

## Particle Bombardment에 의해 전처리 된 참나리(*Lilium lancifolium* Thunb.) 캘러스의 *Agrobacterium tumefaciens*을 통한 형질전환

남상욱\*, 김혜영  
동국대학교 생물학과

### *Agrobacterium* Mediated Transformation from Callus Pretreated with Particle Bombardment in *Lilium lancifolium* Thunb.

Sang Wook Nam\*, Heiyoung Kim-Lee  
Department of Biology, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

**ABSTRACT** To improve transformation efficiency, the callus of *Lilium lancifolium* Thunb. were bombarded by particles coated with pIG121Hm which include *NPT II* and *GUS* genes, and then cocultivated with *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 which contain pIG121Hm binary vector, carrying neomycin phosphotransferase (*NPT II*) and  $\beta$ -Glucuronidase (*GUS*) genes. Three days after cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens* and particle bombardment, the callus clusters were transferred to MS medium containing 1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BAP, 100 mg/L kanamycin and 200 mg/L carbenicillin. Four weeks after transfer to the selection medium, *GUS* expression was detected and PCR analysis revealed the presence of *NPT II* fragment of the expected size (700 bp) in the transformed callus. The *GUS* expression from *Agrobacterium*-mediated transformants after particle bombardment increased to over 3-folds compared with that of callus cocultivated with *Agrobacterium tumefaciens* without particle bombardment. The callus clusters containing kanamycin resistant gene were transferred to MS medium containing 1 mg/L NAA and 1 mg/L BAP. Somatic embryos were developed in four weeks and microbulbs expressing *GUS* were formed.

**Key words:** genetic transformation,  $\beta$ -Glucuronidase, acetosyringone, lily

#### 서 론

식물체의 형질전환 효율을 결정하는 요인으로는 유전자 운반체가 외래유전자를 세포내로 도입시킬 수 있는 능력, 형질전환 된 세포에 대한 효과적인 선발, 형질전환 된 세포로부터의 재분화 그리고 식물체 계승 안으로 투입된 DNA의 안정성을 들 수 있다 (Brown 1995). 이러한 4 가지 요인을 고려할 때, 최근 가장 각광 받고 있는 형질전환 방법으로는 *Agrobacterium*

을 매개로 외부의 특정유전자를 식물체내로 도입시키는 방법과 particle에 특정유전자를 코팅하여 물리적으로 식물체 세포내로 투입시키는 particle bombardment 방법이 있다.

*Agrobacterium*에 의한 방법은 비교적 안정성과 재현성이 높고, 방법도 용이하며 single-copy integration의 빈도도 높고 비용도 적게 소요되는 장점이 있다 (Hiei et al. 1997). 그러나 일반적으로 쌍자엽 식물에 비하여 비속주 식물인 단자엽 식물에서 그 효율이 떨어지는 단점이 있으며 T-DNA 전이에 필요한 페놀계 화합물인 acetosyringone의 처리농도, 공동배양 기간 등과 같은 여러 가지 조건들의 확립이 선행되어야한다 (Hiei et al. 1994).

\*Corresponding author Tel 02-2260-3319 Fax 02-2269-3833  
E-mail: swnam@dgu.edu

Particle bombardment 방법은 세포나 조직에 최소한의 영향을 주면서 여러 종류의 조직세포에 폭넓게 이용가능하고 형질전환효율도 높으나, multi-copy integration의 문제와 고가의 기기가 필요하며 각 식물조직세포마다 기기사용에 따른 부수적인 조건들을 조절해 주어야하는 단점이 있다 (Christou 1997).

형질전환 효율을 증가시키기 위하여 식물 형질전환에 보편적으로 사용되고 있는 위의 두 가지 형질전환 방법을 병행함으로써 Zuker 등 (1999)은 카네이션에서 GUS 발현을 7.5배 더 증가시킬 수 있었다고 보고하였으며, Lucas 등 (2000)은 해바라기에서 이러한 변형된 방식의 형질전환방법을 통하여 형성된 형질전환체의 유전자가 후대에도 안전하게 전달되는 것으로 보고 하였다.

본 연구에서는 위의 두 가지 형질전환 방법을 변형하여 병행함으로써 형질전환 효율을 향상시키고자 하였다. 즉, DNA를 코팅하여 particle bombardment를 실행한 참나리 소인편을 *Agrobacterium*으로 감염시킨 처리구와 전처리 없이 *Agrobacterium*만 감염시킨 처리구로 나누어서 GUS 발현과 PCR 분석을 통한 형질전환 효율을 비교 확인함으로써 보다 효율이 높은 형질전환방법을 개발하기 위하여 실시되었다.

## 재료 및 방법

### 식물재료와 캘러스 유도

식물재료는 참나리 종자를 사용하였으며 종자를 흐르는 수돗물에 깨끗이 씻은 후 증류수로 3 회 세척하고 무균상내에서 70% ethanol로 3 분간 소독한 다음 멸균수로 세척한 후 Tween20이 첨가된 1% sodium hypochlorite 용액에 종자를 교반하면서 10 분간 소독하고 멸균수로 3 회 세척하였다. 소독된 종자를 MS 기본배지(Murashige and Skoog 1962)에 치상하여 26±2°C에서 일장 16 시간 광 (2,000 Lux)과 8 시간 암주기로 70 일정도 배양하여 기내 소식물체의 소인편(microscales)을 실험재료로 사용하였다. 기내배양한 소인편을 캘러스 유도배지 (Table 1)에 치상한 후, 26°C에서 8 주간 암배양하여 캘러스를 유도하였으며, 유기된 캘러스는 직경 0.5 cm의 크기로 잘라 실험재료로 사용하였다.

### *Agrobacterium* strains and plasmids

*Agrobacterium tumefaciens* EHA101에 포함된 vector는 pIG121Hm으로서 T-DNA 내부에 β-glucuronidase (GUS), hygromycin phosphotransferase (HPT)와 neomycin phosphotransferase (NPT II)를 가지고 있다 (Figure 1). *Agrobacterium* strain은 kanamycin 100 mg/L이 첨가된 YEP액체배지 (Table 1)에서 28°C 암배양하여 사용하였다.

## Particle bombardment

Birnboim과 Doli (1979)의 방법을 이용하여 *Agrobacterium*으로부터 plasmid DNA를 추출하여 1 μg/μL의 농도로 -20°C에서 보관하며 사용하였다. Sanford 등 (1993)의 방법에 따라 pIG121Hm을 코팅하기 위하여 tungsten (1.0 μm) 입자 60 mg을 50% glycerol 1 mL로 현탁 한 후 새 튜브에 50 μL씩 분주하고 plasmid DNA 5 μL(μg/μL)을 넣어 입자를 코팅하였다. Particle delivery system은 Biomex사의 'Gene Gun'을 사용하였으며 40 cmHg 진공상태에서 50 kgf/cm<sup>2</sup>의 헬륨압, 사출거리 9 cm로 bombarding하였다.

### *Agrobacterium* 공동배양

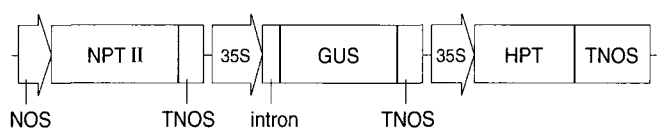
YEP액체배지 (Table 1)에서 28°C, 암배양한 *A. tumefaciens* EHA101을 식물재료와 함께 con-tube에 넣은 후, Chai와 Kim (2000)의 방법을 변형하여 bath sonication에서 5 분간, vacuum 하에서 20 분간 침적시킨 후 co-culture배지에서 3 일간 26°C 암상태에서 공동배양 하였다.

### 형질전환체 선발

3 일간 공동배양한 캘러스를 500 mg/L의 carbenicillin이 포함된 멸균수에 3 회 세척한 후 선발배지 (Table 1)로 옮겨 성

**Table 1.** Media composition used for the tissue culture and transformation of *Lilium lancifolium* Thunb.

Media	Composition
YEP	10 g/L Bacto peptone, 10 g/L Bacto yeast extract, 5 g/L NaCl, pH 7.2
Callus induction	MS salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BAP, 9 g/L agar, pH 5.8
Co-culture	MS salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BAP, 40 mg/L acetosyringone, pH 5.8
Selection	MS salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BAP, 100 mg/L kanamycin, 200 mg/L carbenicillin, 9 g/L agar, pH 5.8
Regeneration	MS salts and vitamins, 30 g/L sucrose, 1 mg/L NAA, 1 mg/L BAP, 100 mg/L carbenicillin, 9 g/L agar, pH 5.8



**Figure 1.** Structure of the T-DNA regions of pIG121Hm. NPT II, neomycin phosphotransferase; GUS, β-glucuronidase; HPT, hygromycin phosphotransferase; 35S, CaMV35S-promoter; NOS, nopaline synthase promoter; TNOS, 3'signal of nopaline synthase.

장시켰다. 26°C에서 4 주간 암배양하여 증식된 캘러스만을 선발하였다.

### GUS 분석

선발배지로부터 증식된 캘러스를 대상으로 *GUS*활성의 조직화학적 분석을 Jefferson 등 (1987)의 방법에 따라 실시하였다. Particle bombardment 처리와 *Agrobacterium* 공동배양 후 선발배지에서 증식된 캘러스와 *Agrobacterium* 공동배양만을 거친 후 선발배지에서 증식된 캘러스를 *GUS* 염색액(2mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide in 50mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.0)에 침적 후 37°C에서 24시간 반응시켜서 *GUS*유전자의 발현 여부를 확인하였다.

### PCR 분석

유전자의 삽입여부를 확인하기 위하여 Fulton 등 (1995)의 방법을 이용하여 *NPT II* primer를 이용한 PCR 분석을 수행하였다. PCR 반응용액은 10×buffer 2.5 μL, dNTPs 2 μL, Taq polymerase 0.125 μL를 첨가하고 primer 1, 2를 각각 0.25 μL, template DNA 5 μL를 넣고 전체용액을 25 μL로 하여 반응시켰다. Primer는 5'-GAGGCTATTCGGCTATGACTG-3'와 5'-ATCGGGAGCGGCGAT ACCGTA-3'를 사용하였고, PCR Thermo Cycler를 이용한 첫 DNA변성은 94°C에서 1분간, 그 후의 변성은 94°C에서 1분간, annealing은 60°C에서 1분간, 그리고 DNA 합성은 72°C에서 1분간 35 cycle로 실행하였으며, 최종 DNA합성은 72°C에서 10분간 하였다. 반응시킨 용액은 1% agarose gel에 전개시켜 확인하였다.

### Kanamycin 저항성 캘러스로부터 소인경 재생

선발배지에서 4 주간 증식된 캘러스를 재분화배지에 치상하여 25°C, 16 시간 광 (2000 lux)조건에서 캘러스로부터 소인경의 발생을 유도하였다. 캘러스로부터 재분화된 소인경의 형질전환 유무를 확인하기 위하여 *GUS*유전자 발현분석을 실시하였다.

## 결과 및 고찰

*Agrobacterium*과 공동배양시 적정량의 Acetosyringone의 첨가는 Bolton 등 (1986)과 Lee 등 (1998)의 결과에서처럼 단자엽 식물인 참나리의 형질전환율에도 크게 영향을 미쳤다. 예비실험에서 가장 적절한 Acetosyringone의 농도는 40 mg/L인 것으로 나타났으며, 특히 Acetosyringone을 전혀 첨가하지 않았을 경우에는 형질전환이 전혀 일어나지 않았다. 또한, *Agrobacterium*과 공동배양하지 않은 캘러스의 경우 kana-

mycin 70 mg/L이 포함된 배지에서 서서히 갈변되며 죽었다. *NPT II* 유전자의 발현 여부를 조사하기 위한 선발배지 내의 kanamycin농도는 100 mg/L가 적당 할 것으로 생각된다.

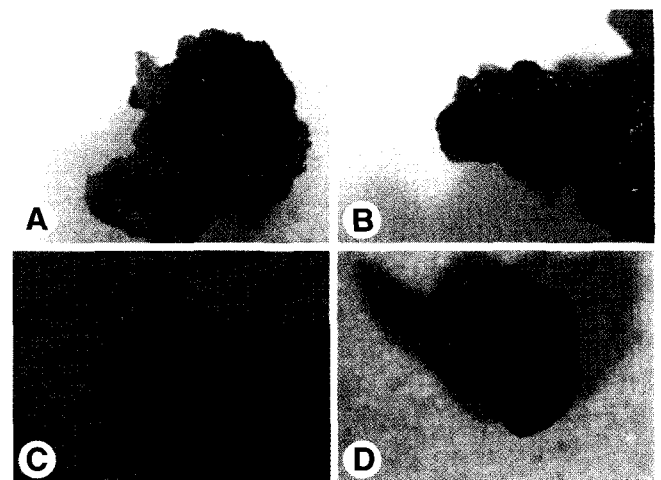
Kanamycin에 저항성을 나타내는 캘러스를 선발한 결과 particle bombardment 후 *Agrobacterium*을 감염시킨 처리구에서는 33%의 kanamycin 저항성 캘러스 발생율을 보였으며 *Agrobacterium*감염만 처리한 실험구에서는 26.5%의 kanamycin저항성 캘러스 발생율을 나타내었다.

선발배지에서 선발된 캘러스 세포괴를 각각 *GUS* 발현 분석해본 결과, particle bombardment 후 *Agrobacterium*을 감염시킨 처리구는 16%, *Agrobacterium*만 감염시킨 실험구는 5.5%의 캘러스 세포괴에서 *GUS* 유전자의 발현이 확인되었다.

도입된 외래 유전자를 확인하기 위하여 캘러스 세포괴로부터 분리한 염색체 DNA로 PCR을 실시하였다. 21-mer의 oligomer로 된 *NPT II* 유전자의 염기서열 양쪽 말단 특이 primer를 사용하여 PCR을 수행한 결과 700 bp크기의 DNA 밴드가 얻어졌다(Figure 3).

Kanamycin저항성 캘러스로부터 소인경으로의 재생율을 조사하기 위하여 particle bombardment 후 *Agrobacterium*을 감염시킨 처리구와 *Agrobacterium*만 감염시킨 처리구를 각각 선발배지에서 4주간 성장시켜 kanamycin저항성 캘러스를 선발한 후 재분화배지에서 4주간 성장시킨 결과 particle bombardment 후 *Agrobacterium*을 감염시킨 처리구 200 개 중에서 3 개 (1.5%)의 소인경이 캘러스로부터 소인경이 형성되는 재분화과정이 진행되었고, *Agrobacterium*만 감염시킨 실험구에서는 재분화가 일어나지 않았다. 재분화된 소인경은 *GUS*가 발현되는 것을 확인하였다(Figure 2).

형질전환 방법 중 *Agrobacterium*만을 감염시키는 방법은 식물조직의 상태에 따라서 크게 영향을 받지만, particle bom-



**Figure 2.** *GUS* gene expression in callus of *Lilium lancifolium* Thunb. after the particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated transformation. A, *GUS* expression of callus after 1 week; B, *GUS* expression of callus after 5 weeks; C, *GUS* expression of somatic embryos developed from callus; D, Microbulb regenerated from callus.

bardment 처리 후 *Agrobacterium*을 감염시키는 방법은 피층이 얇은 캘러스에서 뿐만 아니라 피층이 두꺼운 일반 조직에서도 효과적일 것으로 생각된다. 즉, 식물조직 내로의 접근을 쉽게 해줄 수 있는 방법이라 생각된다.

Zuker 등 (1999)과 Lucas 등 (2000)은 카네이션과 해바라기를 재료로 하여 DNA코팅이 되지 않은 텅스텐 입자를 bombardment 한 후 *Agrobacterium*으로 감염시킴으로써 *Agrobacterium*만 감염시켰을 때 보다 더 높은 형질전환효율을 나타냈다는 보고를 한 바 있다. Bombardment에 사용된 particle이 조직에 미세한 상처를 많이 만들었고 이 상처를 통해서 *Agrobacterium*이 더 쉽게 조직 내로 감염될 수 있는 환경을 만들어 준 것으로 생각된다.

본 실험의 더 나은 형질전환 효과도 이와 같은 효과로 예측된다.

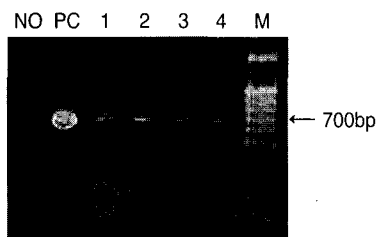
이상의 결과를 통해 참나리 캘러스를 이용한 형질전환 시 particle bombardment 처리 후 *Agrobacterium*을 감염시키는 방법이 *Agrobacterium*만 감염시키는 방법보다 형질전환효율이 더 높은 것으로 나타났다(Table 2).

후 캘러스를 1 mg/L 2,4-D, 0.1 mg/L BAP, 100 mg/L kanamycin, 그리고 200 mg/L carbenicillin이 포함된 MS배지로 옮겨 4주간 성장시킨 후 kanamycin 저항성 캘러스를 선발하여 *GUS* 발현을 관찰하였고, PCR 분석을 통하여 700 bp의 *NPT II* 유전자가 도입된 것을 확인하였다. Particle bombardment 후 *Agrobacterium*과 공동배양 한 처리구가 *Agrobacterium*과 공동배양만 한 처리구보다 *GUS* 발현 분석에 의한 형질전환 효율이 3 배 정도 더 높았다. 형질전환 된 재분화 식물체를 얻기 위해 다시 선발된 kanamycin 저항성 캘러스는 1 mg/L NAA와 1 mg/L BAP가 포함된 재분화 배지에 옮겨져 4주 후 형질전환 된 소인경을 형성하였다.

사사 - 본 연구는 동국대학교의 연구비 지원에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

**적 요**

형질전환 효율을 높이기 위하여, *NPT II*와 *GUS* 유전자를 포함하고 있는 pIG121Hm을 미세 입자에 코팅하여 particle bombardment를 수행한 후 pIG121Hm가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101와 3일간 공동배양하였다. 그



**Figure 3.** PCR detection of NPT II DNA in transformants. Lane M is the 100 bp DNA ladder, lane NC is the negative control, lane PC is the positive control, lane 1, 2 is the *Agrobacterium*-mediated transformants after particle bombardment, lane 3, 4 is the *Agrobacterium*-mediated transformants.

**인용문헌**

Bimboim HC, Doli J (1979) A rapid alk aline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523

Bolton GW, Nester EW, Gordon MP (1986) plant phenolic compounds induce expression of *Agrobacterium tumefaciens* loci needed for virulence. *Science* 232: 983-985

Brown SK (1995) Genetic transformation by particle bombardment and *Agrobacteria*. *J Kor Soc Hort Sci* 36: 432-437

Chai ML, Kim DH (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of korean lawngrass (*Zoysia japonica*). *J Kor Soc Hort Sci* 41: 455-458

Christou P (1997) Rice transformation: bombardment. *Plant Mol Biol* 35: 197-203

Fulton TM, Chunwongse J, Tanksley SD (1995) Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol Biol Rep* 13: 207-209

Hiei Y, Komari T, Kubo T (1997) Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 35: 205-218

Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence

**Table 2.** Efficiency of selection in kanamycin resistance, *GUS* expression and microbulb regeneration

Experiment	No. of callus cluster	No. of selected kanamycin resistance callus cluster (%)	No. of <i>GUS</i> -expressing callus cluster (%)	No. of regenerated microbulb (%)
Bombardment				
<sup>z</sup> <i>Agrobacterium</i> <sup>z</sup>	200	66(33)	32(16)	3(1.5)
<sup>y</sup> <i>Agrobacterium</i> <sup>y</sup>	200	53(26.5)	11(5.5)	0(0)

<sup>z</sup>Treatments cocultivated with *Agrobacterium tumefaciens* after particle bombardment.

<sup>y</sup>Treatments cocultivated with *Agrobacterium tumefaciens* without particle bombardment.

- analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J* 6: 271-282
- Jefferson RA, Kavanaugh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker for higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907
- Lee HY, Lee CH, Kim HI, Han WD, Choi JE, Kim JH, Lim YP (1998) Development of bialaphos-resistant transgenic rice using *Agrobacterium tumefaciens*. *Korean J Plant Tiss Cult* 25: 283-288
- Lucas O, Kallerhoff J, Alibert G (2000) Production of stable transgenic sunflowers (*Helianthus annuus* L.) from wounded immature embryos by particle bombardment and co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Breeding* 6: 479-487
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol* 15: 473-497
- Sanford JC, Smith FD, Russell JA (1993) Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Meth Enzymol* 217: 485-509
- Zuker A, Ahroni A, Tzfira T, Ben-Meir H, Vainstein A (1999) Wounding by bombardment yields highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Mol Breeding* 5: 367-375

(접수일자 2003년 3월 29일, 수리일자 2004년 2월 14일)