

## Agrobacterium을 이용하여 형질전환시킨 배추에서 T-DNA Right Border 인접염기서열 분석

안홍일 · 신공식 · 우희중 · 이기중 · 김효성 · 박용환 · 서석철 · 조현석 · 권순중

### Analysis of right border flanking sequence in transgenic chinese cabbage harboring integrated T-DNA

Hong-Il Ahn · Kong-Sik Shin · Hee-Jong Woo · Ki-Jong Lee · Hyo-Sung Kim · Yong-Hwan Park · Seok-Cheol Suh · Hyun-Suk Cho · Soon-Jong Kweon

Received: 15 November 2010 / Accepted: 15 December 2010  
© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** We developed 14 transgenic lines of Chinese cabbage (*Brassica rapa*) harboring the T-DNA border sequences and CryIac1 transgene of the binary vector 416 using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated DNA transfer. Six lines had single copy *cryIac1* gene and four of them contained no vector backbone DNA. Of the left border (LB) flanking sequences six nucleotides were deleted in transgenic lines 416-2 and 416-3, eleven nucleotides in line 416-9, and 65 nucleotides including the whole LB sequences in line 416-17, respectively. And we defined 499 bp of genomic DNA (gDNA) of transformed Chinese cabbage, and blast results showed 96% homology with *Brassica oleracea* sequences. PCR with specific primer for the right border (RB) flanking sequence revealed 834 bp of PCR product sequence, and it was consisted of 3' end of *cryIac1*, non-terminal region and 52 bp of Chinese cabbage genomic DNA near RB. RB sequences were not found and the 58 nucleotides including 21 bp of nos-terminator 3' end were deleted. Also, there were deletion of 10 bp of the known genomic sequences and insertion of 65 bp undefined genomic sequences of Chinese cabbage in the integration site. These results demonstrate that the integration of T-DNA can be accompanied by unusual deletions and insertions both in transgenic and genomic sequences.

#### 서론

배추과 (Brassicaceae family)의 많은 식물은 채소, 양념, 사료 및 유지 작물 등으로 사용되고 있다 (Beilstein et al. 2006). 특히 배추는 김치의 주재료로 우리나라에서 가장 많이 사용되고 있으며, 배추의 품종육종 기술과 소재는 세계 최고수준을 유지하고 있다. 해충에 의한 많은 피해가 발생하는 현실에서 경제적 손실과 살충제 사용을 줄이고자 해충저항성 단백질 유전자 형질전환 배추를 제작하였다.

*Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 형질전환방법은 보편적으로 많이 이용되는 방법으로 도입하고자 하는 유전자를 Ti plasmid내에 Left border (LB)와 Right border (RB) 사이에 삽입한 후 식물체의 핵 내로 운반시켜 *VirD1*과 *VirD2* 단백질을 이용하여 유전자를 전이 시키는 방법이다 (Sheng and Citovsky 1996; Zupan et al. 2000). 그러나 최근의 연구에서는 도입유전자를 운반하는 과정 중에 LB나 RB 인접부위의 운반체 backbone 유전자 일부 또는 전체 유전자가 함께 식물체의 gDNA에 도입되는 사례를 보여주고 있다 (Kumar and Fladung 2002; Kim et al. 2003; Huang et al. 2004; Kuraya et al. 2004; Kim and Lee 2007). 이러한 경우 식물체의 genomic DNA (gDNA)에 운반체의 backbone 염기서열이 삽입되는 비율은 20~50% 정도이나 높게는 75%까지도 나타난다 (Kononov et al. 1997; De Buck et al. 2000; Kuraya et al. 2004). Lim 등 (2008)의 실험에서도 형질전환에서 backbone DNA가 삽입된 경우가 전이유전자가 1 사본 (copy)인 경우는 33%, 2 사본인 경우는 100% 도입되었던 것으로 나타났다.

T-DNA 삽입부위의 LB와 RB 인접염기서열의 경우 예

H.-I. Ahn · K.-S. Shin · H.-J. Woo · K.-J. Lee · H.-S. Kim · Y.-H. Park · S.-C. Suh · H.-S. Cho · S.-J. Kweon (✉)  
국립농업과학원 생물안전성과  
(Biosafety Division, National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-707, Korea)  
e-mail: kwonsj@korea.kr, ahi0101@korea.kr

상되는 절단부위는 3번째와 4번째 염기 사이지만 대부분의 경우 border의 상당부분이 결실되거나 전체 border의 염기서열 외에 backbone의 일부분도 절단되어 결실되는 경우도 있다 (Kumar and Fladung 2002; Kim et al. 2003; Kuraya et al. 2004; Stahl et al. 2002). Lim 등 (2008)의 실험에서도 36~78 bp 결실이 확인되었고 특히 이번 실험에 사용된 416-3 개체의 경우 예상 절단위치보다 6 bp 외부에 위치한 부위가 절단되었다.

Lim 등 (2008)의 실험에서 수행하였던 인접염기서열 분석 실험에서는 LB 인접서열 분석결과를 얻었으나, RB 인접염기서열은 1, 2차 PCR 결과를 얻지 못하여 염기서열을 결정하지 못하였다. 따라서 이번 실험에서는 기존에 밝혀진 LB의 인접염기서열을 이용하여 bioinformatics 방법으로 RB의 인접염기서열을 결정하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

배추 (*Brassica rapa*) 종자는 동부한농(주)의 순계 계통인 노원을 이용하였고, 형질전환체를 육성하기 위해 사용된 전이유전자 재조합 운반체 416은 pCAMBIA3301을 backbone으로 하여 두 개의 35S 프로모터와 염기서열을 전이유전자가 발현되는 식물체에 적합하도록 변형시킨 해충저항성 유전자인 *cryIaC1* 유전자, 35S 프로모터와 사과로부터 분리된 MdMADS2 (*Malus domestica* MADS box gene) 개화 조절유전자 (Sung et al. 1999)를 역방향으로 삽입하여 제조하였다. 선발마커는 bar 유전자를 사용하였으며 Southern blot을 통하여 전이유전자가 1 사본 삽입된 개체를 선발하여 인접서열 분석에 사용하였다 (Fig. 1A).

### 삽입유전자의 LB인접서열 분석

T-DNA의 삽입이 확인된 형질전환 식물체로부터 gDNA를 추출하였고 Genome walker (Invitrogen co.) 방법으로 인접서열을 확인하기 위하여 제조사가 제공한 방법들을 이용해 T-DNA가 들어간 배추의 gDNA 인접부위를 증폭하였다. 분리된 gDNA를 *StuI*, *EcoRV*, *PvuII*, *DraI*, 등의 제한효소를 이용하여 37°C에서 2시간 처리한 후, gDNA의 절편들을 agarose gel에서 전기영동 하여 확인하였다. 절단된 gDNA에 25µM adaptor (5'-GTA ATA CGA CTCA CTAT AGG GCA CGC GTG GTC GAC GGC CCG GGC TGGT-3', 3'-H<sub>2</sub>N-CCC GAC CA-PO<sub>4</sub>-5')를 첨가하여 16°C에서 8시간 이상 ligation을 실시하였다. 효소활성을 억제하기 위해서 70°C에서 5분간 변성 처리한 뒤에 이를 template DNA로 bar-F1 primer (5'-CTT CAG CCT GCC GGT ACC GCC CCG

TCC GGT CCT GCC CG-3')와 AP1 primer (5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3')를 이용하여 1차 PCR을 수행하였고, 이를 희석하여 bar-F2 primer (5'-GGG TTC CTA TAG GGT TTC GCT CAT GTG TTG AGC-3')와 AP2 primer (5'-ACT ATA GGG CAC GCG TGG T-3')를 이용하여 2차 PCR을 수행하였다. 1차와 2차 PCR 조건은 94°C에서 3분간 변성시킨 후, 94°C에서 25초, 72°C에서 3분의 단계로 7회 실시하고, 94°C에서 25초, 67°C에서 3분의 단계로 32회 반복하여 실시하고, 67°C에서 5분간 최종 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에 전기영동 한 후, Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen)를 사용하여 정제한 후, pGEM-T easy vector (Promega)에 삽입한 다음 HIT DH5-α *E. coli* competent cell (UBI)에 transfer 하여 양방향의 염기서열을 확인하였다. 확인된 염기서열은 NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 분석을 이용하여 유사성 분석을 수행하였다.

형질전환 배추에서 운반체 backbone 염기서열의 삽입 여부를 확인하기 위해서 T-DNA의 안쪽의 bar primer (5'-CTT CAG CCT GCC GGT ACC GCC-3')와 T-DNA의 LB바깥쪽의 backbone에 특이적인 LB out primer (5'-CCG CCG TGA TCA CAG GCA GC-3')를 이용하여 PCR을 수행하였다 (Fig. 1A, B). PCR 조건은 94°C에서 3분간 변성시킨 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 30초의 단계로 30회 반복하여 실시하고, 72°C에서 5분간 최종 증폭하였다. 증폭된 PCR산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 분석하였다.

### 삽입유전자의 RB인접서열 분석

RB 인접서열 분석에 사용한 primer는 NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)에서 Genome Survey Sequences Database의 기존의 보고된 LB 인접서열의 유사성을 분석하여 수행한 결과 찾은 염기서열을 바탕으로 제작하였다. 배추의 gDNA와 유사할 것으로 판단되는 BOGFH65TF1 (5'-gac aag aga aag tat gct agg g-3'), BOGFH65F2 (5'-cac aat aat taa gga ggt cca atg-3'), BOGFH65F3 (5'-ccg tgg agg gtc caa tgg tc-3') primer와 RB 인접서열에 가까운 삽입유전자의 *cryIaC1* 부분의 BeCryFow (5'-gtg cca acg cat tca ctt c-3'), BeCryRev (5'-gta ctc agc ctc aag agt ggc-3') primer 그리고 RB 부분 유전자의 안정적 삽입을 확인하기 위하여 T-DNA의 backbone 염기서열인 P12 (5'-cga tcg ggg aaa ttc gag ctg g-3'), P13 (5'-tta cat gct taa cgt aat tca aca g-3'), P14 (5'-gta tta aat gta taa ttg cgg gac tc-3') primer를 선정하였다. 이들 primer를 이용하여 형질전환 배추의 gDNA에 대하여 PCR을 수행하였다. 수행조건은 94°C에서 3분간 변성시킨 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분의 단계로 35회 반복하여 실시하고, 72°C에서 10분간 최종

증폭하였다. 증폭된 PCR산물은 1% agarose gel에 전기영동하여 분석하였다. 확인된 PCR products는 pGEM-T easy vector (Promega)에 클로닝하여 염기서열을 결정하였고, 염기서열의 유사성은 NCBI BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

### 결과 및 고찰

#### 형질전환 배추 선발

전이유전자 재조합 운반체 416를 *Agrobacterium*을 이용하여 배추에 형질전환시켜 14개체의 형질전환 배추를 얻었다. 그 중 전이유전자가 1, 2 또는 3 사본 이상 도입된 개체는 각각 6, 4, 4개체이었다. 이들 중에서 운반체 backbone 염기서열이 포함되지 않은 경우는 4개체이었으며 2 사본 이상의 개체는 모든 개체에서 backbone 염기서열이 확인되었다 (Fig. 1B). 옥수수의 경우에서도 2 사본 이상의 유전자가 도입된 경우가 1 사본 도입된 경우보다 backbone 염기서열이 많이 포함되었다 (Kuraya et al. 2004).

형질전환 배추의 LB 인접서열은 운반체의 backbone 염기서열이 삽입되지 않은 416-2, -3, -9, -17 등 4 개체를 사용하여 분석하였다.

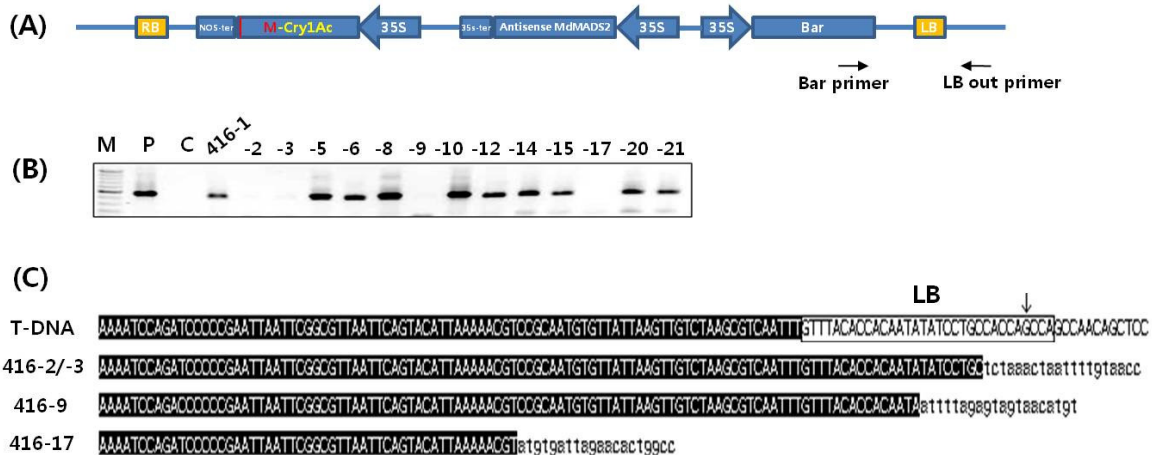
#### 삽입유전자의 LB인접서열 분석

Vector의 backbone 염기서열이 삽입되지 않은 4개의 형질

전환 배추의 LB 인접서열을 분석한 결과, 절단부위로 알려진 3번째와 4번째 염기서열에서의 결합 (junction)은 관찰되지 않았다 (Fig. 1C). 형질전환 벼와 (Kim et al. 2003), 형질전환 보리 (Stahl et al. 2002)에서도 이번 연구결과와 유사하게 절단부위의 결합이 하나도 관찰되지 않은 바 있다. 형질전환 포플러의 경우는 20개체의 형질전환 식물체 중 4개체에서만 절단부위에서의 결합이 확인되었고 (Kumar and Fladung 2002), 형질전환 옥수수는 23개체 중에서는 절단부위의 결합이 한 개체에서만 확인 되었다 (Kuraya et al. 2004).

416운반체를 이용한 형질전환 배추에 4개체의 T-DNA 삽입부위 LB 인접서열 분석 결과, 416-2과 416-3은 23 bp의 LB 부위가 남아있는 동일한 염기서열을 보였고, 416-9 경우 15 bp가 남았으며, 416-17 경우 LB를 포함하여 안쪽의 염기서열의 최대 36 bp의 결실이 확인되었다. 이러한 결과는 기존의 보고된 단자엽 작물인 옥수수에서도 총 23개의T-DNA 삽입부위의 LB 인접서열 분석 결과에서도 12개는 LB의 부위가 남아있었으나, 11개의 경우 최대 78 bp결실이 확인되었고 (Kuraya et al. 2004), 벼의 경우 61개의 LB인접부위에서 28개만이 LB의 부위가 남아있었으나, 나머지의 경우 T-DNA의 180 bp까지 결실이 보고되는 경향을 나타냈다 (Kim et al. 2003).

형질전환 배추 14개체 중에서 *CryIAc1* 유전자가 1 사본 도입된 개체는 6개체로 확인되었다. LB 인접서열을 genome walking PCR 방법을 통하여 분석하였으며 14개의 형질전환 배추 중에서 10개는 운반체의 backbone 염기서열을 지나는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 도입 운반체의 LB 지점에서 제대로 종결이 이루어지지 않아서



**Fig. 1** (A) Diagram of T-DNA 416 binary vector and primer position for the indicated vector backbone insertion. (B) PCR amplification of junction regions between T-DNA and vector backbone. PCR product was amplified from transgenic Chinese cabbage plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of the binary vector 416. P: binary vector, C: non-transformed wild type plants, The numbers above each lane represent individual transgenic Chinese cabbage plant. M: 1kb plus 100 bp DNA ladder. (C) Sequences at junction regions between the T-DNA LB end and Chinese cabbage genomic DNA. T-DNA sequences are presented in capital letters. LB sequence is presented in white box and insertion parts of T-DNA are presented in black boxes. The 20 bp plant sequences are given in lower case. Plant number of transformants is shown at the left ends. Arrows indicate the LB cleavage site

운반체의 backbone 염기서열이 운반된 것으로 보여진다. 운반체의 backbone 염기서열이 도입되지 않은 4개체의 형질전환 배추에 LB 인접서열을 분석한 결과, 모든 LB 부위는 절단부위가 보존되지 않았고, 1개체는 절단부위에서 36 bp까지 결실이 확인되었다 (Lim et al. 2008).

Lim 등 (2008)의 실험에서 총 46개의 형질전환 배추에서 인접부위의 염기서열을 분석한 결과, 9개체를 제외한 35개체에서 운반체 backbone 염기서열이 삽입된 것으로 나타났다. T-DNA의 바깥쪽과 안쪽의 primer를 이용하여 운반체 backbone 염기서열을 확인하기 위한 PCR을 수행하였고, 그 결과 416 운반체를 이용한 PCR에서는 DNA의 증폭이 이루어졌으나 non transgenic 배추에서는 DNA의 증폭이 이루어지지 않았다. 형질전환 배추 14개체 중에서 4개체는 DNA의 증폭이 이루어지지 않아서 운반체의 backbone 염기서열이 존재하지 않음을 확인하였다 (Fig. 1 B).

LB 인접서열 비교 분석 결과

LB 인접서열을 분석한 결과 T-DNA의 염기서열을 제외한 배추의 gDNA 염기서열 499 bp를 확인할 수 있었다. 이를 NCBI BLAST 웹사이트에서 분석한 결과 기존의 Nucleotide collection databases에서는 유사한 염기서열을 확인할 수 없었다. 이는 전이유전자가 아직 서열정보가 알려지지 않은 배추 계통에 삽입되었기 때문으로 생각된다. 따라서 기존의 databases 중에서 Genome Survey Sequence (GSS) 항목을 이용하여 blast를 실행한 결과 *Brassica rapa*의 염

기서열은 아니지만 같은 속의 *B. oleracea* (BOGF65TF: GeneBank No: BH492821.1)의 염기서열과 96% 상동성을 가진 유전자를 확인할 수 있었다 (Fig. 2, 3). 이와 비슷한 배추 기능유전체 연구에서도 배추의 gDNA는 겨자 (*B. carinata*), 유채 (*B. napus*), 갯 (*B. juncea*), 꽃양배추 (*B. oleracea*), 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*), 벼 (*Oryza sativa*) 등에서 다양한 유전자와 높은 상동성을 보였다 (Yu et al. 2010).

Blast 결과 상당한 상동성을 보인 *B. oleracea* BOGF65TF clone의 염기서열은 모두 553 bp로 확인되었으며 LB 인접서열과 중첩된 부분 449 bp와 gap 부분을 제외한 5' 말단 쪽의 염기서열은 99 bp가 확인되었다. 이 부분의 염기서열이 배추의 gDNA와 유사할 것으로 판단하고 3개의 flanking sequence 용 primer BOGFH65TF1, 2, 3를 제작하여 삽입유전자의 염기서열을 이용하여 제작한 BeCryFow primer와 함께 PCR를 실시하였다 (Fig. 4, Table 1).

삽입유전자의 RB인접서열 분석

RB border 인접서열 분석용 primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 BOGFH65TF1/BeCryFow primer의 경우 PCR 증폭이 이루어지지 않았으나, BOGFH65TF2/BeCryFow primer의 경우 예상 size보다 다소 큰 840 bp의 band가 형성 되는 것을 확인하였고, BOGFH65TF3/BeCryFow primer의 경우는 BOGFH65TF2/BeCryFow primer 보다 다소 흐린 band를 나타내는 것으로 보아 primer의 서열이 다소 차이를 보이

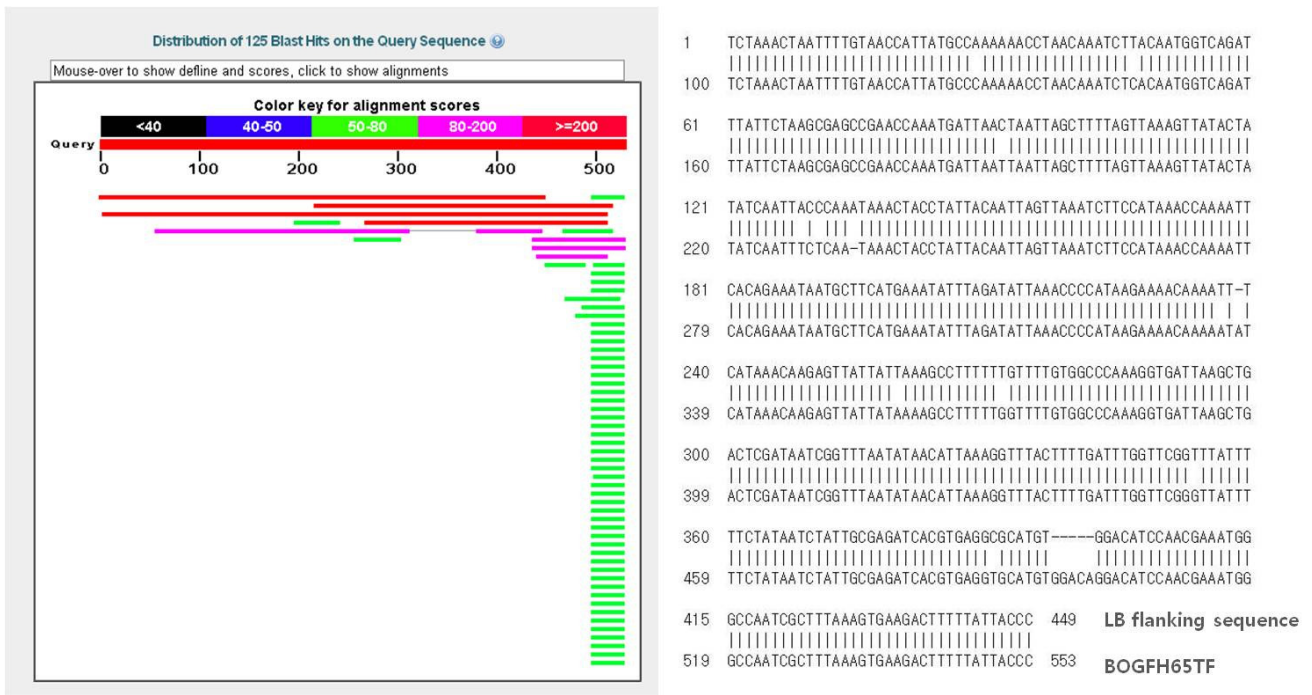
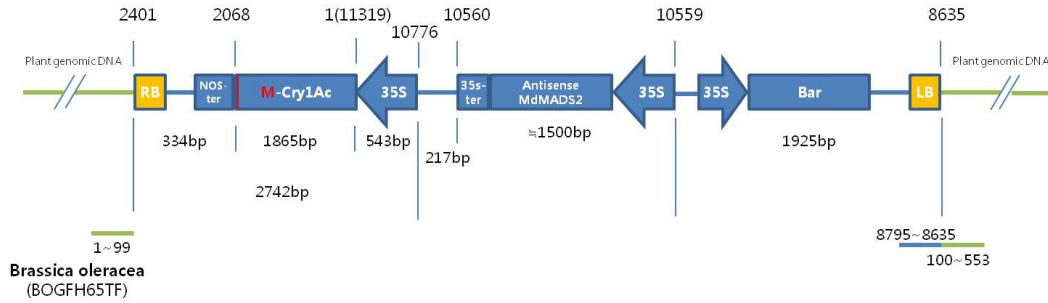


Fig. 2 NCBI Blast result of LB flanking sequence and alignment with *B. oleracea* (BOGF65TF)



**Fig. 3** Diagram of the transferred DNA insertion site in transgenic Chinese cabbage genomic DNA. The numbers above and below the diagram indicate nucleotide numbers of pCAMBIA 3301 binary vector sequences and BOGFH65TF clone sequences of *B. oleracea*, respectively. RB: right border, Nos-ter: nopaline synthase terminator gene, M-Cry1Ac: modified synthetic insect-resistance gene. 35S: *Cauliflower mosaic virus* promoter, 35s-ter: *Cauliflower mosaic virus* terminator, MdMADS2: *Malus domestica* MADS box gene, Bar: phosphinothricin acetyltransferase gene, LB: left border

**Table 1** Primer sequences for detection of T-DNA backbone and flanking sequence

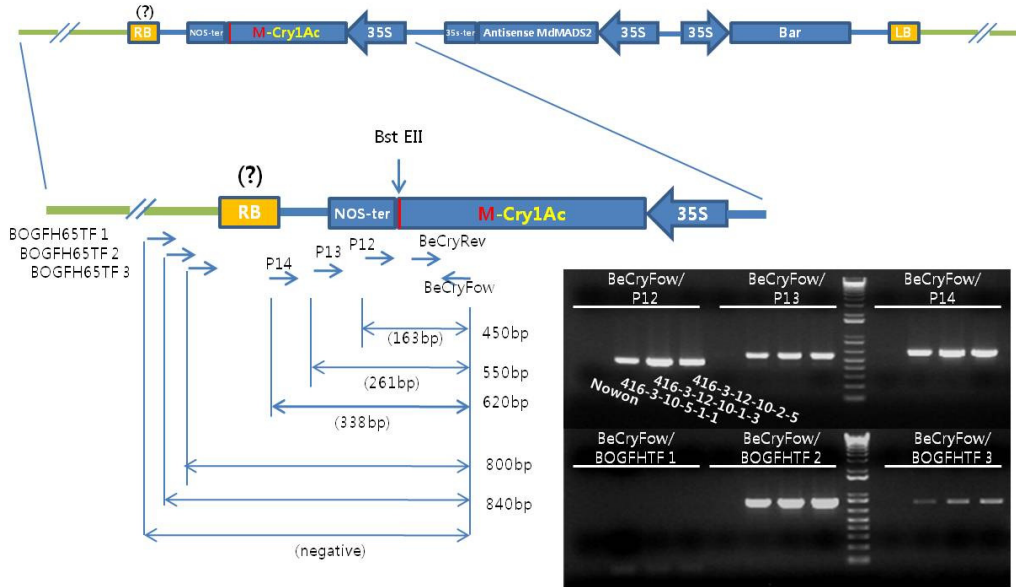
primer	sequence	bp
T-DNA backbone	bar 5'-ctt cag cct gcc ggt acc gcc-3'	
	LB out 5'-ccg ccg tga tca cag gca gc-3'	
genome walker adaptor	5'-gta ata cga ctca ctat agg gca cgc gtg gtc gac gcc ccg gcc tgg t-3', 3'-H2N-ccc gac ca-PO4-5'	
LB flanking sequence	bar-F1 5'-ctt cag cct gcc ggt acc gcc ccg tcc ggt cct gcc cg-3'	
	AP1 5'-gta ata cga ctc act ata ggg c-3'	
	bar-F2 5'-ggg ttc cta tag ggt ttc gct cat gtg ttg agc-3'	
	AP2 5'-act ata ggg cac gcg tgg t-3'	
RB flanking sequence	BOGFH65F1 5' gac aag aga aag tat gct agg g 3'	22
	BOGFH65F2 5' cac aat aat taa gga ggt cca atg 3'	24
	BOGFH65F3 5' ccg tgg agg gtc caa tgg tc 3'	20
	BeCryFow 5' gtg cca acg cat tca ctt ctt c 3'	22
	BeCryRev 5' gta ctc agc ctc aag agt ggc 3'	21
	P12 5' cga tcg ggg aaa ttc gag ctg g 3'	22
	P13 5' tta cat gct taa cgt aat tca aca g 3'	25
	P14 5' gta tta aat gta taa ttg cgg gac tc 3'	26

는 것으로 추측되었다. 또한 RB border 인접부위의 T-DNA 염기서열의 안정적 삽입이 이루어져 있는가를 판단하기 위한 P12, 13, 14/BeCryFow primer의 PCR 결과도 형질전환용 416 vector의 염기서열과 비교한 결과와 예상 크기를 약 310 bp 정도 초과하였다 (Fig. 4). 이것은 vector에 *cryIac1* 유전자와 nos polyA terminator 유전자 사이에 의도하지 않은 염기서열이 들어 있다는 것을 의미한다. 따라서 이를 확인하고자 결과 중 가장 큰 사이즈를 보이는 BOGFH65TF/BeCryFow primer의 PCR 결과물을 cloning 하여 염기서열을 결정하였다. 확인 결과 모두 834 bp의 염기서열을 확인하였고, vector의 구성 요소 중의 *cryIac1*의 3' 말단 부위와 nos-terminator 부위와 52 bp의 배추 gDNA 인접서열을 확인할 수 있었다 (Fig. 5, 6). 그러나 RB 염기서열은 확인할 수 없었으며 nos terminator 3' 말단

의 21개의 염기를 포함하여 모두 58개의 염기서열이 결실된 것을 확인하였다.

T-DNA가 삽입된 인접서열에서는 흔히 운반체의 backbone 염기서열이 끼어들어가는 경우가 발생하지만 (Kumar and Fladung 2002; Kim et al. 2003; Huang et al. 2004; Kuraya et al. 2004; Kim and Lee 2007) 이번 연구에서는 그와는 조금 다른 경우가 확인되었다. T-DNA가 삽입된 배추의 유전자와 유사한 BOGFH65TF 유전자를 근거로 확인한 결과 전이유전자가 삽입된 gDNA부위에서 약 10 bp의 염기서열이 결실된 것을 확인했으며 특히 이 부분에 65 bp 정도의 다른 유전자가 삽입되어 있음을 확인하였다. 이 염기서열을 NCBI BLAST의 GSS 항목으로 검색한 결과 KBrS 008P09F (GeneBank No: DU831759.1)의 염기서열과 동일한 유전자로 확인되었다 (Fig. 5, 6). BOGFH65TF와 KBrS



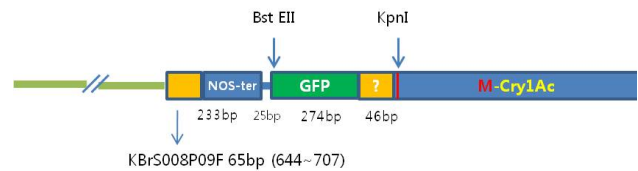


**Fig. 4** Diagram of primer positions for the RB flanking sequence on T-DNA. Numbers in parentheses are the expected size of the PCR products. The photograph below the diagram shows PCR products for the designed primers



**Fig. 5** The flanking sequences of the RB region and comparison with the defined gene. The undefined sequence are in lower case

008P09F 유전자의 나머지 염기서열을 비교한 결과 인접 서열이거나 어떠한 유사점은 찾을 수 없었다. 따라서 연속된 염기서열이 아니고 다른 배추의 유전자 일부가 T-DNA 유전자가 삽입될 당시에 함께 삽입된 것으로 추정된다. 그러나 아직 배추의 genomic DNA의 전체 염기서



**Fig. 6** Diagram of RB flanking sequence region based on the defined results. Nos-ter: nopaline synthase terminator gene, GFP: green fluorescent protein gene, M-Cry1Ac: modified synthetic insect-resistance gene

열이 확정되지 않은 상태이므로 이 유전자의 배추 염색체 내 위치와 기능은 확인 할 수가 없었다. 또한 T-DNA에 의도되지 않은 삽입유전자의 경우 형질전환용 416 vector 제작 시에 cloning vector와 같은 중간 vector의 backbone 염기서열 일부가 제한효소로 처리할 때 절단되지 않고 이루어진 것으로 염기서열 분석결과 확인되었다. cryIac1 유전자의 말단 부분의 제한효소 자리를 생성할 때 Bst EII 제한효소 자리가 Kpn I으로 제작되면서 중간 vector의 Bst EII 제한효소 자리까지 절단되었다. 그 결과 GFP (Green Fluorescence Protein)의 일부 염기서열과 확인되지 않은 46 bp의 염기서열이 포함되었다. 그러나 잘려 들어간 GFP의 단백질은 발현되지 않는 것으로 확인되었다.

**적 요**

Agrobacterium tumefaciens와 운반체 416을 이용하여 cryIac1 유전자가 형질전환된 배추 14개체를 선발하였다. Southern blot을 통하여 분석한 결과 1 사본 유전자가 도입된 개체

가 6개이었으며 backbone 염기서열이 포함되지 않은 경우는 4개체이었다. LB 인접서열 분석 결과, 416-2과 416-3은 23 bp의 LB 부위가 남아있는 동일한 염기서열을 보였고, 416-9 경우 15 bp가 남았으며, 416-17 경우 LB를 포함하여 안쪽의 염기서열의 최대 36 bp의 결실이 확인되었다. T-DNA의 염기서열을 제외한 배추 gDNA의 499 bp의 LB 인접염기서열은 *B. oleracea*의 염기서열과 96% 상동성을 가진 유전자로 확인되었다. RB border 인접서열 분석용 primer를 제작하여 PCR을 수행한 결과 모두 834 bp의 염기서열을 확인하였고, vector의 구성 요소 중 *cryIacI*의 3' 말단 부위, nos-terminator 부위와 52 bp 및 배추 gDNA RB 인접염기서열로 확인되었다. RB 염기서열은 확인할 수 없었으며 nos-terminator 3' 말단의 21개의 염기를 포함하여 모두 58개의 염기서열이 결실된 것을 확인하였다.

형질전환식물체를 제작할 경우 발생하는 전이유전자나 식물의 염색체에 염기 결실은 매우 다양한 형태로 나타난다. 이번 실험의 경우, 전이유전자가 삽입된 위치에서 약 10 bp의 배추의 gDNA 염기가 결실된 것이나 삽입된 전이유전자의 RB 말단부분이 결실된 것은 예상할 수 있는 결과였지만, 특히 전이유전자의 말단인 nos-terminator 3' 끝에 65 bp 정도의 배추의 다른 유전자가 삽입되어 있다는 것을 확인하였고 이는 기대하지 않았던 결과였다. 삽입된 다른 배추유전자의 절편은 앞으로 더 많은 연구를 통하여 위치와 기능확인이 필요할 것이다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 (과제번호200902 FHT020815020)과 교육과학기술부 작물유전체사업단 (과제번호CG2141 to S.C. Suh)에 의해 지원되었습니다.

## 인용문헌

- Beilstein MA, Al-Shehbaz IA, Kellogg EA (2006) Brassicaceae phylogeny and trichome evolution. *Am J Bot* 93:607-619
- De Buck S, De Wilde C, Van Montagu M, Depicker A (2000) T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol Breed* 6:459-468
- Huang S, Gilbertson LA, Adams TH, Malloy KP, Reisenbigler EK, Birr DH, Snyder MW, Zang Q, Luethy MH (2004) Generation of marker-free transgenic maize by regular two-border *Agrobacterium* transformation vectors. *Transgenic Res* 13:451-461
- Kim JH, Lee S (2007) Analysis of junction between T-DNA and plant genome in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *J of plant biology* 50:455-460
- Kim SR, Lee J, Jun SH, Park S, Kang HG, Kwon S, Ahn GH (2003) Transgene structures in T-DNA-inserted rice plants. *Plant Mol Biol* 52:761-773
- Kononov ME, Bassuner B, Gelvin SB (1997) Integration of T-DNA vector 'backbone' sequence into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. *Plant J* 11:945-957
- Kumar S, Fladung M (2002) Transgene integration in aspen: Structures of integration sites and mechanism of T-DNA integration. *Plant J* 31:543-551
- Kuraya Y, Ohta S, Fukuda M, Hiei Y, Murai N, Hamada K, Ueki J, Imaseki H, Komari T (2004) Suppression of transfer of non-T-DNA 'vector backbone' sequences by multiple left border repeats in vectors for transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Breed* 14:309-320
- Lim SH, SH Park, JH Kim, NY Kim, SY Won, SM Lee, KS Shin, HJ Woo, DH Kim, HS Cho. (2008) Analysis of junction between T-DNA and plant genome in insect resistance GM chinese cabbage. *J Plant Biotechnol* 35(2):101-108
- Jae-Gyeong Yu, Ji-Hyun Park, Young-Doo Park (2010) Current status of *Brassica rapa* functional genome research in Korea *J Plant Biotechnol* 37:166-173
- Sheng J, Citovsky V (1996) *Agrobacterium*-plant cell DNA transport; have virulence proteins, will travel. *Plant Cell* 8:1699-1710
- Stahl R, Horvath H, van Fleet J, Voetz M, von Wettstein D, Wolf N (2002) T-DNA integration into the barley genome from single and double cassette vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:2146-2151
- Sung SK, GH Yu, GH An. (1999) Characterization of *MdMADS2*, a member of the *SQUAMOSA* subfamily of genes, in apple *Plant Physiology* 120:969-978
- Yu Jae-Gyeong, Ji-Hyun Park, Young-Doo Park (2010) Current status of *Brassica rapa* functional genome research in Korea *J Plant Biotechnol* 37:166-173
- Zupan J, Muth TR, Draper J, Zambryski P (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J* 23:11-23