(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0094862
(43) 공개일자 2022년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/10* (2018.01)
C07K 14/415 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8243 (2013.01)
A01H 5/10 (2022.05)
(21) 출원번호 10-2020-0186520
(22) 출원일자 2020년12월29일
심사청구일자 2020년12월29일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
하선화
경기도 수원시 영통구 광교호수공원로 277 중흥S클래스아파트 101동 1703호
김병훈
경기도 수원시 영통구 반달로 54-1 2층 201호(영통동)
구형근
경기도 수원시 영통구 영통로200번길 156 1001동 1706호
(74) 대리인
특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 17 항

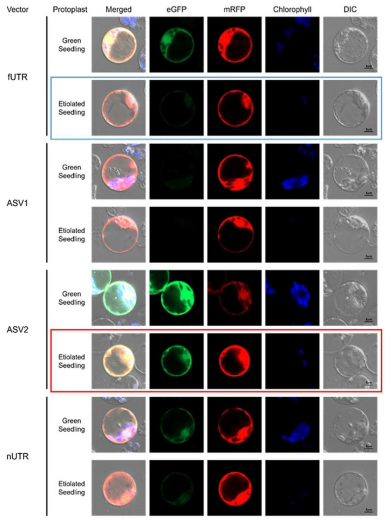
(54) 발명의 명칭 **식물 유전자 상시 발현을 위한 프로모터 교정용 5`UTR 서열 및 이의 이용**

(57) 요 약

본 발명은 식물 유전자 상시 발현을 위한 프로모터 교정용 5`UTR 서열 및 이의 이용에 관한 것이다.

본 발명의 *OsPSY1*의 5'UTR 변이체인 ASV2는 빛 조건에 관계없이 유전자를 강하게 발현할 수 있는 바, 이를 유전자 활성 증진에 이용할 수 있고 최근 각광받고 있는 유전자교정 기술 등을 이용하여 원하는 물질의 생산이 증진된 기능성 작물 개발에 유용하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
G16B 30/10 (2019.02)
C12N 2320/33 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1395065541
과제번호 PJ01477202
부처명 농촌진흥청
과제관리(전문)기관명 농촌진흥청
연구사업명 차세대농작물신육종기술개발
연구과제명 벼 기능성대사경로의 유전자교정에 의한 기능상실 및 염기교정에 의한 golden-SNP 도입 돌연변이집단 구축 (1/2)
기 여 율 70/100
과제수행기관명 경희대학교
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345312134
과제번호 2018R1A6A3A11050254
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 벼 카로티노이드 대사 관련 파이토엔 합성 유전자의 종자발현 유도를 위한 프로모터 교정 연구(3/4)
기 여 율 30/100
과제수행기관명 경희대학교(국제캠퍼스)
연구기간 2018.06.01 ~ 2021.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

벼(*Oryza sativa*) 유래 *PSY1*(*phytoene synthase 1*) 유전자(*OsPSY1* 유전자)의 5'UTR(5' untranslated region, 5'-UTR)을 이루는, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 *OsPsy1* 유전자 시작 코돈의 A 염기로부터 -565번째 내지 -344번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드가 결실된, 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 *OsPsy1* 유전자 시작 코돈의 A 염기로부터 -218번째 내지 -195번째 및 -55번째 내지 -1번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 서열인 것인, 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열은 *OsPSY1* 유전자의 발현을 증가시키는 것인, 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열은 암조건에서 *OsPSY1* 유전자를 발현시키거나, 상기 유전자의 발현을 증가시키는 것인, 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열.

청구항 6

제1항의 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 *OsPsy1* 유전자 시작 코돈의 A 염기로부터 -218번째 내지 -195번째 및 -55번째 내지 -1번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 서열인 것인, 재조합 벡터.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 벡터에 의해 발현되는 유전자는 발현이 증가되는 것인, 재조합 벡터.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 벡터는 OsPSY1 프로모터를 추가로 포함하는 것인, 재조합 벡터.

청구항 10

제6항의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 카로티노이드 생합성 경로의 유전자의 발현이 증가되는 것인, 형질전환 식물체.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 카로티노이드 생합성 경로의 유전자는 PSY1, Pds, Zds, CrtISO, 및 Lcyb로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 형질전환 식물체.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 벼인 것인, 형질전환 식물체.

청구항 14

제10항의 형질전환 식물체의 종자.

청구항 15

제6항의 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 카로티노이드 생합성 경로의 유전자의 발현이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 카로티노이드 생합성 경로의 유전자는 PSY1, Pds, Zds, CrtISO, 및 Lcyb로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 제조방법.

청구항 17

제10항의 형질전환 식물체, 이의 종자 또는 이의 추출물 중 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물 유전자 상시 발현을 위한 프로모터 교정용 5`UTR 서열 및 이의 이용에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 카로티노이드(carotenoid)는 모든 광합성 유기체와 다수의 비광합성 박테리아 및 곰팡이에서 합성되는 천연 친유성 색소로 광합성 보조 안료 및 광보호제로 기능한다. PSY(phytoene synthase)는 카로티노이드 생합성 속도를 조절하는 율속단계의 효소이다. PSY는 일대일 축합을 통해 제라닐 제라닐디포스페이트(geranylgeranyl diphosphate, C20)를 피토엔(phytoene, C40)으로 전환한다.

[0004] 대부분 식물에서 *PSY* 는 서로 다른 조직, 발달 단계 및 환경 조건의 전사 수준에서 조절되는 둘 혹은 세가지의 종류의 유전자군으로 구성된다. 예외적으로 애기장대(*Arabidopsis*)를 포함한 배추과(*Brassicaceae*) 식물은 단일 PSY 유전자를 가지고 있다.

[0005] 다른 벼과(*Poaceae*) 식물과 마찬가지로 벼(*Oryza sativa*)에서는 PSY 유전자가 세 종류가 있으며 이중 *OsPSY1* 발현 수준은 대부분의 조직에서 나머지 *OsPSY2* 및 *OsPSY3*보다 더 높고 광합성 조건에서 잘 발현된다(Welsch et al., A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. Plant Physiol 147(1): 367-380, 2008).

[0006] 한편, 5'UTR(5' untranslated region, 5'-UTR)은 생물체의 유전자 발현을 조절하는 주요 구성성분으로 다양한 유전자에 존재한다. 5'UTR에 의한 단백질 발현 저해 등을 효과적으로 조절할 수 있다면 기본적으로 유전자 활성 증진에 이용할 수 있고 최근 각광받고 있는 유전자교정 기술 등을 이용하여 원하는 물질생산이 증진된 기능성 작물 개발에 유용하게 활용할 수 있다.

[0007] 그러나, 아직까지 5'UTR에 의한 단백질 발현 저해 조절에 대해 구체적으로 연구된 바가 없는 실정이다.

[0008] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 벼 유래 *OsPsy1* 유전자의 빛 의존적 발현 양상을 변화시키기 위해 *OsPSY1* 단백질 합성에 영향을 미치는 5'UTR의 기능을 상세히 분석한 결과 5'UTR은 대체 스플라이싱(alternative splicing)에 의해 두 가지 형태로 존재하며 길이가 긴 5'UTR로 전사체가 만들어질 시 단백질 발현이 크게 저해되고 있음을 확인하였다. 특히, *OsPSY1*은 빛 의존적 발현양상을 보이는데 5'UTR을 일부 제거하면 암 조건하에서도 *OsPSY1*의 발현을 유도할 수 있는 바, 5'UTR에 의한 단백질 발현 저해 등을 효과적으로 조절할 수 있다면 이를 유전자 활성 증진에 이용할 수 있고 최근 각광받고 있는 유전자교정 기술 등을 이용하여 원하는 물질의 생산이 증진된 기능성 작물 개발에 유용하게 활용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 벼(*Oryza sativa*) 유래 *PSY1*(*phytoene synthase 1*) 유전자(*OsPSY1* 유전자)의 5'UTR(5' untranslated region, 5'-UTR)을 이루는, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 *OsPsy1* 유전자 시작 코돈의 A 염기로부터 -565번째 내지 -344번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드가 결실된, 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 형질전환 식물체의 종자를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 카로티노이드 생합성 경로의 유전자의 발현이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 형질전환 식물체, 이의 종자 또는 이의 추출물 중 선택되는 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는, 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 한편, 본 발명에서 개시되는 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 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다. 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0019] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 벼(*Oryza sativa*) 유래 *PSY1*(*phytoene synthase 1*) 유전자(*OsPSY1* 유전자)의 5'UTR(5' untranslated region, 5'-UTR)을 이루는, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 *OsPsy1* 유전자 시작 코돈의 A 염기로부터 -565번째 내지 -344번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드가 결실된, 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열을 제공한다.

[0021] 본 발명에서 용어, "폴리뉴클레오티드"는 뉴클레오티드(염기) 단위체(monomer)가 공유결합에 의해 길게 사슬모양으로 이어진 뉴클레오티드의 중합체(polymer)로 일정한 길이 이상의 DNA 또는 RNA 가닥으로서, 보다 구체적으로는 상기 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 단편을 의미한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 기능을 할 수 있는 폴리뉴클레오티드 집합체인 경우 유전자로 기재될 수 있다. 본 발명에서 폴리뉴클레오티드와 유전자, 폴리뉴클레오티드 서열과 염기 서열은 혼용될 수 있다.

[0023] 본 발명에서 용어, "PSY(phytoene synthase)"은 색소체 국지적(plastid-localized) 카로티노이드(carotenoid) 생합성 경로에서 처음으로 투입되어 카로티노이드 생합성 속도를 조절하는 효소로, PSY는 일대일 축합을 통해 제라닐 제라닐디포스페이트(geranylgeranyl diphosphate, C20)를 피토엔(phytoene, C40)으로 전환한다.

[0024] 본 발명에서 용어, "PSY1(phytoene synthase 1)"은 PSY의 일종일 수 있다.

[0026] 본 발명에서 용어, "5'UTR(5' untranslated region, 5'-UTR)"은 개시 코돈으로부터 상류(upstream)에 있는 mRNA의 영역으로, 일반적으로 프로모터와 개시코돈 사이의 mRNA 영역을 의미한다. 5'UTR은 바이러스, 원핵 생물 및 진핵 생물의 상이한 메커니즘에 의한 전사의 번역의 조절에 중요한 역할을 하며, 비번역 부위로 명명되나, 상기 부위의 일부는 때때로 단백질로 번역되기도 한다.

[0028] 본 발명의 목적상, 상기 5'UTR은 벼(*Oryza sativa*) 유래 *PSY1*(*phytoene synthase 1*) 유전자의 5'UTR, 즉, *OsPSY1* 유전자의 5'UTR일 수 있다.

[0029] 상기 *OsPSY1* 유전자의 5'UTR은 *OsPsy1* 유전자 시작 코돈의 A 염기로부터, (즉, ATG 상위) -565번째 내지 -1번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드를 포함하거나, 이루어지거나, 상기 아미노산 서열로 필수적으로 이루어질(essentially consisting of) 수 있다.

[0030] 상기 *OsPSY1* 유전자의 5'UTR은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열을 가지거나, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어지거나 또는 서열번호 1로 기재되는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열은 공지의 데이터베이스인 NCBI 진뱅크(Genbank)에서 확인할 수 있다.

[0031] 구체적으로, 상기 5'UTR은 서열번호 1 및/또는 상기 서열번호 1과 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성(homology) 또는 동일성(identity)을 가지는 폴리뉴클레오티드 서열을 가질 수 있다. 또한, 이러한 상동성 또는 동일성을 가지며 상기 5'UTR에 상응하는 기능을 나타내는 폴리뉴클레오티드 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 5'UTR도 본 발명의 범위 내에 포함됨

은 자명하다.

[0032] 즉, 본 발명에서 '특정 서열번호로 기재된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 또는 폴리뉴클레오티드', '특정 서열번호로 기재된 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어진 유전자 또는 폴리뉴클레오티드'라고 기재되어 있다 하더라도, 당해 서열번호의 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어진 유전자 또는 폴리뉴클레오티드와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 폴리뉴클레오티드 서열로 이루어진 유전자 또는 폴리뉴클레오티드도 본 발명에서 사용될 수 있음은 자명하다. 예를 들어, '서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 또는 폴리뉴클레오티드'는, 이와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 '서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 유전자 또는 폴리뉴클레오티드'에 속할 수 있음은 자명하다.

[0034] 본 발명에서 용어, "상응하는(corresponding to)"은, 폴리뉴클레오티드에서 열거되는 위치의 염기이거나, 또는 폴리뉴클레오티드에서 열거되는 염기와 유사하거나 동일하거나 상동한 염기를 지칭한다. 상응하는 위치의 염기를 확인하는 것은 특정 서열을 참조하는 서열의 특정 염기를 결정하는 것일 수 있다. 본 발명에 사용된 "상응 영역"은 일반적으로 관련 폴리뉴클레오티드 또는 참조 (reference) 폴리뉴클레오티드에서의 유사하거나 대응되는 위치를 지칭한다.

[0035] 예를 들어, 임의의 아미노산 서열을 서열번호 1과 정렬(align)하고, 이를 토대로 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 각 염기는 서열번호 1의 염기와 상응하는 염기의 숫자 위치를 참조하여 넘버링 할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 기재된 것과 같은 서열 정렬 알고리즘은, 쿼리 시퀀스("참조 서열"이라고도 함)와 비교하여 염기의 위치, 또는 치환, 삽입 또는 결실 등의 변형이 발생하는 위치를 확인할 수 있다.

[0036] 이러한 정렬에는 예를 들어 Needleman-Wunsch 알고리즘 (Needleman 및 Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), EMBOSS 패키지의 Needle 프로그램 (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000), Trends Genet. 16: 276-277) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에 알려진 서열 정렬 프로그램, 쌍 서열(pairwise sequence) 비교 알고리즘 등을 적절히 사용할 수 있다.

[0038] 본 출원에서 용어 "변이체" 또는 "변이형 폴리뉴클레오티드"는 폴리뉴클레오티드를 구성하는 어느 하나 이상의 뉴클레오티드가 다른 뉴클레오티드로 치환되어 변이된 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 상기 변이형 폴리뉴클레오티드는 변이 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드 변이체 등의 용어와 혼용될 수 있다. 일예로, 본 발명에 있어서, 상기 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열은 5'UTR 변이체와 혼용될 수 있다.

[0039] 상기 변이형 폴리뉴클레오티드는 상기 폴리뉴클레오티드의 기능(functions) 또는 특성(properties)이 유지되는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 상기 변이형 폴리뉴클레오티드는 수 개의 염기 치환, 결실 또는 부가에 의해 식별되는 서열(identified sequence)과 상이하다. 이러한 변이체는 일반적으로 상기 폴리뉴클레오티드의 염기서열 중 하나 이상의 염기를 변형하고, 상기 변형된 폴리뉴클레오티드의 특성을 평가하여 식별될 수 있다. 즉, 변이체의 능력은 본래 폴리뉴클레오티드에 비하여 증가되거나, 변하지 않거나, 또는 감소될 수 있다.

[0040] 본 출원에서 용어 "보존적 치환(conservative substitution)"은 한 염기를 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 갖는 또 다른 염기로 치환시키는 것을 의미한다. 상기 변이체는 하나 이상의 생물학적 활성을 여전히 보유하면서, 예를 들어 하나 이상의 보존적 치환을 가질 수 있다.

[0042] 본 발명의 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열은 *OsPSY1* 유전자의 5'UTR을 이루는, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 *OsPsy1* 유전자 시작 코돈의 A 염기로부터, (즉, ATG 상위) -565번째 내지 -344번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드가 결실된 것일 수 있다. 상기 *OsPsy1* 유전자 시작 코돈의 A 염기로부터 -565번째 내지 -344번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드는, 서열번호 1의 염기서열에서 1번째 내지 222번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0043] 상기 *OsPsy1* 유전자 시작 코돈의 A 염기로부터 -565번째 내지 -344번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드, 즉, 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 1번째 내지 222번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드 서열일 수 있다.

[0044] 본 발명에서 상기 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 *OsPsy1* 유전자 시작 코돈의 A 염기로부터 -565번째

내지 -344번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드가 결실된 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열은, 상기 -565번째 내지 -344번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드가 결실된 것은 고정된 채, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는 5'UTR 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있다.

[0045] 즉, 본 발명의 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 서열번호 5의 폴리뉴클레오티드 서열이 결실된 폴리뉴클레오티드 서열을 제한 없이 포함할 수 있다.

[0046] 구체적으로, 본 발명의 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 *OsPsy1* 유전자 시작 코돈의 A 염기로부터 -218번째 내지 -195번째 및 -55번째 내지 -1번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 서열일 수 있다. 상기 *OsPsy1* 유전자 시작 코돈의 A 염기로부터 -218번째 내지 -195번째 및 -55번째 내지 -1번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드는, 서열번호 1의 염기서열에서 347번째 내지 370번째 및 510번째 내지 565번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

[0047] 상기 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열은 *OsPsy1* 유전자 시작 코돈의 A 염기로부터 -218번째 내지 -195번째 및 -55번째 내지 -1번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드, 즉, 서열번호 1의 염기서열에서 347번째 내지 370번째 및 510번째 내지 565번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드로 이루어진, 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 본 발명의 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열은 *OsPSY1* 유전자의 발현을 증가시키는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열은 암조건에서 *OsPSY1* 유전자를 발현시키거나, 상기 유전자의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[0049] 본 발명의 일 구현예에서, 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열을 벼 원형질체로 형질감염시키고, 상기 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열 발현에 따른 형광 단백질 발현을 확인한 결과, 5'UTR 내 일부 영역(ATG 상위 -565bp ~ -344bp)이 제거되면 암 조건하에서도 유전자의 발현이 유도되는 것을 확인하였다(도 2 및 도 3).

[0050] 또한, *OsPsy1* 유전자의 5'UTR에 존재하는 빛 조절에 관여하는 다양한 CRE(cis-regulatory element)와 uORF(upstream open redeading frame)을 분석한 결과, 5'UTR 내 일부 영역(*OsPsy1* 유전자 시작 코돈의 A 염기로부터 -565번째 내지 -344번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드) 내에 암조건 하에서 유전자의 발현을 억제할 수 있는 REALPHALGLHCB21 CRE와 유전자의 전사발현을 억제하는 2종의 uORF가 존재하는 것을 확인하였으며, 상기 5'UTR 내 일부 영역을 제거하면 광 조건하에서만 특이적으로 발현되는 유전자 발현을 빛의 유무에 상관없이 상시 발현이 가능함을 확인하였다(도 4).

[0052] 본 발명에서 용어, "상동성(homology) 및 동일성(identity)"은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열과 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다. 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.

[0053] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나(homologous) 또는 동일한(identical) 서열은 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 일반적으로 서열 전체 또는 전체-길이의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 이상으로 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 코돈 대신 축퇴 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드 또한 고려된다.

[0054] 상기 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열에 대한 상동성 또는 동일성은 예를 들면, 문헌에 의한 알고리즘 BLAST[참조: Karlin 및 Altschul, Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873(1993)], 또는 Pearson에 의한 FASTA(참조: Methods Enzymol., 183, 63, 1990)을 사용하여 결정할 수 있다. 이러한 알고리즘 BLAST에 기초하여, BLASTN이나 BLASTX라고 불리는 프로그램이 개발되어 있다(참조: http://www.ncbi.nlm.nih.gov). 또한, 임의의 아미노산 또는 폴리뉴클레오티드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 정의된 엄격한 조건하에서 써던 혼성화 실험에 의해 서열을 비교함으로써 확인할 수 있으며, 정의되는 적절한 혼성화 조건은 당해 기술 범위 내이고, 당업자에게 잘 알려진 방법(예컨대, J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology)으로 결정될 수 있다.

[0056] 본 발명의 다른 하나의 양태는 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0057] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.

[0058] 상기 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 1의 폴리뉴클레오티드 서열에서 *OsPsy1* 유전자 시작 코돈의 A 염기로부터 -218번째 내지 -195번째 및 -55번째 내지 -1번째에 상응하는 위치의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 서열일 수 있고, 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 상기 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열은 전술한 바와 같다.

[0060] 본 발명에서 용어, "벡터"는 적합한 숙주 내에서 목적하는 폴리뉴클레오티드 서열을 이를 발현시키기에 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 형태로 함유하는 DNA 제조물을 의미한다. 상기 발현 조절 서열은 전사를 개시할 수 있는 프로모터, 그러한 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합부위를 코딩하는 서열, 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 적당한 숙주세포 내로 형질전환된 후, 숙주 게놈과 무관하게 복제되거나 기능할 수 있으며, 게놈 그 자체에 통합될 수 있다.

[0061] 본 발명에서 용어, "재조합 벡터"는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 의미한다. 대체로 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소(translation control element)를 가지는 것이다.

[0062] 구체적으로, 상기 재조합 벡터는 Ti-플라스미드 벡터, 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터 등일 수 있고, 구체적으로는 식물세포에서 단백질을 발현할 수 있는 pGA3651, pGA3574, pCAMBIA1300, pCB302ES, pCXSN, pINDEX3, pBI121, pgR106 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0063] 본 발명의 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 상기 방법은 시험관 내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체 내 재조합 기술 등을 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명에서 용어, "프로모터"는 구조 유전자로부터의 DNA 상부의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 중합효소가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "항시성(constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이며, 본 발명에서는 항시성 프로모터의 사용이 바람직할 수 있다. 따라서, 항시성 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다.

[0065] 본 발명의 재조합 벡터에서, 상기 프로모터는 형질전환에 적합한 프로모터들로서, 구체적으로는 OsPSY1 프로모터, CaMV 35S 프로모터, 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, pEMU 프로모터, MAS 프로모터, 히스톤 프로모터 또는 Clp 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0066] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 아그로박테리움 튜머파시엔스(Agrobacteriumtumefaciens)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 터미네이터 영역이 식물 세포에서의 유전자 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다.

[0067] 본 발명의 재조합 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate) 또는 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol), G418, 블레오마이신(Bleomycin)과 같은 항생제 내성 유전자, aadA 유전자 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0068] 본 발명에서 용어, "형질전환(transformation) 또는 형질감염(transfection)"은 목적하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터가 숙주세포 내에 도입하여 숙주세포 내에서 상기 폴리뉴클레오티드가 코딩하는 단백질이 발현되는 것을 의미한다.

[0069] 또한, 상기에서 용어 "작동 가능하게 연결"된 것이란 본 발명의 목적 유전자를 이루는 폴리뉴클레오티드의 전사

를 개시 및 매개하도록 하는 프로모터 서열 또는 발현조절영역과 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다. 작동 가능한 연결은 당업계의 공지된 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당업계의 절단 및 연결 효소 등을 사용하여 제작할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0070] 본 발명에 있어서, 상기 "목적 유전자"는 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열을 의미하는 것일 수 있다.

[0072] 본 발명의 변이형 5'UTR 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 벡터에 의해 발현되는 유전자는 야생형 5'UTR 또는 이를 포함하는 벡터에 의해 발현되는 유전자에 비해 발현이 증가될 수 있다.

[0074] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0075] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.

[0076] 본 발명에서 용어, "형질전환 식물체"는 본 발명의 재조합 벡터로 형질전환된 식물세포, 식물체 자체를 포함할 수 있다.

[0077] 상기 형질전환 식물체는 야생형 식물체에 비해 카로티노이드 생합성 경로의 유전자의 발현이 증가될 수 있다.

[0078] 상기 카로티노이드 생합성 경로의 유전자는, 예를 들면, PSY1, Pds, Zds, CrtISO, 및 Lcyb 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0080] 본 발명에서, 상기 식물체는 예를 들어 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튤립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드 클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료 작물류로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 구체적으로 벼일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0082] 본 발명의 다른 하나의 양태는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 카로티노이드 생합성 경로의 유전자의 발현이 증가된 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0083] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.

[0084] 상기 카로티노이드 생합성 경로의 유전자는, 예를 들면, PSY1, Pds, Zds, CrtISO, 및 Lcyb 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0086] 상기 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계는 당업자에게 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 미세사출법(microprojectile bombardment), 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 일렉트로포레이션(electroporation), PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법 (microinjection), 리포좀 매개법(liposome-mediated method), 인-플란타 형질전환법(In planta transformation), 진공 침윤법(Vacuum infiltration method), 화아침지법(floral meristem dipping method), 또는 아그로박테리움(Agrobacterium sp.) 매개에 의한 방법 등을 사용할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0087] 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다. 캘러스 또는 원형질체 배양으로부터 성숙한 식물의 재분화를 위한 기술은 수많은 여러 가지 종에 대해서 당업계에 주지되어 있다(Handbook of Plant Cell Culture, 1-5권, 1983-1989 Momillan, N.Y.).

[0089] 본 발명의 또 하나의 양태는 형질전환 식물체, 이의 종자 또는 이의 추출물 중 선택되는 어느 하나 이상을 유효 성분으로 포함하는, 식품 조성물을 제공한다.

[0090] 여기에서 사용되는 용어는 전술한 바와 같다.

[0092] 본 발명의 식품 조성물은 쌀 가공 식품, 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강기능식품 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당 업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.

[0093] 예를 들면, 쌀 가공 식품은 떡·면류(떡, 떡국떡, 떡볶이떡, 국수, 라면, 국수, 생면, 전통 떡), 쌀과자(비스킷, 건빵, 스낵, 한과류, 쌀튀밥, 누룽지), 쌀가루(생미분, 알파 미분, 습식미분), 주류(탁약주, 소주, 맥주, 청주), 조미 식품(엿류, 장류, 식초) 및 기타쌀 가공제품(죽류, 식혜, 스낵 부원료, 꼬치류, 선식류, 쌀음료, 쌀빵, 가공쌀밥)을 본 발명에서 제공하는 형질전환 식물체 또는 이의 종자를 가공하여 제조할 수 있다.

[0094] 본 발명에서 “건강 기능(성) 식품(functional food)”이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.

[0095] 본 발명의 식품 조성물에서 포함할 수 있는 필수 성분으로 상기 형질전환 식물체, 이의 종자 또는 이의 추출물 외에는 다른 성분에는 특별히 제한이 없으며, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약추출물, 식품 보조 첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 또한, 상기 식품 보조 첨가제는 당 업계에 통상적인 식품 보조 첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충진제, 안정화제 등을 포함한다.

[0096] 본 발명의 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없거나, 휴대성이 뛰어나다는 장점을 가질 수 있다.

[0097] 본 발명의 식품 조성물에 포함될 수 있는 형질전환 식물체, 이의 종자 또는 이의 추출물의 함유량은 예를 들어, 최종적으로 제조된 식품 중 0.01 내지 95중량%일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0099] 본 발명의 *OsPSY1*의 5'UTR 변이체인 ASV2는 빛 조건에 관계없이 유전자를 강하게 발현할 수 있는 바, 이를 유전자 활성 증진에 이용할 수 있고 최근 각광받고 있는 유전자교정 기술 등을 이용하여 원하는 물질의 생산이 증진된 기능성 작물 개발에 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0101] 도 1은 *OsPSY1*(*Oryza sativa* 유래 *PSY1*(phytoene synthase 1)) 발현에 대한 5'UTR(5' untranslated region, 5'-UTR)의 효과를 평가하기 위한 벡터 모식도이다.

도 2는 밝거나 어두운 조건의 벼 원형질체에서 GFP(green fluorescent protein)로 표지된 *OsPsy1* 변이체의 일시적인 발현을 나타낸 도이다.

도 3은 밝거나 어두운 조건의 묘목에서 각 변이체의 발현 수준을 비교한 도이다. (A) 전사 수준 및 (B) 번역 수준.

도 4는 *OsPsy1* 유전자의 5'UTR 영역 서열 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0102] 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.

[0104] **실시예 1. *OsPSY1*(*Oryza sativa* 유래 *PSY1*(*phytoene synthase 1*))에 대한 5'UTR(5' untranslated region, 5'-UTR)의 생물 정보학 분석 및 5'UTR 변이체 설계**

[0105] 도 1a에서 보는 바와 같이 5'UTR, 6 개의 엑손, 5 개의 인트론으로 구성된 *OsPSY1*의 게놈 구조는 *ZmPSY1_y*(*Zea mays* 유래 *PSY1*)과 *AtPSY*(*Arabidopsis thaliana* 유래 *PSY*)에 매우 잘 보존되어 있다. *OsPSY1*의 5'UTR에 있는 2 개의 대체 스플라이싱 변이체(alternative splicing variants, ASV)는 *AtPSY*에서 유사하게 발견되며 벼 유전자의 RNA seq 데이터베이스를 사용한 생물 정보학 분석을 통해 식별되었다.

[0106] 5'UTR에서 *ZmPSY1_y* 또는 *AtPSY*로 *OsPSY1*의 이러한 게놈 구조적 보존을 기반으로 한 *OsPSY1*의 5'UTR 매개 조절 가능성을 조사하기 위해 fUTR(5 'UTR 전장, 565 nt, 서열번호 1), ASV1(긴 길이의 5'UTR, 277 nt, 서열번호 3), ASV2(짧은 길이의 5 'UTR, 79 nt, 서열번호 2) 및 nUTR(5'UTR 없음, 0 nt, 서열번호 4)은 uE1(ASV1의 5'UTR 내 엑손 1, 222 nt, 서열번호 6) 및 uE1'(ASV2의 5'UTR 내 엑손 1, 24 nt, 서열번호 7)의 2 개의 업스트림 엑손 1과 uE2(ASV1 및 ASV2의 엑손 2, 55 nt, 서열번호 8)의 1개의 업스트림 엑손 2의 조합에 따라 구성되었다(도 1b).

[0107] 구체적으로, *OsPsy1* 프로모터 서열(OsPSY1pro(OsPSY1-P), AUG 시작 코돈의 A [+1]에 대해 -3065 ~ -566, 서열번호 4) 및 5'UTR 서열(UTR, -565 ~ -1, 서열번호 1)은 벼 게놈 DNA에서 PCR을 이용하여 증폭하였다. 서로 다른 엑손 및 인트론을 포함하는 변이체의 서열을 프로모터, 5'UTR 서열, 프라이머 세트 및 Phusion® High-Fidelity DNA 폴리머라제(NEB, Ipswich, MA, USA)를 사용한 중첩 연장 PCR(overlap extension PCR)을 사용하여 생성하였다. ASV1은 -565 ~ -344 및 -55 ~ -1(서열번호 3), ASV2는 -218 ~ -195 및 -55 ~ -1(서열번호 2) 서열로 각각 구성되었다. In-Fusion® HD EcoDry쩨 클로닝 키트(Takara Bio USA, CA, USA)를 사용하여 *OsPsy1*pro 단독(nUTR) 또는 fUTR, ASV1 및 ASV2와 융합된 *OsPsy1*pro을 eGFP(green fluorescent protein) 유전자를 포함하는 벡터 백본 pGA3651(Kim et al., Cloning Vectors for Rice. J Plant Biol 52(1): 73, 2009)에 클로닝하였다. HindIII 및 KpnI(NEB)를 사용하여 pGA3651의 Ubi 프로모터를 제거하였다. 여기에서 사용된 프라이머는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0109]

서열번호	프라이머	서열(5'-> 3')
9	GFP-Fw	GGCCAGTGCCAAGCTGAGGATATTCGCTGTGTCTTTCTCC
10	GFP-Rv	TAACACTAGTGGATCTATTATACTGGATGGGATCAATCGC
11	ASV1-Fw	AAGCTAGCTAGAGTGATAAGAGCTAGCTACCTTGCAGATCGATCTC
12	ASV1-Rv	TCGATCTGCAAGGTAGCTAGCTCTTATCACTCTAGCTAGC
13	ASV2-Fw	ACACAGCACACACGCCCCGCTATTCTAGCTACCTTGCAGATCGA
14	ASV2-Rv	AATAGCGGGGCGTGTGTGCTGTGTGCTCTAGAGAGGGAGGGAGG
15	nUTR-Fw	GGCCAGTGCCAAGCTGAGGATATTCGCTGTGTCTTTCTCC
16	nUTR-Rv	TAACACTAGTGGATCGCTCTAGAGAGGGAGGGAGGG

[0111] 동일한 OsPSY1 프로모터의 조절 하에 이들 4 개의 5'UTR 변이체를 각각 eGFP 코딩 서열에 융합하고 벼 원형질체(protoplast)에 운반체를 삽입시켜 eGFP 발현에 대한 효과를 비교하였다.

[0113] **실시예 2. 녹화 및 황화(etiolated) 묘목(seedlings)의 벼 원형질체에서 *OsPSY1*의 5 'UTR 변이체에 의한 녹색 형광 확인**

[0114] *OsPSY1*의 5'UTR 변이체가 녹색 조직의 빛 의존적 발현에서 뿌리와 배유를 포함한 비녹색 조직에서도 구성적 발현으로 조직 특이성이 변할 수 있는지를 확인하기 위해, 동일한 *OsPSY1* 프로모터 조절 하에 있는 fUTR, ASV1, ASV2 및 nUTR의 개별 eGFP 벡터를 형질감염 대조군으로 구성적으로 발현된 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, RFP) 벡터와 함께 밝고 어두운 조건을 나타내는 녹화 및 황화 벼 원형질체로 공동 형질감염시켰다.

[0115] 구체적으로, 종자를 어둠 속에서 7 일 동안 28 ℃에서 배양한 후 16 시간 동안 밝거나 어두운 상태에서 각각 녹화와 황화 원형질체를 생산하였다. 원형질체는 일부 수정된 이전 방법에 따라 분리되었다(You et al., Plastoglobule-targeting competence of a putative transit peptide sequence from rice phytoene synthase 2 in plastids. Int J Mol Sci 18(1): 10.3390/ijms18010018, 2016). 구체적으로, 벼 묘목 잎집을 면도날로 0.5mm 토막으로 자른 다음 즉시 세포벽 분해를 위해 15 mL의 셀룰라제(Cellulase) R-10 및 마체로자임(Macerozyme) R-10 효소 용액(Yakult Honsha, Japan)에 침지하였다. 반응 효율을 높이기 위해 10 분 동안 진공 침투한 후 어두운 곳에서 실온에서 50 rpm으로 부드럽게 흔들면서 4 시간 동안 추가로 배양한 뒤, 30 mL W5 용액을 첨가하여 효소 반응을 중단시켰다. 70m 및 40m Falcon쩨 세포 스트레이너(BD, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하여 2회 여과한 후 세포 파편을 제거하고 원형질체 펠릿을 Mmg 버퍼(0.4 M 만니톨(mannitol), 4 mM MES(2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid), 15 mM $MgCl_2$, pH 5.8)에 현탁하였다. 황화 원형질체를 생산하기 위해 모든 실험은 빛이 차단된 것을 제외하고는 동일한 프로토콜로 수행되었다. 분리된 원형질체는 Marienfeld 혈구계(Marienfeld-Superior, Berlin, Germany)로 계수하였다.

[0116] DNA 형질감염을 위해, 동일한 부피의 40 % PEG(polyethylene glycol)-3350 용액(Sigma), 0.5M 만니톨 및 100mM $CaCl_2$을 사용하여, 5'UTR 변이체를 운반하는 5 μg의 pGA3651 및 eRFP를 포함하는 5 μg의 pGA3574를 2 x 10^6 개의 원형질체 세포에 공동 형질감염시켰다. 15 분 동안 배양 한 후 원형질체를 W5의 2배 용량과 1mL의 배양액으로 2 회 세척하고 1mL의 배양액에 재현탁한 후, 28 ℃에서 빛 조건(녹화 원형질체) 및 암 조건(황화 원형질체)에서 밤새도록 배양하였다. 원형질체 배양에 사용된 플레이트는 5 % 송아지 혈청으로 미리 코팅하였다.

[0117] 형질감염된 원형질체를 Carl Zeiss LSM800 공초점 현미경으로 관찰하고 ZEN 2.3 블루 에디션 소프트웨어(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)를 사용하여 형광 신호를 분석하였다. eGFP, 엽록소 및 eRFP 형광은 각각 488 nm 및 505-530 nm, 555 및> 650 nm, 543 및 610-700 nm의 여기 및 방출 파장으로 감지하였다.

[0118] 그 결과, fUTR은 녹화 원형질체에서 강한 형광을 나타내었으나 황화 원형질체에서는 형광을 거의 나타내지 않았다(도 2). 이것은 일반적으로 알려진 광 의존적 *OsPSY1*의 발현 양상과 유사하였다.

[0119] ASV1의 경우, 두 원형질체 모두에서 형광이 거의 관찰되지 않아 ASV1 영역(uE1)의 음성 도메인 또는/및 ASV1의 스플라이싱된 영역(uI1)의 양성 도메인의 존재를 시사하였다.

[0120] ASV2의 경우, 빛 조사 유무에 상관없이 두 원형질체에서 모두 형광을 나타내었고 발현 정도도 증가하였다. 또한, ASV2에 대해 ASV2 영역(uE1') 또는/및 스플라이싱된 영역(uI1' 이상)에서 음성 도메인의 존재를 시사하였다.

[0121] nUTR은 fUTR 대비 녹화 원형질체에서 발현이 약하게 유도되고 황화 원형질체에서 매우 약한 발현을 나타내었다.

[0122] 상기 결과를 종합하면, uE1에 음성 도메인 및 uE1'에 양성 도메인의 존재가 있을 수 있으며 ASV1 또는 ASV2에서 단독으로 eGFP 발현을 위해 주로 작용하는 것을 알 수 있다. 또한, uE1과 uE1'이 둘다 없는 fUTR과 nUTR이 모두 동일한 형광 패턴을 나타내는 결과로부터 서로 보상될 수 있음을 확인하였다. ASV2는 빛의 조건에 관계없이 두 원형질체에서 가장 강한 형광을 보였으며, ASV2가 접합될 때 빛에 반응하는 시스 액팅 요소(cis-acting elements)가 제거될 수 있음을 알 수 있다. 또한, *OsPSY1*은 5'UTR 매개 조절을 받음을 알 수 있다.

[0123] 즉, 긴 길이의 5'UTR(ASV1)에는 유전자 발현을 억제하는 서열이 포함되어 있을 가능성이 높고 이를 제거하였을 때 OsPSY1의 발현 활성이 빛 조사 유무와 상관없이 유도될 수 있음을 확인하였다. 상기 결과는 원형질체 내 GFP 발현 정도를 확인한 결과로 번역 단계에서의 유전자 발현 여부를 확인한 것이다. 이에, 5'UTR 변이체에 의한 발현 양상이 전사 수준에서의 변화인지 또는 전사 이후 수준에서의 변화인지를 확인하기 위하여 qRT-PCR 및 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0125] **실시예 3. 녹화 및 황화 벼 원형질체 간 GFP 발현에 대한 *OsPSY1*의 5'UTR 변이체의 전사 및 번역 효과**

[0126] *OsPSY1*의 5'UTR이 전사 수준에서 GFP 발현에 영향을 미치는지를 알아보기 위해 녹화 또는 황화 원형질체를 4 개의 5'UTR 변이체로 형질감염시킨 후 8 개의 RNA를 준비하고 qRT-PCR을 수행하였다.

[0127] 구체적으로, 형질감염된 원형질체(1 x 10^6 개 세포)를 펠렛화하고 즉시 액체 질소에서 냉동한 후 RNA 및 단백질

추출할 때까지 -75 ℃에서 보관하였다. 총 RNA는 RNeasy® 식물 미니 키트(Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 추출하고 첫 번째 가닥 cDNA는 mRNA 선택적 PCR 키트(AMV) (ver. 1.1, Takara Bio, Shiga, Japan)를 사용하여 합성하였다. Thunderbird쩨 SYBR® qPCR 믹스(Toyobo, Osaka, Japan)를 사용하여 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)을 수행하였다. 여기에서 사용된 프라이머는 하기 표 2와 같다.

표 2

[0129]

서열번호	프라이머	서열(5'->3')
17	eGFP-QFw	GACAAGCAGAAGAACGGCATCA
18	eGFP-QRv	GGCGGCGGTCACGAACT
19	mRFP-QFw	GCCACGAGTTCGAGATCGAG
20	mRFP-QRv	GCAGCTTCACCTTGTAGATG

[0131] CFX96™ 실시간 PCR 시스템(Bio-Rad, Foster City, CA, USA)을 사용하여 SYBR-형광 신호를 검출하고 CFX Manager™ ver 2.1(Bio-Rad)를 사용하여 정량화하였다.

[0132] 그 결과, 녹화 원형질체에서 5'UTR 변이체 간의 전사 수준에는 큰 차이가 보이지 않았으나, 황화 원형질체에서 fUTR 및 nUTR 대비 ASV1 및 ASV2의 전사 수준이 크게 증가하는 경향이 나타났다(도 3a).

[0133] 상기 결과는 5'UTR의 인트론 서열에 전사를 억제하는 효과가 있음을 암시하고 있으며 특히 빛이 없는 조건에서 이런 경향이 나타나는 것으로 보아 광 의존적 시스 조절 요소(cis-regulatory element, CRE)가 존재할 가능성을 시사한다.

[0135] 한편, *OsPSY1*의 5'UTR이 번역 수준에서 GFP 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위해 위의 동일한 원형질체에서 추출한 8 개의 단백질을 사용한 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0136] 구체적으로, 냉동된 원형질체를 Laemmli SDS-샘플버퍼(GenDEPOT, Barker, TX, USA)로 용해하여 단백질 추출물을 준비하였다. 추출물을 10 분 동안 끓인 후 4 ℃에서 원심 분리하고 10 μL의 상층액을 10 % SDS/폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gels)에 로딩하고 단백질을 분리하였다. 분리된 단백질을 Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad)을 사용하여 PVDF 막(Whatman, Kent, UK)으로 옮겼다. 항-GFP Taq 토끼 폴리클로날 항체(Abbikne, China)를 1 : 5000 희석하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 항체 결합 신호는 항 토끼 IgG(Fc) 알칼리성 포스파타제 결합 2 차 항체(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 1 : 20000으로 희석하여 디벨롭하였다. 적색 형광 단백질(RFP)을 검출하기 위한 mCherry 항체(novusBio, CO, USA)를 로딩 대조군으로 사용하였다. West-Q Femto Clean ECL Solution (GenDEPOT)과 함께 배양한 후, 면역 반응 밴드는 LAS 4000 발광 검출기(Fujifilm, Kanagawa, Japan)를 사용하여 이미지화하고 ImageJ 소프트웨어(National Institute of Health, http://rsb.info. nih.gov/ij/)로 정량화하였다.

[0137] 그 결과, 5'UTR 변이체에 의한 번역 수준은 ASV2의 발현이 ASV1에 비해 녹화 및 황화 원형질체에서 현저히 높게 나타났다(도 3b). 상기 단백질 수준은 실시예 2에서 확인한 GFP 형광 세기와 유사한 양상을 나타내지만 도 3a의 mRNA 수준과는 일치하지 않아, 5'UTR은 전사 과정에서는 *OsPSY1*이 빛 유무에 따라 조절받는데 관여하고 번역 과정에서는 빛 유무와는 관계없이 발현을 억제하는 것을 확인하였다. 이는 uE1에서 억제 및 해당 유전자 번역의 uE1'에서 자극을 위한 RNA 모티프/요소가 존재함을 시사하였다.

[0139] **실시예 4. *OsPsy1* 5'UTR의 시스 액팅 요소 분석**

[0140] *OsPSY1*의 5'UTR에서 광 반응성 시스-조절 요소(cis-regulatory elements, CRE) 특성을 확인하기 위해 CRE를 NewPLACE(https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE)를 사용하여 분석하였다.

[0141] 그 결과, 광 반응성 CRE는 도 3에서 전사 억제자와 빛 반응 CRE를 포함하는 것으로 추측되는 uI1 및 uI1' 영역의 REALPHALGLHCB21, 5 GATABOX, 2 SORLIP1AT 및 2 GT1CONSENSUS로 예측되었다. 이는 *OsPSY1*의 5'UTR 매개 전

사 조절 가능성을 뒷받침하였다.

[0142] 또한, *AtPSY*의 5'UTR에서 ASV1은 번역 억제 리보 스위치 구조를 가지는 것으로 알려져 있으나. *OsPSY1*의 ASV1에서는 리보 스위치가 발견되지 않았다(Alvarez et al., Carotenogenesis is regulated by 5'UTR-mediated translation of phytoene synthase splice variants. Plant Physiol 172(4): 2314-2326, 2016). 이는 *OsPSY1* 조절에 관련된 다른 5'UTR 매개 메커니즘의 존재를 시사하였다.

[0144] 한편, *OsPSY1*의 5'UTR에서 2개의 ASV를 예측하기 위해, RNA seq 데이터베이스를 사용하는 생물 정보학 분석을 통해 2개의 업스트림 개방 판독 프레임(upstream open reading frames, uORF)도 ASV1에서 예측되었지만 ASV2에서는 예측되지 않았다(도 4). uORF은 상류 AUG(upstream AUG, uAUG) 코돈에서 리보솜에 의한 빈번한 개시를 유발하는 연관된 mRNA ORF의 번역을 억제하는 작고 보존된 억제 요소인 바, ASV1의 uE1 내에 있는 2개의 uORF는 도 3의 GFP 형광 및 단백질 수준에서 거의 발현되지 않는 음성 조절자로서의 가능성을 가질 수 있음을 알 수 있다.

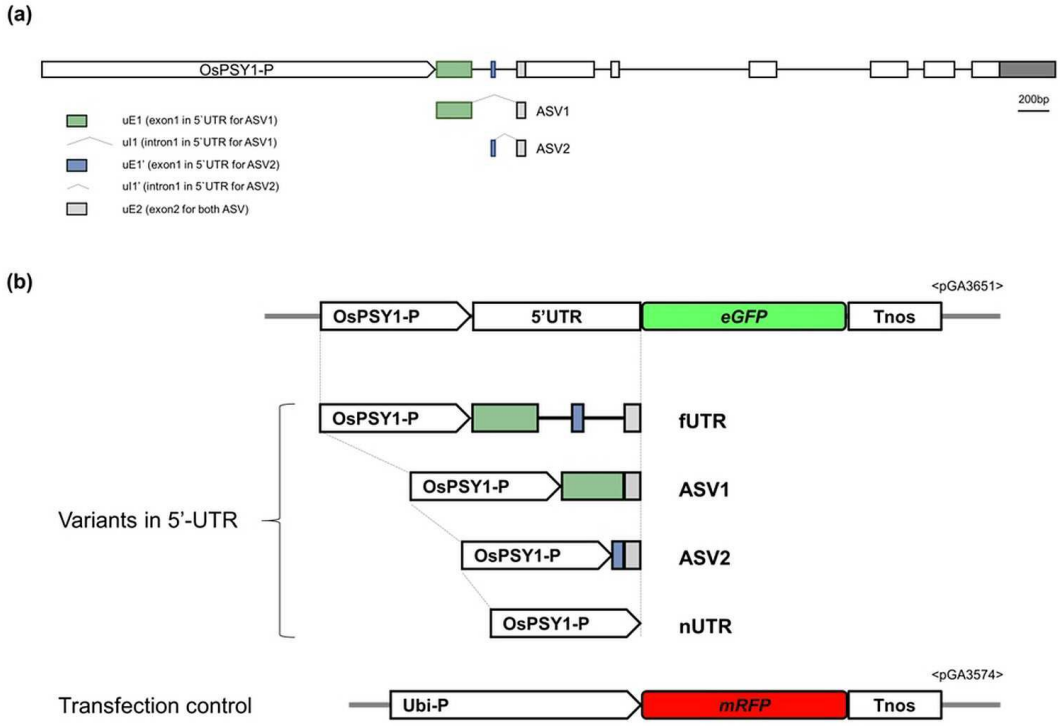
[0145] 상기 결과로부터 5'UTR 내 일부 영역(ATG 상위 -565 ~ -344) 내에 암조건 하에서 유전자의 발현을 억제할 수 있는 REALPHALGLHCB21 CRE와 유전자의 전사발현을 억제하는 2종의 uORF가 존재하는 것을 확인하였으며, 상기 *OsPsy1*의 특정 5'UTR 영역을 제거한 변이체는 광 조건하에서만 특이적으로 발현되는 유전자 발현을 빛의 유무에 상관없는 상시 발현으로 바꿀 수 있을 것으로 예측된다.

[0147] 상기 실시예의 결과로부터 *OsPsy1*의 다양한 5'UTR 변이체는 밝거나 어둡게 자란 묘목에서 파생된 두 개의 원형질체에서 차별적인 형광을 나타내었으며, *OsPSY1*의 5'UTR이 적어도 세 가지 조절자(uI1'에서의 전사를 위한 억제자, uE1에서의 번역 억제 uORF 및 uE1'에서의 번역 자극 RNA 모티프/요소)의 조합을 가짐을 알 수 있다. 음성 조절자나 광 반응 요소가 없는, 본 발명의 *OsPSY1*의 5'UTR 변이체인 ASV2는 빛 조건에 관계없이 유전자를 강하게 발현할 수 있는 바, 이를 유전자 활성 증진에 이용할 수 있고 최근 각광받고 있는 유전자교정 기술 등을 이용하여 원하는 물질의 생산이 증진된 기능성 작물 개발에 유용하게 활용할 수 있다.

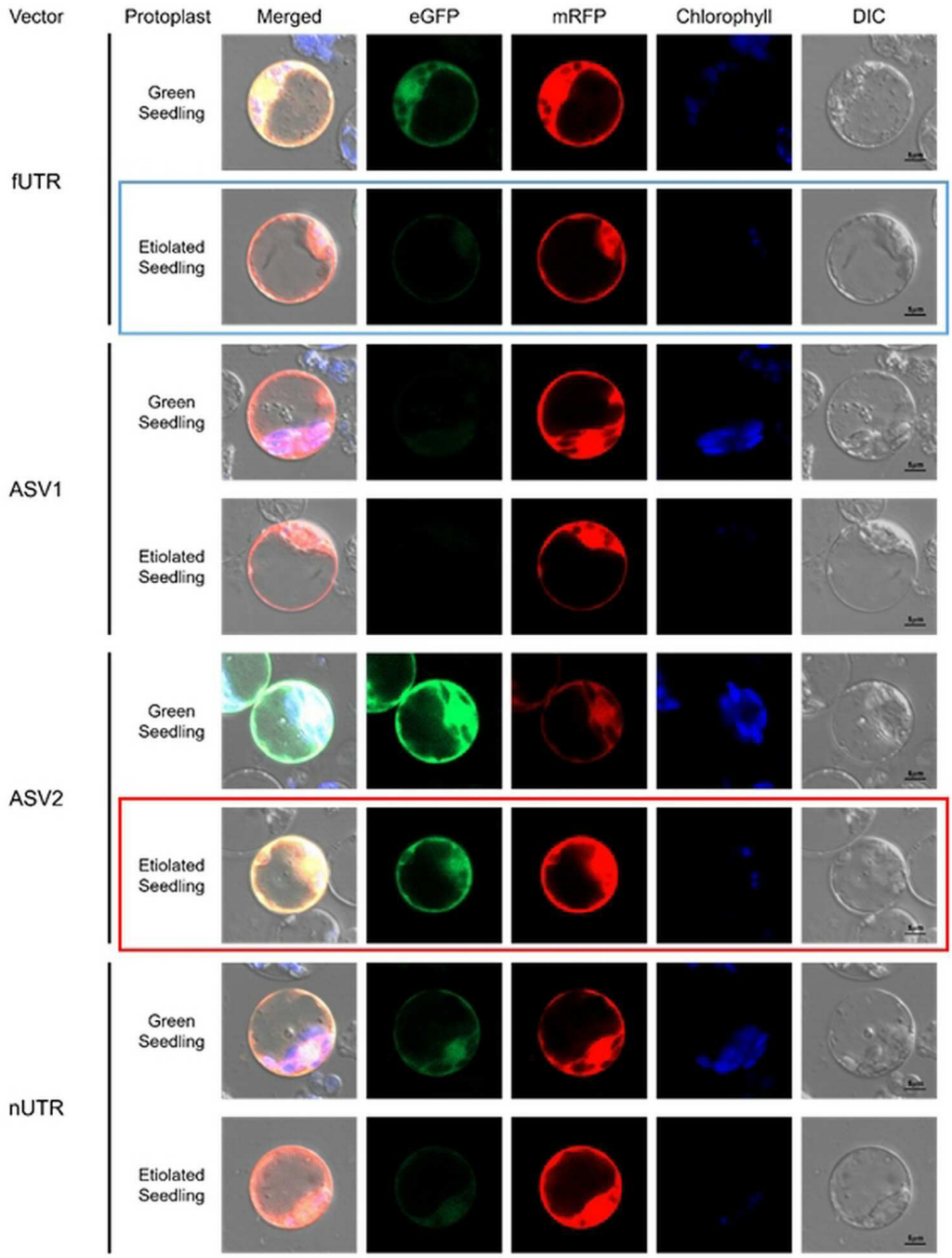
[0149] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

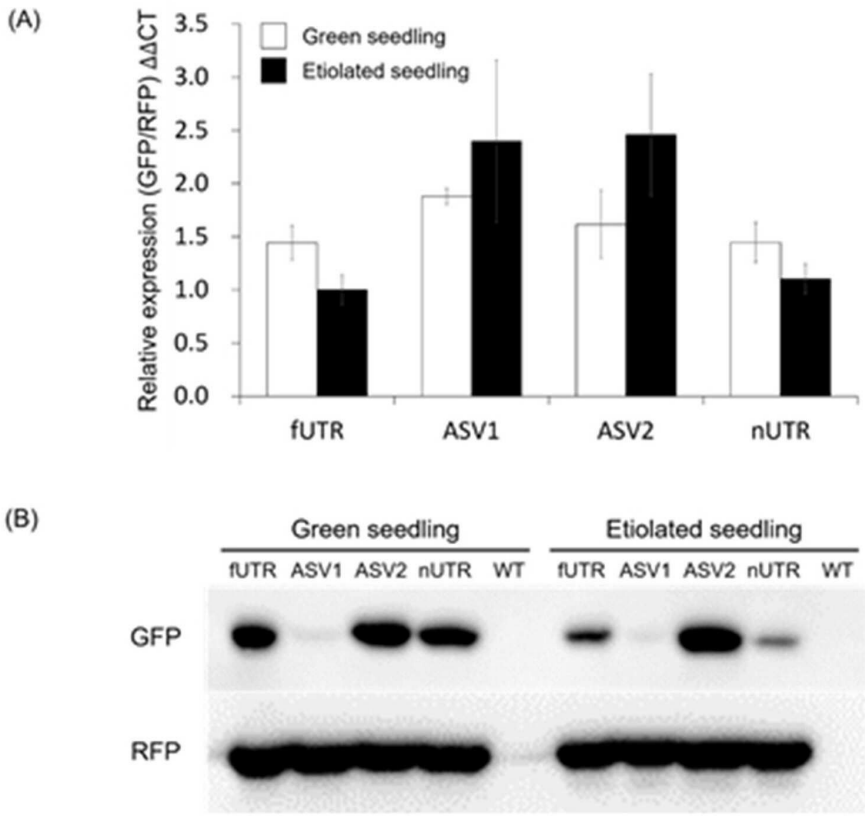
도면1


(a)
OsPSY1-P
200bp
ASV1
ASV2
uE1 (exon1 in 5'UTR for ASV1)
uI1 (intron1 in 5'UTR for ASV1)
uE1' (exon1 in 5'UTR for ASV2)
uI1' (intron1 in 5'UTR for ASV2)
uE2 (exon2 for both ASV)
(b)
<pGA3651>
OsPSY1-P
5'UTR
eGFP
Tnos
Variants in 5'-UTR
OsPSY1-P
fUTR
OsPSY1-P
ASV1
OsPSY1-P
ASV2
OsPSY1-P
nUTR
<pGA3574>
Transfection control
Ubi-P
mRFP
Tnos

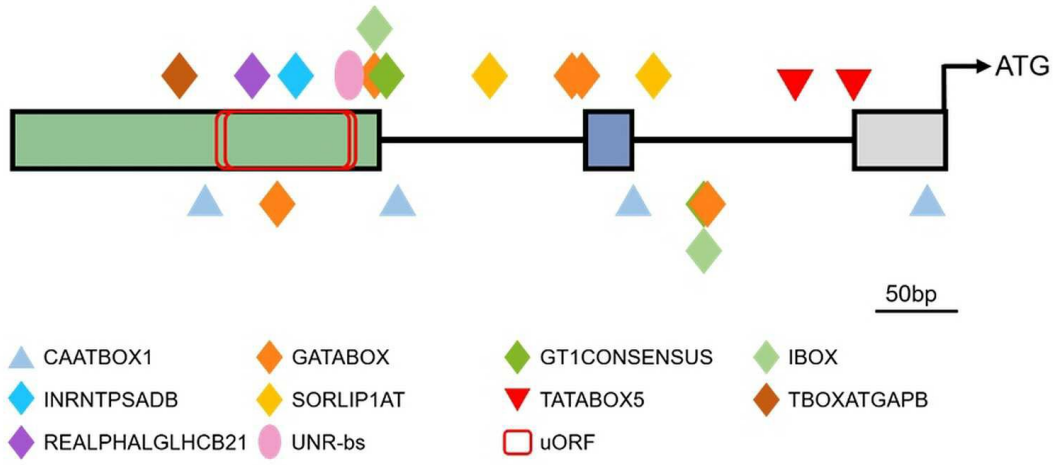
도면2


Vector
Protoplast
Merged
eGFP
mRFP
Chlorophyll
DIC
fUTR
Green Seedling
Etiolated Seedling
ASV1
Green Seedling
Etiolated Seedling
ASV2
Green Seedling
Etiolated Seedling
nUTR
Green Seedling
Etiolated Seedling

도면3



도면4



서 열 목 록

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

<120> 5`UTR sequence to edit promoter activity for constitutive expression of plant genes and use thereof

<130> KPA201674-KR

<160> 20

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 565

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fUTR (5'UTR of OsPSY1 -565~-1)

<400> 1

ctatagccat agctcatcat ccaccctctc ttccttcctt ccttccttcc ttccacacag 60

accagaccag gcatcccgac actacacgca gactctcgac tttgtcacta gcatcattgc 120

ttgatgatcg atgctgagct gcaaccaagc accagcatat cctttccttc attccttcct 180

ggtgctggta gaagaagaac aagctagcta gagtgataag aggtaattgt ttcctccaac 240

tcattccaac cttgcctttt gcctgccaaa ctcctcatcc tctgccactg cataccatac 300

gtgtgcgcgc ctgaatgcct gcctgcctgc ctgatactga tacatacaca cagcacacac 360

gccccgctat tgtaagtgcg gccaccacta gctgtgtttc tgctctctgt gtttatcacc 420

aaattaaagc aacgacactc acttggtctg tttcttttta aaatattatt tctcctcctc 480

acctcacaca tacctgcata ttatttgcag ctagctacct tgcagatcga tctccggcca 540

gcgattgatc ccatccagta taata 565

<210> 2

<211> 79

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASV2(5'UTR of OsPSY1 -218~-195, -55~-1)

<400> 2

acacagcaca cacgccccgc tattctagct accttgcaga tcgatctccg gccagcgatt 60

gatcccatcc agtataata 79

<210> 3

<211> 277

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASV1(5'UTR of OsPSY1 -565~-344, -55~-1)

<400

> 3

ctatagccat agctcatcat ccaccctctc ttccttcctt ccttccttcc ttccacacag 60

accagaccag gcatcccgac actacacgca gactctcgac tttgtcacta gcatcattgc 120

ttgatgatcg atgctgagct gcaaccaagc accagcatat cctttccttc attccttcct 180

ggtgctggta gaagaagaac aagctagcta gagtgataag agctagctac cttgcagatc 240

gatctccggc cagcgattga tcccatccag tataata 277

<210> 4

<211> 2500

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> OsPSY1pro

<400> 4

gaggatattc gctgtgtctt tctcctctca tctcaagtgg ttcggtttcc attttgaccg 60

agccatccat ttgctgaata aatgaatggt gacggctgat gccacttccc tctcctgtct 120

gcaactcatc tgtcacagtt tcagcgaaag cgagtaaaat gcaaggagca agatataaac 180

aagagtagac atttttaca gtatatacaa gattcataac cgcattttcc ccatatctat 240

atatacagtc gtcgataaat tctacaggta cgttcaaata gaacgagaag aaggagcaga 300

acagtatata tacgcgtacg gtaggaagag ggtatgcacg tcaaaagaag attgaagaag 360

aggaatgcat tgcaggcaga gtgcagtgca gtctccatcg catgtatatt cagatgcaat 420

gtattccggc ggcttgctaa ggctagtcca cgctagtata tatgatgaac tgaacttgtt 480

ctattgacgt gcactgcaac agtgcaagta ctctaataag ctttagctac cactgctact 540

actagtcagc aaatcaaaga gtcttccaaa aaaaaaaaag ggtcagcaaa tcaaagggaa 600

acacaaacgc caagtcctac acgtcttgag ttgctgcacg ctgtttttcc tcgccttctt 660

tgctccacca cacaatgctg ctactgctag tcctgtttct ggtgcaccca gccacccctg 720

cccacaccta tagaaaacca tgcatgtctt acatgatcat gataacttta aacgatgtat 780

tttttataaa aaaaattcta tctacaaaaa ttttctatag gaaagttgct ttgaaaaatc 840

atattaatct atttttaaaa tttaaaatag ttaatactca attaatcatg cactaatggc 900

tcacttcgtt ttgtgtatct ttctaatctt ctcaatcccc ttctccccaa agtcagtctt 960

acatgattga gagagaagag tgacattatg caacacacta gtcttgctca gtagtaggct 1020

catactggca ggtggcaccg ttccatatcc tgcaaaatta tactccctcc atttttaat 1080

agatgacgcc gttgactttt tctcgcatgt ttgaccattc gtcttattca aaaattttat 1140

gcaaatgtat aagatataaa tcacacttaa agtactatga gtgataaaaa aactcataag 1200

aaaataaatt ataattacat aaatttttg aatgagacga atggtcaaac atgtgagaaa 1260

aaaatcaacg gcatcatcta tttaaaaaac ggaggtagta tatatactac ttatgtcaca 1320

aaataacttc aattttatac ataattctct ggagtatttc agaaaatacc ctaaaaaaca 1380

aactacgtac tccctccgtc ctataaaaaa ccaacctaat actaaatatg acacatccta 1440

atattataaa tttagacata cctctatcca gattcattgc actagaatat atcacatcta 1500

gtaatagatt cgttttttt ttggaacgga aggagtatga gttatgacca gtaagcagca 1560

ctgactctct caacgataaa ctcaacagta tgtaactgaa gggatcagta cttgagatga 1620

aaaagaaaca aggacagagt agtaaaatca ggctaccatc catttagggc atgtttggag 1680

cagagtataa aacatgtgaa taacacagga aacaaaactt aggaatttgt ttgtattgaa 1740

aaacacagca aattaatgtg tatgaacaaa agtaataaca aaacacctga atcatttttc 1800

tcgtatcatg tcccttgtga tctttattac ttctacttcg attccactgg tataaacaga 1860

ttttcgtttt tgacattggt atggtattca gatagaatac agcttcaata attaatttat 1920

attgtactaa tatgtttgta aagaacttgg tccaaaaaaa atgtgtttgt aaaaacataa 1980

cgaacatata atacttttca aggtaaatct atgcatatgt attgtatgca tctaacatta 2040

atattttagt ataaataaaa atgtgatgta tgtattatta taaaacctgc aatttgaaaa 2100

aaaagagaga gagagagata cccaaaacaa aaaaagaaaa ctagtgaaaa atgctacaac 2160

taaaagaaga cttttcctta ggccactata gaaggttttc tatcacctgt cctccttggt 2220

ccaactatgt cgagaatcga tgaagagcgg gcccagcgtc accaaacggg tgtatggtgt 2280

gtattcttct cctccaaagt tgcaatcttg cctctgtgtg tgtggtactg tagcggtgct 2340

ctttctttgg tgggtgccac gtaggagaaa cccagcagga gtcatttcca agtgtcacca 2400

gtgagagggc aggagggcat gtgagttggc gataacccta tcctcctcct gtcctggccc 2460

ttgtcttctc cacgtctctc cctccctccc tctctagagc 2500

<210> 5

<211> 222

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5'UTR of OsPSY1(-565~-344)

<400> 5

ctatagccat agctcatcat ccaccctctc ttccttcctt ccttccttcc ttccacacag 60

accagaccag gcatcccgac actacacgca gactctcgac tttgtcacta gcatcattgc 120

ttgatgatcg atgctgagct gcaaccaagc accagcatat cctttccttc attccttcct 180

ggtgctggta gaagaagaac aagctagcta gagtgataag ag 222

<210> 6

<211> 222

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> uE1(-565~-344)

<400> 6

ctatagccat agctcatcat ccaccctctc ttccttcctt ccttccttcc ttccacacag 60

accagaccag gcatcccgac actacacgca gactctcgac tttgtcacta gcatcattgc 120

ttgatgatcg atgctgagct gcaaccaagc accagcatat cctttccttc attccttcct 180

ggtgctggta gaagaagaac aagctagcta gagtgataag ag 222

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> uE1'(-218~-195)

<400> 7

acacagcaca cacgccccgc tatt 24

<210> 8

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> uE2(-55~-1)

<400> 8

ctagctacct tgcagatcga tctccggcca gcgattgatc ccatccagta taata 55

<210> 9

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFP-Fw

<400> 9

ggccagtgcc aagctgagga tattcgctgt gtctttctcc 40

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFP-Rv

<400> 10

taacactagt ggatctatta tactggatgg gatcaatcgc 40

<210> 11

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASV1-Fw

<400> 11

aagctagcta gagtgataag agctagctac cttgcagatc gatctc 46

<210> 12

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASV1-Rv

<400> 12

tcgatctgca aggtagctag ctcttatcac tctagctagc 40

<210> 13

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASV2-Fw

<400> 13

acacagcaca cacgccccgc tattctagct accttgcaga tcga 44

<210> 14

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ASV2-Rv

<400> 14

aatagcgggg cgtgtgtgct gtgtgctcta gagagggagg gagg 44

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nUTR-Fw

<400> 15

ggccagtgcc aagctgagga tattcgctgt gtctttctcc 40

<210> 16

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nUTR-Rv

<400> 16

taacactagt ggatcgctct agagagggag ggaggg 36

<210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> eGFP-QFw

<400> 17

gacaagcaga agaacggcat ca 22

<210> 18

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> eGFP-QRv

<400> 18

ggcggcggtc acgaact 17

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mRFP-QFw

<400> 19

gccacgagtt cgagatcgag 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mRFP-QRv

<400> 20

gcagcttcac cttgtagatg 20