

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0001760

(43) 공개일자 2022년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G16B 20/30 (2019.01) G16B 20/20 (2019.01)

G16B 40/20 (2019.01) G16B 50/00 (2019.01)

(52) CPC특허분류

G16B 20/30 (2019.02)

C12Q 1/02 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0080094

(22) 출원일자 2020년06월30일

심사청구일자 2020년06월30일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

정기홍

경기도 수원시 영통구 영통로200번길 112, 103동 504호(망포동, 영통 SK VIEW)

유요한

인천광역시 연수구 원인재로 180, 217동 1606호(연수동, 연수우성2차아파트)

김유진

경기도 수원시 팔달구 권광로317번길 12, 2동 1301호(인계동, 선경1차아파트)

(74) 대리인

위병갑

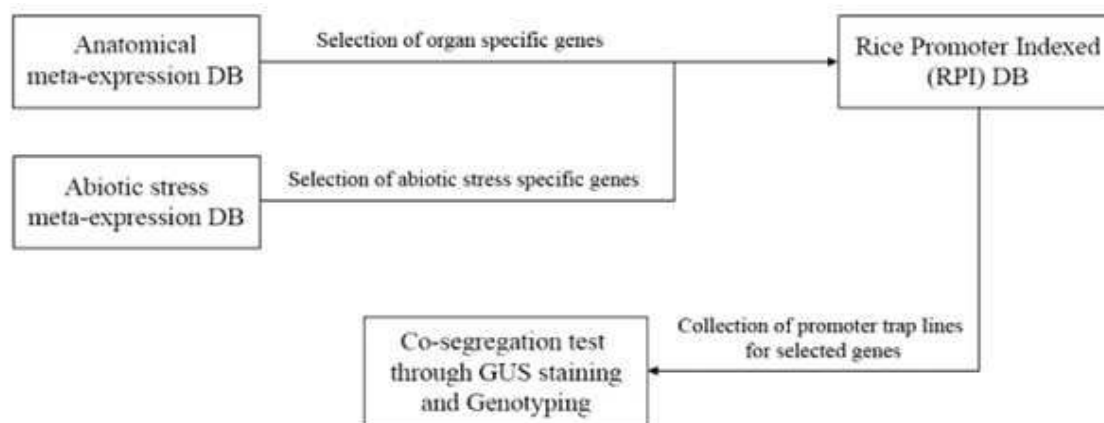
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 프로모터를 발굴하기 위한 방법 및 장치

(57) 요약

본 개시의 일 실시예에 따른 프로모터 발굴 방법은, 기관 메타-발현 및 스트레스 메타-발현 데이터베이스로부터 기 설정된 개수의 기관 특이적 또는 환경-스트레스 특이적 유전자를 선택하는 단계, 프로모터 인덱싱 데이터베이스를 이용하여, 상기 선택된 유전자에 대한 프로모터 트랩 라인을 검색하여 적어도 하나의 유전자를 선택하는 단계, 선택된 적어도 하나의 유전자 각각에 대한 GUS 염색 또는 유전자형 분석을 수행하는 단계 및 수행 결과에 기초하여, 기관 특이적 발현 프로모터 또는 환경-스트레스 특이적 발현 프로모터를 발굴하는 단계를 포함할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 1/6869 (2018.05)

G16B 20/20 (2019.02)

G16B 40/20 (2019.02)

G16B 50/00 (2019.02)

C12Q 2334/52 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395062709
과제번호	PJ013664012020
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	농업생명공학연구단(GM작물개발)
연구과제명	인텔 빅데이터를 기반으로 한 자연변이 벼 품종 활용기술 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교산학협력단
연구기간	2018.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395063001
과제번호	PJ013259012020
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	농생물게놈활용(차세대유전체연구)
연구과제명	게놈 정보 기반의 영양분 이용 효율 증진을 위한 벼 유용 유전자 발굴 및 기능 규명
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교산학협력단
연구기간	2018.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

프로모터 발굴 방법에 있어서,

기관 메타-발현 및 스트레스 메타-발현 데이터베이스로부터 기 설정된 개수의 기관 특이적 또는 환경-스트레스 특이적 유전자를 선택하는 단계;

프로모터 인택싱 데이터베이스를 이용하여, 상기 선택된 유전자에 대한 프로모터 트랩 라인을 검색하여 적어도 하나의 유전자를 선택하는 단계;

상기 선택된 적어도 하나의 유전자 각각에 대한 GUS 염색 또는 유전자형 분석을 수행하는 단계; 및

상기 수행 결과에 기초하여, 기관 특이적 발현 프로모터 또는 환경-스트레스 특이적 발현 프로모터를 발굴하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 유전자를 선택하는 단계는,

기관 메타-발현 데이터베이스로부터, 메타 해부학적 발현 프로파일을 이용하여 선택된 복수개의 유전자에 대해 유클리디언 거리(Euclidian distance)에 기초하여 클러스터링을 수행하는 단계;

상기 클러스터링을 수행한 결과 획득된 복수개의 클러스터 중 기관 별로 선호하는 패턴을 갖는 클러스터를 결정하는 단계; 및

상기 결정된 클러스터에 포함된 적어도 하나의 유전자를 선택하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 유전자형 분석을 수행하는 단계는,

상기 선택된 적어도 하나의 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 종자가 배양됨에 따라, 상기 배양된 종자로부터 획득된 DNA의 유전자형을 분석하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 기관 특이적 발현 프로모터를 발굴하는 단계는,

상기 선택된 적어도 하나의 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 종자에 GUS 염색을 수행한 결과, 특정 기관이 GUS 염색되었는지 여부를 판단하는 단계; 및

상기 특정 기관이 GUS 염색된 경우, 상기 선택된 적어도 하나의 유전자의 프로모터를 기관 특이적 발현 프로모터로 발굴하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 유전자형 분석을 수행하는 단계는,

특정 스트레스 환경에서 상기 적어도 하나의 유전자의 발현량을 기초로 스크리닝을 수행한 결과에 기초하여 유전자를 선택하는 단계;

상기 선택된 적어도 하나의 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 종자가 배양됨에 따라, 상기 배양된 종자로부터 획득된 DNA의 유전자형을 분석하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 환경-스트레스 특이적 발현 프로모터를 발굴하는 단계는,

상기 선택된 적어도 하나의 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 종자를 스트레스 환경에서 배양한 후 GUS 염색을 수행한 결과, 특정 기관이 GUS 염색되었는지 여부를 판단하는 단계; 및

상기 스트레스 환경에서 배양된 시간에 따른 GUS 염색 특성에 따라, 상기 선택된 적어도 하나의 유전자의 프로모터를 환경-스트레스 특이적 발현 프로모터로 발굴하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 7

프로모터 발굴 장치에 있어서,

메모리; 및

적어도 하나의 프로세서를 포함하고,

상기 적어도 하나의 프로세서는, 상기 메모리에 저장된 적어도 하나의 명령어를 실행함으로써,

기관 메타-발현 및 스트레스 메타-발현 데이터베이스로부터 기 설정된 개수의 기관 특이적 또는 환경-스트레스 특이적 유전자를 선택하고,

프로모터 인덱싱 데이터베이스를 이용하여, 상기 선택된 유전자에 대한 프로모터 트랩 라인을 검색하여 적어도 하나의 유전자를 선택하며,

상기 선택된 적어도 하나의 유전자 각각에 대한 GUS 염색 또는 유전자형 분석을 수행하고,

상기 수행 결과에 기초하여, 기관 특이적 발현 프로모터 또는 환경-스트레스 특이적 발현 프로모터를 발굴하는, 장치.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 적어도 하나의 프로세서는,

기관 메타-발현 데이터베이스로부터, 메타 해부학적 발현 프로파일을 이용하여 선택된 복수개의 유전자에 대해 유클리디언 거리(Euclidian distance)에 기초하여 클러스터링을 수행하고,

상기 클러스터링을 수행한 결과 획득된 복수개의 클러스터 중 기관 별로 선호하는 패턴을 갖는 클러스터를 결정하며,

상기 결정된 클러스터에 포함된 적어도 하나의 유전자를 선택하는, 장치.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 적어도 하나의 프로세서는,

상기 선택된 적어도 하나의 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 종자가 배양됨에 따라, 상기 배양된 종자로부터 획득된 DNA의 유전자형을 분석하는, 장치.

청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 적어도 하나의 프로세서는,

상기 선택된 적어도 하나의 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 종자에 GUS 염색을 수행한 결과, 특정 기관이 GUS 염색되었는지 여부를 판단하고,

상기 특정 기관이 GUS 염색된 경우, 상기 선택된 적어도 하나의 유전자의 프로모터를 기관 특이적 발현 프로모터로 발굴하는, 장치.

청구항 11

제 7항에 있어서, 상기 적어도 하나의 프로세서는,

특정 스트레스 환경에서 상기 적어도 하나의 유전자의 FPKM 값을 기초로 스크리닝을 수행한 결과에 기초하여 유전자를 선택하고,

상기 선택된 적어도 하나의 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 종자가 배양됨에 따라, 상기 배양된 종자로부터

획득된 DNA의 유전자형을 분석하는, 장치.

청구항 12

제 7항에 있어서, 상기 적어도 하나의 프로세서는,

상기 선택된 적어도 하나의 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 종자를 스트레스 환경에서 배양한 후 GUS 염색을 수행한 결과, 특정 기관이 GUS 염색되었는지 여부를 판단하고,

상기 스트레스 환경에서 배양된 시간에 따른 GUS 염색 특성에 따라, 상기 선택된 적어도 하나의 유전자의 프로모터를 환경-스트레스 특이적 발현 프로모터로 발굴하는, 장치.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 개시된 실시예는 프로모터를 발굴하기 위한 방법 및 장치에 관한 것으로, 보다 구체적으로 프로모터가 도입된 형질 전환체를 제작하지 않고도, 기존의 데이터베이스를 이용하여 새로운 프로모터를 발굴하는 방법 및 장치에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 분자생물학의 발달로 인하여 외래 유용유전자의 분리 및 편집이 가능하게 되었으며, 외래 유용유전자의 분리 및 편집을 통해 새로운 유전자가 조합된 형질전환체를 얻을 수 있게 되었다. 형질전환체를 만들 수 있는 형질전환 방법으로는, 원형질체에 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol(PEG))과 전기충격법(electroporation)을 적용하는 방법, 유전자총을 이용하는 방법, 아그로박테리움(Agrobacterium) 이용법이 있으며, 이 중 아그로박테리움 이용법이 처음 쌍자엽식물에서 개발된 이래로 식물형질전환 기술로 가장 일반적으로 이용되고 있다.

[0003] 프로모터는 외래 유전자의 발현을 식물체의 전신 또는 특별한 조직에만 국한시킴으로써, 이를 통해 형질전환 목적이 달성될 수 있으며, 프로모터는 그 기능에 따라서 분류될 수 있다.

[0004] 첫째, 전신발현 유도 프로모터를 프로모터 종류의 일 예로 들 수 있다. 쌍떡잎식물용 전신발현 유도 프로모터로는, 꽃양배추 모자이크 바이러스(CaMV: cauliflower mosaic virus)의 35S RNA 유전자의 프로모터가 대표적인 프로모터로 이용되고 있다. 벼 등의 외떡잎식물용 전신발현 유도 프로모터로는 벼 액틴(actin) 및 옥수수 유비퀴틴(ubiquitin) 유전자 프로모터들이 주로 이용되어 왔으며, 최근 벼 시토크롬 C유전자(OsOcl)의 프로모터가 국내 연구진에 의해 개발되어 사용 중에 있다. 이들은 연구적인 측면에서 목적하는 유전자의 식물체 내 기능을 밝히고자 시도할 때 우선적으로 고려되는 프로모터들이다.

[0005] 둘째, 뿌리 특이 발현 프로모터를 프로모터 종류의 일 예로 들 수 있다. 애기장대 퍼옥시다제(peroxidase, prxEa)가 분리되어 뿌리 특이적 발현이 확인되었고, 최근 고구마 유래의 매즈 유전자(ibMADS)와 당 유도성 에이디피 글루코즈 파이로포스파타제(ADP-glucose pyrophosphatase, AGPase) 유전자가 분리되어 해당 프로모터가 뿌리에서 특이 발현을 유도함이 확인되었다. 특히, 해당 유전자가 당근, 무에서 뿌리 특이적 일시적 발현을 유도함이 확인된 바 있다.

[0006] 위와 같이, 전신발현을 위한 프로모터나 기관 특이적 발현을 위한 프로모터들이 알려져 있지만, 프로모터가 도입된 형질전환체를 제작하기 위한 클로닝, 조직배양 실험, 형질전환체 재배 및 수확 등에는 오랜 시간이 소요될 수 있다. 특히, 형질전환체에 도입된 프로모터의 활성은 형질전환 후 당대 식물체나 수확한 씨앗으로 다음세대에서 GUS 염색을 통해서 진행이 되기 때문에 원하는 특성의 프로모터 활성이 확인 안 되는 경우, 이의 측정 및 확인을 위해 전체 과정을 반복해야 되는 한계점을 가지고 있고 이러한 과정에 최소 1년, 일반적으로는 2년 이상의 시간이 소요된다. 따라서, 원하는 특성의 목적 지향적 신규 프로모터를 효율적으로 찾고 이의 활성을 검증하는데 새로운 전략이나 방법이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 개시는 형질전환체에 프로모터를 도입하고 이를 통해 프로모터의 활성을 확인하는 프로세스의 경우 상당한 시간이 소요됨에 따라, 보다 효과적으로 신규 프로모터를 발굴하는 방법 및 장치를 제안하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 일 실시예에 따른 프로모터 발굴 방법은, 기관 메타-발현 및 스트레스 메타-발현 데이터베이스로부터 기 설정된 개수의 기관 특이적 또는 환경-스트레스 특이적 유전자를 선택하는 단계; 프로모터 인덱싱 데이터베이스를 이용하여, 선택된 유전자에 대한 프로모터 트랩 라인을 검색하여 적어도 하나의 유전자를 선택하는 단계; 선택된 적어도 하나의 유전자 각각에 대한 GUS 염색 또는 유전자형 분석을 수행하는 단계; 및 수행 결과에 기초하여, 기관 특이적 발현 프로모터 또는 환경-스트레스 특이적 발현 프로모터를 발굴하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0009] 일 실시예에 따른 프로모터 발굴 방법에 있어서, 적어도 하나의 유전자를 선택하는 단계는, 기관 메타-발현 데이터베이스로부터, 메타 해부학적 발현 프로파일을 이용하여 선택된 복수개의 유전자에 대해 유클리디언 거리 (Euclidian distance)에 기초하여 클러스터링을 수행하는 단계; 클러스터링을 수행한 결과 획득된 복수개의 클러스터 중 기관 별로 선호하는 패턴을 갖는 클러스터를 결정하는 단계; 및 결정된 클러스터에 포함된 적어도 하나의 유전자를 선택하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0010] 일 실시예에 따른 프로모터 발굴 방법에 있어서, 유전자형 분석을 수행하는 단계는, 선택된 적어도 하나의 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 종자가 배양됨에 따라, 배양된 종자로부터 획득된 DNA의 유전자형을 분석하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0011] 일 실시예에 따른 프로모터 발굴 방법에 있어서, 기관 특이적 발현 프로모터를 발굴하는 단계는, 선택된 적어도 하나의 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 식물체에 GUS 염색을 수행한 결과, 특정 기관이 GUS 염색되었는지 여부를 판단하는 단계; 및 특정 기관이 GUS 염색된 경우, 선택된 적어도 하나의 유전자의 프로모터를 기관 특이적 발현 프로모터로 발굴하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0012] 일 실시예에 따른 프로모터 발굴 방법에 있어서, 유전자형 분석을 수행하는 단계는, 특정 스트레스 환경에서 상기 적어도 하나의 유전자의 발현량을 기초로 스크리닝을 수행한 결과에 기초하여 유전자를 선택하는 단계; 선택된 적어도 하나의 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 종자가 배양됨에 따라, 배양된 종자로부터 획득된 DNA의 유전자형을 분석하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0013] 일 실시예에 따른 프로모터 발굴 방법에 있어서, 환경-스트레스 특이적 발현 프로모터를 발굴하는 단계는, 선택된 적어도 하나의 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 종자를 스트레스 환경에서 배양한 후 GUS 염색을 수행한 결과, 특정 기관이 GUS 염색되었는지 여부를 판단하는 단계; 및 스트레스 환경에서 배양된 시간에 따른 GUS 염색 특성에 따라, 선택된 적어도 하나의 유전자의 프로모터를 환경-스트레스 특이적 발현 프로모터로 발굴하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0014] 일 실시예에 따른 프로모터 발굴 장치는, 메모리; 및 적어도 하나의 프로세서를 포함하고, 적어도 하나의 프로세서는, 메모리에 저장된 적어도 하나의 명령어를 실행함으로써, 기관 메타-발현 및 스트레스 메타-발현 데이터베이스로부터 기 설정된 개수의 기관 특이적 또는 환경-스트레스 특이적 유전자를 선택하고, 프로모터 인덱싱 데이터베이스를 이용하여, 선택된 유전자에 대한 프로모터 트랩 라인을 검색하여 적어도 하나의 유전자를 선택하며, 선택된 적어도 하나의 유전자 각각에 대한 GUS 염색 또는 유전자형 분석을 수행하고, 수행 결과에 기초하여, 기관 특이적 발현 프로모터 또는 환경-스트레스 특이적 발현 프로모터를 발굴할 수 있다.

발명의 효과

- [0015] 본 개시는 형질전환체 제작 대신 기존에 만들어져 있는 유전자 색인 T-DNA insertion mutagenesis 벼 씨앗과 대규모 전사체 빅데이터를 이용하여 새로운 프로모터를 빠른 시간 안에 탐색할 수 있다. 이는 특이 기관 및 여러 스트레스에 반응하는 프로모터를 확보하여 주요 작물인 벼에서 형질을 개선하는데 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 일 실시예에 따른 프로모터 트랩 라인에 대한 분석 프로세스를 설명하기 위한 도면이다.
- 도 2는 일 실시예에 따라 프로모터를 발굴하는 방법을 설명하기 위한 흐름도이다.
- 도 3은 일 실시예에 따라 선택된 적어도 하나의 기관 특이적 유전자의 발현 정보를 시각화한 도면이다.
- 도 4는 일 실시예에 따라 선택된 기관 특이적인 두 개 유전자에 대한 유전자형 분석 결과 및 GUS 염색 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 일 실시예에 따라 선택된 환경-스트레스 특이적인 유전자에 대한 유전자형 분석 결과 및 GUS 염색 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 일 실시예에 따른 프로모터 발굴 장치(600)를 설명하기 위한 블록도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 명세서에서 사용되는 용어에 대해 간략히 설명하고, 본 발명에 대해 구체적으로 설명하기로 한다.
- [0018] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 해당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 관례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다. 따라서 본 발명에서 사용되는 용어는 단순한 용어의 명칭이 아닌, 그 용어가 가지는 의미와 본 발명의 전반에 걸친 내용을 토대로 정의되어야 한다.
- [0019] 명세서 전체에서 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있음을 의미한다. 또한, 명세서에 기재된 "...부", "모듈" 등의 용어는 적어도 하나의 기능이나 동작을 처리하는 단위를 의미하며, 이는 하드웨어 또는 소프트웨어로 구현되거나 하드웨어와 소프트웨어의 결합으로 구현될 수 있다.
- [0020] 이하에서는, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 아래의 실시예는 발명의 이해를 돕기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 도 1은 일 실시예에 따른 프로모터 트랩 라인에 대한 분석 프로세스를 설명하기 위한 도면이다.
- [0022] 도 1을 참조하면, 일 실시예에 따른 프로모터 발굴 방법은, transcriptome 데이터와 프로모터 트랩 라인을 사용하여 발굴하고자 하는 발현 특성을 지는 유전자를 식별할 수 있다. 구체적으로, 기관 메타-발현 데이터베이스 및 스트레스 메타-발현 데이터베이스를 사용하여 기 설정된 개수(예를 들어, 700개)의 기관-특이적 또는 환경-스트레스-특이적인 유전자가 선택될 수 있다. 이어서, 벼 프로모터-인텍싱 (RPI) 데이터베이스를 사용하여 선택된 유전자에 대한 잠재적 프로모터 트랩 라인이 검색될 수 있다. 검색 결과, 3개의 유전자가 선발된 경우, 선발된 3개의 유전자 각각에 대해 GUS 염색 또는 유전자형 분석을 수행함으로써, 기관 특이적 발현 프로모터 또는 환경-스트레스 특이적 발현 프로모터가 발굴될 수 있다. GUS 염색 또는 유전자형 분석을 수행하여 프로모터를 발굴하는 방법에 대해서는 도 3 내지 도 5를 참고하여 구체적으로 후술하도록 한다.
- [0023] 도 2는 일 실시예에 따라 프로모터를 발굴하는 방법을 설명하기 위한 흐름도이다.
- [0024] 단계 S210에서, 프로모터 발굴 장치는, 기관 메타-발현 및 스트레스 메타-발현 데이터베이스로부터 기 설정된 개수의 기관 특이적 또는 환경-스트레스 특이적 유전자를 선택할 수 있다.
- [0025] 단계 S220에서, 프로모터 발굴 장치는, 프로모터 인텍싱 데이터베이스를 이용하여, 선택된 유전자에 대한 프로모터 트랩 라인을 검색하여 적어도 하나의 유전자를 선택할 수 있다.
- [0026] 일 실시예에 따른 프로모터 발굴 장치는, 기관 메타-발현 데이터베이스로부터, 메타 해부학적 발현 프로파일을 이용하여 복수개의 유전자를 선택할 수 있다. 프로모터 발굴 장치는 선택된 복수개의 유전자에 대해 유클리디언 거리(Euclidian distance)에 기초하여 클러스터링을 수행할 수 있다. 프로모터 발굴 장치는 클러스터링을 수행한 결과 획득된 복수개의 클러스터 중 기관 별로 선호하는 패턴을 갖는 클러스터를 결정할 수 있다. 프로모터 발굴 장치는 결정된 클러스터에 포함된 적어도 하나의 유전자를 선택할 수 있다.
- [0027] 다만, 이는 일 예일 뿐, 프로모터 발굴 장치가 기관 메타-발현 데이터베이스로부터 적어도 하나의 유전자를 선택하는 방법이 전술한 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 다른 실시예에 따른 프로모터 발굴 장치는 환경-스트레스 메타 발현 데이터베이스로부터 선택된 복수개의 유전자의 발현량을 기초로 스크리닝을 수행하여 적어도 하나의 유전자를 선택할 수도 있다.
- [0029] 단계 S230에서, 프로모터 발굴 장치는 선택된 적어도 하나의 유전자 각각에 대해 GUS 염색 또는 유전자형 분석을 수행할 수 있다.
- [0030] 일 실시예에 따른 프로모터 발굴 장치는 선택된 적어도 하나의 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 종자가 배양됨에 따라, 배양된 종자로부터 추출된 DNA 정보를 획득할 수 있다. 프로모터 발굴 장치는 배양된 종자로부터 획득된 DNA의 유전자형을 분석할 수 있다. 다른 실시예에 따른 프로모터 발굴 장치는 선택된 적어도 하나의 유전

자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 종자가 스트레스 환경에서 배양됨에 따라, 배양된 종자로부터 추출된 DNA 정보를 획득할 수 있다. 이 경우에도, 프로모터 발굴 장치는 배양된 종자로부터 획득된 DNA의 유전자형을 분석할 수 있다.

- [0031] 다만, 이는 일 실시예일 뿐, 프로모터 발굴 장치는 선택된 적어도 하나의 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 종자에 GUS 염색을 수행하고, 이에 대한 결과를 획득할 수도 있다.
- [0032] 단계 S240에서, 프로모터 발굴 장치는 수행 결과에 기초하여, 기관 특이적 발현 프로모터 또는 환경-스트레스 특이적 발현 프로모터를 발굴할 수 있다. 예를 들어, 프로모터 장치는 GUS 염색을 수행한 결과, 특정 기관이 GUS 염색되었는지 여부를 판단하여 프로모터를 발굴할 수 있다.
- [0033] 도 3은 일 실시예에 따라 선택된 적어도 하나의 기관 특이적 유전자의 발현 정보를 시각화한 도면이다.
- [0034] 도 3을 참조하면, 벼 게놈 주식 프로젝트에서 주식이 달린 벼 유전자의 통합 및 메타 발현 데이터를 이용하여 프로모터를 발굴하기 위한 후보 유전자들이 선택될 수 있다.
- [0035] 프로모터 발굴 장치는, 벼 유전자에 대한 주식 데이터로부터 LOC_id (예; LOC_Os07g40320)로 분류된 55,801 개의 유전자 정보를 획득할 수 있다. 프로모터 발굴 장치는, 55,801개의 벼 유전자 중에서 기관 우선 유전자를 찾기 위해 NCBI에서 제공하는 983 rice Affymetrix array anatomical data로 구성된 메타 해부학적 발현 프로파일을 이용할 수 있다. 또한, 프로모터 발굴 장치는, Euclidian distance 알고리즘을 사용하여 클러스터링 분석을 수행하여, 유전자를 임의의 개수의 해부학적 클러스터로 그룹화할 수 있다. 클러스터링 분석을 통해, 프로모터 발굴 장치는 각 기관별로 선호하는 표현 패턴을 보이는 5개 클러스터를 획득할 수 있다(1. leaf/flag leaf/shoot, 2. root, 3. seed/embryo/endosperm, 4. anther/pollen, 5. ubiquitous). 프로모터 발굴 장치는 5개의 클러스터에서 각각 100개의 유전자를 선별할 수 있다. 프로모터 발굴 장치는, 도 3에 도시된 바와 같이, 선별된 500개 유전자에 대한 발현 정보를 MultiExperiment Viewer (MeV) 프로그램을 사용하여 히트맵으로 시각화할 수 있다.
- [0036] 도 4는 일 실시예에 따라 선택된 기관 특이적인 두 개 유전자에 대한 유전자형 분석 결과 및 GUS 염색 결과를 나타낸 도면이다.
- [0037] 일 실시예에 따른 프로모터 발굴 장치는, 선별된 500개 유전자 중에서 앞에서 특이적으로 발현되는 LOC_Os02g38020 유전자와, 기관 전체에서 발현되는 LOC_Os06g15990 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 씨앗을 확보할 수 있다. 확보된 돌연변이 종자를 기반으로 유전자형을 분석하는 과정은 다음과 같다.
- [0038] - 히트맵 데이터와 실제 발현이 동일한지 확인하기 위해 MS배지(Murashige and Skoog Medium)에 종자를 치상한 뒤 일주일 간 인큐베이터에서 키운 후, 그 후 DNA 추출을 위해 뿌리 조직을 조금 떼어 가루 형태로 만들
- [0039] - DNA extraction buffer 1ml을 넣고 잘 섞어 준 후, Chloroform 700ul를 첨가 후 12,000rpm으로 10분 동안 원심분리
- [0040] - 상층액 400ul을 새 tube로 옮기고 Isopropanol를 300ul 넣은 후 잘 섞어 -4℃ 냉동실에 10분 보관
- [0041] - 12,000rpm 조건으로 10분 간 원심분리하고, 상층액을 제거한 뒤에 75% EtOH 700ul을 넣고, DNA pellet이 떨어질 정도로만 섞어 줌
- [0042] - 12,000rpm 조건으로 5분 간 원심분리하고 EtOH를 제거한 뒤 DDW를 50ul 넣어줌.
- [0043] - 유전자형 분석을 위해 합성된 DNA를 주형으로 하여 PCR 실험을 수행(PCR 조건은 95℃에서 5분 후; 95℃에서 30초, 57℃에서 30초, 72℃에서 1분 30초를 28회 혹은 그 이상 반복)
- [0044] 일 실시예에 따른 프로모터 발굴 장치는, 전술한 과정을 통해 LOC_Os02g38020과 LOC_Os06g15990의 유전자형을 분석할 수 있으며, 그 결과는 도 4에 도시된 바와 같다. LOC_Os02g38020과 LOC_Os06g15990의 유전자형을 분석하기 위해 사용된 프라이머 서열은 하기 표 1과 표 2와 같다.

표 1

[0046]

LOC_Os02g38020의 유전자형 프라이머

Primer name	Sequencing (5'-3')
LOC_Os02g38020 F (서열 번호 1)	GCAACTTTTACAAGGGATAG
LOC_Os02g38020 R (서열 번호 2)	CGGCAAATGATATTGCAGTA

표 2

[0047]

LOC_Os06g15990의 유전자형 프라이머

Primer name	Sequencing (5'-3')
LOC_Os06g15990 F (서열 번호 3)	AACCGATGTGAATTGCCTCG
LOC_Os06g15990 R (서열 번호 4)	CCTATAGAACAGCTGAAGCC

[0048]

다른 실시예에 따른 프로모터 발굴 장치는, GUS 염색을 통한 기관 특이적 유전자 프로모터의 유효성을 검사할 수 있다.

[0049]

식물체의 기관 특이적 GUS 발현을 확인하기 위하여, 종자 MS 배지에 10개씩 7일간 배양한 후 모든 개체를 GUS 염색 처리할 수 있다. GUS 용액은 0.5M sodium phosphate buffer 200ml, 12.5mM potassium ferricyanide 100ml, 12.5mM potassium ferrocyanide 100ml, 0.5M EDTA 20ml, 10% Triton X-100 50ml, 10ml 의 DMSO (dimethyl sulfoxide)에 녹인 X-gluc 1g과 Methanol 200ml을 넣고 증류수로 1L의 부피를 맞추어 제조되었다. 각 계통의 식물체는 모두 15ml의 GUS 염색액에 5시간 처리한 후 70% 에탄올과 100% 에탄올을 순차적으로 이용하여 상온에서 탈색될 수 있다. 그 결과는 도 4에 도시되어 있다.

[0050]

도 4의 (B)와 (D)는 GUS 염색된 식물체의 모습을 관찰한 사진이다. 유전자형 분석을 통해 T-DNA가 삽입되지 않은 야생형은 염색이 되지 않는 반면, T-DNA가 삽입된 돌연변이체는 각각 잎과 기관 전체에 GUS 염색이 된 것을 확인할 수 있다. 즉, 프로모터 장치는 GUS 염색 결과를 통해 LOC_Os02g38020는 앞에서, LOC_Os06g15990는 기관 전체에서 발현되는 것을 확인할 수 있고, 이 두 유전자의 프로모터가 기관 특이적인 발현 프로모터로 작용할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0051]

도 5는 일 실시예에 따라 선택된 환경-스트레스 특이적인 유전자에 대한 유전자형 분석 결과 및 GUS 염색 결과를 나타낸 도면이다.

[0052]

일 실시예에 따른 프로모터 발굴 장치는, 가뭄 스트레스 특이적인 한 개 유전자에 대한 유전자형 분석을 위해, 가뭄에 반응하는 유전자를 선별하기 위해 이전에 보고된 RNA-seq 분석에서 차등적으로 발현된 유전자 (DEG)를 사용할 수 있다. (GEO 가입 번호; GSE92989). 프로모터 발굴 장치는 이를 대조군과 비교하여, 가뭄 처리 동안 FPKM 값 (fragments per kilo-base per million fragments mapped)이 가장 높은 100개의 유전자를 스크리닝할 수 있다. 그 중 LOC_Os07g40320 유전자에 T-DNA가 삽입된 돌연변이 씨앗이 확보되었으며, 히트맵 데이터와 실제 발현이 동일한지 확인하기 위해 MS배지(Murashige and Skoog Medium)에 종자를 치상한 뒤 일주일 간 인큐베이터에서 키웠다. 도 4를 참조하여 전술한 방법으로 DNA 추출을 하고, 유전자형 분석을 위해 합성된 DNA를 주형으로 하여 PCR 실험을 수행한 결과를 기초로, 프로모터 발굴 장치는 LOC_Os07g40320의 유전자형을 분석할 수 있다. 유전자형 분석 결과는 도 5에 도시되어 있다. 이 때, PCR은 도 4를 참조하여 전술한 조건과 동일하게 수행될 수 있다

[0053]

프로모터 발굴 장치는 유전자형 분석을 통해 T-DNA가 삽입되지 않은 야생형은 염색이 되지 않는 반면, T-DNA가 삽입된 돌연변이체는 각각 잎과 기관 전체에 GUS 염색이 된 것을 확인할 수 있다. LOC_Os07g40320의 유전자형을 분석하기 위해 사용된 프라이머 서열은 하기 표 3과 같다.

표 3

[0054]

LOC_Os07g40320의 유전자형 프라이머

Primer name	Sequencing (5'-3')
LOC_Os07g40320 F (서열 번호 5)	AATTGGTCGACTCTTCTGTC
LOC_Os07g40320 R (서열 번호 6)	GAGTCGCGTACTCTTGAGTT

[0055]

다른 실시예에 따른 프로모터 발굴 장치는, 다음의 과정을 거친 유전자의 데이터를 기초로 프로모터를 발굴할 수 있다.

[0056]

- 식물체의 가뭄 스트레스 특이적 GUS 발현을 확인하기 위하여, MS 배지에 25개 종자를 7일간 배양한 후 다섯 그룹으로 나누어 가뭄 처리를 0, 30분, 1시간, 2시간, 4시간 처리 후 GUS 염색을 실시/ 도 5의 (D)는 가뭄 스트레스 처리 시간이 길수록 GUS 염색이 진하게 나타나는 뿌리 모습을 관찰한 사진이다.

[0057]

- LOC_Os07g40320 유전자가 가뭄에 반응하는지 확인하기 위해 0시간, 1시간, 4시간 가뭄이 처리된 야생형 벼로부터 RNA 추출 실험을 수행

[0058]

- 각 기관 샘플을 갈아서 가루 형태로 만든 후, TRI reagent(RNAiso)를 sample 0.1g 당 1ml을 첨가하여 섞어줌

[0059]

- BCP(1-bromo-3-chloropropane) 100ul를 첨가 후, 4' C에서 12,000rpm으로 15분 동안 원심분리

[0060]

- 상층액 500ul을 새 tube로 옮기고 Isopropanol 500ul을 넣은 후 잘 섞어줌.₩

[0061]

- 4' C에서 12,000rpm 조건으로 10분 간 원심분리하고, 상층액을 제거한 뒤에 75% EtOH 700ul을 넣고, RNA pellet이 떨어질 정도로만 섞어줌

[0062]

- EtOH를 제거하고 DEPC-treated DDW을 50ul 넣은 후, 55~60' C에서 10~15분 간 보관

[0063]

- 이렇게 추출한 RNA를 역전사효소와 DNA 중합효소에 의하여 상보적 DNA (complementary DNA, cDNA)로 재합성

[0064]

- 합성된 cDNA를 주형으로 하여 qRT-PCR 실험을 수행하였다. qRT-PCR 조건은 95℃에서 20초 후; 95℃에서 5초, 58℃에서 10초, 72℃에서 20초를 40회 반복

[0065]

전술한 과정을 통해, 프로모터 발굴 장치는 LOC_Os07g40320 유전자의 가뭄 스트레스 발현 양상을 분석할 수 있으며, 그 결과는 도 5의 E에 도시된 바와 같다. 도 5의 E에서, LOC_Os07g40320 유전자의 발현은 가뭄 스트레스 동안 증가한 것을 확인하였다. LOC_Os07g40320의 발현을 분석하기 위해 사용된 프라이머 서열은 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0066]

LOC_Os07g40320의 발현용 프라이머

Primer name	Sequencing (5'-3')
LOC_Os07g40320 발현 F (서열 번호 7)	TGCTTTTGAATTGGCTTCT
LOC_Os07g40320 발현 R (서열 번호 8)	TGGTGAATATCCAACCGAA

[0068]

프로모터 발굴 장치는 LOC_Os07g40320은 GUS 염색과 발현 분석을 통해 가뭄 스트레스에 반응하는 것을 확인할 수 있고, 이 유전자의 프로모터가 가뭄 스트레스 특이적인 발현 프로모터로 작용할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0069]

도 6은 일 실시예에 따른 프로모터 발굴 장치(600)를 설명하기 위한 블록도이다.

[0070]

도 6을 참조하면, 전자 장치(600)는 메모리(610) 및 프로세서(620)를 포함할 수 있다. 상기 실시 예들에서 제안한 프로모터 발굴 방법을 설계하기 위한 명령어가 메모리(610)에 저장될 수 있다. 다만, 이는 일 예일 뿐, 메모리(610)에 저장되는 정보가 전술한 예에 한정되는 것은 아니다.

[0071]

프로세서(620)는 메모리(610)에 저장된 적어도 하나의 명령어를 실행하여, 기관 메타-발현 및 스트레스 메타-발

현 데이터베이스로부터 기 설정된 개수의 기관 특이적 또는 환경-스트레스 특이적 유전자를 선택할 수 있다. 또한, 프로세서(620)는 메모리(610)에 저장된 적어도 하나의 명령어를 실행함으로써, 프로모터 인덱싱 데이터베이스를 이용하여, 선택된 유전자에 대한 프로모터 트랩 라인을 검색하여 적어도 하나의 유전자를 선택할 수 있다. 프로세서(620)는 메모리(610)에 저장된 적어도 하나의 명령어를 실행함으로써, 선택된 적어도 하나의 유전자 각각에 대한 GUS 염색 또는 유전자형 분석을 수행하고, 수행 결과에 기초하여, 기관 특이적 발현 프로모터 또는 환경-스트레스 특이적 발현 프로모터를 발굴할 수 있다.

[0072] 본 발명에 따른 장치는 프로세서, 프로그램 데이터를 저장하고 실행하는 메모리, 디스크 드라이브와 같은 영구 저장부(permanent storage), 외부 장치와 통신하는 통신 포트, 터치 패널, 키(key), 버튼 등과 같은 사용자 인터페이스 장치 등을 포함할 수 있다. 소프트웨어 모듈 또는 알고리즘으로 구현되는 방법들은 상기 프로세서상에서 실행 가능한 컴퓨터가 읽을 수 있는 코드들 또는 프로그램 명령들로서 컴퓨터가 읽을 수 있는 기록 매체 상에 저장될 수 있다. 여기서 컴퓨터가 읽을 수 있는 기록 매체로 마그네틱 저장 매체(예컨대, ROM(read-only memory), RAM(random-access memory), 플로피 디스크, 하드 디스크 등) 및 광학적 판독 매체(예컨대, 시디롬(CD-ROM), 디브이디(DVD: Digital Versatile Disc)) 등이 있다. 컴퓨터가 읽을 수 있는 기록 매체는 네트워크로 연결된 컴퓨터 시스템들에 분산되어, 분산 방식으로 컴퓨터가 판독 가능한 코드가 저장되고 실행될 수 있다. 매체는 컴퓨터에 의해 판독가능하며, 메모리에 저장되고, 프로세서에서 실행될 수 있다.

[0073] 본 발명에서 인용하는 공개 문헌, 특허 출원, 특허 등을 포함하는 모든 문헌들은 각 인용 문헌이 개별적으로 및 구체적으로 병합하여 나타내는 것 또는 본 발명에서 전체적으로 병합하여 나타낸 것과 동일하게 본 발명에 병합될 수 있다.

[0074] 본 발명의 이해를 위하여, 도면에 도시된 바람직한 실시 예들에서 참조 부호를 기재하였으며, 본 발명의 실시 예들을 설명하기 위하여 특정 용어들을 사용하였으나, 특정 용어에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니며, 본 발명은 당업자에 있어서 통상적으로 생각할 수 있는 모든 구성 요소들을 포함할 수 있다.

[0075] 본 발명은 기능적인 블록 구성들 및 다양한 처리 단계들로 나타내어질 수 있다. 이러한 기능 블록들은 특정 기능들을 실행하는 다양한 개수의 하드웨어 또는/및 소프트웨어 구성들로 구현될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 하나 이상의 마이크로프로세서들의 제어 또는 다른 제어 장치들에 의해서 다양한 기능들을 실행할 수 있는, 메모리, 프로세싱, 로직(logic), 룩업 테이블(look-up table) 등과 같은 직접 회로 구성들을 채용할 수 있다. 본 발명에의 구성 요소들이 소프트웨어 프로그래밍 또는 소프트웨어 요소들로 실행될 수 있는 것과 유사하게, 본 발명은 데이터 구조, 프로세스들, 루틴들 또는 다른 프로그래밍 구성들의 조합으로 구현되는 다양한 알고리즘을 포함하여, C, C++, 자바(Java), Python, 어셈블러(assembler) 등과 같은 프로그래밍 또는 스크립팅 언어로 구현될 수 있다. 기능적인 측면들은 하나 이상의 프로세서들에서 실행되는 알고리즘으로 구현될 수 있다. 또한, 본 발명은 전자적인 환경 설정, 신호 처리, 및/또는 데이터 처리 등을 위하여 종래 기술을 채용할 수 있다. "매커니즘", "요소", "수단", "구성"과 같은 용어는 넓게 사용될 수 있으며, 기계적이고 물리적인 구성들로서 한정되는 것은 아니다. 상기 용어는 프로세서 등과 연계하여 소프트웨어의 일련의 처리들(routines)의 의미를 포함할 수 있다.

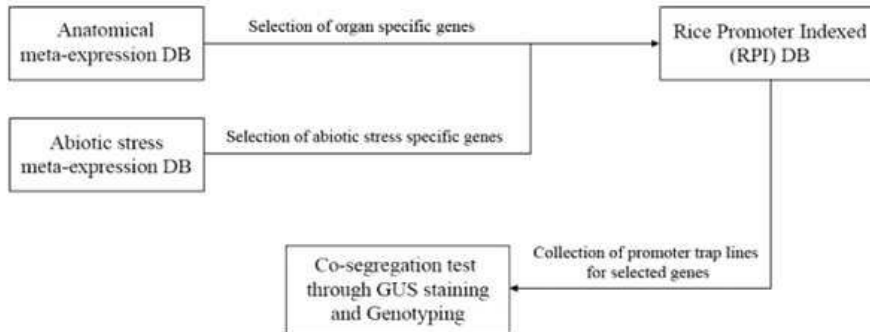
[0076] 본 발명에서 설명하는 특정 실행들은 일 실시 예들로서, 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 명세서의 간결함을 위하여, 종래 전자적인 구성들, 제어 시스템들, 소프트웨어, 상기 시스템들의 다른 기능적인 측면들의 기재는 생략될 수 있다. 또한, 도면에 도시된 구성 요소들 간의 선들의 연결 또는 연결 부재들은 기능적인 연결 및/또는 물리적 또는 회로적 연결들을 예시적으로 나타낸 것으로서, 실제 장치에서는 대체 가능하거나 추가의 다양한 기능적인 연결, 물리적인 연결, 또는 회로 연결들로서 나타내어질 수 있다. 또한, "필수적인", "중요하게" 등과 같이 구체적인 언급이 없다면 본 발명의 적용을 위하여 반드시 필요한 구성 요소가 아닐 수 있다.

[0077] 본 발명의 명세서(특히 특허청구범위에서)에서 "상기"의 용어 및 이와 유사한 지시 용어의 사용은 단수 및 복수 모두에 해당하는 것일 수 있다. 또한, 본 발명에서 범위(range)를 기재한 경우 상기 범위에 속하는 개별적인 값을 적용한 발명을 포함하는 것으로서(이에 반하는 기재가 없다면), 발명의 상세한 설명에 상기 범위를 구성하는 각 개별적인 값을 기재한 것과 같다. 마지막으로, 본 발명에 따른 방법을 구성하는 단계들에 대하여 명백하게 순서를 기재하거나 반하는 기재가 없다면, 상기 단계들은 적당한 순서로 행해질 수 있다. 반드시 상기 단계들의 기재 순서에 따라 본 발명이 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 모든 예들 또는 예시적인 용어(예들 들어, 등등)의 사용은 단순히 본 발명을 상세히 설명하기 위한 것으로서 특허청구범위에 의해 한정되지 않는 이상 상기 예들 또는 예시적인 용어로 인해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다. 또한, 당업자는 다양한 수정,

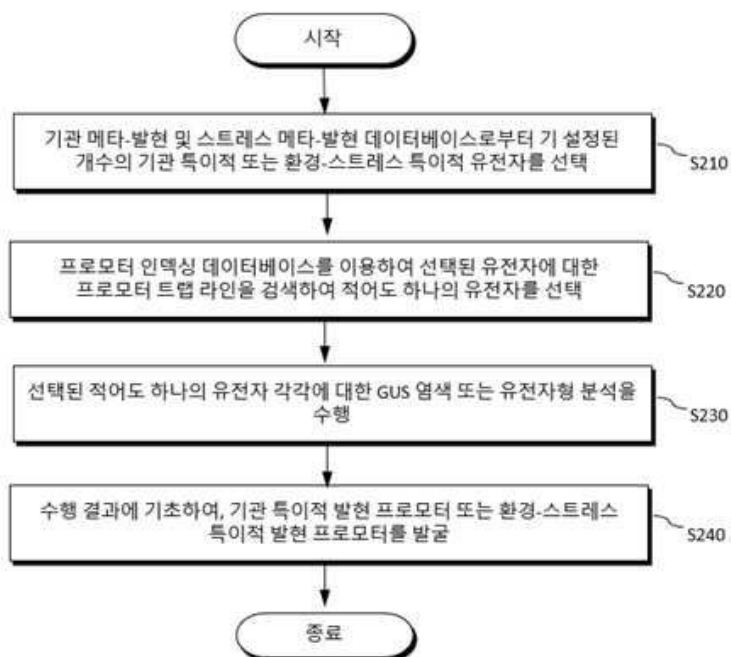
조합 및 변경이 부가된 특허청구범위 또는 그 균등물의 범주 내에서 설계 조건 및 팩터에 따라 구성될 수 있음을 알 수 있다.

도면

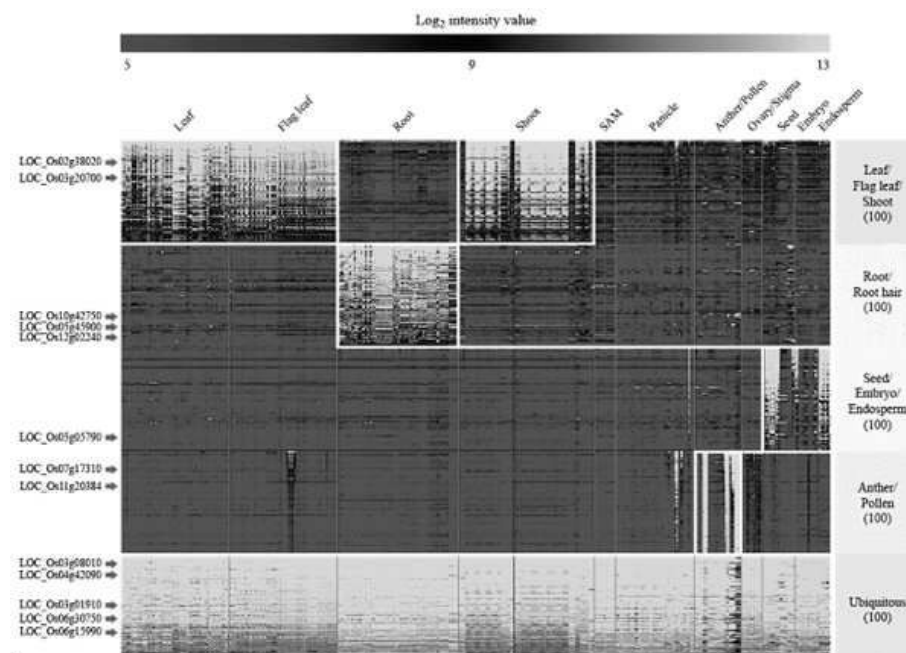
도면1



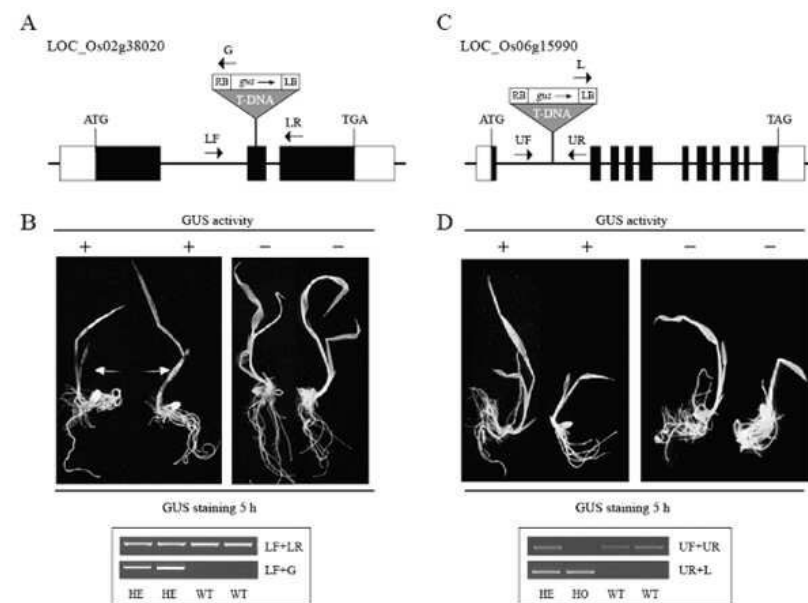
도면2



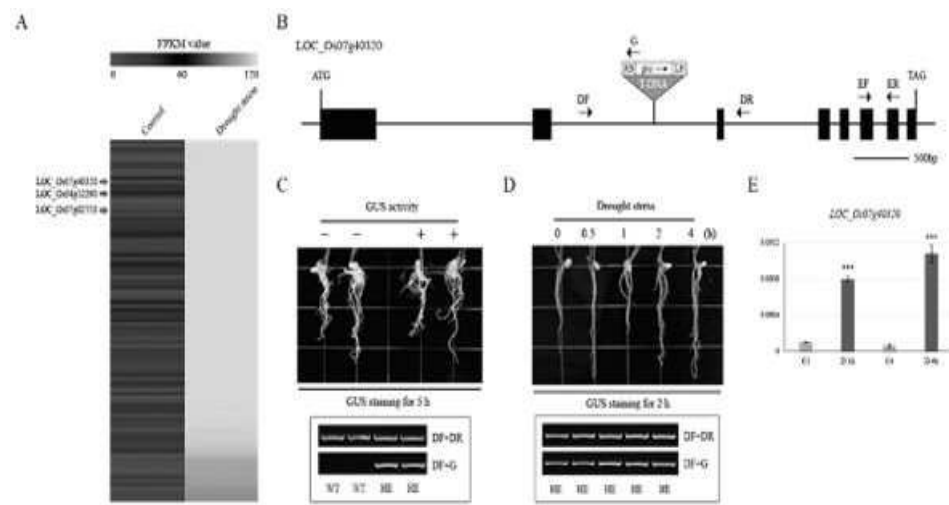
도면3



도면4



도면5



도면6

