

유전자총에 의한 담배의 형질전환

김병오, 김경민¹, 오중열^{1*}

경북대학교 생명자원과학대학 생물응용학과, ¹경북대학교 생명자원과학대학 환경원예학과

Transformation of Tobacco by Gene-gun

Byung-Oh Kim, Kyung-Min Kim¹ and Jung-Youl Oh^{1*}

Department of Applied Biology, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea

¹Department of Environmental Horticulture, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea

Abstract - Since there is no report about more than one gene expression simultaneously in a single mitochondria, this report is very important to novel type of eukaryotic gene expression. In this study, investigated whether mitochondrial expressed gene and GFP that expression in mitochondria of plant expressed to mitochondria. Expression vector (pBin) containing AtBI-1 (mitochondrial expressed gene) and GFP driven by 35S promoter was bombarded by gene gun to leaves and cotyledon of tobacco. Regenerated shoot confirmed expression of AtBI-1 in mitochondria by GFP expression, PCR, and Southern analysis. Successful mitochondria of plant cell transformation in this report implies possible eukaryotic mitochondrial transformation including plants and animals, and moreover two or more gene expression which can be excellent applicable protocols to pharmaceutical field including antibody production.

Key words - Tobacco, Gene-gun, Mitochondria

서 언

식물의 분자생물학 영역에서 미토콘드리아(mt)를 효과적으로 이용한다는 것은 식물의 다양한 세포질적 연구에 매우 중요하다. 미토콘드리아의 유전체는 핵 DNA 보다 작고 그 구성이 단순하며, 모계로만 유전하는 유전특성이 있다. 식물의 미토콘드리아 genome은 동물이나 균류에 비해 일반적으로 크며 200~2400kbp 정도이다. 또한 진핵생물의 미토콘드리아 유전체는 다양하고 복잡하게 재배열 되는 핵 DNA와는 다르게 유전자간의 재배열은 거의 발견되지 않는다고 보고되고 있다(Cann *et al.*, 1987; Nei and Kohen, 1983; Strachan and Read, 1996). 이처럼 미토콘드리아 유전체는 단순한 유전체 구성을 갖으며, 핵 DNA의 영향이 배제된 직선적인 유전양식을 갖고 있다. 따라서 생물의 분화 진화를 연구하는 데 있어 유용한 재료가 된다. 또한 미토콘드리아 유전체가 세포질로 유전되기 때문에 핵과 세포질 사이의 상호 진화 및 기원에 관한 연구에도 유용한 장점이 있다(Wolstenholmn, 1992). Pehu(1991)는 mt의 추출 과정이나 체세포 잡종에 관한 연구에서 mt 형질전환 연구를 제

시하고 있으나, 형질전환 시키는 방법의 개발이 제대로 이루어지지 않고 있어서 mt에 관한 연구가 그다지 활발하게 진전이 되고 있지 않은 실정이다. 담배조직을 이용하여 특이적인 유전자 발현 양상을 연구한 Shirsat 등(1989)은 pBin19 vector에 완두콩의 성숙에 관여하는 *legA* 유전자를 CAAT와 TATA boxes를 포함한 특이 promoter에 구조한 후 담배조직에 *Agrobacterium* 형질전환방법으로 형질전환하여 이 유전자의 발현 양상을 확인한바 있다. 또한 Schoffl 등[8]은 콩의 heat shock 유전자를 담배에 *Agrobacterium* 형질전환방법으로 형질전환하여 발현양상을 보았다. 최근 밀의 ubiquitin promoter와 구조화된 유전자를 particle bombardment를 이용하여 식물의 생체내에서 그 형질이 발현되는 것을 성공하였다고 보고 하였고(Vasil and Vasil, 2006), Kim과 Sul(2006)이 효모를 이용하여 gene gun 형질전환방법에 의하여 특이위치에 그 형질이 발현되는 양상을 구명하였다. 따라서 본 연구에서는 식물의 조직에 미토콘드리아 발현 유전자의 AtBI-1을 이용하였는데, 이는 효모 내에서 세포사에 관여하는 유전자를 억제하는 작용을 하면서 미토콘드리아에서 발현하는 유전자이다(Kawai *et al.*, 1999). 따라서 AtBI-1 유전자와 GFP 유전자를 식물형질전환에 가장 많이 이용되는 pBin vector와 구조화 한 다음, *Agrobacterium*

*교신저자(E-mail) : jyoh@knu.ac.kr

형질전환법을 이용하지 않고 유전자총을 이용하여 담배조직에 형질전환하여 미토콘드리아에서 이 유전자가 발현되는 양상을 구명하려고 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

미토콘드리아(mt) 관련 유전자 및 plasmid construction

미토콘드리아에서 발현하는 유전자인 AtBI-1(Kawai *et al.*, 1999)를 분양받아 pUC35S-NPG vector의 *Sal*I 과 *Nco*I 자리에 cloning하였다. 35Spro-AtBI-GFP-Nos를 *Eco*R I 과 *Hind* III로 digestion 하여 *Eoc*R I/*Hind* III로 digestion한 Bin 19 binary vector(Xiang *et al.*, 1999)와 cloning 하였다 (Fig. 1).

형질전환에 이용된 유전자총

형질전환에 사용될 유전자총은 사출되는 압력조건이 최대 150psi가 되는 콤프레샤(전3-6-1489, 서원주식회사, 한국), spray gun(K601-5, KINKI, Japan, 노즐구경 3mm), 및 carrier bottler(Φ2.0×4.5cm)로 구성되어 코팅된 유전자가 안전하게 사출하는데 이용되었다. Fig. 2의 A는 시료제작 모습이 며, Fig. 2의 B는 유전자를 carrier 할 수 있는 carrier bottler 이며, Fig. 2의 C는 사출시키는 장치이며, Fig. 2의 D는 실지 carrier 용기를 장착하여 형질전환 시키는 모습이다.

유전자 코팅 및 형질전환

미토콘드리아 특이 발현 유전자를 가진 Bin-AtBI-GFP가 cloning된 *E. coli* host DH5α를 10g/l trypton, 5g/l yeast

extract, 5g/l NaCl이 첨가되고 pH 7.0으로 조정된 5ml LB 배 지에 접종하고 37°C에서 12시간 배양한 후, QIAprep spin Miniprep kit(QIAGEN, German)로 plasmid DNA를 뽑고, UV spectrometer(UNICAM, England, UV2)의 OD 260nm 에서 DNA량을 조정하였다. 추출된 plasmid DNA를 코팅하기 위하여 tungsten(Bio-Rad, USA, Tungsten M-10) 입자 60 mg을 70% EtOH로 세척하고 1ml 50% glycerol로 현탁 하였 다. 현탁액을 진탕하여 잘 혼합한 다음, 새로운 튜브에 50μl 분 주하고 5μl plasmid DNA(1μg/μl), 50μl CaCl₂(2.5M), 20μl spemidin(0.1 M)을 차례로 넣어 각각의 입자에 코팅한 다음 70% EtOH로 세척하고 48μl 100% EtOH 를 첨가하여 현탁 한 다음 carrier bottler에 10μl씩 분주하여 사용하였다.

유전자총을 이용하여 형질전환하기 위하여, 먼저 carrier bottler를 70% EtOH로 스프레이 하여 소독하고, 콤프레샤의 압력을 100 psi로 맞춘 다음 준비된 시료에 사출거리를 10cm로 하여 실시하였다.

유전자총으로 담배의 잎과 cotyledon에 코팅된 유전자를 사 출시킨 후 50mg/l kanamycin과 0.5mg/l BAP, 0.1mg/l NAA가 함유된 MS(Murashige & Skoog, 1962) 배지로 이식 하였다. 배양조건은 26±1°C, 5,000 lux로 24시간 명조건으로 처리하였다.

Mitochondria DNA 분리

재분화 된 shoot의 genomic DNA 추출 방법은 shoot의 생 체중 20mg을 채취 한 후, Qiagen DNeasy Plant Mini Kit를 이용하여 DNeasy Plant Maxi 지침서에 의하여 추출하였다.

mtDNA 추출은 Scotti(2001) 방법을 응용하여 아래와 같이 수

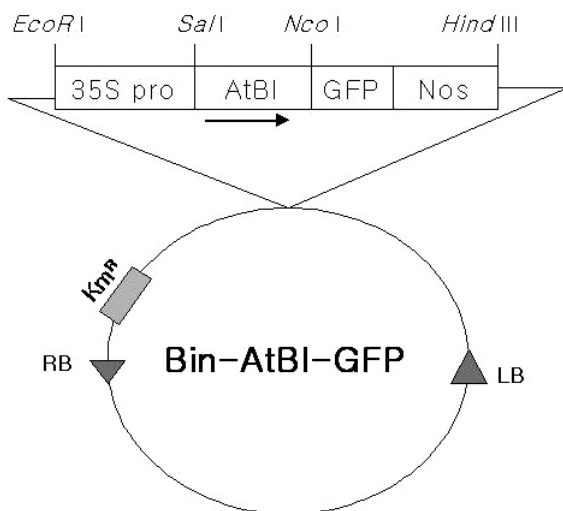


Fig. 1. Construction of Bin-AtBI-GFP binary vector for plant tissue transformation.

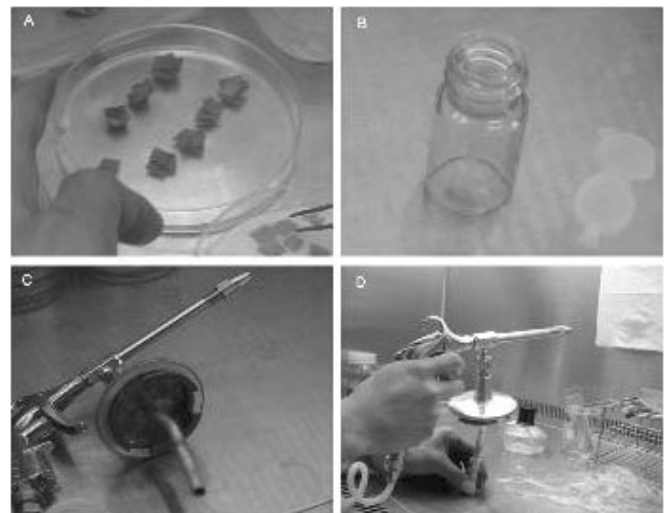


Fig. 2. Method of transformation using gene gun. A: prepared materials, B: carrier bottler, C: spray gun, D: spray gun with carrier bottler.

행하였다. 재분화 된 shoot의 생체중 20mg을 16ml 튜브에 담고, 여기에 얼음에 보관된 5ml Homogenization buffer A를 넣어 16,200rpm, 20초간 호모나제이션 하고 얼음에 보관된 5 ml Homogenization buffer B를 첨가한 후 잘 혼합하였다. 호모나제이션 한 용액을 100 μ m mesh로 걸은 다음, 2,600rpm 10분간 centrifuge하고 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. 3,900rpm 10분간 centrifuge 한 다음 상층액을 새로운 튜브로 옮겼다. 이 과정은 2번 수행 한 다음, 12,700rpm 15분간 centrifuge한 다음 상층액을 버린다. 200 μ l Lysis buffer를 넣고 pellet를 잘 혼합한 후, 2 μ l Proteinase K를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 240rpm으로 1시간 shaking하였다. 0.1 volume 2M ammonium acetate를 넣고 같은 량의 TE-saturated phenol/chloroform(50:50) 넣고 혼합한 후, 2 volume의 100% ethanol을 넣은 후 -20 $^{\circ}$ C에서 overnight하였다. 18,000rpm 20분간 centrifuge한 다음 상층액을 버리고 20 μ l H₂O를 넣고 녹인 다음 10mg/ml RNase A로 넣어 처리한 다음, 같은 량의 phenol을 넣고, ethanol 첨가하여 mtDNA를 회수하여 전기영동에 의하여 mtDNA임을 확인한다. mtDNA 추출에 이용된 시약은 Homogenization buffer A [50mM Tris-HCl(pH8.0), 1.3 M NaCl, 25mM EDTA(pH8.0), 0.2% BSA, 0.05% cysteine, 56mM β -mercaptoethanol], Homogenization buffer B [100 mM Tris-HCl(pH8.0), 2.6 M NaCl, 50mM EDTA(pH8.0), 0.4% BSA, 0.1% cysteine, 56mM β -mercaptoethanol], Lysis buffer [25mM Tris-HCl (pH8.0), 20mM EDTA(pH8.0), 0.5% SDS], 10mg/ml Proteinase K, 2M Ammonium acetate, 10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA, TE-saturated phenol/chloroform (50:50) 등을 만들어 사용하였다.

각각 추출한 genomic DNA와 mtDNA는 PCR과 Southern blot 분석을 실시하여 미토콘드리아에서 AtBI-1 유전자가 발현하는지를 확인하였다.

PCR analysis

PCR 분석에서 primer 조제는 AtBI-1 유전자의 expression 영역의 약 1.1 kB의 크기가 증폭되도록 5'-ATGGATGCGTTCTCTTCCTT-3'(FORWARD), 5'-AACAGGATTATCATTTTCC T-3' (REVERSE)을 작성하였다. 항생제를 함유한 배지에서 재분화 된 shoot에서 분리된 20ng DNA와 10x buffer, 5mM dNTP, forward primer, reverse primer, 0.2units Taq DNA polymerase를 사용하였다. PCR 반응은 PCR

system 2,700(Applied Biosystems, USA)에서 94 $^{\circ}$ C에서 30초, 56 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1 분으로 30cycle로 수행한 후 0.8%의 agarose를 사용하여 전기영동 후에 증폭된 DNA band 들을 UV상에서 확인하였다.

Southern blot analysis

Genomic DNA와 mtDNA를 제한효소 *EcoR* I으로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동 한 다음, capillary transfer 방법으로 nylon membrane에 전달시켰다. DNA가 전달된 membrane을 UV cross-linker로 DNA를 고정시킨 후 5X SSC, 5X Denhardt's solution, 0.1% SDS, 50mM Na-Pi(pH 6.5), 0.1mg/ml denatured salmon sperm DNA, 50% dextran sulfate가 첨가된 용액으로 42 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 prehybridization 한 다음 같은 용액에서 ³²P dCTP로 표식된 AtBI-1 probe를 첨가하여 12시간 이상 incubation하여 hybridization 하였다. Nylon membrane은 50 $^{\circ}$ C의 1차 세정액(2x SSC, 0.1% SDS)에서 10분간, 2차 세정액(0.2x SSC, 0.1% SDS)에서 1시간 동안 세정한 다음 -70 $^{\circ}$ C에서 2~3일간 X-ray film에 노출시켰다.

AtBI-1 유전자의 생체세포내의 발현 조사

Bin-AtBI-GFP 유전자가 식물의 조직세포 중 미토콘드리아 조직에서 발현양상을 조사하기 위하여 재분화 된 shoot를 이용하여 실체현미경(OLYMPUS, SEX12)의 할로겐(12V, 100W) 광원(OLYMPUS, LG-PS2)이 조사되는 곳에서 조사하였다.

결과 및 고찰

Bin-AtBI-GFP 유전자를 tungsten으로 코팅한 후 100 psi 로 담배의 잎과 hypocotyl 조직에 gene gun으로 사출한 후 50 ml/l kanamycin이 함유한 MS 배지에 치상한 30일 경과 후 식물체 재분화 및 식물의 미토콘드리아에서 GFP 유전자 발현을 조사한 결과이다(Table 1). 담배의 잎조직의 경우는 재분화 된 shoot가 19.2% 이었고, hypocotyl의 경우는 22.8%로 나타났으며, 현미경하에서 GFP의 발현의 경우는 각각 5.4%와 6.7%로 나타났다. Shirsat 등(1989)이 보고한 완두의 성숙에 관련된 유전자를 특이 promoter와 구조한 후 *Agrobacterium*에 의한 형질전환 결과에서 얻어진 유전자의 발현에 성공한 실험과 같이 본 실험의 결과에서도 gene gun을 이용하여 목적으로 하는 조

Table 1. GFP gene expression of shoot regeneration in transformants via gene gun

Inoculated explants	No. of inoculated	No. of shoot regeneration (%)	No. of GFP expression (%)
Leaf	240	46 (19.2)	13 (5.4)
Hypocotyl	180	41 (22.8)	12 (6.7)

직에 AtBI-1 유전자가 발현됨을 확인할 수 있었다.

Fig. 3은 담배의 cotyledon에서 식물체재분화 양상과 현미경 검경 하에서 재분화된 조직내의 GFP 유전자가 발현되는 것을 관찰한 것이다. Fig. 3의 A는 담배의 잎조직에서 재분화 된 shoot 양상이고, 항생제가 든 배지에서 잎조직이 백화현상을 보 이면서 shoot가 재분화가 되기 시작했다. Fig. 3의 B는 재분화 된 개체의 조직을 현미경하에서 관찰한 결과 조직내에서 GFP 유전자가 발현되는 양상을 관찰할 수 있었다.

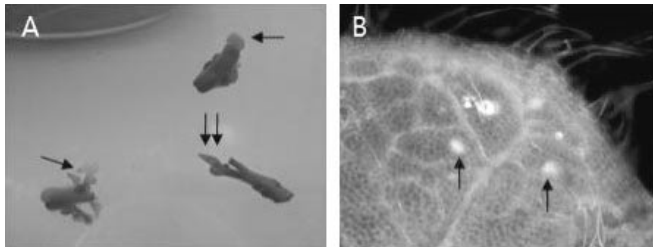


Fig. 3. Development of transformants via gene gun at tobacco. A: shoot regenerations from cotyledon tissue (arrows), B: Observation of GFP expression at mitochondria via microscope (arrows).

유전자총으로 형질전환 된 재분화 shoot에서 genomic DNA 와 mtDNA를 추출하여 AtBI-1 primer를 이용하여 PCR 분석 을 수행한 결과(Fig. 4A), 약 1.1kb에서 밴드가 얻어졌다. 이는 재분화 된 shoot가 목적으로 하는 유전자의 발현이 되었음을 지 적해주는 것으로 생각되며, Fig. 4의 B에서 Southern 분석에 의해서도 재분화되는 식물조직의 genomic DNA에서는 밴드가 나타나지 않고 mtDNA에서는 1개 또는 2개의 밴드가 관찰되었 다. 이는 특이한 promoter를 이용하여 특정부위의 유전자발현 양상을 *Agrobacterium* 형질전환방법을 이용하여 Schoffl 등 (1989)과 Shirsat 등(1989)이 연구한 결과와 같이 유전자총을 이용하여 목적으로 하는 조직에 유전자의 발현이 된 것과 같이

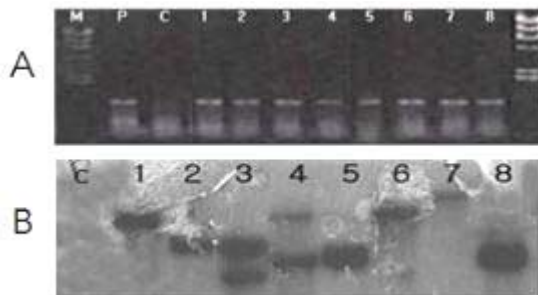


Fig. 4. Genomic analysis of transformants in tobacco. A: Identification of AtBI-1 gene by PCR analysis in transformants. B: Genomic DNA and mtDNA digested with *EcoR* I fractionated on 0.8% agarose gels, and transferred to nylon membranes. The membranes were hybridized with a ³²P-labeled fragment of AtBI-1 probed. M: λ Hind III marker, p: Bin-AtBI-GFP vector, C: genomic DNA of transformants, 1~8: mtDNA of transformants.

본 실험에서도 목적으로 하는 조직에 특이 유전자의 발현 방 법 을 확인 할 수 있었다. 또한 Kim and Sul(2006)이 미토콘드리아 특이 발현 유전자인 cdf2-GFP를 효모를 이용하여 효모의 mt 발현 양상 연구와 일치하였다.

그리고 본 실험의 연구결과는 Pan 등(2001)이 mt와 관련 있 는 유전자인 *Arabidopsis thaliana* ethylene-response element binding protein(AtEBP) 유전자가 효모에서의 발현 양상과도 동일하였다. 따라서 지금까지 mt에 관련된 유전자를 담배의 조직을 이용하여 식물의 mt에 그 관련 유전자가 발현되는 것을 확인할 수가 있었다.

이상과 같이 본 실험의 연구결과는 식물의 mt 관련 연구 분 야에 기초적 자료로 중요하게 제공하게 될 것으로 사료된다.

적 요

식물의 미토콘드리아에서 eukaryotic 유전자 발현하는 양상 을 관찰한다는 것은 매우 중요하게 알려져 왔다. 본 실험에서는 식물의 미토콘드리아에서 발현하는 유전자와 GFP가 미토콘드리아에 발현하는지를 구명하였다. 미토콘드리아(mt)에서 발현 하는 AtBI-1 유전자와 GFP 유전자를 35S promoter를 가진 pBin vector에 재조합한 후, 유전자총을 이용한 형질전환법으 로 담배의 잎과 cotyledon에 형질전환하여 재분화 된 shoot를 얻었다. mt에서 그 유전자가 발현 되는 것을 현미경하에서 GFP가 발광하는 것으로 확인하였다. 또한 PCR분석과 South-ern분석에서도 미토콘드리아에서 AtBI-1 유전자가 발현함을 확인하였다. 따라서 본 연구의 결과로 mt에 관련된 유전자를 식 물의 조직에 형질전환 하여 1개 이상의 유전자가 식물의 mt에 삽입되어 그 유전자의 특성이 발현되는데 이용되어 질수 있을 것이라 생각된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 21사업(과제번호: 20050301-034-482-046-02-00)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

- Cann, R. L., M. Stoneking and A. C. Wilson. 1987. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325: 31-36.
- Kawai, M., L. Pan, J. C. Reed and H. Uchimiya. 1999. Evolutionally conserved plant homologue of the Bax inhibitor-1 (BI-1) gene capable of suppressing Bax-induced cell death in yeast. *FEBS Lett.*

- 464: 143-147.
- Kim, K. M. and I. W. Sul. 2006. Identification of artificial operon gene expression via yeast mitochondrial transformation. *Kor. J. Life Sci.* 16: 365-368.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Nei, M. and R. K. Kohen. 1983. Evolution of genes and proteins. In chapter 4 (Evolution of animal mitochondrial DNA), Sinauer Associates, Sunderland, Ma., USA.
- Pan, L., M. Kawai, L. H. Yu, K. M. Kim, A. Hirata, M. Umeda and H. Uchimiya. 2001. The *Arabidopsis thaliana* ethylene-response element binding protein (AtEBP) can function as a dominant suppressor of Bax-induced cell death of yeast. *FEBS letters* 508: 375-378.
- Pehu, E. 1991. RFLP analysis of organellar genomes in somatic hybrids. In: *Plant Tissue Culture Manual D6*, pp. 1-8, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Schoffl, F., M. Rieping, G. Baumann, M. Bevan and S. Angermuller. 1989. The function of plant heat shock promoter elements in the regulated expression of chimaeric genes in transgenic tobacco. *Mo. gen. Genet.* 217: 246-253.
- Scotti, N., T. Cardi and L. Marechal-Drouard. 2001. Mitochondrial DNA and RNA isolation from small amounts of potato tissue. *Plant Molecular Biology Reports* 19: 67a-67h.
- Shirsat, A., N. Wilford, R. Croy and D. Boulter. 1989. Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Mo. gen. Genet.* 215: 326-331.
- Strachan, O. and A. P. Read. 1996. *Human Molecular Genetics*, In chapter 7, BIOS Scientific Publisher Ltd., Magdalen Road, Oxford, UK.
- Vasil, I. K. and V. Vasil. 2006. Transformation of wheat via particle bombardment. *Methods Mol. Biol.* 318: 273-283.
- Wolstenholmn, D. R. 1992. Animal mitochondrial DNA : Structure and evolution. *Int. Rev. Cytol.* 141: 173-216.
- Xiang, C., P. Han, I. Lutziger, K. Wang and D. J. Oliver. 1999. A mini binary vector series for plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 40: 711-717.

(접수일 2007. 12. 12; 수락일 2008. 6. 17)