



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2015-0092540

(43) 공개일자

2015년08월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2014-0013028

(22) 출원일자

2014년02월05일

심사청구일자

2014년02월05일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

신정섭

서울 성북구 길음로9길 50, 910동 2501호 (길음동, 길음뉴타운9단지)

최준영

경기도 안성시 공도읍 마정강변길 45-12, 201호 (뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

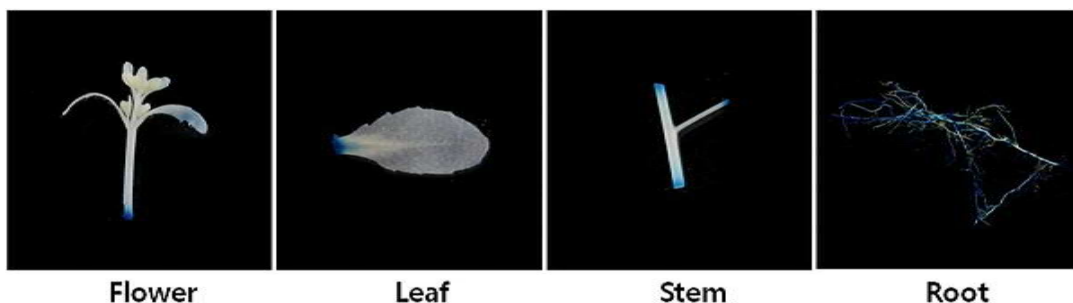
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 상처 스트레스 유도성 발현 프로모터

(57) 요약

본 발명은 식물에서 상처 스트레스 유도성 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 벡터, 그리고 상기 벡터를 포함하는 형질전환체 및 형질전환 방법에 관한 것으로, 상기한 본 발명에 의한 프로모터는 식물체에서 스트레스에 의하여 유전자의 발현을 유도하여, 스트레스 내성 식물 생산을 가능하게 하여, 우수한 품질 또는 수확량 증가 효과를 갖는 고부가 가치의 신품종 육성에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도4a



(72) 발명자

정희정

경기 수원시 영통구 봉영로1517번길 27, 902동
1401호 (영통동, 벽적골9단지아파트)

신현영

서울 성북구 종암로19라길 27, 401호 (종암동, 성
우빌라)

배정명

서울 노원구 한글비석로5길 62, 803동 907호 (중계
동, 중계8단지주공아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008160022014
부처명	농림축산식품부
연구관리전문기관	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21사업
연구과제명	벼 돌연변이 유래 유용유전자의 분자생물학적 기능구명
기 여 율	1/2
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2014.01.01 ~ 2014.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2011-0015848
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	(이공)중견연구자지원_핵심연구
연구과제명	식물의 노화와 스트레스 관련 신규 유전자들의 기능과 신호전달 메커니즘 분석
기 여 율	1/2
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2013.05.01 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지는 상처 스트레스 유도성 프로모터.

청구항 2

제 1항의 프로모터를 포함하는 발현 벡터.

청구항 3

제1항의 프로모터 및 이와 작동 가능하게 연결된 유전자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 4

제1항의 프로모터, 제2항의 벡터 및 제 3항의 벡터 중에서 어느 하나를 포함하는 형질전환체.

청구항 5

제1항의 프로모터, 제2항의 벡터 및 제 3항의 벡터 중에서 어느 하나를 포함하는 식물의 형질전환용 조성물.

청구항 6

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 DNA 단편을 증폭하기 위한 서열번호 2로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 3으로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 프라이머 세트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식물에서 상처(wounding) 스트레스 유도성 발현 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 벡터, 그리고 상기 벡터를 포함하는 형질전환체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 작물분자육종은 모든 종(種)의 유전자를 재료로 사용할 수 있으며 기존의 계통 단위로만 가능하던 육종기술을 유전자 단위로 끌어내려 무한대의 육종 효과를 미세하게 조절할 수 있다는 측면에서 차세대 농업을 이끌어 갈 핵심적인 기술이다. 이러한 작물분자육종 기술을 이용한 유전자변형 작물의 재배면적과 재배량이 전 세계적으로 지속적으로 증가하고 있으며, 상업화된 유전자변형 신종자의 세계 시장 규모는 2002년 40억 달러에서 2010년 100억 달러(종자와 기술료 포함)로 전체 세계 종자 시장규모 300억 달러 대비 15% 수준이며, 종류로는 대두, 옥수수, 면화, 유채가 주 시장을 형성하고 있다. 유전자변형 작물의 효과를 극대화하기 위해서는 외부에서 삽입된 유전자의 발현을 식물의 발달 시기별, 조직 별로 미세하게 조절할 수 있어야 하며 이를 위해 다양한 프로모터의 개발이 이루어져야 한다.

[0003] 이에 1980년대 초반부터 식물 유전자의 발현을 조절하는 프로모터에 대한 연구가 진행되어 왔다. 꽃양배추 모자이크 바이러스(Cauliflower mosaic virus)의 프로모터가 식물 전 조직에서 강한 발현을 유도할 것이라고는 가능성이 제시되고, 상기 프로모터의 염기서열이 밝혀지고, 식물체내에서 강한 발현이 증명되었다. 그 후 CaMV 35S (특허번호: JP1993192172-A1) 프로모터는 식물에서 가장 많이 쓰이는 보편적인(universal) 프로모터가 되었다.

[0004] 한편, 식물은 과습, 고염, 가뭄, 저온, 고온, 활성산소 등의 비생물학적 스트레스와 병충해 같은 생물학적 스트레스와 같은 다양한 유형의 스트레스에 대응하기 위한 내성 메카니즘을 보유하고 있다. 최근, 이러한 스트레스 내성 메카니즘이 분자 수준에서 규명됨에 따라서, 생명공학적 기법을 이용하여 스트레스 내성 식물이 제조되게 되었다. 이러한 식물 스트레스 내성 연구에서, 유전자는 대부분이 꽃양배추 모자이크 바이러스의 35S 프로모터에 결합되어 식물에 도입된다. 그러나 재조합 식물의 스트레스 내성 수준은 불안정하며 도입된 유전자의 발현

수준은 낮게 나타나 이들 중 어떤 것도 실제로 이용되기 쉽지 않아 스트레스 조직 특이적으로 발현을 유도하는 조직 특이 프로모터의 발현에 대한 연구가 꾸준히 진행되어서 가뭄 스트레스 조직 특이 프로모터 (Boyce et al., 2003, Plant Journal 34:395-406), 저온 스트레스 조직 특이 프로모터 (Yamaguchi-shinozaki and shinozaki, 2005, 10:88-94), 활성산소 스트레스 조직 특이 프로모터 (Kim et al., 2003, Plant Mol. Bio. 51:831-838) 등 과 병균 스트레스, 해충 스트레스, 바이러스 스트레스 등의 연구가 이루어졌다. 식물의 스트레스는 식물의 성장을 방해하여 수확량을 감소 문제를 일으키며 더 나아가 식물을 고사시키는 문제가 있다. 따라서 스트레스 반응을 유발하여 발현을 조절할 수 있는 기술에 대한 연구가 요구되어 왔으며, 이를 위해서 상처(wounding) 스트레스로 발현을 유도하는 프로모터의 개발에 대한 요구가 지속적으로 있어 왔다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) KR 10-2007-0115325A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기 요구를 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지는 상처(wounding) 스트레스 유도성 프로모터를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 프로모터를 포함하는 발현 벡터 및 상기 벡터를 포함하는 형질전환체와 형질전환용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 프로모터를 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명가들은 애기장대 TAIR/ATTED DB를 이용하여 종자 특이적 발현을 보이는 At5g55750 유전자의 프로모터 부위를 클로닝하여 식물체에서 상처(wounding) 스트레스 유도성 발현 프로모터를 제작하였고, 애기장대를 이용한 형질전환체에서 상기 프로모터의 활성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 구체적으로, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 상처(wounding) 스트레스 유도성 프로모터를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 프로모터 및 이와 작동 가능하게 연결된 유전자를 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 프로모터 또는 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 프로모터 및 벡터 중에서 어느 하나를 포함하는 식물의 형질전환용 조성물을 제공한다.

[0015] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 DNA 단편을 증폭하기 위한 서열번호 2로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 3으로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 프라이머 세트를 제공한다.

[0016] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0017] 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 상처(wounding) 스트레스 유도성 프로모터에 관한 것이다.

[0018] 상기 프로모터는 전사를 개시할 수 있는 프로모터로, 비생물학적 및/또는 기계적 스트레스에 반응하여 발현된다. 또한, 상기 프로모터 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있다. 변이체는 염기서열은 변화되지만, 서열번호 1의 염기서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기서열을 모두 포함한다. 구체적으로, 상기 프로모터는 서열번호 염기서열과 각각 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 상동성을 갖는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0019] 상기 폴리뉴클레오타이드에 대한 서열 상동성의 %는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써

확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제 포함하지 않음)과 달리 추가 또는 삭제(갭, gap)를 포함할 수 있다.

- [0020] 상기 프로모터의 발현 부위는 식물체 전체에서 나타날 수 있으며, 일 예로 꽃, 잎 및 줄기에서 발현 된다.
- [0021] 미생물학적 및/또는 기계적 스트레스는 바람직하게는 상처 또는 상해(wounding)에 의한 스트레스 일 수 있다.
- [0022] 상기 프로모터는 서열번호 1의 염기서열을 갖고, 상기 염기서열은 애기장대 At5g55750 유전자의 코딩 시퀀스의 번역개시 부위로부터 -1 내지 -1200에서 유래된 것을 특징으로 한다. 상기 프로모터는 식물체의 상처 조직에서 목적 유전자의 발현을 유도할 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 그리고 상기 프로모터 및 이와 작동 가능하게 연결된 유전자를 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0024] 상기 벡터는 바람직하게는 식물 발현 벡터일 수 있고, 식물 발현 벡터로 통상적으로 사용되는 벡터의 종류를 모두 포함할 수 있다.
- [0025] 상기 발현 벡터에서 프로모터는 작동 가능하게 연결된 유전자의 앞에 위치할 수 있다. 작동 가능하게 연결된 이란, 유전자가 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA를 포함하는 것으로, 일 예로 이중 단백질을 발현하기 위한 단위로서 기능하는 발현 카세트 성분 일 수 있다.
- [0026] 상기 유전자는 상처 스트레스 조직에서 발현을 원하는 어떤 유전자도 될 수 있으며, 그 종류에 한정되지 않고, 외래 유전자(exotic gene)도 포함될 수 있다. 일 예로 의학적 활용성이 있는 단백질, 사람을 포함하는 동물의 건강을 증진시킬 수 있는 단백질, 세포 조절 단백질, 식물병 저항성 단백질, 고기능성 단백질, 생장 조절 단백질 및 성숙 조절 단백질 등의 유용한 목적을 달성할 수 있는 단백질을 코딩하는 유전자 일 수 있다.
- [0027] 상기 유전자는 스트레스 유도성 발현 벡터에서 상기 프로모터 부위의 뒤에 위치하며 필요에 따라 리포터 유전자와 융합되어 발현될 수도 있다.
- [0028] 본 발명의 일 실시예에 있어서, GUS 리포터 유전자가 함유된 바이너리 벡터(pBI101)에 본 발명의 프로모터를 삽입한 At5g55750:GUS를 제조하였고, 상기 GUS 리포터 유전자는 다른 유용한 목적의 외래 유전자로 치환될 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 프로모터 또는 벡터를 포함하는 형질전환체 및 상기 프로모터 또는 벡터를 포함하는 식물의 형질전환용 조성물에 관한 것이다.
- [0030] 상기 형질전환체는 본 발명의 발현 벡터를 이용하여 형질전환된 형질전환 식물체 일 수 있다. 상기 식물체는 스트레스 유도성 프로모터가 포함된 유전자 발현 카세트 또는 스트레스 유도성 프로모터를 포함하는 발현 벡터가 삽입되어 형질전환이 가능한 식물체라면 그 종류에 제한되지 않는다. 상기 식물체는 상기 식물 자체, 조직, 세포 및 종자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있다.
- [0031] 상기 식물 세포는 어떤 식물 세포도 가능하며 배양세포, 배양조직, 배양기관 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것은 모두 이용할 수 있다.
- [0032] 상기 식물 조직은 미분화된 또는 분화된 식물의 조직일 수 있고, 일 예로 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들로 단일세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스을 모두 포함한다. 또한, 상기 식물조직은 인 플란타(in planta)이거나, 기관 배양, 조직배양 또는 세포 배양 상태인 것도 모두 포함한다.
- [0033] 상기 식물은 일 예로, 식량작물류, 채소작물류, 특용 작물류, 과수류, 화훼류, 사료작물류 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있다. 상기 식물은 바람직하게는 쌍자엽 식물 일 수 있다.
- [0034] 상기 형질 전환용 조성물은 바람직하게는 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 미생물의 배양물을 포함할 수 있다. 상기 배양물은 본 발명의 벡터를 포함하는 미생물을 배양배지 또는 배양액에서 배양한 배양산물로, 상기 배양물의 상층액, 농축물, 건조물 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나를 포함할 수 있다. 또한 그 제형에 한정되지 않고, 액체 또는 고체일 수 있다.

- [0035] 상기 형질 전환용 조성물은 본 발명의 프로모터 또는 발현 벡터 이외에 식물체의 형질 전환을 위해 사용되는 부가적인 성분을 더 포함할 수 있고, 일 예로, 아주반트, 부형제, 담체 등을 포함하여 형질 전환 효율을 향상시킬 수 있다.
- [0036] 상기 본 발명의 프로모터 또는 이를 포함하는 발현 벡터를 식물체 내로 삽입하는 방법은 본 발명의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법을 사용할 수 있고, 일 예로 아그로박테리움 방법, 삼투압법, 전기천공법, 유전자총 방법 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 방법을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 아그로박테리움 방법을 이용할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 형질전환 방법에 의하여 형질 전환 된 형질전환체는 스트레스에 의하여 발현을 유도하는 본 발명의 프로모터에 의하여 스트레스 조직에서 특이적으로 유전자를 발현 시킬 수 있고, 이를 이용하여 식물의 스트레스를 이용하여 식물의 수확, 목적 유전자의 발현을 통한 유용한 단백질의 생산 등이 가능하다.
- [0038] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 DNA 단편을 증폭하기 위한 서열번호 2로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 3으로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 프라이머 세트 및 상기 프라이머 세트를 포함하는 식물체 선별용 키트에 관한 것이다.
- [0039] 상기 DNA 단편은 서열번호 1로 표시되는 것 일 수 있고, 상기 서열번호 1의 염기서열은 애기장대 At5g55750 유전자로부터 유래된 것이다.
- [0040] 상기 서열번호 2 및 3을 포함하는 프라이머 세트는 본 발명의 스트레스 유도성 프로모터를 증폭할 수 있다.
- [0041] 또한 본 발명은 상기 식물 형질전환체를 이용하여 식물체 스트레스 조직 내에서 목적 단백질이 생산되도록 하는 것을 특징으로 하는 식물체 내에서 목적 단백질을 생산하는 방법에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0042] 본 발명의 애기장대 유래 스트레스 유도성 프로모터는 식물체에서 스트레스에 의하여 유전자의 발현을 유도하여, 스트레스 내성 식물 생산을 가능하게 하여, 우수한 품질 또는 수확량 증가 효과를 갖는 고부가 가치의 신제품 육성에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1은 본 발명의 프로모터에 의해 발현이 조절될 것으로 예상되는 At5g55750 유전자의 RT-PCR을 통한 조직별 발현 양상의 결과를 나타내는 도이다.
- 도 2는 본 발명을 위한 프로모터 클로닝을 위한 PCR 결과를 나타내는 도이다.
- 도 3은 본 발명에 의한 프로모터 클로닝에 이용한 발현벡터인 pBI101 벡터의 모식도이다.
- 도 4a는 본 발명에 의한 상처 스트레스 유도성 At5g55750 프로모터의 상처 부위별 발현양상을 확인한 도이다.
- 도 4b는 본 발명에 의한 상처 스트레스 유도성 At5g55750 프로모터의 조절로 GUS의 발현양상을 분석한 결과를 나타내는 도로, 왼쪽 도는 잎의 가운데 부분을 핀셋으로 집은 후 GUS 발현을 확인한 도이며, 가운데 도는 잎의 전면을 압정으로 상처를 낸 후 GUS 발현을 확인한 도이고, 오른쪽 도는 가운데 도를 확대한 도이다.
- 도 4c는 본 발명에 의한 상처 유도성 At5g55750 프로모터의 조절로, real-time PCR을 통해서, 상처(wounding) 스트레스 유발 후 시간에 따른 유전자의 발현 양상을 확인한 그래프 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다.

[0045] 실시예 1: 종자에서 특이적으로 발현하는 유전자 (At5g55750) 선별 및 확인

- [0046] TAIR/ATTED DB에 공개된 affymetrix 25k(ATH1) array 결과를 토대로 종자에서만 발현하는 유전자들을 선별한 후, 기존에 발표된 논문에서 종자에 특이적으로 발현하는 패턴을 확인할 수가 없는 유전자들을 선별하였다. 그

중 At5g55750에 위치한 유전자를 선발하였다.

[0047] At5g55750 유전자의 발현 양상을 알아보기 위해 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR에 이용할 표준 cDNA를 합성하기 위해 TRI REAGENT[®] (TRI REAGENT[®] - RNA/DNA/PROTEIN ISOLATION REAGENT, MOLECULAR RESEARCH CENTER, INC.)을 이용하여, 5주된 애기장대(Arabidopsis thaliana ecotype Columbia)의 각 조직, 즉 꽃(flower), 줄기(inflorescence), 잎(leaf), 뿌리(root), 미성숙 종자(immature seed)와 7주된 애기장대의 성숙 종자(mature seed)의 전체 RNA(total RNA)를 추출하였다.

[0048] 정량한 전체 RNA(total RNA) 5 µg과 2.5 µM anchored-oligo(dT)₁₈ primer, 1x(8 mM MgCl₂) 전사인자 역전사효소 반응 완충액(transcript reverse transcriptase reaction buffer), 20U 프로텍터 리보뉴클레아제 억제제(protector RNase inhibitor), 1mM 데옥시뉴클레오타이드 믹스(deoxynucleotide mix), 10U 전사인자 역전사효소(transcript reverse transcriptase)를 전체 20 µl가 되도록 잘 섞은 다음 55℃에서 70분간 처리하였다. 이후 전사인자 역전사 효소의 불활성화를 위해서 85℃에서 5분간 처리하였다. 위와 같은 방법으로 조직별 cDNA pool을 만들었으며, 이 cDNA pool을 RT-PCR의 주형(template)으로 사용하였다.

[0049] Tair 부위(Tair site)의 염기서열을 바탕으로 단백질 코딩 부위(protein coding region)에서 프라이머 1, 2(표 1의 서열번호4, 5)를 합성하였고, Gene Amp[®] PCR System 2700 (Perkin Elmer, USA)을 사용하여, 95℃에서 5분간 초기 변성 후, 95℃ 20초, 60℃ 20초, 72℃ 30초 30회 실시하였다.

표 1

[0050]	RT-PCR용 프 라이머	5'-GTAAACCCGCTCTCAACG-3'	서열번호 4
		5'-CGCCAATAGTACCGTAAGGATAA-3'	서열번호 5

[0051] 내적대조군(internal control)으로는 *EF1a*를 사용하였으며, 조직별 cDNA pool에서 *EF1a*의 전사 양이 거의 동일함을 확인하였다. 상기 At5g55750 유전자 특이 프라이머를 이용한 RT-PCR의 결과는 도 1과 같다. 도 1에 나타난 바와 같이 At5g55750 유전자가 꽃, 잎, 줄기, 뿌리에서는 발현하지 않고, 미성숙 종자에서는 약하게 성숙 종자에서는 강하게 발현하는 것을 확인할 수 있었다.

[0052] 실시예 2 : 애기장대 At5g55750 유전자의 프로모터 클로닝

[0053] 상기 유전자의 프로모터로 추정되는 부위는 1200 염기쌍(base pair)으로 추정하였다. 먼저 야생 애기장대의 게놈 DNA(gDNA)를 추출하고, 5' 말단에는 HindIII을 3' 말단에는 BamHI을 포함하고 있는 서열번호 3 및 서열번호 3으로 표시되는 프라이머를 합성하였다(표 2 참조).

표 2

[0054]	프로모터 클로닝용	5' - GGCGAAGCTTAAAAAGCAGAGACTTGGACAG - 3'	서열번호 2
	프라이머	5' - ATTTGGATCCTCATGGTGCTGGGTGAGT - 3'	서열번호 3

[0055] 상기 gDNA를 주형으로 하여 서열번호2, 3 프라이머와 교정(proofreading) 기능을 갖는 DNA 중합효소인 Phusion High-Fidelity DNA Polymerase(Phusion[®] DNA Polymerase, Thermo Scientific)를 이용하여 프로모터 부위를 증폭하였다. 그리고 이때 PCR 반응은 Gene Amp[®] PCR System 2700(Perkin Elmer, USA)을 사용하여, 98℃에서 1분간 초기 변성 후, 98℃에서 10초, 58℃에서 30초 72℃에서 40초로 30회 PCR을 수행하였다.

[0056] PCR로 얻은 산물이 1220 (제한효소 서열 포함) 염기쌍 인지를 아가로스 젤 상에서 확인하고, 이 PCR 산물을 HindIII과 BamHI 제한효소로 말단을 자른 다음 GUS 리포터 유전자를 가지고 있는 pBI101 벡터(vector)의 HindIII과 BamHI 제한효소 인식 부위에 클로닝하였다. 이후 대장균(E.coli) colony-PCR을 수행하여 PCR 산물이 삽입된 것을 확인하고, 그 중 하나의 클론을 시퀀싱(sequencing)한 결과 정확한 염기서열이 클로닝되었음을 확

인하였다 (서열번호 1 참조).

[0057] **실시예 3 : At5g55750 프로모터의 애기장대 형질전환**

[0058] At5g55750 프로모터 클로닝에 이용한 pBI101 벡터는 레프트 보드(left board)와 라이트 보드(right board) 사이에 GUS(β -glucuronidase) 리포터 유전자를 가지고 있으며 식물에 형질전환시킬 수 있는 바이너리 벡터(binary vector)이다(도 3 참조).

[0059] 이 벡터를 아그로박테리움(Agrobacterium, GV3101)에 형질전환을 한 후 꽃침지(flower dipping, Clough et al., Plant J., 16(6): 735-743, 1998) 방법으로 애기장대에 형질전환을 하였다. 형질전환 애기장대를 항생제 카나마이신이 함유된 배지에서 선별하였다.

[0060] **실시예 4 : 형질전환 애기장대의 조직 화학적 염색 분석**

[0061] 선별된 형질전환 식물체의 각 조직으로부터 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법을 이용하며 조사하였다. 식물체의 각 조직은 1 mM X-Gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronidase), 100 mM 인산나트륨(sodium phosphate)(pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM 페리시안화 칼륨(potassium ferricyanide), 0.5 mM 페로시안화 칼륨(potassium ferrocyanide), 그리고 0.1% Triton X-100을 함유하는 용액에 담가 37°C에서 24시간 동안 반응시킨 다음, 용액을 제거한 후 70% 에탄올을 첨가하여 2시간동안 클로로필을 제거하는 과정을 3회 반복한 후, 100% 에탄올에 보관하면서 관찰하였다. 그 결과, 도 4a와 같이 꽃, 잎, 줄기 절단면에서 GUS 염색이 관찰 되었다. 또한 상처(wounding) 스트레스 조직 특이적으로 발현할 것으로 추정되는 At5g55750 유전자의 발현이 실제로 상처(wounding) 스트레스 조직에서만 발현이 되는지 알아보기 위해 상처(wounding) 스트레스 후 조직 화학적 염색 분석을 수행하였다. 상기 결과를 도 4에 나타내었다.

[0062] 이 결과 도 4a 및 4b와 같이 핀셋이나 압정으로 상처(wounding) 스트레스를 처리한 부위에서 GUS 염색이 관찰되었다. 도 4a에 나타난 바와 같이, 꽃, 잎 및 줄기 모두에서 삽입된 유전자의 발현이 가능함을 확인 하였고, 도 4b에 나타난 바와 같이, 상처에 의하여 발현이 유도되는 것임을 확실하게 확인 하였다. 따라서 본 발명의 프로모터가 상처(wounding) 스트레스 받은 줄기, 잎, 꽃 등의 조직에서 프로모터 활성을 보임을 모두 확인 하였다.

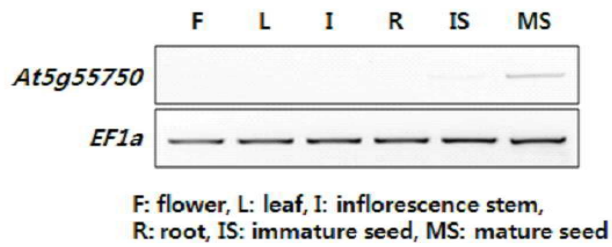
[0063] **실시예 5 : 애기장대 잎 조직에 상처(wounding) 처리 후 시간대별 At5g55750 유전자의 발현 양상**

[0064] 상처(wounding) 스트레스 유도성 At5g55750 유전자 프로모터의 발현이 상처(wounding) 스트레스 조직에서의 시간대별 발현양상을 알아보기 위해 real-time PCR을 실시하였다. 4주된 애기장대의 잎에 압정으로 30번씩 상처를 낸 후 TRI REAGENT[®](TRI REAGENT[®] - RNA/DNA/PROTEIN ISOLATION REAGENT, MOLECULAR RESEARCH CENTER, INC.)을 이용하여 0, 1, 3, 6, 9 시간대별로 RNA를 추출하였다. Real-time PCR은 Light cycler[®] 480 SYBR Green I Master Kit (Roche, Germany)에서 제공하는 방법에 따라 3반복 처리하였으며, Light Cycler[®] 480II (Roche, Germany)을 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 유전자를 인식하는 real-time PCR용 프라이머 1, 2는 표 1의 서열 번호4, 5 와 같으며, 대조 유전자로는 PDF1.2를 이용하여 비교 분석하였다. 그 결과를 도 4c에 나타내었다.

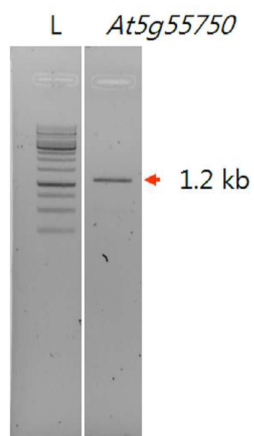
[0065] 도 4c에 나타난 바와 같이, 본 발명의 상처 스트레스 유도성 프로모터는 상처 처리 3시간 후부터 활성이 증가하기 시작하여 6시간 후에는 매우 강하게 활성이 증가하였으며, 이 후 9시간 후에는 활성이 상처 처리 전의 수준으로 감소하였다 (도4c). 따라서, 상처 처리 후 3시간부터 9시간 까지 프로모터의 발현 유도가 가장 강한 것으로 확인 하였다.

도면

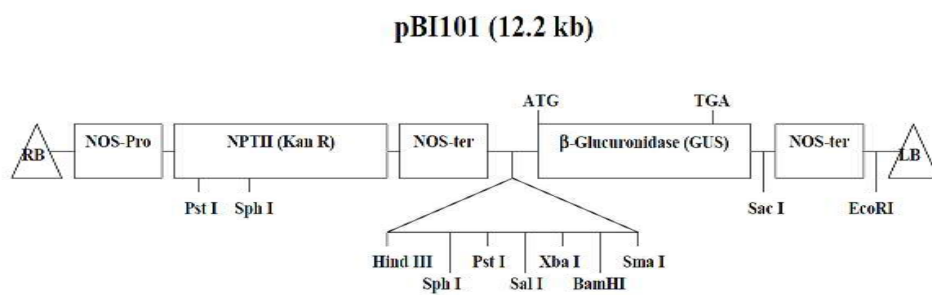
도면1



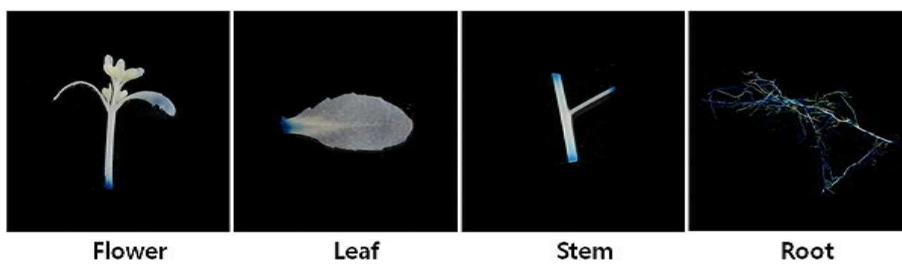
도면2



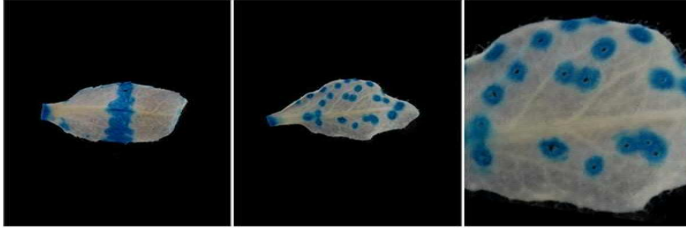
도면3



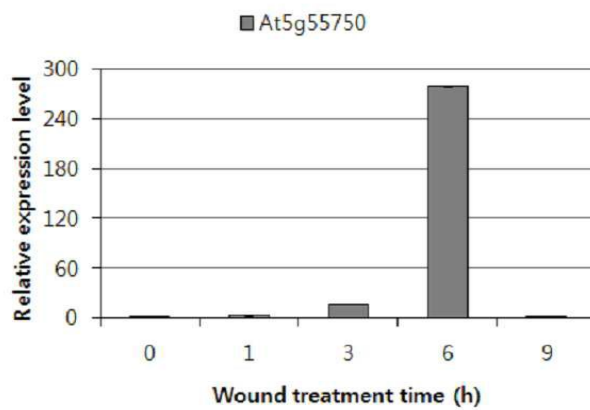
도면4a



도면4b



도면4c



서열목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> WOUNDING STRESS-INDUCIBLE EXPRESSION PROMOTER

<130> KU1-2P

<160> 5

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1200

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 1

aaaaaagcag agacttggac agtgacttct atttatgaag tatcaatata ttttaattct 60

ttttattatg attttattat tatatgcaat ctggaatatt ttttttgaca tttctcagaa 120

tatcagagat ttttagatttt aaaagtgttg ctaaattttt atataacatt tctttattat 180

gtttccctga taaacctaaa gtttgtgata tttaatgaa aatccaaatt agggatttaa 240

ttggattcat ataaaactta ttttatggca tgttattata tttctcaaat ttgtttagtt 300

tggctaaaca aaaatttgat ataagaaaaa cattaattac attaacctaa aatatcatag 360
 ctaaattaag tgggtgatat cattgcaact tttatacat ttcaccaatt tttatctata 420
 tatcatttat ttatttttac tttttttatg taatcatgaa attatgaata tgtgatccat 480
 aatctcttta gtcccagaat tagactgata atatttgtgt caagctcacg gttgtagatc 540
 atcttataac aaaacttgaa ctcggtttcg gtatccttga atcattgtaa acaacattca 600
 tctaattggt taaaccaata caatgagtta ttaataaagt aaatttatcg tcttggtatt 660

atttaaaata tataggtaaa tgtcaacaca ttgaatatg aaaccatttg ataaagtggg 720
 ttgtaatttg taaaatacta aaccatatga cagggtttac tatggattta aattgattct 780
 atgtgacgtt ctggtgcatg ctcaacctg agcttatatt agattaaat cttgttctat 840
 cgaaccgggtt tgaaactcat cactcaaagc cttttgaat tcagtttggg gaataaactt 900
 ataacatadc taagtttcat aaataagtat tgttatatat catcaattta tttatcaaga 960
 ttaacatacc tcacacagtt ttttaataaa aaacatgcag catgcagact taaatatggg 1020
 ttatgttagt cctcattcca ctctcgacaa gaccacaacc cacaccatca gaattaatat 1080

ttcctcggat acaatactgt ccgaaagtgt agtcacacct caacactagc ttgtgcatca 1140
 tttgaaaagt agttgaatcc tacaacagac tagtcaaac aaactcaccc agcaccatga 1200
 1200

<210> 2
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <400> 2

ggcgaagctt aaaaaagcag agacttggac ag 32

<210> 3
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> artificial sequence
 <400> 3

atttggatcc tcatggtgct gggtagt 28

<210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> artificial sequence

<400> 4

gtaaaccg tcttcaacg

19

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial sequence

<400> 5

cgccaatagt accgtaagga taa

23