

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0044071
(43) 공개일자 2015년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0122682
(22) 출원일자 2013년10월15일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
정기홍
경기 수원시 영통구 봉영로1517번길 73, 923동 1504호 (영통동, 벽적골9단지아파트)
문선옥
경기 용인시 기흥구 덕영대로2077번길 53, 204동 801호 (영덕동 청현마을기흥데시아파트)
(74) 대리인
안소영

전체 청구항 수 : 총 7 항

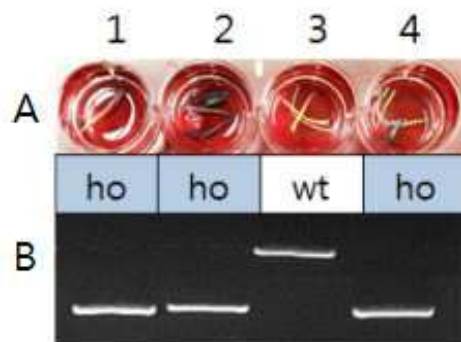
(54) 발명의 명칭 전신 발현 유도 프로모터, 이를 포함하는 발현 벡터, 이에 의한 형질 전환 식물체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 벼의 전신에서 발현하는 프로모터, 이 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 이 발현 벡터로 형질 전환된 형질전환체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 프로모터는 벼의 전신에서 발현하는 프로모터로써, 현재 널리 활용되고 있는 ubiquitin1, actin1, 35S 등의 프로모터와 같이 중요형질을 결정하는 유전자를 벼나 다른 작물에 도입하려고 할 때 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

고현정

경기 용인시 처인구 동부로 719-12, (해곡동)

유요한

전북 익산시 동서로61길 34, 205동 1006호 (어양동, 부영2차아파트)

안진홍

경기 용인시 기흥구 탑실로 152, 210동 1703호 (공세동, 탑실마을대주피오레2단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009514

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 시스템합성농생명공학 사업단

연구사업명 차세대바이오그린 21사업

연구과제명 벼 호르몬 생합성 및 대사 조절 시그널롬 네트워크 구축과 관련 핵심 조절인자 분리를 통한 작물 생산성 향상 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2013.02.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 식물 전신 발현용 프로모터.

청구항 2

제1항의 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터.

청구항 3

제2항의 벡터에 의해 형질 전환된 형질전환세포.

청구항 4

제2항에 따른 벡터 또는 제3항에 따른 형질 전환 세포로 형질 전환된 형질전환 식물체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 형질전환 식물체는 벼(Oryza sativa)인 형질전환 식물체.

청구항 6

제2항의 벡터로 식물을 형질 전환시켜 상기 외래 유전자를 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는 식물의 형질 전환 방법.

청구항 7

하기의 단계들을 포함하는 벼의 전신에서 발현되는 벼 형질전환체의 제조방법:

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계;

벼에 상기 벡터를 도입하는 단계; 및

상기 벡터가 도입되어 전신에서 유전자가 발현되는 벼 형질전환체를 선별하는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 벼의 전신 발현 유도 프로모터, 이 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 이 발현 벡터로 형질전환된 형질 전환체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

벼(Oryza sativa)는 세계에서 가장 중요한 식량 작물의 하나로 과거 20여년 동안 꾸준히 수량 증대에 힘써왔으나 현재 인구증가 추세로 볼 때 2020년이면 현재의 70% 이상에 달하는 수량을 더 생산해야만 될 형편에 놓여있다. 그러나 벼가 재배되는 농지는 세계 각국의 공업화 현상으로 갈수록 줄어들고 육종의 소재가 되는 새로운 유전자원은 고갈되어 외래 유용유전자의 도입이 요구되고 있다. 다행히, 분자생물학의 발달로 외래 유용유전자의 분리 및 조작이 가능하게 되어 유용 유전자를 벼를 비롯한 많은 식물세포에 형질 전환하여 새로운 유전자가 조합된 형질 전환체를 얻음으로써 여러 가지 생명현상을 규명하는 유전자발현 연구는 물론 육종의 좋은 소재가 되고 있다. 이러한 형질전환을 이용한 신품종 생산은 앞으로 다가오는 21세기에는 고부가가치 산업으로 대두함은 물론이며 인류의 가장 큰 문제점으로 부각되는 식량문제를 어느 정도는 해결할 수 있으리라 생각된다.

[0003]

현재까지 알려진 형질전환 방법은 80년대 원형질체에 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol(PEG))과 전기충격

법(electroporation)으로 많은 형질전환체를 획득하였으며, 90년대 후반에는 유전자총 이용법이 보편화되었으며 최근에는 쌍자엽 식물에서 널리 이용되어 왔던 아그로박테리움(Agrobacterium) 이용법도 많이 이용되고 있다. 그 밖에 화분법(pollen pathway), 미세주사(microinjection) 방법 등이 있다.

[0004] 프로모터는 외래 유전자의 발현을 식물체의 전신 또는 특별한 조직에만 국한시켜 형질전환 목적을 달성할 수 있으며, 그 기능에 따라서 다음과 같이 분류할 수 있다.

[0005] 첫째로 뿌리 특이 발현 프로모터이다. 애기장대 퍼옥시다제(peroxidase, prxEa)가 분리되어 뿌리 특이적 발현을 확인하였고, 최근 고구마 유래의 매즈 유전자(ibMADS)와 당 유도성 에이디피 글루코즈 파이로포스파타제(ADP-glucose pyrophosphatase, AGPase) 유전자가 분리되어 해당 프로모터가 뿌리에서 특이 발현을 유도하며 당근, 무에서 뿌리 특이적 일시적 발현을 유도함을 확인하여 특허 등록(대한민국 등록번호 제10-0604186호, 제10-0604191호)된 바 있다.

[0006] 둘째로, 종자 특이적 프로모터를 들 수 있다. 대표적인 예로서 벼의 주요 저장 단백질 유전자의 프로모터들로서 황금쌀(golden rice) 개발에 사용된 벼 글루테린(glutelin) 프로모터가 현재까지 외떡잎 식물의 종자 특이적 발현을 유도하는 경우에 많이 사용되고 있고, 쌍떡잎 식물의 종자 특이적 발현을 유도하는데 주로 사용되는 프로모터로는 콩 유래 렉틴(lectin) 프로모터, 배추 유래 나핀(napin) 프로모터 및 애기장대의 종자에서 감마 토코페롤 메틸기 전이효소(γ -tocopherol methyl transferase: γ -TMT) 유전자 발현을 유도함으로써 비타민 E 생성을 증진시킨 연구에 사용된 당근 유래 DC-3 프로모터, 들깨 유래 올레오신(oleosin) 프로모터의 종자 특이발현 유도 특허출원(참조: 특허출원번호 10-2006-0000783) 사례가 있다. 상기 종자 특이적 프로모터들은 주로 종자 자체가 식량이나 식품 또는 식품의 원료로 사용되는 주요 작물에서 유용 단백질 축적 및 유용 물질 생성 등을 목적으로 주로 사용되고 있다.

[0007] 셋째로, 잎 등의 기타 조직 특이 프로모터를 들 수 있다. 잎 등의 광합성 조직에서만 강력한 유전자의 발현을 유도하는 벼와 옥수수 유래의 알비씨에스(rbcS: ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit) 프로모터, 아그로박테리움 유래의 식물 뿌리 발현을 유도하는 RoID 프로모터, 감자 유래 피경 특이 발현 유도 파타틴(patatin) 프로모터, 토마토 유래의 과실 성숙 특이 발현 유도 피디에스(PDS: phytoene synthase) 프로모터 등이 있다.

[0008] 넷째로 전신발현 유도 프로모터를 들 수 있다. 식물 전신발현 유도 프로모터로는 꽃양배추 모자이크 바이러스(CaMV: cauliflower mosaic virus)의 35S RNA 유전자의 프로모터가 대표적인 쌍떡잎식물용 프로모터로 사용되고 있다. 벼 등의 외떡잎식물용 전신발현 유도 프로모터로는 벼 액틴(actin) 및 옥수수 유비퀴틴(ubiquitin) 유전자 프로모터들이 주로 이용되어 왔으며, 최근 벼 시토크롬 C 유전자(OsOcl)의 프로모터가 국내 연구진에 의해 개발되어 사용 중에 있다(참조: 등록번호 10-0429335). 이들은 식물형질전환 기본 운반체 내에 선발마커로 이용되는 항생제나 제초제 저항성 유전자 및 리포터 유전자의 발현을 유도하기 위해 이미 내재되어 있으며, 연구적인 측면에서 목적하는 유전자의 식물체 내 기능을 밝히고자 시도할 때 우선적으로 고려되는 프로모터들이다.

[0009] 그 외에도 프로모터 관련 개발이 계속 진행 중이지만, 개발자의 의도에 따라 한 가지 프로모터로 중요 유전형질을 결정하는 유전자를 전신 발현시킴으로써 도입형질의 우수성을 한 번에 검증할 수 있는 프로모터의 발굴이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1080291호
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-0803391호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 외래 유전자의 발현을 식물체의 전신에서 발현시킬 수 있는 프로모터, 이 프로모터를 포함하는 발현

벡터, 이 발현 벡터로 형질전환된 형질전환체 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 식물의 전신에서 유전자 발현을 유도할 수 있는 프로모터들을 발굴함으로써, 중요형질을 결정하는 유전자를 벼나 다른 식물체에 도입할 수 있는 시스템을 확립하고자 하였다. 이 과정에서 벼의 LOC_Os06g30750의 프로모터가 잎, 뿌리, 자방, 수술, 암술, 종자 등에서 전반적으로 발현이 이루어짐을 확인하였고, 이에 따라 상기 프로모터를 확보하여 이를 포함하는 발현벡터를 제조한 후 이를 식물에 도입하여 형질 전환시킨 형질전환체의 거의 모든 조직에서 리포터 유전자가 발현됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0013] 보다 구체적으로 본 연구진은 퍼블릭 데이터베이스에 공개된 983개의 벼 microarray data에 기반을 둔 17개 기관별 메타발현 분석용 데이터베이스를 구축하였고 이 자료의 분석을 통해서 모든 조직에서 전반적인 발현을 보이는 4000 여개의 유전자를 분리하였다. 이 유전자들에 대한 프로모터의 초고속 탐색 및 발굴을 위해서 벼 T-DNA gene trap 벡터시스템(pGA2707, pGA2715, pGA2717, pGA2772)을 탐색하였으며, 그 결과 LOC_Os06g30750 유전자의 다섯 번째 exon에 GUS reporter 유전자가 결합된 계통인 계통 2D-00098가 microarray 메타 유전자 발현 분석과 다양한 벼 기관 및 조직에서 GUS 활성 분석을 통해서 벼의 거의 모든 조직에서 유전자 발현 유도에 이용될 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0014] 이들 유전자에 의해서 조절되는 유전자 발현양상은 이들 프로모터 3' 방향에서 GUS reporter 유전자를 발현시켜 식물체 내에서 그 활성을 측정함으로써 정밀하게 분석되었다. 프로모터 활성 검증을 위한 벡터의 벼 형질전환은 많은 시간이 소요되는 어려움이 있기 때문에, 본 발명자들은 기존에 이용되는 방법과 다른 방법으로 최근에 발달하게 시도되고 있는 융합 옴믹스 분석 기법을 활용하였다.
- [0015] 프로모터 탐색용 벡터인 pGA2707, pGA2715, pGA2717, pGA2772의 T-DNA 오른쪽 말단에는 프로모터가 없는 GUS 유전자가 이웃해 있기 때문에, T-DNA가 정방향으로 프로모터 3' 방향에 삽입이 되면 GUS 발현을 통해서 프로모터 활성을 측정할 수 있다. 또한, 이러한 프로모터 trap 계통은 대규모 T-DNA 삽입 위치를 게놈 DNA PCR과 염기서열 분석을 통해 확인할 수 있기 때문에, 데이터베이스에서 유전자 locus id를 색인하여 관련 계통의 탐색이 가능하다.
- [0016] 분리된 4000여개 전신 발현 유전자는 관련 프로모터 탐색 계통을 통해 220개 유전자들에 대한 224개의 프로모터 trap 계통으로 선별되었다. 이들 계통의 종자를 살균 후 영양배지에서 7일 동안 벼 유묘 전체를 GUS 분석에 사용하였다.
- [0017] 그 결과, 실험군 2D-00098은 기존의 유전자와 상동성이 없는 LOC_Os06g30750 유전자의 다섯 번째 exon에 T-DNA가 삽입되었으며 GUS 발현 분석과 게놈 DNA PCR를 통해, 이 계통에서 GUS 발현이 이 유전자의 프로모터 활성을 나타내는 것을 확인하였고, 이를 기반으로 LOC_Os06g30750 유전자의 프로모터를 포함하는 벡터 및 형질 전환체를 제조하였다.
- [0018] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열인 벼의 LOC_Os06g30750의 프로모터를 포함하는 식물 전신에서 발현되는 프로모터를 제공한다.
- [0019] 프로모터는 유전자의 환경적, 시기적 및 조직적 발현을 조절하는 필수적인 요소로서, 본 발명에 따른 전신 발현 유도 프로모터를 사용하여 식물체 내에서 외래 유용 유전자의 발현을 식물체 전신에서 유도할 수 있다.
- [0020] 본 발명은 벼 LOC_Os06g30750 유전자의 프로모터로서, 외래 유전자의 발현이 식물체의 전신에서 이루어지도록 유도하는 전신 유도 발현 프로모터(이하 '본 발명의 프로모터'라 함)를 제공한다.
- [0021] LOC_Os06g30750은 reticulon domain containing protein을 암호화 하는 것으로 예상되며, 다섯 개의 exon으로 구성되어 있다. 265개의 아미노산으로 구성된 본 유전자의 프로모터는 서열번호 1의 염기서열을 갖는다.
- [0022] 또한 본 발명은 상기 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(Operatively linked) 외래 유전자를 포함하는, 식물 전신 발현용 벡터를 제공한다.
- [0023] 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. 발현 벡터는 일반적으로 플라스미드 또는 바이러스 DNA로부터 유래하거나, 둘 다의 요소를 포함할 수 있다. 따라서 발현 벡터는 재조합

DNA 또는 RNA 구축물, 예컨대, 플라스미드, 파지, 재조합 바이러스 또는 적절한 숙주 세포 내 도입 시 클로닝된 DNA의 발현을 초래하는 다른 벡터를 의미한다. 적절한 발현 벡터는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 진핵세포 및/또는 원핵세포 내에서 복제 가능한 것들 및 에피솜으로 남는 것들 또는 숙주 세포 계놈 내에 통합되는 것들을 포함한다.

[0024] 상기 통상의 벡터는 본 발명의 프로모터를 도입할 수 있는 것이면 어떠한 것이든 무방하나, 바람직하게는 pCambia계열, pGA계열, pGWB계열, 예컨대, pGA3383, pCambia3301, pCambia3300, pGA3426, pGA3780, pGWB12, pGWB14와 같은 Ti-plasmid 및 이에 파생된 벡터로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0025] 본 발명의 발현 벡터는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산, 그와 기능적으로 동등한 절편을 포함한다.

[0026] "본 발명의 프로모터"와 "기능적으로 동등한 절편"은 본 발명의 프로모터와 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. 또한, 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 프로모터는 공개된 벼 계놈 서열 상, LOC_Os06g30750의 ATG 앞쪽에 위치하는 서열로, 서열번호 1로 표시되는 염기 서열 중 일부가 변경, 추가 또는 삭제되더라도 공개된 벼 계놈 서열 상 LOC_Os06g30750의 프로모터에 위치한 서열과 상동성이 유지되어 실질적으로 동등한 효과를 나타낸다면 본 발명의 범주에 포함될 수 있다.

[0027] 본 발명의 프로모터는 3' 방향에 목적 단백질에 대한 외래 유전자가 발현되도록 한다. 상기 외래 유전자는 생산성 증대, 스트레스 내성 증대 등 식물체 전신 발현을 목적으로 하는 다양한 특성과 관련된 것이면 무엇이든 무방하다. 예컨대 벼의 생산성 및 생장 관련하여 *Low silicon rice 1 (Lsi1)* 등이 있으며, 또한 *OsNAC10*과 같은 비생물학적 스트레스에 반응하는 유전자 등의 목적 유전자를 전신 발현시키는데 본 프로모터를 이용할 수 있다.

[0028] 본 발명의 프로모터를 도입하여 발현벡터를 제조하는 것은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 공지의 방법에 따라 용이하게 실시 가능하다.

[0029] 또한 본 발명은 상기 프로모터를 활용한 벡터에 의해 형질 전환된 형질 전환 세포를 제공한다.

[0030] 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.

[0031] 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, 줄기, 잎, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 짝 및 캘러스 조직을 포함한다.

[0032] 또한 본 발명은 상기 프로모터를 이용한 벡터로 형질 전환된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0033] "본 발명의 형질전환 식물체"와 "기능적으로 동등한 형질전환 식물체"는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 핵산의 변이체와 비교하여 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 이용하여 제조된 형질 전환 식물체로써, 전신에서 프로모터 효과가 실질적으로 동등한 특징을 가지는 형질전환 식물체이다.

[0034] 본 발명의 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 0301316 호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다.

[0035] 본 발명에서 형질전환되는 식물체는 본 실시예에서 사용된 벼(*Oryza sativa* L.)를 포함한 단자엽식물 뿐만 아니라 쌍자엽 식물도 제한없이 사용할 수 있다.

[0036] 바람직하게는, 단자엽 식물, 더욱 바람직하게는 벼(*Oryza sativa* L.)가 사용된다.

[0037] 이러한 변이체는 당업계에 널리 알려진 분자생물학적 방법에 의하여 용이하게 제작될 수 있다.

[0038] 또한 본 발명은 상기 프로모터를 활용한 벡터로 식물을 형질 전환시켜 상기 외래 유전자를 식물체에서 발현시키는 단계를 포함하는 식물의 형질 전환 방법을 제공한다.

[0039] 바람직하게, 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된(operatively linked) 외래 유전자를 포함하는 벡터를 제조하는 단계; 벼에 상기 발현벡터를 도입하는 단계; 및 상기 발현벡터가 도입되어 벼의 전신에서 발현되는 벼 형질전환체를 선별하는 단계를 포함하는 식물의 형질 전환 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0040] 본 발명의 프로모터는 벼의 전신에서 발현하는 프로모터로써, 현재 널리 활용되고 있는 ubiquitin1, actin1, 35S 등의 프로모터와 같이 중요형질을 결정하는 유전자를 벼나 다른 작물에 도입하려고 할 때 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 히트맵(heatmap)으로 벼의 전신에서 발현을 보이는 분리된 유전자와 그 발현 양상을 나타내는 도이다.

도 2는 본 발명의 프로모터 활성 확인을 위한 T-DNA 삽입 위치를 나타내는 도이다.

도 3은 2D-00098 계통이 LOC_0s06g30750 유전자에 co-segregation한 것을 나타내는 GUS 염색 결과와 PCR 결과를 나타내는 도이다.

도 4는 LOC_0s06g30750 프로모터의 전신 발현 양상을 GUS staining을 통해 2D-00098 계통의 여러 조직에서 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 5는 LOC_0s06g30750 유전자의 전신 발현을 나타내는 마이크로 어레이 결과를 나타내는 도이다.

도 6은 LOC_0s06g30750 프로모터를 포함하는 GUS 식물체 제조를 위해 사용한 벡터의 다이어그램을 나타내는 도이다.

도 7은 LOC_0s06g30750 유전자의 ATG 앞 약 2Kb 프로모터를 나타내는 도이다.

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] <실시예 1> 벼의 전신에서 발현되는 벼 유전자 대량 선별

[0044] 전신에서 발현하는 유전자를 선별하기 위하여, 공개된 마이크로어레이 데이터베이스인 NCBI GEO(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)에서 수집된 983종의 벼 에피메트릭스 마이크로어레이(affymetrix microarray) 자료를 17개 기관별/조직별로 재구성하여 유전자 발현 분석용 데이터베이스를 구축하였다.

[0045] 이를 표 1에 나타내었다.

[0046] 표 1. 기관별/조직별로 재구성된 유전자 발현 분석용 데이터베이스

순서	기관/조직	샘플숫자
1	캘러스(Callus)	41
2	일 마디(collar)	6
3	끝잎(Coleoptile)	4
4	잎(Leaf)	242
5	지엽(Flag leaf)	20
6	뿌리(Root)	130
7	순(Shoot)	164
8	줄기(Stem)	8
9	절간(internode)	3
10	샘(SAM)	27
11	원추꽃차례(Panicle)	112
12	성숙된 꽃밥(Mature_anther)	37
13	씨방/암술머리	17
14	내/외 화영(Palea_lemma)	4
15	씨앗(Seed)	19
16	배(Embryo)	3
17	내배유(Endosperm)	15

[0047]
[0048] K-means clustering 분석 방법을 이용하여, 상기 표 1에 제시된 유전자 발현 분석용 데이터베이스 중 식물 전신에서 발현이 높은 유전자 그룹을 분리하였다.

[0049] 이는 마이크로어레이 자료 분석용 소프트웨어인 MeV의 K-means clustering 분석 방법을 사용하여 수행하였으며, 기관별/조직별 발현 분석용 데이터베이스 중 식물 전신에서 발현이 높은 4034 종의 유전자가 분리되었다.

[0050] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0051] 도 1에 나타난 바와 같이, 노란색에 가까울수록 강한 발현을 보이는 유전자에 해당하며 파란색에 가까울수록 발현이 낮아지게 된다. 즉, 17개의 재구성된 유전자 데이터베이스 중 식물 전신에서 발현이 높은 4,034종의 유전자를 확인할 수 있었다.

[0052] <실시예 2> 전신 발현 유전자에 대한 프로모터 trap 계통의 확인

[0053] 프로모터 탐색용 vector인 pGA2707, pGA2715, pGA2717, pGA2772의 T-DNA 오른쪽 말단에 프로모터가 없는 GUS 유전자가 이웃해 있기 때문에, T-DNA가 유전자가 발현되는 방향과 정방향으로 프로모터 후미에 삽입이 되면 GUS 발현을 통해서 프로모터 활성을 알 수 있다.

[0054] 상기 방법을 통하여, T-DNA가 삽입된 벼 계통에 대한 inverse-PCR 및 염기서열 분석을 하여 대규모로 T-DNA 삽입 위치가 벼 염색체 상에서 결정이 되었으며, 본교(경희대학교)에서 보유하고 있는 대략 벼 계통의 1/2에 해당되는 T-DNA 색인 돌연변이 정보를 통해서 이를 분석하였다.

[0055] 그 결과, 상기 약 4000여종의 전신 발현 유전자로부터 locus id 이름을 가지며 잠재적으로 프로모터가 trap된 계통을 탐색할 수 있었다. 이를 통해서, 220종의 유전자에 대한 224개의 프로모터 trap 계통이 선별되었다.

[0056] <실시예 3> GUS 염색법을 통한 전신 발현 유전자의 발현 분석

[0057] 선별된 유전자의 기관 특이성을 확인하기 위하여, 전신 발현을 보이는 220개 유전자들에 대한 224개의 프로모터 trap 계통들의 종자를 10개씩 28℃에서 7일간 배양한 후 모든 개체를 GUS 염색 처리 하였다.

[0058] GUS 용액은 0.5M sodium phosphate buffer 200ml, 12.5mM potassium ferricyanide 100ml, 12.5mM potassium ferrocyanide 100ml, 0.5M EDTA 20ml, 10% Triton X-100 50ml, 10ml 의 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹인 X-gluc 1g과 Methanol 200ml을 넣고 증류수로 1L의 부피를 맞추어 제조되었다. 각 계통의 식물체를 모두 15ml의 GUS 염색액에 24시간 처리한 후 70% 에탄올과 100% 에탄올을 순차적으로 이용하여 상온에서 탈색하였다.

[0059] 그 결과, GUS 염색을 실시한 200여개 계통 가운데 20계통에서 GUS 발현이 확인되었다. 그 중, T-DNA의 삽입이 정방향으로 이루어진 13계통을 선별하였다.

[0060] <실시예 4> 전신 발현을 보이는 계통들의 GUS 발현과 T-DNA 표지의 co-segregation 검증

[0061] 상기 선별된 13 계통의 벼 종자를 MSO 배지에 28℃에서 7일간 배양하였다. 이렇게 배양한 개체들의 잎을 채취하여 액체질소에 급냉각한 후 분쇄하고 일부는 GUS 염색에 사용하였다. 분쇄된 잎에서 CTAB buffer (CTAB 10g,

NaCl 40.91g, 0.5M EDTA(pH8.0) 20ml, PVP 10g과 ascorbic acid 0.44g을 넣고 물로 500ml을 맞춰 조제하였다)를 이용하여 DNA를 추출하였다.

[0062] 선별된 13계통의 벼 종자에서 DNA를 추출하였으며, 그 중 실험군 2D-00098은 LOC_0s06g30750 유전자의 다섯 번째 exon에 GUS reporter 유전자가 결합된 계통으로 도 2에 삽입 위치를 나타내었다. T-DNA 삽입 위치 앞뒤에서 만들어진 프라이머(서열번호 2와 3)와 NGUS1 프라이머(서열번호 4)를 이용하여 PCR로 유전형 분석을 하였으며 사용된 프라이머는 하기 표 2에 나타내었다.

[0063] 표 2. 2D-00098의 프라이머

Primer name	Sequence (5'-3')
2D-00098-F(서열번호 2)	TGACTCTGCTTTCCCATGTG
2D-00098-R(서열번호 3)	ACAGCCTGAATCCATTTTGC
NGUS1(서열번호 4)	AACGCTGATCAATTCCACAG

[0064]

[0065] 도 2의 1은 서열번호 5의 뉴클레오타이드 147번 내지 384번이며, 2는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 2762번 내지 2942번이며, 3은 서열번호 5의 뉴클레오타이드 3024번 내지 3165번이며, 4는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 3261번 내지 3329번이며, 5는 서열번호 5의 뉴클레오타이드 3420번 내지 3587번이며, T-DNA는 서열번호 5의 3028번 내지 3545번이다. 도 2의 1 내지 5는 각각의 엑손에 해당하는 서열이다.

[0066] PCR 반응은 95℃에서 5분 후, 95℃에서 30초, 57℃에서 30초, 72℃에서 1분30초를 37회 반복하고, 마지막으로 72℃에서 5분을 진행하였다. PCR 반응 산물은 4℃에 보관하였으며 이의 일부를 전기영동으로 확인한 결과를 도 3에 나타내었다.

[0067] 도 3에 나타난 바와 같이, 실험군 2D-00098의 PCR 결과와 GUS염색 결과가 일치하는 것을 확인할 수 있었다.

[0068] 도 3의 A는 2D-00098의 일주일 된 개체 4개에 대한 GUS염색 결과를 나타내며, 도 3의 B는 도 3의 A 실험에 사용된 개체의 유전형 분석 결과이다.

[0069] 도 3의 B에서 상단의 밴드는 LOC_0s06g30750 의 gene specific primer(서열번호 2와 3)의 PCR 산물이며 하단의 밴드는 서열번호 2와 T-DNA의 RB(right border) 상의 NGUS1(서열번호 4)의 PCR 산물이다. 두 산물의 결과를 비교하면 해당 식물체의 유전형분석이 가능하다.

[0070] 서열번호 2와 3의 산물만 증폭 된 경우는 야생형(wild type)이며 서열번호 2와 3의 산물과 서열번호 3과 4의 산물이 모두 증폭 된 경우는 잡종(hetero)이며 서열번호 3과 4의 산물만 증폭 된 경우는 순종(homo)을 의미한다.

[0071] 야생형에서는 T-DNA 삽입이 없으므로 GUS 발현이 나타나지 않고 잡종과 순종에서는 T-DNA상의 GUS 발현이 나타나므로 파랗게 염색된 것을 볼 수 있다.

[0072] 즉, 2D-00098 계통은 LOC_0s06g30750유전자에 co-segregation된 것이 확인되었다.

[0073] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 2D-00098 계통의 7일 개체 염색 결과에서도 전신에서 GUS발현이 보이는 것을 확인할 수 있었다. 도 3에 나타난 바와 같이, 형질전환 식물체들은 전반적인 조직에서 GUS 발현을 보이고 있는 것을 확인할 수 있었다. 도 3의 각각은 식물의 하기 조직을 나타내는 것으로, (a) 어린 잎 (b) 성숙한 지엽 (c) 성숙한 지엽의 단면 (d) 개화기 전의 수상화(spikelet) (e) 성숙한 종자의 단면 (f) 발아 후 2일 경과 종자의 단면 (g) 어린 뿌리 (h) 어린 뿌리의 종근(seminal root) 단면 (i) 어린 뿌리의 관근(crown root) 단면을 보여 주고 있으며, 모든 조직에서 GUS 발현을 확인할 수 있었다.

[0074] <실시예 5> 마이크로 어레이 데이터 분석을 통한 유전자의 조직별 발현 분석

[0075] 마이크로어레이 데이터베이스 분석을 통한 LOC_0s06g30750 유전자의 조직별 발현 양상을 분석하였으며 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0076] 도 5에 나타난 바와 같이, 모든 조직에서 노란색을 띄는 것을 확인할 수 있으며 이는 LOC_0s06g30750 프로모터에 의한 유전자의 조직별 발현이 식물 전신에서 일어남을 보여준다.

[0077] 상기 도 3 내지 도 5의 결과를 토대로 LOC_0s06g30750 유전자의 다섯 번째 exon에 GUS reporter 유전자가 결합된 계통인 실험군 2D-00098이 식물 전신에서 발현을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

<실시예 6> 전신 유도 발현을 위한 프로모터의 클로닝

LOC_Os06g30750의 프로모터를 클로닝하기 위하여 작성된 프라이머들과 동진 벼 (*Oryza sativa* L. japonica cultivar-group) 게놈 DNA를 주형으로 PCR을 실시하였다. 주형 DNA는 100 ng로 사용하였고, 각 프라이머는 5 pmol로 사용하였다. PCR 조건은 95℃에서 5분 후; 95℃에서 30초, 55℃에서 30초, 68℃에서 300초를 4회 반복한 후; 95℃에서 30초, 62℃에서 30초, 68℃에서 300초를 35회 반복하고 마지막으로 68℃, 10분으로 하였다. PCR 산물은 전기영동하여 크기를 확인하고, pGEM T-이지 벡터에 클로닝하여 염기서열 해독을 하였다. 클로닝한 DNA를 BamHI과 XhoI으로 절단한 후, 동일한 제한효소로 절단된 pGA3383 벡터(promoter-GUS cloning용 벡터)와 라이게이션을 14℃에서 12시간 진행하였다. 라이게이션 산물을 Top10 E.coli 컴피턴트 셀 50μl과 혼합하여 1.5 ml 튜브에 옮긴 다음 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 37℃ 오븐에 1분을 다시 방치한 후 1 ml의 LB 액체 배지를 추가로 튜브에 넣은 다음 3시간 동안 37℃ 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 12시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프랩 하였다. 미니 프랩으로 얻은 DNA를 제한 효소 BamHI과 XhoI를 사용하여 효소 절단 후 전기영동에서 아가로스 젤을 분리하고 밴드를 확인하였다. 이렇게 해서 얻어진 클로닝 DNA를 다시 염기 서열 분석을 하여 에러가 발생하지 않은 DNA를 선택하였다. 염기서열 분석은 capillary sequencing 법으로 하였으며(마크로젠 의뢰), 염기서열 분석은 NGUS1, RB(right border), 그리고 프로모터 내 서열을 이용한 프라이머들을 사용하였다. 이렇게 만들어진 LOC_Os06g30750 프로모터 GUS 식물체 제조를 위해 사용한 벡터의 다이어그램을 도 6에 나타내었다.

프로모터 클로닝용 프라이머는 아래 표 3에 나타내었다.

표 3. LOC_Os06g30750의 프로모터 클로닝용 프라이머

Primer name	Sequence (5'-3')	비고
Os06g30750-BamHI-F (서열번호 6)	GGATCCCGCCACACAAATTCGTGTG	벼 염색체 6의 genomic sequence (P0564B04)
Os06g30750-XhoI-R (서열번호 7)	CTCGAGTCGCGCACTGCAACAAAAGG	

표 4. 염기 서열 분석을 위한 프라이머

Primer name	Sequence (5'-3')
NGUS1(서열번호4)	AACGCTGATCAATCCACAG
RB_backbone-F2(서열번호 8)	TCGCACGGAATGCCAAGCA
Os06g30750 -seq_1(서열번호 9)	CGTAAGATCAGAATTGGATC

상기 분석 결과를 도 7 및 서열번호 1에 나타내었으며, LOC_Os06g30750 유전자의 ATG 앞에 약 2,000bp에 해당하는 서열이 전신 유도 발현 프로모터에 해당한다.

<실시예 7> 형질전환 세포의 제작

상기 실시예 6에서 제작한 식물 발현용 벡터를 추출하였다.

아그로박테리움 컴피턴트 셀(*Agrobacterium tumefaciens* LB4404) 50μl와 2μg의 식물발현용 벡터를 혼합하여 얼음에 15분 방치하였다. 이어서, 액체질소에 75초 넣은 후, 37℃ 오븐에 5분을 다시 방치한 후 1 ml의 LB 액체 배지를 넣은 다음 3시간 동안 28℃ 셰이킹 인큐베이터에서 방치하였다. 이어서, 테트라사이클린 저항성 LB 고체 배지에 도말하고 36시간을 기다려 생성되는 콜로니를 1mL의 LB 액체 배지에서 세포 배양 후 미니 프랩 한 후, BamHI과 XhoI을 사용하여 효소 절단 후 사이즈를 확인하였다.

상기 생성된 형질전환된 아그로박테리움을 이용하여 벼의 형질 전환 실험에서 사용하였다.

<실시예 8> 형질전환 식물체의 제작

N6D 고체 배지에서 동진벼 종자를 7일 정도 28℃ 생장실에서 키워서 벼의 캘러스를 생성하였다. 생성된 캘러스를 상기 실시예 6에서 얻은 식물발현용벡터로 형질 전환된 아그로박테리움을 72시간 키운 세포와 혼합하여 N6D-Acetosyringone 을 포함한 배지에서 22℃ 암처리 생장실에 방치하였다.

아그로박테리움에 오염된 캘러스를 3차 증류수로 깨끗이 5번 정도 행구어 낸 다음 N6D 고체 배지에서

hygromycin 선발을 1차(hygromycin 30 mg/L), 2차 (hygromycin 40 mg/L)에 걸쳐서 계대 배양을 통해 진행하였다. 선발은 28℃ 생장실에서 각각 2주씩 합해서 4주 동안 이루어졌다. 분열된 캘러스를 재분화 배지인 MSR (hygromycin 40 mg/L) 고체배지에 옮겨 4주 28℃ 광조건 생장실에서 재분화를 유도한 후, 식물체를 MS 고체 배지로 옮기고 7일 28℃ 광조건 생장실에서 키우고 온실로 옮겨서 재분화 식물체를 키웠다.

[0093] <실시예 9> 형질전환 식물체를 이용한 식물 전신 발현 검증

[0094] 재분화된 식물체의 기관 특이적 GUS 발현을 확인하기 위하여, 여러 시기 및 조직별로 샘플을 채취한 후 GUS 염색 처리하여 식물 전신에서 GUS 발현을 확인하였다.

[0095] <실시예 10> LOC_0s02g38020 유전자의 RNA-seq 발현분석

[0096] LOC_0s06g30750 유전자의 앞에서 우선적 발현을 나타내는 RNA-seq 발현분석 결과를 표 5에 나타내었다.

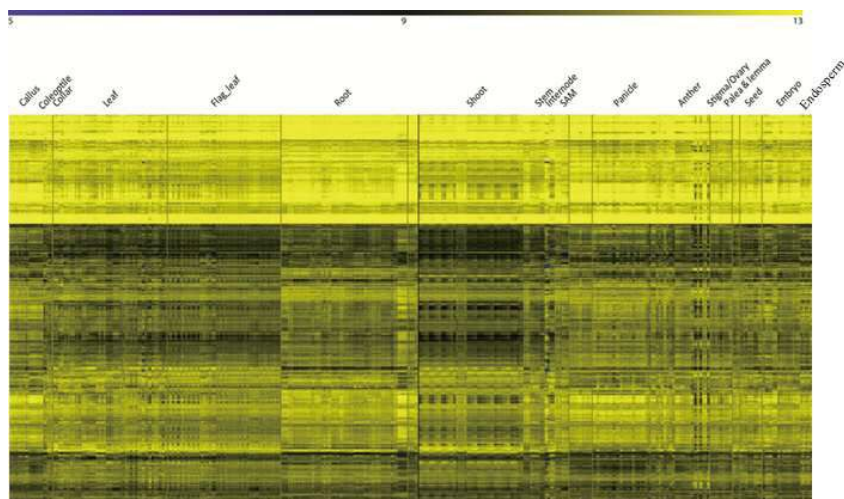
[0097] 표 5. LOC_0s06g30750의 앞에서 우선적 발현을 보이는 RNA-seq 발현 분석

Library Name	Library Description	Rice Genotype	FPKM
OSN_AA	Leaves-20 days	Nipponbare	177.424
OSN_AB	Post-emergence inflorescence	Nipponbare	192.678
OSN_AC	Pre-emergence inflorescence	Nipponbare	115.885
OSN_AD	Anther	Nipponbare	190.793
OSN_AE	Pistil	Nipponbare	200.531
OSN_AF	Seed-5 DAP	Nipponbare	169.428
OSN_AG	Embryo- 25 DAP	Nipponbare	382.067
OSN_AH	Endosperm- 25 DAP	Nipponbare	70.5611
OSN_AK	Seed- 10 DAP	Nipponbare	78.7321
OSN_BH	Endosperm- 25 DAP (replicate)	Nipponbare	68.2002
OSN_CA	Leaves- 20 days (replicate)	Nipponbare	208.536
SRR042529	Shoots	Nipponbare	104.811
SRX016113	Seedling four-leaf stage	F1 93-11/Nipp	91.0431
SRX016112	Seedling four-leaf stage	F1 Nipp/93-11	99.0794
SRX016111	Seedling four-leaf stage	93-11	67.4269
SRX016110	Seedling four-leaf stage	Nipponbare	131.684

[0098] 상기 자료는 미시건 주립대학, Rice Genome Annotation Project 팀에서 제공하는 유전자 발현 분석 서비스 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/expression.shtml>)를 이용한 것으로 발현분석에 사용된 자료는 차세대염기서열 분석 기술에 기반을 둔 RNA 염기서열 (RNA-seq) 분석 결과이다. 표 5에 나열된 library 별로 확인된 RNA-seq의 빈도로 조사한 유전자의 발현 정도를 나타낸다. RNA-seq 분석 결과에 의한 이 유전자는 전반적인 조직에서 높은 수준의 발현을 보였다. 다른 기관과의 발현 비교에서도 전반적인 조직에서 발현이 높게 확인되었다. 이는 마이크로어레이에서 확인한 발현양상을 다시 확인시켜 준다.

도면

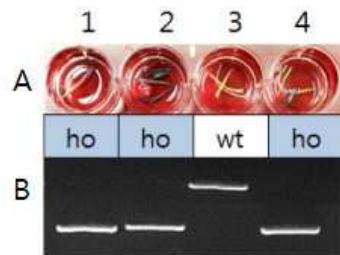
도면1



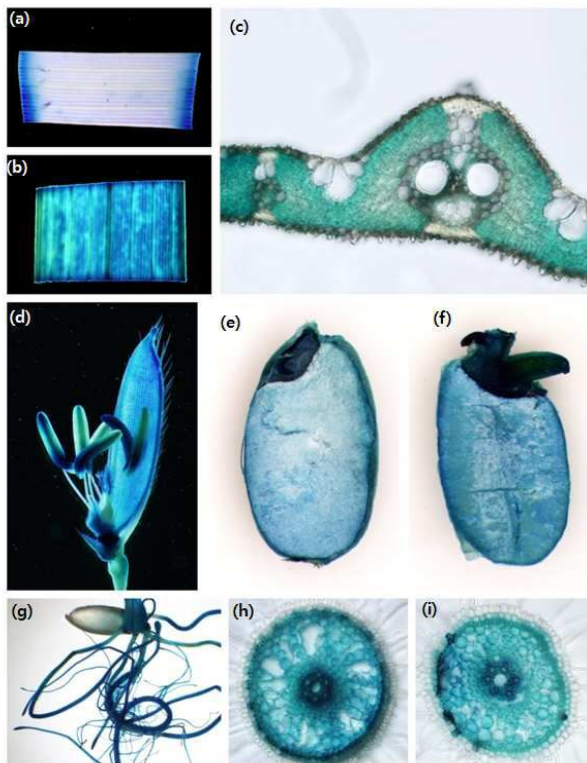
도면2



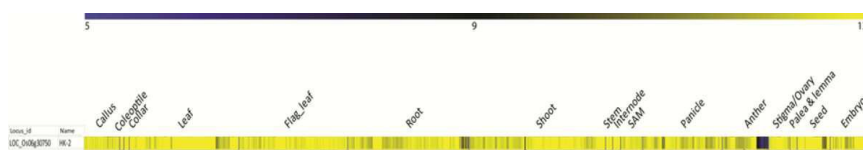
도면3



도면4



도면5



도면6



도면7



서열 목록

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

<120> A promoter for ubiquitous gene expression, Expression vector comprising the same, transformed plants thereby and method for preparation thereof

<130> P13-079-KHU

<160> 9

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1921

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220><221> promoter

<222> (1)..(1921)

<223> LOC Os06g30750

<400> 1

tttatgccta agatgttttg tttgatgcta aaattttttag ggcttggttg gtttgatacc 60

aacttatcgc cctactaaaa ttttggtaac tttaatatta gtaagtgtat gtttggtttg 120

ctaccaaatt ttgtccacaa tagtttaaat tcaatactat ccaatttggg agtgccaaaa 180

cttgccaagg ttttgccact accaaaattt tggtagggca aaaattggtt ccaaaccaaa 240

taggccctta cttttttttt acaaattgac ctttttataa aacttttagt taagaatgaa 300

tcgtgcaaaa aaactaatit cagaaaaaaa aaccgtgacc ttagcaccaa cactgacgac 360

atgagctaaa acatttagtt ggccactgagg tcatattcga cgtggcacac ggtctttgaa 420

cttcttcac tgctttctaa aactatttta tttttaaaact tggtaggaac aaattcgaga 480

acctaaatta tactacacaa gtttaaaaat acaaaattgt aataatttag ctaagtaatt 540

tattgatit agcatitaa ttgatgtttt caaatttgtt tattccaaat tgaacgtaaa 600

attatccctt gcaaaaaaat aaacataaaa taaatctaca aacaaaatgt gattgtttga	660
aaaagaaatt aacagaaaaa aattcaagga ggataagtaa gaaaaaacct gaaaaagagg	720
gattctctga tgtggttcga actaggaacc ggcaagtagg agcaaaaggg acctaccacc	780
gggctcgctt ccatgttttg agcctaatag accacacaca tttttaaac atatagagtt	840
agtatcgga cacatagaac atactaagat aattaggctt caactagggtg cttatcaatt	900
gcaaagcca ataaaaatag acatggtaac caagttaaga tgaattgtaa caagcttgga	960
gggactaggg agaggaatga acctgcagct ggatatcgtg ggggtgcatgc aacggatcaa	1020
agcatgaaat ttggtttgta cagtatgaat atcacaaatc tagctcgact ataggaatat	1080
atgatacata agtattatat tatagttagt ttgggaccga aatatattct ccataatcat	1140
gtatcatttg tataattgtt ttgatattgt gtcttcctcc aattacgaat ctttcgttgg	1200
tgcttactca aaatcattgt ccaagaacat agagagaaaa ataccattaa aacctactta	1260
aactctagaa acaaatcatc atcatcaaat atattgttga ggaacacaaa catatatttc	1320
tgcatcacia aatccgcaaa agagataagg gtttcacggt ttgcagaaga attattataa	1380
gtcgtaatgg cttattagtg ataagaaagt aatttatgtg ttcttagcaa tttaaaaacc	1440
aatgttaaaa aaactatgtt aaaagtattt taaatttaac ttcaaaatta aatttgaaaa	1500
tccaaatttt agcttttagt tatgcttttc agcactaagg gattgttttt ggtatagctc	1560
caactcctaa atttagctct agaagttagg tctgcagtga agttacggaa cagtctaac	1620
ccaactctac ctttttattt tattttgtga gagtttacac ccagctcatt ttaggcagat	1680
ttaaaactgt taaacagggt ctaggacggc gctctaaatc taacctatgc atgtactaat	1740
cccactatgc tcgggggtgca cgtagcaact actccatcat gagcgccgtt aacggccgtc	1800
gctttcgcgc cgcatcttag agatatctcc atccacatct tctccaaacc gaggcgtcaa	1860
aatcgcaatc cccacacaac accaacaccc catagtgcgc gcgccttacg agctcacctc	1920
a	1921
<210> 2	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> 2D-00098-Forward primer	
<400> 2	
tgactctgct ttcccatgtg	20
<210> 3	

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	2D-00098-Reverse primer	
<400>	3	
acagcctgaa tccattttgc		20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	NGUS1	
<400>	4	
aacgctgac aattccacag		20
<210>	5	
<211>	4034	
<212>	DNA	
<213>	Oryza sativa	
<400>	5	
gaggcgtcaa aatcgcaac cccacacaac accaacaccc catagtgcgc gcgccttacg		60
agctcacctc acacacagca aaaagctctc gcctttctct ctggtagctt cgccttgctc		120
tccagcttct gcttttgctg ccgcccatgg ccgatccggc cgccgaggag accgtccccc		180
cgccgccgcc aaccccgccg gtcgacccc cggagggtgc ctccgacgcg ccgcagccgg		240
tcgagctgcc cgccgacacc gccgccgct cgccggagaa ggtgtcgtcg ccaccaccgg		300
agccggcgcc ggcggtgagg agccgggggt tcaggctgct cggggaggac acctccgtgc		360
acaaggctct tggggggcgt aaaagtaagg aaatttctac tccccccctt cttttttttt		420
tcttttcccc tcttctctcc agtgtatctt ttctcctttt gggaagtttt ctttttcttt		480
ctgatacttt tcatcatcag cttattagta ttctgatat cgtttattgt ttgctggatt		540
gattggcaaa gaaaaaaag tttttgtgta ataaagtat ttccgtcagg tttccccagc		600
aagaggaatt tacttgcttt gtttaatttc ttacttacta tatatgtgaa ggacatgatt		660
agtaaaaaaa ttgtatttta catagatctt ccagtatttg cagttgcttt ggcttcttcg		720
ttgtcctggc tatgcttctg cttccattca ttttatatt agtgacagca gattgcgtca		780
acgataaaaa cgtttacctt gtcgtctgtt tacatgtact aggtttgctg aaacagcaag		840

tttgatagac atcttttacc ccaagaaagc gcttacctct agtttgtaa attcgtagtg	900
gcttctgagt tccttacttg gattgtctgg actattggca acctgtacat ccaacatata	960
tactgaattt atggaccagc ggagattatt tgcttggtac ctccatggt gaatagagtg	1020
attcgttcct gtactatgag agagattctg tcaattcttt ttccatgtgg taggaatcat	1080
ctgtggaacc tcctaataaa gaaattcgtc ttaagggtaa tggacttcat gctcaagtta	1140
tactaagaaa gtttggtaat atttgtcat acaaaaataa tgtggctagc tgccttttcc	1200
ctaggacttt cttacccaaa aatgaatata tattcaattc gagctataaa catatggttt	1260
catgtttgac aaattagatg taatgatgat ggtaagtatg aaaaagaaag gccaccgtct	1320
ttcttggaaat cgacatcttt ttgtccagtg tcctatgga tgttatattt ccaccgaaa	1380
gattgtaatg aatcctgtag gcagtaccac cttataaaa ctgagtcac actccaattg	1440
tttggttcct ttttctgca cctcaaaata gattcatgaa gagtcgtaac attatttact	1500
ccacactgaa gtgcgtcctt tttctctttt atctaagaaa ttttggtgat tgtatgccat	1560
atatagcaat gctttgtaat ttagcagagt gttatccac ttgtctgtgt tcctttgatt	1620
ctgaaatgga aaaagtgtgg ttctcaagtt cagggatttc atggttaggt atgagggtag	1680
gcagtaccat catggaaagt gatgtacaat aatacttaaa atgtacacat tcaatgtcag	1740
cagtgtggca catgtcttga acttgttgaa tggtagcct cttaaacttg gaaagttaa	1800
ggatctatta cccacttatg ttttgacatg tttgtttgt tgtgttgca attagaaagg	1860
aatacttctg aatgtttaga acagctggcg tagactaaga gaacaatgaa aagcagtc	1920
tttaaataca gatgagtttt aaaatgcatg gtaggatcca aataatgttc gatatgcaag	1980
gccctattac aagattggaa atttacaat tgttgcttta tagtagattt tgtaatgaag	2040
ttggttggtt ttatctctgg gcgtgcgaac tggttggatt ggccacacaa gttttagtag	2100
gaaaacctaa gtagaaacaa tatttgtaca aaagtacata caaagtaaag cttgttagta	2160
gagttcttgc ttactgtaca gtgtgtgaat cctgtactct gtacttaggc aactggattg	2220
tatccgctag tgtacaaagg atgaacggaa ctaaagggtg aaaatgaggg aatgatatgt	2280
tcatgcttca aagtaacaag gaatccagtt attgtgtatg aagcaggcct aattgctctt	2340
tagaaaacaa tgtcctgttt ttggtttgct tattcgtctg tcctatggtt aattctaat	2400
ttctctgtga ctgaaatttc cttttatgaa gaacttaaat tgttgccagt gttggtcatt	2460
ctatgcagaa tgtaagggtc tgtagcatct gctaactcaa agctgaattt atgtcttatg	2520
aacataatta cttcctagta ggtctgaaga gggttggttt tcctgtattg gaaacattta	2580

gttagcttat tctgcaaagg acaattgaca tgtctgcagg gttgacaata tttcttctgt 2640
 acatgcaata gccctactgg cagagaggat actggagtaa gagaaatttc tgtgtcataa 2700
 atgcgcggct gttcccttct aacctatatt ttgttatgtg ttttggtgca tttctttgca 2760
 gctgctgatg tactattatg gaaagacaag aagacatccg ctgtagtgat tggtggtgca 2820
 actgtcatat ggatcttgtt tgaagtgcct gattaccatc tcttgactct gctttcccat 2880
 gtgatgattg gtgccttggc catcttgctc ctgtgggtcaa aagctaccac atttatcaag 2940
 aagttagttc gatacacgat gattaccata cgctctgatt ggtactgcct ccatgttggt 3000

cacatctagt gtttccgttt caggagtcca ccagatatc ctgtagtaca gataacctgaa 3060
 gatgtcgccg tgaacgtgtc acgagcatta cgcagtgaca taaacagagc acttcacctg 3120
 tttcgggaga tcgcgttggg gcatgacctt aagaagtttc tgggcgtatg tttctatcct 3180
 ggaagataca aactattcat ggttttctt gctccagtgt ttgattgcag attgtttaat 3240
 actgtccttg tgcgttttag gtgattgttg ctctctgggt tctctcagaa gtaggaagct 3300
 gctgcgactt cctcaccttg atatagtgtg gtaatgcact tttgaacttg ttaaaagctt 3360
 ttctgaacct gtggtctcct aagttacctt actgatggtt tggtttgata ctgcaaacag 3420

ccgtcctgat gctccacacg gtgccgatct tgtatgacaa gtaccaggat aaggtcgacc 3480
 actttgtcgg aagggtcac tctgaggcct gcaagcacta tgagggtctg gatgccaagg 3540
 ttttgagcaa gatacccagg ggcccgttga agccaaagaa gaactagaat aagttgcgca 3600
 aggggactcg attcggaagg gtggcgtctt ttgtcgggtt tgcgagttct caggtgtacc 3660
 caactgcgtc gcgtcctact gacggtagca gctgaatgtt cgctctgctt gatgggtggt 3720
 ttgtcggctt cgctcgtgtg tgcttcagtg atgccagttc atgttcattc tatcttgaag 3780
 cctgtatcta aaatatctaa acgtgactga atgctacgtt tctgctactg aagctgcctg 3840

tagatatccg tgataaaaca tgataaaccc ttgttcatga taticgtgtt gttcggtatg 3900
 tttgtcggaa ttgcaaaatg gattcaggct gtgttttagat ccaaaccttg gatccaaatg 3960
 cagtcaatga aggaagtac atttcaaact tccaaattgg aatggggtgt ttagttggct 4020
 gcccaaaatt caaa 4034

<210> 6
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Os06g30750-BamHI-Forward primer
 <400> 6

ggatcccgcc cacacaaatt cgtgtg

26

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Os06g30750-XhoI-Reverse primer

<400> 7

ctcgagtcgc gcaactgcaac aaaagg

26

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RB_backbone-F2

<400> 8

tgcacaggaa tgccaagca

19

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Os06g30750-seq_1

<400> 9

cgtaagatca gaattggatc

20