(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0056588
(43) 공개일자 2022년05월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 1/06* (2006.01)
C07K 14/415 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8229 (2013.01)
A01H 1/06 (2021.01)
(21) 출원번호 10-2020-0141299
(22) 출원일자 2020년10월28일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
윤진미
경기도 수원시 영통구 청명남로4번길 21-4 102호 (영통동)
안진홍
경기도 용인시 기흥구 탑실로 152 210동 1703호 (공세동, 탑실마을대주피오레2단지아파트)
(74) 대리인
특허법인한일

전체 청구항 수 : 총 6 항

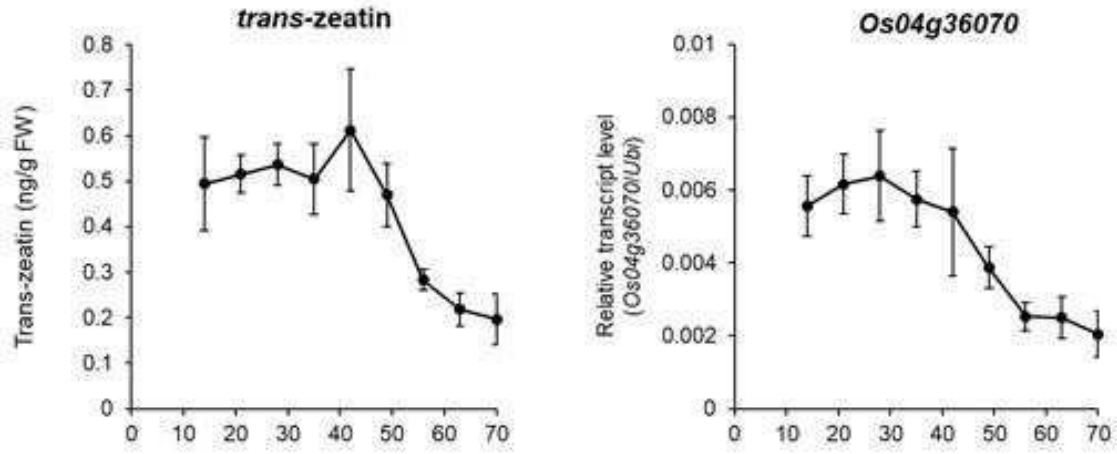
(54) 발명의 명칭 **사이토키닌 특이적 프로모터 및 이의 이용**

(57) 요 약

본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 사이토키닌 특이적으로 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터; 상기 프로모터와 작동 가능하게 연결된, 목적단백질을 암호화하는 외래 유전자를 포함하는, 재조합 발현 벡터; 상기 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체; 및 상기 벡터를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는, 사이토키닌 특이

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도2



적으로 목적단백질이 발현되는 형질전환 식물체의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명은 벼에서 사이토키닌에 의해 발현이 촉진되는 유전자들의 프로모터 부위를 동정하고, 이를 이용하여 사이토키닌에 특이적인 발현을 나타내는 프로모터를 이용하여 이 호르몬 특이적 반응을 가시적으로 보여 줄 수 있는 재료로 이용하는 것을 목적으로 하며, 생장호르몬인 사이토키닌이 형성되는 위치에서 원하는 유전자들의 발현을 과발현 시킬 때에도 유용하게 이용될 수 있을 것으로 예상된다.

또한, 벼의 수확량을 증가시키는 유전자들 중에는 식물체 내의 사이토키닌 함량을 증가시키는 경우가 많으므로, 사이토키닌이 역할을 하는 부위와 적절한 시기에 이 프로모터를 이용하여 좀 더 부작용 없이 생산량을 증대시킬 수 있는 역할을 할 것으로 예상된다.

(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
C12N 15/8261 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395062815
과제번호	PJ013210012020
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21(R&D)
연구과제명	생산성 증진 및 출수 시기 조절 벼 유전자 발굴 및 기능 검정
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 사이토키닌 특이적으로 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 벼(Oryza sativa)유래인 것인, 프로모터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 식물체의 관다발 조직에서 사이토키닌 특이적으로 목적 유전자의 발현을 촉진하는 것인, 프로모터.

청구항 4

제1항의 프로모터와 작동 가능하게 연결된, 목적단백질을 암호화하는 외래 유전자를 포함하는, 재조합 발현 벡터.

청구항 5

제4항의 벡터에 의해 형질전환된, 형질전환체.

청구항 6

제4항의 벡터를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는, 사이토키닌 특이적으로 목적단백질이 발현되는 형질전환 식물체의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 사이토키닌 특이적으로 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터; 상기 프로모터와 작동 가능하게 연결된, 목적단백질을 암호화하는 외래 유전자를 포함하는, 재조합 발현 벡터; 상기 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체; 및 상기 벡터를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는, 사이토키닌 특이적으로 목적단백질이 발현되는 형질전환 식물체의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 벼(Oryza sativa)는 세계에서 가장 중요한 식량작물의 하나로 과거 20여년 동안 꾸준히 수량 증대에 힘써왔으나 현재 인구증가 추세로 볼 때, 2020년이면 현재의 70%이상에 달하는 수량을 더 생산해야만 될 형편에 놓여있다. 그러나 벼가 재배되는 농지는 세계 각국의 공업화 현상으로 갈수록 줄어들고 육종의 소재가 되는 새로운 유전자원은 고갈되어 외래 유용유전자의 도입이 요구되고 있다.

[0004] 다행히 분자생물학의 발달로 외래 유용유전자의 분리 및 조작이 가능하게 되어 유용 유전자를 벼를 비롯한 많은 식물세포에 형질전환하여 새로운 유전자가 조합된 형질전환체를 얻음으로써 여러가지 생명현상을 규명하는 유전자발현 연구는 물론 육종의 좋은 소재가 되고 있다.

[0005] 이러한 형질전환을 이용한 신품종 생산은 앞으로 다가오는 21세기에는 고부가가치 산업으로 대두함은 되고 있다.

[0006] 기존의 프로모터 연구에서는 대부분 조직 특이적 발현에 관심을 가지고 관련 프로모터들이 연구된 바 있으나, 식물호르몬 등에 특이적으로 작동하는 프로모터에 대한 연구는 부족한 실정이다.

[0007] 또한, 기존의 연구로서 식물의 분열 및 생장을 조절하는 식물호르몬인 사이토키닌을 벼에 처리함으로서 개화를 지연시키는 방법에 관한 연구가 진행된 바 있으나(한국특허출원 제10-2018-0037639호), 사이토키닌 특이적인 유전자의 프로모터에 관한 연구는 진행된 바 없다.

[0008] 따라서, 본 발명자들은 식물의 생장 호르몬인 사이토키닌에 반응하는 프로모터 부위를 규명하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 사이토키닌 특이적으로 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 프로모터와 작동 가능하게 연결된, 목적단백질을 암호화하는 외래 유전자를 포함하는, 재조합 발현 벡터를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 벡터에 의해 형질전환된, 형질전환체 를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 벡터를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는, 사이토키닌 특이적으로 목적단백질이 발현되는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0017] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진, 사이토키닌 특이적으로 목적 유전자의 발현을 유도하는 프로모터를 제공한다.

[0018] 상기 프로모터는 벼(Oryza sativa)유래인 것인 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 또한, 상기 프로모터는 식물체의 관다발 조직에서 사이토키닌 특이적으로 목적 유전자의 발현을 촉진하는 것인, 프로모터일 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 하나의 양태는 프로모터와 작동 가능하게 연결된, 목적단백질을 암호화하는 외래 유전자를 포함하는, 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0022] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 벡터에 의해 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[0023] 상기 형질전환체는 식물체일 수 있고, 더욱 구체적으로 벼일 수 있으나, 이에 제한 되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 벡터를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는, 사이토키닌 특이적으로 목적단백질이 발현되는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0026] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는 상기 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 프로모터의 DNA 단편을 증폭하기 위한 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 프라이머 세트를 제공한다.

발명의 효과

[0028] 본 발명은 벼에서 사이토키닌에 의해 발현이 촉진되는 유전자들의 프로모터 부위를 동정하고, 이를 이용하여 사이토키닌에 특이적인 발현을 나타내는 프로모터를 이용하여 이 호르몬 특이적 반응을 가시적으로 보여 줄 수 있는 재료로 이용하는 것을 목적으로 하며, 생장호르몬인 사이토키닌이 형성되는 위치에서 원하는 유전자들의 발현을 과발현 시킬 때에도 유용하게 이용될 수 있을 것으로 예상된다.

[0029] 또한, 벼의 수확량을 증가시키는 유전자들 중에는 식물체 내의 사이토키닌 함량을 증가시키는 경우가 많으므로, 사이토키닌이 역할을 하는 부위와 적절한 시기에 이 프로모터를 이용하여 좀 더 부작용 없이 생산량을 증대시킬 수 있는 역할을 할 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 5μM 6-BAP 처리 후 사이토키닌에 의해 촉진되는 Os04g36070 유전자의 발현을 나타낸 것이다.

도 2는 발달시기별 벼의 잎에서 trans-zeatin (사이토키닌) 함량과 Os04g36070 유전자 발현을 나타낸 것이다.

도 3은 promoter-GUS 형질전환 식물체에서 사이토키닌 처리 후, 관다발 조직에서 특이적으로 사이토키닌에 의해 발현이 촉진되는 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0034] **실시예 1. 사이토키닌에 특이적으로 발현이 조절되는 유전자 선발**

[0036] 식물에서 사이토키닌에 의해 반응한다고 알여진 A-type response regulator와 관련된 유전자 중 벼의 Os04g36070 유전자는 사이토키닌(cytokinin)에 의해 발현이 특이적으로 증가하는 경향성을 보인다. 이 유전자가 사이토키닌에 특이적으로 반응하는지 확인하기 위해 식물체에 5μM 6-BAP를 처리후 잎에서 RNA를 추출하여 이 유전자의 발현을 관찰하였다(도면 1).

[0037] 또한, 식물체 내의 사이토키닌 함량과 발현 양상의 유사성을 관찰하기 위하여 식물체 내 사이토키닌인 trnas-zeatine의 함량을 관찰하고, 이 양상이 Os04g36070 유전자의 발현양상과 유사한 경향성을 가지는 것을 관찰하였다 (도 2). 이 때 사용한 프라이머는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0039]

프라이머 정보	서열 (5 '-3')	서열번호
Os04g36070_RT_F	AAGCCATCAAGGCGCTGAGC	서열번호 3
Os04g36070_RT_R	GTCGCAGCACTGCGTGTTCG	서열번호 4

[0041] **실시예 2. Os04g36070 유전자의 프로모터를 이용한 promoter-GUS 형질전환체 제작**

[0043] 정확한 발현 양상을 식물체에서 관찰하기 위해서 Os04g36070 유전자 promoter를 이용한 promoter-GUS 형질전환체를 제작하고 발현을 관찰하였다.

[0044] 상기 프로모터 부위를 clogning할 때 사용한 primer는 표 2에 기재된 바와 같으며, 본 발명의 서열번호 1의 프로모터 서열, 1st exon과 1st intron 및 2nd exon 일부를 포함한 GUS 형질전환체 제작시 사용한 promoter 부위 서열은 서열번호 7에 기재된 바와 같다.

표 2

[0045]

프라이머 정보	서열 (5 '-3')	**서열번호**
Os04g36070_promoter GUS_F	GGTACCTCCACAGAGAGATATGGATCTG	서열번호 5
Os04g36070_promoter GUS_R	GGATCCAGGAACTCCATGGCCTTCTTG	서열번호 6

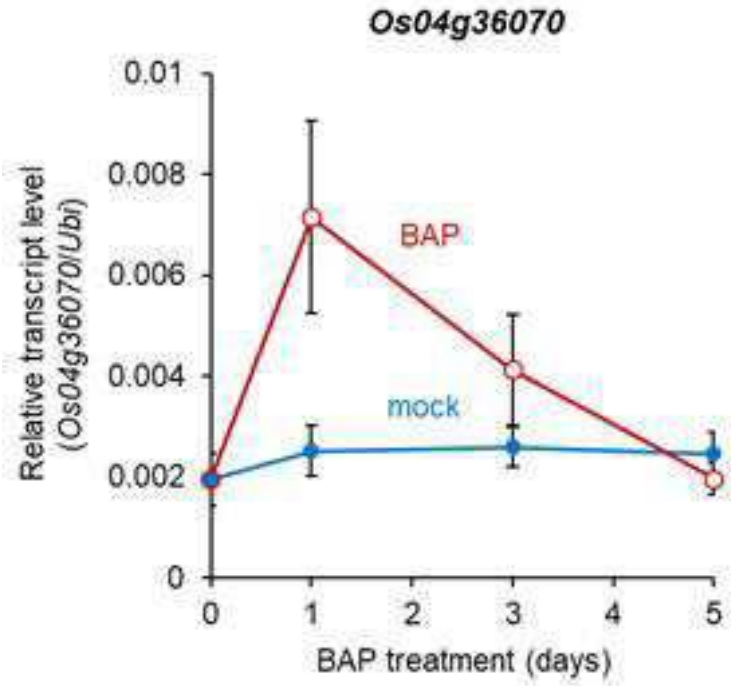
[0047] 상기 형질전환체에서 Os04g36070 유전자의 발현은 사이토키닌인 6-BAP 처리시 크게 증가하는 양상을 볼 수 있으며, 이 때 발현의 증가는 주로 관다발 조직에서 이루어 지는 것을 관찰하였다(도 3).

[0049] 즉, 상기의 결과로서 본 발명의 프로모터는 사이토키닌 특이적으로 목적유전자의 발현을 증가시킴을 확인할 수 있었으며, 이를 통해 생장호르몬인 사이토키닌이 형성되는 위치에서 원하는 유전자들의 과발현에 유용하게 이용이 가능하며, 사이토키닌이 역할을 하는 부위와 적절한 시기에 본 발명의 프로모터를 이용하여 부작용 없이 생산량 증대가 가능하도록 함에 의의가 있을 것이다.

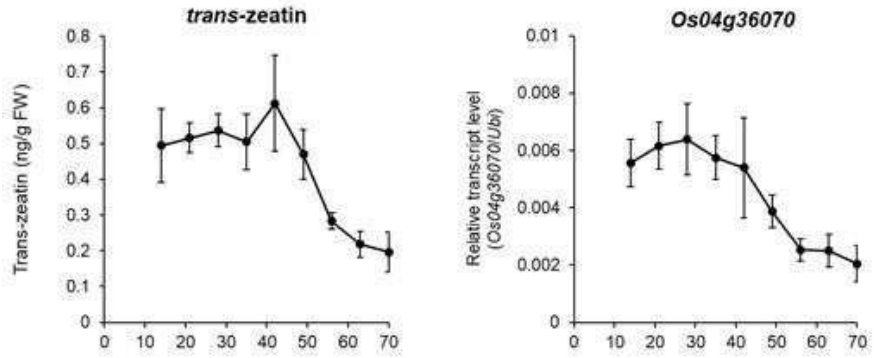
[0051] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

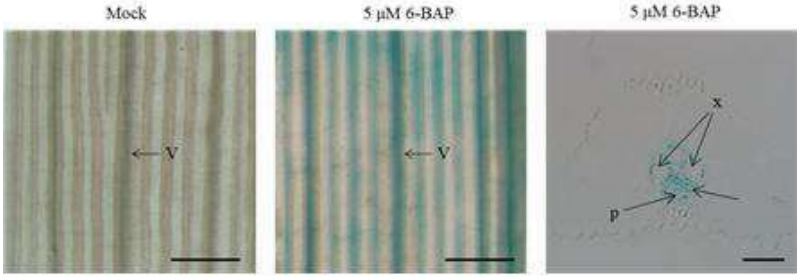
도면1



도면2



도면3



서 열 목 록

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

<120> Promoter for directing the preferential expression by cytokinin and use thereof

<130> KPA201364-KR

<160> 7

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1461

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> LOC_Os04g36070 promoter

<400> 1

tccacagaga gatatggatc tgattgaaga tatttttcct atcttttcca taatgtagca 60

atggaaaaat aattttaggg tacgtaagac ttatacactt gtatatttaa cattctaaaa 120

gtcaaggttg agtgacaaaa aacaacaaaa tgtccttaag ttgtacaaaa ttcaaaattg 180

gctagagttt ataaagtcat agctcagata agcatttcct agaaatgatc cgcaaaccaa 240

tatttcaaac acatctcata tatagaaaat taagcaagtc cacttgtgat gagataatcc 300

agcaaatgcc aagcttgtat ccgggaccta cctcaccaga ttataaaccc acgagacagt 360

tagaacgtat caggaccgaa tccacgtgca gagtttttta aagttccacc gattaaaaac 420

cgcgacgccc actaaaaacc agacgagttc gatcgagcgc cgcctgtagg tcaaacggtt 480

tttaatttcc cacagcaaca acaacaacta aacccccggc gatttaatgg ttaattaaca 540

ccagcaactc aaataaacta attaaccgcg acaaagcgag caatcgagca ttcgatttga 600

tgcgcaaaca cgagaccacg gacggagacg cgcgcgtcgc cgtcaccaaa tattttctgg 660

gcgagaaaaa ggtgtagccc tcccgtctcc gtccgcaaaa gaatacaagc ccatatggag 720

ctttagttag agattttaag ctaaagtgaa aatggttata attggttagg ataaaagagc 780

atgtagaaaa tttaaacaat agagctcttt aattgattga gataagaaaa ttaacattgt 840

ttgaagctta cattctctga taaattttaa ggcctgtagg tttaaggaaa cataggaaca 900

tgaaaaactg agattttaat atgattctat gtgtaaatca gtgaattata aaatataaaa 960

aaacataaaa gtaacctttg aataaaccac aggaaaaata caagaattgg aagaaagata 1020

tagactaaaa aaagttttca agagatctga gctcttgcta atttttctcc aaaccattct 1080

ataaaaatta catagaattt gaaaatctac gatcctttat attaacggac taaataggaa 1140

aaaaagttga atttaaatcc tacggatttc cttcgtaaat tcttcgattt aaaggggctt 1200

cagattattg attttaagcg agaaaacact cttacggagt aggagtactt ttcgtagaag 1260

aagagagaaa gagagaagaa aagggaaaag cggagaggaa gagaagagag gcgttgtttg 1320

ttgtgtgtgc gagtgtgtgg agagattccc cgacagcaaa atctagagga aaagcattct 1380

cgccctccct ccgtgcccca cgagctacca cctccccaca cccacagccc aacccccccac 1440

cggtgggccc acctcccctc c 1461

<210> 2

<211> 3849

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> LOC_Os04g36070 gene genomic DNA sequence

<400> 2

actctcttct tcctctcctc atcagtcctc acggtctctc tcgctcgctc acgcagtctc 60

tcaccacgac tctcacgacc tccccctgac ctgacccaga ggagcaggag agagcatagc 120

acggcctgca cggatcgagc agcggcagca ggagctcgtc gcctctgctt aaaccccccc 180

ccccccccca atatcggtct ctcgccttgt caccttactt gcttggctac tactacttca 240

ccacgcacag ctggttggtt ggttggatta gctagctact aggatcagtg cttcgcttct 300

ctctctcttt gcgttgccgt cgtcgtcgcc gctggtggtg gtggtggttg ttggtgaggg 360

agagatggaa ggaggaaggg gggtgacgag ggtgctgctg gtggacgact cgccggtgga 420

caggagggtg gtgcagctcc tcctcagcag cagcgcatgc gccggctcat tccacggtca 480

gtcatctcag ctcatctcat cccctcctcg attcttcatt tcttcttctc ggcagtgtaa 540

gcttggctgc tgcttgcttg ttcatctctc tgtgtctcca ttcgttttct ggaattctct 600

ctctctctct ctctctctgc ttcttcttct tccatggctt ccaaccgcaa ttccgggctc 660

gtttttttccc ccattctcct ttgttatgct tatactccat tgttttagtt ttcatcataa 720

actgatgctt tttttgaccc ctgatgagta tgcataagct gtgacacaac tgcaatctct 780

cctcgactct gtttttttctt ttttttttttg ttctcccgtt ctttgttttc ccttgccggt 840

ggtgtttttg ggttcgtgtg caagaaacag atgcaccctg ctgctgttgc tgctgctcaa 900

actctagtct tgaactcttg acttgcgact aataatctga aagactgaaa ctcggctcaa 960

tttcgtgcag taatcgccgt cgacagcgcc aagaaggcca tggagttcct cggcctcaag 1020

gaagaaggca aggtaaaaaa aaaaaaaaaa gtctctgcta atcataccac ttaaaccaac 1080

gccattaccg tccataatcg ccgccgatgc cctgctgctg ctgcaagcct gcaagaaacg 1140

aggatcagat cattaacaaa tggcgacgcc atttttgttt tcctcctctc gccggcggcg 1200

ctgcaccgcc ggccgtacgc cggccgtacg gcgcgcgtgc gcgcgtgagg gtttctgttc 1260

ctcctcgtct ccgccttttg ggagcaaaag gtggcctctt ttcatggggg agagagacat 1320

gcagaggaag aagaaaaaaa atactactaa aaaagagaga aaaactcgcc gtcttacagc 1380

agcctgacag agctgtctgg tgtcttgatg acaccaagct tgggttaatg ggattggtta 1440

atggcatggg tttgattctt ggtgtgccct gtgagctcaa cacaggagtg gtagtgacac 1500

ggctgggtgt aattacagct aaccaggatg tgattggatg gctaaataaa ctctttttaa 1560

tatcatgtgc aggagcaggc catcgacatg gtgctcaccg actactgcat gcctgagatg 1620

actggttatg agcttctcaa agccatcaag gtaaaataaa tacaaatact gttaatgcag 1680

aaattcagac ttgcgctgtt gctactacta ttttggtgtc cctagtacta attagcagta 1740

gtagtgatta gttccagtaa taacctgatg tgtgattggc tcatggcttc attggatgtt 1800

tgcaggcgct gagccctctg aagccgatcc cagtgatcgt catgtcgtcg gaaaacgagc 1860

cccagaggat cagcaggtga ggcagagagg ctttcatcct ttttctttct ttttttccttc 1920

agcatctgtt tctgtgcaag taaaaaaaaa aaggggagct gtcttaattt ggtcccaata 1980

cctctgcctg ctgcacaata ggagtacact gtaccgagtg tacaactgag tagcgaactg 2040

tacatacgta tggctatata catccatcca tttaaaaagc ttcatagatt tgtactccct 2100

ctatcgtatt ttaagtgtag ccatactttt tcatactcaa ctttaatcat ctgtcttatt 2160

taaaaaaaaa ttaaaaaaat ttaaaaacat aagtcatgca taaagtacca ttcatgtttt 2220

atcatctcat aacaacaaaa atactaatta taacaaattt ttaaataaga cgaacgatca 2280

aagttagaca cgaaaattta tagttgcatt taaaatataa ccgaggaagt ggaagagaaa 2340

taataatgct tcagtaaata ccccatcttg gcctgttcat gtacttgcct tcccattatg 2400

atccgcactt tggtcgaatg ggcgttcgac ctctgagaag atgctgtatc agatacagag 2460

atccacgaca tttgtgtggt tcattgattg ctgtctcgtg atctctgata tcctgttagt 2520

actgtactag tactgctgtg atcctgcagt ataagaagat tttttttctt aaaaaaaatc 2580

tttttctaaa cacagatgca tgaatgctgg tgctgaagat ttcatcgtaa agcctcttca 2640

aagcaaggac gtacagcgtc tcaggaactg ctcgccggcg aacacgcagt gctgcgacgc 2700

cgggagcgac ggcaagccgc cgctgctgct gctgccatcg gaccacgtcg tcgtcgacgc 2760

caccgccgcg tcgccgccgc cgccgccgtc ccggcgtcgg gcgcacttcg ctggagttgc 2820

catggcaagt ccccccctca tgcactgcat atgctatact caaccacctg cattgtcgtc 2880

acctgttgcc atcggagagt tttacaagaa agagaaccat cgcctcaatt tgcttgccgc 2940

tgcgttttct ctttcaggtc ctgcactcgt cgagcgtcga gctgtcacat tacttccctt 3000

tcctcttcaa gttcatcctg ctggtgtacg ccatcctgtg cctgggtgag ctgctgcaca 3060

gatggtcaaa cggctgcttc ctcaacctgt ggtgtgcttg acgaatgaag caaccggtgc 3120

agtccaaatg caaaggcagg ctgcaactgg caaagctctt tcttgtttgc gatagctttc 3180

tgcactgaaa gagcagcatg gagaggaggt taatgttaca acagatgatg atgatgatga 3240

tggaagtttt aggtagattg tttgctttga gattctaacc tggagcttgg ttcttcttgg 3300

cctttgattg atgagaggag ggaggaagaa ccaatccttg tatccttgta caaaaagcat 3360

aatgaggcag tatctgatgt ccttttttggt tgggatcttg gctgatatgt cgatgtgaca 3420

ttcagagagc tttttccttg ccctttcctt tcgccgatgg caactcctca cctgtattgt 3480

agttcagatc ccatgagaaa agaactacac aagttgacta atgcagcatc aggttcttct 3540

gatgggaaaa gaaacaaaaa ttgcagatat catagtacac tttcgcctca acggttgtaa 3600

acttgtaatc ccattcagat aggcgaaact gggcaataga atgttgtttt ttctttcagt 3660

tgtcacattt caagctaatg acttgagatt tttaaatgac agctatttac aagcctagta 3720

atgtacaact gtgggtttac atattcacag tatcatctcc ttgtggaggc atgggatcac 3780

ccatattttt gctacttcca catcttgagt catgaacata ttcatagctg taagttcctt 3840

tgatgttct 3849

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Os04g36070_RT_forward primer

<400> 3

aagccatcaa ggcgctgagc 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Os04g36070_RT_reverse primer

<400> 4

gtcgcagcac tgcgtgttcg 20

<210> 5

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Os04g36070_promoter GUS_forward primer

<400> 5

ggtacctcca cagagagata tggatctg 28

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Os04g36070_promoter GUS_reverse primer

<400> 6

ggatccagga actccatggc cttcttg 27

<210> 7

<211> 2471

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> promoter for GUS tansfomation

<400> 7

tccacagaga gatatggatc tgattgaaga tatttttcct atcttttcca taatgtagca 60

atggaaaaat aattttaggg tacgtaagac ttatacactt gtatatttaa cattctaaaa 120

gtcaaggttg agtgacaaaa aacaacaaaa tgtccttaag ttgtacaaaa ttcaaaattg 180

gctagagttt ataaagtcat agctcagata agcatttcct agaaatgatc cgcaaaccaa 240

tatttcaaac acatctcata tatagaaaat taagcaagtc cacttgtgat gagataatcc 300

agcaaatgcc aagcttgtat ccgggaccta cctcaccaga ttataaaccc acgagacagt 360

tagaacgtat caggaccgaa tccacgtgca gagtttttta aagttccacc gattaaaaac 420

cgcgacgccc actaaaaacc agacgagttc gatcgagcgc cgcctgtagg tcaaacggtt 480

tttaatttcc cacagcaaca acaacaacta aacccccggc gatttaatgg ttaattaaca 540

ccagcaactc aaataaacta attaaccgcg acaaagcgag caatcgagca ttcgatttga 600

tgcgcaaaca cgagaccacg gacggagacg cgcgcgtcgc cgtcaccaaa tattttctgg 660

gcgagaaaaa ggtgtagccc tcccgtctcc gtccgcaaaa gaatacaagc ccatatggag 720

ctttagttag agattttaag ctaaagtgaa aatggttata attggttagg ataaaagagc 780

atgtagaaaa tttaaacaat agagctcttt aattgattga gataagaaaa ttaacattgt 840

ttgaagctta cattctctga taaattttaa ggcctgtagg tttaaggaaa cataggaaca 900

tgaaaaactg agattttaat atgattctat gtgtaaatca gtgaattata aaatataaaa 960

aaacataaaa gtaacctttg aataaaccac aggaaaaata caagaattgg aagaaagata 1020

tagactaaaa aaagttttca agagatctga gctcttgcta atttttctcc aaaccattct 1080

ataaaaatta catagaattt gaaaatctac gatcctttat attaacggac taaataggaa 1140

aaaaagttga atttaaatcc tacggatttc cttcgtaaat tcttcgattt aaaggggctt 1200

cagattattg attttaagcg agaaaacact cttacggagt aggagtactt ttcgtagaag 1260

aagagagaaa gagagaagaa aagggaaaag cggagaggaa gagaagagag gcgttgtttg 1320

ttgtgtgtgc gagtgtgtgg agagattccc cgacagcaaa atctagagga aaagcattct 1380

cgccctccct ccgtgcccca cgagctacca cctccccaca cccacagccc aacccccccac 1440

cggtgggccc acctcccctc cactctcttc ttcctctcct catcagtcct cacggtctct 1500

ctcgctcgct cacgcagtct ctcaccacga ctctcacgac ctccccctga cctgacccag 1560

aggagcagga gagagcatag cacggcctgc acggatcgag cagcggcagc aggagctcgt 1620

cgcctctgct taaacccccc ccccccccccc aatatcggtc tctcgccttg tcaccttact 1680

tgcttggcta ctactacttc acaacgcaca gctggttggt tggttggatt agctagctac 1740

taggatcagt gcttcgcttc tctctctctt tgcgttgccg tcgtcgtcgc cgctggtggt 1800

ggtggtggtt gttggtgagg gagagatgga aggaggaagg ggggtgacga gggtgctgct 1860

ggtggacgac tcgccggtgg acaggagggt ggtgcagctc ctcctcagca gcagcgcatg 1920

cgccggctca ttccacggtc agtcatctca gctcatctca tcccctcctc gattcttcat 1980

ttcttcttct cggcagtgta agcttggctg ctgcttgctt gttcatctct ctgtgtctcc 2040

attcgttttc tggaattctc tctctctctc tctctctctg cttcttcttc ttccatggct 2100

tccaaccgca attccgggct cgtttttttcc cccattctcc tttgttatgc ttatactcca 2160

ttgttttagt tttcatcata aactgatgct ttttttgacc cctgatgagt atgcataagc 2220

tgtgacacaa ctgcaatctc tcctcgactc tgtttttttct ttttttttttt gttctcccgt 2280

tctttgtttt cccttgccgg tggtgttttt gggttcgtgt gcaagaaaca gatgcaccct 2340

gctgctgttg ctgctgctca aactctagtc ttgaactctt gacttgcgac taataatctg 2400

aaagactgaa actcggctca atttcgtgca gtaatcgccg tcgacagcgc caagaaggcc 2460

atggagttcc t 2471