



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0051825
(43) 공개일자 2022년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) A01H 1/06 (2006.01)
C12Q 1/686 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8225 (2013.01)
A01H 1/06 (2021.01)
(21) 출원번호 10-2021-0139685
(22) 출원일자 2021년10월19일
심사청구일자 2021년10월19일
(30) 우선권주장
1020200135331 2020년10월19일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
신정섭
서울특별시 성북구 낙산길 255, 101동 101호(보문
동3가, 이편한세상보문)
김윤영
서울특별시 성북구 종암로23길 35, 207동 101호(
종암동, 래미안세레니티)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

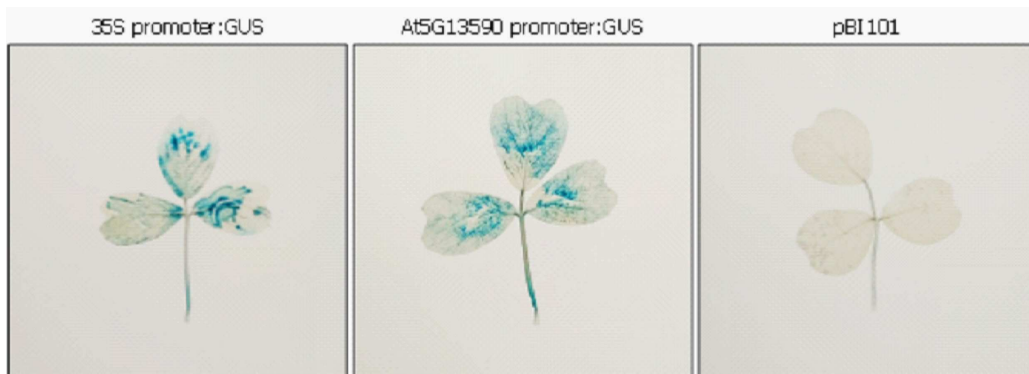
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 알팔파 형질전환용 발현 프로모터

(57) 요약

본 발명은 식물에서 잎 특이적 발현 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 벡터, 그리고 상기 벡터를 포함하는 형질전환체 및 형질전환 방법에 관한 것으로, 상기한 본 발명에 의한 애기 장대 프로모터는 애기 장대뿐만 아니라 유용 사료 작물인 알팔파에서 발현이 가능한 프로모터임을 증명하였고 또 다른 작물인 담배에서 역시 발현이 됨을 확인하였다. 이는 식물체의 잎에 특이적으로 발현을 유도하여, 식물의 성장과 발달에 유익하거나 각종 환경 스트레스 내성을 증진시키기 위한 유전자의 발현을 조절하는데 유용하게 이용할 수 있다. 따라서, 잎에서 특이적으로 발현하는 프로모터 및 상기 프로모터를 이용하여 우수한 품질 또는 수확량 증가 효과를 갖는 고부가 가치의 신종종 육성에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12N 15/8205 (2013.01)

C12N 15/8261 (2013.01)

C12Q 1/686 (2018.05)

C12Q 2600/13 (2013.01)

(72) 발명자

형수진

인천광역시 미추홀구 염창로 101, 406호(주안동, 선정아파트)

소원미

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 자연계 캠퍼스 하나과학관 A동 515호(안암동5가)

노민수

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 자연계 캠퍼스 하나과학관 A동 515호(안암동5가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1395062895

과제번호 PJ01367001

부처명 농촌진흥청

과제관리(전문)기관명 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21(R&D)

연구과제명 바이오매스 증대 및 리그닌 함량 감소 알팔파 형질전환체 개발과 특성 분석

기 여 율 1/1

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2018.02.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지는 일 특이적 발현 프로모터.

청구항 2

제1항의 프로모터를 포함하는 발현 벡터.

청구항 3

제1항의 프로모터 및 이와 작동 가능하게 연결된 유전자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 4

제1항의 프로모터, 제2항의 벡터 및 제3항의 벡터 중에서 어느 하나를 포함하는 형질전환체.

청구항 5

제1항의 프로모터, 제2항의 발현 벡터 및 제3항의 발현 벡터 중에서 어느 하나를 포함하는, 식물의 잎에서 유전자를 특이적으로 발현시키기 위한 조성물.

청구항 6

제2항의 발현 벡터에 외래 유전자를 삽입하는 단계; 및

상기 외래 유전자가 삽입된 발현 벡터를 식물에 형질전환하는 단계;를 포함하는, 외래 유전자를 형질전환 식물의 잎에서 특이적으로 발현시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일 특이적 프로모터에 관한 것으로, 보다 구체적으로 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 유래한 At5G13590 유전자의 프로모터 염기서열, 상기 프로모터를 포함하는 벡터와 이를 알팔파와 담배에서 형질전환 발현이 가능함을 확인한 것이다.

배경 기술

[0002] 작물분자육종은 모든 종(種)의 유전자를 재료로 사용할 수 있으며 기존의 계통 단위로만 가능하던 육종기술을 유전자 단위로 끌어내려 무한대의 육종 효과를 미세하게 조절할 수 있다는 측면에서 차세대 농업을 이끌어 갈 핵심적인 기술이다. 이러한 작물분자육종 기술을 이용한 유전자변형 작물의 재배 면적과 양이 전 세계적으로 지속적으로 증가하고 있으며, 상업화된 유전자변형 신종자의 세계 시장 규모는 2002년 40억 달러에서 2010년 100억 달러(종자와 기술료 포함)로 전체 세계 종자 시장규모 300억 달러 대비 15% 수준이며, 종류로는 대두, 옥수수, 면화, 유채가 주 시장을 형성하고 있다. 유전자변형 작물의 효과를 극대화하기 위해서는 외부에서 삽입된 유전자의 발현을 식물의 발달 시기별, 조직 별로 미세하게 조절할 수 있어야 하며 이를 위해 다양한 프로모터의 개발이 이루어져야 한다.

[0003] 이에 1980년대 초반부터 식물 유전자의 발현을 조절하는 프로모터에 대한 연구가 진행되어 왔다. 꽃양배추 모자이크 바이러스(Cauliflower mosaic virus)의 프로모터가 식물 전 조직에서 강한 발현을 유도할 것이라는 가능성이 제시되고, 상기 프로모터의 염기서열이 밝혀지고, 식물체내에서 강한 발현이 증명되었다. 그 후 CaMV35S (특허번호: JP1993192172-A1) 프로모터는 식물에서 가장 많이 쓰이는 보편적인(universal) 프로모터가 되었다.

[0004] 이렇듯 일반적으로 CaMV35S 프로모터가 전신 발현에 많이 이용이 되고 있지만, 유전자의 기능성과 목적 형질의 특성에 따라 조직별 또는 발현 시기별 프로모터를 써야하는 경우가 있다. 이에 따라 식물의 특정 조직 특이적으

로 발현을 유도하는 조직 특이 프로모터의 발현에 대한 연구가 꾸준히 진행되었고, 구체적으로, 꽃 조직 특이 프로모터(van der Meer et al., 1990, Plant Mol. Biol. 15: 95-109; Ruiz-Rivero and Prat, 1998, Plant Mol. Biol. 36: 639-648; Chiou and Y도, 2008, Plant Molecular Biology, 66: 379-388; Verdonk et al., 2008, Plant Biotechnology Journal 6: 694-701; Liu et al., 2011, Plant Cell Reports 30: 2187-2194), 약 (anther) 특이 프로모터(van Tunen et al., 1990, Plant Cell 2: 393-401; Kato et al., 2010, Plant Molecular Biology Reports 28: 381-387), 종자 특이 프로모터(Bustos et al., 1989, Plant Cell 1: 839-853; Kridl et al., 1991, Seed Sci Res, 1: 209-219; Washida et al., 1999, Welham and Domoney, 2000, Plant Sci. 159: 289-299; Plant Mol. Biol. 40: 1-12; Furtado et al., 2008, Plant Biotechnology Journal 6: 679-693; Chung et al., 2008, Plant Cell Reports, 27: 29-37) 등이 개발되었다.

[0005] 잎은 증산작용 및 호흡 작용을 하는 식물의 기관으로, 특히 광합성을 하여 식물 전체에 영양을 공급하기에 이러한 잎을 건강하게 유지시키는 것은 매우 중요하며 작물의 형질을 개량할 수 있을 뿐만 아니라 식물의 성장과 발달에 유익하거나 각종 환경 스트레스 내성을 증진시키기 위한 유전자의 발현을 조절하는데 유용하게 이용할 수 있다. 따라서, 잎에서 특이적으로 발현하는 프로모터 및 상기 프로모터를 이용하여 목적 유전자의 발현을 유도할 수 있는 연구가 지속적으로 요구되는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기 요구를 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 잎 특이적 프로모터를 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 프로모터를 포함하는 발현 벡터 및 상기 벡터를 포함하는 형질전환체와 형질전환용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 프로모터를 증폭할 수 있는 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

[0009] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터, 및 이를 포함하는 벡터 중에서 어느 하나를 포함하는, 식물의 잎에서 유전자를 특이적으로 발현시키기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 아울러, 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터를 포함하는 발현 벡터에 외래 유전자를 삽입하는 단계; 및

[0011] 상기 외래 유전자가 삽입된 발현 벡터를 식물에 형질전환하는 단계;를 포함하는, 외래 유전자를 형질전환 식물의 잎에서 특이적으로 발현시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명가들은 애기장대 TAIR/ATTED DB를 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명가들은 애기장대 TAIR/ATTED DB를 이용하여 잎 특이적 발현을 보이는 At5G13590 유전자의 프로모터 부위를 클로닝하여 식물체의 잎 특이적 발현 프로모터를 제작하였고, 콩과에 속하는 다년생 작물로서 전세계 많은 나라에서 중요한 가축사료 작물로 재배되고 있는 알팔파(*Medicago sativa L.*)를 이용한 형질전환체에서 상기 프로모터의 활성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였으며, 또 다른 작물인 담배(*Nicotiana benthamiana*)에서도 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

[0013] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0014] 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지고, 잎 특이적 발현 프로모터에 관한 것이다.

[0015] 상기 프로모터는 전사를 개시할 수 있는 프로모터로, 비생물학적 및/또는 기계적 스트레스에 반응하여 발현된다. 또한, 상기 프로모터 서열의 변이체가 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있다. 변이체는 염기서열은 변화되지만, 서열번호 1의 염기서열과 유사한 기능적 특성을 갖는 염기서열을 모두 포함한다. 구체적으로, 상기 프로모터는 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상의 상동성을 갖는 염기서열을 포함할 수 있다.

[0016] 상기 폴리뉴클레오타이드에 대한 서열 상동성의 %는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는

삭제를 포함하지 않음)과 달리 추가 또는 삭제(갭, gap)를 포함할 수 있다.

- [0017] 상기 프로모터의 발현 부위는 식물체 전체에서 나타날 수 있으며, 일 예로 꽃 및 줄기에서 발현된다.
- [0018] 상기 프로모터는 서열번호 1의 염기서열을 갖고, 상기 염기서열은 애기장대 At5G13590 유전자의 코딩 시퀀스의 번역개시 부위로부터 1784 앞에서 유래된 것을 특징으로 한다.
- [0019] [서열번호 1]
- [0020] ctttgttctttcacttcaactctttggtttttccgcaaactctaaaagtgttgcaaaatggttgatcatcaaaaccccataaacatatgggttgataatgggaataaaattaattttgggttttggttgatcgagagaagtaggggtgagaccgagctgaagggagagatagatacagacgaagcttttgtttgttgcaggagttagctgttactaaaattttgcaactttcggtttttccctttatttctgtaacgcctgactctctctctctcttcttcttctttttgttaactttgtgtttaaggtataaataatctggctcatttttggttaaatgactaaattcttgatattattttcaatatccacagtaataactaataaatgtaggagatatttgactggctcaatatagtagttgctctcttaaatgtggagctagctcttttcacaaaaaataattttattagtcaaaacccattacggaaagaattcataaggccattatcaaaaacatggaccagagcagaaaaagtaagtgagtttaattccggattagtgtgaaattaaacctaggcatactaatcggattaaagccggcatgaccacaccatataatttagtccggcgacggcgcaataaagtacagtataactcaatctttatttttttctttagaaaataaatataatttcttaattttcaataatcataagatttaataattttgtttgagtcttaactaattttggatgacaaaaaaaaaaaaaacatcataattataaaaaaatgaatggattttgttttagacaaggaccacaactgttttagtcagcaaaacttaaatgagaacactaaatttaaacatatagacataaacatgtaataatgattttcaaaaattctgaaaaactacagttctatacaaatctttattataattcgctgaatcgattttataaatccgaatatttataaataattcttgaaaaagccgtgaaaaaaaaaaggggtggatgagtcacactgtttataaaggaggcaagttgctgctgcagagttgtgtggcccttgcaagtttagcatctctctcttctctgtgtagccttctcttcatatatttcatatctaaactgtactttttatttaattttcctggaaactgcatcatcatcctcatcatccattatcactcaaacctctccatcactcttcttcttttggtagattcttctctctccctaacacctttctcttcttccctaaactggatttcttattctctttcacacttattttgttttgcgttagatttgcaacctctaattctttgattactcttctctctgctctgtgagttctacgtaactagcttcgatcttggttttacgtattggattcaatcctttttggatattttcagatttttctccactaacatattactttctgatttactttttgttaattctatcggtgacttcattttttctcttgattgttcttcttctataggggccttggtgatctctggattcactgtttacttgcgtctattagggctcagttagatagatacctgtgggatttatgtttgtttcatctgaaatccatttgaatttgaattcttcttttgccttttctctgctttataatgatattgatcttgtaggtgtgttagttggagttagcctgtaaaaaggtacaagagtgaagtttgatttttattaggacctcgaagttcaact
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 프로모터를 포함하는 발현 벡터, 그리고 상기 프로모터 및 이와 작동 가능하게 연결된 유전자를 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0022] 상기 벡터는 바람직하게는 식물 발현 벡터일 수 있고, 식물 발현 벡터로 통상적으로 사용되는 벡터의 종류를 모두 포함할 수 있다.
- [0023] 상기 발현 벡터에서 프로모터는 작동 가능하게 연결된 유전자의 앞에 위치할 수 있다. 이는 유전자가 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 제조할 DNA를 포함하는 것으로, 일 예로 이중 단백질을 발현하기 위한 단위로서 기능하는 발현 카세트 성분일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 실시 예에 있어서, GUS 리포터 유전자가 함유된 바이너리 벡터(pBI101)에 본 발명의 프로모터를 삽입한 At5G13590 promoter:GUS를 제조하였고, 상기 GUS 리포터 유전자는 다른 유용한 목적의 외래 유전자로 치환될 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 프로모터 또는 벡터를 포함하는 형질전환체 및 상기 프로모터 또는 벡터를 포함하는 식물의 형질전환용 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 상기 형질전환체는 본 발명의 발현 벡터를 이용하여 형질전환된 형질전환 식물체 일 수 있다. 상기 식물체는 일 특이적 발현 프로모터가 포함된 유전자 발현 카세트 또는 일 특이적 발현 프로모터를 포함하는 발현 벡터가 삽입되어 형질전환이 가능한 식물체라면 그 종류에 제한되지 않는다. 상기 식물체는 상기 식물 자체, 조직, 세포 및 종자로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있다.
- [0027] 상기 식물 세포는 어떤 식물 세포도 가능하며 배양세포, 배양조직, 배양기관 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 것은 모두 이용할 수 있다.
- [0028] 상기 식물 조직은 미분화된 또는 분화된 식물의 조직일 수 있고, 일 예로 뿌리, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들로 단일세포, 원형질체(protoplast), 짝 및 캘러스를 모두 포함한다. 또한, 상기 식물조직은 인 플란타(in planta)이거나, 기관 배양, 조직배양 또는 세포 배양 상태인 것도 모두 포함한다.

- [0029] 상기 식물은 일 예로, 식량작물류, 채소작물류, 특용 작물류, 과수류, 화훼류, 사료작물류 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에서 알파파와 담배에서 본 발명의 At5G13590 프로모터의 발현이 나타남을 확인하였다(도 2 및 도 4).
- [0031] 상기 형질 전환용 조성물은 바람직하게는 본 발명의 발현 벡터를 포함하는 미생물의 배양물을 포함할 수 있다. 상기 배양물은 본 발명의 벡터를 포함하는 미생물을 배양배지 또는 배양액에서 배양한 배양산물로, 상기 배양물의 상층액, 농축물, 건조물 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나를 포함할 수 있다. 또한 그 제형에 한정되지 않고, 액체 또는 고체일 수 있다.
- [0032] 상기 형질 전환용 조성물은 본 발명의 프로모터 또는 발현 벡터 이외에 식물체의 형질 전환을 위해 사용되는 부가적인 성분을 더 포함할 수 있고, 일 예로, 아췌반트, 부형제, 담체 등을 포함하여 형질 전환 효율을 향상시킬 수 있다.
- [0033] 상기 본 발명의 프로모터 또는 이를 포함하는 발현 벡터를 식물체 내로 삽입하는 방법은 본 발명의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법을 사용할 수 있고, 일 예로 아그로박테리움 방법, 삼투압법, 전기천공법, 유전자 총 방법 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 방법을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 바람직하게는 아그로박테리움 방법을 이용할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 형질전환 방법에 의하여 형질 전환된 형질전환체는 앞에서 특이적으로 유전자를 발현시키는 본 발명의 프로모터에 의하여 잎 조직에서 특이적으로 유전자를 발현시킬 수 있고, 이를 이용하여 식물의 수확, 목적 유전자의 발현을 통한 유용한 단백질의 생산 등이 가능하다.
- [0035] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 포함하는 DNA 단편을 증폭하기 위한, 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 일부에 특이적으로 혼성화할 수 있는 2 내지 50nt의 올리고뉴클레오타이드 및 이를 포함하는 본 발명의 프로모터 또는 이를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 식물체 선별용 조성물; 또는 식물체 선별용 키트를 제공한다. 상기 프라이머 세트는 일 예로, 서열번호 2로 이루어진 정방향 프라이머 및 서열번호 3으로 이루어진 역방향 프라이머를 포함하는 프라이머 세트 및 상기 프라이머 세트를 포함하는 식물체 선별용 키트에 관한 것이다.
- [0036] [서열번호 2]
- [0037] CAT TCTAGA CTT TGT TCT TTC ACT TCA ACT CTT TGG TTT TTC
- [0038] [서열번호 3]
- [0039] CAT GGA TCC AGT TGA ACT TCG AGG GTC CTA ATA AAA ATC
- [0040] 상기 DNA 단편은 서열번호 1로 표시되는 것 일 수 있고, 상기 서열번호 1의 염기서열은 애기장대 At5G13590 유전자의 프로모터로부터 유래된 것이다.
- [0041] 상기 서열번호 2 및 3을 포함하는 프라이머 세트는 본 발명의 잎 특이적 발현 프로모터를 증폭할 수 있다. 또한, 이러한 특성을 통해서, 본 발명의 잎 특이적 발현 프로모터를 포함하는 형질전환체를 선별할 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터, 및 이를 포함하는 벡터 중에서 어느 하나를 포함하는, 식물의 잎에서 유전자를 특이적으로 발현시키기 위한 조성물을 제공할 수 있다.
- [0043] 아울러, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 프로모터를 포함하는 발현 벡터에 외래 유전자를 삽입하는 단계; 및
- [0044] 상기 외래 유전자가 삽입된 발현 벡터를 식물에 형질전환하는 단계;를 포함하는, 외래 유전자를 형질전환 식물의 잎에서 특이적으로 발현시키는 방법을 제공할 수 있다.
- 발명의 효과**
- [0045] 본 발명의 애기장대 유래 잎 특이적 발현 프로모터는 식물체에서 유전자의 발현을 유도하여 우수한 품질 또는 수확량 증가 효과를 갖는 고부가 가치의 신품종 육성에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0046] 도 1은 본 발명에 의한 프로모터 클로닝에 이용한 발현벡터인 pBI101 벡터의 모식도이다.
- 도 2는 본 발명에 의한 잎 특이적 발현 At5G13590 프로모터의 애기장대에서의 발현 양상을 확인한 그림이다.
- 도 3는 본 발명에 의한 잎 특이적 발현 At5G13590 프로모터의 알팔파에서 발현을 분석한 결과를 나타내는 것으로, 왼쪽 그림은 positive control로서 35S promoter:GUS의 발현이며, 가운데 그림은 At5G13590 promoter:GUS의 발현을 확인한 그림이고, 오른쪽 그림은 negative control로서 promoter 부분 없이 empty vector의 발현 양상을 확인한 그림이다.
- 도 4는 본 발명에 의한 잎 특이적 발현 At5G13590 프로모터의 담배에서의 발현을 확인한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0047] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다.

[0049] 실시예 1 : 애기장대 At5G13590 유전자의 프로모터 클로닝

- [0050] 상기 유전자의 프로모터로 추정되는 부위는 1784 염기쌍(base pair)으로 추정하였다. 먼저 야생 애기장대의 게놈 DNA(gDNA)를 추출하고, 5' 말단에는 XbaI을 3' 말단에는 BamHI을 포함하고 있는 서열 2,3으로 표시되는 프라이머를 합성하였다.
- [0051] 상기 gDNA를 주형으로 하여 상기 프라이머 세트와 교정(proofreading) 기능을 갖는 DNA 중합효소인 Phusion High-Fidelity DNA Polymerase(Phusion[®] DNA Polymerase, Thermo Scientific)를 이용하여 프로모터 부위를 증폭하였다. 그리고 이때 PCR 반응은 Gene Amp[®] PCR System 2700 (Perkin Elmer, USA)을 사용하여, 98℃에서 1분간 초기 변성 후, 98℃에서 10초, 58℃에서 30초 72℃에서 40초로 30회 PCR을 수행하였다.
- [0052] PCR로 얻은 산물로 1784 염기쌍을 아가로스 젤 상에서 확인하고, 이 PCR 산물을 XbaI과 BamHI 제한효소로 말단을 자른 다음 GUS 리포터 유전자를 가지고 있는 pBI101 벡터(vector)의 XbaI과 BamHI 제한효소 인식 부위에 클로닝하였다. 이후 대장균(*E. coli*) colony-PCR을 수행하여 PCR 산물이 삽입된 것을 확인하고, 그 중 하나의 클론을 시퀀싱(sequencing)한 결과 정확한 염기서열이 클로닝 되었음을 확인하였다 (서열번호 1 참조).

[0054] 실시예 2 : At5G13590 프로모터의 애기장대 형질전환과 작물 (알팔파, 담배)로의 형질전환

- [0055] At5G13590 프로모터 클로닝에 이용한 pBI101 벡터는 레프트 보드(left board)와 라이트 보드(right board) 사이에 GUS(β -glucuronidase) 리포터 유전자를 가지고 있으며 식물에 형질 전환시킬 수 있는 바이너리 벡터(binary vector) 이다(도 1 참조).
- [0056] 이 벡터를 아그로박테리움(*Agrobacterium*, GV3101)에 형질전환을 한 후 꽃침지(flower dipping, Clough et al., Plant J., 16(6): 735 -743, 1998) 방법으로 애기장대에 형질전환을 하였다. 형질전환 애기장대를 항생제 카나마이신이 함유된 배지에서 선별하였다.
- [0057] 또한, 작물인 알팔파와 담배에 형질 전환을 하기 위해 이 벡터를 아그로박테리움(*Agrobacterium*, LBA4404)에 형질 전환을 한 후 주입(agro-infiltration, Walter et al., Plant J., 40, 428-438, 2004) 방법으로 알팔파와 담배에 형질 전환하였다.

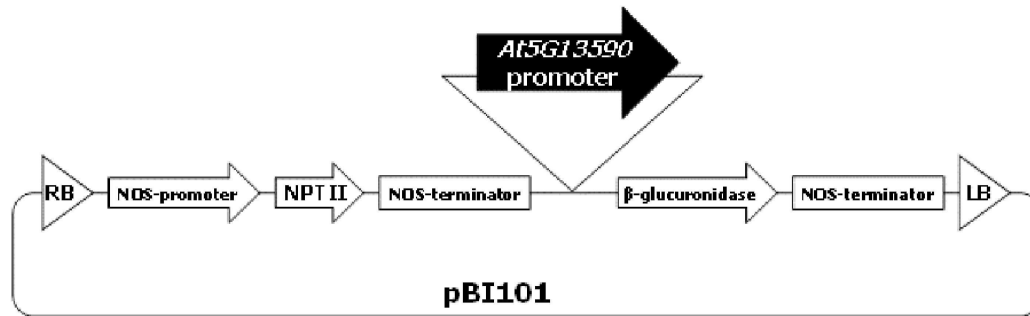
[0059] 실시예 3 : 형질전환 식물체의 조직 화학적 염색 분석

- [0060] 선별된 형질전환 식물체의 각 조직으로부터 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법을 이용하여 조사하였다. 식물체의 각 조직은 1 mM X-Gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronidase), 100 mM 인산나트륨(sodium phosphate)(pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM 페리시안화 칼륨(potassium ferricyanide), 0.5 mM 페로시안화 칼륨(potassium ferrocyanide), 그리고 0.1% Triton X-100을 함유하는 용액에 담가 37℃에서 24시간 동안 반응시킨 다음, 용액을 제거한 후 70% 에탄올을 첨가하여 2시간동안 클로로필을 제거하는 과정을 3회 반복한 후, 100% 에탄올에 보관하면서 관찰하였다. 그 결과, 도 2, 3, 4과 같이 앞에서 GUS 염색이 관찰되었다. 또한, 핀셋이나 가

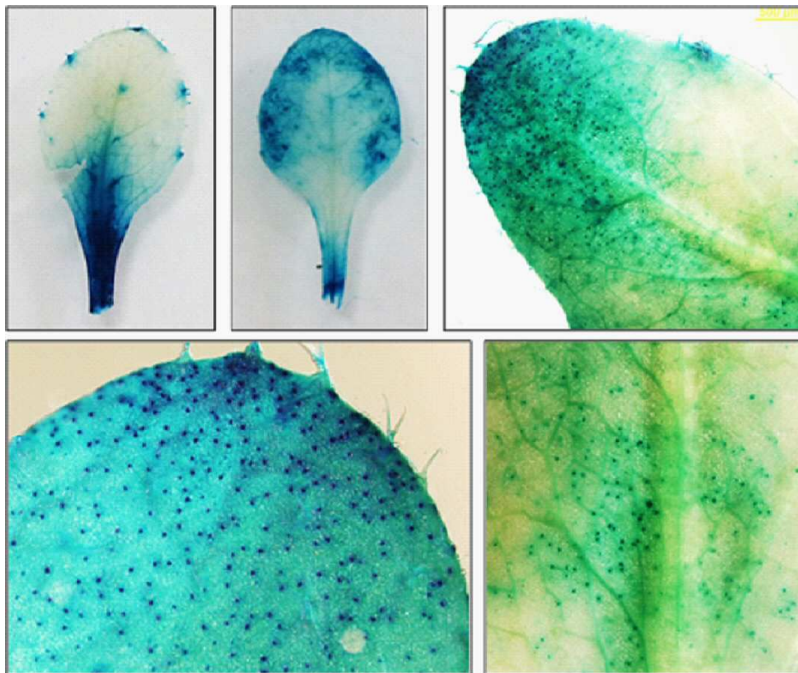
위를 이용한 상처(wounding) 부위에서도 GUS 염색이 관찰되었다. 도 2, 3, 4에 나타낸 바와 같이, 각각의 잎에서 삽입된 유전자의 발현이 유도되는 것임을 확실하게 확인하였다. 따라서 본 발명의 프로모터가 잎 특이적 발현 프로모터로서 애기장대와 작물인 알팔파와 담배에서 활성을 보임을 모두 확인하였다.

도면

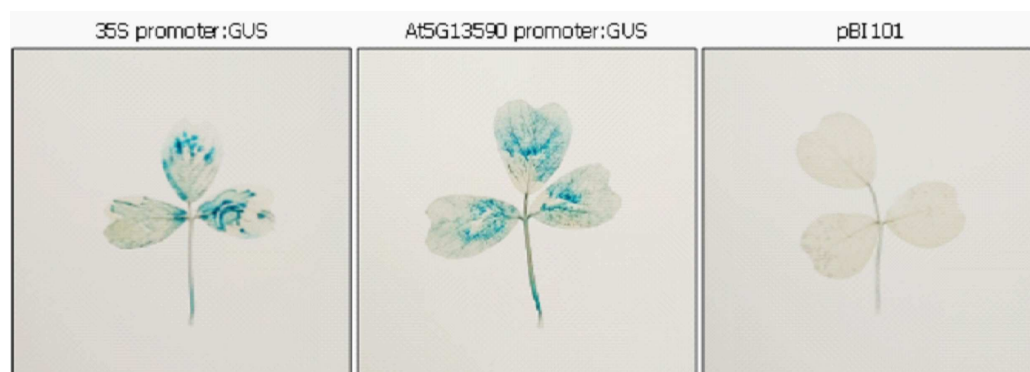
도면1



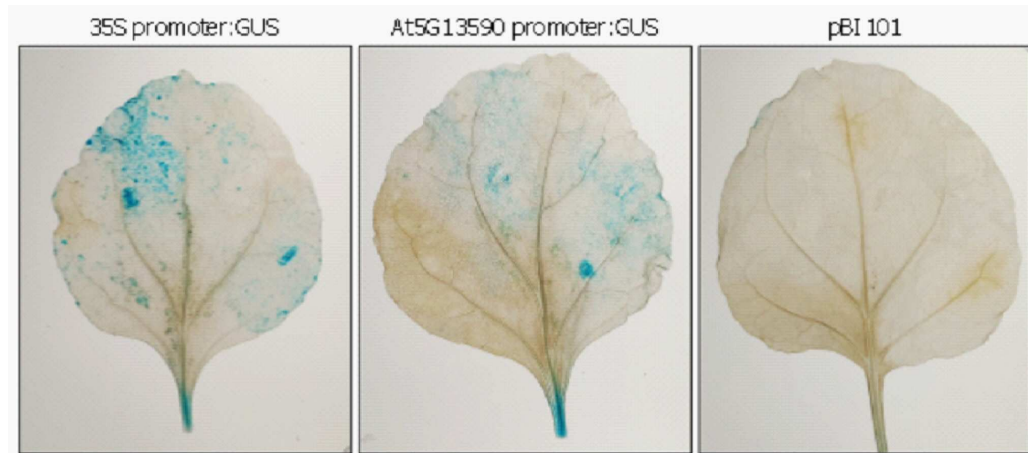
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> A PROMOTER FOR TRANSGENIC EXPRESSION IN ALFALFA

<130> P21U13C0947

<150> KR 10-2020-0135331

<151> 2020-10-19

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1784

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 1

ctttgttctt tcaattcaac tctttggttt ttccgcaaat ctaaaagtgt tgcaaaatgg 60

ttgatcatca aaaccccata aacatatggg ttgataatgg gaataaatta attttgggtt 120

ttggttgat cggagaagta ggggtgagac cgagtctgaa gggagagata gatacagacg 180

aagcttttgt ttgtttgca ggagttagct gttactaaaa ttttgcaact ttcgtttttc 240

cctttatttc tgtaacgcct gactctctct ctctctttct tctttcttt tgtaactttg 300

tgtttacggt aaaatatctg gctcattttg gtaaatgact aaattcttga tattattttt 360

caatatccca cagtaatact aataaatgta ggagatatatt gactgggtcaa tatagtagtt 420

gctctcttaa atgtggagct agctcttttc accaaaaaat attttattag tcaaaacca 480

ttacggaaag aattcataag gccattatc aaaacatgg accagagcag aaaaagtaag 540

tgagttaatt ccggaattagt gtgaaattaa acctaggcat actaatcgga ttaagccggc	600
atgaccacac ccatatattt agtcggcgga cggcgcaata aagtacagta tataactcaat	660
ctttatttat ttttcacttt agaaataaat ataatttctt aattttcaat aatcataaga	720
tttaatatTT attttgtttg agtcctaact aattttggat gacaaaaaa aaaaaaaca	780
tcataattat aaaaaaaatg aatggatttt gttttgagac aaggaccaca actgtttagt	840
cagcaaaact taaatgagaa cactaaattt aaacatatag acatataacc atgtaataat	900
gattttcaaa aattctgaaa aactacagtc ttatacaaat ctttattata attcgctgaa	960
tcgattttat aaatccgaat atttataaat aattcttgaa aaagccgtgt aaaaaaaaa	1020
aaggggtggat gagtcaaaact gtgttataaa gaggcaaagt tgctgctgca gaggttgtgtg	1080
gcccttgtca aagtttagca tctctctctt tctctgtgta gccttctctt catatatttc	1140
atatctaaac tgtacttttt atttaatttt cctggaaact gcatcatcat cctcatcacc	1200
cattatcact caaacctctc catcactctt ccttcttttg gtagattctt ctctctcccc	1260
taacaccttt ctctttcttc cctaaatctg gatttcttat tctctttcac acttattttg	1320
tttttgctgg tagatttgcg aacctctaatt tctttgatta ctctctctc tgctctgtga	1380
gtcttacgta actagcttcg atcttgtttt tacgtattgg attcaatcct ttttggata	1440
cttttccaga ttttctcca ctaaccatat tactttctga ttacttttt ttgtaatctt	1500
atcggtgact tcattttttt cttcttgatt gttcttcctt tctatagggg ccttggtgat	1560
ctctggattc actgtttact tgcgtctatt agggctctagt tagatagata ccttggtgga	1620
tttatgtttg ttccatctga aatccatttg aatttgaatt cttcttttgc cttttctct	1680
gctttataat gatattgac ttgtaggtgt gttagtggga gttagcctgt aaaaaggtag	1740
aagagtgaag ttttgatttt tattaggacc ctccaagtcc aact	1784
<210> 2	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> forward primer for At5G13590 promoter	
<400> 2	
cattctagac ttgttcttt cacttcaact ctttggtttt tc	42
<210> 3	
<211> 39	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for At5G13590 promoter

<400> 3

catggatcca gttgaacttc gagggtccta ataaaaatc

39