

고등식물 형질전환용 유전자 운반체 pKCHI의 개발

鄭相浩·高灵媛·洪周奉·崔仁成·鄭兌和

(한국과학기술원 유전공학센터)

Development of a Plant Transformation Vector, pKCHI

Chung, Sang Ho, Kyung Won Ko, Choo Bong Hong,

In Sung Choi and Tae Wha Chung

(Genetic Engineering Center, KAIST, Seoul)

ABSTRACT

We have developed a plasmid vector, pKCHI, for the purpose of higher plant transformation. It contains the promoter region of cauliflower mosaic virus 35S transcript (P_{35S}) and the terminator region of nopaline synthase gene (T_{nos}) with unique cloning sites, Bam HI and Xba I, between them. After inserting a foreign gene at the cloning site, P_{35S} -foreign gene- T_{nos} cassette can be recovered by using a restriction enzyme Hind III.

서 론

고등식물 유전자의 clone 확보와 고등식물 형질전환기술의 개발은 식물분자생물학 분야의 주요 연구 과제들이라 할 수 있다. 현재까지 개발된 고등식물의 형질전환 기술은 *Agrobacterium*-Ti plasmid를 이용하여 특정 유전자를 식물체 내로 도입하는 방법과 microinjection이나 electroporation등을 통하여 특정 유전자를 식물체 내로 직접 도입하는 방법등이 근간을 이루고 있다(An *et al.*, 1986; Fraley *et al.*, 1985; Fromm *et al.*, 1985; Paszkowsky *et al.*, 1984). 본 논문에서는 전술한 두 형질전환기술에 공히 사용할 수 있는 유전자 운반체를 개발하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

박테리아 균주, plasmids 및 phage. 유전자 운반체 개발에 필요한 plasmid의 증식에는 *E. coli* 균주 HB101, JM83 또는 JM109를 사용하였으며, pGA472 (Washington State Univ., Pullman, U.S.A.의 G. An으로부터 제공 받음)는 *E. coli* MC 1000에서 증식하였다. 또한 M13mp19 phage는 *E. coli* 71-18에서 증식하였다.

Plasmid의 분리 및 조작. Plasmid의 분리는 alkaline lysis 방법과 CsCl 밀도구배 원심분리 방법(Maniatis *et al.*, 1982)에 따랐으며, DNA의 제한 효소처리나 ligation 과정등은 공급자

(Bethesda Research Laboratory, Promega, KOSCO)가 제시한 자료에 따라서 행하였다. 또한 원하는 DNA 절편 들은 agarose gel 전기영동 후 DE81 paper (Whatman)를 이용하여 회수하였다(Maniatis *et al.*, 1982).

박테리아의 형질전환. Plasmid를 *E. coli* 내로 도입할 때는 CaCl₂방법(Maniatis *et al.*, 1982)을 사용하였다.

DNA의 정량. DNA는 260 nm와 280 nm에서의 흡수치를 이용하거나, agarose gel 전기영동 후 시료 DNA와 표준 size marker DNA(1 kb ladder, Bethesda Research Laboratory)가 ethidium bromide에 염색된 정도를 비교함으로써 정량하였다.

DNA sequencing. DNA의 염기서열은 dideoxy chain termination방법(Sanger *et al.*, 1977)을 이용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

CaMV 35S promoter (P_{35S})의 cloning. CaMV strain CM1841의 염기서열 중 7013번에서 7440번 사이의 부위에는 35S promoter와 enhancer 부위가 모두 들어있으며(Gardner *et al.*, 1981; Ow *et al.*, 1987), 35S promoter는 식물의 발달과정에 관계없이 활성을 갖기 때문에(Odell *et al.*, 1985) 특정 유전자를 식물체에 발현시키는데 많이 이용되어왔다(Abel *et al.*, 1986; Bevan *et al.*, 1985; Kay *et al.*, 1987; Morelli *et al.*, 1985; Shah *et al.*, 1986). 또한 transgenic plant 내에서의 neomycin phosphotransferase (NPT II) 유전자의 발현 정도에 대한 비교 실험에서 보면 CaMV 35S promoter가 nopaline synthase (NOS) promoter보다 NPT II의 전사 수준이 약 30배, NPT II 효소 활성은 약 110배 더 높다고 보고된 바 있다(Sanders *et al.*, 1987). 따라서 고등식물에서 강력한 유전자의 발현을 도모하기 위하여 CaMV의 35S promoter를 분리하여 cloning하였다(Fig. 1). CaMV strain CM4-184의 DNA가 plasmid vector pBR322내에 들어 있는 pLW414(Univ. of California, San Diego, U.S.A.의 S. Howell로 부터 제공받음)의 1.18kb Bgl II 제한효소 절편을 plasmid vector pUC8의 BamHI자리에 삽입하여 pGW516 (3.9 kb)을 만들었다. 이 부위에는 P_{35S} sequence가 내포되어 있다. 그러나 이 promoter sequence 내에는 translation initiation codon (ATG) 부분이 존재하기 때문에, 만약 외부 유전자를 이 promoter sequence 다음에 삽입할 경우 외부유전자 자체내에 가지고 있는 ATG codon의 이용 가능성이 줄어들 수 있으며 또한 35S promoter의 ATG codon을 이용하게 될 경우 외부 유전자의 reading frame이 바뀔 가능성이 많게 된다. 따라서 P_{35S} 다음에 나타나는 translation initiation codon(ATG) 부분을 제거하기 위하여 pGW516을 Sal I으로 열고 exonuclease Bal 31을 처리한 다음 re-ligation한 결과 크기가 3.4kb 전후의 plasmid들을 얻을 수 있었다(Fig. 1). 이들 plasmid의 P_{35S} 3' 말단부위의 정확한 염기 서열을 확인하기 위하여 promoter 부위가 포함된 Rsa I 제한효소 절편을 M13mp19의 HincII 자리에 삽입한 다음 dideoxy chain termination 방법을 이용하여 염기서열을 확인하였다(Fig. 2). 그 결과 pGW805에 있는 P_{35S} 부위의 3' 말단에는 'ATG' codon이 완전히 제거된 반면, 전사에 필요한 'CAAT' box와 'TATA' box 및 전사가 시작되는 'G' nucleotide (Ow *et al.*, 1986)는 안전하게 보존되어 있음을 알 수 있었다(Figs. 3 and 4).

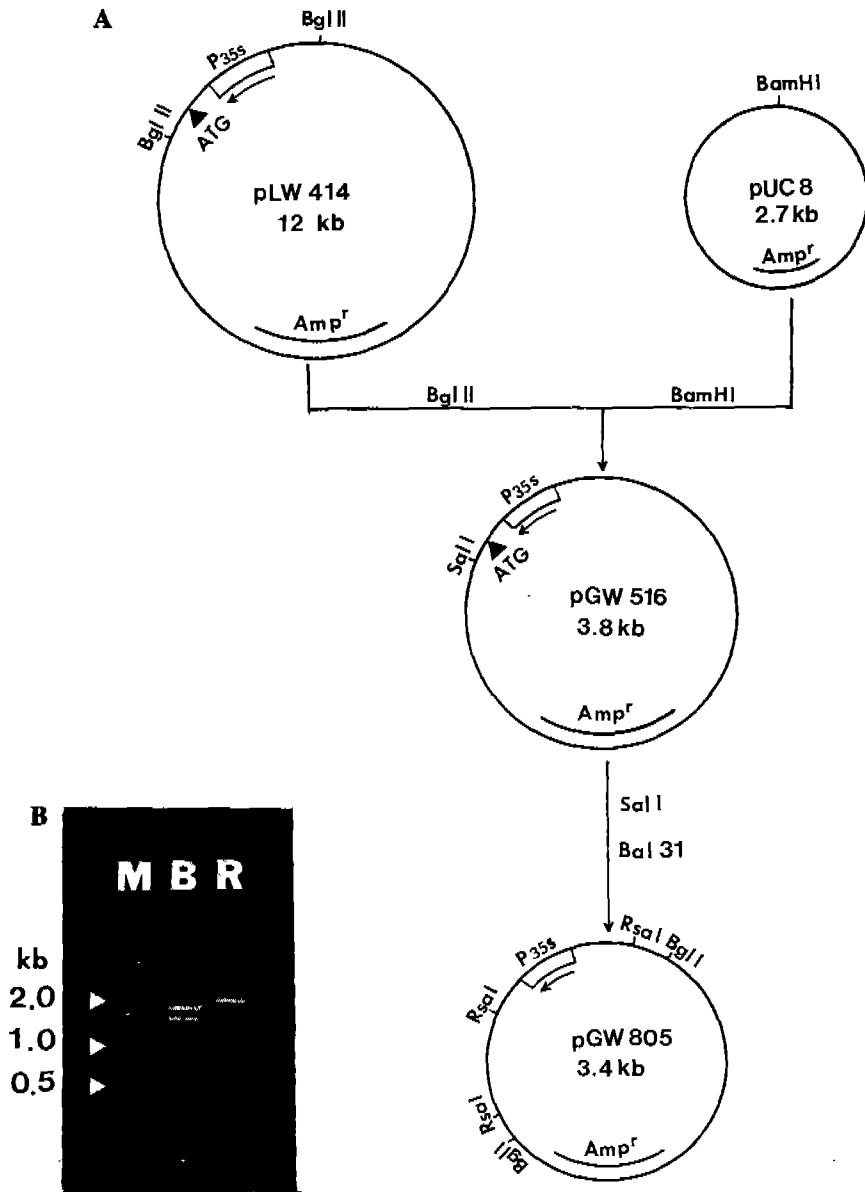


Fig. 1. A: scheme for P_{35S} cloning. The plasmid pLW414 was cleaved with Bgl II, and 1.18 kb fragment containing P_{35S} sequence was recovered. The 1.18 kb fragment was cloned into the Bam HI site of pUC8 to produce pGW516. To remove the translation initiation codon (ATG) which flanks the P_{35S} sequence in pGW516, pGW516 was linearized with Sal I, and the ends were treated with exonuclease Bal 31, then re-ligated to construct pGW805. the orientation of inserted P_{35S} sequence was confirmed by several restriction analyses (data not shown). Plasmids are not drawn to scale. **B:** Restriction enzyme digestion pattern of pGW805.

M, size marker(1kb DNA ladder, BRL); B, Bgl I; R, Rsa I.

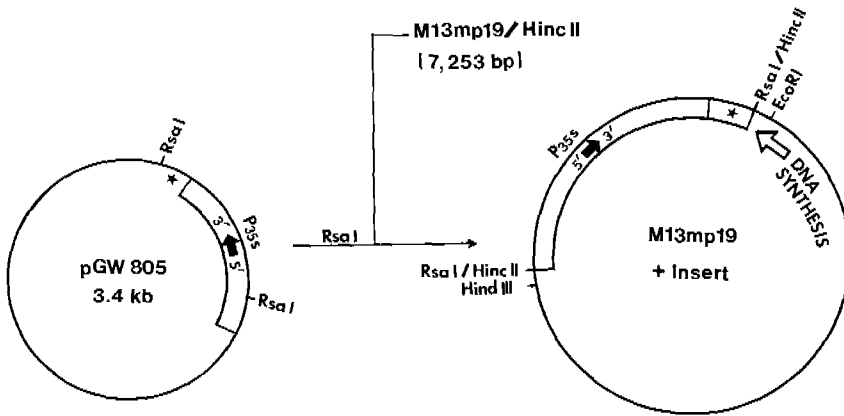


Fig. 2. Nucleotide sequencing strategy of *P_{35S}* 3' end region. To identify the nucleotide sequence of *P_{35S}* 3' region in constructed pGW805, the promoter sequence was excised as an *Rsa* I fragment and introduced into the *Hinc* II site of M13mp19. The sequence was determined by the method of Sanger *et al.* (1977) (See Figs. 3 and 4). The plasmid and a phage DNA are not drawn to scale. Asterisked region represents a part of the pUC8 sequence from pGW805.

Nopaline synthase 유전자의 terminator (Tnos)의 cloning. 고등생물에서는 일반적으로 mRNA의 3' 말단부가 polyadenylation되어 있다(Boutry and Chua, 1985; Darnell, 1982; Nevins, 1983). 동물세포의 경우 mRNA의 3' 말단이 polyadenylation 되어야 안정된 번역이 가능한데, 일반적으로 poly(A) 부가는 핵 안에서 RNA splicing이 있기 이전에 일어난다.

여러 식물세포의 경우에도 mRNA의 3' 말단부에 poly(A)가 추가되는 것이 관찰되었으며, 동물의 경우와 마찬가지로 식물의 경우에도 mRNA의 poly(A) tailing은 일반적인 현상일 것으로 생각되고 있다(Hunt *et al.*, 1987). Tnos는 Ti plasmid의 T-DNA 부위에 존재하며 여러 식물 세포에서 terminator로 공히 작용함이 입증되었다(Barta *et al.*, 1986; DeGreve *et al.*, 1982; Otten *et al.*, 1981). 따라서 유전자 운반체에 삽입된 외부 유전자의 3' 말단부에 poly(A) tail이 추가될 수 있게 하기 위한 terminator 부위의 확보를 위해 Tnos의 cloning을 시도하였다. 우선 pGA472를 *Bam* HI로 처리하여 Tnos가 포함된 2.4kb 크기의 DNA 절편을 분리한 다음 pUC8의 *Bam* HI 자리에 삽입하여 pSC1 (5.1 kb)을 만들었다. 그다음 2.4kb DNA 절편내에 포함되어 있는 NPT유전자를 제거하기 위해 pSC1을 *Bam* HI과 *Dde* I으로 처리하고 크기가 약 1.65kb 되는 DNA 절편을 분리하였다. 분리한 DNA 절편을 Klenow Fragment로 처리하여 5'과 3' 말단을 blunt end로 만든 다음 pUC13의 *Sma* I 자리에 삽입하여 Tnos 부위의 5'쪽 NPT 유전자가 제거된 pSC5 (4.3 kb)를 작성하였다(Fig. 5).

유전자 운반체 pKCH1의 작성. *P_{35S}*부위가 clone된 pGW805와 Tnos부위가 clone된 pSC5를 이용하여 유전자 운반체 pKCH1을 작성하였다. pGW805를 *Rsa* I으로 처리하여 35S promoter가 함유되어 있는 DNA 절편을 분리하고 이것을 Tnos가 들어있는 pSC5의 *Hinc* II 자리에 삽입하였다. 그 결과 35S promoter부위에 이어서 unique cloning site인 *Xba* I과 *Bam* HI자리, 그리고 cloning site바로 뒤에 Tnos부위를 갖춘 pKCH1 (5.0kb)를 얻을 수 있었다(Fig. 6). 더우기 promoter부위의 5' 앞과 terminator부위의 3' 뒤에는 *Hind* III 자리가 각각 하나씩 존재하여 실험

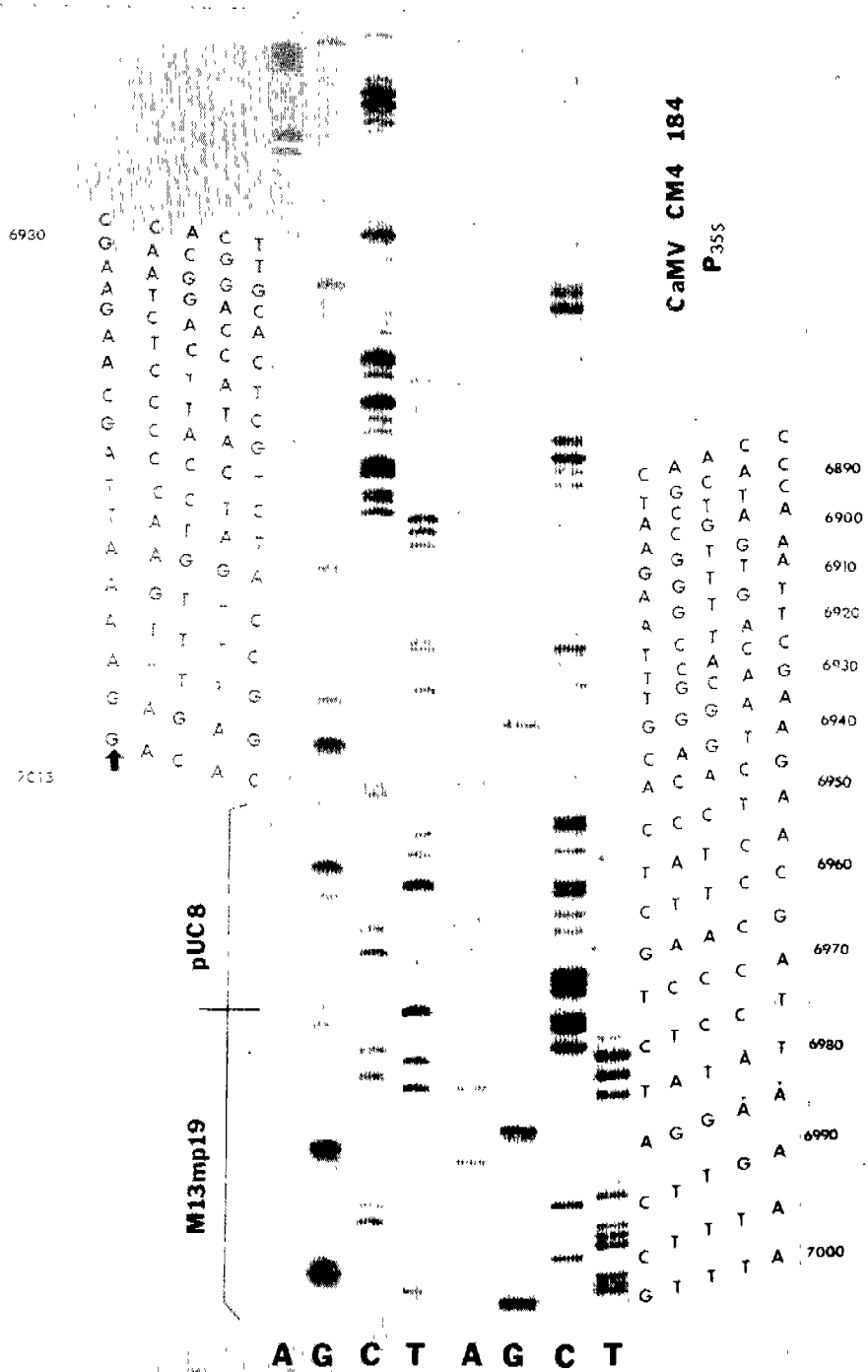


Fig. 3. Nucleotide sequence of P35S 3' end region. Arrow indicates the transcription initiation site.

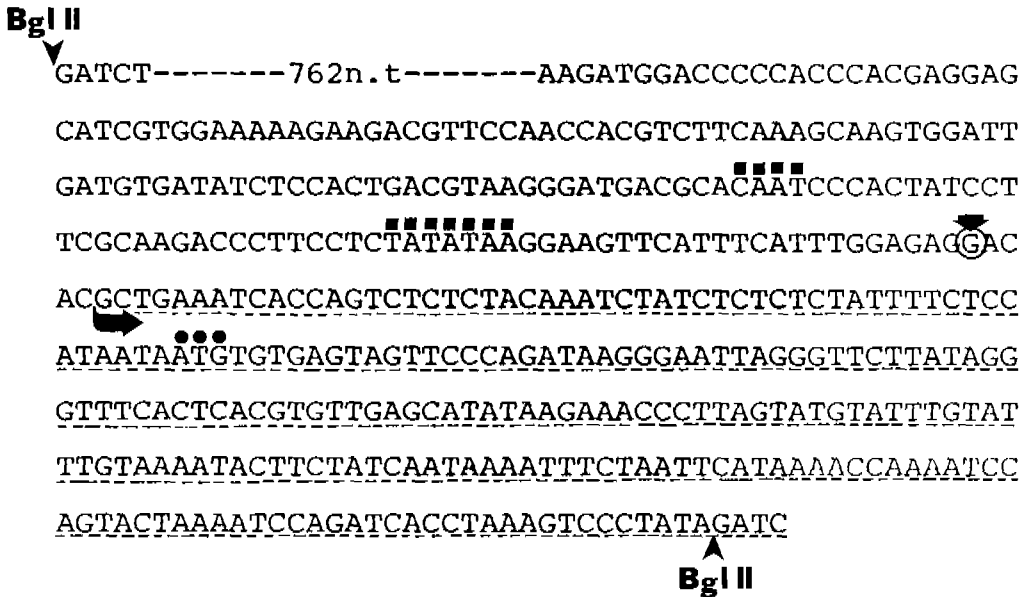


Fig. 4. Nucleotide sequence of the promoter region for CaMV 35S transcript. The 'CAAT' box and 'TATA' box are indicated with closed squares, and the 'ATG' translation initiation codon is indicated with closed circles. The transcriptional start point, 'G', is indicated with a vertical arrow. The sequence with dotted underline was deleted by exonuclease Bal 31 in pGW516. The unrecorded 762 nucleotide sequences are predicted from the published data (Robertson *et al.*, 1983).

험 목적에 따라 편리하게 이용할 수 있다. 이와같이 작성된 pKCH1은 특정 유전자를 직접 식물세포 내로 도입 시킬때나 (Fromm *et al.*, 1985; Balazs *et al.*, 1985), *Agrobacterium*-Ti plasmid를 이용하여 고등식물을 형질전환 시킬 때 사용할 수 있을 것이다. 즉, electroporation이나 microinjection 등의 방법에 의해 식물세포 내로 도입된 외부 유전자는 pKCH1이 가지고 있는 P_{35S}와 Tnos의 기능에 의해 일시적으로 발현 되거나, 고등식물의 염색체내로 삽입되어 안정된 발현이 가능하며, *Agrobacterium*-Ti plasmid를 이용할 때는 T-DNA의 border부위를 가지는 유전자 운반체에 P_{35S}-외부 유전자-Tnos cassette를 옮긴 후 고등식물의 형질전환에 이용할 수 있을 것이다.

적 요

고등식물의 세포내로 특정 유전자를 도입시킬 수 있는 적절한 plasmid유전자 운반체를 얻기 위한 연구 결과 pKCH1을 개발하였다. pKCH1은 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S RNA 유전자의 promoter와 nopaline synthase (NOS)유전자의 transcription terminator(polyadenylation signal포함)를 갖고 있으며, 이들 promoter와 terminator사이에는 unique cloning site로서 Bam HI과 Xba I자리가 포함되어있다. 또한 promoter부위의 5 앞과 terminator부위의 3 뒤

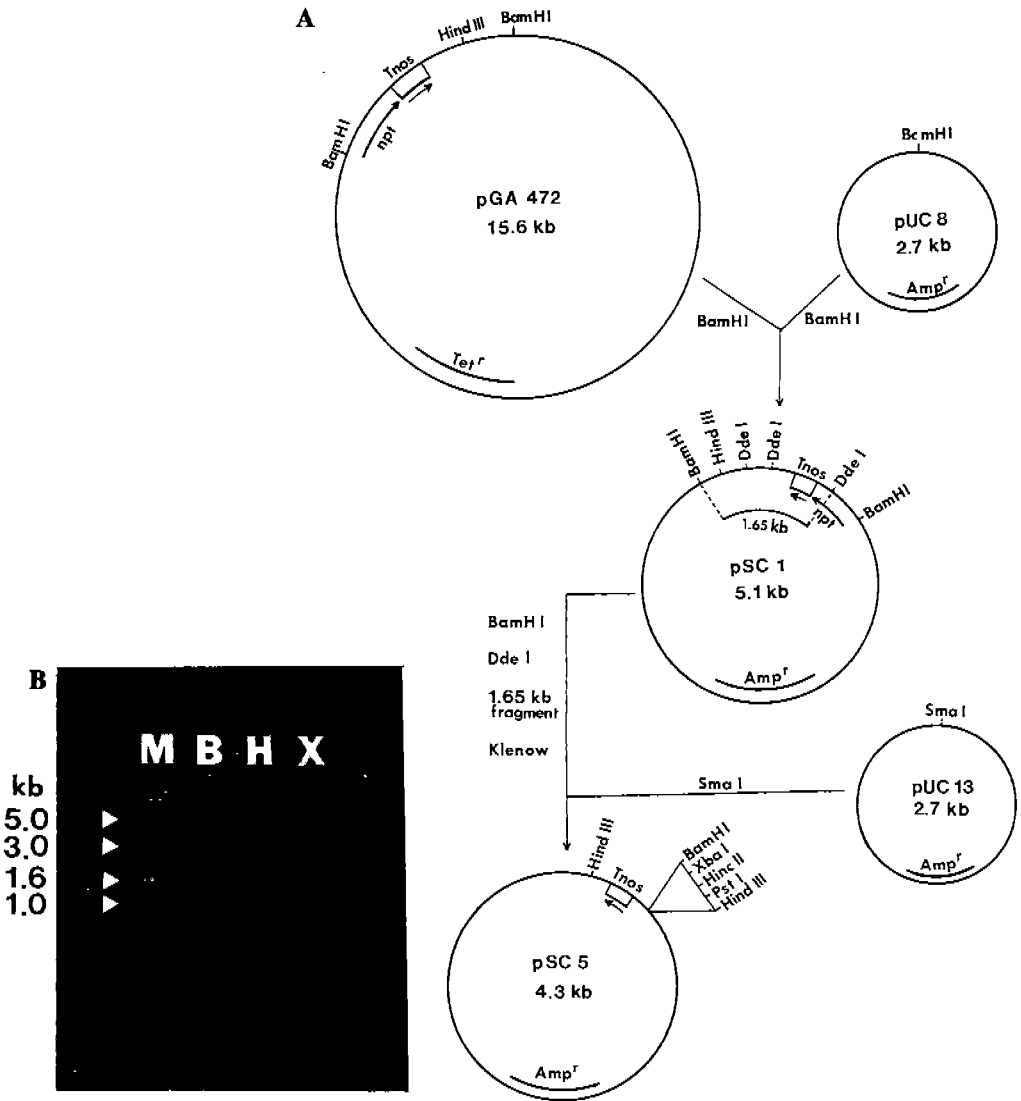


Fig. 5. A: A scheme for Tnos cloning. The BamHI fragment which contains Tnos was excised and cloned into pUC8 to generate pSC1. To obtain the Tnos region, pSC1 was digested partially with BamHI and DdeI and the 1.65kb BamHI-DdeI fragment containing Tnos region was recovered and converted into the blunt ends with DNA polymerase I-large fragment (Klenow Fragment). The 1.65 kb fragment was introduced into the SmaI site of pUC13 to make pSC5. The orientation of inserted Tnos sequence was confirmed by several restriction analyses (data not shown). Plasmids are not drawn to scale.

B: Restriction enzyme digestion pattern of pSC5.

M, size marker (1kb DNA ladder, BRL); B, Bam HI, H, Hind III; X, Xba I.

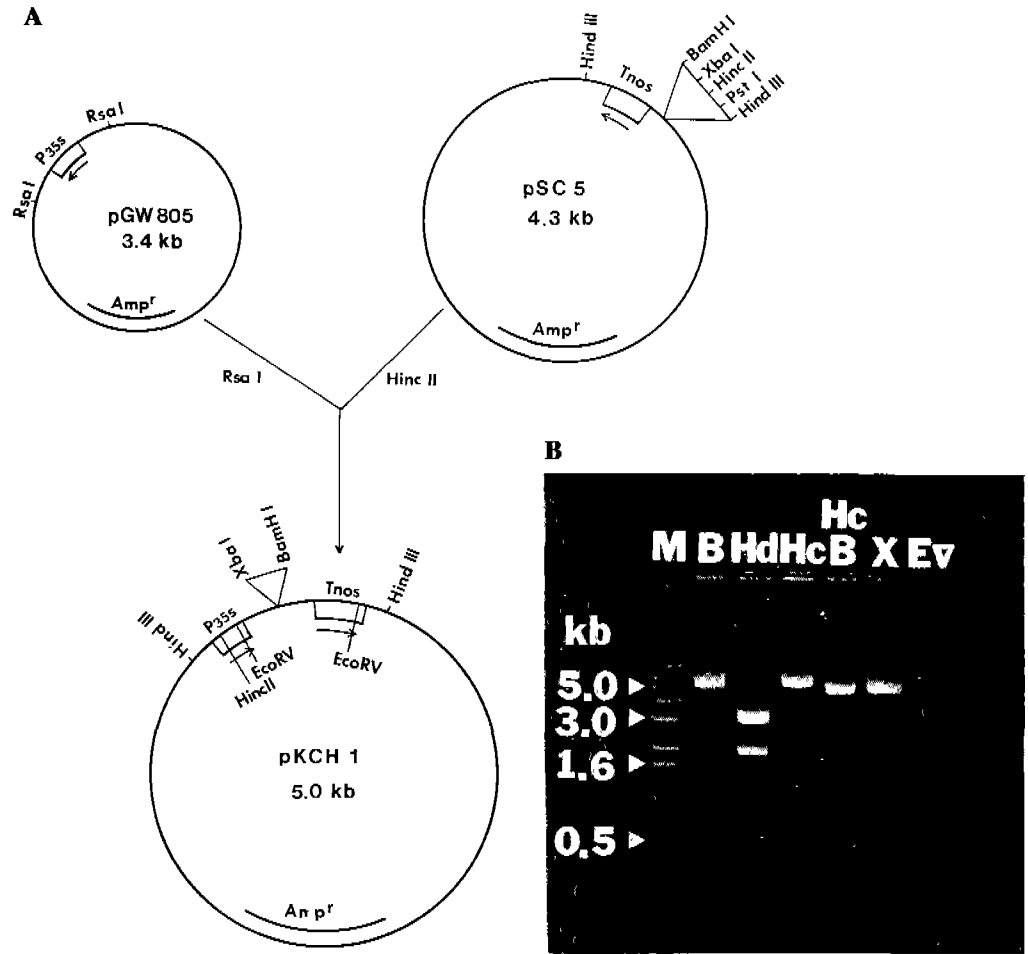


Fig. 6. A: Construction scheme for pKCH1. The *Rsa* I fragment containing *P35s* sequence in pGW805 was excised and ligated with *Hinc* II-linearized pSC5 to construct the expression vector pKCH1. The orientation of the insert DNA was confirmed by several restriction analyses (data not shown). Consequently, the plasmid vector pKCH1 contains the *P35s* and *Tnos* sequence with unique cloning sites, *Xba* I and *Bam* HI, between them. The *P35s* and *Tnos* sequences are flanked by *Hind* III sites. B: Restriction enzyme digestion pattern of pKCH1.
 M, size marker (1 kb DNA ladder, BRL); B, *Bam* HI; Hc, *Hinc* II; Hd, *Hind* III; X, *Xba* I; Ev, *Eco* RV.

에는 *Hind* III 자리가 각각 하나씩 존재하여 promoter-외부 유전자-terminator cassette를 분리해 낼 수 있다.

사 사

본 연구는 과학기술처 기초연구개발 과제의 연구 결과이며(E70380), 아울러 저자들은 본 연

구 수행 과정중 도움을 주신 유장렬 박사에게 감사를 드리는 바입니다.

참 고 문 헌

- Abel, P.P., R.S. Nelson, B. De, N. Hoffmann, S.G. Rogers, R.T. Fraley and R.N. Beachy. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232**: 738-743.
- An, G., B.D. Watson and C.C. Chiang. 1986. Transformation of tobacco, tomato, potato and *Arabidopsis thaliana* using a binary Ti vector system. *Plant Physiol.* **81**: 301-305.
- Balazs, E., S. Bouzoubaa, H. Guilley, G. Jonard, J. Paszkowski and K. Richards. 1985. Chimeric vector construction for higher-plant transformation. *Gene* **40**: 343-348.
- Barta, A., K. Sommergruber, D. Thompson, K. Hartmuth, M.A. Matzke and A.J.M. Matzke. 1986. The expression of a nopaline synthase-human growth hormone chimeric gene in transformed tobacco and sunflower callus tissue. *Plant Mol. Biol.* **6**: 347-357.
- Bevan, M.W., S.E. Mason and P. Goelet. 1985. Expression of tobacco mosaic virus coat protein by a cauliflower mosaic virus promoter in plants transformed by *Agrobacterium*. *EMBO J.* **4**: 1921-1926.
- Bouty, M. and N.-H. Chua. 1985. A nuclear gene encoding the beta subunit of the mitochondrial ATP synthase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *EMBO J.* **4**: 2159-2165.
- Darnell, J.E.Jr. 1982. Variety in the level of gene control in eucaryotic cells. *Nature* **297**: 365-371.
- DeGreve, H., J. Leemans, J.P. Hernalsteens, L. Thia-Toong, M. De Beuckeleer, L. Willmitzer, L. Otten, M. Van Montagu and J. Schell. 1982. Regeneration of normal and fertile plants that express octopine synthase from tobacco crown galls after deletion of tumor-controlling functions. *Nature* **300**: 752-755.
- Fraley, R.T., S.G. Rogers, R.B. Horsch, D.A. Eichholtz, J.S. Flick, C.L. Fink, N.L. Hoffmann and P.R. Sanders. 1985. The SEV system: A new disarmed Ti plasmid vector system for plant transformation. *Bio/Technology* **3**: 629-635.
- Fromm, M.E., L.P. Taylor and V. Walbot. 1985. Expression of genes electroporated into monocot and dicot plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 524-528.
- Gardner, R.C., A.J. Howarth, P. Hahn, M. Brown-Luedi, R.J. Shepherd and J. Messing. 1981. The complete nucleotide sequence of an infectious clone of cauliflower mosaic virus by M13mp7 shotgun sequencing. *Nucl. Acids Res.* **9**: 2871-2888.
- Hunt, A.G., N.M. Chu, J.T. Odell, F. Nagy and N.-H. Chua. 1987. Plant cells do not properly recognize animal gene polyadenylation signals. *Plant Mol. Biol.* **8**: 23-35.
- Kay, R., A. Chan, M. Daly and J. McPherson. 1987. Duplication of CaMV 35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* **236**: 1299-1302.
- Maniatis, T., E. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Morelli, G., F. Nagy, R.T. Fraley, S.G. Rogers and N.-H. Chua. 1985. A short conserved sequence is involved in the light-inducibility of a gene encoding ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit of pea. *Nature* **315**: 200-204.
- Nevens, J.R. 1983. The pathway of eucaryotic mRNA formation. *Ann. Rev. Biochem.* **52**: 441-466.
- Odell, J.T., F. Nagy and N.-H. Chua. 1985. Identification of DNA sequences required for activity of the

- cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**: 810-812.
- Ow, D.W., K.V. Wood, M. DeLuca, J.R. De Wet, D.R. Helinski and S.H. Howell. 1986. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants. *Science* **234**: 856-859.
- Ow, D.E., J.D. Jacobs and S.H. Howell. 1987. Functional regions of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter determined by use of the firefly luciferase gene as a reporter of promoter activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4870-4874.
- Otten, L., H. DeGreve, J.P. Hernalsteens, M. Van Montagu, O. Schieder, J. Straube and J. Schell. 1981. Mendelian transmission of genes introduced into plants by the Ti plasmid: an approach to genetic engineering of higher plant cells. *Mol. Gen. Genet.* **183**: 209-213.
- Paszkowski, J., R.D. Shillito, M. Saul, V. Mandak, T. Hohn, B. Hohn and I. Potrykus. 1984. Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* **3**: 2717-2722.
- Robertson, H.D., S.H. Howell, M. Zaitlin and R.L. Malmberg. 1983. Current communications in molecular biology-Plant infectious agents: viruses, viroids, virusoids, and satellites. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanders, P.R., J.A. Winter, A.R. Barnason, S.G. Rogers and R.T. Fraley. 1987. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucl. Acids Res.* **17**: 1543-1558.
- Sanger, F., S. Nicklen and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Shah, D.M., R.B. Horsch, H.J. Klee, G.M. Kishore, J.A. Winter, N.E. Tumer, C.M. Hironaka, P.R. Sanders, C.S. Gasser, S. Aykent, N.R. Siegel, S.G. Rogers and R.T. Fraley. 1986. Engineering herbicide tolerance in plants. *Science* **233**: 478-481.

(1988.11.25 接受)