



[별지 제7호 서식]

최 종 보 고 서

190mm × 268mm

2001년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 환경 스트레스 저항성 유전자 분리 및 저항성 작물의 분자유종에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

- 첨부 : 1. 최종보고서 10부
2. 최종보고서 디스켓 1매

2001년 10 월 31 일

주관연구기관 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 백경희 (인)

주관연구기관장 : 고려대학교총장

농 립 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “환경 스트레스 저항성 유전자 분리 및 저항성 작물의 분자 육종” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2001년 10월 31일

주관연구기관명 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 백 경 희

세부연구책임자 : 이 세 영

세부연구책임자 : 신 정 섭

연 구 원 : 강 영 휘

연 구 원 : 함 병 국

연 구 원 : 한 상 재

연 구 원 : 문 상 원

연 구 원 : 조 성 기

요 약 문

I. 제 목

환경 스트레스 저항성 유전자 분리 및 저항성 작물의 분자 육종

II. 연구개발의 목적 및 중요성

환경으로부터 주어지는 스트레스는 농작물 생산에 있어서 중요한 제한 인자로 작용한다. 농업에 있어서 가장 심각한 문제는 저온, 가뭄, 홍수 및 높은 염 농도 등의 수분 스트레스로 인하여 농작물 생산이 해마다 고르지 않다는 것과 그 재배 지역에 한계가 있다는 것이다. 특히 저온, 가뭄, 및 높은 염 농도는 온대 기후이고 강수량의 변화가 심하며 간척지 같은 높은 염 농도의 토양을 가진 우리나라에서 매우 중요한 환경 스트레스로 간주된다. 최근에 식물 세포에 대한 연구가 많이 진전되었으며, 분자생물학의 발전으로 환경 스트레스에 대한 생리학적, 생화학적 및 유전적 기구들이 차츰 밝혀지고 있으며, 금명간에 많은 종류의 환경 스트레스에 대하여 저항성을 갖는 새로운 형질의 작물이 육종될 전망이다. 환경 스트레스에 대하여 저항성을 갖는 품종의 육종은 작물의 생산성을 증진시키고, 그 재배 단가를 낮출 뿐만 아니라, 예전에는 환경 제약 때문에 우리 나라에서 재배할 수 없었던 열대성 작물의 재배도 가능하게 할 것으로 기대된다.

본 연구에서는 식물의 저온, 가뭄, 고 염농도 같은 수분 스트레스에 저항성을 나타내는 작용기작을 연구하기 위하여, 그와 관련된 유전자들을 확인하고 분리하여 그 기능과 조절 기작을 조사함으로써 환경 스트레스에 저항성을

부여하는 기작을 확인하고 이를 근거로 최종적으로 스트레스에 저항성이 증가된 작물을 육종하는데 새로운 육종전략을 제공하고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

고려대학교 생명공학원 (백경희, 이세영, 신정섭)의 연구팀이 각각 salt, drought, cold 스트레스 저항성 유전자를 분리하여 그 기능 및 조절기작을 연구하고, 이들 유전자가 식물에서 발현될 수 있도록 유전자 조작을 한다. 이들 조작된 vector들을 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens*로 분리된 유전자를 형질 전환시키고 우선 모델식물의 형질전환을 수행한다. 그리고 이 형질 전환 식물체를 온실에서 키운 다음 그 발현양상을 조사함과 아울러 PEG 등을 처리하여 drought 상태를 유도하거나, growth chamber내에서 cold 스트레스를 주거나, NaCl로 salt 스트레스를 준 뒤 이 상태에서 형질전환 식물체와 비형질전환 식물체와의 성장정도를 비교하고, 이렇게 하여 효과가 좋은 것으로 검증된 유전자를 유용작물의 형질전환에 활용한다. 이를 위하여, 이들 각각 연구팀들은 유용작물 형질전환 확립을 위하여 유용작물의 조직배양을 수행하고 *Agrobacterium* 이나 particle gun을 이용하여 유용작물의 형질전환도 수행한다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

염 스트레스 분야

◆ 유채 (*Brassica napus*)로부터 mRNA differential display법을 사용하여 5개의 유기 유전자를 분리하였다. 분리된 유전자 중 4개에 대하여 유채, 담배, *arabidopsis*에서 5개의 full length cDNA clones (*tsil*, *bsi*, *bwd1*, *bwd2*, 그리고 *atwd*)를 찾았으며, 실험 과정 중 1개의 담배 염 염기 유전자인 *tsip*를 더 분리하여, 6개 염 유기 유전자를 분리하고 유전자 특성을 연구하였다. 그리고 이 중 2개 유전자를 GenBank에 등록하였다. ; *tsil* (AF058827)

와 *tsip* (AF118129)

◆ 분리된 엽 유기 유전자중 3 개가 특성 연구를 거쳐 형질 전환 모델 식물에서의 내염성 부여 테스트를 위해 선발되었다. 3 종의 형질 전환 모델 식물체에서의 내염성 테스트 결과, *tsil*와 *tsip*의 2개 유전자가 내염성을 증가시키는 것을 확인하였다

◆ 내염성을 증가시키는 유전자인 *tsil*과 *tsip*가 각각 유용 작물인 상추의 형질 전환에 이용되었다. 형질 전환 상추는 *tsil*에 대하여 10 개 lines과 *tsip*에 대하여 11 개 line을 얻었으며, 이 중 genomic DNA gel blot analysis와 RNA gel blot analysis를 통해, 도입된 유전자가 constitutive expression을 보이는 *tsil* 형질 전환 상추 line 4 종과 *tsip* 형질전환 상추 line 2 종을 얻었다

◆ *Zymomonas mobilis*에서 분리한 levansucrase 유전자를 담배에 도입한 형질 전환 담배가 저온과 건조 스트레스에 대한 내성을 나타냄을 보였다.

◆ 엽 스트레스 저항성 유전자 연구와 이로부터 습득된 연구 기술의 응용을 통해 4 건의 SCI 등재 국제(2건)/국내(2건) 학술지에 발표하였다. 게재되었거나 예정인 4 건의 논문은 다음과 같다 :

J. Microbiol. Biotechnol. (1999), 9(2), 213-218

Plant Science (2001), 161, 727-737

Plant Mol. Biol. (2001) in press.

Molecules and Cells (2001) in press.

건조 스트레스 분야

◆ 건조 스트레스에 의해 발현이 증가하는 유채 유전자 13개를 분리하였다. 데이터 베이스 조사를 통해 밝혀진 분리된 유전자는 다음과 같다. : chitinase (*Bnrd2*, *Bnrd104* and *Bnrd110*), nine-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (*Bnrd6*), pyrroline-5-carboxylate synthetase (*Bnrd7*), members of the alpha/beta hydrolase superfamily (*Bnrd13*), serine carboxypeptidase (*Bnrd24*), BnD22 (*Brassica napus* drought-induced 22kD) protein (*Bnrd102*), nonspecific lipid-transfer protein (*Bnrd114*), putative serine/threonine kinase (*Bnrd197*), beta-amylase (*Bnrd209*) and unknown proteins (*Bnrd15* and *Bnrd116*). 이 중 다음의 6개 유전자에 대하여

full length clone을 얻었으며 GenBank에 등록하였다 : *Bnrd7* (*Bnp5cs1*: AF314811, *Bnp5cs1*: AF314812), *Bnrd114* (AF101038), *Bnrd116* (AF314810), *Bnrd197* (AF319169), *Bnrd209* (AF319168).

◆ 건조 스트레스에 의해 발현이 증가되는 *Bnrd197* 유전자를 *Agrobacterium* - mediated transforamtion 방법으로 담배 와 *arabidopsis* 등에 형질전환을 하였다. *Bnrd197* 유전자형질전환 담배와 *arabidopsis*의 씨앗 (T2)을 다양한 농도 (200 - 400 mM)의 NaCl과 mannitol이 첨가된 배지에서 발아와 생육 테스트를 수행하였으나 control과의 차이를 확인할 수 없었다.

저온 스트레스 분야

◆ 저온 처리된 동보리 식물체로부터 Differential Display, Suppression Subtractive Hybridization, Ordered Differential Display기법들을 사용하여 저온저항성에 관여하리라고 추정되는 유전자들을 약 200개 이상을 획득하였다.

◆ 저온 유기유전자인 *lti-2* 유전자를 식물체내에서의 생리·생화학적인 기능을 규명하기 위하여 담배에 형질 전환하여 이 들이 저온 저항성을 높여 줌을 확인하였다.

◆저온 저항성 유전자인 *lti-2*를 벼에 도입하여 형질전환체를 만들었다.

◆저온 스트레스 저항성 유전자 연구를 통해 1 건의 논문을 다음의 SCI 등재 국제 학술지에 발표하였다 :

Biochimica et Biophysica acta (2001) in press.

SUMMARY

Plants encounter many adverse environmental challenges. Of those, water stress is one of the most important factors affecting plants' growth and crop yield. To isolate water stress-induced genes, suppression subtractive hybridization and mRNA differential display methods were carried out in *Brassica napus* and winter barley. Thirteen and five cDNA clones induced by dehydration and salt stress, respectively were isolated from the *B. napus* plants. Differential display, suppression subtractive hybridization and ordered differential display were used to screen low temperature induced genes, and isolated about 200 genes in the winter barley. To identify and characterize the genes related with water stress tolerance of higher plants, arabidopsis and tobacco plants were transformed with the isolated genes and tested for water stress resistance. As a result, two of the isolated genes, *tsil* and *tsip*, showed a significant increase in water stress resistance, and were used to develop transgenic crop plants of agricultural value.

CONTENTS

Part I. Introduction	11
Chapter 1. The Need for Research	11
1. Technical aspects	11
2. Economic and industrial aspects	12
3. Social and cultural aspects	12
Chapter 2. Current Status and Problems	13
1. Cold stress	13
2. Dehydration stress	14
3. Salt stress	16
4. Relationship between ABA and water stress	17
Chapter 3. The Research Objectives and Goals	18
Part 2. Isolation of Resistance Genes to Salt Stress and Molecular Breeding of Resistant Crop Plants	14
Chapter 1. Introduction	20
Chapter 2. Study on Transgenic Tobacco Plants Transformed with a Gene Encoding Levansucrase from <i>Zymomonas mobilis</i>	21
1. Introduction	21
2. Selection of T1 transgenic tobacco plants	22
3. Detection of levansucrase activity from transgenic plants	23
4. Tests for water stress-resistance in levansucrase transgenic plants	27
Chapter 3. Isolation and Characterization of Salt Stress-Inducible Genes in <i>Brassica napus</i>	30
1. Introduction	30
2. Screening of salt inducible genes by using mRNA differential display	31
3. Construction of cDNA library	36
4. Isolation and characterization of full length cDNA	37
Chapter 4. Characterization of Salt Inducible Genes by Using Transgenic Model Plants	61
1. Tsil	61
2. Tsip	64
3. Atwd	65
Chapter 5. Transformation of useful crops	70
1. Introduction	70
2. Tsil	71
3. Tsip	73

Part 3 Isolation and Characterization of Drought Stress-Resistant Genes and Molecular Breeding of Stress-Resistant Plants	75
Chapter 1. Introduction	75
Chapter 2. Isolation and characterization of dehydration stress-inducible genes in <i>Brassica napus</i>	76
1. Screening of subtracted partial cDNA	76
2. Identification of dehydration stress-inducible genes	78
3. Partial cDNA sequences of dehydration stress-inducible clones and their homology search	78
4. Cloning of Full-length cDNA	86
5. Bnr7 (Bnp5cs1, Bnp5cs2)	88
6. Bnr14	96
7. Bnr16	99
8. Bnr96	101
9. Bnr209	119
Chapter 3. Transformation of plants	130
1. Transformation of plants using Bnp5cs1	130
2. Transformation of plants using Bnr197	134
3. Transformation of useful crops	136
 Part 4. Isolation and Characterization of Cold Stress-Resistant Genes and Molecular Breeding of Stress-Resistant Plants	 138
Chapter 1. Introduction	138
Chapter 2. Isolation and characterization of cold-induced genes	141
1. Plant materials and extraction of total RNA	141
2. mRNA differential display	143
3. SSH (Suppression subtractive hybridization)	149
4. Isolation of cold-induced genes with ODD(Order Differential display) method	165
Chapter 3. Tissue culture and transformation of model plant	169
1. Construction of gene expression vector	169
2. Transformation of model plant	170
Chapter 4. Tissue culture and transformation of crop plant	173
1. Construction of gene expression vector	173
2. Tissue culture and transformation of barley	174
3. Tissue culture and transformation of rice	176
 Part 5. References	 178

목 차

제 출 문	1
요 약 문	2
I. 제 목	2
II. 연구개발의 목적 및 중요성	2
III. 연구개발 내용 및 범위	3
IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의	3
SUMMARY	6
CONTENTS	7
목 차	9
제 1 장 서 론	11
제 1 절 연구 개발의 필요성	11
1. 기술적 측면	11
2. 경제, 산업적 측면	12
3. 사회, 문화적 측면	12
제 2 절 국내외 관련 기술 현황 및 문제점	13
1. Cold 스트레스	13
2. Dehydration 스트레스	14
3. Salt 스트레스	16
4. 식물 호르몬인 ABA와 Dehydration, cold, salt 관계	17
제 3 절 연구 개발의 목적과 범위	18
제 2 장 염 스트레스 저항성 유전자 분리 및 저항성 작물의 분자 육종	14
제 1 절 서 설	20
제 2 절 미생물 (<i>Zymomonas bobilis</i>)의 levansucrase 유전자를 이용한 형질 전환 담배 연구	21
1. 서론	21
2. levansucrase 형질전환 담배의 T1 세대 선별	22
3. levansucrase가 도입된 형질전환 식물체에서의 유전자 발현 확인	23
4. levansucrase 형질 전환체의 수분스트레스 저항성 검정	27
제 3 절 유채 (<i>Brassica napus</i>)의 salt stress에 의해 발현되는 유용 유전자 선발 및 특성 연구	30
1. 서론	30
2. mRNA differential display를 이용한 염 유기 유전자 분리	31
3. 유채 cDNA library 제작	36
4. Full length cDNA 분리와 유전자 특성 연구	37
제 4 절 형질 전환 모델 식물체에서의 염 스트레스 유기 유전자 특성 연구	61
1. Tsil	61
2. Tsip	64
3. Atwd	65

제 5 절 염 저항성 유전자의 유용작물 형질 전환	70
1. 서설	70
2. Tsil	71
3. Tsip	73
제 3 장 건조 스트레스 저항성 유전자 분리 및 저항성 작물의 분자 육종	75
제 1 절 서 설	75
제 1 절 유채 (<i>Brassica napus</i>)에서 subtractive hybridization법을 이용하여 dehydration 스트레스에 의해 발현되는 유전자의 분리 및 특성 규명	76
1. subtracted partial cDNA 분리	76
2. dehydration stress에 의해 발현되는 유전자 확인	78
3. dehydration stress-inducible partial cDNA 서열 결정 및 그 유사성 조사	78
4. Full-length cDNA 클로닝	86
5. Bnr7 (Bnp5cs1, Bnp5cs2) 유전자 분석	88
6. Bnr14 유전자 분석	96
7. Bnr16 유전자 분석	99
8. Bnr96 유전자 분석	101
9. Bnr209 유전자 분석	119
제 3 절 식물의 형질전환	130
1. Bnp5cs1 유전자를 이용한 형질전환	130
2. Bnr197 유전자를 이용한 형질전환	134
3. 유용작물의 형질전환	136
제 4 장 저온 스트레스 저항성 유전자 분리 및 저항성 작물의 분자 육종	138
제 1 절 서 설	138
제 2 절 저온 유도 유전자의 분리 및 동정	141
1. 실험 대상 식물 확보 및 RNA 추출	141
2. mRNA differential display	143
3. SSH (Suppression subtractive hybridization)	149
4. ODD (Order differential display)를 이용한 저온 유도 유전자 분리	165
제 3 절 Model plant의 조직 배양 조건 확립 및 형질 전환	169
1. 식물발현 벡터 구성	169
2. Model plant의 형질 전환	170
제 4 절 유용 작물의 조직 배양 조건 확립 및 형질 전환	173
1. 식물발현 벡터 구성	173
2. 보리리 조직배양 및 형질 전환	174
3. 벼의 조직배양 및 형질 전환	176
제 5 장 참고문헌	178

제 1 장 서 론

제 1 절 연구 개발의 필요성

1. 기술적 측면

환경으로부터 주어지는 스트레스는 농작물 생산에 있어서 중요한 제한 인자로 작용한다. 농업에 있어서 가장 심각한 문제는 저온, 가뭄, 홍수 및 높은 염 농도 등의 water 스트레스로 인하여 농작물 생산이 해마다 고르지 않다는 것과 그 재배 지역에 한계가 있다는 것이다. 특히 저온, 가뭄, 및 높은 염 농도는 온대 기후이고 강수량의 변화가 심하며 간척지 같은 높은 염 농도의 토양을 가진 우리나라에서 매우 중요한 환경 스트레스로 간주된다. 최근에 식물 세포에 대한 연구가 많이 진전되었으며, 분자생물학의 발전으로 환경 스트레스에 대한 생리학적, 생화학적 및 유전적 기구들이 밝혀지고 있지만 이런 환경 스트레스에 대해 저항성을 부여할 수 있는 factor들은 지금까지 명확히 규명되지 못하고 있다. 그러나 앞으로 식물이 환경 스트레스에 저항하는 작용기작이 분자 수준에서 규명되어지면, 금명간에 대부분의 환경 스트레스에 대하여 저항성을 갖는 새로운 형질의 작물이 육종될 전망이다. 환경 스트레스에 대하여 저항성을 갖는 품종의 육종은 작물의 생산성을 증진시키고, 그 재배 단가를 낮출 뿐만 아니라, 예전에는 환경 제약 때문에 우리 나라에서 재배할 수 없는 열대성 작물의 재배도 가능하게 할 것으로 기대된다.

2. 경제, 산업적 측면

현재 한국의 농업은 UR 등 새로운 국제경제질서 가운데에 경쟁력이 극히 낮은 상태에서 농수산물 수입 개방에 직면하고 있으며 이농 현상의 가속화, 고질적인 농수산물 유통 구조 불합리 문제로 위기를 맞고 있다. 이러한 상황에서 외래 농산물의 대량 저가 유입은 농가 소득 경제에 막대한 영향을 미치고 영세성의 국내 종자 생산업체의 생존을 위협하는 수위까지 와 있다. 따라서 고부가가치 작물, 고수확작물, 낮은 생산비가 드는 작물 및 그 종자의 개발이 필수적으로 요구되고 있다. 특히 고추, 배추, 감자, 토마토, 오이 등은 한국의 주요 채소 작물로 농가의 주요 수입 근거이다.

더군다나 최근 통계에 의하면 주요 식량 작물의 재배 면적은 크게 줄어들고 있는 반면 양념 채소류등의 재배 면적은 해마다 늘고 있는 추세로 '90년부터 '93년까지 채소류의 재배 면적은 무려 14.7%나 늘었다(93년자료, 농림수산부). 이리하여 현재 약 800억원에 이르는 국내 종묘, 종자 시장을 보호할 뿐만 아니라 이제는 국제화, 개방화에 발맞추어 세계 종자 시장(년간 약 620억불 규모)에 진출하여야 하는 시점에 달해 있다. 특히, 일본의 장기신용은행과 미국의 Sheet사는 농업과 식품 분야의 생물 제품이 2000년대의 생물공학 산물의 주축을 이룰 것으로 예측하고 있다(농업 85.5 - 2,187억\$, 식품 1,266억\$). 이러한 상황에 비추어 보면 고품질의 주요 채소 작물의 개발은 필수적이고 이를 위하여 이들 환경 스트레스에 대한 생화학 및 분자생물학적 기초 연구가 선행되어야 한다.

3. 사회, 문화적 측면

개방화 시대를 맞아 우리 농업이 해결해야 할 많은 과제가 있지만 유전자

조작 기술에 의한 신품종 개발 연구는 채소 작물의 품종 개발을 통한 고부가 가치화, 생산성 향상, 노동성 절감 등 농촌 및 농업 기반 보전에 일익을 담당할 수 있다. 또한 신품종 개발 핵심 공동 기반 기술의 국내구축과 국내개발 신품종의 국제시장진출을 통한 기술 선진국으로서의 자긍심을 견지할 수 있다. 현재 냉해, 가뭄, 홍수 등 자연재해에 의한 농작물 산출량 감소 등이 이들 농작물의 불안정한 가격폭등을 야기시켜 전반적인 물가에 영향을 미친다. 그러므로 이러한 환경 스트레스에 대한 생화학적 분자생물학적 연구는 결국 내환경성 작물의 개발로 이어져 농업의 국제 경쟁력 확보와 범국가적인 물가 안정에도 도움을 줄 수 있다.

제 2 절 국내외 관련기술의 현황과 문제점

1. Cold 스트레스

Cold 저항성은 경제적으로 중요한 많은 작물에서 바람직한 특성으로 여겨진다. 열대와 아열대 식물은 저온에 노출되었을 때 냉해를 받는다. 한편 온대 식물은 cold acclimation 하는 능력을 갖고 있어서, 동해를 받지 않을 정도의 낮은 온도에 적당기간 노출되면 cold 저항성이 증가된다. Cold acclimation에 대한 생리적, 생화학적, 분자 생물학적 연구들이 많이 되었다. 그러나 cold acclimation 과정이 복잡하고 수많은 유전자가 관련되기 때문에 저항성을 증가시키는 요인 전부를 면밀히 파악하지는 못하고 있다. 식물이 저온에 노출되는 동안, 생리적 생화학적으로 많은 변화가 관찰되었는데, 다양한 대사경로에 관련된 효소 활성의 변화, 유리 당(sucrose, fructose), 아미

노산(proline) 또는 polyamine의 축적, 세포막 지질 구성 성분의 변화 등이 다. 그리고 cold 스트레스는 새로운 유전자를 발현시키는데 이와 관련된 많은 cold-inducible 유전자들이 분리되었다. 이들은 *cas* (cold acclimation-specific), *cor* (cold-regulated), *rab* (responsive to ABA) 유전자 등을 포함한다. 이들 유전자들의 그 기능은 아직 분명하게 알려져 있지 않으며, 염기서열 유사성으로 그 기능을 유추하지만, cold acclimation에서 직접적인 역할이나, cold 저항성에서 그 필요성이 증명되지는 않았다.

생화학적 연구와 *Arabidopsis*의 돌연변이체에 대한 연구에서 엽록체 막의 phosphatidyl-glycerol에 높은 불포화산 함량과 cold 저항성 사이에 관련이 있음을 보였다. 지방산의 불포화 정도는 엽록체 효소인 glycerol-3-phosphate acyltransferase의 특이성에 의해 결정되는데, 다른 source (*Arabidopsis*, *Squash*, *E. coli*)로 부터 분리한 glycerol-3-phosphate acyltransferase를 식물에 도입했을 때 cold 저항성 정도가 엽록체 세포막 지질의 불포화 정도와 관련이 있음을 보였다.

당의 축적도 cold acclimation 과정과 관련되는데, 최근에 대장균 pyrophosphatase와 효모 invertase를 각각 식물에 도입하였을 때 식물의 생장은 줄어들고 수용성 탄수화물의 농도는 증가하였다. 그리고 놀랍게도 invertase가 도입된 식물은 cold 스트레스에 오히려 더 민감하였고, pyrophosphatase가 도입된 식물은 cold 저항성이 증가하였다. 최근에 환경 스트레스와 관련된 많은 유전자들의 분리되고 있으며, 특히 transcription factor 들이 cloning 되어 이를 이성한 형질전환 식물체가 만들어지고 있다. *CBF1*의 경우 freezing tolerance를 증가 시켰고, *DREB1*의 경우 dehydration 및 freezing tolerance를 증가시켰다.

2. Dehydration 스트레스

식물은 환경에 매우 민감하게 반응하는데 이중에는 새로운 유전자의 발현도 포함되고 있다. Dehydration 스트레스 동안에 많은 식물들은 합성되는 단백질 양상에 많은 변화를 보인다. 이들 중 중요한 것은 dehydrin의 축적을 들 수 있다. dehydrin은 보존적 아미노산 서열부분과 라이신이 풍부한 두 개의 부분을 갖고 있다. 그리고 LEA (late embryogenesis-abundant) 나 RAB (responsive to ABA) 단백질 중에도 dehydrin이 있다. 또한 dehydrin과 관련된 다른 polypeptide로, CAS 18 (cold acclimation-specific), COR 47 (cold-regulated), DSP 14 와 16, LC 30, LE 4, NPR 1, TAS 14, WCS 120, 그리고 WSP 23 등이 있다. dehydrin과 다른 LEA 나 RAB 단백질들은 water 스트레스에 저항하기 위해 합성된다고 제안되고 있다.

이외 dehydration에 의해 유도되는 유전자들이 원핵생물과 하등 진핵 생물에서는 많이 확인 및 분리되었지만 고등식물에서는 그리 많지 않다. Resurrection 식물과 고등식물에서 대부분의 씨는 물이 없이도 오랜기간 동안 살 수 있다. Resurrection 식물인 *Craterostigma plantagineum* 에서 dehydration 저항성에 대해 연구되어졌는데, 수분이 마르기 전에 외부에서 ABA를 처리하면 dehydration 저항성이 증가하며, dehydration 스트레스와 ABA 처리로 많은 새로운 전사체와 단백질이 합성되었다. 이들 중 많은 유전자들이 differential hybridization에 의해 분리되었다. 이들 유전자의 생산물의 대부분은 고등식물의 씨에서 배가 성숙되는 동안 유도되는 단백질이나, water 스트레스를 받는 유묘에서 유도되는 단백질들과 유사하다. 그리고 이들 단백질들이 osmoprotectant로서 역할을 한다는 것이 제안되었다. 그러나 *Craterostigma*에서 분리한 LEA (late embryogenesis-abundant) 단백질을 암호화하는 세개의 유전자들을 각각 담배에 도입하였지만, 이들 형질전환식물은 스트레스에 대한 저항성이 증가하지 않았다.

Resurrection 식물에서 dehydration-rehydration cycle 동안 탄수화물 대

사에도 많은 변화가 있는데, 많은 고등식물의 씨에서처럼, sucrose가 마른 잎에서 축적된다. 하등 생물에서는 이러한 스트레스 하에서 trehalose와 sucrose가 축적된다. 이 경우, 이러한 당들이 세포내부의 구성물질들을 안정화하는 기능을 한다는 것이 *in vitro* 실험에서 밝혀졌다. 최근에 transcription factor 들이 cloning 되어 이를 이용한 형질전환 식물체가 만들어지고 있다. *DREB1*의 경우 dehydration 및 freezing tolerance를 증가시켰다.

3. Salt 스트레스

많은 개체는 염분이 풍부한 환경에 노출되었을 때 한 종류 이상의 저 분자량의 화합물을 축적시킨다. 식물은 환경에 보통 존재하는 무기염류를 체내에 축적하지만 이들은 세포내 생화학 반응에 해로운 영향을 주기 때문에 대부분을 액포에 축적시킨다. 그리고 원형질의 삼투압 균형을 맞추기 위해 식물체는 compatible solute라고 명명된 여러 가지 유기물질들을 원형질에 축적시킨다. 이것은 정상적인 생리 기능에 나쁜 영향을 주지 않고 높은 농도로 원형질에 축적시킬 수 있다. 이들 compatible solute의 축적은 염분뿐만 아니라 저수분, 저온 스트레스 하에서도 이루어진다는 것이 밝혀졌다. mannitol-1-phosphate dehydrogenase을 암호화하는 대장균의 *mtID* 유전자를 담배에 도입하였을 때, mannitol이 축적되었고 염분 스트레스에 대한 저항성이 증가하였다.

Osmotin은 NaCl에 적응된 담배 세포 배양에서 분리한 스트레스 단백질이다. osmotin mRNA의 축적은 발생학적으로 조절되고, ABA, ethylene, salinity, desiccation 이나 wounding에 의해 조절된다. Osmotin은 그 구조와 발현 양상으로 보아 type 5 plant pathogenesis related (PR) 단백질로 분

류된다. 그러므로 osmotin은 삼투압 스트레스와 식물 병원균 방어기작에서 그 기능을 발휘할 것으로 여겨진다.

4. 식물 호르몬인 ABA와 dehydration, cold, salt 스트레스와 관계

ABA는 낙엽과 휴면에 영향을 미치는 식물 호르몬으로 식물의 다양한 생리적, 발생적 과정에 관여한다. 이런 과정은 배의 성숙과 발아 뿐만 아니라, 생육 조직의 water 스트레스에 반응하는 것을 포함한다. 저온, 한발 또는 염분에 의해 water 스트레스가 야기될 때, 식물체 내의 ABA level은 증가하고 이러한 상황에서 특이한 유전자 (*rab gene*)들이 유도되어 스트레스 저항성을 증가시키는데, 이들은 또한 스트레스를 받지 않는 환경에서 외부에서 ABA 처리를 함에 의해서도 유도되어 식물의 스트레스 저항성을 증가시킨다.

최근 ABA에 의해 유도되는 *rab* 유전자들이 differential screening 법에 의해 분리되었다. 이들은 또한 배발생 과정 중에도 발현되므로 *lea* 유전자라고도 한다. 이러한 *rab* 유전자들의 발현과 water 스트레스 저항성 사이에 연관이 있을 것으로 추정된다. 예를 들면, glycophyte 식물이 높은 염 농도에 노출되면 세포벽 다당류와 단백질 조성의 변화, RAB 단백질 또는 proline 같은 osmoprotectant의 축적이 일어난다.

또한 ABA는 식물에서 drought 스트레스에 대해 저항성을 부여하는 성분이다. 수분 결핍시 *rab* 유전자 산물이 잎과 뿌리에 축적된다. 그리고 생육 조직의 cold acclimation 과정에서도 특이한 유전자들이 발현되는데, 외부 ABA 처리에 의해서 cold acclimation이 일어나고 어떤 *rab* 유전자 산물이 축적된다. 또한 저수분이나 염분 환경에 적응된 식물에서도 *rab* 유전자가 발현된다.

Facultative halophyte인 *Mesembryanthemum crystallinum*은 염분처리에 반

응하여 몇몇 *rab* 유전자를 발현하고, resurrection 식물인 *Craterostigma plantagineum*도 저수분 스트레스에 대한 반응으로 *rab* 유전자들을 발현시킨다. 이들 water 스트레스에 의해 발현되는 RAB, LEA, Dehydrin 단백질 등의 아미노산 서열은 uncharged 그리고 hydroxylated 아미노산 함량이 많았고 친수성이 높았다. 그리고 보존적인 domain들을 갖고 있었는데 이것이 스트레스 방어기작에서 중요한 역할을 할 것이라고 추정하고 있다. *rab* 유전자 중에서 pMAH9에 의해 암호화된 단백질은 ribonuclear protein consensus 서열을 갖고 있는데, 이것으로 보아 특정 ABA에 반응 하는 유전자들은 RNA-조절 단백질을 암호화하는 것으로 생각된다.

제 3 절 연구개발 목적 및 범위

본 연구에서는 식물의 저온, 가뭄, 높은 염농도 등 water stress와 관련된 환경 스트레스에 저항성을 나타내는 작용기작을 연구하기 위하여, 그와 관련된 유전자들을 확인하고 이들을 분리하여 그 기능을 밝혀내고자 하였다. 이를 위하여, 수분 스트레스에 강한 것으로 알려진 유채와 보리에서 mRNA differential display법과 subtractive hybridization방법을 사용하여 수분 스트레스에 의해 발현이 증가 되는 유전자를 분리하였다. 분리된 유전자는 담배와 arabidopsis의 모델 식물에서의 형질 전환을 시도, 분리된 유전자 중 어떠한 유전자가 작물의 환경 스트레스에 대한 저항성을 부여할 수 있는지 가능성 여부를 판단하고자 하였다. 더불어, 이들 수분 스트레스 저항성 유전자가 수분 스트레스 저항성을 가져오는 기작을 연구하려고 하였다. 궁극적으로 형질 전환 모델 식물에서 수분 스트레스 저항성을 보이는 유전자는 실제 농업에 이용 가능한 작물인 벼와 상추의 형질 전환에 이용함으로써, 스트레스에

저항성이 증가된 유용한 작물들을 분자 육종하고자 하였다

제 2 장 염 스트레스 저항성 유전자 분리 및 저항성 작물의 분자 육종.

제 1 절 서설

수분 부족에 의한 스트레스는 작물의 생산성을 제한하는 가장 중요한 인자이다. 본 연구의 목적은 수분 스트레스를 가져오는 고 농도 염 농도 의해 유기 되는 스트레스 저항성 유전자를 찾아내고 기능을 연구하여, 이를 작물의 염 스트레스 저항성 분자육종에 이용하고자 하는데 있다. 이에 따라, 수분 스트레스 내성 식물체로 알려진 유채 (*Brassica napus*)로부터 mRNA differential display법을 사용하여 5 개의 유기 유전자를 분리하였다. 분리된 유전자 중 4개에 대하여 유채, 담배, arabidopsis에서 5 개의 full length cDNA clones (*tsil*, *bsi*, *bwd1*, *bwd2*, 그리고 *atwd*)를 찾았으며, 실험 과정 중 1 개의 담배 염 염기 유전자인 *tsip*를 더 분리하여, 6 개 염 유기 유전자를 분리하고 유전자 특성을 연구하였다. 분리된 유전자중 3 개가 특성 연구를 거쳐 형질 전환 모델 식물에서의 내염성 부여 테스트를 위해 선발되었다.

3 종의 형질 전환 모델 식물체에서 내염성 테스트 결과, *tsil*와 *tsip*의 2 개 유전자가 내염성을 증가시킴을 확인하였다. 내염성을 증가시키는 *tsil*과 *tsip*는 각각 유용 작물인 상추의 형질 전환에 이용되었다. 형질 전환 상추는 *tsil*에 대하여 10 개 lines과 *tsip*에 대하여 11 개 line을 얻었으며, 이 중 genomic DNA gel blot analysis와 RNA gel blot analysis를 통해, 도입된 유전자가 constitutive expression을 보이는 *tsil* 형질 전환 상추 line 4 종과 *tsip* 형질전환 상추 line 2 종을 얻었다.

제 2 절 미생물 (*Zymomonas mobilis*)의 Levansucrase 유전자를 이용한 형질 전환 담배 연구

1. 서론

많은 종류의 식물체와 미생물들은 환경에서 주어지는 삼투 스트레스를 이겨내기 위하여 osmolytes 또는 compatible solutes 라고 불리는 sugar alcohols, proline, 그리고 glycinebetaine 과 같은 작은 분자량의 화합물을 만들어 낸다. 이러한 화합물이 정확히 어떠한 기능을 통해 삼투 스트레스 저항성에 기여하는지는 잘 알려져 있지 않으나 이러한 osmolytes를 생성하는 유전자를 이용하여 만든 형질 전환 식물에서 염 저항성이 나타났다는 보고가 있어 왔다. 이러한 작은 분자량의 osmolytes 외에 커다란 분자량의 Fructan (polyfructose)분자도 식물체에 삼투 스트레스 조건에서 식물체의 생장에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고 되어 있다. fructan은 미생물과 식물체 내에서 비 구조성 저장 탄수화물로서 이용된다. 이러한 fructan은 미생물과 식물체에서 몇 가지 차이점을 갖고 있다. fructan의 중합 정도는 식물의 경우 10-250 fructose units 정도 이며, 반면 미생물에서 발견되는 fructan의 경우 100,000 fructose units이다. 이러한 분자 구조의 차이와 더불어 생합성 과정에서도 차이점을 나타내고 있다. 식물의 경우 fructan 합성과정에 관여하는 효소는 적어도 두 개의 fructosyl transferase가 필요한 것으로 보고 되어 있는 반면, 미생물의 경우 단지 한 개의 효소만이 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 경우, 삼투 스트레스 저항성 식물의 분자 육종에 있어서, 단지 한 개의 효소(유전자)을 식물체에 발현시킴으로서 삼투 스트레스 저항성을 부여 할 수 있게 하므로, 식물 유래 유전자를 이용한 식물체 형질 전환 방

법에 비해 외래 미생물 유전자를 이용하는 것이 보다 효율적인 접근 방법이 될 수 있음을 뜻한다. 이 절의 연구는 fructan의 하나인 고중합 levan을 생성하는 미생물 유래의 levansucrase 유전자를 도입한 담배가 osmotic stress에 강하다는 보고에 의해 이상기 박사 연구팀이 *Zymomonas mobilis*에서 분리한 levansucrase 유전자를 담배에 도입하여 형질 전환 담배의 여러 환경 stress에 대한 내성을 연구하였다.

2. levansucrase 형질전환 담배의 T1 세대 선별.

leaf disc method를 이용한 agrobacterim transformation을 담배 (Wisconsin)에 실시한 후 kanamycin selection을 거쳐 얻은 T1 plant (Figure 1)를 대상으로 PCR을 통해 도입된 levansucrase 유전자를 확인하였다 (Figure 2).

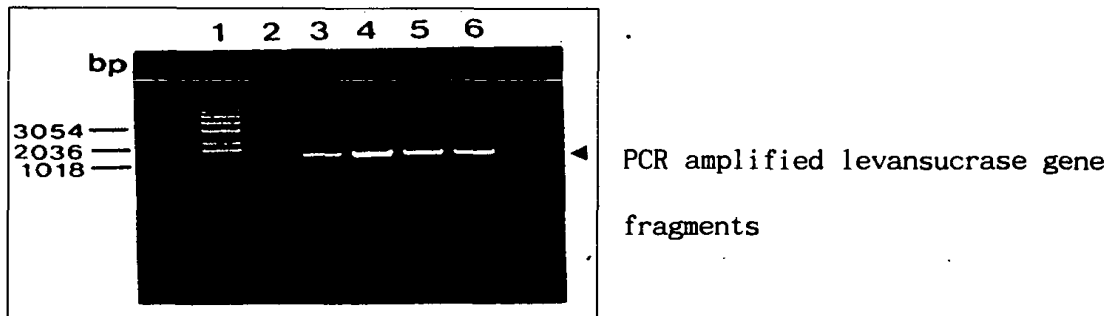


Figure 1. Phenotypic comparison of wild type and transgenic tobaccos in MS/KM agar plates. A: Wisconsin, B-C: transgenic plants containing levansucrase gene.

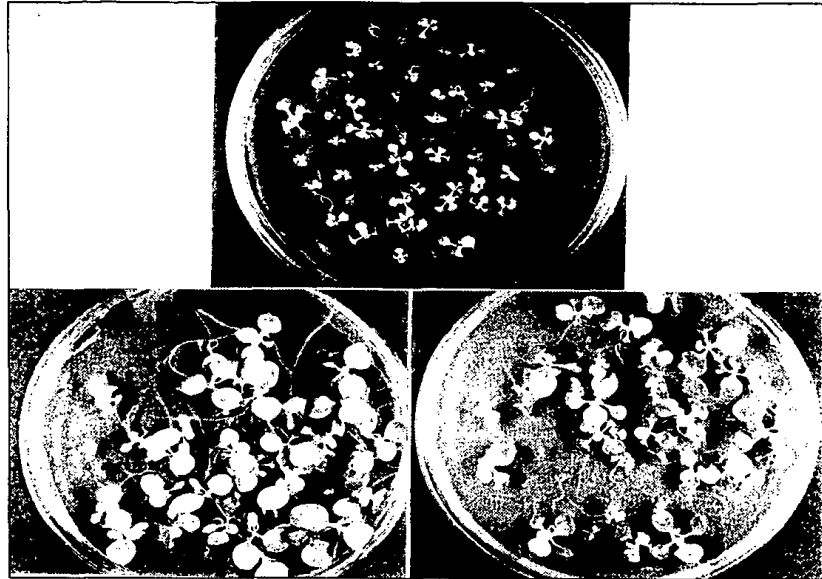


Figure 2. Genetic screening of transformants by PCR. Ethidium bromide-stained gel of PCR reactions from genomic DNA of putative transgenic transformants. Lane 1: size marker, Lane 2: PCR reaction performed with Wisconsin, Lane 3-5: PCR reactions from putative transgenic plants.

3. levansucrase가 도입된 형질전환 식물체에서의 유전자 발현 확인.

Genomic DNA PCR을 통해 확인된 담배 형질전환체로부터 도입된 유전자의 발현이 어느 정도 이루어지고 있는지를 Northern blot analysis로 확인하였다 (Figure 3). 그 결과 levansucrase gene 의 발현이 transgenic plant에서

높은 level로 이루어지고 있음을 볼 수 있다. 또한, 다른 transgenic line에 비해 수분 stress에 대하여 높은 저항성을 보이며(data not shown), RNA gel blot analysis에서 높은 levansucrase transcripts 양을 나타내었던 transgenic plants Line #4와 #6(Figure 3)을 대상으로 levansucrase protein 발현 양을 보기 위해 immunoblot analysis를 수행하였다. 결과로 43kDa의 levansucrase protein이 형질 전환 tobacco 식물체 잎에 축적되는 것을 보였다. 따라서 도입된 유전자가 RNA와 protein level에서 공히 발현 되고 있음을 확인하였다(Figure4).

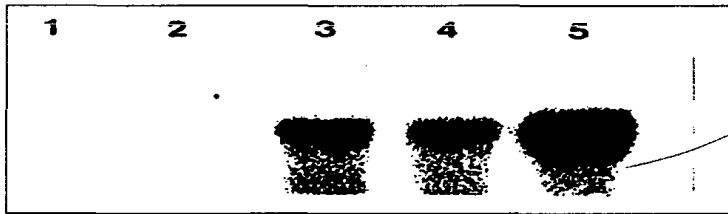


Figure 3. RNA gel blot analysis of transgenic tobacco plants. 형질 전환 식물체로부터 total RNA를 뽑아 RNA gel blot analysis에 이용하였다. 각 lane은 20ug의 RNA를 전기 영동한 것이다. probe로 사용한 levansucrase 유전자는 전체 coding region을 사용하였다. 결과로서, levansucrase의 mRNA에 해당하는 1.6kb에 위치하는 곳에 band가 나타나고 있으며, 세 번째 lane (transgenic plant line #2, lev2), 네 번째 lane (transgenic plant line #4, lev4)과 다섯 번째 lane (transgenic plant line #6, lev6)에서 높은 transcript level이 나타났다. lane 1: non transformant, 2: lev1, 3: lev2, 4: lev4, 5: lev6.

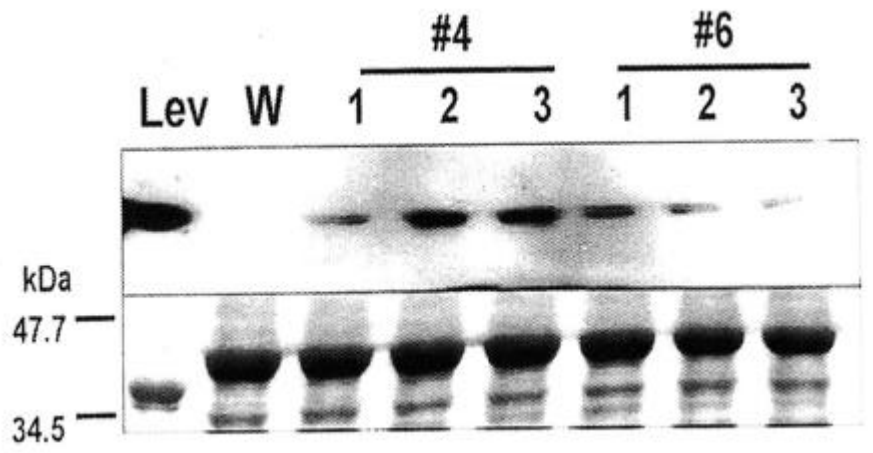


Figure 4. 수분 stress에 대하여 다른 transgenic line에 비해 높은 저항성을 보이며(data not shown), RNA gel blot analysis에서 높은 levanucrase transcripts 양을 나타내었던 transgenic plants Line #4와 #6(Figure 3)을 대상으로 levanucrase protein 발현 양을 보기 위해 immunoblot analysis를 수행하였다. 각 lane은 일에서 추출한 protein 30ug을 동량 전기 영동 하였으며 이를 Coomassie blue-stained SDS gel에서 확인하였다. 결과로서 RNA level에서 뿐만 아니라 protein level에서도 도입된 levanucrase 유전자가 발현되고 있음을 알 수 있다. #4 and #6 표기된 것은 형질 전환 식물체의 두 개 independent lines를 표시한 것이며, Lane 1, 2, 그리고 3은 이들의 T1 세대 자손을, W는 형질 전환 되지 않은 wild type plants를, Lev는 정제된 levanucrase protein을 표기한 것이다. immunostaining은 rabbit polyclonal anti-LevU serum을 1:1000 dilution 하여 사용하였으며, detection은 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG antibody를 secondary antibody도 하여, ECL detection system을 이용하여 수행하였다.

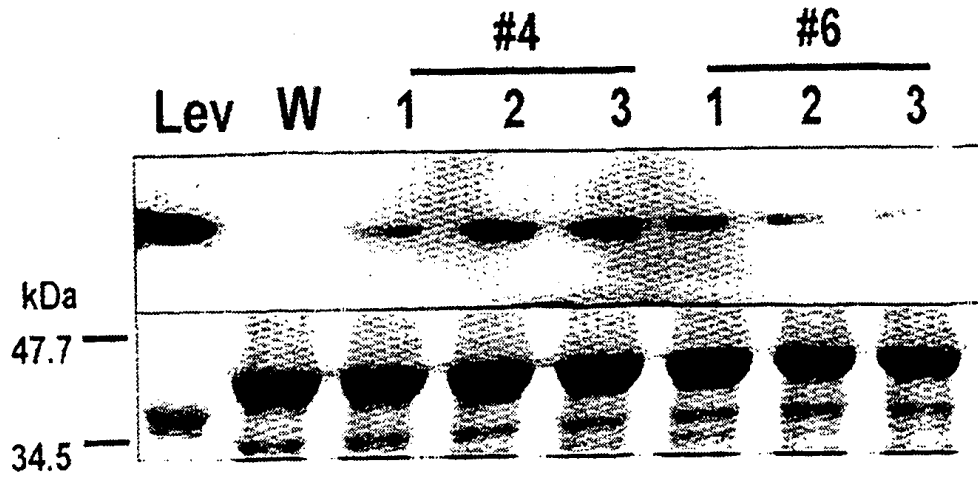


Figure 4. 수분 stress에 대하여 다른 transgenic line에 비해 높은 저항성을 보이며(data not shown), RNA gel blot analysis에서 높은 levansucrase transcripts 양을 나타내었던 transgenic plants Line #4와 #6(Figure 3)을 대상으로 levansucrase protein 발현 양을 보기 위해 immunoblot analysis를 수행하였다. 각 lane은 앞에서 추출한 protein 30ug을 동량 전기 영동 하였으며 이를 Coomassie blue-stained SDS gel에서 확인하였다. 결과로서 RNA level에서 뿐만 아니라 protein level에서도 도입된 levansucrase 유전자가 발현되고 있음을 알 수 있다. #4 and #6 표기된 것은 형질 전환 식물체의 두 개 independent lines을 표시한 것이며, Lane 1, 2, 그리고 3은 이들의 T1 세대 자손을, W는 형질 전환 되지 않은 wild type plants를, Lev는 정제된 levansucrase protein을 표기한 것이다. immunostaining은 rabbit polyclonal anti-LevU serum을 1:1000 dilution 하여 사용하였으며, detection은 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG antibody를 secondary antibody로 하여, ECL detection system을 이용하여 수행하였다.

도입된 levansucrase 유전자의 RNA 와 protein 발현이 강하게 나타나고 있는 Line #2, #4와 #6의 세 개 line만을 다시 genomic DNA gel blot analysis를 실시하여 실제로 도입된 유전자가 genomic DNA 상에 끼어 들어갔음을 재 확인 후 이들 형질 전환체의 수분 스트레스 내성을 검정하였다.

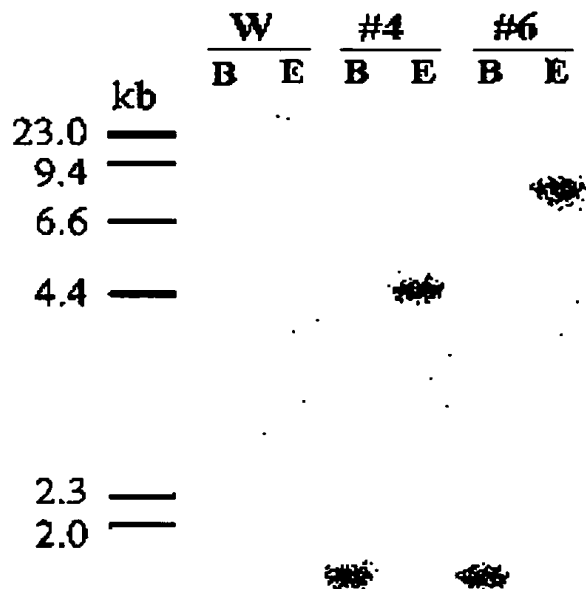


Figure 5. Genomic DNA gel blot analysis of transgenic tobacco plants. 각각의 lane은 genomic DNA 10ug을 제한 효소 절단 후, 전기 영동 하였다. probe로는 1.3kb의 levansucrase 유전자 coding region을 PCR을 통해 증폭하여 사용하였다. W는 untransformed control plant를, B와 E는 *Bam*HI와 *Eco*RI으로 자른 것을 나타낸다.

4. levansucrase 형질 전환체의 수분스트레스 저항성 검정

상기 형질 전환체에서 실제 fructan의 축적이 이루어지는지 알기 위해 앞으로 부터 fructan을 추출한 후 TLC를 이용하여 분석하였다. 이를 위하여 형질 전환체와 untransformed control plants로부터 ethanol precipitation을 거쳐 fructan을 분리하였다. 이 조건에서 분리된 fructan의 평균 중합도는 적어도 6으로 알려져 있다. fructan을 완전히 hydrolyzation 시키기 위하여 precipitation 시킨 fructan을 60 °C sulfuric acid에 녹여 incubation 후 TLC plate에 spotting 하였다 (Figure 6). TLC analysis 결과, 형질 전환 식물체는 fructan을 생성할 뿐 만 아니라, 전적으로 중합화된 fructose 만을 생성하여, 도입된 유전자가 식물체 내에서도 정상적으로 기능하고 있음을 보여 주고 있다.

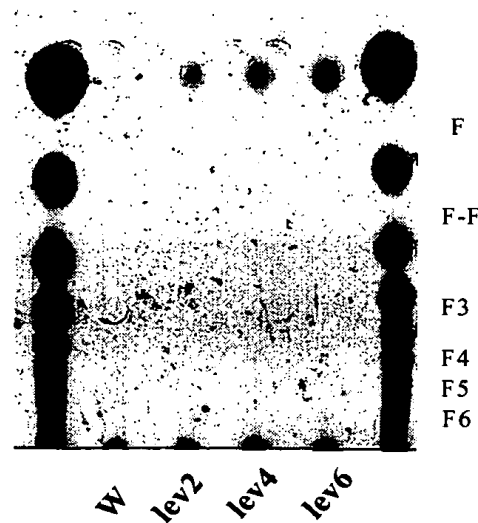


Figure 6. TLC analysis of fructan accumulation in transgenic tobacco plants. F는 fructose monomer 위치를 나타내며 F-F에서 F6는 oligomer의 위치를 나타낸다.

실제로 형질 전환 식물체에서 축적되는 fructan에 의해 수분 스트레스 저항성이 부여되는지 확인하기 위하여 PEG와 cold 처리 후 untransformed control plants에서 생장률을 비교하였다. normal MS agar plate에서 형질전환체의 경우 control plants에 비해 근소한 정도로 빠른 성장을 보인다 (Figure 7. A). 하지만, 스트레스 조건 하에서 현격한 성장 차이를 보임을 알 수 있었다. Figure 7. B는 형질 전환체가 PEG에 의한 수분 스트레스 조건 하에서 control plant에 비해 훨씬 빠른 성장을 보임을 나타내고 있다. control plant의 경우 normal agar medium에서와 stress medium에서의 성장이 크게 차이가 나는 반면에, 같은 조건의 transgenic plant의 경우, 두 independent transformant 모두 normal medium과 PEG-containing medium에서 생장에 큰 차이를 보이지 않고 있다. PEG와 마찬가지로 수분 스트레스를 가져오는 저온 처리에서도 fructan이 식물에 저항성을 주는지 확인하기 위해 2 °C의 저온 조건을 일주일 간 유지 후에 형질전환체의 생장을 조사하였다 (Figure 7 C). 결과로서, untransformed control plants의 경우 모두 괴사하는 반면 transgenic plants의 경우 늙은 잎의 bleaching을 제외하면, 어린 잎은 chlorophyll을 그대로 유지하고 있어 fructan의 합성이 PEG에 의한 수분 스트레스 뿐만 아니라 저온 스트레스에 대해서도 저항성을 공히 가져옴을 보여 주고 있다.

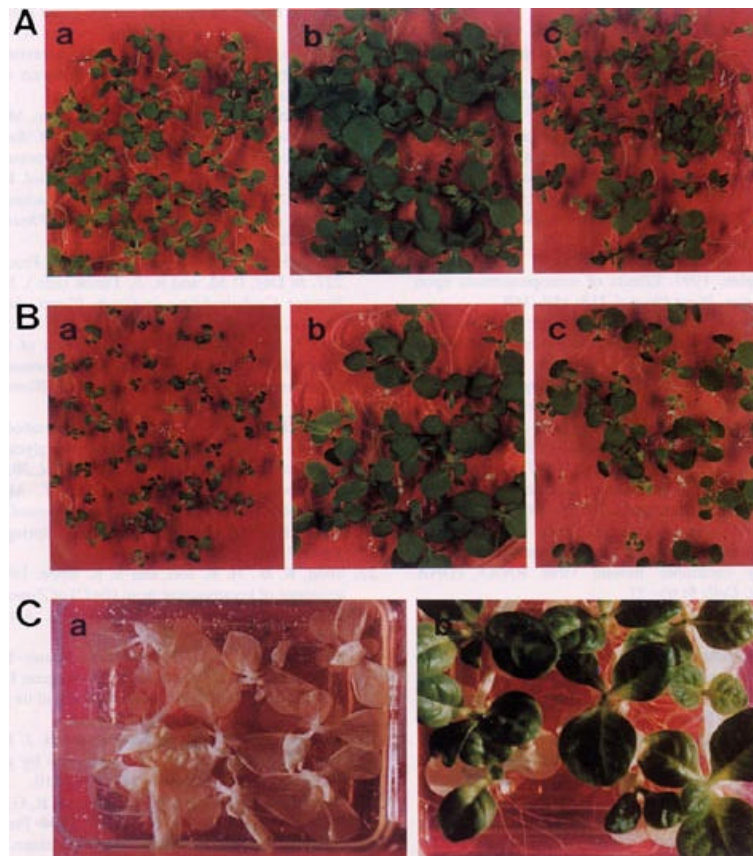


Figure 7. Phenotypes of transgenic tobacco plants under drought and cold stress. A. Comparison of untreated tobacco plants three weeks after germination on MS agar plates. a: untransformed control plants; b and c: transgenic plants containing levanucrase gene. B. Growth performance of untransformed and transgenic tobacco plants under PEG-induced drought stress. Untransformed (a) and transgenic tobacco plants (b and c) were germinated and grown on MS agar plates containing 8% PEG 8,000 in a growth chamber at 25 °C. C. Response of untransformed and transgenic tobacco plants to cold treatment. Four-week-old untransformed (a) and transgenic tobacco plants (b) were transferred to a growth chamber at 2 °C and maintained for 7 days.

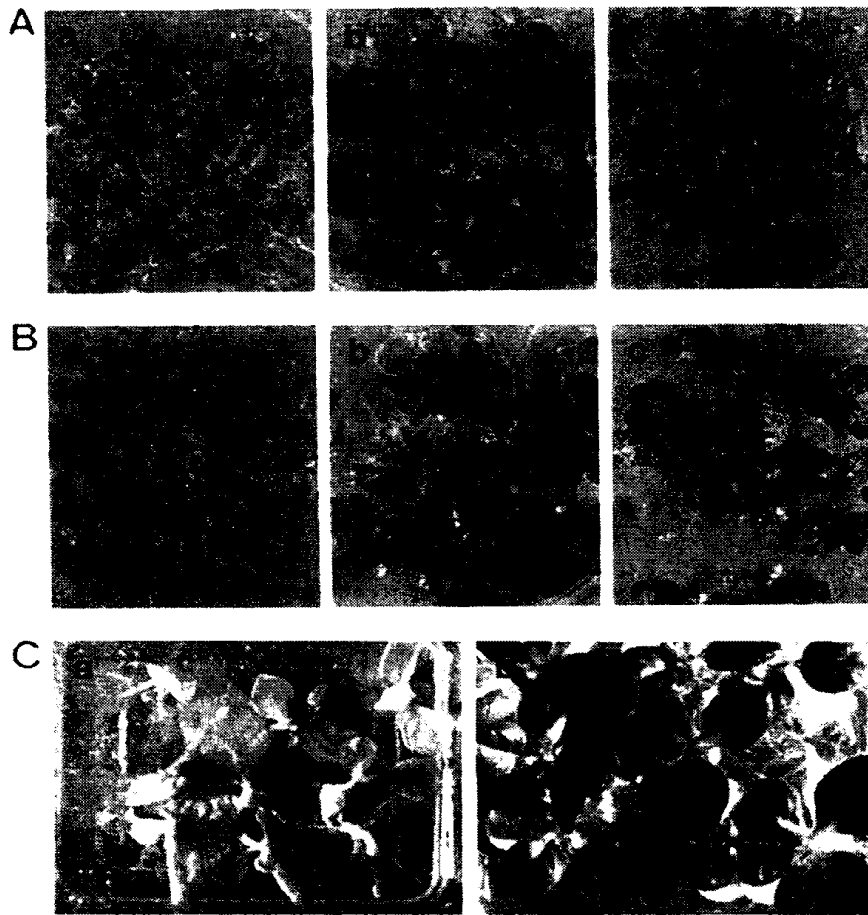


Figure 7. Phenotypes of transgenic tobacco plants under drought and cold stress. A. Comparison of untreated tobacco plants three weeks after germination on MS agar plates. a: untransformed control plants; b and c: transgenic plants containing levansucrase gene. B. Growth performance of untransformed and transgenic tobacco plants under PEG-induced drought stress. Untransformed (a) and transgenic tobacco plants (b and c) were germinated and grown on MS agar plates containing 8% PEG 8,000 in a growth chamber at 25 °C. D. Response of untransformed and transgenic tobacco plants to cold treatment. Four-week-old untransformed (a) and transgenic tobacco plants (b) were transferred to a growth chamber at 2 °C and maintained for 7 days.

제 3 절 유채 (*Brassica napus*)의 salt stress에 의해 발현되는 유용 유전자 선발 및 특성 연구

1. 서론

유용 작물 중에서 염(salt) 스트레스에 강한 유채 (*Brassica napus*)를 실험 대상으로 선정하여 염 스트레스에 의해 발현 되는 유전자를 mRNA differential display 방법을 이용하여 분리하고 발현 양상을 연구하였다. 이 연구를 위한 선행 연구로서, 염 스트레스 조건을 확립하기 위한 실험을 수행하였다. salt stress 에 대한 식물체 반응 연구를 위해서는 정확한 salt 처리와 salt 스트레스 외의 다른 환경 스트레스 배제가 필수적인 바, 유채 재배를 토양이 아닌 액체 배지를 사용함으로써 실험의 정확성을 기하였다. 유채의 액체 배양은 유채 seeds 10 개를 liquid MS 배지가 들어 있는 250ml 삼각 플라스크에 넣어 4 일간 키웠으며, hypoxia를 피하기 위해, shaking incubator (25 °C, 120 rpm)를 사용하여 이루어졌다. 염 스트레스 처리 조건은 200mM NaCl을 0, 0.5, 1, 3시간 처리 한 후 total RNA를 분리, 밝혀진 salt-induced gene을 probe로 Northern hybridization을 수행하여 처리 조건의 정확성을 확인하였다. 이렇게 Salt 처리 시간 별로 분리된 total RNA는 Differential display법을 통해 염 처리에 의해 유기 되는 유전자의 분리에 사용되었다. Differential display 방법을 통해 서로 종의 40 여개 primer combination으로부터 5 개의 염 유기 유전자를 분리하였으며, 이 중 3개의 유전자에 대하여 보다 세부적 연구를 실시하였다.

2. mRNA differential display를 이용한 염 유기 유전자 분리

유채에서 염 스트레스 처리에 의해 발현이 증가하는 유전자를 분리하기 위해 본 연구에서는 mRNA differential display 법을 이용하였다 (Figure 8). 20개의 random primer sets와 더불어, mRNA differential display 방법의 문제점을 보완하기 위해, conserved domain 부분에 대한 20개의 specific primer를 합성하여 mRNA differential display 실험을 수행하였다. polyacrylamide gel 상에서 발현양 차이를 나타내는 48 개의 cDNA fragments를 분리 후, 이들 유전자 각각을 probe로 하여 RNA gel blot analysis를 수행한 결과 5개의 유전자가 염 스트레스 처리에 의하여 발현이 증가됨을 확인하였다 (Figure 9). 이들 5개 clone에 대하여 염기 서열을 결정하고, 염기 서열 database search 결과, 3개의 clone에 대하여 기존 밝혀진 유전자와의 염기 서열 유사성이 나타났으며, 2개 clone에 대하여는 뚜렷한 염기 서열 유사성이 나타나지 않았다 (Table 1). 분리된 cDNA clone들 중 DD1으로 이름 붙여진 clone은 Arabidopsis thaliana의 β -mannosidase와 아미노산 서열의 유사성을 보였다. 지금까지의 보고된 결과들에 따르면, 당 대사에 관련된 효소가 식물의 내건성에 매우 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. 또한 water stress 저항성이 증가될 경우 glycolysis와 gluconeogenesis에 관여하는 효소의 activity가 증가하는 것으로 보고되어 있다. 예를 들면 salt stress 조건에서 Mesembryanthemum crystallinum의 enolase는 효소의 activity가 4배 증가하는 것으로 보고되어 있다. 따라서, β -mannosidase는 oligosaccharide를 분해시키는 효소이기에 아마도 osmoprotectant를 생성시키는 sugar units를 만드는데 관여하리라 사료된다. DD4 로 이름 붙여진 clone은 아미노산 서열에서 hin1과 NDR1과 아미노산 서열에서 유사성을 나타내고 있다. hin1은 담배에서 분리된 유전자로서 박테리아의 단백질인 harpin에 의해 발현이 증가되는 것으로 보고되었다.

1. Isolate RNA and reverse transcribe with four different poly dT primers.

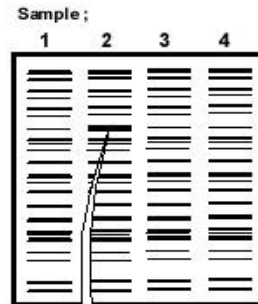
T₁₄VA, T₁₄VT, T₁₄VC, T₁₄VC



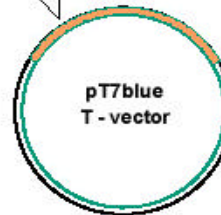
2. Subject to aliquots of the cDNA to [³²S]-dATP-labeled PCR using the same poly dT primers in combination with series of random 10 mers.



3. Run PCR reactions of sequencing gels and identify and excise bands of interest.



4. Reamplify using the same poly-dT and random 10 mer primers. Subclone reamplified PCR fragments into pT7blue T-vector (Novagene), and use blue / white selection.



5. Pick one colony for miniprep and use to generate ³²P-labeled probe for Northern analysis.

6. Northern analysis to confirm differential expression and nucleotide sequence determination.

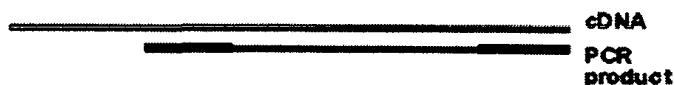
Figure B. A schematic diagram of mRNA differential display analysis.

1. Isolate RNA and reverse transcribe with four different poly dT primers.

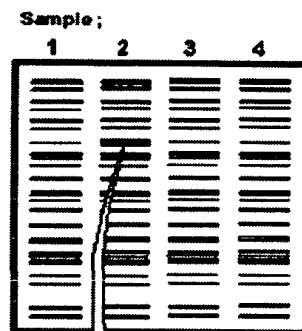
T₁₄VA, T₁₄VT, T₁₄VC, T₁₄VC



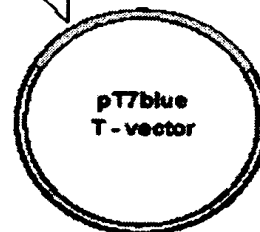
2. Subject to aliquots of the cDNA to [³²S]-dATP-labeled PCR using the same poly dT primers in combination with series of random 10 mers.



3. Run PCR reactions on sequencing gels and identify and excise bands of interest.



4. Reamplify using the same poly-dT and random 10 mer primers. Subclone reamplified PCR fragments into pT7blue T-vector (Novagene), and use blue / white selection.



5. Pick one colony for miniprep and use to generate ³²P-labeled probe for Northern analysis.

6. Northern analysis to confirm differential expression and nucleotide sequence determination.

Figure 8. A schematic diagram of mRNA differential display analysis

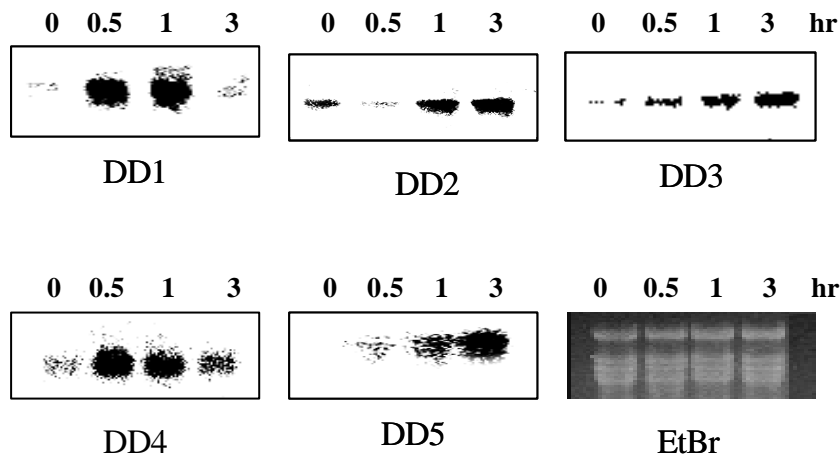


Figure B. Expression pattern of isolated PCR fragments during salt stress treatments. 각 lane은 total RNA 20ug을 전기 영동한 것에도 probe는 differential display에서 얻은 DNA fragment를 PCR을 통해 ^{32}P 도 labeling하여 만들었다.

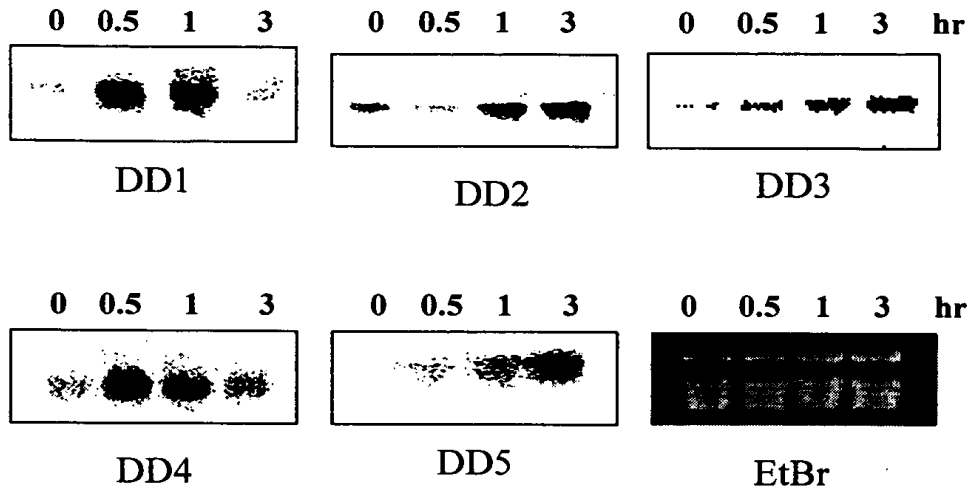


Figure 9. Expression pattern of isolated PCR fragments during salt stress treatments. 각 lane은 total RNA 20ug을 전기 영동한 것으로 probe는 differential display에서 얻은 DNA fragment를 PCR을 통해 ^{32}P 로 labeling 하여 만들었다.

Clone #	cDNA (bp)	Induction time (hr) ^a	Sequence homology ^b	Accession no. ^c	
DD1	489	0.5	contains similarity to Bos beta-mannosidase	AC000106	Arabidopsis
DD2	275	1	unknown		
DD3 ^d	253	1	unknown		
DD4 ^d	266	0.5	hin1	Y07563	tobacco
DD5 ^d	393	0.5	pti6	U89279	tomato

Table 1. Summary of the salt-induced cDNA fragments of *Brassica napus* identified by mRNA differential display.

a Based on RNA gel blot analysis carried out with samples harvested at the time after inoculation.

b According to the NCBI BlastX search results.

c GenBank/EMBL/SwissProt accession number

d full length DNAs were isolated in this study. (partial cDNA sequences were omitted)

DD1

TCGGTCCAGAGTACGAGCTGGAGATCAACCGTCCACAGTACATCTAGAGCTGACTTAGCCGAAAACACTCTTCAGGACGA
TGAAAAACACGGTGTGGGTTTGCTCCAGAAGCTCTTTAGTAGATTTGGTGGACTGAAGATAGCAACCGCGGATTGAAAGT
GGGGAAACGGAGGGATCTGATCCAGGAGTTGCCTTCTTTCTTCGTTTCTCAGTCCACAAGCAGAAGCAGAGAAACAAGAC
ACGAGGATTCTGCCTGTACACTATTCAGACAACACTTCTCACTTGTTCGGGTGAATCAATGTCTTTTAAGATCTCATT
TGCAGCTCCTGCAGGCATGAAGAAGCCTCCTCGTGTTATGCTTCGGGGATGGAACCTACCCTGACGGGTTTACTGTTTTTG
GTTAAGGCAAATTACTTTTCGTGTGCAAACCTCAAACACTTTCAAGAAATGGAACCTTAACACATCTTGTATTGCCAAAA
AAAAAAAAA

Reading High Probability

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:

Frame	Score	P(N)	N	
gi:2342683 (AC000106) Contains similarity to...	-1	130	1.0e-21	5
pir: A55260 cytotoxic necrotizing factor type...	-1	58	0.993	2
sp:P40102:YE17_YEAST HYPOTHETICAL 15.4 KD PROTE...	-1	62	0.998	1
gi:2342683 (AC000106) Contains similarity to Bos beta-mannosidase (gb:U46067).				

[Arabidopsis thaliana] Length = 810

DD2

GATGTATTGAACAAGGCAGGTGGTATTGATGAGTACCTGCTGAAGACACCTTACCACGAGATGGACACTGAATTAGGCCT
CTTCTGGAAAGCTAAGATTGAGAAGTTATACGAGGAGCTTGGAAAATGGAGGTAGTATTCTTTACACCTGAAGATGAAGC
AACTTGAAGAGCAGTTAGGAAGTAAAGTTGGAAGAACGAGGAGCCGGTAGGAAGCCAGGAGAAGATGTATGGTTGGTC
ACCCAAATCCGAGCTAAAAGCAGATTCTGAAGGAAACCTACAGTCTGACTTCCAAGAAGGGATGGTTGCCAATGCTTGAA
AGCATTCAAGCGACAAAATGTTGTAGGTTTCTGAGCTGCTTCTGATATTGAAGGGCCTG

3. 유채 cDNA library 제작

differential display로부터 얻은 partial cDNA clone으로부터 full length cDNA clone을 얻기 위해 200mM NaCl을 1, 3시간 처리한 유채로부터 total RNA를 분리하고 이로부터 mRNA를 순수 분리하여 cDNA library (10^{10} pfu/ml)를 제작하였다. 제작된 library의 효율을 알아보기 위해, library에서 90개의 cDNA clone을 무작위로 선발, 이중 insert DNA를 갖고 있는 lamdar vector 수와 vector 에 들어 있는 insert DNA size를 조사하였다. 결과로 모든 lamdar vector가 cDNA insert을 가지고 있었으며 98% 이상이 insert DNA size가 500bp 이상으로 나타났다 (Figure 10).

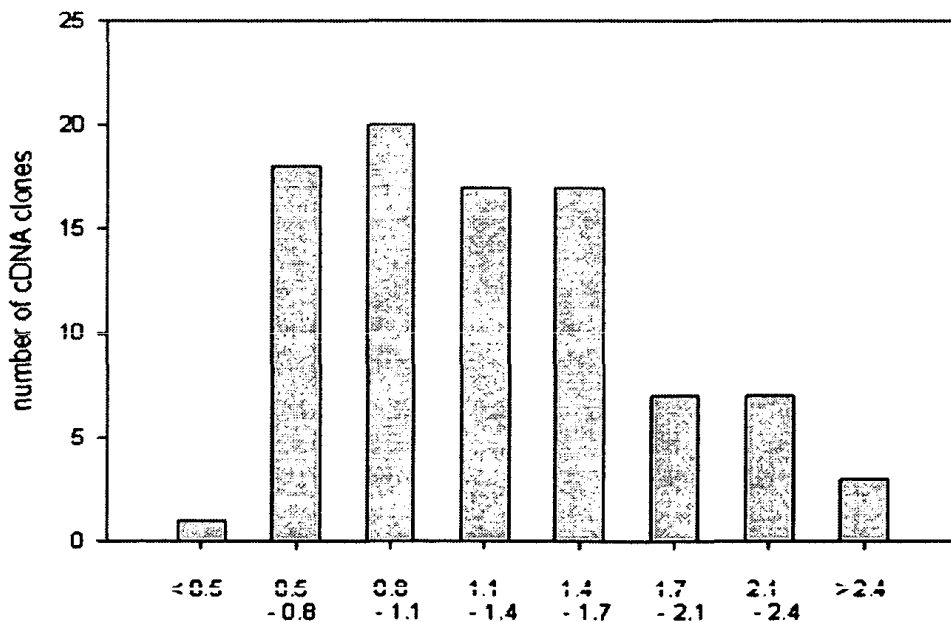


Figure 10. Size distribution of DNA fragments in the *B. napus* cDNA library. cDNA library was constructed in λ Uni-ZAP XR vector by using ZAP-cDNA synthesis kit and ZAP-cDNAR Gigapack(R) Gold cloning kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

4. Full length cDNA 분리와 유전자 특성 연구

가. *Jsf1* (DD5)

담배 cDNA library로부터 유체도로부터 분리된 AP2/BRBP family homolog fragment (DD5)를 probe도 하여 full cDNA clone (*Jsf1* : Tobacco salt-induced gene)을 분리하고 전체 염기 서열을 결정하였다. (GenBank accession number : AF058827)

```

GGCAGCAGAAAATCGCCGTA TAAATTGATTCGGCTGTTTGTGTCGGAATATTAGTCITTTTTGGTGGTACTAATTTGATGTTGCAAC
CAGTCTGTGAITTTGCTTTAATGTTCTAGCTAGAGA TTAATGTTGTAATGCTGTTTTCTAGAAAACATGAACTTTATCGGATGA
M 1
TAAAGAAATCGAGTCGTTTCTGTAA TGGGATGAA CCAAAAAGAGTTAAAGGTTTCCGAAA CAGCATATGAGTAAAAGAAAC
I R K S S R F S N G M N Q K T V K G P P N T I I T K N K 28
AGAGACTTGTTCG GAA TGA TAA GTTAACAGA TGGCCTGAG GGGAGC TGA TTGCTG GGA CCA GGAAGGACAAGA TAGTGTAGCGAG
Q R V V R N H N L T D A L T A T D S S D E E G Q D T V R R 58
AGTGAAAGGCGAGGTGACGGAGATCAACCTGATGCGA TGGCCGAA TTTGATA TGTGAAAAGAAA CCAAGA TTGCTTTCGCGCGAT
V K R H V T E I N L M P S P N L I C E K K R R L V S P D 88
ACTGAGG TGA CTC GCG GGA AAAAGTTA GGGGTG TACGTCAAA GGGGATGGG GTG GTTGGG CAG CAGAGA TTG GGGACGCGA CCG
T D V T R R K K F R G V R Q R P W G R W A A E I R D P T 119
GGGAAAACGGGTTTGGTTCGGAACGTA TGA CAG CCG GGA AGG AAA GCA GGTATG GTTTTA CGA CCG CAG CTTGGTCTTAA GC
R G K R V W L G T Y D T P E G K Q L S P Y Y A S L L V K 142
TGAAGG TCG TGA TGG CGT TAC TAA GTTTTC GGA AAG TAT TAA CCG CCG ATA TAA CCG GAA AAT GGA CTC TGT TAC CGA CCG TCG
L K G P D A V T N P S E S I N G G Y N R K M D S V T D G G 171
AGAGAAAACG GAA AAT GAG TTC GGT TTTG TCG CCG ACG TCA GTTCTG CGT AAG GAT GAT TTTTACG CCG TGT GAG GAT TTTG GGG TT
E K S E N E F A L S P T S V L R G D D P T P S D D L G 188
GTGGAAA GGG GAG GCT GCG TGG TTTGAC GTT GAC TCG GTTTTC GGG TTTG CCG GAA TTTGGG TTTG TCG GAG AAA TAG TAG GGG GAT
G A K G D A R W P D V D S L P R L P E P G L S E K Y Y G D 228
GAATTCG GCG AGT TTTGACT TTTGACGACT TTTGCTG TCG AAG CTC GATAGTGTG GCG TAT TTTGCTT TTA GAT GAAAGT TTTGCG
E P G E P D E D D F A L E A R = 253
GATTTTGTACTGTGAG TGA TTGCTGATG GTGACG TGGCATTTT TGA CCGGAC TATATG GTGATTAGTANGCGA TTTATCGGGGAT
TTTTCGAGAGATT TGTACG TTTTTTAA TTTAAGA TGTGATTTG TGA GGG CCAATTATG TANTAA GAAAATTTTGT TTTTGTATT
CGAAAAA AAAAAAAAAA

```

Figure 11. Sequence of the *Jsf1* cDNA clone and the predicted amino acid sequence.

4. Full length cDNA 분리와 유전자 특성 연구

가. *Tsil* (DD5)

담배 cDNA library로부터 유채로부터 분리된 AP2/EREP family homolog fragment (DD5)를 probe로 하여 full cDNA clone (*Tsil* : Tobacco salt-induced gene)을 분리하고 전체 염기 서열을 결정하였다. (GenBank accession number : AF058827)

```

GGCAGAGAAAATCCCCCTATAAATTCATTCCCTCTTTGTCTCGAATATTACTCTTTTTGCTGCTACTAATTTTCATCTTCCAAC
CAGTTCTTGATTTCTCTTTAATCTTCTACGTACAAGATTAATGTTCTAAATCCTGTTTTCTACAAAACATCAACTTTATCCCATGA
                                                                                               M 1
TAAGGAAATCCAGTCGTTTCTAATGGGATGAACCAAAAAACAGTTAAAGGTTTCCCAAACACCATAATCACTAAAAACAAAC
I R K S S R F S N G M N Q K T V K G F P N T I I T K N K 29
AGAGAGTTGTTTCGGAATCATAACTTAACAGATGCCCTGACGGCAACTGATTCCTCGGACGAGGAAGGACAAGATACTGTACGGAG
Q R V V R N H N L T D A L T A T D S S D E E G Q D T V R R 58
AGTGAAGAGGCACGTGACGGAGATCAACCTCATGCCATCGCCCAATTTGATATGTGAAAAGAAACGAAGATTGGTTTCGCCGGAT
V K R H V T E I N L M P S P N L I C E K K R R L V S P D 86
ACTGACGTCACCTCGCCGAAAAAGTTTAGGGGTGTACGTCAAAGGCCATGGGGTCGTTGGGCAGCAGAGATTCGGGACCCGACCC
T D V T R R K K F R G V R Q R P W G R W A A E I R D P T 114
GGGGAAAACGGGTTTGGTTGGGAACCTATGACACCCCGAAGGAAAGCAGCTATCGTTTTACGACGCCAGCTTGCTCGTTAAGC
R G K R V W L G T Y D T P E G K Q L S F Y Y A S L L V K 142
TCAAAGGTCTGTATGCCGTTACTAATCTTTCCGAAAGTATTAACGGCGGATATAACCGGAAAATGGACTCTGTTACCGACGGTGG
L K G P D A V T N F S E S I N G G Y N R K M D S V T D G G 171
AGAGAAAAGCGAAAATGAGTTTCGCTTTGTGCGCCGACGTCACTTCTCCGTAAGGATGATTTTACGCCGTCTGACGATTTGGGGTT
E K S E N E F A L S P T S V L R G D D F T P S D D L G 199
GTGCGAAGGGGACGCTCGCTGGTTTGACGTTGACTCCCTTTTCCGGTTGCCGGAATTTGGGTTGTCGGAGAAATACTACGGCGAT
C A K G D A R W F D V D S L F R L P E F G L S E K Y Y G D 228
GAATTCGGCGAGTTTGACTTTGACGACTTTGCTCTCGAAGCTCGATAGTGTGGGCTATTTGGTTGTTTTAGATCAAAGTTGTGG
E F G E F D E D D F A L E A R * 253
CATTTTTGTACTTGAGTCATTGCTGATGGTGACGTGGCATTTTGACGGGACTATATGGTGATTAGTANCCGATTTATCGCGGAT
TTTGCAGAGATTTGTACCTTTTTTAATTTAACATGTGATTTGTGAGGGCCAATTATGTANTAAGAAAATTTGTTTTGTTATT
CCAAAAAATAAAAAAAAAA

```

Figure 11. Sequence of the *Tsil* cDNA clone and the predicted amino acid sequence.

유채와 담배에서로부터 genomic DNA를 추출하여 *Tsi1* gene copy수를 측정하기 위해 genomic Southern Blot Analysis를 수행 (Figure 12).

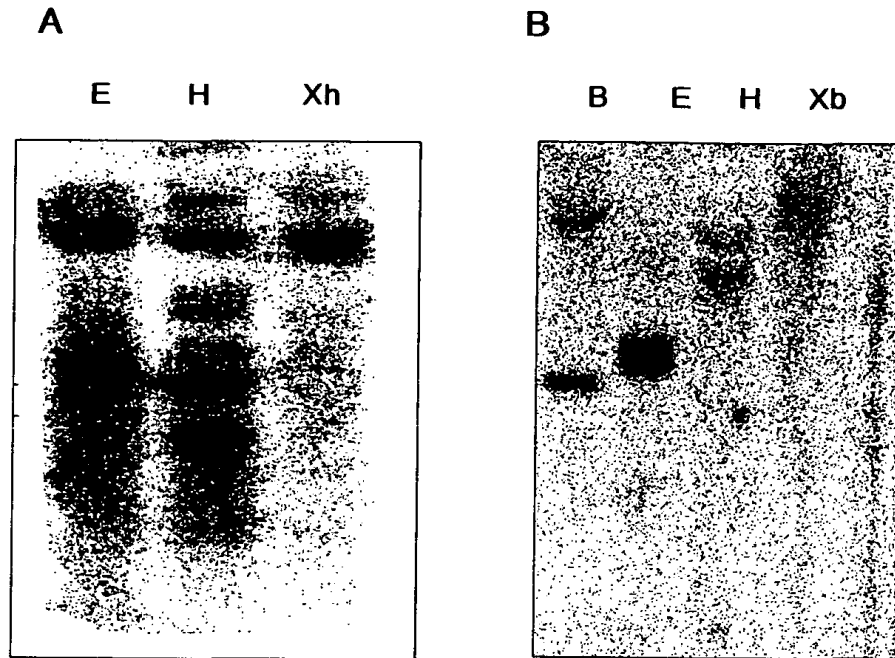


Figure 12. Southern blot analysis of genomic DNA from *Brassica napus* (A) and *Nicotiana Tabacum* (B). Genomic DNA(10 μ g per lane) was digested with *Bam*HI (B), *Eco*RI (E), *Hind*III (H), *Xba*I (Xb), *Xho*I (Xh), fractionated on a 1% agarose gel and transferred to a nylon membrane. The filter was hybridized with α -[32 P] labeled fragment of *SA11-2.2* DNA (A) and *Tsi1* coding region (B), respectively.

mRNA differential display를 통해 담배로부터 분리된 *Tsf1* 유전자의 식물체에서의 발현이 기관별로 어떤 양상을 보이는지 그리고 SA, Salt를 처리할 때 어떻게 달라지는지 Northern blot analysis를 통해 연구하였다. *Tsf1* 유전자의 발현이 높답게도 salt 뿐만이 아니라 병 저항성에 관련이 되는 SA 호르몬에 대해서도 달라짐을 확인 할 수 있었다. (Figure 13. and 14).

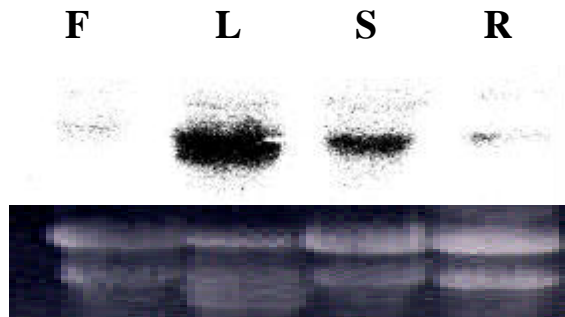


Figure. 13. Tissue specific expression of the *Tsf1* gene. Each lane was loaded with 20ug of total RNA prepared from flowers (F), roots (R), leaves (L), and stem (St). Equal amounts of RNA loading were determined by ethidium bromide staining.

mRNA differential display를 통해 담배로부터 분리된 *Tsi1* 유전자의 식물 체에서의 발현이 기관별로 어떤 양상을 보이는지 그리고 SA, Salt를 처리할 때 어떻게 달라지는지 Northern blot analysis를 통해 연구하였다. *Tsi1* 유전자의 발현이 놀랍게도 salt 뿐만이 아니라 병 저항성에 관련이 되는 SA 호르몬에 대해서도 달라짐을 확인 할 수 있었다. (Figure 13. and 14).

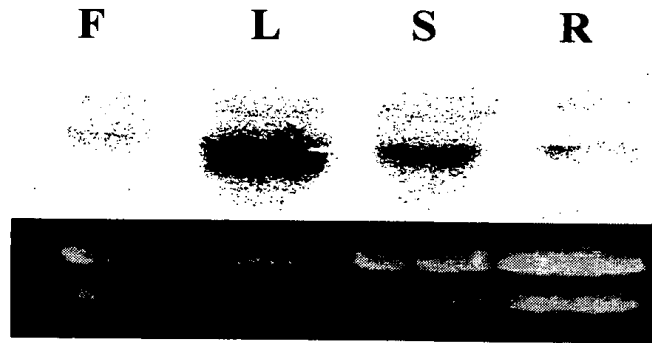


Figure. 13. Tissue specific expression of the *Tsi1* gene. Each lane was loaded with 20ug of total RNA prepared from flowers (F), roots (R), leaves (L), and stems (St). Equal amounts of RNA loading were determined by ethidium bromide staining.

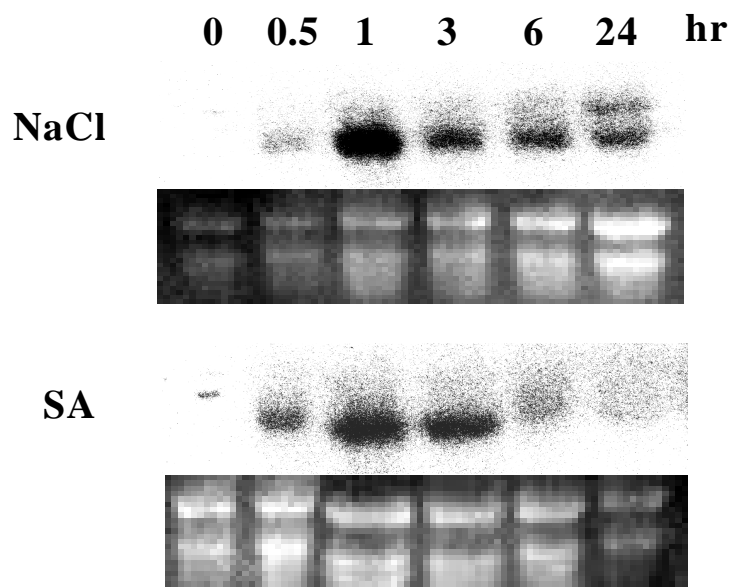


Figure 14. Induction of the *Tsf1* gene expression by treatment with NaCl or salicylic acid. Each lane was loaded with 20 μ g of total RNA from detached tobacco leaves that had been treated either with 400 μ M NaCl (NaCl) or 2 μ M salicylic acid (SA) for the designated time period.

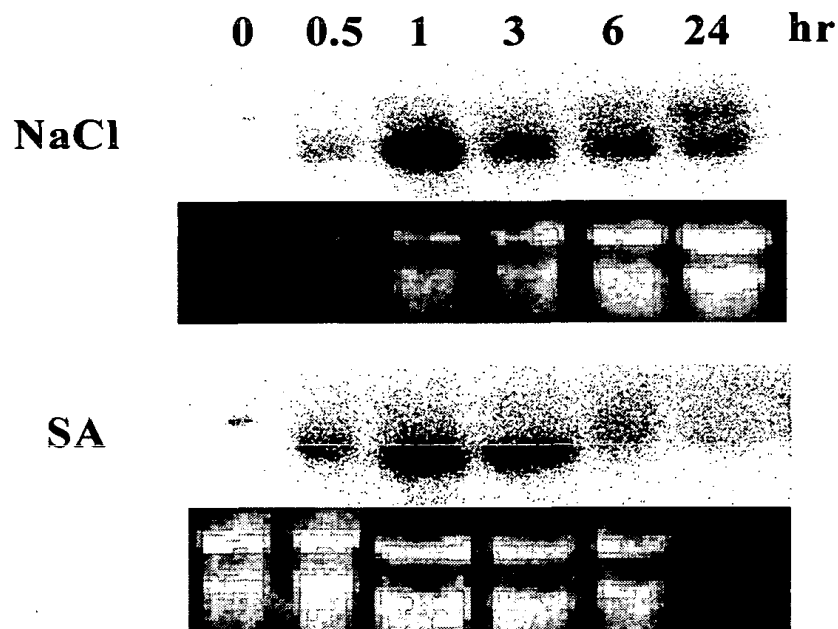


Figure 14. Induction of the *Tsil* gene expression by treatment with NaCl or salicylic acid. Each lane was loaded with 20 g of total RNA from detached tobacco leaves that had been treated either with 400 mM NaCl (NaCl) or 2 mM salicylic acid (SA) for the designated time period.

Ts11 유전자의 식물체 세포 내에서의 localization을 알기 위해 GFP (green florescent protein) 유전자와 fusion을 시킨 후 PEG-mediated transformation 법을 이용하여 fusion 유전자를 BY-2 cell 내로 도입하고 현광 현미경 하에서 관찰하였다. *Ts11::GFP* 유전자의 발현은 식물체내에서 핵으로도 target됨을 알 수 있었다.

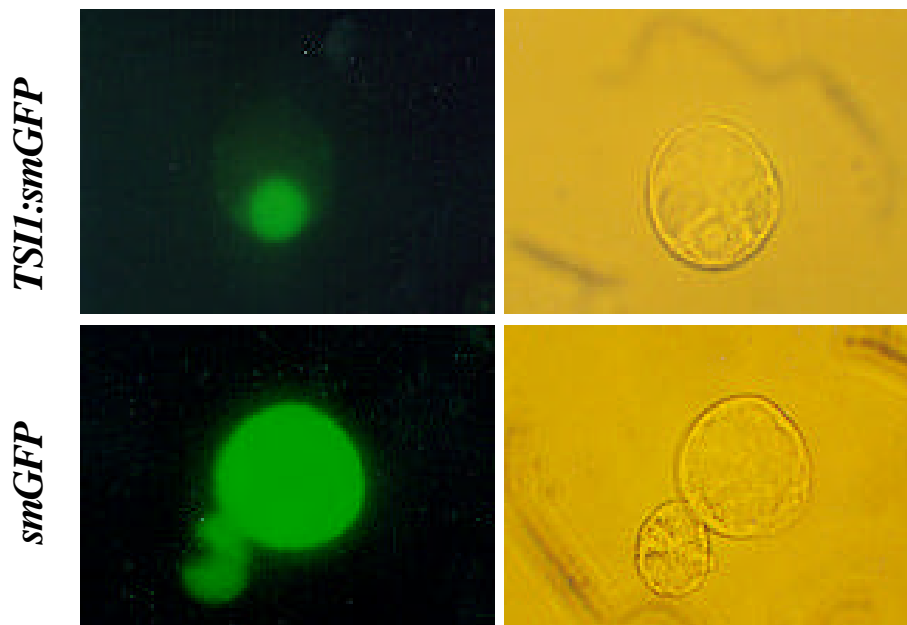


Figure 15. Subcellular localization of the *Ts11*. The *Ts11::smGFP* fusion construct and the control *smGFP* were introduced into tobacco BY-2 cell protoplasts by the PEG-mediated transformation method.

Tsi1 유전자의 식물체 세포 내에서의 localization을 알기 위해 GFP (green florescent protein) 유전자와 fusion을 시킨 후 PEG-mediated transformation 법을 이용하여 fusion 유전자를 BY-2 cell 내로 도입하고 형광 현미경 하에서 관찰하였다. *Tsi1::GFP* 유전자의 발현은 식물체내에서 핵으로 target됨을 알 수 있었다.

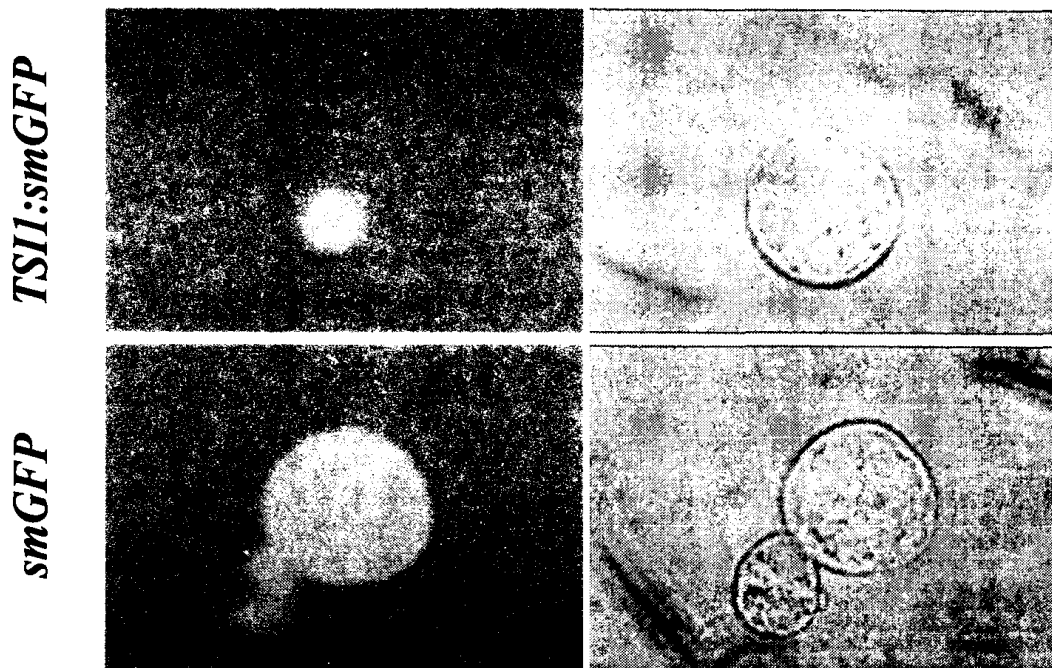


Figure 15. Subcellular localization of the *Tsi1*. The *Tsi1::smGFP* fusion construct and the control *smGFP* were introduced into tobacco BY-2 cell protoplasts by the PEG-mediated transformation method.

나, *Bsi*

mRNA differential display로부터 선발된 유전자중 *hinI* homology를 보였던 partial cDNA clone (DD4)를 probe로 사용하여 library screening을 수행한 결과 *hinI* homolog 유전자는 1054bp (*Bsi-1*, Figure 16. A)와 804bp (*Bsi-2*, Figure 16. B) 크기의 full length cDNA clone을 얻었다. 이중 *hinI* homolog 유전자는 염기배열을 모두 확인하여 BLAST search를 수행한 결과 non race-specific disease resistance gene 인 NDR1 (Karen et al., Science, 1997 DEC. 278 1963-1965) 과 amino acid sequence 유사성이 나타남을 알 수 있었다 (Figure 17).

A.

```
aaccataaataaaagatgtcaaaagattgcggcaaccacggtggtggcaagaagcagcc
      M S K D C G N H G G G K E A A 15
gtccggcgaatctgcgcccggttatagccttcatcataatagtctaatcaccatcttt
V R R I C A A V I A F I I I V L I T I F 35
ctagtatgggtcataactaaggccaactaagccaagattcatcctgcaagaagccaccgtc
L V W V I L R P T K P R F I L Q E A T V 55
ttcgcttcaacctctcgcaaccaaacctctcaccacaaactttcagatcacattcgca
F A F N L S Q P N L L T T N F Q I T F A 75
tctcgtaaccctaactccaagatcggatctactacgaccgtctccacgtctacgctacg
S R N P N S K I G I Y Y D R L H V Y A T 95
taccgtaaccagcagataactctcaggacagcaatccctccgacgtatcaaggccacaaa
Y R N Q Q I T L R T A I P P T Y Q G H K 115
gaagacaacgctctggtctccgtttgtttacgggaccgctgttccgatcgcaccgtacaac
E D N V W S P F V Y G T A V P I A P Y N 135
tccgtcgttttgggagacgagcaaggatcggactcgttcagttgatgatacgcgccgat
S V A L G D E Q G H G L V Q L M I R A D 155
gggcgctgaggtggaaagtagggacgttgatcaccggaaaatatcatatccatgttcgg
G R V R W K V G T L I T G K Y H I H V R 175
gtccggctctcatcaatcttgggaacaaagctgctggtgttattgtcggtgacaacgcc
C P A L I N L G N K A A G V I V G D N A 195
gttaagtatacgttggttactaaatgcagtgtgaacgtttagaactttgacgccgcttca
V K Y T L V T K C S V N V 208
ctttctacaaaatctctgacgcatactgtgcatcctaaacaaatccaagaaaagatt
```

tgccctctatacatacaaaagattgtattacggaaatactcaatattatatctcttatat
 ctttctaaaaatctgtgggcttatagacgcaattgcccggtttcttcgtttacagaagacg
 cagtcgagaacatgtagactggaaaagcttatgaaacatagtcgagaatgagattgaag
 cttttccgggacaagatggaaatgtataaaaaacaaatagtgttgtaatatcggttga
 atggttaacatTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAA

B.

caaacacaaaaaggaagaaatataatcatatagagagagaaaagaagcacaacagtggcag
 aaccgtaataaaagatgtccaaagattggcgcaaccacgggtggcacaagaagcagcc
 M S K D C G N H G G G K E A A 15
 gtccggcgaatctgcgccccgttatagccttcataatagtctaatcaccatcttt
 V R R I C A A V I A F I I I V L I T I F 35
 ctagtatgggtcactcaggccaactaagccaagattcatcctccaagaccaccgctc
 L V W V I L R P T K P R F I L Q D A T V 55
 ttccgcttcaacctctcgcaaccaaactcctcacctcaaactttcagatcacattcgca
 F A F N L S Q P N L L T S N F Q I T F A 75
 tctcgtaaccttaactccaagatcgggtatctactacgaccgtctccacgtctacgctacg
 S R N P N S K I G I Y Y D R L H V Y A T 95
 taccgtaaccagcagataactctcaggacagcgatccctccgacgtaccaaggccacaaa
 Y R N Q Q I T L R T A I P P T Y Q G H K 115
 gaagacaacgtctggctcccgtttgtttacggaaccgctgttccgatcgcaccgtacaac
 E D N V W S P F V Y G T A V P I A P Y N 135
 tccgtcgtttgggagacgagcaaggtcatggactcgttcagttaatgatacgtgccgat
 S V A L G D E Q G H G L V Q L M I R A D 155
 gggcgcgtgaggtggaagttgggacgttgatcaccgaaaatataatccatgttcgg
 G R V R W K V G T L I T G K Y H I H V R 175
 gtccggctctcatcaatcttgggaacaaagctgctggtgttattgtcgggtgataacgcc
 C P A L I N L G N K A A G V I V G D N A 195
 gtttaagtatacgttggttactaaatgtagtgaacgtttagaactttgacgccgttaag
 V K Y T L V T K C S V N V 208
 ttgcttctatctctttttattattattatataatcaaatcattttctatttaca
 aaaaaaaaaaaaaa

Figure 16. Sequences of the *Bsi1* (A) and *Bsi2* (B) cDNA clones and the predicted amino acid sequences.

Region 1

<i>Bsi1</i>	---MSK---DCGNHGGGKEAAVRRICAAV-----	IAFIII VLITIFLWVI	40
<i>Bsi2</i>	---MSK---DCGNHGGGKEAAVRRICAAV-----	IAFIII VLITIFLWVI	40
<i>At hin1</i>	MEFGQK--YCWRCG---DARRAICGAI-----	FTILVILGIIALILWL	40
tobacco <i>hin1</i>	MALPFR--HQQNPITATAAAAAATHVAVSLAASAIVFSKLSSE	FTLLIILGVIALVLWL	58
<i>Os hin1</i>	MGSASRAVSLCCPCKCLACGLFSLCS-----	IIISLLVTLGVLALIFYL	47
<i>NDR1</i>	-----MNNQNEDEGGRNCTCC-----	LSFIFTAGLTSFLWLS	35

Region 2

<i>Bsi1</i>	LRPTKPRFILQEATVFAFNLSQPN-LLTTFNQITFA	SRNPNSKIGIYYDRLHV-YATYRN	98
<i>Bsi2</i>	LRPTKPRFILQDATVFAFNLSQPN-LLTSNFQITFA	SRNPNSKIGIYYDRLHV-YATYRN	98
<i>At hin1</i>	YRPHKPRLTVVGAAYDLNFTAPP-LISTSVQFSVIA	RNPNRVSIHYDKLSM-YVTKD	98
tobacco <i>hin1</i>	LRPNKVKFYVTDATLTQFDLSTNTIFYDLALNMI	RNPNRKIGIYYDSIEA-RALYQG	117
<i>Os hin1</i>	FRPHMIAATVDSAALTQFTLSTNS-ALAYSLTVDLT	VRNPNKRVGLYDYNVES-LALFDG	105
<i>NDR1</i>	LRADKPKCSIQNFIPALGKDPNS-RDNTTLNFMVFE	CDNPNKDKGIYYDDVHLNFSTINT	94

<i>Bsi1</i>	QQITLR-----TAIPPTYQGHKEDN----VWSPFVYG-TAVPIAPYNSVALG-DEQGH	145
<i>Bsi2</i>	QQITLR-----TAIPPTYQGHKEDN----VWSPFVYG-TAVPIAPYNSVALG-DEQGH	145
<i>At hin1</i>	QIITPP-----LPLPLRLGHKSTV----VIAPVMGG-NGIPVSPEVANGLK-NDEAY	145
tobacco <i>hin1</i>	ERFDS-----TNLEPFYQGHKNTS----SLRPVFKQSLVLLGDREKSNYN-NEKNL	164
<i>Os hin1</i>	QRFGY-----APLDSFYQSTEAST----KLSPAFKG-QQPLQGDITAAEFR-SQQT	151
<i>NDR1</i>	TKINSSALVLVGNVYTPKPHYQGHKKAKKWGVKPLNNQTVLRAVLPNGSAVFRDLTKTQ	154

<i>Bsi1</i>	GLVQLMIRADGRVRWVGT-LITGKYHIHVRCP-ALINLGKAAGVIVGDNAVKYTLVTK	203
<i>Bsi2</i>	GLVQLMIRADGRVRWVGT-LITGKYHIHVRCP-ALINLGKAAGVIVGDNAVKYTLVTK	203
<i>At hin1</i>	GVVLMRVVIFGRLRWKAGA-IKTGRYGFYARCD-VWLRFPSSNG-----QVPLLAPST	197
tobacco <i>hin1</i>	GVYEMEVKLYMRIRLKVGVW-IKTHKIKPKIECD-FKVPLGNSGRS-----SSANFEETR	216
<i>Os hin1</i>	GKFDIEVKLNAKLRVKVAW-FKVPGPKPKISCP-ITVPASAPN-----APAFQRTD	200
<i>NDR1</i>	VRFKIVFWTKRYGVEVGADVEVNGDGVKAQKKGIKMKSDSSFPLR---SSFPISVLMN	211

<i>Bsi1</i>	CSVNV--- 208
<i>Bsi2</i>	CSVNV--- 208
<i>Athin1</i>	CKVDV--- 202
tobacco <i>hin1</i>	CHLDW--- 221
<i>Os hin1</i>	CKVWF--- 205
<i>NDR1</i>	LLVFFAIR 219

Figure 17. Comparison of predicted amino acid sequences of *Bsi1* and *Bsi2* with other homologous proteins. The deduced amino acid sequences of *B. napus* *Bsi1* and *Bsi2* genes are aligned with those of *hin1* of *Arabidopsis* (*At hin1*), tobacco and rice (*Os hin1*), and *NDR1* of *Arabidopsis*. Amino acid sequence alignments of *Bsi1* and *Bsi2*. Box regions contain amino sequences that exhibit strong sequence conservation.

분리된 full length cDNA 가 differential display에서 찾은 partial length cDNA 와 마찬가지로 salt 처리 시 transcript level이 증가 하는지 확인하기 위하여 northern blot analysis 수행하였다 (Figure 1B).

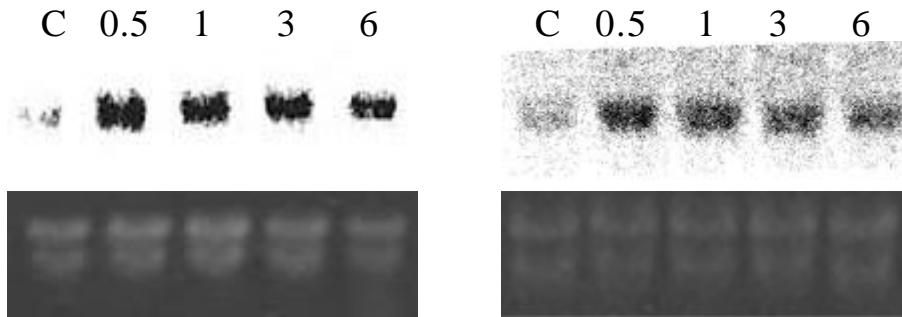


Figure 1B. Expression of *hmi1*-like mRNA (*Bsf-1*) in NaCl-treated *B. napus* seedlings. Gel blots of RNA (20µg per lane) extracted from plants treated with 200 mM NaCl for 30min (0.5), 1hr (1), 3 hr (3), and 6 hr (6), respectively, were hybridized with the full-length cDNA (A) or with a specific fragment from 3' untranslated region of clone *Bsf-1* (B) as probe. Equal amounts of RNA were loaded per lane (bottom panels). *B. napus* seedlings were cultured in MS liquid medium and grown for 4 days before NaCl treatment. Control plants (C) were not treated.

분리된 full length cDNA 가 differential display에서 찾은 partial length cDNA 와 마찬가지로 salt 처리 시 transcript level이 증가 하는지 확인하기 위하여 northern blot analysis 수행하였다 (Figure 18).

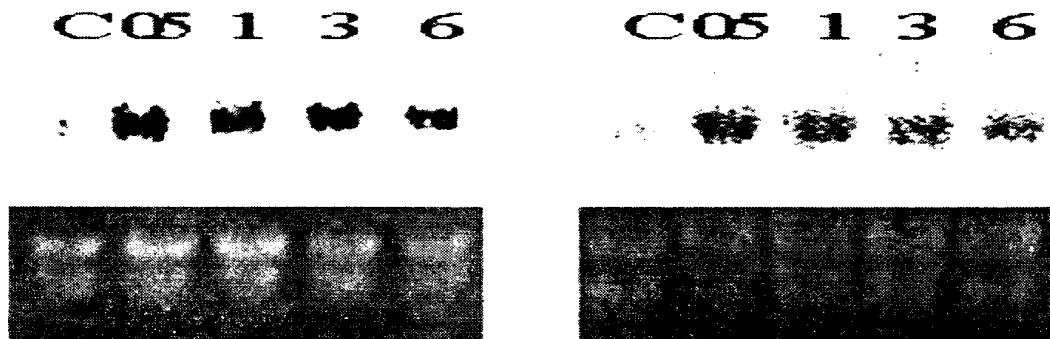


Figure 18. Expression of *hin1*-like mRNA (*Bsi-1*) in NaCl-treated *B. napus* seedlings. Gel blots of RNA (20 μ g per lane) extracted from plants treated with 200 mM NaCl for 30min (0.5), 1hr (1), 3 hr (3), and 6 hr (6), respectively, were hybridized with the full-length cDNA (A) or with a specific fragment from 3' untranslated region of clone *Bsi-1* (B) as probe. Equal amounts of RNA were loaded per lane (bottom panels). *B. napus* seedlings were cultured in MS liquid medium and grown for 4 days before NaCl treatment. Control plants (C) were not treated.

Bsi1 유전자가 아미노산 서열의 유사성을 나타내는 담배의 유전자 *hin1* 처럼 bacterial pathogen attack에 의해 gene expression이 일어나는지 보기 위해 HR을 일으키는 *Pseudomonas syringae pv syringae 61*을 시간 별로 처리하여 Northern Blot analysis를 수행하였다. 결과로서 본 연구에서 분리한 *bsi1* 유전자는 bacterial pathogen이 갖는 hapin에 의해 발현되지 않음을 알 수 있었으며, 염 스트레스에 의해 특이적으로 반응함을 알 수 있었다.

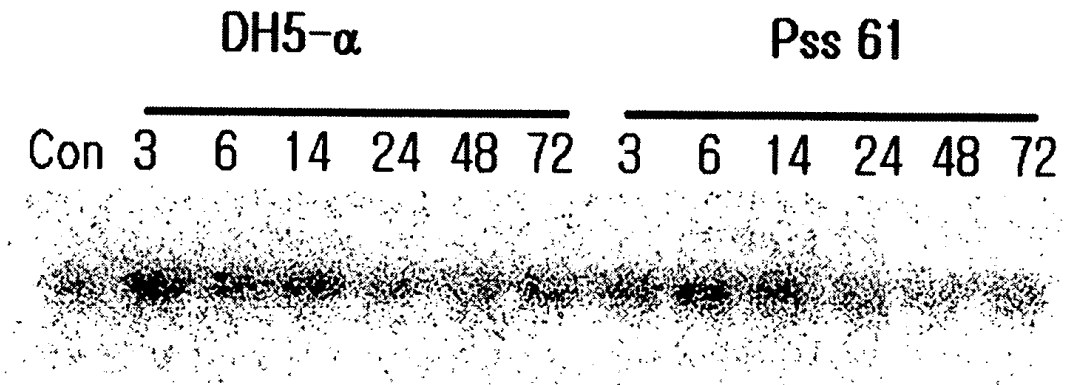


Figure 19. Expression pattern of *bsi1* gene in *B. napus* by *Pseudomonas syringae pv. syringae 61*. Leaves were infiltrated with *DH5* (lanes 2 - 7) and *Pss61* (lanes 8 -13) at $OD_{600}=0.2$. Equal weight of leaf tissues were collected at each time point, respectively and used for RNA extraction. RNA blot (20 μ g per lane) was hybridized with α -[32 P] labeled fragment of *bsi1* DNA.

유체로부터 genomic DNA 추출 후 *Bsi-1* gene specific probe를 사용하여 southern blot analysis를 수행하여 유체에서의 유전자 copy 수를 확인하였다 (Figure 6). 실험 결과 유체의 genomic DNA에는 2개 이상의 *bsi* 유전자 homologue가 있음을 알 수 있었다.

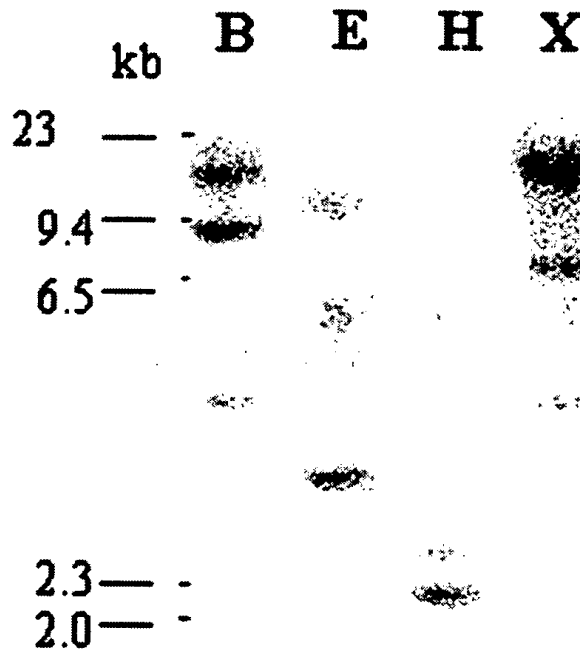
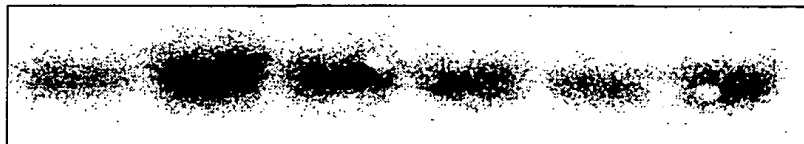


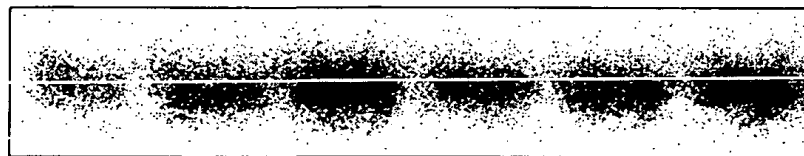
Figure 20. Southern blot analysis of genomic DNA isolated from *B. napus* plants. Twenty micrograms of DNA was digested with *Bam*HI(B), *Eco*RI(E), *Hind*III(H), and *Xho*I(X). Blot was hybridized with a specific fragment from 3 untranslated region of clone *Bsi-1* as a probe.

salt stress를 비롯한 몇몇 abiotic stress의 식물 내 반응에는 ABA 및 ethylene 등의 plant hormone이 관여하고 있으며, abiotic stress에 대한 반응은 biotic stress에 대한 반응과 서로 겹쳐져 나타난다는 연구 결과가 나와 있다. *Bsi* 유전자는 salt stress에 의해 발현이 증가할 뿐만 아니라, pathogene에 대한 식물 반응에 관련된 유전자들과 염기 서열과 아미노산 서열에서 homology를 보이고 있다. 따라서 *Bsi* gene expression에 대한 abiotic 그리고 biotic stress에 관여하는 신호 전달 체계의 영향을 분석하고자 Ethephon, H₂O₂ 및 Methyl jasmonate를 처리하여 *Bsi* 유전자의 발현 양상을 northern blot analysis를 통하여 조사하였다 (Figure 21). orthern blot analysis 결과, *Bsi*유전자는 ABA independent pathway를 통해 salt stress에 의해 그 발현이 증가하며, salt stress와 밀접한 관련을 갖는 oxidative stress (H₂O₂)에 의해서도 발현이 증가됨을 볼 수 있다. 특기할 점은 biotic stress와 관계가 있는 Methyl jasmonate에 의해서도 발현이 조절된다는 것이다

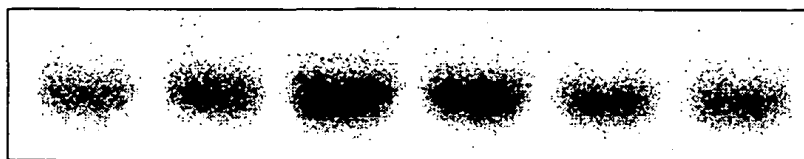
control 1 hr 2 hr 5 hr 10 hr 24 hr



Ethephon
(1mM)



H₂O₂ (1mM)



Methyl
jasmonate
(50 μM)

Figure 21. Expression pattern of Bsi1 gene upon ethephon, H₂O₂, and Methyl Jasmonate treatments.

Bsi의 subcellular localization과 NaCl에 대한 세포 내 작용 기작을 연구하기 위한 목적으로 Bsi::GFP fusion vector를 구축하였다 (Figure 22).

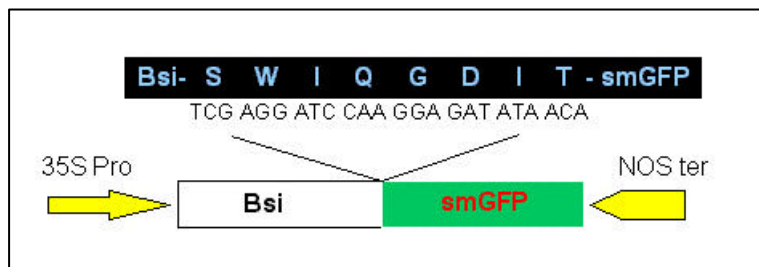


Figure 22. Bsi::GFP fusion vector construct.

제작된 Bsi::GFP fusion vector는 tobacco protoplast 와 유체의 epidermal cell에 각각 PEG transformation 과 particle bombardment를 통한 transformation 후 GFP의 transient expression을 보았다 (Figure 23). Tobacco의 protoplast에서 Bsi의 subcellular localization을 형광 현미경을 통하여 본 결과, 형광은 핵에서 여러개의 반점으로 나타나고 있으며(Figure 23. A, B), 이러한 결과는 유체의 epidermal cell에서 confocal microscopy 결과 (Figure 23 C)와도 일치하고 있다.

Figure 21. Expression pattern of Bsi1 gene upon ethephon, H₂O₂, and Methyl jasmonate treatments.

Bsi 의 subcellular localization과 NaCl에 대한 세포 내 작용 기작을 연구하기 위한 목적으로 *Bsi::GFP* fusion vector를 구축하였다 (Figure 22).

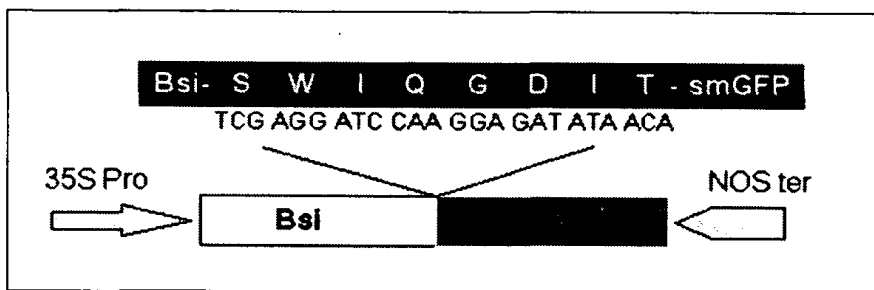


Figure 22. *Bsi::GFP* fusion vector construct.

제작된 *Bsi::GFP* fusion vector는 tobacco protoplast 와 유채의 epidermal cell에 각각 PEG transformation 과 particle bombardment를 통한 transformation 후 GFP의 transient expression을 보았다 (Figure 23). Tobacco의 protoplast에서 *Bsi* 의 subcellular localization을 형광 현미경을 통하여 본 결과, 형광은 핵에서 여러개의 반점으로 나타나고 있으며(Figure 23. A, B), 이러한 결과는 유채의 epidermal cell에서 confocal microscopy 결과 (Figure 23 C)와도 일치하고 있다.

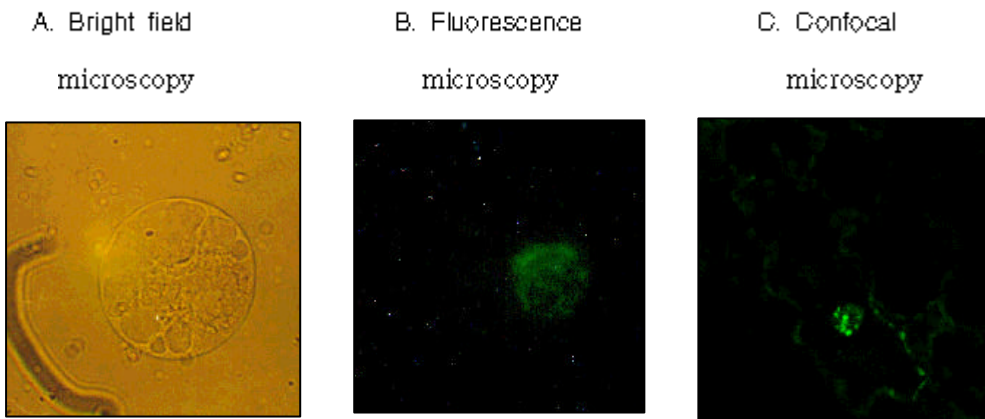


Figure 23. Subcellular localization of Bsl protein.

이러한 결과를 통하여 *Bsl* 유전자가 핵에서 기능하며, northern blot analysis 시 이 유전자의 발현이 NaCl 처리 후 빠른 시간 (30분) 내에 일어난다는 점과, 염기서열에서 membrane spanning sequence가 나타난다는 것을 고려할 때 핵에서 signal transduction에 관여할 것이라 추론할 수 있었다.

다. *tsfp*

담배에서 NaCl에 의해 mRNA 발현이 증가 되는 유전자인 *Tsfp1*을 담배 cDNA library에서 분리 하였다 (Figure 24). cDNA 단편의 염기 서열을 분석한 결과 758bp (GenBank accession number AF118128) 였으며, 17 kDa 의 분자량을 가진 단백질 (158 amino acids)을 암호화 하고 있는 것으로 추정되어 졌다 (Figure 25). Database search 결과 이 유전자는 *Arabidopsis thaliana*의

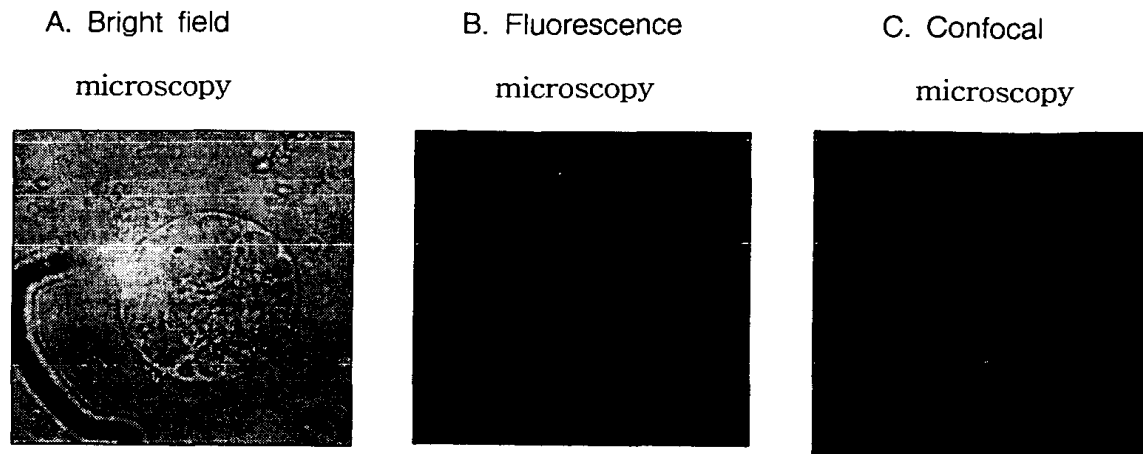


Figure 23. Subcellular localization of Bsi protein.

이러한 결과를 통하여 *Bsi* 유전자가 핵에서 기능하며, northern blot analysis 시 이 유전자의 발현이 NaCl 처리 후 빠른 시간 (30분) 내에 일어난다는 점과, 염기서열에서 membrane spanning sequence가 나타난다는 것을 고려할 때 핵에서 signal transduction에 관여할 것이라 추론할 수 있었다.

다. *tsip*

담배에서 NaCl에 의해 mRNA 발현이 증가 되는 유전자인 *Tsip1*을 담배 cDNA library에서 분리 하였다 (Figure 24). cDNA 단편의 염기 서열을 분석한 결과 758bp (GenBank accession number AF118129) 였으며, 17 kDa 의 분자량을 가진 단백질 (158 amino acids)을 암호화 하고 있는 것으로 추정되어 졌다 (Figure 25). Database search 결과 이 유전자는 *Arabidopsis thaliana*의

unknown protein (GeneBank accession number AC006585)를 제외하고는 기존에 알려진 단백질과 아미노산 서열 상의 유사성이 나타나지 않았다.

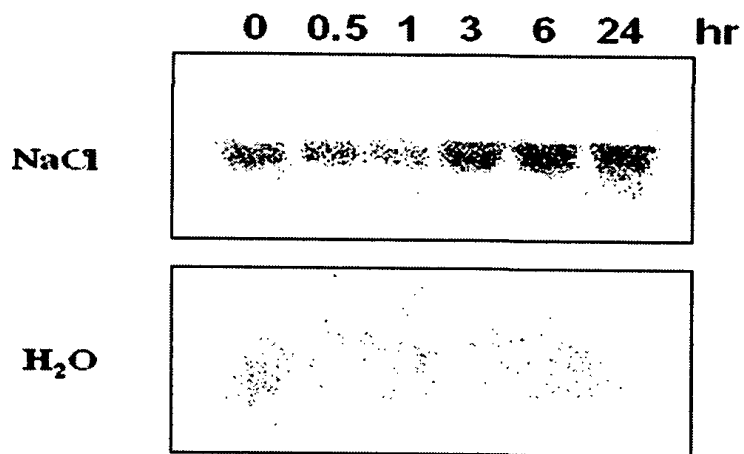


Figure 24. Induction of the *Tsip1* gene expression by treatment with NaCl. Each lane was loaded with 20 g of total RNA from detached tobacco leaves that had been treated either with 200 mM NaCl (NaCl) or distilled water (H₂O) for the designated time periods.

GGCAGGAGACTATTTACGCCACAGAAAAACGGCAAACCTACACCTTGT	50
TTAGTATTAGAACAACAACATAAAAGGATGCATTTTTGTACAAGAAATTGA	100
ACAGGAAAAAGAAGGGGAAAAAATGGCAAGTAGCAGTACTGTACATGTT	150
M A S S S T C T C	9
CTTGTAGACCATAATTACTGCAAAATCTAATATTATTAATCGATTTGTA	200
S C R P I I T A K S N I I N R F V	26
ACACCAAGAGGAATACAATTGATTTTCCATGGAAACCCTAGATTAAGCA	250
T P R G I Q L I F H G N P R L K Q	43
AGTACCGAGAATTTTTGCTGTAAGAGCATCAGCAGTTGATAGCTCATCTA	300
V P R I F A V R A S A V D S S S	60
GCTTTGTTGAACGCATGGAAAAAGCCTGGTTGATTCCAAGCAACCCAGG	350
S F V E R M E K A W L I S K Q P R	77
CCAATGTATGCTCTACTTGTGGTTCAAATGGCCATGTGGAATGCAAGTG	400
P I V C S T C G S N G H V E C K W	94
GTGCAGTGGCACTGGTTTCTTTGTACTTGGTGACAATATGCTCTGTCAAG	450
C S G T G F F V L G D N M L C Q	111
TGCCATCTCGAAACACAAGCTGTGTCATCTGCGCTGGAAGGGTTCTGTA	500
V P S R N T S C V I C A G K G S V	128
TGCTGCACTGATTGTAAGGAACAGGCCATCGTGGGAAGTGGTTGGGAGA	550
C C T D C K G T G H R A K W L G E	145
GCCTCCTCTTCCAATCCTCCTATTGCCAAGGAGTAACCTTTCAACTCAT	600
P P L P N P P I A K E *	156
TGCTTGAATTGTTAATCAATGTTTAGAATGCTACTGGATGTAGCTTATTA	650
CTTGAATCAATATGAATAGGCAAAATGTCCACGTAGCCACTTAAACTTG	700
TGCTGAATTTTTATCCTGGTAAATAAACTTGCATTTTTTCTAAAAA	750
AAAAAAA	758

Figure 25. Nucleotide and predicted amino acid sequences of tobacco *Tsipl* cDNA clone (GenBank accession number AF118129).

salt stress에 의해 유기되는 식물체 내 변화는 ABA와 같은 식물 호르몬을 통해 이루어 지는 것으로 알려져 있다. 또한, salt stress를 포함한 abiotic stress에 대한 식물 반응은 biotic stress에 대한 반응과 서로 겹쳐 있는 부분이 있음이 보고 되어 있다. 따라서 *Tsip1*이 ABA를 포함한 식물 호르몬과 biotic stress반응에 관련된 signaling molecule인 salicylic acid에 어떠한 발현 양상을 나타내는가 보기 위하여 Northern blot analysis를 수행하였다. 결과로서, *Tsip1*는 ABA dependent pathway를 통해 salt에 유기되는 유전자이며, salicylic acid에 의해서도 발현이 증가 되어, abiotic stress 뿐만 아니라 biotic stress에도 관련되어 있음을 추정케 하고 있다. 더구나 *Tsip*유전자가 GA 그리고 ethephone에 의해서 RNA 축적이 이루어 진다는 것은 이 유전자가 식물 내에서 다양한 호르몬 조절을 받고 있어 salt에 대한 반응을 포함 하는 식물 생리에 중요한 역할을 할 것임을 보여 주고 있다 (Figure 3).

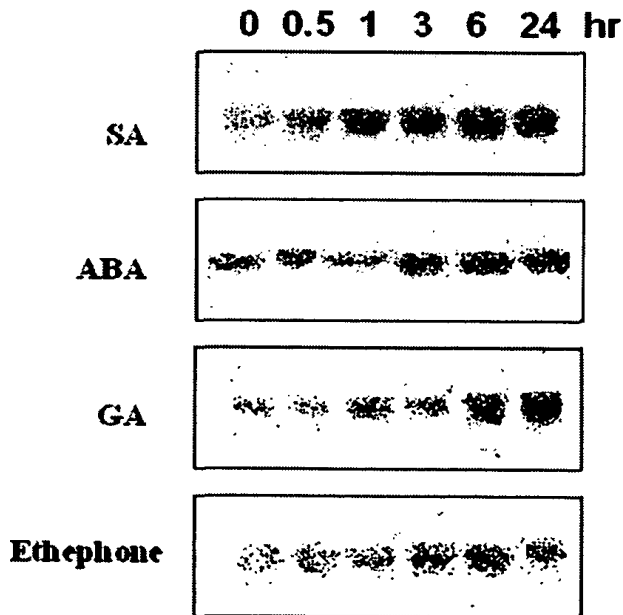


Figure 26. Induction of the *Tsip1* gene expression by treatment with salicylic acid, gibberellic acid, and ethephone. Each lane was loaded with 20 g of total RNA from detached tobacco leaves that had been treated either with 1 mM ethephone (Ethphone), 100 M abscisic acid (ABA), 100 M gibberellic acid (GA), or 1 mM salicylic acid (SA) for the designated time periods.

식물 기관에 따른 *Tsfp1*의 발현 양상을 보기 위하여 꽃, 잎, 줄기, 뿌리에 서 RNA를 뽑아 northern blot analysis를 수행하였다 (Figure 27). 꽃, 잎, 줄기에서는 뿌리 보다 더 높은 기저 발현 수준에서의 *Tsfp1* 발현 양상을 나타 내고 있다. *tsfp1* 유전자의 genomic organization을 보기 위하여 Southern blot analysis를 수행한 결과 담배 유전체 내에는 적어도 두 개 이상의 *Tsfp* 유전자가 있음을 알 수 있었다 (Figure 5).

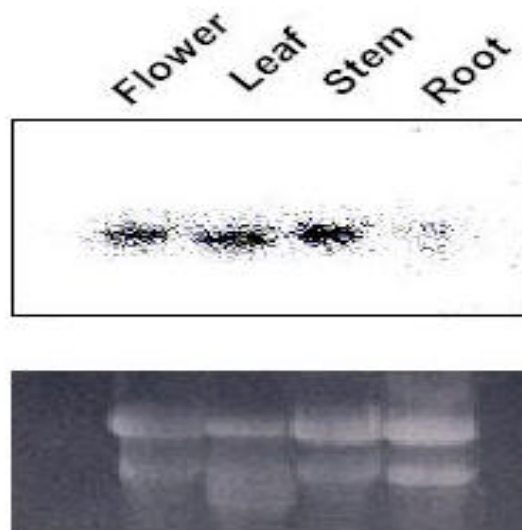


Figure 27. Tissue specific expression of the *Tsfp1* gene. Each lane was loaded with 20 g of total RNA prepared from flowers (F), roots (R), leaves (L), and stems (St). Equal amounts of RNA were loaded, as determined by ethidium bromide staining (bottom).

식물 기관에 따른 *Ts1p1*의 발현 양상을 보기 위하여 꽃, 잎, 줄기, 뿌리에 서 RNA를 뽑아 northern blot analysis를 수행하였다 (Figure 27). 꽃, 잎, 줄기에서는 뿌리 보다 더 높은 기저 발현 수준에서의 *Ts1p1* 발현 양상을 나타 내고 있다. *ts1p1* 유전자의 genomic organization을 보기 위하여 Southern blot analysis를 수행한 결과 담배 유전체 내에는 적어도 두 개 이상의 *Tsip* 유전자가 있음을 알 수 있었다 (Figure 5).

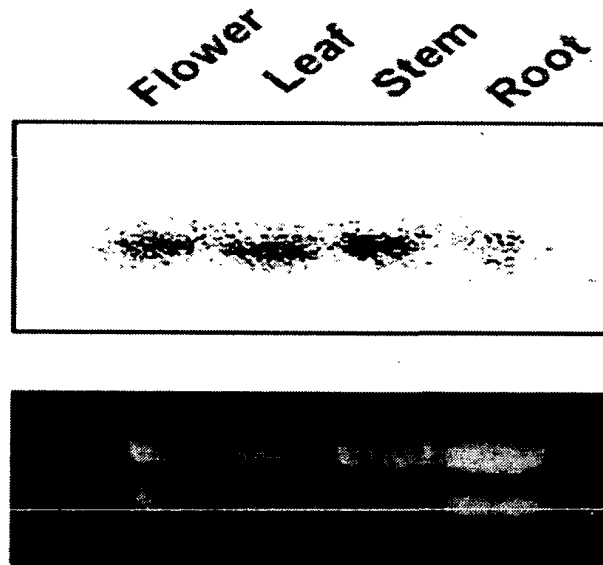


Figure 27. Tissue specific expression of the *Ts1p1* gene. Each lane was loaded with 20 g of total RNA prepared from flowers (F), roots (R), leaves (L), and stems (St). Equal amounts of RNA were loaded, as determined by ethidium bromide staining (bottom).

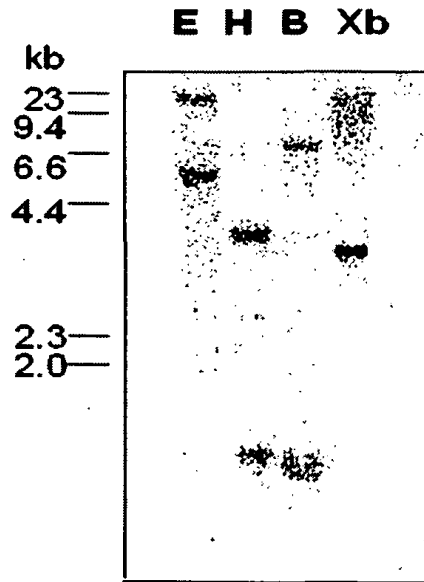


Figure 28. Genomic DNA gel blot analysis. Tobacco genomic DNA was digested with *EcoRI* (E), *HindIII* (H), *BamHI* (B) and *XbaI* (Xb), and separated in a 0.8% agarose gel. After transfer to Hybond-N+ membrane, the blot was hybridized with ^{32}P -labeled probe specific for the *Ts1p1* ORF under medium stringency. Autoradiogram was visualized with Fuji-BAS 2500 phosphorimage analyzer. DNA size standards are shown at left.

라. Bwd 유전자의 분리 및 특성 조사.

Protein-protein interaction을 하는 WD domain을 갖고 있는 유채 유전자

를 cDNA library에서 분리하였다. *Bud* (Brassica napus HD domain) 라고 명명된 이 cDNA clone (1.8kb)의 염기 서열 결정 결과, 이 cDNA clone은 5'-fragment가 없는 partial sequence임을 알 수 있었다. RT-PCR을 통한 full-sequence 분리를 시도한 결과, 이 유전자의 homologs를 4개 이상 찾을 수 있었으며, 이는 유체의 genomic Southern blot analysis와도 일치하였다 (Figure 29). RT-PCR로 찾은 유전자중 한 개의 전체 염기 서열 결정 결과 이 유전자는 다른 알려진 HD domain을 갖는 유전자와 HD domain 내에서 아미노산 서열의 homology를 나타내고 있으나 (Figure 30), 그 외 C terminal fragment에서는 큰 아미노산 서열의 유사성을 발견할 수 없었다. northern blot analysis를 통해 이 유전자는 200 mM NaCl과 100 mM의 ABA에 의해 발현이 증가함을 알 수 있었다. (Figure 31)

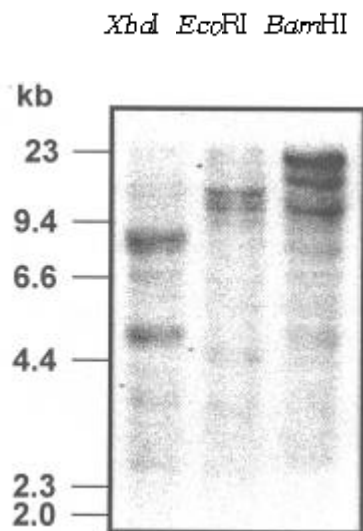


Figure 29. Southern blot analysis of *Bud* gene. 20ug의 유체 genomic DNA를 사용, ³²P-random labeled probe도 detection 하였다.

를 cDNA library에서 분리하였다. *Bwd* (*Brassica napus* WD domain) 라고 명명된 이 cDNA clone (1.8kb)의 염기 서열 결정 결과, 이 cDNA clone은 5'-fragment가 없는 partial sequence임을 알 수 있었다. RT-PCR을 통한 full-sequence 분리를 시도한 결과, 이 유전자의 homologue를 4개 이상 찾을 수 있었으며, 이는 유체의 genomic Southern blot analysis와도 일치하였다 (Figure 29). RT-PCR로 찾은 유전자중 한 개의 전체 염기 서열 결정 결과 이 유전자는 다른 알려진 WD domain을 갖는 유전자와 WD domain 내에서 아미노산 서열의 homology를 나타내고 있으나 (Figure 30), 그 외 C termial fragment에서는 큰 아미노산 서열의 유사성을 발견할 수 없었다. northern blot analysis를 통해 이 유전자는 200 mM NaCl과 100 mM의 ABA에 의해 발현이 증가함을 알 수 있었다. (Figure 31)

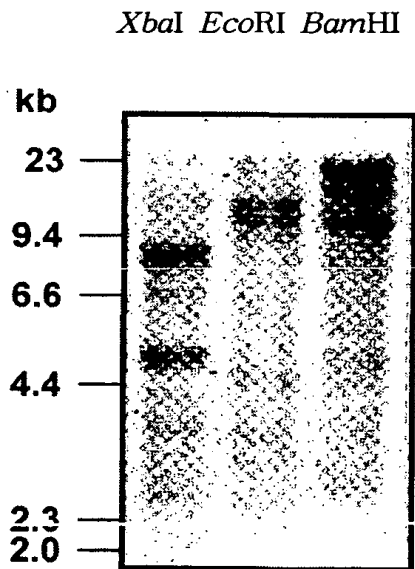


Figure 29. Southern blot analysis of *Bwd* gene. 20ug의 유체 genomic DNA를 사용, ³²P-random labeled probe로 detection 하였다.

BWD1NDGIMASCGTEKLRWVPSGSKIMLRGHIDNRMLLDSTG	47
YPR4_CAEEL	NLGGDSIYSLATTPNLSMLGCTENDRLHDPRTNENMLRGHIDNRALWNEDG	232
PRL1	MLQHLGWRSVAFDPSNEWFCISADRTIIVWATGMALTLTCHIQMCLAVSNRH	230
PRL2	MLQHLGWRSVAFDPSNEWFCISADRTIIVWATGMALTLTCHIQMCLAVSNRH	224
BWD1	RFCLSGSDSMRLWLCQQRLHYWHITDVMWACTPSFTHASGGRDQLMILLA	107
YPR4_CAEEL	TRALSACSDATRLWELCQRCIATCAEECAWLDQSSFTTWSAGDMWVPLY	20
PRL1	TYMFSACDQKCVLEFNKMRSYHGLSGVCLAHPTLDMLTGRESV.....	20
PRL2	TYMFSACDQKCVLEFNKMRSYHGLHGVCLAHPTLDMLTGRESV	27

Figure 30. Bwd 유전자의 deduced amino acids 서열 (BWD1)과 이와 아미노산 서열에서 유사성을 보이는 유전자와의 비교.

YPR4_CAEEL : *Caenorhabditis elegans* β -transducin like protein (gene bank accession number, Q20059). PRL1 : *Arabidopsis thaliana* PRL1 (gene bank accession number, CAA72073). PRL2 : *Arabidopsis thaliana* PRL2 (gene bank accession number, CAA3B1B0).

BWD1	MDYGMASGGTEKLRVWEPSSGSKMLRPHIDNRVLLDSTG	..47
YPR4_CAEEL		NI CENSI YSLATTPNLSLMLGCTEKI RLPDRINENMLRPHIDNRVWVNDG	232
PRL1		VIQQHLQWRSVAFDPSNEVFCISAKTI NIWDATQALNLTGHI EQARCLASNRH	210
PRL2		VIQQHLQWRSVAFDPSNEVFCISAKTI NIWDATQALNLTGHI EQARCLASNRH	224

BWD1		RFCLSCSSEEMRLVELGQFCLHYAWHIDSWWLACTPSFHASGQDQSLITLA	107
YPR4_CAEEL		TRALSAGSDATRLAVI GQDQI ATCI AEEGAVLQADSSFTIVS/GDMMWNPY	220
PRL1		TYMSACDQKAVLELQKVRSHCHLGGVCLAVPTLDALTGQESV	203
PRL2		TYMSACDQKAVLELQKVRSHCHLGGVCLAVPTLDALTGQESV	271

Figure 30. Bwd 유전자의 deduced amino acids 서열 (BWD1)과 이와 아미노산 서열에서 유사성을 보이는 유전자와의 비교.

YPR4_CAEEL : *Caenorhabditis elegans* β -transducin like protein (gene bank accession number, Q20059). PRL1 : *Arabidopsis thaliana* PRL1 (gene bank accession number, CAA72073). PRL2 : *Arabidopsis thaliana* PRL2 (gene bank accession number, CAA39190).

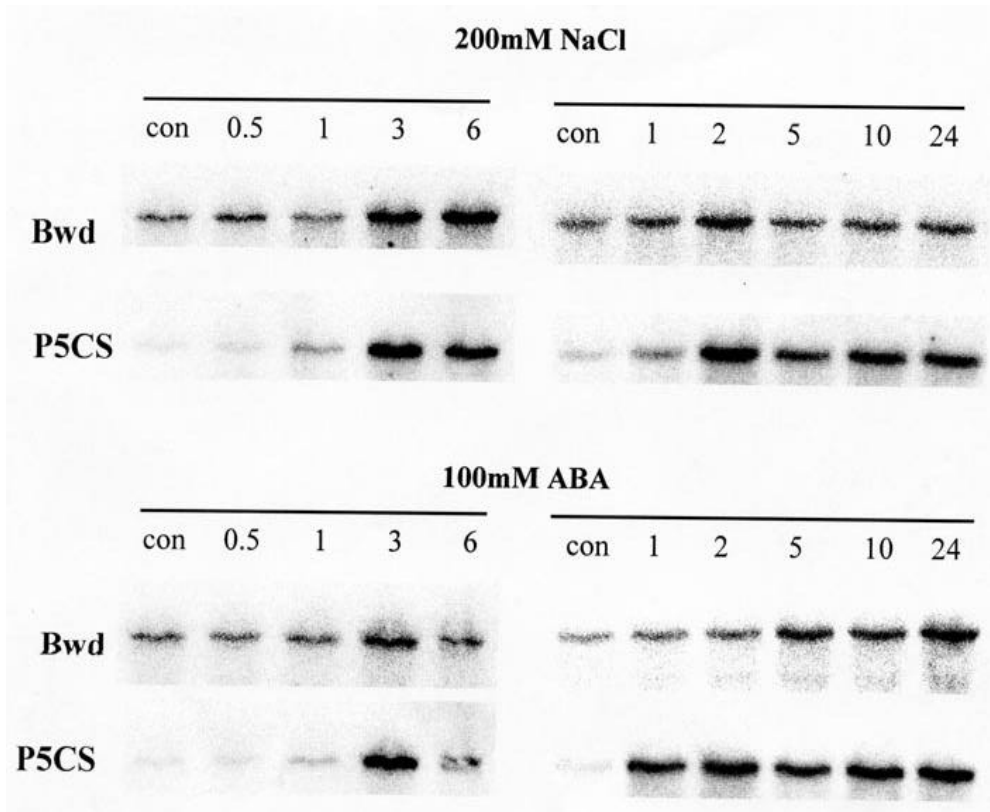


Figure 31. Northern blot analysis of *BwdI*. 각 lane은 유체의 total RNA 20 μ g을 사용하였으며, 다른 알려진 염 유기 유전자와의 발현 시기 비교를 위해 osmolyte인 proline을 합성하는 유체 유전자, P5CS를 probe도 하여 동일 blot에 붙였다.

염기 서열 결정 결과 *BwdI*는 5개의 HD domain repeats를 갖고 있는 것으로 보여졌다. HD-repeats를 갖는 단백질들은 많은 경우 다양한 종류의 생체 조절 기작에 관여하고 있는 것으로 보고 되어 왔다. HD-repeats는 신호 전달계를 구성하는 β -transducin, cell cycle regulation에 관여하는 CDC20와 CDC4, transcriptional repression 역할을 하는 yeast의 TUP1등에서 발견되며, 그 외에도 vesicular trafficking, RNA processing 과정에도 관여하는 것

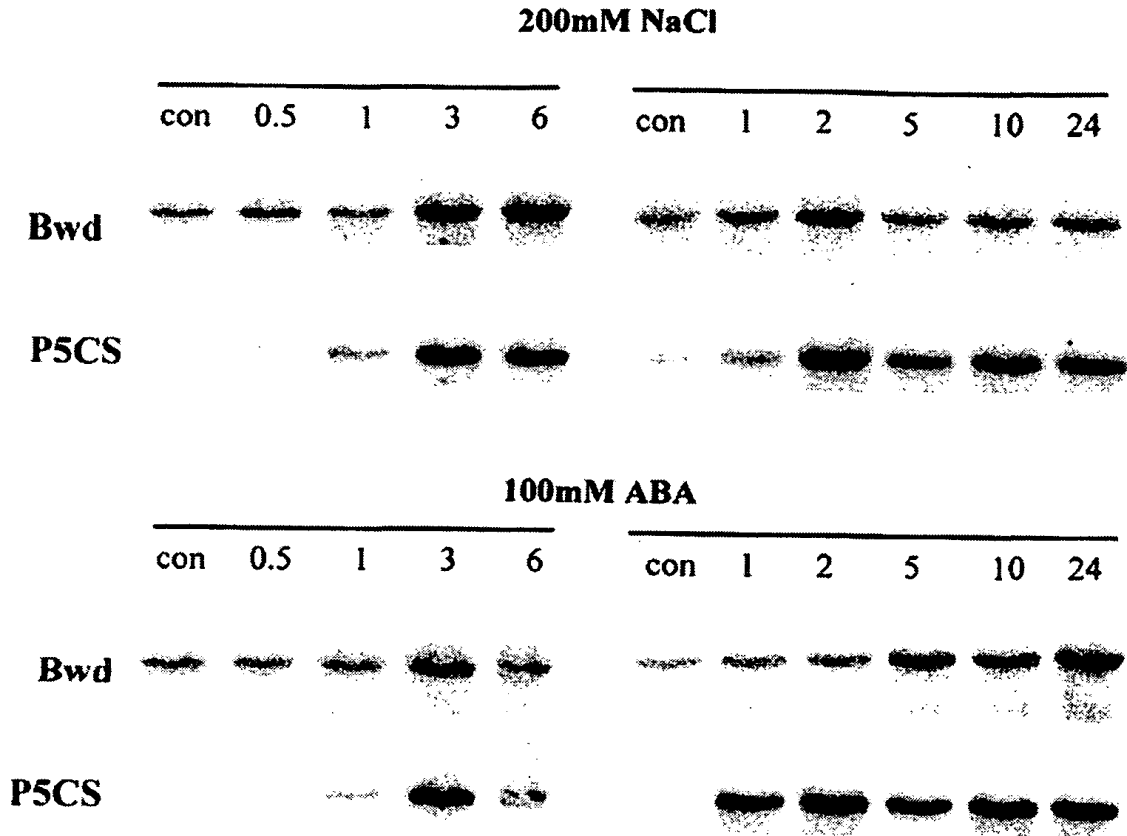


Figure 31. Northern blot analysis of *Bwd1*. 각 lane은 유체의 total RNA 20 μ g을 사용하였으며, 다른 알려진 염 유기 유전자와의 발현 시기 비교를 위해 osmolyte인 proline을 합성하는 유체 유전자, P5CS를 probe로 하여 동일 blot에 붙였다.

염기 서열 결정 결과 *Bwd1*는 5개의 WD domain repeats를 갖고 있는 것으로 보여졌다. WD-repeats를 갖는 단백질들은 많은 경우 다양한 종류의 생체 조절 기작에 관여하고 있는 것으로 보고 되어 왔다. WD-repeats는 신호 전달계를 구성하는 β -transducin, cell cycle regulation에 관여하는 CDC20와 CDC4, transcriptional repression 역할을 하는 yeast의 TUP1등에서 발견되며, 그 외에도 vesicular trafficking, RNA processing 과정에도 관여하는 것

으로 알려져 있다. 식물에서 발견된 WD protein으로 잘 알려져 있는 단백질로 COPI를 들 수 있다. COPI 단백질은 3개의 WD domain을 갖고 있으며, protein complex의 일부로 작용하여 photomorphogenesis의 negative regulator로서 역할 한다. 이 단백질에서 WD-repeats는 필수적인 것으로, COPI-protein complex에서 일어나는 단백질과 단백질 간의 상호작용은 WD-repeats를 통해 일어날 것으로 생각되고 있다.

Northern blot analysis를 통해 본 결과, P5CS유전자의 경우 salt 처리 시 2시간 후, ABA 처리 시 1시간후 발현이 급격히 증가하고 있다. 하지만 *Bwd1*의 경우 스트레스가 없는 조건에서도 basal expression level이 나타나고 있으며 이 후 발현량이 점차 증가하는 양상을 보인다. 이는 *Bwd1*이 염 스트레스의 반응 과정에 관여, 염 스트레스의 신호 전달에 관련된 다른 protein들과 상호작용을 할 것이라 해석될 수 있을 것이다. 또한 *Bwd1*에 상호 작용하는 단백질을 screening 할 경우 염 스트레스 신호 전달에 관련된 다른 주요 단백질 인자를 밝혀낼 수 있으리라 생각된다.

Bwd1 Southern blot analysis결과 이 유전자의 경우 genome내 여러 copy로 존재함을 알 수 있었다. RT-PCR 결과, 이들 유전자는 몇 개의 아미노산 차이를 보일 뿐이었다. 하지만 단백질과 단백질 간의 상호 작용에서 이러한 차이는 결코 무시할 수 없으므로, 다시 arabidopsis의 homologue를 분리하였다. arabidopsis의 database search 결과 이 유전자에 대한 arabidopsis homologue는 한 개 만이 존재하며, 이는 Southern blot analysis에서도 확인되었다 (Figure 32). 따라서, 우리는 RT-PCR을 통해 untranslated region을 포함한 2.5kb의 clone얻었으며, 이를 *Atwd*로 명명하였다. 이 후 염기 서열을 결정한 결과 *Atwd*유전자는 *Bwd*유전자와 약 95%의 염기서열 동일성을 나타냄을 알 수 있었다.

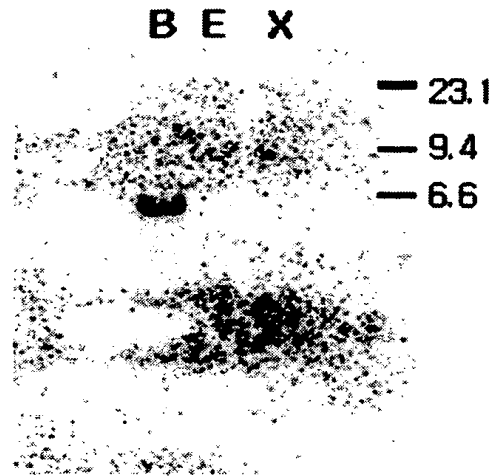


Figure 32. 각 lane은 10 μ g의 arabidopsis genomic DNA를 사용, *Bwd* 유전자
 대한 32 P-random labeled probe를 detection에 사용하였다. B : *Bam*HI, E :
*Eco*RI, X : *Xba*I.

제 3 절 형질 전환 모델 식물체에서의 열 스트레스 유기 유전자 특성 연구

1. *Ts11*

식물체내에서의 *Ts11* 유전자의 기능을 연구하기 위해 식물 발현 벡터에 *Ts11* 유전자를 sense와 antisense 방향으로 construction 한 후 이를 담배식물체에 도입하여 sense (20개체), antisense (15 개체)의 T0 line을 NPTII primer를 이용한 PCR을 통해 확인하였다. (Figure. 33)

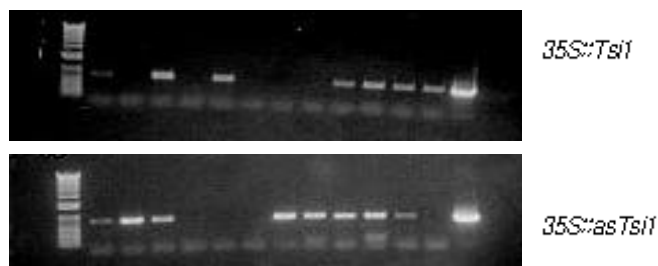


Figure 33. Genetic screening of transformants by PCR. Ethidium bromide-stained gel of PCR reactions from genomic DNA of putative transgenic transformants. Lane 1: size marker, lane 2-13: PCR reactions from putative transgenic plants, lane 14: positive control plant.

제 3 절 형질 전환 모델 식물체에서의 열 스트레스 유기 유전자 특성 연구

1. *Tsi1*

식물체내에서의 *Tsi1* 유전자의 기능을 연구하기 위해 식물 발현 벡터에 *Tsi1* 유전자를 sense와 antisense 방향으로 construction 한 후 이를 담배식물체에 도입하여 sense (20개체), antisense (15 개체)의 To line을 NPTII primer를 이용한 PCR을 통해 확인하였다. (Figure. 33)

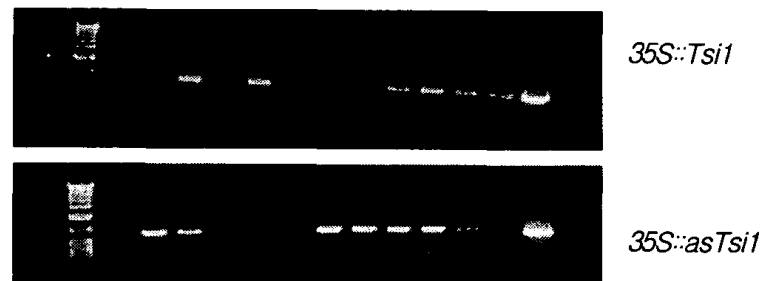


Figure 33. Genetic screening of transformants by PCR. Ethidium bromide-stained gel of PCR reactions from genomic DNA of putative transgenic transformants. Lane 1: size marker, lane 2-13: PCR reactions from putative transgenic plants, lane 14: positive control plant.

PCR을 통해 검정된 *Tsil* transgenic plant는 도입된 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 RNA gel blot analysis를 통해 *tsil* RNA 발현양을 조사하였다 (Figure 34).

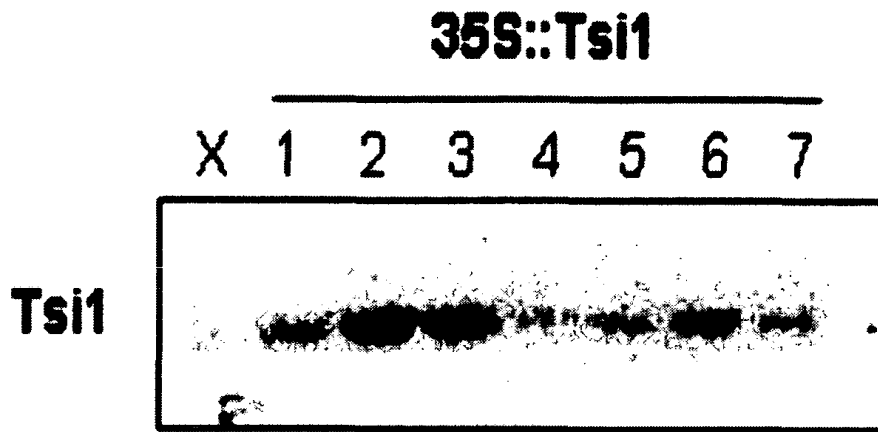


Figure 34. Expression analysis of the *Tsil* gene in transgenic plants. RNA gel blotting was conducted to measure the amount of *Tsil* mRNA in nontransgenic and transgenic tobacco plants carrying the 35S::*Tsil*. DNA fragments for the *Tsil* cDNA was used as a probe.

RNA gel blot analysis를 통해 도입된 유전자의 발현이 확인된 형질전환 식물체를 대상으로 염 스트레스에 대한 저항성을 조사하였다. 실험 결과 *tsil*을 과다 발현시킨 식물체의 경우 염 스트레스에 의한 저항성이 증가되어 있음을 볼 수 있었다 (Figure 35).

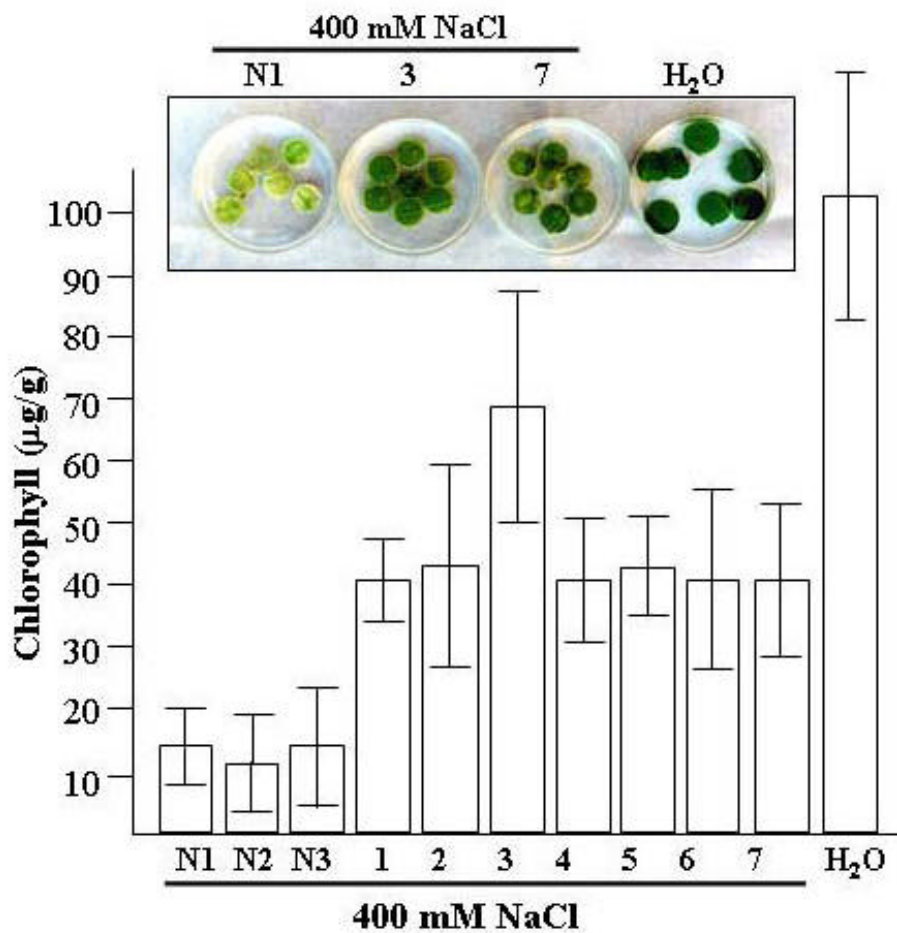


Figure 35. Retardation of salt-induced senescence in transgenic tobacco plants. Leaf discs from the wild-type and transgenic plants carrying the *Tsf1* gene in sense (*Tsf1*) or antisense (*Tsf1-Ae*) orientation were floated in 400 mM NaCl solution for 72 hr under continuous white light at 25°C, and visualized. As a control, the wild-type leaf discs were floated in water.

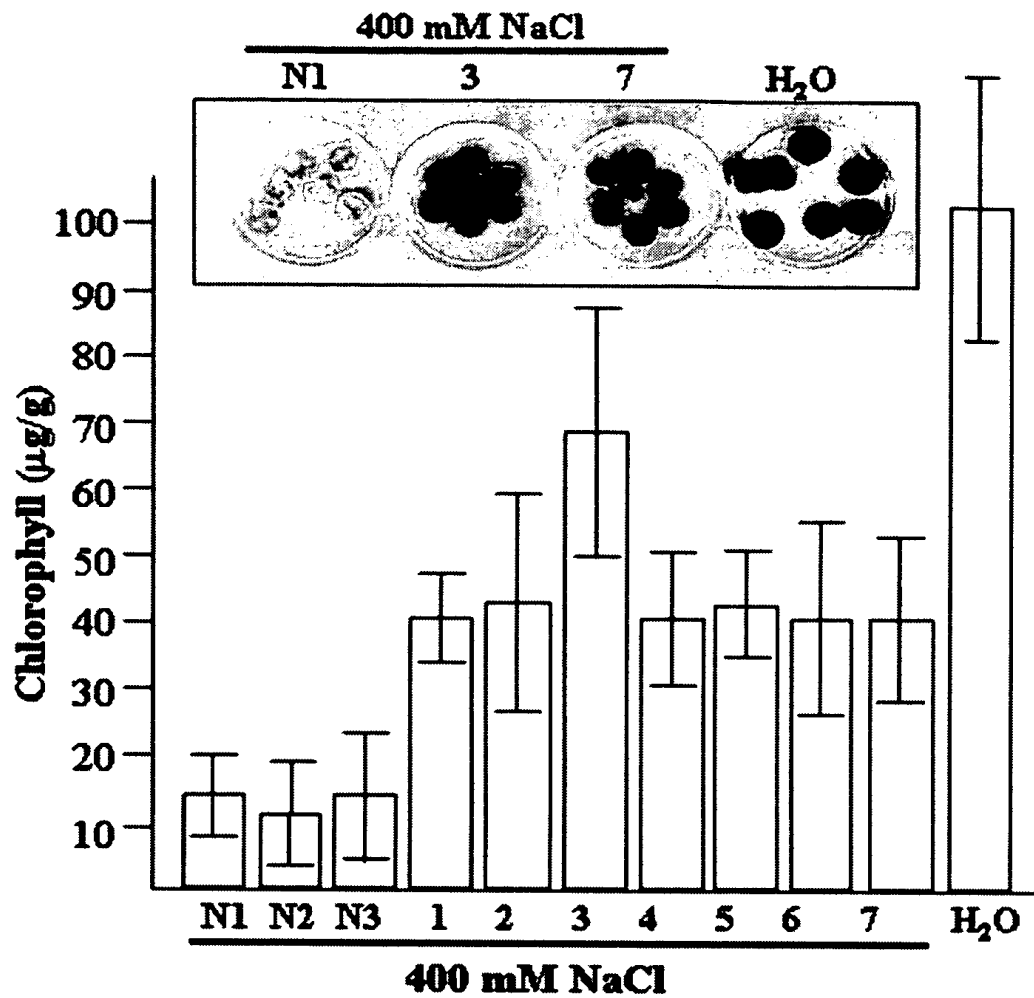


Figure 35. Retardation of salt-induced senescence in transgenic tobacco plants. Leaf discs from the wild-type and transgenic plants carrying the *Tsi1* gene in sense (*Tsi1*) or antisense (*Tsi-As*) orientation were floated in 400 mM NaCl solution for 72 hr under continuous white light at 25C, and visualized. As a control, the wild-type leaf discs were floated in water.

2. *Tsfp*

식물 발현 벡터 구축 - *tsfp1*을 과다 발현시킬 수 있는 담배 형질 전환 식물체를 만들기 위해 식물 발현 벡터인 pMBP2에 Cauliflower mosaic virus 35S promoter에 *Tsfp1* 유전자를 붙여 넣어 주었다 (Figure 36).

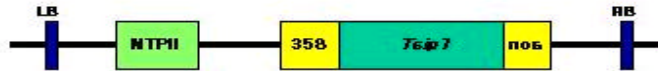


Figure 36. The *Tsfp1* overexpression cassette inserted in pMBP2 vector

담배의 *Tsfp1* 유전자 형질 전환 - 위와 같이 구축된 *Tsfp1* 식물 벡터를 *Agrobacterium*에 넣은 후 leaf disc 법으로 담배에 도입하였다. kanamycin selection media에서 우선적으로 선별된 개체의 T1 세대를 NPTII primer를 이용한 PCR를 통해 재차 선별하는 과정을 거쳐 *Tsfp1*을 과다 발현하는 형질 전환 담배를 만들었다 (Figure 37).

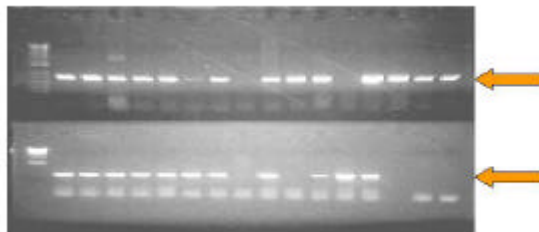


Figure 37. Genetic screening of transformants by PCR: Ethidium bromide-stained gel of PCR reactions from genomic DNA of putative transgenic transformants.

2. *Tsip*

식물 발현 벡터 구축 - *tsip1*을 과다 발현시킬 수 있는 담배 형질 전환 식물체를 만들기 위해 식물 발현 벡터인 pMBP2에 Cauliflower mosaic virus 35S promoter에 *Tsip1* 유전자를 붙여 넣어 주었다 (Figure 36).



Figure 36. The *Tsip1* overexpression cassette inserted in pMBP2 vector

담배의 *Tsip1* 유전자 형질 전환 - 위와 같이 구축된 *Tsip1* 식물 벡터를 *Agrobacterium*에 넣은 후 leaf disc 법으로 담배에 도입하였다. kanamycin selection media에서 우선적으로 선별된 개체의 T1 세대를 NPTII primer를 이용한 PCR를 통해 재차 선별하는 과정을 거쳐 *Tsip1*을 과다 발현하는 형질 전환 담배를 만들었다 (Figure 37).

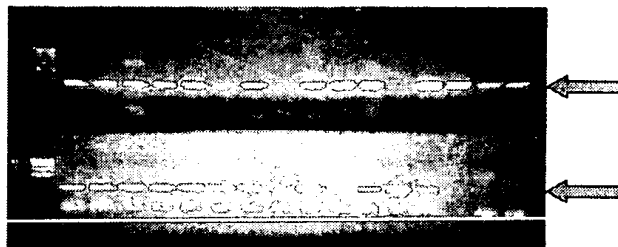


Figure 37. Genetic screening of transformants by PCR: Ethidium bromide-stained gel of PCR reactions from genomic DNA of putative transgenic transformants.

Tsfp1 유전자가 과다 발현되고 있는 형질 전환 담배에서 실제 salt stress 저항성을 나타내는가 알아 보기 위해 salt와 마찬가지로 식물에 water stress를 일으키는 고농도 mannitol을 처리하여 생장을 조사하였다. 5x mannitol을 포함한 MS배지에 담배를 발아 시킨 결과, *Tsfp1*가 과다 발현되고 있는 식물체의 경우 대조구에 비해 매우 높은 성장률을 보였다. 이러한 결과는 *Tsfp1* 유전자가 식물에서 salt stress에 대한 저항성을 부여할 수 있음을 나타내고 있다 (Figure 38).

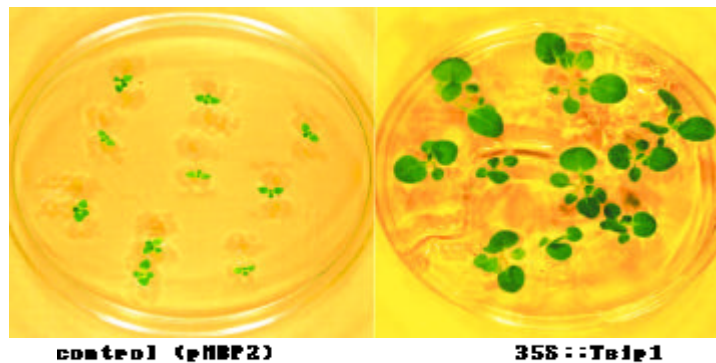


Figure 38. 확보된 유전자인 *tsfp*를 over-expression 시킨 담배에서 5x mannitol이 들어간 MS 배지 위에서 수분 스트레스 저항성 검정.

3. *Atwd*

분리된 *Atwd* 유전자의 기능을 연구하기 위하여 CaMV 35S promoter위의 *BamHI* 자리에 이 유전자를 sense, antisense orientation으로 붙인 식물 형질 전환 벡터를 제작하고, dipping 방법을 통해 *arabidopsis*를 형질 전환하였다. (Figure 39)



Figure 39. Construction of *Atwd* sense/ antisense plant expression vector

Tsip1 유전자가 과다 발현되고 있는 형질 전환 담배에서 실제 salt stress 저항성을 나타내는가 알아 보기 위해 salt와 마찬가지로 식물에 water stress를 일으키는 고농도 mannitol을 처리하여 생장을 조사하였다. 6% mannitol를 포함한 MS배지에 담배를 발아 시킨 결과, *Tsip1*가 과다 발현되고 있는 식물체의 경우 대조구에 비해 매우 높은 성장률을 보였다. 이러한 결과는 *Tsip1* 유전자가 식물에서 salt stress에 대한 저항성을 부여할 수 있음을 나타내고 있다 (Figure 38).

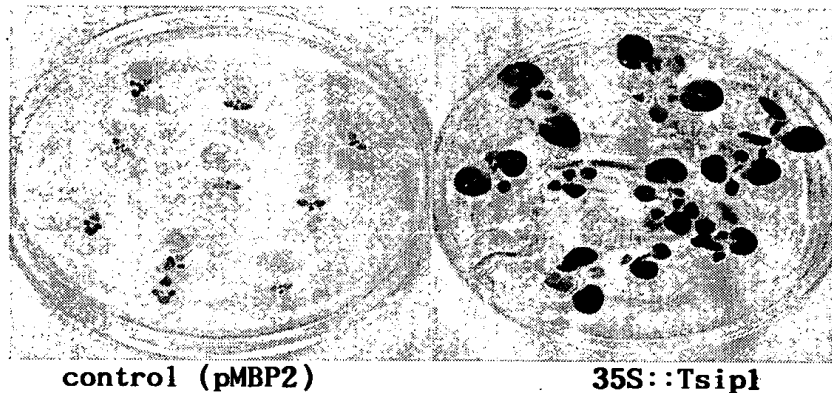


Figure 38. 확보된 유전자인 *tsip*를 over-expression 시킨 담배에서 6% mannitol이 들어간 MS 배지 위에서 수분 스트레스 저항성 검정.

3. *Atwd*

분리된 *AtWD* 유전자의 기능을 연구하기 위하여 CaMV 35S promoter 뒤의 *Bam*HI 자리에 이 유전자를 sense, antisense orientation으로 붙인 식물 형질 전환 벡터를 제작하고, dipping 방법을 통해 arabidopsis를 형질 전환하였다. (Figure 39)

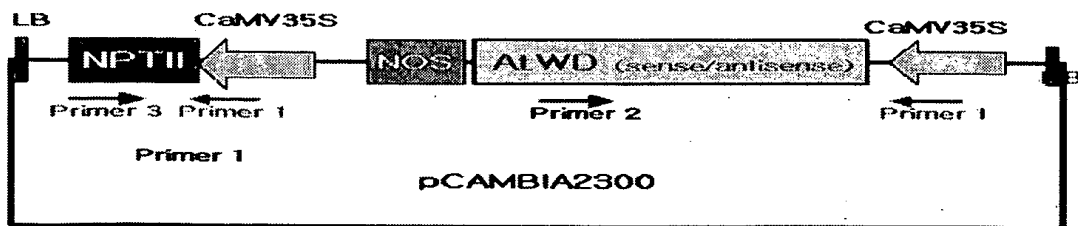


Figure 39. Construction of *Atwd* sense/ antisense plant expression vector

결과로서, kanamycin selection을 통해 AtHD이 sense orientation으로 들어 있는 27개의 transgenic T1 line 을 얻었으며 이를 PCR도 확인하였다. 사용된 PCR primer는 두 쌍을 사용(Figure 5, primer 1과 primer 2, 그리고 primer 1과 primer 3), 교차 확인이 되도록 하였다 (Figure 40, data는 은 27개 형질 전환 T1 line 중 3개만을 무작위 선택하여 보인것). 이 후 PCR확인이 된 27 line중 8개를 골라 Southern blot analysis를 통해 transgene 여부를 확인하였다 (Figure41).

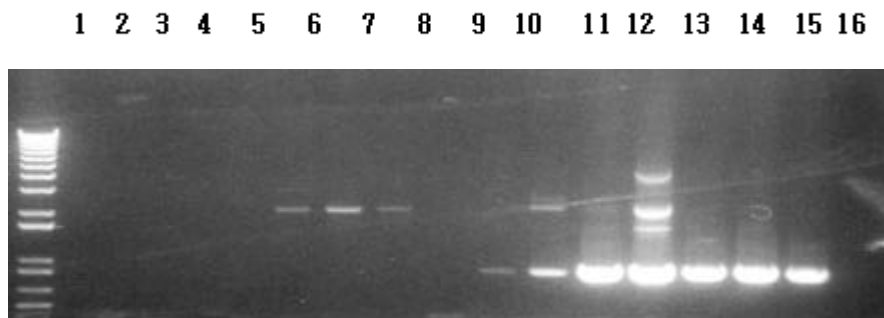


Figure 40. 형질전환 식물의 PCR 확인

1-8 : primer 1과 primer 2 사용하여 PCR.

1-4 : vector control (AtHD가 없는 벡터만 형질전환한 식물체)

5-7 : AtHD가 sense 방향으로 들어간 형질 전환체

8 : wild type arabidopsis

9-16 : primer 1과 primer 3 사용하여 PCR.

9-12 : vector control (AtHD가 없는 벡터만 형질전환한 식물체)

13-15 : AtHD가 sense 방향으로 들어간 형질 전환체

16 : wild type arabidopsis

size marker : 1kb ladder

결과로서, kanamycin selection을 통해 AtWD이 sense orientation으로 들어가 있는 27개의 transgenic T1 line 을 얻었으며 이를 PCR로 확인하였다. 사용된 PCR primer는 두 쌍을 사용(Figure 5, primer 1과 primer 2, 그리고 primer 1과 primer 3), 교차 확인이 되도록 하였다 (Figure 40, data는 은 27개 형질 전환 T1 line 중 3개만을 무작위 선택하여 보인것). 이 후 PCR확인이 된 27 line중 8개를 골라 Southern blot analysis를 통해 transgene 여부를 확인하였다 (Figure41).

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16

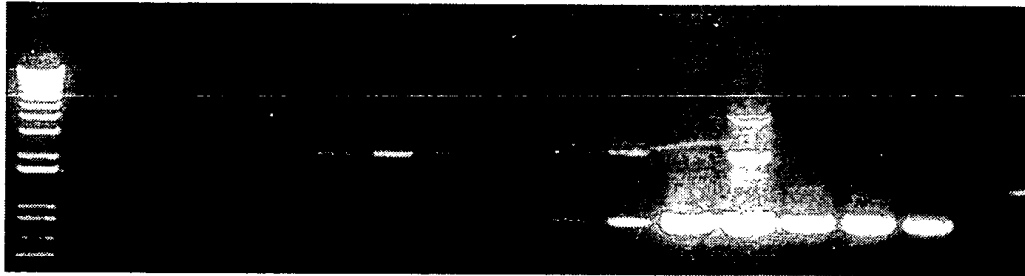


Figure 40. 형질전환 식물의 PCR 확인

1-8 : primer 1과 primer 2 사용하여 PCR.

1-4 : vector control (AtWD가 없는 벡터만 형질전환한 식물체)

5-7 : AtWD가 sense 방향으로 들어간 형질 전환체

8 : wild type arabidopsis

9-16 : primer 1과 primer 3 사용하여 PCR.

9-12 : vector control (AtWD가 없는 벡터만 형질전환한 식물체)

13-15 : AtWD가 sense 방향으로 들어간 형질 전환체

16 : wild type arabidopsis

size marker : 1kb ladder

Col-o 1 2 3 4 5 6 7 8

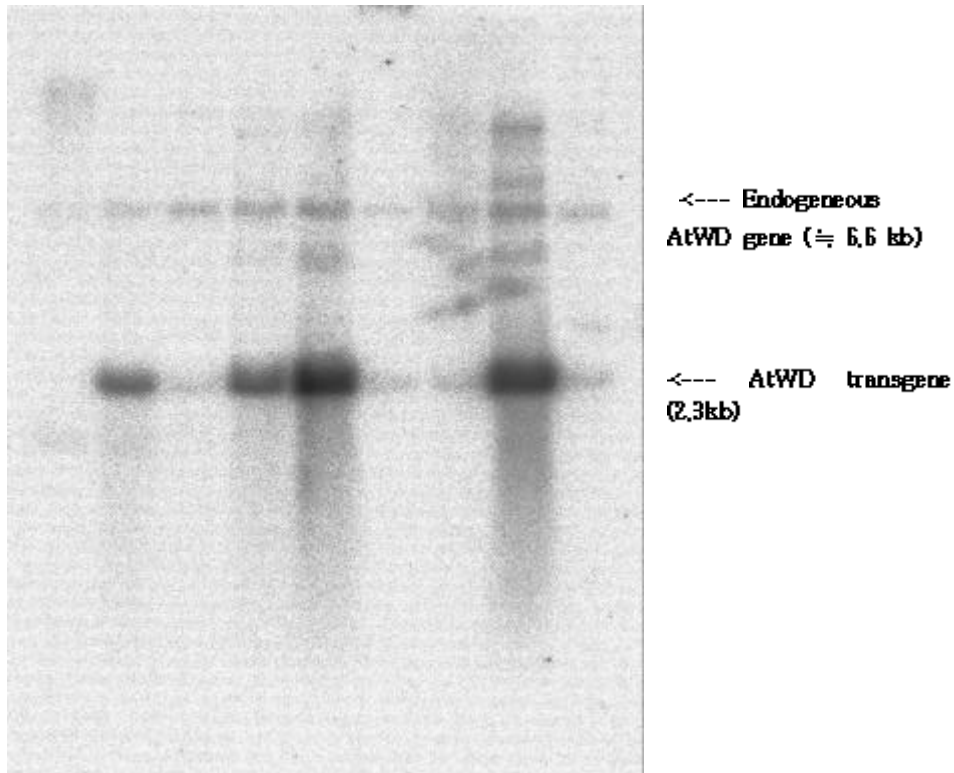


Figure 41. 형질 전환체 확인을 위한 Southern blot analysis 제한된 시도의 양으로도 인하여 각 lane에 사용된 DNA는 $1\mu\text{g}$ - $3\mu\text{g}$ 을 사용, 제한효소는 *Bam*HI를 사용하여 vector 내 들어 있는 transgene이 detection되도록 하였다. AtWD cDNA를 ^{32}P -PCR labeled probe도 사용.

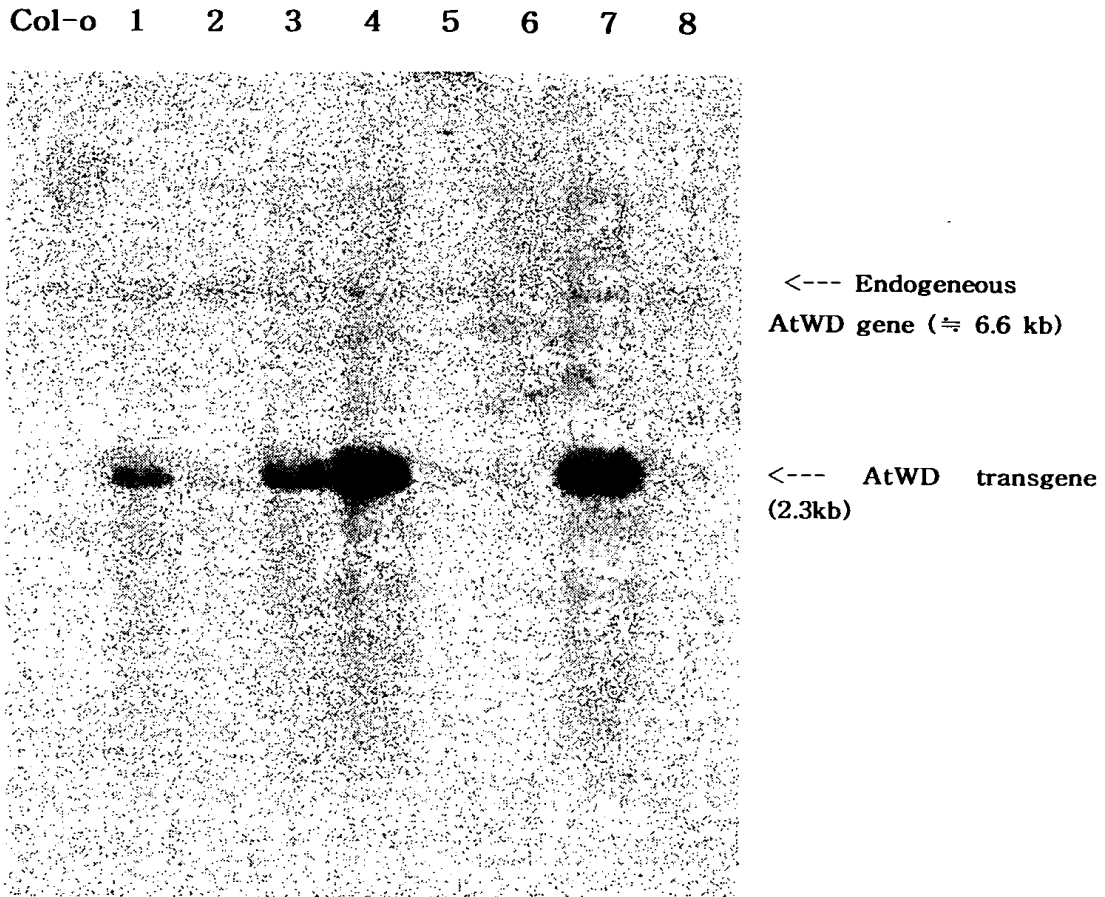


Figure 41. 형질 전환체 확인을 위한 Southern blot analysis 제한된 시료의 양으로 인하여 각 lane에 사용된 DNA는 $1\mu\text{g}$ - $3\mu\text{g}$ 을 사용, 제한효소는 *Bam*HI을 사용하여 vector 내 들어 있는 transgene이 detection되도록 하였다. AtWD cDNA를 ^{32}P -PCR labeled probe로 사용.

PCR에 의해 유전자 도입이 확인된 개체에 대하여 도입된 유전자의 발현이 제대로 일어나는지 확인하기 위해서 northern blot analysis를 실시하였다. (Figure 42)

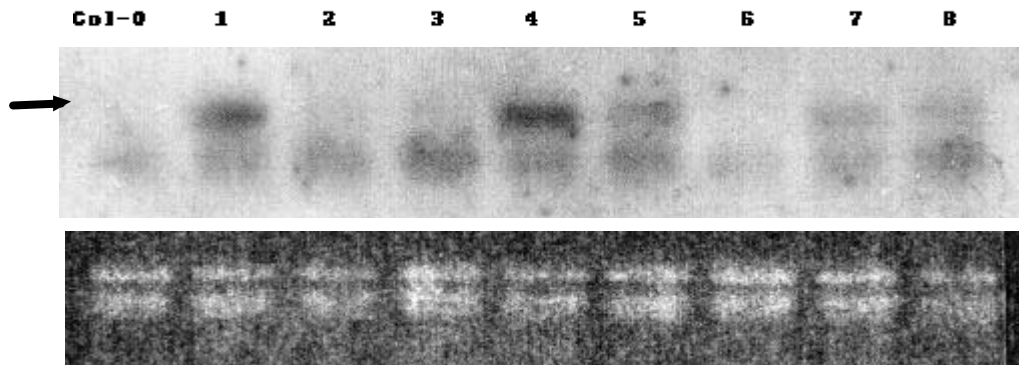


Figure 42. AtHD유전자의 형질 전환체 유전자 발현 확인.

col-0 : wild-type arabidopsis plant, 1-8 : AtHD transgenic lines.

각 lane은 8 μ g의 leaf total RNA 사용하였으며, AtHD에 대한 PCR biotin-labeled probe사용.

결과로서, 양적 차이는 있으나 8개 line 모두 transgene을 발현하고 있으며, wild type plant의 경우 본 조건에서 유전자 발현이 나타나지 않았다. 형질 전환체 중 1 과 4번 lane의 transgenic line의 경우 강한 유전자 발현이 나타남을 확인할 수 있었다.

arabidopsis 식물체에서 *Atb6* 유전자의 constitutive expression에 의해 염 스트레스에 대한 저항성이 증가되는지 알기 위하여 400mM NaCl이 포함된 MS 액체 배지에서 *atd* sense/antisense transgenic arabidopsis plants (T2)를 무작위로 선택하여 salt-induced senescence retardation을 조사하였다. 실험 결과 일부 line에서 염 스트레스 저항성이 약하게 증가됨을 볼 수 있었다.

PCR에 의해 유전자 도입이 확인된 개체에 대하여 도입된 유전자의 발현이 제대로 일어나는지 확인하기 위해서 northern blot analysis를 실시하였다. (Figure 42)

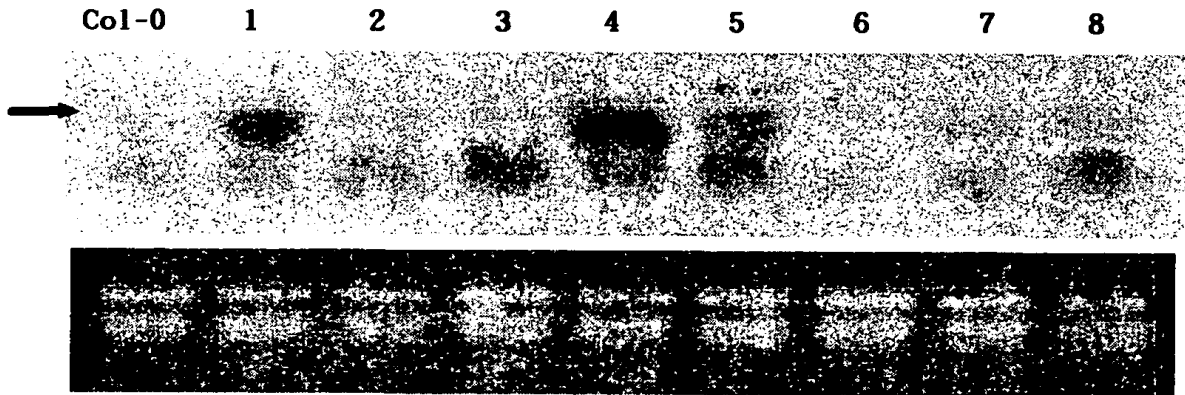


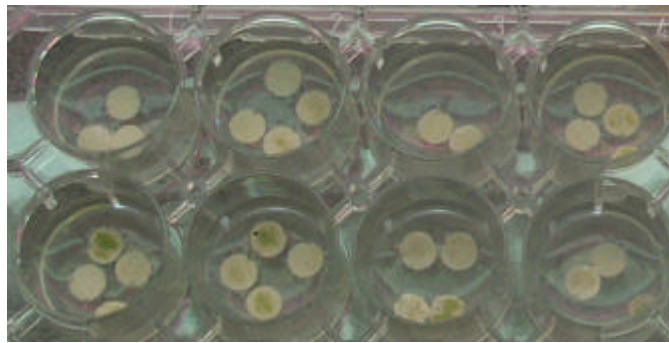
Figure 42. AtWD유전자의 형질 전환체 유전자 발현 확인.

col-o : wild-type arabidopsis plant, 1-8 : AtWD transgenic lines.

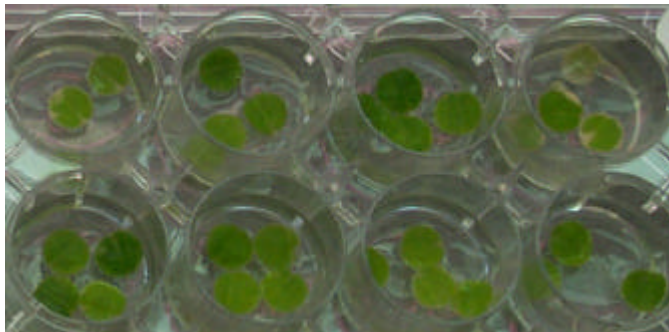
각 lane은 8 μ g의 leaf total RNA 사용하였으며, AtWD에 대한 PCR biotin-labeled probe사용.

결과로서, 양적 차이는 있으나 8개 line 모두 transgene을 발현하고 있었으며, wild type plant의 경우 본 조건에서 유전자 발현이 나타나지 않았다. 형질 전환체 중 1 과 4번 lane의 transgenic line의 경우 강한 유전자 발현이 나타남을 확인할 수 있었다.

arabidopsis 식물체에서 *Atbw* 유전자의 constitutive expression에 의해 염 스트레스에 대한 저항성이 증가되는지 알기 위하여 400mM NaCl이 포함된 MS 액체 배지에서 atwd sense/antisense transgenic arabidopsis plants (T2)를 무작위로 선택하여 salt-induced senescence retardation을 조사하였다. 실험 결과 일부 line에서 염 스트레스 저항성이 약하게 증가됨을 볼 수 있었다.



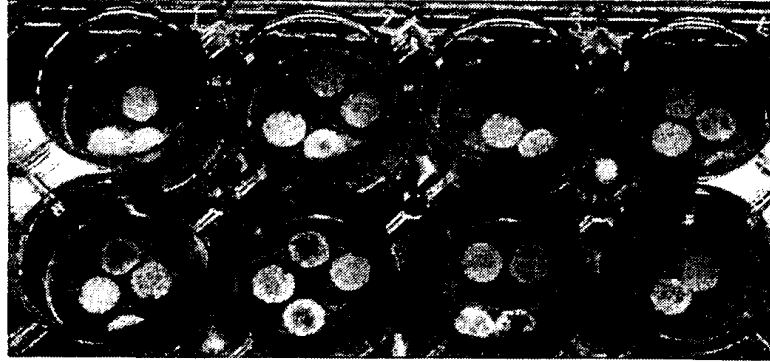
MS media
+ 400mM NaCl



MS media

Col0 wild type plant	atwd - sense transgenic plant line 1	atwd - sense transgenic plant line 2	atwd - sense transgenic plant line 3
atwd - sense transgenic plant line 4	atwd - sense transgenic plant line 5	atwd - sense transgenic plant line 6	atwd - Antisense transgenic plant line

Figure 43. Retardation of salt-induced senescence in transgenic Arabidopsis plants



MS media
+ 400mM NaCl



MS media

Col0 wild type plant	atwd - sense transgenic plant line 1	atwd - sense transgenic plant line 2	atwd - sense transgenic plant line 3
atwd - sense transgenic plant line 4	atwd - sense transgenic plant line 5	atwd - sense transgenic plant line 6	atwd - Antisense transgenic plant line

Figure 43. Retardation of salt-induced senescence in transgenic Arabidopsis plants

제 5 절 염 저항성 유전자의 유용작물 형질전환

1. 서설

형질 전환 모델 식물을 대상으로 실시한 염 저항성 실험 결과를 바탕으로, 염 유기 유전자 중 염 스트레스에 대한 저항성을 크게 증가 시켰던 *tsil* 와 *tsip* 유전자를 유용 작물인 상치에 도입하였으며, 도입된 유전자를 genomic DNA gel blot analysis를 통해 확인하였다. 또한 도입된 유전자의 발현 여부를 검정하기 위해 RNA gel blot analysis로 확인하였다. 실험 결과 *tsil*과 *tsip* 두 염 저항성 유전자가 constitutive expression 되고 있는 형질 전환 상추를 얻었다. 형질 전환으로 통해 얻은 transgenic plant line 의 수는 *tsi* 의 경우 10개 line으로 이중 5개 line을 genomic DNA blot analysis로 확인 하였으며 각 line에 들어간 *tsil* 유전자의 copy 수는 1 - 2개로 추정되었다. 이 중 2개 line의 형질 전환 상추에서 *tsil*의 RNA transcript의 발현량이 크게 나타나고 있음을 RNA gel blot analysis를 통해 확인하였다. *tsip*의 경우 11 개 형질 전환 line을 얻었으며, 이 중 6개 line을 골라 genomic DNA blot analysis를 통해 transgene 유무를 확인한 결과 4개 line에서 *tsip* 유전자가 확인되었다. RNA gel blot analysis 결과 실험에 사용된 6개 line 중 2개 line에서 transcripts가 강하게 발현되고 있음을 확인하였다. 현재는 두 종류의 형질 전환 상추의 T1 seeds를 채종 중이다.

2. *tsf1*

kanamycin 과 PCR을 통해 selection한 10 개의 *tsf1* 상주 형질 전환 line 중 5개 line을 무작위도 몰라 genomic gel blot analysis를 수행하였다 (Figure 44).

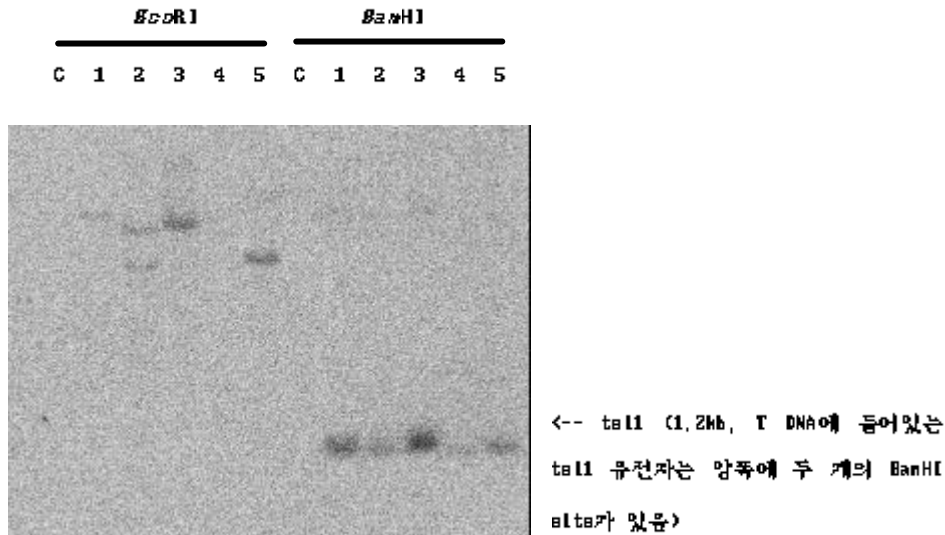


Figure 44. Genomic DNA blot analysis of *tsf1* transgenic lettuce plants. 상주는 시중에서 구입한 '청치마 상주'(서울 종묘)를 사용하였다. 각 lane은 10ug genomic DNA를 *Eco*RI과 *Bam*HI로도 잘라 전기 영동한 것임.

실험 결과, 선택된 모든 line에서 도입된 유전자가 확인되었다. 도입된 유전자가 제대로 형질 전환 상주에서 발현되는가를 확인하기 위하여 genomic DNA gel blot analysis를 수행한 동일한 식물체에서 *tsf1* transcripts의 발현량을 RNA gel blot analysis를 통해 분석하였다 (Figure 45).

2. *Ts1l*

kanamycin 과 PCR을 통해 selection한 10 개의 *ts1l* 상추 형질 전환 line 중 5개 line을 무작위로 골라 genomic gel blot analysis를 수행하였다 (Figure 44).

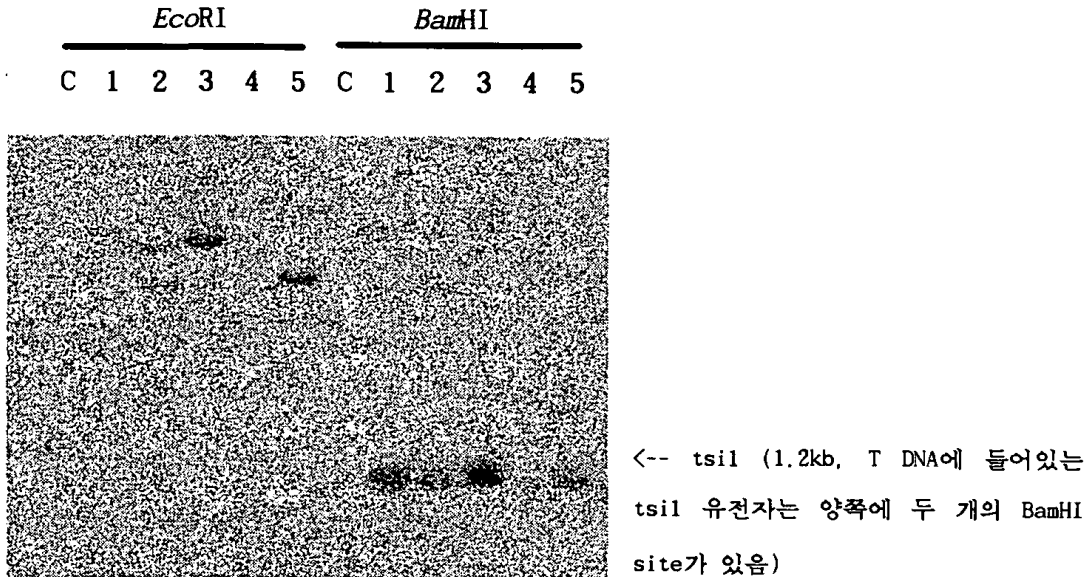


Figure 44. Genomic DNA blot analysis of *ts1l* transgenic lettuce plants. 상추는 시중에서 구입한 '청치마 상추' (서울 종묘)를 사용하였다. 각 lane은 10ug genomic DNA를 *EcoRI*과 *BamHI*으로 잘라 전기 영동한 것임.

실험 결과, 선택된 모든 line에서 도입된 유전자가 확인되었다. 도입된 유전자가 제대로 형질 전환 상추에서 발현되는가를 확인하기 위하여 genomic DNA gel blot analysis를 수행한 동일한 식물체에서 *ts1l* transcripts의 발현량을 RNA gel blot analysis를 통해 분석하였다 (Figure 45).

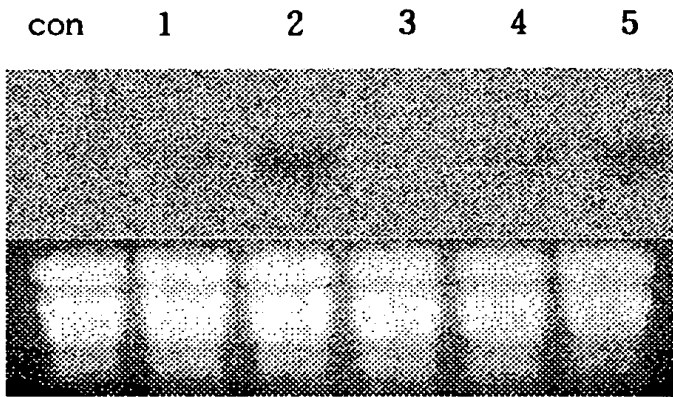


Figure 45. RNA gel blot analysis of *tsil* transgenic lettuce plants. 각 lane은 20ug의 RNA를 사용하였다. 상단의 숫자는 각각의 independent transgenic line을 표시한다.

실험 결과 5개의 transgenic line 중 4개의 line에서 *tsil* 유전자가 발현되고 있음을 확인할 수 있었으며, 이 중 2번과 5번 line에서 특히 강하게 *tsil* 유전자가 발현되고 있었다.

2. *TsfP*

kanamycin 과 PCR을 통해 selection한 11 개의 line 중 6개 line을 무작위
도 골라 genomic gel blot analysis를 수행하였다 (Figure 46).

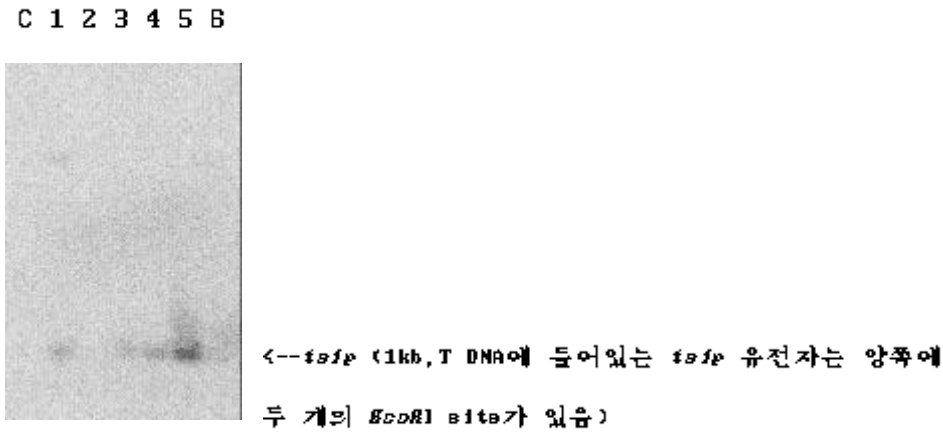


Figure 46. Southern blot analysis of genomic DNA from *tsfP* transgenic lettuce plants. Genomic DNA (10 μ g per lane) was digested with *EcoRI*, fractionated on a 1% agarose gel and transferred to a nylon membrane. The filter was hybridized with α -[³²P] labeled fragment of *TsfP* coding region.

실험결과 6개의 line 중 1, 3, 4, 5 line에서 도입된 유전자가 검출되었
다. 도입된 유전자가 제대로 형질 전환 상수에서 발현되는가를 확인하기 위하
여 genomic DNA gel blot analysis를 수행한 동일한 식물체에서 *tsfP*
transcripts의 발현량을 RNA gel blot analysis를 통해 분석하였다 (Figure
47).

2. *Tsip*

kanamycin 과 PCR을 통해 selection한 11 개의 line 중 6개 line을 무작위로 골라 genomic gel blot analysis를 수행하였다 (Figure 46).

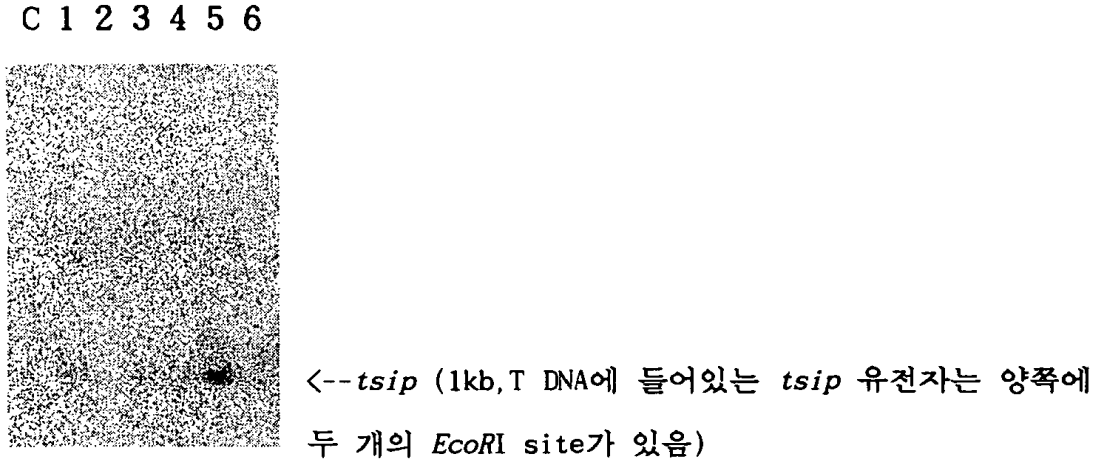


Figure 46. Southern blot analysis of genomic DNA from *tsip* transgenic lettuce plants. Genomic DNA(10 µg per lane) was digested with *EcoRI*, fractionated on a 1% agarose gel and transferred to a nylon membrane. The filter was hybridized with α -[³²P] labeled fragment of *Tsip* coding region.

실험결과 6개의 line 중 1, 3, 4, 5 line에서 도입된 유전자가 검출되었다. 도입된 유전자가 제대로 형질 전환 상추에서 발현되는가를 확인하기 위하여 genomic DNA gel blot analysis를 수행한 동일한 식물체에서 *tsi1* transcripts의 발현량을 RNA gel blot analysis를 통해 분석하였다 (Figure 47).

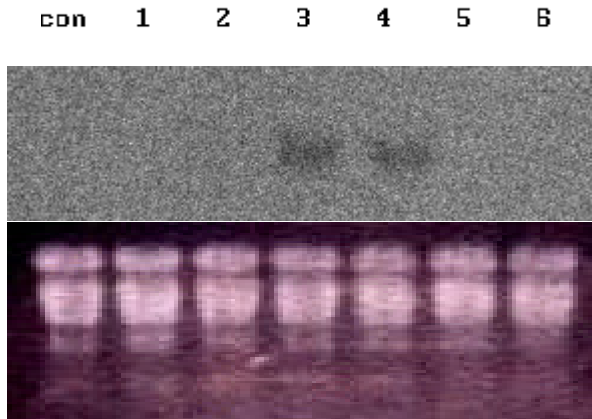


Figure 47. RNA gel blot analysis of *tsf1* transgenic lettuce plants. 각 lane은 20ug의 RNA를 사용하였다. 상단의 숫자는 각각의 independent transgenic line을 표시한다.

실험 결과 6개의 transgenic line 중 3번과 4번 line에서 *tsf1* 유전자가 강하게 발현되고 있음을 확인할 수 있었다.

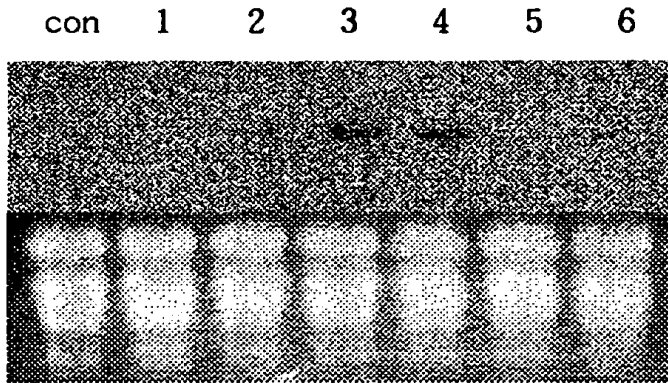


Figure 47. RNA gel blot analysis of *tsil* transgenic lettuce plants. 각 lane은 20ug의 RNA를 사용하였다. 상단의 숫자는 각각의 independent transgenic line을 표시한다.

실험 결과 6개의 transgenic line 중 3번과 4번 line에서 *tsil* 유전자가 강하게 발현되고 있음을 확인할 수 있었다.

제 3 장 건조 스트레스 저항성 유전자 분리 및 저항성 작물의 분자 육종

제 1 절 서설

고등식물은 동물과는 달리 움직일 수 없으므로 다양한 환경 스트레스에 영향을 받아 생화학적, 생리학적 변화를 일으킨다. 수분결핍 스트레스는 이들 환경 스트레스 중에서 가장 일반적인 스트레스 중에 하나로 식물의 성장과 발달과정에 지대한 영향을 미친다. 곡물의 경우, 수분결핍 스트레스는 곡물의 생산성에 가장 영향을 미치는 요인 중에 하나이다. 그리고 cold, salt 및 heat 같은 abiotic stress도 water-deficit stress를 야기 시킨다. 이들 스트레스에 대한 식물의 분자적, 세포적 반응에 대하여 최근에 생화학적으로 광범위하게 분석되었다. 이들 수분결핍 스트레스는 식물세포에 다양한 종류의 proteins과 sugar, proline 및 glycine betaine같은 작은 분자들을 축적시키고 많은 유전자들을 induction 시킨다. 또한 고등식물은 종자 발달과정 동안에도 수분결핍 스트레스를 경험하고 많은 유전자들이 induction 시킨다. 그리고 식물 호르몬인 abscisic acid (ABA)는 종자 발달과정과 환경스트레스에 대한 adaptation에 주요한 역할을 한다. 외부에서 인위적으로 ABA를 식물에 처리하였을 때 수분결핍을 일으키는 스트레스들에 의해 induction 되는 많은 유전자들과 종자 발달과정 동안에 발현되는 많은 유전자들이 induction 된다. 식물에서 이런 스트레스에 의해 induction 되는 유전자들은 중요한 metabolic protein들과 cellular protectant들을 만듦으로써 세포를 보호하는 기능을 하거나, 스트레스 신호전달 체계에 관련된 조절 유전자의 기능을 한다. 전자에

는 다양한 osmoprotectant, late-embryogenesis abundant (LEA) protein, molecular chaperone 및 detoxification enzyme 들이 속하고, 후자에는 transcription factor, protein kinase, protein phosphatase, phosphoinositide 대사에 관련된 enzyme 및 ABA signal transduction에 관련된 protein farnesyl transferase 들이 속한다. 위와 같은 기능을 갖은 유전자들의 분리는 식물이 탈수 스트레스에 반응하는 기작과 저항성을 갖는 기작을 연구하는데 기초가 된다.

제 2 절 유채(*Brassica napus*)에서 subtractive hybridization 법을 이용하여 dehydration 스트레스에 의해 발현되는 유전자의 분리 및 특성규명

1. Subtracted partial cDNA 분리

RWC(relative water content) 100%의 대조구 유채와 30~80%의 다양한 범위의 dehydrated 유채에서 total RNA를 추출한 뒤 Dynal UK사의 paramagnetic oligo dT Dynabeads를 이용하여 total RNA에서 polyadenylated mRNA를 추출하였다. CLONTECH사의 Clontech PCR-select™ cDNA subtraction kit를 이용하여 driver(RWC 100%의 control plant)와 tester (dehydrated plant)의 purified mRNA로부터 1st와 2nd stranded cDNA를 합성하여 만들어진 double stranded driver cDNA와 tester cDNA를 제한효소인 *RsaI*을 이용하여 절단하여 driver cDNA를 완성하고, tester cDNA는 2개의 tube속에서 adaptor 1 또는 adaptor

2R과 각각 ligation 하여 adaptor-ligated tester cDNA를 완성하였다. 각각의 tube에 diluted tester cDNA를 넣고 driver cDNA를 과량 첨가하여 1차 hybridization을 실시한 다음 두 tube를 fresh denatured driver와 섞어 2차 hybridization을 실시하였다. Subtraction을 위해서 두 번의 PCR을 수행하였다. 1차 PCR은 suppression PCR에 의해 stress에 의해 유도된 unhybridized sequence 만을 증폭시키는 과정이며, 2차 PCR은 nested primer를 이용하여 수행하는데 background를 줄이고 스트레스에 의해 유도된 sequence를 많이 만들어지게 한다. 이렇게 하여 얻어진 subtracted cDNA의 PCR product를 T(pCR[™]2.1 vector) vector에 ligation하여 *E. coli* 균주에 transformation하여 100여개의 clone을 확보하였으며 서로 다른 insert가 들어간 것을 구별하기 위해 PCR을 수행하여 insert size가 다른 것들을 먼저 선별하였다 (figure 1).

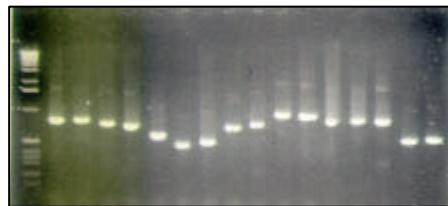


Figure 1. Subtracted partial cDNA clone pattern.

PCR-amplified cDNAs were separated on a 1% agarose gel

2R와 각각 ligation 하여 adaptor-ligated tester cDNA를 완성하였다. 각각의 tube에 diluted tester cDNA를 넣고 driver cDNA를 과량 첨가하여 1차 hybridization을 실시한 다음 두 tube를 fresh denatured driver와 섞어 2차 hybridization을 실시하였다. Subtraction을 위해서 두 번의 PCR을 수행하였다. 1차 PCR은 suppression PCR에 의해 stress에 의해 유도된 unhybridized sequence 만을 증폭시키는 과정이며, 2차 PCR은 nested primer를 이용하여 수행하는데 background를 줄이고 스트레스에 의해 유도된 sequence를 많이 만들어지게 한다. 이렇게 하여 얻어진 subtracted cDNA의 PCR product를 T(pCR™2.1 vector) vector에 ligation하여 *E. coli* 균주에 transformation하여 100여개의 clone을 확보하였으며 서로 다른 insert가 들어간 것을 구별하기 위해 PCR을 수행하여 insert size가 다른 것들을 먼저 선별하였다 (figure 1).



Figure 1. Subtracted partial cDNA clone pattern.

PCR-amplified cDNAs were separated on a 1% agarose gel

2. Dehydration stress에 의해 발현되는 유전자의 확인

먼저 다른 size insert가 들어간 clone을 probe로 하여 Northern hybridization을 수행하였는데 dehydration stress에 의해 발현이 증가하는 13의 클론을 확보하였다(figure 2). Bnrđ2, Bnrđ15, Bnrđ24, Bnrđ102, Bnrđ197 및 Bnrđ209 클론의 경우 transcription 발현이 control에 비해 증가하는 양상을 보이고 있고, Bnrđ6, Bnrđ7, Bnrđ104, Bnrđ110, Bnrđ114 및 Bnrđ116 클론은 non-stress 조건에서는 transcript 가 거의 detect 되지 않고 있으나 dehydration stress 조건에서는 transcript의 발현이 많이 증가하는 양상을 보이고 있다.

3. Dehydration stress-inducible partial cDNA 서열결정 및 그 유사성 조사

Northern hybridization으로 확인된 13개의 clones의 nucleotide sequence 을 1224 primer와 1233 primer를 사용하여 automatic sequencer로 결정하였으며 (figure 3), NCBI BLAST를 이용하여 nucleotide sequence 및 amino acid sequence homology를 비교하였다 (Table 1). Table 1. 에서 보는 것처럼, Bnrđ2, Bnrđ104 및 Bnrđ110은 chitinase와 매우 유사성이 높는데, chitinase 은 일반적으로 pathogen-related protein이지만 극심한 water stress에 의해 transcript가 유도된다는 보고가 있다. Bnrđ6은 nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED)와 유사성이 있는데, 이 NCED는 stress hormone 인 ABA 생합성에 있어서 첫 번째 committed step에 관여하는 효소로서 최근에 옥수수 등 여러 식물에서 클로닝 되었다. Bnrđ7은 delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) 과 유사성이 있는데 P5CS는 식물이 스트레스를 받을 때 축

적되는 proline 생합성에 있어서 rate-limiting step에 관여하는 enzyme으로 γ -glutamyl kinase (γ -GK) and γ -glutamyl phosphate reductase (γ -GPR) 기능을 갖고 있는 bifunctional enzyme이다. Bnr13은 alpha/beta hydrolase superfamily 의 protein (polyneuridine aldehyde esterase, alpha-hydroxynitrile lyase and Pir7b)들과 유사성이 있었고, Bnr24는 serine carbosypeptidase와 유사성이 있었다. Bnr102는 *Brassica napus*의 BnD22와 유사성이 있는데 이는 식물이 water stress를 받을 때 앞에서 축적되는 Kuniz protease inhibitor들과 관련이 있다. Bnr114와 유사성이 있는 nonspecific lipid transfer protein (LTP)는 고등식물에서 많이 축적되는 열기성을 지닌 작은 단백질로 그 기능이 잘 알려지지 않았지만 pathogen defense 기작에 있어서 cutin assembly에 관여할 것으로 추정되는 보고가 있고 최근 몇몇 보고에 의하면 water deficit stress에 의해 몇 종의 LTP transcript가 축적된다는 보고가 있다. Bnr197은 serine/threonine kinase 와 Bnr 209는 β -amylase와 높은 유사성이 있었다. Bnr15와 Bnr116의 경우 지금까지 public database에 그 기능이 추정되는 단백질이 존재하지 않았다.

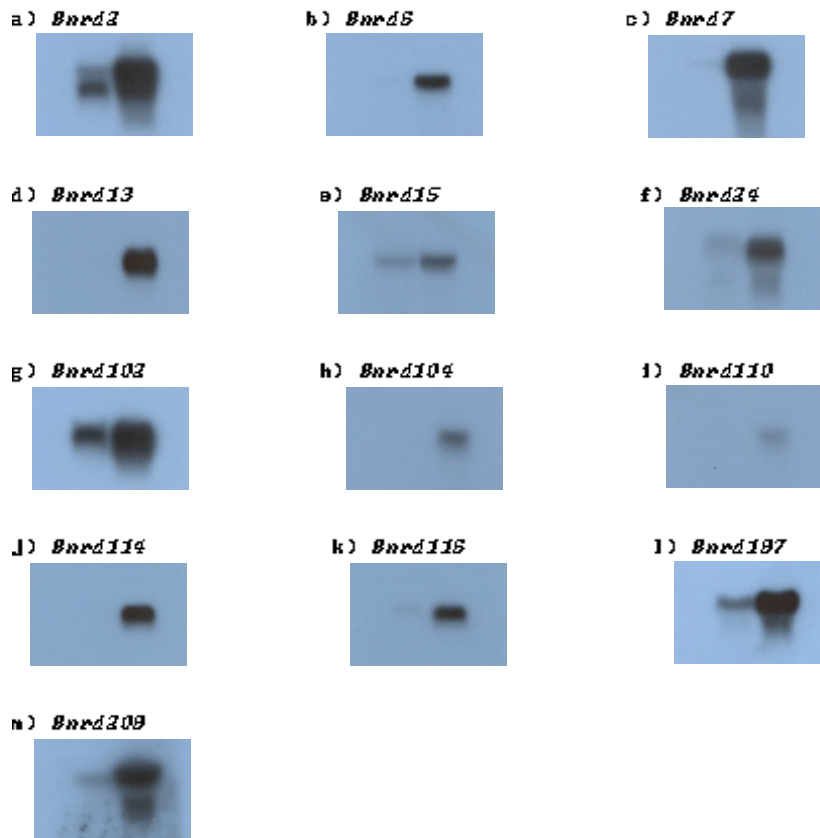


Figure 2. Northern hybridization analysis using each subtracted partial cDNA probe.

Total RNA (20 μ g) were size-separated in a formaldehyde-1% agarose gel, transferred to Hybond-M membranes, and hybridized with each 32 P-labeled cDNA probe. RNAs isolated from control leaves were loaded on the left lane and RNAs from dehydrated leaves were loaded on the right lane.

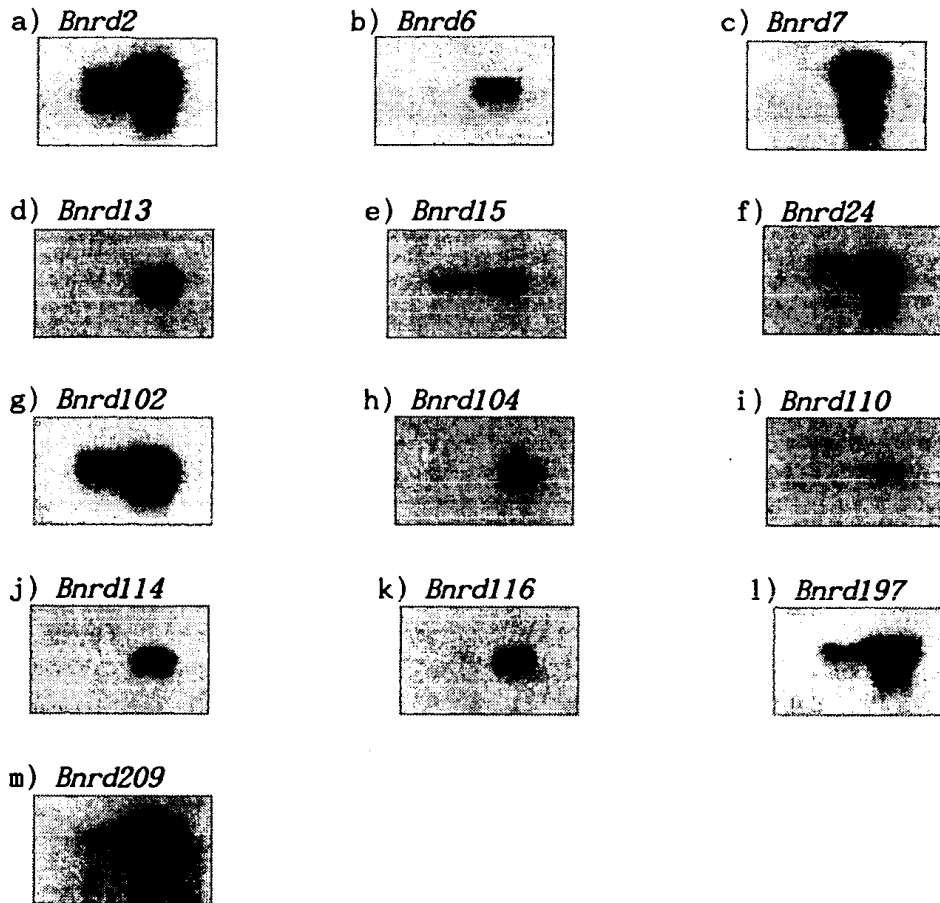


Figure 2. Northern hybridization analysis using each subtracted partial cDNA probe.

Total RNA (20 μ g) were size-separated in a formaldehyde-1% agarose gel, transferred to Hybond-N membranes, and hybridized with each 32 P-labeled cDNA probe. RNAs isolated from control leaves were loaded on the left lane and RNAs from dehydrated leaves were loaded on the right lane.

Bnr2-1224 primer

ACGCATGGCCACTCGAGGTTGCTGCTATCACAGTGGGGTTCGCTTTTGTCAATTCGTCCTTGTAACAGTAG
CCCCATGATTTGCTCCGCCGGTGCACCCGACCATCCACCGTGGTTTCGTGGGAAGTCTGGCCGANGAAG
GCTGCTATCTCCTTCTTCCTCGTGGCAAGGTCTCCGGTGTCCCAAACCTAGGGAAAGACTTAACCGCGGTG
ATGAAGGCGTCGTAAGTGAANAAACCAATCNCATAACAAGCATTGTCGTTTCGTGTGATTAAGCATTTCATAA
AACTGATCTCTTGAAATGATGCCAGA

Bnr2-1233 primer

GTCAATCCATACCCGCGGGAGCCCTCTGCCCAACGGTCTATGCTGTAGCGAGGCTGGATGGTGCGGCACCA
CTGAAGCTTACTGCGGGCATGGTTGCCAAAGCCAGTGCACCTCCACTCCACTCCTCCTGCTCCACTCCCA
CTCCTCCTACTCCACTCCTCCTAGTCCTACCCCTCCTGGTCCACTCCTCCTGGTCCCAGCGGGGATCTTT
CTGGCATCATTCAAGAGATCAGTTTTATGAAATGCTTAATCACACGAACGACAATGCTTGTTATGCTATTG
GTTTCTTCACTTACGACGCTTCATCACCGCGGCTAAGTCTTCCCTANTTTTGGGAACACCGGANACTTGC
CACNAGGAAAAAGAAAAACANCCTCTTCGGCCANACN

Bnr6-1224 primer

ACTTTAAGTAAGGCTTCGAAAACGACGTCGTAGCTTAGAGCGAATAGCTCGCCGATTCCGGGTTCGACTTTTCG
GGTGGGCGATCATTGTGGATTCTAGTTGCCCGTCGAAATCGTAACGGCCAACGGTTTTCAAGTCTCCGCTTG
GAGTGATCCTGACTTGGTAAGGCAAATCGTCCTCCGACATGGCTAATAACCGGTTGTTGAAATANACTAAAC
CGGCGTTAGCTACTCCGGTTCGGTGTCCCGGGTTCGACTAAACCGGTCGAGCTCTGGCGTANAATANCATGA
GACGANCGATACCGGTGTGGCCGTGAAG

Bnr6-1233 primer

CGGGATGGTTCACGCCGTTAAGTTCGAAGACGGTTCAGCTAGCTACGCTTGCCTTTACTCAAACAAACCG
GTTTCATCCAGGAGCGTCAGTTGGGTAAACCTGTTTTCCCAAAGCCATCGGCGAGCTTCACGGCCACACCGG
TATCGCTCGTCTCATGCTATTCTACGCCAGAGCTGCAGCCGGTTTTAGTCGACCCGGGACACGGAACCGGAGT
AGCTAACGCCGGTTTTAGTCTATTTCAACAACCGGTTATTANCCATGTCGGAGGACGATTTGCCTTACCAAGT
CAGGATCACTCCAAGCGGANACTTGAAAACCGTTGGCCGTTACGATTTTCGACGGGCAACTANAATCCACAAT
GATCGCCACCGAAAAGTCNACCGGAATCCGGCAACTATTTCGCTTAAGCTAC

Bnr7-1224 primer

ACTCGTGATTGAACNACCGTGCNCTCNGGTAGGTTAAGTATTTTGCCTTGCCTTTGGTCCNCCATACAAAAGTGA
CTCCATTGCTCTGCNACGCAAATATAAGCTCNNTGAGCACAGCGTTCTGCTCCAGATCCTTATGCACAAGAA
AAGTTTCCANGGCATTACAAGCTGCTGGATAATCCAACCTTTCATCGGAAACTATGCGTTTAGCCATATCCN
CATTACNAGCCTTGTCCNCTATACTGANAGATTCCATCAGCATGACCAAGAACAAGGATNTGCGTGGTGTN
TCTGATC

Bnr7-1233 primer

ACAGATTGCTTCACTTGCCATCCGGAGTGAAATGGTCTTCTACTGAAGGGTGGAAAGGANGCCAGGAGATC
AAATGCTATCTTACACAAGGTGATCACTGATGCAATTCAGAGACTGTGGGTGGTAAACTCATTGGACTTGT
GACTTCAAGGGAAGAGATTCTGATTTGCTCAAGCTTGTGACGTTATTGATCTTGTGATCCCAAGAGGCAG
CAACAAGCTTGTTCAGATCAAAAACACTACAAAATCCCTGTTCTTGGTCATGCTGATGGAATCTGTCA
TGTATATGTGGACAAGGCTTGAATGTGGATATGGCTAAACGCATAGTTTCTGATGCAAAGTTGGATTATCC
ANCAGCTTGTAAATGCCATGAAAACCTTCTTGTGCATAAGGATCTGGAACANAANCN

Bnr13-1224 primer

ACTTGGCCAAGAAGTGGTTCCAAGNAAATACAGACGTTAGAGGACGTTTCATGTGTTCCGTATGTCCCAAAC
TCCATGTTTGAAGTTTCTTCTCCGTAAAACCTCTCTAGACACTTTCAAAGTGTAAAGAGGTGGATTGCTTA
TGTCCGGCATGAACGACGTTACAAAAACAGCAACAGAGCTTCTACTAGGAAACATGTCGGCTGCAAGACCAA
CCGATGGTCTCCAGGCTATGAGCTACGAGGATGGCTTTATCATCTGAGCCAAAAGACTCGAGAAGCTTAAAG
CAACGGTTT

Bnr13-1233 primer

ACAGGTCAAACCGGTGCTGGAAGCTTCAGGACACCGTGTGACTGTCGTGGATCTAACGGCTTCTGGTGTCAA
CATGAGCAGAGTGAAGAGATTCAAGTCTTTCGAGGATTACACCAAACCGTTGCTTAAGGTTCTCGAGTCTTT
TGGCTCAGATGATAAAGCCATCCTCGTAGCTCATAGCCTGGGAGGACCATCGGTTGGTCTTCAGCCGACAT

GTTTCCTANTAAGATCTCTGTTGCTGTTTTGTAAACGTCGTTTCATGCCGGACATAACGAATCCACCTTCTTA
CACTTTTGAAA

Bnrd15-1224 primer

ACTTTTCGTTGGTCCCTTGTCTAACTCGGTCTCAGCAGCTCTTAACCAAGAAGGTAACCTTCTCGGAAGATTG
ATCAGCTACAGAGAGACTTGAACCGGCCTTGACAACGGCAGCTACTTCTTGCAAACACTTCTCGTTGCANAG
GTGACATCTAGGGAGCGTCTGATTCACAGTGCCACCNCTCAAAGATACTTTGGTAATCTGATGTAGATGAAA
AGAACCCTCCAAACGGAACAAAGGATCCCATCAAGCTGGATTTTGGAAAGTTTGGAGGATGTGATTGGAAGAA
CATGA

Bnrd15-1233 primer

ACTTTGTATTGTCGATTCTAGACGATCCGATTGTGAACCGGGTCTTCTGCGACGCCGGGTTTTCGGAGCTCCG
ATATTAAGCTCGACGTGCTTACCCTCCGGTGACAACGCAGTTCTCGCGGGTTCGTTGCTTCCGCCTCTCT
TCCTTTGTAACCTTCCGAGCTCAGATCCGAATAATCGTGTGGTGGGAGCAGCGACGAGAATTGTAGGAGGA
TCGGACAAGTGTGTGTCGGAAGAGAGGAGGAACCCTGTCTTGTGCGAAACTGCGCTGACGAAGCTCTTA
AAACGTTTGTGATGCGATCAACAGTGGGAAGAAGCTA

Bnrd24-1224 primer

ACTCAGGAACAGTATGTCCTGCACCCTTATGGTTAAAAATGTGAGATTGTTTGCATATCCTTCGGTATACC
CTGCGACTTGGTCATTTGATATCCATGCCCTCCATTCAATCACCTGTAAATGAGAGCTCTATATCCACT
TAGAGTGAGGTTTCTATGGAAGCTGATCATACTTCCCTGCATCGTGATGGAACCATAGCTTACCAGTGCAGAG
TTCCCATCTTCTATCTCGCTCTCTCTTTAGCATGAATAGCTTTCCTGATCGCTGGATCGTTTATCCAAGC
TGTTGCAA

Bnrd24-1233 primer

ACTCTGGCTCAATGGTGGTCCAGGTTGCTCAAGCATGGATGGATTTGTATACGAGCATGGTCCCTTCAATTT
CGAACAGCAAAGACAAATTATAGTCTCCCACTCCTGCATCTTAATCCTTATAGTTGGTCAAAGGTGTCTAA
CATGATATACCTTGATTCACCTGTTGGTGTGGGATTCTCTTACTCAAAGAACGAATCTGACTACATAACCGG
TGATATGAAAACCGCGGCTGACTCTACGCGTTCCTTCTCAAGTGGTTCAGATGTTTCCCGAGTTTCAGTC
AAATCCGTTTTACATCTCTGGAGAACTTATGCTGGAGTTTACGTCCCAACTCT

Bnrd102-1224 primer

CTCCTGTAGGCTGCTGCTGTCTGCTCCACNGCAGANCAGCAGGTGAAGGACTCCAACGGAAATNCANTTAAG
CGCGGTGCANTATACTTCCATCCAGCCGGCTAANANCAACGCCNGTGGTCTTGTCCCACCCNCCATTNACNTA
CTTCCGTTTGGTCCNCTTGGCATCACCCAGACACTTCTTCCCTACCATCCGGCCCTGCCGGTTAGCTTCNGA
TATGAGCCANTTATTGTCTGCANATACTACATCTACACNTCTACCACAATAAACATCGAGTTCGAGTCCGAC
ATCTGGCCCGTATGCAACGAGCTTNCN

Bnrd102-1233 primer

ACTTTCCCACCGATGATAATGGCAGGCTCCTTGGCAGCGGATGAGGAAACATCGACTGCCNTTAACTTGGAA
AGCTCGTTGCATACGGGCCAGATGTGCGACTCGAAGTTCGATGTTTATTGTGGTAGATGTGTAATGTAGTCT
GTGCCGACAATAACTGGCTCATATCCGA
AGCTAACCGGCAGGCCCGGTTGGTAGGGAAGAAGTGTCTGGGTGATGCCAAGTGACAAAACGGAAGTAAGT
NAATGGCGGCTGGAACAAGACCAACCGGCGTTGCTCTTAACCGGCTGGATGAANTATTTTGCACCGC

Bnrd104-1224 primer

ACGGATGGTGCAGCACCCAGCTTACTGTGGGCGTGGTTGCCAAAGCCAGTGCCTCCCACTCCCACTC
CTCCTACTCCCAATCCTCCTAGTCCCACCCCTCCTAGGCCACTCCACCTGGTCCCAGCGGGATCTTTTCGG
GCATCATTTCAAGAGATCAGTTCTATAAAAATGCTTAAGCACATGAACGATNATGCTTGTCTGCTAGAGGTT
TCTTCACTTACGATGCCTTCATCACCGCCGCTAAGTTTTTCCCTAGTTTTGGGAACACCGGAGACTTGCAC
AAGGGANGAAGGA

Bnrd104-1233 primer

ACAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGTAAATAAAAGGAGTTTTATTTAGTTTTGATATTCTCTTA
TTGCTTGGATAACAACAAAGCTGCATTATTAACACTCCTTAATTAATAGCAGCATCCAAGAAAACGTTACTA
CNTTCACTAAACGGCCTTTGTTTGTACAGTCAACATTACTTCCCGGATCAACACCAAAACATGCCACAATAC

CTTGTATAAAACGATATCCGATCTTGGACCTGTGCGACATTGCGACCAGCACACTCTAATCCACCGTTAATG
ATATTGGTAATCACTC

Bnrd110-1224 primer

CAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTTTTTACTTATCAAACATGTTACTTAATAATAAGAT
TATCATAAAAGGAGTTTTATGTAGTTTGATATTCTCTTATTGCATGGATACAACAAAGCTGCATTAACACTC
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAACACNCCTTATTANATAGCAGCATCCAAAAAACGTTAATTCCTTCNC
TAAACGGCCTTTGTTTGTCCACAGTCAACATTACTTCCAGGATCAACACCAAACATGCCACAATACCTCGTAT
AAAACGATATCTG

Bnrd110-1233 primer

ACGGATGGTGCAGCACCACCGAAGCTTACTGTGGGCGTGGTTGCCAAAGCCAGTGCCTCCCACTCCTCCCA
TCCCACCTCCCAGTCTCCTAGTCCCACCCCTCCTAGGCCCACTCCACCTGGTCCCAGCGGGNATCTTTTCG
GGCATATTTCAAGAGATCAGTTCTATAAAAATGCTTAAGCACATGAACGATAACGTTGTCTGCTAGAGGG
TTCTTCACTTACGACGCCTTCATCACCGCCGCTAAGTTTTCCCTAGTTTCGGGAACACCGGAGACCTTGCC
ACAAGGAAAGAAGGAGA

Bnrd114-1224 primer

ACAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAATAGGATANTATTATCATATCTTAAACATCATTAAAGAC
ACAATATAAAGCAAAAGATTACAAAGTAACATGACAAACTTTCCACTATAATAAAAACAAGACAAACTAGGA
CATGCTGAGGTCAAGTGTANATACACTCTTTTATTTATGCTAGACCNTNCTGTTTCATCCTCAGGATGATAT
ATGAGTTCCCATTTCACTTGACGGTGTGCGAGTTAGTGCNCATGGANATGGGATAGGGAATGCTAACACCGC
ACTTTCCA

Bnrd114-1233 primer

GAGAAAAGCAAAAGACAATGGCTTCGGCTCTGAGTTTTTTCCATGCCTTGTTTTGACTGTGTGCATAGTTGC
ATCAGTAGATGCAGCAATCTCATGTGGCACAGTGACAAGTAACTTGGCTCCATGTGCCGTCTATCTAATGAA
AGGGCGGCCGGTGCAGCTCCATGCTGCGCCGGAGTTTCAAATTGAACAGTATGGCTAAAACCACACCGGA
CCGCCAACAAAGCATGTAAGTGCCTAAAGACCGCTGCAAAGANACGTCAATCCAAGTCTAGCCTCTAGCCTTC
C

Bnrd116-1233 primer

ACGGTGACTACATCGGGATCAAGAACCTANAGGCTTGGGGTGGGCTAATGGGCCCTGACTACAACACTACTTCG
AGAGAAGCAACCTCGACATTTTCAGCGGAAGAGCACCGTGTTCGCTAGTCCGATCTGCTCTCTAAACCTTA
CCTCCGACGGCTCCGGCGATCACCATGGCTGGTACCTGCCCGGGCGGGCGCTCGACCTGCTTGCCGAATATC
ATGGTGGAAAATGGCCGCTTTCTGGATTCACTNACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGAC
ATANCGT

Bnrd197-1224 primer

AGTTGTAACGACGGCCGTAATTGTAATACGACTACTATAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCG
AGCGGCCCGCAGTGTGATGGATATCTAGCAGAATTCGGCTTAGCGTGGTCCGGCCGAGGTAATCAAGCGTG
TCCCATGATCTTTCTCACCTCCACGACAACAAACGACGGAGCCACCGCGAATATCTCCGCCTCCACCGCC
AACTTCCCTTTCCGGCCATTCTGTTTCCCTTCGATCCTCACTTACTACTCTTCTCACATCAAACCTTA
TTCCCAACCTTCGCCGCTCCTCAAGGCTCGATATCACACTACTCGCCGGCCTAGAAGTCGGAACCTCATC
TCCATCTTCTCCTCTTTCTTCTCCTCGAACAACGGCGAGAGATCAAACCCTTCAGACAACCGGATGATG
TGAAACGCGTTTAGCGTCTCCGTCTCTTCTTGGACTTGTGCACGGACACATCAACATCCTCCTCAGCCTCT
GGTGTGCGGCCACTGGCTCGTTTCTTGATCTCGTTGAGGACTTCTTGAACAGTGTGAATCCATCACCTTA
TCGATAGTGATCCGGGATTCGGATTCCGATCCAGAAGCTTCGTACAGAGCCTTCTNGCATTCCGGANG

Bnrd209-1224 primer

TTAGTTGNAACGCGCCGTAATTGAATCGACTCACTTAGGGCGAATTGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAG
CGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTAGCAGAATTCGGCTTAGCGTGGTCCGGCCGAGGTAATCAATTAAGCAG
CTTGAAAGCAGCAGCTGAAGCTTATGGGAAGCCAGAGTGGGGTGGCACTGGCCCAACCGATGCTGGTACTA
CAATAACTGGCCAGAAGACTCAGTTCTTCAAAAAGAAGACGGTGGTTGGAACACAGAATATGGAGAGTT
CTTCTCAGATGGTATCCAGATGTTGCTGGATCATGGCGAGCGTATCCTTTCTCAGCCAAATCGATATT
CCAAGACACGGGTGTCAAAATATCAGTCAAAGTCGCTGGAATCCACTGGCATTACGGGACACGCTCTCACGG

CCCTGAGCTCACAGCAGGATACTACAACACTAGGTTGAGAGACGGATACCTTCCGATCGCTCAAATGCTAGC
CAGACACAACGCCATATTCAACTTCACCTGTATCGAGATGAGAGACCACGAGCAGCCTCAAGATGCCGCTTT
GTGCACCAGAGAAGCTAGTGAACCAGGTGGCTCTAGCTACTCTAGCTGCAGAAGTTCTCTAGCTGGTGAAA
ACGCATTGCCTANGTATGATGACTACGCGCACGAACAGATCCTTAAGGCGTT

Bnrd209-1233 primer

ANCTTNCNTTTNCANAGCTATGACCTGATTACGCCAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCCTAGTAACGGCCG
CCAGTGTGCTAGGAATTCGGCTTCGAGCGGCCGCCGGGCAGGTACAAACGCCACAACCCTGACCAAAAAA
ACCACAGCTATGGCCCATATCATTTTTTATACCGCCGATACATACACAACCTTAGCCTAAACATCTTTTCGG
CATCATATAATAATCCTTACATTACATCGCTTACGAACATAAACCATGGGGTGGAAACCATAACCATAATCGC
GCGCTCTTTCTAGTGAGTGAGAGCCACTGCAGCTTCTTGAACCAGCGGCTGAGTAACATGCACAAAGTGTT
AGCTTCACGCTCCACTTCTCCCGACACCTATCAGAGTCTCTCCCTCACCCATTTCTTCACAAACCCTAC
AAACTTCCCCCAATTGTCCGCCTTAAACAGCTCCGGATTCATCCTCAGGTAAGTAAACGCACACATCTCTCT
GTTTTCTCCCTCGCTGTTCTGATCAAAGCTCAAGCGGCAGACGCCTTGAGGATCTGCTCGTGCGGTAGTCT
TCATACCTAGGCAATGCGTTTTACCAGCTAGAGGAACTTNTGGAGCTAGAGTAGCTAGAGCCACCTGGTTC
ANTAGCTTTTTTGGTGCACAAGCGCATTTTGANGCTGNTCGGNCTNTNATNTNANNANCNGGTGAANTTGA
ATTTGGNGTAN

Figure 3. The partial cDNA sequence of dehydration stress induced clones.

1224 primer and 1233 primer is M13/pUC forward sequencing primer and M13/pUC reverse sequencing primer, respectively.

Table 1. Amino acid sequence homology of dehydration stress-induced partial cDNA clones.

Clone	Homologous protein	Score	E value	Source
<i>Bnrd2</i>	Chitinase	125	9e-29	<i>Brassica juncea</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> , etc.
<i>Bnrd6</i>	nine- <i>cis</i> -epoxycarotenoid dioxygenase	214	3e-55	<i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Malus domestica</i> , etc
<i>Bnrd7</i>	delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	214	3e-55	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Actinidia deliciosa</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Oryza sativa</i> , etc.
<i>Bnrd13</i>	polyneuridine aldehyde esterase	109	7e-24	<i>Rauvolfia serpentina</i> <i>Manihot esculenta</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> <i>Oryza sativa</i> , etc.
	alpha-hydroxynitrile lyase	103	7e-22	
	Pir7b	80	1e-14	
<i>Bnrd15</i>	unknown protein	147	2e-35	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Bnrd24</i>	serine carboxypeptidase I precursor like protein	188	1e-47	<i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Lycopersicon pennellii</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> , etc.
<i>Bnrd102</i>	drought-induced protein, BnD22	119	5e-51	<i>Brassica napus</i> , <i>Brassica oleracea</i> , etc.
<i>Bnrd104</i>	Chitinase	107	2e-23	
<i>Bnrd110</i>	Chitinase	90	2e-23	
<i>Bnrd114</i>	nonspecific lipid-transfer protein	140	8e-33	<i>Brassica oleracea</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , etc.
<i>Bnrd116</i>	putative protein	129	5e-30	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Bnrd197</i>	putative Ser/Thr protein kinase	105	6e-30	<i>Oryza sativa</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Zea mays</i> , etc.
<i>Bnrd209</i>	beta-amylase	171	2e-45	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Hordeum vulgare</i> <i>Triticum aestivum</i> , etc

Score and E value of highest homologous sequence are shown in the table.

4. Full-length cDNA 클로닝

Dehydrated 유채에서 total RNA를 추출한후 paramagnetic oligo dT Dynabeads를 이용하여 총 RNA에서 polyadenylated mRNA를 분리하여 이를 template로 하여 Clontech사의 Marathon cDNA amplification kit를 이용하여 cDNA library를 합성하였고 또한 이 kit를 이용하여 5'-RACE (5'-rapid amplification of cDNA ends)와 3'-RACE를 수행하여 full cDNA를 cloning 하였다. Northern hybridization 으로 확인된 13개의 clones 중 8개 (Bnrđ6, Bnrđ7, Bnrđ13, Bnrđ15, Bnrđ114, Bnrđ116, Bnrđ197, Bnrđ209)의 clones에 대해 RACE를 위한 primers를 design하여 RACE를 수행하였는데, Bnrđ15의 5'-RACE 제외한 모든 RACE product를 얻었다 (figure 4와 5). 이 RACE product를 pGEMT-T Easy vector에 클로닝하여 그들 유전자들의 5'과 3' 말단 서열을 결정하였다. Bnrđ7의 5'RACE 결과로는 두 개의 P5CS cDNA clone가 얻어 졌는데, 한 clone은 Arabidopsis P5CS1 유전자와 유사성이 있었고, 다른 clone은 Arabidopsis P5CS2 유전자와 유사성이 있었으므로 이 두 개의 P5CS 유전자를 Bnp5cs1과 Bnp5cs2로 명명하였다. 그리고 Bnrđ7 (Bnp5cs1과 Bnp5cs2), Bnrđ114, Bnrđ116, Bnrđ197, Bnrđ209 유전자에 대해서 5'과 3'-말단의 gene specific primer을 합성하고 이들 primer와 pfu DNA polymerase을 이용하여 full length cDNA를 얻었다.

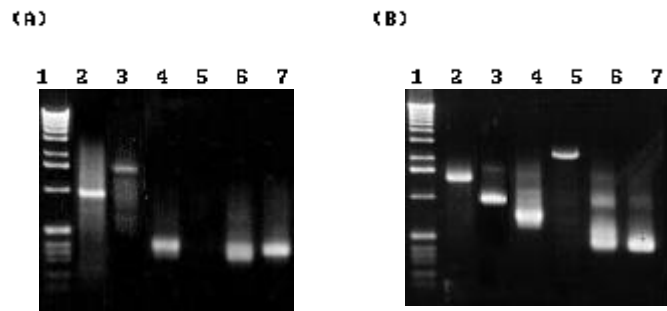


Figure 4. Agarose gel showing the products of 5' RACE (A) and 3' RACE (B) using each gene specific primers.

1 lane: 1kb ladder, 2 lane: *Bard5* clone, 3 lane: *Bard7* clone,
 4 lane: *Bard13* clone, 5 lane: *Bard15* clone, 6 lane: *Bard114* clone,
 7 lane: *Bard115* clone.

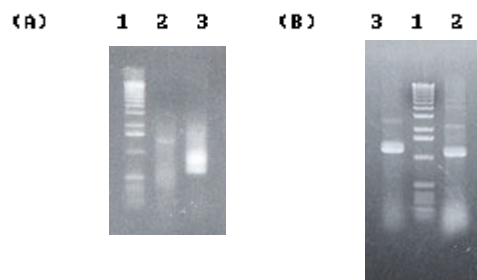


Figure 5. Agarose gel showing the products of 5' and 3' RACE using *Bard197*(A) and *Bard197*(B) gene specific primer.

1 lane: 1kb ladder, 2 lane: 5' RACE, 3 lane: 3' RACE

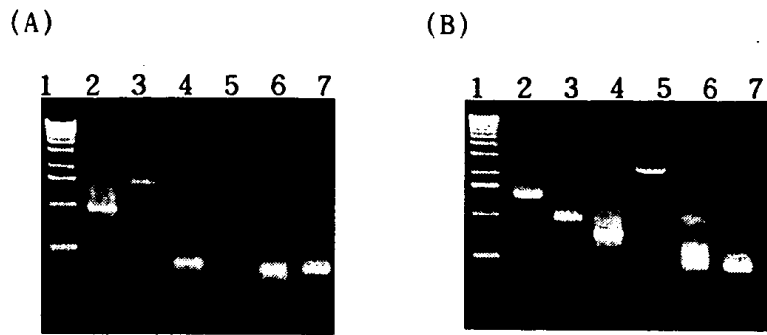


Figure 4. Agarose gel showing the products of 5' RACE (A) and 3' RACE (B) using each gene specific primers.

1 lane: 1kb ladder, 2 lane: *Bnrd6* clone, 3 lane: *Bnrd7* clone,
 4 lane: *Bnrd13* clone, 5 lane: *Bnrd15* clone, 6 lane: *Bnrd114* clone,
 7 lane: *Bnrd116* clone.

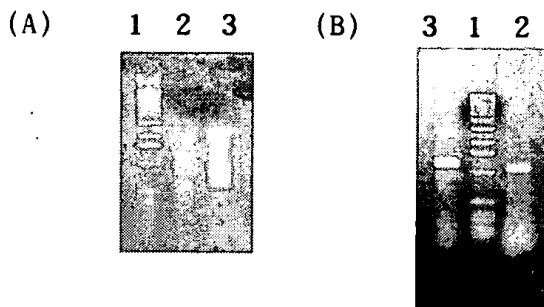


Figure 5. Agarose gel showing the products of 5' and 3' RACE using *Bnrd197*(A) and *Bnrd197*(B) gene specific primer.

1 lane: 1kb ladder, 2 lane: 5 RACE, 3 lane: 3 RACE

5. Bnr7 (Bnp5cs1, Bnp5cs2) 유전자 분석

가. Bnp5cs1과 Bnp5cs2의 염기서열 및 아미노산 서열분석

클로닝된 Bnp5cs1 cDNA의 전체길이는 2551bp이고 717 아미노산을 암호화하고 있으며, 이 유전자의 단백질의 크기와 pI는 각각 77.8kDa 와 5.96으로 추정된다. 그리고 Bnp5cs2 cDNA의 전체길이는 2529bp이고 727 아미노산을 암호화하고 있으며, 이 유전자의 단백질의 크기와 pI는 각각 78.7kDa 와 6.85로 추정된다 (figure 6과 7). 이 두 개의 Bnp5cs 단백질 사이에는 88% 아미노산 유사성을 가지고 있고, 이들과 *A. thaliana* 와 *V. aconitifolia*에서 클로닝된 p5cs cDNA의 아미노산 서열과 유사성을 비교한 것을 figure 8에서 보여주고 있는데, γ -glutamyl kinase (γ -GK)와 γ -glutamyl phosphate reductase (γ -GPR) domain, putative ATP와 NADPH-binding site, leucine-rich region 및 feedback inhibition에 관여하는 두 개의 아미노산 residue들이 보존되고 있는 것을 보여주고 있다.

나. Bnp5cs1과 Bnp5cs2에 의한 γ -GK와 γ -GPR deficient *E. coli*의 functional complementation

P5CS (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase)는 γ -glutamyl kinase 와 γ -glutamyl phosphate reductase의 기능을 갖는 bifunctional enzyme로 식물의 water 스트레스를 받을 때 proline 생합성을 하는데 key enzyme으로 작용한다. Full cDNA가 cloning 된 BnP5CS 유전자들의 기능을 하는지 확인하기 위하여 cDNA가 cloning 된 vector로부터 P5CS의 ORF(open reading frame) 부분만을 PCR로 증폭하여 *E. coli* expression vector 인 pKklacIQ cloning 하여

pKKLacIp5cs1과 PKK1acIp5cs2을 구성하고 이들을 *E. coli proBA* mutant 인 CSH26에 도입하여 이 mutation을 complementation 하는지를 분석하였는데 2종의 유전자 전부가 *E. coli proBA* mutation을 complementation을 하였다 (figure 9).

CAGATATTATTTGGTTCTCTCTCTAAACTCGGT 33
 CACTGACGAACCACTGAGTTTAACTCGTTCCCTTTGGAGGAGGTTTTGGTAGGCGGGGACA 93
 ATGGAGGAGCTAGATCGTTCACGCGCTTTTCGCTAAAGACGTCAAGCGTATCGTCGTTAAG 153
 M E E L D R S R A F A K D V K R I V V K
 GTTGAACAGCTGTTGTAAGTGGGAAAGGTGGAAGATTGGCTCTGGTCGCCTAGGAGCT 213
 V G T A V V T G K G G R L A L G R L G A
 CTGTGTGAACAGCTTGCAGGAAATAAACTCGGATGGATTTGAGGTGATCTTGGTGTCACTA 273
 L C E Q L A E L N S D G F E V I L V S S
 GGTGCGGTTGGCCTTGGCCGCCAAAGGCTTCGCTACAGACAGTTAGTCAATAGCAGCTTT 333
 G A V G L G R Q R L R Y R Q L V N S S F
 GCGGATCTCCAGAAGCCTCAGCATGAACTAGATGGGAAGGCTTGTGCTGGTGTGGACAA 393
 A D L Q K P Q H E L D D G K A C A G V G Q
 AGCAGTCTCAGGCTTATTATGAGACTATGTTTGACCAGCTGGATGTGACGGCTGCTCAG 453
 S S L M A Y Y E T M F D Q L D V T A A Q
 CTGCTGGTGAATGACAGTAGTTTCAGAGACAAGGAGTTCAGGAAGCAACTTAATGAGACA 513
 L L V N D S S F R D K E F R K Q L N E T
 GTGAAGTCCATGCTTGTATTTGAGGGTTATTCCTATTTTCAATGAGAACGATGCTATTAGC 573
 V K S M L D L R V I P I F N E N D A I S
 ACCAGAAGAGCTCCTTATCAGGATTCATCTGGCATCTTTTGGGATAACGACAGCTTAGCT 633
 T R R A P Y Q D S S G I F W D N D S L A
 GCTCTATTTGGCGCTGGAGCTGAAAGCTGATCTTCTGATTCTTCTGAGTGATGTGCAAGGT 693
 A L L A L E L K A D L L I L L S D V E G
 CTTTACACTGGCCCTCCAAGTACCCTAACTCAAAGCTGATCCACACCTTCATCAAGGAG 753
 L Y T G P P S D P N S K L I H T F I K E
 AAACATCAAGACGAGATTACATTTGGCGACAAGTCAAGACTAGGAAGAGGAGGCATGACT 813
 K H Q D E I T F G D K S R L G R G G M T
 GCAAAAGTAAAAGCTGCAGTGAATGCAGCTTATGCTGGTATCCCTGTCATCATAACCAGT 873
 A K V K A A V N A A Y A G I P V I I T S
 GGCTATGCAGCTGAGAACATAGATAAAGTCCTTAGAGGACTGCGTGTTGGAACCTTGTTT 933
 G Y A A E N I D K V L R G L R V G T L F
 CATCAAGATGCTCGTTTATGGGCTCCTATCACGGATTCTACTGCTCGTGACATGGCAGTA 993
 H Q D A R L W A P I T D S T A R D M A V
 GCTGCGAGGAAAGTTCCAGGAAGCTTCAGGCCTTATCTTCGGAGGATAGGAAGCAGATA 1053
 A A R E S S R K L Q A L S S E D R K Q I
 CTGTATAGTATCGCAGATGCTCTTGAAGCAAATGAGAAAAAATCAGAGCTGAGAATGAA 1113
 L Y S I A D A L E A N E K T I R A E N E
 TTAGATGTGGCTACAGCACAAAGAAGCTGGACTTGAAGAGTCATTGGTGGCTCGTTTGGTG 1173
 L D V A T A Q E A G L E E S L V A R L V
 ATGACACCTGCAAAGATCTCGAGCCTTGCAGCTTCAGTTTCGTAAGCTAGCTGATATGGAA 1233
 M T P A K I S S L A A S V R K L A D M E
 GATCCAATTGGCCGTGTTCTAAAGAAAACCGAGGTGGCAGATGGTCTTGTTTTGGAGAAG 1293
 D P I G R V L K K T E V A D G L V L E K
 ACCTCATCCCATTAGGCGTACTCCTGATTGTTTTGAGTCTCGACCTGATGCACTTGA 1353
 T S S P L G V L L I V F E S R P D A L V

CAGATAGCTTCACTTGCTATCCGGAGTGGAATGGTCTTCTATTGAAGGGTGGAAAGGAG 1413
 Q I A S L A I R S G N G L L L K G G K E
 GCCAGGAGATCAAATGCTATCTTACACAAGGTGATAACTGATGCTATTCCAGAGACTGTT 1473
 A R R S N A I L H K V I T D A I P E T V
 GGTGGTAAACTCATTGGACTTGTGACTTCAAGGGAAGAGATTCCTGATTTGCTCAAGCTT 1533
 G G K L I G L V T S R E E I P D L L K L
 GATGACGTTATTGATCTTGTGATCCCAAGAGGCAGCAACAAGCTTGTTTCCAGATTA 1593
 D D V I D L V I P R G S N K L V S Q I K
 AACACTACAAAAATCCCTGTTCTTGGTCATGCTGATGGAATCTGTCATGTATATGTGGAC 1653
 N T T K I P V L G H A D G I C H V Y V D
 AAGGCTTGAATGTGGATATGGCTAAACGCATAGTTTCTGATGCAAAGTTAGACTATCCA 1713
 K A C N V D M A K R I V S D A K L D Y P
 GCAGCTTGAATGCCATGGAAACTCTTCTTGTGCATAAGGATCTGGAGCAGAACGCTGTG 1773
 A A C N A M E T L L V H K D L E Q N A V
 CTCAATGAGCTTATATTTGCTCTGCAGAGCAATGGAGTCACTTTGTATGGTGGACCAA 1833
 L N E L I F A L Q S N G V T L Y G G P K
 GCAAGTAAAAATACTTAACCTACCAGAAGCACGGTCGTTCAATCACGAGTACTGTTCCAAG 1893
 A S K I L N L P E A R S F N H E Y C S K
 GCGTGCACTGTTGAAGTTGTAGAAGATGTTTATGGTGCTGTAGATCACATTCACCGACAT 1953
 A C T V E V V E D V Y G A V D H I H R H
 GGAAGTGACACACAGACTGTATTGTGACAGAGGATCCCGAAGTTGCAGAGCTATTCCTT 2013
 G S A H T D C I V T E D P E V A E L F L
 CGCCAAGTGGACAGCGCTGCTGTGTTCCACAACGCAAGCACAAGATTCTCTGATGGTTTT 2073
 R Q V D S A A V F H N A S T R F S D G F
 CGATTTGGACTTGGTGCTGAGGTGGGGATAAGCACAGGGAGGATCCATGCCCGTGGTCCA 2133
 R F G L G A E V G I S T G R I H A R G P
 GTGGGAGTAGAGGGACTACTTACAACCAGATGGATAATGAGAGGAAAAGGACAAGTTGTG 2193
 V G V E G L L T T R W I M R G K G Q V V
 GATGGAGACAATGGGATTACTTACACCCATCAAGACATTCCCATCCAAGCTTAGAAGACT 2253
 D G D N G I T Y T H Q D I P I Q A
 TTGTGTGAAGTCTTTCTGTGGAGACTAGGAGAGGATGGGCTTTTTGTTTCTCTCTGCTA 2313
 ATATCATATCCTATTATTATTATTGTTGTTGAAACCTCTCTTATAAAGTGAAGTGGTTT 2373
 TGATTTAGGGTTTAGGGATTGCACCAAAAATAAGTTCCTTTGTTCTGTTTTTACCACTTG 2433
 GTCITTTGCTCATAAGTAAGATTGAAGAACTCTTGTAAGCTACACCTTTCTTATTTATCAA 2493
 TTTATCTTTATTTCTTTGGATTTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2551

Figure 6. Nucleotide sequence of *Bnp5cs1* (GenBank accession number AF314811) and its deduced amino acid sequence.

Numbering begins at the first nucleotide of sequence.

CCATTATCTTCCTCCTCTCACGTTCTCCTCTTCTTCTTCGTAGTGGCGGTGACTCAGTC 59
 CGATCGAGTTGACTCGCTCTCTCTCTCTCTCTGTCTTGTGTTTTGATAAGAAGCTAGCT 119
 ATGGAGGATGAGATAGATCGTTCCCGCGCTTTCCCAAGGACGTTAAGCGTATCGTTGTC 179
 M E D E I D R S R A F A K D V K R I V V
 AAGGTTGGGACAGCAGTTGTTACAGGAAAGGTGGAAGATTGGCTCTTGGCCGCTTAGGA 239
 K V G T A V V T G K G G R L A L G R L G
 GCTATCTGCGAGCAGCTTGCTGAATTGAACTCGGATGGTTTTGAGGTCATTTTGGTGTCT 299
 A I C E Q L A E L N S D G F E V I L V S
 TCTGGTGGCGTTGGTCTTGGTCGT CAGAGGCTTAGATACAGACAATTAGTCAACAGCAGC 359
 S G A V G L G R Q R L R Y R Q L V N S S
 TTTGCAGACCTTCAGAAGCCACAGACTGAACTTGATGGGAAGGCTTGTGCTGGTGTGGA 419
 F A D L Q K P Q T E L D G K A C A G V G
 CAGAGCAGTCTCATGGCTTACTATGAGACTATGTTTGACCAGATGGATGTGACGGTGGCT 479
 Q S S L M A Y Y E T M F D Q M D V T V A
 CAAATGCTGGTGACTGATAGCAGTTTCAGAGATAAGGATTTTCAGGAAGCAACTTAGTGAG 539
 Q M L V T D S S F R D K D F R K Q L S E
 ACAGTCAAAGCTATGCTGAAAATGAGAGTTATCCAGTTTTCAACGAGAATGATGCTATA 599
 T V K A M L K M R V I P V F N E N D A I
 AGCACTCGAAAAGCCCTTACAAGGATTCTACTGGTATATTTGGGATAATGACAGCTTA 659
 S T R K A P Y K D S T G I F W D N D S L
 GCTGCTCTACTGGCGTTGAGCTGAAAGCTGATCTTTTGATTCTTCTTAGTGACGTTGAG 719
 A A L L A L L K A D L L I L L S D V E
 GGTCTTTACACTGGTCTCCAAGCGACTCCTAAAGTTAATCCACACATACGTTAAA 779
 G L Y T G P P S D P K S K L I H T Y V K
 GAGAAACACCAGGAAGAGATTACCTTTGGCGAGAAGTCCAGATTAGGACGAGGTGGTATG 839
 E K H Q E E I T F G E K S R L G R G G M
 ACTGCAAAAAGTTAAAGCTGCTGTTAATGCAGCTTATGGTGGCATTCTGTTATCATAACC 899
 T A K V K A A V N A A Y G G I P V I I T
 AGTGGGTATGCAGCTGAGAATATAGCTAAAGTCTTAAAGGACTGCGTGTGGTACCTTG 959
 S G Y A A E N I A K V L K G L R V G T L
 TTCCACCAAGATGCACATTTGTGGGCTAGAGTCGTAGATACTACTTCTCGTGACATGGCA 1019
 F H Q D A H L W A R V V D T T S R D M A
 GTTGCTGCAAGGGAAAGTTCTAGAAAGCTTCAGGCTTTGTCTTCAGAAGATAGGAAAAAC 1079
 V A A R E S S R K L Q A L S S E D R K N
 ATTCTACTAGATATAGCCAACGCTCTAGAAGCAAATGAGAAAATAATTAAGGCTGAGAAT 1133
 I L L D I A N A L E A N E K I I K A E N
 GATTTAGATGTTGCTGCAGCACAAGAAGCTGGATATGAAGAGTCTTTGGTAGCTCGTTTA 1199
 D L D V A A A Q E A G Y E E S L V A R L
 GTTATGAAGCCTGGAAGATCTCAAGCCTTGACGCTTCTATTCCGACGCTAGCTGAAATG 1259
 V M K P G K I S S L A A S I R Q L A E M
 GAAGACCAATTGGTTCGTGTTCTAAAGAAAAGTGGGTTGCAGATGGTCTTATTTTAGAG 1319
 E D P I G R V L K K T E V A D G L I L E
 AAAACCTCATCACCATTAGGTGTTCTTCTGATGTTTTTGAATCCCGTCTGATGCACTT 1379
 K T S S P L G V L L I V F E S R P D A L

```

GTTTCAGATAGCTTCACTTGCAATCAGGAGTGGAAATGGTCTTCTGCTGAAGGGTGGAAAA 1439
V Q I A S L A I R S G N G L L L K G G K
GAGGCTCGTCGATCAAATGCTATCTTACACAAGGTGATCACTGATGCAATCCGAAGACT 1499
E A R R S N A I L H K V I T D A I P K T
GTTGGAGGTAAACTCATAGGACTTGTGACTTCGAGAGATGAGATTCCTGATTTGCTCAAG 1559
V G G K L I G L V T S R D E I P D L L K
CTTGATGATGTTATTGATCTTGTGATCCCAAGAGGCAGCAACAAGCTTGTTCAGATA 1619
L D D V I D L V I P R G S N K L V S Q I
AAAACTCAACGAAAATCCCAGTGCTAGGGCATGCGGATGGTATCTGTTCATGTGTATGTT 1679
K N S T K I P V L G H A D G I C H V Y V
GACAAGTCTTGTAAGTAGACATGGCAAACGTGTTGTTTCAGATGCAAAGTTAGACTAT 1739
D K S C K V D M A K R V V S D A K L D Y
CCAGCAGCCTGTAACGCTATGGAAACCCTTCTGTACATAAGGATCTAGAGCAGAATGGT 1799
P A A C N A M E T L L V H K D L E Q N G
GTGCTAAACGAGCTTATATATGCCCTGCAAGCCAATGGTGTCACTTTGTATGGTGGGCCA 1859
V L N E L I Y A L Q A N G V T L Y G G P
AAAGCAAGTGGTAAACTGAACATCCGGAAGTAAAATCATTTCATCAGGATACAGTTCC 1919
K A S G K L N I P E V K S F H H E Y S S
AAGGCCTGCACCGTTGAAATTGTAGAAGACGTACACGGTGTATAGATCATATTCACCAA 1979
K A C T V E I V E D V H G A I D H I H Q
CACGGGAGTGCACACACTGATTGCATAGTGACAGAAGATAGTGAAGTGGCAGAGATCTTC 2039
H G S A H T D C I V T E D S E V A E I F
CTCCGCCAAGTGGACAGTGCTGCTGTTATCCACAATGCAAGCACAAGATTCTGTGATGGT 2099
L R Q V D S A A V I H N A S T R F C D G
TTTCGATTTGGACTTGGTGTGAGGTGGGAATAAGCACAAGCAGGATCCATGCCCGTGGT 2159
F R F G L G A E V G I S T S R I H A R G
CCAGTTGGAGTAGAAGGATTATTGACAACGAGATGGATAATGAGAGGAAAAGGACAAGTG 2219
P V G V E G L L T T R W I M R G K G Q V
GTGGATGGAGACAATGGAGTCGCTTACACTCATAAGGACCTTCCTGTCTTAGAAAAGGACA 2279
V D G D N G V A Y T H K D L P V L E R T
AAGGCAGTGCAGAACGGGCATTAGTTCTATCTATGCTAATGTATATTATTTACTCT 2339
K A V Q N G H
TTTCTTATGATTGAAGTTTATTTTTTTTCTCGTTTACTAGGATATAGTGTGTGGATTG 2399
CAATAAGTGGTCTTTTGATAATAGTAAAGTGTGATTAGCCTTTTTCGTCATGTCAAAAAG 2459
AAACTCGTTATAAGCCAATGTAACCTTTCTATTTCTCTCAATCGCAAAAAAAAAAAAAAAA 2519
AAAAAAAAAA 2529

```

Figure 7. Nucleotide sequence of *Bnp5cs2* (GenBank accession number AF314812) and its deduced amino acid sequence.

Numbering begins at the first nucleotide of sequence.

		ATP binding site	
BnP5CS1	81
AtP5CS1	81
BnP5CS2	82
AtP5CS2	81
VaP5CS	82
.....			
		feedback inhibition sites	
BnP5CS1	163
AtP5CS1	163
BnP5CS2	164
AtP5CS2	163
VaP5CS	164
.....			
		leucine zipper motif	
BnP5CS1	248
AtP5CS1	248
BnP5CS2	246
AtP5CS2	245
VaP5CS	246
.....			
		conserved γ-GK domain	
BnP5CS1	324
AtP5CS1	324
BnP5CS2	325
AtP5CS2	324
VaP5CS	325
.....			
BnP5CS1	406
AtP5CS1	406
BnP5CS2	407
AtP5CS2	406
VaP5CS	407
.....			
		NADPH binding site	
BnP5CS1	480
AtP5CS1	480
BnP5CS2	480
AtP5CS2	488
VaP5CS	489
.....			
		leucine zipper motif	
BnP5CS1	570
AtP5CS1	570
BnP5CS2	571
AtP5CS2	570
VaP5CS	571
.....			
		conserved γ-GPR domain	
BnP5CS1	632
AtP5CS1	632
BnP5CS2	633
AtP5CS2	632
VaP5CS	633
.....			
BnP5CS1	717
AtP5CS1	717
BnP5CS2	727
AtP5CS2	726
VaP5CS	671

Figure 8. Multiple alignment of predicted BnP5CS1 and BnP5CS2 protein sequences with homologous sequence of *Arabidopsis* and moth bean P5CS proteins.

Sequences in frames show conserved γ-GK and γ-GPR domains, including the putative ATP and NADPH binding domains, leucine-rich regions, as well as amino acids involved in proline feedback inhibition of P5CS enzymes.

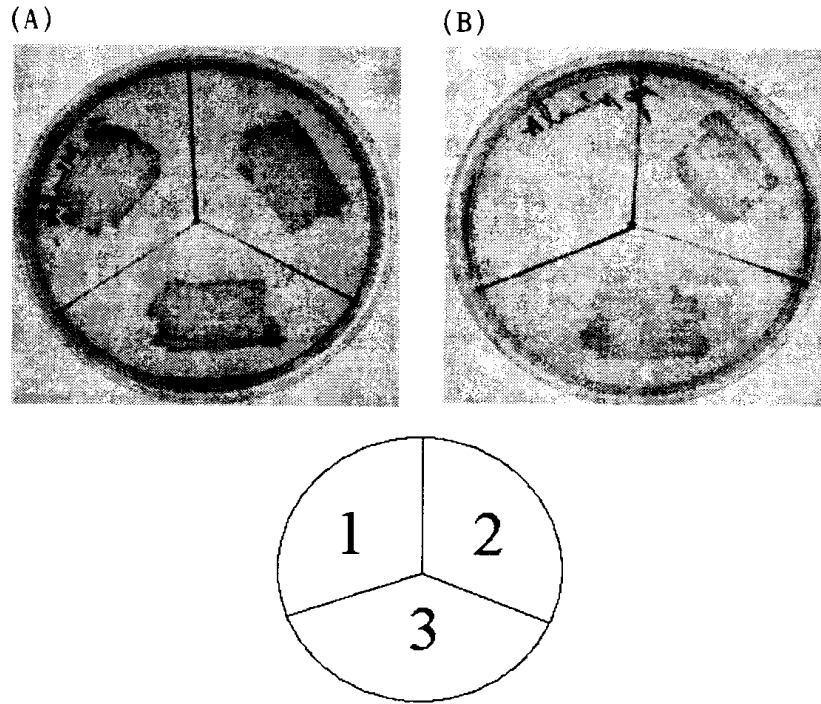


Figure 9. Complementation of a *proBA* mutation by *Bnp5cs1* and *Bnp5cs2* gene.

Expression vectors containing *Bnp5cs1* or *Bnp5cs2* gene were introduced into *E. coli* strain CSH26 [*ara*, $\Delta(lac\ pro)$, *thi*]. CSH26 harboring pKKLacI (1) only, pKKLacIp5cs1(2) and pKKLacIp5cs1(3) were streaked on minimal A media containing ampicillin (100 μ g/ml), IPTG (1mM) and thiamine (0.05 mM) with (A) or without (B) 0.2 mM proline.

6. Bnr114 유전자 분석

Bnr114 cDNA는 587 bp로 구성되어 있고 112개의 아미노산 서열을 암호화하고 있고 추정되는 분자량과 pI는 각각 114kDa와 8.9이다. 이 유전자가 암호화하고 있는 아미노산 서열은 전형적인 signal peptide sequence (아미노산 residue 2-23)를 갖고 있는데, 이것으로부터 이 단백질이 세포벽으로 secretion 되는 것으로 추정할 수 있다 (figure 10). 이 유전자의 단백질 서열은 여러 lipid transfer protein과 유사성이 있지만 (figure 11) 염기서열은 단지 Arabidopsis 3과 4의 mRNA 서열하고만 높은 유사성이 있는데, 지금까지 Arabidopsis에서 클로닝된 LTP 유전자 중 ltp3과 4 유전자만이 ABA에 의해 강하게 발현되는 것이 보고되었다.


```

GACAAAAGAGAAAAGCAAAGACA 24
ATGGCTTCGGCTCTGAGTTTTTTCATGCGCTTGTGACTGTGTGCATAGTTGCATCA 84
M K S A L S F P T C L V I T V C L V A S
GTAGATGCAGCAATCTCATGTGGCACAGTGACAAGTAACTTGGCTCCATGTGCCGTCTAT 144
A I S C G T V T S N L A P C A V Y
CTAATGAAAGGCGGGCCGGTGCCAGCTCCATGCTGCGCCGGAGTTTCAAATTGAACAGT 204
L M K G G P V P A P C C A G V S K L N S
ATGGCTAAAACCAACCGGACCGCCAACAAGCATGTAATGCCTAAAGACCGCTGCAAAG 264
M A K T T P D R Q Q A C K C L K T A A K
AACGTCAATCCAAGTCTAGCCTCTAGCCTTCTGGAAAAGTGGCGGTGTTAGCATTCCCTAT 324
N V N P S L A S S L P G K C G V S I P Y
CCCATCTCCATGAGCACTAACTGCGACACCGTCAAGTGAAATGGGAACTCATATATCATC 384
P I S M S T N C D T V K *
GTGAGGATGAACAGTATGGTCTAGCATAAATAAAAGAGTGTCTATCTACACTGACCTCAG 444
CATGTCCTAGTTTGTCTTGTGTTTTTATTATAGTCGAAAAGTTTGTGATGTTACTTTGTAATC 504
TTTTGCTTTATATTGTGTCTTAATGATGTTTAAAGATATGATAATATTATCCTATTAATAA 564
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 587

```

Figure 10. Nucleotide sequence of *Bnrd114* (GenBank accession number, AF101038) and its deduced amino acid sequence.

The potential signal sequence is boxed in gray, and the potential poly(A) signal is underlined. Numbering begins at the first nucleotide of sequence.

```

      .!*:; :... . *::* . *:::.* *; .:* :* .** *...
AF159800 MAFALRFFTCGLVLTVCIVAS---VDAALSCGTVASLAPCATYLSKGLVPPSCCAGVK* 57
AF159801 MAFALRFFTCGFVLTVFIVAS---VDAALTCGTVASSLSPELQYLSKGGVVPFPCAGVK* 57
BnRD114 MASALSFFTCGLVLTVCIVAS---VDAALSCGTVTSLAPCAVYLMKGGVVPFPCAGVK* 57
AF221503 MASAVIKLALVVALCHAVS---VAHETCSQVSNLAPCINIVRSQGAVPPACCGIKT* 57
AF093751 -MAGVMKLAELVLACNIVAGPITANAALTCGTVNSNVAPCIGYITQGGPLPRACCTGVSK* 59
L33904 -MAGVMKLAELVLACNIVAGPITAKALTCGTVNSNVAPCIGYITQGGPLPRACCTGVSK* 59
U22175 -MAGLVKLEELVLACNIVAGPIATNALSCGTVSGNLACIGYLTONGFVPTACCSGVTS* 59

      :*.:***** **.*: * :* . * .:* ***.:* ** .*** .:*
AF159800 LNSMARTTPEHQACRCIQSTAKSI-SGLNPSLASGLPGKCGVSIYPPIEMSTNCNIR* 115
AF159801 LNSMAQTTPHQACRCLOSAAK----GVNPSLASGLPGKCGVSIYPPISTSTNCATIK* 112
BnRD114 LNSMARTTPEHQACRCCLKTAAKN----VNPSSLASGLPGKCGVSIYPPIEMSTNCQTVK* 112
AF221503 INGLAKTTPHQACRCCLKNLASV-SGVNPGVAESLPGKCGVNVFYKISTSTNCATVK* 115
AF093751 LNSMARTTPEHQACRCLETAASALGPNLNAGRAAGIPKACGVSVFPPISTSTNCNIVK* 118
L33904 LNSMARTTPEHQACRCLETAARALGPNLNAGRAAGIPKACGVSVFPPISTSTNCNIVK* 118
U22175 LNSMARTTPEHQACRCLEVAANAL-PTINVARAAGLPKACGVNIPYKISKTTNENIVK* 117

```

Figure 11. Comparison of deduced amino acid sequence of BnRD114 and other lipid transfer proteins.

The sequences are from *A. thaliana* ltp 3 (AF159800, GenBank accession number) and ltp 4 (AF159801), *P. communis* ltp (AF221503), *B. oleracea* ltp, wax9E (AF093751) and wax9A (L33904), and *B. napus* ltp3 (U22175). The mature deduced amino acid sequences were aligned using the ClustalW software. Amino acids that are strictly conserved are indicated by the corresponding symbol (*).

7. BnrD116 유전자 분석

BnrD116의 염기 및 아미노산 서열을 figure 12에서 보여주고 있는데, 이 유전자의 cDNA는 695 bp로 이루어져 있고 주요한 open reading frame로 537bp 염기서열을 갖고 있으며 이로부터 추정되는 polypeptide의 크기와 pI는 19.7 kDa와 4.82 이다. 그러나 이 polypeptide sequence는 public database에서 그 기능이 알려진 어떠한 단백질과도 유사성이 없었다. 이 유전자의 추정되는 아미노산 서열은 signal sequence (아미노산 residue 2-20)와 PLAT/LH (Polycystin-1, Lipoxygenase, Alpha-Toxin / Lipoxygenase homology) domain (아미노산 residue 27-160)을 갖고 있는 것으로 추정되므로 아마 이 유전자의 단백질은 세포벽을 포함하는 세포 밖으로 secretion 되고 lipoxygenase 활성을 가질 것으로 추정되어진다. 일반적으로 PLAT/LH domain은 다양한 membrane 과 lipid associated protein에서 발견되어진다.

```

                                AGGAAGGTCAAAAACCG 17
ATGGCTCGTCTCCTCCCCTTACTCCTCCTCATCGCCACCGTCTCCGCCGTCGCATTCGCC 77
M A R L L P L L L L I A T V S A V A F A
GACGATGAACCGGACTGCGTCTACACATTCTACCTCCGAACCGGATCAATCTGGAAGCC 137
D D E P D C V Y T F Y L R T G S I H K A
GGAACCGACTCGATTATCAGCGCTAGAATCTACGACAAGTACGGTGACTACATCGGGATC 187
G T D S I I S A R I Y D K Y G D Y I G I
AAGAACCTAGAGGCTTGGGGTGGGCTAATGGGCCCTGACTACAACACTTTCGAGAGAAGC 257
K N L E A W G G L N G P D Y N Y F E R S
AACCTCGACATTTTCAGCGGAAGAGCACCGTGTTCCTAGTCCGATCTGCTCTCTAAC 317
N L D I F S G R A P C L P S P I C S L N
CTTACCTCCGACGGCTCCGGCGATCACCATGGCTGGTACGTCATTTACGTCGAGGTTTCG 377
L T S D G S G D H H G W Y V N Y V E V S
ACAGCTGGAGTTCACGCTCAGTCTCCACCGCAGAACTTCGAGATCGAGCAGTGGCTCGCC 437
T A G V H A Q C S T Q N F E I E Q H L A
ACCGATACGTCCTTATGAGCTCACCGCGTGAGGAACAATTGTCCTCGTCTGCTAAGG 487
T D T S P Y E L T A V R N N C P V S L R
GATAGCGTTAGTCCGGCCGGCTCGGAGATCCGGAACAGCTTTCTTGGGTCATCTGAGTG 557
D S V S R A G S E I R K Q L S H V I
AGATGAGTGTGTTATTCATAAGGCTTTTCGTATTGTATGTTTATCATCGTCTTATGAGTG 617
TAATGTGCCCTTTGATTATATGATTCGATAAATAAACTTTTTAGTTACGCAAAAAAAA 677
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 685

```

Figure 12. Nucleotide sequence of *Bordetella pertussis* (GenBank accession number AF314810) and its deduced amino acid sequence.

The potential signal sequence is boxed in gray, and the potential PLAT/LH2 (Polycystin-1, Lipoxigenase, Alpha-Toxin / Lipoxigenase homology) domain is underlined. Numbering begins at the first nucleotide of sequence.

```

AGGAAGGTCAAAAACCG 17
ATGGCTCGTCTCCTCCCTTTACTCCTCCTCATCGCCACCGTCTCCGCCGTGCGATTCCGCC 77
M
GACGATGAACCGGACTGCGTCTACACATTCTACCTCCGAACCGGATCAATCTGGAAAGCC 137
D D E P D C V Y T F Y L R T G S I W K A
GGAACCGACTCGATTATCAGCGCTAGAATCTACGACAAGTACGGTGACTACATCGGGATC 197
G T D S I I S A R I Y D K Y G D Y I G I
AAGAACCTAGAGGCTTGGGGTGGGCTAATGGGCCCTGACTACAACACTTTCGAGAGAAGC 257
K N L E A W G G L M G P D Y N Y F E R S
AACCTCGACATTTTCAGCGGAAGAGCACCGTGTTCCTAGTCCGATCTGCTCTCTAAAC 317
N L D I F S G R A P C L P S P I C S L N
CTTACCTCCGACGGCTCCGGCGATCACCATGGCTGGTACGTCAATTACGTGAGGTTTCG 377
L T S D G S G D H H G W Y V N Y V E V S
ACAGCTGGAGTTCACGCTCAGTGCTCCACGCAGAACTTCGAGATCGAGCAGTGGCTCGCC 437
T A G V H A Q C S T Q N F E I E Q W L A
ACCGATACGTCTCCTTATGAGCTCACCGCCGTGAGGAACAATTGTCCCGTGTGCGTAAGG 497
T D T S P Y E L T A V R N N C P V S L R
GATAGCGTTAGTCGGGCCGGGTCCGAGATCCGAAACAGCTTCTTGGGTCATCTGAGTG 557
D S V S R A G S E I R K Q L S W V I
AGATGAGTGTGTTATTCATAAGGTCTTTCGTATTGTATGTTTATCATCGTCTTATGAGTG 617
TAATGTGGCCTTTGATTATATGATTCGATAAATAAACTTTTTAGTTACGCAAAAAAAAAA 677
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 695

```

Figure 12. Nucleotide sequence of *Bnrd116* (GenBank accession number AF314810) and its deduced amino acid sequence.

The potential signal sequence is boxed in gray, and the potential PLAT/LH2 (Polycystin-1, Lipoxxygenase, Alpha-Toxin / Lipoxxygenase homology) domain is underlined. Numbering begins at the first nucleotide of sequence.

8. Bnr197 유전자 분석

가. Bnr197의 염기서열 및 아미노산서열 분석

Bnr197 cDNA는 염기서열을 분석한 결과 1969 bp 서열을 갖고 있고 441개의 아미노산 서열을 암호화하고 있으며, 추정되는 단백질 크기와 pI는 각각 49.2kDa와 8.77이다 (figure 13). Bnr197 아미노산 서열은 다른 serine/threonine protein kinase와 유사성을 갖고 있는데 N-terminal region에 catalytic domain을 갖고 있고 추정되는 ATP binding site가 아미노산 residue 30-57 사이에 발견되고 serin/threonine protein kinase motif가 아미노산 residue 142-154 사이에 있다. 이 유전자의 단백질 서열은 SnRKs (SNF1-related protein kinases)의 subfamily 3과 유사성이 높는데 이들 SnRK3들은 protein kinase의 subdomain들이 잘 알려져 있다 (figure 14). 최근에 Bnr197 homologue 유전자가 Arabidopsis에서 cloning되었는데, 이 유전자의 product인 AtCIPK6 (Arabidopsis CBL-interacting protein kinase 6)은 Bnr197 아미노산 서열과 95% 유사성이 있다. 그러므로 Bnr197 아미노산서열과 다른 AtCIPK 서열과 유사성을 비교하여 보았을 때 그 유사성이 매우 높았다 (figure 15). 그러나 SnRK3과 CIPK 단백질들의 full-length protein과 C-terminal regulatory domain에 있어서 phylogenetic tree를 그려보면 Bnr197 단백질과 AtCIPK6는 AtCIPK보다 SNRK3에 더 유사함을 보이고 있다 (figure 16).

(A)

CAGATTCGTTTCTCTCTCTCCTACCTCCTCTACTGATTTTGAGAA 47
AAAATAAGCGTTAAAAACCTTTGAAGGGAATGCAGAGAGATGGTCGGAGTATCGCCGGG 107
GAAGACTAAGCTGTGTGATCGGTTTAAACCGATCTGTTGGCGGCAGGAACTGCCACCGGAA 167
ACACGTCGAGGACGGGTGATCCAATTCAACTCTCTCGAATTCTCCGGACATCGAAAGCTT 227
AAACCTTTTTTCTGTTTTATTTTTCTTTTAAATTTAAAATAATCATTGTAATTAAAAAAAT 287
ATGGTCGGAGCAAACCTATAGAGAACGGATCTGACGGTGGAGCAAGCACTGGTCTTCTC 347
M V G A K P I E N G S D G G A S T G L L
CACGGACGTTACGAGCTAGGCCGTCTTAGGCCACGGGACATTGCTAAAGTGTACCAC 407
H G R Y E L G R L L G H G T F A K V Y H
GCGGTAACGTAACCGGTAAGCGGTGGCGATGAAAGTCGTCGGAAAAGAGAAGGTG 467
A R N V T T G K S V A M K V V G K E K V
GTGAAGTCGGCATGGTGGACCAGATCAAGCGCGAGATCTCGGTGATGAGGATGGTGAAG 527
V K V G M V D Q I K R E I S V M R M V K
CATCCCAACATCGTCGAGCTCCACGAGGTGATGGCTAGCAAACCAAGATCTACTTCGCC 587
H P N I V E L H E V M A S K T K I Y F A
ATGGAGCTCGTGGAGCGGGGAGCTGTTCCGCAAAGTCGCAAAGGGAGGCTGCGCGAG 647
M E L V R G G E L F A K V A K G R L R E
GACGTGGCGCGGTGACTTTTTCAGCAGCTGATCTCCGCCGTCGATTTTTGCCACAGCCG 707
D V A R V Y F Q Q L I S A V D F C H S R
GGGGTTTACCACCGAGATCTCAAGCCGAGAATCTCTTGTGACGAAGAAGGCAACCTC 767
G V Y H R D L K P E N L L L D E E G N L
AAGGTCACCGACTTTGGTCTCTGCTTTACCGAGCATTTGAAGCAAGACGGGCTTCTC 827
K V T D F G L S A F T E H L K Q D G L L
CACACCACTTGTGGAACCTCCGGCGTACGTCGCGCCGGAGGTTATACTGAAGAAAGGATAT 887
H T T C G T P A Y V A P E V I L K K G Y
GACGGAGCGAAGGCGGATCTTTGGTCTTGGCGGCTTATCCTCTTCGTGCTCCTCGCGGGT 947
D G A K A D L W S C G V I L F V L L A G
TACTTCCGTTTTCAGGATGATAATCTTGTCAACATGTATAGGAAGATCTACAGAGGAGAC 1007
Y L P F Q D D N L V N M Y R K I Y R G D
TTCAAGTCCCTGGGTGGCTCTCCTCCGATGCGGAGGCTCGTGACGAAGCTTCTGGAT 1067
F K C P G W L S S D A R R L V T K L L D
CCGAATCCGAATACCGGATCACTATCGATAAGGTGATGGATTCACTGTTCAAGAAG 1127
P N P N T R I T I D K V M D S H W F K K
TCCTCAACGAGATCAAGAAACGAGCCAGTGGCCGCAACACCAGAGGCTGAGGAGGATGTT 1187
S S T R S R N E P V A A T P E A E E D V
GATGTGCCGTGCACAAGTCCAAGGAAGAGACGGAGACGCTAAACGCGTTTACATCATC 1247
D V S V H K S K E E T E T L N A F H I I
GCGTTGTCTGAAGGTTTGTCTCTCGCCGTTGTTTCGAGGAGAAGAAGAAGAGGAGAAG 1307
A L S E G F D L S P L F E E K K K E E K
ATGGAGATGAGGTTTCGCGACTTCTAGGCCGCGAGTAGTGTGATATCGAGCCTTGAGGAG 1367
M E M R F A T S R P A S S V I S S L E E
GCGCGAAGGTTGGGAATAAGTTTGTGATGTGAGGAAGAGCGAGTGTAGAGTGAGGATCGAA 1427
A A K V G N K F D V R K S E C R V R I E
GGGAAACAGAATGGCCGGAAGGGAAGTTGGCGGTGGAGGCGGAGATATTCGCGGTGGCT 1487
G K Q N G R K G K L A V E A E I F A V A
CCGTCCGTTTGTGTCGTGGAGGTGAAGAAAGATCATGGGGACACGCTTGTGATAAATAC 1547
P S F V V V E V K K D H G D T L E Y N N
TTTTGTAGTACGGCTCTTAGACCAGCTCTCAAGGACATCTTCTGGACTTCTACTACCT 1607
F C S T A L R P A L K D I F W T S T P
GCTTGATTATTAGTATCTGTTTAAATCTTGTGTGTTTTTAATTCCTGTCTGTAATAATATT 1667
A
GTTGGGTTTCGTGATTCGGTTCCGGATTATTGTTCTTGATTCTTAAATGAGTATCGTTTGA 1727
ACTTTAAATCGTGTAAGGTTTCGAGTCTTTTCATCATTTGTGTATGTTTTGTGTCGTT 1787
GTTCCCGTTTTGTTGCGTCACGAAGCAGAGAATGTTTGTGTGGTGTGTGTTTCGTGCGGTG 1847

TTAGAAATTTAGAATCGTGTCTTAAAAATTCCTTACCAATAAATGATATTTATGACTCCT 2907
 CTTTGAGAATGTTCAAGGGTCGATGTTTATACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 2967
 AA 2969

(B)

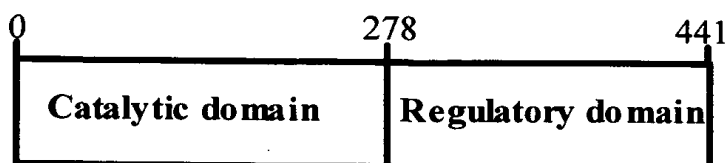


Figure 13. *Bnrd197* (GenBank accession number, AF319169) encodes a putative serine/threonine protein kinase.

(A) *Bnrd197* cDNA sequence and the conceptual translational product of its longest ORF. (B) Diagrammatic representation of BnRD197 structure.

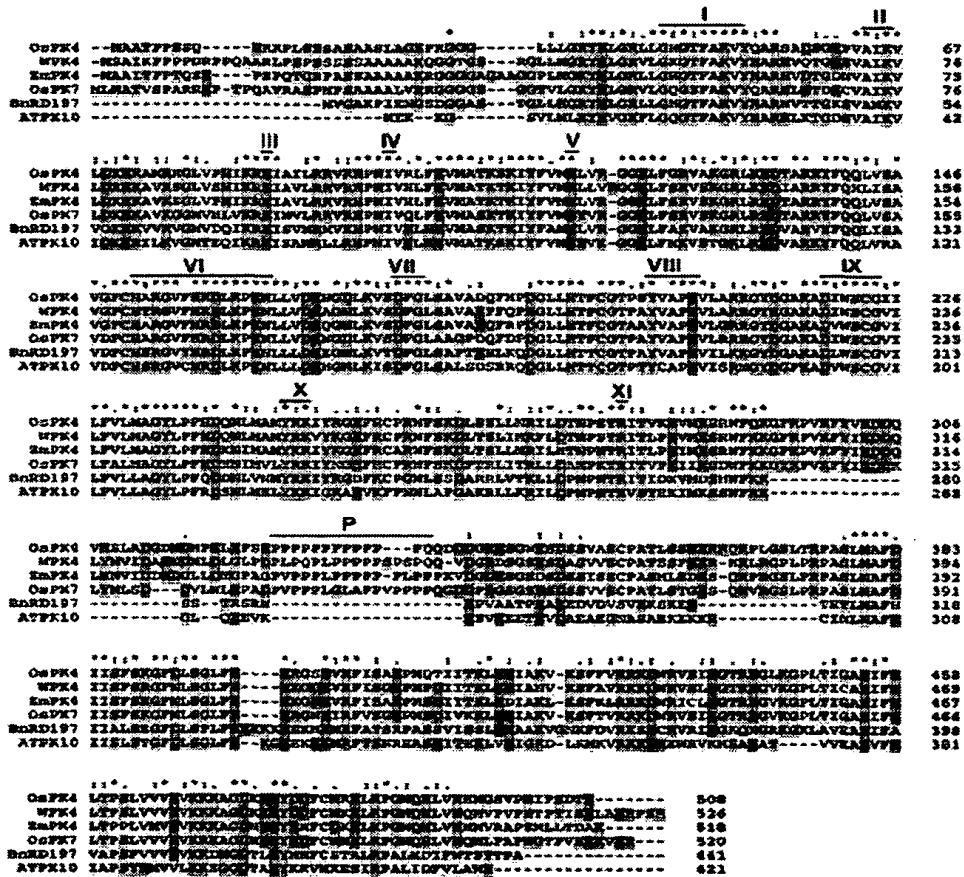


Figure 14. The alignment of the deduced amino acid sequence of BrRD197 and members of the SNF1-related protein kinase subfamily 3. Sequences are from maize (ZmPK4), rice (OsPK4 and OsPK7), wheat (WPK4) and *Arabidopsis* (ATPK10) protein kinases. The conserved catalytic subdomains of protein kinases are numbered by roman numerals (I-XI). The proline-rich region (P) is indicated by over-lines. The mature deduced amino acid sequences were aligned using the ClustalW software. Amino acids that are strictly conserved are indicated by the corresponding symbol (*).

BnRD197	MVDAKPIKNSQSDGASVOLLKQNTLGRLLGDTFARYTRASVYFQKSVAGKVAQKRYVYK-VQDVFQDICKRISVYK-N	78
CIPK6	MVDAKPIKNSQSDGASVOLLKQNTLGRLLGDTFARYTRASVYFQKSVAGKVAQKRYVYK-VQDVFQDICKRISVYK-N	78
CIPK2	-----K-PSVLLK-----MRELLDQOTFARYVIGKSKNTRMSEVAIKHIDKRYVYK-VQLSQDICKRISVYK-N	56
CIPK3	-----MRELLDQOTFARYVIGKSKNTRMSEVAIKHIDKRYVYK-VQLSQDICKRISVYK-N	54
CIPK4	---KQSEPTFK---SPEKIPOTVLLGRKLLKQDLSQSEFAKRYVYKASLSTFQGLVAIKHIDKRYVYK-VQDVFQDICKRISVYK-N	59
CIPK5	-----NCKRQ-----QVKKRNVKRYVYKASLSTFQGLVAIKHIDKRYVYK-VQDVFQDICKRISVYK-N	76
SOS2	-----NTRK-----N-RKRVKRYVYKASLSTFQGLVAIKHIDKRYVYK-VQDVFQDICKRISVYK-N	60
CIPK1	MVDAKPIKNSQSDGASVOLLKQNTLGRLLGDTFARYTRASVYFQKSVAGKVAQKRYVYK-VQDVFQDICKRISVYK-N	74
BnRD197	VKRPNI VLLKAVGASKTRISYFANGLVKQGLFARVAK-GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	157
CIPK6	VKRPNI VLLKAVGASKTRISYFANGLVKQGLFARVAK-GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	157
CIPK2	AKRPVVVLLKAVGASKTRISYFANGLVKQGLFARVAK-GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	145
CIPK3	VKRPNI VLLKAVGASKTRISYFANGLVKQGLFARVAK-GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	133
CIPK4	KDQKPVVLLKAVGASKTRISYFANGLVKQGLFARVAK-GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	156
CIPK5	VKRPNI VLLKAVGASKTRISYFANGLVKQGLFARVAK-GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	148
SOS2	VKRPNI VLLKAVGASKTRISYFANGLVKQGLFARVAK-GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	145
CIPK1	IKRPNI VLLKAVGASKTRISYFANGLVKQGLFARVAK-GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	154
BnRD197	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	237
CIPK6	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	237
CIPK2	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	225
CIPK3	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	213
CIPK4	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	226
CIPK5	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	238
SOS2	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	233
CIPK1	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	234
BnRD197	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	298
CIPK6	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	299
CIPK2	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	299
CIPK3	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	293
CIPK4	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	294
CIPK5	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	298
SOS2	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	293
CIPK1	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	293
BnRD197	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	374
CIPK6	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	378
CIPK2	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	372
CIPK3	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	357
CIPK4	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	354
CIPK5	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	370
SOS2	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	368
CIPK1	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	376
BnRD197	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	441
CIPK6	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	441
CIPK2	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	443
CIPK3	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	428
CIPK4	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	400
CIPK5	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	373
SOS2	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	429
CIPK1	GRLLKQAVAVYFQGLKSAVDFCSKQVYVYKRLKREKLLKREK	448
BnRD197	-----	441
CIPK6	-----	441
CIPK2	-----	448
CIPK3	-----	432
CIPK4	-----	400
CIPK5	-----	373
SOS2	-----	448
CIPK1	-----	448

Figure 15. Amino acid sequence alignment of BnRD197 and other *Arabidopsis* CIPKs.

CIPK1-6 and SOS2 are identical to gene products with the following GenBank accession numbers: AB022219, AF286050, AF286051, Z97336, AF285105, AF285106, and AF237670, respectively. The deduced amino acid sequences were aligned using the ClustalW software. Amino acids that are strictly conserved are indicated by the corresponding symbol (*).

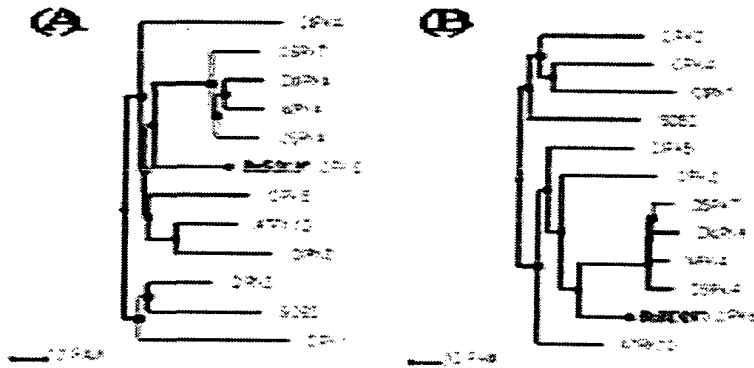


Figure 16. Phylogenetic tree (A) for subfamily proteins of SnRKs and CIPK proteins and phylogenetic tree (B) for the C-terminal region of these proteins.

The dendrogram shows BnRD197 protein is more similar to SnRK proteins than other CIPK proteins. It was constructed using the multiple alignment program MultiAlin from the web server (Corpet, 1988)

나. Water stress와 ABA 처리시 Bnr197 유전자의 transcription level

다양한 water-deficit stress와 스트레스 호르몬인 ABA에 대한 Bnr197 유전자의 transcription 발현 양상을 알아보기 위하여 northern hybridization을 수행하였다.

dehydration stress 조건에서는 dehydration stress 정도가 증가함에 따라 detached leaf의 Bnr197 mRNA 발현이 증가하는 것을 알 수 있었고 물에 둔 detached leaf와 non-stressed plant의 leaf에서 mRNA level이 비슷하였다 (figure 17). 유채 잎을 다양한 농도의 NaCl 용액 (0-400mM)에 1시간 동안 두었을 때는 농도가 증가함에 따라 Bnr197의 transcription level이 조금씩 증가하였고, 400mM NaCl 용액에 다양한 시간 (1-12hr)동안 두었을 때는 transcription이 점차로 증가하면서 3시간이 지나면서 최대점에 도달하였고 그 수준이 12시간 동안 유지되었다 (figure 18). 4주된 유채 plant에 cold stress를 주었을 때는 mRNA level이 점차로 증가하다가 6시간 시점에서 최대로 증가하고 그 이후 90 시간 incubation 시간동안 그 level이 유지되었다 (figure 19). 4주된 유채 plant에 heat stress를 주었을 때, 식물체가 점차로 시들어 들었는데 Bnr197 mRNA 축적 양상은 dehydration stress leaf에서와 비슷하였다 (figure 20). 유채의 detached leaf에 다양한 농도의 ABA를 24시간 동안 처리하였을 때와 1mM ABA를 다양한 시간동안 처리하였을 때는 Bnr197 mRNA level이 ABA 농도가 증감함에 따라 조금씩 높아지고 1mM ABA에서는 1시간 내에 그 축적이 최대점에 도달함을 알 수 있었다 (figure 21). 유채의 잎을 0.44M mannitol 용액에 두었을 때는 Bnr197 mRNA가 1시간 안에 최대점에 도달하고 그 이후 incubation 시간동안 그 수준이 유지되었다 (figure 22).

SnRK3 subfamily에 속하는 유전자들은 다양한 스트레스와 식물호르몬에 대해 각기 다양하게 반응하는데 Bnr197 유전자는 지금까지 조사된 SnRK3에 속

하는 유전자들과는 다르게 test된 모든 water-deficit stress와 스트레스 호르몬인 ABA에 의해 그 transcript가 축적됨을 알 수 있었다 (Table 2).

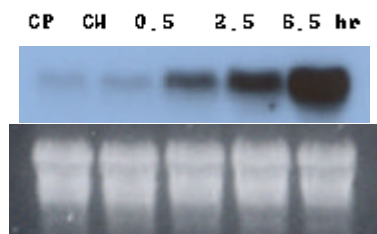


Figure 17. Expression of *BncD197* gene in response to dehydration stress. Dehydration treatment was carried out on detached expanding leaves. Leaves were removed from the plant and wilted to about 87% of their original fresh weight on the laboratory bench (at 25°C and 35% relative humidity) for 30min (lane 3) and then maintained in their wilted state in clear plastic bags for period of 2h (lane 4) and 6h (lane5). A leaf of non-stressed plant (CP) and a detached leaf placed in water for 6hr 30min (CH) were used as controls.

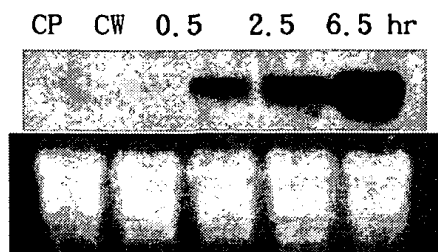


Figure 17. Expression of *Bnr197* gene in response to dehydration stress. Dehydration treatment was carried out on detached expanding leaves. Leaves were removed from the plant and wilted to about 87% of their original fresh weight on the laboratory bench (at 25oC and 35% relative humidity) for 30min (lane 3) and then maintained in their wilted state in clear plastic bags for period of 2h (lane 4) and 6h (lane5). A leaf of non-stressed plant (CP) and a detached leaf placed in water for 6hr 30min (CW) were used as controls.

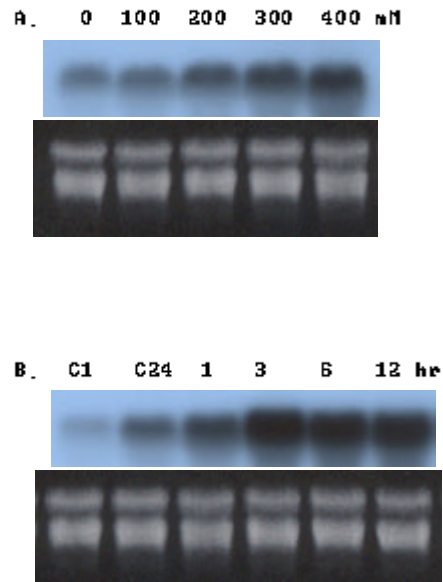
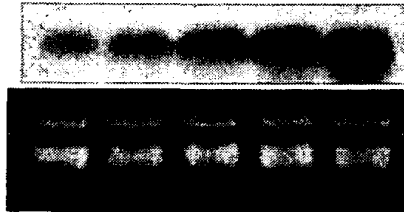


Figure 1B. Expression of the *SARD197* gene in response to salinity stress.

(A) Dose-response analysis of expression of the *SARD197* gene. Detached leaves were incubated in 0, 100, 200, 300, or 400 nM NaCl solution for 1hr.

(B) Time course of expression of the *SARD197* gene. Detached leaves were incubated in DH for 1 (C1) or 24 hr (C24), or 400 nM NaCl solution for 1, 3, 6, or 12hr under continuous light.

A. 0 100 200 300 400 mM



B. C1 C24 1 3 6 12 hr

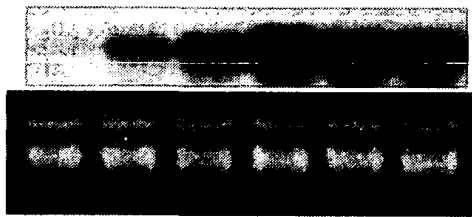


Figure 18. Expression of the *BnrD197* gene in response to salinity stress.

(A) Dose-response analysis of expression of the *BnrD197* gene. Detached leaves were incubated in 0, 100, 200, 300, or 400 mM NaCl solution for 1hr.

(B) Time course of expression of the *BnrD197* gene. Detached leaves were incubated in DW for 1 (C1) or 24 hr (C24), or 400 mM NaCl solution for 1, 3, 6, or 12hr under continuous light.

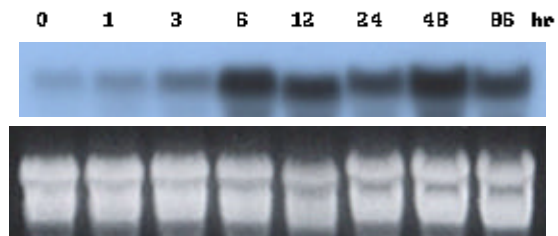


Figure 19. Expression of the *Bard197* gene in response to cold stress.

Four-week-old plants were exposed to 4°C under continuous light for 1, 3, 6, 12, 24, 48, or 96 he prior to analysis.

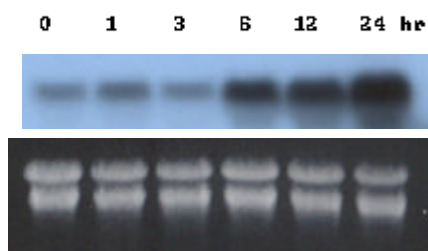


Figure 20. Expression of the *Bard197* gene in response to heat stress.

Four-week-old plants were exposed to 40°C under continuous light for 1, 3, 6, 12, or 24 he prior to analysis.

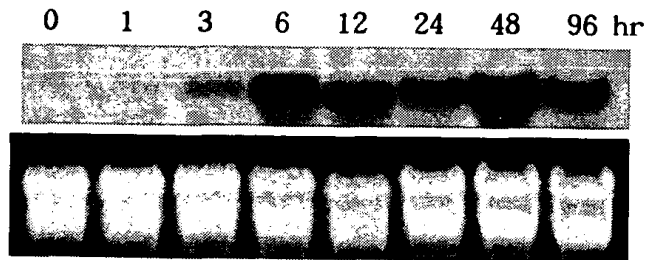


Figure 19. Expression of the *BnrD197* gene in response to cold stress. Four-week-old plants were exposed to 4°C under continuous light for 1, 3, 6, 12, 24, 48, or 96 hr prior to analysis.

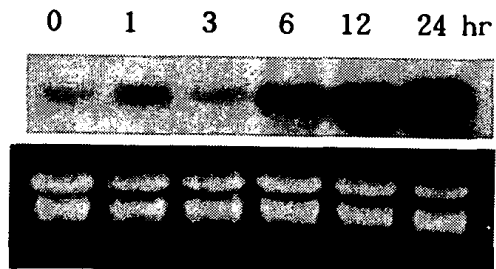
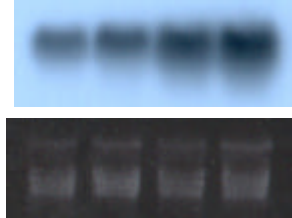


Figure 20. Expression of the *BnrD197* gene in response to heat stress. Four-week-old plants were exposed to 40°C under continuous light for 1, 3, 6, 12, or 24 hr prior to analysis.

(A) 0 50 100 1000 μ M



(B) C1 1 3 6 12 24 C24

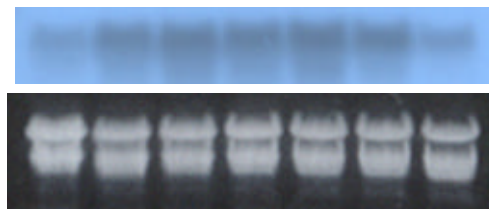


Figure 21. Expression of the *SARD197* gene in response to abscisic acid.

(A) Dose-response analysis of expression of the *SARD197* gene. Detached leaves were incubated in 0, 50, 100, or 1000 μ M ABA solution for 24hr.

(B) Time course of expression of the *SARD197* gene. Detached leaves were incubated in DH for 1 (C1) or 24 hr (C24), or 1 μ M ABA solution for 1, 3, 6, 12 or 24 hr under continuous light.

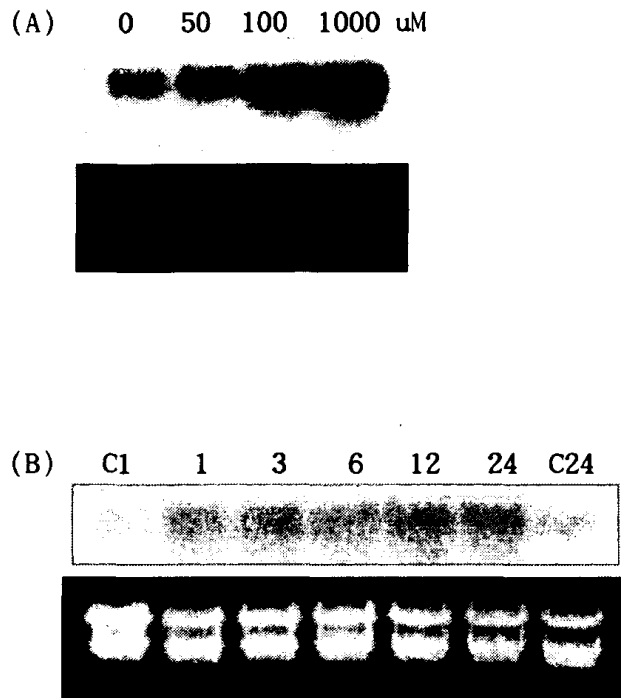


Figure 21. Expression of the *BnrD197* gene in response to abscisic acid.

(A) Dose-response analysis of expression of the *BnrD197* gene. Detached leaves were incubated in 0, 50, 100, or 1000 μ M ABA solution for 24hr.

(B) Time course of expression of the *BnrD197* gene. Detached leaves were incubated in DW for 1 (C1) or 24 hr (C24), or 1 mM ABA solution for 1, 3, 6, 12 or 24 hr under continuous light.

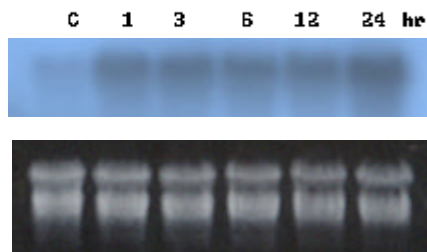
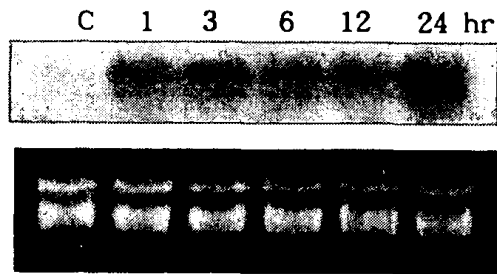


Figure 22. Expression of the *SARD197* gene in response to osmotic stress.

Detached leaves were incubated in DM for 3hr (C), or 0.44M mannitol solution for 1, 3, 6, 12, or 24 hr under continuous light.



aFigure 22. Expression of the *Bnr197* gene in response to osmotic stress.

Detached leaves were incubated in DW for 3hr (C), or 0.44M mannitol solution for 1, 3, 6, 12, or 24 hr under continuous light.

다. Bnr197 유전자의 발현에 있어서 light, nutrient 및 다양한 phytohormone의 영향

Bnr197 유전자의 아미노산 서열은 SnRK3 (subfamily3 SNF1-related protein kinase)의 아미노산 서열과 유사성이 높았다. SnRK3 유전자들은 다양한 스트레스와 호르몬에 의해서 각기 다양하게 반응하는데, wheat의 WPK4와 rice의 OsPK4의 유전자는 light와 nutrient deprivation에 의해 발현되고 여러 식물 호르몬중 BA에 의해서만 발현된다.

Bnr197 유전자의 발현에 대한 다양한 식물 호르몬의 영향을 알아보기 위해 유체의 detached leaf에 N6-benzylaminopurine (BA), 1-naphthaleneacetic acid (NAA), abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA)와 gibberellic acid A3 (GA)을 처리하여 Bnr197 유전자의 transcription level을 northern hybridization 분석으로 조사하였다. Bnr197 유전자의 발현은 BA와 ABA에 의해 분명히 증가하는 것을 보이고 있으며, 이들 처리중 ABA가 Bnr197 유전자 발현을 가장 많이 시키고 있음을 보이고 있다 (Figure 23). SnRK3 유전자들 중 지금까지 실험된 어떠한 유전자들 (WPK4, OsPK4, ZmPK4와 OsPK7)도 ABA에 의해 그 발현이 증가된다는 보고는 없었다 (Table 2).

Light와 nutrient deprivation에 의한 Bnr197 유전자의 발현양상도 northern hybridization 분석으로 조사하였는데 (figure 24), Bnr197 유전자의 transcript level은 nutrient에 의해서는 영향이 없었으나, 암처리를 하였을 때 증가하는 양상을 보였다. 이는 WPK4와 OsPK4와는 반대되는 양상이다 (Table 2).

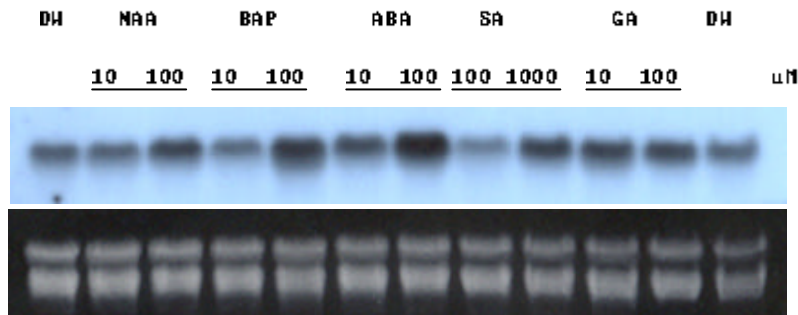


Figure 23. Expression of the *Bard197* gene in response to various phytohormones.

Detached leaves were incubated in DH (lane 1, lane12), or NAA, BAP, ABA, SA or GA solution of indicated concentrations for 24hr under continuous light.

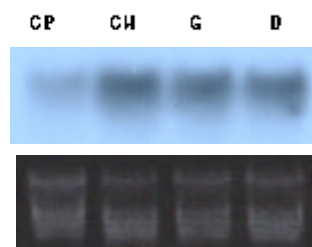


Figure 24. Expression of the *Bard197* gene in response to light and nutrient.

Six-week-old plants were transferred into the dark for 66hr (D) and detached leaves of other plant were incubated in DH containing 0.5% glucose for 24hr under the continuous light (G). A leaf of light-grown plant (CP) and a detached leaf placed in water for 24 hr under continuous light (CH) were used as controls.

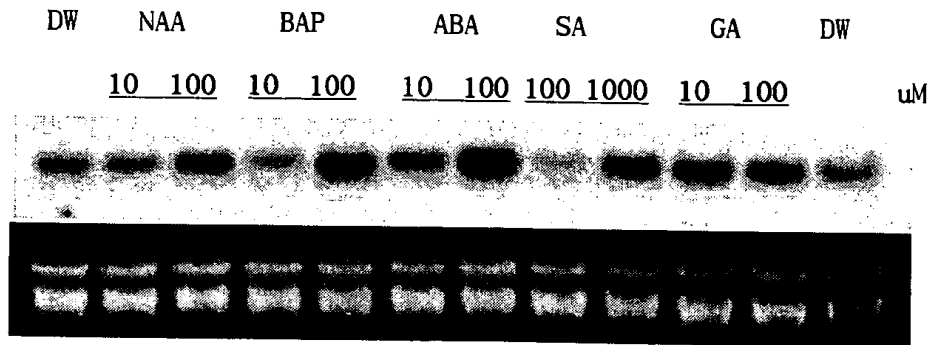


Figure 23. Expression of the *BnrD197* gene in response to various phytohormones.

Detached leaves were incubated in DW (lane 1, lane 12), or NAA, BAP, ABA, SA or GA solution of indicated concentrations for 24hr under continuous light.

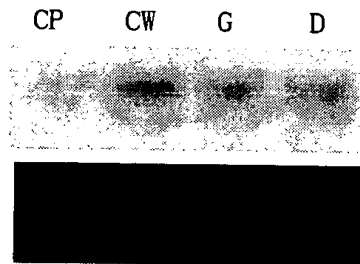


Figure 24. Expression of the *BnrD197* gene in response to light and nutrient.

Six-week-old plants were transferred into the dark for 66hr (D) and detached leaves of other plant were incubated in DW containing 0.6% glucose for 24hr under the continuous light (G). A leaf of light-grown plant (CP) and a detached leaf placed in water for 24 hr under continuous light (CW) were used as controls.

Table 2. Summary of findings for transcript accumulation of *BnRD197* and other *SnRK3s*.

Condition	Gene ^a				
	BnRD197	WPK4 ^b	OsPK4 ^b	OSPK7 ^b	ZmPK4 ^b
Localization					
Root	nt	-	+	-	+
Leaf	+	+	+	±	+
Stresses					
Light	*	+	++	-	-
Nutrient	-	++	+	-	-
Cold	++	++	-	-	+
Drought	++	-	-	-	-
Salt	++	nt	-	-	-
Hormones					
ABA	++	-	-	-	-
BA	+	+	+	-	-
NAA	-	-	-	nt	-
GA	-	-	-	nt	-

^aTranscripts present or induced (+), absent or unaffected (-), not tested (nt), downregulated (*).

^bData from Sano and Youssefian (1994), Ikeda *et al.* (1999) and Ohba *et al.* (2000).

라. BnRD197 protein 과 AtCBL (Arabidopsis calcineurin B-like Ca²⁺ binding protein)의 interaction.

BnRD197 아미노산 서열은 SnRKs와 CIPK (CBL-interaction protein kinase)의 아미노산 서열과 유사성이 높았는데, 최근 보고에 의하면 Arabidopsis의 CIPK1 (AtCIPK1)이 AtCBL1, AtCBL3, 와 AtCBL4와 특이적으로 interaction을 하나 다른 Ca²⁺ binding protein인 calmodulin과는 interaction을 하지 않는다는 보고가 있다. BnRD197 단백질도 CBL과 특이적으로 interaction을 하는지 조사하기 위해 GenBank에 등록된 유전자 서열을 참조하여 Arabidopsis에서 AtCBL1, AtCBL2, AtCBL3, AtCBL4, AtCBL5, AtCBL7, AtCBL8 및 calmodulin (CaM7)의 유전자와 유체에서 calmodulin 유전자 (BCM1)을 RT-PCR을 통하여 cloning 한 후 이들의 단백질과 BnRD197 단백질과의 interaction을 yeast two hybridization을 통하여 조사하였다. 그 결과 BnRD197 단백질은 AtCBL1, AtCBL2, AtCBL3 및 AtCBL4와는 interaction을 하나 다른 AtCBL5, AtCBL7, AtCBL8과 2개의 calmodulin과는 interaction을 하지 않음을 보였다 (Figure 25).

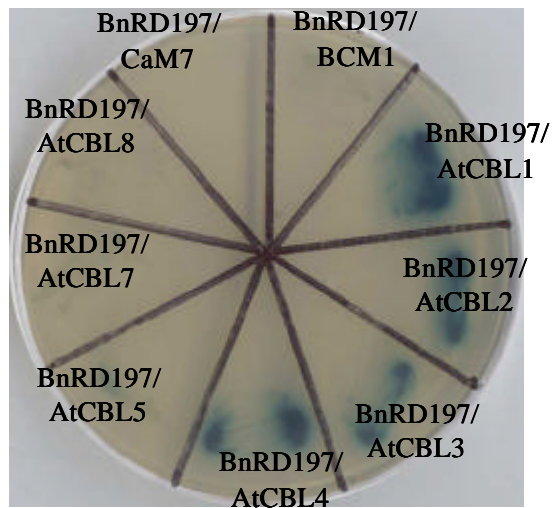


Figure 25. Interactions between BnRD197 and BCM1 (*Brassica napus* calmodulin), CaM7 (*Arabidopsis thaliana* calmodulin), AtCBL1, AtCBL2, AtCBL3, AtCBL4 (SDS3), AtCBL5 AtCBL7, or AtCBL8 (*Arabidopsis thaliana* calcineurin B-like Ca²⁺ binding protein) in the yeast two-hybrid assay. EGY48[pBop-lacZ] strains containing pLexBnrd197 and pBDBCM1, pBDCaM7, pBDCBL1, pBDCBL2, pBDCBL3, pBDCBL4 pBDCBL5, pBDCBL7, or pBDCBL8 respectively, smeared on selection medium which is SD/Gal/Raf medium (minus uracil, histidine, tryptophan and leucine) containing X-gal and BU salts to determine the expression of the nutritional reporter gene *lacZ* and other reporter gene *lacZ*.

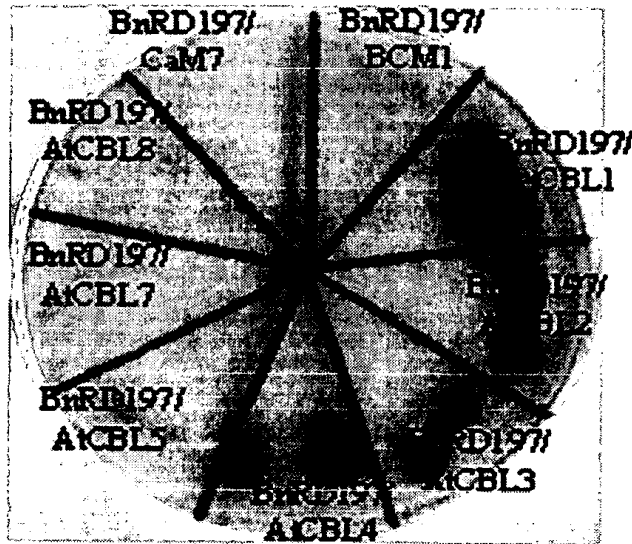


Figure 25. Interactions between BnRD197 and BCM1 (*Brassica napus* calmodulin), CaM7 (*Arabidopsis thaliana* calmodulin), AtCBL1, AtCBL2, AtCBL3, AtCBL4 (SOS3), AtCBL5 AtCBL7, or AtCBL8 (*Arabidopsis thaliana* calcineurin B-like Ca²⁺ binding protein) in the yeast two-hybrid assay. EGY48[p8op-lacZ] strains containing pLexBnrd197 and pBDBCMI, pBDCaM7, pBDCBL1, pBDCBL2, pBDCBL3, pBDCBL4 pBDCBL5, pBDCBL7, or pBDCBL8 respectively, smeared on selection medium which is SD/Gal/Raf medium (minus uracil, histidine, triptophan and leucine) containing X-gal and BU salts to determine the expression of the nutritional reporter gene *leu2* and other reporter gene *lacZ*.

9. Bnrd209 유전자 분석

가. Bnrd209의 염기서열 및 아미노산서열 분석

Bnrd 209 cDNA는 1979 bp로 구성되어 있고 569개의 아미노산을 암호화하고 있으며 계산된 분자량은 63.8 kDa이고 추정된 pI는 5.52이다. 그리고 Bnrd209 아미노산 서열내에는 모든 β -amylase에서 보존되는 2개의 motif가 존재하는데 figure 26에 그 site가 표시되었다. Bnrd209의 protein (BN-BMY) 서열은 extrachloroplasmic β -amylase와 chloroplasmic β -amylase (figure 27)과 유사성이 있으나 PROSITE library 의 motif search로부터 Bnrd209 단백질의 N-terminal에는 chloroplast-targeting signal이 존재하는 것으로 추정되었고 이 signal의 cleavage site 는 74와 75 아미노산 residue 사이로 추정되었다.

```

AAA GTC AAA GGT TGT GAA TGA AAT AGA GGG AAG GAA TTT GTT ATC GGA ACG AAG GTT TTT AAT TTC TGG AGA AAA TTC GGA GAA GAA AAG 82
M 1
GGG TTT AAT GAA ACG GAT CAG CTC GGA GGT CCG GCG GGA ACT CCG AUC AAG TCA GCG GAA ATG ACC GGA GGA TGG GCG GAA TGG TGG GAA 182
A P N L T H Q L G A L A G T P I K S G E M T A P S A E S S L 31
TGG GTT TGT GCA CCG TGG GCG AAG AAG CTT AAT TGG ATG AAG ATG AAT TGC ACC TGG AAG AGA AAG GAA TGT CCG GCG ATG ACT CCG GTC 272
S V S P P S A R M P I S M N M N Y T S N R N V S P P M S P V 81
TTC GAA TGG AAG GGA GCG GAT CTC TCG GCG GCG TGT AAA GCG TTC CCG GCG GAG ACA GTG GAG GAG CAG ACG ACG TAC AAG GAA GAA GCG 382
L G S R R A D L S V A C K A P A V E T V E E Q R T Y K E G G 81
ATC GAA GAA GAG AAA GGG AAG GGA GAA GAT GAT GTC TTC GTC ATG AHA CCG GTC GAT AAG GTC ACG AHA GCG AAG ACT GTC AAG CCG AAG 482
I G G E K G K G G V P V P V M I P L D S V T I G N T V N R R 121
AAG CCG AUC AGA GCG ACT CTC CAG CCG TGG AAG ACT GCT GCT GTT GAA GCG AUC ATG AUC GAT GTC TGG TGG GGT TTC GTC GAG AAG GAG 582
K A M R A S L Q A L K S A G V E G I M I D V W W G L V E R E 151
GCT CTT GCG GCT TAT AAG TGG GAA GAT TAT AAT GAA CCG GTT CAG AUC GCG AAG AAG GTT GAA GTT AAG GTC CAG GCT GTT AUC TGG TTT 682
A P G A Y N W G G Y P V P V M I P L D S V T I G N T V N R R 181
GAT CAG TGT GAT GCT AAG GTT GAT GAG TGT GTC ACT AAT GCT TTC CTT CAG TGG GTT GTT GAA GAG GTT CAG AAG GAT GGA GAG GTT GAA 722
H Q G G G N V G D S V T I P L P Q W V V E E V D K D P D L A 211
TAT ACT GAT CAG TGG GGA AGA AAG AAG CAG GAA GAT AHA TGA GTT GCG GCT GAT ACA CTC GGA GTT CCG AAA GGT AGA AGA CCG GTC GAA 812
Y T D Q W G R R N H E H I S L L G A D T L P V L K G R T P V Q 281
TGG TAT TGG GAT TTC ATG GCT GCT TGG AGA GAG AAG TGG AAG GAT GCT GTC GAA GAG ACC AAT GTC GAA AUC GAA GTC GGA ATG GGA GAA 882
G Y S D F M R A P R D N P K H L L G D T I V E I Q V G M G P 271
GGA GAA GAG GTC GCT TAC GCT TCA TAC CCG GAG GAA GAG GGA GAT GAG GTT CCG AAG GAT TGG ACG GTT GGA GTC GGA GAA GAG TCA 882
A G E L R Y F S Y P E Q D G H E V P R D W S L P V L R Q D S 301
TGA ACG ACG TGG AAA GGA GGA GAT GAA GAT TGG GAG AAG GGA GAG TGG GGT GCG ACT GCG GGA ACC GAT GCT GGT GAG TAC AAT AAG TGG 1082
L S S L K A A A E A Y G K P E W G G T G P T D A G H Y N N W 381
GGA GAA GAG ACT CAG TTC TTC AAA AAA GAA GAG GGT GGT TGG AAG AHA GAA TGC GAA GAT TTC TTC CCG AHA TGG TAT TCG CAG ATG TTC 1172
P E D T Q F P K K E D G G W N T E Y G D P P L T W Y S Q M L 381
CTG GAT GAT GCG GAG GGT AUC GTT TCG TCA GCG AAA TGG AHA TTC GAA GAG ACG GGT GTC AAA AHA TCA GTC AAA GTC GCT GGA ATG CAG 1282
L D H G E R I L S S A K S I P Q D T G V K I S V K V A G I H 381
TGG GAT TAC GCG AGA GCG TGT CAG CCG CTT GAG CTC AGA GGA GGA TAC TAC AAG ACT AAG TTC AGA GAG GAA TAC GTT CCG ATG GCT GAA 1382
W H Y G T R S H A P E L T A G Y Y N T R P R D G Y L P I A Q 421
ATG GAA CCG AHA GAG AAG CCG AHA TGG AAG TGC ACC TGT ATG GAG AUC AHA GAG CAG CAG CCG CTT GAA GAT GCG GTT TGT GGA GGA GAG 1482
M L A R H N A I P N P T C I E M R D H E Q P Q D A L G A P E 451
AAG GAA GTC AAG CAG GTC GCT GAA GAT ACT GAA GCT GGA GAA GTT CTT GAA GCT GAT GAA AAG GAA TGG CCG ACG TAT GAA GAG TAC GCG 1582
K L V N Q V A L A T L A A E V P L A G E N A L P R Y E D Y A 481
CAG CAG CAG AUC CTC AAG CCG TGT CCG CAG ACG TTT GAT CAG AAG ACG GAG GAA GAA AAG AGA GAG AUC TGT CCG TTT ACT TAC CTC AAG 1822
H E Q I L K A S A L S P D Q N S E G E N R E M G A P T Y L R 511
ATG AAT CCG GAG CTC TTT AAG CCG GAG AAT TGG GCG AAG TTT GAA GCG TTT GTC AAG AAA ATG GCT GAA GCG AHA GAG TGT GAT AAG TGT 1712
M N P E L F K A D N W G K P V G F V K K M G E G R D S D R C 581
GCG GAA GAA GTC GAG GCT GAA GCT GAA CAG TTT GTC GAT GAT ACT CAG CCG GTC GTT GAA GAA GCT GAA GTC GCT CTC ACT CAG TAC AAA 1802
R E E V E R E A E H P V H V T Q P L V Q E A A V A L T H = 588
GAG CCG CCG AAT AUC GAA TGG TTC CAG CCG AUC GTT TAT GTT GCT AAG GAA TGT AAT GAA AAG AAT AAT AUC AUC AUC AUC CCG AAA AGA TGT 1882
TGA GCG TAA GGT TGT GAA TGT AUC GCG GCT AHA AAA AAT GAT AUC GCG GAT ACG TGT GAT TTT TTT TGG TCA GCG TTC TGG GCT TTC 1878

```

Figure 26. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *Bard209* gene.

Two motifs that are conserved in all β -amylase are boxed in gray.


```

AAA CTC AAA CCT TCT GAA TCA AAT AGA GGG AAC CAA TTT GTT ATC GTA ACG ATC GTT TTT ATT TTC TCG AGA AAA TTC GCA GAA GAA ATG 92
M 1
CGG TTT AAT CTA ACG CAT CAG CTC GGA CCT CTC CCC GGA ACT CCG ATC AAG TCA GCC GAA ATG ACC GCA CCA TCG CCC GAA TCG TCG CTA 182
A F N L T H Q L G A L A G T P I K S G E M T A P S A E S S L 31
TCC GTT TCT CCA CCG TCG GCG AGG ATG CCT ATA TCG ATG AAC ATG AAT TAC ACC TCG AAC AGA AAC GTA TCT CCG CCG ATG AGT CCG GTC 272
S V S P P S A R M P I S M N M N Y T S N R N V S P P M S P V 61
TTG GCA TCG AGG CGA CCG GAT CTG TCC GIG GCG TGT AAA CCC TTC CCG GTG GAG ACA GTG GAG GAG CAG AGG CCG TAC AAG GAA GGA CCG 362
L G S R R A D L S V A C K A F A V E T V E E Q R T Y K E G G 91
ATC GGA GGA GAG AAA GCG AAG GGA GGA GTT CCT GTG TTC GTG ATG ATA CCG CTT GAT AGC GTG ACG ATA GCG AAC ACT GTG AAC CCG AGG 482
I G G E K G K G G V P V F V M I P L D S V T I G N T V N R R 121
AAG CCG ATG AGA CCG AGT CTC CAG CCG TTG AAG AGT CCT GGT GTT GAA GCG ATC ATG ATC GAT GIG TCG TCG CGT TTG GIG CAG AGG GAG 542
K A M R A S L Q A L K S A G V E G I M I D V W W G L V E R E 151
CCT CCT CCG CCT TAT AAC TCG GGA CGT TAT AAT GAA CTG CTT GAG ATG CCG AAG AGT GGA CTT AAG GTG CAG CCT GTT ATG TCG TTT 632
A P G A Y N W G G Y N E L L E M A K K V G L K V Q A V M S F 181
CAT CAG TGT GGT GGT AAC GTT GGT GAC TCT GTC ACT ATT CCT TTG CCT CAG TCG GTT GTT GAA GAG GTT GAC AAG GAT CCA GAC CTT CCA 722
S V T I P L P Q W V V E E V D K D P D L A 211
TAT ACT GAT CAG TCG GGA AGA ACG AAC CAC GAA CAT ATA TCA CTT CCC CCT GAT ACA CTC CCA GTT CTC AAA CGT AGA ACA CCC GTG CAA 812
Y T D Q W G R R N H E H I S L G A D T L P V L K G R T P V Q 241
TCC TAT TCC GAT TTC ATG CGT CCT TTC AGA GAC AAC TTC AAG CAT CTT CTT GGA GAC ACC ATT GTG GAA ATC CAA GTG GGA ATG GGA CCA 902
C Y S D F M R A F R D N F K H L L G D T I V E I Q V 271
GCA GGA GAG CTG CGT TAC CCT TCA TAC CCC GAG CAA GAC GGA CAT GAG GTT CCC AGG GAT TCG ACC CTT CCA GTG CTA GGA CAA GAC TCA 992
S Y P E Q D G H E V P R D W S L P V L R Q D S 301
TTA ACC ACC TTG AAA GCA GCA CCT GAA CCT TAT GGG AAG CCA GAG TCG GGT CCC ACT CCC CCA ACC GAT CCT CGT CAC TAC AAT AAC TCG 1082
L S S L K A A A E A Y G K P E W G G T G P T D A G H Y N N W 331
CCA GAA GAC ACT CAG TTC TTC AAA AAA GAA GAC GGT GGT TCG AAC ACA GAA TAT GGA GAT TTC TTC CTC ACA TCG TAT TCC CAG ATG TTG 1172
P E D T Q F F K K E D G G W N T E Y G D F F L T W Y S Q M L 361
CTG GAT CAT GGC CAG CGT ATC CTT TCC TCA CCC AAA TCG ATA TTC CAA GAC ACG GGT GTC AAA ATA TCA GTC AAA GTC CCT GGA ATC CAC 1262
L D H G E R I L S S A K S I F Q D T G V K I S V K V A G I H 391
TGG CAT TAC GGG ACA CCC TCT CAC GCC CCT GAG CTC ACA GGA GGA TAC TAC AAC ACT ACG TTC AGA GAC GGA TAC CTT CCG ATC CCT CAA 1362
W H Y G T R S H A P E L T A G Y Y N T R F R D G Y L P I A Q 421
ATG CTA GCC AGA CAC AAC GCC ATA TTC AAC TTC ACC TGT ATC GAG ATG AGA GAC CAC GAG CAG CCT CAA GAT CCG CTT TGT GCA CCA GAG 1442
M L A R H N A I F N F T C I E M R D H E Q P Q D A L C A P E 451
AAG CTA GTG AAC CAG GTG CCT CTA CCT ACT CTA GCT GCA GAA GTT CCT CTA GCT GGT GAA AAC GCA TTG CCT AGG TAT GAA GAC TAC CCG 1532
K L V N Q V A L A T L A A E V P L A G E N A L P R Y E D Y A 481
CAC GAG CAG ATC CTC AAG GCG TCT CCG CTG ACC TTT GAT CAG AAC ACG GAG GGA GAA AAC AGA GAG ATG TGT CCG TTT ACT TAC CTG AGG 1622
H E Q I L K A S A L S F D Q N S E G E N R E M C A F T Y L R 511
ATG AAT CCG GAG CTG TTT AAG CCG GAC AAT TGG CCG AAG TTT GTA CCG TTT GTG AAG AAA ATG CGT GAA CCG AGA GAC TCT GAT ACG TGT 1712
M N P E L F K A D N W G K F V G F V K K M G E G R D S D R C 541
CCG GAA GAA GTG CAG CGT GAA CCT GAA CAC TTT GTG CAT GTT ACT CAG CCG CTG GTT CAA GAA CCT GCA GTG CCT CTC ACT CAC TAG AAA 1802
R E E V E R E A E H F V H V T Q P L V Q E A A V A L T H * 589
GAG CCC GCG ATT ATG GTA TGG TTC CAC CCC ATG GTT TAT GTT CGT AAG CGA TGT AAT GTA ACG ATT ATT ATG ATG ATG CCG AAA AGA TGT 1882
TTA GCC TAA GGT TGT GTA TGT ATC CCC GGT ATA AAA AAT GAT ATG GCC CAT ACC TGT GGT TTT TTT TGG TCA GCG TTG TCG CGT TTG 1979

```

Figure 26. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *Bnrd203* gene.

Two motifs that are conserved in all β -amylase are boxed in gray.

나. 여러 가지 스트레스에 대한 Bnr209 유전자의 transcription level

다양한 water-deficit stress와 stress hormone인 ABA에 대한 Bnr209 유전자의 transcription 양상을 알아보기 위하여 northern hybridization을 수행하였다. dehydration stress 조건에서 detached leaf에서 Bnr209 transcript는 30분 내에 매우 높게 induction 되었다가 점차로 감소하였다 (figure 28). 유채 잎을 250mM NaCl 용액에 다양한 시간 동안 두었을 때는 Bnr209 transcription이 점차로 증가하면서 3시간이 지나면서 최대점에 도달하였다가 다시 감소하고 24시간이 되었을 때 다시 증가하였다 (figure 29). 4주된 유채 plant에 cold stress를 주었을 때는 mRNA level이 점차로 증가하다가 12시간 시점에서 최대로 증가하고 그 이후 조금 감소하는 양상을 보였다 (figure 30). 4주된 유채 plant에 heat stress를 주었을 때 Bnr209 mRNA 측정 양상도 시간에 따라 fluctuation 되는 양상을 보였다 (figure 31). 유채의 detached leaf에 1mM ABA를 다양한 시간동안 처리하였을 때도 마찬가지로 Bnr197 mRNA level이 시간에 따라 fluctuation 되는 양상을 보였다 (figure 32). 유채의 잎을 0.44M (8%) mannitol 용액에 두었을 때에도 Bnr209 mRNA가 1시간 안에 급격히 최대점에 도달하고 그 이후 급격히 감소하다가 24시간 되었을 때 다시 급격히 증가하였으나 detached leaf을 DW에 처리하였을 때는 1시간과 24시간 시점에서 Bnr209 mRNA가 전혀 induction되지 않았다 (figure 33).

최근에 sweet potato의 petiole에서 beta-amylase가 5% sucrose를 처리하였을 때 induction 되나 5% mannitol과 sorbitol에서는 induction 되지 않는다는 보고가 있는데, detached leaf에 5% sucrose와 5% mannitol을 처리하였을 때 모두 시간에 따라 fluctuation 되는 양상을 보였다 (figure 34와 35). 이 결과와 figure 33 결과를 비교해 볼 때 Bnr209 유전자는 분명히 osmotic stress에 반응함을 알 수 있다. 위에서 조사된 모든 water-deficit stress,

ABA 및 sucrose 처리에 대해 Bnr197 유전자의 mRNA 축적양상은 시간에 따라 fluctuation되는 양상을 보이고 있다 (figure 36). 이는 최초로 water 스트레스에 발현되고 chloroplast target 되는 β -amylase의 유전자를 characterization 한 것이다.

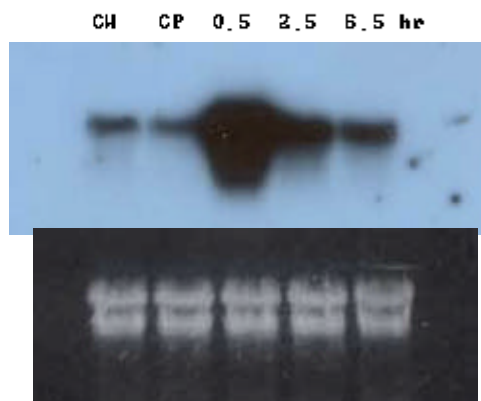


Figure 2B. Induction hn20B gene in response to dehydration

Dehydration treatment was carried out on detached, expanding leaves. Leaves were removed from the plant and wilted to 87% of their original fresh weight on the laboratory bench (at 25°C and 35% relative humidity) for 30min (lane 3) and then maintained in their wilted state in clear plastic bags for period of 2h (lane 4) and 6h (lane5).

CH: detached leaf in water for 6hr, CP: leaf of non-stressed plant

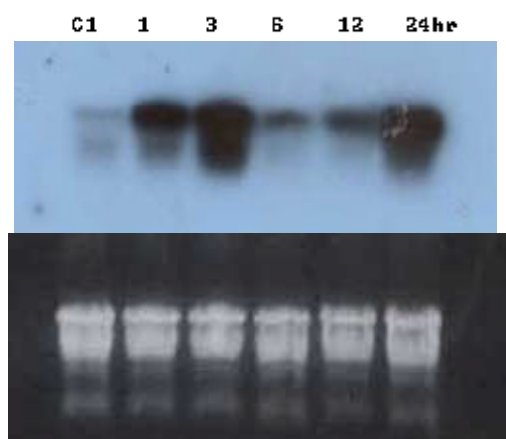


Figure 2B. Induction hn20B gene in response to Salt stress in NaCl solution

Detached leaves were incubated in DW for 1 hr (C1), or 250mM NaCl solution for 1, 3, 6, 12, 24hr under continuous light.

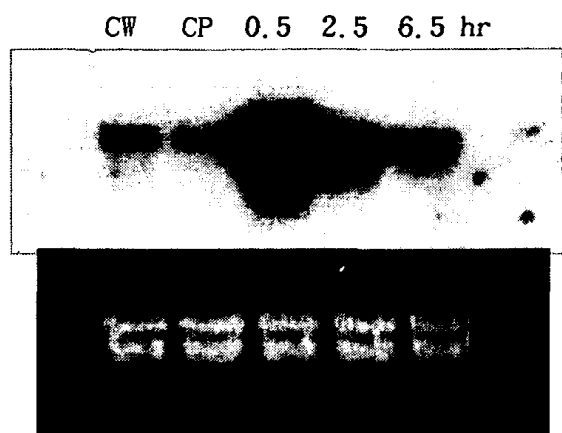


Figure 28. Induction bn209 gene in response to dehydration

Dehydration treatment was carried out on detached, expanding leaves. Leaves were removed from the plant and wilted to 87% of their original fresh weight on the laboratory bench (at 25°C and 35% relative humidity) for 30min (lane 3) and then maintained in their wilted state in clear plastic bags for period of 2h (lane 4) and 6h (lane5).

CW: detached leaf in water for 6hr, CP: leaf of non-stressed plant

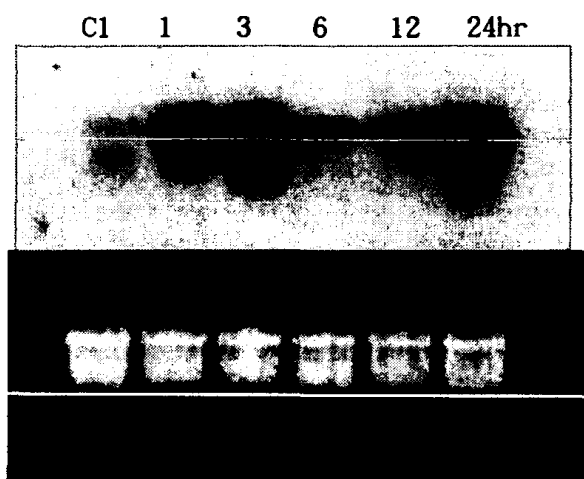


Figure 29. Induction bn209 gene in response to Salt stress in NaCl solution

Detached leaves were incubated in DW for 1 hr (C1), or 250mM NaCl solution for 1, 3, 6, 12, 24hr under continuous light.

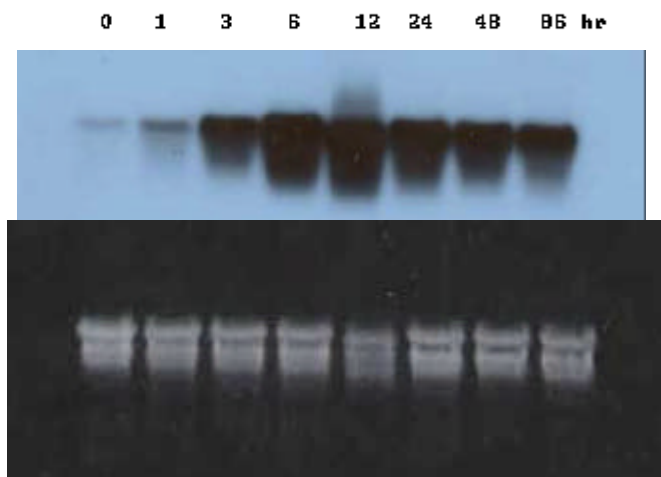


Figure 30. Induction bn208 gene in response to cold stress

Four-week-old plants were exposed to 4°C under continuous light for various periods of time prior to analysis.

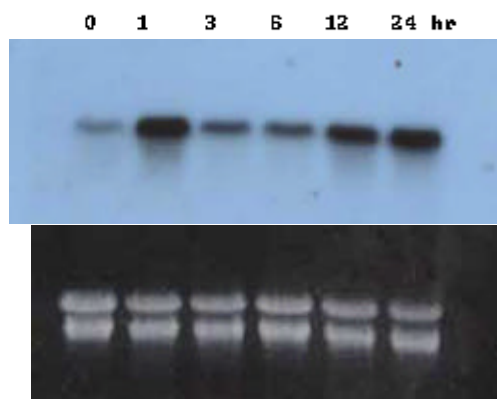


Figure 31. Induction bn208 gene in response to Heat stress

Four-week-old plants were exposed to 40°C under continuous light for various periods of time prior to analysis.

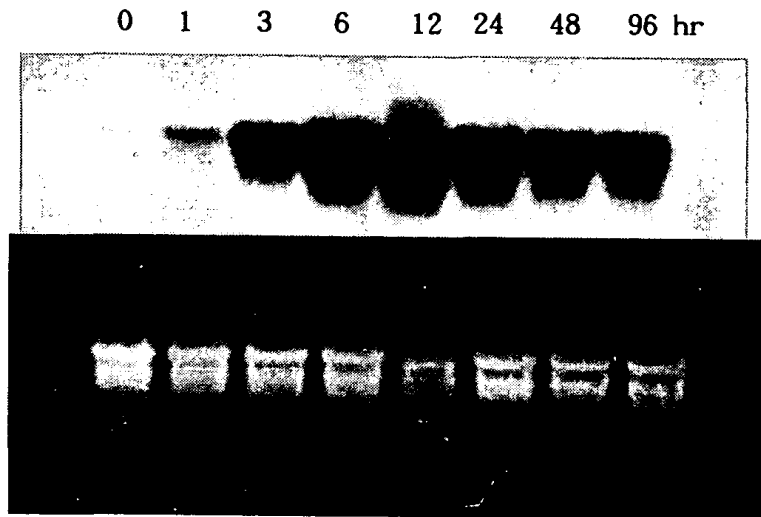


Figure 30. Induction bn209 gene in response to cold stress
 Four-week-old plants were exposed to 4°C under continuous light for various periods of time prior to analysis.

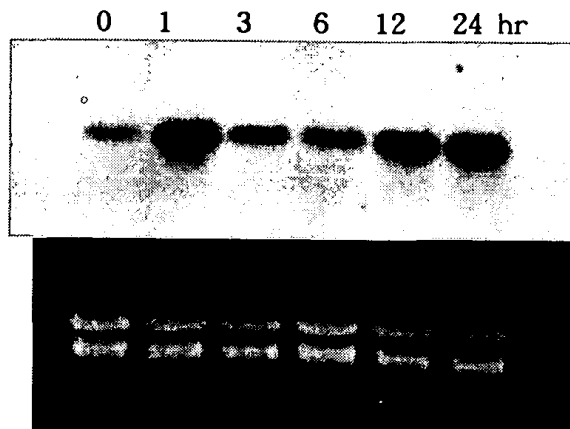


Figure 31. Induction bn209 gene in response to Heat stress
 Four-week-old plants were exposed to 40°C under continuous light for various periods of time prior to analysis.

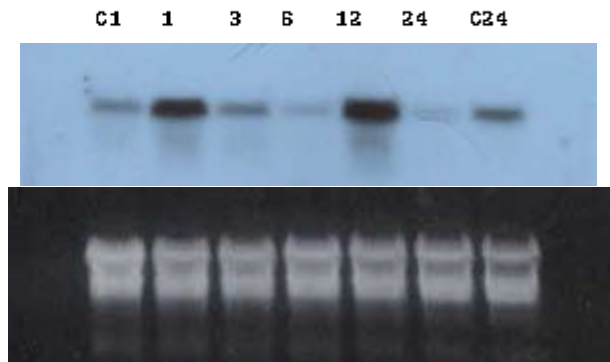


Figure 32. Expression of the bn209 gene in response to abscisic acid
 Detached leaves were incubated in DM for 1 (C1) or 24 hr (C24), or 1 mM ABA solution for 1, 3, 6, 12 or 24 under continuous light.

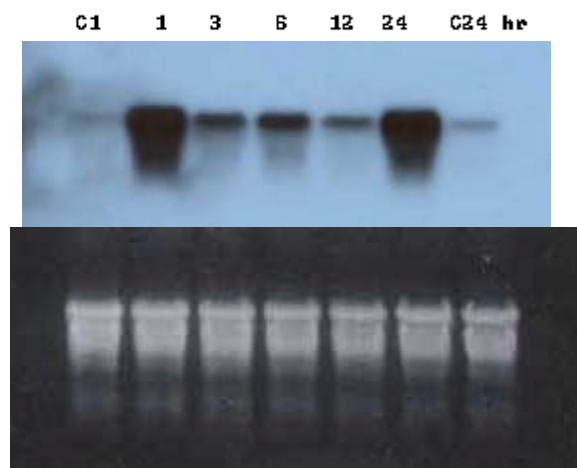


Figure 33. Expression of the bn209 gene in response to osmotic stress.
 Detached leaves were incubated in DM for 1 (C1) or 24hr (C24), or 0.44 M (8%) mannitol solution for 1, 3, 6, 12 or 24hr under continuous light.

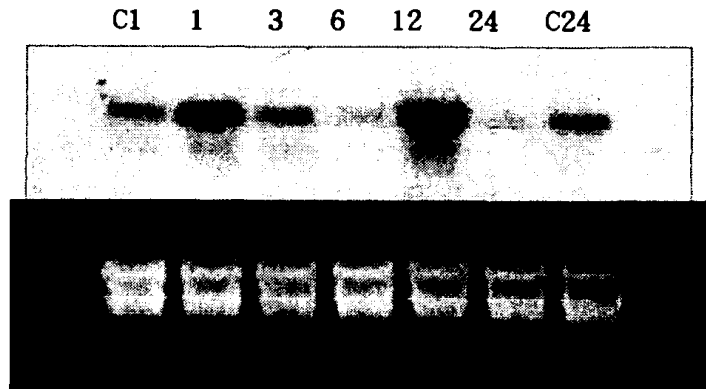


Figure 32. Expression of the bn209 gene in response to abscisic acid. Detached leaves were incubated in DW for 1 (C1) or 24 hr (C24), or 1 mM ABA solution for 1, 3, 6, 12 or 24 under continuous light.

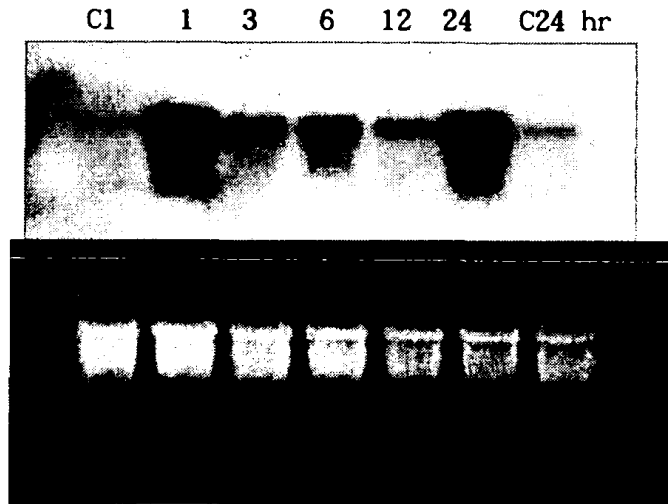


Figure 33. Expression of the bn209 gene in response to osmotic stress. Detached leaves were incubated in DW for 1 (C1) or 24hr (C24), or 0.44 M (8%) manitol solution for 1, 3, 6, 12 or 24hr under continuous light.

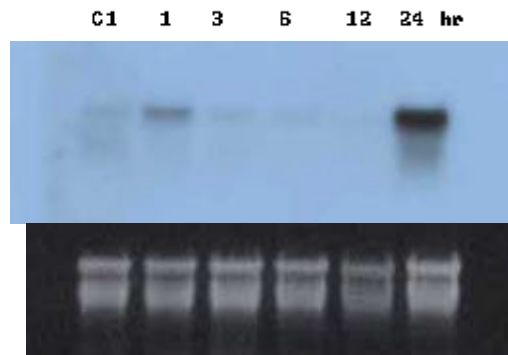


Figure 34. Induction bn20B gene in response to sucrose 5%

Detached leaves were incubated in DH for 1hr (C1) or 5% sucrose solution (for 1, 3, 6, 24hr) under continuous light.

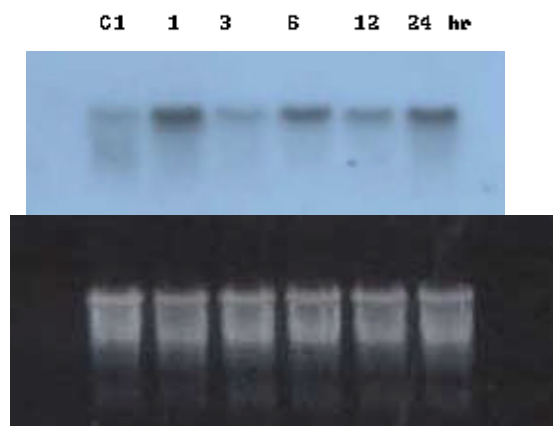


Figure 35. Induction bn20B gene in response to mannitol 5%

Detached leaves were incubated DH for 1hr (C1) or 5% mannitol solution (for 1, 3, 6, 24hr) under continuous light.

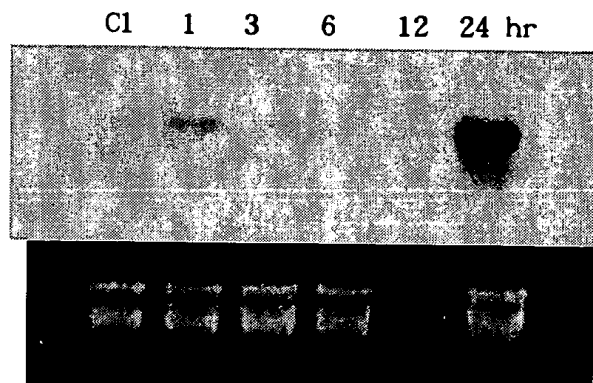


Figure 34. Induction bn209 gene in response to sucrose 5%
 Detached leaves were incubated in DW for 1hr (C1) or 5% sucrose solution
 (for 1, 3, 6, 24hr) under continuous light.

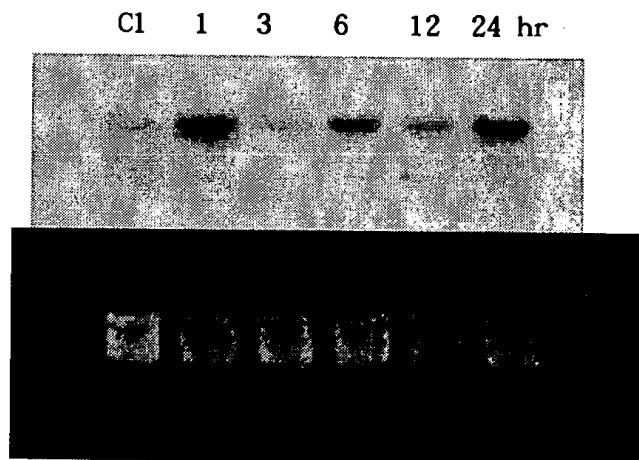


Figure 35. Induction bn209 gene in response to mannitol 5%
 Detached leaves were incubated DW for 1hr (C1) or 5% mannitol solution
 (for 1, 3, 6, 24hr) under continuous light.

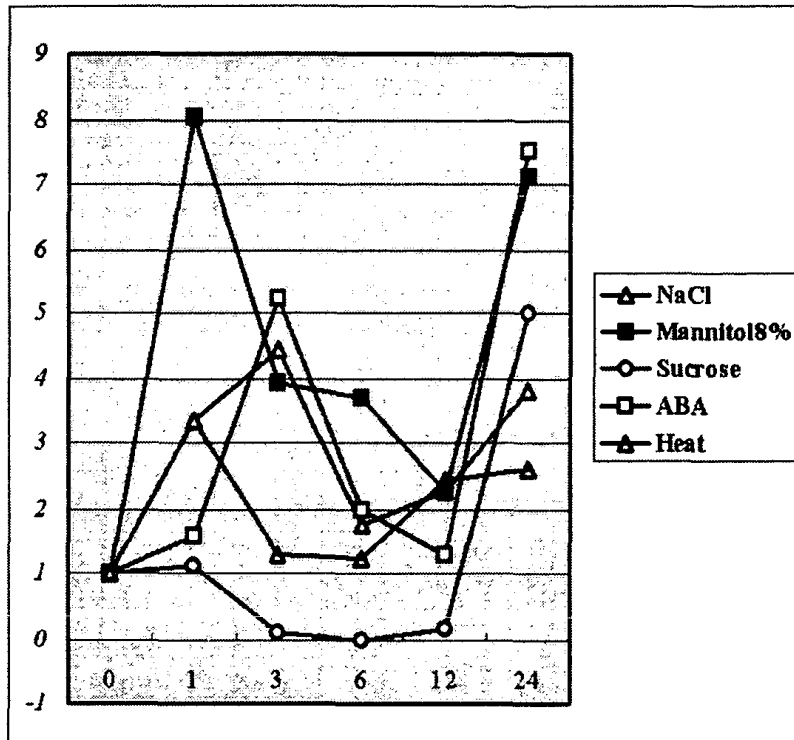


Figure 36. Relative mRNA levels were densitometrically estimated for the *Bnr209* gene.

다. Bnrd209 gene product의 활성 측정

Bnrd209 gene product의 활성을 측정하기 위해 그 유전자를 대장균 발현벡터인 pTrcHisTOP0 vector에 클로닝하여 대장균에서 그 유전자를 발현시켜 enzyme source로 이용하고 beta-amylase 특이적인 substrate인 *p*-nitrophenol- α -D-maltopentaose을 이용하여 β -amylase activity를 측정하였다. 그 specific activity가 대조구에 비해 90배정도 증가하였다 (Table 3). 이것으로 보아 Bnrd209 cDNA가 활성을 가진 유전자를 암호화하고 있음을 알 수 있다.

cell	specific activity (umols/min · mg protein)
pTrcHis	3.02 X10 ⁻³
pTrcHis209	85.22 X10 ⁻³

Table 3. β -amylase activity of bn209 gene product.

Total proteins were extracted from HB101 containing pTrcHisTOP0 vector (vector only) and HB101 containing pTrcHis209. β -amylase activity was determined using *p*-nitrophenol- α -D-maltopentaose, a specific β -amylase substrate.

제 3 절 식물의 형질전환

1. Bnp5cs1 유전자를 이용한 형질전환

Bned7 clone은 P5CS (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) 유전자와 유사성이 있다. P5CS는 식물이 water 스트레스를 받을 때 proline을 축적시키는데 key enzyme로도 작용하는데, 이를 overexpression하여 식물체내에 proline을 축적시킬 수 있으면, 식물체의 water-deficit stress 저항성을 증가시킬 수 있을 것으로 추정된다.

가. 식물말천 벡터 구성

Bnp5cs1 유전자를 식물에 도입하기 위하여 pT7T3 18U에 cloning 된 cDNA를 *Xba* I/T4 DNA polymerase 와 *Xba* I 으로 잘라내어 식물 binary vector 인 pB1121의 *Sac* I/T4 DNA polymerase와 *Xba* I 으로 잘라낸 부분에 삽입하여 pB1p5cs1을 만들었다 (figure 37).

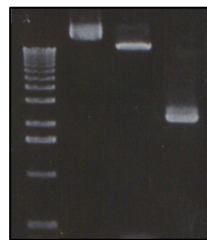


Figure 37. Construction of pB1p5cs1-2.

1 lane: 1kb ladder, 2 lane: intact pB1p5cs1, 3 lane: pB1p5cs1/*Xba* I,

4 lane: PCR product of Bnp5cs1 using pB1p5cs1 as a template

제 3 절 식물의 형질전환

1. Bnp5cs1 유전자를 이용한 형질전환

Bnr7 clone은 P5CS (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) 유전자와 유사성이 있다. P5CS는 식물이 water 스트레스를 받을 때 proline을 축적시키는데 key enzyme으로 작용하는데, 이를 overexpression하여 식물체내에 proline을 축적시킬 수 있으면, 식물체의 water-deficit stress 저항성을 증가시킬 수 있을 것으로 추정된다.

가. 식물발현 벡터 구성

Bnp5cs1 유전자를 식물에 도입하기 위하여 pT7T3 18U에 cloning 된 cDNA를 *Kpn* I/T4 DNA polymerase 와 *Xba* I 으로 잘라내어 식물 binary vector 인 pBI121의 *Sac* I/T4 DNA polymerase와 *Xba* I 으로 잘라낸 부분에 삽입하여 pBIp5cs1을 만들었다 (figure 37).

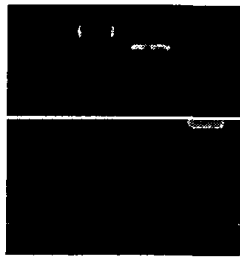


Figure 37. Construction of pBIp5cs1-2.

1 lane: 1kb ladder, 2 lane: intact pBIp5cs1, 3 lane: pBIp5cs1/*Xba* I,
4 lane: PCR product of Bnp5cs1 using pBIp5cs1 as a template

나. 모델식물의 형질전환

BnP5CS1 유전자를 *Agrobacterium*-mediated transformation 방법으로 담배를 형질전환하여 genomic PCR으로 BnP5CS1 유전자가 담배에 도입된 것을 확인하였고 (figure 3B) RT-PCR으로 발현되는 것을 확인 하였다 (figure 3B). Kanamycin에 의해 selection 된 대부분의 담배가 유전자가 도입되었다. 형질전환된 담배에서 proline 함량이 증가하는 것을 알아보기 위해서 Acid-ninhydrin 방법으로도 proline 함량을 150 여개의 형질전환체에서 분석하였으나 wild-type 보다 현저히 증가하는 형질전환체는 발견되지 않았다 (Table 4).

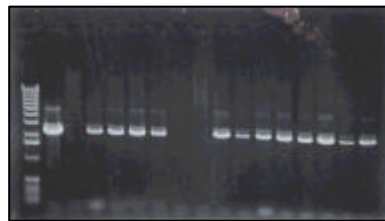


Figure 3B. Presence of the Bnp5cs1 gene in transformed plants as determined by PCR analysis of leaf DNA. The amplified 2.2 kb fragment from the genomic DNA was produced by PCR reaction. lane 1: 1kb ladder, lane 2: pBIp5cs1. lane 3: untransformed tobacco, lane4-17: putative transgenic tobacco

나. 모델식물의 형질전환

BnP5CS1 유전자를 *Agrobacterium*-mediated transformation 방법으로 담배를 형질전환하여 genomic PCR으로 BnP5CS 유전자가 담배에 도입된 것을 확인하였고 (figure 38) RT-RCR으로 발현되는 것을 확인 하였다 (figure 39). Kanamycin에 의해 selection 된 대부분의 담배가 유전자가 도입되었다. 형질전환된 담배에서 proline 함량이 증가하는 것을 알아보기 위해서 Acid-ninhydrin 방법으로 proline 함량을 150 여개의 형질전환체에서 분석하였으나 wild-type 보다 현저히 증가하는 형질전환체는 발견되지 않았다 (Table 4).

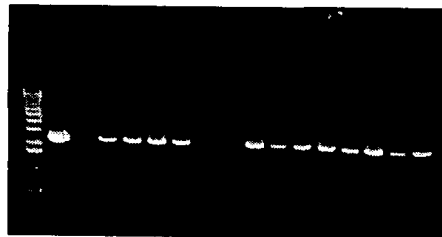


Figure 38. Presence of the Bnp5cs1 gene in transformed plants as determined by PCR analysis of leaf DNA. The amplified 2.2 kb fragment from the genomic DNA was produced by PCR reaction. lane 1: 1kb ladder, lane 2: pBIp5cs1. lane 3: untransformed tobacco, lane4-17: putative transgenic tobacco

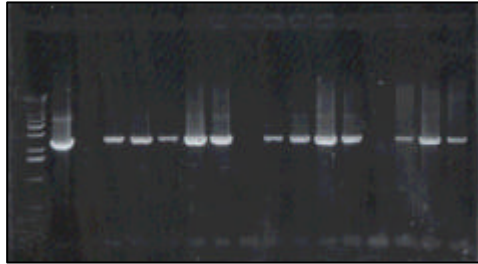


Figure 3B. Expression of Bnp5cs1 gene in transgenic plants determined by RT-PCR analysis of leaf RNA. The amplified 2.2 kb fragment was produced. lane 1: 1kb ladder, lane 2: pB1p5cs1. lane 3: untransformed tobacco, lanes4-17: putative transgenic tobacco

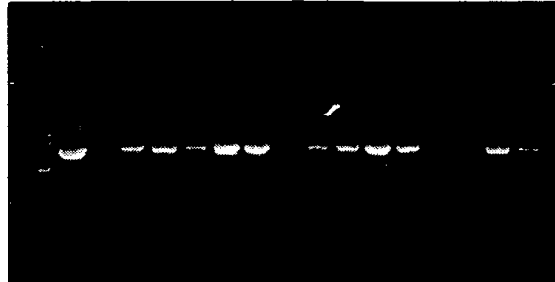


Figure 39. Expression of Bnp5cs1 gene in transgenic plants determined by RT-PCR analysis of leaf RNA. The amplified 2.2 kb fragment was produced. lane 1: 1kb ladder, lane 2: pBIp5cs1. lane 3: untransformed tobacco, lane4-17: putative transgenic tobacco

Table 4. The proline content in leaves of the wild-type and Bnp5cs1 transgenic plants under the non-stress condition. NC1 and NC2 : wild-type plants

line	proline($\mu\text{g/g}$)	line	proline($\mu\text{g/g}$)
NC1	22.16	21	17.28
NC2	19.08	22	17.18
1	12.08	23	17.23
2	24.82	24	17.10
3	22.49	25	14.98
4	16.67	26	14.90
5	13.18	27	23.00
6	17.79	28	15.46
7	61.53	29	16.02
8	14.58	30	14.01
9	20.05	31	9.70
10	19.21	32	23.40
11	21.57	33	20.45
12	16.16	34	19.64
13	11.25	35	22.51
15	13.02	36	17.50
16	16.29	37	20.18
18	15.11	38	17.66
19	42.12	39	19.48
20	17.87	40	14.90

2. BnrD197 유전자를 이용한 형질전환

BnrD197 유전자는 Ser/Thr protein kinase들 중 SnRK3와 AtCIPk들과 높은 유사성이 있었고, 그 유전자의 발현양상이 water-deficit stress와 관련되어 있음을 확인 하였다. 그리고 단백질의 인산화 및 탈 인산화는 신호 전달체계에 있어서 중추적인 역할을 하므로 이 유전자를 식물체내에 sense 방향과 antisense 방향으로 발현시켰을 때 식물체의 저항성에 영향을 미치는지 조사하기 위해 이 유전자를 이용하여 형질 전환체를 만들었다.

가. 식물발현 벡터구성

BnrD197 유전자를 식물에 도입하기 위하여 BnrD197 유전자 cDNA의 ORF 부분을 sense와 antisense 방향으로 식물 binary vector인 pMBP2에 cloning 하였다.

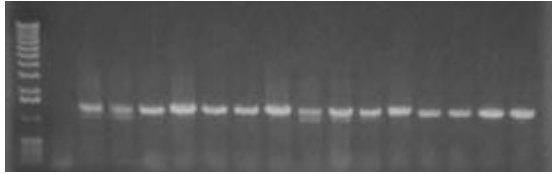
나. 모델식물의 형질전환

담배의 경우 BnrD197 유전자를 Agrobacterium-mediated transformation 방법으로 형질전환을 하였다. genomic PCR으로 BnrD197 유전자가 sense와 antisense 방향으로 도입된 것을 확인하였고, 도입된 유전자가 발현되는 것을 RT-PCR으로 확인 하였다 (figure 40와 41). 이렇게 확인된 형질전환 담배의 T1 seed을 얻었으며 이 형질전환된 씨앗을 다양한 농도 (200 - 400mM)의 NaCl 과 mannitol 이 첨가된 배지에서 발아와 생육 테스트를 수행하였는데 control 과 차이를 확인할 수 없었다.

Arabidopsis 경우 Agrobacterium infiltration 방법으로 형질전환을 수행하였는데, T0 plant에서 얻은 씨(T1)를 kanamycin 배지에서 1차로 selection 을 하였고 (figure 42) T2 씨앗 몇 line을 가지고 담배와 마찬가지로 다양한

농도의 NaCl과 mannitol 배지에서 발아와 생육 실험을 하였으나 현재 차이가 나는 line을 확인하지 못하였다.

(A)



(B)

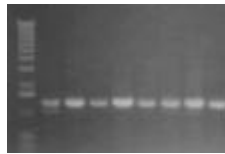


Figure 40. Presence of the Bnr187 gene with sense or antisense orientation in transformed plants as determined by PCR analysis of leaf DNA. The amplified 1.4 kb fragment from the genomic DNA was produced by PCR reaction with CaMV35S promoter primer and Bnr187-3' primer (A) or CaMV35S primer and Bnr187 5' primer (B).

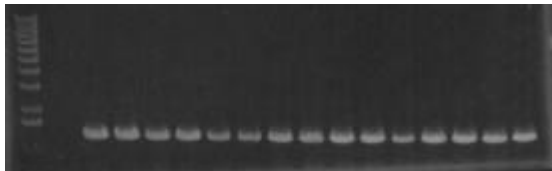


Figure 41. Expression of Brassica Bnr187 gene in transgenic plants determined by RT-PCR analysis of leaf RNA. The amplified 1.4 kb fragment was produced. Lane 1: 1kb ladder, lane 2: untransformed tobacco, lane 3-10: putative transgenic tobacco with sense Bnr187, lane 11-17: putative transgenic tobacco with antisense Bnr187.

농도의 NaCl과 mannitol 배지에서 발아와 생육 실험을 하였으나 현재 차이가 나는 line을 확인하지 못하였다.

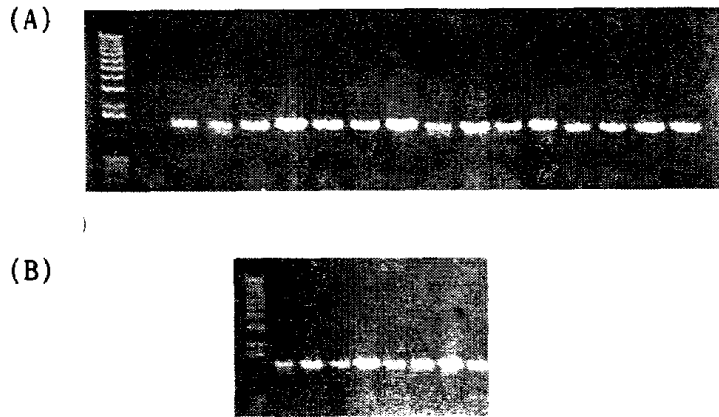


Figure 40. Presence of the Bnr197 gene with sense or antisense orientation in transgenic plants as determined by PCR analysis of leaf DNA. The amplified 1.4 kb fragment from the genomic DNA was produced by PCR reaction with CaMV35S promoter primer and Bnr197-3' primer (A) or CaMV35S primer and Bnr197 5' primer (B).

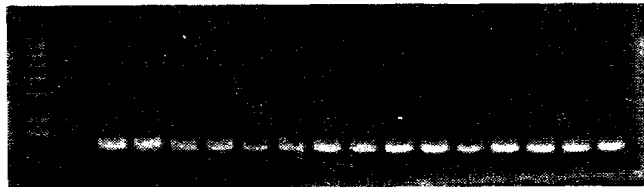


Figure 41. Expression of Brassica Bnr197 gene in transgenic plants determined by RT-PCR analysis of leaf RNA. The amplified 1.4 kb fragment was produced. lane 1: 1kb ladder, lane 2: untransformed tobacco, lane 3-10: putative transgenic tobacco with sense Bnr197, lane 11-17: putative transgenic tobacco with antisense Bnr197.

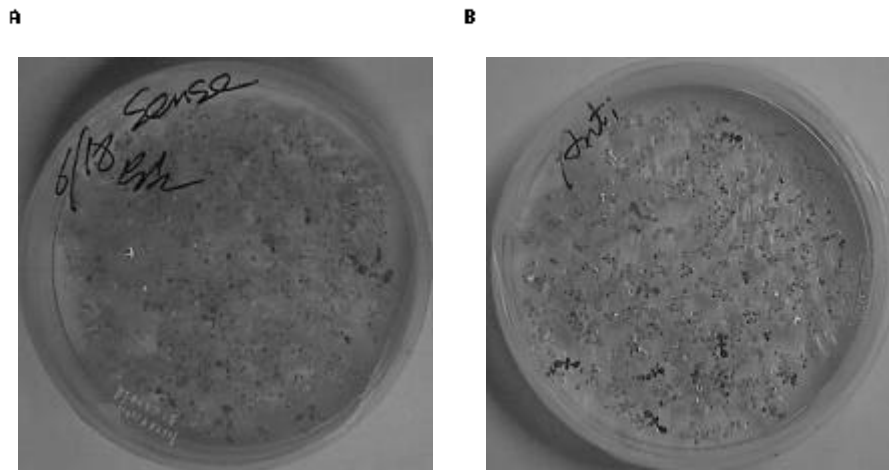


Figure 42 Transformation of *Arabidopsis thaliana* with Bred1B7 gene by the method of *Agrobacterium* infiltration. T1 seeds were selected in the medium containing 50 µg/ml kanamycin. A: Sense, B: Antisense

3. 유용작물의 형질전환

상치의 형질전환 조건을 확인하였으며, 본 실험실에서 *otaA* 유전자를 상치에 도입하여 발현양상을 확인한 적이 있고, 백경희 교수 lab에서 cloning 된 *Tel1* 유전자와 *Tel2* 유전자를 상치에 형질전환 시켰다.

* 상치 (*Lactuca sativa* L.)의 형질전환 조건

상치 종자를 무균적으로 파종하여 발아후 5일째의 자엽을 *Agrobacterium* 배양액에 5분간 침적시킨후 여분의 현탁액을 여지도 제거하여, MS 기본배지에 0.1mg/l NAA, 0.1mg/l BA를 함유한 재분화 배지에 치상한다. 배양 2일째 100-200mg/l kanamycin과 500mg/l carbenicillin을 함유한 배지에 계대배양하여 재분화시킨다.

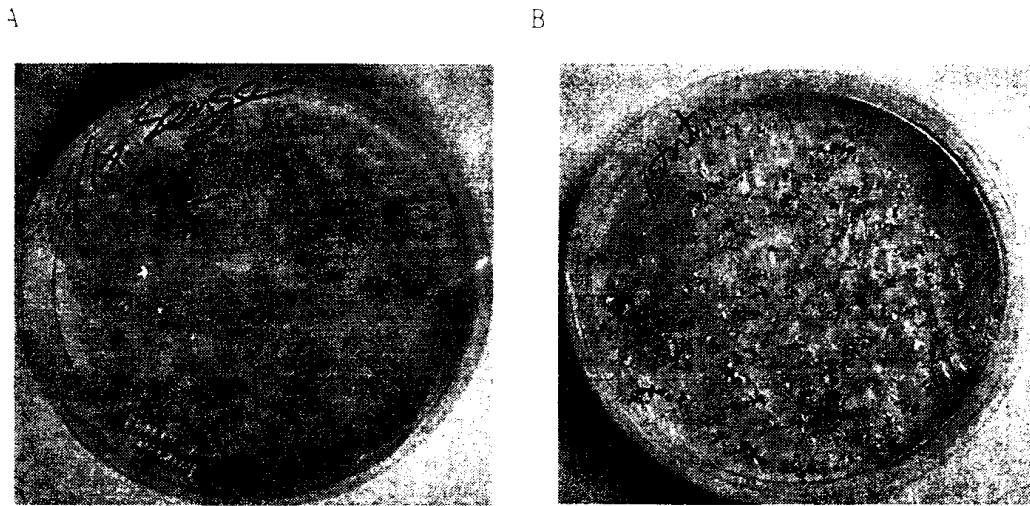


Figure 42 Transformation of *Arabidopsis thaliana* with Bnrd197 gene by the method of *Agrobacterium* infiltration. T1 seeds were selected in the medium containing 50 ug/mM kanamycin. A: Sense, B: Antisense

3. 유용작물의 형질전환

상치의 형질전환 조건을 확립하였으며, 본 실험실에서 *otsA* 유전자를 상치에 도입하여 발현양상을 확인한 적이 있고, 백경희 교수 lab에서 cloning 된 *Tsi* 유전자와 *Tsip* 유전자를 상치에 형질전환 시켰다.

* 상치 (*Lactuca sativa* L.)의 형질전환 조건

상치 종자를 무균적으로 파종하여 발아후 5일째의 자묘를 *Agrobacterium* 배양액에 5분간 침적시킨후 여분의 현탁액을 여지로 제거하여, MS 기본배지에 0.1mg/l NAA, 0.1mg/l BA을 함유한 재분화 배지에 치상한다. 배양 2일째 100-200mg/l kanamycin과 500mg/l carbenicillin을 함유한 배지에 계대배양하여 재분화시킨다.



Figure 43. Adventitious shoots produced from lettuce cotyledons on selection medium containing kaamycin at 200ng/L

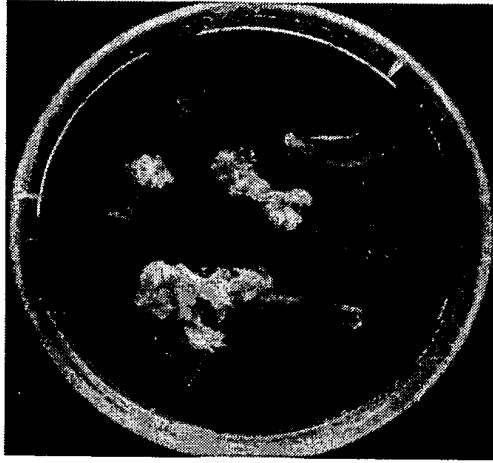


Figure 43. Adventitious shoots produced from lettuce cotyledons on selection medium containing kaanamycin at 200mg/L

제 4 장 저온 스트레스 저항성 유전자 분리 및 저항성 작물의 분자 육종

제 1 절 서 설

식물은 자신의 생리적 또는 발달 단계적 변화를 인지하여 생체의 조절기작을 변화시킬 뿐만 아니라 낮은 온도, 높은 염농도, 가뭄, 그리고, 일장 등과 같은 환경의 변화도 민감하게 인식하여 그에 따른 변화를 나타낸다. 식물의 발육과 생장은 다른 어떠한 환경스트레스 보다도 저온에 대하여 민감한데, 일반적으로 생식기관의 발육단계인 개화의 경우에 이러한 냉해와 동해에 민감하며, 온도조건이 가장 중요한 요인으로 작용한다. 냉해의 기작에 대해서는 여러 가지 학설이 제시되고 있으나, 결국은 성장점, 생식기관 및 유엽 등의 활발한 분열 기능이 직·간접적으로 저하될 뿐만 아니라 양분, 수분, 식물호르몬 등의 원활한 이동이 지체됨으로써 정상적인 생리작용이 수행되지 못하기 때문에 식물체가 냉해를 입게 된다고 생각되어진다. 식물체나 조직의 동사는 저온이 직접적인 영향을 끼치는 것이 아니라 조직 내의 결빙이 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 대부분의 식물조직은 결빙점 이하로 냉각하였을 때도 얼지 않았을 경우에는 피해가 적다. 조직이 저온에 의해 동결될 경우 처음에는 세포 간극에서 결빙이 일어나는데 이것을 세포외결빙이라고 하며, 동결이 세포 내부까지 진행되는 경우도 있는데, 이것을 세포내결빙이라고 한다. 동결 온도나 시간 여하를 불구하고 세포내결빙의 경우에는 거의 치명적이어서 조직이 사멸하고 만다. 이것은 원형질의 콜로이드적 구조의 기계적인 장애와 원형질 탈수에 의하여 원형질 콜로이드가 파괴됨으로써 그 기능을 잃기 때문이다. 이처럼 저온은 많은 주요 작물들의 생합성 기작과 대사의 불균형을 초래

하는 명백한 요소이며 저온에 대한 식물의 반응은 대단히 복잡한 기작을 가진다는 것이 알려져 있다.

최근 저온 처리된 식물체에서 abscisic acid (ABA)의 양이 증대되며 그 정도에 따라 당, 수용성 단백질, proline, 그리고, 유기산의 함량이 증대되어 저온 저항성이 증가한다는 연구결과가 발표되었다. 게다가 이와 관련된 새로운 동위효소가 발견되었으며 이들에 의해 세포막지질의 지방산 조성이 변화한다는 연구결과가 발표되었다. 그리고, 열대와 아열대 식물은 저온에 노출되었을 때 냉해를 받는데, 온대 식물은 cold acclimation 하는 능력을 갖고 있어서, 동해를 받지 않을 정도의 낮은 온도에 적당기간 노출되면 cold 저항성이 증가된다고 알려졌다. 이러한 Cold acclimation에 대한 생리적, 생화학적, 분자 생물학적 연구들이 많이 되어 왔다. 그러나 cold acclimation 과정이 복잡하고 수많은 유전자가 관련되기 때문에 저항성을 증가시키는 요인 전부를 면밀히 파악하지는 못하고 있다. 이러한 연구에서도 식물이 저온에 노출되는 동안, 생리적 생화학적인 변화로 대사경로에 관련된 효소 활성의 변화, 유리당(sucrose, fructose), 아미노산(proline) 또는 polyamine의 축적, 세포막지질 구성 성분의 변화 등은 마찬가지로 나타났다.

그리고, 현재 cold 스트레스에 의해 새로운 유전자가 발현된다는 것이 알려졌다고, 이와 관련된 cold-inducible 유전자들이 분리되었다. 이들은 *cas* (cold acclimation-specific), *cor* (cold-regulated), *rab* (responsive to ABA), *blt* (barley low-temperature), *blti* (barley low-temperature induced) 유전자 등을 포함한다. 하지만 이들 유전자들의 기능은 아직 분명하게 알려져 있지 않으며, 염기서열 유사성으로 그 기능을 유추하지만, cold acclimation에서 직접적인 역할이나, cold 저항성에서 그 필요성이 증명되지는 않았다.

*Arabidopsis*의 들연변이체에 대한 생화학적 연구에서 엽록체 막 phosphatidyl-glycerol의 높은 불포화산 함량과 cold 저항성 사이에 관련이

있음이 알려졌다. 지방산의 불포화 정도는 엽록체 효소인 glycerol-3-phosphate acyltransferase의 특이성에 의해 결정되는데, 다른 source (*Arabidopsis*, *Squash*, *E. coli*)로부터 분리한 glycerol-3-phosphate acyltransferase를 식물에 도입한 연구에서 cold 저항성 정도가 엽록체 세포막 지질의 불포화 정도와 관련이 있음이 밝혀졌다.

당의 축적도 cold acclimation 과정과 관련됨이 최근 알려졌다. 대장균 pyrophosphatase와 효모 invertase 유전자를 각각 식물에 도입하였을 때 식물의 생장은 줄어들고 수용성 탄수화물의 농도는 증가하였다. 그리고 invertase 유전자가 도입된 식물은 cold 스트레스에 오히려 더 민감하였고, pyrophosphatase 유전자가 도입된 식물은 cold 저항성이 증가하였다. 최근에 환경스트레스와 관련된 많은 유전자들이 분리되고 있으며, 특히 transcription factor 들이 cloning 되어 이를 이용한 형질전환 식물체가 만들어지고 있다. *CBF1*의 경우 freezing tolerance를 증가시킨다는 것이 알려졌다.

여러 가지 냉·동해에 대한 저항성을 통털어서 내한성이라고 일반적으로 표현하고 있는데, 겨울밀, 겨울보리, 호밀 같은 작물들은 내한성의 정도가 매우 높다. 이러한 겨울을 나는 작물들은 그에 상응하는 봄보리, 봄밀 같은 작물이나 앞서 언급한 연구들에서 재료로 사용된 *Arabidopsis* 같은 식물들과는 여러 가지 생리적인 특성이 다르다는 것은 명백한 사실이며 이미 널리 알려져 있다. 게다가 겨울보리는 화본과로 벼와 아주 밀접한 관계를 가진 식물이기 때문에, 저온 저항성이 탁월하면서 벼와 유사한 보리의 저온저항성 유전자와 그 기작의 연구는 *Arabidopsis* 같은 단순한 model plant에서의 연구와는 연구 결과가 부여하는 가치가 크게 다를 것이다. 그리고, 그 연구결과를 적용함에 있어서도 마찬가지 일 것이다. 하지만 이러한 겨울을 나는 작물들의 내한성과 같은 생리적인 기작에 관여하는 생화화적인 대사는 충분히 연구되어 있지 않으며, 특히 이들 작물들에서의 내한성에 관련되어 있는 유전자들에 대한 조

사는 미진하다. 따라서, 본 과제에서는 내한성의 정도가 매우 높은 겨울보리를 재료로 하여 내한성에 관련된 유전자들에 대한 연구를 수행하였다.

우선 내한성 기작이 탁월한 겨울보리에서 저온 스트레스 저항성에 관련된 유전자를 획득하기 위하여 저온처리로 저온 저항성 유전자들의 발현이 유기된 겨울보리를 이용하여 Differential Display (DDRT), Suppression Subtractive Hybridization (SSH), Orded Differential Display (ODD) 기법들을 사용하여 저온저항성에 관여하리라고 추정되는 유전자들을 대량으로 획득하였다. 그 후 northern hybridization 기법으로 이들의 발현양상을 정확히 규명한 후, 저온저항성에 관여하는 유전자라고 생각되는 것들을 Rapid Amplification of cDNA End (RACE) 기법으로 full-length의 cDNA를 확보하였다. 확보된 이들 유전자들의 정확한 생리·생화학적인 기능을 규명하기 위하여 담배를 model plant로 이용하여 형질전환 한 후, 저온저항성 기작과 생체 내에서의 기능을 살펴 보았으며, 저온저항성을 조절해 주는 유전자를 아열대 식물이자 우리나라의 주작물인 벼에 도입하여 저온저항성이 높은 벼 품종을 만들기 위한 연구를 수행하였다.

제 2 절 저온 유도 유전자의 분리 및 동정

1. 실험대상 식물 확보 및 RNA 추출

가. 재료식물 확보 및 total RNA 추출

본 실험에서 사용한 보리 (*Hordeum vulgare* L.) 품종은 '동보리'로써 수원 농촌진흥청에서 재료를 분양받았으며, 내한성에 관련된 유전자를 확인하고 분

석하여 유용한 유전자원의 확보를 위하여 사용하였다. Total RNA를 추출하기 위하여 Chomczynski와 Sacchi방법을 변형하여 사용하였는데, protein detergent도 사용된 guanidium salt는 현재까지 알려진 가장 효율적인 RNase inhibitor도 받은 실험에서 RNA추출에 널리 이용되고 있다.

저온 처리를 하지 않은 wild type과 24시간 동안 4℃에서 저온 처리한 wild type을 준비한 후, total RNA 추출에 보리 잎을 각각 약 2g씩 사용하였다. 추출된 RNA는 1×MOPS-formaldehyde 1× agarose gel에서 전기영동하여 rRNA band가 분명하고 (Figure 1) $OD_{260/280}$ 값이 1.8이상인 RNA시료만 선별하여 흡광계 250nm에서 농도를 산출한 후 -70℃에 보관하였다. RNA농도는 아래와 같이 산출되었다.

$$\text{RNA농도} = OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times 200$$

두 차례에 걸쳐 RNA를 추출하였는데, 2g의 시료도부터 약 500-700 μg 의 total RNA가 추출되었다.

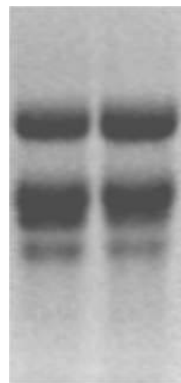


Figure 1. Total RNA의 전기영동사진.

석하여 유용한 유전자원의 확보를 위하여 사용하였다. Total RNA를 추출하기 위하여 Chomczynski와 Sacchi방법을 변형하여 사용하였는데, protein detergent로 사용된 guanidium salt는 현재까지 알려진 가장 효율적인 RNase inhibitor로 많은 실험에서 RNA추출에 널리 이용되고 있다.

저온 처리를 하지 않은 wild type과 24시간 동안 4℃에서 저온 처리한 wild type을 준비한 후, total RNA 추출에 보리 잎을 각각 약 2g씩 사용하였다. 추출된 RNA는 1×MOPS-formaldehyde 1% agarose gel에서 전기영동하여 rRNA band가 분명하고 (Figure 1) OD_{260/280}값이 1.8이상인 RNA시료만 선별하여 흡광계 260nm에서 농도를 산출한 후 -70℃에 보관하였다. RNA농도는 아래와 같이 산출되었다.

$$\text{RNA농도} = \text{OD}_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times 200$$

두 차례에 걸쳐 RNA를 추출하였는데, 2g의 시료로부터 약 500-700μg의 total RNA가 추출되었다.

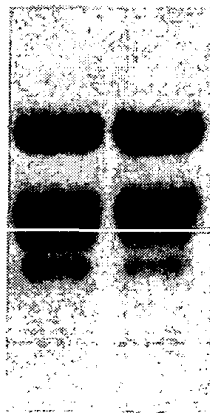


Figure 1. Total RNA의 전기영동사진.

나. mRNA 추출

Total RNA도부터 mRNA를 Dynal UK사의 paramagnetic oligo dT Dynabeads를 이용하여 추출하였고, Total RNA 75 μ g을 증류수에 희석시켜 75 μ g/100 μ l의 농도도 조정하였다.

2. mRNA differential display

가. DDRT-PCR

추출된 10 μ l의 mRNA에 2 μ l의 20 μ M oligo-dT₁₁-UU primer (U=A,G,C)을 넣어 cDNA합성반응이 끝난 후 50 μ l의 증류수를 첨가하여 4배 희석시켰으며, 희석된 cDNA를 주형으로 random primer를 사용하여 differential display PCR을 수행하였다. 준비된 PCR product를 polyacrylamide gel에 전기영동하여 different band의 유무를 분석하였다 (Figure 2). Polyacrylamide겔도부터 무처리구와 저온 처리구간에 확연히 구분되어지는 37개의 band가 발견되었으며, 이들에 대한 계속적인 연구를 위하여 sample도 확보를 하였다.

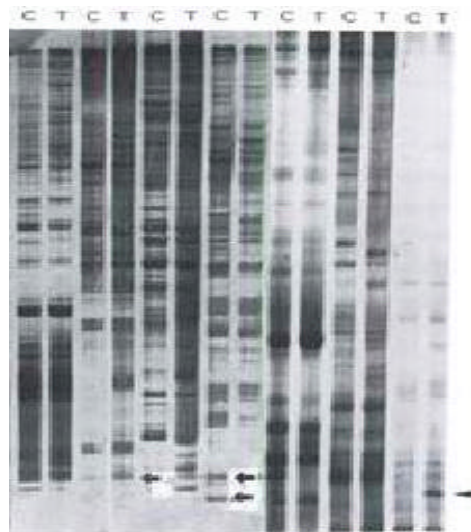


Figure 2. UBC #241 5'-primer사용해서 나타난 DD-RT band pattern.

나. mRNA 추출

Total RNA로부터 mRNA를 Dynal UK사의 paramagnetic oligo dT Dynabeads를 이용하여 추출하였고, Total RNA 75 μ g을 증류수에 희석시켜 75 μ g/100 μ l의 농도로 조정하였다.

2. mRNA differential display

가. DDRT-PCR

추출된 10 μ l의 mRNA에 2 μ l의 20 μ M oligo-dT₁₁-VV primer (V=A,G,C)을 넣어 cDNA합성반응이 끝난 후 60 μ l의 증류수를 첨가하여 4배 희석시켰으며, 희석된 cDNA를 주형으로 random primer를 사용하여 differential display PCR을 수행하였다. 준비된 PCR product를 polyacrylamide gel에 전기영동하여 different band의 유무를 분석하였다 (Figure 2). Polyacrylamide젤로부터 무처리구와 저온 처리구간에 확연히 구분되어지는 37개의 band가 발견되었으며, 이들에 대한 계속적인 연구를 위하여 sample로 확보를 하였다.

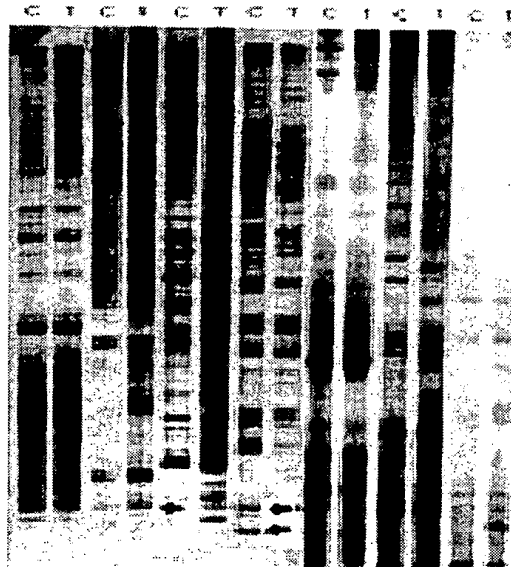


Figure 2. UBC #241 5'-primer사용해서 나타난 DD-RT band pattern.

나. Polymorphic band들의 재증폭 및 cloning

위에서 확인된 different band들을 polyacrylamide gel로부터 모러내어, elution하였다. 동일한 primer를 사용하여, DORT-PCR 조건 보다 더 stringent한 조건으로도 PCR을 수행하였으며, 같은 크기 band의 재증폭을 확인하였다. (Figure 3)

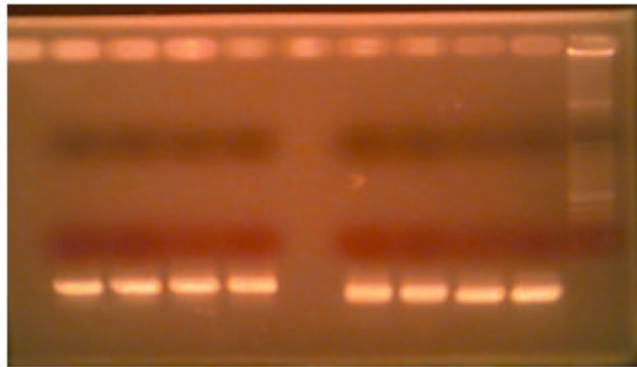


Figure 3. 241번 5'-primer을 사용한 재증폭.

다. 염기서열 분석

TA-cloning kit (INVITROGEN)을 이용하여 위의 단계에서 재증폭된 different band의 PCR product를 pCR™2.1 vector내로 TA-cloning시키고, heat shock으로 Top10 competent cell을 transformation하였다. 이들도부터 plasmid DNA를 추출하였고, ABI 310 automatic sequencer로 염기서열을 분석하였다 (Figure 4).

나. Polymorphic band들의 재증폭 및 cloning

위에서 확인된 different band들을 polyacrylamide gel로부터 오려내어, elution하였다. 동일한 primer를 사용하여, DDRT-PCR 조건 보다 더 stringent 한 조건으로 PCR을 수행하였으며, 같은 크기 band의 재증폭을 확인하였다. (Figure 3)

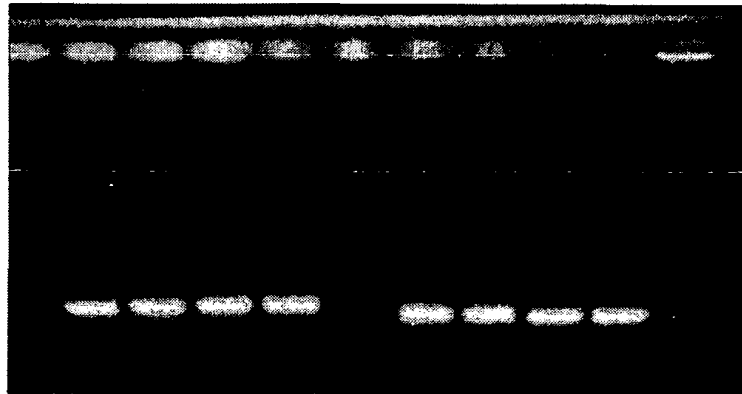


Figure 3. 241번 5'-primer을 사용한 재증폭.

다. 염기서열 분석

TA-cloning kit (INVITROGEN)을 이용하여 위의 단계에서 재증폭된 different band의 PCR product를 pCR™2.1 vector내로 TA-cloning시키고, heat shock으로 Top10 competent cell을 transformation하였다. 이들로부터 plasmid DNA를 추출하였고, ABI 310 automatic sequencer로 염기서열을 분석하였다 (Figure 4).

sequence1

1 CATNNATGCT CNTATACTGT CTCGAGCGGC CGANAGTGTT ATGGATATCT GCAGAATTCG
61 GCTTACGGCC GACCAAGGAC GCTGTCAAGG GAGGCAGGTG GCGTTATGAT CCGTAAGGCT
121 CTTGAGGCAC GATGTTGAGG AGGCCCTTC TAATGTTTCA GCGGCTCTAT GTCGCTAGGA
181 TCGAGTCCCG CACATTTCCC GACCGCCGTT GCGTGTGACT GAGTGAACGA ATGTGGCCAC
241 AGGTTCGGCC GTAAGCCGAA TTCCAGCACA CTGGCGGCCG TTAGTAGTGG ATCCGAGCTC
301 GGTACCAAGC TTGGCGTAAT CATGGTCATA GCTGTTTCTT GTGTGAAATT GTTATCCGCT
361 CACAATTCCA CACAACATAC GAGCCGGAAG CATAAAGTGT AAAGCCTGGG GTGCCTAATG
421 AGTGAATAA CTCACATTAA TTGCGTTGCG CTCACTGCCC GCTTTCCAGT CCGGAAACCT
481 GT

sequence2

1 CAATNNATGC TCNTNATACG CGTGCTCGAG CGGCCGAGAG TGTATGGAT ATCTGCAGAA
61 TTCGGCTTAC GGCCGACCCA CTCTATCATC AACGATAATA AATCTCTCCA GTCGCATTTA
121 CAAAGGAGTA CAGAAGAATG TTGGTACATT CAGGCGTTGA TTTCTCAATG TGAATCTATC
181 TCGGTGAGGT TATGTCTAAA AAGTTGACTT CCGTAAAGTC TACGAAAGGC ATTTCACTCG
241 ACCACGCCAG GGCTTGAACC TGGAACCTCC TGATTACTTC TATCGTAGTC CTATGATAAT
301 TGAAGAGGGA TGAGATCAAG AATGAATACG CTGAATGTGG TAGCCTGACT TACAGACACA
361 CTATCCAATT GTGATACGCG GCTCCGGTCG GCCGTAAGCC GAATTCAGC AACTGGCGG
421 CCGTTACTAT GGATCCGAAC TCGGTACCAG CTTGGCGTAA TCANGTCATA CTGTTTCTG

sequence3

1 CAATNNANTG CTCNTNATAC NCGNNCTCGA GCGGCCGANA GTGTTATGGA TATCTGCAGA
61 ATTTCGGCTTA CGGCCGACCG GGGGNAACCG GTTCCGTTGG CGAGGCATGC ACTTGCCTTG
121 CCGCTGCACA TGCCGCTGAC GATTGAGCTT GACCTTCGTC GCGGCCGATC CGGAGATGAA
181 ATTGTTAGAG GCGAGCTTGA GTTCAAACT GCCATCGACG GCCTGCATAC GGAACGTCTT
241 GTTGGTGTCA ATGGTGCTGA ATTCGAGGTG ACAATCTCAT GGTCGGCCGT AAGCCGAATT
301 CCAGCACACT GCGGCCCGTT ACTAGTGGAT CCGAGCTCGG TACCAAGCTT GGC GTAATCA
361 TGGTCATAGC TGTTTCCTGT GTGAAATTGT TATCCGCTCA CAAATTCCA CAAACATACG
421 AGCCGGAAGC ATAAAAGTGT AAAGCCTGGG GGTGCTAATG ANTNACTAA CTCACATTA
481 TTGCGTTGCG C

sequence4

1 CATTNATTGC TCNTNATACG GTGCTCGAGC GGCCGATAGT GTTATGGATA TCTGCAGAAT
61 TCGGCTTACG GCCGACCGTA TGAACAAGGA GATCACCGCG CTCGCGCCCT GCAGCATGAG
121 GGTGAAGGTG GTCGCTCCGC CGGAGANGAA GTACAGTGTG TGGATCGGCG GCTCCATTCT
181 CGCCTCCCTC AGTACCTTCC AGCAGATGTG GATCTCCAAG GCAGAGTACG ACGAAGCTGG
241 CCCGTCGATC GTCCACGTGA AGTGCTTCTG ATCAGTCCAT GGCTTGCCAA CCTGTACCTG
301 TCATTCAGTT GCTTGAGGTC CAAATCGCAG ATGCTTGAAC GTGTCATGGT TTCCACTGCG
361 TCGTGGTCGG CCGTAAGCCG AATTCCAGCA CACTGGCGGG CCGTTACTAT GGATCCGAGC
421 TCGGTACCAA GCTTGGCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA TTGTATCCGC
481 TCACAATTCC C

sequence5

1 CATNNATCNC TATANCCTCT CGAGCGGCAN AGTGTTTGGG TACTGCAGAA TTCNGCTTGC
61 CCGACGCGGC AAGGCAGCCT TACGTCTCTCA GGATCGCCTG GACGTACAGG CCCTGGAGCG
121 TCAGGGAAGA TGCCATCTGC ATCGTGTTC ACGAAGCAA AACTTCACC AATCCCGCCC
181 TCGCGGCAA GCGAGGCGAC CCGGACGTTT TCAATCAACT GCGTCGGTAC CGCCGGACTA
241 TCGCCCAACA TTCCGCAACT CTGCTTGACC GCTACCAGGC AACTTGCCGT GCCCTCGTGC
301 GCGTCGGGCA GCCGAATTCC AGCACACTGG CGGCCGTTAC TAGTGGATCC GAGCTCGGTA
361 CCAAGCTTGG CGTAATCATG GTCATAGCTG TTTCCTGTGT GAAATTGTAT CCGCTCACAA
421 TTCCACACAA CATACAAACC GGAAGCATAA AGTGTAAGC TGGGGTGCCT AATGA

sequence6

1 CANNCTCGAT NTTGTTTCN CGAGCGGCCA TTNTGTCTAT GGATATCTGC AGAATTGCGC
61 TTGCCCGACG CGTTAAACAC AGAGTTGGAT CGCGCCCAA TGTGTTCCG CAGAGANATG
121 CCACACGACG TGGTGACAAT GAACAGCCGG GTTAAATTCC GCAATCTTAG CGATGGCGAA
181 GTGCGTGTGC GCACGCTGGT GTATCCGCA AAAATGACCG ATAGCAATAC TCAGCTTTCC
241 GTTATGGCTC CGGTAGGTGC CGCACTGCTG GGGCTGCGG TCGGGCAAGC CGAATTCCAG
301 CACTGCGG GCGCGTTAAC TAGTTGGATC CGAGCTCGGT ACCAAGCTTG GCGTAATCAT
361 GGTACATANT GTTTCCTGGT GTGAAATTGT TATCCGCTCA CAATTCCACA CAACATACAA
421 CCGGAAGCAT AAAGTGTAAG GCCTGGGGTT GCTAATGANT GAC

sequence7

```
1 CAATNNATTG CTCNTNATAC GCGTGCTCGA GCGGCCGACA GTGTTTATGG ATATCTGCAG
61 AATTGCGGCT TCAGGATACC ACCATCACAC CTCGATACTC CCTCACTGAT CACTCTCGTG
121 GCCACGATAC ATCATTITTC GACCACATGT CTCCCGCGAC AAACCTTCCT CAAGGTTGTC
181 TAGACCCACA TGGCATAACG GGCACGAGAC AGTACCCACT CATCACTGGT ATCCTGAAGC
241 CGAATTCCAG CACTGTCGCG GCCGTTACTA GTGGATCCGA GCTCGGTACC AAGCTTGGCG
301 TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC CGCTCACAAT TCCACACAAC
361 ATACGANCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGGTGCC TAATGAGTGA GCTAACTCAC
421 ATTAATTGCG TTGCGCTCAC TGCCCGCTTT CCAGTCGGGA AAC
```

Figure 4. 분리된 저온 스트레스 유기 유전자의 염기 서열

라. Homology test

PCGENE software (Intelligenetics, Switzerland)를 이용하여 nucleotide 와 amino acid 서열 분석을 실시한 후, insert 서열만을 BLAST subroutine 을 이용하여 gene-bank에 등록된 다른 유전자와 nucleotide level, amino acid level에서 비교하여 homology가 높은 다양한 종류의 유전자에 대한 정보를 비교, 분석 하였다. sequence 4, sequence 5, sequence 6은 control에서 발현된 gene으로 regulator of nucleoside diphosphate kinase와 매우 유사한 것으로 나타났으며 score는 336이다. sequence 4는 actin과 매우 유사하며 score는 320이다. actin은 세포분열시 방추사의 중요한 구성성분으로 세포분열이 활발할수록 발현이 높아지는데 이것으로 보아 low temperature보다 control의 세포분열이 활발하다는 것을 알 수 있다. sequence 5는 citrolysin protein 1과 score 102를 보였으며 계속 연구중에 있다. sequence 6도 regulator of nucleoside diphosphate kinase와 score 367의 높

은 유사성을 보였다.

sequence 1, sequence 2, sequence 3, sequence 7은 low temperature에서 발현된 gene으로 sequence 1은 catalase와 score 170의 유사성을 보였으며, catalase는 stress 조건하에서 발현이 증가된다. sequence 2는 protein tyrosine phosphate와 score 65를 보였으나 유사성이 너무 낮아 지속적인 연구가 진행중이다. sequence 3는 60KD JASMONATE-INDUCED PROTEIN과 유사성이 높았으며 homology search 결과 226의 score를 보였다.

3. SSH (Suppression subtractive hybridization)

가. SSH의 원리

Suppression subtractive hybridization법은 CLONTECH사에 의해 최근에 개발된 방법으로서 inducible gene의 분리에 아주 효율적인 방법으로 알려져있다. suppression subtractive hybridization법의 원리는 stress를 가한 sample 및 control의 mRNA로부터 각각의 ds cDNA를 합성한 다음 cDNA들간에 hybridization을 유도하여 hybrid sequence를 제거하고 stress에 의해 유도된 unhybridized sequence만을 PCR에 의해 선별하는 것인데 이 과정 중에 적절한 adaptor와 primer를 이용하여 unhybridized sequence의 선별력을 높이고 크기가 작은 cDNA fragment는 제거되도록 고안된 것이다. 실험의 대략적인 순서와 원리는 Figure 5에 도식화되어 있다. Driver ds cDNA 2 μ L를 2 μ L의 adaptor 1과 adaptor 2에 ligation된 tester cDNA를 포함하는 2개 tube에 각각 첨가하였다. 그리고 98 $^{\circ}$ C에서 2분간 denature시키고 68 $^{\circ}$ C에서 8시간 동안 hybridization시켰다. 1st hybridization후에, 두 sample은 heat-denature된 driver와 함께 섞었고, overnight으로 68 $^{\circ}$ C에서 hybridization 시켰다.

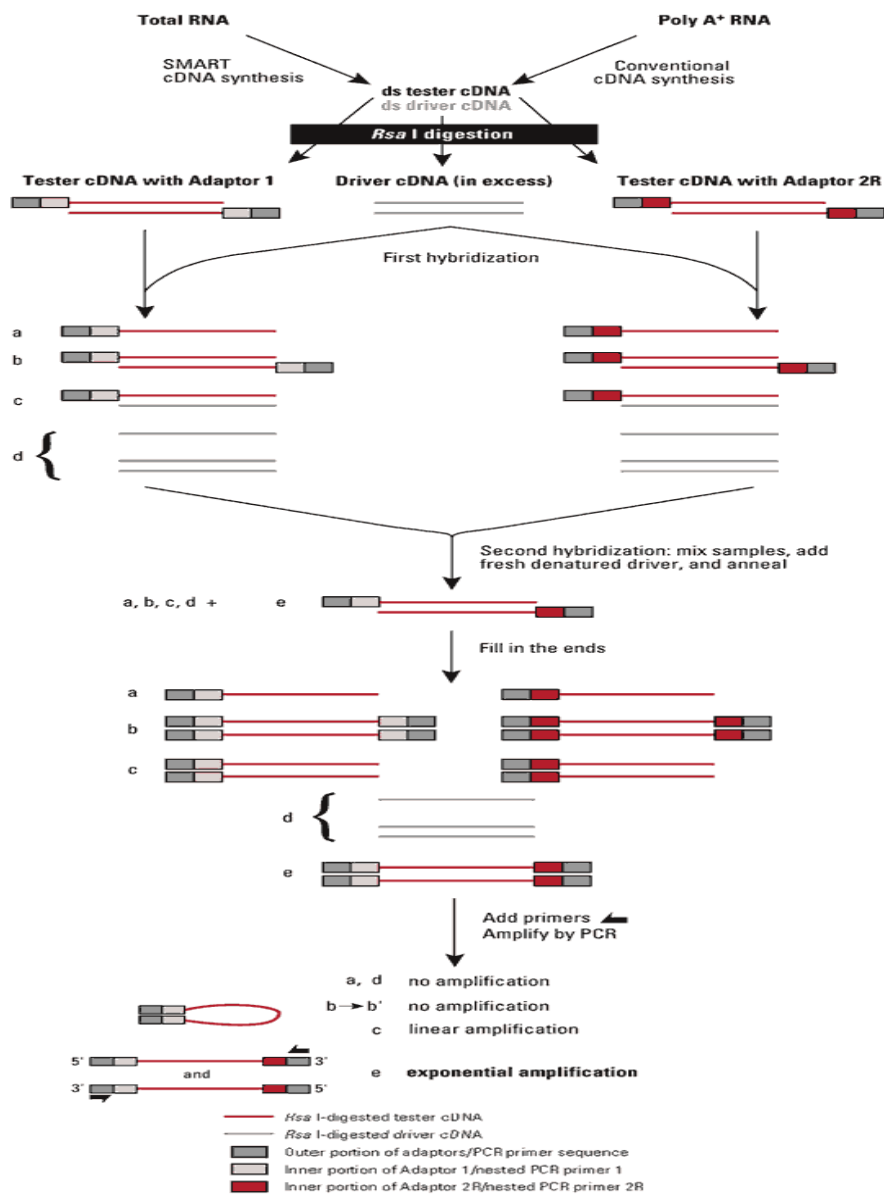


Figure 5. SSH의 기본 원리

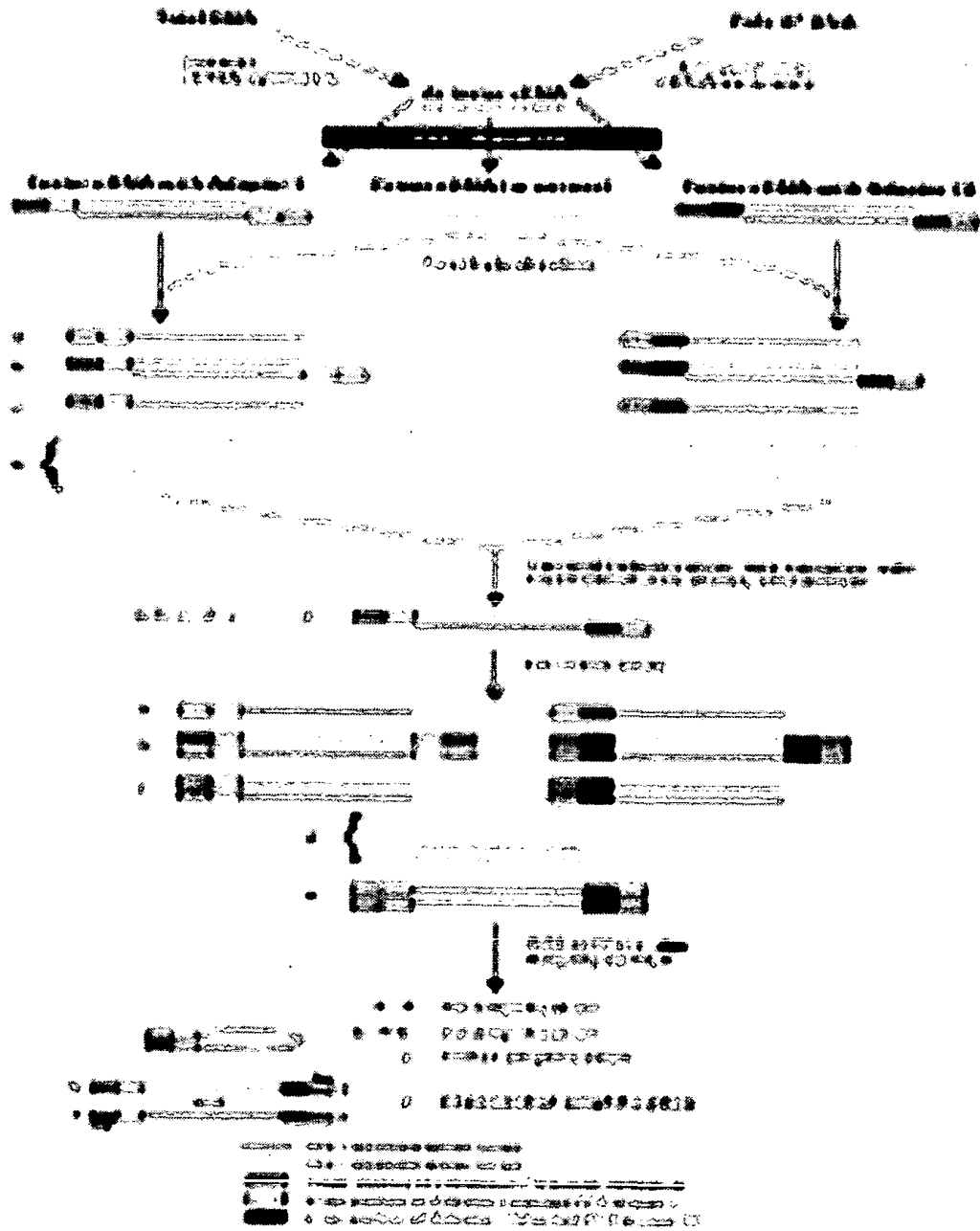


Figure 5. SSH의 기본 원리

나. PCR증폭 및 cloning

Suppression PCR을 수행하기 위하여 서로 다른 두 개의 adaptor primer와 nested primer를 사용하였고, 증폭된 PCR product를 TOPO TA cloning kit (invitrogen)로 subcloning 시켰으며, E. coli에 transformation하여 clone을 확보하였다.

다. Northern blot analysis

clon들이 저온 유도 유전자 인지를 재확인하기 위하여 RNA expression analysis를 수행하였다. DECAprime II DNA labeling kit(Ambion, USA)를 이용하여 probe를 제작하였고, Nylon membrane으로의 transfer는 Chomczynski의 방법으로 실시하였다. Nylon membrane에 3시간 동안 capillary transfer를 실시한후 nylon membrane을 0.2M sodium phosphate buffer에서 10분간 처리한 후 80℃에서 30분간 baking시켰다. 만들어진 probe와 nylon membrane은 20시간 동안 hybridization을 실시하였다.

Suppression subtractive hybridization방법을 이용하여 총 125개 clone을 획득했고, 이 중 25개 clone을 Northern분석하여 9개의 cold specific expression 유전자를 확인하였다 (Figure 6). 그리고 하나의 clone은 RT-PCR로 확인하였다. (data not shown)

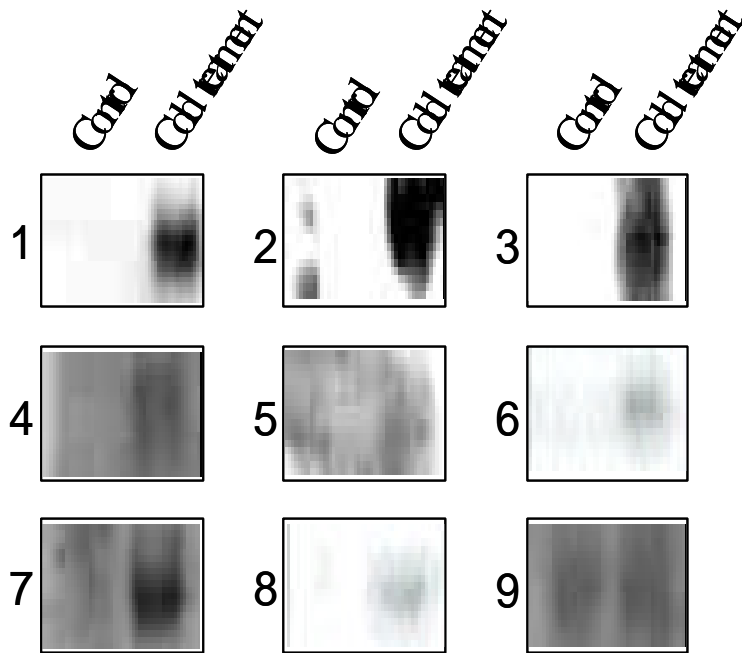


Figure 6. Northern 분석

라. DNA sequencing 및 homology 분석

DNA sequence는 PERKIN ELMER사의 automatic sequencer AB1310에 의하여 분석하였고, NCBI BLAST을 이용하여 nucleotide sequence 및 amino acid sequence homology를 비교하였다. 총 10개 clone에 대해서 sequencing되었고, homology 분석이 이루어 졌는데, 결과는 Figure 7과 같다.

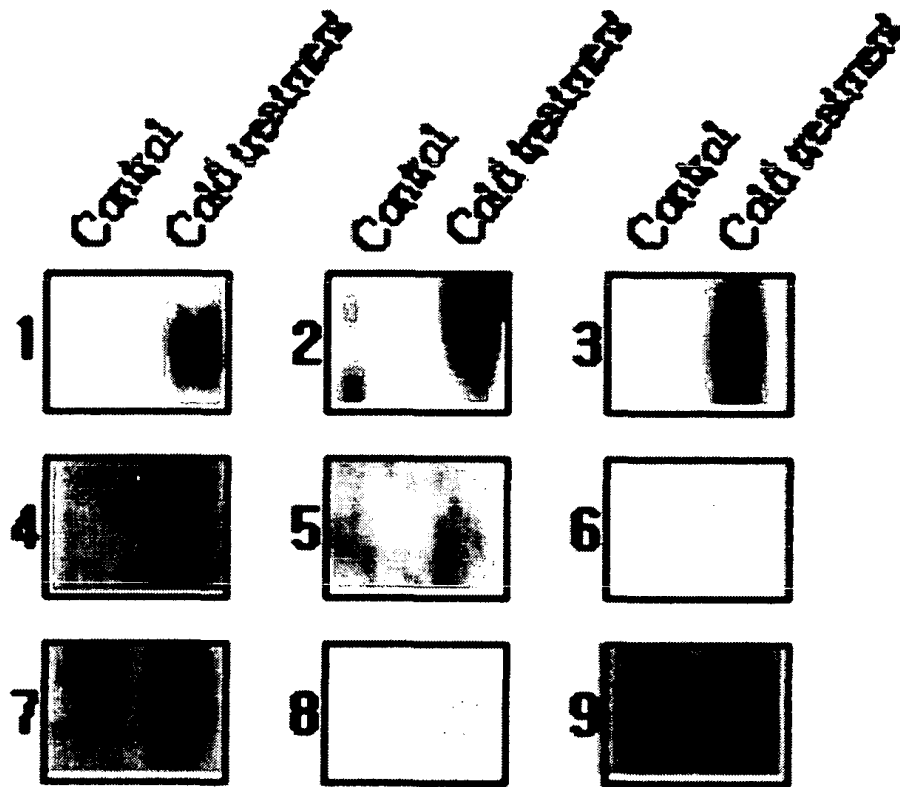


Figure 6. Northern 분석

라. DNA sequencing 및 homology 분석

DNA sequence는 PERKIN ELMER사의 automatic sequencer ABI310에 의하여 분석하였고, NCBI BLAST을 이용하여 nucleotide sequence 및 amino acid sequence homology를 비교하였다. 총 10개 clone에 대해서 sequencing되었고, homology 분석이 이루어 졌는데, 결과는 Figure 7과 같다.

clone	size of mRNA	Blast score	Homology
BLTI-1	0.7 kb	unknown	
BLTI-2	0.8 kb	hypothetical protein	61
BLTI-3	1.4 kb	unknown	
BLTI-4	0.9 kb	cutinase precursor	153
BLTI-5	0.7 kb	DNA-activated protein	
		Kinase catalase	61
BLTI-6	0.8 kb	hypothetical protein	68
BLTI-7	? kb	unknown	
BLTI-8	0.9 kb	unknown	
BLTI-9	1.2 kb	unknown	
BLTI-10	1.2 kb	unknown	

* Blast search was done at the amino acid level.

* BLTI : Barley Low Temperature Induced (BLTI)

BLTI-1

CGAGGACACGCTGCTCAAGCTCAACAATATCGCCGACCCCAAGTCCCTCAAGAAGGACCAGGTCCTTGATGTCCCGCTCC
CTGTTTGACGCTCATCAATCAGCAACAACCTCGGCTGATCATAATCTGCGCCTCCCGAACGGCACCTACGCGCTCACCGG
CAGGACTGCATCCAGTGCAGCTGCAGTTCAAACACCTTCAGCTAGATTGCACACTGCAAGGAAAAAGGGATGCCAGC
AGTGCCACCGTGAACGGAGGGCTCAAGCTTGGGGACACAAGCGGCGCCGTTGCGACTCGACGATGTGCGCTTACAGTG
GTTATTCCAACGGCTCTTCGTTACAGCATAACAGCCACTCTTTTCAAAAACAGACAGCACCAGCATGCGAGAAAGGAGGA
TCTTCGAGGTGCGGTGTTCCGCGGGTCCGTGTGGAGGATATCTGCCATCTCCTCCACATGGTGTGATCTTGGTATGCTT
CCTTTGATACCGAAGACTCCGACTCTAGCTGGTGTATACGCTCTGAAGAAAACCTCAAGATCAATTTGTCGATCGATGTGA
TTGTTGTTGTTGTAACCTGAAATTCCGATGACCGGTTTGTGCGAGCTTTTCGTTTTGACTATCTTTCTAGAGAATGAGTGG
CACTAGCTGCCTGAATAAAGCAATGACATGTGTAAGGTTTGCCTCTGGAAATGAATTGTAGT

BLTI-2

ACTGACCTCTTCTGCTCGCTGGATCTATCTTCTCYCTTCAGGTTGCCTCTACCTACTATCCAAGCTCGGTAGCACAAG
AGATBWAATCTTCTTATAAGACATACTCCCTTCATTCTAAATATAAGTCTTTCTAGAGATTCCACTATAGACTAGAT
ACGGAGCAAAATGAATGAACCTATACTCTAAAAGACGTCTATATACATCGTGTAGTCTTCTAGTGAATCTCTAAAAGG
ACTTATATTTAGGAACGAAG

BLTI-3

GCCCGGGCAGGTACAGTTACAGTTCCAACGTTTCAGCACAATAGTGATAGAAGTTACACGGAACCATTTACAAGCCGGCAT
CAGATTCTTTGCACTCTAGAAAHnAAACGAAAGAGGAAGTCTTGAAGTGCCTCAAACATCTCATGGCTCTTCAGGGGTT
TGAAATCTTTTGTCTCTGTAAAGCATCTTTCATTTGTTCCATCCATAAGCTTGCCTGATCTGTACCTCGGC

BLTI-4

AGCCTCTCCACCAAGCGGCCGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCATCATGCGAAACGATCCTCATCTGTCTC
TTGATCAGATCTGWCCTGCGCATCRHVVAAGCAATCCAAGTTTACTTTGCAGGGCTTCCCAACCTTACCAGAGGGCGCCC

CAGCTGGCAATTCCGGTTGCTTGTCCATAAAACCGCCAGTCTAGCTATCGCCATGTAAGCCACTGCAAGCTACCT
GCTTCTCTTTGCGCTTTCG

BLTI-5

GGGATCCCTGCTCACCCATGATCATCACTAGTTCATGTGCTGGCTTACAAGATGAAGCTCACCTCGTACTTTAGACTCA
GGTCARDRCRGTTSGCTCATATATGTCCATGTTCCCTTAATGGGCGTCTGTATCAACTATCCTCATATGTAATTCTTTTC
AGTCCGTGTTGCTGTATTTTTTCGTCCCTTGATGTGGTACCTCGGCCGCGACCACcGCTAAGGGG

BLTI-6

ACTGACCTCTTCTGCTTCGCTGGATCTATCTTCTCTCTTCAGGTTGCCTCTACCTACTATCCAAGCTCGGTAGCACAAAG
AGGADYAAATCTTCTCATAAGACATACTYCCCTTCATTCCCTAAATATAAGTCTTTCTAGAGATTCCACTATAGACTAGA
TACGGAGCAAAATGAATGAACCTATACTCTAAAAGACGTCTATATACATCATGTAGTCTTCTAGTGGGATCT

BLTI-7

ACGGCCGACCAAGGACGCTGTCAAGGGAGGCAGGTGGCGTTATGATCGGTAAGGCTCTTGAGGCACGATGTTGAGGAGGC
CCCTTCTAATGTTGAGCGGCTCTATGTCGCTAGGATCGAGTCCCGCACATTTCCCGACCGCCGTTGCGTGTGACTGAGT
GAACGAATGTGGCCACAGGGTCGGCCGT

BLTI-8

GCGTNNCNNTTAGGGGNCNNACNCAGGNNCNTTTGCGGNGGNACCCNNGAGNNAACGGCCGCAAGAGAGCANGGAANA
CGCGCAACAAANANAAANANCACCACNGCGGCNCGAGCAGGNGNGAACCAGGCNNACGGAACNTAGNNACNCANAAAGAN
CNGGCGGGANACTNCANAGGGAACGNAACAAG

BLTI-9

TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTNNGGGGGGGGGGGGGGGGCNAAAAAAGTGTNNGGGGGGTNGTTATTTTTTTTTNTTG
ANNGGGGGGGGGGTANGAAAANCCTTTGGGGTNNGAGACTGGGAGGNNAGNNGAGTNGGTNGGNCTNAGAGGGGAGT
ATNGNGTGAGGNCGTNNAGAAGAGNGNGAGAGNTGNGNGCGGGA

BLTI-10

GCGTNNCNNTTAGGGGNCNNACNCAGGNNCNTTTGCGGNGGNACCCNNGAGNNAACGGCCGCAAGAGAGCANGGAANA
CGCGCAACAAANANAAANANCACCACNGCGGCNCGAGCAGGNGNGAACCAGGCNNACGGAACNTAGNNACNCANAAAGAN
CNGGCGGGANACTNCANAGGGAACGNAACAAGNAAAATGGNCNAGC

Figure 7. 염기서열 분석 및 homology test

마. SSH clone의 추가분석

약 200개의 SSH clone을 확보하였으며, automatic sequencer ABI

310(PERKIN ELMER)을 이용하여, 추가로 DNA sequence를 분석하였고, NCBI BLAST을 이용하여 nucleotide sequence 및 amino acid sequence homology를 비교하였다. (Figure 8)

<u>clone</u>	<u>partial seq</u>	<u>Best Homology</u>	<u>Origin of Clone</u>	<u>Accession No.</u>
BLTI-1	400	unknown	SSH	AF069327
BLTI-2	full	hypothetical protein	SSH [1.1 kb]	AF069328
BLTI-5	full	DNA-activated protein	SSH [0.7 kb]	AF069331
BLTI-6	?	hypothetical protein	SSH	-
BLTI-7	0.9 kb	unknown	DDRT	AF069332
BLTI-12	246.	unknown	SSH	-
BLTI-20	260.	putative protein	SSH	-
BLTI-26	198.	hypothetical protein	SSH	-
BLTI-30	334.	putative protein	SSH	-
BLTI-31	53.	unknown	SSH	-
BLTI-33	121.	Ig heavy chain-like protein	SSH	-
BLTI-34	60 + poly(A).	wheat gst2 gene	SSH	-
BLTI-35	95+ poly(A).	unknown	SSH	-
BLTI-36	240 + poly(A).	hypothetical protein	SSH	-
BLTI-43	340.	putative protein	SSH	-
BLTI-52	180 + poly(A).	fatty acid synthase subunit	SSH	-
BLTI-56	100.	protein kinase	SSH	-
BLTI-57	120.	Ig heavy chain-like protein	SSH	-
BLTI-61	160 + poly(A)	unknown	SSH	-
BLTI-76	240.	H. vulgare nucellin gene	SSH	-
CLONE 23	240 + poly(A)	unknown	SSH	-
CLONE 37	240 + poly(A)	unknown	SSH	-

CLONE 40	80 + poly(A)	unknown	SSH	-
CLONE 65	no sequencing		SSH	-
CLONE 69	360.	putative protein	SSH	-
CLONE 71	350 + poly(A)	putative protein	SSH	-
CLONE 73	no sequencing		SSH	-
CLONE 77	no sequencing		SSH	-
CLONE 80	no sequencing		SSH	-
CLONE 81	no sequencing		SSH	-
CLONE 86	no sequencing		SSH	-
CLONE 88	no sequencing		SSH	-
CLONE 89	no sequencing		SSH	-
CLONE 90	no sequencing		SSH	-
CLONE 93, 98, 99	: no sequencing		SSH	-
CLONE 101 ~125	[except for 105,114]		SSH	

Figure 8. SSH clone의 염기서열 분석

바. RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends) library 제작 및 full cDNA cloning

저온처리를 한 식물체에서 total RNA를 추출한 후 paramagnetic oligo dT Dynabeads(Dynal, Norway)를 이용하여 total RNA에서 polyadenylated mRNA를 분리하였다. 이를 template로 Marathon cDNA amplification kit를 이용하여 cDNA library를 합성하였고, full cDNA를 cloning 하기 위하여, 5'-RACE (5'-rapid amplification of cDNA ends)와 3'-RACE를 수행하였다. 이러한 실험 결과, 이미 확보된 clone들 중에 blti-2와 blti-6는 family member로 추정되었고, novel gene으로 추정되는 blti-2의 full cDNA를 확보하였다. 또한,

blti-5도 full cDNA를 확보하였는데, 이미 보고된 blt-14 family member로 확인되었다.

사. blti-5와 blti-2 유전자 분석

1) DNA염기서열 및 amino acid 서열

Primer extension과 RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)기법으로 full cDNA와 ORF(Open Reading Frame)를 확보하였다 (Figure 9).

BLTI-5 (Full-Length)

```
CAGCCACGCAACTACCCACACATCCACCCAAGCAACATTATCTCATCAGTAGTATTACCCAGAGCCTCCCA
CTTTGCCATAGTTGCTAAGTGGGAGGCTTCTGGTAATATGGCAAAGTGCCTCGCCGTCGCGATCCTTCTACT
GGTGGCGCTCGGTAAGTGCACGGGAGGGAGCTGAACCAGAAGGACCAGGCACTCGCAACGGCACACGGCGC
CGGTGCCGTCGGCGAGTCTGAAGTGTGGGGTTGCCTGACCTGCCTACTGTGGGAACAGTTACCGGTACCAG
CACCCTAACGCCCCGTTGGTGGTGCTTCTGGGATCCCTGCTCACCCATGATCATCACTAGTTCATGTGCT
GGCTTACAAGATGAAGCTCACCTCGTGACTTTAGACTCAGGTCATTCACGTTTGGCTCATATATGTCCATGT
TCCTTAATGGGCGTCTGTATCAACTATCCTCATATGTAATCTTTTCAGTCCGTGTTGCTGTATTTTCGTC
CCTTGATGTGGTACAGTATCGTCAGCGTAAAAACTGTAAATTCGACTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Amino acid seq.

```
MAKCLAVAILLLVALAYCDGRELNQKDQALATAHGAGAVGESEVLGLPDLPTVGTVTGTSTTNGPLVVLPGI
PAHP
```

☞ Open reading frame of BLTI-2 (full-length)

```
CCACGGCGTGGGTTCCGCCATTCCGTCTGCCCGGAGGGATTGGGTCGGACCTGGA-60
```

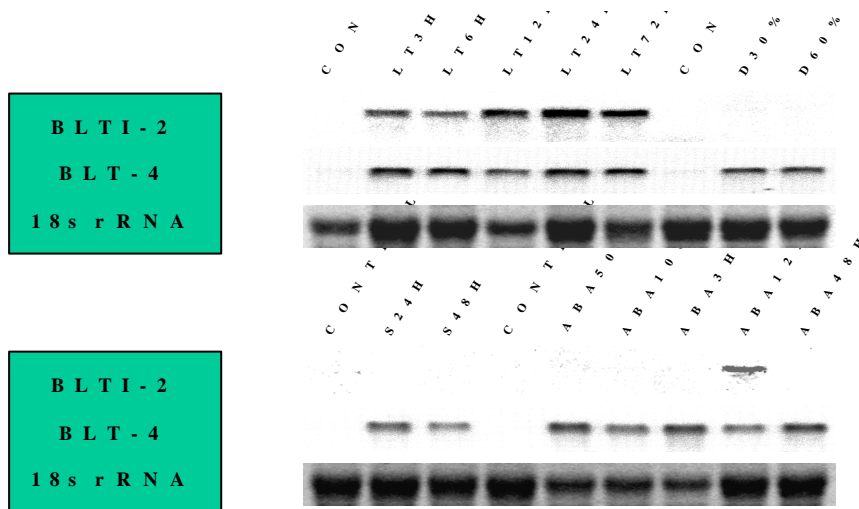
GGCGGGCATCGAGAAGGTCATCTACGCCTGCCGCTTCATGGCCTTCCTCGCCATCGCCGG-120
M A F L A I A G
ATCTCTCGCCGGATCCGTCCTCTGCTTCCTCAAGGGCTGCACTTTTGTGATGGACGCCTT-180
S L A G S V L C F L K G C T F V M D A F
CGTGGAGTACTACTTGC CGGGGATGGGAAGGTCGTGCTCATGCTGATTGAAGCCATTGA-240
V E Y Y L R G D G K V V L M L I E A I D
TATGTAICTCATCGGCACCGTCATGTTTGTCTTCGGGACGGGCCTGTACGAGCTGTTCAT-300
M Y L I G T V M F V F G T G L Y E L F I
CAGTAACATGGACATTGCAAACAGTCCCATGACCGCTCCAGCCTCTTTGGCTTGTTCAA-360
S N M D I A K N S H D R S S L F G L F K
GCTTCCGGAACGGCCCAAGTGGCTGGAAATCCGCTCGGTGAGTGACCTCAAGACAAAGCT-420
L P E R P K W L E I R S V S D L K T K L
GGGTATGTAATCGTCCTGGTTCTGCTGGTTGGCATCTCCGAGAAGAGCAAGAGGGTGAC-480
G H V I V L V L L V G I S E K S K R V T
CATCACGTCGTGACTGACCTCTTCTGCTTCGCTGGATCTATCTTCCTCTCTCAGGTTG-540
I T S C T D L F C F A G S I F L S S G C
CCTCTACCTACTATCCAAGCTCGGTAGCACCAAAGGAGGGAGTCATGCCTGAAACAGAAA-600
L T L L S L L G S T L G G S H A
AATCTTCTTCATAAGACATACTCCCTTCATTCCCTAAATATAAGTCTTTCTAGAGATTCCA-660
CTATAGACTAGATACGGAGCAAAATGAATGAACCTATACTCTAAAAGACGTCTATATACA-720
TCGTGTAGTCTTCTAGTGGAATCTCTAAAAAGGACTTATATTTAGGAACGGAGGGAGTAG-780
ATCTGGTGTGTGTCCTTTTCGGCACTCCAGGTTGTCTATGCCTCATGTACTGCTTGATG-840
GATTGACATTAGGC GACTATATAGTGGTATATATAGTGATGTACATCGTCTGATATTGTA-900
ACTTGCTGCTAAGATGGTGTCTATGATCAATAACAGATATATTGTGCCAAAAAAAAAAAAA-960
AAA-Poly(A)_n

Figure 9. b1ti-5와 b1ti-2의 DNA염기서열 및 amino acid 서열

2) 다른 스트레스에 의한 발현 양상.

분석된 b1ti-2 [whole sequence]는 다른 일반적인 저온 처리에 의해 야기되는 유전자들과 달리 특히 저온 특이적 특징을 보였으며, 저온처리 초기(3시간 후)부터 유전자 발현 양상이 나타났다. 또한 ABA 처리 외에 다른 처리구에서는 유전자 발현이 확인되지 않았으며 ABA처리구의 경우, 초기(3시간

후)에서는 유전자 발현이 확인되지 않았으나 특히하게도 12시간 처리 후에 최대의 발현 양상을 보이다가 이후 급격한 발현 감소를 보여 처리후 24시간에서는 유전자 발현을 확인할 수 없는 일시적으로 발현되는 양상을 보였다. 이후 이러한 양상에 대한 좀더 세밀한 characterization이 요구된다. 실험의 정확성을 확인하기 위하여 대조구를 사용하였는데, 대조구로서 일반적인 스트레스에 야기되는 유전자로서 알려져 있는 BLT-4를 사용하였다. 18S rRNA는 모두 동일한 양을 loading 하였음을 나타내고있다. (Figure 10)



- 처리 형태 -

C : Control [Room Temperature]

1 : Low Temperature [3 h]

2 : Low Temperature [6 h]

3 : Low Temperature [12 h]

4 : Low Temperature [24 h]

5 : Low Temperature [72 h]

6 : Drought [30% loss of fresh weight]

7 : Drought [50% loss of fresh weight]

8 : Salt [250 mM NaCl for 24 h]

9 : Salt [250 mM NaCl for 48 h]

10 : ABA [50 μM ABA for 24 h]

11 : ABA [100 μM ABA for 24 h]

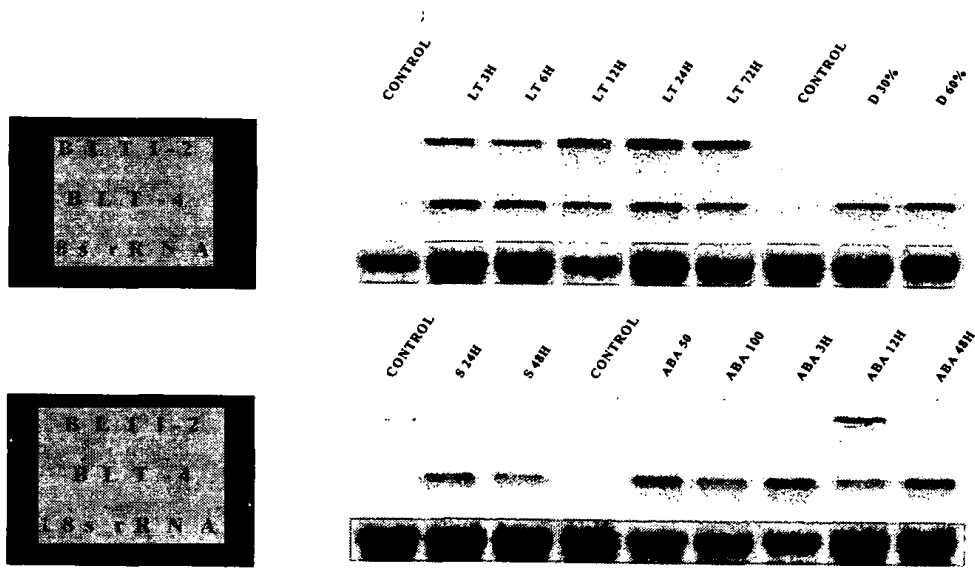
12 : ABA [100 μM ABA for 3 h]

13 : ABA [100 μM ABA for 12 h]

14 : ABA [100 μM ABA for 48 h]

Figure 10. 여러 가지 처리에 의한 blt1-2의 RNA 발현 양상

후)에서는 유전자 발현이 확인되지 않았으나 특이하게도 12시간 처리 후에 최대의 발현 양상을 보이다가 이후 급격한 발현 감소를 보여 처리후 24시간에서는 유전자 발현을 확인할 수 없는 일시적으로 발현되는 양상을 보였다. 이후 이러한 양상에 대한 좀더 세밀한 characterization이 요구된다. 실험의 정확성을 확인하기 위하여 대조구를 사용하였는데, 대조구로서 일반적인 스트레스에 야기되는 유전자로서 알려져 있는 BLT-4를 사용하였다. 18sRNA는 모두 동일한 양을 loading 하였음을 나타내고있다.(Figure 10)



- 처리 형태 -

C : Control [Room Temperature]

1 : Low Temperature [3 h]

2 : Low Temperature [6 h]

3 : Low Temperature [12 h]

4 : Low Temperature [24 h]

5 : Low Temperature [72 h]

6 : Drought [30% loss of fresh weight]

7 : Drought [50% loss of fresh weight]

8 : Salt [250 mM NaCl for 24 h]

9 : Salt [250 mM NaCl for 48 h]

10 : ABA [50 μ M ABA for 24 h]

11 : ABA [100 μ M ABA for 24 h]

12 : ABA [100 μ M ABA for 3 h]

13 : ABA [100 μ M ABA for 12 h]

14 : ABA [100 μ M ABA for 48 h]

Figure 10. 여러 가지 처리에 의한 bti-2의 RNA 발현 양상

3) *blt1-2*의 genomic structure

*blt1-2*의 유전자 copy수를 확인하기 위하여 genomic DNA도 Southern 분석을 하였고(Figure 11), 그 결과 small gene family도 나타났는데, 아마도 *blt1-6*가 여기에 포함되는 것처럼 보였다. 실제로 *blt1-6*의 RNA 발현양상이 *blt1-2*와 동일하게 나타났다.

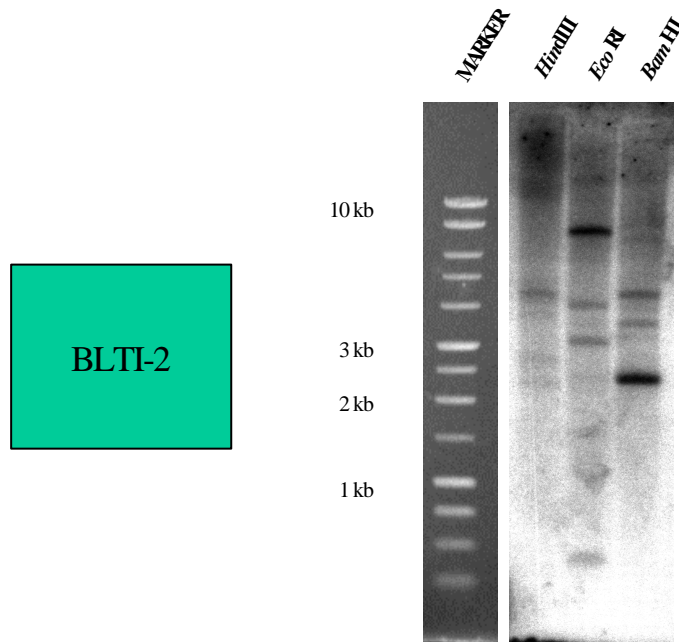


Figure 11. *blt1-2*의 Genomic DNA southern 분석

3) b1ti-2의 genomic structure

b1ti-2의 유전자 copy수를 확인하기 위하여 genomic DNA로 Southern 분석을 하였고(Figure 11), 그 결과 small gene family로 나타났는데, 아마도 b1ti-6가 여기에 포함되는 것처럼 보였다. 실제로 b1ti-6의 RNA 발현양상이 b1ti-2와 동일하게 나타났다.

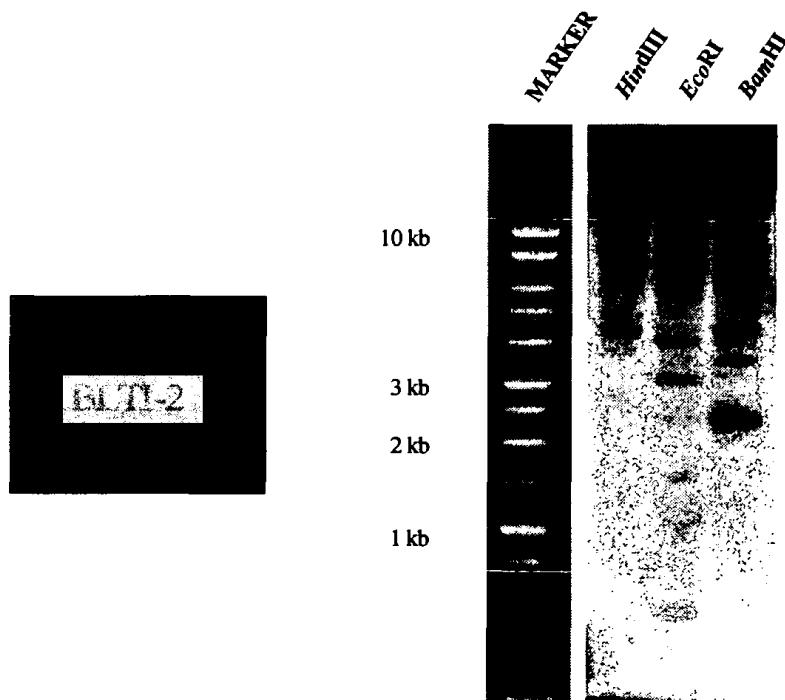


Figure 11. b1ti-2의 Genomic DNA southern 분석

4) blast homology search

확보된 Blti-2의 whole sequence를 가지고 blast subroutine을 이용하여 Gene bank에 등록된 sequence의 유사성이 있는 다른 유전자들과 비교하였다. 그 결과, Transmembrane proteins중의 putative protein과 매우 높은 homology를 나타내었으며, 아직까지 그 기능이 밝혀지지 않은 유전자임을 확인하였는데, search 결과는 다음과 같다 (Figure 12).

blastx : blti-2

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	Reading Frame	High Score	Probability P(N)	N
emb CAA18626 (AL022580) putative protein [Arab...	+2	217	1.6e-40	4
emb CAA07299 (AJ006877) putative inner membran...	+2	105	2.2e-05	1
gi 3282738 (AF041837) putative membrane-asso...	+2	102	5.8e-05	1
gi 3282730 (AF041836) putative membrane-asso...	+2	102	5.8e-05	1
gi 2982987 (AE000682) putative protein [Aqui...	+2	100	0.00011	1
emb CAA72708 (Y11974) putative innermembrane p...	+2	100	0.00011	1
sp P52082 YQHA_ECOLI HYPOTHETICAL 18.6 KD PROTEIN IN H...	+2	86	0.0093	1
emb CAA50612 (X71612) unknown reading frame [B...	+2	63	0.088	2
sp P44010 YQHA_HAEIN HYPOTHETICAL PROTEIN HI0507 /pir ...	+2	63	0.84	2

##

emb|CAA18626| (AL022580) putative protein [Arabidopsis thaliana]

Length = 275 Plus Strand HSPs:

Score = 130 (59.6 bits), Expect = 1.6e-40, Sum P(4) = 1.6e-40

Identities = 25/33 (75%), Positives = 27/33 (81%), Frame = +2

Query: 56 LEAGIEKVIYACRFMAFLAIIAGSLAGSVLCFLK 154

LE GIEKVIY+CRFM FL GSL GSVLCF+K

Sbjct: 97 LEEGIEKVIYSCRFMTFLGTLGSLGSLVLCFLK 129

Score = 46 (21.1 bits), Expect = 1.6e-40, Sum P(4) = 1.6e-40

Identities = 7/24 (29%), Positives = 16/24 (66%), Frame = +2

Query: 155 GCTFVMDAFVEYYLRGDGKVVLM 226

GC +V+D+F++Y + + L++

Sbjct: 142 GCMYVVDVDFLQYVNRGKVIIFLLV 165

Score = 70 (32.1 bits), Expect = 1.6e-40, Sum P(4) = 1.6e-40

Identities = 13/18 (72%), Positives = 16/18 (88%), Frame = +2

Query: 269 VFGTGLYELFISNMDIAK 322

VFG GLYELFISN+D ++

Sbjct: 169 VFGLGLYELFISNLDTSE 186

Score = 217 (99.4 bits), Expect = 1.6e-40, Sum P(4) = 1.6e-40
 Identities = 44/80 (55%), Positives = 55/80 (68%), Frame = +2
 Query: 332 DRSSLFGLFKLPERPKWLEIRSVSDLTKXXXXXXXXXXXXXXXXSEKSKRVTTITCTDLFCF 511
 +RSSLFG+F L ERP+WLE++SVS+LTKK +KSKRV ITS TDL C
 Sbjct: 195 NRSSLFGMFTLKERPQWLEVKSVSELKTKLGHVIVMLLLIGLFDKSKRVVITSVTDLLCI 254
 Query: 512 AGSIFLSSGCLYLLSKLGST 571
 + SIF SS CL+LLS+L +
 Sbjct: 255 SVSIFSSACLFLSRLNGS 274

##

emb|CAA07299| (AJ006877) putative inner membrane protein [Buchnera
 aphidicola] Length = 167 Plus Strand HSPs:
 Score = 105 (48.1 bits), Expect = 2.2e-05, P = 2.2e-05
 Identities = 29/91 (31%), Positives = 46/91 (50%), Frame = +2
 Query: 56 LEAGIEKVIYACRFMAFLAIAGSLAGSVLCFLKGCTFVMDAFVEYYLRGDGKVVMLIEA 235
 +E IEK+IYA R++ F G G +L LK ++ + +VL+++
 Sbjct: 1 MENIIEKIIYASRWLMFPVNIIGLSFGFILLTLKFFQIIIFILPNILTMSEGLVLIVLSL 60
 Query: 236 IDMYLIGTVMFVFGTGLYELFISNMDIAKQS 328
 ID+ L+G ++ + YE FIS MDI S
 Sbjct: 61 IDIALVGGLLVMMFSGYENFISKMDIKDDS 91

##

gi|3282738 (AF041837) putative membrane-associated protein [Buchnera
 aphidicola] Length = 167 Plus Strand HSPs:
 Score = 102 (46.7 bits), Expect = 5.8e-05, P = 5.8e-05
 Identities = 28/87 (32%), Positives = 45/87 (51%), Frame = +2
 Query: 56 LEAGIEKVIYACRFMAFLAIAGSLAGSVLCFLKGCTFVMDAFVEYYLRGDGKVVMLIEA 235
 +E IEK IYA R++ F G G +L LK ++ + +VL+++
 Sbjct: 1 MERIIEKAIYASRWLMFPVYVGLSFGFILLTLKFFQIIVFIIPDILAMSESGLVLVVLVSL 60
 Query: 236 IDMYLIGTVMFVFGTGLYELFISNMDI 316
 ID+ L+G ++ + YE FIS MDI
 Sbjct: 61 IDIALVGGLLVMMFLGYENFISKMDI 87

##

gi|3282730 (AF041836) putative membrane-associated protein [Buchnera
 aphidicola] Length = 167 Plus Strand HSPs:
 Score = 102 (46.7 bits), Expect = 5.8e-05, P = 5.8e-05
 Identities = 28/87 (32%), Positives = 44/87 (50%), Frame = +2
 Query: 56 LEAGIEKVIYACRFMAFLAIAGSLAGSVLCFLKGCTFVMDAFVEYYLRGDGKVVMLIEA 235
 +E IEK IYA R++ F G G +L LK ++ + +VL ++
 Sbjct: 1 MEKIIIEKSIYASRWLMFPVYVGLSFGFILLTLKFFQIIIFIIIPDILAMSESGLVLAVLVSL 60
 Query: 236 IDMYLIGTVMFVFGTGLYELFISNMDI 316
 ID+ L+G ++ + YE FIS MDI
 Sbjct: 61 IDIALVGGLLVMMFSGYENFISKMDI 87

```

##
gi|2982987 (AE000682) putative protein [Aquifex aeolicus]
      Length = 175 Plus Strand HSPs:
      Score = 100 (45.8 bits), Expect = 0.00011, P = 0.00011
      Identities = 18/46 (39%), Positives = 31/46 (67%), Frame = +2
Query:  209 KVLMLIEAIDMYLIGTVMFVFGTGLYELFISNMEDIAKQSHDRSSL 346
      K++ +I ++D++LI T + +F GLYELFIS +D A++ S +
Sbjct:  60 KILASVISSLDLFLIATFLIIFSLGLYELFISKIDPAERDQRSSRI 105

##
emb|CAA72708| (Y11974) putative innermembrane protein [Buchnera aphidicola]
      Length = 178 Plus Strand HSPs:
      Score = 100 (45.8 bits), Expect = 0.00011, P = 0.00011
      Identities = 26/83 (31%), Positives = 43/83 (51%), Frame = +2
Query:  68 IEKVIYACRFMAFLAIAGSLAGSVLCFLKGCTFVMDAFVEYYLRGDGKVVMLIEAIDMY 247
      IEK+IY R++ F G +L LK V F E + + ++L+++ ID+
Sbjct:  5 IEKMIYISRWLIFPIYLGLSFCLILLTLKFFQLVFFIFPEIFFISEGLILVILSLIDIV 64
Query:  248 LIGTVMFVFGTGLYELFISNMEDI 316
      L+G ++ + YE FIS M+I
Sbjct:  65 LVGGLLVMMFSGYENFISKMNI 87

##
sp|P52082|YQHA_ECOLI HYPOTHETICAL 18.6 KD PROTEIN IN HYBA-EXBD
      INTERGENIC REGION (F164) gi|882531 (U28377) ORF_f164 [Escherichia
      coli] gi|1789376 (AE000382) orf, hypothetical protein [Escherichia
      coli] Length = 164 Plus Strand HSPs:
      Score = 86 (39.4 bits), Expect = 0.0093, P = 0.0093
      Identities = 21/89 (23%), Positives = 43/89 (48%), Frame = +2
Query:  56 LEAGIEKVIYACRFMAFLAIAGSLAGSVLCFLKGCTFVMDAFVEYYLRGDGKVVMLIEA 235
      +E +E +YA R++ G V LK ++ + + ++L+L+
Sbjct:  1 MERFLENAMYASRWLLAPVYFGLSLALVALALKFFQEIIHVLPNIFSMAESDLILVLLSL 60
Query:  236 IDMYLIGTVMFVFGTGLYELFISNMEDIAK 322
      +DM L+G ++ + YE F+S +DI++
Sbjct:  61 VDMTLVGGLLVMMFSGYENFVSQLDISE 89

```

Figure 12. blti-2의 homology test

5) blti-2의 단백질 예상구조

blti-2가 발현하는 protein의 구조를 조사한 결과 전형적인 transmembrane protein형태인 친수성 domains과 소수성 domains의 반복적인 구조를 나타내었

다 (Figure 13). 또한, b1ti-2의 domain search를 해 본 결과, 3개의 transmembrane domain을 가지는 putative transmembrane protein이라는 것을 확인했으며, 아마도 cold stress에 반응하여 membrane의 안정성을 강화시키는 역할을 하리라고 추측된다 (Figure 14).

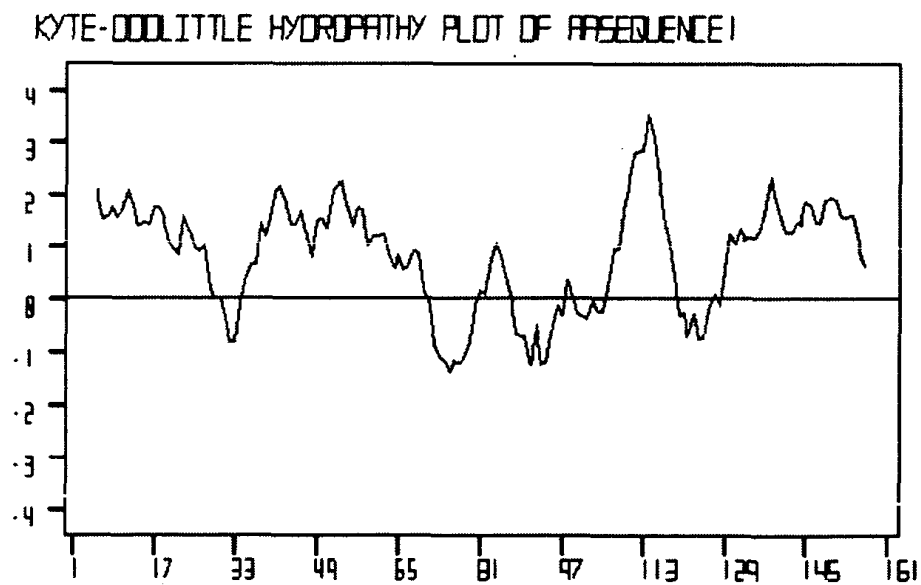


Figure 13. b1ti-2의 Hydrophathy plot

domain I : secretory signal sequence at the N-terminal

domain II: glycine rich motif G-X-G-X--(V)G

domain III: transmembrane domain

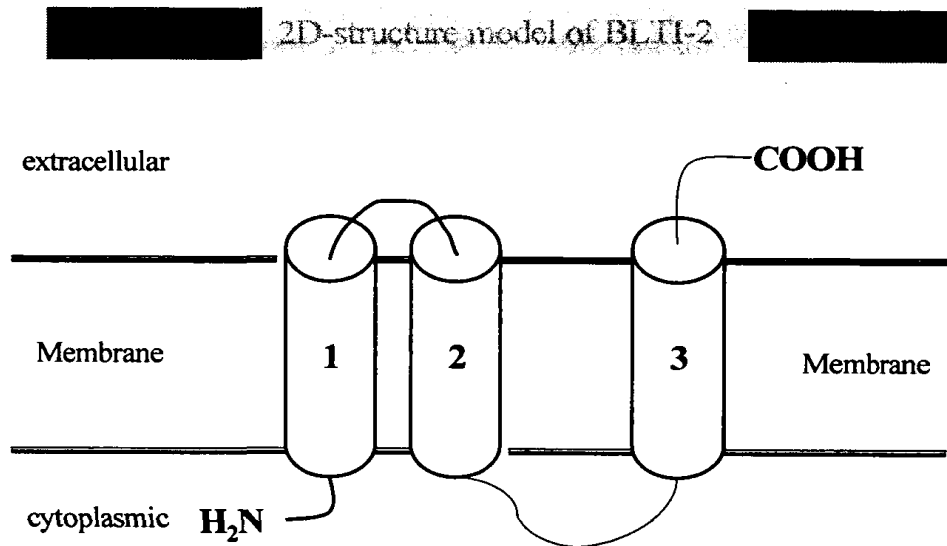


Figure 14. blti-2의 2D 구조 모델

4. ODD(Order Differential display)를 이용한 저온유도 유전자 분리

가. ODD(Order Differential Display)의 원리

앞에서 사용한 DDRT와 SSH의 의 기법에 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)의 특징을 약간 혼용한 방법으로, Figure 15에 도식화되어 있다. adaptor의 특성에 의하여 suppression PCR이 수행되고, 그 결과, 저온에 의해 유도되는 유전자를 분리할 수 있다.

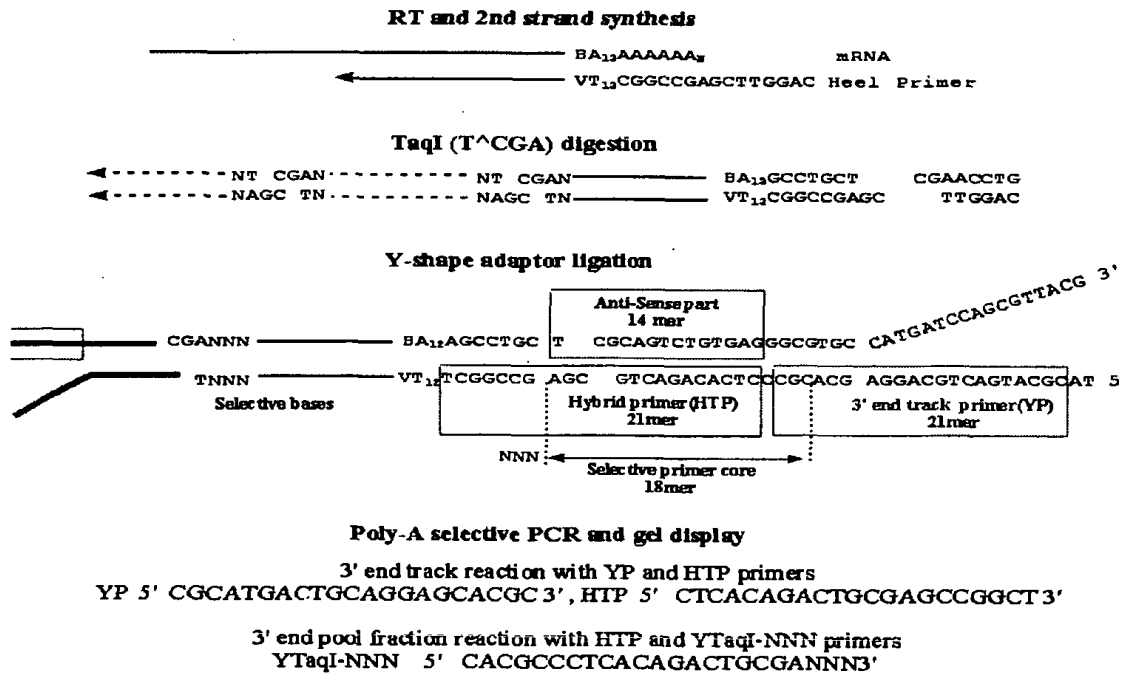


Figure 15. ODD에 이용되는 adaptor의 구조.

나. ODD에 의한 유전자의 분리

제 3 본엽까지 출현한 보리를 4℃에서 각각 24, 48, 그리고 72시간을 처리하고, mRNA를 추출하여 cDNA를 합성하였다. 제작한 adaptor를 ligation한 후, 적절한 primer로 suppression PCR을 수행하여, polyacrylamide gel에서 separation시켰다. silver staining을 이용하여 처리시간별로 차이나는 band를 확인하였고(Figure 16), 이를 분리하여 재증폭 후, TA-cloning을 수행하였다.

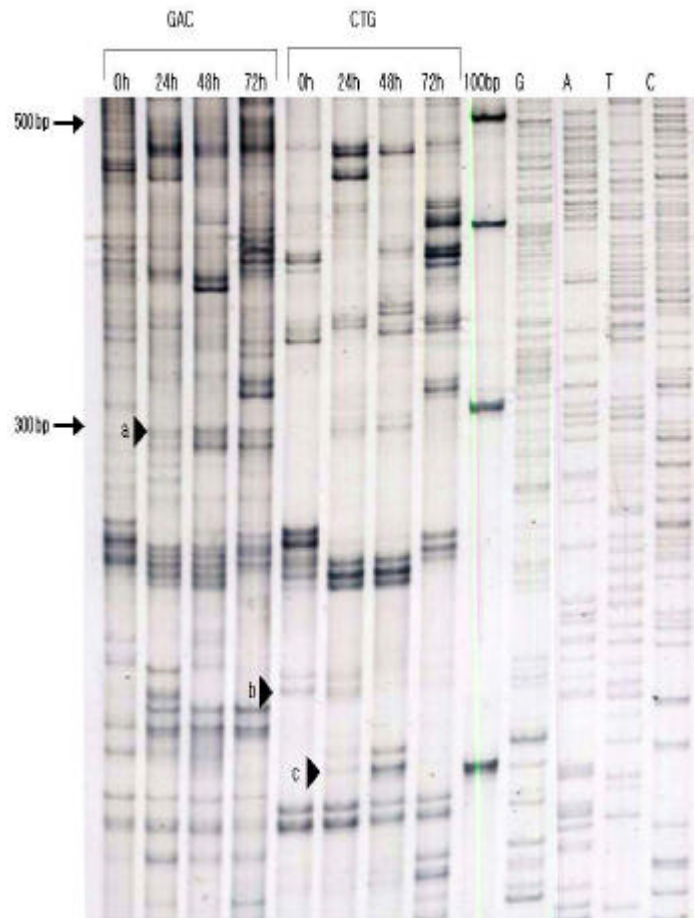


Figure 16. DDD에 의한 유전자 발현 양상.

다. 분리된 유전자의 northern 분석

동일한 처리구도 Northern blot을 수행한 결과, 저온에 의해서 유도된 유전자임이 확인되었다 (Figure 17).

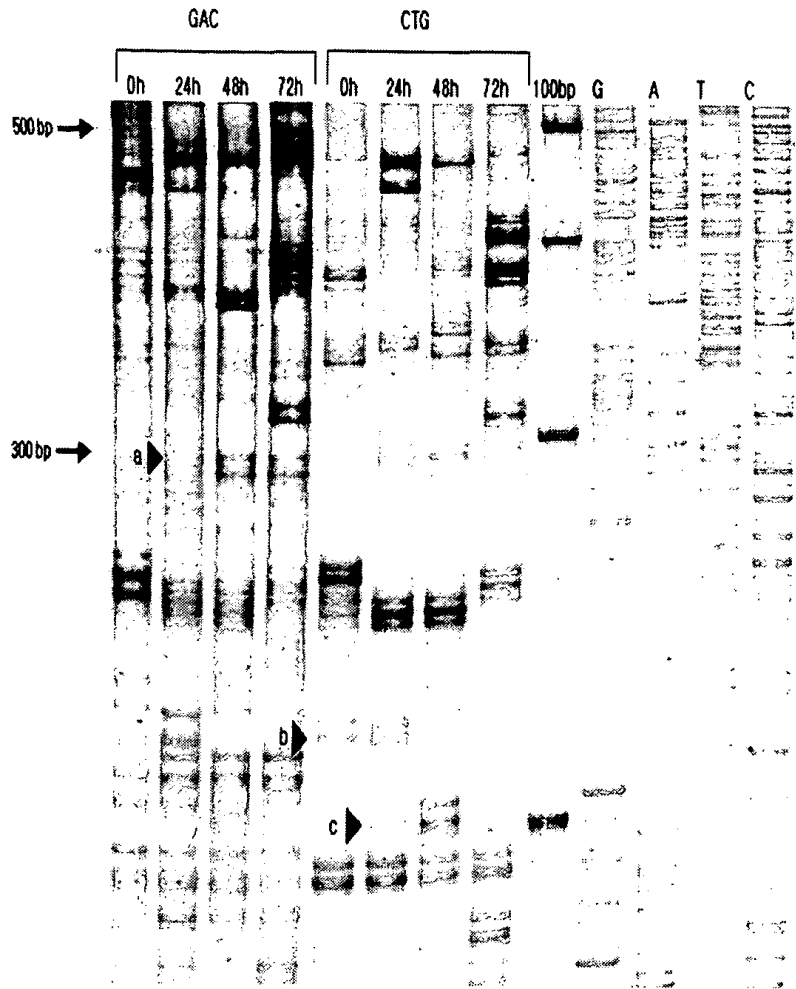


Figure 16. ODD에 의한 유전자 발현 양상.

다. 분리된 유전자의 northern 분석

동일한 처리구로 Northern blot을 수행한 결과, 저온에 의해서 유도된 유전자임이 확인되었다 (Figure 17).

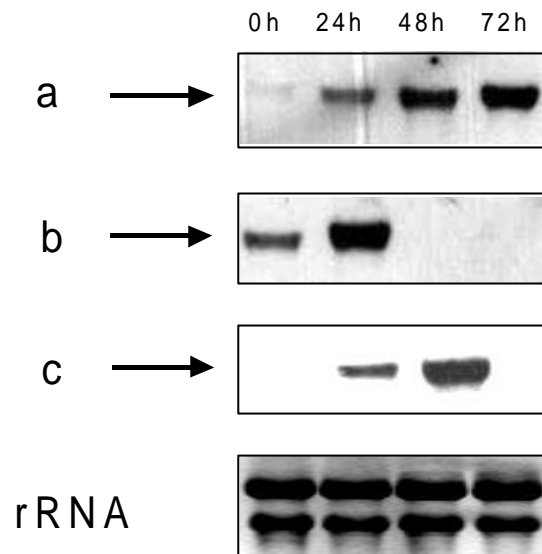


Figure 17. RNA 발현 분석

라. 분리된 유전자의 염기서열 분석

염기서열을 분석하고 homology search를 해 본 결과, 모두 밝혀지지 않은 유전자도 추정 되었는데, RACE와 같은 기법으로 분리된 유전자를 동정하고 있다.

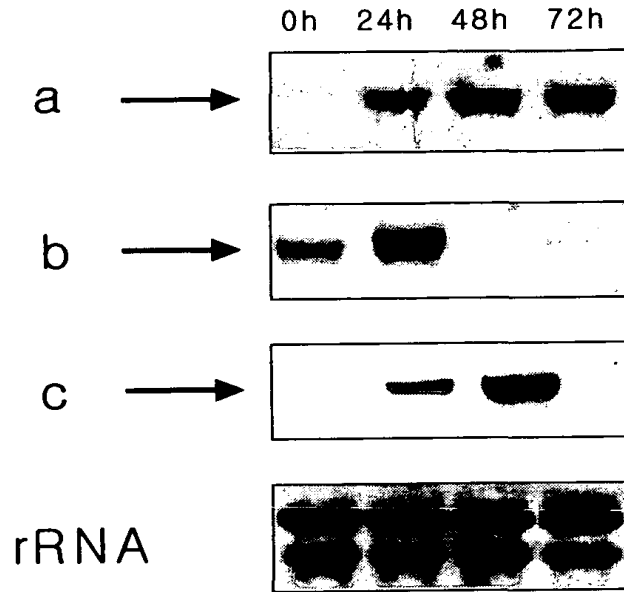


Figure 17. RNA 발현 분석

라. 분리된 유전자의 염기서열 분석

염기서열을 분석하고 homology search를 해 본 결과, 모두 밝혀지지 않은 유전자로 추정 되었는데, RACE와 같은 기법으로 분리된 유전자를 동정하고 있다.

제 3 절 Model plant의 조직배양 조건 확립 및 형질전환

1. 식물발현 벡터 구성

가. Dicot용 식물발현벡터의 제작

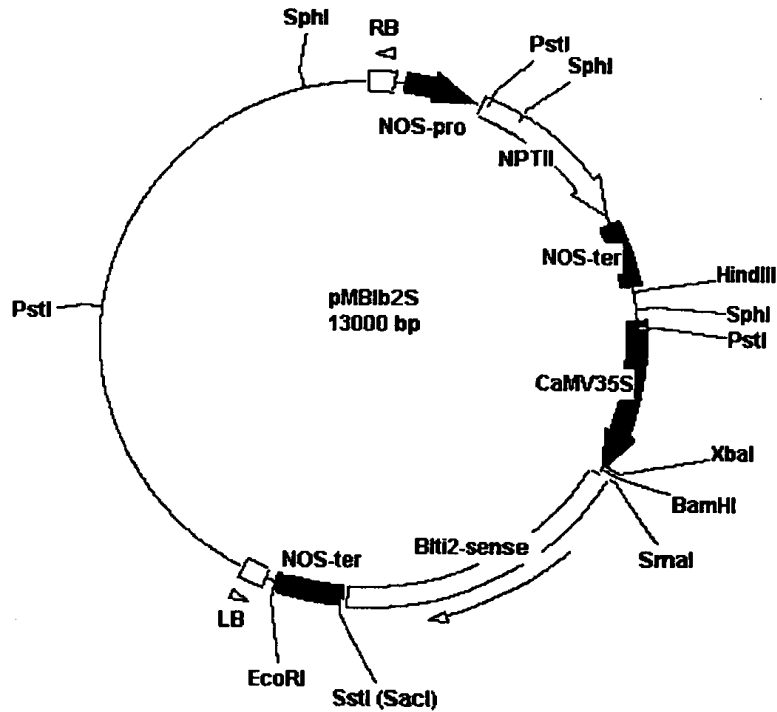


Figure 18. 담배 형질전환용 발현벡터 (pMBIb2S)

이미 확보된 저온반응 유전자의 기능을 알아보기 위하여 현재 담배로의 형질전환을 위한 기초실험 및 벡터 제작을 수행하였다. SSH방법에 의해 선택된 125개의 clone들중 Bti-2가 저온 반응에 의해서 나타나는 유전자로서 transmembrane protein으로 추정되었는데, 이를 확인하기 위하여 모델식물인 담배에 도입하기 위한 발현벡터를 제조하였다. 즉, bti-2의 full length cDNA를 식물발현벡터인 pMBPI에 SmaI과 SacI을 사용하여 cloning 하여 pMBIb2S를 제작하였다 (Figure 18).

2. Model plant의 형질 전환

가. 담배의 형질전환

모델식물인 담배에 *hlt1-2*가 overexpression되도록, 발현벡터를 포함한 *Agrobacterium tumefaciens* 와 혼합 배양을 통한 담배의 형질 전환을 실행했으며 16 lines의 putative transgenic tobacco plants를 만들었다. Wild type tobacco(*N. tabacum* cv. Xanthi)의 leaves들 중 mitotic division이 가장 왕성하게 보이는 것 들을 골라서 약 0.5 cm²직경으로 잎을 자르고, 28'C에서 36시간 동안 배양한 *Agrobacterium tumefaciens* 와 leaf discs을 28'C 암조건에서 2-3일간 Coculture했다. 멸균된 3차 증류수를 사용하여 transformation 된 잎들을 씻어내고, Shooting media에 이러한 leaf disc를 transfer하여 형성된 Callus도부터 shooting을 induction하여, Rooting media에 shooting induced callus를 transfer하여 기본 MS 배지에 옮겨 뿌리를 유도 했다 (Figure 18). Pot으로도 옮길 수 있을 정도의 크기도 자란 담배들을 도양조건으로 옮겨 온실에서 배양하였다.

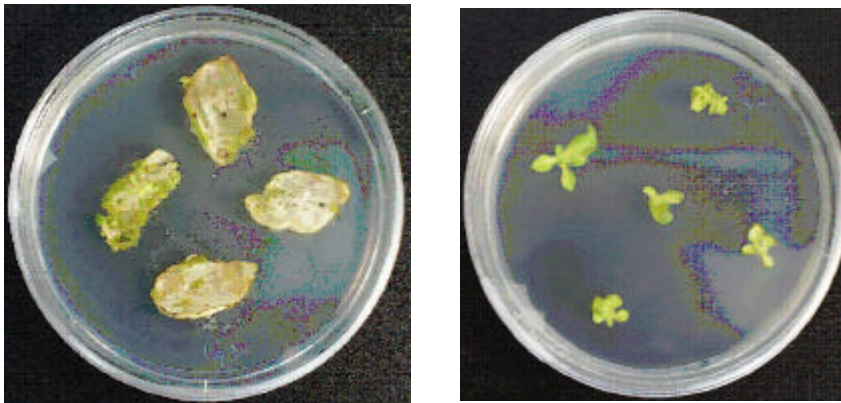


Figure 18. transformant의 shooting과 rooting

2. Model plant의 형질 전환

가. 담배의 형질전환

모델식물인 담배에 bti-2가 overexpression되도록, 발현벡터를 포함한 *Agrogacterium tumefaciens* 와 혼합 배양을 통한 담배의 형질 전환을 실행했으며 16 lines의 putative transgenic tobacco plants를 만들었다. Wild type tobacco(*N. tabacum* cv. Xanthi)의 leaves들 중 mitotic division이 가장 왕성하게 보이는 것 들을 골라서 약 0.5 Cm²직경으로 잎을 자르고, 28'C에서 36시간 동안 배양한 *Agrogacterium tumefaciens* 와 leaf discs을 28'C 암조건에서 2-3일간 Coculture했다. 멸균된 3차 증류수를 사용하여 transformation 된 잎들을 씻어내고, Shooting media에 이러한 leaf disc를 transfer하여 형성된 Callus로부터 shooting을 induction하여, Rooting media에 shooting induced callus를 transter하여 기본 MS 배지에 옮겨 뿌리를 유도 했다 (Figure 19). Pot으로 옮겨 갈 수 있을 정도의 크기로 자란 담배들을 토양조건으로 옮겨 온실에서 배양하였다.

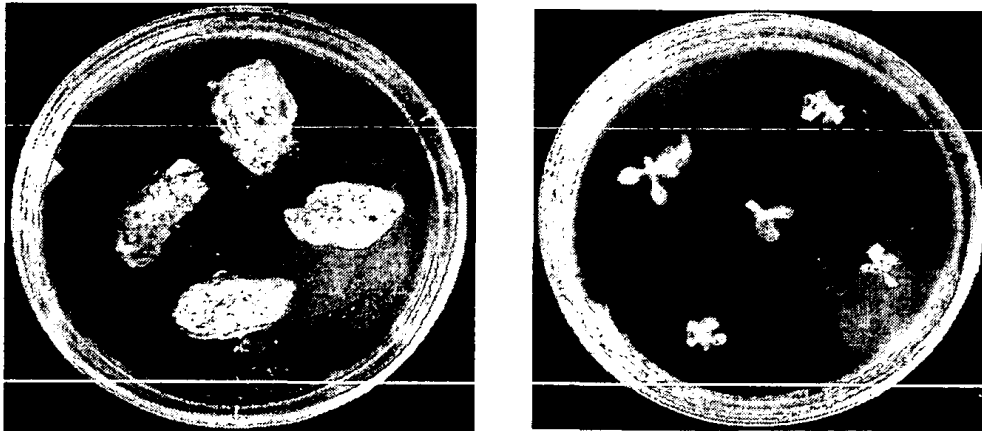


Figure 19. transformant의 shooting과 rooting

나. genomic DNA의 PCR 분석

적당한 크기로 자란 형질전환체들의 잎으로 부터 genomic DNA를 각각 추출하고, Vector specific primer(NPT11)와 gene specific primer를 사용하여 PCR로 확인을 하였다. 그 결과, 모든 식물체가 형질전환체로 확인 되었다 (Figure 20, 21).

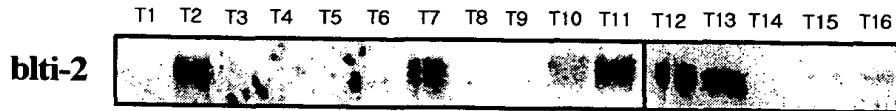


Figure 20. NPT II gene의 PCR확인에 의한 형질전환체 확인

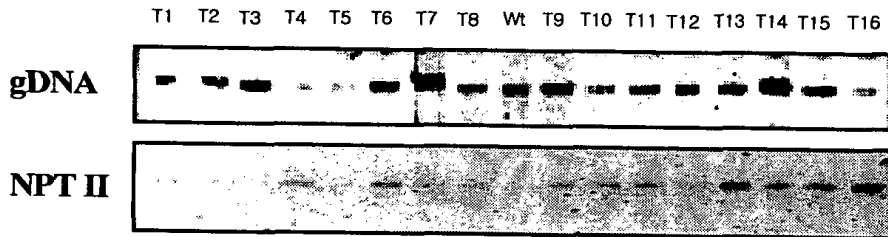


Figure 21. b1ti-2 gene의 PCR확인에 의한 형질전환체 확인

다. 형질전환체의 RNA발현 분석

Mitotic division이 가장 활발하게 보이는 잎을 각각 sampling하고, total RNA를 추출하였다. RNA blot을 만들어 발현 분석을 해 본 결과, 총 16 line 들 중에 8 line을 형질전환체로 확보하였다 (Figure 22).

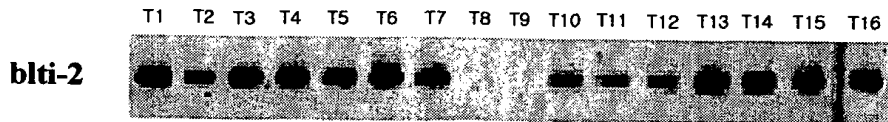


Figure 22. b1ti-2 gene의 RNA 발현에 의한 형질전환체 확인

라. Freezing test

담배의 저온 저항성여부를 확인하기 위하여 여러 가지 조건으로 0℃ 이하의 저온 처리를 수행하였다. Wild type의 경우, -7℃에서 2시간30분을 처리하였을 때, 회복이 안되고 고사하는 조건임을 확인하였다. 이와 동일한 조건으로 담배 형질 전환체를 처리하였을 때, 살아난 형질 전환체를 선택하였고, 얻어진 형질 전환체도 membrane stability, 즉, 전해질 용출량 변화와 얼음결정의 형성 등과 같은 관련된 생리적 분석을 수행할 목적으로, 도양조건으로 옮긴 후 배양중이다 (Figure 23).



처리전



처리후

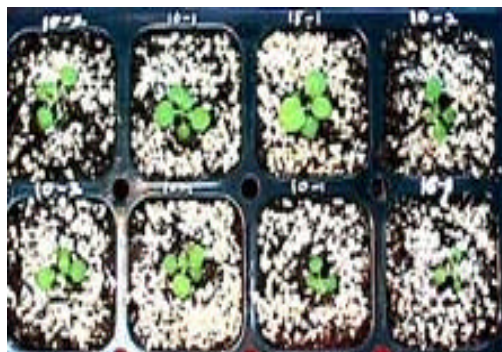
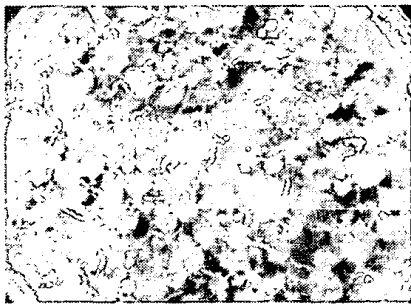


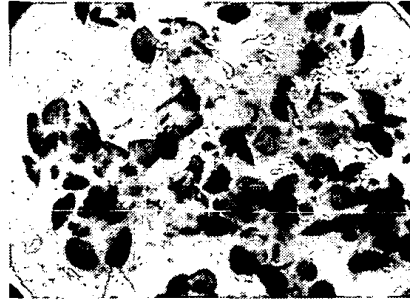
Figure 23. 담배 형질전환체의 Freezing test와 저항성 식물의 선발

라. Freezing test

담배의 저온 저항성 여부를 확인하기 위하여 여러 가지 조건으로 0℃ 이하의 저온 처리를 수행하였다. Wild type의 경우, -7℃에서 2시간30분을 처리하였을 때, 회복이 안되고 고사하는 조건임을 확인하였다. 이와 동일한 조건으로 담배 형질 전환체를 처리하였을 때, 살아난 형질 전환체를 선택하였고, 얻어진 형질 전환체로 membrane stability, 즉, 전해질 용출량 변화와 얼음결정의 형성 등과 같은 관련된 생리적 분석을 수행할 목적으로, 토양조건으로 옮긴 후 배양중이다 (Figure 23).



처리전



처리후

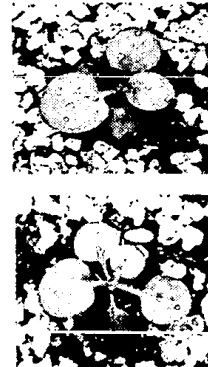
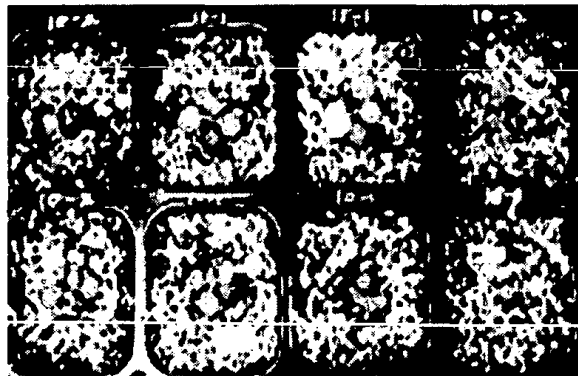


Figure 23. 담배 형질전환체의 Freezing test와 저항성 식물의 선발

제 4 절 유용 작물의 조직배양 조건 확립 및 형질전환

1. 식물발현 벡터 구성

가. monocot용 식물발현벡터의 제작

이미 확보된 저온 반응 유전자인 *blt1-2*의 기능을 알아보기 위하여, 보리에 형질전환할 목적으로 gene knock out용 발현 벡터를 제작하였다. 즉, *blt1-2*의 ORF(Open reading frame)와 pGA1611을 각각 *SacI*과 *KpnI*을 사용하여 식물발현벡터인 pGAb2A를 만들었으며, agrobacterium strain EHA105에 형질전환하였다 (Figure 24). 또한, 벼에 저온 저항성형질을 도입하기 위하여, 동일 발현 벡터인 pGA1611에 *KpnI*과 *SacI*을 사용하였고, 그 결과 gene overexpression용 벡터인 pGAb2S를 제작하였다 (Figure 25).

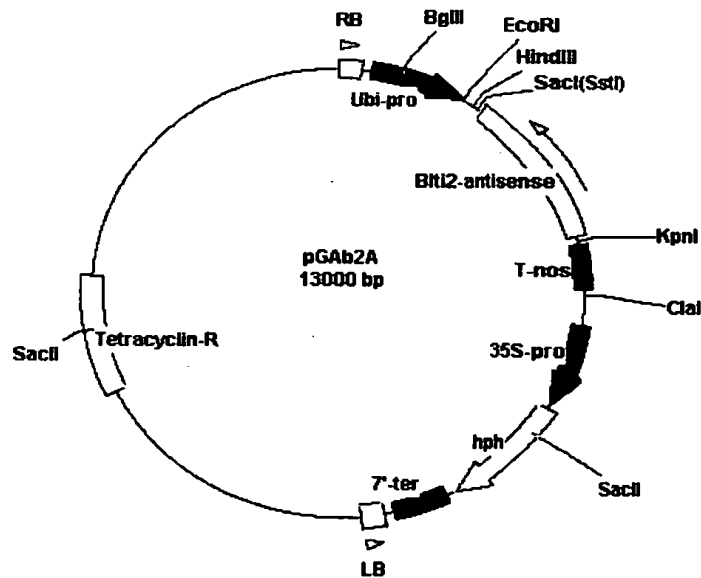


Figure 24. 보리의 형질전환을 위한 gene knock out용 벡터 (pGAb2A)

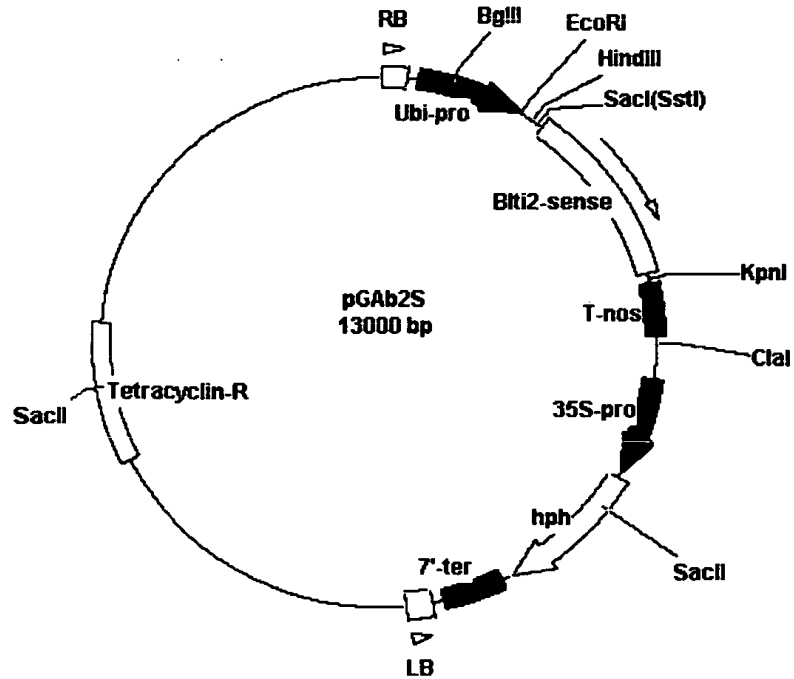


Figure 25. 벼의 형질전환을 위한 gene overexpression용 벡터 (pGAb2S)

2. 보리의 조직배양 및 형질전환

가. 보리 형질전환의 의의

Cold 조건에서 발현되는 유전자들의 정확한 기능을 규명하기 위한 목적으로, 각 유전자를 형질전환을 통하여 다시 보리안으로 재 도입시켜 유전자의 발현을 knock out 시킨 돌연변이체들을 얻기 위해서 형질전환체계를 연구하였다.

나. 보리재료의 준비

1) 종자소독

보리(*Hordium vulgare* L. cv. Dongbori)종자를 95% 알콜로 1분간 소독하였고, 6% NaClO로 45분간 소독하였으며, 증류수로 3-4회 씻어낸 후 1-2일 동안 증류수에 담가두었다.

2) 종자치상

불어오른 종자를 증류수로 씻어준후 petridish에 autoclave한 filter paper를 한 장 덮고 종자를 치상시켰다. 메스로 종자의 측면을 살짝 절개하고 절개된 부위를 핀셋을 이용해 종피를 벗겨냈다. 노출된 배를 메스로 살짝 그어 배가 자연스럽게 분리되도록 하였고, 절개된 배를 절단면이 위로 향하도록 callus induction media에 치상하였다. 그 결과, 암조건 또는 광조건하에서 2-3일 후에 callus가 유도되기 시작하였다.

3) 형질전환

Gene gun(PDS-1000, Bio-rad)을 이용하여 pGAb2A 유전자를 callus에 적용하여 selectable marker를 포함한 재분화 배지에 치상하였다. 전반적인 형질전환 과정은 일본의 Hagio의 실험방법을 따라서 진행하였다 (Figure 26). 현재, 형질전환체를 검정중에 있으며, 확인후 저온 반응 여부를 분석할 예정이다.

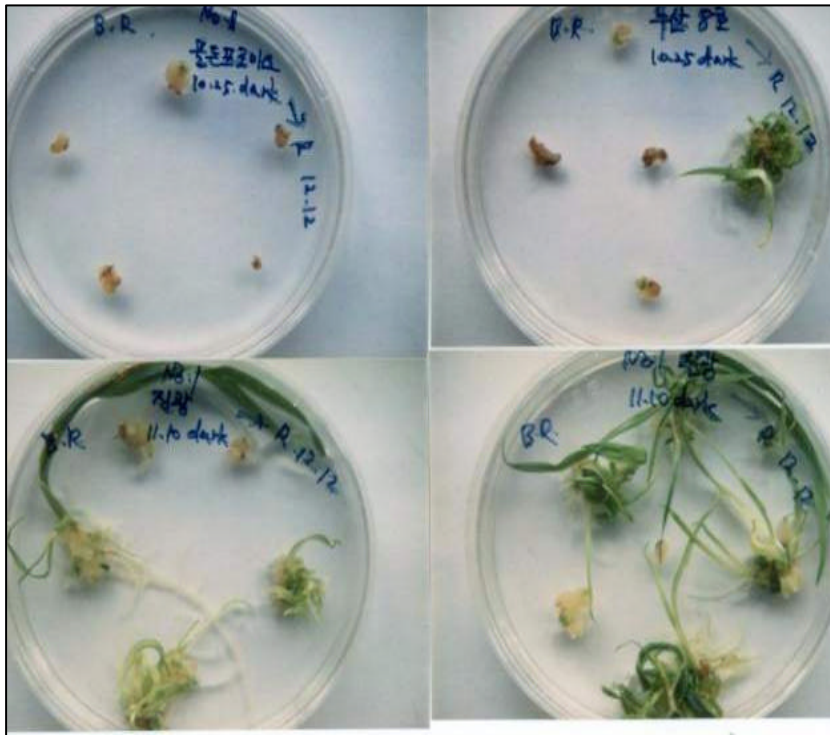


Figure 26. 보리의 callus 유도과 재분화까지의 모습

3. 벼의 조직배양 및 형질전환

가. 벼 형질전환의 의의

Cold 조건에서 발현되는 유전자들의 정확한 기능을 규명하기 위한 목적으로, 각 유전자를 형질전환을 통하여 유용작물인 벼도 도입시켜 유전자의 발현을 overexpression시킨 돌연변이체들을 얻기 위해서 형질전환체계를 연구하였다.

나. 재도 준비

1) 종자 준비 및 callus 유도



Figure 26. 보리의 callus 유도와 재분화까지의 모습

3. 벼의 조직배양 및 형질전환

가. 벼 형질전환의 의의

Cold 조건에서 발현되는 유전자들의 정확한 기능을 규명하기 위한 목적으로, 각 유전자를 형질전환을 통하여 유용작물인 벼로 도입시켜 유전자의 발현을 overexpression시킨 돌연변이체들을 얻기 위해서 형질전환체계를 연구하였다.

나. 재료 준비

1) 종자 준비 및 calli 유도

표편을 멸균 처리한 벼씨(*Oryza sativa* L cv. 'Nihonbare')를 MSO media에 치상하고, 28℃의 조건으로 암 상태에서 배양하여, 발아 후 4 주된 scutellum-derived calli를 형질전환에 사용했다.

2) 형질전환

monocot용 발현벡터인 pGAb2e를 가진 *Agrobacterium* strain BHA105를 0.5 μ g acetosyringone을 포함한 AAM media에 1 분간 suspension하고, 2MS-AS media에 transfer하여 암 상태에서 3 일간 *Agrobacterium*과 calli를 동시에 배양하였다. 250mg/L cefotaxime을 포함한 멸균된 증류수 25ml을 petri plate에 넣고 calli를 이들 plate에 옮겨 washing하였으며, Calli를 cefotaxime(250mg/L)과 hygromycin(50mg/L)을 포함한 2MS-AS plate에 옮겨서, 암 상태에서 배양하여 calli에 남아 있는 *Agrobacterium*을 죽이고 transgenic calli를 선별하였다. 2주 마다 한 번씩 calli를 계대배양하였고, Hygromycine에 저항성 있는 transgenic calli가 3주 후부터 나타나기 시작했다. 형질전환된 calli를 regeneration media도 옮겨 광 조건에서 배양하여 식물체를 유도하였다. 유도된 식물체는 rooting media도 옮긴 2 -10 주 후 pot도 transfer하였다 (Figure 27). 현재, 형질전환체를 검증중에 있으며, 확인후 저온 저항성 여부를 분석할 예정이다.



Figure 27. 벼의 callus 유도과 재분화까지의 모습

표면을 멸균 처리한 벼씨(*Oryza sativa* L cv. 'Nihonbare')를 N6D media에 치상하고, 28℃의 조건으로 암 상태에서 배양하여, 발아 후 4 주된 scutellum-derived calli를 형질전환에 사용했다.

2) 형질전환

monocot-용 발현벡터인 pGAb2s를 가진 *Agrobacterium* strain EHA105를 0.5ug acetosyringon을 포함한 AAM media에 1 분간 suspension하고, 2N6-AS media에 transfer하여 암 상태에서 3 일간 *Agrobacterium*과 calli를 동시에 배양하였다. 250mg/L cefotaxime을 포함한 멸균된 증류수 25ml을 petri plate에 넣고 calli를 이들 plate에 옮겨 washing하였으며, Calli를 cefotaxime(250mg/L)과 hygromycin(50mg/L)을 포함한 2N6-AS plate에 옮겨서, 암 상태에서 배양하여 calli에 남아 있는 *Agrobacterium*을 죽이고 transgenic calli를 선택하였다. 2주 마다 한 번씩 calli를 계대배양하였고, Hygromycine에 저항성 있는 transgenic calli가 3주 후부터 나타나기 시작했다. 형질전환된 calli를 regeneration media로 옮겨 광 조건에서 배양하여 식물체를 유도하였다. 유도된 식물체는 rooting media로 옮긴 2 -10 주 후 pot로 transfer하였다 (Figure 27). 현재, 형질전환체를 검정중에 있으며, 확인후 저온 저항성 여부를 분석할 예정이다.



Figure 27. 벼의 callus 유도과 재분화까지의 모습

제 5 장 참 고 문 헌

Bartels, D., and Nelson, D. (1994) Approaches to improve stress tolerance using molecular genetics, *Plant, Cell and Environment* 17, 659-667

Bartels D., Schneider K., Terstanppen G., Piatkowski, D. and Salamini, F. (1990) Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta* 181, 27-34

Bergantino, E., Dainese, P., Cerovic, Z., Salvatore, S., and Bassi, R. (1995) A Post-translational modification of the photosystem II subunit CP29 protects maize from cold stress. *The Journal of Biological chemistry* 270, 8474-8481

Bohnert, H., Nelson, D., and Jensen, R. (1995) Adaptations to Environmental stresses. *Plant Cell* 7, 1099-1111

Booth, J.R., Cairney, J., Sutherland, E., and Higgins, C.F. (1988) Enteric bacteria and osmotic stress : an integrated homeostatic system. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 355-495

Boyer, J. S. (1982) Plant productivity and environment *Science* 218, 443-448

Browse, J. Kunst, L., Anderson, S., Hugly, S., and Somerville, C. (1989) A mutant of *Arabidopsis* deficient in the chloroplast 16:1 / 18:1 desaturase. *Plant physiol.* 90, 522-529

Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987) Single step method of RNA isolation by Acid Guanidine Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. *Analytical*

Biochemistry 162, 156-159

Gawel, N. J., and Jarret, R. L. (1991) A modified CTAB DNA extraction procedure for the *Musa* and *Ipomea*. *Plant Molecular Biology Reporter* 9, 262-266

Graham, D., and Patterson, B. D. (1982) Response of plants to low, nonfreezing temperatures : proteins, metabolism, and acclimation.. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 347-372

Grierson, D. (1991) *Plant Genetic Engineering*, Blackie & Son Ltd.

Iturriaga, G., et al. (1992) Expression of desiccation related proteins from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. in transgenic tobacco *Plant Molecular Biology* 20, 555-558

Jun, S. I., Kwon, S. Y., Paek, K. Y., and Paek, K. H. (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. Spring Flavor). *Plant Cell Reports* 17, 665-670

Kodama, J., Hamada, T., Horiguchi, G., Vishimura, M., and Iba, K. (1994) Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast ω -3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant physiol.* 105, 601-605

Lee, S. J., Kim, B. D., and Paek, K. H. (1993) *K. J. Plant Tissue Cul:* 20, 289-294

Lemieux, B., Miguel, M., Somerville, C., and Browse, J. (1990) Mutants of *Arabidopsis* with alternation in seed lipid fatty acid and composition theor. *Appl. Genet.* 80, 234-240

Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K., and Shinozaki, K. (1996) A gene

encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 765-769

Murata, N., Sato, N., Takahashi, N., and Hamazaki, Y. (1982) Compositions and positional distributions of fatty acids in phospholipids from leaves of chilling-sensitive and chilling-resistant plants. *Plant cell physiol.* 23, 1071-1079

Naot, D., Ben-Hayyim, G., Eshdat, Y., and Holland, D. (1995) Drought, heat and salt stress induce the expression of a citrus homologue of an atypical late-embryogenesis *Lea5* gene. *Plant Molecular Biology* 27, 619-622

Sabehat, A., Weiss, D., and Lurie, S. (1996) The correlation between heat- shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruit. *Plant Physiol.* 110, 531-537

Skriver, K., and Mundy, J. (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress *The Plant Cell* 2, 503-512

Somerville, C., and Browse, J. (1991) Plant lipids : metabolism, mutants and membranes. *Science* 252, 80-87

Song, K.B., Joo, H. K. and Rhee, S. K. (1993) *Biochim Biophys Acta* 1171, 320-324

Straub, P. F., Shen, Q., and Ho, T. H. D., (1994) Structure and promoter analysis of ABA- and stress-regulated barley gene, *HVY1*. *Plant Molecular Biology* 26, 617-630

Van der Meer, I. M., Ebskamp, M. J. M., Visser. R. G., Weisbeck, P. J.,

- and Smeekens, S. C. M. (1994) *The Plant Cell* 6, 561-570
- Xu, D., Duan, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T. D., and Wu, R. (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* 110, 249-257
- Ramani S. and Apte S.K. (1997) Transient expression of multiple genes in salinity-stressed young seedlings of rice (*Oryza sativa L.*) cv. bura rata. *Biochem Biophys Res Commun* 233: 663-7
- Savoure A.; Hua X. J.; Bertauche N.; Van Montagu M. and Verbruggen N. (1997) Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* 254: 104-9
- Hong S.W.; Jon J.H.; Kwak J.M. and Nam H.G. (1997) Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt, and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 113: 1203-12
- Donald E. N., Gerald R., and Hans J. B. (1998) Regulation of cell-specific inositol metabolism and transport in plant salinity tolerance. *The Plant Cell* 10, 753-764
- Qing L., Mie kasuga, Yoh S., Hiroshi A., Setsuko M., Kazuo Y-S., and Kazuo S. (1998) Two trnscription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10, 1391-1406.
- Kumpatla et al. (1998) Genome intruder scanning and modulation systema and transgene silencing, *Trends in plant science* 3, 97-101

Ebinuma et al, (1998) Development of new transformation methods (MAT VECTORS SYSTEM) using oncogenes of *agrobacterium* (IPT, ROL ABC), The 12th Symposium on Plant Biotechnology 12, 27-37

Capel et al. (1998) Low temperature regulates *Arabidopsis Lhcb* gene expression in a light-independent manner, The Plant Journal 13, 411-418