



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년08월01일
(11) 등록번호 10-1760620
(24) 등록일자 2017년07월17일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) A01H 5/12 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 15/8216 (2013.01)
A01H 5/12 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0128500</p> <p>(22) 출원일자 2016년10월05일
심사청구일자 2016년10월05일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
Scientia Horticulturae. Vol. 160, No. 1, 페이지123-128 (2013.06.25.)
GenBank Accession Number GQ253431 (2009.07.15.)</p> | <p>(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
박영두
경기도 용인시 수지구 성북2로 220 305동 1404호 (성북동, 버들치마을성북힐스테이트3차)</p> <p>이기호
부산광역시 금정구 장전동 금강로 225번길 벽산블루밍 디자인시티 203동 504호</p> <p>(74) 대리인
손민</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 최준호

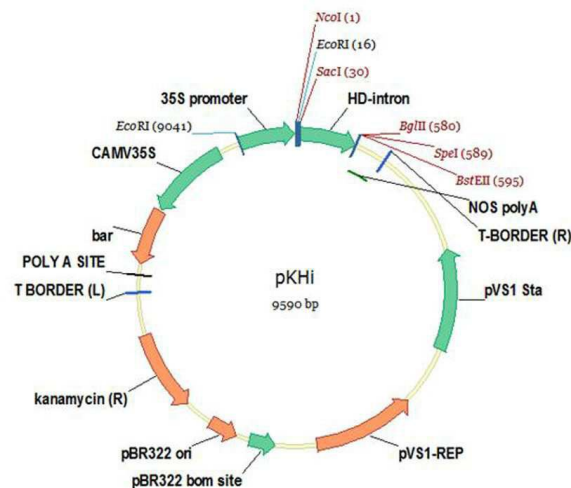
(54) 발명의 명칭 HD1 인트론을 포함하는 식물 형질전환용 재조합 벡터 및 이의 이용

(57) 요약

본 발명은 HD1 유전자의 인트론을 포함하는 식물 형질전환용 재조합 벡터 및 이의 이용에 관한 것으로, 구체적으로 (a) 목적 유전자의 제1단편; (b) 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진 HD1(Histone Deacetylase 1) 유전자의 인트론(intron); 및 (c) 상기 제1단편에 역방향으로 상보적인 제2단편을 순차적으로 포함하는 목적 유전자 발현 억제용 카세트, 상기 카세트를 포함하는 목적 유전자 발현 억제용 벡터, 상기 벡터를 포함하는 목적 유전자 발현이 억제된 형질전환 식물체, 및 상기 형질전환 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

본 발명의 목적 유전자 발현 억제용 카세트 및 이를 포함하는 재조합 벡터는 목적 유전자의 siRNA를 형성하여 그 유전자의 발현을 억제할 수 있으므로, 유용 작물의 개발뿐만 아니라, 미지의 유전자의 기능 분석에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 15/8205 (2013.01)

C12N 9/0006 (2013.01)

C12Y 101/01219 (2013.01)

C12N 2310/141 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01112301

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 유용 유전자를 이용한 농업 생산 효율 개선용 GM 배추 개발 및 우량계통 육성

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2015.01.15 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 목적 유전자의 제1단편; (b) 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진, HD1(Histone Deacetylase 1) 유전자의 인트론(intron); 및 (c) 상기 제1단편에 역방향으로 상보적인 제2단편을 순차적으로 포함하는, 목적 유전자 발현 억제용 카세트.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 카세트는 이중나선(double-stranded) RNA를 형성하는 것인, 카세트.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 이중나선 RNA는 작은 간섭 RNA(siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA) 및 마이크로 RNA(miRNA)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 카세트.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 인트론의 정방향에는 *NcoI* 및 *SacI*의 제한효소 인식부위; 및 역방향에는 *BglIII*, *SpeI* 및 *BstEII*의 제한효소 인식부위를 추가로 포함하는, 카세트.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 카세트를 포함하는, 목적 유전자 발현 억제용 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 벡터는 서열번호 18의 염기서열로 표시되는 폴리뉴클레오티드로 이루어지는 것인, 벡터.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 벡터는 도 8의 개열지도로 표시되는 것인, 벡터.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 벡터는 CaMV 35S 프로모터를 포함하는 것인, 벡터.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 벡터는 멀티클로닝 사이트(multi cloning site)에 *SacI* 제한효소 인식부위가 포함되지 않는 것인, 벡터.

청구항 10

제5항의 벡터를 포함하는, 목적 유전자 발현 억제용 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*).

청구항 11

제5항의 벡터를 포함하는, 목적 유전자 발현이 억제된 형질전환 식물체.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 식물체는 담배인 것인, 식물체.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 식물체는 목적 유전자의 발현이 야생형 식물체에 비하여 4 내지 6배 감소된 것인, 식물

체.

청구항 14

(a) DFR(dihydroflavonol 4-reductase) 유전자의 제1단편; (b) 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진, HD1(Histone Deacetylase 1) 유전자의 인트론(intron); 및 (c) 상기 제1단편에 역방향으로 상보적인 제2단편을 순차적으로 포함하는 DFR 유전자 발현 억제용 카세트를 포함하는, DFR 유전자 발현 억제용 벡터로 형질전환된, 야생형 식물체에 비하여 꽃의 붉은색이 감소한 식물체.

청구항 15

(a) DFR(dihydroflavonol 4-reductase) 유전자의 제1단편; (b) 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진, HD1(Histone Deacetylase 1) 유전자의 인트론(intron); 및 (c) 상기 제1단편에 역방향으로 상보적인 제2단편을 순차적으로 포함하는 DFR 유전자 발현 억제용 카세트를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는, DFR 유전자 발현이 억제된 형질전환 식물체의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 HD1 인트론을 포함하는 식물 형질전환용 재조합 벡터 및 이의 이용에 관한 것으로, 구체적으로 (a) 목적 유전자의 제1단편; (b) 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진 HD1(Histone Deacetylase 1) 유전자의 인트론(intron); 및 (c) 상기 제1단편에 역방향으로 상보적인 제2단편을 순차적으로 포함하는 목적 유전자 발현 억제용 카세트, 상기 카세트를 포함하는 목적 유전자 발현 억제용 벡터, 상기 벡터를 포함하는 목적 유전자 발현이 억제된 형질전환 식물체, 및 상기 형질전환 식물체의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] RNAi(RNA interference) 방법은 염기서열의 상동성을 바탕으로 목적 유전자의 발현을 억제시키는(homology-dependent gene silencing) 기술로서, siRNA를 생성하여 목적 유전자를 분해하는 PTGS(post-transcriptional gene silencing)와 DNA 메틸레이션(methylation)을 유발하여 유전자의 발현을 억제하는 TGS(transcriptional gene silencing) 등이 포함된다.

[0003] 이와 같은 RNAi 기작을 바탕으로 한 목적 유전자의 발현 침묵(silencing) 기술은 유전자의 기능 연구에 적용될 수 있다. 최근 생명공학의 발달에 따라 다양한 작물의 유전자 염기서열이 보고되고 있는데, 염기서열은 해독되었으나 아직 기능이 밝혀지지 않은 유전자들이 많이 존재한다. 이러한 미지의 유전자는 그 발현을 억제하여 표현형을 관찰함으로써 기능을 확인할 수 있는데, 여기에 RNAi 방법이 이용된다.

[0004] 유전자의 기능연구뿐만 아니라, RNAi 방법을 통해 대사 경로를 바꾸어 유용한 GM 작물을 생산하기도 한다. 대표적인 예로, 면화에서 스테아르산(stearic acids) 또는 올레산(oleic acids)의 함량 증가; 콩에서 생산되는 기름의 열 안정성 증가; 토마토에서 카로티노이드(carotenoid) 또는 플라보노이드(flavonoid)의 함량 증가; 및 사료용 옥수수에서 리신(lysine)의 함량을 증가시킨 연구 결과가 발표된 바 있다. 또한, RNAi 방법을 통해 화단용, 조경용 등에 적합한 키가 작은 난쟁이 식물을 제조할 수 있음이 공지되었다(한국 공개특허공보 제10-2015-0137538호).

[0005] 이와 같은 RNAi 현상은 dsRNA의 도입 및 발현에 의해서 발생하게 되는데, 특히 정상적인 염기서열(sense sequence)과 그것에 상보적인 염기서열(compliment sequence)을 동시에 넣음으로써 발생하는 헤어핀 RNA(hairpin RNA)에 의한 RNAi 현상이 가장 효과적인 것으로 밝혀져 있다. 또한 식물에서 RNAi의 효율을 더 높이기 위하여 기존의 hpRNA 보다 더 발전된 adj-hpRNA 방법이 등장하였으며, 최근에는 헤어핀 영역의 인트론에 스플라이싱 신호(splicing signal)를 부착하여 siRNA가 발생하는 효율을 극대화한 ihpRNA(intron splicing hairpin RNA) 방법이 개발되었다.

[0006] 이에 따라 ihpRNA 방법이 적용된 RNAi 벡터가 많이 등장하고 있다. 그 중에서도 일반적으로 식물에서 많이 사용되고 있는 것은 CSIRO사의 pHANNIBAL 및 pKANNIBAL, invitrogen사의 GATEWAY system이 적용된 쌍자염용 pHELLSGATE와 단자염용 pSTARGATE가 있으며, VIB(Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology)사의

GATEWAY system이 적용된 p*7GWIWG2(I)와 p*7GWIWG2(II)가 있다. 이들 벡터는 연구용으로는 사용하는데 제한사항이 없으나, 이것으로 만들어진 유전자변형 작물의 실용화 시에는 도입된 인트론이나 GATEWAY system 등에 대한 지적재산권 문제로 상용화가 힘들다는 단점이 있다. 이에 따라 국내에서 개발할 유전자변형 작물의 실용화를 위하여, ihpRNA를 생성함으로써 목적 유전자의 발현을 효과적으로 억제할 수 있는 새로운 RNAi 재조합 벡터의 제작이 요구되는 실정이었다.

[0007] 이러한 배경하에, 목적 유전자의 발현을 효과적으로 억제할 수 있는 새로운 RNAi 재조합 벡터를 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 배추 유래 인트론인 BrHD1(*Brassica rapa* Histone Deacetylase 1)이 유전자의 헤어핀 구조를 형성할 수 있음을 확인하였고, 이를 포함하는 RNAi 재조합 벡터를 제작하였다. 또한, 상기 벡터를 이용하여 담배 식물체를 형질전환시킨 결과, 상기 형질전환체에서는 목적 유전자의 발현이 감소되며, 형질전환 되지 않은 야생형 식물체에 비하여 목적 유전자와 관련된 형질이 변화됨을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 (a) 목적 유전자의 제1단편; (b) 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진 HD1(Histone Deacetylase 1) 유전자의 인트론(intron); 및 (c) 상기 제1단편에 역방향으로 상보적인 제2단편을 순차적으로 포함하는, 목적 유전자 발현 억제용 카세트를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 카세트를 포함하는 목적 유전자 발현 억제용 벡터를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 벡터를 포함하는 목적 유전자 발현 억제용 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*)을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 벡터를 포함하는 목적 유전자 발현이 억제된 형질전환 식물체를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 (a) DFR(dihydroflavonol 4-reductase) 유전자의 제1단편; (b) 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진 HD1(Histone Deacetylase 1) 유전자의 인트론(intron); 및 (c) 상기 제1단편에 역방향으로 상보적인 제2단편을 순차적으로 포함하는 DFR 유전자 발현 억제용 카세트를 포함하는, DFR 유전자 발현 억제용 벡터로 형질전환된, 야생형 식물체에 비하여 꽃의 붉은색이 감소한 식물체를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 DFR 유전자 발현 억제용 카세트를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는, DFR 유전자 발현이 억제된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 하나의 양태는 (a) 목적 유전자의 제1단편; (b) 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진 HD1(Histone Deacetylase 1) 유전자의 인트론(intron); 및 (c) 상기 제1단편에 역방향으로 상보적인 제2단편을 순차적으로 포함하는, 목적 유전자 발현 억제용 카세트를 제공한다.

[0015] 본 발명의 용어, "HD1(Histone Deacetylase 1) 유전자"는 Histone Deacetylase 1을 코딩하는 유전자를 의미하며, 이의 염기서열은 NCBI의 GenBank 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있다(예: GenBank Accession: ACT33454.1 등). 구체적으로, 상기 유전자는 배추(*Brassica rapa*), 더욱 구체적으로 내흔계 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)에서 유래한 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 명세서에서, 상기 유전자는 'HD1 유전자' 또는 'BrHD1 유전자'로 혼용되어 명명될 수 있다.

[0016] 본 발명의 용어, "인트론(intron)"은 단백질을 만드는 데 관여하지 않는 DNA 부분을 의미하며, 유전자의 전사과정에서 pre-mRNA를 만드는 데 사용되지만 matured mRNA를 만드는 데 쓰이지 않고 잘리는 부분을 의미한다. 이때, matured mRNA에 남아있는 DNA 전사 부분이 엑손(exon)이다. 인트론의 개수와 길이는 중간에서만뿐만 아니라 종 내부에서도 다르다고 알려져 있다.

[0017] 구체적으로, 본 발명의 HD1 유전자의 인트론(intron)은 HD1 유전자의 첫 번째 인트론일 수 있으며, 더욱 구체적으로 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 명세서에서, 상기 HD1 유전자의 인트론(intron)은 'BrHD1 인트론' 또는 'BrHD1의 첫 번째 인트론'으로 혼용되어 명명될 수 있다.

- [0018] 본 발명에서 이용되는 염기서열은, 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, '실질적인 동일성'은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.
- [0019] 따라서, 상기 서열번호 3으로 표시되는 염기서열과 높은 상동성을 갖는 염기서열, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 90%이상의 높은 상동성을 갖는 염기서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.
- [0020] 본 발명의 용어, "목적 유전자"는 발현을 억제하고자 하는 유전자를 의미한다. 구체적인 예로 식물에 존재하는 유전자, 더욱 구체적인 예로 DFR(dihydroflavonol 4-reductase) 유전자가 될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 발명의 목적에 맞게 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 용어, "유전자 발현 억제용 카세트"는 목적 유전자의 발현을 억제시킬 수 있는 발현구조체를 의미한다.
- [0022] 본 발명의 목적상, 상기 카세트는 목적 유전자와 상동성을 가지는 염기 조각, 즉 목적 유전자의 제1단편 및 제2단편을 인트론의 양 옆에 정방향 및 역방향으로 도입시킨 구조를 가질 수 있으며, 구체적으로, (a) 목적 유전자의 제1단편; (b) 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진 HD1(Histone Deacetylase 1) 유전자의 인트론(intron); 및 (c) 상기 제1단편에 역방향으로 상보적인 제2단편을 순차적으로 포함하는 구조를 가질 수 있다.
- [0023] 또한, 상기 카세트는 목적 유전자의 센스가닥 핵산 서열, HD1(Histone Deacetylase 1) 유전자의 인트론(intron) 서열, 센스가닥 핵산 서열과 상보적으로 결합 가능한 안티센스가닥 핵산 서열을 5' 방향에서 3' 방향으로 순차적으로 포함하는 구조를 가질 수 있다. 이때, 상기 인트론 서열은 서열번호 3으로 표시되는 염기서열일 수 있다.
- [0024] 상기 센스가닥 핵산 서열 및 안티센스가닥 핵산 서열의 상보적 결합은 센스가닥 핵산 서열의 염기의 전부 또는 일부와 안티센스 가닥 핵산 서열의 염기의 전부 또는 일부가 결합하여 이루어지며, 상기 염기 개수는 나노입자 제조 시 자가조립을 위하여 적절히 조절될 수 있다.
- [0025] 구체적으로, 상기 카세트는 이중나선(double-stranded) RNA를 형성하는 구조를 가지는 것일 수 있으며, 상기 이중나선 RNA는 구체적인 예로, 작은 간섭 RNA(siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA) 또는 마이크로 RNA(miRNA)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0026] 또한, 상기 카세트는 목적 유전자의 제1단편 및 제2단편을 용이하게 도입시키기 위한 제한효소 인식부위를 추가로 포함할 수 있다. 구체적인 예로, 상기 제한효소 인식부위는 인트론의 정방향 및 역방향에 포함될 수 있으며, 더욱 구체적으로, 정방향에는 *NcoI* 및 *SacI*의 제한효소 인식부위; 및 역방향에는 *BglII*, *SpeI* 및 *BstEII*의 제한효소 인식부위가 포함될 수 있다.
- [0027] 상기 용어, '제한효소 인식부위'(restriction sites, restriction recognition sites)는 4 내지 8 bp의 특이적 염기서열을 포함하는, 제한효소가 인식하여 작용하는 DNA 상의 영역을 의미한다. 본 명세서에서, '(제한효소명)의 제한효소 인식부위'는 해당하는 제한효소가 인식하여 작용하는 염기서열을 의미할 수 있다.
- [0028] 본 명세서에서, 상기 카세트는 'BrHD1 인트론 RNAi 카세트' 또는 'RNAi 카세트'로 혼용되어 명명될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 배추(*Bprassica rapa*) 유래 BrHD1 인트론이 목적 유전자의 siRNA가 형성되도록 헤어핀 구조를 유지하는 인트론임을 확인하였고(실시예 1 및 2), 상기 인트론의 정방향에는 *NcoI* 및 *SacI*; 및 역방향에는 *BglIII*, *SpeI* 및 *BstEII*의 제한효소 인식부위를 추가하였다(도 3). 이후, 목적 유전자인 DFR 유전자의 단편을 제작하여 상기 인트론의 양 옆에 정방향 및 역방향으로 도입시켰으며(도 9). 상기 벡터로부터 이중나선 RNA가 형성됨을 확인하였다(도 10 및 11). 아울러, 상기 벡터로 형질전환된 담배 식물체는 목적 유전자인 DFR 유전자의 발현이 감소되며, DFR 유전자에 대해 siRNA를 형성함을 확인하였고(도 13 및 14), 형질전환되지 않은 야생형 식물체에 비하여 꽃의 붉은색이 감소한 것을 확인하였다(도 15 및 16).
- [0030] 이는, 본 발명의 벡터는 목적 유전자 발현 억제에 우수한 효과를 나타내므로, 형질전환 식물체의 제조에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0031] 다른 하나의 양태는 상기 목적 유전자 발현 억제용 카세트를 포함하는 목적 유전자 발현 억제용 벡터를 제공한

다.

- [0032] 이때, 상기 '유전자 발현 억제용 카세트' 및 '목적 유전자'의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0033] 본 발명의 용어, "벡터"는 숙주세포에 DNA를 도입하여 목적 유전자의 발현을 효율적으로 억제시키기 위한 수단으로서, 구체적으로 목적 유전자의 이중나선 RNA가 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서, 상기 벡터는 본 발명의 유전자 발현 억제용 카세트를 포함하며, 구체적으로 서열번호 18의 염기서열로 표시되는 폴리뉴클레오타이드로 이루어지는 것일 수 있고, 더욱 구체적으로 도 8의 개열지도로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 상기 벡터의 구체적인 예로, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터 또는 바이러스 벡터 등을 들 수 있다. 더욱 구체적인 예로, 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118, pUC119, pET30a, pET30c 및 pGEX-GST), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110 및 pTP5), 효모 유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50) 또는 Ti 플라스미드 등을 사용할 수 있고, 레트로바이러스, 아데노바이러스 또는 백시니아바이러스와 같은 동물 바이러스, 배콜로바이러스와 같은 곤충 바이러스 또는 식물 바이러스가 사용될 수 있으며, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이너리 벡터를 사용할 수 있으나, 본 발명의 카세트를 숙주 세포 내로 도입할 수 있는 한, 이에 제한되지 않는다. 더욱 구체적인 예로, 상기 벡터는 pCAMBIA 계열의 pCAMBIA 3301일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 또한, 상기 벡터는 발현조절 서열과 기능적으로 연결될 수 있다. 구체적인 예로, 상기 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함할 수 있으며, 더욱 구체적인 예로, 상기 벡터는 CaMV 35S 프로모터를 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니며, 발명의 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 또한, 상기 벡터는 선택성 마커를 포함할 수 있으며, 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다. 본 발명의 벡터는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 목적상, 상기 벡터는 목적 유전자와 상동성을 가지는 염기 조각을 용이하게 도입시키기 위하여, 벡터의 멀티클로닝 사이트(multi cloning site)에 특정한 제한효소 인식부위를 포함하지 않을 수 있다. 구체적인 예로, 본 발명의 벡터는 멀티클로닝 사이트(multi cloning site)에 *SacI* 제한효소 인식부위를 포함하지 않는 것일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, BrHD1 인트론 RNAi 카세트에는 *SacI* 제한효소 인식부위가 존재함에 따라 추후 재조합 벡터의 구축 시 야기될 수 있는 어려움을 예방하기 위해 pCAMBIA 3301 벡터의 MCS에 존재하는 *SacI* 인식부위를 제거하였으며(도 4), 상기 MCS가 변형된 벡터에 본 발명의 RNAi 카세트를 도입하였다(도 6 내지 8). 또한, 상기 벡터에 목적 유전자인 DFR 유전자의 단편을 제작하여 상기 인트론의 양 옆에 정방향 및 역방향으로 도입함으로써 목적 유전자 발현 억제용 벡터를 제작하였다(도 9 및 10). 아울러, 상기 벡터로 형질전환된 담배 식물체는 목적 유전자인 DFR 유전자의 발현이 감소되며, DFR 유전자에 대해 siRNA를 형성함을 확인하였고(도 13 및 14), 형질전환 되지 않은 야생형 식물체에 비하여 꽃의 붉은색이 감소한 것을 확인하였다(도 15 및 16).
- [0039] 이는, 본 발명의 벡터는 목적 유전자 발현 억제에 우수한 효과를 나타내므로, 형질전환 식물체의 제조에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0040] 또 다른 하나의 양태는 상기 벡터를 포함하는 목적 유전자 발현 억제용 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*)을 제공한다.
- [0041] 이때, 상기 '벡터' 및 '목적 유전자'의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0042] 본 발명의 용어, "아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*)"은 식물 근두암증(crown gall) 병원균의 일종으로, 본 발명의 목적상, 본 발명의 목적 유전자 발현 억제용 벡터를 식물로 전달하는 매개체를 의미할 수 있다.
- [0043] 구체적으로, 상기 아그로박테리움 투마파시엔은 아그로박테리움 투마파시엔 LBA4404, GV2260, GV3101, GV3100, GV3850, A136, C58C1, AGL-1, EHA101 또는 EHA105일 수 있으나, 본 발명의 벡터를 식물로 전달할 수 있는 한, 이에 제한되지 않는다.

- [0044] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, BrHD1 인트론 RNAi 카세트를 포함하는 유전자 발현 억제용 벡터를 함유하고 있는 아그로박테리움 투마파시엔 LBA4404를 제작하였고, 이를 담배 잎에 접종함으로써 형질전환된 담배 식물체를 제조하였다(실시예 5-2). 또한, 상기 식물체는 형질전환 되지 않은 야생형 식물체에 비하여 꽃의 붉은색이 감소한 것을 확인하였다(도 15 및 16).
- [0045] 이는, 본 발명의 아그로박테리움 투마파시엔은 목적 유전자 발현 억제에 우수한 효과를 나타내므로, 형질전환 식물체의 제조에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0046] 또 다른 하나의 양태는 상기 벡터를 포함하는 목적 유전자 발현이 억제된 형질전환 식물체를 제공한다.
- [0047] 이때, 상기 '벡터' 및 '목적 유전자'의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0048] 본 발명의 용어, "형질전환"은, 유전물질을 다른 계통의 살아 있는 세포에 도입함으로써 유전형질을 변화시키는 현상을 의미한다.
- [0049] 본 발명의 용어, "식물체"는 성숙한 식물체뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 수 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함한다.
- [0050] 본 발명에서 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 또는 수수를 포함하는 식량 작물; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 또는 당근을 포함하는 채소 작물; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 또는 유채를 포함하는 특용작물; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 또는 바나나를 포함하는 과수; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 또는 튜립을 포함하는 화훼; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 또는 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있으며, 구체적으로 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 또는 유채를 포함하는 특용작물이며, 더욱 구체적으로 담배일 수 있으나, 본 발명의 벡터에 의해 유전자의 발현이 억제될 수 있는 한, 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 본 발명의 목적상, 상기 식물체는 목적 유전자의 발현이 야생형 식물체에 비하여 4 내지 6배 감소된 것일 수 있다.
- [0052] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 본 발명의 벡터로 담배를 형질전환시킨 결과, 형질전환된 담배 식물체는 목적 유전자인 DFR 유전자의 발현이 4 내지 6배 감소되며, DFR 유전자에 대해 siRNA를 형성함을 확인하였고(도 13 및 14), 형질전환 되지 않은 야생형 식물체에 비하여 꽃의 붉은색이 감소한 것을 확인하였다(도 15 및 16).
- [0053] 이는, 본 발명의 벡터는 목적 유전자 발현 억제에 우수한 효과를 나타내므로, 형질전환 식물체의 제조에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0054] 또 다른 하나의 양태는 (a) DFR(dihydroflavonol 4-reductase) 유전자의 제1단편; (b) 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진 HD1(Histone Deacetylase 1) 유전자의 인트론(intron); 및 (c) 상기 제1단편에 역방향으로 상보적인 제2단편을 순차적으로 포함하는 DFR 유전자 발현 억제용 카세트를 포함하는, DFR 유전자 발현 억제용 벡터로 형질전환된, 야생형 식물체에 비하여 꽃의 붉은색이 감소한 식물체를 제공한다.
- [0055] 이때, 'HD1(Histone Deacetylase 1) 유전자', '인트론(intron)', '유전자 발현 억제용 카세트', '벡터' 및 '목적 유전자'의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0056] 본 발명에서, 상기 DFR 유전자 발현 억제용 벡터는 목적 유전자가 DFR(dihydroflavonol 4-reductase) 유전자인 것일 수 있다. 즉, DFR 유전자의 제1단편 및 제2단편을 인트론의 양 옆에 정방향 및 역방향으로 도입시킨 구조를 가질 수 있으며, 구체적으로, (a) DFR 유전자의 제1단편; (b) 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어진 HD1(Histone Deacetylase 1) 유전자의 인트론(intron); 및 (c) 상기 제1단편에 역방향으로 상보적인 제2단편을 순차적으로 포함하는 구조를 가질 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 벡터는 도 10의 개열지도로 표시되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명의 용어, "DFR(dihydroflavonol 4-reductase) 유전자"는 dihydroflavonol 4-reductase을 코딩하는 유전자를 의미하는데, 이는 안토시아닌의 합성에 관여하며, 식물체의 꽃 색을 조절한다고 알려져 있다. 상기 유전자의 염기서열은 NCBI의 GenBank 등 공지의 데이터베이스에서 얻을 수 있다(예: GenBank Accession: ABN80437.1, ABN80436.1 등). 구체적으로, 상기 유전자는 담배(*Nicotiana tabacum*)에서 유래한 유전자일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0058] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 본 발명의 DFR 유전자 발현 억제용 벡터로 담배를 형질전환시킨 결과, 형질 전환된 담배 식물체는 목적 유전자인 DFR 유전자의 발현이 감소되며, DFR 유전자에 대해 siRNA를 형성함을 확인하였고(도 13 및 14), 형질전환 되지 않은 야생형 식물체에 비하여 꽃의 붉은색이 감소한 것을 확인하였다(도 15 및 16).
- [0059] 이는, 상기 벡터는 DFR 유전자 발현 억제에 우수한 효과를 나타내므로, 야생형 식물체에 비하여 꽃의 붉은색이 감소한 식물체의 제조에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0060] 또 다른 하나의 양태는 상기 DFR 유전자 발현 억제용 카세트를 식물체에 도입하는 단계를 포함하는, DFR 유전자 발현이 억제된 형질전환 식물체의 제조 방법을 제공한다.
- [0061] 이때, 상기 'DFR 유전자', '벡터', '형질전환' 및 '식물체'의 정의는 전술한 바와 같다.
- [0062] 본 발명에서, DFR 유전자 발현 억제용 카세트를 식물체에 도입하는 단계는 상기 카세트를 포함하는 DFR 유전자 발현 억제용 벡터를 식물체에 도입하는 단계일 수 있고, 이는 당업자에게 공지된 형질전환기술에 의해 수행될 수 있다.
- [0063] 구체적인 예로, 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 이용한 형질전환방법, 미세사출법(microprojectile bombardment), 일렉트로포레이션(electroporation), PEG-매개 융합법(PEG-mediated fusion), 미세주입법(microinjection), 리포좀 매개법(liposome-mediated method), 인-플란타 형질전환법(In planta transformation), 진공 침윤법(Vacuum infiltration method), 화아침지법(floral meristem dipping method) 또는 아그로박테리아 분사법(*Agrobacterium* spraying method)을 이용할 수 있으며, 더욱 구체적으로 아그로박테리움을 이용한 형질전환방법을 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0064] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 상기 DFR 유전자 발현 억제용 벡터를 함유하고 있는 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*)을 선별하여 담배의 잎에 접종하였고, 상기 담배의 형질전환된 조직에서 슈트 및 뿌리를 유도하여 형질전환된 담배를 제작하였다(도 12). 또한, 형질전환 담배 식물체는 DFR 유전자의 발현이 감소되며, DFR 유전자에 대해 siRNA를 형성함을 확인하였고(도 13 및 14), 형질전환 되지 않은 야생형 식물체에 비하여 꽃의 붉은색이 감소한 것을 확인하였다(도 15 및 16).
- [0065] 이는, 상기 벡터는 DFR 유전자 발현 억제에 우수한 효과를 나타내므로, DFR 유전자 발현이 억제된 형질전환 식물체의 제조에 유용하게 사용될 수 있음을 시사하는 것이다.

발명의 효과

- [0066] 본 발명의 목적 유전자 발현 억제용 카세트 및 이를 포함하는 재조합 벡터는 목적 유전자의 siRNA를 형성하여 그 유전자의 발현을 억제할 수 있으므로, 유용 작물의 개발뿐만 아니라, 미지의 유전자의 기능 분석에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0067] 도 1은 배추로부터 증폭된 BrHD1의 첫 번째 인트론(이하, 'HD 인트론' 또는 'BrHD1 인트론'으로 명명)을 전기영동한 이미지이다. M은 100 bp size 마커를 의미한다.
- 도 2는 pGEM-T easy 벡터에 삽입된 BrHD1 인트론을 확인하기 위해 *EcoRI* 효소를 처리하여 전기영동한 이미지이다. M은 100 bp size 마커를 의미한다.
- 도 3은 BrHD1 인트론의 가장자리에 제한효소 인식부위를 추가로 도입하는 전략을 보여주는 개략도이다.
- 도 4는 pCAMBIA 3301 벡터의 멀티클로닝 사이트(multi-cloning site)를 변형하는 전략을 보여주는 개략도이다.
- 도 5는 pCAMBIA 3301 벡터에 삽입된, *EcoRI*과 *NcoI* 자리를 가진 CaMV 35S 프로모터를 확인하기 위해 *EcoRI*과 *NcoI* 효소를 동시에 처리하여 전기영동한 이미지이다. M은 1.0 kp size 마커를 의미한다.
- 도 6은 재조합 벡터에 삽입된 BrHD1 인트론의 RNAi 카세트(이하, 'RNAi 카세트'로 명명)를 확인하기 위해, *SacI*+*SpeI*, *NcoI*+*BglII*, *NcoI*+*BstEII*의 효소를 처리한 결과에 관한 것으로, a는 제작된 벡터 내 제한효소 자리 및 효소 처리에 따른 예상되는 단편의 크기를 보여주는 개략도이고, b는 효소 처리 후의 전기영동 이미지이다.
- 도 7은 재조합 벡터에 삽입된 RNAi 카세트의 염기서열을 분석한 결과이다.

도 8은 최종적으로 완성된, RNAi 카세트가 도입되어 목적 유전자의 발현을 억제할 수 있는 식물 형질전환용 벡터의 구조를 보여준다. 상기 벡터를 'pKH_i'로 명명하였다.

도 9는 DFR 유전자를 pKH_i 벡터에 도입하는 전략을 보여주는 개략도, 및 증폭된 DFR 유전자의 단편을 보여주는 전기영동 이미지이다. M은 100 bp size 마커를 의미한다.

도 10은 최종적으로 완성된, RNAi 카세트 및 DFR 유전자의 단편이 도입되어 DFR의 발현을 억제할 수 있는 식물 형질전환용 벡터의 구조를 보여준다. 상기 벡터를 'pKH-DFR_i'로 명명하였다.

도 11은 상기 pKH-DFR_i 벡터에서 형성되는 이중나선 RNA를 보여주는 이미지로서, a는 상기 이중나선 RNA의 이차 구조, b는 상기 이차구조에서 형성되는 헤어핀(hairpin) 구조를 확대한 것이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따라 형질전환된 담배 식물체에 삽입된 pKH-DFR_i 벡터를 확인하기 위해, PCR을 수행한 후 전기영동한 이미지이다. P는 pKH-DFR_i 벡터 플라스미드 DNA, M은 100 bp 사이즈 마커, N은 비형질전환체, 및 1 내지 4는 pKH-DFR_i 벡터가 형질전환된 담배 식물체를 의미한다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따라 형질전환된 담배 식물체의 내생 DFR 발현을 분석한 real-time RT-PCR 결과이다. SRI는 야생형 담배, DFR_i-1 내지 4는 담배 형질전환체를 의미한다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따라 형질전환된 담배 식물체의 DFR 유전자의 siRNA 형성 여부를 분석한 Northern blot 결과이다. M은 21 nt DNA 마커, SRI는 야생형 담배, DFR_i-1 내지 4는 담배 형질전환체를 의미한다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따라 형질전환된 담배 식물체의 꽃 색을 보여주는 이미지이다. SRI는 야생형 담배, DFR_i-1 내지 4는 담배 형질전환체를 의미한다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에 따라 형질전환된 담배 식물체의 꽃 색을 LAB 컬러를 이용하여 비교한 그래프이다. SRI는 야생형 담배, DFR_i-1 내지 4는 담배 형질전환체를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0069] 실시예 1. 헤어핀 구조를 갖는 인트론(intron)의 규명

[0070] 유전자의 발현을 억제하는 식물 형질전환용 벡터를 개발하기 위하여, 목적 유전자의 이중나선 RNA, 즉 siRNA가 형성되도록 헤어핀 구조를 유지하는 인트론을 사용하고자 하였다.

[0071] 먼저, 효과적인 헤어핀 구조를 이루기 위한 인트론의 길이로 500~600 bp를 선정하고, 배추과이며 모델 식물인 애기장대의 데이터베이스(<http://www.arabidopsis.org/>)를 이용하여 적용 가능한 인트론을 조사하였다.

[0072] 그 결과, HD1(Histone Deacetylase 1, AT4G38130)의 첫 번째 인트론이 적절한 길이임을 확인하였다.

[0073] 실시예 2. 배추 유래 HD1(BrHD1) 인트론의 동정 및 확인

[0074] 실시예 2-1. BrHD1 인트론의 동정

[0075] 상기 실시예 1-1을 통해 규명한, 헤어핀 구조를 유지하는 HD1 유전자의 첫 번째 인트론을 식물 형질전환용 벡터의 개발에 적용하고자, 배추(*Brassica rapa*) 유래 BrHD1 인트론(이하, 'BrHD1'로 명명)을 동정하였다.

[0076] 먼저, 기내의 무균상태에서 키운 배추(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)에서 gDNA를 분리하였다. 구체적으로, 배추의 잎을 액체 질소를 이용하여 파쇄하고, 800 μ l 2X CTAB buffer(0.1M Tris-HCl, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, 1% 2-ME, 2% PVP, 1% Sodium bisulfite) 용액을 첨가하여 잘 섞어준 후, 30분 동안 65℃에서 반응하였다. 800 μ l의 PCI 용액을 넣고 섞어준 다음, 4℃에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하고, 그 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 획득한 상등액의 1/10 양의 NaOAc와 2.5배의 100% 에탄올을 첨가하여 -20℃에서 2시간 동안 재조합 DNA를 침전시킨 후, 원심분리하여 침전물을 얻었다. 70% 에탄올로 침전물을 세척한 다음 멸균 증류수에 녹여 사용하였다. 그 다음, 에탄올이 없도록 잘 건조시키고, TE 버퍼(10 mM Tris-Cl pH 8.0, 1 mM EDTA)에 녹여 사용하였다.

[0077] 이후, 분리된 gDNA 1 μ g을 사용하여 하기 표 1의 프라이머와 태그 중합효소(Taq polymerase)로 PCR을

수행하였다. PCR 프로그램은 95℃에서 5분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 95℃에서 30초, 58℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 40회 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후, 16℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

표 1

프라이머	구분	염기서열
HD-intron-F	서열번호 1	5'-CTC TTA AGC AGC ATG AGG TTT GTC-3'
HD-intron-R	서열번호 2	5'-TCT AAC GTA CAG AAC ACG CTG-3'

그 결과, 도 1에서 볼 수 있듯이, 증폭된 산물은 552 bp에 존재함을 확인할 수 있었다.

실시예 2-2. BrHD1 인트론의 염기 서열 확인

상기 실시예 2-1을 통해 증폭된 산물이 BrHD1의 인트론인지 확인하기 위하여, 하기 실시예 2-2-1 내지 2-2-3에 따른 방법으로 증폭산물의 염기 서열을 분석하였다.

실시예 2-2-1. 재조합 벡터 및 형질전환 대장균의 이용

먼저, 상기 실시예 2-1에서 수득한 증폭 산물을 염기서열 분석용 벡터 pGEM-T easy 벡터에 클로닝하여 재조합 벡터를 제작하였다.

이후, 상기 염기서열 분석용 벡터를 대장균에 형질전환하였다. 구체적으로, 대장균(*E. coli*) DH10β를 LB 50ml에 접종시켜 37℃에서 OD₅₇₀ = 0.375 ~ 0.400이 되도록 배양한 후, 균주배양액을 3,000rpm에서 10분간 원심분리하였고, 얻어진 침전물을 0.1M CaCl₂ 용액으로 풀어준 뒤 30분간 얼음에 보관하였다. 그 후, 3,000rpm에서 7분간 원심분리한 뒤 0.1M CaCl₂에 침전물을 녹이고, 상기 벡터를 함께 섞어 얼음에 30분간 두었다가 42℃에서 90초간 열 충격을 주었다. 이후, 10분간 얼음에 방치한 후, LB 배지 700μl를 첨가하여 37℃에서 1시간 진탕배양하였다. 배양액을 12,000rpm으로 수 초간 원심분리한 후, 100μl만 남기고, 상등액을 제거하였으며, 남은 상등액으로 침전물을 녹였다. 이후 암피실린(ampicillin, 50 mg/ℓ), X-gal(200 mg/ℓ in N-N dimethylformamide) 및 IPTG (200 mg/ℓ)가 첨가된 고체 LB 배지에 녹인 침전물을 전개하고, 37℃에서 12시간 배양한 후 고체 배지에서 저항성을 보이며 흰색의 콜로니를 형성하는 형질전환된 대장균 콜로니를 선발하였다.

실시예 2-2-2. 재조합 벡터의 분리 및 유전자 삽입 여부 확인

상기 실시예 2-2-1을 통해 선발한 형질전환 대장균 콜로니를 대량으로 배양하여 재조합 DNA 벡터를 증폭한 뒤, 이를 분리하여 벡터 내 유전자의 삽입 여부를 확인하였다.

구체적으로, 항생제가 첨가된 LB 배지 3ml에 상기 선발한 콜로니를 접종한 후 37℃에서 12시간 배양하고, 배양액을 4℃에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 침전된 균 덩어리에 Solution I(200μl/ml)을 첨가하여 보텍스(vortex)를 수초 간 수행하여 충분히 풀어준 후, Solution II(200μl/ml)를 첨가하여 조심스럽게 섞어주어 세포막이 완전히 깨어지도록 실온에서 5분간 방치하였다. 이후, Solution III(200 μl/ml)를 첨가하여 잘 섞어주고, 얼음에서 10분간 방치한 뒤, 12,000rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 획득하였다. 획득한 상등액의 1/10 양의 NaOAc와 2.5배의 100% 에탄올을 첨가하여 -20℃에서 2시간 동안 재조합 DNA를 침전시킨 후, 원심분리하여 침전물을 얻었다. 70% 에탄올로 상기 DNA를 세척한 다음 멸균 증류수에 녹여 사용하였다. 이후, 상기 분리한 재조합 DNA에 제한효소 *EcoRI*을 처리하였다.

그 결과, 도 2에서 볼 수 있듯이, *EcoRI* 처리에 의해 삽입된 유전자는 552 bp로, pGEM-T easy 벡터는 약 3 kb로 분리됨을 확인함으로써, pGEM-T easy 벡터에 유전자의 삽입이 제대로 이루어졌음을 알 수 있었다.

실시예 2-2-3. 유전자의 서열 확인

상기 실시예 2-2-2를 통해 분리한 552 bp의 증폭 산물이 BrHD1의 인트론인지 확인하기 위하여, 상기 증폭산물의 염기서열을 확인하였다.

구체적으로, 유전자가 삽입된 자리에서 근접한 부분에 상보적인 T7 및 SP6 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였으며, 염기서열 분석에는 GenBank BLAST program을 사용하였다.

그 결과, PCR에 의해 분리된 유전자는 서열번호 3으로 표시되는, 실시예 2-1의 배추 유래 BrHD1의 첫 번째 인트

론의 염기서열임을 확인하였다. 아울러, 상기 인트론은 스플라이싱 신호인 GT 및 AG 지역을 포함하고 있으므로, siRNA의 발생 효율이 더욱 증가할 것임을 알 수 있었다.

[0093] 실시예 3. BrHD1 인트론을 포함한 RNAi 카세트(cassette) 구축

[0094] 유전자 발현 억제용 형질전환 벡터를 제조하기 위해, 상기 실시예 1 및 2를 통해 규명한, 배추 유래 BrHD1 인트론을 포함하는 유전자 발현 억제용 RNAi 카세트(이하, 'BrHD1 인트론 RNAi 카세트'로 명명함)를 구축하였다.

[0095] 먼저, 상기 BrHD1 인트론의 앞뒤로 제한효소 인식부위를 추가로 도입하였다. 각각의 제한 효소는 모두 스틱키 엔드(sticky end)로 정확한 방향으로 재조합(ligation) 되도록 하였으며, 실험자가 편리하게 실험할 수 있도록 유사한 제한효소 반응 버퍼를 사용하는 것으로 구성하였다. 또한, 저렴한 가격으로 입수가 용이한 제한효소를 사용하여, RNAi 벡터를 구축하는 비용을 절감할 수 있도록 구성하였다.

[0096] 구체적으로, 도 3에 나타난 바와 같이, 유전자 카세트를 발현 벡터에 도입시키기 위한 목적으로 상기 인트론의 양 끝에 *NcoI* 및 *BstEII*의 제한효소 인식부위를 추가하였다. 또한, 목적 유전자의 발현을 억제하기 위한 목적으로 상기 인트론의 정방향(sense)에는 *NcoI* 및 *SacI*의 제한효소 인식부위, 역방향(anti-sense)에는 *Bg/II* 및 *SpeI*의 제한효소 인식부위를 추가하였다.

[0097] 각각의 제한효소 인식부위는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide)를 합성한 후에 재조합하는 방법을 이용하였다. *NcoI*과 *SacI*은 서열번호 4 및 5의 프라이머로 합성하여 *NcoI*과 *SacI*의 스틱키 엔드가 구성되도록 하였으며, *Bg/II*, *SpeI* 및 *BstEII*는 서열번호 6 및 7의 프라이머로 합성하여 양 말단은 각각 *Bg/II*과 *BstEII*의 스틱키 엔드가 구성하고 내부에 *SpeI*이 포함되도록 하였다. 상기 프라이머의 서열은 하기 표 2에 기재하였다.

표 2

프라이머	구분	염기서열
N+S-1	서열번호 4	5'-CAT GGC GGC CGC GGG AAT TCG ATT GAG CT-3'
N+S-2	서열번호 5	5'-TCA ATC GAA TTC CCG CGG CCG C-3'
B+S+B-1	서열번호 6	5'-GAT CTA TCA CTA GTG-3'
B+S+B-2	서열번호 7	5'-GTC ACC ACT AGT GAT A-3'

[0099] 합성된 올리고뉴클레오타이드(100 nmol) 각각을 10X 결합 반응 버퍼(100mM Tris-HCl, 1M NaCl, 10mM EDTA)에 넣고, 65℃에서 10분 처리 후 상온에서 2시간 동안 천천히 식히는 방식으로 dsDNA를 만든 후에 재조합 벡터에 도입하였다.

[0100] 실시예 4. BrHD1 인트론 RNAi 카세트를 포함하는 재조합 벡터의 제작

[0101] 실시예 4-1. 바이너리 벡터의 MCS 변형

[0102] 상기 실시예 3의 BrHD1 인트론 RNAi 카세트를 포함하는 재조합 벡터를 제작하고자, 먼저 바이너리 벡터인 pCAMBIA 3301 벡터의 멀티클로닝 사이트(multi-cloning site; MCS)를 포함하는 프로모터 부분을 변형시켰다.

[0103] BrHD1 인트론 RNAi 카세트에는 *SacI* 제한효소 인식부위가 존재하는데, 상기 *SacI* 인식부위는 pCAMBIA 3301 벡터의 MCS에도 존재함에 따라, 추후 재조합 벡터의 구축 시 어려움이 예상되었다.

[0104] 이에 따라, 도 4에 나타난 바와 같이, pCAMBIA 3301 벡터의 MCS에 존재하는 *SacI* 인식부위를 제거하였다. 구체적으로, 하기 표 3에 기재된 바에 따른 프라이머를 이용하여 CaMV 35S 프로모터 앞부분에 *EcoRI* 자리를 추가하고, 뒷부분에는 기존 벡터에 존재하는 *NcoI* 자리를 이용해 재결합하는 방법으로 MCS의 *SacI* 자리를 제거하였다. 이후, 정확한 변형이 이루어졌는지 확인하기 위하여, MCS가 변형된 상기 벡터에 *EcoRI*과 *NcoI* 효소를 동시에 처리하였다.

표 3

프라이머	구분	염기서열
35s-EcoR-F	서열번호 8	5'-GAA TTC TCA TGG AGT CAA AGA TTC-3'
35s-R	서열번호 9	5'-CCT AAC CAA GAA AAT GAA GGA GA-3'

[0106] 그 결과, 도 5에서 볼 수 있듯이, 606 bp의 프로모터와 약 10 kb의 pCAMBIA 3301 벡터의 두 개의 단편으로 분리

됨을 확인하였다.

[0107] 이를 통해, pCAMBIA 3301 벡터의 MCS에 존재하는 *SacI* 인식부위가 제거되었으며, 새로이 구성된 CaMV 35S 프로모터가 정확히 삽입된 것을 확인할 수 있었다.

[0108] **실시예 4-2. BrHD1 인트론 RNAi 카세트의 도입**

[0109] 이후, 상기 실시예 4-1의 MCS가 변형된 pCAMBIA3301 벡터에 BrHD1 인트론 RNAi 카세트를 도입하였다. 상기 도입에는 상기 실시예 2의 카세트 제작에 사용된 *NcoI*, *BgIII*, *SacI*, *SpeI* 및 *BstEII* 제한효소를 사용하였다.

[0110] 이후, 정확한 벡터가 구축되었는지 확인하고자 *SacI+SpeI*, *NcoI+BgIII*, *NcoI+BstEII*의 제한효소를 처리하여 절단 양상을 확인한 결과, 도 6의 a 및 b에서 볼 수 있듯이, 예상한 크기의 단편으로 분리됨을 확인하였다.

[0111] 또한, 벡터의 염기서열을 분석한 결과, 도 7에서 볼 수 있듯이, 제한효소 자리 및 BrHD1의 첫 번째 인트론이 정확하게 도입됨을 확인하였다.

[0112] 이에 따라, BrHD1 인트론 RNAi 카세트가 도입되어 목적 유전자의 발현을 억제할 수 있는 식물 형질전환용 벡터(이하, 'pKHi'로 명명)를 제작할 수 있었으며, 상기 벡터의 구조는 도 8에 나타내었다.

[0113] **실시예 5. BrHD1 인트론 RNAi 카세트를 포함하는 재조합 벡터의 작동 여부 확인**

[0114] 상기 실시예 1 내지 4를 통해 제작된 유전자 발현 억제용 pKHi 벡터의 작동 여부를 확인하기 위하여, 하기 실시예 5-1 내지 5-5에 따른 방법으로, 상기 벡터를 이용하여 담배에서 DFR(dihydroflavonol 4-reductase; Genbank ID J969389.1) 유전자의 발현을 억제하였다.

[0115] **실시예 5-1. DFR 유전자를 포함하는 재조합 벡터의 제작**

[0116] 먼저, 담배의 화색 조절 관련 유전자인 DFR(dihydroflavonol 4-reductase; Genbank ID J969389.1)을 목적 유전자로 하여, 이를 선택적으로 발현억제(down-regulation)시키는 재조합 벡터를 제작하였다.

[0117] 구체적으로, 하기 표 4에 기재된 바에 따른 프라이머를 이용하여 DFR 유전자의 간접 RNA(RNAi) 단편을 제작하였다. 한 번의 PCR 산물로 헤어핀 구조를 유도하기 위하여, 정방향(sense) 프라이머의 5'에는 *SpeI-NcoI* 자리를 추가하고, 역방향(anti-sense) 프라이머의 5'에는 *BgIII-SacI* 자리를 추가하였다.

표 4

프라이머	구분	염기서열
DFRi-TF	서열번호 10	5'-ACTAGT CCATGG GAA TCT AAG GAT CCC-3'
DFRi-TR	서열번호 11	5'-AGATCT GAGCTC AGA AAC TCG GAG ATA G-3'

[0119] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, 473bp로 나타나는 DFR 유전자의 단편을 수득할 수 있었다.

[0120] 이에 따라, 상기 단편이 도입됨으로써 DFR의 발현을 억제할 수 있는 식물 형질전환용 벡터(이하, 'pKH-DFRi'로 명명)를 제작할 수 있었으며, 상기 벡터의 구조는 도 10에 나타내었고, 상기 벡터에 의해 형성되는 이중나선 RNA(double-stranded RNA) 이차구조는 도 11에 나타내었다.

[0121] **실시예 5-2. pKH-DFRi를 이용한 형질전환된 담배의 제작**

[0122] 이후, 상기 실시예 5-1에 따라 제작된 식물 형질전환용 벡터를 이용하여, 하기 실시예 5-2-1 내지 5-2-4에 따른 방법으로, DFR의 발현이 억제된 형질전환된 담배를 제작하였다.

[0123] **5-2-1. pKH-DFRi를 포함하는 아그로박테리움의 제작**

[0124] 담배에 접종하는 형질전환 매개체로서, 식물 형질전환용 벡터 pKH-DFRi를 함유하고 있는 아그로박테리움 투마파시엔(*Agrobacterium tumefaciens*, 이하, 'LBA4404/pKH-DFRi')를 사용하였다.

[0125] 먼저, LBA4404/pKH-DFRi를 카나마이신(kanamycin) 50 mg/L가 함유된 고체 YEP 배지에 평판배양하여 28℃에서 48시간 배양하였고, 배양된 아그로박테리움 투마파시엔 세포 중 몇몇 콜로니(colony)를 찍어 카나마이신 50 mg/L가 함유된 5 mL 액체 YEP 배지에 접종하여 28℃에서 48시간 현탁배양 하였다. 배양된 현탁에서 700μl를 추출한 다음, 0.02 mM Acetosyringone이 첨가되고 pH가 5.6으로 조정된 50ml 액체 YEP 배지에 첨가하여 28℃에서 OD₆₀₀이 1.0이 될 때까지 현탁배양하였다. 마지막으로 배양된 현탁액은 원심분리기에서 4000rpm으로 15분간 원심

분리시켜 25ml 액체 YEP 배지로 재현탁하여 담배 잎의 접종에 사용하였다.

5-2-2. 형질전환된 담배의 제작 및 이의 슈트 유도

담배(*Nicotiana tabacum* 'SR1')를 무균상태에서 생육시킨 뒤 잎을 가로 및 세로 10 mm로 자르고, 제작된 LBA4404/pKH-DFRi 현탁액에 1분간 침지시켜 접종하였다. 접종된 잎 절편은 공동배양배지(MS기본배지, 3% sucrose, 0.8% plant agar, 1.5 mg/L BA, pH 5.7)에서 3일간 공동배양하였다. 이후, 잎 절편을 액체 공동배양 배지로 세척하여 아그로박테리움 투마파시엔을 씻어낸 후 슈트 유도배지(MS기본배지, 3% sucrose, 0.8% plant agar, 1.5 mg/L BA, 200 mg/L cefotaxime, pH 5.7)에 형질전환된 담배 잎 절편을 배양하여 형질전환된 조직에서만 슈트가 유도되도록 하였다.

실시예 5-2-3. 형질전환된 담배의 뿌리 유도

유도된 형질전환 슈트를 절단하여 뿌리 유도배지(1/2 MS기본배지, 3% sucrose, 0.8% plant agar, 200 mg/L cefotaxime, pH 5.8)로 옮겨 뿌리 발생을 유도하였다. 뿌리가 생성된 담배 형질전환체는 멸균된 질석에 이식하여 순화시켰고 이후 화분에 이식하여 온실에서 재배하였다.

실시예 5-2-4. 형질전환된 담배의 선발

상기 실시예 5-2-1 내지 5-2-3에 따라 형질전환된 담배를 대상으로 형질전환 유무를 확인하기 위하여, PCR 검정을 수행하였다.

구체적으로, 제조제(PPT) 저항성 유전자인 'bar' 유전자를 대상으로 PCR 검정을 수행하였다. 하기 표 5에 기재된 바에 따른 프라이머를 이용하였으며, PCR 프로그램은 95℃에서 5분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 95℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 40초로 35 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

표 5

프라이머	구분	염기서열
bar-F	서열번호 12	5'-GTA GAG CGT GGA GCC CAG T-3'
bar-R	서열번호 13	5'-TAC CAT GAG CCC AGA ACG AC-3'

그 결과, 도 12에서 볼 수 있듯이, 형질전환된 담배의 4개체 모두 pKH-DFRi 벡터 플라스미드 DNA가 포함됨을 확인함으로써, pKH-DFRi 벡터에 의한 형질전환이 잘 이루어졌음을 확인하였다.

실시예 5-3. 형질전환된 담배의 내생 DFR 유전자 발현 및 siRNA 형성 검정

상기 실시예 5-2를 통해 제작한 형질전환된 담배를 대상으로, 내생 DFR 유전자의 발현 감소 여부를 real-time RT-PCR을 통해 확인하였고, DFR 유전자의 siRNA 형성 여부는 Northern blot 방법으로 검정하였다.

구체적으로, 상기 형질전환체로부터 분리한 총 RNA에 대해 real-time RT-PCR을 수행하였다. siRNA 형성 지역을 피하여 담배 DFR 유전자의 90~100bp 부분을 특이적으로 증폭하는 프라이머를 작성하였고, 내생 대조군(housekeeping gene)으로는 Actin을 이용하였다. 상기 프라이머의 서열은 하기 표 6에 기재하였다. real-time RT-PCR 프로그램은 95℃에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 95℃에서 10초, 60℃에서 30초로 40 반복(cycle) 실행하고, 매 반복의 마지막에 SYBR green의 형광 값을 읽은 후 delta delta CT 분석법을 이용하여 정량화하였다.

표 6

프라이머	구분	염기서열
NtDFR-real-F	서열번호 14	5'-TAT GAG CAC CCA AAG GCA GAG G-3'
NtDFR-real-R	서열번호 15	5'-CGG CCA TTT CTC TTG GAC CAT C-3'
Nt_Actin-real-F	서열번호 16	5'-TCC CAC ATG CTA TTC TCC GCT T-3'
Nt_Actin-real-R	서열번호 17	5'-CCC TGA CAA TTT CCC GCT CA-3'

그 결과, 도 13에서 볼 수 있듯이, 담배의 각 형질전환체는 대조군 대비 DFR 유전자의 발현이 4~6배 감소함을 확인하였다.

다음으로, DFR 유전자의 siRNA 형성 여부를 40% Acrylamide(19:1) 젤에 전기영동한 후 Northern blot 방법으로

검정한 결과, 도 14에서 볼 수 있듯이, 대조군에서는 siRNA가 확인되지 않았으며, 형질전환체에서는 형성된 siRNA를 확인할 수 있었다.

[0141] 상기 결과를 통해, pKH-DFRi 벡터에 의해 형질전환된 담배 식물체는 DFR 유전자의 발현이 감소되며, DFR 유전자에 대해 siRNA를 형성함을 확인할 수 있었다.

[0142] **실시예 5-4. 형질전환된 담배의 화색 변화 검정**

[0143] 상기 실시예 5-2를 통해 제작한 형질전환된 담배를 대상으로, 꽃의 색을 비교 분석하였다.

[0144] 그 결과, 도 15에서 볼 수 있듯이, pKH-DFRi가 도입된 형질전환된 담배의 경우에는, 대조군인 비형질전환체 담배에 비하여 꽃의 붉은색이 감소한 것을 확인하였다.

[0145] 또한, 도 16에서 볼 수 있듯이, 해당하는 꽃의 색을 LAB 컬러 값을 이용하여 정량분석한 결과, 꽃의 색에 유의적인 변화가 일어남을 확인하였다.

[0146] 상기 결과를 통해, pKH-DFRi가 도입된 담배 형질전환체는 식물체 내부에서 DFR 유전자에 대한 siRNA를 효과적으로 생성하고, 이에 의해 내생 DFR 유전자의 발현이 억제되어, 꽃의 색이 변화됨을 확인할 수 있었다.

[0147] 또한, 상기 실시예 1 내지 4를 통해 제작한 BrHD1 인트론 RNAi 카세트가 도입되어 목적 유전자의 발현을 억제할 수 있는 식물 형질전환용 벡터는 목적 유전자의 siRNA를 생성함으로써, 목적 유전자의 발현을 효과적으로 억제함을 알 수 있었다.

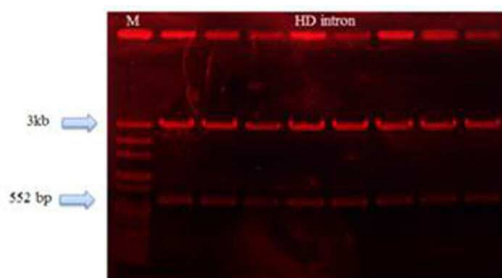
[0148] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

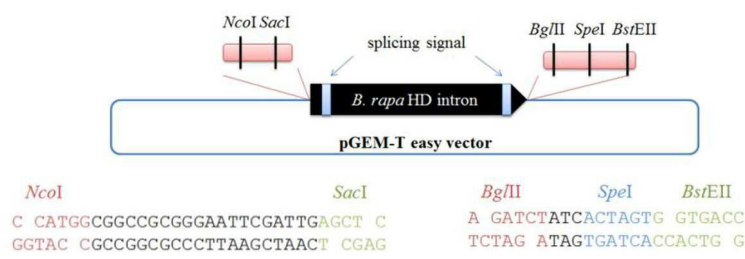
도면1



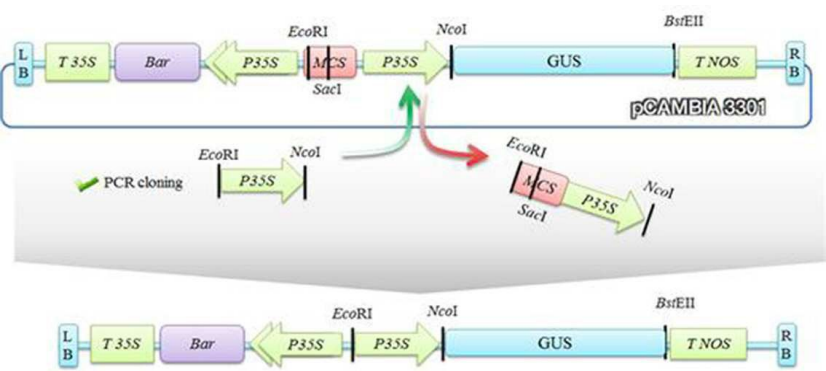
도면2



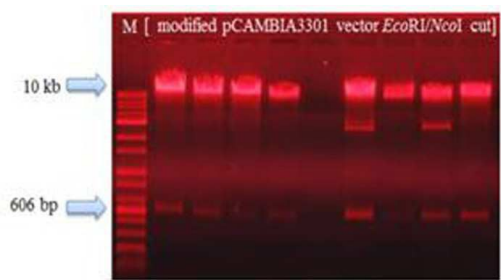
도면3



도면4

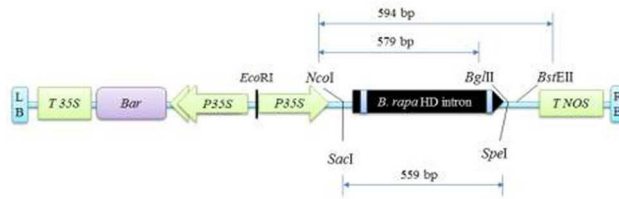


도면5

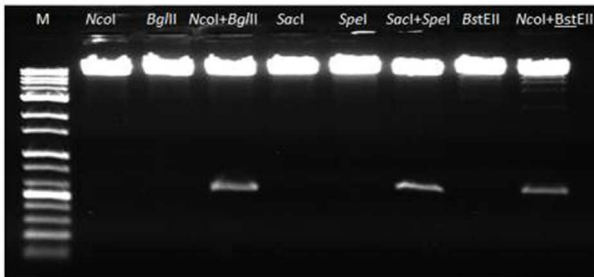


도면6

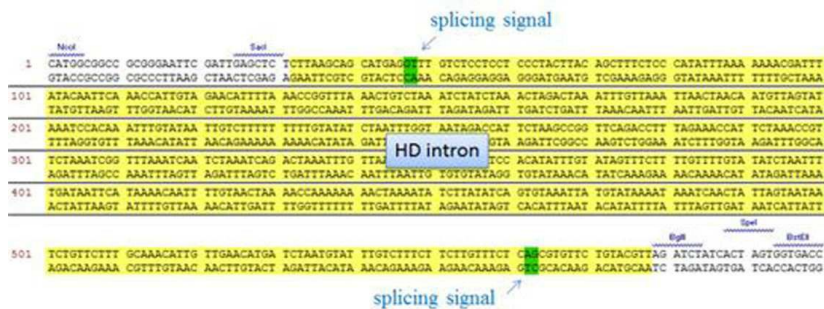
a



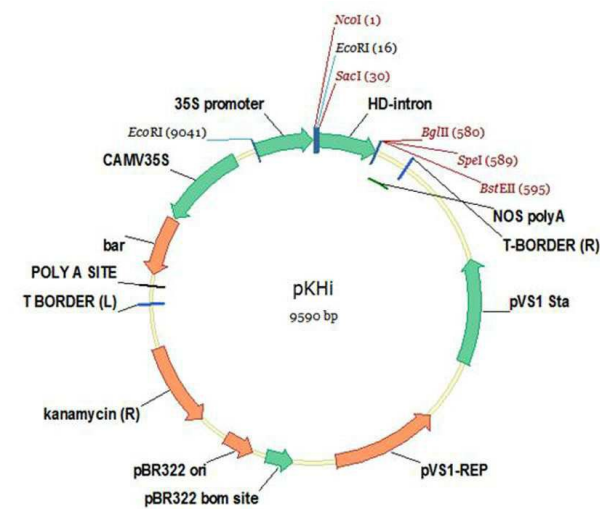
b



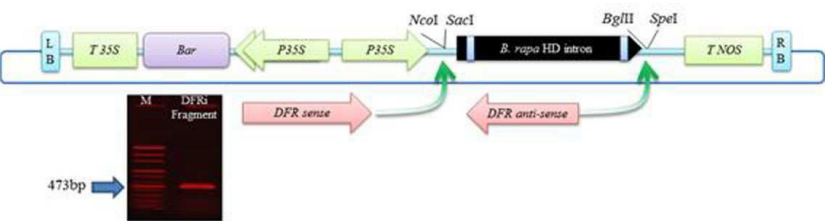
도면7



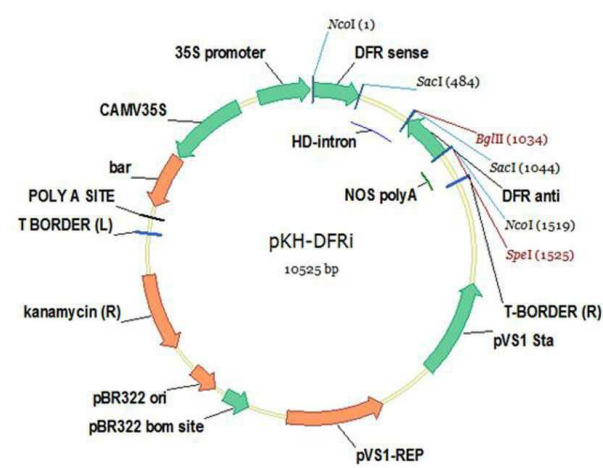
도면8



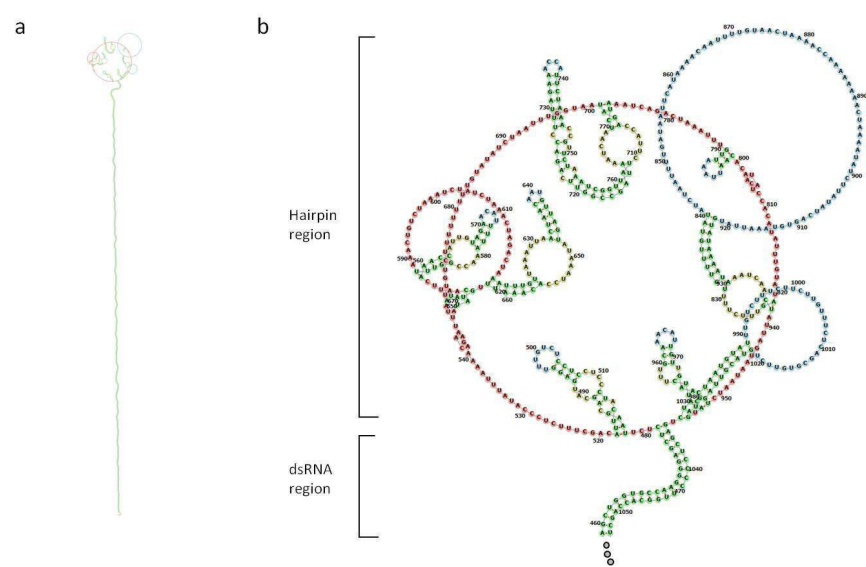
도면9



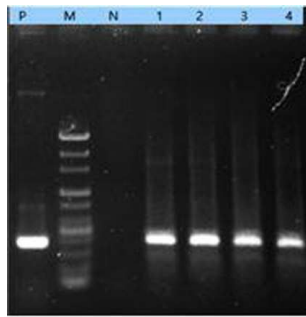
도면10



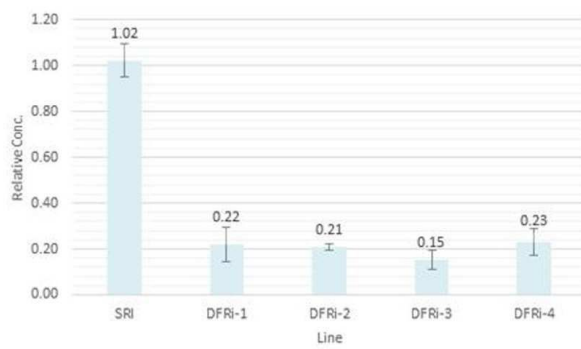
도면11



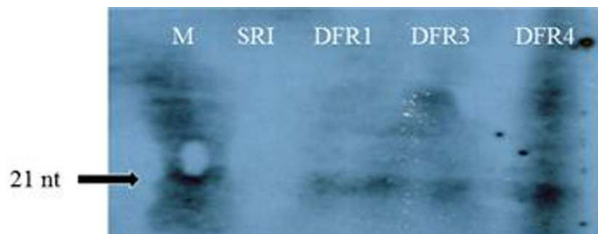
도면12



도면13



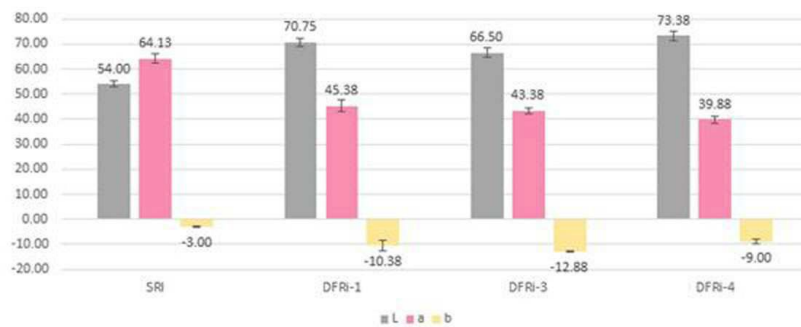
도면14



도면15



도면16



서열 목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
 <120> A recombinant vector comprising intron of Histone Deacetylase 1
 for plant transformation and use thereof

<130> KPA161296-KR

<160> 18

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HD-intron-F

<400> 1

ctcttaagca gcatgaggtt tgtc 24

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HD-intron-R

<400> 2

tctaactac agaacacgt g 21

<210> 3

<211> 547

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 3

cttaagcagc atgaggtttg tctctctcct cctacttaca gctttctccc atatttaaaa 60
aaacgattta tacaattcaa accattgtag aacattttta accggtttaa actgtctaaa 120
tctatctaaa ctagactaaa ttgtttaaat taactaaca tgtagtata aatccacaaa 180
tttgataat tgcctttttt ttgtatata taatttggta atagaccatt ctaagccggt 240

tcagaccttt agaaccatt ctaaaccgtt ctaaaccggt ttaaataat ctaaatacaga 300
ctaaatttgt taaattaaca cacatateca catatttgta tagtttcttt tgttttgtat 360
atctaatttt gataattcat aaaacaattt tgtaactaaa accaaaaaaa actaaaatat 420
cttatatcag tgtaatttat gtataaata aatcaactat tagtaataat ctgttctttg 480
caaacattgt tgaacatgat ctaatgtatt tgcctttctt cttgtttctc agcgtgttct 540
gtacgtt 547

<210> 4
<211> 29
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N+S-1

<400> 4

catggcggcc gcgggaattc gattgagct 29

<210> 5
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N+S-2

<400> 5

tcaatcgaat tcccgcggcc gc 22

<210> 6
<211> 15
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> B+S+B-1

<400> 6

gatctatcac tagtg 15

<210> 7

<211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> B+S+B-2
 <400> 7
 gtcaccacta gtgata 16
 <210> 8
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 35s-EcoR-F
 <400> 8
 gaattctcat ggagtcaaag attc 24
 <210> 9
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> 35s-R
 <400> 9
 cctaaccaag aaaatgaagg aga 23
 <210> 10
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> FRi-TF
 <400> 10
 actagtccat gggaatctaa ggatccc 27
 <210> 11
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> DFRi-TR
 <400> 11
 agatctgagc tcagaaactc ggagatag 28

<210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> bar-F
 <400> 12
 gtagagcgtg gagcccagt 19

<210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> bar-R
 <400> 13
 taccatgagc ccagaacgac 20

<210> 14
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NtDFR-real-F
 <400> 14
 tatgagcacc caaaggcaga gg 22

<210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NtDFR-real-R
 <400> 15
 cggccatttc tcttggacca tc 22

<210> 16
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nt_Actin-real-F

<400>	16	
tcccacatgc tattctccgc tt		22
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Nt_Actin-real-R	
<400>	17	
ccctgacaat ttcccgetca		20
<210>	18	
<211>	9590	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pKHi vector	
<400>	18	
catggcggcc gcgggaattc gattgagctc tcttaagcag catgaggttt gtctcctcct		60
ccctacttac agctttctcc catattttaa aaaacgatit atacaattca aaccattgta		120
gaacatttta aaccggttta aactgtctaa atctatctaa actagactaa atttggttaa		180
ttaactaaca atgttagtat aaatccacaa atttggtataa ttgtcttttt ttttgatat		240
ctaatttggg aatagaccat tctaagccgg ttcagacctt tagaaacat tctaaaccgt		300
tctaaatcgg tttaaataca tctaaatcag actaaatttg ttaaattaac acacatatcc		360
acatatattgt atagtttctt ttgttttgta tatctaattt tgataattca taaaacaatt		420
ttgtaactaa aaccaaaaaa aactaaaata tcttatatca gtgtaaatta tgtataaaat		480
aatcaacta ttagtaataa tctgttcttt gcaaacattg ttgaacatga tctaatgtat		540
ttgtctttct tcttgtttct cagcgtgttc tgtacgttag atctatcact agtggtgacc		600
agctcgaatt tccccgatcg ttcaaacatt tggcaataaa gtttcttaag attgaatcct		660
gttgccggtc ttgcgatgat tatcatataa tttctgttga attacgttaa gcatgtaata		720
attaacatgt aatgcatgac gttatttatg agatgggttt ttatgattag agtcccgcaa		780
ttatacatit aatacgcgat agaaaacaaa atatagcgcg caaactagga taaattatcg		840
cgcgcggtgt catctatgtt actagatcgg gaattaaact atcagtgttt gacaggatat		900
attggcgggt aaacctaaga gaaaagagcg tttattagaa taatcggata tttaaaaggg		960
cgtagaaagg tttatccgtt cgtccatttg tatgtgcatg ccaaccacag ggttccctc		1020

gggatcaaag tactttgatc caaccctcc gctgctatag tgcagtcggc ttctgacgtt	1080
cagtgcagcc gtcttctgaa aacgacatgt cgcacaagtc ctaagttacg cgacaggctg	1140
ccgcctgcc cttttcctgg cgttttcttg tcgctgttt tagtcgcata aagtagaata	1200
cttgcgacta gaaccggaga cattacgcca tgaacaagag cgccgccgtt ggccctgctgg	1260
gctatgcccc cgtcagcacc gacgaccagg acttgaccaa ccaacgggcc gaactgcacg	1320
cggccggctg caccaagctg ttttccgaga agatcacccg caccaggcgc gaccgcccgg	1380
agctggccag gatgcttgac cacctacgcc ctggcgacgt tgtgacagt accaggctag	1440
accgcctggc ccgcagcacc cgcgacctac tggacattgc cgagcgcac caggaggccg	1500
gcgcgggcct gcgtagcctg gcagagccgt gggccgacac caccacgccg gccggccgca	1560
tgggtgtgac cgtgttcgcc ggcatgtccg agttcgagcg ttcctaata atcgaccgca	1620
cccggagcgg gcgcgaggcc gccaaaggccc gaggcgtgaa gtttggcccc cgccctacc	1680
tcaccccgcc acagatcgcg cagcccgccg agctgatcga ccaggaaggc cgcaccgtga	1740
aagaggcggc tgcactgctt ggctgtcatc gctcgacct gtaccgcgca cttgagcgca	1800
gcgaggaagt gacgcccacc gaggccaggc ggccgggtgc cttccgtgag gacgattga	1860
ccgaggccga cgccttggcg gccgcccaga atgaaccca agaggaacaa gcatgaaacc	1920
gcaccaggac ggccaggacg aaccgttttt cattaccgaa gagatcgagg cggagatgat	1980
cgccggccgg tactgtttcg agccggccgc gcacgtctca accgtgcggc tgcataaat	2040
cctggccggt ttgtctgat ccaagctggc ggccctggcc gccagcttgg ccgtgaaga	2100
aaccgagcgc cgcctctaa aaagtgatg tgtattgag taaaacagct tgcgtcatgc	2160
ggtcgtcgc tatatgatg gatgagtaa taaacaata cgcaagggga acgatgaag	2220
gttatcgtg tacttaacca gaaaggcggg tcaggcaaga cgaccatgc aacctatca	2280
gcccgcgcc tgcaactgc cggggccgat gttctgttag tcgattccga tccccagggc	2340
agtccccgcg attgggcggc cgtgcgggaa gatcaaccgc taaccgttgt cggcatcgac	2400
cggccgacga ttgaccgca cgtgaaggcc atcgccggc gcgacttct agtgatcgac	2460
ggagcgcgcc aggcggcgga cttggctgtg tcccgatca aggcagccga cttcgtgctg	2520
attccggtgc agccaagccc ttacgacata tgggccaccg ccgacctggt ggagctggtt	2580
aagcagcgca ttgaggtcac ggatggaagg ctacaaggc cctttgtcgt gtcgcgggcg	2640
atcaaaggca cgcgcatcgg cggtaggtt gccgaggcgc tggccgggta cgagctgccc	2700
attcttgagt cccgtatcac gcagcgcgtg agctaccag gcactgccgc cgccgacaca	2760
accgttcttg aatcagaacc cgaggcgac gctgcccgcg aggtccaggc gctggccgct	2820
gaaattaaat caaaactcat ttgagttaat gaggtaaaga gaaaatgagc aaaagcaca	2880

acacgctaag tgccggccgt ccgagcgcac gcagcagcaa ggctgcaacg ttggccagcc	2940
tgccagacac gccagccatg aagcgggtca actttcagtt gccggcggag gatcacacca	3000
agctgaagat gtacgcggta cgccaaggca agaccattac cgagctgcta tctgaataca	3060
tcgcgcagct accagagtaa atgagcaaat gaataaatga gtagatgaat tttagcggct	3120
aaaggaggcg gcatggaaaa tcaagaacaa ccaggcaccg acgccgtgga atgccccatg	3180
tgtggaggaa cgggcgggtg gccaggcgta agcggctggg ttgtctgccg gccctgcaat	3240
ggcactggaa ccccaagcc cgaggaatcg gcgtgacggc cgcaaaccat ccggcccggc	3300
acaaatcggc gcggcgctgg gtgatgacct ggtggagaag ttgaaggccg cgcaggccgc	3360
ccagcggcaa cgcctcaggc cagaagcacg ccccggtgaa tcgtggcaag cggccgctga	3420
tcgaatccgc aaagaatccc ggcaaccgcc gcgagccggc gcgccgtcga ttaggaagcc	3480
gccccaggcg gacgagcaac cagatTTTTT cgttccgatg ctctatgacg tgggcaccgc	3540
cgatagtcgc agcatcatgg acgtggccgt tttccgtctg tcgaagcgtg accgacgagc	3600
tggcgaggctg atccgctacg agcttccaga cgggcacgta gaggtttccg cagggccggc	3660
cggcatggcc agtgtgtggg attacgacct ggtactgatg gcggtttccc atctaaccga	3720
atccatgaac cgataccggg aagggaaggg agacaagccc ggccgcgtgt tccgtccaca	3780
cgttgcggac gtactcaagt tctgccggcg agccgatggc ggaaagcaga aagacgacct	3840
ggtagaaacc tgcatcggc taaacaccac gcacgttgcc atgcagcgta cgaagaaggc	3900
caagaacggc cgcttggtga cggatatcga ggtgaagcc ttgattagcc gctacaagat	3960
cgtaaagagc gaaaccggcg ggccggagta catcgagatc gagctagctg attggatgta	4020
ccgcgagatc acagaaggca agaaccggga cgtgctgacg gttcaccccg attactttt	4080
gatcgatccc ggcatcgccc gttttctcta ccgctggca cgccgcgccg caggcaaggc	4140
agaagccaga tggttgttca agacgatcta cgaacgcagt ggacgcgccg gagagttcaa	4200
gaagtctctg ttaccgtgc gcaagctgat cgggtcaaat gacctgccgg agtacgattt	4260
gaaggaggag gcggggcagg ctggcccgat cctagtcatg cgctaccgca acctgatcga	4320
gggcgaagca tccgccggtt cctaattgtac ggagcagatg ctagggcaaa ttgccctagc	4380
aggggaaaaa ggtcgaagg gtctctttcc tttggatagc acgtacattg ggaacccaaa	4440
gccgtacatt gggaaccgga acccgtacat tgggaacca aagccgtaca ttgggaaccg	4500
gtcacacatg taagtactg atataaaaga gaaaaaggc gatttttccg cctaaaactc	4560
tttaaaactt attaaaactc ttaaaaccg cctggcctgt gcataactgt ctggccagcg	4620

cacagccgaa gagctgcaaa aagcgccctac ccttcggctcg ctgcgctccc tacgccccgc	4680
cgcttcgcgt cggcctatcg cggccgctgg ccgctcaaaa atggctggcc tacggccagg	4740
caatctacca gggcgccggac aagccgcgcc gtcgccactc gaccgccggc gcccacatca	4800
aggcacccctg cctcgcgcgt ttcggatgat acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc	4860
cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcaggggc	4920
cgtcagcggg tgttggcggg tgctggggcg cagccatgac ccagtcacgt agcgatagcg	4980
gagtgtatac tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcacatat	5040
gcggtgtgaa ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaaatac cgcatcaggc gctcttcgc	5100
ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggc cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca	5160
ctcaaaggcg gtaatacggc tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg	5220
agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca	5280
taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa	5340
cccagacgga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc	5400
tgttccgacc ctgccctta ccggataact gtccgccttt ctccttcgg gaagcgtggc	5460
gctttctcat agctcacgt gtaggtatct cagttcggcg taggtcgttc gctccaagct	5520
gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg	5580
tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atgccactg gcagcagcca ctggtaacag	5640
gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggc ggcctaacta	5700
cggctacact agaaggacag tatttgggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg	5760
aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaacacc gctggtagcg gtggtttttt	5820
tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt	5880
ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga aaactcacgt taagggattt tggatcatgca	5940
ttctaggtac taaaacaatt catccagtaa aatataatat tttatcttct cccaatcagg	6000
cttgatcccc agtaagtcaa aaaatagctc gacatactgt tcttccccga tatctccct	6060
gatcgaccgg acgcagaagg caatgtcata ccacttgctc gcctgccgc ttctcccaag	6120
atcaataaag ccacttactt tgccatcttt cacaagatg ttgctgtctc ccaggtcgcc	6180
gtgggaaaag acaagttcct cttcgggctt ttccgtcttt aaaaaatcat acagctcgcg	6240
cggatcttta aatggagtgt cttcttccca gttttcgcaa tccacatcgg ccagatcgtt	6300
attcagtaag taatccaatt cggctaagcg gctgtctaag ctattcgtat agggacaatc	6360
cgatatgtcg atggagtga agagcctgat gcactccgca tacagctcga taatcttttc	6420
agggctttgt tcatcttcat actcttccga gcaaaggacg ccacggcct cactcatgag	6480

cagattgctc cagccatcat gccgttcaaa gtgcaggacc tttggaacag gcagctttcc	6540
ttccagccat agcatcatgt ccttttcccg ttccacatca taggttggtcc ctttataccg	6600
gctgtccgtc atttttaaat ataggttttc attttctccc accagcttat ataccttagc	6660
aggagacatt ccttccgtat cttttacgca gcggtatttt tcgatcagtt ttttcaattc	6720
cggatgatatt ctcatTTtag ccatttatta tttcttctct cttttctaca gtatttaaag	6780
atacccaag aagctaatta taacaagacg aactccaatt cactgttctt tgcattctaa	6840
aaccttaaat accagaaaac agctttttca aagtTgtttt caaagtTggc gtataacata	6900
gtatcgacgg agccgatttt gaaaccgagg tgatcacagg cagcaacgct ctgtcatcgt	6960
tacaatcaac atgtaccct ccgcgagatc atccgtgttt caaacccggc agcttagttg	7020
ccgttcttcc gaatagcatc ggtaacatga gcaaagtctg ccgccttaca acggctctcc	7080
cgctgacgcc gtcccgact gatgggctgc ctgtatcgag tggTgatttt gtgccgagct	7140
gccggtcggg gagctgttgg ctggctggTg gcaggatata ttgtggTgta aacaaattga	7200
cgcttagaca acttaataac acattgcgga cgtttttaat gtactgaatt aacgccgaat	7260
taattcgggg gatctggatt ttagtactgg attttggttt taggaattag aaattttatt	7320
gatagaagta ttttacaat acaaatacat actaagggtt tcttatatgc tcaacacatg	7380
agcgaacc tataggaacc ctaattccct tatctgggaa ctactcacac attattatgg	7440
agaaactcga gtcaaatctc ggtgacgggc aggaccggac ggggcggTac cggcaggctg	7500
aagtccagct gccagaaacc cagTcatgc cagttccctg gcttgaagcc ggccgccgc	7560
agcatgccgc ggggggcata tccgagcgc tcgtgcatgc gcacgctcgg gtcgttgggc	7620
agcccgatga cagcgaccac gctcttgaag cctgtgcct ccagggaatt cagcaggtgg	7680
gtgtagacgc tggagcccg tcccgctcgc tggTggcggg gggagacgta cacggtcgac	7740
tcggccgtcc agtcgtaggc gttgcgtgcc ttccaggggc ccgcgtaggc gatgccggcg	7800
acctgccgt ccacctcggc gacgagccag ggatagcgt cccgcagacg gacgaggtcg	7860
tccgtccact cctcggttc ctgcggctcg gtacggaagt tgaccgtgct gTctcgtg	7920
tagtggttga cgatggtgca gaccgccgc atgtccct cggTggcacg gcgcatgctg	7980
gccgggcgtc gttctgggct catggtagac tcgagagaga tagatttga gagagagact	8040
ggtgatttca gcgtgtcctc tccaaatga atgaacttc ttatatagag gaagggtctt	8100
gcgaaggata gtgggattgt gcgtcatccc ttacgtcagt ggagatatca catcaatcca	8160
cttgctttga agacgtggtt ggaacgtctt cttttccac gatgctctc gtgggtgggg	8220
gtccatcttt gggaccactg tcggcagagg catcttgaac gatagccttt cttttatcg	8280
aatgatggca ttgttaggtg ccaccttct tttctactgt cttttgatg aagtgcaga	8340

tagctgggca atggaatccg aggaggtttc ccgatattac cttttgttga aaagtctcaa	8400
tagccctttg gtcttctgag actgtatctt tgatattctt ggagtagacg agagtgtcgt	8460
gtccacccat gttatcacat caatccactt gctttgaaga cgtggttga acgtcttctt	8520
tttccacgat gctcctcgtg ggtgggggtc catctttggg accactgtcg gcagaggcat	8580
cttgaacgat agccttttct ttatcgcaat gatggcattt gtaggtgccca ctttcctttt	8640
ctactgtcct tttgatgaag tgacagatag ctgggcaatg gaatccgagg aggtttcccg	8700
atattaccct ttgttgaaaa gtctcaatag ccctttggtc ttctgagact gtatctttga	8760
tattcttggga gtagacgaga gtgtcgtgct ccaccatgtt ggcaagctgc tctagccaat	8820
acgcaaaccg ccctctcccc cgcggtggcc gattcattaa tgcagctggc acgacaggtt	8880
tcccactgg aaagcgggca gtgagcgcaa cgcaattaat gtgagttagc tcactcatta	8940
ggcaccccg gctttacact ttatgcttcc ggctcgtatg ttgttgga ttgtgagcg	9000
ataacaattt cacacaggaa acagctatga catgattacg aattctcatg gagtcaaaga	9060
ttcaaataga ggacctaaca gaactcgccg taaagactgg cgaacagttc atacagagtc	9120
tcttacgact caatgacaag aagaaaatct tcgtcaacat ggtggagcac gacacacttg	9180
tctactccaa aaatatcaaa gatacagtct cagaagacca aagggaatt gagacttttc	9240
aacaaaggtt aatatccgga aaactcctcg gattccattg cccagctatc tgtcacttta	9300
ttgtgaagat agtggaaaag gaaggtggct cctacaaatg ccatcattgc gataaaggaa	9360
aggccatcgt tgaagatgcc tctgccgaca gtggtcccaa agatggaccc ccaccacga	9420
ggagcatcgt ggaaaaagaa gacgttccaa ccacgtcttc aaagcaagtg gattgatgtg	9480
atatctccac tgacgtaagg gatgacgcac aatcccacta tccttcgcaa gacccttcct	9540
ctatataagg aagttcattt catttggaga gaacacgggg gactcttgac	9590

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 3

【변경전】

제3항에 있어서,

【변경후】

제2항에 있어서,