



- (51) 국제특허분류:
C12N 15/55 (2006.01) A01H 5/00 (2006.01)
C12N 15/82 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/000092
- (22) 국제출원일: 2013년 1월 7일 (07.01.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0030376 2012년 3월 26일 (26.03.2012) KR
- (71) 출원인: 경상대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 660-701 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: **곽연식 (KWAK, Youn-Sig)**; 660-783 경상남도 진주시 서장대로 235, 이현주공아파트 205동 305호, Gyeongsangnam-do (KR). **허빛나 (HEO, Bit-Na)**; 630-857 경상남도 창원시 마산회원구 내서읍 아랫구슬길, 광천아파트 나동 207호, Gyeongsangnam-do (KR).
- (74) 대리인: **위병갑 (WIE, Byoung-Gab)**; 137-885 서울특별시 서초구 서초대로 255, 고덕빌딩 401호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

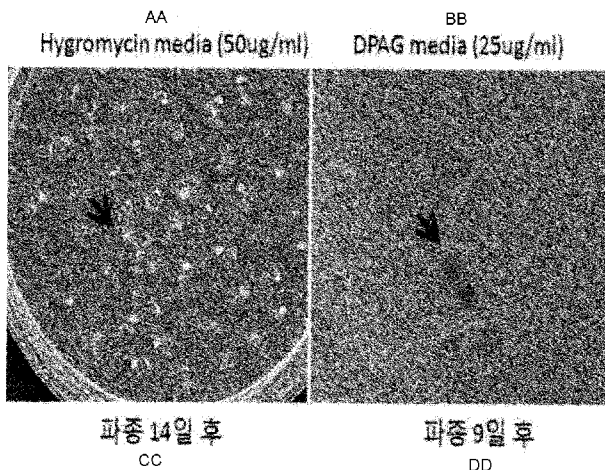
공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: USE OF DAPG HYDROLASE GENE AS MARKER FOR SCREENING TRANSGENIC PLANTS

(54) 발명의 명칭: DAPG 가수분해효소 유전자의 형질전환 식물 선별 마커로서의 용도

[Fig. 3]



AA ... Hygromycin media (50µg/ml)
BB ... DPAG media (25µg/ml)
CC ... 14 days after seeding
DD ... 9 days after seeding

(57) Abstract: The present invention relates to the use of a 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) hydrolase gene (*phlG*) as a marker for screening transgenic plants, and more particularly, to a marker comprising a *phlG* gene for screening transgenic plants, to a recombinant plant expression vector comprising the marker, to a plant having undergone transgenesis by means of the vector, and to a method for screening transgenic plants using the vector. Since less contamination occurs in a transgenic plant screening system that uses the marker of the present invention during the screening process than a transgenic screening system that uses conventional antibiotics, and also the seed of a non-transgenic is not germinated in a DAPG medium, the present invention provides the effects of less time consumed for screening and easy use.

(57) 요약서: 본 발명은 DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) 가수분해효소 유전자(*phlG*)의 형질전환 식물 선별 마커로서의 용도에 관한 것으로서, 구체적으로 *phlG* 유전자를 포함하는 형질전환 식물 선별용 마커, 상기 마커를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 식물, 및 상기 벡터를 이용한 형질전환 식물 선별 방법 등에 관한 것이다. 본 발명의 유전자 마커를 이용한 형질전환 식물 선별 시스템은, 기존의 항생제를 이용한 형질전환체 선별 시스템에 비하여 선별 과정에서 오염이 적고, DAPG 배지에서 비-형질전환체의 종자는 발아하지 않기 때문에 선별에 더 짧은 시간이 소요되며 손쉽게 이

용할 수 있는 효과가 있다.

명세서

발명의 명칭: D A P G 가수분해효소 유전자의 형질전환 식물 선별 마커로서의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) 가수분해효소 유전자(*phlG*)의 형질전환 식물 선별 마커로서의 용도에 관한 것으로서, 구체적으로 *phlG* 유전자를 포함하는 형질전환 식물 선별용 마커, 상기 마커를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터, 상기 벡터로 형질전환된 식물 및 상기 벡터를 이용한 형질전환 식물 선별 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol)는 페놀 화합물의 일종으로서, 과거에서부터 상당히 광범위하게 연구가 이루어져 온 슈도모나스(*Pseudomonas*) 항생제 중의 하나이다. DAPG는 박테리아, 곰팡이, 선충 뿐만 아니라 식물에 이르기까지 상당히 광범위하게 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다(Broadbent, D., et al. 1976. C-Acetylphloroglucinols from *Pseudomonas fluorescens*. *Phytochemistry* 15:1785; Keel, et al. 1990. *Pseudomonads* as antagonists of plant pathogens in the rhizosphere: role of the antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of black root rot of tobacco. *Symbiosis* 9:327-341; Keel, et al. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 5:4-13; Reddi, et al. 1969. *Pseudomonas fluorescens* strain 26-o, a producer of phytotoxic substances. *Mikrobiologiya* 38:909-913; 및 Thomashow, et al. 1995. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control, p. 187-235. In G. Stacey and N. Keen (ed.), *Plant-microbe interactions*, vol. 1. Chapman & Hall, New York, N.Y). DAPG는 다양한 토양에서 분리된 여러 형광 슈도모나스 종들에 의해 생산되며, 한 종류 이상의 토양 유래 질병들을 조절하는 능력을 가지고 있다(Paulsen, et al. 2005. Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat. Biotechnol.* 23:873-878). 또한 직접적인 항미생물 활성 이외에도, DAPG는 병원체에 대한 식물의 전신 저항성(systemic plant resistance)을 유도하는 신호로 기능할 수 있다(Iavicoli, A., et al. 2003. Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:851-858).
- [3] *P. fluorescens* CHA0를 포함한 여러 슈도모나스 종들에서 DAPG의 생합성에 필요한 염색체 부위가 발견되었다(Schnider-Keel, et al. 2000. Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and

pyoluteorin. J. Bacteriol. 182:1215-1225). DAPG 유전자좌(locus)는 단일 오페론으로 전사되는 4개의 생합성 유전자 *phlABCD* 를 포함하며, 이들은 DAPG의 합성에 필요하다. *phlE* 유전자는 *phlABCD* 오페론의 바로 아래(downstream)에 위치하며, DPAG 저항성과 관련이 있어 보이는 막 관통 투과효소(putative transmembrane permease)를 암호화한다(Abbas, et al. 2004. The putative permease PhlE of *Pseudomonas fluorescens* F113 has a role in 2,4-diacetylphloroglucinol resistance and in general stress tolerance. Microbiology 150:244-2450). 다양하게 전사되는 *phlF* 유전자는 *phlA* 옆에 위치하며, DAPG 생합성 오페론의 경로-특이적(pathway-specific) 전사 억제인자를 암호화한다. DAPG는 PhlF를 *phlA* 프로모터로부터 분리시키는 신호로 작용하며, 그에 따라 그 생합성을 스스로 유발한다(Abbas, et al. 2002; Haas, D., and C. Keel. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. Annu. Rev. Phytopathol. 41:117-153; Schnider-Keel, et al. 2000). *phlG*는 *P. fluorescens* CHA0의 DAPG 생합성 유전자좌 내에 있는 또 다른 유전자로서, *phlF* 유전자와 *phlH* 유전자 사이에 존재한다(Schnider-Keel, et al. 2000). *phlG*는 높은 기질 특이성으로 잠재적인 항생제인 DAPG를 독성이 약한 MAPG로 전환하는 과정을 촉매하는 효소를 암호화하는 것으로 보고되었다(Melanie Bottiglieri and Christoph Keel. Characterization of PhlG, a Hydrolase That Specifically Degrades the Antifungal Compound 2,4-Diacetylphloroglucinol in the Biocontrol Agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Appl Environ Microbiol. 2006 January; 72(1): 418-427).

- [4] 한편, 종래 형질전환 식물을 선별하는데 이용된 대부분의 마커 유전자는 박테리아로부터 분리되었으며, 이들은 항생제 또는 제초제 등의 활성을 나타내는 물질의 독성을 분해하는 효소를 암호화한다. 그러나 독성 화학 물질을 이용하는 종래의 선별 시스템에 대해서는 비교적 고가의 화합물을 이용하여야 할 뿐 아니라, 병원체에 내성을 부여할 위험성, 오염 등 여러 문제가 제기되었다.

- [5] 이에 본 발명자들은 형질전환 식물을 선별할 수 있는 새로운 마커를 모색하던 중, DAPG와 그 가수분해 효소를 암호화하는 *phlG* 유전자의 형질전환 식물 선별용 마커로서의 용도를 발견하고 종래의 선별방법들과의 비교실험을 통해 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본 발명의 목적은 DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) 및 DAPG 가수분해 효소 유전자(*phlG*)를 이용하여 식물의 형질전환 여부를 식별할 수 있는 시스템을 제공하는 것이다.
- [7] 또한 본 발명의 다른 목적은 *phlG* 유전자를 포함하는 마커, 이를 포함하는 발현

백터, 형질전환 식물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

- [8] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 시스템을 이용하여 형질전환 식물을 선별 및 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [9] 상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) 가수분해효소 유전자(*phlG*)를 포함하는 형질전환 식물 선별용 마커를 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 형질전환 식물 선별용 마커 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 백터를 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 백터로 형질전환시킨 형질전환 식물을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 백터로 식물 세포를 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환시킨 식물 세포를 DAPG 함유 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 형질전환 식물의 선별방법을 제공한다.
- [13] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 DAPG 함유 배지에서 성장하는 식물로부터 DNA를 분리한 후, *phlG* 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 세트를 사용하여 PCR을 수행함으로써 *phlG* 유전자의 삽입 여부를 확인하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [14] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 DAPG 함유 배지에서 성장하는 식물로부터 RNA를 분리하여 그것의 cDNA를 제작한 후, *phlG* 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 세트를 사용하여 RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)을 수행함으로써 *phlG* 유전자의 발현 여부를 확인하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [15] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 *phlG* 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 세트는 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머 세트일 수 있다.
- [16] 또한, 본 발명은, 본 발명에 따른 상기 백터로 식물 세포를 형질전환시키는 단계; 상기 형질전환시킨 식물 세포를 DAPG 함유 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 DAPG 함유 배지에서 증식가능한 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 형질전환 식물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [17] 본 발명의 유전자 마커를 이용한 형질전환 식물 선별 시스템은, 기존의 항생제를 이용한 형질전환체 선별 시스템에 비하여 선별 과정에서 오염이 적고, DAPG 배지에서 비-형질전환체의 종자는 발아하지 않기 때문에 선별에 더 짧은 시간이 소모되며, 손쉽게 이용할 수 있는 방법이다.

도면의 간단한 설명

- [18] 도 1은 식물에 대한 DAPG의 독성을 나타내는 것으로서, 배지에 함유된 DAPG의 농도에 따른 애기장대의 발아 및 생육의 변화를 보여주는 사진이다.

- [19] 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 식물 형질 전환용 벡터로서 pCAMBIA1301 벡터에 *phlG* 유전자를 삽입한 pCAMBIA1301-*phlG* 벡터의 구조를 나타낸 그림이다.
- [20] 도 3은 본 발명의 벡터로 형질전환된 형질전환체의 선별을 보여준다. 화살표로 표시한 식물이 형질전환체로 선별된 것이다. 좌측은 항생물질(하이그로마이신)에 저항성을 보이는 애기장대를 나타낸다.
- [21] 도 4는 본 발명의 형질전환 식물 선별방법의 오염 정도를 실험한 결과이다. 기존의 항생제(Kanamycin) 배지의 경우 총 30개의 배지 중 8개가 오염된 반면, 본 발명에 따른 DAPG 첨가 배지의 경우 총 30개 중 2개만이 오염되었다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [22] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) 가수분해효소 유전자(*phlG*)의 형질전환 식물 선별용 마커로서의 용도에 관한 것이다. 바람직하게 상기 *phlG* 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 표시될 수 있으나, 상기 서열의 변이체도 본 발명의 범위 내에 포함됨은 당업자에게 자명할 것이다. 여기에서 '변이체'라 함은 염기서열은 변화되지만, 서열번호 1의 염기서열과 동등하거나 유사한 기능을 갖는 염기서열을 의미한다. 구체적으로, *phlG* 유전자는 서열번호 1의 염기 서열과 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 염기 서열을 포함할 수 있다. 여기에서 폴리뉴클레오티드에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인되며, 비교 영역에서의 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 두 서열의 최적 배열에 대한 참고 서열(추가 또는 삭제를 포함하지 않음)에 비해 추가 또는 삭제(gap)를 포함할 수 있다.
- [23] 다른 양태로서, 본 발명은 상기 *phlG* 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터를 제공한다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 벡터는 도 2에 기재된 pCAMBIA1301-*phlG* 벡터일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [24] 여기에서 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호화된 단백질을 발현하는 것을 지칭하는 것이다. 상기 벡터로 형질전환된 재조합 세포는 상기 세포의 자연 형태에서는 발현되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 자연 상태의 세포에서 발현되는 유전자를 발현할 수 있으나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다. 여기에서 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭한다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용될 수 있다. "발현 벡터"는 목적인 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산

서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 진핵세포에서 이용가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다. 상기 벡터는 신호 펩타이드를 코딩하는 핵산 서열을 포함할 수 있으며, 이것은 발현된 단백질의 배출(export)을 가능하게 한다. 여기에서 신호 펩타이드를 코딩하는 핵산 서열은 발현되는 이형 유전자의 5'에 직접적으로 결합되는 것이 바람직하다. 많은 진핵 세포 단백질의 분비 및 변형에 있어서, 폴리펩타이드를 분비 기구(secretion apparatus) 속으로 배출하기(steer) 위해서는 N-말단에 신호 서열을 가지는 단백질 서열과의 융합이 필요하다. 상기 벡터는 조합 효모 플라스미드(YIp : integrative yeast plasmid) 및 염색체외 플라스미드 벡터(extrachromosomal plasmid vector)가 모두 가능하나, 식물 발현 벡터인 것이 바람직하다.

- [25] 식물 발현 벡터의 바람직한 예는 아그로박테리움 투머파시엔스와 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 생산될 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 DNA를 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.
- [26] 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) 또는 포스포노트리신과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(Kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [27] 본 발명의 일실시예에 있어서, 식물 발현 벡터의 프로모터는 CaMV 35S, 액틴, 유비퀴틴, pEMU, MAS 또는 히스톤 프로모터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. "프로모터"란 용어는 구조 유전자로부터의 DNA 업스트림의 영역을 의미하며 전사를 개시하기 위하여 RNA 폴리머라아제가 결합하는 DNA 분자를 말한다. "식물 프로모터"는 식물 세포에서 전사를 개시할 수 있는 프로모터이다. "구성적 (constitutive) 프로모터"는 대부분의 환경 조건 및 발달 상태 또는 세포 분화하에서 활성이 있는 프로모터이다. 형질전환체의 선택이 각종 단계에서

각종 조직에 의해서 이루어질 수 있기 때문에 구성적 프로모터가 본 발명에서 바람직할 수 있다. 따라서, 구성적 프로모터는 선택 가능성을 제한하지 않는다. 상기 터미네이터는, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 베타 α -아밀라아제 RAmy1 A 터미네이터, 파세올린(phaseoline) 터미네이터, 아그로박테리움 투메파시엔스(*agrobacterium tumefaciens*)의 옥토파인(Octopine) 유전자의 터미네이터 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 터미네이터의 필요성에 관하여, 그러한 영역이 식물 세포에서의 전사의 확실성 및 효율을 증가시키는 것으로 일반적으로 알고 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[28] 또 다른 양태로서, 본 발명은 본 발명에 따른 재조합 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다. 본 발명에 따른 상기 식물체는 DAPG 가수분해 효소를 발현한다. 또한, 본 발명은 상기 식물체의 종자를 제공한다.

[29] 상기 식물에는 제한이 없으며, 예컨대 담배, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩 및 완두 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 쌍자엽 식물일 수 있으나, 바람직하게는 애기장대이다. 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 식물양자를 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) 입자충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투메파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등 으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다. 특히 바람직한 것은 EP A 120 516호 및 미국 특허 제4,940,838호에 기재된 바와 같은 소위 이원 벡터 기술을 이용하는 것이다.

[30] 또 다른 양태로서, 본 발명은 본 발명의 마커 유전자를 이용하여 형질전환 식물을 선별하는 방법을 제공한다. *phlG* 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터로 식물 세포를 형질전환시킨 후, 상기 형질전환시킨 식물 세포를 DAPG 함유 배지에서 배양하면, 상기 발현 벡터가 정상적으로 삽입된 형질전환 식물 세포는 DAPG 가수분해 효소가 발현되어 배지 중의 DAPG를 분해할 수 있으므로 DAPG 함유 배지에서 생존할 수 있다. 그러나, 상기 발현 벡터로 형질전환되지

않은 식물 세포는 DAPG 분해 효소를 생성하지 못하므로 DAPG 함유 배지에서 생존할 수 없게 된다. 이러한 방식으로, DAPG 분해 효소는 식물의 형질전환 여부를 선별할 수 있는 선별 마커(selection marker)로 활용될 수 있다.

- [31] 구체적으로, 상기 방법은 상기 재조합 식물 발현 벡터로 식물 세포를 형질전환시키는 단계; 및 상기 형질전환시킨 식물 세포를 DAPG 함유 배지에서 배양하는 단계를 포함한다. 먼저, 식물 세포의 형질전환 방법은 상술한 바와 같으며, 식물의 형질전환에 이용되는 "식물 세포"에는 제한이 없으며, 예컨대 배양 세포, 배양 조직, 배양기관 또는 전체 식물이 모두 포함되나, 상기 식물 세포는 DAPG에 의해 생장이 억제되는 것이어야 한다. 상기 "조직"은 분화된 또는 미분화된 식물의 조직, 예를 들면 이에 한정되진 않으나, 뿌리, 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. 상기 형질전환시킨 식물 세포를 DAPG 함유 배지에서 배양하는 단계에 있어서, 상기 DAPG 함유 배지는 식물의 종류에 따라 당업계에서 사용되는 통상의 배양 배지에 DAPG를 첨가하여 만들 수 있다. DAPG의 첨가 농도는 식물의 종류에 따라 효율적으로 선별할 수 있는 양만큼 투여될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 일실시예에 있어서, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100 μ g/mL의 농도로 첨가될 수 있다.
- [32] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 선별 방법은 상기 DAPG 함유 배지에서 성장하는 식물로부터 DNA를 분리한 후, *phlG* 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 세트를 사용하여 PCR을 수행함으로써 *phlG* 유전자의 삽입 여부를 확인하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [33] 상기 프라이머 세트는 PCR, nested PCR 또는 마이크로 PCR 용도 등으로 사용가능하다. 상기 nested PCR로 사용되는 경우 1차 PCR 프라이머 세트는 공지된 프라이머 세트와 동시에 PCR 반응시키거나 또는 1차 PCR 프라이머로 1차 PCR 후, PCR 산물에 상기 바이러스 검출용 프라이머를 반응시켜 2차 PCR을 실시할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 *phlG* 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 세트는 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머 세트가 사용될 수 있다.
- [34] 본 발명에 있어서, PCR이란 당업계에서 잘 알려져 있는 바와 같이, 일반적으로, 1) 표적 DNA 분자를 분리하기 위하여 시료를 처리하여 조추출물을 얻는 단계; 2) 효소, 버퍼, dNTP, 및 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 포함하는 수성 용액을 첨가하는 단계; 3) 상기 반응 혼합물을 열순환(thermal cycling)(예를 들면, 90 $^{\circ}$ C-96 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C 및 37 $^{\circ}$ C-55 $^{\circ}$ C)하는 단계 및 4) 증폭 DNA를 검출하는 단계를 거친다. 본 발명에 있어서, 상기 PCR은 폴리프로필렌 튜브, 96-웰 플레이트 또는 실리콘-기초 마이크로 PCR 칩에서 수행될 수 있다. 실리콘-기초 마이크로 PCR 칩을 이용하여 PCR을 수행함으로써, PCR 반응을 시간을 30분 이내로 단축할 수

있다. 상기 실리콘-기초 마이크로 PCR칩은, 예를 들면, 일면에는 실리콘 식각법으로 제작된 PCR 반응 챔버를 포함하고, 다른 일면에는 상기 PCR 반응 챔버를 가열하기 위한 가열기를 포함하는 실리콘 기판; 및 입구 및 출구가 형성되어 서로 접합된 유리기판을 포함하는 것일 수 있다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 PCR은 0.2 μ M 내지 1 μ M 농도의 각 프라이머와 0.01 pg 내지 1 μ g의 주형 DNA를 사용하여 수행될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 PCR은 변성 1초 내지 30초 (86 °C 내지 97°C) 및 어닐링 1초 내지 30초 (50 °C 내지 70°C), 신장 1초 내지 30초 (60 °C 내지 72°C)의 3 온도의 열순환 조건이나, 변성 1초 내지 30초 (86 °C 내지 97°C)와 어닐링 및 신장 (50 °C 내지 70°C)을 동시에 5초 내지 30초 동안 수행하는 2 온도 열순환 반응 조건에서 수행되는 것일 수 있다. PCR은 통상적인 열 블록 중합효소연쇄반응(Thermal Block PCR) 기기 또는 마이크로 중합효소연쇄반응(Micro PCR) 기기로 실시될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 방법은 1종의 PCR 프라이머 세트를 이용하여 본 발명의 마커를 검출할 수 있을 뿐만 아니라, 2종 이상의 PCR 프라이머 세트를 이용하여 다중 PCR(Multiplex polymerase Chain Reaction)을 수행함으로써, 한 번에 신속 정확하게 검출할 수 있다. 본 발명의 검출방법에서 채택되는 PCR 반응조건은, PCR의 종류 예컨대 nested PCR, 다중 PCR, 마이크로 PCR, 단일 PCR 등에 따라 통상의 PCR 반응조건을 채택하거나 일부 변형하여 실시할 수 있으며, 이는 본원발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 용이하게 예측할 수 있는 범주에 해당된다.

- [35] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 방법은 상기 DAPG 함유 배지에서 성장하는 식물로부터 RNA를 분리하여 그것의 cDNA를 제작한 후, *phlG* 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 세트를 사용하여 RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)을 수행함으로써 *phlG* 유전자의 발현 여부를 확인하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [36] 상기 RT-PCR은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법으로 PCR 기기(ABI 2400)를 사용하여 수행할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어, 주형 농도는 2 μ g/ 20 μ l으로, 반응액 25 μ l를 사용하여 RNA 시료를 cDNA로 전환하는 역전사 반응을 60분 (42 °C) 수행한 후에, 변성 20초 (95 °C), 어닐링 40초 (65 °C) 및 신장 60초 (72 °C)의 열순환 조건에서 50회 수행하는 방법 등을 사용할 수 있다. PCR 결과는 통상적인 PCR 검출 수단, 예컨대 전기영동 등의 방법으로 실시될 수 있다.
- [37] 또 다른 양태로서 본 발명은 상기 마커 유전자를 이용하여 형질전환 식물을 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은, 상기 벡터로 식물 세포를 형질전환시키는 단계; 상기 형질전환시킨 식물 세포를 DAPG 함유 배지에서 배양하는 단계; 및 상기 DAPG 함유 배지에서 증식 가능한 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함한다. 상기 형질전환 및 형질전환 식물을 재분화하는 방법에는 제한이 없으며, 식물의 종류에 따라 당업계에

공지되어 있는 방법을 적절히 활용할 수 있다.

[38]

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

[40]

[41] <실시예 1>

[42] **DAPG 농도에 따른 애기장대의 감수성 확인**

[43] 애기장대의 DAPG에 대한 독성을 평가하기 위하여, 표면 소독된 애기장대 종자를 식물배양 배지인 MS 고체 배지에 파종하였다. MS 배지에는 각각 0, 2.13, 4.57, 10, 21.3, 및 45.7 µg/mL의 DAPG를 첨가하였다. 종자 파종 10일 후, 발아율을 기준으로 DAPG의 독성 농도를 평가하였다(도 1).

[44]

[45] <실시예 2>

[46] **phlG 유전자의 분리**

[47] 상용화되어 있는 DNA 분리 정제 키트를 이용하여 *Pseudomonas fluorescens* CHA0 균주의 게놈(genomic) DNA를 분리하였다. 게놈 DNA로부터 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 *phlG* 유전자를 증폭하였다. 사용한 프라이머는 다음과 같다.

[48] *phlG* F : 5'-ATG GAA GCG CGC AAC ATG ACT-3' (서열번호 2),

[49] *phlG* R : 5'-TCA GGC CGC GGG GGT GCC GAA-3' (서열번호 3).

[50] PCR 반응 조건은, 95°C에서 5분간 최초 변성을 실시한 후, 95°C, 30초, 60°C, 30초, 72°C, 1분으로 30회 실시하였다. 최종적으로 72°C에서 10분간 반응시킴으로써, 유전자 증폭을 종료하였다.

[51] 증폭된 *phlG* 유전자를 클로닝 벡터인 pBlueSkriptII에 삽입하였다. pBlueSkriptII 벡터에 삽입된 *phlG* 유전자는 시퀀싱(sequencing)을 통하여 *P. fluorescens* CHA0 염기서열과 100% 동일함을 확인하였다.

[52]

[53] <실시예 3>

[54] **phlG 유전자 발현을 위한 식물 형질전환용 벡터 및 형질전환 식물의 제작**

[55] <3-1> 식물 형질전환용 발현 벡터의 제작 및 형질전환

[56] 본 발명에 따른 식물의 형질전환용 벡터를 제작하기 위하여, 상용화된 식물 형질전환용 벡터인 pCAMBIA1301을 이용하여 pCAMBIA1301-*phlG* 벡터를 제작하였다(도 2). pCAMBIA1301-*phlG* 벡터를 제작하기 위하여, pCAMBIA1301 벡터와 상기 *phlG* 가 삽입된 pBlueSkriptII-*phlG* 벡터에 *Bam*HI 및 *Kpn*I 제한효소를 처리하여 절단한 뒤, T4 DNA 리가아제(ligase)를 사용하여 절단된 *phlG* 유전자를 pCAMBIA1301에 도입하였다.

[57] 위와 같이 제작된 pCAMBIA1301-*phlG* 벡터를 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101에 도입하여 식물의 형질전환을 실시하였다.

[58]

[59] <3-2> DAPG를 이용한 형질전환체의 선별

[60] 애기장대 형질전환체에서 수확한 종자를 표면 소독한 뒤, DAPG (25 μ g/mL - 50 μ g/mL)가 첨가된 MS 배지에 파종한 후, 9일째 발아 및 성장하는 개체를 형질전환체로 선별하였다(도 3). 항생제인 하이그로마이신을 사용하여 선별할 경우 약 14일 정도의 기간이 소요되는 것과 비교하여, DAPG를 이용한 선별방법은 상대적으로 단기간 내에 선별이 가능한 장점이 있었다. 또한, 항생제인 카나마이신을 사용한 경우 총 30개의 배지 중 8개의 배지에서 오염이 발생하였으나, DAPG를 사용한 경우 2개의 배지에서만 오염이 발생하였다(도 4).

[61]

[62] *한편, DAPG 농도에 따른 형질전환체의 내성을 분석하기 위하여, 각각 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 및 100 μ g/mL 농도의 DAPG를 첨가한 MS 배지에서 종자의 발아 및 생육 정도를 관찰하였다. 대조구는 20 μ g/mL 이상에서 발아 및 생육하지 못하였으나 형질전환체는 상대적으로 고농도의 DAPG 배지에서도 정상적인 발아와 생육이 가능하였다.

[63]

[64] <3-3> 형질전환체의 *phlG* 유전자 도입 및 발현 분석

[65] DAPG를 첨가한 배지를 이용하여 형질전환체로 선별된 식물체의 옆편을 채취하여 게놈(genomic) DNA를 분리한 후, 상기 서열번호 2 및 서열번호 3의 *phlG* 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 PCR로 유전자 삽입여부를 확인하였다. PCR 반응 조건은, 95°C에서 5분간 최초 변성을 실시한 후, 95°C, 30초, 60°C, 30초, 72°C, 1분으로 30회 실시하고, 최종적으로 72°C에서 10분간 반응시켰다. PCR 반응산물은 아가로오스 겔에서 전기영동하여 확인하였다.

[66] 추가적으로, 상기 선별된 형질전환체들에서 *phlG* 유전자의 발현을 확인하기 위하여, 역전사 중합효소연쇄반응(Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)을 실시하였다. 우선 DAPG 배지에서 발아 생육한 애기장대에서 절편을 채취하여 RNA를 분리하였다. 분리정제된 RNA로부터 cDNA를 제작한 후, *phlG* 특이적 프라이머를 사용하여 95°C, 30초; 60°C, 30초; 72°C, 1분의 30회 조건으로 PCR을 수행하여 *phlG* 유전자의 발현을 확인하였다.

[67]

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

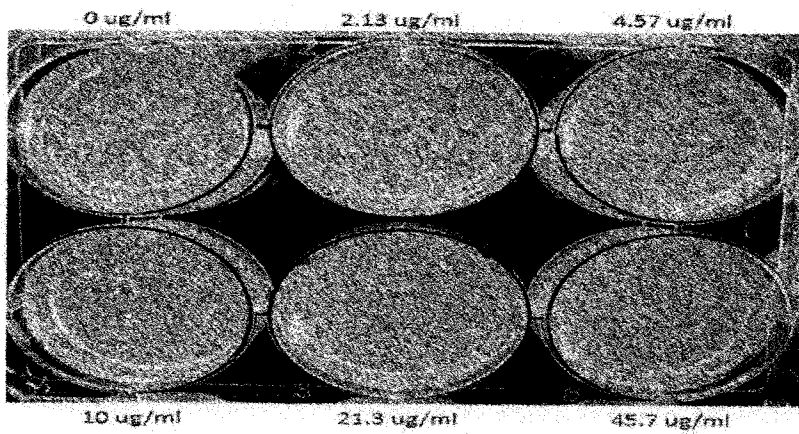
서열목록 Free Text

[69] 서열목록 전자파일 첨부

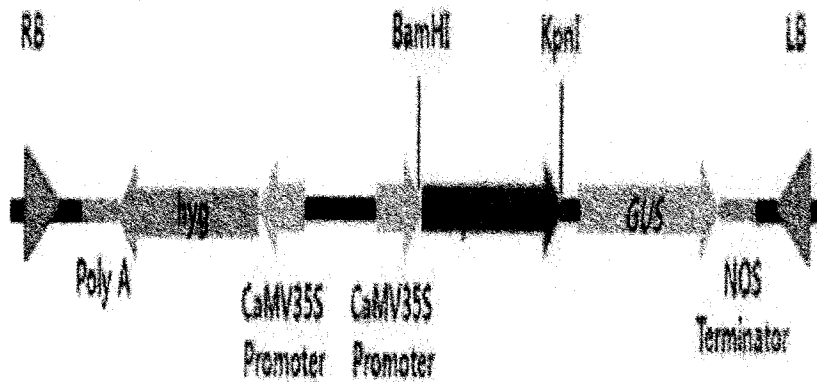
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol) 가수분해효소 유전자(*phlG*)를 포함하는 형질전환 식물 선별용 마커.
- [청구항 2] 제1항의 마커 유전자를 포함하는 재조합 식물 발현 벡터.
- [청구항 3] 제2항의 벡터로 형질전환시킨 형질전환 식물.
- [청구항 4] 제2항의 벡터로 식물 세포를 형질전환시키는 단계; 및
상기 형질전환시킨 식물 세포를 DAPG 함유 배지에서 배양하는 단계를 포함하는, 형질전환 식물의 선별방법.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 DAPG 함유 배지에서 성장하는 식물로부터 DNA를 분리한 후, *phlG* 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 세트를 사용하여 PCR을 수행함으로써 *phlG* 유전자의 삽입 여부를 확인하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 식물의 선별방법.
- [청구항 6] 제4항에 있어서,
상기 DAPG 함유 배지에서 성장하는 식물로부터 RNA를 분리하여 그것의 cDNA를 제작한 후, *phlG* 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 세트를 사용하여 RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)을 수행함으로써 *phlG* 유전자의 발현 여부를 확인하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 형질전환 식물의 선별방법.
- [청구항 7] 제5항 또는 제6항에 있어서,
상기 *phlG* 유전자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머 세트는 서열번호 2 및 서열번호 3의 프라이머 세트인 것을 특징으로 하는 형질전환 식물의 선별방법.
- [청구항 8] 제2항의 벡터로 식물 세포를 형질전환시키는 단계;
상기 형질전환시킨 식물 세포를 DAPG 함유 배지에서 배양하는 단계; 및
상기 DAPG 함유 배지에서 증식가능한 식물 세포로부터 형질전환 식물을 재분화하는 단계를 포함하는 형질전환 식물의 제조방법.

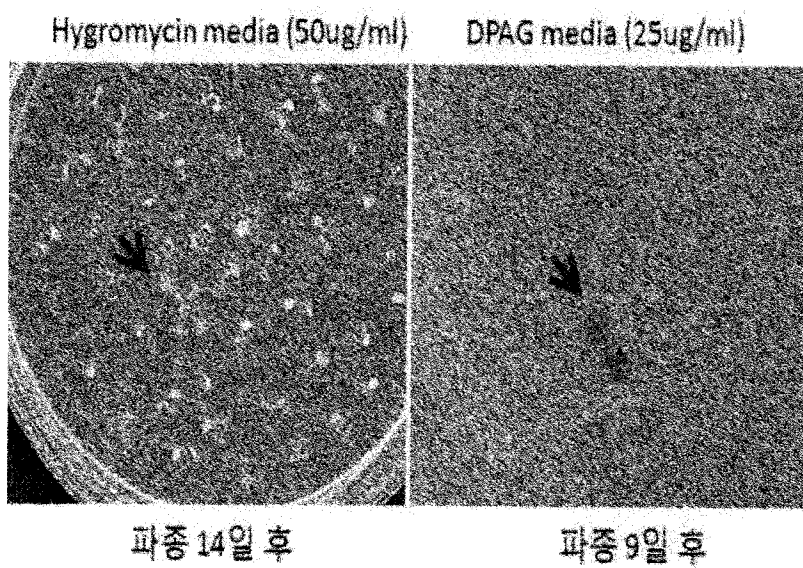
[Fig. 1]



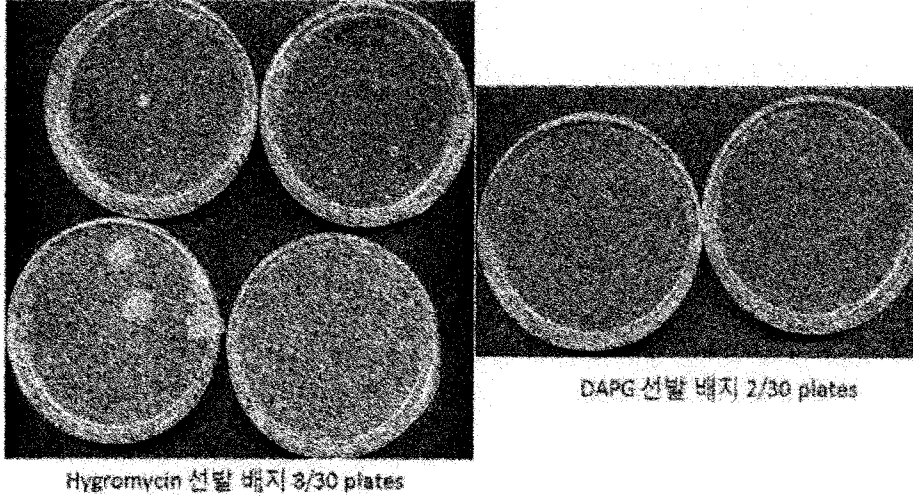
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/000092**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 15/55(2006.01)i, C12N 15/82(2006.01)i, A01H 5/00(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/55; C12N 15/29; C12N 15/113; C12N 15/09; C12N 9/02; A01H 5/00; C12Q 1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: DAPG, diacetylphloroglucinol, phlG, marker, transgenic plant, DAPG hydrolase

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BOTTIGLIGLIERI, Melanie et al., "Characterization of PhlG, a hydrolase that specifically degrades the antifungal compound 2,4 diacetylphloroglucinol in the biocontrol agent pseudomonas fluorescens CHAO", Applied and Environmental Microbiology, January 2006, vol. 72, no. 1, pages 418-427. See the entire document.	1-8
A	KR 10-2009-0050189 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 20 May 2009 See the entire document.	1-8
A	US 2009-0170093 A1 (SARADHI, Peddisetty Pardha) 02 July 2009 See the entire document.	1-8
A	JP 2008-546419 A (ZHEJIANG UNIVERSITY) 25 December 2008 See the entire document.	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 APRIL 2013 (29.04.2013)

Date of mailing of the international search report

29 APRIL 2013 (29.04.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/000092

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

☐

on paper

☒

in electronic form

b. (time)

☒

in the international application as filed

☐

together with the international application in electronic form

☐

subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/000092

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2009-0050189 A	20.05.2009	KR 10-0917574 B1	15.09.2009
US 2009-0170093 A1	02.07.2009	EP 1795611 A1	13.06.2007
		EP 1795611 B1	02.05.2012
		US 8101410 B2	24.01.2012
		WO 2007-065697 A2	14.06.2007
		WO 2007-065697 A3	04.10.2007
JP 2008-546419 A	25.12.2008	EP 1900817 A1	19.03.2008
		EP 1900817 A4	22.04.2009
		EP 1900817 B1	05.12.2012
		US 2008-0313772 A1	18.12.2008
		US 8049063 B2	01.11.2011
		WO 2007-000077 A1	04.01.2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/55(2006.01)i, C12N 15/82(2006.01)i, A01H 5/00(2006.01)i, C12Q 1/68(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/55; C12N 15/29; C12N 15/113; C12N 15/09; C12N 9/02; A01H 5/00; C12Q 1/68

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: DAPG, diacetylphloroglucinol, phlG, 마커, 형질전환 식물, DAPG 가수분해효소

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	BOTTIGLIIGLIERI, MELANIE 외 1명, `Characterization of PhlG, a hydrolase that specifically degrades the antifungal compound 2,4 diacetylphloroglucinol in the biocontrol agent pseudomonas fluorescens CHA0`, Applied and Environmental Microbiology, 2006.01., 72권, 1호, 418-427 페이지. 문서 전체 참조.	1-8
A	KR 10-2009-0050189 A (한국생명공학연구원) 2009.05.20 문서 전체 참조.	1-8
A	US 2009-0170093 A1 (SARADHI, PEDDISSETTY PARDHA) 2009.07.02 문서 전체 참조.	1-8
A	JP 2008-546419 A (절강 대학) 2008.12.25 문서 전체 참조.	1-8

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2013년 04월 29일 (29.04.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 04월 29일 (29.04.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

 대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관

허주형

전화번호 82-42-481-8150



제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

a. 출원시 또는 추후 제출된 서열목록

☐

서면

☒

전자적 형태

b. 제출시기

☒

출원시 국제출원에 포함

☐

전자적 형태로 국제출원과 함께 제출

☐

조사를 위해 본 기관에 추후 제출

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시의 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

KR 10-2009-0050189 A

2009.05.20

KR 10-0917574 B1

2009.09.15

US 2009-0170093 A1

2009.07.02

EP 1795611 A1

2007.06.13

EP 1795611 B1

2012.05.02

US 8101410 B2

2012.01.24

WO 2007-065697 A2

2007.06.14

WO 2007-065697 A3

2007.10.04

JP 2008-546419 A

2008.12.25

EP 1900817 A1

2008.03.19

EP 1900817 A4

2009.04.22

EP 1900817 B1

2012.12.05

US 2008-0313772 A1

2008.12.18

US 8049063 B2

2011.11.01

WO 2007-000077 A1

2007.01.04