



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2008년01월23일  
 (11) 등록번호 10-0797667  
 (24) 등록일자 2008년01월17일

- (51) Int. Cl.  
*C12N 15/82* (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2002-7004322  
 (22) 출원일자 2002년04월03일  
 심사청구일자 2005년09월22일  
 번역문제출일자 2002년04월03일  
 (65) 공개번호 10-2002-0057967  
 (43) 공개일자 2002년07월12일  
 (86) 국제출원번호 PCT/CA2000/001143  
 국제출원일자 2000년10월02일  
 (87) 국제공개번호 WO 2001/25454  
 국제공개일자 2001년04월12일
- (30) 우선권주장  
 60/157,133 1999년10월04일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
 Plant Mol Biology vol.17(1):9-18 (1991)  
 Plant Physiology Vol.112(4):1447-1456 (1996)  
 Plant Mol Biology Vol.27(1):165-177 (1995)  
 US 4997930 A
- (73) 특허권자  
**메디카고 인코포레이티드**  
 캐나다, 퀘벡 쥐1브이 3브이9, 세인트-포이, 슈트  
 600, 루트드 레그리즈, 1020
- (72) 발명자  
**베지나, 루이-필립**  
 캐나다, 퀘벡쥐0에이2알0, 누빌, 루트138,206  
**다우스트, 마끄-앙드레**  
 캐나다, 퀘벡쥐1에스2더블유9, 퀘벡, 에이피피.2, 에  
 브뉴만레스, 939
- (74) 대리인  
**이원희**

전체 청구항 수 : 총 17 항

심사관 : 신원혜

**(54) 외래 유전자의 전사를 조절하는 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 유전자 변형 생물체에서 형질전환 유전자의 전사를 조절하는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 질소의 존재에 의해 활성이 조절되는 프로모터 서열의 전사적 조절하에서 목적 유전자의 코딩 서열을 포함하는 발현 벡터의 용도에 관한 것이다.

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리제, 모잠비크, 그라나다, 가나, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨, 감비아, 시에라리온

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

형질전환 생물체에서 외래 유전자의 전사를 촉진하는 분리된 프로모터 서열로서, 상기 형질전환 생물체는 외래 유전자의 발현을 위하여 시스-작용(cis-acting) 서열이 있거나 또는 없는 질소-유도 프로모터를 포함하고, 질소 유도자의 첨가 또는 제거에 의해 상기 외래 유전자의 전사적 발현이 조절되고, 상기 분리한 프로모터는 **서열번호 1 내지 서열번호 13**으로 기재되는 서열로 구성되는 군으로부터 선택되는 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 프로모터.

**청구항 2**

제 1항에 있어서, 상기 생물체는 식물, 균류(fungus), 박테리아, 효모 및 동물로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 프로모터.

**청구항 3**

제 2항에 있어서, 상기 식물은 쌍자엽식물(dicot)인 것을 특징으로 하는 프로모터.

**청구항 4**

제 3항에 있어서, 상기 쌍자엽식물은 엘팔퍼(alfalfa) 또는 담배(tobacco)인 것을 특징으로 하는 프로모터.

**청구항 5**

제 1항의 분리된 프로모터를 이용하여 형질전환 생물체에서 외래 유전자의 전사를 조절하는 방법.

**청구항 6**

제 5항에 있어서, 질소 유도자의 첨가 또는 제거에 의해 상기 외래 유전자의 전사 조절을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 7**

제 5항에 있어서, 상기 생물체는 식물, 균류, 박테리아, 효모 및 동물로 구성되는 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 8**

제 7항에 있어서, 상기 식물체는 쌍자엽식물인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 9**

제 8항에 있어서, 상기 쌍자엽식물은 엘팔퍼(alfalfa) 또는 담배(tobacco)인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 10**

제 6항에 있어서, 상기 질소 유도자는 질산염(nitrate)인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 11**

제 5항에 있어서, 상기 프로모터는 질소 동화 경로에 관여하는 유전자의 5' 상위 부위로부터 분리되는 시스(cis)-작용 요소와 작용할 수 있게 조합되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 12**

삭제

**청구항 13**

제 11항에 있어서, 상기 시스-작용 요소는 질소원의 이용도에 의해 전사가 조절되는 유전자의 5' 상위 부위로부터

터 분리되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 14**

제 11항에 있어서, 상기 시스-작용 요소는 살아있는 생물체의 환경 내에서 또는 상기 환경으로부터 질소원의 첨가 또는 제거에 의해 전사 활성이 조절되는 서열인 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 15**

제 11항에 있어서, 상기 시스-작용 요소는 식물, 균류, 효모, 박테리아 또는 동물로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 16**

제 11항에 있어서, 상기 시스-작용 요소는 앨펄퍼에서 발견된 Nir 유전자의 5' 상위 부위로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 17**

제 5항에 있어서, 상기 프로모터는 상기 외래 유전자의 3' 끝에 삼입을 위한 폴리아데닐레이션 (polyadenylation) 신호 끝 위치를 포함하는 터미네이터 (terminator)와의 결합에 사용되고, 상기 터미네이터는 상기 외래 유전자 및 상기 분리된 프로모터와 관련하여 작동가능하도록 위치함으로써 상기 외래 유전자가 발현되도록 하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 18**

제 17항에 있어서, 상기 터미네이터는 **서열번호 14** 내지 **서열번호 16**으로 기재되는 서열로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**명세서**

**기술분야**

<1> 본 발명은 유전자 변형 생물체에서 형질전환 유전자의 전사를 조절하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로는, 본 발명은 질소의 존재에 의해 활성이 조절되는 프로모터 서열의 전사적 조절하에서 목적 유전자의 코딩 서열을 포함하는 발현벡터의 용도에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 컨스트럭트는 무기물 질소의 결핍에 의해 성장이 손상되지 않는 형질전환 콩과(leguminous) 식물(예를 들면, 대두(soybean), 앨펄퍼(alfalfa), 클로버(clover), 벌노랑이(birdsfoot trefoil), 강남콩(bans), 완두(peas), 땅콩(peanuts))에 사용되고, 상기 식물에서 발현의 유도는 발생 동안 적합한 질소원의 첨가에 의해 어떠한 주어진 시간에 수행되어질 수 있다. 넓은 견해로, 본 발명은 질소 유도자가 없을 때에 충분히 성장할 수 있는 생물체에 질소원의 첨가에 의해 어떠한 주어진 형질전환 유전자의 발현을 유도하는데 사용할 수 있다; 식물계 안에서의 예로, 좁개구리밥(duckweed, Lemnaminor)은 질소원으로 질산염 또는 암모늄에서 성장할 수 있다; 따라서, 형질전환 좁개구리밥은 유일한 질소원으로 질산염 및 암모늄의 첨가에 의해 발현이 시작되는 천연 유전자로부터의 프로모터를 포함하는 카세트를 제공하여 암모늄의 추가에 의해 촉발되는 형질전환 유전자의 발현에 의해 성장할 수 있다. 따라서, 본 발명은 여러 질소 유도자의 추가에 의해 생물체에서 형질전환 된 것의 발현을 조절하는 방법을 제공한다.

**배경 기술**

- <2> 질소는 생존에 필수적인 분자이다. 모든 살아있는 생물체는 단백질의 구성요소인 아미노산 및 핵산의 구성요소인 뉴클레오타이드의 합성을 위하여 질소를 필요로 한다. 질산 암모늄은 비료의 형태로 농작물에 주어지는 무기질 질소의 형태가 바람직하다. 질산염-질소는 처음 환원되어 질산염이 되고, 대부분의 풀에 일반적인 대사 경로의 활성을 통해 암모늄으로 된다. 종에 따라 흡수되는 질산염의 일부분 또는 전체는 암모늄으로 환원되기 전에 목질부를 통해 잎세포로 이동한다. 암모늄 또는 질소의 다른 환원된 형태는 뿌리 시스템에서 흡수(매우 낮은 속도이지만)되지만, 이들의 흡수가 환원을 필요로 하는 것은 아니다. 이들 새로이 흡수된 암모늄 또는 암모늄-포함 분자들은 아미노산 및 다른 질소함유 분자를 통한 암모늄 사이클링을 의해 형성된 세포들에서 세포내 풀(pools)과 결합한다. 몇몇 종들은 질산염-질소를 쉽게 대사하지 못하여, 유일한 질소원으로 질산염에 의존하지 못한다; 많은 침엽수 종들은 후자의 카테고리에 해당한다. 콩과 식물 및 다른 공생 식물 종들은 식물계 내에서 3번째 부류에 해당한다; 이들은 기체 질소를 고정시킬 수 있는 미생물과 함께 대사 동맹을 형성한다. 상기 환원된 질소는 성장을 위하여 식물에 의해 효율적으로 사용되고, 따라서 이러한 농작물은 토양에서 무기질 질소의 이용도와 무관하게 성장할 수 있다.
- <3> 많은 미생물 및 야생 식물 종들은 질소원의 이용도에 광범위하게 적응하고, 따라서 단일분자 형태의 질소가 없어도 그들의 생활할 수 있고, 만일 다른 성장 환경에서 가능하면 단일분자 형태의 질소는 배타적으로 및 효율적으로 이용될 수 있다. 대부분의 흡수 경로에서, 질소 흡수는 세포에서 엄격히 조절된다. 예를 들어, 질산염에서 암모늄으로의 환원을 담당하는 질산염 환원효소(nitrate reductase; NaR) 및 아질산염 환원효소(nitrite reductase; NiR)를 인코딩하는 유전자의 발현은 여러 미생물 및 식물에서 보고되어 있다(Mifflin and Lea, Books 5 and 12, in *The Biochemistry of Plants*). 질산염은 NaR 및 NiR 발현의 조절에 관여하는 유일한 조절 분자가 아니지만, 이들의 존재는 이러한 유전자의 지속적인 전사 및 번역의 원인이 되는 신호전달의 캐스캐이드를 시작하게 하는데 필수적이다. 무기질 질소의 결핍되었을 때 성장한 경우, 콩과 식물에서 NaR 및 NiR 유전자의 발현이 억제된다.
- <4> NiR 프로모터는 몇몇 식물 중에서 특징이 밝혀졌다(Back et al., 1991, *Plant Molecular Biology* 17:9-18; Sander et al., 1995, *Plant Molecular Biology* 27:165-177). 이러한 프로모터의 유도능은 형질전환 식물에서 마커 유전자를 사용하여 밝혀졌고, 형질전환 식물은 질산염의 이용성이 전사의 완전한 활성화에 필요한 것을 나타낸다.
- <5> 다른 질소원에 대한 동화 경로도 밝혀졌고, 이러한 몇몇 경로에 관여하는 유전자들에 대한 프로모터가 밝혀졌다.
- <6> 미생물의 유전자 형질전환은 유용한 재조합 분자를 생산하기 위하여 15년 이상 사용되어 오고 있고, 의약품, 화장품 및 더마슈티컬 산업에 이용되어 지고 있다. 상기 기술은 지난 10년 동안 일반적인 개념을 복잡한 진핵생물에 적용하는데 필요한 기술의 발전과 함께 미생물에서부터 식물 및 동물에 까지 확대되었다. 기본적으로 목적 단백질을 코딩하는 유전자 또는 목적 분자의 생산을 유도하는 대사 경로의 변형을 담당하는 효소를 인코딩하는 유전자는 시스(cis) 및 트랜스(trans)-작용 조절 서열에 적당한 방법으로 연결되어 있고, 타겟 세포에 옮겨져 여기서 분자 기구에(일시적 또는 안정한 방법으로) 통합된다. 형질전환 세포로부터 재생된 형질전환 세포 또는 조직 또는 생물체는 형질전환 유전자의 전사 및 번역을 수행하고, 따라서 목적 단백질의 축적 또는 목적 효소의 활성을 통한 새로운 대사 작용을 수행할 수 있게 한다.
- <7> 분자농업(동물 또는 농작물에서 재조합 분자의 생산)의 떠오르는 산업은 다가오는 세기의 가장 유망한 산업중의 하나이다. 상기 분자농업의 유망성은 안전하고 재생가능한 산업용 분자 공장을 제공할 것이다. 최근 개발되어진 실용성 중에서는 치료 및 진단용 단일클론 항체의 저가 생산, 만성 또는 치명적인 질병의 치료를 위한 호르몬, 사이토카인 및 다른 생-활성 분자의 무한 생산, 여러 혈액 요소에 대한 안전한 대체체의 생산, 음식 및 펄프 산업에서 공정 효소의 무한적 생산, 쓰레기 처리를 위한 효소의 엄가 생산 및 화장품 산업에 대한 생물학적으로 안정한 분자의 생산이 있다.
- <8> 이러한 기술의 실용성의 한계는 재조합 산물을 충분한 양으로 축적하기 위하여 형질전환 생물체의 무능력으로 기인하고, 적은 전사 속도, 메신저의 부적합한 스플라이싱(splicing)의 결과, 외래 mRNA의 불안정, 낮은 번역 속도, 엔도지너스 프로타제의 작용에 대한 재조합 단백질의 과감수성 또는 외래 단백질에 대한 재조합 생물체의 과감수성은 부적합 및 제한된 성장 또는 최악의 상황을 초래하고, 호스트 생물체에 강력한 해를 끼친다. 이익 마진이 적거나 또는 잔여 물질의 처리 및/또는 폐기가 생물학적 안전 또는 환경 문제를 일으킬 때, 불충분한 생

산 수준은 응용 개발에 직접적인 영향을 미친다. 원하는 재조합 산물의 축적 수준의 향상은 분자 농업의 많은 응용의 상용화를 보장하는 중요한 요소일 것이다.

- <9> 상기 언급한 모든 요소들의 조합된 효과를 증화하기 위하여, 유도 프로모터의 용도가 제안되어 오고 있고, 몇몇 경우에는 성공적으로 사용되었다. 강력한 유도 프로모터는 외래 mRNA 및 번역 산물의 고도의 일시적 축적을 초래하는 고도의 단명 전사 속도를 생성하는데 성공적일 것이다. 결과적으로, 발현의 유도능은 적합한 동시 단백질 회복 절차와 짝지어질 때, 회수 유니트 당 수율은 구조상(constitutive) 발현을 사용한 것 보다 더욱 높다.
- <10> 유도 프로모터를 포함하는 여러 발현 카세트가 미생물 생산 시스템을 위하여 개발되고 있고, 일부는 현재 연구 목적으로 이용할 수 있다. 일부 유도 프로모터는 식물(상처 유도성) 또는 동물(유선 세포에 특이성, PPL) 시스템에서 현재 사용되고 있으나, 질산염과 같은 저비용 및 안전한 화학 유도자를 사용한 것에 대해서는 아직 보고가 없는 실정이다.
- <11> 따라서, 유전적으로 변형된 생물체에서 형질전환 유전자의 전사를 조절하는 방법을 개발하여야 한다.

**발명의 상세한 설명**

- <12> 본 발명의 목적은 유전자 변형 생물체에서 형질전환 유전자의 전사를 조절하는 방법을 제공하는 것이다.
- <13> 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 질소의 존재에 의해 활성이 조절되는 프로모터 서열의 전사 조절하에서 목적 유전자의 코딩 서열을 포함하는 발현벡터의 용도를 제공하는 것이다.
- <14> 본 발명은 식물에서 외래 유전자의 조절된 발현을 위한 질소-유도 발현 카세트의 용도에 관한 것이다. 조절 서열의 분리가 가능하여 시스-작용 서열이 목적 유전자의 ORF와 적절히 결합되었을 때 그의 전사는 특정 질소원의 첨가에 의해 조절될 수 있는 것을 하기에 설명하였다.
- <15> 본 발명에 따르면, 타겟 시스템은 콩과 식물 중에 사용하여, 만일 형질전환 식물이 질산염 없는 배지에서 유지된다면 질산염-유도 프로모터를 포함하는 컨스트럭트는 성장 기간 동안 낮은 전사로 유지되고, 따라서 형질전환체로부터 방해없이 식물 생물자원(biomass)을 개발할 수 있다. 성장 배지에 질산염을 첨가하면, 그 다음날 부터 생물자원이 상대적으로 많은 비율로 전사가 유도된다. 목적 재조합 산물을 최대 회수하기 위하여, 유도 시간 및 단백질 축적의 최적화가 수행되어질 것이다.
- <16> 하기 설명에서 본 발명이 질산염 유도를 질산염-박탈 형질전환 콩과 식물에 쉽게 적용되는 것을 명확히 하지만, 이러한 일반적인 개념은 미생물, 식물 및 동물계에서 질소 동화 시스템의 여러 가지 이익을 만드는 다른 생산 시스템의 개발에 응용될 수 있다.
- <17> 본 발명에 따르면, 질소 유도성은 공생 관계를 통해 질소고정을 수행하지 않는 생물체에서 단백질 생산을 최대화하는데 사용할 수 있고, 성장을 위해 여러 (환원된 또는 산화된) 질소원을 사용할 수 있고, 적절히 개발할 수 있는 능력을 포함하고 있으며, 성장 환경에서 이들 질소성 기질의 결핍으로 질소 동화 경로의 하나가 불활성화된다. 생물체에서 목적 유전자의 발현을 유도하기 위하여, 상기 불활성화 경로에서 어떤 유전자의 전사를 조절하는 발현 카세트를 사용하여, 이전의 결핍된 질소성 화합물을 첨가하여 형질전환체의 유도 발현을 가능하게 할 수 있다. 예를 들어, 좁개구리밥은 질산염 또는 암모늄에서 양자택일로 성장할 수 있는 식물종이다; 본 발명은 목적 유전자가 적절히 연결된 암모늄-유도 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 개발하는데 사용될 수 있고, 질산염-성장 형질전환 유전자 좁개구리밥 식물에서 유도가 수행되어진다.
- <18> 본 발명에 따르면, 형질전환 생물체에서 외래 유전자의 전사를 조절하기 위하여,
- <19> a) **서열번호 1** 내지 **서열번호 13** 및 그들의 기능적 절편 및 유도체로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 하나 이상의 질소-유도 프로모터 및 상기 유전자의 ORF로 구성되는 발현 컨스트럭트를 사용하여 형질전환 생물체를 제조하고, 상기 프로모터는 상기 유전자의 발현을 위하여 상기 유전자와 관련하여 작용할 수 있도록 위치하고 있는 단계;

- <20> 를 포함하는 외래 유전자의 전사를 조절하는 방법을 제공한다.
- <21> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 형질전환 생물체에서 외래 유전자의 전사를 조절하는 방법은
- <22> a) 시스-작용 서열을 있거나 또는 없는 하나 이상의 질소-유도 프로모터, 유전자의 ORF, 및 상기 컨스트럭트의 3' 끝에 폴리아데닐레이션(polyadenylation) 신호 끝 위치로 구성되는 발현 컨스트럭트를 제조하고, 상기 프로모터는 상기 유전자의 발현을 위하여 상기 유전자와 관련하여 작용할 수 있도록 위치하고, 질소 유도자를 첨가 또는 제거하여 상기 유전자의 전사적 발현을 위해 조절되는 단계;
- <23> b) 단계 a)의 컨스트럭트를 상기 생물체에 적합한 감염벡터에 서브클로닝하는 단계;
- <24> c) 상기 벡터를 상기 생물체의 DNA 또는 그의 세포에 전달하는 단계; 및
- <25> d) 적합한 배지에서 형질전환된 것을 선별하는 단계를 포함한다.
- <26> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 상기 방법은 다음의 단계를 추가로 포함한다.
- <27> e) 적합한 아그로박테리아 푸메파시엔스(agrobacterium tumefaciens) 균주에 상기 벡터를 도입하는 단계;
- <28> f) 단계 a)의 아그로박테리아 균주를 사용하여 T-DNA를 식물 세포에 전달하는 단계;
- <29> g) 적합한 배지에서 상기 식물 세포의 형질전환된 것을 선별하는 단계;
- <30> h) 상기 형질전환 세포로부터 배아(embryos) 또는 모종(plantlets)을 재생하는 단계; 및
- <31> i) 상기 재생된 배아로부터 성숙한 식물을 키우는 단계.
- <32> 본 발명의 방법에 대한 바람직한 실시예에 따르면, 상기 시스-작용 서열은 엘렐퍼에서 발현된 Nir 유전자의 5' 상위 부위로부터 분리된다.
- <33> 본 발명의 방법에 대한 바람직한 실시예에 따르면, 상기 프로모터는 **서열번호 1** 내지 **서열번호 13**으로 기재되는 서열 및 그들의 기능적 절편 및 유도체를 포함한다.
- <34> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 상기 생물체는 식물이고, 보다 바람직하게는 쌍자엽(dicotyledonous) 식물이다.
- <35> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 상기 생물체는 엘렐퍼 또는 담배(tobacco)이다.
- <36> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 상기 질소 유도자는 질산염이다.
- <37> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 상기 DNA 전달 방법은 DNA 충격(bombardment), 전기충격(electroporation), PEG-매개 DNA 전달 및 위스커(whiskers) 등을 포함하는 어떠한 적합한 전달 방법이다.
- <38> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 상기 발현 컨스트럭트는 하나 이상의 질소-유도 프로모터 및 하나 이상의 시스(cis) 또는 트랜스(trans) 작용 요소를 포함한다.
- <39> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 상기 생물체는 식물, 균류(fungus), 박테리아(bacteria), 효모(yeast) 또는 동물이다.
- <40> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 상기 프로모터 또는 시스-작용 서열은 질소 동화 경로에 관여하는 유전자의 5' 상위 부위로부터 분리된다.
- <41> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 상기 프로모터 또는 시스-작용 서열은 주어진 질소원의 이용도에 의해 전사가 조절되는 유전자의 5' 상위 부위로부터 분리된다.
- <42> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 상기 프로모터 또는 시스-작용 서열은 살아있는 생물체의 환경에 있는 또는 상기 환경으로부터 질소원의 첨가 또는 제거에 의해 전사 활성이 조절되는 서열이다.
- <43> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 프로모터 또는 시스-작용 서열을 분리한 상기 생물체는 식물, 균류, 효모, 박테리아 또는 동물이다.
- <44> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 형질전환 생물체에서 외래 유전자의 전사를 촉진하기 위한 프로모터를 제공하고, 상기 형질전환 생물체는 상기 유전자의 발현을 위한 시스-작용 서열이 있거나 또는 없는 질소-유도 프

로모터를 포함하고, 질소 유도자를 첨가 또는 제거하여 상기 유전자의 전사적 발현이 조절되도록 적용되어 있는 프로모터이다.

<45> 바람직하게는, 상기 프로모터는 **서열번호 1** 내지 **서열번호 13**, 및 그들의 기능적 절편 및 유도체로부터 구성되는 군으로부터 선택되는 서열을 갖는다.

<46> 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 프로모터와의 결합에 사용되는 형질전환 생물체에서 외래 유전자를 발현시키는 터미네이터(terminator)로, 상기 프로모터는 유전자의 3' 끝에 삽입을 위한 폴리아데닐레이션 신호 끝 위치를 포함하고, 상기 터미네이터는 상기 유전자 및 상기 프로모터와 관련하여 작용할 수 있도록 위치하고, 그것에 의해서 상기 유전자를 발현시키도록 하는 터미네이터를 제공한다.

<47> 바람직하게는, 상기 터미네이터는 **서열번호 14** 내지 **서열번호 16**, 및 그들의 기능적 절편 및 유도체로 구성되는 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다.

<48> 본 발명의 목적을 위해, 다음 용어들을 하기와 같이 정의한다.

<49> "그들의 기능적 절편 또는 유도체"는 외래 유전자의 발현수준이 **서열번호 1** 내지 **서열번호 13**으로 기재되는 본 발명의 프로모터 또는 **서열번호 14** 내지 **서열번호 16**으로 기재되는 본 발명의 터미네이터와 비슷한 **서열번호 1** 내지 **서열번호 16**으로 기재되는 서열의 유도체 또는 절편을 의미한다.

### 실시예

<53> 하기는 리포터 유전자의 발현에서 조절되는 형질전환 담배 및 알팔퍼를 제조하는데 사용되는 방법에 대한 상세한 설명이다. 본 방법은 질소-유도 프로모터를 분리하거나, 이를 식물에서 발현하는데 사용되는 컨스트럭트의 ORF에 연결하거나, 컨스트럭트의 다른 시스 및 트랜스 요소가 사용되고 공간적으로 배열하거나, 질소에 의한 유도가 증명되고 사용되는데, 본 발명의 범위 내에서 변화가 가능하다.

<54> 실시예에서, 상동성이 있는 식물 NiR 서열로부터 유래된 프라이머로 RT-PCR을 수행하여 알팔퍼로부터 NiR cDNA 가닥은 분리하였다. 상기 cDNA를 상위/하위 게놈 워킹(genome walking)을 수행하는데 사용하였다. NiR 프로모터 부위 및 결실, 5'UTR 및 NiR 터미네이터는 리포터 유전자 GUS의 전사 및 증결을 조절하기 위하여 기능적으로 위치하였다. 상기 컨스트럭트를 담배 및 알팔퍼 잎에 DNA 총격을 위하거나 데스카그네스(Desgagnes et al., 1995, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 42:129-140)의 방법에 따라 아그로박테리아 매개 DNA 전달을 위해 적합한 발현 벡터에 삽입하였다. 이러한 두 DNA 전달 방법은 사용하여 리포터 유전자의 발현이 성장 배지에서 질산염의 첨가 또는 제거에 의해 조절되는 것을 증명하였다.

### <55> 재료 및 방법

#### <56> 생물학적 재료

<57> 대장균(*E. coli*) 균주 DH5- $\alpha$ 를 모든 클로닝 단계를 수행하는데 사용하였다. 냉해 저항 알팔퍼 유전자형 11.9는 A. 투메파시엔스 감염(Desgagnes et al., 1995, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 42:129-140)을 이용한 안정한 형질전환을 포함하는 모든 실험에 사용하였다.

#### <58> 전체 RNA의 분리

<59> 전체 RNA는 브리에 등(de Vries et al., 1988, B6 page 1, In: Gevin SB and Shilperoot RA editors, *Plant Molecular Biology Manual*, Dordrecht: Kluwer Academic Publisher)에 의해 기재된 열 페놀 방법을 사용하여 추출하였다.

#### <60> RT-PCR

<61> 일 전체 mRNA로부터 많은 NiR mRNA 분자 종들에 해당하는 DNA 절편을 생산하기 위하여 RT-PCR을 사용하였다. 보존된 부위는 5개의 알려진 식물 NiR ORFs로부터 밝혀졌다; 진뱅크 서열 #AB006032(Arabidopsis Nir mRNA), #X66145(Tobacco partial Nir mRNA), #U10419(Bean complete Nir cds), #X07568(Spinach Nir mRNA), 및 #U90429(Glycine max Nir complete cds). 변성 올리고뉴클레오타이드는 2개의 보존된 부위로부터 유추된다; 코딩 가닥의 5'말단에 Nir5 - 5'GATATTGATGTTAGACTCAAGTGGC 3'(서열번호 17), 코딩 가닥의 3'말단에 Nir3 - 5'CACYSATTCCTTCCTWGGC 3'(서열번호 18). 역전사 반응은 200 유니트의 M-MLV 역전사효소(RT)로 1 ug 전체 일 RNA, 4 mM dNTP(각각 1 mM), 1X M-MLV-RT 버퍼(50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>)에서 5 uM 랜덤 헥사머 프라이머를 가지고 37°C에서 1시간 동안 수행하였다. PCR 반응은 1X PCR 버퍼(20 mM Tris-HCl pH 8.4, 80 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>)에서 2.5 유닛 Taq DNA 중합효소, 2 uM Nir5 프라이머, 2 uM Nir3 프라이머, 800 uM dNTPs(각각 200 uM)를 사용하여 PCR 시스템(Perkin elmer Cetus GenAmp PCR system 9600; EG&G, Wellesley, MA)에서 수행하였다. 사이클링 프로그램은 다음과 같다: 94°C에서 처음 4분; 94°C에서 1분, 55°C에서 30초, 72°C에서 3분을 30회 반복; 72°C에서 3분. 프로그램에서 72°C에서 7분의 연장 기간을 포함하였다.

<62> **DNA 서열분석**

<63> DNA 서열분석은 생거(Sanger et al. 1977, *P.N.A.S.USA*, 74:5643-5647)의 방법에 따라 수행하였다.

<64> **게놈 워킹(genome walking)**

<65> RT-PCR 반응으로 부터 클론된 앨펠퍼 Nir cDNA 절편의 상위 워킹은 키트(Universal Genome Walker kit; Glontech Laboratories, Palo Alto, CA; Cat. #1807-1)를 사용하여 수행되었다. 코딩 서열의 상위 서열을 증폭하기 위하여, NiR 특이 상용 프라이머를 사용하였다:

<66> Nir1106r - 5' TTGTCACATCAGCACATCCGTCTTTC 3' (서열번호 19)

<67> Nir1061r - 5' TCGCCAAGTATCTTGTGTTGAGCACTTG 3' (서열번호 20)

<68> 증폭된 3,775 bp 절편은 더 분석하기 위하여 pGEM-T Easy 벡터(Promega, Madison,WI)(Cat. #A1360)에 서브클로닝하였다. 그 결과 생성된 플라스미드를 pGNir4c라 명명하였다.

<69> 하위 워킹은 하기 NiR 특이 프라이머를 사용하여 상위 워킹과 같이 수행하였다.

<70> Nir1c - 5' ATGCTCTCCTTCTCAGTACGTTTCCTC 3' (서열번호 28)

<71> Nir138c - 5' CAAGTTGATGCATCAAGGTGGGAGCCTAGA 3' (서열번호 29)

<72> 증폭된 3,508 bp 절편은 더 분석하기 위하여 pGEM-T Easy 벡터(Promega, Madison,WI)(Cat. #A1360)에 서브클로닝하였다. 그 결과 생성된 플라스미드를 pGN3'1이라 명명하였다.

<73> **발현 카세트 및 벡터의 제조**

<74> GUS 리포터 유전자를 사용하여 발현 분석을 위한 카세트는 다음과 같이 제조하였다. 프로모터가 없는 GUS 카세트는 pBI101을 Hind III 및 EcoR I을 가지고 분해하였고, 이를 pUC19 폴리클로닝 위치의 Hind III 및 EcoR I 위치에 삽입하였다. 그 결과 생성된 플라스미드를 pBI201이라 명명하였다. Nir 상위 서열은 상위 위치 프라이머로 키트(Universal Genome Walking Kit)의 AP2 프라이머 및 말단에 Sma I 제한효소 부위를 갖는 상용 하위 프라이머를 사용하여 증폭된 것이다. 4개의 프라이머는 하기 서열에 위치한다; 유전자의 5' UTR 부위(Nir-23r-Sam-5' AGAGCCCGGGAGAAGAGAGTGTGTTG 3' (서열번호 21)), 트랜짓 펩타이드 코딩 서열의 말단(Nir51r-Sma - 5' TTCTCCGGGGACGAGAGATGGATGGT 3' (서열번호 22)), 트랜짓 펩타이드 코딩 서열 후 50 bp (Nir158r-Sma- 5' TTCTCCGGGGTTGAA-ACAGGTGCAACTGA 3' (서열번호 23)), 트랜짓 펩타이드 코딩 서열 후 100 bp (Nir158r-Sma- 5' TTCTCCGGGTAACCATCTTTTCTCA 3' (서열번호 24)). pGNir4c 플라스미드를 주형으로 하여 정상 조건에서 증폭을 수행하였다.

<75> 증폭된 절편은 특정 제한효소로 분해하여 Nir 프로모터의 5' 결실을 생산하였다. pNir3k-23은 Xma I을 가지고 AP2 및 Nir-23r-Sma 프라이머로 이전에 증폭된 절편을 분해하여 생산되었고, 그 절편은 이전에 XmaI로 분해한

pB1201에 삽입하였다. 비슷한 방법으로, 하위 프라이머를 Nir51r-Sma, Nir103r-Sma 및 Nir158r-Sma를 사용하여 각각 pNir3k51, pNir3k103 및 pNir3k158 플라스미드를 제조하였다. pNir2.2k-23은 AP2 - Nir-23-Sma 증폭 절편을 SmaI-BglIII로 분해한 것을 Sma I 및 BamH I으로 분해한 pB1201에 삽입하여 제조되었다. 같은 방법으로 하위 프라이머를 Nir51r-Sma, Nir103r-Sma 및 Nir158r-Sma를 사용하여 각각 pNir2.2k51, pNir2.2k103 및 pNir2.2k158 플라스미드를 제조하였다. 삽입된 것의 충실성과 방향은 제한효소로 절단하여 확인하였다. 이러한 결실 절편은 pB1201의 GUS 리포터 유전자의 5'말단에 연결하고, DNA 충격을 이용한 일시적 발현 연구에 사용하였다. 적합한 결실 절편을 확인하면 pB1101(Clontech)과 같은 이진 식물 발현 벡터에 서브클로닝하였다.

<76> NiR 프로모터 이외에 GUS 유전자의 NiR 터미네이터 하위를 포함하는 카세트를 제조하기 위하여, 하기 NiR 특이 프라이머를 사용하였다.

<77> Nir2514c-Sac - 5' AGAAGAGCTCAGTATATAGGTATTTGGTGA 3' (서열번호 30)

<78> Nir2728c-Sac - 5' AGAAGAGCTCTTGTACATTTGGATAAGTCA 3' (서열번호 31)

<79> Nir3029r-Eoc - 5' AGAAGAATTCGTTTTCCCGATACTTCAACT 3' (서열번호 32)

<80> 617 bp 터미네이터 절편은 Nir2514c-Sac 및 Nir3029r-Eoc 프라이머를 사용하여 증폭된 것이고, 503 bp 터미네이터 절편은 Nir2728c-Sac 및 Nir3029r-Eoc 프라이머를 사용하여 증폭된 것이다. 상기 절편은 Sac I 및 EcoR I으로 분해하고, Sac I 및 EcoR I 위치의 사이에 NOS 터미네이터를 결실시킨 후 NiR-GUS 컨스트럭트를 포함하는 플라스미드에 삽입하였다.

<81> 이러한 재조합 플라스미드는 하기한 바와 같이 A. 투메파시엔스를 통한 안정한 삽입을 위하여 사용되었다.

<82> **아그로박테리아-매개 DNA 전달 및 형질전환 엘펠퍼의 재생**

<83> 재조합 플라스미드를 하우디(Khoudi et al., 1997, *Gene*, 197:343-351)의 방법에 따라 전기충격법으로 아그로박테리아 투메파시엔스 LBA4404에 삽입하였다. 선별된 아그로박테리아 균주는 유전자형 C5-1으로부터 선별강압(카나마이신) 없이 4일 동안 일 디스크와 공동재배하였다. 이러한 유도 시기 다음에, 일 디스크를 세척하고 키워, 이를 B5H 배지에서 캘러스가 생성되게 하였다. 캘러스는 배아 유도를 위해서는 21일 동안 SH 배지에서 및 배아 발생을 위해서는 28일 동안 키웠다. 어뢰 모양의 배아는 Boi2Y로부터 잘라내어, 재생을 위하여 MS 배지에 놓았다. 카나마이신은 MS에 공동-재배 및 재생을 위해서는 제외하고는 모든 재배 배지에 존재하였다. 상기 방법은 데스가그네스(Desgagnes et al., 1995, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 42:129-140)에 기재되었다. 뿌리가 있는 모종은 온실에서 성숙하도록 키웠다. 형질전환 유전자의 삽입은 게놈 DNA로부터 NiR-GUS 절편의 PCR 증폭으로 확인하였다. 하기의 프라이머를 사용하였다.

<84> Nir-102c- 5' CACACTTCTCACTCACCTCTCAA 3' (서열번호 25)

<85> Nir-2016c- 5' ATCTAGGAGGGGCAGACATTG 3' (서열번호 26)

<86> GUS228r- 5' TCGGTATAAAGACTTCGCGTGAT 3' (서열번호 27)

<87> **아그로박테리아-매개 DNA 전달 및 형질전환 단배의 재생**

<88> 재조합 플라스미드를 하우디(Khoudi et al., 1997, *Gene*, 197:343-351)의 방법에 따라 전기충격법으로 아그로박테리아 투메파시엔스 균주 LBA4404에 삽입하였다. 선별된 아그로박테리아 균주는 유전자형 C5-1으로부터 카나마이신 없이 2일 동안 일 디스크와 공동재배하였다. 이 기간 후에 외식체(explants)를 선별 배지(카나마이신이 있는 MS)에 옮겼다. 외식체를 3주 동안 상기 배지에 뒤서, 감염된 세포로부터 캘러스 및 싹(shoots)이 형성되게 하였다. 카나마이신 저항 싹은 루팅(rooting) MS 배지에 옮겼다. 뿌리가 있는 모종은 온실에서 성숙 때까지 키웠다. 형질전환 유전자의 삽입은 게놈 DNA로부터 NiR-GUS 절편의 PCR 증폭으로 확인하였다. 하기의 프라이머를 사용하였다.

<89> Nir-102c- 5' CACACTTCTCACTCACCTCTCAA 3' (서열번호 25)

<90> Nir-2016c- 5' ATCTAGGAGGGGCAGACATTG 3' (서열번호 26)

<91> GUS228r- 5' TCGGTATAAAGACTTCGCGCTGAT 3' (서열번호 27)

<92> **질산염 유도**

<93> 형질전환 및 비-형질전환 담배 및 앨펠퍼 식물을 질석(vermiculite) 배지에서 질산염 없이 키웠다. 무기질 균형은 질산염이 없는 호아그랜드 용액(Hoagland and Varnon, 1950, Circular, 347, California Agr. Exp. Stat. Berkeley)을 반복적으로 첨가하여 유지하였다. 질산염 유도는 20-20-20 비료를 5g/L의 농도로 또는 40 mM 질산염이 함유된 호아그랜드 용액으로 식물에 물을 주어 수행하였다.

<94> **담배 잎에서 NiR 프로모터 활성화**

<95> NiR 유래 프로모터를 전사 및 번역 융합에서 GUS 리포트 유전자의 상위에 위치시켰다. 분석된 NiR 프로모터의 5' 결실은 (1) 코딩 부위의 초기 ATG의 2,813 bp를 포함하는 추정되는 완전한 길이의 프로모터, (2) 프로모터의 1,905 bp 버전, 및 (3) 프로모터의 1,905 bp 버전으로 구성된다. 프로모터의 3' 끝은 GUS 코딩 부위의 5' 끝과 융합하여 전사 및 번역 융합을 형성한다. 분석된 번역 융합은 (1) NiR 클로로플라스트 트랜짓 펩타이드, (2) NiR로부터 추가로 17 아미노산을 갖는 NiR 트랜짓 펩타이드, 및 (3) NiR로부터 추가로 36 아미노산을 갖는 NiR 트랜짓 펩타이드를 포함하는 β-글루쿠로니다제를 생산하게 한다. 담배 식물에 도입한 NiR 프로모터의 5' 및 3' 결실의 12개 조합을 도 1에 나타내었다.

<96> 유전자 컨스트럭트를 아그로박테리아 감염 방법(Khoudi et al., 1997, *Gene*, 197:343-351)을 사용하여 담배에 전달하였다. 형질전환 식물은 성장 챔버에 옮기고, 질산염 시비 전 및 후의 그들의 잎 β-글루쿠로니다제 성분을 분석하였다. 도 1은 모종의 1차 확장 잎에서 측정된 β-글루쿠로니다제 활성의 중간 수준을 나타낸 것이다.

<97> 모든 NiR 유래 프로모터는 질산염 유도에 반응성을 나타내었다. β-글루쿠로니다제 발현의 5 내지 10 배 사이의 증가가 프로모터의 잘린 것에 상관 없이 보통 관찰되었고, 중요한 질산염 반응 요소가 초기 ATG의 처음 1.1 kb에 포함되어 있다는 것을 나타낸다. NiR 프로모터의 5' 및 3' 결실은 β-글루쿠로니다제 활성의 중요한 변형을 일으킨다. GUS 발현의 최고 수준은 2.8 kb 프로모터에서 나타났고, 이는 상위 부위는 잎에서 NiR 발현의 수준을 조절하는 역할을 한다는 것을 나타낸다.

<98> 프로모터의 GUS 코딩 부위에 번역 융합은 프로모터의 5' 끝의 연장에 따라 여러 발현 수준을 나타낸다. 그러나, 가장 짧은 융합(17 아미노산 NiR 트랜짓 펩타이드가 β-글루쿠로니다제의 아미노-말단 끝에 융합)은 모든 3개의 5' 끝 잘린 것중에서 가장 높은 활성을 나타낸다. 이러한 짧은 번역 융합은 상위 프로모터 부위의 가장 긴 연장과 결합하여 가장 강력한 프로모터(3 kb + 50)가 생긴다. 유도되었을 때, 이러한 특정 컨스트럭트는 35S-GUS-NOS 컨스트럭트를 가지고 얻은 GUS 발현 수준의 13 배 이상이 나타난다.

<99> 프로모터의 가장 긴 5' 연장을 살펴보면, GUS 유전자에 전사 융합(3 kb - 5)은 짧은 번역 융합(3 kb + 50)에 비해 7배 정도 효과가 적다. 그러나, 유도된 상에서는, 3 kb - 5 프로모터 결실을 포함하는 식물에서 GUS 발현 수준은 35S-GUS-NOS 식물에서 관찰되는 것보다 1.8 배 높다.

<100> 상기 결과는 앨펠퍼 NiR 유전자의 상위 서열은 담배 잎에서 엑소지너스 유전자를 과-유도 발현시킬 수 있다.

<101> **NiR 터미네이터의 효율**

<102> 담배 식물은 NiR 프로모터 및 결실(서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 5 및 서열번호 6), 35S, 3'UTR 서열 및 터미네이터(서열번호 15, 서열번호 16)을 포함하며 리포트 유전자 GUS의 전사 및 종결을 유도하게 기능적으로 위치한 컨스트럭트로 형질전환 시켰다. 성장, 질산염 유도 및 GUS 활성 측정은 도 1에 나타낸 실험마다 수행하였다. 도 2에 나타낸 결과는 Nir 터미네이터 서열은 전사를 종결하여 번역가능한 mRNA가 되게 한다.

<103> **앨펠퍼 잎에서 NiR 프로모터 활성화**

<104> 도 3에 나타낸 유전자 컨스트럭트를 포함하는 형질전환 앨펠퍼 식물은 데스가그네스의 아그로박테리아-매개 감염 방법(Desgagnes et al., 1995, *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 42:129-140)을 사용하여 제조하였다. 시험

관 내(*in vitro*) 식물을 성장 챔버로 옮겨 정상적 식물 성장이 되게 하였다. 각각의 형질전환 식물로부터 잘라낸 것을 질석에서 성장시키고, 질산염 없는 호아그랜드 배지로 시비하였다. 2주 후에, 뿌리를 니트라진(Nitragin, LiphaTech inc., Milwaukee, WI)으로 접종하였다. 접종 2주 후에, 혹은 뿌리에서 성장시켰다. β-글루쿠로니다제의 형광 측정 전(유도 전)에 뿌리가 있는 식물은 적어도 1주 동안 식물 성장을 지속시켰다. 측정 후에, 식물은 40 mmol KNO<sub>3</sub>를 포함하는 호아그랜드 배지로 물을 주었다. 유도 2일 후, 잎 β-글루쿠로니다제 활성을 측정하여 앨펠퍼 잎에서 NiR 프로모터의 질산염 유도성을 평가하였다. 결과는 도 3에 나타내었다. 프로모터 NiR은 흑이 있는 앨펠퍼 식물에서 질산염의 첨가로 GUS 리포터 유전자의 발현을 유도한다는 것을 나타낸다. 상기 결과로부터, 대기중 질소의 고정이 질산염 동화로 바뀌면, NiR 프로모터 유도성은 앨펠퍼 식물에서 외래 유전자의 발현을 조절하는데 사용될 수 있다.

<105> 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명은 더 이상의 변형이 가능하고, 이러한 응용은 여러 변화, 용도 또는 본 발명의 개작을 포함하고, 본 발명의 원리 및 본 명세서에 의해 당업자가 알 수 있는 모든 것을 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

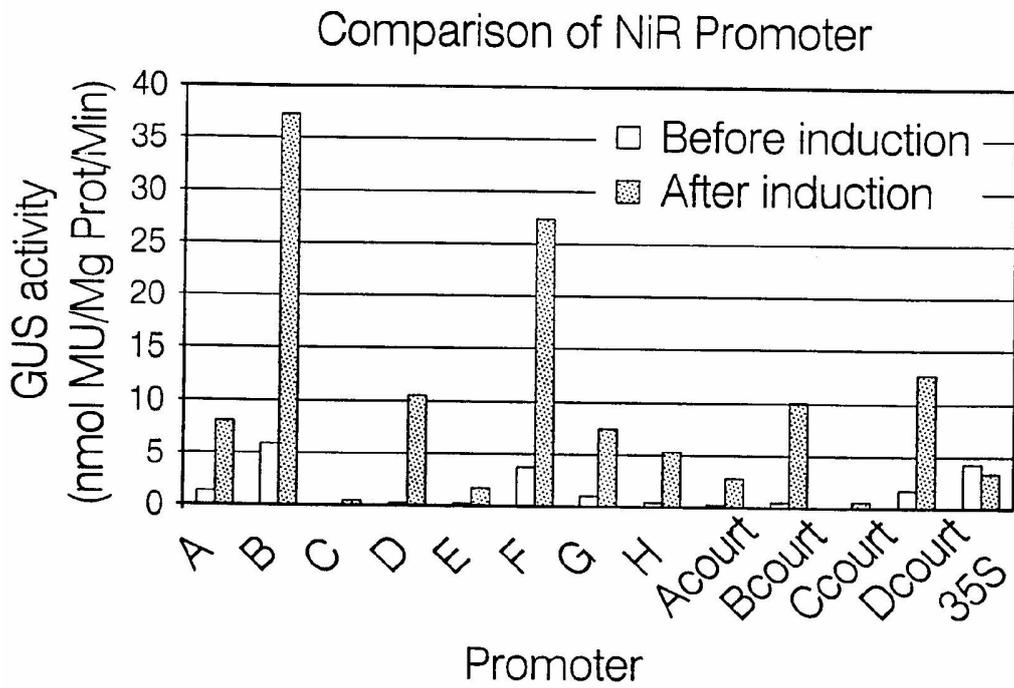
<50> 도 1은 식물에 질산염 시비 전(빈 막대) 및 시비 후(채워진 막대)에 형질전환 담배 식물의 잎에서 프로모터 Nir(서열번호 2 내지 서열번호 13) 및 터미네이터 NOS를 사용하여 GUS 발현 수준을 나타낸 것이다. 하기 재료 및 방법에 기재된 것과 같이 GUS 리포터 유전자의 전사 및 종결을 조절하기 위하여 기능적으로 위치한 앨펠퍼 NiR 프로모터 및 NOS 터미네이터의 완전한 길이 및 결실된 형태가 담배 식물에 형질전환되어 있다. GUS 활성은 제퍼슨(Jefferson et al., 1987, *EMBO J.* 13:3901-3907)의 방법에 따라 질산염 유도 전 및 후에 측정하였다.

<51> 도 2는 식물에 질산염 시비 전(빈 막대) 및 시비 후(채워진 막대)에 형질전환 담배 식물의 잎에서 프로모터 Nir(서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 5, 서열번호 6) 및 터미네이터 Nir(서열번호 15, 서열번호 16)을 사용하여 GUS 발현 수준을 나타낸 것이다. 하기 재료 및 방법에 기재된 것과 같이 GUS 리포터 유전자의 전사 및 종결을 조절하기 위하여 기능적으로 위치한 앨펠퍼 NiR 프로모터 및 NiR 터미네이터의 완전한 길이 및 결실된 형태가 담배 식물에 형질전환되어 있다. GUS 활성은 제퍼슨(Jefferson et al., 1987, *EMBO J.* 13:3901-3907)의 방법에 따라 질산염 유도 전 및 후에 측정하였다.

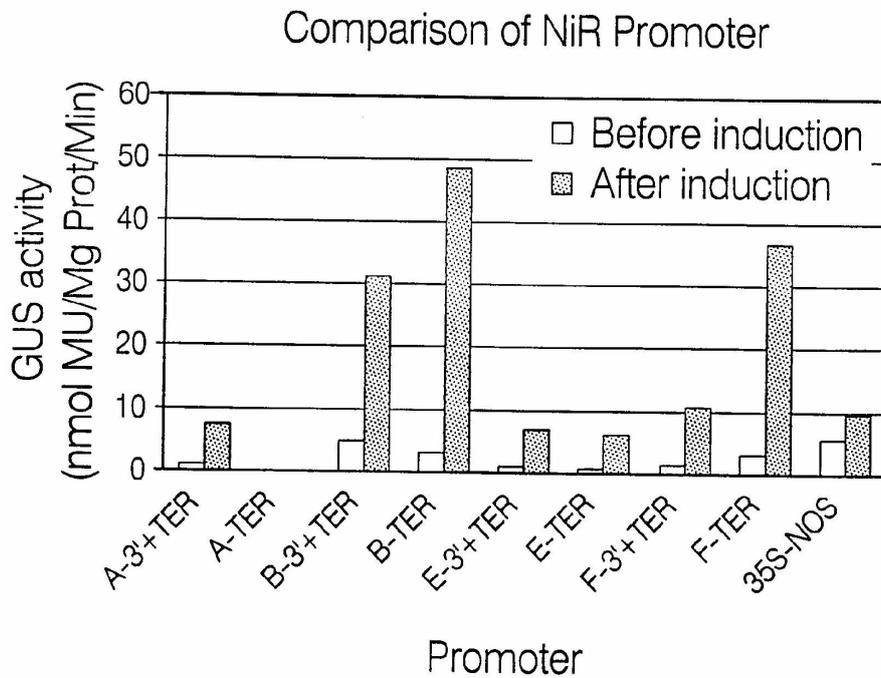
<52> 도 3은 식물에 질산염 시비 전(빈 막대) 및 시비 후(채워진 막대)에 흑이 있는 형질전환 앨펠퍼 식물의 잎에서 프로모터 Nir 및 터미네이터 NOS를 사용하여 GUS 발현 수준을 나타낸 것이다. 하우디(Khoudi et al., 1997, *Gene*, 197:343-351)의 방법에 따라, 리포터 유전자 GUS의 발현을 유도하기 위하여 기능적으로 위치한 컨스트럭트 GC2-E, GC2-B, DC1-D 및 35S를 앨펠퍼 유전자형 11.9에 형질전환시켰다. 재생 후에, 형질전환 식물을 멸균된 질석에 옮기고, 리조비움 균주 발작(Rhizobium strain Balzac; Nitragin)에 접종하였다. 상기 식물을 질산염이 없는 호아그랜드 용액(Hoagrand's solution)을 반복적으로 첨가하며 3주 동안 키웠다. GUS 활성은 제퍼슨(Jefferson et al., 1987, *EMBO J.* 13:3901-3907)의 방법에 따라 1차 완전 확장된 잎에서 측정하였다. 상기 식물은 이를 동안 40 mM 질산염으로 시비하였다. GUS 활성을 1차 완전 확장된 잎에서 다시 측정하였다. 여기에 나타낸 데이터는 질산염 유도 후 및 전의 GUS 특이 활성 사이의 비율이다.

도면

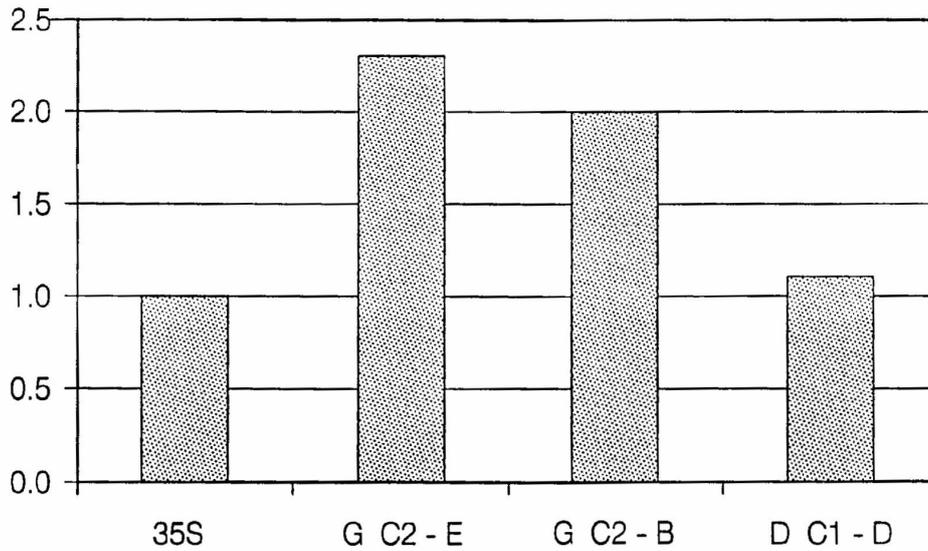
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> MEDICAGO INC.

<120> Method for regulating transcription of foreign genes

<130> 2FPI-03-04

<150> US 60/157,133

<151> 1999-10-04

<160> 32

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 3714

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Sequences to be used as promoter for regulating expression of foreign genes

<400> 1

```

ctgtacattc atcttgccgc ctttgcattc acttggecac aaagagtaga gagaaggaag      60
agaagagccc agacttcaag aagcgacctt gcaagtgcac tcgaggggtca gaaactgtat      120
atcatatcta tggagagaa aggggaacat ttgagatgga gtccatttac ttgaggtata      180
cttattattt tgatcaataa atttgtatac ttcttattta gatcaataaa ttgtcatta      240
agctataatc caaataaat tacgatcaaa tatgcaaatg ttagccagta cttgtgttaa      300
acttgatggc atctcttggf ttctttggca atcacatgcc taagaataaa atagtatcat      360
atgatttgtt ttggtcagac ttcagagtca
gatgactctg tttggataaa cagcttaatt      420
    
```

aagcgttat agaatacat atgattgtgt ttggtcagac ttcagagcat ctcttggttt 480  
ctctggcaat catatgccta agaaataaat agtatcatat gattgtgttt ggtcagactt 540  
cagagtcaga tgacctgtt tgggtaaacac gcttaattaa gtgcttatag aataagcgt 600  
tatcatataa gtgcttttgt acagttatit ctatgaaagt agaagaaata gtcataatgt 660  
tttaataataa gctatcctgg agagcttgtg gaaataacca gaaaagaact tatggacacg 720  
tcatgagctg tttacataag atctccctaa cagtctcaaa agtgtttatg ccagtagata 780  
  
aattcaaata agtcaatcta aacagaccct aaatccatta tggtagctat cattttagct 840  
tattccatct ttattaagaa tgtcatgaga taacataatg ataacacatt attttgacac 900  
aaatgggcag atctagcaat ttaactctgg agtcttcaa gactgctgtt ctacgaagt 960  
tcacgtccct gaatcatgtt cctgtatgga agcctgaaag acctcaaatt ctaaaagggtg 1020  
gcgataaatt gaaggtttac aaaatatacc ctgcccgtt gacacagagg caagctcttt 1080  
ataccttcca gttcaacggg gatgttgatt tcagaagtca cttggagagc aatccttgtg 1140  
ccaagtttga agtaatttt gtgtagcata tgttagcta  
cctacaattt acatgatcac 1200  
ctagcattag ctctttcact taactgagag aatgaagttt taggaatgag tatgaccatg 1260  
gagtcggcat ggctttgtaa tgcctaccct actttggcca actcatcggg gatttacatt 1320  
cagaaaatat acatgacttc aaccataactt aaacccttt ttgtagata actgaatgtt 1380  
catatttaat gttgggttgt agtgttttta ctgtattata tccagacagt tacaagtgg 1440  
acaacaagat tgtgggtctg tactgttatt tttttatit ttttttagca gaaacacctt 1500  
atcttttgtt tcgtttgaat gtagaatgaa aataaaagaa agaaaatata acatcatcgg 1560  
ccgcgttgt  
ctaatttcgg gcagtttaga tcctctccgg tcaccgaaa gtttcagtag 1620  
aagaaacaaa acaccgtgac taaaatgata ctattatit atttattgtg tttttctttt 1680  
ttctaccgga actttttaga acggatcca actcgttccg gggccgtac aactgaacaa 1740  
aaagaagata tttctctct cttcagaaat glaagttttc ctttacagat acccattcac 1800  
catttgattc agatgtgggt actagagata aagcactata atttgactct tggaaacca 1860  
taaagtttat gttatccgtt ttctggacca atccactgg gggcataacc tgtgtctatg 1920  
tgtggtttgg tttccattct gatttatgcg gcgacttga atttaaaatc  
taggaggggc 1980  
agacattgaa caatcccaat attttaataa cttatgcaag atttttttta ttaatgagat 2040  
gatgtgtttg tgactgagat tgagtcatac atttcactaa gaaatggttc caagtaccaa 2100  
actatcatga cccagttgca aacatgacgt tcgggagttg tcactttgat agttcaattt 2160  
catcttggct tcttattcct tttataattc taattcttct tgtgtaaact atttcatgta 2220  
ttatitttct ttaaaatita catgtcattt attttgctc actaactcaa ttttgcatat 2280  
aacaatgata agtgatattt tgactcaaa aatttacatc aaatttcgac atcgtttatt 2340  
atgttcattg gatgattaac  
aaatataaca aactttgcaa ctaattaacc accaactgaa 2400  
tataattaac tataactgtg aaagtgtta accatattt ttagatgtat atatcatcgg 2460  
ttgaatgtaa ttattcatat atttgaacta agttacccta caacttaaag aacttaaaga 2520  
actcggtttg agacctgggg acgaaaatgt aatgagactt taatgttgac tttgacaccg 2580  
caccatgt gccttttaca tatagtttat atgacaagta atgacaatcc ttgctctatt 2640  
ataagcgcac ccttagctcc aaccaaagga cgatggagtt aagaagaaa ctcttgctta 2700  
cttgtaaggc ccacattct tcaactcact ctcaattca tcctacaaaa atgtccaac  
2760  
ttctctttct cacaatcaca aactcattcc aaacacactc tcttctccaa aatgtcttc 2820  
cttctcagta cgtttctca ccccaccatc catctctcgt cccaacaaaa catggctact 2880  
atctgctgca acatccatcag ttgcacctgt ttcaacacca caagttgat catcaagggt 2940  
ggagcctaga gttgaggaaa aagatggttta ctgggttttg aaggaagagt atagaggggg 3000  
tattaatcct caggagaaa ttaagattca gaaagaacct atgaagcttt ttatggaagg 3060  
tgggattaat gatttggcta atatgtctct tgaagagatt gaaagctcta agcttactaa 3120  
agatgatatt gatgttagac ttaaatggct  
tggcttttt catagaagga aacatcattg 3180  
taagttttt taccttcttt ttatacctca aagttctctc atactctgta tttgtttatt 3240  
agtttttgta gacttaataa ttctctttga ttacatagt gaaactccat tttgtttcc 3300  
gaaattgtag tgtgtatagt ctagaaaat aagaagtaga caaatgatt tatgagattg 3360  
taaatgtag gctttttatc aatttattaa ttttagagac caaatttgc ctatcttatt 3420

tggaccaata ttgtatgtca ggatcgacat gaggtttagta aatcatgac ggcacatga 3480  
 ctgtgttgaa gcttctttgt gtaactttaa ccaaaattat atggcacacc ataattatgc 3540

aaactcaccg tcgatccaaa catagaaatt cgggtgtaat ctttgtgaga ataaaaagct 3600  
 atgagttatg ttgtactaat ttatttccat tgtgaaaatc agatggtaga tttatgatga 3660  
 gactgaaact tccaatggg gtaacaacaa gtgctcaaac aagatacttg gcga 3714

<210> 2

<211> 2808

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequences to be used as promoter for regulating expression of foreign genes

<400> 2

ctgtacattc atcttgccgc ctttgcattc acttggccac aaagagtaga gagaaggaag 60  
 agaagagccc agacttcaag aagcgacctt gcaagtgcac tcgagggtca gaaactgtat 120  
 atcatatcta tgtgagagaa aggggaacat ttgagatgga gtccatttac ttgaggtata 180  
 ctattatttt tgatcaataa atttgtatac ttcttattta gatcaataaa tttgtcatta 240  
 agctataatc caaaataaat tacgatcaaa tatgcaaatg ttagccagta ctgtgttaa 300  
 acttgatggc atctcttggg ttctttggca atcacatgcc taagaataa atagtatcat 360  
 atgattgtgt ttggtcagac ttcagagtca  
 gatgactctg ttggataaa cagcttaatt 420  
 aagcgcttat agaatatcat atgattgtgt ttggtcagac ttcagagcat ctcttggttt 480  
 ctctggcaat catatgecta agaaataaat agtatcatat gattgtgttt ggtcagactt 540  
 cagagtcaga tgaccctgtt tgggtaaaca gcttaattaa gtgcttatag aataagcgct 600  
 tatcatataa gtgcttttgg acagttattt ctatgaaagt agaagaaata gtcattttgt 660  
 ttaataataa gctatcctgg agagcttggg gaaataacca gaaaagaact tatggacacg 720  
 tcatgagctg tttacataag atctccctaa cagtctcaaa agtgtttatg ccagtagata 780

aattcaata agtcaatcta aacagacctt aaatccatta tggtagctat catttttagct 840  
 tattccatct ttattaagaa tgtcatgaga taacataatg ataacacatt attttgacac 900  
 aaatgggcag atctagcaat ttaactctgg agtccctcaa gactgctgtt cttacgaagt 960  
 tcacgtccct gaatcatgtt cctgtatgga agcctgaaag acctcaaatt ctaaaagggtg 1020  
 gcgataaatt gaaggtttac aaaatatacc ctgcgggctt gacacagagg caagctcttt 1080  
 ataccttcca gttcaacggg gatgttgatt tcagaagtca cttggagagc aatccttgtg 1140  
 ccaagtttga agtaattttt gtgtagcata tgttagctca

cctacaattt acatgatcac 1200  
 ctagcattag ctctttcact taactgagag aatgaagttt taggaatgag tatgaccatg 1260  
 gagtcggcat ggctttgtaa tgccctacct actttggcca actcatcggg gatttacatt 1320  
 cagaaaaat acatgacttc aaccataact aaacccttt ttgtaagata actgaatgtt 1380  
 catatttaat gttgggttgt agtgttttta cttgattata tccagacagt tacaagtgg 1440  
 acaacaagat tttgggtctg tactgttatt tttttttt ttttttagca gaaacacctt 1500  
 atcttttgtt tcgttttgaat gtagaatgaa aataaaagaa agaaaatata acatcatcgg 1560  
 ccgccttgt

ctaatttcgg gcagtttaga tcctctccgg tcaccgaaa gtttcagtag 1620  
 aagaaacaaa acaccgtgac taaaatgata ctattatttt atttattgtg tttttctttt 1680  
 ttctaccgga actttttaga acggatcca actcgttccg gggccgctac aactgaacaa 1740  
 aaagaagata ttttctctct cttcagaaat gtaagttttc ctttacagat acccattcac 1800  
 cttttgattc agatgtgggt actagagata aagcactact atttgactct tggaaaccca 1860  
 taaagtttat gttatccgtg ttctggacca atccacttgg gggcataacc tgtgtctatg 1920  
 tgtggtttgg tttcattct gatttatgcg gcgacttga atttaaaatc

taggaggggc	1980		
agacattgaa caatccaat attttaataa cttatgcaag attttttta ttaatgagat			2040
gatgtgtttg tgactgagat tgagtcatac atttcactaa gaaatggttc caagtaccaa			2100
actatcatga cccagttgca aacatgacgt tcgggagtgg tcactttgat agttcaattt			2160
catcttggct tcttattcct ttataaattc taattcttct tgtgtaaact atttcatgta			2220
ttatTTTTct ttaaaattta catgtcattt attttgctc actaactcaa ttttgcata			2280
aacaatgata agtgatattt tgactcacia aatttacatc aaatttcgac atcgtttatt			2340
atgttcattg gatgattaac			
aaatataaca aactttgcaa ctaattaacc accaactgaa	2400		
tataattaac tataactgtg aaagtagtta accatatTTT ttagatgtat atatcatccg			2460
ttgaatgtaa ttattcatat atttgaacta agttaccta caacttaaag aacttaaaga			2520
actcggtttg agacctgggg acgaaaatgt aatgagactt taatgttgac ttigacaccg			2580
caccacatgt gccttttaca tatagtttat atgacaagta atgacaatcc ttgctctatt			2640
ataaggcgac ccttagctcc aaccaaaagga cgatggagtT aagaaagaaa ctcttgctta			2700
cttctaaggt ccacacttct tcactcacct ctcaatttca tctacaaaa atgtccaac			
	2760		
ttctctttct cacaatcaca aactcattcc aaacacactc tcttctcc			2808
<210>	3		
<211>	2069		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220>			
<223>	Sequences to be used as promoter for regulating expression of foreign genes		
<400>	3		
gatctcccta acagtctcaa aagtgtttat gccagtagat aaattcaaat aagtcaatct			60
aaacagacc taaatccatt atggfaccta tcattttagc ttattccatc tttattaaga			120
atgtcatgag ataacataat gataacacat tttttgaca caaatgggca gatctagcaa			180
tttaactctg gagtccctca agactgctgt tcttacgaag ttcacgtccc tgaatcatgt			240
tcctgtatgg aagcctgaaa gacctcaaat tctaaaaggT ggcgataaat tgaaggttta			300
caaaatatac cctcggggct tgacacagag gcaagctctt tataccttcc agttcaacgg			360
ggatgttgat ttcagaagtc acttggagag			
caatccttgt gccaaagttg aagtaatttt	420		
tgtgtagcat atgttgagct acctacaatt tacatgatca cctagcatta gctctttcac			480
ttaaactgaga gaatgaagtt ttaggaatga gtatgacat ggagtcggca tggctttgta			540
atgcctacc tactttggcc aactcatcgg ggatttcat tcagaaaata tacatgactt			600
caaccatact taaccctt tttgtaagat aactgaatgt tcatattta tgttgggtt			660
tagtgtttt acttgattat atccagacag ttacaagttg gacaacaaga ttgtgggtct			720
gtactgttat ttatttattt ttttttagc agaaacacct tatcttttgt ttcgtttgaa			780
tgtagaatga aaataaaaga aagaaaatat aacatcatcg gccgcgcttg tctaatttcg			840
ggcagttagg atcctctccg gtcaccggaa agtttcagta gaagaacaa aacaccgtga			900
ctaaaatgat actattattt tttttattgt gttttcttt tttctaccgg aactttttag			960
aacggatccc aactcgttcc ggggccgcta caactgaaac aaaagaagat attttctctc			1020
tcttcagaaa tgtaagttt cctttacaga taccattca ccatttgatt cagatgtggt			1080
gactagagat aaagcactact aatttgactc ttggaaacce ataaagttta tgttatccgt			1140
gttctggacc aatccacttg ggggcataac ctgtgtctat			
gtgtggtttg gtttccattc	1200		
tgatttatgc ggcgacttgt aatttaaaat ctaggagggg cagacattga acaatcccaa			1260
tattttaata acttatgcaa gattttttt attaatgaga tgatgtgttt gtgactgaga			1320
ttgagtcata catttacta agaaatggtt ccaagtacca aactatcatg acccagttgc			1380

aaacatgacg ttcgggagtg gtcactttga tagttcaatt tcatcttggc ttctttatcc 1440  
 ttttataatt ctaattcttc ttgtgtaaac ttttcatgt attattttcc tttaaaattt 1500  
 acatgtcatt tttttgctt cactaactca attttgcata taacaatgat aagtgatatt 1560  
 ttgactcaca  
 aaatttacat caaatttcga catcgtttat tatgttcatt ggatgattaa 1620  
 caaatataac aaactttgca actaattaac caccaactga atataattaa ctataactgt 1680  
 gaaagtagtt aaccatattt ttttagatgta tatatcatcc gttgaatgta attattcata 1740  
 ttttgaact aagttaccct acaacttaaa gaacttaaag aactcggttt gagacctggg 1800  
 gacgaaaatg taatgagact ttaatgttga ctttgacacc gcaccacatg tgccttttac 1860  
 atatagttta tatgacaagt aatgacaatc cttgctctat tataaggcga cccttagctc 1920  
 caaccaagg acgatggagt taagaagaa actcttgctt acttgaagg  
 tccacacttc 1980  
 ttcactcacc tctcaatttc atcctacaaa aatgtccaaa cttctcttcc tcacaatcac 2040  
 aaactcattc caaacacact ctctctcc 2069

<210> 4

<211> 1220

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequences to be used as promoter for regulating expression of foreign genes

<400> 4

gatcctctcc ggtcaccgga aagtttcagt agaagaaaca aaacaccgtg actaaaatga 60  
 tactattatt ttatttatgt tgtttttctt ttttctaccg gaacttttta gaacggatcc 120  
 caactcgttc cggggccgct acaactgaaa caaagaaga tttttctct ctcttcagaa 180  
 atgtaagttt tcttttacag ataccattc accatttgat tcagatgtgg tgactagaga 240  
 taaagcatac taatttgact cttggaaacc cataaagttt atgttatccg tgttctggac 300  
 caatccactt gggggcataa cctgtgtcta tgtgtggttt ggtttccatt ctgatttatg 360  
 cggcgacttg taatttaaaa tctaggaggg  
 gcagacattg aacaatccca atattttaat 420  
 aacttatgca agatttttt tattaatgag atgatgtgtt tgtgactgag attgagtcat 480  
 acatttcact aagaaatggt tccaagtacc aaactatcat gaccagttg caaacatgac 540  
 gttcgggagt ggtcactttg atagttcaat ttcacttgg cttcttattc cttttataat 600  
 tctaattctt cttgtgtaa ctatttcatg tattatttt ctttaaaatt tacatgtcat 660  
 ttattttgce tctaactc aattttgcat ataacaatga taagtgatat tttgactcac 720  
 aaaatttaca tcaaatctcg acatcgttta ttatgttcat tggatgatta acaaatataa 780  
  
 caaactttgc aactaattaa ccaccaactg aatataatta actataactg tgaaagtagt 840  
 taacatattt ttttagatgt atatatcatc cgttgaatgt aattattcat atatttgaac 900  
 taagtacc tacaacttaa agaacttaa gaactcggtt tgagacctgg ggacgaaaat 960  
 gtaatgagac tttaatgttg actttgacac cgcaccacat gtgcctttta catatagttt 1020  
 atatgacaag taatgacaat ctttgcctta ttataaggcg acccttagct ccaaccaaaag 1080  
 gacgatggag ttaagaaga aactcttgc tacttgaag gtccacactt ctactcac 1140  
 ctctcaattt catcctaaa aaatgtccaa acttctcttt  
 ctcaaatca caaactcatt 1200  
 ccaaacacac tctctctcc 1220

<210> 5

<211> 2863

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequences to be used as promoter for regulating expression of foreign genes

<400> 5

```

ctgtacattc atcttgccgc ctttgattc acttggccac aaagagtaga gagaaggaag      60
agaagagccc agacttcaag aagcgacctt gcaagtgcac tcgagggtca gaaactgtat      120
atcatatcta tgtgagagaa aggggaacat ttgagatgga gtccatttac ttgaggtata      180
cttattattt tgatcaataa atttgtatac ttcttattta gatcaataaa ttgtcatta      240
agctataatc caaataaat taccgatcaa tatgcaaatg ttagccagta ctgtgttaa      300
acttgatggc atctcttggc ttcttggca atcacatgcc taagaaataa atagatcat      360
atgattgtgt ttggtcagac ttcagagtca
gatgactctg ttggataaa cagcttaatt      420
aagcgcttat agaatalcat atgattgtgt ttggtcagac ttcagagcat ctcttggttt      480
ctctggcaat catatgccta agaaataaat agtatcatat gattgtgttt ggtcagactt      540
cagagtcaga tgacctgtt tgggtaaca gcttaattaa gtgcttatag aataagcgct      600
tatcatataa gtgcttttgt acagttattt ctatgaaagt agaagaaata gtcatttgt      660
tttaataata gctatctcgg agagcttgtg gaaataacca gaaaagaact tatggacacg      720
tcatgagctg ttacataag atctccctaa cagtctcaaa agtgtttatg ccagtagata      780

aattcaaata agtcaatcta aacagaccct aatccatta tggtagctat cttttagct      840
tattccatct ttattaagaa tgtcatgaga taacataatg ataacacatt atttgacac      900
aatgggcag atctagcaat ttaactctgg agtcttcaa gactgctgtt ctacgaagt      960
tcacgtccct gaatcatgtt cctgtatgga agcctgaaag acctcaaatt ctaaaagggtg      1020
gcatataaatt gaaggtttac aaaatatacc ctgctggcctt gacacagagg caagctcttt      1080
ataccttcca gttaacggg gatgttgatt tcagaagtca cttggagagc aatccttgtg      1140
ccaagtttga agtaattttt gtgtagcata tgttagctta

cctacaattt acatgatcac      1200
ctagcattag ctctttcact taactgagag aatgaagttt taggaatgag tatgaccatg      1260
gagtcggcat ggctttgtaa tgacctacct actttggcca actcatcggg gatttacatt      1320
cagaaaaata acatgacttc aaccataact aaacccttt ttgtaagata actgaatgtt      1380
catatttaat gttgggttgt agtgttttta ctgattata tccagacagt tacaagtgg      1440
acaacaagat tgtgggtctg tactgttatt tttttattt ttttttagca gaacacctt      1500
atcttttgtt tcgtttgaat gtagaatgaa aataaaagaa agaaaatata acatcatcgg      1560
ccgcgcttgt

ctaatttcgg gcagttagga tcctctcggg tcaccggaaa gtttcagttag      1620
aagaaacaaa acaccgtgac taaaatgata ctattatttt atttattgtg tttttctttt      1680
ttctaccgga actttttaga acggatccca actcgttccg gggccgctac aactgaaaca      1740
aaagaagata ttttctctct ctccagaaat gtaagttttc ctttacagat acccattcac      1800
catttgattc agatgtgggtg actagagata aagcatacta atttgactct tggaaaccca      1860
taaagtttat gttatccgtg ttctggacca atccacttgg gggcataacc tgtgtctatg      1920
tgtggtttgg tttcattctt gatttatgcg gcgacttcta attttaaatac

taggaggggc      1980
agacattgaa caatcccaat attttaataa cttatgcaag atttttttta ttaatgagat      2040
gatgtgtttt tgactgagat tgagtcatac atttcactaa gaaatggttc caagtaccaa      2100
actatcatga cccagttgca aacatgacgt tcgggagtgg tcactttgat agttcaattt      2160
catcttggct tcttattcct ttataaattc taattcttct tgtgtaaact atttcatgta      2220
ttatttttct ttaaaattta catgtcattt attttgctc actaactcaa ttttgcata      2280
aacaatgata agtgatattt tgactcacia aatttacatc aaatttcgac atcgtttatt      2340
atgttcattg gatgattaac

aaatataaca aactttgcaa ctaattaacc accaactgaa      2400
tataattaac tataactgtg aaagtagtta accatatttt ttagatgtat atatcatcgg      2460
ttgaatgtaa ttattcatat atttgaacta agttacccta caacttaaag aacttaaaga      2520

```

actcggtttg agacctgggg acgaaaatgt aatgagactt taatgttgac ttigacaccg 2580  
 caccacatgt gccttttaca tatagtttat atgacaagta atgacaatcc ttgctctatt 2640  
 ataaggcgac ccttagctcc aaccaaagga cgatggagtt aagaaagaaa ctcttgctta 2700  
 cttgtaaggt ccacacttct tcactcacct ctcaatttca tcctacaaaa atgtccaac

2760

ttctctttct cacaatcaca aactcattcc aaacacactc tcttctccaa aaatgtcttc 2820  
 cttctcagta cgtttctca ccccaccatc catctctcgt ccc 2863

<210> 6

<211> 2124

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequences to be used as promoter for regulating expression of foreign genes

<400> 6

gatctcccta acagtctcaa aagtgtttat gccagtagat aaattcaaat aagtcaatct 60  
 aaacagacc taaatccatt atggfaccta tcattttagc ttattccatc ttattaaga 120  
 atgtcatgag ataacataat gataacacat tattttgaca caaatgggca gatctagcaa 180  
 tttactctg gagtcttca agactgctgt tcttacgaag ttcacgtccc tgaatcatgt 240  
 tcctgtatgg aagcctgaaa gacctcaaat tctaaaagggt ggcgataaat tgaaggttta 300  
 caaaataac cctgcgggct tgacacagag gcaagctctt tataccttcc agttcaacgg 360  
 ggatgttgat ttcagaagtc acttggagag  
 caatccttgt gccaaagttg aagtaatttt 420  
 tgtgtagcat atgttgagct acctacaait tacatgatca cctagcatta gctctttcac 480  
 ttaactgaga gaatgaagtt ttaggaatga gtatgaccat ggagtcggca tggctttgta 540  
 atgcctacc tactttggcc aactcatcgg ggatttacct tcagaaaata tacatgactt 600  
 caaccatact taacccttt tttgtaagat aactgaatgt tcatatttaa tgttgggttg 660  
 tagtgttttt acttgattat atccagacag ttacaagttg gacaacaaga ttgtgggtct 720  
 gtactgttat ttatttttt tttttttagc agaaacacct tatcttttgt ttcgtttgaa 780

tgtagaatga aaataaaaga aagaaaatat aacatcatcg gccgcgcttg tctaatttcg 840  
 ggcagttagg atcctctccg gtcaccggaa agtttcagta gaagaaacaa aacaccgtga 900  
 ctaaaatgat actattattt tattttattgt gtttttcttt tttctaccgg aactttttag 960  
 aacggatccc aactcgttcc ggggccgcta caactgaaac aaaagaagat attttctctc 1020  
 tcttcagaaa tgtaagtttt cttttacaga taccattca ccatttgatt cagatgtggg 1080  
 gactagagat aaagcactat aatttgactc ttggaaacc ataagttta tgttatccgt 1140  
 gtcttgacc aatccacttg ggggcataac ctgtgtctat

gtgtggtttg gtttccattc 1200

tgatttatgc ggcgacttgt aattttaaact ctaggagggg cagacattga acaatcccaa 1260  
 tattttaata acttatgcaa gatttttttt ataatgaga tgatgtgttt tggactgaga 1320  
 ttgagtcata catttacta agaaatggtt ccaagtacca aactatcatg acccagttgc 1380  
 aaacatgacg ttcgggagtg gtcactttga tagttcaatt tcatcttgcc ttcttatcc 1440  
 ttttataaatt ctaattcttc ttgtgtaaac tatttcatgt attatttttc tttaaaattt 1500  
 acatgtcatt tattttgctt cactaactca attttgcata taacaatgat aagtgatatt 1560  
 ttgactcaca

aaatttacct caaatttcga catcgtttat tatgttcatt ggatgattaa 1620  
 caaatataac aaactttgca actaattaac caccaactga atataattaa ctataactgt 1680  
 gaaagtagtt aaccatattt tttagatgta tatatcatcc gttgaatgta attattcata 1740  
 tatttgaact aagtaccct acaacttaa gaacttaaag aactcggttt gagacctggg 1800  
 gacgaaaatg taatgagact ttaatgttga ctttgacacc gcaccacatg tgccttttac 1860  
 atatagttta tatgacaagt aatgacaatc cttgctctat tataaggcga cccttagctc 1920

caaccaaagg acgatggagt taagaagaa actcttgctt acttgaagg  
 tccacacttc 1980  
 ttcactcacc tctcaatttc atcctacaaa aatgtccaaa cttctctttc tcacaatcac 2040  
 aaactcattc caaacacact ctctctcca aaaatgtctt ccttctcagt acgtttctc 2100  
 accccacat ccatctctcg tccc 2124

<210> 7

<211> 1160

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequences to be used as promoter for regulating expression of foreign genes

<400> 7

gatcccaact cgttccgggg cgcctacaac tgaacaaaa gaagatattt tctctctctt 60  
 cagaaatgta agttttcctt tacagatacc cattcaccat ttgattcaga tgtggtgact 120  
 agagataaag catactaatt tgactcttgg aaaccataa agtttatgtt atccgtgttc 180  
 tggaccaatc cacttggggg cataacctgt gtctatgtgt ggtttggttt ccattctgat 240  
 ttatgcggcg acttgaatt taaaatctag gaggggcaga cattgaacaa tcccaatatt 300  
 ttaataaact atgcaagatt tttttatta atgagatgat gtgtttgtga ctgagattga 360  
 gtcatacatt tactaagaa atggttccaa  
 gtaccaaact atcatgacc agttgcaaac 420  
 atgacgttcg ggagtggta ctttgatagt tcaatttcat cttggcttct tattectttt 480  
 ataattctaa ttctcttctg gtaaaactatt tcatgtatta ttttcttta aaatttacet 540  
 gtcatttatt ttgcctcact aactcaattt tgcataaac aatgataagt gatattttga 600  
 ctcaaaaaat ttacatcaaa tttcgacatc gtttattatg ttcattggat gattaacaaa 660  
 tataacaac ttigcaacta attaaccacc aactgaatat aattaactat aacttgaaa 720  
 gtagttaacc atatttttta gatgtatata tcatccgttg aatgtaatta ttcatatatt 780  
  
 tgaactaagt taccctacaa cttaaagaac ttaaagaact cggtttgaga cctggggacg 840  
 aaaatgtaat gagactttaa tgttgacttt gacaccgcac cacatgtgcc ttttacetat 900  
 agtttatatg acaagtaatg acaatccttg ctctattata aggcgacct tagctccaac 960  
 caaaggacga tggagttaag aaagaaactc ttgcttactt gtaaggtcca cacttcttea 1020  
 ctacactctc aattteatcc tacaanaatg tccaaacttc tctttctcac aatcacaac 1080  
 tcattccaaa cacactctct tctcaaaaa tgccttctt ctcagtacgt ttcctcacc 1140  
 caccatccat ctctctgccc 1160

<210> 8

<211> 2904

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequences to be used as promoter for regulating expression of foreign genes

<400> 8

ctgtacattc atcttgccgc ctttgacttc acttggccac aaagagtaga gagaaggaag 60  
 agaagagccc agacttcaag aagcgacctt gcaagtgcac tgcagggtca gaaactgtat 120  
 atcatatcta tgtgagagaa aggggaacat ttgagatgga gtcatttac ttgaggtata 180

cttattattt tgatcaataa atttgtatac ttcttattta gatcaataaa ttigtcatta 240  
 agctataate caaaataaat tacgatcaaa tatgcaaatg ttagccagta cttgtgttaa 300  
 acttgatggc atctcttggg ttctttggca atcacatgcc taagaataa atagtatcat 360  
 atgattgtgt ttggtcagac ttcagagtca  
 gatgactctg ttggataaa cagcttaatt 420  
 aagcgcttat agaatatcat atgattgtgt ttggtcagac ttcagagcat ctcttggttt 480  
 ctctggcaat catatgccta agaaataaat agtatcatat gattgtgttt ggtcagactt 540  
 cagagtcaga tgaccctgtt tgggtaaca gcttaattaa gtgcttatag aataagcgct 600  
 tatcatataa gtgcttttgt acagtattt ctatgaaagt agaagaaata gtcatatgt 660  
 ttaataataa gctatcctgg agagcttgtg gaaataacca gaaaagaact tatggacacg 720  
 tcatgagctg tttacataag atctccctaa cagtctcaaa agtgtttatg ccagtagata 780  
  
 aattcaaata agtcaatcta aacagacct aaatccatta tggtagctat ctttttagct 840  
 tattccatct ttattaagaa tgtcatgaga taacataatg ataacacatt attttgacac 900  
 aatgggagc atctagcaat ttaactctgg agtcttcaa gactgctgtt ctacgaagt 960  
 tcacgtccct gaatcatgtt cctgtatgga agcctgaaag acctcaaatt ctaaaagggtg 1020  
 gcgataaatt gaaggtttac aaaatatacc ctgctggctt gacacagagg caagctcttt 1080  
 atacctcca gttcaacggg gatgttgatt tcagaagtca cttggagagc aatccttgtg 1140  
 ccaagtttga agtaattttt gtgtagcata tgttgagcta  
 cctacaattt acatgatcac 1200  
 ctacgattag ctctttcact taactgagag aatgaagttt taggaatgag tatgaccatg 1260  
 gagtcggcat ggctttgtaa tgacctacct actttggcca actcatcggg gatttacatt 1320  
 cagaaaaat acatgacttc aaccataact aaacctttt ttgtaagata actgaatgtt 1380  
 catatttaat gtgggttgt agtgttttta cttgattata tccagacagt tacaagtgg 1440  
 acaacaagat tggggctctg tactgttatt tttttttt ttttttagca gaaacacctt 1500  
 atcttttgtt tctgttgaat gtagaatgaa aataaaagaa agaaaatata acatcatcgg 1560  
 ccgccttgt  
 ctaatttcgg gcagtttaga tctctcggg tcaccgaaa gtttcagtag 1620  
 aagaaacaaa acaccgtgac taaaatgata ctattatttt atttattgtg tttttctttt 1680  
 ttctaccgga actttttaga acggatcca actcgttccg gggccgctac aactgaacaa 1740  
 aaagaagata tttctctct cttcagaaat gtaagttttc cttacagat acccattcac 1800  
 cttttgattc agatgtgggt actagagata aagcactact atttgactct tggaaaccca 1860  
 taaagtttat gttatccgtg ttctggacca atccactgg gggcataacc tgtgtctatg 1920  
 tgtggtttgg tttccattct gatttatgcg gcgacttga atttaaaatc  
 taggaggggc 1980  
 agacattgaa caatcccaat attttaataa cttatgcaag atttttttta ttaatgagat 2040  
 gatgtgtttg tgactgagat tgagtcatac atttcactaa gaaatggttc caagtaccaa 2100  
 actatcatga cccagttgca aacatgacgt tggggagtgg tcactttgat agttcaattt 2160  
 catcttggct tcttattcct tttataattc taattcttct tgtgtaaact atttcatgta 2220  
 ttatttttct ttaaaattta catgtcattt attttgctc actaactcaa ttttgcata 2280  
 aacaatgata agtgatattt tgactcaaa aatttacatc aaatttcgac atcgtttatt 2340  
 atgttcattg gatgattaac  
 aaatataaca aactttgcaa ctaattaacc accaactgaa 2400  
 tataattaac tataactgtg aaagtgtta accatatttt ttagatgtat atatcatccg 2460  
 ttgaatgtaa ttattcatat atttgaacta agttacccta caacttaag aacttaaga 2520  
 actcggtttg agacctgggg acgaaaatgt aatgagactt taatgttgac ttgacaccg 2580  
 caccacatgt gccttttaca tatagtttat atgacaagta atgacaatcc ttgctctatt 2640  
 ataaggcgac cttagctcc aaccaaggga cgatggagt aagaagaaa ctcttgctta 2700  
 cttgtaaggc ccacacttct tcaactcact ctcaatttca tctcaaaaa atgtccaac  
 2760  
 ttctctttct cacaatcaca aactcattcc aaacacactc tcttctccaa aatgcttcc 2820  
 cttctcagta cgtttcctca ccccaccatc catctctcgt cccaacaaaa catggctact 2880  
 atctgctgca actccatcag ttgc 2904

<210> 9

<211> 2165

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequences to be used as promoter for regulating expression of foreign genes

<400> 9

```

gatctcccta acagtctcaa aagtgtttat gccagtagat aaattcaaat aagtcaatct      60
aaacagacc  taaatccatt atggtaccta tcattttagc ttattccatc ttattaaga      120
atgtcatgag ataacataat gataacacat tttttgaca caaatgggca gatctagcaa      180
tttaactctg gagtccitca agactgctgt tcttacgaag ttcacgtccc tgaatcatgt      240
tcttgtatgg aagcctgaaa gacctcaaat tctaaaagg ggcgataaat tgaaggttta      300
caaaatatac cctgcgggct tgacacagag gcaagctctt tataccttcc agttcaacgg      360
ggatgttgat ttcagaagtc acttggagag
caatccttgt gccaagttg aagtaatfff      420
tgtgtagcat atgttgagct acctacaatt tacatgatca cctagcatta gctctttcac      480
ttaactgaga gaatgaagtt ttaggaatga gtatgacat ggagtcggca tggctttgta      540
atgcctacce tactttggcc aactcatcgg ggattttacat tcagaaaaata tacatgactt      600
caaccatact taaaccctt tttgtaagat aactgaatgt tcatatftaa tgttgggttg      660
tagtgttttt acttgattat atccagacag ttacaagttg gacaacaaga ttgtgggtct      720
gtactgttat ttatftatft ttttttttagc agaaacacct tatcttttgt ttcgtttgaa      780

tgtagaatga aaataaaaga aagaaaatat aacatcatcg gccgcgcttg tctaatttcg      840
ggcagtagg  atcctctccg gtcaccggaa agtttcagta gaagaaacaa aacaccgtga      900
ctaaaatgat actattatft tatttattgt gtttttctft tttctaccgg aactttttag      960
aacggatccc aactcgttcc gggggccgcta caactgaac  aaaagaagat attttctctc      1020
tcttcagaaa tgtaagtttt cttttacaga tacccattca ccatttgatt cagatgtggg      1080
gactagagat aaagcactact aatttgactc ttggaaacct ataaagttta tgttatccgt      1140
gttctggacc aatccacttg ggggcataac ctgtgtctat

gtgtggtttg gtttccattc      1200
tgatttatgc ggcgacttgt aattftaaat ctaggagggg cagacattga acaatcccaa      1260
tattftaata acttatgcaa gatftttttt atftaatgaga tgatgtgttt tgactgaga      1320
ttgagtcata catttcacta agaaatggtt ccaagtacca aactatcatg acccagttgc      1380
aaacatgacg ttcgggagtg gtcactttga tagttcaatt tcatcttggc ttcttattcc      1440
ttttataatt ctaattcttc ttgtgtaaac tatttcatgt attatfttftc tftaaattt      1500
acatgtcatt tattttgctt cactaactca attttgcata taacaatgat aagtgatatt      1560
ttgactcaca

aaatttcat  caaatttcga catcgtttat tatgttcatt ggatgattaa      1620
caaatataac aaactttgca actaattaac caccaactga atataattaa ctataactgt      1680
gaaagtagtt aaccatattt tttagatgta tatatcatcc gttgaatgta attattcata      1740
tatttgaact aagttacctt acaactftaa gaactftaaag aactcggttt gagacctggg      1800
gacgaaaatg taatgagact ttaatgttga ctttgacacc gcaccacatg tgccttttac      1860
atatagttta tatgacaagt aatgacaatc cttgctctat tataaggcga cccttagctc      1920
caaccaaagg acgatggagt taagaaagaa actcttgcct acttftaagg

tccacacttc      1980
ttcactcacc tetcaatttc atcctacaaa aatgtccaaa cttctcttftc tcacaatcac      2040
aaactcattc caaacacact ctcttcteca aaaatgtctt ctttctcagt acgtttctc      2100
accccatcat ceatctctcg tcccaacaaa acatggetac tatctgctgc aactecatca      2160
gttgc      2165

```

<210> 10

- <211> 1316
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Sequences to be used as promoter for regulating expression of foreign genes

<400> 10

```

gatcctctcc ggtcaccgga aagtttcagt agaagaaca aaacaccgtg actaaatga      60
tactattatt ttatttattg tgtttttctt ttttctaccg gaacttttta gaacggatcc      120
caactcgttc cggggccgct acaactgaaa caaagaaga tattttctct ctcttcagaa      180
atgtaagttt tcctttacag ataccattc accattgat tcagatgtgg tgactagaga      240
taaagcatac taatttgact cttggaaacc cataaagttt atgitatccg tgttctggac      300
caatccattt gggggcataa cctgtgtcta tgtgtggttt ggtttccatt ctgatttatg      360
cggcgacttg taatttaaaa tctaggaggg
gcagacattg aacaatccca atattttaat      420
aacttatgca agatTTTTTt tattaatgag atgatgtgtt tgtgactgag attgagtcac      480
acatttcact aagaaatggt tccaagtacc aaactatcat gaccagttg caaacatgac      540
gttcgggagt ggtcactttg atagttcaat ttcactctgg cttcttattc cttttataat      600
tctaattctt cttgtgtaa ctatttcatg tattatTTTT ctttaaaatt tacatgtcat      660
ttattttgcc tctaactc aattttgcat ataacaatga taagtgatat ttgactcac      720
aaaatttaca tcaaatttcg acatcgttta ttatgttcat tggatgatta acaaatataa      780

caaactttgc aactaattaa ccaccaactg aatataatta actataactg taaaagtgt      840
taaccatatt ttttagatgt atatatcatc cgttgaatgt aattattcat atatttgaac      900
taagttacce tacaacttaa agaacttaa gaactcgtt tgagacctgg ggacgaaat      960
gtaatgagac ttaaatgtg actttgacac cgcaccacat gtgcctttta catatagttt     1020
atatgacaag taatgacaat cttgtctcta ttataaggcg acccttagct ccaaccaaag     1080
gacgatggag ttaagaaaga aactcttgct tacttgaag gtccacactt cttcactcac     1140
ctctcaattt catctacaa aaatgtccaa acttctcttt

ctcacaatca caaactcatt      1200
ccaaacacac tctcttctcc aaaaatgtct tccttctcag tacgtttcct cacccacca     1260
tccatctctc gtccaacaa aacatggcta ctatctgctg caactccatc agttgc     1316

```

- <210> 11
- <211> 2971
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Sequences to be used as promoter for regulating expression of foreign genes

<400> 11

```

ctgtacattc atcttgccgc ctttgcatc acttggccac aaagagtaga gagaaggaag      60
agaagagccc agacttcaag aagcgacctt gcaagtgcac tcgagggtca gaaactgtat      120
atcatatcta tgtgagagaa aggggaacat ttgagatgga gtccatttac ttgaggtata      180
cttattattt tgatcaataa atttgtatac ttcttattta gatcaataaa ttgtcatta      240
agctataate caaataaat tacgatcaaa tafgcaaatg ttagccagta cttgtgttaa      300
acttgatggc atctcttggc ttctttggca atcacatgcc taagaataa atagtatcat      360
atgattgtgt ttggtcagac ttcagagtca
gatgactctg tttggataaa cagcttaatt      420

```

aagcgcttat agaatatcat atgattgtgt ttggtcagac ttcagagcat ctcttggttt 480  
 ctctggcaat catatgccta agaaataaat agtatcatat gattgtgttt ggtcagactt 540  
 cagagtcaga tgacctgtt tgggtaaacac gcttaattaa gtgcttatag aataagcgct 600  
 tatcatataa gtgcttttgt acagttatit ctatgaaagt agaagaaata gtcataatgt 660  
 ttaataataa gctatcctgg agagcttgtg gaaataacca gaaaagaact tatggacacg 720  
 tcatgagctg tttacataag atctccctaa cagtctcaaa agtgtttatg ccagtagata 780

aattcaaata agtcaatcta aacagaccct aaatccatta tggtagctat cattttagct 840  
 tattccatct ttattaagaa tgtcatgaga taacataatg ataacacatt attttgacac 900  
 aaatgggcag atctagcaat ttaactctgg agtcttcaa gactgctgtt ctacgaagt 960  
 tcacgtccct gaatcatgtt cctgtatgga agcctgaaag acctcaaatt ctaaaagggtg 1020  
 gcgataaatt gaaggtttac aaaatatacc ctgcccgtt gacacagagg caagctcttt 1080  
 atacctcca gttaacggg gatgttgatt tcagaagtca cttggagagc aatccttgtg 1140  
 ccaagtttga agtaatttt gtgtagcata tgttgagcta

cctacaattt acatgatcac 1200

ctagcattag ctctttcact taactgagag aatgaagttt taggaatgag tatgaccatg 1260  
 gagtcggcat ggctttgtaa tgcctaccct actttggcca actcatcggg gatttacatt 1320  
 cagaaaatat acatgacttc aaccataactt aaacccttt ttgtagata actgaatgtt 1380  
 catatttaat gttaggttgt agtgttttta ctgtattata tccagacagt tacaagtgg 1440  
 acaacaagat tgtgggtctg tactgttatt tttttatit ttttttagca gaaacacctt 1500  
 atcttttgtt tcgtttgaat gtagaatgaa aataaaagaa agaaaatata acatcatcgg 1560  
 ccgcgcttgt

ctaatttcgg gcagtttaga tcctctccgg tcaccgaaa gtttcagtag 1620

aagaaacaaa acaccgtgac taaaatgata ctattatit atttattgtg tttttctttt 1680  
 ttctaccgga actttttaga acggatcca actcgttccg gggccgctac aactgaaaca 1740  
 aaagaagata tttctctct cttcagaaat glaagttttc ctttacagat acccattcac 1800  
 catttgattc agatgtgggt actagagata aagcactata atttgactct tggaaacca 1860  
 taaagtttat gttatccgtt ttctggacca atccacttgg gggcataacc tgtgtctatg 1920  
 tgtggtttgg tttccattct gatttatgcg gcgacttga atttaaaatc

taggaggggc 1980

agacattgaa caatcccaat attttaataa cttatgcaag atttttttta ttaatgagat 2040  
 gatgtgtttg tgactgagat tgagtcatac atttcactaa gaaatggttc caagtaccaa 2100  
 actatcatga cccagttgca aacatgacgt tcgggagtggt tcactttgat agttcaattt 2160  
 catcttggct tcttattcct tttataattc taattcttct tgtgtaaact atttcatgta 2220  
 ttatitctt ttaaaatita catgtcattt attttgctc actaactcaa ttttgcatat 2280  
 aacaatgata agtgatattt tgactcaca aatttacatc aaatttcgac atcgtttatt 2340  
 atgttcattg gatgattaac

aaatataaca aactttgcaa ctaattaacc accaactgaa 2400

tataattaac tataactgtg aaagttagta accatattt ttagatgtat atatcatcgg 2460  
 ttgaatgtaa ttattcatat atttgaacta agttacccta caacttaaag aacttaaaga 2520  
 actcggtttg agacctgggg acgaaaatgt aatgagactt taatgttgac tttgacaccg 2580  
 caccatgt gccttttaca tatagtttat atgacaagta atgacaatcc ttgctctatt 2640  
 ataagcgcac ccttagctcc aaccaaagga cgatggagtt aagaagaaa ctcttgctta 2700  
 cttgtaaggt ccacacttct tcaactcact ctcaattca tctacaaaa atgtccaac

2760

ttctctttct cacaatcaca aactcattcc aaacacactc tcttctccaa aatgtcttc 2820  
 cttctcagta cgtttctca ccccaccatc catctctcgt cccaacaaaa catggctact 2880  
 atctgtcga actccatcag ttgcacctgt ttcaacacca caagttgatg catcaaggtt 2940  
 ggagcctaga gttgaggaaa aagatggttta c 2971

<210> 12

<211> 2232

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequences to be used as promoter for regulating expression of foreign genes

<400> 12

```

gatctcccta acagtctcaa aagtgtttat gccagtagat aaattcaaat aagtcaatct      60
aacagagacc taaatccatt atggfaccta tcattttagc ttattccatc tttattaaga      120
atgtcatgag ataacataat gataacacat tttttgaca caaatgggca gatctagcaa      180
ttaactctg gagtccctca agactgctgt tcttacgaag ttcacgtccc tgaatcatgt      240
tcctgtatgg aagcctgaaa gacctcaaat tctaaaaggt ggcgataaat tgaaggttta      300
caaaataac cctgcgggct tgacacagag gcaagctctt tataccttcc agttcaacgg      360
ggatgttgat tcagaagtc acttggagag
caatccttgt gccaaagtgg aagtaatttt      420
tgtgtagcat atgttagct acctacaatt tacatgatca cctagcatta gctctttcac      480
ttaactgaga gaatgaagtt ttaggaatga gtagacat ggagtcggca tggctttgta      540
atgctacc tactttggcc aactcatcgg ggattttacat tcagaaaaata tacatgactt      600
caaccatact taaaccctt tttgtaagat aactgaatgt tcatatftaa tgttgggttg      660
tagtgtttt acttgattat atccagacag ttacaagtgg gacaacaaga ttgtgggtct      720
gtactgttat ttattttatt ttttttttagc agaaacacct tatcttttgt ttcgtttgaa      780

tgtagaatga aaataaaaga aagaaaatat aacatcatcg gccgcgcttg tctaatttcg      840
ggcagttagg atcctctccg gtcaccggaa agtttcagta gaagaaacaa aacaccgtga      900
ctaaaatgat actattttt tttttattgt gtttttcttt tttctaccgg aacttttttag      960
aacggatccc aactcgttcc ggggccccta caactgaac aaaagaagat attttctctc     1020
tcttcagaaa tgaagtttt ctttacaga tacccattca ccatttgatt cagatgtggt     1080
gactagagat aaagcactt aatttgactc ttggaaacct ataaagtta tgttatccgt     1140
gttctggacc aatccacttg ggggcataac ctgtgtctat
gtgtggtttg gtttccattc      1200
tgatttatgc ggcgacttgt aattttaaata ctaggagggg cagacattga acaatcccaa     1260
tattttaata acttatgcaa gatTTTTTTT attaatgaga tgatgtgttt gtgactgaga     1320
ttgagtcata catttacta agaaatggtt ccaagtacca aactatcatg acccagttgc     1380
aaacatgacg ttcgggagtg gtcactttga tagttcaatt tcatcttggc ttcttattcc     1440
ttttataaatt ctaattcttc ttgtgtaaac tatttcatgt attatTTTTT tttaaaattt     1500
acatgtcatt tattttgctt cactaactca attttgcata taacaatgat aagtgatatt     1560
ttgactcaca

aaatttcat caaatttga catcgtttat tatgttcatt ggatgattaa      1620
caaatataac aaactttgca actaattaac caccaactga atataattaa ctataactgt     1680
gaaagtagtt aaccatattt tttagatgta tatatcatcc gttgaatgta attattcata     1740
tatttgaact aagtaccctt acaacttaa gaacttaaag aactcggttt gagacctggg     1800
gacgaaaatg taatgagact ttaatgttga ctttgacacc gcaccacatg tcctttttac     1860
atatagttta tatgacaagt aatgacaatc cttgctctat tataaggcga cccttagctc     1920
caaccaaagg acgatggagt taagaaagaa actcttgctt acttgaagg
tccacacttc      1980
ttcactcacc tetcaatttc atcctacaaa aatgtccaaa cttctctttc tcacaatcac     2040
aaactcattc caaacacact ctcttctcca aaaatgctt ccttctcagt acgtttctc     2100
acccacat ceatctctg tcccaacaaa acatggctac tatctgctgc aactccatca     2160
gttgcacctg tttcaacacc acaagttgat gcatcaaggt tggagcctag agttgaggaa     2220
aaagatgggt ac      2232

```

<210> 13

<211> 1383

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequences to be used as promoter for regulating expression of foreign genes

<400> 13

```

gatcctctcc ggcaccgga aagtttcagt agaagaaca aaacaccgtg actaaaatga      60
tactattatt ttatttatg tgtttttctt tttctaccg gaacttttta gaacggatcc      120
caactcgttc cggggccgct acaactgaaa caaagaaga tttttctct ctcttcagaa      180
atgtaagttt tcctttacag atacccattc accattgat tcagatgtgg tgactagaga      240
taaagcatac taatttgact ctggaaacc cataaagttt atgttatccg tgttctggac      300
caatccactt gggggcataa cctgtgtcta tgtgtggtt ggtttccatt ctgattatg      360
cggcgacttg taatttaaaa tctaggaggg
gcagacattg aacaatcca atattttaat      420
aacttatgca agattttttt tattaatgag atgatgtgtt tgtgactgag attgagtcac      480
acatttcact aagaaatggt tccaagtacc aaactatcat gaccagttg caaacatgac      540
gttcgggagt gtcactttg atagttcaat ttcacttgg cttcttattc cttttataat      600
tctaattctt ctgtgtaaa ctatttcag tattattttt ctttaaaatt tacatgtcat      660
ttattttgcc tactaactc aattttgcat ataacaatga taagtgatat tttgactcac      720
aaaatttaca tcaaatftgc acatcgttta ttatgttcat tggatgatta acaaatataa      780

caaactttgc aactaattaa ccaccaactg aatataatta actataactg taaaagtagt      840
taaccatatt ttttagatgt atatatcatc cgttgaatgt aattattcat atatttgaac      900
taagttacc tacaacttaa agaacttaa gaactcgggt tgagacctgg ggacgaaat      960
gtaatgagac ttaaatgttg actttgacac cgcaccacat gtgcctttta catatagttt     1020
atatgacaag taatgacaat cttgtctcta ttataaggcg acccttagct ccaaccaaaag     1080
gacgatggag ttaagaaaga aactcttgct tacttgaag gtccacactt cttcactcac     1140
ctctcaattt catctacaa aatgtccaa acttctcttt
ctcacaatca caaactcatt      1200
ccaaacacac tcctttctcc aaaaatgtct tccttctcag tacgtttcct cacccacca      1260
tccatctctc gtccaacaa aacatggcta ctatctctg caactccatc agttgcacct      1320
gtttcaacac cacaagtga tgcataagg ttggagccta gagttgagga aaaagatgg      1380
tac      1383

```

<210> 14

<211> 3472

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequences to be used as terminator for regulating expression of foreign genes

<400> 14

```

caagttgatg catcaaggtt ggagcctaga gttgaggaaa aagatggta ctgggttttg      60
aaggaagagt atagaggagg tattaatcct caggagaaag ttaagattca gaagaacct      120
atgaagcttt ttatggaagg tgggattaat gatttgcta atatgtctct tgaagagatt      180
gaaagctcta agcttactaa agatgataat gatgttagac ttaaatggct tggcttttt      240
catagaagga aacatcattg taagtttttt tactttcttt ttatacttca aagttctctc      300
atactctgta ttgttttatt agtttttgta gacttaaata ttctctttga ttacatagt      360
gaaactccat tctgtttcc gaaattgtag
tgtgtatagt ctagaaaatt aagaagtaga      420
caaaatgatt tatgagattg taaattgtag gctttttatc aatttattaa ttttagagac      480
caaaatttgc ctatcttatt tggaccaatt tattgtatgt taggatcgac atgagtttag      540

```

caaaatcatg acggccacat gactgtgttg aagcttcttt gtgtaacttt aaccaaatt 600  
 atatggcaca ccatgattat gcaaaactcac cgtcaatcca aacatagaaa ttcagtgtta 660  
 atctttgtga caataaaaaa ctatgagtta tgttgacta atttatctcc attgtgaaac 720  
 tcagatggta gatttatgat gagactaaaa ctcccaaatg gggtaacac aagtgtctca 780  
  
 acaagatact tggcgagtgt gataaaaaa tatggcaaag acggatgtgc tgatgtgaca 840  
 acgaggcaga attggcaaat tcgaggtgta acgttacctg atgtccctga aattcttaag 900  
 ggccctgcag aggtcggctt gacaagtctg cagagtggaa tggacaatgt tcgaaacca 960  
 gtggtaacc ctcttgctgg tattgacct gatgagattg ttgatacaag accttacacc 1020  
 aatttgctgt cccaattcat cactgcta atcacttggt atccaacat tacaacttg 1080  
 taagtctaaa ctatctcctc tttatattc actcattata tcatattagt agttagttac 1140  
 ttgcatgca agcattacgt gaccgtgtgt agcctctaaa  
 tccttttgat aatatgtca 1200  
 ggccaaggaa gtggaatgta tgtgtgatag gttcccatga tcttttcgag catccgcata 1260  
 ttaacgatct tgcttatatg cctgctaata aggatggtcg atttggattc aacttatgg 1320  
 tgggtggttt cttagtccc aagcagatgt ctgaagcagt tccacttgat gcatgggtct 1380  
 ctgcagatga tttatccca ctttgtaaag ctgtccttga gacctatagg gacctcgga 1440  
 caagaggaa tagacagaaa accagaatga tgtggtgat cgatgaactt gtaagttacc 1500  
 acttttttc ttcacatatt attaactgaa gtgactttaa cgaccatttt acaattgaaa 1560  
 ttaagtgga  
 ttttagccct atcattaca gaacaaattt gtttaattcac tagcaagagc 1620  
 aattccactt tggcttgac atgacaagtg tttgtgaaat gcaggggata gaagtattca 1680  
 gatcagaggt ggaaaaaga atgccagaga agaagctaga gagagcatcc aaagaagaac 1740  
 ttgtcaaaa acaatggaaa gaggagacat cttaggtgtt catccacaaa aacaagaagg 1800  
 tttaaagctat gttggaattc acattccagt ttgtagaatc caagcagatg agatggaaga 1860  
 gctagctcgt atcgccgat aatacggaac cggagaacta aggctaaccg tggagcaaaa 1920  
 cataataat ccaaatgtgg aaaactcaaa acttgatgca ttgctaaatg  
 aacctctctt 1980  
 gaaagacaaa ttctcaccag aaccttccat cctaatgaaa acacttgtgg catgcactgg 2040  
 taaccaattt tgggccaag caataattga acaaaaaca agagctttaa aagtaactga 2100  
 agaagtgaa agacatgtgg ctgtgagcaa accagtgaga atgcatgga ctggtgtcc 2160  
 taacacttgt ggtcaagtct aggttgctga tattggtttt atgggttgta tggctagggga 2220  
 tgagaatggt aaggctactg aaggtgttga tttttcctt ggtgggagaa ttggaagtga 2280  
 ttctcattta gctgaggtgt ataagaaagg tgtcccttgc aaggacttgg tgcctattgt 2340  
 agctgatatt ttggttaaat  
 attttgagc tgcctaaagg aatagagaag aaggggatga 2400  
 ttaaagtata taggtatttg gtgattttta ttgctctac acaaaattat tatgttctgt 2460  
 ccaaaatata aagtcacaag ggataattga gattgagatg cagcagcca cacatgaact 2520  
 tgtacatttg gataagtcatt tttcattgc tttttataa gttacacttt gaattttata 2580  
 ataaatttta tttatttca aggaccagat ttataagga aaccgcta atcactatct 2640  
 ttactcgtaa tttgtcattt gagagctacg gagatcgttg agtttacgta tgagtgttta 2700  
 gtctcacatt aattatgaat ggtcaaatg ttaaattat aagagatgta atctatatac  
 2760  
 ctaatgcatt aaaaatttgg atggagatgc gacgcccc tttttgtgg tectgaagta 2820  
 tagacttgtt gtcgctctg gtgcactctc atacttcca acaaggagaa aaaactacca 2880  
 taacaattaa caaactaaca tttgttattt aaaaaacat acggatactg tttttcccc 2940  
 atttattagg aagatgatgg ctgggatttc aatggctgag tttatTTTT ttttggtcgg 3000  
 gagttgaagt atcgggaaaa ctaaatatgc tatgacttta aacatttgtt tgatatatga 3060  
 ttagttttca acttacttaa aaagtggcaa actagtttag tggttctctc ccttcttgt 3120  
 agttcaagga acatgggttt gaactctgtc  
 caaatTTTTg tactttcaat tatccataca 3180  
 tttaaaagct atataccaca tcattatatt caagtcaatg atcatgcggc ctgccacatt 3240  
 agcatcgat tacacattaa ttttaagtgg catgaacaca ttaacatttc ataaaagcta 3300  
 tgtgccagat catcattcaa gtctatgcac acatggfcaa cacattagta ccattTTTT 3360  
 ttttatgtt gatcagattg gatgtcggta ttgttgatg gctacaaact caaacaatct 3420  
 ccagctgtta gagaacgtcg aaaatgaatg catcacgggt gcacacttag at 3472

<210> 15

<211> 617

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequences to be used as terminator for regulating expression of foreign genes

<400> 15

```

agtatatagg tatttgggta ttttaattgc ctctacacaa aattattatg ttctgtccaa      60
aatataaagt cacaagggat aattgagatt gagatgcagc acgccacaca tgaacttgta      120
catttggata agtcatTTTT cattgctatt ttataagtta cacittgaat ttataataa      180
atTTtatttt atttcaagga ccagatttta taaggaacc gctaatactaa ctatctttac      240
tcgtaatttg tcatttgaga gctacggaga tcgttgagtt tacgtatgag tgtttagtct      300
cacattaatt atgaatggtc aaaatgtaa atttataaga gatgtaatct atatacctaa      360
tgcattaaaa atttggatgg agatgcgacg
ccccctttt ttgtggtcct gaagtataga      420
cttgttgctg ctctcgtgac actctcatac ttcccaacaa ggagaaaaaa ctaccataac      480
aattaacaaa ctaacatttg ttatttaaaa aaacatacgg atactgtttt ttccccattt      540
attaggaaga tgatggcttg gatttcaatg gctgagttaa tttttttttt ggtcgggagt      600
tgaagtatcg ggaaaaac      617
    
```

<210> 16

<211> 502

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequences to be used as terminator for regulating expression of foreign genes

<400> 16

```

ttgtacattt ggataagtca ttttccattg ctattttata agttacactt tgaattttat      60
aataaatttt attttatttc aaggaccaga ttttataagg aaaccgctaa tctaactatc      120
tttactcgta atttgtcatt tgagagctac ggagatcggt gagtttacgt atgagtgttt      180
agtctcacat taattatgaa tggTcaaaat gttaaattta taagagatgt aatctatata      240
cctaattgcat taaaaatttg gatggagatg cgacgcccc cttttttgtg gtcctgaagt      300
atagacttgt tgcgcttct ggtgcactct catacttccc aacaaggaga aaaaactacc      360
ataacaatta acaaactaac atttgttatt
taaaaaaaca tacggatact gttttttccc      420
catttattag gaagatgatg gcttggattt caatggctga gtttattttt tttttggtcg      480
ggagttgaag tatcgggaaa ac      502
    
```

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Sequences to be used as primers  
  
 <400> 17  
 gatattgatg ttagactcaa gtggc 25  
  
 <210> 18  
  
 <211> 21  
  
 <212> DNA  
  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sequences to be used as primers  
  
 <400> 18  
 cacysattcc acttcctwgg c 21  
  
 <210> 19  
  
 <211> 27  
  
 <212> DNA  
  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sequences to be used as primers  
  
 <400> 19  
 ttgtcacatc agcacatccg tctttgc 27  
  
 <210> 20  
  
 <211> 27  
  
 <212> DNA  
  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sequences to be used as primers  
  
 <400> 20  
 tcgccaagta tcttgtttga gcacttg 27  
  
 <210> 21  
  
 <211> 27  
  
 <212> DNA  
  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Sequences to be used as primers

<400> 21	
agagcccggg agaagagagt gtgtttg	27
<210> 22	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Sequences to be used as primers	
<400> 22	
ttctcccggg ggacgagaga tggatggt	28
<210> 23	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Sequences to be used as primers	
<400> 23	
ttctcccggg gttgaaacag gtgcaactga	30
<210> 24	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Sequences to be used as primers	
<400> 24	
ttctcccggg taaccatctt tttcctca	28
<210> 25	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Sequences to be used as primers	
<400> 25	
cacacttctt cactcacctc tcaa	24

<210>	26	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	Sequences to be used as primers	
<400>	26	
	atctaggagg ggcagacatt g	21
<210>	27	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	sequences to be used as primers	
<400>	27	
	tcggtataaa gacttcgcgc tgat	24
<210>	28	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	sequences to be used as primers	
<400>	28	
	atgtcttctt tctcagtacg tttcctc	27
<210>	29	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220>		
<223>	sequences to be used as primers	
<400>	29	
	caagttgatg catcaagtg ggagcctaga	30
<210>	30	

<211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> sequences to be used as primers  
 <400> 30  
 agaagagctc agtatatagg tatttgggtga 30  
 <210> 31  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> sequences to be used as primers  
 <400> 31  
 agaagagctc ttgtacatth ggataagtca 30  
 <210> 32  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> sequences to be used as primers  
 <400> 32  
 agaagaattc gttttccga tacttcaact 30