

24. Glutathione synthetase으로 형질전환 된 벼의 분석

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

Analysis of Transformed Rice with Glutathione Synthetase

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

Key words : Glutathione, Glutathione synthetase, Rice transformation, Southern blot analysis.

<목 적>

GSH(Glutathione)은 glutamic acid, cysteine 및 glycine의 3 종의 아미노산이 결합한 tripeptide(γ -L-Glu-L-Cys-Gly)로서, 두 종류의 효소 γ -Glutamylcysteine synthetase(γ -ECS) 및 Glutathione synthetase(GS)에 의해 ATP 의존 양상으로 생합성 된다. 또한 GSH은 bacteria에서 필수 대사산물은 아니지만, 다양한 xenobiotic 및 oxidative agent에 대한 내성을 증가 시키며, environment stress로 부터 식물을 보호하는 중요한 역할을 한다. 본 연구는 항산화물질인 Glutathione이 과 발현 되는 벼를 생산하기 위하여 Glutathione 생합성에 있어 중요한 enzyme인 Glutathione synthetase를 클로닝하고 이것을 벼에 형질전환 한 후 Southern blot을 통해 분석하였다.

<방 법>

Glutathione synthetase(GS)가 과 발현되는 벼를 생산하기 위하여 GS 유전자와 종자 특이적 발현 promoter인 GluB-1을 결합하여 GluB-1::GS::pIG121 construct를 구축하였다(Fig. 1). 구축된 construct를 Yukoh Hiei 등(1997)의 *Agrobacterium tumefaciens* mediated method에 따라 벼에 형질전환 시켰다. 형질전환 된 벼의 Genomic DNA를 추출하여 GS 내부의 forward primer(GS-NS) 5'-TGC TTG ACG AGG AAA CAA AGTC-3'와 reverse primer(GS-NAS) 5'-TCT CTG GGA GTA TAG CCT GAT CTG-3'를 이용하여 PCR를 수행하였으며, 이를 Southern hybridization을 통해 확인하였다.

<결과 및 고찰>

GluB-1::GS::pIG121 construct로 형질전환 된 *Agrobacterium*을 rice callus에 감염시켜 재분화 개체를 획득하였다. 획득한 재분화 개체를 무균배양한 후 온실로 옮겨 현재는 출수기 및 개화 발아 단계를 지나 등숙기 과정에 있다(Fig. 2). 형질전환 된 Rice의 Genomic DNA를 추출하여 GS 내부의 primer로 PCR를 수행한 결과 436 bp의 원하는 밴드를 확인할 수 있었다(Fig. 3). 또한 추출한 Genomic DNA를 *BamH* I 으로 enzyme digestion을 한 후 GS plasmid DNA를 probe로 하여 Southern hybridization을 실시한 결과 Fig. 4와 같았다. 이로써 형질전환 된 벼가 GS로 형질전환됨을 확인할 수 있었다. 앞으로 종자가 등숙 되면 종자의 GSH 함량을 측정하여 형질전환되지 않은 벼와 형질전환된 벼의 GSH 함량을 비교 할 것이다.

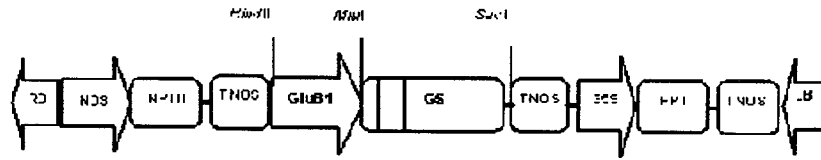


Fig. 1. GS with gluB1 promoter inserted piG121 binary vector. For the construction of expression vector, GS.

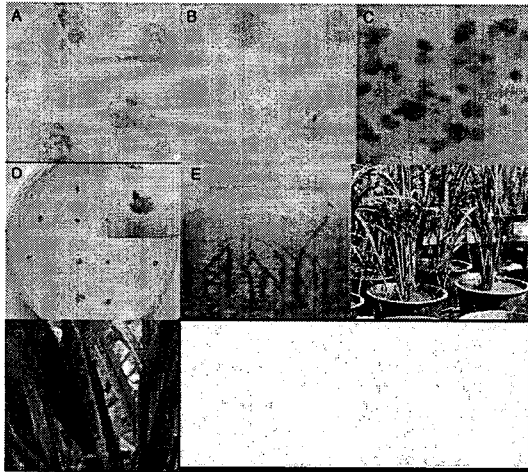


Fig. 2. Regeneration of transformed rice plants.
 (A) Callus Induction in NB medium.
 (B) Callus subculture in NB medium.
 (C) Callus selection in NB-CH medium.
 (D) Shoot emergence in NB medium.
 (E) Regenerated plants in the hygromycin containing selection medium.
 (F) Transgenic rice in greenhouse.
 (G) Rice seeds acquired from transgenic rice.

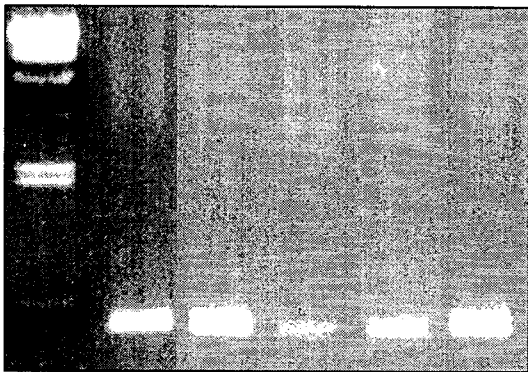


Fig. 3. PCR analysis of transgenic rice plant. PCR amplification with GS-NS and GS-NAS primers Numbers indicate independent lines.

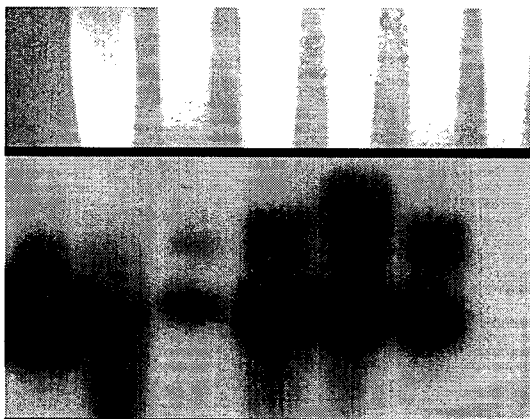


Fig. 4. Southern blot hybridization of genomic DNA prepared From transformed plant hybridization. DNA isolate from transformed plant was digested with *Bam*HI (upper). Autoradiogram. Lane 1, positive control; lane 2-6, DNA from transgenic plant digested with *Bam*HI; lane 7, negative control.