

Agrobacterium tumefaciens KU-12 균주에서 분리한 플라스미드 pTi 12의 제한효소 지도

이용욱·손정훈·심웅섭
고려대학교 이과대학 생물학과

Restriction endonuclease mapping of the plasmid pTi12 from *Agrobacterium tumefaciens*

Lee, Y.W., Sohn, J.H., and W.S. Sim

Department of Biology, College of Science, Korea University

ABSTRACT: Ti plasmids were isolated from three strains of *Agrobacterium tumefaciens* in Korea and their types and molecular weights were determined. All of these are octopine-type and their molecular weights are 44Kb (pTi 12), 180Kb (pTi 14) and 172Kb (pTi 49), respectively. In order to construct physical map of pTi 12, pTi 12 was digested with restriction endonucleases Sma I and Hind III. Sma I digestion of pTi 12 produce 8 fragments and Hind III produced 10 fragments. Physical arrangements of these fragments was determined by Southern hybridization techniques.

KEY WORDS □ Ti plasmid, restriction endonuclease map, southern hybridization techniques

*Agrobacterium tumefaciens*는 Gram negative soil bacteria로서 (Lippincott *et al.*, 1981) 많은 쌍자엽식물에서 tumor를 유발한다. 이러한 병원성은 *A. tumefaciens*가 갖고 있는 분자량이 매우 큰 plasmid에 기인하는데 이를 Ti(tumor-inducing) plasmid라 한다(Zaenen *et al.*, 1974; Van Larebeke *et al.*, 1974; Watson *et al.*, 1975). *A. tumefaciens*의 감염에 의해 형성된 tumor는 *in vitro*에서 정상적인 식물체와는 달리 auxin이나 cytokinin같은 hormone이 없어도 성장하며(Thomashow *et al.*, 1980), opine이라는 basic amino acid 유도체를 합성한다(Montoya *et al.*, 1977).

Opine의 종류에는 octopine, nopaline 과 agropine 등이 알려져 있고(Guyon *et al.*, 1980) opine type은 숙주식물에 의해서가 아니라 감염된 bacteria에 의해 결정된다(Montoya *et al.*, 1977). 이러한 opine의 type은 Ti plasmid

를 나누는 일차적인 분류기준으로서 사용된다(Sciaky *et al.*, 1978). 또한 tumor 세포의 염색체내에는 T-DNA라는 Ti plasmid의 일부분이 안정하게 삽입되어 있으며(Chilton *et al.*, 1977; Schell *et al.*, 1979) 삽입된 T-DNA는 식물체내에서 전사 발현된다(Drummond *et al.*, 1977; Gurley *et al.*, 1979). 현재 T-DNA가 식물체의 염색체에 안정하게 삽입, 발현되는 성질을 이용하여 다른 이질 유전자를 많은 고등식물체로 도입시킬수 있는 vector system을 개발하고자 하는 연구가 진행되고 있다(Hernalsteens *et al.*, 1980; Zambryski *et al.*, 1983).

본 연구에서는 Ti plasmid를 이용한 vector system 개발의 일환으로서 한국산 *A. tumefaciens* 3균주에서 Ti plasmid를 분리하여 분자량과 type을 결정하였으며, Southern hybridization 방법에 의해 그중 pTi 12의 Sma I과 Hind III digest fragment의 제한효소 지도를 작성

하였다.

재료 및 방법

균주 및 plasmids

본 실험에 사용한 균주는 *Agrobacterium tumefaciens* KU-12, KU-14, KU-49 (Cha *et al.*, 1983), Ach 5 (Klapwijk *et al.*, 1978)와 *E. coli* C 600이며 plasmid는 pTi 12, pTi 14, pTi 49, pTiAch 5와 RP 4이다.

배 지

*A. tumefaciens*의 배양에는 YMA (1l 당 Mannitol 10g, K_2HPO_4 0.5g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g, NaCl 0.1g, yeast extract 0.4g, Agar 15g, pH 7.1) 배지를 사용하였고 *E. coli*의 배양에는 LB (1l 당 trypton 10g, yeast extract 5g, NaCl 10g, pH 7.5) 배지를 사용하였다. 또한 opine test를 위해서는 N-free 배지 (1l 당 K_2HPO_4 10.25g, KH_2PO_4 7.25g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g, NaCl 0.15g, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.067g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025g, glucose 4g)을 사용하였다.

Opine test

Octopine (0.1% w/v)과 nopaline (0.1% w/v)을 질소원으로 첨가한 N-free 배지에 균주를 접종하여 29°C에서 5일간 진탕배양한 후 A_{600} 값을 측정하여 성장 여부를 확인하였다.

Plasmid의 분리 및 제한절편의 제조

분자량 측정을 위한 plasmid의 소량 분리는 Kado 등 (1981)의 방법을 사용하였고 제한효소 지도 작성을 위한 plasmid의 대량 분리는 Hansen과 Olsen (1978)의 방법을 사용하여 CsCl-ethidium bromide 밀도구배 원심분리를 통하여 분리하였고 분리한 DNA의 양은 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 분리한 plasmid를 제한효소로 처리할 때 완충용액으로서 Hind III는 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl을, Sma I은 15 mM Tris-HCl (pH 8.0), 6 mM $MgCl_2$, 15 mM KCl을 사용하였으며 Hind III는 37°C, Sma I은 30°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 제한효소로 처리된 plasmid 표품을 0.7%

Agarose의 horizontal slab gel을 사용하여 30~36시간 동안 2V/cm로 전기영동하였다.

제한효소 지도 작성

Probe 작성을 위한 digest fragment의 분리는 Thuring 등 (1975)의 방법을 사용하였고, Maniatis 등 (1975)과 Thomashow 등 (1980)의 방법을 이용하여 분리된 digest fragment 각각을 α - ^{32}P -dCTP (Amersham, specific activity 400 Ci/mmole)로 표지하였다. 또한 Southern 등 (1975)과 Maniatis 등 (1982)의 방법을 사용하여 gel상의 DNA를 nitrocellulose filter (Millipore HAHY)에 결합시킴으로써 cellulose nitrate transfer를 준비하였다. 준비된 probe와 cellulose nitrate transfer와의 혼성체 형성은 Thomashow 등 (1980)의 방법에 의거하여 실험하였고 hybridization이 끝난 nitrocellulose filter는 -70°C에서 1~2일간 autoradiography하였다.

결과 및 고찰

Opine test

Octopine과 nopaline을 질소원으로 사용한 N-free 배지에서 각 균주의 성장여부는 Table 1과 같다.

모든 균주가 octopine에서만 성장하는 것으로 보아 본 실험에서 사용한 3개의 *A. tumefaciens* 균주의 Ti plasmid는 모두 octopine type임을 알 수 있다.

Plasmid 및 제한절편의 분자량

분자량이 60 Kb인 RPA와 193.6 Kb인 pTiAch 5를 marker로 사용하여 Ti plasmid의 분자량을 측정된 결과는 Fig. 1에서 보는 바와 같으며, pTi 12, pTi 14 및 pTi 49의 분자량은 각각 44 Kb,

Table 1. Octopine and Nopaline degradation by *A. tumefaciens*

Strain	Octopine	Nopaline
KU-12	+(1.83)	-(0.02)
KU-14	+(1.40)	-(0.01)
KU-49	+(1.43)	-(0.01)

The values in parenthesis indicate A_{600} .

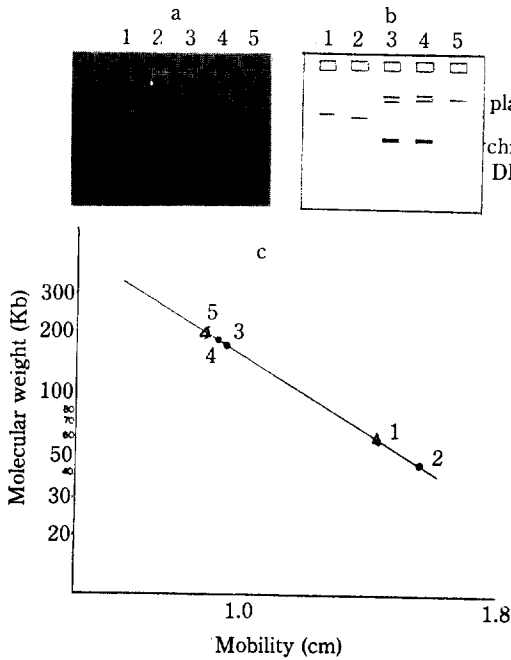


Fig. 1. Molecular Weights of Ti-plasmid
 a. b. c. calibration curve 1. RP4 2. pTi 12
 3. pTi 14 4. pTi 49 5. pTi Ach5

Table 2. Molecular weights of SmaI and Hind III digest fragments of pTi 12 plasmid DNA

	SmaI fragment number	M.W (Kb)	Hind III fragment number	M.W (Kb)
	1	13.40	1	8.65
	2	9.70	2	7.50
	3	4.75	3	5.35
	4	4.55	4	4.45
	5	3.70	5	4.15
	6	3.65	6	4.05
	7	2.58	7	3.65
	8	1.98	8	2.85
			9	2.40
			10	1.40

180Kb 그리고 172Kb이었다. 또한 pTi12를 HindIII와 SmaI으로 처리한 결과는 Fig.2와 같으며 λDNA의 HindIII digest fragment를 marker로 사용하여 이들 fragment의 분자량을 측정하였다(Table 2).

제한지도

³²P로 표지된 각 SmaI digest fragment와 nitrocellulose filter에 결합된 HindIII digest fragment간의 혼성체 형성 결과는 Fig.3과 Table 3과 같다. 또한 ³²P로 표지된 각 HindIII digest fragment간의 혼성체형성 결과는 Fig.4 및 Table 4와 같다.

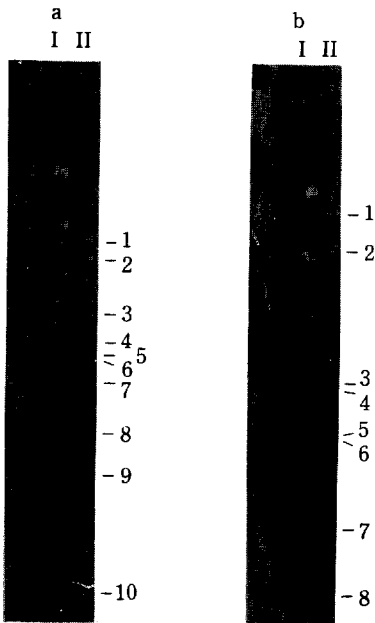


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of pTi 12 digested fragments
 a) Hind III
 I) λ-HindIII digested fragments
 II) digested fragment of pTi12

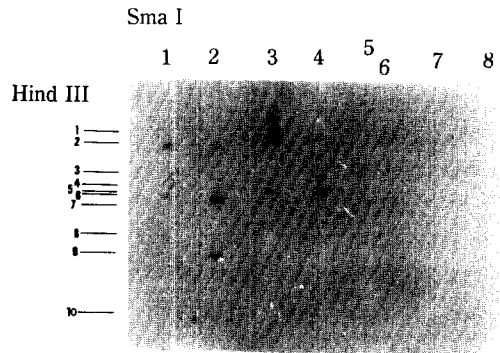


Fig. 3. Autoradiograms of hybrids formed by cellulose nitrate transfer of HindIII digest fragments. Labeled SmaI digest fragments were hybridized with cellulose nitrate transfer strips of the HindIII digest fragments. After 48h of autoradiography, the film was developed.

Table 3. Hybridization of labeled *Sma*I digest fragments with cellulose nitrate transfer of *Hind*III digest fragments based on Fig. 3.

labeled <i>Sma</i> I fragments	HindIII digest fragments									
	1	2	3	4	5,6	7	8	9	10	
1		+++			++		++			
2		++			+++			+++	++	
3	+++		+	++						
4	+		++	+++						
5,6	+		++							
7						++				
8						+			+	

Hybridization bands on autoradiograms were scored by inspection as strong(+++), medium(++) or weak(+). *Sma*I fragment 5,6 and *Hind*III fragment 5,6 were not seperated.

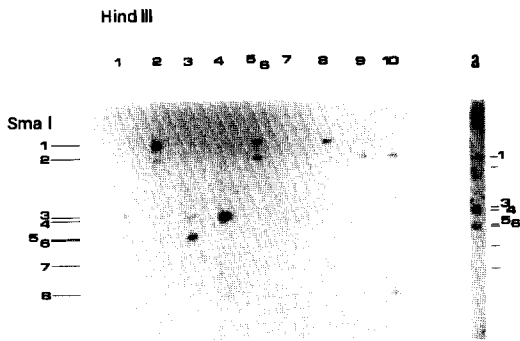


Fig. 4. Autoradiograms of hybrids formed by cellulose nitrate transfer of *Sma*I digest fragments. Labeled *Hind*III digest fragments were hybridized with cellulose nitrate transfer strips of the *Hind*III digest fragments. After 48h of autoradiography, the X-ray film was developed.
a) Autoradiogram of lane 1 without washing.

Table 3과 Table 4를 종합하여 볼 때 *Hind*III fragment 5번과 8번은 *Sma*I fragment 1번과만 혼성체를 형성하는 것으로 보아 *Sma*I fragment 1번에 포함되고 *Hind*III fragment 6번과 9번은 *Sma*I fragment 2번에 포함된다. 또 *Sma*I fragment 1번과 2번은 *Hind*III fragment 2번과만 혼성체를 형성하는 것으로 볼 때 *Hind*III fragment 2번을 매개로 하여 연결됨을 알 수 있다.

위와 마찬가지로 *Hind*III fragment 10번을 매개로 *Sma*I fragment 2번과 8번이 연결되고 *Hind*III fragment 7번을 매개로 *Sma*I fragment 7번과 8번이 연결되며 *Hind*III fragment 4번을 매개로 *Sma*I fragment 3번과 4번이 연결된다. 또 *Hind*III fragment 3번을 매개로 *Sma*I

Table 4. Hybridization of labeled *Hind*III digest fragments with cellulose nitrate transfer of *Sma*I digest fragments based on Fig. 4.

<i>Sma</i> I digest fragment	labeled <i>Hind</i> III digest fragments									
	1	2	3	4	5,6	7	8	9	10	
1	+	+++		+	+++		+++			
2		++		+	+++			+++	+++	
3	+++			++						
4		+	++	+++						
5,6	++	+	+++		+					
7						++	+			
8			+	+		++			+++	

Hybridization bands on autoradiograms were scored by inspection as strong(+++), medium(++), or weak(+). *Sma*I fragment 5,6 and *Hind*III fragment 5,6 were not seperated.

fragment 4번과 5, 6번이 연결되며 HindIII fragment 1번은 SmaI fragment 3번과 5, 6번과 혼성체를 형성한다.

전체적인 pTi12의 잠정적인 circular map은 Fig. 5와 같다.

pTi12의 분자량은 44Kb로서 일반적인 Ti plasmid가 148~240Kb(Sciaky *et al.*, 1978) 정도인 것에 비하면 아주 작은 Ti plasmid로서 현재 우리는 pTi12를 Ti plasmid의 deletion mutant라고 추정하고 있다. 이를 뒷받침하는 사실로서, 본 연구와 병행된 조직배양 결과 *A. tumefaciens* KU-12 균주를 접종한 감자 disc에서 tumor가 유발되었으며 tumor에서 shoot가 성장하였다(chung, 1986). 식물 tissue로부터 root나 shoot의 성장은 auxin과 cytokinin이 상대적 농도에 의해서 결정되는데 Ooms 등(1981)에 따르면 정상적인 *A. tumefaciens*에 의해 유발된 tumor에서는 tumor 자체의 auxin과 cytokinin의 농도 균형에 의해서 root나 shoot가 성장하지 못하지만 T-DNA mutant인 LBA 4210이나 LBA 4060의 경우에는 어떤 한쪽 phytohormone을 생산하는 부분이 inactivation 됨으로써 상대적으로 다른 phytohormone의 증가효과를 나타내게 되고 이들

두 phytohormone의 농도가 불균형해짐에 따라서 root 또는 shoot가 성장할 수 있게 된다고 하였다. 따라서 KU-12에 의해 유발된 tumor에서 shoot가 성장하는 것으로 보아 pTi12는 T-DNA 부분이 관련된 deletion mutant일 것이다.

그러나 *A. tumefaciens* KU-12의 tumor 형성능은 거의 완전하였으며 tumor 세포로부터 octopine이 합성되고 있음도 확인되었다(chung, 1986). 또한 DNA-DNA hybridization을 통하여 tumor 세포 염색체내에 pTi12의 일부분인 T-DNA가 존재하고 있음도 확인하였다(Chung, 1986). 위와 같은 사실에 비추어 볼 때 pTi12는 거의 완전한 병원성을 갖는 반면 크기가 아주 작은 Ti plasmid이기 때문에 식물체에 이용할 수 있는 vector 개발에 여러가지 장점을 제공할 수 있으리라 사료된다.

Fig. 1의 전기영동 결과 lane 3과 4에서 보는 바와 같이 두개의 plasmid 밴드가 나타나는데, 이는 Casse 등(Casse *et al.*, 1979)이 2개의 밴드중 아래 밴드는 Ti plasmid에 해당되고 위의 밴드는 Ti plasmid의 open circular 형태이거나 catenane 일 것이라고 보고 한 바 있다. 따라서 본 연구에서도 위의 밴드를 open circular 형태나 catenane으로 간주하였다.

pTi12의 제한효소 지도 작성시 실제로 나타나야 할 hybrids보다 많은 hybrids가 autoradiography를 통하여 나타났는데 Chilton 등(1978)은 이런 경우에 Autoradiogram에서 감광된 정도가 강한 쪽에 동질성이 있다고 결정하였고 본 연구에서는 probe를 바꾸어 실험하여 두 결과 모두에서 같이 나타난 hybrids를 중시함으로써 error를 제거했다.

HindIII fragment 1번과 SmaI fragment 1번과의 동질성 여부와 HindIII fragment 3번과 SmaI fragment 7번과의 동질성 여부가 확실하지 않은데 이것은 이들 두 fragment들의 전체적인 크기에 비하여 동질성이 매우 약하기 때문에 hybridization이 끝난 후 세척단계에서 대부분 다시 분리되어 버렸기 때문일 것이라고 추측되며 이를 뒷받침하는 근거로 Fig. 4(a)는 Washing 단계를 거치지 않고 Autoradiography한 결과인데 이

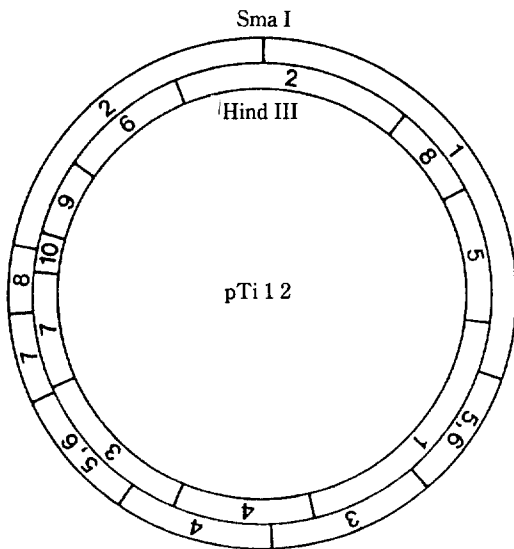


Fig. 5. Physical map of HindIII and SmaI digest fragments of pTi12 plasmid DNA. Scale: 90°C of arc equal 7.2 x 10⁶ daltons of DNA.

경우에는 HindIII fragment 1번과 SmaI fragment 1번이 hybridization되어 있음을 알 수 있다. 또한 pTi12의 T-DNA가 조사 결과 SmaI fragment 2, 1, 5, 6, 3, 4으로 이루어져 있었으며 (Chung, 1986) 이것으로 비추어 보아 HindIII fragment 1번과 SmaI fragment 1번이 동질성을

가지고 있다고 추정할 수 있다.

그러나 이들 부분에 대한 정확한 동질성 여부와 SmaI fragment 1번내부에 포함되는 HindIII fragment 6번과 9번의 순서는 partial digestion과 다른 제한효소를 이용하여 계속 연구를 하고자 한다.

적 요

한국산 *A. tumefaciens*의 3균주에서 분리한 Ti plasmid의 type과 분자량을 조사한 결과 이들 모두는 octopine type이었으며 각 plasmid의 분자량은 pTi12가 44Kb이었고, pTi14는 180Kb이었으며, pTi14는 172Kb이었다.

이중 pTi12를 SmaI 및 HindIII로 가수분해한 결과 8개의 SmaI digest fragment와 10개의 HindIII digest fragment를 얻었으며 Southern hybridization techniques을 이용하여 잠정적인 physical map을 작성하였다.

REFERENCES

1. Bomhoff, G., P.M. Klapwijk, H.C.M. Kester, R.A. Schillperoot, J.P. Hernalsteens and J. Schell, 1976. Octopine and nopaline synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* **145**, 177-181.
2. Casse, F., C. Boucher, J.B. Julliot, M. Michel and J. Denarie, 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using Agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* **113**, 229-242.
3. Cha, Y.J., J.S. Eum, S.B. Hong and W.S. Sim, 1983. Possible use of Ti plasmid for genetic engineering of higher plants. I. Isolation of Ti plasmid from *Agrobacterium tumefaciens* in Korea. *Kor. J. Microbiol.* **21**, 238-244.
4. Chilton, M.D., M.H. Drummond, D.J. Merlo and D. Sciaky, 1978. Highly conserved DNA of Ti plasmids overlaps T-DNA maintained in plant tumors. *Nature.* **275**, 147-149.
5. Chilton, M.D., R.K. Sciaky, N. Yadav, M.P. Gordon and F. Quetier, 1980. T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 4060-4064.
6. Chung, Sang-ho. 1986. Protoplast fusion between potato and tobacco and regeneration of potato tuber cells by Ti-plasmid. Ph. D. Thesis. Kor. Univ.
7. Drummond, M.P. Gordon, E.W. Nester and M.D. Chilton, 1977. Foreign DNA of bacterial plasmid origin is transcribed in crown gall tumors. *Nature.* **269**, 535-536.
8. Gurley, W.B., J.D. Kemp, M.J. Albert, D.W. Sutton and J. Callis, 1979. Transcription of Ti plasmid-derived sequences in three octopine-type crown gall tumor lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 2828-2832.
9. Hansen, J.B. and R.H. Olsen, 1978. Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5. *J. Bacteriol.* **135**(1), 227-238.
10. Hernalsteens, J.P., F.V. Vliet, M.D. Beuckeleer, A. Depicker, G. Engler, M. Lemmer, M. Holsters, M.V. Montagu and J. Schell, 1980. The *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid as a host vector system for introducing foreign DNA in plant cells. *Nature.* **287**, 654-656.
11. Kado, C.I. and S.T. Liu, 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**, 1365-1373.

12. Klapwijk, P.M., T. Schilperoot and R.A. Schilperoot, 1978. Coordinated regulation of octopine of degradation and conjugative transfer of Ti plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*: Evidence for a common regulatory gene and separate operons. *J. Bacteriol.* **136**, 755-785.
13. Lippincott, J.A., B.B. Lippincott and M.P. Starr, 1981. The Genus *Agrobacterium*. pp. 842-855. In: Starr, M.P., H.Stolp, H.G. Trüper, A. Balows, H.G. Schiegel (eds). The Prokaryotes Vol. 1. Berlin. Heidelberg. New York: Springer-Verlag.
14. Maniatis, T., A. Jeffrey and D.G. Kleid, 1975. Nucleotide sequence of the rightward operator of phage λ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 1184-1188.
15. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook, 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor.
16. Montoya, A., M.D. Chilton, M.P. Gordon, D. Sciaky and E.W. Nester, 1977. Octopine and nopaline metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall tumor cell: Role of plasmid genes. *J. Bacteriol.* **129**, 101-107.
17. Ooms, G., P.J.J. Hooykaas, G. Moolenaar and R.A. Schilperoot, 1981. Crown gall plant tumors of abnormal morphology induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti plasmids; analysis of T-DNA functions. *Gene*. **14**, 33-50.
18. Sciaky, D., A.L. Montoya and M.D. Chilton, 1978. Fingerprints of *Agrobacterium* Ti plasmids. *Plasmid*. **1**, 238-253.
19. Southern, E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.
20. Thomashow, M.F., R. Nutter, A.L. Montoya, M.P. Gordon and E.W. Nester, 1980. Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell*. **19**, 729-739.
21. Thuring, R.W. J., J.P.M. Sanders and P. Borst, 1975, A freeze-squeeze method for recovering long DNA from agarose gels. *Anal. Biochem.* **66**, 213-220.
22. Van Larebeke, N., G. Engler, M. Holster, S.V. Deu Elsacker, I. Zaenen, R.A. Schilperoot and J. Schell, 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature*. **252**, 169-170.
23. Vos, G.D., D. Beuckeleer, M.V. Montagu and J. Schell, 1981. Restriction endonuclease mapping of the octopine tumor-inducing plasmid pTiAch5 of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plasmid*. **6**, 245-253.
24. Watson, B., T.C. Currier, M.P. Gordon, M.D. Chilton and E.W. Nester, 1975. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **123**, 255-264.
25. Yang, F., A.L. Montoya, D.J. Merlo, M.H. Drummond, M.D. Chilton, E.W. Nest and M.P. Gordon, 1980. Foreign DNA sequences in crown gall teratomas and their fate during the loss of the tumorous traits. *Mol. Gen. Genet.* **177**, 707-714.
26. Zaenen, I., N.V. Larebeke, H. Teuchy, M.V. Montagu and J. Schell, 1974. Supercoiled circular DNA in crown gall inducing *Agrobacterium* strains. *J. Mol. Biol.* **86**, 109-127.
27. Zambryski, P., H. Joos, C. Genetello, J. Lee-mans, M.V. Montagu and J. Schell, 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* **2**, 2143-2150.

(Received June. 4, 1987)