(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0136762
(43) 공개일자 2020년12월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *C12N 9/80* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8273 (2013.01)
C12N 9/80 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0062767
(22) 출원일자 2019년05월28일
심사청구일자 2019년05월28일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이호정
서울특별시 관악구 관악로 125, 103동 1604호 (봉천동, 서울대입구삼성아파트)
이원제
서울특별시 마포구 마포대로7길 22, 302동 404호 (공덕동, 래미안 공덕3차)
뚜롱, 하이 안
서울특별시 성북구 보문로14길 39 (안암동4가)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

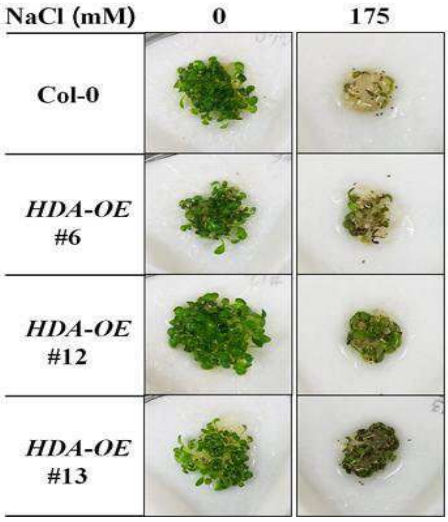
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **식물체의 염분 저항성을 부여하는 ＨＤＡ１５ 유전자 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 식물체의 염분 저항성을 부여하는 애기장대 HDA15 유전자 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 염분 스트레스에 대한 저항성을 갖는 형질전환 식물체, 식물체의 염분 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 방법 및 식물체의 염분 스트레스 저항성 증진용 발현벡터에 관한 것이다. 본 발명에 따른 상기 HDA15 유전자를 식물체에 도입하여 과발현시킬 경우, 식물체의 염분 스트레스에 대한 저항성을 증진시켜 염분이 높은 토양 조건에서도 식물이 잘 생육할 수 있으며 이로 인해 식물의 생산량을 증대시킬 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12Y 305/01098 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

HDA15(histone deacetylases 15) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된, 염분 스트레스에 대한 저항성을 갖는 형질전환 식물체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 염분 스트레스에 대한 저항성을 갖는 형질전환 식물체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 도 1의 개열지도를 갖는 벡터인 것을 특징으로 하는, 염분 스트레스에 대한 저항성을 갖는 형질전환 식물체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튤립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 또는 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알팔파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료 작물류;인 것을 특징으로 하는, 염분 스트레스에 대한 저항성을 갖는 형질전환 식물체.

청구항 5

HDA15(histone deacetylases 15) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하여 HDA15 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는,

식물체의 염분 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 식물체의 염분 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 재조합 벡터는 도 1의 개열지도를 갖는 벡터인 것을 특징으로 하는, 식물체의 염분 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튤립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 또는 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알팔파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료 작물류;인 것을 특징으로 하는, 식물체의 염분 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 방법.

청구항 9

서열번호 1의 염기서열로 이루어진 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자를 포함하는, 식물체의 염분 스트레스 저항성 증진용 발현벡터.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 발현벡터는 도 1의 개열지도를 갖는 벡터인 것을 특징으로 하는, 식물체의 염분 스트레스 저항성 증진용 발현벡터.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물체의 염분 저항성을 부여하는 HDA15 유전자 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물체의 비생물적 스트레스 (abiotic stress)는 세계 농작물 생산량 감소의 가장 중요한 이유 중 하나이다. 그 중에서 염분 스트레스는 전 세계적인 지구 온난화와 함께 가장 크게 부각되고 있다. 또한 염분 함유량이 높은 땅에서의 작물재배는 수득률이 매우 낮다는 문제거 있다. 이는 식물이 염분이 함유되어 있는 토양에서 생장이 억제되며 빠르게 시들기 때문이다.

[0003] 따라서 이러한 염분 스트레스 기작을 연구하는 것과 염분 저항성을 갖는 작물을 개발하기 위한 노력이 필요하다.

[0004] 특히 식물이 염분 스트레스 환경에 놓이게 되면 이온 항상성을 잃게 되어 대사에 큰 영향을 미친다. 그리고 과삼투성 스트레스로 인해 말라서 죽게 된다. 이런 것들을 막기 위해서 많은 곳에서 식물 염분 스트레스 기작에 관한 연구를 진행하고 있으나, 아직까지 식물체에게 효과적으로 염분 스트레스 저항성을 갖도록 하는 기술이 개발되지 못하고 있다.

[0005] 한편, 본 발명에서는 식물체에 염분 저항성을 효과적으로 유도할 수 있는 방법으로, 애기장대의 HDA15 유전자의 이용 가능성을 확인하였고, 상기 유전자가 도입된 식물체의 경우 염분 스트레스에 대하여 우수한 저항성을 갖는다는 것을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2017-0097867

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질 전환된, 염분 스트레스에 대한 저항성을 갖는 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하여 HDA15 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는, 식물체의 염분 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자를 포함하는, 식물체의 염분 스트레스 저항성 증진용 발현벡터를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 그러므로 본 발명은 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된, 염분 스트레스에 대한 저항성을 갖는 형질전환 식물체를 제공한다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 재조합 벡터는 도 1의 개열지도를 갖는 벡터일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튤립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 또는 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알팔파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료 작물류;일 수 있다.

[0014] 또한 본 발명은 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하여 HDA15 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는, 식물체의 염분 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 재조합 벡터는 도 1의 개열지도를 갖는 벡터일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튤립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 또는 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알팔파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료 작물류;일 수 있다.

[0018] 나아가 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자를 포함하는, 식물체의 염분 스트레스 저항성 증진용 발현벡터를 제공한다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 발현벡터는 도 1의 개열지도를 갖는 벡터일 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명은 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 염분 스트레스에 대한 저항성을 갖는 형질전환 식물체, 식물체의 염분 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 방법 및 식물체의 염분 스트레스 저항성 증진용 발현벡터에 관한 것이다. 본 발명에 따른 상기 HDA15 유전자를 식물체에 도입하여 과발현시킬 경우, 식물체의 염분 스트레스에 대한 저항성을 증진시켜 염분이 높은 토양 조건에서도 작물의 재배가 가능하며, 이로 인해 식물 또는 작물의 생산량을 증대시킬 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 일실시예에서 HDA15 유전자를 식물체에 도입하여 과발현시킬 수 있는 재조합 벡터 HDA15-pMDC32의 개열지도(벡터맵)를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에서 HDA15 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대에서 HDA15 유전자의 발현수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에서 HDA15 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대 식물체를 고농도의 염분 조건하에서 생육이 가능한지 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자의 신규 용도에 관한 것으로, HDA15(histone deacetylases 15) 유전자가 식물의 염분 스트레스에 대한 저항성을 증진시킬 수 있는 활성이 있음을 규명한 점에 특징이 있다.

[0023] 따라서 본 발명은 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된, 염분 스트레스에 대한 저항성을 갖는 형질전환 식물체를 제공한다.

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 염기서열의 상동체가 본 발명의 범위 내에 포함된다. 구체적으로, 상기 유전자는 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열 (추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제 (즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 본 발명의 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자가 식물체에 대해 염분 스트레스 저항성을 증진시킬 수 있는지 확인하고자, HDA15 유전자가 도입된 재조합 발현 벡터를 제조하였고, 상기 벡터로 식물체에 도입하여 형질전환된 애기장대를 제조하였으며, 상기 형질전환 애기장대 식물체를 고농도의 염분 환경 조건에서 생육이 가능한지 분석한 결과, HDA15 유전자가 과발현되지 않은 대조군 애기장대의 경우, 염분 환경 하에서 식물의 생육이 일어나지 못하는 것으로 나타난 반면, 본 발명의 HDA15 유전자가 과발현된 애기장대들은 모두 고농도의 염분 환경 조건에서도 모두 생육이 잘 일어나는 것을 확인하였다.

[0026] 따라서 본 발명의 HDA15 유전자를 식물체에 도입하여 식물체 내에서 HDA15 유전자를 과발현시킬 경우, 염분 스트레스에 대한 저항성을 증진시켜 염분이 있는 토양 조건 하에서도 목적하는 식물 또는 작물을 재배할 수 있고 따라서 식물의 생산량을 증진시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0027] 본 발명에서 HDA15 유전자를 도입하여 과발현시킬 수 있는 상기 식물체는 쌍자엽 또는 단자엽 식물일 수 있으며, 바람직하게는 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용 작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튤립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알팔파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료 작물류일 수 있으며, 이에 제한되지는 않는다.

[0028] 또한 본 발명에서 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자를 포함하는 재조합 벡터는 상기 HDA15 유전자가 도입된 식물체내에서 상기 유전자의 발현을 유도할 수 있는 발현벡터일 수 있다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 '발현벡터'란, 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. 상기 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 유전자 서열은 바람직하게 HDA15 유전자 일 수 있으며, 상기 유전자는 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.

[0030] 상기 '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 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 DNA 서열을 의미한다. 그러한 조절 서열은 전사를 실시하기 위한 프로모터, 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보좀 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.

[0031] 또한 상기 본 발명에 따른 발현벡터로는 단백질 발현에 사용되는 기존의 벡터를 기본 골격으로 하여 프로모터를 포함하고 상기 프로모터의 하류(downstream) 쪽으로 목적 단백질을 코딩하는 염기서열, 즉 본 발명의 HDA15 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 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.

[0032] 그러나 당업자라면 프로모터와 작동가능하게 연결되어 있는 목적 단백질을 코딩하는 염기서열을 숙주 세포 내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 도 1의 개열지도를 갖는 HDA15-pMDC32 재조합 벡터를 사용하였다.

[0033] 따라서 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자를 포함하는, 식물체의 염분 스트레스 저항성 증진용 발현벡터를 제공할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 형질전환 식물체는 타겟 유전자의 식물체 내로의 도입을 통해 제조될 수 있는데, 타겟 유전자를 포함하는 벡터를 사용하여 이루어질 수 있으며, 본 발명의 벡터를 식물 숙주세포 내로 운반하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들면, 유전자총-매개 형질전환 방법 (bombardment), 아그로박테리움-매개 형질전환법, 미세주입법, 칼슘포스페이트 침전법, 전기천공법, 리포좀-매개 형질감염법 및 DEAE-덱스트란 처리법 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 또한, 상기 본 발명의 방법으로 제조된 염분 스트레스에 대한 저항성을 갖는 형질전환 식물체는 식물체 자체 또는 식물체의 종자를 모두 포함할 수 있다.

[0036] 나아가 본 발명은 HDA15(histone deacetylases 15) 유전자를 포함하는 재조합 벡터로 식물체를 형질전환하여 HDA15 유전자를 과발현시키는 단계를 포함하는, 식물체의 염분 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 방법을 제공할 수 있다.

[0037]

[0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0040] **<실시예 1>**

[0041] **애기장대 유래 HDA15 유전자를 함유한 재조합 벡터의 제조**

[0042] 발아 후 2주일된 야생형(Wild-type) 애기장대 성체로부터 mRNA를 추출하였다. 이후 추출된 총 mRNA을 주형으로 cDNA를 합성하였고, 합성된 cDNA를 주형으로하여 HDA15 유전자의 코딩 DNA 시퀀스(CDS)를 PCR을 통해 증폭 및 추출하였다. 이때 HDA15 CDS 합성을 위해 사용한 프라이머는 다음과 같다.

[0044] HDA15 정방향 프라이머 : ATGGTTGTAGAAACTATCGAGAGGT (서열번호 2)

[0045] HDA15 역방향 프라이머 : CGACGGATTAGGAAGAATGC (서열번호3)

[0047] 이후 PCR로 증폭된 HDA15 CDS DNA(1695 bp)를 topo vector(pCR®8/GW/TOPO : invitrogen)에 삽입하고 이를 다시 유전자 과발현 기능을 가지는 pMDC32 벡터로 LR 반응시켰다(LR Clonase® : invitrogen)한다. 이후 E.coli 세포에(TOP10 cell : invitrogen)에 heat-shock transformation 방법으로 형질전한 후 콜로니가 생성될때까지 37℃에서 12시간 동안 배양하였다. 이후 생성된 콜리니를 다시 LB 배지에서 배양 후, HDA15 CDS DNA가 삽입된 HDA15-pMDC32 벡터를 추출하였으며, 상기 HDA15-pMDC32 벡터지도는 도 1에 나타내었다.

[0049] **<실시예 2>**

[0050] **HDA15 유전자 함유 재조합 벡터로 형질전환된 염분 저항성을 갖는 식물체의 제조**

[0051] 본 발명자들은 애기장대 유래 HDA15 유전자가 실제적으로 식물체의 염분 저항성을 갖도록 하는지 확인하기 위해, 상기 실시예 1에서 제조한 HDA15 과발현용 HDA15-pMDC32 벡터를 이용하여 다음과 같이 형질전환된 식물체를 제조하였다. 이를 위해 HDA15-pMDC32 벡터를 Agrobacteria에 electric shock transformation 방법으로 형질전환한 후 배양하였다. 형질전환된 Agrobacteria를 floral dipping trans- formation을 통해 준비된 야생형의 애기장대에 형질전환하였고, 이후 형질전환된 식물로부터 씨를 수확한 다음, 3세대까지 자가수분하여 호모로고스 라인(homologous line)을 확보하였으며, RT-PCR을 이용하여 HDA15 유전자의 과발현 여부를 확인하였다.

[0053] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, HDA15 유전자를 함유하는 HDA15-pMDC32 벡터로 형질전환된 3개의 애기장대 식물체에서 본 발명의 HDA15 유전자가 모두 대조군(형질전환 시키지 않은 야생형 애기장대)에 비해 과발현되어 있음을 확인하였다.

[0055] **<실시예 3>**

[0056] **HDA15 유전자가 과발현된 형질전환 식물체의 염분 저항성 확인**

[0057] 상기 실시예 2에서 제조한 HDA15 유전자가 과발현된 3개의 형질전환 애기장대 식물체(HDA-OE#6, HDA-OE#12, HDA-OE#13)들이 염분 저항성이 있는지를 확인하기 위해, 175mM의 고농도 염분 조건에서 야생형 대조군 애기장대 및 본 발명의 형질전환 애기장대들을 각각 배양하였고, 식물의 염분 저항성 여부를 관찰하였다.

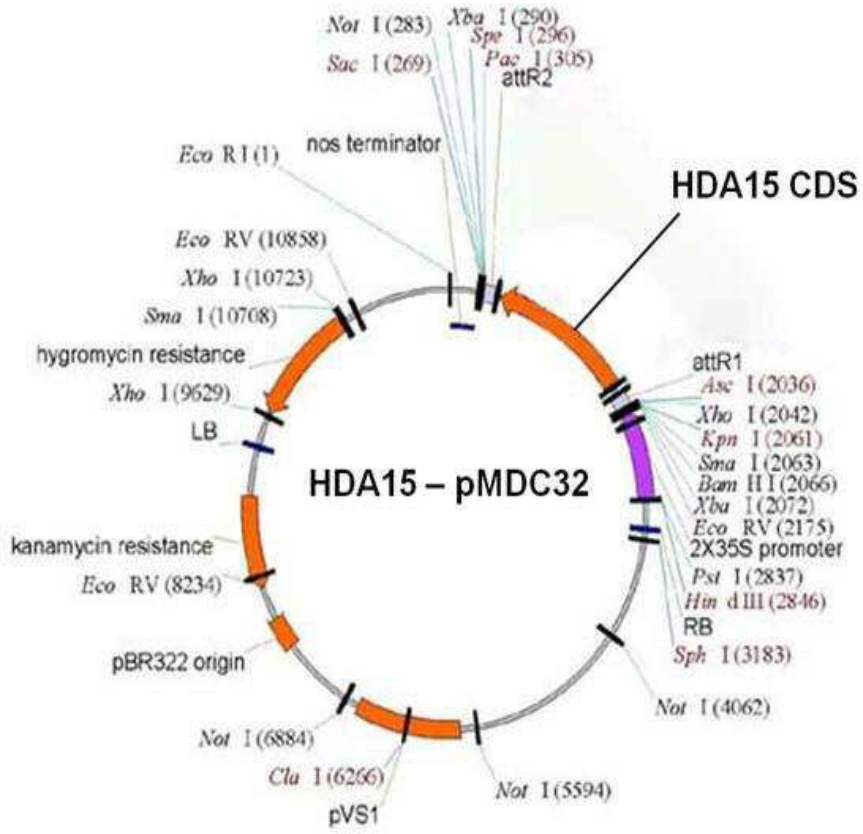
[0059] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 HDA15 유전자가 도입되지 않은 대조군 야생형 애기장대의 경우 염분에 의해 식물이 살지 못하고 죽는 것으로 나타난 반면, 본 발명의 HDA15 유전자가 도입되어 상기 유전자가 과발현된 형질전환 애기장대들은 모두 염분 환경 하에서도 잘 생장하는 것으로 나타났다.

[0061] 따라서 이러한 결과를 통해, 본 발명자들은 본 발명의 HDA15 유전자를 식물체에 도입할 경우, 염분 저항성이 우수한 식물체를 제조할 수 있으며, 염분이 많은 토양에서도 작물의 생산량을 증대시킬 수 있음을 알 수 있었다.

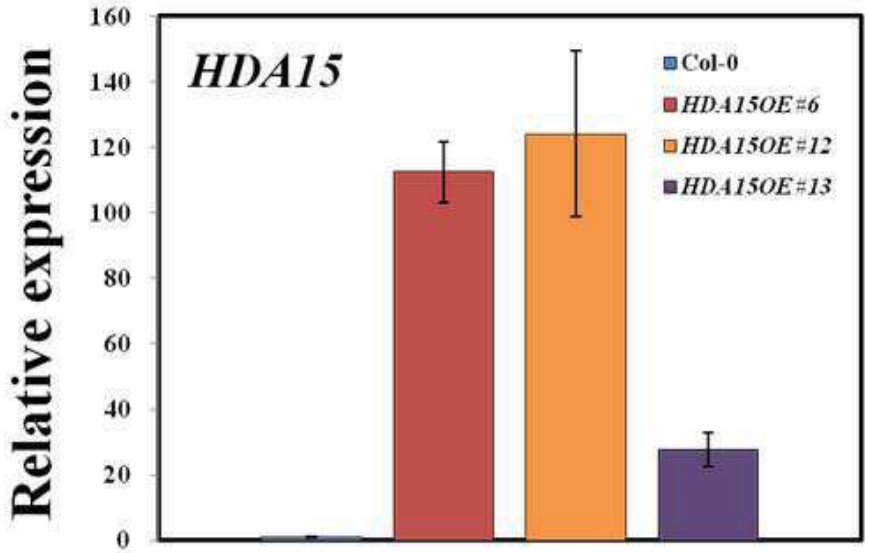
[0063] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

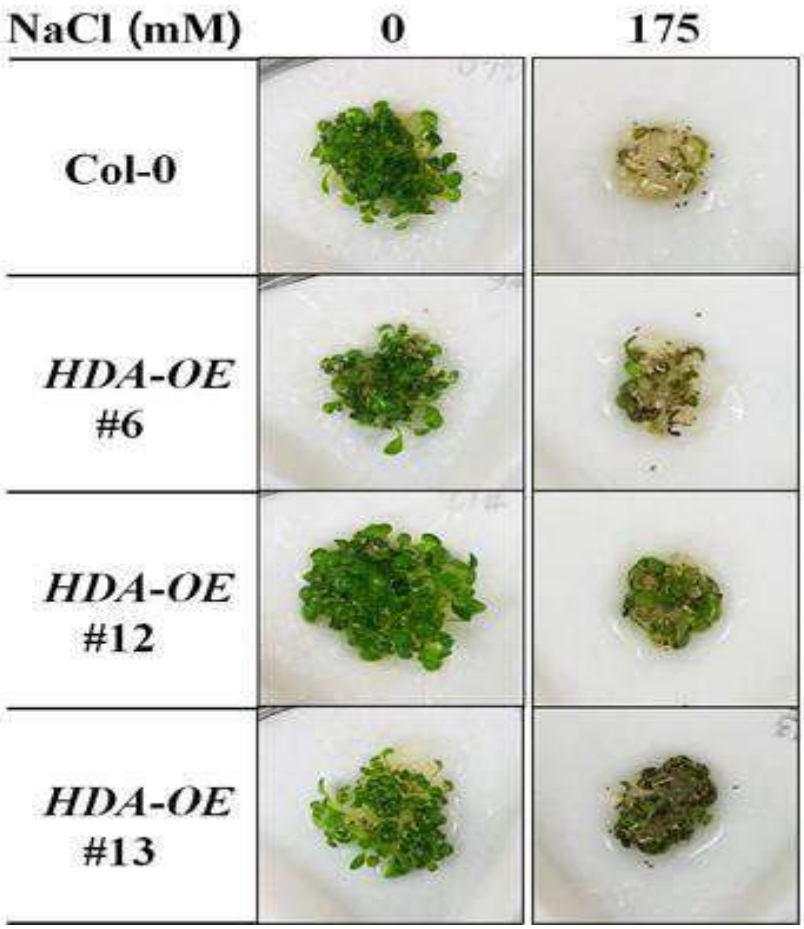
도면1


Not I (283)
Xba I (290)
Spe I (296)
Sac I (269)
Pac I (305)
attR2
nos terminator
Eco R I (1)
HDA15 CDS
Eco RV (10858)
Xho I (10723)
Sna I (10708)
hygromycin resistance
Xho I (9629)
LB
attR1
Asc I (2036)
Xho I (2042)
Kpn I (2061)
Sma I (2063)
Bam H I (2066)
Xba I (2072)
Eco RV (2175)
2X35S promoter
HDA15 – pMDC32
Pst I (2837)
Hin d III (2846)
RB
Sph I (3183)
kanamycin resistance
Eco RV (8234)
pBR322 origin
Not I (4062)
Not I (6884)
Cla I (6266)
Not I (5594)
pVS1

도면2


HDA15
Relative expression
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Col-0
HDA15OE#6
HDA15OE#12
HDA15OE#13

도면3



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of Korea University

<120> HDA15 gene conferring tolerance to salt stress in plant and use thereof

<130> NPDC77921

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 1695

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HDA15 CDS sequence

<400> 1

atggttgtag aaactatcga gaggtcttgt gagggttcaa agagaagaca tgtgaacggt 60

ggagatatcg ctgttccttg ttcgggagaa gagtgtagca atggagatat aaatgtagct 120

cctggagttt cagcgaaaag agctagggtt tctagagaaa tgacgtttga agatatttac 180

ggtgctgatg cattactcaa tgatgacgat gatgaggatg atgattgtga ttgggaacct 240

gtgcaggcgc ctatggagtt tgtaaaatgg tgttgtgtca attgcactat gtcgaaccct 300

ggtgatatgg tccactgttg tatatgcggt gagcacaagg aatctggcat tttgaggcat 360

ggatatttag cgtctccctt ttttaaagac actggtctca ttgaagtcga ggagaaatat 420

ggaggaagct catctgcaac cagctcgaca gctgttgggt tcgacgagag aatgttgcta 480

cactcagaat ttgaagtgaa ggcacaacca catccagaga gacctgatcg tcttcgagct 540

atagctgcta gtcttgccac agctggtgtt tttcctggaa gatgcttgcc tatcaatgca 600

agggaaatca cgaaacaaga actccagatg gtccacactt cagagcatgt tgatgctgtt 660

gatactacaa gccagcttct ctatagctac ttcacctctg acacatatgc taatgagtat 720

tcagcacgtg ctgctagact tgcagcaggt ttgtgcgctg atctagctac agatattttc 780

actggccgtg taaaaaatgg ttttgctttg gttagacctc ccggtcatca tgctggcgtc 840

aggcatgcta tggggttttg ccttcacaat aatgcagccg ttgctgcatt agtagcacaa 900

gcagcagggg caaagaaggt gctgattgtg gactgggatg tccatcatgg caacggaacc 960

caagagatat tcgaacaaaa caaatctgta ttgtacatat ccttgcacag acatgaggga 1020

ggaaacttct atcccggtac tggagctgct gatgaggttg gttctaatgg tggggaaggt 1080

tattgtgtaa atgttccatg gagttgcggt ggagttgggg ataaagacta tatctttgcg 1140

tttcaacatg tggttctccc catagcttct gcattttctc cagattttgt catcatatct 1200

gcgggatttg atgcggctag aggagaccca ctaggatgct gtgatgtgac tccggctggc 1260

tattctcgaa tgacacagat gttgggtgat ctgtgtggtg ggaaaatgct agttattctc 1320

gagggcggct acaatcttcg ctccatatct gcttctgcaa cagcagtgat caaggtgctt 1380

ctgggtgaaa atccggagaa cgagttgccc atcgccacca cgccttcagt agccggcctg 1440

caaactgttc ttgatgtact gaatatccaa ctggagttct ggccatcact tgctatcagc 1500

tactccaaat tactctcaga gttggaagca cgtctgatcg aaaacaaaag tgaaaaatca 1560

gatgaaaagg aaggttgttc gggttccgac atggtggaaa tggggacgaa agaagctttt 1620

gtacaacttt ctctcggctc gtatgatttc aagatcaaag tgattttaga aagcattctt 1680

cctaatccgt cgtag 1695

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HDA15 F primer

<400> 2

atggttgtag aaactatcga gaggt 25

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HDA15 R primer

<400> 3

cgacggatta ggaagaatgc 20