

## Marker gene의 직접삽입에 의한 transgenic plant의 제조 및 전기융합

홍경애 · 류기중 · 소인섭 · 김양록 · 유장걸

제주대학교 방사능이용연구소

**초록** : 제라니움(*Pelargonium zonale* hybrids)의 원형질체에 외래유전자를 전기충격에 의해 직접도입시키는 조건을 methylene blue 염색법을 이용하여 조사하였다. 그 결과 1.77 kV/cm의 직류전압을 40 $\mu$  sec 동안 가해 주는 것이 제일 효과적이었으며 이때의 원형질체 생존율은 70%, 염색율은 58%이었다. 정제된 pBin19 plasmid를 전기충격법으로 원형질체에 삽입시킨 뒤 kanamycin이 포함된 배지에서 배양하였으며 원형질체의 세포분열은 KM8P 액체배지에서 제일 높았다. 원형질체의 최적 전기융합 조건은 교류 주파수 1 MHz를 40 V/cm에서 15 sec 동안 가한 후 직류전압 0.5 kV/cm를 60 $\mu$  sec 동안 처리해 준 결과 이때의 융합율과 생존율은 각각 13%, 81%이었다(1993년 12월 4일 접수, 1993년 12월 16일 수리).

식물의 형질을 전환시키는 방법으로는 *Agrobacterium*의 Ti-plasmid나 Ri-plasmid의 이용, PEG나 dextran같은 화학물질의 처리, micropipette이나 electric cell manipulator 또는 particle gun의 알려져 있지만 각각 일장일단이 있다. DNA를 직접 원형질체에 넣은 뒤에 배양함으로써 형질전환 식물체를 얻는 방법으로는 전기충격법(electroporation)이 가장 많이 시도되어 왔다.<sup>1-4)</sup> 외래 유전자를 원형질체내에 집어 넣을 때 도입코저하는 목표 DNA와 함께 kanamycin 저항성 유전자와 같은 marker gene을 vector에 탑재시켜 도입함으로써 screening media에서 외래 DNA가 들어간 원형질체만을 선별할 수 있게 된다.

따라서 본 실험은 kanamycin 저항성 marker gene을 갖고 있는 pBin19를 *E. coli* DH5 $\alpha$  strain으로부터 순수 분리하여 이를 전기충격법(electroporation)으로 protoplast에 직접 도입하므로써 형질전환식물(transgenic plant)을 만드는 조건을 확립하고, electroporation 후에 원형질체를 배양하는데 적합한 배지와 원형질체 기리의 전기융합 조건을 아울러 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 원형질체 분리

무균적으로 생육된 제라니움(*Pelargonium zonale* hyb-

rids)의 엽조직으로부터 유기된 callus(BA 1 mg/l와 NAA 3 mg/l)에 2% cellulase R-10, 0.3% pectolyase, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MES, 0.6 M sorbitol(pH 5.8) 용액에 넣어 25 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C에서 3~4시간 동안 처리한 뒤에 원형질체를 분리하였다. 원형질체는 0.6 M sorbitol/0.6 M sucrose 용액의 밀도구배계에서 100 $\times$ g로 원심분리하여 sucrose 용액과 sorbitol 용액 사이에 부유된 것을 채취하는 방법으로 정제하였다.

#### Marker gene

형질전환에 사용된 marker gene은 kanamycin 내성 유전자인 *npII*이었다. Vector로 사용된 plasmid는 pBin 19인데 이것은 Tn5에서 유래된 aminoglycoside phosphotransferase II gene과 식물에서 trans-cription되기 위해 필요한 nos gene을 갖고 있을 뿐만 아니라 *Eco*R1, *Hind*III 등이 작용할 수 있는 multiple cloning site를 가지고 있다. 이 plasmid는 *E. coli* DH5 $\alpha$ 로 cloning 하였으며, 균배양은 50 ml의 LB(kanamycin 50  $\mu$ g/ml) 배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C의 진탕배양기에 하룻밤 배양시킨 뒤 사용하였다.

*E. coli* 배양액을 1.5 ml씩 microfuge tube에 취하여 4 $^{\circ}$ C, 8000 $\times$ g에서 3분간 원심분리하여 침전시킨 다음 최종 농도가 2 mg/ml 되도록 조절된 lysozyme<sup>5-6)</sup> 용액과 혼합하여 alkaline법<sup>7)</sup>으로 분리 정제하였다.

Key words : electroporation, electrofusion, pBin19, protoplast culture

Corresponding author : Z.-K. U.

**Electroporation**

원형질체를 HBM[1 mM HEPES(pH 7.0), 10% Mannitol] 완충용액 2 ml로 2회 세척한 후 원형질체의 밀도가  $1 \times 10^6/ml$ 가 되도록 HBM 완충용액으로 희석시켰다. 먼저 electroporation 조건을 검토하기 위하여 DNA 대신에 0.5 mM methylene blue 염색용액 10  $\mu$ l와 1 ml의 protoplast 현탁액을 혼합시킨 뒤 electroporation chamber(P/N471)에 0.5 ml씩 넣고 전압을 변화(1.2~2.4 kV/cm) 시키면서 40  $\mu$ sec 동안 처리한 뒤 원형질체의 viability를 fluorescein diacetate(FDA)법으로 측정하였고, 원형질체의 파괴, 염색액의 침투 여부 등을 조사하였다.

marker gene을 도입할 때는 정제된 10  $\mu$ g plasmid DNA와 50  $\mu$ g carrier DNA를 HBM 완충용액에 넣어 methylene blue를 이용하여 확립한 최적 조건에서 electroporation시켰다. 사용한 electroporator는 Electro Cell Manipulator 401A(BTX Inc. San Diego, California, USA)<sup>9)</sup>이었다.

**전기융합**

원형질체 밀도를  $1 \times 10^6/ml$  되도록 융합용액(600  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 140  $\mu$ M HEPES, 0.6 M sorbitol, pH 7.0)으로 조절한 현탁액 20  $\mu$ l를 0.2 mm 간극의 electrode slide에 넣고 cover glass를 덮은 뒤 형광장치가 부착된 도립현미경(Nikon, Diaphot)에 올려 놓은 뒤 Electro Cell Manipulator의 교류의 주파수(1 MHz), 전압(40 V/cm), 처리시간(10 sec, 15 sec) 그리고 직류 전압(0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 kV/cm)과 처리시간(20, 40, 60, 80 sec)을 달리하면서 융합시켰다.

**원형질체의 배양**

electroporation 또는 전기융합 후의 원형질체 배양은

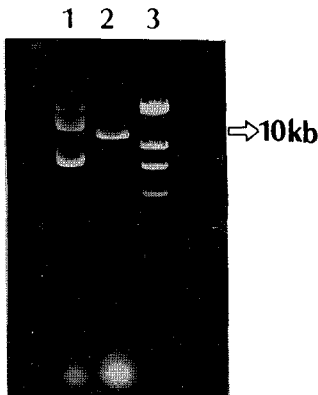


Fig. 1. Electrophoretic patterns of pBin19 plasmid. Lane 1, pBin19; lane 2, pBin19/EcoRI; lane 3, Marker.

MS solid<sup>9)</sup>, MS liquid,<sup>9)</sup> B5 solid,<sup>10)</sup> B5 liquid,<sup>10)</sup> KM8P liquid<sup>11)</sup> 그리고 AA liquid<sup>12)</sup> 배지상에서 비교했다.

**결과 및 고찰**

**Plasmid DNA 분리 정제**

Alkaline 법으로 *E.coli*에서 plasmid를 분리 정제하여 전기영동한 결과는 Fig. 1과 같다.

형질전환을 목적으로 사용되는 DNA는 순도가 높아야 하는데 여기서 분리된 plasmid DNA는 260 nm와 280 nm의 흡광도 비가 1.84로 더 이상의 정제과정 없이 직접 형질전환에 사용되었다.

**Electroporation 조건 검토**

전술한 조건하에서 electroporation을 행하고 FDA 처리로 원형질체의 생존율을 조사한 결과 원형질체의 생존율은 voltage가 증가할수록 감소하였으나 burst율은 증가하였다(Fig. 2). Hwang과 Hwang<sup>13)</sup>의 보고에서와 같이 이는 전기충격시 높은 열의 발생으로 원형질체의 생존율이 감소한 것으로 생각된다.

electroporation을 통한 methylene blue dye 삽입은 1.77 kV/cm, 40  $\mu$ sec일 때 가장 좋았으나(Fig. 3) voltage가 더 증가하게 되면 dye 삽입율이 줄어들었는데 그것은 원형질체가 깨지기 때문이다. Hwang과 Hwang<sup>13)</sup>의 electroporation 조건 검토 결과에서는 750 V/cm에서

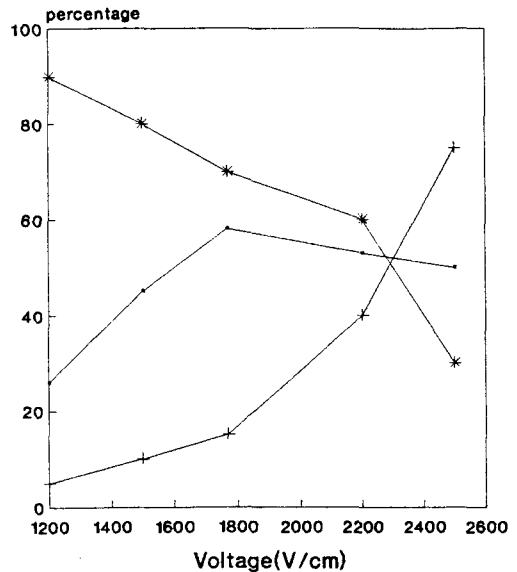


Fig. 2. Percentages of methylene blue-stained, burst and biable protoplast influenced by the applied voltages. ●, stained protoplasts; +, burst; \*, viability.

생존율 60%인 결과를 보여주고, Nishiguchi 등<sup>14)</sup>의 담배 원형질체에 대한 TMV의 유도실험에서는 200 V(0.67 kV/cm), 10 msec일 때 원형질체의 80~90%가 TMV에 의해 감염되었다는 보고들이 있다. 또한 Planckaert와 Walbot<sup>15)</sup>도 maize의 형질전환에서 450 V/cm가 가장 이상적이었다고 하였는데 이는 식물재료나 세포의 연령, 크기, 조직의 구성요소 등에 따라 차이가 나는 것으로 보여진다.

**원형질체융합**

Callus에서 분리한 protoplasts를 전장하에서 융합 시키는 조건을 확립하기 위한 예비 실험 결과 pearl chain 형성이 1 MHz, 40 V/cm의 10 sec와 15 sec에서 가장 양

호하였다. 따라서 pearl chain 형성이 양호한 이상의 두 조건에서 직류 전압과 처리시간을 달리하여 융합율과 생존율을 조사한 결과는 Table 1에 나타낸 바와 같다. 즉 교류 1 MHz, 40 V/cm, 15 sec의 전장과 직류 0.5 kV/cm, 60 μsec에서 12.7%의 융합율과 81.2%의 생존율을 나타내어 가장 양호하였으며, 다음으로 직류 1 kV/cm,

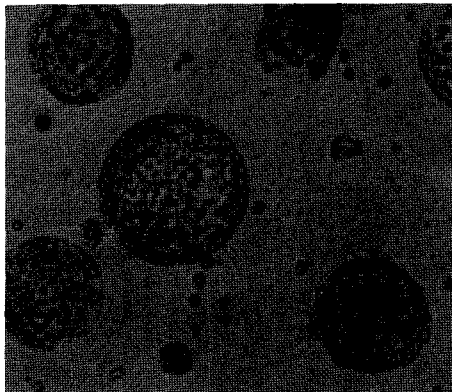


Fig. 3. Protoplasts stained with methylene blue by electroporation.

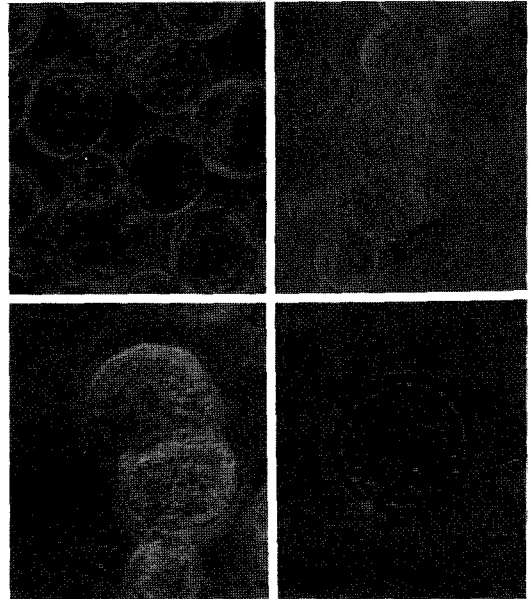


Fig. 4. Protoplast fusion process. A, isolated protoplasts; B, pearl chain formation; C, partially fused protoplast; D, fully fused protoplast.

Table 1. Effects of the DC pulse under the selected AC conditions on the fusion and vitality of the pearl-chained protoplasts

DC Amplitude (kV/cm)	Time (μsec)	No. of protoplasts tested	AC pulse			
			1 MHz. 40 V/cm. 10 sec		1 MHz. 40 V/cm. 15 sec	
			Fusion (%)	Vitality (%)	Fusion (%)	Vitality (%)
0.5	20	54	7.40	85.2	7.97	84.8
	40	55	5.43	80.6	9.09	81.2
	60	55	4.44	83.0	12.72	81.2
	80	54	4.44	84.4	9.25	81.4
1.0	20	53	9.85	84.1	9.43	83.0
	40	53	10.37	80.0	9.43	83.0
	60	53	10.08	86.0	12.37	81.1
	80	53	8.15	81.5	5.66	81.1
1.5	20	54	4.95	86.5	5.56	81.5
	40	53	7.71	82.0	5.56	81.5
	60	55	Burst	Burst	Burst	Burst
	80	55	Burst	Burst	Burst	Burst

60  $\mu\text{sec}$ 에서 12.4%의 융합율과 81.1%의 생존율을 나타내었다. 그러나 직류 1.5 kV/cm, 60  $\mu\text{sec}$  이상에서는 protoplasts가 80% 이상 파괴 되었다. DC pulse 조건은 원형질체의 형태나 source에 따라 다양하지만 본 실험은 일반적 범주인 1 kV/cm, 10  $\mu\text{sec}$ 에서 2 kV/cm, 50  $\mu\text{sec}^{16)}$ 에 속하고 있었다. Fig. 4는 분리된 원형질체(A)가 pearl chain(B)을 형성한 뒤에 융합되어 가는(C, D) 과정을 나타낸다.

**배지의 종류에 따른 원형질체의 배양**

배지조성에 따른 세포분열 및 colony 형성에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig. 5에서와 같이 세포분열은 KM8P 배지와 AA액체 배지가 각각 37%, 36%로 좋았고, colony형성은 AA액체배지와 KM8P배지가 각각 8.1%, 7.7%로 높았으나 MS와 B5 고체배지는 colony 형성이 매우 저조하였다. 이는 Kouider 등<sup>17)</sup>이 *Malus x domestica* cv. 'Jonathan' callus에서 분리한 protoplasts를 KM-8P 배지에, Gatenby와 Cocking<sup>18)</sup>이 kale protoplast를 B5 배지에, Ni와 Hazel<sup>19)</sup>이 *Vitis rotundifolia* cv. protop-

last를 B5 배지에, Bidney 등<sup>20)</sup>이 *Brassica oleracea*의 mesophyll protoplast를 MS 배지에 배양하였을 때 가장 효과적이라는 보고 와는 차이를 나타냈고, Toriyama와 Hinata<sup>21)</sup> 그리고 Lee와 Kim<sup>22)</sup>이 rice protoplasts를 AA 배지에 배양하였을 때 가장 효과적이라는 보고와는 일치하였으나 본 실험결과에서는 KM8P 배지가 AA액체 배지와 거의 동등한 효과를 나타냈다. Fig. 6은 pBin19 plasmid DNA(kanamycine 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )를 전기충격법으로 원형질체에 도입시켜 형질전환시킨 뒤에 kanamycine이 첨가된 KM8P 배지에서 배양시킨 결과 microcalli가 생육하는 것을 관찰할 수 있었다.

**감사의 글**

본 연구는 1991년도 교육부 학술연구조성비(유전공학)에 의하여 수행된 결과입니다.

**참 고 문 헌**

1. Bates, G. W., Piastuch, W., Riggs, C. D., and Rabussay, D.: Plant Cell Tissue Org. Cult., 12 : 213(1988)
2. Saunders, J. A., Matthews, B. F. and Miller, P. D.: In 'Electroporation and Electrofusion in Cell Biology', Neumann, E., Sowers, A. E., and Jordan, C. (eds), Plenum Press, New York, pp. 343-354(1989)
3. Wolf, H., Puhler, A. and Neumann, E.: Microbiol Biotechnol 30 : 283(1989)
4. Zhang, H. M., Yang, H., Rech, E. L., Golds, T. J., Davis, A. S., Mulligan, B. J., Cocking, E. C. and Davey, M. R.: Plant Cell Reports, 7 : 379(1988)
5. 大澤省三, 堀田康雄: 細胞 生理學 實驗法, pp. 210 : 213, 廣川書店(1990)
6. 鈴木裕行, 山本德監: 遺傳子 操作의 基本 手技, 東北大學, pp. 15-21(1990)
7. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.: In 'Molecular cloning', Cold Spring Harbor Lab. Press, pp1. 25-1.31.(1989)
8. Zimmerman, V. and Schurich, P.: Planta, 151 : 26 (1981)
9. Murashige, T., and Skoog, F.: Physiol. Plant, 15 : 473(1962)
10. Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K.: Exp. Cell Res. 50 : 151(1968)
11. Kao, K. N. and Michayluk, M. R.: Planta (Berl.), 126 : 105(1975)
12. Toriyama, K., Kameya, T. and Hinata, K.: Planta, 170 : 308(1987)
13. Hwang, S. J. and Hwang, B.: Korean J. Bot., 34 : 19

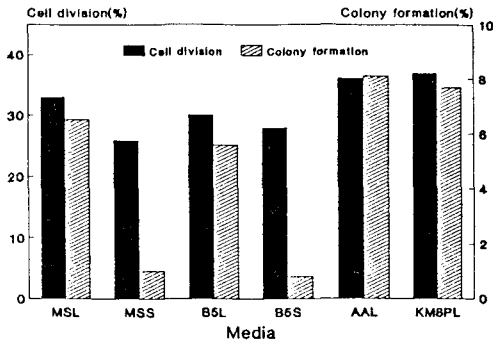


Fig. 5. Effects of various culture media on cell division and colony formation in protoplast culture.

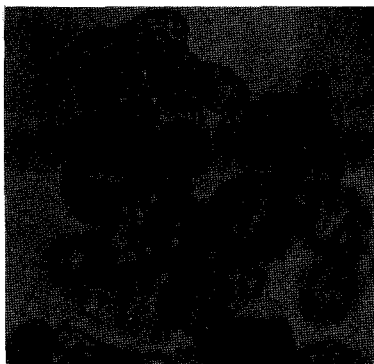


Fig. 6. Geranium callus transformed with nptII.

- (1989)
14. Nishiguchi, M., Sato, T. and Motoyoshi, F.: Plant Cell Reports, 6 : 90(1987)
  15. Planckaert, F. and Walbot, V.: Plant Cell Reports, 8 : 144(1989)
  16. Bates, G. W.: In 'Guide to Electroporation and Electrofusion', Chang, D. C. (ed), Academic Press, Inc., pp. 250-254(1992)
  17. Kouider, M., Hauptmann, R., Widholm, J. M., Skirvin, R. M. and Korban, S. S.: Plant Cell Reports, 5 : 142(1984)
  18. Gatenby, A. A. and Cocking, E. C.: Plant Sci. Lett., 8 : 275(1977)
  19. Ni, L. and Hazel, Y. W.: Plant Cell Reports, 7 : 531 (1988)
  20. Bidney, D. L., Shepard, J. F. and Kaleikau, E.: Protoplasma, 117: 89(1983)
  21. Toriyama, K and Hinata. K.: Theor. Appl. Genet., 76 : 665(1988)
  22. Lee, Y. H. and Kim, H. I.: Korean J. Plant Tissue Culture. Vol. 18. No. 1 : 7(1991)
  12. Murashige, T. and Skoog, F.: Physiol. Plant, 15 : 473(1962)

---

### **Electrofusion and preparation of transgenic plant by direct insert of marker gene**

Kyung-Ae Hong, Ki-Jung Riu, In-Sup So, Yang-Lok Kim and Zang-Kual U. (Cheju Applied Radioisotope Research Institute, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea)

**Abstract :** The conditions required for plant transformation through the electroporation system and for the electrofusion of the protoplasts were investigated for geranium (*Pelargonium zonale hybrids*). The optimum condition for electroporation was 1.77 kV/cm for 40  $\mu$ sec under which 70% of the protoplasts were viable and 58% of the viable protoplasts were stained with methylene blue. The pBin19 DNA plasmid used as a carrier vector was isolated from *E.coli* DH5 $\alpha$  strain, purified, identified by the electrophoresis on agarose gel and electroporated into the protoplasts. The KM8 liquid medium gave better cell division than any other media. One MHz of AC frequency with 40 V/cm of amplitude for 15 sec followed by 0.5 kV/cm of DC amplitude for 60  $\mu$ sec was most efficient for the electrofusion of protoplasts.