

Adenosine Deaminase 표지유전자로 형질전환된 연초의 신속한 Assay 방법

양덕춘* · 김용환¹ · 임학태² · 방극수³ · 배창휴⁴

한국인삼연초연구원, ¹농업과학기술원 생화학과, ²강원대학교 식물응용과학부, ³익산대학교 생명공학과, ⁴순천대학교 농업과학연구소

Visible and Fast Assay System for Tobacco Transformant Introduced with Adenosine Deaminase Marker Gene

YANG, Deok-Chun* · KIM, Yong-Hwan¹ · LIM, Hak-Tae² · BANG, Keuk-Soo³ · BAE, Chang-Hyu⁴

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taedok Science Town, Taejon, 305-345, Korea

¹Biochemistry Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon, 441-707, Korea

²Division of Applied Plant Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea

³Department of Biotechnology, Iksan National College, Iksan, 579-749, Korea

⁴Research Institution of Agricultural Science, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea

ABSTRACT New visible and fast assay system have been developed for tobacco transformant introduced with adenosine deaminase (ADA) marker gene, which converts cytotoxic adenosine analogues to non-toxic inosine analogues and ammonia. Ammonia was changed to blue color in the solution of phenol-nitoprusside and alkaline-hypochlorite. It was possible to detect activity of ADA visibly on the holes of 96 well plate using tiny explant of transgenic tobacco leaves within 1 hour incubation time. As substrates of ADA enzyme from transgenic plant on the plate, a number of adenosine analogues such as 9-D-arabinofuranosyl adenine, cordycepin, 2'-deoxyadenosine, adenosine and xylofuranosyl adenine were possible for detection of ADA activity. Optimal condition of substrate for ADA enzyme was each 10 mM and pH 7.5 in adenosine solution. Especially, transgenic plant did not convert adenosine to inosine and ammonia in the presence of ADA inhibitor deoxycofomycin, which means that ammonia produced from transgenic plant is due to expression of ADA gene. Now, we show that this detection system can be easily, sensitively, fast and cheaply as well as visibly assayed *in vitro* as GUS gene system with very small size of transformant explant.

Key words: Adenosine analogues, ammonium, colorimetric assay, deoxycofomycin

서 론

식물체에 도입할 수 있는 많은 유용유전자들의 개발과 식물세포의 형질전환용 운반체의 다수 등장으로 외부 유전자들을 식물 세포체내로 쉽게 삽입이 가능하게 되었으나 (An 1987; Herrera-Estrella et al. 1983; Hoekema et al. 1983;

Hoekema et al. 1986), 기술적인 면에서는 형질전환된 세포와 형질전환되지 않은 세포의 조기구별이 매우 중요한 관건으로 대두되게 되었다. 여기에 등장한 것이 바로 우성으로 작용하는 항생제 내성유전자 등과 제초제저항성 유전자 등을 선발 표지유전자로 사용하는 것이며 (Datla et al. 1992; DeBlock et al. 1987; Bevan et al. 1983; Herrera-Estrella et al. 1983), 또한 눈으로 바로 확인할 수 있도록 visible 표지유전자를 사용하는 것이다 (Jefferson 1987; Ludwig et al. 1990; Schneider et al. 1990). 이 중에서 현재 주로 사용되고 있는 항생제 표지유전자는 박테리아에서 유래된 neomycin phospho-

*Corresponding author. Tel 042-866-5434 Fax 042-862-2522

E-mail dcyang@gtr.kgtri.re.kr

transferase (NPT) II gene이며 (Datla et al. 1992), 이 유전자는 식물세포에서 발현되면 kanamycin, neomycin 그리고 G-418 등의 항생제에 내성을 나타내게 되어 형질전환체는 생존하지만 비형질전환체는 고사하게 된다. 한편 visible 표지유전자로서는 β -glucuronidase gene을 사용하는 것이 가장 많으며 (Jefferson 1987), 이 외에도 luciferase gene (Schneider et al. 1990)과 anthocyanin (Ludwig et al. 1990) 합성유전자의 사용가능성을 보고하고 있다. 그러나 이런 visible 표지유전자는 형질전환체의 선발 이후에 확인할 수 있는 방법으로 NPT II 유전자와 같이 직접 선발하는 데는 실제적으로 사용할 수가 없다. 이런 연유로 visible 표지유전자와 항생제 내성 표지유전자를 동시에 삽입시켜 일차적으로 항생제 배지에서 선발하고 이어 추가로 visible 표지유전자에 의하여 재확인하는 방법 등이 이용되고 있다 (Jefferson 1987; Bevan et al. 1983). 최근에 식물형질전환용 표지유전자의 개발에 힘입어 adenosine deaminase (ADA) 유전자를 형질전환용 표지유전자로 개발하고자 하는 연구가 진행되고 있으며 그 가능성을 제시한 바 있다 (Yang et al. 1995b). Adenosine deaminase는 purine 대사에 관여하는 효소로서 동물조직에는 어느 부위에나 존재하지만 세포의 성장에는 직접 관여하지 않으며 (Kellems et al. 1985; Yeung et al. 1985), 식물체에는 전혀 존재하지 않는 것으로 보고되어 있다 (Fox and Kelley 1978; Yeung et al. 1985).

ADA 효소는 adenosine을 inosine으로 변환시키는 효소로서 (Weyden and Kelley 1977), adenosine 대신 독성 adenosine 유도체를 식물조직배양 배지에 첨가하면 ADA 효소가 없는 식물체는 adenosine kinase의 작용으로 cAMP와 RNA 합성과정에서 cytotoxicity을 갖게 되어 모두 고사하게 된다 (Yang et al. 1989b). 반면에 ADA효소가 도입된 형질전환식물체의 경우에는 독성 adenosine 유도체를 무독성 inosine 유도체로 전환함으로써 정상적으로 생존이 가능할 것이라는 이론적인 근거에 의해서 많은 연구가 진행되고 있다. 이미 Yang (1995a) 등은 식물유전공학기법을 이용하여 mouse ADA cDNA를 연초조직에 형질전환시켜 동물세포유래 유전자가 연초식물체에서도 훌륭히 발현되었음을 확인한 바 있으며, 감자 (Choi et al. 1998), 고추 (Yang et al. 1997), 인삼 (Yang et al. 1996b) 등에서도 정상적으로 발현됨이 확인된 바 있다. 또한 독성인 adenosine 유도체를 이용하여 ADA 유전자를 연초조직의 형질전환시 표지유전자로서 사용이 가능함을 보고하여 (Yang et al. 1995b), 앞으로 많은 식물체에서 ADA 유전자를 표지유전자로서의 사용가능성을 제시하였다. 특히 일차적으로 표지유전자에 의해서 형질전환체가 확인되면 다시 여러 가지 방법에 의해서 형질전환체의 발현여부를 재확인해야 하는데, 이때 주로 활성도를 측정하는 방법이 사용된다. ADA 효소의 활성 측정방법은 동물조직에서는 여러 가지 방법으로 수행되어 왔으며 (Klenow 1952; Koerber et al. 1975; Martinek 1963), ADA 도입 형질전환 식물체에서도 spec-

trophotometer를 이용하여 활성도를 측정할 수 있는 방법이 이미 보고되었다 (Yang et al. 1996a).

본 실험은 ADA 유전자를 식물형질전환용 표지유전자로 활용할 때 NPT II 유전자와 같이 직접 형질전환체 선발을 유도할 수 있으며, 또한 형질전환체의 확인도 GUS 유전자와 같이 눈으로 확인할 수 있는 색깔 변화를 plate 위에서 직접 볼 수 있는 방법을 개발코자 수행하였던 바, 그 결과를 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시재료 및 시약

본 실험에 사용한 형질전환체는 ADA 유전자가 도입된 연초 (Yang et al. 1995a)로서 잎절편을 재분화배지 (MS/B5배지에 30 g의 sucrose, 2.5 mg/L BA, 0.1 mg/L NAA)에 치상하여 형성된 지상부를 발근배지 (1/2MS/B5 배지에 30 g의 sucrose, 0.1 mg/L NAA)에서 배양한 후 포트에 순화시켜 약 20 cm의 높이의 형질전환체 T182, T183과 비형질전환체를 사용하였다. Adenosine deaminase는 bovine spleen typeV (Sigma)를 사용하였으며, 9-D-arabinofuranosyl adenine (Ara-A), cordycepin, 2'-deoxyadenosine, adenosine, nitroprusside, phenol 등은 Sigma 제품을 사용하였고, xylofuranosyl adenine (Xyl-A)은 캐나다 식물유전공학연구소 (PBI, NRC)에서 공여받았다.

형질전환체의 확인 및 Xyl-A에 대한 반응

형질전환된 연초조직에서 ADA gene의 존재여부를 확인하기 위해서 PCR (Perkin Elmer Cetus, Fotodyne Incorporated)에 의한 확인방법을 사용하였다. PCR 분석을 위한 빠르고 간편한 DNA 추출방법은 Edwards 등 (1991)의 방법에 준하여 수행하였으며, PCR 조건은 96°C에서 2분간 pre-denaturation한 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 2분으로 하여 36 cycle을 수행하였으며, 이어서 72°C에서 15분간 post-extension시켜 확인하였다. ADA 유전자의 검출을 위한 primer는 sense 5'-ACT-TTG-GCA-AGA-AGA-GAG-GCA-TCG-3'와 antisense 5'-TAG-GGT-GGA-CTT-GAA-GAT-GAG-GGG-3'을 사용하였다. 본 실험에 사용된 연초 형질전환체 T183이 ADA 유전자가 발현되는지를 1차적으로 확인하기 위해서 강력한 독성 adenosine 유도체인 Xyl-A에 대한 반응을 조사하고자 연초의 잎을 ϕ 6 mm cork borer을 이용해서 절편을 만들어 사용하였다. MS/B5 (Sigma M0404) 배지에 sucrose 및 식물호르몬을 첨가한 후 pH 5.6, phyto agar 0.7% 첨가하여 습열멸균을 한 후, 온도가 55°C 정도 되었을 때 membrane filtration에 의하여 멸균된 Xyl-A

을 농도별 (0, 5, 10, 25, 50, 100 μM)로 처리하여 형질전환체와 비형질전환체의 잎절편을 접종하였으며, 25°C로 16 시간 광조건하에서 30일간 배양하여 분화능을 조사하였다.

ADA 효소의 활성분석을 위한 제반요인의 구명

연초 형질전환체로부터 ADA 효소의 활성여부를 색깔변화로 확인하기 위해서 Hopkinson (1969) 방법을 약간 변형해서 활성도를 측정하는 Yang 등 (1996a)의 방법을 활용하여 plate 위에서 색깔반응을 조사하였다. 우선 형질전환절편의 크기에 따른 ADA의 활성을 조사하기 위해서 1X, 1/2X, 1/4X 1/8X로 절편을 절단하여 adenosine이 함유된 plate의 well에 넣고 30분 및 60분간 배양한 후 색깔의 변화를 관찰하였다. 특히 모든 색깔의 변화가 ADA 효소에 의한 것인지 아니면 다른 요인 때문에 일어나는 현상인지를 조사하기 위해서 ADA 효소의 inhibitor인 deoxycoformycin을 처리하여 발색여부를 조사하였다. Substrate로 사용되는 adenosine 용액의 pH별 (pH 5.5에서 9.5), adenosine의 농도별 (1mM에서 20mM), adenosine의 substrate의 종류별 (adenosine, 2-deoxyadenosine, cordycepin, Ara-A, Xyl-A), 형질전환체별 (NPT II gene 도입식물체, NPT II gene과 proteinase inhibitor (PI) I gene 도입 식물체, PI II gene 도입 식물체, 내병성유전자 Mac gene, 그리고 제초제 저항성인 유전자 PAT gene과 GUS gene이 도입된 식물체), 연초품종별 (*Nicotiana tabacum* Xanthi, BY4 diploid, BY4 haploid, NC82, KF109), 연초조직의 부위별 (잎, 줄기, 뿌리, 엽병, midrib)로 처리하여 색깔의 변화여부를 조사하였다. 색깔의 반응은 50 μL phenol nitroprusside reagent (5.04 g phenol, 40 mg sodium nitroprusside/100 mL H₂O)를 넣고 현탁한 후 바로 50 μL 의 alkaline-hypochlorite reagent (0.6 M NaOH에 0.125%의 sodium hypochlorite 첨가)를 넣고 잘 혼합하여 30분간 37°C에서 배양하여 발색시켰다.

결과 및 고찰

ADA 도입 형질전환체의 확인 및 Xyl-A에 대한 반응

ADA 유전자가 도입된 연초 T182와 T183의 형질전환체 여부를 확인하기 위해서 우선 PCR에 의하여 확인하였다. 비형질전환체에는 전혀 밴드가 형성되지 않았으나 2종의 형질전환체에서는 800 bp 위치에 밴드가 공히 형성되어 ADA 유전자가 도입되어 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 1A). 또한 ADA 유전자의 발현여부를 간접적으로 조사하기 위해서 독성 adenosine 유도체인 Xyl-A가 농도별로 함유된 배지에서 생존여부를 조사한 결과, 비형질전환 조직은 25 μM 이상에서 모두 고사하였으나 (Figure 1B), 형질전환체 T183에서는 100

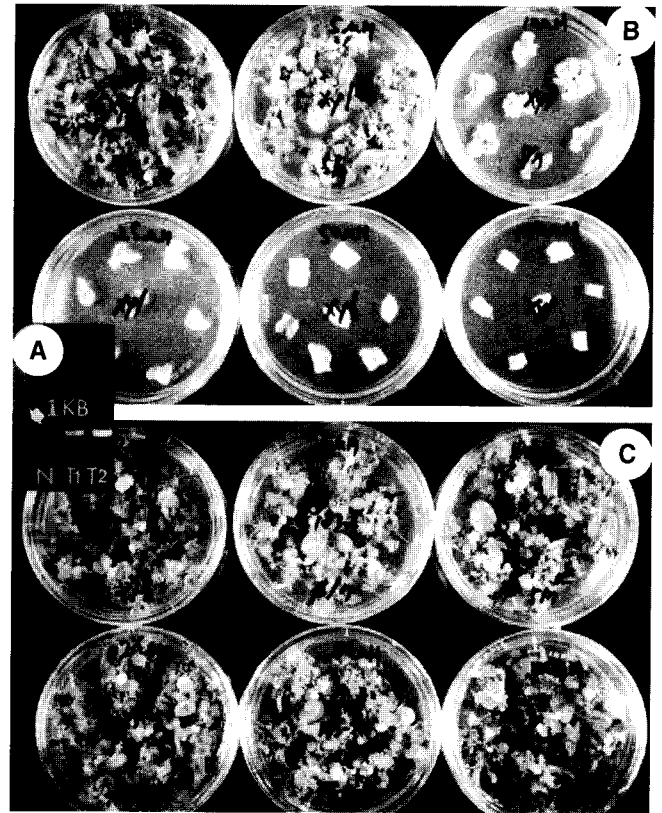


Figure 1. PCR products (800 bp) of non-transformant (A-N) and transformant T182 (A-T1), T183 (A-T2) of tobacco, and inhibition of growth of non-transformant (B) and transformant T183 (C) tobacco with ADA gene on the toxic Xyl-A media.

μM 의 고농도의 Xyl-A에서도 왕성하게 생존함을 알 수 있었다 (Figure 1C). 이로서 자연 상태에서는 ADA 효소가 식물체에는 존재하지 않지만 (Fox and Kelley 1978; Yeung et al. 1985), Yang (1995a) 등에 의하여 개발된 vector system으로 ADA 유전자가 도입된 연초 형질전환체는 ADA 효소가 정상적으로 발현되고 있음을 간접적으로 확인할 수 있었다. 따라서 본 형질전환체를 활용하여 신속하고 간단한 방법에 의하여 ADA 활성을 눈으로 직접 확인할 수 있는 방법이 필요할 것으로 생각된다.

ADA 효소의 활성분석을 위한 제반요인의 구명

ADA 유전자가 도입된 연초조직 T182, T183조직을 색깔 변화로 형질전환체 여부를 확인하기 위해서 비형질전환체의 잎조직과 함께 plate 위에서 ADA 효소활성에 의해서 나타나는 여러 가지 색깔변화 요인을 조사하였다 (Figure 2). 본 실험은 Yang (1996a) 등이 ADA 효소의 활성도를 spectrophotometer에 의해서 측정하는 방법을 변형하여 활용하였는데, 보편화되어 있는 GUS 유전자의 확인방법 (Jefferson 1987)과 유사하게 형질전환체의 잎조직을 96 well plate 위에서 발색을 보고 형질전환체 여부를 조사하는 방법이다. ADA 효소는 adenosine을 inosine과 암모니아로 변환시키는 효소로

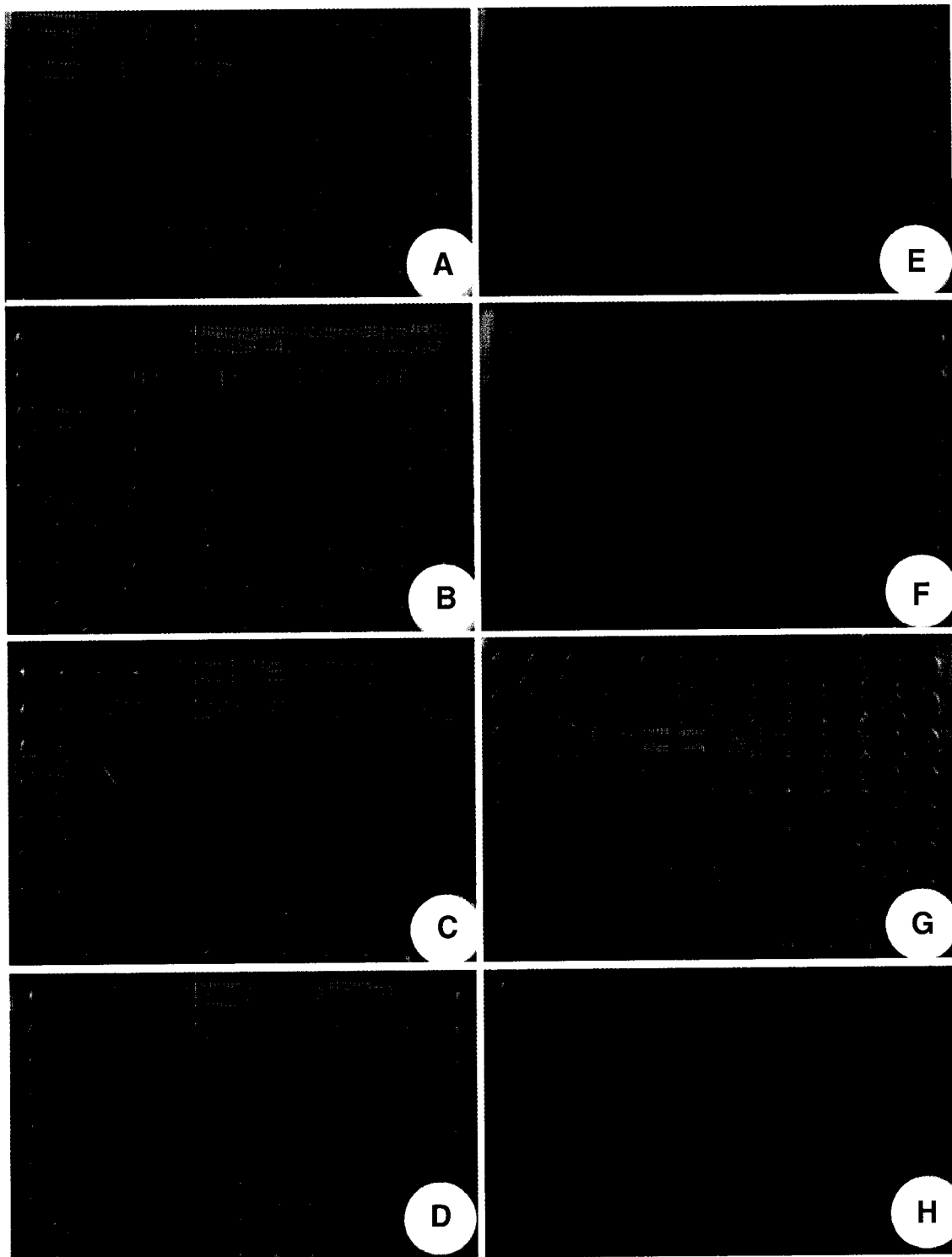


Figure 2. Color change according to various condition of tobacco transformant on the plate : A, explant size and incubation time; B, concentration of adenosine solution; C, various adenosine analogues (Aden, adenosine; 2'-DA, 2'-deoxy- adenosine; Cord, cordycepin; Ara-A, arabinofuranosyl adenine; Xyl-A, xylo- furanosyl adenine); D, different varieties of tobacco; E, pH of adenosine solution as substrate; F, effect of 2'-deoxycoformycin on the inhibition of adenosine deaminase activity on the plate; G, transgenic plants with various foreign DNA; H, parts of normal and transgenic tobacco plant on the plate.

adenosine을 substrate로 공급하였을 때 형성되는 암모니아를 phenol로 plate위에서 바로 채집하여 색깔로 변환시키는 방법이다. 즉, plate의 well에 일정량의 adenosine 용액을 넣고, 이어 형질전환체의 절편을 넣어 절편 속에 들어 있는

ADA 효소의 작용으로 adenosine이 inosine과 암모니아로 변환되면서 이때 형성된 암모니아를 포집하여 조사하는 방법이다. 이때 가장 문제가 되는 것이 식물체 절편 내에 존재하는 endogenous 암모니아였는데, 이 문제는 형질전환체의

explant의 크기를 매우 작게 함으로써 해결할 수 있었다 (Figure 2A). 직경 6 mm의 형질전환체와 비형질전환체의 절편의 크기를 다시 1X, 1/2X, 1/4X 1/8X 절단하여 절편을 adenosine 용액이 함유된 plate의 well에 넣고 30분 및 60분 간 배양한 후 색깔의 변화를 관찰하였던 바, 1/4X 및 1/2X의 크기에서 형질전환체는 모두 색깔이 변화되었지만 비형질전환체에서는 색깔이 변화되지 않았으며 (Figure 2A), 처리시간도 30분과 60분이 서로 차이가 없는 것으로 나타났다 (Figure 2A). 이런 결과는 절편의 크기를 적게 했을 경우 성공적으로 형질전환체와 비형질전환체를 구별할 수 있음을 시사하며, assay 시간의 단축을 위해서 60분보다 30분을 처리하는 것이 더 효과적일 것으로 사료되었다. 이후 모든 실험에서 절편의 크기는 1/8X의 크기로 사용하였으며 처리시간도 30분으로 하였다. 또한 암모니아는 pH에 따라 많은 차이가 있으므로 substrate로 사용되는 adenosine 용액의 pH를 5.5에서 9.5까지 달리 처리하여 색깔의 변화를 조사한 결과 상기 농도에서는 발색의 차이가 거의 없었지만 (Figure 2B), pH 7.5로 사용하는 것이 다소 양호한 것으로 나타났다. 한편 adenosine 용액의 농도에 따라 발색정도를 조사하기 위해서 농도를 1 mM에서 20 mM까지 조사하였던 바, 역시 커다란 차이가 외관상 나타나지 않고 형질전환체는 발색을, 그리고 비형질전환체는 전혀 발색이 되지 않았다 (Figure 2C). 이런 점을 고려할때 adenosine 용액의 농도는 10mM로 사용하는 것이 좋을 것으로 사료되었다. 또한, 각종 adenosine 유도체의 substrate에 따른 발색정도를 조사한 결과, 기 사용된 adenosine 뿐만 아니라 2'-deoxyadenosine, cordycepin, Ara-A 그리고 Xyl-A 공히 색깔변화를 나타내어 모두 ADA의 substrate로 사용할 수 있을 것으로 생각되었다 (Figure 2D). 그러나 이런 색깔변화가 ADA gene의 발현에 의한 것이 아니라 다른 영향에 의하여 나타날 가능성을 전혀 배제할 수 없으므로 ADA 효소의 작용을 억제시키는 deoxycoformycin을 사용하여 실제 ADA의 작용에 의해서 색깔변화가 일어나는지를 조사하였다. Figure 2E에서 보듯이 deoxycoformycin을 첨가하지 않은 처리구에서는 비형질전환 조직은 색깔변화가 없었고, 형질전환체들에서만 색깔이 변화되었으나 deoxycoformycin이 첨가된 처리구에서는 비형질전환 조직뿐 아니라 형질전환체에서도 모두 색깔변화가 일어나지 않아 색깔의 변화가 ADA 작용에 의하여 나타남을 확인시켜 주었다. 또한 다른 외부유전자에 의해서 색깔이 나타날 가능성이 있으므로 NPT II gene만이 도입된 식물체, NPT II gene과 proteinase inhibitor (PI) I gene이 도입된 식물체, PI II gene이 도입된 식물체, 내병성유전자인 Mac gene, 그리고 제초제 저항성인 PAT gene과 GUS gene이 도입된 식물체를 대상으로 색깔의 변화정도를 조사하였던 바, ADA gene이 아닌 다른 외부유전자들에서는 전혀 색깔의 변화를 관찰할 수 없었다 (Figure 2F). GUS gene의 경우에는 식물체에 따라서는 자체 내에서 GUS 활성도를 가지고 있으므로 (Jefferson 1987), 본 실험에

서도 연초품종에 따라 ADA 발현 가능성이 있을 가능성을 배제하기 위해서 품종별로 조사한 결과 어느 품종에서도 색깔을 변화시키지 못하였다 (Figure 2G). 또한 ADA gene에 의해서 형질전환된 조직일지라도 부위에 따라 활성도가 다를 것으로 생각되어 잎, 줄기, 뿌리, 엽병 그리고 midrib를 대상으로 하여 활성도를 조사한 결과 잎부위를 사용하는 것이 형질전환된 조직과 형질전환 되지 않은 조직을 구별하기가 가장 양호하였다 (Figure 2H).

상기 결과를 종합하여 plate위에서 ADA 효소의 assay를 위한 가장 양호한 조건을 요약하면 Figure 3과 같다.

먼저 ADA 유전자의 substrate로 adenosine용액의 농도를 10mM로 하여 pH가 7.5 되게 조절하여 96 well plate의 hole에 50 μ l를 넣고, 여기에 형질전환식물체와 대조구로 비형질전환체의 잎을 ϕ 6 mm cork borer로 절편을 내어 크기를 다시 1/8X로 하여 adenosine용액이 함유되어 있는 hole에 넣었다. 본 plate를 37°C의 incubator에서 30분 동안 반응시킨 후 phenol-nitoprusside 50 μ l를 넣고 반응을 정지시키고, 이어 바로 alkaline-hypochlorite용액 50 μ l를 첨가하여 다시 37°C의 incubator에서 30분 동안 반응시키면 ADA 형질전환체의 경우 청색의 색깔이 매우 선명하게 나타났다. 따라서 이 발색여부로 형질전환체와 비형질전환체를 성공적으로 확인할 수 있게 되었다.

ADA 효소를 가지고 있는 동물조직의 경우 ADA 효소측정을 위해서 가장 일반적으로 사용해 온 방법이 adenosine을 기질로 하여 생성된 inosine의 함량을 265 nm에서 조사하는 방법인데 이 방법은 inosine의 순수분리를 잘해야 좋은 결과를 얻을 수 있어 간단한 추출방법에 의해서는 spectrophotometer에 나타나는 수치가 매우 차이가 심한 편이다 (Koerber et al. 1975; Martinek 1963). 또한 NAD(P)H-

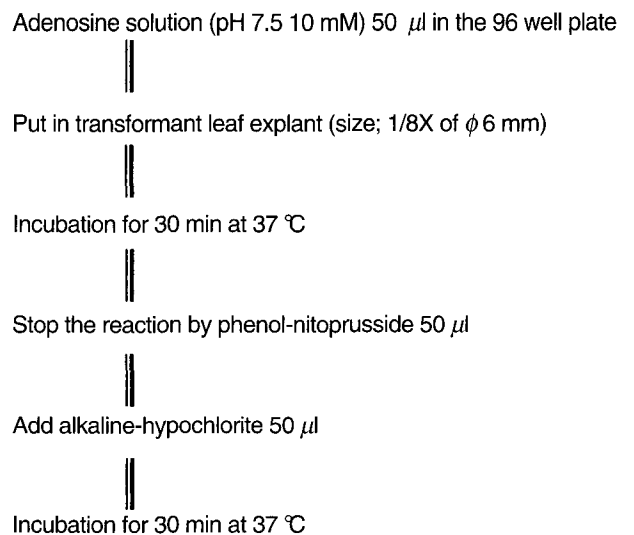


Figure 3. Optimal condition for visible assay of adenosine deaminase activity on the plate.

coupling 방법 (Ellis and Goldberg 1970; Heinz et al. 1980) 과 방사선으로 표지된 기질을 이용하여 radiometric assay 방법 (Meier and Conscience 1980) 등이 이용되고 있으나, 방법이 복잡하고 방사선동위원소를 사용해야 하므로 간편하게 사용하기에는 다소 문제점이 있었다. 따라서 ADA가 adenosine을 inosine으로 변환시킬 때 암모니아가 방출되므로 암모니아의 함량을 조사하여 ADA의 활성도를 조사하는 것이 비교적 간편하며 신속하고 (Hjemdahl-Monsen et al. 1977) 방사선동위원소를 사용하지 않아도 가능하므로 이 방법을 사용하는 것이 매우 효과적일 것으로 생각된다. 특히 암모니아는 phenol을 알칼리성 용액과 sodium hypochlorite가 함유된 용액 내에서 매우 강한 청색의 indo-phenol로 변화시킴으로 쉽게 spectrophotometer 635 nm에서 측정할 수 있어 (Hopkinson et al. 1969), 누구나 쉽게 ADA 활성여부를 조사할 수 있는 방법으로 생각된다. 이미 Yang 등 (1996a)도 Hopkinson (1969) 방법을 약간 변형하여 ADA의 활성도를 spectrophotometer를 이용하여 조사하였는데, 형질전환된 연초 잎에서 훌륭히 ADA 활성도를 측정할 수 있었으며 이런 결과는 최초로 식물에서 ADA 효소의 활성도를 조사한 결과라고 생각된다. 또한 본 실험결과 성공적으로 형질전환체로부터 발색여부를 눈으로 직접 확인할 수 있어 그 동안 주로 사용해온 GUS gene의 단점을 보완할 수 있게 되었다. 즉, GUS gene은 일차적인 선발표지유전자로 사용할 수 없고, 다만 선발된 형질전환체를 재확인하는 보조적인 방법으로밖에 사용할 수 없었다. 그러나 본 실험에서 확인된 ADA gene은 일차적인 선발표지유전자로써 뿐만 아니라 이차적으로 발색여부에 의한 확인방법까지 결합할 수 있는 방법이 개발되었으며, 특히 형질전환체 여부를 매우 작은 절편을 이용하여, 쉽고 빠르고 값싸게 확인할 수 있게 되었다.

적 요

Adenosine deaminase 유전자를 연초의 형질전환용 표지유전자로 활용할 때 형질전환체 여부를 매우 빠르고 눈으로 직접 색깔을 확인할 수 있는 새로운 방법이 개발되었다. ADA 효소는 독성인 adenosine 유도체를 비독성인 inosine 유도체와 암모니아로 변환시키는데, 이때 형성된 암모니아를 phenol-nitopruside와 alkaline-hypochlorite 용액을 이용하여 청색으로 변환시켜 96 well plate 상에서 1시간 내에 형질전환체 여부를 쉽게 확인할 수 있게 되었다.

ADA 효소의 substrate로서 9-D-arabinofuranosyl adenine, cordycepin, 2'-deoxyadenosine, adenosine and xylofuranosyl adenine이 모두 가능하였으며, substrate 용액의 최적조건은 adenosine 10 mM과 pH 7.5이었다. 특히 형질전환체는 ADA 효소의 inhibitor인 deoxycoformycin이 함유되어 있는 용액 속에서는 adenosine을 inosine과 암모니아로 변환시키

지 못해 색깔의 변화가 없었는데, 이는 형질전환체에서 색깔의 변화는 ADA 효소의 작용 때문에 일어나는 것을 의미한다. 따라서 본 연구결과는 ADA 표지유전자가 도입된 형질전환체의 확인에 있어서 GUS gene system과 같이 눈으로 직접 확인할 수 있을 뿐만 아니라 매우 작은 크기의 형질전환체 절편으로 쉽고, 빠르면, 값싸게 확인할 수 있게 되었다.

인용문헌

- An G (1987) Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymology* **153**:292-305
- Bevan MW, Flavell RB, Chilton MD (1983) A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* **304**:184-187
- Choi KH, Yang DC, Jeon JH, Kim HS, Jung YH, Jung H (1998) A comparison of microtuberization efficiency between normal and adenosine deaminase transgenic potato plantlets cultured *in vitro*. *Korean J Plant Res* **11**:252-256
- Datla RSS, Hammerlindl JK, Panchuk B, Pelcher LE, Keller W (1992) Modified binary plant transformation vectors with the wild type gene encoding NPT 2. *Gene* **211**:383-384
- DeBlock M, Herrera-Estrella L, Montagu MV, Schell J, Zambryski P (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J* **3**:1681-1689
- Edwards K, Johnston C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**:1349
- Ellis G, Goldberg DM (1970) A NADH linked kinetic assay for adenosine deaminase EC 3.5.4.4. activity. *J Lab Clin Med* **76**:507-517
- Fox IH, Kelley WN (1978) The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Ann Rev Biochem* **47**:655-686
- Heinz F, Reckel S, Pilz R, Kalden JR (1980) A new spectrophotometric assay for enzymes of purine metabolism: IV Determination of adenosine deaminase. *Enzyme* **25**:361-367
- Herrera-Estrella L, De Block M, Montagu MV, Schell J (1983) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J* **2**:987-992
- Herrera-Estrella L, Depicker A, Montagu MV, Schell J (1983) Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-Plasmid derived vector. *Nature* **303**:209-213
- Hjemdahl-Monsen OE, Papastathopoulos DS, Rechnitz GA (1977) Automated adenosine deaminase enzyme determination with an ammoniasensing membrane electrode. *Anal Chim Acta* **88**:253-259
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*

- 303:179-180
- Hoekema A, Van Haaren MJJ, Fellingner AJ, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA** (1986) Non-oncogenic plant vectors for use in the *Agrobacterium* binary vector system. *Plant Molecular Biology* 5:85-89
- Hopkinson DAH, Cook PJJ, Harris H** (1969) Further data on the adenosine deaminase polymorphism and a report of a new phenotype. *Ann Hum Genet* 32:361-367
- Jefferson RA** (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5:387-405
- Kellems RE, Yeung CY, Ingolia DE** (1985) Adenosine deaminase deficiency and severe combined immunodeficiencies. *Trend Genet* 1:278-283
- Klenow J** (1952) The enzymic oxidation and assay of adenine. *Biochem J* 50:404-407
- Koerber W, Meisterernst EB, Herrmann G** (1975) Quantitative measurement of adenosine deaminase from human erythrocytes. *Clin Chim Acta* 63:323-333
- Ludwig SR, Bower B, Beach L, Wessler SR** (1990) A regulatory gene as a novel visible marker for maize transformation. *Science* 247:449-450
- Martinek RG** (1963) Micromethod for the estimation of serum adenosine deaminase. *Clin Chem* 9:620-625
- Meier W, Conscience JF** (1980) A fast and simple radiometric assay for adenosine deaminase using reversed-phase thin-layer chromatography. *Anal Biochem* 105:334-339
- Schneider M, Ow DW, Howell SH** (1990) The *in vivo* pattern of firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* 14:935-947
- Weyden MBV, Kelley WM** (1977) Adenosine deaminase: characterization of the molecular heterogeneity of the enzyme in human tissue. *Adv Exp Med Biol* 76:236-248
- Yang DC, Park JC, Choi KT, Lee JM** (1995a) Expression of mouse adenosine deaminase gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Korean J Plant Tissue Culture* 22:195-200
- Yang DC, Han SS, Yoon ES** (1995b) Adenosine deaminase gene: possible selectable marker for tobacco transformation. *Korean J Plant Tissue Culture* 22:235-240
- Yang DC, Bang KS, Choi KH** (1996a) Extraction and activity assay of mouse adenosine deaminase from transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Korean J Plant Tissue Culture* 23:55-60
- Yang DC, Bang KS, Park JC, Choi KH, Choi KT** (1996b) Expression of adenosine deaminase gene in ginseng hairy root by genetic transformation. *Korean Society of Plant tissue Culture* 23:303-309
- Yang DC, Lee KY, Yoo YS, Choi KH, Lim HT** (1997) Plant Regeneration and expression of mouse adenosine deaminase gene in transgenic hot pepper (*Capsicum annuum* L.) plant. 1997. *Korean Society of Plant tissue Culture* 24:37-41
- Yeung CY, Ingolia DE, Roth DB, Shoemaker C, Al-Ubaidi MR, Yen JY, Ching C, Bobomis C, Kaufman RJ, Kellems RE** (1985) Identification of function murine adenosine deaminase cDNA clones by complementation in *E. Coli*. *J Biol Chem* 260:10299-10307

(접수일자 2001년 2월 6일)