

곡물류의 형질전환 유도에 관한 연구 III. 외래 유전자가 도입된 벼 원형질체의 배양 및 재분화

황 백·황 성 진·임 형 탁·강 영 희*

전남대학교 생물학과

*연세대학교 생물학과

Studies on the Induction of Transformation in Cereal Plants. III. Cultures and Regeneration of Rice Protoplasts Transferred Foreign Genes.

Baik Hwang, Sung Jin Hwang, Hyong Tak Im and Young Hee Kang*

Department of Biology, Chonnam National University

*Department of Biology, Yonsei University

ABSTRACT

Transformed rice plantlet were recovered from protoplasts by electroporation with the plasmid pBI 121, which contain the plant expressible NPT-II and GUS genes. Embryogenic cell suspension culture was established with embryogenic callus induced from mature seeds of rice (*Oryza sativa* L. cv. Dong-jin) on the MS medium supplemented with 2.0 mg/ℓ 2,4-D, 0.5 mg/ℓ kinetin, 3% sucrose. Protoplasts isolated from embryogenic cell suspensions were electroporated and then potentially transformed tissues were selected by growth on the medium containing 200 mg/ℓ kanamycin sulfate. When subjected to GUS assay, they stained blue, indicating the expression of the insearted GUS genes. Plantlets were regenerated from electroporated protoplasts on the hormone free MS medium. Transferred foreign genes in the plants were confirmed by southern hybridization. These results support use of electroporation for transformation of this important cereal plants.

서 론

화본과 식물에 있어서 외래 유전자 도입에 의해 형질전환된 식물체는 단자엽 식물의 분화와 발달에 관련된 유전자의 조절 기작에 대한 이해는 물론 유전 육종학적 측면에서 매우 유용하게 이용될 수 있다. 그러나 최근까지 벼를 포함한 화본과 식물에 있어서 외래 유전자의 도입 방법에는 숙주 제한성 등에 기인한 natural vector인 *Agrobacterium* 속의 사용이 어렵기 때문에 PEG (1, 2), electroporation

(3, 4, 5), particle gun (6, 7) 등과 같은 직접 유전자 전이(direct gene transfer) 방식이 사용되고 있다(8). 직접 유전자 전이방식 중 매우 간단하면서도 사용이 용이한 electroporation 방법은 순간적인 전기 충격으로 열려진 세포막을 통하여 외래 유전자를 도입하는 방식으로 원형질체 배양조건이 확립되었을 때 이와 같은 electroporation 방법은 매우 간단하면서도 효율적으로 사용될 수가 있다. 벼의 경우 배 발 생세포의 현탁배양과 이로부터 분리한 원형질체 배양이 최근에 와서 점진적으로 이루어지고 있으므로

electroporation과 같은 직접 유전자 전이방식에 의한 형질 전환 식물체의 유도 가능성은 매우 높다고 볼 수 있다(1, 9, 10).

본 연구에서는 벼를 재료로 분화능이 높은 배 발생 세포만을 유도, 선별하여 배양하고 이로부터 다수의 원형질체를 분리하여 여기에 표지 유전자로서 항생제 저항성 유전자와 GUS 유전자가 들어있는 외래 유전자를 electroporation 방법을 이용하여 도입시키고 배양하여 재분화 식물체에서 도입된 유전자의 발현을 확인함으로써 벼를 포함한 주요 화분과 식물에서의 electroporation에 의한 형질전환 식물체의 유도 가능성을 높이고자 하였다.

재료 및 방법

배 발생 캘러스 유도 및 배양

벼(*Oryza sativa* L. cv. Dong-jin) 종자를 표면 살균한 후 MS 배지(10)(2.0 mg/l 2, 4-D, 0.5 mg/l kinetin, 3% sucrose, pH 5.8)에서 캘러스를 유도하고 4주 후 해부현미경 하에서 배 발생 캘러스만을 선별하였다(11, 12).

배 발생세포의 현탁배양

배 발생세포의 현탁배양은 선별된 배 발생 캘러스만을 동일 조성의 액체 배지로 옮겨 배양하면서 100, 200 μ m stainless steel mesh를 사용하여 잔존하는 비배발생세포를 제거하고 새로 형성된 배 발생 세포만을 분리 수집하여 MS 배지 및 AA 배지(13)(2 mg/l 2, 4-D, 0.5 mg/l kinetin, 3% sucrose, pH 5.8)에서 6일 간격으로 계대 배양하였다.

사용균주 및 Plasmid DNA

형질전환에 사용된 plasmid DNA는 형질전환을 확인할 수 있는 표지 유전자인 *E. coli*의 GUS(β -glucuronidase) 유전자가 CaMV 35S 전사체의 promoter와 nopaline synthase의 terminator(NOS-ter) 사이에 삽입되어 있고 NPT-II(neomycin-phosphotransferase) 유전자가 *Agrobacterium*의 Ti-plasmid의 T-DNA border sequence (LB and RB borders) 사이에 위치한 pBI 121 (Fig. 1)을 사용하였다. 이와 같은 plasmid pBI 121은 Maniatis등(14)의 방법에 따라 *E. coli* HB101에 도입하여 증식하였다.

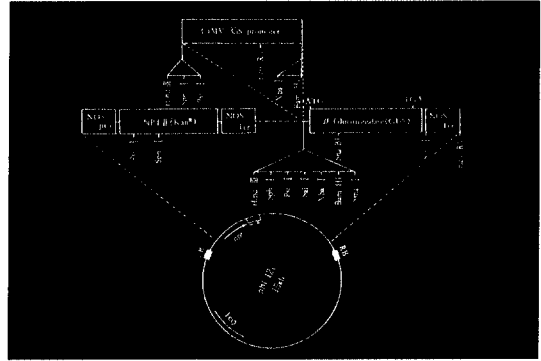


Fig. 1. The plasmid pBI 121 used in electroporation

Plasmid DNA의 분리

형질전환된 *E. coli* HB101로부터 plasmid DNA 분리는 Biruboin과 Doly의 방법(15)에 따라 항생체가 첨가된 LB 배지(10g/l tryptone, 5g/l yeast-extract, 10g/l NaCl, 50 μ g/ml kanamycin, pH 7.0)에서 대수기까지 배양한 *E. coli* HB101을 수집 (5000 \times g, 15 min at 4 $^{\circ}$ C)하고 여기에 Lysis buffer(25 mM Tris HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 15% sucrose, 2 mg/ml lysozyme)을 처리하여 20분간 유지시킨 후 12 ml의 0.2 M NaOH, 1% SDS와 7.5 ml의 3 M sodium acetate pH 4.6을 넣고 잘 섞은 다음 원심분리(10,000 \times g 15 min)하여 상등액에서 50 μ l RNase를 처리하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 유지시켰다. RNase가 처리된 현탁액에 phenol/chloroform과 chloroform : isoamylalcohol (24 : 1) 각기 처리한 다음 얻어진 상등액에 동량의 ethanol을 넣고 -20 $^{\circ}$ C에서 12시간 유지하고 원심분리(10,000 \times g, 20 min)하여 침전된 DNA를 얻었다. 한편 이와 같이 얻어진 DNA는 1.6 ml H₂O와 0.4 ml 4 M NaCl에 녹인 다음 여기에 2 ml 13% PEG를 넣어 잘 섞은 후 원심분리하는 방법으로 정제하여 시료로 사용하였다.

원형질체 분리 및 electroporation

원형질체는 새로운 배지로 옮겨 3~4일 된 배 발생 세포에 효소 처리(2% cellulase O-RS, 1% macerozyme R-10, 0.1% pectolyase Y-23, pH 5.6)하여 분리하였으며(12), electroporator chamber에 80 μ g/ml의 plasmid DNA와 분리된 벼 원형질체(1 \times 10⁶ protoplasts/ml)를 함께 넣고 200

~300V/1180 μF 으로 electroporation을 수행하였다(16). Electroporation이 끝난 원형질체는 10분간 4°C에서 유지시킨 후 원형질체 배양 배지로 1회 세척한 다음 배양하였다.

원형질체 배양 및 재분화

Electroporation이 끝난 원형질체의 배양은 mixed nurse culture 방법(17)에 의하여 원형질체 (2×10^6 protoplasts/ m^3)를 동량의 배지(2.5% Sea Plaque agarose, FMC)와 혼합하여 페트리디쉬 ($60 \times 15 \text{ mm}$)에 넣어 배양하였다. 배양 10일 후 원형질체가 들어있는 solidified agarose sheet를 4등분하여 5ml 정도의 액체 배지에 현탁하고 여기에 약 100 mg의 nurse cell을 첨가하여 3주 정도 배양한 다음 새로운 배지로 agar block을 2회 세척하여 nurse cell을 완전히 제거시켰다. 이후 새로운 배지로 옮겨 10일 간격으로 계대 배양하면서 지속적으로 분열을 유도시켰다. 배양 5주 후 형성된 캘러스를 재분화 배지로 옮겨 재분화 개체를 형성시켰다.

형질전환 확인

(1) 조직화학적 분석

Jefferson 등(18)의 방법에 따라 형질전환된 조직에서 GUS 유전자의 발현을 확인하였다. Kanamycin(200 mg/l)이 첨가된 배지에서 배양을 통하여 선별된 형질전환된 조직을 얇게 절편을 만들어 고정액 (0.3% formaldehyde, 10 mM MES, pH 5.6, 0.3 M mannitol)에서 45분간 고정한 후 50 mM NaPO_4 (pH 7.0)로 2~3회 세척한 다음 1~2 ml의 1 mM X-Glu 용액(5-bromo-4-chloro-3-indolyl glu-curonide 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, 0.006% Triton X-100, 0.5 mM potassium ferric cyanide)을 첨가하여 37°C에서 30분 이상 반응시킨 뒤 70% ethanol로 5분간 세척하여 광학현미경(Model SDZ-P, Kyowa, JAPAN)하에서 청색 침전 반응에서 GUS 유전자의 발현을 확인하였다.

(2) Southern 분석

재분화된 식물체로부터의 total genomic DNA의 분리는 Dellaporta 등(19)의 방법에 따라 식물조직 1g을 액체 질소에서 마쇄시킨 후 15 ml의 EB buffer(100 mM Tris pH 8.0, 50 mM EDTA pH 8.0, 500 mM NaCl, 10 mM β -mercaptoethanol)를 첨가한 후 여기에 1.0 ml의 20% SDS를 넣고 65°C에서 10분간 유지시켰다. 이후 5 ml의 5 M potass-

ium acetate를 첨가하여 0°C에서 20분간 유지시키고, $25,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리하여 상층액을 수거하고 여기에 10 ml의 isopropanol을 첨가하여 -20°C에서 30분간 정지시킨 다음 $20,000 \times g$ 에서 원심분리하여 얻은 pellet DNA를 TE buffer (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8.0)로 세척한 후 75 μl 의 3 M sodium acetate와 500 μl 의 isopropanol을 처리하고 80% ethanol로 재세척한 다음 건조시켜 시료로 사용하였다. 이와 같이 10 μg 의 DNA를 Bam HI, Eco RI으로 절단하여 0.8% agarose gel에서 전기영동한 후 gel로부터 DNA fragments를 nitrocellulose filter에 blotting 시키고 nitro-cellulose filter를 2X SS buffer에 넣고 상온에서 5분간 soaking 한 다음 80°C에서 2시간동안 baking 하고 prehybridization solution에서 1~4시간(68°C) 유지한 후 hybridization하였다. 이후 2X SS buffer와 0.1% SDS에서 2~3번 세척하고 건조시켜 X-ray film에 감광시켰다. 이 때 probe는 ^{32}P 로 표지된 2.17Kb GUS Nos-poly A probe를 사용하였다.

결과 및 고찰

Electroporation 방법을 이용하여 국내 재배종인 품종의 벼의 형질전환을 유도하기 위하여 동진벼의 성숙 종자로부터 캘러스를 유도하였으며, 4주 후 이와 같은 캘러스로부터 해부현미경하에서 형태적 특징에 의하여 전형적인 배발생 캘러스와 비발생 캘

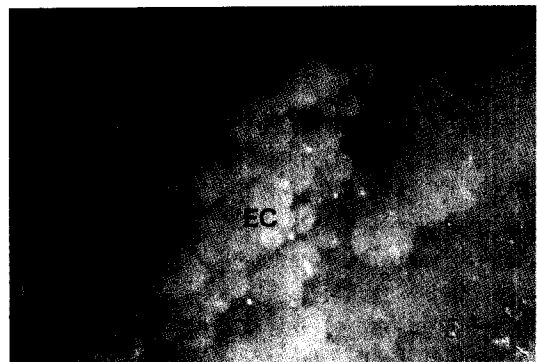


Fig. 2. Embryogenic (EC) and non-embryogenic calli (NEO) induced from rice seeds. EC appears white, embryo-like whilst NEC appears yellow to translucent and crystalline

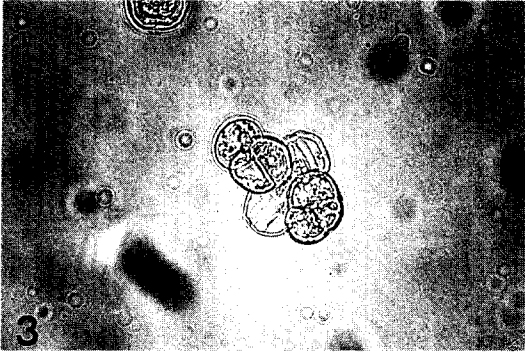


Fig. 3. Dividing protoplasts-derived cells cultured in modified MS medium



Fig. 4. Cell colonies derived from rice protoplasts after 2 weeks of subculture

러스를 선별할 수 있었다(Fig. 2). 선별된 배 발생 캘러스만을 동일 조성의 액체 배지에 옮겨 현탁 배양하면서 일주일 간격으로 새로 형성된 배 발생 세포만을 재수집하여 단독 배양함으로써 매우 효율적으로 배 발생세포의 현탁배양을 수행할 수 있었다. 높은 분화능을 갖는 배 발생 캘러스의 유도 및 배양은 최근 일부 화분과 식물 중에서 제한적으로 이루어지고 있으며 (13, 20,21), 이와 같이 배양된 배 발생 세포는 오랜 기간동안 재분화능을 유지하는 것으로 알려지고 있다. 따라서 이와 같은 배 발생세포로부터 분리한 원형질체를 이용함으로써 체세포 잡종 및 형질전환 유도와 같은 연구가 효율적으로 이루어지고 있다(22, 23). 새로운 배지로 옮겨 4일 정도 지난 현탁배양세포에 효소 처리하여 분리한 원형질체는 세포질이 풍부하며 생존율(viability)에 있어서도 매우 높았다(data not shown). 이러한 배 원형질체에 표지 유전자로서 항생제 저항성 유전자인



Fig. 5. Formation of colonies from rice protoplasts subjected to electroporation with pBI 121(right) and those without(left) after 5 weeks of plating on kanamycin containing medium

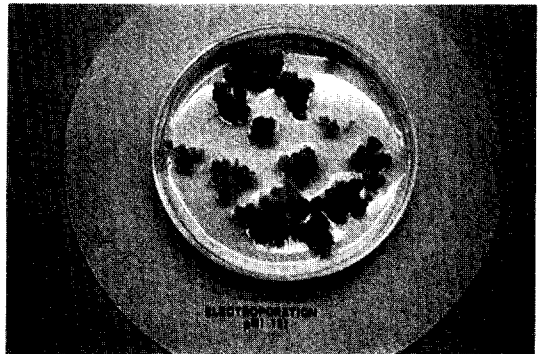


Fig. 6. Calli formed from electroporated rice protoplasts

NPT II(neomycin phosphotransferase) 유전자와 GUS(β glucuronidase) 유전자를 갖는 pBI 121 plasmid DNA를 electroporation 방법으로 도입하였으며, electroporation 후 mixed nurse culture 방법 (17)에 의해 배양된 원형질체는 3~4일 이후부터 분열을 시작하여 4주 후 colony를 형성하였다(Fig. 3, 4). 형질전환된 세포주는 항생제가 첨가된 선발 배지로 옮겨 저항성 세포주만을 선별하였으며(Fig. 5, 6, 7), 이를 재분화 배지로 옮겨 유식물체를 형성하였다(Fig. 8, 9). Electroporation에 의해서 도입된 GUS 유전자의 발현을 확인한 결과 대조구와 달리 GUS 활성을 나타내는 청색반응을 나타냄으로써 형질전환 유무를 확인할 수 있었다(Fig. 10). 본 연구에서 배 원형질체로 도입된 유전자의

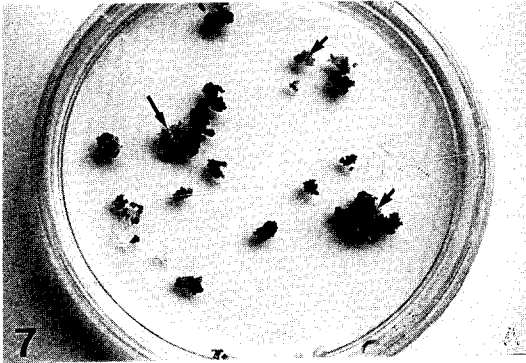


Fig. 7. Rice plant regeneration(arrow indicate) from transformed callus on selected medium containing 200 mg/l kanamycin

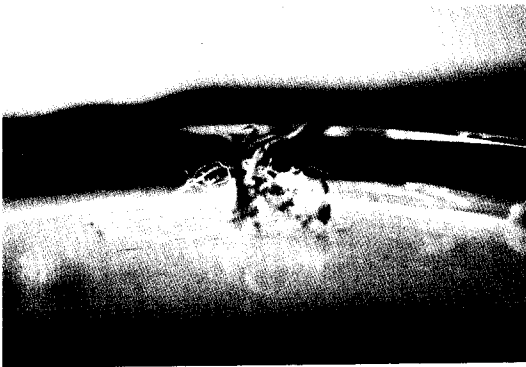


Fig. 8. Rice plantlet regeneration from transformed callus on hormone free medium

발현은 kanamycin이 첨가된 배지에서 저항성 세포주의 선별과 조직내 GUS의 활성을 통하여 이루어졌으나 최근 보고된 일부 단자엽식물에서의 kanamycin에 대한 내성과 종자식물의 일부 기관과 조직에서 확인된 GUS와 유사한 청색반응, 그리고 kanamycin에 의한 식물체의 불임 유발 가능성이 문제점으로 보고되고 있다(24, 25). 벼의 조직내 청색반응이 대조구에서는 전혀 나타나지 않음으로써 벼과식물의 형질전환 유도에 GUS 유전자의 이용 가능성을 확인할 수 있었으나 항생제 저항성 유전자를 이용한 저항성 세포주의 선별 등이 형질전환된 식물체에 미치는 영향에 대해서는 좀 더 연구가 필요할 것으로 사료된다. 한편 재분화된 식물체로부터 분리한 염색체 DNA를 이용하여 southern 분석을 시행

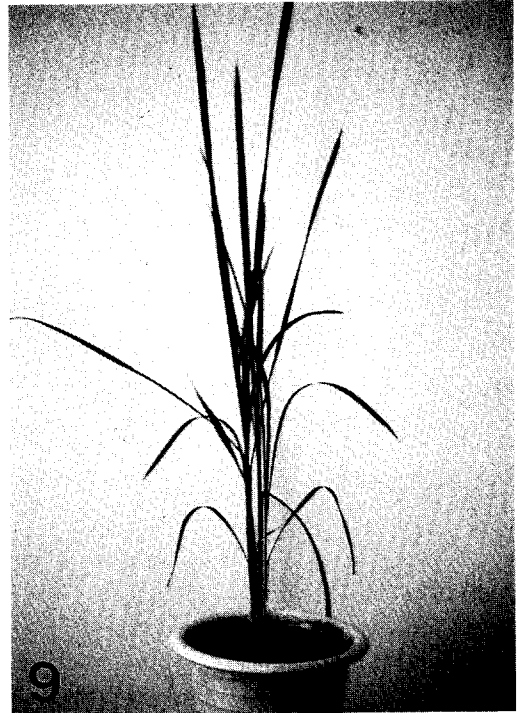


Fig. 9. Transgenic plants regenerated from electroporated rice protoplasts in potting soil

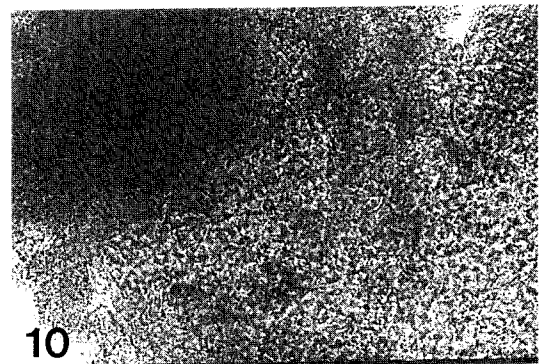


Fig. 10. Histochemical localization of GUS expression in callus derived electroporated rice protoplasts with pB I 121

하였을 때 2.17 Kb에서 밴드를 확인할 수 있었으나 대조구인 재분화 식물체와 발아된 유식물체에서는 2.17Kb에 해당하는 밴드를 확인할 수 없었다(Fig.

적 요

화분과 식물의 형질 전환 유도를 위하여 동진벼의 성숙 종자로부터 유도한 배 발생세포로부터 분리한 벼 원형질체에 표지 유전자로서 NPT-II와 GUS 유전자를 갖는 plasmid pBI 121을 electroporation 방법을 사용하여 도입하고 이를 배양하여 형질전환된 재분화 식물체를 얻었다. 형질전환된 세포주는 항생제가 첨가된 배지에서 선발하고 조직에서 청색 반응으로 GUS 유전자의 발현을 확인하였다. 또한 재분화된 식물체로부터 분리한 염색체 DNA에서 southern 분석을 통하여 도입 유전자가 염색체 DNA내에 안정하게 삽입되어 있음을 확인하였다. 이와 같은 결과는 벼를 포함한 주요 곡물류에서의 electroporation을 이용한 형질전환 가능성을 보여주는 결과로 사료된다.

감 사

본 연구는 1991년도 교육부 기초과학 연구 학술 연구 조성 지원비에 의해 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. A. H. Shimamoto, Z. Li and N. Murai(1990), *Plant Physiol.*, **93**, 857.
2. J. Y. Peng, L. A. Lyznik, L. Lee, and T. K. Hodges(1990), *Plant Cell Rep.*, **9**, 168.
3. R. A. Dekeyser, B. Claes, M. M. Van Montagu and A. Caplan(1989), *Plant Physiol.*, **90**, 217.
4. M. Battra and T. C. Hall(1990). *Plant Mol. Biol.*, **15**, 527.
5. K. Toriyama, Y. Arimoto, H. Uchimiya and K. Hinata (1988), *Bio/Technology*, **6**, 1072.
6. J. C. Sanford(1988), *Trens Biotech.*, **6**, 299.
7. P. Christou, T Ford and M. Kofron(1991), *Bio/Technology*, **9**, 957.
8. I. Potrykus(1990 a), *Bio/Technology*, **8**, 535.
9. I. Potrykus(1990 b), *Physiol. Plant*, **79**, 125
10. Z. Li and N. Murai(1990), *Plant Cell Rep.*, **9**, 216.
11. T. Murashige and F. Skoog(1962), *Physiol. Plant*, **5**, 473.

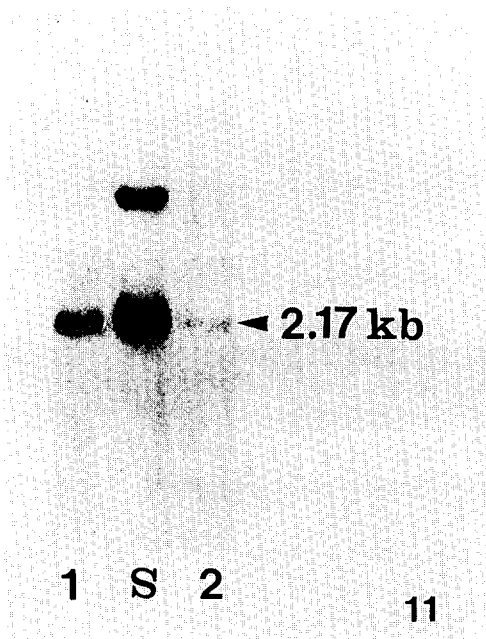


Fig. 11. Southern blot analysis of rice plant regenerated from electroporated protoplasts. The 2.17 Kb fragment of GUS NOS-poly A labeled with an ^{32}P was used for a probe
Lane S ; size marker
Lane 1 ; transformed plants
Lane 2 ; non-transformed plants

11). 이로써 electroporation에 의해서 벼 원형질체에 도입된 vector DNA가 염색체 DNA내에 안정하게 삽입되어 발현됨을 알 수 있었다. 이와 같이 벼 원형질체를 재료로 electroporation을 이용한 형질전환 식물체의 유도는 Toriyama 등 (5)과 Shimamoto 등 (27)에 의해 보고되었으나 japonica 계통의 일부 종에 한해서 제한적으로 이루어지고 있을 뿐이다. 따라서 indica 계열을 포함한 다양한 벼 품종에 있어서 효율적으로 이루어질 수 있는 방법이 개발되어야 할 필요성이 있다. 본 연구는 국내 재배 품종인 동진벼의 성숙종자로부터 배 발생세포를 유도하고 이와 같은 분화능이 높은 세포에 electroporation 방법을 사용하여 형질전환을 유도함으로써 앞으로 이와 같은 방법 체계가 벼를 포함한 주요 화분과 식물체로의 유용 유전자를 매우 용이하게 도입할 수 있는 가능성을 가져올 것으로 사료된다.

12. S. J. Hwang and B. Hwang(1991), *Kor. J. Botany*, **34**, 19.
13. R. Abdullah, E. C. Cocking and J. A. Thompson(1986), *Bio/Technology*, **4**, 1087.
14. T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook (1982), *Molecular Cloning ; A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab, Cold Spring Harbor, N. Y.
15. H. C. Birnboim and J. Doly(1979), *Nucl. Acids. Res.*, **7**, 1513.
16. S. J. Hwang, B. Hwang, W. B. Im, H. T. Im, and Y. H. Kang(1990), *Kor. J. Biotech, Bioeng*, **5**, 323.
17. J. Kyojuka, Y. Hayashi and K. Shimamoto (1987), *Mole. Gen. Genet.*, **206**, 408.
18. R. A. Jefferson (1987), *Plant Mole. Biol. Rep.*, **5**, 387.
19. S. L. Dellaporta, J. Wood and J. B. Hicks (1983), *Plant Mol. Biol. Rep.*, **1**, 19.
20. R. D. Shillito, G. K. Carswell, C. M. Jefferson, J. J. DiMaio and C. T. Harns. (1989), *Biotechnology.*, **7**, 581.
21. F. A. Redway, V. Vasil and I. K. Vasil (1990), *Plant Cell Rep.*, **8**, 74.
22. K. Toriyama, K. Hinata and T. Sasaki(1986), *Theor. Appl. Genet.*, **73**, 16.
23. K. Toriyama, Y. Arimoto, H. Uchimiya and K. Hinata(1988), *Bio/Technology*, **6**, 1072.
24. R. M. Hanptmann, V. Vasil, P. Ozias-Akins, Z. Tabaeizadeh, S. G. Rogers, R.T. Fraley, R. B. Horsch and I. K. Vasil(1988), *Plant Physiol*, **86**, 602.
25. L. Zhijian, M. D. Burow and N. Murai(1988), *Plant Mole, Biol. Rep.*, **8**, 276.
26. Y. Y.amada, Y. zhi-Qi and T. Ding-Tai (1986), *Plant Cell Rep.*, **5**, 85.
27. K. Shimamoto, R. Terada, T. Izawa and H. Fujimoto(1989), *Nature*, **338**, 274.