



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0030354
(43) 공개일자 2018년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/415 (2006.01) A01H 5/12 (2018.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
A01H 5/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0118223
(22) 출원일자 2016년09월13일
심사청구일자 2016년09월13일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
박영두
경기도 용인시 수지구 성북2로 220 305동 1404호
(성북동, 버들치마을성북힐스테이트3차)
이기호
부산광역시 금정구 금강로 225번길 벽산블루밍 디자인시티 203동 504호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 내건성 단백질 BrDST28, 상기 단백질을 코딩하는 유전자 및 상기 유전자로 형질전환된 식물체

(57) 요약

본 발명은 내건성 단백질 BrDST28, 상기 단백질을 코딩하는 유전자 및 상기 유전자로 형질전환된 식물체에 관한 것이다.

본 발명의 BrDST28(*Brassica rapa* drought stress Tolerance 28) 유전자는 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성에 관여를 하며, 이를 과발현시킨 형질전환 식물체는 지구 온난화 등에 의한 기후조건 변화로 야기된 건조 스트레스에 대한 내성이 탁월하여 건조한 경작 조건에 적응성이 뛰어난 신기능 작물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

C12N 15/8273 (2013.01)

(72) 발명자

박지수

경기도 성남시 분당구 정자로 144 406동 2102호

유재경

경기도 수원시 영통구 광교중앙로 247 휴먼시아아파트 3201동 2005호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ011016

부처명 농촌진흥청 국립농업과학원

연구관리전문기관 농생물계놈활용연구사업단

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 배추의 체세포영양계변이에 따른 비의도적 유전체 변형 원인과 기작 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 내건성 단백질 BrDST28(*Brassica rapa* drought stress Tolerance 28).

청구항 2

제1항의 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 2의 염기서열을 가지는 것인, 유전자.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 유전자는 배추(*Brassica rapa*) 유래의 것인, 유전자.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 유전자는 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) 유래의 것인, 유전자.

청구항 6

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항의 유전자를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 7

제6항의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 또는 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 또는 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 또는 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 또는 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 또는 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 또는 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 9

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항의 유전자를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 식물체의 내건성을 향상시키는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 내건성 단백질 BrDST28, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자로 형질전환된 식물체 및 상기 유전자를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 식물체의 내건성을 향상시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 식물체의 생장은 건조 스트레스에 매우 큰 영향을 받는다. 그러므로 식물체들은 생존을 위해 건조 스트레스에

적응해야 한다. 건조 스트레스는 식물 잎의 세포 내 기공의 폐쇄에 관여하는 앱시스산 호르몬(abscisic acid, ABA)의 생산을 촉진하는데, 이에 대한 연구가 많이 진행되어 ABA-responsive element binding protein 1(AREB1)/ABA-responsive element(ABRE)-binding factor 2(ABF2), dehydration-responsive element(DRE)-binding protein 2A(DREB2A), receptor-like kinase 1(RPK1), SNF1-related protein kinase 2C(SRK2C), calcium-dependent protein kinases(CDPKs) CPK3과 CPK6 등이 중요한 시그널로 작용됨이 밝혀져 있다. 또한 건조 스트레스는 식물체 내에서 다양한 생화학적·생리적 반응을 유발한다. 건조 스트레스 발생 시 식물들은 제각각 당류(sucrose, trehalose, sorbitol 등), 당알콜(mannitol 등), 아미노산류(proline 등), 아민류(glycine betaine, polyamine류 등)들을 축적한다. 이들 대사물질들은 식물체가 건조 스트레스에 내성을 지니는데 도움을 줄 수 있는 삼투질(osmolyte), 항산화물질(antioxidant), 스캐빈저(scavenger)로서 작용하는 것으로 밝혀져 있다.

[0003] 그러나, 많은 식물들은 건조 스트레스에 내성을 가질 수 있는 특수 대사물질들을 합성하는 능력이 부족하여 생장 및 생존의 위협을 받고 있다. 건조 스트레스 관련 대사기작 내 물질들에 관계된 유전자들을 이용한 유전공학 연구는 건조 스트레스 저항성 형질전환 식물체들을 개발하는데 있어 매우 유용한 방법이며, 유전공학 기법으로 개발된 많은 형질전환 식물들이 건조 스트레스에 대한 내성이 증진되었다는 보고들이 있다. 그리고 지금까지 다양한 작물에서 다양한 저항성 유전자들이 발견되고 있으며 그 발현 네트워크에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다.

[0004] 예를 들어, 옥수수에서는 NPK1(tobacco MAPKKK), ZmNF-YB2(maize nuclear factor YB2), ZmPLC1(phospholipase C1), TsVP(vacuolar-H⁺-pyrophosphatase)가 벼에서는 HVA1(barley group 3 LEA protein), Dadc(Daturastramonium arginine decarboxylase), ABF3(*Arabidopsis* ABRE-binding factor 3), DREB1A(*Arabidopsis* DREbinding protein 1), MnSOD(pea Mn superoxide dismutase), SNAC1(rice stress responsive NAC1), OsDREB1(rice DRE-binding protein 1), HvCBF4(barley C-repeat binding factor), OsCIPK12(rice calcineurin B-like protein-interacting protein kinase 12), ZFP252(rice TFIIIA-type zinc finger protein) 등이 있다.

[0005] 한편, 배추는 김치의 주재료로서 한국의 4대 채소 가운데 하나이며 유채속(*Brassica*)에 포함되어 있다. 유채속(*Brassica*)에는 유채, 겨자 등 산업적 경제성이 우수한 작물이 포함되어 있어 외국에서도 중요한 작물이다. 유채속(*Brassica*) 작물은 건조 환경에 의한 피해에 민감하며, 이로 인한 생육장애로 수확량이 감소되어 농가와 소비자에게 막대한 피해를 줄 수 있다.

[0006] 이같이 건조 환경에 의한 농업생산성 저하는 심각한 수준으로 이러한 환경에 내성을 갖는 우량 품종의 개발이 식량자원의 안정적 확보에 매우 시급하게 필요한 실정이다.

[0007] 한편, 본 발명과 관련된 선행기술문헌으로는 ‘내건성 및 당 독성에 대한 내성을 증가시키는 활성을 갖는 배추 유래 UGE1 유전자 및 이의 용도’에 관한 대한민국 공개특허 제2014-0050413호(특허문헌 1)가 개시되어 있으나, 상기 특허문헌 1은 BrDST28을 이용하는 것에 관한 내용에 대하여는 어떠한 개시 또는 암시조차 되어 있지 않다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 식물체의 내건성을 향상시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 연구 노력한 결과, 서열번호 2의 염기서열을 갖는 유전자가 상술한 식물체의 형질에 관여를 하고 이 유전자를 식물체에 형질전환하는 경우, 식물체의 내건성을 증진시킬 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 대한민국 공개특허 제2014-0050413호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 주된 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 내건성 단백질 BrDST28(*Brassica rapa* drought

stress Tolerance 28)을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명 다른 목적은 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체를 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유전자의 발현을 증가시켜 식물체의 내건성을 향상시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명자들은 식물체의 내건성을 향상시킬 수 있는 유전자 및 단백질을 발굴하고자 예의 연구 노력한 결과, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 단백질 및 상기 단백질을 코딩하는 유전자가 식물체의 건조 스트레스에 관여를 하고 이 유전자를 식물체에 형질전환하여 과발현시키는 경우, 식물체의 건조 스트레스 저항성을 증진시킬 수 있음을 확인하였다.

[0016] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 내건성 단백질 BrDST28(*Brassica rapa* drought stress Tolerance 28)을 제공한다.

[0017] 본 발명에서 상기 단백질은 첨부한 서열목록에 기재된 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 단백질에 한정되지 않으며, 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 내건성 단백질과 기능적 동등물일 수 있다. 상기 "기능적 동등물"이란, 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60%, 구체적으로는 70%, 보다 구체적으로는 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로서 본 발명의 BrDST28과 실질적으로 동질의 활성을 나타내는 단백질을 의미한다.

[0018] 상기 기능적 동등물에는, 예를 들어, 서열번호 1의 아미노산 서열의 아미노산 중 일부가 치환되거나, 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함된다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황 함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 본 발명의 BrDST28의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다. 또한 상기 기능적 동등물의 범위에는 BrDST28의 기본 골격 및 이의 생리활성을 유지하면서 단백질의 일부 화학 구조가 변형된 단백질 유도체도 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 단백질의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경 및 생리활성을 유지하면서 GFP(Green Fluorescent Protein)와 같은 다른 단백질과 융합으로 만들어진 융합 단백질 등이 이에 포함된다.

[0019] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0020] 본 발명에서 용어 “상기 단백질을 코딩하는 유전자”는 상기 단백질의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 가진 유전자를 의미한다. 보다 상세하게, 상기 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 내건성 관련 단백질을 코딩하는 유전자로, 서열번호 2의 염기서열을 가지는 BrDST28(*Brassica rapa* drought stress Tolerance 28) 유전자이며, 배추(*Brassica rapa*)에서 유래되었고, 구체적으로는 내훈계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)에서 유래되었다. 또한 식물체에 건조 스트레스를 가할 경우 BrDST28 유전자의 발현이 증가하며, 상기 유전자의 발현을 증가시킬 경우 이러한 건조 스트레스들에 대한 내성이 증가함을 확인되어, 상기 유전자는 식물체의 내건성에 관여함을 확인하였다.

[0021] 상기 BrDST28 유전자는 서열번호 2의 염기서열에 한정되지 않으며, 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈, 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 염기서열을 포함한다. 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 이용되는 염기서열은 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 구체적으로는 70%의 상동성, 보다 더 구체적으로는 80%의 상동성, 가장 구체적으로는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 따르면, 먼저 배추 유래 신규 내건성 관련 유전자를 동정하기 위해 "*Brassica rapa* EST and Microarray Database"를 활용하여, KBGP-24K oligo chip에서의 483bp ORF(Open Reading Frame)와 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 상동성을 가지는 cDNA 염기서열(AT2G28400)을 바탕으로 한 쌍의 프라이머를 제작

하였다. 이 후, 내흔계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis* inbred line "CT001")에서 총 RNA를 분리하였으며, 상기 확보된 RNA를 주형으로 oligo dT primer와 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤, 상기 실시예 1에서 얻은 프라이머를 이용하여 483bp의 PCR 산물을 얻었으며, 이를 염기서열 분석용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 재조합 벡터를 구축하였다. 이후, 삽입된 483bp의 PCR 산물의 유전자 서열을 분석하기 위하여, 삽입된 자리에 근접한 T7 및 SP6 프라이머를 이용하여 염기서열을 조사하였으며, 염기서열 분석은 GenBank BLAST program을 사용하여 분석하였다. 확인된 염기서열을 바탕으로 시작 코돈(codon)과 종료 코돈을 결정하여 아미노산 서열을 결정한 후, 그것을 배추로부터 분리된 전장(full length)의 내건성 유전자 BrDST28(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 28)로 명명하였다.

[0023] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 BrDST28(*Brassica rapa* drought stress Tolerance 28) 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0024] 본 발명에서 상기 재조합 벡터는 형질전환용 재조합 벡터를 포함한다.

[0025] 본 발명에서 "형질전환용 재조합 벡터"란 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물로, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함한 통상의 모든 벡터를 포함한다.

[0026] 본 발명의 "형질전환용 재조합 벡터"는 상기 BrDST28(*Brassica rapa* drought stress Tolerance 28) 유전자가 발현될 수 있도록, 발현조절 서열과 기능적으로 연결되어 있다. 예를 들어, 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시 코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 또한, 벡터는 선택성 마커를 포함할 수 있으며, 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다. 본 발명의 벡터는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용한다.

[0027] 상기 본 발명의 BrDST28 유전자를 삽입할 수 있는 벡터로는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118, pUC119, pET30a, pET30c 및 pGEX-GST), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5), 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 및 Ti 플라스미드 등이 있고, 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 백시니아 바이러스와 같은 동물 바이러스, 배콜로바이러스와 같은 곤충 바이러스 및 식물 바이러스가 사용될 수 있으며, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이너리 벡터를 사용할 수 있다. 당업자라면 본 발명의 BrDST28 유전자를 도입시키는데 적합한 벡터를 선택할 수 있으며, 본 발명에서는 상기 유전자를 숙주 세포내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있다. 그러나 바람직하게는 단백질 발현 유도 및 발현된 단백질의 분리가 용이하도록 디자인된 벡터를 사용할 수 있고, 보다 바람직하게는 pGEM-T, pGEX 4T-1, pCAMBIA1300 벡터를 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명의 상기 재조합 벡터는 내건성을 증진시키는 재조합 벡터일 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 실시예에서는, 내흔계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis* inbred line "CT001")에서 분리된 총 RNA를 주형으로 cDNA를 합성하고, 실시예 1의 프라이머를 이용하여 상기 cDNA로부터 483bp의 PCR 산물을 획득한 후, 이를 염기서열 분석용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 재조합 벡터를 구축하였다(실시예 1 내지 3). 이후, 상기 삽입된 483bp의 PCR 산물의 유전자 서열을 분석하여 서열번호 2의 염기서열과 서열번호 1의 아미노산 서열을 결정하여 내건성 관련 유전자 BrDST28(*Brassica rapa* drought stress Tolerance 28)로 명명하였다(실험예 3).

[0030] 또한, 본 발명의 일실험예에 따르면, 상기 BrDST28(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 28) 유전자가 건조 스트레스와 관련이 있는지를 확인하기 위하여, 분리한 BrDST28 유전자를 과발현시키기 위한 형질전환용 과발현 재조합 벡터와 상기 유전자를 발현 억제시키기 위한 형질전환용 발현억제 재조합 벡터를 제작하였다. 구체적으로, 상기 유전자를 과발현시키기 위한 형질전환용 재조합 벡터는, pCAMBIA3301(Cambia, Australia)에 483bp의 BrDST28 유전자를 삽입하여 형질전환용 과발현 벡터인 p280를 제작하였고, 상기 유전자의 발현을 억제시키기 위한 형질전환용 발현억제 재조합 벡터는, 상기 pCAMBIA3301(Cambia, Australia)를 응용한 벡터에 318bp의 BrDST28 유전자의 RNAi 절편을 삽입하여 형질전환용 발현억제 벡터인 p28D를 제작하였다(실험예 4). 아울러, 이를 대상으로 실제 건조 스트레스를 유발한 결과, BrDST28 유전자가 과발현된 형질전환체는 모두 건조 스트레스 처리 전과 동일한 모습을 유지하여 표현형상의 뚜렷한 차이를 보이지 않음을 확인하였다(실험예 7).

[0031] 상기의 결과를 통해, BrDST28 유전자가 식물체의 건조 스트레스에 관여하며, 이 유전자의 발현이 증가하도록 식

물체를 형질전환시키는 경우, 식물체의 건조 스트레스 저항성이 증진됨을 확인할 수 있었다.

- [0032] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [0033] 발명에서 용어 "형질전환"은, 유전물질인 DNA를 다른 계통의 살아 있는 세포에 주입했을 때, DNA가 그 세포에 들어가 유전형질(遺傳形質)을 변화시키는 현상으로, 형질변환, 형전환, 또는 형변환 이라고도 한다.
- [0034] 본 발명에서 상기 벡터로 식물체를 "형질전환"하는 것은 당업자에게 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로는, 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법, 미세사출법(microprojectile bombardment), 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), 및 아그로박테리아 분사법(*Agrobacterium* spraying method)을 이용할 수 있으며, 더 구체적으로는 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법을 이용할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 용어 "식물체"는, 성숙한 식물체뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다.
- [0036] 본 발명에서 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 또는 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 또는 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 또는 유채를 포함하는 특용작물류; 사과 나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 또는 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 또는 튜립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 또는 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나이며, 구체적으로는 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 또는 유채를 포함하는 특용작물류이며, 더욱 구체적으로는 담배이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 본 발명에서 상기 식물체는 BrDST28 유전자 또는 이의 단백질을 발현하므로, 상기 BrDST28 유전자를 도입함으로써 식물체에 존재하는 BrDST28의 발현을 증진시킬 수 있다.
- [0038] 본 발명의 일실험예에 따르면, 실험예 5에서 배추의 BrDST28 유전자가 과발현된 담배 및 상기 유전자의 발현이 억제된 담배의 형질전환체를 제작하기 위하여 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*)을 사용하여, 담배의 형질전환체를 제작하였으며, 실험예 6에서 형질전환체로 확인된 과발현 벡터로 생산된 8개체 및 발현억제 벡터로 생산된 4개체를 대상으로, 실제 건조 스트레스 발생 시 표현형의 변화(내건성 여부)를 자연건조 처리 조건에서 관찰한 결과, 건조 처리 20일째가 되었을 때 대조군인 비형질전환체 담배와 BrDST28 유전자가 발현억제된 형질전환체 담배는 잎과 줄기의 탄력을 잃어 힘없이 쓰러졌으며, 염색이 점차 연해지고 더 이상 생장하지 못하는 모습을 보였으나, BrDST28 유전자가 과발현된 형질전환체 5개체는 모두 건조 스트레스 처리 전과 동일한 모습을 유지하여 표현형상의 뚜렷한 차이를 보이지 않음을 확인하여(실험예 7), 상기 BrDST28(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 28) 유전자가 식물체의 건조 스트레스에 관여하며, 이 유전자의 발현이 증진되도록 식물체에 형질전환시킨 경우, 식물체의 건조 스트레스 저항성을 증진시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0039] 상기의 결과를 통해, 본 발명에 의해 형질전환된 식물체는 건조 스트레스와 관련된 BrDST28 유전자의 세포 내 발현 수준을 증진할 수 있어서, 상기 식물체는 지구 온난화 등에 의한 기후조건 변화로 야기된 경작지의 건조 스트레스에 대한 내성이 탁월하여 건조한 경작 조건에 적응성이 뛰어난 신기능 작물로 유용하게 이용될 수 있음을 확인할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 유전자를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 식물체의 내건성을 향상시키는 방법을 제공한다.
- [0041] 본 발명에서 용어 "유전자를 식물체에 도입하는 단계"는 특정 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제작하고, 그 재조합 벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계를 의미한다. 구체적으로 본 발명에서는, pCAMBIA3301(Cambia, Australia)를 응용한 벡터에 483bp의 BrDST28 유전자를 삽입하여 형질전환용 과발현 재조합 벡터인 p280를 제작하고(실험예 4), 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*)을 사용하여, 담배의 형질전환체를 제작하여(실험예 5). 상기 재조합 벡터 p280를 이용하여 생산된 담배 형질전환체들을 대상으로 PCR 검정을 수행하여 형질전환 유무를 확인하였다(실험예 6).
- [0042] 본 발명에서 용어 "내건성 향상"은 본 발명에서 정의된 대조군 식물과 비교하여 적어도 5% 또는 10%, 구체적인

로는 적어도 20% 또는 40%, 더욱 바람직하게는 50%, 60%, 70% 또는 80% 이상의 내건성을 의미하며, 식물이 원래 가지고 있는 내건성 활성화에 비해 상기 유전자의 발현을 증진하여 내건성이 증가되는 것을 의미한다.

[0043] 본 발명에 의하면, 상기 BrDST28 유전자의 발현이 증진되는 경우, 식물체의 내건성이 증가되므로, 식물체의 내건성을 향상시키기 위하여, 전술한 바와 같이 BrDST28 유전자의 발현을 증진하는 형질전환용 과발현 벡터를 이용하여, 식물체를 형질전환하거나 또는 다른 인위적인 물질의 처리에 의해 상기 유전자의 발현을 증진시켜 식물체의 내건성을 향상시키는 것도 가능하며, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0044] 본 발명의 BrDST28(*Brassica rapa* drought stress Tolerance 28) 유전자는 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성에 관여하며, 이를 과발현시킨 형질전환 식물체는 지구 온난화 등에 의한 기후조건 변화로 야기된 건조 스트레스에 대한 내성이 탁월하여 건조한 경작 조건에 적응성이 뛰어난 신기능 작물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 BrDST28-F와 BrDST28-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 BrDST28을 코딩하는 유전자의 단편을 전기영동한 사진이다.

도 2는 BrDST28의 pGEM-T easy vector 내로의 삽입 여부를 확인하기 위해서 EcoRI를 재조합 DNA에 처리하여 확인한 사진이다.

도 3은 내건성 관련 유전자 BrDST28(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 28)의 아미노산 서열 및 염기서열을 보여주는 것이다.

도 4는 BrDST28(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 28)의 아미노산 서열 및 염기서열을 GenBank BlastX program 및 CLC viewer 7을 사용하여 분석한 결과이다.

도 5는 BrDST28(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 28)의 아미노산 서열 및 염기서열을 NCBI Conserved Domain program을 사용하여 분석한 결과이다.

도 6은 BrDST28 유전자를 과발현(over-expression) 시키기 위하여 pCambia3301 (Cambia, Australia)에 483bp의 BrDST28 유전자를 삽입하여 형질전환용 벡터인 p280를 제작하는 대략적인 과정을 보여주는 모식도이다. 이러한 도 6에서 'LB'는 left border, '35S Poly A'는 Cauliflower mosaic virus 35S terminator, 'bar'는 PPT resistance gene, '35SP'는 Cauliflower mosaic virus 35S promoter, 'NOS Poly A'는 nopaline synthase terminator, 'RB'는 right border를 의미한다.

도 7은 BrDST28 유전자를 발현억제(down-regulation) 시키기 위하여 pCambia3301를 응용한 발현억제 벡터에 318bp의 BrDST28의 간섭 RNA(RNAi) 단편을 삽입하여 형질전환용 발현억제 벡터인 p28D를 제작하는 대략적인 과정을 보여주는 모식도이다. 이러한 도 7에서 'LB'는 left border, '35S Poly A'는 Cauliflower mosaic virus 35S terminator, 'bar'는 PPT resistance gene, '35SP'는 Cauliflower mosaic virus 35S promoter, 'sense'는 sense fragment of BrDST28, 'antisense'는 antisense fragment of BrDST28, 'RB'는 right border를 의미한다.

도 8은 PPT 저항성 유전자(bar gene)를 대상으로 PCR 검정을 수행하여 p280 벡터를 이용하여 생산된 8개체가 형질전환체로 확인된 결과를 보여주는 사진이다. 이러한 도 8에서 'P'는 PPT 저항성 유전자, 'M'은 100bp size 분자마커, 'N'은 비형질전환체, '1~10'은 BrDST28 유전자가 과발현된 담배형질전환체를 의미한다.

도 9는 PPT 저항성 유전자(bar gene)를 대상으로 PCR 검정을 수행하여 p28D 벡터를 이용하여 생산된 4개체가 형질전환체로 확인된 결과를 보여주는 사진이다. 이러한 도 9에서 'P'는 PPT 저항성 유전자, 'M'은 100bp size 분자마커, 'N'은 비형질전환체, '1~4'는 BrDST28 유전자가 발현억제된 담배형질전환체를 의미한다.

도 10은 내건성을 보이는 담배 형질전환체들을 대상으로 한 건조 스트레스 처리 후 표현형을 분석한 결과를 보여주는 사진이다. 이러한 도 10에서 'CON'은 비형질전환체, 'T280'은 BrDST28 유전자가 과발현된 담배형질전환체, 'T28D'은 BrDST28 유전자가 발현억제된 담배형질전환체를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예

에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0047] 실시예 1 : 배추 유래 내건성 관련 유전자 조사

[0048] 배추 유래 신규 내건성 관련 유전자를 동정하기 위해 "*Brassica rapa* EST and Microarray Database"의 정보를 이용하였다. 상기 데이터베이스(database)는 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis* inbred line "Chiifu")를 3주간 생장상(광도 $290 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$, 광주기 명처리 16시간/암처리 8시간, 생육온도 25℃, 생육 습도 40 ~ 70%)에서 재배하고, 건조 스트레스를 48시간 동안 처리한 후, 처리 시간별로 총 RNA를 추출하고 KBGP-24K oligo chip을 이용한 각 유전자들의 발현 변화를 비교분석한 정보들을 제공한다.

[0049] 본 발명자들은 "*Brassica rapa* EST and Microarray Database"를 활용하여, 건조 스트레스 처리시 반응하는 유전자들 중 발현이 강하게 변화한 유전자들을 분류하고, 완전장을 갖추고 있으며 기능이 알려지지 않은 대상유전자 중에서 선정하였다.

[0050] 배추에서 신규 내건성 관련 유전자를 동정하기 위해, KBGP-24K oligo chip에서의 483bp ORF(Open Reading Frame)와 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 상동성을 가지는 cDNA 염기서열(AT2G28400)을 바탕으로 한 쌍의 프라이머를 제작하였고, 그 서열을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

프라이머	염기서열
BrDST-F(서열번호 3)	5'-ATG GCG ACG AGC AAA TG-3'
BrDST-R(서열번호 4)	5'-TTA ATT CTC CAG TTG TGT T-3'

[0052] 실시예 2 : 배추로부터 RNA 분리

[0053] 본 발명에 사용된 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis* inbred line 'CT001')는 기내의 무균상태에서 키운 것에서 샘플을 채취하여 RNA 분리에 사용하였다. 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)의 잎을 액체 질소를 이용하여 파쇄하고, 1 ml 트리졸(Trizol, Gibco BRL) 용액을 첨가하여 잘 섞어준 후, 5분 동안 상온에서 방치하였다. 200 μl 의 클로로포름(chloroform)을 넣고 섞어준 다음, 4℃에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하고, 그 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 이소프로페놀(isopropanol) 500 μl 를 넣고 13,000rpm으로 15분간 원심분리하여 침전시킨 뒤, 이소프로페놀을 제거하고 침전물을 75% 에탄올로 세척하였다. 그 다음, 에탄올이 없도록 잘 건조시키고, DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리된 멸균 증류수에 녹여 사용하였다.

[0054] 실시예 3 : 내건성 관련 유전자인 BrDST28(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 28) 유전자의 분리 및 재조합 벡터 제조

[0055] 내건성 관련 유전자 BrDST28 유전자의 분리는 상기 확보된 RNA를 주형으로 oligo dT 프라이머(primer)와 역전사 효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤, 상기 [표 1]에 작성된 프라이머로 RT-PCR을 수행하여 분리하였다.

[0056] 먼저, cDNA를 합성하기 위하여, 1 μg 의 RNA를 oligo dT primer를 첨가하고 70℃에 보관하여 RNA 이차구조를 제거한 뒤, 45℃에서 30분간 역전사시키고, 사용된 역전사효소를 불활성화 시키기 위해 94℃에서 5분간 보관하였다. 그 후 합성된 cDNA 1 μg 을 사용하여 상기 표 1의 프라이머와 태그 중합효소(Taq polymerase)로 PCR 하였다. PCR 프로그램은 94℃에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 40회 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후, 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

[0057] 도 1은 각 BrDST28-F와 BrDST28-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 BrDST28을 코딩하는 유전자의 단편을 전기영동한 사진(M: 100bp size 분자마커)이다. 실험결과 증폭된 내건성 관련 유전자 BrDST28의 단편을 전기영동을 통해 확인하였다(도 1). 그 결과, 483bp에 해당하는 PCR 산물을 확인할 수 있었다.

[0058] 이후, 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머들로 증폭된 단편의 염기서열을 분석하기 위해 염기서열 분석용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 재조합 벡터를 구축하였다.

[0059] 실험예 1. 재조합 벡터를 이용한 *E. coli* DH10 β 의 형질전환

[0060] 대장균 DH10 β 를 LB 50ml에 접종시켜 37℃에서 OD570 = 0.375 ~ 0.400이 되도록 배양한 후, 균주배양액을 3,000rpm에서 10분간 원심분리 하였고, 얻어진 침전물을 0.1M CaCl₂ 용액으로 풀어준 뒤 30분간 얼음에 보관하

였다. 그 후, 3,000rpm에서 7분간 원심분리한 뒤 0.1M CaCl₂에 침전물을 녹이고, 상기 실시예 3의 재조합 벡터를 함께 섞어 얼음에 30분간 두었다가 42℃에서 90초간 열 충격을 주었다. 이 후, 10분간 얼음에 방치한 후, LB 배지 700 μ l를 첨가하여 37℃에서 1시간 진탕배양 하였다. 배양액을 12,000rpm으로 수 초간 원심분리한 후, 100 μ l만 남기고, 상등액을 제거하였으며, 남은 상등액으로 침전물을 녹였다. 이후 앰피실린(ampicillin, 50 mg/ ℓ), X-gal(200 mg/ ℓ in N-N dimethylformamide) 및 IPTG (200 mg/ ℓ)가 첨가된 고체 LB 배지에 녹인 침전물을 전개하고, 37℃에서 12시간 배양한 후 고체 배지에서 저항성을 보이며 흰색의 콜로니를 형성하는 형질전환 콜로니를 선별하였다.

[0061] **실험예 2 : 재조합 DNA 분리 및 유전자 삽입 여부 조사**

[0062] 항생제가 첨가된 LB 배지 3ml에 상기 선별한 형질전환 콜로니를 접종한 후 37℃에서 12시간 배양하고, 배양액을 4℃에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 침전된 균 덩어리에 Solution I(200 μ l/ml)을 첨가하여 보텍스(vortex)를 수 초 간 수행하여 충분히 풀어준 후, Solution II(200 μ l/ml)를 첨가하여 조심스럽게 섞어주어 세포막이 완전히 깨어지도록 실온에서 5분간 방치하였다. 이 후 Solution III(200 μ l/ml)를 첨가하여 잘 섞어주고, 얼음에서 10분간 방치한 뒤, 12,000rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 획득하였다. 획득한 상등액의 1/10 양의 NaOAc와 2.5배의 100% 에탄올을 첨가하여 -20℃에서 2시간 동안 재조합 DNA를 침전시킨 후, 원심분리하여 침전물을 얻었다. 70% 에탄올로 침전물을 세척한 다음 멸균 증류수에 녹여 사용하였다.

[0063] 배추로부터 증폭된 내건성 관련 유전자 BrDST28의 pGEM-T easy vector 내로의 삽입 여부를 확인하기 위해서 제한효소 *EcoRI*를 상기 분리한 재조합 DNA에 처리하여 확인하였다(도 2). 도 2는 각 BrDST28-F와 BrDST28-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 BrDST28을 코딩하는 유전자를 pGEM-T easy vector에 넣은 후 정확한 삽입을 확인하기 위해 *EcoRI* 효소를 처리하여 확인한 사진(M: 1Kp size 분자마커)이다. 그 결과, *EcoRI* 처리에 의해 483bp의 삽입된 유전자와 pGEM-T easy vector로 두 개의 단편으로 분리되어, pGEM-T easy vector에 유전자가 삽입된 것을 확인할 수 있었다.

[0064] **실험예 3. 내건성 관련 유전자 BrDST28의 전체 서열 확인**

[0065] 다음으로, 상기 483bp의 삽입된 유전자의 염기서열을 확인하기 위하여, 삽입된 자리에 근접한 T7 및 SP6 프라이머를 이용하여 염기서열을 조사하였다. 염기서열 분석용 pGEM-T easy vector 내부에 클로닝 된 PCR 단편의 염기서열 분석은 GenBank BLAST program을 사용하여 이루어졌다.

[0066] 도 3은 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 BrDST28을 코딩하는 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열 결과이다. 확인된 염기서열(서열번호 2)을 바탕으로 시작 코돈(codon)과 종료 코돈을 결정하여 아미노산 서열(서열번호 1)을 결정한 후, 그것이 배추로부터 분리된 전장(full length)의 내건성 관련 유전자 BrDST28(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 28)로 명명하였다(도 3).

[0067] BrDST28-F(서열번호 3)와 BrDST28-R(서열번호 4) 프라이머 쌍으로 증폭된 483bp 산물의 염기서열과 아미노산 서열을 GenBank BlastX program 및 CLC viewer 7을 사용하여 분석한 결과, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), 양배추 (*Brassica oleracea* var. *oleracea*), 또는 유채(*Brassica napus*) 시퀀스와 높은 상동성을 보임을 확인할 수 있었으며(도 4), NCBI Conserved Domain program을 이용하여 분리한 유전자에 노화 조절자 도메인(senescence regulator domain)이 있는 것을 확인하였고 E-value가 2.38e-36로 그 정확도가 높음을 확인하였다(도 5).

[0068] **실험예 4. BrDST28 유전자의 형질전환용 재조합 벡터 제작**

[0069] 분리한 BrDST28 유전자를 과발현(over-expression) 시키기 위하여 pCAMBIA3301 (Cambia, Australia)에 483bp의 BrDST28 유전자를 삽입하여 형질전환용 벡터인 p280를 제작하였다(도 6). 또한, BrDST28 유전자를 발현억제(down-regulation) 시키기 위하여 pCAMBIA3301를 응용한 발현억제 벡터에 318bp의 BrDST28의 간섭 RNA(RNAi) 단편을 삽입하여 형질전환용 발현억제 벡터인 p28D를 제작하였다(도 7). 도 6 및 도 7은 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 BrDST28 유전자를 과발현시키는 형질전환용 과발현 벡터(p280)와 BrDST28 유전자를 억제시키는 형질전환용 발현억제 벡터(p28D)를 나타낸다.

[0070] **실험예 5: BrDST28 유전자가 형질전환된 담배 제작**

[0071] 배추의 BrDST28 유전자가 과발현 또는 발현억제된 담배 형질전환체를 작성하기 위하여 “아그로박테리움에 의한 효율적인 배추의 형질전환방법(특허 등록 제0523758호, 2005.10.31.)”을 변형하여 실시하였다. 세부 형질전환 방법은 하기와 같다.

- [0072] 1. 형질전환용 운반체(p280 또는 p28D)를 함유하고 있는 아그로박테리움 투마파시엔의 배양
- [0073] 담배에 접종하는 형질전환 매개체로는 식물형질전환용 벡터 p280 또는 p28D를 함유하고 있는 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404/p280 또는 LBA4404/p28D를 사용하였다. 이하에서 아그로박테리움 투마파시엔이라 함은 상기 아그로박테리움 투마파시엔 LBA4404/p280 또는 LBA4404/p28D를 말한다.
- [0074] 담배의 잎을 아그로박테리움 투마파시엔으로 접종시킬 때 형질전환의 효율을 높이기 위해, 먼저 형질전환용 운반체(p280 또는 p28D)를 함유하고 있는 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404/p280 또는 LBA4404/p28D)을 카나마이신(kanamycin) 50 mg/L가 함유된 고체 YEP 배지에 평판배양하여 28℃에서 48시간 배양하였고, 배양된 아그로박테리움 투마파시엔 세포 중 몇몇 콜로니(colony)를 찍어 카나마이신 50 mg/L가 함유된 5 mL 액체 YEP 배지에 접종하여 28℃에서 48시간 현탁배양 하였다. 배양된 현탁액에서 700 μ l를 추출한 다음, 0.02 mM Acetosyringone이 첨가되고 pH가 5.6으로 조정된 50ml 액체 YEP 배지에 첨가하여 28℃에서 OD600이 1.0이 될 때까지 현탁배양하였다. 마지막으로 배양된 현탁액은 원심분리기에서 4000rpm으로 15분간 원심분리시켜 25ml 액체 YEP 배지로 재현탁 되어 담배 잎의 접종에 사용되었다.
- [0075] 2. 담배 형질전환 및 슈트 유도
- [0076] 담배[Nicotiana tabacum ‘SR1’]를 무균상태에서 생육시킨 뒤 잎을 가로?세로 10 mm로 자르고, 제작된 아그로박테리움 투마파시엔 현탁액에 1분간 침지시켜 접종하였다. 접종된 잎 절편은 공동배양배지(MS기본배지, 3% sucrose, 0.8% plant agar, 1.5 mg/L BA, pH 5.7)에서 3일간 공동배양하였다. 이후 잎 절편을 액체 공동배양배지로 세척하여 아그로박테리움 투마파시엔을 씻어낸 후 슈트 유도배지(MS기본배지, 3% sucrose, 0.8% plant agar, 1.5 mg/L BA, 200 mg/L cefotaxime, pH 5.7)에 형질전환된 담배 잎 절편을 배양하여 형질전환된 조직에서만 슈트가 유도되도록 하였다.
- [0077] 3. 뿌리 유도
- [0078] 유도된 형질전환 슈트를 절단하여 뿌리 유도배지(1/2 MS기본배지, 3% sucrose, 0.8% plant agar, 200 mg/L cefotaxime, pH 5.8)로 옮겨 뿌리 발생을 유도하였다. 뿌리가 생성된 담배 형질전환체는 멸균된 질석에 이식하여 순화시켰고 이후 화분에 이식하여 온실에서 재배하였다.
- [0079] 실험예 6. PCR 검정을 통한 형질전환체 선발
- [0080] 상기와 같이 p280 또는 p28D 벡터를 이용하여 형질전환된 담배 형질전환체들을 대상으로 형질전환 유무를 확인하기 위하여, PCR 검정을 수행하였다.
- [0081] PPT 저항성 유전자(bar gene)를 대상으로 PCR 검정을 수행하여 p280 벡터를 이용하여 생산된 8개체(도 8)와 p28D 벡터를 이용하여 생산된 4개체(도 9) 모두 형질전환체임을 확인하였다(도 8 및 도 9). PCR 프로그램은 95℃에서 5분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 40초로 35 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다. PCR 검정을 위해 사용된 프라이머인 bar-F(서열정보 5)와 bar-R(서열정보 6)의 염기서열은 [표 2]와 같다.

표 2

프라이머	염기서열
bar-F (서열번호 5)	5' -GTA GAG CGT GGA GCC CAG T-3'
bar-R (서열번호 6)	5' -TAC CAT GAG CCC AGA ACG AC-3'

- [0083] 실험예 7. 건조 스트레스 발생시 담배 형질전환체들의 내건성 검증
- [0084] PPT 저항성 유전자를 이용한 PCR 검정으로 형질전환이 확인된 형질전환체를 대상으로 실제 건조 스트레스 발생시 표현형의 변화(내건성 여부)를 관찰하였다. 건조처리는 본엽이 4 내지 6매가 된 비형질전환체와 형질전환체를 대상으로 온실에서 진행되었고, 표현형적으로 명확한 차이를 보이는 시기(생장 멈춤, 엽색 변화, 도복 여부)까지 실시하였다.
- [0085] 도 10은 내건성을 보이는 담배 형질전환체들을 대상으로 한 건조 스트레스 처리 후 표현형을 분석한 결과이다. 그 결과, 건조처리 20일째가 되었을 때 대조군인 비형질전환체 담배와 BrDST28 유전자의 발현이 억제된 형질전환체는 잎과 줄기의 탄력을 잃고 힘없이 쓰러졌으며, 엽색이 점차 연해지고 더 이상 성장하지 못하는 모습을 보인 반면, BrDST28 유전자의 발현이 증진된 형질전환된 8개체는 모두 건조처리 전과 동일한 모습으로서 표현형상

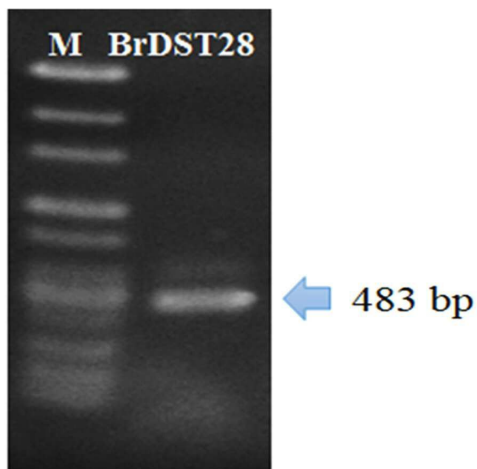
의 차이를 보여 주지 않았다(도 10).

[0086] 이와 같은 결과를 통해, BrDST28을 발현하는 모든 식물체에서, BrDST28을 인위적으로 과발현시키면 해당 식물체는 건조 스트레스에 저항성을 가진다는 것을 확인할 수 있었다.

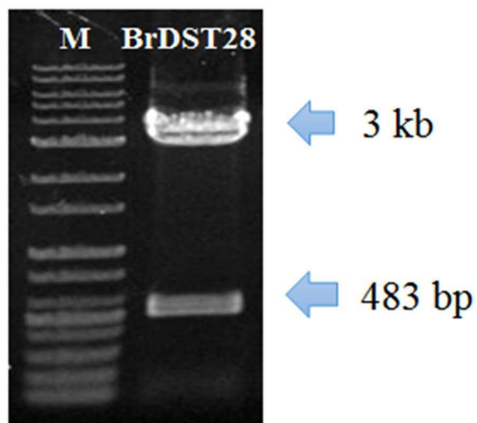
[0087] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1



도면2



도면3

M A T S K C Y Y P R P S H R F F S T D H Q H V S S P S D F E
 ATGGCGACGAGCAAAATGCTACTACCCACGCCAAGCCACCGATTCTTCTCCACCGACCACCAACAGTCTCTTCCCCTTCGACTTCGAG 90

 L D E W D L F N T G S D S A S G F T F S D L T I T S D R T G
 CTCGACGAGTGGGACCTCTCAACACCGGTCAGATTCTGCTTCGGGTTTCACCTTCAGTGACCTTACGATCACCTCCGATCGAACCGGA 180

 A N R K P R G G S A A S S L P V N V P D W S K I L G E E S P
 GCTAACCGGAAGCCTCGCGGTGGTTACGTGCGTCTTCTCTCCCGGTCAACGTGCCGACTGGTCCAAGATCCTCGGGGAAGAGAGTCCA 270

 R R Q T S Y D G D E V A A C G G E T R R V P P H E L I A S R
 CGGAGGCAGACTTCGTACGACGGTGACGAAGTTGCTGCATGCGGTGGAGAGACACGGCGGTGCCGCCATGAGTTGATTGCGAGCCGG 360

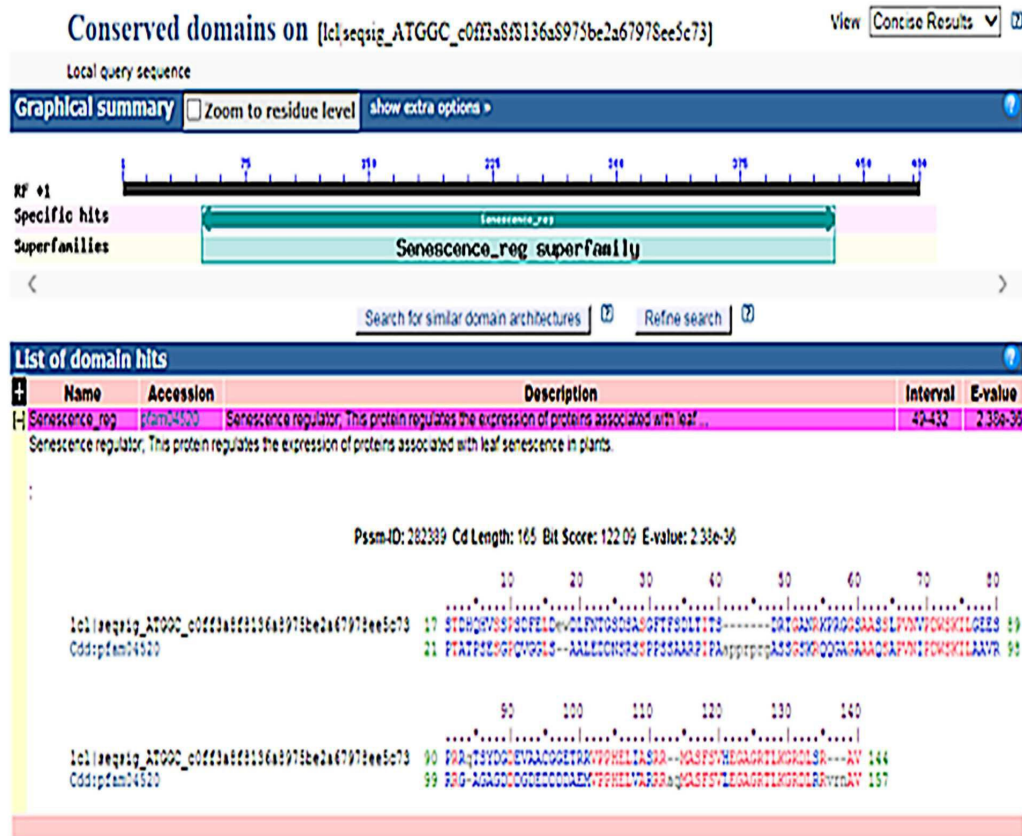
 R M A S F S V H E G A G R T L K G R D L S R A V A D E P Q V
 AGGATGGCTTCGTTTTCGGTTACGAAGGTGCTGGGAGGACGTGAAGAGGAGAGATCTGAGTAGGGCTGTAGCAGATGAACCTCAAGTT 450

 R S Y R R L N S L R *
 AGGTCATATCGCCGATTAAACAGCCTCCGATGA 483

도면4

		20		40		60	
BrDSR28	MATSKCYYPR	PSHRFFSTDH	QHVSSPSDFE	LDEWDLFNTG	SDSASGFTFS	DLTITSORTG	60
B. napus	MATSKCYYPR	PSHRFFSTDH	QHVSSPSDFE	LDEWDLFNTG	SDSASGFTFS	DLTITSORTG	60
B. oleracea	MATSKCYYPR	PSHRFFSTDH	QHVSSPSDFE	LDEWDLFNTG	SDSASGFTFS	DLTITSORTG	59
A. thaliana	MATSKCYYPR	PSHRFFSTDH	QHVSSPSDFE	LDEWDLFNTG	SDSASGFTFS	DLTITSORTG	59
Consensus	MATSKCYYPR	PSHRFFSTDH	QHVSSPSDFE	LDEWDLFNTG	SDSASGFTFS	DLTITSORTG	
		80		100		120	
BrDSR28	ANRKPRGGSV	SEKFAAGSAAS	SLPVNVPDWS	KILGEESPRR	Q--TSN--EYD	GDEVAACGGE	107
B. napus	ANRKPRGGSV	SEKFAAGSAAS	SLPVNVPDWS	KILGEESPRR	Q--TSN--EYD	GDEVAACGGE	118
B. oleracea	ANRKPRGGSV	SEKFAAGSAAS	SLPVNVPDWS	KILGEESPRR	Q--TSN--EYD	GDEVAACGGE	117
A. thaliana	TNRQTHGGSV	S--GK--AAS	SLPVNVPDWS	KILGDESRRQ	RKISN--EYD	GDEIL--CGGE	114
Consensus	ANRKPRGGSV	SEKFAAGSAAS	SLPVNVPDWS	KILGEESPRR	Q--TSN--EYD	GDEVAACGGE	
		140		160			
BrDSR28	TRRVPPHELL	ASRRMASFSV	HEGAGRTLKG	RDLSRAVADE	POVRS--YRRL	NSLR--	161
B. napus	TRRVPPHELL	ASRRMASFSV	HEGAGRTLKG	RDLSR-----	--VRNTIFKI	RGIED-	166
B. oleracea	TRRVPPHELL	ASRRMASFSV	HEGAGRTLKG	RDLSR-----	--VRNTIFKI	RGIED-	165
A. thaliana	TRRVPPHELL	ANRRMASFSV	HEGAGRTLKG	RDLSR-----	--VRNTIFKI	RGIED*	163
Consensus	TRRVPPHELL	ASRRMASFSV	HEGAGRTLKG	RDLSR-----	--VRNTIFKI	RGIED-	

도면5



도면6



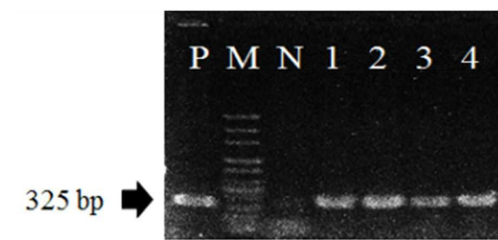
도면7



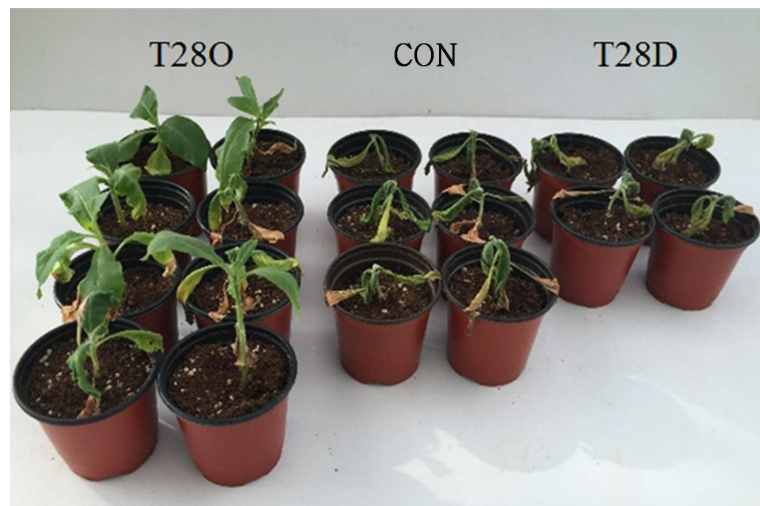
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> BrDST28 protein implicated in drought stress tolerance, gene encoding the protein and transformed plants with the same
- <130> KPA161068-KR
- <160> 6
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 161
- <212> PRT
- <213> Brassica rapa
- <400> 1

Met Ala Thr Ser Lys Cys Tyr Tyr Pro Arg Pro Ser His Arg Phe Phe

1 5 10 15

Ser Thr Asp His Gln His Val Ser Ser Pro Ser Asp Phe Glu Leu Asp

20 25 30
 Glu Trp Asp Leu Phe Asn Thr Gly Ser Asp Ser Ala Ser Gly Phe Thr
 35 40 45
 Phe Ser Asp Leu Thr Ile Thr Ser Asp Arg Thr Gly Ala Asn Arg Lys
 50 55 60
 Pro Arg Gly Gly Ser Ala Ala Ser Ser Leu Pro Val Asn Val Pro Asp
 65 70 75 80
 Trp Ser Lys Ile Leu Gly Glu Glu Ser Pro Arg Arg Gln Thr Ser Tyr
 85 90 95

 Asp Gly Asp Glu Val Ala Ala Cys Gly Gly Glu Thr Arg Arg Val Pro
 100 105 110
 Pro His Glu Leu Ile Ala Ser Arg Arg Met Ala Ser Phe Ser Val His
 115 120 125
 Glu Gly Ala Gly Arg Thr Leu Lys Gly Arg Asp Leu Ser Arg Ala Val
 130 135 140
 Ala Asp Glu Pro Gln Val Arg Ser Tyr Arg Arg Leu Asn Ser Leu Arg
 145 150 155 160

<210> 2

<211> 483

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 2

atggcgacga gcaaatgcta ctaccacagg ccaagccacc gattcttctc caccgaccac 60
 caacacgtct ctcccccttc cgacttcgag ctgcacgagt gggacctctt caacaccggt 120
 tcagattctg ctcccggttt caccttcagt gaccttacga tcacctcga tcgaaccgga 180
 gctaaccgga agcctcgcgg tggttcagct gcgtcttctc tcccgggtcaa cgtgccggac 240
 tggccaaga tcctcgggga agagagtcca cggaggcaga cttcgtacga cggtagcgaa 300
 gttgctgcat gcggtggaga gacacggcgg gtgccgccgc atgagttgat tgcgagccgg 360

 aggatggctt cgttttcggg tcacgaaggt gctgggagga cgttgaaagg gagagatctg 420
 agtagggctg tagcagatga acctcaagtt aggtcatatc gccgattaaa cagcctccga 480

tga	483
<210> 3	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> BrDST-F	
<400> 3	
atggcgacga gcaaatg	17
<210> 4	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> BrDST-R	
<400> 4	
ttaattctcc agttgtgtt	19
<210> 5	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> bar-F	
<400> 5	
gtagagcgtg gagcccagt	19
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> bar-R	
<400> 6	
taccatgagc ccagaacgac	20