의미하고, 본 발명에서는 벼가 내재적으로 가지고 있는 유전자가 전사 또는 번역이 되는 비율이 낮아서 그 기능을 제대로 발현하지 못하는 것을 의미하고, 특히, OC_0s11g15300 유전자가 그 기능을 제대로 발현하지 못하는 것을 의미한다.

- [0022] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 OC_0s11g15300 유전자의 발현 조절 부위에 발현 유도 서열(서열번호 4)을 삽입함으로써, OC_0s11g15300 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인하였다(도 4). 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서 상기 OC_0s11g15300 유전자의 활성이 강화되도록 형질전환된 식물 형질 전환체가 흰잎 마름병에 대해 병 저항성을 가지는 것을 확인하였다(도 5).
- [0023] 본 발명에서 용어, "발현 유도 서열"은 유전자의 발현 조절 부위에 존재할 때 발현을 촉진하는 기능을 하는 서열을 제한없이 포함하며, 전사인자 결합 부위, 인핸서(enhancer), 조효소 결합 부위(co-factor binding region) 등을 포함한다. 본 발명에서 상기 유전자의 발현 조절 부위에 삽입되는 서열은 서열번호 4로 기재되는 발현 유도 서열을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0024] 본 발명에서 용어, "형질전환"은 DNA 염기서열 상의 삽입, 결실 또는 대체 등의 변이를 통해 특정 형질이 발생하거나 사라지거나 조절되는 모든 행위를 의미하며, 특히 본 발명에서는 외부로부터 주어진 DNA에 의하여 생물의 유전적인 성질이 변하는 것을 의미한다. 본 발명에서 용어, "형질 전환체"는 형질전환으로 인해 생성된 형질 전환 식물을 의미하며, 유전자 재조합 기술을 이용하여 특정 유전자의 변형 또는 활성의 변이가 유발되어 생성된 유전자 재조합체를 포함한다.
- [0025] 본 발명에서 용어, "식물 형질 전환체"는 형질전환의 대상이 될 수 있는 모든 식물을 포함하며, 특히, OC_0s11g15300 유전자 또는 이에 해당하는 유전자가 불활성되거나 활성이 낮은 식물은 모두 제한없이 포함한다. 바람직하게는 상기 식물 형질 전환체는 벼(*Oryza sp.*)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 동진벼일 수 있다.
- [0026] 본 발명에서 상기 식물 형질 전환체는 흰잎 마름병에 대한 저항성을 가질 수 있다.
- [0027] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는 동진벼에 상기 내재적 유전자인 OC_0s11g15300의 발현 조절 부위에 서열번호 4의 발현 유도 서열을 삽입하는 형질전환을 통하여 OC_0s11g15300에 해당하는 유전자의 활성이 강화되는 형질전환체를 제조하였으며, 이를 SAMT 22이라고 명명하였다.
- [0028] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 OC_0s11g15300 유전자의 활성을 강화시키는 발현 유도 서열을 포함하는, 식물의 병 저항성 증진용 재조합 벡터를 제공한다.
- [0029] 상기 메틸전이효소, OC_0s11g15300 및 발현 유도 서열은 상기 설명한 바와 같다.
- [0030] 본 발명에서 용어, "병 저항성"은 각종 질병에 대해 발병이 잘 일어나지 않거나, 발병되더라도 병 진행의 속도가 현저히 느리거나, 회복이 되는 능력이 뛰어난 것을 의미한다. 본 발명에서 병 저항성은 흰잎 마름병에 대한 저항성을 의미할 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 용어, "재조합 벡터"는 특정 서열이 변이, 삽입 또는 제거되는 유전자 재조합 과정을 거친 벡터를 의미하며, 바람직하게는 발현 유도 서열이 삽입된 벡터를 의미하고, 더욱 바람직하게는 해당 발현 유도 서열을 OC_0s11g15300의 발현 조절 부위에 삽입할 수 있는 기능을 하는 재조합 벡터를 의미한다.
- [0032] 상기 재조합 벡터는 OC_0s11g15300 유전자가 발현될 수 있도록, 발현조절 서열과 기능적으로 연결되어 있다. 예를 들어, 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 또한, 벡터는 선택성 마커를 포함할 수 있으며, 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다. 본 발명의 벡터는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에서는, OC_0s11g15300 유전자의 발현 조절 부위에 서열번호 4의 발현 유도 서열 포함하는 재조합 벡터를 제조하였으며, 이를 아그로박테리움을 통해 벼 세포에 도입하여, 내재적 유전자였던 OC_0s11g15300 유전자의 발현을 증가하였다.
- [0034] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 (a) 상기 재조합 벡터가 도입된 아그로박테리움으로 식물을 감염시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계에서 감염된 식물의 세포를 캘러스(callus)화하여 형질전환된 식물의 세포를 수득하는 단계를 포함하는, 병 저항성이 증진된 식물 형질 전환체의 제조방법을 제공한다.
- [0035] 본 발명에서 용어, "아그로박테리움"은 그람양성의 세균으로, 식물의 뿌리나 줄기의 상처를 통해 식물세포에 감

염되어, 자신이 가지고 있는 유전자를 식물 세포의 유전체에 삽입하여 식물세포의 형질전환을 일으키는 암종세균의 일종이다. 본 발명에서 상기 아그로박테리움은 바람직하게는 아그로박테리움 투메파키엔스(Agrobacterium tumefaciens)일 수 있다.

[0036] 본 발명에서 용어, "캘러스(callus)"란, 식물에 상처가 났을 때 생기는 분화되지 않은 부정형의 세포덩어리로 즉, 미분화세포를 의미하며, 특히, 본 발명에서는 식물의 잘린 부위에 아그로박테리움 등 형질전환용 암종세균을 감염시켰을 때 감염된 세포가 미분화상태로 상처부위에 덩어리진 것을 의미한다. 즉, 본 발명에서는 암종세균에 감염되어 형질전환된 세포만이 암종 덩어리를 생성하는 특징을 이용하여 형질전환된 미분화세포를 얻을 수 있는데 이것이 캘러스 형태로 생성되게 된다.

[0037] 상기 병 저항성이 증진된 형질전환체의 제조방법은, 바람직하게는 수득된 캘러스를 뿌리 및 성체로 분화시키는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 캘러스는 상기 설명한대로 미분화된 상태의 세포 덩어리에 불과하기 때문에, 이를 온전한 종자로 수득하기 위해서는 뿌리 및 성체로 분화하는 것을 유도하는 것이 필요할 수 있다.

[0038] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 수득된 캘러스를 루트-인덕션 배지에서 배양하여 뿌리 및 성체로 분화하는 것을 유도하였다(실시예 2).

[0039] 또 하나의 양태로, 본 발명은 메틸전이효소를 코딩하는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 OC_0s11g15300 유전자의 활성을 강화시키는 단계를 포함하는, 식물의 병 저항성의 증진방법을 제공한다.

[0040] 본 발명의 OC_0s11g15300 유전자, 활성 강화 및 병 저항성 등은 상기 설명한 바와 같다.

[0041] 본 발명에서, 상기 용어 "증진"은 본 발명에서 대조군 벼와 비교하여 적어도 5% 또는 10%, 바람직하게는 적어도 20% 또는 40%, 더욱 바람직하게는 50%, 60%, 70% 또는 80% 이상의 병 저항성을 의미하며, 벼가 원래 가지고 있는 병 저항성에 비해 상기 유전자를 도입하여 병 저항성이 증가되는 것을 의미한다.

발명의 효과

[0042] 본 발명은 벼에 내재적으로 존재하는 흰잎 마름병에 대한 저항성 유전자, OC_0s11g15300의 발현 조절 부위에 발현 유도 서열을 삽입함으로써, 흰잎 마름병에 대해 강력한 저항성을 갖는 형질전환 벼에 대한 것으로, 본 발명의 형질전환 벼를 이용하면 병 저항성을 통해 농약사용 절감, 생산성 향상 및 안전한 농산물 공급이 가능하게 되어 널리 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 흰잎 마름병에 대한 저항성과 관련된 유전자로 선별된 OC_0s11g15300의 구조에 대한 개요도로, 도 1의 A는 유전자 상의 구조를 나타내며, 도 1의 B는 유전자가 발현된 단백질의 구조를 나타낸다. 이에 표시된 Methyltransf_7은 메틸전이효소 활성 부분 (methyltransferase domain)을 의미한다.

도 2는 OC_0s11g15300의 발현을 조절하는 부위에 T-DNA를 포함한 유전자 발현 유도 서열이 삽입된 SAMT 22 유전자 변형 벼의 게놈 DNA의 일부분을 나타내는 구조도이다.

도 3은 SAMT 22 유전자 변형 벼에서 T-DNA 삽입위치를 PCR로 확인한 도면이다.

도 4는 SAMT 22 유전자 변형 벼에서 OC_0s11g15300의 발현을 확인하는 RT-PCR 결과를 보여주는 도면이다.

도 5는 SAMT 22 유전자 변형 벼의 흰잎 마름병에 대한 저항성을 실험한 결과를 보여주는 도면으로, 도 5의 A는 천연형 벼 및 SAMT 22 유전자 변형 벼의 흰잎 마름병균을 가위 접종법으로 접종한 결과를 보여주는 사진이고, 도 5의 B는 이의 감염에 의해 파괴된 벼 잎의 길이를 측정하여 평균 낸 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0045] **실시예 1. Bioinformatics를 통한 형질전환 타겟 유전자 선별**

[0046] 동진벼의 유전체가 보유한 식물체의 질환 저항성과 밀접한 관련이 있을 것으로 예측되는 메틸전이효소 230개를 동정하였다. 이 중, microarray data를 바탕으로 MeV v2.0 프로그램을 이용하여 흰잎 마름병에 저항성을 가질 확률이 높은 유전자를 108개 선별하였다. 선별된 유전자에 대하여 형질전환체를 제조하여 병 저항성을 갖는 유전자를 동정해 내는 과정에서, 본 발명의 OC_0s11g15300이 흰잎 마름병에 저항성을 갖는 유전자로 선별되었다.

[0047] **실시예 2. 발현 유도체 삽입된 형질전환 벼 제조**

[0048] **2-1. 벼 형질전환용 재조합 벡터 제조**

[0049] 타겟 유전자의 발현 조절 부위의 염기서열에 발현 유도 서열을 삽입하기 위해 벡터를 제작하였다. 먼저, 유전체 삽입을 위한 T-DNA, 삽입위치의 왼쪽 유전자 서열을 확인하기 위한 N-GUS, 서열번호 4의 유전자의 발현 유도 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제조하기 위한, 담배 잎 모자이크바이러스 35S 프로모터 유래 DNA, 삽입위치의 오른쪽 유전자 서열을 확인하기 위한 L-0.5/1.5를 가지는 벡터를 제작하였다. 삽입된 유전체로부터 타겟 유전자의 확인과 증폭을 위한 프라이머는 아래와 같다.

[0050] Enhancer-F (정방향, 서열번호 9)

[0051] 5' - gatccccaacatggtggagc - 3'

[0052] Enhancer-R (역방향, 서열번호 10)

[0053] 5' - ggatctagatatcacatcaa - 3'

[0054] PCR 증폭 조건은 처음 DNA의 열변성을 위하여 94℃에서 3분간 1 cycle, 그리고 94℃ 1분, 58℃에서 1분, 72℃에서 2분간으로 총 35 cycle을 실시하였으며, 최종 DNA 합성은 7분으로 하였다.

[0055] 해당 증폭된 PCR 산물을 1.0%의 아가로스겔(agarose gel)로 전기영동 한 후 EtBr(ethidium bromide) 용액에 염색하여 UV lamp하에서 염기 크기에 해당하는 band를 절단하여 아가로스겔(agarose gel) 정제법으로 정제하였다.

[0056] 추출한 PCR 산물을 상기 제한효소 BamH I /Kpn I 으로 절단하였다. 또한, 재조합 벡터인 pGA2772 벡터를 제한효소 BamH I /Kpn I 로 절단하여, 절단된 벡터를 상기 아가로스겔 정제법으로 정제하였다. 상기 PCR 산물에 의한 DNA 단편을 절단된 재조합 벡터에 삽입하여, 조절부위 발현 유도체 서열 (Enhance sequence, 서열번호 4)이 삽입된 재조합 벡터 pGA2772 vector를 제조하였다.

[0057] **2-2. 형질전환체 제조**

[0058] 상기 제조된 벡터를 전기충격 방법(electroporation)을 이용하여 아그로박테리움 투메파키엔스(Agrobacterium tumefaciens)에 도입하였다. 배양실에서 무균상태로 자란 동진벼에 리프 디스크(leaf disc)법으로 형질전환하였다. 구체적으로는 벼잎을 대략 5 x 5 mm 크기로 잘라서 200 μ l의 아그로박테리움이 포함된 MSO 액체 배지(MS 염 4.3g, 수크로스 30g/L, pH 5.6 내지 5.8)에 넣었다가 암조건에서 2 내지 3일 동안 배양하고, 배양된 잎 절편을 캘러스-슈트(callus-shoot) 유도 배지(MSO배지에 100 μ g NAA, 1mg BA, 500 μ g 세포탁심, 1 mg 포스포노트리신(phosphinothricin), 0.7% 피토 한천(phyto agar), pH 5.6)으로 옮기고, 새로운 배지로 옮겨 주었다. 유도된 발아는 1.5 내지 2 cm 정도 자라면 루트-인덕션 배지(MSO배지에 250 μ g 세포탁심, 10mg 포스포노트리신, 0.7% 피토 한천, pH 5.6)로 옮겨 주었다.

[0059] 발현 유도체가 삽입된 상기 유전자 형질전환 벼를 SAMT 22로 명명하였으며, 이의 유전자 구조는 도 2에 개시된 바와 같다. 구체적으로는, 동진 벼의 첫 번째 유도체에 존재하는 OC_0s11g15300의 발현 조절 부위로 예측되는

상류부분 (upstream region)에 T-DNA 서열 (서열번호 5)을 삽입하여, 도 2와 같은 유전체 구조를 가진 형질전환체를 제작하였다.

[0060] 2-3. 재조합 벡터의 벼 유전체 삽입위치 확인

[0061] T-DNA 삽입에 의해 만들어진 SAMT 22에 대한 inverse-PCR 및 염기 서열 분석을 통해 T-DNA가 삽입된 염색체를 분석하였다.

[0062] 상기 선발된 계통의 벼 종자를 MSO 배지에 28℃에서 10일간 배양하였다. 이렇게 배양한 개체들의 잎 100mg을 채취하여 액체질소를 이용하여 급냉각한 후 분쇄하였다. 분쇄된 잎에서 one step buffer (1M Tris (pH9.5) 5ml, 0.5M EDTA 1ml, KCl 3.73g을 넣고 물로 50ml을 맞춰 조제)을 이용하여 DNA를 추출하였다.

[0063] SAMT 22은 OC_0s11g15300 유전자의 발현조절 상류부분에 T-DNA가 삽입된 계통으로 T-DNA 삽입위치에서 앞뒤에서 만들어진 프라이머 (서열번호 6 및 서열번호 7)와 T-DNA 삽입서열 중 NGUS1 프라이머 (서열번호 8)를 이용하여 PCR로 유전형 분석을 하였다.

[0064] PCR 반응은 95℃에서 5분 후; 95℃에서 1분, 57℃에서 1분, 72℃에서 1분 을 38회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 7분을 진행하였다. PCR 산물은 agarose gel을 이용하여 전기영동으로 확인하였다(도 3). 이를 통해 유전형을 선발하였다.

[0065] 이에 사용된 프라이머 서열은 다음과 같다.

[0066] SAMT 22_F (서열번호 6)

[0067] 5' - GGAGGACACCCGTTTATAGAT - 3'

[0068] SAMT 22_R (서열번호 7)

[0069] 5' - CCACGGCATGAATCTTGTTT - 3'

[0070] NGUS1 (서열번호 8)

[0071] 5' - AACGCTGATCAATCCACAG - 3'

[0072] 실시예 3. 형질전환 벼의 유전자 활성 검증

[0073] OC_0s11g15300 유전자의 발현 조절 부위에 발현 유도체를 삽입한 형질전환 벼 (SAMT 22)에서 OC_0s11g15300 유전자 활성을 역전사 효소 PCR (RT-PCR, reverse transcriptase-PCR)로 확인 하였다.

[0074] 구체적으로는, 형질전환 벼 (SAMT 22)의 잎 0.1g에서 total RNA를 추출하였다. 이를 주형으로 하여 OC_0s11g15300의 발현을 확인할 수 있는 RNA 역전사용 프라이머와 역전사 효소 (reverse transcriptase DNA polymerase)를 이용하여 역전사 효소 PCR을 수행하였다.

[0075] 도3 에서 확인할 수 있듯이, 천연형 동진벼에 비하여 본 발명의 형질전환 벼에서는 유전자 OC_0s11g15300의 발현이 높아졌다는 것을 확인할 수 있었다.

[0076] RT-SAMT 22_F (정방향, 서열번호 11)

[0077] 5' - TGATCTTGAAGTTGGGCGTA - 3'

[0078] RT-SAMT 22_R (역방향, 서열번호 12)

[0079] 5' - ACACCCTTGTTGCAGTCTTA - 3'

[0080] **실시예 4. 형질전환 벼(SAMT 22)의 벼 흰잎 마름병에 대한 저항성 검정**

[0081] 상기 실시예 2에서 제조된 형질전환 벼가 흰잎 마름병에 대해 저항성을 보이는지 확인하기 위해, OC_Os11g15300 발현 조절부위에 발현 유도체가 삽입된 형질전환 벼인 SAMT 22과 대조군으로 천연형 동진벼를 6주간 생장시켜 흰잎 마름병을 유발하는 균주인 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (strain : PXO99Az)를 가위에 묻혀 접종한 2주 후 병증을 측정하였다 (도 5). 병증 측정은 접종한 부위로부터 감염되어 파괴된 상처 길이(Lesion Lengths)를 측정하여 천연형 동진벼와 비교하였다.

[0082] 도 5의 B에서 확인할 수 있듯이 SAMT 22 형질전환체는 평균 병증의 길이가 천연형 동진벼의 반 정도에 불과하여 (천연형 vs. SAMT 22 : 20.9cm vs. 11.5cm), 흰잎 마름병에 대한 강력한 저항성을 가짐을 확인할 수 있었다.

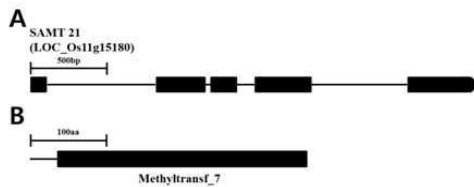
[0083] 이와 같은 결과를 통하여, 본 발명의 형질전환 벼 SAMT 22은 내재적 유전자 OC_Os11g15300를 활성화시킴으로써 흰잎 마름병에 대한 저항성을 가질 수 있음을 확인하였다.

[0084]

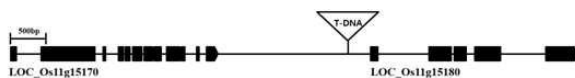
[0085] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

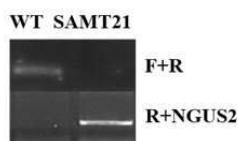
도면1



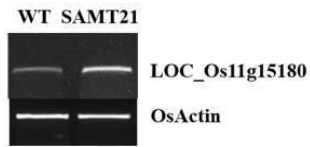
도면2



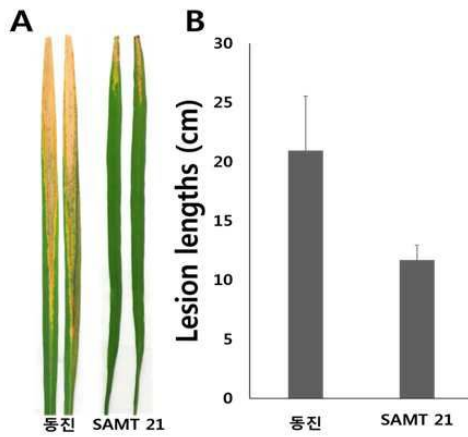
도면3



도면4



도면5



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Methyltransferase gene resistant to a bacterial blight, and the transgenic plant using the same

<130> KPA141028-KR

<160> 12

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 2000

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

```

attggtgtta tgctccacct tacacagtgc aaggtaggat caggatttct ttggaagccc      60
ttgtaggaaa tgaagatcga gcacgacctc cacatgatca aggggggatgg agacacaagc      120
tacgccagga actctagtac ccaagtttgt accaactaac ccttcgccc caattaaat        180

ttggcacatc ttatatatit ctttcgtttt actttcgctg aatcacatgc tataacatat      240
catgtgcact gagtaataat ttactcgtt ggtgtatgac cagtacacaa atacttgacg      300
agtacaggta tacaaaatat gttggaagtt atgaagtata cattgcattg gatgtggcaa      360
    
```

aatagtatatt cttcacaaatt tttttgcatg tgcatttgtt atttgtttat ggatttagcta	420
glaataacaa catttagact tgctcatgaa attaagaagt actagcctgt tcgatatcta	480
tgctcatgaa atttagtaat aacaacattt taatttctat gctcgtgcat gcatgtgtga	540
tagagaaaag ccatttctgc gactaaacat atggttgaga aggccatgaa aggagtattc	600
atggaactta aaccgcagtc aatggtcgtc gctgacctag gctgctctc tggtaaaaac	660
acacttctct ttatatctga gatgattgcc atgataagtg aagaaaacac aagcgacaat	720
aacatcagga agtgcctcat ggaggtccaa ttcttctca atgacctacc cagtaacgat	780
ttcaaccaca tttcaagtc tcttgggcag ttgagcaat caatagtga agatttgtct	840
cgcatagggc taaaacctcc tccacactat gttgccggcg tgccaggatc ctctacacc	900
aggctctttc ctgcaatag cgtccatata ttctattcat ccttcagcct tatgtggctc	960
tctcaggtat atcatattat tttttggatg aattctcgca tctcaagtag tagtgtgcat	1020
taccatattc tcatataaac aaaattttga tatttgaggt ttttatgatc tagacttgac	1080
tggctagcaa tggttgtttg gacagatccc agagcatctt gacagcacca tgaacaaagg	1140
caacatttat ataggggtga ctacaccgcc acttgtagcc aagctctatc ttgatcagtt	1200
cgagaaggac ttctctcgtt tcttcagtt caggtgcata gagcttgtgt ctgggtggcca	1260
gatggtgttg acatttcttg gaaggaaaag caatgacgtg gttcatgggg gtgggatgat	1320
gaacatttcc atcgagttgc ttccacaggc agtgcaaact cttgtagcag aggtatggct	1380
actgatgtgg tacaataatt ttgtgtaaat tactatagct tacaataat tatacctccc	1440
agtatgtttc tatggaccac aaaatcactt acattaaagg acaagattta ctgggagaat	1500
aaatatattc tgattcttca ttatcttaca caatagggtc gtgtggagaa ggagaagttg	1560
gactctttca acctgccatt ttatggccct tctgtggatg aactgaagca gctagtacaa	1620
caaagcgagc tgctcgacat cattgacatc caggcctttg aactgacttt tgateccata	1680
gacaaatcag agctgaagga aggcatcacc accgcaccag cgatacaaga caatgttcat	1740
gaggccaccg gccataacat cgctgcgggt ttaagagcgg tgatggagcc gctatttgca	1800
agccatttgc gggaatccat aatcgacgat ctcttcacgt tgtttgcatg taatgtcatc	1860
agacatcttg cgagtgcaga ggagatgagt agtgtgacag ccatttcatt gtcattacag	1920
gcaaagggtg caagggtgata gctcattggg tatcataccc atcttttcta tatagttgca	1980
acctatgcaa ttgctactac	2000
<210> 2	
<211> 1167	
<212> DNA	

<213> Oryza sativa

<400> 2

atgaagatcg agcacgacct ccacatgac aaggggatg gagacacaag ctacgccagg 60

aactctagta cccaaagaaa agccattctc gcgactaaac atatggttga gaaggccatg 120

aaaggagtat tcatggaact taaaccgcag tcaatggtcg tcgctgacct aggctgctcc 180

tctggtacaa acacacttct ctttatatct gagatgattg ccatgataag tgaagaaaac 240

acaagcgaca ataacatcag gaagtgcctc atggaggctc aattcttctt caatgaccta 300

cccagtaacg atttcaacca catcttcaag tctcttgggc agtttgagca atcaatagtg 360

caagattgtg ctgcatagg gctaaaacct cctccacact atgttgccgg cgtgccagga 420

tccttctaca ccaggctctt tccttgcaat agcgtccata tatttcattc atccttcagc 480

cttatgtggc tctctcagat cccagagcat ctgacagca ccatgaacaa aggcaacatt 540

tatatagggg tgactacacc gccacttgta gccaagctct atcttgatca gttcgagaag 600

gacttctctc ggttcttca gttaggtgc atagagcttg tgtctggtgg ccagatggtg 660

ttgacatttc ttggaaggaa aagcaatgac gtggttcattg ggggtgggat gatgaacatt 720

tccatcgagt tgctttcaca ggcagtgc aaactctttag cagagggtcg tgtggagaag 780

gagaagttgg actctttcaa cctgccattt tatggccctt ctgtggatga actgaagcag 840

ctagtacaac aaagcgagct gctcgacatc attgacatcc aggcctttga actgactttt 900

gatcccatag acaaatcaga gctgaaggaa ggcatcacca ccgcaccagc gatacaagac 960

aatgttcattg aggccaccgg ccataacatc gctgcgggtt taagagcggt gatggagccg 1020

ctatttgcaa gccatttcgg ggaatccata atcgacgac tcttcacgtt gtttgcatgt 1080

aatgtcatca gacatcttgc gagtgcagag gagatgagta gtgtgacagc catttcattg 1140

tcattacagg caaaggtggc aaggtga 1167

<210> 3

<211> 388

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 3

Met Lys Ile Glu His Asp Leu His Met Ile Lys Gly Asp Gly Asp Thr

1 5 10 15

Ser Tyr Ala Arg Asn Ser Ser Thr Gln Arg Lys Ala Ile Leu Ala Thr

20 25 30

Lys His Met Val Glu Lys Ala Met Lys Gly Val Phe Met Glu Leu Lys
 35 40 45
 Pro Gln Ser Met Val Val Ala Asp Leu Gly Cys Ser Ser Gly Thr Asn
 50 55 60
 Thr Leu Leu Phe Ile Ser Glu Met Ile Ala Met Ile Ser Glu Glu Asn
 65 70 75 80
 Thr Ser Asp Asn Asn Ile Arg Lys Cys Pro Met Glu Val Gln Phe Phe
 85 90 95
 Leu Asn Asp Leu Pro Ser Asn Asp Phe Asn His Ile Phe Lys Ser Leu
 100 105 110
 Gly Gln Phe Glu Gln Ser Ile Val Gln Asp Cys Ala Arg Ile Gly Leu
 115 120 125
 Lys Pro Pro Pro His Tyr Val Ala Gly Val Pro Gly Ser Phe Tyr Thr
 130 135 140
 Arg Leu Phe Pro Cys Asn Ser Val His Ile Phe His Ser Ser Phe Ser
 145 150 155 160
 Leu Met Trp Leu Ser Gln Ile Pro Glu His Leu Asp Ser Thr Met Asn
 165 170 175
 Lys Gly Asn Ile Tyr Ile Gly Val Thr Thr Pro Pro Leu Val Ala Lys
 180 185 190
 Leu Tyr Leu Asp Gln Phe Glu Lys Asp Phe Ser Arg Phe Leu Gln Phe
 195 200 205
 Arg Cys Ile Glu Leu Val Ser Gly Gly Gln Met Val Leu Thr Phe Leu
 210 215 220
 Gly Arg Lys Ser Asn Asp Val Val His Gly Gly Gly Met Met Asn Ile
 225 230 235 240
 Ser Ile Glu Leu Leu Ser Gln Ala Val Gln Thr Leu Val Ala Glu Gly
 245 250 255
 Arg Val Glu Lys Glu Lys Leu Asp Ser Phe Asn Leu Pro Phe Tyr Gly
 260 265 270
 Pro Ser Val Asp Glu Leu Lys Gln Leu Val Gln Gln Ser Glu Leu Leu
 275 280 285

Asp Ile Ile Asp Ile Gln Ala Phe Glu Leu Thr Phe Asp Pro Ile Asp
290 295 300

Lys Ser Glu Leu Lys Glu Gly Ile Thr Thr Ala Pro Ala Ile Gln Asp
305 310 315 320

Asn Val His Glu Ala Thr Gly His Asn Ile Ala Ala Gly Leu Arg Ala
325 330 335

Val Met Glu Pro Leu Phe Ala Ser His Phe Gly Glu Ser Ile Ile Asp
340 345 350

Asp Leu Phe Thr Leu Phe Ala Cys Asn Val Ile Arg His Leu Ala Ser
355 360 365

Ala Glu Glu Met Ser Ser Val Thr Ala Ile Ser Leu Ser Leu Gln Ala
370 375 380

Lys Val Ala Arg
385

<210> 4

<211> 1361

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> promoter

<400> 4

gatccccaac atggtggagc acgacactct cgtctactcc aagaatatca aagatacagt 60
ctcagaagac cagagggcta ttgagacttt tcaacaaagg gtaatatcgg gaaacctcct 120
cggattccat tgcccagcta tctgtcactt catcgaaagg acagtagaaa aggaagatgg 180
ctttacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggctatc gttcaagatg cctctaccga 240
cagtgggtccc aaagatggac cccacccac gaggaacatc gtggaaaaag aagacgttcc 300
aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctag atccccaaca tgggtggagca 360

cgacactctc gtctactcca agaatatcaa agatacagtc tcagaagacc agagggtctat 420
tgagactttt caacaaaggg taatatcggg aaacctctc ggattccatt gcccagctat 480
ctgtcacttc atcgaaagga cagtagaaaa ggaagatggc ttctacaaat gccatcattg 540
cgataaagga aaggctatcg ttcaagatgc ctctaccgac agtgggtccca aagatggacc 600
cccacccacg aggaacatcg tggaaaaaga agacgttcca accacgtctt caaagcaagt 660
ggattgatgt gatatttaga tccccaacat ggtggagcac gacactctcg tctactccaa 720

gaatatcaaa gatacagtct cagaagacca gagggctatt gagacttttc aacaaagggt	780
aatatcggga aacctcctcg gattccattg cccagctatc tgtcatttca tcgaaaggac	840
agtagaaaag gaagatggct tctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa aggctatcgt	900
tcaagatgcc tctaccgaca gtgggcccaa agatggaccc ccaccacga ggaacatcgt	960
ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg atatctagat	1020
ccccaatg gtggagcacg acactctcgt ctactccaag aatatcaaag atacagtctc	1080
agaagaccag agggctattg agacttttca acaaagggtg atatcgggaa acctcctcgg	1140
attccattgc ccagctatct gtcacttcat cgaaaggaca gtagaaaagg aagatggctt	1200
ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa ggctatcggt caagatgcct ctaccgacag	1260
tgggtccaaa gatggacccc caccacgag gaacatcgtg gaaaaagaag acgttccaac	1320
cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga tatctagatc c	1361
<210> 5	
<211> 8275	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> T-DNA	
<400> 5	
gtttaccgc caatatatcc tgtcaaacac ggatccgagg taccaggtac caggtaggtt	60
ccattcttac taccaggtg ctatTTTTT tgcTatgtgg ctaattacat gactaacttg	120
gggtgctaaa tcttacaggt tatatgcagg ttatatgcag gtccgggta ggtcagtcct	180
ttatgttacg tctgtagaa accccaacc gtgaaatcaa aaaactcgac ggcctgtggg	240
cattcagtct ggatcgcaa aactgtggaa ttgatcagcg ttggtgggaa agcgcgttac	300
aagaaagccg ggcaattgct gtgccaggca gttttaacga tcagttcgcc gatgcagata	360
ttcgtaatta tgcgggcaac gtctggatc agcgcgaagt ctttataccg aaaggttggg	420
caggccagcg tatcgtgctg cgtttcgatg cggcactca ttacggcaaa gtgtgggtca	480
ataatcagga agtcatggag catcaggcg gctatacgcc atttgaagcc gatgtcacgc	540
cgtatgttat tgccgggaaa agtgtacgta tcaccgttg tgtgaacaac gaactgaact	600
ggcagactat cccgccggga atggtgattt ccgacgaaa cggcaagaaa aagcagtctt	660
acttccatga tttctttaac tatgccgaa tccatcgag cgtaatgctc tacaccacgc	720
cgaacacctg ggtggacgat atcaccgtgg tgacgcatgt cgcgcaagac tgtaaccacg	780
cgtctgttga ctggcaggtg gtggccaatg gtgatgtcag cgttgaactg cgtgatgcgg	840

atcaacaggt gggtgcaact ggacaaggca ctagcgggac tttgcaagtg gtgaatccgc	900
acctctggca accgggtgaa gggtatctct atgaactgtg cgtcacagcc aaaagccaga	960
cagagtgtga tatctaccg cttcgcgtcg gcatccggtc agtggcagtg aaggccaac	1020
agttcctgat taaccacaaa ccgttctact ttactggctt tggctgtcat gaagatgcgg	1080
acttacgtgg caaaggattc gataacgtgc tgatgggtgca cgaccacgca ttaatggact	1140
ggattggggc caactcctac cgtacctcgc attaccctta cgtgaagag atgctcgact	1200
gggcagatga acatggcatc gtgggtgattg atgaaactgc tgctgtcggc tttaacctct	1260
ctttaggcat tggtttcgaa gcgggcaaca agccgaaaga actgtacagc gaagaggcag	1320
tcaacgggga aactcagcaa gcgcacttac aggcgattaa agagctgata gcgcgtgaca	1380
aaaaccaccc aagcgtgggtg atgtggagta ttgccaacga accggatacc cgtccgaag	1440
tgcacgggaa tatttcgcca ctggcggaag caacgcgtaa actcgaccg acgcgtccga	1500
tcacctgcgt caatgtaatg ttctgcgacg ctacacccga taccatcagc gatctctttg	1560
atgtgctgtg cctgaaccgt tattacggat ggtatgtcca aagcggcgat ttggaacgg	1620
cagagaaggt actggaaaaa gaacttctgg cctggcagga gaaactgcat cagccgatta	1680
tcacacccga atacggcgtg gatacgttag ccgggctgca ctcaatgtac accgacatgt	1740
ggagtgaaga gtatcagtg gcatggctgg atatgtatca ccgcgtcttt gatcgcgtca	1800
gcgccgtcgt cggatgaacag gtatggaatt tcgccgattt tgcgacctcg caaggcatat	1860
tgcgcgttgg cggtacaag aaagggatct tctctcga ccgcaaaccg aagtcggcgg	1920
cttttctgct gcaaaaacgc tggactggca tgaacttcgg tgaaaaaccg cagcaggag	1980
gcaacaatg aatcaacaac tctctggcg caccatcgtc ggctacagcc tcgggaattg	2040
ctaccgagct cgaatttccc cgatcgttca aacatttggc aataaagttt cttaagattg	2100
aatcctgttg ccggtcttgc gatgattatc atataatttc tgttgaatta cgttaagcat	2160
glaataatta acatgtaatg catgacgtta ttatgagat gggtttttat gattagagtc	2220
ccgcaattat acatttaata cgcgataga aacaaaatat agcgcgcaaa ctaggataaa	2280
ttatcgcgcg cgggtgtcatc tatgttacta gatcggaat taattcatcg ataggctagt	2340
catggtgact gtacgttgta agtcagcaa actgccgacg cgatgcaaac tgtacacgtt	2400
aacatgccac tcacctggaa cgcacaatgg ccactagggt cggccgtagt gtggatttca	2460
aagagagaga gagagagaga gagctaatca cgtaaacgta aacacagcag atagcagaga	2520
tgttgattag gcaaacagc ataaaagcca atccaataaa ctacatttag cgaagtgcta	2580
tactaatgca ctaataacga actgttcttt tcttaagatc ggagccagta atgggtgtc	2640

agcaggagaa gcacgtaaac cttgaacat actaagttcc acagtcgaga gtaaaccgta 2700

 atcaacacaa gaaacaaaca taaaattgaa caaacgcgca tattataagt gacgaagcgg 2760
 tctcacataa aacagggcac acaggttaca acaacgaggg ttgtaagccc attaagcccc 2820
 aaacatcaga tcaccacaag caaatgtctc gaagacacac gcacacggca acaggataac 2880
 tccacactgg cagatcatgg gatagcagca gttatcaatc aggcccttgac acacagaaca 2940
 tcaagcccc agacgacgac gactcctcta gatcccggtc ggcatctact ctattccttt 3000
 gccctcggac gagtgctggg gcgtcgggtt ccactatcgg cgagtlacttc tacacagcca 3060
 tcggtccaga cgcccgcgct tctgcgggcg atttgtgtac gcccgcagct cccggctcgg 3120

 gatcggacga ttgcgtcgca tcgaccctgc gccaagctg catcatcgaa attgccgtca 3180
 accaagctct gatagagttg gtcaagacca atgcggagca tatacgccc gagccgcggc 3240
 gatctgcaa gtcctggatg cctccgctcg aagtagcgcg tctgtctctc catacaagcc 3300
 aaccacggcc tcagaagaa gatgttggcg acctcgtatt gggaatcccc gaacatcgcc 3360
 tcgctccagt caatgaccgc tgttatgcgg ccattgtccg tcaggacatt gttggagccg 3420
 aaatccgctg gcacgaggtg ccggacttcg gggcagtcct cgccccaag catcagctca 3480
 tcgagagcct gcgcgacgga cgcactgacg gtgtcgtcca tcacagtttg ccagtatac 3540

 acatggggat cagcaatcgc gcatatgaaa tcacgccatg tagtgtattg accgattcct 3600
 tgcggtccga atgggccgaa cccgctctc tggctaagat cgcccgagc gatcgcatcc 3660
 atggcctcgg cgaccggctg cagaacagcg ggcagttcgg tttcaggcag gtcttgcaac 3720
 gtgacacct gtgcacggcg ggagatgcaa taggtcaggc tctcgtgaa ttccccaatg 3780
 tcaagcactt ccggaatcgg gagcgcggcc gatgcaaagt gccgataaac ataacgatct 3840
 ttgtgaaac catcggcgca gctatttacc cgcaggacat atccagccc tctacatcg 3900
 aagctgaaag cagcagattc ttccgctcc gagagctgca tcaggtcgga gacgtgtcg 3960

 aacttttcga tcagaaactt ctcgacagac gtcgcggtga gttcaggctt tttcatatct 4020
 cattgcccc cgggatccgt cgagtcagcc tgaaggaca aaatacatgt tagcgcctta 4080
 gtggtacatt attatttcag tacagcaaga taacacaatt caaaagactg acccataata 4140
 aataactagt cctcaattta aaatttgagt tcctaaatag acatctatga atatgctgta 4200
 catcggcact acagaaaata cgattcccaa taattgaaca attgtacttt atttagttgt 4260
 tactacaaca atggaagata caagatcgtt tcaaaactac catacatgca tggagtattt 4320
 gttccacaga tctggaaaaa acagatctga cgggcagtggt caccaaacac tagacatatg 4380

tatttgtatt aggtggatga cgtgtacaaa catgactacc agatctagaa ttagaacgcg	4440
gcgtgctttg gaaatgttaa gtagatccaa atacatcggt aacaaatgaa catattcata	4500
tgacatagct gtaaaacatc atgatctatc atatcaacta gaggggatct cggcatgtat	4560
cattctattg catctagaac catagcattt ccatgtgaca aacaattttg aaacatacat	4620
tgctcagatc taccataaga acaccatgtt catgacagca tcgaccatga tttccacatt	4680
taacagcatc ccgaggtcag atccagtgtt tagaactatc atttcagcaa aattcacaaa	4740
ataaatctc caattcgctt acatatatcc attccacgca tcctaggacc agatccacca	4800
taccagtata cacgaacact aaacatttca tcagatccgc taactacgac agagaaaacg	4860
cagatccaga caaccagatc caccgacaaa taaacacagc cccccacatc caacaaccgc	4920
gaatccacc agatctgacc cagaagcagg cacgaagaac acgggggggtg agggagatgg	4980
gacgcggatc caagcttgcc ggccgattgg gttgatgctg cgacggcggc ggagaaggga	5040
gagaggggag aggaggaaaa gcgcggaggc gcggagagag gcgagtacga agacgccttt	5100
ctctgcgttg tctcggtta gggtttgcga tccccgact ccgcccgttt tataggcca	5160
gacagcctgg acctctcagg agcgggaagc aagggatggg ggagttttc gttttacccc	5220
ctttgacgtc ttcaaaattc actcgcatct cacatcgtgc ctgcaaaggt cgggtggttg	5280
gatcatatcg agaataatta ataagttagg gagctttctg ataatatcca ccgcaaggag	5340
gccatttctg ttgcaactcg ttgaagtcca taccgcctc tcgttagttt cactgacagg	5400
tgggtccaga ggcttccctc gtgtgcggtt agcagatgca cgcgtcgtc caagaaaaag	5460
cagtaggtga cctggccacc tcgtttagg tgcgaccgat gcagacgtcc cgcttgccgg	5520
tgggcccacg ttacagctgg gtccacata tcggtgggtg cgatgagttg ttcggtgcgt	5580
aggagtagat tggatcccaa cgggtggttg cgtcgtcggc ggccctgccg attttatttt	5640
cgatttttga aatgcgagag cgggagaacg gcaccgttgg cttggctgtg gatgccgtta	5700
gccgcaccgg actattcggc ccagttccat ttggcccaa cttgaaacag cgcggagcac	5760
aagacggggg agcccattha ggcccgtaat ctgagccctg tagaaagtcc gtgtcgttgc	5820
gatggaccag aaagcccata aaccttgag gcgttctctg ctgggaataa aataagttca	5880
cactctgtcc ctcaacttha cgtcgagttt gtttgacatc gctaagccc agtaccagaa	5940
atcttgata caaataaggt ttgatataaa gtggcacgtg gtgaatggca tcgtttgaaa	6000
aatcttcaga tcgagcgggc ttcaaacgc gtaagtcaa gtgccaaaat ttgtgaagaa	6060
aattacttcc ttcatctcac aatgtaagt attttagcat tttccacatt catattgata	6120
tcaataaatt tagatagata tatatgtctg aattcgtacc gttaacgagc tctagaagct	6180
tcagtactac gcgtctcgag gcctattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga	6240

gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc	6300
ccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa	6360
ataggcgtat cagcaggccc ttctgtctcg cgcgtttcgg tgatgacggt gaaaacctct	6420
gacacatgca gctcccggag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc gggagcagac	6480
aagcccgtca gggcgcgtca gcgggtgttg gcgggtgtcg gggctggctt aactatgcgg	6540
catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaataaccg cacagatgcg	6600
taaggagaaa ataccgcac caggcgcatt cgccattcag gctgcgcaac tgttgggaag	6660
ggcgatcggg gcgggcctct tcgctattac gccagctggc gaaaggggga tgtgtgcaa	6720
ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaaa acgacggcca	6780
gtgaattcac tagtgattgc tctagacact gatagtttcg gatctagata tcacatcaat	6840
ccacttgctt tgaagacgtg gttggaacgt cttctttttc cacgatgttc ctctgggtg	6900
ggggtccatc ttggggacca ctgtcggtag aggcattctg aacgatagcc ttctctttat	6960
cgcaatgatg gcattttag aagccattct cttttctac tgtcctttcg atgaagtgc	7020
agatagctgg gcaatggaat ccgaggaggt ttcccgatat taccttttgt tgaagagct	7080
caatagccct ctggtcttct gagactgtat cttgatatt cttggagtag acgagagtgt	7140
cgtgtccac catgttgggg atctagatat cacatcaatc cacttgcttt gaagacgtgg	7200
ttggaacgtc ttctttttcc acgatgttcc tctgggtgg ggggccatct ttgggaccac	7260
tgtcggtaga ggcatttga acgatagcct ttctttatc gcaatgatgg cattttaga	7320
agccatcttc cttttctact gtcttttga tgaagtgaca gatagctggg caatggaatc	7380
cgaggagggt tcccgatatt accctttgtt gaaaagcttc aatagccctc tggctttctg	7440
agactgtatc ttgatattc ttggagtaga cgagagtgtc gtgtccacc atgttgggga	7500
tctagatata acatcaatcc acttgctttg aagacgtggt tggaacgtct tctttttcca	7560
cgatgttctt cgtgggtggg ggtccatctt tgggaccact gtcggtagag gcatcttgaa	7620
cgatagcctt tcctttatcg caatgatggc attttagtaa gccatcttcc ttttctactg	7680
tcctttcgat gaagtgacag atagctgggc aatggaatcc gaggagggtt cccgatatta	7740
ccctttgttg aaaagtctca atagccctct ggtcttctga gactgtatct ttgatattct	7800
tggagtagac gagagtgtcg tgctccacca tgttggggat ctagatatca catcaatcca	7860
cttgctttga agacgtggtt ggaacgtctt cttttccac gatgttctc gtgggtgggg	7920
gtccatcttt gggaccactg tcggtagagg catcttgaac gatagccttt cttttatcgc	7980
aatgatggca ttgtagaag ccatttctt tttctactgt ctttcgatg aagtgcaga	8040
tagctgggca atggaatccg aggaggtttc ccgatattac ctttgttga aaagtctcaa	8100

tagccctctg gtcttctgag actgtatctt tgatattctt ggagtagacg agagtgtcgt 8160

gctccacat gttggggatc ctctagagtc gagaattcag tacattaaaa acgtccgcaa 8220

tgtgttatta agttgtctaa gcgtcaattt gtttacacca caatatatcc tgcca 8275

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SAM 22_F primer

<400> 6

ggaggacacc cgttttagat 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SAM 22_R primer

<400> 7

ccacggcatg aatcttgttt 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NGUS1

<400> 8

aacgctgac aattccacag 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Enhancer-F primer

<400> 9

gatccccaac atggtggagc 20

<210> 10

<211> 20

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Enhancer-R primer	
<400>	10	
ggatctagat atcacatcaa		20
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	RT-SAMT 22_F primer	
<400>	11	
tgatcttgaa gttgggcgta		20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	RT-SAMT 22_R primer	
<400>	12	
acacccttgt tgcagtctta		20