



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월09일

(11) 등록번호 10-1510828

(24) 등록일자 2015년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

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

C12N 15/11 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0124112

(22) 출원일자 2013년10월17일

심사청구일자 2013년10월17일

(56) 선행기술조사문헌

KR101259682 B1

KR100604191 B1

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

배정명

서울 노원구 한글비석로5길 62, 803동 907호 (중계동, 중계8단지주공아파트)

노철아

서울 성북구 동소문로20가길 62, 302호 (동선동1가, 대은빌딩)

신정섭

서울 성북구 길음로9길 50, 910동 2501호 (길음동, 길음뉴타운9단지)

(74) 대리인

김순용

전체 청구항 수 : 총 4 항

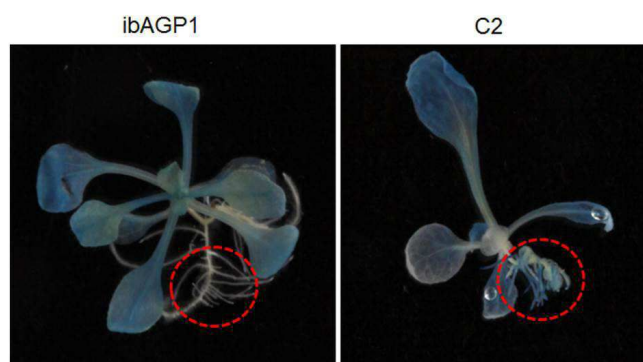
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 식물체 전신 고 발현 재조합 프로모터

(57) 요약

본 발명은 서열번호 1의 염기서열 ~ 서열번호 4의 염기서열로 구성되는 군에서 선택되는 염기서열을 갖는, ibAGP1 프로모터와 SRD1 프로모터가 연결된 식물체 전신 고 발현 재조합 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 식물체 전신 고 발현벡터 및 상기 벡터를 이용하여 외래 유전자를 식물체의 전 조직에서 발현시키는 방법에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의한 식물체 전신 고 발현 프로모터는 쌍자엽 식물의 전 조직에서 외래유전자의 고 발현을 유도한다. 따라서 형질전환체 제작 시 항생제 혹은 제초제 저항성 유전자를 이용한 형질전환체 선발 및 의료, 산업용 유용 물질 생산 형질전환 식물체 등의 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ00807603

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린 21사업 _GM작물실용화사업단

연구과제명 주요 채소작물 형질전환체 개발용 전신 고발현 재조합 프로모터 개발

기 여 율 1/1

주관기관 서울대학교

연구기간 2011.05.01 ~ 2014.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진, ibAGP1 프로모터 및 SRD1 프로모터가 연결된 쌍자엽 식물체의 전신 고 발현 재조합 프로모터.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항의 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 발현벡터는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 재조합 프로모터가 pBGWFS7.0에 도입된 형질전환용 발현벡터.

청구항 6

제4항 기재의 발현벡터에 의해 형질전환된 식물체.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 식물체 전신 고 발현 재조합 프로모터에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 쌍자엽 식물체의 뿌리를 포함한 식물 전 조직에서 강한 발현을 유도하는 재조합 프로모터 염기서열, 상기 염기서열을 포함하는 쌍자엽 식물체 전신 고 발현 플라스미드 벡터 및 상기 벡터를 이용하여 외래 유전자를 쌍자엽 식물체의 전 조직에서 발현시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[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.

[0003]

이러한 작물분자육종 기술을 이용한 유전자변형 작물의 재배면적과 재배량이 전 세계적으로 지속적으로 증가하고 있으며, 2009년 현재 유전자 변형 작물의 재배 국가는 미국, 브라질, 아르헨티나, 인도, 중국 등을 비롯하여 총 25개국에 되었으며, 유전자 변형 작물의 재배면적 및 재배량이 지속적으로 증가하고 있는 실정이며, 실제로 2008년에 비해서 2009년에는 약 7%인 9백만 헥타아르의 재배 면적이 증가한 것으로 나타났다.

[0004]

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 주시장을 형성하고 있다. 유전자변형 작물의 향후 시장 규모에 대한 전망은 장기적으로 유전자변형 작물 시장이 바이오산업에서 가장 큰 영역을 차지할 것이라고 예측하면서 2020년 시장규모를 Astra-Zeneca 등 생명과학 기업들은 750억 달러, 일본의 미쓰비시 연구소는 1,375억 달러에 달할 것으로 전망하였다. 이와 함께 유전자 변형 가공식품도 2010년 1,360억 달러, 2020년에는 1,590억 달러의 거대 시장을 형성하여 21세기 최대의 바이오산업으로 부

상할 것으로 예측하였다.

[0005] 유전자변형 작물의 효과를 극대화하기 위해서는 외부에서 삽입된 유전자의 발현을 가장 효과적으로 조절할 수 있어야하며 이를 위해 다양한 프로모터의 개발이 이루어져야 한다. 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 것이라고는 가능성이 제시되고(Hohn et al., 1982, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 96: 193-236), 상기 프로모터의 염기서열이 밝혀지고(Odell et al., 1985, *Nature* 313:810-812), 식물체내에서 강한 발현이 증명되었다(Sanders et al., 1987, *Nucleic Acids Res.* 15: 1543-58). 그 후 CaMV 35S(특허번호: JP1993192172-A1) 프로모터는 식물에서 가장 많이 쓰이는 항상성(universal) 프로모터가 되었다.

[0006] 이 후 아그로박테리움 유래 opine synthase 프로모터가 개발되었다(Bevan et al., 1983, *Nature* 304: 184-187). 근래에는 형질전환 식물체 제작 시 식물 유래의 프로모터 사용에 대한 사회적인 요구가 지속적으로 있어 왔으며, 이에 식물 유래 쌍자엽 식물용 항상성 프로모터 개발이 이루어져 왔다. 애기장대 ubiquitin 프로모터(Callis et al., 1990, *Journal of Biological Chemistry*, 265: 12486-12493), 담배 식물의 NeIF-4A 프로모터(Mandel et al., 1995, *Plant Molecular Biology*, 29: 995-1004), 애기장대 actin 프로모터(An et al., 1996, *Plant Journal*, 10: 107-121), 담배식물 tCUP 프로모터(Foster et al., 1999, *Plant Molecular Biology*, 41: 45-55; Wu et al., 2001, *Molecular Genetics and Genomics* 265: 763-770; Malik et al., 2002, *Theor Appl Genet*, 105: 505-514) 등이 개발되어왔다.

[0007] 하지만 식물 유래의 쌍자엽용 항상성 프로모터는 여전히 부족한 상황으로 쌍자엽용 항상성 프로모터의 개발에 대한 요구가 지속적으로 있어왔다. 본 발명자들에서 개발한 고구마 유래 ibAGP1 프로모터는 쌍자엽 식물의 지상부 조직에서 강한 활성을 보이는 항상성 프로모터(대한민국 등록특허 제10-0604191 호(2006.07.25))이며, ibAGP1 유전자의 전분체 타겟팅 염기서열과 함께 사용할 경우 식물의 지상부 각 조직에서 CaMV35S 프로모터를 능가하는 활성을 보인다(Kwak et al., 2007, *Plant Cell Reports*, 26: 1253-1262; 대한민국 등록특허 제10-0542053호(2006.01.12)). 하지만 뿌리 조직에서는 그 활성이 매우 약하여 CaMV35S 프로모터에 훨씬 못 미치는 활성을 보이는 문제점이 있었다.

[0008] 본 발명의 배경이 되는 기술로, 본 발명자들은 대한민국 등록특허 제10-1259682호(2013.05.02)에 미세조류 유래 베타카로틴 케톨레이제(ketolase) 유전자 및 이를 이용한 케토형 카로티노이드 생산과 동시에 베타카로틴 증산하는 형질전환 식물체 제조 방법에 대해 개시한 바가 있고, 대한민국 등록특허 제10-1260565호(2013.05.06)에 고구마 유래 SRD1 유전자의 cDNA, 상기 cDNA를 포함하는 식물 형질전환용 벡터 및 상기 벡터를 이용하여 생산한 뿌리작물 등의 형질전환 식물체에 대해 개시한 바 있다. 그러나, ibAGP1 프로모터를 포함하여 뿌리를 포함한 쌍자엽 식물의 전 조직에서 강한 발현을 유도하는 것에 대해 알려진 바는 없다.

[0009] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 인용문헌 및 특허 문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 문헌 및 특허의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0604191호(2006.07.25)
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-0542053호(2006.01.12)
(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허 제10-1259682호(2013.05.02)
(특허문헌 0004) 대한민국 등록특허 제10-1260565호(2013.05.06)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 상기 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 기 개발된 ibAGP1 프로모터의 뿌리 조직에서 활성을 증가시켜 쌍자엽 식물체의 뿌리를 포함한 식물 전 조직에서 강한 발현을 유도하는 재조합 프로모터의 염기서열을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 본 발명에 의한 재조합 프로모터를 포함하는 식물체 형질전환용 벡터 및 이에 의해 형질 전환된 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 ~ 서열번호 4의 염기서열로 구성되는 군에서 선택되는 하나의 염기서열을 갖는, ibAGP1 프로모터와 SRD1 프로모터가 연결된 식물체 전신 고 발현 재조합 프로모터를 제공한다.
- [0015] 바람직하게, 상기 재조합 프로모터는 서열번호 2의 염기서열 또는 서열번호 3의 염기서열을 갖는다.
- [0016] 바람직하게, 상기 식물체는 쌍자엽 식물체인 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 재조합 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현벡터를 제공한다.
- [0018] 바람직하게, 상기 발현벡터는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 재조합 프로모터가 pBGWFS7.0에 도입된 형질전환용 발현벡터이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 발현벡터에 의해 형질전환된 식물체를 제공한다.
- [0020] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [0021] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명자들은 고구마 유래 ibAGP1 프로모터의 5' 말단 부위에 SRD1 프로모터를 융합시켜 재조합 프로모터를 제작하였으며 배추식물에 일시적 발현 및 애기장대 형질전환체에서 동일 프로모터의 활성을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0022] 따라서 본 발명은 서열번호 1의 염기서열 ~ 서열번호 4의 염기서열로 구성되는 군에서 선택되는 하나의 염기서열을 갖는, ibAGP1 프로모터와 SRD1 프로모터가 연결된 식물체 전신 고 발현 재조합 프로모터를 제공한다.
- [0023] 본 발명에 있어, '프로모터(promoter)'란, 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. 또한, 이러한 프로모터 중에는 모든 조직에서 상시적으로 발현을 유도하는 프로모터 및 시간 또는 위치 특이적으로 발현을 유도하는 프로모터가 있으며, 바람직하게 본 발명에 따른 프로모터는 전 조직에서 발현하는 재조합 프로모터이다. 따라서, 본 발명에 의한 상기 프로모터는 식물체 전 조직에서 목적 유전자의 발현을 유도시킬 수 있다.
- [0024] 본 발명에 의한 재조합 프로모터는 상기 두 개의 프로모터의 4가지 조합을 이용할 수 있다 (도 1). ibAGP1 프로모터는 그 활성이 높으며 당 처리에 의해 프로모터 활성이 가장 높게 유도되는 전체 크기(1976 bp)의 프로모터와 전분체 타겟팅 염기서열 (TP)가 연결되어 있는 ibAGP1 프로모터를 이용한다. 한편, SRD1 프로모터는 3-kb 전체에 뿌리 특이 발현 조절 인자가 산재해 있을 것으로 추정되는 결손 프로모터 결과 (Noh et al., 2012, Transgenic Research, 21: 265-278)를 바탕으로 SRD1의 활성이 높게 나타나는 전체 크기(-2801~+209; 2801 bp SRD1 프로모터 + 209 bp 5' 비번역 부위)와 최소 크기(-321~+209; 321 bp SRD1 프로모터 + 209 bp 5' 비번역 부위), 그리고 ROOT MOTIF가 다량 산재되어 있는 부위(-2088 ~ -1543)를 선정하여 ibAGP1의 프로모터에 연결함으로써 새로운 재조합 프로모터 합성을 완성할 수 있다.
- [0025] 재조합 프로모터 제작 시에 ibAGP1 프로모터를 3' 방향에 그리고 SRD1 결손 프로모터들을 5' 방향에 위치하게 제작한다. 즉 4 가지의 종류가 다른 합성 프로모터 C1, C2, C3, C4를 제작할 수 있는데, C1은 SRD1 (-2801 ~

+209) + ibAGP1 (-1909 ~ +67) (서열번호 1), C2는 SRD1 (-321 ~ +209) + ibAGP1(-1909 ~ +67)(서열번호 2), C3는 SRD1(-2088 ~ -1543) + ibAGP1(-1909 ~ +67)(서열번호 3), C4는 SRD1(-2801 ~ +209) + ibAGP1[(-1909 ~ +67) + TP1](서열번호 4)의 프로모터들로 구성되어 있다 (도 1).

[0026] 본 발명에 의한 상기 프로모터는 기존의 ibAGP1 프로모터의 뿌리 조직에서 약한 활성을 보완하여 쌍자엽 식물에서 뿌리를 포함한 모든 조직에서 목적 유전자의 강한 발현을 유도시킬 수 있다.

[0027] 바람직하게, 상기 재조합 프로모터는 서열번호 2의 염기서열 또는 서열번호 3의 염기서열을 갖으며, 더욱 바람직하게 서열번호 2의 염기서열을 갖는 재조합 프로모터(C2)이다. 상기 C2 프로모터는 기존의 ibAGP1 프로모터의 5' 말단 부위에 SRD1 프로모터의 일부분 (-321 ~ +209)을 연결시킨 것으로 발현유도 효율이 가장 우수하다.

[0028] 본 발명의 식물체 전 조직 고 발현 재조합 프로모터는 상기 서열번호 1 ~ 서열번호 4의 염기서열뿐만 아니라 상기 염기서열의 일부 염기가 치환, 결실 또는 부가된 변형서열로서 전 조직 특이적 프로모터 활성을 나타내는 염기서열을 포함한다.

[0029] 본 발명에서 상기 식물체는 쌍자엽 식물 또는 단자엽 식물일 수 있으며, 바람직하게는 쌍자엽 식물체이고, 상기 쌍자엽 식물은 이에 제한되지는 않으나, 애기장대, 대두, 담배, 가지, 고추, 감자, 토마토, 배추, 무, 양배추, 상추, 복숭아, 배, 딸기, 수박, 참외, 오이, 당근, 셀러리 및 유채일 수 있고, 상기 단자엽 식물로는 이에 제한되지는 않으나, 벼, 보리, 밀, 호밀, 옥수수, 사탕수수, 귀리 및 양파일 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 재조합 프로모터를 포함하는 형질전환용 발현 벡터를 제공한다. 바람직하게 본 발명은 상기 프로모터의 하류(downstream)에 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 작동 가능하게 연결시켜 제조된 식물체의 전 조직 고 발현 재조합 발현 벡터를 제공한다.

[0031] 본 발명에 있어, '발현 벡터'란 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 전 조직 고 발현 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 상기 작동 가능하게 연결된 유전자 서열과 발현 조절 서열은 선택 마커 및 복제 개시점(replication origin)을 같이 포함하고 있는 하나의 발현 벡터 내에 포함될 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어, '작동 가능하게 연결(operably linked)' 된다는 것은 적절한 분자가 발현 조절 서열에 결합할 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 연결되는 것을 의미한다. 또한, '발현 조절 서열(expression control sequence)'이란, 특정한 숙주 세포에서 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 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.

[0033] 상기 본 발명에 따른 발현 벡터로는 단백질 발현에 사용되는 기존의 벡터를 기본 골격으로 하여 본 발명의 재조합 프로모터를 삽입하고 상기 프로모터의 하류(downstream) 쪽으로 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 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 서브틸러스 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 pBI101 벡터 및 pBGWFS7.0를 이용하여 C2::GUS 발현벡터를 제조하였다.

[0034] 본 발명에 있어서, '목적 단백질'이란 본 발명의 프로모터에 의해 식물체의 전 조직에서 고 발현되길 원하는 외부 유래의 어떤 표적 단백질을 말하며, 바람직하게는 외인성 단백질이거나 또는 내인성 단백질 및 리포터 단백질일 수 있다. 상기 외인성 단백질은 특정 조직 또는 세포에 천연으로 존재하지 않는 단백질을 말하며, 상기 내

인성 단백질은 특정 조직 또는 세포에 천연으로 존재하는 유전자에 의해 발현된 단백질을 말한다. 또한, 상기 리porter 단백질은 리porter 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 리porter 시스템이 내재되어 있는 pBI101 또는 pBGWFS7.0에 본 발명의 애기장대 재조합 프로모터를 GUS 유전자의 상류부분에 작동가능하게 연결한 재조합 발현 벡터 C2::GUS를 제조하였다. 상기 외래 유전자는 필요에 따라 리porter 유전자와 융합되어 발현될 수도 있다.

[0035] 나아가 본 발명의 식물체 전 조직 고 발현 프로모터의 전사활성에 의하여 발현되는 목적 단백질 유전자의 예로는, 형질전환 대상 식물체가 유채, 들깨 및 참깨 등의 유지작물인 경우 지방산 생합성 및 조절 관련 유전자 등을 들 수 있고, 단백질의 생성 및 축적량이 다른 식물에 비해 상대적으로 높은 콩 및 알팔파 등의 두과식물인 경우 경제적으로 부가가치가 높은 항체 유전자 등을 들 수 있고, 사료작물로 대표적인 옥수수의 경우 돼지 설사병, 구제역 바이러스 등의 경구 백신(edible vaccine) 유전자 등을 들 수 있고, 뿌리로 장기간 보관, 유통되는 대부분의 작물의 경우 수확 후 저장성을 높이도록 각종 병 저항성에 관련된 유전자 등을 들 수 있으며, 그 외에도 토코페롤, 베타카로틴 등과 같이 특정 영양 성분을 작물의 뿌리에서 강화하려는 경우에는 관련 물질대사경로의 생합성 유전자 등을 들 수 있으나, 여기에 한정되지 않고, 본 발명의 전 조직 고 발현 프로모터를 사용하여 조절될 수 있는 각종 목적 단백질을 코딩하는 유전자들이 포함될 수 있다.

[0036] 그러므로 본 발명의 프로모터를 이용한다면 식물체의 전 조직을 섭취하는 작물의 경우, 유용한 목적 단백질을 식물체의 전 조직에서 발현시킴으로써 식물체와 함께 목적 단백질을 함께 섭취할 수 있는 작물을 개발할 수 있다. 또는, 식물체 내에서 생산된 목적 단백질을 당업계에 알려진 적절한 방법에 따라 추출하여 사용할 수도 있다.

[0037] 또한, 본 발명은 상기 재조합 발현 벡터로 형질전환된 식물세포 및 식물체를 제공한다. 본 발명의 프로모터 및 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 포함하는 재조합 발현 벡터는 당해 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 식물 세포내로 도입할 수 있다. 상기 본 발명에 따른 재조합 발현 벡터를 식물 세포내로 도입하는 방법으로는, 제한 없이 당해 공지된 방법이 사용할 수 있으며, 예를 들어, 염화칼슘(CaCl_2) 및 열 쇼크(heat shock) 방법, 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 전기천공(electroporation) 및 PEG(Polyethyleneglycol)에 의한 침전법 등과 같은 방법들이 있다.

[0038] 또한, 본 발명은 본 발명의 재조합 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 식물발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계를 포함하는, 목적 단백질을 식물체 전 조직에서 고발현시키는 형질전환 식물체의 제조방법을 제공한다.

[0039] 본 발명은 또한, 1) 서열번호 1 ~ 4의 염기서열 중 하나의 염기서열을 갖는 재조합 프로모터 및 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 포함하는 재조합 발현 벡터로 식물체를 형질전환하는 단계; 및 2) 상기 형질전환된 식물체의 전 조직 내에서 목적 단백질을 코딩하는 유전자를 발현시켜 목적 단백질을 생산하는 단계를 포함하는 목적 단백질 생산 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0040] 상술한 바와 같이 본 발명은 재조합 프로모터에 관한 것으로서 이는 쌍자엽 식물의 뿌리 조직을 포함한 전 조직에서 강한 발현을 유도한다. 그러므로 본 발명은 쌍자엽 식물의 전 조직에서 강한 발현을 유도할 때 효과적으로 이용될 수 있다. 특히, 형질전환 식물체 제작 시 제조제 혹은 항생제 합성 유전자 등의 선발 유전자의 강한 발현을 유도하거나, 의료 산업용 유용 물질 생산 형질전환체 제작에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 본 발명의 재조합 프로모터의 구조를 나타내는 도면.

도 2는 본 발명을 위한 일시적 발현 분석용 프로모터 클로닝에 이용한 pBI101 벡터 모식도.

도 3a는 본 발명에 의한 재조합 프로모터의 일시적 발현 분석 결과를 GUS 염색으로 나타내는 도면.

도 3b는 본 발명에 의한 재조합 프로모터의 일시적 발현 분석 결과를 뿌리 조직에서 GUS 단백질 정량 분석으로 나타내는 도면.

도 3c는 본 발명에 의한 재조합 프로모터의 일시적 발현 분석 결과를 잎 조직에서 GUS 단백질 정량 분석으로 나타내는 도면.

도 4는 본 발명에 의한 재조합 프로모터의 활성을 세포 단위별로 확인하기 위해 Agrobacterium infiltration 방법을 이용하여 일시적으로 형질전환시키고 GUS 염색이 완료된 배추 식물체 뿌리 조직의 단면을 관찰한 결과를 보여주는 도면.

도 5는 본 발명을 위한 재조합 프로모터 애기장대 형질전환체 제작용 벡터 (pBGWFS7.0) 모식도.

도 6은 본 발명에 의한 재조합 프로모터의 애기장대 형질전환체에서 활성을 GUS 염색으로 나타낸 도면. 붉은 색 점선으로 된 원 내부는 뿌리 조직을 나타냄.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 그러나 하기 실시예들은 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 본 발명에 의한 ibAGP1+SRD1 재조합 프로모터 제작

ibAGP1 프로모터와 SRD1 프로모터를 재조합하여 뿌리를 포함한 전 조직에서 강하게 발현하는 프로모터를 개발하기 위하여 두 개의 프로모터의 4가지 조합을 이용하였다 (도 1).

ibAGP1 프로모터는 그 활성이 높으며 당 처리에 의해 프로모터 활성이 가장 높게 유도되는 전체 크기(1976 bp)의 프로모터와 전분체 타겟팅 염기서열 (TP)가 연결되어 있는 ibAGP1 프로모터를 이용하였다.

한편, SRD1 프로모터는 3-kb 전체에 뿌리 특이 발현 조절 인자가 산재해 있을 것으로 추정되는 결손 프로모터 결과 (Noh et al., 2012, Transgenic Research, 21: 265-278)를 바탕으로 SRD1의 활성이 높게 나타나는 전체 크기(-2801~+209; 2801 bp SRD1 프로모터 + 209 bp 5' 비번역 부위)와 최소 크기(-321~+209; 321 bp SRD1 프로모터 + 209 bp 5' 비번역 부위), 그리고 ROOT MOTIF가 다량 산재되어 있는 부위(-2088 ~ -1543)를 선정하여 ibAGP1의 프로모터에 연결함으로써 새로운 재조합 프로모터 합성을 완성하였다.

재조합 프로모터 제작 시에 ibAGP1 프로모터를 3' 방향에 그리고 SRD1 결손 프로모터들을 5' 방향에 위치하게 제작하였다. 즉 4 가지의 종류가 다른 합성 프로모터 C1, C2, C3, C4를 제작하였는데, C1은 SRD1(-2801 ~ +209) + ibAGP1(-1909 ~ +67)(서열번호 1), C2는 SRD1(-321 ~ +209) + ibAGP1(-1909 ~ +67)(서열번호 2), C3는 SRD1(-2088 ~ -1543) + ibAGP1(-1909 ~ +67)(서열번호 3), C4는 SRD1(-2801 ~ +209) + ibAGP1[(-1909 ~ +67) + TP1](서열번호 4)의 프로모터들로 구성되어 있었다 (도 1).

이상의 재조합 프로모터들의 벡터를 제작하기 위하여 두 개의 과정으로 클로닝을 실시하였다 (도 2). 먼저, ibAGP1 프로모터의 5'쪽 프라이머는 (서열번호 5) *Xba* I 제한효소 인식부위를 첨가시키고, 3'쪽 프라이머에 (ibAGP1은 서열번호 6, ibAGP1+TP1은 서열번호 7) *Bam* HI 제한효소 인식부위를 첨가시켜 PCR로 증폭시켰다. 이때 PCR은 94℃에서 5분간 처리 후, 94℃-1분, 55℃-1분, 72℃-1분 30초를 30회 수행한 후 72℃에서 10분간 처리하였다. 이 PCR 산물을 pBI101 벡터에 삽입 시키고, *Xba* I 과 *Bam* HI를 처리하여 확인하였다.

표 1

5' 프라이머	5-GACTCTAGACTGATACTTTGGTGACT-3'	서열번호 5
3' 프라이머	5-TGCGGATCCCTTTTAAGCCGCGCTACCA-3'	서열번호 6
3' 프라이머	5-TGCGGATCCCTGCGAATTCCTGCGAATC-3'	서열번호 7

먼저 제작된 ibAGP1이 삽입된 pBI101 벡터에 각각의 SRD1 프로모터를 클로닝하기 위하여, SRD1 프로모터의 5'쪽 프라이머는 *Sal* I 제한효소 인식부위를 첨가시키고, 3'쪽 프라이머에 *Xba* I 제한효소 인식부위를 첨가시켜 PCR로 증폭시켰다 (표 2). C1 과 C4용 PCR은 94℃에서 5분간 처리 후, 94℃-1분, 58℃-1분, 72℃-2분 30초를 30회

수행한 후 72℃에서 10분간 처리하였으며, C2와 C3용 PCR은 94℃에서 5분간 처리 후, 94℃-1분, 58℃-1분, 72℃-1분을 30회 수행한 후 72℃에서 10분간 처리하였다. 이 PCR 산물을 각각 ibAGP1이 삽입된 pBI101 벡터에 삽입시키고, *Sal* I 과 *Xba* I 을 처리하여 확인하였다. 삽입이 확인된 colony 들을 대상으로 플라스미드 DNA를 추출한 후 염기서열 분석을 통해 최종적으로 재조합 프로모터 제작을 완료하였다.

표 2

C1	5' 프라이머	5'-CATGTCGACGGCTGGTTTCTAAGACAT-3'	서열번호 8
	3' 프라이머	5'-GACTCTAGACCTTCTCCTCCCTGAAGAAATC-3'	서열번호 9
C2	5' 프라이머	5'-CATGTCGACGCTAATTAATCAAACTACTCAT-3'	서열번호 10
	3' 프라이머	5'-GACTCTAGACCTTCTCCTCCCTGAAGAAATC-3'	서열번호 9
C3	5' 프라이머	5'-GACGTCGACATTATTTTCATTGGCAGC-3'	서열번호 11
	3' 프라이머	5'-GACTCTAGAGGTGCATTATTTTAAAGTTTAATGTGCT-3'	서열번호 12
C4	5' 프라이머	5'-CATGTCGACGGCTGGTTTCTAAGACAT-3'	서열번호 8
	3' 프라이머	5'-GACTCTAGACCTTCTCCTCCCTGAAGAAATC-3'	서열번호 9

실시예 2: 배추 식물에서 재조합 프로모터 일시적 발현 분석

제작된 4종의 재조합 프로모터(C1, C2, C3, C4) (도 1)를 대조구와 함께 agroinfiltration 실험을 실시하였다. Agroinfiltration 분석을 위하여 10일 동안 온실에서 키운 배추가 사용되었다. 각각의 프로모터가 삽입된 바이너리 벡터는 LBA4404에 각각 형질전환하고 잎과 뿌리 조직에 infiltration을 실시하였다. Agrobacterium 하나의 콜로니는 50 mg/L kanamycin과 25mg/L rifampicin이 포함된 3 mL YEP 액체배지에서 하루 동안 28℃에서 키웠다. 하루 동안 키운 배양액의 500 μL를 50 mL YEP 액체배지에서 OD₆₀₀ 값이 1.0이 되도록 키운 후 5000g, room temperature에서 5분 동안 원심분리하고 상층액을 버렸다. 여기에 50 mL infiltration buffer [10 mM MgCl₂, 10 mM MES-KOH (pH5.7), 200 μM Acetosyringone]를 넣어 현탁 시킨 후 다시 원심분리하고 상층액을 버리고 다시 infiltration buffer를 OD₆₀₀ 값이 1.0이 되게 넣어 주었다. OD₆₀₀ 값이 1.0으로 맞춰진 배양액은 상온에서 2-4시간 동안 뒀다가 vacuum을 이용한 infiltration을 실시하였다. Agroinfiltration 실시 이틀 후 유식물을 각각 X-gluc이 첨가된 용액에 하룻밤 동안 반응시켜 발현된 GUS의 양상을 비교하고, 정량적 분석을 위해서는 자엽과 뿌리 조직을 각각 채취하여 GUS 추출용액에 담근 후 드릴과 플라스틱 막대를 이용하여 곱게 파쇄하였다. 이렇게 파쇄된 샘플에 MUG를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, MUG로부터 GUS에 의해 변환된 MU값을 정량적으로 환산하여 분석하였다.

분석 결과 ibAGP1 프로모터의 활성은 지상부에서는 35S 프로모터의 활성과 비슷한 수준이었다(도 3a 및 도 3c). 뿌리에서는 ibAGP1프로모터의 활성이 35S 프로모터보다 낮았다.(도 3a, 3b 및 3c) 그러나 재조합 프로모터의 활성은 뿌리에서는 35S 프로모터보다 높고 ibAGP1 프로모터보다 높아졌으며, 잎에서는 그 활성이 크게 감소되지 않았다 (도 3a ~ 도 3c). 그중에서도 특히, 재조합 프로모터 C2과 C3에 의해 뿌리에서 높아진 활성을 나타내었다. 이 결과는 뿌리에서 약한 ibAGP1 프로모터의 활성을 뿌리 특이적 활성을 나타내는 SRD1 프로모터가 보완함으로써 쌍자엽 형질전환체 개발에 유용한 전신 고발현 프로모터를 제공할 수 있다는 것을 보여준다.

실시예 3: 뿌리 조직에서 재조합 프로모터 활성 부위 확인

재조합 프로모터의 활성을 세포 단위별로 확인하기 위해 Agroinfiltration 방법을 이용하여 일시적으로 형질전환시키고 GUS 염색이 완료된 배추 식물체 뿌리 조직의 단면을 hand-section 하여 관찰하였다.

그 결과 도 4에서 보는 바와 같이 ibAGP1 프로모터는 뿌리 조직의 cortex 층에서만 GUS 염색이 관찰된 반면 재조합 프로모터 C2와 C3에 의해 형질전환된 뿌리들에서는 중심주 내부의 도관 조직 세포에서 강한 GUS 염색을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 기존의 ibAGP1 프로모터에서는 부족하던 뿌리 조직에서의 활성이 C2와 C3 재조합 프로모터에서는 첨가된 SRD1 프로모터 단편에 의해 뿌리의 도관 조직 내에서 강한 프로모터 활성을 보이고 있음을 시사한다. 따라서 C2와 C3 재조합 프로모터는 쌍자엽 식물의 형질전환체 개발에 유용한 전신 고발현 프로모터임을 보여주며, 이 중 뿌리와 잎 두 조직에서 모두 높은 활성을 보여주는 (도 3a 및 도 3b) C2 프로모터가 가장 적합한 재조합 프로모터임을 나타낸다.

[0058]

실시예 4: 애기장대 형질전환용 벡터 제작

[0059]

일시적 발현 분석에서 가장 적합한 전신 고발현 프로모터로 선정된 C2 프로모터의 활성을 형질전환 식물체에서 확인하기 위해, 애기장대 형질전환체를 제작하였다. 재조합 프로모터 C2와 ibAGP1 프로모터를 PCR로 증폭시킨 후 게이트웨이 벡터 pBGWFS7.0의 GFP-GUS 유전자의 5' 부위에 삽입시켰다 (도 5). PCR 조건은 상기 실시예 1에서 사용하였던 조건과 동일하였으며 프라이머 염기서열도 실시예 1에서 사용하였던 염기서열에서 제한효소 인식 부위만 제외한 동일한 부위의 염기서열을 사용하였다. 제작된 벡터를 아그로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101)에 냉-해동(Freeze-thaw) 방법(An, G. 1987, Methods in Enzymology)으로 도입하였다. 형질전환된 아그로박테리아 (Agrobacteria)는 2일 동안 28℃에서 진탕 배양한 후, 플로랄딤(floral dip) 방법(Clough 와 Bent, 1998, The Plant Journal)에 근거하여 애기장대(*Arabidopsis thaliana* cv. columbia)의 개화 직전 암술머리에 접종하여 애기장대 식물체를 형질전환시켰다.

[0060]

실시예 5: 형질전환된 애기장대의 조직 화학적 염색 분석

[0061]

실시예 3에서 제조된 애기장대 형질전환체로부터 종자를 수확한 다음, PPT(phosphinothricin, 10 mg/L)을 함유하는 MS 배지에 도달하여 저항능을 가진 형질전환 식물체를 선별하였다. 선별된 형질전환 식물체의 각 조직으로부터 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법을 이용하여 조사하였다. 유식물체의 전체 조직을 1 mM X-Gluc(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronidase), 100 mM sodium phosphate (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 그리고 0.1% Triton X-100을 함유하는 용액에 담가 37℃에서 24시간 동안 반응시킨 다음, 용액을 제거한 후 70% 에탄올을 첨가하여 2시간 동안 클로로필을 제거하는 과정을 3회 반복한 후, 100% 에탄올에 보관하면서 관찰하였다.

[0062]

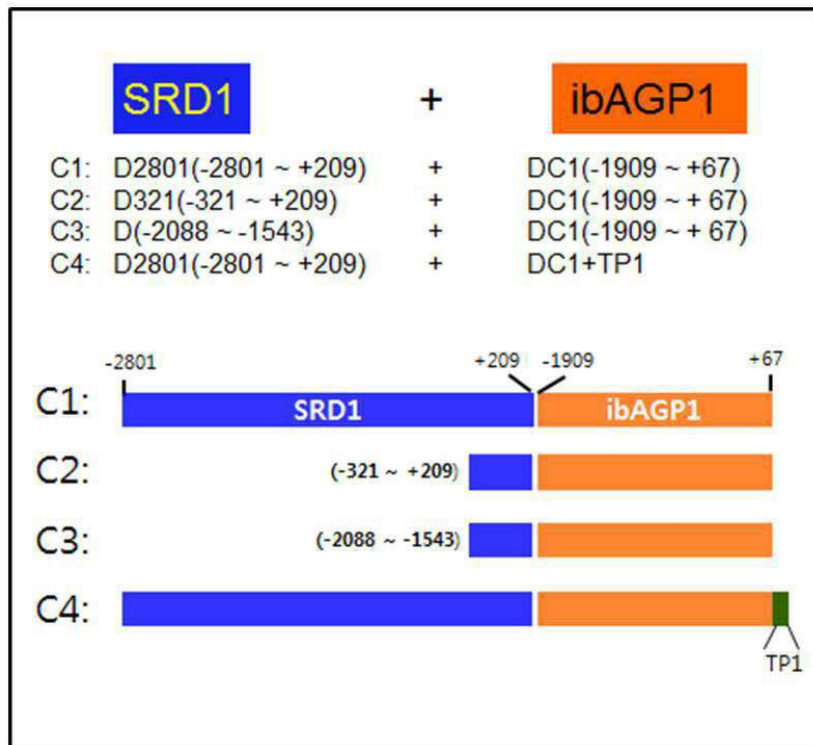
그 결과, 도 6과 같이 ibAGP1 프로모터는 유식물의 지상부 전 조직에서 강한 활성을 보이는 반면, 뿌리에서는 활성이 없어서 GUS 염색을 관찰할 수 없었던 반면 C2 프로모터는 뿌리를 포함한 지상부 전 조직에서 강한 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 실시예 2의 일시적 발현 분석에서도 뿌리 조직에서 C2 프로모터의 활성이 ibAGP1 프로모터의 활성에 비해 상승하였으나 형질전환체에서는 재조합 프로모터의 효과가 더 극명함을 보여준다. 이러한 결과는 형질전환체 제작 시에 C2 프로모터가 매우 효과적으로 사용할 수 있는 전신 고발현 프로모터임을 나타낸다.

[0063]

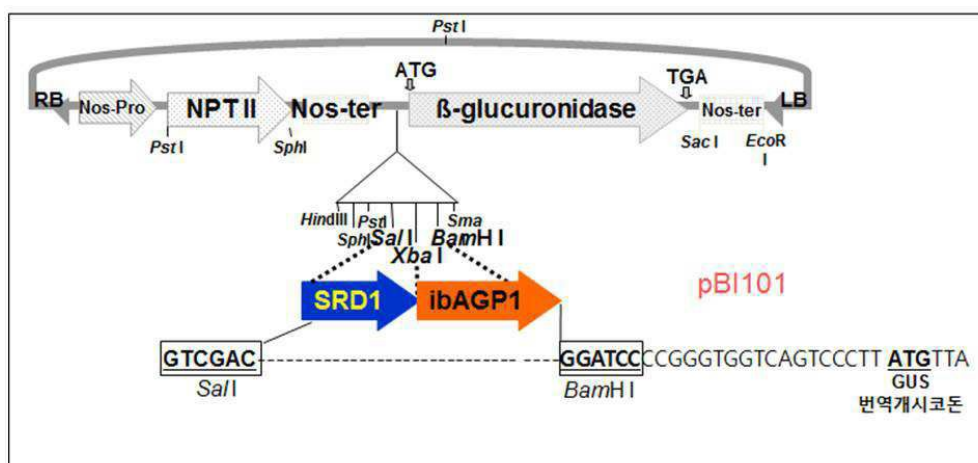
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현의 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

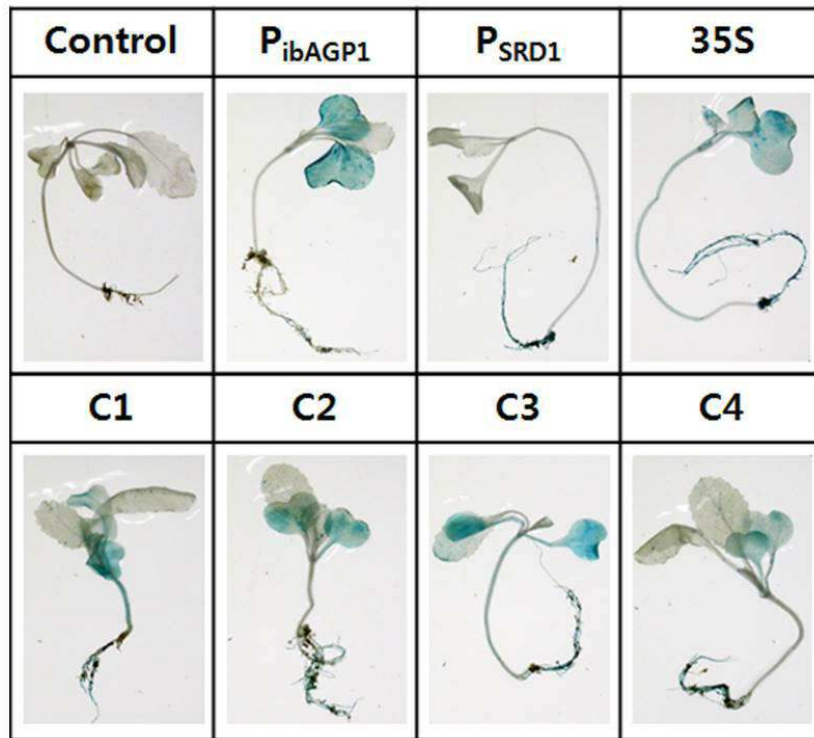
도면1



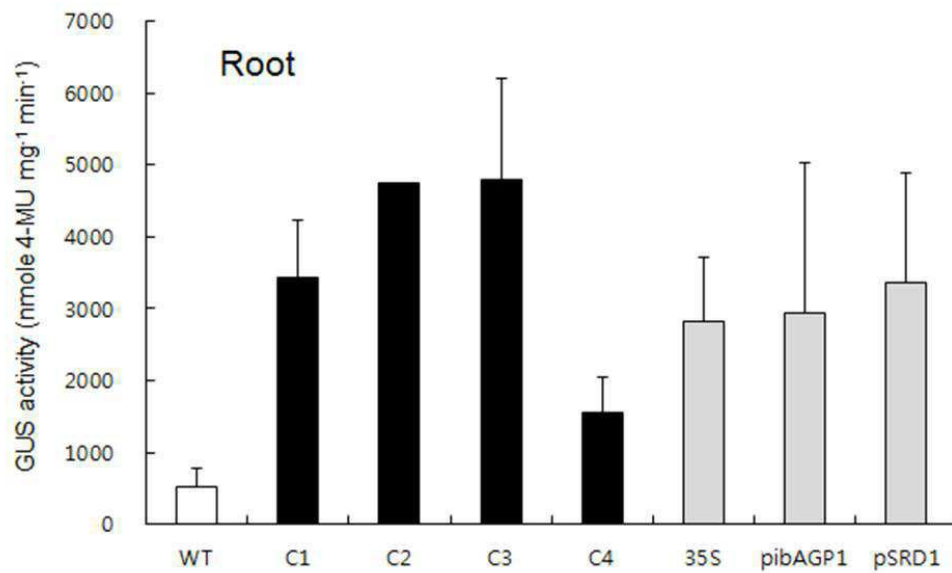
도면2



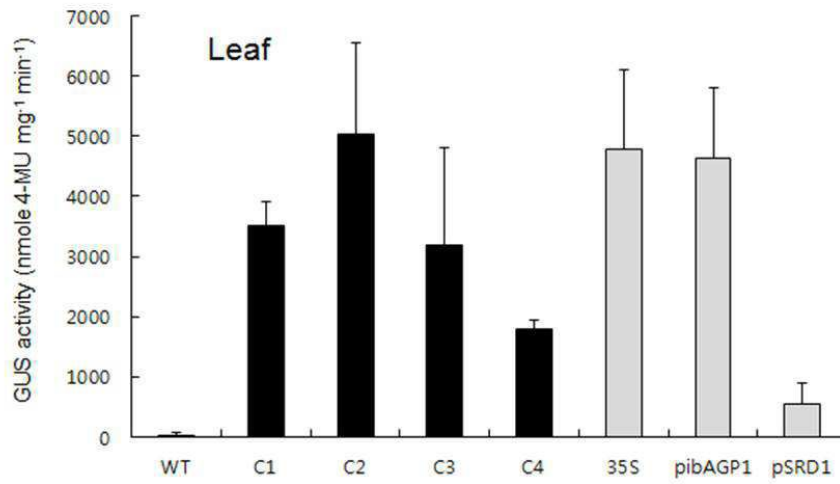
도면3a



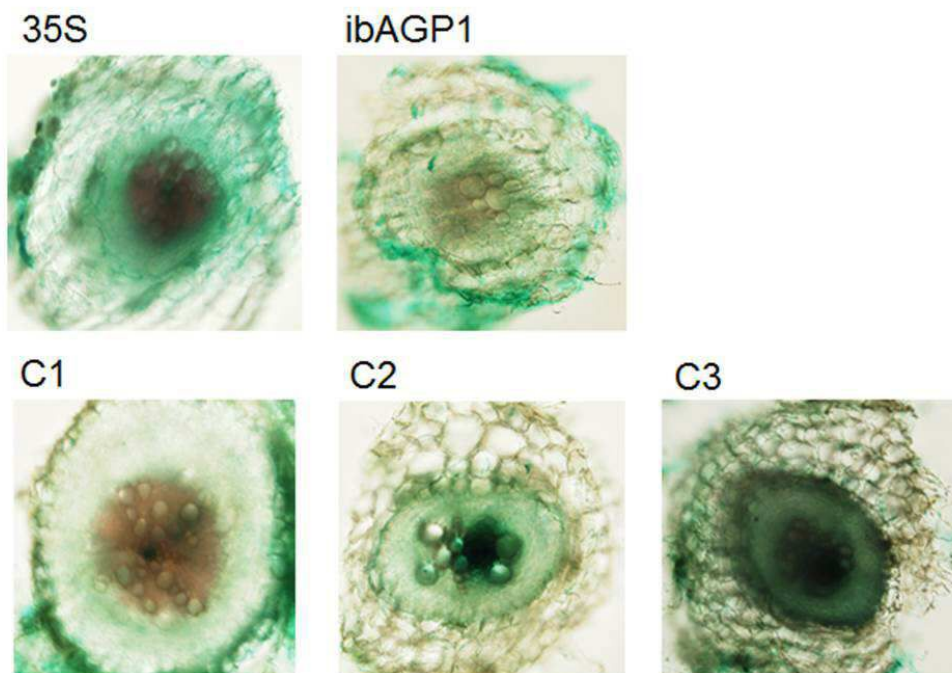
도면3b



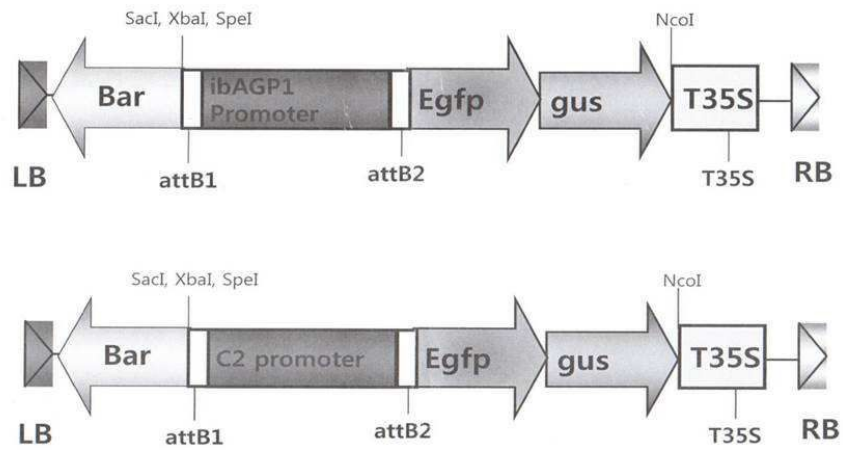
도면3c



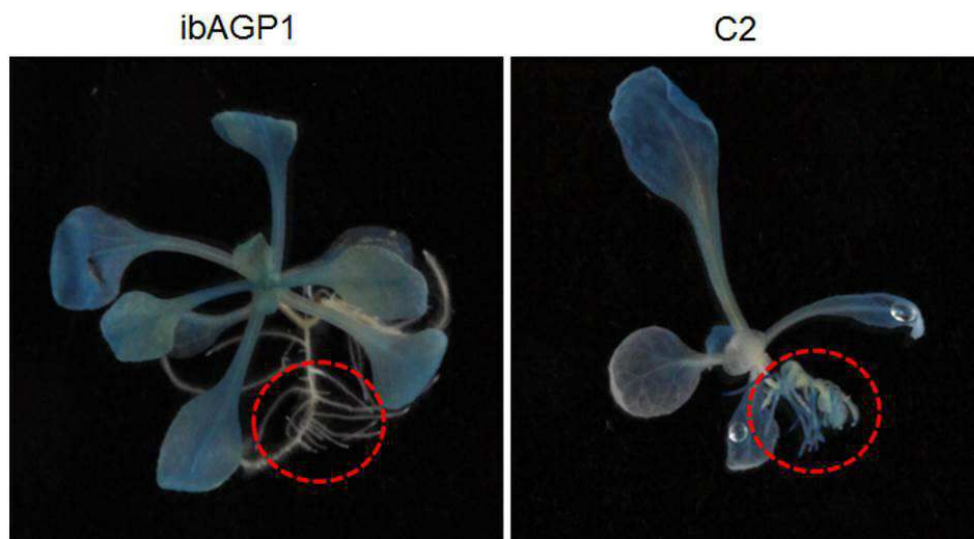
도면4



도면5



도면6



<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
 <120> Chimeric promoter for directing strong universal expression in
 plants
 <130> P11-130923-03
 <160> 12
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 4986
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Chimeric promoter
 <400> 1

cgacggcccg ggctggtttc taagacattt tttggtttta tccaaaccta attacaaata	60
ttcccaacaa gatcgaatga tctatggcta caaacctat cccaacaaaa aactacattt	120
agtacatcaa attaagtggc atgattattt tttttgttc gacaaagtag catcaaataa	180
actacaaaa aaactacatc attacaaaa gactaattat caggcatcaa tgttagtata	240
tgggaggtag tgggttcgag cctcagtga ggcgttgctg tctctttgtt cttcagtagg	300
ttgagagagt aatttatgaa cagatactac actgtaatag agtcagtagc aatcaaaaaa	360
aaatttgttt taataatata ctaatatatt atttttctaa ccagtactat gctttcggct	420
ttccagaagg cagaagccta aaaaattcaa ttaagtttat aaactttaat ccacttgttt	480
gagtaattga gtatctttca gaacggttgt agatttaggt gggatgacaa atggtattcc	540
aaagttcaag atatttcttt ttagatttag gaattttag tcttttaagg ttagaggtta	600
cttaaaagga tgaacaaatt ttttatccca ttctatttct aggaagaatt tataatccgt	660
acgtgtgacg gctgccatta attatagtgc ccattcattt ttattgggaa aaagtactca	720
tccattattt cattggcagc gcaacccagt tttaaatatt ttataacaat aataacatat	780
ggaaccaaatt tgtaaccttt atatcccaca gaccacaca ttacacatcc aataaaactt	840
gagccaaatt atatatttag gttactgagt actgactaaa atatattttt aaaatatact	900
aaaatattat taaaaaata ttaaaatagt aaaattatat taaatagaaa atttaattta	960
atcaaagaat accaactaaa acgtataaaa tgagaaaata taggtatata atattgatga	1020
ttccttttga tttttttttt atgatccgaa aattcttttg ccataagaag agtaaatgaa	1080
caatttaaac taagaaaata agtaagttag tcctatgtga ttaatatata aagttagatt	1140
tgagctgttg atctatatta ttgaattaga tcaacgactc aaaatgaagg ataatttttt	1200

taaaaaatcg cttcctgtta atattaatgc tttaaaatta agcacattaa actttaaaat	1260
aatgcacatt ttttttaaat actattgacc ttgttacatg tagtatctga agtccaacaa	1320
agtcaacatt gtcceccactg aggcctcaaac ccgtgacctc ccactaggga gaatcgcttc	1380
atgccgcttg accacaagtc ctttggtaaa aataatgcac cttaaagatg taaacttacg	1440
catcttcgat gaactgacca ctttgagctt gcaacttata cttttttgaa gataagcttg	1500
taacttatta taatggctcta ttaacattaa aaaaaaaaa agtttcacaa tcaaattata	1560
atattttag ccaaatgaat ttaccgcggg tgtgactatt caggaattta aatacactaa	1620
agttggagg gtagtacact caatacacta ttgctcatga cttttttctt cttttttttt	1680
tagattagct aatatattaa tcccaaatag aaacgtttac accaaagtgc gaaaaaatgt	1740
tgtgtcattt cttacagtta gacacaaaaa taacattttt agctaagtta cagtaaaactt	1800
gattggcaga ctgtttcaca aattggggagc ttggatcctt gaaggaaactt actgctttct	1860
tagagtcatt aatggtttgg ccaacatag aaaagattag ttgagcagtc ttgcacacta	1920
cttgagtaat catctccatt cttctactta ttgacaatat tctcttatga aaaaacacac	1980
ttgatcttat atcagttagg gatttgaccg gtttattaaa ggatagccta ccaactttgt	2040
tgaacgacat atcatcatat catgattcaa aagatgctct tttttattgt catattttgtg	2100
gcacaggatg agtacagttt cgcatacacc atgatcattt ttatcaaacc atactctata	2160
aaaccctgtc aaagaaaaga gaggaagaaa cgagaagaag aaactcatcc aagaacaag	2220
aggaacatta ttgctcatga ttgatcgac ttgaacatgt actaatgcca atctcaaatt	2280
acctacatag gtgtgttaga caaatatttg ttaattagct gattgactta atggatttga	2340
ctagtgttta acattaattg attgtaggaa attgttttgt aaattagtgt ttagttagata	2400
gttgattaca tgaaaattac tttctcaaaa agcttatcga aaaaactatt ttgaacagct	2460
ttttgaattt taacatttta taacaataag ttgttacaaa aagctaatta atcaaatact	2520
catatccatt gtttaacat gtcaaacaac taataataat taaataattt gtttttaaaa	2580
tataagttaa atttaattga taagctaact atattacca acataccgta atattttctt	2640
aaccgcggtg tgggctaaga tatgattgta tactattttt gttgcgagca tgattaatac	2700
agtaatacca tcatttaaaa gtggaaacca cattcgcagc tgtttccgaa agcaaacagc	2760
taacatttgc taggttctta cttatgcatt aatctgggtt ataaaatccc catttccatg	2820
ttggtgtgaa caaccaccta aacctagcgt cttcaacaat tctaccctac tatcatcccc	2880
caagacttcc ccgaccagta aataaccgcg tttcctcttt cagtgatttc ttcatttgac	2940
tttgctatat atatatataa tctgatctgc tttcatcttt cagtgatttc ttcatttgga	3000
tttcttcagg actgatactt tgggtgactgc attgtgtttg ggtcttgcca aatctattga	3060

gggaggggaa gaaagtagaa gtgtcaggga ttggtgtgtg gtggggtttc caaagtttcc	3120
ctcttttccct ttcttattct tagtttgctc gtcataagtg tcagggatig gtaaccaata	3180
gaaatctcat ctttaacctt tatgtatgtt ctagtatcat aattaagctc ttactcaaag	3240
gaatgttcca tttaggtcat ttttaatgtc tatcaattga tcatttcaag taaacaaaac	3300
tctggctcta atgctgggac ttgggtttct ttattatgca gtcttatggg ataaaggttg	3360
gttatgttgg catcccgagg ccatcaatcg gaagagatgg agctcctgct ccaggagggg	3420
gttgctgcag ctgaaaatgg gacgtaattt cttttgagta aatgcttggt tcattgttaa	3480
ttcgtgacta attgttcttt gtttttcaat tgttcaaaag cttacatgta tacgtggtgt	3540
ataatgtaat acaacagcca gcattagat gtgaatagag gtttcaaatt aaactcaacc	3600
agaatcctgc ttatttcgag aattactacc attctcaaaa aataaataaa taaatcatga	3660
gatgtgttga tataaataaa taaatcatga gatgtgttga acgctcttca agtttttcac	3720
agttgtatga ataatgacga gcacatgata gttagagaac ttaggagcat tgaatctggt	3780
gcttgggctg atcgatttat ggcatgatgc agtgcatcca ctgtatagcg tgtgattgca	3840
ggcattagat cttggtttat ggtctgcatt tcacgtgggg tgaccatttt gtgccgtttc	3900
cgtcagccac ttaaatggac caacatcccc tgaggaagac ctgcaaattc agacttagac	3960
acactaatta taggggcata tgatattatg attggataat ggctgatgaa attttcagcc	4020
gttaattcta aacaataaac agtatggcgg tctatgaatg ataacgatct ttaagctgaa	4080
gatgggcaaa acaatatgga tcgtctacta gtatttgtct ctttccttat cctgcttgc	4140
tacaccacaa tactaaagac caaaacttga gtgactgaga gaaatatgca ttcatatcc	4200
gagtctgtat catgtaaatt ttatcttgta attttaacta ataaaaaatc aggagaaaat	4260
cagcctaaat tatttatagc tcataactta ctagttcaga ctaagaagac taataaaaca	4320
tccccgttac aaaattaaca ttttgactaa cttgtaacgt ttgcatggtc agaaacagga	4380
tacaccaact ttggttgtga tgatgatatc atatacaaa caaaccttcc aaaaagtcac	4440
ttgcaagggtg gcactttgcg acagaccacc atgcttaatt gtcataatc agctaaacta	4500
ttattattac ttatataaat attttcgccc catatcatat aatttggcca ataatatatc	4560
attttatctg tcttacttat tatttattaa ttacataaaa tgaacggaa tgaataacat	4620
aaataatata aagatatatc ccgtataagt aacggtgcaa aggagccgat tagatatattt	4680
cagtaatcac aagtcacatg tgatcatatc atgtgtatgt ttcatataaa ataaaactag	4740
tataccccac cctgatTTTT gctctaaact tccaaatata cccttgggtca cgcaaatgct	4800

agccgctggt ttggaagggc aaaccgtaaa tgttgacaaa ttctttggca attaggtaat	4860
agggtgcacc tatttgaaca cttactataa aaggacgcct agtttctgtc caaatitcaa	4920
cagaatcact cgcttcaca cactccaaag tccgcagaga gctcagagt gtagcgcggc	4980
gttaaa	4986
<210> 2	
<211> 2494	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Chimeric promoter	
<400> 2	
gctaattaat caaatactca tatccattgt ttaacatgt caaacaacta ataataatta	60
aataatttgt ttttaaaata taagttaaat ttaattgata agctaactat attaccaaac	120
ataccgtaat attttcttaa ccgcggtatg ggctaagata tgattgtata ctatttttgt	180
tgcgagcatg attaatacag taataccatc atttaaaagt ggaaaccaca ttcgcagctg	240
tttccgaaag caaacagcta acatttgcta ggttcttact tatgcattaa tctgggttat	300
aaaatcccca tttccatgtt ggtgtgaaca accacctaaa cctagcgtct tcaacaattc	360
tacctacta tcatcccca agacttcccc gaccagtaaa taaccgcgtt tcctctttca	420
gtgatttctt catttgactt tgctatatat atatataatc tgatctgctt tcatctttca	480
gtgatttctt catttggatt tcttcaggga ggagaaggac tgatactttg gtgactgcat	540
tgtgtttggg tcttgccaaa tctattgagg gaggggaaga aagtagaagt gtcagggatt	600
ggtgtgtggt ggggtttcca aagtttcctt cttttccttt cttattctta gtttgcctgt	660
cataagtgtc agggattggt aaccaataga aatctcatct ttaacctata tgtatgttct	720
agtatcataa ttaagctctt actcaaagga atgttccatt taggtcattt ttaatgtcta	780
tcaattgac atttcaagta aacaaaactc tggctctaata gctgggactt tggtttcttt	840
attatgcagt cttatgggat aaaggttggt tatggtggca tcccggggcc atcaatcgga	900
agagatggag ctctgtctcc aggagggggt tgctgcagct gaaaatggga cgtaatttct	960
tttgagtaaa tgcttgtttc attgttaatt cgtgactaat tgttctttgt ttttcaattg	1020
ttcaaaagct tacatgtata cgtgggtgat aatgtaatac aacagccagc attaggatgt	1080
gaatagaggt ttcaaattaa actcaaccag aatcctgctt atttcagaaa ttactaccat	1140
tctcaaaaaa taaataaata aatcatgaga tgtgttgata taaataaata aatcatgaga	1200
tgtgttgaac gctcttcaag tttttcacag ttgtatgaat aatgacgagc acatgatagt	1260

tagagaactt aggagcattg aatctgggtc ttgggctgat cgatttatgg catgatgcag	1320
tgcatctact gtatagcgtg tgattgcagg cattagatct tggtttatgg tctgcatttc	1380
acgtggggtg accatcttct gccgtttccg tcagccactt aaatggacca acatcccctg	1440
aggaagacct gcaaatcag acttagacac actaattata ggggcatatg atattatgat	1500
tggataatgg ctgatgaaat ttccagccgt taattctaaa caataaacag tatggcggtc	1560
tatgaatgat aacgatcttt aagctgaaga tgggcaaac aatatggatc gtctactagt	1620
atttgtctct ttccctatcc tgcttgtcta caccacaata ctaaagacca aaacttgagt	1680
gactgagaga aatatgcatt cattatccga gtctgtatca tgtaaatttt atcttgtaat	1740
tttaactaat aaaaaatcag gagaaaatca gcctaaatta tttatagctc ataacttact	1800
agttcagact aagaagacta ataaaacatc cccgttacaa aattaacatt ttgactaact	1860
tgtaacgttt gcatggctcag aaacaggata caccaacttt ggttgtgatg atgatatcat	1920
atcataaaca aacctccaa aaagtcactt gcaagggtggc actttgcgac agaccaccat	1980
gcttaattgc tcataatcag ctaaaactatt attattactt tataaaatat ttctgcccc	2040
tatcatataa ttggccaat aatatatcat tttatctgtc ttacttatta tttattaatt	2100
acataaaatg aaacggaatg aataacataa ataataaaa gatatactcc gtataagtaa	2160
cggtgcaaag gagccgatta gatattttca gtaatcaca gtcacatgtg atcatatcat	2220
gtgtattttt catataaaat aaaactagta taccccaccc tgatttttgc tctaaacttc	2280
caaataatcc cttgggtcac caaatgctag ccgctgggtt ggaagggcaa accgtaaatg	2340
ttgacaaatt ctttgccaat taggtaatag gtgtcaccta ttgaacact tactataaaa	2400
ggagcgctag ttctgtcca aatttcaaca gaatcactcg ctccacaca ctccaaagtc	2460
cgagagagc tcagagtggg agcgcggtcgt taaa	2494
<210> 3	
<211> 2521	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PCR PRIMER	
<400> 3	
attatttcat tggcacggca acccagtttt aaatatttta taacaataat aacatatgga	60
accaaattgt aacctttata tcccacagac ccacacatta cacatccaat aaaacttgag	120
ccaaattata tattagcgtt actgagtact gactaaaata tttttttaa atatactaaa	180
atattattaa aaaaatatta aaatagtaaa attatattaa atagaaaatt taatttaatc	240

aaagaatacc aactaaaacg tataaaatga gaaaatatag gtatataata ttgatgattc	300
cttttgattt ttttttatg atccgaaaat tctttggcca taagaagagt aaatgaacaa	360
tttaactaa gaaaataagt aagttgctcc tatgtgatta atatataaag tgagatttga	420
gctgttgatc tatattattg aattagatca acgactcaaa atgaaggata atttttttaa	480
aaaatcgctt cctgttaata ttaatgcttt aaaattaagc acattaaact ttaaaataat	540
gcaccactga tactttggtg actgcattgt gtttgggtct tgccaatct attgagggag	600
gggaagaag tagaagtgc agggattggt gtgtggtggg gtttcaaag tttccctctt	660
ttcctttctt attcttagtt tgctcgcat aaggtgcagg gattggtaac caatagaaat	720
ctcatcttta acctatatgt atgttctagt atcataatta agctcttact caaaggaatg	780
ttccatttag gtcattttta atgtctatca attgatcatt tcaagtaaac aaaactctgg	840
ctctaagct gggacttttg tttctttatt atgcagtctt atgggataaa ggttggttat	900
ggtggcatcc cggggccatc aatcggaaga gatggagctc ctgctccagg agggggttgc	960
tgcagctgaa aatgggacgt aatttctttt gagtaaatgc ttgtttcatt gttaattcgt	1020
gactaattgt tctttgtttt tcaattgttc aaaagcttac atgtatacgt ggtgtataat	1080
gtaatacaac agccagcatt aggatgtgaa tagaggtttc aaattaaact caaccagaat	1140
cctgcttatt tcgagaatta ctaccattct caaaaaataa ataaataaat catgagatgt	1200
gttgatataa ataaataaat catgagatgt gttgaacgct cttcaagttt ttcacagtig	1260
tatgaataat gacgagcaca tgatagttag agaacttagg agcattgaat ctggtgcttg	1320
ggctgatcga tttatggcat gatgcagtgc attcactgta tagcgtgtga ttgcaggcat	1380
tagatcttgg tttatggtct gcatttcacg tggggtgacc attttgtgcc gtttcctca	1440
gccacttaaa tggaccaaca tcccctgagg aagacctgca aattcagact tagacacact	1500
aattataggg gcatatgata ttatgattgg ataatggctg atgaaatttt cagccgttaa	1560
ttctaacaa taaacagtat ggcggtctat gaatgataac gatctttaag ctgaagatgg	1620
gcaaaacaat atggatcgtc tactagtatt tgtctcttcc cctatcctgc ttgtctacac	1680
cacaatacta aagacaaaaa cttgagtac tgagagaaat atgcattcat tatccgagtc	1740
tgtatcatgt aaattttatc ttgtaatttt aactaataaa aaatcaggag aaaatcagcc	1800
taaattatft atagctcata acttactagt tcagactaag aagactaata aaacatcccc	1860
gttacaaaat taacattttg actaacttgt aacgtttgca tggtcagaaa caggatacac	1920
caactttggt tgtgatgatg atatcatatc ataacaac cctccaaaaa gtcacttgca	1980

agggtggcact ttgcgacaga ccaccatgct taattgctca taatcagcta aactattatt	2040
attactttat aaaatatattt cgccccatat catataattt ggccaataat atatcatttt	2100
atctgtctta cttattattt attaattaca taaaatgaaa cggaatgaat aacataaata	2160
atataaagat atactccgta taagtaacgg tgcaaaggag ccgattagat attttcagta	2220
atcacaagtc acatgtgac atatcatgtg tatttttcat ataaaataa actagtatac	2280
cccacctga tttttgctct aaacttccaa atataccctt ggtcacgcaa atgctagccg	2340
ctggtttga agggcaaacc gtaaatgtg acaaatctt tggcaattag gtaatagggtg	2400
tcacctattt gaacacttac tataaaagga cgcctagttt ctgtccaaat ttcaacagaa	2460
tcactcgtt ccacacactc caaagtcgc agagagctca gagtggtagc gcggcgtaa	2520
a	2521
<210> 4	
<211> 5205	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Chimeric promoter	
<400> 4	
cgacggcccg ggctggtttc taagacattt tttggtttaa tccaaaccta attacaaata	60
ttcccaacaa gatcgaatga tctatggcta caaacctat cccaacaaaa aactacattt	120
agtacatcaa attaagtggc atgattattt tttttgttc gacaaagtag catcaaataa	180
actacaaaa aaactacatc attacaaaa gactaattat caggcatcaa tgttagtata	240
tgggaggtag tgggttcgag cctcagtga ggcgttgctg tctctttgtt cttcagtagg	300
ttgagagagt aatttatgaa cagatactac actgtaatag agtcagtagc aatcaaaaaa	360
aaatttgttt taataatc ctaatattat atttttctaa ccagtactat gctttcggct	420
ttccagaagg cagaagccta aaaaattcaa ttaagtttat aaactttaat ccacttgttt	480
gagtaattga gtatctttca gaacggttgt agatttaggt gggatgacaa atggtattcc	540
aaagttcaag atatttcttt ttagatttag gaattttag tcttttaagg ttagaggtta	600
cttaaaagga tgaacaaatt ttttatccca ttctatttct aggaagaatt tataatccgt	660
acgtgtgacg gctgccatta attatagtgc ccattcattt ttattgggaa aaagtactca	720
tccattattt cattggcacg gcaaccaggt tttaaatatt ttataacaat aataacatat	780
ggaaccaaat tgtaacctt atatcccaca gaccacaca ttacacatcc aataaaactt	840
gagccaaatt atatttagc gttactgagt actgactaaa atatatattt aaaatatact	900

aaaatattat taaaaaata ttaaaatagt aaaattatat taaatagaaa atttaattta	960
atcaaagaat accaactaaa acgtataaaa tgagaaaata taggtatata atattgatga	1020
ttccttttga ttttttttt atgatacgaa aattctttgg ccataagaag agtaaatgaa	1080
caatttaaac taagaaaata agtaagtgc tcctatgtga ttaatatata aagtgaatt	1140
tgagctgttg atctatatta ttgaattaga tcaacgactc aaaatgaagg ataatttttt	1200
taaaaaatcg cttcctgtta atattaatgc tttaaaatta agcacattaa actttaaaat	1260
aatgcacctt tttttttaat actattgacc ttgttacatg tagtatctga agtccaacaa	1320
agtcaacatt gtccccactg aggcctcaaac ccgtgacctc ccactaggga gaatcgcttc	1380
atgccgcttg accacaagtc ctttggtaaa aataatgcac cttaaagatg taaacttacg	1440
catcttcgat gaactgacca ctttgagctt gcaacttata cttttttgaa gataagcttg	1500
taacttatta taatggctta ttaacattaa aaaaaaaaa agtttcacaa tcaaattata	1560
atattttagt ccaaatgaat ttaccgctgg tgtgactatt caggaattta aatacactaa	1620
agttggaggg gtagtacact caatacacta ttgctcatga cttttttctt cttttttttt	1680
tagattagct aatatattaa tcccaaatag aaacgtttac accaaagttc gaaaaaatgt	1740
tgtgtcattt cttacagtta gacacaaaaa taacattttt agctaagtta cagtaaaactt	1800
gattggcaga ctgtttcaca aattgggagc ttggatcctt gaaggaactt actgctttct	1860
tagagtcatt aatggtttgg ccaaacatag aaaagattag ttgagcagtc ttgcacacta	1920
cttgagtaat catctccatt cttctactta ttgacaatat tctcttatga aaaaacacac	1980
ttgatcttat atcagttagg gatttgaccg gtttattaaa ggatagccta ccaactttgt	2040
tgaacgacat atcatcatat catgattcaa aagatgctct tttttattgt catattttgt	2100
gcacaggatg agtacagttt cgcatacacc atgatcattt ttatcaaacc atactctata	2160
aaaccctgtc aaagaaaaga gaggaagaaa cgagaagaag aaactcatcc aagaacaag	2220
aggaacatta ttgctcatga ttagatcgac ttgaacatgt actaatgcca atctcaaatt	2280
acctacatag gtgtgttaga caaatatttg ttaattagct gattgactta atggatttga	2340
ctagtgttta acattaattg attgtaggaa attgttttgt aaattagtgt ttagttgata	2400
gttgattaca tgaaaattac tttctcaaaa agcttatcga aaaaactatt ttgaacagct	2460
ttttgaattt taacatttta taacaataag ttgttacaaa aagctaatta atcaaatact	2520
catatccatt gtttaacct gtcaacaac taataataat taaataattt gtttttaaaa	2580
tataagttaa atttaattga taagctaact atattaccaa acataccgta atattttctt	2640

aaccgcggta tgggctaaga tatgattgta tactatTTTT gttgcgagca tgattaatac	2700
agtaatacca tcatttaaaa gtggaaacca cattcgcagc tgtttccgaa agcaaacagc	2760
taacatttgc taggttctta cttatgcatt aatctgggtt ataaaatccc catttccatg	2820
ttggtgtgaa caaccaccta aacctagcgt cttcaacaat tctaccctac tatcatcccc	2880
caagacttcc cgcaccagta aataaccgcg tttctctttt cagtgatttc ttcatttgac	2940
tttcttatat atatataaa tctgatctgc tttcatcttt cagtgatttc ttcatttgga	3000
tttcttcagg actgatactt tgggtactgc attgtgtttg ggtcttgcca aatctattga	3060
gggaggggaa gaaagtagaa gtgtcaggga ttggtgtgtg gtggggttcc caaagtttcc	3120
ctcttttctt ttcttattct tagtttgctc gtcataagtg tcagggatg gtaaccaata	3180
gaaatctcat ctttaaccta tatgtatgtt ctagtatcat aattaagctc ttactcaaag	3240
gaatgttcca tttaggtcat ttttaatgtc tatcaattga tcatttcaag taaacaaaac	3300
tctggctcta atgctgggac tttggtttct ttattatgca gtcctatggg ataaagggtg	3360
gttatgttgg catcccgagg ccatcaatcg gaagagatgg agctcctgct ccaggagggg	3420
gttgctgcag ctgaaaatgg gacgtaattt cttttgagta aatgcttgtt tcattgttaa	3480
ttcgtgacta attgttcttt gtttttcaat tgttcaaaag cttacatgta tacgtggtgt	3540
ataatgtaat acaacagcca gcattaggat gtgaatagag gtttcaaatt aaactcaacc	3600
agaatcctgc ttatttcgag aattactacc attctcaaaa aataaataaa taaatcatga	3660
gatgtgttga tataaataaa taaatcatga gatgtgttga acgctcttca agtttttcac	3720
agttgtatga ataatgacga gcacatgata gttagagaac ttaggagcat tgaatctggt	3780
gcttgggctg atcgatttat ggcatgatgc agtgcatcca ctgtatagcg tgtgattgca	3840
ggcattagat cttggtttat ggtctgcatt tcacgtgggg tgaccatttt gtgccgttcc	3900
cgtcagccac ttaaatggac caacatcccc tgaggaagac ctgcaaattc agacttagac	3960
acactaatta taggggcata tgatattatg attggataat ggctgatgaa attttcagcc	4020
gttaattcta aacaataaac agtatggcgg tctatgaatg ataacgatct ttaagctgaa	4080
gatgggcaaa acaatatgga tcgtctacta gtatttgtct ctttccctat cctgctgtc	4140
tacaccacaa tactaaagac caaaacttga gtgactgaga gaaatatgca ttcattatcc	4200
gagtctgtat catgtaaatt ttatcttgta attttaacta ataaaaaatc aggagaaaat	4260
cagcctaaat tatttatagc tcataactta ctagttcaga ctaagaagac taataaaaca	4320
tccccgttac aaaattaaca ttttgactaa cttgtaacgt ttgcatggtc agaaacagga	4380

tacaccaact ttggttgatg tgatgatatc atatacataa caaacctcc aaaaagtcac 4440
 ttgcaaggtg gcactttgag acagaccacc atgcttaatt gtcataatc agctaaacta 4500
 ttattattac ttataaaat attttcgccc catatcatat aatttggcca ataatatatc 4560
 attttatctg tcttacttat tattatttaa ttacataaaa tgaacaggaa tgaataacat 4620
 aaataatata aagatatatc ccgtataagt aacgggtgcaa aggagccgat tagatatattt 4680
 cagtaatcac aagtcacatg tgatcatatc atgtgtattt ttcataataa ataaaactag 4740
 tataccccac cctgattttt gctctaaact tccaaatata cccttgggtc cgcaaatgct 4800

agccgctggt ttggaagggc aaaccgtaaa tgttgacaaa ttctttggca attaggtaat 4860
 aggtgtcacc tatttgaaca cttactataa aaggacgcct agtttctgtc caaatitcaa 4920
 cagaatcact cgcttcaca cactccaaag tccgcagaga gtcagagtg gtagcgcggc 4980
 gttaaaatgg cagcagcgac gatcggagct ctgtcgtctc cgtataccgg cggcgttggg 5040
 gagagaattg acggtgatgt tagcaaggcg tcgttccgga ggttgtcgtt cgcgtcgtct 5100
 catctctctg gcgataagct gatgccattg cctcctcgac ggcttcgttc cggcggtaaa 5160
 tctccgagg ttcggactgc tccgttcac gtttctccaa aggc 5205

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 5

gactctagac tgatactttg gtgact 26

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 6

tgcggtaccc tttaagccgc gctacca 27

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400>	7	
tgcgatccc	tgcaattct	gcgaatc
		27
<210>	8	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	8	
catgtcgacg	gctggtttct	aagacat
		27
<210>	9	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	9	
gactctagac	cttctcctcc	ctgaagaaat c
		31
<210>	10	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	10	
catgtcgacg	ctaattaatc	aaatactcat
		30
<210>	11	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PCR primer	
<400>	11	
gacgtcgaca	ttatttcatt	ggcacg
		26
<210>	12	
<211>	37	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 12

gactctagag gtgcattatt ttaaagttta atgtgct

37