

DNA imbibition을 이용한 벼의 형질전환과 vector 개발

유 준 희 · 남 홍 길* · 정 구 흥

서울대학교 생물교육과 및 세포분화 연구센터, 포항공과대학 생명과학과*

Rice Transformation by DNA Imbibition and Construction of Plant Vector

Jun-Hi Yoo, Hong-Gil Nam* and Gu-Hung Jung

Department of Biology Education and Research Center for Cell
Differentiation, Seoul National University, Sillim-Dong, Kwanak-Ku, Seoul, 151-742, Korea
Pohang Institute of Science And Technology P. O. Box 125, Pohang, 790-620, Korea

ABSTRACT

A vector for plant transformation which had two reporter genes(Gus and Hpt genes) in a single plasmid was constructed. After rice embryos imbibed DNA solution, DNA uptake and gene expression in rice were monitored. Main expression sites of the Gus gene were meristem of root and coleoptiles. There was no difference in Hpt gene expression between a single Hpt vector and the constructed vector in viability of rice in the hygromycin medium after DNA imbibition, The genomic DNA and total RNA extracted from rice transformant survived in the hygromycin medium were subjected to PCR and RT-PCR analysis, respectively. As a result, we found the existence of the Hpt gene and its expression in rice.

서 론

단자엽식물에 속하는 벼의 형질전환 방법에는 여러 가지가 있는데 대부분이 현탁배양을 통하여 원형질체를 얻은 후 naked DNA를 electroporation(1)이나 PEG(2)를 이용하여 직접 전달하는 방법들이 있고 그외에 shotgun을 이용하여 조직에다 DNA를 직접 전달하는 particle bombardment(3) 등이 있다. 그러나 앞의 방법들의 대부분은 어렵고 힘든 원형질체배양의 단계를 거치거나 비싼 기구를 사용하여야 하는 제한점을 가지고 있다.

본 연구에서는 단자엽 식물의 형질전환에 대한 모델이 될 수 있는 벼의 종자에, 위 방법의 단점을 극

복할 수 있는 손쉬운 방법을 이용하여 plasmid DNA를 transfer시켰다. 즉 벼의 종자를 자연건조시킨 후 embryo를 떼내어 DNA 용액을 imbibition시켜 DNA uptake와 그 발현을 연구하였다. 이 방법의 원리는 명확하게 밝혀 있지 않지만, 종자가 자연건조되면 세포막들의 생리화학적 변화를 일으키게 되며 이때 DNA용액을 imbibition시키면 imbibition damage에 의하여 세포내로 물질이 출입할 수 있게 되고(4) 이 상태를 이용하여 DNA를 세포내로 흡수시키는 것으로 알려져 있다. 이 방법을 이용한 식물의 형질전환은 계속 논쟁이 되어왔으나 이미 다수 보고가 된 바 있었다(5-10). 또한 이미 저자의 전 연구에서도 표지유전자를 이용하여 벼의 종자에

imbibition시킨 결과, 유전자의 발현과 발현된 벼에서 외부유전자가 integration되었음을 보였다(논문투고중).

식물을 형질전환시킬 수 있는 plasmid DNA는 대부분 chimeric vector로 한 개의 표지 유전자만을 갖는다. 이 한 개의 표지유전자를 갖는 vector를 이용하여 식물의 형질전환의 여부를 가리기에는 부족한 점이 있다. 그래서 서로 다른 표지유전자를 갖는 두 개의 vector들을 이용하여 식물체를 cotransformation시켜 독립된 두 개의 유전자의 발현을 알아보는 방법이 있으나, 이 방법도 cotransformation의 효율이 20~30% 밖에 가능하지 않은 제한점을 가지고 있다(11). 만일 두 개의 reporter gene을 나란히 붙여 한 개의 plant vector로 이용할 수 있다면 cotransformation보다는 많은 장점을 가질 수 있을 것이다. 즉 항생배지에서 첫번째 선별을 거친 후 두번째 효소분석을 하여 완전한 형질 전환체를 얻을 수 있을 것이다. 그래서 β -glucuronidase(Gus) gene과 hygromycin에서 생존할 수 있는 hygromycin phosphotransferase(Hpt) gene를 이용하여 두 개의 유전자를 한 개의 plasmid에 나란히 붙이고 그 사이에 유용한 유전자를 넣을 수 있도록 multiple cloning site를 넣은 vector를 고안하였다.

이 연구의 목적은 위의 과정을 통하여 개발된 vector를 이용하여 벼의 종자에 DNA용액을 imbibition시켜 DNA uptake 및 그 발현을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

재조합 vector의 개발

Vector 개발에 사용한 Gus gene vector와 Hpt gene vector는 크기가 5.7Kb, 6Kb이고 두 vector 모두 promoter로 Cauliflower mosaic virus의 35S rRNA 것과 terminator로 nopaline synthase gene을 가지고 있다.

DNA 조작을 통하여 Gus gene을 떼내어 Hpt vector의 Hind III site에 cloning 하였다(Fig. 1). 형질전환에 사용한 *E. coli*는 NM522이고 재조합 plasmid를 구성하는데 필요한 모든 DNA 조작기술은 주로 Maniatis등 (12)의 방법을 따랐다.

벼의 형질전환 및 재양

벼(*Oryza sativa L. cv. Nagdong*)의 걸저를 벗긴 후 Clorax용액을 이용하여 종자를 표면살균하였다.

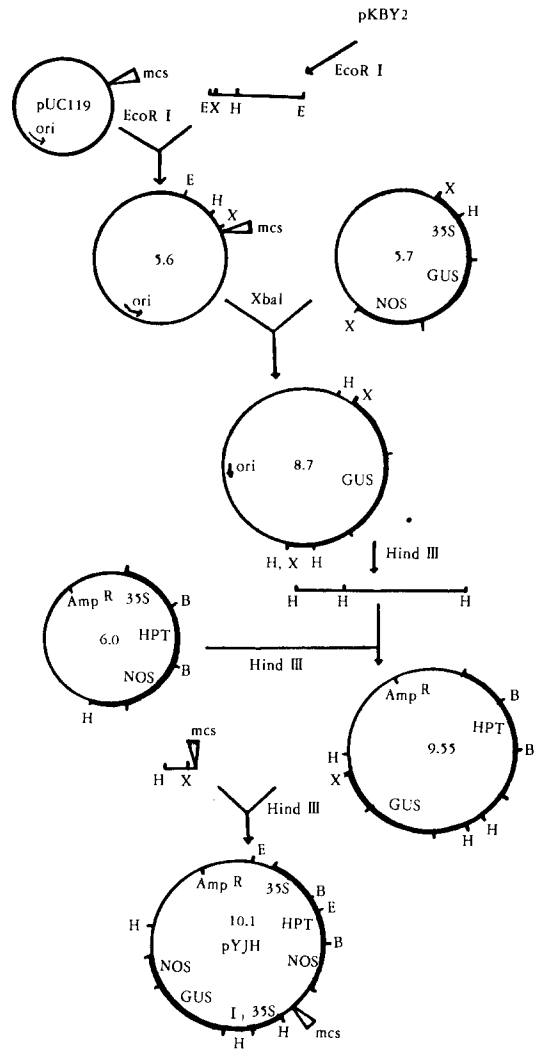


Fig. 1. Schematic diagrams for construction of recombinant plasmid. E; EcoR I, H; Hind III, X; Xba I, B; BamH I, 35S; Cauliflower mosaic virus promoter, GUS; β -glucuronidase gene, HPT; hygromycin phosphotransferase gene, NOS; nopaline synthase polyadenylation region, Amp^r; ampicillin resistant gene, mcs; multiple cloning site.

1주일간 건조시킨 후 그 종자로부터 분리해낸 50~100개의 embryos에 15mM NaCl, 1.5mM Na-

ciate, 20% DMSO용액과 200 μ g/ml의 DNA를 섞어 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 imbibition시켰다(8). DNA용액을 imbibition시킨 embryo를 15mM NaCl, 1.5mM Na-citrate 용액으로 3번 씻어 건조 후, hygromycin B가 들어간 MSO배지(13)에 치상하였다. 배양 1일은 빛이 없는 28 $^{\circ}$ C, 암상태에서 키웠고 2일째부터는 광조건에서 배양하였다.

Hpt gene과 Gus gene의 발현

먼저 예비실험을 통하여 대조군으로 형질전환된 것을 선별할 수 있는 hygromycin B의 농도를 결정하였다. 그 결과 70 μ g/ml을 농도로 결정하였다. embryo를 hygromycin배지 내에 5일간 치상시켜 살아 발아한 것을 선별하고 다시 MSO배지에 옮겨 성체로 2개월간 키운 후 genomic DNA와 RNA의 분석재료로 이용하였다. 1주일 가량 키운 벼 중 일부를 채취하여 0.05% X-gluc, 100 μ g/ml ampicillin용액에서 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 반응시켰다(4). 반응이 끝난 후 70% 에탄올용액에 넣고 풀여 chlorophyll을 제거하였다. Gus gene이 발현된 곳을 광학현미경을 이용하여 확인하였다.

Genomic DNA와 cDNA의 준비

Hygromycin 배지에서 선별한 벼를 2개월 가량 키운 후 DNA와 RNA를 추출하였다. genomic DNA는 Paszkowski등(15)의 방법을 이용하여 추출하고 total RNA는 RNAzolTM B(Biotex Laboratories)용액을 이용하여 분리하였다. cDNA를 만들기 위하여 1 \times PCR buffer, 1mM dNTP, 1unit/ μ l RAasin, random hexamer 100 pmole, 1 μ g total RNA, 100 units MuLV RT(BRL)를 이용하여 역전사 반응을 시켰다. 즉, 상온에서 10분간 둔 후 42 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시키고 95 $^{\circ}$ C에서 5~10분 열을 가한 후 빨리 냉각시켰다. 반응액을 에탄올을 이용하여 침전시키고 50 μ l 물에 녹인 후 그중 6 μ l를 reverse transcription PCR(RT PCR)의 templates로 이용하였다.

Polymerase chain reaction(PCR)

PCR은 primer 2 μ M, 200 μ M dNTP, 1 unit Taq DNA polymerase, PCR buffer, DNA templates를 이용하여 100 μ l reaction으로 행하였다. 사용한 primers의 조성은, sense primer로 5'-AA-AAAGCC-TGAAGTACCGCGACG-3', antisense primer로 5'-TTCCTTTGCCCTCGGACGAG-

TGCT-3'의 oligomers(16)를 사용하였다. annealing 온도는 55 $^{\circ}$ C에서 70초, denaturation과 extension은 94 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C에서 80초, 70초간 하였고 25 cycles을 행하였다. Products의 분석은 1.2% agarose gel에서 이루어졌다. RT PCR은 위와 같은 조건으로 하고 cDNA를 재료로 33 cycles을 행하였다.

Southern blot analysis

재조합 plasmid와 PCR products를 Hybond-N에 transfer한 후, (α -³²P)ATP를 이용하여 random priming labelling을 통하여 얻은 1Kb, Hpt gene과 2.6Kb, Gus gene을 probes로 hybridization시켰다(12).

결과 및 고찰

재조합 vector의 제조

DNA 조작을 통하여 약 10Kb의 vector를 얻었다. 제한효소를 이용하여 자르고 1Kb Hpt gene과 2.6Kb Gus gene을 probes로 Southern blot analysis하여 재조합 vector의 방향과 위치를 입증하였다(Fig. 2A, 2B, 2C).

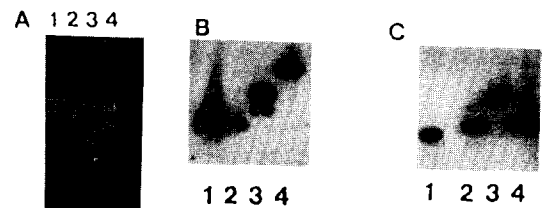


Fig. 2. Restriction enzyme pattern of pYJH and southern blot analysis. A. Restriction enzyme pattern. lane 1; λ Hind III size marker, lane 2; pYJH digested with BamH I, lane 3; pYJH digested with EcoR I, lane 4; pYJH digested with Hind III, B. C. Southern blot analysis of pYJH, using 1 Kb Hpt DNA of gene(B) and 2.6 Kb GUS gene(C) as probes. lane 1; positive control. lane 2; pYJH digested with BamH I, lane 3; pYJH digested with EcoR I, lane 4; pYJH digested with Hind III.

Gus gene과 Hpt gene의 발현

다른 종자의 embryo에 DNA 용액을 흡수시킨 후 5~7일간 키워 Gus expression을 알아보 결과, 배반에서 전반적으로 발현되었으며 잎 중에서도 특히 자엽초에서 강하게 발현되었다(Fig. 3A). 주요발현 부위는 세포분열이 왕성한 곳인 뿌리의 생장점이었다(Fig. 3B).

Hpt gene의 발현결과, hygromycin B, 70µg/ml의 농도를 기준으로 대조군은 생존할 수 없다(Fig. 4). 6Kb의 Hpt vector와 비교하여 재조합 vector의 발현을 차이가 없었다(Table 1). 위의 결과로부터, 크기가 4Kb 더 커진 재조합 vector로 말미암아 그 발현에 있어 원래의 vector와 차이가 없음을 알 수 있었다.

PCR과 RT PCR분석을 통한 벼의 genomic DNA와 RNA의 분석

PCR의 가장 큰 장점은 부족한 copy수의 특성을 유전자를 증폭시켜 확인시킬 수 있는 것으로, 직접적인 genomic Southern analysis의 난점을 해결할

수 있다는 점이다. DNA imbibition을 통하여 얻은 형질전환체는 mosaic이므로 Southern blot analysis를 하기에는 copy수가 부족한 상황에 있었다(논문 투고중). Genomic DNA를 이용하여 PCR과 그 products의 Southern분석을 한 결과 imbibition을 통하여 DNA uptake가 일어났음을 알 수 있었고(Fig. 5) 또한, Hpt gene의 소량 mRNA를 역전사 반응을 통하여 cDNA로 바꾼 후 RT PCR을 하여 그 발현을 증명할 수 있었다(Fig. 6). 즉 RT PCR결과 정상 PCR과 동일한 크기의 1Kb Hpt DNA를 확인하였다. 지금까지의 결과를 종합해 볼 때 DNA 용액의 imbibition을 통하여 세포벽을 소유한 건조한 종자로 DNA uptake가 일어남을 알 수 있었고, 2개월간 키워 벼의 잎으로부터 총 DNA와 RNA를 이용하여 PCR분석을 하였으므로 표지유전자의 발현은 일시적인 transient expression이 아닌 genomic DNA로의 integration의 결과임을 예측할 수 있다.

Table 1. Frequency of Hpt gene expression of vectors in rice. Frequency of expression was calculated as the number of embryos expressing viability in hygromycin medium among the total.

vectors	1	2	3	4	5	mean
pCaMV35SHptN	23%	23%	54%	25%	46%	34%
pYJH	13%	23%	67%	29%	21%	31%

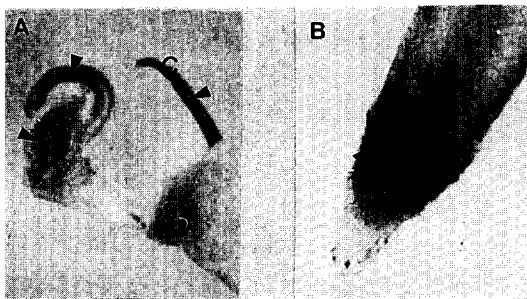


Fig. 3. Histochemical analysis of Gus assay in rice seedlings. Arrows indicate the position of Gus gene expression. C ; coleptile, R ; root, M ; meristem, S ; scutellum.

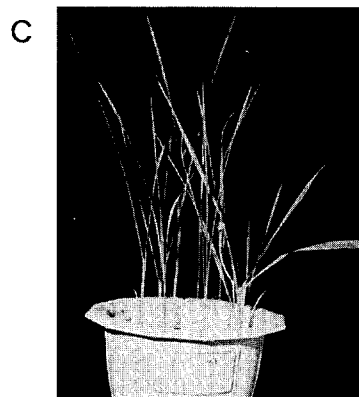
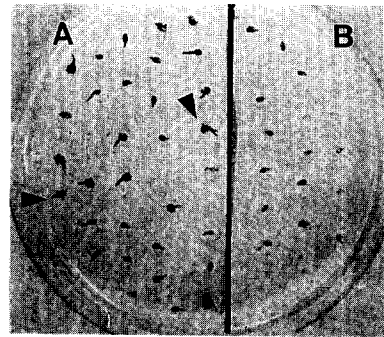


Fig. 4. Rice seedling were grown 3 days in hygromycin medium(A, B) and transformed rice in pot(C). A ; embryos imbibed pYJH DNA, B ; control embryos.

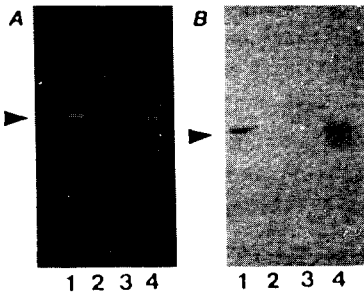


Fig. 5. Analysis of PCR products and Southern blot analysis in rice. lane 1 ; positive control, amplified PCR products of Hpt gene, lane 2 ; λ Hind III size marker, lane 3 ; PCR products of control rice, lane 4 ; PCR products of transformed rice. Arrows indicate 1kb, Hpt DNA.

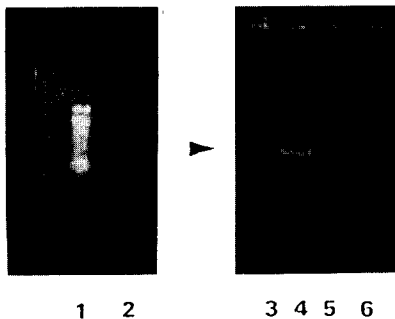


Fig. 6. Analysis of RT PCR products. lane 1 ; total RNA of rice. lane 2 ; cDNA made from reverse transcription reaction of total RNA, lane 3 ; λ Hind III size marker, lane 4 ; positive control, amplified PCR products of Hpt gene, lane 5 ; RT PCR products of transformed rice, lane 6 ; RT PCR products of control rice. Arrow indicates 1Kb, Hpt DNA.

이 방법은 첫째 쉽고, 그외에 간편하며, 시간, 경비를 절약할 수 있으므로 이것을 통하여 많은 식물의 형질전환이 가능하리라 생각하며, 앞으로 모든 식물에게 재현가능한, 최적의 DNA uptake조건에 대한 연구와 다음 세대에서의 발현 등이 연구과제로 남아 있다.

요 약

한 개의 plasmid에 Gus gene과 Hygromycin resistant gene(Hpt)을 합친 vector를 개발하였다. 이 재조합된 DNA를 벼의 건조한 종자에 imbibition시켜 형질전환했을 때, hygromycin 배지에서 선별한 결과 그 발현율은 single Hpt vector와 차이가 없었으며, 주로 뿌리의 생장점이나 자엽초에서 Gus expression을 볼 수 있었다. 또한 hygromycin 배지에서 선별되어 성체가 된 개체에서 그 genomic DNA를 뽑아 PCR을 한 결과 1Kb Hpt gene을 확인하였다. 그리고 성체에서 추출한 총 RNA에서 cDNA를 만든 후 reverse transcription PCR을 통하여, 외부 유전자의 발현을 증명하였다.

감 사

이 연구는 한국과학재단의 기초연구(911-0411-035-2)와 세포분화연구센터(92-4-3)의 지원으로 진행되었으며 pCaMV35SHptN과 pCaMV-35SI₁GusN을 제공하여 주신 백경희 박사, 남백희 박사께 감사드립니다.

참고문헌

1. M. E. Fromm, L. P. Taylor, V. Walbot(1985), Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **82**, 5834.
2. R. D. Shillito, M. W. Saul, J. Psszkowski, M. Muller, I. Potrykus(1985), *Boi/Technology*, **3**, 1099.
3. J. M. Klein, E. D. Wolf, R. Wu, J. C. Sanford (1987), *Nature*, **327**, 70.
4. S. C. Spaeth(1987), *Plant Physiol.*, **85**, 217.
5. L. Ledoux and R. Huart(1969), *J. Mol. Biol.*, **43**, 243.
6. L. Ledoux, R. Huart, M. Jacobs(1971), *Eur. J. Biochem.*, **23**, 96.
7. L. Ledoux, R. Huart, M. Jacobs(1974), *Nature(Lond.)*, **249**, 17.
8. R. Topfer, B. Gronenborn, J. Schell, H. Steinbiß(1989), *The Plant Cell*, **1**, 133.
9. R. Topfer, B. D. Mckersie, K. J. Kasha, J. D. Procnier(1991), *Plant Science*, **79**, 223.
10. T. Senaratna, B. D. Mckersie, K. J. Kasha, J. D. Procnier(1991), *Plant Science*, **79**, 223.

11. J. Peng, L. A. Lyznik, L. Lee, T. K. Hodge (1990), *Plant Cell Reports*, **9**, 168.
12. T. Maniatis, E. F. Fritsch, I. Sambrook (1989), *Molecular Cloning A Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
13. T. Murashige and F. Skoog(1962), *Physiol. Plant*, **15**, 473.
14. R. A. Jefferson. T. A. Kavanagh, M. W. Beran(1987), *Nature*, **327**, 70.
15. J. Paszkowski, R. D. Shillito, M. Saul, V. Mandak, *EMBO J.*, **3**, 2717.
16. L. Gritz and J. Davies(1983), *Gene*, **25**, 179.