(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년04월10일
(11) 등록번호 10-1724933
(24) 등록일자 2017년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/415 (2006.01) *A01H 5/12* (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/415 (2013.01)
A01H 5/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0148249
(22) 출원일자 2015년10월23일
심사청구일자 2015년10월23일
(56) 선행기술조사문헌
김아람 등. 한국육종학회지. Vol. 46, No. 2, 페이지 143-151 (2014.06.)
KR1020140050218 A
유재경 등. 원예과학기술지 Vol. 33 ,No. 4, 페이지 575-584 (2015.08.)

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
박영두
경기도 용인시 수지구 성복2로 220 305동 1404호 (성복동,버들치마을성복힐스테이트3차)
박지수
경기도 성남시 분당구 정자로 144 406동 2102호
유재경
경기도 수원시 영통구 광교중앙로 247 휴먼시아아파트 3201동 2005호
(74) 대리인
손민

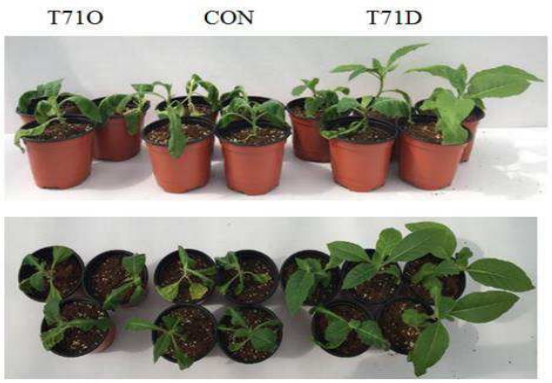
전체 청구항 수 : 총 15 항 심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 **내건성 조절 단백질 BrDST71(Brassica rapa Drought Stress Tolerance 71), 상기 단백질을 코딩하는 유전자 및 상기 단백질 또는 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 내건성 증진용 재조합 벡터**

(57) 요 약

본 발명은 내건성 조절 단백질 BrDST71(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 71), 상기 단백질을 코딩하는 유전자 및 상기 단백질 또는 상기 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 내건성 증진용 재조합 벡터에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체, 서열번호 7의 서열로 이루어지는 안티센스 뉴클레오티드, 상기 안티센스 뉴클레오티드를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 식물체의 내건성을 향상시키는 방법, 및 상기 형질전환 식물체의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 BrDST71 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체는 지구 온난화 등에 의한 기후조건 변화로 야기된 건조 스트레스에 대한 내성이 탁월하여 건조한 경작 조건에 적응성이 뛰어난 신기능 작물로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도10



[주] CON, 비 형질전환체
T71O, BrDST71 유전자가 과발현된 담배 형질전환체
T71D, BrDST71 유전자가 발현억제된 담배 형질전환체

(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/8205 (2013.01)
C12N 15/8273 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ01112301
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 GM작물개발사업단
연구사업명 차세대바이오그린21사업
연구과제명 유용 유전자를 이용한 농업 생산 효율 개선용 GM 배추 개발 및 우량계통 육성
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교
연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31
공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 6의 아미노산 서열로 이루어진 내건성 조절 단백질 BrDST71(*Brassica rapa* drought stress Tolerance 71).

청구항 2

제1항의 단백질을 코딩하는 유전자..

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 유전자는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것인, 유전자.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 유전자는 배추(*Brassica rapa*) 유래의 것인, 유전자.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 유전자는 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. pekinesis) 유래의 것인, 유전자.

청구항 6

제1항의 단백질 또는 제2항 내지 제5항 중 어느 한 항의 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 내건성 증진용 재조합 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 안티센스 뉴클레오티드는 간섭 RNA(RNAi), 작은 간섭 RNA(siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 및 마이크로 RNA(miRNA)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 재조합 벡터.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 안티센스 뉴클레오티드는 서열번호 7의 염기서열로 이루어진 것인, 재조합 벡터.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 내건성을 증진시키는 것인, 재조합 벡터.

청구항 10

제6항의 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 또는 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 또는 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 또는 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 또는 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 또는 튤립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 또는 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 식물체는 담배인 것인 식물체.

청구항 13

서열번호 7로 이루어진 내건성 증진용 안티센스 뉴클레오티드.

청구항 14

제13항의 안티센스 뉴클레오티드를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 식물체의 내건성을 향상시키는 방법.

청구항 15

(1) 제6항의 재조합 벡터를 제조하는 단계;

(2) 상기 벡터를 아그로박테리움을 이용하여 식물체에 형질전환하는 단계; 및

(3) 상기 형질전환체를 선별하는 단계를 포함하는 형질전환 식물체 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 내건성 조절 단백질 BrDST71(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 71), 상기 단백질을 코딩하는 유전자 및 상기 단백질 또는 상기 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 내건성 증진용 재조합 벡터에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체, 서열번호 7의 서열로 이루어지는 안티센스 뉴클레오티드, 상기 안티센스 뉴클레오티드를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 식물체의 내건성을 향상시키는 방법, 및 상기 형질전환 식물체의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물체의 생장은 건조 스트레스에 매우 큰 영향을 받는다. 그러므로 식물체들은 생존을 위해 건조 스트레스에 적응해야 한다. 건조 스트레스는 식물 잎의 세포 내 기공의 폐쇄에 관여하는 앱시스산 호르몬(abscisic acid, ABA)의 분비를 촉진하는데, 현재 ABA-responsive element binding protein 1(AREB1)/ABA-responsive element(ABRE)-binding factor 2(ABF2), dehydration-responsive element(DRE)-binding protein 2A(DREB2A),

receptor-like kinase 1(RPK1), SNF1-related protein kinase 2C(SRK2C), calcium-dependent protein kinases(CDPKs) CPK3과 CPK6 등이 중요한 시그널로 작용됨이 밝혀져 있다.

[0003] 건조 스트레스는 식물체 내에서 다양한 생화학적·생리적 반응을 유발한다. 예를 들어, 건조 스트레스 발생 시 식물들은 제각각 당류(sucrose, trehalose, sorbitol 등), 당알콜(mannitol 등), 아미노산류(proline 등), 아민류(glycine betaine, polyamine류 등)들을 축적하며, 이들 대사물질들은 식물체가 건조 스트레스에 내성을 지니는데 도움을 줄 수 있는 삼투질(osmolyte), 항산화물질(antioxidant), 스캐빈저(scavenger)로서 작용하는 것으로 밝혀져 있다.

[0004] 그러나 많은 식물들은 건조 스트레스에 내성을 가질 수 있는 특수 대사물질들을 합성하는 능력이 부족하여 생장 및 생존의 위협을 받고 있다. 건조 스트레스 관련 대사기작 내 물질들에 관계된 유전자들을 이용한 유전공학 연구는 건조 스트레스 저항성 형질전환 식물체들을 개발하는데 있어 매우 유용한 방법이며, 유전공학 기법으로 개발된 많은 형질전환 식물들이 건조 스트레스에 대한 내성이 증진되었다는 보고들이 있다. 그리고 지금까지 다양한 작물에서 다양한 저항성 유전자들이 발견되고 있으며 그 발현 네트워크에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다.

[0005] 예를 들어, 옥수수에서는 NPK1(tobacco MAPKKK), ZmNF-YB2(maize nuclear factor YB2), ZmPLC1(phospholipase C1), TsVP(vacuolar-H^+-pyrophosphatase)가, 벼에서는 HVA1(barley group 3 LEA protein), Dadc(*Datura stramonium* arginine decarboxylase), ABF3(Arabidopsis ABRE-binding factor 3), DREB1A(Arabidopsis DRE-binding protein 1), MnSOD(pea Mn superoxide dismutase), SNAC1(rice stress responsive NAC1), OsDREB1(rice DRE-binding protein 1), HvCBF4(barley C-repeat binding factor), OsCIPK12(rice calcineurin B-like protein-interacting protein kinase 12), ZFP252(rice TFIIIA-type zinc finger protein) 등이 건조 스트레스에 저항성을 가지는 유전자로 알려져 있다.

[0006] 한편, 배추는 김치의 주재료로서 한국의 4대 채소 가운데 하나이며 유채 속(*Brassica*)에 포함되어 있다. 유채 속(*Brassica*)에는 유채, 겨자 등 산업적 경제성이 우수한 작물이 포함되어 있어 외국에서도 중요한 작물이다. 유채 속(*Brassica*) 작물은 건조 환경에 의한 피해에 민감하며, 이로 인한 생육장애로 수확량이 감소되어 농가와 소비자에게 막대한 피해를 줄 수 있다.

[0007] 이같이 건조 환경에 의한 농업생산성 저하는 심각한 수준으로 이러한 환경에 내성을 갖는 우량 품종의 개발이 식량자원의 안정적 확보에 매우 시급하게 필요한 실정이다.

[0008] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 식물체의 내건성과 관련된 유전자를 발굴하고자 예의 연구 노력한 결과, 서열번호 5의 염기서열을 갖는 유전자 또는 서열번호 5의 염기서열에 의해 코딩되는 서열번호 6의 단백질이 상술한 식물체의 형질에 관여를 하고, 이 유전자 또는 단백질의 발현이 억제되도록 형질전환된 식물체의 경우 식물체의 내건성이 증진된다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 내건성 조절 단백질 BrDST71(*Brassica rapa* drought stress Tolerance 71)을 제공하는데 데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 단백질을 코딩하는 BrDST71(*Brassica rapa* drought stress Tolerance 71) 유전자를 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 단백질 또는 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 내건성 증진용 재조합 벡터를 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체를 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 내건성 증진용 안티센스 뉴클레오티드를 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 안티센스 뉴클레오티드를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 식물체의 내건성

을 향상시키는 방법을 제공하는 데 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 재조합 벡터를 제조하는 단계, 상기 벡터를 아그로박테리움을 이용하여 식물체에 형질전환하는 단계, 및 상기 형질전환체를 선별하는 단계를 포함하는 형질전환 식물체 제조방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 내건성 조절 단백질 BrDST71(*Brassica rapa* drought stress Tolerance 71)을 제공한다.

[0017] 본 발명에서 용어 "BrDST71(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 71)"은, 건조 스트레스와 관련된 단백질을 의미한다. 보다 상세하게, 상기 단백질은 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 내건성 관련 단백질로, 배추(*Brassica rapa*)에서 유래되었고, 구체적으로는 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)에서 유래되었다.

[0018] 본 발명에서 상기 단백질은 첨부한 서열목록에 기재된 서열번호 6의 아미노산 서열로 구성된 단백질에 한정되지 않으며, 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 내건성 관련 단백질과 기능적 동등물일 수 있다. 상기 "기능적 동등물"이란, 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열과 적어도 60%, 구체적으로는 70%, 보다 구체적으로는 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로서 본 발명의 BrDST71과 실질적으로 동질의 활성을 나타내는 단백질을 의미한다.

[0019] 상기 기능적 동등물에는, 예를 들어, 서열번호 6의 아미노산 서열의 아미노산 중 일부가 치환되거나, 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함된다. 아미노산의 치환은 구체적으로는 보존적 치환이다. 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산 (Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황 함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 구체적으로는 본 발명의 BrDST71의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치한다. 또한 상기 기능적 동등물의 범위에는 BrDST71의 기본 골격 및 이의 생리활성을 유지하면서 단백질의 일부 화학 구조가 변형된 단백질 유도체도 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 단백질의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경 및 생리활성을 유지하면서 GFP(Green Fluorescent Protein)와 같은 다른 단백질과 융합으로 만들어진 융합단백질 등이 이에 포함된다.

[0020] 본 발명에서 용어 "내건성"은, 건조 스트레스 조건에서 여러 가지 형태적, 생리적 또는 생화학적 형질들의 종합적 대응 노력에 의하여 생장 유지 및 생산을 유지하는 것으로 정의할 수 있다. 현재까지, 알려진 내건성 관련 주요 형질은 건조조건에서 양호한 수분상태 및 생산성 유지에 기여하는 심근성, 잎의 노화 방지, 기공의 개폐 조절, 삼투조절 능력, 세포의 막 구조 유지 능력 등이다.

[0021] 본 발명의 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 단백질을 코딩하는 BrDST71(*Brassica rapa* drought stress Tolerance 71) 유전자를 제공한다.

[0022] 본 발명에서 용어 "상기 단백질을 코딩하는 BrDST71(*Brassica rapa* drought stress Tolerance 71) 유전자"는 상기 단백질의 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 가진 유전자를 의미한다. 보다 상세하게, 상기 유전자는 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지는 내건성 관련 단백질을 코딩하는 유전자로, 서열번호 5의 염기서열을 가지는 BrDST71 유전자이며, 배추(*Brassica rapa*)에서 유래되었고, 구체적으로는 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)에서 유래되엇다.

[0023] 상기 BrDST71 유전자는 서열번호 5의 염기서열에 한정되지 않으며, 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈, 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 염기서열을 포함한다. 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 이용되는 염기서열은 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 구체적으로는 70%의 상동성, 보다 더 구체적으로는 80%의 상동성, 가장 구체적으로는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 따르면, 먼저 배추 유래 신규 내건성 관련 유전자를 동정하기 위해 "*Brassica rapa* EST and Microarray Database"를 활용하여, KBGP-24K oligo chip에서의 1089bp ORF(Open Reading Frame)와 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 상동성을 가지는 cDNA 염기서열(AT1G71695)을 바탕으로 한 쌍의 프라이머를 제작하였다. 이 후, 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. pekinensis inbred line "CT001")에서 총 RNA를 분리하였으며, 상기 확보된 RNA를 주형으로 oligo dT primer와 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤, 상기 실시예 1에서 얻은 프라이머를 이용하여 1089bp의 PCR 산물을 얻었으며, 이를 염기서열 분석용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 재조합 벡터를 구축하였다. 이후, 삽입된 1089bp의 PCR 산물의 유전자 서열을 분석하기 위하여, 삽입된 자리에 근접한 T7 및 SP6 프라이머를 이용하여 염기서열을 조사하였으며, 염기서열 분석은 GenBank BLAST program을 사용하여 분석하였다. 확인된 염기서열을 바탕으로 시작 코돈(codon)과 종료 코돈을 결정하여 아미노산 서열을 결정한 후, 그것을 배추로부터 분리된 전장(full length)의 내건성 유전자 BrDST71(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 71)로 명명하였다.

[0025] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 BrDST71(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 71) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 내건성 증진용 재조합 벡터를 제공한다.

[0026] 본 발명에서 용어 "BrDST71 단백질", "상기 단백질을 코딩하는 유전자" 및 "내건성"은 상기에서 설명한 바와 같다.

[0027] 본 발명에서 용어 "발현 또는 활성을 억제할 수 있는 안티센스 뉴클레오티드"는, 유전자에서 발현되어 생산되는 전사체를 억제할 수 있는 물질로서, 특정 핵산과 상보적으로 결합할 수 있는 뉴클레오티드를 의미한다. 구체적으로, 상기 안티센스 뉴클레오티드는 간섭 RNA(RNAi), 작은 간섭 RNA(siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 및 마이크로 RNA(miRNA)일 수 있다. 보다 구체적으로는, 간섭 RNA(RNAi) 또는 그의 단편일 수 있다.

[0028] 본 발명의 용어 "간섭 RNA(RNA interference)"는, 유전자의 활성을 억제하는 간섭 RNA(RNAi)를 유발시킬 수 있는 이중가닥 RNA를 의미한다. 본 발명에 있어서 상기 간섭 RNA는 BrDST71 유전자의 발현 또는 활성을 억제시키기만 하면 어떠한 형태의 것도 가능하다. 구체적으로 상기 간섭 RNA는 BrDST71의 발현을 억제하는 서열번호 7의 서열일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 상기 용어 "서열번호 7"의 간섭 RNA는 상기 각 단백질을 코딩하는 유전자의 일부에 대하여 이에 제한되지 않으나 구체적으로 약 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 100%의 상동성을 가지는 서열로 구성될 수 있고, 이중가닥 부분을 포함하는 RNA 또는 그의 개변체를 사용할 수도 있다.

[0030] 본 발명에서 용어 "재조합 벡터"는, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물로, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함한 통상의 모든 벡터를 포함한다.

[0031] 상기 재조합 벡터는 BrDST71 유전자가 발현 또는 유전자의 발현이 억제될 수 있도록, 발현조절 서열과 기능적으로 연결될 수 있다. 예를 들어, 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 또한, 벡터는 선택성 마커를 포함할 수 있으며, 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다. 본 발명의 벡터는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

[0032] 상기 본 발명의 BrDST71 유전자를 삽입할 수 있는 벡터로는 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118, pUC119, pET30a, pET30c 및 pGEX-GST), 바실러스 서브틸러스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5), 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 및 Ti 플라스미드 등을 사용할 수 있고, 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 백시니아바이러스와 같은 동물 바이러스, 배큘로바이러스와 같은 곤충 바이러스 및 식물 바이러스가 사용될 수 있으며, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이너리 벡터를 사용할 수 있다. 당업자라면 본 발명의 BrDST71 유전자를 도입시키는데 적합한 벡터를 선택할 수 있으며, 본 발명에서는 상기 유전자를 숙주 세포내로 도입할 수 있는 벡터라면 어떠한 벡터라도 모두 사용할 수 있다. 구체적으로는, 단백질 발현 유도 및 발현된 단백질의 분리가 용이하도록 디자인된 벡터를 사용할 수 있고, 보다 구체적으로는, pGEM-T, pGEX 4T-1, pCAMBIA1300 벡터를 사용할 수 있다.

[0033] 또한, 상기 본 발명의 BrDST71 유전자의 발현을 억제하는 벡터는 상기 BrDST71 유전자를 삽입할 수 있는 벡터에 상기 BrDST71 유전자의 발현을 억제시킬 수 있는 간섭 RNA 절편, siRNA, 또는 miRNA를 삽입하여 제작할 수 있으며, 구체적으로는 간섭 RNA 또는 그의 단편을 사용할 수 있다.

[0034] 본 발명의 상기 재조합 벡터는 내건성을 증진시키는 재조합 벡터일 수 있다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에서는, 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. pekinensis inbred line "CT001")에서 분리된 총 RNA를 주형으로 cDNA를 합성하고, 실시예 1의 프라이머를 이용하여 상기 cDNA로부터 1089bp의 PCR 산물을 획득한 후, 이를 염기서열 분석용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 재조합 벡터를 구축하였다(실시예 1 내지 3). 이후, 상기 삽입된 1089bp의 PCR 산물의 유전자 서열을 분석하여 서열번호 5의 염기서열과 서열번호 6의 아미노산 서열을 결정하여 내건성 관련 유전자 BrDST71로 명명하였다(실험예 3).

[0036] 또한, 본 발명의 일실험예에 따르면, 상기 BrDST71(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 71) 유전자가 건조 스트레와 관련이 있는지를 확인하기 위하여, 분리한 BrDRS71 유전자를 과발현시키기 위한 형질전환용 과발현 재조합 벡터와 상기 유전자를 발현 억제시키기 위한 형질전환용 발현억제 재조합 벡터를 제작하였다. 구체적으로, 상기 유전자를 과발현시키기 위한 형질전환용 재조합 벡터는, pCAMBIA3301(Cambia, Australia)에 1089bp의 BrDST71 유전자를 삽입하여 형질전환용 과발현 벡터인 p71O를 제작하였고, 상기 유전자의 발현을 억제시키기 위한 형질전환용 발현억제 재조합 벡터는, 상기 pCAMBIA3301(Cambia, Australia)를 응용한 벡터에 455bp의 BrDST71 유전자의 RNAi 절편을 삽입하여 형질전환용 발현억제 벡터인 p71D를 제작하였다(실험예 4). 아울러, 이를 대상으로 실제 건조 스트레스를 유발한 결과, BsDRS71 유전자의 발현이 억제된 형질전환체는 모두 건조 스트레스 처리 전과 동일한 모습을 유지하여 표현형상의 뚜렷한 차이를 보이지 않음을 확인하였다(실험예 7).

[0037] 상기의 결과를 통해, BsDRS71 유전자가 식물체의 건조 스트레스에 관여하며, 이 유전자의 발현이 억제되도록 식물체를 형질전환시키는 경우, 식물체의 건조 스트레스 저항성이 증진됨을 확인할 수 있었다.

[0038] 본 발명의 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 재조합 벡터에 의해 형질전환된 식물체를 제공한다.

[0039] 본 발명에서 용어 "재조합 벡터" 및 "식물체"는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0040] 본 발명에서 용어 "형질전환"은, 유전물질인 DNA를 다른 계통의 살아 있는 세포에 주입했을 때, DNA가 그 세포에 들어가 유전형질(遺傳形質)을 변화시키는 현상으로, 형질변환, 형전환, 또는 형변환 이라고도 한다.

[0041] 본 발명에서 상기 벡터로 식물체를 "형질전환"하는 것은 당업자에게 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로는, 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법, 미세사출법(microprojectile bombardment), 일렉트로포레이션(electroporation), PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection), 리포좀 매개법(liposome-mediated method), 인-플란타 형질전환법(In planta transformation), 진공 침윤법(Vacuum infiltration method), 화아침지법(floral meristem dipping method), 및 아그로박테리아 분사법(Agrobacteria spraying method)을 이용할 수 있으며, 더 구체적으로는 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법을 이용할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 용어 "식물체"는, 성숙한 식물체 뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다.

[0043] 본 발명에서 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 또는 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 또는 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 또는 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 또는 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 또는 튤립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 또는 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나이며, 구체적으로는 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 또는 유채를 포함하는 특용작물류이며, 더욱 구체적으로는 담배이나, 이에 제한되지 않는다.

[0044] 본 발명에서 상기 식물체는 BrDST71 유전자 또는 이의 단백질을 발현하므로, 상기 BrDST71에 대한 안티센스 뉴클레오티드를 도입함으로써 식물체에 존재하는 BrDST71의 발현을 억제할 수 있다.

[0045] 본 발명의 일실험예에 따르면, 실험예 5에서 배추의 BrDST71 유전자가 과발현된 담배 및 상기 유전자의 발현이 억제된 담배의 형질전환체를 제작하기 위하여 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*)을 사용하여, 담배의 형질전환체를 제작하였으며, 실험예 6에서 형질전환체로 확인된 과발현 벡터로 생산된 3개체 및 발현억제 벡터로 생산된 5개체를 대상으로, 실제 건조 스트레스 발생 시 표현형의 변화(내건성 여부)를 자연건조 처리 조건에서 관찰한 결과, 건조 처리 16일째가 되었을 때 대조군인 비형질전환체 담배와 BrDST71 유전자가 과발현된 형질전환체 담배는 잎과 줄기의 탄력을 잃어 힘없이 쓰러졌으며, 염색이 점차 연해지고 더 이상 생장하지 못하는 모습을 보였으나, BrDRS71 유전자의 발현이 억제된 형질전환체 5개체는 모두 건조 스트레스 처리 전과 동일한 모습을 유지하여 표현형상의 뚜렷한 차이를 보이지 않음을 확인하여(실험예 7), 상기 BrDST71(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 71) 유전자가 식물체의 건조 스트레스에 관여하며, 이 유전자의 발현이 억제되도록 식물체에 형질전환시킨 경우, 식물체의 건조 스트레스 저항성을 증진시킬 수 있음을 확인하였다.

[0046] 상기의 결과를 통해, 본 발명에 의해 형질전환된 식물체는 건조 스트레스와 관련된 BrDST71 유전자의 세포 내 발현 수준을 억제시킬 수 있어서, 상기 식물체는 지구 온난화 등에 의한 기후조건 변화로 야기된 경작지의 건조 스트레스에 대한 내성이 탁월하여 건조한 경작 조건에 적응성이 뛰어난 신기능 작물로 유용하게 이용될 수 있음을 확인할 수 있다.

[0047] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 7로 이루어진 내건성 증진용 안티센스 뉴클레오티드를 제공한다.

[0048] 상기 용어 "서열번호 7", "내건성", 및 "안티센스 뉴클레오티드"는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0049] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 안티센스 뉴클레오티드를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는 식물체의 내건성을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0050] 상기 용어 "안티센스 뉴클레오티드", "식물체", 및 "내건성"은 상기에서 설명한 바와 같다.

[0051] 본 발명에서 용어 "안티센스 뉴클레오티드를 식물체에 도입하는 단계"는 특정 염기서열을 갖는 폴리뉴클레오티드에 대한 안티센스 뉴클레오티드를 제조한 다음 이를 포함하는 재조합 벡터를 제작하고, 그 재조합 벡터를 이용하여 형질전환시킨 형질전환체를 식물체에 형질전환시키는 단계를 의미한다. 구체적으로 본 발명에서는, pCAMBIA3301(Cambia, Australia)를 응용한 벡터에 455bp의 BrDST71 유전자의 간섭 RNA를 삽입하여 형질전환용 발현억제 재조합 벡터인 p71D를 제작하고(실험예 4), 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*)을 사용하여, 담배의 형질전환체를 제작하여(실험예 5). 상기 재조합 벡터 p71D를 이용하여 생산된 담배 형질전환체들을 대상으로 PCR 검정을 수행하여 형질전환 유무를 확인하였다(실험예 6).

[0052] 본 발명에서 용어 "내건성 향상"은 본 발명에서 정의된 대조군 식물과 비교하여 적어도 5% 또는 10%, 구체적으로는 적어도 20% 또는 40%, 더욱 바람직하게는 50%, 60%, 70% 또는 80% 이상의 내건성을 의미하며, 식물이 원래 가지고 있는 내건성 활성에 비해 상기 유전자의 발현을 억제하여 내건성이 증가되는 것을 의미한다.

[0053] 본 발명에 의하면, 상기 BrDST71 유전자의 발현이 억제되는 경우, 식물체의 내건성이 증가되므로, 식물체의 내건성을 향상시키기 위하여, 전술한 바와 같이 BrDST71 유전자의 발현을 억제하는 형질전환용 발현억제 벡터를 이용하여, 식물체를 형질전환하거나 또는 다른 인위적인 물질의 처리에 의해 상기 유전자의 발현을 억제시켜 식물체의 내건성을 향상시키는 것도 가능하며, 이에 제한되지 않는다.

[0054] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 제조하는 단계, 상기 벡터를 아그로박테리움을 이용하여 식물체에 형질전환하는 단계, 및 상기 형질전환체를 선별하는 단계를 포함하는 형질전환 식물체 제조방법을 제공한다.

[0055] 상기 용어 "재조합 벡터", 및 "식물체", 및 "형질전환"은 상기에서 설명한 바와 같다.

[0056] 본 발명에서 용어 "형질전환체를 선별하는 단계"는, 상기 재조합 벡터를 이용하여 생산된 담배 형질전환체들을

대상으로 형질전환 유무를 확인하여 형질전환이 이뤄진 형질전환체를 분리하는 단계로, 구체적으로는 프라이머 쌍을 이용하여 PCR 검정을 통해 선별하는 것을 의미한다.

[0057] 본 발명에서 일실험예에 따르면, pCAMBIA3301(Cambia, Australia)에 1089bp의 BrDST71 유전자를 삽입하여 형질전환용 과발현 재조합 벡터 p71O를 제작하였고, 상기 pCAMBIA3301(Cambia, Australia)를 응용한 벡터에 455bp의 BrDST71 유전자의 RNAi 단편을 삽입하여 형질전환용 발현억제 재조합 벡터인 p71D를 제작하였으며(실험예 4), 실험예 5에서 배추의 BrDST71 유전자가 과발현된 담배 및 상기 유전자의 발현이 억제된 담배의 형질전환체를 제작하기 위하여 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*)을 사용하여, 담배의 형질전환체를 제작하였다(실험예 5). 또한, 실험예 6에서 상기 형질전환용 과발현 재조합 벡터 p71O 및 형질전환용 발현억제 재조합 벡터인 p71D를 이용하여 생산된 담배 형질전환체들을 대상으로 PCR 검정을 수행하여 형질전환 유무를 확인하였다(실험예 6).

발명의 효과

[0058] 본 발명의 BrDST71(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 71) 단백질 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 안티센스 뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 이용하여 형질전환된 식물체는 지구 온난화 등에 의한 기후조건 변화로 야기된 건조 스트레스에 대한 내성이 탁월하여 건조한 경작 조건에 적응성이 뛰어난 신기능 작물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0059] 도 1은 각 BrDST71-F와 BrDST71-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 BrDST71을 코딩하는 유전자의 단편을 전기영동한 사진이다.

도 2는 각 BrDST71-F와 BrDST71-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 BrDST71을 코딩하는 유전자를 pGEM-T easy vector에 넣은 후 정확한 삽입을 확인하기 위해 EcoRI 효소를 처리하여 확인한 사진이다.

도 3은 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 BrDST71을 코딩하는 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열을 나타낸다.

도 4는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 BrDST71을 코딩하는 유전자의 아미노산 서열을 GenBank BlastX program 분석 및 CLC free workbench 3.2.3 progam을 사용하여 유채(*Brassica napus*), 양배추(*Brassica oleracea* var. oleracea), 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 아미노산 서열과 상동성을 비교한 것이다.

도 5는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 BrDST71 유전자를 코딩하는 유전자를 NCBI Conserved Domain program을 이용하여 분석한 결과이다.

도 6은 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 BrDST71 유전자를 과발현시키는 형질전환용 과발현 벡터(p71O)를 나타낸 그림이다.

도 7은 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 BrDST71 유전자를 억제시키는 형질전환용 발현억제 벡터(p71D)를 나타낸 그림이다.

도 8은 BrDST71 과발현 벡터를 이용하여 생산된 담배 형질전환체의 형질전환 유무를 PCR 검정을 통해 분석한 결과이다.

도 9는 BrDST71 발현억제 벡터를 이용하여 생산된 담배 형질전환체의 형질전환 유무를 PCR 검정을 통해 분석한 결과이다.

도 10은 PCR 검정으로 형질전환이 확인된 담배 형질전환체들을 대상으로 한 건조 스트레스 처리 후 표현형을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한

것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0061] **실시예 1 : 배추 유래 내건성 관련 유전자 조사**

[0062] 배추 유래 신규 내건성 관련 유전자를 동정하기 위해 "*Brassica rapa* EST and Microarray Database"의 정보를 이용하였다. 상기 데이터베이스(database)는 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. pekinensis inbred line "Chiifu")를 3주간 생장상(광도 290μmol?m^{-2}·sec^{-1}, 광주기 명처리 16시간/암처리 8시간, 생육온도 25℃, 생육습도 40 ~ 70%)에서 재배하고, 건조 스트레스를 48시간동안 처리한 후, 처리 시간별로 총 RNA를 추출하고 KBGP-24K oligo chip을 이용한 각 유전자들의 발현 변화를 비교·분석한 정보들을 제공한다.

[0063] 본 발명자들은 "*Brassica rapa* EST and Microarray Database"를 활용하여, 건조 스트레스 처리시 반응하는 유전자들 중 발현이 강하게 변화한 유전자들을 분류하고, 완전장을 갖추고 있으며 기능이 알려지지 않은 대상유전자 중에서 선정하였다.

[0064] 배추에서 신규 내건성 관련 유전자를 동정하기 위해, KBGP-24K oligo chip에서의 1089bp ORF(Open Reading Frame)와 애기장대(Arabidopsis thaliana)에서 상동성을 가지는 cDNA 염기서열(AT1G71695)을 바탕으로 한 쌍의 프라이머를 제작하였고, 그 서열을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0065]

프라이머	염기서열
BrDST71-F (서열번호 1)	5'-ATG GGT AAG GAT TTA TCC AGA CGT G-3'
BrDST71-R (서열번호 2)	5'-CTA GAT CAT GGA AAG AGC CTC CTC-3'

[0066] **실시예 2 : 배추로부터 RNA 분리**

[0067] 본 발명에 사용된 내혼계 배추(*Brassica rapa* ssp. pekinensis inbred line 'CT001')는 기내의 무균상태에서 키운 것에서 샘플을 채취하여 RNA 분리에 사용하였다. 배추(*Brassica rapa* ssp. pekinensis)의 잎을 액체 질소를 이용하여 파쇄하고, 1 ㎖ 트리졸(Trizol, Gibco BRL) 용액을 첨가하여 잘 섞어준 후, 5분 동안 상온에서 방치하였다. 200 ㎕의 클로로포름(chloroform)을 넣고 섞어준 다음, 4℃에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하고, 그 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 이소프로페놀(isopropanol) 500㎕를 넣고 13,000rpm으로 15분간 원심분리하여 침전시킨 뒤, 이소프로페놀을 제거하고 침전물을 75% 에탄올로 세척하였다. 그 다음, 에탄올이 없도록 잘 건조시키고, DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리된 멸균 증류수에 녹여 사용하였다.

[0068] **실시예 3 : 내건성 관련 유전자인 BrDST71(*Brassica rapa* Drought Stress Tolerance 71) 유전자의 분리 및 재조합 벡터 제조**

[0069] 내건성 관련 유전자 BrDST71 유전자의 분리는 상기 확보된 RNA를 주형으로 oligo dT 프라이머(primer)와 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤, 상기 [표 1]에 작성된 프라이머로 RT-PCR을 수행하여 분리하였다.

[0070] 먼저, cDNA를 합성하기 위하여, 1㎍의 RNA를 oligo dT primer를 첨가하고 70℃에 보관하여 RNA 이차구조를 제거한 뒤, 45℃에서 30분간 역전사시키고, 사용된 역전사효소를 불활성화시키기 위해 94℃에서 5분간 보관하였다. 그 후 합성된 cDNA 1㎍을 사용하여 상기 표 1의 프라이머와 태그 중합효소(Taq polymerase)로 PCR 하였다. PCR 프로그램은 94℃에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 40회 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후, 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

[0071] 도 1은 각 BrDST71-F와 BrDST71-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 BrDST71을 코딩하는

유전자의 단편을 전기영동한 사진이다. 실험결과 증폭된 내건성 관련 유전자 BrDST71의 단편을 전기영동을 통해 확인하였다(도 1). 그 결과, 1089bp에 해당하는 PCR 산물을 확인할 수 있었다.

[0072] 이후, 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머들로 증폭된 단편의 염기서열을 분석하기 위해 염기서열 분석용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 재조합 벡터를 구축하였다.

[0073] **실험예 1. 재조합 벡터를 이용한 E. coli DH10β의 형질전환**

[0074] 대장균 DH10β를 LB 50㎖에 접종시켜 37℃에서 OD570 = 0.375 ~ 0.400이 되도록 배양한 후, 균주배양액을 3,000rpm에서 10분간 원심분리 하였고, 얻어진 침전물을 0.1M CaCl2 용액으로 풀어준 뒤 30분간 얼음에 보관하였다. 그 후, 3,000rpm에서 7분간 원심분리한 뒤 0.1M CaCl2에 침전물을 녹이고, 상기 실시예 3의 재조합 벡터를 함께 섞어 얼음에 30분간 두었다가 42℃에서 90초간 열 충격을 주었다. 이 후, 10분간 얼음에 방치한 후, LB 배지 700㎕를 첨가하여 37℃에서 1시간 진탕배양 하였다. 배양액을 12,000rpm으로 수 초간 원심분리한 후, 100㎕만 남기고, 상등액을 제거하였으며, 남은 상등액으로 침전물을 녹였다. 이후 앰피실린(ampicillin, 50 mg/ℓ), X-gal(200 mg/ℓ in N-N dimethylformamide) 및 IPTG (200 mg/ℓ)가 첨가된 고체 LB 배지에 녹인 침전물을 전개하고, 37℃에서 12시간 배양한 후 고체 배지에서 저항성을 보이며 흰색의 콜로니를 형성하는 형질전환 콜로니를 선발하였다.

[0075] **실험예 2 : 재조합 DNA 분리 및 유전자 삽입 여부 조사**

[0076] 항생제가 첨가된 LB 배지 3㎖에 상기 선발한 형질전환 콜로니를 접종한 후 37℃에서 12시간 배양하고, 배양액을 4℃에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 침전된 균 덩어리에 Solution I(200㎕/㎖)을 첨가하여 보텍스(vortex)를 수초 간 수행하여 충분히 풀어준 후, Solution Ⅱ(200㎕/㎖)를 첨가하여 조심스럽게 섞어주어 세포막이 완전히 깨어지도록 실온에서 5분간 방치하였다. 이 후 Solution Ⅲ(200 ㎕/㎖)를 첨가하여 잘 섞어주고, 얼음에서 10분간 방치한 뒤, 12,000rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 획득하였다. 획득한 상등액의 1/10 양의 NaOAc와 2.5배의 100% 에탄올을 첨가하여 -20℃에서 2시간 동안 재조합 DNA를 침전시킨 후, 원심분리하여 침전물을 얻었다. 70% 에탄올로 침전물을 세척한 다음 멸균 증류수에 녹여 사용하였다.

[0077] 배추로부터 증폭된 내건성 관련 유전자 BrDST71의 pGEM-T easy vector 내로의 삽입 여부를 확인하기 위해서 제한효소 EcoRI을 상기 분리한 재조합 DNA에 처리하여 확인하였다(도 2). 도 2는 각 BrDST71-F와 BrDST71-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 BrDST71을 코딩하는 유전자를 pGEM-T easy vector에 넣은 후 정확한 삽입을 확인하기 위해 EcoRI 효소를 처리하여 확인한 사진이다. 그 결과, EcoRI 처리에 의해 1089bp의 삽입된 유전자와 pGEM-T easy vector로 두 개의 단편으로 분리되어, pGEM-T easy vector에 유전자가 삽입된 것을 확인할 수 있었다.

[0078] **실험예 3. 내건성 관련 유전자 BrDST71의 전체 서열 확인**

[0079] 다음으로, 상기 1089bp의 삽입된 유전자의 염기서열을 확인하기 위하여, 삽입된 자리에 근접한 T7 및 SP6 프라이머를 이용하여 염기서열을 조사하였다. 염기서열 분석용 pGEM-T easy vector 내부에 클로닝 된 PCR 단편의 염기서열 분석은 GenBank BLAST program을 사용하여 이루어졌다.

[0080] 도 3은 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 BrDST71을 코딩하는 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열 결과이다. 확인된 염기서열(서열번호 5)을 바탕으로 시작 코돈(codon)과 종료 코돈을 결정하여 아미노산 서열(서열번호 6)을 결정한 후, 그것이 배추로부터 분리된 전장(full length)의 내건성 관련 유전자 BrDST71(*Brassica rapa Drought* Stress Tolerance 71)로 명명하였다(도 3).

[0081] BrDST71-F(서열번호 1)와 BrDST71-R(서열번호 2) 프라이머 쌍으로 증폭된 1089bp 산물의 염기서열과 아미노산

서열을 GenBank BlastX program 및 CLC viewer 7을 사용하여 분석한 결과, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), 양배추 (*Brassica oleracea* var. oleracea), 또는 유채(*Brassica napus*) 시퀀스와 높은 상동성을 보임을 확인할 수 있었으며(도 4), NCBI Conserved Domain program을 이용하여 분리한 유전자에 secretory peroxidase 도메인 (secretory peroxidase domain)이 있는 것을 확인하였고 E-value가 5.67e-175로 그 정확도가 높음을 확인하였다(도 5).

[0082] **실험예 4. BrDST71 유전자의 형질전환용 재조합 벡터 제작**

[0083] 분리한 BrDST71 유전자를 과발현(over-expression) 시키기 위하여 pCAMBIA3301 (Cambia, Australia)에 1089bp의 BrDST71 유전자를 삽입하여 형질전환용 벡터인 p710를 제작하였다(도 6). 또한, BrDST71 유전자를 발현억제(down-regulation) 시키기 위하여 pCAMBIA3301를 응용한 발현억제 벡터에 455bp의 BrDST71의 간섭 RNA(RNAi) 단편을 삽입하여 형질전환용 발현억제 벡터인 p71D를 제작하였다(도 7). 도 6 및 도 7은 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 BrDST71 유전자를 과발현시키는 형질전환용 과발현 벡터(p710)와 BrDST71 유전자를 억제시키는 형질전환용 발현억제 벡터(p71D)를 나타낸다.

[0084] **실험예 5: BrDST71 유전자가 형질전환된 담배 제작**

[0085] 배추의 BrDST71 유전자가 과발현 또는 발현억제된 담배 형질전환체를 작성하기 위하여 "아그로박테리움에 의한 효율적인 배추의 형질전환방법(특허 등록 제0523758호, 2005.10.31.)"을 변형하여 실시하였다. 세부 형질전환 방법은 하기와 같다.

[0086] 1. 형질전환용 운반체(p710 또는 p71D)를 함유하고 있는 아그로박테리움 투마파시엔의 배양

[0087] 담배에 접종하는 형질전환 매개체로는 식물형질전환용 벡터 p710 또는 p71D을 함유하고 있는 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404/p710 또는 LBA4404/p71D을 사용하였다. 이하에서 아그로박테리움 투마파시엔이라 함은 상기 아그로박테리움 투마파시엔 LBA4404/p710 또는 LBA4404/p71D을 말한다.

[0088] 담배의 잎을 아그로박테리움 투마파시엔으로 접종시킬 때 형질전환의 효율을 높이기 위해, 먼저 형질전환용 운반체(p710 또는 p71D)를 함유하고 있는 아그로박테리움 투마파시엔(Agrobacterium tumefaciens LBA4404/p710 또는 LBA4404/p71D)을 카나마이신 (kanamycin) 50 mg/L가 함유된 고체 YEP 배지에 평판배양하여 28℃에서 48시간 배양하였고, 배양된 아그로박테리움 투마파시엔 세포 중 몇몇 콜로니(colony)를 찍어 카나마이신 50 mg/L가 함유된 5 mL 액체 YEP 배지에 접종하여 28℃에서 48시간 현탁배양 하였다. 배양된 현탁에서 700㎕를 추출한 다음, 0.02 mM Acetosyringone이 첨가되고 pH가 5.6으로 조정된 50ml 액체 YEP 배지에 첨가하여 28℃에서 OD600이 1.0이 될 때까지 현탁배양하였다. 마지막으로 배양된 현탁액은 원심분리기에서 4000rpm으로 15분간 원심분리시켜 25ml 액체 YEP 배지로 재현탁 되어 담배 잎의 접종에 사용되었다.

[0089] 2. 담배 형질전환 및 슈트 유도

[0090] 담배[Nicotiana tabacum 'SR1']를 무균상태에서 생육시킨 뒤 잎을 가로·세로 10 ㎜로 자르고, 제작된 아그로박테리움 투마파시엔 현탁액에 1분간 침지시켜 접종하였다. 접종된 잎 절편은 공동배양배지(MS기본배지, 3% sucrose, 0.8% plant agar, 1.5 mg/L BA, pH 5.7)에서 3일간 공동배양하였다. 이 후 잎 절편을 액체 공동배양배지로 세척하여 아그로박테리움 투마파시엔을 씻어낸 후 슈트 유도배지(MS기본배지, 3% sucrose, 0.8% plant agar, 1.5 mg/L BA, 200 mg/L cefotaxime, pH 5.7)에 형질전환된 담배 잎 절편을 배양하여 형질전환된 조직에서만 슈트가 유도되도록 하였다.

[0091] 3. 뿌리 유도

[0092] 유도된 형질전환 슈트를 절단하여 뿌리 유도배지(1/2 MS기본배지, 3% sucrose, 0.8% plant agar, 200 mg/L cefotaxime, pH 5.8)로 옮겨 뿌리 발생을 유도하였다. 뿌리가 생성된 담배 형질전환체는 멸균된 질석에 이식하여 순화시켰고 이후 화분에 이식하여 온실에서 재배하였다.

[0093] **실험예 6. PCR 검정을 통한 형질전환체 선발**

[0094] 상기와 같이 p71O 또는 p71D 벡터를 이용하여 형질전환된 담배 형질전환체들을 대상으로 형질전환 유무를 확인하기 위하여, PCR 검정을 수행하였다.

[0095] PPT 저항성 유전자(bar gene)를 대상으로 PCR 검정을 수행하여 p71O 벡터를 이용하여 생산된 3개체와 p71D 벡터를 이용하여 생산된 5개체 모두 형질전환체로 확인되었다(도 8 및 도 9). PCR 프로그램은 94℃에서 5분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 40초로 35 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다. PCR 검정을 위해 사용된 프라이머인 bar-F(서열정보 3)와 bar-R(서열정보 4)의 염기서열은 [표 2]와 같다.

표 2

[0096]

프라이머	염기서열
bar-F (서열번호 3)	5’-GTA GAG CGT GGA GCC CAG T-3’
bar-R (서열번호 4)	5’-TAC CAT GAG CCC AGA ACG AC-3’

[0097] **실험예 7. 건조 스트레스 발행 시 담배 형질전환체들의 내건성 검정**

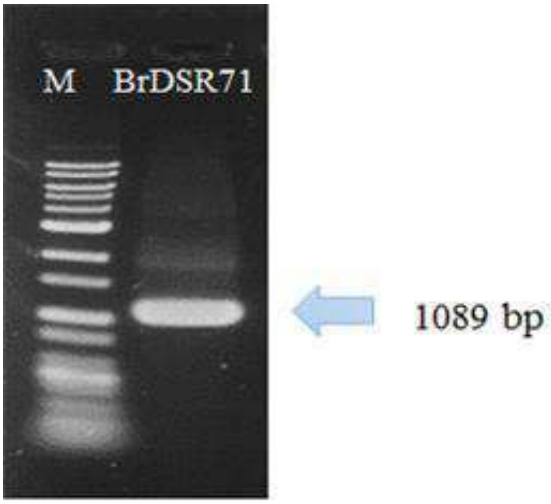
[0098] PPT 저항성 유전자를 이용한 PCR 검정으로 형질전환이 확인된 형질전환체를 대상으로 실제 건조스트레스 발생 시 표현형의 변화(내건성 여부)를 관찰하였다. 건조처리는 본엽이 4 ~ 6매가 된 비형질전환체와 형질전환체를 대상으로 온실에서 진행되었고, 표현형적으로 명확한 차이를 보이는 시기(생장 멈춤, 엽색 변화, 도복 여부)까지 실시하였다.

[0099] 도 10은 내건성을 보이는 담배 형질전환체들을 대상으로 한 건조 스트레스 처리 후 표현형을 분석한 결과이다. 그 결과, 건조처리 16일째가 되었을 때 대조군인 비형질전환체 담배와 BrDST71 유전자의 발현이 증가한 형질전환체는 잎과 줄기의 탄력을 잃고 힘없이 쓰러졌으며, 엽색이 점차 연해지고 더 이상 생장하지 못하는 모습을 보인 반면, BrDST71 유전자의 발현이 억제된 형질전환된 5개체는 모두 건조처리 전과 동일한 모습으로서 표현형상의 차이를 보여 주지 않았다(도 10).

[0100] 상기와 같은 결과를 통해, BrDST71을 발현하는 모든 식물체에서, BrDST71의 발현을 인위적으로 억제하게 되면 해당 식물체는 건조 스트레스에 저항성을 가진다는 것을 확인할 수 있다.

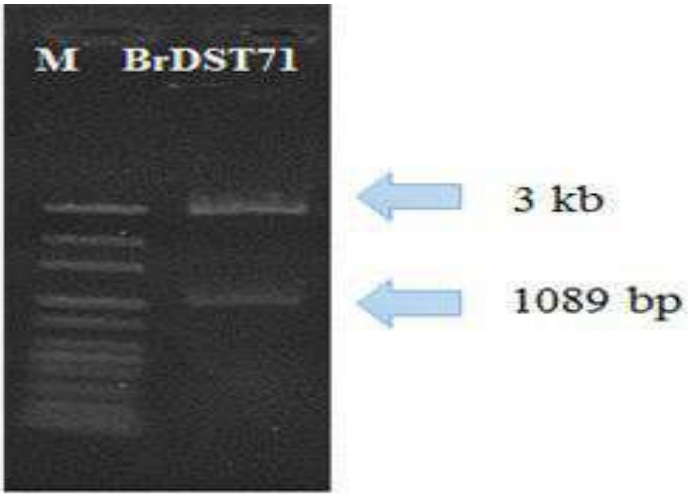
도면

도면1



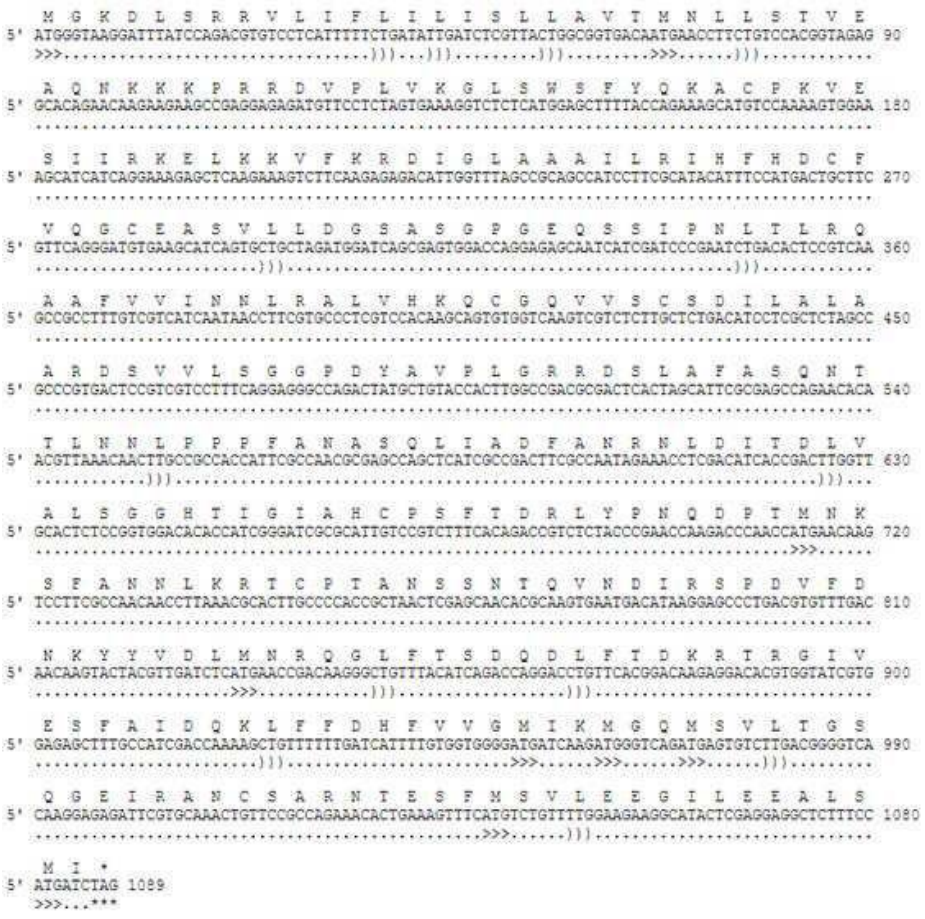
[주] M, 1Kb size 분자마커

도면2

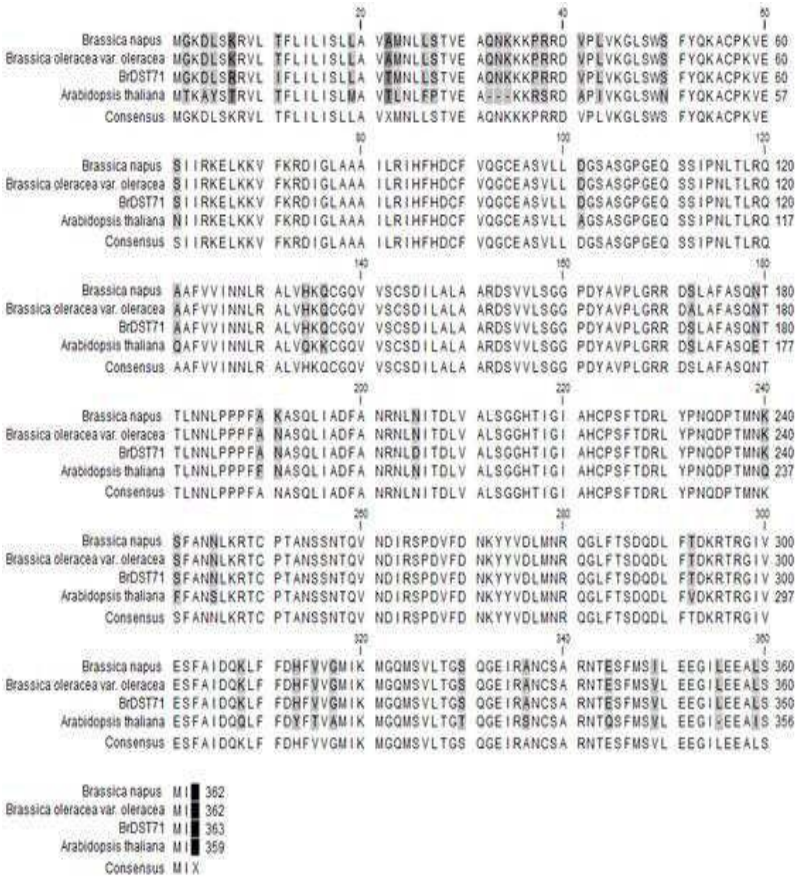


[주] M, 1Kb size 분자마커

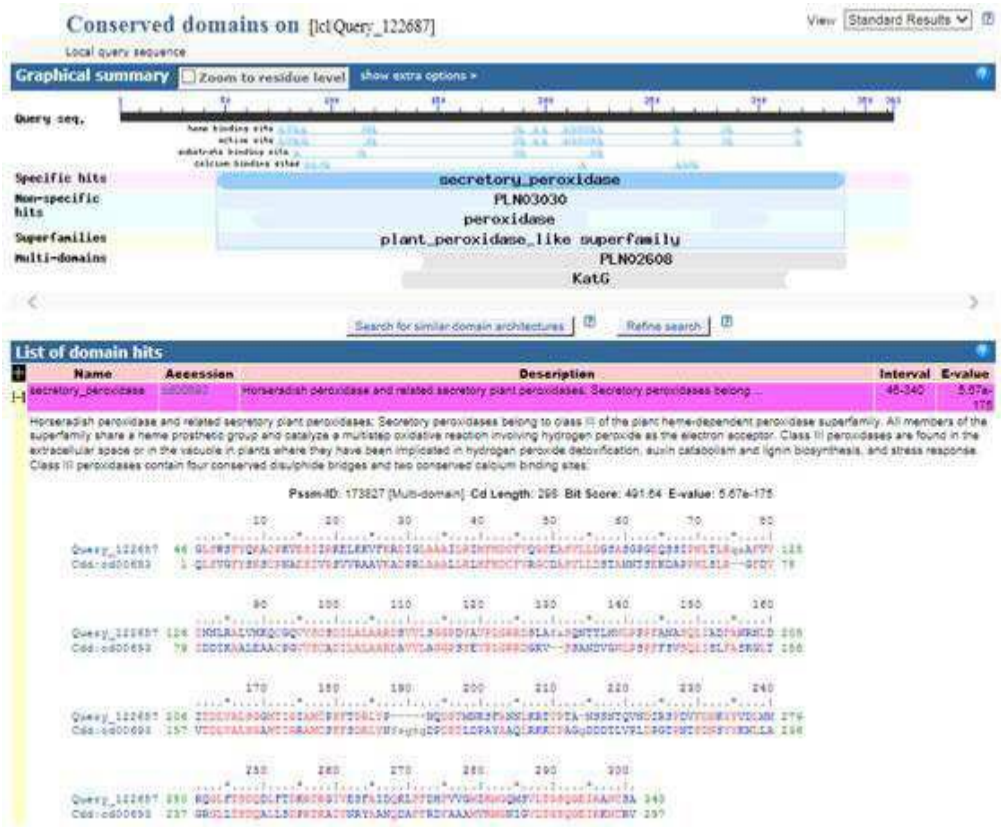
도면3


M G K D L S R R V L I F L I L I S L L A V T M N L L S T V E
5' ATGGGTAAGGATTTATCCAGACGTGTCCTCATTTTTCTGATATTGATCTCGTTACTGGCGGTGACAATGAACCTTCTGTCCACGGTAGAG 90
A Q N K K K P R R D V P L V K G L S W S F Y Q K A C P K V E
5' GCACAGAACAAGAAGAAGCCGAGGAGAGATGTTCCTCTAGTGAAAGGTCTCTCATGGAGCTTTTACCAGAAAGCATGTCCAAAAGTGGAA 180
S I I R K E L K K V F K R D I G L A A A I L R I H F H D C F
5' AGCATCATCAGGAAAGAGCTCAAGAAAGTCTTCAAGAGAGACATTGGTTTAGCCGCAGCCATCCTTCGCATACATTTCCATGACTGCTTC 270
V Q G C E A S V L L D G S A S G P G E Q S S I P N L T L R Q
5' GTTCAGGGATGTGAAGCATCAGTGCTGCTAGATGGATCAGCGAGTGGACCAGGAGAGCAATCATCGATCCCGAATCTGACACTCCGTCAA 360
A A F V V I N N L R A L V H K Q C G Q V V S C S D I L A L A
5' GCCGCCTTTGTCGTCATCAATAACCTTCGTGCCCTCGTCCACAAGCAGTGTGGTCAAGTCGTCTCTTGCTCTGACATCCTCGCTCTAGCC 450
A R D S V V L S G G P D Y A V P L G R R D S L A F A S Q N T
5' GCCCGTGACTCCGTCGTCCTTTCAGGAGGGCCAGACTATGCTGTACCACTTGGCCGACGCGACTCACTAGCATTCGCGAGCCAGAACACA 540
T L N N L P P P F A N A S Q L I A D F A N R N L D I T D L V
5' ACGTTAAACAACTTGCCGCCACCATTCGCCAACGCGAGCCAGCTCATCGCCGACTTCGCCAATAGAAACCTCGACATCACCGACTTGGTT 630
A L S G G H T I G I A H C P S F T D R L Y P N Q D P T M N K
5' GCACTCTCCGGTGGACACACCATCGGGATCGCGCATTGTCCGTCTTTCACAGACCGTCTCTACCCGAACCAAGACCCAACCATGAACAAG 720
S F A N N L K R T C P T A N S S N T Q V N D I R S P D V F D
5' TCCTTCGCCAACAACCTTAAACGCACTTGCCCCACCGCTAACTCGAGCAACACGCAAGTGAATGACATAAGGAGCCCTGACGTGTTTGAC 810
N K Y Y V D L M N R Q G L F T S D Q D L F T D K R T R G I V
5' AACAAGTACTACGTTGATCTCATGAACCGACAAGGGCTGTTTACATCAGACCAGGACCTGTTCACGGACAAGAGGACACGTGGTATCGTG 900
E S F A I D Q K L F F D H F V V G M I K M G Q M S V L T G S
5' GAGAGCTTTGCCATCGACCAAAAGCTGTTTTTTGATCATTTTGTGGTGGGGATGATCAAGATGGGTCAGATGAGTGTCTTGACGGGGTCA 990
Q G E I R A N C S A R N T E S F M S V L E E G I L E E A L S
5' CAAGGAGAGATTCGTGCAAACTGTTCCGCCAGAAACACTGAAAGTTTCATGTCTGTTTTGGAAGAAGGCATACTCGAGGAGGCTCTTTCC 1080
M I *
5' ATGATCTAG 1089

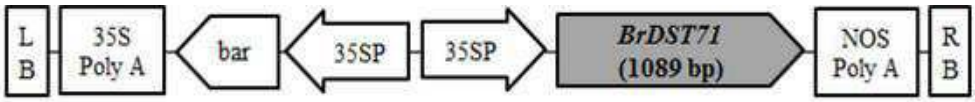
도면4


Brassica napus
Brassica oleracea var. oleracea
BrDST71
Arabidopsis thaliana
Consensus

도면5


Conserved domains on [lcl|Query_122687]
Graphical summary
Specific hits
Non-specific hits
Superfamilies
Multi-domains
secretory_peroxidase
PLN03030
peroxidase
plant_peroxidase_like superfamily
PLN02608
KatG
List of domain hits
Name
Accession
Description
Interval
E-value

도면6



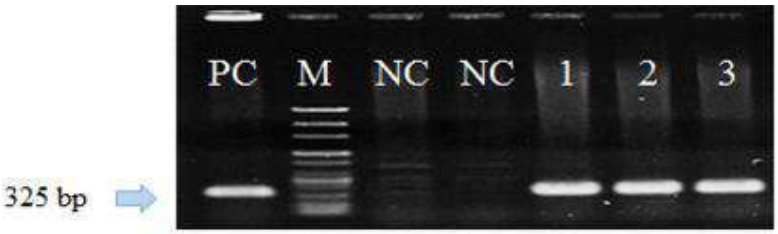
[주] LB, left border
35S Poly A, Cauliflower mosaic virus 35S terminator
bar, PPT resistance gene
35SP, Cauliflower mosaic virus 35S promoter
NOS Poly A, nopaline synthase terminator
RB, right border

도면7



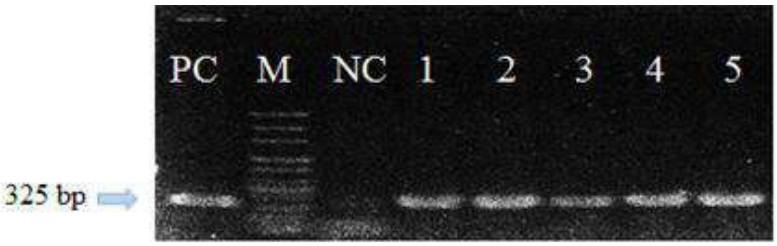
[주] LB, left border
35S Poly A, Cauliflower mosaic virus 35S terminator
bar, PPT resistance gene
35SP, Cauliflower mosaic virus 35S promoter
sense, sense fragment of BrDST71
antisense, antisense fragment of BrDST71
RB, right border

도면8



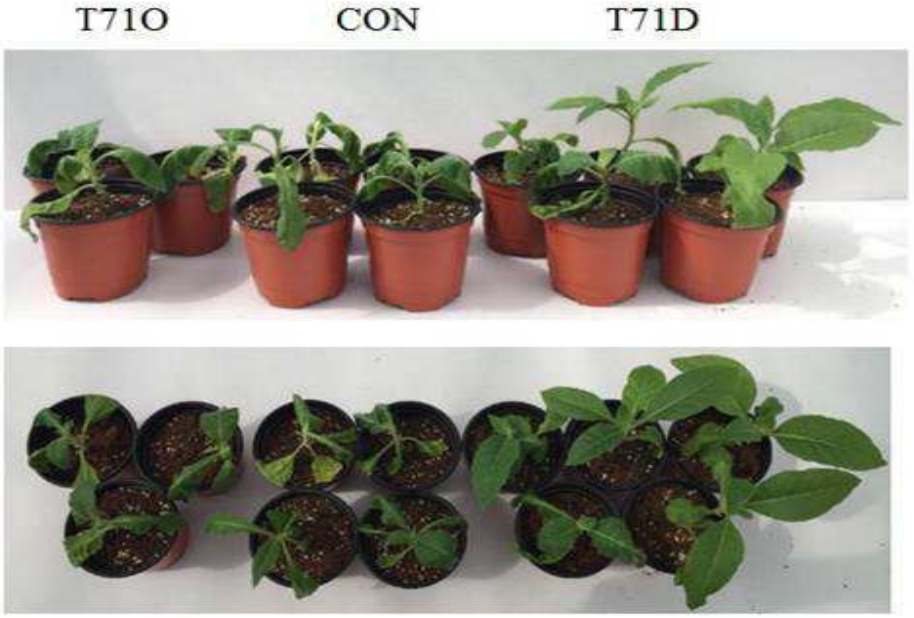
[주] PC, PPT 저항성 유전자
M, 100bp size 분자마커
NC, 비형질전환체
1~3, BrDST71 유전자가 과발현된 담배 형질전환체

도면9



[주] PC, PPT 저항성 유전자
M, 100bp size 분자마커
NC, 비형질전환체
1~5, BrDST71 유전자가 발현억제된 담배 형질전환체

도면10



[주] CON, 비형질전환체
T71O, BrDST71 유전자가 과발현된 담배 형질전환체
T71D, BrDST71 유전자가 발현억제된 담배 형질전환체

서 열 목 록

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

<120> BrDST71 Protein Implicated in Drought Stress Tolerance, Gene Encoding Thereof Protein and Recombinant Vector for enhancing Drought Stress Tolerance Comprising Antisense Nucleotide

Suppressing the Expression or Activity of Thereof

<130> KPA151142-KR

<160> 7

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer_BrDST71-F

<400> 1

atgggtaagg atttatccag acgtg 25

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer_BrDST71-R

<400> 2

ctagatcatg gaaagagcct cctc 24

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer_bar-F

<400> 3

gtagagcgtg gagcccagt 19

<210> 4

<211> 20

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer_bar-R

<400> 4

taccatgagc ccagaacgac 20

<210> 5

<211> 1089

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 5

atgggtaagg atttatccag acgtgtcctc atttttctga tattgatctc gttactggcg 60

gtgacaatga accttctgtc cacggtagag gcacagaaca agaagaagcc gaggagagat 120

gttcctctag tgaaaggtct ctcatggagc ttttaccaga aagcatgtcc aaaagtggaa 180

agcatcatca ggaaagagct caagaaagtc ttcaagagag acattggttt agccgcagcc 240

atccttcgca tacatttcca tgactgcttc gttcagggat gtgaagcatc agtgctgcta 300

gatggatcag cgagtggacc aggagagcaa tcatcgatcc cgaatctgac actccgtcaa 360

gccgcctttg tcgtcatcaa taaccttcgt gccctcgtcc acaagcagtg tggtcaagtc 420

gtctcttgct ctgacatcct cgctctagcc gcccgtgact ccgtcgtcct ttcaggaggg 480

ccagactatg ctgtaccact tggccgacgc gactcactag cattcgcgag ccagaacaca 540

acgttaaaca acttgccgcc accattcgcc aacgcgagcc agctcatcgc cgacttcgcc 600

aatagaaacc tcgacatcac cgacttggtt gcactctccg gtggacacac catcgggatc 660

gcgcattgtc cgtctttcac agaccgtctc tacccgaacc aagacccaac catgaacaag 720

tccttcgcca acaaccttaa acgcacttgc cccaccgcta actcgagcaa cacgcaagtg 780

aatgacataa ggagccctga cgtgtttgac aacaagtact acgttgatct catgaaccga 840

caagggctgt ttacatcaga ccaggacctg ttcacggaca agaggacacg tggtatcgtg 900

gagagctttg ccatcgacca aaagctgttt tttgatcatt ttgtggtggg gatgatcaag 960

atgggtcaga tgagtgtctt gacggggtca caaggagaga ttcgtgcaaa ctgttccgcc 1020

agaaacactg aaagtttcat gtctgttttg gaagaaggca tactcgagga ggctctttcc 1080

atgatctag 1089

<210> 6

<211> 362

<212> PRT

<213> Brassica rapa

<400> 6

Met Gly Lys Asp Leu Ser Arg Arg Val Leu Ile Phe Leu Ile Leu Ile

1 5 10 15

Ser Leu Leu Ala Val Thr Met Asn Leu Leu Ser Thr Val Glu Ala Gln

20 25 30

```
Asn Lys Lys Lys Pro Arg Arg Asp Val Pro Leu Val Lys Gly Leu Ser
          35                  40                  45

Trp Ser Phe Tyr Gln Lys Ala Cys Pro Lys Val Glu Ser Ile Ile Arg
      50                  55                  60
Lys Glu Leu Lys Lys Val Phe Lys Arg Asp Ile Gly Leu Ala Ala Ala
 65                  70                  75                  80
Ile Leu Arg Ile His Phe His Asp Cys Phe Val Gln Gly Cys Glu Ala
                 85                  90                  95
Ser Val Leu Leu Asp Gly Ser Ala Ser Gly Pro Gly Glu Gln Ser Ser
            100                 105                 110
Ile Pro Asn Leu Thr Leu Arg Gln Ala Ala Phe Val Val Ile Asn Asn

        115                 120                 125
Leu Arg Ala Leu Val His Lys Gln Cys Gly Gln Val Val Ser Cys Ser
    130                 135                 140
Asp Ile Leu Ala Leu Ala Ala Arg Asp Ser Val Val Leu Ser Gly Gly
145                 150                 155                 160
Pro Asp Tyr Ala Val Pro Leu Gly Arg Arg Asp Ser Leu Ala Phe Ala
                165                 170                 175
Ser Gln Asn Thr Thr Leu Asn Asn Leu Pro Pro Pro Phe Ala Asn Ala
            180                 185                 190

Ser Gln Leu Ile Ala Asp Phe Ala Asn Arg Asn Leu Asp Ile Thr Asp
        195                 200                 205
Leu Val Ala Leu Ser Gly Gly His Thr Ile Gly Ile Ala His Cys Pro
    210                 215                 220
Ser Phe Thr Asp Arg Leu Tyr Pro Asn Gln Asp Pro Thr Met Asn Lys
225                 230                 235                 240
Ser Phe Ala Asn Asn Leu Lys Arg Thr Cys Pro Thr Ala Asn Ser Ser
                245                 250                 255
Asn Thr Gln Val Asn Asp Ile Arg Ser Pro Asp Val Phe Asp Asn Lys

            260                 265                 270
Tyr Tyr Val Asp Leu Met Asn Arg Gln Gly Leu Phe Thr Ser Asp Gln
```

275 280 285

Asp Leu Phe Thr Asp Lys Arg Thr Arg Gly Ile Val Glu Ser Phe Ala

290 295 300

Ile Asp Gln Lys Leu Phe Phe Asp His Phe Val Val Gly Met Ile Lys

305 310 315 320

Met Gly Gln Met Ser Val Leu Thr Gly Ser Gln Gly Glu Ile Arg Ala

325 330 335

Asn Cys Ser Ala Arg Asn Thr Glu Ser Phe Met Ser Val Leu Glu Glu

340 345 350

Gly Ile Leu Glu Glu Ala Leu Ser Met Ile

355 360

<210> 7

<211> 455

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense nucleotide

<400> 7

gcaatcatcg atcccgaatc tgacactccg tcaagccgcc tttgacgtca tcaataacct 60

tcgtgccctc ctccacaagc agtgtggtca agtcgtctct tgctctgaca tcctcgctct 120

agccgcccgt gactccgtcg tcctttcagg agggccagac tatgctgtac cacttggccg 180

acgcgactca ctagcattcg cgagccagaa cacaacgtta aacaacttgc cgccaccatt 240

cgccaacgcg agccagctca tcgccgactt cgccaataga aacctcgaca tcaccgactt 300

ggttgcactc tccggtggac acaccatcgg gatcgcgcat tgtccgtctt tcgcagaccg 360

tctctacccg aaccaagacc caaccatgaa caagtccttc gccaacgacc ttaaacgcac 420

ttgccccacc gctaactcga gcaacacgca agtga 455