

TMV 외피 단백질 유전자의 연초로의 형질전환

이기원, 박성원, 김남원, 박은경
한국인삼연초연구원 원료연구부

Tobacco plant transformed with a coat protein gene sequence of TMV

K.W. Lee, S.W. Park, N.W. Kim, E.K. Park
Korea Ginseng & Tobacco Research Institute

ABSTRACT : A double-stranded cDNA fragment (436bp) encoding coat protein of tobacco mosaic virus(TMV) was derived from the total 480nucleotides gene after reverse transcription of TMV RNA, and subcloned into a plant expression vector pBI 121, resulting in pBL 430.

The plasmid DNA containing this chimeric gene was moved from *E. coli* to *Agrobacterium tumefaciens* strain A281, and was introduced into the tobacco plant by the *Agrobacterium* Ti-mediated transformation system.

The transformants were selected on a selection media containing kanamycin. The shoots and roots could be differentiated from the explants and whole plants were obtained. From Southern blot hybridization analysis, DNA extracted from transformants, it could be confirmed that the chimeric gene fragment was inserted into the genomic DNA of tobacco plant.

서론

고등식물에 질병을 일으키는 바이러스는 현재 600여종이 보고되어 있으나 바이러스에 대한 연구는 대부분이 virus 피해조사 및 chemical에 의한 virus 발병 억제에 관한 연구가 대부분이며, virus중 TMV는 대표적인 식물 바이러스로써 연초의 모자이크병 뿐만 아니라 고추, 가지 등 주요 작물에 피해를 주는 광범위한 숙주범위를 나타내어 그 피해가 점차 커지고 있다. TMV에 대한 피해를 근본적으로 줄이기 위해서는 TMV내성 품종을 육성해야 하는데, 담배의 경우 TMV내성 유전자는 single dominant로서, 여교잡에 의한 순계분리가 가능한데 이에겐 오랜 세월이 소요되며, 특히 TMV 저항성 인자는 담배의 생장 및

당함량에 관련된 수량 및 품질에 좋지않은 영향을 주는 인자들과 염색체상에 근접해 있으므로 재래식 교잡육종에는 한계에 도달한 실정이다. 또한 약독성 바이러스를 작물에 사전 감염시켜 일종의 저항력을 부여하는 "cross-protection"이란 방법을 시도해 보았으나, 효율성이 낮아 virus 완전방제에는 크게 미흡한 실정이다. 그러나 연초에서 TMV의 완전 내병성 품종 육성에는 도달치 못하더라도 발병을 수확 이후로 지연시켜도 수확엽에는 아무런 피해가 없으므로 성공이라 할 수 있겠다. 최근 virus의 coat protein 유전자를 연초에 도입하였을 때 virus의 감염 증상이 늦게 나타난다는 사실이 보고^{1,12)}된 이후에 이에 대한 연구가 국내외에서 활발히 진행되어, 토마토에서의 유사한 보고¹⁴⁾, 그리고 cucumber mosaic virus^{2,7)}, al-

falfa mosaic virus¹⁾, potato virus X^{8, 9)} 등 virus coat protein 유전자 및 TMV nonstructural 유전자의 cDNA가 도입된 연초에서 virus 감염이 저해되었다고 보고⁶⁾되고 있는 실정이다. TMV의 구조는 단백질이 95%, RNA가 5%를 차지하고 있고 2130개의 subunit로 구성되어 있으며 각각의 subunit는 153개의 아미노산으로 이루어져 있으며 두께가 18nm이고 길이가 300nm인 막대 모양이다⁵⁾. TMV의 유전자의 coat protein부분은 염기서열 5712 nucleotides에서 619 nucleotides까지 전체 480 nucleotides로 구성되어 있으며³⁾, 연초에 도입하여 발현되기 위하여는 그에 대한 complementary DNA를 합성하여 강력한 promoter를 가지고 있는 식물 발현 vector에 삽입되어야 한다.

따라서 본 실험에서는 TMV coat protein의 cDNA를 NPT II gene과 CaMV 35S promoter 및 NOS terminator를 포함하고 있는 식물발현 vector에 재조합한 후 *Agrobacterium*을 이용하여 연초에 도입시켰으며 TMV CP cDNA가 도입된 연초조직으로부터 완전한 형질전환 식물체를 얻었기에 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. DNA의 정제

E. coli 균주에서 plasmid의 분리는 alkaline lysis 방법¹⁵⁾을 사용하였다.

2. 제한 효소의 처리

본 실험에 사용된 제한효소는 *Bam* H I, *Bgl* II, *Dra* I *Hind* III, *Sac* I, *Sma* I, *Pst* I 등이며, 제한효소는 5 unit/ μ g DNA로 각각 사용하였으며, 반응온도는 *Sma* I 이 30°C처리 하였고 나머지는 37°C에서 반응 시켰다.

3. DNA의 ligation

DNA의 ligation은 vector DNA 5 μ g, insert DNA 5 μ g, 10 \times ligase buffer 2.5 μ l, dH₂O 11 μ l을 ice-bath상에서 조제후 ligase 1.5 μ g을 첨가하여 총량 25 μ l를 16°C에서 하룻밤 반응 시켰다.

4. TMV CP cDNA의 plant expression vector로의 subcloning

pBluescript II KS+에 삽입되어 있는 TMV CP cDNA를 *Dra* I, *Sac* I으로 절단하였고 이 fragment는 plant expression vector pBI 121의 *Sma* I, *Sac* I 자리에 ligation 시켰다. 이를 freeze-thaw 방법¹⁰⁾에 의하여 *A. tumefaciens* A281에 형질전환 하였다.

5. 연초의 형질전환

온실에서 4-8주 동안 재배된 연초 (*Nicotiana tabacum* L. line - KF 109)의 잎을 표면살균하여 이미 배양되어 있는 *A. tumefaciens* A281과 함께 48시간 동안 동시배양한 후 BA 0.5 μ g/ml, kanamycin 100 μ g/ml, cefotaxime 300 μ g/ml가 첨가된 MS배지에 치상하여 형질전환체를 선발하였다.

6. 핵산 분석

대조구 및 형질전환체 연초의 DNA를 SDS법에 의하여 분리하였으며¹⁵⁾, 분리 정제된 DNA는 제한효소로 절단하여 0.8% agarose gel에서 전기영동으로 분리한 후 nylon membrane에 capillary transfer하고 P³²-dCTP가 labelling된 pBL430의 *Eco*R I - *Hind* III 절편 probe를 이용하여 DNA-DNA hybridization 하였다.

결과 및 고찰

1. TMV CP cDNA의 subcloning

TMV CP cDNA를 포함하고 있는 1320bp를 pBluescript II KS+의 *Hind*III, *Pst* I site에 삽입하여 얻은 plasmid를 pBT1.3이라 명명하였으며, 이를 *Hind*III와 *Pst* I으로 절단하여 0.8% agarose gel 전기영동을 하였을 때 1.3 Kbp 크기의 band를 Fig. 2의 lane 5에서와 같이 확인할 수 있었다. 1320bp중 TMV CP를 합성하는 sequence는 약 480bp로서 그 염기서열이 Table 1에 제시 한바와 같고 이는 TMV vulgare strain과 100%, TMV strain Tomato L과 76%, 그리고 Cowpea strain과는 57%의 일치도를 보였는바, 본 실험에서는 이를 함유하는 pBT1.3을 식물에 도입되어 발현할 수 있는 vector재조합에 이용하였다.

TMV 외피 단백질 유전자의 연초로의 형질전환

Table 1. The nucleotide sequence of cDNA clone of the genomic RNA of TMV common strain
START

... TTA AAT ATG TCT TAC AGT ATC ACT ACT CCA TCT CAG TTC GTG TTC TTG TCA TCA GCG TGG
GCC GAC CCA ATA GAG TTA ATT AAT TTA TGT ACT AAT GCC TTA GGA AAT CAG TTT CAA ACA CAA CAA
GAT CGA ACT GTC GTT CAA AGA CAA TTC AGT GAG GTG TGG AAA CCT TCA CCA CAA GTA ACT GTT AGG
TTC CCT GAC AGT GAC TTT AAG GTG TAC AGG TAC AAT GCG GTA TTA GAC CCG CTA GTC ACA GCA CTG
TTA GGT GCA TTC GAC ATC AGA AAT AGA ATA ATA GAA GTT GAA AAT CAG GCG AAC CCC ACG ACT GCC
GAA ACG TTA GAT GCT ACT CGT AGA GTA GAC GAC GCA ACG GTG GCC ATA AGG AGC GCG ATA AAT AAT
TTA ATA GTA GAA TTG AGC AGA GGA ACC GGA TCT TAT AAT CGG AGC TCT TTC GAG AGC TCT GCT GGT
TTG GTT TGG ACC TCT GGT CCT GCA ACT TGA

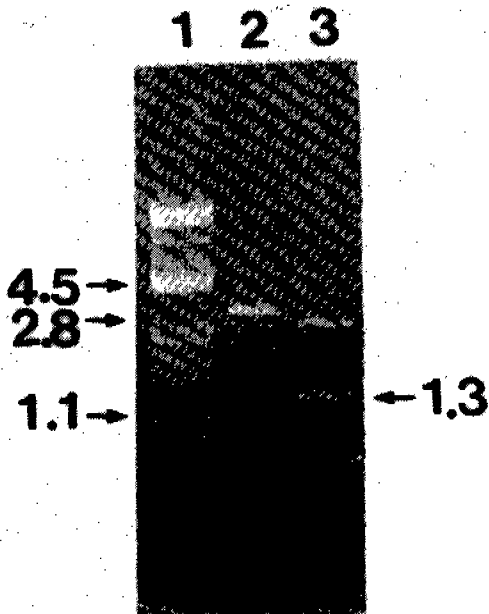


Figure 1. Electrophoretic band pattern of plasmid pBluescript II KS+ and pBT1.3 on a 0.8% agarose gel Lane 1 : Marker Lane 2 : pBluescript II KS+ lane 3 : pBT1.3 double digested with *Hind*III and *Pst* I.

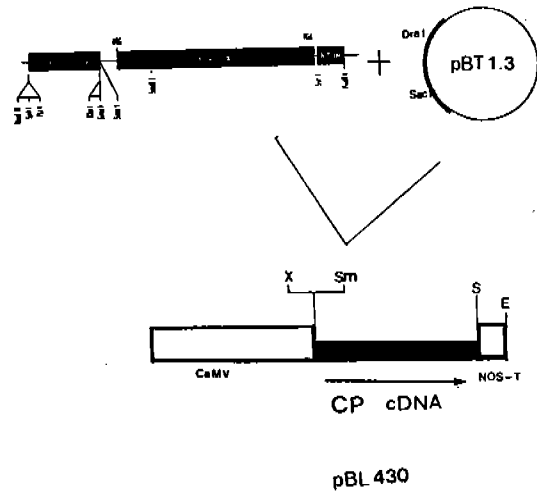


Figure 2. Structure of the plasmid pBL 430 containing the TMV coat protein cDNA. The 436 bp *Dra* I/*Sac* I fragment encoding the TMV CP cDNA was inserted into *Sma* I/*Sac* I site of pBI 121 between CaMV 35S promoter and NOS terminator. The resulting plasmid pBL 430 was introduced into a *A. tumefaciens* strain A 281, carrying pTiBo542 plasmid (Hood *et al.* 1986). Leaf disks of *N. tabacum* L. (line KF - 109) were transformed with *A. tumefaciens* containing pBL 430, selected for kanamycin resistance and regenerated into plants

2. Plant expression vector의 재조합

pBI121을 *Sma* I, *Sac* I으로 절단하여 GUS gene부분을 제외하고 나머지 fragment를 정제하여 pBT1.3의 *Dra* I/*Sac* I fragment(약 436 bp)를 삽입한 plasmid pBL430을 재조합 하였는데 (그림 2) 이는 promoter와 TMV CP cDNA가 ligation된 부분에 restriction site가 존재하지 않으므로 이를 *Hind*III, *Sac* I으로 이중 절단하여 0.8% agarose gel상에서

전기영동을 실시하였을 때 CP cDNA 430 bp와 CaMV 35S promoter를 포함하는 약 1.0Kbp의 band를 그림 3의 lane 5에서 확인할 수 있었다. 이렇게 재조합된 plasmid는 식물에서 발현될 수 있는 strong promoter인 CaMV35S promoter, NOS terminator, marker로서 kanamycin의 내성을 가지는 NPT II gene, 그리고 외부 DNA를 식물세포로 이동시키는데 필요한 유전자(cis-acting element)인 T-DNA의 border

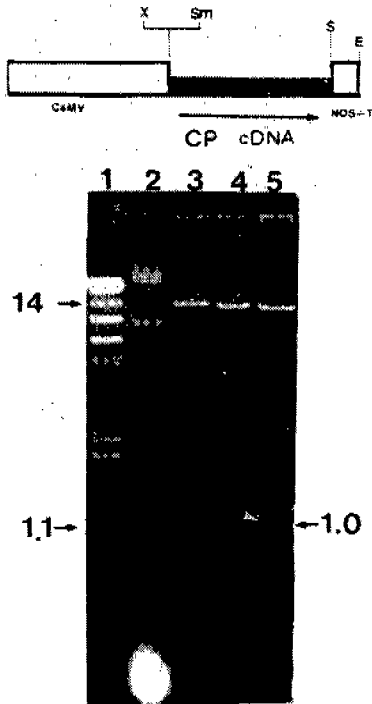


Figure 3. Electrophoretic band pattern of plasmid pBL 430 on a 0.8% agarose gel Lane 1 : Marker Lane 2 : pBL 430 intact DNA Lane 3 : pBL 430 DNA digested with *Sac* I Lane 4 : pBL 430 DNA digested with *Hind* III Lane 5 : pBL 430 DNA double digested with *Sac* I and *Hind* III

sequence를 모두 포함하고 있어 TMV CP cDNA가 식물체로 도입되고 발현되므로서 형질전환체의 선발이 가능할 것으로 판단되었는 바, 이 vector를 *A. tumefaciens* A281에 freeze-thaw 방법으로 형질도입하고 kanamycin 50 $\mu\text{g/ml}$ 가 포함되어 있는 선택배지에서 선발하여 이 유전자의 연초내 도입에 이용하였다.

3. 연초의 형질전환체선발

식물체 형질전환은 pBL 430로 형질전환되어 있는 *A. tumefaciens* A281을 온실에서 4-8주 재배한 *Nicotiana tabacum* L. (line-KF 109)에서 얻은 연초의 leaf disk와 동시배양하는 *in vitro* cocultivation 방법을 사용하였고, MS 배지에 BA 0.5 $\mu\text{g/ml}$, kanamycin 100 $\mu\text{g/ml}$, *Agrobacterium*을 제거하기 위한 cefotaxime 300 $\mu\text{g/ml}$ 이 포함되어 있는 shoot induction 배지에 치상하였고, 28°C 2500 lux 16시간 일장 조건으로 배양하였을 때 약 4-6 주후에 shoot가 형성되었다(그림 4). 비록 항생제가 들어있는 선택배지에서 shoot가 유기되었다 해도 형질전환체가 아닌 경우가 있지만 뿌리는 항생제에 매우 민감하므로 형질전환된 식물체에서만 뿌리가 형성된다는 보고^{11, 13)}가 있어 선택배지에서 정상적인 생육을 하는 shoot KA9343, KA9342, KA9346, KA9348, KA93411를 절단하여 kanamycin이 포함되어 있는 MS배지에 옮겨 뿌리 형성여부를 확인하였던 바, 90% 이상의 뿌리



Figure 4. Tobacco shoots induced directly from cocultured *N. tabacum* leaf tissues with *A. tumefaciens* A281 containing pBL 430 plasmid, and then cultured on the MS selection medium containing 100 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ BA and cefotaxime 300 $\mu\text{g/ml}$ for 4 weeks

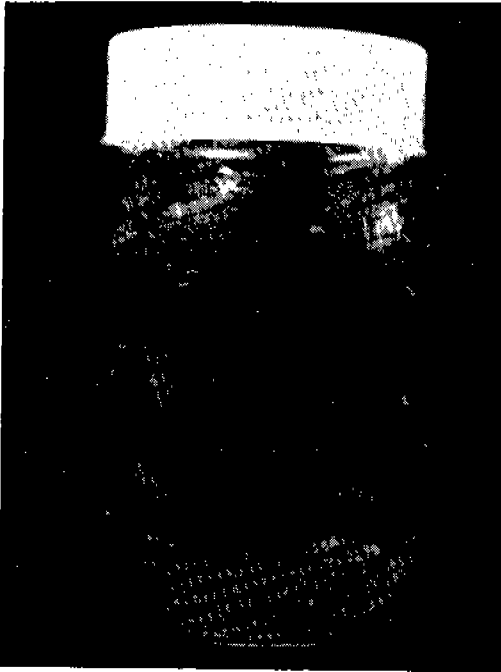


Figure 5. Roots formation from shoots on the MS selection medium containing 100 µg/ml kanamycin



Figure 7. Southern blot analysis for the cDNA of TMV CP from transformed tobacco plants. Lane 1, *EcoR* I / *Pst* I digested total DNA from nontransformed tobacco plant : Lane 2 - 6, *EcoR* I / *Pst* I digested total DNA from transformed plant KA 9343, KA 9342, KA 9346, KA 9348, KA 93411. The 1.5Kb *EcoR* I - *Hind*III fragment was used as a probe



Figure 6. Transgenic whole plant, *Nicotiana tabacum* L. (line - KF 109) developed from cocultured tissue with *A.tumefaciens* A281 containing pBL 430 plasmid and selected by kanamycin resistance.

형성음을 보였다(그림 5). 이들 뿌리가 형성된 재분화 유식물체를 살균된 토양에 옮겨갈 때 대부분 건전하였고 정상적인 모양을 갖추고 있었다(그림 6).

4. 재분화 식물체의 DNA 분석

TMV CP cDNA가 포함되어 있는 *EcoR* I - *Hind*III fragment 1.5Kbp를 probe로 이용하여 kanamycin에 내성이 있는 재분화식물체의 DNA에 Southern blot hybridization 하였을 때 나타난 band로 보아(그림 7) TMV CP cDNA가 연초식물체에 삽입되었음을 확신할 수 있었다.

결 론

1. TMV CP cDNA를 식물에 도입하기 위하여 식물 발현벡터 pBL 430을 재조립하였고,
2. 이 발현벡터를 *A. tumefaciens* A281에 도입하였으며, 이를 이용하여 *Nicotiana tabacum* L. (line KF-109)에 형질전환 하여 재분화 식물체 KA 9343, KA9342, KA9346, KA9348, KA93411등을 얻었으며 토양에 옮겨 건전한 식물체를 확보하였다.
3. 재분화 식물체의 DNA를 TMV CP cDNA와 Southern hybridization 하였을 때 TMV CP cDNA가 식물체의 chromosome상에 삽입되었음을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Anderson, E.J., D.M. Nelson, R.S. Powell, N.E. Tumer and R.N. Beachy. 1989. *Pytopathol.* 79 : 1284 - 1290.
2. Cuzzo, M., K.M. O'Connell, W. Kaniexski, R.X. Fang, N.H. Chua and N.E. Tumer. 1988. *Bio/Tech.* 6 : 549 - 557.
3. Dawson, W.O., D.L. Beck, D.A. Knorr and G.L. Grantham. 1986. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 : 1832 - 1936.
4. Draper, J., S. Roderick and J. Hamil. 1988. *Plant Genetic Transformation and Gene Expression - A Laboratory manual.* Blackwell Scientific Publications pp. 71 - 160.
5. Fraenkel - Conrat, H., P.C. Kimball and J.A. Levy. 1988. *Virology.* 2nd ed. Prentice - Hall. Inc. New Jersey. pp. 39 - 95.
6. Golemboski, D.B., G.P. Lomonosoff and M. Zaitlin. 1990. *Proc. Natl. Asad.Sci. U.S.A.* 87 : 6311 - 6315.
7. Harrison, B.D., M.A. Mayo and D.C. Baulcombe. 1987. *Nature* 328 : 799 - 802.
8. Hemnway, C., R.X. Fang, W. Kaniewski, N.H. Chua and N.E. Tumer. 1988. *EMBO J.* 7 : 1273 - 1280.
9. Hoekema, A., M.J. Huisman, L. Molendijk, P.J.M. Van Den Elzen and V.J.C. Cornelissen. 1989. *Bio/Tech.* 7 : 273 - 278.
10. Holsters, M., D. Waele, A. Depicker, E. Messens, M. Van Montagu and J. Schell. 1978. *Mol. Gen. Genet.* 163 : 181 - 187.
11. Horsch, R.B., J.E. Fry, N.L. Hoffmann, D. Eichholtz, S.G. Rogers and R.T. Fraley. 1985. *Science* 227 : 1229 - 1231.
12. Loesch - Fries, L.S., D. Merlo, T. Zinnen, L. Burhop, K. Hill, K. Krahn, N. Javis, S. Nelson and E. Halk. 1987. *EMBO J.* 6 : 1845 - 1851.
13. McCormick, S., F. Niedermeyer, J. Fry, A. Barnason, R. Horsch and R. Fraley. 1986. *Plant Cell Rpts* 5 : 81 - 4.
14. Nelson, R.S., S.M. McCormick, X. Delancy, P. Dube, J. Layton, E.J. Anderson, M. Daniexska, R.K. Proksch, R.B. Horsch, S.G. Rogers, R.T. Fraley and R.N. Beachy. 1988. *Bio/Tech.* 6 : 403 - 409.
15. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning.* 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y. pp. A.9 - A.13.