Microinjector를 이용한 제초제저항성 유전자의 잔디 세포내로의 도입

정재훈*, 한성수, 양덕춘[1)]

원광대학교 농화학과, [1)]한국인삼연초연구원 유전생리부

단자엽 식물체의 형질전환은 *Agrobacterium*을 이용한 방법이 어려워서 주로 electroporation 이나 particle bombardment를 이용하는 방법 등이 사용되고 있으나 일부분의 식물체에 한정되고 있다. 본 실험은 동물세포의 형질전환에 많이 사용되고 있는 microinjector를 이용하여 식물세포의 형질전환가능성을 진단하고, 제초제 Basta에 저항성인 잔디(*Agrostis palustris* Huds.)를 개발하고자 수행하였다. Microinjector는 narishinge사의 microinjector와 joistick을 사용하였으며 유전자는 basta 제초제에 저항성을 나타내는 PAT(phosphinotricin-acetyltransferase) 유전자로서 GUS::NPT가 fusion된 maker gene과 CaTV 35S-35S promoter와 AMT leader sequence로 구성된 발현체계를 가지고 있는 유전자를 사용하였다. 잔디의 현탁배양은 완숙배로부터 유도된 배발생 캐러스를 2.4-D 1mh/L MS액체배지에 넣어 회전진탕(180rpm) 배양하였으며, microinjection은 현탁배양액 1ml을 5cm 크기의 petri dish에 넣고 현미경하에서 single cell을 찾아 holder를 이용 고정하고, injection needle을 이용하여 잔디 세포에 넣은 다음 DNA를 주입하였다. 현탁배양액 1ml당 5~6개의 single cell를 주입하고, 이를 선발배지(Kanamycin 100mg/L, 2.4-D, 2mg/L, MS배지)에 옮겨 암조건에서 배양하였다. 선발배지에서 선발된 callus의 형질전환 여부를 확인하기 위해 GUS gene test를 위해서 x-glu용액에 하루밤 침지하여 청색의 발현을 보았으며, PCR반응을 실시하여 PAT 유전자의 증폭을 확인하였다. 또한 PCR DIG Labelling Mix Kit를 이용 Probe를 제조하여 PCR product를 이용 Southern blot를 실시하여 유전자의 존재를 확인하였다.