

난과식물의 형질전환 유도 및 다량증식에 관한 연구.

Ⅲ. Electroporation에 의해서 자란의 원형질체로 도입된 유전자의 발현

*이 정 석 · 황 성 진 · 김 영 준 · 황 백
전남대학교 생물학과, *임학과

Studies on the Induction of Transformation and Multiplication in Orchid Plants.(Ⅲ) Expression of Gene Transferred into Orchid Protoplasts by Electroporation.

Jung Seok Lee*, Sung Jin Hwang, Young Jun Kim and Baik Hwang
Department of Biology, *Department of Forestry
Chonnam Nat'l, University, Gwang-ju

ABSTRACT

Embryogenic cell suspension cultures of *B. striata* were established as transferred selected embryogenic callus into liquid medium. 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 200-300 voltage/1180 uF. Protoplast viability was up to the 80% at the optimal voltage.

서 론

최근 난과식물에 있어서 기내(in vitro) 배양을 통한 다량증식뿐만 아니라 형질전환 기술을 이용해서 유용유전자를 도입하고 발현을 유도함으로써 이러한 연구를 통하여 우량변이종의 생성과 난과식물에 있어서의 분화와 발달과정에 대한 분자생물학적 이해를 가져올 수 있도록 하고 있다. 난과식물에 있어서 외래유전자의 도입에 의한 형질전환은 유전자 도입 방법에 있어서 일부 쌍자엽 식물에서 쉽게 이용되어지는 *Agrobacterium*에 의한 방법이 난과식물을 포함한 대부분의 식물에서 제한성을 갖기 때문에 직접유전자도입(direct gene transfer)

방식인 PEG(1, 2, 3, 4), electroporation(5, 6, 7), micro-injection (8, 9)과 particle gun(10, 11, 12) 방법들을 이용할 수 있다(13, 23, 24). 그러나, 직접유전자 도입 방식에 있어서는 원형질체로 부터 식물체로의 재분화가 재현성 있게 이루어지지 않은 식물체에 있어서는 그 결과를 기대하기가 어렵다(13). 따라서, 직접 유전자도입 방식에 의한 형질전환 식물체를 유도하기 위해서는 우선적으로 totipotency를 갖는 embryogenic callus를 유도하고 embryogenic cell suspension culture를 통하여 이로부터 분리된 원형질체를 사용하고, 세포배양기술의 개발등으로 재분화개체를 효율적으로 형성 시킬 수 있는 방법을 확립 함으로서 이와같은 제한성을 극복할 수 있다(2

3, 24). 본 연구에서는 자란의 미성숙종자로 부터 embryogenic callus를 유도하여 embryogenic cell suspension culture를 행하고(15) 이로부터 분리된 원형질체에 reporter genes(NPT II, GUS)이 들어 있는 pBI121 plasmid DNA를 electroporation 방법을 이용하여 도입하고 발현을 확인함으로써 electroporation에 의한 난과식물체로의 외래 유전자 도입에 관계되는 몇가지 요인들에 대한 최적조건을 확립하고 나아가 형질전환 개체의 형성 가능성을 얻고자 하였다.

재료 및 방법

Embryogenic callus의 유도 및 배양

자란(*Bletilla striata*)의 green pods로 부터 채취한 미성숙 종자를 3mg/l 2,4-D와 0.5mg/l BAP가 첨가된 VW 배지(14)에 치상하여 캘러스를 유도 하였으며, 이와 같은 캘러스 중 해부현미경 하에서 희고 단단한 형태의 embryogenic callus만을 선별하여 4주 간격으로 계대배양 하였다. 이어 embryogenic callus를 동일조성의 액체배지로 옮겨 4-6일 간격으로 새로운 배지를 첨가하면서 현탁배양을 행하였다.

원형질체의 분리

계대배양 3-5일된 자란의 embryogenic cell suspensions에 20-30 ml/gram(fresh weight)의 효소용액(1.5% Cellulase RS, 0.5% Driselase, 1% Macerozyme, 0.05% Pectolyase Y-23, 0.4 M Mannitol, pH 5.3)을 4-5시간 처리하여 원형질체를 분리하였다(15).

사용균주 및 DNA

실험에 사용된 DNA는 *E. coli*의 GUS유전자가 CaMV의 35S 전사체의 promoter와 nopaline synthase의 terminator (NOS-ter) 사이에 삽입되어 있고 형질전환을 확인할 수 있는 표지 유전자로 NPT-II 유전자를 *Agrobacterium*의 Ti-plasmid의 T-DNA border sequence (LB와 RB) 사이에 가지고 있는 plasmid DNA (pBI121) (17)를 사용하였다. pBI121의 증식은 *E. coli* HB101에서 행하였다.

Plasmid DNA의 분리 및 Bacterial Transformation

Plasmid DNA (pBI121) (Fig. 1)의 *E. coli* HB101로의 도입은 Maniatis등(16)의 방법에 따라 행하였으며, *E. coli*로부터 plasmid DNA의 분리는 *E. coli* HB101을 LB 배지(10g/l, Trptone; 5g/l, Yeast-Extract, 10g/l, NaCl; pH 7.0)에서 OD 0.5-1까지 배양한 후 alk-

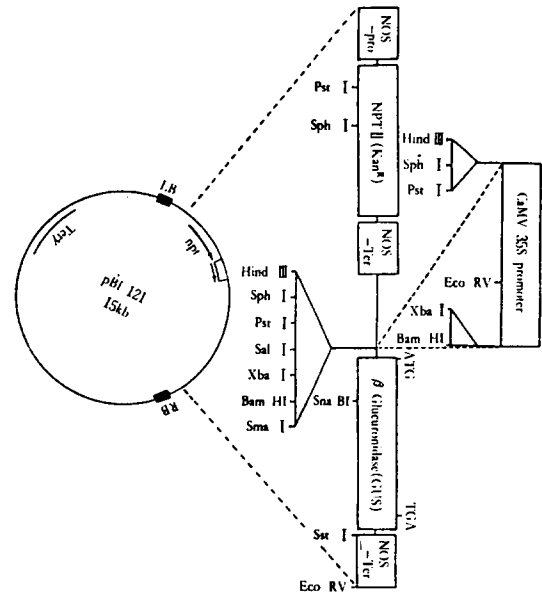


Fig. 1. The plasmid DNA of pBI121 used in the transformed experiments.

LB, T-DNA left border; RB, T-DNA right border; npt, neomycin phosphotransferase gene; Tet, tetracycline resistance gene; NOS-pro, nopaline synthase promoter; NPT-II, neomycin phosphotransferase gene; NOS-ter, nopaline synthase terminator; GUS, beta-glucuronidase gene.

aline extraction 방법(16)에 의해 분리하여 시료로 사용하였다.

Electroporation

Embryogenic cell suspensions로부터 분리된 자란의 원형질체를 electroporation buffer(18)로 1회 세척한 후 재현탁시켜 (1×10^6 protoplasts/ml), 20-80 μ g/ml의 plasmid DNA와 함께 electroporation chamber에 넣고 voltage와 capacitance를 각기 달리하여 4 $^{\circ}$ C 하에서 single pulse로 electroporation 하였다. Electroporation이 끝난 자란의 원형질체는 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 유지 시키고나서 원형질체 배양 배지로 1회 세척한 후 배양하였다(15).

형질전환 확인

Electroporation에 의해서 자란의 세포내로 도입된 plasmid DNA(pBI121)의 발현은 Jefferson 등(17)의 방법에 따라 배양 48시간이 지난 자란의 원형질체를 회수(100×g, 10 min)하여 lysis buffer(50 mM NaPO₄, pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.1% TritonX-100, 0.1% sarcosyl, 10mM beta-mercaptoethanol)에 넣고 5초간 sonication한 후 상층액에 50 μl 1 mM para-Nitrophenyl-beta-D-glucuronide 를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시키고 0.4 ml 2.5 M 2-amino-2-methyl-propanediol를 넣어 반응을 정지시킨 다음 spectrophotometer에서 흡광도(415nm)를 측정하였다.

결과 및 고찰

난과식물의 형질전환을 통한 우량변이종의 육성 및 분화와 발달과정에 대한 분자생물학적 연구를 위한 기초 과정으로서 자란의 원형질체로 외래유전자를 도입하는데 있어서 electroporation방법을 이용하여 유용유전자의 효율적인 도입하고 발현을 최대로 높일 수 있는 조건을 확립하고자 하였다.

자란의 미성숙 조직으로 부터 형성된 캘러스중 embryogenic callus 만을 선별하여 embryogenic cell suspension culture를 통하여 다량의 원형질체를 분리하였으며, electroporator를 사용하여 이와같이 분리된 자란의 원형질체에 몇가지 조건하에서 plasmid DNA (pBI121)를 도입하고 발현을 확인하였다. Fig. 2는 200-300 V / 1180 uF의 조건에서 electroporation을 행하였을 때 자란의 세포내로 도입된 GUS 유전자의 발현이 최대로 나타났다.

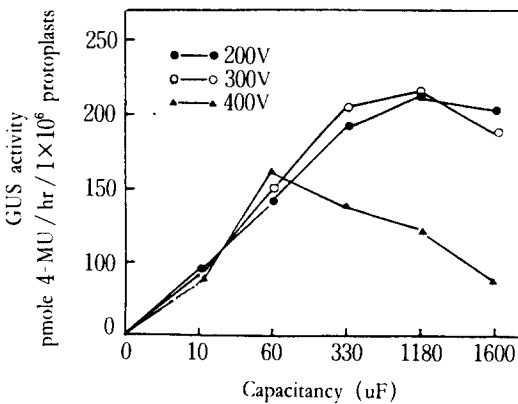


Fig. 2. Effect of electric strength on the transient GUS activity of electroporated *B. striata* cells.

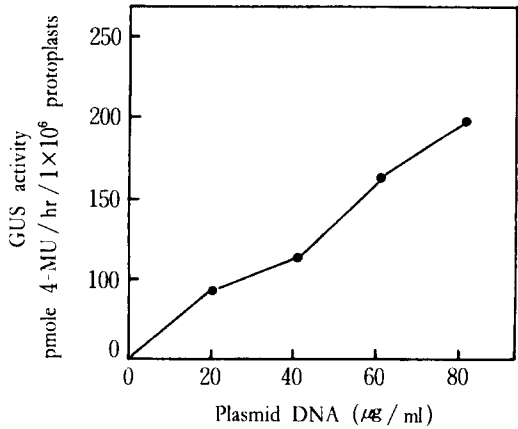


Fig. 3. Effect of concentration of plasmid DNA on the transient GUS activity of electroporated cells.

Electroporation에 따르는 원형질체의 생존율과 유전자의 발현에 있어서 관계되는 요인들로는 voltage와 capacitance 뿐만 아니라 식물재료나 세포의 상태, 그리고 사용되는 pulse의 횟수나 형태등에 의해서도 영향을 받으며(18, 19, 20, 22, 25), 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 필요하다(18).

한편, plasmid DNA의 양을 10-80 μg/ml로 높였을 때 유전자의 발현이 유의적인 증가를 나타내었다(Fig. 3). 이와같은 결과에 대하여 Bower등(21)은 처리한 plasmid DNA의 양이 많을수록 원형질체에서의 발현율이 높게 나타나는 것은 각 원형질체에 도입되는 gene copy수가 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 electroporation에 의해 각 세포에 도입될 수 있는 DNA양의 포화와 일부 제한된 세포에서 만이 형질전환능력을 갖는 등의 이유 때문에 적정 농도 이상에서는 발현율의 유의적인 변화를 볼 수 없다고 하였다.

이와같은 연구결과는 electroporation 방법을 사용하여 난과식물체로의 유용유전자의 도입 및 발현을 통한 우량 변이종의 육성과 분화와 발달과정의 분자생물학적 해석에 대한 기초자료가 될 수 있으리라 사료되어진다.

적 요

자란(*B. striata*)의 미성숙종자로 부터 유도한 embryogenic callus를 현탁배양하고 이와같은 embryogenic cell suspensions로부터 분리한 원형질체에 electroporation 방법을 사용하여 reporter genes이 들어있는 pBI121 plasmid DNA를 도입하고 그 발현을 확인하였다. 배양된 세포에 있어서 GUS의 활성은 plasmid DNA 양의 증가와 함께 높게 나타났으며, 200-300 voltage / 1180 uF에서 GUS의 활성 및 원형질체의 생존율(viability)이 가장 좋았다.

감 사

본 연구는 1991년도 교육부 유전공학 연구소 학술연구 조성비의 일부로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

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. Lorz, B. Baker, J. Shell (1985) Mole. Gen. Genet., 199, 178.
3. I. Potrykus, M. W. Saul, J. Petruska, J. Paskowski, 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. Jones (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. S. Ichihashi (1987) Investigation of Orchids Culture Media, Proc. World Orchids Hiroshima Symp. p. 60
15. J. S. Lee, Y. J. Kim, S. J. Hwang, B. Hwang (1991) Kor. J. Biotech. Bioeng. 6:201
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. Pharm., 105, 175.
20. E. Neumann, M. S. Lidder, Y. Wang, P. M. Hofschneider (1982) EMBO J., 1, 841
21. R. Bower and R. D. Birch (1990) Plant Cell Rep., 9, 386.
22. M. Joersbo, and J. Brunstedt (1990) Plant Cell Rep., 8, 701
23. V. Vasil, R. M. Hauptmann, F. M. Morrish, I. K. Vasil (1988) Plant Cell Rep. 7, 499.
24. E. C. Cocking and M. R. Davey (1987) Science, 236, 1259.
25. M. J. Templaar, M. G. K. Jones (1985) Planta, 165, 205.

(Received; November 5, 1991, Revised; November 20, 1991,
Accepted; December 5, 1991)