

## 식물 원형질체에서의 marker gene 삽입

유장길 · 류기중 · 소인섭 · 홍경애

제주대학교 방사능이용연구소

**초록** : Polyethylene glycol(PEG)법 또는 electroporation법으로 제라니움 원형질체에 neomycin phosphotransferase II(*nptII*) 유전자를 옮기고, 세포내에 도입된 *nptII* DNA의 존재유무와 발현여부를 조사하였다. Polymerase chain reaction(PCR)을 이용하여 검토한 결과, PEG법을 사용했을 때나 electroporation법을 사용했을 때 모두 세포내에 도입된 *nptII* DNA가 있음이 확인되었다. 또 이들 세포의 추출물을 전기영동하여 neomycin phosphotransferase 활성을 조사한 결과, 효소활성을 보이는 band가 검출되어 marker gene 으로 도입된 *nptII* 유전자가 세포내에서 발현된다는 것이 확인되었다(1993년 12월 4일 접수, 1993년 12월 16일 수리).

형질전환 식물체를 만들기 위하여 외래유전자를 세포에 도입하는 수단으로 흔히 쓰이고 있는 것은 *Agrobacterium*을 이용<sup>1-2)</sup>하는 것인데, 이 방법은 단자엽식물에 적용하기 어려운 단점이 있다.<sup>3)</sup> 식물의 종류에 관계없이 사용할 수 있는 방법으로서 대표적인 것은 particle gun<sup>3)</sup>을 이용하는 것과 원형질체를 이용하는 것<sup>3)</sup>인데, 전자는 특수한 장비가 필요하다는 단점이 있다. 그러므로 원형질체를 분리하고 배양하는 작업이 번거롭고 원형질체로부터 식물체를 재분화시키는 조건이 다소 까다롭다는 단점이 있음에도 불구하고, 원형질체를 이용하여 유전자를 도입하는 연구가 여러사람들에 의해 시도되고 있다.<sup>3)</sup>

본 연구에서는 제라니움 현탁배양세포에서 유래된 원형질체에, PEG처리나 electroporation방법으로 marker gene(*nptII*)을 넣은 다음 원형질체내에 이 DNA가 있는지 여부와 도입된 유전자가 배양세포 내에서 발현되는지를 확인하고자 하였다. 본 연구의 목표는 유용한 외래유전자를 다양한 식물에 도입하여 직접 형질전환식물체를 만드는 데 있지만, 또한 원형질체융합을 통한 somatic hybrid를 만들 때 융합원형질체의 선발에 필요한 screening gene을 도입하는 데에도 있다.

### 재료 및 방법

#### 세포배양과 원형질체의 분리

제라늄(*Pelargonium zonale* hybrids) 잎조직으로부터

NAA 3 ppm과 BA 1 ppm을 함유하는 MS배지<sup>4)</sup>에서 callus를 유지시키고, friable cell을 선발하여 현탁배양하였다. 현탁배양세포의 성장곡선은 배양시간별로 packed cell volume을 측정하여 구하였다. 원형질체는 현탁배양세포를 효소용액(2% cellulase R-10, 0.3% pectolyase, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MES, 0.6 M sucrose, pH 5.8)에 넣어 25°C cm<sup>3</sup>에서 6시간 처리한 뒤 분리하였다.

#### Marker gene

Marker gene으로는 *E. coli*의 Tn5<sup>5)</sup>에서 유래된 kanamycine 저항성 유전자인 neomycin phosphotransferase II 유전자(*nptII*)를 사용하였다. Vector로 사용한 plasmid는 Bin19<sup>6)</sup>인데 *nptII*와 함께 *nos* transcription factor를 가지고 있고, *EcoRI*, *HindIII* 등이 작용하는 multiple cloning site를 가지고 있다. 제라니움 원형질체에 도입할 때는 *EcoRI*으로 처리한 linear DNA를 사용했다.

#### PEG법<sup>3)</sup>에 의한 DNA도입

원형질체를 1.6×10<sup>6</sup>ml가 되게 0.6 M sucrose-CPW<sup>7)</sup> 용액에 현탁시킨 후, 이 원형질체 현탁액 0.66 ml에 10 ug의 linearized pBin19 DNA와 50 ug의 carrier DNA를 넣어 5분간 천천히 혼합시켰다. 이어서 20% PEG-용액 0.33 ml를 가하여 10분 동안 조심스럽게 혼합한 다음, 5분 간격으로 2 ml의 F용액(4 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 10 g/l CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 50 g/l glucose, 0.1 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02

Key words : Protoplast, polyethylene glycol, electroporation, polymerase chain reaction, neomycin phosphotransferase, *Pelargonium zonale* hybrids.

Corresponding author : Z.-K. U.

g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.4)을 4회에 나누어 가하였다. 원심분리하여 상정액을 제거한 원형질체는 KM8P배지<sup>8)</sup>에서 배양하였다.

Electroporation<sup>9)</sup>에 의한 DNA도입

HBM용액[1 mM HEPES(pH 7.0), 10% mannitol]에 원형질체를 1×10<sup>6</sup>/ml가 되게 현탁시키고, 이 현탁액 0.5 ml와 linearized pBin19 DNA 10 ug 및 carrier DNA (sheared calf thymus DNA) 50 ug을 electroporation chamber에 넣고 1.77 kV/cm, 40 usec에서 electroporation하였다. 이 후 원형질체는 KM8P배지<sup>8)</sup>에서 배양하였다.

PCR<sup>9)</sup>에 의한 nptII DNA 분석

nptII DNA증폭에 사용된 primer쌍은 둘다 20 mer이며, 각각 다음과 같은 염기서열이 되도록 만들었다. 이 primer쌍에 의해 증폭되는 DNA의 크기는 0.795 kb이다.

5'-ATG ATT GAA CAA GAT GGA TT-3'

5'-TCA GAA GAA CTC GTC AAG AA-3'

반응액의 MgCl<sub>2</sub> 농도는 1.5 mM, dNTP는 각각 200 μM, primer는 각각 0.25 μM이었고, Taq DNA polymerase는 2.5 μ/50 μl of reaction volume를 사용했다. 각 thermal cycle은 96°C /1 min - 58°C /30 sec - 72°C /1 min으로 구성하였고, 총 cycle수는 30이었다.

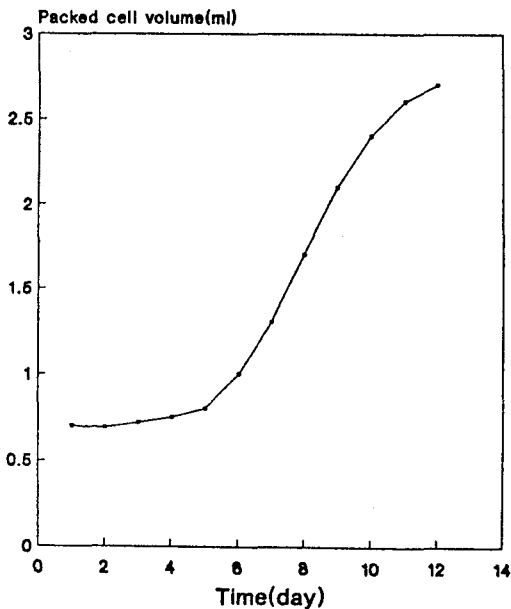


Fig. 1. Growth curve of suspension cells derived from callus of geranium leaves.

Neomycin phosphotransferase 검정

세포추출액을 비해리계의 10% acrylamide gel에서 전기영동하고, neomycin phosphotransferase의 활성을 가진 단백질 band를 조사하였다. Neomycin phosphotransferase활성이 있는 단백질을 확인하는 데는, kinase에 의해 kanamycin이 인산화되는 반응을 기초로 개발된 Draper 등<sup>3)</sup>과 Herrera-Strella/Simpson<sup>6)</sup>의 npt-II assay 방법을 사용하였다.

결과 및 고찰

원형질체의 Viability

외부유전자를 도입한 후 원형질체로부터 식물체를 얻기 위해서는 원형질체의 분리에 사용되는 세포의 재분화능이 매우 중요하다. 그러므로 먼저 고체배지에서 배양한 callus 중에서 재분화능이 우수한 것을 선발하여 현탁배양 함으로서 embryogenic cell line을 확립하였다. 현탁배양세포는 생육시기에 따라 재분화능이 다른데 일반적으로 대수생장기에 접어든 것이 가장 우수한 것으로 알려져 있다.<sup>10-11)</sup>

본 실험에 사용된 현탁배양세포의 경우에는 Fig. 1의 성장곡선에서 보는 바와 같이 계대배양후 5일경에 대수생장기가 시작되는 것을 알 수 있다. 원형질체의 수율과 생존율을 조사한 결과(자료는 제시하지 않았음) 계대배양 후 5일 전후의 세포가 가장 좋았다. 이 시기가 경과되면 세포벽 제거가 어려워져 원형질체 수율이 떨어졌으며,

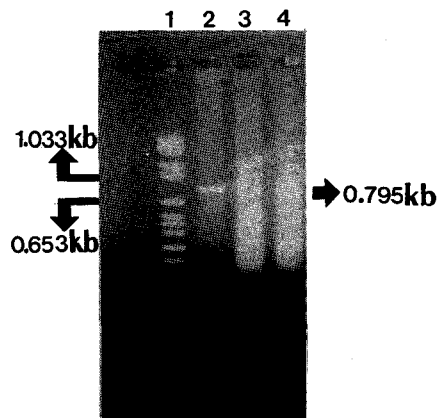


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of nptII DNA in the protoplasts amplified by PCR. Lane 1, Size marker; lane 2, Pleagonium after DNA transfer with PEG method; Lane 3, Pleagonium before DNA transfer with PEG method; lane 4, tobacco with nptII gene.