



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년11월10일
 (11) 등록번호 10-1460231
 (24) 등록일자 2014년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/82 (2006.01) *C12N 15/29* (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01) *A01H 5/00* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-0076960
 (22) 출원일자 2011년08월02일
 심사청구일자 2012년08월28일
 (65) 공개번호 10-2013-0015123
 (43) 공개일자 2013년02월13일
 (56) 선행기술조사문헌
 US07632936 B2*
 Cha Young Kim 등. 한국식물생명공학회 학술발표
 논문집 페이지 151 (2008)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 한국생명공학연구원
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 (72) 발명자
 김차영
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 추효섭
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
 (74) 대리인
 손민

전체 청구항 수 : 총 28 항

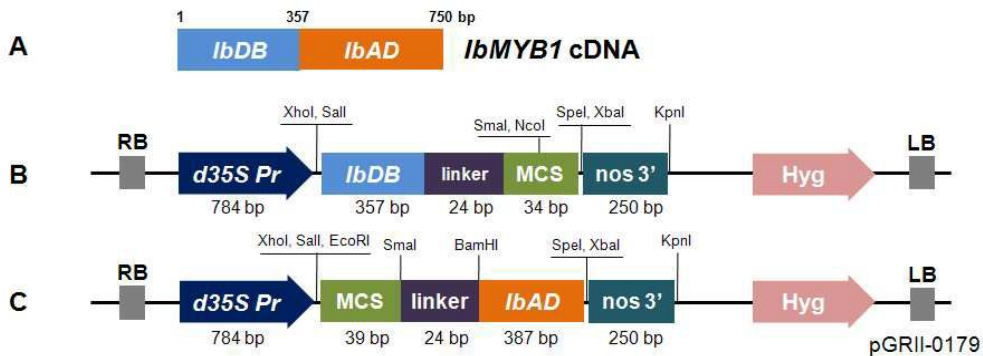
심사관 : 최준호

(54) 발명의 명칭 식물 이중-하이브리드 시스템을 이용한 단백질 상호작용 검출방법 및 검출키트

(57) 요약

본 발명은 안토시아닌 생합성 조절 IbMYB1 전사인자의 DNA-결합 도메인과 전사활성 도메인을 이용한 식물 이중-하이브리드 시스템을 개발하고 이를 이용한 식물에서의 단백질 상호작용 검출방법 및 검출키트를 제공한다. 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템은 단백질 상호작용 여부를 안토시아닌 색소 발현을 통해 간단하면서도 정확하게 육안으로 분석할 수 있어 식물에서의 단백질 상호작용, 특히 단백질 결합 여부를 확인하는데 매우 유용하게 적용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자
우현숙
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
김민수
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

김중수
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
윤병대
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20100009416
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단(대전)
연구사업명 기초연구사업(일반)
연구과제명 분자대사공학기술이용 바이러스 감염, 염증 제어용 스틸벤 화합물 생산시스템 구축
기 여 율 1/1
주관기관 한국생명공학연구원
연구기간 2010.05.01 ~ 2011.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

프로모터, 상기 프로모터의 하류에 위치하는 IbMYB1 전사인자의 DNA-결합 도메인(DB-도메인)을 코딩하는 서열, 상기 DB-도메인의 하류에 위치하는 링커 서열, 상기 링커의 하류에 위치하는 다중 클로닝 부위, 및 상기 다중 클로닝 부위의 하류에 위치하는 터미네이터 서열을 포함하고, 상기 다중 클로닝 부위 내에 베이트 단백질을 코딩하는 서열이 삽입될 수 있는 DB 벡터, 및

프로모터, 상기 프로모터의 하류에 위치하는 다중 클로닝 부위, 상기 다중 클로닝 부위의 하류에 위치하는 링커 서열, 상기 링커의 하류에 위치하는 IbMYB1 전사인자의 전사활성 도메인(AD-도메인)을 코딩하는 서열, 및 상기 AD-도메인의 하류에 위치하는 터미네이터 서열을 포함하고, 상기 다중 클로닝 부위에 프레이 단백질을 코딩하는 서열이 삽입될 수 있는 AD 벡터를 포함하는 식물 이중-하이브리드 시스템을 이용하여, 분석하고자 하는 베이트(bait) 단백질과 그와 상호작용을 할 것으로 예상되는 프레이(preY) 단백질의 상호작용을 검출하는 단계를 포함하는, 식물에서 단백질 상호작용을 검출하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

- 1) 식물 이중-하이브리드 시스템의 DB 벡터 내에 베이트 단백질을 코딩하는 서열을 삽입하여 베이트 DB 발현벡터를 제조하고, AD 벡터 내에 프레이 단백질을 코딩하는 서열을 삽입하여 프레이 AD 발현벡터를 제조하는 단계;
- 2) 단계 1)에서 제조된 각각의 발현벡터를 식물체에 형질전환하여 일시적으로 발현시키는 단계; 및
- 3) 상기 식물체로부터 안토시아닌 색소의 발현을 확인하여 베이트 단백질과 프레이 단백질의 상호작용 여부를 판정하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, IbMYB1 전사인자의 DB-도메인을 코딩하는 서열은 서열번호: 2로 기재되는 염기서열을 포함하고, AD-도메인을 코딩하는 서열은 서열번호: 3으로 기재되는 염기서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, DB 벡터가 식물 이원(binary) 벡터의 우측 경계(right border, RB)와 좌측 경계(left border, LB) 사이에 프로모터, IbMYB1 전사인자의 DB-도메인을 코딩하는 염기서열, 링커, 다중 클로닝 부위 및 터미네이터가 순서대로 작동가능하게 연결되어 있는 것인 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, AD 벡터가 식물 이원 벡터의 우측 경계(RB)와 좌측 경계(LB) 사이에 프로모터, 다중 클로닝 부위, 링커, IbMYB1 전사인자의 AD-도메인을 코딩하는 염기서열 및 터미네이터가 순서대로 작동가능하게 연결되어 있는 것인 방법.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 DB 벡터의 프로모터 또는 AD 벡터의 프로모터가 콜리플라워 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus, CaMV) 35S 프로모터, CaMV 이중-증강(double-enhanced) 35S(d35S) 프로모터, 벼 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터 및 담배 또는 아라비도시스 유래 화학적 유도성 PR-1 프로모터로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 8

제5항 또는 제6항에 있어서, 식물 이원 벡터가 pGreen 시리즈 벡터, pGA 시리즈 벡터, pCG 시리즈 벡터, pCIT 시리즈 벡터, pGPTV 시리즈 벡터, pBECK2000 시리즈 벡터 및 Binary-BAC(BIbAD) 벡터로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 9

제2항에 있어서, DB 벡터가 서열번호: 6의 염기서열로 기재되는 유전자 절편을 포함하는 벡터인 것인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, DB 벡터가 도 1의 B로 표시되는 개열지도를 갖는 pGreenII0179-d35S-IbDB 벡터인 것인 방법.

청구항 11

제2항에 있어서, AD 벡터가 서열번호: 9의 염기서열로 기재되는 유전자 절편을 포함하는 벡터인 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, AD 벡터가 도 1의 C로 표시되는 개열지도를 갖는 pGreenII0179-d35S-IbAD 벡터인 것인 방법.

청구항 13

제3항에 있어서, 상기 베이트 DB 발현벡터는 IbMYB1 전사인자의 DB-도메인과 베이트 단백질이 융합된 재조합 단백질을 발현하는 벡터인 것인 방법.

청구항 14

제3항에 있어서, 상기 프레이 AD 발현벡터는 IbMYB1 전사인자의 AD-도메인과 프레이 단백질이 융합된 재조합 단백질을 발현하는 벡터인 것인 방법.

청구항 15

제3항에 있어서, 단계 2)에서 식물체로의 형질전환이 CaCl₂ 침전법, CaCl₂ 침전법에 환원제 DMSO(dimethyl sulfoxide)의 사용을 접목시킨 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리움 매개 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 리포솜을 이용한 형질전환법, DEAE-텍스트란 매개 형질전환법 및 리포펙타민 매개 형질전환법으로 구성된 군으로부터 선택된 기술에 의해 수행되는 것인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 단계 2)에서 식물체로의 형질전환이 아그로박테리움 매개 형질전환법에 의해 수행되는 경우,

2-1) 단계 1)에서 제조된 베이트 DB 발현벡터 및 프레이 AD 발현벡터를 각각 아그로박테리움 속 균주 내로 도입하는 단계; 및

2-2) 상기 발현벡터가 각각 도입된 아그로박테리움 속 균주를 동시에 식물체에 감염시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 17

제3항에 있어서, 단계 2)에서 식물체가 담배인 것인 방법.

청구항 18

제3항에 있어서, 단계 3)에서 식물체로부터 안토시아닌 색소의 발현이 확인되는 경우에 베이트 단백질과 프레이 단백질이 상호작용하는 것으로 판정하는 것인 방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

프로모터, 상기 프로모터의 하류에 위치하는 IbMYB1 전사인자의 DNA-결합 도메인(DB-도메인)을 코딩하는 서열, 상기 DB-도메인의 하류에 위치하는 링커 서열, 상기 링커의 하류에 위치하는 다중 클로닝 부위, 및 상기 다중 클로닝 부위의 하류에 위치하는 터미네이터 서열을 포함하고, 상기 다중 클로닝 부위 내에 베이트 단백질을 코딩하는 서열이 삽입될 수 있는 DB 벡터, 및

프로모터, 상기 프로모터의 하류에 위치하는 다중 클로닝 부위, 상기 다중 클로닝 부위의 하류에 위치하는 링커 서열, 상기 링커의 하류에 위치하는 IbMYB1 전사인자의 전사활성 도메인(AD-도메인)을 코딩하는 서열, 및 상기 AD-도메인의 하류에 위치하는 터미네이터 서열을 포함하고, 상기 다중 클로닝 부위에 프레이 단백질을 코딩하는 서열이 삽입될 수 있는 AD 벡터를 포함하는, 단백질 상호작용을 검출하기 위한 키트.

청구항 21

제20항에 있어서, IbMYB1 전사인자의 BD-도메인을 코딩하는 서열이 서열번호: 2로 기재되는 염기서열을 포함하고, AD-도메인을 코딩하는 서열이 서열번호: 3으로 기재되는 염기서열을 포함하는 것인 키트.

청구항 22

제20항에 있어서, DB 벡터가 식물 이원 벡터의 우측 경계(RB)와 좌측 경계(LB) 사이에 프로모터, DB-도메인을 코딩하는 염기서열, 링커, 다중 클로닝 부위 및 터미네이터가 순서대로 작동가능하게 연결되어 있는 것인 키트.

청구항 23

제20항에 있어서, AD 벡터가 식물 이원 벡터의 우측 경계(RB)와 좌측 경계(LB) 사이에 프로모터, 다중 클로닝 부위, 링커, AD-도메인을 코딩하는 염기서열 및 터미네이터가 순서대로 작동가능하게 연결되어 있는 것인 키트.

청구항 24

제20항에 있어서, 상기 DB 벡터의 프로모터 또는 AD 벡터의 프로모터가 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터, CaMV 이중-증강 35S(d35S) 프로모터, 벼 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터 및 담배 또는 아라비도시스 유래 화학적 유도성 PR-1 프로모터로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 키트.

청구항 25

제22항 또는 제23항에 있어서, 식물 이원 벡터가 pGreen 시리즈 벡터, pGA 시리즈 벡터, pCG 시리즈 벡터, pCIT 시리즈 벡터, pGTV 시리즈 벡터, pBECK2000 시리즈 벡터 및 Binary-BAC(BIbAD) 벡터로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 키트.

청구항 26

제20항에 있어서, DB 벡터가 서열번호: 6의 염기서열로 기재되는 유전자 절편을 포함하는 벡터인 것인 키트.

청구항 27

제26항에 있어서, DB 벡터가 도 1의 B로 표시되는 개열지도를 갖는 pGreenII0179-d35S-IbDB 벡터인 것인 키트.

청구항 28

제20항에 있어서, AD 벡터가 서열번호: 9의 염기서열로 기재되는 유전자 절편을 포함하는 벡터인 것인 키트.

청구항 29

제28항에 있어서, AD 벡터가 도 1의 C로 표시되는 개열지도를 갖는 pGreenII0179-d35S-IbAD 벡터인 것인 키트.

청구항 30

제20항에 있어서, DB 벡터 및 AD 벡터의 다중 클로닝 부위 내에 각각 베이트 단백질과 프레이 단백질을 코딩하는 염기서열을 삽입하기 위한 제한효소 인식부위를 추가로 포함하는 것인 키트.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 식물 이중-하이브리드 시스템을 이용한 단백질 상호작용 검출방법에 관한 것으로, 구체적으로 프로모터, 상기 프로모터의 하류에 위치하는 안토시아닌 생합성 조절 IbMYB1 전사인자의 DNA-결합 도메인(DB-도메인)을 코딩하는 서열, 상기 DB-도메인의 하류에 위치하는 링커 서열, 상기 링커의 하류에 위치하는 다중 클로닝 부위, 및 상기 다중 클로닝 부위의 하류에 위치하는 터미네이터 서열을 포함하고, 상기 다중 클로닝 부위 내에 베이트(bait) 단백질을 코딩하는 서열이 삽입될 수 있는 DB 벡터, 및 프로모터, 상기 프로모터의 하류에 위치하는 다중 클로닝 부위, 상기 다중 클로닝 부위의 하류에 위치하는 링커 서열, 상기 링커의 하류에 위치하는 IbMYB1 전사인자의 전사활성 도메인(AD-도메인)을 코딩하는 서열, 및 상기 AD-도메인의 하류에 위치하는 터미네이터 서열을 포함하고, 상기 다중 클로닝 부위에 프레이(pre) 단백질을 코딩하는 서열이 삽입될 수 있는 AD 벡터를 포함하는 식물 이중-하이브리드 시스템, 상기 식물 이중-하이브리드 시스템을 이용한 단백질 상호작용 검출방법 및 검출키트에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 단백질 상호작용(protein-protein interaction)은 세포들의 성장, 분화, 이동, 사멸 등에 중요한 역할을 담당한다. 단백질 상호작용을 분석하는 일반적인 방법으로는 면역침강법(immunoprecipitation), GST 풀-다운 분석(GST pull-down assay), 효모 이중-하이브리드(yeast two-hybrid) 시스템 등이 있다.

[0003] 이중 효모 이중-하이브리드 시스템은 단백질 상호작용을 세포 외가 아닌 살아있는 효모 세포 내에서 리포터 유전자의 전사활성을 통해 분석할 수 있는 방법이다. 효모 이중-하이브리드 시스템은 단백질의 상호작용을 생체 내에서 볼 수 있다는 장점이 있어 고등 동물세포 내에서 일어나는 단백질 상호작용을 연구하는데 크게 기여하고 있다. Gal4를 이용한 효모 이중-하이브리드 시스템은, 효모의 Gal4 전사인자의 DNA 결합 도메인(DNA binding domain)과 전사활성 도메인(transcription activation domain)을 분리하여 발현되도록 하고 리포터 유전자 프로모터의 상부에 Gal4 결합 도메인 서열이 존재하도록 제작된다. 상기 시스템을 이용하여 상호작용하는 두 단백질을 각각 Gal4의 DNA 결합 도메인 및 전사활성 도메인에 부착하여 함께 발현시키면 Gal4의 DNA 결합 도메인이 부착된 단백질은 Gal4 결합 도메인에 결합하는 동시에 Gal4 전사활성 도메인이 부착된 단백질과 결합하게 되며, 이 Gal4 전사활성 도메인은 RNA 중합효소 II와 상호작용하여 최종적으로 리포터 유전자를 발현시킨다. 그러나, 효모 이중-하이브리드 시스템은 전사인자들의 상보적 결합에 의한 시스템이기 때문에 핵 내부에 존재하는 단백질 상호작용 분석에는 유용하지만 핵 외부에 존재하는 단백질 상호작용 분석에서는 위양성(false-positive) 결과를 많이 보이는 단점이 있다.

[0004] 새로운 개념의 단백질 상호작용 분석 시스템으로, 형광 공명에너지 전이(fluorescence resonance energy transfer; FRET) 원리를 이용하여 칼모듈린(calmodulin)과 칼모듈린 결합 펩티드(calmodulin-binding peptide)간의 상호작용을 분석하는 방법이 개발되었다(Miyawaki et al., Nature 1997, 388: 882-887). 형광단백질은 서로 다른 고유한 파장 영역의 빛을 흡수하여 흥분(excitation)되며, 그 에너지가 빛 혹은 열로 발산되고 나면 기저 상태로 회복되면서 형광단백질 마다 독특한 파장대의 빛을 발산(emission)한다. 형광 공명에너지 전이 원리는 서로 다른 두 형광단백질이 10 내지 100 Å 내에 있을 경우, 단파장 형광단백질이 흥분된 후 방출하는 빛이 장파장 형광단백질의 흥분을 유도하여 형광을 발산하는 현상이다. 즉, 상호작용을 알아보려고 하는 두 단백질 뒤에 서로 다른 두 형광단백질을 각각 부착시킨 후, 단백질 상호작용에 의해 두 형광단백질이 10 내지 100 Å 이내로 인접했을 때 일어나는 형광 공명에너지 전이 현상에 의한 형광을 탐지함으로써 단백질 상호작용을 분석할 수 있는 것이다. 이 시스템은 살아있는 세포 내에서 단백질의 동적인 상호작용 분석이 가능한 장점이 있지만, 미묘한 형광 파장의 변화를 감지하기 위해서는 단백질의 대량 발현이 요구되며 형광 공명에너지 전이 분석을 위해 고가의 장비가 필요한 단점이 있다.

[0005] 또한, 고등 동물세포에서 이분자 형광 상보 기법(bimolecular fluorescence complementation, BiFc)을 이용한 단백질 상호작용 분석 시스템이 개발되었다(Hu et al., Mol. Cell 2002, 9: 789-798). 이분자 형광 상보 시스템은 기존에 보고되었던 단백질 절편의 상보작용을 형광단백질에 적용시켜 형광단백질을 N-말단 및 C-말단 절편으로 나눈 후 상호작용을 알아보려고 하는 두 단백질에 부착하여 발현되게 한 다음, 두 단백질이 상호작용을 하기 위해 가까워질 경우 형광단백질의 두 절편이 합쳐져 온전한 형광단백질이 형성될 때 나타나는 형광을 분석하

는 방법이다. 최근에 이분자 형광 상보 시스템을 이용한 단백질 상호작용 분석 결과들이 많이 보고되고 있으며, 살아있는 세포 내에서 단백질 상호작용의 분석과 상호작용의 세포 내 위치 분석이 가능하다는 장점이 있다. 그러나, 이분자 형광 상보 시스템은 목표 단백질의 상호작용을 보기 위해 플라스미드에 단백질을 코딩하는 유전자 서열과 형광단백질의 절편을 코딩하는 서열을 클로닝한 후 인위적으로 발현시키는 것이기 때문에 실제 세포 내에서 일어나는 상황과는 다소 차이가 날 가능성이 있으며 세포 내 단백질 상호작용을 자연 상태 그대로 정확히 보여준다고 하기는 어렵다.

[0006] 이에 본 발명자들은 고가의 장비를 사용하지 않으면서 식물에서의 단백질 상호작용을 육안으로 쉽게 탐색할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 고구마에서 자색의 안토시아닌 생합성을 조절하는 핵심 조절인자인 IbMYB1 전사인자가 DNA-결합 도메인과 전사활성 도메인으로 구분될 수 있음을 확인하고, 이들 도메인 각각을 식물 이원 벡터에 도입하여 식물 이중-하이브리드 시스템을 개발하였으며, 상기 시스템이 안토시아닌 색소의 발현을 통해 단백질 상호작용을 간편하게 탐색할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 식물체 내에서 단백질 상호작용을 검출하기 위한 식물 이중-하이브리드 시스템을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 식물 이중-하이브리드 시스템을 이용한 단백질 상호작용 검출방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 식물 이중-하이브리드 시스템을 이용한 단백질 상호작용 검출키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 안토시아닌 생합성을 조절하는 IbMYB1 전사인자를 이용한 식물 이중-하이브리드 시스템을 제공한다.

[0011] 발명의 일 양태에서, 본 발명은 식물체 내에서 단백질 상호작용에 의해 안토시아닌이 발현되도록 구현된 식물 이중-하이브리드 시스템을 제공한다.

[0012] 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템은

[0013] 1) 프로모터, 상기 프로모터의 하류에 위치하는 IbMYB1 전사인자의 DNA-결합 도메인(DB-도메인)을 코딩하는 서열, 상기 DB-도메인의 하류에 위치하는 링커 서열, 상기 링커의 하류에 위치하는 다중 클로닝 부위, 및 상기 다중 클로닝 부위의 하류에 위치하는 터미네이터 서열을 포함하고, 상기 다중 클로닝 부위 내에 베이트(bait) 단백질을 코딩하는 서열이 삽입될 수 있는 DB 벡터, 및

[0014] 2) 프로모터, 상기 프로모터의 하류에 위치하는 다중 클로닝 부위, 상기 다중 클로닝 부위의 하류에 위치하는 링커 서열, 상기 링커의 하류에 위치하는 IbMYB1 전사인자의 전사활성 도메인(AD-도메인)을 코딩하는 서열, 및 상기 AD-도메인의 하류에 위치하는 터미네이터 서열을 포함하고, 상기 다중 클로닝 부위에 프레이(pre) 단백질을 코딩하는 서열이 삽입될 수 있는 AD 벡터를 포함할 수 있다.

[0015] 본 발명에 따른 단백질 상호작용 검출 시스템은 안토시아닌 생합성 조절에 핵심인자로 알려진 IbMYB1 전사인자를 DNA-결합 도메인과 전사활성 도메인으로 나누어 이중-하이브리드 시스템에 적용한데 특징이 있다.

[0016] 본 발명에서 IbMYB1 전사인자는 고구마 유래 R2R3-타입 MYB 전사인자로, 고구마에서 자색의 안토시아닌 생합성을 조절하는 핵심 전사인자이다. IbMYB1 전사인자는 서열번호: 1로 기재되는 염기서열(GenBank Accession No. AB444398)을 갖는다. 본 발명자들은 이전 연구에서 고구마 유래 IbMYB1 유전자가 고구마 게놈 유래 유전자로 구성된 인트라제닉(intragenic) 벡터를 이용한 고구마 형질전환에 있어 가시적 마커(visible marker)로 유용하게 사용될 수 있음을 제안하였다(Cha Young Kim 등, Physiologia Plantarum. 2010, 139: 229-240).

[0017] 본 발명자들은 IbMYB1 전사인자에 대해 추가적인 연구를 수행하면서 상기 전사인자가 DNA-결합 도메인(DB-도메

인)과 전사활성 도메인(AD-도메인)으로 구성된다는 사실에 착안하여 이를 Gal4를 이용한 효모 이중-하이브리드 시스템에 적용하였다.

- [0018] 먼저, IbMYB1 전사인자에 대해 염기서열 데이터베이스 분석을 수행하여 서열번호: 1의 염기서열에서 1 내지 357 bp 부위는 DB-도메인에 해당하고 358 내지 750 bp 부위는 AD-도메인에 해당함을 확인하였다. DB-도메인은 서열번호: 2로 기재되는 염기서열을 가지며, AD-도메인은 서열번호: 3으로 기재되는 염기서열을 갖는다.
- [0019] 상기와 같이 확인된 IbMYB1 전사인자의 DB-도메인 및 AD-도메인 각각에 링커(linker), 다중 클로닝 부위(multi cloning site, MCS) 및 터미네이터 서열을 연결한 후 식물 이원(binary) 벡터에 삽입하여 DB-도메인을 함유하는 DB 벡터 및 AD-도메인을 함유하는 AD 벡터를 제작한다.
- [0020] 구체적으로, DB 벡터는 식물 이원 벡터의 우측 경계(right border, RB)와 좌측 경계(left border, LB) 사이에 프로모터, DB-도메인을 코딩하는 염기서열, 링커, 다중 클로닝 부위 및 터미네이터가 순서대로 작동가능하게 연결되어 있다. 상기 DB 벡터에는 단백질 상호작용을 분석하고자 하는 목적 단백질, 즉 베이트 단백질을 코딩하는 염기서열이 다중 클로닝 부위 내에 삽입될 수 있다. 이 경우, DB 벡터는 프로모터의 활성 하에서 DB-도메인과 베이트 단백질을 코딩하는 융합 단백질을 발현할 수 있다.
- [0021] 또한, AD 벡터는 식물 이원 벡터의 RB와 LB 사이에 프로모터, 다중 클로닝 부위, 링커, AD-도메인을 코딩하는 염기서열 및 터미네이터가 순서대로 작동가능하게 연결되어 있다. 상기 AD 벡터에는 베이트 단백질과 상호작용을 할 것으로 예상되는 단백질, 즉 프레이 단백질을 코딩하는 염기서열이 다중 클로닝 부위 내에 삽입될 수 있다. 이 경우, AD 벡터는 프로모터의 활성 하에서 프레이 단백질과 AD-도메인을 코딩하는 융합 단백질을 발현할 수 있다.
- [0022] 하기의 정의들과 방법들은 본 발명을 더 잘 이해하고, 본 발명을 실시하는데 있어서 당업자에게 도움을 제공하기 위한 것이다. 달리 지적되지 않는 한, 용어들은 당업자들에 의한 통상적인 용례로서 해석될 것이다.
- [0023] 본 발명에서 용어 "이중-하이브리드 시스템"은 리포터 유전자의 활성화를 이용하여 단백질 결합을 확인함으로써 단백질 상호작용을 분석하는 방법 및 이를 위해 사용되는 일련의 구성물을 의미한다. 일반적으로, 이중-하이브리드 시스템은 리포터 유전자를 활성화할 수 있는 전사인자를 두 개의 물리적으로 분리되는 모듈 도메인, 즉 DNA-결합 도메인과 전사활성 도메인으로 나누어 사용한다. 이들을 이용하여 단백질 상호작용을 분석하기 위해서는, 상기 DNA-결합 도메인과 전사활성 도메인을 상호작용을 알아보하고자 하는 베이트 및 프레이 단백질에 각각 융합하여 재조합 단백질을 발현시키고, 발현된 재조합 단백질은 베이트 및 프레이 단백질의 상호작용에 의해 DNA-결합 도메인과 전사활성 도메인이 결합하여 활성을 나타내면서 리포터 유전자를 발현시킴으로써 두 단백질의 상호작용을 확인할 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 용어 "베이트(bait)"는 단백질 상호작용에 대한 연구에 있어 단백질 결합을 확인할 때, 상호작용을 알아보하고자 하는 목적 단백질 또는 이를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 상기 베이트 단백질은 단백질 상호작용을 확인하기 위하여 리포터 유전자를 활성화시키는 전사인자의 DNA-결합 도메인 또는 전사활성 도메인과 융합될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 베이트 단백질은 IbMYB1 전사인자의 DNA-결합 도메인과 융합된다.
- [0025] 본 발명에서 용어 "프레이(preY)"는 단백질 상호작용에 대한 연구에 있어 단백질 결합을 확인할 때, 목적 단백질과 결합할 것으로 예상되는 단백질 또는 이를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 상기 프레이 단백질은 단백질 상호작용을 확인하기 위하여 리포터 유전자를 활성화시키는 전사인자의 DNA-결합 도메인 또는 전사활성 도메인과 융합될 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 프레이 단백질은 IbMYB1 전사인자의 전사활성 도메인과 융합된다.
- [0026] 본 발명에서 용어 "DB 벡터"는 단백질 상호작용을 분석하고자 하는 목적 단백질, 즉 베이트 단백질을 코딩하는 염기서열이 다중 클로닝 부위 내에 삽입되어 단백질 상호작용의 가시적 마커로 사용되는 IbMYB1 전사인자의 DB-도메인이 융합된 재조합 단백질이 숙주 내에서 발현될 수 있도록 구성된 벡터를 의미한다. 본 발명에서 DB 벡터는 숙주로 사용되는 식물체 내로 삽입되어 발현될 수 있도록 식물 이원 벡터의 우측 경계(RB)와 좌측 경계(LB) 사이에 프로모터, DB-도메인을 코딩하는 염기서열, 링커, 다중 클로닝 부위 및 터미네이터가 순서대로 작동가능하게 연결될 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 용어 "AD 벡터"는 베이트 단백질과 상호작용을 할 것으로 예상되는 단백질, 즉 프레이 단백질을 코

당하는 염기서열이 다중 클로닝 부위 내에 삽입되어 단백질 상호작용의 가시적 마커로 사용되는 IbMYB1 전사인자의 AD-도메인이 융합된 재조합 단백질이 숙주 내에서 발현될 수 있도록 구성된 벡터를 의미한다. 본 발명에서 AD 벡터는 숙주로 사용되는 식물체 내로 삽입되어 발현될 수 있도록 식물 이원 벡터의 우측 경계(RB)와 좌측 경계(LB) 사이에 프로모터, 링커, 다중 클로닝 부위, AD-도메인을 코딩하는 염기서열 및 터미네이터가 순서대로 작동가능하게 연결될 수 있다.

- [0028] 본 발명에서 용어 "베이트 DB 발현벡터"는 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템의 DB 벡터 내 다중 클로닝 부위에 단백질 상호작용을 분석하고자 하는 목적 단백질, 즉 베이트 단백질을 코딩하는 염기서열이 삽입되어 IbMYB1 전사인자의 DB-도메인과 베이트 단백질이 융합된 재조합 단백질을 숙주 내에서 발현할 수 있도록 구성된 벡터를 의미한다.
- [0029] 본 발명에서 용어 "프레이 AD 발현벡터"는 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템의 AD 벡터 내 다중 클로닝 부위에 베이트 단백질과 상호작용을 할 것으로 예상되는 단백질, 즉 프레이 단백질을 코딩하는 염기서열이 삽입되어 IbMYB1 전사인자의 AD-도메인과 프레이 단백질이 융합된 재조합 단백질을 숙주 내에서 발현할 수 있도록 구성된 벡터를 의미한다.
- [0030] 본 발명에서 용어 "링커"는 본 발명에 따른 베이트 또는 프레이 재조합 단백질에 있어서, 베이트 단백질과 IbMYB1 전사인자의 DB-도메인 또는 프레이 단백질과 IbMYB1 전사인자의 AD-도메인 사이에 삽입되어 이들을 연결하는 아미노산 서열 또는 이를 코딩하는 염기서열을 의미한다.
- [0031] 본 발명에서 용어 "다중 클로닝 부위"는 제한효소(restriction enzyme)가 인식할 수 있는 부위를 여러 개 가지고 있는 부분으로, 클로닝 시에 유전자 조작을 용이하게 하기 위해 벡터 내에 목적하는 유전자를 삽입할 수 있도록 다양한 제한효소 부위를 포함하도록 구성된 염기서열 부위를 의미한다. 본 발명에서는 다양한 제한효소 부위를 가진 공지된 다양한 벡터의 다중 클로닝 부위 중 어느 것을 사용하여도 무방하다.
- [0032] 본 발명에서 용어 "작동 가능하게 연결된"은 유전자 발현의 매개나 조절과 같은 의도된 기능을 수행하기 위해 특정 서열들이 직접적으로 또는 간접적으로 상호작용하는 것을 의미한다. 작동 가능하게 연결된 서열들의 상호작용은, 예를 들어 작동 가능하게 연결된 서열들과 상호작용하는 단백질에 의해 매개될 수 있다. 전사 조절영역과 관심 서열이 작동 가능하게 연결된 경우, 이 서열들이 기능적으로 연결됨으로써 전사 조절영역에 의해 관심 서열의 전사가 매개되거나 조절될 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 용어 "프로모터"는 RNA 폴리머라제에 대한 인지 및 적절한 전사에 요구되는 다른 인자를 제공함으로써 코딩서열의 발현을 제어하는, 일반적으로 코딩서열의 상류(5')에 위치하는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. "프로모터"는 TATA-박스과 전사 개시위치를 특징하는 역할을 하는 다른 서열로 이루어진 짧은 DNA 서열인 최소 프로모터를 포함하며, 여기에 발현 제어를 위한 조절성분이 첨가된다. "프로모터"는 또한 코딩서열 또는 기능적 RNA의 발현을 조절할 수 있는 최소 프로모터와 조절성분을 포함하는 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 프로모터는 전체가 천연 유전자로부터 유래될 수 있거나, 자연에서 발견된 상이한 프로모터들로부터 유래된 상이한 성분들로 이루어질 수 있으며, 또는 합성 DNA 절편으로 이루어질 수 있다. 프로모터는 또한 생리적 또는 성장 조건에 대한 반응으로 전사 개시의 유효성을 제어하는 단백질 인자의 결합에 관여하는 DNA 서열을 함유할 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 DB 벡터 및 AD 벡터에 포함되는 프로모터는 식물체 내에서 상기 벡터로부터 DB-도메인과 베이트 단백질의 융합 단백질 및 AD-도메인과 프레이 단백질의 융합 단백질을 발현시킬 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다. 예컨대, 본 발명에 적합한 프로모터에는 콜리플라워 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus, CaMV) 35S 프로모터, CaMV 이중-증강(double-enhanced) 35S(d35S) 프로모터, 벼 액틴 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, 담배 또는 아라비도시스 유래 화학적 유도성 PR-1 프로모터 등이 포함된다. 또한, 본 발명의 DB 벡터 및 AD 벡터에 사용되는 프로모터는 서로 같거나 다를 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 용어 "벡터" 또는 "발현벡터"는 본 발명에 따른 베이트 또는 프레이 재조합 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 식물체에 삽입될 수 있는 당업계에 공지된 플라스미드, 바이러스 또는 기타 매개체를 의미한다. 일반적으로 식물 형질전환에 이용 가능한 수많은 벡터가 식물 형질전환 분야의 당업자들에게 공지되어 있다. 이러한 벡터의 선택은 바람직한 형질전환 기술 및 형질전환하고자 하는 대상 식물에 따라 달라질 수 있다. 본 발명에서는 발명의 목적상, 아그로박테리움(agrobacterium) 매개 형질전환법을 통해 식물체를 형질전환하는 것이 선호되므로, 바람직하게는 식물 이원(binary) 벡터를 사용한다.
- [0036] 본 발명에서 식물 "이원 벡터"는 아그로박테리움이 갖는 Ti 플라스미드의 일부인 T-DNA가 식물 게놈 내로 통합

되는 특징을 기초로 개발되었다. 이러한 이원 벡터는 T-DNA가 식물 게놈 내로 통합 시 T-DNA의 절제에 요구되는 우측 경계(RB)와 좌측 경계(LB)를 포함하고, T-DNA의 절제 및 이들의 식물로의 이동에 필요한 Ti 플라스미드의 독성 영역(Vir 영역) 내에 위치하는 일군의 유전자들을 포함한다. 이원 벡터는 의도된 형질전환을 위해 외래 유전자를 T-DNA 영역 내로 통합시키는데 사용된다. 삽입될 외래 유전자는 대개 숙주 식물 내에서 작동할 수 있는 프로모터와 프로모터의 하류에 연결된 식물에 부여할 특성을 암호화하는 구조 유전자를 포함한다. 필요한 경우, 하나 이상의 유전자가 함께 연결될 수 있으며, 부가적으로 또는 선택적으로, 발현 효율을 개선하기 위한 서열이 T-DNA 영역 내로의 삽입 전에 상기 프로모터와 하류 구조 유전자 사이에 개재될 수 있다. 이러한 이원 벡터는 다양한 식물 조직, 예를 들면, 담배, 토마토, 해바라기, 목화, 평지, 감자, 콩, 및 포플라 등에 사용될 수 있고, 특히 담배가 그 조직의 용이성 때문에 흔히 선택되어 사용된다.

[0037] 본 발명에 적합한 이원 벡터로는, 이들로 한정되는 것은 아니지만, pGreen 시리즈 벡터, pGA 시리즈 벡터, pCG 시리즈 벡터, pCIT 시리즈 벡터, pGPTV 시리즈 벡터, pBECK2000 시리즈 벡터, Binary-BAC(BIbAD) 벡터 등이 사용될 수 있다. 바람직하게는 pGreen 시리즈 벡터 중의 하나인 pGreenII0179 벡터가 사용된다. 상기 pGreenII0179 벡터는 광범위한 숙주 복제 기원(ori pSa)과 대장균 복제 기원(ColE1 ori)을 포함하고, 좌측 경계의 HpaI 부위 내에 프로모터-선택마커로 35S-hyg 카세트가 삽입되어 있어 식물 형질전환 선발 시 하이그로마이신(hygromycin)에 대한 내성을 부여한다.

[0038] 본 발명의 바람직한 실시양태에서는, IbMYB1 전사인자의 DNA-결합 도메인 및 전사활성 도메인을 pGreenII0179 이원 벡터에 각각 클로닝하여 식물 이중-하이브리드 시스템의 DB 벡터로서 pGreenII0179-d35S-IbDB와 AD 벡터로서 pGreenII0179-d35S-IbAD를 제조한다(도 1 참조). 상기 pGreenII0179-d35S-IbDB 벡터는 pGreenII0179-d35S 벡터의 우측 경계(RB) 및 좌측 경계(LB) 사이에 d35S 프로모터, IbMYB1 전사인자의 DB-도메인, 링커, 다중 클로닝 부위 및 nos-3' 터미네이터 서열이 순차적으로 연결된 서열번호: 6의 염기서열을 포함한다. 또한, 상기 pGreenII0179-d35S-IbAD 벡터는 pGreenII0179-d35S 벡터의 우측 경계(RB) 및 좌측 경계(LB) 사이에 d35S 프로모터, 다중 클로닝 부위, 링커, IbMYB1 전사인자의 AD-도메인 및 nos-3' 터미네이터 서열이 순차적으로 연결된 서열번호: 9의 염기서열을 포함한다.

[0039] 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템으로서 상기와 같이 제조된 DB 벡터 및 AD 벡터는 각각에 상호작용을 분석하고자 하는 베이트 단백질 및 프레이 단백질을 삽입하여 베이트 DB 발현벡터 및 프레이 AD 발현벡터를 제조할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서는, DB 벡터 및 AD 벡터의 다중 클로닝 부위에 각각 서로 단백질 상호작용을 한다고 알려진 AtRAR1 및 AtSGT1a를 코딩하는 핵산 서열을 삽입하여 베이트 DB 발현벡터로서 pGreenII0179-d35S-IbDB-linker-RAR1과, 프레이 AD 발현벡터로서 pGreenII0179-d35S-SGT1a-linker-IbAD를 제조한다(도 2 참조).

[0040] 상기와 같이 제조된 베이트 DB 발현벡터 및 프레이 AD 발현벡터를 담배 식물체에 아그로박테리움 침윤(agro-infiltration)을 통해 일시적으로 발현시킴으로써, 잎 표면에서의 색소 생성 여부로 간단히 단백질 상호작용 분석을 수행할 수 있다. 이처럼 본 발명의 식물 이중-하이브리드 시스템은 담배 일시적 발현 시스템을 이용하기 때문에 안정적 형질전환체를 제조할 필요가 없이 단시간 내에 간단한 방법으로 단백질 상호작용을 분석할 수 있다는 장점이 있다.

[0041] 본 발명에서 용어, "형질전환"은 본 발명에 따른 핵산 서열이 숙주 식물체의 게놈 내로 이동하여 목적하는 단백질을 발현할 수 있도록 만드는 것을 의미한다. 본 발명에서 형질전환 방법은 식물체에 적용가능한 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행될 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 CaCl₂ 침전법, CaCl₂ 침전법에 환원제 DMSO(dimethyl sulfoxide)의 사용을 접목시킨 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리움 매개 형질전환법, PEG 또는 리포솜을 이용한 형질전환법, DEAE-텍스트란 매개 형질전환법, 리포펙타민 매개 형질전환법 등이 있으나, 본 발명의 목적상 아그로박테리움 매개 형질전환법을 사용하는 것이 바람직하다.

[0042] 아그로박테리움 매개 형질전환법에 따르면, 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템의 베이트 DB 발현벡터 및 프레이 AD 발현벡터는, 표적 식물 내로 도입되기 전에 먼저 식물을 감염시킬 수 있는 아그로박테리움 속 균주, 바람직하게는 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*) 내로 도입된다. 여기에는 당업자에게 잘 알려진 다양한 방법들이 사용될 수 있는데, 일례로서, 상기 발현벡터가 접합(conjugation)에 의해 아그로박테리움 내로 전달되거나, 직접 형질전환에 의해 아그로박테리움 내로 전달될 수 있다.

[0043] 이어서, 베이트 DB 발현벡터 및 프레이 AD 발현벡터가 도입된 아그로박테리움으로 식물체를 감염시킨다. 이를

위해 식물체 내로 유전자를 도입하여 발현시키거나 식물체 내에서 원하는 단백질을 생산하기 위해 당업계에 공지된 임의의 방법을 제한 없이 사용할 수 있다. 이러한 방법으로는 식물체의 일부분에 상처를 입히고 그 부분에 아그로박테리움을 감염시키는 방법, 대상 식물체의 유합조직(callus)을 아그로박테리움으로 감염시키는 방법, 원형질체와 아그로박테리움을 공동 배양하는 방법, 잎 조직의 단편을 아그로박테리움과 공동 배양하는 방법, 아그로-침윤(agro-infiltration) 방법 등이 포함된다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서는 아그로-침윤 방법을 이용한다. 아그로-침윤 방법은 이동시키고자 하는 유전자가 도입된 아그로박테리움의 현탁액을 바늘이 없는 주사기를 사용해서 압력을 줌으로써 식물의 잎에 주입하여 식물체 세포로 원하는 유전자를 이동시키는 방법으로, 전통적인 식물 형질전환과 비교하면 신속하고 편리하다는 장점이 있다. 이러한 방법들에 의해 얻은 형질전환된 아그로박테리움 세포들은 적합한 선택 마커를 사용하거나 또는 그 세포들이 의도된 특성을 발현하는지를 분석함으로써 선택될 수 있다.

[0044] 바람직한 실시양태에서는, 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템의 작동 여부를 확인하기 위해 DB 벡터 및 AD 벡터의 다중 클로닝 부위에 각각 서로 단백질 상호작용을 한다고 알려진 AtRAR1 및 AtSGT1a를 코딩하는 핵산 서열을 삽입하여 베이트 DB 발현벡터로서 pGreenII0179-d35S-IbDB-linker-RAR1 및 프레이 AD 발현벡터로서 pGreenII0179-d35S-SGT1a-linker-IbAD를 제조한다(도 2 참조). 상기 발현벡터 pGreenII0179-d35S-IbDB-linker-RAR1은 IbMYB1 전사인자의 DB-도메인과 AtRAR1 단백질이 융합된 재조합 단백질을 발현하고, 발현벡터 pGreenII0179-d35S-SGT1a-linker-IbAD는 IbMYB1 전사인자의 AD-도메인과 AtSGT1a 단백질이 융합된 재조합 단백질을 발현한다. 상기 두 발현벡터를 아그로박테리움 투머파시엔스에 도입한 후 각각의 발현벡터가 도입된 아그로박테리움 투머파시엔스를 아그로-침윤 방법에 의해 담배 잎에 동시 형질전환시킨다. 각각의 발현벡터로부터 발현된 재조합 단백질에서 AtRAR1과 AtSGT1a가 서로 상호작용을 함으로써 IbMYB1 전사인자의 DB-도메인과 AD-도메인이 결합되어 활성화되고, 그로 인해 안토시아닌 생합성이 촉진된다. 그 결과, 담배 잎의 표면에서 자색의 안토시아닌 색소가 검출되고, 이는 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템이 식물에서 단백질 상호작용의 검출에 유용하게 적용될 수 있음을 나타내는 것이다(도 3 참조). 이때, IbMYB1 전사인자의 DB-도메인과 AD-도메인만을 포함하는 발현벡터, DB 벡터 및 AD 벡터가 도입된 아그로박테리움 투머파시엔스를 각각 담배 잎에 형질전환시킨 경우에는, 담배 잎의 표면에서 자색의 안토시아닌 색소가 전혀 검출되지 않는다. 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템이 식물에서의 단백질 상호작용을 검출하는데 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0045] 발명의 다른 양태에서, 본 발명은 상기 식물 이중-하이브리드 시스템을 이용한 단백질 상호작용 검출방법을 제공한다.

[0046] 본 발명에 따른 검출방법은

[0047] 1) 식물 이중-하이브리드 시스템의 DB 벡터 내에 베이트 단백질을 코딩하는 서열을 삽입하여 베이트 DB 발현벡터를 제조하고, AD 벡터 내에 프레이 단백질을 코딩하는 서열을 삽입하여 프레이 AD 발현벡터를 제조하는 단계;

[0048] 2) 단계 1)에서 제조된 각각의 발현벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계; 및

[0049] 3) 상기 식물체로부터 안토시아닌 색소의 발현을 확인하여 베이트 단백질과 프레이 단백질의 상호작용 여부를 판정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0050] 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템에 따르면, 목적 단백질 및 이와 상호작용을 할 것으로 예상되는 후보 단백질을 각각 포함하는 베이트 DB 발현벡터 및 프레이 AD 발현벡터를 쉽게 제작하여 식물체 내로 도입할 수 있다. 이때, 발현된 목적 단백질과 후보 단백질이 서로 상호작용을 하는 경우에만 IbMYB1 전사인자의 DB-도메인과 AD-도메인이 결합하게 되고, 그로 인해 상기 IbMYB1 전사인자의 활성화가 이루어져 육안으로 용이하게 식별 가능한 자색의 안토시아닌 색소가 발현되어 특별한 검출 장비 없이도 단백질 상호작용을 분석할 수 있다.

[0051] 단계 1)은 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템에 상호작용을 알아보하고자 하는 두 단백질을 도입하는 단계로, DB 벡터 내의 다중 클로닝 부위에 목적 단백질, 즉 베이트 단백질을 코딩하는 염기서열을 삽입함으로써 프로모터의 활성 하에서 IbMYB1 전사인자의 DB-도메인에 융합된 베이트 단백질이 재조합 단백질 형태로 발현될 수 있는 베이트 DB 발현벡터를 제조한다. 또한 AD 벡터 내의 다중 클로닝 부위에 목적 단백질과 상호작용을 할 것으로 예상되는 후보 단백질, 즉 프레이 단백질을 코딩하는 염기서열을 삽입함으로써 프로모터의 활성 하에서 IbMYB1 전사인자의 AD-도메인에 융합된 프레이 단백질이 재조합 단백질 형태로 발현될 수 있는 프레이 AD 발현벡터를 제조한다. 이때, 목적 단백질과 상호작용을 할 것으로 예상되는 후보 단백질은 라이브리리 형태로 적용

될 수 있다. 베이트 DB 발현벡터 및 프레이 AD 발현벡터에 포함되거나 포함될 수 있는 구성요소에 대한 상세한 설명은 전술한 이중-하이브리드 시스템의 설명을 참조로 인용한다.

[0052] 단계 2)는 단계 1)에서 제작된 베이트 DB 발현벡터와 프레이 AD 발현벡터를 식물체에 형질전환시키는 단계이다. 단계 2)에서 식물체로의 형질전환은 당업계에 공지된 다양한 방법을 제한 없이 이용하여 수행될 수 있으며, 바람직하게는 아그로박테리움 매개 형질전환법을 이용하여 수행된다. 간략히 설명하면, 베이트 및 프레이 재조합 단백질 각각을 발현하는 벡터를 먼저 표적 식물체를 감염시킬 수 있는 아그로박테리움 속 균주, 바람직하게는 아그로박테리움 튜머파시엔스 내로 도입한다. 이어서 상기 발현벡터가 도입된 아그로박테리움 속 균주를 동시에 식물체에 감염시켜 식물체 내에서 베이트 및 프레이 재조합 단백질의 발현을 유도한다.

[0053] 단계 3)은 단계 2)에서와 같이 형질전환된 식물체 내에서 발현된 베이트 및 프레이 재조합 단백질의 상호작용 여부에 따라 안토시아닌 색소의 발현을 확인하는 단계이다. 이 단계에서, 목적 단백질과 후보 단백질의 상호작용이 이루어지면, 서로 분리되어 있던 IbMYB1 전사인자의 DB-도메인과 AD-도메인이 결합되어 활성화되면서 자색의 안토시아닌 색소가 발현되고, 이를 통해 목적 단백질과 후보 단백질간의 단백질 상호작용 여부를 확인할 수 있다.

[0054] 발명의 다른 양태에서, 본 발명은 상기 식물 이중-하이브리드 시스템을 이용한 단백질 상호작용 검출키트를 제공한다.

[0055] 본 발명에 따른 검출키트는,

[0056] 프로모터, 상기 프로모터의 하류에 위치하는 IbMYB1 전사인자의 DNA-결합 도메인(DB-도메인)을 코딩하는 서열, 상기 DB-도메인의 하류에 위치하는 링커 서열, 상기 링커의 하류에 위치하는 다중 클로닝 부위, 및 상기 다중 클로닝 부위의 하류에 위치하는 터미네이터 서열을 포함하고, 상기 다중 클로닝 부위 내에 베이트 단백질을 코딩하는 서열이 삽입될 수 있는 DB 벡터, 및

[0057] 프로모터, 상기 프로모터의 하류에 위치하는 다중 클로닝 부위, 상기 다중 클로닝 부위의 하류에 위치하는 링커 서열, 상기 링커의 하류에 위치하는 IbMYB1 전사인자의 전사활성 도메인(AD-도메인)을 코딩하는 서열, 및 상기 AD-도메인의 하류에 위치하는 터미네이터 서열을 포함하고, 상기 다중 클로닝 부위에 프레이 단백질을 코딩하는 서열이 삽입될 수 있는 AD 벡터를 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명의 검출키트에 따른 DB 벡터 및 AD 벡터에 포함되거나 포함될 수 있는 구성요소에 대한 상세한 설명은 전술한 이중-하이브리드 시스템의 설명을 참조로 인용한다.

[0059] 또한, 본 발명에 따른 검출키트는 추가로 상기 DB 벡터 및 AD 벡터의 다중 클로닝 부위 내에 각각 베이트 단백질로서 목적 단백질과, 프레이 단백질로서 목적 단백질과 상호작용을 할 것으로 예상되는 후보 단백질을 코딩하는 염기서열을 삽입하기 위한 제한효소를 포함할 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명에 따른 검출키트에는 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템을 이용한 단백질 상호작용 검출방법을 실시하기 위한 프로토콜(protocol)이 동봉될 수 있다. 이처럼 본 발명의 식물 이중-하이브리드 시스템을 키트화하는 것에 의해 한층 더 간편하고 용이하게 식물에서의 단백질 상호작용을 검출할 수 있다.

발명의 효과

[0061] 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템은 식물의 안토시아닌 색소 발현을 촉진하는 전사인자를 이용하므로 식물에서의 단백질 상호작용을 검출하는데 유용하게 사용될 수 있으며, 특히 특별한 장치 없이 안토시아닌 색소 생성 여부를 통해 단백질 상호작용을 육안으로 확인할 수 있어 보다 쉽고 정확하게 단백질 상호작용을 탐색할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템을 구성하는 DB 벡터 및 AD 벡터의 모식도이다.
 도 2는 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템의 검증을 위해 사용된 AtRAR1 함유 베이트 DB 발현벡터 및

AtSGT1a 함유 프레이 AD 발현백터의 모식이다.

도 3은 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템을 담배 잎에 적용하여 단백질 상호작용을 확인한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 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.

[0064] <실시예 1> 식물 이중-하이브리드 시스템의 구축

[0065] 식물체 내에서 단백질 상호작용에 의해 안토시아닌이 발현되도록 하는 식물 이중-하이브리드 시스템을 구축하기 위해, 고구마 유래의 안토시아닌 생합성 관련 IbMYB1 전사인자에 대해 데이터베이스 분석을 수행하여 서열번호: 1의 염기서열에서 1 내지 357 bp 부위는 DB-도메인(서열번호: 2)에 해당하고 358 내지 750 bp 부위는 AD-도메인(서열번호: 3)에 해당함을 확인하였다(도 1의 A).

[0066] 상기와 같이 확인된 IbMYB1 전사인자의 DB-도메인 및 AD-도메인 각각을 식물 이원(binary) 백터에 삽입하여 DB-도메인을 함유하는 백터 및 AD-도메인을 함유하는 백터를 제작한다.

[0067] <1-1> IbMYB1 전사인자의 DNA-결합 도메인을 포함하는 DB 백터의 제조

[0068] IbMYB1 전사인자의 DNA-결합 도메인(DB-도메인)을 포함하는 DB 백터를 제조하기 위해, 식물 이원 백터의 우측 경계(RB)와 좌측 경계(LB) 사이에 프로모터, DB-도메인을 코딩하는 염기서열, 링커, 다중 클로닝 부위 및 터미네이터를 순서대로 작동가능하게 연결시켰다. 상기 DB 백터에는 단백질 상호작용을 분석하고자 하는 목적 단백질, 즉 베이트 단백질을 코딩하는 염기서열이 다중 클로닝 부위 내에 삽입될 수 있다. 이 경우, DB 백터는 프로모터의 활성 하에서 DB-도메인과 베이트 단백질이 융합된 재조합 단백질을 발현할 수 있다.

[0069] 구체적으로, IbMYB1 DNA 염기서열 정보를 이용해 고안된 제한효소 인식부위를 포함하는 서열번호: 4 및 5의 IbMYB1-DB_SalI_F 및 IbMYB1-DB_SmaI_R 프라이머 쌍을 사용하여 PCR을 수행하였다. 이때, PCR 반응조건은 IbMYB1 유전자를 주형으로 94℃에서 5분간 변성 후 94℃에서 15초, 55℃에서 30초 및 68℃에서 2분의 주기를 25회 반복한 다음, 최종적으로 68℃에서 10분간 신장시켰다. PCR 반응용액은 10 μ l 완충액 5 μ l, 10 mM dNTP 1 μ l, 서열번호: 4 및 5의 프라이머(10 pmole/ μ l) 각 2 μ l, Pfu DNA 중합효소 0.5 μ l(SolgentTM) 및 DNA 주형 1 μ l를 포함하고, 총 부피가 50 μ l가 되도록 증류수를 첨가하였다.

[0070] PCR로 증폭된 유전자 절편을 pT-블런트 키트(pT-Blunt Kit, SolgentTM)를 이용하여 T-백터에 클로닝하여 pT-Blunt IbDB 백터를 제조하였다. 이어서 상기 T-Blunt IbDB 백터에 SalI 및 SmaI 제한효소를 처리하여 얻은 유전자 절편을 pGreenII0179-d35S-nos-ter 백터(Hellens RP et al., Plant Mol. Biol. 2000, 42: 819-832; www.pgreen.ac.uk/pGreenII/pGreenII.htm)에 클로닝하여 IbMYB1 전사인자의 DB-도메인을 포함하는 DB 백터를 제조하고, 이를 pGreenII0179-d35S-IbDB 백터로 명명하였다(도 1의 B).

[0071] 상기 pGreenII0179-d35S-IbDB 백터는 pGreenII0179-d35S 백터(Hellens RP et al., Plant Mol. Biol. 2000, 42: 819-832)의 우측 경계(RB) 및 좌측 경계(LB) 사이에 d35S 프로모터, IbMYB1 전사인자의 DB-도메인, 링커, 다중 클로닝 부위 및 nos-3' 터미네이터 서열이 순차적으로 연결된 서열번호: 6의 염기서열을 포함한다. 상기 pGreenII0179-d35S-IbDB 백터는 d35S 프로모터의 조절 하에서 IbMYB1 전사인자의 DB-도메인과 다중 클로닝 부위 내에 삽입될 수 있는 베이트 단백질의 재조합 단백질을 발현할 수 있다. 이로부터 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템에서 DB 백터로 사용되는 pGreenII0179-d35S-IbDB 백터를 구축하였다.

[0072] <1-2> IbMYB1 전사인자의 전사활성 도메인을 포함하는 AD 백터의 제조

[0073] IbMYB1 전사인자의 전사활성 도메인(AD-도메인)을 포함하는 AD 백터를 제조하기 위해, 식물 이원 백터의 우측 경계(RB)와 좌측 경계(LB) 사이에 프로모터, 다중 클로닝 부위, 링커, AD-도메인을 코딩하는 염기서열 및 터미네이터를 순서대로 작동가능하게 연결시켰다. 상기 AD 백터에는 목적 단백질과 상호작용을 할 것으로 예상되는

후보 단백질, 즉 프레이 단백질을 코딩하는 염기서열이 다중 클로닝 부위 내에 삽입될 수 있다. 이 경우, AD 벡터는 프로모터의 활성 하에서 프레이 단백질에 AD-도메인이 융합된 재조합 단백질을 발현할 수 있다.

[0074] 구체적으로, IbMYB1 DNA 염기서열 정보를 이용해 고안된 제한효소 인식부위를 포함하는 서열번호: 7 및 8의 IbMYB1-AD_SaSmBa_F 및 IbMYB1-AD_Sp_R 프라이머 쌍을 사용하여 PCR을 수행하였다. 이때, PCR 반응조건은 IbMYB1 유전자를 주형으로 94°C에서 5분간 변성 후 94°C에서 15초, 55°C에서 30초 및 68°C에서 2분의 주기를 25회 반복한 다음, 최종적으로 68°C에서 10분간 신장시켰다. PCR 반응용액은 10 \times 완충액 5 μ l, 10 mM dNTP 1 μ l, 서열번호: 7 및 8의 프라이머(10 pmole/ μ l) 각 2 μ l, Pfu DNA 중합효소 0.5 μ l(SolgentTM) 및 DNA 주형 1 μ l를 포함하고, 총 부피가 50 μ l가 되도록 증류수를 첨가하였다.

[0075] PCR로 증폭된 유전자 절편을 pT-블런트 키트(pT-Blunt Kit, SolgentTM)를 이용하여 pT-벡터에 클로닝하여 pT-Blunt IbAD 벡터를 제조하였다. 이어서 상기 pT-Blunt IbAB 벡터에 SmaI 및 SpeI 제한효소를 처리하여 얻은 유전자 절편을 pGreenII0179-d35S-nos-ter 벡터(Hellens RP et al., Plant Mol. Biol. 2000, 42: 819-832; www.pgreen.ac.uk/pGreenII/pGreenII.htm)에 클로닝하여 IbMYB1 전사인자의 AD-도메인을 포함하는 AD 벡터를 제조하고, 이를 pGreenII0179-d35S-IbAD 벡터로 명명하였다(도 1의 C).

[0076] 상기 pGreenII0179-d35S-IbAD 벡터는 pGreenII0179-d35S 벡터(Hellens RP et al., Plant Mol. Biol. 2000, 42: 819-832)의 우측 경계(RB) 및 좌측 경계(LB) 사이에 d35S 프로모터, 다중 클로닝 부위, 링커, IbMYB1 전사인자의 AD-도메인 및 nos-3' 터미네이터 서열이 순차적으로 연결된 서열번호: 9의 염기서열을 포함한다. 상기 pGreenII0179-d35S-IbAD 벡터는 d35S 프로모터의 조절 하에서 IbMYB1 전사인자의 AD-도메인과 다중 클로닝 부위 내에 삽입될 수 있는 프레이 단백질의 재조합 단백질을 발현할 수 있다. 이로부터 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템에서 AD 벡터로 사용되는 pGreenII0179-d35S-IbAD 벡터를 구축하였다.

[0077] <실시예 2> 식물 이중-하이브리드 시스템의 검증

[0078] 상기 실시예 1에서 제조된 DB 벡터 및 AD 벡터로 구성된 식물 이중-하이브리드 시스템의 효과를 검증하기 위하여, 서로 상호작용한다고 알려져 있는 AtRAR1와 AtSGT1a 단백질을 선택하였다(Chen et al., Plant Physiol. 2008, 146: 368-376).

[0079] 먼저 AtRAR1 유전자(At5g51700, NM_124549.7)를 포함하는 베이트 DB 발현벡터를 제조하기 위해, 서열번호: 10 및 11의 EcoRV-linker_F 및 AtRAR1_SpeI_R1 프라이머 쌍을 이용한 PCR을 통해 pUC-split LUC-RAR 플라스미드(Chen H et al., Plant Physiol. 2008, 146: 368-376)로부터 링커를 포함하는 AtRAR1 유전자 절편을 증폭하였다. PCR로 증폭된 유전자 절편을 pT-블런트 키트(pT-Blunt Kit, SolgentTM)를 이용하여 pT-벡터에 클로닝하여 pT-Blunt linker-AtRAR1 벡터를 제조하였다. 이어서 상기 pT-Blunt linker-AtRAR1 벡터에 EcoRV 및 SpeI 제한효소를 처리하여 얻은 유전자 절편을 상기 <1-1>에서 제조된 DB 벡터 pGreenII0179-d35S-IbDB 내로 클로닝하여 IbMYB1 전사인자의 DB-도메인과 AtRAR1이 융합된 재조합 단백질을 발현하는 베이트 DB 발현벡터를 제조하고, 이를 pGreenII0179-d35S-IbDB-linker-RAR1로 명명하였다(도 2의 B).

[0080] 이어서, AtSGT1a 유전자(At4g23570, NM_179098.2)를 포함하는 프레이 AD 발현벡터를 제조하기 위해, 서열번호: 12 및 13의 AtSGT1a_EcoRI_F1 및 SmaI-linker_R 프라이머 쌍을 이용한 PCR을 통해 pUC-split LUC-SGT1a 플라스미드로(Chen H et al., Plant Physiol. 2008, 146: 368-376)부터 링커를 포함하는 AtSGT1a 유전자 절편을 증폭하였다. PCR로 증폭된 유전자 절편을 pT-블런트 키트(pT-Blunt Kit, SolgentTM)를 이용하여 pT-벡터에 클로닝하여 pT-Blunt AtSGT1a-linker 벡터를 제조하였다. 이어서 상기 pT-Blunt AtSGT1a-linker 벡터에 EcoRI 및 SmaI 제한효소를 처리하여 얻은 유전자 절편을 상기 <1-2>에서 제조된 AD 벡터 pGreenII0179-d35S-IbAD 내로 클로닝하여 IbMYB1 전사인자의 AD-도메인과 AtSGT1a가 융합된 재조합 단백질을 발현하는 프레이 AD 발현벡터를 제조하고, 이를 pGreenII0179-d35S-SGT1a-linker-IbAD로 명명하였다(도 2의 C).

[0081] 제조된 발현벡터 pGreenII0179-d35S-DB-linker-RAR1 및 pGreenII0179-d35S-SGT1a-linker-IbAD를 아그로박테리움 튜머파시엔스 GV3101(pSoup) 균주(Hellens RP et al., Plant Mol. Biol. 2000, 42: 819-832)에 직접 형질전환에 의해 도입하였다. 상기 발현벡터 각각이 도입된 아그로박테리움 튜머파시엔스 균주를 50 μ g/ml 카나마이신 및 200 μ M 아세토시린곤(acetosyringone)이 함유된 LB 배지에 접종하여 30°C에서 180 rpm으로 18시간 동안 배양하였다. 배양이 종결되면, 원심분리에 의해 균체를 분리한 후 200 μ M 아세토시린곤, 10 mM MES 및 10 mM

MgCl₂가 함유된 완충용액(pH 5.6)으로 한번 세척한 후 동일한 완충용액을 이용하여 각각의 균주를 OD₆₀₀ = 1로 현탁하여 준비하였다. 이때, 비교군으로 IbMYB1 전사인자의 DB-도메인과 AD-도메인만을 포함하는 발현벡터(도 3의 C), 음성 대조군으로 유전자 과발현에 의한 유전자 침묵(silencing)을 방지하기 위한 침묵 저해자(suppressor)로 알려진 p19 발현벡터(도 3의 B) 및 양성 대조군으로 IbMYB1 전사인자를 포함하는 pGreenII0179-d35S-IbMYB1 발현벡터(도 3의 A) 역시 동일한 방법으로 준비하였다.

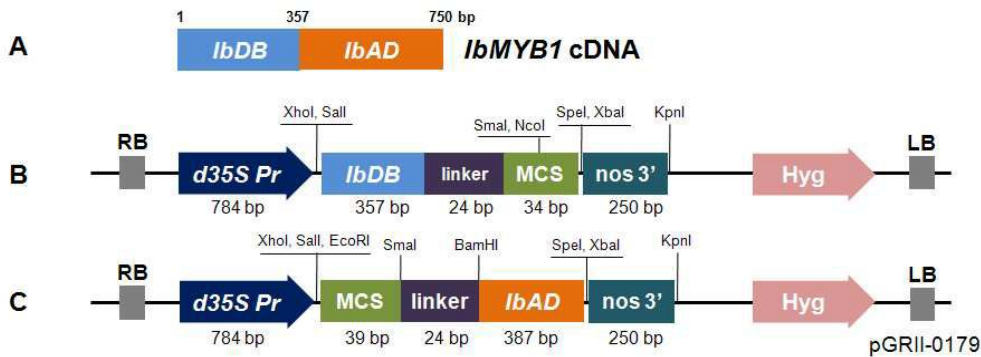
[0082] 각각의 발현벡터를 포함하는 아그로박테리움 튜머과시엔스 균주들을 p19 발현벡터와 함께 아그로박테리움 매개 형질전환법을 통해 담배의 잎에 1 ml 주사기로 침윤(infiltration)시켰으며, 그 후 10일 뒤 잎 표면에서 자색의 안토시아닌 색소 생성 여부를 관찰하였다.

[0083] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템에 따라 제작된 발현벡터 pGreenII0179-d35S-DB-linker-RAR1 및 pGreenII0179-d35S-SGT1a-linker-IbAD는 이들 각각을 담배 잎에 침윤시킨 경우(도 3의 D 및 E)에는 자색의 안토시아닌 색소를 발현하지 않았으나, 이들을 함께 담배 잎에 침윤시킨 경우(도 3의 F)에는 자색의 안토시아닌 색소가 발현되어 담배의 잎이 붉게 변화되는 것을 확인하였다. 이는 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템에서 베이트 DB 발현벡터로부터 발현된 IbMYB1 전사인자의 DB-도메인과 AtRAR1이 융합된 재조합 단백질과, 프레이 AD 발현벡터로부터 발현된 IbMYB1 전사인자의 AD-도메인과 AtSGT1a이 융합된 재조합 단백질 사이에 상호작용이 일어나 상기 DB-도메인과 AD-도메인이 결합하게 됨으로써 안토시아닌 색소의 생합성이 이루어진 결과이다.

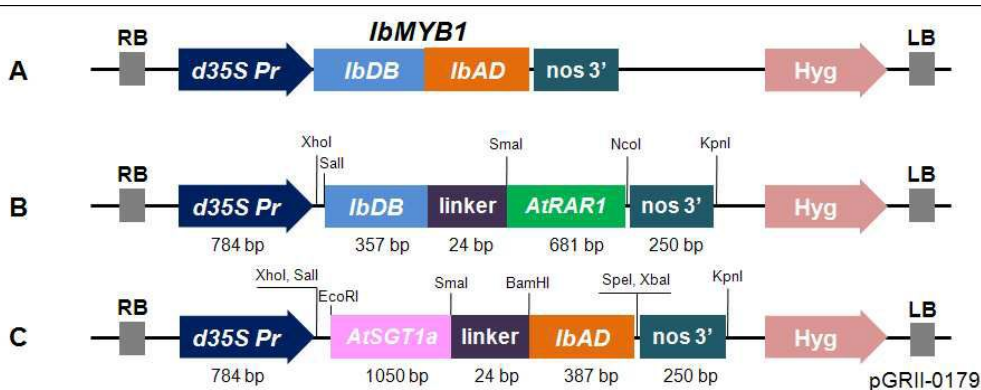
[0084] 이로부터 본 발명에 따른 식물 이중-하이브리드 시스템이 식물에서 단백질 상호작용, 구체적으로 단백질 결합 여부를 확인하는데 효과적으로 사용될 수 있음을 확인하였다.

도면

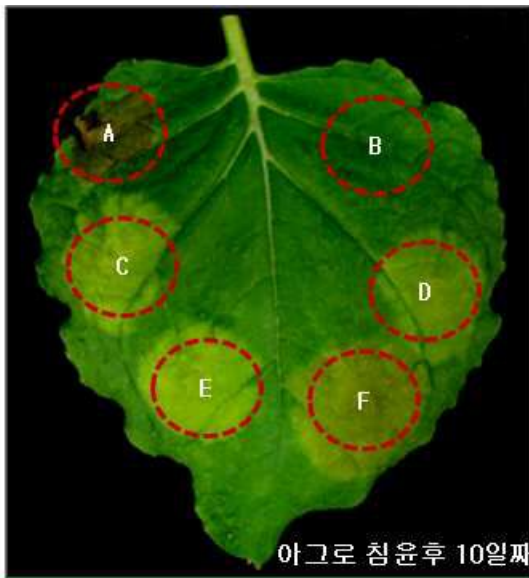
도면1



도면2



도면3



- A, 양성대조군 (pGR-d35S-IbMYB1 벡터)
- B, 음성대조군 (p19 침묵저해 벡터)
- C, pIbDB + pIbAD
- D, pIbDB-AtRAR1
- E, pIbAD-AtSGT1a
- F, pIbDB-AtRAR1 + pIbAD-AtSGT1a

서열목록

<110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

<120> Method and kit for the detection of protein-protein interaction
using a plant two-hybrid system

<130> PA110328KR

<160> 13

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 750

<212> DNA

<213> IbMYB1a cDNA

<400> 1

atggttattt caictglatg gtcgggatcg tcttcgagag tgagaaaagg ttcatggtcc 60

gaagaagaag accaactttt gagggagtgc attcagaaat atggigaagg aaaatggcat 120

ctaattcccc ttagagetgg attgaatagg tgcagaaaaa gttgtagatt aagatggttg 180

aattatctcc gtcccgatat aaagagaggc gaatttagtc ccgatgaaat tgatctcatt 240
 ctgcgctcc ataggctctt aggcaacagg tggtcgctta ttgctggaag aattccggga 300
 agaacagcaa acgatgtgaa gaatttatgg aacaccatc ttcagaagaa ggtgtctgcc 360
 atggcttctt caaggcaaga taattattgg aagggcaaag ccccagaaat cacggaaaac 420
 accgtcgta ggctcgacc tcggagattc ttaaaggcct catcatctcc gacgactcta 480
 ttgaccgaa atgctacat ggttgctat gatggtcaac tccaagaaca tatgacgaca 540
 caaccgaaa caacgtcgga cttgctaag gaaaatgtcc acaaaaaaaaa cttacaacc 600

actttgcctt cagcactaga aacaacgcca cagacaatg tgaagtggg ggaagatgta 660
 ctctccgaca aggaactcaa tgaggaagga caaatctgtt ggagtgagtt tccaactgat 720
 atagacctac tgcagaact gttaagctaa 750

<210> 2
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> IbMYB1 DB-domain
 <400> 2

atggttattt catctgatg gtcgggatcg tcttcgagag tgagaaaagg ttcattgtcc 60
 gaagaagaag accaactttt gagggagtgc attcagaaat atggtgaagg aaaatggcat 120
 ctaattcccc ttagagctgg attgaatagg tgcagaaaaa gttgtagatt aagatggttg 180

aattatctcc gtcccgatat aaagagaggc gaatttagtc ccgatgaaat tgatctcatt 240
 ctgcgctcc ataggctctt aggcaacagg tggtcgctta ttgctggaag aattccggga 300
 agaacagcaa acgatgtgaa gaatttatgg aacaccatc ttcagaagaa ggtgtct 357

<210> 3
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> IbMYB1 AC-domain
 <400> 3

gcttcttcaa ggcaagataa ttattggaag ggcaaagccc cagaaatcac ggaaaacacc 60
 gtggttaggc ctgacctcg gagattctta aaggccatc catctccgac gactctattg 120
 accggaatg ctaccatggt tgcctatgat ggtcaactcc aagaacatat gacgacacaa 180

ccggaacaa cgtcggactt gctaattgaa aatgtccaac aaaaaaactt aacaaccact 240
 ttgccttcag cactagaaac aacgccacac gacaatgtga agtgggtgga agatgtactc 300
 tccgacaagg aactcaatga ggaaggacaa atctgttga gtgagttcc aactgatata 360

gacctactgt cagaactggt aagctaa 387

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IbMYB1-DB_Sall_F forward primer

<400> 4

gtcgacatgg ttatttcac t 21

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IbMYB1-DB_SmaI_R reverse primer

<400> 5

cccgggagac accttcttct g 21

<210> 6

<211> 1487

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pGreenII0179-d35S-IbDB

<400> 6

aacatggtgg agcagcacac tctcgtctac tccaagaata tcaaagatac agtctcagaa 60

gaccaaaggg ctattgagac ttttcaacaa agggtaatat cgggaaacct cctcggattc 120

cattgcccag ctatctgtca cttcatcaaa aggacagtag aaaaggaagg tggcacctac 180

aaatgccatc attgcgataa aggaaaggct atcgttcaag atgcctctgc cgacagtgg 240

cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg 300

tcttcaaage aagtgattg atgtgataac atggtggagc acgacactct cgtctactcc 360

aagaatatca aagatacagt ctcagaagac caaagggcta ttgagacttt tcaacaaagg 420

gtaatcgcg gaaacctcct cggattccat tgcccagcta tctgtcactt catcaaaagg 480

acagtagaaa aggaaggagg cacctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggctatc 540

gttcaagatg cctctgccga cagtggtecc aaagatggac ccccaccac gaggagcatc 600

gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc 660

actgacgtaa gggatgacgc acaatccac tacccttcgc aagaccttcc tctatataag 720
 gaagttcatt tcatttggag aggacacgct gaaatcacca gtctctctct acaaatctat 780
 ctctctcgag gtcgacatgg ttatttcac tgtatggctg ggatcgtctt cgagagtgag 840
 aaaaggttca tggatccgaag aagaagacca acttttgagg gagtgcattc agaaatattg 900
 tgaaggaaaa tggcatctaa ttccccttag agctggattg aataggtgca gaaaaagttg 960
 tagattaaga tggttgaatt atctccgtcc cgatataaag agaggcgaat ttagtcccga 1020

tgaattgat ctattctgc gcctccatag gctcttaggc aacaggtggt cgcttattgc 1080
 tggagaatt ccggaagaa cagcaaacga tgtgaagaat ttatgaaca cccatcttca 1140
 gaagaaggtg tctcccatcg gaggtggctc atctggcgga ggtcagatct cgtacgcgtc 1200
 ccggggcggg accatggact agttctagag cggcccggtt caaacatttg gcaataaagt 1260
 ttcttaagat tgaatctgt tgccggtctt gcatgatta tcatataatt tctgttgaat 1320
 tacgttaagc atgtaataat taacatgtaa tgcacgacgt tatttatgag atgggttttt 1380
 atgattagag tcccgaatt atacatttaa tacgcatag aaaacaaaat atagcgcgca 1440

aactaggata aattatcgcg cgcggtgtca tctatgttac tagatcg 1487

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IbMYB1-AD_SaSmBa_F forward primer

<400> 7

gagctcccgg gggatccgct tcttcaaggc aagat 35

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IbMYB1-AD_Sp_R reverse primer

<400> 8

actagtttag cttaacagtt ct 22

<210> 9

<211> 1528

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pGreenII0179-d35S-IbAD

<400> 9

aacatggtgg agcacgacac tctcgtctac tccaagaata tcaaagatac agtctcagaa 60
 gaccaaaggg ctattgagac ttttcaacaa agggtaatat cgggaaacct cctcggattc 120
 cattgccag ctatctgtca cttcatcaaa aggacagtag aaaaggaagg tggcacctac 180
 aaatgccatc attgcgataa aggaaagget atcgttcaag atgcctctgc cgacagtgg 240
 cccaaagatg gacccccacc cacgaggagc atcgtggaaa aagaagacgt tccaaccacg 300
 tcttcaaagc aagtggattg atgtgataac atggtggagc acgacactct cgtctactcc 360

aagaatatca aagatacagt ctcagaagac caaagggcta ttgagacttt tcaacaaagg 420
 gtaatatcgg gaaacctctt cggattccat tgcccagcta tctgtcactt catcaaaagg 480
 acagtagaaa aggaaggtgg cacctacaaa tgccatcatt gcgataaagg aaaggctatc 540
 gttaaatg cctctgccga cagtgggtccc aaagatggac ccccaccac gaggagcatc 600
 gtggaaaaag aagacgttcc aaccacgtct tcaaagcaag tggattgatg tgatatctcc 660
 actgacgtaa gggatgacgc acaatcccac tatccttcgc aagaccttcc tctatataag 720
 gaagttcatt tcatttggag aggacacgct gaaatcacca gtctctctct acaaatctat 780

ctctctcgag gtcgacgga tgcataagct tgatatcgaa ttctctcagc cggggggcgg 840
 tggctcatct ggccggaggatg atgggggatc cgcttcttca aggcaagata attattggaa 900
 gggcaaaacc ccagaaatca cggaaaacac cgtcgttagg cctcgacctc ggagattctt 960
 aaagcctca tcatctccga cgactctatt gaccggaaat gctacatgg ttgcctatga 1020
 tggtaactc caagaacata tgacgacaca accggaaaca acgtcggact tgctaagga 1080
 aaatgtcaa caaaaaact taacaaccac tttgccttca gcactagaaa caacgccaca 1140
 cgacaatgtg aagtgggtggg aagatgtact ctccggcaag gaactcaatg aggaaggaca 1200

aatctgttgg agtgagtttc caactgatat agacctactg tcagaactgt taagctaac 1260
 tagttctaga gcggccgct tcaaacattt ggcaataaag tttcttaaga ttgaatcctg 1320
 ttgccggtct tgcgatgatt atcatataat tctgttgaa ttacgttaag catgtaataa 1380
 ttaacatgta atgcatgacg ttatttatga gatgggtttt tatgattaga gtcccgaat 1440
 tatacattta atacgcgata gaaaacaaaa tatagcgcgc aaactaggat aaattatcgc 1500
 gcgcggtgtc atctatgta ctagatcg 1528

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EcoRV-linker_F forward primer

<400> 10

gatatcggag gtggctcatc t 21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtRAR1_SpeI_R1 reverse primer

<400> 11

actagttcag accgccgat c 21

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AtSGT1a_EcoRI_F1 forward primer

<400> 12

gaattcatgg cgaaggagct t 21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SmaI-linker_R reverse primer

<400> 13

cccgggacct ccgccagatg a 21