

과 제 구 분	경상기본 Code: LS 0209	수행시기	전반기	연구기간	2002~2003
연구과제명	국화 내충성 신품종 육성			과제책임자	소 호 섭
세부과제명	국화 내충성 유전자 형질전환을 위한 유용벡터 제작				
색 인 용 어	국화, 내충성, 형질전환, 벡터				
연구원별 임무					
구 분	소 속	성 명	전화번호	담 당 임 무	
세부과제책임자	경기도원 환경농업연구과	소호섭	031)229-5813	시험연구수행	
공동연구자	"	한영희	031)229-5811	조사분석	
	"	박경열	031)229-5820	시험지도	
	경희대학교	박영두	031)201-2663	벡터제작 지도	

ABSTRACT

The goal of this work was to develop an efficient method for chrysanthemum genetic transformation, taking into account for two different type of vectors and between agrobacterium strains. These binary vectors(the pGRBT vector and the pMJRTB vector) were transformed using agrobacterium LBA4404, GV301, and EHA105. So we constructed 4 types binary vectors (pGRBT + LBA4404, pGRBT+GV301, pGRBT+EHA105, pMJRTB+ LBA4404).

Key word : Chrysanthemum, transformation, vector

1. 연구목표

우리나라 농작물 재배는 주로 농약에 의한 화학적 방제에 의존하고 있는 실정 으로 과다하게 사용하게 되면 토양, 환경 오염, 농약중독, 해충의 농약 저항성 등 여러 가지 문제가 야기되고 있다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위해서 최근 유전 공학적 기술을 이용한 해충방제에 노력하고 있는 가운데 토양 박테리아인 *Bacillus thuringiensis*가 포자번식시 살충성 단백 질인 δ -endotoxin을 형성하는 것을 발견

(Hofte 등, 1989)하여 이 유전자를 *Bt*독소 유전자라고 하였다. 이 유전자를 이용하여 플라스미드 벡터를 제작한 후 식물에 형질 전환 시켜 새로운 식물체를 만들어 내는 연구가 담배(이정민등, 1997), 토마토(최성진등, 1993), 목화(Perlak등, 1990), 배추(조현석등, 1997)에서 진행되어 밤나방과 해충에 저항성이 있다고 보고되었다.

따라서 본 시험은 유전공학 기법을 이용한 밤나방과 해충 저항성 플라스미드 벡터를 제작하여 국화에 형질전환 시키고자 수행 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 벡터

살충성 유전자인 *cry IAc* 유전자를 농업생명공학연구원에서 분양받아 pGR벡터에 삽입시켜 pGRBT 바이너리 벡터를 제작하고, 명지대에서 pMJU벡터를 분양받아 pMJRTB 벡터를 제작하였다. pMJRTB 벡터는 HB101 벡터와 같은 helper 플라스미드와 함께 tri parental mating (TPM)을 하는 벡터로 사용하였다.

나. 균주 및 배양

국화 형질전환을 위한 *Agrobacterium* 균주는 LBA4404, GV301 및 EHA105로써 농업생명공학연구원에서 분양받아 사용하였다. 배양된 균주의 콜로니는 kanamycin 50mg/L 첨가된 액체 YEP(10mg/L peptone, 10g/L yeast extract, 5g/L NaCl) 배지에 3ml 접종하여 28°C에서 250rpm으로 2일간 진탕 배양하였다.

3. 결과 및 고찰

Bt 독소 유전자인 *cry IAc*를 pGR 벡터와 pMJ 벡터에 subcloning한 벡터의 maps은 그림1과 같다. pGRBT 벡터는 *CaMV 35S* 프로모터와 *Nos* 터미네이터를 구성하는 *cry IAc* 유전자 세트와 더불어 *hpt* 유전자가 있어 하이그로마이신을 배지에 첨가하여 형질전환 식물체를 선발할 수 있는 벡터이다.

pMJRTB 바이너리 벡터는 *cry IAc* 유전자 외에도 유전자 발현에 필요한 프로모터 부위를 포함하여 전체 3.3kb 크기의 절편으로 재조합하였으며, 제초제 유효성분에 저항성이 있는 *bar* 유전자를 coding 하고 있다. 특히 단자엽 식물인 벼에서 형질전환이 용이하도록 하는 rice *rbcS* 프로모터를 가지며, TP(transit peptide)를 가졌으며, 왼쪽과 오른쪽 경계에 matrix attachment region(MAR)이 있는 것이 이 벡터의 특징으로 tri-parental mating으로 벡터를 제작하였다.

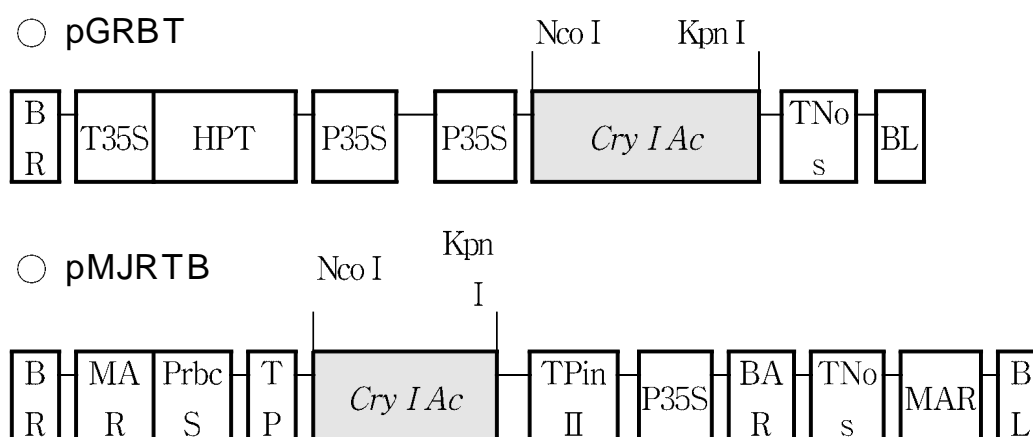


그림1. 내충성 형질전환을 위하여 제작된 바이너리 벡터 constructs.

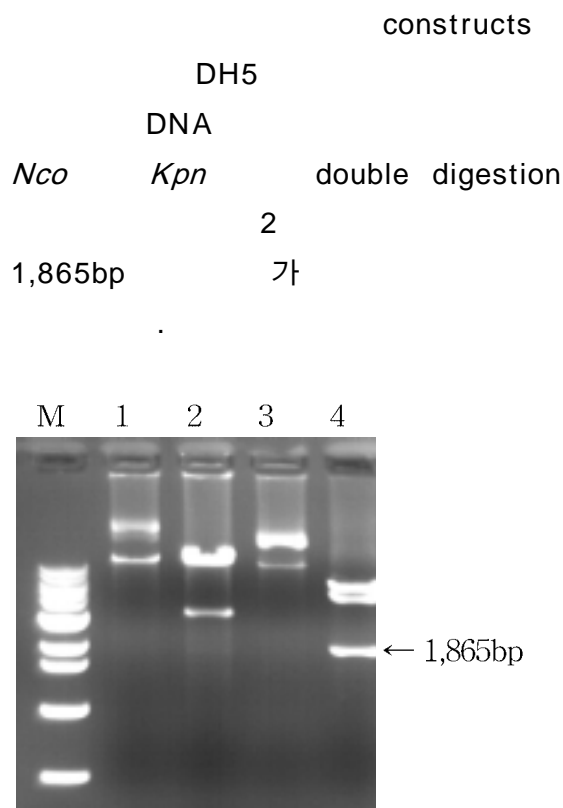


그림2. 전기영동에 의해 제작된 바이너리 벡터 확인

(M : 1kb ladder molecular marker,
 1 : pMJRTB, 2 : pMJRTB(*Nco* I /*Kpn* I),
 3 : pGRBT20, 4 : pGRBT20 (*Nco* I /*Kpn* I))

현재까지 12종의 아그로박테리움이 밝혀졌는데 속에 따라 그 특성이 매우 다르다고 보고하였다(Harry, 2000). 본 연구에서는 pGRBT는 LBA4404, GV301, EHA105등 3종의 아그로박테리움과 heat shock 방법으로 conjugation시켰으며, pMJRTB 벡터는 LBA4404와 helper 플라스미드인 pRK2013(HB101)과 tri-parental mating을 통하여 conjugation시켰다.

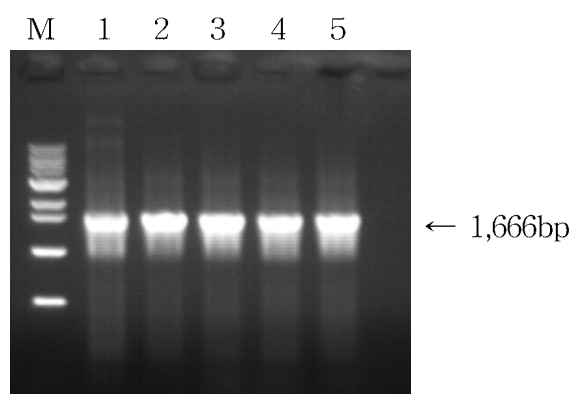


그림3. PCR에 의한 아그로박테리움 conjugation 확인

(M : 1kb ladder molecular marker,
 1 : pGRBT20, 2 : pMJRTB+LBA4404+HB101,
 3 : pGRBT+LBA4404, 4 : pGRBT+GV301,
 5 : pGRBT+EHA105)

Conjugation시킨 다음 아그로박테리움 DNA를 추출한 후 *Bt*유전자의 일부분을 포함하는 primer를 디자인한 결과 sense primer는 5'-TGCTTGAGTAACCCAGAAGT-3', anti sense primer는 5'-AATCGCTGGATTGAA GATTA-3'로 각각 20mer로 구성하는 nucleotides조각을 디자인 하였다. 이러한 primer로 PCR한 결과 그림3과 같이 4종의 바이너리 벡터 모두 1,666bp 크기의 DNA조각을 복제하여 아그로박테리움에 conjugation되었음을 확인할 수 있었다.

4. 적 요

가. pGRBT 플라스미드 벡터로 LBA4404, GV301 및 EHA105 아그로박테리움에 형질전환시켜 3종의 벡터를 제작하였다

나. pMJRTB플라스미드 벡터를 LBA4404 및 HB101 균주로 tri-parental mating 실시하여 1종의 벡터를 제작하였다. 따라서 pGRBT 플라스미드 벡터 3종과 pMJRTB플라스미드 벡터 1종 등 총 4종의 내충성 아그로박테리움 벡터를 제작하였다.

5. 인용문헌

- 이정민, 류종식, 권무식. 1997. *Bacillus thuringiensis* 살충성 결정단백질 유전자 (*cryIIA*)의 형질전환 식물 제작. 한국 식물조직배양학회 24:305-311
- 조현석, 이연희, 박범석, 김호일, 손재근. 1997. 형질전환에 의한 살충성 유전자 *cryIIA*의 배추로의 도입. 한국육종학회지. 29:92-102
- 최성진, 김준철. 1993. 형질전환 토마토식물(*Lycopersicon esculentum*)의 자가수분후세대에서 살충성유전자의 전달. 한국식물조직배양학회. 20:321-327
- Harry K. 2000. A guide to Agrobacterium binary Ti vectors. Trends in plant science. 5:446-451
- Hofte H., Whiteley HR. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiological Reviews. 53:242-255
- Perlak, FJ., Deaton, RW., Armstrong, TA., Fuchs, RL., Sims, SR., Greenplate, JT., Fischhoff, DA. 1990. Insect resistant cotton plants. Bio/Technology. 8:939-943