

## 연초의 형질전환을 위한 새로운 표지유전자로서 Mouse Adenosine Deaminase 유전자의 이용가능성

양덕춘\* · 한성수<sup>1</sup> · 윤의수<sup>2</sup>

한국인삼연초연구원 유전생리부, <sup>1</sup>원광대학교 농화학과, <sup>2</sup>공주대학교 생물학과

### Adenosine Deaminase Gene: Possible Selectable Marker for Tobacco Transformation

Deok Chun YANG\*, Sung Su HAN<sup>1</sup>, and Eui-Soo YOON<sup>2</sup>

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

<sup>1</sup>Department of Agricultural Chemistry, Won-Kwang University, Iksan, Chunbuk, 579-749; and

<sup>2</sup>Department of Biology, Kongju National University, Kongju, Chung-Nam, 449-900. \*Corresponding author.

The development of selectable markers for transformation has been a major factor in the successful genetic manipulation of plant. We established a new selectable marker system for tobacco transformation using chimeric adenosine deaminase (ADA) gene, which confers resistance to cytotoxic adenosine analogues, 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl adenine(Ara-A) and cordycepin. The transformants with the chimeric ADA gene in tobacco grew in the presence of normally lethal level of cytotoxic adenosine analogues, 100  $\mu$ M Ara-A and 50  $\mu$ M cordycepin. We successfully distinguished transformed shoot from non-transformed shoots on the same selectable media with cytotoxic adenosine analogues. In this selectable media, we were able to select seeds with/without ADA gene from transgenic tobacco seeds. These results show that the mammalian ADA gene may serve as a new selectable marker for tobacco transformation.

**Key words:** adenosine analogues, arabinofuranosyl adenine, cordycepin, cytotoxicity, lethal marker

식물분자생물학의 급속한 발전으로 많은 유용유전자들이 cloning되고 식물형질전환용 운반체 등이 개발됨으로써 외부 유전자를 식물세포의 핵내로 쉽게 도입할 수 있게 되었지만(An, 1987; Bevan, 1984; Hoekema et al., 1983), 기술적인 면에서 외부유전자가 도입되어 형질전환된 세포와 형질전환되지 않은 세포를 조기에 구별하는 방법이 식물세포의 형질전환을 위한 매우 중요한 관건으로 대두되고 있다. 이에 우선적으로 작용하는 항생제 내성 유전자(Bevan et al., 1983; Herrera-Estrella et al., 1983; Hayford, et al., 1986) 등과 제초제 저항성 유전자(DeBlock et al., 1987; Fraley et al., 1983) 등을 선발 표지유전자로 사용하는 방법이 개발되었으며, 또한 눈으로 바로 확인할 수 있도록 visible 표지유전자(Jefferson, 1987; Schneider et al., 1990; Ludwig et al., 1990) 등이 개발되었다.

현재까지 주로 사용된 항생제표지 유전자는 bacteria Tn5에서 유래된 neomycin phospho-transferase II gene 이며, 이

유전자는 식물세포에 전이되면 kanamycin, neomycin 그리고 G-418 등의 항생제에 내성을 나타내게 된다(Herrera-Estrella et al., 1983). 또한 streptomycin phosphotransferase gene (Jones et al., 1987), chloramphenicol acetyltransferase gene (Herrera-Estrella et al., 1983), hygromycin phosphotransferase gene (Van et al., 1985), gentamycin acetyltransferase gene (Hayford, et al., 1986), dihydrofolate reductase gene (Eichholtz et al., 1987), blasticidin S deaminase gene (Kamakura et al., 1990), bleomycin 및 phleomycin resistance gene (Hille et al., 1986; Perez et al., 1989)등이 개발되어 식물 세포의 형질전환체를 선발하는데 사용가능한 표지유전자로 보고되고 있다. 그러나 기존에 사용해 온 항생제 표지유전자는 사용하고자 하는 식물에 따라서는 내성을 지니고 있는 식물체가 있어 항생제 표지유전자의 사용에 대해 제한 요인이 되고 있으며(Vasil et al., 1991), 한번 표지유전자에 의하여 형질전환된 식물체는 지속적인 식물체의 육종

을 위해서 또 다른 유용유전자를 삽입해야 할 경우 기사용된 표지유전자는 다시 사용할 수 없기 때문에 새로운 표지유전자의 지속적인 개발이 요구되고 있다.

Adenosine deaminase (E.C.3.5.4.4, ADA)는 adenosine을 inosine으로 변환시키는 purine 대사에 관여하는 효소로서 동물세포의 조직배양시 adenosine대신 독성 adenosine 유도체가 첨가되면 ADA효소가 부족하거나 없을 경우 세포가 죽게 된다(Fox et al., 1978). 그러나 ADA 효소가 존재할 경우에는 독성 adenosine 유도체를 비독성인 inosine 유도체로 변환시킴으로서 생장이 가능하게 된다(Yeung et al., 1983). ADA효소는 동물세포에는 어느 부위에나 존재하지만 식물세포 내에는 전혀 존재하지 않음이 이미 보고된 바 있다(Fox et al., 1978; Yeung et al., 1983; Yeung et al., 1985). 그러나 Yang (1995)등이 mouse ADA cDNA를 식물형질전환용 binary vector에 재조합하여 연초조직을 형질전환시킨 결과, 동물세포유래 유전자가 연초식물체에서도 훌륭히 발현되었음을 확인한 바 있다. 따라서 본 실험은 식물세포의 형질전환시 사용되는 표지유전자로써 기존에 사용되어온 항생제내성유전자대신 동물유전자중에서 연초세포내에서 발현이 가능한 ADA 유전자를 식물형질전환용 표지유전자로 사용하고자 수행하였던 바, 그 결과를 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### Inosine 및 Adenosine 유도체에 대한 연초조직의 감수성 조사

*Nicotiana tabacum* cv Xanthi을 *in vitro*에서 배양한 후 cork borer를 이용해서 절편을 만들어 배양에 사용하였다. 사용배지는 MS/B5 (Sigma M0404)에 sucrose 및 식물호르몬을 첨가한 후 pH 5.6, phyto agar 0.7%첨가하여 습열멸균을 한 후, 배지의 온도가 55°C 정도 되었을 때 membrane filtration에 의하여 멸균된 adenosine 및 inosine analogue용액을 농도별로 넣어 사용하였다. 재분화를 위한 호르몬은 BA 2.5 mg/L, NAA 0.1 mg/L를 사용하였으며, adenosine 유도체로써는 adenosine, 2'-deoxyadenosine, arabinofuranosyl adenine, cordycepin을 사용하였고, inosine 유도체는 inosine과 2'-deoxyinosine을 사용하였다. 농도는 유도체에 따라 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 및 640  $\mu$ M를 사용하였으며 모든 시약은 Sigma 제품을 사용하였다. 배양은 25°C 배양실에서 광(일장 16 시간)처리구와 암처리구로 나누어 수행하였으며 3주간 배양하여 성장량을 조사하였다.

### ADA 유전자를 이용한 형질전환체의 선발

ADA 유전자를 식물형질전환용 표지유전자로 사용가능성을 진단하기 위해서 BA 2.5 mg/L, NAA 0.1 mg/L를 첨가한 재분화 MS배지에 Ara-A와 cordycepin을 각각 100  $\mu$ M 및 50  $\mu$ M을 첨가하여 정상연초조직과 기 형질전환된 조직(Yang et al., 1995)의 절편을 무균적으로 치상하여 생존여부를 조사하였다. 또한 ADA 유전자를 표지유전자로 사용하여 형질전환체를 선발하기 위해서는 Yang 등이 사용했던(Yang et al., 1995) 공동배양방법에 따라서 *A. tumefaciens* pDY183에 의해 연초조직을 형질전환시켰다. 선발배지는 재분화배지에 cefotaxime제재(Claforan 250 mg/L, Han-Dok Remedia Ind. Co., Ltd, Seoul, Korea)와 Ara-A (100  $\mu$ M), cordycepin (50  $\mu$ M) 그리고 대조구로써 kanamycin (100  $\mu$ g/mL)를 첨가하여 사용하였다. 배양은 광상태배양실에서 30일간 하였으며 형질전환체는 다시 발근배지(Yang et al., 1995)에 옮겨 배양하였다.

### 재분화체의 형질전환을 조사

발근배지에서 성장하고 있는 재분화체의 잎을 cork borer로 직경 6 mm의 크기로 절단하고 다시 1/8 배의 크기로 절편을 만든 다음 ADA 유전자의 발현정도를 색깔로 확인하였다(Yang et al., 1994). 즉 절단된 절편을 adenosine이 함유된 plate (cell culture cluster dish, Costar)에 넣고 30분간 반응시킨 후 발색시약(Yang et al., 1994)을 넣어 형질전환여부를 확인하였다. 형질전환율은 96개의 각각 다른 재분화체의 절편으로부터 발색이 되는 개체의 수를 확인하여 백분율로 환산하였다.

### ADA 유전자가 도입된 형질전환체의 종자 검정

형질전환체를 토양에 재배하여 획득한 종자와 정상종자를 각 꼬투리별로 2% NaHCl에서 소독한 후 각각 Ara-A 100  $\mu$ M이 함유된 식물호르몬 무첨가 배지에 파종하여 30일간 배양한 후 생존율을 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### Inosine 및 Adenosine 유도체에 대한 연초조직의 감수성 조사

Adenosine deaminase (ADA)효소는 식물세포에는 존재하지 않지만 유전공학기법에 의하여 동물 ADA 유전자가 연초식물세포에 도입되어 발현됨이 확인되었으므로(Yang et al., 1995), 본 실험에서는 ADA 유전자를 식물세포의 형질전환용 표지유전자로서 사용가능성을 조사하고자 수행하였다. 우선 ADA 효소는 동물조직내에서 adenosine을 inosine으로

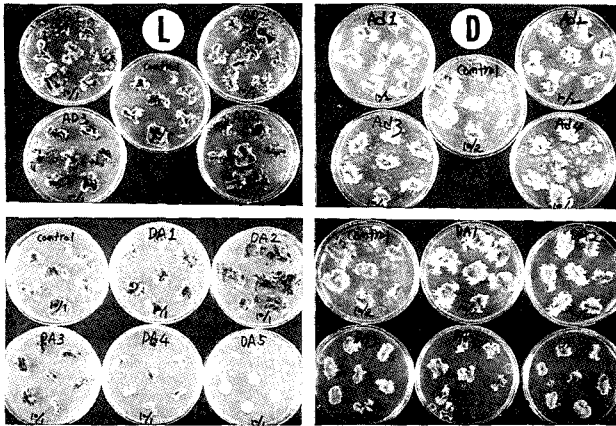


Figure 1. Effects of concentration (0, 40, 50, 160, 320  $\mu$ M) of inosine (A) and 2'-deoxyinosine (B) on the growth of *Nicotiana tabacum* cv Xanthi leaf explant in the light (L) and dark (D) condition.

변환시키므로(Fox et al., 1978), 식물에서도 기존에 없었던 시스템이긴 하지만 동물 ADA 유전자에 의해서 형질전환된 식물세포도 adenosine를 inosine으로 변환시키므로써 식물조직에 inosine이 과량 축적되어 식물세포의 생장에 악영향을 미칠 가능성을 전혀 배제할 수 없으므로, 우선 inosine 유도체를 농도별로 처리된 배지에서 연초조직을 치상하여 배양한 후 성장량을 조사하였다. Inosine의 농도를 0  $\mu$ M에서 320  $\mu$ M까지 농도별로 처리하여 광 및 암상태에서 3주간 배양한 후 성장량을 조사한 결과, 광(Figure 1-A-L) 및 암(Figure 1-A-D)상태에서 공히 무처리구에 비해서 inosine 처리구가 생장이 양호하였으며 일부 처리구에서는 오히려 성장량이 증가됨을 관찰할 수 있었다(Figure 1-A, Ino 2, Ino 3). 또한 inosine 유도체인 2'-deoxyinosine의 경우에도 모든 처리구에서 캘러스의 성장량이 무처리구에 비해 높은 경향을 보였다(Figure 1-B).

이런 결과는 adenosine뿐만 아니라 2'-deoxyadenosine이 형질전환된 연초식물체에서 발현된 ADA 효소에 의해서 inosine과 2'-deoxyinosine으로 변환되어 체내에 다량 축적이 된다고 하더라도 형질전환체의 성장에는 거의 악영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다. 따라서 adenosine과 동물세포 배양시 독성을 가지고 있는(Fox et al., 1978) 2'-deoxyadenosine 대한 연초조직의 감수성을 조사하였다. Adenosine이 농도별로 첨가된 처리구에서도 inosine첨가구와 마찬가지로 광배양시 생장이 매우 양호하였으며, 특히 adenosine 40  $\mu$ M에서 160  $\mu$ M첨가된 배지에서는 무첨가배지에 비해 오히려 약 2배 가량 생장이 좋은 경향을 보였다(Figure 2). 그러나 고농도인 320  $\mu$ M에서는 무첨가배지와 거의 비슷한 수준을 보였다(Figure 2). 반면에 2'-deoxyadenosine의 경우에는 80  $\mu$ M에서 생장이 무처리구에 비해 양호하였지만 160  $\mu$ M 이상에서는 생장이 급격히 감소하였으며, 320  $\mu$ M이상부터는 거의 생장이 되지 않아(Figure

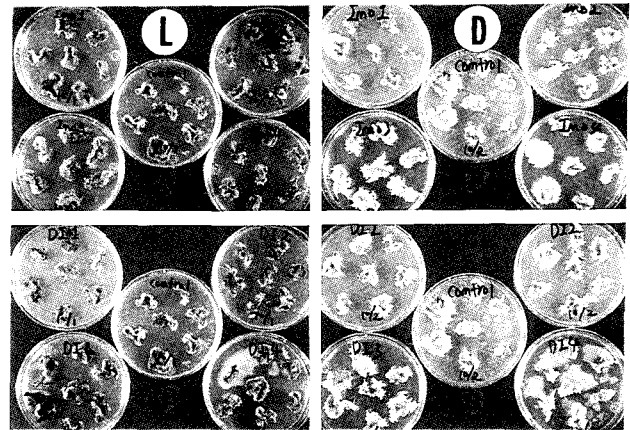


Figure 2. Effects of concentration of adenosine (A: 0, 40, 80, 160, 320  $\mu$ M) and 2'-deoxyadenosine (B: 0, 40, 80, 160, 320, 640  $\mu$ M) on the growth of *Nicotiana tabacum* cv Xanthi leaf explant in the light (L) and dark (D) condition.

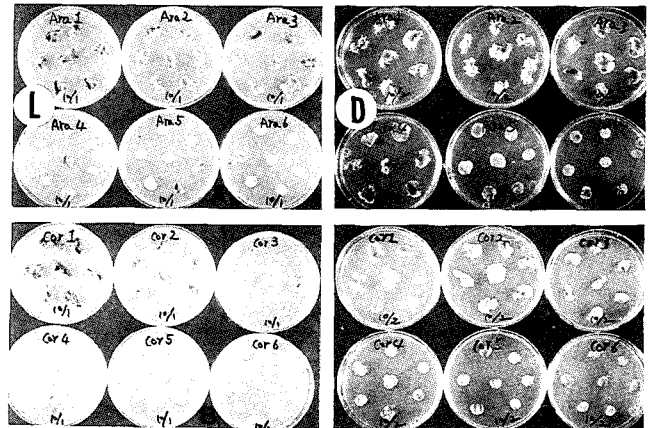
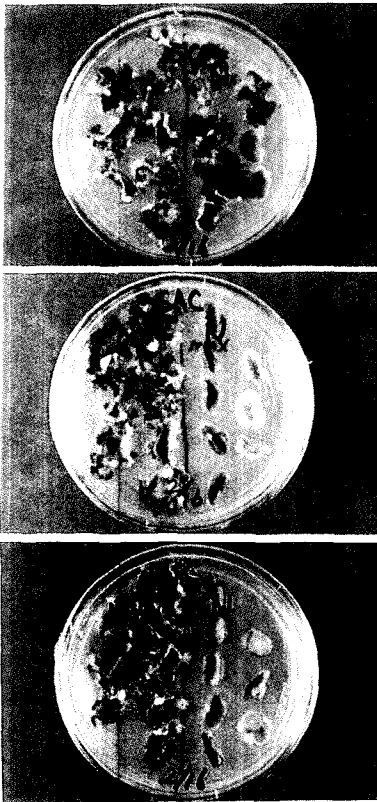


Figure 3. Effects of concentration (5, 10, 20, 40, 80, 160  $\mu$ M) of arabinofuranosyl adenine (A) and cordycepin (B) on the growth of *Nicotiana tabacum* cv Xanthi leaf explant in the light (L) and dark (D) condition.

2), 2'-deoxyadenosine의 경우에는 동물세포와 마찬가지로 식물에서도 독성을 나타내고 있음을 알 수 있었다. 그러나 동일한 2'-deoxyadenosine처리구를 암상태에서 배양할 경우에는 독성을 나타내는 정도가 광배양상태와는 다소 차이를 나타내었는 바, 고농도인 640  $\mu$ M에서도 생장이 다소 가능하는 것을 관찰할 수 있었다. 이런 점을 고려할 때 2'-deoxyadenosine이 식물에 독성을 가지고 있긴 하지만 ADA 표지유전자의 선발을 위한 물질로 사용하기에는 다소 미흡할 것으로 사료되며 더 독성이 강한 adenosine 유도체의 선발이 필요한 것으로 사료되었다. 이런 연유로 비교적 강력한 독성물질로 알려진 adenosine 유도체중 Ara-A와 cordycepin (Yeung et al., 1985)을 대상으로 하여 상기 실험



**Figure 4.** Leaf discs assay of transgenic T182 tobacco plant (left side of Petridish) and normal plant (right side) on the shooting media with cytotoxic adenosine analogues (A, normal medium; B, 100  $\mu$ M Ara-A medium; C, 50  $\mu$ M cordycepin medium). The photographs were taken after 3 weeks of culture.

과 동일한 방법으로 연초조직의 생장에 미치는 독성정도를 조사하였던 바, Ara-A의 경우에는 80  $\mu$ M이상의 농도에서 전혀 생장이 되지 않았으며, 특히 광배양조건에서 고사된 조직은 엽록소가 모두 파괴되어 백색의 조직이 되었으나 암상태에서는 다소 녹색을 띠고 있었다. 또한 cordycepin의 경우에는 Ara-A보다 훨씬 독성이 강함을 관찰할 수 있었는데, 20  $\mu$ M부터는 조직의 색깔이 완전히 백색으로 변색되면서 조직이 모두 고사되었다(Figure 3). 상기결과를 종합하면 연초조직의 형질전환을 위해서 adenosine유도체를 사용할 경우 2'-deoxyadenosine보다 Ara-A와 cordycepin을 사용하는 것이 더 효과적일 것으로 생각되며, 선발농도로써는 Ara-A의 경우에 100  $\mu$ M, cordycepin의 경우에는 50  $\mu$ M을 사용하는 것이 형질전환체 선발을 위해서 좋을 것으로 사료되었다.

#### 새로운 표지유전자로서 ADA 유전자의 이용가능성 진단

상기 실험결과 독성 adenosine 유도체를 사용할 경우 정상조직은 치사하고 ADA 유전자에 의하여 형질전환된 식물체는 비독성 inosine 유도체로 변환시킴으로서 성장할 수 있는 이론적인 근거를 확보하였으므로 Ara-A와 cordycepin을 정상조직이 치사하는 농도 100  $\mu$ M 및 50  $\mu$ M을 각각 첨가한 재분화 MS배지에 정상연초조직과 기형질전환된 조직(Yang et al., 1995)을 치사하여 생존여부를 조사하였다. Ara-A와

cordycepin이 전혀 첨가되지 않은 정상배지에서는 정상조직과 형질전환체 공히 생장이 왕성하였으나(Figure 4-A), Ara-A를 100  $\mu$ M 첨가한 배지(Figure 4-B)와 cordycepin을 50  $\mu$ M 첨가한 배지(Figure 4-C)의 경우에는 정상조직은 전혀 분화하지 못하였으나 형질전환체는 모두 왕성히 성장하는 것을 관찰할 수 있었다(Figure 4-B, C). 그러나 ADA 유전자가 도입된 형질전환체는 배지에 함유되어 있는 독성의 adenosine유도체를 비독성의 inosine유도체로 변환시킴으로써 생존이 가능하지만 변환시키는 과정 중에 배출된 다량의 암모니아(Fox et al., 1978)에 의해서 식물조직이 고사할 것으로 생각되었으나 실험결과 전혀 죽지 않고 오히려 생장이 왕성한 것은 체내에서 ADA효소에 의하여 생성된 암모니아가 바로 다른 아미노산으로 변환되기 때문인 것으로 사료되며 여기에 glutamine synthetase (Cock et al., 1991; Eckes et al., 1989)등이 관여하는지에 대해서는 추후 좀더 구체적으로 조사하여야 할 것이다. 그러나 이런 결과는 독성 adenosine 유도체를 substrate로 배지에 사용했을 때 ADA gene을 표지유전자로 사용할 수 있음을 시사한다.

#### 독성 Adenosine 유도체를 이용한 형질전환체의 선발

상기 실험결과 독성 adenosine 유도체를 선발 물질로 사용하여 형질전환체를 선발할 수 있음이 확인되어, Yang 등이 사용했던(Yang et al., 1995) 공동배양방법에 의하여 ADA 유전자가 함유되어 있는 *A. tumefaciens* pDY183에 의해 연초조직을 형질전환시켰다. 선발물질로서는 Ara-A (100  $\mu$ M), cordycepin (50  $\mu$ M) 그리고 대조구로써 kanamycin (100  $\mu$ g/mL)를 사용하였다. 단순히 2YT배지에서 공동배양한 정상조직은 상기 선발물질이 함유된 배지에서 모두 고사하였지만 ADA 유전자를 함유한 *Agrobacterium*과 공동배양했던 조직은 shoots가 매우 왕성하게 형성되었으며 kanamycin 함유 처리구에서는 89%의 재분화율을 보였으나 Ara-A 및 cordycepin함유 처리구에서는 100%의 재분화율을 보여(Table 1) kanamycin를 사용했을 때보다 훨씬 재분화능이 높게 나타났다. 그러나 독성 adenosine 유도체와 kanamycin이 함유된 배지에서 생존한 재분화체에 실제 형질전환율을 조사하기 위해서 Yang (1994)등이 개발한 assay 방법에 의해서 조사하였던 바, Ara-A처리구에서는 형질전환율이 28%, 그리고 cordycepin을 첨가한 배지에서는 36%에 불과하였고 kanamycin에 의하여 선발된 재분화체의 형질전환율은 94%로 매우 높은 경향을 보였다. 이런 결과는 ADA 유전자를 식물세포의 형질전환용 표지유전자로 사용하기 위해서 독성 adenosine 유도체를 선발 물질로 사용할 경우 형질전환체를 선발할 수 있음을 의미한다. 그러나 독성 adenosine analogues 첨가배지에서 재분화율은 매우 높지만 실지로 형질전환된 개체가 매우 적어 그 원인과 형질전환을 높일 수 있는 방법을 계속적으로 조사하여야 할 것으로 생각된다.

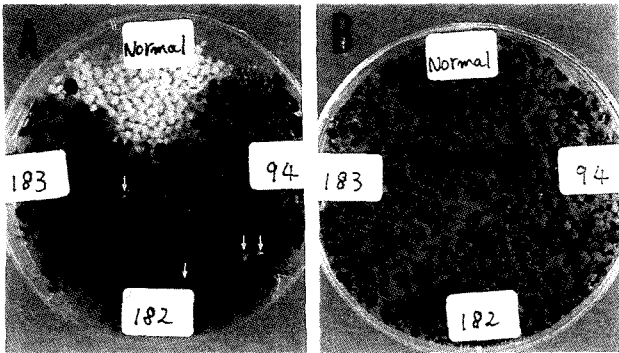


Figure 5. Transgenic (94, 182, 183) and normal seeds on the hormone free MS media with (A) or without (B) Ara-A 100 M. Arrows indicate non-transgenic seeds.

Table 1. Ratio of regeneration and transformation by toxic agents of Ara-A, cordycepin and kanamycin using *Agrobacterium tumefaciens* pDY18 with ADA and NPT II genes.

Toxic agent	Ratio (%) of	
	Regenerant	Real transformant
Ara-A	100	28
Cordycepin	100	36
Kanamycin	89	94

### ADA 유전자가 도입된 형질전환체의 종자 검정

형질전환이 확인된 식물체와 정상식물체에서 채종한 종자로부터 ADA 유전자가 다음세대로 전이되는지 여부와 독성 adenosine 유도체에 의하여 형질전환된 종자의 경우에도 선발이 가능 하는지의 여부를 ADA 표지유전자를 이용하여 확인하기 위해서 Ara-A 100  $\mu$ M이 함유된 배지와 함유되지 않은 배지에 멸균된 종자를 파종하여 성장여부를 관찰하였던 바, Ara-A가 함유되지 않은 배지에서는 형질전환 및 정상종자 공히 생장이 왕성하였으나(Figure 5-A), Ara-A가 함유된 배지에서는 정상조직은 모두 고사하였고(Figure 5-B, normal), 반면에 형질전환체의 경우에는 왕성히 성장하였다(Figure 5-B, 94, 182, 183). 이런 결과는 종자에서도 형질전환체의 확인에 ADA 유전자를 사용할 수 있음을 시사한다. 또한 본 실험에서는 거의 대부분 형질전환된 종자는 Ara-A가 첨가배지에서 생존하였지만 ADA 유전자 이 1개의 copy만 삽입되었을 경우 대부분 멘델이즘에 의해 3 : 1로 분리되는 바, 이때에도 형질전환된 종자와 형질전환되지 않은 종자(Figure 5-B, -)를 조기에 선발할 수 있을 것으로 생각된다.

Adenosine deaminase (E.C.3.5.4.4, ADA)는 adenosine을 inosine으로 변환시키는 purine 대사에 관여하는 효소로서 주로 동물체내에서 adenosine대신 독성 adenosine 유도체가 첨가되면 ADA 효소가 존재할 경우에는 비독성인 inosine 유

도체가 됨으로서 생장에 악영향을 미치지 못하지만 ADA 효소가 부족하거나 없을 경우 ADA 효소 대신에 adenosine kinase의 효소가 작용하여 독성 adenosine 유도체를 adenosine monophosphate (AMP)로 변환시키며, 계속 ADP 및 ATP를 걸쳐 DNA polymerase 및 cAMP와 RNA합성과 정에서 독성을 갖게 되어 조직이 죽게 된다(Fox et al., 1978). 식물세포에는 원래 ADA 효소가 존재하지 않지만(Fox et al., 1978; Yeung, 1983; Yeung, 1985), Yang(1995) 등은 이미 ADA cDNA를 식물형질전환용 binary vector에 재조합하여 연초조직을 형질전환시켜 발현되었음을 확인하였으므로 본 실험에서는 식물세포의 형질전환시 사용되는 표지유전자로써 ADA 유전자의 사용가능성을 진단하였다. 본 실험 결과 ADA 유전자가 발현되는 연초 형질전환체는 독성 adenosine 유도체에서도 생장이 가능하고 훌륭히 형질전환체를 선발할 수 있어 연초의 형질전환 표지유전자로 ADA 유전자를 사용할 수 있음을 시사하였다. 이렇게 동물에 존재하는 유전자를 식물세포의 형질전환시 표지유전자로 사용이 가능하므로써 최근 미생물 유래 표지유전자의 사용에 대해서 극히 일부이긴 하지만 사용에 대한 재검토가 논의되고 있으며(Bryant et al, 1992; Flavel et al., 1992), 일부에서는 형질전환 후 다시 negative selection 방법에 의해서 항생제 표지유전자의 제거 등에 대한 논의들이 조심스럽게 제기되고 있는 바(Goldsbrough, 1992), ADA 유전자는 원래 사람이 가지고 있는 유전자이며 사람조직의 어느 부위이나 광범위하게 존재하기 때문에 미생물유래 항생제 표지유전자보다 안전성 문제에서 더 좋은 조건일 것으로 사료되어, 추후 좀더 많은 작물에 대해서 표지유전자로 사용가능성과 선택배지에 사용되는 독성 adenosine의 유도체에 대한 연구, 그리고 형질전환시 재분화능은 좋지만 재분화체의 형질전환율이 낮은 이유 등에 대해서 집중적으로 연구하므로써 형질전환체의 분석방법도 매우 빠르고 싼 값이며 극미량을 가지고도 분석이 가능한(Yang et al., 1994) ADA 유전자를 식물세포의 형질전환용 표지유전자로 널리 사용할 수 있을 것으로 생각된다.

### 적 요

식물세포의 형질전환을 위한 새로운 표지유전자의 개발은 식물유전공학의 중요한 관건이 되고 있다. 본 실험은 독성 adenosine 유도체인 9- $\beta$ -D-arabinofuranosyl adenine (Ara-A)과 cordycepin등에 저항을 나타내는 adenosine deaminase (ADA) 유전자를 새로운 식물세포의 형질전환용 표지유전자로 사용코자 수행하였다. 정상식물체에서는 치사하는 농도인 Ara-A 100  $\mu$ M과 cordycepin 50  $\mu$ M이 함유된 선발배지에서 ADA 유전자에 의하여 형질전환된 연초식물체는 생장이 가능하였으며 성공적으로 형질전환체를 선발할 수 있었

다. 또한 형질전환된 연초식물체에서 획득한 종자도 동일한 선발배지에서 ADA 유전자가 유전된 종자와 유전되지 않은 종자를 쉽게 구별할 수 있었다. 이런 결과는 동물유전자인 ADA 유전자를 연초조직의 새로운 형질전환용 표지유전자로 사용할 수 있음을 시사한다.

## 인용문헌

- An G (1987) Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymology* **153**: 292-305
- Beyan MW, Flavell RB, Chilton MD (1983) A chimaeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* **304**: 184-187
- Bevan MW (1984) Binary agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* **12**: 8711-8721
- Bryant J, Leather S (1992) Removal of selectable marker genes from transgenic plant: needless sophistication or social necessity?. *Trends Biotechnol* **10**: 274-275
- Cock JM, Brock IW, Watson AT, Swarup R, Morby AP, Cullimore JV (1991) Regulation of glutamine synthetase genes in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Molecular Biology* **17**: 761-771
- 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
- Eckes P, Schmitt P, Daub W, Wengenmayer F (1989) Overproduction of alfalfa glutamine synthetase in transgenic tobacco plants. *Mol Gen Genet* **217**: 263-268
- Eichholtz DA, Roger SG, Horsch RB, Klee HJ, Hayford M, Hoffmann NL, Braford SB, Fink C, Flick J, O'connell KM, Fraley RT (1987) Expression of mouse dihydrofolate reductase gene confers methotrexate resistance in transgenic petunia plants. *Somatic Cell and Molecular Genetics* **13**: 67-76
- Flavel RB, Dart E, Fuchs RL, Fraley RT (1992) Selectable marker genes: safe for plant? *Bio/Technol* **10**: 141-144
- Fox IH, Kelley WN (1978) The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Ann Rev Biochem* **47**: 655-686
- Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR, Goldberg SB, Hoffmann NL, Woo SC (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci* **80**: 4803-4806
- Goldsbrough A (1992) Marker gene removal: a practical necessity?. *Trends Biotechnol* **10**: 417
- Hayford MB, Medford JI, Hoffmann NL, Roger SG, Klee H (1986) Development of a plant transformation selection system based on expression of genes encoding gentamycin acetyl transferases. *Plant Physiol* **86**: 1216-1222
- Herrera-Estrella L, De Block M, Montagu MV, Schell J (1983) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J* **2**: 987-992
- Hille J, Verheggen F, Roelink P, Franssen H, Kammen A, Zable P (1986) Bleomycin resistance: A new dominant selectable marker for plant cell transformation. *Plant Molecular Biology* **7**: 171-176
- Hoekema A, Horsch 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
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* **5**: 387-405
- Jones JDG, Svab Z, Harper EC, Hurwitz CD, Maliga P (1987) A dominant nuclear streptomycin resistance marker for plant cell transformation. *Mol Genet* **210**: 86-91
- Kamakura T, Yoneyama K, Yamaguchi I (1990) Expression of the blasticidin S deaminase gene (bsr) in tobacco: Fungicide tolerance and a new selective marker for transgenic plants. *Mol Gen Genet* **223**: 332-334
- Ludwig SR, Bower B, Beach L, Wessler SR (1990) A regulatory gene as a novel visible marker for maize transformation. *Science* **247**: 449-450
- Perez P, Tiraby G, Kallerhoff J, Perret J (1989) Phleomycin resistance as a dominant selectable marker for plant cell transformation. *Plant Molecular Biology* **13**: 365-373
- Schneider M, Ow DW, Howell SH (1990) The *in vivo* pattern of firefly luciferase expression in transgenic plants. *Plant Molecular Biology* **14**: 935-947
- Van den Elzen PJM, Townsend J, Lee KY, Bedbrook JR (1985) A chimeric hygromycin resistance gene as a selectable marker in plant cells. *Plant Molecular Biology* **5**: 299-302
- Vasil V, Brown SM, Re D, Fromm ME, Vasil IK (1991) Stably transformed callus lines from micro projectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *Bio/Technology* **9**: 743-747
- Yang DC (1994) Adenosine deaminase gene as a new selectable marker for plant cell transformation. The Proceeding of eighth symposium on plant biotechnology-Transgenic plant in Korea- pp 141-176
- Yang DC, Park JC, Choi KT, Lee JM (1995) Expression of mouse adenosine deaminase gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). In press of Korean J Plant Tissue Culture
- Yeung CY, Riser ME, Kellems RE, Sicilano MJ (1983) Increased expression of one of two adenosine deaminase alleles in a human choriocarcinoma cell line following selection with adenine nucleosides. *J Biol Chem* **258**: 8330-8337
- Yeung CY, Ingolia DE, Roth DB, Shoemaker C, Al-Ubaidi MR, Yen JY, Ching C, Bobomis 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