

식물세포의 형질전환을 위한 새로운 표지유전자로서 Mouse Adenosine Deaminase Gene의 이용

양 덕 춘
(한 국 인 삼 연 초 연구 원)

서 론

과거의 전통적인 육종방법으로는 target 유전자를 직접식물세포의 핵내로 삽입 시키기가 무척 어려웠으나 최근 식물 유전공학분야의 급속한 발전으로 인하여 식물 형질전환용 운반체가 개발됨으로써 외부 유용유전자를 쉽게 식물체내로 도입, 발현 시켜 새로운 식물체를 육성할 수 있는 방법이 많이 개발되었다(4, 7, 11, 36). 또한 식물세포내로 도입할 외부 유용유전자들도 많이 개발되고 있으며 현재 주로 식물체내에 적용하여 실용화 시킬 수 있는 유전자들은 제초제 저항성 유전자(17, 25), 내병성 유전자(6, 14), 내충성 유전자(22, 57), 중금속 내성유전자(3, 26), 바이러스 내성유전자(1, 45), 저온 및 고온 장해 내성유전자등 내재해성 유전자들(56, 61)과 특히 물질합성및 분해에 관여한 물질대사 관련 유전자(39, 51)등이 개발되고 있다. 이렇듯 식물체에 도입할 수 있는 많은 유전자들과 식물세포의 형질전환용 운반체등의 개발로 외부 유전자의 식물 세포체내로 삽입이 가능하게 되었지만(4, 7, 35, 38), 기술적인 면에서 형질전환된 세포와 형질전환되지 않은 세포의 조기에 구별하는 방법이 매우 중요한 관건으로 대두되었다. 여기에 등장한 것이 바로 우성으로 작용하는 항생제 내성 유전자등과 제초제저항성 유전자등을 선발 표지유전자로 사용하는것이며, 또한 눈으로 바로 확인할 수 있도록 visible 표지유전자를 사용하는것이다. Visible 표지유전자로써는 β -glucuronidase gene을 사용하는것이 가장 많으며(40, 41) 그외에도 luciferase gene과 anthocyanine 합성유전자의 사용가능을 보고하고 있다(52, 5, 47). 그러나 이런 visible 표지유전자는 형

질 전환체의 선발이후에 확인할 수 있는 방법이지 직접 선발하는데는 실제적으로 사용하기가 어렵다. 이런 연유로 visible 표지유전자와 항생제 내성 표지유전자를 동시에 삽입시켜 일차적으로 항생제 배지에서 선발하고 이어 추가로 visible 표지유전자에 의하여 재확인하는 방법등이 이용되고 있다(16). Table 1 은 형질 전환식물에 따라서는 사용가능한 표지유전자들의 selective agent와 작용기작등에 대한 내용을 요약한 표이다.

이중에서도 현재까지 주로 사용된 항생제 표지 유전자의 현황을 보면 가장 많이 사용된 것이 bacteria Tn5 에서 유래된 neomycin phosphotransferase II gene 이며, 이 유전자는 식물 세포에 전이되면 kanamycin, neomycin 그리고 G-418 등의 항생제에 내성을 나타내게 된다(7, 25, 32). 또한 streptomycin 항생제에 대해서 저항성을 나타내는 streptomycin phosphotransferase gene이 사용되고 있으며(42), chloramphenicol에 저항성을 나타내는 chloramphenicol acetyltransferase gene(33), hygromycin에 저항성인 hygromycin phosphotransferase gene(58, 60), gentamycin에 대해서 저항성인 gentamycin acetyltransferase gene(30), streptomycin과 spectinomycin에 저항성인 aminoglycoside-3-adenyltransferase gene(55), methotrexate에 저항성인 dihydrofolate reductase gene(20), fungicide인 blasticidin S에 저항성인 blasticidin S deaminase gene(43), blomycin 및 phleomycin resistance gene(34, 53) 등이 개발되어 식물 세포의 형질 전환체 선발에 사용되고 있다(Table 1). 그러나 최근 미생물 유래 표지유전자의 사용에 대해서 극히 일부이긴 하지만 사용에 대한 재검토와 혹은 형질 전환 후 negative selection 방법에 의해서 다시 항생제 표지유전자의 제거에 대한 논의들이 조심스럽게 제기되고 있다(9, 23, 28). 또한 항생제 표지유전자는 사용하고자 하는 식물에 따라서는 내성을 지니고 있는 식물체가 있어 항생제 표지유전자의 사용에 대해 제한 요인이 되고 있으며(59), 한번 표지유전자에 의하여 형질 전환된 식물체는 계속적인 식물체의 육종을 위해서 유용유전자를 또다시 삽입해야 할 경우 기사용된 표지유전자는 다시 사용할 수 없기 때문에 새로운 표지 유전자의 계속적인 개발이 요구되고 있다.

Adenosine deaminase(E.C.3.5.4.4, ADA)는 purine 대사에 관여한 효소로서 mammalian organism의 어느 부위에나 존재하지만 세포의 성장에는 직접 관여 하지

Table 1. Selectable markers for plant gene transfer.

Selective agent(s) Mechanism	Mode of action	Selectable marker(s)
Blasticidin-S	?	Blasticidin S deaminase(bsr) D
Bleomycin, Phleomycin	Breaks DNA	Bleomycin binding protein(ble) S
Chloramphenicol	I/Translation	Chloramphenicol acetyltransferase D
Geneticin/G418	I/Translation	Neomycin 3'-O-phosphotransferase D
Gentamicin	I/Translation	Aminoglycoside 3-N-acetyltransferases D
Hygromycin B	I/Translation	Hygromycin 3'-O-phosphotransferase D
Kanamycin	I/Translation	Neomycin 3'-O-phosphotransferase D
Lincomycin	I/Translation	Chloroplast rRNA MTR/C
Paromomycin	I/Translation	Neomycin 3'-O-phosphotransferase D
Puromycin	I/Translation	Puromycin N-acetyltransferase(PAC) D
Spectinomycin	I/Translation	Aminoglycoside adenyllyltransferase D
Streptomycin	I/Translation	Streptomycin 3'-O-phosphotransferase D
Tabtoxinine-B-lactam		Tabtoxin acetyltransferase(ur) D
Bialophos, Glufosinate,	I/GS	Glutamine synthetase(GS) MTP/O
Phosphinothricin		Phosphinothricin acetyltransferase D
Bromacil	I/PSII	Quinone binding protein(Q _b ; psba) MTP/C
Bromoxynil	I/PSII	Bromoxynil nitrilase(bxn) D
2,4-D	Auxin analog	2,4-D monooxygenase(lfda; DPAM) D
Diuron	I/PSII	Quinone binding protein(Q _b ; psba) MTP/C
Glyphosate	I/EPSPS	5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase(EPSPS; aroA) MTP/C
Haloxypop	I/ACCCase	Acetyl-CoA carboxylase(ACCCase; Acc) MTP/O
Imidazolinones	I/ALS	Acetolactate synthase(ALS; AHAS) MTP
Isonicotinate hydrazide	I/GD	Glycine decarboxylase(GD) MTP/M
Pyrimidylxybenzoates	I/ALS	Acetolactate synthase(ALS; AHAS) MTP/C
Sethoxydim	I/ACCCase	Acetyl-CoA carboxylase(ACCCase; Acc) MTP/O
Sulfonamides	I/DHPS	Dihydropteroate synthase(DHPS; sulI) MTP/C
Sulfonylureas	I/ALS	Acetolactate synthase(ALS; AHAS; SUR) MTP/C
Tabtoxin,	I/GS	Glutamine synthetase(GS) MTP
Triazines	I/PSII	Glutathione S-transferase(GST) D
Triazolopyrimidines	I/ALS	Acetolactate synthase(ALS; AHAS) MTP/C
Lysine/threonine	I/AK	Aspartate kinase(AK; Ask) MTP/O
Methotrexate	I/DHFR	Dihydrofolate reductase(dhfr; DHFR) MTP/O
Methyltryptophan	I/AS	Anthranilate synthase(AS) MTP/O
Cadmium	I/metalloenzymes	Metallothionein II(MTII) S

Abbreviations : I, Inhibitor; PSII, Photosystem II; MTP, Mutant target protein; MTR, Mutant target RNA; O, Overproduction; D, Detoxification; S, Sequestration; C/M, Requires chloroplast(C) or mitochondrial(M) localization.

않는 것으로 알려져 있으며(24, 62, 63), 동물세포에서 ADA의 부족은 면역결핍증 (immunodeficiency)을 유발하는것으로 보고 되어있다(44, 54). 동물세포내에서 ADA는 adenosine을 inosine으로 변환시키며 adenosine 대신 toxic adenosine analogues을 첨가하면 ADA가 부족할 경우 adenosine kinase의 작용으로 adenosine monophosphate(AMP)가 되며(24), 계속 ADP 및 ATP를 걸쳐 DNA polymerase 및 cAMP와 RNA 합성과정에서 cytotoxicity을 갖게된다(Fig.1).

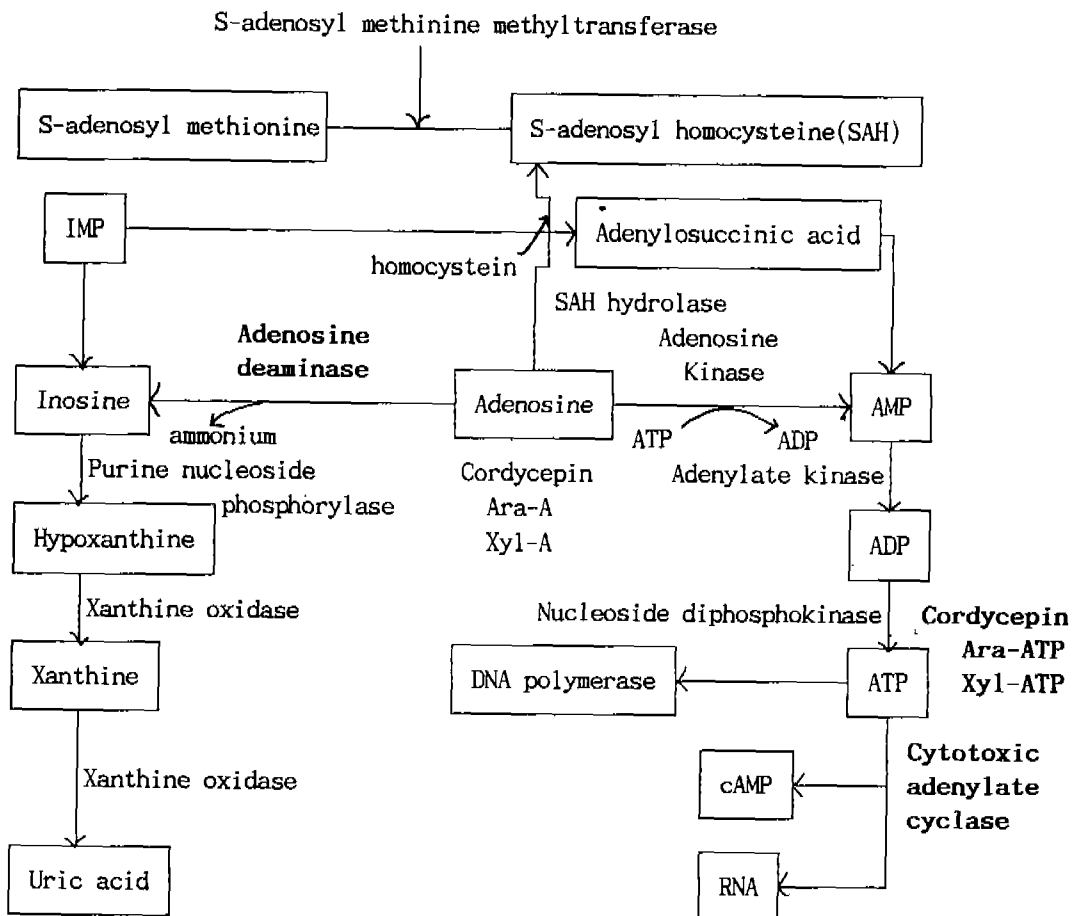


Fig. 1. Pathway of Purine Metabolism.

본실험은 식물세포의 형질전환시 사용되는 표지유전자로써 기존에 사용되어온 항생제 내성유전자 대신 동물유전자중에서 표지유전자로써 2'-deoxyadenosine, xylofuranosyl adenine(Xyl-A), 9-β-D-arabinofuranosyl adenine(Ara-A), cordycepin등을 substrate로 사용할 수 있는 adenosine deaminase gene을 표지유전자로 사용하고, 우선 (1)murine adenosine deaminase cDNA을 식물형질전환용 binary vector에 재조합하고, (2)재조합된 vector에 의하여 연초조직을 형질전환시켜 발현여부를 확인한 다음, (3)형질전환체의 각종특성을 조사하고, (4)형질전환체의 발현이 확인된 다음 연초조직의 cytotoxic adenosine analogues에 대한 감수성을 조사하고, (5)정상조직이 치사하는 adenosine analogues의 농도에서 다시 연초조직의 형질전환을 시도하고 이에 관련되는 새로운 형질전환 방법을 확립하며, (6)ADA gene에 의하여 형질전환된 식물체의 쉽고 빠르며 값싼 assay 방법을 개발하고자 수행하였던 바, 얻어진 결과를 보고하는 바 이다.

본 론

1. 식물세포의 형질전환을 위한 잡종 ADA binary vector의 재조합

Murine ADA cDNA(62)를 연초에서 발현시키기 위한 binary vector pDY18의 재조합과정은 Fig. 2와 같다. 우선 강력한 식물발현용 promoter(50)을 가지고 있는 524 XbaI cassette vector를 사용하였으며, 524 XbaI cassette vector는 cauliflower mosaic virus double 35S promoter와 alfalfa mosaic virus enhancer sequence를 가지고 있으며 terminator로서는 nopaline synthase의 polyadenylation signal로 이루어져 있다(Fig.2). 또한 murine ADA cDNA는 pADA5-29을 이용하였으며(62), 1,056 nucleotide open reading frame(62)로 이루어져 있다(Fig. 2). 524 XbaI(3.7 kb)에 ADA gene을 도입하기 위해서 먼저 pADA5-29을 NcoI과 EcoRV로 절단하고, 524 XbaI cassette vector는 BamHI으로 절단한 다음 klenow로 fill in 시켜 NcoI으로 다시 절단한 후 ligation시켰다. Ligation된 vector를 다시 식물형질전환용 binary vector pRD400(10)에 도입하기 위해서 XbaI으로 절단한 다음(Fig. 3-A), 2.1 kb의 절편을 pRD400의 XbaI위치에(Fig. 2) 도입하여 pDY18 vector를 재조합하였다(Fig.2).

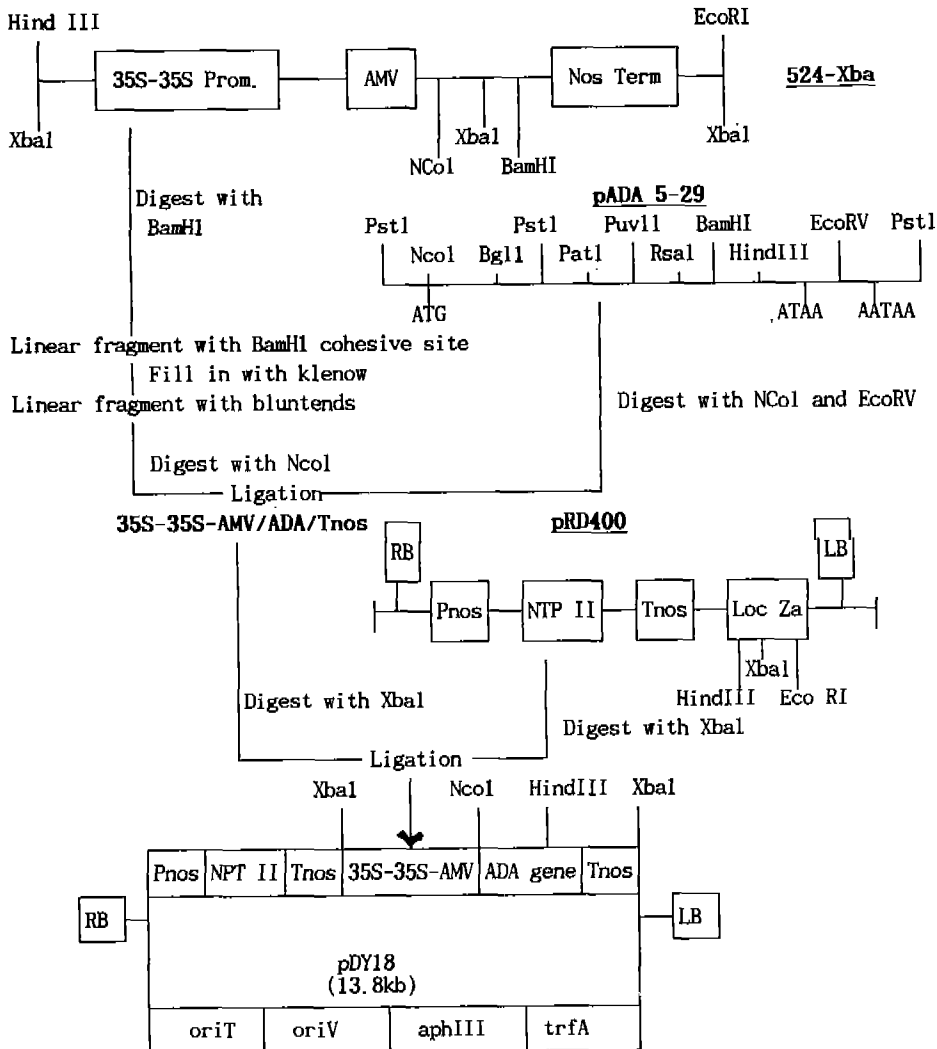


Fig. 2. Scheme for derivation of pDY18. pDY18 is a binary type plant transformation vector, containing the double CaMV 35S promoter, the coding sequence of the murine ADA cDNA. It also contains the chimaeric Pnos/NPT II/Tnos gene for expression in plant. Abbreviations used are : Pnos, nopaline synthase 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.

재조합된 pDY18 vector를 *E. coli*에 형질전환시킨 후 다시 plasmid를 분리하여 XbaI으로 절단한 결과 11.7 kb의 pRD400 vector와 2.1 kb의 ADA 절편을 확인할 수 있었다(Fig. 3-B).

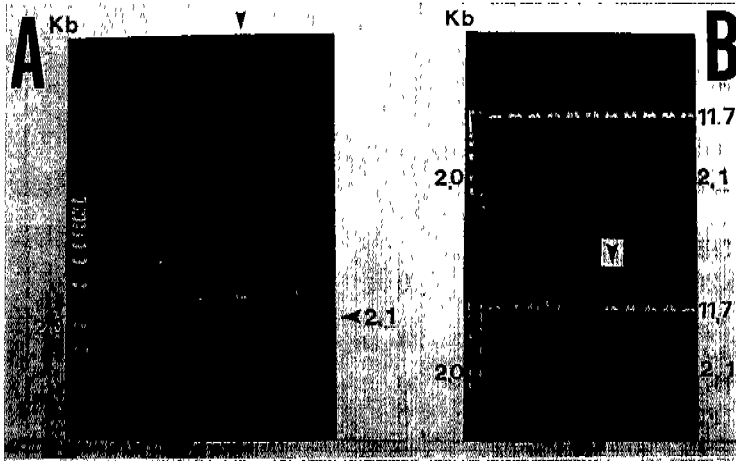


Fig. 3. Construction and confirm of 35S-35S-AMV/ADA/Tnos cassette vector(A) and binary vector harboring murine ADA cDNA(B). 2.1 Kb fragment contains 35S-35S-AMV/ADA/Tnos

2. ADA gene에 의한 연초조직의 형질전환 및 발현

Murine ADA cDNA 함유 pDY18 binary vector을 *E. coli* DH5a에 도입하여 non-oncogenic 균주이지만 virulence region(36)을 그대로 가지고 있는 disarmed Ti-plasmid(36)의 소유 *Agrobacterium tumefaciens* MP90(15)에 도입하기 위해서 pRK2013(21)을 이용하여 tri-parental mating방법에(18) 의하여 conjugant을 선발하였으며, 선발된 균주로부터 plasmid를 분리하여 XbaI으로 절단하여 2.1kb ADA gene을 함유하고 있는(Fig. 4) conjugant인 *Agrobacterium tumefaciens* pDY182와 pDY183을 획득하였다(Table 2).

Table 2. Tri-parental mating for conjugants of *Agrobacterium* with ADA gene

Strains	Media			
	2YT	2YT(K)	2YT(G)	2YT(KG)
Acceptor				
<i>A. tumefaciens</i> MP90	0	X	0	X
Donors				
<i>E. coli</i> DH5 α /pDY18	0	0	X	X
Helper				
<i>E. coli</i> DH5 α /pRK2013	0	0	X	X
Conjugants				
<i>A. tumefaciens</i> pDY182	0	0	0	0
pDY183	0	0	0	0

K : Kanamycin 25 μ g/ml G : Gentamycin 25 μ g/ml.

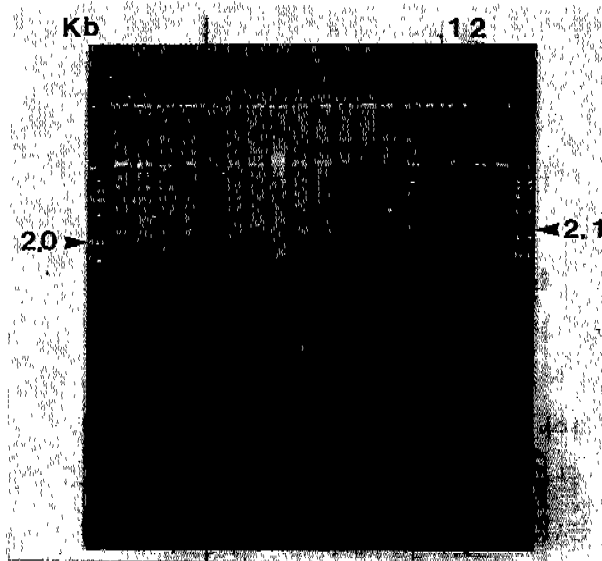


Fig. 4. Confirm of pDY18 binary vector (lanes 1 and 2 are *Agrobacterium tumefaciens* pDY182 and pDY183). pDY18 binary vector contained chimaeric ADA genes was isolated from transconjugants by alkaline lysis procedure, and digested with *Bam*HI for 2.1 kb 35S-35S-AMV/ADA gene/Tnos fragment.

ADA gene이 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* pDY182와 183에 의하여 연초조직을 형질전환시키기 위해서 Fig. 5. 와 같은 방법으로 leaf disc를 이용한 동시배양방법에 의하여 형질전환을 유도하였다. 사용한 재료는 *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi로써 Magenta GA-7 vessel에 성숙한 연초 shoot를 배양하여 사용하였다. 2,4-D가 첨가된 동시배양배지에서 2일간 배양한 후 kanamycin 100 μ g/ml과 carbenicillin이 함유되어 있는 재분화배지에서 6주간 배양하여 shoot를 형성시켰으며, 형성된 shoot를 절단하여 다시 kanamycin이 50 μ g/ml 함유된 발근배지에 옮겨 뿌리를 유도한 후(Fig. 6) 토양에 이식하여 성숙된 식물체(Fig. 7)의 형태적특성과 유전적인 특성등을 조사하였다.

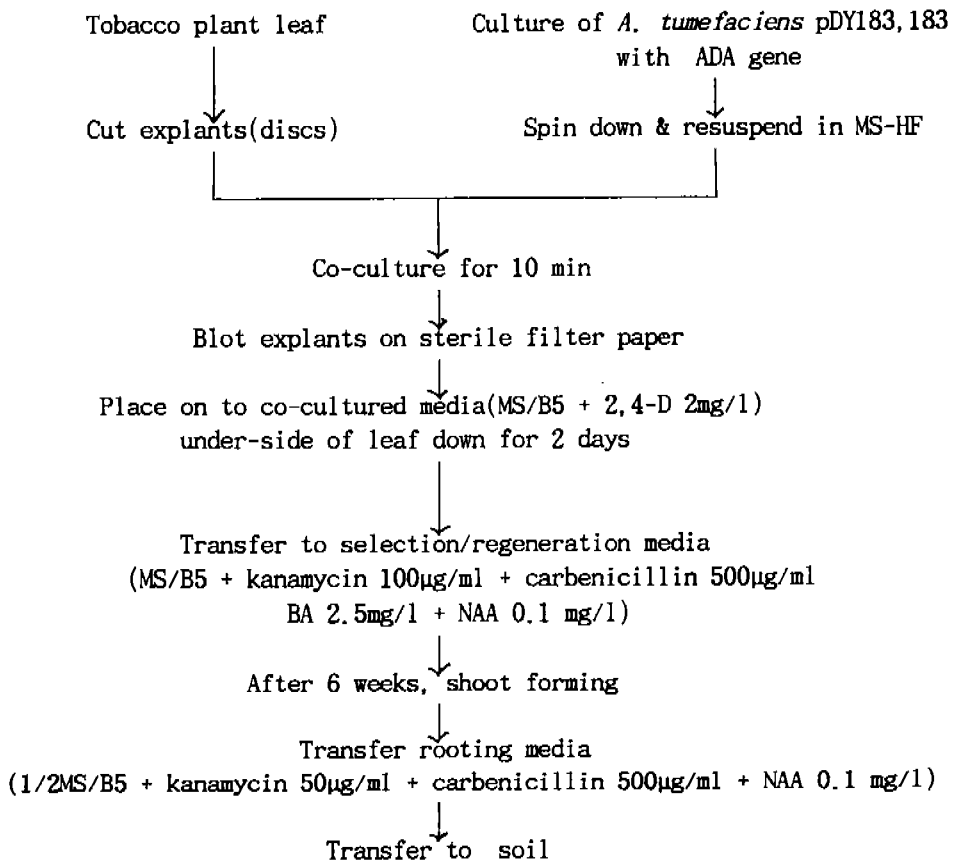


Fig. 5. Coculture of *Agrobacterium* and plant explants.



Fig. 6. Formation of transgenic shoots(A) and roots(A) with ADA gene by coculture of *A. tumefaciens* pDY183 and pDY182 and tobacco leaf discs.



Fig. 7. Transgenic plants, T183(A) and T(182) grown in soil.

3. 형질전환체의 특성검정

형질전환체의 형태적 특성은 Fig. 7에서 보듯이 정상식물체와 거의 동일한 형태를 보였으며 생장도 매우 양호하게 되었다. 그러나 유전적으로는 외부유전자가 삽입되어 있음을 확인하기 위해서 우선 형질전환된 잎을 절단하여 다시 kanamycin이 100 µg/ml 첨가된 배지에서 생존한 식물체를 선발하였다. 선발된 연초의 형질전환된 조직으로부터 외부에서 도입한 ADA gene의 존재여부를 확인하기 위해서 PCR(Perkin Elmer Cetus, Fotodyne Incorporated)을 사용하였다. PCR을 위한 빠르고 간편한 DNA추출방법은 Edwards등(19)의 방법에 준하여 수행하였으며 PCR 조건은 96°C에서 2분간 heating한 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 2분으로 하여 35 cycle을 돌렸으며, 이어서 72°C에서 15분간 heating하였다. 대조구로서 *A. tumefaciens* pDY182와 pDY183에서 plasmid를 alkaline lysis procedure(8)에 준해서 분리하여 사용하였으며, 형질전환된 연초 T182 및 T183과 형질전환되지 않은 정상조직에서 함께 DNA를 추출하여 ADA gene의 존재여부를 확인한 결과(Fig. 8) ADA gene을 도입한 *A. tumefaciens* pDY182와 pDY183과 형질전환된 식물체는 모두 ADA gene을 확인할 수 있었으나 정상식물에서는 전혀 ADA gene을 확인할 수 없어 T182와 T183식물체는 ADA gene에 의해서 형질전환되었음을 확인할 수 있었다(Fig. 8).

상기 방법에 의하여 동물 ADA gene이 형질전환이 식물세포에 삽입되어있을 확인할 수 있었으나 과연 이 유전자가 식물체내에서 정상적으로 전사와 번역과정을 걸쳐 발현이 되어 protein이 형성될지의 여부는 별개의 문제이므로 우선 ADA gene의 식물에서 전사여부를 확인하기 위해서 Northern hybridization을 수행하였다. 형질전환된 잎에서 total RNA의 추출은 Logemann등(46)의 방법에 준하였으며, 전기영동은 1.2% agarose gel상에서 수행하였고(Fig. 9-A), Maniatis등(48)의 방법에 준하여 35S-35S-AMV/ADA/Tnos의 2.1 kb절편을 ³²P로 labeling하여 probe로 사용하였다. Hybridization은 Quick Hyb rapid hybridization solution(Stratagene)을 이용하여 수행하였던 바, 형질전환된 조직의 RNA에서는 ADA transcript를 확인할 수 있었으나 정상조직에서는 역시 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 9-B).

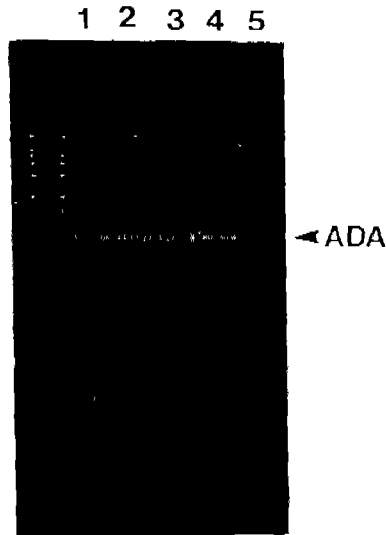


Fig. 8. Adenosine deaminase gene from *Agrobacteria* and transgenic tobacco explants by PCR(1-2, *A. tumefaciens* pDY182,183; 3-4, transgenic plants T182, T183; 5, normal plant).

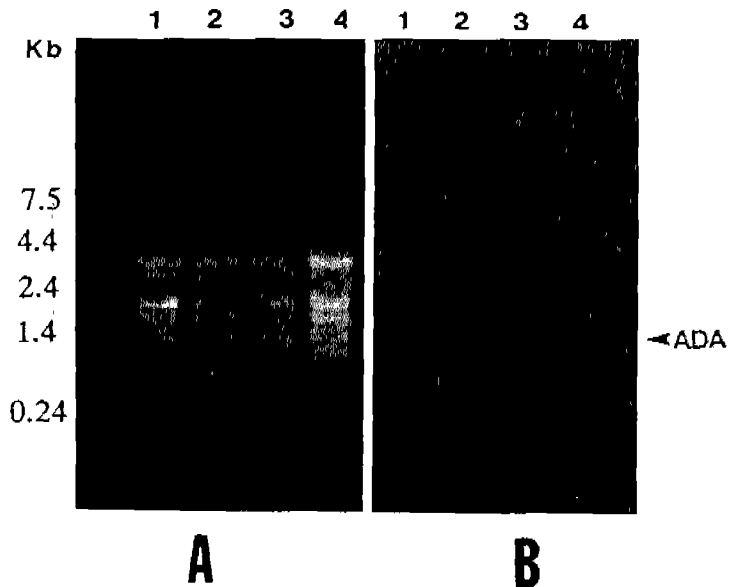


Fig. 9. Northern hybridization(B) of total RNA(A) isolated from transgenic and normal tobacco plant for ADA transcripts(lane 1, normal plant; lanes2-4, transgenic plants).

최종적으로 형질전환된 연초잎에서 ADA protein을 확인하기 위해서 우선 polyclonal antibody를 제조하였다. Bovine Spleen ADA isoenzyme(Type V, Sigma)을 형질전환된 연초잎 및 정상연초잎과 함께 각각 continuous native-PAGE에 의하여 분리하였다. 즉 15%의 mini slab gel에 100 μ g의 protein을 loading한 후 overnight running하였다. 분리된 gel을 coomassie Blue R-250으로 staining하여 그 결과를 조사한 결과 Sigma 제품인 bovine ADA isoenzyme에서는 4개의 band를 관찰할 수 있었다(Fig. 10). 이 중에서 2번째의 band(ADA2)가 가장 진하게 staining되었으며 이 band를 gel로부터 절단하여 증류수로 깨끗하게 세척하여 rabbit immunization을 위해서 0.6 ml의 complete Freund's adjuvant로 마쇄한 후 injection하여 antibody를 제조하였다(29). 또한 native-PAGE에 의하여 분리된 ADA의 활성도를 확인하기 위해서 gel를 3 mm의 폭에 1mm 간격으로 각각 절단한 다음 절편들의 ADA 활성도(참조: 본 논문의 ADA 표지유전자의 신속한 assay 방법의 개발)를 조사한 결과 정상 식물체에서는 전혀 ADA의 활성도가 관찰되지 않았지만 형질전환된 식물체에서 활성도를 관찰할 수 있었으며(Fig. 10), bovine ADA isoenzyme과는 달리 한곳에서만 활성도를 관찰할 수 있었다(Fig. 10).

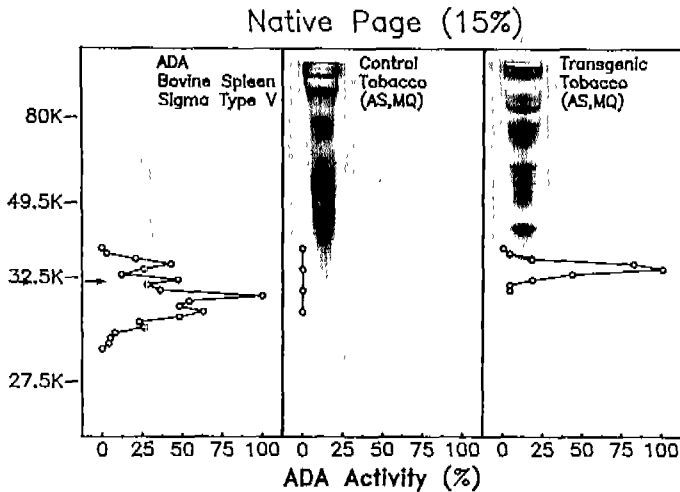


Fig.10. Native-PAGE(15%) separation, and activity determination of mouse ADA expressed in tobacco. Lanes were loaded with samples from wild-type and transgenic tobacco that had been preprocessed by ammonium sulfate(AS) precipitation and Mono Q(MQ) chromatography.

Immunoblot을 위해서 형질전환된 식물체에서 단백질을 crude extract 방법 (Fig. 11-A, lane 2, 3), 70% ammonium sulfate을 이용한 추출(Fig. 11-A, lane 3, 6), anion-exchange Fast Performance Liquid Chromatography(Mono Q HR16/10, Pharmacia)방법(Fig. 11-A, lane 4)에 의해서 추출한 후 10% SDS-PAGE에 의해서 분리하였다(Fig. 11-A). 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 Lane방법에 준하여 수행하였으며(29), nitrobluetetrazolium chloride와 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate(Biorad)을 이용하여 염색하여 형성되는 band를 확인하였다(Fig.11-B). 그 결과 형질전환된 연초(lanes 2-4)에서는 대략 분자량 Mr 39,000에서 band를 확인할 수 있었지만 형질전환되지 않은 연초(lane 5-6)에서는 전혀 band가 관찰되지 않았다(Fig. 11-B). 또한 band의 선명도는 추출방법을 crude extract으로 했을때보다 70%의 ammonium sulfate를 이용해서 추출할 경우에서 더 선명하였으며, anion-echange chromatography 방법을 이용했을때 가장 선명하게 band가 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 11). 이로써 동물 유전자인 murine ADA gene이 식물에서도 전사되어 RNA을 합성하고 있을뿐 아니라, 성공적으로 번역과정을 걸쳐 ADA protein을 합성하고 있음을 확인할 수 있었으며 최초로 식물에서도 동물유전자인 ADA gene 이 발현되는 식물체를 획득할 수 있었다.

또한 형질전환체를 토양에 순화시켜 계속적으로 재배한 결과 정상적으로 생장이 가능하였으며 종자결실도 가능하였으며(Fig. 12), 후대에서도 계속적으로 ADA gene 의 발현여부를 조사하기 위해서 형질전환체에서 채취한 종자와 정상종자를 소독하여 1/2 MS배지에 Ara-A 100 μ M 과 kanamycin 100 μ g/ml 이 첨가된 배지에 치상하여 20일 후에 생존여부를 조사한 결과 정상 종자는 모두 고사하였으나 형질 전환된 종자는 생존하였다(Fig. 13). 일반적으로 형질전환이 될때 삽입되는 외부 유전자가 식물의 핵속에 한개가 삽입된다면 이론적으로 3 : 1 로 분리가 가능하겠지만 여러개의 외부유전자가 동시에 삽입될 수 있으므로 본 실험에서와 같이 대부분의 종자가 생존한것(Fig. 13) ADA gene이 여러개 핵내로 삽입되어 나타나는 현상으로 생각되지만 추후 계속적으로 후대에서 분리비와 외부유전자의 copy 수에 대해서는 연구가 진행되어야 할것으로 생각된다.

SDS-PAGE. (10%)



abbit Polyclonal Anti-ADA IgG

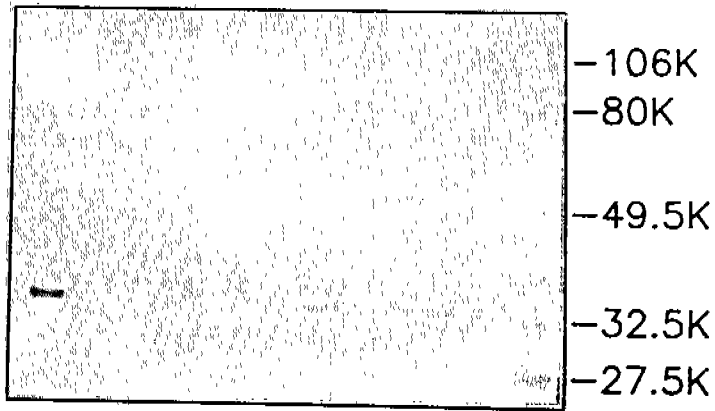


Fig. 11. SDS-PAGE(A) and immunoblot analysis(B) of mouse ADA expressed in tobacco. Lane 1, bovine ADA(Type V, Sigma); lane 2, crude extract of transgenic tobacco; lane 3, ammonium sulfate precipitated protein from transgenic tobacco; lane 4, pooled active fractions of anion-exchange chromatographed ADA 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 markers(numbers to the right).



Fig. 12. Transgenic plants with ADA gene in soil.

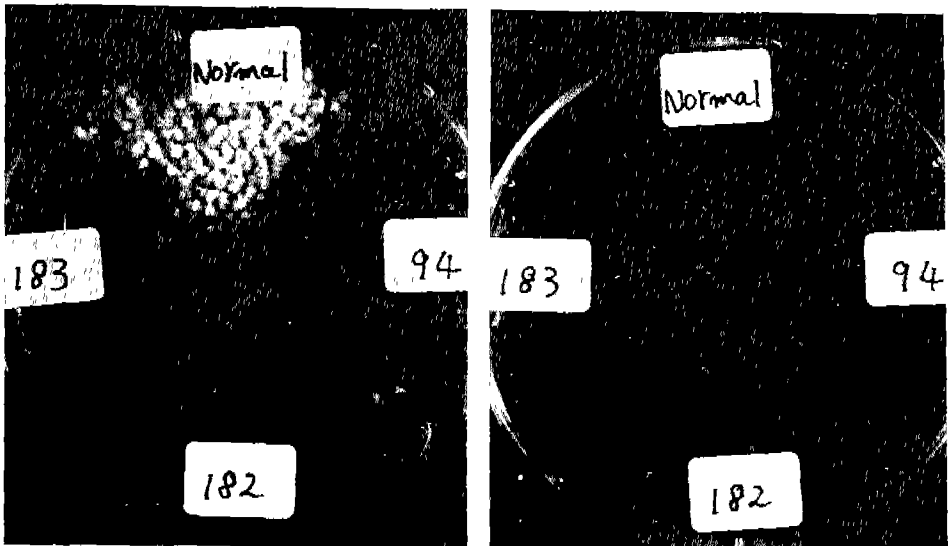


Fig. 13. Transgenic(183, 182, 94) and normal seeds on th media with(A) or without(B) Ara-A 100 μ M and kanamycin 100 μ g/ml.

4. Adenosine 유도체에 대한 연초조직의 감수성 조사

Adenosine deaminase(ADA)효소는 식물세포에는 존재하지 않지만 유전공학기법에 의하여 동물 ADA유전자를 연초식물세포에 도입하였던 바, 상기 실험결과 성공적으로 murine ADA cDNA가 연초에서 발현됨을 확인되었으므로, 본 실험에서는 ADA gene을 식물세포의 형질전환용 표지유전자로 사용하고자 지속적인 실험을 수행하였다. 우선 ADA 효소는 동물조직내에서 adenosine을 inosine으로 변환시키므로(24), 식물에서도 기존에 없었던 system이긴하지만 동물 ADA gene에 의해서 형질전환된 식물세포도 adenosine를 inosine으로 변환시킴으로써 식물조직에 inosine이 과량 축적되어 식물세포의 성장에 영향을 미칠 가능성을 전혀 배제할 수 없으므로, 우선 inosine이 농도별로 함유된 배지에서 연초조직을 치상하여 배양한 후 성장량을 조사하였다(Table 3). Inosine의 농도를 0-320 μM 까지 처리하여 광 및 암상태에서 3주간 배양하여 성장량을 조사한 결과 광 및 암상태 공히 오히려 무처리구에 비해서 inosine 처리구에서 모두 성장량이 증가됨을 관찰할 수 있었다(Table 3). 또한 2'-deoxyinosine 의 경우에도 모두 성장량이 무처리구에 비해 양호한 경향을 보였다.

Table 3. Effects of inosine and 2'-deoxyinosine on the growth of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi leaf explant.

Chemical	Concentration(μM)	Fresh weight of explant(gram)	
		Light	Dark
Inosine	0	0.55 ± 0.065	0.71 ± 0.075
	40	0.61 ± 0.046	0.65 ± 0.065
	80	0.86 ± 0.054	0.70 ± 0.090
	160	0.85 ± 0.043	0.91 ± 0.072
	320	0.60 ± 0.054	0.72 ± 0.061
2'-deoxyinosine	40	0.65 ± 0.061	0.39 ± 0.044
	80	0.63 ± 0.040	0.59 ± 0.069
	160	0.81 ± 0.063	0.78 ± 0.071
	320	0.68 ± 0.066	0.72 ± 0.076

이러한 결과는 adenosine뿐 아니라 독성을 가지고 있는 2'-deoxyadenosine이 식물체에서 발현된 ADA 효소에 의해서 inosine과 2'-deoxyinosine으로 변환되어 체 내에 축적되어있어도 성장감소에는 거의 영향을 미치지 않을 것으로 나타났다. 그래서 이제는 실제로 adenosine과 독성을 가지고 있는 adenosine 유도체에 대한 연초조직의 감수성을 조사하였다. Adenosine이 첨가된 배지에서도 inosine첨가배지와 마찬가지로 오히려 adenosine이 첨가되지 않은 배지보다 생장이 더 양호한 경향을 보였으며, 특히 adenosine 40 μM 에서 160 μM 첨가된 배지에서는 무첨가배지에 비해 약 2배가량 생장이 좋았다. 그러나 고농도인 320 μM 에서는 무첨가배지와 거의 비슷한 수준을 보였다(Table 4). 2'-deoxyadenosine의 경우에는 80 μM 는 생장이 양호하였지만 160 μM 에서는 생장이 급격히 감소하였으며, 320 μM 이상부터는 거의 생장이 되지 않았다(Table 4). 또한 일반적으로 강력한 독성물질로 알려진 Ara-A의 경우에는 80 μM 이상에서, 그리고 cordycepin의 경우에는 20 μM 부터는 생장이 거의 되지 않았다(Table 4). 상기결과를 종합하면 연초조직의 형질전환을 위해서 adenosine유도체를 사용할 경우 연초정상조직은 adenosine 유도체로써 2'-deoxyadenosine보다 Ara-A와 cordycepin을 사용하는것이 더 효과적일것으로 생각되며, 사용농도는 Ara-A의 경우에 100 μM , cordycepin의 경우에는 50 μM 사용하는 것이 좋을 것으로 사료되었다.

5. 새로운 표지유전자로써 ADA gene의 이용

상기 실험결과 adenosine 유도체를 사용할 경우 정상조직은 치사하고 ADA gene에 의하여 형질전환된 식물체는 성장할수 있는 이론적인 근거를 확보하였으므로 Ara-A와 cordycepin을 정상조직이 치사하는 농도 100 μM 및 50 μM 이 첨가된 배지에 정상연초와 형질전환된 연초조직을 치상하여 생존여부를 조사한 결과 Fig. 14에서 보듯이 정상조직은 분화되지 못하고 고사하였지만 ADA gene을 함유하고 있는 형질전환체는 모두 왕성히 성장하였다. 특히 adenosine 유도체로써 Xyl-A를 농도별로 처리하여 정상조직과 형질전환조직을 치상하여 30일간 배양하여 분화능을 조사한 결과 정상조직은 25 μM 이상에서는 전혀 분화가 되지 않았다(Fig. 15-A). 반면에 형질전환조직은 100 μM 에서도 왕성히 성장하는것을 관찰할 수 있

었다(Fig. 15-B). 이런 결과는 toxic adenosine 유도체를 substrate로 사용했을때 ADA gene을 표지유전자로 사용될 수 있음을 시사한다.

Table 4. Effects of adenosine, 2'-deoxyadenosine, arabinofuranosyl adenine and cordycepin on the growth of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi leaf explant

Chemical	Concentration(μ M)	Fresh weight of explant(gram)	
		Light	Dark
Adenosine	40	0.95 \pm 0.069	0.74 \pm 0.086
	80	0.81 \pm 0.060	0.68 \pm 0.038
	160	0.94 \pm 0.056	0.79 \pm 0.064
	320	0.57 \pm 0.052	0.75 \pm 0.078
2'-deoxyadenosine	40	0.74 \pm 0.058	1.03 \pm 0.105
	80	0.96 \pm 0.050	0.91 \pm 0.089
	160	0.32 \pm 0.038	0.35 \pm 0.033
	320	0.07 \pm 0.005	0.21 \pm 0.033
	640	0.04 \pm 0.003	0.19 \pm 0.031
Arabinofuranosyl	5	0.56 \pm 0.047	0.41 \pm 0.039
	10	0.32 \pm 0.037	0.46 \pm 0.044
	20	0.23 \pm 0.025	0.30 \pm 0.040
	40	0.10 \pm 0.048	0.13 \pm 0.009
	80	0.05 \pm 0.008	0.09 \pm 0.009
	160	0.02 \pm 0.001	0.03 \pm 0.004
Cordycepin	5	0.61 \pm 0.059	0.36 \pm 0.053
	10	0.10 \pm 0.016	0.20 \pm 0.030
	20	0.06 \pm 0.008	0.14 \pm 0.018
	40	0.04 \pm 0.049	0.05 \pm 0.005
	80	0.02 \pm 0.001	0.03 \pm 0.001
	160	0.02 \pm 0.001	0.02 \pm 0.001
Control	0	0.55 \pm 0.065	0.71 \pm 0.075

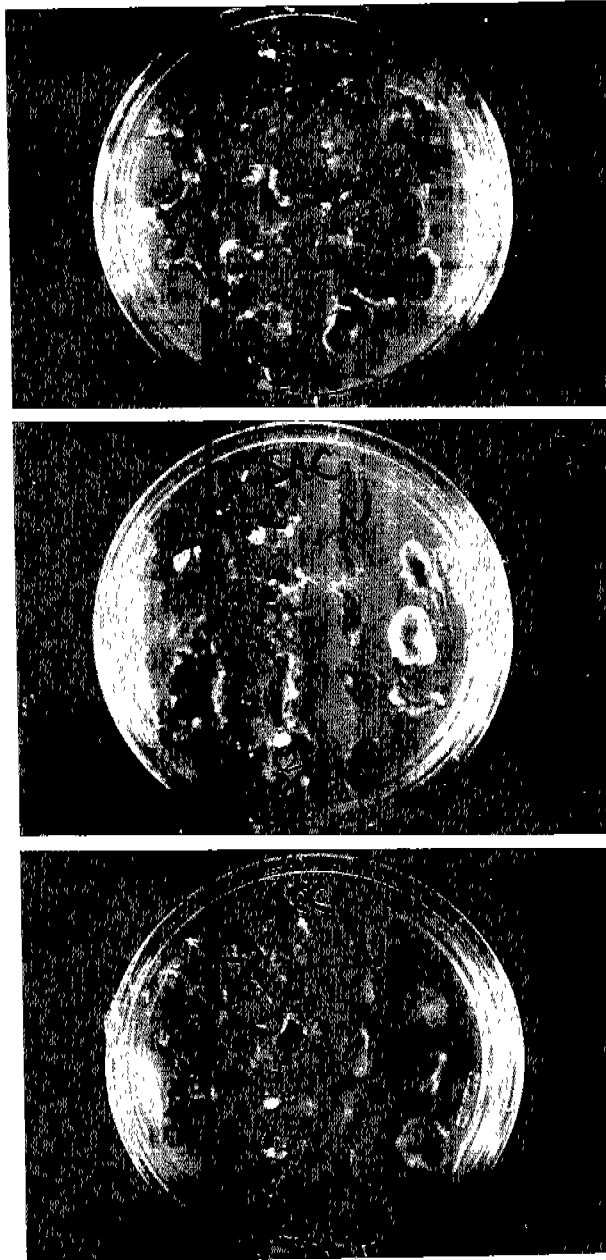


Fig. 14. Leaf discs assay of transgenic T182 tobacco plant(left side of Petridish) and normal plant(right side of Petridish) on the shooting media with cytotoxic adenosine analogues(A, normal medium; B, 100 μ M Ara-A medium; C, 50 μ M cordycepin medium). The photograph was taken 3 weeks after the start of the experiment.

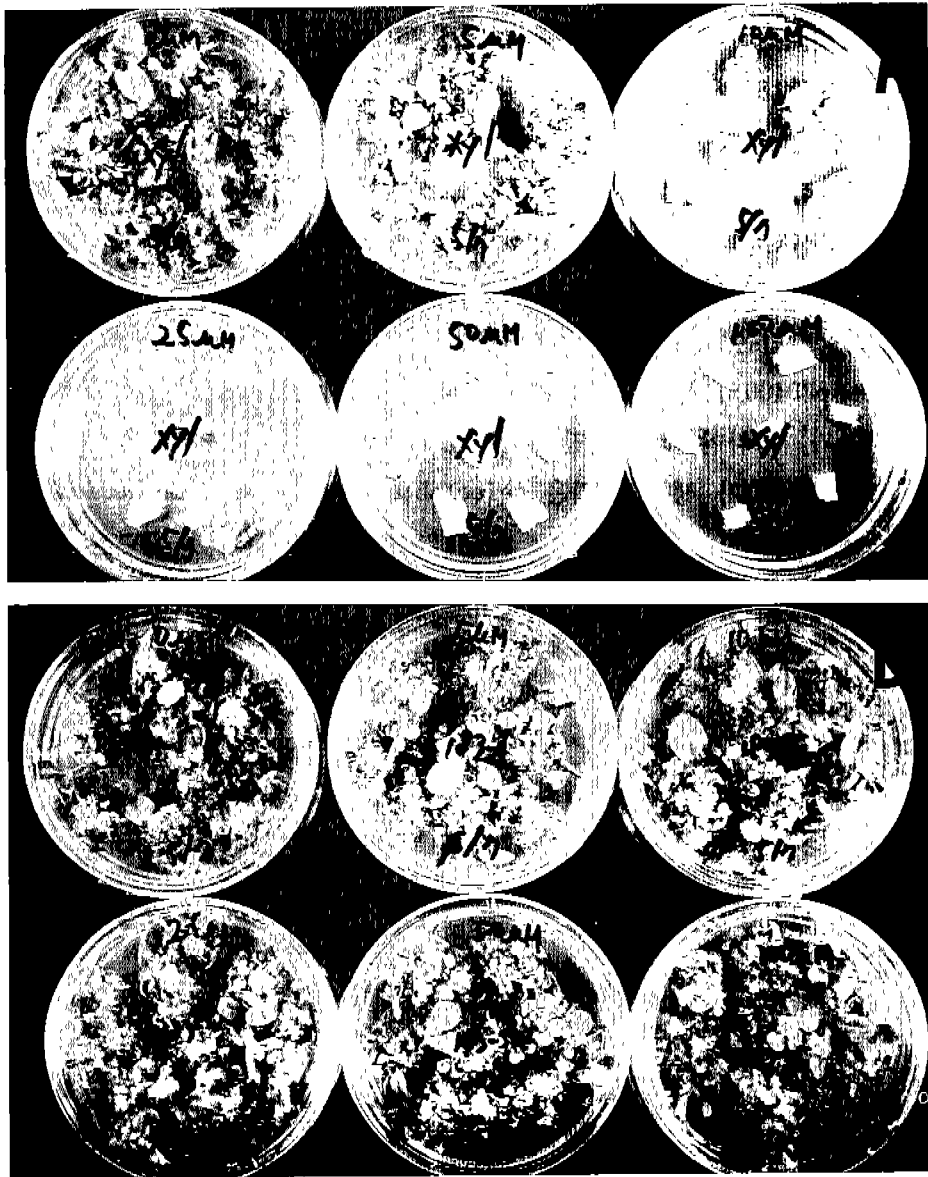


Fig. 15. Effect of Xyl-A on the growth of normal(A) and transgenic(B) T183-5 tobacco leaf explants.

상기 실험결과 cytotoxic adenosine analogues를 selectable agent로 사용하여 형질전환체를 선발할 수 있음이 확인되어, 앞선실험에서 사용했던(Fig. 5) 동시배양방법에 의하여 다시 연초조직을 형질전환시켰다. 이 때 사용한 균주는 *A. tumefaciens* pDY183과 ADA gene을 함유하지 않고 항생제 표지유전자인 NPT II gene만이 도입된 균주 *A. tumefaciens* pRD400이며 selectable agent로써는 Ara-A, cordycepin 그리고 Xyl-A를 사용하였다. 정상조직은 상기한 selectable agent에서 모두 고사하였지만 *Agrobacterium*과 동시배양했던 조직은 모두 shoots가 형성되어 ADA gene을 표지유전자로 사용하는데 전혀 지장이 없었다. 그러나 계속적인 배양 동안 이 배양방법은 문제점을 야기시켰다. 전혀 생장이 되지 않아야 될 *A. tumefaciens* pRD400와 동시배양했던 explant에서도 생장이 된 것이다. 물론 자세한 연구결과가 나와야 되겠지만 이렇게 ADA gene을 함유하고 있지 않은 *A. tumefaciens* pRD400가 생존한 것은 selectable agent를 *A. tumefaciens*가 성장원으로 일부 사용함으로써 selectable agent의 농도가 약화되어 ADA gene을 함유하고 있지 않은 균주에서도 생장이 되었던 것으로 사료되었다. 그래서 본실험에서는 *A. tumefaciens*가 선발배지에서 노출되어 있는 시간을 최대한 단축시켜 기존에 사용해 왔던 방법(Fig. 5)을 약간 변형한 후 새로운 동시배양방법을 개발하였다. 우선 coculture 시간을 10분에서 5분으로 단축하고 cocultured media에서 2일간 배양했던 것을 1일간으로 단축하였으며 제 1차 선발배지에서는 carbenicillin만 첨가된 배지에서 5일간 배양하며, 제2차 선발배지에서 Xyl-A가 함유된 배지에 계대배양하여 선발함으로써 목적을 달성할 수 있었다(Fig. 16).

6. ADA 표지유전자의 신속한 assay 방법의 개발

ADA 활성도는 대장균과 사람조직에서는 여러가지 방법으로 조사하였으나 (12,2), 식물조직에서는 처음으로 본 실험에서 동물 ADA gene을 식물에서 발현시켜 조사하기 때문에 모든 조건을 다시 확인하여야 한다. 동물조직에서 가장 일반적으로 사용해 온 방법은 adenosine을 substrate로 하여 생성된 inosine의 함량을 265 nm에서 조사하는 방법인데 이 방법은 inosine의 순수분리를 잘해야 좋은 결과를 얻을 수 있어 간단한 추출방법에 의해서는 spectrophotometer에 나타나는 수치

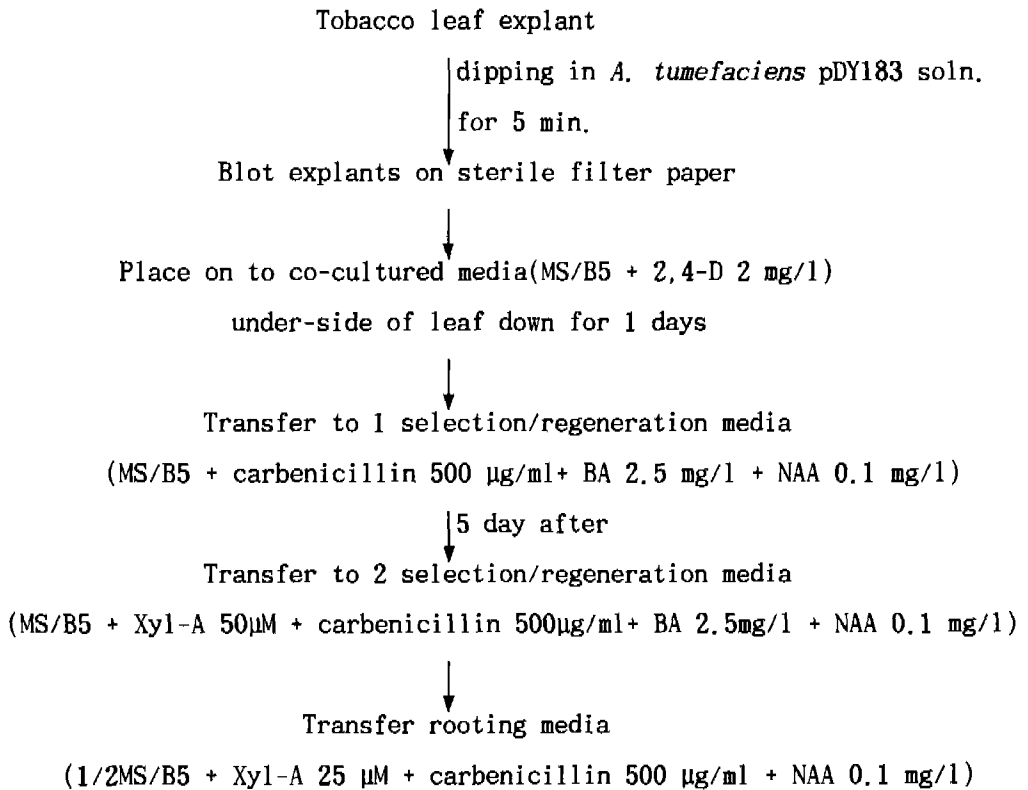


Fig.16. Coculture of *Agrobacterium* and plant explants.

가 매우 차이가 심한편이다. 또한 NAD(P)H-coupling방법(31)과 방사선으로 표지된 substrate을 이용하여 radiometric assay 방법(49)등이 이용되고 있으며, ADA가 adenosine을 inosine으로 변환시킬 때 형성되는 암모니아의 함량을 조사하는방법 등이 이용되고 있다(13,27).

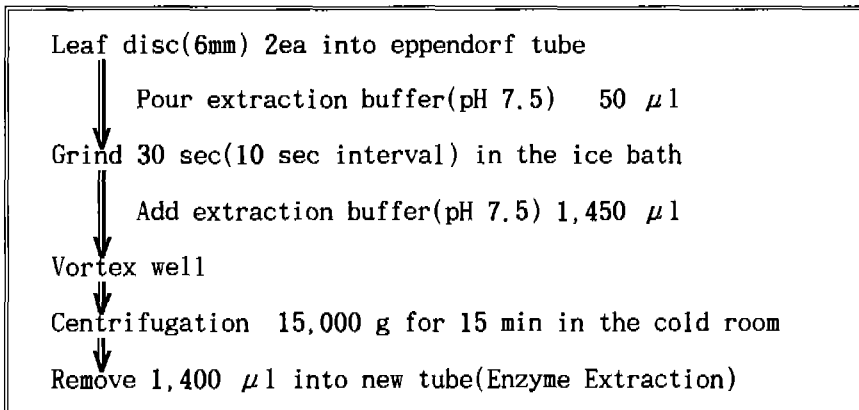
본 실험은 Hopkinson(37) 방법을 약간 변형하여 Berthelot reaction(27)을 이용하여 형성된 암모니아의 함량을 조사함으로써 ADA의 활성도를 조사하였다 (Table 5). 우선 효소의 추출은 형질전환된 잎을 buffer pH 6.5와 7.5에서 처리 하였으며, 효소 assay 시간은 30분 및 60분으로하였고 효소처리온도는 25°C와 37°C로 하였다. 형질전환된 식물체 T182와 T183의 경우에는 처리간에 다소의 차이는 있었으나 정상식물에 비하여 월등히 함량이 높았으며 T182에 비해 T183이 더 높은

경향을 보였다(Table 5). ADA의 활성도를 위한 조건은 buffer의 pH 7.5에서 효소 처리시간과 온도는 각각 30분 및 37°C에서 하는것이 가장 좋을것으로 사료되었으며, 효소의 추출 및 assay 방법은 Fig. 17과 같이 하는 것이 가장 바람직한것으로 생각되었다.

Table 5. Adenosine deaminase activity from normal and transgenic tobacco Plants according to extraction buffer pH, incubation time and incubation temperature by spectrophotometer(Unit : O.D. 635/cm²)

Incubation		Plants	Normal		T182		T183	
Time(min)	Temperature(°C)		Buffer pH	6.5	7.5	6.5	7.5	6.5
30	25		0.38	0.41	14.69	14.32	15.16	18.19
	37		0.42	0.60	30.48	29.84	31.26	35.56
60	25		0.30	0.32	27.51	31.75	43.69	45.18
	37		0.34	0.30	55.42	58.04	60.68	64.56

Extraction of Enzyme



(continued)

Assay of ADA from Enzyme solution

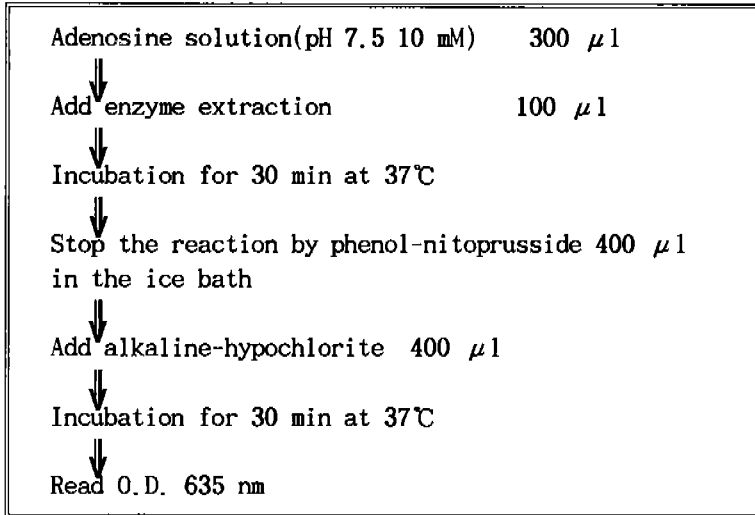


Fig. 17. Extraction and assay for adenosine deaminase by spectrophotometer from transgenic and normal plants in *N. tabacum* cv. Xanthi.

또한 spectrophotometer을 사용하지 않고 극소량의 형질전환체를 가지고 외부 유전자의 삽입여부를 확인하기 위해서 GUS gene(40, 41)과 같은 방법으로 plate 위에서 쉽게 확인 할 수 있는 방법을 개발하고자 본 실험을 시도하였다. ADA의 식물세포에서 발현으로 adenosine을 substrate 하였을때 형성되는 암모니아와 inosine중 암모니아를 phenol로 plate 위에서 바로 채집하여 색깔로 변환시키는 방법이다. 이때 가장 문제가 되는것이 식물체내에 존재하는 endogenous 암모니아 이었는데, 이문제는 형질전환체의 explant의 크기를 매우 작게 함으로써 해결할 수 있었다(Fig. 18-A). 직경 6 mm의 형질전환체와 정상식물체의 explant의 크기를 다시 1 X, 1/2 X, 1/4 X 1/8 X 절단하여 절편을 adenosine이 함유된 plate에 넣고 30분 및 60분간 배양한 후 색깔의 변화를 관찰하였던 바, 1/4 X 및 1/2 X의 크기에서 형질전환체는 모두 색깔이 변화되었지만 정상식물체에서는 색깔이 변화되지 않았다(Fig. 18-A). 또한 처리시간도 30분과 60분이 서로 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig. 18-A). 이런 결과는 explant의 크기를 적게 했을 경우 성공적으로 형

질 전환체와 정상식물체를 구별할 수 있음을 시사하며 assay 시간의 단축을 위해서 60분보다 30분을 처리하는 것이 더 효과적일 것으로 사료되었다. 이후 모든 실험에서 explant는 1/8 X의 크기로 사용하였으며 처리시간도 30분을 사용하였다. 특히 암모니아는 pH에 따라 많은 차이가 있으므로 substrate로 사용되는 adenosine의 pH를 5.5에서 9.5까지 달리 처리하여 색깔의 변화를 조사한 결과 상기 농도에서는 거의 차이가 없었지만(Fig. 18-B) pH 7.5로 사용하는 것이 다소 양호할 것으로 사료되었다. 또한 adenosine의 농도에 따라 색깔의 변화정도를 조사하기 위해서 농도를 1 mM에서 20 mM까지 조사하였던 바 역시 커다란 차이가 외관상 나타나지 않고 형질전환체는 색깔을 나타내었으나 정상식물체는 색깔을 나타내지 못하였다(Fig. 18-C). 이런 점을 고려할 때 adenosine의 농도는 10 mM로 사용하는 것이 좋을 것으로 사료되었다. 한편, adenosine의 substrate에 따른 색깔 정도를 조사한 결과, 기사용된 adenosine뿐만 아니라 2'-deoxyadenosine, cordycepin, Ara-A 그리고 Xyl-A 공히 색깔변화를 나타내 모두 ADA의 substrate로 사용할 수 있을 것으로 생각되었다(Fig. 18-D). 그러나 이런 색깔변화가 ADA gene의 발현에 의한 것이 아니라 다른 영향에 의하여 나타날 가능성을 전혀 배제할 수 없으므로 ADA 효소의 작용을 억제시키는 deoxycoformycin을 사용하여 실제 ADA의 작용에 의해서 색깔변화가 일어나는지를 조사하였다. Fig. 18-E에서 보듯이 deoxycoformycin을 첨가하지 않은 처리구에서는 정상조직은 색깔변화가 없었고 형질전환체들에서만 색깔이 변화되었으나 deoxycoformycin이 첨가된 처리구에서는 정상조직뿐만 아니라 형질전환체에서도 모두 색깔변화가 일어나지 않아 색깔의 변화가 ADA 작용에 의하여 나타남을 확인시켜주었다. 또한 다른 외부유전자에 의해서 색깔이 나타날 가능성이 있으므로 NPT II gene만이 도입된 식물체, NPT II gene과 proteinase inhibitor(PI) I gene이 도입된 식물체, PI II gene이 도입된 식물체, 내병성유전자인 Mac gene, 그리고 제초제 저항성인 PAT gene과 GUS gene이 도입된 식물체를 대상으로 색깔의 변화정도를 조사하였던 바, ADA gene이 아닌 다른 외부유전자들에서는 전혀 색깔이 변화되지 않았다(Fig. 18-F). GUS gene의 경우에는 식물체에 따라서는 자체 내에서 GUS 활성도를 가지고 있으므로 본실험에서도 연초품종에 따라 ADA 발현 가능성이 있을 가능성을 배제하기 위해서 품종별로 조사한 결과 어느 품종에서도 색깔을 변화시키지 못하였다(Fig. 18-G). 또한 ADA gene에 의해서 형질전환된 조직

일지라도 부위에 따라 활성도가 다를것으로 생각되어 잎, 줄기, 뿌리, 엽병 그리고 midrib를 대상으로 하여 활성도를 조사한 결과 잎부위를 사용하는것이 형질전환된 조직과 형질전환되지 않은 조직를 구별하기가 가장 양호하였다(Fig. 18-H). 상기 결과를 종합하여 plate위에서 ADA 효소의 assay를 위한 가장 양호한 조건을 요약하면 Fig. 19과 같다. ADA gene을 표지유전자로 사용할 경우 우선 동물유전자를 그대로 사용하기 때문에 미생물 유전자를 표지유전자로 사용했을 때보다 안전성문제에서 소비자에게 더많은 호응을 얻을 수 있을 것으로 생각되며 특히 형질전환시킬때 사용되는 선발 agent를 항생제 표지유전자를 사용할 경우 한가지의 항생제밖에 사용할 수 없지만 ADA gene을 이용할 경우 여러종류의 toxic adenosine analogues를 사용할 수 있다. 더우기 ADA gene의 assay이 과정이 새로 개발된 방법을 사용함으로써 다른 표지유전자보다 assay하기가 쉽고 처리시간이 빠르며 매우 값싸게 사용할 수 있다. 또한 isotope를 사용하지 않고도 매우 민감할뿐더러 극히 적은량으로도 assay가 가능하다는 장점을 가지고 있어 추후 계속적으로 연초가 아닌 타작물에서도 표지유전자로 사용 가능성을 조사하여야 할 것으로 사료된다.

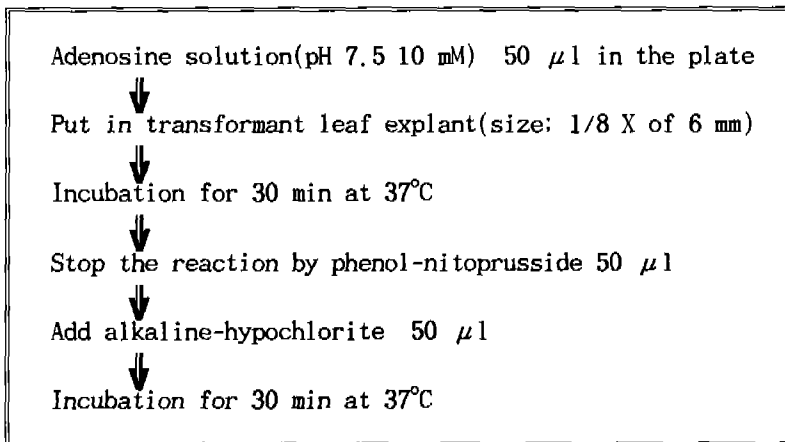


Fig. 19. Optimum condition for assay of Adenosine deaminase activity on the plate.

결 론

Adenosine deaminase(E.C.3.5.4.4, ADA)는 purine 대사에 관여한 효소로써 모든 사람조직에 존재하며 특히 면역관련 세포에서 활성도가 높다. 사람이 ADA의 활성이 약할 경우에는 심한 면역결핍증(immunodeficiency)을 유발하며 식물세포에서는 ADA효소가 존재하지 않은 것으로 보고되어 있다. 또한 ADA는 동물세포와 미생물세포에서는 toxic adenosine analogues을 무독성인 inosine으로 변환시키지만 ADA gene이 없는 식물체에 toxic adenosine analogues을 첨가하면 식물세포가 cytotoxicity을 갖게 되어 전혀 생장이 되지 않는다.

본 실험은 식물세포의 형질전환시 사용되는 표지유전자로써 기존에 사용되어온 항생제 내성유전자 대신 동물유전자 중에서 표지유전자로써 2'-deoxyadenosine, xylofuranosyl adenine(Xyl-A), 9-β-D-arabinofuranosyl adenine(Ara-A), cordycepin등을 substrate로 사용할 수 있는 ADA gene을 표지유전자로 사용하고, 우선 (1)murine adenosine deaminase cDNA을 식물형질전환용 binary vector에 재조합하고, (2)재조합된 vector에 의하여 연초조직을 형질전환시켜 발현여부를 확인한 다음, (3)형질전환체의 각종특성을 조사하고, (4)형질전환체의 발현이 확인된 다음 연초조직의 cytotoxic adenosine analogues에 대한 감수성을 조사하고, (5)정상조직이 치사하는 adenosine analogues의 농도에서 다시 연초조직의 형질전환을 시도하고 이에 관련되는 새로운 형질전환 방법을 확립하며, (6)ADA gene에 의하여 형질전환된 식물체의 쉽고 빠르며 값싼 assay 방법을 개발하고자 수행하였다.

우선 murine ADA cDNA를 연초에 도입하여 강력히 발현시키기 위해서 35S-35S-AMV promoter를 사용하였으며 식물세포에 도입을 위해서 binary vector인 pRD400을 이용하였다. 연초의 형질전환은 triparental mating에 의해서 도입된 ADA gene함유 binary vector와 disarmed Ti-plasmid를 함유하고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* MP90을 사용하였다. 동시배양은 연초의 잎 disc을 이용해서 kanamycin이 첨가된 배지로 부터 직접 shoots을 선별하여 형질전환체로 유도하였다. 형질전환체에 ADA gene의 삽입여부는 PCR을 이용하였으며, 실험결과 형질전환연초에서 모두 ADA gene을 확인 할수 있었다.

또한 형질전환식물체내에서 정상적으로 ADA gene이 전사와 번역과정을 걸쳐 발현이 되어 protein이 형성되는지를 Northern hybridization과 Western blot방법에 의하여 수행하였다. Northern hybridization결과 형질전환된 연초에서는 ADA gene의 transcript를 확인할 수 있었지만 정상조직에서는 전혀 나타나지 않았다.

Immunoblot을 위해서 형질전환된 식물체에서 단백질을 crude extract 방법, 70% ammonium sulfate을 이용한 추출, anion exchange chromatography 방법에 의해서 추출한 후 10% SDS PAGE에 의해서 분리하였다. Immunoblot은 제조된 rabbit polyclonal anti-bovine ADA2 serum을 이용하여 수행하였으며, 그 결과 형질전환된 연초에서는 대략 분자량 Mr 39,000에서 band를 확인할 수 있었지만 형질전환되지 않은 연초에서는 전혀 band가 관찰되지 않았다. 또한 ADA의 활성도를 조사한 결과 정상조직에서는 거의 활성도가 없었지만 형질전환체에서는 활성도가 매우 높음을 확인할 수 있었다. 이로써 동물유전자인 murine ADA gene이 식물에서도 전사되어 RNA을 합성하고 있을뿐 아니라, 성공적으로 번역과정을 걸쳐 ADA protein을 합성하고 있음을 확인할 수 있었으며 최초로 식물에서도 동물유전자인 ADA gene 이 발현되는 식물체를 획득할 수 있었다. 또한 형질전환체를 토양에 순화시켜 계속적으로 재배한 결과 정상적으로 생장이 가능하였으며 종자결실도 가능하였고, 후대에서도 계속적으로 ADA gene의 발현이 되는지를 조사한 결과 정상 종자는 Xyl-A배지에서 모두 고사하였으나 형질전환된 종자는 생존하여 후대에서도 ADA gene이 소실되지않고 그대로 존재한 것을 확인할 수 있었다.

자연상태에서는 adenosine deaminase효소는 식물세포에는 존재하지 않지만 본 실험결과 유전공학기법에 의하여 동물 ADA유전자를 연초식물세포에 도입하여 성공적으로 발현됨을 확인하였으므로, ADA gene을 식물세포의 형질전환용 표지유전자로 사용하고자 지속적인 실험을 수행하였다. 연초조직의 형질전환을 위해서 adenosine유도체를 사용할 경우 Ara-A, Xyl-A와 cordycepin을 사용하는것이 효과적이었으며, 사용농도는 Ara-A의 경우에 100 μ M, Xyl-A와 cordycepin의 경우에는 50 μ M을 사용하는 것이 좋을 것으로 나타났다. 또한 선발배지에서 생존한 형질전환체를 조기에 재확인하는 방법이 실제적인 실험에 있어 커다란 관건으로 대두되고 있으며 GUS gene과 같은 매우 좋은 선발 표지유전자가 개발되기도 하였다. 그러나 GUS gene은 일차적인 선발 표지유전자로 사용은 어렵고 다만 선발된 형질전

환체를 재확인하는 보조적인 방법으로 밖에 사용할 수 없다. 그러나 본실험에서는 ADA gene을 일차적인 선발 표지유전자로써 뿐만아니라 이차적으로 색깔의 변화에 의한 확인방법까지 검할 수 있는 방법을 개발하고자 수행하였다.

ADA 활성도는 대장균과 사람조직에서는 여러가지 방법으로 조사하였으나, 식물 조직에서는 처음으로 본실험에서 동물 ADA gene을 식물에서 발현시켜 조사하였기 때문에 모든 조건을 다시 확인하여야 한다. 본실험은 Hopkinson 방법을 약간 변형하여 Berthelot reaction을 이용해서 형성된 암모니아의 함량을 조사함으로써 ADA의 활성도를 조사하였다. ADA의 활성도를 위한 조건은 buffer의 pH 7.5에서 효소처리시간과 온도는 각각 30분 및 37°C에서 하는것이 가장 좋을 것으로 나타났다.

또한 spectrophotometer을 사용하지 않고 극소량의 형질전환체를 가지고 외부 유전의 삽입여부를 눈으로 직접 확인하기 위해서 plate 위에서 쉽게할 수 있는 방법을 개발하고자 본실험을 시도하였다. ADA의 식물세포에서 발현으로 adenosine을 substrate 하였을때 형성되는 암모니아와 inosine중 암모니아를 phenol로 plate위에서 바로 채집하여 색깔로 변환시키는 방법이다. 이때 가장 문제가 되는것이 식물체내에 존재하는 endogenous 암모니아였는데, 이 문제는 사용하는 explant의 크기를 매우 작게 함으로써 해결할 수 있었다. 본 실험결과 explant의 크기를 직경 6 mm의 disc의 1/8 X로 절단했을 경우 성공적으로 형질전환체와 정상식물체를 구별할 수 있었으며 assay 시간도 30분으로 충분하였다. 그러나 본실험에서 나타난 assay 방법이 ADA gene의 발현에 의한것이 아니고 다른 영향에 의해서 나타날 수 있는 가능성을 배제하기 위해서 ADA 효소의 억제제인 deoxycoformycin을 첨가하여 조사한결과 정상조직뿐만아니라 형질전환체에서도 모두 색깔변화가 일어나지 않았다. 그러나 deoxycoformycin이 첨가되지 않은 일반 처리구에서는 역시 형질전환체는 모두 색깔이 변화되었으나 정상조직은 전혀 색깔이 변화되지않아 색깔의 변화가 ADA 작용에 의하여 나타남을 확인시켜주었다. 또한 좀더 효율적인 assay를 위해서 색깔변화에 나타날 수 있는 많은 요인들에 대한 조사를 하였던 바, 특히 암모니아는 pH에 따라 많은 차이가 심하므로 substrate로 사용되는 adenosine의 최적 pH를 조사한 결과 pH 7.5로 사용하는것이 양호하였으며, adenosine의 농도는 10mM로 사용하는것이 가장 양호하였다. 한편, adenosine의 substrate로써는

adenosine뿐만 아니라 2'-deoxyadenosine, cordycepin, Ara-A 그리고 Xyl-A 모두 사용가능하였다. 또한 ADA gene이 아닌 다른 외부유전자에 의해서 색깔이 나타날 가능성도 있으므로 여러종류의 외부유전자가 도입된 형질전환체를 사용하여 ADA assay를 시도한 결과 오직 ADA gene을 가지고 있는 형질전환체에서만 색깔변화가 일어났다. 또한 연초품종간에 ADA 발현정도를 조사하였던 결과 역시 정상적인 다른 연초품종에서는 전혀 ADA 활성도를 가지지 못하였으며, 부위에 따른 활성도 조사에서 줄기, 뿌리, 엽병 그리고 midrib보다 잎을 사용했을때 가장 깨끗한 결과를 유도할 수 있었다.

ADA gene을 표지유전자로 사용할 경우 우선 동물유전자를 그대로 사용하기 때문에 미생물 유전자를 표지유전자로 사용했을 때보다 안전성 문제에서 소비자에게 더 많은 호응을 얻을 수 있을 것으로 생각되며 특히 형질전환시킬 때 사용되는 선발 agent를 항생제 표지유전자를 사용할 경우 한가지의 항생제밖에 사용할 수 없지만 ADA gene을 이용할 경우 여러종류의 toxic adenosine analogues를 사용할 수 있다. 더우기 ADA gene의 assay이 과정이 새로 개발된 방법을 사용함으로써 다른 표지유전자보다 assay하기가 쉽고 처리시간이 빠르며 매우 값싸게 사용할 수 있다. 또한 isotope를 사용하지 않고도 매우 민감할 뿐더러 극히 적은 양으로도 assay가 가능하다는 장점을 가지고 있어 추후 계속적으로 연초가 아닌 타작물에서도 표지유전자로 사용가능성을 조사하여야 할것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Abel, P.P., Nelson, R.S., Hoffmann, N., Rogers, S.G., Fraley, R.T., Shah, D.M., *EMBO J.* 6: 1181-1188(1987).
2. Agarwal, R.P., Parks, R.E., *Methods in Enzymology* Vol. LI: 502-507(1978).
3. Akihito, K., Nishizawa, M., Teranishi, Y., Murata, K., Kimura, A., *Mol. Gen. Genet.* 219: 161-167(1989).
4. An, G. *Methods in Enzymology* 153: 292-305(1987).
5. Benfey, P.N., Lehtvaslaiho, H., Frank, M., Uotila, J., Heino, P., Palva, E.T., Montagu, M.V., Herrero-Estrella, L.C., *EMBO J.* 8: 349-350(1989).
6. Ben, J.C., Melchers, L.S., *Plant Physiol.* 101: 709-712(1993).
7. Bevan, M.W., *Nucleic Acids Res.* 12: 8711-8721(1984).
8. Birnboim, H.C., Doly, J. *Nucleic Acids Res.* 7: 1521-1523(1979).
9. Bryant, J., Leather, S. *Trends Biotechnol.* 10: 274-275(1992).
10. Butters, J.A., Burrell, M.M., Hollonon, O.W. *Physiological Plant Pathology* 27: 65-74(1985).
11. Caplan, A., Herrera-Estrella, L., Inze, D., van Haute, E., van Montague, M., Schell, J., Zambyski, P., *Science* 222: 815-821(1983).
12. Cercignani, G., Allegrinis. *Analytical Biochemistry* 192: 312-315(1991).
13. Chaney, A.L., Marbach, E.P., *Clin. Chem.* 8: 130-132(1962).
14. Chiang, C.C., Hadwiger, L.A., *Plant-Microbe Interactions* 3(2): 78-85(1990).
15. Datla, R.S.S., Hammerlindl, J.K., Panchuk, B., Pelcher, L.E., Keller, W. *Gene* 211 : 383-384(1992).
16. Datla, R.S.S., Hammerlindl, J.K., Pelcher, L.E., Crosby, W.L., Selvaraj, G. *Gene* 101: 239-246(1991).
17. De Block, M., Herrera-Estrella, L., Montagu, M.V., Schell, J., Zambyski, P. *EMBO J.* 3: 1681-1689(1987).

18. Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., Helinski, D.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 7347-7351(1980).
19. Edwards K, Johnston C, Thompson C. *Nucleic Acids Res.* 19 : 1349-1352(1991).
20. Eichholtz, D.A., Roger, S.G., Horsch, R.B., Klee, H.J., Hayford, M., Hoffmann, N.L., Bradford, S.B., Fink, C., Flick, J., O'connell, K.M., Fraley, R.T. *Somatic Cell and Molecular Genetics* 13: 67-76(1987)
21. Figurski, D.H., Hellinski, D.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1648-1652(1979).
22. Fischhoff, D.A., Bowdish, K.S., Perlak, F.J., Marrone, P.G., Mayer, E., Rochester, D., Rogers, S., Fraley, R. *Bio/Technology* 5: 807-814(1987).
23. Flavel, R.B., Dart, E., Fuchs, R.L., Fraley, R.T. *Bio/Technology*.10: 141-144 (1992).
24. Fox, I.H., Kelley, W.N. *Ann. Rev. Biochem.* 47: 655-686(1978).
25. Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L., Woo, S.C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4803-4806(1983).
26. Giuseppina, N., Simon, S., Misra, T. *Mol. Gen. Genet* 220: 69-72(1989).
27. Giusti, G., Gakis, C. *Enzyme* 12: 417-425(1971).
28. Goldsbrough, A. *Trends Biotechnol.* 10: 417-419(1992).
29. Harlow, E., Lane, D. A laboratory manual. Cold spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(1988).
30. Hayford, M.B., Medford, J.I., Hoffmann, N.L., Roger, S.G., Klee, H. *Plant Physiol* 86: 1216-1222(1986).
31. Heins, F., Reckel, S., Pilz, R., Kalden, J.R. *Enzyme* 25 :50-55(1980).
32. Herrera-Estrella, L., De Block, M., Montagu, M.V., Schell, J. *EMBO J.* 2: 987-992 (1983).
33. Herrera-Estrella, L., Depicke,r A., Montagu, M.V., Schell, J. *Nature*

- 303: 209-213 (1983).
34. Hille, J., Verheggen, F., Roeluink, P., Franssen, H., Kammen, A., Zable, P. *Plant Mol. Biol* 7: 171-176(1986).
 35. Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A. *Nature* 303: 179-180(1983).
 36. Hoekema, A., Van Haaren, M.J.J., Fellingner, A.J., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, A. *Plant Mol. Biol.* 5: 85-89(1986).
 37. Hopkinson, D.A., Cook, P.J.L., Harris, H., *Ann. Hum. Genet. Lond* 32: 361-367 (1969).
 38. Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Wallroth, M., Eichholtz, D., Rogers, S.G., Fraley, R.T. *Science* 227: 1229-1231(1985).
 39. Ignacio, E., Ronald, J., Nessler, C.L. *Plant Physiol.* 100: 1613-1614(1992).
 40. Jefferson, R.A. *Nature* 342: 837-838(1989) .
 41. Jeggerson, S.R., Burgess, S.M., Hirsh, D. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83: 8447-8451 (1986).
 42. Jones, J.D.G., Svab, Z., Harper,E.C., Hurwitz, C.D., Maliga, P. *Mol. Gen. Genet.* 210: 86-91(1987).
 43. Kamakura, T., Yoneyama, K., Yamaguchi, I. *Mol. Gen. Genet.* 223: 332-334(1990).
 44. Kellems, R.E., Yeung, C.Y., Ingolia, D.E. *Trend Genet.* 1: 278-283(1985).
 45. Loeach-Fries, L.S., Meerlo, D., Zinmen, T., Burhop, L., Hill, K., Krahn, K., Jarvis, N., Nelson, S., Halk, E. *EMBO J.* 6: 1845-1851(1987).
 46. Logemann, J., Schell, J., Willmitzer, L. *Analytical Biochemistry* 163: 16-20 (1987).
 47. Ludwig, S.R., Bower, B., Beach, L., Wessler, S.R. *Science* 247: 449-450(1990).
 48. Maniatis, T., Fritsch, E., Sambrook, J. *Molecular cloning:A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY(1982).

49. Meier, W., Conscience, J.F. *Anal. Biochem.* 105: 34-339(1980).
50. Odell, J.T., Nagy, F., Chua, N.H. *Nature* 313: 810-812(1985).
51. Oscar, J.M., Zanetti, A., Schilperoort, R.A. Harry, J., Hoge, C. *Plant Mol. Biol.* 18: 1113-1120(1992).
52. Ow, D.W., Wood, K.V., Deluca, M., De Wet, J., Helinski, D.R., Howell, S.H. *Science* 234 : 856-859(1986).
53. Perez, P., Tiraby, G., Kallerhoff, J., Perret, J. *Molecular Biology* 13: 365-373 (1989).
54. Shipman, C., Drach, J.C. *Science* 200: 1163-1165(1978).
55. Svab, Z., Harpet, E.C., Jones, J.D.G., Mariga, P. *Plant Mol. Biol.* 14: 197-205 (1990).
56. Takahashi, T., Naito, S., Komeda, Y. *Plant J.* 12(5): 751-761(1992).
57. Vaeck, M., Reynaerts, A., Hofte, H., Jansens, S., Beuckeleer, M.D., Dean, C., Zabea, M., Montagu, M.V., Leemans, J. *Nature* 328: 33-37(1987).
58. Van den Elzen, P.J.M., Townsendm, J., Lee, K.Y., Bedbrook, J.R. *Plant Mol. Biol.* 5: 299-302(1985).
59. Vasil, V., Brown, S.M., Re, D., Fromm, M.E., Vasil, I.K. *Bio/Technology* 9: 743-747(1991).
60. Waldron, C., Murph, E.B., Roberts, J.L., Gustafson, G.D., Armour, S.L., Malcolm, S.K. *Plant Mol. Biol.* 5: 103-108(1985).
61. Guo, W., Ward, R.W., Thomashow, M.F. *Plant Physiol.* 100: 915-922(1992).
62. Yeung, C.Y., Ingolia, D.E., Roth, D.B., Shoemaker, C., Al-Ubaidi, M.R., Yen, J.Y., Ching, C., Bobomis, C., Kaufman, R.J., Kellems, R.E. *J. Biol. Chem.* 260: 10299-10307(1985).
63. Yeung, C.Y., Riser, M.E., Kellems, R.E., Sicilano, M.J. *J. Biol. Chem.* 258: 8330-8337(1983).