

들잔디 체세포 배발생 세포로의 DNA 전입을 위한 Electroporation 조건 구명

박건환¹ · 안병준*

¹경기도 농촌진흥원 원예과, 단국대학교 농과대학 식물자원학부

Electroporation Conditions for DNA Transfer into Somatic Embryogenic Cells of *Zoysia japonica*

PARK, Gun Hwan¹ · AHN, Byung Joon*

¹Kyungki Provincial R. D. A., Hwasung, 445-970, Korea: and Division of Plant Resources, Dankook University, Cheonan, 330-714, Korea. *Corresponding author.

We have reported previously that intact embryogenic cells can be used instead of protoplasts for electroporation-mediated transformation of zoysiagrass and rice. In this study, conditions of the tissue electroporation were examined to optimize the procedures. Embryogenic cell suspensions were established in liquid MS medium containing 2 mg/L of 2,4-D with embryogenic calluses induced from mature embryos of *Z. japonica*. The suspension-cultured cell clumps were electroporated with 35S-*gusA* expression vector DNA, and degrees of DNA introduction into the cells were determined by histological expression rates of the *gusA* marker gene. DNA transfer into the cell clumps occurred in wide range of voltage (100-400 V) and capacitance (10-1980 μ F), but more in the ranges of 200-300 V and 330-800 μ F. DNA concentrations higher than 6 μ g/mL were adequate for GUS expression of the electroporated cells. DNA transfers were confirmed in all three embryogenic cell lines but only in one out of eleven non-embryogenic lines. Positive GUS expressions occurred with DNAs added even 20-40 h after pulse treatments. As a promoter of *gusA*, Act1 and Ubi1 were effective 7 and 5 times than 35S respectively in number of GUS expression units on electroporated cell clumps. Embryogenic cell clumps survived and regenerated into plantlets after pulse treatments of wide range of conditions.

Key words: Zoysiagrass, β -glucuronidase, transient GUS expression, promoter

클로닝된 유용유전자를 식물체로 도입하는 형질전환 연구는 매우 활발하여 형질전환된 식물의 포장 검정 연구가 현재 3000건 이상 진행되고 있다(Birch, 1997). 지금까지 35과 120종 이상의 식물에서 형질전환이 보고된 바 있어 이제 형질전환의 가능성 여부보다는 식물 종류에 따라 선택된 방법의 적합성이 관심이 되고 있다.

쌍자엽식물에서 이미 효율적인 이용이 일반화된 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 기법은 단자엽식물의 경우 벼(Chan et al., 1992)와 옥수수(Donson et al., 1988) 등 일부 식물에서 최근 성공적인 이용이 보고되고 있으며 적용 가능한 식물이 늘 것으로 예상되고 있다. 단자엽식물의 형질전환은 원형질체를 electroporation 또는 polyethylene glycol 처리하여 DNA를 직접 전입시키거나, particle

bombardment를 이용하는 방법이 주로 이용되고 있다(Klein et al., 1989; Wang et al., 1988). Particle bombardment는 단자엽식물에서 가장 일반적인 방법으로 이용되고 있으나 장비가 고가이고, 일부 기종의 경우 획득된 형질전환체에 대한 지적 소유권 문제가 걸려 있으며, 다수의 유전자 전입에 따른 gene silencing이 문제가 되고 있다.

Electroporation은 효율이 높고 결과의 재현성이 있으며, 한 번에 많은 원형질체에 유전자를 전입시킬 수 있는 장점 때문에 particle bombardment가 도입되기 전에 널리 활용된 기술로서 벼는 물론 red top, tall fescue와 같은 잔디류의 형질전환에 성공적으로 이용된 바 있다(Asano and Ugaki, 1994; Ha et al., 1992). 그러나 원형질체 분리나 배양의 어려움 때문에 그 활용이 크게 제한되고 있다.

최근 옥수수 미숙배나 캘러스를 효소 처리하거나 물리적으로 상처를 낸 후 electroporation하여 형질전환된 식물체를 얻어낸 보고가 있다(Kathleen et al., 1992). 또한 종자나 체세포배를 건조시킨 후 DNA 용액 속에서 흡수시켜 배조직 세포 내로 외래유전자를 도입한 연구 결과가 밀(Reinhard et al., 1989)과 알팔파(Tissa et al., 1991)에서 보고된 바 있어 배조직 세포가 세포벽을 제거하지 않아도 DNA와 같은 거대분자가 침투할 수 있는 특성을 가졌음을 시사하고 있다. 조직배양 중인 체세포배발생 세포의 경우도 접합자배와 같이 mucopolysaccharide와 같은 점액성 물질의 축적이나 이차세포벽 발달이 심하지 않아 거대분자 화합물이 세포 내로 도입될 수 있을 것이라 생각된다(Ahn et al., 1988). 실제 우리는 벼와 잔디의 electroporation 실험에서 원형질체 대신에 배발생 세포를 이용하여도 DNA가 도입될 수 있음을 반복적으로 확인하여 보고한 바 있다(Park et al., 1994).

Electroporation시 유전자 전입 효율과 원형질체의 활력은 electroporation 배지 조성, 전기 충격의 시간과 진폭, 처리온도 등 여러 요인들의 영향을 받으며, 특히 pulse 형태, 전기장 강도, pulse 시간 및 횟수 등의 요인들에 의해 결정된다(Okada 등, 1986). Neumann(1982)은 electroporation 실험에서 전기충격 처리후 10분간 세포를 DNA와 함께 배양하는 것이 형질전환에 필수적이라고 하였고, 낮은 온도에서는 전기충격에 의한 세포막의 침투성 상태가 수분에서 몇 시간까지 유지될 수 있다고 하였다(Knight 등, 1982). DNA 형태도 유전자 전입에 영향을 미치는 요인으로서, Shillito(1985)는 circular와 supercoil 형태보다 선형의 plasmid가 10배의 더 높은 전입 효율을 보인다고 한 반면, 다른 보고에서는 DNA 형태에 따른 전입 효율엔 차이가 없다고 하는 등 다양한 연구 결과가 보고되고 있다(Okada 등, 1986).

본 연구는 세포벽 약화와 같은 전처리 없이 들잔디 배발생세포내로 DNA를 도입하기 위한 electroporation 조건, 즉 capacitance 와 전압 수준, promoter 종류, DNA 농도와 저온처리 효과 등을 구명하며, 처리에 따른 DNA의 전입 현상을 이해하고자 수행되었다.

재료 및 방법

배발생 캘러스 유도 및 식물체 재분화

한국잔디의 배발생 캘러스 유도, 증식 및 식물체 재분화는 이미 보고된 방법을 이용하였다(Park et al., 1994; Noh et al., 1995). 들잔디(*Zoysia japonica*)를 생장상 (2 × 500 watt halogen 등 인조 조명, 14시간 일장, 27°C)에서 재배하며 채취한 미숙종자를 70% ethyl alcohol에서 1분, 0.5% sodium hypochlorite 용액에서 10분간 소독한 후 미숙배를

절취하여 절편체로 이용하였다. 이들을 sucrose 30 g/L, Phytagel (Sigma Co., USA) 3 g/L, 2,4-D가 2 mg/L 함유된 MS 고체 배지에 치상하여 배발생 캘러스를 유도하였다. 유도된 캘러스 중 단단한 구상 배발생 캘러스와 그렇지 않은 비배발생 캘러스를 구분하여 별도의 세포주로 유지 및 증식하였다. 이들 캘러스들을 30 g/L sorbitol, 10 g/L sucrose, 12 mM proline, 100 mg/L tryptone, 5 mM MES (pH 5.8), 1 mg/L 2,4-D가 포함된 MS 액체배지에 옮겨 회전진탕 (100 rpm) 배양하였다. 계대배양은 배지의 4/5를 동일한 양의 새 배지로 교체하며 7일 마다 실시하였으며 때때로 2 mm 체를 통과시켜 미세한 세포피 상태로 유지하였다. 잔디 캘러스들의 체세포배발생과 식물체 재분화를 확인하기 위하여 2,4-D가 함유되지 않은 MS 한천배지에 이식하였다.

Plasmid DNA

형질전환 실험의 표지유전자로 GUS 유전자를 이용하였다. pGA1074는 CaMV 35S에 이어 Sh1 intron이 부가된 promoter에 의해 조절되는 NOS-poly A signal을 가지며 그 외에도 ampicillin 저항성 유전자를 포함하고 있다(Park et al., 1994). Promoter에 따른 도입 표지유전자의 식물세포내 발현 정도를 비교하기 위하여 유전자 조성이 다른 plasmid를 비교하였다. Act1 (McElroy et al., 1991; Zhang et al., 1991), CaMV 35S (Odell et al., 1985) 그리고 Ubi1 (Christensen et al., 1992) promoter에 의해 조절되는 *gusA* 유전자를 pUC 또는 pUC와 유사한 운반체에 포함시킴으로써 유전자 발현에 미치는 plasmid의 다른 영향을 배제시켰다.

Sambrook 등(1989)의 방법을 이용하여 이 plasmid를 증식하였고 sodium dodecyl sulfate (SDS) 방법으로 분리하였다. DNA 용액은 1 µg/µL의 농도로 멸균 증류수에 희석하여 사용하였다.

Electroporation 처리

Electroporation 처리는 Cell-Porator System I (BRL, Gaithersburg, Maryland, USA)을 이용하였다. 처리의 기본 방법으로 200 µL(PCV) 미세 세포피를 cuvette에 옮긴 후 30 µg/mL DNA 용액을 넣고 최종 부피가 1 mL이 되도록 MS 액체배지를 첨가하여 섞은 후 4°C에서 10분간 저온처리한 후 전기충격을 주었다. 전기충격은 400 V의 전압과 800 µF의 capacitance 수준에서 한 번의 pulse를 주었다. Electroporation 후 cuvette을 4°C에서 10분간 저온처리한후 세포피들을 24-cell well plate(Nunc, Denmark)에 옮겨 28°C 암상에서 24시간 배양한 다음, *gusA* 유전자 발현 정도를 측정함으로써 DNA 전입 효율을 측정하였다. 적정 electroporation 조건을 구명하기 위하여 전압과 capacitance의 수준(10, 50, 60, 330, 800, 1180, 1600, 1900 µF)을 조정하며

DNA 전입 효율을 조사하였다. 세포괴, DNA, 액체배지를 담은 cuvette을 electroporation chamber에 넣은 후, chamber내 물의 온도를 0, 10, 20, 30, 40, 50°C로 각각 조절하며 전기충격을 주고 DNA 전입 정도를 비교하였다. 또한 electroporation cuvette의 pGA1074 DNA 농도를 2, 4, 6, 8, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 달리하여 electroporation하므로써 적정 DNA 농도를 구명하고자 하였다.

GUS 조직화학적 분석

표지 DNA와 함께 electroporation 처리된 세포를 24-cell well plate에 옮겨서 28°C 암상태에서 24시간 배양 후 Jefferson 등(1987)의 방법을 따라 GUS 분석을 실시하였다. Cell plate에 세포괴를 옮기고 200 L의 GUS 반응용액[1 mM X-Gluc, 0.1% DMSO, 0.1% Triton X-100, 100 mM phosphate (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM K⁺ ferriyanide, 0.5 mM K⁺ ferrocyanide]을 첨가하였다. Cell plate를 28°C에서 48시간 배양한 후 *gusA* 유전자 발현에 따른 β -glucuronidase에 의한 청색 발색 반응 정도를 조사하였다. 각 처리마다 DNA를 첨가하지 않고 pulse 처리만 한 것과 DNA는 첨가하고 pulse는 주지 않은 것을 대조구로 하여 함께 비교하였다.

전기충격과 세포막의 침투성 변화

Electroporation 처리시 cuvette의 반응액에 DNA를 첨가하는 시간을 달리하므로써 전기충격 순간을 중심으로 하여 배발생 세포의 세포벽과 세포막을 통하여 DNA가 도입 가능한 시간 범위를 조사하였다. Electroporation cuvette에 세포괴와 전해질을 넣고 DNA가 첨가되지 않은 상태에서 electroporation한 후 각각 10분, 30분, 1, 2, 4, 10, 20, 40시간 후에 DNA를 첨가하였다. DNA 첨가후 cell-well plate에 옮겨서 24시간 동안 상온에서 배양하고, 처리된 세포괴들을 액체 MS배지로 3회이상 세척한 후 GUS 분석을 하였다.

Electroporation 후 세포의 성장 및 형질전환체 선발배양

Electroporation 처리 조건에 따른 배발생 세포괴의 활력 상실 여부를 조사하기 위하여 배양 실험을 하였다. 100, 200, 300, 400 V의 전압과 capacitance 수준을 10에서 1980 μF 로 조절하며 각각 전기충격 처리한 미세세포괴를 24 cell-well plate (Nunc, Denmark)에 옮겨 24시간 방치한 후 다시 2,4-D가 0.5 mg/L 함유된 MS 고체배지에 이식하여 28°C에서 4주간 배양하였다. 본 실험은 처리별로 5반복씩 시기를 달리 하여 4회 이상 실시하고, 이에 따른 캘러스의 지속적 성장 여부 및 재분화 가능성을 조사하였다.

결과 및 고찰

배발생 캘러스 유도 및 식물체 재분화

들잔디의 미숙배를 2,4-D가 1.0 mg/L 함유된 MS 고체배지에 치상하였을때 이미 보고된(Park et al., 1994; Noh et al., 1995)대로 대부분의 절편체에서 캘러스가 유도되었으며 이들중 많은 캘러스가 흰색을 띠며 흑과 같은 구조가 덩어리진 형태를 가지며 갈색의 물질이 침착되는 배발생 캘러스의 특징을 나타내었다(Figure 1A). 이들은 2,4-D가 함유된 증식배지에서도 배발생 및 재분화가 진전되기 때문에 여러 발생 단계의 배조직이 혼재된 특징을 나타내었으며, 캘러스 증식에 따라 전체적인 배발생능은 1년 이상 유지됨이 확인되었다. 재분화된 각 소식물체는 연결되어 있지 않고 쉽게 분리되어 체세포배 유래 식물임을 쉽게 확인할 수 있었다. 반면에 비배발생 캘러스는 동일한 절편체에서 유래하였더라도 팽창된 세포로 구성되어 부드럽고 표면이 거친 형태적 특성을 나타내었으며, 재분화배지에서도 모상근과 같은 뿌리만이 형성되었다(Noh et al., 1995). 배발생 캘러스와 비배발생 캘러스를 각각 3개, 11개 씩 선정하여 고체 및 액체

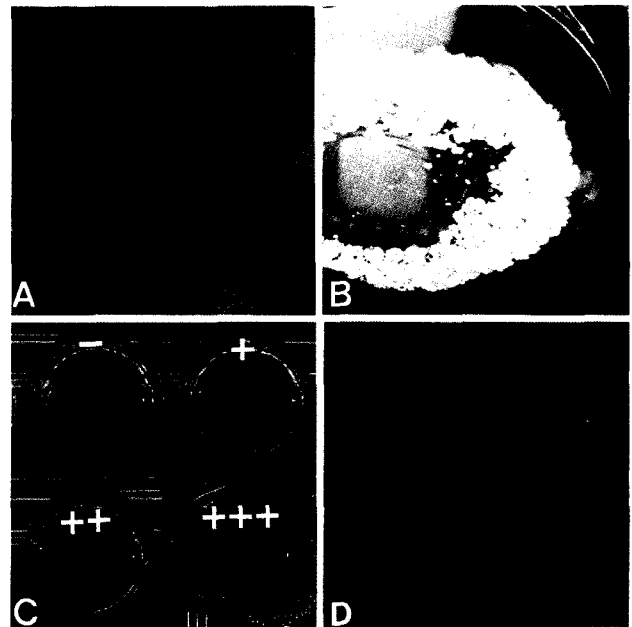


Figure 1. Embryogenic cultures of *Zoysia japonica* and tissue electroporation: (A) Embryogenic cultures of *Z. japonica* with spontaneous plantlet regeneration. (B) Embryogenic cell clumps in liquid agitation culture, applicable to tissue electroporation. (C) Transient GUS gene expression of the cultures after electroporation with GUS expression vector. The rates of the expressions are symbolized as -, +, ++, +++ to compare the efficiency of electroporation conditions. (D) Embryogenic calluses growing on selection medium containing 10 mg/L of phosphinothricin after electroporation with plasmid DNA containing bar-GUS fusion protein gene.

배지에서 증식하며 electroporation 실험에 이용하였다. 액체 진탕배양에서 배발생 캘러스는 5 mm 이상의 세포괴로 증식하는 경향을 보였기 때문에 계대배양시 2 mm 체로 통과 시켜 미세 세포괴 상태의 배양체로 유지하였다(Figure 1B).

Electroporation 처리 조건에 따른 DNA 전입 효율

Cell Porator System I (Biorad, Gaithersburg, Maryland, USA)을 사용하여 배발생 세포괴를 GUS expression 운반체 DNA와 함께 300 V의 전압과 800 μ F의 capacitance로 electroporation하면 이미 보고 한 대로 24시간 배양 후 GUS 유전자의 transient 발현에 따른 청색의 발색 반응이 나타났 다(Park et al., 1994). 세포벽을 제거하지 않은 식물의 조직 이나 또는 전처리하지 않은 조직을 대상으로 electroporation 하여 DNA를 도입한 연구 결과가 이미 보고된 바 있는데, electroporation이 원형질체가 아니더라도 재분화능이 있는 조직에 이용할 수 있음을 한국잔디에서 다시 확인할 수 있 었다(D'Halluin et al., 1992; Van Mellaet, 1992).

세포벽을 제거하거나 약화시키는 등의 전처리를 하지 않 은 배발생 세포괴를 DNA와 함께 전압(100, 200, 300, 400 V)과 capacitance 수준(10, 50, 60, 330, 800, 1180, 1980 μ F)을 달리하여 electroporation 하였을 때, 100 V 전압과 10 μ F의 낮은 capacitance 수준을 포함하여 처리 전반에 걸쳐 DNA 도입에 따른 GUS 유전자 발현이 반복적인 실험을 통하여 확인되었다(Table 1). 그러나 DNA 도입 효율은 전압과 capacitance 수준에 따른 밀접한 상관성을 보여주지 않아 다 른 여러 요인이 DNA 전입에 간여하고 있음을 짐작할 수 있었다. 그래도 200-300 V의 전압과 330-800 μ F capacitance 수준에서 전입이 양호한 경향을 보여 이후 실험에서는 300 V, 800 μ F를 기본 조건으로 하였다.

Electroporation 처리시 cuvette chamber 내의 온도(0 10, 20, 30, 40, 50°C)에 따른 DNA 전입 효율을 조사한 결과 온 도에 따른 효율의 차이는 확인되지 않았다(Table 1). 원형 질체 electroporation에서 전기 방전 처리가 0-4°C에서 이루 어지고, 방전 후에도 5-10분 저온에 방치하는 것이 DNA의 도입 효율과 세포의 생명력을 유지하는데 도움을 준다는 보고가 있는 반면(Potter et al., 1984), Bates(1988)는 상온에 서의 실험이 얼음에서 보다 CAT 표지유전자 도입에 3배의 효과가 있었다고 하였다. 본 실험의 경우는 배발생 세포로 의 DNA 도입을 위해 전기 방전 전과 후의 온도 처리가 큰 영향을 주지 않았음이 밝혀졌다. 따라서 세포에 스트레스를 주어 활성화에 영향을 미칠 수 있는 저온처리 과정이 반드시 필요하지 않은 것으로 생각되었다.

Electroporation 처리 용액 내의 DNA 농도가 6 μ g/mL 이 상 첨가된 처리에서는 GUS 유전자 발현이 확인되었다 (Table 1). 사탕수수 원형질체 electroporation 실험시 25 μ g/mL의 농도에서는 DNA 도입이 관찰되지 않았으며, 100 μ

Table 1. Effects of capacitance and voltage levels, temperature, and DNA concentrations on the efficiency of DNA transfer into electroporated - embryogenic cell clumps of *Zoysia japonica*.

Treatment ^a	Level	GUS expression rate ^b			
		Voltage	100	200	300
Capacitance (μ F)	no pulse	-	-	-	-
	10	++	+	++	+
	50	++	+	+	+
	60	++	+	++	+
	330	+	++	+	-
	800	+	+	+	+
	1180	-	++	++	+
	1600	-	+	+	-
1980	-	+	-	+	
Temperature (°C)	0			++	
	10			++	
	20			++	
	30			++	
	40			++	
	50			++	
DNA concentration (μ g/mL)	0			-	
	2			-	
	4			+	
	6			++	
	8			++	
	10			+++	
	20			+++	
	40			+++	

^aStandard electroporation conditions were used unless mentioned specifically: Voltage= 300 Volt, Capacitance = 800 μ F, temperature = 25°C, DNA concentration = 30 μ g/mL.

^bVisual rates of GUS expression: refer to Figure 1C.

g/mL에서 DNA 전입율이 높았다고 한 연구 결과(Carls and Birch, 1992)와 비교할 때, 배발생 세포를 이용하는 본 실험의 방법도 DNA 농도와 관련하여 효율이 높음을 알 수 있었다.

캘러스 형태와 DNA 도입 효율

동일 유전형질을 가지며 배발생능이 다른 캘러스 세포주, 즉 배발생 캘러스와 비배발생 캘러스 세포주들을 electroporation하고 이에따른 DNA 도입 정도를 확인하였다 (Table 2). 배발생 캘러스의 경우 세 세포주 모두 DNA 도 입이 확인되었으나 비배발생 캘러스의 경우 한 세포주를 제외하고는 유전자 도입이 확인되지 않았다. 배발생 캘러스 세포주들의 경우도 2,4-D 농도를 20 mg/L 이상 높인 MS 액체배지에서 지속적으로 배양하면 배발생능의 상실과 함 께 DNA 전입 정도가 감소하거나 없어지는데, 이때 세포주 들은 형태적으로도 배발생 캘러스의 특성을 상실하는 것이 관찰되었다. 조직 electroporation을 이용하는 다른 연구 보고 의 경우 조직을 기계적 또는 효소를 이용하여 세포벽의 침

Table 2. Effects of callus types on the delivery rates of DNA into electroporated cell clumps of *Zoysia japonica*^a

Callus type	Cell line	GUS expression ^b
Embryogenic callus	1	+++
	2	++
	3	+
Non-embryogenic callus	4	+
	5, 6, 7, 8, 9, 10	-
	11, 12, 13, 14	-
		-

^aElectroporation conditions: Voltage= 400 Volt, Capacitance = 800 μ F, temperature = 25°C, DNA concentration = 30 μ g/mL.

^bVisual rates of GUS expression: refer to Figure 1C.

투성을 높이는 것과 달리, 본 연구의 경우 특정 세포주를 이용함으로 전처리 과정 없이 세포벽을 통한 DNA의 침투가 가능한 것을 확인하였다(D'Halluin et al., 1992).

전기충격과 세포벽 및 세포막의 DNA 침투성

전기충격후 40 시간 후에 DNA를 첨가하여도 높은 효율로 전입에 따른 *gusA* 유전자 발현이 반복적으로 관찰되었다(Table 3). GUS 발현 정도는 방전 처리 전은 물론 처리 10분 후이나 20-40 시간 후에 첨가하여도 결과는 비슷하게 나타났다. 일반적으로 원형질체에 전기충격을 주면 100 μ s 보다 짧은 시간 동안 세포막에 구멍이 형성되며, 이때 DNA가 도입되는 것으로 알려져 있다(Sauders et al., 1989). 그러나 본 실험에서는 방전 처리하고 20-40시간 후에 DNA를 첨가하였을 때도 *gusA* 유전자가 transient하게 발현됨이 반복적으로 확인되었다. 전기충격에 따라 세포가 파괴되거나 세포막 밖으로 누출된 세포질에 의한 pGA1074 DNA의

Table 3. Effects of DNA adding time after pulse treatment on the rates of DNA delivery into the embryogenic cells of *Zoysia japonica*^a

Time of DNA addition	Rate of GUS expression ^c
no DNA	-
10 min	++
30 min	++
1 h	++
2 h	++
4 h	++
10 h	++
20 h	++
40 h	++

^aElectroporation conditions: Voltage= 300 Volt, Capacitance = 800 μ F, temperature = 25°C, DNA concentration = 30 μ g/mL.

^bElectroporated cell clumps were incubated for 24 h at 28°C in the dark before GUS histological assays.

^cVisual rates of GUS expression: refer to Figure 1C.

기내전사 및 발현의 가능성을 생각할 수도 있으나, pulse 처리후 세포괴들을 멸균수로 여러 차례 세척하고 DNA를 첨가하였을 때도 DNA 도입이 확인되었으며, 실험의 조건이 기내전사 및 발현이 일어날 가능성은 거의 없다고 생각된다. 또한 한국잔디의 경우 내생 β -glucuronidase 활성에 의한 GUS 발색 반응이 없었음을 수차례의 대조구 반복 실험을 통해 확인한 바 있다. 따라서 전기 충격은 세포막에 일시적인 구멍을 형성하는 것 외에 세포막의 침투성 변화를 통해 외래 DNA가 원형질체로 도입되는 것으로 판단된다. 이는 밀이나 알팔파 종자의 재습윤 과정에서도 DNA가 세포벽과 세포막을 통해 배조직 세포로 도입된다는 사실을 미루어 보아도 쉽게 추측할 수 있다(Reinhard et al., 1989; Tissa et al., 1991). 따라서 electroporation의 효과는 오랜 시간 동안 세포막의 침투성에 변화를 일으킴으로써 DNA와 같은 거대 분자의 전입이 허용되는 것이라고 판단된다.

Promoter 활성에 따른 transient GUS 유전자 발현

표지유전자로 이용된 pGA1074 플라스미드의 *gusA* 유전자는 CaMV 35S promoter에 의해 조절되는데 들잔디의 배발생 세포에서 발현 정도가 양호하였다(Figure 1, Table 1-3). 일반적으로 단자엽식물에서는 활성 정도가 낮은 것으로 밝혀진 35S promoter가 들잔디 배발생 세포에서는 GUS 유전자 발현 조절에 효과적인 것으로 나타난 것은 pGA1074의 35S promoter에 Sh1의 첫 번째 intron이 덧붙여진 유전자 구성 때문인 것으로 추측되었다(McElroy et al., 1990). 실제로 35S-*gusA* chimeric gene에 벼의 Act1 또는 Adh1의 첫째 intron을 삽입한 DNA를 옥수수에 전입시킨 결과 GUS 발현이 6에서 60배까지 증가하였다는 보고도 있다(McElroy et al., 1991).

들잔디에서 promoter별 활성을 비교하기 위한 실험에서 CaMV 35S에 비해 단자엽식물에서 유래한 Ubi1과 Act1 promoter가 GUS 유전자의 발현을 각각 7배 및 5배 촉진시키는 효과가 확인되었다(Table 4). 따라서 다른 단자엽식물에서 활성이 높은 것으로 밝혀진 Act1과 Ubi1이 들잔디에서

Table 4. Comparison of various gene promoters on transient GUS gene expression in electroporated embryogenic cell clumps of *Zoysia japonica*.

promoter	Gene source	Number of GUS unit count ^a			
		1	2	3	Average
35S	CaMV	71	93	34	66
Ubi1	Maize	456	219	562	412
Act1	Rice	190	368	459	339

^aNumber of blue spots per 300 μ L (packed cell volume) of embryogenic cell clumps after electroporation and GUS histochemical assays

도 높은 활성을 나타내는 것으로 확인되었으며 형질전환 운반체에 이용될 수 있을 것으로 생각되었다. 그러나 형질 전환체에서 gene silencing 문제를 고려할 때 어느 promoter 가 외래유전자의 발현에 유효할지는 이후 형질전환식물 수준에서의 도입된 유전자의 수와 발현 정도를 통해서 확인 될 수 있을 것으로 판단된다.

Electroporation 처리된 세포괴의 활성 및 식물체 재분화

100-400V의 전압 범위에서 capacitance 수준을 0에서 1980 μ F까지 달리하며 세포괴에 전기충격을 주고 배양 실험을 실시하였을 때 전 처리 범위에서 캘러스의 지속적인 생장과 함께 식물체 재분화가 일어났다. 이전의 보고(Park et al., 1994)에서 electroporation 처리시 DNA 전입 효율을 최대 로 하면서도 세포의 생명력을 유지할 수 있는 적정 capacitance와 전압 수준을 조사한 결과 400V의 수준에서 800 μ F의 capacitance를 주었을 때 50%의 세포괴가 생명력을 상실하여 이를 표준 조건으로 설정한 바 있다. 이 결과는 tetrazolium 환원력을 이용하여 생명력을 간접적으로 검정한 결과인데 본 실험에서는 보다 광범위한 electroporation 처리 조건하에서도 지속적인 배양이 가능함이 확인되었다 (Table 5). 이는 배발생 세포 electroporation 처리가 표지유전자의 전입에도 유효할 뿐 아니라 처리후 캘러스 생장 및 식물재분화에도 큰 장애가 되지 않는다는 사실이 확인되었다. 현재 phosphinothricin 제초제 저항성 유전자인 bar 유전자와 함께 electroporation 처리된 세포괴들이 지속적으로 생장하며 선발배양을 거쳐 식물체까지 재 분화되고 있어 본 실험 조건이 한국잔디 형질전환 기법의 하나로 이용될 수 있음을 확인하고 있다(Figure 1D).

적 요

Electroporation을 이용한 형질전환 연구에서 원형질체 대신 체세포 배발생 세포를 이용하여도 DNA가 도입될 수 있음을 이미 보고한 바 있다. 본 연구는 배발생 세포 내로 DNA를 도입하기 위한 electroporation의 최적 조건, 즉 전압과 capacitance 수준, promoter 종류, DNA 농도, 저온처리 효과 등을 구명하며, 처리에 따른 DNA의 전입 현상을 이해하고 전기충격후의 생장과 분화 정도를 조사하고자 수행되었다.

들잔디 미숙배를 2,4-D가 2 mg/L 함유된 MS배지에서 배양하여 배발생 캘러스를 유도하였고, 동일 조성의 액체배지에 진탕배양하여 조직 electroporation에 적합한 현탁배양 세포괴를 증식할 수 있었다. 100-400 V의 전압과 10-1980 μ F의 capacitance 수준에서 세포괴를 35S-*gusA* 조성을 갖는 운반체 DNA와 함께 electroporation 하였을 때, 전반적으로

Table 5. Viability test of embryogenic cell clumps of *Zoysia japonica* after electroporation at various voltage and capacitance levels^{ab}.

Capacitance (μ F)	Voltage			
	100	200	300	400
0	++++	++++	++++	++++
10	++ R	++	+ R	+
50	+ R	+ R	++ R	+ R
60	-	-	++ R	+++ R
330	-	+ R	+	+ R
800	+ R	++ R	++ R	+++ R
1180	+	++ R	++	+++ R
1600	+ R	+ R	+	+++ R
1980	++ R		++ R	+++ R

^aThe number of + signs at each treatment indicated the number of experiments out of total four showing callus growth after pulse treatment.

^bR=Plantlet regeneration occurred

DNA가 도입되었음을 표지유전자 *gusA*의 transient 발현을 통하여 확인하였으며, 200-300 V 전압과 330-800 μ F capacitance 수준이 보다 효과적인 경향을 보였다. 처리시 온도는 큰 영향을 미치지 않았으며, 6 μ g/mL 이상의 DNA 농도에서는 GUS 발현이 양호하였다. 배발생 캘러스 세포주들은 모두 DNA가 도입되었으나 비배발생 캘러스 세포주는 11개중 하나에서만 도입이 확인되었다. Electroporation시 전기충격후 20, 40시간 후에 DNA를 첨가하여도 *gusA*가 발현됨에 따라 전기충격이 세포막의 침투성을 장시간 변화시킴으로써 DNA가 전이될 수 있는 것임을 확인할 수 있었다. *GusA*의 promoter로 CaMV 35S외에 Act1과 Ubi1의 활성을 비교한 바, 35S에 비해 각각 7배, 5배의 활성을 나타내었다. Electroporation 처리후 세포괴의 배양실험에서 100-400 V의 전압과 10-1980 μ F capacitance의 전 처리 범위에서 캘러스의 지속적인 생장과 함께 식물체 재분화가 일어났다.

사시-본 논문은 1994년도 단국대학교 교내연구비와 한국과학재단 '96 핵심전문연구과제 (961-0601-003-2) 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

인용문헌

Ahn BJ, King JW, Huang FH (1988) Common bermudagrass [*Cynodon dactylon* (L.) Pers.]. In Bajaj YPS, ed, Biotechnology in Agriculture and Forestry 6: Crop II. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 458-469

Asano Y, Ugaki M (1994) Transgenic plants of *Agrostis alba* obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts. Plant Cell Reports 13: 243-246

Bates GW, Piastuch W, Riggs CD, Rabussay D (1988) Electroporation of DNA delivery into plant protoplasts. Plant Cell Tissue Organ Culture 12: 213-18

- Birch RG** (1997) Plant transformation: Problems and strategies for practical application. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 297-326
- Carls R, Birch RG** (1992) Optimization of conditions for electroporation and transient expression of foreign genes in sugarcane protoplasts. *Plant Science* **81**: 65-74
- Chan MS, Lee TM, Chang HH** (1992) Transformation of indica (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Physiol* **33**: 577-583
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH** (1992) Maize polyubiquitin genes: Structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Cell Mol Biol* **18**: 675-689
- D'Halluin K, Bonne E, Bossut M, De Beuckeleer M, Leemans J** (1992) Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell* **4**: 1495-1505
- Donson J, Gunn HV, Woolston CJ, Pinner MS, Boulton MI, Mullineaux PM, Davies JW** (1988) *Agrobacterium*-mediated infectivity of cloned Digitaria streak virus DNA. *Virology* **162**: 248-250
- Ha SB, Wu FS, Thome TK** (1992) Transgenic turf-type tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) plants regenerated from protoplasts. *Plant Cell Reports* **11**: 601-604
- Jefferson RA** (1987) Assaying chimeric genes in plant: the *GUS* gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* **5**: 397-405
- Kathleen D, Bonne E, Bossut M, Beuckeleer MD, Leemans J** (1992) Transgenic maize plants by tissue electroporation. *Plant Cell* **4**: 1495-1505
- Klein TM, Harper EC, Svab Z, Sanford JC, Fromm ME, Maliga P** (1988) Stable genetic transformation of intact Nicotiana cells by the particle bombardment process. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 8502-8505
- Knight DE, Baker PF** (1982) Calcium-dependence of catecholamine release from bovine adrenal medullary cells after exposure to intense electric fields. *J Membr Biol* **68**: 107-140
- McElroy D, Zhang D, Cao J, Wu R** (1990) Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell* **2**: 163-171
- McElroy D, Blowers A, Jenes B, Wu R** (1991) Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (Act1) 5' region for use in monocot transformation. *Mol Gen Genet* **231**: 150-160
- Neuman E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH** (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* **7**: 841-845
- Noh HY, Choi JS, Ahn BJ** (1995) Plant regeneration through somatic embryogenesis in zoysiagrasses (*Zoysia* spp.). *J Kor Soc Hort Sci* **36**: 582-587
- Odell JT, Nagy F, Chua N** (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* **313**: 170-173
- Okada K, Nagata T, Takebe I** (1986) Introduction of functional RNA into plant protoplasts by electroporation. *Plant Cell Physiol* **27**: 619-626
- Park GH, Choi JS, Yun CH, Ahn BJ** (1994) DNA delivery into embryogenic cells of zoysiagrass (*Zoysia japonica* Steud.) and rice (*Oryza sativa* L.) by electroporation. *Kor J Plant Tissue Culture* **21**: 309-314
- Potter H, Weir L, Leder P** (1984) Enhancer-dependent expression of human K immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 7161-7165
- Reinhard T, Gronenborn B, Schell J, Steinbiss HH** (1989) Uptake and transient expression of chimeric genes in seed-derived embryos. *Plant Cell* **1**: 133-139
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor
- Sauders JA, Smith CR, Kaper JM** (1989) Effects of electroporation pulse wave on the incorporation of viral RNA into tobacco protoplasts. *BioTechniques* **7**: 1124-1131
- Shillito RD, Saul MW, Paszkowski J, Muller M, Potrykus I** (1985) High efficiency direct gene transfer to plants. *Bio/Technology* **3**: 1099-1103
- Tissa S, McKersie DB, Kasha KJ, Procnunier JD** (1991) Direct DNA uptake during the imbibition of dry cells. *Plant Sci* **79**: 223-228
- van Mellaet H** (1992) Transformation made easier. *Seed World Des Plaines* **130**: 40
- Zhang W, McElroy D, Wu R** (1991) Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants. *Plant Cell* **3**: 1155-1165

(1997년 7월 29일 접수)