

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0063309 (43) 공개일자 2014년05월27일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01H 5/00 (2006.01) C12N 15/31 (2006.01) C12N 15/82 (2006.01)	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)	
(21) 출원번호 10-2012-0130521	(72) 발명자 이동희 서울 종로구 창의문로11길 24, (부암동) 김새롬 서울 강서구 양천로75길 57, 103동 910호 (염창동, 현대1차아파트)	
(22) 출원일자 2012년11월16일 심사청구일자 2012년11월16일	(74) 대리인 유미특허법인	

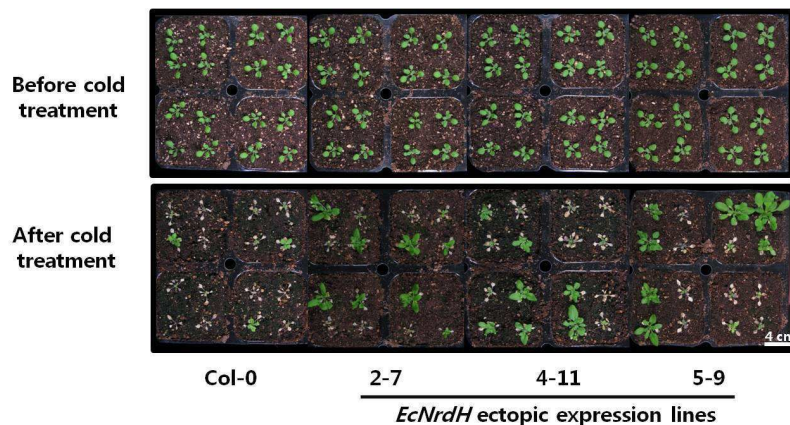
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **n r d H 유전자가 형질전환된 저온 내성 및 내염성이 증진된 형질전환 식물체 및 그 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 nrdH 유전자를 포함하는 식물의 저온 스트레스 또는 고염 스트레스 저항성 향상용 조성물, 그리고 상기 조성물로 형질전환된 식물 세포 또는 식물체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 nrdH 유전자를 식물에 형질전환시켜 저온 스트레스 또는 고염 스트레스에 대한 저항성이 증진된 형질전환 식물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 nrdH 유전자를 식물에 형질전환시켜 식물의 저온 스트레스 또는 고염 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ007441072012
부처명	농촌진흥청
연구사업명	공동연구사업-국책기술개발사업
연구과제명	기후변화 대응 광지역 적용 및 스트레스 저항성 GM 바이오디젤 원료작물 개발
기 여 율	80/100
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2010.01.01 ~ 2012.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-0007003
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기초연구사업-선도연구센터육성사업-세포신호전달계 바이오의약 연구센터
연구과제명	세포신호전달계 바이오의약 Target Validation 및 효능물질 설계
기 여 율	10/100
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2006.06.01 ~ 2013.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2009-0076245
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기초연구사업-일반연구자지원사업-기본연구지원사업(유형 I)
연구과제명	애기장대 근연종에서의 침수 스트레스 반응의 기능유전체학적 비교분석을 통한 복합 내재
해성 증진 유망 유전자의 발굴	
기 여 율	10/100
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2009.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

nrdH 유전자를 포함하는, 식물의 저온 스트레스 또는 고염 스트레스 저항성 향상용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 nrdH 유전자는 대장균(E.coli)유래의 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 nrdH 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열로 이루어진 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 nrdH 유전자는 서열번호 2의 핵산 서열로 이루어진 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 nrdH 유전자는 식물 발현용 재조합 벡터 형태로 포함된 것인 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물로 형질전환된, 저온 스트레스 또는 고염 스트레스 저항성이 증진된 식물 세포.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물로 형질전환된, 저온 스트레스 또는 고염 스트레스 저항성이 증진된 식물.

청구항 8

nrdH 유전자를 식물에 형질전환하는 단계를 포함하는,

저온 스트레스 또는 고염 스트레스에 대한 저항성이 증진된 형질전환 식물을 제조하는 방법.

청구항 9

nrdH 유전자를 식물에 형질전환하는 단계를 포함하는,

식물의 저온 스트레스 또는 고염 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 nrdH 유전자를 포함하는 식물의 저온 스트레스 또는 고염 스트레스 저항성 향상용 조성물, 그리고 상기 조성물로 형질전환된 식물 세포 또는 식물체에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 nrdH 유전자를 식물에 형질전환시켜 저온 스트레스 또는 고염 스트레스에 대한 저항성이 증진된 형질전환 식물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 nrdH 유전자를 식물에 형질전환시켜 식물의 저온 스트레스 또는 고염 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 다양한 산화효소 및 과산화효소의 활성을 통해 발생하는 활성산소 (Reactive oxygen species, ROS)는, 내부 발

생 신호 또는 외부 환경 자극에 반응하여 세포 내 신호전달 물질로 작용하여 항산화효소나 열충격 단백질과 같은 식물생체 방어에 필요한 유전자들의 발현을 유도하게 되지만, ROS 의 농도가 증가되면 생리적인 장애를 유발하게 된다. 가뭄, 저온, 염분, 건조, 공해, 상처, 오존, 과도한 자외선 노출 및 삼투압 충격과 같은 각종 비생물적 환경 스트레스에 의하여 식물 내 ROS 가 과도하게 축적될 수 있으며, 이에 의하여 세포 내 거대분자들(macromolecules)을 손상되고 세포가 죽음에 이를 수 있다.

[0003] 최근 식물에서 ROS에 의하여 매개되는 신호전달 경로에 대한 관심이 증가하고 있으며, 이들 경로를 조절하게 되면 세포 내의 항산화 효소 및 생체방어 단백질의 발현을 증가시킬 수가 있고 궁극적으로는 각종 환경 스트레스에 저항성을 가진 식물체를 개발할 수 있을 것으로 기대되고 있다.

[0004] 한편, 식물 내 항산화 시스템에서, 글루타레독신 (glutaredoxin, Grx)의 생리적 역할은 잘 알려져 있지 않다. Grx 는 거의 모든 동물, 식물, 미생물에 존재하는 글루타치온-의존성 환원효소로 알려져 있으며, 글루타치온 의존적 반응을 촉매하여 활성산소에 의한 손상으로부터 특정 세포 단백질을 보호한다. E.coli 는 5개의 Grx (*EcGrxA*, *EcGrxB*, *EcGrxC*, *EcGrxD*, 및 *EcNrdH*)를 가지고 있으며, 애기장대는 31개의 Grx 를 가지고 있다.

[0005] 본 발명자들은 E.coli 의 Grx 유전자들이 식물의 환경 스트레스에 대한 저항성에 미치는 영향을 연구하던 중, nrdH 유전자가 형질전환된 식물체의 경우 저온 스트레스 및 염 스트레스에 대한 내성을 나타내는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 하나의 목적은 nrdH 유전자를 포함하는, 식물의 저온 스트레스 또는 고염 스트레스 저항성 향상용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조성물로 형질전환된 식물 세포를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조성물로 형질전환된 식물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 하나의 목적은 nrdH 유전자를 식물에 형질전환하는 단계를 포함하는, 저온 스트레스 또는 고염 스트레스에 대한 저항성이 증진된 형질전환 식물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 하나의 목적은 nrdH 유전자를 식물에 형질전환하는 단계를 포함하는, 식물의 저온 스트레스 또는 고염 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 nrdH 유전자를 포함하는, 식물의 저온 스트레스 또는 고염 스트레스 저항성 향상용 조성물에 관한 것이다.

[0012] 바람직한 양태로서, 상기 nrdH 유전자는 대장균(E.coli) 유래의 것일 수 있다.

[0013] 바람직하게, 상기 nrdH 유전자는 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열로 이루어진 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게, 상기 nrdH 유전자는 서열번호 2의 핵산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0014] 또한 바람직하게, 상기 nrdH 유전자는 식물 발현용 재조합 벡터 형태로 포함된 형태일 수 있다.

[0015] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 조성물로 형질전환되어 저온 스트레스 또는 고염 스트레스 저항성이 증진된 식물 세포에 관한 것이다.

[0016] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 조성물로 형질전환되어 저온 스트레스 또는 고염 스트레스 저항성이 증진된 식물에 관한 것이다.

[0017] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 nrdH 유전자를 식물에 형질전환하는 단계를 포함하는, 저온 스트레스 또는 고염 스트레스에 대한 저항성이 증진된 형질전환 식물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0018] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 nrdH 유전자를 식물에 형질전환하는 단계를 포함하는, 식물의 저온 스트레스 또는 고염 스트레스에 대한 저항성을 증진시키는 방법에 관한 것이다.

[0019] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

- [0020] 글루타레독신 (glutaredoxin, Grx)은 거의 모든 동물, 식물, 미생물에 존재하는 글루타치온-의존성 환원효소로 알려져 있으며, CXXC, CXXS 를 활성 부위로 가지고 있고, 글루타치온 의존적 반응을 촉매하여 활성산소에 의한 손상으로부터 특정 세포 단백질을 보호한다. *E.coli* 는 5개의 Grx (*EcGrxA*, *EcGrxB*, *EcGrxC*, *EcGrxD*, 및 *EcNrdH*)를 가지고 있다.
- [0021] 본원에서, *nrdH* 유전자는 Grx 패밀리의 하나인 글루타레독신-유사 단백질 NrdH를 코딩한다. 대장균 유래의 *nrdH* 유전자는 서열번호 2의 핵산 서열을 가지며, 이에 의해 코딩되는 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 가진다.
- [0022] 바람직하게, 본 발명에서 *nrdH* 유전자는 기능적으로 균등한 코돈 또는 (코돈의 축퇴성에 의해) 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈, 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는 핵산분자를 포함한다. 또한, 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 이용되는 유전자는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 배열하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 배열된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 보다 바람직하게는 70%의 상동성, 보다 더 바람직하게는 80%의 상동성, 가장 바람직하게는 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 배열 방법은 당업계에 공지되어 있다.
- [0023] Grx 가 식물 내 항산화 시스템에서 환경 스트레스 저항성에 어떤 영향을 미치는지는 알려져 있지 않은 상황에서, 본 발명자들은 *nrdH* 유전자를 형질전환시킨 식물체의 저온 스트레스 및 고염 스트레스에 대한 저항성이 월등하게 향상됨을 처음으로 규명하였다. 따라서, *nrdH* 유전자를 이용하여 저온 스트레스 또는 고염 스트레스 저항성이 증진된 식물을 제조할 수 있다.
- [0024] 식물체 내에 *nrdH* 유전자의 도입은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의하여 이루어질 수 있으며, 바람직하게는 식물 형질전환용 발현벡터가 이용될 수 있다. 벡터에 포함되는 적합한 프로모터로는, 식물체의 유전자 도입을 위해 당업계에서 통상적으로 이용되는 어떠한 것도 이용될 수 있으며, 예를 들어, SP6 프로모터, T7 프로모터, T3 프로모터, PM 프로모터, 옥수수의 유비퀴틴 프로모터, 콜리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터, 노팔린 신타아제(nos) 프로모터, 피그위트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리프 바이러스 프로모터, 콤멜리나 엘로우 모틀 바이러리스 프로모터, 리볼로오스-1,5-비스-포스페이트 카르복실라아제 스몰 서브유닛(ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 벼 사이토졸 트리옥스포스페이트 이소머라아제(TPI) 프로모터, 아라비도시스의 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제 (APRT) 프로모터, 옥토파인 신타아제 프로모터 및 BCB(blue copper binding protein) 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0025] 또한, 상기 벡터는 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널서열을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 아그로박테리움 투메파시엔스의 노팔린 신타아제 유전자로부터 유래된 것(NOS 3' end), 아그로박테리움 튜머페이션스의 옥토파인 신타아제 유전자로부터 유래된 것, 토마토 또는 감자의 프로테아제 억제자 I 또는 II 유전자의 3' 말단 부분, CaMV 35S 터미네이터 및 OCS 터미네이터(octopine synthase terminator)서열을 포함할 수 있다.
- [0026] 또한, 상기 벡터는 선택적으로, 리포터 분자(예: 루시페라아제 및 β -글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 포함할 수 있으며, 선택 표지로서 항생제(예: 네오마이신, 카네시린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 또는 제초제(예: 바스타) 내성 유전자(예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제 (*npt II*), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제(*hpt*) 등)를 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 식물발현용 재조합벡터는 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 바이너리 벡터, 코인테그레이션 벡터(cointegration vector) 또는 T-DNA 부위를 포함하지는 않지만 식물에서 발현될 수 있도록 디자인된 일반 벡터가 사용될 수 있다. 이 중, 바이너리 벡터는 Ti(tumor inducible) 플라스미드에서 이동에 필요한 부분인 LB(left border)와 RB(right border)를 가지는 플라스미드와 타겟 뉴클레오타이드를 옮기는 데 필요한 유전자를 가진 플라스미드를 두 개로 나누어 놓은 벡터를 말하며, 그 내부에 식물체에서 발현시키기 위한 프로모터 부위와 폴리아데닐화 신호 서열을 포함하는 벡터를 사용할 수 있다.
- [0028] 상기에서 바이너리 벡터 또는 코인테그레이션 벡터를 사용하는 경우, 식물체에 상기 재조합 벡터를 도입하기 위한 형질전환용 균주로는 아그로박테리움을 사용하는 것이 바람직하며(*Agrobacterium*-mediated transformation), 이때 아그로박테리움 투메파시엔스 (*Agrobacterium tumefaciens*) 또는 아그로박테리움 라이조게네스 (*Agrobacterium rhizogenes*)를 사용할 수 있다. 그밖에 T-DNA 부위를 포함하지 않는 벡터를 이용하는

경우에는, 전기천공법(electroporation), 입자 총법(microparticle bombardment), 폴리에틸렌 글리콜 침전법(polyethylene glycol-mediated uptake) 등이 재조합 플라스미드를 식물체로 도입하는데 이용될 수 있다.

[0029] 본원에서 형질전환의 대상이 되는 식물은, 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다.

[0030] 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 식물은 특별히 제한되지 않는다. 본 발명에서 형질전환 대상이 되는 식물은, 벼, 밀, 보리, 옥수수, 대두, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수로 이루어진 군에서 선택된 식량작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근으로 이루어진 군에서 선택된 채소작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무, 들깨, 땅콩 및 유채로 이루어진 군에서 선택된 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나로 이루어진 군에서 선택된 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튜립으로 이루어진 군에서 선택된 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스로 이루어진 군에서 선택된 사료작물류일 수 있다. 바람직하게는, 상기 식물체는 애기장대, 감자, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 샐러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이, 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩, 또는 완두 등의 쌍자엽 식물일 수 있으며, 가장 바람직하게는 애기장대일 수 있다.

발명의 효과

[0031] nrDH 유전자를 식물에 도입하여 저온 스트레스에 대한 내성과 과염 스트레스에 대한 내성을 증진시킬 수 있으므로, 이를 이용하여 기후 변화에 따른 이상 저온에 견디거나 추운 지방이나 간척지 같은 과염 토양에서 농작물 또는 화훼작물의 생산성 증진을 도모할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 EcNrDH 유전자를 발현시키기 위한 벡터의 구성(A) 및 벡터의 제조 과정(B)을 나타낸 것이다.

도 2는 EcNrDH 유전자를 형질전환시킨 애기장대 #2-7, #4-11, #5-9 에 대하여 EcNrDH 유전자가 발현함을 확인한 전기영동 결과이다.

도 3 은 냉동 조건에서 Col-0 (Columbia-0 생태형) 및 EcNrDH 를 발현하는 식물체의 각 표현형을 비교한 것이다. 냉동 처리 후 2주 후의 사진으로, 대표적인 식물체들을 나타내었다.

도 4는 저온 저항성을 평가하기 위해 콜드 스트레스를 처리한 스케줄을 나타낸다.

도 5는 고염 저항성을 평가하기 위해 고염 스트레스를 처리한 스케줄을 나타낸다.

도 6은 Col-0 생태형과 EcNrDH 를 발현하는 형질전환 식물체를 17일간 생장시키고 프리징 처리한 후 정상 조건에서 2주간 회복시킨 경우의 표현형을 나타낸 것이다.

도 7은 17일간 생장시킨 애기장대 식물체에 대한 프리징 어세이 결과 각 식물체의 생존율을 나타낸 것이다. 각 실험은 독립적으로 3회 반복하여 실시하였으며, 막대는 평균값±표준편차를 나타낸다.

도 8은 Col-0 생태형과 EcNrDH 를 발현하는 형질전환 식물체를 17일간 생장시키고 NaCl 500 mM 를 24시간 처리한 후 1주간 회복시킨 경우의 표현형을 나타낸 것이다. 대표적인 식물체들을 나타내었으며, 각 실험은 독립적으로 3회 반복하여 실시하였다.

도 9는 17일간 생장시킨 애기장대 식물체에 대한 염 내성 어세이 결과 각 식물체의 생존율을 나타낸 것이다. 각 실험은 독립적으로 3회 반복하여 실시하였으며, 막대는 평균값±표준편차를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0034] 실시예 1. 식물 재료 및 성장조건

[0035] 애기장대 (Arabidopsis thaliana ecotype Columbia) 씨를 5% 소듐 하이포클로라이트 및 0.05% Triton-X 100에

서 5분 동안 소독하고 증류수로 5회 세척한 후, 0.8% agar와 0.5x MS (Murashige-Skoog salts, Duchefa)와 1% sucrose 농도 및 pH 5.7 배지에서 $110 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 빛 강도 하에서 성장시켰다. 7일 후에 흙으로 식물을 옮겨 준 후 파종 후 17일이 되는 날에 스트레스 테스트에 사용하였다. 모든 식물체는 16 hr/8 hr 낮:밤의 주기를 가지고 65% 습도를 유지하는 23도 챔버에서 성장시켰다.

[0036] 실시예 2. 플라스미드 제조 및 형질전환 식물체 제조

[0037] 2-1. *EcNrdH* 바이너리 벡터 제조

[0038] Entry vector의 제조를 위해 gateway cloning system을 이용하였다 (도 1). Gateway cloning system은 λ phage의 부위 특이적 재조합 ($attB \times attP \rightarrow attL \times attR$)에 기반한다. 대장균의 약 20ng의 gDNA에서 두 종류의 Forward primer : 5'-AAA GCA GGC TCC ATG CGC ATT ACT AT-3' (서열번호 3)와 reverse primer : 5'-AAA GCT GGG TTT TAT TTC AGC AGG GGA-3'(서열번호 4)를 이용하여 *grxC* 유전자를 분리 및 증폭시켰다. PCR은 1 unit의 r-Taq (Takara)를 이용하여 5cycle (94도 30초; 55도 30초; 72도 30초) 후, 30cycle (94도 30초; 60도 30초; 72도 30초)로 실시하였다. BP 재조합을 위해 두번째 PCR을 *attB1* primer 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTG CCA TGG-3' (서열번호 5) 및 *attB2* primers 5'-GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTA CTA GGT CAC C-3' (서열번호 6)를 이용하여 *attB1 attB2* site를 PCR product 뒷부분에 만들어주었다(*attB1-ORF of EcNrdH-attB2*). PCR은 1 unit의 r-Taq (Takara)를 이용하여 5cycle (94도 30초; 50도 30초; 72도 30초) 후, 30cycle (94도 30초; 60도 30초; 72도 30초)로 실시하였다. BP reaction의 donor vector로는 pYJ3를 사용하였으며, pYJ3는 *attP1-ccdB-attP2* cassette를 가지고 있으며, BP clonase (Invitrogen)를 이용하여 BP 부위 특이적 재조합을 시행하였다. *ccdB* 유전자는 *attP1*과 *attP2* 사이에 있어 재조합이 시행되었을 경우 제거되어, 유전자 재조합이 된 벡터만 선별이 가능하게 해준다. BP 재조합은 100ng의 PCR product와 40ng의 vector plasmid (pYJ3), 1 μ l of 5 X BP Clonase reaction buffer (Invitrogen), 0.2 μ l of BP Clonase enzyme mix (Invitrogen) 및 TE buffer (pH8,0)를 사용하였으며, 25도에서 1시간 재조합반응을 시킨후, 제조된 plasmid를 전기충격 트랜스포메이션 방법으로 *E.coli*(DH5 α)에 주입한 후, 100 mg/ μ l ampicillin이 들어간 LB plate에 스프레딩 하여 단일 콜로니를 획득하였다. 획득한 콜로니를 LB 액체배지에서 배양하여 플라스미드를 대량으로 얻어 LR 재조합 방법에 이용하였다.

[0039] LR 재조합에서는 *attR-ccdB-attR2* cassette를 가지고 있는 pEarleygate vector를 이용하였다. *ccdB* 유전자는 *attR1*과 *attR2* 사이에 있어 재조합이 시행되었을 경우 제거되어, 유전자 재조합이 된 벡터만 선별이 가능하게 해준다. LR 재조합은 100ng의 재조합이 된 pYJ3와 40ng의 vector plasmid (pEarleygate), 1 μ l of 5 X LR Clonase reaction buffer (Invitrogen), 0.2 μ l of LR Clonase enzyme mix (Invitrogen) 및 TE buffer (pH8, 0)를 사용하여 25도에서 1시간 배양시켰다.

[0040] 재조합 반응 이후, 제조된 plasmid를 전기충격 트랜스포메이션 방법으로 *E.coli* (DH5 α)에 주입한 후, 100 mg/ μ l kanamycin이 들어간 LB plate에 스프레딩 하여 단일 콜로니를 획득하였다. 획득한 콜로니를 LB 액체배지에서 배양하여 플라스미드를 대량으로 얻어 정제 후 sequencing 하여 *E.coli nrdH*의 유전자와 비교했을 때, 100% matching 되는 것을 확인하였다.

[0041] 2-2. 과다발현된 형질전환 식물체의 제조

[0042] 실시예 2-1에서 제조된 과발현 플라스미드를 애기장대에 침지법 (floral dipping)을 통해 식물체에 형질전환시켰으며, 확보된 T1 종자를 상토에 심은 후 0.01%의 글루포시네이트 암모늄을 포함하는 BASTA 용액을 사용하여 형질전환체를 선별하고, 개체별로 T2 종자를 확보하였다. T2 종자들은 0.5 X MS, 1% Sucrose 및 50 μ g/ml의 DL 포스포노트리신(DL-phosphinothricin, PPT)를 첨가한 배지에 파종하여 바스타(BASTA) 저항성을 가지는 개체와 민감한 개체의 수를 측정하고 콰이-스퀘어 검정법으로 p-값이 0.05 미만인 라인을 과다발현된 T-DNA가 한 카피가 삽입된 것으로 간주하였다. 표 1은 T2 세대에서의 *nrdH* 라인을 선별한 과정을 나타낸다.

표 1

nrdH	observed				expected		observed - expected		(o-e) ² /e	PPT R PPT S		x ²	X
	PPT R	PPT S	No germination	SUM	PPT R	PPT S	PPT R	PPT S		(o-e) ² /e	(o-e) ² /e		
							(o-e)	(o-e)					
1	100	0	0	100	75	25	25	-25	625.00	8.33	25.00	33.33	X
2	83	31	3	114	85.5	28.5	-2.5	2.5	6.25	0.07	0.22	0.29	p<0.05
3	82	23	0	105	78.75	26.25	3.25	-3.25	10.56	0.13	0.40	0.54	p<0.05
4	53	19	1	72	54	18	-1	1	1.00	0.02	0.06	0.07	p<0.05
5	85	36	0	121	90.75	30.25	-5.75	5.75	33.06	0.36	1.09	1.46	p<0.05

[0043]

[0044] (sum : 총 식물체, PPT R: 바스타저항성, PPT S: 바스타 민감성, X^2 값은 3:1의 기대비율, $X^2 = (o-e)^2/e$ (바스타 R) + $(o-e)^2/e$ (바스타 s); X^2 이 3.84 이하인 경우 P<0.05)

[0045] 선별된 T2 식물체를 한 세대 더 키워 종자를 수확한 후 다시 파종하여 PPT가 들어간 배지에서 100% 살아남는 호모 라인을 선별하였고, 식물체의 로켓 앞에서 RNA를 분리하여 각 유전자의 과다 발현 정도를 각 유전자들의 특이적인 프라이머를 사용하여 RT-PCR로 검출하였다 (도 2). 그 결과, 각 유전자는 각 식물체에서 일정수준 이상으로 발현하였음을 알 수 있었고, 대장균의 유전자인 만큼 정상인 WT 애기장대 (Col-0)에서는 발현하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 표 2는 T3 세대에서의 선별 결과를 나타낸다.

표 2

line	homo/hetero	line	homo/hetero	line	homo/hetero	line	homo/hetero
2-1		3-1		4-1		5-1	hetero
2-2		3-2	hetero	4-2		5-2	
2-3		3-3		4-3		5-3	
2-4		3-4		4-4	hetero	5-4	
2-5		3-5	hetero	4-5		5-5	homo
2-6		3-6	hetero	4-6		5-6	
2-7	homo	3-7		4-7		5-7	hetero
2-8		3-8		4-8	hetero	5-8	
2-9		3-9		4-9		5-9	homo
2-10		3-10		4-10	hetero	5-10	hetero
2-11	hetero	3-11		4-11	homo	5-11	
2-12		3-12		4-12	hetero	5-12	
2-13		3-13		4-13		5-13	hetero
2-14	hetero	3-14		4-14		5-14	
2-15		3-15		4-15	hetero	5-15	

[0046]

[0047] 실시예 3. 콜드 스트레스 처리 및 프리징 어세이

[0048] 실시예 1에 기재한 조건에서 17일 동안 키운 식물체를 도 4에 나타난 바와 같이 콜드 스트레스 처리에 이용하였다. 구체적으로, 프리징 민감성에 대한 효과를 테스트 하기 위해, 애기장대 ecotype Col-0와 대장균의 nrdH가 들어간 식물체를 17일 동안 성장시켰다. 17일 동안 성장시킨 형질전환 식물체는 야생형 식물체와 비교했을 때 형태학적으로는 별 차이가 없었다 (도 3). 이후 암조건에서 8시간 -1도 처리; 빛조건에서 1시간 마다 1도를 낮추면서 -1도부터 -12도까지 처리한 후 -12도에서 2시간 처리; 다시 암 조건에서 12시간 동안 4도 처리. 프리징 후 식물체들을 정상 23도 성장 챔버에서 2주동안 성장시켰다. 정상 성장 조건 하에서 2주 동안 회복시킨 후, 특정 온도에서 전체 식물체 중 살아있는 식물체의 백분율을 계산하여 저온 저항성을 평가하였다. 실험은 16개의 식물체들에서 서로 독립적으로 세 번씩 반복하였다.

[0049] **실시예 4. 고염 스트레스 처리 및 고염 스트레스 어세이**

[0050] 실시예 1에 기재한 조건에서 17일 동안 키운 식물체를 도 5에 나타난 바와 같이 염 스트레스 처리에 이용하였다. 구체적으로, 고염 민감성에 대한 효과를 테스트 하기 위해, 애기장대 ecotype Col-0와 대장균의 nrdH 가 들어간 식물체를 17일 동안 생장시켰다. 17일이 된 식물체를 가지고 500 mM 의 NaCl을 24 시간 동안 처리 해 주었다. 고염 스트레스 처리 일주일 후 다시 물을 주기 시작하며 물을 다시 주기 시작한 후 일주일 후 전체 식물체 중 살아있는 식물체의 백분율을 계산하여 고염 저항성을 평가하였다. 모든 실험은 23도 챔버에서 이루어졌으며 16개의 식물체들에서 서로 독립적으로 세 번씩 반복하였다.

[0051] **실험결과**

[0052] **1. 대장균의 nrdH 유전자를 이용한 식물에서의 저온내성 증진**

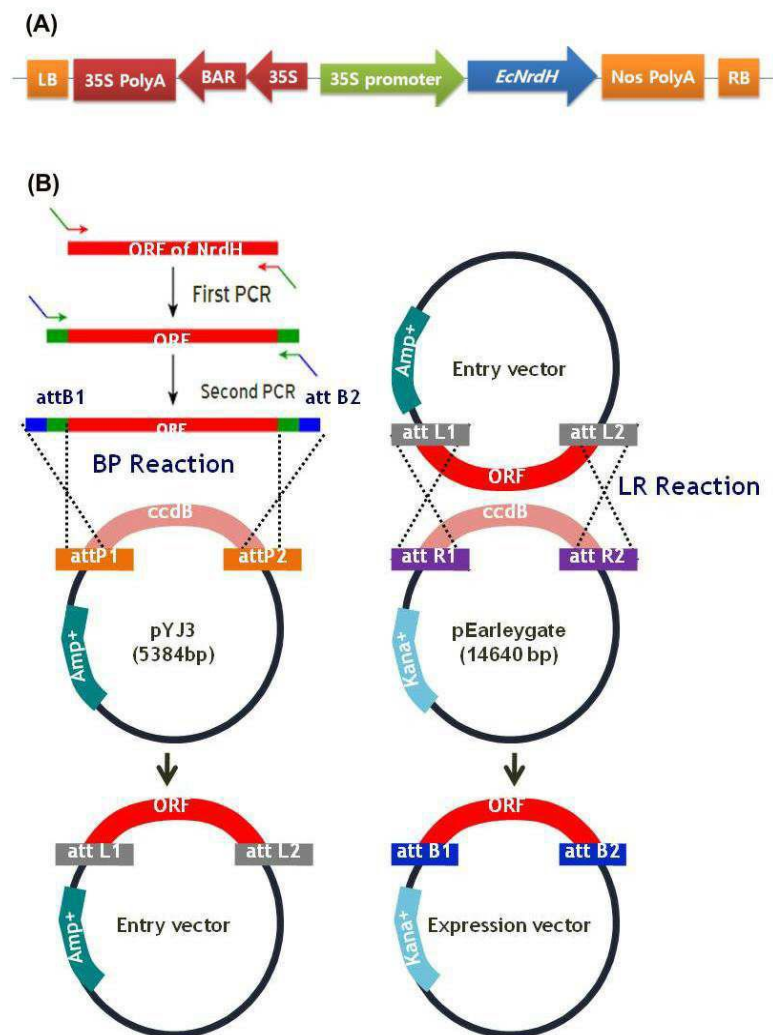
[0053] 식물체에서 스트레스 발생시 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 발생하며, 이는 식물에게 치명적인 영향을 끼치게 된다. 이런 ROS 를 줄이기 위해 수많은 환원효소가 필요하며, 식물의 GRX는 약 31개가 존재한다고 알려져 있으며, GRX like protein과 같이 비슷한 기능을 한다고 알려진 유전자는 80여개가 넘는다고 알려져 있다. 식물에서의 GRX의 기능을 유추해 보기 위해 그보다 수가 적고, 식물의 GRX의 기능을 포함할 꺼라 생각되는 대장균의 nrdH 유전자를 부위 특이적 재조합 방법을 이용해 클로닝 하였으며, 침지법을 이용하여 35S 프로모터로 발현되는 EcNrdH 유전자를 가지는 4개의 제조체 저항성 애기장대 형질전환체를 T2 세대에서 선별하였으며, EcNrdH 과다발현 하는 동종접합 라인들을 T3 세대에서 선택적 항생제 마커를 이용한 분리분석 (segregation analysis) 를 통해 선택 한 후, 최종 3개의 식물체를 선별하였다. (#2-7, #4-11, #5-9). 세 개의 nrdH 형질전환 식물체를 가지고 저온내성 스트레스를 처리해본 결과, 애기장대 WT 식물체는 25% 만이 프리징 테스트에서 생존한 반면에, EcNrdH 과다발현 식물체인 #2-7, #4-11, #5-9는 43.8%, 50.0%, 31.3% 정도 생존하였다. 대부분의 WT식물체의 잎에서 스트레스에 의한 손상의 사인으로 잎의 황화 (leaf yellowing)가 발생하며, 살아남은 WT의 식물체들의 크기도 작은 반면에, EcNrdH 과다발현 트랜스제닉 식물체의 경우, 생존한 식물체의 개체수 뿐만 아니라 성장 정도도 차이가 남을 확인하였다 (도 6 및 도 7). 이러한 결과로 볼 때, 프리징 스트레스를 통해서 발생하는 ROS에 의해 WT의 식물체는 심각한 손상을 입고, 성장에도 영향을 끼치는 반면, EcNrdH 과다발현 형질전환 식물체의 경우 대장균의 nrdH 유전자 애기장대 내에서 ROS에 의한 손상을 감소시켜 저온 내성을 증가시킬 수 있다는 것을 제시할 수 있다.

[0054] **2. 대장균의 nrdH 유전자를 이용한 식물에서의 내염성 증진**

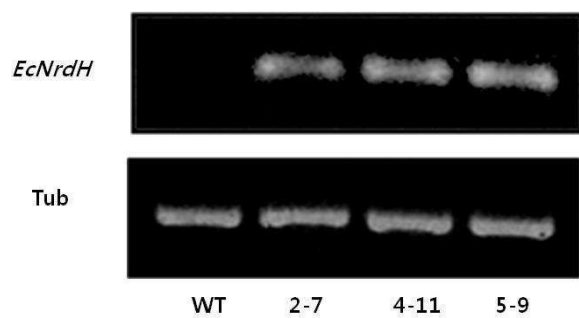
[0055] EcNrdH이 과다발현 하는 것으로 최종 선별된 3개의 형질전환 식물체 (#2-7, #4-11, #5-9)에 대하여, 고염 스트레스를 처리해본 결과, 애기장대 WT 식물체는 46.8% 만이 생존한 반면에, EcNrdH 과다발현 식물체인 #2-7, #4-11, #5-9는 74.7%, 74.1%, 64.1% 정도 생존하였다. 대부분의 WT 식물체의 잎에서 스트레스에 의한 손상의 사인으로 잎의 황화 (leaf yellowing)가 발생하며, 그 정도가 심해지면서 죽게 된다. EcNrdH 과다발현 식물체의 경우 황화가 되는 속도가 WT에 비해 느렸으며, 스트레스 처리 후 꽃대가 나오는 속도 등이 WT에 비해 빨라 지고, 성장적으로 차이를 보임을 확인 할 수 있었다 (도 8 및 도 9). 이를 통해 EcNrdH 과다발현 식물체의 nrdH 유전자가 ROS 를 줄여주고, 이로 인해 고염 스트레스 하에서 더 잘 살아남을 수 있는 내성을 가지게 했음을 제시할 수 있다.

도면

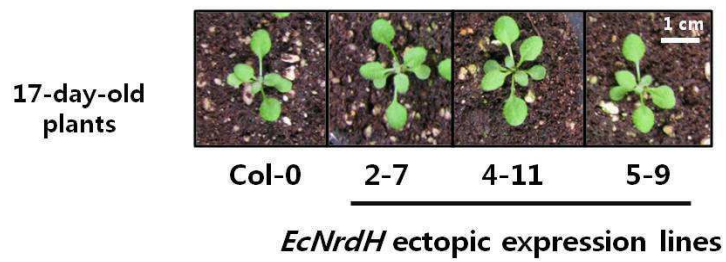
도면1



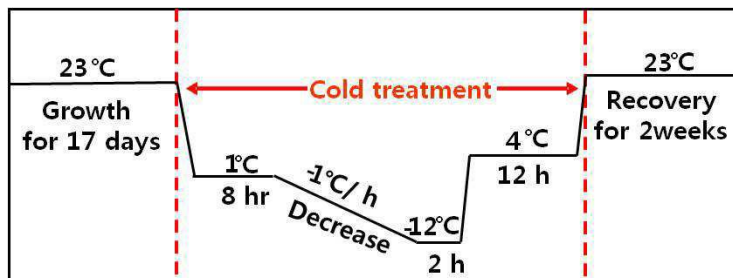
도면2



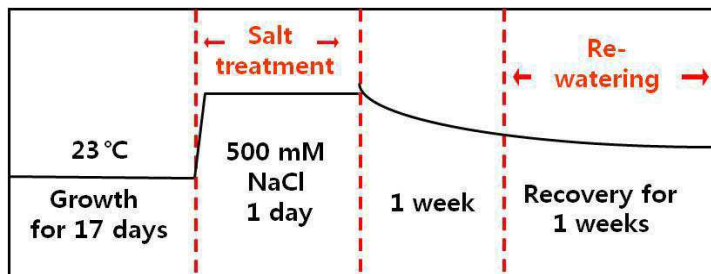
도면3



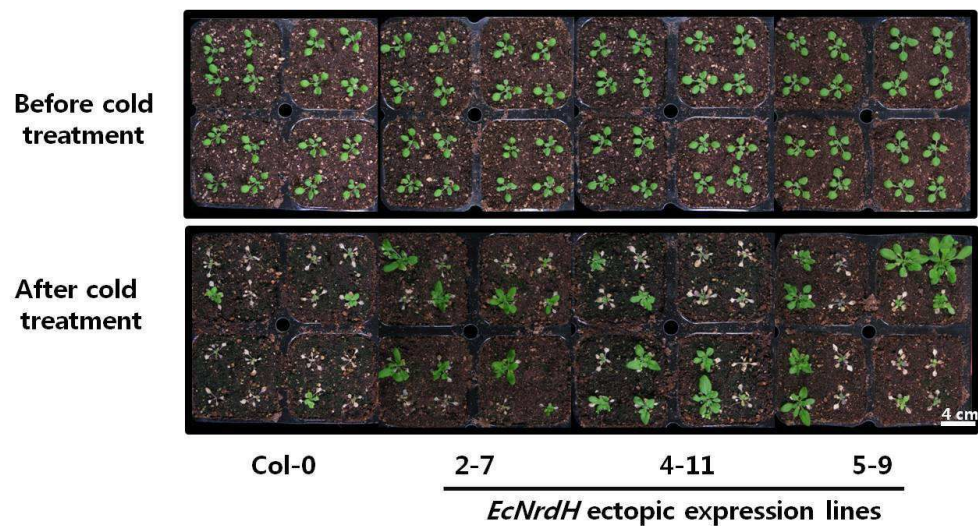
도면4



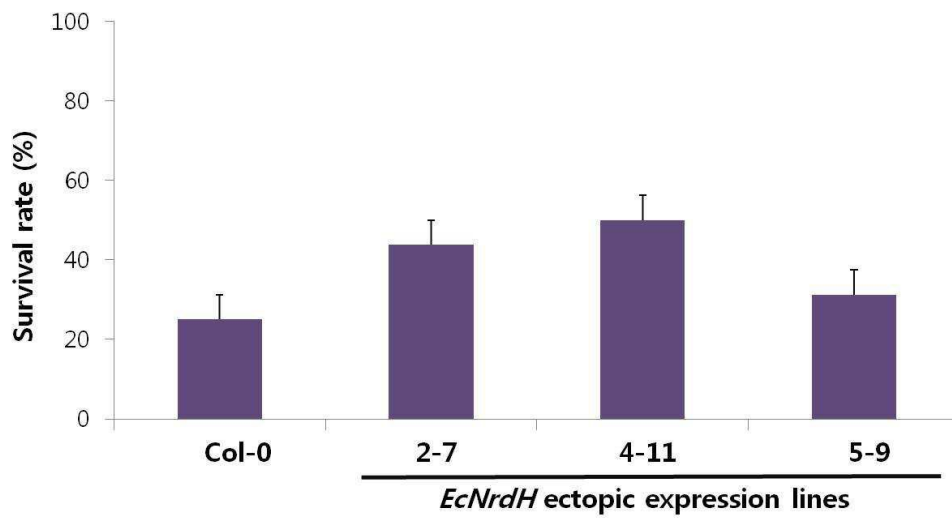
도면5



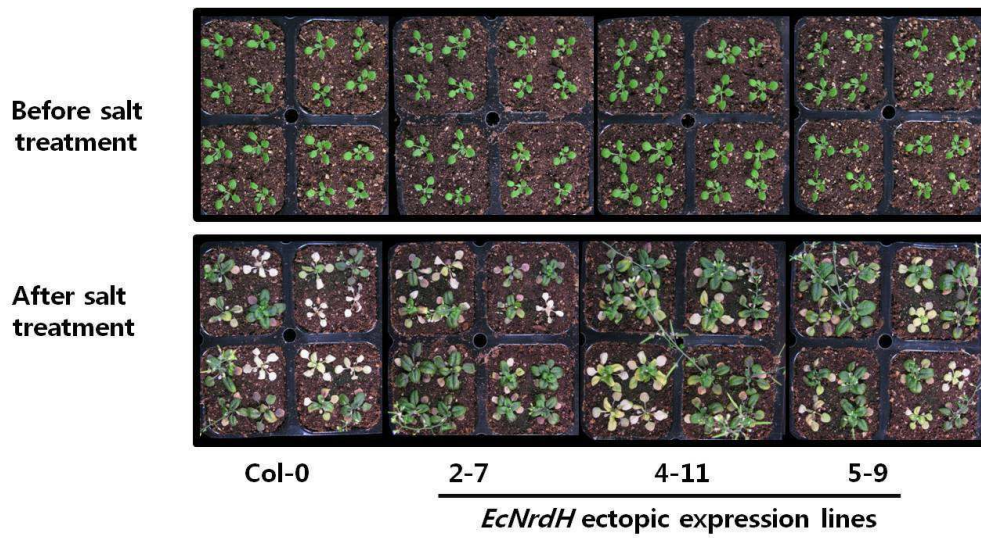
도면6



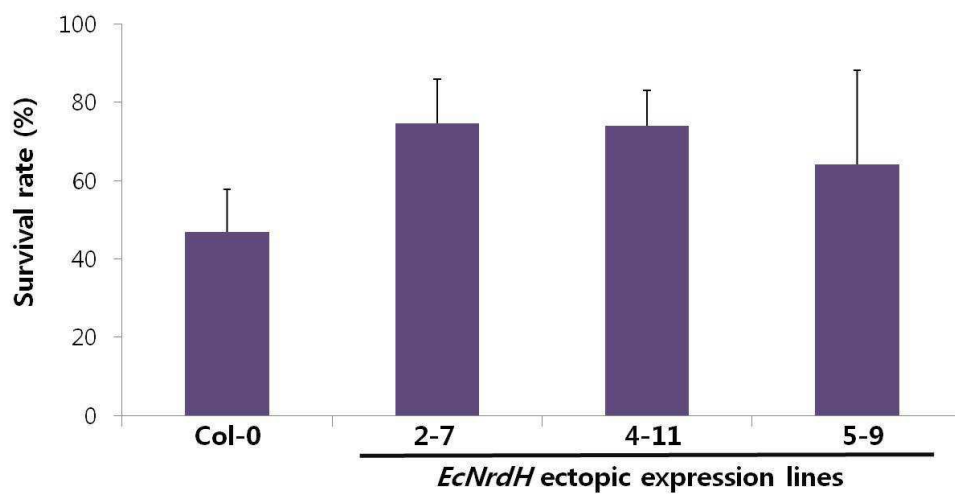
도면7



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
- <120> Transgenic plant with enhanced tolerance to cold stress and salt stress by introducing nrdH gene and preparation method thereof
- <130> DPP20128104KR
- <160> 6
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 81
- <212> PRT
- <213> Escherichia coli
- <220><221> PEPTIDE
- <222> (1)..(81)
- <223> amino acid sequence of nrdH
- <400> 1

Met Arg Ile Thr Ile Tyr Thr Arg Asn Asp Cys Val Gln Cys His Ala

1 5 10 15

Thr Lys Arg Ala Met Glu Asn Arg Gly Phe Asp Phe Glu Met Ile Asn

20 25 30

Val Asp Arg Val Pro Glu Ala Ala Glu Ala Leu Arg Ala Gln Gly Phe

35 40 45

Arg Gln Leu Pro Val Val Ile Ala Gly Asp Leu Ser Trp Ser Gly Phe

50 55 60

Arg Pro Asp Met Ile Asn Arg Leu His Pro Ala Pro His Ala Ala Ser

65 70 75 80

Ala

- <210> 2

- <211> 246

- <212> DNA

- <213> Escherichia coli

- <220><221> gene

- <222> (1)..(246)

<223> nucleic acid sequence of nrdH
 <400> 2
 atgcgcatta ctatttacac tcgtaacgat tgcgttcagt gccacgccac caaacgggcg 60
 atggaaaacc ggggctttga ttttgaaatg attaatgtcg atcgcgttcc tgaagcggca 120
 gaagcgttgc gtgctcaggg ctttcgtcag ttgccggtag tgattgctgg cgatcttagc 180
 tggctctggtt tccgtccgga catgattaac cgtctgcac cagcgccaca cgcggccagt 240
 gcatga 246

<210> 3
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> forward primer
 <400> 3
 aaagcaggct ccatgcgcat tactat 26
 <210> 4
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 4
 aaagctgggt tttatttcag cagggga 27
 <210> 5
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> attB1 primer
 <400> 5
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtg ccatgg 36

<210> 6
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> attB2 primer

<400> 6

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggcta ctaggtcacc

40