

# 형광 Differential Display법에 의한 파리지옥플 포충임트랩 특이발현 유전자 탐색

강권규<sup>1\*</sup>, 이근향<sup>1</sup>, 박진희<sup>2</sup>, 홍경의<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>한경대학교 원예학과, <sup>2</sup>고려대학교 생명공학연구소

## Molecular Cloning of Differentially Expressed Genes in First Trap Leaf of *Dionaea muscipula* by Fluorescent Differential Display

Kwon-Kyoo Kang<sup>\*</sup>, Keun-Hyang Lee, Jin-Heui Park<sup>1</sup>, Kyong-Ei Hong

Department of Horticulture, Hankyong National University, 67 Seokjeong-dong, Anseong city, Gyeonggi-do 456-749, Korea

<sup>1</sup>Division of Biotechnology and Genetic Engineering, College of Life and Environmental Sciences, Korea University, 5-ga, Anam-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-701, Korea

**ABSTRACT** Fluorescent differential display (FDD) is a method for identifying differentially expressed genes in eukaryotic cells. The mRNA FDD technology works by systematic amplification of the 3' terminal regions of mRNAs. This method involve the reverse transcription using anchored primers designed to bind 5' boundary of the poly A tails, followed by polymerase chain reaction (PCR) amplification with additional upstream primers of arbitrary sequences. The amplified cDNA subpopulations are separated by denaturing polyacrylamide electrophoresis. To identify the genes involved in the development of first trap leaf, we applied a FDD method using mRNAs from leaf base, first trap leaf and flower tissue, respectively. We screened several genes that expressed specifically in first trap leaf. Nucleotide sequence analysis of these genes revealed that these were protease inhibitor (PI), myo-inositol-1-phosphate synthase and lipocalin-type prostaglandin D synthase. Northern blot analysis showed that these genes were expressed specifically in first trap leaf (*in vivo* and *in vitro*). FDD could prove to be useful for simultaneous scanning of transcripts from multiple cDNA samples and faster selection of differentially expressed transcripts of interest.

**Key words:** Polyacrylamide gel electrophoresis, polymerase chain reaction (PCR), first trap leaf specific gene

### 서 론

파리지옥플 (*Dionaea muscipula* Ellis)은 *Nepenthes*목, *Droseraceae*과, *Dionaea*속에 속하는 1속 1종의 식물로 종소명은 쥐덫 (mousetrap) 또는 파리 (musca, fly)를 의미하는 것으로 알려져 있다. 자생지는 미국 사우스 캐롤라이나주 남부 지역으로 일반적으로 Venus Flytrap으로 불리고 있다. 파리지

옥플이 식충식물 중에서 가장 많은 호기심과 신비감을 주고 있는 이유는 그 형태가 매우 독특하고 활동적인 포충 트랩 형태를 가지고 있어, 마치 조개가 입을 벌리고 있다가 곤충이 그 사이로 들어오면 입을 닫아 무는 형태와 같기 때문이다 (George 1962). 곤충이 포획되면, 소화물질이 곤충의 몸체 내로 주입되고, 곤충몸체가 분해된 액체는 잎의 표면을 통해 흡수된다 (Salisbury and Ross 1985). 곤충의 외피를 구성하는 비소화성 아미노당인 키틴은 흡수되지 않고, 트랩이 열릴 때 바람이나 빗물에 의해 제거된다 (Hodick and Sievers 1989). 식물세포가 곤충의 몸체내의 물질을 어떻게 분해시켜 흡수하는

\*Corresponding author Tel 031-670-5104 Fax 031-670-5100  
E-mail kykang@hnu.hankyong.ac.kr

지를 알기 위해서는 먼저 first trap leaf 특이 발현 유전자군을 탐색하는 것이 매우 중요하다. DD-PCR은 두 개 또는 그 이상의 RNA sample로부터 역전사되어 증폭된 cDNA들을 비교하여 세포, 조직 및 기관 특이적으로 발현하는 유전자를 탐색하는 mRNA 지문법으로 알려져 있다 (Liang et al. 1992; Roland et al. 1998). DD-PCR로 얻어진 cDNA들은 mRNA의 3' 부분의 비전사지역 (Untranslated region)에 주로 나타나는 매우 짧은 (약 100~400 bp) ESTs (expressed sequence tags)들이다 (de Obeso et al. 2003; Gotoh and Oishi 2003; Halitschke et al. 2003; Kao et al. 2002; Louie et al. 2003; Tamasloukht et al. 2003). 이 방법은 가장 보편적이고, 폭넓게 사용되지만 재현성이 낮고, false positives의 확률이 매우 높아 많은 문제점을 보이고 있다 (Liang et al. 1992; Ito et al. 1994). 이를 극복하기 위하여 최근 개발된 fluorescent differential display (FDD)는 DD-PCR 방법보다 안정되고 많은 시간을 절약할 수 있는 것으로 보고되었다 (Iida et al. 2002; Ito et al. 1996; Wang and Chen 2002; Zhao et al. 2001).

본 연구에서 파리지옥풀 first trap leaf에서만 특이적으로 발현하는 유전자군을 탐색하기 위하여 기내배양 식물체와 포충 능력을 가진 3년생 실생주를 이용하여 각각의 leaf base, flower tissue 및 first leaf trap에서 발현량이 차이가 나는 유전자군을 FDD법으로 분리하여 그 특성을 조사하였다.

**재료 및 방법**

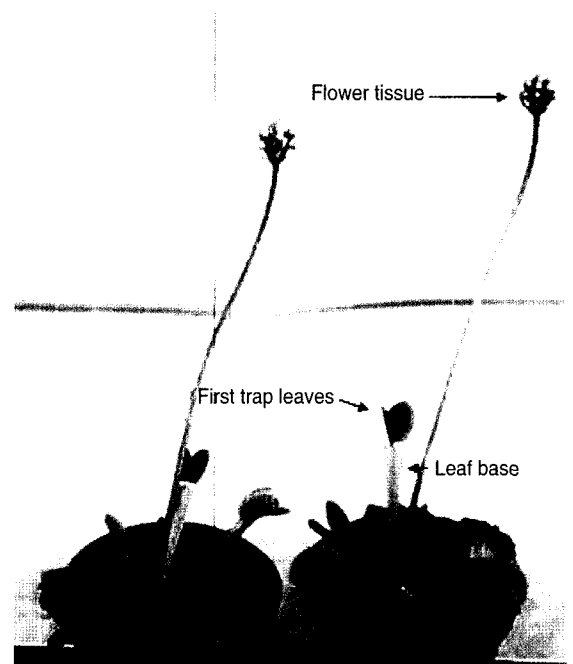
**식물재료**

파리지옥풀 (*Dionaea muscipula*)의 leaf base, flower tissue 및 first trap leaf의 sample은 first trap leaf에 곤충이 한번도 접하지 않았던 기내배양 식물체와 곤충을 접한 경험이 있는 3년생 실생주로부터 각각 분리하였다 (Figure 1). 곤충을 접했던 first trap leaf으로부터 곤충의 외피를 구성하는 비소화성 물질을 제거하기 위해 트랩부분을 떼어 멸균수에 3회 세척 후, 물기를 제거하고 액체질소로 동결하여 total RNA를 분리하였다.

**형광 differential display**

형광 differential display (FDD)는 Ito 등 (1996)이 보고한 방법을 약간 변형시켜 수행하였다. Total RNA는 ATA 방법 (Gonzalez et al. 1980)으로 분리하였으며, DNase 처리 후 LiCl로 정제하였다. cDNA는 2.5 µg의 total RNA, 역전사효소 (Super Script II, Gibico BRL), 그리고 oligo-dT primer를 사용하여 합성하였다. Second strand는 FDD-PCR의 첫 cycle은 임의로 제작된 primer들 (Table 1) 중 하나를 사용하여 PCR하였으며, 그 후의 cycle은 rhodamine x isothiocyanate (XRITC)가 표식된

primer와 임의의 primer를 사용하여 FDD-PCR를 수행하였다. PCR 산물 10 µL를 같은 양의 dye 용액과 혼합하여 90°C에서 3분간 변성시킨 후, 얼음에 즉시 넣어 냉각시켰다. 이 중 3 µL를 4.5% polyacrylamide gel에 loading하여 1600V로 2.5시간 전기영동하였다. 전기영동조 (Biocraft)로부터 떼어낸 plate를 fluorescent image analyzer (FM-Bio, TAKARA)에 고정하여



**Figure 1.** Plant materials used for fluorescent differential display (FDD). Flower tissue, first trap leaves and leaf base were detached, cut into 2 pieces with a pair of scissors and quickly floated on water, immediately frozen in the liquid nitrogen and stored at -80°C until use for RNA isolation.

**Table 1.** Sequences of upstream primers used in FDD-PCR

Primers	Sequence	Primers	Sequence
No. 1	5'GATCATAGCC3'	No. 17	5'GATCTGACTG3'
No. 2	5'CTGCTTGATG3'	No. 18	5'TCGATACAGG3'
No. 3	5'GATCGCATTG3'	No. 19	5'TACAACGAGG3'
No. 4	5'CTTGATTGCC3'	No. 20	5'GATCAAGTCC3'
No. 5	5'AGGTGACCGT3'	No. 21	5'GATCTCAGAC3'
No. 6	5'GATCATGGTC3'	No. 22	5'AGCCAGCGAA3'
No. 7	5'TTTTGGCTCC3'	No. 23	5'CAAACGTCGG3'
No. 8	5'GATCCAGTAC3'	No. 24	5'CTTTCATCCC3'
No. 9	5'GTTTTCGCAG3'	No. 25	5'CAGGCCCTTC3'
No. 10	5'GTTGCGATCC3'	No. 26	5'TGCCGAGCTG3'
No. 11	5'GATCTGACAC3'	No. 27	5'AGTCAGCCAC3'
No. 12	5'CTGATCCATG3'	No. 28	5'AATCGGGCTG3'
No. 13	5'TGGATTGGTC3'	No. 29	5'AGGGGTCTTG3'
No. 14	5'GGAACCAATC3'	No. 30	5'GGTCCCTGAC3'
No. 15	5'GATCAATCGC3'	No. 31	5'GAAACGGGTG3'
No. 16	5'TCGGTCATAG3'	No. 32	5'GTGACGTAGG3'

scanning하였다. Gel image는 software (FM-Bio analysis ver 5.0, TAKARA)로 분석하였다.

#### cDNA cloning

전기영동한 후, acrylamide gel로부터 발현양이 차이나는 DNA 단편들을 분리하기 위하여 plate와 같은 크기로 gel을 인쇄하여 부착한 후, signal pattern을 찾아 붉은 매직펜으로 표시하였다. 그리고 fluorescent image analyzer에 한번 더 scanning한 후, 차이가 나는 단편과 동일한 band를 칼로 잘라 200  $\mu$ L TE용액에 30분간 침적시켜 DNA를 분리하였다. Gel 조각은 15000 rpm으로 5분간 원심분리하여 제거한 후, DNA는 에탄올로 침전시켜 20  $\mu$ L 멸균수를 넣어 용해하였다. DNA 단편은 첫 번째 증폭에 사용하였던 primer로 증폭시켜 확인한 후, kit (Prep-A-Gene, Bio-Rad)로 정제하여 pGEM T-vector (Promega)에 cloning하였다. 형질전환에 사용된 *E. coli* 균주는 XL1-Blue로 heat shock 방법으로 형질전환시켰다. Insert의 확인은 colony PCR로 수행하였으며, 적당한 크기를 가진 plasmid는 alkaline lysis 방법으로 추출하여 사용하였다.

#### Differential fragment의 co-migration 확인

Plasmid내에 삽입된 DNA 단편이 기관 특이적으로 발현하는 것인지를 조사하기 위하여 probe를 DIG labelling kit (Boehringer Mannheim)로 표식하여 사용하였다. FDD-PCR 산물과 cloning된 DNA를 전기영동한 후, 한쪽면의 glass plate를 떼어낸 다음 gel 표면에 nylon membrane (Hybond-N, Amersham)을 얹고, 그 위에 3장의 Whatman 3 MM filter paper와 한쪽면에서 떼어낸 glass를 올려 2시간 동안 DNA를 membrane에 transfer하였다. Hybridization 및 detection은 DIG labelling kit의 설명한 방법에 따라 실시하였다.

#### Northern blot 분석

Northern blot 분석을 위한 total RNA는 ATA방법 (Gonzalez et al. 1980)으로 분리하였다. 20  $\mu$ L의 total RNA를 1% formaldehyde/agarose gel에서 전기영동한 후, nylon membrane (Hybond-N, Amersham)에 transfer시켰다. RNA가 전이된 membrane을 filter paper 위에 올려놓고 UV transilluminator로 2분간 cross-linking시켰다. Pre-hybridization은 60 $\times$ SSC, 5% dextran sulfate, 0.1% SDS 용액을 넣고 60 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 수행하였으며, 선발된 plasmid로부터 PCR(SP6, T7 primer)에 의해 증폭된 DNA를  $^{32}$ P로 labelling한 probe와 overnight으로 hybridization시켰다. Membrane의 세척은 2 $\times$ SSC, 0.1% SDS 용액으로 실온에서 5분씩 2회, 0.5 $\times$ SSC, 0.1% SDS 용액으로 65 $^{\circ}$ C에서 15분간, 0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS 용액으로 65 $^{\circ}$ C에서 15분간 세척한 후, X-ray film (Kodak)에 감광시켜 band를 확인

하였다.

#### 염기서열 분석

Plasmid DNA를 정제한 후, automatic DNA sequencer (ABI373)를 이용하여 dideoxynucleotide chain termination 방법 (ABI PRISM Dye Terminator)으로 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 분석하고, 아미노산 및 다중염기배열의 비교는 GeneWorks system을 이용하여 수행하였다.

## 결과 및 고찰

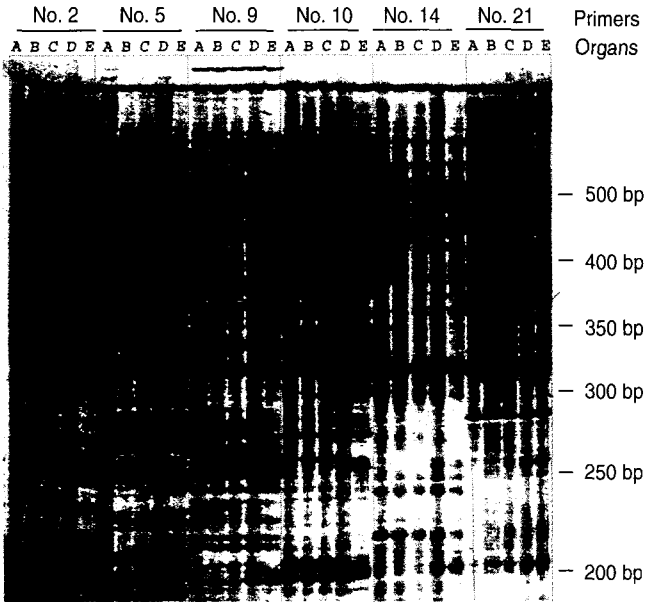
#### FDD-PCR의 조건

파리지옥풀 first leave trap에서만 발현하는 유전자군을 분리하기 위한 FDD-PCR 조건을 정하기 위하여 같은 cDNA sample을 이용하여 dNTP 농도, template cDNA 량, extension 시간 등을 조사하였다. 그 결과 50  $\mu$ M dNTP, 1  $\mu$ L cDNA template 그리고 1분의 extension 조건하에서 가장 안정적인 signal pattern을 얻을 수 있었다. 따라서 이 FDD-PCR 조건하에서 실험을 수행하였다.

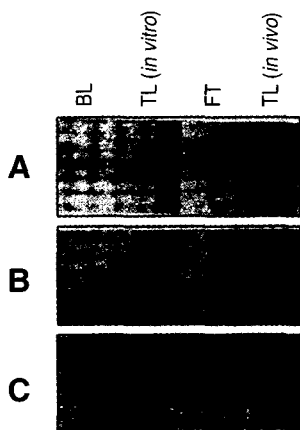
#### FDD-PCR에 의한 first trap leaf 특이적 발현 유전자의 분리

파리지옥풀 leaf base, flower tissue 및 first trap leaf로부터 분리한 RNA와 XRITC으로 표식된 oligo-dT primer와 32개의 임의로 제작한 primer를 조합하여 FDD를 실시하여 signal를 검출한 결과 기관 특이적으로 존재하는 cDNA fragment들이 증폭되었다 (Figure 2). 이들 중 leaf base 특이적인 band는 6개였으며, first trap leaf 특이적인 band는 17개로 나타났다. DD-PCR의 단점 중 재현성 문제를 실험하기 위하여 1차 FDD-PCR을 수행하여 선발된 기관특이 band들을 사용하여 2차 FDD-PCR를 수행하였다. 그 결과 first trap leaf에서만 강하게 발현되는 type (Figure 3A, 3C), leaf base에서는 약하게 발현되고, flower tissue에는 발현되지 않으나, first trap leaf에서는 강하게 발현되는 type (Figure 3B), first trap leaf에 double band로 강하게 발현되는 type (Figure 3C)으로 나누어졌다. 몇몇 연구자들은 FDD-PCR방법의 문제점으로 PCR의 low-stringency와 false positive의 선발 등을 지적하고 있다 (Liang et al. 1992; Ito et al. 1996). 이를 극복하기 위하여 first trap leaf 특이적인 band를 template로 사용하여 같은 조건하에서 재증폭시킨 결과 선발된 17개의 band 중 2개는 증폭되지 않았다 (Figure 4). 따라서 증폭된 DNA fragment들을 *E. coli*에 형질전환시켜 cloning하였다. 또한 cloning된 특이적인 단편이 원래 FDD-PCR에 나타났던 산물과 단편의 크기가 같은지를 알아보기

위해 co-migration test를 실시하여 본 결과 선발된 크기의 단편과 동일함을 확인하고 염기서열을 조사하였다. Ito 등 (1996)



**Figure 2.** Screening of first trap leaf specific transcripts by the FDD. After cDNA synthesis with GT15VA anchored primer (5'-GTTTTTTTTTTTTTTTTT(A,C, or G)A-3'), the FDD-PCR was performed in combination with 32 arbitrary primers (Table 1). Organs were leaf base from plants grown in *in vitro* (A), leaf base from plants grown in *in vivo* (B), flower tissue (C), first trap leaf from plants grown in *in vitro* (D) and first trap leaves from plants grown in *in vivo* (E). Then, 10  $\mu$ L of PCR products were mixed with an equal volume of dye solution and denatured. Each four microliters of each samples were subjected on a 4.5% denaturing polyacrylamide gel and electrophoresed at 1500 V for 3 hr. Signals were detected by the FM-BIO image analyzer at the 16-times reading mode. After 32 trials of FDD-PCR, 17 bands were selected for further analysis. Arrowheads represent specific bands in first trap leaf.



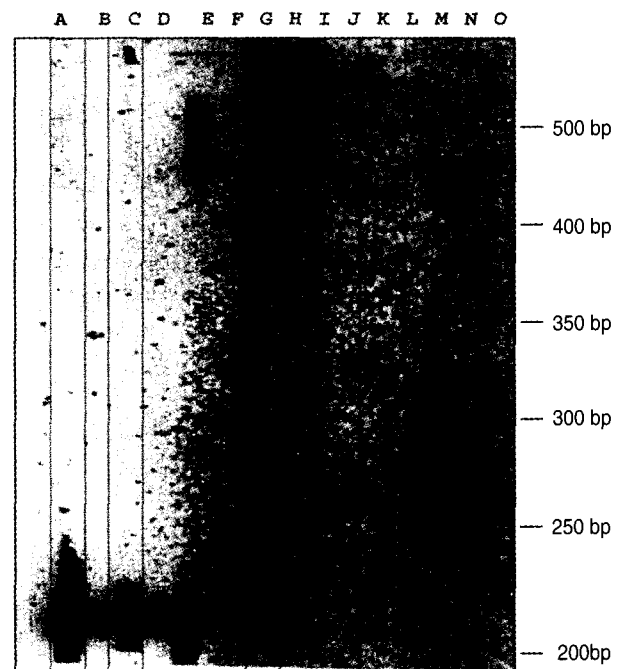
**Figure 3.** Expression patterns of differentially expressed genes in different organs of *D. muscipula*. After 32 FDD-PCR, 17 bands expressed differentially were selected for cloning. BL; leaf base, TL (*in vitro*); first trap leaf from plants grown in *in vitro*, FT; flower tissue, TL (*in vivo*); first trap leaf from plants grown in *in vivo*. (A); TL5, (B); TL9, (C); TL13

은 이론적으로 잎 조직에서 발현되는 유전자가 15,000~20,000정도로 추정했을 때, FDD-PCR 한 lane에서 증폭되는 band가 100개를 계산하여 150~200개 FDD-PCR를 수행하여야 100% cover 할 수 있다고 하였다. 본 연구에서 first trap leaf 특이적으로 발현하는 유전자 분리를 위해 사용된 primer 수는 32개로 FDD-PCR의 이론에 따라 계산 4.7~6.3%을 cover 되었다고 할 수 있다.

**First trap leaf 특이발현 유전자군의 특성**

**Northern blot 분석**

FDD-PCR 분석에 의해 cloning된 15개의 cDNA fragment를 대상으로 leaf base (LB), first trap leaf 중에서 기내배양 식물체 유래 (TL, *in vitro*)와 3년생 실생주 유래 (TL, *in vivo*)로부터 분리한 total RNA를 사용하여 Northern blot 분석을 실시하였다. 그 결과 TL5와 TL7은 모든 기관에서 발현되나 3년생 실생주의 first trap leaf에서 가장 강하게 발현되었으며 (Figure 5A), TL4, TL8, TL13 및 TL15은 first trap leaf 특이적으로 발현되었으며, (Figure 5B), TL1, TL3, TL9, TL11 및 TL12는 기내배양 식물체 (TL, *in vitro*)와 3년생 실생주 (TL, *in vivo*)의 first trap leaf 특이적으로 발현되었다 (Figure 5C). TL2, TL6, TL10



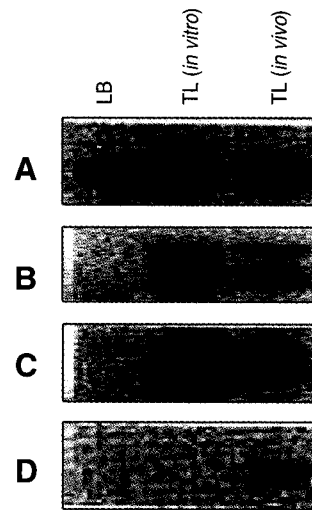
**Figure 4.** Reamplification of DNA fragments screened by first FDD using GT15VA anchored primer (5'-GTTTTTTTTTTTTTTTTT(A,C, or G)A-3') and 32 arbitrary primers (Table 1). fifteen bands were selected for cloning. DNA fragments were eluted from excised gel slices, and reamplified under same condition used first FDD. Lane A; GT15VA+No. 1, Lane B; GT15VA+No. 3, Lane C; GT15VA+No. 5, Lane D~G; GT15VA+No. 9, Lane H; GT15VA+No. 12, Lane I~K; GT15VA+No. 17, Lane L; GT15VA+No. 23, Lane M~O; GT15VA+No. 30

및 *TL14*는 기내배양 식물체 유래 first trap leaf에서는 발현되지 않는 반면, 3년생 실생주의 first trap leaf에서만 특이적으로 발현양상을 보였다 (Figure 5D). First trap leaf에서만 강한 signal를 보이는 DNA fragment는 5' RACE법으로 full length cDNA를 cloning하여 유전자의 구조분석 및 세포 내에서 어떤 기능을 하는지를 조사한다면 식물세포가 곤충의 몸체내의 물질을 어떻게 분해시켜 흡수하는지에 대한 기초자료가 될 것으로 생각된다. 이와 같이 FDD pattern과 Northern blot 결과가 상이하게 나타난 이유는 pseudo-transcripts와 FDD-PCR의 증폭산물 양 차이로부터 일어날 가능성을 생각할 수 있다. 많은 연구자들이 이와 유사한 실험에서도 FDD pattern과 Northern blot 결과가 상이함을 보였다 (Iida et al. 2002; Wang and Chen 2002; Zhao et al. 2001).

**분리한 유전자들의 특성**

분리한 15개의 DNA의 염기서열을 조사하여 GenBank내에 EMBL 및 dbEST data bases와 비교한 결과 6개의 유전자는 기존에 알려진 유전자와 유사성을 보였으며, 나머지 9개 clone들은 전혀 알려지지 않았거나 중요 match부분이 없었다 (Table 2). *TL2*의 부분 염기서열은 3' 말단부분의 270 bp의 단편으로 membrane bound O-acyl transferase 유전자와 높은 상동성을 보였으며, 아미노산배열에서 *Arabidopsis*, 벼의 membrane bound O-acyl transferase 유전자와의 상동성은 각각 86%, 80%로 나타났다. Membrane bound O-acyl transferase 유전자는 세포골격을 구성하는 단백질로 알려져 있다 (Micchelli et al. 2002). *T5*의 3' 말단부분의 220 bp의 부분 염기배열은 allatotropin에 관련된 유전자와 상동성이 매우 높았다. 아미노산 배열에서도 *Spodoptera frugiperda*의 allatotropin

유전자와 90%의 상동성을 보였다. Allatotropin은 곤충에서 methyl farnesoate의 전구체 물질로 hormone 생합성에 관여하는 것으로 알려져있다. 또한 allatotropin은 *Lacnobia oleracea*의 유충이 생산하는 protease에 의해 분해되는 것으로 보고되고있다 (Rachinsky and Feldlaufer 2000; Audsley et al. 2002). 따라서 *TL5* 유전자는 식충식물인 파리지옥풀의 first trap leaf에 걸려든 곤충들로부터 양분흡수에 중요한 역할을 하는 단백질로 사료된다. *TL8* DNA의 3' 말단부분의 310 bp는 lipocalin-type postaglandin D synthase와 매우 유사하였으며,



**Figure 5.** RNA gel blot analysis of *TL5* (A), *TL8* (B), *TL12* (C) and *TL14* (D). Total RNAs were extracted from leaf base (LB), first trap leaf [TL (*in vitro*)] and [TL (*in vivo*)], respectively for total RNA extraction by ATA method. Thirty five microgram of RNA per lane was subjected to hybridization with <sup>32</sup>P-labeled DNA clones.

**Table 2.** Sequence analysis of differentially expressed genes by FDD-PCR

cDNA clone	Size (bp)	Expression tissue*	GenBank/EMBL and dbEST match (% identity/overlap)
TL 1	240	TL	No match
TL 2	270	TL#	No significant match
TL 3	350	TL	<i>Arabidopsis thaliana</i> membrane bound O-acyl transferase (MBOAT) family (Atg12640) 5' (80-86%107nt)
TL 4	400	TL	No significant match
TL 5	220	LB, TL	<i>Spodoptera frugiperda</i> mRNA for allatotropin (AJ488180) 3' (90%155nt)
TL 6	450	TL#	No match
TL 7	500	LB, TL	<i>Enterobacter gergoviae</i> GTPase (bipA) gene, glutamine synthetase (glnA) and nitrogen regulatory protein (ntrB) genes, (AF072440) 5' (85% /147nt)
TL 8	310	TL	<i>Danio rerio</i> gene for lipocalin-type prostaglandin D synthase-like protein, (AB071602) 5' (99%115nt)
TL 9	454	TL	No significant match
TL 10	326	TL#	No significant match
TL 11	275	TL	<i>Arabidopsis thaliana</i> myo-inositol-1-phosphate synthase (At4g39800), 5' (82%220nt)
TL 12	210	TL	No significant match
TL 13	350	TL	No significant match
TL 14	240	TL#	<i>Rattus norvegicus</i> serine (or cysteine) protease inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin, antitrypsin), (NM133617) 5' (90%/124nt)
TL 15	470	TL	No match

\* Expression tissue: TL; first trap leaf (*in vitro* and *in vivo*), TL#; first trap leaf (*in vivo* only), LB; leaf base

아직 기능 및 작용에 대하여 전혀 알려진바 없다. *T11* DNA의 3' 말단부분의 275 bp는 inositol 생합성경로에서 glucose-6-phosphate (G-6-P)를 myo-inositol-1-phosphate (Insol-1-P)로 바꾸는 myo-inositol-1-phosphate synthase 유전자와 높은 상동성을 보였다. Insol-1-P는 phospholipid을 형성하는 데 필요하며, plasma membrane phosphoinositide의 기질로 이용된다 (Chun et al. 2003; Facchini et al. 2003; Torres et al. 2003). Insol-1-P synthase의 발현은 duckweed에서 ABA에 의해 증가된다고 하였다 (Abu-Abied and Holland 1994). 이 유전자가 파리지옥풀 first trap leaf에서 특이적으로 발현하고 있는 것으로 미루어볼 때 phosphoinositide이 first trap leaf에서 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. *TL14* DNA의 240 bp 염기서열은 *Rattus* 및 tobacco로부터 알려져 있는 serine (or cysteine) protease inhibitor (PI)와 매우 유사하였다.

이와 같이 FDD에 의해 분리된 DNA들을 기존에 알려진 유전자와의 상동성으로 비교 검토하였다. 식물세포가 어떻게 곤충세포를 분해시켜 양분을 흡수하는지를 이해하기 위해서는 지금까지 기능이 밝혀지지 않고 있는 9개 유전자에 대한 연구와 first trap leaf에서의 역할 등에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 적 요

파리지옥풀 first trap leaf에만 발현하는 유전자군을 탐색하기 위하여 기내배양 식물체와 포충능력을 가진 3년생 실생주를 이용하여 각각의 포충잎 (leaf base), 꽃조직 (flower tissue) 및 포충잎트랩 (first trap leaf)으로부터 분리한 RNA로 Fluorescent differential display (FDD)를 실시하였다. First trap leaf 특이발현 유전자 15개를 screening하여 염기서열을 분석하였다. 분리된 DNA들은 protease inhibitor (PI), myo-inositol-1-phosphate synthase 및 lipocalin-type prostaglandin D synthase 유전자들과 매우 유사하였다. 또한 Northern blot 분석 결과, 이들 유전자들이 first trap leaf에 특이적으로 발현하고 있는 것을 확인하였다. FDD방법은 세포, 조직 및 기관에 특이적으로 발현하고 있는 유전자들을 선별하는데 매우 유용한 수단으로 사용될 수 있다.

## 인용문헌

- Abu-Abied M, Holland D (1994) Two newly isolated genes from citrus exhibit a different pattern of diurnal expression and light response. *Plant Mol Biol* 26: 165-173
- Audsley N, Weaver RJ, Edwards JP (2002) Degradation of *Manduca sexta* allatostatin and allatotropin by proteases associated with the foregut of *Lacanobia oleracea* larvae. *Peptides* 23: 2015-2023
- Chun JA, Jin UH, Lee JW, Yi YB, Hyung NI, Kang MH, Pyee JH, Suh MC, Kang CW, Seo HY, Lee SW, Chung CH (2003) Isolation and characterization of a myo-inositol 1-phosphate synthase cDNA from developing sesame (*Sesamum indicum* L.) seeds: functional and differential expression, and salt-induced transcription during germination. *Planta* 216: 874-80
- de Obeso M, Caparros-Ruiz D, Vignols F, Puigdomenech P, Rigau J (2003) Characterisation of maize peroxidases having differential patterns of mRNA accumulation in relation to lignifying tissues. *Gene* 309: 23-33
- Facchini PJ, De Luca V (1995) Phloem-specific expression of tyrosine/dopa decarboxylase genes and the biosynthesis of isoquinoline alkaloids in *Opium poppy*. *Plant Cell* 7: 1811-1821
- George J (1962) Plants that eat insects. *Readers Digest* 2: 221-226
- Gonzalez RG, Haxo RS, Schleich T (1980) Mechanism of action of polymeric aurintricarboxylic acid, a potent inhibitor of protein-nucleic acid interactions. *Biochemistry* 19: 4299-4303
- Gotoh K, Oishi M (2003) Screening of gene-associated polymorphisms by use of in-gel competitive reassociation and EST (cDNA) array hybridization. *Genome Res* 13: 492-495
- Halitschke R, Gase K, Hui D, Schmidt DD, Baldwin IT (2003) Molecular interactions between the specialist herbivore *manduca sexta* (*Lepidoptera, Sphingidae*) and its natural host *Nicotiana attenuata*. VI. Microarray analysis reveals that most herbivore-specific transcriptional changes are mediated by fatty acid-amino acid conjugates. *Plant Physiol* 131: 1894-1902
- Hodick D, Sievers A (1989) On the mechanism of trap closure of Venus flytrap (*Dionaea muscipula* Ellis) *Planta* 179: 32-42
- Iida R, Yasuda T, Tsubota E, Takatsuka H, Masuyama M, Matsuki T, Kishi K (2002) Five age-dependently expressed genes in mouse brain revealed by the fluorescence differential display-PCR technique. *Exp Gerontol* 37: 1121-1126
- Ito T, Kito K, Adati N, Mitsui Y, Hagiwara H, Sakaki Y (1994) Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. *FEBS Lett* 351: 231-236
- Ito T, Sakaki Y (1996) Fluorescent differential display method for high speed scanning of tissue- or cell-specific transcripts. In *methods in molecular genetics, human molecular genetics* edited by Adolph KW pp. 229-245. Academic Press, New York
- Kao YY, Harding SA, Tsai CJ (2002) Differential expression of two distinct phenylalanine ammonia-lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. *Plant Physiol* 130: 796-807
- Liang R, Chan V, Chan TK, Wong T, Todd D (1992) Detection of immunoglobulin gene rearrangement in B-cell lymphomas by polymerase chain reaction gene amplification. *Hematol Oncol* 10: 149-154
- Louie M, Kondor N, DeWitt JG (2003) Gene expression in cadmium-tolerant *Datura innoxia*: detection and characterization of cDNAs

- induced in response to  $Cd^{2+}$ . *Plant Mol Biol* 52: 81-89
- Micchelli CA, The I, Selva E, Mogila V, Perrimon N (2002) Rasp, a putative transmembrane acyltransferase, is required for hedgehog signaling. *Development* 129: 843-851
- Rachinsky A, Feldlaufer MF (2000) Responsiveness of honey bee (*Apis mellifera* L.) corpora allata to allatoregulatory peptides from four insect species. *J Insect Physiol* 46: 41-46
- Roland J, Roland GN, Suzanne MC, John WB (1998) Identification and cloning of differentially expressed genes by long-distance differential display. *Anal Biochem* 259: 235-244
- Salisbury FB, Ross CW (1985) *Plant Physiology*. Wadsworth Publ. Co. Belmont, CA. p 540
- Tamasloukht M, Sejalon-Delmas N, Kluever A, Jauneau A, Roux C, Becard G, Franken P (2003) Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiol* 131: 1468-1478
- Torres GA, Lelandais-Briere C, Besin E, Jubier MF, Roche O, Mazubert C, Corre-Menguy F, Hartmann C (2003) Characterization of the expression of *Phaseolus vulgaris* OCT1, a dehydration-regulated gene that encodes a new type of phloem transporter. *Plant Mol Biol* 51: 341-349
- Wang J, Chen S (2002) Screening and identification of gastric adenocarcinoma metastasis-related genes using cDNA microarray coupled to FDD-PCR. *J Cancer Res Clin Oncol* 128: 547-553
- Zhao GR, Liu JY, Du XM (2001) Molecular cloning and characterization of cotton cDNAs expressed in developing fiber cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 65: 2789-2793

(접수일자 2003년 8월 2일, 수리일자 2003년 10월 9일)