(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0093813
(43) 공개일자 2016년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12N 15/82* (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
*A23L 33/13* (2016.01) *A23L 33/18* (2016.01)
(52) CPC특허분류
*C12N 15/8261* (2013.01)
*A01H 5/00* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0014572
(22) 출원일자 2015년01월29일
심사청구일자 2015년01월29일

(71) 출원인
**고려대학교 산학협력단**
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
**이호정**
서울특별시 동대문구 약령시로 25 107동 1804호 (제기동,벽산아파트)
**정찬영**
서울특별시 성북구 인촌로22길 12-2 8호 (안암동5가)
**누엔 호아이 누엔**
서울특별시 성북구 인촌로12길 24 (안암동3가)
(74) 대리인
**김순웅**

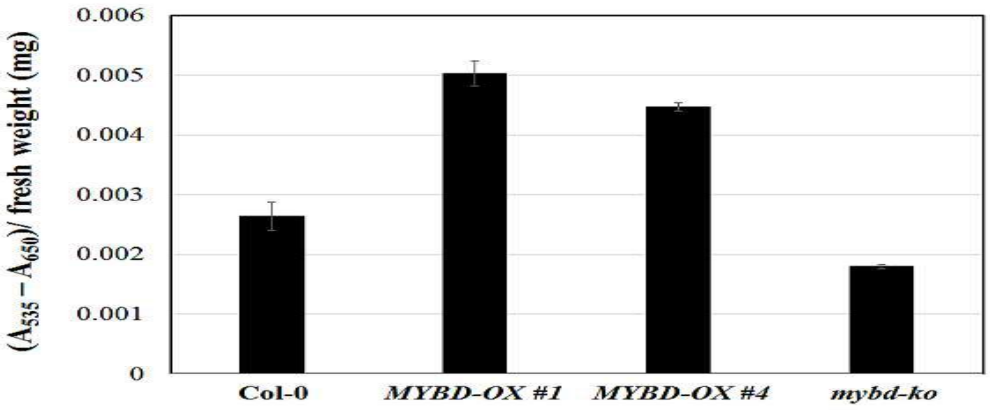
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **AT1G70000을 포함하는 식물체의 안토시아닌 합성 증가 유도용 조성물 및 그의 이용**

## (57) 요 약

본 발명은 AT1G70000 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 식물체의 안토시아닌 합성 증가 유도용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 AT1G70000를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 식물체의 안토시아닌 합성 증가 유도용 재조합 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 식물체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 벡터를 이용하여 식물체의 안토시아닌 합성 증가를 유도하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 AT1G70000 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 식물체 내에서 안토시아닌의 합성을 효과적으로 유도하는 바, 안토시아닌의 대량생산을 가능하게 할 수 있으며, 또한 안토시아닌의 함량이 증가된 기능성 식품의 원료로서의 식물체의 생산도 가능하게 될 것으로 기대된다.

*대 표 도* - 도3



(52) CPC특허분류
***A23L 1/3012*** (2013.01)
***A23L 1/3053*** (2013.01)
***C12N 15/8205*** (2013.01)
*A23V 2002/00* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 112068031SB010
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 고부가가치식품기술개발사업
연구과제명 폴리페놀 대사조절 유채품종 개발을 통한 유채유 향산화능 향상에 관한 연구
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2012.08.08 ~ 2013.08.07

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

AT1G70000 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 식물체의 안토시아닌 합성 증가 유도용 조성물.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 AT1G70000는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 식물체의 안토시아닌 합성 증가 유도용 조성물.

### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 AT1G70000을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것인, 식물체의 안토시아닌 합성 증가 유도용 조성물.

### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 AT1G70000는 애기장대로부터 유래된 것인, 식물체의 안토시아닌 합성 증가 유도용 조성물.

### 청구항 5

AT1G70000를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 식물체의 안토시아닌 합성 증가 유도용 재조합 벡터.

### 청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 벡터는 도 1의 개열지도로 이루어진 것인, 재조합 벡터.

### 청구항 7

청구항 5의 재조합 벡터로 형질전환된, 안토시아닌 합성이 증가된 식물체.

### 청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 식물체는 애기장대, 배추, 양배추, 무, 겨자, 유채, 꽃양배추, 아루굴라, 케일, 브로콜리, 청경채, 냉이, 콜리플라워, 또는 루꼴라인 것인, 안토시아닌 합성이 증가된 식물체.

### 청구항 9

AT1G70000를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 식물체를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 식물체의 안토시아닌 합성 증가를 유도하는 방법.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 AT1G70000 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 식물체의 안토시아닌 합성 증가 유도용 조성물에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 AT1G70000를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 식물체의 안토시아닌 합성 증가 유도용 재조합 벡터 및 상기 벡터로 형질전환된 식물체에 관한 것이다.

[0003] 또한, 본 발명은 상기 벡터를 이용하여 식물체의 안토시아닌 합성 증가를 유도하는 방법에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0004] 안토시아닌(anthocyanin)은 식물의 꽃, 열매, 줄기 또는 잎 등의 색깔을 결정할 뿐 아니라 식물의 성장 및 발달

에 있어서도 아주 중요한 기능을 한다. 안토시아닌은 꽃잎에서 곤충 등의 꽃가루 매개자를 유혹하고, 열매 및 씨앗에서 종자의 분산을 돕는다. 또한, 안토시아닌을 포함한 플라보노이드 화합물은 곤충 및 외부 스트레스에 대한 식물의 손상을 보호하는 기능을 하고, 특히 활성산소 등에 의한 손상을 막는 항산화제로 작용한다(Gould et al., 2004, J. Biomed. Biotechnol. 5:314-320).

[0005] 안토시아닌의 동물 체내에서의 효능이 연구되어왔다. 안토시아닌은 산화방지 작용이 월등하여 체세포를 보호하고 면역 체계를 증진 할 뿐만 아니라, 항암작용에도 뛰어난 효과가 있다고 알려져있다. 안토시아닌의 항암작용은 이미 여러 종류의 암세포에서 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. 특히 안토시아닌은 암의 성장, 전이, 내성에 관련된 NF-κB의 억제 효과 있음이 보고되었다.

[0006] 식물에서 안토시아닌 생합성 경로는 잘 알려져 있는데, 식물체 내 안토시아닌의 축적은 플라보노이드 생합성 경로에 포함된 주요 효소들을 암호화하는 구조 유전자군의 조절과 이들 구조 유전자들의 발현을 조절하는 조절 유전자들에 의해 이루어진다. 금어초, 페튜니아 및 애기장대에서 CHS(chalcone synthase), CHI(chalcone isomerase), F3H(flavanone 3-hydroxylase) 등은 플라보노이드계 화합물의 초기 합성에 관여하는 EBGs(early biosynthetic genes)로서 다양한 플라보노이드 화합물 생합성 기작에 모두 공통으로 관련되어 있으며, 초기에 발현이 이루어진다. 한편 DFR(dihydroflavonol 4-reductase), LDOX(leucoanthocyanidin oxygenase), ANR(anthocyanidin reductase), UF3GT(UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase) 등은 LBGs(late biosynthetic genes)로서 EBG들의 발현이 이루어진 후 나중에 발현되며, 안토시아닌 생합성 경로의 후반부를 담당하고 있다.

[0007] 식물체에서 안토시아닌의 축적은 다양한 환경자극에 반응하여 조절되는 것으로 알려져 있는데 특히 빛, 온도, 당, 식물호르몬 및 무기염류 등은 식물체의 안토시아닌 생합성에 있어 아주 중요한 인자들이며, 이들의 상호작용에 의해 다양한 조직 및 세포에서 색소 축적이 조절된다. 따라서 안토시아닌 생합성에 있어 이들 인자의 상호작용을 밝히는 것은 식물체의 안토시아닌 색소 축적 및 식물 2차 대사 기작을 이해하는 데 있어 매우 중요하다. 이전의 연구에서 다양한 빛 조건 하에서 안토시아닌의 생합성 변화를 연구하여, 빛이 안토시아닌 생합성에 있어서 아주 중요한 인자 중 하나임이 밝혀졌으며, 특히 인산의 결핍, 저온 스트레스 및 당의 증가는 빛에 의해 야기되는 안토시아닌 축적에 있어 중요한 인자로 작용하는 것으로 알려졌다(Lea et al., 2007, Planta. 225:1245-1253). 또한, 안토시아닌 생합성에 있어 수크로즈, 호르몬 에틸렌, 시토키닌, 지베렐린 및 앱시스산의 상관관계에서 당에 의한 안토시아닌 생합성이 에틸렌 및 지베렐린에 의해서 억제되는 것으로 알려졌다(Das et al.,2012, Mol. Cell. 34:501-507).

[0008] 그러나, 아직까지 식물체 내에서 안토시아닌 합성 증대에 관여하는 유전 자원에 대한 다각화된 연구가 미흡한 상황이다.

## *선행기술문헌*

### *특허문헌*

[0009] (특허문헌 0001) 출원번호 10-2011-0078073

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0010] 이에 본 발명자들은 식물체 내에서 안토시아닌의 합성을 증대시킬 수 있는 유전자원을 발굴하기 위하여 예의 노력한 결과, AT1G70000 유전자가 안토시아닌 합성 증진을 유도할 수 있다는 것을 바탕으로 식물체 내에 상기 유전자를 과발현시켰을 때, 안토시아닌의 합성이 증가되었음을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0011] 이에 따라, 본 발명의 일 양상은 식물체의 안토시아닌 합성 증가 유도용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 양상은 식물체의 안토시아닌 합성 증가 유도용 재조합 벡터 및 이에 의하여 형질전환된 식물체를 제공하는 것이다.

[0013] 또한, 본 발명의 다른 양상은 식물체의 안토시아닌 합성 증가를 유도하는 방법을 제공하는 것이다.

## *과제의 해결 수단*

[0014] 본 발명의 일 양상은 AT1G70000 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 식물체의 안토시아닌 합성 증가 유도용 조성물을 제공한다.

[0015] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명에서 AT1G70000 (Gene Code [MIPS (http://pgsb.helmholtz-muenchen.de/plant/athal/reportsjsp/geneticElement.jsp?gene=AT1G70000.1)][TAIR(http://arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=locus&name=At1g70000)])는 myb-유사 전사인자로 알려져 있으며, 그 기능이 아직 상세하게 알려진 바가 없다. 본 발명은 AT1G70000와 안토시아닌 합성과의 관계를 최초로 규명한 것에 해당한다. 상기 AT1G70000는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 상기 AT1G70000는 애기장대로부터 유래된 것일 수 있다.

[0017]

[0018] 본 발명에 따른 식물체의 안토시아닌 합성 증가 유도용 조성물은 AT1G70000을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명에서 사용하는 용어 폴리뉴클레오티드 (polynucleotide)는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 중합체이다. RNA 게놈 서열, DNA(gDNA 및 cDNA) 및 이로부터 전사되는 RNA 서열을 포괄하며, 특별하게 다른 언급이 없는 한 천연의 폴리뉴클레오티드의 유사체를 포함한다.

[0020] 상기 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 cDNA일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 뉴클레오티드 서열뿐만 아니라, 그 서열에 상보적인 (complementary) 서열도 포함한다. 상기 상보적인 서열은 완벽하게 상보적인 서열뿐만 아니라, 실질적으로 상보적인 서열도 포함한다. , 이는 당업계에 공지된 가혹조건 (stringent conditions) 하에서, 예를 들어, 서열번호 1 내지 10 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 혼성화될 수 있는 서열을 의미한다.

[0022] 또한 상기 폴리뉴클레오티드는 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오티드의 추가, 결실 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 뉴클레오티드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기 뉴클레오티드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 70%의 상동성, 최소 80%의 상동성 또는 최소 90%의 상동성을 나타내는 서열일 수 있다.

[0023] 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(즉, 갭)를 포함할 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명의 일 양상은 AT1G70000를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 식물체의 안토시아닌 합성 증가 유도용 재조합 벡터를 제공한다.

[0025] 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 암호된 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.

[0026] 본 발명에서, 상기 AT1G70000를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 재조합 벡터 내로 삽입될 수 있다. 용어 "재조합

벡터"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 이는 세균 플라스미드, 파아지, 효모 플라스미드, 식물 세포 바이러스, 포유동물 세포 바이러스, 또는 다른 벡터를 포함한다. 대체로, 임의의 플라스미드 및 벡터는 숙주 내에서 복제 및 안정화할 수 있다면 사용될 수 있다. 상기 발현 벡터의 중요한 특성은 복제 원점, 프로모터, 마커 유전자 및 번역 조절 요소(translation control element)를 가지는 것이다.

[0027] AT1G70000를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터는 당업자에 주지된 방법에 의해 구축될 수 있다. 상기 방법은 시험관내 재조합 DNA 기술, DNA 합성 기술 및 생체내 재조합 기술 등을 포함한다. 상기 DNA 서열은 mRNA 합성을 이끌기 위해 발현 벡터 내의 적당한 프로모터에 효과적으로 연결될 수 있다. 또한 발현 벡터는 번역 개시 부위로서 리보좀 결합 부위 및 전사 터미네이터를 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 재조합 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.

[0029] 발현 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 선택성 마커를 포함할 수 있다. 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 포스피노트리신(phosphinothricin)과 같은 제초제 저항성 유전자, 카나마이신(kanamycin), G418, 블레오마이신(Bleomycin), 하이그로마이신(hygromycin), 클로람페니콜(chloramphenicol)과 같은 항생제 내성 유전자가 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명의 재조합 벡터에서, 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.

[0031] 본 발명의 재조합 벡터에서, 통상의 터미네이터를 사용할 수 있으며, 그 예로는 노팔린 신타아제(NOS), 벼 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 알려져 있다. 그러므로, 터미네이터의 사용은 본 발명의 내용에서 매우 바람직하다.

[0032] 본 발명의 상기 백터는 도 1의 개열지도로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된, 안토시아닌 합성이 증가된 식물체를 제공한다.

[0034] 상기 안토시아닌의 합성의 증가는 안토시아닌의 합성이 형질전환되지 않은 식물체에 비하여 증가한 것을 의미하며, 안토시아닌 합성 기능의 발휘를 포함하는 개념이다.

[0035] 상기 식물체는 외떡잎 식물, 쌍떡잎 식물, 다년생 식물, 단년생 식물 등 그 종류를 제한하지 않으며, 예를 들면, 애기장대, 배추, 양배추, 무, 겨자, 유채, 꽃양배추, 아루굴라, 케일, 브로콜리, 청경채, 냉이, 콜리플라워, 또는 루꼴라인 등의 십자화과 식물일 수 있다. 또한, 상기 식물체는 식물 세포주, 식물 캘러스, 종자, 또는 식물의 일부 기관을 포함하는 개념이다.

[0036] 또한, 본 발명의 일 양상은 AT1G70000를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 식물체를 형질전환시키

는 단계를 포함하는, 식물체의 안토시아닌 합성 증가를 유도하는 방법을 제공한다.

[0037] 식물의 형질전환은 DNA를 식물에 전이시키는 임의의 방법을 의미한다. 그러한 형질전환 방법은 반드시 재생 및 (또는) 조직 배양기간을 가질 필요는 없다. 식물 종의 형질전환은 이제는 쌍자엽 식물뿐만 아니라 단자엽 식물 양자를 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) 입자 충격법(Klein T.M. et al., 1987, Nature 327, 70), 식물의 침윤 또는 성숙 화분 또는 소포자의 형질전환에 의한 아그로박테리움 투머파시엔스 매개된 유전자 전이에서 (비완전성) 바이러스에 의한 감염(EP 0 301 316호) 등으로부터 적당하게 선택될 수 있다. 본 발명에 따른 바람직한 방법은 아그로박테리움 매개된 DNA 전달을 포함한다.

## *발명의 효과*

[0038] 본 발명에 따른 AT1G70000 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 식물체 내에서 안토시아닌의 합성을 효과적으로 유도하는 바, 안토시아닌의 대량생산을 가능하게 할 수 있으며, 또한 안토시아닌의 함량이 증가된 기능성 식품의 원료로서의 식물체의 생산도 가능하게 될 것으로 기대된다.

## *도면의 간단한 설명*

[0039] 도 1은 AT1G70000의 식물체내 발현을 위한 벡터의 개열지도이다.

도 2는 도 1의 벡터로 형질전환된 식물체에서 AT1G70000의 과발현을 확인한 결과이다.

도 3은 AT1G70000의 과발현이 확인된 식물체에서 안토시아닌의 함량이 증가되었음을 확인한 결과이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0040] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] **실시예 1: AT1G70000 cDNA 클로닝**

[0042] 발아 후 2주일된 Wild-type 애기장대 성체의 mRNA를 추출한 뒤, Reverse transcriptase를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 그 후 전기영동을 통하여 증폭된 AT1G70000 cDNA를 확인하고, 젤에서 용출하였다.

[0043] 용출된 cDNA 조각(786 bp)을 topo vector(pCR®8/GW/TOPO : invitrogen)에 삽입하고 이를 식물체 과발현용 vector인 pMDC32 vector에 LR reaction(LR Clonase®:invitrogen)으로 삽입하였다. 구체적인 벡터의 개열지도는 도 1에 도시하였다.

[0044] 상기 확립한 벡터를 E.coli cell(TOP10 cell:invitrogen)에 heat-shock transformation 방법으로 형질전환한 후 colony가 생성 될 때까지 37℃에서 12시간 동안 배양하였다.

[0045] 이후 생성된 colony를 다시 LB 배지에 배양 후 plasmid vector를 추출하였다.

[0046] **실시예 2: AT1G70000 cDNA로 식물체를 형질전환**

[0047] 실시예 1과 같이 제조한 벡터, 즉 35S CaMV promoter::AT1G70000 vector를 Agrobacteria에 electric shock transformation방법으로 형질전환한 후 배양하였다. 형질전환된 Agrobacteria를 floral dipping transformation을 통해 준비된 wild-type 애기장대와 유채에 형질전환시켰다. 이후 형질전환된 식물로부터 씨를 수확하고 3세대까지 자가교배시켜 homologous line을 확보하였다.

[0048] 뒤이어, Rt-PCR의 방법을 통하여 AT1G70000 과발현을 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, AT1G70000 (MybD)가 1# 및 4#라인에서 rRNA의 양이 증가하였음을 노던 블로팅을 이용하여 확인 할 수 있었다.

[0049] **실시예 3: 식물체에서 안토시아닌 함량의 증가 확인**

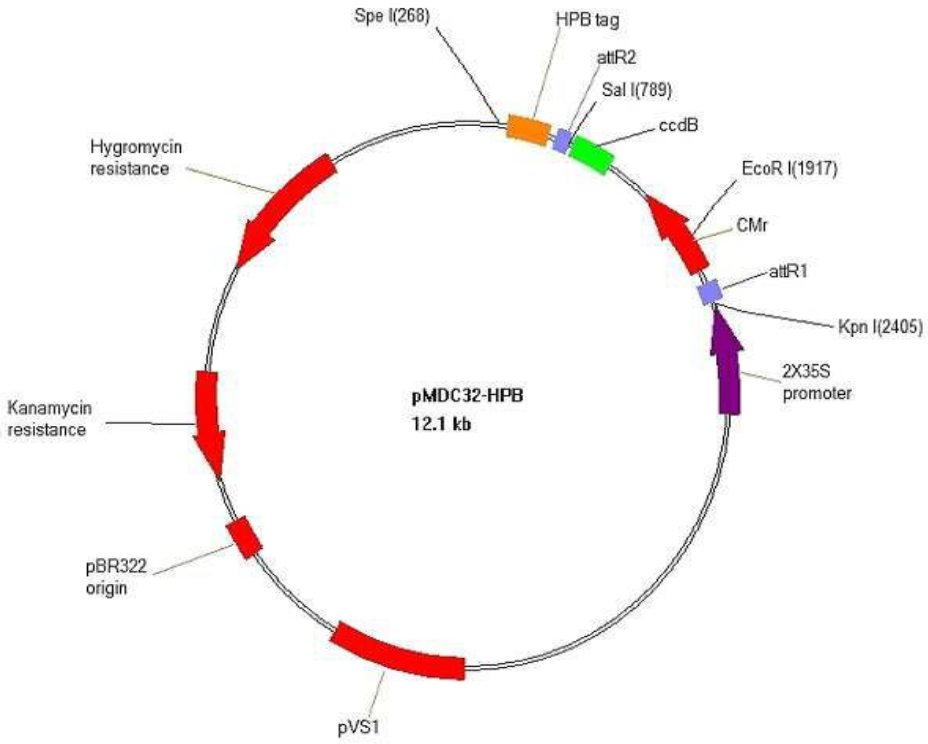
[0050] 발아한 지 7일이 된 식물의 60mg을 안토시아닌 추출 실험에 사용한다. 액체질소로 급속 냉동시킨 후, 샘플을 곱게 분쇄시킨다. 분쇄된 샘플에 45 mL methanol + 450 μL HCl 로 혼합된 용액을 300 μL를 넣은 뒤 4ºC의 암조건에서 16시간 이상 반응시킨다. 그 후 DW 200 μL와 Chloroform 500 μL를 넣고 잘 섞어준 뒤 3000 rpm의 고속원심분리를 시킨다. 상등액을 일정량 옮겨 흡광도 (OD 535-650)를 측정한다.

[0051] 그 결과를 도 3에 나타내었다.

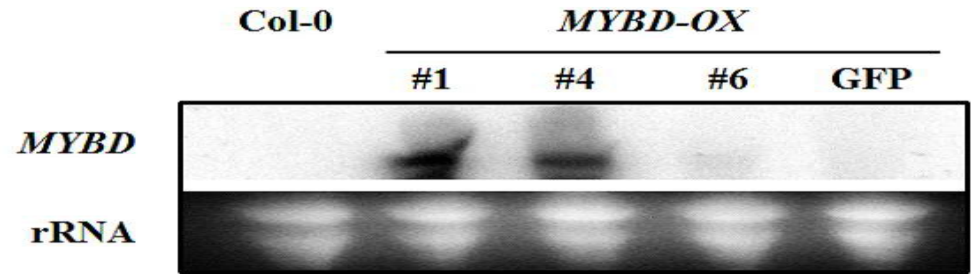
[0052] 도 3에 나타난 바와 같이, 실시예 2에서 AT1G70000 (MybD)의 발현양이 증가된 것으로 확인된 1# 및 4#라인에서 안토시아닌의 함량이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

## 도면

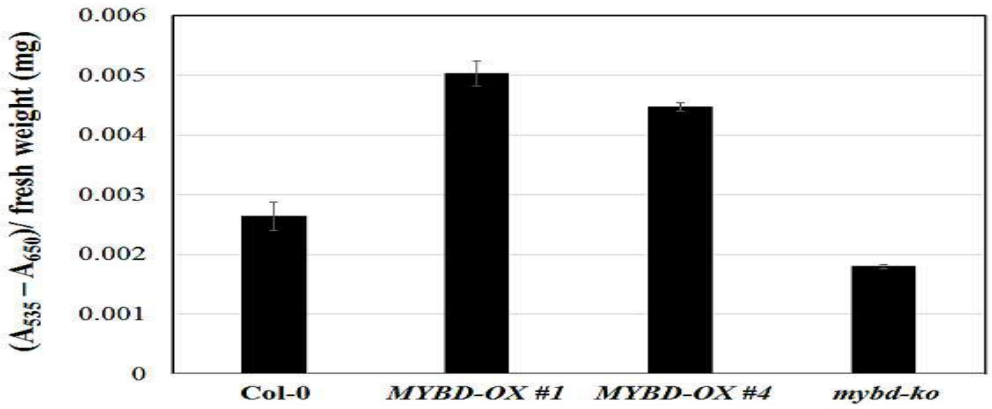
### 도면1



도면2


Col-0
MYBD-OX
#1
#4
#6
GFP
MYBD
rRNA

도면3


0.006
0.005
0.004
0.003
0.002
0.001
0
(A535 − A650)/ fresh weight (mg)
Col-0
MYBD-OX #1
MYBD-OX #4
mybd-ko