

## 형질전환 연초(*Nicotiana tabacum* L.)의 Mouse Adenosine Deaminase 유전자 발현

양덕춘\* · 박지창 · 최광태 · 이정명<sup>1</sup>

한국인삼연초연구원 유전생리부, <sup>1</sup>경희대학교 원예학과

### Expression of Mouse Adenosine Deaminase Gene in Transgenic Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

Deok Chun YANG\*, Ji Chang PARK, Kwang-Tae CHOI, and Jung Myung LEE<sup>1</sup>

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taedok Science Town, Taejeon, 305-345; and

<sup>1</sup>Department of Horticulture, Kyung Hee University, Yongin, Kyungi-do, 449-900. \*Corresponding author.

The mammalian adenosine deaminase(ADA) gene was stably expressed in transgenic tobacco plants. The chimeric ADA gene, 35S/35S/AMV/ADA/Tnos, has been constructed. This chimeric gene was introduced into the binary vector pRD400, which was thereafter mobilized into *Agrobacterium tumefaciens* strain MP90 harboring disarmed Ti-plasmid. The resulting strains were used to transform *Nicotiana tabacum* L. using the leaf disc. Incorporation of the chimeric gene into plants were confirmed by PCR and Northern blot analyses. Immunoblot analysis showed that ADA protein was successfully synthesized in the transgenic tobacco plants.

**Key words:** ADA, *Agrobacterium* Ti plasmid-mediated transformation, immunoblot

과거의 전통적인 육종방법은 목적 유전자를 직접 식물세포의 핵내로 삽입시키기가 무척 어려웠으나 최근 식물유전공학분야의 급속한 발전으로 인하여 식물 형질전환용 운반체가 개발됨으로써 외부 유용유전자를 쉽게 식물체내로 도입, 발현시켜 새로운 식물체를 육성할 수 있게 되었다(An, 1987; Hoekema et al., 1986). 또한 식물세포내로 도입할 외부 유용유전자들도 많이 개발되고 있으며 현재 주로 식물체내에 정상적으로 발현되어 실용화 가능성이 있는 유전자들은 제초제 저항성 유전자(DeBlock et al., 1987), 내병성 유전자(Ben et al., 1993), 내충성 유전자(Vaek et al., 1987), 중금속 내성유전자(Giuseppina et al., 1989), 바이러스 내성유전자(Abel, 1987), 저온 및 고온장해 내성유전자(Guo et al., 1992; Takahashi et al., 1992)등과 특이 물질합성 및 분해에 관여한 물질대사 관련 유전자(Ignacio et al., 1992)등이 보고되어 있다. 그러나 이렇게 식물세포내에서 발현되는 유전자들은 대부분 미생물유래 유전자들이거나 식물세포유래 유전자들이다. 최근에는 동물세포유래 유전자들이 cloning되어 식물세포에 도입되어 발현된다는 결과가 보고(Maiti et al., 1989; Sijmons et al., 1990; Song and Hong, 1991)되고 있지만 유전자의 종류에 따라서는 발현 여부가 매우 불투명하

다(Herrera-Estrella et al., 1983).

Adenosine deaminase (E.C.3.5.4.4, ADA)효소는 adenosine을 inosine으로 변환시키는 purine 대사에 관여하는 효소로서 동물세포에는 어느 부위에나 존재하지만 식물세포에는 전혀 존재하지 않은 것으로 알려져 있다(Fox and Kelley, 1978; Yeung et al., 1985). 특히 ADA 효소는 동물세포에서 부족시 면역결핍증(immunodeficiency)을 유발하는 것으로 보고되어 있어(Kellems et al., 1985), 미생물 등에서 ADA 효소를 대량으로 생산할 목적으로 ADA 효소 고함유 세포주의 선발을 위하여 많은 실험들이 진행되었다(Kaufman et al., 1986; Yeung et al., 1983). 본 실험은 우선 mouse adenosine deaminase cDNA을 식물형질전환용 binary vector에 재조합하고, 재조합된 vector에 의하여 연초조직을 형질전환시켜 동물유전자가 식물체내에서 발현되는지 여부를 확인하고자 수행하였다.

#### 재료 및 방법

공시 시료

본 실험에 사용된 연초는 *Nicotiana tabacum* cv Xanthi로써 잎절편을 shooting배지(MS/B5배지에 30 g의 sucrose, 2.5 mg/L BA, 0.1 mg/L NAA 그리고 7 g/L Phytoagar를 함유하고 있는 배지)에 치상하여 형성된 shoot를 발근배지(1/2 MS/B5배지에 30 g의 sucrose, 0.1 mg/L NAA 그리고 6 g/L Phytoagar를 함유하고 있는 배지)가 함유되어 있는 Magenta GA-7(Sigma)용기에서 유지시키면서 계속적으로 시료로 사용하였다.

### 운반체의 재조립

ADA효소를 만들 수 있는 유전자는 mouse ADA cDNA를 coding하고 있는 pADA5-29 사용하였으며(Yeung et al., 1985), 이 cDNA를 식물세포에서 발현시키기 위해서 cauliflower mosaic virus double 35S 및 alfalfa mosaic virus enhancer sequence (Odell et al., 1985)를 가지고 있는 promoter와 nopaline synthase의 polyadenylation signal를 함유한 terminator를 coding하고 있는 524Xba cassette vector를 사용하였다. 또한 binary vector로서는 pRD400 (Datla et al., 1992)을 사용하였고 형질전환을 위해서 사용한 박테리아는 disarmed Ti-plasmid (Hoekema et al., 1986)를 함유하고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* MP90을 사용하였다. 본 실험에 사용된 균주와 plasmid 등은 캐나다 식물유전공학연구소에서 공여받았다.

운반체의 재조립은 Maniatis 등(1982)의 방법에 준하여 수행하였으며 재조립된 운반체의 *Agrobacterium tumefaciens* MP90에 도입은 tri-parental mating방법(Ditta et al., 1980)의하여 수행하였다.

### 식물체의 형질전환 및 재분화

Tri-parental mating방법에 의하여 선발된 *Agrobacterium tumefaciens* pDY182와 pDY183균주를 kanamycin 25 µg/mL, gentamycin 25 µg/mL 함유된 AB배지(An, 1987)에 2일간 배양한 후 형질전환을 위해서 연초의 잎과 공동배양에 사용하였다. 공동배양은 배양한 균주를 원심분리하여 상등액을 제거하고 식물호르몬 무첨가 MS배지(MS-HF)로 현탁하여 연초의 잎 disc와 10분간 공동배양한 후 멸균된 여과지에서 10분간 건조시켰다. 건조된 절편을 2,4-D가 첨가된 배지(MS/B5 + 2,4-D 2 mg/L)에서 2일간 배양한 후 kanamycin과 carbenicillin이 함유되어 있는 재분화배지(MS/B5 + kanamycin 100 µg/mL + carbenicillin 500 µg/mL, BA 2.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L)에서 6주간 배양하여 shoot를 형성시켰다. 형성된 shoot를 절단하여 kanamycin이 50 µg/mL 함유된 발근배지(1/2 MS/B5 + kanamycin 50 µg/mL + carbenicillin 500 µg/mL + NAA 0.1 mg/L)에 옮겨 뿌리를 유도한 후 토양에 이식하였다.

### 형질전환체의 특성검정

형질전환된 연초조직에서 ADA 유전자의 존재여부를 확인하기 위해서 PCR (Perkin Elmer Cetus, Fotodyne Incorporated)을 사용하였다. PCR을 위한 빠르고 간편한 DNA 추출방법은 Edwards 등(1991)의 방법에 준하여 수행하였으며 PCR 조건은 96°C에서 2분간 pre-denaturation한 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 2분으로 하여 36 cycle을 돌렸으며, 이어서 72°C에서 15분간 post-extension시켰다. 대조구로서 정상 연초식물체와 *A. tumefaciens* pDY182와 pDY183에서 plasmid를 alkaline lysis procedure (Birboim and Doly, 1979)에 준해서 분리하여 사용하였다.

Northern hybridization을 위해서는 형질전환된 잎에서 total RNA의 추출을 Logemann 등(1987)의 방법에 준하여 하였으며, 전기영동은 1.2% agarose gel상에서 수행하였고, Maniatis 등(1982)의 방법에 준하여 35S-35S-AMV/ADA/Tnos의 2.1 kb절편을 <sup>32</sup>P로 labeling하여 probe로 사용하였다. Hybridization은 Quick Hyb rapid hybridization solution (Stratay 유전자)을 이용하여 수행하였다.

Immunoblot을 위해서 형질전환된 식물체에서 단백질을 crude extract 방법, 70% ammonium sulfate을 이용한 추출, anion-exchange Fast Performance Liquid Chromatography (Mono Q HR16/10, Pharmacia)방법에 의해서 추출한 후 10% SDS PAGE에 의해서 분리하였다. 단백질이 분리된 gel을 semi-dry apparatus (Transblot SD, Biorad)을 사용하여 nitrocellulose에 electrotransfer시켜 immunoblot에 사용하였다. Immunoblot은 제조된 rabbit polyclonal anti-bovine ADA2 serum을 이용하여 Harlow와 Lane(1988)방법에 준하여 수행하였으며, nitroblue tetrazolium chloride와 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (Biorad)을 이용하여 염색하여 형성되는 밴드를 확인하였다.

## 결과 및 고찰

### 식물세포의 형질전환을 위한 잡종 ADA Binary Vector의 재조합

Mouse ADA cDNA를 연초에서 발현시키기 위한 binary vector pDY18의 재조합 과정은 Figure 1과 같다. ADA 유전자를 식물세포에서 발현시키기 위해서 식물세포 발현용 promoter를 가지고 있는 524Xba(3.7 kb) cassette vector를 BamHI으로 절단한 다음 klenow로 채워서 NcoI으로 다시 절단하였다(Figure 1). 동시에 ADA cDNA(1,056 bp nucleotide)를 함유하고 있는 pADA5-29을 NcoI과 EcoRV로 절단하여 cassette vector에 접합시켰다. 접합된 vector를 *E. coli* DH5α에 도입한 후 다시 추출하여 접합 여부를 확인하

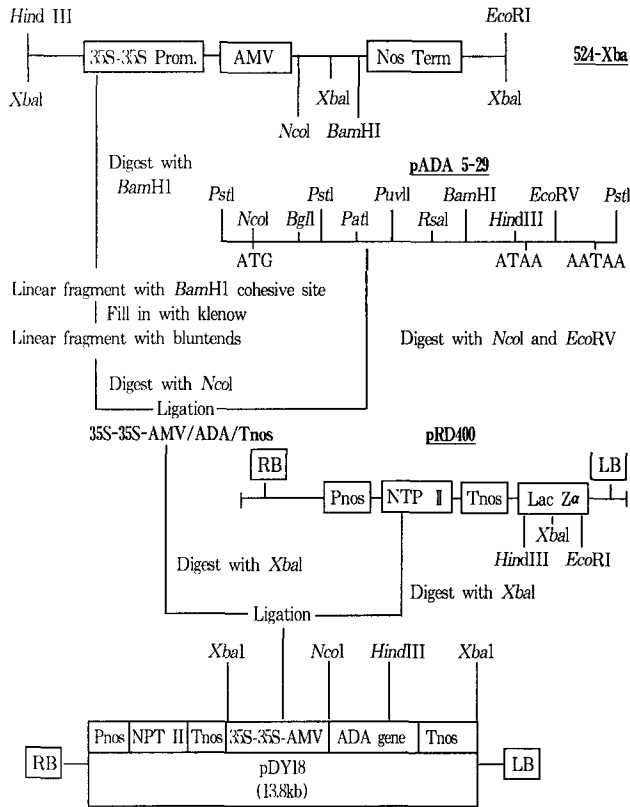


Figure 1. Scheme for derivation of pDY18. pDY18 is a binary vector containing the double CaMV 35S promoter and the coding sequence of the mouse ADA cDNA. It also contains the chimeric Pnos/NPT II/Tnos gene for expression in plant. Abbreviations used are: Pnos, nopaline synthase promoter; NPT II, neomycin phosphotransferase type II; Tnos, polyadenylation signal of the nopaline synthase gene; 35S-35S, 35S promoter of cauliflower mosaic virus; AMV, alfalfa mosaic virus enhancer sequence; Rb, right border of the T-region; LB, left border of the T-region.

기 위해서 XbaI로 절단하였던 바, 35S-35S-AMV/ADA 유전자/Tnos을 함유하고 있는 2.1 kb DNA 단편과 cassette vector 2.6 kb DNA 단편을 확인 할 수 있었다. 이중 접합이 확인된 vector를 다시 식물형질전환용 binary vector pRD400 (11.7 kb)에 도입하기 위해서 XbaI로 절단한 다음, 2.1 kb의 단편을 pRD400의 Lac Za 유전자의 XbaI위치에(Figure 1) 도입하여 pDY18 vector(13.8 kb)를 재조합하였다(Figure 1). 재조합된 pDY18 vector를 E. coli에 형질전환시킨 후 다시 추출하여 XbaI로 절단한 결과 11.7 kb의 pRD400 vector와 2.1 kb의 ADA 절편을 확인할 수 있었다.

ADA 유전자에 의한 연초조직의 형질전환 및 재분화

Mouse ADA cDNA 함유 pDY18 binary vector를 E. coli DH5α에 도입하여 non-oncogenic 균주 virulence region (Hoekema et al., 1983)을 그대로 가지고 있는 disarmed Ti-

plasmid (Hoekema et al., 1986)의 소유 Agrobacterium tumefaciens MP90 (Datla et al., 1992)에 도입하기 위해서 pRK2013 (Figurski and Hellinski, 1979)을 이용하여 tri-parental mating방법에 의하여 transconjugant을 선발하였다. 선발된 균주로부터 plasmid를 분리하여 각각 XbaI으로 절단하여 2.1 kb ADA 유전자를 함유하고 있는 Agrobacterium tumefaciens pDY182와 pDY183을 획득하였다.

ADA 유전자에 도입된 Agrobacterium tumefaciens pDY182와 pDY183에 의하여 연초조직을 형질전환시키기 위해서 leaf disc를 이용한 공동배양방법에 의하여 형질전환을 유도하였다. 2,4-D가 첨가된 동시배양배지에서 2일간 배양한 후 정상조직은 모두 고사하는 kanamycin 100 µg/mL과 공동배양 후 살아 있는 Agrobacterium를 제거하기 위해서 carbenicillin이 함유되어 있는 재분화배지에서 배양하였던 바, 6주후에는 shoot를 형성하였으며(Figure 2-A), 형성된 shoot를 절단하여 다시 kanamycin이 50 µg/mL 함유된 발근배지에 옮겨 뿌리를 유도하였던 바 배양 20일 후에는 토양에 이식할 정도의 뿌리가 형성되었다(Figure 2-B).

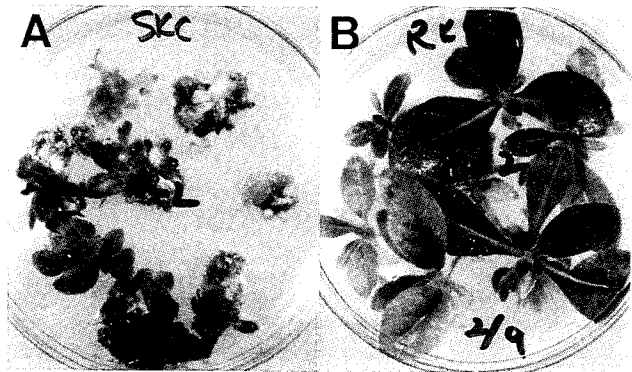
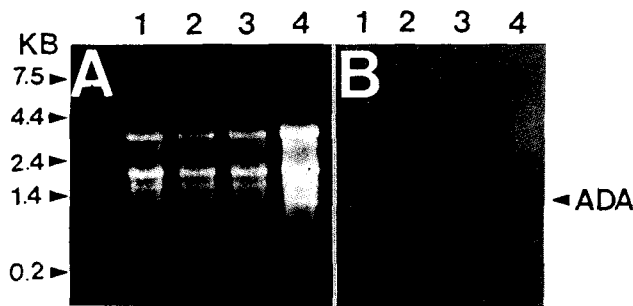
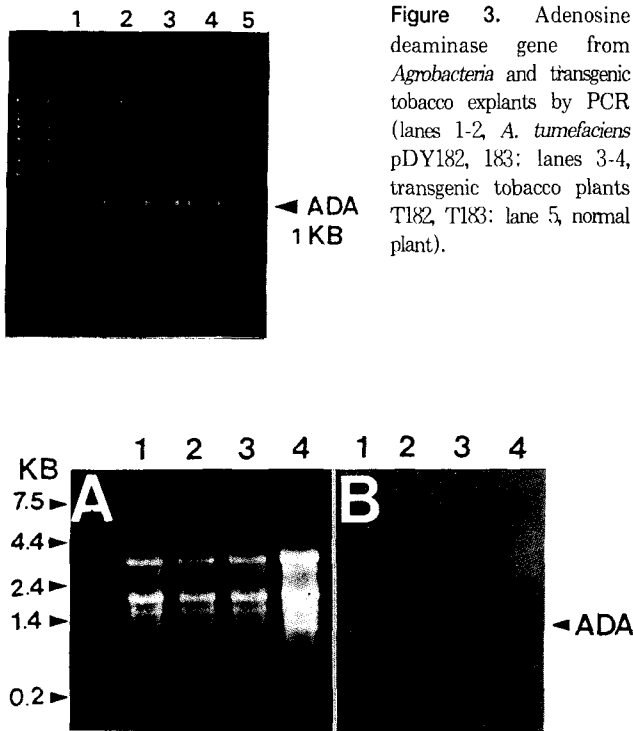


Figure 2. Formation of transgenic shoots (A) and roots (B) with ADA gene by co-cultivation of A. tumefaciens pDY182 harboring ADA gene and tobacco leaf discs.

형질전환체의 특성검정

일차적으로 항생제가 첨가된 배지에서 선발한 식물체로부터 외부유전자가 삽입되어 있음을 재확인하기 위해서 다시 선발된 잎을 절단하여 kanamycin이 100 µg/mL 첨가된 배지에서 생존여부를 확인하였다. 재조합한 binary vector pDY18은 kanamycin 저항성 유전자가 삽입되어 있기 때문에 연초에 도입되면 항생제인 kanamycin에 저항을 나타내므로 선발한 연초식물체가 kanamycin에 대해서 저항성을 나타내면 일단 외부유전자에 의해서 형질전환된 것으로 간주하고자 하였다. Kanamycin배지에서 선발된 연초조직으로부터 ADA 유전자의 존재여부를 확인하기 위해서 연초 T182 및 T183형질전환체와 형질전환되지 않은 정상조직에



서 함께 DNA를 추출하여 PCR에 의해서 존재 여부를 확인한 결과, ADA 유전자를 도입한 *A. tumefaciens* pDY182와 pDY183과 형질전환된 식물체는 모두 ADA 유전자를 확인할 수 있었으나 정상식물에서는 전혀 ADA 유전자를 확인할 수 없어 T182와 T183식물체는 ADA 유전자에 의해서 형질전환되었음을 확인할 수 있었다(Figure 3).

상기 방법에 의하여 동물 ADA 유전자가 형질전환 식물 세포에 삽입되어있음을 확인할 수 있었으며 전사 여부를 확인하고자 Northern hybridization을 수행하였던 바, 형질전환된 식물체 T182, T183과 T183-5 조직의 RNA에서는 ADA transcript를 확인할 수 있었으나 정상조직에서는 역시 관찰되지 않았다(Figure 4).

최종적으로 형질전환된 연초 잎에서 ADA 단백질을 확인하기 위해서 immunoblot을 위한 형질전환된 식물체에서 단백질을 crude extract 방법(Figure 5-A, lanes 2, 3), 70% ammonium sulfate을 이용한 추출 방법(Figure 5-A, lanes 3, 6), anion-exchange Fast Performance Liquid Chromatography (Mono Q HR16/10, Pharmacia) 방법(Figure 5-A, lane 4)에 의해서 추출한 후 10% SDS PAGE로 분리하였다(Figure 5-A). 분리된 단백질 nitrocellulose에 electrotransfer시켜 immunoblot한 결과, 형질전환된 연초(lanes 2-4)에서는 대략

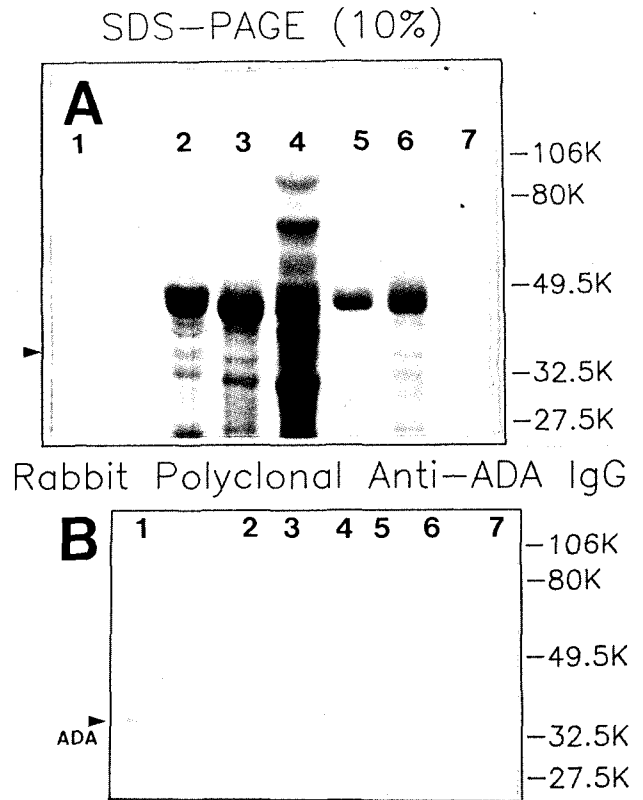


Figure 5. SDS-PAGE (A) and immunoblot analysis (B) of mouse ADA expressed in tobacco. Lane 1, bovine ADA (Type V, Sigma); lane 2, crude extract of transgenic tobacco; lane 3, ammonium sulfate precipitated protein from transgenic tobacco; lane 4, pooled active fractions of anion-exchange chromatographic ADA from transgenic tobacco; lane 5, crude extract of wild-type tobacco; lane 6, ammonium sulfate precipitated protein from wild-type tobacco; lane 7, prestained protein size markers (numbers at the right).

분자량 Mr 39,000에서 밴드를 확인할 수 있었지만 형질전환되지 않은 연초(lanes 5-6)에서는 밴드가 관찰되지 않았다(Figure 5-B). 또한 밴드의 선명도는 추출 방법을 crude extract으로 했을 때보다 70% ammonium sulfate를 이용해서 추출할 경우에서 더 선명하였으며, anion-exchange chromatography 방법을 이용했을 때 가장 선명하게 밴드가 나타남을 확인할 수 있었다(Figure 5-B). 이로써 동물유전자인 mouse ADA 유전자가 식물에서도 전사되어 RNA를 합성하고 있을 뿐 아니라, 성공적으로 번역과정을 걸쳐 ADA 단백질을 합성하고 있음을 확인할 수 있었으며 최초로 식물에서도 동물유전자인 ADA 유전자가 발현되는 식물체를 획득할 수 있었다.

적 요

동물유전자인 mouse adenosine deaminase (ADA) 유전자가 안정적으로 연초 형질전환체에서 발현되었다. ADA cDNA 을 연초에서 강력히 발현시키기 위해서 35S/35S/AMV promoter을 부착시켰으며 식물세포에 도입을 위해서 binary vector인 pRD400을 이용하였다. 연초의 형질전환은 tri-parental mating에 의해서 도입된 ADA 유전자 함유 binary vector와 disarmed Ti-plasmid을 함유하고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* MP90을 사용하였다. 동시배양은 연초의 잎 disc을 이용해서 kanamycin이 첨가된 배지로부터 직접 shoots을 선발하여 형질전환체로 유도하였다. 형질전환체에 ADA 유전자의 삽입여부는 PCR을 이용하였으며, 실험결과 ADA 유전자를 확인할 수 있었다. 또한 도입된 mouse ADA 유전자로부터 mRNA 및 단백질 합성여부를 각각 northern blot 및 immunoblot 분석한 결과 형질전환체에서는 공히 확인되었다.

## 인용문헌

- Abel PP, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RI, Shah DM (1987) Expression of alfalfa mosaic virus coat protein gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato plants. *EMBO J* 6: 1181-1188
- An G (1987) Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymology* 153: 292-305
- Ben JC, Melchers LS (1993) Update on biotechnology; strategies for control of fungal diseases with transgenic plants. *Plant Physiol* 101: 709-712
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res* 7: 1521-1523
- Datla RSS, Hammerlindl JK, Panchuk B, Pelcher LE, Keller W (1992) Modified binary plant transformation vectors with the wild type gene encoding NPT 2. *gene* 211: 383-384
- DeBlock M, Herrera-Estrella L, Montagu MV, Schell J, Zambryski P (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J* 3: 1681-1689
- Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR (1980) Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium melioli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 7347-7351
- Edwards K, Johnston C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19: 1349
- Figurski DH, Hellinski DR (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 1648-1652
- Fox IH, Kelley WN (1978) The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Ann Rev Biochem* 47: 655-686
- Giuseppina N, Simon S, Tapan K (1989) Down regulation of the mercury resistance operon by the most promoter-distal gene merD. *Mol Gen genet* 220: 69-72
- Guo W, Richard W, Michael F (1992) Characterization of a cold-regulated wheat gene related to *Arabidopsis* cor47. *Plant Physiol* 100: 915-922
- Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies. A laboratory manual*. Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y
- Herrera-Estrella L, Depicker A, Montagu MV, Schell J (1983) Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-Plasmid derived vector. *Nature* 303: 209-213
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir-and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179-180
- Hoekema A, Van Haaren MJJ, Fellingner AJ, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1986) Non-oncogenic plant vectors for use in the *Agrobacterium* binary vector system. *Plant Molecular Biology* 5: 85-89
- Ignacio E, Burnett RJ, Nessler CL (1992) Nucleotide sequence of a cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* 100: 1613-1614
- Kaufman RJ, Murtha P, Ingolia DE, Yeung CY, Dellems RE (1986) Selection and amplification of heterologous genes encoding adenosine deaminase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3136-3140
- Kellems RE, Yeung CY, Ingolia DE (1985) Adenosine deaminase deficiency and severe combined immunodeficiencies. *Trend genet* 1: 278-283
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry* 163: 16-20
- Maiti IB, Wanger GJ, Yeargan R, Hunt AG (1989) Inheritance and expression of the mouse metallothionein gene in tobacco. *Plant Physiol* 91: 1020-1024
- Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J (1982) *Molecular cloning: A laboratory manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Odell JT, Nagy E, Chua NH (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* 313: 810-812
- Sijmo PC, Dekker BMM, Schrammeijer B, Verwoerd TC, van den Elzen PJM, Hoekema A (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Tech* 8: 217-221
- Song H, Hong C (1991) Transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) cell line carrying human proinsulin gene. *Korean J Plant Tissue Culture* 18: 195-200
- Takahashi T, Satoshi N, Yoshibumi K (1992) The *Arabidopsis* HSP18.2 promoter/GUS gene fusion in transgenic *Arabidopsis* plants: a powerful tool for the isolation of regulatory mutants of the heat-shock

response. *The Plant J* 2: 751-761

Vaeck M, Reynaerts A, Hofte H, Jansens S, Beuckeleer MD, Dean C, Zabea M, Montagu MV, Leemans J (1987) Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328: 33-37

Yeung CY, Ingolia DE, Bobonis C, Dunba BS, Riser ME, Siciliano MJ, Siciliano J, Kellems RE (1983) Selective overproduction of adenosine

deaminase in cultured mouse cells. *J Biol Chem* 258: 8338-8345

Yeung CY, Ingolia DE, Roth DB, Shoemaker C, Al-Ubaidi MR, Yen JY, Ching C, Bobonis C, Kaufman RJ, Kellems RE (1985) Identification of function murine adenosine deaminase cDNA clones by complementation in *E. Coli*. *J Biol Chem* 260: 10299-10307

(1995년 7월 13접수)