



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년01월04일
(11) 등록번호 10-0790809
(24) 등록일자 2007년12월26일

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/05 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0049574

(22) 출원일자 2006년06월01일

심사청구일자 2006년06월01일

(65) 공개번호 10-2007-0115325

(43) 공개일자 2007년12월06일

(56) 선행기술조사문헌

KR20040110944 A

WO0216655

(73) 특허권자
대한민국

(72) 발명자

김영미

경기 수원시 장안구 정자동 청솔마을 SK한화아파트 626동1304호

이데레사

경기 수원시 팔달구 화서2동 꽃피버들마을 금강아파트151동 1401호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 5 항

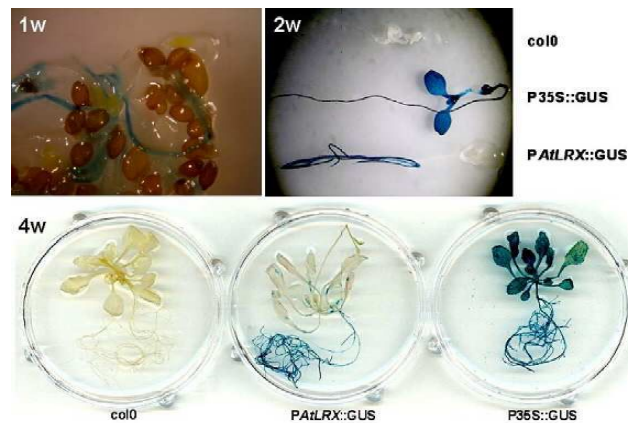
심사관 : 조경주

(54) 뿌리 특이적 발현 프로모터

(57) 요약

본 발명은 식물체 내에 외래 유용유전자의 발현 부위를 뿌리로 제한하여 조절하는 뿌리 조직 특이 발현 유도 프로모터에 관한 것으로, 보다 상세하게는 애기장대에서 분리된 익스텐신 프로모터가 뿌리 특이적으로 발현됨으로써 뿌리 작물의 농업적 형질을 개량하거나 당근, 고구마, 인삼 뿌리 등을 이용한 유용 물질 생산시 식물 생육에 영향을 주지 않고 뿌리에 국한시키고자 하는 식물 형질전환체 개발시 유용한 AtLRX 프로모터 제공을 목적으로 한다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

강상호

경기 수원시 장안구 율전동 541-3 203호

김세희

경기 용인시 기흥구 고매동 우림아파트 202동 110
3호

하선화

경기 수원시 장안구 정자동 백설마을 동양성지아파
트554동 1402호

서석철

경기 화성시 병점동 858번지 신창아파트 209동 30
4호

특허청구의 범위

청구항 1

서열목록1의 염기서열을 갖는 뿌리 특이적으로 발현하는 것을 특징으로 하는 익스텐신 프로모터*APLRX*.

청구항 2

서열목록6의 염기서열 및 서열목록7의 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 익스텐신 프로모터*APLRX*의 증폭용 프라이머.

청구항 3

삭제

청구항 4

서열목록1의 염기서열을 갖는 뿌리 특이적으로 발현하는 특징이 있는 익스텐신 프로모터*APLRX*를 포함하는 것을 특징으로 하는 외래 단백질 발현벡터 pBGWFS7-*PatLRX* (기탁번호; KACC95046).

청구항 5

서열목록1의 염기서열을 갖는 뿌리 특이적으로 발현하는 특징이 있는 익스텐신 프로모터*APLRX*를 포함하는 외래 단백질 발현벡터 pBGWFS7-*PatLRX* (기탁번호; KACC95046)가 형질전환된 것을 특징으로 하는 형질전환 식물세포.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 형질전환되는 식물세포로는 근채류 작물로서 무, 순무, 배추, 양배추, 당근, 우엉, 고구마, 마, 연근, 감자 및 생강, 약용식물로서 인삼, 쑥 및 더덕, 사료작물로서 옥수수 및 콩, 주곡작물로서 벼와 유지작물로서 유채를 포함하는 뿌리로 이용될 수 있는 식물 세포군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조직배양에 의해 무성 번식되는 형질전환 식물세포.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <35> 본 발명은 식물체 내에 외래 유용유전자의 발현 부위를 뿌리로 제한하여 조절하는 뿌리 조직특이 발현 유도 프로모터에 관한 내용이다.
- <36> 작물분자유종은 모든 종(種)의 유전자를 재료로 사용할 수 있으며 기존의 계놈 단위로만 가능하던 육종기술을 유전자 단위로 끌어내려 무한대의 육종 효과를 미세하게 조절할 수 있다는 측면에서 차세대 농업을 이끌어 갈 핵심적인 기술이다.
- <37> 이러한 작물분자유종은 기술의 효과를 극대화시키려면 1) 여러 가지 식물의 유전자를 대표할 수 있는 많은 유전자 데이터의 축적이 선행되어야 하며, 2) 다양한 작물의 형질전환 시스템이 구축되어야 하며, 3) 외부에서 삽입된 유전자의 발현을 조절할 수 있는 다양한 프로모터의 개발이 선행되어야 한다.
- <38> 외래 유전자의 발현을 식물체의 특별한 조직에만 국한시켜 형질전환 목적을 달성하는데 이용되는 공지된 프로모터들은 그 기능에 따라서 다음과 같이 분류할 수 있다.
- <39> 첫째로, 뿌리 특이 발현 프로모터이다. 아직 상용화된 사례는 없으나 애기장대 퍼옥시다제(peroxidase, prxEa)가 분리되어 뿌리 특이적 발현을 확인하였고, 최근 고구마 유래의 매즈 유전자(*ibMADS*)와 당 유도성 에이디피 글루코즈 파이로포스파타제(ADP-glucose pyrophosphatase, AGPase) 유전자가 분리되어 해당 프로모터가 뿌리에

서 특이 발현을 유도하며 당근, 무에서 뿌리 특이적 일시적 발현을 유도함을 확인하여 특허 출원(특허공보 2004-0067290, 특허공보 2004-0070820)된 바 있다. 이들 프로모터는 식량이나 식품, 또는 식품의 원료로 사용되는 주요 뿌리작물에서 농업적 형질 개량이나 유용 단백질 축적 및 유용 물질 생성 등을 목적으로 주로 사용이 기대될 수 있다.

<40> 둘째로, 종자 특이적 프로모터를 들 수 있다. 대표적인 예로서 벼 주요 저장 단백질 유전자의 프로모터들로서 황금쌀(golden rice) 개발에 사용된 벼 글루테린(glutelin) 프로모터가 현재까지 외떡잎 식물의 종자 특이적 발현을 유도하는 경우에 많이 사용되고 있고, 쌍떡잎 식물의 종자 특이적 발현을 유도하는데 주로 사용되는 프로모터로는 콩 유래 렉틴(lectin) 프로모터, 배추 유래 나핀(napin) 프로모터 및 애기장대의 종자에서 감마 토코페롤 메틸기 전이효소(γ -tocopherol methyl transferase: γ -TMT) 유전자 발현을 유도함으로써 비타민 E 생성을 증진시킨 연구에 사용된 당근 유래 DC-3 프로모터 등을 들 수 있으며 들깨 유래 올레오신(oleosin) 프로모터의 종자 특이발현 유도를 확인한 사례가 있다. 상기 종자 특이적 프로모터들은 주로 종자 자체가 식량이나 식품 또는 식품의 원료로 사용되는 주요 작물에서 유용 단백질 축적 및 유용 물질 생성 등을 목적으로 주로 사용되고 있다.

<41> 셋째로, 전신발현 유도 프로모터를 들 수 있다. 식물 전신발현 유도 프로모터로는 꽃양배추 모자이크 바이러스(CaMV: cauliflower mosaic virus)의 35S RNA 유전자의 프로모터가 대표적인 쌍떡잎식물용 프로모터로 사용되고 있으며, 벼 등의 외떡잎식물용 전신발현 유도 프로모터로는 벼 액틴(actin) 및 옥수수 유비퀴틴(ubiquitin) 유전자 프로모터들이 주로 이용되어 왔으며, 최근 벼 시토크롬 C 유전자(OsOcl)의 프로모터가 국내 연구진에 의해 개발되어 사용 중에 있다(대한민국 특허 등록 2001-0429335). 이들은 식물형질전환 기본 운반체 내에 선발마커로 이용되는 항생제나 제초제 저항성 유전자 및 리포터 유전자의 발현을 유도하기 위해 이미 내재되어 있으며, 연구적인 측면에서 목적하는 유전자의 식물체내 기능을 밝히고자 시도할 때 우선적으로 고려되는 프로모터들이다.

<42> 넷째로, 잎 등의 기타 조직 특이 프로모터를 들 수 있다. 잎 등의 광합성 조직에서만 강력한 유전자의 발현을 유도하는 벼와 옥수수 유래의 알비씨에스(rbcS: ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase small subunit) 프로모터, 아그로박테리움 유래의 식물 뿌리 발현을 유도하는 RoID 프로모터, 감자 유래 괴경 특이 발현 유도 파타틴(patatin) 프로모터, 토마토 유래의 과실 성숙 특이 발현 유도 피디에스(PDS: phytoene synthase) 프로모터, 그리고, 그 기능이 배추 꽃의 화분 특이적임이 확인된 배추 유래 올레오신(oleosin) 프로모터 등이 포함되며 본 연구소의 연구팀에 의해 꽃의 웅성기관 약의 융단조직 특이 BcA9 프로모터(참조: 특허 등록번호 10-0435143)를 세포에 독성을 갖는 Bt 단백질 유전자의 발현을 유도케 함으로써 웅성불임 작물을 개발하여 특허 등록한 사례가 있다.

<43> 그 외에도 다양한 목적에 따른 다양한 식물 유래의 식물체 각 조직에 대하여 많은 수의 프로모터들이 보고되었고 현재에도 계속 개발이 진행 중이지만, 상용화 되었거나 식물 연구자들 사이에 범용되는 프로모터의 종류는 이상에서 언급된 경우에 대부분 속하며, 개발자의 의도에 따라서 보다 정밀하게 유전자 발현의 부위를 조절할 수 있는 새로운 프로모터들이 앞으로 계속 개발될 필요성이 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<44> 본 발명은 상기와 같은 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 외래 유용 단백질 및 물질을 식물 뿌리에서 생성하거나 축적시킴으로써 식물 뿌리 성분을 변경하거나 농업적 특성을 개량하고자 할 때 사용가능한 신규한 뿌리 특이적 발현 프로모터를 제공하는 것이다.

<45> 따라서, 본 발명의 목적은 서열목록1의 염기서열을 갖는 뿌리 특이적으로 발현하는 것을 특징으로 하는 익스텐신 프로모터 *PatLRX*를 제공하는 것이다.

<46> 본 발명의 또 다른 목적은 서열목록6의 염기서열 및 서열목록7의 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 익스텐신 프로모터 *PatLRX*의 증폭용 프라이머를 제공하는 것이다.

<47> 삭제

<48> 삭제

- <49> 본 발명의 또 다른 목적은 서열목록1의 염기서열을 갖는 뿌리 특이적으로 발현하는 특징이 있는 익스텐신 프로모터 *PatLRX*를 포함하는 것을 특징으로 하는 외래 단백질 발현벡터 pBGWFS7-*PatLRX* (기탁번호; KACC95046)를 제공하는 것이다.
- <50> 본 발명의 또 다른 목적은 서열목록1의 염기서열을 갖는 뿌리 특이적으로 발현하는 특징이 있는 익스텐신 프로모터 *PatLRX*를 포함하는 외래 단백질 발현벡터 pBGWFS7-*PatLRX* (기탁번호; KACC95046)가 형질전환된 것을 특징으로 하는 형질전환 식물세포를 제공하는 것이다.
- <51> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환되는 식물세포로는 근채류 작물로서 무, 순무, 배추, 양배추, 당근, 우엉, 고구마, 마, 연근, 감자 및 생강, 약용식물로서 인삼, 쑥 및 더덕, 사료작물로서 옥수수 및 콩, 주곡작물로서 벼와 유지작물로서 유채를 포함하는 뿌리로 이용될 수 있는 식물 세포군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조직배양에 의해 무성번식되는 형질전환 식물세포를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <52> 본 발명은 식물체 내에 외래 유용유전자의 발현 부위를 뿌리로 제한하여 조절하는 뿌리 조직특이 발현 유도 프로모터에 관한 것이다.
- <53> 본 발명은 서열목록1의 염기서열을 갖는 뿌리 특이적으로 발현하는 것을 특징으로 하는 익스텐신 프로모터 *PatLRX*를 포함한다.
- <54> 본 발명은 서열목록6의 염기서열 및 서열목록7의 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 익스텐신 프로모터 *PatLRX*의 증폭용 프라이머를 포함한다.
- <55> 삭제
- <56> 삭제
- <57> 본 발명은 서열목록1의 염기서열을 갖는 뿌리 특이적으로 발현하는 특징이 있는 익스텐신 프로모터 *PatLRX*를 포함하는 것을 특징으로 하는 외래 단백질 발현벡터 pBGWFS7-*PatLRX* (기탁번호; KACC95046)를 포함한다.
- <58> 본 발명은 서열목록1의 염기서열을 갖는 뿌리 특이적으로 발현하는 특징이 있는 익스텐신 프로모터 *PatLRX*를 포함하는 외래 단백질 발현벡터 pBGWFS7-*PatLRX* (기탁번호; KACC95046)가 형질전환된 것을 특징으로 하는 형질전환 식물세포를 포함한다.
- <59> 본 발명은 상기 형질전환되는 식물세포로는 근채류 작물로서 무, 순무, 배추, 양배추, 당근, 우엉, 고구마, 마, 연근, 감자 및 생강, 약용식물로서 인삼, 쑥 및 더덕, 사료작물로서 옥수수 및 콩, 주곡작물로서 벼와 유지작물로서 유채를 포함하는 뿌리로 이용될 수 있는 식물 세포군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조직배양에 의해 무성번식되는 형질전환 식물세포를 포함한다.
- <60> 본 발명의 상기 신규한 뿌리 특이적 프로모터는 애기장대에서 분리된 익스텐신 단백질 유전자의 전사에 관여하는 프로모터이다.
- <61> 상기 익스텐신은 세포 형태를 유지하고 세포벽 강화에 관련되는 단백질로 애기장대의 전체염기서열이 밝혀져 단백질 코딩영역으로 기능을 유추하는 아노테이션(annotation)결과 익스텐신 단백질에 대한 유전자들은 전체 7개 정도가 존재하는 것으로 알려져 있다. 애기장대 유래 익스텐신 단백질 중 뿌리에 발현되는 익스텐신은 애기장대의 뿌리털 발달시 세포벽 형성 기능을 가진다
- <62> 상기 애기장대의 여러 가지 익스텐신 유전자들 중에서 본 발명의 프로모터는 뿌리털 발달과정에만 특이적으로 발현되는 익스텐신 유전자의 전사에 관여하는 익스텐신 유전자 코딩 부위의 상류 1,904bp에 해당하는 프로모터이다.
- <63> 상기 프라이머는 뿌리 특이적 프로모터인 *PatLRX*를 특이적으로 증폭하는 각각 32bp로 이루어지는 순방향 프라이머와 역방향 프라이머로 구성된다. 상기 프라이머는 당업자에게 공지된 올리고뉴클레오타이드의 합성 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 상업적으로 합성하여 사용할 수도 있다.
- <64> 상기 발현벡터 pBGWFS7-*PatLRX*은 농업생명공학연구원에 미생물 기탁 번호 KACC95046로 2006년 3월 6일에 기탁

되었다.

- <65> 상기 발현벡터 pBGWFS7-P*AtLRX*에는 본 발명의 서열목록1로 구성되는 프로모터, 제초제 저항성 유전자인 Bar 및 리포터 유전자인 *Egfp:gus*가 포함될 수 있다.
- <66> 본 발명의 뿌리 특이적 프로모터의 전사활성에 의하여 발현되는 목적 유전자의 예로는, 형질전환 대상 작물의 농업적 형질 개량을 위해서는 뿌리 병 방제를 위한 내병성 또는 병 방어 신호전달 관련 유전자들이 될 수 있다. 특히, 인삼 등 약용 뿌리작물의 경우, 내병성 유전자를 도입하게 되면 수년간 재배시 가장 문제가 되고 있는 병 방제 농약의 사용량 감소도 기대할 수 있다. 또한 뿌리작물의 배양근 세포를 이용하여 경제적으로 부가가치가 높은 약용성분이나 특정 유효성분을 생산하거나 강화하려는 목적으로 토코페롤, 베타카로틴 등과 같이 특정 영양 성분을 작물의 뿌리에서 강화하려는 경우에는 관련 물질대사경로의 생합성 유전자 또는 사포닌, 감마리놀렌산 등 약용성분 관련 생합성 유전자 등을 들 수 있으나, 여기에 한정되지 않고, 본 발명의 뿌리 특이적 프로모터를 사용하여 조절될 수 있는 각종 목적 유전자들이 포함될 수 있다.
- <67> 본 발명은 하기의 실시예에 의하여 보다 구체적으로 이해될 수 있으며, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 보호 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다. 한편, 하기 실시 예들에서 특별히 언급되지 않은 일반적으로 사용된 DNA 실험방법들은 Sambrook 등의 “Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, second edition, 1989”를 참조하였다.
- <68>
- <69> <실시 예1: 애기장대 익스텐신 유전자의 발현양상 분석>
- <70> 애기장대 익스텐신 유전자의 발현양상을 조사하기 위해서 애기장대 뿌리, 잎, 줄기 및 꽃과 발달과정 중에 있는 종자를 포함한 꼬투리로부터 전체 RNA (total RNA)를 분리하여 역전사효소 이용 핵산중합효소반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 분석을 수행하였다. 전체 RNA를 분리과정을 상세히 설명하면, 약 1g의 각 시료를 액체질소를 이용하여 막자사발로 분쇄하여 2 ml 튜브에 옮긴 다음 각 튜브에 500 μ l의 RNA 추출 완충액 (50mM sodium acetate pH 5.5, 150mM LiCl, 5mM EDTA, 0.5% SDS)과 500 μ l 페놀을 넣고 혼합한다. 혼합액을 65℃에서 10분 동안 처리한 후 상온에서 15분 동안 교반기 (rotary shaker)를 이용해 섞어주었다. 4℃에서 원심분리(10000rpm, 10분)한 후 상등액 층을 조심스럽게 새 튜브에 옮기고, 클로로포름 500 μ l를 첨가하여 잘 섞어준 후 다시 원심분리 하여 상등액을 취한다. 여기에 0.6배 부피의 8M 리튬 클로라이드 (LiCl)를 첨가한 후 -20℃에 2시간 이상 보관하였다. 4℃, 12,000rpm에서 20분간 원심분리 후 RNA 침전물을 4M LiCl와 80% 에탄올로 각각 한차례씩 씻어준 후 수득한 최종 RNA 침전물을 50 μ l의 증류수에 녹였다. RNA 용출액은 자외선 흡광도 분석기 (UV spectrophotometer)를 이용하여 A_{260}/A_{280} 를 측정하여 정량한 후, 전체 RNA 5 μ g을 주형으로 50uM oligo dT 프라이머를 이용해 50℃에서 50분, 85℃에서 5분 처리 후 얼음에서 식힌 후 여기에 다시 RNase H를 1 μ l를 첨가하고 37℃에서 20분간 처리하여 cDNA를 합성(10X RT buffer, 25mM MgCl₂, 0.1M DTT, RNase OUT, SuperScript™ RT) 하였고, 합성된 cDNA를 주형으로 익스텐신 유전자 AtLRX 특이 프라이머 세트, 즉 5'-ACCATCACCAGTTTACTATCCATC-3' (서열목록2) 염기서열의 lrx-F 프라이머와 5'-CAAGAAAAAGTAAGTGAATGTCTT-3' (서열목록3) 염기의 lrx-B 프라이머 세트를 이용하였다. 또한 사용된 RNA의 상대적인 양이 균일함을 증명하기 위한 애기장대 액틴 (actin) 프라이머 세트인 5'-CATCAGGAAGGACTGTACGG-3' (서열목록4) 염기서열의 act-F 프라이머와 5'-GATGGACCTGACTCGTCATAC-3' (서열목록5) 염기서열의 act-R을 이용하여 95℃에서 10분간 변성 후, 95℃에서 30초간 반응 후 65℃에서 30초간 어닐링반응, 72℃에서 30초간의 중합반응의 일련의 반응을 35회 실시한 후 72℃에서 7분간의 중합반응과 같은 PCR 조건으로 각각의 PCR을 수행하였다.
- <71> 역전사 PCR 반응의 결과, 애기장대 유래의 익스텐신 유전자의 전사체가 잎, 줄기, 꽃 및 종자 포함 꼬투리 조직에서는 검출되지 않는데 비해 뿌리조직에서만 특이적으로 검출되었다(도 1). 이 때 애기장대 액틴(actin) 특이 프라이머를 이용하여 사용된 RNA의 상대적인 양이 균일함을 증명하였다. 따라서 애기장대의 익스텐신 유전자가 뿌리 특이적으로 발현됨을 확인하였으므로 해당 프로모터를 분리하고자 하였다.
- <72> <실시예2: 형질전환용 플라스미드 제작>
- <73> 애기장대의 여러 조직별 발현양상을 조사한 실시 예 1에서 언급한 바와 같이, 뿌리 조직에서 특이적으로 발현을 보이는 익스텐신에 해당하는 유전자를 공개된 애기장대 전체 염기서열로부터 유전자를 검색하여 익스텐신 유전자(At1g12040)의 개시코돈 상위에 TATA box 등을 포함하는 약1.9kb 영역 (서열목록1)을 분리하고 벨기에의 겐트 대학으로부터 구입한 게이트웨이 운반체 pBGWFS7을 이용하여 P*AtLRX* 프로모터 기능 분석용 운반체를

제작하였다. 형질전환 애기장대 식물체의 잎 조직 소량을 에펜도르프 튜브에 넣고 Genomic DNA Purification Kit (I.J.BIO DNA System)을 이용하여 분리 정제하였다. DNA 용출액은 자외선 흡광도 분석기(UV spectrophotometer)를 이용하여 A_{260}/A_{280} 를 측정하여 정량하였다. 애기장대로부터 분리한 게노믹 DNA로부터 박테리아가 박테리오파지에 감염될 때 박테리아측 특이적으로 가지고 있는 재조합 핵산서열 부위를 일부 포함하면서 *PatLRX* 프로모터를 특이적으로 증폭할 수 있도록 설계된 서열목록 6과 7의 프라이머 세트를 제작하여 유전자 증폭 반응 (PCR : polymerase chain reaction)을 통해 1.9kb의 프로모터 부위를 다시 분리하였다. 이 때, *PatLRX* 프로모터의 기능을 쌍자엽 식물의 형질전환에 주로 사용되는 35S 프로모터의 활성과 비교하기 위하여 박테리아측 특이적 재조합 핵산서열 부위를 일부 포함하면서 약 860bp의 35S 프로모터를 증폭할 수 있도록 설계된 35S-F 프라이머 5'-AAAAAGCAGGCTGGTCCCCAGATTAGCCT-3'(서열목록8)과 35S-R 프라이머 5'-AGAAAGCTGGGTCCCGGGATCTCTAGA-3'(서열목록9)를 제작하여 35S 프로모터 부위를 분리하였다. 증폭된 PCR 산물들은 박테리아가 박테리오파지에 감염될 때 박테리아측 특이 재조합 핵산서열 부위 전체를 포함하는 어댑터 프라이머 B1인 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCT-3'(서열목록10)와 B2인 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'(서열목록11)를 사용하여 각각 재 PCR되었다.

<74> 2차로 PCR된 산물들은 박테리아가 박테리오파지에 감염될 때 박테리오파지 측 특이 재조합 핵산서열 부위를 포함하는 pDONR201 벡터와 BP 재조합반응을 거쳐 pDONR-*PatLRX*와 pDONR-P35S의 클로닝 벡터가 제작되었다. 서브 클로닝 된 두 종류의 이 운반체들은 최종 식물형질전환 운반체를 제작하기 위해 *Egfp* 와 *Gus* 유전자가 연결된 형태의 리포터 시스템이 내재되어 있는 pBGWFS7 벡터와 다시 LR 재조합 반응을 거쳐 최종적인 pBGWFS7-*PatLRX*와 pBGWFS7-P35S 운반체가 완성되었다(도 2). 이 때, 기본 운반체(binary vector)로 사용된 pBGWFS7는 미생물 선발을 위한 스펙티노마이신 (spectinomycin) 저항성 유전자를 가지며, 식물체 선발인자로 제초제 저항성 Bar유전자를 포함하고 있다. 제작된 형질전환운 운반체들은 액체질소를 이용한 직접적인 아그로박테리아 형질전환 방법 (참조: Holster 등의 freeze-thaw method, 1978)에 따라 아그로박테리아 튜메파시엔스 균주 GV3101에 형질전환 시킨 후, An 등의 알칼리 방법 (alkaline lysis)에 근거한 아그로박테리아 급속 선발 (quick-screen)을 이용하여 아그로박테리아 내 도입을 확인하였다.

<75> <실시예3: 식물 재료 및 애기장대 형질전환>

<76> 파종한 후 23℃ 배양기 (16시간 낮/8시간 밤)에서 약 4주간 생육된 애기장대 (*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia) 식물체의 일차 추대를 제거하여 최소한 3-4개의 이차 추대를 유도한 후, 식물 형질전환 운반체가 보유된 아그로박테리아 배양액을 5% 수크로즈(sucrose)와 0.05% silwet77이 함유된 용액에 OD 0.8 정도로 희석한 현탁액을 꽃봉우리에 분사하여 아그로박테리아를 감염시킨다. 충분한 습도와 암 조건을 유지한 상태로 하룻밤동안 배양한 후 23℃ 배양기 (16시간 낮/8시간 밤)에서 4~5일간 배양한 후 상기와 동일한 방법으로 배양·희석한 아그로박테리아를 재차 화기조직에 분사하고 충분한 습도와 암 조건을 유지한 상태로 하룻밤동안 배양한 후 23℃ 배양기 (16시간 낮/8시간 밤)에서 꼬투리 조직(silique)이 갈색으로 완전히 성숙할 때까지 약 3~5주간 생육시킨 후 채종하였다. 채종된 종자는 다시 파종하여 생육 2주째 일차, 3주째 이차로 0.3% 바스타를 살포함으로써 T1세대의 형질전환체를 선발하였다. T1 형질전환 식물체는 23℃ 배양기 (16시간 낮/8시간 밤)에서 꼬투리 조직(silique)이 갈색으로 완전히 성숙할 때까지 약 2달간 생육시킨 후 T2 종자를 채종하였다.

<77> <실시예4: 형질전환 식물체의 RT-PCR 반응>

<78> 형질전환 T2 종자를 파종하여 생육 2주째 1차, 3주째 2차로 0.3% 바스타를 살포하여 선발된 형질전환 애기장대 식물체의 잎, 줄기, 뿌리, 꽃 및 꼬투리 (개화 후 3주째의 종자 포함) 등 여러 조직으로부터 실시 예 1과 동일한 방법으로 추출한 전체 RNA 약 5μg 주형으로 50uM oligo dT 프라이머를 이용해 50℃에서 50분, 85℃에서 5분 처리 후 얼음에서 식힌 후 여기에 다시 RNase H 를 1μl를 첨가하고 37℃에서 20분간 처리하여 cDNA를 합성(10X RT buffer, 25mM MgCl₂, 0.1M DTT, RNase OUT, SuperScript™ RT) 하였고, 합성된 cDNA를 주형으로 녹색형광 유전자 Gfp 특이 프라이머 세트, 즉 5'-CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAA-3'(서열목록12) 염기서열의 GFP-F 프라이머와 5'-TGTAACGCGCTTTCCCACTC-3'(서열목록13) 염기서열의 GFP-R 프라이머 세트와 사용된 RNA의 상대적인 양이 균일함을 증명하기 위한 애기장대 연장요소 (EF-1α: elongation factor-1α) 프라이머 세트인 5'-GTTCACATTAACATTGTGGTCATT-3'(서열목록14)의 EF1a-F 프라이머와 5'-CAGGTACCAGTGATCATGTTCTTG-3'(서열목록15)의 EF1a-R 프라이머를 이용하여 95℃에서 10분간 변성 후, 95℃에서 30초간 반응 후 55℃에서 30초간 어닐링 반응, 72℃에서 30초간의 중합반응의 일련의 반응을 35회 실시한 후 72℃에서 7분간의 중합반응과 같은 PCR 조건으로 각각의 PCR을 수행하였다.

<79> 역전사 PCR 반응의 결과, *PatLRX* 프로모터 형질전환 애기장대의 잎, 줄기, 꽃, 종자꼬투리 조직에서 녹색형광

단백질 유전자 Gfp의 전사체가 전혀 검출되지 않은데 반해, *PatLRX* 프로모터 형질전환 애기장대 식물체의 뿌리 조직에서만 Gfp의 전사체가 뚜렷이 검출되었다(도 3). 이 때 애기장대 연장요소 EF-1 α 를 이용하여 사용된 RNA의 상대적인 양이 균일함을 증명하였다.

<80> <실시예5: GUS 청색발색 반응 분석>

<81> *PatLRX* 프로모터 및 35S 프로모터 형질전환 T2 종자를 25% 락스에 7분간 소독한 다음, 형질전환체 선별을 위해 바스타 제초성분인 포스피노트리신(phosphinotricin)을 0.75mg/L농도로 함유한 식물생장용 MS배지에서 발아시켰다. 대조구로 비형질전환 애기장대 식물체는 포스피노트리신을 포함하지 않는 MS배지에서 발아시켰다. 발아 후 1주, 2주, 4주째의 형질전환 애기장대 식물체를 GUS-assay buffer [Sol. I: X-gluc (cyslohexyl ammonium salt) 20mM, Sol. II : NaH₂PO₄ H₂O 100mM, NaEDTA 10mM, Triton-X-100 0.1%, pH7.5]에 침지하고 37°C에서 24시간 처리 후, 70% 에탄올을 처리하여 클로로필(chlorophyll)을 제거하였다. 식물체는 광학현미경(light microscope)을 이용하거나 육안으로 관찰하였다. 발아 1주째의 유묘단계부터 *PatLRX* 프로모터 형질전환체는 뿌리에만 특이적인 GUS 청색발색이 관찰되었다. 2주째 및 4주째의 식물체에서 비형질전환 애기장대에서는 GUS 청색발색이 전혀 보이지 않았고 35S 프로모터 형질전환체는 GUS 청색발색이 전신 식물체에서 관찰되면 반면, *PatLRX* 프로모터 형질전환 식물체에서는 뿌리에서만 특이적으로 GUS 청색발색이 관찰되었다(도 4).

<82> <실시예6: GFP 녹색형광 이미지 분석>

<83> *PatLRX* 프로모터 T2 세대 종자를 25% 락스에 7분간 소독한 후 포스피노트리신(phosphinotricin)을 0.75mg/L농도로 함유한 식물생장용 MS배지에서 발아시켜 9-day-seedling 재료를 준비하였다. 공초점 현미경을 이용하여 GFP 형광을 포착하였다. 발아 후 9일째의 유묘에서 녹색형광 이미지를 관찰한 결과, *PatLRX* 프로모터는 뿌리조직 중 새롭게 생성되는 뿌리털에서 강한 형광 발현을 보였다. 동일한 재료를 실시예 6에서 언급한 방법으로 청색발색반응을 관찰한 결과, 신생되는 뿌리털 조직에서도 청색발색을 확인할 수 있었다.

<84> 이상의 실험적 결과를 종합해 볼 때, *PatLRX* 프로모터는 리포터 유전자의 뿌리 특이 발현을 전사 단계를 거쳐 그 단백질의 축적과 최종적인 리포터 단백질 기능에 의한 청색발색 반응과 녹색 형광이미지까지 확실히 유도함이 확인되었다(도 5).

발명의 효과

<85> 이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명에 의한 뿌리 특이적 프로모터는 유전공학적 방법으로 변경된 단백질 또는 외래 유용 유전자 도입에 의한 단백질 등과 같은 목적 단백질을 뿌리 특이적으로 유도함으로써 식물 생육에 영향을 주지 않고, 그 발현을 뿌리에 국한시키는 효과가 있기 때문에 형질전환 저장뿌리 조직에서 유용 단백질을 대량으로 생산하고자 할 때, 혹은 형질전환체를 이용한 저장뿌리 조직의 대사 조절 및 기능성 물질 생산 등에 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 애기장대 뿌리, 잎, 줄기 및 꽃, 종자조직에서 추출한 전체 RNA를 이용하여 역전사반응 후 애기장대 익스텐신을 암호화하는 유전자 *AtLRX*와 양성 대조구로 내재유전자인 액틴(actin) 유전자를 각각 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머로 증폭된 유전자 밴드를 보여주는 전기영동 사진이고,

<2> <부호의 설명>

<3> *AtLRX* - 애기장대 익스텐신유전자

<4> *actin* - 애기장대 액틴유전자

<5> 도 2는 플라스미드 pBGWFS7-*PatLRX*와 pBGWFS7-P35S의 유전자지도의 모식도이고,

<6> <부호의 설명>

<7> LB - Left border (좌측면)

<8> Tnos - nos 터미네이터

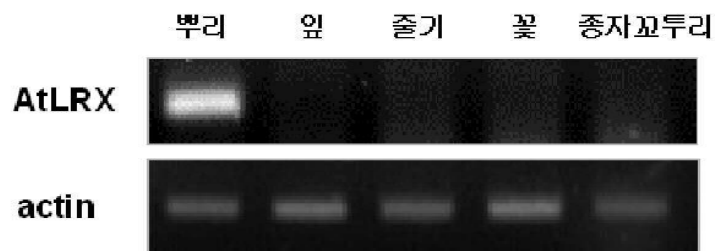
<9> *BAR* - 제초제저항성 유전자

<10> Pnos - nos 프로모터

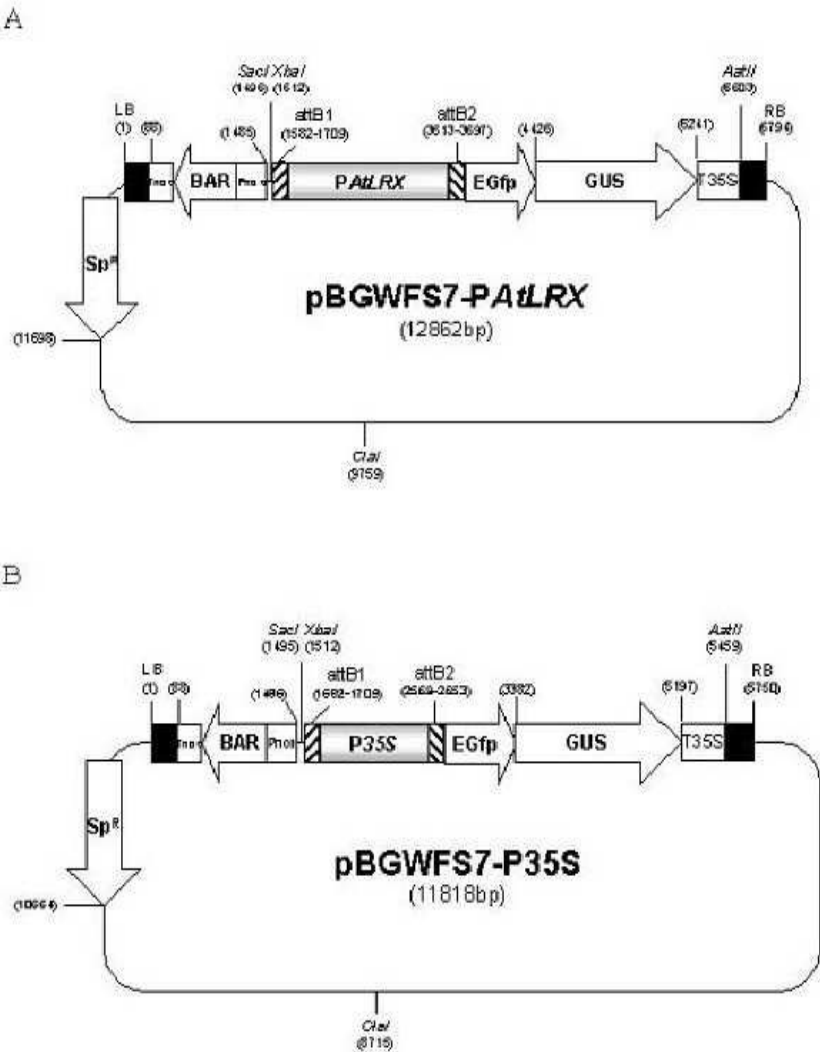
- <11> *PatLRX* - 익스텐신 프로모터
- <12> P35S - 꽃양배추바이러스 35S 프로모터
- <13> EGfp - 녹색형광단백질(green fluorescent protein) 유전자
- <14> *GUS* - 청색발색(β -glucuronidase) 유전자
- <15> T35S -꽃양배추바이러스 35S 터미네이터
- <16> RB - Right border (우측면)
- <17> 도 3은 pBGWFS7-*PatLRX*로 형질전환된 애기장대의 각 조직에서 추출한 전체 RNA를 이용하여 역전사 반응 후 향상된 녹색형광 단백질 유전자 *Egfp*와 양성 대조구로 애기장대 내재유전자인 액틴유전자(actin)를 각각 특이적으로 증폭하는 프라이머로 증폭된 유전자 밴드를 보여주는 전기영동 사진이고,
- <18> <부호의 설명>
- <19> M - 1kb ladder DNA 마커
- <20> GFP - 녹색형광 단백질 유전자
- <21> EF1a - 애기장대 연장요소 elongation factor 1a
- <22> 도 4는 pBGWFS7-*PatLRX*와 pBGWFS7-P35S로 형질전환된 애기장대의 유묘 및 잎 발달 과정 중의 청색발색 반응을 관찰한 것이고,
- <23> <부호의 설명>
- <24> col0 - 비형질전환 애기장대
- <25> P35S::GUS - pBGWFS7-P35S 형질전환 애기장대 식물체
- <26> *PatLRX*::GUS - pBGWFS7-*PatLRX*의 형질전환 애기장대 식물체
- <27> 1W - 발아 후 1주째의 애기장대 유묘
- <28> 2W - 발아 후 2주째의 애기장대 식물체
- <29> 4W - 발아 후 4주째의 애기장대 식물체
- <30> 도 5는 pBGWFS7-*PatLRX*로 형질전환된 애기장대의 뿌리세포에서 관찰된 녹색형광(A) 및 청색발색(B) 이미지이다.
- <31> <부호의 설명>
- <32> GFP - 녹색형광 현미경 이미지
- <33> Light - 일반 형광현미경 이미지
- <34> GUS - 청색발색 일반현미경 이미지

도면

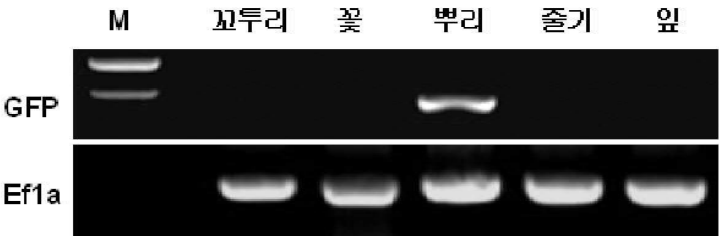
도면1



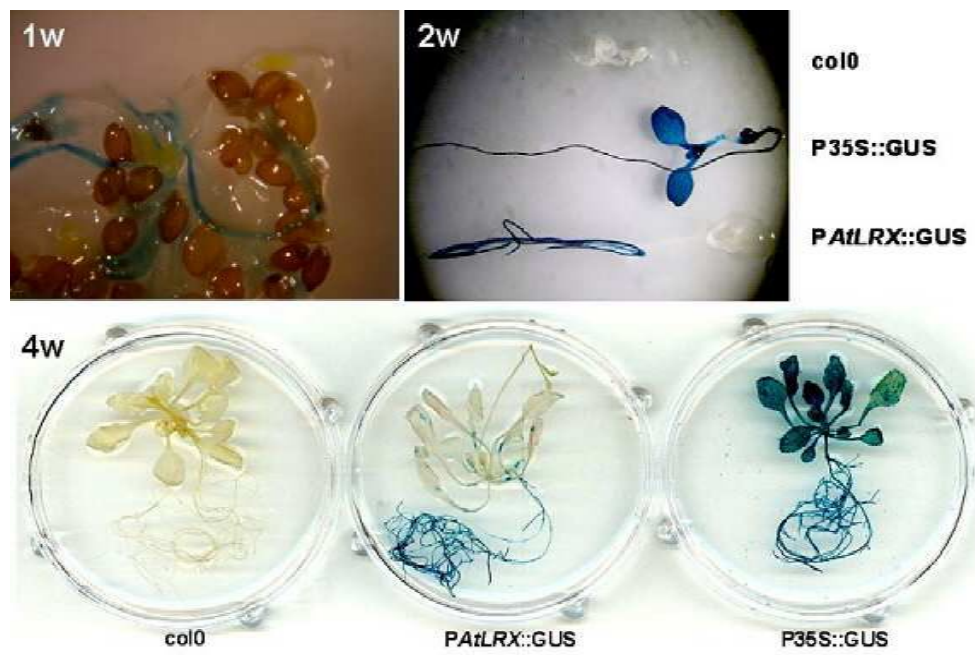
도면2



도면3

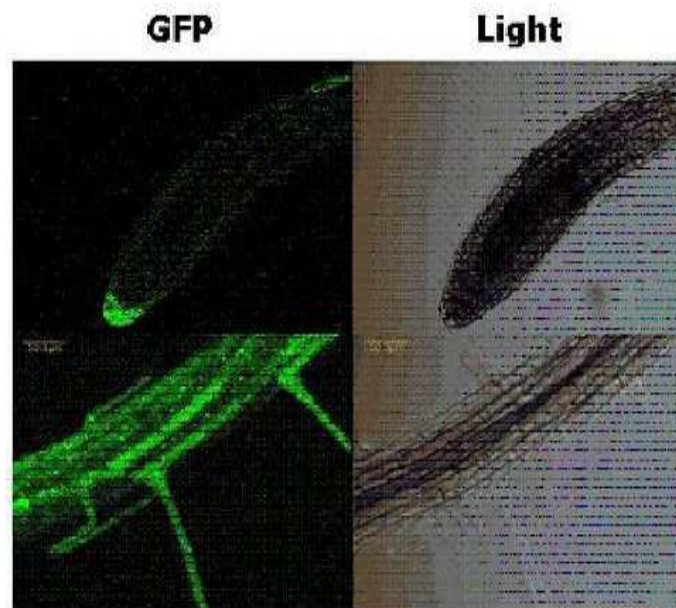


도면4



도면5

A



B



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)