



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

A01H 1/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0048336

(43) 공개일자 2007년05월09일

(21) 출원번호 10-2005-0105290

(22) 출원일자 2005년11월04일

심사청구일자 2005년11월15일

(71) 출원인 경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 수원캠퍼스내

(72) 발명자 박영두
경기도 용인시 상현동 만현마을 쌍용3차아파트 606동 1101호
김셋별
경기 부천시 소사구 소사본동 235-26

(74) 대리인 이덕록
류창희
구창모

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소를 코딩하는 유전자를이용한 형질전환된 배추

(57) 요약

본 발명은 배추(*Brassica rapa ssp. pekinensis*)로부터 분리된 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 코딩하는 유전자 및 이를 이용한 형질전환 배추를 제공하는 것으로서, 상세하게는 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소는 파이토 호르몬인 에틸렌(ethylene)과 폴리아민(polyamine) 합성에 단계의 가장 결정적인 물질이며, 메틸레이션에 있어서 가장 큰 영향을 미치는 효소로서, 상기 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소를 코딩하는 유전자를 이용한 형질전환 배추의 경우 배추의 생장을 조절함으로써 배추의 출하시기를 조절할 수 있기 때문에 농민이 원하는 시기에 배추를 출하시킬 수 있으므로 배추 가격을 안정화시킬 수 있어 농민 뿐만 아니라 소비자 모두에게 유익한 발명이다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

에스 아데노실 엘 메티오닌의 생성에 관여하는 서열번호 1에 기재된 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 코딩하는 유전자.

청구항 2.

제 1항의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 코딩하는 유전자를 이용한 배추의 생장시기를 조절할 수 있는 형질전환 배추.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 배추(*Brassica rapa ssp. pekinensis*)로부터 분리된 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 코딩하는 유전자 및 이를 이용한 형질전환 배추를 제공하는 것이다.

일반적으로 에스 아데노실 엘 메티오닌(S-adenosyl-L-methionine)은 황(sulfur-)에 메틸기(-CH₃)를 갖는 화합물로서 미생물, 식물, 동물 등의 다양한 종에서 공통적으로 발견된다고 알려져 있다. 에스 아데노실 엘 메티오닌(S-adenosyl-L-methionine)은 식물의 2차 대사물질과 단백질, 탄수화물, 핵산, 지질의 합성을 위한 대부분의 메틸레이션 반응 과정에서 메틸기(-CH₃)를 제공하는데 작용하며, 파이토호르몬인 에틸렌(ethylene)과 폴리아민(polyamine)의 전구체이며, 식물체의 세포벽 형성에 관여한다고 여겨진다.

이러한 에스 아데노실 엘 메티오닌(S-adenosyl-L-methionine)은 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)에 의해 ATP와 L-메티오닌(L-methionine)이 가수분해되어 생성되며, 동시에 피로포스페이트(pyrophosphate)와 무기 오르토인산염(inorganic orthophosphate)을 방출한다. 이렇게 생성된 에스 아데노실 엘 메티오닌은 다양한 자극에서 조직 특이적 또는 유전자 특이적으로 발현이 조절되며, 식물의 생장과 노화에 여러 가지의 변화를 유도한다. 특히 식물의 성장과 생장에 있어서 중요한 호르몬인 에틸렌(ethylene)은 에스 아데노실 엘 메티오닌으로부터 ACCase에 의해 생성되며, 마찬가지로 세포 분화와 생장, 노화를 조절하는 폴리아민(polyamine)인 스퍼미딘(spermidine)과 스퍼민(spermine) 역시 에스 아데노실 엘 메티오닌으로부터 생성된다. 1993년에 Capell 등이 폴리아민(polyamine)이 식물의 노화를 지연시킨다는 보고가 있었으며, 1981년에 Apelbaum 등이 식물조직에서 폴리아민이 에틸렌 생합성을 억제시킨다는 보고가 있었다. 또한 1984년 Yang 그리고 Hoffman이 식물체내에 존재하는 에스 아데노실 엘 메티오닌의 발현 변화가 에틸렌 합성에 큰 영향을 미친다는 보고가 있었다.

지금까지 이루어진 다양한 연구 결과로 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소가 식물의 생장과 분화에 있어서 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있으며, 따라서 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase) 유전자를 이용할 경우, 날씨에 따라 가격 변동이 심한 배추의 생장 시기를 조절하여 안정적인 가격으로 공급을 할 수 있으며, 또한 한국의 4대 채소 가운데 하나인 배추의 기능 연구에 이바지 할 수 있다.

배추는 김치의 주재료로써 국이나 찜 등에도 이용되는 한국의 4대 채소 가운데 하나이다. 그러나 배추(*Brassica rapa ssp. pekinensis*) 유래의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 코딩(coding)하는 유전자를 이용한 형질전환된 배추는 상기 어디에도 교시 또는 개시되어 있지 않다.

이에 따라, 본 발명자들은 배추 유래의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase) 유전자를 코딩하는 유전자를 규명하고, 이를 이용하여 배추의 형질전환을 성공함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 배추(*Brassica rapa ssp. pekinensis*)로부터 분리된 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 코딩하는 유전자 및 이를 이용한 형질전환 배추를 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 에스 아데노실 엘 메티오닌의 생성에 관여하는 서열번호 1에 기재된 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 코딩하는 유전자를 제공한다.

또한, 상기 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 코딩하는 유전자를 이용한 배추의 성장시기를 조절할 수 있는 형질전환 배추를 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명에서는 배추(*Brassica rapa ssp. pekinensis*)로부터 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 코딩하는 유전자를 분리하기 위해, 우선 프라이머를 작성한다.

상기 프라이머를 작성하기 위하여, NCBI GenBank를 통해 글루타치온 에스 트랜스퍼레이즈 유전자의 시퀀스를 수집하고, 수집된 유전자 시퀀스 중 채소작물에 속하는 작물들을 우선 대상으로 하여 코딩 지역만을 분리한 뒤 유전자 코딩 지역만을 정렬(alignment)한다. 정렬(alignment)한 결과 중 상동성 빈도가 높은 곳을 택하여 프라이머를 작성할 수 있다.

상기 프라이머를 이용하여 RT-PCR 과정을 거쳐 배추로부터 배추의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소를 코딩하는 전체 유전자의 염기서열을 밝혔으며, 이는 서열번호 1에 기재된 염기서열을 갖는다.

본 발명은 기존에 발표되어 있는 채소작물의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소 염기서열들의 상동성을 기초로, 배추의 에스 아데노실 엘 메티오닌 효소 유전자를 크로닝할 수 있는 프라이머를 작성하는 단계; 상기 프라이머를 이용한 RT-PCR 방법으로 배추로부터 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소의 유전자 단편과 전체 유전자를 얻는 단계; 및 상기 염기서열을 함유하는 재조합 벡터를 제조하여 이를 아그로박테리움에 형질전환시킨 다음, 상기 아그로박테리움을 이용하여 배추를 형질전환시키는 단계로 구성된다.

실시예 1: 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소 유전자를 분리하기 위한 프라이머의 작성

에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 유전자(S-adenosyl-L-methionine synthetase)의 공통된 부분을 찾기 위하여 기존에 발표되어 있는 작물별 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 유전자(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 NCBI (National Center for Biotechnology Information) Genbank에서 검색하였다. 유전자의 전체 염기서열을 수집하기 위해 Entrez program을 사용하였다. 검색방법으로는 유전자명으로 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 검색어로 선정하였다.

수집된 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase) 유전자 가운데, 같은 배추과 식물인 유채(*Brassica napus*), 갯배(*Brassica Juncea*), 그리고 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)등의 염기서열을 선별, 염기서열의 상동성을 많이 보이는 부분을 BLAST program 으로 찾은 뒤 그 부분을 중심으로 프라이머를 제작하였다. 작성된 프라이머는 하기 표 1과 같다.

[표 1]

프라이머	염기서열
BC f(서열번호 1)	5'-ATG GAG ACT TTT CTA TTC ACA TC-3'
BC mf(서열번호 2)	5'-ATG TTT GGT TAC GCC ACT GAT-3'
BC mr(서열번호 3)	5'-TCT TTC CCT GAG AAA GCA CCT-3'
BC r(서열번호 4)	5'-CAT TAC TTA AGC TTG AGG TTT GT-3'
BC lr(서열번호 5)	5'-TTT AAT TAT TGC TCA CAG TAG AT-3'

실시예 2: 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase) 유전자의 분리

2-1. 배추로부터 RNA의 분리

본 발명에 사용된 배추(*Brassica rapa ssp. pekinensis*)는 기내의 무균상태에서 키운 것에서 샘플을 채취하여 RNA 분리에 사용하였다.

배추로부터 RNA의 분리는 GibcoBRL회사에서 제공된 트리졸(Trizol) 시약을 사용하여 하기와 같이 수행하였다.

배추(*Brassica rapa ssp. pekinensis*)의 잎을 액체질소를 이용하여 파쇄 한다음, 1ml 트리졸(Trizol) 용액을 첨가하여 잘 섞은 후 5분 동안 상온에 두었다. 200 μ l의 클로로포름(chloroform)을 첨가하여 혼합한 후 다시 4℃에서 13,000rpm으로 10분 동안 원심분리한 뒤 그 혼합액의 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 이소프로페놀 (isopropanol)을 500 μ l을 첨가하고 13,000rpm으로 15분 동안 원심 분리하여 침전시켰다. 그 후, 이소프로페놀을 제거하고 침전물을 75% 에탄올로 세척한 다음, 에탄올이 없도록 잘 건조시킨 후 DEPC 처리된 멸균 증류수에 녹여 사용하였다.

2-2. 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소 유전자의 분리

에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase) 유전자의 분리는 상기 실시예 2-1에서 확보된 RNA를 주형으로 올리고 dT 프라이머(primer)와 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용, cDNA를 합성한 뒤 작성한 프라이머로 PCR하여 분리하였다. cDNA합성 프로그램 조건은 1 μ g의 RNA를 올리고 dT 프라이머와 70℃에서 2분간 RNA 이차구조를 제거한 뒤 42℃에서 30분간 역전사시키고 그 사용된 역전사효소를 불활성화 시키기 위해 75℃에서 10분간 두었다. 그 후 합성된 cDNA 1 μ g을 사용, 작성한 프라이머와 태그 중합효소(tag polymerase)로 PCR하였는데 그 프로그램은 96℃에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 96℃에서 30초, 58℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 40 순환(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

각각의 프라이머들로 증폭된 단편들은 그 각각의 염기서열을 분석하기 위해 PCR 산물용 벡터 pGEM-T easy vector에 크로닝하고 삽입된 자리에 근접한 T7, SP6 프라이머를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

실시예 3: 배추의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소 유전자의 전체의 확인

염기서열 분석용 pGEM-T 이지 벡터(pGEM-T easy vector) 내부에 크로닝 된 PCR 단편의 염기서열 분석은 GenBank BLAST 프로그램을 사용하여 이루어졌다. 상기 표 1에 기재된 BC f와 BC mr 프라이머로 증폭된 824bp 산물, BC mf와 BC mr 프라이머로 증폭된 약 448bp 산물, BC mf와 BC r 프라이머로 증폭된 약 830bp 산물, 그리고 BC f와 BC lr 프라이머로 증폭된 약 1265bp 산물 각각의 염기서열과 아미노산 서열을 분석한 결과, 여러 식물의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 유전자와 상동성을 보였으며, 특히 갯(B. juncea)의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)와는 98%의 높은 상동성을 보였다(도 2 참고).

RNA를 대상으로 BC f/mr(도 1의 (1)), BC mf/mr(도 1의 (2)), BC mf/r(도 1의 (3)) 그리고 BC f/lr(도 1의 (4)) 프라이머를 이용해 RT-PCR을 수행한 결과 배추의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소 유전자의 대부분이 증폭된다는 것을 확인할 수 있었다. 또한 BC f/lr 프라이머를 이용한 RT-PCR 결과 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소의 전체 유전자가 확보되었음을 확인하였다.

이 연결한 것의 시작 코돈과 종료 코돈을 결정한 후 처음과 끝 각각에 제한 효소 자리를 시작 코돈 쪽에는 EcoRI 절단서열을 종료 코돈 쪽에는 SpeI 절단서열을 부착한 뒤 새롭게 전체 유전자를 한꺼번에 크로닝하기 위한 프라이머를 작성하여 배추의 cDNA로부터 pfu 중합효소를 이용하여 PCR하여 전체 유전자를 염기서열 분석용 pGEM-T 이지 벡터 내부에 크로닝하여 확보한 뒤 그 염기서열을 분석하였다. 최종 분석 확인한 염기서열을 배추로부터 분리된 전체 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 코딩하는 유전자로 결정, 서열번호 1에 그 염기서열을 제시한다.

실험예 1. 아그로박테리움을 이용한 배추의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소 유전자의 식물체내로의 도입

1-1. 벡터의 준비

배추의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase) 유전자를 식물체내로 도입하기 위한 발현 재조합 벡터를 만들기 위해 삽입(insert)될 배추의 전체 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 코딩하는 유전자를 포함하고 있는 pGEM-T 이지 벡터를 EcoRI 과 SpeI로 절단하고 전기영동을 통하여 유전자 단편의 크기를 확인한 후 겔(gel)에서 추출하는 방법으로 삽입(insert)을 준비하였다.

같은 방법으로 pCambia1390 벡터도 EcoRI과 SpeI로 절단하고 DNA단편의 크기를 확인하고 겔(gel)에서 추출하는 방법으로 벡터(이하 pCSAMS 로 지칭)를 준비하였다.(도 3 참고)

1-2. *E.coli* DH5a에 형질전환

상기 실험에 1-1에서 준비한 벡터와 삽입부를 적정농도로 혼합한 후 T4 DNA 리가아제(ligase)를 이용하여 결합시키고 *E.coli* DH5a에 하기와 같은 방법으로 형질전환시켰다.

E.coli DH5a를 LB 50ml에 접종시켜 37℃에서 OD₅₇₀ = 0.375~0.400이 되도록 배양하였다. 상기 균주배양액을 3000rpm에서 10분 동안 원심분리하고 수득한 침전물은 0.1M CaCl₂ 용액으로 풀어준 후 30분 동안 얼음에 두었다. 그 후 3000rpm에서 7분 동안 원심분리한 후 0.1M CaCl₂에 침전물을 녹였다. 재조합 플라스미드를 함께 섞어 얼음에 30분 동안 두었다가 42℃에서 90초간 열 충격을 주었다. 그 후 10분 동안 얼음에 두었다가 LB 배지 700μl를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 진탕배양하고, 그 배양액을 12000rpm으로 수초간 원심분리한 후 100μl만 남기고 상등액을 제거하고, 그 상등액으로 침전물을 녹였다. 엠페실린(Ampicillin) 50mg/L, X-gal (200mg/L in N-N dimethylformamide), IPTG 200mg/L이 첨가된 고체 LB 배지에 전개하여 37℃에서 12시간 배양하였다. 고체배지에서 저항성을 보이며 흰색의 콜로니를 형성하는 형질 전환된 것을 선발하여 배양하였다.

상기 배양한 콜로니에서 재조합 플라스미드 DNA를 하기와 같은 방법으로 추출하였다.

항생제가 첨가된 LB배지 3ml에 콜로니를 감염시킨 후 37℃에서 12시간 동안 배양하고, 콜로니가 진탕배양된 배양액을 4℃에서 12,000rpm으로 10분 동안 원심분리하였다. Solution I(200μl/ml)을 첨가하여 보텍스(vortex)를 수초간 실행하고, Solution II(200μl/ml)를 첨가하여 조심스럽게 섞은 후 실온에서 5분 동안 방치한 후, Solution III(200μl/ml)를 첨가하여 잘 섞은 후 얼음에서 10분 동안 둔 뒤 12000rpm, 4℃에서 10분 동안 원심분리하였다. 상기 원심분리한 후에 수득한 상등액을 취하여 1/10 양의 NaOAC를 첨가한 후 2.5배의 100% 에탄올을 첨가하여 -20℃에서 2시간 침전시킨 후 원심 분리하여 침전물을 70% 에탄올로 세척한 후 멸균 증류수에 녹인 후 사용하였다.

상기에서 수득한 DNA를 BglII과 BbrpI로 절단하고 전기영동을 통하여 벡터와 삽입의 크기와 존재를 확인하고 PCR과 시퀀싱(sequencing)을 통해 제대로 결합했는지 확인하였다.

1-3. 형질전환용 운반체를 함유하는 아크로박테리움 투마파시엔스의 준비

벡터와 삽입부의 결합이 확인된 발현 벡터를 아크로박테리움 투마페이선스 LBA4404(A. tumefaciens LBA4404)에 Freeze-thaw법에 의하여 형질전환시켰다. 형질전환된 아크로박테리움 투마페이선스 LBA4404는 2005년 11월 2일자에 한국농업미생물자원센터에 기탁하였고, 미생물의 명칭을 S-adenosyl-L-methionine synthetase를 코딩하는 유전자로 하고, 기탁번호는 KACC 95041P이다.

형질전환 후 아그로박테리움 역시 콜로니를 배양하여 재조합 벡터가 제대로 포함되었는지 PCR로 확인하였다. 이때 PCR은 플라스미드(plasmid)를 주형(template)으로 넣는 대신 태그(Tag) 중합효소, 유전자전체를 분리할 수 있는 프라이머(SAM oe 5': 5' gaattc atg gag act ttt cta ttc aca tc 3', SAM oe 3': 5' actagt tta agc ttg agg ttt gtc cca 3')와 10X tag buffer, 염화마그네슘 용액이 포함된 액체에 콜로니가 찍힌 이쑤시개를 넣어 액체속에 그 콜로니가 녹게 한 뒤 그것으로 PCR하여 그 중, 발현 벡터(vector)의 도입이 확인된 아그로박테리움 투마페이선스 LBA4404를 배추 형질전환에 사용하였다. PCR 반응조건은 95℃에서 2분간 처리후 30순환의 95℃ 20초, 58℃ 40초, 72℃ 2분 처리 그리고 마지막으로 72℃에서 5분 처리하였다.

1-4. 아그로박테리움 투마파시엔스를 이용한 배추의 형질전환

배추에 아그로박테리움 투마파시엔스 LBA4404(KACC 95041P)를 이용하여 형질전환하는 방법은 하기와 같다.

배추를 무균상태에서 발아시킨 뒤 배추를 5-10mm로 자르고, 상기에서 제작된 아그로박테리움 투마파시엔스 현탁액에 10분동안 침지시켜 접종하였다. 접종된 절편은 공동배양배지(MS 기본배지, 3% 수크로스, 0.8% 식물아가, 4mg/L BA, 1mg/L NAA, 4mg/L AgNO₃, 5mg/L acetosyringone, pH5.6)에서 3일동안 공동배양하였다. 그 후 배추 배추를 액체 공동배양배지로 세척하여 아그로박테리움 투마파시엔스를 세척한 후 캘러스 유도배지(MS기본배지, 3% 수크로스, 0.8% 식물아가, 4mg/L BA, 1mg/L NAA, 4mg/L AgNO₃, 5mg/L acetosyringone, 10mg/L 하이그로마이신, 200mg/L cefotaxime, pH5.6)에 배추 배추절편을 배양하여 형질전환된 조직에서만 캘러스가 유도되도록 하였다.

유도된 형질전환 캘러스를 절단하여 슈트 유도배지(캘러스 유도배지와 동일)에 옮겨 배양하여 슈트를 유도하였고 유도된 형질전환 슈트는 뿌리 유도배지(1/2 MS 기본배지, 3% 수크로스, 0.7% 식물 아가, 200mg/L cefotaxime, pH5.8)로 옮겨 뿌리 발생을 유도하였다. 뿌리가 생성된 형질전환체는 멸균된 질석에 이식하여 순화시켰고 이후 화분에 이식하여 온실에서 재배하였다.

그 결과, 도 4에서 보는 바와 같이, 아그로박테리움에 의해 배추가 형질전환되었음을 알 수 있다. 아그로박테리움에 의한 배추의 형질전환 과정 중 배추를 아그로박테리움과 공동배양하는 과정(도 4의 A 참고), 캘러스 유도배지에서 형질전환된 캘러스(callus)가 유도되는 과정(도 4의 B 참고), 슈트 분화배지에서 슈트(shoot)가 발달하는 과정(도 4의 C 참고), 슈트로부터 뿌리(root)가 생성되는 과정(도 4의 D 참고) 및 아그로박테리움에 의한 배추의 형질전환 과정 중 온실에서 육성되고 있는 배추 형질전환 식물체(도 4의 E 참고)를 확인하였다.

실험예 2. 형질전환체와 그 후대에서 유전자 삽입 및 안정성 확인

상기 실험예 1에서 수행한 하이그로마이신 저항성 유전자와 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소가 이들 형질전환 개체에 성공적으로 삽입되었는지 확인하기 위하여 배추 형질전환체에서 genomic DNA를 분리하고 PCR로 확인하였다.

이때 하이그로마이신 유전자가 삽입되었는지를 확인하는 프라이머는 하이그로마이신 유전자 내부에서 증폭될 수 있는 프라이머(primer) 쌍 3'-CCTCTACGTTATCCAGTCCGA-5'와 3'-GGTTGTTACAGGACTGCCTGT-5'를 형질전환 배추의 genomic DNA template에서 PCR로 증폭시켰다.

상기 실험 수행의 결과, 도 5에서 보는 바와 같이 형질전환 배추에서 0.35 kb 크기의 밴드(band)가 생성되어 하이그로마이신 유전자가 배추 게놈(genome) 내부에 안정적으로 삽입된 것을 확인할 수 있었다.

또한 도 6에서 보는 바와 같이, 형질전환 배추에서 RNA를 분리하여 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소 유전자를 코딩하는 부분을 일부 벡터를 포함한 양쪽에서 분리할 수 있는 프라이머를 이용하여 RT-PCR 을 실행하여 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소가 안정적으로 삽입된 것을 확인할 수 있었다.

발명의 효과

본 발명은 배추(*Brassica rapa ssp. pekinensis*)로부터 분리된 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소(S-adenosyl-L-methionine synthetase)를 코딩하는 유전자 및 이를 이용한 형질전환 배추를 제공하는 것이다.

본 발명의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소는 파이트 호르몬인 에틸렌(ethylene)과 폴리아민(polyamine) 합성에 단계의 가장 결정적인 물질이며, 메틸레이션에 있어서 가장 큰 영향을 미치는 효소로서, 상기 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성효소를 코딩하는 유전자를 이용한 형질전환 배추의 경우 배추의 성장을 조절함으로써 배추의 출하시기를 조절할 수 있어 농민이 원하는 시기에 배추를 출하시킬 수 있어 배추 가격을 안정화시킬 수 있어 농민 뿐만 아니라 소비자 모두에게 유익한 발명이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 BC f/mr, BC mf/mr, BC mf/r 그리고 BC f/lr 프라이머를 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소를 코딩하는 유전자의 단편을 전기영동한 사진이며,

도 2는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소 유전자의 시퀀스와 갓(*Brassica juncea*), 양배추(*Brassica oleracea*) 그리고 아라비도시스(*Arabidopsis thaliana*) 각각의 시퀀스간에 상동성 비교 결과를 나타내는도이며,

도 3은 배추에 형질전환시킬 벡터 크로닝을 위한 모식도이며,

도 4는 아그로박테리움에 의한 배추의 형질전환 과정을 나타내는 것으로서, 형질전환 과정 중 배추를 아그로박테리움과 공동배양하는 과정(A), 캘러스 유도배지에서 형질전환된 캘러스(callus)가 유도되는 과정(B), 슈트 분화배지에서 슈트(shoot)가 발달하는 과정(C), 슈트로부터 뿌리(root)가 생성되는 과정(D) 및 아그로박테리움에 의한 배추의 형질전환 과정 중 온실에서 육성되고 있는 배추 형질전환 식물체(E)를 나타낸 도이며,

도 5은 형질전환 배추로부터 하이그로마이신 저항성 유전자를 PCR을 이용하여 확인한 도이며,

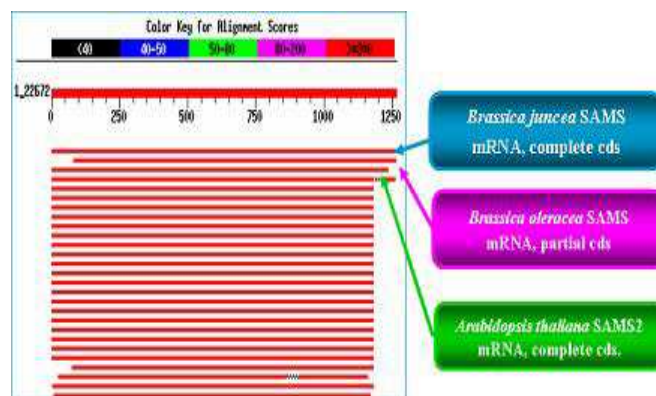
도 6은 하이그로마이신 저항성 유전자가 확인된 형질전환 식물체에서 에스 아데노실 엘 메티오닌 합성 효소를 RT-PCR로 확인한 도이다.

도면

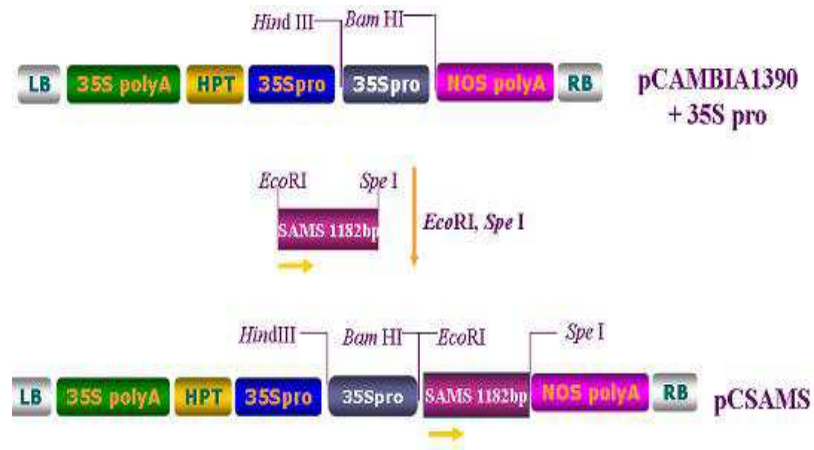
도면1



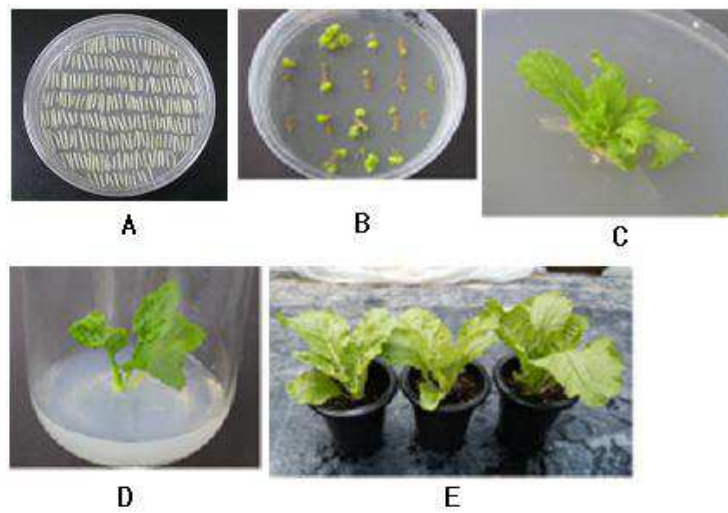
도면2



도면3



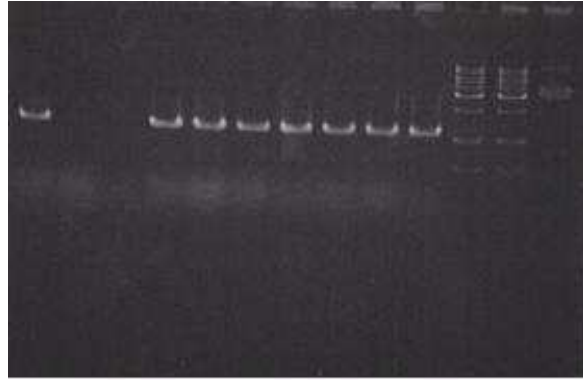
도면4



도면5



도면6



서열목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of KyungHee University

<120> Brassica campestris ssp. pekinensis transformed by
S-adenosyl-L-methionine synthetase coding gene

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1265

<212> DNA

<213> Brassica rapa

<400> 1

atggagactt ttctattcac atctgagtct gtcaacgaag gccacccaga caagctctgc	60
gaccagatct ccgacgcagt cctcgacgcc tgccctcgagc aagaccccgag cagcaaagtc	120
gcctgcgaga cgtgcaccaa gaccaacatg gtcattggtct tcggcgagat caccaccaa	180
gccaccgtcg actacgagaa gatcgctcgc gacacttgcc gctccatcgg attcatctct	240
gacgacgtcg gtctcgacgc cgacaagtgc aaagtcctcg tcaacatcga gcagcagagc	300
cccgacattg ctcaaggtgt tcacgggtcac ttcaccaaga ggccctgaaga tattggagct	360
ggtgaccagg gtcacatggt tgggtacgct actgatgaga cccctgagct catgcctttg	420
agtcattgtc ttgcgaccaa gatcgggtgct aagcttactg aggtcagaaa gaacgggact	480
tgccgttggt taagaccaga cggcaagacc caagtcactg ttgagtacta caacgacaac	540
ggcgcgatgg ttccgggtccg tgtccacacc gtccctcatct caaccagca cgatgagacc	600
gtgaccaacg acgagatcgc acgtgacctc aaggagcacg tgatcaagcc catcatcccc	660

gagaagtacc ttgacgacaa aaccatcttc cacctcaacc catcaggccg gttcgtgatc	720
ggtggaccgc acggtgacgc cggtttaacc ggacgtaaga tcatcatcga cacttacgga	780
gggtggggag ctcacggagg aggtgctttc tcaggggaagg acccgaccaa ggtcgacaga	840
agcggggcct acatcgtgag gcaagccgcc aagagcgttg tcgctaacgg gatggctcgt	900
agggctcttg ttcaggtctc ctacgccatt ggagtgcccg agccgttgtc tgtgttcgtg	960
gacacttacg gaacagggct gattcccgac aaggagatac tgaagatcgt gaaggagagc	1020
ttcgatttca gaccggggat gatgacgac aacttggact tgaagagagg aggcaacggg	1080
aggtttttga aaacggcggc gtatggacat ttcggaaggg acgaccctga cttcacctgg	1140
gaggtcgtga agccactcaa gtgggacaaa cctcaagctt aagtaatgat ttaatatcat	1200
tttgcttatg cttgtttctc tatctttttc acttttttaa aatctactgt gagcaataat	1260
taaaa	1265