

## 토양으로부터의 *Agrobacterium tumefaciens*의 분리, 동정 및 옥수수의 형질전환에 이용

노광수 · 강봉중  
계명대학교 자연과학대학 생물학과

### Identification of *Agrobacterium tumefaciens* from Soil and Transformation of Maize

Kwang Soo Roh and Bong Joong Kang  
Department of Biology, College of Natural Science,  
Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

#### ABSTRACT

Several strains of *Agrobacterium tumefaciens* were isolated from soil in the Taegu area and characterized to develop some useful vector systems for higher plant genetic engineering.

The selected colonies had a unique form, and strains from the colonies were capable of tumor formation on the sunflower leaf surface. They had a large plasmid. The restriction analysis showed that they were another kinds of Ti plasmid compared with C58 and Ach5. The isolated strains were identified as the nopaline type and also as biovar 1 *A. tumefaciens*, according to their tumor morphology, biophysical and biochemical characteristics.

One of the isolated strains, AK204 was transformed with binary vector(pGA642), having selectable marker(Km', Tc'). Furthermore, maize tissue cells were transformed by cocultivation with AK204/pGA642, and the transformants were selected on the selective medium and identified using PAGE patterns of their soluble proteins.

#### 서 론

고등식물의 품질개량 기술이 실제의 농업이나 원예에 응용되기 위해서는 유용한 유전자의 분리증식과 함께 인위적인 형질전환이나 형질전환된 유전자의 발현조절에 관한 연구가 필요하다.

새로운 형질을 갖는 고등식물체를 개발하기 위한 방법으로 polyethylene glycol 등의 처리에 의한 원형질체 융합(1, 2), 미세주입기를 사용한 나출 DNA의 원형질체 직접 주입(3, 4), liposome을 이용한 융

합(5-8), 식물체의 조직이나 세포와 세균 세포의 공존배양(9-10), electroporation을 이용한 방법(11-16)등이 연구되고 있으며 이와 병행하여 외래 DNA를 식물체의 genome으로 전이시켜 줄 수 있는 vector 개발에도 많은 연구가 진행되고 있다.

고등식물의 형질전환에 이용될 수 있는 잠재력을 가진 vector system으로는 *Agrobacterium tumefaciens*의 Ti plasmid(17-20)와 *A. rhizogenes*의 Ri plasmid(21-25), 식물 바이러스인 cauliflower mosaic virus(26, 27)나 geminivirus(28, 29) 또는

식물체에서 발견되는 transposable element나 미토콘드리아와 염록체 같은 세포질성 유전체를 이용하려는 연구도 시도되고 있다(30-33).

*A. tumefaciens*는 Rizobaceae에 속하는 토양 미생물로서 주로 쌍자엽식물의 상처 부위에 감염되면 crown gall이라 불리우는 tumor를 유발하는데(34), 이는 이 균주가 가지는 거대 plasmid의 일부인 T-DNA가 식물세포의 genome으로 전이되어(35, 36) 식물생장 조절물질의 균형을 파괴하고 종양성 세포분열을 유발시킨 데에서 비롯된다(37-40). 일단 형성된 tumor조직은 균주를 제거하여도 종양으로서의 성질을 잊지 않고, 식물 생장 물질이 존재하지 않는 배지에서도 계대배양되며(41), opine이라는 비단백질성 아미노산 유도체를 생산하게 된다(42). 또한 T-DNA의 양쪽 말단에 위치한 25bp의 불완전한 반복서열 사이에 위치한 유전자는 모두 식물 세포 내로 옮겨질 수 있음이 밝혀져 있다(43). 이러한 특징을 이용하여 Ti plasmid를 고등 식물체의 vector system으로 개발하려는 연구가 계속되고 있으나 식량자원으로 유용한 단자엽 식물에 대하여서는 종양을 형성하는 속주범위가 지극히 제한된 점과 식물세포 내에서의 형질발현 조절의 한계성 등이 난점으로 지적된다(44). 이러한 문제점을 해결하기 위해서는 새로운 균주를 분리하거나 속주범위 돌연변이체를 선발하고, 종양형성유전자의 제거 및 식물세포 내에서의 발현능이 뛰어난 promoter나 terminator 염기서열의 삽입 그리고 외부 DNA(foreign DNA)의 삽입 및 식물체로의 전이 방법등의 개발이 필요할 것이다.

이에 본 연구에서는 국내종 옥수수의 형질전환체의 육성이나 배양 기술의 확립을 위한 연구의 일환으로 토양 시료로부터 직접 *A. tumefaciens*를 분리 동정하고 이를 옥수수의 형질전환에 이용하기 위하여 binary vector를 이용하여 형질전환시킨 후 옥수수의 증배축 조직과 공존배양을 실시하였다.

## 재료 및 방법

### 종자 및 시약

본 실험에 사용한 옥수수 종자(*Zea mays* cv. Jin-Joo Ock)는 수원 농촌진흥청으로부터 분양받았으며, *EcoR I*, *Hind III*, *BamHI*, *SmaI* 및 carbenicillin(Cb), kanamycin(Km), tetracycline(Tc)은 Sigma(미국) 회사 제품을 사용하였다.

### 균주

대조 세균으로서 *A. tumefaciens* 균주 C58과 Ach5는 KIST의 유전자 은행으로부터 분양받아 YEP배지를 사용하여 계대배양하면서 사용하였고, binary vector(pGA642/*E. coli* MC1000)는 Washington 주립대학교의 Dr. An으로부터 분양받아 LB 배지 상에서 계대배양하였다.

### 종자의 발아

비슷한 무게( $300\text{mg} \pm 10\text{mg}$ )의 종자를 선별하여 70% 에탄올용액에 30초간 처리하고 20% sodium hypochlorite용액을 사용하여 15분간 멸균한 후, 무균상태에서 멸균수로 4회 세척한 다음, 멸균 증류수에 5시간 동안 침윤시켰다. 침윤시킨 종자는 0.7% water-agar plate 상에 파종하여  $30^{\circ}\text{C}$ 의 암처에서 발아시켰다.

### *Agrobacterium tumefaciens*의 분리

*A. tumefaciens*의 분리를 위한 토양시료는 대구 근교의 팔공산, 방촌동, 반야월 및 성서지역에서 채취하였으며(45) Schroth(46)의 선택배지를 사용하였다.

토양시료의 혼탁액을 선택배지 상에 접종하여  $28^{\circ}\text{C}$ 의 항온 하에서 배양하면서 colony형성을 관찰하였다. pH 7.1로 조절된 배지를 가압 살균한 후 berberine 275ppm, sodium selinite 100ppm, penicillin G (1,625 units/mg) 60ppm, streptomycin sulfate 30ppm, cyclohexamide 250ppm 그리고 bacitracin 100ppm을 각각 무균적으로 첨가하였다. 형성된 colony는 동일 배지에서 2회 계대배양한 후 단일 colony를 택하여 YEP배지에서 보존 하였다.

### 종양 형성능 검사

선택배지 상에서 선별된 균주들의 종양 형성능을 조사하기 위하여 해바라기(*Helianthus annuus*) 유식물의 어린잎을 사용하였다(47).

녹화된 해바라기의 어린잎을 절취하여 표면 소독을 한 후 해부칼을 사용하여 잎면에 상처를 만들고 회석된 액체 배양액을 접종하여 식물호르몬이 결여된 B5 배지에 치상하여  $28^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하면서 종양의 형성과 성장을 관찰하였다.

### 형태 및 생리, 생화학적 특성 조사

종양을 형성한 균주들에 대하여 Gram염색을 실시하였으며 광학현미경을 사용하여 형태 및 운동성

을 관찰하였다.

분리 균주들의 생리, 생화학적 특성을 알아보기 위하여 3-Ketolactose 형성능(48), citrate 이용능(49), H<sub>2</sub>S 생성능, 2% NaCl에 대한 내염성 및 생장 임계온도(50) 그리고 탄소원 이용능(51)을 조사하였다.

#### Plasmid의 확인 및 plasmid의 상동성 조사

Plasmid DNA의 확인은 alkaline lysis 방법(52)에 준하였다. YEP배지에서 배양된 배양액을 4,500 × g에서 5분간 원심분리하여 집균하고 glucose 완충용액(25mM Tris-HCl, 50mM glucose, 10mM EDTA, pH 8.0)에 혼탁한 후 lysozyme를 처리하였다. Alkali용액(50mM Tris-HCl, 3% SDS, pH 12.45)을 가한 다음 수 회에 걸쳐 혼합한 후, 용균된 plasmid를 추출하였다. 5M potassium-acetate 용액(pH 4.8)을 부가하여 원심분리된 상동액에 ss-phenol을 처리하여 단백질을 제거한 후, 재 원심분리하여 상층을 회수하고 95% ethanol을 부가하여 -70°C에서 plasmid를 침전 시켰다. 침전된 plasmid DNA는 TE 완충용액(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 녹여 0.5% agarose gel 전기영동을 실시하였다.

선발된 균주의 plasmid의 상동성을 조사하기 위하여 균주 C58 및 Ach5의 plasmid를 대조군으로 하여 EcoR I, HindIII, BamH I, 및 SmaI 등의 제한 효소를 처리한 후 0.7% agarose gel 전기영동을 실시하였다. EcoR I, HindIII 및 BamH I의 처리에 있어서 사용한 완충용액은 50mM NaCl, 100mM MgCl<sub>2</sub> 및 100mM β-mercaptoethanol을 함유한 1mM Tris-HCl(pH 7.5)이었으며, 37°C에서 2시간 동안 반응시켰고, SmaI의 경우는 200mM KCl, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM β-mercaptoethanol이 첨가된 150mM Tris-HCl(pH 8.0)완충용액이었으며, 반응은 30°C에서 2시간 동안 실시하였다.

#### *Agrobacterium tumefaciens*의 형질전환

분리된 균주의 형질전환을 위하여 freeze-thaw 방법(53)을 사용하였다. 균주를 YEP배지에 배양한 후 4°C에서 원심분리하여 집균하고, 이를 0.15N NaCl 용액에 혼탁하여 다시 원심분리 하였으며, 수집된 균체는 20 mM CaCl<sub>2</sub>에 재현탁하였다. 처리된 시료의 일부에 chloroform으로 살균한 binary vector(pGA 642, Km', Tc')를 가하고 액화질소로서 1분 동안 급냉 동결시켰으며, 이를 37°C의 항온수조

에서 5분간 처리하여 해동하였다. 여기에 YEP배지를 부가하여 28°C에서 2시간 동안 진탕한 다음, 5 μg /mℓ의 Tc와 20 μg /mℓ의 Km을 함유한 YEP배지 상에 접종하여 28°C에서 배양하면서 형질전환체를 선발, 보존하였다.

#### 옥수수의 형질전환

무균상태에서 발아시킨 옥수수 유식물의 중배축부위를 5mm 크기로 절단하여 표면에 상처를 만든 후 형질전환된 *A. tumefaciens*와 공존배양을 실시하였다.

공존배양한 조직은 500 μg /mℓ의 Cb를 함유한 B5배지에서 3일 동안 배양하여 표면에 부착된 균체를 제거한 후 500 μg /mℓ의 Cb와 250 μg /mℓ의 Km이 포함된 배지로 옮겨 callus형성을 유도하였다.

2주일 간격으로 새로운 배지에 이식하였으며, 표면에 callus가 형성된 조직으로부터 가용성 단백질을 추출하여(54) 정량한 후 5% slab gel을 사용하여 PAGE를 실시하고 정상 callus조직과 비교함으로서 형질전환 여부를 조사하였다.

## 결 과

#### *Agrobacterium tumefaciens*의 분리 및 동정

선택배지 상에서 형성된 균주들의 colony들은 모두 둥근 형태로 나타났으며 가장자리가 매끈한 특징을 보였다. Colony의 색은 대부분 ivory색 또는 옅은 노랑색을 띠었으며, 배양 기간이 길어짐에 따라 부분적으로 주홍색 또는 붉은색을 보이기도 하였다. 또한 colony의 표면은 윤기가 있었으며 입면은 약간 불룩하게 나타났다(Fig. 1., Table 1.).

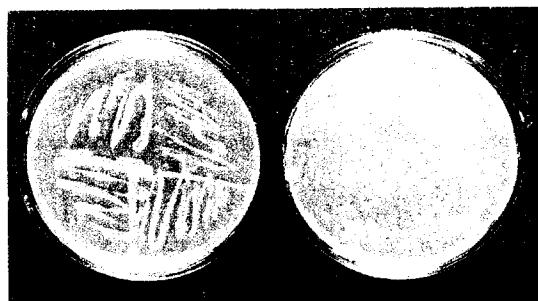


Fig. 1. Isolated colonies on selective medium.

#### 종양 형성능

선택배지 상에서 colony를 형성한 균주들의 종양 형성능을 조사한 결과, 배양 15일 후에 해바라기 유

Table 1. Morphological characteristics of colonies on selective medium.

Strains	Color	Form	Surface	Elevation	Margin	Optical character
AK204	ivory	circular	smooth	convex	entire	glistening
AK260	ivory	circular	smooth	convex	entire	glistening
AK301	yellowish	circular	smooth	convex	entire	glistening
AK400	ivory	circular	smooth	convex	entire	glistening
AK403	ivory	circular	smooth	convex	entire	glistening
AK501	yellowish	circular	smooth	convex	entire	glistening
C58	yellowish	circular	smooth	convex	entire	glistening
Ach5	yellowish	circular	smooth	convex	entire	glistening

식물의 어린잎 주변부와 상처부위를 중심으로 활발하게 종양이 형성됨을 볼 수 있었으며, 이는 계속하여 식물호르몬이 결여된 B5 기본배지 상에서 증식하였다(Fig. 2).



Fig. 2. Tumors formed on sunflower leaf surface by isolated strain(AK204).

#### 형태 및 생리, 생화학적 특성

분리, 선별된 균주들은 모두 Gram 음성으로 나타났으며 간균이었고 활발한 운동성을 가지고 있었다 (Table 2).

공시균주들에 대하여 lactose를 3-ketolactose로 산화시키는 능력을 검사한 결과 양성으로 나타났으며, citrate를 함유한 Simmons배지에서는 alkali반응을 나타내므로 citrate를 이용할 수 있는 것으로 판정되었다. 또한 2% NaCl에 대하여 내염성을 지니고 있는 것으로 나타났고, 모든 균주는 28°C와 37°C에서 생육한 반면에 40°C에서는 생육하지 못하였다. 그리고 lead acetate paper를 사용한 H<sub>2</sub>S 생

성 검사에서는 모두 양성으로 나타남으로서 (Table 3) biovar 1임을 시사하였다.

공시균주들은 탄소원으로서 arabinose, cellobiose, mellibiose, trehalose, adonitol등은 이용하였으나, erythritol, tartarate, phenylalanine, tryptophane 등은 이용하지 못하는 것으로 판정되었다(Table 4).

Table 2. Morphological characteristics of isolated strains.

Strains	Gram staining	Shape	Motility
AK204	-	rod	+
AK260	-	rod	+
AK301	-	rod	+
AK400	-	rod	+
AK403	-	rod	+
AK501	-	rod	+
C58	-	rod	+
Ach5	-	rod	+

- ;negative, + ;motile

#### Plasmid의 확인 및 plasmid의 상동성 조사

Plasmid를 확인하기 위해 0.5% agarose gel 전기영동을 실시한 결과는 Fig. 3과 같다. 6개의 공시균주들은 대조균주인 C58과 Ach5의 경우와 유사한 3개의 band pattern을 나타내었는데, 가장 많이 이동한 band는 chromosomal DNA로 생각되며, 나머지 2개의 band중에서 아랫쪽의 band가 Ti plasmid의 CCC형으로, 윗쪽의 band는 OC형일 것으로 예상된다. 따라서 6개의 공시균주들은 모두 1개씩의 plasmid를 가지고 있는 것으로 생각된다.

**Table 3.** Biochemical and physiological characteristics of isolated strains.

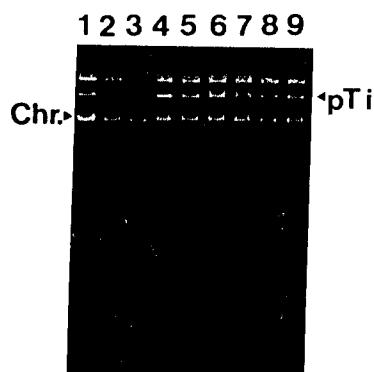
Charteristics	AK204	AK260	AK301	AK400	AK501	C58	Ach5
Formation of 3-Ketolactose	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of citrate(Simmons)	-	-	-	-	-	-	-
2% NaCl tolerance	+	+	+	+	+	+	+
Growth Temp.							
28°C	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
37°C	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
40°C	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
H <sub>2</sub> S formation (lead acetate)	+	+	+	+	+	+	+

+ : positive, - : negative, (+) : growth, (-) : no growth

**Table 4.** Utilization of several organic compounds as a sole C source.

Charteristics	AK204	AK260	AK301	AK400	AK501	C58	Ach5
None	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+
Adonitol	+	+	+	+	+	+	+
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-
Tartarate	d	d	-	-	-	-	-
Phenylalanine	-	-	-	-	-	-	-
Tryptophane	d	d	d	d	d	d	d

+ : utilization(growth), - : no utilization(not growth), d : doubtful

**Fig. 3.** Resolution of high molecular weight plasmid of isolated strains.

lane 1; *A. tumefaciens* C58  
lane 2; *A. tumefaciens* Ach5  
lane 3; *A. tumefaciens* C58Ci  
lane 4; AK204  
lane 5; AK260  
lane 6; AK301  
lane 7; AK400  
lane 8; AK403  
lane 9; AK501

Chr. ; chromosomal DNA  
pTi ; Ti plasmid(ccc form)

공시균주들 중에서 해바라기 유식물의 어린잎 표면에 대한 종양 형성능이 우수하다고 판단된 AK-204 균주의 plasmid를 분리하여 *EcoR I*, *Hind III*, *BamH I* 및 *Sma I* 등의 제한효소를 처리하여 대조균주로서의 C58과 Ach5의 경우와 비교한 전기영동상의 pattern은 Fig. 4와 같이 나타났다.

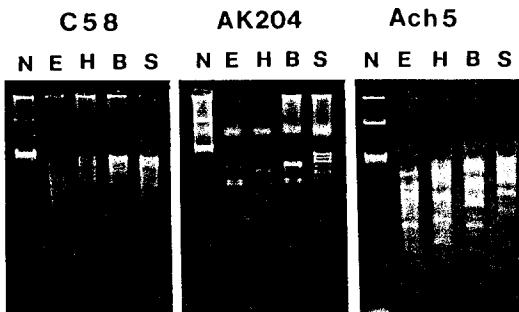


Fig. 4. Cleavage patterns of pTiAK204 compared with C58 and Ach5 which were used as controls by 4 kinds of restriction enzymes.

N ; no treated, E ; *EcoR I*, H ; *Hind III*  
B ; *BamH I*, S ; *Sma I*

각각의 제한효소에 의하여 소화된 AK204의 plasmid pattern이 C58 및 Ach5와 다르게 나타났는데, 전반적으로 band의 수가 적었을 뿐만 아니라 소화질편의 분포에 있어서도 차이가 있었다. 따라서 AK204의 plasmid는 C58 및 Ach5와는 다른 종류임을 확인할 수 있었다.

#### *Agrobacterium tumefaciens*의 형질전환

Tc와 Km이 첨가된 YEP배지 상에서는 생육할 수 없는 AK204균주를 형질전환 시킨 후, Tc와 Km이 각각 5 µg/ml, 20 µg/ml 첨가된 배지에서 24시간 배양하여 colony를 형성하는 균주를 선발하였다. 선발 균주로부터 plasmid를 추출하여 agarose gel 전기영동한 결과는 Fig. 5와 같았다.

전체적으로 5가지 band가 나타났는데 1번, 2번 band는 각각 pTiAK204의 OC, CCC형으로 생각되며, 3번 및 5번 band는 pGA642의 OC, CCC형으로 생각된다. 그리고 4번 band는 chromosomal DNA일 것으로 생각된다. lane 1은 형질전환체의 plasmid pattern으로서 AK204(lane 2)에는 존재하지 않는 pGA642(lane 3)의 plasmid band(3, 5번)가 비슷한 위치에 나타났으므로 binary vector가 전이되었음을 확인할 수 있었다.

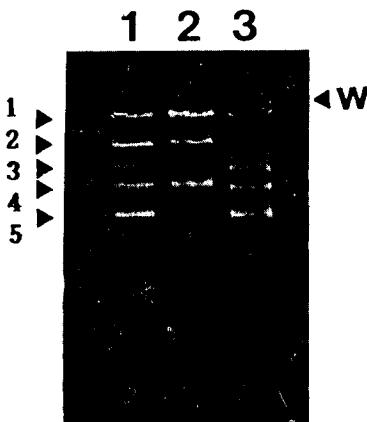


Fig. 5. Agarose gel electrophoretic patterns of plasmids.

lane 1; transformant AK204/pGA642

lane 2; AK204

lane 3; *E. coli* MC1000/pGA642

W; Well

1; pTiAK204(oc form)

2; pTiAK204(cc form)

3; pGA642(oc form)

4; chromosomal DNA

5; pGA642(ccc form)

#### 옥수수의 형질전환

형질전환체인 AK204/pGA642와 옥수수 중배축부위의 세포를 공존배양시킴으로서 옥수수의 형질전환을 유도하는데 필요한 조건을 찾기위하여 공존배양 시간을 5분에서 48시간까지 다양하게 조절하여 본 결과, callus의 유기는 5분이후 부터 점차 증가하여 2시간째 까지는 유의의 결과를 나타내었으나 공존배양 시간이 2시간 이상으로 길어질 경우에는 callus유기율이 급격히 저하되었다. 뿐만 아니라 조직이

Table 5. The effects of cocultivation time on callus induction from maize mesocotyl tissue.

Time	5min	30min	1hr	2hr	5hr	12hr	24hr	48hr
Callus induction	+	++	+++	+++	+	+	-	-
Browning	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+++)	(+++)

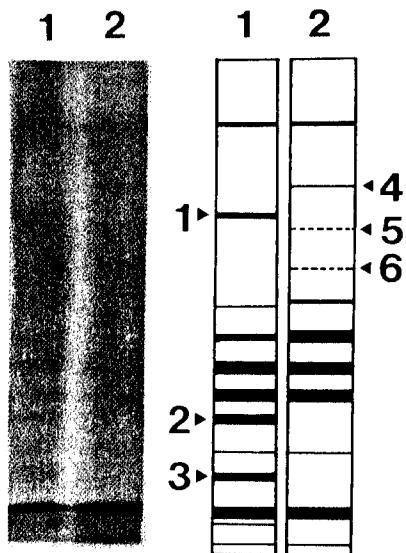
+, -: Degree of callus induction

(+), (-): Degree of browning

## 고 찰

짙은 갈색으로 변하여 고사하는 갈변현상이 배양 2시간까지는 별로 나타나지 않으나 배양시간이 5시간 이상으로 길어짐에 따라 심하게 나타났다(Table 5).

Callus를 형성한 시료로부터 가용성 단백질을 추출하여 전기영동한 결과는 Fig. 6과 같았다.



**Fig. 6. Electrophoretic patterns of soluble proteins extracted from callus forming maize tissue.**

lane 1; original tissue(control),  
lane 2; transformed tissue with AK204/  
pGA642 by cocultivation. In transformant  
the band 1, 2, and 3 disappeared while  
band 4, 5 and 6 appeared newly.

모조직으로부터 callus 유기 중에 추출한 단백질의 pattern(lane 1)과 Km이 함유된 배지에서 callus를 형성한 조직으로부터 추출한 단백질의 pattern(lane 2)을 비교하여 보면, 1번, 2번 및 3번 band는 모조직에서 뚜렷히 관찰되는 반면에 형질전환체에서는 나타나지 않았다. 또한 4번, 5번 및 6번 band는 모조직에서는 나타나지 않는 band들로서 형질전환체에서 관찰되므로서 전이된 유전자가 발현됨을 시사하였다. 나머지 band들은 유사한 pattern을 나타내었으며 band에 따라 상대적인 강도 차이가 관찰되었다.

*Agrobacterium* 속은 생리적 특성을 고려하여 *A. tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. radiobacter* 그리고 *A. rubi*의 4가지 종으로 나누어 지는 데(55-57), Schrotter 선택배지에서는 *A. rhizogenes*와 *A. rubi*가 생육할 수 없으므로 (47, 58) 토양으로부터 *A. tumefaciens*를 순수 분리할 때 사용이 용이하다 (45). 본 실험의 결과에서도 토양으로부터 분리된 colony들은 거의 단일 형태로 형성되었으며, 다른 잡균의 오염이나 곰팡이의 오염까지도 어느정도는 방지할 수 있는 것으로 나타났다. 그러나 선택배지 상에서의 배양시간이 길어 질수록 red 혹은 salmon 색을 띠게 되어 선택배지 상에 포함된 항생물질에 의한 대사 변화를 나타내었다. 따라서 본 연구에서는 colony의 색이 red를 띠기 전에 선별하여 항생물질이 배제된 배지에서 계대하였다.

분리, 선별된 균주들은 해바라기 유식물의 잎 표면에 smooth한 tumor를 형성하였다. *Agrobacterium*을 crown gall의 형태에 따라 rough tumor를 형성하는 균주는 octopine형으로, smooth tumor를 형성하는 균주는 nopaline형으로 보고한 (59) 바에 미루어 본 실험에서 분리된 균주는 nopaline형으로 추정되지만 이는 opine 생성효소의 활성여부를 조사하여(60) 확인하여야 할 과제라 생각된다.

*A. tumefaciens*는 biovar 1, 2 및 3의 3가지 type으로 구분되는데(61), 이들은 대부분이 citrate 이용능은 음성으로, nitrate 환원능은 양성으로 나타난다. 그러나 biovar 1이 lactose를 3-ketolactose로 산화시키는 능력이 있음에 비하여 biovar 2, 3은 그렇지 못하며, biovar 1이 2% NaCl에 대해 내성을 가지고 28°C뿐만 아니라 37°C에서도 생육할 수 있음에 비하여 biovar 2는 2% NaCl을 포함한 배지에서는 생육할 수 없으며 35°C 이상에서는 생육할 수 없는 특성을 지니므로 구별이 가능하다. 또한 lead acetate를 사용한 H<sub>2</sub>S 생성능 검사에서는 biovar 1만이 양성을 나타내므로(47) 이러한 특성들로서 *A. tumefaciens*의 biovar를 결정할 수 있다. 본 연구에서 나타난 분리 균주들의 생리, 생화학적 특성들이 biovar 1으로 나타났고, 대조 균주인 C58(nopaline type, biovar 1)과 Ach5(octopine type, biovar 1)와도 유사하게 나타났으므로 biovar 1으로 동정하였다.

일반적으로 Ti plasmid의 크기는 180-220 Kb로서(62), 본 실험에서 분리한 균주들은 1개의 plasmid를 가지고 있었는데 AK204로부터 추출한 plas-

mid를 4가지 제한효소로 소화시켰을 때 전기영동상의 pattern이 pTiC58과 pTiAch5의 경우와 달리 나타났으므로 서로 다른 종류의 plasmid를 가지고 있는 것으로 확인하였다(63). 그러나 plasmid의 어느 영역이 tumor형성에 관여하는지는 제한효소지도를 작성하거나 Southern분석을 통하여 앞으로 연구하려고 한다.

*A. tumefaciens*내로 plasmid를 전이시키는 freeze-thaw 방법(64)이 triparental mating 방법(65)에 비하여 형질전환율이 plasmid  $\mu\text{g}$  당  $10^{-3}$  정도로서 저조한 반면에 조작을 간편하면서도 빠르게 할 수 있으며, triparental mating 방법에서 나타나는 plasmid의 rearrangement도 방지할 수 있어 효과적이라 할 수 있다(10). 본 실험에서도 분리한 AK204균주 내로 binary vector인 pGA642를 전이시키는데 freeze-thaw 방법이 효율적인 것으로 확인되었다. pGA642에는 식물세포 내에서의 발현이 가능한 promoter와 terminator sequence가 존재하며 9개의 unique cloning site가 있을 뿐만 아니라 *npt II gene*를 가지고 있어 식물세포 내로 전이되었을 때 marker로 사용할 수 있다(12). 실제로 본 실험에 있어서 옥수수의 중배축조직이 pGA642를 가진 AK304와 공존 배양에 의해 Km에 대한 저항성을 띠는 callus를 생성할 수 있음이 확인 되었다.

담배를 48시간동안 공존배양하여 50% 이상의 형질전환체를 얻었다고 보고한 바 있으며(53), 당근 배양세포와  $^{32}\text{p}$ 로 표지된 *A. tumefaciens*를 공존배양 시켰을 때 배양 60분부터 부착율이 증가하여 120분 후에 최고치에 달한다고 보고한 바 있다(66). 본 실험에서는 2시간 이사를 공존배양시킬 경우 점진적으로 고사하는 결과를 나타내었는데 이러한 갈변현상이 장시간 배양에 따른 균체 수의 증가에 기인하는 대사 억제현상이라 생각되어 공존배양 시간을 2시간으로 하였으며 균체의 수도  $10^5$ 개체 정도로 조절하였다. 공존배양 후 Km이 함유된 선택배지를 사용하여 계대배양하였을 때, 균주를 처리하지 않은 조직은 callus형성에 이르지 못하고 고사하였으나 공존배양을 실시한 조직은 callus를 형성하였다. 뿐만 아니라 새로운 배지에 계대배양 하였을 때 callus가 증식하는 것을 알 수 있었다. 따라서 옥수수 중배축의 상처를 통한 균주의 침입이 2시간 이내에 이루어 진 것으로 생각되었다.

Nopaline type의 균주에 의하여 담배에서 유발된 tumor에 존재하는 T-DNA는 그 크기가 매우 작아서 약 14-15 Kb정도이나 유동적일 수 있다고 알려

져있다(67). 또한 균주에 따라서는 식물체에 전달되는 T-DNA의 크기가 차이가 있을 수 있지만, 전달되는 T-DNA에는 언제나 94 Kb되는 부분이 보존된다고 보고한 바 있다(68, 69). 가용성 단백질을 추출하여 PAGE에 의한 단백질 band pattern 변화로서 형질전환체를 확인한 결과, 토양으로부터 분리된 균주중 AK204의 plasmid에는 옥수수 세포내로 유전자를 전이시킬 수 있는 T-DNA 영역이 존재하는(35, 36, 43)것으로 추측되었다. 그러나 T-DNA의 어느 부분이 어느 유전자 부위에 전이되어 단백질 pattern이 변화하였는지는 다른 방법을 사용하여 확인하려고 한다.

## 요 약

토양 시료로부터 *A. tumefaciens*를 분리 동정하고 이를 옥수수의 형질전환에 이용하기 위하여 binary vector를 이용하여 형질전환시킨 후 옥수수의 중배축 조직과 공존배양을 실시하였다.

Schroth의 선택배지에서 선별된 colony들은 단일 형태를 나타내었다. 분리 균주는 해바라기 유식물의 잎조직에 종양을 형성하였으며, 거대 plasmid를 가지고 있었는데 이는 대조균주인 C58이나 Ach5의 plasmid와는 다른 종류였다.

분리 균주들에 의해 형성된 tumor의 형태 및 균주의 생리, 생화학적 특성들에 의하여 공시균주를 *A. tumefaciens* biovar 1으로 동정하였으며 nopaline 형으로 추정하였다. 분리 균주 중 AK204를 사용하여 옥수수 조직을 형질전환시키기 위하여 선택maker를 가지고 있는 binary vector(pGA642)를 균주내로 전이 시켰다. 이로 인하여 형질전환된 AK204를 옥수수 중배축 조직과 공존배양하므로서 옥수수 조직세포를 형질전환 시킨 결과, 1차적으로 Km에 저항성을 띠는 형질전환체를 선별할 수 있었으며, 그들의 가용성 단백질의 PAGE pattern이 변화되었음을 확인하였다.

## 감 사

본 연구는 1988년도 문교부 학술연구 조성비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. H. Lôrz, B. Baker and J. Schell(1985), *Mol. Gen. Genet.*, **199**, 178.
2. T. Hibi, H. Kano, M. Sugiura, T. Kazami and S. Kimura(1988), *Plant Cell Reports*, **7**, 153.
3. W. A. Lawrence and D. R. Davies(1985), *Plant Cell Reports*, **4**, 33.
4. H. Toyoda, Y. Matsuda, R. Utsumi and S. Ouchi(1988), *Plant Cell Reports*, **7**, 293.
5. A. C. Cassells(1978), *Nature*, **275**, 760.
6. R. T. Fraley, C. S. Fornari and S. Kaplan (1979), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3348.
7. H. Uchimiya(1981), *Plant Physiol.*, **67**, 629.
8. R. M. Straubinger and D. Papahadjopoulos (1983), *Methods in Enzymol.*, vol.101, 512, Academic Press.
9. G. J. Willems, F. A. Krens and R. A. Schilperoort (1986), *Handbook of Plant Cell culture, Techniques and Applications*, vol.4, 197, Macmillan.
10. G. An, P. R., Ebert, A. Mitra and S. B. Ha (1988), *Plant Mol. Biol. Manual*, p.1, Academic Pub.
11. M. Fromm, L. P. Taylor and V. Walbot (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5824.
12. M. Fromm, L. P. Taylor and V. Walbot (1986), *Nature*, **319**, 791.
13. M. Nishiguchi, W. H. R. Langridge, A. A. Szalay and M. Zaitlin(1986), *Plant Cell Reports*, **5**, 57.
14. P. Guerche, M. Charbonnier, L. Jouanin, C. Tourneur, J. Paszkowski and G. Pelletier (1987), *Plant Sci.*, **52**, 111.
15. K. P. Mishra, D. C. Joshua and C. R. Bhatia (1987), *Plant Sci.*, **52**, 135.
16. S. J. Ochatt, P. K. Chand, E. L. Rech, M. R. Davey and J. B. Power(1988), *Plant Sci.*, **54**, 165.
17. R. C. Nutter, M. F. Thomashow, M. P. Gordon and E. W. Nester(1981), *Genetic Engineering in the Plant Sciences*, 111, Praeger Sci.
18. K. A. Barton and M. D. Chilton(1983), *Methods in Enzymol.*, **101**, 527, Academic Press.
19. J. L. Roberts(1985), *Plant Mol. Biol. Reporter*, **3**, 107.
20. K. Sukhapinda, R. Spivey and E. A. Shahin (1987), *Plant Mol. Biol.*, **8**, 209.
21. F. Boulanger, A. Berkalloff and F. Richaud (1986), *Plant Mol. Biol.*, **6**, 271.
22. G. Ooms, D. Twell, M. E. Bossen, J. C. Hoge and M. M. Burrell(1986), *Plant Mol. Biol.*, **6**, 321.
23. Z. M. Wei, H. Kamada and H. Harada(1986), *Plant Cell Reports*, **5**, 93.
24. L. Jouanin, F. Vilaine, J. Tourneur, C. Tourneur, V. Pautot, J. D. Muller and M. Caboche (1987), *Plant Sci.*, **53**, 53.
25. A. J. Morgan, P. N. Cox, D. A. Turner, E. Peel, M. R. Davey, K. M. A. Gartland and B. J. Mulligan(1987), *Plant Sci.*, **49**, 37.
26. J. Paszkowski, B. Pisan, R. D. Shillito, T. Hohn, B. Hohn and I. Potrykus(1986), *Plant Mol. Biol.*, **6**, 303.
27. M. M. Hussain, U. Melcher, T. Whittle, A. William, C. M. Brannan and E. D. Mitchell Jr.(1987), *Plant Physiol.*, **83**, 633.
28. R. J. Shepherd(1979), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **30**, 405.
29. S. G. Lazarowitz(1987), *Plant Mol. Biol.*, **4**, 177.
30. H. Augustyniak, P. Borsuk, I. Hirschler, P. P. Stepine and E. Bartnik(1983), *Gene*, **22**, 69.
31. H. Fukuzawa, Y. Uchida, Y. Yamano, L. Ohshima and T. Komano(1985), *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2725.
32. P. L. Traynor, and C. S. Levings(1986), *Plant Mol. Biol.*, **7**, 225.
33. M. Boutry, F. Nagy, C. Poulsen, K. Aoyagi and N. H. Chua(1987), *Nature*, **328**, 340.
34. M. D. Chilton, M. H. Drummond, D. J. Merlo, D. Sciaky, A. L. Montoya, M. P. Gordon and E. W. Nester(1977), *Cell*, **11**, 263.
35. G. Bomhoff, P. M. Klapwijk, H. C. H. Kester, R. A. Schilperoort, J. P. Hernalsteens and J. Schell(1976), *Mol. Gen. Genet.*, **145**, 177.
36. M. D. Chilton, R. K. Saiki, N. Yadav, M. P. Gordon and F. Quetier(1980), *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA.*, **77**, 4060.
37. D. E. Akiyoshi, R. O. Morris, R. Hinz, B. S. Mischke, T. Kosuge, D. J. Garfinkel, M. P. Gordone and E. W. Nester(1983), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **80**, 407.
38. D. E. Akiyoshi, H. Klee, R. M. Amasino, E. W. Nester and M. P. Gordon(1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 5994.
39. G. F. Barry, S. G. Rogers, R. T. Fraley and L. Brand(1984), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **81**, 4776.
40. G. Schröder, S. Waffenschmidl, E. W. Weiler and J. Schröder(1984), *Eur. J. Biochem.*, **138**, 387.
41. A. C. Braun(1986), *Handbook of Plant Cell Culture, Techniques and Applications*, **4**, 13, Macmillan.
42. A. L. Montoya, M. D. Chilton, M. P. Gordon, D. Sciaky and E. W. Nester(1977), *J. Bacteriol.*, **129**, 101.
43. C. H. Shaw, M. D. Watson, G. H. Carter and C. H. Shaw(1984), *Nucleic Acids Res.*, **12**, 6031.
44. H. Klee, R. Horsch and S. Rogers(1987), *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **38**, 467.
45. Y. J. Cha, J. S. Eum, S. B. Hong and W. S. Sim(1983), *Kor. J. Microbiol.*, **21**, 238.
46. M. N. Schroth, J. P. Thompson and D. C. Hilderbrand(1965), *Phytopathol.*, **55**, 645.
47. K. Kersters and J. De Ley(1984), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **1**, 244.
48. M. J. Bernaerts and J. De Ley(1963), *Nature*, **197**, 406.
49. J. S. Simmons(1962), *J. Infec. Disease.*, **39**, 209.
50. P. H. Graham and C. A. Parker(1964), *Plant and Soil.*, **20**, 383.
51. L. O. White(1972), *J. Gen. Microbiol.*, **72**, 565.
52. H. C. Birnboim and J. Doly(1979), *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513.
53. G. An.(1985), *Plant Physiol.*, **79**, 568.
54. L. Wetter and L. Dyck(1984), *Hand book of Plant Cell Culture*, **1**, 607.
55. J. A. Lippincott and B. B. Lippincott(1969), *J. Gen. Microbiol.*, **59**, 57.
56. P. J. Keane, A. Kerr and P. B. New(1970). *Aust. J. Biol. Sci.*, **23**, 585.
57. K. Kersters, J. De Ley, D. H. A. Sneath and M. Sackin(1973), *J. Gen. Microbiol.*, **78**, 227.
58. J. A. Lippincott, B. B. Lippincott and M. P. Starr(1981) *The Prokaryotes*, 842, Springer Verlag.
59. Y. Lee, C. H. Kim, S. H. Kim, I. D. Yoo and T. I. Mheen(1987), *Kor. J. Microbiol.*, **25**, 17.
60. L. A. Otten and R. A. Schilperoort(1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **527**, 497.
61. A. Kerr and C. G. Panagopoulos(1977), *Phytopath. Z.*, **90**, 172.
62. A. N. Binns(1984) *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, p.133, Clarendon Press, Oxford.
63. J. S. Eum, K. H. Kim and W. S. Sim(1986), *Kor. J. Microbiol.*, **24**, 1.
64. M. Holsters, D. De Waele, A. Depicker, E. Messens, M. Van Montagu and J. Schell (1978), *Mol. Gen. Genet.*, **163**, 181.
65. G. Ditta, S. Stanfield, D. Corbin and D. Helinski(1980), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **77**, 7347.
66. K. Ohshima, L. E. Pelcher and A. Schaefer (1979), *Plant Physiol.*, **63**, 382.
67. M. Holsters, J. P. Hernalsteens, M. Van Montagu and J. Schell(1982), *Molecular Biology of Plant Tumors*, p.269, Academic Press.
68. M. D. Chilton, M. H. Drumond, D. J. Merlo and D. Sciaky(1987), *Nature*, **275**, 147.
69. A. Depicker, M. Van Montague and J. Schell (1978), *Nature*, **275**, 150.