

D24 내동성 관련 유전자의 분리 및 특성 검증

단국대학교 : 박현우*, 황은영, 황철호, 생명공학연구소 : 유장렬

Isolation and Characterization of Freezing Tolerance Related Gene from Barley

Dankook University: Hyun Woo Park*, Eun Young Hwang,

Cheol Ho Hwang, KRIBB: Jang Ryol Liu

실험목적

결빙온도에 노출되었을 때 세포밖 공간에서 생성되는 얼음 결정은 식물의 동사와 밀접한 관계를 갖는다. 따라서 본 실험은 저온에 의해 세포밖 공간에 축적이 유도되어 얼음 결정의 성장을 저해하여 내동성에 기여하는 단백질의 유전자를 분리하고 그 기능을 확인하고자 수행하였다.

재료 및 방법

- 실험재료 : 동보리1호
- cDNA library 작성 : $5\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 저온 3일 처리한 동보리1호로부터 mRNA를 추출후 λ ZAPII expression library kit를 이용하여 작성
- Library screening : Heterologous probe를 이용해서 screening
- PCR Cloning : 저온처리시 세포밖 공간에 축적되는 16kD의 thaumatin like protein의 N-terminal sequencing 결과를 이용 DNA full sequence를 얻어 primer를 합성해서 PCR을 수행
- Northern : chitinase, dehydrin(dhn5), blt101 유전자를 probe으로 이용 Northern분석

결과 및 고찰

- 저온처리시 축적되는 CLP, GLP, TLP는 반결빙 활성도를 갖는 것으로 보고된 바 저온처리시 축적되는 CLP와 TLP 유전자를 확보하였다. 분리된 CLP는 chitinase type II로 chitin binding domain이 없고, 엑스포로 향하는 signal이 없어서 세포밖 공간에 존재하는 것으로 확인 되었고, TLP는 세포밖으로 향하는 signal peptide를 포함하는 것으로 확인되어 반결빙 단백질로 작용할 것으로 예상된다.
- 저온 또는 건조에 의해서 발현되는 dehydrin(dhn5) 유전자의 3'의 1.8kb에 해당하는 부분을 분리하였고 5'의 0.6kb에 해당하는 부분은 5'-RACE 방법으로 확보하였다.
- dhn5는 Gly-rich domain과 Lys-rich domain으로 반복 구성되고, membrane에 위치하여 물의 유출을 감소시켜 내동성에 관여한다. 일부 dhn 유전자는 보리의 내동성과 직접적으로 연관되어 있음이 보고되었다. 또한 월동중 식물의 생존에 밀접히 연관된 생장점의 유관속 전이 부위에서 저온처리시 특이적으로 강하게 발현되어 동사중 발생하는 식물의 탈수를 억제하는 blt101 유전자를 확보하였다.
- CLP, dhn5, blt101 유전자를 이용 northern 분석하여 저온 유도성 발현을 확인하였다.
- 위의 유전자들을 pET32 vector에 넣어 단백질을 대량생산하고 있으며 얻어진 단백질을 이용하여 polyclonal antibody를 만들고 반결빙 활성도를 측정할 예정이다.
- 위의 유전자들을 사용한 담배, 배추, 상치, 딸기에 형질전환이 진행되고 있다.

연락처 전화: 0417-550-3626 E-mail: sfeho@anseo.dankook.ac.kr

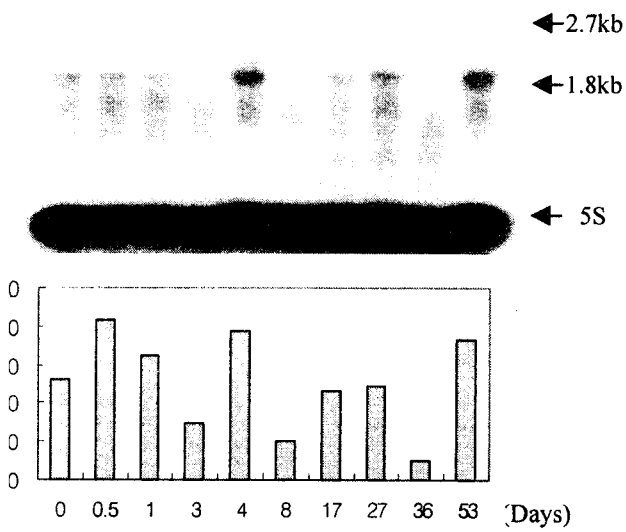


Figure.1 Accumulation of chitinase transcripts as a function of cold-acclimation period

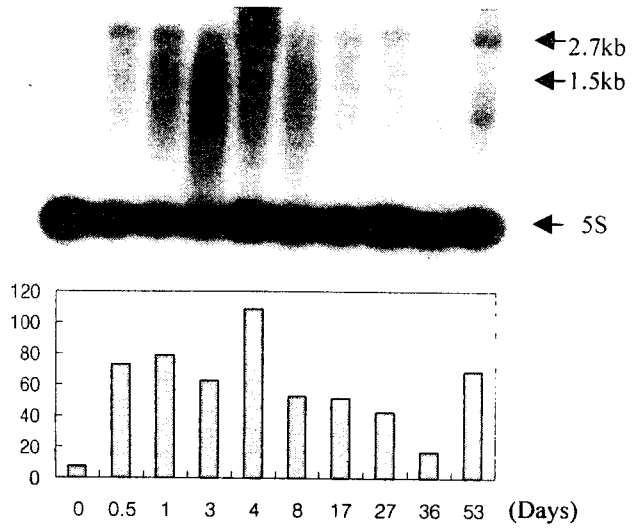


Figure.2 Accumulation of dehydrin transcripts as a function of cold-acclimation period

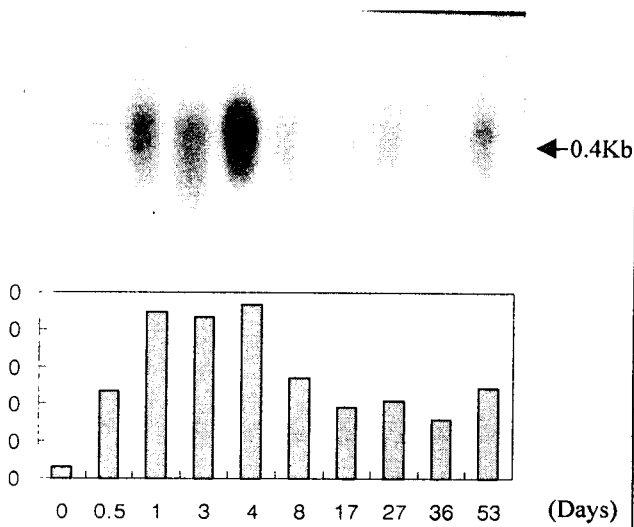


Figure.3 Accumulation of blt101 transcripts as a function of cold-acclimation period

Name	MW	Site of expression	Function	Reference
chitinase	27.7KD	Apoplast	Antifreezing	Griffith et al., 1999
TLP	17.6KD	Apoplast	Antifreezing	Griffith et al., 1999
dehydrin	58.5KD	Membrane near crown	Retention of water	Sarhan et al., 1998
blt101	5.94KD	Membrane near crown	Retention of water	Pearce et al., 1998

Table. 1 List of the freezing tolerance related genes cloned