

## Binary Vector System을 이용한 당근 (*Daucus carota*) 세포의 형질전환

양 덕 조 · \*이 성 택

충북대학교 생물학과, \*한국과학기술원 생물공학과

## Transformation of Carrot (*Daucus carota*) Cells Using Binary Vector System

Deok-Cho Yang and Sung-Taick Lee\*

Dept. of Biology, Chung-buk National University

\*Dept. of Biological Science and Engineering, Korea  
Advanced Institute of Science and Technology.

### ABSTRACT

These studies were carried out to obtain the transformant from carrot cells by using binary vector pGA472 with NPT II gene to confer kanamycin resistance in the plant cells. The binary vector pGA472 was mobilized from *E. coli* MC1000 into *A. tumefaciens* strains isolated in the Korea, C23-1, K29-1, and disarmed Ti-plasmid PC2760, and A281 using a tri-parental mating method with *E. coli* HB101 / pRK2013. Transconjugants, C23-1 / pGA472, K29-1 / pGA472, PC2760 / pGA472 and A281 / pGA472 were obtained on the minimum AB media containing tetracycline and kanamycin, were confirmed to hold the Ti-plasmid and pGA472 binary vector on the 0.7% agarose gel. Transformed carrot calli were initiated on the MS media supplemented with 100 $\mu$ g/ml kanamycin and 250 $\mu$ g/ml carbenicillin after co-cultivation of carrot explant and transconjugant *Agrobacteria*. Selected callus was grown vigorously for subculture on the medium containing 100 $\mu$ g/ml kanamycin, thus indicating that the selected callus was transformed with NPT II gene.

### 서 론

식물의 품종육성은 멘델이즘에 근거를 두고 주로 양성교배에 의하여 이루어져 왔으나, 이런 육종방법은 교배기간에 친화력이 없거나 원연간의 품종일 경우에는 교배가 되지않고, 간혹 교배가 되어 수정이 되었다고 하더라도 잡종개체가 불임화 되며, 또한 유용유전자의 발현보다 주로 열성유전자의 발현빈도가 높아 목적하는 유전자를 발현시키는데는 오랜 육종기간이 소요되었으며, 경제적으로도 많은 제한요소가 뒤따랐다. 그러나 최근 식물유전공학 기술의 발달로 외부유전자의 도입을

통한 식물세포의 형질전환가능성이 제시되면서 이러한 제한요소들이 점차 해결될 전망을 보이고 있다.

식물세포의 형질전환용 운반체로서는 자연상태에서 crown gall tumor를 유발하는 *Agrobacterium tumefaciens*의 Ti-plasmid가 가장 많이 연구되고 있다(1). Ti-plasmid는 T-DNA라는 유전물질을 virulence region의 도움을 받아 식물세포의 핵내로 삽입시켜 형질전환을 유도하는데 형질전환된 식물체는 T-DNA내에 배열되어 있는 유전자의 발현으로 식물호르몬을 과다 분비하며(2), 정상식물체는 거의 발견되지 않은 opine이라는 아미노산 유도체를 생산하게 된다(3). 이런 원리는 자연상태에서

미생물의 유전자가 식물세포의 염색체에 융화되어 발현된 형질전환의 가장 대표적인 예로서 외부유전자를 식물세포내로 도입할 수 있는 계기를 제공해준 셈이 된다.

최근 외부유전자 도입시 사용되는 vector system은 cis-acting 부분과 trans-acting 부분이 따로 존재하면서 형질전환시키는 binary vector(4)와 Ti plasmid내로 삽입되어 형질전환된 intermediated vector(5)가 보고되어 있다. 외부유전자도입시 형질전환 여부를 감집적으로 판단하기 위해서 marker 유전자를 함께 사용하게 되는데 이런 유전자로써는 neomycin phosphotransferase(5, 6), chloramphenicol acetyltransferase(5), streptomycin phosphotransferase (7), dihydrofolate reductase(6), hygromycin phosphotransferase(8), glucuronidase(5)와 bleomycin resistance(9) 유전자등이 보고되어 있다. Marker 유전자를 삽입한 binary vector system에 의해서 일부식물에서는 식물세포의 형질전환을 쉽게 하고 있으나, Virulence region의 제공균주인 *Agrobacterium* spp.에 따라서 식물체간의 형질전환율, 유전적차이와 발현기작등은 차이가 있다(10, 11, 12).

따라서 본 실험은 국내에서 선발된 *Agrobacterium* spp와, disarmed Ti-plasmid 및 hyper-virulent Bo542 plasmid 를 가지고 있는 *Agrobacteria*에 NPT II gene 이 함유된 binary vector system를 도입하여 당근세포를 형질전환 시키고자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 binary vector

본 실험에 사용한 균주는 국내토양에서 선발한(관련 논문은 발간중에 있음) *Agrobacterium tumefaciens* K29-1과 C23-1를 사용하였으며, 또한 disarmed Ti-plasmid 를 함유하고 있는 *A. tumefaciens* PC2760(14)과 hyper-virulent plasmid인 Bo542 plasmid를 함유하고 있는 *A. tumefaciens* A281(5)를 사용하였다. Binary vector는 An(14)이 개발한 pGA472를 사용하였으며 pGA472 vector에는 식물세포내로 삽입되면 kanamycin에 대한 저항을 나타내는 neomycin phosphotransferase II gene (NPT II gene)이 삽입되어 있다. 균주의 배양은 주로 YEP (bacto-peptone 10 g / l, bacto-yeast extract 10 g / l, NaCl 5 g / l, agar 15 g / l)배지에 29℃에서 암상태로 배양하였다.

### *Agrobacterium tumefaciens*에 의한 당근조직의 tumor 형성능 확인

본실험에 사용할 *Agrobacterium tumefaciens* 4균주의 tumor형성능을 조사하기 위해서 식물호르몬 무첨가 water agar plate(1.5%)에 carbenicillin 250 $\mu$ g/ml를 첨가하여 멸균된 당근절편을 0.5cm 높이로 절단한 후 치상하였다. 당근의 소독은 깨끗한 물로 세척하고 70%의 ethanol에서 3분간 침지한 후 2%의 NaOCl에서 20분간 침지하여 멸균증류수로 3회 세척하였다. 치상된 당근 절편위에 1일간 YEB(Beef extract 5.0 g / l, peptone 5.0 g / l, yeast extract 1.0 g / l, sucrose 5.0 g / l, MgSO<sub>4</sub> 0.406 g / l, pH 7.1)배지에서 배양된 균주의 현탁액 0.1ml를 도말하여 25℃의 배양실에서 배양하면서 tumor의 형성여부를 관찰하였다.

### Tri-parental mating 방법에 의한 binary vector 의 *Agrobacterium* spp에 도입

당근세포에 도입할 NPT II gene은 pGA472(14)에 도입되어 있는 유전자를 사용하였으며 virulent region 제공 *Agrobacterium* spp는 *A. tumefaciens* C23-1, K29-1, A281과 PC2760을 사용하였다. *Agrobacterium* spp에 binary vector의 도입은 pRK2013을 helper plasmid로 하는 tri parental mating 방법(13)을 약간 수정하여 수행하였으며, transconjugant의 선발은 AB배지에 tetracycline 15 $\mu$ g/ml과 kanamycin 25 $\mu$ g/ml이 첨가된 배지에서 선발하였다.

### Transconjugant로 부터 Ti-plasmid 및 binary vector 존재여부 확인

Tri-parental mating방법에 의하여 *Agrobacterium* spp에 binary vector가 도입되어 있는지 여부를 확인하기 위해서는 An(15)방법을 이용하여 Ti-plasmid 및 pGA472를 추출하였으며, 0.7% agarose gel 상에서 plasmid 존재여부를 확인하였다.

### 당근조직의 kanamycin에 대한 반응조사

당근조직이 kanamycin에 대해서 가지고 있는 내성을 조사하기 위해서 2.4 D가 0.5mg/l 함유되어 있고 kanamycin monosulfate (sigma, k1377)가 0, 10, 30, 50, 100, 150 $\mu$ g/ml 첨가된 MS배지에 당근절편을 접종하여 30일간 배양한 후 callus 형성율을 조사하였다.

### NPT II gene의 당근세포내로 도입 및 형질전환 세포의 증식

NPT II gene이 도입된 *A. tumefaciens* C23-1/pGA472, K29-1/pGA472, PC2760/pGA472 및 A281/pGA472와 당근절편을 1일간 동시배양(11)시킨 후 carbenicillin

250 $\mu$ g/ml과 kanamycin 100 $\mu$ g/ml 및 2,4-D 0.5mg/l가 첨가된 MS배지에 치상하여 callus 형성여부를 조사하였으며, 형성된 callus는 계속 신선한 동일배지에 옮겨 증식시켰다.

**결과 및 고찰**

**당근절편을 이용한 tumor의 형성**

본 실험에서 NPT II gene이 함유되어 있는 binary vector를 식물세포내로 도입할 때 helper 균주로 사용할 *Agrobacteria*의 tumor 형성능을 조사하였다. *A. tumefaciens* K29-1과 C23-1, 그리고 hyper virulent Ti-plasmid인 Bo[42(5)를 가지고 있는 A281균주와, T-DNA의 식물호르몬 자가합성 유전자가 제거된 PC2760균주(14)를 당근절편에 접종하여 tumor의 형성여부를 조사한 결과, 사용균주에 따라 tumor의 형성시기에 다소 차이가 나타났다. C23-1에서는 접종 8일만에 tumor가 형성되어 hyper virulent 균주인 A281보다 오히려 2배이상 빨리 tumor가 형성되었으며 K29-1에서도 tumor형성 시기가 16일로 역시 A281보다 tumor가 빨리 형성되었다(Table 1). Tumor callus의 유기도 균주에 따라 차이를 나타내었으며, 둥그런 상태의 tumor를 형성한 C23-1에서 callus 유기가 가장 잘되었고, A281은 K29-1보다도 callus 유기가 불량한 경향을 보였다(Table 1). 한편 PC2760균주에서는 전혀 tumor가 형성되지 않아 tumor를 형성하는 식물호르몬 자가합성유전자가 제거되어 있음(14)을 확인할 수 있었다(Table 1).

Tumor의 형태도 균주에 따라 다양하게 나타났는데 C23-1의 경우에는 둥그러운 상태이었으나 A281의 경우에는 전면에 tumor가 퍼져있는 상태를 보였고 K29-1의 경우에는 tumor가 퍼져있는 상태와 둥그러운 상태가 공존하는 경향을 보였다(Fig. 1).

당근절편위에 형성된 tumor조직을 절취하여 식물호르몬이 전혀 첨가되지 않고 항생제로써 carbenicillin만이



Fig. 1. Phenotype of tumor on carrot discs by infection of *A. tumefaciens* strains C23-1(A) and K29-1(B).

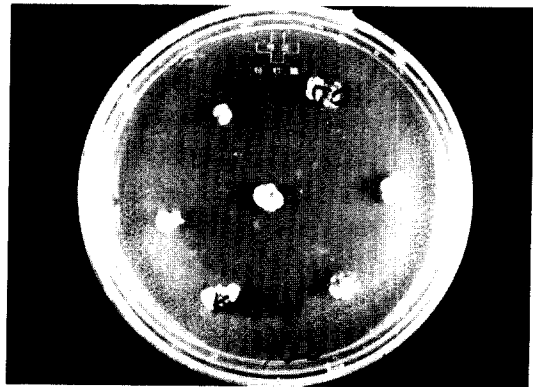


Fig. 2. Tumor callus induced by infection of *A. tumefaciens* K29-1 on the phyto-hormone free MS medium.

**Table 1. Tumor formation on the carrot disc by infection of various *A. tumefaciens* and callus initiation on the hormone free medium**

Strains	Time of formation(days)	Type of tumor	Callus initiation
A281	18	Spread	++
PC2760	0	No tumor	
K29-1	16	Spread and round	+++
C23-1	8	Round	++++

-: no growth, ++: good growth, +++: well growth, ++++: excellent growth.

250 $\mu$ g/ml 첨가된 MS배지에 접종하면 callus가 형성되는데, 이는 Ti-plasmid의 일부인 T-DNA에 coding되어있는 식물호르몬 자가합성유전자가 발현되어(1, 2) 탈분화가 일어난것으로 판단된다. Tumor조직에서 형성된 callus를 식물호르몬 무첨가배지에 계속 계대배양하면 단단하며 구형의 callus가 형성되었다(Fig. 2).

**선발 Agrobacterium spp.에 binary vector system의 도입 및 확인**

선발된 자연산 *A. tumefaciens* K29-1과 C23-1, 그리고 A281 및 PC2760균주에 binary vector인 pGA472를 도입하기 위해서 pRK2013을 helper로 사용하여 tri-parental mating방법(15)에 의해서 형질전환을 유도하였다. AB배지에서는 *Agrobacterium*은 모두 생존하지만 *E. coli*는 생존하지 못하는 배지특성과 식물세포내로 도입되면 kanamycin에 저항을 나타내는 NPT II gene과 미생물에서 항생제 marker로 사용될 수 있는 tetracycline 유전자를 가지고 있어(14) 항생제 첨가배지에서 생존할 수 있는 *E. coli* MC1000/pGA472의 특성을 이용해서 AB배지에 kanamycin과 tetracycline이 함유된 배지에서 형질전환된 transconjugant를 선발하고자 하였다. 우선 상기 조건을 만족시키는지 여부를 확인하기 위해서 AB배지에 K29-1, C23-1, A281과 PC2760를 접종하여 생존 여부를 조사한 결과 모두 생존하였으나 *E. coli* MC1000/pGA472와 *E. coli* HB101/pGK2013은 전혀 생존하지 못했

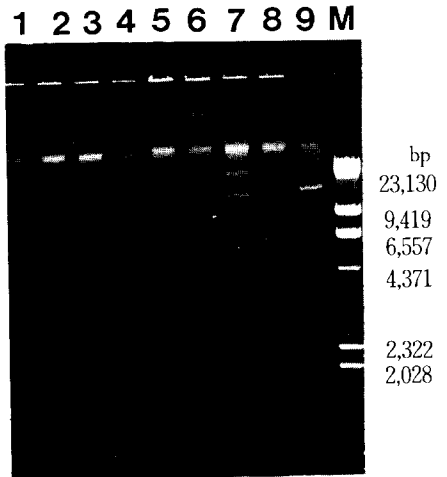
다.(Table 2.). 반면에 kanamyc in 25 $\mu$ g/ml와 tetracycline 15 $\mu$ g/ml이 함유된 LB배지에서는 *Agrobacterium* spp는 생존하지 못했지만 *E. coli*는 모두 생존하였고 항생제 첨가 AB배지에서는 모두 생존이 되지않아 mating조건에 매우 합당하였다(Table 2). 3종의 균주를 적정배지에서 배양한다음 MGL배지에 동량혼합하여 1일동안 29 $^{\circ}$ C에서 배양한 후 항생제가 첨가된 AB배지에 도말하여 생존 여부를 조사한 결과 3일후에 colony가 형성되기 시작하였다. 형성된 colony를 다시 동일배지에 계대배양하여 단일 colony로 만든다음 An(15)의 방법에 따라 plasmid를 추출하여 Ti-plasmid 및 pGA472 binary vector(14)의 존재여부를 확인하였다.

Fig. 3.은 추출한 plasmid를 0.7% agarose gel상에서 확인하는 electrophoregram.으로서 lanes 2, 4, 6, 8은 pGA472가 들어가 있지 않은 wild type *Agrobacterium* spp. 이고 lanes 1, 3, 5, 7은 pGA472 vector가 들어갔는 균주이다. 또한 lane 9는 단순히 size가 15.6kb인 pGA472(14)가 들어있는 *E. coli*로써 size marker로 사용한 결과 transconjugant모두는 pGA472가 들어 있는것을 확인할 수 있어 당근세포의 형질전환에 사용할 수 있을

**Table 2. Test for growth of different strains cultured on the various media and selection of transconjugant**

	MGL	LB(A)	AB	AB(A)
Acceptor: <i>Agrobacterium</i> spp.				
A281	0	×	0	×
C23-1	0	×	0	×
K29-1	0	×	0	×
PC2760	0	×	0	×
Donor: <i>E.coli</i> MC1000/pGA472	0	0	×	×
Helper: <i>E.coli</i> HB 101/pRK2013	0	×	×	×
Conjugant:A281/pGA472	0	0	0	0
C23-1/pGA472	0	0	0	0
K29-1/pGA472	0	0	0	0
PC2760/pGA472	0	0	0	0

(A): Tetracycline 15 $\mu$ g/ml, kanamycin 25 $\mu$ g/ml.  
O: Survived, X: Dead.



**Fig. 3. Electrophoregram of plasmid DNA after insertion of binary vector into *Agrobacterium* spp.**

Lane 1: PC2760/pGA472, 2:PC2760, 3:K29-1/pGA472, 4:K29-1, 5:C23-1/pGA472, 6:C23-1, 7:A281/pGA472, 8:A281, 9:*E.coli* MC1000/pGA472(15.6kb), M: DNA digested with Hind III.

것으로 사료 되었다.

**Binary vector system 도입에 의한 당근세포의 형질전환**

Binary vector에 삽입되어 있는 NPT II gene은 식물 세포의 핵내로 도입되어 발현되면 항생제인 kanamycin에 대해서 저항을 나타나게 된다(6, 11, 12). 그러나 식물체에 따라서는 자체 저항능력에 의해서 항생제에 저항력을 가지고 있는 식물체가 있으므로 우선 당근 조직에서 kanamycin에 대한 자체저항능력을 조사하였다. 2,4-D가 0.5mg/l 함유된 MS배지에 kanamycin을 농도별로 첨가하여 당근 절편을 접종하여 30일간 배양한 후 탈분화능을 조사하였던바, kanamycin 10 $\mu$ g/ml이하에서는 callus가 왕성히 형성되었으나 30 $\mu$ g/ml에서 부터는 callus 형성율이 점차 감소되었으며, 50 $\mu$ g/ml에서는 극히 일부에서 callus가 형성되긴 하였으나 계속성장하지 못했으며, 100 $\mu$ g/ml에서는 전혀 callus가 형성되지 못하고 절편이 고사하였다(Table 3). Kanamycin에 대해서 식물체가 본래 가지고 있는 내성정도는 서로 다르게 보고 되어 있는데, *Arabidopsis thaliana*에서는 20 $\mu$ g/ml (16), *alfalfa*에서는 25 $\mu$ g/ml(17)에서 생장이 억제되었다고 보고되어 있으며, *Populus*에서는 60 $\mu$ g/ml의 kanamycin의 농도에서 생장이 억제되었다고 보고하였다(18). 그러나 *Triticum monococcum*에서는 800 $\mu$ g/ml의 고농도에서도 생장이 가능하였음을 보고하여(19) 식물체마다 매우 차이가 있음을 보여주었다. 본실험에서는 당근조직이 kanamycin 100 $\mu$ g/ml에서는 전혀 생장이 되지 않았으므로 선발배지에 kanamycin 100 $\mu$ g/ml를 첨가하여 형질전환체를 선발하는 것이 효율적인 것으로 생각되었다.

Binary vectory가 도입되어 있음을 확인한 transconju-

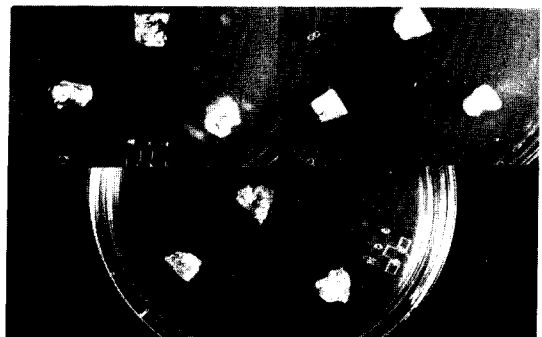
**Table 3. Callus induction of carrot explant on the media with various concentration of kanamycin**

Concentration of kanamycin( $\mu$ g/ml)	Callus induction (%)
0	94.86
10	96.24
30	62.68
50	8.57
100	0
150	0

gants 와 당근 절편을 1일간 동시배양한 후 2,4 D 0.5 mg/l, carbenicillin 250 $\mu$ g/ml 그리고 kanamycin 100 $\mu$ g/ml 첨가된 배지에 치상하여 25 $^{\circ}$ C의 항온실에서 배양하면서 callus의 형성여부를 관찰하였다. C23-1/pGA472, K29-1/pGA472와 PC2760/pGA472에서는 Fig.4에서 보는바와 같이 callus가 형성되었으나 접종후 30일이 경과해서야 callus 나타났으며, 형성율도 매우 낮았고 성장도 잘 되지 않았다. 특히 callus의 형태도 균주에 따라 차이가 있었는데 C23-1/pGA472과 K29-1/pGA472의 경우에는 callus의 형태가 PC2760/pGA472에 비해 둥그럽고 단단한 형태의 callus로 형성되었다. 이런 형태는 T-DNA가 들어 갔을때에도 나타나는 현상으로서(Fig. 1) T-DNA와 NPT II gene이 동시에 삽입되어 나타난 것으로 생각되지만 2가지의 유전자가 확실히 삽입되었는지의 여부는 추후 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

반면 PC2760/pGA472에 의하여 형질전환된 callus는 다소 friable 한 형태를 나타내었으며, 2,4-D 1.0mg/l 와 kanamycin 100 $\mu$ g/ml 첨가된 배지에 계속 개대배양한 결과 왕성히 성장하였다(Fig. 5).

정상 당근조직은 모두 죽은 kanamycin의 농도에서(Table 3) 형질전환 callus는 생존이 가능한것은 일차적으로 NPT II gene이 당근세포 내로 삽입되어 발현 된것으로 사료되지만 추후 southern blot에 의한 NPT II gene의 존재여부 및 northern blot에 의한 발현 여부등을 조사하여 확실한 형질전환체임을 확인하여야 할 것으로



**Fig. 4. Transformation of *Daucus carota* by co-cultivation with *Agrobacteria* conjugants, K29-1/pGA472(A), C23-1/pGA472(B) and PC2760/pGA472(C) on the media with kanamycin 100 $\mu$ g/ml and carbenicillin 250 $\mu$ g/ml.**

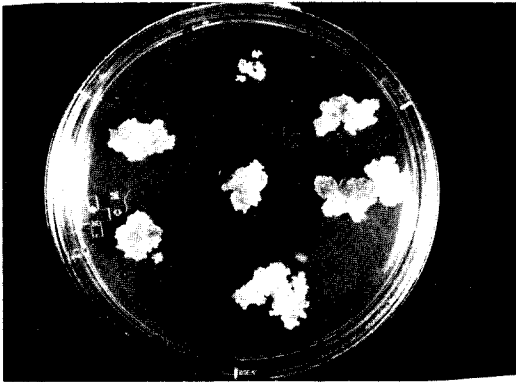


Fig. 5. Growth of kanamycin resistant callus transformed by PC2760 / pGA472 vector on the media with 100 $\mu$ g / ml kanamycin.

사료된다.

## 감 사

본 연구는 1989년도 한국과학재단의 연구비 지원(831-0408-033-2)으로 수행되었으며, 연구비의 지원에 감사드립니다.

## 요 약

고등식물의 형질전환용 유전자운반체로서 가장 많이 사용되고 있는 Ti-plasmid를 이용해서 당근세포를 형질 전환시키기 위한 연구의 일환으로 *Agrobacterium* spp를 helper로 이용하여 NPT II gene를 함유하고 있는 binary vector pGA472를 당근세포에 삽입시켜 kanamycin에 대해 저항성을 나타내는 세포주를 선발하고자 본 연구를 수행하였다. 국내토양에서 선발한 *A. tumefaciens* 2종과 disarmed된 PC2760 그리고 hypervirulent 균주인 A281에 tri-parental mating 방법에 의해서 binary vector인 pGA472을 도입하여 transconjugants인 *A. tumefaciens* C23-1 / pGA472, K29-1 / pGA472, PC2760 / pGA472 그리고 A281 / pGA472를 획득하였다. Transconjugants는 plasmid의 분리, 정제방법에 의해서 추출한후 0.7%의 agarose gel 상에서 관찰해 본 결과 4균주 공히 NPT II gene이 삽입된 pGA472와 Ti-plasmid를 함유하고 있는 것을 확인 하였다. 확인된 conjugant와 당근정상조직을 동시배양방법에 의해서 형질전환을 유도한 후 정상조직

은 전혀 생존이 되지않은 kanamycin에 대해서 저항을 나타내는 callus를 선발할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. M. H. Drummond, M. P. Gordon, E. W. Nester and M. D. Chilton(1977), *Nature (London)* **269**, 535.
2. R. M. Amasino and C. O. Miller(1982), *Plant physiology* **69**, 389.
3. L. A. M. B. Otten and R. A. Schilperoort(1978), *Biochim. Biophys. Acta* **572**, 497.
4. A. Hoekema, P. Horsch, P. Hooykass and R. Schilperoort(1983), *Nature (London)* **303**, 179.
5. R. Fraley, S. Rogers, R. Horsch, D. Eichlotz, J. Flick, N. Hoffman and P. I. Snaders(1985), *Bio/technology* **3**, 629.
6. L. Herrera-Estrella, M. De Block, E. Messens, J. P. Hernalsteens, M. V. Montagu and J. Schell(1983), *The EMBO Journal* **2**, 987.
7. P. Klapwijk(1980), *J. of Bacteriology* **141**, 129.
8. J. M. Peter, V. D. Elzen, R. Townsend, K. Y. Lee and J. R. Bedbrook(1985), *Plant Molecular Biology* **5**, 299.
9. J. Hille, F. Verheggen, P. Roelvink, H. Franssen, A. V. Kammen and P. Zabel(1986), *Plant Molecular Biology* **7**, 171.
10. E. E. Hood, G. L. Helmer, R. T. Fraley and M. D. Chilton(1986), *J. of Bacteriology* **168**, 1291.
11. G. An, B. D. Watson and C. C. Chiang(1986), *Plant Physiol.* **81**, 301.
12. G. An(1985), *Plant Physiol.* **79**, 568.
13. G. An(1987), *Methods in enzymology* **153**, 292.
14. G. An, B. D. Watson, S. Stachel, M. P. Gordon and E. W. Nester(1985), *The EMBO J.* **4**, 277.
15. G. An, P. R. Ebert, A. Miytra and S. N. Ha(1988), *Plant Molecular Biology Manual A3. 1. Kluwer Academic. Belgium.*
16. R. Schmidt, and L. Willmitze(1988), *Plant Cell Reports* **7**, 593.
17. M. Chabaud, J. E. Passiatore, F. Cannon and V. Buchanan-Wollaston(1988), *Plant Cell Reports* **7**, 512.

18. J. Fillatti, J. Xeller, B. Hassig and L. Comai(1987), *Mol. Gen. Genet.* **206**, 192.
19. R. M. Hauptmann, V. Vasil, P. Ozias-Akins, R. B. Horsch and I. K. Vasil(1988), *Plant Physiol.* **86**, 602.

**(Received; October 17, 1990, Accepted; November 30, 1990)**