(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0133476
(43) 공개일자 2023년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *A01H 5/10* (2018.01)
A01H 6/46 (2018.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8234 (2013.01)
A01H 5/10 (2022.05)
(21) 출원번호 10-2022-0030526
(22) 출원일자 2022년03월11일
심사청구일자 2022년03월11일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
하선화
경기도 수원시 영통구 광교호수공원로 277, 101동 1703호(원천동, 광교중흥에스클래스)
유지수
전라북도 군산시 문화로 208-8, 104동 408호(미장동, 파인빌아파트)
이여진
경기도 성남시 수정구 희망로 472, 1동 1304호(단대동, 미도아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

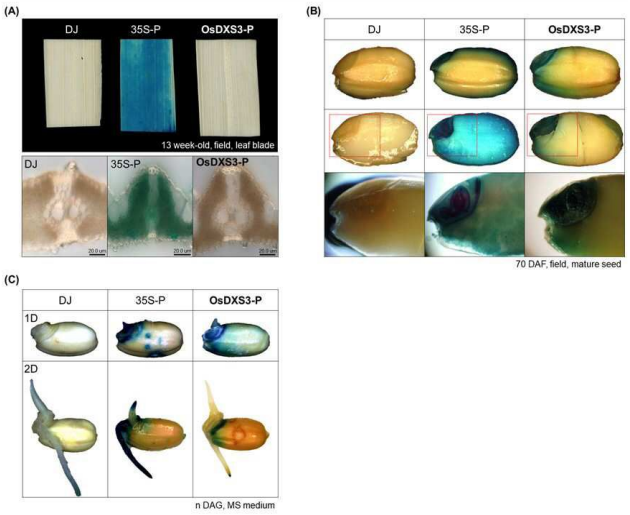
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **식물 종자의 배아 특이적 OsDXS3 프로모터 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 식물 종자의 배아 특이적 OsDXS3 프로모터 및 이의 용도에 대한 것으로, 식물 종자에서 배아 특이적(embryo specific) 발현을 위한 OsDXS3(*Oryza sativa* 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 3) 프로모터를 개발함으로써 상기 OsDXS3 프로모터를 배아 특이적 발현을 목적으로 하는 유용 유전자 발현용 프로모터 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 식물 종자 배아 특이적 프로모터는 외래 유전자를 식물 종자의 배아에서 특이적으로 발현시켜 종자 내에서 목적 유전자의 기능 분석에 이용할 수 있고, 이를 토대로 황금쌀(golden rice), 거대 배아미(giant embryo)와 같은 기능성 종자를 개발하는 데에 활용할 수 있다. 또한, 종자의 발아 또는 휴면과 관련된 유전자의 기능 분석과 이와 관련된 배아의 형태 및 농업적 형질을 개량한 형질전환 작물의 개발 시 상기 프로모터를 유용하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A01H 6/4636 (2022.05)
C12N 15/8267 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395067453
과제번호	PJ015671012021
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린연계농생명혁신기술개발(R&D)
연구과제명	시스템 대사공학 기반 구축을 통한 다중모듈 적용 기능성 터펜 생산 식물 소재 개발(1주관)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진, 식물 종자의 배아(embryo) 특이적인 발현을 유도하는 OsDXS3(*Oryza sativa* 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 3) 프로모터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 프로모터는 벼(*Oryza sativa*)로부터 분리된 것을 특징으로 하는 OsDXS3 프로모터.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 식물은 벼(*Oryza sativa*)인 것을 특징으로 하는 OsDXS3 프로모터.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 OsDXS3 프로모터를 포함하는, 식물 종자의 배아 특이적 발현용 재조합 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 상기 OsDXS3 프로모터 및 발현 목적 유전자가 작동 가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 식물 종자의 배아 특이적 발현용 재조합 벡터.

청구항 6

제4항의 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체.

청구항 7

제6항의 형질전환 식물체로부터 수득한 형질전환된 종자.

청구항 8

서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 OsDXS3 프로모터 및 이와 작동 가능하게 연결된 발현 목적 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및

상기 제조된 재조합 벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하는, 발현 목적 유전자를 형질전환 식물체의 배아에서 특이적으로 발현시키는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 식물체는 벼(*Oryza sativa*)인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 식물 종자의 배아 특이적 OsDXS3 프로모터 및 이의 용도에 대한 것으로, 식물 종자에서 배아 특이적(embryo specific) 발현을 위한 OsDXS3(*Oryza sativa* 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 3) 프로모터를 개발함으로써 상기 OsDXS3 프로모터를 배아 특이적 발현을 목적으로 하는 유용 유전자 발현용 프로모터 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전신 발현뿐만 아니라 다양한 목적에 따라 식물의 특정 조직에서 목적 유전자를 조직 특이적으로 발현을 유도하기 위한 프로모터들도 개발되고 있다. 대표적인 예로 종자 특이 프로모터로 황금쌀(golden rice) 개발을 비롯하

여 단자엽 식물에 종자 특이적 발현을 유도하는 경우는 벼의 글루테린(gluterin) 프로모터가 현재까지 많이 사용되고 있다. 그러나 상기 종자 특이 프로모터는 종자 배유 특이 프로모터로서 배유(endosperm) 특이적으로 목적 유전자를 발현시킬 수 있는 장점이 있으나 배아에서는 발현이 되지 않는다는 단점이 있다. 또한, 배아에서 특이적으로 발현되는 프로모터들이 개발되고 있으나 그 발현량이 미미한 단점이 있어, 이러한 이유로 종자 배아 특이적으로 강하게 발현을 유도하는 새로운 프로모터의 개발이 매우 필요하다고 할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0003] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-2145626호(2020.08.11 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 식물 종자의 배아(embryo) 특이적인 발현을 유도하는 OsDXS3(*Oryza sativa* 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 3) 프로모터, 상기 프로모터를 포함하는 식물 종자의 배아 특이적 발현용 재조합 벡터, 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체 및 상기 형질전환 식물체로부터 수득한 형질전환된 종자를 제공하는 데에 있다.

[0005] 본 발명의 다른 목적은 상기 프로모터를 이용하여 발현 목적 유전자를 형질전환 식물체의 배아에서 특이적으로 발현시키는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진, 식물 종자의 배아(embryo) 특이적인 발현을 유도하는 OsDXS3(*Oryza sativa* 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 3) 프로모터를 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 OsDXS3 프로모터를 포함하는, 식물 종자의 배아 특이적 발현용 재조합 벡터를 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 형질전환 식물체로부터 수득한 형질전환된 종자를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 OsDXS3 프로모터 및 이와 작동 가능하게 연결된 발현 목적 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및 상기 제조된 재조합 벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하는, 발현 목적 유전자를 형질전환 식물체의 배아에서 특이적으로 발현시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 식물 종자의 배아 특이적 OsDXS3 프로모터 및 이의 용도에 대한 것으로, 식물 종자에서 배아 특이적(embryo specific) 발현을 위한 OsDXS3(*Oryza sativa* 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 3) 프로모터를 개발함으로써 상기 OsDXS3 프로모터를 배아 특이적 발현을 목적으로 하는 유용 유전자 발현용 프로모터 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 식물 종자 배아 특이적 프로모터는 외래 유전자를 식물 종자의 배아에서 특이적으로 발현시켜 종자 내에서 목적 유전자의 기능 분석에 이용할 수 있고, 이를 토대로 황금쌀(golden rice), 거대 배아미(giant embryo)와 같은 기능성 종자를 개발하는 데에 활용할 수 있다. 또한, 종자의 발아 또는 휴면과 관련된 유전자의 기능 분석과 이와 관련된 배아의 형태 및 농업적 형질을 개량한 형질전환 작물의 개발 시 상기 프로모터를 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 RiceXPro 데이터베이스를 활용한 인실리코(*in silico*) 발현 분석을 통해 OsDXS3 유전자의 벼 조직별 발현 양상을 분석한 결과이다. 벼의 광합성 조직 또는 뿌리에 발현이 집중되어있는 OsDXS1 및 OsDXS2와는 다르게,

OsDXS3는 그 발현량이 크지는 않지만 벼 종자 내 배아에 집중되어있는 발현양상을 보여준다.

도 2는 본 발명의 OsDXS3 프로모터-GUS 발현 벡터의 모식도를 나타낸 것이다.

도 3은 OsDXS3 프로모터-GUS 발현 벡터를 활용하여 제작한 형질전환체의 T0 세대에서 벡터 유입 여부를 확인한 PCR 결과와 TagMan PCR 결과로, 벡터의 유입이 확인되었고 그 도입 copy 수가 단일 copy임을 확인한 3개의 식물체를 선별하였다.

도 4는 OsDXS3 프로모터-GUS 발현 벡터가 도입된 형질전환체의 벼 조직 내 GUS 염색 분석 결과이다. 구체적으로, (A) 13주 정도 생장한 벼 성체를 활용하여 벼의 다양한 조직 내 GUS 염색 분석 결과, (B) 수정 후 70일 정도 지난 성숙 종자 내 GUS 염색 분석 결과, (C) 발아 후 종자 내 GUS 염색 분석 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이에 본 발명자들은 OsDXS3 프로모터 발현 벡터를 활용하여 형질전환체를 제작하였고, 벼 조직 내 GUS 염색 분석 결과, OsDXS3 프로모터 형질전환체는 엽신(leaf blade)과 엽초(leaf sheath), 뿌리(root)에서는 전혀 GUS 발현 관찰을 할 수 없었고 종자 내에서도 배아 조직에만 특이적으로 발현되는 것을 관찰하고, 본 발명을 완성하였다.

[0014] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진, 식물 종자의 배아(embryo) 특이적인 발현을 유도하는 OsDXS3(*Oryza sativa* 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase 3) 프로모터를 제공한다.

[0015] 바람직하게는, 상기 프로모터는 벼(*Oryza sativa*)로부터 분리될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 바람직하게는, 상기 식물은 벼(*Oryza sativa*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명에서 용어, "배아(embryo)"란 배, 씨눈이라고도 하며, 종자식물에서는 휴면종자 내에 위치하며 나중에 식물체가 되는 부분을 의미한다.

[0018] 본 발명에서 용어 "프로모터(promoter)"란 구조유전자(gene)의 상부 쪽에 연결되어 있는 유전체(genome) 부위로서, 이에 연결된 구조유전자가 mRNA로 전사(transcription) 되도록 조절하는 역할을 한다. 프로모터에는 여러 일반전사인자(general transcription factor)들이 결합함으로써 활성화(activation)되는데, 보편적으로 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. 생체의 기본대사에 필요한 단백질들은 세포 내에서 일정 농도를 유지하여야 하므로 이들의 유전자에 연결된 프로모터는 일반전사인자의 작용만으로도 항시 활성화되어 있다. 이에 반하여 평시에는 역할이 없고 특수한 상황 하에서만 기능이 요구되는 단백질들은 해당 구조유전자의 발현을 유도하는 조직 특이 프로모터(tissue specific promoter) 또는 유도성 프로모터(inducible promoter)가 연결되어 있다. 즉 조직 특이 프로모터는 생물체의 발달 과정에서, 유도성 프로모터는 주변으로부터의 환경적 요인에서 오는 외부 자극에 의해 활성화된 특이 전사인자(specific transcription factor)가 결합함으로써 활성화된다.

[0019] 본 발명의 프로모터는 식물체의 특정 부위, 특히 식물체의 성숙 종자의 배아(embryo) 에서만 특이적으로 발현을 유도하는 프로모터로, 서열번호 1의 염기서열을 가지나 상기 서열과 80% 이상의 상동성을 가지는 서열, 바람직하게는 90% 이상의 상동성, 더 바람직하게는 95% 이상의 상동성, 보다 더 바람직하게는 98% 이상의 상동성, 가장 바람직하게는 99% 이상의 상동성을 나타내는 서열로서, 실질적으로 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 염기를 포함할 수 있다. 또한, 이러한 상동성을 갖는 서열로서 실질적으로 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 염기서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 염기서열을 갖는 프로모터도 본 발명의 범위에 포함됨은 자명하다.

[0020] 본 발명에 있어 "상동성"이란 야생형(wild type) 염기서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 염기서열과 상기와 같은 퍼센트 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함할 수 있다. 이러한 상동성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열 간의 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있으며, 상동성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

[0021] 본 발명의 프로모터는 식물체의 성숙 종자의 배아에서 목적 단백질 내지 목적 유전자 RNA를 발현시킬 수 있으며, 보다 바람직하게는 상기 식물체의 성숙 종자의 배아에서 특이적으로 목적 단백질을 발현시킬 수 있다.

[0022] 본 발명에서 용어 "특이적"은 프로모터의 발현 활성이 동일한 식물체 내의 적어도 하나 이상의 다른 조직보다 특정한 조직 내에서 더 높다는 것을 의미한다. 프로모터의 발현 활성의 수준은 본 기술분야에서 공지된 방법을

이용하여 미리 측정된 조직 내에서의 프로모터의 발현 수준을 다른 조직 내에서의 것과 비교함으로써 평가될 수 있다. 일반적으로 프로모터의 발현 수준은 프로모터의 조절 하에서 발현된 유전자 생성물, 예를 들어 단백질 및 RNA 등의 생성량에 의해 측정된다.

[0023] 따라서, 용어 "식물 종자의 배아(embryo) 특이적"이란 프로모터의 발현 활성이 동일한 식물 내 다른 조직 보다 식물 종자의 배아 조직 내에서 더 높다는 것을 의미한다.

[0024] 본 발명은 상기 OsDXS3 프로모터를 포함하는, 식물 종자의 배아 특이적 발현용 재조합 벡터를 제공한다.

[0025] 바람직하게는, 상기 재조합 벡터는 상기 OsDXS3 프로모터 및 발현 목적 유전자가 작동 가능하게 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명에서 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 세포를 지칭하는 것이다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0027] 본 발명에서 용어 "벡터(vector)"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "발현 벡터"는 흔히 "재조합 벡터"와 호환하여 사용된다. 용어 "재조합 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[0028] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 것이다. 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), 글루포시네이트암모늄(glufosinate ammonium) 또는 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 제한하지 않는다.

[0029] 본 발명에서 용어 "작동 가능하게 연결된(operably linked)"이란 프로모터 서열이 상기 코딩 서열의 전사를 개시 및 매개하도록, 상기 코딩 서열과 프로모터가 기능적으로 연결되어 있는 것을 의미한다.

[0030] 상기 재조합 벡터는 프로모터의 하위(downstream)에 리포터 유전자를 연결시켜 프로모터의 활성 정도를 측정할 수 있으며, 예를 들어 리포터 유전자로는 GUS(β-glucuronidase)를 이용할 수 있다. 본 발명의 일실시예에서는 OsDXS3 프로모터-GUS 발현 벡터를 예시하고 있으나, 본 발명은 이러한 특정 벡터에 한정되는 것은 아니다. 상기 GUS 리포터 유전자는 프로모터의 활성 정도를 측정하기 위한 것으로, 본 발명의 재조합 벡터에서 GUS 리포터 유전자 대신 식물 종자의 배아에서 특이적 발현을 유도하기 위한 목적하는 외래 유전자를 도입할 수 있음은 자명한 것이다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환 식물체를 제공한다.

[0032] 상기 재조합 벡터의 식물체로의 도입은 당 기술분야에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 아그로박테리움(Agrobacterium sp.)-매개에 의한 방법, 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 실리콘 탄화물 위스커(Silicon carbide whiskers), 초음파 처리(sonication), 히트 쇼크법(heat shock), 전기천공법(electroporation) 및 PEG(Polyethylenglycol)에 의한 침전법을 사용할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 아그로박테리움-매개에 의한 방법, 즉 본 발명에 따른 발현벡터가 도입된 아그로박테리움을 이용하여 식물 세포를 형질전환시키는 방법을 통해 본 발명의 재조합 벡터로 식물세포를 형질전환하였으나, 본 발명은 이에 제한되는 것은 아니다.

[0033] 상기 재조합 벡터가 도입되는 식물 세포는 세포가 식물로 재생될 수 있는 한 특정한 형태로 특별히 제한되는 것은 아니다. 이들 세포는, 예를 들면, 배양된 세포 부유물, 원형질체(protoplast), 잎 절편(leaf section) 및 캘러스(callus)를 포함한다.

[0034] 또한, 본 발명은 상기 형질전환 식물체로부터 수득한 형질전환된 종자를 제공한다.

[0035] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 OsDXS3 프로모터 및 이와 작동 가능하게 연결된

발현 목적 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제조하는 단계; 및 상기 제조된 재조합 벡터를 식물체에 형질전환하는 단계를 포함하는, 발현 목적 유전자를 형질전환 식물체의 배아에서 특이적으로 발현시키는 방법을 제공한다.

[0036] 바람직하게는, 상기 식물체는 벼(*Oryza sativa*)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 상기 발현 목적 유전자는 모든 종류의 발현 목적 단백질을 암호화하는 유전자일 수 있으며, 예컨대 효소, 호르몬, 항체, 사이토카인 등의 의학적 활용성이 있거나, 사람을 포함한 동물의 건강을 증진시킬 수 있는 영양성분을 다량 축적할 수 있는 단백질이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0039] **<실시예 1> RiceXPro로부터 OsDXS3의 종자 내 배아 특이적 발현 확인**

[0040] 벼의 DXS(*Oryza sativa* 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate) 유전자 3종(OsDXS1, Os05g0408900; OsDXS2, Os07g0190000; OsDXS3, Os06g0142900)의 조직별·생장시기별 발현 분석을 위하여 RiceXPro(https://ricexpro.dna.affrc.go.jp/)의 spatio-temporal gene expression 분석을 진행하여 OsDXS1-28183, OsDXS2-43985, OsDXS3-23264의 발현 데이터를 통해 각 유전자의 발현을 확인하였고, OsDXS1/2/3 간의 발현 차이를 관찰할 수 있는 heatmap 데이터를 제작하여, OsDXS3의 종자 내 배아 특이적 발현을 관찰하였다(도 1).

[0041] **<실시예 2> OsDXS3 유전자의 프로모터 부위의 DNA 서열 선정**

[0042] Rice Genome Annotation Project(http://rice.uga.edu/)의 데이터베이스를 이용하여 OsDXS3 유전자의 genomic DNA(이하 gDNA) 서열을 분석하였고, 이 서열을 NCBI의 BLAST에 활용하여 OsDXS3 유전자의 첫 exon 부위 내 개시코돈인 ATG로부터 상위 2300bp의 DNA 서열을 OsDXS3의 프로모터 부위로 선정하였다(서열번호 1).

[0043] **<실시예 3> OsDXS3 프로모터-GUS 발현 벡터 제작**

[0044] 선정한 OsDXS3 프로모터 DNA 서열을 활용하여 벼의 gDNA pool로부터 OsDXS3 프로모터 부위를 증폭하기 위한 프라이머 서열을 선정하였으며 Gateway cloning method를 활용하기 위한 서열까지 포함하여 프라이머를 제작하였다(표 1).

표 1

[0045]

프라이머 명칭	프라이머 방향	염기서열(5'→3')
attB1_OsDXS3-P_fwd	정방향	5'-ggggacaagtttgtacaaaaaagcaggctATTAGAACCATAATAAGCCTACTGCTCATC-3'
attB2_OsDXS3-P_rev	역방향	5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggtCCTGCGCAAGGAGTGACGACCAAAA-3'

[0046] 증폭한 OsDXS3 프로모터의 DNA 단편을 pBGWFS7 운반체에 클로닝하여 OsDXS3 프로모터 서열 이후 GFP(Green fluorescent protein)와 GUS(β-glucuronidase)가 연결된 운반체를 제작하였으며, Basta 제초제 저항성 유전자 카세트를 식물체의 형질전환 여부를 확인 가능한 선별 마커(selection marker)로 활용하였다(도 2).

[0047] 식물의 다양한 조직 내 GUS 염색 분석에 활용하기 위하여 양성대조군으로 식물 전신발현 프로모터로 잘 알려진 Cauliflower Mosaic Virus 35S(이하 35S) 프로모터-GUS 발현 벡터를 제작하였다.

[0048] **<실시예 4> OsDXS3 프로모터-GUS 발현 형질전환체 제작 및 운반체 도입 여부와 도입 copy 수 분석**

[0049] 상기 실시예 3에서 제작한 OsDXS3 프로모터-GUS 발현 벡터를 벼의 종자로부터 유도한 캘러스에 agrobacterium-mediated 형질전환을 하여 OsDXS3 프로모터-GUS 발현 형질전환체를 제작하였고, 상토로 이식 후 4주 정도의 T0 세대 식물체의 잎 조직에서 추출한 gDNA로 운반체의 도입 여부를 확인하기 위한 PCR을 진행하여 운반체 도입이 확인된 형질전환체를 선별하였다(도 3A).

[0050] 선별된 형질전환체의 운반체 도입 copy 수를 분석하기 위해 상토로 이식 후 4주 정도의 T0 세대 식물체의 잎 조직을 이용하여 추출한 gDNA를 활용하여 TaqMan PCR을 진행하였고 운반체의 단일 copy 도입이 확인된 형질전환체

(#10, #11, #14)를 선별하였다(도 3B).

[0051] **<실시예 5> OsDXS3 프로모터의 조직 특이적 발현 검정을 위한 GUS 염색 분석**

[0052] 상기 실시예 4에서 선별한 OsDXS3 프로모터 형질전환체의 식물의 다양한 조직 내 GUS 염색 분석에 활용하기 위하여 음성대조군으로는 형질전환 하지 않은 동진 벼를 사용하였고 양성대조군으로는 35S 프로모터 형질전환체를 사용하였다.

[0053] 발아 후 13주 정도 생장한 성체 벼를 활용하여 벼의 다양한 조직 내 GUS 염색 분석 결과 OsDXS3 프로모터 형질전환체는 엽신(leaf blade)과 엽초(leaf sheath), 뿌리(root)에서는 전혀 GUS 발현 관찰을 할 수 없었으며, 벼 엽신(leaf blade)의 단편을 도수 절편한 단면을 현미경으로 관찰한 결과 어떠한 조직 및 세포에서도 GUS 발현을 관찰할 수 없었다(도 4A).

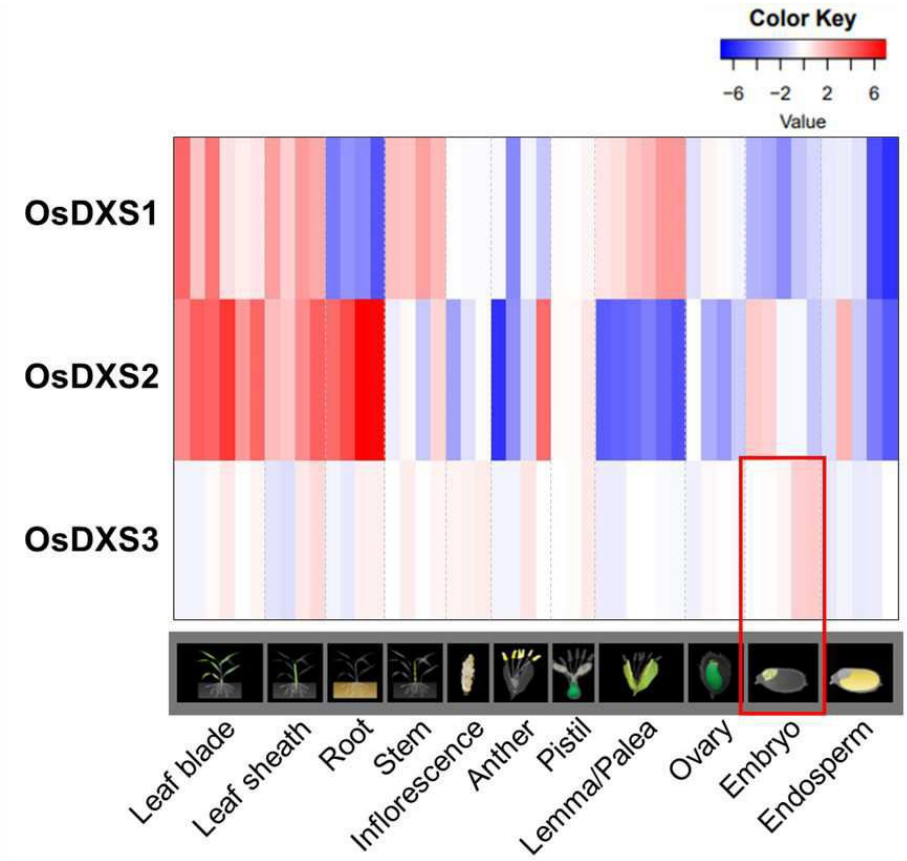
[0054] 또한, 수정 후 70일 정도 지난 성숙 종자 내 GUS 염색 분석 결과, OsDXS3 프로모터 형질전환체는 종자 내 배아 특이적 발현을 보이며 전신발현 양성대조군인 35S 프로모터 형질전환체와 비슷한 정도로 강한 발현 강도를 보여주는 것으로 확인되었다(도 4B).

[0055] 발아 후 종자 내 GUS 염색 분석 결과에서도 OsDXS3 프로모터 형질전환체는 배아 특이적 발현을 유지하였고 발아한 자엽초(coleoptile)에서는 전혀 발현을 보이지 않았다(도 4C).

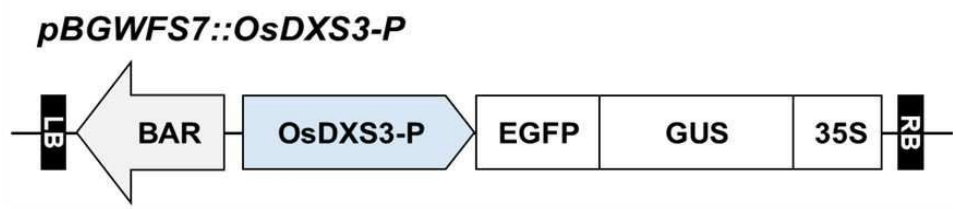
[0056] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

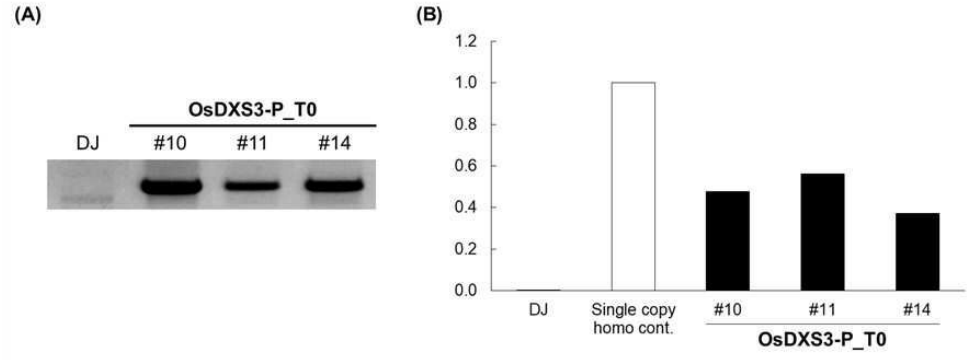
도면1



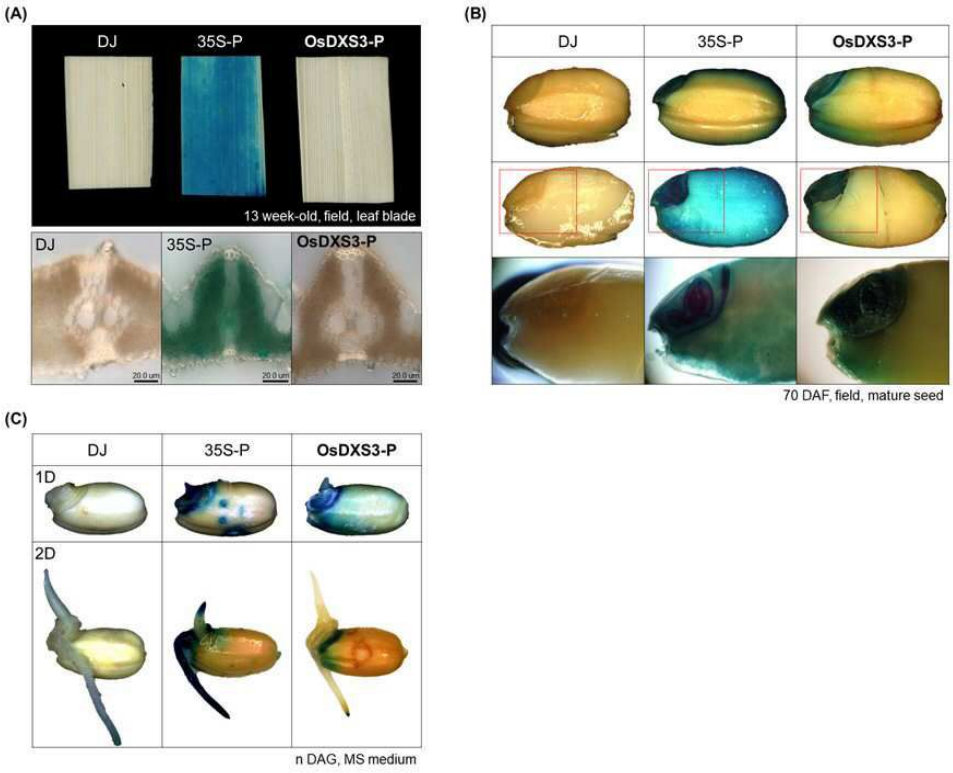
도면2



도면3



도면4



서 열 목 록

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

<120> Embryo-specific OsDXS3 promoter for plant seeds and uses thereof

<130> ADP-2021-0960

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 2300

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<400> 1

attagaacca taataagcct actgctcatc ctttttcag gctttcagtt atgtgcaaca 60

attaaacatg tacactgaag ctatcaggat gaaaatttga tgggtacaaa taaaatatcc 120

aactaatggg ggaaaaaagc caaataataa caacattacc tgtgctgcat tattatattc 180

tggtaatggg ttgccgttgt tgtatgcttc ttttattagt tcctccagag tgtacccata 240

gaacatgctg gtagcaagct gcttattcaa gctatccaca tagtcttgct gatgcttacc 300

ccagtgaagt tcaactgtcc tcttgctaat ataaggttcc agggcatcct ggacaccata 360

ggacaagcta taagttaaaa tcttttcctt ttaaatggca gaatgtaatc tgtcgaggca 420

atattaacag gtgaggagaa catacaagtt tatacggcgg agtagtgaga gcgtagtaag 480

ccacgacttt tgaatacctt cgagatctac agccctgcct ttgttctctc tgcaacaaac 540

agaaggcgta aagattgcaa ccagcactaa acatcatagt caagggcccg tagaattaca 600

aaagctgagg tacaatcttc aaagcttgta atgtcattcc aacttcacaa tagaacattg 660

gttgctaagc ccagtgtcag cgtgatacac acaatcctaa gctctcttta gcattgcttg 720

agcactacgc aagcatgaca cggattatca tggaaactgg cacagttcac caaatttaac 780

acaaagaaac attaaacatc ttacactgca tatgcacagt ggaagatgga agaaaaatga 840

gacgtggctg acttaccgtg gtgaatacca acaacataga gaaacgatct tgtctaacta 900

caatgagatt atatgacact acatagaccc accacctata caaacctgtt cttaaaaaac 960

tagggcttga aaaattactc acaaaagctg aatatccacc ataaaggatc actaacttat 1020

caaatagtat attgatttgt aacatcacag acacacatga tctttagcgg tgtcatgttt 1080

gagaccgata ataatatggt acaaaagatt atagtgccac tcataatcaa ttattaatcg 1140

atttaaagtc ctcaaattcg cactatccta aaatctgcaa ggaaaaaacc tgcaatgccc 1200

tcgaattcca aacgtctaac tctttgaaat gccagtgtct cccttcccct tcctatccct 1260

tttatcaaat ctcaagtcac aaatcgaaga acaaggcagc tcgccaaatg agaaagcttc 1320

cagcgagcgc acgagcaagg ggcagaaaga agaagaaggt atccatgggt ttcgcgacga 1380

ggagctcacc gagcgaagcc gacgaggcac cgcagccggc ggcgagggga gaacgcggag 1440

agcggaggcg aaagccgcca tcttttcttc tcctctttcc tctgccgcgc tatctatcca 1500

ccacctctgc aaaagaaaaa atcgaagctt ttttcttttt cacttcgtct ctatctcatc 1560

ccaggggcaa tctcgtaaat ttacccgagc aaaccactcc agtgccactg gcagttgggc 1620

cccgcgagta cggacgaaca agttaaccga ataatgaatg attaggagag acgtgattag 1680

tttagtagct aatcctctgt caaattaatc atcgtcccct tttctgctcg gattaatgcc 1740

taactaatct gtcatgtcaa gagcgcagag gagcactccg cgtcccaaat cccaaaccgg 1800

agctagggtt gctgctgctg ccactcgcga gcagcagcgc cccctcacgc tgagccgcct 1860

ccggctccct cgccgccgat cctgcgcgtg cggcggcggc gggtggccgg tttgaaggag 1920

gagaggaggt aacggtagat gggttcttgg ttttcttttg ccccccgcgg ctatttcggt 1980

ttctagtgga agctggttgc ctgtggtgta aattggggat tacggatttt ggccgtctga 2040

ttctccattt tagctgtccc tggatggata gatgagtttg ctgtttgtag ctgattcttg 2100

gtgtggtgtc attccaagga ctgatacttg attgtgtgct catcttcatc tagaacactg 2160

aaaacatatg tggataattg tttatgatga atttaggatc cagtgatctc tccatgttta 2220

tttttagaaa aaaaataagt ttctcacagg ctaaagaata ctgtaaattt caggcttttg 2280

gtcgtcactc cttgcgcagg 2300