

Liposome을 이용한 Ti Plasmid의 꽃담배 원형질체내 도입

林明鎭 · 鄭載東¹ · 金仁洙*

慶北大學校 自然科學大學 遺傳工學科,

¹慶北大學校 農科大學 園藝學科

초록 : *A. tumefaciens* C58로부터 ³H-thymidine으로 표지한 Ti plasmid를 분리하여 lyophilization-rehydration법으로 octadecyl rhodamine B로 표지한 liposome에 내포시켰다. Liposome조제에 사용한 지질은 phosphatidylserine(PS)을 사용한 PS liposome과, PS와 cholesterol (Chol)을 같은 mole비로 섞은 PS-Chol이었다. 꽃담배 원형질체는 0.1% macerozyme과 1.5% cellulase를 처리하여 유리시키고 불연속성 농도구배 원심분리로 정제하였다. ³H-Ti plasmid를 포함하고 있는 liposome(1 μ mole PS)을 5 mM Ca²⁺과 10% PEG로 처리하여 꽃담배 원형질체 (10⁶)와 융합시켰다. 원형질체와 융합한 liposome의 양은 rhodamine B의 형광으로 측정하고 원형질체에 도입된 Ti plasmid 양은 tritium의 방사능으로 측정하였다. 이때 PS liposome에서는 7.9%가 PS-Chol liposome에서는 7.2%의 liposome이 원형질체와 융합하였는데 융합과정에서 PS liposome에서는 약 60%의 내용물이 유실되었고 PS-Chol liposome에서는 약 30%의 내용물이 유실되었다. 따라서 Ti plasmid를 식물원형질체에 도입하는데는 PS 보다는 PS-Chol로 구성된 liposome이 효율적인 것으로 나타났다. PS-Chol liposome을 사용할 경우에 1개의 원형질체에 약 1,700개의 Ti plasmid가 결합하고 있으므로 lyophilization-rehydration법을 사용하여 Ti plasmid를 식물원형질체에 도입할 경우에 식물의 형질전환 효율을 높일 수 있을 것임을 시사하여 준다. (1994년 8월 23일 접수, 1994년 9월 16일 수리)

서 론

식물을 유전공학적인 방법으로 개량하기 위해서는 유용한 유전자의 개발과 그 유전자를 식물체내로 운반하여 발현시킬 수 있는 유전자운반체(vector)의 개발이 중요한 당면과제이다. 현재까지 알려진 식물 형질전환 유전자 운반체로는 *Agrobacterium tumefaciens*의 Ti plasmid(tumor inducing plasmid), *A. rhizogene*의 Ri plasmid, Cauliflower mosaic virus(CaMV) 및 Gemini virus 등이 있으며 이들 중 Ti plasmid가 가장 효과적인 유전자 운반체로 알려져 있으며 또한 가장 많이 연구되어 왔다.¹⁾

그러나 *A. tumefaciens*의 Ti plasmid를 유전자운반체로 사용함에 있어 그 기주범위를 단자엽식물, 특히 주곡작물로 넓히는 것이 중요한 과제이다. *A. tumefaciens*의 기주범위는 *A. tumefaciens*와 식물세포벽간의 상호작용²⁾과 T-DNA의 염기배열에^{3,4)} 의하여 결정되는 것으로 알려져 있다. *A. tumefaciens*와 식물세포벽간의 상호작용의 결핍으로 인하여 나타나는 기주범위의 제한은 Ti plas-

mid를 원형질체내에 직접 도입하는 방법으로 극복할 수 있다.

원형질체내에 DNA를 직접 도입하는 방법으로는 분리한 DNA를 원형질체와 같이 calcium phosphate나 polyethylene glycol(PEG)로 처리하는 방법,⁵⁾ microinjection법⁶⁾ 그리고 electrophoration법⁷⁾ 등이 있다. Liposome을 매개체로하여 DNA를 식물 원형질체내로 도입하는 방법은 원형질체와 핵산을 직접 혼합하는 것보다 10~1000배의 높은 효율을 나타낸다.⁸⁾ 특히 liposome은 Ti plasmid가 원형질체내에 도입되어 핵의 genome에 삽입되는 과정 중에 Ti plasmid가 nuclease에 의하여 가수분해되는 것을 방지하는 보호벽 역할을 함으로서⁹⁾ 원형질체의 형질전환 빈도를 높여주는데 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

본 실험실에서는 전보¹⁰⁾에서 Ti plasmid를 liposome에 효과적으로 내포시키는 방법을 보고하였다. 그 결과 phosphatidylserine(PS) 지질을 이용하여 lyophilization-rehydration 방법으로 liposome을 조제할 경우에, lipo-

Key words : *Agrobacterium*, *Liposome*, *Nicotiana glauca*, Protoplast, Ti plasmid

*Corresponding author : I.-S. Kim

some을 구성하는 지질 PS μmole 당 5~8 μg Ti plasmid를 내포하는 liposome을 조제하였다. 본 실험에서는 이 liposome을 꽃담배 원형질체와 융합하여 Ti plasmid를 식물 원형질체에 도입하는 최적 조건을 확립하고 그 방법으로 인한 식물원형질전환 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

A. *tumefaciens* C58로부터 ^3H -Ti plasmid의 분리 정제

A. *tumefaciens* C58을 ^3H -thymidine(1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$)을 첨가한 TY 액체배지에서 배양한 다음 ^3H -Ti plasmid를 분리하여 CsCl 농도구배 초원심분리로 정제하였다.¹⁰⁾ 정제된 Ti plasmid는 TES 완충액(2 mM Tris-base, pH 7.4, 2 mM histidine, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA)에 녹여 사용하였다.¹¹⁾

Ti plasmid를 내포한 liposome의 조제

^3H -thymidine 표지된 Ti plasmid를 lyophilization-rehydration방법을 사용하여 phosphatidylserine(PS)이나, PS-cholesterol(PS-Chol, PS: Chol=1:1 molar ratio)로 구성된 liposome에 내포시켰다.¹⁰⁾ Liposome의 조제시에 PS에는 1 mole %의 octadecyl rhodamine B chloride를 첨가하였다. 5 μmole 의 PS와 150 μg 의 Ti plasmid를 사용하여 조제한 liposome을 TES 완충액에 2번 세척한 다음에 10 μmole PS/ml TES 완충액의 농도가 되도록 현탁시켜 원형질체와 융합에 사용하였다. Ti plasmid의 양은 tritium의 방사능으로 측정하였고 liposome을 구성한 인지질의 양은 rhodamine B의 형광으로 측정하였다.

원형질체의 분리

과종 후 60~90일 된 꽃담배(*Nicotiana glauca*)의 어린잎을 재료로하여 원형질체를 분리 정제하였다. 꽃담배의 어린잎을 4°C에서 전처리 용액(CPM무기염-0.01 M MES완충액 1l에 1 mg의 NAA와 BA를 넣고 CaCl_2 와 $(\text{NH}_4)_2\text{NO}_3$ 가 각각 1 mM이 되게 한 용액)에 16시간 동안 처리하였다. 이것을 CPM무기염-0.01 M MES완충액에 0.6 M mannitol, 0.12% BSA, 0.1% Mace-rozyme R-10 및 1.5% Cellulase Onozuka R-10을 넣은 효소액으로 28°C에서 4시간 동안 처리하여(50 stroke/min) 원형질체를 유리시켰다.¹²⁾ 유리된 원형질체는 0.6 M mannitol-0.6 M sucrose 용액에 불연속 농도구배 원심분리로 정제하였다.¹³⁾ 정제된 원형질체는 0.6 M manni-

tol-8PKM 배지¹⁴⁾에 현탁하여 융합에 사용하였다. 원형질체의 수율과 생존율은 0.2% Evans blue로 염색한 후에 hemocytometer로 조사하였다.

^3H -Ti plasmid를 함유한 liposome과 꽃담배 원형질체의 융합

위에서 조제한 ^3H -Ti plasmid를 내포시킨 PS liposome 및 PS-Chol liposome과 담배 원형질체를 융합제를 처리하여 융합시켰다. 10⁶개의 원형질체를 함유한 현탁액을 50×g에서 5분간 원심분리하여 원형질체를 침전시키고 이것을 5 mM CaCl_2 를 함유한 0.5 M mannitol/TES 완충액으로 세척한 다음 0.1 ml의 liposome용액(1 μmole PS)과 잘 섞은 후 5분간 방치하였다. 여기에 동량의 20% PEG용액(0.5 M mannitol-PEG 완충액에 20%의 PEG 6000을 녹인용액)을 넣고 잘 혼합한 다음에 25°C에서 20분간 방치하였다. 이렇게하여 liposome과 융합처리된 원형질체는 0.5 M mannitol/PEG 완충액으로 50×g에서 5분간 원심분리하여 세척하는 과정을 3번 반복하여, 융합하지 않은 liposome을 제거하였다. 이와 같이 liposome과 융합한 원형질체를 형광현미경 하에서 560 nm의 필터를 사용하여 rhodamine B의 형광을 관찰하여 융합을 확인 하였다. 침전된 원형질체에 TES 완충액을 넣고 Branson 220 sonicator로 원형질체를 맑게 용해한 다음 rhodamine B의 형광과 tritium의 방사능을 측정함으로써, 원형질체에 도입된 Ti plasmid량과 원형질체에 결합된 지질의 양을 측정하였다.

흡광도, 형광 및 방사능의 측정

Ti plasmid의 흡광도는 Beckman DU-65 spectrophotometer를 이용하여 260 nm의 파장에서 측정하였으며, 흡광도가 1.0일 때 용액 1 ml당 45 μg 의 DNA가 있는 것으로 환산하였다. Rhodamine B의 형광측정은 Farrand MK-2 spectrofluorometer를 사용하여 560 nm로 여기시킨 후 590 nm에서 형광을 측정하였다. Tritium의 방사능은 100 μl 의 시료를 10 ml의 toluene base scintillation cocktail에 넣고 Packard TRI-CARB 4530 liquid scintillation counter로 측정하였다.

결과 및 고찰

^3H -Ti plasmid의 분리 및 liposome의 조제

전보에서 발표한 바와 같이 A. *tumefaciens* C58로부터 분리정제하여 사용한 [^3H]-Ti plasmid는 95% 이상 순수하였으며 고유 방사선활성(specific activity)은 약 1.0×

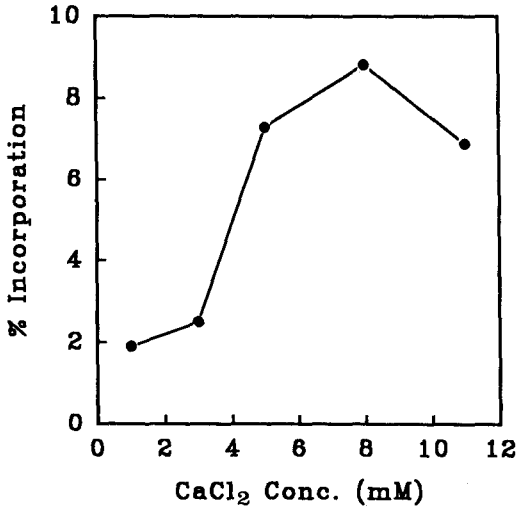


Fig. 1. The effect of CaCl_2 concentrations on the fusion of PS-Chol liposome with tobacco protoplasts. Protoplasts (10^6 cells) were washed twice with 1 ml of 0.5 M mannitol-TES buffer containing different level of CaCl_2 by centrifugation. The protoplasts were precipitated, mixed with 0.1 ml of liposome (1 μmole PS) labeled with rhodamine B and incubated for 5 min before adding an equal volume of 20% PEG. Following incubation for 30 min, the protoplasts were washed three times and resuspended in 0.5 M mannitol-TES buffer. The resulting protoplasts were sonicated in TES buffer and the fluorescence of rhodamine B of the solution was measured for the liposomal lipids associated with protoplasts.

10^4 cpm/ μg DNA이었다. 여러 가지 지질로 구성된 liposome을 lyophilization-rehydration 방법으로 조제하고 그 liposome에 붙어 있는 Ti plasmid의 양을 측정할 결과 PS와 phosphatidylcholine(PC)은 Ti plasmid를 liposome에 내포시키는 효율은 비슷하였다.¹⁰⁾ 그러나 liposome의 지질의 조성은 핵산의 liposome 내포율에도 영향을 미칠 뿐만 아니라 세포와의 상호작용 및 세포내에 도입된 물질의 활성에도 영향을 미치게 되는데,¹⁵⁾ 일반적으로 PS가 세포에 대한 독성이 낮은 것으로 알려져 있어^{15,16)} PS로 구성된 liposome을 사용하였다.

Liposome과 원형질체의 융합에 미치는 Ca^{2+} 및 PEG의 영향

Liposome의 내용물을 원형질체내로 도입하는데는 융합제의 처리가 중요한 역할을 한다. 융합제에는 PEG, polyvinyl alcohol(PVA), Ca^{2+} , DEAE-dextran 또는 di-

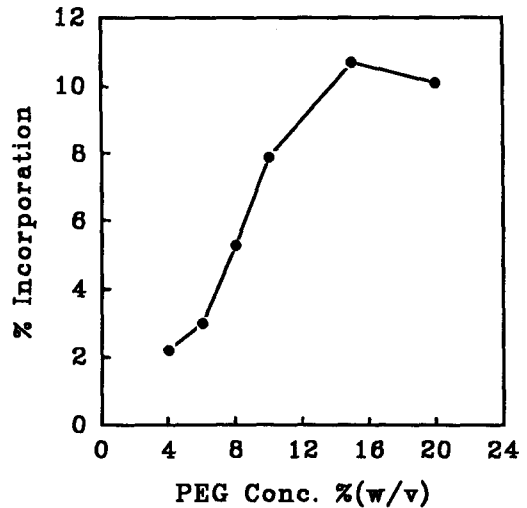
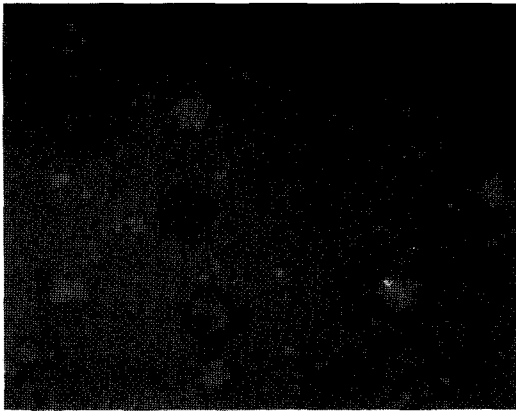
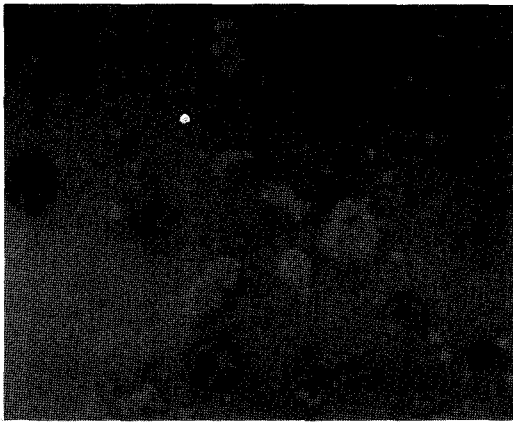


Fig. 2. Effect of polyethylene glycol 6000 on the fusion of PS-Chol liposome with tobacco protoplasts. Protoplasts (10^6 cells) were washed with 0.5 M mannitol-TES buffer containing 0.5 mM CaCl_2 and treated by the same procedure as described in Table 1 except that the protoplasts were treated with different concentrations of PEG.

methyl sulfoxide 등이 있으며 일반적으로 PEG가 많이 사용되고 있다.¹⁷⁾ 본실험에서는 Ca^{2+} 으로 원형질체를 세척한 후에 PEG를 처리하여 융합효율을 높였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 원형질체를 여러 가지 농도의 Ca^{2+} 용액으로 세척한 후에 10%의 PEG 6000를 처리하여 본 결과 5~8 mM Ca^{2+} 농도에서 융합이 가장 효율적이었다. 또한 원형질체를 5 mM CaCl_2 를 함유한 0.5 M mannitol-TES 완충액으로 세척한 후에 여러 가지 농도의 PEG 6000을 처리하여 liposome과 원형질체를 융합시킨 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 PEG의 농도가 15%까지는 융합이 증가 하였으나 그 이상의 농도 즉 20% PEG 처리에서는 융합효율에 변화가 없었다. 그러나 원형질체와 liposome의 융합상태를 liposome에 포함되어 있는 rhodamine B의 형광을 이용하여 형광현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 15% PEG 처리에 비하여 20% PEG에서는 원형질체간에 엉김이 많이 일어날 뿐만 아니라 원형질체의 파괴가 현저하게 증가하였다. 5 mM Ca^{2+} 를 함유한 0.5 M mannitol-TES 완충액으로 세척하고 10% PEG 6000을 처리하여 liposome을 원형질체와 융합시켰을 경우에 약 50%의 융합 원형질체가 회수되었다.



(A)



(B)

Fig. 3. Fluorescence microscopy of *Nicotiana sanderae* protoplasts fused with PS-Chol liposome loaded with octadecyl rhodamine B in the presence of 15% PEG (A) and 20% PEG (B). Photography was taken by exciting the sample with 580 nm light.

융합에 의한 원형질체 내로의 DNA 도입효율과 그에 미치는 지질의 영향

Liposome과 원형질체간의 융합은 융합제의 처리 뿐만 아니라 liposome과 원형질체간의 상호비율 및 융합온도 등도 영향을 미치게 됨으로 이들은 핵산의 도입율을 결정짓는 중요한 인자들이다. 원형질체에 대한 liposome 지질의 비율을 높여감으로서 내용물의 도입은 증가하지만 liposome의 양이 과다할 경우에는 원형질체에도 손상을 가져오기 때문인데 그 적정비율은 세포에 따라서 서로 다르다.¹⁵⁾ 본 실험조건에서는 liposome과 융합후에 약 50%의 원형질체가 회수되고 있지만 회수된 원형질체는 그 원형을 잘 보존하고 있었다. 일반적으로

Table 1. Fusion of Ti plasmid-loaded liposomes with *Nicotiana sanderae* protoplasts

Liposomes	PS (nmole)		Fusion efficiency (%)
	Incubated	10 ⁶ protoplast-associated	
PS	1,000	78.9	7.9
PS/Chol	1,000	71.6	7.2

10⁶ Protoplasts were incubated with Ti plasmid-loaded liposomes made of 1 μmole of PS and 1 μmole of Chol in the presence of 10% PEG, after washing the protoplasts with 5% CaCl₂. The liposomes were labled with 1 mole percent octadecyl rhodamine B and PS recovery was assayed by the fluorescence of rhodamine B.

Table 2. Transfer of ³H-Ti Plasmid entrapped in liposomes into *Nicotiana sanderae* protoplasts after protoplast fusion with liposomes

Liposomes	³ H-Ti plasmid (ng)		Transfer efficiency (B/A)
	associated with 10 ⁶ protoplast expected(A)	determined(B)	
PS	632	253	0.40
PS/Chol	582	420	0.72

³H-Ti plasmid (7,500 cpm/μg) was entrapped into liposomes supplemented with octadecyl rhodamine B by lyophilization-rehydration method. 10⁶ protoplasts were fused with Ti plasmid-loaded liposomes made of 1 μmole of PS and 1 μmole of Chol in the presence of 10% PEG, after washing the protoplasts with 5% CaCl₂. The amounts of phospholipid and Ti plasmid recovered in the protoplasts were assayed by the fluorescence of rhodamine B and radioactivity of tritium, respectively. The expected amount of plasmid was calculated from the fusion efficiency (refer to Table 1) assuming that the plasmid did not leak during the fusion. The determined amount of plasmid was calculated from the actual cpm of the sample.

PEG 농도를 20% 이상 사용할 경우도 있지만 그 경우에는 원형질체의 생존율이 떨어지는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾

원형질체와 융합하고 있는 liposome의 양을 liposome에 포함되어 있는 rhodamine B의 형광을 이용하여 측정한 결과는 Table 1과 같았다. PS liposome의 경우 7.9%의 liposome이 원형질체와 융합하였고 PS-Chol liposome의 경우 7.2%가 융합하여 원형질체에 부착되는 지질의 양은 두 liposome에서 유사하였다. 그러나 lipo-

some과 담배 원형질체가 융합할때 liposome의 내용물인 Ti plasmid가 원형질체로 전달되는 양을 $^3\text{H-Ti}$ plasmid의 방사능으로 측정된 결과는 PS liposome에서는 약 40%이고 PS-Chol liposome에서는 약 70%로서 PS-Chol liposome에서 약 2배정도 높게 나타났다(Table 2).

Liposome의 내용물은 원형질체와 융합이나 endocytosis를 통하여 원형질체에 도입된다. Liposome을 구성하는 지질의 전이온도 보다 낮은 온도에서는 endocytosis가 우세하고 전이온도 보다도 높은 온도에서는 융합이 우세하다. 본 실험에서는 PS의 전이온도($T_c=7^\circ\text{C}$)¹⁹⁾ 보다도 높은 온도에서 liposome과 원형질체가 반응하였으므로 상호간의 융합에 의하여 Ti plasmid가 전달된 것으로 보인다. Liposome이 원형질체와 융합할 때 liposome 내용물의 일부를 잃게되는데 이것은 liposome의 투과성이 중요한 영향을 미치게 된다. 즉 liposome은 그 구성 지질의 전이온도 보다 높은 온도에서는 지질이충동이 유동상태이기 때문에 그 투과성이 증가하게되고 따라서 그 내용물의 소실이 증가한다. Table 2의 결과에서 보면 PS liposome에 비하여 PS-Chol liposome에서 약 2배정도 많이 liposome의 내용물인 Ti plasmid를 원형질체에 전달하고 있다. 이와 같은 결과는 liposome에 Chol이 있을 경우에 liposome의 구조가 견고하여 지고 따라서 liposome의 투과성이 감소함으로써, 융합효율은 약간 떨어지지만 융합할 때에 liposome의 내용물이 유실되는 것을 방지하여 Ti plasmid의 전달을 높인 것으로 생각된다.²⁰⁾ 따라서 PS로 구성된 liposome을 통하여 Ti plasmid를 식물원형질체에 도입할 경우에는 Chol을 첨가하는 것이 도입효율을 높이는 중요한 인자이었다. 또한 PS-Chol liposome의 표면에 붙어 있는 Ti plasmid량은 약 40%이고 liposome에 내포된 것은 60%에 불과하였는데¹⁰⁾ PS-Chol liposome에 있는 약 70%의 Ti plasmid가 원형질체로 도입되는 결과(Table 2)로 보아서 liposome표면에 있는 Ti plasmid의 일부도 원형질체내로 도입되고 있음을 보여주고 있다.

본 실험조건하에서 약 400 ng의 Ti plasmid가 10^6 개의 원형질체와 결합하고 있다(Table 2). *A. tumefaciens* C 58의 Ti plasmid는 약 210 kbp(분자량 약 130 MDa)이고²¹⁾ 400 ng의 DNA는 1.7×10^9 개의 Ti plasmid에 상당함으로 원형질체 1개당 약 1700개의 Ti plasmid와 결합하게 된다. Liposome을 통하여 세포내에 도입된 핵산이 세포내에서 분포되는 양상이 그 활성을 발휘하는데 중요한 영향을 미치게 되는데 liposome을 통하여 세포내에 도입된 핵산은 소포체와 결합하여 핵으로 수송됨으로 도입된 Ti plasmid가 비교적 안정하게 유지될 것

으로 생각된다.²²⁾ 따라서 본 연구에서 확립한 조건으로 liposome을 이용하여 Ti plasmid를 식물원형질체에 도입하면 식물의 형질전환을 시킬 수 있을 것임을 시사하고 있다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 및 교육부지원 유전공학 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Hong, J. B., I. S. Choi and I. S. Kim (1992) In 'Biotechnology (Plant),' J. D. Chung, K. S. Chung and C. Y. Han, 1st Ed., Chap. 5, Kyungpook National University Press, Taegu, Korea
- Douglas, C., W. Halperin, M. Gordon and E. Nester (1985) Specific attachment of *Agrobacterium tumefaciens* to bamboo cells in suspension cultures, *J. Bacteriol.*, 161, 764-766
- Buchholz, W. G. and M. F. Thomshow (1984) Host range encoded by the *A. tumefaciens* tumor inducing plasmid pTiAg63 can be expanded by modification of its T-DNA oncogene complement, *J. Bacteriol.*, 160, 327-332
- Nester, E. W., M. P. Gordon, R. M. Amasino and M. F. Yanofsky (1984) Crown gall: a molecular and physiological analysis, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35, 387-413
- Krens, F. A., L. Molendijk, G. J. Wallems and R. A. Schilperoort (1982) *In vitro* transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA, *Nature*, 296, 72-74
- Crossway, A., J. V. Oakes, J. M. Irvine, B. Wand, V. C. Knauf and C. K. Schewmaker (1986) Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts, *Mol. Gen. Genet.*, 202, 179-185
- D'Halluin, K., E. Bonne, M. Bossut, M. D. Beuckeleer and J. Leemans (1992) Transgenic maize plants by tissue electroporation, *Plant Cell*, 4, 1495-1505
- Fraley, R. T. and R. D. Horsch (1983) In 'Genetic Engineering of Plants: An Agricultural Perspective,' 1st Ed., p. 177-193, Plenum Press, New York, U.S.A.
- Lurquin, P. F. (1979) Entrapment of plasmid DNA

- by liposomes and their interaction with plant protoplasts, *Nucl. Acid Res.*, 6, 3773-3784
10. Park, J. S., H. J. Park and I. S. Kim (1994) Encapsulation of *Agrobacterium* Ti plasmid into liposomes, *Korean Biochemical J.*, 27, 190-195
 11. Kado, C. I. and S. T. Liu (1981) Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids, *J. Bacteriol.*, 145, 1365-1373
 12. Takebe, I. and T. Nagata (1984) In 'Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants,' I. K. Vasil, 1st Ed., Vol. 1, pp. 328-339 Academic Press, New York, U.S.A.
 13. Kim, I. S., and P. S. Song (1981) Binding of Phytochrome to liposomes and protoplasts, *Biochemistry*, 20, 5482-5489
 14. Kao, K. N. and M. R. Michayluk (1975) Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low density population in liquid medium, *Planta*, 126, 105-110
 15. Fraley, R. T., S. L. Dellapota and D. Papahadjopoulos (1982) Liposome-mediated delivery of tobacco mosaic virus RNA into tobacco protoplasts: a sensitive assay for monitoring liposome-protoplast interactions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79, 1859-1863
 16. Mannino, R. J., E. S. Allebach and W. A. Strohl (1979) Encapsulation of high molecular DNA in large unilamella phospholipid vesicles, *FEBS Lett.*, 101, 229-232
 17. Nagata, T. (1984) In 'Cell Fusion: Gene transfer and Transformation,' R. F. Beers, Jr and E. G. Bassett, 1st Ed., Vol. 14, Chap. 4, Raven Press, New York, U.S.A.
 18. Constabel, F (1984) In 'Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants,' I. K. Vail, 1st Ed., Vol. 1, pp. 414-422, Academic Press, U.S.A.
 19. Poste, G. and D. Papahadjopoulos (1976) Lipid vesicles as carriers for introducing materials into cultured cells: Influence of vesicle lipid composition on mechanism (s) of vesicle incorporation into cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 73, 1603-1607
 20. Lurquin, P. F. (1979) Entrapment of plasmid DNA by liposomes and their interactions with plant protoplasts, *Nucleic Acid Res.*, 6, 3773-3784
 21. Holsters, M., J. P. Hernalsteens, M. Van Montagu and J. Schell (1982) In 'The Molecular Biology of Plant Tumors,' G. Kahl and J. Schell, 1st Ed., Chap. 8, Academic Press, New York, U.S.A.
 22. Poste, G. (1980) In 'Liposomes in Biological Systems,' G. Gregoriadis and A. C. Allison, 1st Ed., Chap. 4, John Wiley & Sons, New York, U.S.A.

Delivery of Ti Plasmid into *Nicotiana sanderae* Protoplasts via Liposomes

Lim, Myung-Ho, Jae-Dong Jeong¹, and In-Soo Kim* (Department of Genetic Engineering, College of Natural Science, Kyungpook National University, Taegu, ¹Department of Horticulture, Kyungpook National University, Taegu)

Abstract : Ti plasmid of *A. tumefaciens* was labeled with ³H-thymidine, purified and encapsulated into phosphatidylserine (PS) and PS-cholesterol (Chol; 1 : 1 molar ratio) liposomes by lyophilization-rehydration method. PS was supplemented with 1 mole percent octadecyl rhodamine B for fluorometric measurement of PS. Liposomes entrapping ³H-Ti plasmid were fused with *Nicotiana sanderae* protoplasts by treating with 5 mM CaCl₂ and 10% PEG. The fusion was evidenced by fluorescence microscopic technique. The amounts of Ti plasmid and PS associated with protoplasts were assayed by the radioactivity of ³H-Ti plasmid and by the fluorescence of rhodamine B. About 7.9% of the PS liposome and 7.2% of PS-Chol liposome were fused with protoplasts. During the fusion process, about 30% of the liposomal contents of PS-Chol liposome was leaked, in contrast to about 60% leakage of its contents in PS liposome. Accounting the number of liposomes fused with protoplasts together with the encapsulation efficiency and the leakage of liposomal contents, it was calculated that ca. 1,700 Ti plasmid was transferred into one protoplast by the present method. This result may indicate that the present method transfers enough Ti plasmid into plant protoplast to elicit genetic transformation of plants.