

곡물류의 형질전환에 관한 연구. II. Electroporation에 의해  
벼 원형질체로 도입된 유전자의 발현

황 백·황성진·임옥빈·임형탁·\*강영희

진남대학교 생물학과

\*연세대학교 생물학과

Studies on the Induction of Transformation in Cereal Plants. II.  
Expression of Gene Transferred into Rice Protoplasts by Electroporation.

Baik Hwang, Sung Jin Hwang, Wook Bin Im, Hyong Tak Im, Young Hee Kang\*

Department of Biology, Chonnam Nat'l. University

\*Department of Biology, Yonsei University

ABSTRACT

Protoplasts isolated from embryogenic cell suspensions were electroporated in buffered solutions containing plasmid DNA of pBI121. Transient GUS (beta-glucuronidase) activity measurement and selection for kanamycin resistant showed that expression of foreign genes and stable transformation were achieved.

GUS transient gene expression was increased by increasing DNA concentration of pBI121 plasmid and affected by the level of the applied voltage. An optimal level of GUS activity was obtained after electroporation with a pulse of 200 voltage/1180 uF. Protoplast viability was up to the 60% at the optimal voltage.

Cell colonies resistant to 200 $\mu$ g/ml kanamycin were selected in agar medium and identified by histochemical GUS assay.

서 론

외래유전자의 도입에 의한 화분과 식물의 형질전환은 최근 직접유전자도입(direct gene transfer)방법인 PEG(1,2,3,4), electroporation(5,6,7), microinjection(8,9) 그리고, particle gun(10,11,12) 방법들에 의해 그 가능성이 확인되고 있다. 벼를 포함한 단자엽식물에 있어서 외래 유전자 도입에 의한 형질전환 유도의 어려움은 쌍자엽 식물에서 널리 사용되고 있는 *Agrobacterium*에 의한 유전자도입 방식이 적용되지 못하고 있을 뿐 아니라(13,24,25) 직접유전자 도입 방법에 있어서 필요로 하는 원형질체로 부터 유식물체의 재분화가 재현성 있게

이루어지지 않았기 때문이다(13). 따라서, 직접 유전자 도입 방법에 의한 형질전환 식물체를 유도하기 위해서는 우선적으로 totipotency를 갖는 embryogenic callus를 유도하여 이로부터 분리된 원형질체를 사용하고, 세포배양기술의 개발등으로 재분화개체를 효율적으로 형성시킬 수 있는 방법을 확립 함으로서 이와같은 문제점을 극복할 수 있다(24, 25). 본 연구에서는 국내재배종인 낙동벼로 부터 embryogenic callus를 유도하여 embryogenic cell suspension culture를 행하고(15) 이로부터 분리된 원형질체에 reporter genes(NPT II, GUS)이 들어있는 pBI121 plasmid DNA를 electroporation 방법을 이용하여 도입하고 발현을 확인함으로서 electroporation에 의한

화분과 식물체로의 외래유전자 도입에 관계되는 몇가지 요인들에 대한 최적조건을 확립하고 나아가 형질전환 개체의 형성 가능성을 연구자 한다.

## 재료 및 방법

### 원형질체의 분리

낙동비의 종자로 부터 embryogenic callus를 유도하고 (14) 이를 동일조성의 액체배지(2.0 mg / l 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, 30 g / l sucrose, pH 5.7)에서 embryogenic cell suspension culture를 행한 후 재대배양 3-5일 된 embryogenic cell suspensions에 4-5시간 효소 (1%, Cellulase 0-RS, 0.5% Macerozyme, pH 5.6)치리를 하여 원형질체를 분리 하였다(15).

### Plasmid DNA 분리

pBI121 plasmid(Fig.1)가 들어있는 *A. tumefaciens* A281 strain을 kanamycin(100 µg/ml)이 들어있는 YEP 배지(10 g / l Yeast extract, 10 g / l Bacto peptone, 5 g / l NaCl, pH 7.0)에서 OD 0.5-1까지 배양한 후 alkaline extraction 방법(16)에 의해 plasmid DNA를 분리하여 시료로 사용하였다.

### Electroporation

분리된 원형질체를 electroporation buffer(18)에 1회 세척한 후 제한타사키( $1 \times 10^6$  protoplasts/ml), 20 80µg/ml

의 plasmid DNA와 함께 electroporation chamber에 넣고 voltage와 capacitance를 각기 달리하여 4°C하에서 electroporation 하였다. Electroporation이 끝난 원형질체는 4°C에서 10분간 유지 시키고나서 원형질체 배양 배지로 1회 세척한 후 배양 하였다(15).

### 형질전환 확인

Jefferson 등(17)의 방법에 따라 배양 48시간이 지난 원형질체를 회수(100×g, 10 min)하여 lysis buffer (50 mM NaPO<sub>4</sub>, pH7.0, 10 mM EDTA, 0.1% Triton×-100, 0.1% sarcosyl, 10 mM beta-mercaptoethanol)에 넣고 5초간 sonication한 후 상층액에 50 µl 1mM para-Nitrophenyl-beta-D-glucuronide를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응 시키고 0.4ml 2.5 M 2-amino-2-methyl-propandiol를 넣어 반응을 정지 시킨 다음 spectrophotometer에서 흡광도(415nm)를 측정하였다. 또한 kanamycin이 첨가된 (200-300 µg/ml) 배지에서 배양을 통하여 선별된 colony에서 GUS gene의 발현은 callus를 고정액 (0.3% formaldehyde, 10 mM MES pH5.6, 0.3 M mannitol)에서 45분간 고정한 후 50 mM NaPO<sub>4</sub> (pH7.0)으로 2-3회 세척한 다음 1-2 ml 2 mM 5-bromo-4-chloro 3-indolyl glucuronide를 첨가하여 37°C에서 30분 이상 반응 시킨 뒤 70% ethanol로 5분간 세척하여 광학 현미경 하에서 blue precipitate로 GUS의 활성을 확인 하였다.

## 결과 및 고찰

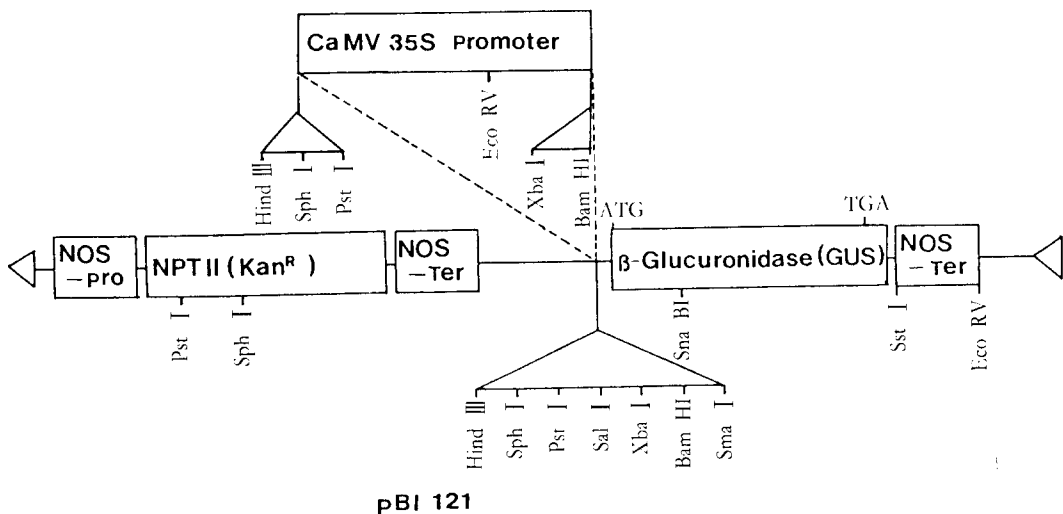


Fig. 1. The plasmid pBI121 used in the transformed experiments.

비 원형질체로의 외래유전자의 도입, 발현에 있어서 적정 voltage와 capacitance를 조사 하기 위해 비의 원형질체의 pBI121 plasmid DNA를 electroporation buffer에 현탁한 후 4°C에서 electroporation 하였다. 이때 200V / 1180  $\mu$ F에서 원형질체의 생존율이 안정적으로 유지되면서 유전자의 발현이 높게 나타났다(Fig. 2). Hauptmann 등(18)은 electroporation시 voltage와 capacitance의 증가는 원형질체의 생존율에 있어서는 감소를 가져오나 외래유전자의 도입을 높여주기 때문에 원형질체의 생존율이 안정적으로 유지되면서 유전자의 발현을 최대로 할 수 있는 적정 voltage와 capacitance를 찾는게 필요하다고 하였다. 이와같이 원형질체의 생존율과 유전자의 발현에 있어서 관계되는 요인들로는 voltage(capacitance)뿐만 아니라 식물재료나 세포의 상태, 그리고 사용되는 pulse의 횟수나 형태등에 의해서도 영향을 받는다(18,19,20, 23,26).

한편, plasmid DNA의 양을 20-80 $\mu$ g/ml로 높였을 때 유전자의 발현이 유의적인 증가를 나타내었다(Fig. 3). 이와 유사한 결과에 대하여 Bower등(21)은 첨가한 plasmid DNA의 양이 많을수록 원형질체에서의 발현율이 높게 나타나는 것은 각 원형질체에 도입되는 gene copy 수가 증가하기 때문으로 보았으며 처리한 DNA의 양이 증가함으로 원형질체의 생존율에는 영향을 미치지 않는다고 하였다. 그러나 이와달리 Shillito등(6)은 *N. tabacum*의 엽육세포의 원형질체를 사용한 실험에서 ele-

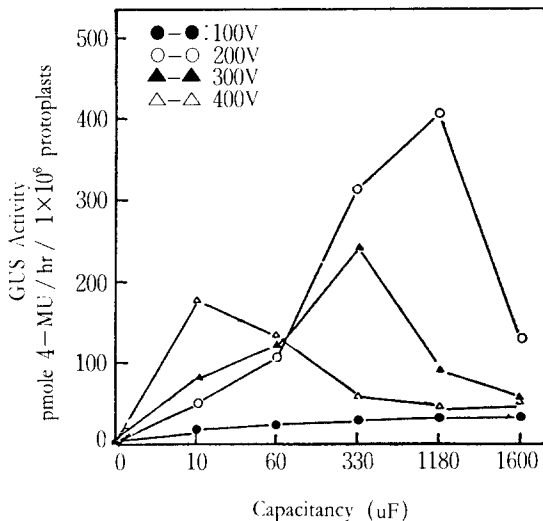


Fig. 2. Transient GUS activity of electroporated rice protoplasts.

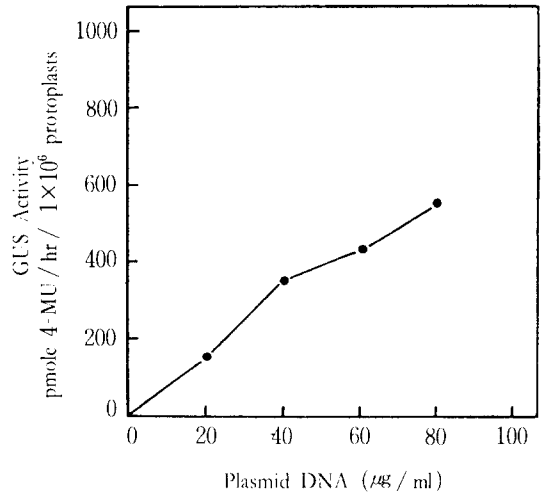


Fig. 3. Effect of concentration of pBI 121 vector on transient GUS activity of electroporated rice protoplasts

ctroporation에 의해 각 세포에 도입될 수 있는 DNA의 양의 포화와 일부 제한된 세포에서만이 형질전환능력을 갖는 등의 이유 때문에 적정 농도 이상에서는 발현율의 유의적인 변화를 볼 수 없다고 하였다.

Fig. 4, 5)는 electroporation한 원형질체를 항생제가 첨가된 배지에서 배양하여 선발된 callus에서 histochemical assay에 의해 GUS의 활성을 확인할 수 있었다. Hauptmann등(18)은 일부 단자엽식물에 있어서 kanam-

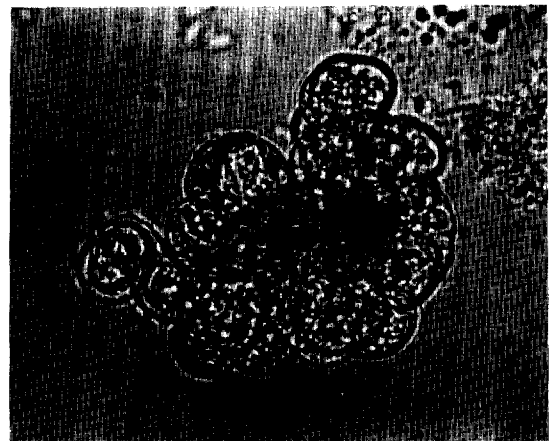


Fig. 4. Regenerating transformed callus after 2 weeks on selection medium containing 100 $\mu$ g/ml of kanamycin.

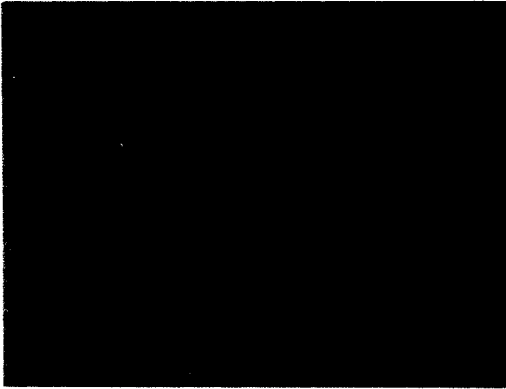


Fig. 5. Expression of GUS gene in transgenic callus.

ycin에 대한 저항성을 나타내기 때문에 복합적인 reporter gene을 사용함이 바람직하다고 보았다. 본 연구에서는 kanamycin이 첨가된 배지에서 1차적으로 저항성을 갖는 callus를 선발하고 이로부터 GUS의 활성을 확인하였다. 한편, Hu등(22)은 최근 식물체의 형질전환 연구에서 reporter gene으로 사용되어지고 있는 *E. coli* beta-glucuronidase(GUS)와 유사한 효소활성을 몇몇 종자식물의 일부 기관의 조직에서 확인할 수 있었다고 보고 하였다. 그러나, 본 실험 결과 형질전환된 조직에서 blue precipitate로서 GUS gene의 발현으로 여겨지는 반응을 보였으나 대조구에서는 이같은 반응이 전혀 나타나지 않음으로서 배과 식물로의 유용유전자 도입에 있어서 reporter gene으로서 GUS gene의 이용이 가능함을 보여 주었다.

이와같은 연구결과는 electroporation방법에 의한 배과 식물로의 유용유전자의 도입 및 발현에 대한 가능성을 제시하여 주는 기초자료가 될 수 있으리라 사료되어진다.

## 적 요

배의 embryogenic cell suspensions로부터 분리한 원형질체에 electroporation 방법을 사용하여 reporter genes이 들어있는 pBI121 plasmid DNA를 도입하고 그 발현을 확인 하였다. GUS gene의 발현은 plasmid DNA 양의 증가와 함께 높게 나타났으며, 200 voltage / 1180 uF에서 GUS의 활성 및 원형질체의 생존율(viability)이 가장 좋았다. 또한, kanamycin이 첨가된 배지에서 선발된 callus 에서 GUS의 활성을 확인할 수 있었다.

## 감 사

본 연구는 1990년도 교육부 기초과학 학술 연구 조성비 지원에 의해 수행되었음

## 참 고 문 헌

1. J. Paszkowski, R. D. Shillito, M. W. Saul, V. Mandak, T. Hohn, B. Hohn, I. Potrykus (1984) *EMBO J.*, **3**, 2717.
2. H. Lörz, B. Baker, J. Shell (1985) *Mole. Gen. Genet.*, **199**, 178.
3. I. Potrykus, M. W. Saul, J. Petruska, J. Paszkowski, R. D. Shillito(1985) *Mole. Gen. Genet.*, **199**, 183.
4. C. Mass and W. Werr(1989) *Plant Cell Rep.*, **8**, 148.
5. M. From, L. P. Taylor, V. Walbot(1985), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 5824.
6. R. D. Shillito, M. W. Saul, J. Paszkowski, M. Muller, I. Potrykus (1985), *Bio / Technology*, **3**, 1095.
7. K. Lindsey and M. G. K. Johnes (1987a) *Planta*, **172**, 346.
8. W. A. Lawrence and D. R. Davies (1985) *Plant Cell Rep.*, **4**, 33.
9. S. Joshi and A. M. Vincentini (1990) *Plant Cell Rep.*, **9**, 117.
10. H. Morikawa, A. Iida, Y. Yamada (1989) *App. Microbiol. Biotech.*, **31**, 320.
11. D. Twell, T. M. Klein, M. E. Fromm, S. McCormick (1989) *Plant Physiol.*, **91**, 1270.
12. J. H. Oard, D. F. Paige, J. A. Simmond, T. M. Gradziel (1990) *Plant Physiol.*, **92**, 334.
13. I. Potrykus (1990) *Physiol. Planta.*, **79**, 125.
14. B. Hwang, M. K. Kim and I. K. Vasil (1988) *Kor. J. Bot.*, **31**, 41.
15. S. J. Hwang and B. Hwang (1991) *Kor. J. Bot.*, **34** (in press)
16. T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook (1982), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY
17. R. A. Jefferson, T. A. Kavanagh, M. W. Bevan (1987), *EMBO J.*, **6**, 3901.
18. R. M. Hauptmann, P. Ozias-Akins, V. Vasil, Z. Tabaeizadeh, S. G. Rogers, I. K. Vasil (1987), *Plant Cell Rep.*, **6**, 265.

19. U. Zimmermann (1986), Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., **105**, 175.
  20. E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P. M. Hofschneider (1982), EMBO J., **1**, 841.
  21. R. Bower and R. D. Birch (1990) Plant Cell Rep., **9**, 386.
  22. C. Y. Hu, P. P. Chee, R. H. Chesney, J. H. Zhou, P. P. Miller, W. T. O'Brien(1990) Plant Cell Rep., **9**, 1.
  23. M. Joersbo, and J. Brunstedt (1990) Plant Cell Rep., **8**, 701.
  24. V. Vasil, R. M. Hauptmann, F. M. Morrish, I. K. Vasil (1988), Plant Cell Rep. **7**, 499.
  25. E. C. Cocking and M. R. Davey (1987), Science, **236**, 1259.
  26. M. J. Templaar, M. G. K. Jones (1985), Planta, **165**, 205.
  27. K. Okada, I. Takebe, T. Nagata (1986), Mole. Gen. Genet., **205**, 398.
- (Received; November 4, 1990, Accepted; December 30, 1990)**