

# DNA 조작에 의한 고등식물의 형질전환에 관한 연구

Transformation of Higher Plants by Means of  
DNA Manipulation

1989. 3

한국과학기술원  
부설 유전공학센터



# 배 포 선

사 본 번 호	부 수	배 포 선
1/15 - 2/15	2	유전공학센터 연구기획실 영구보존용
3/15	1	" " 참고용
4/15 - 7/15	4	" " 보관용
8/15 - 9/15	2	" 식물세포 생물학연구실
10/15 - 15/15	(6)	(기타)



# 제 출 문

한국과학기술원 유전공학센터 소장 귀하

본 보고서를 “DNA 조작에 의한 고등식물의 형질전환에 관한 연구” 사업의 최종 보고서로 제출합니다.

1989. 3.

연구책임자 : 홍주봉 ( 유전공학센터 식물세포생물학실 )

연 구 원 : 정상호 ( " " )

정현숙 ( " " )

김성천 ( " " )



# 요 약 문

## I. 제 목

DNA 조작에 의한 고등식물의 형질전환에 관한 연구

## II. 연구 개발의 목적 및 중요성

재조합 DNA 기술은 생명현상의 이해를 가져올 수 있는 강력한 수단으로 부각되고 있으며 이를 이용한 생물체의 형질 개량의 가능성은 차츰 현실화 되어가고 있다. 고등식물의 경우 종래의 육종 기술은 인류의 발전사와 병행하여 많은 업적들을 이루어 놓았으나 종간의 벽을 극복할 수 없는 등의 문제점을 안고 있어 고등식물체의 형질 개량을 이루는데 중요한 제한성을 가지고 있다. 반면 재조합 DNA 기술의 고등식물체에의 이용은 종래의 육종기술이 가지고 있는 제한성등을 무리 없이 극복할 수 있음이 증명되고 있어 고등식물체 DNA의 재조합 기술의 발전에 따른 개량된 고등식물체의 생산이 기대되고 있다.

본 보고서는 1987년도 수행된 “고등식물 형질전환용 유전자 운반체 개발” 과제에 연결되어 이루어진 업무로서 개발된 유전자 운반체의 분석과 유전자 운반체 개량 및 고등식물의 형질개량에 유용하게 쓰일 수 있는 유전자들의 크로닝에 관한 연구 결과이다.

### Ⅲ. 연구 개발의 내용 및 범위

1. 유전자 운반체, pKCH 1. 의 분석
2. 외래 유전자 ( B. t., HD-73, 독성 유전자와 PINS 유전자의 pKCH 1에 삽입 및 *Agrobacterium*에서의 증식
3. B. t., HD-1, 독성 유전자의 분석
4. 벼의 PAPI 유전자의 분석

### Ⅳ. 연구 개발결과 및 활용에 관한 건의

1. 유전자 운반체 pKCH 1은 DNA 염기 서열을 확인한 결과 CaMV 35S 전사체의 promoter 부위 ( TATA box와 5' cap 부위 및 약 700염기쌍 )는 가지고 있으나 ATG translation 시작 codon은 가지고 있지 않음.
2. B. t., HD-73, 독성 유전자와 proinsulin 유전자의 고등식물체에의 도입 및 발현을 위해 이들 유전자를 pKCH 1의 cloning site, BamHI,에 삽입 후 *Agrobacterium*으로 이전하여 증식.
3. 나비목 해충에 대해 독성을 나타내는 유전자 크론을 *B. thuringiensis*, 변종 HD-1,으로 부터 확보키 위해 B. t., HD-1, DNA를 B. t., HD-73, 독성 유전자 크론으로 Southern 분석한 결과 네 개의 Hpa I/Pst I band 들을 확인.
4. 벼의 amylase와 protease의 inhibitor로 알려진 PAPI 유전자의 크론 확보를 위해 확인된 아미노산 서열에 해당되는 oligonucleotide를 이용한 벼의 호분층의 RNA



Northern 분석 결과 약 900base 부위에서 RNA band 확인.

유전자 운반체 pKCH 1은 고등식물체에서 강력하게 작용하는 promoter인 CaMV 35S promoter ( $P_{35S}$ )와 terminator인 nopaline synthase 유전자의 terminator (Tnos)를 보유하고 있어 유용 유전자를  $P_{35S}$ 와 Tnos 사이의 cloning site에 삽입 후 고등식물체에 도입하여 발현시킴으로써 고등식물체의 형질개량을 도모할 수 있을 것이다.

pKCH 1의  $P_{35S}$ 와 Tnos사이의 cloning site에 삽입된 후 Ti plasmid-*Agrobacterium*으로 옮겨진 B.t., HD-73, 독성 유전자와 proinsulin 유전자는 *Agrobacterium*의 고등식물체의 감염과정을 통해 고등식물체 내로 도입될 수 있을 것이며 아울러 발현이 이루어질 수 있을 것이다. B.t., HD-73, 독성유전자의 적절한 발현은 내충성 식물의 개발을 가져올 것이며 proinsulin 유전자의 적절한 발현은 고등동물 유전자의 고등식물체로의 이전 및 발현의 성공적인 예가 될 것이다.

*B. thuringiensis*, 변종 HD-1,으로 부터 해충에 대한 독성 유전자의 크로닝은 보다 넓은 범위의 해충 제거에 도움이 될 것이며 내충성 식물의 개발에 사용될 수 있는 유용한 유전자 크론의 확보가 될 것이다. Southern 분석결과 확인된 네 개의 Hpa 1/Pst I band 들은 그 크기로 보아 *B. thuringiensis*, 변종 HD-1, 은 세 가지의 B.t., HD-73, 독성 유전자와 염기 서열이 매우 유사한 유전자들을 가지고 있음을 나타내며 이들의 크로닝과 분석에 따른 B.t., HD-1., 독성 유전자의 크론 확보가 가능할 것으로 보인다.

벼의 PAPI는 벼 종자의 호분층 (aleurone layer)에 주로 발현되는 amylase 와 protease 의 억제제로 여겨지는 단백질로서 PAPI 유전자의 크론 확보는 벼에서의 조직 특이성 유전자 발현 기작의 해명과 PAPI 의 기능 분석에 많은 도움이 될 것이다. PAPI 의 크로닝의 기초 과정으로 PAPI 의 아미노산 서열에 기초를 두어 제작된 oligonucleotide 를 이용하여 벼의 RNA Northern 분석 결과 약 900 base에서 band 를 볼 수 있었으며 이를 기초로한 PAPI 의 cDNA 크로닝이 가능하겠다.

## SUMMARY

Recombinant DNA technology initiated and bloomed in microorganisms has been extending its influence to higher organisms and the effects will be even larger once proper technology can be established in dealing with genes of higher organisms. In higher plants, it has been shown that recombinant DNA technology can be applied to fish out specific genes and produce transgenic plants which will facilitate the efforts to understand and improve plants. As a part of the research to improve major crops by changing genes, we have characterized the higher plant transformation vectors developed during the previous research period (March, 1987 - Feb. 1988), introduced the insecticidal protein gene from *B. thuringiensis*, strain HD-73, and proinsulin gene into the binary vector system utilizing *Agrobacterium*, and characterized *B. thuringiensis*, strain HD-1, plasmid DNA for the insecticidal protein genes and rice RNA for the probable amylase/protease inhibitor gene.

Among the transformation vectors developed during the previous research, pKCH 1 has been confirmed to have the expected DNA sequence to function as a promoter in higher plants (TATA box, CAAT box and 5' cap site have been found by DNA sequencing, but ATG translation initiation codon has been removed) and should be able to function to promote transcription in plants.

*B. thuringiensis*, strain HD-73, insecticidal protein gene and human proinsulin gene have been moved between P<sub>35s</sub> and Tnos of pKCH 1 and introduced to Ti plasmid - *Agrobacterium* system. Once they are properly transferred to plants following the infection of *Agrobacterium* of plants, they can be expressed in plants by the function of P<sub>35s</sub> and Tnos.

Southern analysis of DNA of *B. thuringiensis*, strain HD-1, with B.t., HD-73, toxin gene clone showed four Hpa I/ Pst I bands at around 5.2 kb, 4.3 kb, 3.6 kb and 2.8 kb. Based on the size of the bands, it is likely that there are three genes in B.t., HD-1, with high DNA sequence homologies to B.t., HD-73, insecticidal protein gene. These highly homologous genes can be cloned and assayed for the insecticidal activities.

Probable amylase/protease inhibitor (PAPI) is mainly found in the aleurone layer of rice and likely to possess the function of amylase/protease inhibitor. Northern analysis of mRNA isolated from the aleurone layer of rice with the oligonucleotide mixed probes designed based on the amino acid sequence of PAPI showed a Northern band at around 900 base. Thus it is likely that the mRNA fraction prepared contains the message for PAPI and the oligonucleotide mixed probes can be used to screen for PAPI cDNA clone.

## CONTENTS

Chapter I. Introduction .....	15
Chapter II. Material and Methods .....	17
1. Host Bacteria .....	17
2. Purification and Manipulation of DNA .....	17
3. Purification and Manipulation of RNA .....	18
4. Transformation of Bacteria .....	18
5. DNA and RNA Assay .....	19
6. Chemicals .....	21
Chapter III. Results .....	22
Section 1. Plant Transformation Vector, pKCH 1 .....	22
Section 2. Introduction of Foreign Genes in the pKCH 1 - Ti Plasmid - <i>Agrobacterium</i> System .....	25
Section 3. Analysis of B.t., HD-1, Plasmid for the Insecticidal Protein Gene .....	32
Section 4. Analysis of Rice RNA for the PAPI Gene ...	32
Chapter IV. Discussion .....	37
References .....	40



# 목 차

제 1 장 서 론 .....	15
제 2 장 재료 및 방법 .....	17
1. 박테리아 숙주 .....	17
2. DNA 추출 및 조작 .....	17
3. RNA 추출 및 조작 .....	18
4. 박테리아의 형질전환 .....	18
5. DNA 와 RNA 의 분석 .....	19
6. 시 약 .....	21
제 3 장 결 과 .....	22
제 1 절 식물 형질전환용 유전자 운반체, pKCH 1 .....	22
제 2 절 외래 유전자의 pKCH 1-Ti plasmid- <i>Agrobacterium</i> system에 삽입.....	25
제 3 절 B.t., 변종 HD-1, plasmid DNA 의 제충성 유전자에 관한 분석.....	32
제 4 절 벼 RNA 의 PAPI 유전자에 관한 분석 .....	32
제 4 장 고 찰 .....	37
참 고 문 헌 .....	40





## 약 어 표

B.t.	:	<i>Bacillus thuringiensis</i>
CaMV	:	Cauliflower mosaic virus
<i>E. coli</i>	:	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	:	Ethylene diamine tetraacetic acid
EGTA	:	Ethyleneglycol-bis-( $\beta$ -aminoethyl ether) N,N,N',N'-Tetraacetic acid
LB	:	left border
nm	:	nano meter
npt	:	neomycin phosphotransferase 유전자
PAPI	:	Probable amylase/protease inhibitor
PINS	:	Proinsulin
P <sub>35s</sub>	:	CaMV 35S promoter
RB	:	right border
S	:	sedimentation coefficient
Ti	:	tumor inducing
Tnos	:	nopaline synthase 유전자의 terminator
vir	:	virulence 유전자



## 제 1 장 서 론

고등식물의 형질개량은 농업의 역사의 중요한 일부가 되어 추구되어 왔으며 종래의 육종 기술은 획기적인 결과들을 수 없이 이룩해 왔다. 종 내부의 교잡 방법에 기초를 둔 육종 기술은 종이 공급할 수 있는 유전자원을 활용함으로써 막대한 식량의 증산을 가져 왔으며 수목의 품질을 개량해 왔고 새로운 관상용 식물을 개발하였다. 그러나 종의 벽을 극복할 고등식물의 형질개량은 종간의 교잡시 발생하는 불임성 때문에 종래의 육종기술로는 이루어질 수 없는 것으로 여겨지고 있다.

고등식물의 형질개량에 적용되는 유전공학 기법은 현재 급격히 발전 및 변화하는 단계에 있어 비록 일부 선진국에 치우쳐 있기는 하나 이 분야의 연구진들에 의한 결과는 개개가 중요한 의미를 내포하고 있다. 유전자 조작에 의한 고등식물의 형질개량은 근본적으로 유용 유전자의 크론이 확보되어야 하며 유전자의 식물체 내로의 도입 및 발현기술(형질전환 기술)이 확보되어야 한다.

본 연구팀은 핵산조작을 통한 고등식물의 형질개량을 추구키 위한 기초연구를 수행하였으며 그 결과는 다음과 같이 요약될 수 있다.

1. 고등식물 형질전환용 유전자 운반체 pKCH 1의 promoter 부위 염기서열 확인

2. 제충성 유전자인 B.t., HD-73, 독성 유전자와 인간 proinsulin 유전자의 고등식물체에 도입 및 발현을 위해 이들 유전자의 pKCH 1에 삽입 및 Ti plasmid-*Agrobacterium* system 에로의 이전
  
3. *B.thuringiensis*, 변종 HD-1, plasmid DNA 상의 제충성 독성 유전자의 크로닝을 위한 Southern 분석 결과 네 개의 Hpa I/Pst I band 확인
  
4. 벼의 amylase와 protease의 inhibitor로 알려진 PAPI의 크로닝을 위한 벼의 RNA의 Northern 분석결과 900 base 부위에서 RNA band 확인.

## 제 2 장 재 료 및 방 법

### 1. 박테리아 숙주

유전자 운반체 개발에 필요한 plasmid DNA의 amplification은 *E. coli* 변종 HB 101 또는 JM 83을 사용하여 이루어 졌으며 Ti plasmid의 amplification은 *Agrobacterium*을 숙주로 하여 이루어 졌다. *E. coli*는 LB ( 1리터 당 bactotryptone 10g, bacto - yeast extract 5g 과 NaCl 10g ) 액체 또는 고체 배지에서 키워졌으며 *Agrobacterium*은 M9 ( 1리터 당  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g, NaCl 0.5g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1g, 2mM  $\text{MgSO}_4$ , 0.2 % glucose와 0.1mM  $\text{CaCl}_2$  ) 액체 또는 고체 배지에서 37 °C 에서 키워졌다.

### 2. DNA 추출 및 조작

박테리아로 부터의 plasmid DNA의 분리는 alkaline lysis 방법에 의하여 이루어 졌으며 고도의 순도가 요구될 시는 CsCl 농도차 원심분리 ( Maniatis 등, 1982 )를 이용 하였다. DNA의 제한효소 처리나 ligation 과정등은 공급자 ( 미국의 Bethesda Research Lab., Promega 와 한국의 KOSCO )가 제공한 자료를 따랐으며 일정 DNA 조각을 분리할 시는 agarose gel 전기영동을 거친후 DEAE - cellulose 종이를 이용하여 원하는 DNA 조각을 회수 하였다. DEAE - cellulose 종이에 의한 DNA 조각의 분리는 agarose gel 전기영동 중인 원하는 DNA 조각 앞 쪽에 DEAE-cellulose 종이를 gel 사이에 삽입시킨 후 전기영동을 계속시켜 DNA의 DEAE-cellulose에의 흡착을 유도한 후 이 DEAE-cellu-

lose 종이를 0.1 M NaCl가 들어 있는 TE(10mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EDTA)로 수 차 세척한 후 2M NaCl가 들어있는 TE 완충액으로 씻음으로써 DNA 조각을 회수 하였다.

### 3. RNA 추출 및 조작

벼 (*Oryza sativa* L.)의 호분층으로 부터의 총 RNA 분리는 근본적으로 홍과 전 (1987) 에 의하였다. 도정기를 이용하여 분리한 벼의 호분층을 액체질소에 넣어 얼린후 막자사발을 이용하여 잘게 갈았다. 가루 9 당 2ml 의 추출 완충액 ( 0.2M Tris.Cl pH9.0, 0.4M KCl, 60mM MgAcetate, 50mM EGTA pH9.0, 0.2M sucrose, 3.4mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 1mg/ml heparin) 을 넣어 잘 섞은 후 두겹의 cheesecloth 로 걸렀다. 걸러진 액을 5분간 500g 에서 원심분리 하여 녹말을 포함한 큰 크기의 세포 내 기관들을 제거한 후 그 상등액에 50% ( W/V) guanidium thiocyanate 와 1% Triton X-100 를 첨가한 후 5.7M CsCl cushion 위에 놓아 초고속 원심분리 하였다. 침전물을 10mM Tris.Cl pH7.0, 5mM EDTA, 1% SDS 용액에 녹인 후 butanol/phenol 추출과정과 에타놀 침전과정을 거쳐 RNA 를 분리 하였다.

용기와 용액들은 고온 처리 되었거나 diethyl pyrocarbonate 로 처리하여 RNase 를 제거한 후 사용 되었다 ( Manniat- is 등, 1982).

### 4. 박테리아의 형질전환

plasmid DNA 의 *E. coli* 내로의 도입은  $CaCl_2$  방법 ( Mani-

atis 등, 1982)을 변형하여 시행 되었다. Log phase의 *E. coli*를 3,000g로 원심분리 함으로써 수확한 후 0 °C의 원래 culture 부피의 1/5의 CM 1 완충액 ( 10mM sodium acetate pH 5.6, 50mM NaCl)에 resuspend시킨 후 20 분간 얼음 위에 보관 하였다. 위 preparation을 다시 4 °C에서 3,000g로 3 분간 원심분리 하여 박테리아를 수확한 후 원래 culture 부피의 1/50의 CM 2 완충액 ( 10mM sodium acetate pH 5.6, 5 % glycerol, 70mM CaCl<sub>2</sub>, 5mM MnCl<sub>2</sub>)에 resuspend시켜 형질전환에 사용 하였다. 약 40ng의 DNA에 100ul의 위와 같이 준비된 “transformation competent” 박테리아를 사용 하였다. 이후의 형질전환 과정은 Maniatis 등 (1982)에 의했다.

Plasmid DNA의 *Agrobacterium* 내로의 도입은 근본적으로 An (1987)에 따라 이루어 졌다. YEP 배지에서 exponential 성장 단계에 있는 *Agrobacterium*을 3,000g로 5 분간 4 °C에서 원심분리 하여 수확한 다음 20mM CaCl<sub>2</sub> 용액에 resuspend시켰다. 이들 *Agrobacterium*에 plasmid DNA를 첨가 후 액체 질소에서 급속 냉동 시키고 다시 37 °C 수조에서 5 분간 녹였다. 여기에 YEP 용액 배지를 첨가해 28 °C에서 2 - 4 시간 배양한 후에 5ug/ml tetracycline과 25 µg/ml kanamycin이 들어있는 YEP agar 배지에서 형질전환된 *Agrobacterium*을 분리해 냈다.

## 5. DNA와 RNA의 분석

DNA의 염기서열은 M13mp19 phage에 DNA를 삽입 후 dideoxy chain termination 방법 ( Sanger 등 , 1977)을 이용하여

결정 하였다. DNA와 RNA의 정량은 표품의 흡수도를 260nm와 280 nm에서 측정하여 이루어 졌다. 분리 정제된 DNA는 ethidium bromide 존재하에 agarose gel 전기영동으로 분석 하였고 RNA는 50 % formaldehyde가 함유된 agarose gel 전기영동으로 분석 하였다. 전기영동이 끝난 DNA와 RNA는 Nytran막 (Schleicher & Schuell, U.S.A.)으로 6 × SSPE 존재 하에 옮겨졌다 (Maniatis 등, 1982). 크론된 DNA는 nick translation과정으로 <sup>32</sup>P label 되었고 oligonucleotide는 T4 polynucleotide kinase를 이용하여 <sup>32</sup>P로 label 되었다 (Maniatis 등, 1982). Southern 또는 Northern hybridization은 6 × SSPE, 0.5 % sodium dodecyl sulfate(SDS), 5 × Denhardt's 용액과 100ug/ml salmon sperm single-stranded DNA 존재 하에 <sup>32</sup>P로 label 된 probe로 hybridization 되었다. 크론된 DNA의 경우는 37 °C에서 50 % formamide 존재하에 hybridization이 이루어졌고 oligonucleotide의 경우는 45 °C에서 hybridization이 이루어졌다. Hybridization이 끝난 후의 세척과정은 크론된 DNA의 경우는 0.1 × SSPE로 37 °C에서 이루어 졌고 oligonucleotide의 경우는 0.1 × SSPE로 실온에서 이루어졌다.

PAP1의 probe로 사용된 oligonucleotide는 PAPI의 아미노산 순번 46번부터 50번까지 (Thr-Ala-Cys-Asn-Cys)에 해당하는 아미노산 서열에 상응하는 유전 codon에 따라 화학적으로 합성된 (Mallace 등, 1981) 것으로서 Sephadex G-50 column으로 일부 정제하여 사용 하였다.



## 6. 시 약

사용된 시약들은 모두 reagent grade로서 미국의 Sigma Chemical Co. 또는 일본의 Kanto Chemical Co.의 제품들이었다.

## 제 3 장 결 과

### 제 1 절 고등식물 형질전환용 유전자 운반체, pKCH 1

1987년 3월 1일 부터 1988년 2월 28일 까지 수행된 기본연구사업 “고등식물 형질전환용 유전자 운반체 개발”에 의해 네 가지의 유전자 운반체들, pKCH 1과 pKCH 3과 pPBT 1 - 1과 pPBT 1 - 3, 이 제작 되었다. 이들 유전자 운반체들은 고등식물에서 작용하는 promoter로 CaMV 35S promoter와 terminator로 Tnos를 공히 가지고 있으며 이들 유전자 운반체가 가지고 있는 promoter의 크기가 약간씩 차이가 있음이 제한효소 처리 결과로 확인 되었다(유 장렬 등, 1988). 염기 서열 확인 결과 유전자 운반체 pKCH 1(그림 1)이 가장 바람직한 promoter 부위를 함유하고 있음이 확인 되었으며 확인된 염기 서열은 다음과 같이 정리될 수 있다. pKCH 1으로 부터 promoter 부위 만을 RsaI으로 처리 분리해 낸 후 M13mp19의 Hinc II 위치에 삽입하여 dideoxy chain termination 방법으로 염기 서열을 확인한 결과 pKCH 1은 CaMV 35S promoter의 transcription 시작점인 G(☉)와 TATA box와 CAAT box를 함유하고 있다(그림 2).

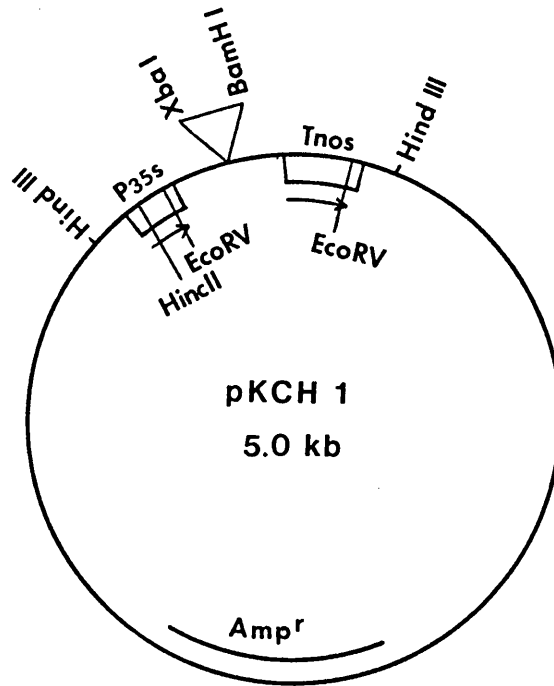
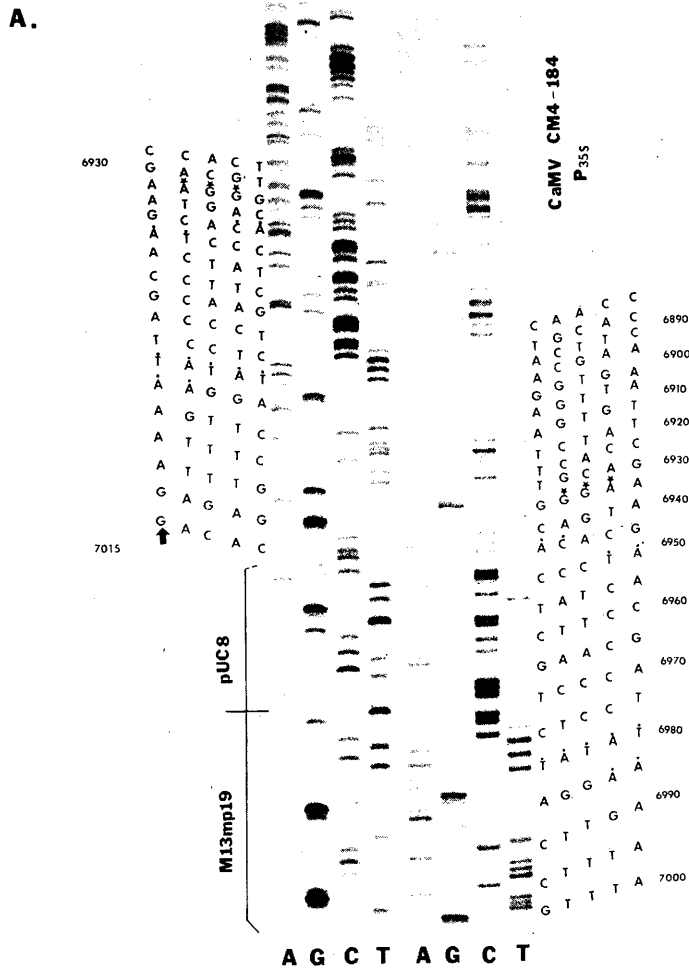


그림 1. 고등식물 형질전환용 유전자 운반체, pKCH 1.

$P_{35s}$ 는 Cauliflower mosaic virus의 35S 전사체의 promoter 부위를 뜻하며 Tnos는 nopaline synthase 유전자의 terminator 부위를 뜻함.

$Amp^r$  부위는 ampicillin 저항성 유전자로서 pUC 13으로부터 도래된 것이며  $P_{35s}$ 와 Tnos는 실제로는 Xba I과 BamH I 제한효소 위치를 사이에 두고 인접해 있음.



**B.**

Bgl II

GATCT-----762n.t-----AAGATGGACCCCCACCCACGAGGAG  
 CATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATT  
 GATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCT  
 TCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTTCATTTGGAGAGGAC

그림 2. P<sub>35S</sub> 부위의 DNA 염기 서열.  
 A. P<sub>35S</sub> 부위의 염기서열을 보여 주는 autoradiogram. ↑는 transcription 시작점을 표시하며 double loading을 한 결과로 상당부분의 염기서열이 중복되어 나와 있음.  
 B. P<sub>35S</sub> 부위의 염기서열. 'CAAT' box와 'TATA' box는 ■■■ 들로 표시되어 있으며 transcription 시작점인 G는 ↓로 표시되어 있음.

## 제 2 절 외래 유전자의 pKCH 1-Ti plasmid-Agrobacterium system에 삽입

### 1. *B. thuringiensis*, 변종 HD-73, 제충성 유전자

*B. thuringiensis*, 변종 HD-73, 는 plasmid 상에 나비목에 속하는 해충에 독성을 보이는 유전자를 가지고 있으며 이 독성 유전자의 크로닝이 완료 되어 *E. coli* 에서의 발현이 이루어져 해충 제거용 농약으로 사용 되고 있다 ( Min 등, 1986). 크론 pMK73-5 (당 센터의 김 정일 박사 제공) 로 부터 독성 유전자의 coding부위 바로 바깥쪽에 위치하는 제한효소 자리 Bam HI 을 이용하여 독성 유전자를 분리해 낸 후 pKCH 1 의 Bam HI 자리 에 삽입 하였다. P<sub>35S</sub>-독성유전자 - Tnos 조합을 Hind III 를 이용하여 분리해 낸 후 neomycin phospho transferase 유전자 (npt) 와 식물체의 염색체 내로의 삽입에 필요한 T-DNA 의 왼쪽과 오른쪽 border-sequence ("LB" 와 "RB") 와 *Agrobacterium* 내에서의 복제 시작점을 가지고 있는 plasmid vector pGA 472 ( 미국 워싱턴 주립 대학의 안 진홍 박사 제공 ) 의 Hind III 위치 에 삽입 하였다 ( 그림 3 ). 일단 *E. coli* 내에서 크로닝이 된 "LB"-npt-P<sub>35S</sub>-독성유전자 - Tnos-"RB" 를 가지고 있는 plasmid 를 고등식물체의 감염에 필요한 유전자 ('vir') 를 가지고 있는 helper plasmid 가 함유된 *Agrobacterium* 으로 이전하였다. *Agrobacterium* 으로 부터 분리된 plasmid DNA 의 제한효소 처리 결과는 예상 되는 위치에의 DNA band 들을 보여 주고 있다. 제한효소 Bam HI 으로 처리시의 13.2, 2.72, 2.3 그리고 1.67Kb 에서의 band 들은 *Agrobacterium* 으로 이전된 plasmid 에 의한 것이다 ( 그림 4 ).

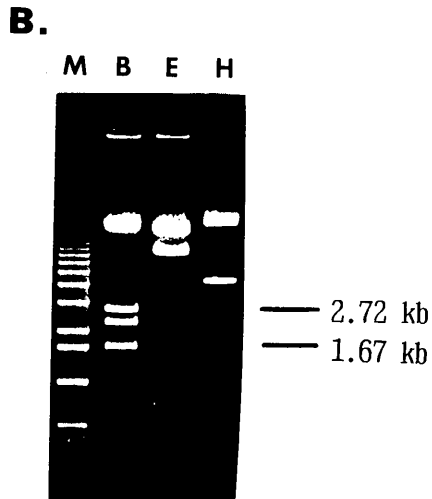
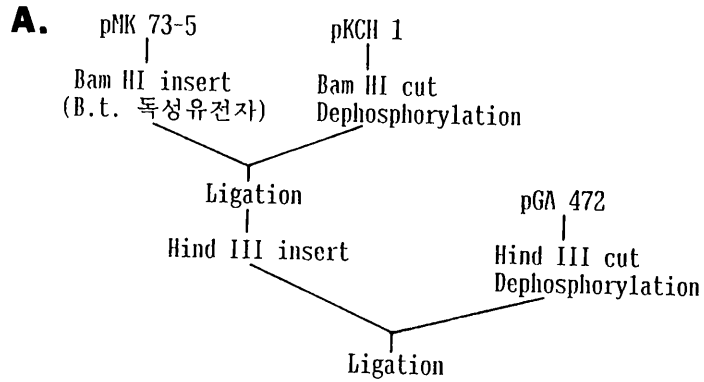


그림 3. B.t., HD-73, 독성유전자의 pKCH 1-pGA 472 에의 도입.

A. 모식도. B.t., HD-73, 독성유전자 크론 pMK 73-5로부터 제한효소 BamHI 을 이용하여 독성유전자를 뽑아낸 후  $P_{35S}$ 와 Tnos를 가지고 있는 유전자 운반체 pKCH 1의 BamHI 위치에 삽입한 후 “LB”와 “RB” 그리고 *Agrobacterium*에서의 복제 시작점과 npt 유전자를 제공하는 pGA 472 로 옮겨졌다.

B. Gel 사진.  $P_{35S}$ -독성유전자-Tnos cassette이 옮겨진 pGA 472의 제한효소 처리결과를 ethidium bromide 존재하에 agarose gel 분석한 결과로 제한효소 BamHI 처리시 나타나는 2.72 kb와 1.67 kb 크기의 band 들이 B.t. 독성 유전자의 정확한 삽입을 나타냄.

M ; 1kb DNA ladder , B ; BamHI , E ; EcoRI , H ; HindIII.

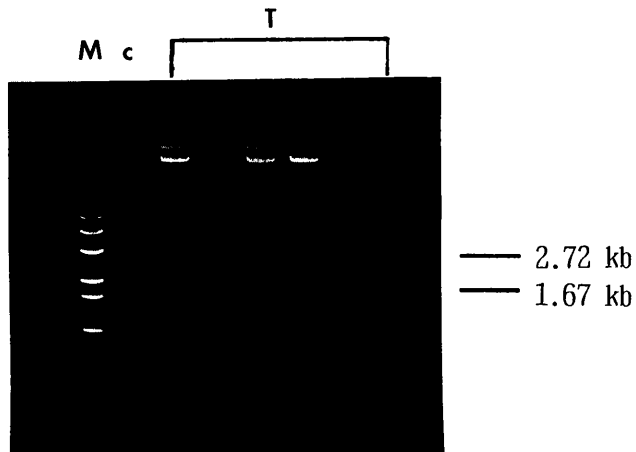


그림 4. B.t., HD-73, 독성유전자의 Ti plasmid-*Agrobacterium*에의 도입.

B.t., HD-73, 독성유전자를 pKCH 1 - pGA 472 에 삽입 후 *Agrobacterium* 내로 이전된 결과로 형성된 kanamycin 에 저항성을 띄는 *Agrobacteria*로부터 plasmid DNA 를 분리후 제한효소 BamHI 처리하며 agarose gel 전기영동한 것. 2.72kb와 1.67kb에서 나타나는 두개의 band들이 B.t., HD-73, 독성유전자등이 *Agrobacterium*으로 이동되었음을 표시함. M ; 1kb DNA ladder; C ; B.t. 독성유전자가 이전되지 않은 *Agrobacterium*의 plasmid DNA 제한효소 BamHI 처리결과, T ; B.t. 독성유전자등이 이전된 *Agrobacteria*의 plasmid DNA 제한효소 BamHI 처리결과.

## 2. Proinsulin 유전자

Proinsulin 유전자 (PINS)는 insulin의 A chain과 B chain 그리고 그 사이에 C chain을 기록하고 있는 유전자이다. proinsulin 유전자를 고등식물체에 도입 및 발현을 시키기 위해 pKCH 1의  $R_{35S}$  뒤에 삽입 후 Ti plasmid-*Agrobacterium* system으로 이전하였다. 크론 pPINS (유전공학 센터 이대실 박사 제공)로부터 Bam HI 제한효소를 이용하여 PINS의 coding 부위를 분리해 낸 후 pKCH 1의 Bam HI 자리에 삽입 하였다.  $R_{35S}$ -PINS 유전자-Tnos 조합을 Hind III를 이용하여 분리해 낸 후 npt, "LB"와 "RB" 그리고 *Agrobacterium* 내에서의 복제 시작점을 가지고 있는 plasmid 유전자 운반체 pGA 643 (미국 워싱턴 주립대학의 안 진홍 박사 제공)의 Hind III 위치에 삽입 하였다.(그림 5). 일단 *E. coli* 내에서의 크로닝이 된 "LB"-npt- $R_{35S}$ -PINS-Tnos-"RB"를 가지고 있는 plasmid를 'vir' 인자를 가지고 있는 helper plasmid가 함유된 *Agrobacterium*으로 이전 하였다. *Agrobacterium*으로 부터 분리된 plasmid DNA를 제한효소 처리하여 agarose gel 전기영동 후  $^{32}P$ 로 label된 PINS probe로 Southern 분석한 결과 예상 되는 위치에 band가 나타남을 볼 수 있었다. Hind III로 처리됐을시 약 2.3 kb에서 Southern band가 확인되었다 (그림 6).



**A.**

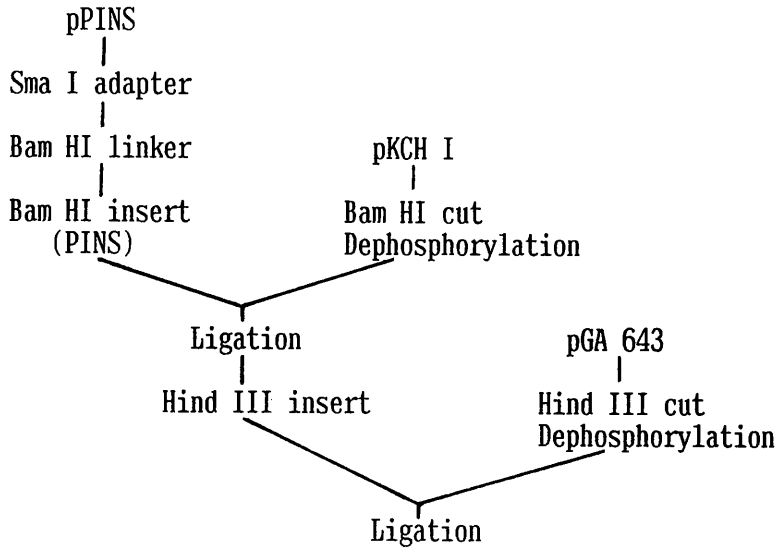
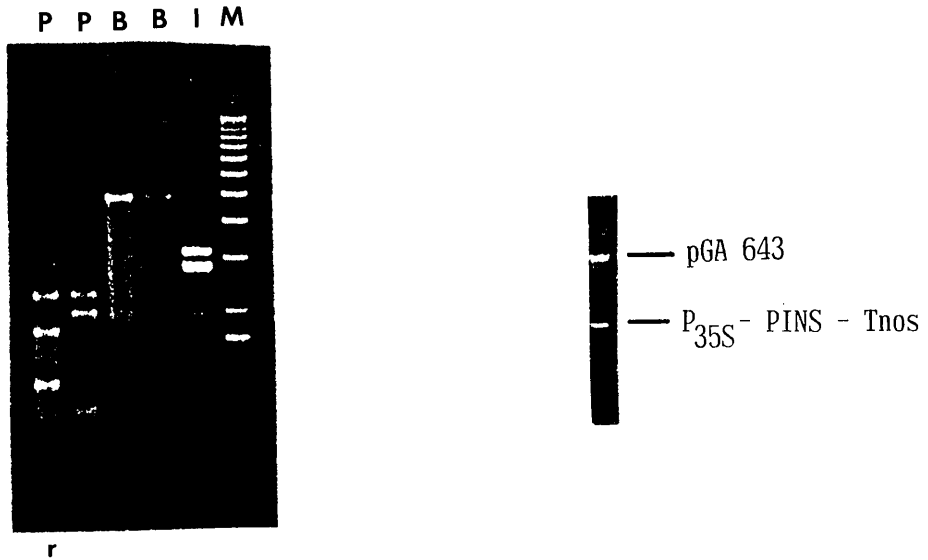


그림 5. Proinsulin 유전자의 pKCH1-pGA 643 plasmid에  
의 도입

A. 모식도. Proinsulin 유전자 크론 pPINS의 Hind III 자리를 BamHI 자리로 바꾸기 위해 pPINS를 Hind III 로 열고 Sma I adapter를 붙인 후 다시 BamHI linker를 붙였다. 제한효소 BamHI을 이용하여 proinsulin 유전자만을 뽑아 내어 유전자 운반체 pKCH 1의 BamHI 자리에 삽입하였다. 형성된 P<sub>35s</sub>-PINS 유전자-Tnos cassette을 Hind III를 이용하여 뽑아 내어 “LB”와 “RB” 그리고 *Agrobacterium* 내에서의 복제 시작점과 npt 유전자를 가지고 있는 pGA 643의 Hind III 자리에 삽입하였다.

**B.**



B. Gel 사진. PINS 유전자를 pKCH 1에 삽입후 제한효소 처리결과 일부의 재조합 DNA가 PINS 유전자를 정확한 방향으로 가지고 있음이 확인되었으며 P<sub>35S</sub>-PINS 유전자-Tnos cassette을 pGA 643에 삽입한 후 그 결과로 만들어진 재조합 DNA를 제한효소 Hind III로 처리결과 pGA 643의 Hind III 자리에 상기 cassette이 정확하게 삽입되어 있음이 확인되었음. M ; 1 kb DNA ladder, I ; intact 재조합 DNA, B ; BamHI digest, P ; Pst I digest, r : PINS가 정확한 방향으로 삽입됐음을 뜻함.

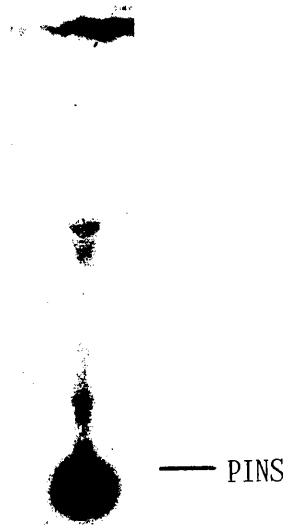


그림 6. P<sub>35s</sub>-PINS 유전자-Tnos cassette 을 Ti plasmid-*Agrobacterium* system에 도입후의 Southern 분석결과. 형질전환된 *Agrobacterium*으로부터 plasmid DNA를 분리하여 HindⅢ로 처리하고 agarose gel 전기영동을 거쳐 Nytran막으로 옮긴 후 <sup>32</sup>p로 label된 PINS 로 Southern 분석한 결과 2.3kb 전후에서 band 확인 되었음.

### 제 3 절 *B. thuringiensis*, 변종 HD-1, plasmid DNA 의 제충성 유전자에 관한 분석

*B. thuringiensis*, 변종 HD-1, 도 역시 변종 HD-73와 마찬가지로 나비목 유충에 대해 독성을 나타내는 단백질들을 생산하며 이들에 대한 유전자들을 plasmid상에 가지고 있음이 보고되었다 (Kronstad와 Whiteley, 1986). 이들 plasmid상에 기록되어 있는 독성 유전자의 크로닝을 위해 분리된 plasmid DNA를 제한효소 Hpa I과 Pst I으로 처리하여 전기영동한 후 Nytran 막으로 Southern blotting 하였다. B. t., HD-73, 독성유전자 크론 pMK 73-5를 nick translation 과정을 통해  $^{32}$ p로 label 하여 hybridization한 결과 네 개의 band들 (약 5.3, 4.3, 3.7 그리고 2.8 kb)을 볼 수 있었다 (그림 7).

### 제 4 절 벼 RNA의 PAPI 유전자에 관한 분석

벼 종자의 호분층 (aleurone layer)에 주로 존재하며 amylase와 protease의 inhibitor(PAPI)로 추정되는 단백질이 벼 종자의 호분층에서 분리되어 분석되었다. 이 단백질은 약 9,000 M.W.로 SDS-PAGE에서 나타나며 Ala과 Ser과 Gly과 Cys을 특히 많이 함유하고 있다. (Yu 등, 1988).

PAPI의 유전자 크론 확보를 위해 호분층으로부터 총 RNA를 분리해 낸 후 PAPI의 아미노산 서열 46-50번에 해당되는

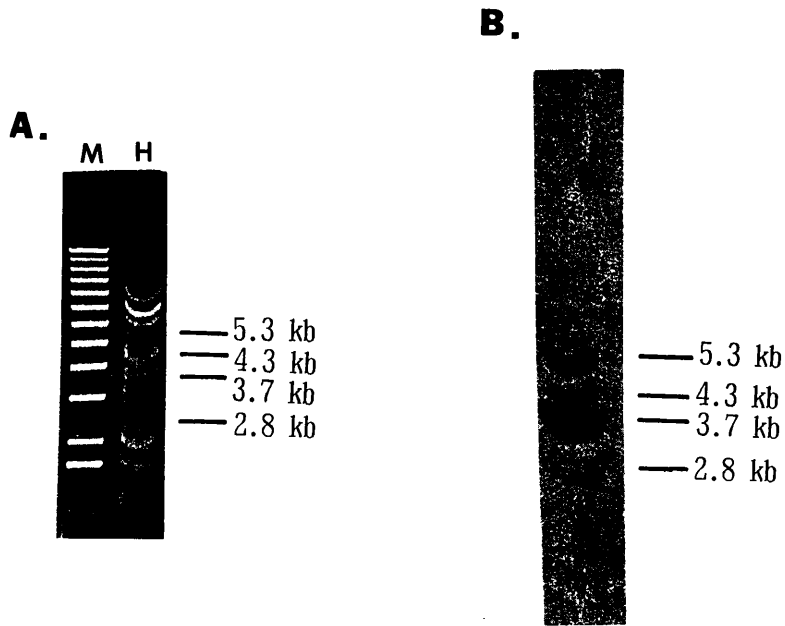


그림 7. *B.t.*, HD-1, DNA의 독성유전자에 관한 Southern 분석.

- A. Gel 사진. *B. thuringiensis*, 변종 HD-1의 plasmid DNA를 제한효소 *E.coRI* 과 *PstI*으로 동시 처리한 후 agarose gel 전기영동한 것. 표시된 5.3kb, 4.3 kb, 3.7kb 그리고 2.8kb는 그림 B에 표시된 Southern band들의 위치임. M ; 1 kb DNA ladder, H ; *B.t.*, 변종 HD-1, DNA의 *E. coRI/PstI* digest.
- B. Southern hybridization 결과. 그림 A에의 gel을 Nytran 막으로 Southern blotting 한 후  $^{32}P$ 로 표기된 pMK 73-5로 Southern hybridization 한 결과. 약 5.3kb, 4.3kb, 3.7kb 그리고 2.8kb에서 band들을 볼 수 있음.

	46	47	48	49	50	
	Thr	Ala	Cys	Asn	Cys	
5'	ACN	GCN	TGT/C	AAA/G	TGT/C	3' ;N=A,G,C,T

PAPI 1: 5' ACA TTT ACA NGC NGT 3'  
 PAPI 2:    ACA TTT GCA NGC NGT  
 PAPI 3:    GCA TTT ACA NGC NGT  
 PAPI 4:    GCA TTT GCA NGC NGT  
 PAPI 5:    ACA CTT ACA NGC NGT  
 PAPI 6:    ACA CTT GCA NGC NGT  
 PAPI 7:    GCA CTT ACA NGC NGT  
 PAPI 8:    GCA CTT GCA NGC NGT

그림 8. PAPI oligonucleotide 들의 염기 서열.

확인된 probable amylase와 protease의 inhibitor의 아미노산 서열을 기초로 하여 여덟가지의 oligonucleotide가 화학적으로 합성되었다. 사용된 아미노산 서열과 여덟가지의 oligonucleotide 들의 염기 서열이 표시되어 있음.

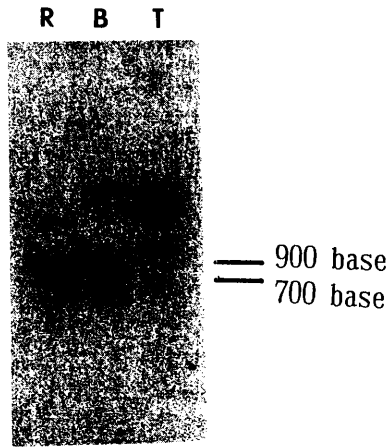


그림 9. 벼 호분층에 존재하는 PAPI 에 대한 Northern 분석.

벼의 호분층과 보리의 자엽과 담배의 잎에서 부터 추출한 총 RNA 약 10  $\mu$ g씩을 50 % formaldehyde agarose gel 전기 영동한 후 Nytran막으로 Northern blotting하고  $^{32}$ p로 표기된 PAPI oligonucleotide로 Northern hybridization한 결과 벼의 호분층으로 부터는 약 900 base 위치에 PAPI의 mRNA band로 여겨지는 단일 band가 관찰됨. 보리의 자엽으로 부터는 약 700 base 위치에 보고된 보리의 PAPI mRNA band가 관찰되며 담배의 잎으로 부터는 이 부위에서 Northern band가 관찰되지 않음.

R ; 벼의 호분층, B ; 보리의 자엽, T ; 담배의 잎.

oligonucleotide mixed probe (그림 8)를 이용하여 Northern 분석하였다. 감자 (*Solanum tuberosum* L. cv. superior)의 잎과 담배 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38)의 잎으로부터 추출한 RNA로부터는 크기 약 800-1,000 base 전후에서 band가 관찰되지 않는 반면 벼 (*Oryza sativa* L.)의 호분층의 RNA로부터는 약 900 base 정도의 위치에 Northern band가 나타남을 볼 수 있다 (그림 9).



## 제 4 장 고 찰

고등식물 형질전환용 유전자 운반체로 개발된 pKCH 1은 염기 서열을 확인한 결과 CaMV의 35 S 전사체를 가져오는 promoter에 해당되는 부위를 정확하게 함유하고 있음이 확인 되었다. RNA의 시작점인 RNA capping 위치를 3'끝쪽에 가지고 있으며 promoter로서의 기능에 필수라고 여겨지는 TATA box와 CAAT box를 그리고 CAAT box의 5' 방향 윗쪽으로 약 700 염기를 추가로 가지고 있어 고등식물체에서 작용키 위한 promoter 염기 서열을 모두 가지고 있음을 알 수 있다 (그림 2).

토양 미생물인 *Bacillus thuringiensis*, 변종 HD - 73, 에는 나비목 유충에 독성을 나타내는 단백질의 유전자가 plasmid 상에 기록 되어 있으며 이 독성 유전자의 크론, pMK 73 - 5,을 이용하여 독성 유전자를 고등식물체에 도입하여 발현 시킴에 따른 내충성 고등식물의 제조가 가능하겠다. B.t., HD - 73,의 독성유전자를 pKCH 1의 P<sub>35s</sub>와 Tnos사이의 Bam HI 크로닝 위치에 삽입한 후 pGA 472에 옮겨 *Agrobacterium*으로 전입 하였다. DNA의 제한효소 처리 결과는 독성 유전자가 정확한 방향으로 (promoter와 terminator에 대한) 삽입되어 있음을 보여 주고 있으며 (그림 3과 4) 따라 일단 이러한 *Agrobacterium*의 고등식물체 감염이 이루어 지면 B.t. 독성 유전자의 고등식물체의 염색체 내로의 도입이 일어날 것이며 이에 따른 B.t. 독성 유전자의 고등식물체에서의 발현이 이루어질 수 있을 것으로 여겨 진다.

고등식물의 단백질에는 인간에게 필수인 아미노산 중의 일부가 결여 되어 있으며 ( 예, 베크로 부터는 lysin, 콩으로 부터는 methionine 등 ) 이에 식물체의 단백질은 동물의 단백질에 비해 저급으로 여겨지고 있다. 일반적으로 식물체의 단백질이 동물에 의해 섭취되어 동물성 단백질로 바뀌는 과정에서 막대한 에너지 손실이 일어나며 이러한 막대한 단백질원의 손실을 막는 근본적인 해결책으로 식물체 내의 단백질을 동물성 단백질로 전환 시키는 것이 모색되고 있다 ( Polacco, 1984 ). 궁극적으로 식물체의 단백질 중의 상당량이 동물성으로 바뀌어 야만 원래의 취지에 부합되는 식물체의 단백질의 질적 변화가 이루어 지겠으나 이러한 목표를 달성키 위한 기초 연구로 본 연구진은 인간의 proinsulin 유전자를 식물체에 도입하여 발현되는 과정을 연구 하고 있다. 크론 pPINS ( 당 센터의 이 대실 박사 제공 ) 로 부터 proinsulin 유전자를 분리해 내 pKCH 1의 Bam HI 위치에 삽입한 후 pGA 643 에 옮겨져 *Agrobacterium* 으로 전입 되었다. *Agrobacterium* 으로 부터 분리된 DNA 의 proinsulin 유전자에 관한 Southern 분석 결과는 proinsulin 유전자가 정확한 위치에 삽입 되어 있음을 보여 주며 ( 그림 6 ) 일단 이러한 *Agrobacterium* 의 고등 식물체 감염이 이루어지면 proinsulin 유전자의 고등식물체 내로의 도입 및 발현이 이루어질 것으로 여겨진다.

*B. thuringiensis*, 변종 HD - 1, 로 부터의 나비목 유충에 독성을 나타내는 유전자의 크로닝은 좀 더 넓은 범위의 해충 제거에 많은 도움이 될 것이다. B.t., HD - 73, 독성 유전자 크론, pMK 73-5, 을 이용한 B.t., HD - 1, plasmid DNA 의 Southern 분석 결과

로 네 개의 Hpa 1/Pst 1 band 들을 볼 수 있었다. 네 개의 band 의 크기로 미루어 HD - 1 에는 HD - 73 독성 유전자와 염기 서열이 매우 유사한 세 개의 유전자가 존재함을 알 수 있으며 이들의 크론 확보에 따른 독성 정도의 판명에 대한 귀추가 주목 된다 하겠다.

벼 종자의 호분층에 존재하는 아밀라아제 (amylase) 와 프로테아제 (protease) 의 억제제로 여겨지고 있는 PAPI 의 유전자의 크로닝은 벼 발아 과정에서 중요한 역할을 하는 호분층에 특이한 발생학적 조절능력의 실마리를 푸는 데 도움이 될 것이며 PAPI 의 크론 확보에 따른 이의 대량 확보 가능성은 PAPI 의 기능 분석에도 많은 도움을 줄 것이다. Oligonucleotide 를 이용한 Northern 분석 결과는 PAPI mRNA 의 호분층에의 존재와 약 900 base 정도의 크기를 말해 주고 있으며 이를 이용한 PAPI 의 cDNA 크로닝이 가능할 것으로 여겨진다.

## 참 고 문 헌

- 1) An, G. 1987. Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis. In *Methods in Enzymology* 153: 292-305.
- 2) Kronstad, J.W.와 H.R. Whiteley. 1986. Three classes of homologous *Bacillus thuringiensis* crystal-protein genes. *Gene* 43: 29-40.
- 3) Maniatis, T., E.F. Fritsch와 J. Sambrook. 1982. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y.
- 4) Min, S.Y., H.Y. Park, M.H. Kim와 J.I. Kim. 1986. Cloning of insecticidal crystal toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 and its toxicity to the fall webworm, *Hyphantria cunea*. *한국생화학회지* 19: 363-371.
- 5) Polacco, J.C. 1984. Genetic engineering of genes controlling seed quality. In *Applications of Genetic Engineering to Crop Improvement*. ed. by G.B. Collins와 J.G. Petolino. Martinus Nijhoff/W. Junk Publishers. pp. 255-303.
- 6) Sanger, F., S.Nicklen와 A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- 7) Wallace, R.B., M. Schold, M.J. Johnson, P. Dembeck과 K. Itakura. 1981. The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. *Nucleic Acids Res.* 9: 3647-3656.

- 8) Yu, Y.G., C.H. Chung, A. Fowler와 S.W. Suh. 1988. Amino acid sequence of a probable amylase/protease inhibitor from rice seeds. Arch. Biochem. Biophys. 265: 466-475.
- 9) 유장렬, 홍주봉, 정혁, 정상호, 고경원과 양승균, 1988. 고등식물 형질전환용 유전자 운반체 개발. 한국과학기술원 연구보고서.
- 10) 홍주봉과 전재홍, 1988. 간편한 고등식물 RNA 분리방법. 한국식물학회지, 30:201-203.

