

## Cellular Localisation of GFP (green fluorescent protein) -tagged plat protein

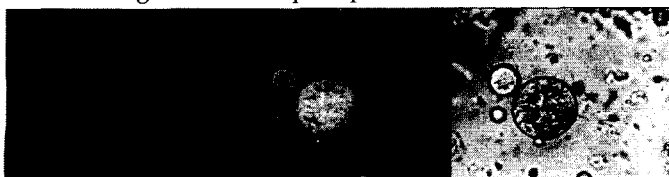
김석형

대구외국어대 생명공학과

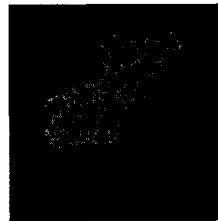
GFP (green fluorescent protein) fusion을 이용하여 cellular level에서의 단백질 위치를 확인하고자하는 목적으로 이 실험이 설계되고 진행되었다. 첫째로 GFP 단백질이 식물체에서 발현 되었을 때 default targeting이 생길 것인가라는 질문을 하게 되는데 본 실험에서 GFP의 발현은 정상적이었으며 이 단백질은 세포질 속에 고루 퍼져 분포해 있었던 것으로 사료되며 default targeting은 매우 적었다 (Figure1). 둘째로 GFP fusion의 위치, 다시 말해 C-terminal region와 N-terminal region중 어떠한 형태가 발현이 좋을 것인가라는 질문을 던져보게 된다. 본인의 실험에서 GFP fusion을 이용하여 TRAMP 위치가 원형질막에 존재함을 규명하였으며, tomato에선 GFP를 유전자의 N-terminal에 fusion시켰을 경우가 C-terminal에 fusion시켰을 경우보다 mRNA와 protein 발현이 월등히 높았다 (Figure 2, Figure 3). 그리고 transgene copy 수가 높을수록 gene silencing 현상이 두드러졌다 (Figure 2). 세번째는 GFP fusion이 되었을 경우 단백질의 기능이 정상적일 것인가라는 질문을 해보았으며 GFP fusion된 유전자를 yeast에서 발현을 시킨 후 기능을 점검하였는데 본 실험에선 GFP fusion이 큰 영향을 주지 않았다고 사료된다. 다양한 유전자를 발현과 단백질 위치를 다양한 식물 재료에서 검증하였다.

이결과를 종합해보면, GFP 단백질은 soluble protein이었으며 specific targeting을 하지않았다. 그리고 GFP fusion 단백질들의기능엔 큰 변화가 없었으며, 발현은 C-terminal fusion (Gene-GFP)보다N-terminal fusion (GFP-Gene)에서 높게 나타났다. 35S Promoter를 사용하더라도 단백질의 발현은 protein carrier와 plant species 그리고 다른 조건들에 아마도 영향을 받을 것이라 사려된다.

A. transgenic tomato protoplast



B. Tobacco leaf (confocal image)



C. Onion



Figure 1. 35S::GFP expression in cells of tomato protoplast, tobacco and onion

(A) transgenic tomato protoplast expressing 35S:GFP control (pBDHG5.2) (B) Onion and (C) tobacco leaf cellsexpressing the pDHG5.2 control vector DNA containing the 35S promoter and GFP with a stop codon.

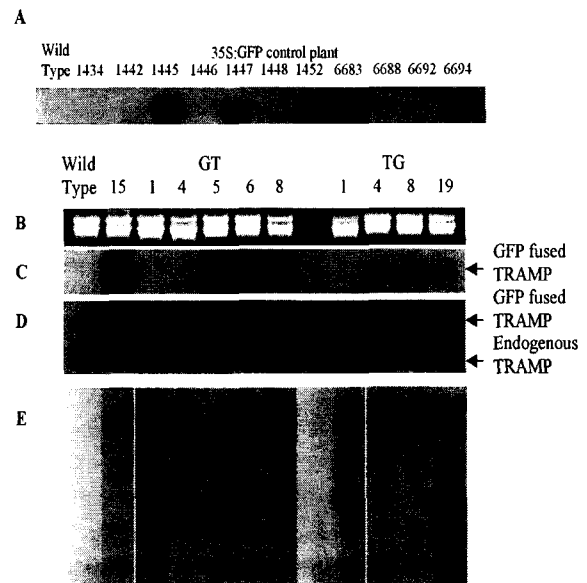


Figure 2. RNA and genomic DNA gel blot analysis showing endogenous TRAMP and GFP fused TRAMP mRNA and transgene copy number in leaves of

transgenic and wild type plants.

(A) RNA gel blot analysis of 35S:GFP control plants using GFP cDNA as probe. (B) Ethidium bromide stained total RNA extracted from tomato leaves of wild type, and a series of GT plants (15, 1, 4, 5, 6, 8) carrying the GFP-TRAMP N-terminal fusion and TG plants (1, 4, 8, 19), carrying the TRAMP-GFP C-terminal fusion. (C) RNA gel blot analysis using GFP cDNA as probe. (D) RNA gel blot analysis using pNY507 TRAMP cDNA as probe. (E) Southern analysis of wild type, TG and GT transgenic plants Using *NPTII*cDNA as probe. Total RNA 40g; genomic DNA 40g, *Bam*HI digestion; exposure 24 h.

A. pBDHGT6.2.(GT)

B. pBDHTG5.2.(TG)

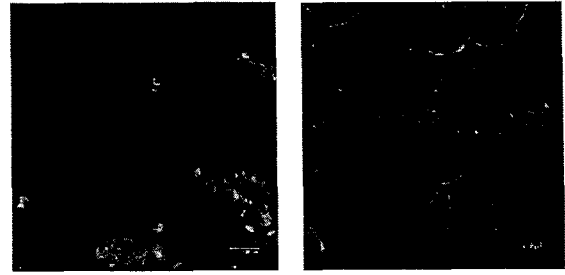


Figure 3. Confocal laser scanning microscopy images of pBDHGT6.2. (GT) and pBDHTG5.2. (TG) transgenic tomato fruit.