(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0039737
(43) 공개일자 2016년04월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/415 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0132453
(22) 출원일자 2014년10월01일
심사청구일자 2014년10월01일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
박영두
경기 용인시 수지구 성복2로 220, 305동 1404호 (성복동, 버들치마을성복힐스테이트3차)
유재경
경기도 수원시 영통구 광교중앙로 247 휴먼시아아파트 3201동 2005호
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 10 항

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

(57) 요 약

본 발명은 배추(*Brassica rapa*) 유래의 BrDSR(*Brassica rapa* Drought Stress Resistance) 유전자 및 단백질에 관한 것이다. 본 발명의 BrDSR(*Brassica rapa* Drought Stress Resistance) 유전자 및 단백질은 식물체의 건조 스트레스에 대한 내성에 관여를 하며, 이를 과발현시킨 형질전환 식물체는 건조 스트레스에 대한 내성이 탁월하다. 따라서, 상기의 형질전환 식물체는 지구 온난화 등에 의한 기후조건 변화로 야기된 경작지의 건조 스트레스에 대한 내성이 탁월하여 건조한 경작 조건에 적응성이 뛰어난 신기능 작물로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도7

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ008118
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청 국립농업과학원
연구사업명 차세대바이오그린21사업
연구과제명 배추의 기후 변화 대응 환경 스트레스 저항성 관련 유전자 대량 발굴 및 발현 네트워크 분석
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교
연구기간 2011.05.01 ~ 2014.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 내건성 단백질 BrDSR(*Brassica rapa* Drought Stress Resistance).

청구항 2

제1항의 단백질을 코딩하는 유전자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 5의 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, 사탕무우, 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 튤립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 또는 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 식물체는 담배인 것인 식물체.

청구항 10

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항의 유전자의 발현을 증가시켜 식물체의 내건성을 향상시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 배추(*Brassica rapa*)로부터 분리된 내건성 단백질 BrDSR, 상기 단백질을 코딩하는 유전자 및 상기 유전자로 형질전환된 식물체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[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 생화학적생리적 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(*Datura stramonium* arginine decarboxylase), ABF3(Arabidopsis ABRE-binding factor 3), DREB1A(Arabidopsis DRE-binding 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 유채 속(*Brassica*)에 포함되어 있다. 유채 속(*Brassica*)에는 유채, 겨자 등 산업적 경제성이 우수한 작물이 포함되어 있어 외국에서도 중요한 작물이다. 유채 속(*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] 이에, 본 발명자들은 식물체의 내건성을 향상시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 연구 노력한 결과, 서열번호 5의 염기서열을 갖는 유전자가 상술한 식물체의 형질에 관여를 하고 이 유전자를 식물체에 형질전환하는 경

우, 식물체의 내건성을 증진시킬 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 내건성 단백질 BrDSR(*Brassica rapa* Drought Stress Resistance), 상기 단백질을 코딩하는 BrDSR(*Brassica rapa* Drought Stress Resistance) 유전자 및 상기 유전자를 포함하는 벡터 및 상기 벡터에 의해 형질전환된 식물체를 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 유전자의 발현을 증가시켜 식물체의 내건성을 향상시키는 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명자들은 식물체의 내건성을 향상시킬 수 있는 유전자 및 단백질을 발굴하고자 예의 연구 노력한 결과, 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 단백질 및 상기 단백질을 코딩하는 유전자가 식물체의 건조스트레스에 관여를 하고 이 유전자를 식물체에 형질전환하여 과발현 시키는 경우, 식물체의 건조 스트레스 저항성을 증진시킬 수 있음을 확인하였다.

[0011] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 내건성 단백질 BrDSR(*Brassica rapa* Drought Stress Resistance)을 제공한다.

[0012] 본 발명에서 상기 단백질은 첨부한 서열목록에 기재된 서열번호 6의 아미노산 서열로 구성된 단백질에 한정되지 않으며, 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 내건성 단백질과 기능적 동등물일 수 있다. 상기 "기능적 동등물"이란, 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60%, 바람직하게는 70%, 보다 바람직하게는 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로서 본 발명의 BrDSR과 실질적으로 동질의 활성을 나타내는 단백질을 의미한다.

[0013] 상기 기능적 동등물에는, 예를 들어, 서열번호 6의 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 BrDSR의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다. 또한 상기 기능적 동등물의 범위에는 BrDSR의 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)와같은다른단백질과융합으로만들어진융합단백질등이 이에 포함된다.

[0014] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 단백질을 코딩하는 유전자를 제공한다.

[0015] 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 438bp ORF(Open Reading Frame)과 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 상동성을 가지는 cDNA 염기서열(AT1G16850)을 바탕으로 한 쌍의 프라이머를 제작하였다(실시예 1). 이 후, 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis* inbred line "CT001")에서 총 RNA를 분리하였으며(실시예 2), 상기 확보된 RNA를 주형으로 oligo dT 프라이머(primer)와 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤, 상기 실시예 1에서 얻어진 프라이머를 이용하여, 438bp의 PCR 산물을 얻었으며, 이를 염기서열 분석용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 재조합 벡터를 구축하였다(실시예 3). 이후, 삽입된 438bp의 PCR 산물의 유전자 서열을 분석하기 위하여, 삽입된 자리에 근접한 T7 및 SP6 프라이머를 이용하여 염기서열을 조사하였으며, 염기서열 분석은 GenBank BLAST program을 사용하여 분석하였다. 확인된 염기서열(서열번호 5)을 바탕으로 시작 코돈(codon)과 종료 코돈을 결정하여 아미노산 서열(서열번호 6)을 결정한 후, 그것을 배추로부터 분리된 전장(full length)의 내건성 유전자 BrDSR(*Brassica rapa* Drought

Stress Resistance)로 명명하였다(실험예 3).

[0016] 본 발명의 상기 유전자는 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 내건성 단백질을 코딩하는 유전자로, 서열번호 5의 염기서열을 가지는 BrDSR(*Brassica rapa* Drought Stress Resistance) 유전자로, 배추(*Brassica rapa*)에서 유래되었으며, 바람직하게는 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)에서 유래된 것이다. 또한, 식물체에 건조 스트레스를 가할 경우 BrDSR 유전자의 발현이 증가하며, 상기 유전자의 발현을 증가시킬 경우 이러한 건조 스트레스들에 대한 내성이 증가함을 확인되어, 상기 유전자는 식물체의 내건성에 관여함을 확인하였다.

[0017] 본 발명에서 일실험예에 따르면, 배추에서 유래한 상기 BrDSR(*Brassica rapa* Drought Stress Resistance) 유전자를 형질전환용 벡터, pH2GW7(VIB-Ghent University, Belgium)에 삽입하여 형질전환용 벡터인 pDSR를 제작한 후(실험예 4). 이를 이용하여 담배 형질전환체들을 제조하였으며(실험예 5), 이를 대상으로 실제 건조 스트레스를 유발한 경우, 대조군과 달리 상기 형질전환체들은 모두 건조 처리 전과 동일한 모습을 유지하여 표현형상의 뚜렷한 차이를 보이지 않음을 확인하여(실험예 8), 상기 BrDSR(*Brassica rapa* Drought Stress Resistance) 유전자가 식물체의 건조 스트레스에 관여하며, 이 유전자를 식물체에 형질전환하여 과발현 시키는 경우, 식물체의 건조 스트레스 저항성을 증진시킬 수 있음을 확인하였다.

[0018] 상기와 같이 건조 스트레스에 저항성을 가지는 BrDSR(*Brassica rapa* Drought Stress Resistance) 유전자는 서열번호 5에 기재된 염기서열을 가지는데, 상기 유전자는 첨부한 서열목록에 기재된 서열번호 5의 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 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.

[0019] 본 발명의 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 BrDSR 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.

[0020] 본 발명에서 상기 재조합벡터는 형질전환용 재조합 벡터를 포함한다.

[0021] 상기 본 발명의 BrDSR 유전자를 삽입할 수 있는 벡터로는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118, pUC119, pET30a, pET30c 및 pGEX-GST), 바실러스 서브틸러스 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, 배큘로바이러스와 같은 곤충 바이러스 및 식물 바이러스가 사용될 수 있으며, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이너리 벡터를 사용할 수 있다. 당업자라면 본 발명의 BrDSR 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.

[0022] 본 발명의 일실험예에서는 염기서열을 분석하기 위하여 배추로부터 증폭된 내건성 관련 유전자를 pGEM-T easy vector 내로의 삽입하였고, 이를 확인하기 위해서 제한효소 EcoR을 상기 분리한 재조합 DNA에 처리하여 확인하였다(실험예 2). 염기서열 분석용 pGEM-T easy vector 내부에 클로닝 된 PCR 단편의 염기서열 분석은 GenBank BLAST program을 사용하여 이루어졌으며, 확인된 염기서열(서열번호 5)을 바탕으로 시작 코돈(codon)과 종료 코돈을 결정하여 아미노산 서열(서열번호 6)을 결정한 후, 그것을 배추로부터 분리된 전장(full length)의 내건성 유전자 BrDSR로 명명하였다(실험예 3).

[0023] 본 발명에서 "형질전환용 재조합 벡터"란 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소

를 포함하는 유전자 작제물로, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함한 통상의 모든 벡터를 포함한다.

[0024] 본 발명의 "형질전환용 재조합 벡터"는 상기 BrDSR(*Brassica rapa* Drought Stress Resistance) 유전자가 발현될 수 있도록, 발현조절 서열과 기능적으로 연결되어 있다. 예를 들어, 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 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

[0025] 본 발명에서 일실험예에 따르면, 상기 BrDSR(*Brassica rapa* Drought Stress Resistance) 유전자가 건조 스트레에 대한 내성을 가지는지를 확인하기 위하여, 먼저 형질전환용 벡터, pH2GW7(VIB-Ghent University, Belgium)에 438bp의 BrDSR 유전자를 삽입하여 형질전환용 벡터인 pDSR을 제작하였다(실험예 4).

[0026] 본 발명의 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체를 제공한다.

[0027] 본 명세서에서, 용어 "식물체"는 성숙한 식물체 뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다. 본 발명에서 상기 벡터로 식물체를 형질전환하는 것은 당업자에게 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있다. 바람직하게는 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(Agrobacteria spraying method)을 이용할 수 있으며, 더 바람직하게는 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법을 이용할 수 있다.

[0028] 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, 사탕무우, 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 튤립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 또는 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나이며, 바람직하게는 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 또는 유채를 포함하는 특용작물류이며, 더욱 바람직하게는 담배이나, 이에 제한되지 않는다.

[0029] 본 발명에서 일실험예에 따르면, 실험예 5에서 배추의 BrDSR 유전자가 과발현된 담배의 형질전환체를 제작하기 위하여 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*)을 사용하여, 담배의 형질전환체를 제작하였으며, 실험예 6에서 형질전환체로 확인된 5개체를 대상으로, 건조 스트레스 발생 시 체내 BrDSR 유전자의 발현 수준을 정량적인 리얼-타임(quantitative real-time) RT PCR로 분석한 결과, 비형질전환체(CON) 보다 약 1.7 내지 2.6배까지 높은 발현 수준을 보였으며(실험예 7), 히그로마이신(hygromycin) 저항성 유전자를 이용한 PCR 검정으로 형질전환이 확인되고, 정량적인 리얼-타임(quantitative real-time) RT PCR 분석으로 비형질전환체 보다 높은 발현량이 확인된 5개체의 형질전환체들을 대상으로 실제 건조 스트레스 발생 시 표현형의 변화(내건성 여부)를 자연건조 처리 조건에서 관찰한 결과, 건조 처리 5일째가 되었을 때 대조군인 비형질전환체는 잎과 줄기의 탄력을 잃어 쓰러지기 시작하였으며, 7일 째 다시 수분을 공급하여도 회복하지 못하는 모습을 보였으나, 형질전환체들은 모두 건조 처리 전과 동일한 모습을 유지하여 표현형상의 뚜렷한 차이를 보이지 않음을 확인하여(실험예 8), 상기 BrDSR(*Brassica rapa* Drought Stress Resistance) 유전자가 식물체의 건조 스트레스에 관여하며, 이 유전자를 식물체에 형질전환하여 과발현 시키는 경우, 식물체의 건조 스트레스 저항성을 증진시킬 수 있음을 확인하였다.

[0030] 따라서, 본 발명에 의해 형질전환된 식물체는 건조 스트레스들에 대한 내성을 가지는 BrDSR 유전자의 세포 내 발현 수준을 증가시킬 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 있다

.

[0031] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 유전자의 발현을 증가시켜 식물의 내건성을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0032] 본 발명에서 용어 "유전자의 발현"은 유전자의 전사를 의미하며, 구체적으로는 mRNA로의 전사를 의미한다. 상기 "전사"는 DNA의 전사 및 생성된 mRNA 산물의 가공을 포함한다. 본 발명에서, 상기 용어 "향상"은 본 발명에서 정의된 대조군 식물과 비교하여 적어도 5% 또는 10%, 바람직하게는 적어도 20% 또는 40%, 더욱 바람직하게는 50%, 60%, 70% 또는 80% 이상의 내건성을 의미하며, 식물이 원래 가지고 있는 내건성에 비해 상기 유전자를 도입하여 내건성이 증가되는 것을 의미한다.

[0033] 본 발명에서 용어 "내건성"은 건조 스트레스 조건에서 여러 가지 형태적, 생리적 또는 생화학적 형질들의 종합적 대응 노력에 의하여 생장 유지 및 생산을 유지하는 것으로 정의할 수 있다. 현재까지, 알려진 내건성 관련 주요 형질은 건조조건에서 양호한 수분상태 및 생산성 유지에 기여하는 심근성, 잎의 노화 방지, 기공의 개폐 조절, 삼투조절 능력, 세포의 막 구조 유지 능력 등이다.

[0034] 본 발명에 의하면, 상기 BrDSR(*Brassica rapa* Drought Stress Resistance) 유전자의 발현이 증가하는 경우, 식물체의 내건성이 증가되므로, 식물체의 내건성을 향상시키기 위하여, BrDSR(*Brassica rapa* Drought Stress Resistance) 유전자를 전술한 바와 같이 벡터에 도입한 후, 식물체에 형질전환하거나 또는 다른 인위적인 물질의 처리에 의해 상기 유전자의 발현을 증가시켜 식물체의 내건성을 향상시키는 것도 가능하며, 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 BrDSR(*Brassica rapa* Drought Stress Resistance) 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.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 각 BrDSR-F와 BrDSR-R 프라이머 쌍을 사용한 PCR에 의해 배추로부터 증폭된 BrDSR을 코딩하는 유전자의 단편을 전기영동한 사진이다.

도 2는 각 BrDSR-F와 BrDSR-R 프라이머 쌍을 사용한 PCR에 의해 배추로부터 증폭된 BrDSR을 코딩하는 유전자를 pGEM-T easy vector에 넣은 후 정확한 삽입을 확인하기 위해 EcoRI 효소를 처리하여 확인한 사진이다.

도 3은 PCR에 의해 분리된 배추의 BrDSR을 코딩하는 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸다.

도 4는 PCR에 의해 분리된 배추의 BrDSR 유전자를 과발현 시키는 형질전환용 과발현 벡터(pDSR)를 나타낸 그림이다.

[주] LB,좌측 보더

T-35S, 콜리플라워 모자이크 바이러스 35S 종결부위

hpt, 히그로마이신 저항성 유전자

P-35S, 콜리플라워 모자이크 바이러스 35S 프로모터

RB, 우측 보더

도 5는 BrDSR 과발현 벡터를 이용하여 생산된 담배 형질전환체의 형질전환 유무를 PCR 검정을 통해 분석한 결과이다.

도 6은 PCR 검정으로 형질전환이 확인된 담배 형질전환체들을 대상으로 체내 BrDSR 유전자의 발현 수준을 정량적인 리얼-타임(quantitative real-time) RT PCR 분석을 통해 확인한 결과이다.

도 7은 내건성을 보이는 담배 형질전환체들을 대상으로 한 건조 스트레스 처리 후 표현형을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0038] **실시예 1 : 배추 유래 내건성 관련 유전자 조사**

[0039] 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 μmol · m^{-2} · sec^{-1}, 광주기 명처리 16시간/암처리 8시간, 생육온도 25℃, 생육습도 40 ~ 70%)에서 재배하고, 건조 스트레스(자연건조)를 48시간동안 처리한 후, 처리 시간별로 total RNA를 추출하고 KBGP-24K oligo chip을 이용한 각 유전자들의 발현 변화를 비교분석한 정보들을 제공한다.

[0040] 본 발명자들은 "*Brassica rapa* EST and Microarray Database"를 활용하여, 건조 스트레스 처리시 반응하는 유전자들 중 발현이 강하게 증가한 유전자들을 분류하고, 완전장을 갖추고 있으며 기능이 알려지지 않은 대상유전자 중에서 선정하였다.

[0041] 배추에서 신규 내건성 관련 유전자를 동정하기 위해, KBGP-24K oligo chip에서의 438bp ORF(Open Reading Frame)과 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 상동성을 가지는 cDNA 염기서열(AT1G16850)을 바탕으로 한 쌍의 프라이머를 제작하였고, 그 서열을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0042]

프라이머	염기서열
BrDSR-F (서열번호 1)	5-ATG ACT TTG CAA GTT TTC CA-3
BrDSR-R (서열번호 2)	5-TTA GAG CTC CTC AGT ACC A-3

[0043] **실시예 2 : 배추로부터 RNA 분리**

[0044] 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, 1ml 트리졸(Trizol, Gibco BRL) 용액을 첨가하여 잘 섞어준 후, 5분 동안 상온에서 방치하였다. 200 ㎕의 클로로포름(chloroform)을 넣고 섞어준 다음, 4℃에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하고, 그 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 이소프로페놀(isopropanol) 500㎕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.

[0045] **실시예 3 : 내건성 관련 유전자의 분리 및 재조합 벡터 제조**

[0046] 내건성 관련 유전자의 분리는 상기 확보된 RNA를 주형으로 oligo dT 프라이머(primer)와 역전사효소(reverse tr℃anscriptase)를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤, 상기 [표 1]에 작성된 프라이머로 PCR을 수행하여 분리하였다.

[0047] 먼저, cDNA를 합성하기 위하여, 1㎍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㎍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, 61℃에서 30초, 72℃에서 30초로 40회 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후, 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

[0048] 도 1은 각 BrDSR-F와 BrDSR-R 프라이머 쌍을 사용한 PCR에 의해 배추로부터 증폭된 BrDSR을 코딩하는 유전자의 단편을 전기영동한 사진이다. 실험결과 증폭된 내건성 관련 유전자의 단편이 전기영동을 통해 확인하였다(도 1). 그 결과, 438bp에 해당하는 PCR 산물을 확인할 수 있었다.

[0049] 이후, 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머들로 증폭된 단편의 염기서열을 분석하기 위해 염기서열 분석용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 재조합 벡터를 구축하였다.

[0050] **실험예 1. 재조합 벡터를 이용한 E. coli DH10의 형질전환**

[0051] 대장균 DH10를 LB 50에 접종시켜 37℃에서 OD_{570} = 0.375 ~ 0.400이 되도록 배양한 후, 균주배양액을 3,000rpm에서 10분간 원심분리 하였고, 얻어진 침전물을 0.1M $CaCl_2$ 용액으로 풀어준 뒤 30분간 얼음에 보관하였다. 그 후, 3,000rpm에서 7분간 원심분리한 뒤 0.1M $CaCl_2$에 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 700를 첨가하여 37℃에서 1시간 진탕배양 하였다. 배양액을 12000rpm으로 수 초간 원심분리한 후, 100㎕만 남기고, 상등액을 제거하였으며, 남은 상등액으로 침전물을 녹였다. 이후 앰피실린(ampicillin, 50 mg/L), X-gal(200 mg/L in N-N dimethylformamide)이 첨가된 고체 LB 배지에 녹인 침전물을 전개하고, 37℃에서 12시간 배양한 후 고체 배지에서 저항성을 보이며 흰색의 콜로니를 형성하는 형질전환 콜로니를 선발하였다.

[0052] **실험예 2 : 재조합 DNA 분리 및 유전자 삽입 여부 조사**

[0053] 항생제가 첨가된 LB 배지 3ml에 상기 선발한 형질전환 콜로니를 접종한 후 37℃에서 12시간 배양하고, 배양액을 4℃에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 침전된 균 덩어리에 Solution I(200㎕/ml)을 첨가하여 보텍스(vortex)를 수초 간 수행하여 충분히 풀어준 후, Solution (200㎕/ml)를 첨가하여 조심스럽게 섞어주어 세포막이 완전히 깨어지도록 실온에서 5분간 방치하였다. 이 후 Solution (200㎕/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.

[0054] 배추로부터 증폭된 내건성 관련 유전자의 pGEM-T easy vector 내로의 삽입 여부를 확인하기 위해서 제한효소 EcoR을 상기 분리한 재조합 DNA에 처리하여 확인하였다(도 2). 도 2는 각 BrDSR-F와 BrDSR-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 BrDSR을 코딩하는 유전자를 pGEM-T easy vector에 넣은 후 정확한 삽입을 확인하기 위해 EcoRI 효소를 처리하여 확인한 사진이다. 그 결과, EcoRI처리에 의해 438bp의 삽입된 유전자와 pGEM-T easy vector로 두 개의 단편으로 분리되어, pGEM-T easy vector에 유전자가 삽입된 것을 확인할 수 있었다.

[0055] **실험예 3. 내건성 관련 유전자 전체 서열의 확인**

[0056] 다음으로, 상기 438bp의 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.

[0057] 도 3은 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 BrDSR을 코딩하는 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열 결과이다. 확인된 염기서열(서열번호 3)을 바탕으로 시작 코돈(codon)과 종료 코돈을 결정하여 아미노산 서열(서열번호 4)을 결정한 후, 그것이 배추로부터 분리된 전장(full length)의 내건성 유전자 BrDSR로 명명하였다(도 3).

[0058] **실험예 4. BrDSR 유전자의 형질전환용 재조합 벡터 제작**

[0059] 분리한 BrDSR 유전자를 과발현(over-expression) 시키기 위하여 pH2GW7(VIB-Ghent University, Belgium)에 438bp의 BrDSR 유전자를 삽입하여 형질전환용 벡터인 pDSR을 제작하였다(도 4). 도 4는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 BrDSR 유전자를 과발현 시키는 형질전환용 과발현 벡터(pDSR)를 나타낸다.

[0060] **실험예 5: BrDSR 유전자가 형질전환된 담배 제작**

[0061] 배추의 BrDSR 유전자가 과발현된 담배 형질전환체를 작성하기 위하여 아그로박테리움에 의한 효율적인 배추의 형질전환방법(특허 등록 제0523758호, 2005.10.31.)을 변형하여 실시하였다. 세부 형질전환 방법은 하기와 같다.

[0062] 1. 형질전환용 운반체(pDSR)를 함유하고 있는 아그로박테리움 투마파시엔의 배양

[0063] 담배에 접종하는 형질전환 매개체로는 식물형질전환용 벡터 pDSR을 함유하고 있는 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404/pDSR을 사용하였다. 이하에서 아그로박테리움 투마파시엔이라 함은 상기 아그로박테리움 투마파시엔 LBA4404/pDSR을 말한다.

[0064] 담배의 잎을 아그로박테리움 투마파시엔으로 접종시킬 때 형질전환의 효율을 높이기 위해, 먼저 형질전환용 운반체(pDSR)를 함유하고 있는 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404/pDSR)을 스펙티노마이신(spectinomycin) 50 mg/L가 함유된 고체 YEP 배지에 평판배양하여 28℃에서 48시간 배양하였고, 배양된 아그로박테리움 투마파시엔 세포 중 몇몇 콜로니(colony)를 찍어 스펙티노마이신 50 mg/L가 함유된 5 mL 액체 YEP 배지에 접종하여 28℃에서 48시간 현탁배양 하였다. 배양된 현탁에서 700㎕를 추출한 다음, 0.02 mM Acetosyringone이 첨가되고 pH가 5.6으로 조정된 50ml 액체 YEP 배지에 첨가하여 28℃에서 OD_{600}이 1.0이 될 때까지 현탁배양하였다. 마지막으로 배양된 현탁액은 원심분리기에서 4000rpm으로 15분간 원심분리시켜 25ml 액체 YEP 배지로 재현탁 되어 담배 잎의 접종에 사용되었다.

[0065] 2. 담배 형질전환 및 슈트 유도

[0066] 담배[*Nicotiana tabacum* SR1]를 무균상태에서 생육시킨 뒤 잎을 가로세로 10 mm로 자르고, 제작된 아그로박테리움 투마파시엔 현탁액에 1분간 침지시켜 접종하였다. 접종된 잎절편은 공동배양배지(MS기본배지, 3% sucrose, 0.8% plant agar, 1.5 mg/L BA, pH 5.7)에서 3일간 공동배양하였다. 이 후 잎절편을 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 잎절편을 배양하여 형질전환된 조직에서만 슈트가 유도되도록 하였다.

[0067] 3. 뿌리 유도

[0068] 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.

[0069] **실험예 6. PCR 검정을 통한 형질전환체 선발**

[0070] 상기와 같이 pDSR 벡터를 이용하여 형질전환된 담배 형질전환체들을 대상으로 형질전환 유무를 확인하기

위하여, PCR 검정을 수행하였다.

[0071] 도 5는 BrDSR 과발현 벡터를 이용하여 생산된 담배 형질전환체의 형질전환 유무를 PCR 검정을 통해 분석한 결과이다. 그 결과, 히그로마이신(hygromycin) 저항성 유전자(*hpt*)를 대상으로 PCR 검정을 수행하여 생산된 5개체 모두 형질전환체로 확인되었다(도 5). PCR 프로그램은 94℃에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 후, 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. PCR 검정을 위해 사용된 primer인 HPT-F(서열번호 3)과 HPT-R(서열번호 4)의 염기서열은 [표 2]와 같다.

표 2

[0072]

프라이머	염기서열
HPT-F (서열번호 3)	5-TTT CCA CT GCG AGT AC-3
HPT-R (서열번호 4)	5-TGT CGA GAA GTT TCT GAT CGA-3

[0073] **실험예 7. 정량적인 리얼-타임(Quantitative real-time) RT PCR 분석을 통한 형질전환체에서의 BrDSR 유전자의 발현 수준 분석**

[0074] 실험예 6에서 형질전환체로 확인된 5개체를 대상으로, 건조 스트레스 발생 시 체내 BrDSR 유전자의 발현 수준을 정량적인 리얼-타임(quantitative real-time) RT PCR로 분석하였다.

[0075] 도 6은 PCR 검정으로 형질전환이 확인된 담배 형질전환체들을 대상으로 체내 BrDSR 유전자의 발현 수준을 quantitative real-time RT PCR 분석을 통해 확인한 결과이다. 그 결과, PCR 검정으로 형질전환이 확인된 담배 형질전환체들은 비형질전환체(CON) 보다 약 1.7 내지 2.6배까지 높은 발현 수준을 보였다(도 6).

[0076] PCR 프로그램은 먼저 42℃에서 30분간 cDNA 합성 후, 95℃에서 10분간 변성(denature) 시켰다. 그 후, 95℃에서 10초, 59℃에서 15초, 72℃에서 20초 반응을 35회 반복하였다. 발현 분석 방법은 증폭량에 따른 형광강도수치(fluorescence intensity data)를 각 cycle의 종료 시마다 측정하였고, 측정치는 Rotor-Gene 6000의 분석 소프트웨어에 의해 분석하였다. 각 형질전환체의 BrDSR 발현 값은 actin 유전자의 발현 값에 비례하여 상대적으로 계산하였다. 사용된 primer는 서열번호 1과 서열번호 2의 primer를 이용하였다.

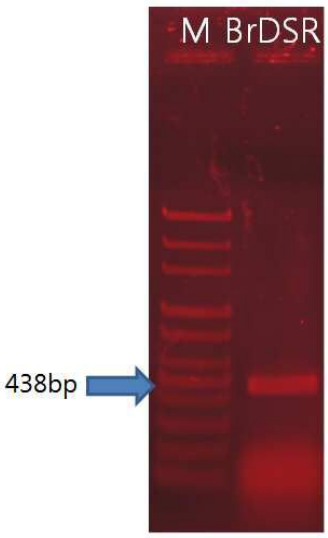
[0077] **실험예 8. 건조 스트레스 발생 시 담배 형질전환체들의 내건성 검정**

[0078] 히그로마이신(Hygromycin) 저항성 유전자를 이용한 PCR 검정으로 형질전환이 확인되고, 정량적인 리얼-타임(quantitative real-time) RT PCR 분석으로 비형질전환체 보다 높은 발현량이 확인된 5개체의 형질전환체들을 대상으로 실제 건조 스트레스 발생 시 표현형의 변화(내건성 여부)를 자연건조 처리 조건에서 관찰하였다. 건조 스트레스는 본엽이 7 ~ 9매가 된 비형질전환체와 형질전환체를 건조처리가 진행되는 동안 다른 어떠한 비생물적 자극(수분, 온도, 빛 등)이나 생물적 자극(병원균 감염, 해충 피해 등)이 발생하지 않는 제한된 조건(광도 250 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot sec^{-1}$, 광주기 16시간 명처리/8시간 암처리, 생육온도 22℃, 습도 30 - 50%)에서 표현형적으로 도복(倒伏) 여부가 명확한 차이를 보이는 시기까지 실시하였다.

[0079] 도 7은 내건성을 보이는 담배 형질전환체들을 대상으로 한 건조 스트레스 처리 후 표현형을 분석한 결과이다. 그 결과, 건조 처리 5일째가 되었을 때 대조군인 비형질전환체는 잎과 줄기의 탄력을 잃어 쓰러지기 시작하였으며, 7일 째 다시 수분을 공급하여도 회복하지 못하는 모습을 보였다. 반면, 형질전환체들은 모두 건조 처리 전과 동일한 모습을 유지하여 표현형상의 뚜렷한 차이를 보이지 않았다(도 7).

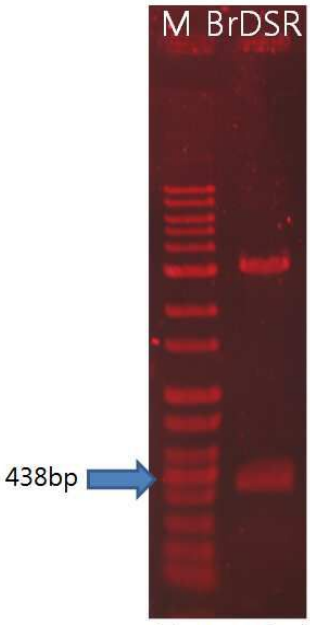
도면

도면1



[주] M, 1Kb size 분자 마커

도면2



[주] M, 1Kb size 분자 마커

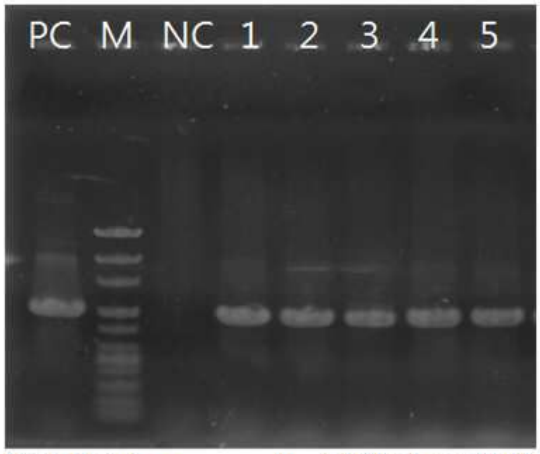
도면3

```
M  T  L  Q  V  F  H  L  L  S  I  S  L  V  I  I  F  V  F  S     20
ATGACTTTGCAAGTTTTCCATTTGCTAAGCATATCTTTAGTCATCATCTTTGTATTCTCT   60

A  N  V  V  S  E  E  D  H  Q  R  A  V  P  P  E  D  K  T  T     40
GCGAATGTTGTCAGTGAGGAGGATCACCAGAGAGCGGTGCCTCCGGAAGATAAAACGACT  120

T  V  W  F  S  R  I  K  Q  S  G  N  D  Y  W  G  K  L  K  E     60
ACGGTTTGGTTCTCTAGGATCAAACAGTCTGGTAATGATTACTGGGGGAAACTCAAAGAG  180

S  L  G  R  G  H  A  R  F  F  P  P  N  I  E  G  K  D  D  P     80
AGTTTAGGTCGTGGTCACGCCCGCTTTTTTCCTCCAAACATAGAAGGAAAGGATGATCCA  240

S  M  G  A  G  G  K  M  K  E  A  V  T  R  S  F  E  H  S  K    100
TCAATGGGAGCAGGAGGAAAGATGAAAGAGGCGGTCACAAGGAGCTTCGAGCACAGTAAA  300

D  S  V  E  E  A  A  R  S  A  A  E  V  A  C  D  A  A  E  A    120
GATTCGGTGGAGGAAGCTGCCAGATCAGCAGCGGAGGTGGCGTGTGATGCGGCGGAAGCA  360

V  K  E  K  V  K  R  S  F  S  G  S  E  T  T  Q  Q  Q  S  Y    140
GTTAAAGAAAAGGTGAAGAGGAGCTTTTCCGGCAGCGAGACGACTCAGCAGCAGTCATAT  420

G  T  E  E  L  *                                              145
GGTACTGAGGAGCTCTAA                                            438
```

도면4

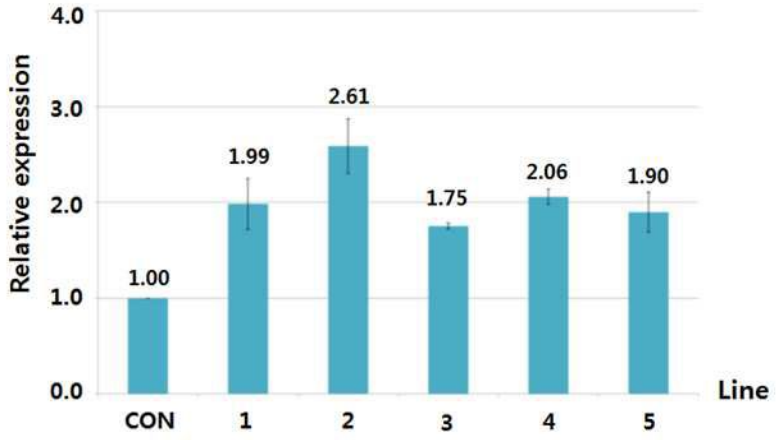
[주] LB, left border
T-35S, Cauliflower mosaic virus 35S terminator
hpt, hygromycin 저항성 유전자
P-35S : Cauliflower mosaic virus 35S promoter
RB, right border

도면5



[주] PC, hygromycin 저항성 유전자
M, 1Kb size 분자 마커
NC, 비형질전환체
1~5, 담배 형질전환체

도면6



[주] CON, 비형질전환체
1~5, 담배 형질전환체

도면7

[주] CON, 비형질전환체

서 열 목 록

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

<120> BrDSR Protein Implicated in Drought Stress Tolerance, Gene Encoding Thereof Protein and Transformed Plants with the Same

<130> KPA140802KR

<160> 6

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer BrDSR-F

<400> 1

atgactttgc aagttttcca 20

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer BrDSR-R

<400> 2

ttagagctcc tcagtacca 19

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer HPT-F

<400> 3

tttccactgc gagtac 16

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer HPT-R

<400> 4

tgtcgagaag tttctgatcg a 21

<210> 5

<211> 438

<212> DNA

<213> BrDSR

<400> 5

atgactttgc aagttttcca cttgctaagc atatctttag tcatcttctt tgtattctct 60

gtgaatgttg tcagtgagga ggattaccag agagcggtgc ctccggaaga taaaacgact 120

acggtttggt tctctaggat caaacagtct ggtaatgatt actgggggaa actcaaagag 180

agtttaggtc gtggtcacgc ccgctttttt cctccaaaca tagaaggaaa ggatgatcca 240

tcaatgggag caggaggaaa gatgaaagag gcggtcacaa ggagcttcga gcacagtaaa 300

gattcggtgg aggaagctgc cagatcagca gcggaggtgg cgtgtgatgc ggcggaagca 360

gttaaagaaa aggtgaagag gagcttttcc ggcagcgaga cgactcagca gcagtcatat 420

ggtactgagg agctctaa 438

<210> 6

<211> 145

<212> PRT

<213> BrDSR

<400> 6

Met Thr Leu Gln Val Phe His Leu Leu Ser Ile Ser Leu Val Ile Phe
1 5 10 15

Phe Val Phe Ser Val Asn Val Val Ser Glu Glu Asp Tyr Gln Arg Ala
20 25 30

Val Pro Pro Glu Asp Lys Thr Thr Thr Val Trp Phe Ser Arg Ile Lys
35 40 45

Gln Ser Gly Asn Asp Tyr Trp Gly Lys Leu Lys Glu Ser Leu Gly Arg
50 55 60

Gly His Ala Arg Phe Phe Pro Pro Asn Ile Glu Gly Lys Asp Asp Pro
65 70 75 80

Ser Met Gly Ala Gly Gly Lys Met Lys Glu Ala Val Thr Arg Ser Phe
85 90 95

Glu His Ser Lys Asp Ser Val Glu Glu Ala Ala Arg Ser Ala Ala Glu
100 105 110

Val Ala Cys Asp Ala Ala Glu Ala Val Lys Glu Lys Val Lys Arg Ser
115 120 125

Phe Ser Gly Ser Glu Thr Thr Gln Gln Gln Ser Tyr Gly Thr Glu Glu
130 135 140

Leu
145