

Resveratrol synthase로 형질전환 된 지황에서 *Agrobacterium*을 매개로 한 Cyclophilin 유전자의 co-transformation

강원대학교 농업생명과학대학

서은원, 이동욱, 이재근, 김재광, 임정대, Bimal K. Ghimire, 유창연*

Agrobacterium-mediated co-transformation of Cyclophilin gene in *Rehmannia glutinosa* L. transformed with Resveratrol synthase

College of Agriculture and Life Science, Kangwon National University

Eun Won Seo, Dong Wook Lee, Jae Geun Lee, Jae Kwang Kim, Jung Dae Lim, Bimal K.

Ghimire, Chang Yeon Yu*

실험목적

Resveratrol synthase로 형질전환 된 지황식물체에 복합기능성을 부여하기 위하여 장기이식과 자가면역질환의 치료기능과 식물방어기작에 연관성을 나타내는 Cyclophilin 유전자를 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 지황에 도입하고 지황의 형질전환체계를 확립하고자 실험을 진행하였다.

재료 및 방법

배양 중인 Resveratrol synthase로 형질전환 된 지황식물체의 엽편을 사용하여 Pre-culture배지 (MS + 30g/l Sucrose + 0.1mg/l NAA + 4mg/l BAP)에서 2일 동안 배양하였다. *Agrobacterium* 배양액에 식물체를 넣고 10분간 접종한 다음 공동배양 배지(30g/l Sucrose)에 옮겨 암조건에서 2일 동안 공동배양을 수행하였다. 공동배양 후 선발배지(MS + 30g/l Sucrose + 0.1mg/l NAA + 4mg/l BAP + 5mg/l Hygromycin + 200mg/l Timentin)에서 배양하였고 캘러스가 형성된 절편체는 캘러스만 분리하여 Shoot 유도배지(MS + 30g/l Sucrose + 0.5mg/l BAP + 0.5mg/l TDZ + 5mg/l Hygromycin + 200mg/l Timentin)에서 배양하였다. 이 중에서 Shoot가 유도된 캘러스를 (MS + 30g/l Sucrose + 0.5mg/l BAP + 0.5mg/l TDZ + 1mg/l Hygromycin + 50mg/l Timentin)을 넣은 배지에서 배양하였다. 이 배지에서 유도된 shoot는 항상제가 들어있지 않은 MS배지로 옮겨 뿌리를 유도하였다.

Cyclophilin 유전자의 cDNA 단편을 CaMV 35S promotor와 35S terminator polyadenylation signal를 갖는 pRTL2에 도입한 후 transformation vector인 pCAMBIA1301에 도입하여 pCAMBIA-Cyclophilin vector를 구성하였고 이 vector를 *Agrobacterium* AGL1으로 도입하여 형질전환에 사용하였다. Cyclophilin 유전자가 존재하는지의 여부를 확인하기 위하여 CTAB방법으로 DNA를 추출하였으며 PCR 분석을 한 후 전기영동을 수행하여 DNA band를 확인하였다.

결과 및 고찰

형질전환 시 접종재료 식물체의 전처리 배양을 수행한 것이 수행하지 않은 것보다 더 효과적이었으며 *Agrobacterium*과의 접종시간은 30분, 공동배양 기간은 2일간 배양하였을 때 효과적이었다. 식물 절편체를 *Agrobacterium*과 공동배양 하고 선발 배지로 옮긴 다음 7주 후 상처부위로부터 calluse가 생성되었고 그 후 9주 뒤에 calluse에서 shoot의 분화를 관찰할 수 있었다. 이러한 shoot는 뿌리유도배지로 옮긴 후 2주 만에 뿌리가 유도되었다.(Fig 1)

주저자 연락처 : 유창연

E-mail : cyyu@kangwon.ac.kr

Tel : 033-250-6411

형질전환을 통하여 재분화 된 지황식물체로부터 분리된 염색체상에서 cyp유전자가 존재하는지의 여부를 확인하기 위하여 CTAB방법으로 DNA를 추출하였으며 PCR분석을 진행하였다. cyp유전자의 도입을 확인하기 위하여 primer CYP-5' : GGT CTT CTT CGA CAT GAC AGT CGG 와 CYP-3' : AGC TGA CCA CAA TCG GCA ATA ACG A를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR산물을 전기영동 한 결과 wild type 식물체에서는 나타나지 않은 498bp DNA band가 형질전환 되었다고 추정되는 식물체에서 나타났다(Fig 2).

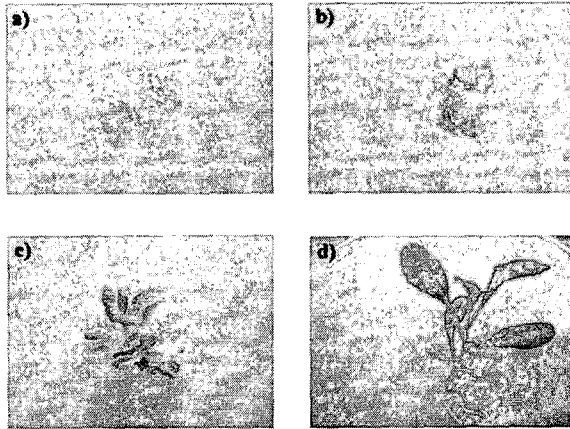


Fig 1. 형질전환된 지황의 재분화 ; a) callus, b) callus로부터 유도된 shoot, c) 유도 2주후 발달된 shoot, d) shoot로부터 root유도

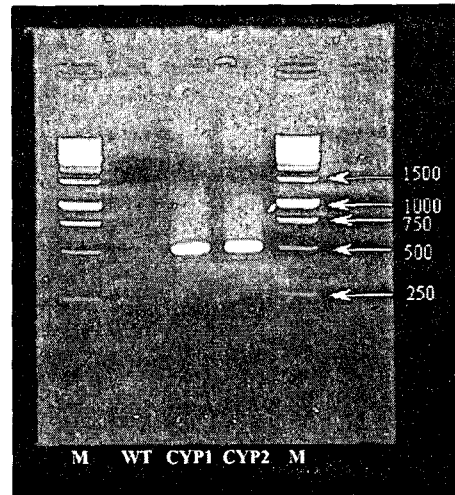


Fig 2. wild type 지황과 CYP 유전자가 도입된 지황의 PCR 분석
M : marker, WT : wild type, CYP1,2 : transformation plant