



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0129822
(43) 공개일자 2010년12월10일

(51) Int. Cl.

C12N 15/63 (2006.01) *A01H 1/00* (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0048372

(22) 출원일자 2009년06월02일

심사청구일자 2009년06월02일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

윤대진

경남 사천시 용현면 선진리 517번지

박형철

경상남도 진주시 초전동 757-1번지

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김동완

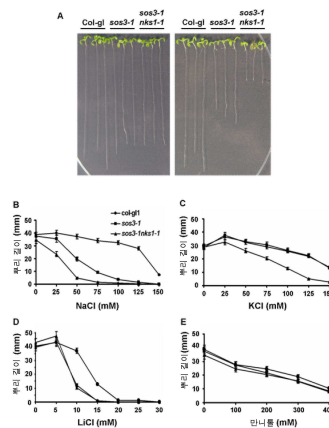
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) NKS1 유전자 발현을 통한 고염 저항성을 지닌 아라비도시스 식물체

(57) 요약

본 발명은 NKS1 유전자(GenBank 수납 번호: NM_119249)를 발현시켜 고농도 나트륨염에 대한 저항성 및 나트륨과 칼륨의 이온 항상성을 증진시킨 아라비도시스 식물체를 제공하는 것이다. 즉 아라비도시스 식물체를 고염 또는 건조 스트레스로부터 식물체의 저항성을 증진시키는 유전자의 발현을 측정하는 것이며 NKS1 유전자의 발현이 고염 또는 건조 스트레스로부터 식물체의 저항성을 증진시킴과 동시에 나트륨과 칼륨의 이온 항상성을 유지시킴을 측정하여 NKS1 유전자 발현을 통한 고염 저항성 아라비도시스 식물체를 제공하는 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

백동원

경상남도 진주시 금산면 장사리 두산위브APT 108동
1002호

최원균

경기도 안산시 상록구 장하동 227-5번지

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20070301-034-030-009-01-00

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관

연구사업명 바이오그린21사업(바이오그린)

연구과제명 스트레스 반응표적 유전자를 이용한 재해저항성 유전자의 발굴 및 기능해석

기여율

주관기관 경상대학교

연구기간 2009년 01월 01일 ~ 2009년 12월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

NKS1 유전자(GenBank 수납 번호: NM_119249)를 발현시켜 고농도 나트륨염에 대한 저항성 및 나트륨과 칼륨의 이온 항상성을 증진시킨 아라비돕시스 식물체

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 아라비돕시스 식물체는 고농도 NaCl 또는 KCl로부터 뿌리 생장 억제를 저해함을 특징으로 아라비돕시스 식물체

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 아라비돕시스 식물체는 뿌리 내의 Na^+ 이온 축적을 저해하고, 뿌리 내의 K^+ 이온/ Na^+ 이온 비율을 유지케 하며 K^+ 이온의 감소를 저해함을 특징으로 하는 아라비돕시스 식물체

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 아라비돕시스 식물체는 건조 스트레스에 저항성을 지님을 특징으로 하는 아라비돕시스 식물체

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 NKS1 유전자 발현을 통한 고염 저항성을 지닌 아라비돕시스 식물체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 NKS1 유전자(GenBank 수납 번호: NM_119249)를 발현시켜 고농도 나트륨염에 대한 저항성 및 나트륨과 칼륨의 이온 항상성을 증진시킨 아라비돕시스 식물체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식물생장을 위해서는 토양 내에 미네랄과 같은 필수 영양소를 필요로 한다. 그러나 과다하게 존재하는 염분농도는 식물의 생장을 저해하는 중요한 요소이며 작물의 생산성과도 밀접한 연관을 보인다. 식물이 고염 스트레스에 노출되게 되면 세포 내에 삼투압의 불균형과 이온농도의 불균형을 일으키게 된다. 또한 2차 스트레스로서 산화스트레스, 세포막 파괴, 영양장애, 대사장애, 광합성 장애 등 여러 가지 문제를 야기시킨다. 토양 중에 존재하는 이온 독성 중 Na^+ 이온에 대한 독성은 가장 심각한 이온 스트레스로 간주된다. 고염 농도에 의한 삼투압의 불균형은 물의 흡수를 방해하며 생리학적으로 건조 스트레스를 받은 상태와 동일하게 된다.

[0003] 최근 많은 연구에서 애기장대의 유전학 시스템을 이용하여 내염성 스트레스 적응에 이상을 초래하는 변이체가 선별되어 그 기능이 밝혀지고 있다. 이들 중 SOS3(salt overly sensitive 3) 유전자는 NaCl에 극히 감수성을 보였으며 분자생물학적 연구를 통하여 SOS3 유전자는 효모의 calcineurine B 서브유니트와 상동성을 보였으며

Ca^{2+} 결합 활성을 보였다. 이러한 기능을 지닌 SOS3 유전자는 환경스트레스 신호전달에 중요한 인자이며 SOS3 변이체를 이용한 새로운 변이체 풀(pool)의 구축을 통하여 SOS 경로에 존재하는 다양한 유전자의 기능을 연구할 수 있다.

[0004] 활성화 태깅 벡터인 pSKI105 벡터를 이용하여 sos3 돌연변이 식물에 돌연변이 식물체를 구축한 후 NaCl에 민감성을 보이는 변이체를 선별하였다. 50 mM NaCl이 함유된 생장배지에서 sos3 보다 더 민감성을 보이는 NKS1 유전자를 함유한 식물체를 선별하고 다른 이온 스트레스와 삼투압 스트레스에 반응을 보이는지 확인한 결과 NKS1 유전자가 NaCl과 KCl에 뿌리생장에 관여하는 표현형을 보임을 확인하였다.

[0005] 이러한 표현형을 보이는 NKS1의 유전자를 확인하기 위해 TAIL-PCR을 이용하여 유전자를 클로닝하고 또 다른 NKS1의 대립형질을 SALK institute로부터 확보하여 표현형을 확인해본 결과 NKS1의 표현형을 보이는 것으로 보아 NKS1 돌연변이체의 표현형은 NKS1 유전자의 파괴로 야기된 넉아웃 형태일 것으로 판단된다.

[0006] 이러한 NKS1 유전자가 Na^+ 와 K^+ 의 민감성을 보이는 것이 세포 내 이온불균형에 의한 것인지를 확인하기 위해서 세포 내 이온농도를 측정해본 결과 NKS1 넉아웃 변이체에서 높은 농도의 Na^+ 이온과 낮은 농도의 K^+ 이온을 축적하는 것을 확인하였다. 식물세포가 고염의 스트레스에 적응하기 위해서는 이와 같은 Na^+/K^+ 이온의 비율이 매우 중요한 역할을 하는데 NKS1 넉아웃 변이체는 이러한 이온 항상성의 불균형에 의해 고염에 민감한 것을 알 수 있다. 또한 CoroNa Green 염색을 통하여 NKS1 넉아웃 변이체의 뿌리에서 높은 농도의 Na^+ 이온을 축적함을 확인할 수 있었다.

[0007] 고염에 민감성을 보이는 많은 변이체들은 또한 건조 스트레스에도 민감한 표현형을 보인다. 이러한 표현형을 확인하기 위해서 NKS1 야생형과 NKS1 넉아웃 변이 식물에 건조 스트레스를 처리하여 관찰한 결과 NKS1 넉아웃 변이체가 NKS1 야생형보다 더욱 건조 스트레스에 민감하였으며, 수분 손실율을 측정해본 결과 더 많은 수분을 NKS1 넉아웃 변이체가 상실하는 것을 확인하였다.

[0008] 따라서 본 발명자들은 NKS1 유전자의 발현이 아라비도시스 식물체를 고염 또는 건조 스트레스로부터 식물체의 저항성을 증진시키는 물론 나트륨과 칼륨의 이온 항상성을 유지시키는 발견하고 NKS1 유전자 발현을 통한 고염 저항성 아라비도시스 식물체를 개발함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0009] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 아라비도시스 식물체를 고염 또는 건조 스트레스로부터 식물체의 저항성을 증진시키는 유전자의 발현을 측정코자 한 것이며 NKS1 유전자의 발현이 고염 또는 건조 스트레스로부터 식물체의 저항성을 증진시키고 동시에 나트륨과 칼륨의 이온 항상성을 유지시키는 측정하고 NKS1 유전자 발현을 통한 고염 저항성 아라비도시스 식물체를 개발코자 한 것이다.

과제 해결수단

[0010] 본 발명의 목적은 NKS1 유전자(GenBank 수납 번호: NM_119249)를 발현시켜 고농도 나트륨염에 대한 저항성 및

나트륨과 칼륨의 이온 항상성을 증진시킨 아라비돕시스 식물체를 제공하는 것이다.

[0011] 또한 상기 아라비돕시스 식물체는 고농도 NaCl 또는 KCl로부터 뿌리 성장 억제를 저해함을 특징으로 한다.

[0012] 또한 상기 아라비돕시스 식물체는 뿌리 내의 Na^+ 이온 축적을 저해하고, 뿌리 내의 K^+ 이온/ Na^+ 이온 비율을 유지케 하며 K^+ 이온의 감소를 저해함을 특징으로 한다.

[0013] 또한 상기 아라비돕시스 식물체는 건조 스트레스에 저항성을 지님을 특징으로 한다.

효 과

[0014] 본 발명의 효과는 아라비돕시스 식물체를 고염 또는 건조 스트레스로부터 식물체의 저항성을 증진시키는 유전자의 발현을 측정하는 것이며 NKS1 유전자의 발현이 고염 또는 건조 스트레스로부터 식물체의 저항성을 증진시킴과 동시에 나트륨과 칼륨의 이온 항상성을 유지시킴을 측정하여 NKS1 유전자 발현을 통한 고염 저항성 아라비돕시스 식물체를 제공하는 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0015] NKS1 단백질의 기능을 연구하기 위하여 NKS1의 아미노산 서열을 분석한 결과 1개의 ER 잔류 신호 펩타이드가 존재하는 것을 확인하였다. 정확한 NKS1 단백질의 위치를 확인하기 위해 NKS1 단백질에 GFP(녹색 형광 단백질)를 융합하여 애기장대의 원형질세포에 형질도입시켜 확인해본 결과 소포체에 위치함을 ER 마커인 BiP::RFP를 통하여 확인하였다. 또한 대부분의 ER 단백질들은 ER 스트레스인 DTT나 Tunicamycin같은 화학물질에 의해 그 발현이 유도되는 것으로 알려져 있다. 따라서 NKS1 유전자의 발현이 이러한 화학물질에 대해 반응하는지 확인해본 결과 야생형에서 NKS1 전사체의 발현이 증가함을 확인하였다.

[0016] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0017] *sos3-1* 인헨서로서 *nks1*의 분리

[0018] *sos3-1* 유전자 배경 내 65,000개 개별적 T-DNA 삽입 Nick아웃 변이 라인 유래의 T2 모종이 NaCl에 대한 *sos3-1* 과민성에 대한 억제인자 또는 인헨서에 대해 선별되었다. 50 mM NaCl에서 *sos3-1*의 증진된 민감성을 나타내는 *sos3-Inks1-1*(Na^+ 및 K^+ 민감성 1) Nick아웃 변이체가 분리되었다. 정상 성장 조건에서 *sos3-Inks1-1* Nick아웃 변이체의 뿌리 생장은 Col-gl1 및 *sos3-1*과 비교시 어떠한 억제 표현형도 나타내지 않았다(도 1A, 좌측).

[0019] 그러나 배지 내 50 mM NaCl의 보충시 *sos3-1* 단일 Nick아웃 변이체가 *col-gl1*보다 증가된 뿌리 성장 억제 표현형을 나타내었고 *sos3-1 nks1-1* 이중 Nick아웃 변이체는 *sos3-1* Nick아웃 변이체와 비교시 더욱 더 강한 뿌리 성장 지연을 나타내었다(도 1A, 우측; 도 1B). *sos3-Inks1-1* Nick아웃 변이체는 *sos3-1* 식물체와 역교배되었고 F1 자손(179 중 179)은 BASTA(제초제) 저항적이고 모든 Nick아웃 변이체는 *sos3-1*과 동일하게 50 mM NaCl 배지 내에서 뿌리 성장 민감성을 나타내었다. *sos3-1* 표현형 및 *nks1-1* 표현형에 대해 402:132(=3:1) 비율로 분리된 자가수분을 통한 F2 자손(n=534)은 열성 Nick아웃 변이의 결과이고 제초제 저항성 표현형(n=140, 분리 비율 = 103:37)은

nks1-1 녹아웃 변이가 단일 T-DNA 삽입임을 나타낸다(표 1).

표 1

***nks1-1*의 유전자 분석**

세대	유전형 (교배)	시험 식물 (번호)	<i>sos3</i> ^a	돌연변이체 ^a	저항성 ^b	민감성 ^b
F1	<i>sos3-1(F)/sos3-1nks1-1(M)</i>	179	179	0	179	0
F2	<i>sos3-1(F)/sos3-1nks1-1(M)</i>	534	402	132	—	—
		140	—	—	103	37

^a 돌연변이체 및 *sos3* 표현형은 50 mM NaCl로의 뿌리-굴곡 분석을 이용하여 측정되었음.

^b 저항성 또는 민감성은 식물체를 바스타로 스프레이함으로써 측정되었음.

[0020]

[0021]

sos3-1nks1-1 녹아웃 변이체가 이온 스트레스 또는 삼투압 스트레스에 민감한지 여부를 측정하기 위해 정상 발아된 4-일령 모종이 KCl, LiCl 및 만니톨을 함유한 스트레스 배지로 옮겨졌다. *sos3-1nks1-1* 녹아웃 변이 모종은 *sos3-1*과 비교시 LiCl 및 만니톨 배지 내에서 뿌리 생장 억제를 나타내지 않았으나(도 1D~E), *sos3-1nks1-1*은 KCl 배지 내에서 증가된 뿌리 생장 지연을 나타내었다(도 1C). 이들 결과는 염 과민성 표현형의 *nks1* 녹아웃 변이체는 삼투압 스트레스에 대한 과민성으로부터 유발되지 않고 이온 독성 Na⁺ 및 K⁺에 특이적임을 나타낸다.

[0022]

*NKSI*의 분자 클로닝 및 *nks1-1* 두 번째 대립유전자의 표현형

[0023]

nks1-1 내의 게놈 측면 T-DNA 삽입을 확인하기 위해 열 비대칭 교차 PCR(TAIL-PCR)이 이용되었다. 그 결과는 T-DNA 삽입이 At4g30996의 첫 번째 엑손 및 5'-UTR 내에 위치함을 나타내고 *LB3*, *NKSI* 전방 및 역방 프라이머를 이용한 게놈 DNA PCR에 의해 T-DNA 삽입을 확인하였다. *NKSI* 코딩 영역의 첫 번째 인트론 내에 2개의 T-DNA 삽입을 지닌 *nks1-1*의 T-DNA 삽입 대립유전자(SALK_151073, *nks1-2*로 표기됨)는 오하이오주립대학교에 소재한 아라비도시스 생물자원 센터의 Salk Institute Laboratory에 의해 입증되었다. 역전사 PCR(RT-PCR)은 *NKSI* 전사체가 *sos3-1nks1-1* 녹아웃 변이체(도 2B) 및 *nks1-2*(도 2C) 내에서 검출 가능하지 않음을 나타내었다.

[0024]

nks1-2 내 *sos3-1nks1-1* 표현형의 염 민감성을 확인하기 위해 본 발명자들은 다양한 스트레스 배지 상의 *nks1-2*의 뿌리 생장 억제를 조사하였다. *nks1-2*도 NaCl 및 KCl에 대해 뿌리 생장 억제를 나타내었으나 LiCl 및 만니톨에서는 나타내지 않았다(도 2E~H). 이러한 결과는 *sos3-1nks1-1* 뿌리 생장 표현형에서 중전 관찰한 바와 유사한 것이다.

[0025]

nks1 녹아웃 변이체 내 구성적 *NKSI* 발현의 유전자 상보성

[0026]

sos3-1nks1-1 및 *nks1-2* 녹아웃 변이체 표현형이 *nks1* 녹아웃 변이를 유발하는지 여부를 규명하기 위해 전체 길 이 *NKSI* cDNA가 이원 벡터 pCambia 1300-PT 내로 클론되었고 아그로박테리움-매개 형질전환을 통해 CaMV 35S 프로모터의 제어 하에 *sos3-1nks1-1* 및 *nks1-2* 내로 형질전환되었다. 형질전환체는 하이그로마이신(Hygromycin) B 저항성에 의해 선택되었고 자손은 스트레스 배지 상에서 11일간 뿌리 생장에 의해 시험되었다. 빈 pCambia 1300-PT 벡터와 비교시 *NKSI* cDNA의 구성적 발현은 각각 50 mM NaCl 및 75 mM NaCl 내에서 *sos3-1nks1-1* 및 *nks1-2*의 뿌리 생장 억제를 완전하게 복구시켰다(도 3C). *NKSI* 과발현 식물체는 Col-*gll1*, Col-*gll1sos3-1* 및 Col-0 식물체와 비교시 증가된 스트레스 내성 표현형을 나타내지 않았다. RT-PCR 분석은 야생형 *NKSI* 전사체

가 벡터가 아닌 *NKS1* 상보성 라인 내에서만 발현됨을 입증하였다(도 3B 및 3D).

[0027] *nks1* 넉아웃 변이체의 이온 함량 측정

[0028] 이온 독성 조건에서 생장을 조절하기 위해 식물체는 세포질 내 높은 K^+ 농도 및 낮은 Na^+ 농도를 유지한다. 본 발명은 NaCl 부재 또는 존재시 Col-*g11 sos3-1*, Col-0 및 *nks1* 넉아웃 변이체의 Na^+ 및 K^+ 축적을 비교하기 위해 이온 함량을 측정하였다. NaCl 부재시 *sos3-Inks1-1* 넉아웃 변이체의 슈트(shoot) 및 뿌리는 *sos3-1*과 비교시 동일한 함량의 Na^+ (도 4A 및 4D) 및 다소 낮은 함량의 K^+ (도 4B 및 4E)를 축적하였다. 그러나 50 mM NaCl에서 *sos3-Inks1-1* 모종은 *sos3-1*과 비교시 높은 수치의 Na^+ (도 4A 및 4D) 및 낮은 수치의 K^+ (도 4B 및 4E)를 축적하였다. *nks1-2*도 50 mM NaCl 존재시 유사한 패턴의 이온 함량을 나타내었다. 50 mM NaCl 조건에서 *sos3-1 nks1-1* 및 *nks1-2* 넉아웃 변이체 내의 K^+/Na^+ 비율은 Col-*g11 sos3-1* 및 Col-0 보다 낮다(도 4C 및 4F).

[0029] *nks1* 내의 과량의 나트륨 이온 축적

[0030] 이온 함량 측정 데이터는 *nks1* 넉아웃 변이체가 세포 내 높은 함량의 Na^+ 를 축적함을 나타내었다. 뿌리 세포 내의 Na^+ 를 관찰하기 위해 본 발명은 150 mM NaCl로 24시간 동안 처리시키고 신규한 Na^+ 반응지시 염료인 CoroNa-Green을 통해 염색하였고 공초점 현미경 하에서 관찰하였다. 현미경 이미지는 *nks1-2* 이 NaCl 존재시 Col-0보다 더 많은 Na^+ 를 축적함을 나타내었다(도 5A 및 5B).

[0031] 소포체 내에 위치하는 NKS1

[0032] 예측된 아미노산 서열은 Expasy 프로그램(www.expasy.org/prosite)의 단백질 데이터베이스에서 검색되었다. 생명정보학 분석에 따라 NKS1은 하나의 N-미리스틸화 사이트(myristoylation site), 막형단 도메인 및 N-말단 영역에 ER 잔류 신호 펩타이드 및 중앙 내 2개의 N-당화 사이트를 지닌 19 KDa의 신규한 단백질을 암호화한다. NKS1의 하위세포 위치를 측정하기 위해 본 발명은 NKS1의 C-말단에 인프레임으로 녹색 형광 단백질(GFP)을 구축하였다. 생명정보학 분석 데이터는 NKS1이 ER 잔류 신호 펩타이드를 지님을 나타내었다. NKS1의 위치를 검증하기 위해 본 발명은 아라비도시스 원형질체 내에서 *NKS1::GFP* 및 *BiP1::RFP*, ER 마커를 동시-발현시켰다. GFP 신호는 RFP 신호와 대부분 병합되었고 이는 NKS1이 ER에 위치함을 나타낸다.

[0033] NKS1의 ER 스트레스 반응

[0034] 대부분의 ER 거주 단백질은 단백질 폴딩(folding) 또는 분비 과정 억제 반응인 ER 스트레스 신호전달과 관련되었다. 아라비도시스 내에서 *NKS1*이 ER 스트레스 반응과 관련되는지 여부를 측정하기 위해 본 발명은 Col-0 및 *nks1-2* 모종에 대해 ER 스트레스 유도 화합물질인 투니카마이신(tunicamycin)(N-결합 당화의 억제제), DTT(이황 결합 형성을 억제하는 환원 화합물질) 및 아제티딘-2-카복실레이트(azetidine-2-carboxylate)(AZC, 단백질 구조를 교란시키는 프롤린 아날로그)를 시험하였다. ER 스트레스 마커 유전자(*BiP1&2*, *BiP3* 및 *PDI*)의 발현 패턴은 ER 스트레스 존재시 Col-0 및 *nks1-2* 간에 차이를 나타내지 않았으나 Col-0 내 *NKS1*의 전사 수치는 ER 스트레스 반응에 대해 증가되었다(도 7).

- [0035] 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0036] 식물 재료
- [0037] 활성화 표지 벡터[pSKI105; D. Weigel, The Salk Institute, La Jolla, CA, ref(Weigle, 2000)에 의해 제공됨]가 체초제 선택을 기반으로 한 유전자 배경으로 아라비도시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) Col-0 *gll sos3-1* 내에 삽입 집단(T1)을 생성하는데 이용되었다. T2 식물체 유래의 자손은 Col-0 *gll sos3-1* 배경 식물체와 비교시 75 mM NaCl에 대해 과민성을 나타내는 넉아웃 변이체에 대해 선택되었다. 아라비도시스 종자는 표면-멸균되고 4℃에서 3일간 암조건으로 침지되었다. 모든 식물체는 생장 챔버에서 16시간-명/8시간-암 조건으로 22℃에서 생장되었다. 뿌리 생장 분석의 경우 모종은 4일간 1.2%(w/v)를 함유한 반강도 Murashige and Skoog(MS) 염 배지 상에서 수직으로 발아되었고 생장 챔버 내에서 추가 11일간 다양한 스트레스(NaCl, KCl, LiCl 및 만니톨)의 존재 또는 부재 배지로 이동되었다. 배지(1X MS 염, 3% 슈크로스, 0.25% Phytigel(Sigma), pH 5.7) 상에서 수평으로 배양된 식물체가 분자 분석에 이용되었다.
- [0038] (실시예 1) *sos3-1 nks1-1* 넉아웃 변이체의 분리
- [0039] Liu YG, 1995에 기술된 바와 같이 *sos3-1 nks1-1* 넉아웃 변이 식물체 내 삽입된 T-DNA의 좌측 경계 서열을 지닌 측면 계놈 DNA가 열 비대칭 교차 PCR(TAIL-PCR)에 의해 분리되었다. T-DNA 좌측 경계의 3개 프라이머의 집합 세트: LB1: 5'-ATACGACGGATCGTAATTTGTC-3'(서열번호: 1), LB2: 5'-TAATAACGCTGCGACATCTAC-3'(서열번호: 2) 및 LB3: 5'-TTGACCATCATACTCATTGCTG-3'(서열번호: 3) 및 축퇴성 프라이머(#1: 5'-NTCGASTWTSWGTT-3'(서열번호: 4); #2: 5'-NGTCGASWGANAWGAA-3'(서열번호: 5) 및 #3: 5'-WGTGNAGWANCANAGA-3'(서열번호: 6); W = A/T, S = C/G, 및 N = A/T/G/C)가 TAIL-PCR에 사용되었다. PCR 증폭 서열은 측정되고 BLASTN 분석되었다(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). 삽입을 확인하기 위해 본 발명자들은 하기 프라이머 세트를 이용하여 진단 PCR을 수행하였다: 야생형 NKS1 서열의 경우, 전방 5'-ATGCCTCGTCGATCCGGAGATTG-3'(서열번호: 7), 역방 5'-TTACTCACCTTCCCAACCTGATTGC-3'(서열번호: 8) 및 LB3 프라이머. Col-0 백그라운드 내의 *nks1-1* 대립유전자(*nks1-2*)는 Salk institute Genome Analysis Laboratory 데이터베이스 내에서 확인되었고 T3 종자는 오하이오 주립대학교에 소재한 아라비도시스 생물자원 센터의 Salk Institute Laboratory에 의해 입증되었다. *nks1-2* 동형접합성 라인은 역방, 전방 및 LB3 프라이머 세트를 이용한 PCR에 의해 선택되었다.
- [0040] (실시예 2) RNA 제조 및 전사 분석
- [0041] 전체 RNA는 스트레스 존재 또는 부재의 1X MS 배지 상의 10-일령 모종으로부터 추출되었고, 1 µg의 전체 RNA는 20 µl의 반응 부피로 첫 번째 스트랜드 cDNA 합성(Invitrogen Co., CA., USA)에 사용되었다. 1 µl의 cDNA 생성물은 역전사 PCR(RT-PCR, 25 사이클)에 사용되었다. 튜불린에 특이적인 프라이머(Tub 전방; 5'-CGTGGATCGCAGCAATACAGAGCC-3'(서열번호: 9), Tub 역방: 5'-GAAGACGAAGTGAAGTGCAGGAGG-3'(서열번호: 10))는 적가 대조군으로 사용되었다. RNA 젤 블롯 하이브리다이제이션은 Zhu J, 2008에 기술된 바와 같이 수행되었다.
- [0042] (실시예 3) *nks1* 넉아웃 변이체의 상보성
- [0043] *nks1* 상보성의 경우 전체 길이 *NKS1* cDNA는 전방 프라이머, 5'-GCTCTAGAATGCCGCGTCGATCCG-3'(서열번호: 11) 및 역방 프라이머, 5'-GTCGACCTCACCTTCCCAACCTGATT-3'(서열번호: 12)를 이용하여 아라비도시스 cDNA 라이브러리로부터 증폭되었다. PCR 생성물은 Xba I 및 Sal I로 분해되고 Xba I 및 Sal I로 분해된 이원 벡터 pCAMBIA 1300-PT로 라이게이트되었다. 상기 컨스트럭트는 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)(균

주 GV3101)-매개 플로랄 디핑법(floral dipping method)을 통해 *sos3-1 nks1-1* 및 *nks1-2* 넉아웃 변이체 내로 형질전환되었다. 1차 선택은 30 mg/L 하이그로마이신 B(Calbiochem)를 함유한 MS 배지 상에서 선택되었고 토양으로 옮겨져 생장되었다.

[0044] (실시예 4) 이온 함량 측정

[0045] 1X MS 배지 상에서 생장된 3-주령 모종(n = 40~60)은 50 mM NaCl 함유 배지로 옮겨지고 추가 2일간 생장되었다. 모종은 채취되고 멸균수로 세척되고 65°C 오븐에서 2일간 건조되었다. 100 mg의 분쇄 조직이 0.1 M HNO₃ 10 ml로 30분간 추출되었고 Watman No. 1 여과지로 여과되었다. Na⁺ 및 K⁺ 함량은 원자 흡광 분석 계로 측정되었다.

[0046] (실시예 5) 세포 내 Na⁺의 가시화

[0047] 1-주령 모종이 염색되고 125 mM NaCl로 24시간 동안 처리된 후 공초점 현미경 하에서 관찰되었다. 뿌리는 2시간 동안 0.02% 플루오릭 애시드(pluoric acid) 존재 하에 20 μM CoroNa-Green으로 염색되었다.

[0048] (실시예 6) NKS1::GFP의 세포하 위치

[0049] *NKS1* 및 *BiP1* 코딩 영역은 각각 GFP 및 RFP의 N-말단에 인-프레임으로 융합되고 CaMV 35S 프로모터 제어된 326-sGFP 및 326-RFP 벡터 내에 구축되었다. *NKS1::GFP* 및 *BiP1::RFP*의 일시적 발현을 위한 원형질체 세포는 4-주령 아라비도시스 식물체의 좌측 조직(5 g)에서 분리되었고 Jin, 2001에 기술된 바와 같이 폴리에틸렌 글리콜-매개법에 의해 동시-형질전환되었다. GFP 영상화는 488 nm 여기 및 510~530 nm 방사에서, RFP 영상화는 540 nm 여기 및 560~610 nm 방사에서 Olympus FV1000 공초점 현미경을 이용하여 수행되었다.

[0050] (실시예 7) ER 스트레스 처리

[0051] 2-주령 모종은 소포체(ER) 스트레스 시약(투니카마이신(tunicamycin), DTT 및 AZC)로 0, 1, 3, 6 및 12시간 동안 처리되었다. 각각의 시약은 15 μM 투니카마이신, 1 mM DTT 및 5 mM AZC의 최종 농도로 1/2 MS 액체 배지 내에 첨가되었다. 유사한 크기의 50개 모종이 5분간 표피하로 진공 침윤되었고 표시된 시간 동안 22°C 생장 챔버 내에서 재생되었다.

도면의 간단한 설명

[0052] 도 1은 *sos3-1* 인헨서로서 *nks1*의 분리를 나타낸 것이다. 도 1(A)는 *Col-g11*, *sos3-1* 및 *sos3-Inks1-1* 모종 내에서 조사된 뿌리 생장 분석을 나타낸다. 4-일령 모종은 11일간 50 mM NaCl 존재 또는 부재 배지로 옮겨졌다. 도 1(B~E)는 염 및 삼투압 스트레스 배지에 대한 *sos3-Inks1-1* 뿌리 생장의 민감성을 나타낸다. 4-일령 모종은 NaCl(B), KCl(C), LiCl(D) 및 만니톨(E)의 존재 또는 부재 배지로 옮겨졌다. 뿌리 생장은 11일 후 측정되었다. 흑색 원형(●), *Col-g11*; 흑색 사각형(■), *sos3-1*; 흑색 삼각형(▲), *sos3-Inks1-1*. 패널(B~E) 내 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다(n=10).

[0053] 도 2는 NaCl 및 KCl에 민감한 *nks1*의 두 번째 대립유전자를 나타낸 것이다. 도 2(A)는 *NKS1* 내 T-DNA의 위치를 나타내는 개략도이다(B~C). *Col-g11*, *sos3-1*, *sos3-Inks1-1*, *Col-0* 및 *nks1-2* 식물체 내 *NKS1*의 전사체 분석은 RT-PCR에 의해 수행되었다. 튜블린은 적가 대조군으로 사용되었다. 도 2(D)는 75 mM NaCl 보충을 포함 하거나 포함하지 않는 MS 배지 상에 이동 후 촬영된 사진이다. 도 2(E~H)는 NaCl, KCl, LiCl 및 만니톨의 존

재 또는 부재 배지로 옮겨진 4-일령 모종을 나타낸다. 뿌리 생장은 11일 후 측정되었다. 흑색 원형(●), Col-0; 흑색 사각형(■), *nks1-2*. 패널(E~H) 내 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다(n=10).

[0054] 도 3은 *NKS1* cDNA의 구성적 발현에 의해 보완되는 *nks1* 녹아웃 변이를 나타낸 것이다. 도 3(A)는 NaCl 함유 MS 배지로 옮겨진 Col-*g11*, *sos3-1*, *sos3-1nks1-1* 및 MS 배지 상에서 성장된 야생형 *NKS1* cDNA로 형질전환된 *sos3-1nks1-1*의 4-일령 모종을 나타낸다. 사진은 이동 11일 후 촬영되었다. 도 3(B)는 RT-PCR에 의해 검출된 Col-*g11*, *sos3-1*, *sos3-1nks1-1*, 라인 #2(pCambia1300-PT 벡터 대조군) 및 라인 #1(*NKS1* 발현) 내의 *NKS1* 전사체 함량을 나타낸다. 도 3(C)는 75 mM NaCl 함유 MS 한천 배지로 이동된 Col-0, *nks1-2* 및 MS 배지 상에서 성장된 야생형 *NKS1* 유전자로 형질전환된 *nks1-2*의 4-일령 모종을 나타낸다. 사진은 이동 11일 후 촬영되었다. 도 3(D)는 Col-0, *nks1-2*, 라인 #12(pCambia1300-PT 벡터 대조군) 및 라인 #1(*NKS1* 발현) 내에서 RT-PCR에 의해 검출된 *NKS1* 전사체 함량을 나타낸다.

[0055] 도 4는 높은 수치의 Na^+ 를 축적하는 *nks1* 녹아웃 변이 식물체를 나타낸 것이다. 도 4(A~B, D~E)는 50 mM NaCl 존재 또는 부재 배지 내에서 Col-*gl*, *sos3-1*, *sos3-1nks1-1*, Col-0 및 *nks1-2* 식물체 슈트(A~B) 및 뿌리(D~E)에서 측정된 Na^+ 및 K^+ 함량을 나타낸다. 도 4(C, F)는 50 mM NaCl 존재시 Col-*gl*, *sos3-1*, *sos3-1nks1-1*, Col-0 및 *nks1-2* 식물체의 슈트(C) 및 뿌리(F) 내 Na^+ 및 K^+ 축적 비율을 나타낸다. 유전형 간의 평균 수치는 스트레스 존재시 통계학적으로 유의적으로 상이하였다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다(n=40 내지 60).

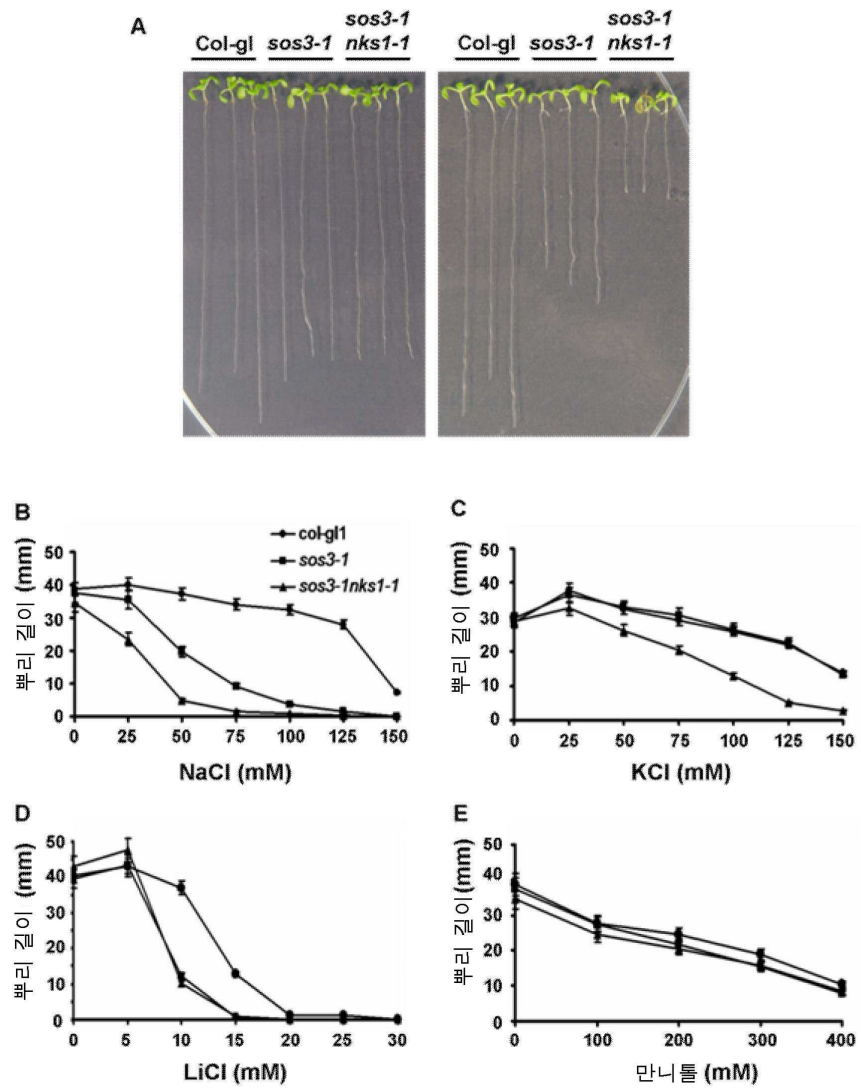
[0056] 도 5는 *nks1* 내에 축적되는 과량의 나트륨 이온을 나타낸 것이다. 도 5(A~B)는 CoroNa-Green으로 염색된 Col-0(A) 및 *nks1-2*(B) 모종 뿌리 내 Na^+ 를 나타낸다. Col-0 및 *nks1-2* 모종은 일반 MS 배지 내에서 7일간 성장되었고 125 mM NaCl 함유 배지로 24시간 동안 이동되었다. 이미지는 공초점 현미경 하에서 관찰되었다.

[0057] 도 6은 ER에 국한된 *NKS1*을 나타낸 것이다. 도 6(A)는 원형질체 형질전환에 사용된 *NKS1* 단백질의 도표이다. SP는 ER 잔류 신호 펩타이드를 나타낸다. 도 6(B)는 아라비도시스 원형질체 내 *NKS1*의 하위세포 위치를 나타낸다. 야생형 아라비도시스 모종에서 분리된 원형질체는 리포터 유전자 융합 컨스트럭트인 *NKS1::sGFP* 및 *BiP::RFP*로 동시-형질전환되었다. ER 내에 암호화된 단백질의 동시-위치화는 12시간 후 형광 현미경으로 관찰되었다. 좌측부터 각각 하나의 원형질체 내의 위상차(광), 녹색(GFP) 및 적색(RFP) 형광 이미지, 적색과 녹색 형광 이미지 병합 이미지를(병합)를 나타낸다.

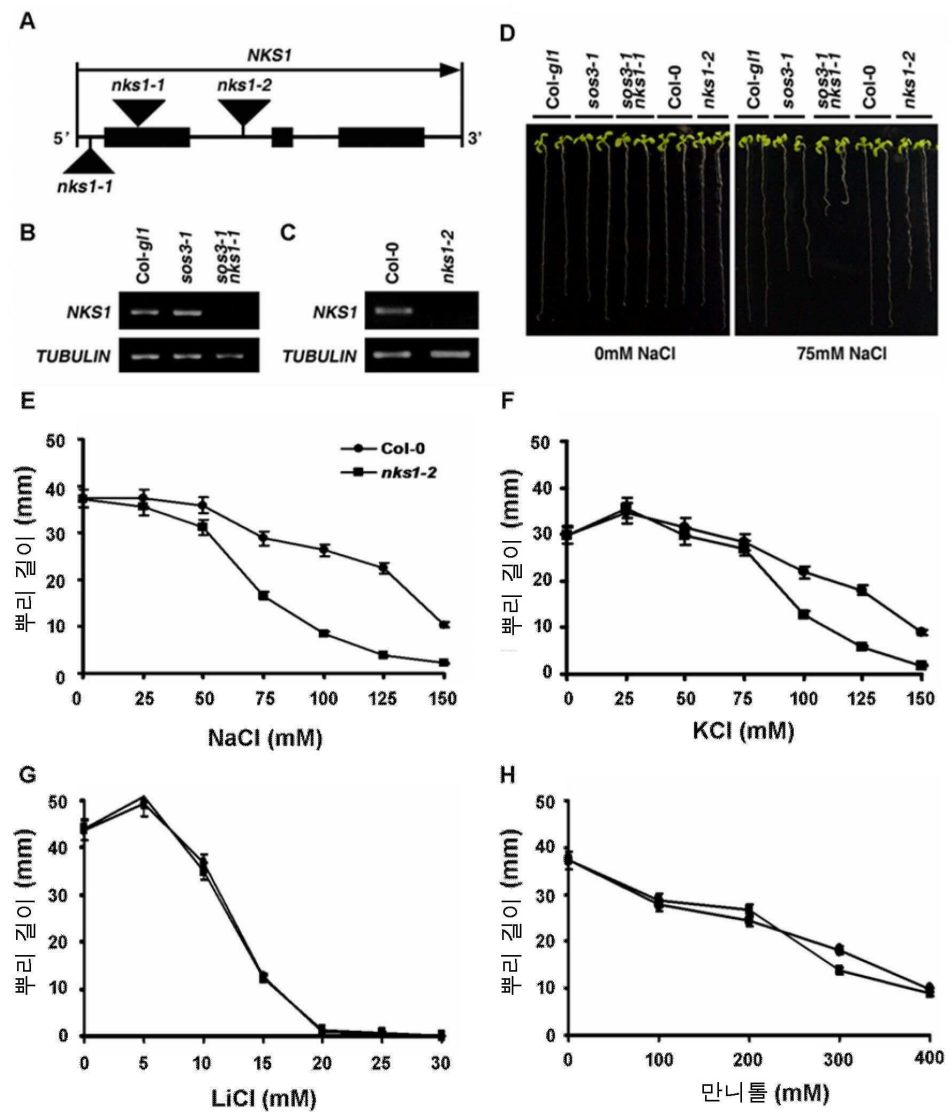
[0058] 도 7은 ER 스트레스에 의해 증가된 *NKS1* 발현을 나타낸 것이다. 일반 MS 배지 내에서 성장된 2-주령 모종은 ER 스트레스 유도 화합물질(5 mM AZC, 좌측 패널; 1 mM DTT, 중앙 패널; 15 μM 투니카마이신, 우측 패널)로 처리되었다. 전체 RNA는 각각의 레인에 적가되었다. ER 스트레스 마커 프로브(*BiP 1&2*, *BiP3*, *PDI*)는 좌측에 나타나 있다. rRNA는 적가 대조군으로 사용되었다. Col-0 내 *NKS1* 발현 수치도 전체 길이 *NKS1* 프로브로 검출되었다. 동일한 양의 RNA가 시험되었다.

도면

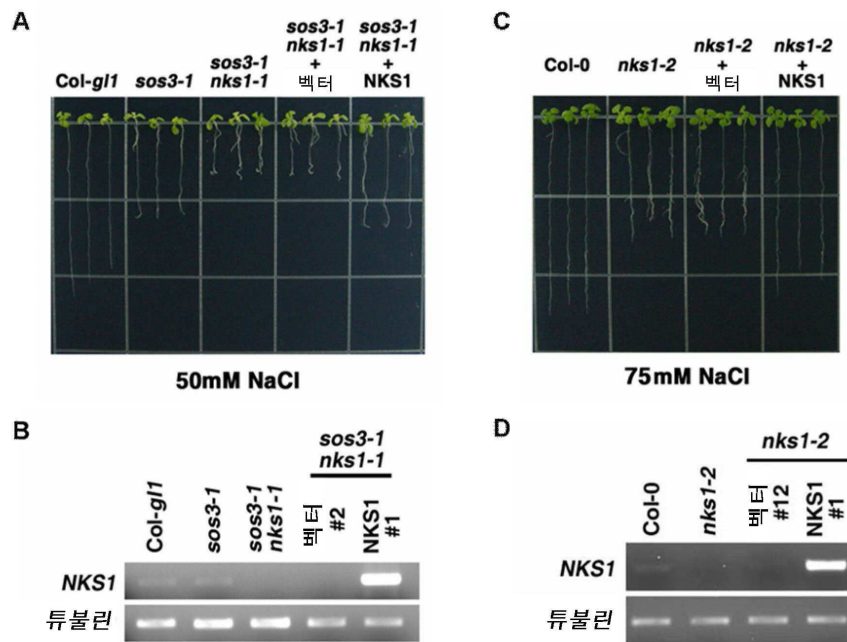
도면1



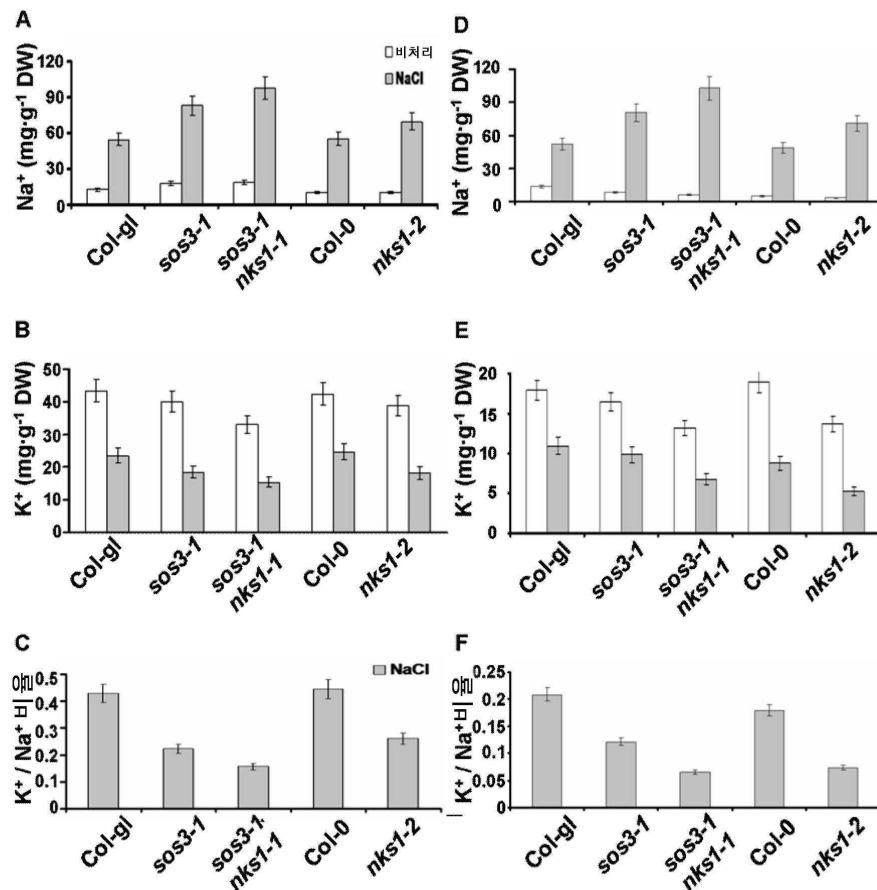
도면2



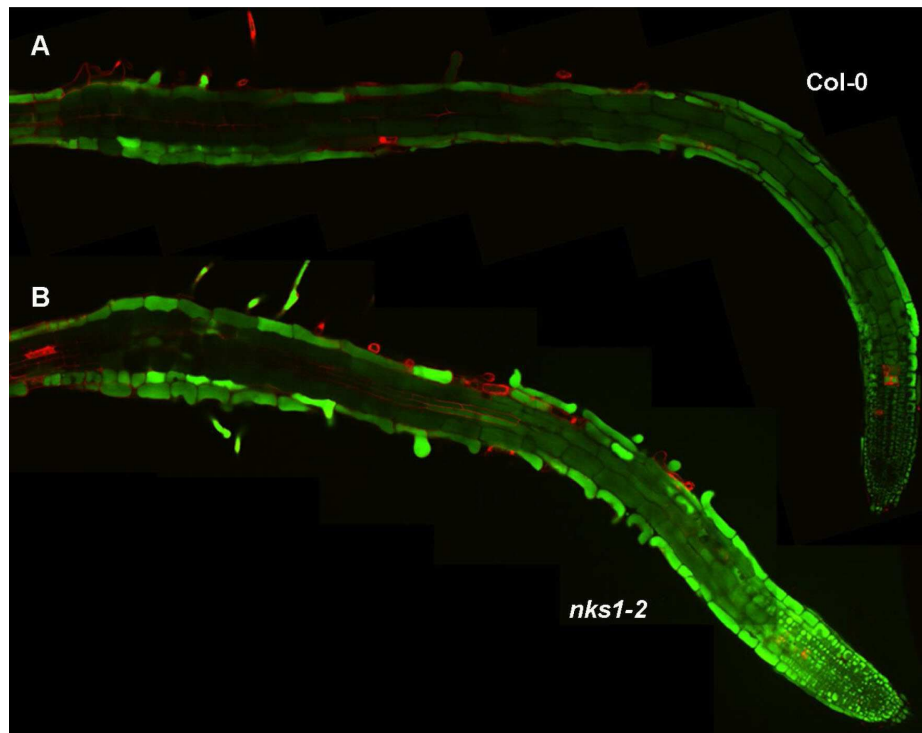
도면3



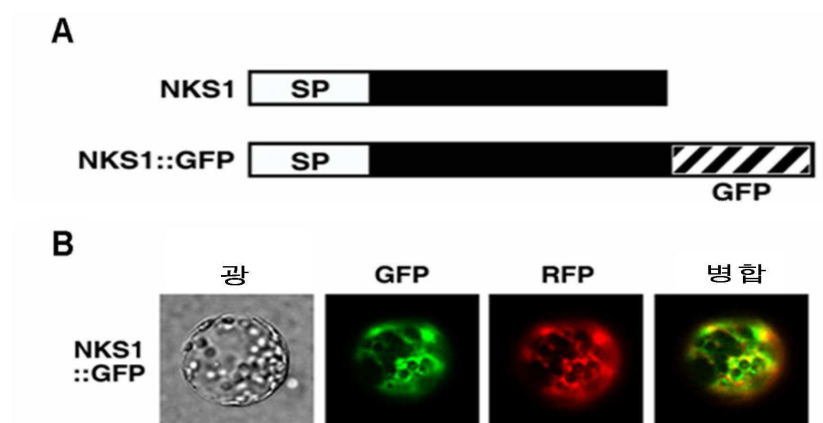
도면4



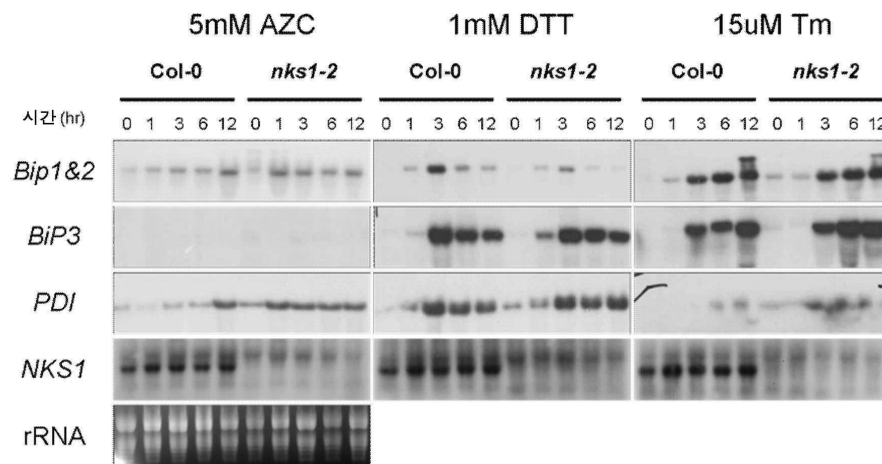
도면5



도면6



도면7



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
 <120> Arabidopsis plant having high salt resistance expressing NKS1 gene

<160> 12

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 1

atacgcgga tcgtaatttg tc

22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 2

taataacgct gcggacatct ac

22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 3

ttgaccatca tactcattgc tg

22

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 4

ntcgastwts gwggtt

15

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 5

ngtcgaswga nawgaa

16

<210> 6
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 6
 wgtgnagwan canaga

16

<210> 7
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 7
 atgcctcgtc gatccggaga ttg

23

<210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 8
 ttactcacct tcccaacctg attgc

25

<210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 9
cgtggatcgc agcaatacag agcc 24

<210> 10
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 10
gaagacgaag tggaagtgcg ggagg 25

<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 11
gctctagaat gccgcgtcga tccg 24

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 12
gtcgacctca ccttccaac ctgatt 26