(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월26일
(11) 등록번호 10-1485831
(24) 등록일자 2015년01월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/29 (2006.01) *C12N 15/82* (2006.01)
A01H 5/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0127609
(22) 출원일자 2013년10월25일
심사청구일자 2013년10월25일
(30) 우선권주장
1020130119090 2013년10월07일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110043981 A
KR1020140063309 A

(73) 특허권자
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교)
(72) 발명자
박영두
경기도 용인시 수지구 성복2로 220, 305동 1404호 (성복동, 버들치마을 힐스테이트3차)
유재경
경기도 수원시 영통구 광교중앙로 247, 3201동 2005호 (하동, 휴먼시아아파트)
(74) 대리인
유수미

전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 이영기

(54) 발명의 명칭 **저온 저항성 관련 유전자 및 형질전환 식물체**

(57) 요 약

본 발명은 식물체의 저온 저항성 증진용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 식물체의 저온 스트레스에 대한 내성에 관여를 하며, 이를 과발현시킨 형질전환 식물체는 저온 스트레스에 대한 내성이 탁월하다.

따라서, 본 발명의 형질전환 식물체는 이상 저온 또는 냉해를 비롯한 각종 스트레스에 대한 내성이 탁월하여 재배지역의 이상 기후에 적응성이 뛰어난 신기능 작물로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도9



[주] CON, 비형질전환체
1~3, 담배 형질전환체

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ008118
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 차세대유전체연구사업단
연구과제명 배추의 기후 변화 대응 환경 스트레스 저항성 관련 유전자 대량 발굴 및 발현 네트워크 분석
기 여 율 1/1
주관기관 경희대학교
연구기간 2011.05.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 8의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 식물체의 저온 저항성 증진용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 식물체의 저온 저항성 증진용 조성물.

청구항 3

(a) 제1항 또는 제2항의 뉴클레오타이드 서열; (b) 상기 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 결합(operatively linked)되어 있고 식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (c) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 저온 저항성 증진용 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항의 조성물로 형질전환된 저온 저항성이 증진된 식물세포.

청구항 5

제1항 또는 제2항의 조성물로 형질전환된 저온 저항성이 증진된 식물체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튤립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 식물체.

청구항 7

서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 세포 내 발현 수준(level)을 증가시켜 식물의 저온 저항성을 향상시키는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 배추(*Brassica rapa ssp. pekinensis*)로부터 분리된 저온 저항성 관련 BrCSR(*Brassica rapa* Cold Stress Resistance) 유전자 및 형질전환 식물체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 고농도 염 집적, 건조, 저온과 같은 비생물적 스트레스는 대부분의 작물에서 생장·생육 형태 변화, 생리적·생화학적 변화, 및 수확량의 저하를 일으키는 중요한 요인이다. 이 중, 저온 스트레스는 효소활성 저하와 에너지 대사의 불균형 등을 초래하고 transcriptome, proteome, metabolome의 변화를 동반하게 되므로, 최근 다양한 작물에서 저온 저항성 유전자를 찾아내는 연구들이 활발히 진행되고 있다.

[0003] 예를 들어, 벼에서는 GPAT(arabidopsis glycerol-3P-acyltransferase), OsCDPK7(rice calcium-dependent

protein kinase), OsDREB1(rice DRE-binding protein 1), HvCBF4(barley C-repeat binding factor), OsCIPK03(rice calcineurin B-like protein-interaction protein kinase 03), 및 OsTPP1 (trehalose-6-phosphate phosphatase) 등의 저온 저항성 유전자가 발굴되었고, 옥수수에서는 NPK1(nicotiana protein kinase), 애기장대에서는 MYB15(MYB-like transcription factor) 등이 대표적인 저온 저항성 유전자로 발굴되었다. 실제로 GPAT 유전자의 경우에는 벼에 GPAT 유전자가 도입되어 28%까지 불포화 지방산이 증가되었음이 보고되었으며, 17℃에서 광합성 효율이 20%까지 증가되는 결과를 가져와 저온 환경에서 벼의 생육 저하를 최소화하였다. 그리고 애기장대에서 MYB15 유전자의 억제가 저온 저항성과 관련 있는 CBF(C-repeat binding factor) 유전자들의 발현을 증가시켜 저온 저항성을 높이는 것으로 보고되었다.

[0004] 한편, 배추는 김치의 주재료로서 한국의 4대 채소 가운데 하나이며 유채 속(*Brassica*)에 포함되어 있다. 유채 속(*Brassica*)에는 유채, 겨자 등 산업적 경제성이 우수한 작물이 포함되어 있어 외국에서도 중요한 작물이다.

[0005] 현재 인구 증가에 따른 식량 소모는 지속적으로 증가하고 있으나, 지구온난화에 따라 재배가능 경작지는 점점 줄어들고 있는 실정이다. 우리나라는 온대성 기후에 속하지만, 지구 기후변화에 따른 이상저온 현상으로 인해 작물 피해가 빈번히 발생하고 있다. 이같이 이상저온에 의한 농업생산성 저하는 심각한 수준으로 이러한 환경에 내성을 갖는 우량 품종의 개발이 식량자원의 안정적 확보에 매우 시급하게 필요한 실정이다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 식물체의 저온 저항성을 향상시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열이 상술한 식물체의 형질에 관여를 하고 이 유전자를 식물체에 형질전환하는 경우, 식물체의 저온 저항성을 증진시킬 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 식물체의 저온 저항성 증진용 조성물 및 상기 조성물로 형질전환된 저온 저항성이 증진된 식물세포 또는 식물체를 제공하는 데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 식물체의 저온 저항성을 증진시키는 방법을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 8의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 식물체의 저온 저항성 증진용 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명자들은 식물체의 저온 저항성을 향상시킬 수 있는 유전자를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 서열번호 8의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 상술한 식물체의 형질에 관여를 하고 이 유전자를 식물체에 형질전환하는 경우, 식물체의 저온 저항성을 증진시킬 수 있음을 확인하였다.

[0012] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 서열번호 8의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진다. 본 발명에 따르면, 서열번호 7의 뉴클레오타이드 서열은 배추의 유전체에서 동정되었으며, 이 유전자의 이름은 BrCSR(*Brassica rapa* Cold Stress Resistance)로 명명되었다. 상기 유전자는 핵인 단백질 16 도메인(Nucleolar protein 16 domain, NOP16)을 포함하고 있다.

[0013] 본 발명에 따르면, 본 발명자들은 식물체에 저온 스트레스를 가할 경우 BrCSR 유전자의 발현이 증가하며, 상기 유전자의 발현을 증가시킬 경우 이러한 저온 스트레스들에 대한 내성이 증가함을 확인하였다.

[0014] 본 발명에서 이용되는 뉴클레오타이드 서열은 첨부한 서열목록에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다.

[0015] 뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있다. 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈 또는 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈, 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 포함하는

핵산분자를 포함한다. 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 이용되는 핵산 분자는 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 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 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 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 얼라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 선행문헌[Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482(1981); Needleman and Wunsch, J. Mol. Bio. 48:443(1970); Pearson and Lipman, Methods in Mol. Biol. 24:307-31(1988); Higgins and Sharp, Gene 73:237-44(1988); Higgins and Sharp, CABIOS 5:151-3(1989); Corpet et al., Nuc. Acids Res. 16:10881-90(1988); Huang et al., Comp. Appl. BioSci. 8:155-65(1992) and Pearson et al., Meth. Mol. Biol. 24:307-31(1994)]에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blasm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLAST는 인터넷(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) 상에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 인터넷(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html) 상에서 확인할 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 본 발명에서 개시하고 있는 뉴클레오타이드 서열; (b) 상기 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 결합(operatively linked)되어 있고 식물세포에서 RNA 분자를 형성시키는 프로모터; 및 (c) 식물세포에서 작용하여 RNA 분자의 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열을 포함하는 식물발현용 재조합 벡터를 포함하는 식물체의 저온 저항성 증진용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 명세서에서 용어 “작동 가능하게 결합”은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사(transcription) 및/또는 번역(translation)을 조절하게 된다.

[0018] 본 발명의 벡터 시스템은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있으며, 이에 대한 구체적인 방법은 Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)에 개시되어 있다.

[0019] 본 발명에 적합한 프로모터는, 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, 컬리플라워 모자이크 바이러스(CaMV) 35S 프로모터, 노팔린 씬타아제(nos) 프로모터, 피그워트 모자이크 바이러스 35S 프로모터, 수가크레인 바실리폼 바이러스 프로모터, 콤멜리나 엘로우 모틀 바이러스 프로모터, 리불로오스-1,5-비스-포스페이트 카르복실라아제 스몰 서브유티트(ssRUBISCO)의 광유도성 프로모터, 벼 사이토졸 트리오스포스페이트 이소머라아제(TPI) 프로모터, 아라비돕시스의 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라아제(APRT) 프로모터 및 옥토파인 신타아제 프로모터를 포함한다.

[0020] 또한, 본 발명에 적합한 3'-말단의 폴리아데닐화를 야기시키는 폴리 A 시그널 서열은 아그로박테리움 투메파시엔스의 노팔린 신타아제 유전자로부터 유래된 것(NOS 3' end)(Bevan et al., Nucleic Acids Research, 11(2):369-385(1983)), 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 포함한다.

[0021] 선택적으로, 상기 벡터는 리포터 분자(예: 루시퍼라아제 및 β-글루쿠로니다아제)를 코딩하는 유전자를 추가적으로 운반할 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터는 선택 표지로서 항생제(예: 네오마이신, 카베니실린, 카나마이신, 스펙티노마이신, 하이그로마이신 등) 내성 유전자(예: 네오마이신 포스포트랜스퍼라아제(nptⅡ), 하이그로마이신 포스포트랜스퍼라아제(hpt) 등)를 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 조성물로 형질전환된 저온 저항성이 증진된 ‘식물세포’를 제공한다.

[0023] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 조성물로 형질전환된 저온 저항성이 증진된 ‘식물체’를 제공한다.

[0024] 본 발명의 형질전환 식물세포 및 형질전환 식물체를 제조하기 위하여 당업계에 일반적으로 공지된 방법(Methods

of Enzymology, Vol. 153, (1987))에 따라 실시될 수 있다. 외래성 폴리뉴클레오티드를 플라스미드나 바이러스 등과 같은 벡터 등의 운반체에 삽입하여 식물을 형질전환 할 수 있고, 아그로박테리움 박테리아를 매개체로 사용할 수 있으며(Chilton et al., Cell 11:263-271, 1977), 직접 외래성 폴리뉴클레오티드를 식물 세포내로 도입시켜 식물을 형질전환 할 수 있다(Lorz et al., Mol. Genet. 199:178-182; 1985). 예를 들어, T-DNA 부위를 포함하지 않는 벡터를 이용하는 경우에는 전기천공법(electroporation), 입자충격법(microparticle bombardment), 폴리에틸렌 글리콜 침전법(polyethylene glycol-mediated uptake)을 이용할 수 있다.

[0025] 일반적으로 식물을 형질전환 함에 있어 많이 사용되는 것이 외래성 폴리뉴클레오티드로 형질전환된 아그로박테리움 투메페이시언스(Agrobacterium tumefaciens)로 식물 세포나 종자 등을 감염시키는 방법이다. 당업자는 공지된 적절한 조건하에서 형질전환된 식물 세포나 종자를 배양 또는 재배하여 식물로 발육시킬 수 있다.

[0026] 본 명세서에서, 용어 “식물(또는 식물체)”은 성숙한 식물뿐만 아니라 성숙한 식물로 발육할 있는 식물 세포, 식물 조직 및 식물의 종자 등을 모두 포함하는 의미로서 이해된다.

[0027] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 식물체는 벼, 밀, 보리, 옥수수, 콩, 감자, 밀, 팥, 귀리 및 수수를 포함하는 식량 작물류; 애기장대, 배추, 무, 고추, 딸기, 토마토, 수박, 오이, 양배추, 참외, 호박, 파, 양파 및 당근을 포함하는 채소 작물류; 인삼, 담배, 목화, 참깨, 사탕수수, 사탕무우, 들깨, 땅콩 및 유채를 포함하는 특용작물류; 사과나무, 배나무, 대추나무, 복숭아, 양다래, 포도, 감귤, 감, 자두, 살구 및 바나나를 포함하는 과수류; 장미, 글라디올러스, 거베라, 카네이션, 국화, 백합 및 튤립을 포함하는 화훼류; 및 라이그라스, 레드클로버, 오차드그라스, 알파알파, 톨페스큐 및 페레니얼라이그라스를 포함하는 사료작물류로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0028] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 서열번호 8로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드의 세포내 발현 수준(level)을 증가시켜 식물의 저온 저항성을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0029] 본 발명에서 이용되는 핵산분자, 식물발현용 재조합 벡터 및 이를 식물체에 도입하는 방법은 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0030] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0031] (a) 본 발명은 식물체의 저온 저항성 증진용 조성물을 제공한다.

[0032] (b) 본 발명의 뉴클레오타이드 서열은 식물체의 저온 스트레스에 대한 내성에 관여를 하며, 이를 과발현시킨 형질전환 식물체는 이상 저온 또는 냉해를 비롯한 각종 스트레스에 대한 내성이 탁월하여 재배지역의 이상 기후에 적응성이 뛰어난 신기능 작물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 각 BrCSR-F와 BrCSR-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 BrCSR을 코딩하는 유전자의 단편을 전기영동한 사진이다.

도 2는 각 BrCSR-F와 BrCSR-R 프라이머 쌍을 사용한 RT-PCR에 의해 배추로부터 증폭된 BrCSR을 코딩하는 유전자를 pGEM-T easy vector에 넣은 후 정확한 삽입을 확인하기 위해 EcoRI 효소를 처리하여 확인한 사진이다.

도 3은 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 BrCSR을 코딩하는 유전자의 시퀀스를 GenBank BlastX 프로그램 및 CLC free workbench 3.2.3 프로그램을 사용하여 포플라(*Populus trichocarpa*), 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), 포도(*Vitis vinifera*), 및 피마자(*Ricinus communis*) 시퀀스와 상동성을 비교한 결과이다.

도 4는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 BrCSR을 코딩하는 유전자의 염기서열 및 아미노산 서열 결과이다.

도 5는 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 BrCSR을 코딩하는 유전자를 NCBI Conserved Domain 프로그램을 이용하여 분석한 결과이다.

도 6은 RT-PCR에 의해 분리된 배추의 BrCSR 유전자를 과발현 시키는 형질전환용 과발현 벡터(pSL101)을 나타낸

그림이다.

도 7은 BrCSR 과발현 벡터를 이용하여 생산된 담배 형질전환체의 형질전환 유무를 PCR 검정을 통해 분석한 결과이다.

도 8은 PCR 검정으로 형질전환이 확인된 담배 형질전환체들을 대상으로 체내 BrCSR 유전자의 발현 수준을 quantitative real-time RT PCR 분석을 통해 확인한 결과이다.

도 9는 저온 저항성을 보이는 담배 형질전환체들을 대상으로 한 저온 스트레스 처리 후 표현형을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0035] 본 발명에 사용된 내혼계 배추(*Brassica rapa ssp. pekinensis* inbred line 'CT001')는 기내의 무균상태에서 키운 것에서 샘플을 채취하여 RNA 분리에 사용하였다. 이하에서, 본 발명의 BrCSR 유전자 동정과정 및 저온 저항성 검정을 설명한다.

[0036] **실시예 1. 배추 유래 저온 저항성 관련 유전자 조사**

[0037] 배추 유래 신규 저온 저항성 관련 유전자를 동정하기 위해 "*Brassica rapa* EST and Microarray Database"의 정보를 이용하였다. 상기 database는 내혼계 배추(*Brassica rapa ssp.* pekinensis inbred line 'Chiifu')를 3주간 생장상(광도 290 μmol · m^{-2} · sec^{-1}, 광주기 명처리 16시간/암처리 8시간, 생육온도 25℃, 생육습도 40 ~ 70%)에서 재배하고 저온(4℃)을 48시간까지 처리한 후, 생육단계별로 total RNA를 추출하여 cDNA library를 이용한 127,144개의 배추 EST 분석을 수행하고, KBGP-24K oligo chip을 이용하여 각 유전자들의 발현 변화를 비교·분석한 정보들을 제공한다. 본 발명자들은 "*Brassica rapa* EST and Microarray Database"를 활용하여, 저온 스트레스 처리 시 반응하는 유전자들 중 발현이 강하게 증가한 유전자들을 분류하고, 완전장을 갖추고 있으며 기능이 알려지지 않은 대상유전자 중에서 저온 저항성 유전자를 선정하였다.

[0038] 배추에서 저온 저항성 유전자 동정을 위해, 상기 KBGP-24K oligo chip의 585bp ORF(Open Reading Frame) 및 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 상동성을 가지는 cDNA 염기서열(AT1G02870)과 NCBI에 등록된 *Brassica rapa subsp. pekinensis* clone KBrB030F10 염기서열(AC189302)을 바탕으로 한 쌍의 프라이머를 제작하였고, 그 서열을 하기 [표 1]에 나타내었다.

[0039] [표 1]

[0040]

프라이머	염기서열
BrCSR-F(서열번호 1)	5'-ATG GCG AGG TCA AGG AGG A-3'
BrCSR-R (서열번호 2)	5'-TCA GAA TGG AAC TAA AAC AGG-3'

[0041] **실시예 2. 배추로부터 RNA 분리**

[0042] 배추(*Brassica rapa ssp. pekinensis*)의 잎을 액체 질소를 이용하여 파쇄하고, 1 ㎖ 트리졸(Trizol, Gibco BRL) 용액을 첨가하여 잘 섞어준 후, 5분 동안 상온에서 방치하였다. 200 ㎕의 클로로포름(chloroform)을 넣고 섞어준 다음, 4℃에서 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하고, 그 상등액을 새 튜브로 옮겼다. 이소프로페놀(isopropanol) 500㎕를 넣고 13,000rpm으로 15분간 원심분리 하여 침전시킨 뒤, 이소프로페놀을 제거하고 침전물을 75% 에탄올로 세척하였다. 그 다음, 에탄올이 없도록 잘 건조시키고, DEPC(diethyl pyrocarbonate) 처리된 멸균 증류수에 녹여 사용하였다.

[0043] **실시예 3. 저온 저항성 유전자의 분리**

[0044] 저온 저항성 유전자의 분리는 상기 확보된 RNA를 주형으로 oligo dT 프라이머(primer)와 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성한 뒤, 상기 [표 1]에 작성된 프라이머로 RT-PCR을 수행하여 분리하였다.

[0045] cDNA 합성 프로그램 조건은 하기와 같다.

[0046] 1㎍의 RNA를 oligo dT primer를 첨가하고 70℃에 보관하여 RNA 이차구조를 제거한 뒤, 45℃에서 30분간 역전사시키고, 사용된 역전사효소를 불활성화 시키기 위해 94℃에서 5분간 보관하였다. 그 후 합성된 cDNA 1㎍을 사용하여 상기 표 1의 프라이머와 태그 중합효소(Taq polymerase)로 PCR 하였다. PCR 프로그램은 94℃에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 40회 반복(cycle) 실행하고 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후, 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다.

[0047] 증폭된 저온 저항성 유전자의 단편을 전기영동을 통해 확인하였다(도 1). 각각의 프라이머들로 증폭된 단편들은 그 각각의 염기서열을 분석하기 위해 PCR 산물용 벡터 pGEM-T easy vector에 클로닝하여 재조합 벡터를 구축하였다.

[0048] **실험예 1. 재조합 벡터를 이용한 E. coli DH10β의 형질전환**

[0049] 대장균 DH10β를 LB 50㎖에 접종시켜 37℃에서 OD_{570} = 0.375~0.400이 되도록 배양한 후, 균주배양액을 3,000rpm에서 10분간 원심분리 하였고, 얻어진 침전물을 0.1M $CaCl_2$ 용액으로 풀어준 뒤 30분간 얼음에 보관하였다. 그 후, 3,000rpm에서 7분간 원심분리한 뒤 0.1M $CaCl_2$에 침전물을 녹이고, 상기 실시예 3의 재조합 벡터를 함께 섞어 얼음에 30분간 두었다가 42℃에서 90초간 열 충격을 주었다. 이 후, 10분간 얼음에 방치한 후, LB 배지 700㎕를 첨가하여 37℃에서 1시간 진탕배양 하였다. 배양액을 12000rpm으로 수 초간 원심분리한 후, 100㎕만 남기고, 상등액을 제거하였으며, 남은 상등액으로 침전물을 녹였다. 이후 앰피실린(ampicillin, 50 mg/ℓ), X-gal(200 mg/ℓ in N-N dimethylformamide) 및 IPTG(200 mg/ℓ)가 첨가된 고체 LB 배지에 녹인 침전물을 전개하고, 37℃에서 12시간 배양한 후 고체 배지에서 저항성을 보이며 흰색의 콜로니를 형성하는 형질전환 콜로니를 선발하였다.

[0050] **실험예 2. 재조합 DNA 분리 및 유전자 삽입 여부 조사**

[0051] 항생제가 첨가된 LB 배지 3㎖에 상기 선발한 형질전환 콜로니를 접종한 후 37℃에서 12시간 배양하고, 배양액을 4℃에서 12,000rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 침전된 균 덩어리에 Solution Ⅰ(200 ㎕/㎖)을 첨가하여 보텍스(vortex)를 수초 간 수행하여 충분히 풀어준 후, Solution Ⅱ(200 ㎕/㎖)를 첨가하여 조심스럽게 섞어주어 세포막이 완전히 깨어지도록 실온에서 5분간 방치하였다. 이 후 Solution Ⅲ(200 ㎕/㎖)를 첨가하여 잘 섞어주고, 얼음에서 10분간 방치한 뒤, 12,000rpm으로 4℃에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 획득하였다. 획득한 상등액의 1/10 양의 NaOAc와 2.5배의 100% 에탄올을 첨가하여 -20℃에서 2시간 동안 재조합 DNA를 침전시킨 후, 원심분리하여 침전물을 얻었다. 70% 에탄올로 침전물을 세척한 다음 멸균 증류수에 녹여 사용하였다.

[0052] 배추로부터 증폭된 저온 저항성 유전자의 pGEM-T easy vector 내로의 삽입 여부를 확인하기 위해서 제한효소 EcoR Ⅰ을 상기 분리한 재조합 DNA에 처리하여 확인하였다(도 2). 삽입된 자리에 근접한 T7 및 SP6 프라이머를 이용하여 염기서열을 조사하였다.

[0053] **실험예 3. 저온 저항성 유전자 전체 서열의 확인**

[0054] 염기서열 분석용 pGEM-T easy vector 내부에 클로닝 된 PCR 단편의 염기서열 분석은 GenBank BLAST program을 사용하여 이루어졌다. BrCSR-F(서열번호 1)와 BrCSR-R(서열번호 2) 프라이머 쌍으로 증폭된 585bp 산물의 염기서열과 아미노산 서열을 GenBank BlastX 프로그램 및 CLC free workbench 3.2.3 프로그램을 사용하여 분석한 결과, 포플라(*Populus trichocarpa*), 애기장대(*Arabidopsis thaliana*), 포도(*Vitis vinifera*), 피마자(*Ricinus communis*) 시퀀스와 높은 상동성을 확인하였다(도 3 및 도 4). 즉, 배추 RNA를 대상으로 BrCSR-F와 BrCSR-R 프

라이머 쌍을 이용해 RT-PCR을 수행한 결과, 배추의 저온 저항성 유전자의 전체 유전자가 증폭된다는 것을 확인할 수 있었다(도 4). 또한 NCBI Conserved Domain program을 이용하여 분리한 유전자에 핵인 단백질 16 도메인(Nucleolar protein 16 domain, NOP16)이 있는 것을 확인하였으며, E-value가 $1.14e^{-35}$로 그 정확도가 높은 것을 확인하였다(도 5). 확인된 서열번호 7의 염기서열을 바탕으로 시작 코돈(codon)과 종료 코돈을 결정하여 서열번호 8의 아미노산 서열을 결정한 후, 그것이 배추로부터 분리된 전장(full length)의 저온 저항성 유전자 BrCSR로 명명하였다.

[0055] **실시예 4. BrCSR 유전자의 과발현용 벡터 제작**

[0056] 분리한 BrCSR 유전자를 과발현(over-expression) 시키기 위하여 pH2GW7(VIB-Ghent University, Belgium)에 585bp의 BrCSR 유전자를 삽입하여 형질전환용 벡터인 pSL101을 제작하였다(도 6).

[0057] **실시예 5. PCR 검정을 통한 형질전환체 선발**

[0058] pSL101 벡터를 이용하여 생산된 담배 형질전환체들을 대상으로 형질전환 유무를 확인하였다. 먼저 hygromycin 저항성 유전자(hpt)를 대상으로 PCR 검정을 수행하여 생산된 3개체 모두 형질전환체로 확인되었다(도 7). PCR 프로그램은 94℃에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 후, 94℃에서 30초, 60℃에서 30초, 72℃에서 1분으로 40회 반복(cycle) 실행하고, 마지막으로 72℃에서 10분간 최종 연장시킨 후, 4℃를 유지하여 전체 반응을 종료하였다. PCR 검정을 위해 사용된 primer인 HPT-F(서열번호 3)과 HPT-R(서열번호 4)의 염기서열은 하기 [표 2]와 같다.

[0059] [표 2]

[0060]

프라이머	염기서열
HPT-F (서열번호 3)	5'-TTT CCA CT GCG AGT AC-3'
HPT-R (서열번호 4)	5'-TGT CGA GAA GTT TCT GAT CGA-3'

[0061] **실시예 6. Quantitative real-time RT PCR 분석을 통한 형질전환체의 BrCSR 유전자의 발현 수준 분석**

[0062] 실시예 5의 형질전환체로 확인된 3개체를 대상으로, 저온 스트레스 발생 시 체내 BrCSR 유전자의 발현 수준을 quantitative real-time RT PCR로 분석하였다. 그 결과, 3개체 모두 비형질전환체(CON) 보다 약 2배 가량 높은 발현 수준을 보였다(도 8). PCR 프로그램은 먼저 42℃에서 30분간 cDNA 합성 후, 95℃에서 10분간 변성(denature) 시켰다. 그 후, 95℃에서 10초, 59℃에서 15초, 72℃에서 20초 반응을 35회 반복하였다. 발현 분석 방법은 증폭량에 따른 형광 강도 수치(fluorescence intensity data)를 각 cycle의 종료 시마다 측정하였고, 측정치는 Rotor-Gene 6000의 분석 소프트웨어에 의해 분석하였다. 각 형질전환체의 BrCSR 발현 값은 actin 유전자의 발현 값에 비례하여 상대적으로 계산하였다. 사용된 primer인 CSReal-F(서열번호 5)와 CSReal-R(서열번호 6)의 염기서열은 하기 [표 3]과 같다.

[0063] [표 3]

[0064]

프라이머	염기서열
CSReal-F (서열번호 5)	5'-ATG GCG AGG TCA AGG AGG-3'
CSReal-R (서열번호 6)	5'-TCA GAA TGG AAC TAA AAC A-3'

[0065] **실시예 7. 저온 자극 시 담배 형질전환체들의 저온 저항성 검정**

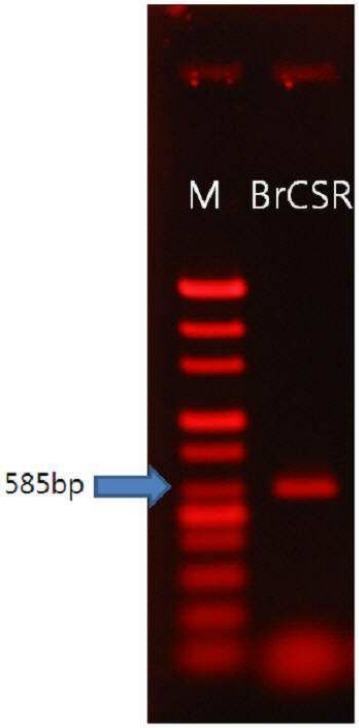
[0066] Hygromycin 저항성 유전자를 이용한 PCR 검정으로 형질전환 여부가 확인되고, quantitative real-time RT PCR 분석으로 비형질전환체 보다 높은 발현량이 확인된 3개체의 형질전환체를 대상으로 실제 저온 스트레스 발생시

표현형의 변화(저온 저항성 여부)를 관찰하였다. 저온 자극은 본엽이 7 ~ 9매가 된 비형질전환체와 형질전환체를 저온처리가 진행되는 동안 다른 어떠한 비생물적 자극(수분, 온도, 빛 등)이나 생물적 자극(병원균 감염, 해충 피해 등)이 발생하지 않는 제한된 조건(광도 250 μmol · m^{-2} · sec^{-1}, 광주기 16시간 명처리/8시간 암처리, 처리온도 4℃, 습도 30 ~ 50%)에서 표현형적으로 명확한 차이를 보이는 시기(생장 멈춤, 엽색 변화, 도복 여부)까지 실시하였다.

[0067] 그 결과, 저온 처리 5일째가 되었을 때, 대조군인 비형질전환체 담배는 잎과 줄기의 탄력을 잃고 힘없이 쓰러졌으며, 엽색이 점차 연해지고, 더 이상 생장하지 못하는 모습을 보였다. 반면, 형질전환된 3개체들은 모두 저온처리 전과 동일한 모습으로서 표현형상의 차이를 보이지 않았다(도 9).

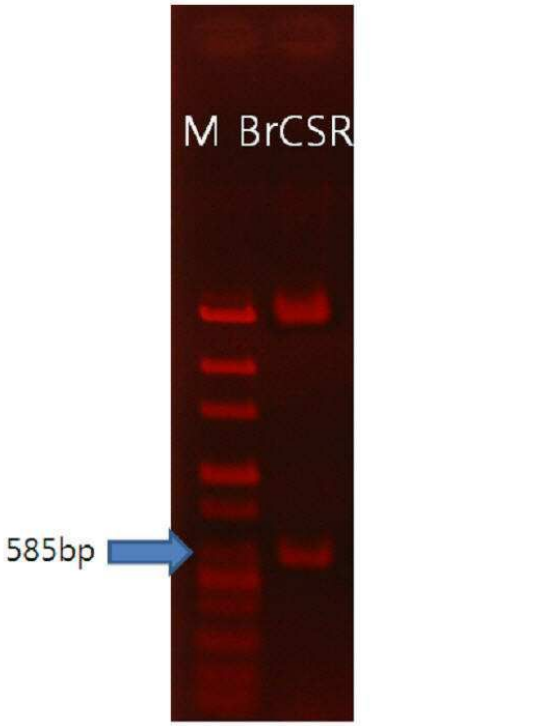
도면

도면1



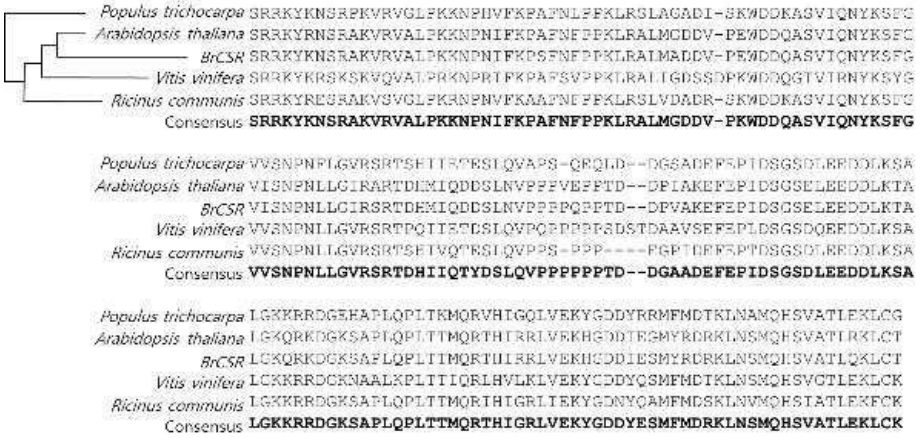
[주] M, 1Kb size 분자 마커

도면2



[주] M, 1Kb size 분자 마커

도면3



도면4

```
M  A  R  S  R  R  K  Y  K  N  S  R  A  K  V  R  V  A  L  P      20
ATGGCGAGGTCAAGGAGGAAGTACAAGAACTCAAGAGCCAAAGTACGCGTCGCACTCCCC    60

K  K  N  P  N  I  F  K  P  S  F  N  F  P  P  K  L  R  A  L      40
AAGAAGAACCCAAACATCTTCAAACCATCTTTCAACTTCCCTCCCAAGCTCCGCGCCCTC   120

M  A  D  D  V  P  E  W  D  D  Q  A  S  V  I  Q  N  Y  K  S      60
ATGGCCGACGACGTCCCCGAGTGGGACGATCAAGCCAGCGTCATCCAGAACTACAAATCC   180

F  G  V  I  S  N  P  N  L  L  G  I  R  S  R  T  D  H  M  I      80
TTCGGCGTCATCTCCAACCCTAACTTGCTCGGCATCCGATCTCGCACCGACCATATGATC   240

Q  D  D  S  L  N  V  P  P  P  P  Q  P  P  T  D  D  P  V  A     100
CAGGACGACTCCCTCAACGTTCCCCCACCTCCTCAGCCGCCGACCGATGATCCTGTGGCT   300

K  E  F  E  P  I  D  S  G  S  E  L  E  E  D  D  L  K  T  A     120
AAGGAGTTCGAGCCTATCGATTCCGGTAGCGAACTCGAGGAAGACGATCTTAAGACAGCA   360

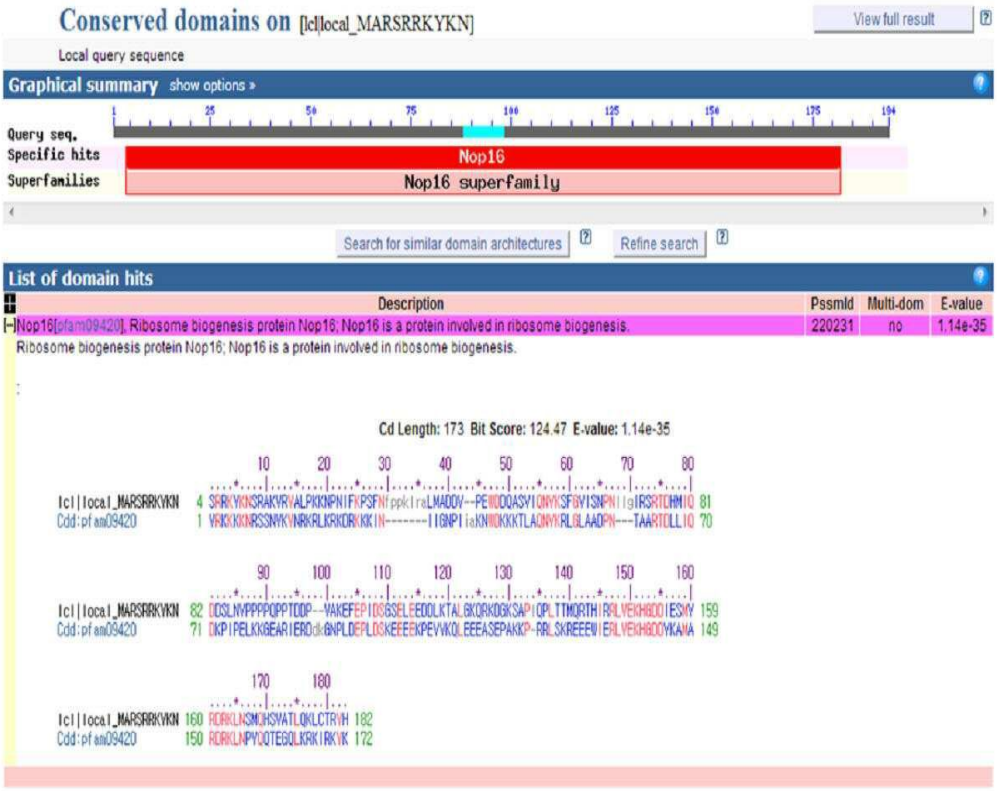
L  G  K  Q  R  K  D  G  K  S  A  P  L  Q  P  L  T  T  M  Q     140
TTAGGGAAGCAAAGAAAAGATGGAAAGAGTGCTCCTTTACAGCCACTTACTACTATGCAA   420

R  T  H  I  R  R  L  V  E  K  H  G  D  D  I  E  S  M  Y  R     160
CGTACGCATATCAGACGTTTGGTTGAGAAACATGGTGATGACATTGAGTCCATGTACCGG   480

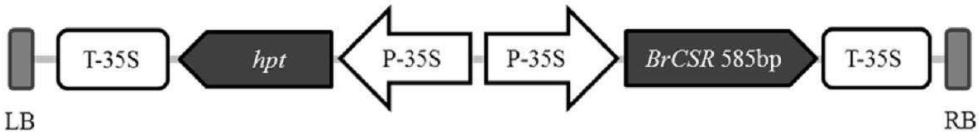
D  R  K  L  N  S  M  Q  H  S  V  A  T  L  Q  K  L  C  T  R     180
GACAGGAAGCTAAACTCGATGCAGCATTCGGTTGCAACACTACAGAAGCTGTGCACAAGA   540

Y  H  M  Y  K  D  K  N  P  V  L  V  P  F  *                    194
TATCACATGTACAAGGATAAGAACCCTGTTTTAGTTCCATTCTGA                  585
```

도면5

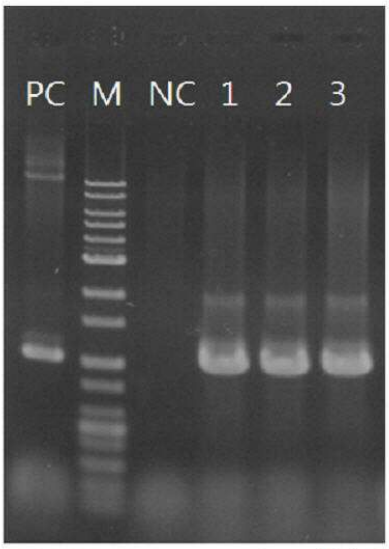


도면6



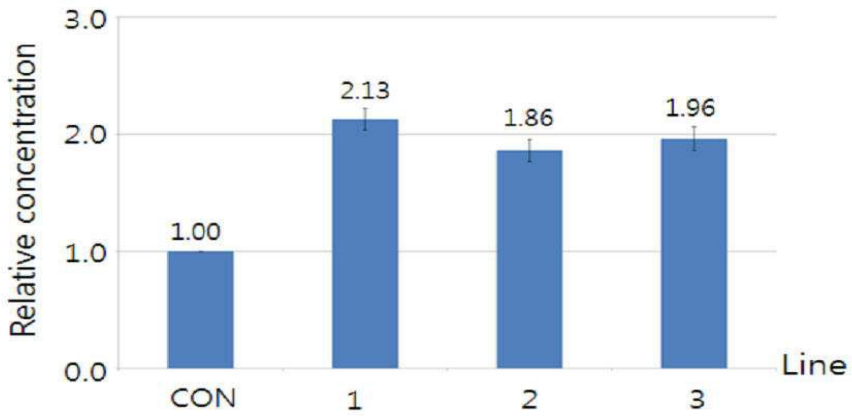
[주] LB, left border
T-35S, Cauliflower mosaic virus 35S terminator
hpt, hygromycin 저항성 유전자
P-35S : Cauliflower mosaic virus 35S promoter
RB, right border

도면7



[주] PC, hygromycin 저항성 유전자
M, 1Kb size 분자 마커
NC, 비형질전환체
1~3, 담배 형질전환체

도면8



[주] CON, 비형질전환체
1~3, 담배 형질전환체

도면9



[주] CON, 비형질전환체
1~3, 담배 형질전환체

서 열 목 록

<110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY

<120> Gene Implicated in Cold Stress Tolerance and Transformed Plants with the Same

<130> SDP50498

<150> KR 10-2013-0119090

<151> 2013-10-07

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 1

atggcgaggt caaggagga 19

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 2

tcagaatgga actaaaacag g 21

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 3

tttccactgc gagtac 16

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 4

tgtcgagaag tttctgatcg a 21

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 5

atggcgaggt caaggagg 18

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR primer

<400> 6

tcagaatgga actaaaaca 19

<210> 7

<211> 585

<212> DNA

<213> Brassica rapa ssp. pekinensis

<400> 7

atggcgaggt caaggaggaa gtacaagaac tcaagagcca aagtacgcgt cgcactcccc 60

aagaagaacc caaacatctt caaaccatct ttcaacttcc ctcccaagct ccgcgccctc 120

atggccgacg acgtccccga gtgggacgat caagccagcg tcatccagaa ctacaaatcc 180

ttcggcgtca tctccaaccc taacttgctc ggcatccgat ctcgcaccga ccatatgatc 240

caggacgact ccctcaacgt tcccccacct cctcagccgc cgaccgatga tcctgtggct 300

aaggagttcg agcctatcga ttccggtagc gaactcgagg aagacgatct taagacagca 360

ttagggaagc aaagaaaaga tggaaagagt gctcctttac agccacttac tactatgcaa 420

cgtacgcata tcagacgttt ggttgagaaa catggtgatg acattgagtc catgtaccgg 480

gacaggaagc taaactcgat gcagcattcg gttgcaacac tacagaagct gtgcacaaga 540

tatcacatgt acaaggataa gaaccctgtt ttagttccat tctga 585

<210> 8

<211> 194

<212> PRT

<213> Brassica rapa ssp. pekinensis

<400> 8

Met Ala Arg Ser Arg Arg Lys Tyr Lys Asn Ser Arg Ala Lys Val Arg
1 5 10 15

Val Ala Leu Pro Lys Lys Asn Pro Asn Ile Phe Lys Pro Ser Phe Asn
20 25 30

Phe Pro Pro Lys Leu Arg Ala Leu Met Ala Asp Asp Val Pro Glu Trp
35 40 45

Asp Asp Gln Ala Ser Val Ile Gln Asn Tyr Lys Ser Phe Gly Val Ile
50 55 60

Ser Asn Pro Asn Leu Leu Gly Ile Arg Ser Arg Thr Asp His Met Ile
65 70 75 80

Gln Asp Asp Ser Leu Asn Val Pro Pro Pro Pro Gln Pro Pro Thr Asp
85 90 95

Asp Pro Val Ala Lys Glu Phe Glu Pro Ile Asp Ser Gly Ser Glu Leu
100 105 110

Glu Glu Asp Asp Leu Lys Thr Ala Leu Gly Lys Gln Arg Lys Asp Gly
115 120 125
Lys Ser Ala Pro Leu Gln Pro Leu Thr Thr Met Gln Arg Thr His Ile
130 135 140
Arg Arg Leu Val Glu Lys His Gly Asp Asp Ile Glu Ser Met Tyr Arg
145 150 155 160
Asp Arg Lys Leu Asn Ser Met Gln His Ser Val Ala Thr Leu Gln Lys
165 170 175
Leu Cys Thr Arg Tyr His Met Tyr Lys Asp Lys Asn Pro Val Leu Val
180 185 190
Pro Phe