

6. γ -glutamylcysteine synthetase를 과 발현시킨 형질전환 벼의 개발

신재천 · 김혜기 · 허인경 · 나킵 아산 · 이인애 · 조진기
(경북대학교 농업생명과학대학 동물공학과)

Synthetase of Transgenic Rice Plants Overexpressing γ -glutamylcysteine Synthetase

Jae-Cheon Shin, Hye-Gi Kim, In-Kyung Heo, Nagib Ahsan, In-Ae Lee and Jinki Jo
(Department of Animal Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701)

Key words : γ -glutamylcysteine synthetase, *Agrobacterium tumefaciens*.

<목 적>

생체내의 활성산소종을 제거해 주는 glutathione을 많이 생산하는 벼를 만들기 위해 key enzyme인, γ -glutamylcysteine synthetase 유전자(γ -ECS cDNA)를 *Brassica juncea* 에서 cloning 하였다. 그리고, 종자에서만 특이적으로 발현하도록 하기 위해 glutelin promoter(GluB-1)에 결합시키고 *Agrobacterium tumefaciens* 를 이용하여 형질전환 벼를 생산한다.

<방 법>

배추에서 분리한 γ -ECS 유전자를 DNA sequencing으로 확인하고, 분리 유전자에 의하여 coding 되는 단백질을 대장균 내에서 대량생산하기 위해서 T7 expression vector인 pET vector에 frame이 맞도록 overexpression vector를 구축하였고, 분리 유전자가 pET vector에 frame이 맞게 subcloning 되었는지 T7 primer를 사용한 sequencing으로 확인한 후 IPTG로 induction 하여 단백질을 분리하였다. 이 단백질의 N-terminal에 있는 histidine tag를 이용하여 Ni-NTA agarose affinity chromatography로 분리하였다. 정제한 단백질을 Freund's adjuvant와 섞은 후 토끼의 피하에 주사하여 항체를 얻었고, 재분화된 식물체로부터 CTAB법으로 genomic DNA를 분리하여 PCR 분석 및 Southern blot 분석을 통해 형질전환여부를 확인한 다음, guanidine thiocyanate (GTC) 법으로 total RNA를 분리하여 Northern blot 분석을 통해 도입된 유전자의 발현수준을 확인하였다. wide type과 형질전환 벼의 잎에서 glutathione 함량을 측정해 보았다.

<결과 및 고찰>

종자에서만 특이적으로 발현하는 벼 glutelin 유전자의 promoter(gluB-1)와 cloning된 배추 γ -ECS cDNA의 결합을 확인하였고, 그 중 colony PCR 방법을 사용하여 positive clone을 두 개 선별하는데 성공하였다(Fig. 1). 이 두 clone에서 plasmid DNA를 추출한 다음 restriction enzyme을 사용하여 그 두 clone이 gluB-1 promoter와 γ -ECS gene이 결합된 상태임을 확인하였고(Fig. 2), 다음 단계로 두 plasmid DNA의 sequencing을 의뢰하여 염기서열을 분석하여 성공적인 결합을 확인하였다. 그리고, Southern blot 분석과 Northern blot 분석을 통해 벼 γ -ECS 형질전환 식물체내에서 배추 γ -ECS gene의 도입과 발현을 확인하였고, 종자를 맺기 위해 지금은 온실에서 생육중이며 일단 glutathione 함량 테스트를 잎에서 실시하였는데, 종자 특이적으로 발현되어야 하는 형질전환식물체에서 신기하게도 wild type 보다 유의적으로 높게 나타났다(Fig. 3 and Table 1). 앞으로 종자가 맺히면 wild type과 형질전환 벼의 glutathione 함량을 분석해 보면 최종결과를 알 수 있을 것이다.

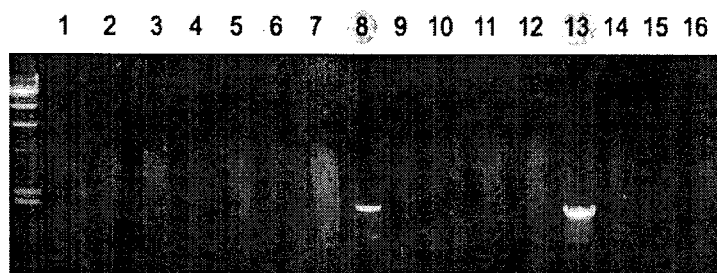


Fig. 1. Two colonies showing PCR products (No. 8 and 13) indicating the ligation of gluB-1 promoter and the γ -ECS gene.



Fig. 2. Restriction enzyme digestion of the clone 8 and 13. Expected banding pattern was shown in all the restriction digestion lanes. R, EcoRI; M, MluI; H, HindIII.

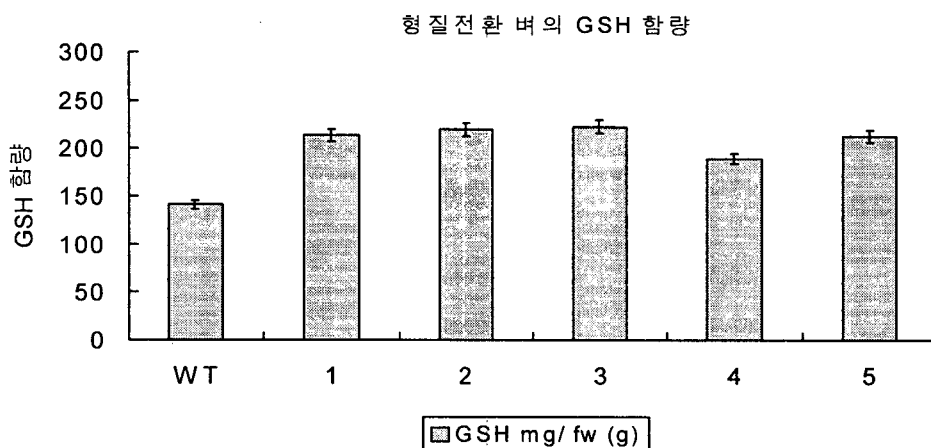


Fig. 3. Total glutathione levels in wild-type and transgenic plants. The glutathione concentration was determined from wild and transgenic rice leaves. The means(\pm SE) are for three replicates per treatment.

Table 1. ^{abcd}Mean scores within a row followed by the same superscript are not significantly different at 5% level using Duncan's multiple range test.

	GSH mg/ fw (g)
WT	141 ^d
1	214 ^b
2	220 ^a
3	223 ^a
4	189 ^c
5	213 ^b