



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0048050
(43) 공개일자 2012년05월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/29 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0104506

(22) 출원일자 2010년10월26일

심사청구일자 2010년10월26일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)

(72) 발명자

안진홍

경기도 용인시 기흥구 탑실로 152, 탑실마을2단지 210동 1703호 (공세동)

박종진

경기도 수원시 권선구 동수원로146번길 16-23, 드림하우스 101호 (곡반정동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

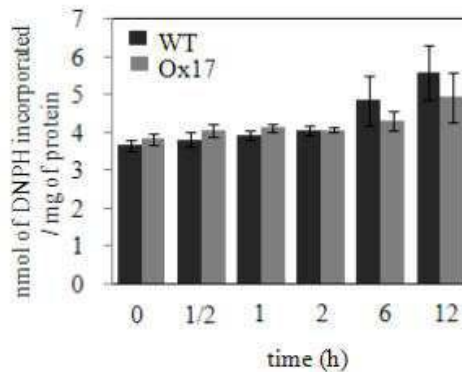
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 파라쿼트, 염, 및 가뭄에 대한 내성 증가를 위한 재조합 벡터, 이의 용도 및 이에 의한 형질 전환 식물체

(57) 요약

본 발명은 파라쿼트, 염, 및 가뭄에 대한 내성 증가를 위한 재조합 벡터, 이의 용도 및 이에 의한 형질전환 식물체를 제공한다. 본 발명의 형질전환된 식물체는 파라쿼트, 염, 가뭄 스트레스에 대한 증가된 저항성을 나타내며, 따라서, 기후 변화/재해에도 불구하고 재배 및 곡물 수확 등에 유리하다.

대표도 - 도9



(72) 발명자

이자경

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 우정원 기숙사 3761호 (서천동, 경희대학교)

윤진미

전라남도 해남군 계곡면 반계리 417번지

김평

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 작물바이오텍센터 (서천동, 경희대학교)

정희중

경기도 수원시 영통구 봉영로1482번길 7-1, 302호 (영통동)

조석근

서울특별시 노원구 동일로178길 50, 현대맨션 302호 (공릉동)

김우택

경기도 고양시 일산서구 대산로 142, 문촌우성아파트 304동 601호 (주엽동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2009-009-3862
부처명	교육과학기술부
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	모델 벼 시스템 개발 및 활용
주관기관	포항공과대학교
연구기간	2007.12.01 ~ 2012.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-K0006-77
부처명	교육과학기술부
연구사업명	21세기 프론티어연구개발사업
연구과제명	벼 발달 및 분화 조절 유용유전자 기능 규명
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2001.09.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 OsPUB15 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는, 식물체의 스트레스에 대한 내성 증가용 재조합 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 스트레스는 파라쿼트, 염, 및 가뭄 중에서 선택되는 하나 이상인 재조합 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 OsPUB15 단백질을 코딩하는 유전자가 도 2에 기재된 pCB302벡터 내에 삽입된 재조합 벡터.

청구항 4

제1항에 기재된 재조합 벡터에 의하여 형질전환된 형질전환 세포.

청구항 5

제4항에 있어서, 세포는 아그로박테리움 속 미생물인 형질전환 세포.

청구항 6

제5항에 있어서, 아그로박테리움 속 미생물은 아그로박테리움 투메파시엔스 LB4404(*Agrobacterium tumefaciens* LB4404)인 형질전환 세포.

청구항 7

제1항의 재조합 벡터에 의하여 형질 전환된 형질전환 식물체.

청구항 8

제7항에 있어서, 식물체는 단자엽식물인 형질전환 식물체.

청구항 9

제8항에 있어서, 단자엽식물은 벼(*Oryza sativa* L.)인 형질전환 식물체.

청구항 10

서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 OsPUB15 단백질을 코딩하는 유전자를 식물체에서 과다 발현시킴으로써 파라쿼트, 염 및 가뭄 중에서 선택되는 하나 이상의 스트레스에 대한 식물체의 저항성을 증가시키는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 식물체 내 벼 유래의 OsPUB15 단백질을 코딩하는 유전자의 과다 발현은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 벼 유래의 OsPUB15 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하고, 식물체 내에서 상기 도입된 유전자를 발현시킴으로써 수행되는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 스트레스에 대한 내성 증가용 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터의 용도 및 상기 재조합벡터에 의한 형

질 전환 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식물의 생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 대한 저항성을 증가시킴으로써 보다 수월하게 곡물을 수확하고, 곡물 수확량을 늘리기 위한 연구가 활발히 진행 중이다. 한국공개특허공보 제2006-80235호에는 식물에서 스트레스 내성을 향상시키는 방법 및 이들의 방법이 기재되어 있다. 또한, 벼(*Oryza sativa* L.)는 아시아를 포함한 많은 나라에서 주식으로 사용하고 있으며, 식물 연구를 위한 중요한 모델로서 현재까지 많은 연구가 활발히 진행 중이며, 한국공개특허공보 제2008-107497호에는 식물 스트레스 저항성을 증가시키는 OsRDCP1 유전자 및 이에 의해 형질전환된 벼가 기재되어 있다.

[0003] 한편, 기후 변화가 갈수록 정도가 심해져서 농업적 환경이 크게 위협받고 있다. 이러한 환경적 변화에 능동적 대처하기 위해서 환경 변화에 덜 민감하게 반응하는 식물의 개발이 필수적이다.

[0004] 이에 본 발명자들은 지구 온난화와 불규칙적인 강우로 인한 한반도의 아열대성 기후 변화에 따른 작물의 기후 적응성을 높이고, 점점 증가하는 기후 재해로 인한 피해를 최소화하여 작물의 재배 면적을 확대하여 식량의 원활한 공급을 기대할 수 있는 식물의 개발을 위하여, 식물의 환경 스트레스 저항성을 연구하던 중, 벼 유래의 OsPUB15 유전자에 의해 형질전환된 식물체가 생물학적 또는 비생물학적 스트레스에 대한 증가된 내성을 가지는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 파라쿼트, 염, 및 가뭄과 같은 스트레스에 대한 식물체의 저항성을 증가시키기 위한, OsPUB15 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 스트레스에 대한 저항성이 증가된 식물체를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 유전자를 식물체에서 과다 발현시킴으로써 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 방법에 의해 스트레스 저항성이 증가된 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 OsPUB15 유전자를 포함하는 파라쿼트, 염, 및 가뭄에 대한 내성 증가용 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터의 용도 및 상기 재조합 벡터에 의한 형질전환 식물체에 관한 것이다.

[0010] 본 발명자들은 OsPUB15 단백질(서열번호 2)이 식물체 내의 활성 산소 종(Reactive Oxygen Species: ROS)의 양을 감소시켜 고염도, 가뭄 스트레스에 대한 저항성을 나타낸다는 점을 처음으로 확인하여 하기와 같은 본 발명을 제공한다.

[0011] 본 발명은 OsPUB15 유전자를 포함하는, 식물체의 파라쿼트, 염, 및 가뭄 등 스트레스에 대한 저항성을 증가시키기 위한 재조합 벡터를 제공한다.

[0012] 본 발명의 재조합 벡터는 형질전환되는 식물체 내에서 OsPUB15 단백질을 과다 발현하는 벡터로서, 바람직하게는 재조합 식물 발현 벡터이다.

[0013] 본 발명의 파라쿼트, 염, 및 가뭄에 대한 내성 증가용 재조합 벡터 내에 포함되는 OsPUB15 유전자는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산, 그와 기능적으로 동등한 절편 또는 변이체를 포함한다.

[0014] 본원에서 사용된 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 OsPUB15 유전자는 [Zeng 등, (2008) Mol Plant 1:800-815]의 명명법에 따라 명명하였다. OsPUB15 cDNA(서열번호 1)는 2475bp 길이로, 이는 824개의 아미노산 폴리펩티드(서열번호 2)를 코딩하며, 또한 도 1에서 나타나듯이 다섯 개의 엑손과 네 개의 인트론으로 구성되어 있고, OsPUB15 단백질은 E3 라이게이즈 효소 활성을 나타내는 유-박스 도메인과, 단백질 단백질 상호 결합을 할 수 있는 아마딜로 반복 도메인을 C 말단에 가지고 있다.

- [0015] 본원에서 사용되는 OsPUB15 유전자와 "기능적으로 동등한 절편"은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 야생형 OsPUB15 단백질의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산이 결실 또는 절단된 폴리펩티드를 코딩하며, 그 폴리펩티드가 야생형 OsPUB15 단백질과 실질적으로 동등한 효과를 나타내는, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 조각 또는 일부분을 의미한다. 이러한 핵산 절편은 서열번호 1에 기재된 염기서열과 비교하여 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 가지며, 이러한 핵산 절편은 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.
- [0016] 본원에서 사용되는 OsPUB15 유전자와 "기능적으로 동등한 변이체"는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 야생형 OsPUB15 단백질의 아미노산 서열에서 하나 이상의 아미노산이 변형(예, 치환, 부가 또는 결실)된 폴리펩티드를 코딩하며, 그 폴리펩티드가 야생형 OsPUB15 단백질과 실질적으로 동등한 효과를 나타내는, 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 변이체를 의미한다. 이러한 핵산의 변이체는 서열번호 1에 기재된 염기서열과 비교하여 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 가지며, 이러한 변이체는 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.
- [0017] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 의미하며, DNA를 복제하고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 발현벡터는 진핵세포에서 이용가능한 하나 이상의 복제기점, 프로모터, 선택마커, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 서열을 포함할 수 있다. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유래하거나, 둘다의 요소를 포함할 수 있다. 따라서, 발현 벡터는 재조합 DNA 또는 RNA 구축물, 예컨대, 플라스미드, 파지, 재조합 바이러스 또는 적절한 숙주 세포 내 도입시, 클로닝된 DNA의 발현을 초래하는 다른 벡터를 의미한다. 적절한 발현 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 진핵세포 및/또는 원핵세포 내에서 복제가 가능한 것들 및 에피솜으로 남는 것들 또는 숙주 세포 계승 내에 통합되는 것들을 포함한다.
- [0018] 본원에서는, 형질전환되는 식물체에 도입되어 OsPUB15 단백질을 발현할 수 있는 임의의 식물 발현 벡터가 이용 가능하며, 이러한 재조합 식물 발현 벡터는 당업계에 알려진 통상적 기술을 이용하여 제작될 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 이용되는 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투메파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터(EP 0 116 718 B1호 참조)가 현재 식물세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 계승 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 생산될 수 있는 원형질체로 잡종DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 이원(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 OsPUB15 유전자를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 식물 발현 벡터는 또한 선택마커, 프로모터 및 터미네이터를 포함한다.
- [0021] 본 발명에서 사용가능한 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질 전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트(glyphosate), 포스포노트리신과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신, G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 바스타 저항성(BAR) 유전자가 사용된다.
- [0022] 본 발명에서 사용가능한 프로모터는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터로서, CaMV35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, 히스톤 프로모터 등이 있으며, 바람직하게는 CaMV35S 프로모터가 사용된다.
- [0023] 본 발명에서 사용가능한 터미네이터는 당업계에서 통상적으로 사용되는 터미네이터일 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS) 터미네이터, 베타-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(agrobacterium tumefaciens)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터, 대장균의 rrnB1/B2 터미네이터 등이 있으며, 바람직하게는 NOS 터미네이터가 사용된다.
- [0024] 특히, 본 발명에서 바람직한 재조합벡터는 2개의 T-DNA 보다 사이에 제초제 저항성을 가지는 BAR 유전자,

CaMV35S 프로모터 및 노스(NOS) 터미네이터를 포함하고, OsPUB15 유전자가 프로모터와 작동가능하게 연결된 식물 발현 재조합벡터이다. 본 발명의 일 구현예에 따른 상기 벡터는 도 2에 기재된 pCB302벡터이다 (Plant Mol. Biol. 40: 711-717 참조).

- [0025] 본 명세서에서 유전자와 프로모터가 작동가능하게 연결되었다고 함은 핵산 서열들이 이들의 의도된 기능을 수행하도록 연결된 상태를 지칭한다. 예를 들어, 프로모터 서열을 목적하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결시킨다는 것은 프로모터 서열이 목적하는 뉴클레오티드 서열의 전사를 지시할 수 있게 하는 방식으로 프로모터 서열과 목적하는 뉴클레오티드 서열을 연결하는 것을 의미한다.
- [0026] 상기 재조합벡터는 당업계에 알려진 재조합 DNA 기술을 이용한 재조합 수단에 의하여 제조될 수 있다.
- [0027] 본 발명은 또한 상기 파라쿼트, 염, 및 가뭄에 대한 내성 증가용 재조합 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.
- [0028] 상기한 재조합 벡터는 감염, 형질도입, 트랜스펙션, 전기천공 및 형질전환과 같은 주지된 기술을 이용하여 배양된 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 숙주의 대표적인 예는 박테리아 세포, 예를 들면, 대장균, 스트렙토마이세스 및 살모넬라 티피무리움 세포; 및 식물 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 임의의 식물 세포가 이용가능하다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 가능하다. "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다.
- [0030] 숙주 세포에 대한 적당한 배양 배지 및 조건은 당업자에게 널리 알려져 있다. 본 발명에서는 식물체 형질전환에 사용하기 위하여 아그로박테리움 속 미생물을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0031] 본 발명은 또한 상기한 재조합 벡터로 형질전환된, 파라쿼트, 염, 및 가뭄에 대한 내성이 증가된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0032] 본 발명의 재조합 벡터에 의한 식물체의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키기 위한 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 예를 들어, 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법(Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법(Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법(Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의(DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 매개된 유전자 전이에서(비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316 호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 바람직하게는 아그로박테리움 매개 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EP A 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 이원 벡터 기술을 이용하는 것이다.
- [0033] 아그로박테리움 벡터에 의한 식물체의 형질전환을 위한 최적 절차는 형질전환될 식물체의 종류에 따라 다양하다. 아그로박테리움 매개 형질전환을 위한 대표적인 방법은 멸균된 묘목 및/또는 작은 식물체로부터 유래된, 배축, 정단(shoot tip), 줄기 또는 잎 조직의 외식편의 형질전환을 포함한다. 그와 같은 형질전환된 식물체는 유성생식으로 또는 세포 또는 조직 배양에 의해 번식될 수 있다. 아그로박테리움 매개 형질전환은 이전에 다수의 상이한 종류의 식물체를 위해 기재되었으며 그와 같은 형질전환을 위한 방법은 당업계에 공지된 문헌에서 찾을 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 사용가능한 식물 형질전환용 아그로박테리움 균주로는 통상 이용되는 어떠한 균주라도 사용이 가능하다. 구체적으로 본 발명에서는, 식물시료에 침투하여 외래 유전자를 전달하는데 필요한 병원성이 큰 것으로 알려진 아그로박테리움 투메파시엔스, 더욱 바람직하게는, 아그로박테리움 투메파시엔스 LB4404(*Agrobacterium tumefaciens* LB4404)를 사용할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 형질전환되는 식물체는 본 실시예에서 사용된 벼(*Oryza sativa* L.)를 포함한 단자엽식물 뿐만 아니라 쌍자엽 식물도 제한 없이 사용할 수 있다. 바람직하게는, 단자엽 식물, 더욱 바람직하게는 벼(*Oryza sativa* L.)가 사용된다.
- [0036] 본 발명에 따른 OsPUB15 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질 전환한 다음 통상적인 방법에 따라 캘

러스의 유도, 발근 및 토양 순화의 과정인 무성번식 방법을 통해 수득할 수 있다. 즉, OsPUB15 유전자가 포함된 재조합 벡터로 형질 전환된 아그로박테리움을 켈러스 유도 절편체에 공급한다.

[0037] 본 발명은 또한 OsPUB15 유전자를 식물체에서 과다-발현시킴으로써 스트레스에 대한 저항성을 증가시키는 방법을 제공한다. 상기 스트레스는 파라쿼트, 염, 가뭄이 해당된다. 식물체에서 OsPUB15 유전자를 과다 발현시키는 방법으로는 OsPUB15 유전자를 포함하는 식물체 또는 OsPUB15 유전자를 포함하고 있지 않은 식물체 내로 OsPUB15 유전자를 도입함으로써 수행될 수 있다. 상기 "유전자의 과다 발현"이란 야생형 식물에서 발현되는 수준 이상으로 OsPUB15 유전자가 발현되도록 하는 것을 의미한다. 식물체 내로 OsPUB15 유전자를 도입하는 방법으로는 프로모터의 조절을 받는 OsPUB15 유전자가 포함된 발현 벡터를 이용하여 식물체를 형질전환하는 방법이 있다. 상기에서 프로모터로는 식물체 내에 삽입 유전자를 과다 발현시킬 수 있는 것이라면 액틴, 유비퀴틴, 35S 프로모터 등 특별히 제한되지 않는다.

[0038] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 것을 포함하는, 파라쿼트, 염, 및 가뭄에 대한 내성이 증가된 식물체를 제조하는 방법을 제공한다.

[0039] 상기 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하는 방법은 본원에서 상기 언급된 방법들 뿐만 아니라 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

발명의 효과

[0040] 본 발명의 OsPUB15 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 식물체는 파라쿼트, 염, 가뭄 스트레스에 대한 증가된 저항성을 나타내며, 따라서, 기후 변화/재해에도 불구하고 재배 및 곡물 수확 등이 유리하다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 OsPUB15 유전자의 염기서열에서 엑손과 인트론을 나타낸 것이다. OsPUB15 유전자는 5 개의 엑손과 4개의 인트론을 가지며 유박스와 아마달로 반복 도메인을 가지고 있다. 회색 박스는 엑손을 나타내며 짙은 회색선은 인트론과 UTR (untranslation region)을 나타낸다.

도 2는 OsPUB15 유전자의 과다발현 식물체 제조를 위하여 사용한 벡터의 다이어그램과 사용한 벡터 내의 유전자의 크기와 설명을 나타낸 것이다.

도 3은 비생물학적 스트레스 조건에서 OsPUB15 유전자의 발현 분석 결과를 로 나타낸 것이다.

도 4는 OsPUB15 단백질의 E3 라이게이즈 효소활성을 MBP에 특이적인 항체를 이용하여 확인한 것이다.

도 5는 OsPUB15 단백질의 E3 라이게이즈 효소활성을 Ub에 특이적인 항체를 이용하여 확인한 것이다.

도 6은 OsPUB15 유전자가 과다 발현된 형질전환 벼의 발현의 증가를 real-time PCR로 분석하여 나타낸 것이다.

도 7은 야생형 벼와 OsPUB15 과다발현체에 대하여 250 nM 파라쿼트(도7A), 250 mM NaCl(도7B), 가뭄(도7C) 처리 시 식물체의 표현형을 나타낸 것이다.

도 8은 야생형 벼와 OsPUB15 과다발현체를 1/2 MS 배지에서 5일 동안 키운 식물체(Mock), 250 nM의 파라쿼트를 5일 동안 처리한 야생형 벼와 과다발현체, 7일된 야생형 벼와 과다발현체를 2시간 동안 250 mM NaCl을 처리한 실험구 사이의 과산화수소(H_2O_2)의 양을 비교하여 나타내었다.

도 9는 7일된 야생형 벼와 OsPUB15 과다발현체에 대하여 20 μ M 파라쿼트 처리 후 0, 0.5, 1, 2, 6, 그리고 12 시간 후 DNPH 어세이를 통한 산화된 단백질의 양을 나타낸 것이다.

도 10은 pMAL 벡터의 개열지도를 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하에서는, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 아래의 실시예는 발명의 이해를 돕기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0043] [제조예]

[0044] 과산화수소, 염, 가뭄 스트레스에 대한 OsPUB15의 발현 양상 관찰

[0045] 야생벼의 종자를 30℃, 40% 상대 습도를 가지는 생장실에서 1/2 MS 배지가 포함되어 있는 밀폐된 투명한 플라스

틱 통에서 1주일을 키웠다.

- [0046] 그후, 동일한 온도, 습도를 가지는 생장실에서 1mM H₂O₂ 용액, 250 mM NaCl 용액, 및 종이 타올 위에 15 개체씩 7일 동안 키운 식물체를 옮긴 다음 처음 0분부터 30분, 60분, 및 120분 지점에서 3개체씩 4번에 걸쳐 잎을 절취를 하여서 RNA를 추출하였다.
- [0047] RNA를 추출시 절취한 잎을 2mL 튜브에 담고 액체 질소에 넣어 동결시킨 후, 믹서(Retsch MM300)로 곱게 분쇄하고 RNAiso Plus (TaKaRa) 1mL을 첨가 후 혼합하였다. 그후, 상온에서 5분 동안 방치 후 BCP(Sigma) 0.1 mL을 첨가하고 다시 흔들어 혼합한 후 상온에서 5분 동안 방치하였다. 이어서, 원심 분리기에서 4℃, 13000 rpm에 15분 동안 원심 분리한 후 상등액을 새로운 1.5 mL 튜브에 옮겼다. 옮긴 샘플에 0.5 mL IPA(JUNSEI)를 넣고 혼합한 후, 다시 원심 분리기에서 4℃, 13000 rpm에서 10분 동안 원심 분리한 후, 남은 펠렛을 70% 알코올로 가볍게 세척하였다.
- [0048] 펠렛을 50 μ L의 증류수에 녹인 후 RNA 정량하여 4 μ g의 RNA를 주형 가닥으로 하여 cDNA를 합성하였다. 상기 cDNA를 주형 가닥으로 유비퀴틴 프라이머[F2 5' -ACCATACCAGAAGGGAGGA-3' (정방향) 및 R1 5' -CGGGAATTCAGCAAGGAGA-3' (역방향)] 와 OsPUB15 프라이머[F3 5' - GGAATTCAGCAAGGAGAT-3' (정방향) 및 R3 5' -TGCCCTGCATGTTGTACC-3' (역방향)]을 이용하여 Real-Time PCR(Corbett) 을 수행하였다. 유비퀴틴의 발현을 기준으로 상대적인 OsPUB15의 발현 수준을 결정하였다 (도 3).
- [0049] 도 3에 나타난 바와 같이, 과산화수소, 염, 가뭄 등의 스트레스 조건에서 OsPUB15 유전자의 발현 증가가 관찰되었다. 저온 및 건조처리의 경우 발현이 현저하게 증가되는 것이 확인되었다. 특히, 스트레스 처리후 1시간에서 2시간 사이에서 발현이 가장 높게 나타났다. OsPUB15 유전자가 외부 스트레스와 관련한 기능을 하는 유전자인 것으로 결정하고, OsPUB15 단백질의 외부 스트레스와 관련한 기능을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.
- [0050] [실시예]
- [0051] **실시예 1. OsPUB15 유전자 클로닝 및 식물 발현용 재조합 벡터의 제작**
- [0052] OsPUB15 유전자는 벼의 KOME(Knowledge-based Oryza Molecular Biological Encyclopedia) cDNA를 분양 받아 cDNA 플라스미드를 주형가닥으로 PCR을 수행하여 획득하였다.
- [0053] OsPUB15 유전자를 클로닝하기 위해 정방향 프라이머(5'-ATGGAATTTCTCCCCGAG-3'(서열번호 3))와 역방향 프라이머(5'-TCATCTCCTTGCTGAATTC-3'(서열번호 4))를 제작하였다. 상기 프라이머는 pCB302 벡터(35S 프로모터 아래 OsPUB15를 식물체 내에서 과다 발현시키기 위한 바이너리 벡터)와 pMal-c2(MBP 내재 OsPUB15 단백질 정제용 벡터)에 삽입을 위한 BamHI linker 및 StuI linker를 포함하도록 디자인하였다.
- [0054] 상기 프라이머를 사용하여 PCR(polymerase Chain Reaction)을 수행하였다.
- [0055] GeneAmp[®] PCR System 9700(Applied Biosystems) PCR 기기에서 Pfu taq을 사용해서 벼의 cDNA를 주형가닥으로 하여 상기 프라이머로 디네이처 95℃, 어닐링 57℃, 익스텐션 72℃ 조건에서 36 사이클 동안 증폭하였다. 이로써 얻은 PCR 산물을 다시 Taq pol을 사용하여 증폭된 가닥의 3' 가닥에 아데닌을 붙이고서 T-easy 벡터(Promega)에 라이게이션을 12시간 동안 14도에서 진행하였다. 라이게이션 산물을 Top10 E.coli 컴피턴트 셀 50 μ L과 혼합한 후 1.5 mL 튜브에 옮긴 다음 얼음에 30분 방치하였다. 이어서, 37℃ 오븐에서 1분 동안 방치한 후 추가로 1 mL의 LB 액체 배지를 튜브에 첨가하고, 1시간 동안 37℃ 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 엠포실린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 12시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 LB액체 배지에서 12시간 세포 배양하였다.
- [0056] 배양한 세포를 5분간 상온에서 12,000 rpm으로 원심분리를 하였다. 그후, 상층의 배양액을 제거한 후 sol I(50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl PH8.0, 10 mM EDTA), sol II(0.2% NaOH, 1% SDS), 그리고 sol III(5 M potassium acetate, glacial acetic acid, PH 4.8)를 사용하여 세포벽을 파쇄하였다. 다시 10분간 상온에서 12,000 rpm으로 원심분리를 한 후, 상등액을 1.5 mL 새로운 튜브에 넣은 후 95 % EtOH를 넣고 섞은 후 10분간 상온에서 12,000 rpm으로 원심분리해서 얻은 펠렛을 70 % EtOH로 씻은 후 100 μ L 물에 녹였다. (이하, 본 과정을 "미니 프랩(mini-prep)"이라 함)
- [0057] 상기 회수한 DNA를 제한 효소 BamHI과 StuI을 사용하여 효소 절단 후 전기영동에서 아가로스 젤 분리 하고서 OsPUB15 크기의 밴드를 오려낸 후 동일 효소로 절단된 pCB302 벡터(pCB302 벡터에 관하여는 PMB(Plant Mol.

Biol. 40: 711-717) 참조, 또한, 모식도는 도2 참조)와 라이게이션을 14℃에서 12시간 진행하였다. 라이게이션 산물을 Top10 E.coli 컴피턴트 셀 50 μ l과 혼합하여 1.5 ml 튜브에 옮긴 다음 얼음에 30분 방치하였다. 이어서, 37도 오븐에 1분을 다시 방치한 후 1 ml의 LB 액체 배지를 추가로 튜브에 넣은 다음 1시간 동안 37도 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 카나마이신 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 12시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프랩하였다.

[0058] 미니 프랩으로 얻은 DNA를 제한 효소 BamHI과 StuI을 사용하여 효소 절단 후 전기영동에서 아가로스 젤 분리 하고서 OsPUB15 크기의 밴드와 pCB302 벡터의 크기 밴드를 확인하였다. 이렇게 해서 얻어진 클로닝 DNA를 다시 염기 서열 분석을 하여 에러가 발생하지 않은 DNA를 선택하였다. 이렇게 얻어진 재조합 벡터를 pCB302-OsPUB15 벡터라 명명하였다.

[0059] **실시예 2: 단백질 정제용 재조합 벡터 제작 및 OsPUB15 단백질 분리**

[0060] 실시예 1에 기재된 OsPUB15 유전자용 프라이머를 사용하여 PCR(polymerase Chain Reaction)을 수행하였다.

[0061] GeneAmp[®] PCR System 9700(Applied Biosystems) PCR 기기에서 Pfu taq을 사용해서 버의 cDNA를 주형가닥으로 하여 상기 프라이머로 디네이처 95℃, 어닐링 57℃, 익스텐션 72℃ 조건에서 36 사이클 동안 증폭하여 얻은 PCR 산물을 다시 Taq pol을 사용하여 증폭된 가닥의 3' 가닥에 아데닌을 붙이고 T-easy 벡터(Promega)에 라이게이션을 12시간 동안 14℃에서 진행하였다. 진행된 라이게이션 산물을 Top10 E.coli 컴피턴트 셀 50 μ l과 섞어서 1.5 ml 튜브에 옮긴 다음 얼음에 30분 방치하였다. 이어서, 37℃ 오븐에 1분 동안 방치 후 1 mL의 LB 액체 배지를 추가로 튜브에 넣고 1시간 동안 37℃ 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 엠포실린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 12시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 LB액체 배지에서 12시간 세포 배양 후 미니 프랩하였다.

[0062] 미니 프랩으로 얻은 DNA를 제한 효소 BamHI과 StuI을 사용하여 효소 절단 후 전기영동에서 아가로스 젤 분리 하고서 OsPUB15 크기의 밴드를 올려낸 후, 동일 효소로 절단된 pMAL 벡터(도 10 참조)와 라이게이션을 14℃에서 12시간 진행하였다. 라이게이션 산물을 Top10 E.coli 컴피턴트 셀 50 μ l과 섞어서 1.5 ml 튜브에 옮긴 다음 얼음에 30분 방치 후 37℃ 오븐에 1분을 다시 방치 후 1 ml의 LB 액체 배지를 추가로 튜브에 넣은 다음 1시간 동안 37℃ 셰이킹 인큐베이터에서 방치 후 엠포실린 저항성 LB 고체 배지에 도말 하고 12시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 엠포실린 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프랩하였다.

[0063] 미니 프랩으로 얻은 DNA를 제한 효소 BamHI과 StuI을 사용하여 효소 절단 후 전기영동에서 아가로스 젤 분리한 후 OsPUB15 크기의 밴드와 pMAL 벡터의 크기 밴드를 확인하였다. 이렇게 해서 얻어진 클로닝 DNA를 다시 염기 서열 분석을 하여서 에러가 발생하지 않은 DNA를 선택하였다. 이렇게 얻어진 재조합 벡터를 pMAL-OsPUB15 벡터라 명명하였다.

[0064] 선택된 pMALC2-OsPUB15 벡터 DNA를 BL21 strain E.coli 에 다시 형질 전환 후에 엠포실린 LB 고체 배지에 도말 후에 생성된 콜로니를 선발하여 1 mL LB 액체 배지를 시험관에 넣어 37℃ 셰이킹 인큐베이터에서 12시간 키우고 이를 50 mL LB 액체 배지에 다시 계대 배양 후에 37℃ 셰이킹 인큐베이터에서 약 3시간(흡광도 값이 0.5~0.6) 까지 세포를 키운 후 IPTG 3 mM(Duchefa)를 첨가하여 인덕션시켰다.

[0065] 그후 8 시간 동안 28℃ 셰이킹 인큐베이터에서 키우고, 3500 rpm 5분 동안 원심 분리한 후 1 mL lysis buffer(Qiagen) 첨가하여 소니케이션을 2분간 2회 실시하여 세포벽을 분쇄하였다. 다시 3500 rpm 10분 간 원심 분리 후 상등액을 500 μ l MBP Exellose[®](Bioprogen) 와 혼합하고 4℃ 저온실에서 1시간 회전하여 혼합하였다. 1 시간 후 스핀 다운 후에 상등액을 버리고 1 mL의 washing buffer(Qiagen)을 넣어서 스핀 다운과 상등액 제거, washing buffer 교환을 각 10분 마다 5회 실시하였다. 마지막 회에서 상등액 제거 후 200 μ l elution buffer(Qiagen)를 첨가한 후 30 분간 회전하여 혼합하고 스핀 다운 후 상등액을 취하여 브레드포드 어세이를 통한 단백질 정량 후에 PAGE gel에서 MBP-OsPUB15의 밴드를 확인하였다.

[0066] **실시예 3: 형질전환 세포의 제작**

[0067] 상기 실시예 1에서 제작한 식물 발현용 벡터(pCB302-OsPUB15 벡터)를 추출하였다.

[0068] 아그로박테리움 컴피턴트 셀(Agrobacterium tumefaciens LB4404) 50 μ l와 2 μ g의 pCB302-OsPUB15 벡터를 혼합하여 전기천공을 위한 4mm 큐벳에 넣었다. 상기 큐벳을 전기천공기(Bio-rad, USA)에 넣고 300 V, 450 B μ F의 전기 충격을 주어서 형질전환하였다. 형질전환된 혼합물을 1 mL의 YEP 액체 배지에서 넣고 셰이킹 인큐베이터에서 2

시간 방치 후 고품 YEP 배지(카나마이신 50 mg/mL)에 도말한 후 28℃에서 배양하였다. 그후 생성된 콜로니를 다시 1 mL 카나마이신 저항성 YEP 배지에서 12 시간 키운 다음 미니 프랩 후 얻은 DNA를 가지고 BamHI과 StuI 제한 효소 절단을 하여 OsPUB15의 사이즈를 확인하였다.

[0069] 상기 생성된 형질전환된 아그로박테리움을 이용하여 벼의 형질 전환 실험에서 사용하였다.

[0070] 실시예 4: 형질전환 식물체의 제작

[0071] MS 고체 배지에서 동진벼 종자를 30일 정도 28℃ 암 조건인 생장실에서 키워서 벼의 캘러스를 생성하였다. 생성된 캘러스를 상기 실시예 3에서 얻은 pCB302-OsPUB15 벡터로 형질 전환된 아그로박테리움을 72시간 키운 세포와 혼합하여 MS-Acetosyringone 고체 배지에서 22℃ 암처리 생장실에 방치하였다.

[0072] 아그로박테리움에 오염된 캘러스를 3차 증류수로 깨끗이 5번 정도 헹구어 낸 다음 MSD 고체 배지의 basta 선발을 1차(phosphinothricin(PPT) 5 mg/L), 2차 (PPT 10 mg/L)에 걸쳐서 계대 배양을 통해 진행하였다. 선발은 28℃ 암 조건 생장실에서 각각 2주 씩 합해서 4 주 동안 이루어졌다. MS-7(PPT 10 mg/L)고체 배지에 캘러스를 옮기고 다시 10일 동안 28℃ 암 조건 생장실에서 키우고 분열된 캘러스를 재분화 배지인 MS-RI(PPT 10 mg/L) 고체 배지에서 2주 28℃ 광조건 생장실에서 캘러스를 계속 키웠다. MS-RII(PPT 10 mg/L) 고체 배지에서 추가로 2주 28℃ 광조건 생장실로 캘러스를 계대 배양 후 생성된 재분화 식물체를 MS 고체 배지로 옮기고 7일 28℃ 광조건 생장실에서 키우고 온실로 옮겨서 재분화 식물체를 키웠다.

[0073] 얻어진 재분화 식물체의 OsPUB15 유전자 과다 발현을 확인하기 위해서 재분화 식물체의 잎에서 RNA를 추출하였다. RNA 추출시 절취한 잎을 2mL 튜브에 담고 액체 질소에 넣어서 동결시키고 믹서(Retsch MM300)로 곱게 분쇄한 후 RNAiso Plus(TaKaRa) 1mL을 첨가하고 혼합하였다. 그리고 상온에서 5분을 방치 후 BCP(Sigma) 0.1 mL을 넣고 다시 흔들어 혼합한 후 상온에서 5분 동안 방치하였다.

[0074] 그후 원심 분리기에서 4℃, 13000 rpm에 15분을 원심 분리한 후 상등액을 새로운 1.5 mL 튜브에 옮겼다. 옮겨진 샘플에 0.5 ml IPA(JUNSEI) 첨가 후 혼합하고 다시 원심 분리기에서 4℃, 13000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 남은 펠렛을 70% 알코올로 가볍게 세척하였다.

[0075] 펠렛을 50μL의 증류수에 녹인 다음 RNA 정량을 하여 4μg의 RNA를 주형 가닥으로 하여 cDNA를 합성하고 cDNA를 주형 가닥으로 유비퀴틴 프라이머[F2 (정방향) 5' -ACCATACCAGAAGGGAGGA-3' 및 R1(역방향) 5' -CGGGAATTCAGCAAGGAGA-3'] 과 OsPUB15 프라이머[F3(정방향) 5' - GGAATTCAGCAAGGAGAT-3' 및 R3(역방향) 5' -TGCCCTGCATGTTGTAC-3']를 가지고 Real-Time PCR(Corbett) 을 수행하였다. 유비퀴틴의 발현을 기준으로 상대적인 OsPUB15의 발현 수준을 결정하였다. 대조군으로 야생형 식물체 내의 OsPUB15과 유비퀴틴의 mRNA 발현 수준을 위와 동일한 방법으로 확인하였다. 실험결과, 36개의 식물체 중에서 22개에서 특히 발현이 증가한 것을 관찰할 수 있었다 (도 6).

[0076] [실험예]

[0077] 실험예 1: OsPUB15 단백질의 효소활성 분석

[0078] 상기 실시예 2에서 분리한 OsPUB15 단백질의 유비퀴티네이션 어세이를 실시하였다.

[0079] 구체적으로, OsPUB15 단백질의 효소활성을 분석하기 위해 E1, E2의 제공원으로써 각각 인간의 UBC5c(Sigma), 애기장대의 UBA1(At2g30110)을 사용하였다.

[0080] OsPUB15 단백질은 MBP(maltose binding protein)에 융합하여 구축하였으므로 MBP-OsPUB15 단백질을 사용하여 시험관 내에서 200 ng hUBC5c (Sigma), AtUBA1 100 ng, 40 mM Tris-Cl(Sigma) pH 7.5, 5 mM MgCl₂(Sigma), 2 mM ATP(Sigma), 2 mM dithiothreitol(DTT)(Sigma), 300 ng/ml ubiquitin(Sigma), 그리고 E3 라이게이즈로써 MBP-OsPUB15 단백질 1μg을 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응 후 MBP-OsPUB15 혼합물을 100℃ 물에 5분간 끓인 후 얼음에 두었다. 혼합물을 식힌 후 PAGE 상에 걸어준 후 MBP 항체와 Ub 항체를 이용하여 각각 웨스턴 블롯을 수행하여 신호를 감지하였다.

[0081] OsPUB15 단백질의 효소활성 관찰한 결과, 도 4에 나타난 것과 같이, pMAL-C2 벡터에 클로닝된 OsPUB15는 MBP(maltose binding protein)에 융합되어 MBP 항체로 웨스턴 블롯을 실시하였을 때 E1, E2, 및 Ubiquitin이 존재하였을 때만 사다리 모양의 밴드가 나타났다.

[0082] Ubiquitin 항체로 웨스턴 블롯을 실시하였을 때도 동일한 결과(도 5)를 얻었다. MBP-OsPUB15 단백질이 오토유비퀴티네이션된 것임을 알 수 있었다. 따라서, OsPUB15 단백질이 E3 라이게이즈 효소 활성을 가지고 있는 것을

관찰할 수 있었다.

[0083] 실험예 2: 스트레스(파라콰트, 염, 가뭄)에 대한 내성 확인

[0084] (1) 시료 성장

[0085] 스트레스 처리를 위하여, 상기 실시예 4에서 제작한 형질전환 식물체를 3세대 키워 종자를 획득하여 다음의 실험에 사용하였다. 벼 식물체를 키우는 조건은 하기한 스트레스 처리 전까지는 동일하게 수행하였다.

[0086] 1/2 MS salt 배지(MS salt including vitamin 2.2g, sucrose 30g per L)에 agar를 넣어 고형 배지를 만들고, 아래 실험예에서의 필요에 따라 250 nM의 파라콰트, 100mM의 NaCl을 추가로 넣어서 종자 껍질을 깬 현미 종자를 상대 습도40%, 30도, 광조건 18시간, 암 조건 6시간으로 자동 조절되는 식물 성장실에서 키웠다.

[0087] 7일간 성장실에서 현미 종자를 키운 후 각각의 성장 크기를 측정하거나 다음 스트레스 처리를 위하여 사용하였다.

[0088] (2) 스트레스(파라콰트, 염, 가뭄) 처리

[0089] ① 파라콰트에 대한 내성 확인

[0090] 위에서 7일간 성장시킨 야생형 현미 종자를 250 nM 파라콰트가 포함된 1/2 MS salt 고체 배지에서 1주일간 키운 후 각각의 벼 지상부의 길이를 측정하였다 (도 7A).

[0091] 도 7A에 나타난 바와 같이, OsPUB15 과다발현 식물체(0x14, 0x17, 0x22) 4개체에서 파라콰트 처리 조건 아래서 도 4개체의 야생형 벼보다 더 크게 자랐다.

[0092] ② 염에 대한 내성 확인

[0093] 염의 처리는 상기 고체배지에서 7일간 성장시킨 어린 벼를 각각 250 mM NaCl 용액에 담근 후 시간대 별로 관찰하였고 다시 NaCl이 제거된 물에 옮겨서 벼의 회복을 관찰하였다 (도 7B).

[0094] 7일 동안 키운 야생형 벼와 OsPUB15 과다 발현 식물체를 24시간 동안 250 mM NaCl에 넣어 두었다가 다시 물에 옮겨서 72시간 동안 관찰하였다. 도 7B에 나타난 바와 같이, 야생형 벼(WT) 4개체는 새로운 잎이 나오지 않은 반면 과다발현체 (0x17) 4개체에서는 새로운 네 번째 잎이 나타난 것이 확인되었다.

[0095] ③ 가뭄에 대한 내성 확인

[0096] 가뭄 처리는 45일 동안 25도, 상대 습도 55%, 광조건 14시간, 암조건 10시간 온실의 화분에서 키운 벼를 3일 동안 물을 빼고서 건조시킨 후 흙이 마른 시점에서 추가로 3일을 더 가뭄 처리를 하였고, 다시 물을 주어 벼가 회복되는 것을 관찰하였다 (도 7C).

[0097] 도 7C에 나타난 바와 같이, 야생형(WT) 벼는 황백화 현상이 나타나며 급격하게 시든 반면 OsPUB15 과다 발현 식물체(0x17)는 잎 끝만 시들고서 녹색의 잎을 나타내었다. 3일 가뭄 처리 후 물을 다시 공급한 조건 아래에서 역시 야생형 벼는 회복하지 못하고 잎이 황백화되면서 마르는 반면 OsPUB15 과다발현체에서는 잎 끝이 마르긴 했지만 여전히 잎 전체에서 녹색을 띠며 성장을 지속하였다.

[0098] (3) 스트레스 처리시 식물체 내 발생한 과산화수소의 정량

[0099] 위에서 각각의 스트레스를 처리한 야생형 벼 및 과다 발현체 샘플들을 액체 질소를 사용하여 분쇄기에서 갈아 가루로 파쇄한 다음 샘플 0.1 g 당 0.5 ml의 과산화수소 추출완충 용액(0.05 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4)를 넣고 잘 섞어 주었다. 13000 rpm에서 10 분 동안 원심 분리를 한 후 상등액의 50 μ l를 50 μ l의 Amplex[®] Red reagent/HRP working solution (Invitrogen)에 섞어서 상온 암 조건에서 1시간을 방치하였다. 그리고 난 다음, 흡수 스펙트럼 530 nm의 파장에서 전자를 여기시킨 후 방출 스펙트럼 560 nm에서 파장을 측정하였다.

[0100] 야생형(WT) 벼와 OsPUB15 과다발현 식물체(0x14, 0x17, 0x22)를 1/2 MS 배지에서 5일 동안 키운 식물체(Mock), 250 nM의 파라콰트를 5일 동안 처리한 야생형 벼와 과다발현체, 7일된 야생형 벼와 과다발현체를 2시간 동안 250 mM NaCl을 처리한 실험군 사이의 과산화수소(H₂O₂)의 양을 비교하여 나타내었다(도 8). OsPUB15 과다 발현 식물체내 과산화수소 양이 야생형에 비해 적음을 확인할 수 있었다. 따라서, OsPUB15 과다 발현 식물체가 스트레스에 더 큰 내성을 가지는 것을 알 수 있었다.

[0101] (4) 스트레스 처리시 식물체 내 산화된 단백질 측정

[0102] 7일간 성장시킨 야생형 벼 및 과다 발현체 샘플들을 20 μ m파라콰트를 처리 후 0, 0.5, 1, 2, 6, 그리고 12 시간 후에 각각 샘플링하여 액체 질소를 사용하여 분쇄기에서 갈아 가루로 파쇄한 다음 샘플 0.3g 당 1 ml의 추출 용액(10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol, 1 mM PMSF, and 25 mM Tris-HCl, pH 7.5) 을 넣고 잘 혼합하였다.

[0103] 13000 rpm에서 10분 동안 원심 분리한 후 상등액의 5 μ l를 사용하여 브레드포드 어세이를 통하여 단백질을 정량하였다. 그후, 1 mg의 단백질을 두 개의 튜브에 각각 옮겨 담고 한 개에는 1 mL의 2 N HCl을 첨가하고 다른 한 개에는 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)이 있는 1 mL의 2 N HCl을 첨가하였다.

[0104] 한 시간 정도 상온에서 방치 후, 10% trichloroacetic acid를 첨가하고 얼음에서 추가로 한 시간 정도 방치하였다. 튜브를 13000 rpm에 15분 동안 원심 분리한 후 튜브에 남은 침전물을 1:1 에탄올 : 에틸 아세테이트로 세척하였다.

[0105] 침전물은 6 M guanidine-HCl이 포함되어 있는 20 mM 소듐 포스페이트 용액에 용해시켰다. 침전물이 녹아 있는 용액을 370 nm의 스펙트럼에 흡광도를 측정하였다. 2 N의 HCl-DNPH에 얻은 흡광도에서 2 N HCl에서 얻은 흡광도를 빼고서 남은 수에 흡광 계수 22,000을 곱하여 산화된 단백질의 양을 계산하여 도 9에 나타내었다. 시간이 경과함에 따라 OsPUB15 과다 발현체에 비하여 야생형 식물체에서 산화된 단백질의 양이 더욱 증가함을 확인할 수 있었다. OsPUB15 과다 발현체가 스트레스에 대한 내성 증가를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

도면

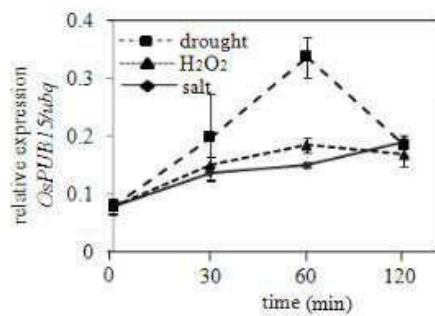
도면1



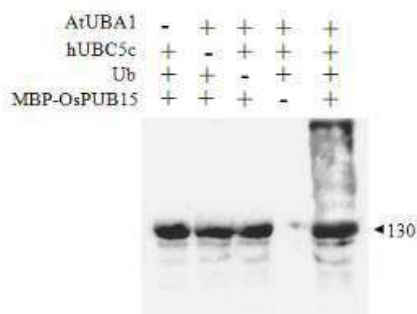
도면2

<i>oriV</i>	<i>nptII</i>	<i>trfA</i>	RB	Tnos	DHA	<i>OsPUB15</i>	HBT95 promoter	Tnos	<i>bar</i>	Pnos	M1	LB
order	description											size (bp)
<i>oriV</i>	part of RK2 origin of replication (from pBIN19)											618
<i>nptIII</i>	gene for neomycin phosphotransferase for kanamycin resistance (from pBIN19)											1000
<i>trfA</i>	part of RK2 origin of replication											1480
RB	right border of T-DNA											160
Tnos	terminator of nos (nopaline synthase) gene											250
DHA	double HA tag											60
<i>OsPUB15</i>	<i>OsPUB15</i> full length sequence											2419
<i>HBT95 promoter</i>	35S minimal promoter of cauliflower mosaic virus											600
Tnos	terminator of nos (nopaline synthase) gene											300
<i>Bar</i>	gene for phosphinothricin acetyltransferase											600
Pnos	promoter of nos (nopaline synthase) gene											600
M1	mutiple cloning site 1											35
LB	right border of T-DNA											140

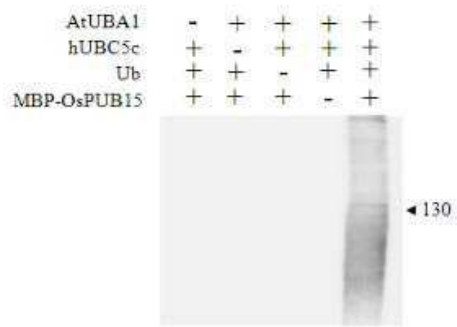
도면3



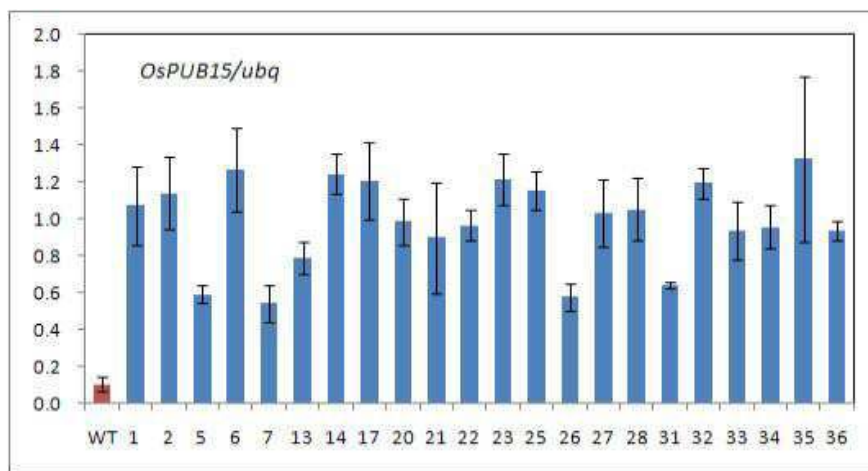
도면4



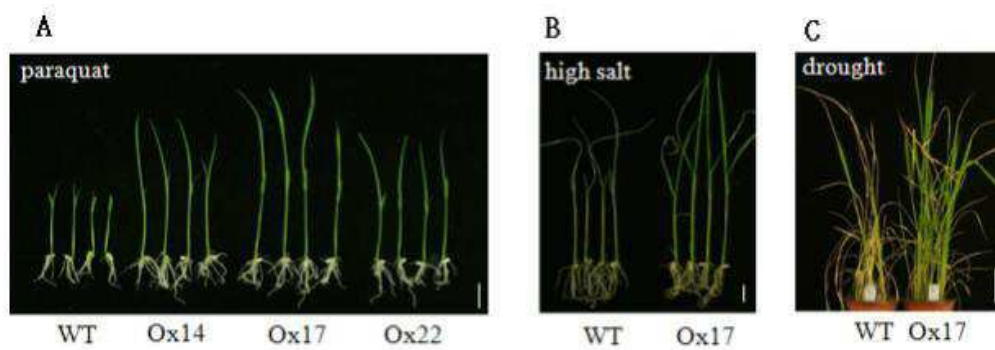
도면5



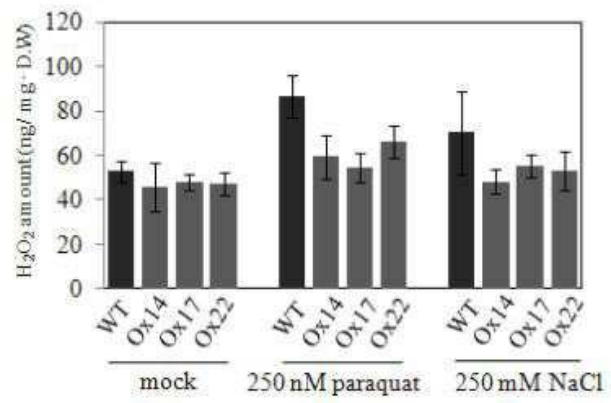
도면6



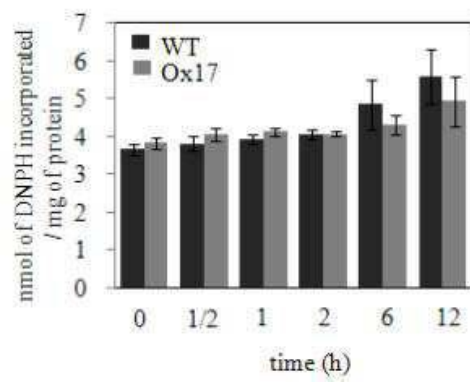
도면7



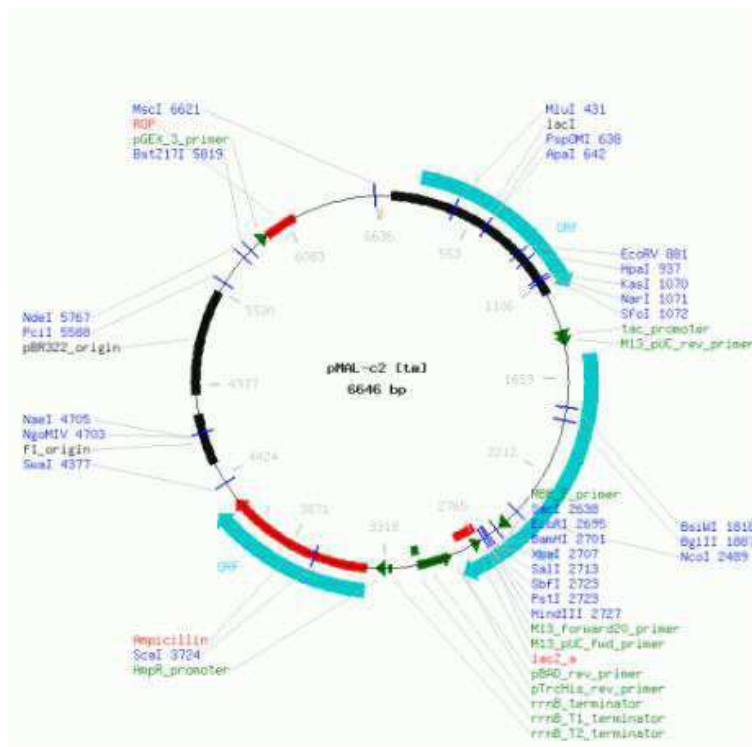
도면8



도면9



도면10



서 열 목 록

<110>	University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
<120>	Recombinant vector for increasing tolerance to paraquat, salt, and drought stresses, uses thereof and transformed plants thereby
<130>	P10-041-KHU
<160>	4
<170>	Kopatent In 1.71
<210>	1
<211>	2475
<212>	DNA
<213>	Oryza sativa
<220><221>	gene
<222>	(1)..(2475)
<223>	OsPUB15 cDNA
<400>	1

atggaaaatt tctcccgag aacctgctc aatagtatct tgcgtatcac tgtcttaacc 60

tccgatggct ctactgcaag gcccaagccc attcagaagt actgccaaaa tgtgtgtgat 120

atctcaagca ttgtgagccc tctcatagag gatctatgtg agtctcctga agagcaactc 180

aatgagggtg taaggagct tggcactgct attaacagag cttcagggtt tattgggaac	240
tggcaacaga caaccagcaa aatatatttt atatggcaga ttgaatcagt aatctcagat	300
atccagggat gttctctaca gctgtgccag cttgttaact ctctattacc ttctttgact	360
ggccgtgcat gcacatgtat tgagaaactc caagacataa attatgaaaa catgtttgat	420
ctggtaaagg agtcttcatt ggagctagtt gagacggaca caacaagtcc tgagaatctg	480
tcgagactat ctagttcatt gagtttgtca actaacctgg aattttacat ggaagctgtt	540
tcccttgaga atctcagagc aagggaatg cggagtgaga accgtgaaga aatggatctg	600
gctgacaaga tgatccccct ggtcaactat atgcatgacc accttctgag ggaacacaa	660
ctgcttagca tcaatggggt gcccatcct gcagattttt gctgcccgtt gtccttagag	720
ctgatgtcag atcctgttat tgtagcatct ggtcagacat atgagcgggt ttatatcaag	780
ttatggcttg atgagggttt tactatctgc ccgaagacac gccaaagact tggtcactcc	840
aatttaattc caaattacac cgtgaaagct ttgatagcta attggtgcga atcacacaac	900
attaggttcc ctgacccat gaaatccttg aaattgaact tccctttggc tgcgtctgct	960
ctccaggatt cgagcaccac aggaagcagc cctctacac ctaactgtcg tgctaagggt	1020
aatattcctg ggtccccgga agctgacctt tatatgagaa gcttgaatag agcatctcct	1080
ccacacagtg tagtccatca gaattctcat gcgcatgtga accgtgctgg tcatgaagcc	1140
tccattaagc aatcttcaga aaatgctaatt ggttctgcat cagatgtttc aaggttatct	1200
cttgacggtt ctgaaacaag agagtctagt ctggaagaaa gaaatgctgg ttctatcggg	1260
caaacttcag aacagtcaat tgaggaagca tttcaagcat ctaatttga cagggttca	1320
catgaccatg tgggtagtcc ttcggtgaat ggtagccttc caaatagcgg tcaacttgat	1380
gcagaatgtg acaatgggcc aagcgaagg acaattaca gtagtgatgc atctggagaa	1440
gttacagatg ggcttcagc atcttctgct cctcagaggg agcatctaatt ccttctaga	1500
ttggctgatg ttcgtagtag aggccaattt gttcggcgac catctgaaag gggtttcccc	1560
agaataatat cttctcacc catggataca cggagtgatc tttccgcat cgagaatcag	1620
gtccgcaagt tagttgatga tttagaagt gattctgtag atgttcaaag atcagcgaca	1680
tcagatatcc gccttttagc taagcacaac atggagaaca ggatcatcat tgcaactgt	1740
ggagctataa acttgctggt tggctttctt cattcgccag attccaaaac ccaagagcat	1800
gccgtgacag cccttctgaa tttgtcaatc aatgataata ataagattgc cattgcaaat	1860
gctgatgctg ttgacccct catccatgtc cttgagactg ggaaccctga agccaaggag	1920
aattcagcgg ctacattatt cagtctctcg gttattgaag aaaacaaagt gaggattgga	1980
agatccggtg ccatcaaacc tctctcgac ctactaggaa atgggacccc tcgaggaaag	2040

aaagatgcag ctactgcatt gtttaattta tccatattac atgagaacaa ggcgcgatt 2100
gtgcaggctg acgctgtgaa gtacctagt gaaacttatgg accctgctgc tggaaatggtt 2160

gacaaagctg tggctgtttt ggcaaacctt gctaccatac cagaaggag gacagcaatt 2220
ggtcaagcgc gtggtattcc agcccttggt gaagtgttg aactcgggtc agcaaggggg 2280
aagaaaaatg cggtgcagc attgcttcag ctatgtacaa acagcagcag attttgcagt 2340
atagttcttc aagagggtgc tgtgcctcct ctagtgtcat tgtcacagtc aggcacgcca 2400
cgggcaagag agaaggcaca ggctcttctc agctactttc gcagccaaag gcacgggaat 2460
tcagcaagga gatga 2475

<210> 2
<211> 824
<212> PRT

<213> Oryza sativa
<220><221> PEPTIDE
<222> (1)..(824)
<223> OsPUB15 protein
<400> 2

Met Glu Asn Phe Ser Pro Arg Thr Leu Leu Asn Ser Ile Leu Arg Ile
1 5 10 15
Thr Val Leu Thr Ser Asp Gly Ser Thr Ala Arg Pro Lys Pro Ile Gln
20 25 30
Lys Tyr Cys Gln Asn Val Cys Asp Ile Ser Ser Ile Val Ser Pro Leu
35 40 45
Ile Glu Asp Leu Cys Glu Ser Pro Glu Glu Gln Leu Asn Glu Val Leu
50 55 60
Arg Glu Leu Gly Thr Ala Ile Asn Arg Ala Ser Gly Leu Ile Gly Asn
65 70 75 80
Trp Gln Gln Thr Thr Ser Lys Ile Tyr Phe Ile Trp Gln Ile Glu Ser
85 90 95
Val Ile Ser Asp Ile Gln Gly Cys Ser Leu Gln Leu Cys Gln Leu Val
100 105 110
Asn Ser Leu Leu Pro Ser Leu Thr Gly Arg Ala Cys Thr Cys Ile Glu

115 120 125
 Lys Leu Gln Asp Ile Asn Tyr Glu Asn Met Phe Asp Leu Val Lys Glu
 130 135 140
 Ser Ser Leu Glu Leu Val Glu Thr Asp Thr Thr Ser Pro Glu Asn Leu
 145 150 155 160
 Ser Arg Leu Ser Ser Ser Leu Ser Leu Ser Thr Asn Leu Glu Phe Tyr
 165 170 175
 Met Glu Ala Val Ser Leu Glu Asn Leu Arg Ala Arg Ala Met Arg Ser
 180 185 190
 Glu Asn Arg Glu Glu Met Asp Leu Ala Asp Lys Met Ile Pro Leu Val
 195 200 205
 Asn Tyr Met His Asp His Leu Leu Arg Glu Thr Gln Leu Leu Ser Ile
 210 215 220
 Asn Gly Val Pro Ile Pro Ala Asp Phe Cys Cys Pro Leu Ser Leu Glu
 225 230 235 240
 Leu Met Ser Asp Pro Val Ile Val Ala Ser Gly Gln Thr Tyr Glu Arg
 245 250 255
 Val Tyr Ile Lys Leu Trp Leu Asp Glu Gly Phe Thr Ile Cys Pro Lys
 260 265 270
 Thr Arg Gln Arg Leu Gly His Ser Asn Leu Ile Pro Asn Tyr Thr Val
 275 280 285
 Lys Ala Leu Ile Ala Asn Trp Cys Glu Ser His Asn Ile Arg Leu Pro
 290 295 300
 Asp Pro Met Lys Ser Leu Lys Leu Asn Phe Pro Leu Ala Ala Ser Ala
 305 310 315 320
 Leu Gln Asp Ser Ser Thr Thr Gly Ser Ser Pro Leu His Pro Thr Val
 325 330 335
 Ala Ala Lys Gly Asn Ile Pro Gly Ser Pro Glu Ala Asp Leu Tyr Met
 340 345 350
 Arg Ser Leu Asn Arg Ala Ser Pro Pro His Ser Val Val His Gln Asn
 355 360 365

Ser His Ala His Val Asn Arg Ala Gly His Glu Ala Ser Ile Lys Gln
370 375 380

Ser Ser Glu Asn Ala Asn Gly Ser Ala Ser Asp Val Ser Arg Leu Ser
385 390 395 400

Leu Ala Gly Ser Glu Thr Arg Glu Ser Ser Leu Glu Glu Arg Asn Ala
405 410 415

Gly Ser Ile Gly Gln Thr Ser Glu Gln Ser Ile Glu Glu Ala Phe Gln
420 425 430

Ala Ser Asn Leu Asp Arg Asp Ser His Asp His Val Gly Ser Ser Ser
435 440 445

Val Asn Gly Ser Leu Pro Asn Ser Gly Gln Leu Asp Ala Glu Cys Asp
450 455 460

Asn Gly Pro Ser Glu Arg Thr Asn Tyr Ser Ser Asp Ala Ser Gly Glu
465 470 475 480

Val Thr Asp Gly Pro Ser Ala Ser Ser Ala Pro Gln Arg Glu His Leu
485 490 495

Ile Pro Ser Arg Leu Ala Asp Val Arg Ser Arg Gly Gln Phe Val Arg
500 505 510

Arg Pro Ser Glu Arg Gly Phe Pro Arg Ile Ile Ser Ser Ser Ser Met
515 520 525

Asp Thr Arg Ser Asp Leu Ser Ala Ile Glu Asn Gln Val Arg Lys Leu
530 535 540

Val Asp Asp Leu Arg Ser Asp Ser Val Asp Val Gln Arg Ser Ala Thr
545 550 555 560

Ser Asp Ile Arg Leu Leu Ala Lys His Asn Met Glu Asn Arg Ile Ile
565 570 575

Ile Ala Asn Cys Gly Ala Ile Asn Leu Leu Val Gly Leu Leu His Ser
580 585 590

Pro Asp Ser Lys Thr Gln Glu His Ala Val Thr Ala Leu Leu Asn Leu
595 600 605

Ser Ile Asn Asp Asn Asn Lys Ile Ala Ile Ala Asn Ala Asp Ala Val
610 615 620

Asp Pro Leu Ile His Val Leu Glu Thr Gly Asn Pro Glu Ala Lys Glu

625 630 635 640

Asn Ser Ala Ala Thr Leu Phe Ser Leu Ser Val Ile Glu Glu Asn Lys

645 650 655

Val Arg Ile Gly Arg Ser Gly Ala Ile Lys Pro Leu Val Asp Leu Leu

660 665 670

Gly Asn Gly Thr Pro Arg Gly Lys Lys Asp Ala Ala Thr Ala Leu Phe

675 680 685

Asn Leu Ser Ile Leu His Glu Asn Lys Ala Arg Ile Val Gln Ala Asp

690 695 700

Ala Val Lys Tyr Leu Val Glu Leu Met Asp Pro Ala Ala Gly Met Val

705 710 715 720

Asp Lys Ala Val Ala Val Leu Ala Asn Leu Ala Thr Ile Pro Glu Gly

725 730 735

Arg Thr Ala Ile Gly Gln Ala Arg Gly Ile Pro Ala Leu Val Glu Val

740 745 750

Val Glu Leu Gly Ser Ala Arg Gly Lys Glu Asn Ala Ala Ala Ala Leu

755 760 765

Leu Gln Leu Cys Thr Asn Ser Ser Arg Phe Cys Ser Ile Val Leu Gln

770 775 780

Glu Gly Ala Val Pro Pro Leu Val Ala Leu Ser Gln Ser Gly Thr Pro

785 790 795 800

Arg Ala Arg Glu Lys Ala Gln Ala Leu Leu Ser Tyr Phe Arg Ser Gln

805 810 815

Arg His Gly Asn Ser Ala Arg Arg

820

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for cloning OsPUB15 gene (forward)

<400

> 3

atggaaaatt tctccccgag

20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer for cloning OsPUB15 gene (reverse)

<400> 4

tcattctcctt gctgaattc

19