



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2016-0099105  
 (43) 공개일자 2016년08월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**C12N 15/82** (2006.01) **A01H 5/10** (2006.01)  
 (52) CPC특허분류  
**C12N 15/8216** (2013.01)  
**A01H 5/10** (2013.01)  
 (21) 출원번호 **10-2016-7020573**  
 (22) 출원일자(국제) **2014년12월31일**  
 심사청구일자 **없음**  
 (85) 번역문제출일자 **2016년07월27일**  
 (86) 국제출원번호 **PCT/US2014/072921**  
 (87) 국제공개번호 **WO 2015/103354**  
 국제공개일자 **2015년07월09일**  
 (30) 우선권주장  
 61/922,529 2013년12월31일 미국(US)

(71) 출원인  
**다우 아그로사이언시즈 엘엘씨**  
 미국 인디애나주 46268-1054 인디애나폴리스 자이언스빌 로드 9330  
 (72) 발명자  
**쿠마르 산딕**  
 미국 46032 인디애나주 카멜 윈도트 드라이브 201  
**굽타 만주**  
 미국 46032 인디애나주 노블스빌 위너맥 코트 13463  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
**양영준, 류현경**

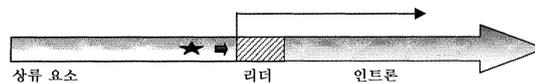
전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 **신규 메이즈 유비퀴틴 프로모터**

**(57) 요약**

제아 메이스 c.v. B73 유비퀴틴-1 (지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1) 프로모터는 식물에서 높은 수준의 구성적 트랜스진 발현을 유도한다. 다중-유전자 구축물에서의 동일한 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 프로모터의 반복 사용은 또한 유전자 침묵을 일으킬 수 있으며, 그에 따라 트랜스제닉 생성물이 덜 효과적으로 생성될 수 있다. 유전자 조절 프로모터 요소, 구축물, 및 상이한 제아 중, 지. 룩수리안스 v1의 Ubi-1 프로모터로부터의 유전자 조절 요소를 사용하여 식물 세포 및/또는 식물 조직에서 트랜스진을 발현시키는 방법이 제공된다.

**대표도** - 도1



(52) CPC특허분류

**C12N 15/8243** (2013.01)

**C12N 15/8274** (2013.01)

(72) 발명자

**라이트 테리 알**

미국 46074 인디애나주 카멜 채리티 체이스 서클  
14162

**제인 수잔 엠**

미국 46077 인디애나주 자이언스빌 카마그 드라이브  
1962

**스미스 더그 에이**

미국 46060 인디애나주 노블스빌 에드워즈 그로브  
드라이브 19038

**알라베드 디아**

미국 46074 인디애나주 카멜 골든 게이트 드라이브  
이스트 13310

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

트랜스진에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 유전자 발현 카세트이며, 여기서 프로모터는 서열식별번호: 2에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것인 유전자 발현 카세트.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 프로모터가 엄격한 조건 하에 서열식별번호: 2의 상보체에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 포함하는 폴리뉴클레오티드 프로브에 혼성화하는 것인 유전자 발현 카세트.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 작동가능하게 연결된 트랜스진이 폴리펩티드 또는 소형 RNA를 코딩하는 것인 유전자 발현 카세트.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 트랜스진이 살균중제 저항성 트랜스진, 제초제 내성 트랜스진, 질소 사용 효율 트랜스진, 물 사용 효율 트랜스진, 영양 품질 트랜스진, DNA 결합 트랜스진, 및 선택 마커 트랜스진으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 유전자 발현 카세트.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 3'-비번역 영역을 추가로 포함하는 유전자 발현 카세트.

#### 청구항 6

제1항의 유전자 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 플라스미드, 코스미드, 박테리아 인공 염색체, 바이러스, 및 박테리오파지로 이루어진 군으로부터 선택되는 재조합 벡터.

#### 청구항 8

제1항의 유전자 발현 카세트를 포함하는 트랜스제닉 세포.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 트랜스제닉 식물 세포인 트랜스제닉 세포.

#### 청구항 10

제9항의 트랜스제닉 식물 세포를 포함하는 트랜스제닉 식물.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 단자엽 또는 쌍자엽 식물인 트랜스제닉 식물.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 단자엽 식물이 메이즈 식물, 벼 식물, 및 밀 식물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 트랜스제닉 식물.

#### 청구항 13

제10항의 트랜스제닉 식물로부터의 트랜스제닉 종자.

**청구항 14**

서열식별번호: 2에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 합성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 트랜스제닉 세포.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 합성 폴리뉴클레오티드가 엄격한 조건 하에 서열식별번호: 2의 상보체에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 포함하는 폴리뉴클레오티드 프로브에 혼성화하는 것인 트랜스제닉 세포.

**청구항 16**

제14항에 있어서, 트랜스제닉 식물 세포인 트랜스제닉 세포.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 트랜스제닉 식물 세포가 식물 형질전환 방법에 의해 생산되는 것인 트랜스제닉 세포.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 식물 형질전환 방법이 아그로박테리움(*Agrobacterium*)-매개 형질전환 방법, 바이오리스틱 형질전환 방법, 탄화규소 형질전환 방법, 원형질체 형질전환 방법, 및 리포솜 형질전환 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 트랜스제닉 세포.

**청구항 19**

제14항의 트랜스제닉 식물 세포를 포함하는 트랜스제닉 식물.

**청구항 20**

제19항에 있어서, 단자엽 식물인 트랜스제닉 식물.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 단자엽 식물이 메이즈 식물, 벼 식물, 및 밀 식물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 트랜스제닉 식물.

**청구항 22**

제21항의 트랜스제닉 식물로부터의 트랜스제닉 종자.

**청구항 23**

제14항의 유전자 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 플라스미드, 코스미드, 박테리아 인공 염색체, 바이러스, 및 박테리오파지로 이루어진 군으로부터 선택되는 재조합 벡터.

**청구항 25**

- a) 3'-비번역 영역에 작동가능하게 연결된 이중 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 서열식별번호: 2를 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 발현 카세트로 식물 세포를 형질전환시키는 것;
- b) 유전자 발현 카세트를 포함하는 형질전환된 식물 세포를 단리하는 것;
- c) 형질전환된 식물 세포를 트랜스제닉 식물로 재생시키는 것; 및
- d) 서열식별번호: 2를 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함하는 트랜스제닉 식물을 수득하는 것

을 포함하는, 트랜스제닉 식물에서 이중 코딩 서열을 발현시키는 방법.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 이중 코딩 서열이 살균충제 저항성 코딩 서열, 제초제 내성 코딩 서열, 질소 사용 효율 코딩 서열, 물 사용 효율 코딩 서열, 영양 품질 코딩 서열, DNA 결합 코딩 서열, 및 선택 마커 코딩 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 27**

제25항에 있어서, 식물 세포를 형질전환시키는 것이 식물 형질전환 방법인 방법.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 식물 형질전환 방법이 아그로박테리움-매개 형질전환 방법, 바이오리스틱 형질전환 방법, 탄화규소 형질전환 방법, 원형질체 형질전환 방법, 및 리포솜 형질전환 방법으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 29**

제25항에 있어서, 트랜스제닉 식물이 단자엽 또는 쌍자엽 트랜스제닉 식물인 방법.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 단자엽 트랜스제닉 식물이 메이즈 식물, 밀 식물, 및 벼 식물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 31**

제25항의 트랜스제닉 식물로부터의 트랜스제닉 종자.

**청구항 32**

제25항에 있어서, 이중 코딩 서열이 트랜스제닉 식물 조직에서 발현되는 것인 방법.

**청구항 33**

제25항에 있어서, 트랜스제닉 식물 조직이 트랜스제닉 식물 뿌리, 싹, 줄기, 또는 화분 조직인 방법.

**청구항 34**

- a) 서열식별번호에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 단리하는 것;
- b) 서열식별번호에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열에 결합하는 복수의 올리고뉴클레오티드 프라이머 서열을 생산하는 것;
- c) 복수의 올리고뉴클레오티드 프라이머 서열로부터 선택된 올리고뉴클레오티드 프라이머 서열을 사용하여 DNA 샘플로부터 서열식별번호에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 증폭시키는 것; 및,
- d) 서열식별번호에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 단리하는 것

을 포함하는, 서열식별번호: 2에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 단리하는 방법.

**청구항 35**

제34항에 있어서, 서열식별번호: 2에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드 서열이 트랜스진에 작동가능하게 연결되는 것인 방법.

**청구항 36**

제35항에 있어서, 작동가능하게 연결된 트랜스진이 폴리펩티드 또는 소형 RNA를 코딩하는 것인 방법.

**청구항 37**

서열식별번호: 2에 대해 적어도 90% 서열 동일성을 포함하는 정제된 폴리뉴클레오티드 서열이며, 여기서 정제된 폴리뉴클레오티드 서열은 트랜스진의 발현을 촉진하는 것인 정제된 폴리뉴클레오티드 서열.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 서열식별번호: 2의 상보체에 대해 적어도 90%의 서열 동일성을 포함하는 폴리뉴클레오티드 프로브 서열이 엄격한 조건 하에 제37항의 정제된 폴리뉴클레오티드 서열에 혼성화하는 것인 정제된 폴리뉴클레오티드 서열.

**청구항 39**

제37항에 있어서, 트랜스진에 작동가능하게 연결된 정제된 폴리뉴클레오티드 서열.

**청구항 40**

제39항에 있어서, 작동가능하게 연결된 트랜스진이 폴리펩티드를 코딩하는 것인 작동가능하게 연결된 트랜스진.

**청구항 41**

3'-비번역 영역에 작동가능하게 연결된 제37항의 트랜스진에 작동가능하게 연결된 정제된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 발현 카세트.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 트랜스진이 살균증제 저항성 트랜스진, 제조제 내성 트랜스진, 질소 사용 효율 트랜스진, 물 사용 효율 트랜스진, 영양 품질 트랜스진, DNA 결합 트랜스진, 및 선택 마커 트랜스진으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 유전자 발현 카세트.

**청구항 43**

제41항의 유전자 발현 카세트를 포함하는 재조합 벡터.

**청구항 44**

제43항에 있어서, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 및 BAC 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되는 재조합 벡터.

**청구항 45**

제37항의 정제된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 트랜스제닉 세포.

**청구항 46**

제45항에 있어서, 트랜스제닉 식물 세포인 트랜스제닉 세포.

**청구항 47**

제46항의 트랜스제닉 식물 세포를 포함하는 트랜스제닉 식물.

**청구항 48**

제47항에 있어서, 단자엽 식물인 트랜스제닉 식물.

**청구항 49**

제48항에 있어서, 단자엽 식물이 메이즈 식물, 밀 식물, 및 벼 식물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 트랜스제닉 식물.

**청구항 50**

제49항의 트랜스제닉 식물로부터의 트랜스제닉 종자.

**발명의 설명**

**기술 분야**

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 35 USC § 119(e) 하에 2013년 12월 31일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 61/922,529를 우선권 주장하고, 그 전체 개시 내용이 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] 전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 참조
- [0004] 서열 목록의 공식 사본은 2014년 12월 30일에 생성되고 13.3 킬로바이트 크기를 갖는 "75665\_ST25.txt"로 명명된 ASCII 포맷화된 서열 목록으로서 EFS-웹을 통해 전자적으로 제출되었고, 이는 본 명세서와 함께 제출된다. 이 ASCII 포맷화된 문서에 함유된 서열 목록은 본 명세서의 일부이고, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0005] 발명 분야
- [0006] 본 발명은 일반적으로 식물 분자 생물학 분야, 및 보다 구체적으로, 식물에서의 트랜스진의 발현의 분야에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0007] 다수의 식물 종은 트랜스진으로 형질전환되어 농경학상 바람직한 형질 또는 특징을 도입할 수 있다. 식물 종은 특정한 바람직한 형질을 가지도록 개발되고/거나 변형된다. 일반적으로, 바람직한 형질은, 예를 들어 영양 품질 개선, 수율 증가, 해충 또는 질병 저항성 부여, 가뭄 및 스트레스 내성 증가, 원예 품질 (예를 들면, 착색 및 성장) 개선, 제초제 저항성 부여, 식물로부터의 산업상 유용한 화합물 및/또는 물질의 생산 가능 및/또는 제약의 생산 가능성을 포함한다.
- [0008] 단일 계놈 유전자좌에 스택킹된 다중 트랜스진을 포함하는 트랜스제닉 식물 종은 식물 형질전환 기술을 통해 생산된다. 식물 형질전환 기술은 식물 세포 내로의 트랜스진의 도입, 식물 계놈 내에 안정하게 통합된 트랜스진 카피를 함유하는 생식력 있는 트랜스제닉 식물의 회수, 및 식물 계놈의 전사, 및 번역을 통한 후속 트랜스진 발현에 의한 바람직한 형질 및 표현형을 보유하는 트랜스제닉 식물의 생성을 발생시킨다. 그러나, 형질 스택으로서 조작된 다중 트랜스진을 고도로 발현하는 트랜스제닉 식물 종의 생산을 가능하게 하는 메카니즘이 바람직하다.
- [0009] 마찬가지로, 식물의 특정한 조직 또는 기관 내에서 트랜스진이 발현되도록 하는 메카니즘이 바람직하다. 예를 들어, 토양-매개 병원체에 의한 감염에 대한 식물의 증가된 저항성은 병원체-저항성 단백질이 식물의 뿌리 내에서 강하게 발현되도록 식물 계놈을 병원체-저항성 유전자로 형질전환시킴으로써 달성될 수 있다. 대안적으로, 트랜스진을 특정한 성장 또는 발생 단계에 있는, 예컨대, 예를 들어 세포 분열 또는 신장 중인 식물 조직에서 발현시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0010] 프로모터, 상류-프로모터, 5'-UTR, 및 인트론을 포함하는 제아 룩수리안스(*Zea luxurians*) Ubi-1 프로모터 조절 요소가 본원에 기재된다. 유전자 조절 요소를 사용하는 구축물 및 방법이 추가로 기재된다.

**발명의 내용**

- [0011] 개요
- [0012] 식물 세포, 및/또는 식물 조직에서 트랜스진의 발현을 위한 프로모터, 구축물, 및 방법이 본원에 개시된다. 한 실시양태에서, 트랜스진의 발현은 프로모터의 사용을 포함한다. 한 실시양태에서, 프로모터는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열은 상류-프로모터, 5'-비번역 영역(5'-UTR) 또는 리더 서열, 및 인트론을 포함한다. 한 실시양태에서, 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열은 유비퀴틴-1 유전자(Ubi-1)를 포함한다. 한 실시양태에서, 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열은 제아 룩수리안스(지. 룩수리안스(*Z. luxurians*))의 Ubi-1 유전자를 포함한다.
- [0013] 한 실시양태에서, 구축물은 지. 룩수리안스의 Ubi-1 유전자로부터 수득된 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함한다. 한 실시양태에서, 지. 룩수리안스로부터의 Ubi-1 프로모터 폴리뉴클레

오티드 서열은 상류-프로모터 영역, 5'-UTR 또는 리더 서열, 및 인트론을 포함한다. 한 실시양태에서, 구축물은 피알리디움(*Phialidium*) 종으로부터의 황색 형광 단백질을 코딩하는 유전자 (PhiYFP)로부터의 인트론에 융합된 지. 룩수리안스 Ubi-1 유전자로부터 수득된 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함한다. 한 실시양태에서, 구축물은 피알리디움 종으로부터의 황색 형광 단백질을 코딩하는 유전자 (PhiYFP)로부터의 인트론에 융합된 지. 룩수리안스 Ubi-1 유전자로부터 수득된 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열, 이어서 지. 메이스(*Z. mays*)의 피옥시다제 5 유전자 (*ZmPer5*)의 3'-비번역 영역 (3'-UTR)을 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함한다. 생성된 폴리뉴클레오티드 서열은 신규 프로모터 유전자 조절 요소를 포함한다.

[0014] 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 트랜스진 또는 이중 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 유전자 프로모터 조절 요소를 포함한다. 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과인 트랜스진을 포함한다.

[0015] 신규 유전자 프로모터 조절 요소 (예를 들면, 상류-프로모터, 5'-UTR, 및 인트론)를 사용하여 트랜스진을 발현하는 식물을 성장시키는 방법이 본원에 개시된다. 신규 유전자 프로모터 조절 요소를 사용하여 트랜스진을 발현하는 식물 조직 및 세포를 배양하는 방법이 본원에 또한 개시된다. 한 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 방법은 식물 잎, 뿌리, 캘러스, 및 화분에서의 구성적 유전자 발현을 포함한다. 신규 유전자 프로모터 조절 요소를 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 정제하는 방법이 또한 본원에 개시된다.

### 도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 제아 메이스(*Zea mays*) c.v. B73 Ubi-1 유전자를 포함하는 개략적 신규 프로모터를 보여준다. 프로모터는 상류 요소, 5'-UTR 또는 리더 서열, 및 인트론으로 구성된다. 상류 요소는 긴 화살표로 표시된 전사 개시 부위 (TSS)의 5' 상류에 위치한다. 상류 요소는 짧은 화살표로 표시된 조절 요소, 예컨대 TATA 박스, 및 별표로 표시된 열 쇼크 요소로 구성된다.

도 2는 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 유전자의 PCR 증폭된 프로모터 서열을 포함하는 벡터 pDAB105710에 대한 플라즈미드 지도를 보여준다.

도 3은 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 대조 프로모터의 폴리뉴클레오티드 서열 (서열식별번호: 1)을 보여주며, 상류-프로모터 영역은 밑줄표시되어 있고, 5'-UTR/리더 서열은 음영표시되어 있고, 인트론 영역은 소문자로 되어 있다.

도 4는 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터의 폴리뉴클레오티드 서열 (서열식별번호: 2)을 보여주며, 상류-프로모터 영역은 밑줄표시되어 있고, 5'-UTR/리더 서열은 음영표시되어 있고, 인트론 영역은 소문자로 되어 있다.

도 5는 지. 메이스 c.v. B73 대조 상류-프로모터 서열 (서열식별번호: 3)과 비교한 지. 룩수리안스 v1의 상류-프로모터 영역의 폴리뉴클레오티드 서열 (서열식별번호: 4) 정렬을 보여준다.

도 6은 지. 메이스 c.v. B73 대조 5'-UTR/리더 서열 (서열식별번호: 5)과 비교한 지. 룩수리안스 v1의 5'-UTR/리더 영역의 폴리뉴클레오티드 서열 (서열식별번호: 6) 정렬을 보여준다.

도 7은 지. 메이스 c.v. B73 대조 인트론 서열 (서열식별번호: 7)과 비교한 지. 룩수리안스 v1의 인트론 영역의 폴리뉴클레오티드 서열 (서열식별번호: 8) 정렬을 보여준다.

도 8은 목표 벡터, pDAB10197 내로 삽입된 대조 진입 벡터, pDAB105742 (지. 메이스 c.v. B73)를 포함하는 이원 발현 구축물, pDAB105748의 벡터 지도를 보여준다.

도 9는 목표 벡터, pDAB10197 내로 삽입된 진입 벡터, pDAB105737 (지. 룩수리안스 v1)을 포함하는 이원 발현 구축물, pDAB105743의 벡터 지도를 보여준다.

도 10은 이원 발현 구축물 pDAB105748 (지. 메이스 c.v. B73) 및 pDAB105743 (지. 룩수리안스 v1)에 대한 T<sub>0</sub> 식물 캘러스에서의 PhiYFP 유전자 발현을 보여준다.

도 11은 이원 발현 구축물 pDAB105748 (지. 메이스 c.v. B73), pDAB105743 (지. 룩수리안스 v1), 및 음성 대조군에 대한 T<sub>1</sub> 식물 화분에서의 PhiYFP 유전자 발현을 보여준다.

도 12는 ZmUbi-1 프로모터 v2에 의해 유도되는 PhiYFP 리포터 유전자 및 ZmPer5 3'-UTR, 및 지. 룩수리안스 v1에 의해 유도되는 AAD-1 v3 유전자 및 ZmLip 3'-UTR v1을 포함하는 이원 발현 구축물, pDAB112853의 벡터 지도

를 보여준다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0017] 정의
- [0018] 본원에 사용된 단수 형태는 달리 문맥상 명백하게 및 명확하게 지시되지 않는 한, 복수 지시대상을 포함한다.
- [0019] 본원에 사용된 용어 "역교배"는 육종가가 잡종 자손을 다시 부모 중 하나와, 예를 들어 제1 세대 잡종 F1을 F1 잡종의 부모 유전자형 중 하나와 교배시키는 과정을 지칭한다.
- [0020] 본원에 사용된 용어 "인트론"은 전사되지만 번역되지 않는 유전자 (또는 발현되는 관심 뉴클레오티드 서열)에 포함된 임의의 핵산 서열을 지칭한다. 인트론은 DNA의 발현된 서열 내의 비번역 핵산 서열뿐만 아니라, 그로부터 전사된 RNA 분자 중의 상응하는 서열을 포함한다.
- [0021] 본원에 기재된 구축물은 또한 번역 및/또는 mRNA 안정성을 증진시키는 서열, 예컨대 인트론을 함유할 수 있다. 이러한 한 인트론의 예는 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*)의 히스톤 H3 변이체의 유전자 II의 제1 인트론 또는 통상적으로 공지된 임의의 다른 인트론 서열이다. 인트론은 프로모터 서열과 함께 사용되어 번역 및/또는 mRNA 안정성을 증진시킬 수 있다.
- [0022] 본원에 사용된 용어 "5'-비번역 영역" 또는 "5'-UTR"은 프리-mRNA 또는 성숙 mRNA의 5' 말단의 비번역 절편을 지칭한다. 예를 들어, 성숙 mRNA 상에서, 5'-UTR은 전형적으로 그의 5' 말단에 7-메틸구아노신 캡을 보유하고, 다수의 과정, 예컨대 스플라이싱, 폴리아데닐화, 세포질을 향한 mRNA 유출, 번역 기구에 의한 mRNA의 5' 말단 확인, 및 분해에 대한 mRNA 보호에 관련된다.
- [0023] 본원에 사용된 용어 "3'-비번역 영역" 또는 "3'-UTR"은 프리-mRNA 또는 성숙 mRNA의 3' 말단의 비번역 절편을 지칭한다. 예를 들어, 성숙 mRNA 상에서 이 영역은 폴리-(A) 꼬리를 보유하고, mRNA 안정성, 번역 개시, 및 mRNA 유출에서 많은 역할을 갖는 것으로 공지되어 있다.
- [0024] 본원에 사용된 용어 "폴리아데닐화 신호"는 전사체가 폴리-(A) 폴리머라제의 존재 하에, 예를 들어 폴리-(A) 신호의 10 내지 30 염기에 위치하는 폴리아데닐화 부위 상에서 폴리아데닐화되도록 하는 mRNA 전사체에 존재하는 핵산 서열을 지칭한다. 다수의 폴리아데닐화 신호는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 본 발명에 유용하다. 예시적인 서열은 문헌 [Loke J., et al., (2005) *Plant Physiology* 138(3); 1457-1468]에 기재된 바와 같이, AAUAAA 및 그의 변이체를 포함한다.
- [0025] 본원에 사용된 용어 "단리된"은 생물학적 성분 (핵산 또는 단백질 포함)이 그 성분을 자연적으로 발생시키는 유기체의 세포 내의 다른 생물학적 성분 (즉, 다른 염색체 및 염색체의 DNA)으로부터 분리된 것을 지칭한다.
- [0026] 본원에 사용된, 핵산 분자에 관한 용어 "정제된"은 완전한 순수성 (예컨대, 균질 제조)을 요구하지 않는다. 대신에, "정제된"은 서열이 그의 본래 세포 환경에서보다 비교적 더 순수하다는 것을 나타낸다. 예를 들어, 핵산의 "정제된" 수준은 그의 자연적 수준과 비교하여 농도 또는 유전자 발현 수준의 관점에서 적어도 2-5배 더 커야 한다.
- [0027] 청구된 DNA 분자는 직접적으로 총 DNA로부터 또는 총 RNA로부터 취득될 수 있다. 추가로, cDNA 클론은 자연 발생하지 않지만, 오히려 바람직하게는 부분적으로 정제된 자연 발생 물질 (메신저 RNA)의 조작을 통해 취득된다. mRNA로부터의 cDNA 라이브러리의 구축은 합성 물질 (cDNA)의 생성을 수반한다. 개별적 cDNA 클론은 cDNA 라이브러리를 보유하는 세포의 클론 선택에 의해 합성 라이브러리로부터 정제될 수 있다. 따라서, mRNA로부터의 cDNA 라이브러리의 구축 및 별개의 cDNA 클론의 정제를 포함하는 과정은 천연 메시지의 대략 10<sup>6</sup>배 정제를 발생시킨다. 마찬가지로, 프로모터 DNA 서열은 플라스미드 내로 클로닝될 수 있다. 이러한 클론은 자연 발생하지 않지만, 오히려 바람직하게는 부분적으로 정제된 자연 발생 물질, 예컨대 게놈 DNA 라이브러리의 조작을 통해 취득된다. 따라서, 적어도 한 자릿수, 바람직하게는 두 또는 세 자릿수, 보다 바람직하게는 네 또는 다섯 자릿수로의 정제가 이 기술에서 선호된다.
- [0028] 유사하게, 정제는 성분 DNA 서열에서 화학적 또는 기능적 변화가 발생했다는 것을 나타낸다. "정제된" 핵산 분자 및 단백질은 표준 정제 방법에 의해 정제된 핵산 분자 및 단백질을 포함한다. 용어 "정제된"은 또한 숙주 세포 (예를 들면, 식물 세포)에서 재조합 DNA 방법에 의해 제조된 핵산 및 단백질뿐만 아니라, 화학적으로 합성된 핵산 분자, 단백질, 및 펩티드를 포괄한다.

- [0029] 용어 "재조합"은 유전자 재조합이 발생한 세포 또는 유기체를 의미한다. 이는 또한 인간 개입에 의해 인공적으로 또는 합성적으로 (즉, 비-자연적으로) 변경된 분자 (예를 들면, 벡터, 플라스미드, 핵산, 폴리펩티드, 또는 소형 RNA)를 포함한다. 변경은 그의 자연 환경 또는 상태 내의 또는 그로부터 분리된 분자 상에서 수행될 수 있다.
- [0030] 본원에 사용된 용어 "발현"은 폴리뉴클레오티드가 mRNA (소형 RNA 분자 포함)로 전사되는 과정 및/또는 전사된 mRNA (또한 "전사체"로서 지칭된)가 후속적으로 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질로 번역되는 과정을 지칭한다. 유전자 발현은 외부 신호, 예를 들어 유전자 발현을 증가 또는 감소시키는 작용제로의 세포, 조직, 또는 유기체의 노출에 의해 영향을 받을 수 있다. 유전자의 발현은 DNA → RNA → 단백질의 경로 중 임의의 곳에서 조절될 수 있다. 유전자 발현의 조절은, 예를 들어 전사, 번역, RNA 수송 및 프로세싱, 중간 분자, 예컨대 mRNA의 분해에 작용하는 제어를 통해, 또는 특정 단백질 분자가 제조된 후에 그의 활성화, 불활성화, 구획화, 또는 분해를 통해, 또는 그의 조합에 의해 발생한다. 유전자 발현은 노던(Northern) 블롯, RT-PCR, 웨스턴(Western) 블롯, 또는 시험관내, 계내, 또는 생체내 단백질 활성 검정(들)을 비제한적으로 포함하는, 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 RNA 수준 또는 단백질 수준에서 측정될 수 있다.
- [0031] 본원에 사용된 용어 "상동성-기반 유전자 침묵" 또는 "HBGS"는 전사 유전자 침묵 및 전사 후 유전자 침묵 둘 다를 포함하는 일반 용어이다. 연결되지 않은 침묵 유전자좌에 의한 표적 유전자좌의 침묵은 각각 프로모터 또는 전사된 서열에 상응하는 이중-가닥 RNA (dsRNA)의 생산에 의해, 전사 억제 (예를 들면, 전사 유전자 침묵; TGS) 또는 mRNA 분해 (예를 들면, 전사후 유전자 침묵; PTGS)로부터 야기될 수 있다. 각 과정에서 별개의 세포 성분의 관여는 dsRNA-유도된 TGS 및 PTGS가 고전적인 통상의 메카니즘의 다양화로부터 야기되었을 가능성을 시사한다. 그러나, TGS 및 PTGS의 엄격한 비교는 일반적으로 별개의 침묵 유전자좌의 분석에 의존하기 때문에 달성하기가 어려웠다. 단일 트랜스진 유전자좌는 상이한 표적 유전자의 프로모터 및 전사된 서열에 상응하는 dsRNA의 생산으로 인해 TGS 및 PTGS 둘 다를 촉발하는 것으로 설명될 수 있다.
- [0032] 본원에 사용된 용어 "핵산 분자", "핵산", 또는 "폴리뉴클레오티드" (3개 용어는 모두 서로 동의어임)는 RNA, cDNA, 게놈 DNA, 및 합성 형태, 및 그의 혼합된 중합체의 센스 및 안티-센스 가닥 둘 다를 포함할 수 있는, 뉴클레오티드의 중합체 형태를 지칭한다. "뉴클레오티드"는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 또는 어느 하나의 뉴클레오티드 유형의 변형된 형태를 지칭할 수 있다. 핵산 분자는 통상적으로, 달리 명칭되지 않는 한 적어도 10개의 염기 길이이다. 용어는 결정되지 않은 길이의 RNA 또는 DNA 분자를 지칭할 수 있다. 용어는 DNA의 단일- 및 이중-가닥 형태를 포함한다. 핵산 분자는 자연 발생 및/또는 비-자연 발생 뉴클레오티드 연결에 의해 함께 연결된 자연-발생 및 변형된 뉴클레오티드 중 어느 하나 또는 둘 다를 포함할 수 있다.
- [0033] 핵산 분자는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 인지되는 바와 같이, 화학적으로 또는 생화학적으로 변형될 수 있거나, 비-천연 또는 유도체화 뉴클레오티드 염기를 함유할 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 표지, 메틸화, 자연 발생 뉴클레오티드 중 하나 이상의 유사체로의 치환, 뉴클레오티드간 변형 (예를 들면, 비하전된 연결, 예컨대 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포르아미데이트, 카르바메이트 등; 하전된 연결, 예컨대 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등; 팬던트 모이어티, 예컨대 펩티드; 삽입제, 예컨대 아크리딘, 프소랄렌 등; 킬레이트화제; 알킬화제; 및 변형된 연결, 예컨대 알파 아노머 핵산 등)을 포함한다. 용어 "핵산 분자"는 또한 단일-가닥, 이중-가닥, 부분 이중나선, 삼중나선, 헤어핀, 원형, 및 패드록 입체형태를 비롯한 임의의 위상 입체형태를 포함한다.
- [0034] 전사는 DNA 가닥을 따라 5'에서 3'으로의 방식으로 진행된다. 이는 RNA가 피로포스페이트의 필수적인 제거와 함께 성장하는 쇠의 3' 말단으로의 리보뉴클레오티드-5'-트리포스페이트의 순차적 첨가에 의해 제조된다는 것을 의미한다. 선형 또는 원형 핵산 분자에서, 별개의 요소 (예를 들면, 특정한 뉴클레오티드 서열)는 이들이 추가의 요소로부터 5' 방향으로 동일한 핵산에 결합하거나 결합할 것이라면 추가의 요소에 대해 "상류"인 것으로 지칭될 수 있다. 유사하게, 별개의 요소는 이들이 추가의 요소로부터 3' 방향으로 동일한 핵산에 결합하거나 결합할 것이라면 추가의 요소에 대해 "하류"인 것으로 지칭될 수 있다.
- [0035] 본원에 사용된 용어 "염기 위치"는 지정된 핵산 내의 주어진 염기 또는 뉴클레오티드 잔기의 위치를 지칭한다. 지정된 핵산은 참조 핵산과의 정렬에 의해 규정될 수 있다.
- [0036] 본원에 사용된 용어 "혼성화"는 올리고뉴클레오티드 및 그의 유사체가 왓슨-크릭(Watson-Crick), 후그스틴(Hoogsteen), 또는 역 후그스틴 수소 결합을 포함하는, 상보적 염기 사이의 수소 결합에 의해 혼성화하는 과정을 지칭한다. 일반적으로, 핵산 분자는 피리미딘, 예컨대 시토신 (C), 우라실 (U), 및 티민 (T), 또는 퓨린, 예컨대 아데닌 (A) 및 구아닌 (G)인 질소함유 염기로 이루어진다. 질소함유 염기는 피리미딘과 퓨린 사이에 수

소 결합을 형성하고, 피리민딘의 퓨린에의 결합은 "염기 쌍형성"으로서 지칭된다. 보다 구체적으로, A는 T 또는 U에 특이적 수소 결합을 형성할 것이고, G는 C에 특이적으로 결합할 것이다. "상보적"은 2개의 별개의 핵산 서열 또는 동일한 핵산 서열의 2개의 별개의 영역 사이에서 발생하는 염기 쌍형성을 지칭한다.

[0037] 본원에 사용된 용어 "특이적으로 혼성화가능한" 및 "특이적으로 상보적"은 안정한 및 특이적 결합이 올리고뉴클레오티드와 DNA 또는 RNA 표적 사이에서 발생하도록 하기에 충분한 정도의 상보성을 지칭한다. 올리고뉴클레오티드는 특이적으로 혼성화하기 위해 표적 서열에 대해 100% 상보적일 필요는 없다. 올리고뉴클레오티드는, 올리고뉴클레오티드의 표적 DNA 또는 RNA 분자에의 결합이 표적 DNA 또는 RNA의 정상적인 기능을 방해하는 경우에 특이적으로 혼성화가능하고, 특이적 결합이 요구되는 조건 하에, 예를 들어 생체내 검정 또는 시스템의 경우에서의 생리학적 조건 하에 올리고뉴클레오티드의 비-표적 서열에의 비-특이적 결합을 회피하기에 충분한 정도의 상보성이 존재한다. 이러한 결합은 특이적 혼성화로서 지칭된다. 특정한 정도의 엄격도를 발생시키는 혼성화 조건은 선택된 혼성화 방법의 성질 및 혼성화 핵산 서열의 조성 및 길이에 따라 달라질 것이다. 일반적으로, 혼성화 온도 및 혼성화 완충제의 이온 강도 (특히,  $Na^+$  및/또는  $Mg^{2+}$  농도)가 혼성화의 엄격도에 기여하지만, 세척 시간도 또한 엄격도에 영향을 미친다. 특정한 정도의 엄격도를 획득하는데 요구되는 혼성화 조건에 관한 계산은 문헌 [Sambrook et al. (ed.), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989]에 논의되어 있다.

[0038] 본원에 사용된 용어 "엄격한 조건"은 혼성화 분자와 DNA 표적 사이에 50% 미만의 미스매치가 있는 경우에만 혼성화가 발생할 조건을 포괄한다. "엄격한 조건"은 추가의 특정한 수준의 엄격도를 포함한다. 따라서, 본원에 사용된 "중증도의 엄격도"의 조건은 50% 초과 서열 미스매치를 갖는 분자가 그 조건 하에 혼성화하지 않는 것이고; "고도의 엄격도"의 조건은 20% 초과 미스매치를 갖는 서열이 그 조건 하에 혼성화하지 않는 것이고; "매우 고도의 엄격도"의 조건은 10% 초과 미스매치를 갖는 서열이 그 조건 하에 혼성화하지 않는 것이다. 특정한 실시양태에서, 엄격한 조건은 65°C에서의 혼성화에 이어서, 40분 동안 65°C에서 0.1x SSC/0.1% SDS로의 세척을 포함할 수 있다. 하기는 대표적인 비제한적 혼성화 조건이다:

[0039] · 매우 고도의 엄격도: 16시간 동안 65°C에서 5x SSC 완충제 중에서 혼성화; 각각 15분 동안 실온에서 2x SSC 완충제 중에서 2회 세척; 및 각각 20분 동안 65°C에서 0.5x SSC 완충제 중에서 2회 세척.

[0040] · 고도의 엄격도: 16-20시간 동안 65-70°C에서 5-6x SSC 완충제 중에서 혼성화; 각각 5-20분 동안 실온에서 2x SSC 완충제 중에서 2회 세척; 및 각각 30분 동안 55-70°C에서 1x SSC 완충제 중에서 2회 세척.

[0041] · 중증도의 엄격도: 16-20시간 동안 실온에서 55°C로 6x SSC 완충제 중에서 혼성화; 각각 20-30분 동안 실온에서 55°C로 2-3x SSC 완충제 중에서 적어도 2회 세척.

[0042] 한 실시양태에서, 특이적으로 혼성화가능한 핵산 분자는 매우 고도의 엄격도의 혼성화 조건 하에서 결합된 상태로 유지될 수 있다. 한 실시양태에서, 특이적으로 혼성화가능한 핵산 분자는 고도의 엄격도의 혼성화 조건 하에서 결합된 상태로 유지될 수 있다. 한 실시양태에서, 특이적으로 혼성화가능한 핵산 분자는 중증도의 엄격도의 혼성화 조건 하에서 결합된 상태로 유지될 수 있다.

[0043] 본원에 사용된 용어 "올리고뉴클레오티드"는 짧은 핵산 중합체를 지칭한다. 올리고뉴클레오티드는 더 긴 핵산 절편의 절단에 의해, 또는 개별 뉴클레오티드 전구체의 중합에 의해 형성될 수 있다. 자동 합성기는 수백 개의 염기쌍 길이 까지의 올리고뉴클레오티드 합성을 허용한다. 올리고뉴클레오티드는 상보적 뉴클레오티드 서열에 결합할 수 있기 때문에, 이는 DNA 또는 RNA를 검출하기 위한 프로브로서 사용될 수 있다. DNA (올리고데옥시리보뉴클레오티드)로 구성된 올리고뉴클레오티드는 짧은 DNA 서열의 증폭을 위한 기술인 폴리머라제 연쇄 반응에 사용될 수 있다. 폴리머라제 연쇄 반응에서, DNA 폴리머라제가 올리고뉴클레오티드를 연장시키고 상보적 가닥을 복제하도록 하는 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 "프라이머"로서 지칭된다.

[0044] 본원에 사용된 용어 "폴리머라제 연쇄 반응" 또는 "PCR"은 미국 특허 번호 4,683,195에 기재된 바와 같이 미량의 핵산, RNA, 및/또는 DNA를 증폭시키는 절차 또는 기술을 지칭한다. 일반적으로, 관심 영역의 말단 또는 그 너머로부터의 서열 정보는 올리고뉴클레오티드 프라이머가 설계될 수 있도록 이용가능할 필요가 있다. PCR 프라이머는 증폭될 핵산 주형의 대향하는 가닥과 서열상 동일하거나 유사할 것이다. 2개 프라이머의 5' 말단 뉴클레오티드는 증폭되는 물질의 말단과 일치할 수 있다. PCR은 특정 RNA 서열 또는 DNA 서열을 전체 게놈 DNA 및 전체 세포 RNA, 박테리오파지, 또는 플라스미드 서열 등으로부터 전사되는 cDNA로부터 증폭시키는데 사용될 수 있다. 일반적으로 문헌 [Mullis et al., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51:263 (1987); Erlich, ed., *PCR Technology*, (Stockton Press, NY, 1989)]을 참조한다.

- [0045] 본원에 사용된 용어 "프라이머"는 조건이 프라이머 연장 생성물의 합성에 적합한 경우에 상보적 가닥을 따라 합성의 개시점으로서 작용할 수 있는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 합성 조건은 4가지의 상이한 데옥시리보뉴클레오티드 트리포스페이트 (즉, A, T, G, 및 C)의 존재 및 적어도 1종의 중합-유도 작용제 또는 효소, 예컨대 역전사효소 또는 DNA 폴리머라제를 포함한다. 이들 시약은 전형적으로 보조인자이거나, 각종 다양한 적합한 온도에서 pH 등과 같은 조건에 영향을 미치는 구성성분을 포함할 수 있는 적합한 완충제 중에 존재한다. 프라이머는 바람직하게 증폭 효율이 최적화되도록 하는 단일 가닥 서열이지만, 이중 가닥 서열이 사용될 수도 있다.
- [0046] 본원에 사용된 용어 "프로브"는 표적 서열에 혼성화하는 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 택맨(TaqMan)<sup>®</sup> 또는 택맨<sup>®</sup>-스타일 검정 절차에서, 프로브는 2개의 프라이머의 어닐링 부위 사이에 위치하는 표적 부분에 혼성화된다. 프로브는 약 8개의 뉴클레오티드, 약 10개의 뉴클레오티드, 약 15개의 뉴클레오티드, 약 20개의 뉴클레오티드, 약 30개의 뉴클레오티드, 약 40개의 뉴클레오티드, 또는 약 50개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로브는 약 8개의 뉴클레오티드 내지 약 15개의 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0047] 서던(Southern) 블롯 검정 절차에서, 프로브는 막에 부착되는 DNA 단편에 혼성화한다. 프로브는 약 10개의 뉴클레오티드, 약 100개의 뉴클레오티드, 약 250개의 뉴클레오티드, 약 500개의 뉴클레오티드, 약 1,000개의 뉴클레오티드, 약 2,500개의 뉴클레오티드, 또는 약 5,000개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로브는 약 500개의 뉴클레오티드 내지 약 2,500개의 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0048] 프로브는 검출가능한 표지, 예컨대 방사성 표지, 비오티닐화 표지, 형광단 (예를 들면, 텍사스-레드(Texas-Red)<sup>®</sup>, 플루오레세인 이소티오시아네이트 등)을 추가로 포함할 수 있다. 검출가능한 표지는 표지가 프로브의 5' 말단 또는 3' 말단에 위치하도록 프로브 올리고뉴클레오티드에 직접 공유 부착될 수 있다. 형광단을 포함하는 프로브는 또한 켄처 염료 (예를 들면, 블랙 홀 켄처(Black Hole Quencher)<sup>™</sup>, 아이오와 블랙(Iowa Black)<sup>™</sup> 등)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0049] 본원에 사용된 용어 "서열 동일성" 또는 "동일성"은 상호교환가능하게 사용될 수 있고, 명시된 비교 윈도우 상에서 최대의 상응도를 위해 정렬된 경우에 동일한 2개의 서열 내의 핵산 잔기를 지칭한다.
- [0050] 본원에 사용된 용어 "서열 동일성의 백분율" 또는 "서열 상동성의 백분율"은 비교 윈도우 상에서 2개의 최적으로 정렬된 서열 (예를 들면, 핵산 서열 및 아미노산 서열)을 비교함으로써 측정된 값을 지칭하며, 여기서 비교 윈도우 중 서열의 일부는, 2개의 서열의 최적 정렬을 수득하기 위해 참조 서열과 비교하여, 첨가, 치환, 미스매치, 및/또는 결실 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 백분율은, 동일한 핵산 또는 아미노산 잔기가 둘 다의 서열에서 발생하는 위치의 개수를 결정하여 매칭되는 위치의 개수를 산출하고, 매칭되는 위치의 개수를 비교 윈도우에서의 위치의 총 개수로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 백분율을 산출함으로써 계산된다. 비교를 위해 서열을 정렬하는 방법은 널리 공지되어 있다. 다양한 생물정보학 또는 컴퓨터 프로그램 및 정렬 알고리즘, 예컨대 클러스탈W(ClustalW) 및 시퀀처(Sequencher)가 또한 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고/거나, 예를 들어 문헌 [Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482; Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443; Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444; Higgins and Sharp (1988) Gene 73:237-44; Higgins and Sharp (1989) CABIOS 5:151-3; Corpet et al. (1988) Nucleic Acids Res. 16:10881-90; Huang et al. (1992) Comp. Appl. Biosci. 8:155-65; Pearson et al. (1994) Methods Mol. Biol. 24:307-31; Tatiana et al. (1999) FEMS Microbiol. Lett. 174:247-50]에 기재되어 있다.
- [0051] 여러 서열 분석 프로그램과 함께 사용하기 위한 경우, 국립 생물 정보 센터 (NCBI) 베이직 로컬 얼라인먼트 서치 툴(Basic Local Alignment Search Tool) (BLAST<sup>™</sup>; 문헌 [Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10])은 국립 생물 정보 센터 (메릴랜드주 베데스다)를 비롯한 여러 공급원으로부터, 및 인터넷 상에서 입수가능하다. 이 프로그램을 사용하여 서열 동일성을 측정하는 방법의 설명은 BLAST<sup>™</sup>의 "도움" 섹션 하에 인터넷 상에서 입수가능하다. 핵산 서열의 비교를 위해, BLAST<sup>™</sup> (Blastn) 프로그램의 "Blast 2 서열" 기능이 디폴트 파라미터를 사용하여 사용될 수 있다. 참조 서열에 대해 훨씬 더 큰 유사성을 갖는 핵산 서열은 본 방법에 의해 평가된 경우에 증가하는 동일성 백분율을 나타낼 것이다.
- [0052] 본원에 사용된 용어 "작동가능하게 연결된"은 또 다른 핵산과 기능적 관계로 배치된 핵산을 지칭한다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 핵산이 인접함을 의미할 수 있다. 연결은 편리한 제한 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우에는, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커를 핵산에 라이게이션 또는 어닐링시키고, 이를 사용하여 인접 폴리뉴클레오티드 단편을 연결시킨다. 그러나, 요

소는 작동가능하게 연결되기 위해 인접할 필요는 없다.

- [0053] 본원에 사용된 용어 "프로모터"는 일반적으로 유전자의 상류에 (즉, 유전자의 5' 말단을 향해) 위치하고 유전자의 전사를 개시하고 유도하는데 필요한 DNA의 영역을 지칭한다. 프로모터는, 프로모터가 제어하는 유전자의 적절한 활성화 또는 억제를 허용할 수 있다. 프로모터는 전사 인자에 의해 인식되는 특정 서열을 함유할 수 있다. 이들 인자는 프로모터 DNA 서열에 결합할 수 있고, 이는 유전자의 코딩 영역으로부터 RNA를 합성하는 효소인 RNA 폴리머라제의 동원을 유발한다. 프로모터는 일반적으로 5'-UTR, 인트론, 및 리더 서열을 비롯한 유전자의 상류에 위치하는 모든 유전자 조절 요소를 지칭한다.
- [0054] 본원에 사용된 용어 "상류-프로모터"는 전사의 개시를 지시하기에 충분한 인접 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 상류-프로모터는 TATA 박스, 개시 (Intr) 서열, TFIIB 인식 요소 (BRE), 및 다른 프로모터 모티프를 포함하는 여러 서열 모티프를 갖는 전사의 개시 부위를 포괄한다 (문헌 [Jennifer, E.F. et al, (2002) Genes & Dev., 16: 2583-2592]). 상류-프로모터는 TFIIA, B, D, E, F, 및 H와 같은 기본적인 또는 일반적 전사 인자를 사용하는 다중-서브유닛 효소인 RNA 폴리머라제 II에 대한 작용 부위를 제공한다. 이들 인자는 DNA 주형으로부터 RNA의 합성을 촉매하는 전사 개시전 복합체 (PIC)로 조립된다.
- [0055] 상류-프로모터의 활성화는 다양한 단백질이 결합하고 후속적으로 전사 개시 복합체와 상호작용하여 유전자 발현을 활성화시키는 조절 DNA 서열 요소의 첨가에 의해 수행된다. 이들 유전자 조절 요소 서열은 특정 DNA-결합 인자와 상호작용한다. 이들 서열 모티프는 때때로 시스-요소로서 지칭될 수 있다. 조직-특이적 또는 발생-특이적 전사 인자가 결합하는 이러한 시스-요소는 개별적으로 또는 조합되어 프로모터의 시공적 발현 패턴을 전사 수준에서 결정할 수 있다. 이들 시스-요소는 작동가능하게 연결된 유전자에 대해 발휘하는 제어 유형에서 광범위하게 다르다. 일부의 요소는 환경 반응 (예를 들면, 온도, 수분, 및 상처 형성)에 반응하여 작동가능하게 연결된 유전자의 전사를 증가시키도록 작용한다. 다른 시스-요소는 발생 신호 (예를 들면, 발아, 종자 성숙, 및 개화) 또는 공간 정보 (예를 들면, 조직 특이성)에 반응할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Langridge et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3219-23]을 참조한다. 이들 시스-요소는 전사 개시점으로부터 다양한 거리에 위치한다. 일부 시스-요소 (근위 요소로 불림)는 최소 코어 프로모터 영역에 인접한 반면, 다른 요소는 프로모터 (인헨서)의 수 킬로염기 5' 상류 또는 3' 하류에 위치할 수 있다.
- [0056] 본원에 사용된 용어 "형질전환"은 핵산 분자를 세포 내로 도입할 수 있는 모든 기술을 포괄한다. 예는 다음을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다: 바이러스 벡터를 사용하는 형질감염; 플라스미드 벡터를 사용하는 형질전환; 전기천공; 리포펙션; 미세주사 (문헌 [Mueller et al. (1978) Cell 15:579-85]); 아그로박테리움 (*Agrobacterium*)-매개 전달; 직접 DNA 흡수; 휘스커스(WHISKERS)<sup>TM</sup>-매개 형질전환; 및 미세발사체 충격. 이들 기술은 식물 세포의 안정한 형질전환 및 일시적 형질전환 둘 다를 위해 사용될 수 있다. "안정한 형질전환"은 핵산 단편을 숙주 유기체의 게놈 내로 도입하여, 유전적으로 안정한 유전을 유발시키는 것을 지칭한다. 일단 안정하게 형질전환되면, 핵산 단편은 숙주 유기체 및 임의의 후속 세대의 게놈 내에 안정하게 통합된다. 형질전환된 핵산 단편을 함유하는 숙주 유기체는 "트랜스제닉" 유기체로서 지칭된다. "일시적 형질전환"은 핵산 단편을 숙주 유기체의 핵 또는 DNA-함유 소기관 내로 도입하여, 유전적으로 안정한 유전의 부재 하의 유전자 발현을 유발시키는 것을 지칭한다.
- [0057] 본원에 사용된 용어 "형질도입하다"는 바이러스가 핵산을 세포 내로 전달하는 과정을 지칭한다.
- [0058] 본원에 사용된 용어 "트랜스진"은 외인성 핵산 서열을 지칭한다. 한 예에서, 트랜스진은 유전자 서열 (예를 들면, 제초제-저항성 유전자), 산업적으로 또는 제약상 유용한 화합물을 코딩하는 유전자, 또는 바람직한 농업 형질을 코딩하는 유전자이다. 또 다른 예에서, 트랜스진은 안티센스 핵산 서열이며, 여기서 안티센스 핵산 서열의 발현은 표적 핵산 서열의 발현을 억제한다. 트랜스진은 트랜스진에 작동가능하게 연결된 조절 서열 (예를 들면, 프로모터, 인트론, 5'-UTR, 또는 3'-UTR)을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 관심 핵산은 트랜스진이다. 그러나, 다른 실시양태에서, 관심 핵산은 내인성 핵산 (내인성 핵산의 추가의 게놈 카피가 요구되는 경우), 또는 숙주 유기체 내의 표적 핵산의 서열에 관해 안티센스 배향으로 존재하는 핵산이다.
- [0059] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 세포 내로 도입되어 그에 따라 형질전환된 세포를 생산하는 핵산 분자를 지칭한다. 벡터는 숙주 세포 내에서 복제될 수 있도록 해주는 핵산 서열, 예컨대 복제 기점을 포함할 수 있다. 예는 외인성 DNA를 세포 내로 운반하는 플라스미드, 코스미드, 박테리오파지, 박테리아 인공 염색체 (BAC), 또는 바이러스를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 벡터는 또한 1종 이상의 유전자, 안티센스 분자, 선택 마커 유전자, 및 관련 기술분야에 공지된 다른 유전 요소를 포함할 수 있다. 벡터는 세포를 형질도입, 형질전환 또는 감염시켜, 그에 따라 세포가 벡터에 의해 코딩된 핵산 분자 및/또는 단백질을 발현하도록 할 수 있다. 벡터

는 핵산 분자의 세포 내로의 진입을 달성하는 것을 돕는 물질 (예를 들면, 리포솜)을 임의로 포함할 수 있다.

[0060] 본원에 사용된 용어 "카세트", "발현 카세트", 및 "유전자 발현 카세트"는 특정 제한 부위 또는 상동 재조합에 의해 핵산 또는 폴리뉴클레오티드 내로 삽입될 수 있는 DNA의 절편을 지칭한다. DNA의 절편은 관심 소형 RNA 또는 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 함유하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 카세트 및 제한 부위는 전사 및 번역을 위한 적절한 리딩 프레임으로의 카세트의 삽입을 보장하도록 설계된다. 한 실시양태에서, 발현 카세트는 관심 소형 RNA 또는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 요소 이외에 특정한 숙주 세포의 형질전환을 용이하게 하는 폴리뉴클레오티드를 가질 수 있다. 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 또한 숙주 세포 내에서 관심 폴리펩티드를 코딩하는 소형 RNA 또는 폴리뉴클레오티드의 증진된 발현을 허용하는 요소를 포함할 수 있다. 이들 요소는 프로모터, 최소 프로모터, 인핸서, 반응 요소, 인트론, 5'-UTR, 3'-UTR, 종결 서열, 폴리아데닐화 서열 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0061] 본원에 사용된 용어 "이중 코딩 서열"은 숙주 유기체에 정상적으로 존재하지 않고 적절한 조건 하에 숙주 세포에서 발현될 수 있는 펩티드 또는 단백질 또는 그의 등가 아미노산 서열, 예를 들면 효소를 코딩하거나, 궁극적으로 코딩하는 임의의 폴리뉴클레오티드를 나타내는데 사용된다. 이에 따라, "이중 코딩 서열"은 세포가 세포에서 정상적으로 존재하지 않는 코딩 서열의 추가의 카피를 발현하도록 숙주 세포에서 정상적으로 존재하지 않는 코딩 서열의 1개 또는 추가의 카피를 포함할 수 있다. 이중 코딩 서열은 RNA 또는 그의 임의의 유형 (예를 들면, mRNA), DNA 또는 그의 임의의 유형 (예를 들면, cDNA), 또는 RNA/DNA의 하이브리드일 수 있다. 코딩 서열의 예는 코딩 서열, 인트론, 프로모터 영역, 5'-UTR, 3'-UTR, 및 인핸서 영역과 같은 특색을 포함하는 전장 전사 단위를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0062] "이중 코딩 서열"은 또한 펩티드 또는 효소의 코딩 부분 (즉, cDNA 또는 mRNA 서열), 전장 전사 단위의 코딩 부분 (즉, 인트론 및 엑손을 포함하는 유전자), "최적화된 코돈" 서열, 말단절단된 서열 또는 효소를 코딩하거나 그의 등가 아미노산 서열을 코딩하는 변경된 서열의 다른 형태를 포함하는데, 단 등가 아미노산 서열은 기능적 단백질을 생성한다. 이러한 등가 아미노산 서열은 N-말단, C-말단 또는 내부에, 1개 이상의 아미노산의 결실을 가질 수 있다. 말단절단된 형태는 그들이 본원에 나타난 촉매 능력을 갖는 한 고려된다.

[0063] 본원에 사용된 용어 "대조군"은 비교 목적의 분석 절차에 사용되는 샘플을 지칭한다. 대조군은 "양성" 또는 "음성"일 수 있다. 예를 들어, 분석 절차의 목적이 세포 또는 조직에서 차등 발현된 전사체 또는 폴리펩티드를 검출하는 것인 경우, 이는 일반적으로 양성 대조군, 예컨대 목적하는 발현을 나타내는 공지된 식물로부터의 샘플, 및 음성 대조군, 예컨대 목적하는 발현이 결여된 공지된 식물로부터의 샘플을 포함하는 것이 바람직하다.

[0064] 본원에 사용된 용어 "식물"은 식물 세포 및 식물 조직, 예컨대 잎, 캘러스, 줄기, 뿌리, 꽃, 화분, 및 종자를 포함하나 이에 제한되지는 않는 식물 및 식물 부분을 포함한다. 본 발명에 사용될 수 있는 식물의 부류는 일반적으로 속씨식물, 겉씨식물, 양치식물, 및 다세포 조류를 비롯한 돌연변이유발에 적용될 수 있는 고등 및 하등 식물 부류만큼 광범위하다. 따라서, "식물"은 쌍자엽 및 단자엽 식물을 포함한다. 쌍자엽 식물의 예는 담배, 아라비도시스(*Arabidopsis*), 대두, 토마토, 파파야, 카놀라, 해바라기, 목화, 알팔파, 감자, 포도덩굴, 비둘기콩, 완두, 브라시카(*Brassica*), 병아리콩, 사탕무, 평지씨, 수박, 멜론, 페퍼, 땅콩, 호박, 무, 시금치, 스쿼시, 브로콜리, 양배추, 당근, 콜리플라워, 셀러리, 배추, 오이, 가지, 및 상추를 포함한다. 단자엽 식물의 예는 옥수수, 벼, 밀, 사탕수수, 보리, 호밀, 소르굴, 난초, 대나무, 바나나, 부들, 백합, 귀리, 양파, 기장, 및 트리티케일을 포함한다.

[0065] 본원에 사용된 용어 "식물 물질"은 잎, 캘러스, 줄기, 뿌리, 꽃 또는 꽃 부분, 과일, 화분, 난세포, 접합자, 종자, 깍뚝이순, 세포 또는 조직 배양물, 또는 식물의 임의의 다른 부분 또는 생성물을 지칭한다. 한 실시양태에서, 식물 물질은 자엽 및 잎을 포함한다. 한 실시양태에서, 식물 물질은 뿌리 조직 및 지하에 위치하는 다른 식물 조직을 포함한다.

[0066] 본원에 사용된 용어 "선택 마커 유전자"는 식물 형질전환에서, 예를 들어 식물 세포를 선택적 작용제로부터 보호하거나 저항성/내성을 선택적 작용제에 제공하는데 임의로 사용되는 유전자를 지칭한다. 추가로, "선택 마커 유전자"는 리포터 유전자를 포괄하도록 의도된다. 기능적 선택 마커가 부여된 세포 또는 식물만이 선택적 작용제를 사용하는 조건 하에 분열 또는 성장할 수 있다. 선택적 작용제의 예는 예를 들어, 스펙티노마이신, 네오마이신, 카나마이신, 파로모마이신, 겐타미신, 및 히그로마이신을 비롯한 항생제를 포함할 수 있다. 이들 선택 마커는 항생제 카나마이신에 대한 저항성을 부여하는 효소를 발현하는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 (npt II), 및 관련 항생제 네오마이신, 파로모마이신, 겐타미신, 및 G418에 대한 유전자, 또는 히그로마이신에 대한 저항성을 부여하는 효소를 발현하는 히그로마이신 포스포트랜스퍼라제 (hpt)에 대한 유전자를 포함한다. 다른

선택 마커 유전자는 bar 또는 pat (글루포시네이트 암모늄 또는 포스포노트리신에 대한 저항성), 아세트락테이트 신타제 (ALS, 분지쇄 아미노산의 합성의 제1 단계를 방해하는 억제제, 예컨대 술폰일우레아 (SU), 이미다졸리논 (IMI), 트리아졸로피리미딘 (TP), 피리미디닐 옥시벤조에이트 (POB), 및 술폰일아미노 카르보닐 트리아졸리논에 대한 저항성), 글리포세이트, 2,4-D를 비롯한 제초제 저항성, 및 금속 저항성 또는 감수성을 코딩하는 유전자를 포함할 수 있다. 선택 마커 유전자로서 사용될 수 있는 "리포터 유전자"의 예는 발현된 리포터 유전자 단백질, 예컨대 β-글루쿠로니다제 (GUS), 루시페라제, 녹색 형광 단백질 (GFP), 황색 형광 단백질 (YFP), DsRed, β-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제 (CAT), 알칼리성 포스파타제 등을 코딩하는 단백질의 시각적 관찰을 포함한다. 어구 "마커-양성"은 선택 마커 유전자를 포함하도록 형질전환된 식물을 지칭한다.

[0067] 본원에 사용된 용어 "검출가능한 마커"는 검출할 수 있는 표지, 예컨대, 예를 들어 방사성동위원소, 형광 화합물, 생물발광 화합물, 화학발광 화합물, 금속 킬레이트화제, 또는 효소를 지칭한다. 검출가능한 마커의 예는 다음을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다: 형광 표지 (예를 들면, FITC, 로다민, 란타나이드 인광체), 효소적 표지 (예를 들면, 양고추냉이 퍼옥시다제, β-갈락토시다제, 루시페라제, 알칼리성 포스파타제), 화학발광, 비오틴, 2차 리포터에 의해 미리 결정된 폴리펩티드 에피토프 (예를 들면, 류신 지퍼 쌍 서열, 2차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 태그). 한 실시양태에서, 검출가능한 마커는 다양한 길이의 스페이서 아암에 의해 부착되어 잠재적 입체 장애를 감소시킬 수 있다.

[0068] 본원에 사용된 용어 "검출하는"은 가장 넓은 의미로 특정 분자의 정성적 및 정량적 측정 둘 다, 예를 들어, 특정 폴리펩티드의 측정을 포함하도록 사용된다.

[0069] 달리 구체적으로 설명되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 분자 생물학에서 통상적인 용어의 정의는, 예를 들어 문헌 [Lewin, Genes V, Oxford University Press, 1994; Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, Blackwell Science Ltd., 1994; 및 Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, Inc., 1995]에서 찾을 수 있다.

[0070] 유전자 발현 조절 요소로서의 프로모터

[0071] 기초 연구 및 생명공학적 응용을 위해 사용된 식물 프로모터는 일반적으로 단방향성으로서, 그의 3' 말단 (즉, 하류)에 융합된 트랜스진의 구성적 발현을 유도한다. 트랜스진을 대사 조작 및 형질 스택킹을 위해 식물 내에서 강하게 발현시키는 것은 종종 필요하다. 추가로, 다중 신규 프로모터는 전형적으로 다중 유전자의 발현을 유도하기 위해 트랜스제닉 작물에서 요구된다. 그의 3' 말단에 융합된 트랜스진의 발현을 유도할 수 있는 구성적 프로모터가 본원에 개시된다.

[0072] 트랜스제닉 생성물 개발은 점점 더 복잡해지고 있으며, 이는 트랜스진을 강하게 발현시키는 것 및 다중 트랜스진을 단일 유전자와 내로 스택킹하는 것을 필요로 한다. 전통적으로, 각 트랜스진은 발현을 위해 특징적인 프로모터를 필요로 하며, 여기서 다중 프로모터가 한 유전자 스택 내에서 여러 트랜스진을 발현시키는데 요구된다. 유전자 스택의 크기가 증가함에 따라, 이 방법은 빈번하게 동일한 프로모터를 반복 사용하여, 단일 다유전자 형질의 발현과 유사한 수준의 여러 트랜스진의 발현 패턴 수준을 수득하게 된다.

[0073] 동일한 프로모터에 의해 유도되는 다중 유전자 구축물은 유전자 침묵을 유발하여 덜 효과적으로 트랜스제닉 생성물을 생성하는 것으로 관련 기술 분야에 알려져 있다. 프로모터 반복으로 인한 과도한 전사 인자 (TF)-결합 부위는 내인성 TF의 결실을 유발하여 전사 불활성화를 야기할 수 있다. 트랜스진의 침묵은 트랜스진을 발현하도록 생산된 트랜스제닉 식물의 성능에 바람직하지 못한 영향을 줄 수 있는 가능성이 있다. 트랜스진 내의 반복적인 서열은 유전자좌내 유전자 상동성 재조합을 일으켜, 폴리뉴클레오티드 재배열을 유발시킬 수 있다.

[0074] 구성적 프로모터 이외에, 조직-특이적 및 기관-특이적 프로모터는 식물의 특정 조직에서, 예컨대 커널, 뿌리, 잎, 깬터스, 화분, 또는 용단에서 유전자 발현을 유도한다. 조직 및 발생 단계 특이적 프로모터는 특정한 조직 또는 식물 발생 동안 특정한 시간에 발현되는 유전자의 발현을 유도한다. 조직-특이적 프로모터는 트랜스제닉 식물 산업에서 특정 응용을 위해 요구되고, 조직 및/또는 선택된 발생 단계에서의 이중 유전자의 특이적 발현 (다양한 기관, 조직, 및/또는 상이한 시간에서 이중성 유전자의 차등 발현을 나타냄)을 허용하지만, 다른 것들에서는 그렇지 않으므로 바람직하다.

[0075] 예를 들어, 토양-매개 병원체에 의한 식물의 감염에 대한 증가된 저항성은 병원체-저항성 단백질이 식물 내에서 강하게 발현되도록 식물 게놈을 병원체-저항성 유전자로 형질전환시킴으로써 달성될 수 있다. 대안적으로, 특정한 성장 또는 발생 단계에 있는, 예컨대, 예를 들어 세포 분열 또는 신장 중인 식물 조직에서 트랜스진을 발

현시키는 것이 바람직할 수 있다. 또 다른 응용은 프로모터가 발생 중인 식물 부분 (즉, 뿌리, 잎, 캘러스, 또는 화분)에서 농경학적 형질을 코딩하는 트랜스진의 발현을 국한시키도록 조직-특이적 프로모터를 사용하는 것의 바람직성이다.

- [0076] 본원에 기재된 프로모터는 다중 유전자를 함유하는 상업적 트랜스진 구축물을 만들기 위한 유망한 도구이다. 이들 프로모터는 또한 박테리아 숙주에서 구조적 안정성 및 식물 세포에서 기능적 안정성, 예컨대 트랜스진 침묵의 감소를 제공하여 트랜스진 발현을 가능하게 한다. 다양한 발현 범위를 갖는 프로모터는 또한 본원에 기재된 방법을 사용함으로써 수득될 수 있다. 단일 프로모터를 다수회 사용하는 트랜스진 구축물과 비교하여, 본 출원에 기재된 다양화된 프로모터 구축물은 트랜스제닉 사례의 하류 분자 분석에 보다 호환적이다. 본원에 기재된 다양화된 프로모터의 사용은 또한 표적화 동안 아연 핑거 기술로 트랜스제닉 다유전자 유전자좌에서의 재배열을 완화시킬 수 있다 (문헌 [SHUKLA et al. 2009]).
- [0077] 제아 메이스 및 제아 록수리안스 유비퀴틴-1 프로모터
- [0078] 제아 메이스 Ubi-1 프로모터는 메이스에서의 안정한 높은 트랜스제닉 발현에 우세하게 사용되는 생명공학 산업 표준이었다 (문헌 [(CHRISTENSEN and QUAIL 1996; CHRISTENSEN et al. 1992; TOKI et al. 1992])). 각각의 트랜스진은 통상적으로 충분한 발현을 위해 특정 프로모터를 필요로 한다. 다중 프로모터는 전형적으로 하나의 유전자 스택 내에서 여러 트랜스진을 발현시키는데 필요하다. 이 패러다임은 빈번하게 그의 목적하는 높은 수준의 단백질 발현 및 구성적 발현 패턴으로 인해 지. 메이스 Ubi-1 프로모터를 반복 사용하게 된다.
- [0079] 그러나, 반복 서열의 트랜스제닉 유전자좌로의 의도적 도입은 또한 트랜스진 발현 및 안정성에 대해 바람직하지 않은 부정적 영향을 야기할 수 있다 (문헌 [FLADUNG and KUMAR 2002; KUMAR and FLADUNG 2000a; KUMAR and FLADUNG 2000b; KUMAR and FLADUNG 2001a; KUMAR and FLADUNG 2001b; KUMAR and FLADUNG 2002; METTE et al. 1999; MOURRAIN et al. 2007])). 다중 통합된 트랜스진 발현의 문제는 여러 프로모터를 사용하여 동일한 발현 프로파일을 갖는 여러 트랜스진을 유도하는 프로모터 다양성 접근법을 사용하여 다룰 수 있다 (문헌 [PEREMARTI et al. 2010])). 본 출원은 상이한 제아 종으로부터 신규 프로모터를 확인하고 정제함으로써 수득된 다양화된 Ubi-1 프로모터 서열을 기재한다.
- [0080] 식물 유전자에서의 전사 개시 및 유전자 발현의 조절은 프로모터로 불리는 보다 큰 서열 내에 집합적으로 배열된 다양한 DNA 서열 요소에 의해 지시된다. 진핵 프로모터는 전형적으로 최소 코어 프로모터 및 상류 조절 서열로 이루어진다. 코어 프로모터는 전사의 정확한 개시를 지시하기에 충분한 인접 DNA 서열의 최소 스트레치이다. 식물에서의 코어 프로모터는 일반적으로 전사의 개시와 연관된 정규 영역, 예컨대 CAAT 및 TATA 박스 (컨센서스 서열 TATAWAW)를 포함한다. TATA 박스 요소는 통상적으로 전사 개시 부위 (TSS)의 대략 20 내지 35 염기 쌍 (bp) 상류에 위치한다. 코어 프로모터의 활성화는, 다양한 단백질이 결합하고 후속적으로 전사 개시 복합체와 상호작용하여 유전자 발현을 활성화시키는 상류 조절 서열에 의해 달성된다. 이들 조절 요소는 프로모터의 시공적 발현 패턴을 결정하는 DNA 서열을 포함한다.
- [0081] 도 1을 참조하면, 지. 메이스 Ubi-1 유전자 프로모터는 지. 메이스 근교 세포주 B73으로부터 유래된다. 지. 메이스 Ubi-1 프로모터는 TSS의 5' 상류에 위치하는 대략 895bp의 DNA 서열 (즉, 상류 요소)로 구성된다. 추가로, 지. 메이스 Ubi-1 프로모터는 TSS의 3' 하류에 위치하는 약 1093bp의 DNA 서열로 구성된다 (미국 특허 번호 5,510,474 참조). 따라서, 지. 메이스 Ubi-1 프로모터는 전체 DNA 서열의 대략 2 킬로 염기 쌍 (kb)으로 구성된다.
- [0082] 지. 메이스 Ubi-1 프로모터의 상류 요소는 TSS의 대략 30bp 5' 상류에 위치하는 TATA 박스를 포함한다 (도 1 및 3). 추가로, 상류 요소는 TSS의 바로 5' 상류에 위치하는 2개의 중첩된 열 쇼크 컨센서스 요소를 포함한다. 82bp 5'-UTR 또는 리더 서열은 TSS의 바로 3' 하류에 위치하고, 염기 83에서 1093까지 연장된 인트론이 이어진다 (도 1 및 3).
- [0083] 이전 연구는 지. 메이스 Ubi-1 프로모터에 의해 조절되는 유전자 및/또는 트랜스진의 증가된 유전자 발현을 기재하였다. 예를 들어, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제 (CAT) 유전자의 지. 메이스 Ubi-1 프로모터로의 전사 융합은 콜리플라워 모자이크 바이러스(Cauliflower Mosaic Virus) 35S 프로모터에 의해 유도되는 발현보다 메이스 원형질체에서 10배 초과로 더 높은 수준의 CAT 활성을 생성한다 (문헌 [CHRISTENSEN and QUAIL 1996; CHRISTENSEN et al. 1992])).
- [0084] 대조 지. 메이스 Ubi-1 프로모터 이외에, 본 출원은 신규 메이스 Ubi-1 프로모터를 기재한다. 지. 메이스 유전자형 c.v. B73으로부터 유래된 대조 Ubi-1 프로모터와는 다르게, 신규 Ubi-1 프로모터는 상이한 제아 종, 제아

룩수리안스로부터 유래되었다. 본원에 사용된 지. 룩수리안스 Ubi-1 프로모터는 버전 1 (v1) 유전자형을 가졌다. 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 지. 메이스 또는 지. 룩수리안스 Ubi-1 프로모터를 사용하는 구축물 및 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 프로모터는 하기와 같이 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 유전자로부터의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다:

GTGCAGCGTGACCCGGTTCGTGCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTCTA  
 AGTTATAAAAAATTACCACATATTTTTTTTGTACACTTGTTTGAAGTGCAGTTTA  
 TCTATCTTTATACATATATTTAAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATAGTAC

[0085]

TACAATAATATCAGTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTCT  
 AAAGGACAATTGAGTATTTTGACAACAGGACTCTACAGTTTATCTTTTATAGTGT  
 GCATGTGTTCTCTTTTTTTTTTGCAAATAGCTTCACCTATATAATACTTCATCCAT  
 TTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAATGGTTTTATAGACTAATTTTT  
 TTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCTAAATTAAGAAAATAAACTCTA  
 TTTTAGTTTTTTTTATTAATAGTTTAGATATAAAAATAGAATAAAAATAAAGTACT  
 AAAAAATTAACAAATACCCTTTAAGAAATTAAAAAACTAAGGAAACATTTTTTC  
 TTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGAC  
 ACCAACCGCAACAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACG  
 GCATCTCTGTCGCTCTGACCCCTCTCGAGAGTTCGCTCCACCGTTGGAC  
 TTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCG  
 GCACGGCAGGCGGCTCTCTCTCTCACGGCACGGCAGCTACGGGGGATTC  
 CTTTCCACCGCTCTTCGCTTTCCTTCTCGCCCGCGTAATAAATAGACACCC  
 CCTCCACACCTCTTCCCAACCTCGTGTGTTGTCGGAGCGCACACACACAAC  
 CAGATCTCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAGGTACGCCGCTCGT  
 CCTCCCCCCCCCCCCCTCTACCTCTCTAGATCGCGGTTCCGGTCCATGCAT  
 GGTTAGGGCCCGTAGTTCTACTCTCTGTTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTTTGTG  
 TTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACGTACAGACAGT  
 TCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTCCTCTTTGGGGAATCTGGGATGGCTTAGCC  
 GTTCCCGACACGGGATCGATTTTCATGATTTTTTTTGTTCGTTGCATAGGGTTTGG  
 TTTGCCCTTTCTTTATTTCAATATATGCCGTGCACTTGTTTGTCGGGTCATCTTT  
 TCATGCTTTTTTTTGTCTTGGTTGTGATGATGTGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTA  
 GATCGGAGTAGAATCTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTATTAATTTGGATCT  
 GTATGTGTGTGCCATACATATTCATAGTTACGAATTGAAGATGATGGATGAAAT  
 ATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTACTGATGCATATACAGA  
 GATGCTTTTTGTTGCTTGGTTGTGATGATGTGGTGTGGTTGGGCGGTCGTTTCATT  
 CGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGTGTATTTATTAATTTT  
 GGAACGTATGTGTGTCATACATCTTCATAGTTACGAGTTAAGATGGATGGA  
 AATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTTTACTGATGCATATAC  
 ATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTACCTATCTATT  
 ATAATAACAAGTATGTTTTATAAATTTTCGATCTTGATATACTGGATGATGG  
 CATATGCAGCAGTATATGTGGATTTTTTAGCCCTGCCCTCATACGCTATTTATT  
 TGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTGTCGATGCTCACCTGTTGTTGGTGTACTTCTGCA  
 (SEQ ID NO: 1)

[0086]

[0087]

또 다른 실시양태에서, 프로모터는 하기와 같이 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 유전자로부터의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다:

GACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAGGTATCAA  
 AAATTACCACATATTTTTTTGGCACACTTATTTAAAGTGCAGTTTATCTATCTCTA  
 TACACATATTTAAACTTCACTTTATAAATAATATAGTTTATAGTACTAAACTAAT  
 ATCAGTGTTTTAGATAATTATATAAATGAACCGCTAGACATGGTCTAAAGTACAA  
 CCGAGTATTTGACAACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCT  
 CTCTGTTTTTTTTTTCAAATAGCTTGACCTATATAACTTCATCCATTTTATTAG  
 TACATCCATTAGGGATTAGGGTTGATGGTTTCTATAGACTAATTTTTTAGTACAT  
 CTATTTTATTATTTTAAATTTTTAAATTAAGAAAAGTAAACTCTATTTTAGTTAC  
 TACAAATTAACAATAACCTTTAAGGAATTAAAAAAAGTAAAGGAAACATTTTT  
 CTTGTTTCGAGTAGATTATGACAGCCTGTTCAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGA  
 CACCAACCAGCGAACAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCAC  
 GGCATCTCTGTCGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTCCGCTCCACCGTTGGA  
 CTTGCTCCGCTGTCGGCATCCAGAAAGTGCCTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGGC  
 GGCTCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCTTTCCACCGC  
 TCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCGTAATAAATAGACACCCCTCCACACCT  
 CTTTCCCAACCTCGTGTGTTGTTGCGAGCGCACACACACAACCAGATCTCCCC  
 CAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGTTCAAGGTACGCCGTCATCTCCCCCCCC  
 CTCTACCTTCTCTAGATCGGCAATCCGGTCCATGGTTAGGGCCCGATAGTTCT  
 ACTTCTGTTTATGTTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACACGGATGCG  
 ACCTGTACATCAGACACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTCCTTTGGCGA  
 ATCCAGGGATGGCTTAGCCGTTCCGCAGACGGGTTTCGATTTTCATGATTTTTTT  
 GTTTCGTTGCACATAGGGTTTGGTTTGGCCTTTTCCTTTATTTCCCTTATATGCTGTA  
 CACTCTTTGTCGGGTCATCTTGTTCATGCTCTTTTAAATCTTGGTTGTGATGATGTG  
 CTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAGCTACCTGG  
 TGGATTTATTAATTTTGTATCTGTACGTGTGTGCCATACATCTTCATAGTTACGAG  
 TTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGG  
 GTTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTTTTCGCTTGGTTGTGATGATGCGG  
 TCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGGT  
 GGATTTATTAATTTCTGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATCTTGATAGTTACGAGT  
 TTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTCGATGTGGG  
 TTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAAC  
 CTTGAGTACCTATCTATTATAAATAACAAGTATGTTTTATAATTATTTTGACCTTG

[0088]

ATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTTAGCCTTGC  
 CTCATACGCTATTTATTTGTTTGGGGCTGTTTCTTTTTGTTGACGCTCACCTGTT  
 GTTTGGTGTACTTCTGCAG (SEQ ID NO: 2)

[0089]

[0090] 본원에 기재된 프로모터를 클로닝 및 후속 DNA 서열 상동성 분석에 의해 특징화하여, 프로모터의 특정 영역 (즉, 상류-프로모터, 5'-UTR, 및 인트론 영역)을 확인하였다. 상류-프로모터 영역, 5-UTR 또는 리더 영역, 및 인트론의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 구성적 지. 메이스 또는 지. 룩수리안스 Ubi-1 프로모터를 사용하여 식물에서 트랜스진을 발현시키는 구축물 및 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 프로모터는 하기와 같이 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 유전자로부터의 상류-프로모터 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다:

GTGCAGCGTGACCCGGTCTGTCGCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTCTA  
 AGTTATAAAAAATTACCACATATTTTTTTTGTCCACTTGTGTTGAAGTGCAGTTTA  
 TCTATCTTTATACATATATTTAAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATAGTAC  
 TACAATAATATCAGTGTGTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTCT  
 AAAGGACAATTGAGTATTTTGACAACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGT  
 GCATGTGTCTCTCTTTTTTTTTTGCAAATAGCTTCACCTATATAATACTTCATCCAT  
 TTTATTAGTACATCCATTTAGGGTTTAGGGTTAATGGTTTTTATAGACTAATTTTT  
 TTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTAGCCTCTAAATTAAGAAAATAAACTCTA  
 TTTTAGTTTTTTTTATTTAATAGTTTAGATATAAAAATAGAATAAAAATAAAGTGACT  
 AAAAATTAACAAATACCCTTTAAGAAATTAATAAACTAAGGAAACATTTTTTC  
 TTGTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGAC  
 ACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCACG  
 GCATCTCTGTGCTGCCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGAC  
 TTGCTCCGCTGTGCGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGCCG  
 GCACGGCAGGCGCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTC  
 CTTTCCCACCGCTCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCC  
 CCTCCACACCTCTT (SEQ ID NO: 3)

[0091]

또 다른 실시양태에서, 프로모터는 하기와 같이 지. 특수리안스 v1 Ubi-1 유전자로부터의 상류-프로모터 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다:

[0092]

GACCCGGTCTGTCGCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAGGTATCAA  
 AAATTACCACATATTTTTTTGGCACACTTATTTAAAGTGCAGTTTATCTATCTCTA  
 TACACATATTTAAACTTCACTTTATAAATAATATAGTTTATAGTACTAACTAAT  
 ATCAGTGTGTTTAGATAATTATATAAATGAACCGCTAGACATGGTCTAAAGTACAA  
 CCGAGTATTTGACAACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCT  
 CTCTGTTTTTTTTTTCAAATAGCTTGACCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAG  
 TACATCCATTAGGGATTCAGGGTTGATGGTTTCTATAGACTAATTTTTTTAGTACAT  
 CTATTTTATTATTTTTAATTTTTAAATTAAGAAAATAAAGTAACTCTATTTTAGTTAC  
 TACAAATTAACAAATACCCTTTAAGGAATTAATAAACTAAGGAAACATTTTTT  
 CTTGTTTCGAGTAGATTATGACAGCCTGTTCAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGA  
 CACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCAC  
 GGCATCTCTGTGCTGCCCTCTGGACCCCTCTCGAGAGTTCCGCTCCACCGTTGGA  
 CTTGCTCCGCTGTGCGCATCCAGAAAGTGCCTGGCGGAGCGGCAGACGTGAGGC  
 GGCTCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCCTTTCCCACCGC  
 TCCTTCGCTTTCCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCTCCACACCT  
 CTT (SEQ ID NO: 4)

[0093]

추가적 유전자 조절 요소

[0094]

트랜스진 발현은 또한 상류-프로모터 서열의 3' 하류에 위치하는 5'-UTR 및/또는 인트론 영역에 의해 조절될 수 있다. 5'-UTR 및/또는 인트론에 작동가능하게 연결된 상류-프로모터 영역을 포함하는 프로모터는 트랜스진 발현을 조절할 수 있다. 상류-프로모터가 전사를 유도하는데 필요한 반면, 5'-UTR 및/또는 인트론의 존재는 발현 수준을 증가시켜 번역 및 단백질 합성을 위한 보다 많은 mRNA 전사체를 생성할 수 있다. 5'-UTR 및/또는 인트론의 상류-프로모터 폴리뉴클레오티드 서열로의 첨가는 트랜스진의 안정한 발현을 보조할 수 있다.

[0095]

추가로, 상류-프로모터 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 구성적 프로모터는 5-UTR 또는 리더 영역이 이어져, 식물에서의 트랜스진의 발현을 보조할 수 있다. 한 실시양태에서, 프로모터는 하기와 같이 지. 메이스 c.v.

B73 Ubi-1 유전자로부터의 5'-UTR 또는 리더 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다:

TCCCCAACCTCGTGTGTTGTTTCGGAGCGCACACACACAACCAGATCTCCCCAAA  
TCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAG (SEQ ID NO: 5)

[0097]

또 다른 실시양태에서, 프로모터는 하기와 같이 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 유전자로부터의 5'-UTR 또는 리더 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다:

TCCCCAACCTCGTGTGTTGTTTCGGAGCGCACACACACAACCAGATCTCCCCAAA  
ATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAG (SEQ ID NO: 6)

[0099]

추가로, 상류-프로모터 폴리뉴클레오티드 서열에 이어 5-UTR 또는 리더 영역을 포함하는 구성적 프로모터는 또한 인트론이 이어져, 식물에서의 트랜스진의 발현을 보조할 수 있다. 한 실시양태에서, 프로모터는 하기와 같이 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 유전자로부터의 인트론 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다:

GTACGCCGCTCGTCTCCCCCCCCCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCGTT  
CCGGTCCATGCATGGTTAGGGCCCCGGTAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTTGTGTTAG  
ATCCGTGTTTGTGTTAGATCCGTGCTGCTAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGT  
ACGTCAGACACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTCCTTTGGGGAATCCTG  
GGATGGCTCTAGCCGTCCCGCAGACGGGATCGATTCATGATTTTTTTTGTTCGT  
TGCATAGGGTTTGGTTTGGCCTTTTCTTTATTTCAATATATGCCGTGCACTTGT  
TGTCGGGTTCATCTTTTCATGCTTTTTTTTGTCTTGGTTGTGATGATGTGGTCTGGTT  
GGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATTCTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTA  
TTAATTTTGGATCTGTATGTGTGCCATACATATTCATAGTTACGAATTGAAGA  
TGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACT  
GATGCATATACAGAGATGCTTTTTGTTCGCTTGGTTGTGATGATGTGGTGTGGTT  
GGGCGGTCGTTTCATTCGTTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAAACCTACCTGG  
TGTATTTATTAATTTTGGAACTGTATGTGTGTGCATACATCTTCATAGTTACGAG  
TTTAAGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGTTGATGTGGGTTT  
TACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTT  
GAGTACCTATCTATTATAATAAACAAGTATGTTTTATAATTATTTTCGATCTTGATA  
TACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTTAGCCCTGCCTTC  
ATACGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTCTTTTGTTCGATGCTCACCTGTTGTTG  
GTGTTACTTCTGCA (SEQ ID NO: 7)

[0101]

또 다른 실시양태에서, 프로모터는 하기와 같이 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 유전자로부터의 인트론 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다:

[0102]

GTACGCCGCTCATCCTCCCCCCCCCTCTCTACCTTCTCTAGATCGGCAATCCGGTC  
 CATGGTTAGGGCCCCGATAGTTCTACTTCTGTTCATGTTTGTGTTAGATCCGTGCTG  
 CTAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACATCAGACACGTTCTGATTGCTAACT  
 TGCCAGTGTCTTCTTTGGCGAATCCAGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAGACGG  
 GTTCGATTTTCATGATTTTTTTTTGTTTCGTTGCACATAGGGTTTGGTTTGCCCTTTTC  
 CTTTATTTCTTATATGCTGTACACTCTTTGTCGGGTCATCTTGTTCATGCTTCTTTT  
 AATCTTGGTTGTGATGATGTGCTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGA  
 ATACTGTTTCAAGCTACCTGGTGGATTTATTAATTTTGTATCTGTACGTGTGTGCC  
 ATACATCTTCATAGTTACGAGTTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGAT  
 AGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGATGCATATACAGAGATGCTTTTTTTTTC  
 GCTTGGTTGTGATGATGCGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAAT  
 ACTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTATTAATTCTGGATCTGTATGTGTGTGCCAT  
 ACATCTTGATAGTTACGAGTTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCTAGGATA  
 GGTATACATGTCGATGTGGGTTTTACTGATGCATATACATGATGGCATATGCAGC  
 ATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAGTACCTATCTATTATAATAACAAGTATGTT  
 TTATAATTTATTTGACCTTGATATACTTGGATGATGGCATATGCAGCAGCTATAT  
 GTGGATTTTTTTAGCCTTGCCCTCATAACGCTATTTATTTGTTTGGGGCTGTTTCTTT  
 TTGTTGACGCTACCCTGTTGTTTGGTGTACTTCTGCAG (SEQ ID NO: 8)

[0103]

[0104] 트랜스진 및 리포터 유전자 발현 카세트

[0105] 트랜스진 발현은 또한 유전자 발현 카세트에 의해 조절될 수 있다. 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 프로모터를 포함한다. 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 Ubi-1 프로모터를 포함한다. 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 식물로부터의 Ubi-1 프로모터를 포함한다. 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 지. 룩수리안스 v1 로부터의 Ubi-1 프로모터를 포함한다.

[0106] 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터를 포함하며, 여기서 프로모터는 서열 식별번호: 2에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 또는 100% 동일하다. 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 리포터 유전자 또는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 구성적 프로모터, 예컨대 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터를 포함한다. 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 구성적 프로모터를 포함하며, 여기서 트랜스진은 살곤충제 저항성 트랜스진, 제초제 내성 트랜스진, 질소 사용 효율 트랜스진, 물 사용 효율 트랜스진, 영양 품질 트랜스진, DNA 결합 트랜스진, 선택 마커 트랜스진, 또는 그의 조합일 수 있다. 한 실시양태에서, 구성적 프로모터를 포함하는 유전자 발현 카세트는 1종 이상의 트랜스진 또는 리포터 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 한 실시양태에서, 구성적 프로모터를 포함하는 유전자 발현 카세트는 2종 이상의 트랜스진 또는 리포터 유전자의 발현을 유도할 수 있다.

[0107] 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터를 포함하며, 여기서 상류-프로모터 서열은 서열식별번호: 4에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 또는 100% 동일하다. 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 리포터 유전자 또는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 구성적 프로모터, 예컨대 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 상류-프로모터를 포함한다. 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 구성적 상류-프로모터를 포함하며, 여기서 트랜스진은 살곤충제 저항성 트랜스진, 제초제 내성 트랜스진, 질소 사용 효율 트랜스진, 물 사용 효율 트랜스진, 영양 품질 트랜스진, DNA 결합 트랜스진, 선택 마커 트랜스진, 또는 그의 조합일 수 있다. 한 실시양태에서, 구성적 상류-프로모터를 포함하는 유전자 발현 카세트는 1종 이상의 트랜스진 또는 리포터 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 한 실시양태에서, 구성적 상류-프로모터를 포함하는 유전자 발현 카세트는 2종 이상의 트랜스진 또는 리포터 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 추가 실시양태에서, 상류-프로모터는 인트론을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서 상류-프로모터는 리포터 유전자 또는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 인트론 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서 상류-프로모터는 5'-UTR 또는 리더 서열을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서 상류-프로모터는 리포터 유전자 또는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 5'-UTR 또는 리더 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 실시양태에서 상류-프로모터는 5'-UTR 또는 리더 서열 및 인트론 서열을 포함할 수 있다. 한 실시양태에

서 상류-프로모터는 리포터 유전자 또는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 5'-UTR 또는 리더 서열 및 인트론 서열을 포함할 수 있다.

- [0108] 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터를 포함하며, 여기서 5'-UTR 또는 리더 서열은 서열식별번호: 6에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 또는 100% 동일하다. 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 프로모터에 작동가능하게 연결된 유비퀴틴-1 단백질을 코딩하는 메이즈 유전자로부터의 5'-UTR 또는 리더를 포함하며, 여기서 프로모터는 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터, 또는 식물 (예를 들면, 제아 메이즈 또는 제아 룩수리안스 유비퀴틴-1 프로모터), 바이러스 (예를 들면, 카사바 베인 모자이크 바이러스 프로모터), 또는 박테리아 (예를 들면, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 델타 마스)로부터 유래하는 프로모터이다. 한 예시적 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 유비퀴틴 단백질을 코딩하는 메이즈 유전자로부터의 지. 룩수리안스 v1 5'-UTR 또는 리더 서열을 포함하며, 여기서 트랜스진은 살균충제 저항성 트랜스진, 제초제 내성 트랜스진, 질소 사용 효율 트랜스진, 물 사용 효율 트랜스진, 영양 품질 트랜스진, DNA 결합 트랜스진, 선택 마커 트랜스진, 또는 그의 조합일 수 있다.
- [0109] 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터를 포함하며, 여기서 인트론 서열은 서열식별번호: 8에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 또는 100% 동일하다. 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 프로모터에 작동가능하게 연결된 유비퀴틴-1 단백질을 코딩하는 메이즈 유전자로부터의 인트론을 포함하며, 여기서 프로모터는 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터, 또는 식물 (예를 들면, 제아 메이즈 또는 제아 룩수리안스 유비퀴틴-1 프로모터), 바이러스 (예를 들면, 카사바 베인 모자이크 바이러스 프로모터) 또는 박테리아 (예를 들면, 아그로박테리움 투메파시엔스 델타 마스)로부터 유래하는 프로모터이다. 한 예시적 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 유비퀴틴 단백질을 코딩하는 메이즈 유전자로부터의 인트론을 포함하며, 여기서 트랜스진은 살균충제 저항성 트랜스진, 제초제 내성 트랜스진, 질소 사용 효율 트랜스진, 물 사용 효율 트랜스진, 영양 품질 트랜스진, DNA 결합 트랜스진, 선택 마커 트랜스진, 또는 그의 조합일 수 있다.
- [0110] 한 실시양태에서, 벡터는 본원에 기재된 바와 같은 유전자 발현 카세트를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 벡터는 플라스미드, 코스미드, 박테리아 인공 염색체 (BAC), 박테리오파지, 바이러스, 또는 직접적인 형질전환 또는 유전자 표적화에서 사용하기 위한 절제된 폴리뉴클레오티드 단편, 예컨대 공여자 DNA일 수 있다.
- [0111] 한 실시양태에서, 세포 또는 식물은 본원에 기재된 바와 같은 유전자 발현 카세트를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 또는 식물은 본 출원에 개시된 바와 같은 유전자 발현 카세트를 포함하는 벡터를 포함한다. 한 실시양태에서, 벡터는 플라스미드, 코스미드, 박테리아 인공 염색체 (BAC), 박테리오파지, 또는 바이러스일 수 있다. 그에 따라, 유전자 발현 카세트를 포함하는 세포 또는 식물은 각각 트랜스제닉 세포 또는 트랜스제닉 식물이다.
- [0112] 한 실시양태에서, 트랜스제닉 식물은 단자엽 또는 쌍자엽 식물일 수 있다. 트랜스제닉 단자엽 식물의 한 실시양태는 메이즈, 밀, 벼, 소르그움, 귀리, 호밀, 바나나, 사탕수수, 및 기장일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 트랜스제닉 쌍자엽 식물의 한 실시양태는 대두, 목화, 해바라기, 또는 카놀라일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 본원에 기재된 바와 같이, 한 실시양태는 또한 트랜스제닉 식물로부터의 트랜스제닉 종자를 포함한다.
- [0113] 선택 마커
- [0114] 리포터 유전자로서도 기재된 다양한 선택 마커는 선택된 발현 벡터로 혼입되어 형질전환된 식물 ("형질전환체")의 확인 및 선택을 허용한다. 예를 들어, 다수의 방법이 형질전환된 식물에서 선택 마커의 발현을 확인하는데 이용가능하며, 이는 예를 들어 DNA 서열분석 및 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR), 서던 블롯팅, RNA 블롯팅, 벡터로부터 발현되는 단백질, 예컨대 포스포노트리신 저항성을 매개하는 침전된 단백질의 검출, 또는 다른 단백질, 예컨대 리포터 유전자 코딩 β-글루쿠로니다제 (GUS), 루시페라제, 녹색 형광 단백질 (GFP), 황색 형광 단백질 (YFP), DsRed, β-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제 (CAT), 알칼리성 포스포타제 등을 코딩하는 리포터 유전자의 시각적 관찰을 위한 면역학적 방법을 포함한다 (문헌 [Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor Press, N.Y., 2001]을 참조하며, 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다).
- [0115] 선택 마커 유전자는 형질전환된 세포 또는 조직 선택에 사용된다. 선택 마커 유전자는 항생제 저항성을 코딩하

는 유전자, 예컨대, 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 II (NEO) 및 히그로마이신 포스포트랜스퍼라제 (HPT)를 코딩하는 유전자뿐만 아니라, 제초 화합물에 대한 저항성을 부여하는 유전자를 포함한다. 제초제 저항성 유전자는 일반적으로 제초제에 대해 감수성을 띠지 않는 변형된 표적 단백질, 또는 작용할 수 있기 전에 식물에서 제초제를 분해하거나, 해독시키는 효소를 코딩한다. 예를 들어, 글리포세이트에 대한 저항성은 돌연변이체 표적 효소, 5-엔올피루빌쉬키메이트-3-포스페이트 신타제 (EPSPS)를 코딩하는 유전자를 사용함으로써 획득되었다. EPSPS에 대한 유전자 및 돌연변이체는 널리 공지되어 있고, 이는 하기에 추가로 기재된다. 글루포시네이트 암모늄, 브로모시닐, 및 2,4-디클로로페녹시아세테이트 (2,4-D)에 대한 저항성은 각각의 제초제를 해독시키는, pat 또는 DSM-2를 코딩하는 박테리아 유전자, 니트릴라제, aad-1 또는 aad-12 유전자를 사용하여 획득되었다.

[0116] 한 실시양태에서, 제초제는 성장점 또는 분열조직을 억제할 수 있으며, 이는 이미다졸리논 또는 솔포닐우레아, 및 아세트하이드록시산 신타제 (AHAS) 및 아세트락테이트 신타제 (ALS)의 저항성/내성을 위한 유전자를 포함할 수 있다. 글리포세이트 저항성 유전자는 각각 돌연변이체 5-엔올피루빌쉬키메이트-3-포스페이트 신타제 (EPSP) 및 dgt-28 유전자 (제조업 핵산의 도입 및/또는 천연 EPSP 유전자에 대한 다양한 형태의 생체내 돌연변이유발법을 통한), aroA 유전자, 및 글리포세이트 아세틸 트랜스퍼라제 (GAT) 유전자를 포함한다. 다른 포스포노 화합물에 대한 저항성 유전자는 스트렙토미세스 히그로스코피쿠스 (*Streptomyces hygroscopicus*) 및 스트렙토미세스 비리도크로모게네스 (*Streptomyces viridichromogenes*)를 포함하는 스트렙토마이세스 종으로부터의 BAR 유전자, 및 피리딘옥시 또는 페녹시 프로프리온산 및 시클로헥산 (ACCase 억제제-코딩 유전자)을 포함한다. 시클로헥산디온 및/또는 아릴옥시페녹시프로판산 (할록시포프(Haloxyfop), 디클로포프(Diclofop), 페녹시프로프(Fenoxypop), 플루아지포프(Fluazifop), 퀴잘로포프(Quizalofop) 포함)에 대한 저항성을 부여하는 예시적인 유전자는 아세틸 조효소 A 카르복실라제 (ACCase)--Acc1-S1, Acc1-S2 및 Acc1-S3의 유전자를 포함한다. 한 실시양태에서, 제초제는 트리아진 (psbA 및 1s+ 유전자) 또는 벤조니트릴 (니트릴라제 유전자)을 비롯한 제초제는 광합성을 억제할 수 있다.

[0117] 한 실시양태에서, 선택 마커 유전자는 다음을 코딩하는 유전자를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다: 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 II; 시안아미드 히드라타제; 아스파르테이트 키나제; 디히드로디피콜리네이트 신타제; 트립토판 데카르복실라제; 디히드로디피콜리네이트 신타제 및 탈감작된 아스파르테이트 키나제; bar 유전자; 트립토판 데카르복실라제; 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 (NEO); 히그로마이신 포스포트랜스퍼라제 (HPT 또는 HYG); 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR); 포스포노트리신 아세틸트랜스퍼라제; 2,2-디클로로프로피온산 데할로게나제; 아세트하이드록시산 신타제; 5-엔올피루빌-쉬키메이트-포스페이트 신타제 (aroA); 할로아릴니트릴라제; 아세틸-조효소 A 카르복실라제; 디히드로프테로에이트 신타제 (sul I); 및 32 kD 광화학계 II 폴리펩티드 (psbA).

[0118] 한 실시양태는 또한 클로람페니콜; 메토티렉세이트; 히그로마이신; 스펙티노마이신; 브로모시닐; 글리포세이트; 및 포스포노트리신에 대한 저항성을 코딩하는 유전자를 포함한다.

[0119] 선택 마커 유전자의 상기 목록은 제한적인 것으로 의도되지 않는다. 임의의 리포터 또는 선택 마커 유전자가 본 발명에 포함된다.

[0120] 선택 마커 유전자는 식물에서의 최적의 발현을 위해 합성된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 유전자의 코딩 서열은 코돈 최적화에 의해 변형되어 식물에서 발현을 증진시킬 수 있다. 선택 마커 유전자는 특정한 식물 종에서 발현에 대해 최적화될 수 있거나, 대안적으로 쌍자엽 또는 단자엽 식물에서 최적의 발현을 위해 변형될 수 있다. 식물 선호 코돈은 특정한 관심 식물 종에서 최다량으로 발현되는 단백질에서의 최고 빈도의 코돈으로부터 결정될 수 있다. 한 실시양태에서, 선택 마커 유전자는 식물에서 더 높은 수준으로 발현되어 더 높은 형질 전환 효율을 유발시키도록 설계된다. 유전자의 식물 최적화 방법은 널리 공지되어 있다. 최적화에 대한 지침 및 합성 폴리뉴클레오티드 서열의 제조는, 예를 들어 본원에 참고로 포함된 W02013/016546, W02011/146524, W01997/013402, 미국 특허 번호 6,166,302, 및 미국 특허 번호 5,380,831에서 찾을 수 있다.

[0121] 트랜스진

[0122] 개시된 방법 및 조성물은 식물 계통 내에 폴리뉴클레오티드 유전자 서열을 발현시키는데 사용될 수 있다. 따라서, 제초제 내성, 곤충 저항성, 영양소, 항생제, 또는 치료 분자를 코딩하는 유전자는 신규 프로모터에 의해 발현될 수 있다.

[0123] 한 실시양태에서 본 개시내용의 구성적 프로모터 조절 요소는, 글리포세이트, 2,4-D 글루포시네이트, 또는 또 다른 제초제에 대한 저항성 또는 내성을 제공하고, 선택 곤충 또는 질병에 대한 저항성 및/또는 영양 증진, 개

선된 농경학적 특징, 단백질, 또는 사료, 식품, 산업, 제약 또는 다른 용도에 유용한 다른 생성물을 제공하는 폴리뉴클레오티드 서열을 코딩하는 1종 이상의 유전자와 조합되거나 이와 작동가능하게 연결된다. 트랜스진은 식물 계층 내에 2개 이상의 관심 핵산 서열과 "스택킹"될 수 있다. 스택킹은, 예를 들어 2개 이상의 사례를 사용하는 통상적 식물 육종, 관심 서열을 함유하는 구축물을 사용한 식물의 형질전환, 트랜스제닉 식물의 재-형질전환, 또는 상동 재조합을 통한 표적화된 통합에의 새로운 형질의 첨가를 사용하여 달성될 수 있다.

- [0124] 이러한 관심 폴리뉴클레오티드 서열은 하기 제공된 예들을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다:
- [0125] 1. 해충 또는 질병에 대한 저항성을 부여하는 유전자 또는 코딩 서열 (예를 들면, iRNA)
- [0126] (A) 식물 질병 저항성 유전자. 식물 방어는 종종, 식물에서의 질병 저항성 유전자 (R)의 생성물과 병원체에서의 상응하는 비병독성 (Avr) 유전자의 생성물 사이의 특이적 상호작용에 의해 활성화된다. 식물 품종을 클로닝된 저항성 유전자로 형질전환시켜, 특정 병원체 균주에 저항성인 식물을 조작할 수 있다. 이러한 유전자의 예는 클라도스포리움 풀BUM(*Cladosporium fulvum*)에 대한 저항성의 경우 토마토 Cf-9 유전자 (문헌 [Jones et al., 1994 Science 266:789]), 슈도모나스 시린가에(*Pseudomonas syringae*) 병원체변종 토마토에 대한 저항성의 경우 단백질 키나제를 코딩하는 토마토 Pto 유전자 (문헌 [Martin et al., 1993 Science 262:1432]), 및 슈도모나스 시린가에에 대한 저항성의 경우 아라비도시스 RSSP2 유전자 (문헌 [Mindrinos et al., 1994 Cell 78:1089])를 포함한다.
- [0127] (B) 바실루스 투링기엔시스(*Bacillus thuringiensis*) 단백질, 그의 유도체, 또는 그를 모델로 한 합성 폴리펩티드, 예컨대 Bt  $\delta$ -내독소 유전자의 뉴클레오티드 서열 (Geiser et al., 1986 Gene 48:109), 및 영양 살균증 (VIP) 유전자 (예를 들면, 문헌 [Estruch et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. 93:5389-94] 참조). 더욱이,  $\delta$ -내독소 유전자를 코딩하는 DNA 분자는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection) (메릴랜드주 록빌)으로부터 ATCC 수탁 번호 40098, 67136, 31995 및 31998 하에 구입될 수 있다.
- [0128] (C) 렉틴, 예컨대, 여러 클리비아 미니아타(*Clivia miniata*) 만노스-결합 렉틴 유전자의 뉴클레오티드 서열 (문헌 [Van Damme et al., 1994 Plant Molec. Biol. 24:825]).
- [0129] (D) 곤충 해충에 대한 살유충제로서 유용한 비타민 결합 단백질, 예컨대 아비딘 및 아비딘 상동체. 미국 특허 번호 5,659,026 참조.
- [0130] (E) 효소 억제제, 예를 들면 프로테아제 억제제 또는 아밀라제 억제제. 이러한 유전자의 예는 벼 시스테인 프로테이나제 억제제 (문헌 [Abe et al., 1987 J. Biol. Chem. 262:16793]), 담배 프로테이나제 억제제 I (문헌 [Huub et al., 1993 Plant Molec. Biol. 21:985]), 및  $\alpha$ -아밀라제 억제제 (문헌 [Sumitani et al., 1993 Biosci. Biotech. Biochem. 57:1243])를 포함한다.
- [0131] (F) 곤충-특이적 호르몬 또는 페로몬, 예컨대 엑디스테로이드 및 유충 호르몬, 그의 변이체, 그에 기초한 모방체, 또는 그의 길항제 또는 효능제, 예컨대 예컨대 유충 호르몬의 불활성인자인, 클로닝된 유충 호르몬 에스테라제의 바칼로바이러스 발현 (문헌 [Hammock et al., 1990 Nature 344:458]).
- [0132] (G) 발현 시에 침범한 해충의 생리학을 교란시키는 곤충-특이적 펩티드 또는 뉴로펩티드 (문헌 [J. Biol. Chem. 269:9]). 이러한 유전자의 예는 곤충 이노 호르몬 수용체 (Regan, 1994), 디플로프테라 폰크타타(*Diploptera punctata*)에서 확인된 알로스타틴 (Pratt, 1989), 및 곤충-특이적, 마비성 신경독소 (미국 특허 번호 5,266,361)를 포함한다.
- [0133] (H) 뱀, 말벌 등에 의해 자연에서 생산된 곤충-특이적 독, 예컨대 전갈 곤충독성 펩티드 (문헌 [Pang, 1992 Gene 116:165]).
- [0134] (I) 모노테르펜, 세스퀴테르펜, 스테로이드, 히드록삼산, 페닐프로파노이드 유도체 또는 살균증 활성을 갖는 또 다른 비-단백질 분자의 과축적에 대한 책임이 있는 효소.
- [0135] (J) 생물학적 활성 분자의 변형 (번역후 변형 포함)에 관련되는 효소; 예를 들어, 천연이든 합성이든 관계없이, 당분해 효소, 단백질분해 효소, 지질분해 효소, 뉴클레아제, 시클라제, 트랜스아미나제, 에스테라제, 히드롤라제, 포스포타제, 키나제, 포스포릴라제, 폴리머라제, 엘라스타제, 키티나제 및 글루카나제. 이러한 유전자의 예는 칼라스 유전자 (PCT 공개 출원 W093/02197), 키티나제-코딩 서열 (이는, 예를 들어 수탁 번호 3999637 및 67152 하에 ATCC로부터 취득될 수 있음), 담배 구충 키티나제 (문헌 [Kramer et al., 1993 Insect Molec. Biol. 23:691]), 및 파슬리 ubi4-2 폴리유비퀴틴 유전자 (문헌 [Kawalleck et al., 1993 Plant Molec. Biol.

21:673]를 포함한다.

- [0136] (K) 신호 전달을 자극하는 분자. 이러한 분자의 예는 녹두 칼모듈린 cDNA 클론에 대한 뉴클레오티드 서열 (문헌 [Botella et al., 1994 Plant Molec. Biol. 24:757]) 및 메이즈 칼모듈린 cDNA 클론의 뉴클레오티드 서열 (문헌 [Griess et al., 1994 Plant Physiol. 104:1467])을 포함한다.
- [0137] (L) 소수성 모멘트 펩티드. 미국 특허 번호 5,659,026 및 5,607,914 참조; 후자는 질병 저항성을 부여하는 합성 항미생물 펩티드를 교시한다.
- [0138] (M) 막 퍼미아제, 채널 형성제 또는 채널 차단제, 예컨대 트랜스제닉 담배 식물이 슈도모나스 솔라나세아룸 (*Pseudomonas solanacearum*)에 대해 저항성이 되도록 하는 세크로핀-β 용해 펩티드 유사체 (문헌 [Jaynes et al., 1993 Plant Sci. 89:43]).
- [0139] (N) 바이러스-침습성 단백질 또는 이로부터 유래된 복합 독소. 예를 들어, 형질전환된 식물 세포에서의 바이러스 코트 단백질의 축적은, 코트 단백질 유전자가 유래되는 바이러스뿐만 아니라 관련 바이러스에 의해 실시되는 바이러스 감염 및/또는 유발된 질병 발생에 대해 저항성을 부여한다. 코트 단백질-매개 저항성은 알팔파 모자이크 바이러스, 오이 모자이크 바이러스, 담배 줄무늬 바이러스, 감자 바이러스 X, 감자 바이러스 Y, 담배 식각 바이러스, 담배 얼룩무늬 바이러스 및 담배 모자이크 바이러스 대하여 형질전환된 식물에 부여되어 왔다. 예를 들어, 문헌 [Beachy et al. (1990) Ann. Rev. Phytopathol. 28:451]을 참조한다.
- [0140] (O) 곤충-특이적 항체 또는 그로부터 유래된 면역독소. 따라서, 곤충 장에서의 결정적 대사 기능을 표적화하는 항체는 침범된 효소를 불활성화시켜 곤충을 사멸시킬 것이다. 예를 들어, 문헌 [Taylor et al. (1994) Abstract #497, Seventh Int'l. Symposium on Molecular Plant-Microbe Interactions]은 단일-쇄 항체 단편의 생산을 통한 트랜스제닉 담배에서의 효소 불활성화를 보여준다.
- [0141] (P) 바이러스-특이적 항체. 예를 들어, 재조합 항체 유전자를 발현시키는 트랜스제닉 식물이 바이러스 공격으로부터 보호된다는 것을 보여주는 문헌 [Tavladoraki et al. (1993) Nature 266:469]을 참조한다.
- [0142] (Q) 병원체 또는 기생충에 의해 자연에서 생산되는 발생-정지 단백질. 따라서, 진균 엔도 α-1,4-D 폴리갈락투로나제는 식물 세포벽 호모-α-1,4-D-갈락투로나제를 가용화시킴으로써 진균 콜로니화 및 식물 영양소 방출을 용이하게 한다 (문헌 [Lamb et al., 1992 Bio/Technology 10:1436]). 콩 엔도폴리갈락투로나제-억제 단백질을 코딩하는 유전자의 클로닝 및 특장화는 문헌 [Toubart et al. (1992 Plant J. 2:367)]에 기재되어 있다.
- [0143] (R) 식물에 의해 자연에서 생산되는 발생-정지 단백질, 예컨대 진균성 질병에 대한 증가된 저항성을 제공하는 보리 리보솜-불활성화 유전자 (문헌 [Longemann et al., 1992. Bio/Technology 10:3305]).
- [0144] (S) RNA 분자가 사용되어 표적 유전자의 발현을 억제시키는 RNA 간섭. 한 예에서 RNA 분자는 부분 또는 완전 이중 가닥이고, 이는 침묵 반응을 촉발하여 dsRNA를 소형 간섭 RNA로 절단하고, 이어서 이는 상동 mRNA를 파괴하는 표적화 복합체 내로 혼입된다. 예를 들면, 미국 특허 번호 6,506,559 (Fire et al.); 미국 특허 번호 6,573,099 (Graham et al.)를 참조한다.
- [0145] 2. 제초제에 대한 저항성을 부여하는 유전자
- [0146] (A) 성장점 또는 분열조직을 억제하는 제초제, 예컨대 이미다졸리논, 술폰아닐리드 또는 술폰닐우레아 제초제에 대한 저항성 또는 내성을 코딩하는 유전자. 이 카테고리 내의 예시적인 유전자는 아세트히드록시산 신타제 (AHAS) 효소로도 공지된 (문헌 [Miki et al., 1990 Theor. Appl. Genet. 80:449]) 돌연변이체 아세트락테이트 신타제 (ALS)를 코딩한다 (문헌 [Lee et al., 1988 EMBOJ. 7:1241]).
- [0147] (B) 돌연변이체 EPSP 신타제 및 *aroA* 유전자에 의해 부여되거나, 또는 유전자, 예컨대 DGT-28, 2mEPSPS, GAT (글리포세이트 아세틸트랜스퍼라제) 또는 GOX (글리포세이트 옥시다제) 및 다른 포스포노 화합물, 예컨대 글루포시네이트 (*pat*, *bar*, 및 *dsm-2* 유전자), 및 아릴옥시페녹시프로피온산 및 시클로헥산디온 (ACCase 억제제 코딩 유전자)에 의한 대사 불활성화를 통해 부여된 글리포세이트에 대한 저항성 또는 내성을 코딩하는 하나 이상의 추가의 유전자. 예를 들어, 글리포세이트 저항성을 부여할 수 있는 EPSP 형태의 뉴클레오티드 서열을 개시하는 미국 특허 번호 4,940,835를 참조한다. 돌연변이체 *aroA* 유전자를 코딩하는 DNA 분자는 ATCC 수탁 번호 39256 하에 취득될 수 있고, 돌연변이체 유전자의 뉴클레오티드 서열은 미국 특허 번호 4,769,061에 개시되어 있다. 유럽 특허 출원 번호 0 333 033 및 미국 특허 번호 4,975,374는 제초제, 예컨대 L-포스포노트리신에 대한 저항성을 부여하는 글루타민 신타제 유전자의 뉴클레오티드 서열을 개시한다. 포스포노트리신아세틸-트랜스퍼라제 유전자의 뉴클레오티드 서열은 유럽 출원 번호 0 242 246에 제공된다. 문헌 [De Greef et al. (1989)

Bio/Technology 7:61]은 포스포노트리신 아세틸 트랜스퍼라제 활성을 코딩하는 키메라 bar 유전자를 발현하는 트랜스제닉 식물의 생산을 설명한다. 아릴옥시페녹시프로피온산 및 시클로헥산디온, 예컨대 세톡시딤 및 할록 시포프에 대한 저항성을 부여하는 예시적인 유전자는 문헌 [Marshall et al. (1992) Theor. Appl. Genet. 83:435]에 기재된 Accl-S1, Accl-S2 및 Accl-S3 유전자이다.

- [0148] (C) 광합성을 억제하는 제조제, 예컨대 트리아진에 대한 저항성 또는 내성을 코딩하는 유전자 (psbA 및 gs+ 유전자) 및 벤조니트릴에 대한 저항성 또는 내성을 코딩하는 유전자 (니트릴라제 유전자). 문헌 [Przibilla et al. (1991) Plant Cell 3:169]은 클라미도모나스(*Chlamydomonas*)를 형질전환시키기 위한 돌연변이체 psbA 유전자를 코딩하는 플라스미드의 사용을 설명한다. 니트릴라제 유전자에 대한 뉴클레오티드 서열은 미국 특허 번호 4,810,648에 개시되어 있고, 이들 유전자를 함유하는 DNA 분자는 ATCC 수탁 번호 53435, 67441 및 67442 하에 입수가능하다. 글루타티온 S-트랜스퍼라제를 코딩하는 DNA의 클로닝 및 발현은 문헌 [Hayes et al. (1992) Biochem. J. 285:173]에 기재되어 있다.
- [0149] (D) 파라-히드록시페닐피루베이트 (HPP)를 호모젠티세이트 내로 형질전환시키는 반응을 촉매하는 효소인 히드록시페닐피루베이트 디옥시게나제 (HPPD)에 결합하는 제조제에 대한 저항성 또는 내성을 코딩하는 유전자. 이는 제조제, 예컨대 이속사졸 (EP418175, EP470856, EP487352, EP527036, EP560482, EP682659, 미국 특허 번호 5,424,276), 특히 메이즈에 대해 선택적 제조제인 이속사플루톨, 디케토니트릴 (EP496630, EP496631), 특히 2-시아노-3-시클로프로필-1-(2-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-4-CF<sub>3</sub> 페닐)프로판-1,3-디온 및 2-시아노-3-시클로프로필-1-(2-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>-4-2,3C<sub>12</sub>페닐)프로판-1,3-디온, 트리케톤 (EP625505, EP625508, 미국 특허 번호 5,506,195), 특히 숄코트리온 및 피라졸리네이트를 포함한다. 식물에서 과잉의 HPPD를 생산하는 유전자는 이러한 제조제에 대한 내성 또는 저항성을 제공할 수 있으며, 이는 예를 들어 미국 특허 번호 6,268,549 및 6,245,968 및 미국 특허 출원 공개 번호 2003/0066102에 기재된 유전자를 포함한다.
- [0150] (E) 페녹시 옥신 제조제, 예컨대 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-D)에 대한 저항성 또는 내성을 코딩하며, 또한 아릴옥시페녹시프로피오네이트 (AOPP) 제조제에 대한 저항성 또는 내성을 부여할 수 있는 유전자. 이러한 유전자의 예는 미국 특허 번호 7,838,733에 기재된 α-케토글루타레이트-의존성 디옥시게나제 효소 (aad-1) 유전자를 포함한다.
- [0151] (F) 페녹시 옥신 제조제, 예컨대 2,4-디클로로페녹시아세트산 (2,4-D)에 대한 저항성 또는 내성을 코딩하며, 또한 피리딜옥시 옥신 제조제, 예컨대 플루록시피르 또는 트리클로피르에 대한 저항성 또는 내성을 부여할 수 있는 유전자. 이러한 유전자의 예는 W02007/053482 A2에 기재된 α-케토글루타레이트-의존성 디옥시게나제 효소 유전자 (aad-12)를 포함한다.
- [0152] (G) 디캄바에 대한 저항성 또는 내성을 코딩하는 유전자 (예를 들면, 미국 특허 공개 번호 20030135879 참조).
- [0153] (H) 프로토포르피리노젠 옥시다제 (PPO)를 억제하는 제조제에 대한 저항성 또는 내성을 제공하는 유전자 (미국 특허 번호 5,767,373 참조).
- [0154] (I) 광화학제 II 반응 중심 (PS II)의 코어 단백질에 결합하는 트리아진 제조제 (예컨대 아트라진) 및 우레아 유도체 (예컨대 디우론) 제조제에 대한 저항성 또는 내성을 제공하는 유전자 (문헌 [Brussian et al., (1989) EMBO J. 1989, 8(4): 1237-1245] 참조).
- [0155] 3. 가치-부가된 형질을 부여하거나 이에 기여하는 유전자
- [0156] (A) 예를 들어, 메이즈 또는 브라시카를 안티센스 유전자 또는 스테아로일-ACP 테세투라제로 형질전환시켜 식물의 스테아르산 함량을 증가시킴으로써 변형된 지방산 대사 (문헌 [Knultzon et al., 1992 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:2624]).
- [0157] (B) 감소된 피타제 함량
- [0158] (1) 피타제-코딩 유전자, 예컨대 아스페르길루스 니거(*Aspergillus niger*) 피타제 유전자의 도입 (문헌 [Van Hartingsveldt et al., 1993 Gene 127:87])은 피테이트의 파괴를 증진시켜 보다 많은 유리 포스페이트를 형질 전환된 식물에 첨가한다.
- [0159] (2) 피테이트 함량을 감소시키는 유전자가 도입될 수 있다. 메이즈에서, 이는 예를 들어 낮은 수준의 피트산을 특징으로 하는 메이즈 돌연변이체를 담당하는 단일 대립유전자와 연관된 DNA를 클로닝한 다음 재도입함으로써 달성될 수 있다 (문헌 [Raboy et al., 1990 Maydica 35:383]).

- [0160] (C) 예를 들어, 식물을 전분의 분지화 패턴을 변경시키는 효소를 코딩하는 유전자로 형질전환시킴으로써 실시된 변형된 탄수화물 조성물. 이러한 효소의 예는 스트렙토코쿠스 무쿠스(*Streptococcus mucus*) 프록토실트랜스퍼라제 유전자 (문헌 [Shiroza et al., 1988 J. Bacteriol. 170:810]), 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 레반수크라제 유전자 (문헌 [Steinmetz et al., 1985 Mol. Gen. Genet. 200:220]), 바실루스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*)  $\alpha$ -아밀라제 (문헌 [Pen et al., 1992 Bio/Technology 10:292]), 토마토 인버타제 유전자 (문헌 [Elliot et al., 1993]), 보리 아밀라제 유전자 (문헌 [Sogaard et al., 1993 J. Biol. Chem. 268:22480]), 및 메이즈 내배유 전분 분지화 효소 II (문헌 [Fisher et al., 1993 Plant Physiol. 102:10450])를 포함한다.
- [0161] 형질전환
- [0162] 식물의 형질전환에 적합한 방법은 DNA가 세포 내로 도입될 수 있는 임의의 방법, 예를 들어 비제한적으로 다음을 포함한다: 전기천공 (예를 들면, 미국 특허 번호 5,384,253 참조); 미세발사체 충격 (예를 들면, 미국 특허 번호 5,015,580; 5,550,318; 5,538,880; 6,160,208; 6,399,861; 및 6,403,865 참조); 아그로박테리움-매개 형질전환 (예를 들면, 미국 특허 번호 5,635,055; 5,824,877; 5,591,616; 5,981,840; 및 6,384,301 참조); 및 원형질체 형질전환 (예를 들면, 미국 특허 번호 5,508,184). 이들 방법은 식물을 안정하게 형질전환시키거나 일시적으로 형질전환시키는 데 사용될 수 있다.
- [0163] DNA 구축물은 탄화규소 섬유를 사용하는 교반과 같은 기술을 사용하여 식물 세포의 게놈 DNA 내로 직접적으로 도입될 수 있다 (예를 들면, 미국 특허 번호 5,302,523 및 5,464,765 참조). DNA 구축물은 바이오리스틱 방법, 예컨대 DNA 입자 충격을 사용하여 식물 조직 내로 직접적으로 도입될 수 있다 (예를 들면, 문헌 [Klein et al., (1987) Nature 327:70-73] 참조). 대안적으로, DNA 구축물은 나노입자 형질전환을 통해 식물 세포 내로 도입될 수 있다 (예를 들면, 미국 특허 공개 번호 2009/0104700 참조, 그 전문이 본원에 참조로 포함됨).
- [0164] 추가로, 유전자 전달은 비-아그로박테리움 박테리아 또는 바이러스, 예컨대 리조비움(*Rhizobium*) 종 NGR234, 시노리조비움 멜리로티(*Sinorhizobium meliloti*), 메소리조비움 로티(*Mesorhizobium loti*), 감자 바이러스 X, 콜리플라워 모자이크 바이러스, 카사바 베인 모자이크 바이러스, 및/또는 담배 모자이크 바이러스를 사용하여 달성될 수 있다 (예를 들면, 문헌 [Chung et al. (2006) Trends Plant Sci. 11(1):1-4] 참조).
- [0165] 형질전환 기술의 적용을 통해, 사실상 임의의 식물 종의 세포를 안정하게 형질전환시킬 수 있고, 이들 세포는 널리 공지된 기술에 의해 트랜스제닉 식물로 발생될 수 있다. 예를 들어, 목화 형질전환과 관련하여 특히 유용할 수 있는 기술은 미국 특허 번호 5,846,797; 5,159,135; 5,004,863; 및 6,624,344에 기재되어 있고; 특히 브라시카 식물을 형질전환시키는 기술은, 예를 들어 미국 특허 번호 5,750,871에 기재되어 있고; 대두를 형질전환시키는 기술은, 예를 들어 미국 특허 번호 6,384,301에 기재되어 있고; 메이즈를 형질전환시키는 기술은, 예를 들어 미국 특허 번호 7,060,876 및 5,591,616, 및 국제 PCT 공개 W095/06722에 기재되어 있다.
- [0166] 외인성 핵산의 수용 세포로의 전달을 실시한 후, 형질전환된 세포는 일반적으로 추가의 배양 및 식물 재생을 위해 확인된다. 형질전환체를 확인하는 능력을 개선시키기 위해, 형질전환체를 생성하는 데 사용된 형질전환 벡터와 함께 선택 마커 유전자를 사용하기를 원할 수 있다. 한 예시적 실시양태에서, 형질전환된 세포 집단은 세포를 선택적 작용제 또는 작용제들에 노출시킴으로써 검정될 수 있거나, 세포는 목적하는 마커 유전자 형질에 대해 스크리닝될 수 있다.
- [0167] 선택적 작용제에 노출되어 생존한 세포, 또는 스크리닝 검정에서 양성으로 스코어링된 세포는 식물 재생을 지지하는 배지 중에서 배양될 수 있다. 한 실시양태에서, 임의의 적합한 식물 조직 배양 배지는 추가의 물질, 예컨대 성장 조절제를 포함함으로써 변형될 수 있다. 식물 조직은 식물 재생 활동을 개시하기에 충분한 조직이 이용가능할 때까지 성장 조절제를 포함하는 기본 배지 상에서 유지될 수 있다. 대안적으로, 수동 선택의 반복 라운드 후에, 조직의 형태가 재생에 충분할 때까지 (예를 들면, 적어도 2주), 조직은 이어서, 싹 형성에 도움이 될 수 있는 배지로 옮겨진다. 충분한 싹 형성이 발생할 때까지 배양물은 주기적으로 옮겨진다. 싹이 형성되면, 이를 뿌리 형성에 도움이 되는 배지로 옮긴다. 충분한 뿌리가 형성되면, 식물은 추가 성장 및 성숙을 위한 토양으로 옮겨진다.
- [0168] 재생 식물에 제공된 구축물을 포함하는 목적하는 핵산의 존재를 확인하기 위해, 다양한 검정이 수행될 수 있다. 이러한 검정은 다음을 포함한다: 분자생물학적 검정법, 예컨대 서던 및 노던 블롯팅 및 PCR; 생화학적 검정법, 예컨대, ELISA, 웨스턴 블롯, 및/또는 LC-MS MS 분광광도측정법과 같은 면역학적 수단에 의한 또는 효소 기능에 의한, 예컨대 잎, 캘러스, 또는 화분 검정과 같은 식물 부분 검정에 의한 단백질 생성물의 존재 검출; 및/또는

재생된 전체 식물의 표현형 분석.

- [0169] 트랜스제닉 사례는 예를 들어, 관심 핵산 분자에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하는 PCR 증폭에 의해 스크리닝될 수 있다. PCR 유전자형 결정은, 계놈 내로 통합된 관심 핵산 분자를 함유할 것으로 예측되는 단리된 및/또는 정제된 숙주 식물 조직으로부터 유래된 계놈 DNA의 PCR 증폭에 이어서, PCR 증폭 생성물의 표준 클로닝 및 서열 분석을 포함하나 이에 제한되지 않는 것으로 이해된다. PCR 유전자형 결정의 방법은 널리 기재되어 있고 (예를 들면, 문헌 [Rios et al. (2002) Plant J. 32:243-53] 참조), 세포 배양물을 비롯한 임의의 식물 종 또는 조직 유형으로부터 유래된 계놈 DNA에 적용될 수 있다.
- [0170] 표적 서열 및 도입된 서열, 둘 다에 결합하는 올리고뉴클레오티드 프라이머의 조합은 PCR 증폭 반응에서 순차적으로 사용되거나, 또는 멀티플렉스화될 수 있다. 표적 부위, 도입된 핵산 서열, 및/또는 2개의 유형의 핵산 서열의 조합에 어닐링되도록 설계된 올리고뉴클레오티드 프라이머가 생산될 수 있다. 따라서, PCR 유전자형 결정 전략은, 예를 들어 비제한적으로, 식물 계놈 중 특이적 서열의 증폭; 식물 계놈 중 다중 특이적 서열의 증폭; 식물 계놈 중 비-특이적 서열의 증폭; 및 상기 중 임의의 조합을 포함할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 프라이머 및 증폭 반응의 추가의 조합을 고안하여 계놈을 조사할 수 있다. 예를 들어, 정방향 및 역방향 올리고뉴클레오티드 프라이머는 도입된 핵산 서열의 경계 바깥쪽 표적에 특이적인 핵산 서열(들)에 어닐링되도록 설계될 수 있다.
- [0171] 정방향 및 역방향 올리고뉴클레오티드 프라이머는, 예를 들어 도입된 핵산 분자에 포함된 관심 뉴클레오티드 서열 내의 코딩 영역, 또는 핵산 분자의 다른 부분에 상응하는 서열에서 도입된 핵산 분자에 특이적으로 어닐링되도록 설계될 수 있다. 프라이머는 본원에 기재된 프라이머와 함께 사용될 수 있다. 올리고뉴클레오티드 프라이머는 목적하는 서열에 따라 합성될 수 있고, (예를 들면, 인티그레이티드 DNA 테크놀로지스, 인크.(Integrated DNA Technologies, Inc.), 아이오와주 코탈빌로부터) 상업적으로 이용가능하다. 증폭 후에 클로닝 및 서열분석, 또는 증폭 생성물의 직접적 서열 분석이 이어질 수 있다. 한 실시양태에서, 유전자 표적에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프라이머가 PCR 증폭에 사용된다.
- [0172] 트랜스진 발현 방법
- [0173] 한 실시양태에서, 식물에서 적어도 1개의 트랜스진을 발현시키는 방법은 적어도 1개의 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터 (서열식별번호: 2)를 포함하는 식물을 성장시키는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 식물 조직 또는 식물 세포에서 적어도 1개의 트랜스진을 발현시키는 방법은 적어도 1개의 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터 (서열식별번호: 2)를 포함하는 식물 조직 또는 식물 세포를 배양하는 것을 포함한다.
- [0174] 한 실시양태에서, 식물에서 적어도 1개의 트랜스진을 발현시키는 방법은 적어도 1개의 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터 (서열식별번호: 2)를 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함하는 식물을 성장시키는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 식물 조직 또는 식물 세포에서 적어도 1개의 트랜스진을 발현시키는 방법은 적어도 1개의 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터 (서열식별번호: 2)를 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함하는 식물 조직 또는 식물 세포를 배양하는 것을 포함한다.
- [0175] 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터 (서열식별번호: 2)를 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함한다. 여기서 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터 (서열식별번호: 2)는 상류-프로모터 (서열식별번호: 4), 5'-UTR (서열식별번호: 6), 및 인트론 (서열식별번호: 8)으로 구성된다. 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 상류-프로모터 (서열식별번호: 4), 5'-UTR (서열식별번호: 6), 및 인트론 (서열식별번호: 8)을 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함한다. 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 유전자의 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 상류-프로모터 (서열식별번호: 4), 5'-UTR (서열식별번호: 6), 및 인트론 (서열식별번호: 8)을 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함한다. 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 유전자의 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 상류-프로모터 (서열식별번호: 4), 5'-UTR (서열식별번호: 6), 및 인트론 (서열식별번호: 8)을 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함한다.
- [0176] 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터를 포함한다. 한 실시양태에서, 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터는 서열식별번호: 2일 수 있다. 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 프로모터를 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함하며, 여기서 프로모터는 서열식별번호: 2에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 또는 100% 등

일하다. 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터를 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함한다. 한 예시적 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터를 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함하며, 여기서 트랜스진은 살곤충제 저항성 트랜스진, 제초제 내성 트랜스진, 질소 사용 효율 트랜스진, 물 사용 효율 트랜스진, 영양 품질 트랜스진, DNA 결합 트랜스진, 선택 마커 트랜스진, 또는 그의 조합일 수 있다.

[0177] 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 상류-프로모터를 포함한다. 한 실시양태에서, 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 상류-프로모터는 서열식별번호: 4일 수 있다. 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 상류-프로모터를 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함하며, 여기서 상류-프로모터는 서열식별번호: 4에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 또는 100% 동일하다. 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 상류-프로모터를 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함한다. 한 예시적 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 상류-프로모터를 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함하며, 여기서 트랜스진은 살곤충제 저항성 트랜스진, 제초제 내성 트랜스진, 질소 사용 효율 트랜스진, 물 사용 효율 트랜스진, 영양 품질 트랜스진, DNA 결합 트랜스진, 선택 마커 트랜스진, 또는 그의 조합일 수 있다.

[0178] 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 5'-UTR 또는 리더 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 5'-UTR 또는 리더 서열은 서열식별번호: 6의 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 5'-UTR 또는 리더 서열을 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함하며, 여기서 5'-UTR 또는 리더 서열은 서열식별번호: 6에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 또는 100% 동일하다. 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 프로모터에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 5'-UTR 또는 리더를 포함하며, 여기서 프로모터는 유비퀴틴 프로모터, 또는 식물 (예를 들면, 제아 메이스 또는 제아 룩수리안스 유비퀴틴-1 프로모터), 바이러스 (예를 들면, 카사바 베인 모자이크 바이러스 프로모터) 또는 박테리아 (예를 들면, 아그로 박테리움 투메파시엔스 델타 마스)로부터 유래하는 프로모터이다. 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 5'-UTR 또는 리더를 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함한다. 한 예시적 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 5'-UTR 또는 리더를 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함하며, 여기서 트랜스진은 살곤충제 저항성 트랜스진, 제초제 내성 트랜스진, 질소 사용 효율 트랜스진, 물 사용 효율 트랜스진, 영양 품질 트랜스진, DNA 결합 트랜스진, 선택 마커 트랜스진, 또는 그의 조합일 수 있다.

[0179] 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 Ubi-1 인트론을 포함한다. 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 인트론을 포함한다. 한 실시양태에서, 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 인트론은 서열식별번호: 8의 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 인트론을 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함하며, 여기서 인트론은 서열식별번호: 8에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 또는 100% 동일하다. 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 프로모터에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 인트론을 포함하며, 여기서 프로모터는 유비퀴틴 프로모터, 또는 식물 (예를 들면, 제아 메이스 또는 제아 룩수리안스 유비퀴틴-1 프로모터), 바이러스 (예를 들면, 카사바 베인 모자이크 바이러스 프로모터) 또는 박테리아 (예를 들면, 아그로 박테리움 투메파시엔스 델타 마스)로부터 유래하는 프로모터이다. 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 인트론을 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함한다. 한 예시적 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 인트론을 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함하며, 여기서 트랜스진은 살곤충제 저항성 트랜스진, 제초제 내성 트랜스진, 질소 사용 효율 트랜스진, 물 사용 효율 트랜스진, 영양 품질 트랜스진, DNA 결합 트랜스진, 선택 마커 트랜스진, 또는 그의 조합일 수 있다.

[0180] 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 상류-프로모터, Ubi-1 인트론, 및 Ubi-1 5'-UTR을 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함한다. 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터, Ubi-1 인트론, 및 Ubi-1 5'-UTR은 유전자 발현 카세트가 2개 이상의 트랜스진을 포함하는 경우, 유전자 발현 카세트 내의 여러 트랜스진에 작동가능하게 연결될 수 있다. 한 예시적 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터를 포함하며, 여기서 트랜

스진은 살균제 저항성 트랜스진, 제초제 내성 트랜스진, 질소 사용 효율 트랜스진, 물 사용 효율 트랜스진, 영양 품질 트랜스진, DNA 결합 트랜스진, 선택 마커 트랜스진, 또는 그의 조합일 수 있다. 한 예시적 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 록수리안스 v1 Ubi-1 인트론을 포함하며, 여기서 트랜스진은 살균제 저항성 트랜스진, 제초제 내성 트랜스진, 질소 사용 효율 트랜스진, 물 사용 효율 트랜스진, 영양 품질 트랜스진, DNA 결합 트랜스진, 선택 마커 트랜스진, 또는 그의 조합일 수 있다. 한 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 프로모터에 작동가능하게 연결된 지. 록수리안스 v1 Ubi-1 인트론을 포함하며, 여기서 프로모터는 유비퀴틴 프로모터, 또는 식물 (예를 들면, 제아 메이스 또는 제아 록수리안스 유비퀴틴-1 프로모터), 바이러스 (예를 들면, 카사바 베인 모자이크 바이러스 프로모터) 또는 박테리아 (예를 들면, 아그로 박테리움 투메파시엔스 델타 마스)로부터 유래하는 프로모터이다. 한 예시적 실시양태에서, 유전자 발현 카세트는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 지. 록수리안스 v1 Ubi-1 5'-UTR을 포함하며, 여기서 트랜스진은 살균제 저항성 트랜스진, 제초제 내성 트랜스진, 질소 사용 효율 트랜스진, 물 사용 효율 트랜스진, 영양 품질 트랜스진, DNA 결합 트랜스진, 선택 마커 트랜스진, 또는 그의 조합일 수 있다.

[0181] 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 본원에 개시된 바와 같은 구성적 유전자 프로모터 조절 요소를 포함하는 벡터를 포함한다. 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 본원에 개시된 바와 같은, 트랜스진에 작동가능하게 연결된 구성적 유전자 프로모터 조절 요소를 포함하는 벡터를 포함한다. 한 실시양태에서, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 본원에 개시된 바와 같은, 유전자 발현 카세트를 포함하는 벡터를 포함한다. 한 실시양태에서, 벡터는 플라스미드, 코스미드, 박테리아 인공 염색체 (BAC), 박테리오파지, 또는 바이러스 단편일 수 있다.

[0182] 한 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 따라, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 단자엽일 수 있다. 단자엽 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 옥수수, 벼, 밀, 사탕수수, 보리, 호밀, 소르굼, 난초, 대나무, 바나나, 부들, 백합, 귀리, 양파, 기장, 및 트리티케일일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에 따라, 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 쌍자엽일 수 있다. 쌍자엽 식물, 식물 조직, 또는 식물 세포는 평지씨, 카놀라, 인도 겨자, 에티오피아 겨자, 대두, 해바라기, 및 목화일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0183] 유전자 변형 식물의 생산에 관하여, 식물의 유전자 조작 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 쌍자엽 식물뿐만 아니라, 단자엽 식물에 대한 생물학적 및 물리학적 형질전환 프로토콜을 비롯한 다수의 식물 형질전환 방법이 개발되었다 (예를 들면, 문헌 [Goto-Fumiyuki et al., Nature Biotech 17:282-286 (1999); Miki et al., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B. R. and Thompson, J. E. Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 67-88 (1993)]). 추가로, 식물 세포 또는 조직 형질전환, 및 식물의 재생을 위한 벡터 및 시험관내 배양 방법은, 예를 들어 문헌 [Gruber et al., Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick, B. R. and Thompson, J. E. Eds., CRC Press, Inc., Boca Raton, pp. 89-119 (1993)]에서 이용가능하다.

[0184] 관련 기술분야의 통상의 기술자는 외인성 서열이 트랜스제닉 식물에 안정하게 도입되고 작동가능한지 확인된 후, 이것이 유성 교배에 의해 다른 식물 내로 도입될 수 있다는 것을 인지할 것이다. 교배될 종에 따라, 다수의 표준 번식 기술 중 임의의 것이 사용될 수 있다.

[0185] 형질전환된 식물 세포, 뿌리, 잎, 캘러스, 화분, 조직, 또는 식물은 조작된 식물 물질을 형질전환 DNA 상에 존재하는 마커 유전자에 의해 코딩되는 형질에 대해 선택하거나 스크리닝함으로써 확인하고 단리될 수 있다. 예를 들어, 선택은 조작된 식물 물질을 억제량의 항생제 또는 제초제 (형질전환 유전자 구축물이 이에 대한 저항성을 부여함)를 함유하는 배지 상에서 성장시킴으로써 수행될 수 있다. 추가로, 형질전환된 세포는 또한 재조합 핵산 구축물 상에 존재할 수 있는 임의의 가시적 마커 유전자 (예를 들면, YFP, GFP, β-글루쿠로니다제, B 또는 C1 유전자)의 활성화에 대해 스크리닝함으로써 확인될 수 있다. 이러한 선택 및 스크리닝 방법론은 관련 기술분야의 통상의 기술자들에게 널리 공지되어 있다.

[0186] 물리적 및 생화학적 방법을 또한 사용하여, 삽입된 유전자 구축물을 함유하는 식물 또는 식물 세포 형질전환체를 확인할 수 있다. 이러한 방법들은 다음을 포함하나, 이에 제한되지 않는다: 1) 재조합 DNA 삽입물의 구조를 검출하고 결정하기 위한 서던 분석 또는 PCR 증폭; 2) 유전자 구축물의 RNA 전사체를 검출하고 조사하기 위한 노던 블롯, S1 RNase 보호, 프라이머-연장 또는 역전사효소-PCR 증폭; 3) 효소 또는 리보자임 활성을 검출하기 위한 효소적 검정 (이러한 유전자 산물은 유전자 구축물에 의해 코딩됨); 4) 차세대 서열 (NGS) 분석; 5) 단백질 겔 전기영동, 웨스턴 블롯 기술, 면역침전, 또는 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA) (유전자 구축물 산물은

단백질임). 추가의 기술, 예컨대 계내 혼성화, 효소 염색, 및 면역염색을 또한 사용하여, 특정 식물 기관 및 조직에서의 재조합 구축물의 존재 또는 발현을 검출할 수 있다. 모든 이들 검정을 수행하는 방법은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.

[0187] 본원에 개시된 방법을 사용하는 유전자 조작의 효과는, 예를 들어 관심 조직으로부터 단리된 RNA (예를 들면, mRNA)의 노던 블롯에 의해 관찰될 수 있다. 전형적으로, mRNA가 존재하거나 mRNA 양이 증가하였다면, 상응하는 트랜스진이 발현되고 있는 것으로 가정될 수 있다. 유전자 및/또는 코딩된 폴리펩티드 활성을 측정하는 다른 방법이 사용될 수 있다. 사용된 기질, 및 반응 생성물 또는 부산물의 증가 또는 감소를 검출하는 방법에 따라, 상이한 유형의 효소적 검증이 사용될 수 있다. 추가로, 발현된 폴리펩티드의 수준은 면역화학적으로, ELISA, RIA, EIA, 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있는 다른 항체 기반 검정, 예컨대 전기영동 검출 검정 (염색 또는 웨스턴 블롯팅과 함께)에 의해 측정될 수 있다. 하나의 비제한적인 예로서, ELISA 검정법을 사용하는 AAD-1 (아릴옥시알카노에이트 디옥시게나제; WO 2005/107437 참조) 및 PAT (포스포노트리신-N-아세틸-트랜스퍼라제) 단백질의 검출은 미국 특허 공개 번호 20090093366에 기재되어 있으며, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 트랜스진은 또한 식물의 일부 세포 유형 또는 조직에서 또는 일부 발생 단계에서 선택적으로 발현될 수 있다. 트랜스진은 또한 모든 식물 조직에서 및 그의 전체 생활 주기를 따라 실질적으로 발현될 수 있다. 그러나, 임의의 조합 발현 방식이 또한 적용가능하다.

[0188] 본 개시내용은 또한 상기 기재된 트랜스제닉 식물의 종자를 포괄하며, 여기서 종자는 리포터 유전자, 트랜스진, 또는 유전자 발현 카세트를 포함한다. 본 개시내용은 상기 기재된 트랜스제닉 식물의 자손, 클론, 세포주, 또는 세포를 추가로 포괄하며, 여기서 상기 자손, 클론, 세포주, 또는 세포는 리포터 유전자, 트랜스진, 또는 유전자 구축물을 포함한다.

[0189] 본 발명은 구체적인 방법 및 실시양태를 참조로 하여 기재되었지만, 다양한 변형 및 변화가 본 발명을 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있는 것으로 이해되어야 한다.

[0190] 실시예

[0191] 실시예 1: 신규 프로모터 확인 및 단리

[0192] 지. 룩수리안스 v1의 Ubi-1 유전자로부터의 신규 프로모터 서열을 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)을 사용하여 증폭시켰다. 신규 프로모터, 지. 룩수리안스 v1을 증폭시키도록 설계된 올리고뉴클레오티드 (표 1)는 대조군으로서 제공된 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 프로모터 서열의 보존된 영역에서 유래하였다. PCR 생성물을 지. 룩수리안스 v1로부터 수득하였고, 특징화하였다.

[0193] 신규 프로모터를 포함하는 PCR 생성물을 제조업체의 지침에 따라 인비트로젠 제로 블런트(Invitrogen Zero Blunt)® TOPO® PCR 클로닝 키트를 사용하여 Topo™ 벡터 내로 클로닝하였다. 신규 프로모터 PCR 생성물을 포함하는 클로닝된 플라스미드를 보여주는 벡터 지도가 제공된다. 플라스미드 pDAB105710은 지. 룩수리안스 v1에 해당한다 (도 2).

표 1: 신규 Ubi-1 프로모터의 PCR 증폭에 사용된 프라이머	
	Seq ID No:
정방향 프라이머: GCTACCGCGGACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAATG	9
역방향 프라이머: AGTCAGGTACCCTGCAGAAGTAACACCAAACAACAG	10
PCR 프라이머의 프로모터-특이적 서열은 밑줄표시되어 있다. 프로모터-특이적 서열의 5' 상류에 위치하는 프라이머 서열은 클로닝에 사용되는 링커 서열이다.	

[0194] 클로닝한 후, PCR 생성물을 함유하는 프로모터 삽입물을 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 사용하여 서열분석하였다. 지. 룩수리안스 v1의 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열 (도 4)을 전산적으로 정렬시키고, 후속적으로 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 대조 서열 (도 3)에 대한 서열 상동성을 분석하였다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 생물정보학적 방법 및/또는 소프트웨어 프로그램, 예컨대 클러스탈W 또는 시퀀처를 사용하여 서열 상동성 분석을 수행하였다.

[0196] 실시예 2: 신규 프로모터 특징화

[0197] 추가의 특징화를 위해 신규 Ubi-1 프로모터를, 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 대조 서열 (서열식별번호: 1; 도 3)에 대한 서열 정렬 및 비교를 포함하는 서열 상동성 분석 (도 3-7)으로 밝혀내었다. 지. 룩수리안스 v1로부터

수득한 신규 Ubi-1 프로모터 서열 (서열식별번호: 2; 도 4)은 3개의 별개의 영역의 폴리뉴클레오티드 서열; 1) 상류-프로모터 영역 (서열식별번호: 4), 2) 5'-UTR (서열식별번호: 6), 및 3) 인트론 (서열식별번호: 8)을 포함하는 것으로 또한 관찰되었다. 지. 록수리안스 v1로부터의 프로모터 영역 및 특정 프로모터 요소를 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 대조 서열에 대한 서열 상동성에 대해 분석하였다 (도 5-7). 보다 구체적으로, 서열 정렬을 수행하여 지. 록수리안스 v1 프로모터의 상류-프로모터, 5'-UTR, 및 인트론 영역뿐만 아니라 TATA 박스 및 열 쇼크 요소 (HSE) 조절 요소를 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 대조 서열의 상응하는 영역에 대해 독립적으로 비교하였다 (도 5-7, 표 2).

**표 2: 지. 메이스 B73 Ubi-1 프로모터와 신규 Ubi-1 프로모터 사이의 서열 상동성 (%)**

프로모터	총	상류-프로모터	5'-UTR/리더	인트론	TATA 박스	열 쇼크 요소
지. 록수리안스 v1	90.4	87.8	98.8	91.7	100	100

[0198]

[0199]

도 5는 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 대조 프로모터 서열의 상류-프로모터 영역과 비교한 지. 록수리안스 v1 프로모터의 상류-프로모터 영역의 서열 정렬을 보여준다. 도 6은 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 대조 프로모터 서열의 5'-UTR 또는 리더 서열과 비교한 지. 록수리안스 v1 프로모터의 5'-UTR 또는 리더 서열의 서열 정렬을 보여준다. 도 7은 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 대조 프로모터 서열의 인트론 서열과 비교한 지. 록수리안스 v1 Ubi-1 프로모터의 인트론 영역의 서열 정렬을 보여준다.

[0200]

지. 록수리안스 v1로부터 수득한 프로모터 요소는 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 서열에 대해 90.4% 전체 서열 동일성을 나타내었다 (표 2). 지. 록수리안스 v1로부터의 신규 프로모터 서열의 특징화는, 전형적으로 기능적 프로모터에서 발견되는 대부분의 프로모터 조절 요소 (즉, TATA 박스 또는 열 쇼크 요소)가 또한 지. 록수리안스 v1 Ubi-1 유전자의 코어 프로모터 영역 내에 고도로 보존되어 있음을 확인하였다 (표 2). 예를 들어, 도 5는 신규 지. 록수리안스 v1 Ubi-1 프로모터의 상류-프로모터 영역에서 TSS의 대략 50bp 5' 상류에 위치하는 것으로 확인되고 밝혀진, 고도로 보존된 TATA 박스 (밑줄표시된 염기 쌍 869-876)를 보여준다. 단지 작은 수준의 변이가, 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 대조 서열과 98.8% 서열 상동성을 갖는 신규 지. 록수리안스 v1 Ubi-1 프로모터 (도 6)의 5'-UTR 또는 리더 서열에서 관찰되었고 (도 4), 상류-프로모터 영역 (도 5) 및 인트론 영역 (도 7)에서 보다 낮은 서열 보존 영역이 또한 확인되었다.

[0201]

지. 록수리안스 v1 Ubi-1 프로모터의 상류-프로모터 영역은 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 상류-프로모터로부터 변이를 보였으며, 단지 87.8 % 서열 상동성을 가졌다 (표 2). 지. 록수리안스 v1 상류-프로모터 영역에서 확인된 대부분의 차이는 뉴클레오티드 결실, 치환, 및/또는 미스매치를 포함하였다 (도 5). 특히, TATA 박스 프로모터 요소의 100bp 5' 상류 내에 위치하는 12-13bp 결실은 지. 록수리안스 v1 Ubi-1 프로모터 (박스로 표시된 염기 쌍 773-784)에서 발견되었다. 유사하게, 도 5는 본 연구에서 분석된 신규 지. 록수리안스 v1 Ubi-1 프로모터에 보존되지 않은 2개의 중첩된 열 쇼크 요소 (HSE) 서열 (각각 원으로 둘러싸인 염기 쌍 457 - 481 및 482 - 500)을 보여준다.

[0202]

추가로, 추가의 조절 모티프는 TSS의 100-200bp 5' 상류로 연장된 Ubi-1 상류-프로모터 영역에 존재한다. 이들 모티프는 전사 개시 복합체와 상호작용하여 그의 어셈블리를 용이하게 하거나, 그의 안정성을 개선시키거나, 전사 기구 시작시에, 프로모터 탈출 효율을 증가시키는 전사 인자에 결합한다 (문헌 [Peremarti et al. 2010]). 따라서, 지. 록수리안스 v1 Ubi-1 프로모터에서 관찰되는 것과 같은 이 조절 영역 내의 결실, 치환, 및 미스매치 (도 5)는 잠재적으로 프로모터 강도 및 특이성 둘 다에 영향을 미칠 수 있었다.

[0203]

서열 변이를 또한 지. 록수리안스 v1 Ubi-1 프로모터의 인트론 영역에서 확인하였다. 신규 지. 록수리안스 v1 Ubi-1 프로모터는 비교적 보존된 수준의 서열 동일성 (즉, 91.7%)을 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 대조 프로모터 서열과 공유하였고 (표 2), 지. 록수리안스 v1 인트론 프로모터 서열은 또한 대조 서열에서 확인되지 않은, 각각 대략 17bp 및 8bp의 2개의 유의한 결실을 함유하였다 (도 7). 17bp 결실은 TSS의 대략 195bp 3' 하류 (박스로 표시된 염기 쌍 120-136)에 위치하고, 8bp 결실은 TSS의 대략 710bp 3' 하류 (밑줄표시된 염기 쌍 626-633)에 위치하였다.

[0204]

실시예 3: 유전자 발현을 위한 새로운 프로모터를 사용한 벡터 구축

[0205]

달리 나타내지 않는 한, 본 실시예 및 후속 실시예에 기재된 분자 생물학 및 생화학적 조작을, 예를 들어 문헌 [Ausubel et al. (1995), 및 Sambrook et al. (1989)], 및 그의 최신판에 개시된 바와 같이 표준 방법론에 의해 수행하였다. 실험에 사용된 구축물은 하기에 더욱 상세히 기재된다 (표 3).

[0206] 이전에 기재된 바와 같은, 상류-프로모터, 5'-UTR, 및 인트론 영역을 포함하는 지. 룩수리안스 프로모터를 지. 룩수리안스 종의 Ubi-1 유전자로부터 추출하고, PCR 앰플리콘을 쿼릭 젤 추출 키트(QIAquick Gel Extraction Kit)® (쿼릭 칼스바드(Qiagen Carlsbad), 캘리포니아)를 사용하여 겔 정제하였다. 프로모터 폴리뉴클레오티드 서열을 이어서 관련 기술분야에 공지된 표준 클로닝 기술을 사용하여 게이트웨이 진입 벡터(Gateway Entry Vector)® (인비트로젠) 내로 클로닝하였다. 지. 룩수리안스 v1에 대한 Ubi-1 프로모터 서열을 포함하는 생성된 게이트웨이 진입 벡터®를 제한 소화 및 서열분석을 통해 확인하였다. 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 프로모터 서열을 포함하는 대조 진입 벡터를 또한 관련 기술분야의 표준 클로닝 기술을 사용하여 게이트웨이 진입 벡터 내로 클로닝하였다.

[0207] Ubi-1 프로모터 서열뿐만 아니라, 진입 벡터는 또한 그 서열 내로 혼입된 ST-LS1 인트론 (문헌 [Vancanneyt, G., (1990) Mol Gen Genet. 220:245-50]) 및 제아 메이스 피옥시다제 5 유전자 (*ZmPer5*; 미국 특허 번호 6,699,984)의 3'-UTR 영역과 함께 피알리디움 종으로부터의 황색 형광 단백질 리포터 유전자 (*PhiYFP*; 문헌 [Shagin, D. A., (2004) Mol Biol Evol. 21:841-50])를 포함하였다. 각각의 프로모터 서열을 포함하는 클로닝된 진입 벡터를 보여주는 벡터 지도가 제공된다. 구축물 pDAB105742는 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 프로모터 서열을 포함하는 대조 진입 벡터에 해당한다. 구축물 pDAB105737은 지. 룩수리안스 v1 프로모터 서열을 포함하는 진입 벡터에 해당한다. 따라서, 제아 종 Ubi-1 프로모터, *PhiYFP* 유전자, 및 *ZmPer5* 3'-UTR을 포함하는 유전자 발현 카세트를 포함하는 진입 벡터를 확립시켰다.

[0208] 표 3에 기재된 바와 같이, 새로운 프로모터 서열에 의해 구동되고 *ZmPer5* 3'-UTR에 의해 종결되는 *PhiYFP* 리포터 유전자를 포함하는 이원 발현 벡터 구축물을 구축하였다. 아그로박테리움-매개 메이즈 배아 형질전환을 위한 형질전환 또는 발현 벡터를, 표준 목표 이원 벡터, pDAB101917, 및 상기 기재된 바와 같은 유전자 발현 카세트를 포함하는 진입 벡터를 사용하는 표준 클로닝 방법 및 게이트웨이® 재조합 반응의 사용을 통해 구축하였다.

[0209] 이원 목표 벡터, pDAB101917은 제초제 내성 유전자, 포스포노트리신 아세틸트랜스퍼라제(*phosphinothricin acetyltransferase*) (PAT; 문헌 [Wehrmann et al., 1996, Nature Biotechnology 14:1274-1278])를 포함하였다. pDAB101917 벡터에서, PAT 유전자 발현은 지. 메이스 Ubi-1 프로모터, 5'-UTR, 및 인트론의 제어 하에 있었다. pDAB101917 벡터는 또한 지. 메이스 리파제 유전자 (*ZmLip*; 미국 특허 번호 7,179,902)로부터의 3'-UTR 영역을 포함하였다. *ZmLip* 3'-UTR을 사용하여 PAT mRNA의 전사를 종결시켰다. 게이트웨이® 재조합 반응은 유전자 발현 카세트 (즉, 지. 룩수리안스 v1 또는 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 프로모터, *PhiYFP* 유전자, 및 *ZmPer5* 3'-UTR)를 포함하는 각각의 진입 벡터의 pDAB101917 목표 이원 벡터 내로의 삽입을 가능하게 하였다. 진입 벡터를 pDAB101917 목표 벡터 내로 T-DNA 경계 A 및 B, 및 PAT 발현 카세트의 상류 사이에 삽입하였다.

**표 3: 이원 유전자 발현 벡터 구축**

이원 벡터 구축물	진입 벡터 구축물			목표 벡터 구축물			도면
	프로모터	트랜스진	3'-UTR	프로모터	리포터 유전자	3'-UTR	
pDAB105748	지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1	<i>PhiYFP</i>	<i>ZmPer5</i>	지. 메이스 Ubi-1	PAT	<i>ZmLip</i>	8
pDAB105743	지. 룩수리안스 v1 Ubi-1	<i>PhiYFP</i>	<i>ZmPer5</i>	지. 메이스 Ubi-1	PAT	<i>ZmLip</i>	9

[0210]

[0211] 지. 메이스 또는 지. 룩수리안스 Ubi-1 프로모터, *PhiYFP* 유전자, 및 *ZmPer5* 3'-UTR로 구성된 유전자 발현 카세트가 혼입된 이원 발현 구축물, pDAB101917을 보여주는 벡터 지도가 제공된다. 대조 구축물, pDAB105748은 지. 메이스 c.v. B73 Ubi-1 프로모터를 포함하는 유전자 발현 카세트에 해당한다 (도 8). 추가로, 구축물 pDAB105743은 지. 룩수리안스 v1 Ubi-1 프로모터 서열을 포함하는 유전자 발현 카세트에 해당한다 (도 9).

[0212] 실시예 4: 식물 형질전환

[0213] 이원 벡터 구축물, pDAB105748 (지. 메이스 c.v. B73) 및 pDAB105743 (지. 룩수리안스 v1)을 각각 관련 기술분야에 공지된 표준 형질전환 기술을 사용하여 아그로박테리움 투메파시엔스 균주, EHA101 내로 형질전환시켰다. 박테리아 콜로니를 단리하고, 이원 플라스미드 DNA를 추출하고, 정제하고, 제한 효소 소화를 통해 확인하였다.

[0214] 옥수수 식물의 형질전환을 아그로박테리움-매개 형질전환 및 선택 식물 마커로서 포스포노트리신 아세틸트랜스퍼라제 유전자 (PAT; 문헌 [Wehrmann et al., 1996, Nature Biotechnology 14:1274-1278])를 사용하는 문헌 [Vega et al., 2008, Plant Cell Rep 27:297-305]에 기재된 프로토콜에 따라 수행하였다. 이원 벡터 구축물을

포함하는 아그로박테리움 투메파시엔스 배양물 (상기 기재됨)을 사용하여 지. 메이스 c.v. Hi-II 식물을 형질전환시키고 제1 라운드, T<sub>0</sub>, 트랜스제닉 옥수수 사례를 생산하였다 (표 4). 미성숙 접합 배아를 생산하고, 제조하고, 형질전환 2.5개월 후에 수확하였다.

[0215] 개별 유전자 발현 구축물에 대한 형질전환 결과를 추가로 표 4에 기재한다. 생산된 총 배아 수, 캘러스 단계에서 및 전체 식물에서 관찰되는 총 트랜스제닉 사례 수뿐만 아니라, 전체 형질전환 효율의 백분율이 개시된다. 이원 발현 구축물의 전체 형질전환 효율은 다수의 실험에서의 불량한 배아 활력으로 인해 이전에 보고된 것 (문헌 [Vega et al., 2008]) 보다 낮았다.

이원 벡터 구축물	총 배아 수	캘러스 수	트랜스제닉 사례 수	효율 (%)
pDAB105748	545	221	33	6.1
pDAB105743	632	228	28	4.4

[0216]

실시예 5: 트랜스진 카피 수 분석

[0217]

[0218] 트랜스제닉 지. 메이스 식물의 게놈 내의 *PhiYFP* 트랜스진의 안정한 통합을 가수분해 프로브 검정을 통해 확인하였다. 캘러스로부터 발생한 안정하게-형질전환된 트랜스제닉 지. 메이스 소식물체를 획득하고 분석하여 적은 카피 수 (즉, 1-2개 카피)의 전장 T-가닥 삽입물을 함유하는 사례를 확인하였다.

[0219]

[0219] 로슈 라이트 사이클러(Roche Light Cycler) 480™ 시스템을 제조업체의 지침에 따라 사용하여 트랜스진 카피 수를 결정하였다. 방법은 단일 검정으로 *PhiYFP* 유전자에 및 내인성 참조 유전자, 지. 메이스 인버타제 (*ZmInv*; 진뱅크 수탁 번호 U16123.1)에 특이적인 올리고뉴클레오티드를 사용하는 바이플렉스 택맨® PCR 반응을 사용하였다. 카피 수 및 접합성을 공지된 카피 수 표준물과 비교하여, *ZmInv*-특이적 형광에 비해 *PhiYFP*-특이적 형광의 강도를 측정함으로써 결정하였다.

[0220]

[0220] *PhiYFP* 유전자-특이적 DNA 단편을 FAM™ 형광 염료로 표지된 프로브를 함유하는 하나의 택맨® 프라이머/프로브 세트를 사용하여 증폭시키고, *ZmInv*는 HEX™ 형광으로 표지된 프로브를 함유하는 제2 택맨® 프라이머/프로브 세트를 사용하여 증폭시켰다 (표 5). 카피 수 분석을 위한 프라이머 및 프로브를 인티그레이티드 DNA 테크놀로지스 (아이오와주 코랄빌)에 의해 상업적으로 합성하였다. FAM™ 형광 모이어티는 465/510 nm의 광학 밀도에서 여기하였고, HEX™ 형광 모이어티는 533/580 nm의 광학 밀도에서 여기하였다.

[0221]

[0221] PCR 반응물을 표 6에 기재한 바와 같이, 시약을 사용하여 최종 10 μl 반응 부피로 제조하였다. 유전자-특이적 DNA 단편을 표 7에 나타난 열순환 조건에 따라 증폭시켰다. 샘플의 카피 수 및 접합성을 공지된 카피 수 표준물과 비교하여, 참조 유전자, *ZmInv*에 대해 특이적인 형광에 대한, 리포터 유전자, *PhiYFP*에 대해 특이적인 형광의 상대 강도를 측정함으로써 결정하였다.

[0222]

[0222] 카피 수 표준물을, 벡터, pDAB108706을 지. 메이스 c.v. B104 게놈 DNA (gDNA) 내로 회색하여 기지의 비의 pDAB108706:gDNA를 갖는 표준물을 수득함으로써 생성하였다. 예를 들어, 지. 메이스 c.v. B104 gDNA의 1개 카피당 벡터 DNA의 1, 2, 및 4개 카피를 갖는 샘플을 제조하였다. 지. 메이스 c.v. B104 gDNA 표준물과 혼합된 pDAB108706의 1 및 2개 카피 회색물을 반접합으로 공지된 대조 지. 메이스 사례, 및 동형접합으로 공지된 대조 지. 메이스 사례에 대해 검증하였다 (즉, 지. 메이스 사례 278; PCT 국제 특허 공개 번호 WO 2011/022469 A2 참조).

[0223]

[0223] 각각 PAT 유전자 및 내인성 *ZmInv* 참조 유전자에 대해 특이적인 올리고뉴클레오티드를 사용하는 택맨® 바이플렉스 PCR 증폭 검정을 수행하였다. PAT에 대한 유전자-특이적 DNA 단편을 검출하기 위해 1개의 택맨® 프라이머 세트 및 FAM™ 형광 염료로 표지된 프로브를 사용하는 PCR 증폭을 사용하였다 (표 5). 제2 프라이머 세트 및 HEX™ 형광 염료로 표지된 프로브를 또한 사용하여, *ZmInv* 내인성 참조/대조 유전자를 증폭시키고 검출하였다 (표 5). PAT 택맨® 반응 혼합물을 표 6에 나타난 바와 같이 제조하였고, 특정 단편을 표 7에 나타난 조건에 따라 증폭시켰다.

[0224]

[0224] 상이한 프로모터 구축물로의 형질전환을 통해 수득한 트랜스제닉 식물의 트랜스진 카피 수 분석으로부터의 결과를 표 8에 나타낸다. *PhiYFP* 트랜스진의 1-2개 카피를 갖는 식물만을 온실로 옮겨, 추가의 발현 분석을 위해

성장시켰다.

**표 5: 카피수 검정을 위한 프라이머 및 프로브**

유전자	프라이머/프로브	뉴클레오티드 서열	SEQ ID No:
<i>Phi</i> YFP	정방향 프라이머	CGTGTGGGAAAGAAGACTTGGGA	11
	역방향 프라이머	CCGTGGTTGGCTTGGTCT	12
	프로브 (형광 표지/서열)	5'FAM/CACTCCCCACTGCCT	13
<i>ZmInv</i> 대조군	정방향 프라이머	TGGCGGACGACGACTTGT	14
	역방향 프라이머	AAAGTTTGAGGCTGCCGT	15
	프로브 (형광 표지/서열)	5'HEX/CGAGCAGACCGCCGTGACTT	16
PAT	정방향 프라이머	ACAAGAGTGGATTGATGATCTAGAGAGGT	17
	역방향 프라이머	CTTTGATGCCTATGTGACACGTAACAGT	18
	프로브 (형광 표지/서열)	5'FAM/GGTGTGTGGCTGGTATTGCTTACGCTGG	19

[0225]

**표 6: 택덴® 카피수 PCR 반응 시약**

시약	작업 농도	부피 (μl)	최종 농도
물	--	0.5	--
로슈 라이트사이클러 마스터 믹스	2X	5	1X
<i>Phi</i> YFP 정방향 프라이머	10μM	0.4	400nM
<i>Phi</i> YFP 역방향 프라이머	10μM	0.4	400nM
<i>Phi</i> YFP 프로브-FAM 표지됨	5 μM	0.4	200nM
<i>ZmInv</i> 정방향 프라이머	10μM	0.4	400nM
<i>ZmInv</i> 역방향 프라이머	10μM	0.4	400nM
<i>ZmInv</i> 프로브-FAM 표지됨	5 μM	0.4	200nM
폴리비닐피롤리돈 (PVP)	10%	0.1	0.10%
계놈 DNA 주형	~5ng/μl	2	10ng/μl

[0226]

**표 7: 카피수 PCR 증폭을 위한 열순환 조건**

PCR 단계	온도 (°C)	시간	사이클 수
1	95	10 분	1
2	95	10 초	40
	58	35 초	
	72	1 초	
3	40	10 초	1

[0227]

**표 8: 트랜스제닉 식물의 트랜스진 카피수 분석**

구축물	분석된 사례	단순 (1-2 개 카피)	복합 (>2 개 카피)
105748	21	15	6
105743	22	4	18

[0228]

[0229]

[0230]

실시예 6: *Phi*YFP 및 PAT 단백질의 ELISA 정량화

식물을 잎 ELISA 검정을 사용하여 발생의 V4-5 단계에서 샘플링하였다. 샘플을 96-웰 수집 튜브 플레이트 내에 수집하고, 4개의 잎 절편 (종이 홀 펀치 크기)을 각각의 샘플에 대해 채취하였다. 2개의 4.5 mm BB (테이지 코포레이션(Daisy corporation), 아칸소주 로저) 및 200 μL 추출 완충제 [0.05% 트윈(Tween)®-20 및 0.05% BSA로 보충된 1x PBS (밀리포어 프로부민(Millipore Probumin)®, EMD 밀리포어 코포레이션(Millipore Corp.), 매사추세츠주 빌러리카)]를 각각의 튜브에 첨가하였다. 추가의 200 μL의 추출 완충제를 각각의 튜브에 첨가한 다음, 역전시켜 혼합하였다. 플레이트를 3000 rpm에서 5분 동안 회전시켰다. 상청액을 빙상에서 저장된 딥 웰 96의 상응하는 웰로 옮겼다. 눈크(Nunc)® 96-웰 맥시-소르프(Maxi-Sorp) 플레이트 (써모 피셔 사이언티픽 인크.(Thermo Fisher Scientific Inc.), 일리노이주 록포드)를 ELISA에 사용하였다. 플레이트를 마우스 모노클로날 항-YFP 포획 항체 (오리진 테크놀로지스, 인크.(OriGene Technologies Inc.), 메릴랜드주 록빌)로 코팅하였다. 항체를 PBS 중에 희석시키고 (1 μg/mL), 150 μL의 희석된 PBS를 웰당 첨가하였다. 플레이트를 4°C에서 밤샘 인큐베이션하였다. 밤샘 플레이트를 20-30분 동안 실온에서 유지시킨 후, 350 μL의 세척 완충제 [0.05% 트윈®-20으로 보충된 1x PBS (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미주리주 세인트루이스)]로 4x 세척하

였다. 플레이트를 최소 1시간 동안 +37°C에서 웰당 200 μL의 차단 완충제 [0.05% 트윈®-20 플러스 0.5% BSA 로 보충된 1x PBS (밀리포어 프로부민®)]로 차단시킨 다음, 350 μL의 세척 완충제 (토타 콰드라워시(Tomtec QuadraWash)™ 2, 토타, 인크.(Tomtec, Inc.), 코네티컷주 햄든)로 4x 세척하였다.

[0231] YFP ELISA를 위해, 에브로젠(Evrogen) 재조합 Phi-YFP 1mg/mL (악소라 엘엘씨(Axxora LLC), 뉴욕주 파밍데일)를 표준물질로 사용하였다. 5-파라미터 피트 표준 곡선 (1 ng/ml와 0.125 ng/ml 표준물 사이)을 사용하여 모든 데이터가 곡선의 선형 부분에 속하도록 보장하였다. 100 μL의 표준물 또는 샘플을 웰에 첨가하였다. 검정 완충제 중 샘플의 최소 1:4 희석물을 사용하였다. 플레이트를 플레이트 진탕기 (250 rpm; 타이터 플레이트 진탕기) 상에서 1시간 동안 실온에서 인큐베이션한 다음, 350 μL의 세척 완충제 (토타 콰드라워시™ 2)로 4x 세척하였다. 약 100 μL의 1 μg/mL 에브로젠 토끼 폴리클로날 항-PhiYFP 1차 항체 (악소라)를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 플레이트 진탕기 상에서 250 rpm에서 1시간 동안 실온에서 인큐베이션한 다음, 350 μL의 세척 완충제 (토타 콰드라워시™ 2)로 4x 세척하였다. 다음에, 100 μL의 항-토끼 IgG HRP 2차 항체 (써모 사이언티픽)를 차단/검정 완충제 중에 1:5000으로 희석하였고, PAT 단백질을 엔바이로로지스(Envirologix) (메인주 포틀랜드)로부터의 키트를 사용하여 정량화하였다. ELISA를 식물 추출물의 다중 희석물 및 본질적으로 공급업체에 의해 제공된 바와 같은 시약 및 지침을 사용하여 수행하였다.

[0232] 실시예 7: 신규 프로모터에 작동가능하게-연결된 트랜스진의 안정한 식물 발현

[0233] 단백질 발현을 트랜스제닉 식물 조직에서 관찰하였다. 예를 들어, *PhiYFP* 발현을 아그로박테리움과의 공동-배양에 의해 안정하게 형질전환된 T<sub>0</sub> 식물의 캘러스에서 관찰하였다. 트랜스제닉 식물을 신규 프로모터, pDAB105743 (지. 룩수리안스 v1, 도 9) 및 대조 프로모터, pDAB105748 (지. 메이스 c.v. B73, 도 8)을 포함하는 이원 벡터 구축물을 사용하여 형질전환된 지. 메이스 배아로부터 성장시켰다. 식물 캘러스를 입체현미경 (레이카 마이크로시스템즈(Leica Microsystems), 일리노이주 버팔로 그로브) 하에 YFP 필터 및 500 nm 광원을 사용하여 관찰하였다. 대조, pDAB105748과 비교하여 pDAB105743을 포함하는 트랜스제닉 T<sub>0</sub> 메이스 식물의 캘러스 조직에서 관찰되는 *PhiYFP*의 안정한 발현의 대표적인 예는 도 10에 제시된다. 데이터는 본원에 기재된 바와 같은 pDAB105743 (지. 룩수리안스 v1)을 포함하는 신규 프로모터가 T<sub>0</sub> 트랜스제닉 식물의 캘러스 조직에서 *PhiYFP* 유전자의 강한 발현을 유도할 수 있음을 확인시켜준다.

[0234] 표 8에 기재한 바와 같이, 낮은 카피 수 (즉, 1-2개 카피)의 *PhiYFP* 트랜스진을 함유하는 전체 식물을 온실에서 성장시켰다. 일반적으로, 구축물당 약 다섯 (5) 내지 약 열 (10)개의 사례 및 사례당 약 다섯 (5)개의 식물을 T<sub>1</sub> 발현 분석에 사용하였다. ELISA 데이터는 대조 구축물, pDAB105748 (지. 메이스 c.v. B73)과 비교하여, 신규 프로모터, pDAB105743 (지. 룩수리안스 v1)을 포함하는 벡터 구축물을 사용하여 T<sub>1</sub> 옥수수 식물의 잎에서의 *PhiYFP* 단백질의 일관된 발현을 밝혀내었다.

[0235] 대조 구축물, pDAB105748 (지. 메이스 c.v. B73, 도 8)을 포함하는 대조 식물에 의해 생산되는 대략 285.3 ng/mg (+/- 22.7 ng/mg)의 *PhiYFP* 단백질과 비교하여, 신규 프로모터 구축물, pDAB105743 (지. 룩수리안스 v1, 도 9)을 포함하는 T<sub>1</sub> 식물에서 대략 142.5 ng/mg (+/-35.9 ng/mg)의 *PhiYFP*의 평균 *PhiYFP* 단백질 발현이 관찰되었다. 이들 결과는 본원에 개시된 바와 같이, 지. 룩수리안스 v1로부터의 신규 프로모터가 트랜스제닉 형질을 높은 단백질 생산 수준으로 생산시키는데 유용하였음을 확인시켜준다.

[0236] 추가로, pDAB105743 (지. 룩수리안스 v1)을 포함하는 모든 T<sub>1</sub> 식물에 대한 평균 PAT 발현은, 지. 메이스 c.v. B73 프로모터로부터의 pDAB105748을 포함하는 대조 식물에 의해 생산되는 대략 105.8 ng/mg (+/- 7.4 ng/mg)의 PAT 단백질과 비교하여, 대략 59.0 ng/mg (+/- 11.6 ng/mg)이었다. 전반적으로, 모든 메이스 식물에서의 PAT 단백질의 발현은 메이스 식물에서 *PhiYFP* 유전자에 대해 관찰된 발현에 비해 유의하게 더 낮았다.

[0237] *PhiYFP* 단백질 발현을 또한 본원에 기재된 각각의 신규 프로모터 구축물을 대표하는 선택된 T<sub>1</sub> 트랜스제닉 식물의 옹수로부터 유래된 화분에서 측정하였다. 도 11에 제시한 바와 같이, 트랜스제닉 화분의 영상 분석은, 본출원에 기재된 바와 같은 pDAB105743 (지. 룩수리안스 v1)을 포함하는 신규 프로모터가 화분에서 *PhiYFP* 단백질의 높은 발현을 유도함을 확인시켜준다.

[0238] 실시예 8: 벡터 구축

[0239] 이원 발현 벡터 구축물 pDAB112853을 도 12에 도시한다. pDAB112853 구축물은 *PhiYFP* 리포터 유전자 및 *ZmUbi-1* 프로모터 v2에 의해 유도된 *ZmPer5* 3'-UTR을 포함하였다. pDAB112853 구축물은 또한 AAD-1 v3 유전자

및 지. 특수리안스 v1에 의해 유도된 *ZmLip* 3'-UTR v1을 포함하였다.

[0240] pDAB112853 구축물을, 예를 들어 문헌 [Ausubel et al. (1995), Sambrook et al. (1989)], 및 그의 최신판에 개시된 바와 같이 표준 방법론을 사용하여 생성하였다. 아그로박테리움-매개 메이즈 배아 형질전환을 위한 형질전환 또는 발현 벡터를 표준 목표 이원 벡터 및 상기 기재된 바와 같은 유전자 발현 카세트를 포함하는 진입 벡터를 사용하는 표준 클로닝 방법 및 게이트웨이® 재조합 반응의 사용을 통해 구축하였다.

[0241] 실시예 9: 신규 프로모터에 작동가능하게 연결된 트랜스진의 안정한 식물 발현

[0242] 낮은 카피 수 (즉, 1-2개 카피)의 *PhiYFP* 트랜스진을 함유하는 전체 식물을 온실에서 성장시켰다. 열아홉 (19)개의 사례를 표 9 (하기)에 나타낸 바와 같이 T<sub>0</sub> 발현 분석에 사용하였다. 강한 AAD1 단백질 발현을 분석된 모든 사례에서 수득하였다 (표 9 참조).

[0243] T<sub>0</sub> 단일 트랜스진 카피 식물을 야생형 B104 옥수수 식물과 역교배시켜 T<sub>1</sub> 종자를 수득하였다. 반접합 T1 식물을 분석에 사용하였다. 구축물당 세 (3)개의 사례 및 사례당 다섯 (5)개의 식물을 R3 및 발현에 대해 분석하였다. 사례당 세 (3)개의 사례를 다른 조직 유형 발현에 사용하였다.

[0244] 신규 프로모터 구축물을 포함하는 T<sub>1</sub> 트랜스제닉 식물의 잎 조직으로부터 수득한 AAD1 단백질의 정량적 측정을 표 10 (하기)에 나타낸다. 표 10의 데이터는 T<sub>0</sub> 및 발현 결과를 확인시켜주고 (표 9 참조), 추가로 본원에 기재된 신규 프로모터를 함유하는 식물로부터 수득한 R3 및 다른 조직에서의 AAD1 단백질의 일관된 높은 발현을 보여준다.

**표 9: T<sub>0</sub> V4 앞에서의 AAD1 단백질 발현**

#	사례	AAD1 단백질 (ng/cm <sup>2</sup> )
1	112853[1]-001.001	45.7
2	112853[1]-006.001	42.4
3	112853[1]-007.001	34.9
4	112853[1]-008.001	47.9
5	112853[1]-009.001	62.0
6	112853[1]-010.001	168.9
7	112853[1]-012.001	142.7
8	112853[1]-013.001	127.0
9	112853[1]-014.001	26.5
10	112853[1]-015.001	59.3
11	112853[2]-016.001	49.3
12	112853[2]-019.001	80.5
13	112853[2]-020.001	68.9
14	112853[2]-022.001	40.3
15	112853[2]-025.001	62.9
16	112853[2]-027.001	50.5
17	112853[2]-028.001	76.3
18	112853[2]-029.001	55.8
19	112853[2]-030.001	72.5

[0245]

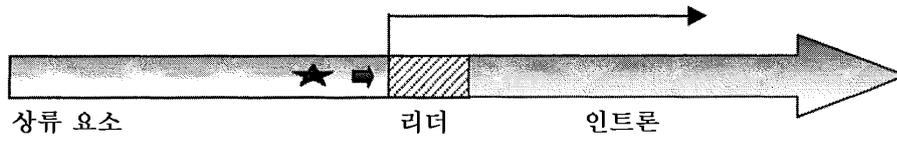
**표 10: T<sub>1</sub> 식물의 상이한 조직 유형에서의 AAD1 단백질 발현**

사례	평균 AAD-1 (ng/mg)							
	속대	껍질	커널	화분	R3 잎	뿌리	수염	줄기
112853[1]-001	2004.3	769.1	689.7	1134.9	824.7	1731.7	1765.5	2851.3
112853[2]-019	1542.8	672.4	896.6	859.8	776.9	2078.0	2174.5	3551.4
112853[2]-020	1725.7	1015.5	625.9	591.2	556.0	1738.0	2203.7	2838.7

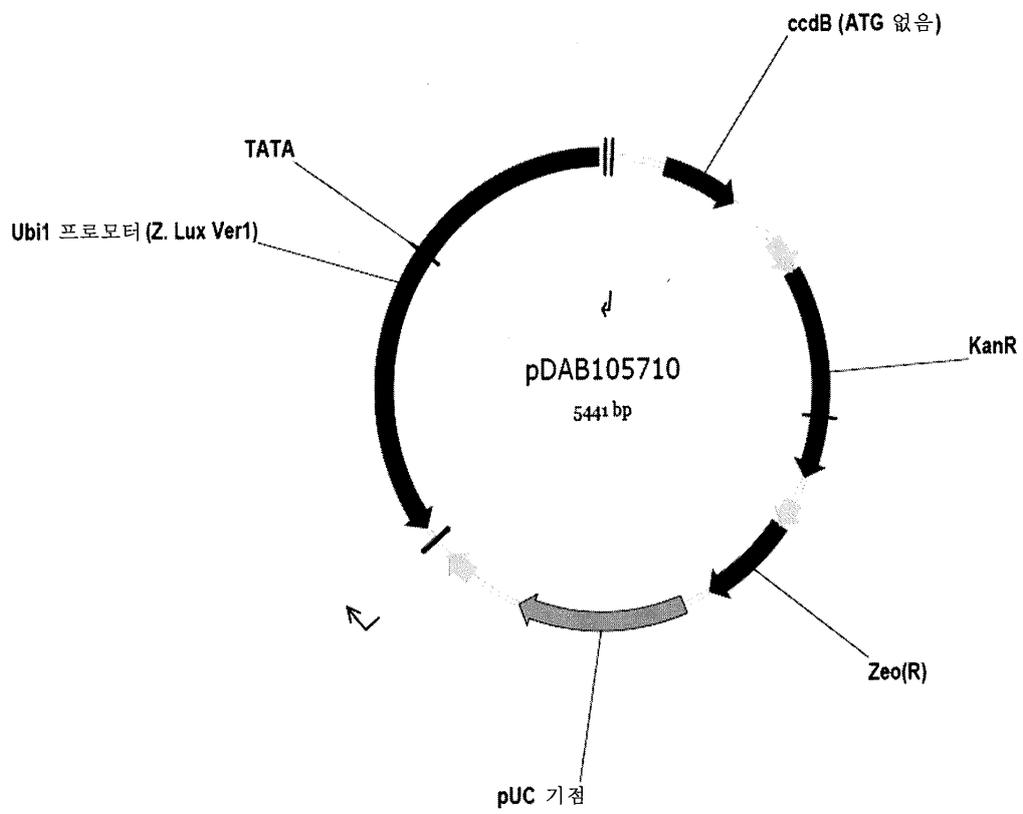
[0246]

도면

도면1



도면2



도면3

GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTCTAAGT  
TATAAAAAATTACCACATATTTTTTTTGTCCACTTGTGTTGAAGTGCAGTTTATCTATCT  
TTATACATATATTTAACTTTACTCTACGAATAATATAATCTATAGTACTACAATAATA  
TCAGTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGTTAGACATGGTCTAAAGGACAATGA  
GTATTTTGACAACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTFAGTGTGCATGTGTTCTCCTTTTT  
TTTTGCAAATAGCTTCACCTATATAAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTTAGG  
GTTTAGGGTTAATGGTTTTTATAGACTAATTTTTTTAGTACATCTATTTTATCTATTTT  
AGCCTCTAAATTAAGAAAACTAAAACCTCTATTTTAGTTTTTTTATTTAATAGTTTAGAT  
ATAAAATAGAATAAAAATAAAGTGACTAAAAATTAACAATAACCTTTAAGAAATTA  
AAAAAACTAAGGAAACATTTTTCTTGTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAAACGC  
CGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGGGCCAAG  
CGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCTGCTGCCCTCGGACCCCTCTCGAGAGTCCGC  
TCCACCGTTGGACTTGTCTCCGCTGTCCGGCATCCAGAAATTGCGTGGCGGAGCGGCAGA  
CGTGAGCCGGCACGGCAGGCGGCCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGG  
GATTTCTTTCCCAACCGCTTTCGCTTTCCCTTCCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACAC  
CCCTCCACACCTCTTTCCCAACCTCGTGTGTTCGGAGCGCACACACACAACCA  
GATCTCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAGgtacgccctcctcccccccccc  
cctctaccctctctagatcgccggtccggccatgcatggttagggcccgtagtctactctgttcatgttggtagaccgtgttggtaga  
tccgtgctctagcgttcgtacacggatcgacctgtacgtcagacagcttctgattgctaactgccaggtttctcttggggaatccgggatg  
gctctagccgtcccgacagcgggacgattcatgattttttgttcgtcataggggttgggttgccttttcccttattcaatatatccgtgcat  
gtttgtcgggcatctttcatgctttttgtctgtggtgtagatggtgctggtggcggtcttagatcggagtagaattctgtttcaacta  
cctgggtgatttatttgaactgtatgtgtgcccatacatattcatagttacgaattgaagatgatggatgaaatcgcactagataggtg  
tacctgtgatcgggtttactgatgcatatacagagatgctttgtctgctgtgtgtagatggtgtggtggcggtctcattcgtctag  
atcggagtagaactgtttcaactacctgggtatttatttgaactgtatgtgtgcatatctctatagttacgatttaagatggatg  
gaaatcgcactagataggtatacatgtgatgtgggtttactgatgatalacatgatggatgacagcatctattcatgcttaaccttga  
gtacctatattataaacaagatgtttataattttcagcttgatatactggatgatggcatatgcagcagctatatgtggatttttagccc  
tgccctacacgctatttttctgtgactgtttctttgtcgtatgctaccctgttgggtgttactctgca

도면4

GACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAAAGAGCATTGCATGTCTAAGGTATCAAAAA  
TTACCACATATTTTTTTGGCACACTTATTTAAAGTGCAGTTTATCTATCTCTATAACAT  
ATTTAACTTCACTTTATAAATAATATAGTTTATAGTACTAAACTAATATCAGTGTTTT  
AGATAATTATATAAATGAACCGCTAGACATGGTCTAAAGTACAACCGAGTATTTGACA  
ACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTTAGTGTGCATGTGTTCTCTCTGTTTTTTTTTTCA  
AATAGCTTGACCTATATAAATACTTCATCCATTTTATTAGTACATCCATTAGGGATTGAG  
GGTTGATGGTTTCTATAGACTAATTTTTTGTGACATCTATTTTATTATTTTAAATTTTA  
AATTAAGAAAACCTGAAACTCTATTTTAGTTACTACAAATTAACAATAACCTTTAAG  
GAATTAAAAAAACTAAGGAAACATTTTCTTGTTCGAGTAGATTATGACAGCCTGTT  
CAACGCCGTCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCAGCAGCGTCGCGTCGG  
GCCAAGCGAAGCAGACGGCACGGCATCTCTGTCTGCTGCCCTCGGACCCCTCTCGAGAG  
TTCGCTCCACCGTTGGACTTGTCTCCGCTGTCCGGCATCCAGAAAGTGCCTGGCGGAGC  
GGCAGACGTGAGGCGGCCCTCCTCCTCTCACGGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCC  
TTTCCACCGCTCCTTCGCTTTCCCTTCCCTCGCCCGCCGTAATAAATAGACACCCCTC  
CACACCTCTTTCCCAACCTCGTGTGTTCGGAGCGCACACACACAACCAAGATCT  
CCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTCAAGgtacgccctcctccccccccctctaccctctct  
gatcggcaatccggtccatggttagggcccgatagttctactctgttcatgttggtagaccgtgctgtagcgttcgtacacggatgacacct  
gtacatcagacacgttctgattgctaactgccaggtttctcttggcgaatccaggatgctctagccgttcccgacagcgggttcgattcatg  
atftttttgttctgtgacataggggttgggttgccttttcccttattccttatatgctgtacactcttgcgggtcactctgtcatgcttttattctgt  
gttgtgatgctgctggttggcggtcttagatcggagtagaatactgtttcaagctacctggtgatttatttatttctgtacgtgtgt  
gccatacatctcatagttacgagtttaagatgatggatgaaatcgcactagataggtatacatgttgatgcgggtttactgatgcatataca  
agatgcttttttctgctgtgtgatgacgggtctggtggcggtcttagatcggagtagaatactgtttcaactacctggtgatttatt  
aattctgacatctgtatgtgtgcccatacatctgatagttacgagtttaagatgatggatgaaatcgcactagataggtatacatgctgatgtg  
ggtttactgatgatalacatgatggatgacagcatctattcatgcttaacctgagtagacctatattataaacaagatgtttataatt  
ttgacctgatacttggatgatggcatatgcagcagctatatgtggatttttagccttgcctcactacgctattttgttgggctgtttctttt  
gttgacgctaccctgttgggtgttactctgca

도면5i

		1	35
지. 메이스 c.v.B73 상류	(1)	GTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCCCTCTCTAGAGA	
지. 룩수리안스 v1 상류	(1)	-----GACCCGGTCGTGCCCCCTCTCTAGAGA	
		36	70
지. 메이스 c.v.B73 상류	(36)	TAATGAGCATTGCATGCTAAGTTATAAAAAATTA	
지. 룩수리안스 v1 상류	(27)	TAAAGAGCATTGCATGCTAAGGTATCAAAAAATTA	
		71	105
지. 메이스 c.v.B73 상류	(71)	CCACATATTTTTTTTGTCCACTTGTGGAAGTGC	
지. 룩수리안스 v1 상류	(62)	CCACATATTTTTTTT-GGCACACTTATTAAAGTGC	
		106	140
지. 메이스 c.v.B73 상류	(106)	AGTTTATCTATCTTTATACATATATTTAAACTTTA	
지. 룩수리안스 v1 상류	(96)	AGTTTATCTATCTCTATACACATATTTAAACTTCA	
		141	175
지. 메이스 c.v.B73 상류	(141)	CTCTACGAATAATATAAATCTATAGTACTACAATAA	
지. 룩수리안스 v1 상류	(131)	CTTTATAAATAATATAGTTTATAGTACTAAACTAA	
		176	210
지. 메이스 c.v.B73 상류	(176)	TATCAGTGTTTTAGAGAATCATATAAATGAACAGT	
지. 룩수리안스 v1 상류	(166)	TATCAGTGTTTTAGATAAATATATAAATGAACCCG	
		211	245
지. 메이스 c.v.B73 상류	(211)	TAGACATGGTCTAAAGGACAATTGAGTATTTTGAC	
지. 룩수리안스 v1 상류	(201)	TAGACATGGTCTAAAGTACAACCGAGTATTT-GAC	
		246	280
지. 메이스 c.v.B73 상류	(246)	AACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTAGTGTGCA	
지. 룩수리안스 v1 상류	(235)	AACAGGACTCTACAGTTTTATCTTTTAGTGTGCA	
		281	315
지. 메이스 c.v.B73 상류	(281)	TGTGTTCTCC---TTTTTTTTTGCAAATAGCTTC	
지. 룩수리안스 v1 상류	(270)	TGTGTTCTCTCTGTTTTTTTTTTTCAAATAGCTTG	
		316	350
지. 메이스 c.v.B73 상류	(312)	ACCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACAT	
지. 룩수리안스 v1 상류	(305)	ACCTATATAATACTTCATCCATTTTATTAGTACAT	
		351	385
지. 메이스 c.v.B73 상류	(347)	CCATTTAGGGTTTAGGGTTAATGGTTTTTATAGAC	
지. 룩수리안스 v1 상류	(340)	CCATTTAGGGATTCAGGGTTCATGGTTTCTATAGAC	
		386	420
지. 메이스 c.v.B73 상류	(382)	TAATTTTTTAGTACATCTATTTTATTCTATTTTA	
지. 룩수리안스 v1 상류	(375)	TAATTTTTT-AGTACATCTATTTTATTAT-TTTTA	
		421	455
지. 메이스 c.v.B73 상류	(417)	GCCCTAAATTAAGAAAACATAAACTCTATTTTAG	
지. 룩수리안스 v1 상류	(408)	ATTTTTAAATTAAGAAAACATAAACTCTATTTTAG	
		456	490
지. 메이스 c.v.B73 상류	(452)	TTTTTTTATTTAATAGTTTAGATATAAAATAGAAT	
지. 룩수리안스 v1 상류	(443)	T-----T-----	
		491	525
지. 메이스 c.v.B73 상류	(487)	AAAATAAAGTGAATAAAATTAACAAATACCCTT	
지. 룩수리안스 v1 상류	(445)	-----ACTACAAATTAACAAATACCCTT	
		526	560
지. 메이스 c.v.B73 상류	(522)	TAAGAAATTA-----ACTAAGGAACATTTTCTT	
지. 룩수리안스 v1 상류	(469)	TAAGGAATTA-----ACTAAGGAACATTTTCTT	
		561	595
지. 메이스 c.v.B73 상류	(557)	GTTTCGAGTAGATAATGCCAGCCTGTTAAACGCCG	
지. 룩수리안스 v1 상류	(504)	GTTTCGAGTAGATTATGACAGCCTGTTCAACGCCG	

도면5i

계속됨

		596		630
지. 메이스 c.v.B73 상류	(592)	<u>TCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCGAG</u>		
지. 록수리안스 v1 상류	(539)	<u>TCGACGAGTCTAACGGACACCAACCAGCGAACCGAG</u>		
		631		665
지. 메이스 c.v.B73 상류	(627)	<u>CAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCAC</u>		
지. 록수리안스 v1 상류	(574)	<u>CAGCGTCGCGTCGGGCCAAGCGAAGCAGACGGCAC</u>		
		666		700
지. 메이스 c.v.B73 상류	(662)	<u>GGCATCTCTGTGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAG</u>		
지. 록수리안스 v1 상류	(609)	<u>GGCATCTCTGTGCTGCCTCTGGACCCCTCTCGAG</u>		
		701		735
지. 메이스 c.v.B73 상류	(697)	<u>AGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCG</u>		
지. 록수리안스 v1 상류	(644)	<u>AGTTCCGCTCCACCGTTGGACTTGCTCCGCTGTCG</u>		
		736		770
지. 메이스 c.v.B73 상류	(732)	<u>GCAATCCAGAAATGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTG</u>		
지. 록수리안스 v1 상류	(679)	<u>GCAATCCAGAAATGCGTGGCGGAGCGGCAGACGTG</u>		
		771		805
지. 메이스 c.v.B73 상류	(767)	<u>AGCCGGCACGGCAGGCGGCCTCCTCCTCCTCAC</u>		
지. 록수리안스 v1 상류	(714)	<u>AG-----GCGGCCTCCTCCTCCTCAC</u>		
		806		840
지. 메이스 c.v.B73 상류	(802)	<u>GGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCCCTTCCACCG</u>		
지. 록수리안스 v1 상류	(737)	<u>GGCACCGGCAGCTACGGGGGATTCCCTTCCACCG</u>		
		841		875
지. 메이스 c.v.B73 상류	(837)	<u>CTCCTTCGCTTTCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAA</u>		
지. 록수리안스 v1 상류	(772)	<u>CTCCTTCGCTTTCCTTCCTCGCCCGCCGTAATAA</u>		
		876		900
지. 메이스 c.v.B73 상류	(872)	<u>ATAGACACCCCTCCACACCCTCTT</u>		
지. 록수리안스 v1 상류	(807)	<u>ATAGACACCCCTCCACACCCTCTT</u>		

도면6

		1		40
지. 록수리안스 v1 5'UTR	(1)	<u>TCCCCAACCTCGTGTTTGTTCGGAGCGCACACACACAA</u>		
지. 메이스 c.v. B73 5'UTR	(1)	<u>TCCCCAACCTCGTGTTT-GTTCGGAGCGCACACACACAA</u>		
		41		80
지. 록수리안스 v1 5'UTR	(41)	<u>CCAGATCTCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTC</u>		
지. 메이스 c.v. B73 5'UTR	(40)	<u>CCAGATCTCCCCAAATCCACCCGTCGGCACCTCCGCTTC</u>		
		81		
지. 록수리안스 v1 5'UTR	(81)	<u>AAG</u>		
지. 메이스 c.v. B73 5'UTR	(80)	<u>AAG</u>		

도면7i

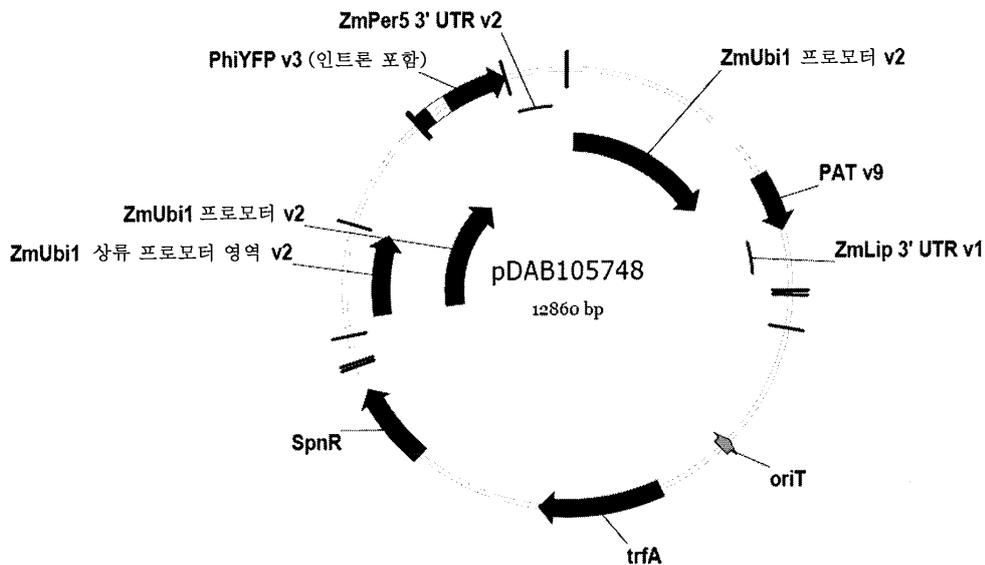
		1	35
지. 록수리안스 v1 인트론	(1)	GTACGCCGCTCATCCTCCCCCCCC-----TCTC	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(1)	GTACGCCGCTCGTCCTCC <del>CCCCCCCCCCCCCTCTC</del>	
		36	70
지. 록수리안스 v1 인트론	(30)	TACCTTCTCTAGATCGGCAATCCGGTCCATG----	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(36)	TACCTTCTCTAGATCGGCGTTCCGGTCCATGCATG	
		71	105
지. 록수리안스 v1 인트론	(61)	GTTAGGGCCCGATAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTT	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(71)	GTTAGGGCCCGTAGTTCTACTTCTGTTTCATGTTT	
		106	140
지. 록수리안스 v1 인트론	(96)	GTGTTAGATCCGTG-----CTGC	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(106)	GTGTTAGATCCGTGTTTGTGTTAGATCCGTGCTGC	
		141	175
지. 록수리안스 v1 인트론	(114)	TAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACATCAGA	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(141)	TAGCGTTCGTACACGGATGCGACCTGTACATCAGA	
		176	210
지. 록수리안스 v1 인트론	(149)	CACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTCCTCTT	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(176)	CACGTTCTGATTGCTAACTTGCCAGTGTTCCTCTT	
		211	245
지. 록수리안스 v1 인트론	(184)	TGGCGAATCCAGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAG	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(211)	TGGCGAATCCAGGGATGGCTCTAGCCGTTCCGCAG	
		246	280
지. 록수리안스 v1 인트론	(219)	ACGGGTTTCGATTTTCATGATTTTTTTTGTTCGTTG	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(246)	ACGGGATCGATTTTCATGATTTTTTTTGTTCGTTG	
		281	315
지. 록수리안스 v1 인트론	(254)	CACATAGGGTTTGGTTTGCCTTTTCCTTTATTTT	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(281)	CA--TAGGGTTTGGTTTGCCTTTTCCTTTATTTT	
		316	350
지. 록수리안스 v1 인트론	(289)	CTTATATGCTGTACACTC-TTTGTCCGGTTCATCTT	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(314)	AATATATGCCGTGCACTTGTGTTGTCGGGTTCATCTT	
		351	385
지. 록수리안스 v1 인트론	(323)	GTCATGCTTCTTTTAATCTTGCTTGTGATGATGTG	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(349)	TTCATGCTTTTTTTTGTCTTGGTTGTGATGATGTG	
		386	420
지. 록수리안스 v1 인트론	(358)	CTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAA	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(384)	GTCTGGTTGGGCGGTCGTTCTAGATCGGAGTAGAA	
		421	455
지. 록수리안스 v1 인트론	(393)	TACTGTTTCAAGCTACCTGGTGGATTTATTAATTT	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(419)	TTCTGTTTCAAACCTACCTGGTGGATTTATTAATTT	
		456	490
지. 록수리안스 v1 인트론	(428)	TGTATCTGTACGTGTGTGCCATACATCTTCATAGT	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(454)	TGGATCTGTATGTGTGTGCCATACATATTCATAGT	
		491	525
지. 록수리안스 v1 인트론	(463)	TACGAGTTTAAGATGATGGATGGAAATATCGATCT	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(489)	TACGAATTGAAGATGATGGATGGAAATATCGATCT	
		526	560
지. 록수리안스 v1 인트론	(498)	AGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGA	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(524)	AGGATAGGTATACATGTTGATGCGGGTTTTACTGA	
		561	595
지. 록수리안스 v1 인트론	(533)	TGCATATACAGAGATGCTTTTTTTTCGCTTGGTTG	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(559)	TGCATATACAGAGATGCTTTTTTTTCGCTTGGTTG	

도면7ii

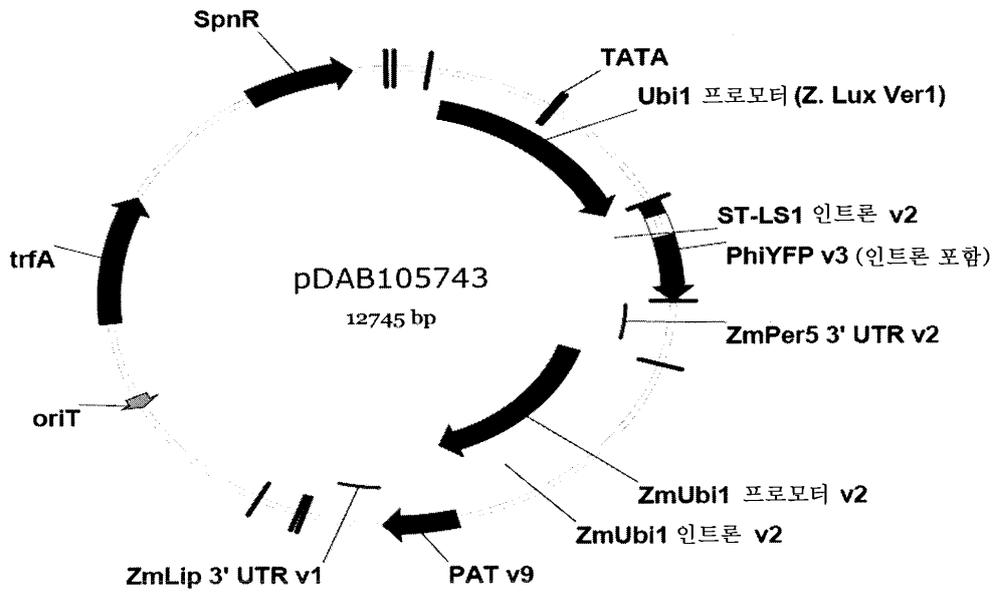
계속됨

		596	630
지. 룩수리안스 v1 인트론	(568)	TGATGATGCCGGTCTGGTTGGGCGGTCGTTT	-----
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(594)	TGATGATGTGGTGTGGTTGGGCGGTCGTTT	<u>CATTCC</u>
		631	665
지. 룩수리안스 v1 인트론	(598)	---TAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAA	ACTACC
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(629)	<u>TTCTAGATCGGAGTAGAATACTGTTTCAA</u>	<u>ACTACC</u>
		666	700
지. 룩수리안스 v1 인트론	(630)	TGGTGGATTTATTAATTCTGGATCTGTATGTGT	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(664)	TGGTGTATTTATTAATTTTGGAACTGTATGTGT	
		701	735
지. 룩수리안스 v1 인트론	(665)	GCCATACATCTTGATAGTTACGAGTTAAGATGAT	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(699)	GTCATACATCTTCATAGTTACGAGTTAAGATG--	
		736	770
지. 룩수리안스 v1 인트론	(700)	GGATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGT	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(732)	-GATGGAAATATCGATCTAGGATAGGTATACATGT	
		771	805
지. 룩수리안스 v1 인트론	(735)	CGATGTGGGTTTACTGATGCATATACATGATGGC	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(766)	TGATGTGGGTTTACTGATGCATATACATGATGGC	
		806	840
지. 룩수리안스 v1 인트론	(770)	ATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAG	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(801)	ATATGCAGCATCTATTCATATGCTCTAACCTTGAG	
		841	875
지. 룩수리안스 v1 인트론	(805)	TACCTATCTATTATAATAACAAGTATGTTTATA	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(836)	TACCTATCTATTATAATAACAAGTATGTTTATA	
		876	910
지. 룩수리안스 v1 인트론	(840)	ATTATTTTGACCTTGATATACTTGGATGATGGCAT	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(871)	ATTATTTTCGATCTTGATATACTTGGATGATGGCAT	
		911	945
지. 룩수리안스 v1 인트론	(875)	ATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTAGCCTTGC	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(906)	ATGCAGCAGCTATATGTGGATTTTTTAGCCTTGC	
		946	980
지. 룩수리안스 v1 인트론	(910)	<u>CTTCATACGCTATTTATTTGTTTGGGGCTGTTTCT</u>	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(941)	<u>CTTCATACGCTATTTATTTGCTTGGTACTGTTTCT</u>	
		981	1015
지. 룩수리안스 v1 인트론	(945)	TTTTGTTGACGCTCACCTGTTGTTTGGTGTACT	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	(976)	TTT-GTCGATGCTCACCTGTTGTTTGGTGTACT	
		1016	
지. 룩수리안스 v1 인트론	(980)	TCTGCAG	
지. 메이스 c.v. B73 인트론	1010)	TCTGCA-	

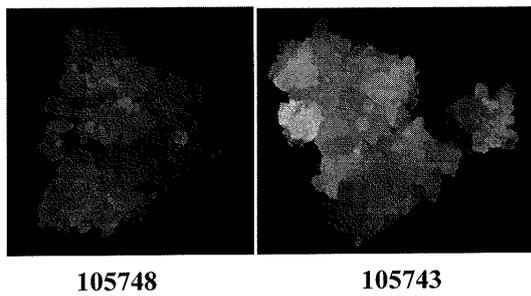
도면8



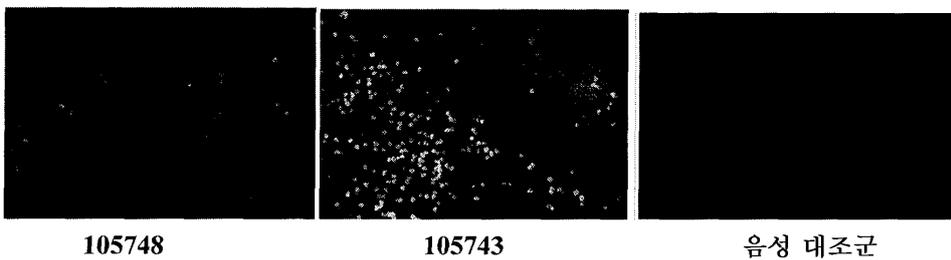
도면9



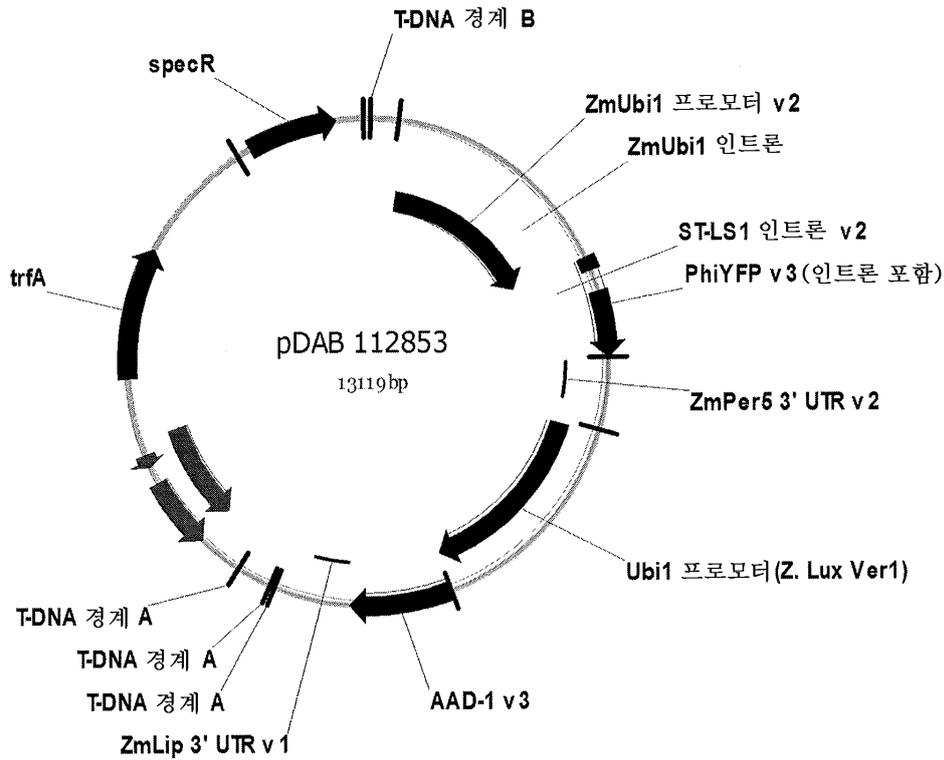
도면10



도면11



도면12



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> DOW AGROSCIENCES LLC

<120> NOVEL MAIZE UBIQUITIN PROMOTERS

<130> DAS-75665

<140><141><150> 61/922,529

<151> 2013-12-31

<160> 19

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1993

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 1

gtgcagcgtg acccggtcgt gccctctct agagataatg agcattgcat gtctaagtta	60
taaaaaatta ccacatattt tttttgtcac acttgtttga agtgcagttt atctatcttt	120
atacatatat ttaaacttta ctctacgaat aatataatct atagtactac aataatatca	180
ggtttttaga gaatcatata aatgaacagt tagacatggt ctaaaggaca attgagtatt	240

ttgacaacag gactctacag ttttatcttt ttagtgtgca tgtgttctcc ttttttttg 300  
 caaatagctt cacctatata atacttcac ctttttatta gtacatccat ttagggttta 360  
 gggttaatgg tttttataga ctaatTTTT tagtacatct attttattct attttagcct 420  
 ctaaattaag aaaactaaaa ctctatTTTta gtttttttat ttaatagttt agatataaaa 480  
 tagaataaaa taaagtgact aaaaattaaa caaatacct ttaagaaatt aaaaaaacta 540  
  
 aggaaacatt tttcttgttt cgagtagata atgccagcct gttaaaccgc gtcgacgagt 600  
 ctaacggaca ccaaccagcg aaccagcagc gtcgcgtcgg gccaagcgaa gcagacggca 660  
 cggcatctct gtcgctgctt ctggaccctt ctcgagagtt ccgctccacc gttggacttg 720  
 ctccgctgtc ggcatccaga aattgctggg cggagcggca gacgtgagcc ggcacggcag 780  
 gcggcctcct ctcctctca cggcaccggc agctacgggg gattcctttc ccaccgctcc 840  
 ttcgctttcc cttcctcgcc gcgccgtaata aatagacacc cctccacac cctctttccc 900  
 caacctcgtg ttgttcggag cgcacacaca cacaaccaga tctccccaa atccaccctg 960  
 cggcacctcc gcttcaaggt acgccgctcg tctcccccc cccccccct ctctacctc 1020  
 tctagatcgg cgttccggtc catgcatggt tagggcccgg tagttctact tctgttcatg 1080  
 tttgtgttag atccgtgttt gtgttagatc cgtgctgcta gcgttcgtac acggatgcga 1140  
 cctgtacgtc agacacgttc tgattgctaa cttgccagtg tttctctttg gggaatcctg 1200  
 ggatggctct agccgttccg cagacgggat cgatttcatg attttttttg tttcgttgca 1260  
  
 tagggtttgg tttgcccttt tcctttatTT caatatatgc cgtgcacttg tttgtcgggt 1320  
 catcttttca tgcTTTTttt tgccttggtt gtgatgatgt ggtctggttg ggcggtcgtt 1380  
 ctagatcggg glagaattct gtttcaact acctgggtgga tttattaatt ttggatctgt 1440  
 atgtgtgtgc catacatatt catagttacg aattgaagat gatggatgga aatatcgatc 1500  
 taggataggt afacatgttg atcggggttt tactgatgca tatacagaga tgctTTTTgt 1560  
 tcgcttgggt glgatgatgt ggtgtgggtg ggcggctcgtt cattcgttct agatcggagt 1620  
 agaatactgt ttcaaacctac ctggtgtatt tattaatTTT ggaactgtat gtgtgtgtca 1680  
 tacatcttca tagttacgag ttttaagatgg atggaaatat cgatctagga taggtataca 1740  
 tgttgatgtg ggttttactg atgcatatac atgatggcat atgcagcatc tattcatatg 1800  
 ctctaacctt gagtacctat ctattataat aaacaagtat gttttataat ttttctgatc 1860  
 ttgatatact tggatgatgg catatgcagc agctatatgt ggattTTTT agccctgcct 1920  
 tcatacgcta tttatttgcT tggtactgtt tcttttgcg atgctcacc tgttgtttgg 1980  
 tgttacttct gca 1993  
  
 <210> 2  
 <211> 1900  
 <212> DNA

<213> Zea luxurians

<400> 2

gacccggtcg tgcccctctc tagagataaa gagcattgca tgtctaaggt atcaaaaatt 60  
 accacatatt tttttggcac acttatntaa agtgcagttt atctatctct atacacatat 120  
 ttaaaacttca ctttataaat aatatagttt atagtactaa actaatatca gtgttttaga 180  
 taattatata aatgaaccgc tagacatggt ctaaagtaca accgagtatt tgacaacagg 240  
 actctacagt tttatctttt tagtgtgcat gtgttctctc tgtttttttt tttcaaatag 300  
  
 cttgacctat ataatacttc atccatntta ttagtacatc cattagggat tcagggttga 360  
 tggtttctat agactaattt ttagtacat ctatnttatt atntntaatt tttaaattaa 420  
 gaaaactgaa actctatntt agttactaca aattaaacaa ataccntta aggaattaa 480  
 aaaactaagg aaacatnttt ctgtnttga gtagattatg acagcctgtt caacccgtc 540  
 gacgagtcta acggacacca accagcgaac cagcagcgtc gcgtcgggcc aagcgaagca 600  
 gacggcacgg catctctgtc gctgcctctg gacccctctc gagagtccg ctccaccgtt 660  
 ggacttgctc cgtgtcggc atccagaaaag tgcgtggcgg agcggcagac gtgaggcggc 720  
 ctctctctc tctcacggca ccggcagcta cgggggatc ctttcccacc gctcctctc 780  
 tttccttcc tcgcccggc taataaatag acacccctc cacacctct tteccaacc 840  
 tcgtgtttgt tcggagcgca cacacacaca accagatctc ccccaaatcc acccgtcggc 900  
 acctccgtt caaggtacgc cgtctacct cccccccct ctctacctc tctagatcgg 960  
 caatccggtc catggttagg gccgatagt tctactctg ttcagtttg tgttagatcc 1020  
  
 gtgctgctag cgttcgtaca cggatgcgac ctgtacatca gacacgttct gattgctaac 1080  
 ttgccagtgt tctcttttg cgaatccagg gatggctcta gccgttccgc agacgggttc 1140  
 gatttcatga tttttttgt ttcgttgcac atagggtttg gtttgcctt ttcctttatt 1200  
 tccttatatg ctgtacactc tttgtcgggt catctgtca tgcctctttt aatcttggtt 1260  
 gtgatgatgt gctctggtt ggcggtcgtt ctagatcgga gtagaatact gtttcaagct 1320  
 acctggtgga tttattaatt ttgtatctgt acgtgtgtc catacatctt catagttacg 1380  
 agtttaagat gatggatgga aatatcgatc taggataggt atacatgtt atgcgggttt 1440  
 tactgatgca tatacagaga tgcctttttt tcgcttggtt gtgatgatgc ggtctggtt 1500  
 ggccgtcgtt ctagatcgga gtagaatact gtttcaaact acctggtgga tttattaatt 1560  
 ctggatctgt atgtgtgtgc catacatctt gatagttacg agtttaagat gatggatgga 1620  
 aatatcgatc taggataggt atacatgtc atgtgggtt tactgatgca tatacatgat 1680  
 ggcatatgca gcactatctc atatgctcta accttagta cctatctatt ataataaca 1740  
 agtatgtttt ataattatnt tgacctgat atacttggat gatggcatat gcagcagcta 1800  
 tatgtggatt tttttagcct tgccttcata cgctatntat ttgtttgggg ctgtttcttt 1860  
 ttgttgacgc tcaccctgtt gtttgggtt acttctgcag 1900

<210> 3

<211> 896

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 3

```
gtgcagcgtg acccggtcgt gccctctct agagataatg agcattgcat gtctaagtta 60
taaaaaatta ccacatattt tttttgtcac acttgtttga agtgcagttt atctatcttt 120
atacatatat ttaaacttta ctctacgaat aatataatct atagtactac aataatatca 180

gtgttttaga gaatcatata aatgaacagt tagacatggc ctaaaggaca attgagtatt 240
ttgacaacag gactctacag ttttatcttt ttagtgtgca tgtgttctcc tttttttttg 300
caaatagctt cacctatata atacttcac cttttatta gtacatccat ttagggttta 360
gggttaatgg tttttataga ctaatTTTT tagtacatct atttattct attttagcct 420
ctaaattaag aaaactaaaa ctctatttta gtttttttat ttaatagttt agatataaaa 480
tagaataaaa taaagtgact aaaaattaaa caaataccct ttaagaaatt aaaaaacta 540
aggaaacatt tttcttgttt cgagtagata atgccagcct gttaaagcc gtcgacgagt 600
ctaacggaca ccaaccagc aaccagcagc gtcgctcgg gccaaagcaa gcagacggca 660
cggcatctct gtcgctgect ctggaccct ctcgagagtt ccgctccacc gttggacttg 720
ctccgctgtc ggcattcaga aattgcgtgg cggagcggca gacgtgagcc ggcacggcag 780
gcggcctect cctcctctca cggcaccgga agctacgggg gattcctttc ccaccgctcc 840
ttcgctttcc ctctctgcc cgcgtaata aatagacacc ccctccacac cctctt 896
```

<210> 4

<211> 831

<212> DNA

<213> Zea luxurians

<400> 4

```
gacccggtcg tgcccctctc tagagataaa gagcattgca tgtctaaggt atcaaaaatt 60

accacatatt tttttggcac acttatTTAA agtgcagttt atctatctct atacacatat 120
ttaaacttca cttataaat aatatagttt atagtactaa actaatatca gtgttttaga 180
taattatata aatgaaccgc tagacatggc ctaaagtaca accgagtatt tgacaacagg 240
actctacagt tttatctttt tagtgtgcat gtttctctc tgtttttttt tttcaaatag 300
cttgacctat ataatacttc atccatttta ttagtacatc cattagggat tcagggttga 360
tggtttctat agactaattt ttttagtcat ctattttatt atttttaatt tttaaattaa 420
gaaaactgaa acictatttt agttactaca aattaaaca atacccttta aggaattaaa 480
aaaactaagg aaacattttt cttgtttcga gtagattatg acagcctgtt caacgccgctc 540
```

gacgagtcta acggacacca accagcgaac cagcagcgtc gcgtcgggcc aagcgaagca 600  
gacggcacgg catctctgtc gctgcctctg gacccctctc gagagtccg ctccaccgtt 660  
ggacttgctc cgtgtcggc atccagaaag tgcgtggcgg agcggcagac gtgaggcggc 720  
ctctctctcc tctcacggca ccggcagctc cgggggattc ctttcccacc gtccttctgc 780  
tttcccttcc tcgcccggcg taataaatag acacccctc cacacctct t 831

<210> 5

<211> 82

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 5

tccccaacct cgtgtttgtc ggagcgcaca cacacacaac cagatctccc ccaaattcac 60  
ccgtcggcac ctccgcttca ag 82

<210> 6

<211> 83

<212> DNA

<213> Zea luxurians

<400> 6

tccccaacct cgtgtttgtt cggagcgcac acacacacaa ccagatctcc cccaaatcca 60  
cccgtcgga cctccgcttc aag 83

<210> 7

<211> 1015

<212> DNA

<213> Zea mays

<400> 7

gtacgccgt cgtctctccc cccccccc ctcttaact tctctagatc ggcgttccgg 60  
tccatgatg gtagggccc gtagttcta ctctgttca tgtttgtgtt agatccgtgt 120  
ttgtgttaga tccgtgctgc tagcgttctg acacggatgc gacctgtacg tcagacacgt 180  
tctgattgct aacttgccag tgtttctctt tggggaatcc tgggatggct ctagecgttc 240  
cgcagacggg atcgatttca tgattttttt tgtttcgttg catagggttt ggtttgcct 300  
tttctttat ttcaatatat gccgtgcaact tgtttgctgg gtcactttt catgctttt 360  
tttgtcttgg ttgtgatgat gtggctctgg tggcggctcg ttctagatcg gagtagaatt 420  
ctgtttcaaa ctacctggtg gatttattaa ttttggatct gtatgtgtgt gccatacata 480

ttcatagtta cgaattgaag atgatggatg gaaatatcga tctaggatag gtatacatgt 540  
 tgatgcgggt tttactgatg catatacaga gatgcttttt gttcgcttgg ttgtgatgat 600  
 gtgggtgggt tgggcggtcg ttcattcgtt ctgatcgga gtagaatact gtttcaaact 660  
 acctggtgta tttattaatt ttggaactgt atgtgtgtgt catacatctt catagttacg 720  
 agtttaagat ggatggaat atcgatctag gataggtata catgttgatg tgggttttac 780  
 tgatgcatat acatgatggc atatgcagca tctattcata tgctctaacc ttgagtacct 840  
 atctattata ataaacaagt atgttttata attatttca tcttgatata cttggatgat 900  
 ggcatatgca gcagctatat gtggattttt ttagcctgc cttcatacgc tatttatttg 960  
 ctggactg tttctttgt cgatgctcac cctgttgtt ggtgttactt ctgca 1015  
 <210> 8  
 <211> 986  
 <212> DNA  
 <213> Zea luxurians  
 <400> 8  
 gtacgccgt cactctccc cccctctct accttctcta gatcggcaat cgggtccatg 60  
 gttaggccc gatagtcta cttctgttca tgtttgtgtt agatccgtgc tgctagcgtt 120  
  
 cgtaacacgga tgcgacctgt acatcagaca cgttctgatt gctaacttgc cagtgtttct 180  
 ctttggcga tccagggatg gctctagccg tccgcagac gggttcgatt tcatgatatt 240  
 ttttgtttcg ttgcacatag ggtttggtt gcccttttcc tttatttctt tatatgctgt 300  
 acactctttg tcgggtcacc ttgtcatgct tcttttaac ttggttgtga tgatgtgctc 360  
 tggttggcg gtcgttctag atcggagtag aactgttt caagctacct ggtggattta 420  
 ttaattttgt atctgtactg gtgtgccata catcttata gttacgagtt taagatgatg 480  
 gatgaaata tcgatctagg ataggtatac atgttgatgc gggttttact gatgcatata 540  
 cagagatgct ttttttgc ttggttgtga tgatgcggtc tggttggcg gtcgttctag 600  
 atcggagtag aactgttt caaactacct ggtggattta ttaattctgg atctgtatgt 660  
 gtgtgccata catcttgata gttacgagtt taagatgatg gatgaaata tcgatctagg 720  
 ataggtatac atgtcgatgt gggttttact gatgcatata catgatggca tatgcagcat 780  
 ctattcatat gctctaacct tgagtaccta tctattataa taaacaagta tgtttataa 840  
 ttattttgac cttgatatac ttggatgatg gcatatgcag cagctatatg tggatttttt 900  
 tagccttgc ttcatacgt atttatttgt ttgggctgt tctttttgt tgacgctcac 960  
 cctgttgtt ggtgttactt ctgcag 986  
 <210> 9  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer  
 <400> 9  
 gctaccgagg acccggtcgt gccctctct agagataatg 40  
 <210> 10  
 <211> 36  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer  
 <400> 10  
 agtcaggtac cctgcagaag taacacaaa caacag 36  
 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer  
 <400> 11  
 cgtgttggga aagaacttg a 21  
 <210> 12  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer  
 <400> 12  
 ccgtggttg cttgtct 18  
 <210> 13  
 <211> 15  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic probe  
 <220><223> 5'FAM  
 <400> 13  
 cactcccccac tgctt 15  
 <210> 14

<211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer  
 <400> 14  
 tggcggacga cgacttgt 18  
 <210> 15  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer  
  
 <400> 15  
 aaagtttgga ggctgccgt 19  
 <210> 16  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic probe  
 <220><223> 5'HEX  
 <400> 16  
 cgagcagacc gccgtgtact t 21  
  
 <210> 17  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer  
 <400> 17  
 acaagagtgg attgatgatc tagagaggt 29  
  
 <210> 18  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 18

ctttgatgcc tatgtgacac gtaaacagt

29

<210> 19

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic probe

<220><223> 5'FAM

<400> 19

ggtgttgtgg ctggtattgc ttacgtgg

29