

# 식물 원형질체에서의 Marker Gene

## 삼입

유장길<sup>1</sup>.류기중<sup>1</sup>.소인섭<sup>2</sup>.홍경애<sup>3</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 농화학과, <sup>2</sup>제주대학교원예학과,

<sup>3</sup>제주대학교방사능이용연구소

### DNA-mediated gene transfer in plant protoplasts

Zang-Kual U<sup>1</sup>, Key-Zung Riu<sup>1</sup>, In-Sup So<sup>2</sup> and Kyung-Ae Hong<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Agricultural Chemistry, <sup>2</sup>Department of Horticultural Science, <sup>3</sup>Applied Radioisotope Research Institute, Cheju University, Cheju-shi 690-756, Korea

### Abstract

The neomycin phosphotransferase II gene(*nptII*) was introduced into geranium(*Pelargonium zonale* hybrids) protoplast by using PEG or electroporation method. The presence of the introduced DNA in the protoplast and the expressions of the gene in the transformed cells were examined. The presence of the *nptII* DNA in the protoplasts were detected by polymerase chain reaction. The expressions of *nptII* gene in the transformed cells were confirmed by the NPT-II assay.

### 서론

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>.

1) 본 연구에서는 제라니움 현탁배양세포에서 유래된 원, PEG 처리나 electroporation 방법으로 marker gene (*npt-II*)을 넣은 다음 원형질체내에 이 DNA가 있는지 여부와 도입된 유전자가 배양세포 내에서 발현되는지를 확인하고자 하였다. 본 연구의 목표는 유용한 외래유전자를 다양한 식물에 도입하여 직접 형질전환 식물체를 만드는데 있지만, 또한 원형질체 융합을 통한 somatic hybrid를 만들 때 융합 원형질체의 선발에 필요한 screening gene을 도입하는 데에도 있다.

### 재료 및 방법

#### 세포배양과 원형질체의 분리

제라늄(*Pelargonium zonale* hybrids) 일조직으로 부터 NAA 3 mg/ml과 BA 1 mg/ml을 함유하는 MS배지<sup>4)</sup>에서 callus를 유기시키고, friable cell을 선별하여 현탁배양하였다. 현탁배양세포의 생장곡선은 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 에서 6시간 처리한 뒤 분리하였다.

#### Marker gene

Marker gene으로는 *E. coli*의 Tn<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. 제라니움을 원형질체에 도입할 때는 EcoRI으로 자른 linear DNA를 사용했다.

#### PEG법<sup>3)</sup>에 의한 DNA 도입

원형질체를 1.6 x 10<sup>6</sup> /ml가 되게 0.6 M sucrose-CPW<sup>7)</sup> 용액에 현탁시킨 후, 이 원형질체 현탁액 0.66 ml에 10 µg의 linearized pBin19 DNA와 50 µg의 carrier DNA를 넣어 5분간 천천히 혼합시켰다. 이어서 20 % PEG용액 0.33 ml를 가하여 10분 동안 조심스럽게 혼합한 다음, 5분 간격으로 2

본 논문은 한국농화학회지 36권6호(1994)에 게재됨.

ml의 F용액 (4g/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 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>3)</sup>에 의한 DNA도입

HBM용액[1 mM HEPES(pH 7.0), 10% mannitol]에 원형질체를 1x10<sup>6</sup>/ml가 되게 현탁시키고, 이 현탁액 0.5 ml와 linearized pBin19 DNA 10 µg 및 carrier DNA(sheared calf thymus DNA) 50 µg을 electroporation chamber에 넣고 1.77 kV/cm, 40 µsec에서 electroporation 하였다. 이 후 원형질체는 KM8P배지<sup>8)</sup>에서 배양하였다.

### PCR<sup>9)</sup>에 의한 *nptII* DNA 분석

*nptII* DNA 증폭에 사용된 primer 쌍은 둘 다 20mer 이며, 각각 다음과 같은 염기서열이 되도록 만들었다. 이 primer 쌍에 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 ul of reaction volume를 사용했다. 각 thermal cycle은 96 °C / 1 min - 58 °C / 30 sec - 72 °C / 1 min으로 구성하였고, 총 cycle 수는 30 이었다.

### Neomycin phosphotransferase 검정

세포추출액을 비헤리제의 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<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 함으로써 embryogenic cell line 을 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 생장 곡선에서 보는 바와 같이 계대배양후 5일경에 대수생장기가 되는 것을 알 수 있다. 원형질체의 수율과 생존율을 조사한 결과(자료는 제시하지 않았음) 계대배양 5일 전후의 세포 수가 가장 좋았다. 이 시기가 경과되면 세포벽 제거가 어려워져 원형질체 수율이 떨어졌으며, 원형질체의 수율을 증가시키기 위해 세포벽 분해효소의 처리시간을 길게하면 viability가 저하되었다. 그러므로 원형질체는 계대배양 후 5일이 된 현탁배양세포로부터 분리하여 사용하였다.

### PEG법에 의한 유전자도입

pBin19 DNA를 넣은 원형질체는 PEG와 DNA를 제거하고 배양매지에 옮겨 3일간 배양한 다음, 원형질체로부터 DNA를 추출하여 template로 하고 *nptII*-specific primers를 사용하여 PCR로 DNA를 증폭하였다. 사용된 primer pair에 의해 증폭되는 DNA의 예상된 크기는 0.795 kb인데, Fig. 2에서 보는 바와 같이 DNA 도입 후의 원형질체(lane 2)에서 이 크기의 DNA가 증폭되어 원형질체내에 *nptII* DNA가 삽입된 것을 알 수 있다. PCR의 sensitivity가 매우 높기 때문에 이 결과가 오염에 의한 오류일 가능성도 있으나, PEG를 사용하지 않고 단순히 pBin 19 DNA와 혼합했다가 분리한 원형질체(lane 3)에서 795b DNA가 나타나지 않은 점으로 보아 오염에 의한 오류라고는 생각되지 않았다.

원형질체에 *nptII*를 넣을 때 사용한 pBin19에는 nos gene transcription factor가 있어서 식물세포 내에서 *nptII*가 발현되도록 구성되어 있다. *nptII* DNA가 삽입된 것으로 판단된 원형질체를 배양하여 얻은 세포내에서 도입된 유전자가 실제로 발현되고 있는지를 알아보기 위하여, NPT-II assay 방법에 따라 세포 추출물을 전기영동하고 autoradiography로 neomycin phosphotransferase 활성을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다.

pBin19 DNA를 도입하지 않은 세포(Fig. 3. lane 3)에서 는 효소활성을 보이는 band가 전혀 없는 반면 DNA가 도입

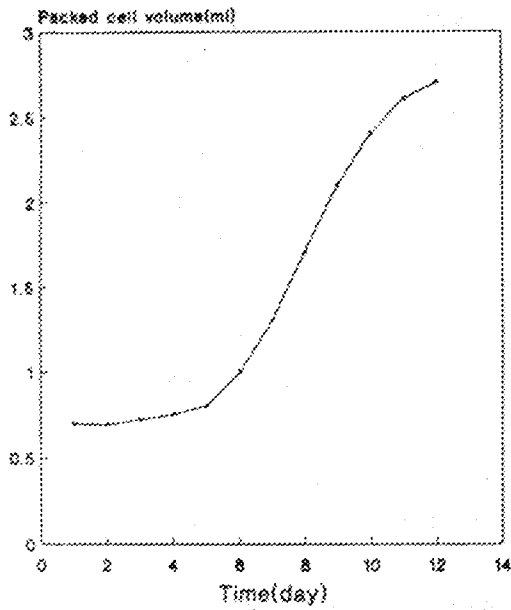


Fig. 1. Growth curve of suspension cells derived from callus of geranium leaves.

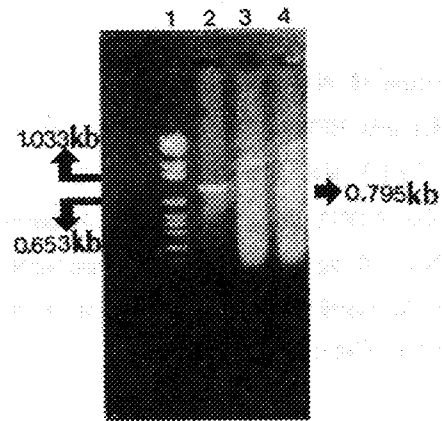


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of *nprII* DNA in the protoplasts amplified by PCR.

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 *nprII* gene.

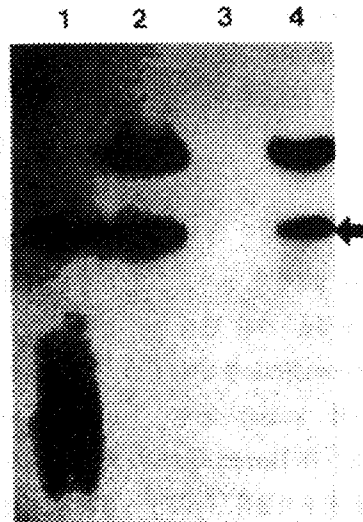


Fig. 3. Expression of *nprII* gene in the cells transformed by using PEG.

Lane 1, *E. coli* (*nprII*<sup>+</sup>); lane 2, *Agrobacterium* (*nprII*<sup>+</sup>); lane 3, *Pleagonium* (No treatment); lane 4, *Pleagonium* (PEG treatment).

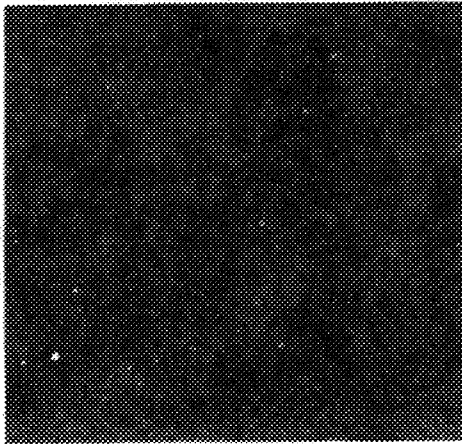


Fig. 4. Microcalli formed after 40 days in culture following transformation of protoplasts with PEG treatment

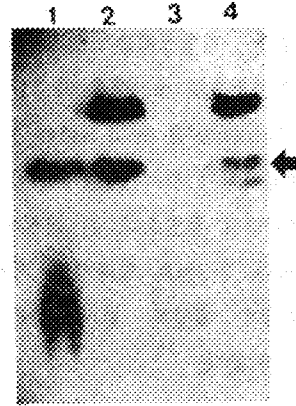


Fig. 5. Agarose gel electrophoresis of *nptII* DNA in the protoplasts amplified by PCR. Lane 1, 0.795 kb marker; lane 2, *Pelargonium* after DNA transfer by electroporation; Lane 3, *Pelargonium* before DNA transfer by electroporation; lane 4, tobacco with *nptII* gene.



Fig. 6. Expression of *nptII* gene in the cells transformed by electroporation. Lane 1, *E. coli* (*nptII*<sup>+</sup>); lane 2, *Agrobacterium* (*nptII*<sup>+</sup>); lane 3, *Pelargonium* (No treatment); lane 4, *Pelargonium* (electroporation).

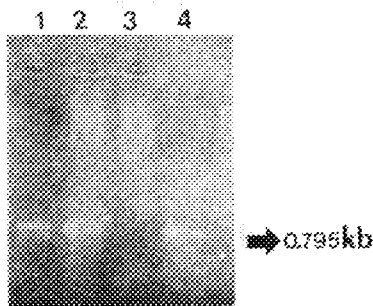


Fig. 7. Microcalli formed after 40 days in culture following transformation of protoplasts by electroporation.

Fig. 7. Microcalli formed after 40 days in culture following transformation of protoplasts by electroporation.

된 세포(lane 4)에서는 효소활성을 가진 단백질 band가 나타나, 도입된 *nptII* 유전자가 세포내에서 발현된다는 것이 확인되었다. pBin19 DNA를 도입한 세포에서 효소활성을 가진 단백질 band는 *nptII*의 산물로 추정되는 것 외에도 이동도가 작은 것 하나가 더 나타났는데, 이것은 *nptII*의 산물인 neomycin phosphotransferase 이외의 다른 kinase로 생각된다<sup>3,12</sup>.

pBin19을 도입한 원형질체를 kanamycin이 함유된 KM8P 배지에서 암조건으로 배양했을 때 2일 후 세포벽 재생이 관찰되었다. Brown등<sup>11</sup>은 wild lettuce의 protoplast로부터 식물체를 재생시키기 위해 처음 7일 동안 암배양 해주는 것이 효과적이라고 하였으나, 본 실험에서는 2-3일의 암처리로 충분하였다. 2-3일의 암배양을 거친 원형질체를 광조건으로 변경하여 배양한 결과 30일 후 형성된 microcalli는 Fig. 4와 같다.

#### Electroporation에 의한 유전자 도입

Electroporation 후 KM8P 배지에 옮겨 3일간 배양한 원형질체에 대하여 pBin19 DNA의 존재여부를 PCR을 이용하여 조사하였다. PEG법<sup>13</sup>에서와 마찬가지로, 원형질체로부터 추출한 DNA액을 template로 하고 *nptII*-specific primers를 사용하여 PCR로 DNA를 증폭한 결과(Fig. 5), pBin19 DNA와 혼합은 했지만 전기자극을 주지않은 원형질체(lane 3)에서는 0.795kb DNA가 나타나지 않았다. 반면 electroporation으로 pBin19 DNA를 도입한 원형질체(lane 2)에서는 *nptII*의 0.795kb DNA가 증폭되어 원형질체 내에 *nptII*가 있다는 것이 확인되었다.

pBin19 DNA를 도입한 원형질체를 배양하여 얻은 callus 세포에 대해 *nptII* 유전자의 발현여부를 알아보기 위해, 세포추출액을 전기영동하여 neomycin phosphotransferase의 활성을 보이는 band를 조사하였다. pBin19 DNA를 도입하지 않은 세포(Fig. 6. lane 3)에서는 효소활성을 보이는 band가 전혀 없는 반면 DNA가 도입된 세포(Fig. 6. lane 4)에서는 효소활성을 가진 단백질 band가 나타나, 도입된 *nptII*가 세포내에서 발현된다는 것이 확인되었다. pBin19 DNA를 도입한 세포에서 효소활성을 가진 단백질 band는 *nptII*의 산물로 추정되는 것 외에도 두개가 더 나타났는데, 이들은 *nptII*의 산물인 neomycin phosphotransferase가 아

닌 다른 kinase로 생각된다<sup>3,12</sup>.

Electroporation방법으로 *nptII*를 도입한 원형질체를 KM8P 배지에서 처음 2일간은 암조건으로, 3일째 부터는 광조건(1100-1500 lux)에서 배양한 뒤 세포벽이 생성된 뒤에는 osmol 농도를 점점 낮추어 AA<sup>13</sup> 배지에서 키우고 배양 8주 후에 MS고체배지(NAA 3 mg/l, BA mg/l)에 옮겨 배양한 결과 Fig. 7과 같은 callus를 얻었다.

### 적 요

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 gene으로 도입된 *nptII* 유전자가 세포내에서 발현된다는 것이 확인되었다.

### 감사의 글

본 연구는 1992년도 교육부 학술연구 조성비에 의해 수행된 것으로 이에 감사 드립니다.

### 참 고 문 헌

1. Brown, C., Lucas, J.A. and Power, J.B.: Plant Cell Report, 6:180-182(1987)
2. Paszkowski, J. and Saul, M.W.: Methods for Plant Molecular Biology(Ed. by A.Weissbach and H. Weisswach). Academic Press, p.447-463(1988)
3. Draper, J., Scott, R., Kumar, A. and Dury, G.: Plant Genetic Transformation and Gene Expression, Draper, J., Scott, R., Armitage, P. and Walden, R.(eds) Blackwell, p.161-198(1988)

4. Murashige, T. and Skoog, F.: *Physiol. Plant*, 15 : 473-497(1962)
5. Beck, E., Ludwig, G., Auerswald, E.A., Reiss, B. and Schaller, H.: *Gene* 19, 327-336(1982)
6. Herrera-Estrella, L. and Simpson, J.: *Plant Molecular Biology*(Ed. by C.H.Shaw). IRL Press, p.131-160(1988)
7. Dixon, R.A.: *Plant Cell Culture*. IRL Press, p.40-41(1985)
8. Kao, K.N. and Michayluk, M.R.: *Planta*, 126: 105-110(1975)
9. Erlich, H.A.: *PCR Technology*. M Stockton Press, p.7-38(1989)
10. Chen, W.H., Davey, M.R., Power, J.B. and Cocking, E.C.: *Plant Cell Reports*, 7:344-347(1988)
11. Horn, M.E., Conger, B.V. and Harms, C.T.: *Plant Cell Reports*, 7:371-374(1988)
12. Yang, H., Zhang, H.M., Davey, M.R., Mulligan, B.J. and Cocking, E.C.: *Plant Cell Reports*, 7:421-425(1988)
13. Toriyama, K. and Hinata, K.: *Theor. Appl. Genet.*, 76: 665-668(1988)