

해충저항성 GM 배추에서 T-DNA와 식물체 게놈의 인접 부위 분석

임선형*, 박승혜, 김정환, 김나영, 원소윤, 이시명, 신공식, 우희종, 김동현, 조현석*
농업생명공학연구원 생물안전성과

Analysis of junction between T-DNA and plant genome in insect resistance GM Chinese cabbage

Sun-Hyung Lim*, Seung-Hye Park, Jung-Hwan Kim, Na-Young Kim, So-Youn Won, Si-Myung Lee, Kong-Sik Shin, Hee-Jong Woo, Dong-Hern Kim, and Hyun-Suk Cho*

Biosafety Division, National Institute of Agricultural Biotechnology, RDA, Suwon 441-707, Korea

ABSTRACT The *Agrobacterium*-mediated transformation has been successfully used method to introduce foreign genes into some monocotyledonous as well as a large number of dicotyledonous plants genome. We developed transgenic Chinese cabbage plants with insect-resistance gene, modified *CryIIAc*, by *Agrobacterium*-transformation and confirmed transgene copy number by Southern blot analysis. We confirmed that twenty-nine out of 46 transgenic Chinese cabbage plants have single copy of *CryIIAc*. To obtain the sequences information on the transferred DNA (T-DNA) integration into plant genome, we analyzed left border (LB) flanking sequences by genome walking (GW) PCR method. Out of 46 transgenic Chinese cabbage plants examined, 37 carried the vector backbone sequences. This result indicates that the transfer of the vector backbone from the binary vectors resulted mainly from inefficient termination of LB site. Analysis of T-DNA LB flanking region of 9 transgenic Chinese cabbage plants without vector backbone revealed that all LB ends were not conserved and nucleotides up to 36bp from the LB cleavage site were deleted.

서 론

*Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 형질전환방법은 외래 유전자를 전달하는 보편적이며 가장 많이 이용되는 방법이다 (Hansen and Wright 1999; Glevin 2003). 도입하고자 하는 외래유전자는 *A. tumefaciens*의 Ti (Tumor-inducing) plasmid에서 25개의 염기 쌍으로 구성된 좌측 boarder (LB)와 우측 boarder (RB) 사이에 위치한다. Ti plasmid내의 *VirD1*과 *VirD2* 단백질은 LB와 RB의 3번째와 4번째 염기서열을 인식하여 절단한 후, *VirD2* 단백질이 단일가닥 T-DNA의 5'에 공

유결합함으로써 식물체 핵 내로의 T-DNA 운반에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Sheng and Citovsky 1996; Zupan et al. 2000). T-strand는 일반적으로 RB에서 시작되어서 LB에서 종결되는 것으로 알려져 있다.

그러나 최근의 연구들에서 식물체의 게놈내로 목적유전자뿐만 아니라 운반체의 backbone도 함께 도입되는 보고가 있었다 (Kumar and Fladung 2002; Kim et al. 2003; Huang et al. 2004; Kuraya et al. 2004; Kim and Lee 2007). 많은 경우, LB 또는 RB 인접부위에 운반체 backbone의 일부 염기서열 또는 운반체의 backbone 전체가 식물체의 게놈내로 도입됨이 보고되었다. 형질전환된 식물체 게놈에 운반체의 backbone 염기서열이 삽입되는 비율은 20% 내지 50%로 보고되었으나, 많은 경우에는 75%까지도 나타났다 (Kononov et al. 1997; De

*Corresponding author Tel 031-299-1163 Fax 031-299-1122
E-mail: limsh2@rda.go.kr

Buck et al. 2000; Kuraya et al. 2004). 이러한 원인을 *Agrobacterium* 유래의 형질전환에서는 2가지 가설로 설명하고 있다. 첫째, *Vir* 단백질이 T-strand 형성을 위해서 RB를 개시부위로 인식하나, LB에서 T-strand 종결을 인식하지 못하여 계속적으로 read-through (전사진행)되어 운반체의 backbone도 함께 도입되는 것과, 둘째, T-strand 형성이 LB에서 시작되어 RB로 진행되어 전체 운반체가 도입되어 일어나는 것으로 알려져 있다.

도입하고자 하는 T-DNA 외에 운반체의 backbone 염기서열이 식물체의 게놈내로 도입되는 것은 다음과 같은 문제점을 야기할 수 있다. 첫째, 운반체의 backbone에 있는 염기서열은 도입유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 둘째, 상업적인 유전자변형농산물을 규제하는 관리당국이나 구매하는 소비자들은 도입유전자 이외의 불필요한 유전자의 도입을 원하고 있지 않다 (Gamble and Gunson 2002; Lusk and Sullivan 2002; Small 2004; http://www.defra.gov.uk/environment/acre/molecdata/pdf/acre_mdr_guidance.pdf). 따라서 최근 이러한 문제점을 극복하고자 T-DNA의 바깥 염기서열에 식물체로 들어가면 치사작용을 일으키는 유전자를 도입하여 운반체의 backbone이 식물체에 삽입될 경우 형질전환체를 얻지 못하는 방법 (Hanson et al. 1999)과 LB에서 T-strand 종결을 인식하지 못하여 계속적으로 전사진행되는 것을 막기 위해서 두개 이상의 LB를 연속적으로 위치하여 전사진행을 막는 방법 (Stahl et al. 2002; Kuraya et al. 2004; Huang et al. 2004) 등이 연구되고 있다.

본 연구에서는 형질전환 배추에서의 T-DNA의 식물체 게놈내의 도입양상을 밝히고자, *Agrobacterium*을 이용하여 배추 형질전환체를 얻었고, 이들 배추 형질전환체의 도입유전자의 copy 수를 Southern 분석을 통해 확인하였다. Genome walking PCR을 이용하여 형질전환 배추의 T-DNA의 인접서열을 증폭하고, 염기서열을 분석하여, 형질전환 배추의 경우에도 형질전환시 운반체의 backbone 염기서열이 다수 들어감을 확인하였다.

재료 및 방법

식물재료

배추 (*Brassica rapa*) 종자는 동부한농(주)의 순계계통인 노원을 사용하였다. 배추종자를 70% (v/v) 에탄올에서 2분간 표면 살균한 다음, 2.5% (v/v) sodium hypochlorite 용액에서

10분간 살균하고 멸균수로 3회 세척하였다. 살균된 종자는 MS 기본배지 (Murashige and Skoog 1962)에 치상한 후, 26°C에서 암배양하고, 발아 후 5일된 배추식물체의 하배축을 실험재료로 사용하였다.

유전자

해충저항성 배추형질전환체를 육성하기 위해 사용된 운반체인 416은 pCAMBIA3301을 backbone으로 하여 dual 35S 프로모터와 식물에서 발현이 잘 되도록 염기서열을 변형한 해충저항성 유전자인 *CryIac* 유전자와 35S 프로모터와 사과로부터 분리된 개화유전자인 *MdMADS*를 역방향으로 삽입하여 제조하였다. 운반체 410은 pCAMBIA3301을 backbone으로 하여 dual 35S 프로모터와 식물에서 발현이 잘 되도록 염기서열을 변형한 해충저항성 유전자인 *CryIac* 유전자와 35S 프로모터와 또 다른 해충저항성 유전자인 *CryIC* 유전자를 도입하여 구축된 것을 사용하였다. 2개의 운반체 모두 선발마커로는 *bar* 유전자를 사용하였으며, *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 형질전환된 것을 동부한농(주)으로부터 분양 받아 사용하였다 (Fig. 1A and Fig. 2A)

배추 형질전환

형질전환된 *A. tumefaciens* LBA4404를 YEP (Km^R) 액체배지에 접종하여 48시간 동안 진탕배양하였다. *Agrobacterium* 배양액에 배추 하배축을 20분간 감염시킨 다음, 1 mg/L NAA, 1 mg/L BA, 10 g/L sucrose, 8 g/L agar가 첨가된 MS배지에서 2일간 공동배양하였다. 형질전환된 재분화 식물체를 얻기 위하여 1 mg/L NAA, 1 mg/L BA, 300 mg/L carbenicillin, 3 mg/L phosphinotricine (PPT), 10 g/L sucrose, 8 g/L agar가 첨가된 MS 배지에서 배양한 다음, 3주마다 계대배양 하였다. 재분화된 신훈은 300 mg/L carbenicillin, 3 mg/L PPT, 10 g/L sucrose, 8 g/L agar가 첨가된 MS배지로 옮겨 발근을 유도하였다. 발근된 개체는 순화 후 화분으로 이식하여 온실에서 생육하였다.

배추 형질전환체의 Southern blot 분석

Genomic DNA는 Kim (2002)의 방법을 이용하여 추출하였고, 20 µg DNA를 제한효소 *HindIII*로 처리하여 0.8% agarose gel에 전기영동한 다음, capillary transfer 방법 (Southern 1975)으로 nylon membrane에 전이시켰다. Membrane은 0.5

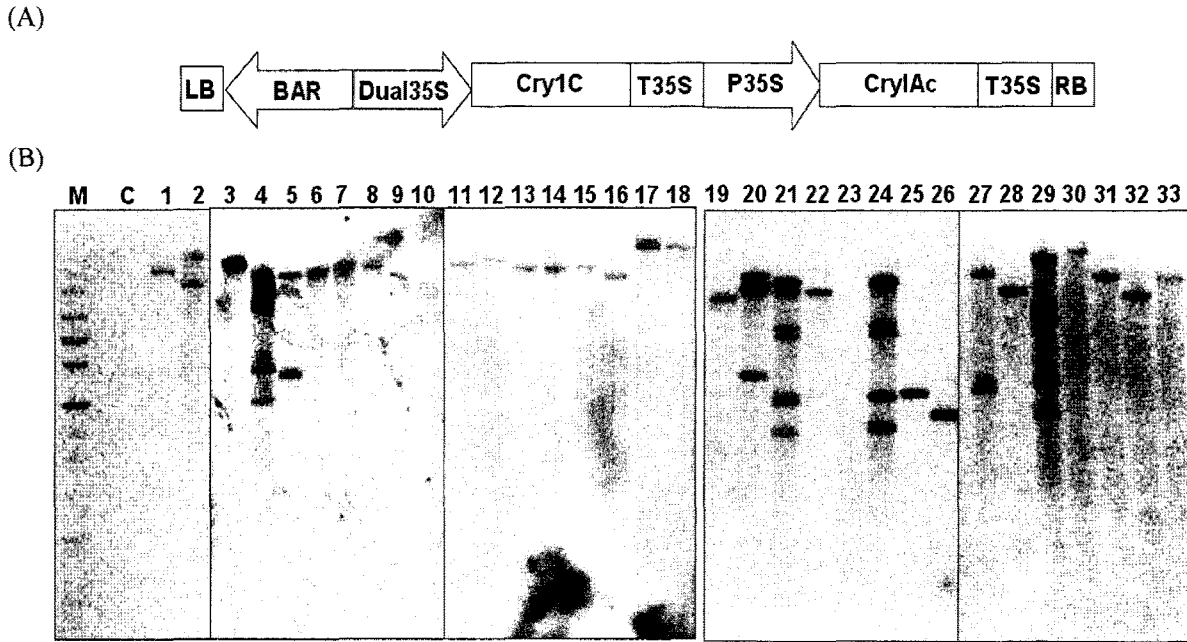


Figure 1. Map of the binary vector 410 (A) and Southern blot analysis of transgenic Chinese cabbage plants (B). (A) LB: left border, Dual P35S: Cauliflower mosaic virus promoter 35, T35S: Cauliflower mosaic virus terminator, BAR: phosphinothricin acetyltransferase gene, Cry1C: synthetic insect - resistance gene, CryIAc: synthetic insect - resistance gene, RB: right border. (B) Genomic DNA isolated from transgenic plants harboring 410, was digested with *Hind*III, and then hybridized with *CryIAc* gene. C: wild type plant, number means different Chinese cabbage plants. M: 1kb plus 100bp DNA ladder.

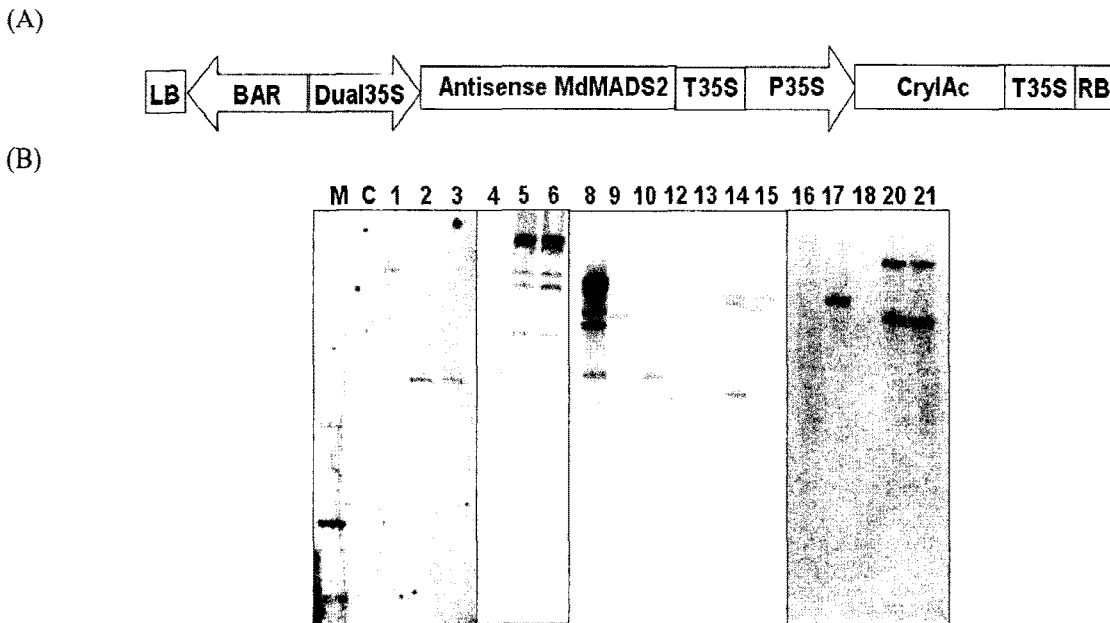


Figure 2. Map of the binary vector 416 (A) and Southern blot analysis of transgenic Chinese cabbage plants (B). (A) LB: left border, Dual P35S: Cauliflower mosaic virus promoter 35, T35S: Cauliflower mosaic virus terminator, BAR: phosphinothricin acetyltransferase gene, CryIAc: synthetic insect - resistance gene, MdMADS2: *Malus domestica* MADS box gene, RB: right border. (B) Genomic DNA isolated from transgenic plants harboring 416, was digested with *Hind*III, and then hybridized with *CryIAc* gene. C: wild type plant, number means different Chinese cabbage plants. M: 1kb plus 100bp DNA ladder.

M sodium phosphate buffer (pH 7.2), 7% SDS, 1% BSA, 1 mM EDTA, 0.1 mg/ml denatured salmon sperm DNA가 첨가된 용액에서 3시간 (65°C) 동안 prehybridization 한 다음, [α - 32 P]dCTP

로 표지된 *CryIAc* DNA를 첨가하여 12시간 hybridization 하였다. Membrane은 2 X SSC, 0.1% SDS 용액 (65°C)에서 20분, 1 X SSC, 0.1% SDS 용액 (65°C)에서 20분 세척한 후

Bio-imaging analyzer (BAS-2000; Fuji Photo Film, Japan)로 분석하였다.

T-DNA 삽입부위의 인접서열 분석

유전자도입이 확인된 배추식물체로부터 genomic DNA를 분리하여 genome walker (Invitrogen co.)를 이용하여 인접서열을 확인하였다. 제조사가 제공한 방법들을 이용하여 T-DNA가 삽입된 인접부위를 증폭하였다. Genome walker의 방법에 따라 분리된 genomic DNA를 *DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *StuI*의 blunt-end 제한효소를 이용하여 37°C에서 2시간 처리한 후, 전기영동을 통하여 genomic DNA의 절단을 확인하였다. 절단된 genomic DNA에 25 µM genome walker adaptor (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTTCGACGGCCCGGGCTGGT-3', 3'-H₂N-CCCGACCA-PO₄-5')를 첨가하여 16°C에서 8시간이상 ligation을 수행하였다. 효소반응을 억제하기 위해서 70°C에서 5분간 처리한 뒤에 이를 주형 DNA로 bar F1 프라이머 (5'-CTTCAGCCTGCCGGTACCGCCC GTCCGGTCTGCCCG-3')와 AP1 프라이머 (5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3')를 이용하여 1st PCR을 수행하였고, 이를 희석하여 bar F2 프라이머 (5'-GGGTTCTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGC-3')와 AP2 프라이머 (5'-ACTATAGGGCAGCGTGGT-3')를 이용하여 2nd PCR을 수행하였다. 1st PCR과 2nd PCR 조건은 94°C에서 3분간 변성시킨 후, 94°C에서 25초, 72°C에서 3분의 단계로 7회 실시하고, 94°C에서 25초, 67°C에서 3분의 단계로 32회 반복하여 실시하고, 67°C에서 5분간 최종 증폭하였다. 증폭된 PCR산물은 1% agarose gel에 전기영동한 후, gel extraction kit (Qiagen co.)를 사용하여 정제한 후, pGEM-T easy 벡터 (Promega)에 삽입하여 양방향의 염기서열을 확인하였다. 확인된 염기서열을 NCBI BLAST 분석을 이용하여 유사성 분석을 수행하였다.

배추 형질전환체에서 운반체 backbone 염기서열의 존재 여부를 확인하기 위해서 T-DNA의 안쪽의 bar 프라이머 (5'-CTTCAGCCTGCCGGTACCGCC-3')와 T-DNA의 LB바깥쪽의 backbone 특이적인 프라이머인 LB out 프라이머 (5'-CCGCCGTGATCACAGGCAGC-3')를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 조건은 94°C에서 3분간 변성시킨 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초의 단계로 30회 반복하여 실시하고, 72°C에서 5분간 최종 증폭하였다. 증폭된 PCR산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 분석하였다.

결과 및 고찰

배추 형질전환

해충저항성 배추를 개발하기 위해서 제작된 2종류의 식물발현용 운반체(410, 416)를 octopine형의 *vir* 유전자를 지닌 *agrobacterium* strain LBA4404 (Hoekema et al. 1983)에 도입하였다. 5일간 암배양한 배추 하배축에 *agrobacterium* 현탁액을 접종한 후, 2일간 공동배양을 실시하고, PPT가 첨가된 배지에서 형질전환체를 선발하였다. 살아남은 개체를 PPT가 첨가된 배지에서 2-3주마다 계대배양하였고, 뿌리유도 후 화분에 심어서 온실에서 순화시켜 운반체의 종류에 번호를 붙여 명명하였다.

형질전환 배추의 도입 유전자의 copy 수

재분화된 배추식물체의 해충저항성 유전자 도입여부 및 도입유전자의 수를 확인하기 위해서, PPT 배지에서 살아남은 배추 잎과 형질전환시키지 않은 대조구 배추 잎으로부터 genomic DNA를 추출하여 *CryIac*의 DNA 단편을 probe로 이용하여 Southern 분석을 수행하였다.

식물발현용 운반체 410과 416을 이용하여 형질전환된 해충저항성 배추를 분석한 결과, 대조구에서는 band가 검출되지 않았으나 (Fig. 1과 2의 lane C), 형질전환 배추식물체에서는 band가 검출되어 배추식물체의 genome내로 *CryIac* 유전자가 도입되었음을 확인하였다. 식물발현용 운반체 410을 이용하여 선발된 형질전환 배추식물체의 Southern 분석결과 1 copy의 유전자가 도입된 것은 72% (23/32개체), 2 copy의 유전자가 도입된 것은 12.5% (4/32개체), 3 copy의 유전자가 도입된 것은 3% (1/32개체), 4 copy 이상의 유전자를 도입된 경우는 12.5% (4/32개체)로 나타났다 (Fig. 1). 식물발현용 운반체 416을 이용하여 선발된 형질전환 배추식물체를 분석한 결과, 형질전환된 배추식물체 14개체 중에서 1 copy의 유전자가 도입된 것은 43% (6/14개체), 2 copy의 유전자가 도입된 것은 29% (4/14개체), 3 copy의 유전자가 도입된 것은 7% (1/14개체), 4 copy 이상의 유전자가 도입된 경우는 21% (3/14개체)로 나타났다 (Fig. 2). 형질전환된 배추에서 도입유전자의 copy 수는 운반체에 따라 차이가 나지만 1 copy의 유전자가 도입된 것이 43% (416운반체) - 72% (410운반체)로 나타났고, 이는 형질전환 비의 비율 (36% - 49%) 보다 다소

높은 빈도의 결과이다. 형질전환 배추의 T-DNA 평균 copy 수는 410 운반체의 경우 1.56, 416 운반체의 경우 2.07로 나타났고 이러한 결과는 기존의 애기장대의 T-DNA 평균 copy 수인 1.5 (Alonso et al. 2003)와 벼의 T-DNA 평균 copy 수인 1.76 - 2.0과 비슷한 경향을 나타냈다 (Sallaud et al. 2003; Sha et al. 2004).

T-DNA 삽입부위의 인접서열

본 실험에서 사용된 배추 형질전환체는 운반체별로 3반복의 형질전환을 수행하여 획득하였다. 410 운반체의 경우 형질전환 효율이 $1.8 \pm 0.5\%$ 로 나타났고, 416 운반체의 경우 이보다 낮은 $0.7 \pm 0.3\%$ 로 나타났다 (Table 1). *Agrobacterium*을 이용한 배추형질전환 효율은 배추품종에 따라 0.4 - 8.9%의 차이가 나타나는 것으로 보고되었고 (Cho et al. 2001), 본 실험에서 사용된 배추는 순계계통으로 형질전환 효율이 높은 품종에 비해 다소 낮은 형질전환 효율을 나타내고 있다.

배추 genome내의 T-DNA 삽입부위의 인접서열을 분석하고자 genome walker의 방법에 따라 PCR을 수행하였다. 그 결과, 410 운반체로 형질전환된 32개체와 416 운반체로 형질전환된 14개체에서 LB 인접부위에서 총 98개의 PCR 산물이 증폭되었고, 이들의 염기서열을 분석하였다. 그 결과 410 운반체로 형질전환된 배추식물체에서 15% (5/32개체), 416 운반체로 형질전환된 배추에서 28.5% (4/14개체)가 운반체 backbone DNA가 없이 배추 genome내로 삽입되었다. *Agrobacterium*을 이용한 식물체 형질전환 결과, 애기장대는 20% (De Buck et al. 2000), 담배는 25% - 50% (Kononov et al. 1997; De Buck et al. 2000), 딸기는 34% (Abdal-Aziz et al. 2006), 옥수수는 8% (Kuraya et al. 2004)가 운반체

backbone DNA가 없이 T-DNA가 도입된 것은 보고되고 있으며, 본 연구에서 배추의 경우 15% 내지 28.5%로 나타난 범위는 다른 여러 연구의 결과와 유사한 경향으로 보인다.

410 운반체의 경우 T-DNA copy 수가 하나인 경우 13% (3/23개체)가 운반체 backbone DNA가 없이 T-DNA가 도입되었으나, 416 운반체의 경우 T-DNA copy 수가 하나인 경우에 67% (4/6개체)가 운반체 backbone DNA 없이 T-DNA가 도입된 것으로 나타나서 운반체별로 범위의 폭이 매우 크게 나타났다. 그러나, 2개 이상의 T-DNA copy가 도입된 경우 운반체 backbone DNA가 삽입된 것은 410 운반체의 경우 77.7% (7/9개체), 416 운반체의 경우 100% (8/8개체)로 나타났고, 옥수수의 경우에서도 2개 이상의 T-DNA가 도입된 형질전환체에서 T-DNA가 1 copy 삽입된 경우보다 많이 운반체 backbone DNA가 삽입된 것으로 보고되었다 (Kuraya et al. 2004).

운반체 별로 T-DNA copy 수와 배추 genomic DNA의 인접부위를 살펴본 결과 410 운반체로 형질전환된 배추 개체 중에서 410-13과 410-14는 동일한 인접서열을 지닌 것으로 확인되어서 이들은 동일한 캘러스 유래의 형질전환체로 판단되며, T-DNA copy가 2개 이상 도입된 배추식물체의 경우에서도 운반체의 backbone DNA가 삽입없이 형질전환이 이루어짐을 확인하였고 개체마다 다른 염색체내로 삽입된 것을 염기서열 분석으로 확인할 수 있었다. 416 운반체로 형질전환된 경우에도 410 운반체와 마찬가지로 동일한 캘러스 유래의 형질전환체를 확인할 수 있었고 (416-2과 416-3), 416 운반체의 경우에는 T-DNA copy가 1개인 경우에만 운반체의 backbone DNA 없이 형질전환이 이루어짐을 확인하였고 (Table 2), 이들의 염색체내의 위치는 배추 게놈연구가 완료되면 보다 정확한 정보를 제공할 수 있으리라 판단된다.

Table 1 Characterization of transgenic plants harboring 410 and 416 binary vector

Plant expression vector	410	416
(a) Transformation efficiency	1.8 ± 0.5%	0.7 ± 0.3%
(b) % Cry1Ac (+) from (a)	96.9% (32/33)	77.7% (14/18)
(c) % Cry1Ac (-) from (a)	3.1% (1/33)	22.3% (4/18)
(d) % plants with single copy Cry1Ac from (b)	71.8% (23/32)	42.8% (6/14)
(e) % plants confirmed backbone (-) from (d)	13% (3/23)	66.6% (4/6)
(f) single copy, backbone-free plants isolated/ plant generated	9.09% (3/33)	22.2% (4/18)

(a) plants generated/explants treated ± standard deviation
 (b) Cry1Ac(+) plants were confirmed by Southern blot analysis
 (c) Cry1Ac(-) plants were confirmed by Southern blot analysis
 (e) Cry1Ac(+) plants were confirmed to be backbone-free by GW PCR analysis

Table 2 Analysis of T-DNA integration into plant genome in LB region

Line of transgenic Chinese cabbage plant	Copy number	Read length (bp)	Homology search by Blast
410-6	1	581	Toc33
410-13/14	1	491	KBrBO89H07
410-27	2	720	KBrBO86M23
		115	Not found
410-29	Multi	300	KBrHO97M21
416-2/3	1	630	Not found
416-9	1	720	KBr00p13
416-17	1	462	Not found

T-DNA 삽입부위의 LB 인접서열 분석

운반체의 backbone DNA가 삽입되지 않은 배추 형질전환체의 LB 인접서열 분석 결과, 25개의 LB 염기서열에서 절단 부위로 알려진 3번째와 4번째 염기서열에서의 결합(junction)은 관찰되지 않았다 (Fig. 3). 다른 작물에서 LB 인접서열 분석 결과를 살펴보면, 포플리는 20개의 LB 인접서열 분석결과 4개만 절단부위에서의 결합이 확인되었고 (Kumar and Fladung 2002), 벼에서는 61개 중에서 하나도 절단부위의 결합이 관찰되지 않았고 (Kim et al. 2003), 옥수수의 경우 23개 중에서 오직 하나만이 절단부위의 결합이 보고되었고 (Kuraya et al. 2004), 보리의 경우 39개 중에서 하나도 절단부위의 결합은 관찰(Stahl et al. 2002)되지 않아서 본 연구의 결과는 기존의 보고와도 비슷한 경향을 나타내었다. 형질전환 배추의 8개의 T-DNA 삽입부위의 LB 인접서열 분석 결과 6개는 LB의 부위가 남아있었으나, 2개의 경우 LB 안쪽의 염기서열의 최대 36bp의 절단이 확인되었다. 이러한 결과는 기존의 보고된 단자엽 작물인 옥수수에서도 총

23개의 T-DNA 삽입부위의 LB 인접서열 분석 결과에서도 12개는 LB의 부위가 남아있었으나, 11개의 경우 최대 78bp 절단이 확인되었고 (Kuraya et al. 2004), 벼의 경우 61개의 LB인접부위에서 28개만이 LB의 부위가 남아있었으나, 나머지의 경우 T-DNA의 180bp까지 절단이 보고되는 경향을 나타냈다 (Kim et al. 2003).

본 실험에서 총 46개의 배추형질전환체에서 인접부위의 염기서열을 분석한 결과, 운반체 backbone 염기서열이 삽입된 개체는 35개체로 나타났다. 이들의 인접부위의 염기서열을 분석한 결과 모두 운반체의 LB부위의 backbone 염기서열이 확인되었다. 배추형질전환체에서 운반체의 backbone 염기서열의 존재여부를 확인하기 위해서 T-DNA의 바깥쪽과 안쪽의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다 (Fig. 4). 그 결과 운반체를 이용한 PCR에서는 DNA의 증폭이 이루어졌으나 대조구에서는 DNA의 증폭이 이루어지지 않았다 (Fig. 4 P와 C). 배추형질전환체 46개체 중에서 인접서열분석결과 운반체의 backbone 염기서열이 삽입되지 않았던 9개체 중에서 8개체는 모두 DNA의 증폭이 이루어지지 않아서 운반체의 backbone 염기서열이 존재하지 않음을 확인하였다. 그러

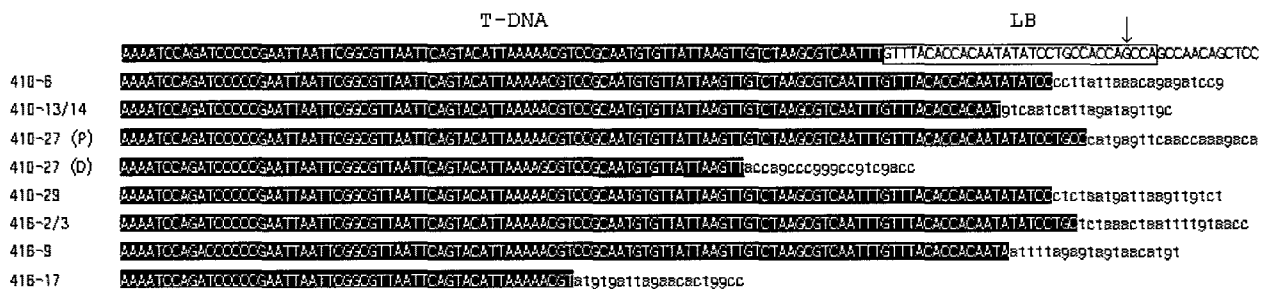


Figure 3. Sequences at junction regions between the T-DNA LB end and Chinese cabbage genomic DNA. T-DNA sequences are presented in capitals with LB sequences in box. The 20bp plant sequences are given in lower case. Plant number of transformants is shown at the left ends. Arrow indicated LB cleavage site.

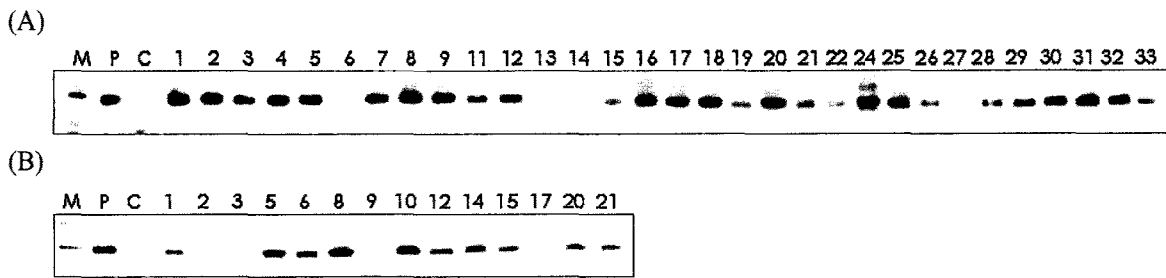


Figure 4. PCR amplification of junction regions between T-DNA and vector backbone. (A) PCR product from transgenic Chinese cabbage plants obtained by 410 binary vector. (B) PCR product from transgenic Chinese cabbage plants obtained by 416 binary vector. P: binary vector, C: wild type plants, numbers above each lane represent individual transgenic Chinese cabbage plant. M: 1kb plus 100bp DNA ladder.

나, Southern 분석결과 다수의 copy가 도입된 것으로 확인된 410-29개체의 경우 DNA의 증폭이 이루어져 운반체의 backbone 염기서열이 존재함이 확인되었다. 이는 410-29개체에 다수의 copy가 도입되어서 인접서열분석시 운반체의 backbone이 검출되지 않았던 T-DNA 외에도 운반체의 backbone 염기서열이 삽입된 T-DNA copy가 존재함을 나타내고 있다 (Fig. 4A). 이러한 운반체의 backbone 염기서열의 삽입은 LB부위에서 T-strand의 종결이 제대로 이루어지지 않았거나 LB부위가 T-strand의 개시로 작용한 것으로 판단된다. 최근의 많은 보고에 의하면 LB부위를 두개 이상 연속적으로 운반체 내에 삽입하여 형질전환을 수행한 경우 운반체의 backbone 염기서열의 삽입이 현저히 줄어든다는 결과가 제시되었다 (Kuraya et al. 2004; Huang et al. 2004). 이는 LB부위가 T-strand의 종결이 제대로 작용되지 않아서 운반체의 backbone 염기서열이 식물체의 게놈내로 연속적으로 삽입된 것으로 판단된다.

이상의 결과로 *Agrobacterium*을 이용한 배추 형질전환을 수행하고, 형질전환된 배추식물체의 도입유전자의 게놈내의 위치 및 주변서열들을 확인한 결과 운반체의 backbone 염기서열이 높은 비율로 삽입됨이 확인되었다. 따라서 형질전환 작물의 상업화를 위한 포장검정 등을 수행하기 전에 형질전환체들의 도입유전자의 인접서열에 관한 분자생물학적 분석이 요구된다.

적 요

아그로박테리움을 이용한 형질전환은 대다수의 쌍자엽과 몇몇 단자엽 식물의 게놈내로 외래유전자를 도입하는 성공적인 방법이다. 해충저항성 *CryIAc* 유전자가 도입된 배추형질전환체를 아그로박테리움 형질전환법을 통해 얻은 후, 도

입유전자의 수를 Southern 분석을 통하여 확인하였다. 배추형질전환체 46개 중에서 29개는 1 copy의 *CryIAc* 유전자가 도입된 것으로 확인되었다. 식물체의 게놈내로 T-DNA 결합에 관한 정보를 얻기 위해서 LB 인접서열을 genome walking PCR 방법을 통하여 분석하였다. 46개의 배추형질전환체중에서 37개는 운반체의 backbone 염기서열을 지나는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 도입 운반체의 LB 지점에서 제대로 종결이 이루어지지 않아서 운반체의 backbone 염기서열이 운반된 것으로 보여진다. 운반체의 backbone 염기서열이 도입되지 않은 9개체의 배추형질전환체를 LB 인접서열을 분석한 결과, 모든 LB 부위는 절단부위가 보존되지 않았고, 절단부위에서 36bp까지도 결실이 확인되었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 농업생명공학연구원의 일몰형 과제(07-5-12-5-4)에 의해 지원되었습니다.

References

- Abdal-Aziz SA, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA (2006) Evidence of Frequent Integration of Non-T-DNA Vector Backbone Sequences in Transgenic Strawberry. *Plant. J Biosci Bioeng* 101: 508-510
- Alonso JM, Stepanova AN, Lisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseew

- E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657
- Cho HS, Cao J, Ren JP, Earle ED (2001) Control of lepidopteran insect pests in transgenic Chinese cabbage transformed with synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1C gene. *Plant Cell Rep* 20: 1-7
- De Buck S, De Wilde C, Van Montagu M, Depicker A (2000) T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol Breed* 6: 459-468
- Gamble J, Gunson A (2002) The New Zealand public's attitudes regarding genetically modified food: May and October 2001. HortReserch Client Report No. 2003/35
- Gelvin SB (2003) *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbio and Mol Bio Rev* 67: 16-37
- Hansen G, Wright MS (1999) Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci* 3: 226-231
- Hanson B, Engler D, Moy Y, Newman B, Ralston E, Gutter-son N (1999) A simple method to enrich an *Agrobacterium*-transformed population for plants containing only T-DNA sequences. *Plant J* 19: 727-734
- Hoekema A, Hirsh PR, Hooykass PJJJ, 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
- Huang S, Gilbertson LA, Adams TH, Malloy KP, Reisenbigler EK, Birr DH, Snyder MW, Zhang Q, Luethy MH (2004) Generation of marker-free transgenic maize by regular two-border *Agrobacterium* transformation vectors. *Transgenic Res* 13: 451-461
- Kim JH, Lee S (2007) Analysis of Junctions between T-DNA and Plant genome in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *J of plant biology* 50: 455-460
- Kim JS (2002) Composite of a linkage map of *Brassica rapa* (ssp. *pekinensis*) using EST clones and comparative genome study to *Arabidopsis thaliana*. PhD thesis, Kyunghee University, Suwon, Republic of Korea
- Kim SR, Lee J, Jun SH, Park S, Kang HG, Kwon S, Ahn GH (2003) Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. *Plant Mol Biol* 52: 761-773
- Kononov ME, Bassuner B, Gelvin SB (1997) Integration of T-DNA vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant J* 11: 945-957
- Kumar S, Fladung M (2002) Transgene integration in aspen: Structures of integration sites and mechanism of T-DNA integration. *Plant J* 31: 543-551
- Kuraya Y, Ohta S, Fukuda M, Hiei Y, Murai N, Hamada K, Ueki J, Imaseki H, Komari T (2004) Suppression of transfer of non-T-DNA 'vector backbone' sequences by multiple left border repeats in vectors for transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Breed* 14: 309-320
- Lusk JL, Sullivan P (2002) Consumer acceptance of genetically modified foods. *Food Technol* 56: 32-37
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments. *J Mol Biol* 98: 503-517
- Sallaud C, Meynard D, van Boxtel J, Gay C, Bes M, Brizard JP, Larmande P, Ortega D, Raynal M, Portefaix M, Ouwerkerk PB, Rueb S, Delseny M, Guiderdoni E (2003) Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theor Appl Genet* 106: 1396-1408
- Sha Y, Li S, Pei Z, Luo L, Tian Y, He C (2004) Generation and flanking sequence analysis of a rice T-DNA tagged population. *Theor Appl Genet* 108: 306-314
- Sheng J, Citovsky V (1996) *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *Plant Cell* 8: 1699-1710
- Small B (2004) Public perceptions about genetically engineered forage crops and resultant animal products. In: new directions for a diverse planet, proceedings of the 4th international crop science congress, Brisbane, Australia, 26 Sep-1 Oct 2004. In: T. Fisher, N. Tuner, J. Angus, L. McIntyre, M. Robertson, A. Borrell and D. Lloyd, eds. CD Rom. The Regional Institute Ltd, Gosford, Australia
- Stahl R, Horvath H, van Fleet J, Voetz M, von Wettstein D, Wolf N (2002) T-DNA integration into the barley genome from single and double cassette vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2146-2151
- Zupan J, Muth TR, Draper J, Zambryski P (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J* 23: 11-23

(접수일자 2008년 3월 1일, 수리일자 2008년 4월 16일)