



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월30일
(11) 등록번호 10-1843873
(24) 등록일자 2018년03월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) C12Q 1/68 (2018.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8227 (2013.01)
C12N 15/8257 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0176865
(22) 출원일자 2016년12월22일
심사청구일자 2016년12월22일
(56) 선행기술조사문헌
JP2007202461 A*
JP2010524474 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이호정
서울특별시 서대문구 가재울미래로 2, 122동 2301호 (남가좌동, DMC파크뷰자이)
이원제
서울특별시 마포구 마포대로7길 22, 302동 404호 (공덕동, 래미안 공덕3차)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 6 항

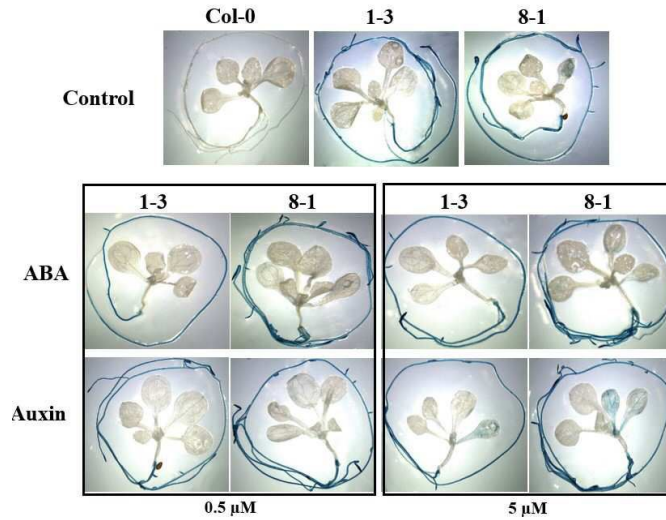
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 뿌리 특이적 발현 MybC 프로모터

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성된 뿌리 특이적 발현 프로모터에 관한 것이다. 본 발명에 따른 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성된 뿌리 특이적 발현 프로모터는 목적 유전자를 뿌리 특이적으로 발현시킬 수 있고, 환경 스트레스에서 발현이 변화되는 특징을 가지고 있으므로, 뿌리에서의 발현 변화 검출을 통해 환경스트레스에 대한 표지 인자로도 활용될 수 있다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6895 (2013.01)

G01N 33/5097 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성된 뿌리 특이적 발현 프로모터를 포함하는, 식물의 환경스트레스 검출용 조성물로, 상기 환경스트레스는 만니톨, 수크로오스, NaCl, 살리실산, 자스몬산, 옥신 및 앱시스산으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 식물의 환경 스트레스 검출용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 벡터에 포함된 것을 특징으로 하는, 식물의 환경 스트레스 검출용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 프로모터에 작동가능하게 연결된 목적 유전자를 더 포함하는, 식물의 환경 스트레스 검출용 조성물.

청구항 4

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성된 뿌리 특이적 발현 프로모터가 도입된 식물 세포를 포함하는, 식물의 환경스트레스 검출용 조성물로, 상기 환경스트레스는 만니톨, 수크로오스, NaCl, 살리실산, 자스몬산, 옥신 및 앱시스산으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 식물의 환경 스트레스 검출용 조성물.

청구항 5

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성된 뿌리 특이적 발현 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 목적 유전자를 포함하는 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 단계; 를 포함하는 환경 스트레스 검출용 식물세포의 제조방법으로, 상기 환경스트레스는 만니톨, 수크로오스, NaCl, 살리실산, 자스몬산, 옥신 및 앱시스산으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이며, 상기 검출은 식물의 뿌리에서 이루어지는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

서열번호 1로 표시되는 프로모터 및 이에 작동가능하게 연결된 검출용 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 식물체를 제조하는 단계; 및

뿌리에서 검출용 유전자의 발현 변화를 확인하는 단계;를 포함하는 환경 스트레스 검출 방법으로, 상기 환경스트레스는 만니톨, 수크로오스, NaCl, 살리실산, 자스몬산, 옥신 및 앱시스산으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 환경 스트레스 검출 방법.

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성된 뿌리 특이적 발현 프로모터에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 들어 식물의 형질을 개량시키고자 하는 많은 연구 중 목적 유용 유전자를 형질전환 식물체로부터 얻고자 하는 기술들에 대해 많은 관심이 대두되고 있는데 이러한 목적 유용 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키고자 할 때 유전자 발현을 조절하는 프로모터(promoter)가 요구된다.

[0003] 프로모터란 유전자가 언제 어디서 얼마나 발현할 것인가를 결정하는 작용을 하는 염기서열, 즉, 유전자의 발현을 조절하는 기능을 갖는 조절영역의 일종으로써, 상시적으로 발현을 유도하는 프로모터 및 시간 또는 위치 특이적으로 발현을 유도하는 프로모터 등 그 특징 및 기능에 따라 다양한 종류의 프로모터에 대한 연구가 보고된 바 있다.

[0004] 그 예로, 발현 양을 최대화 할 수 있는 강한 프로모터를 들 수 있으며, 이는 목적 유전자의 발현 양을 최대화하는데 이용되는 프로모터로써 형질전환체 연구 초기에 많이 이용되었다. 대표적인 예로는 꽃양배추 모자이크 바이러스의 35S RNA 유전자의 프로모터(CaMV 35S) 및 벼의 액틴(actin) 유전자 프로모터가 있다. 이들은 식물의 형질 전환 시 선발 마커로 이용되는 항생제 저항성 유전자, 식물의 병충해 억제 유전자 또는 식물을 이용한 물질 생산 등의 목적으로 주로 사용되고 있다.

[0005] 또다른 예로는 발현 시기를 제한하는 프로모터를 들 수 있다. 이는 목적 유전자의 발현을 식물 발달 단계 중 특별한 시기에만 국한시킬 수 있는 프로모터이다. 예를 들어, 개화에 관련된 유전자들의 프로모터는 개화기에만 유전자를 발현시키며, 각종 생물학적(biotic) 또는 비생물학적(abiotic) 스트레스에 의하여 발현되는 유전자들의 프로모터들도 시기를 조절하는 프로모터에 포함시킬 수 있다.

[0006] 또다른 예로는 발현 조직을 제한하는 조직 특이적인 프로모터를 들 수 있다. 이는 목적 유전자의 발현을 식물체의 특별한 조직에만 국한시켜 형질전환 목적을 달성하는데 이용되는 프로모터들이다. 이러한 조직 특이적인 발현을 유도하는 프로모터들은 사용하고자 하는 다양한 목적에 따라 식물체의 각 조직에 대하여 활발히 연구되고 있다.

[0007] 이와 같은 조직 특이적인 프로모터는 조직에 따라 전신발현 유도 프로모터, 종자 특이적 발현 유도 프로모터, 뿌리 특이적 발현 유도 프로모터, 잎 등 기타 조직 특이적 발현 유도 프로모터 등을 들 수 있다.

[0008] 이러한 종자, 뿌리 또는 잎 특이적 발현 프로모터들은 식량이나 식품, 또는 식품의 원료로 사용되는 주요 작물에서 농업적 형질 개량이나 유용 단백질 축적 및 유용 물질 생성 등을 목적으로 사용이 기대되고 있다. 이 중 뿌리는 식물의 성장, 수분 흡수 및 영양분 흡수의 중요한 역할을 담당하는 기관으로 해당 부위에서의 유전자 발현에 대한 관심이 높음에도 불구하고 아직까지 뿌리 특이적으로 발현 유도하는 프로모터가 널리 상용화 되지 않았으므로 뿌리 특이적인 발현을 유도할 수 있는 새로운 프로모터에 대한 필요성이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에 본 발명자들은 다른 식물 조직에서는 발현되지 않으면서 뿌리에서만 특이적으로 목적 유전자의 발현을 유도할 수 있는 프로모터에 관한 연구를 수행하던 중, 뿌리 조직 특이적 발현 프로모터를 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서 본 발명은 뿌리 특이적 발현 프로모터, 이를 포함하는 벡터, 형질전환 식물, 목적유전자를 뿌리 특이적으로 발현시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성된, 뿌리 특이적 발현 프로모터를 제공한다.

- [0012] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는, 뿌리 특이적 발현용 벡터를 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 상기 프로모터가 도입된 식물 세포를 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 상기 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 목적 유전자를 포함하는 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 단계; 를 포함하는 목적 유전자를 식물 뿌리 특이적으로 발현시키는 방법을 제공한다.
- [0015] 또한 본 발명은 서열번호 2로 표시되는 올리고뉴클레오타이드 및 서열번호 3으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제1항의 뿌리 특이적 프로모터 증폭용 프라이머 셋트를 제공한다.
- [0016] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 프로모터 및 이에 작동가능하게 연결된 검출용 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 식물체를 제조하는 단계; 및 뿌리에서 검출용 유전자의 발현의 변화를 확인하는 단계;를 포함하는 환경 스트레스 검출 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따른 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성된 뿌리 특이적 발현 프로모터는 목적 유전자를 뿌리 특이적으로 발현시킬 수 있고, 환경 스트레스에서 발현이 변화되는 특징을 가지고 있으므로, 뿌리에서의 발현 변화 검출을 통해 환경스트레스에 대한 표지 인자로도 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 뿌리특이적 발현 프로모터 MybC 유전자 (서열번호 1) 를 포함하는 벡터를 나타낸 도이다.
- 도 2A는 MybC 프로모터가 도입되지 않은 대조군 (Col-0), MybC 프로모터가 도입되었으나 환경스트레스가 가해지지 않은 대조군 (Control 1-3 및 8-1), MybC 프로모터가 도입되고 환경적 스트레스로 앱시스산(ABA) 및 옥신이 처리된 실험군에서의 MybC 프로모터에 의한 GUS 유전자의 뿌리특이적 발현 및 발현량의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2B는 MybC 프로모터가 도입되지 않은 대조군 (Col-0), MybC 프로모터가 도입되었으나 환경스트레스가 가해지지 않은 대조군 (Control 1-3 및 8-1), MybC 프로모터가 도입되고 환경적 스트레스로 수크로오스와 NaCl이 처리된 실험군에서의 MybC 프로모터에 의한 GUS 유전자의 뿌리특이적 발현 및 발현량의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 다양한 환경스트레스에 따른 MybC 발현량의 변화를 RT PCR로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성된, 뿌리 특이적 발현 프로모터 및 이를 포함하는 뿌리 특이적 발현용 벡터에 관한 것이다.
- [0020] 상기 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성된 뿌리 특이적 발현 프로모터는 다른 식물 조직에서는 유전자의 발현을 유도하지 않으면서 뿌리 조직 특이적으로 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터인 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명의 뿌리 특이적 발현 프로모터는 상기 서열번호 1의 염기서열뿐만 아니라 상기 서열번호 1의 염기서열의 일부 염기가 치환, 결실 또는 부가된 변형서열로서 뿌리 특이적 프로모터 활성을 나타내는 염기서열을 포함한다.
- [0022] 상기 프로모터는 일반적으로 전사를 개시하는 지점을 포함하는 암호화 부위의 상류 쪽에 위치하는 유전자 부위로, 흔히 유전자 발현을 조절하는 TATA 박스, CAAT 박스 부위, 외부 자극에 반응하여 유전자 발현에 영향을 주는 부위 및 위치와 방향에 상관없이 거의 모든 유전자의 발현을 촉진하는 인핸서 등으로 이루어져 있다.
- [0023] 상기 발현 벡터란 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 유전자 서열이 삽입 또는 도입될 수 있는 당 분야에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 본 발명에 따른 식물체의 뿌리 특이적 발현 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다.
- [0024] 따라서 상기 벡터는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성된 뿌리 특이적 발현 프로모터에 작동가능하게 연결

된 목적 유전자를 더 포함하는 뿌리 특이적 발현용 벡터일 수 있다.

- [0025] 본 발명에 있어, '작동 가능하게 연결(operably linked)' 된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결되는 것을 의미한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란, 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.
- [0026] 상기 본 발명에 따른 발현 벡터로는 단백질 발현에 사용되는 기존의 벡터를 기본 골격으로 하여 본 발명의 MybC 프로모터를 삽입하고 상기 프로모터의 하류(downstream) 쪽으로 목적 단백질을 코딩하는 염기서열인 목적 유전자를 삽입함으로써 제조할 수 있다. 따라서 본 발명에 사용될 수 있는 벡터로 다양한 클로닝 부위를 가지고 있는 대장균 유래 플라스미드 (pBR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드 (pUB110 및 pTP5), 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 및 Ti 플라스미드 등의 플라스미드가 있고, 식물 바이러스 벡터가 있으며, pCHF3, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이너리 벡터를 사용할 수 있다. 그러나 당업자라면 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 숙주 세포 내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 pMDC162 벡터를 이용하여 MybC ::GUS 벡터를 제조하였다.
- [0027] 본 발명에 있어서, '목적 유전자'란 본 발명의 프로모터에 의해 식물체 뿌리에서 특이적으로 발현되길 원하는 외부 유래의 어떤 표적 단백질을 코딩하는 유전자를 말하며, 바람직하게는 외인성 단백질 또는 내인성 단백질 및 리포터 단백질을 코딩하는 유전자일 수 있다. 상기 외인성 단백질은 특정 조직 또는 세포에 천연적으로 존재하지 않는 단백질을 말하며, 상기 내인성 단백질은 특정 조직 또는 세포에 천연적으로 존재하는 유전자에 의해 발현된 단백질을 말한다. 또한, 상기 리포터 단백질은 리포터 유전자에 의해 발현된 단백질로서 그 존재에 의해서 세포 내에서의 그의 활성을 알려주는 표지 단백질을 말한다. 본 발명의 일 실시예에서는 청색 발색 유전자인 GUS가 연결된 형태의 리포터 시스템이 내재되어 있는 pMDC162 벡터에 본 발명의 애기장대 MybC 프로모터를 GUS 유전자의 상류부분에 작동가능하게 연결한 재조합 발현 벡터를 제조하였다.
- [0028] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 구성된 뿌리 특이적 발현 프로모터가 도입된 식물 세포에 관한 것이다. 즉, 본 발명의 프로모터 또는 상기 프로모터와 작동 가능하게 연결되어 있는 목적 유전자의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 발현벡터는 당분야에 공지된 방법을 이용하여 숙주세포 내로 도입할 수 있다. 본 발명에 따른 재조합 발현벡터를 숙주세포내로 도입하는 방법으로는, 이에 한정되지는 않으나, 염화칼슘(CaCl_2) 및 열 쇼크(heat shock) 방법, 아그로박테리움(*Agrobacterium* sp.)-매개에 의한 방법, 입자 총충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공법(electroporation) 및 PEG(polyethyleneglycol)에 의한 침전법 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는 아그로박테리움(*Agrobacterium* sp.)-매개에 의한 방법을 사용할 수 있다.
- [0029] 또한 본 발명은 상기 뿌리 특이적 발현 프로모터 및 이와 작동가능하게 연결된 목적 유전자를 포함하는 벡터로 식물세포를 형질전환시키는 단계; 를 포함하는 목적 유전자를 식물 뿌리 특이적으로 발현시키는 방법에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명에서 상기 식물체는 쌍자엽 식물 또는 단자엽 식물일 수 있으며, 상기 쌍자엽 식물로는 이에 제한되지는 않으나, 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추, 감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근, 샐러리 및 유채일 수 있고, 상기 단자엽 식물로는 이에 제한되지는 않으나, 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양파일 수 있다.
- [0031] 또한 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 구성되는 뿌리 특이적 발현 프로모터 1.4kb 를 증폭하기 위한 서열번호 2로 표시되는 올리고뉴클레오타이드 및 서열번호 3으로 표시되는 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 제1항의 뿌리 특이적 프로모터 증폭용 프라이머 셋트에 관한 것이다. 서열번호 2의 올리고뉴클레오타이드는 정방향 프라이머이며, 서열번호 3의 올리고뉴클레오타이드는 역방향 프라이머이다. 상기 프라이머는 당업자에게 공지된 올리고뉴클레오타이드의 합성 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 상업적으로 합성하여 사용할 수도 있다. 본 발명의 상기 프라이머는 프라이머를 구성하는 개별 염기서열의 일부에 변이가 일어난 변형서열을 포함할 수 있다. 상기 변형서열은 변이가 이루어진 프라이머를 사용하여 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행한 결과와 미변형서열로 이루어진 프라이머(서열번호: 2 및 서열번호: 3)를 사용하여 PCR을 수행한 결과가 실질적으로 동일한 범위 내에서의 결실, 치환 또는 부가된 서열을 의미한다.

[0032] 또한 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 프로모터 및 이에 작동가능하게 연결된 검출용 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환된 식물체를 제조하는 단계; 및 뿌리에서 검출용 유전자의 발현의 변화를 확인하는 단계;를 포함하는 환경 스트레스 검출 방법에 관한 것이다.

[0033] 본 발명에 따르면 뿌리에서 특이적으로 발현하는 MybC 프로모터는 환경 스트레스에 의하여 그 발현이 변화할 수 있는 것을 확인하였으므로 식물체 내에서 MybC 프로모터의 발현량 변화를 통해 검사 대상 환경이 식물에게 스트레스를 주는 환경인지 여부를 검출하는 방법으로 유용하게 이용할 수 있다.

[0034] 상기 환경 스트레스는 식물체에 스트레스를 유발할 수 있는 다양한 물리적 또는 화학적 조건을 제한 없이 포함할 수 있으며, 예컨대 염분 농도, 식물 호르몬, 당 농도 등일 수 있고 보다 구체적으로 만니톨, 수크로오스, NaCl, 살리실산, 자스몬산, 옥신 및 앱시스산로 이루어진 군에서 선택된 1종 일 수 있다. 가해지는 환경 스트레스 종류에 따라 MybC 프로모터의 발현량은 상향 또는 하향 조절될 수 있으며, 기준이 되는 발현량에 대한 상대적인 변화에 따라 환경스트레스의 유무를 구별하는데 이용할 수 있다. 기준이 되는 발현량은 스트레스를 전혀 받지 않은 기본 수준의 발현양일 수 있으며 일정 정도의 스트레스를 받은 상태일 수 있다. 이 경우 일정 정도의 스트레스를 받은 상태의 발현량은 환경스트레스의 유무가 아닌 증가 또는 감소를 확인하기 위한 기준 발현 양이 될 수 있다.

[0035] 상기 발현 양을 확인하기 위해서는 검출용 유전자가 뿌리 조직에서 변화되는 것을 확인하는 단계가 필수적이며, 검출용 유전자는 발색을 나타내는 유전자인 것이 바람직하다. 본 발명의 바람직한 일 예로는 GUS 유전자가 이용될 수 있다.

[0036] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0037] 실시예 1. MybC 클로닝 및 형질전환 식물의 제조

[0038] 애기장대 MybC 프로모터를 확보하기 위하여 발아 후 2주일 된 야생형 애기장대 성체의 gDNA를 추출하였다. 이 gDNA를 주형으로 MYBC 1.4kb 프로모터 양끝 자리 20bp와 같은 서열을 갖는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR은 denaturation 95℃ 5분, annealing 57℃ 1분, polymerization 70℃ 1분, 총 40cycle조건으로 진행하였다. 그 후 전기영동을 통하여 증폭된 MYBC의 프로모터를 확인하고, 겔에서 용출하였다. 수득된 MybC 프로모터의 서열은 하기 표 1에 나타난 서열번호 1의 서열과 같다.

표 1

서열번호	설명	서열
서열번호1	MybC 프로모터	GTAACATTGTATCTTTAAAAAAATTATCCTAAACAAAGAACGAAACGATACAATAGTATAAATTTGTCTCTGTGCTATAAACGATAATTCCAGGTAAGATTAAGGATAAAACAAAAAGCTTATAATAGCAATTTAAAAACGAATTCAACGTACGATCCACCACAATCCTCGTCGTTTCAAACCTAAAATACCGAACTACCTTACCTTCTCTTTCCATAAGAAATCAAAACCAAGTCCTATGGTCGAATTGTATCTCTATCTAAAAATCTTCTTTGAATTTGTGTATACAAATCTTATTCAACGAATCATTTATCACCAAAAGGTTCTCTCTTTTTGTTTGTGTTCTGTCTTGTGTGA
서열번호 2	정방향 프로모터	CTTAAGATCTAAATTTATGT
서열번호 3	역방향 프로모터	TCACACAAGACAGAAACAAAC

[0040] 용출된 DNA 조각(1.4kb)을 topo vector (pCR 8/GW/TOPO: invitrogen)에 삽입하고 이를 다시 GUS 벡터인 pMDC162 벡터에 LR 반응 (LR Clonase®: invitrogen) 시켰다. 이후 E.coli cell(TOP10 cell: invitrogen)에 열 충격 형질전환 (heat shock transformation) 방법으로 형질전환한 후 콜로니 (colony)가 생성될 때까지 배양하였다(37도, 12시간). 이후 생성된 콜로니 (colony)를 다시 LB 배지에 배양 후 플라스미드 벡터 (plasmid vector)를 추출하였다. 사용된 MybC GUS 벡터 구조를 도 1에 나타내었다.

[0041] 도 1에 나타난 바와 같이, MybC GUS 는 총 12884bp 크기로 제조되었으며, 1.4kb의 MybC 프로모터 서열이 삽입되어 있다. 준비된 MybC pro::GUS 벡터를 아그로박테리아에 전기충격 형질전환 (electric shock transformation) 방법으로 형질전환한 후 배양하였다. 형질전환된 아그로박테리아를 꽃침지법(floral dipping transformation)을 통해 준비된 야생형 애기장대에 형질전환하였다. 이후 형질전환된 식물로부터 씨를 수확하고 3세대까지 자가수분 (selfing)하여 homologous line을 확보하였다.

[0042] 실시예 2. GUS 청색발현 반응 확인

[0043] 상기 실시예 1에서 제조된 형질전환된 식물에서 뿌리 특이적 발현이 유도되는지 여부를 확인하기 위하여, 형질전환된 식물을 파종하여 GUS 청색 발현 반응을 확인하였다. 더 정확한 확정을 위해 두 개의 MybC pro GUS라인 (1-3, 8-1) 과 control plant인 Col-0를 사용 하여 실험을 진행하였다. 보다 구체적으로 형질전환된 식물을 9일간 생육한 뒤 각 200, 300 mM NaCl 과 수크로오스, 0.5, 5 μ M ABA 및 옥신으로 24 시간 동안 스트레스 처리 후 GUS 염색을 진행하였다. 애기장대를 GUS 염색한 후 아가 4% 배지 위에 표본을 만들어 leica사의 해부 현미경 (stereoscopic microscope) (모델명: leica EZ 4D)을 사용하여 8x 로 관찰하였으며 그 결과를 도 2A 및 2B 에 나타내었다. 대조군으로는 MybC 프로모터가 도입되지 않은 식물 야생형 (Col-0) 및 MybC 프로모터가 도입되었으나 환경스트레스를 받지 않은 군을 두었다.

[0044] 도 2A 및 2B에 나타난 바와 같이, 모든 MybC 프로모터 도입군에서 GUS 발현이 뿌리 부분에서 특이적으로 많이 발현되는 것을 확인하였다. 또한 abiotic 스트레스를 처리하지 않은 대조군의 경우에도 마찬가지로 뿌리에서 특이적으로 염색이 나타났다. 상기와 같은 결과를 통해 서열번호 1의 MybC 프로모터는 식물체내에서 뿌리 특이적 발현을 유도할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0045] 실시예 3. 스트레스 조건에 따른 MybC 발현량 비교

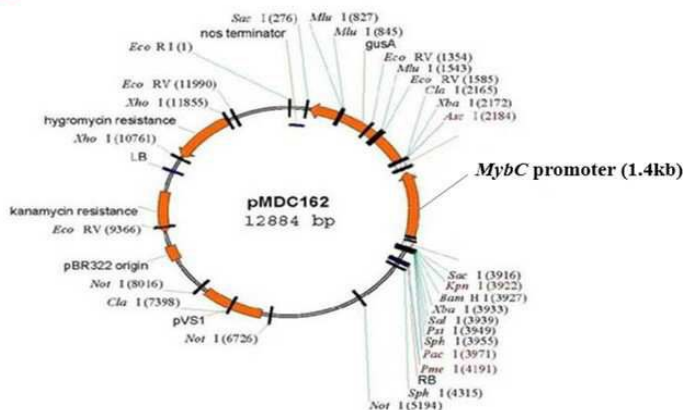
[0046] 처리된 스트레스 조건에 따른 MybC 발현량의 변화를 확인하기 위하여, 9일 된 야생형 Col-0 식물로부터 총 RNA 를 얻고 이로부터 cDNA을 합성하였다. 스트레스 조건으로는 수크로오스 200, 300mM, NaCl 200, 300mM, 만니톨 200, 400mM, 자스몬산(JA) 1, 10 μ M, ABA 1, 10 μ M, IAA 1, 10 μ M, 살리실산 (SA) 1, 10 μ M을 처리하였다. EvaGreen 2X qPCR MasterMix를 이용하여 RT-PCR을 진행하였다. 내부 대조군으로는 *ACTIN2*를 이용하였으며, 결과를 도 3에 나타내었다.

[0047] 도 3에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해 수크로오스 처리군에서 MybC의 발현량이 감소하였고, NaCl, 만니톨 처리군에서는 약간 높은 발현량을 보인다. ABA처리군에서는 발현량이 감소하였다. JA 처리군에서도 농도가 증가 할수록 많은 발현량을 보이나 이는 SA 처리군에서 감소한 것과는 반대되며, 특히 IAA에서 농도가 증가 할수록 발현량이 많이 감소하는 것으로 확인하였다. 이를 통해 뿌리특이적 발현 프로모터인 MybC 프로모터의 발현이 환경스트레스에 의해서 발현량이 변화할 수 있다는 것이 확인되며, MybC 프로모터에 검출용 유전자를 연결하여 이의 발현량 변화를 확인하는 경우, 환경 스트레스의 영향을 비교 분석할 수 있음을 예측할 수 있다. 예컨대 MybC 프로모터가 도입된 식물체의 뿌리에서의 MybC 발현량의 변화를 통해 토양이 식물에 스트레스를 주는 환경인지 여부 및 환경스트레스 양의 증감을 확인할 수 있다.

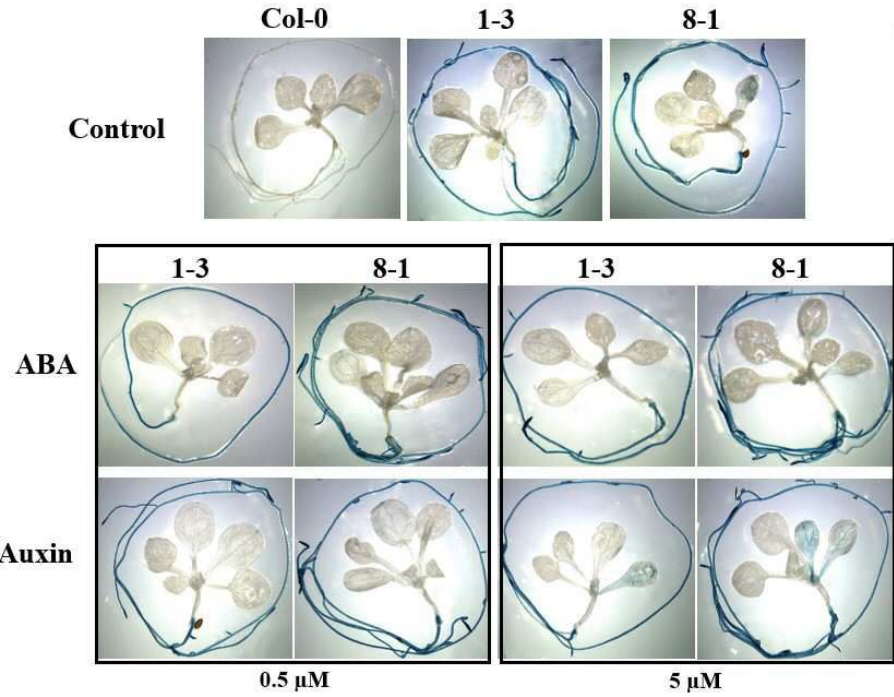
도면

도면1

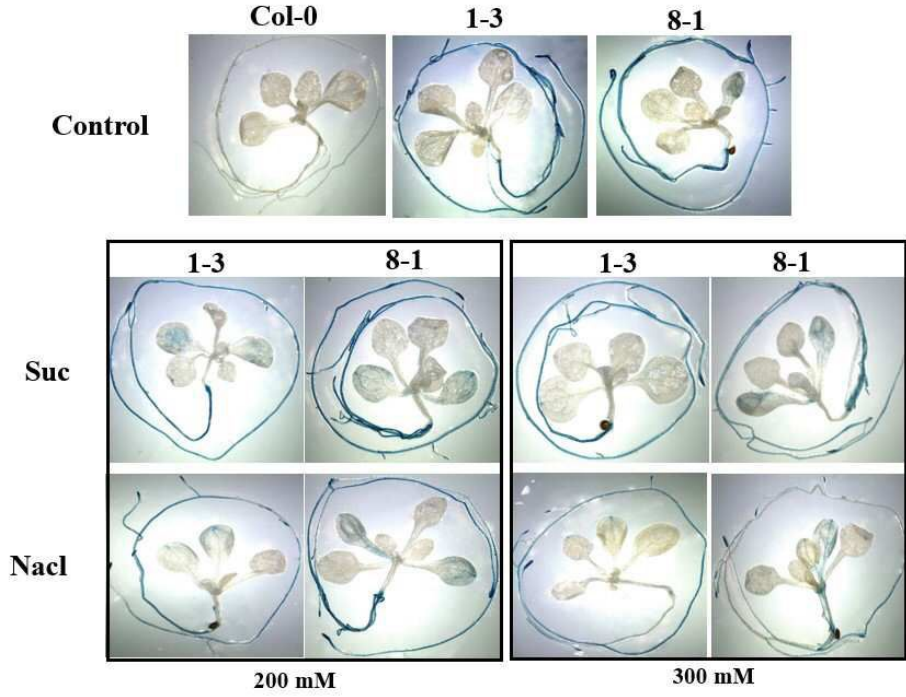
- MybC GUS vector structure



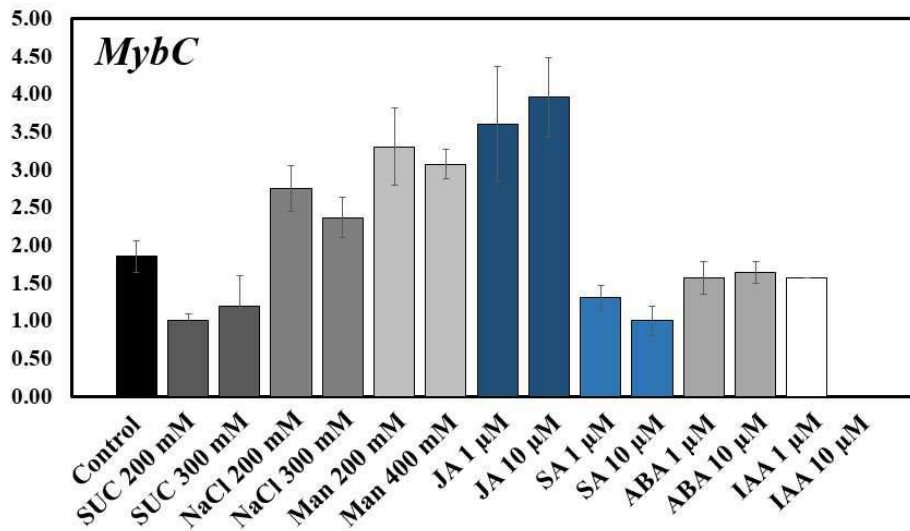
도면2a



도면2b



도면3



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> MybC promoter with root specific expression

<130> KU1-78p

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1392

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MybC promoter

<400> 1

cttaagatct aaatttatgt atatcctaac agttatatcc gttttgtaca ctattttaaa 60

actttttaca gatctaagat aaacatagat ttatttttaag aatcaaatag tgaaaactct 120

gcgtggaaaa aattaatcat gagtcatgac aatgatgagc tagttaaggt tccaagtgat 180

tgcaatcaca ttttgtgagc actaaagaac acatacacac actatatata tattcttgat 240

cacctaacga gtgaatcaaa agagatgagt agtttatgt attttgggac aaacttcgat 300

taaataatat ttacactatt tcatgaaaac atttgatcac tcatcaaata catcttatga 360

aggcgcatat atatctactg tttatgaaat ctaatctact ttactatatg aaaaaaacat 420

acaaatttgc cggagcttgc taaagacttc tcagcttctt ctccggtatt atcatcccta 480

gaccgggtcaa ttttgggttac ttaagttgca agaaatctcc gtgtaacca aatttcataa 540

atgcgtagtg ggatttactc ttcttctttt ttggtttcat atttgggtgt tgcctttcgc	600
gtaaaatacc aacatatagc aaagagcgtt tagacgtcaa atgtgtttgt tttatttgtg	660
tagagtatac atactttttt aagaaaagaa aaaagaagtt atgaaagctt gttctttttt	720
gttaaagatt atgaaagctt gtttaaatcc taatcacatc tcgtactaaa taaagaacta	780
tatgtgtgtg ggtaatatata tccaatctct ttaaatttaa accacttgtc tcatttcata	840
tgcaaaacgt gtatcttgta agaacacacg ctcttctaata atagaaatag atcgcgtaac	900
aagtggactt ggaaaagcta tagtttatgg cgttttcgga cagatttaca cttaaataat	960
attatcctca catcttttaa attcaattat ttcattatct tggttatcag aactgagttt	1020
tgtcggtaac attgtatctt taaaaaaaaat taccctaaac aaagaacgaa acgatacaat	1080
agtataaatt tgttcttgtc ataaacgata atttccaggt aagattaagg ataaaacaaa	1140
aaagcttata atagcaattt aaaacacgaa ttcaacgtac gatccaccac aatcctcgtc	1200
gtctttcaaa cttaaaatag cgaaactacc ctacattct tctttccata agaaatcaaa	1260
accaagtcct atggtcgcaa ttgtatctct atctaaaaat cttctttgaa tttgtgtata	1320
cacaaatctt attcaacgaa tcatttatca ccaaaagggt ctctcttttt tgtttgtttc	1380
tgtcttgtgt ga	1392
<210> 2	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer	
<400> 2	
cttaagatct aaatttatgt	20
<210> 3	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> reverse primer	
<400> 3	
tcacacaaga cagaacaaaa c	21