



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0053093
(43) 공개일자 2024년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/82 (2006.01) *A01H 6/82* (2018.01)

C12N 15/74 (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/8205 (2013.01)

A01H 6/823 (2022.05)

(21) 출원번호 10-2022-0132169

(22) 출원일자 2022년10월14일

심사청구일자 2022년10월14일

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

주식회사놀라바이오

경상남도 진주시 진주대로 501, 27동 305 (가좌동)

(72) 발명자

김재연

경상남도 진주시 진주역로73번길 33, 104동 1401호 (가좌동, 센트럴웰가)

정진희

부산광역시 사하구 하신중앙로 170, 101동 112호 (신평동, 신평현대아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

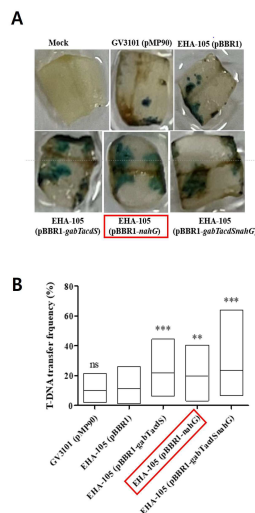
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **nahG 유전자가 도입된 아그로박테리움을 이용하여 식물체의 형질전환 효율을 향상시키는 방법**

(57) 요약

본 발명은 *nahG* 유전자가 도입된 아그로박테리움을 이용하여 식물체의 형질전환 효율을 향상시키는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 아그로박테리움을 이용하면 원하는 유전자(gene of interest)를 효과적이고 안정적으로 식물체에 전달함으로써 형질전환 효율을 향상시킬 수 있으므로, 형질전환 식물체 제조 및 식물 유전자 교정 분야에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A01H 6/825 (2022.05)
C12N 15/743 (2013.01)
C12N 15/8291 (2013.01)
C12N 9/0073 (2013.01)

송영중

경상남도 진주시 천수로298번길 10, 903호(신안동, 대화리네르빌)

(72) 발명자

황민기

경상남도 진주시 금산면 금산순환로 122

전은영

전라남도 고흥군 도양읍 용정등넘길 29-16

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711156282
과제번호	2020M3A9I4038352
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발
연구과제명	유전자교정 도구 전달 효율증진 및 상동성수선(HDR) 기반 범용성 식물 유전체교정
활용 원천기술 개발	
기 여 율	6/10
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711153091
과제번호	2022R1A2C3010331
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구
연구과제명	세포간 이동 유전자가위 활용 in planta 유전자교정
기 여 율	3/10
과제수행기관명	경상국립대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711174911
과제번호	2022-주문연구창업-공공-SB1-01
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	(재단)과학기술일자리진흥원
연구사업명	연구산업육성
연구과제명	식물유전자교정기반 주문연구 서비스 및 BM 개발
기 여 율	1/10
과제수행기관명	(주)놀라바이오
연구기간	2022.04.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

nahG(salicylate hydroxylase) 유전자가 도입된 아그로박테리움 속 세균을 이용하여 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는, 식물체의 형질전환 효율을 향상시키는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 *nahG* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 식물체의 형질전환 효율을 향상시키는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 아그로박테리움 속은 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)인 것을 특징으로 하는, 식물체의 형질전환 효율을 향상시키는 방법.

청구항 4

- (a) 토마토의 종자를 발아시키는 단계;
- (b) 상기 발아된 종자에서 얻은 자엽(cotyledon)으로부터 외식편을 얻는 단계;
- (c) *nahG*(salicylate hydroxylase) 유전자 발현 벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 균주에 표적 유전자 발현 벡터를 도입하고 배양하여 배양액을 준비하는 단계;
- (d) 상기 (b) 단계의 외식편을 상기 (c) 단계의 배양액에 10~30분 동안 침지한 후, 70~74시간 동안 공동배양하여 형질전환하는 단계; 및
- (e) 상기 형질전환된 토마토 외식편을 자당 및 티멘틴이 첨가된 배지에서 40~56시간 동안 추가로 배양하는 단계;를 포함하는, 식물체의 형질전환 효율을 향상시키는 방법.

청구항 5

- (a) 담배의 종자를 발아시켜 25~35일 동안 배양하는 단계;
- (b) 상기 배양된 담배 식물체에서 완전히 펼쳐진 잎을 얻는 단계;
- (c) *nahG*(salicylate hydroxylase) 유전자 발현 벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 균주에 표적 유전자 발현 벡터를 도입하고 배양하여 배양액을 준비하는 단계; 및
- (d) 상기 (b) 단계의 잎의 뒷면에 상기 (c) 단계의 배양액을 침윤시킨 후, 94~98시간 동안 공동배양하여 형질전환하는 단계;를 포함하는, 식물체의 형질전환 효율을 향상시키는 방법.

청구항 6

nahG(salicylate hydroxylase) 유전자가 도입된 아그로박테리움 속 세균을 유효성분으로 포함하는, 식물체의 형질전환 효율 향상용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 아그로박테리움 속 세균은 GABA 아미노기 전이 효소 유전자(*gabT*) 및 ACC 탈아미드 효소 유전자(*acdS*)가 추가로 도입된 것을 특징으로 하는, 식물체의 형질전환 효율 향상용 조성물.

청구항 8

nahG(salicylate hydroxylase) 유전자가 도입되어 식물 형질전환 효율이 향상된 아그로박테리움 속 세균.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 아그로박테리움 속 세균은 GABA 아미노기 전이 효소 유전자(*gabT*) 및 ACC 탈아미드 효소 유전자(*acdS*)가 추가로 도입된 것을 특징으로 하는 아그로박테리움 속 세균.

청구항 10

nahG(salicylate hydroxylase) 유전자가 도입된 아그로박테리움 속 세균을 이용하여 식물세포를 형질전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함하는, 형질전환 효율이 향상된 식물체의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 *nahG*(salicylate hydroxylase) 유전자가 도입된 아그로박테리움을 이용하여 식물체의 형질전환 효율을 향상시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아그로박테리움(*Agrobacterium*)은 식물생명공학 분야에서 외래의 특정 유전자를 식물로 도입하고자 할 때 유용하게 사용되는 자연적 유전 도구로, 초기에는 아그로박테리움이 Ti(Tumor inducing) 플라스미드를 포함하고 있어 식물체에 종양유전자(oncogene)를 전달하고 발현시킴으로써 뿌리혹을 발병킨다고 보고되었다. 하지만 식물생명공학 기술이 발전함에 따라 Ti 플라스미드가 종양유전자를 포함하지 않는 헬퍼 플라스미드와 바이너리(binary) 벡터로 분리되어 있다는 것을 알게 되었고, 이를 통해 특정 유전자를 안전하게 식물체에 도입하는 기술이 발전하게 되었다. 하지만 아직까지 많은 종의 식물체에서 아그로박테리움을 이용한 형질전환이 효과적으로 이루어지지 않고 있다.

[0003] 또한, 아그로박테리움은 식물에서 유래한 여러 가지 물질에 의해 고유의 특정 능력이 촉진되는 등의 긍정적인 영향을 받기도 하고, 성장이 저해되는 등의 부정적인 영향도 받기도 한다. 아그로박테리움에 부정적인 영향을 준다고 알려진 식물 유래 물질은 GABA(γ -aminobutyric acid), 에틸렌(ethylene), IAA(indole acetic acid) 또는 살리실산(salicylic acid) 등이 있다.

[0004] 특히, 살리실산(salicylic acid)은 다양한 병원체에 대한 식물 방어 반응을 활성화하는 식물 호르몬으로, 퀴럼 센싱(quorum sensing) 신호를 억제함으로써 아그로박테리움의 Ti 플라스미드의 복제를 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한, *VirA/VirG* 두 구성요소 신호전달 시스템(two component signaling system)을 직접적으로 억제하여 아그로박테리움의 *vir* 유전자 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다. 이러한 살리실산은 살리실레이트 하이드록실라제(salicylate hydroxylase) 또는 살리실레이트 1-모노옥시게나아제(salicylate 1-monooxygenase)에 의해 산화되어 카테콜(catechol)로 분해된다. 이에, 본 발명자들은 살리실산 분해 효소가 도입된 아그로박테리움을 이용하여 식물의 형질전환을 유도했을 때, 실제로 식물의 살리실산 활성이 변할 수 있는지 또는 유전자의 전달 효율이 변할 수 있는지에 대해 알아보고자 하였다.

[0005] 한편, 한국등록특허 제0948980호에는 '아그로박테리움을 이용한 마늘의 형질전환 효율을 증가시키는 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 형질전환마늘'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제0927135호에는 '고농축액 아그로박테리움과 진공 처리를 통한 식물형질전환 효율을 향상시키는 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 *nahG* 유전자가 도입된 아그로박테리움을 이용하여 식물체의 형질전환 효율을 향상시키는 방법에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 *nahG*(salicylate hydroxylase) 유전자를 발현하는 벡터를 제조하여 아그로박테리움에 도입한 후, 살리실산 분해 활성을 측정한 결과, *nahG* 유전자가 도입된 아그로박테리움의 살리실산 분해 활성 활성이 대조군 대비 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 상기 *nahG* 유전자가 도입된 아그로박테리움에 표적 유전자(*GUS* 또는 *GFP*) 발현 벡터를 추가로 도입하여 제조한 아그로박테리

움을 이용하여 식물체를 형질전환시킨 후, 표적 유전자에 대한 형질전환 효율을 분석한 결과, *nahG* 유전자가 도입된 아그로박테리움을 이용했을 때의 형질전환 효율이 대조군(*nahG* 유전자 비도입 아그로박테리움) 대비 증가하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 *nahG*(salicylate hydroxylase) 유전자가 도입된 아그로박테리움 속 세균을 이용하여 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는, 식물체의 형질전환 효율을 향상시키는 방법을 제공한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 *nahG* 유전자가 도입된 아그로박테리움 속 세균을 유효성분으로 포함하는, 식물체의 형질전환 효율 향상용 조성물을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 *nahG*(salicylate hydroxylase) 유전자가 도입되어 식물 형질전환 효율이 향상된 아그로박테리움 속 세균을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 *nahG*(salicylate hydroxylase) 유전자가 도입된 아그로박테리움 속 세균을 이용하여 식물세포를 형질전환하는 단계; 및
- [0011] 상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함하는, 형질전환 효율이 향상된 식물의 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명의 *nahG*(salicylate hydroxylase) 유전자가 도입된 아그로박테리움 속 세균을 이용하면 원하는 유전자(gene of interest)를 효과적이고 안정적으로 식물체에 전달함으로써 형질전환 효율을 향상시킬 수 있으므로, 형질전환 식물체 제조 및 식물 유전자 교정 분야에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1A는 *nahG* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG*)의 모식도이고, 도 1B는 *gabT* 및 *acdS* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*gabT/acdS*)의 모식도이며, 도 1C는 *nahG*, *gabT* 및 *acdS* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG/gabT/acdS*)의 모식도이다.
- 도 2는 *nahG* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG*)가 도입된 아그로박테리움 EHA-105 균주의 살리실산(salicylic acid, SA) 분해 활성을 측정한 결과이다. pMP90 벡터가 도입된 아그로박테리움 GV3101 균주 및 *nahG* 유전자가 삽입되지 않은 pBBR1 벡터가 도입된 아그로박테리움 EHA-105 균주는 대조군이다.
- 도 3은 *nahG* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG*)가 도입된 아그로박테리움 EHA-105 균주를 이용하여 토마토 식물체에서의 *GUS*(β -D-glucuronidase gene) 유전자에 대한 형질전환 효율을 평가한 결과로, A는 토마토 외식편에서 *GUS* 유전자에 의해 X-gluc가 분해된 정도를 염색한 사진이고, B는 전체 면적에서 염색된 부위의 면적을 %로 계산한 것이다.
- 도 4는 *nahG* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG*)가 도입된 아그로박테리움 EHA-105 균주를 이용하여 담배 식물체에서의 *GFP*(green fluorescent protein) 유전자에 대한 형질전환 효율을 평가한 결과로, A는 담배 잎에서의 GFP 발현을 확인한 사진이고, B는 GFP 단백질 발현량을 확인한 웨스턴 블랏 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *nahG*(salicylate hydroxylase) 유전자가 도입된 아그로박테리움 속 세균을 이용하여 식물세포를 형질전환하는 단계를 포함하는, 식물체의 형질전환 효율을 향상시키는 방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명에서 용어 "형질전환 효율(transformation efficiency)"은 원하는 표적 유전자를 식물체로 안정적이고 효과적으로 전달할 수 있는 것을 의미한다.
- [0016] 본 발명에 따른 식물체의 형질전환 효율을 향상시키는 방법에 있어서, 상기 *nahG* 유전자는 슈도모나스 속(*Pseudomonas* sp.), 에스케리키아 속(*Escherichia* sp.), 엔시퍼 속(*Ensifer* sp.), 크리날룸 속(*Crinallium* sp.), 시아노박테리움 속(*Cyanobacterium* sp.), 스트렙토마이세스 속(*Streptomyces* sp.), 엔테로박터 속

(*Enterobacter* sp.), 바실러스 속(*Bacillus* sp.), 프로비덴시아 속(*Providencia* sp.) 또는 미코박테리움 속(*Mycobacterium* sp.) 세균 유래의 살리실레이트 하이드록실라제(salicylate hydroxylase, *nahG*) 유전자일 수 있으며, 바람직하게는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 유래의 *nahG* 유전자로, 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0017] 또한, 상기 아그로박테리움 속은 바람직하게는 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 또한, 본 발명에 따른 방법에 있어서, 상기 *nahG* 유전자가 도입된 아그로박테리움 속 세균을 이용하여 형질전환되는 "식물세포"는 어떤 식물세포도 된다. 식물세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물이다. "식물조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 떡잎, 하배축, 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 구현 예에 따른 식물체의 형질전환 효율을 향상시키는 방법은 구체적으로는,
- [0021] (a) 토마토의 종자를 발아시키는 단계;
- [0022] (b) 상기 발아된 종자에서 얻은 자엽(cotyledon)으로부터 외식편을 얻는 단계;
- [0023] (c) *nahG*(salicylate hydroxylase) 유전자 발현 벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 균주에 표적 유전자 발현 벡터를 도입하고 배양하여 배양액을 준비하는 단계;
- [0024] (d) 상기 (b) 단계의 외식편을 상기 (c) 단계의 배양액에 10~30분 동안 침지한 후, 70~74시간 동안 공동배양하여 형질전환하는 단계; 및
- [0025] (e) 상기 형질전환된 토마토 외식편을 자당 및 티넨틴이 첨가된 배지에서 40~56시간 동안 추가로 배양하는 단계;를 포함하는 것일 수 있으며,
- [0026] 또는,
- [0027] (a) 담배의 종자를 발아시켜 25~35일 동안 배양하는 단계;
- [0028] (b) 상기 배양된 담배 식물체에서 완전히 펼쳐진 잎을 얻는 단계;
- [0029] (c) *nahG*(salicylate hydroxylase) 유전자 발현 벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 균주에 표적 유전자 발현 벡터를 도입하고 배양하여 배양액을 준비하는 단계; 및
- [0030] (d) 상기 (b) 단계의 잎의 뒷면에 상기 (c) 단계의 배양액을 침윤시킨 후, 94~98시간 동안 공동배양하여 형질전환하는 단계;를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 상기 표적 유전자는 본 발명을 통해 전달하고자 하는 일부 DNA를 의미하며, 그 유전자의 종류에 제한되지 않으며, 코딩 영역 및 비-코딩 영역을 모두 포함할 수 있다. 당업자는 그 목적에 따라, 제조하고자 하는 형질전환 식물체에 대하여 상기 표적 유전자를 선별할 수 있다.
- [0032] 본 발명은 또한, *nahG*(salicylate hydroxylase) 유전자가 도입된 아그로박테리움 속 세균을 유효성분으로 포함하는, 식물체의 형질전환 효율 향상용 조성물을 제공한다.
- [0033] 본 발명의 식물체의 형질전환 효율 향상용 조성물에 있어서, 상기 *nahG* 유전자 및 아그로박테리움 속 세균은 전술한 것과 같다.
- [0034] 본 발명의 식물체의 형질전환 효율 향상용 조성물에 있어서, 상기 아그로박테리움 속 세균은 GABA 아미노기 전이 효소 유전자(*gabT*) 및 ACC 탈아미드 효소 유전자(*acdS*)가 추가로 도입된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 발명은 또한, *nahG*(salicylate hydroxylase) 유전자가 도입되어 식물 형질전환 효율이 향상된 아그로박테리움 속 세균을 제공한다.

- [0036] 본 발명의 아그로박테리움 속 세균에 있어서, 상기 *nahG* 유전자 및 아그로박테리움 속 세균은 전술한 것과 같다.
- [0037] 본 발명의 일 구현 예에 따른 아그로박테리움 속 세균에 있어서, 상기 아그로박테리움 속 세균은 GABA 아미노기 전이 효소 유전자(*gabT*) 및 ACC 탈아미드 효소 유전자(*acdS*)가 추가로 도입된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명은 또한, *nahG*(salicylate hydroxylase) 유전자가 도입된 아그로박테리움 속 세균을 이용하여 식물세포를 형질전환하는 단계; 및
- [0039] 상기 형질전환된 식물세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함하는, 형질전환 효율이 향상된 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명의 형질전환 효율이 향상된 식물체의 제조 방법에 있어서, 상기 *nahG* 유전자 및 아그로박테리움 속 세균은 전술한 것과 같다.
- [0042] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] **실시예 1. 살리실레이트 하이드록실라제(Salicylate hydroxylase) 발현 벡터 제조**
- [0045] 본 발명에서는 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 유래의 살리실레이트 하이드록실라제(salicylate hydroxylase, *nahG*) 유전자의 염기서열(서열번호 1)을 GenBank 데이터베이스(Accession No. M60055.1)에서 확인하여 사용하였다. *nahG* 유전자, VirG 프로모터 및 VirG 터미네이터를 유전자 합성 서비스(GENEWIZ)를 통해 pUC-GW-Amp 벡터(Azenta Life Sciences, USA)에 클로닝한 후, 광범위 숙주 벡터인 pBBR1-MCS5B(Kovach et al., 1995, Gene. 166(1);175-176)의 클로닝 부위에 골든게이트 클로닝을 통해 삽입하여 *nahG* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG*)를 제조하였다(도 1A).
- [0046] 상기 *nahG* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG*)를 전기천공법을 통해 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA-105 균주에 도입한 후, 50 mg/L 겐타마이신(gentamycin), 50 mg/L 리팜피신(rifampicin)을 포함하는 LB(Luria-Bertani) 배지에서 배양하였다. pMP90 벡터(Molecular and General Genetics MGG.1986.204.3;383-396 참고)를 아그로박테리움 튜머파시엔스 GV3101 균주에 도입하고, *nahG* 유전자가 삽입되지 않은 pBBR1 벡터를 아그로박테리움 튜머파시엔스 EHA-105 균주에 도입하여 대조군으로 이용하였다.
- [0048] **실시예 2. GABA 아미노기 전이 효소 유전자(*gabT*) 및 ACC 탈아미드 효소 유전자(*acdS*) 발현 벡터 제조**
- [0049] 본 발명에서는 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 유래의 GABA 아미노기 전이 효소 유전자(γ -aminobutyric acid transaminase, *gabT*) 및 슈도모나스 푸티다 유래의 ACC 탈아미드 효소 유전자(1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase, *acdS*)의 염기서열(서열번호 2)을 GenBank 데이터베이스(각각 Accession No. 948067 및 Accession No. AY823987)에서 확인하여 사용하였다. *gabT* 및 *acdS* 유전자를 공동 발현하는 DNA 조각은 GenScript에서 유전자 합성 서비스를 통해 pUC57 벡터(Binder A et al. PLoS One. 13;9(2), e88218)에 클로닝하여, 광범위한 숙주 벡터인 pBBR1-MCS5B(Kovach, Michael E., et al. Gene 166.1, 175-176.)의 클로닝 부위에 Type IIS 제한 효소인 *BsaI*을 이용한 골든게이트 클로닝을 수행하였으며(Engler et al., PloS one 3.11, e3647), VirD1 프로모터에 의해 구동되도록 하여 *gabT* 및 *acdS* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*gabT/acdS*)를 제조하였다(도 1B).
- [0050] 또한, 상기 실시예 1의 *nahG* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG*)를 주형으로 하고, pvirg-F1(5'-cagtcGGTCTCatagctgtaacctcgaagcgt-3': 서열번호 3) 프라이머 및 tvirg-R1(5'-cagtcGGTCTCaAAGCccgtcttggtggtcagtggt-3': 서열번호4) 프라이머를 사용한 PCR 분석을 통해 *nahG* 유전자 발현 카세트를 제조하고, *gabT* 및 *acdS* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*gabT/acdS*)를 주형으로 하고, pvird1-F1(5'-cagtcGGTCTCaGAGGTTTATTTCAAATTCGTTATA-3': 서열번호 5) 프라이머 및 tt7-R1(5'-cagtcGGTCTCaGCTAcaaaaaaacccctcaagaccc-3': 서열번호 6) 프라이머를 사용한 PCR 분석을 통해 *gabT* 및 *acdS* 유전자 발현 카세트를 제조하여 광범위한 숙주 벡터인 pBBR1-MCS5B(Kovach, Michael E., et al. Gene 166.1,

175-176.)의 클로닝 부위에 Type IIS 제한 효소인 *Bsa*I를 이용한 골든게이트 조립을 통해 *nahG*, *gabT* 및 *acdS* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG/gabT/acdS*)를 제조하였다(도 1C).

실시예 3. 살리실산 분해 활성 측정

살리실레이트 하이드록실라제(salicylate hydroxylase, *nahG*) 유전자는 살리실산(salicylic acid, SA)을 산화시켜 카테콜(catechol)로 분해하는 효소이다. 이에, *nahG* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG*)가 도입된 아그로박테리움 EHA-105 균주의 살리실산 분해 활성을 측정하였다.

상기 실시예 1의 아그로박테리움 균주를 배양하여(OD₆₀₀=0.8), 세균 유래 단백질 추출 시약 BugBuster Master Mix(Novagen) 및 EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail(Roche)를 첨가하고 20분간 실온에서 용해시켰다. 그런 다음 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 새 튜브로 옮기고, BCA 단백질 분석법(Thermo scientific)을 이용하여 상층액의 단백질 농도를 측정하였다. 그 후, 반응액(200 μM Salicylic acid, 200 μM NADH, 20 μM FAD, 33 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0)에 상기 단백질 50 μg을 첨가하여 25℃에서 살리실산 분해 반응을 유도하였다. 반응 후, 남은 살리실산은 염화철(FeCl₃)에 의해 살리실산-염화철 복합체(purple salicylic acid-FeCl₃ complex)를 형성하고, 이는 보라색으로 보이게 된다. 이 보라색 용액을 파장 560 nm에서 측정하여 반응액에 남은 살리실산의 양을 측정하여 살리실산 분해 활성을 계산하였다.

그 결과, *nahG* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG*)가 도입된 아그로박테리움 EHA-105 균주의 살리실산 분해 활성은 대조군 대비 현저하게 증가하는 것을 확인함으로써, 도입된 *nahG* 유전자가 아그로박테리움 내에서 정상적으로 작동하는 것을 알 수 있었다(도 2).

실시예 4. 토마토 식물체에서의 유전자 형질전환 효율 평가

본 발명의 *nahG* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG*)가 도입된 아그로박테리움 EHA-105 균주를 이용하여 토마토 (*Solanum lycopersicum*) 식물체에서의 유전자 형질전환 효율을 평가하기 위하여 *GUS*(β-D-glucuronidase gene) 유전자를 토마토 식물체에 전달한 후, *GUS* 유전자의 형질전환 효율을 평가하였다.

구체적으로는, 토마토 홍광(HongKwang) 품종의 종자를 1.5% 자당이 함유된 1/2 MS(Murashige-Skoog) 배지에서 무균 조건으로 성장시켜 얻어진 자엽(cotyledon)을 잘라내어 일정한 크기의 외식편으로 사용하였다. *nahG* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG*)가 도입된 아그로박테리움 EHA-105 균주에 *GUS* 유전자를 포함한 BeYDV-유래 레플리콘 pLSL.R-GUS(Addgene #50332, Plant biotechnology journal.2020.18(10);2133-2143 참고)를 전기천공법을 통해 도입한 후, LB 배지에서 배양하여 OD₆₀₀=0.8로 맞추어 미리 준비된 상기 외식편에 20분 동안 감염시킨 후, ABM-MS 고체배지(표 1)에서 72시간 동안 암조건의 23℃에서 공배양하였다. 이후, 티넨틴 300 mg/L가 함유된 멸균된 물로 5차례 씻어주고, 1.5% 자당 및 티넨틴 300 mg/L 함유가 함유된 1/2 MS 배지로 옮겨 48시간 동안 16시간 명/8시간 암의 광주기 조건으로 25℃에서 배양하였다.

표 1

토마토 외식편 배양에 사용된 배지 조성

AMB (for 1L)	MS (for 1L)	ABM-MS
K ₂ HPO ₄ : 2.212 g KH ₂ PO ₄ : 1.130 g NH ₄ NO ₃ : 1.496 g KCl: 0.149 g MgSO ₄ : 0.308 g CaCl ₂ : 0.015 g FeSO ₄ : 0.003 g Glucose: 20 g MES: 3.904 g pH 5.5	MS salts + B5 vitamins: 2.2 g Sucrose: 5 g pH 5.5	Mix ABM and MS as 1:1 ratio. For semisolid ABM-MS, add 8g/L of agar. Autoclave then add: Zeatin trans-isomer: 1.0 mg/L IAA: 0.2 mg/L putrescine (1mM): 1ml AS (200 μM)

[0061] 이후, 형질전환된 토마토 외식편을 페리시안화 칼륨(potassium ferricyanide) 0.4 mM, 페로시안화 칼륨(potassium ferrocyanide) 0.4 mM, 0.1 % Triton X-100 및 X-gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid) 1.2 mM을 함유하는 인산염 완충액(phosphate buffer) 100 mM에 침지시키고 37℃에서 밤새 배양하였다. 이 때, *GUS* 유전자에 의해 기질인 X-gluc가 분해되면, 형질전환된 세포는 진한 파란색으로 염색된다. 염색 정도를 관찰하기 위하여 토마토 외식편을 70% 에탄올을 시작으로, 100% 에탄올로 옮겨가며 염색소를 탈색시킨 후, 짙은 파란색으로 염색된 외식편의 출현 빈도를 조사하였고, Image J 프로그램을 이용하여 전체 면적에서 염색된 부위의 면적을 %로 계산하였다.

[0062] 그 결과, *nahG* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG*)가 도입된 아그로박테리움 EHA-105 균주로 형질전환된 토마토 식물체에서의 *GUS* 유전자 발현이 대조군 대비 현저하게 증가하는 것을 확인함으로써, *nahG* 유전자의 발현에 의해 토마토 식물체에서 *GUS* 유전자 형질전환 효율이 증가하는 것을 알 수 있었다(도 3).

[0064] 실시예 5. 담배 식물체에서의 유전자 형질전환 효율 평가

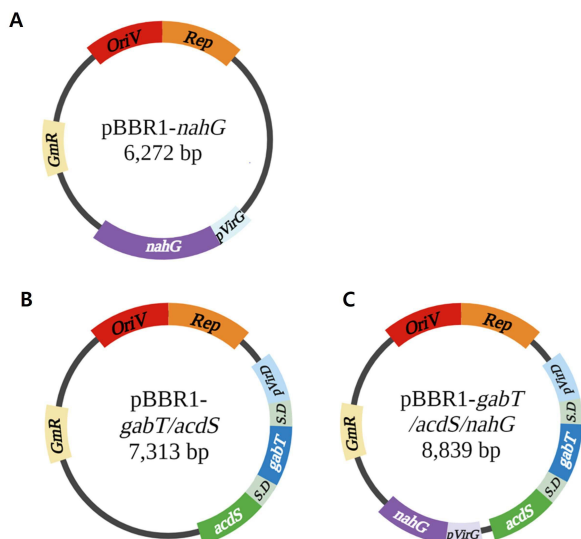
[0065] 본 발명의 *nahG* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG*)가 도입된 아그로박테리움 EHA-105 균주를 이용하여 담배(*Nicotiana benthamiana*) 식물체에서의 유전자 형질전환 효율을 평가하기 위하여 *GFP*(green fluorescent protein) 유전자를 담배 식물체에 전달한 후, *GFP* 유전자의 형질전환 효율을 평가하였다.

[0066] 구체적으로는, 담배 종자를 흙에 뿌린 뒤, 16시간 명/8시간 암의 광주기 조건으로 23℃에서 한 달 동안 배양하여 완전히 펼쳐진 담배 잎을 준비하였다. *nahG* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG*)가 도입된 아그로박테리움 EHA-105 균주에 *GFP* 유전자를 포함한 바이너리 벡터 pAGM4723-*GFP*(Addgene #40259, #48015)를 전기천공법을 통해 도입한 후, LB 배지에서 배양하여 OD₆₀₀=0.8로 맞추어 미리 준비된 상기 담배 잎의 뒷면에 1 ml 주사기를 이용하여 지름 2 cm 정도의 크기만큼 침윤시킨 후, 16시간 명/8시간 암의 광주기 조건으로 23℃에서 96시간 동안 배양하고, Azure 600 Imaging system(azure biosystems)을 이용하여 GFP 형광 신호를 확인하였다. 또한, 침윤된 잎을 잘라내어 액체질소에서 급냉시킨 100 mg에서 단백질을 추출하여 anti-GFP 폴리클로날 토끼 항체(1:10,000, abcam-ab6556)를 이용한 웨스턴 블랏을 수행하여 GFP 단백질의 발현을 확인하였다.

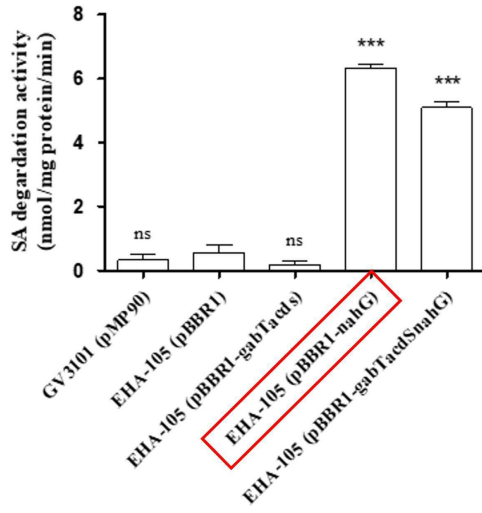
[0067] 그 결과, *nahG* 유전자 발현 벡터(pBBR1-*nahG*)가 도입된 아그로박테리움 EHA-105 균주로 형질전환된 담배 식물체에서의 *GFP* 발현이 대조군 대비 증가하는 것을 확인함으로써, *nahG* 유전자의 발현에 의해 담배 식물체에서 *GFP* 유전자 형질전환 효율이 증가하는 것을 알 수 있었다(도 4).

도면

도면1

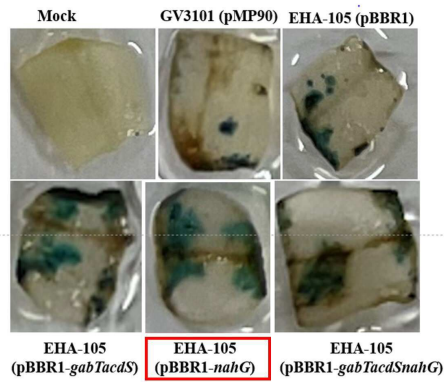


도면2

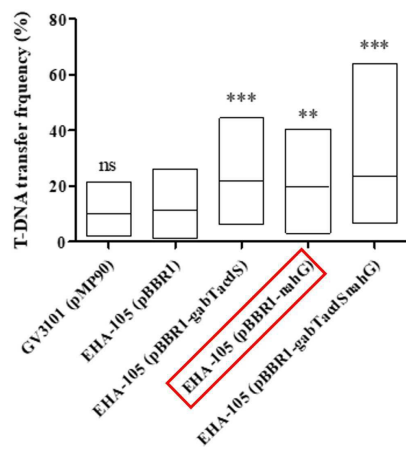


도면3

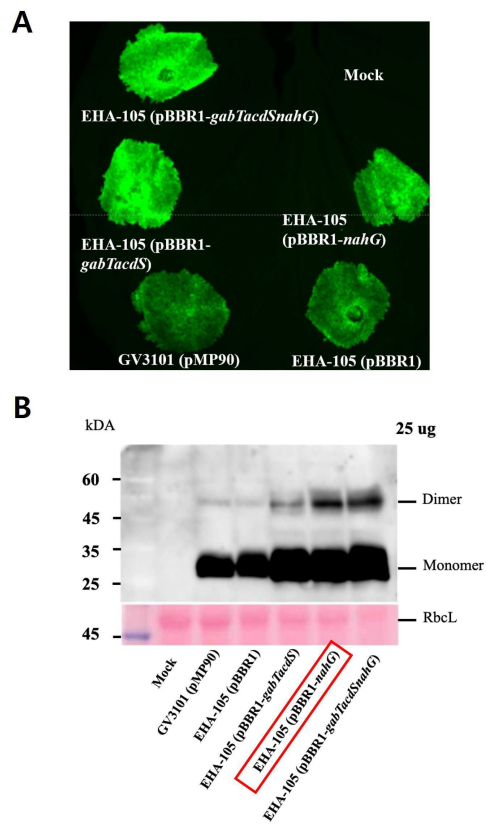
A



B



도면4



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.