배추(*Brassica rapa*)에서 분리한 스트레스 관련 후보 유전자 *BrTSR53*의 특성 분석

김아람^{1†} · 임혜민^{1†} · 박성한² · 지현소¹ · 윤웅한¹ · 김태호¹ · 조정일² · 김창국¹ · 이강섭^{1*}

¹국립농업과학원, ²GM작물실용화사업단

Molecular Characterization of a Putatively Stress-related Gene *BrTSR53* Isolated from Chinese Cabbage (*Brassica rapa*)

A-Ram Kim^{1†}, Hyemin Lim^{1†}, Sung Han Park², Hyeonso Ji¹, Ung-Han Yoon¹, Tae-Ho Kim¹,
Jung-Il Cho², Chang-Kug Kim¹, and Gang-Seob Lee^{1*}

¹National Academy of Agricultural Science, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

²The National Center for GM Crops, National Academy of Agricultural Science,
Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

Abstract : Crops are exposed to various environmental stresses. These have been affecting the growth of crops, resulting in the severe loss of agronomic production in many countries. Therefore, development of new varieties of resistant crops is required to assure the desired productivity of crops in stress conditions. In this study, a putatively stress-related gene *BrTSR53* was isolated from *Brassica rapa*. The *BrTSR53* is 481 bp long and contains ORF region of 234 bp. This ORF showed strong sequence similarities to the uncharacterized genes from *Arabidopsis*. The expression of *BrTSR53* was determined by quantitative real-time PCR analysis. After 3 hr, the highest quantities of mRNA were revealed in cold and salt stress treatments. In drought stress treatments, there was the highest expression after 36 hr. Therefore, it was confirmed that the ORF in *BrTSR53* should be a gene that confer increased resistance to *B. rapa* growing in different stress conditions. The ORF region of *BrTSR53* gene was cloned into an expression vector, pYES-DEST52, and a new protein with molecular weight of 13 kDa was detected by western blot analysis. Also, stress tolerance tests showed that *BrTSR53*-ORF transgenic yeast exhibited increased resistance to the salt stresses compared with the control. In conclusion, the present data predicts that novel ORF in *BrTSR53* can serve as an important genetic resource for abiotic stress resistance.

Keywords : *Brassica rapa*, Triple stress resistance 53 gene, Abiotic stress, Yeast

서 언

농작물은 기후변화와 환경오염 등에 의한 많은 환경 스트레스를 받아왔다. 고온, 저온, 가뭄, 고염, 오존, 중금속, 산소 부족 등 다양한 비생물(abiotic) 환경 스트레스는 작물의 성장과 발달에 영향을 주며, 그 중 가뭄과 고염으로 인한 건조 스트레스는 전 세계 50% 이상의 경작지의 농업 생산량을 심각

하게 감소시키고 있다(Boyer 1982). 다양한 환경스트레스 중 가뭄, 고염, 저온은 자연환경에서 공통적으로 접해지며 식물이 성장하는데 심각한 영향을 미친다(Xue et al. 2009, Kim et al. 2010).

가뭄 스트레스는 전 세계적으로 작물의 생산량을 감소시키는 주된 원인이며, 이에 따라 식물의 대응 및 방어 기작에 관한 연구는 그 동안 많은 관심을 받아왔다(Boyer 1982, Cushman & Bohnert 2000). 물 부족 상황에 처했을 때 식물 내에서는 기공폐쇄, 세포분열 및 생장억제, 광합성 감소 등의 생리학 및 생화학적 반응이 일어난다(Shinozaki & Yamaguchi-sinozaki 2007). 저온 스트레스는 낮은 온도인 0~15°C 사이에서 일어

*Corresponding author (E-mail: kanglee@korea.kr, Tel: +82-31-299-1656, Fax: +82-31-299-1657)

[†]The first two authors contributed equally to this work

(Received on December 30 2013. Revised on June 9 2014.

Accepted on June 13 2014.)

난다(Lyons 1973). 식물은 성장 단계별 저온에 대한 민감도가 다르게 나타나는데 일반적으로, 성장과정에서 발아단계와 화분의 성숙 단계가 저온에 민감하다(Patterson et al. 1987, Sataka & Koike 1983). 작물은 고염에 노출되면 세포 내에 삼투압의 불균형(osmotic imbalance)과 이온농도의 불균형(ionic imbalance)이 일어나게 된다. 또한 2차 스트레스로서 영양장애, 대사장애, 광합성 장애 등이 초래되며, 심할 경우 고사하게 된다(Yun 2005).

하지만 식물은 앞선 환경오염, 지구환경의 급격한 변화로부터 생존하기 위해 다양한 스트레스에 대한 생존 전략의 일환으로 체내에 반응 기작을 가지고 있다. 스트레스를 받은 식물은 많은 유전자들이 발생하고, 유전자 발현조절, 신호전달의 역할을 한다(Xue et al. 2009). 유전자 발현분석은 생물학적 연구의 많은 분야에서 중요하며, 생물에서 복잡한 조절 네트워크의 발생에 유용한 의미를 생산 한다(Chandna et al. 2012). 스트레스에 의해 유도된 유전자 발현은 3개의 그룹으로 분류된다. 첫 번째로 알고 있는 효소적 또는 구조적 기능을 가지고 있는 단백질의 유전자, 두 번째는 아직 기능이 알려지지 않는 단백질 유전자이며 마지막 세 번째는 조절 단백질이다(Bhatnager-mathur 2008). Chen et al. (2011)의 보고에 의하면 COR 단백질은 저온 조절 유전자이며, 이 유전자를 이용하여 배추(*Brassica rapa*)에서는 *BrCOR25* 유전자를 분리하였고, 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서는 *COR15a* 및 *COR15b* 유전자를 분리하였으며, 차나무(*Camellia sinensis*)에서는 *COR1* 유전자를 분리하였다. 또한, Yadav et al. (2012)의 보고에 의하면, 함초(*Salicornia brachiata*)에서 유래한 단백질의 기능이 밝혀지지 않은 *SbSI-1* 유전자를 분리한 것으로 보고되었다. 또한 최근에 Jung et al. (2013)의 보고에 의하면, *BrRZFPI* 유전자를 저온, 고염 및 건조 스트레스에서 저항성이 증가한 유전자를 배추에서 분리하였으며, Seo et al. (2010)의 보고에서는 *BrERF4* 유전자를 염과 건조 스트레스에서 저항성이 증가한 유전자를 배추에서 분리하여 배추유전자 관련 연구들이 활발히 진행되고 있다.

식물대사의 복잡한 특성은 많은 단백질의 기능 분석을 방해할 수 있다. 그러나, 효모는 간단한 생물체에서 단백질의 발현은 기능 분석을 위한 효과적인 시스템을 제공한다. *Saccharomyces cerevisiae*는 단세포로 된 진핵생물이며, 단백질의 정확한 접힘, 번역 후 변형과 표적 단백질의 유전정보를 통해서 많은 식물 유전자들의 기능 발현이 가능하다(Jellouli et al. 2010). 그러므로 스트레스 저항성 유전자를 효모에 적용하는 것은

산업적으로 중요하다(Hirashi et al. 2006). 보고된 연구에 의하면, 배추에서 유래한 *BrCOR25* 유전자와 목화에서 유래한 *GhMT3a* 유전자를 효모에 형질전환 하여 환경스트레스 저항성을 확인하였다(Xue et al. 2009, Chen et al. 2011). 본 연구에서는 배추로부터 저온, 고농도의 염과 가뭄과 같은 환경스트레스에 관련하여 특이반응을 나타내는 환경스트레스 관련 후보 유전자인 *BrTSR53*의 염기서열을 분석하였으며, 환경저항성에 대한 발현을 확인하기 위한 연구를 수행하였다. 이를 위하여 *BrTSR53* 유전자의 발현 벡터 시스템을 구축하였으며, 구축된 벡터 시스템을 *Saccharomyces cerevisiae*에 형질전환하여 환경스트레스에 대한 발현특성을 분석하였다.

재료 및 방법

식물재료 및 생육조건

배추 식물체는 지부(*Brassica rapa*, 'Chiifu') 품종을 사용하였다. 페트리 접시에 3M 종이를 얹고 배추종자를 올려놓았으며, 25℃, 내부조도 3 lux 배양실에서 3일 간 멸균수에 침지시켜 배양하였다. 발아한 종자는 원예용 상토로 옮겨 심어 주었고, 25℃, 습도 93% 조건의 온실에서 3주 동안 배양하였다.

식물체와 효모의 스트레스 처리 조건

배추의 스트레스 처리는 Lee et al. (2008)의 방법에 따라 3주간 성장한 배추를 대상으로 수행하였다. 저온 스트레스는 4℃로 처리한 후 시간대별(0.5, 3, 12, 24, 48시간)로 채취하였다. 건조 스트레스는 25℃에서 건조 처리한 후 시간대별(0.5, 3, 12, 24, 48시간)로 샘플을 채취하였고, 고염 스트레스는 250 mM NaCl 용액을 주입한 후 시간대별(6, 12, 24, 36, 48시간)로 샘플을 채취하였다. 채취한 샘플은 total RNA를 추출한 후 cDNA를 합성하여 분석하였다.

효모의 스트레스 처리는 Jeong et al. (2000)의 방법에 따라 수행하였다. 형질전환 된 효모를 SC-ura minimal 액체배지(2% glucose)에 접종하고 30℃에서 2일간 배양 한 후 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 하였다. 상층액을 버리고 SC-ura minimal 액체배지(2% galactose)을 넣고 16시간 동안 배양 한 후, 12,000 rpm에서 5분 동안 원심분리를 하였다. 상층액을 버리고 10 mM MgSO₄ 용액에 세척을 하였으며, 원심분리 하여 배양된 효모를 획득하고, 스트레스 처리를 하였다. 저온 처리는 효모를 YPD 배지에 접종하여 각각 4, 10℃를 5~10일 동안 처리하였다. 염분 처리는 YPD 기본

배지에 NaCl (1.0 1.5, 2.0 M)를 넣어서 수행하였고 건조 처리는 Micro vac MV-100 (Tony, Japan)을 이용하여 20분간 건조 처리한 후에 멸균수로 적당히 희석 후 YPD 배지에 접종하여 30°C에서 2일 동안 배양하였다.

Quantitative real time-PCR (qRT-PCR) 분석

배추 식물체의 total RNA는 plant mini kit (Quiagen, USA)로 추출하였고, Sprint™ RT Complete-oligo (dT) 18 kit (Clontech, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa, Japan) 효소를 사용하여 95°C에서 30초 초기 반응 후, 95°C에서 5초, 60°C에서 34초를 40 cycle조건으로 ABI StepOnePlus (Applied Biosystems, USA)를 이용하여 qRT-PCR을 수행하였다. 상대정량은 Livak & schmittgen (2001)의 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법으로 측정하였다. 각 시간대별 *BrTSR53* 유전자 Ct값에서 β -actin (housekeeping gene) 유전자 Ct값을 빼주어 보정한 후, 각 시간대별 값에서 대조군(0 hr)의 값을 빼주었다. 그리고 각각의 값을 2의 거듭제곱을 하여 대조군(0 hr)의 값을 1로 두고 나머지 시간대별에 대한 값을 비교하였다. *BrTSR53*의 primer는 forward primer; 5'-GGTGACGTCATGGCTTGTGGCT-3', reverse primer; 5'-ACACGTGAAAAACGAGAGGACAACA-3' 사용하였고, 비교 유전자 β -actin의 primer는 forward primer; 5'-TGGGCGTACTACTGGTATTGTG-3', reverse primer; 5'-TGTACCCTCTCTCGGTGAGAAT-3' 사용하였다.

효모 발현 벡터 구축과 형질전환

BrTSR53 유전자를 효모에서 발현시키기 위하여 pYES-DEST52 gateway 벡터 시스템을 이용하였다. *BrTSR53* 유전자를 분리하기 위하여 배추 cDNA를 주형으로 RT-PCR을 수행하였다. TaKaRa *Ex Taq*™ (TaKaRa, Japan) 효소와 *BrTSR53*의 forward primer; 5'-AAAATGTCTTCATGGAAGAAAACA-3', reverse primer; 5'-AGAAGACAGATTGTTTGAAGA-3'를 이용하였으며 PCR 반응 조건은 초기(initiation) 95°C에서 5분 처리 후 95°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분을 총 35회 반복 수행하였으며, 종결(termination) 과정은 72°C에서 7분간 반응시켰다. pCR8/GW/TOPO 벡터에 sub-cloning을 실시한 클론은 sequence를 확인한 후 pYES-DEST52 Gateway™ 벡터(Invitrogen, USA)에 Gateway LR Clonase™ II Enzyme Mix kit (Invitrogen, USA)를 사용하여 효소 발현 벡터에 cloning하였다.

효모에 대한 형질전환은 *Saccharomyces cerevisiae* (strain W303-1A)를 이용하였으며 YPD (yeast peptone dextrose) 액체배지에 30°C, 200 rpm으로 진탕하면서 2~3일간 배양하였다. 형질전환은 pYES-DEST52 Gateway™ 벡터의 small-scale 형질전환 방법에 따라 수행하였다. 효모를 YPD 액체배지 5 ml에 접종하여 30°C, 2일간 진탕 배양하였다. 다시 YPD 액체배지 50 ml 배양액에 3 ml의 cell을 접종하고 30°C, 4시간 진탕 배양하고 4,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하였으며, 1X TE 40 ml에 재현탁 시켜준 후 4,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하였다. 상층액을 제거하고 2 ml의 1X LiAc / 0.5X TE에 재현탁 시켜준 후 10분간 상온에 두었다. 재현탁한 효모 100 µl와 전처리한 salmon sperm DNA 100 µg 및 플라스미드 DNA 1 µg 을 혼합해 주었다. 혼합액에 1X LiAc / 40% PEG-3350 / 1X TE 700 µl를 첨가하여 섞어주고, 30°C에서 30분 동안 배양하였다. 88 µl의 DMSO를 첨가하고 42°C에서 7분간 heat shock을 해주었다. 10초 동안 원심분리 후 상층액을 제거하고, 1 ml의 1X TE로 재현탁 시켜주었다. SC-ura minimal 고체배지에 접종하여 도말한 후 30°C, 2일간 배양하여 콜로니를 확인하였으며, 유전자의 삽입은 PCR을 통해 확인하였다.

단백질 발현

효모에서 단백질 추출은 Kushnirov (2000)의 방법에 따라 수행하였다. 배양한 효모는 12,000 rpm에서 1분 동안 원심분리 후 상층액을 버리고, 멸균수를 첨가하였다. 0.2 M NaOH 100 µl를 첨가하여 잘 섞어준 후 상온에서 5분간 두었고, 12,000 rpm으로 1분간 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 2X SDS sample buffer를 첨가하였으며, 5분간 끓는 물에서 단백질을 변성 시켜주었다. 이후 SDS-PAGE gel (running gel 15%, stacking gel 1%)을 이용하여 단백질을 분리하였고, membrane에 transfer 하였다. Transfer된 membrane은 5% skim milk을 첨가하여 blocking하였다. 이후 1차 항체인 anti-V5 (invitrogen, USA)를 1:1000으로 넣어주고 2시간 동안 반응시켰다. 1X TBS-T (10% Triton X100)를 사용하여 10분간 2회 세척하였으며, 1X TBS를 사용하여 5분간 세척하였다. 2차 항체인 anti-mouse IgG (Sigma, USA)를 1:10,000의 비율로 넣어 90분 동안 반응 후 세척과정을 수행하였다. Amersham™ ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, UK)를 이용하여 단백질 발현을 관찰하였다.

결과 및 고찰

스트레스 처리한 배추에서 *BrTSR53* 유전자의 mRNA 분석

BrTSR53 유전자는 배추의 환경스트레스에 대한 저항성을 microarray 분석으로 찾아낸 저항성을 가진 unknown 유전자 중에 하나이다(Lee et al. 2008). *BrTSR53* 유전자의 환경스트레스 저항성을 재확인하기 위해 Lee et al. (2008)와 동일한 방법으로 배추 식물체를 염분, 저온, 건조 스트레스를 처리하여 qRT-PCR 분석하였다. 배추에서 염분, 저온, 건조 스트레스 처리에 따른 *BrTSR53* 유전자의 mRNA의 발현 결과는 Fig. 1과 같다. 스트레스를 처리하지 않은 대조구를 기준으로 염분 스트레스 처리에서는 30분 처리했을 때는 발현이 감소하였지만, 3시간 후에는 1.6배까지 증가하였다. 이후 48시간까지는 점차 감소하는 경향을 보였다. Lee et al. (2013)에 의하면, 배추 유래 유전자인 *BrARPI*와 *BrRPL27* 유전자에 대하여 염분 처리를 하였을 때, 각각 8시간, 12시간에서 mRNA 양이 가장 높게 증가하였다고 보고하였다. 이 결과와 비교하였을 때, *BrTSR53* 유전자는 3시간 염분 처리시에 가장 높은 발현량을 보여 염분 처리에 대하여 상대적으로 빠르게 반응하는 것으로 나타났다(Fig. 1).

저온 처리 결과에서는 30분에 2배로 증가하였고, 3시간에서는 5배의 최대치를 보였으며 12시간 이후부터는 감소하는 경향을 보였다(Fig. 1). 이러한 경향은 *BrTSR53* 유전자의 염분 처리한 결과와 유사한 경향을 보였다. Wang et al. (2012)은, 4°C 저온처리를 하였을 때, 배추(*Brassica campestris*)에 유래한 *BcWRKY46* 유전자는 2시간 까지 mRNA 양이 증가

하였고, *BrCBF* 유전자는 4시간까지 증가하는 것을 보고한 바 있다. 스트레스 관련 후보유전자인 *BrTSR53* 유전자의 반응도 3시간에서 최대치를 보이고 있어 유사한 경향을 보였는데, 이는 분리된 유전자의 유래가 배추임에 따른 결과로 보여진다.

건조 처리 결과에서는 염분 처리, 저온 처리와 다르게 6시간에서는 1.9배 증가하였고, 24시간 처리한 결과에서는 0.5배까지 감소하였으나, 36시간 처리 후 다시 2배로 증가하여 최대치를 보이는 경향이 나타났다(Fig. 1). Yadav et al. (2012)의 보고에 의하면, 함초(*Salicornia brachiata*)에 유래한 *SbSI-1* 유전자는 건조 처리를 하였을 때, 24시간 까지 mRNA 양이 증가하였다. 이 유전자와 비교하여 보았을 때, *BrTSR53* 유전자는 36시간에서 mRNA 양이 증가한 것으로 나타남으로써, 건조에 대해서는 다른 스트레스에서 보다는 상대적으로 늦게 반응이 나타나는 것을 확인되었다.

이 결과들을 종합할 때, 배추에서 유래한 *BrTSR53* 유전자는 저온과 염분 등의 스트레스 초기에 발현하는 유전자임을 추론할 수 있었으며, 염분 또는 건조 스트레스 처리보다 저온 처리에서 유전자 발현량이 증가하는 특성을 확인할 수 있었다. 이는 Dai et al. (2007)의 보고에서도 벼에서 유래한 *OsISAP1* 유전자가 염분, 건조, 저온 스트레스 중 저온 스트레스에서 mRNA 양이 가장 증가한 특성을 보인 것으로 보고되어 비슷한 경향을 보이는 결과를 얻었다.

BrTSR53 유전자의 염기서열 분석

배추 식물체에서 염분, 저온, 건조 스트레스에 저항성을 가지는

Fig. 1. Quantitative Real-time PCR analysis of expression of the *BrTSR53* gene in *Brassica. rapa* under salt, cold and drought stress treatment. Rice β -actin was used as a control for relative expression for each treatment. The results are mean values $\pm$ SD of three replicates. A. Salt (250 mM NaCl) treatment; B. Cold (4°C) treatment; C. Drought (air dry) treatment.

것으로 확인된 신규유전자를 *BrTSR53* (*Triple Stress Resistance 53 gene*)이라고 명명하였다. *BrTSR53* (gene number: BRAS0-001S00024153) 유전자의 염기서열 분석결과 mRNA는 481 bp로 구성되며 ORF는 234 bp 되어있다(Fig. 2). 또한 *BrTSR53* 77개의 아미노산으로 이루어진 단백질을 지령할 수 있다(Fig. 2). 분석된 염기서열을 대상으로 blast 분석결과, *Eutrema salsugineum* (XM006393369.1)와는 max score가 총 392가 일치하였으며 97%의 상동성을 보여 *BrTSR53*와 가장 유사한 유전자로 확인되었다. 그 다음 *Arabidopsis lyrata* (XM002891379.1)와는 max score가 총 356이 일치하였으며 94%의 상동성을 보였고, 이 외에 *Arabidopsis thaliana* (CP002684.1), (NM103730.4), (BT011259.1), (BT010781.1), (BX818303.1)와 (AC007932.3)는 max score는 329이었으며, 91% 상동성을 보이는 것으로 나타났다. 검색결과에서 *BrTSR53* 유전자는 NCBI에 등록되어 있지도 않았으며, 이에 따른 주요기능 또한 보고된 바 없음을 확인할 수 있었다. 그러나 Yang et al. (2013)의 보고에 의하면, ORF에 대한 상동성 분석에서 가장 유사한 *Eutrema salsugineum*는 *A. thaliana* 와 *Brassica* 속과 분류학적으로

거리가 가까운 엽생 식물이며, 엽분스트레스의 저항성을 연구하기 위한 모델 식물체인 것으로 알려져 있다. 따라서 *BrTSR53* 유전자는 그 기능은 밝혀져 있지는 않지만, 엽분 스트레스와 관련된 유전자임을 추정할 수 있었다(Fig. 3).

효모에서 *BrTSR53* 유전자의 발현

BrTSR53 유전자의 기능을 알아보기 위해 효모 단백질 발현 벡터인 pYES-DEST52 벡터에 *BrTSR53* 유전자의 ORF를 cloning하였다. *BrTSR53* 유전자의 삽입위치는 T7 promoter와 V5 epitope 사이에 위치 하였으며, 단백질 검출을 위한 항체인 V5 epitope, 단백질 정제를 위한 6X his tag과 선별마커인 *URA3* 합성 유전자로 구성되었다(Fig. 4). pYES-DEST52/*BrTSR53* 벡터를 *Saccharomyces cerevisiae*에 형질전환을 수행하였고, PCR 방법으로 형질전환 유무를 확인하였다. 형질전환체 효모의 단백질을 발현을 확인하기 위하여 SDS-PAGE와 western blot을 수행하였다. pYES-DEST52 벡터만 삽입한 효모로부터 단백질 발현을 유도(induction)한 경우와 유도하지 않는 경우(non-induction), pYES-DEST52/*BrTSR53* 벡터

Fig. 2. Sequence analysis of the *BrTSR53* gene. Full-length nucleotide sequence and amino-acid sequences for ORF region of the *BrTSR53* gene isolated from *Brassica rapa*.

Fig. 3. Phylogenetic analysis for the *BrTSR53* gene isolated from *Brassica rapa*. The distance was calculated by Kimura's two-parameter methods and the tree was constructed by using the neighbor-joining method. Number indicates bootstrap values after 1000 replications.

Fig. 4. Generation of the BrTSR53 transgenic yeast. A. pYES-DEST54/BrTSR53 vector construct for expression of the BrTSR53 in yeast B. Western blot analysis of the BrTSR53 for protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*; (a) non induction of empty vector; (b) induction of empty vector; (c) non induction of pYES-DEST54/BrTSR53; (d) induction of pYES-DEST54/BrTSR53.

시스템을 삽입한 효모에 대하여 단백질을 유도한 경우와 유도하지 않은 경우 등 특정 단백질 발현을 확인하기 위한 4가지의 조건을 비교하였다. Western blot 분석법을 이용하여 *BrTSR53* 단백질이 10~15 KDa 사이에서 형성되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이로써, 효모를 이용한 발현 시스템에서 *BrTSR53* 단백질이 발현됨을 알 수 있었으며, 형성된 단백질은 오직 *BrTSR53* 유전자에 의해서만 형성될 수 있는 특정 단백질을 확인할 수 있었다.

환경스트레스에 대한 저항성

BrTSR53 유전자의 저항성을 알아보기 위해 효모발현시스템을 이용하여 환경 스트레스를 처리하였다. 대조구인 pYES-DEST52 벡터만 삽입한 효모와 pYES-DEST52/*BrTSR53* 벡터를 삽입한 효모의 발현을 유도하였으며, 저온, 건조, 염분 스트레스 처리를 하였다.

저온과 건조 처리에서 pYES-DEST52 효모와 pYES-DEST52/*BrTSR53* 삽입한 효모는 차이가 보이지 않았다(data not shown). 염분 처리 결과에서는 1 M NaCl 처리에서는 pYES-DEST52 효모와 pYES-DEST52/*BrTSR53* 효모에서는 차이가 나타나지 않았으나 1.5 M NaCl 처리에서는 pYES-DEST52 효모보다 pYES-DEST52/*BrTSR53* 효모에서 집락이 증가하였다. 또한 2 M NaCl 처리에서는 pYES-DEST52 효모에서는 집락이 형성되지 않았지만, pYES-DEST52/*BrTSR53* 효모에서는 10^{-2} 까지 배양된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5). Diao et al. (2010)의 보고에 의하면, *Limonium bicolor*로부터 유래한 환경스트레스 저항성 유전자인 *LbGST1*의 형질전환체 효모를 NaHCO_3 , 건조, 저온, 염분, 고온 및 UV (Ultraviolet radiation)

의 다양한 스트레스 처리를 하였고, *LbGST1* 유전자를 삽입한 형질전환체 효모와 유전자를 삽입하지 않은 효모의 세포를 희석하여 비교하였다. 그 결과 대조군을 제외한 NaHCO_3 , 건조, 저온, 염분, 고온 및 UV 스트레스를 처리하였을 때, *LbGST1*의 유전자를 삽입한 형질전환체 효모에서 저항성을 나타내었다. 이 결과와 비교하였을 때, *BrTSR53* 유전자는 효모발현시스템에서 염분 스트레스에 대해 저항성을 보이는 것으로 나타났다.

적 요

농작물은 다양한 외부 환경스트레스에 노출되어 있다. 환경스트레스는 작물의 성장에 영향을 주어 세계 각 지역의 농업 생산량을 심각하게 감소시키고 있다. 따라서 작물의 생산성을 높이기 위해서 다양한 환경스트레스에 내성이 강한 새로운 품종의 개발이 요구된다. 최근의 연구 동향은 환경스트레스 저항성 유전자를 작물에 도입시켜 환경 변화에 대한 저항성이 강한 작물을 개발하는 것이다.

본 연구에서는 배추의 저온, 고농도의 염과 건조 등의 환경스트레스에 대한 저항성 유전자로 추정되는 *BrTSR53*의 염기서열을 분석하였다. *BrTSR53*의 유전자의 총 길이는 481 bp이며 이중에서 ORF 부위는 234 bp이었다. 이 ORF의 염기서열 상동성을 분석한 결과 *Arabidopsis*에서 보고된 유전자와 유사한 것으로 나타났다. *BrTSR53*의 발현을 분석하기 위하여 quantitative real-time PCR을 실시하였다. 그 결과 배추를 고염 처리, 저온 처리하고 3시간 후에 가장 높은 mRNA 양을 보였으며, 건조 처리에서는 36시간 후에 발현량이 최대치를

Fig. 5. Salt stress treatment of the *BrTSR53* transgenic yeast cell. pYES-DEST52 and pYES-DEST52/*BrTSR53* transgenic yeast cells were spotted on plates with normal growth medium (YPD) or medium containing 1.0, 1.5 and 2.0 M NaCl, respectively. Transgenic yeast cells were diluted by 10^{-1} to 10^{-4} . The inoculated transgenic yeast cells were incubated at 30°C for 3~5 days.

보였다. 따라서 이 ORF는 환경스트레스에 대한 배추의 저항성 유전자임을 확인하였다.

그리고 *BrTSR53* 유전자를 효모발현 벡터인 pYES-DEST52에 삽입하고 western blot 분석법을 통해 효모에서 분자량이 약 13 kDa인 저항성 단백질의 발현을 확인하였다. 또한 *BrTSR53* 형질전환 효모는 염분 스트레스에 대한 저항성이 증가한 것으로 나타났다. 따라서 *BrTSR53* 유전자는 농작물의 환경스트레스 저항성을 높여줄 수 있는 주요한 유전자원으로 이용될 수 있다고 사료된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 어젠다(과제번호: PJ010086)와 차세대 바이오그린 21사업(과제번호: PJ0080912012)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Bhatnagar-Mathur P, Vadez V, Sharma KK. 2008. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Reports* 27: 411-424.
- Boyer JS. 1982. Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.
- Chandna R, Augustine R, Bisht NC. 2012. Evaluation of candidate reference genes for gene expression normalization in *Brassica juncea* using real time quantitative RT-PCR. *PLoS One* 7: e36918.
- Chen L, Zhong H, Ren F, Guo QQ, Hu XP, Li XB. 2011. A novel cold-regulated gene, *COR25*, of *Brassica napus* is involved in plant response and tolerance to cold stress. *Plant Cell Rep.* 30: 463-471.
- Cushman JC, Bohner HJ. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 117-124.
- Dai X, Xu Y, Ma Q, Xu W, Wang T, Xue Y, Chong K. 2007. Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, *OsMYB3R-2*, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143: 1739-1751.
- Diao G, Wang Y, Yang C. 2010. Functional characterization of a glutathione S-transferase gene from *Limonium bicolor* in response to several abiotic stresses. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 5060-5065.
- Hirashi H, Mochizuki M, Takaki H. 2006. Enhancement of stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of ubiquitin ligase Rsp5 and ubiquitin-conjugating enzymes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 2762-2765.
- Jellouli N, Jouira HB, Daldoul S, Chenennaoui S, Ghorbel A, Salem AB, Gargouri A. 2010. Proteomic and transcriptomic analysis of grapevine PR10 expression during salt stress and functional characterization in yeast. *Plant Mol. Biol. Rep.* 28: 1-8.
- Jeong MJ, Park SC, Kwon HB, Byun MO. 2000. Isolation and characterization of the gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278: 192-196.
- Jung YJ, Lee IH, Nou IS, Lee KD, Rashotte AM, Kang KK. 2013. *BrRZFPI* a *Brassica rapa* C3HC4-type RING zinc finger protein involved in cold, salt and dehydration stress. *J. Plant Biol.* 15: 274-283.
- Kim HJ, Baek SH, Shin WC, Seo CS, Park MR, Ko JK, Yum SJ. 2010. Development of salt-tolerant transgenic rice using soybean *PR10* gene. *Korean J. Breed. Sci.* 42: 540-546.
- Kushnirov VV. 2000. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* 16: 857-860.
- Lee J, Han CT, Hur Y. 2013. Molecular characterization of the *Brassica rapa* auxin-repressed, superfamily genes, *BrARPI* and *BrDRMI*. *Mol. Biol. Rep.* 40: 197-209.
- Lee SC, Lim MH, Kim JA, Lee SI, Kim JS, Jin M, Kwon SJ, Mun JH, Kim YK, Kim HU, Hur Y, Park BS. 2008. Transcriptome analysis in *Brassica rapa* under the abiotic stresses using *Brassica* 24K oligo microarray. *Mol. Cells* 26: 595-605.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25: 402-408.
- Lyons JM. 1973. Chilling injury in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 445-466.
- Patterson BD, Mutton L, Paull RE, Nguyen VQ. 1987. Tomato pollen development: stages sensitive to chilling and a natural environment for the selection of resistant genotypes. *Plant Cell Environ.* 10: 363-368.
- Sataka T, Koike S. 1983. Sterility caused by cooling treatment at the flowering stage in rice plants. I. The stage and organ susceptible to cool temperature. *Jpn. J. Crop Sci.* 52: 207-214.
- Seo YJ, Park JB, Cho YJ, Jung C, Seo HS, Park SK,

- Nahm BH, Song JT. 2010. Overexpression of the ethylene-responsive factor gene *BrERF4* from *Brassica rapa* increases tolerance to salt and drought in Arabidopsis plants. *Mol. Cells* 30: 271-277.
21. Shinozaki K, Yamaguchi-shinozaki K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58: 221-227.
22. Wang F, Hou X, Tang J, Wang Z, Wang S, Jiang F, Li Y. 2012. A novel cold-inducible gene from Pak-choi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*), *BcWRKY46*, enhances the cold, salt and dehydration stress tolerance in transgenic tobacco. *Mol. Biol. Rep.* 39: 4553-4564.
23. Xue T, Li X, Zhu W, Wu C, Yang G, Zheng C. 2009. Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. *J. Exp. Bot.* 60: 339-349.
24. Yadav NS, Rashmi D, Singh D, Agarwal PK, Jha B. 2012. A novel salt-inducible gene SbSI-1 from *Salicornia brachiata* confers salt and desiccation tolerance in *E.coli*. *Mol. Biol. Rep.* 39: 1943-1948.
25. Yang R, Jarvis DE, Chen H, Beilstein MA, Grimwood J, Jenkins J, Shu S, Prochnik S, Xin M, Ma C, Schmutz J, Wing RA, Mitchell-Olds T, Schumaker KS, Wang X. 2013. The reference genome of the halophytic plant *Eutrema salsugineum*. *Front Plant Sci.* 46: 1-14.
26. Yun DJ. 2005. Molecular mechanism of plant adaption to high salinity. *J. Plant Biotechnol.* 32: 1-14.