(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0078589
(43) 공개일자 2009년07월20일

(51) Int. Cl.
A01N 59/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0004491
(22) 출원일자 2008년01월15일
심사청구일자 2008년06월03일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천 남구 용현동 253 인하대학교
(72) 발명자
조성호
인천 남구 용현3동 인하대학교
서미정
광주 북구 용봉동 300 전남대학교 농업생명과학대학식물생명공학부
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장한특허법인

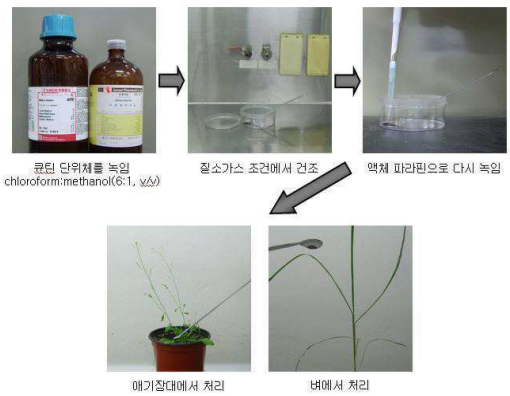
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 큐틴 단위체의 식물체 침투방법

(57) 요 약

본 발명은 독성을 수반하는 화학물질을 사용하지 않는 큐틴 단위체의 식물체 침투방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 클로로포름 및 메탄올 혼합용매를 이용하여 큐틴 단위체를 용해시키는 용해단계; 큐틴 단위체가 용해된 용액을 질소가스로 건조하는 건조단계; 및 건조된 용액을 액체 파라핀으로 다시한번 용해한 후, 식물체에 처리하는 식물체 처리단계를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 큐틴 단위체의 식물체 침투방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김태현

인천 남구 용현동 253 인하대학교 생명과학과

박종호

인천 남구 용현동 253 인하대학교 생명과학과

특허청구의 범위

청구항 1

클로로포름 및 메탄올 혼합용매를 이용하여 큐틴 단위체를 용해시키는 용해단계;

큐틴 단위체가 용해된 용액을 질소가스로 건조하는 건조단계; 및

건조된 용액을 액체 파라핀으로 다시한번 용해한 후, 식물체에 처리하는 식물체 처리단계;

를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 큐틴 단위체의 식물체 침투방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 혼합용매가 클로로포름과 메탄올을 6:1 (v/v)의 부피비로 구성되는 것을 특징으로 하는 큐틴 단위체의 식물체 침투방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 큐틴 단위체가 1-헥사데카놀(1-hexadecanol; 1-HDO), *cis*-9-헥사데켄-1-올(*cis*-9-hexadecen-1-ol; 1-HDEO), 1,2-헥사데칸디올(1,2-hexadecandiol; 1,2-HDDO), 1,16-헥사데칸디올(1,16-hexadecandiol; 1,16-HDDO), 팔미틴산(palmitic acid; PA) 및 16-히드록시팔미틴산(16-hydroxypalmitic acid; HPA)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 큐틴 단위체의 식물체 침투방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 독성을 수반하는 화학물질을 이용하지 않고 액체 파라핀을 이용한 큐틴 단위체의 식물체 침투방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 지질운반단백질(lipid transfer protein; LTP)은 *in vivo* 및 *in vitro*에서 지질분자를 운반할 수 있는 단백질로서, 염, 가뭄, 혹한과 같은 환경적 스트레스 및 아브시스산(abscisic acid; ABA), 살리실산(salicylic acid; SA), 에틸렌, 메틸 자스모네이트와 같은 신호전달 분자의 처리에 의해 반응하는 것으로 알려져 있다.

<3> LTP 발현은 곰팡이 및 바이러스 침투에 대한 보호효과가 있으며, 또 LTP는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 전신획득저항성(systemic acquired resistance; SAR)의 습득시 장시간 신호전달에 관련된다고 보고되었다.

<4> 벼 LTP 패밀리는 단백질의 구조적 특징에 따라 5개 클래스로 분류되는 9개 유전자로 구성되며, 염, ABA, SA에 대한 반응에 있어서 3개의 LTP 유전자 즉, 클래스 I, II 및 III 유전자가 상이한 발현을 나타낸 것으로 보고되어 있다.

<5> 글리신 리치 단백질(glycine-rich protein; GRP)은 글리신의 비율이 높은 단백질로서, 그 기능에 따라 20~70%의 정도를 차지하고 있다(Sachetto-Martins *et al.*, 2000; Mousavi and Hotta, 2005).

<6> 또한, GRP는 분자 구조에 따라 여러 그룹으로 분류되어지는데, 크게 신호펩타이드(signal peptide)를 갖는 구조와 RNA-결합 도메인(RNA-binding domain)을 갖는 그룹으로 분류되며, 식물체 내에 생리적 역할이 다르게 나타난다.

<7> 아직까지 그 기능이 확실히 알려져 있지 않은 GRP 유전자들이 많이 존재하고 있으며, 초기에 발견된 GRP는 세포벽에 위치하는 것으로 보고되어 있어, 구조적인 기능을 가진 것으로 알려졌으나, 현재는 다양한 분포를 가지는 GRP 종류가 보고되고 있다(Sanchetto-Martins *et al.*, 2000).

<8> 이중에서 AtGRP3은 수용체 단백질 키나아제(receptor protein kinase)인 Wak1과 상호작용하여 병원성 관련 과정(pathogenesis-related procedure)에 관여하는 것으로 알려져 있다(Park *et al.*, 2001).

<9> 특히 세포벽에 존재하는 것으로 알려진 GRP 그룹은 신호펩타이드(signal peptide)와 10-20 kD의 작은 분자량을

갖는데, 이러한 단백질의 경우 병원균에 대한 방어 기작에 있어 신호전달 과정에 관여하며, 세포벽의 보강을 돕는 역할을 한다(Molina *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2001; Ueki and Citovsky, 2002; Lu *et al.*, 2007).

<10> 한편, 큐틴 단위체는 곰팡이 병원균에 대한 식물 방어시 신호전달역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 보리 또는 벼의 잎을 큐틴 단위체로 처리하면 곰팡이 병원균에 대한 저항성이 증가되었다.

<11> 또한, 큐틴 단위체는 오이 잎에서 과산화수소 생성을 효과적으로 유도하여 식물 방어 반응에 기여할 것으로 보고되어 있다.

<12> 현재 사용되는 큐틴 단위체의 침투방법은 큐틴 단위체의 작용을 관찰할 수는 있지만, 독성을 수반하는 화학물질 예를들어, 클로로포름(Chloroform), 메탄올(methanol), 디메틸설폭사이드(DMSO) 등을 사용함으로 인하여 이러한 화학물질에 대한 작용도 배제할 수 없다.

<13> 따라서, 큐틴 단위체만의 작용을 밝히기 위한 새로운 방법을 개발하여 식물 방어 기전과 관련된 큐틴 단위체의 역할을 보다 명확하게 규명할 필요가 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<14> 본 발명의 목적은 독성을 수반하는 화학물질의 사용없이 큐틴 단위체가 식물체의 원하는 부위에 용이하게 침투할 수 있도록 유도하는 데에 있다.

<15> 따라서, 본 발명에서는 식물체를 보호하는 큐틴층과 왁스층을 투과하여 큐틴 단위체의 작용을 확인할 수 있는 새로운 큐틴 단위체의 식물체 침투방법을 개발하였다.

과제 해결수단

<16> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 클로로포름 및 메탄올 혼합용매를 이용하여 큐틴 단위체를 용해시키는 용해단계; 큐틴 단위체가 용해된 용액을 질소가스로 건조하는 건조단계; 및 건조된 용액을 액체 파라핀으로 다시한번 용해한 후, 식물체에 처리하는 식물체 처리단계를 포함하여 구성되는 것을 특징으로 하는 큐틴 단위체의 식물체 침투방법을 제공한다.

<17> 본 발명에서 사용하는 혼합용매는 클로로포름과 메탄올을 6:1 (v/v)의 부피비로 구성되는 것이 바람직하다.

<18> 또한, 본 발명에서 사용되는 상기 큐틴 단위체로는 1-헥사데카놀(1-hexadecanol; 1-HDO), *cis*-9-헥사데켄-1-올(*cis*-9-hexadecen-1-ol; 1-HDEO), 1,2-헥사데칸디올(1,2-hexadecandiol; 1,2-HDDO), 1,16-헥사데칸디올(1,16-hexadecandiol; 1,16-HDDO), 팔미틴산(palmitic acid; PA) 및 16-히드록시팔미틴산(16-hydroxypalmitic acid; HPA)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나이며, 오이잎 모델계에서 과산화수소의 축적을 유도하는 데에 효과적인 것으로 알려진 16-히드록시팔미틴산을 사용하는 것이 보다 바람직하다.

<19> 이하, 도 1을 참조하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

<20> 먼저, 본 발명의 용해단계는 클로로포름 및 메탄올을 부피비 6:1(v/v)로 포함하는 혼합용매를 이용하여 큐틴 단위체를 용해한다.

<21> 이때, 클로로포름 및 메탄올이 상기 함량범위를 벗어나면 큐틴 단위체의 용해가 곤란하거나 큐틴 단위체를 용해한 후 건조하는 데에 시간이 많이 들어 비경제적인 문제가 야기될 수 있다.

<22> 본 발명의 건조단계는 큐틴 단위체가 용해된 상기 용액을 질소가스로 상온 즉, 25 내지 30℃에서 10 내지 30분 동안 건조하여 휘발성 용매인 클로로포름 및 메탄올 혼합용매를 제거한다.

<23> 본 발명의 식물체 처리단계는 상기 건조된 용액을 액체 파라핀으로 다시한번 용해한 후, 식물체에 처리하는 단계로서, 이때 사용되는 액체 파라핀은 종래 사용하던 클로로포름(Chloroform), 메탄올(methanol), 디메틸설폭사이드(DMSO) 등과 같은 화학물질과 달리 무독하다.

<24> 상기 식물체로는 벼 등과 같은 단자엽 식물, 애기장대 등과 같은 쌍자엽 식물을 포함한 다양한 1년생 초본 식물을 사용할 수 있고, 시약스푼 등을 이용하여 식물체의 각 부위 즉, 잎, 줄기, 뿌리, 꽃 등에 상기 준비된 용액을 처리한다.

<25> 이렇게 개발된 큐틴 단위체의 식물체 침투방법을 이용하여 벼 또는 애기장대 식물체를 큐틴 단위체로 처리한 반

응에서의 과산화수소 유도 및 *Os*LTP 유전자 또는 *At*GRP 유전자의 발현 패턴을 조사하였다.

<26> 큐틴 단위체에 의한 과산화수소 유도를 조사하기 위하여, 3,3'-디아미노벤지딘(diaminobenzidine; DAB) 염색법을 이용하였고, 큐틴 단위체에 의한 *Os*LTP 유전자 또는 *At*GRP 유전자의 발현 패턴을 조사하기 위하여, RT-PCR을 수행하였다.

<27> 그 결과, 본 발명에 따른 큐틴 단위체의 식물체 침투방법에 의하면 과산화수소가 표피 및 도관조직에서 유도된 것을 확인할 수 있고, 또한 벼 및 애기장대에 큐틴 단위체 처리 후 각각 *Os*LTP 유전자 또는 *At*GRP 유전자가 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

효 과

<28> 본 발명에 따른 큐틴 단위체의 식물체 침투방법은 독성을 수반하는 화학물질을 이용하여 큐틴 단위체를 침투시키는 종래의 기술과 달리, 독성이 없는 액체 파라핀을 이용함으로써 큐틴 단위체만의 작용을 확인할 수 있고, 식물체와 큐틴 단위체의 상호작용에 대한 식물방어 신호전달과정을 밝히는데 적용할 수 있으며, 화학적인 농약을 사용하지 않는 식용작물 재배방법 개발로 인하여 농가의 부가가치를 창출할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<29> 이하, 하기 실시예에 의해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 설명일 뿐 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

<30> **<실시예 1> 식물체 준비 및 큐틴 단위체 처리**

<31> 1) 식물 재료 및 성장 조건

<32> 벼(*Oryza sativa* L.) 또는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)는 멸균 페트리디쉬에서 축축한 필터 페이퍼 상에서 2회 발아되었다. 그후, 묘목은 온실로 운반되고, 16시간 광주기 하 30℃에서 성장되었다. 기관은 액체 질소에서 수집되어 사용 전까지 -70℃에서 저장되었다.

<33> 2) 큐틴 단위체 처리

<34> 큐틴 단위체의 처리는 3주령 식물에서 수행되었다. 16-히드록시팔미틴산(hydroxypalmitic acid; HPA, Sigma) 2.742㎎를 큐틴 단위체로 이용하여 클로로포름:메탄올(6:1, v/v) 혼합용매 1㎖에 용해시킨 후, 200㎛M의 농도로 맞추기 위해 2㎕의 용해용액(혼합용매+큐틴단위체)에 98㎕(클로포름:메탄올,6:1,v/v)의 혼합액으로 희석하였다.

<35> 질소 가스로 건조하고 액체 파라핀 100㎕에 다시 용해한 후, 시약스푼, 파이펫을 이용하여 잎의 앞면에 처리하였다.

<36> 이때, 큐틴 단위체는 벼의 경우에는 200㎛M로, 애기장대의 경우에는 200㎛M 및 800㎛M로 각각 처리하였고, RNA 추출은 처리 후 4시간 및 12시간 후에 수행하였다. 비교를 위하여, 잎에 액체 파라핀만을 처리하여 대조군으로 하였다.

<37> **<실시예 2> 과산화수소의 *In situ* 검출**

<38> 과산화수소(H_2O_2)는 3,3'-디아미노벤지딘(diaminobenzidine; DAB)-업테이크 방법(*Plant J.*, 11: 1187-94, 1997; *Plant J.*, 36: 215-28, 2003)에 의해 *in situ* 검출하였다.

<39> 큐틴 단위체로 처리된 각 식물체 잎의 밑끝 부분을 잘라 준비하고, 상기 밑끝 부분을 1㎎/㎖의 3,3'-DAB-HCl(pH 3.8, Sigma) 용액에 담가 25℃, 빛 조건 하에서 8시간 동안 놓아두었다.

<40> 끓는 96% 에탄올에서 10분 동안 끓여 엽록소를 제거한 후, 차가운 96% 에탄올에서 보관하여 갈색으로 염색된 부분을 관찰하였다.

<41> 그 결과, 도 2와 같이 잎의 표피 및 도관 조직에서 과산화수소의 유도를 의미하는 갈색 염색부위를 관찰할 수 있었다.

<42> **<실시예 3> RT-PCR**

<43> 2㎛g의 전체 RNA를 주형으로 이용하고 M-MLV 역전사효소(Promega)로 42℃에서 1시간 동안, 그 후 65℃에서 10분

동안 역전사 반응을 수행하였다. 그후, 상기 20㎕ 역전사 반응물 중 5㎕를 PCR의 주형으로 이용하고, 다음과 같은 유전자 특이적 프라이머를 이용하였다.

<44> 먼저, 사용된 유전자 특이적 프라이머인 벼 지질운반단백질 관련 유전자로서, *Os*LTP5(AF017361)는 서열목록 1 및 서열목록 2를 이용하여 401-bp 단편을 합성하였고, *Os*LTP1(AF017358)는 서열목록 3 및 서열목록 4를 이용하여 374-bp 단편을 합성하였고, *Os*LTP2(AAB70540)는 서열목록 5 및 서열목록 6을 이용하여 115-bp 단편을 합성하였고, *Os*LTP3(NP_001065985)은 서열목록 7 및 서열목록 8을 이용하여 162-bp 단편을 합성하였다.

<45> 또한, 벼 병원균 관련 유전자 10α로서, PR-10α(AK071613)은 서열목록 9 및 서열목록 10을 이용하여 106-bp 단편을 합성하였다.

<46> 또한, 대조군 유전자로 사용되는 벼 베타 튜블린 유전자로서, *Os*TUB2(ㅠ-2 튜블린: NM_001051100)는 서열목록 11 및 서열목록 12를 이용하여 662-bp 단편을 합성하였다.

<47> 또한, 애기장대 글리신 리치 유전자로서, *At*GRP5(AY045629)는 서열목록 13 및 서열목록 14를 이용하여 413-bp 단편을 합성하였고, *At*GRP23(AAC04494)은 서열목록 15 및 서열목록 16을 이용하여 427-bp 단편을 합성하였고, *At*GRP3(AAB24075)은 서열목록 17 및 서열목록 18을 이용하여 377-bp 단편을 합성하였다.

<48> 또한, 애기장대 병원균 관련 유전자로서, PR-1(NM_127025)은 서열목록 19 및 서열목록 20을 이용하여 478-bp 단편을 합성하였고, PR-4(NM_111344)는 서열목록 21 및 서열목록 22를 이용하여 593-bp 단편을 합성하였다.

<49> 또한, 대조군 유전자로 사용되는 애기장대 베타 튜블린 유전자로서, *At*TUB(AY081473)는 서열목록 23 및 서열목록 24를 이용하여 517-bp 단편을 합성하였다.

<50> PCR 반응 혼합물(25㎕)은 500ng 주형, 2.5㎕ 10 X PCT 완충액[100mM 트리스-HCl, pH 80, 50mM KCl, 1mM EDTA, 0.1% 트립톤X-100, 50% 글리세롤(v/v)], 50㎛M 프라이머, 200㎛M dNTPs, 및 2.5 단위 ExTaq 폴리머레이즈(TaKaRa)를 포함하였다.

<51> 반응은 95℃에서 40초 동안 변성; 30초 동안 어닐링, 이때 어닐링 온도는 각각 56℃(*Os*LTP5), 58℃(*Os*LTP1), 68℃(*Os*LTP2), 51℃(*Os*LTP3), 54℃(PR-10), 60℃(*Os*TUB), 64.4℃(*At*GRP5), 58℃(*At*GRP23), 58℃(*At*GRP3), 58℃(PR-1), 58℃(PR-4), 62℃(*At*TUB); 72℃에서 30초 동안 연장을 수행하였다. 25주기로 수행되었다.

<52> 그 결과, 도 3에 도시된 바와 같이 벼의 경우 큐틴 단위체를 처리한 실험군이 대조군보다 뛰어난 *Os*LTP 및 PR-10의 발현 양상을 나타내었고, 도 4에 도시된 바와 같이 애기장대의 경우에도 큐틴 단위체를 처리한 실험군이 대조군보다 뛰어난 *At*GRP 및 PR의 발현 양상을 나타내었다.

도면의 간단한 설명

<53> 도 1은 큐틴 단위체의 식물체 처리과정을 나타낸 것이고,

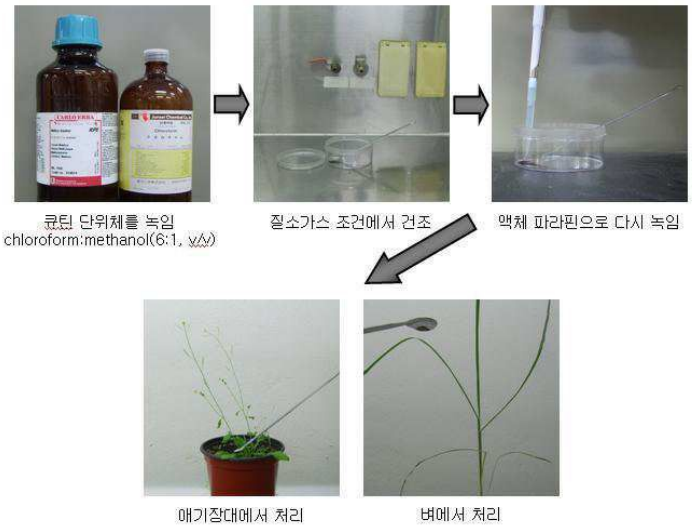
<54> 도 2는 큐틴 단위체로 처리 후 DAB-염색을 이용하여 과산화수소 생성을 검토한 것이고,

<55> 도 3은 벼 잎에서 큐틴 단위체 처리 후 관련 유전자의 발현 양상을 나타낸 것이고,

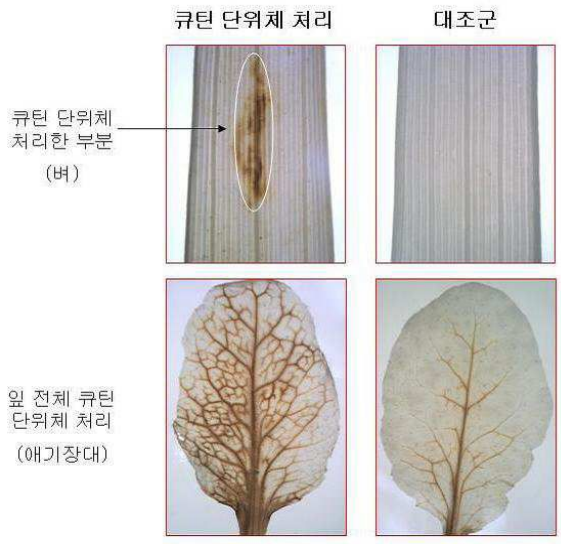
<56> 도 4는 애기장대 잎에서 큐틴 단위체 처리 후 관련 유전자의 발현 양상을 나타낸 것이다.

도면

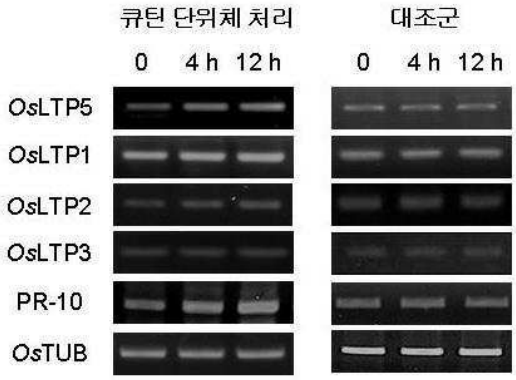
도면1


큐틴 단위체를 녹임
chloroform:methanol(6:1, v/v)
질소가스 조건에서 건조
액체 파라핀으로 다시 녹임
애기장대에서 처리
벼에서 처리

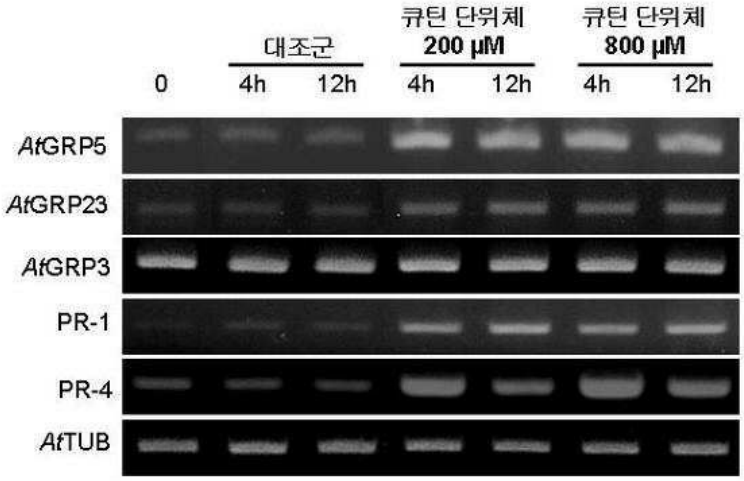
도면2


큐틴 단위체 처리
대조군
큐틴 단위체
처리한 부분
(벼)
잎 전체 큐틴
단위체 처리
(애기장대)

도면3



도면4



서 열 목 록

<110> Inha University Industry Academic Cooperation Foundation
<120> Method for penetrating cutin monomer into plant

<130> dp-bc-2008-0003

<160> 24

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsLTP5F

<400> 1
gatcgatcga gcaacagtag t 21

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsLTP5R

<400> 2
aatgatccat ccgatcgata 20

<210> 3
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsLTP1F

<400> 3
tgcacagctc ctcttggtcg c 21

<210> 4
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsLTP1R

<400> 4

gctgcatgtc atcttccggt a 21

<210> 5
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsLTP2F

<400> 5
gcttccatcg actgctcc 18

<210> 6
<211> 17
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsLTP2R

<400> 6
ggctccacac atcgacc 17

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsLTP3F

<400> 7
tgctccaaga tcaactaa 18

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsLTP3R

<400> 8
tacatgtaaa cattgaaa 18

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PR-10aF

<400> 9
gaggaatact gcctctatcc 20

<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PR-10aR

<400> 10
ctctcacgga ctcaaacgcc a 21

<210> 11
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsTUB2F

<400> 11

ttgtgaggaa ggaggctga 19

<210> 12
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> OsTUB2R

<400> 12
ggatgagttc ttgttctgga 20

<210> 13
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AtGRP5F

<400> 13
acattcttcc accatccaag cgga 24

<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AtGRP5R

<400> 14
caatgatgtc caccaccgaa acca 24

<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AtGRP23F

<400> 15
acaaacctcg tccattcctc caca 24

<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AtGRP23R

<400> 16
atgcctttac caaatccacc accg 24

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AtGRP3F

<400> 17
aggctttggt tctgttgggt ctct 24

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AtGRP3R

<400> 18

tgagcagccg ttgtaacctc tgta 24

<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PR-1F

<400> 19
cggcgacaag actaccttga tg 22

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PR-1R

<400> 20
tggcacatcc aacccactct g 21

<210> 21
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PR-4F

<400> 21
tggtcgaact tgtcccggta acat 24

<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PR-4R

<400> 22
gtagaccgat cgatattgac ctca 24

<210> 23
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AtTUBF

<400> 23
cgtggatcac agcaatacag agcc 24

<210> 24
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> AtTUBR

<400> 24
cctcctgcac ttccacttcg tcttc 25