(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0075368
(43) 공개일자 2013년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01H 5/00 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
C12N 15/52 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0143712
(22) 출원일자 2011년12월27일
심사청구일자 2011년12월27일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
전종성
경기도 안양시 동안구 범계동 목련아파트 103동 1302호
김현비
경상북도 포항시 북구 용흥동 248-2 산호양학 309호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

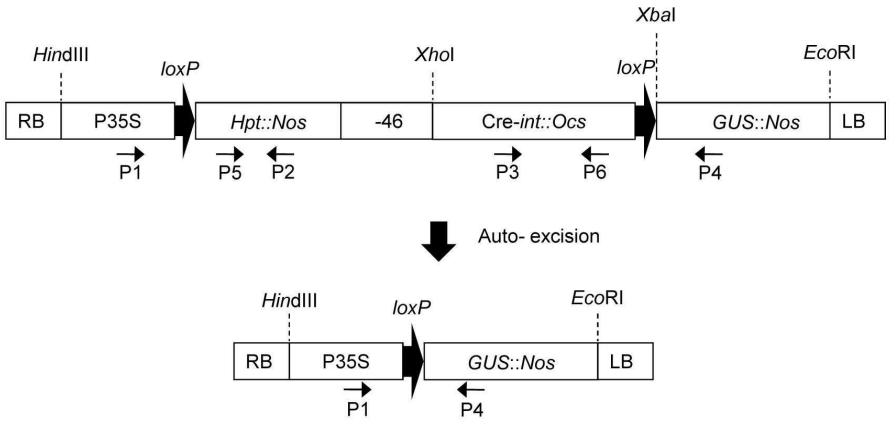
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **CaMV 35S 유래의 최소 프로모터를 포함하는 선별 마커-프리 형질전환 벡터 및 이를 이용한 형질전환 식물체의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 CaMV 35S 유래의 최소 프로모터를 포함하는 선별 마커-프리 (selectable marker-free) 재조합 식물 발현 벡터, 상기 재조합 식물 발현 벡터를 이용한 선별 마커-프리 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 선별 마커-프리 형질전환 식물체 및 이의 종자에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

조정일

경기도 용인시 기흥구 보라동 화성파크드림아파트 304동 502호

류나연

경기도 수원시 영통구 영통동 롯데아파트 944동 506호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ008156012011
부처명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21 사업
연구과제명	병 저항성 및 미네랄 강화 GM 벼 개발
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2014.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	PJ008114022011
부처명	농촌진흥청
연구사업명	차세대바이오그린21 사업
연구과제명	생산기관 탄수화물 대사 시스템 최적화를 통한 식물 생산성 향상
주관기관	경희대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2012.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 CaMV 35S 유래의 최소 프로모터를 포함하는 선별 마커-프리 (selectable marker-free) 재조합 식물 발현 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 벡터는 두개의 loxP 자리 유전자, 선별 마커 유전자, 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 CaMV 35S 유래의 최소 프로모터 및 상기 프로모터 조절하의 Cre 리콤비나아제 (recombinase) 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 벡터는 5'에서 3' 방향으로 작동가능하게 연결된 loxP 자리 유전자, 선별 마커 유전자, 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 CaMV 35S 유래의 최소 프로모터, 상기 프로모터 조절하의 Cre 리콤비나아제 (recombinase) 유전자 및 loxP 자리 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 벡터는 도 1에 기재된 벡터인 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 5

제1항에 따른 벡터에 외래 유전자를 삽입하여 식물 세포를 형질전환하는 단계; 및

상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 선별 마커-프리 형질전환 식물체의 제조 방법.

청구항 6

제5항의 방법에 의해 제조된 선별 마커-프리 형질전환 식물체.

청구항 7

제6항의 형질전환 식물체의 종자.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CaMV 35S 유래의 최소 프로모터를 포함하는 선별 마커-프리 형질전환 벡터 및 이를 이용한 형질전환 식물체의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 CaMV 35S 유래의 최소 프로모터를 포함하는 선별 마커-프리 (selectable marker-free) 재조합 식물 발현 벡터, 상기 재조합 식물 발현 벡터를 이용한 선별 마커-프리 형질전환 식물체의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 선별 마커-프리 형질전환 식물체 및 이의 종자에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현재 중요한 작물 종에 유용한 유전자를 형질전환하는 것은 식물 생명공학에서 통상적인 방법이고, 최근 수많은 작물 종은 농업 수확량 및 영양 성분을 증가시키기 위하여 유전적으로 변형되어왔다. 형질전환 중에 선별 마커 유전자의 도입은 형질전환 식물체의 성공적인 제조에서 중요하다. 그러나, 일단 형질전환 식물체가 제조되고 규명되면, 이 선별 마커는 더 이상 필요하지 않고, 제초제 또는 항생제 저항성을 갖는 선별 마커는 유전자 변형 식물체의 상업적 이용에 있어서 이들의 발현과 관련되어 일어날 수 있는 위험에 대한 대중적인 관심을 야기해 왔다. 따라서, 생명공학자들은 마커-프리 형질전환 식물체의 제조를 위한 간단하고 효율적인 기술의 개발을 위하여 수많은 노력을 기울여 왔다 (Miki and McHugh, 2004 J. Biotechnol. 107 : 193-232).

[0003] 마커-프리 형질전환 식물체를 제조하기 위하여 다음과 같은 몇 가지 방법이 개발되어 왔다: 비-선별 방법, 트랜스포존-매개 재배치, 두 개의 T-DNA 분자의 동시 형질전환과 후대자손에서 분리, 박테리오파지 attP 자리-매개 염색체 내의 상동 재조합 및 자리-특이적 재조합. 비-선별 방법은 추정의 형질전환체를 초기 스크리닝하는데 가시적 마커 유전자 또는 PCR 방법을 이용하지만 수많은 키메라 식물체를 제조한다 (Li et al., 2009 Plant Cell Rep. 28 : 373-386). 트랜스포존-매개 재배치 방법에서, 말단 반복 서열에 의해 플랭킹되는(flanked) 선별 마커 유전자는 Ac 전이 효소 (Ac transposase)에 의해 제거된다. 그러나, 이 방법은 높은 비율의 형질전환 유전자 재삽입을 야기한다 (Ebinuma et al., 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 : 2117-2121). 동시 형질전환 및 분리 방법에서, 선별 마커 유전자 및 목표 형질전환 유전자는 두 개의 분리된 T-DNA 또는 플라스미드와 함께 동시 형질전환 되었다. 그러나 이 방법은 종종 비효율적이고, 마커-프리 형질전환 식물체가 후대에서 분리될 때까지 시간이 다소 소요될 수 있다 (Sengupta et al., 2010 Plant Cell Rep. 29 : 261-271). 상동 재조합 방법에 있어서, 비적합 재조합을 통한 큰 결실은 종종 관찰되었고, 선별 마커-프리 형질전환 식물체로 회복하는 효율이 낮다 (Zubko et al., 2000 Nat. Biotechnol. 18 : 442-445). Cre/loxP 및 Flp/frt와 같은, 자리-특이적 리콤비나아제-매개 제거 시스템을 사용하면, 리콤비나아제 Cre 및 Flp가 선별 마커 유전자를 플랭킹하는 표적 서열인 loxP 및 frt에 각각 작용하여, 형질전환 식물체로부터 이 선별 마커 유전자를 제거한다 (Wang et al., 2010 Plant Cell Rep. 30 : 267-285). 이 방법 중에서, Cre/loxP을 사용한 자리-특이적 재조합 기술은 선별 마커 유전자의 보유 없이 형질전환 식물체를 제조하는데 널리 사용되어 왔다.

[0004] Cre/loxP 시스템에서, Cre 리콤비나아제는 정방향으로 배열된 두 개의 loxP 자리 사이에서 DNA 단편의 제거를 촉매한다. 초기 Cre/loxP 시스템에서, 목표 유전자 및 loxP 자리에 의해 플랭킹된 마커 유전자를 갖는 형질전환 식물체는 Cre 리콤비나아제-발현 식물체와 교배를 필요로 한다. 따라서, 마커 또는 Cre 유전자가 없는 형질전환 식물체의 제조는 여러 세대의 증식이 필수적이다. 이 단점을 극복하기 위해서, loxP 자리에 의해 플랭킹된 마커 유전자와 동일 DNA 단편에 Cre가 포함되는 대체 기술이 개발되었다 (Hoff et al., 2001 Plant Mol. Biol. 45 : 41-49). 이 방법으로, 마커 유전자의 자동-제거 시스템은 화학적 또는 열 유도성 프로모터의 조절 하에 개발되었다 (Wang et al., 2005 Transgenic Res. 14 : 605-614). 마커 유전자에 대한 유사한 자동-제거 시스템은 또한 화분, 종자 또는 꽃-특이적 프로모터를 사용하여 개발되어 왔다. 또한, 바이러스-기반 벡터를 이용한 일시적인 Cre 발현 시스템은 담배에서 사용되어 왔다. 그러나 Cre/loxP-매개 제거 기술은 Cre 발현을 유도하기 위한 화학적 또는 열 처리의 필요성, 각각 표적 종에서 적절한 조직-특이적 프로모터의 필요성 및 바이러스-기반 벡터의 제한된 숙주 범위와 같은 몇몇 주목할 만한 제약점을 갖는다.

[0005] 한편, 한국특허등록 제10-1040579호에는 스트레스 유도성 자가-절단형 식물형질전환 벡터 및 이를 이용한 선발 마커 프리 식물체의 제조방법이 개시되어 있으며, 한국특허등록 제10-0592490호에는 선발 표지 유전자가 제거된 형질전환 식물체의 제조를 위한 벡터 및 이를 이용한 형질전환체의 제조방법이 개시되어 있으나, 본 발명의 CaMV 35S 유래의 최소 프로모터를 포함하는 선별 마커-프리 형질전환 벡터 및 이를 이용한 형질전환 식물체의 제조방법에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 선별 마커-프리 (selectable marker-free) 형질전환 식물체의 제조를 위한 식물 발현 벡터 개발에 노력함으로써, CaMV 35S 유래의 최소 프로모터를 포함하는 선별 마커-프리 재조합 식물 발현 벡터를 개발하였고, 이 벡터로 형질전환된 식물체는 T_2 세대에서 선별 마커 유전자가 완전히 제거되고 목적 유전자만 갖는 선별 마커-프리 형질전환 식물체가 완성되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 CaMV 35S 유래의 최소 프로모터를 포함하는 선별 마커-프리 (selectable marker-free) 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 재조합 식물 발현 벡터를 이용한 선별 마커-프리 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 선별 마커-프리 형질전환 식물체 및 이의 종자를 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 벡터를 사용하면, 선별 마커 유전자 제거를 위해 다른 화학적 처리 또는 열처리 없이 효율적이고 간편한 선별 마커-프리 형질전환 식물체의 제조가 가능하다. 또한, 기존에 CaMV 35S 프로모터 전체를 사용하면 Cre/loxP 시스템에 의해 T_1 세대에서 항생제 내성 유전자와 같은 선별 마커 유전자가 제거되므로, T_1 세대에서 항생제를 사용한 선별이 불가능한 반면, 본 발명의 벡터를 사용하면 T_1 세대에서 항생제 내성 유전자와 같은 선별 마커 유전자가 제거되지 않고 남아 있으므로, T_1 세대에서 항생제를 사용한 선별이 가능하여 시간 및 비용면에서 형질전환체 선별 효율을 증가시킬 수 있으며, 최종 형질전환체에서는 선별 마커 유전자가 제거되므로 원하는 선별 마커 프리 형질전환 식물체를 얻을 수 있다. 따라서, 형질전환 식물체의 상업화를 위한 위해성 및 안전성 평가에 소요되는 많은 시간과 비용을 줄일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 Cre/loxP 벡터 및 Cre/loxP 매개 재조합의 도식을 나타낸다. loxP-특이적 DNA 제거가 발생할 때, 선별 마커 영역이 제거되고, 그 후 HindIII 및 EcoRI 사이의 3kb 밴드는 검출될 수 있으나, 그렇지 않으면 6.5kb 밴드가 존재한다. RB : 오른쪽 보더, P35S : CaMV 35S 프로모터, Hpt : 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라제 유전자, Nos : 노팔린 신타제 터미네이터, -46 : 46bp CaMV 35S 최소 프로모터, Cre-int : 인트론을 갖는 박테리오파지 P1 Cre 리콤비나아제 유전자, Ocs : 옥토파인 신타제 터미네이터, GUS : β-글루쿠로니다제 전체 코딩 영역, LB : 왼쪽 보더. P1-P6 프라이머는 PCR 분석에 사용되었다.

도 2는 형질전환 애기장대 식물체의 잎 및 성숙된 화분에서 GUS 활성의 조직화학적 분석결과를 나타낸다. (A-C) T_2 형질전환 라인 22-2 (A), 46-2 (B), 46-1 (C)의 잎. (D-F) T_2 형질전환 라인 22-2 (D), 46-2 (E), 마커-프리 T_2 형질전환 라인 46-1 (F)의 화분. 이들은 균일한 GUS 염색(46-1), 키메라 잎 GUS 염색 (46-2) 및 비-GUS 염색 (22-2) 라인에 대한 대표로 선별되었다.

도 3은 T_1 형질전환 식물체의 DNA 겔-블롯 분석을 나타낸다. 첫 세대 형질전환 식물체로부터 게놈 DNA가 EcoRI 및 HindIII로 절단되었고, GUS 프로브 (A) 또는 Hpt 프로브 (B)로 혼성화되었다. 6.5kb 밴드에 프로브의 혼성화는 Cre/loxP 벡터의 비-제거 형태를 나타내는 반면, 검출된 3.0kb 혼성화 단편은 Cre-매개 재조합이 발생했음을 나타낸다. M : 분자 마커, V : Cre/loxP 벡터, 4, 22 및 41 ~ 48은 독립 T_1 형질전환 라인이다.

도 4는 T_2 형질전환 식물체의 DNA 겔-블롯 분석을 나타낸다. T_2 형질전환 식물체로부터 게놈 DNA가 EcoRI 및 HindIII로 절단되었고, GUS 프로브 (A) 및 Hpt 프로브 (B)로 혼성화되었다. 6.5kb 밴드에 프로브의 혼성화는 Cre/loxP 벡터의 비-제거 형태를 나타내는 반면, 검출된 3.0kb 혼성화 단편은 Cre-매개 재조합이 발생했음을 나타낸다. M : 분자 마커, V : Cre/loxP 벡터, 46-1 ~ 46-9는 독립 T_2 형질전환 라인이다.

도 5는 선별 마커 유전자 제거의 확인을 나타낸다. (A-B) 형질전환 식물체의 생장은 50㎎/ℓ 하이그로마이신이 첨가된 배지에서 발아 후 10일에 관찰되었다. (A) Cre/loxP 벡터의 비-제거 형태를 갖는 라인 22-2 생장, (B) 46-1 라인의 생장. (C-D) 발아된 유식물체의 GUS 발현 패턴을 나타낸다. (C) 라인 22-2로부터 유도된 후대 식물체의 GUS 음성적 염색, (D) 라인 46-1로부터 유도된 마커-프리 형질전환 식물체의 전체 식물체 GUS 염색 패턴.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 CaMV 35S 유래의 최소 프로모터를 포함하는 선별 마커-프리 (selectable marker-free) 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다.

[0013] 상기 CaMV 35S 유래의 최소 프로모터는 바람직하게는 CaMV 35S 유전자의 프로모터 전체가 아닌 일부에 해당하며, 더욱 바람직하게는 CaMV 35S 유전자의 개시 코돈인 ATG의 업스트림으로 -46bp 길이에 해당하는 것으로, 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 것을 특징으로 하나, 이에 제한되지 않는다.

[0014] 본 발명의 벡터는 바람직하게는 두개의 loxP 자리 유전자, 선별 마커 유전자, 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 CaMV 35S 유래의 최소 프로모터 및 상기 프로모터 조절하의 Cre 리콤비나아제 (recombinase) 유전자를 포함하고,

[0015] 본 발명의 벡터는 더욱 바람직하게는 5'에서 3' 방향으로 작동가능하게 연결된 loxP 자리 유전자, 선별 마커 유

전자, 서열번호 1의 염기 서열로 이루어진 CaMV 35S 유래의 최소 프로모터, 상기 프로모터 조절하의 Cre 리콤비나아제 (recombinase) 유전자 및 loxP 자리 유전자를 포함하고,

[0016] 본 발명의 벡터는 더더욱 바람직하게는 도 1에 기재된 벡터이나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 본 발명의 벡터에서, Cre 리콤비나아제 (recombinase) 유전자 및 loxP 자리 유전자는 당업계에 공지된 것을 이용할 수 있다.

[0018] 기존에 CaMV 35S 프로모터 전체를 사용한 재조합 벡터와 본 발명의 CaMV 35S 유래의 최소 프로모터를 사용한 재조합 벡터는 하기와 같은 차이점을 보인다. 즉, 기존에 CaMV 35S 프로모터 전체를 사용하면 Cre/loxP 시스템에 의해 T_1 세대에서 항생제 내성 유전자와 같은 선별 마커 유전자가 제거되므로, T_1 세대에서 항생제를 사용한 선별이 불가능하다. 그러나, 본 발명의 재조합 벡터를 사용하면 T_1 세대에서 항생제 내성 유전자와 같은 선별 마커 유전자가 제거되지 않고 남아 있으므로, T_1 세대에서 항생제를 사용한 선별이 가능하여 시간 및 비용면에서 형질전환체 선발 효율을 증가시킬 수 있으며, 최종 형질전환체에서는 선별 마커 유전자가 제거되므로 원하는 선별 마커 프리 형질전환 식물체를 얻을 수 있다.

[0019] 본 발명에 이용될 수 있는 바이너리 벡터는 *A. tumefaciens*의 Ti 플라스미드와 함께 존재시 식물체를 형질전환시킬 수 있는 T-DNA의 RB (right border)와 LB (left border)를 함유하는 어떤 바이너리 벡터도 될 수 있으나, 바람직하게는 당업계에서 자주 사용되는 pBI101 (Cat#: 6018-1, Clontech, 미국), pBIN19 (Genbank 수탁번호 U09365), pBI121, pCAMBIA 벡터 등을 사용하는 것이 좋다.

[0020] 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재제조될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다.

[0021] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 튜머파시엔스와 같은 적당한 숙주에 존재할 때 그 자체의 일부, 소위 T-영역을 식물 세포로 전이시킬 수 있는 Ti-플라스미드 벡터이다. 다른 유형의 Ti-플라스미드 벡터 (EP 0 116 718 B1호 참조)는 현재 식물 세포, 또는 잡종 DNA를 식물의 게놈 내에 적당하게 삽입시키는 새로운 식물이 제조될 수 있는 원형질체로 잡종 DNA 서열을 전이시키는데 이용되고 있다. Ti-플라스미드 벡터의 특히 바람직한 형태는 EP 0 120 516 B1호 및 미국 특허 제4,940,838호에 청구된 바와 같은 소위 바이너리(binary) 벡터이다. 본 발명에 따른 유전자를 식물 숙주에 도입시키는데 이용될 수 있는 다른 적합한 벡터는 이중 가닥 식물 바이러스(예를 들면, CaMV) 및 단일 가닥 바이러스, 게미니 바이러스 등으로부터 유래될 수 있는 것과 같은 바이러스 벡터, 예를 들면 비완전성 식물 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다. 그러한 벡터의 사용은 특히 식물 숙주를 적당하게 형질전환하는 것이 어려울 때 유리할 수 있다.

[0022] 본 발명의 재조합 식물 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선별 마커 유전자를 포함한다. 상기 마커는 통상적으로 화학적인 방법으로 선택될 수 있는 특성을 갖는 핵산 서열로, 형질전환된 세포를 비형질전환 세포로부터 구별할 수 있는 모든 유전자가 이에 해당된다. 그 예로는 글리포세이트 (glyphosate) 또는 포스피노트리신과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신, G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명의 일 구현 예에 따른 재조합 식물 발현 벡터에서, 터미네이터는 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제 (NOS), 벼 α-아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린 (phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 튜머파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인 (Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 또한, 본 발명은 본 발명의 벡터에 외래 유전자를 삽입하여 식물 세포를 형질전환하는 단계; 및

[0025] 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 선별 마커-프리 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.

[0026] 상기 외래 유전자는 어떠한 유전자도 가능하며, 본 발명의 선별 마커-프리 재조합 식물 발현 벡터에서 두개의 loxP 자리 유전자 밖 (outside)에 위치하며 필요에 따라 리포터 유전자와 융합되어 발현될 수도 있다.

[0027] 본 발명의 외래 유전자가 삽입된 상기 벡터로 형질전환된 식물체는 T_1 세대에서 하이그로마이신 저항성 유전자의

발현으로 하이그로마이신을 이용한 형질전환 식물체의 선별이 가능하게 되고, T_2 세대에서 Cre 리콤비나아제 유전자의 발현으로 두개의 loxP 자리를 특이적으로 인식하고, 이를 통한 두개의 loxP 자리의 재조합에 의한 절단이 완성됨으로써, 선별 마커는 제거되고, 외래 유전자만이 남아 있는 형질전환 식물체를 제조할 수 있는 것이다.

[0028] 본 발명의 방법은 본 발명에 따른 재조합 식물 발현 벡터로 식물 세포를 형질전환하는 단계를 포함하는데, 상기 형질전환은 예를 들면, 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefiaciens*)에 의해 매개될 수 있다. 또한, 본 발명의 방법은 상기 형질전환된 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 형질전환 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있다.

[0029] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및/(또는) 조직 배양 기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 포함한 식물 종에 대해 일반적이다. 원칙적으로, 임의의 형질전환 방법은 본 발명에 따른 잡종 DNA를 적당한 선조 세포로 도입시키는데 이용될 수 있다. 방법은 원형질체에 대한 칼슘/폴리에틸렌 글리콜 방법 (Krens, F.A. et al., 1982, Nature 296, 72-74; Negrutiu I. et al., June 1987, Plant Mol. Biol. 8, 363-373), 원형질체의 전기천공법 (Shillito R.D. et al., 1985 Bio/Technol. 3, 1099-1102), 식물 요소로의 현미주사법 (Crossway A. et al., 1986, Mol. Gen. Genet. 202, 179-185), 각종 식물 요소의 (DNA 또는 RNA-코팅된) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 튜머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염 (EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다.

[0030] 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"는 어떤 식물 세포도 된다. 식물 세포는 배양 세포, 배양 조직, 배양 기관 또는 전체 식물, 바람직하게는 배양 세포, 배양 조직 또는 배양 기관 및 더욱 바람직하게는 배양 세포의 어떤 형태도 된다.

[0031] "식물 조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 열매, 줄기, 잎, 꽃가루, 종자, 암 조직 및 배양에 이용되는 다양한 형태의 세포들, 즉 단일 세포, 원형질체(protoplast), 싹 및 캘러스 조직을 포함한다. 식물 조직은 인 플란타(in planta)이거나 기관 배양, 조직 배양 또는 세포 배양 상태일 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 본 발명의 선별 마커-프리 재조합 식물 발현 벡터로 형질전환된 식물체 및 종자를 제공한다.

[0033] 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용작물류; 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, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료작물류일 수 있으며, 바람직하게는 애기장대이나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0035] **재료 및 방법**

[0036] **Cre/loxP 벡터의 구축**

[0037] Cre/loxP 벡터는 CaMV 35S의 46bp 업스트림 서열의 최소 프로모터(-46 프로모터라 명명함), 인트론을 갖는 Cre 발현 삽입체, loxP 자리 및 바이너리 벡터 pCAMBIA0380 (GenBank Accession no. AF234290)의 백본을 조합함으로써 구축되었다(도 1). 먼저, pBI101.1 바이너리 벡터 (Jefferson et al., 1987 Plant Mol. Biol. Rep.5 : 387-405)로부터 Nos (nopaline synthase) 터미네이터를 포함하는 GUS 유전자 단편은 pCAMBIA0380 (Hajdukiewicz et al., 1994 Plant Mol. Biol. 25: 989-994)의 HindIII 및 EcoRI 자리로 삽입되었다. 그리고

이 구축물은 pJJ1895로 나타내었다. 그 후에, 표 1의 프라이머를 이용한 PCR-매개 결합 방법을 이용하여, 두 개의 단편인 35S::Hpt 및 Cre/loxP은 각각 HindIII/XhoI 또는 XhoI/XbaI 자리를 갖도록 증폭되었다 (Sieburth and Meyerowitz, 1997 Plant Cell 9 : 355-365). 35S::Hpt 단편은 CaMV 35S 프로모터, loxP 자리, Hpt 유전자, Nos 터미네이터 및 -46 프로모터를 포함한다. Cre/loxP 단편은 인트론-함유 Cre 리콤비나아제 유전자, OCS (octopine synthase) 터미네이터 및 loxP 자리를 포함한다. 인트론-함유 Cre 리콤비나아제 유전자는 Zuo 등 (Zuo et al., 2001 Nat. Biotechnol. 19 : 157-161)의 방법에 따라 Cre 코딩 서열로 애기장대 Korrigan1 (Kor1) 인트론을 도입함으로써 구축되었다 (GenBank Accession no. AF330636). CaMV 35S 프로모터, Hpt, 인트론-함유 Cre 리콤비나아제 및 -46 프로모터 영역은 pPZP2Ha3 (+) (Fuse et al., 2001 Plant biotechnol. 18 : 219-222), pYLTAC7 (Liu et al., 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 : 6535-6540), pHpt-Ds5 (Qu et al. 2009 J. Integr. Plant Biol. 51 : 982-992) 및 pGA2406 (Jeon et al., 2008 Mol. Cells 26 : 474-480)으로부터 각각 증폭되었다. 이 두 PCR-증폭 산물, 35S-Hpt 및 Cre/loxP은 각각 HindIII/XhoI 및 XhoI/XbaI으로 절단되었고, 이후 pJJ1895의 HindIII 및 XbaI 자리로 클로닝 되었다.

표 1

[0038] 본 발명에 사용된 PCR 프라이머

Primer	Sequence (5'-3')
P1	CAAAGATTCAAATAGAGGACCTAA (서열번호 2)
P2	CAAGCTCTGATAGAGTTGGTCAAG (서열번호 3)
P3	AGTAAAAACTATCCAGCAACATTT (서열번호 4)
P4	AAAGAAATCATGGAAGTAAGACTG (서열번호 5)
P5	TTATGTTTATCGGCACTTTGCAT (서열번호 6)
P6	AGATGTCGCTATAAACCTATTCAG (서열번호 7)
GUS forward	CTACACCACGCCGAACACCT (서열번호 8)
GUS reverse	CAGGCACAGCACATCAAAGA (서열번호 9)
Hpt forward	TTATGTTTATCGGCACTTTGCAT (서열번호 10)
Hpt reverse	CAAGCTCTGATAGAGTTGGTCAAG (서열번호 11)
35S-Hind-F1	CCAAGCTTAGATTAGCCTTTTCAATTTCAG (서열번호 12)
35S-Lox-R1	AACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATCGTGTTCTCTCCAAATGAAA (서열번호 13)
Hpt-Lox-F1	ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGAAAAAGCCTGAACTCACCG (서열번호 14)
Hpt-Mini-R1	AATGAACTTCCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGCGTAGTAACATAGATGACACCG (서열번호 15)
Hpt-Xho-R2	CCCTCGAGCGTGTCCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGCG (서열번호 16)
Cre-Xho-F1	CCCTCGAGTCGACTCTAGCCTCGACATGTCCAATTTACTGACCGTAC (서열번호 17)
Cre-Lox-R1	GCTCTAGATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATTCCTGCTGAGCCTCGACATGTT (서열번호 18)

[0039] **유전자 총(particle bombardment)의 이용**

[0040] 직경 0.7㎛의 텅스텐 M-10 입자 (Bio-Rad)가 유전자 총에서 사용되었다. 텅스텐 입자의 제조는 Hull 등 (Hull et al. 1996 Plant sci. 120 : 153-160)이 기재한 바와 같이 수행되었다. 텅스텐 입자의 최종 농도는 50% 글리세롤 중에 67 mg/㎖였다. 45㎕의 텅스텐 입자 현탁액을 1.5㎖ 튜브에 넣었고, 후에 10㎍의 플라스미드 DNA, 50㎕의 2.5M $CaCl_2$ 및 10㎕의 0.1M 스퍼미딘 (spermidine)을 볼텍싱하면서 첨가하였다. 이 혼합물을 추가로 3분 볼텍싱한 다음 10분 동안 얼음에 두었다. 플라스미드 DNA로 코팅된 텅스텐 입자는 2초 동안 원심분리되었고 상등액은 제거되었다. 그 후에 펠렛은 140㎕의 70% 에탄올로 세척되었고 이어서 동일한 양의 100% 에탄올로 세척되었다. 마지막으로 텅스텐 입자는 48㎕의 100% 에탄올에 재현탁되었다. 6㎕의 텅스텐 입자는 미세입자투사법 (microprojectiles)으로 침투시켰다. 양파 표피 세포의 유전자총은 PDS-1000/He Biolistic Particle Delivery System (Bio-Rad)를 사용하여 28인치 Hg의 진공 상태에서 수행되었다.

[0041] **아그로박테리움-매개 형질전환**

[0042] 형질전환 애기장대 식물체를 제조하기 위해서, 전기천공법 (electroporation)으로 아그로박테리움 튜머파시엔스 균주 GV3101에 Cre/loxP 벡터를 도입하였다 (Mersereau et al., 1990 Gene 90 : 149-151). 형질전환 콜로니는 25㎎/ℓ 카나마이신이 첨가된 LB 배지에서 선별되었고, 제한 효소 분석에 의해 확인되었다. 이 벡터를 갖는 아그로박테리움 튜머파시엔스 GV3101 균주는 28℃에서 250rpm으로 25㎎/ℓ 카나마이신이 첨가된 LB 액체 배지에서

정지상까지 배양되었다. 애기장대 야생형 콜럼비아는 이전에 기재된 것처럼 꽃 침지 방법을 사용하여 아그로박테리움 균주로 형질전환되었다 (Clough and Bent, 1998 Plant J. 16 : 735-743). T_0 식물체에서 얻은 종자는 50 mg/ℓ 하이그로마이신을 첨가한 Gamborg B5 배지에서 발아되었다 (Lim et al., 2009 Mol. Cells 27 : 641-649). 선별된 식물체는 토양에 이식되었고, 자가-수분되었으며 T_1 세대까지 개별적으로 수확되었다. 이후, 어떤 항생제 선별없이 발아된 후대 식물체는 16시간-명/8시간-암의 광주기 하에 22℃ 토양에서 생장시켰다.

[0043] **PCR 분석**

[0044] 게놈 DNA는 mini-prep 방법을 사용하여 형질전환 식물체의 잎으로부터 분리되었다 (Chen and Ronald, 1999 Biol. Rep. 17 : 53-57). 형질전환 식물체에서 벡터의 제거 또는 비-제거 형태의 존재는 특이 프라이머 (표 1)를 사용한 PCR 증폭에 의해 검출되었다. 반응 조건은 94℃ 5분의 1 사이클; 94℃ 30초, 56℃ 1분, PCR 산물의 크기에 따라 72℃ 1~5분의 35 사이클; 마지막 신장단계는 72℃ 7분이었다. 이 증폭된 산물은 0.7% (w/v)의 아가로오스 겔에 로딩되었다.

[0045] **DNA 겔-블롯 분석**

[0046] 3-4주 된 형질전환 식물체의 어린 잎에서 총 게놈 DNA가 분리되었고, DNA 겔-블롯 분석에 사용되었다. 30㎍의 게놈 DNA는 EcoRI 및 HindIII로 절단되었고, 1% (w/v) 아가로오스 겔에 전기영동되었고, 이어서 Hybond N+ 나일론 막(Amersham Biosciences)에 옮겨졌다. GUS 및 Hpt 코딩 영역은 GUS 및 Hpt의 정방향 및 역방향 프라이머 (표 1)를 각각 사용하여 Cre/loxP 플라스미드로부터 증폭되었다. 증폭 산물은 Amersham Rediprime™ 랜덤 프라이머 DNA 라벨링 시스템 (GE Healthcare)을 사용하여 ^{32}P-dCTP로 표지되었고, 그 후 DNA 겔-블롯 혼성화에 대한 프로브로 사용되었다. 혼성화는 0.5M 소듐 포스페이트 (pH 7.2), 1mM EDTA, 1% (w/v) BSA 및 7% (w/v) SDS를 포함한 용액에서 65℃로 16시간 동안 수행되었다. 혼성화 후, 막은 0.2 × SSC (3M NaCl 및 0.3M 소듐 시트레이트) 및 0.1% SDS를 사용하여 65℃에서 10분 동안 2회 세척되었다. 세척 후, 혼성화 신호는 phosphorimager(Typhoon, Amersham Biosciences)로 기록되었다.

[0047] **GUS 조직화학적 (histochemical) 분석**

[0048] 형질전환 식물체의 잎 및 화분은 GUS 염색에 사용되었다. 각 조직은 0.2M의 소듐 포스페이트 (pH 7.0), 10mM EDTA, 20% 메탄올, 0.01% 트리톤 X-100, 2% DMSO (dimethyl sulfoxide) 및 0.1% X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indole-β-glucopyranoside)를 포함하는 반응 버퍼와 함께 10분 동안 진공상태로 Jeon 등 (Jeon et al. 1999 Plant Mol. Biol. 39 : 35-44)이 기재한 대로 침투되었다. 화분은 30분 동안 37℃에서 배양되었고, 다른 조직은 2시간에서 밤새 충분한 염색이 관찰될 때까지 배양되었다. 그 후 잎 샘플은 엽록소를 제거하기 위해 70% 에탄올 용액에 옮겨졌다. GUS 염색 패턴은 해부 현미경 SZX12 (Olympus, Japan)에서 관찰되었고 ImagePro Express(Olympus)로 사진 촬영되었다.

[0049] **실시예 1 : 최소 프로모터::Cre 융합 구축물의 일시적인 발현 분석**

[0050] 본 발명의 목적은 TATA 박스 및 전사 개시 자리를 포함하는 46bp CaMV 35S 최소 프로모터에 의해 조절되는 Cre 유전자를 기반으로 새로운 Cre/loxP 벡터를 개발하는 것이다. 이 -46 프로모터 단독으로는 Cre 유전자 발현을 유도할 수 없으나 식물체 게놈에서 인접한 인핸서 인자와 함께 유전자를 활성화할 수 있다 (Springer, 2000 Plant Cell 12 : 1007-1020). Cre 리콤비나아제 유전자의 지속적 발현은 생장 지연, 잎 백화무늬병 및 감소된 증식력과 같은 원하지 않은 표현형을 야기한다는 점에서 주목할 만하다 (Coppoolse et al., 2003 Plant Mol. Biol. 51 : 263-279). 따라서, 본 발명자는 -46::Cre가 loxP 자리 사이에서 Hpt 마커 유전자 및 Cre 구축물의 절단을 야기할 수 있는 새로운 구축물을 설계하였다. 이 벡터 설계에서, 본 발명자는 형질전환 세포가 형질전환 라인의 선별을 위한 검증된 시스템인 하이그로마이신 배지에서 선별되도록 CaMV 35S 프로모터 및 loxP 서열의 다운스트림에 바로 Hpt 유전자를 배치하였다 (Qu et al. 2009 J. Integr. Plant Biol. 51: 982-992)(도 1). 이 벡터의 효율을 조사하기 위해서, Cre/loxP 융합 구축물을 유전자 총에 의해 양파 (Allium cepa) 표피 세포로 전

달하였다 (Hull et al., 1996 Plant sci. 120 : 153-160). -46 프로모터에 의한 Cre 리콤비나아제 유전자의 유도는 Hpt를 포함하는 loxP 자리 사이 영역의 결실을 야기할 수 있고, 따라서 GUS에 CaMV 35S 프로모터의 결합을 유도하여, 리포터 유전자 발현의 가시적 분석을 가능하게 하였다. 실제로 일시적 분석에서, 본 발명자는 양파 표피 세포에서 많은 GUS 염색 부분이 관찰되었는데 (데이터 미제시), 이것은 -46::Cre 융합 시스템의 기능성을 나타낸다.

[0051] **실시예 2 : 새로운 Cre/loxP 벡터를 갖는 형질전환 라인의 제조 및 선별**

[0052] 아그로박테리움-매개 형질전환에 의해 제조된 형질전환 애기장대 식물체 풀로부터, 하이그로마이신-포함 배지에서 생장한 T_1 형질전환 애기장대 식물체 10개 라인이 상세한 특성규명을 위해 선별되었다. 모든 식물체에서 야생형 식물체에 비해 눈에 띄는 표현형이 보이지 않았다. 어린 잎을 사용하여 이 라인의 GUS 염색 패턴을 조사하였다. 10개 라인 중에 9개 라인은 키메라 GUS 염색 패턴을 나타냈는데, 이것은 제거 및 비-제거 형태의 존재를 나타내는 것이다. 반면 나머지 라인은 염색되지 않았는데, 이것은 제거되지 않은 것을 나타내는 것이다. 이러한 결과는 -46::Cre 인자가 식물체 내에서 성공적으로 loxP 영역을 제거할 수 있음을 나타낸다. 분석 중인 T_1 형질전환 식물체 10개 라인은 다음 세대로의 형질전환 유전자의 유전을 평가하기 위해 종자가 결실되기까지 재배되었다.

[0053] 키메라 GUS 염색 패턴을 보여주는 T_1 형질전환 9개 라인으로부터 T_2 후대 식물체 4~9개 라인은 하이그로마이신이 없는 배지에서 발아시켰고, 이후에 토양에서 더 재배되었다. 그 후에 T_2 개별 식물체의 게놈에서 Cre/loxP 벡터의 구조를 확인하기 위해서 GUS 염색을 수행하였다. 실험한 T_2 형질전환 식물체 72개 라인 중에서, 24개 라인은 균일한 전체 조직 염색 패턴을 보여주었는데, 이는 Hpt 저항성 유전자가 없는 마커-프리 형질전환 식물체일 가능성이 높다는 것을 나타낸다 (도 2C). 반면에 29개 라인은 제거 및 비-제거 키메라 패턴의 특징인 키메라 GUS 염색 프로파일을 보여주었고 (도 2B), 19개 라인은 염색이 되지 않았는데 (도 2A), 이들이 야생형 분리주이거나 또는 형질전환 유전자에서 비-제거 구조를 갖기 때문인 것 같다. 이 결과는 벡터의 제거 형태가 후대로 성공적으로 유전되어 30% 이상의 효율로 마커-프리 형질전환 식물체를 생성하는 것을 제시한다.

[0054] 이 구축물의 제거 형태가 생식 조직에서 존재하는지 여부를 검사하기 위해서, 형질전환 식물체로부터 화분의 GUS 염색을 더 수행하였다 (도 2D, 2E 및 2F). 균일한 잎 염색 라인 중에 7개 라인은 화분 전체 GUS 염색을 보였는데, 이 결과는 -46::Cre 융합 벡터의 제거 형태에 대한 동형 접합체라는 것을 나타내고 (도 2F), 반면에, 균일 및 키메라 잎 염색 라인으로부터 각각 11개 및 23개 라인은 GUS 염색 및 비-염색 화분 사이의 분리 패턴을 보였는데 (도 2E), 이 결과는 백터의 제거 및 비-제거 형태를 갖거나 또는 제거 형태에 대한 이형 접합체라는 것을 나타낸다. 또한, 나머지 형질전환 라인 (균일 및 키메라 잎 염색 라인으로부터 각각 6개 및 비-염색 라인 모두)은 GUS 염색에 음성적이었고, 또한 이 결과는 야생형 분리개체 또는 이 게놈에서 벡터의 비-제거 형태만을 갖는다는 것을 나타낸다 (도 2D).

[0055] **실시예 3 : -46::Cre 융합 벡터를 갖는 T_1 및 T_2 형질전환 라인의 분자적 특성규명**

[0056] 형질전환 애기장대 식물체의 게놈에서 새로운 Cre/loxP 벡터의 구조를 조사하기 위해, 여러 개의 프라이머 세트의 조합을 사용한 게놈 PCR 분석을 수행하였다 (도 1 및 표 1). 특이 프라이머 쌍을 사용한 Cre/loxP 벡터의 비-제거 형태에 대한 증폭물 (Amplicon) 크기는 하기와 같다: P1 및 P2에 대하여 1,389bp, P3 및 P4에 대하여 2,290bp, P1 및 P4에 대하여 4,553bp 및 P5 및 P6에 대하여 2,812bp. 벡터 제거 형태에 대해 구별되는 1,081bp 단편은 P1 및 P4 프라이머를 사용하여 증폭되어야 한다. 또한, Hpt 선별 마커의 존재가 이 유전자에 대해 특이적인 P5 및 P2 프라이머에 의해 확인될 수 있다 (도 1). 본 발명자는 P1 및 P4 프라이머를 사용한 PCR로 T_1 형질전환 10개 라인을 시험하였고, 라인 번호 22를 제외하고 4,553 및 1,081bp의 증폭된 PCR 산물은 모든 경우에서 획득된 것을 발견하였다 (표 2). 이것은 이 라인이 Cre/loxP 벡터의 제거 및 비-제거 형태를 둘다 갖는다는 것을 나타낸다. 이어서 라인 번호 22는 P5 및 P2 프라이머를 사용하여 확인하였듯이 Hpt 영역 및 P3/P4 및 P5/P6 증폭물에 대해 양성이었으나, P1/P2 또는 P1/P4 프라이머로 증폭된 산물은 없었다 (표 2). 이것은 T-DNA의 RB(right border)에 인접한 P35S 프로모터 및 loxP 영역의 변형을 나타내고, 따라서 벡터의 비-제거 형태만이 존재하는 것을 나타내는 것 같다.

표 2

[0057] T_1 라인에서 선별된 10개체의 분자적 분석

Line	Primer					GUS staining[a]	Vector structure[b]
	P1/P2	P3/P4	P1/P4	P5/P6	P5/P2		
4	+	+	+	+	+	+	E/NE
22	-	+	-	+	+	-	NE
41	+	+	+	+	+	+	E/NE
42	+	+	+	+	+	+	E/NE
43	+	+	+	+	+	+	E/NE
44	+	+	+	+	+	+	E/NE
45	+	+	+	+	+	+	E/NE
46	+	+	+	+	+	+	E/NE
47	+	+	+	+	+	+	E/NE
48	+	+	+	+	+	+	E/NE

[a] +, chimeric staining; -, no staining

[b] NE, non-excision form; E/NE, both forms

[0058] 본 발명의 형질전환 식물체로부터 Hpt 마커 유전자의 제거를 더 확인하기 위해, GUS 및 Hpt 유전자 프로브를 각각 사용하여 EcoRI 및 HindIII로 게놈 DNA 절단 후에, DNA 겔-블롯 분석을 수행하였다. 선별 마커 유전자가 제거된다면, 3,032bp의 밴드는 GUS 프로브를 사용하여 획득할 수 있으나 Hpt 프로브로는 획득할 수 없다. 대조적으로, 마커 유전자 영역이 비-제거 구조로 남아있을 때에는, 6,504bp의 밴드는 GUS 또는 Hpt 프로브를 사용하여 검출될 수도 있다. 도입 벡터의 비-제거 형태를 나타내는 단일 밴드만 보여주는 라인 번호 22를 제외하고, 시험한 T_1 형질전환 식물체의 모두에서 GUS 프로브와의 혼성화는 3,032bp 및 6,504bp 밴드를 나타냈다 (도 3A). Hpt 프로브를 사용한 실험은 비-제거 형태의 단일 밴드를 나타냈는데 (도 3B), 이것은 T_1 형질전환 식물체 10개 라인 중에 9개 라인은 게놈에서 Cre/loxP 벡터의 제거 및 비-제거 형태를 모두 갖는 것으로 분석되었고, 라인 번호 22는 비-제거 형태만을 포함하는 것을 나타낸다.

[0059] 본 발명자는 T_2 형질전환 라인을 이용하여, 다시 PCR 및 게놈 DNA 겔-블롯 분석을 수행하였다. 이 실험을 위해, 비-제거 형태로서 번호 22를 선별하였고, 제거 및 비-제거 형태를 포함하는 라인으로서 번호 46 및 48을 선별하여 총 3개체를 대표 라인으로 선별하였다 (표 3). PCR 분석은 P5/P2, P3/P4 및 P5/P6 프라이머 쌍을 사용하여 번호 22의 거의 모든 T_2 라인에서 PCR 산물이 증폭되었으나, P1/P4 또는 P1/P2 프라이머 쌍에서는 증폭되지 않았다는 것을 보여주었다. 예외는 야생형 분리주일 수 있는 T_2 라인 22-1, -3 및 -9였다.

[0060] 이 결과와 대조적으로, 라인 번호 46의 T_2 라인 PCR 분석은 1,081bp PCR 산물이 46-1, -4, -5, 및 -9 라인에서 P1/P4 프라이머로 증폭되었지만, P5/P2, P1/P2, P3/P4 또는 P5/P6 프라이머 쌍으로는 PCR 산물을 얻지 못했다는 것을 나타낸다 (표 3). 이것은 이들 라인이 마커-프리 형질전환 식물체이고, 이 식물체는 제거 형태만을 갖고 게놈에서 Hpt 유전자를 갖지 않는 것을 나타낸다. 시험한 프라이머 조합의 모든 PCR 산물이 T_2 라인 46-2 및 46-6에서 성공적으로 증폭되었는데, 이것은 이들 라인이 Cre/loxP 벡터의 제거 및 비-제거 형태를 모두 갖는 것을 나타낸다. 반대로, PCR 산물 중에서 어떠한 것도 46-3, -7 및 -8 라인에서 증폭되지 않았는데, 이것은 이들이 야생형 분리주인 것으로 확인되었다 (표 3). 유사한 결과는 라인 번호 48의 T_2 라인에서 관찰되었다 (표 3).

표 3

[0061] 선별된 라인의 T_2 세대의 분자적 분석.

Line	Primers					GUS staining[a]	Vector structure[b]
	P1/P2	P3/P4	P1/P4	P5/P6	P5/P2		
46-1	-	-	+	-	-	+++	E

46-2	+	+	+	+	+	+	E/NE
46-3	-	-	-	-	-	-	W
46-4	-	-	+	-	-	+++	E
46-5	-	-	+	-	-	+++	E
46-6	+	+	+	+	+	+	E/NE
46-7	-	-	-	-	-	-	W
46-8	-	-	-	-	-	-	W
46-9	-	-	+	-	-	+++	E
48-1	-	-	-	-	-	-	W
48-2	-	-	+	-	-	+++	E
48-3	+	+	+	+	+	+	E/NE
48-4	+	+	+	+	+	+	E/NE
48-5	+	+	+	+	+	+	E/NE
48-6	-	-	+	-	-	+++	E
48-7	-	-	+	-	-	+++	E
48-8	+	+	+	+	+	+	E/NE
48-9	+	+	+	+	+	+	E/NE
22-1	-	-	-	-	-	-	W
22-2	-	+	-	+	+	-	NE
22-3	-	-	-	-	-	-	W
22-4	-	+	-	+	+	-	NE
22-5	-	+	-	+	+	-	NE
22-6	-	+	-	+	+	-	NE
22-7	-	+	-	+	+	-	NE
22-8	-	+	-	+	+	-	NE
22-9	-	-	-	-	-	-	W

[a] +++, whole tissue staining; +, chimeric staining; -, no staining

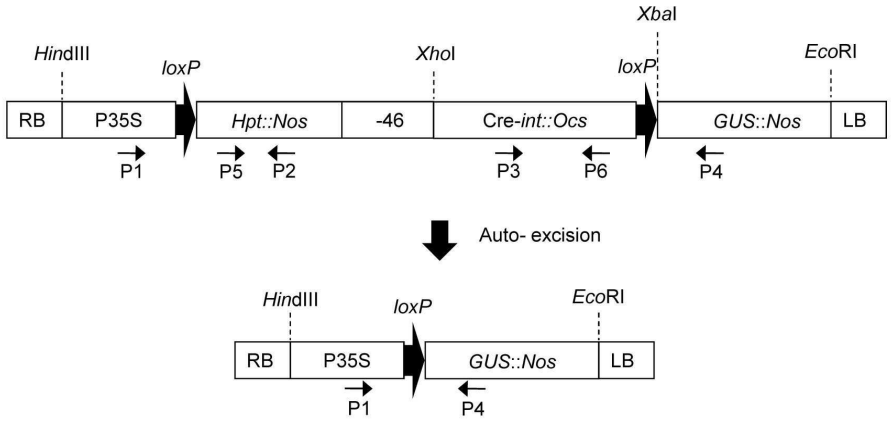
[b] E, excision form; NE, non-excision form; E/NE, both forms; W, wild type segregant

[0062] 추가로 이 PCR 데이터를 확인하기 위해서, 라인 번호 46의 T_2 후대에서 GUS 및 Hpt 유전자 프로브를 각각 사용하여 게놈 DNA 겔-블롯 분석을 수행하였다. T_2 라인 46-1, -4, -5 및 -9은 GUS 프로브와 혼성화된 3,032bp 밴드를 보였으나, Hpt 프로브에 결합한 밴드는 나타나지 않았다 (도 4A 및 4B). 이것은 이들 라인이 형질전환 유전자의 제거 형태만을 갖는 마커-프리 형질전환 식물체이고, 이들의 게놈에서 Hpt 유전자를 갖고 있지 않다는 PCR 데이터 결과로 확인하였다. 일관성 있게도, 이들 라인은 균일한 전체 조직 GUS 염색 패턴을 보여주었다 (표 3). GUS 프로브와 혼성화되었을 때, T_2 라인 46-2 및 46-6은 3,032 및 6,504bp 밴드를 보였고, 또한 이것은 이들 라인이 Cre/loxP 벡터의 제거 및 비-제거 형태를 모두 갖는 PCR 데이터 관찰로 확인되었다. 또한, T_2 라인 46-3, 46-7 및 46-8은 어떤 프로브와 혼성화되지 않았는데, 이것은 이들이 야생형 분리주라는 것을 나타낸다 (도 4A 및 4B).

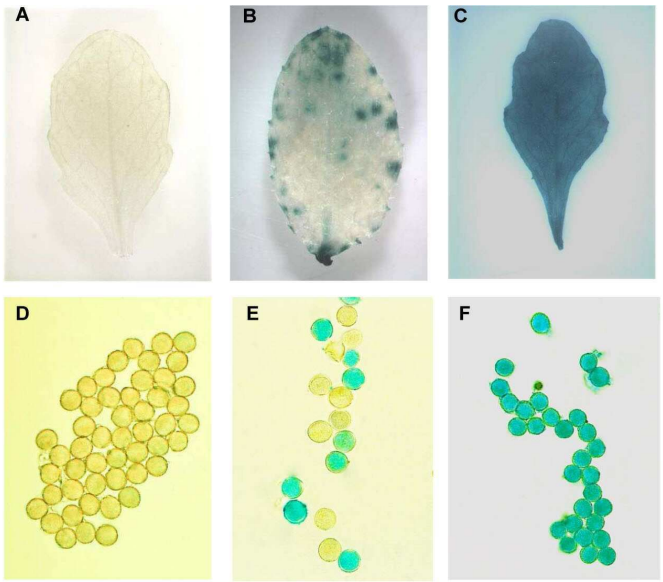
[0063] 제거 형태를 갖는 식물체가 마커-프리 형질전환 식물체인지를 증명하기 위해서, 라인 46-1 및 46-4의 T_3 종자를 수확하였고 이 종자를 하그로마이신-포함 배지에서 발아시켰다. 대조구로, 라인 22-2는 비-제거 형태를 갖는 라인으로 사용되었다. 하이그로마이신 선별 시험은 라인 46-1 및 46-4의 발아된 모든 종자가 생장하지 않았고 결국 죽는 결과를 나타냈다 (도 5B). 반면, 라인 22-2의 후대 식물체는 하이그로마이신-함유 배지에서 정상적으로 생장했다 (도 5A). 46-1의 T_3 후대 식물체를 사용한 PCR 분석은 1,081bp 산물이 모든 식물체에서 P1/P4 프라이머로 증폭되었으나 P5/P2 프라이머로는 증폭되지 않았다는 것을 확인하였다 (데이터 미제시). GUS 염색 실험은 라인 46-1 및 46-4의 후대 식물체는 양성적 GUS 염색을 나타냈다 (도 5D). 반면, 라인 22-2로부터 유도된 식물체는 염색에 대해 음성적이었다 (도 5C). 이것은 46-1 및 46-4의 후대 식물체가 마커-프리 형질전환 식물체라는 앞선 데이터와 일치하였다.

도면

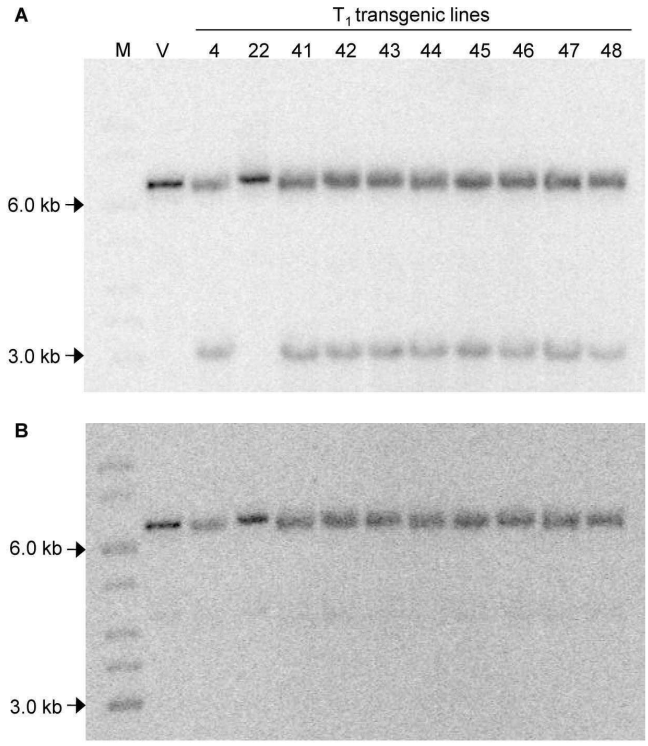
도면1


HindIII
loxP
XhoI
loxP
XbaI
EcoRI
RB
P35S
Hpt::Nos
-46
Cre-int::Ocs
GUS::Nos
LB
P1
P5
P2
P3
P6
P4
Auto- excision
HindIII
loxP
EcoRI
RB
P35S
GUS::Nos
LB
P1
P4

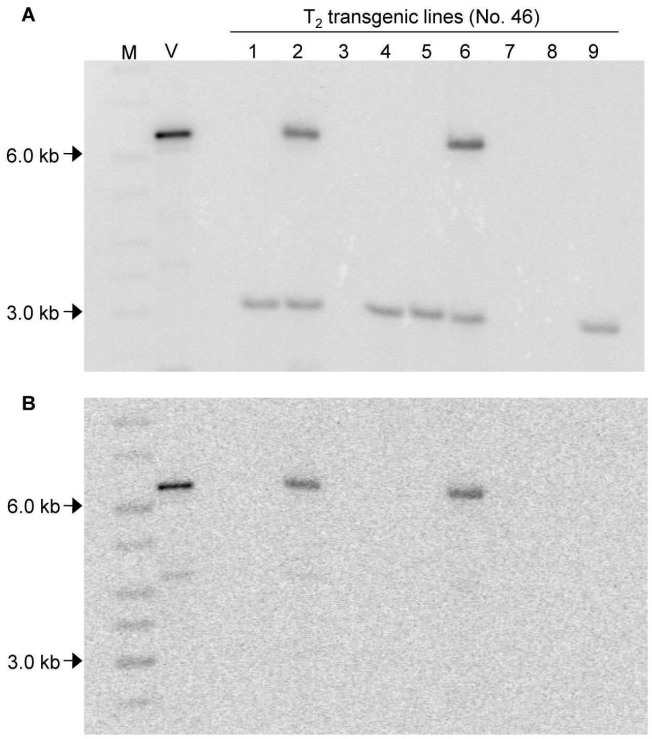
도면2


A
B
C
D
E
F

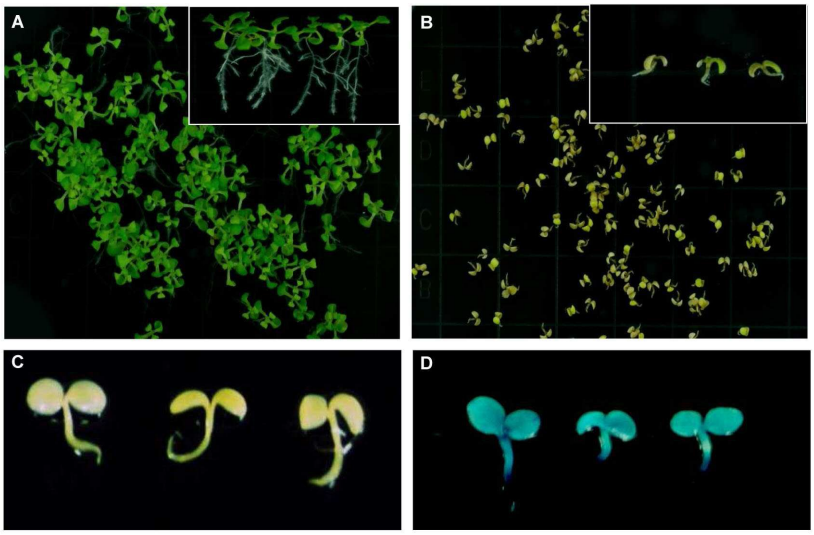
도면3


A
T1 transgenic lines
M V 4 22 41 42 43 44 45 46 47 48
6.0 kb
3.0 kb
B
6.0 kb
3.0 kb

도면4


A
T2 transgenic lines (No. 46)
M V 1 2 3 4 5 6 7 8 9
6.0 kb
3.0 kb
B
6.0 kb
3.0 kb

도면5



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> Selectable marker-free vector containing minimal promoter from CaMV 35S and method for producing transformed plant using the same

<130> PN11294

<160> 18

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 46

<212> DNA

<213> Cauliflower mosaic virus

<400> 1

caagaccctt cctctatata aggaagttca tttcatttgg agagga 46

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

caaagattca aatagaggac ctaa 24

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 3

caagctctga tagagttggt caag 24

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 4

agtaaaaact atccagcaac attt 24

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 5

aaagaaatca tggaagtaag actg 24

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 6

ttatgtttat cggcactttg cat 23

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

agatgtcgct ataaacctat tcag 24

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

ctacaccacg ccgaacacct 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

caggcacagc acatcaaaga 20

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

ttatgtttat cggcactttg cat 23

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

caagctctga tagagttggt caag 24

<210> 12

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 12

ccaagcttag attagccttt tcaatttcag 30

<210> 13

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 13

aacttcgtat aatgtatgct atacgaagtt atcgtgttct ctccaaatga aa 52

<210> 14

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 14

ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttatgaaaaa gcctgaactc accg 54

<210> 15

<211> 54

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 15

aatgaacttc cttatataga ggaagggtct tgcgtagtaa catagatgac accg 54

<210> 16

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 16

ccctcgagcg tgtcctctcc aaatgaaatg aacttcctta tatagaggaa gggtcttgcg 60

60

<210> 17

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 17

ccctcgagtc gactctagcc tcgacatgtc caatttactg accgtac 47

<210> 18

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 18

gctctagata acttcgtata atgtatgcta tacgaagtta ttcctgctga gcctcgacat 60

gtt 63