

형질전환된 담배에서 해너콩 Leghemoglobin cDNA의 발현

李 善 英* · 洪 周 奉¹ · 安 正 善

서울대학교 自然科學大學 生物學科, ¹遺傳工學研究所

담배(*Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38) 잎 절편을 해너콩(*Canavalia lineata*)의 leghemoglobin(Lb) cDNA를 포함하는 *Agrobacterium*과 함께 배양한 후, 0.5 mg/L BAP, 0.1 mg/L α -NAA와 200 mg/L kanamycin, 500 mg/L carbenicillin을 포함하는 MS 배지에서 선별하여 7개의 재분화 개체를 얻었다. 이로부터 분리한 계놈 DNA에 대한 Southern 혼성화 반응과 PCR 결과로 Lb cDNA가 담배의 계놈에 삽입되었음을 확인하였다. 형질전환된 담배로부터 분리한 RNA에 대한 northern 혼성화 실험 결과 약 1,000 nt의 RNA가 혼성화 반응을 보였으며, 총 RNA를 주형으로 합성한 1차 가닥의 cDNA를 PCR로 증폭한 결과, Lb cDNA와 혼성화 반응을 보이는 0.5 kb의 DNA가 증폭되었다. 항의 Lb에 대한 다군항체(polyclonal antibody)를 사용하여 단백질 면역 항체 반응을 실시한 결과, Lb로 판단되는 약 15.8 kD의 위치에서 혼성화 반응이 나타났다. 이상의 결과로 해너콩 Lb cDNA가 형질전환된 담배의 계놈에 삽입되었을 뿐만 아니라 mRNA로 전사되어 Lb 단백질을 해독되었음을 알 수 있었다.

주요어: 해너콩 Lb cDNA, 담배 형질전환, PCR, Southern 및 northern 혼성화 반응, 면역 항체반응

Leghemoglobin(Lb)은 척추동물의 근육조직에 있는 myoglobin과 유사한 단백질로서 콩과식물 뿐만 아니라 비콩과식물에도 존재한다(Appleby, 1983). 콩과식물에서 Lb는 뿌리혹 세포에 존재하며 공생균주의 호흡에 필요한 산소의 확산을 촉진함과 동시에 산소에 민감한 질소고정효소 복합체(nitrogenase complex)의 불활성화를 막기 위해 뿌리혹내의 산소 분압을 낮게 유지하는 기능을 수행하는 것으로 여겨지고 있다(Appleby, 1984).

콩과식물의 Lb는 monomeric hemoprotein인 반면, 비콩과식물에서는 dimer로 발견된다(Appleby, 1983). Leghemoglobin 유전자에 관한 연구가 가장 활발한 식물중의 하나인 콩의 경우, Lba, Lbc₁, Lbc₂ 그리고 Lbc₃(Fuchsman and Appleby, 1979)의 4종류의 유전자를 포함하는 multigene family로부터 1차 Lb 단백질이 만들어지고 그 각각은 해독 후에 Lbb, Lbd₁, Lbd₂ 그리고 Lbd₃로 변형된다(Whittaker *et al.*, 1981). 그의 다른 콩과식물에서도 2-6종류의 다양한 Lb를 가지고 있지만(Sullivan *et al.*, 1981; Jing *et al.*, 1982), *Parasponia*나 *Trema*와 같은 비콩과식물은 한 종류의 Lb를 갖는 것으로 밝혀졌다(Landsmann *et al.*, 1986; Bogusz *et al.*, 1988).

지금까지 여러 식물체에서 Lb에 대한 cDNA 클론 혹은 계놈 클론이 분리되어 그 유전자의 구조가 밝혀졌고, 그 결과 유전자의 구조와 염색체 배열 상태에서 포유동물의 globin 유

전자와 높은 유사성을 가지고 있다는 것이 밝혀졌다. 그러나 해너콩의 Lb에 관한 연구는 해너콩의 뿌리혹 특이 단백질의 분석(Choi and An, 1991), 해너콩의 뿌리혹으로부터 Lb cDNA 클론의 분리 및 클론 중 일부 염기서열의 결정(Kim *et al.*, 1994) 등에 국한되어 있을 뿐, 이들 유전자의 발현 조절 기작에 관한 연구나 다른 식물체 혹은 뿌리혹 이외의 기관에서의 발현 가능성 및 기능 수행에 관한 연구는 아직 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 해너콩의 뿌리혹에서 특이적으로 발현되는 Lb 유전자의 발현 조절기작을 연구함과 동시에 비콩과식물에서 이 단백질의 역할을 연구하기 위한 첫단계로 해너콩의 Lb cDNA를 *Agrobacterium*을 이용하여 담배(*Nicotiana tabacum*)로 도입하였고, 형질전환된 담배에서 이 cDNA의 발현과 해독을 확인하였다.

재료 및 방법

생물 재료 및 시약

본 실험에서 사용한 *E. coli* 균주는 JM101 및 K802이며, LB (bacto-tryptone 10 g/L, yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L, pH 7.5) 배지에서 37°C를 유지하며 배양하였다. 식물체 형질전환에는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 사용하였으며, YEP (bacto-peptone 10 g/L, yeast extract 10 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.4) 배지에서 28°C로 유지하며 배양하였다. 담배는 *Nicotiana*

*교신저자: Fax (02) 872-6881

© 한국식물학회 [서울] 1995

tabacum L. cv. Wisconsin 38이며 발현벡터는 pBKS1-1(Suh *et al.*, 1994)이 사용되었으며 PCR에 사용한 primer는 서울대학교 기초과학교육연구공동기원에서 합성하였다. 단백질 면역항체 반응 실험에 사용한 다균항체는 Ohio 주립대학교의 Dr. Verma로부터 제공받았다.

Plasmid DNA의 분리 및 탐침 DNA 표지

Plasmid DNA는 alkaline lysis 방법(Birnboim and Doly, 1979)으로 분리하였으며, Brush 등(1985)에 의해 개량된 차별 침전법을 사용하여 순수 분리하였다. 본 연구에서 사용된 탐침 DNA는 해녀콩의 Lb cDNA 클론인 pCILb1(Kim *et al.*, 1994)의 676 bp *EcoRI* 절편이며, [α - 32 P]-dCTP와 random primer를 사용하여 표지하였다.

해녀콩 Lb cDNA를 포함하는 발현벡터의 재조합

pCILb1의 *EcoRI* 절편중 652 bp *BamHI* 절편을 식물 발현벡터인 pBKS1-1의 cauliflower mosaic virus(CaMV) 35S promoter와 nopaline synthase(nos) terminator 사이의 *BamHI* site에 subclonig하여 *E. coli* K802로 Sambrook 등(1989)의 방법에 따라 형질전환하였다.

발현벡터의 *Agrobacterium*으로의 형질전환

발현벡터를 freeze-thaw 방법(An *et al.*, 1988)에 의하여 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입하였고, 선별된 콜로니를 YEP 액체 배지에서 증식시켜 이로부터 *Agrobacterium* plasmid quick screening 방법(An *et al.*, 1988)에 따라 plasmid를 분리하였다.

*Agrobacterium*에 의한 담배 형질전환 및 식물체 재분화

*Agrobacterium*을 매개로한 담배의 형질전환은 leaf disc 방법(Horsch *et al.*, 1985)을 변형하여 수행하였다. 담배 잎을 0.5% (w/v) hypochloride 용액에서 표면살균하고 1 cm²의 크기로 절단한 후 YEP 배지에서 24시간 배양한 *Agrobacterium* 현탁액에 접종한 후 28°C, 암조건하에서 48시간 혼합 배양하였다. 이를 MS 배지(Murashige and Skoog, 1962)에 식물 호르몬(0.5 mg/L BAP)과 항생제(200 mg/L kanamycin, 500 mg/L carbenicillin)가 포함된 shoot 유도 배지에 옮겨 28°C 그리고 1일 16시간의 명조건하에서 배양하였다. 형성된 shoot를 절편체로부터 분리하여 MS 배지에 0.1 mg/L NAA, 200 mg/L kanamycin, 500 mg/L carbenicillin이 첨가된 뿌리 유도 배지로 옮겨,

28°C 명조건하에서 배양하였다. 뿌리가 형성된 재분화 개체는 멸균된 토양을 포함하는 화분으로 이식하여 순화시켰다.

식물 DNA 분리 및 PCR

식물체 잎으로부터 게놈 DNA는 Dellaporta 등(1983)의 방법에 따라 분리하였으며, Lb cDNA를 PCR로 증폭시켰다(Sambrook *et al.*, 1989). PCR은 500 ng의 게놈 DNA, 0.25 mM의 dNTP 혼합용액, N-terminal primer로 5'-ATGGGTGCTTTCAGTGAG-3'를, C-terminal primer는 5'-AGCAGGAACCTGTTTAATAACGAG-3'를 각각 1 μ M, 2.5 unit의 Taq DNA polymerase를 사용하였다. 94°C에서 1분간 변성, 60°C에서 2분간 annealing, 그리고 72°C에서 3분간 extension의 반응 사이클을 30회 반복한 후, 마지막 단계로 94°C에서 1분간, 60°C에서 2분간, 72°C에서 10분간 반응시켰다.

식물 RNA 분리, cDNA 합성 및 PCR

담배의 잎으로부터 전체 RNA는 Maniatis(1982)의 방법에 따라 분리하였다. 담배 잎조직 2 g을 막자사발과 액체 질소를 사용하여 마쇄한 후 extraction buffer(4 M guanidium isothiocyanate, 5 mM sodium citrate, 100 mM mercaptoethanol, 0.5 % laurylsarcosine)를 첨가하고 CsCl-cushion(5.7 M CsCl, 0.1 M EDTA, pH 7.5) 하에서 Kontron 회사의 TST 28.38로터를 사용하여 20시간 동안 초원심분리를 수행하여 RNA 침전을 얻고 멸균된 2차 증류수에 녹였다. RNA 2 μ g, human placental ribonuclease inhibitor, dNTP 혼합용액, oligo-d(T)₁₂₋₁₈ primer, 역전사 효소를 첨가하여 42°C에서 40분간 처리하여 1차 가닥 cDNA를 합성하였다. PCR은 1차 가닥 cDNA의 1/20을 기질로 사용했으며 94°C에서 1분간 변성, 60°C에서 1분간 annealing, 그리고 73°C에서 2분간 extension의 반응 사이클을 30회 반복한 후에, 마지막 단계로 94°C에서 1분간, 60°C에서 2분간, 73°C에서 3분간 반응시켰다.

Southern 및 northern 혼성화반응

DNA와 RNA 전기영동은 Sambrook 등(1989)의 방법에 따라 수행하였으며 전기영동이 끝난 DNA와 RNA는 nylon 막으로 전이한 후 63°C에서 2시간 동안 전혼성화 반응(6 \times SSC, 5 \times Denhardt's solution, 0.1% SDS, 100 μ g/mL 변성된 salmon sperm DNA)을 수행한 후 [α - 32 P]-dCTP로 표지된 탐침 DNA를 넣고 12시간 동안 동일한 온도에서 혼성화 반응을 수행하였다. 반응이 끝난 후 nylon막을 꺼내어 37°C에서 2 \times SSC 용액으로 15분씩 2회, 2 \times SSC/0.1% SDS 용액으로 30분간

세척하고 공기건조 시킨 후 -70°C 에서 X-ray film에 방사선 자동사진법으로 감광시켰다.

수용성 단백질 추출 및 면역 항체 반응

담배 잎을 석영사와 함께 넣고 마쇄한 후 단백질 추출 완충용액인 50 mM Tris-HCl(pH 6.8)을 g 생체량 당 1 mL 첨가하고 다시 충분히 마쇄하였다. 원심분리하여 상정액을 취해 단백질 분석의 시료로 사용하였으며 Bradford(1976)의 방법으로 정량하였다. 추출한 단백질은 Laemmli 등(1970)의 방법에 따라 15% acrylamide 젤을 사용하여 전기영동하였고, nitrocellulose 막으로 electroblotting하였다. 면역 항체 실험은 Towbin 등(1979)의 방법에 따라 수행하였다. Nitrocellulose 막을 3% BSA, Tris-buffered saline(TBS) 용액에서 1시간 동안 진탕하고 TBST 완충액(0.05% Tween 20을 포함하는 TBS)으로 세척한 후, Lb에 대한 다군항체가 포함된 TBST 완충액을 첨가하여 1시간 동안 상온에서 진탕하였다. 단백질에 결합되지 않은 항체를 제거하기 위하여 TBST 완충액으로 세척한 후 horseradish peroxidase(HRP)가 결합된 goat anti-rabbit IgG 항체가 포함된 TBST 완충액을 첨가하여 2시간 동안 진탕하였다. 이후 TBST 완충액으로 3회 세척하고 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4-chloro-1-naphtol, 20% MetOH, 80% TBS, 0.06% H_2O_2 를 포함하는 기질 용액에서 발색시켰다.

결과 및 고찰

Leghemoglobin cDNA와 발현벡터의 재조합 및 *Agrobacterium*으로의 도입

해너콩의 Lb cDNA를 식물 발현벡터인 pBKS1-1의 CaMV 35S promoter와 nopaline synthase terminator 사이의 BamHI 위치에 도입하였다(Figs. 1, 2A). 이를 해너콩의 Lb 유전자를 탐침으로 하여 Southern 혼성화 반응을 수행한 결과, 0.65 kb의 band에서 강한 혼성화반응을 보임으로써 Lb cDNA의 단백질 암호화 부위가 발현벡터로 도입되었음을 확인하였다(Fig. 2B).

또한, 삽입된 Lb cDNA의 벡터내 방향성 확인을 위해 CaMV 35S promoter(800 bp)와 Lb cDNA의 137 bp 위치의 절편이 절단되도록 HindIII와 HaeII로 이중 절단한 결과, Fig. 2C에서 보는 바와 같이 클론 A와 C에서는 바른 방향으로 삽입된 0.9 kb의 절편을 확인한 반면, 클론 B에서는 반대 방향으로 삽입된 1.3 kb의 절편을 확인하였다.

방향성이 확인된 재조합 발현벡터를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404로 도입한 후, 플라스미드를 분리하여 BamHI로 절단하고 전기영동한 후 Lb를 탐침으로 한 Southern

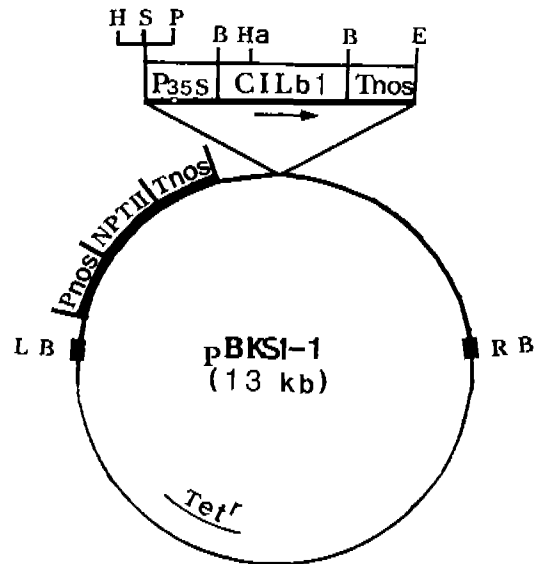


Fig. 1. Structure of a recombinant binary vector pBKS 1-1 with the Lb cDNA. The arrow indicates the direction of transcription. Tet^r, tetracycline resistance gene; LB and RB, left and right borders of T-DNA; Pnos, promoter of the nopaline synthase gene; NPTII, neomycin phosphotransferase II gene; P_{35S}, cauliflower mosaic virus 35S promoter; Tnos, terminator of the nopaline synthase gene. B, BamHI; H, HindIII; Ha, HaeII; P, PstI; S, SphI.

혼성화 반응을 수행한 결과 발현벡터가 도입되었음을 확인하였다(Fig. 2D).

발현벡터의 담배로 도입 및 담배 재분화

발현벡터가 도입된 *Agrobacterium*과 leaf disc 방법을 이용하여 해너콩 Lb cDNA를 담배로 도입하였다. *Agrobacterium*과 담배 잎 절편을 함께 48시간 배양한 후 식물 호르몬과 항생제를 포함한 MS shoot 유도 배지에 옮겨주어 형질전환된 담배 잎 절편으로부터 shoot를 유도하였다(Fig. 3A, 3B). 형성된 shoot를 절편체로부터 분리하여 뿌리 유도 배지로 옮겨 뿌리를 유도하였으며(Fig. 3C), 뿌리가 형성된 재분화 개체는 토양으로 이식하여 순화시켰고(Fig. 3D), 재분화된 개체로부터 종자를 획득하였다.

형질전환된 담배는 기내 배양시 대조구보다 성장이 빠른 것 외에는 특별한 차이를 보이지 않았다.

담배 게놈에서 Lb cDNA의 확인

재분화된 담배 게놈에 Lb cDNA가 도입되었음을 PCR과 게놈 혼성화 반응으로 확인하였다. PCR은 형질전환된 담배 잎으로부터 게놈 DNA를 분리한 후 Lb cDNA의 전사 개시

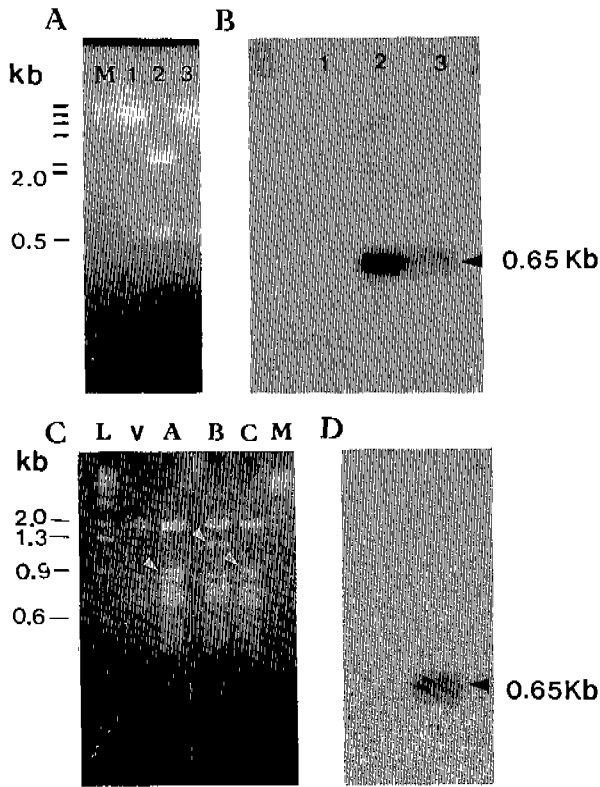


Fig. 2. Subcloning of the coding sequence of *C. lineata* Lb cDNA into the *Bam*HI site of pBKS1-1. A, Recombinant DNAs digested with *Bam*HI; B, Southern hybridization of the corresponding blot with the pCILb1 cDNA as a probe. Lane M, lambda DNA digested with *Hind*III; lane 1, pBKS1-1; lane 2, pUC19/Lb-cDNA; lane 3, pBKS1-1/Lb cDNA. C, Determination of orientation for the recombinant DNA. pBKS1-1/Lb cDNA was digested with *Hind*III/*Hae*II. Lane L, BRL's 1 kb DNA Ladder; lane V, pBKS1-1 digested with *Hind*III/*Hae*II; lane A and C, sense orientation of the recombinant DNA; lane B, anti-sense orientation of the recombinant DNA; D, Southern hybridization of the recombinant DNA introduced into *Agrobacterium tumefaciens*, strain LBA4404. DNA was digested with *Bam*HI. Arrow heads indicate 0.9 kb and 1.3 kb *Hind*III/*Hae*II fragments.

부위를 포함한 18-mer의 forward primer와 poly(A⁺) signal의 앞부분에 해당하는 24-mer의 backward primer를 사용하여 수행하였다. 그 결과 Lb cDNA의 두 primer 사이에 해당하는 500 bp DNA 절편이 7개의 재분화 개체중 6 개체에서 증폭 되었으며, 형질전환되지 않은 대조구에서는 증폭이 일어나지 않았다(자료 미제시). 또한, ³²P로 표지된 Lb-cDNA를 탐침 유전자로 사용하여 Southern 혼성화 반응을 수행한 결과, PCR 실험에서 확인된 6개체에 대해 혼성화 반응을 보여 담배의 염색체상에 Lb cDNA가 삽입되었음을 확인하였다(Fig. 4).

PCR을 통해 Lb cDNA의 도입이 확인된 형질전환체로부터

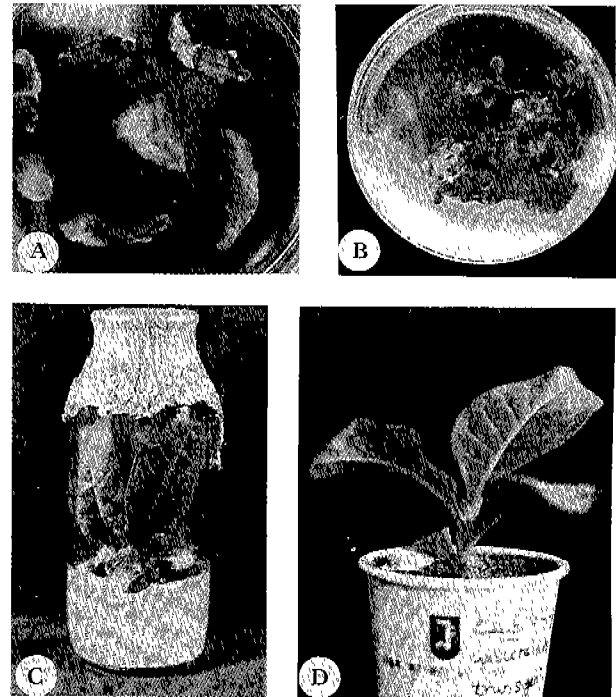


Fig. 3. Regeneration of a tobacco plant after transformation. A, transformed leaf segments. B, shoots formation from leaf discs on a shoot inducing medium (0.5 mg/L BAP, 200 mg/L kanamycin, 500 mg/L carbenicillin). C, root induction on a MS selection medium (0.1 mg/L NAA, 200 mg/L kanamycin, 500 mg/L carbenicillin). D, regenerated transformant.

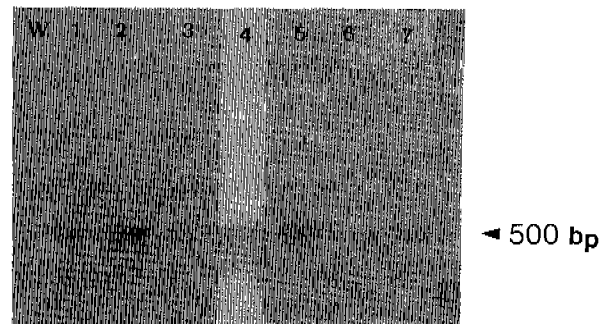


Fig. 4. Southern hybridization of the PCR products from the transgenic tobacco DNA with *C. lineata* Lb cDNA as a probe. lane W, wild type plant; lanes 1-5 and 7, transgenic plants with Lb cDNA; lane 6, transgenic plant without Lb cDNA.

분리한 DNA 10 µg을 *Eco*RI, *Sac*I으로 각각 절단한 후 676 bp의 Lb cDNA를 탐침으로 하여 게놈 Southern 혼성화 반응을 수행하였다. *Eco*RI으로 절단했을 경우, 1번 lane은 5.8, 3.5 kb, 3번 lane은 5.2 kb, 그리고 5번 lane은 6.2 kb의 band 위치에서 혼성화 반응을 보였다(Fig. 5A). *Sac*I으로 절단한

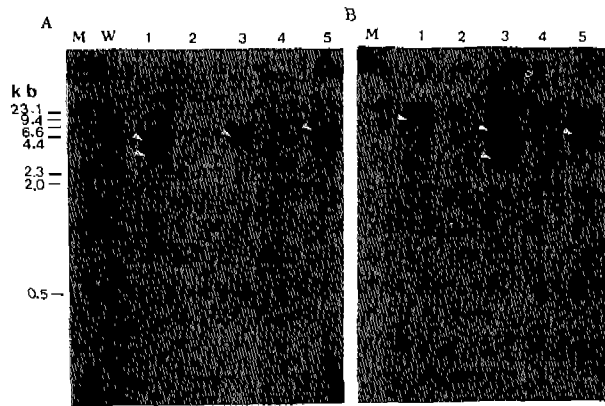


Fig. 5. Southern hybridization of the transgenic tobacco genomic DNAs digested with *EcoRI* (A) and *SacI* (B) with *C. lineata* Lb cDNA as a probe. Lane M, lambda DNA digested with *HindIII*; lanes 1-5, transgenic tobacco plants with Lb cDNA. Arrow heads indicate hybridizing fragments with the probe.

경우, 1번 lane에서는 8.0 kb, 3번 lane은 6.6, 4.0 kb 그리고 5번 lane에서는 6.6 kb의 위치에서 혼성화 반응을 보였다(Fig. 5B). Lane 2와 4에서는 혼성화 반응이 나타나지 않았는데, 이는 PCR 수행 결과를 고려하였을 경우(Fig. 4) DNA의 양적인 차이나 시료의 준비 과정중 DNase 등에 의한 게놈 DNA의 분해 때문인 것으로 여겨진다.

각 개체의 게놈 DNA를 제한효소로 절단하였을 때 서로 다른 위치에서 혼성화 반응을 보이는 것은 Lb cDNA가 식물체 염색체상의 서로 다른 위치에 삽입되었음을 보여주는 것으로 각 유전자의 발현이 상이하게 조절될 것으로 사료된다.

Leghemoglobin cDNA의 전사

형질전환된 담배에서 Lb cDNA의 전사는 northern 혼성화 반응과 PCR 분석으로 확인하였다. 전체 RNA 20 µg을 Lb cDNA를 탐침으로 사용하여 northern 혼성화 반응을 수행한 결과 PCR 수행에서 확인된 6개체의 형질전환체에서 Lb cDNA의 전사체에 해당하는 약 1,000 nt의 RNA가 혼성화 반응을 보였다(Fig. 6A).

또한, 전체 RNA 약 2 µg을 취해 1차 가닥의 cDNA를 합성하였고, 그 중 일부를 기질로 하여 Lb 유전자를 PCR로 증폭한 결과 Lb cDNA의 양 primer의 거리에 해당하는 약 500 bp의 DNA band를 확인하였다(자료 미제시). 증폭된 PCR 생성물을 nylon 막으로 전이한 후 Lb cDNA를 탐침으로하여 Southern 혼성화 반응을 실시한 결과 형질전환된 식물체의 PCR 산물에서 강한 혼성화 반응을 나타내었다(Fig. 6B). PCR을 이용한 RNA의 분석은 northern 혼성화 반응에 비하여

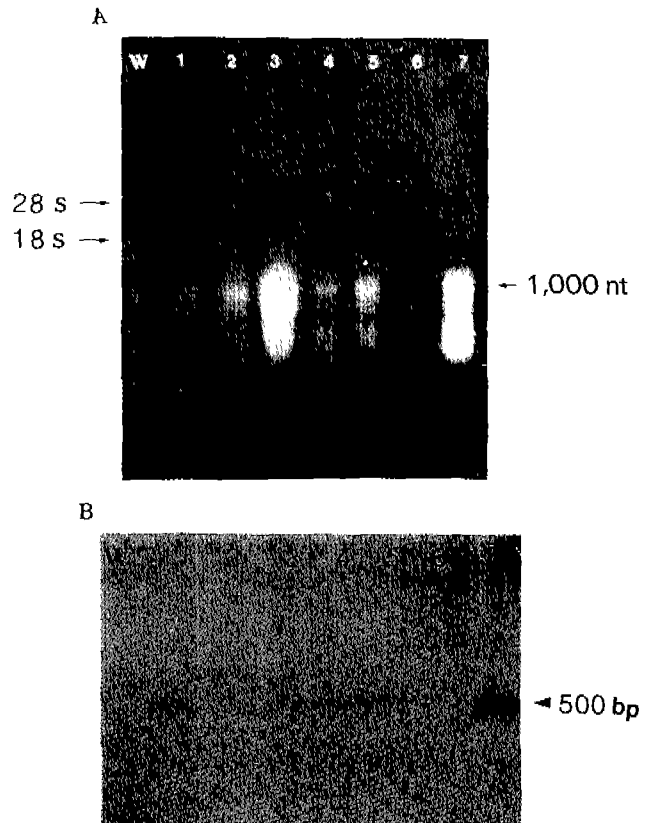


Fig. 6. Northern hybridization for the total RNA from the transformed tobacco (A) and Southern hybridization of the PCR products of the first strand cDNA synthesized from the total RNA (B) with *C. lineata* Lb cDNA as a probe. Lane designations are the same as in Fig. 4.

짧은 시간내에 적은 양의 시료를 사용하여 유전자의 발현을 증명할 수 있는 장점을 지니고 있으며(Dallman and Porter, 1991), 본 실험으로 그러한 사실을 확인할 수 있었다.

이상의 PCR 분석과 northern 혼성화반응의 결과로부터 위에서 도입된 해녀콩의 Lb cDNA가 형질전환된 식물체내에서 mRNA로 안정하게 전사됨을 확인할 수 있었다.

Leghemoglobin 단백질 검색

형질전환된 담배에 도입된 Lb cDNA가 단백질로 발현되는지를 확인하기 위하여 담배 잎에서 수용성 단백질을 분리하고 SDS-PAGE로 분리한 후, nitrocellulose 막으로 전이시켜 콩의 Lb에 대한 polyclonal antibody를 사용하여 면역 항체 반응 실험을 수행하였다.

그 결과 형질전환된 담배 모두에서 각각 31, 28, 24.5, 23.5, 16.4 그리고 15.8 kD의 최소 6개의 단백질이 혼성화 반응을 보였으며, 형질전환되지 않은 담배에서는 15.8 kD의 단백질을

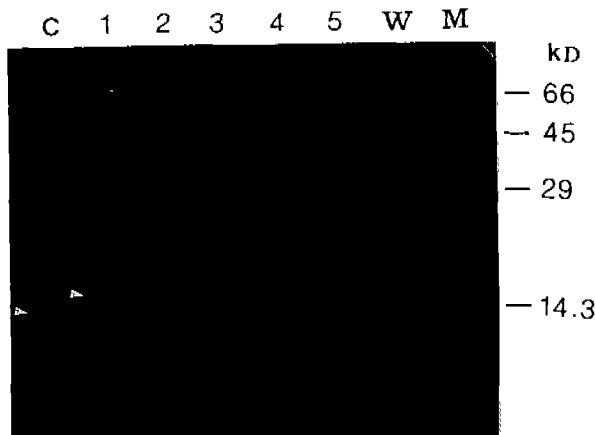


Fig. 7. Western blot analysis for a putative Lb produced in transgenic plants. Lane M, protein molecular weight markers; lane C, *C. lineata*; lane W, wild type tobacco plant; lanes 1-5, transgenic tobacco plants with the Lb cDNA. Arrow heads indicate putative leghemoglobins.

제외한 31, 28, 24.5 그리고 23.5 kD의 단백질이 혼성화 반응을 보였다(Fig. 7). 해너콩 Lb cDNA의 염기서열로부터 계산된 Lb 단백질의 분자량이 16.2 kD(Kim *et al.*, 1994)이며 뿌리혹 단백질의 2차원 전기영동을 통하여 확인한 Lb 단백질의 분자량이 15.7 kD(Choi and An, 1991)임을 고려하면 형질전환된 담배에서만 나타나는 15.8 kD의 단백질이 잠정적인 Lb 단백질로 판단되었다.

형질전환된 담배와 형질전환되지 않은 담배에서 공통적으로 혼성화 반응을 보이는 단백질들은 catalase, peroxidase, cytochrome C 등으로 대표되는 heme를 가지고 있는 hemoproteins일 것으로 사료된다(Runnegar, 1984).

이상의 결과를 종합해 보면, 질소고정을 하는 해너콩의 뿌리혹에서 산소운반과 산소분압 조절에 관여하는 Lb cDNA를 담배에 도입했을 경우, Lb cDNA가 식물체 핵 게놈상에 안정하게 삽입되고 Lb 단백질로 발현됨을 확인할 수 있었다. 형질전환된 식물체에 도입된 이러한 Lb cDNA가 안정되게 다음 세대로 전달되는지 또는 산소에 대한 높은 친화력과 상대적으로 낮은 해리율에서 기인하는(Wittenberg *et al.*, 1972) Lb의 기능이 형질전환된 담배에서 어떤 역할을 수행되는지에 대해서는 본 연구에서 밝히지 못하였으며, 분자생물학적, 생리학적 수준에서 보다 심도있는 연구에 의해 밝혀질 것으로 기대된다.

사 사

본 논문은 과학기술처 지원 선도기술개발사업 “고급 단백질 생산 형질전환 식물 개발”의 위탁과제 연구비에 의해 수행되었음.

인 용 문 헌

An, G., P.R. Ebert, A. Mitre and S.B. Ha. 1988. Binary vectors. In *Plant Molecular Biology Manual*. A3. S.B. Gelvin and R.A. Schilperoort (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 1-19.

Appleby, C.A. 1983. Hemoglobin in non-leguminous plant *Parasponia*: possible genetic origin and function in nitrogen fixation. *Science* **220**: 951-953.

Appleby, C.A. 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **35**: 443-478.

Birnbiom, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**: 1513-1523.

Bogusz, D., C.A. Appleby, J. Landsmann, E.S. Dennis, M.J. Trinick and W.J. Peacock. 1988. Functioning hemoglobin genes in a non-nodulating plant. *Nature* **331**: 178-180.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **102**: 459-471.

Brush, D., J.B. Dodgsin, O.-R. Choi, D.W. Stevens and J.D. Engels. 1985. Replacement variant histone genes contain intervening sequences. *Mol. Cell. Biol.* **5**: 1307-1317.

Choi, S.H. and C.S. An. 1991. Changes in nodule-specific proteins during nodule development of *Canavalia lineata*. *Korean J. Bot.* **34**: 121-127.

Dallman, M.J. and A.C.G. Porter. 1991. Semi-quantitative PCR for the analysis of gene expression. In *PCR a practical approach*. M.J. McPherson, P. Quirke and G.R. Taylor (eds.). IRL Press, New York. pp. 215-244.

Dellaporta, S.I., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**: 19-21.

Fuchsman, W. and C.A. Appleby. 1979. Separation and determination of relative concentration of the homogeneous components of soybean leghemoglobins by isoelectric focusing. *Biochem. Biophys. Acta.* **579**: 314-324.

Horsch, R.B., J.E. Fry, N.C. Hoffman, D. Eicholtz, S.G. Rogers and R.T. Fraley. 1985. A simple and general method for transforming gene into plants. *Science* **227**: 1229-1231.

Jing, Y., A.S. Paa and W.J. Brill. 1982. Leghemoglobin from alfalfa (*Medicago sativa* L. Vernal) root nodules. I. Purification and *in vitro* synthesis of five hemoglobin components. *Plant Sci. Lett.* **25**: 119-132.

Kim, I.S., S.H. Choi and C.S. An. 1994. Nucleotide sequence of leghemoglobin cDNA from *Canavalia lineata*. *J. Plant Biol.* **37**: 167-173.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Landsmann, J., E.S. Dennis, T.J.V. Higgins, C.A. Appleby, A.A. Kortt and W.J. Peacock. 1986. Common evolutionary origin of legume and non-legume plant hae-

- moglobin. *Nature* **324**: 166-168.
- Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook.** 1982. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 256-294, 368-369, 464-465.
- Murashige, T. and F. Skoog.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* **15**: 473-497.
- Runnegar, B.** 1984. Derivation of the globins from Type b cytochrome. *J. Mol. Evol.* **21**: 33-41.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Ed., Cold Spring Harbor laboratory Press, New York, pp. 7.37-7.50.
- Suh, M.J., C.B. Hong, S.S. Kim and W.S. Sim.** 1994. Transgenic tobacco plants *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin gene resistant to Korean-born tobacco budworms. *Molecules and cells* **4**:211-219.
- Sullivan, D., N. Brisson, B. Goodchild and D.P.S. Verma.** 1981. Molecular cloning and organization of two leghemoglobin genomic sequence of soybean. *Nature* **289**: 516-518.
- Towbin, H.T., T. Staehelin and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- Whittaker, R.G., S. Lennox and C.A. Appleby.** 1981. Relationship of the minor soybean leghemoglobins d1, d2, d3 to the major leghemoglobins c1, c2 and c3. *Biochem. Int.* **3**: 117-124.
- Wittenberg, J.B., B.A. Wittenberg and C.A. Appleby.** 1972. The kinetics of the reactions of leghemoglobin with oxygen and carbon monoxide. *J. Biol. Chem.* **247**: 527-531

(1995. 4. 28 接受)

Expression of *Canavalia lineata* Leghemoglobin cDNA in Transgenic *Nicotiana tabacum*

Lee, Seon Young, Choo Bong Hong¹ and Chung Sun An^{*}
*Department of Biology and ¹Institute for Molecular Biology and Genetics,
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*

ABSTRACT

Tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38) leaf discs were cocultivated with *Agrobacterium* carrying a leghemoglobin (Lb) cDNA from *Canavalia lineata*. Seven plants were regenerated from the transformed leaf discs on MS media supplemented with 0.5 mg/L BAP, 0.1 mg/L α -NAA, 200 mg/L kanamycin and 500 mg/L carbenicillin. Southern hybridization and PCR of genomic DNA from transgenic plants showed that the Lb cDNA was stably integrated into the genome of the tobacco. Total RNA from the transgenic tobacco showed northern hybridization signal at 1,000 nt and PCR of the first strand cDNA synthesized from the total RNA amplified 0.5 kb Lb cDNA. Furthermore, western hybridization using a polyclonal antibody against soybean Lb showed a 15.8 kD LB-like band on SDS-PAGE of proteins from the transformed tobacco. These results demonstrated that the Lb cDNA of *C. lineata* was not only incorporated into the genome of tobacco, but also transcribed into mRNA and translated into Lb protein in the transformed tobacco.

Keywords: *Canavalia lineata* Lb cDNA, tobacco transformation, PCR, Southern and northern hybridization, Western hybridization

*Corresponding author: Fax +82-2-872-6881