

벼 종자 由來 胚에서 外來遺傳子의 導入과 發現

劉 俊 姬 · 鄭 求 興*

서울대학교 師範大學 生物學科

종자를 자연건조시킨 상태에서 β -glucuronidase (*GUS*) 유전자와 hygromycin phosphotransferase (*HPT*) 유전자를 가진 plasmid DNA 용액을 imbibition시켰다. *GUS* 유전자의 경우 품종, vector의 종류, imbibition의 온도에 따라 표지유전자의 발현율에 차이가 있었으며 약 30-50%의 transient expression을 나타내었다. Hygromycin B (HmB) 배지에서 선별된 개체의 genomic DNA를 뽑아 외부유전자의 존재를 dot 분석을 통하여 확인하였다. Inverse polymerase chain reaction 결과 만들어지는 생성물을 cloning하고 sequencing한 결과 CaMV35S promoter sequence를 찾았다. Hygromycin이 첨가된 배지에서 선별된 개체들에서 *GUS* 유전자의 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 20개체 중 18개체에서 *GUS* 유전자가 안정되게 존재하여 HmB 배지에서 *GUS* 유전자의 존재비율은 90%였다. 본 연구의 결과로부터 두 개의 유전자를 소유한 pYJH vector system이 고등식물의 형질전환에 유용하게 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

주요어: DNA imbibition, rice, IPCR, *GUS*, *HPT*

고등식물의 형질전환 방법에는 여러가지가 있다. 그러나 단자엽식물은 *Agrobacterium* system을 이용할 수 없기 때문에 대부분이 현탁배양을 통하여 원형질체를 얻은 후 DNA를 직접 전달한다. 즉, 화학물질 polyethylene glycol를 사용하여 원형질체로의 DNA 유입을 촉진하거나(Potrykus *et al.*, 1985; Lorz *et al.*, 1985) 전기자극으로 막의 일시적인 변화를 가져와 DNA를 집어넣는 electroporation 방법(Fromm *et al.*, 1986) 등이 가장 많이 쓰이고 있다. 그러나 원형질체를 이용하는 방법은 원형질체배양을 통하여 식물체의 재분화라는 어려운 과정을 거치므로 쉽게 이용할 수 없다는 단점이 있다. 최근들어 원형질체로부터의 재분화의 과정을 극복하기 위하여 식물의 조직을 이용하여 외부유전자를 도입시키는 시도가 계속되고 있다. 대표적인 예로 particle gun을 이용하여 텡스텐에 입힌 DNA 입자를 조직에 쏘아 형질전환시키는 biolistic 방법(Klein *et al.*, 1987; Wang *et al.*, 1988)이 보편화되어 사용되고 있을 뿐 아니라 화분관을 이용한 pollen tube pathway 방법(Luo and Wu, 1988) 등 그 외에 여러 방법들이 개발되고 있다.

본 연구에서는 다른 벼의 종자에서 배를 분리하여 DNA 용액을 imbibition시키는 방법을 이용하여 벼의 형질전환을 시도하였다. 이미 전 연구(Yoo *et al.*, 1993)를 통하여 DNA imbibition에 의하여 외부 유전자가 세포내로 들어가 발현되며,

genomic integration의 가능성을 제시한 바 있다.

종자가 자연건조되면 세포막들의 생리화학적 변화를 일으키게 되고 imbibition시키게 되면 이때의 imbibition damage (Spaeth, 1987)에 의하여 DNA 용액이 세포내로 흡수되는 것으로 알려져 왔다(Töpfer *et al.*, 1989). 먼저 기존의 쉽게 이용할 수 있는 식물의 대표적인 표지유전자인 *GUS* gene vector와 *HPT* gene vector를 각각 이용하여 DNA imbibition시켰다. 즉 한 개의 표지유전자를 갖는 기존의 single vector를 이용하여 형질전환시 종자와 vector의 종류, imbibition의 조건에 따른 발현효율을 알아 보았다. 또한, 각각의 *GUS* gene과 *HPT* gene을 한 개의 plasmid에 연결한 이미 개발된 vector(Yoo *et al.*, 1993)를 이용하여 벼를 형질전환시키고 두 가지의 유전자가 완전히 발현되는 vector로서의 효율성을 PCR을 통하여 알아 보고자 하였다.

재료 및 방법

Vector

GUS 유전자 vector로 주로 사용한 것은 promoter로 cauliflower mosaic virus의 것과 nopaline synthase 유전자의 terminator를 갖고 있는 5.7 kb, pCaMV35S1,*GUSN*(남백희 박사로부터 받음)를 사용하였고 다른 *GUS* vector로서 intron이 없는 pBI

*교신저자: Fax (02) 889-8791

221.2(남백희 박사로부터 받음)도 이용하였다. 또한, 항생물질의 저항유전자로서 hygromycin 저항성 유전자인 1 kb hygromycin phosphotransferase(*HPT*)를 갖는 6.0 kb pCaMV35S*HPTN* (백경희 박사로부터 받음)을 벼의 형질전환에 사용하였다. 또한 *GUS* 유전자와 *HPT* 유전자를 모두 가진 10 kb, pYJH vector (Yoo *et al.*, 1993)도 DNA imbibition에 이용하였다(Fig. 1).

DNA 조작과 genomic DNA 추출

DNA 조작기술은 주로 Sambrook 등(1989)의 방법을 따랐으며 벼의 genomic DNA는 Paszkowski 등(1984)의 방법을 이용하여 분리하였고 이것을 polymerase chain reaction(PCR)의 template로 이용하였다. Inverse PCR(IPCR) product 들은 pUC119의 *SmaI* site에 클로닝하였고 그 염기서열의 분석은 double strand를 이용하여 Sanger 등(1977)의 방법을 사용하여 수행하였다.

벼의 형질전환과 배양

벼의 형질전환에 사용한 품종은 수원 서울대 농과대학과 농촌진흥연구소에서 구입한 낙동과 섬진치의 두 품종을 이용하였다. 벼의 길거를 벗긴 후 원액을 3배 희석한 sodium hypochloride 용액에서 45분 동안 종자를 표면살균하고 멸균된 증류수를 이용하여 5번 씻어주었다. DNA imbibition은 Töpfer 등(1989)의 방법을 이용하였다. 1주일 동안 건조시킨 종자로부터 칼을 이용하여 각각의 배를 분리한 후 약 50-100개의 배에 15 mM NaCl, 1.5 mM Na-citrate, 20% dimethyl sulfoxide 용액과 200 µg/mL의 DNA를 섞어 1.5 mL tube에서 12시간 동안 imbibition시켰다. DNA 용액을 imbibition시킨 배는 15 mM NaCl, 1.5 mM Na-citrate 용액으로 5번 씻어 배지에 치상시켰다. *GUS* vector를 imbibition시킨 것은 MS 배지(Murashige and Skoog, 1962)에, *HPT* vector와 pYJH vector를 imbibition시킨 것은 hygromycin B가 70 µg/mL 들어간 MS배지에 배를 5일간 치상시켜 살아남는 것으로 형질전환된 것을 선별한 후 다시 MS배지에 옮겨 3-4주 동안 키우고 그 잎을 채취하여 genomic DNA 분석 재료로 이용하였다.

GUS vector를 이용한 형질전환체의 선별

MS배지에서 1주일 동안 자란 벼를 채취하여 0.05% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-glucuronic acid(X-gluc), 50 mM Na-phosphate buffer(pH 7.0), 100 µg/mL ampicillin, 50 µL

N,N-dimethyl formamide가 포함된 용액에서 37°C 에서 24시간 반응시켰다(Jefferson *et al.*, 1987). 반응이 끝난 후 70% 알코올용액에 넣고 끓여 엽록소를 제거하였다. 광학현미경(Olympus PM-6)을 이용하여 *GUS* 유전자가 발현된 부위를 확인하고 미세절단하여 관찰하였다. 절단시 조직을 Carnoy 용액을 이용하여 고정시키고 이를 점차적으로 탈수시켜 포매상자에 포매시켰다. Microtome을 이용하여 10 µm 두께로 썰어 미리 알부민용액을 발라놓은 따뜻한 슬라이드에 옮겨 놓아 밀착시키고, xylene과 알코올을 이용하여 파라핀을 제거하여 현미경으로 검경하였다.

Polymerase chain reaction (PCR)

PCR은 primer 1 µM, 200 µM dNTP, 1-2 unit Taq DNA polymerase, PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 약 10⁶ copy의 DNA template를 이용하여 100 µL 반응으로 행하였다. 반응전에 50 µL의 mineral oil을 떨구어 증발을 막았다. Denaturation, annealing, extension 온도는 각각 94, 55, 72°C 를 사용하였고 30 cycle(cycler: PCR ROBOT Fine Inc.)을 행하였다. Product의 분석은 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. *GUS* 유전자의 유무를 알기 위한 primer의 결합부위는 2.6 kb의 안쪽의 일부 유전자를 택하여 0.97 kb가 합성되어지는 두 곳에 primer 결합부위로 지정하였다(Fig. 1). 그 primer의 조성은 sense primer로 5'-GCCGATGTCACGCCGTATGT-3'와 anti-sense primer로 5'-CCGGTGACCGCCTTCGTTGC-3'을 사용하였다.

정상의 PCR과 DNA가 합성되는 방향이 반대로 진행되는 IPCR은 *HPT* 유전자합성에 사용된 primer의 반대 방향으로 합성되는 promoter와 terminator의 일부 sequence를 primer 들로 이용하였다(Fig. 1). 즉 IPCR을 수행하기 위하여, *HPT* vector promoter 상단부위의 *BglII* site 아래편에 결합하는 primer와 terminator에 결합하는 primer들을 이용하여 vector 바깥쪽으로 DNA를 합성하도록 하였다. Promoter쪽은 5'-TA-GACGAGAGTGTCTGCTCCACC-3'(Gardner *et al.*, 1981) 이고 terminator쪽은 5'-ATCTCCCAGTTGGCGGCGGCT-GAT-3'(Bevan *et al.*, 1983)의 oligomer를 primer로 이용하였다. Template로 사용할 genomic DNA는 *BglIII*로 자른 후 ligation하고, 다시 *EcoRI*으로 잘라 사용하였다. PCR은 앞의 조건과 동일하게 수행하였고 단, buffer는 큰 크기의 DNA도 합성할 수 있도록 Ponce와 Micol(1992)의 buffer III를 사용하였다.

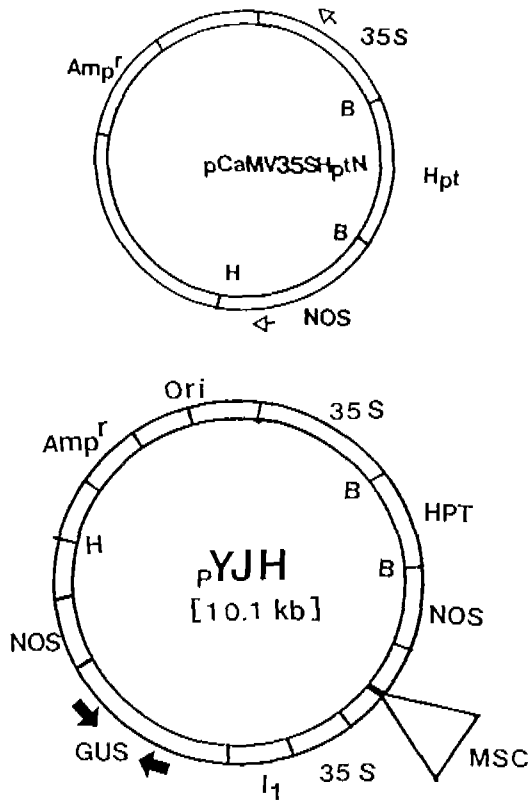


Fig. 1. Diagrams of pCaMV35SHPTN and pYJH vectors, and positions and directions of primers used in PCR. The black arrows indicate the positions and directions of primers used in PCR amplification of 0.97 kb, *GUS* DNA. The white arrows indicate the positions and directions of primers used in IPCR. 35S, cauliflower mosaic virus promoter; *HPT*, hygromycin phosphotransferase gene; NOS, nopaline synthase polyadenylation region; *Amp^r*, ampicillin resistant gene; B, *Bam*HI; H, *Hind*III; I₁, first intron; *GUS*, β-glucuronidase; MSC, multiple cloning sites.

Dot blot 및 southern blot 분석

벼의 genomic DNA, 10 μg을 이용하여 dot blot 장치를 이용하여 Hybond-N(Amersham)에 blotting시키고 나머지 과정은 Southern blot 분석과 동일한 방법으로 수행하였다. PCR product를 0.8% agarose gel에서 전기영동한 후 DNA를 변성, 중화시키고 20X SSC 용액을 사용하여 Hybond-N에 옮겼다. Prehybridization한 후 [³²P]ATP를 이용하여 random priming labelling을 통하여 얻은 probe를 42°C에서 20시간 동안 혼성화시키고 0.1X SSC, 0.1% SDS 용액을 이용하여 세척 후 X-ray film에 노출시켰다(Sambrook *et al.*, 1989).

결 과

***GUS* 유전자의 발현**

품종 낙동의 다른 종자의 배를 이용하여 pCaMV35SI, *GUSN*의 DNA 용액을 흡수시킨 후 MS배지에 치상하여 transient *GUS* 유전자의 발현을 알아보았다. Microsection하여 조직에서 관찰하였 때 indigo dye의 축적을 자엽초의 관다발 조직에서 많이 볼 수 있었으며 mineral oil을 떨구었을 때 더욱 확실히 관찰할 수 있었다(Fig. 2). pYJH vector를 이용하여 imbibition 후 HmB배지에서 선별한 개체에서의 *GUS* 유전자의 발현빈도는 70-80%를 나타내었다. 동일한 *GUS* 유전자를 소유하면서 promoter 뒤에 intron을 가지고 있지 않는 pBI221.2를 사용하였을 때는 20-30%의 발현율의 감소를 나타내었다 (Table 1).

***HPT* 유전자의 발현**

항생물질에서 살아남는 것을 선별할 수 있는 hygromycin 저항성 유전자(Gritz and Davies, 1983), pCaMV35SHPTN을 사용하였을 때, 품종 낙동을 사용하여 실험한 결과 대조구에 비하여 약 30-40%의 생존율을 나타내었다(Table 2). 그러나 품종을 바꾸어 섬진으로 하였을 경우에는 그 효율이 2-3배 감소하는 결과를 나타내었다. 또한 4°C에서 DNA imbibition 하였을 경우에는 survival selection의 효율이 크게 증진하였다 (Table 3). 항생물질이 첨가된 배지에서 선별된 개체의 일반적인 특징은 대조군에 비하여 키가 작고 밀등에서 많은 줄기의 생성을 보여 종자유래의 정상 개체와 형질전환된 개체 사이의 차이를 보였다(Fig. 3).

Dot blot과 PCR 분석

1 kb *HPT* DNA를 probe로 dot blot 결과 형질전환체에서 *HPT* 유전자가 있음을 알 수 있었다(Fig. 4). IPCR을 한 결과 여러가지의 clone들을 찾았으나 동일한 clone들이 겹쳐 종합적으로 3가지 종류의 산물을 얻을 수 있었다(Fig. 5A). 이 여러 DNA를 cloning, sequencing한 결과 벼의 genomic DNA내에서 모두 CaMV35S promoter sequence를 찾았다(Fig. 5B).

Hygromycin B (HmB) 선별한 개체에서의 *GUS* 유전자의 존재

두 개의 표지 유전자를 갖는 pYJH vector를 이용하여 벼를 형질전환시켰을 때, hygromycin 배지에서 선별한 형질전환체에 존재하는 *GUS* 유전자의 비율을 조사하였다. 이미 이전의

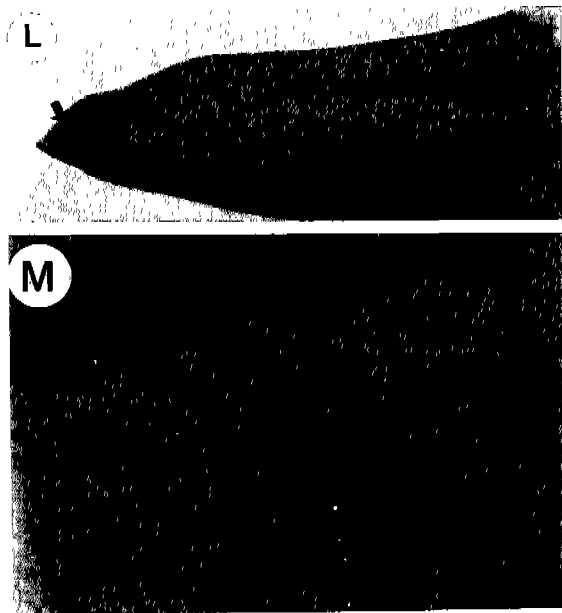


Fig. 2. Histochemical analysis of *GUS* expression in rice seedlings. Arrows indicate the position of *GUS* gene expression. L, leaf; M, microsectioning view of rice transformants.

Table 1. Frequency of *GUS* gene expression according to different types of vectors using rice cultivar *Nagdong*

Type of vector	% of seedlings expressing <i>GUS</i> gene
pCaMV35S ₁ GusN	51
pBI221.2	31

Frequency of expression was calculated as the number of embryos expressing *GUS* activity among the total. Values were determined as an average of 3 repeats.

Table 2. Frequency of *HPT* gene expression in rice

Kinds of rice cultivar	% of embryos expressing viability in HmB medium
cv. <i>Nagdong</i>	32
cv. <i>Sumjin</i>	9

Frequency of expression was calculated as the number of embryos expressing viability in hygromycin medium among the total. Values were determined as an average of 3 repeats.

연구(Yoo *et al.*, 1993)를 통하여 두 개의 표지유전자가 모두 발현됨을 알 수 있었으나 두 개의 유전자가 동시에 도입되어 발현되는 비율은 연구가 이루어지지 않았기 때문에 *GUS* 유전자를 이용하여 PCR 분석을 하였다. HmB가 첨가된 배지

Table 3. Frequency of *HPT* gene expression according to incubation temperature of imbibition

Temperature (°C)	% of embryos expressing viability effect using cv. <i>Nagdong</i>	% of germination in MS medium in HmB medium
4	45 (100)	
28	32 (94)	
37	0 (7)	

Values were determined as an average of 3 repeats. The values in parenthesis indicate germination efficiency according to temperature.

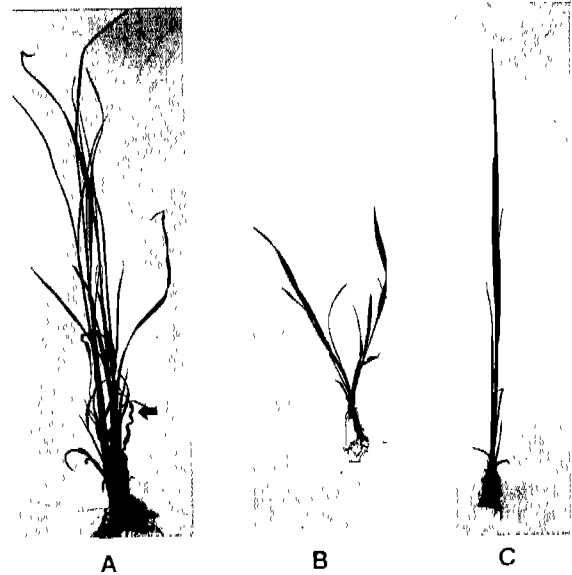


Fig. 3. Rice survived in HmB medium. Compared with control rice (C), selected rice has more leaves than a control and shows dwarfness (A, B).

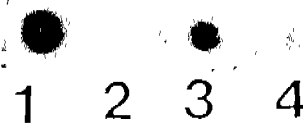


Fig. 4. Dot-blot test of rice using probe of 1 kb *HPT* DNA. spot 1, positive control; spot 2, negative control; spot 3, selected rice in HmB medium; spot 4, control of rice.

에서 선별된 개체를 약 2-4주 동안 MS배지에서 기내배양하여 20개체로부터 genomic DNA를 추출하였다. *HPT* 유전자를 소유하고 있는 20개체의 형질전환체를 대상으로 *GUS* 유전자에 대한 PCR을 수행한 결과는 Fig. 6와 같았다. 즉 *GUS* 유전자의 target product인 0.97 kb DNA가 genomic DNA내에 존재하는

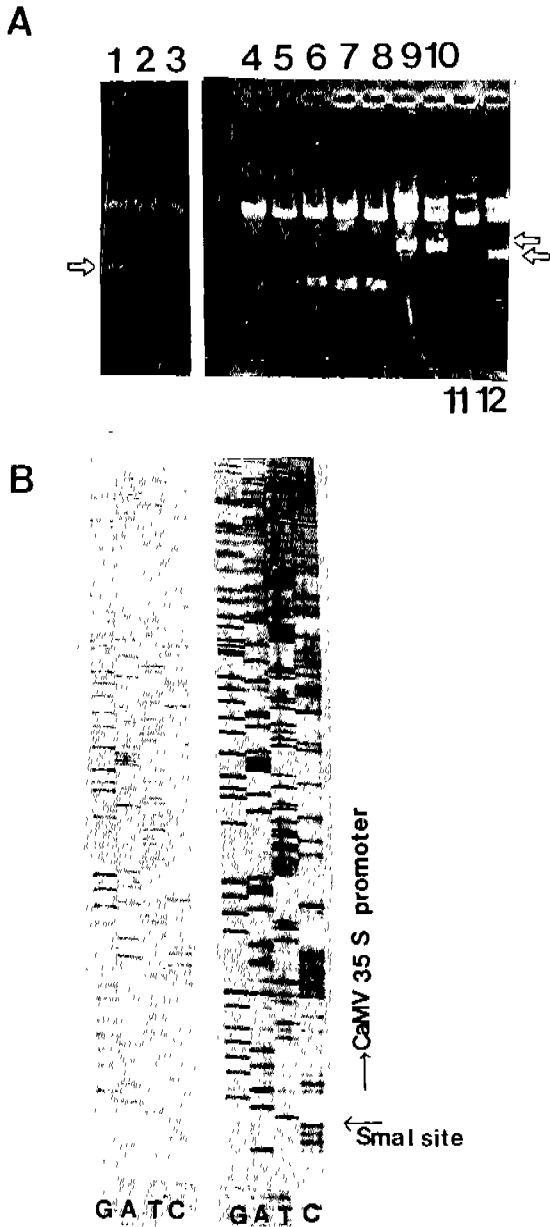


Fig. 5. (A) Cloning of IPCR products for selected rice. The cloning DNA was digested with *Sma*I and electrophoresed in agarose gel. (B) Sequencing products of IPCR products.

비율은 20개체 중 18개체에서 확인되어 *HPT* 유전자와 *GUS* 유전자가 동시에 발현되는 비율은 90%였다. PCR product가 양의 차이는 다소간 있어 조사 분석한 몇 개의 개체에서는 agarose gel에서는 그 양이 희미하였으나 *GUS* 유전자를 probe로 하여 Southern 분석을 하였을 때, 2개체를 제외하고 뚜렷하게 *GUS* 유전자의 존재를 확인할 수 있었다.

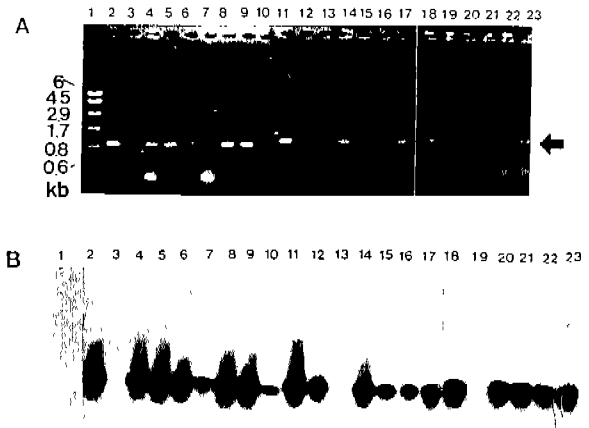


Fig. 6. PCR analysis of selected rice in HmB medium for *GUS* gene (A) and Southern analysis (B). Lane 1, DNA size marker; lane 2, control of rice in HmB medium; lane 3-22, selected rice in HmB medium. Arrow indicates 0.97 kb target products of *GUS* DNA.

고 찰

DNA 용액을 종자에 imbibition시켰을 때 외래유전자의 도입 효율은 품종, imbibition시의 온도, vector의 종류 등의 여러 조건에 따라 차이를 보였다. 품종에 따른 차이는 배의 크기나 조직 구조상의 차이가 변수로 작용했으리라 생각되며 다른 식물에 적용시켜도 각기 차이가 있으리라 생각된다. *GUS* 유전자는 생장점, 관다발조직에서 강하게 발현되었으며 가끔 mosaic하게 나타나는 경우가 있었다. 종자유래의 배를 이용하여 외래 DNA를 imbibition시켰으므로 식물체의 대부분의 기관에서 외래유전자가 발현되었으며 특히, 자엽초나 배반 등의 배 바깥쪽의 기관에서 빈번하게 그 발현을 나타내었다(Yoo *et al.*, 1993). Intron의 유무에 따른 두 종류의 *GUS* vector를 DNA imbibition에 사용하였을 때, intron의 효과는 이미 Callis 등(1987)의 보고와 일치한다. 즉 intron이 있는 pCaMV35 SGUSN vector가 pBI221.2에 비하여 약 60%의 발현의 증진을 가져왔다.

HPT vector의 발현효율은 *GUS* vector보다 그 발현효율이 현저히 떨어지는데 이러한 결과는 *HPT* vector는 항생배지에서 survival selection하여 유전자를 발현시키고 *GUS* vector는 호소반응에 의한 색으로 발현을 탐지하기 때문에 유전자의 발현을 탐지하는 방법상의 차이에 기인한 결과라고 사료된다. 즉 *HPT* vector의 경우는 유전자가 도입되어 그 발현량이 적은 경우에는 HmB배지에서 생존하지 못하여 선별되지 않았을 가능성을 시사하고 있다.

또한 외부유전자의 도입은 4°C 일 때 가장 높은 효율을 나타내었는데 이는 온도에 따른 조직이나 DNA의 conformation의 변화가 DNA 도입에 큰 영향을 미쳤을 것으로 생각된다. Table 3의 결과를 보면 저온처리에 의해서 항생제가 없는 배지에서 발아하는 비율이 다소 증가하는 경향이 있었으나, imbibition에 의한 survival selection이 저온처리에 의하여 더욱 현저한 증가를 보이는 것으로 보아 HPT 유전자의 발현효율의 증가는 imbibition의 효과로 해석할 수 있을 것이다.

성숙한 종자를 이용하여 imbibition에 의하여 DNA를 유입시켰을 때 모든 세포가 외부 유전자를 갖지 못하므로 DNA imbibition을 통하여 얻은 형질전환체는 mosaic의 성질을 가지고 있다. 그러므로 Southern blot 분석하기에는 절대 copy 수가 부족하여 여러 조건의 PCR을 통하여 형질전환체의 외부 DNA의 상태를 탐색하였다. Dot blot의 결과를 통하여 외부 유전자의 존재를 확인할 수 있었고 PCR을 통하여 외부 DNA의 존재를 증폭하여 확인할 수 있었다. 또한 IPCR product의 염기서열의 분석을 통해서도 CaMV35S promoter의 일부 sequence를 찾았는데(Fig. 5B). 이 promoter의 염기서열 분석결과로부터 PCR product가 벼의 외부 대장균의 오염에 의한 것이라는 오류의 가능성을 배제할 수 있었다. 즉 식물체에 표지한 HPT, GUS 유전자는 대장균의 것으로부터 왔으므로 genomic DNA 분석시 탐지되는 외부 DNA가 혹 대장균의 오염으로 올 수 있다는 가능성이 있기 때문이다.

두 개의 표지유전자를 가진 vector의 효율성은 GUS 유전자를 target으로 하는 PCR을 통하여 잘 증명할 수 있었다(Fig. 6). 두 개의 표지유전자가 동일한 promoter, terminator를 사용했기 때문에 genomic DNA 내부에서 재조합에 의하여 결실되는 경우가 많을 것으로 생각되었으나 조사한 대부분의 개체에서 두 개의 유전자가 안정하게 있었다. HmB배지에서 선별된 개체를 이용하여 GUS assay 결과 그 발현율이 70-80%로, PCR을 이용하여 GUS 유전자를 분석한 수치, 90%보다 더 떨어지는 이유는 유전자가 genome내에 존재하더라도 발현은 insertion site나 농도 등에 의하여 그 발현이 안되었을 가능성이 있기 때문이라 생각한다.

GUS 유전자와 hygromycin에서 생존할 수 있는 HPT 유전자를 가지며 두 개의 표지유전자 사이에 유용한 유전자를 넣을 수 있도록 multiple cloning site가 고안된 pYJH vector는, GUS 유전자의 장점을 이용하여 조직화학적 염색에 의하여 쉽게 그 발현을 알아볼 수 있고, 항생물질을 분해하는 유전자인 HPT 유전자는 형질전환체를 항생물질이 있는 배지내서 선택적으로 고를 수 있는 장점을 지니고 있다. 또한 사용된 HPT 유전자는 다른 항생제 저항성 유전자에 비하여 형질전환체를 선별할 수 있는 좋은 표지유전자로 알려져 있다(Shimamoto *et al.*, 1989).

두 개의 표지유전자를 가지는 vector를 식물의 형질전환에 이용하면 1차 항생제 저항성유전자의 선별을 거친 개체를 성체로 키운 후 2차 표지유전자의 기능을 이용하여 형질전환체를 다시 확실하게 선별할 수 있으므로 유용하게 쓰일 수 있다.

Fig. 6의 결과는 1차 표지유전자를 이용하여 선별한 개체가 대부분 2차 표지유전자도 보유하고 있었으므로 pYJH vector의 'two marker genes, one vector system'이 효율적으로 이용될 수 있음을 나타내었다.

사 사

이 연구는 한국과학재단의 기초연구(911-0411-035-2)와 세포분화연구센터(92-4-3)의 지원으로 진행되었음.

인 용 문 헌

- Bevan, M., W.M. Barnes and M.D. Chilton. 1983. Structure and transcription of nopaline synthase region of T-DNA. *Nucleic Acid Res.* **11**: 369-385.
- Callis, J., M. Fromm and V. Walbot. 1987. Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes and Development* **1**: 1183-1200.
- Fromm, M.E., L.P. Taylor and V. Walbot. 1986. Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* **319**: 791-793.
- Gardner, R.C., A.J. Howarth, P. Hahn, M. Brown-Luedi, R.J. Shepherd and J. Messing. 1981. The complete nucleotide sequence of an infectious clone of cauliflower mosaic virus by M13mp7 shotgun sequencing. *Nucleic Acid Res.* **12**: 2871-2888.
- Gritz, L. and J. Davies. 1983. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **25**: 179-188.
- Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh and M.W. Beran. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**: 3901-3907.
- Klein, J.M., E.D. Wolf, R. Wu and J.C. Sanford. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**: 70-73.
- Lorz, H., B. Baker and J. Schell. 1985. Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. *Mol. Gen. Genet.* **199**: 178-182.
- Luo, Z-X and R. Wu. 1988. A simple method for the transformation of rice via pollen tube pathway. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**: 165-174.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.
- Paszkowski, J., R.D. Shillito, M. Saul, V. Mandak, T.

- Hohn, B. Hohn and I. Potrykus. 1984. Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* **3**: 2717-2722.
- Ponce, M.R. and J.L. Micol. 1992. PCR amplification of long DNA fragments. *Nucleic Acid Res.* **20**: 623.
- Potrykus, I., M.W. Soul, J. Petruska, J. Pazkowski and R.D. Shillito. 1985. Direct gene transfer to cells of a graminaceous monocot. *Mol. Gen. Genet.* **199**: 183-188.
- Sambrook, T. E.F. Fritsch and I. Maniatis. 1989. Molecular cloning, A Laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Colson. 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Shimamoto, K., R. Terada, T. Izawa and H. Fujimoto. 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* **338**: 274-276.
- Spaeth, S.C. 1987. Pressure-driven extrusion of intracellular substances from bean and pea cotyledons during imbibition. *Plant Physiol.* **85**: 217-213.
- Töpfer, R., B. Gronenborn, J. Schell and H. Steinbiß. 1989. Uptake and transient expression of chimeric genes in scd-derived embryos. *The Plant Cell.* **1**: 133-139.
- Wang, Y.C., T.M. Klein, M. Fromm, J.C. Sanford and R. Wu. 1988. Transient expression of foreign genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. *Plant Mol. Biol.* **11**: 433-439.
- Yoo, J.H., H.G. Nam and G.H. Jung. 1993. Rice transformation by DNA imbibition and construction of plant vector. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **8**: 104-109.

(1993. 12. 6 接受)

Uptake and Expression of Foreign Genes Using Seed-Derived Embryos of Rice

Yoo, Junhi and Guhung Jung*

Department of Biology Education, Seoul National University, Seoul

ABSTRACT

DNA uptake in dry embryos of rice by DNA imbibition was detected by monitoring the expression of chimeric vectors. The selective markers of expression vectors used were β -glucuronidase (*GUS*) and hygromycin phosphotransferase (*HPT*) genes under the control of CaMV35S promoter. Frequency of transient expression of the foreign gene was generally 30-50% varying according to the types of vectors and rice cultivars. Dot blot analysis and DNA sequence analysis of inverse polymerase chain reaction products showed that selected rice in hygromycin B (HmB) medium had *HPT* gene and CaMV35S promoter DNA sequence in genomic DNA of rice. To investigate what ratio of rice having two marker genes simultaneously as rice embryos imbibed the vector DNA having two *HPT* and *GUS* gene, transformants selected in HmB medium were subjected to PCR for *GUS* gene. It was shown that about 90 percentage of surviving ones in HmB medium had *GUS* gene.

Key words : DNA imbibition, rice, IPCR, *GUS*, *HPT*

*Corresponding author : Fax 82-2-889-8791