

(05-1-72)

배추로부터 분리한 MTs (Metallothioneins)의 엽록체 targeting에 의한 환경저항성 식물의 개발 연구

김선하¹, 송원용¹, 이현숙¹, 허운강², 최관삼¹

¹충남대학교 농업생명과학대학 응용생물학과, ²충남대학교 자연과학대학 생물학과.

Objectives

배추에서 분리한 MTs (BrMT1, BrMT2a, BrMT2b, BrMT3)를 엽록체에 targeting 함으로써 여러 가지 환경스트레스와 중금속에 강한 식물을 개발하고자 하였다. 본 실험에서는 MTs의 엽록체 targeting의 확인과 아울러 형질전환체 T₂까지 채종하여 형질 전환된 MTs 유전자군이 유전되었음을 확인하였으며 생리적인 반응을 본 결과에 관해 논의 하려 한다.

Materials and Methods

1. 우리는 배추에서 Metallothioneins 유전자들을 (*BrMT1*, *BrMT2a*, *BrMT2b*, *BrMT3*) 분리한 후 chloroplast transit sequence (small subunit of rubisco complex; RBCs)를 이용한 vector를 제작, *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101)를 이용하여 *Arabidopsis thaliana* (col-0)에 형질전환 하였다.
2. Green fluorescent protein(GFP)의 antibody를 이용한 western blot 분석을 하였고 Cd(II) 저항성 실험과 형광현미경을 이용하여 세포 내 GFP 위치를 관찰하였다.
3. 엽록체의 분리는 STN buffer (pH 8.0, 0.4 M sucrose, 0.05 M Tris, 0.01 M NaCl)를 사용하였다.

Results and Discussion

1. 우리는 배추에서 Metallothioneins 유전자들을 (*BrMT1*, *BrMT2a*, *BrMT2b*, *BrMT3*) 분리한 후, chloroplast transit sequence를 이용하여 vector를 제작하였다.
 2. *RBCs-BrMTs-GFP*를 형질 전환한 애기장대의 엽록체에서 단백질을 분리하여 GFP antibody를 이용한 western blot 결과, GFP 단백질을 확인하였고 형광 현미경을 통해 *RBCs-BrMTs-GFP*의 위치를 엽록체에서 관찰할 수 있었다.
 - 3 애기장대 전체에 발현시킨 (*NPC-BrMTs*)것과 chloroplast targeting (*RBCs-BrMTs*)한 애기장대를 50 μ M의 카드뮴을 포함한 배지에서 자라게 했을 때, 양쪽 모두 WT과 비교하여 카드뮴에 저항성을 보였다.
- 이상의 결과에서 우리는 *RBCs-BrMTs-GFP*를 형질 전환한 애기장대에서 *RBCs-BrMTs-GFP* 단백질이 엽록체에 존재함을 확인 하였고, Cd(II) 처리에 의해서도 저항성이 증가됨을 보았다. 앞으로 우리는 엽록체에서 카드뮴을 비롯한 여러 가지 스트레스, CdCl₂, CuSO₄, Paraquat 등에 대한 차이를 비교 분석할 예정이다. 이것으로 우리는 MTs 단백질의 엽록체 targeting 기술이 환경저항성 식물을 개발하는 하나의 가능성이 될 수 있을 것으로 생각한다.

References

- K S Choi et. al (2004) "Role of metallothionein and phytochelatin synthase genes in toxic metal detoxification in *Brassica rapa*." Joint Meeting of the 14th Crucifer Genetics Workshop and the 4th ISHS Symposium on Brassicas. Brassica 2004 Abstract Book. p215
- K H Lee, et. al (2002). "In vivo Import Experiments in Protoplasts Reveal the Importance of the Overall Context but Not Specific Amino Acid Residues of the Transit Peptide during Import into Chloroplasts." *Mol. Cells*, Vol. 14, No. 3, pp. 388-397