

논벼에서 유전자 *Bcl-2*의 발현

김영호, 리동철

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《농업부문 과학자, 기술자들의 역할을 높여 우리 나라의 기후풍토에 맞으며 어떤 불리한 자연기후조건에서도 높고 안전한 수확을 거둘수 있는 새로운 품종들을 더 많이 만들어내도록 하여야 하겠습니다.》(《김정일선집》 증보판 제10권 351페이지)

프로그램화된 세포죽음(programmed cell death: PCD)은 식물의 생장발육과 형태형성, 불리한 환경에 대한 방어반응에서 중요한 역할을 한다. *Bcl-2*, *Ced-9*를 비롯한 아포토시스 억제유전자들은 염스트레스를 비롯한 불리한 환경에서 일어나는 세포죽음을 억제함으로써 식물체의 저항성을 높여준다.[1-4]

우리는 아포토시스억제유전자 *Bcl-2*를 *Agrobacterium*법으로 논벼에 도입하여 식물체를 얻는데 기초하여 후대에서 검정하기 위한 연구를 하였다.

재료와 방법

연구재료로는 논벼(*Oryza sativa* L.)품종 《중화 11》호에 아포토시스억제유전자 *Bcl-2*를 도입한 계통을 리용하였다.

실험에 리용된 모든 시약들은 분석순급이상이었다.

벼게놈DNA의 분리정제는 CTAB법으로, 총RNA의 분리정제는 Trizol법으로 하였다.

목적유전자의 삽입유무는 PCR법과 사우던잡종화법[4]으로, 발현측정은 노던잡종화법[4]으로 진행하였다. 총RNA의 전기영동분리는 1.2%(w/v) 포름알데히드-아가로즈겔을 리용하였으며 탐침은 α -32P-dCTP로 표식하였다. 잡종화신호의 검출은 화상분석기(《Typhoon8600》)로 진행하였다.

PCR반응시약으로는 PCR반응키트(《Promega》)를 리용하였다.

PCR반응은 다음의 공정에 따라 진행하였다.

예비변성 94°C 5min⇒변성 94°C 30s, 아닐링 60°C 30s, 연장 72°C 40s, 연장 72°C 10min, 30회 순환⇒최종연장 4°C 1h.

프라이머설계프로그램 Primer Premier 5.0을 리용하여 프라이머를 설계한 다음 전문기관에 의뢰하여 합성하였다.

Bcl-2(ORF) 상류프라이머 ATGGCGCACGCTGGGAGAACAGGG

하류프라이머 TCACTTGTGGCCCAGATAGGCACC

유전자를 도입한 식물체의 멘델유전분리비의 분석은 식물체의 T1, T2대 잎절편(약 2cm)을 1mg/mL의 하이그로미딘(Hyg)용액에 잠그고 3일 지나서 잎절편의 갈색화정도를 관찰하여 항생소저항성을 평가하였다. χ^2 -검정을 통하여 유전분리비를 결정하였다.

결과 및 논의

T1대에서 유전분리비의 검정 한꼬빼체로 선발된 *Bcl-2*도입T1대 종자를 정상조건에서 싹틔워 액체배지에서 10일간 자래운 다음 잎절편(2cm 정도의 길이)을 취하여 1mg/mL Hyg 수용액에 잠그었다. 3일 후에 잎절편의 갈색화정도를 육안으로 관찰하고 저항성과 감수성개체들의 비율을 분석하였다.(표)

표. *Bcl-2*도입T1대에서의 Hpt저항성
분리비의 χ^2 -검정표

계통	갈색화정도	측정값	리론값	χ^2 계산값
<Bcl-2-36>	저항성	38	41.25	1.02
	감수성	17	13.75	
<Bcl-2-41>	저항성	57	60	0.30
	감수성	23	20	

자유도 1, χ^2 계산값(3:1), χ^2 0.05=3.84

도 우와 같은 결과를 얻었으며 따라서 5개 계통들에 대하여 유전자의 정확성을 확인하였다.

목적유전자의 발현형형검사 한꼬빼체로 선발된 5개 계통의 T1대식물체의 잎절편에서 총RNA를 추출하여 유전자의 발현정도를 노우던잡종화분석한 결과는 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 야생형과 빈운반체를 전이시킨 대조식물체에서는 *Bcl-2*가 발현되지 않았지만 도입개체들에서는 유전자가 뚜렷이 발현되었으며 <Bcl-2-36>그루에서 발현량이 제일 높았다.

*Bcl-2*가 도입된 논벼후대에서 같은형접합체선발 T2대 어린모들중에서 12개의 개체를 두 번에 걸쳐 임의로 선발하고 게놈DNA를 추출하여 PCR검정에서 모두 양성이면 같은형접합체로 보았다.(그림 2)

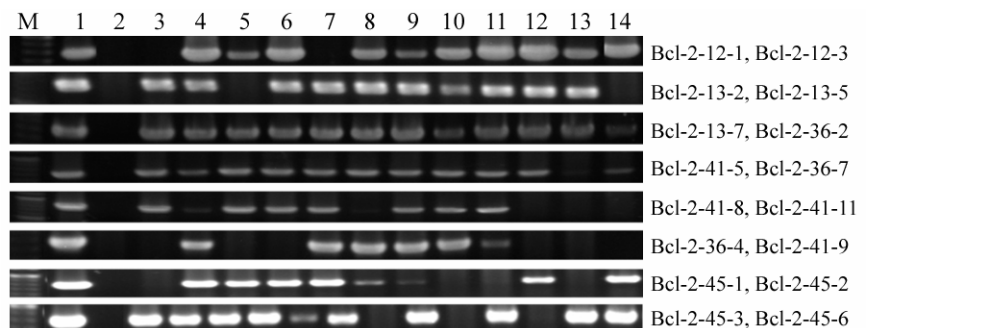


그림 1. *Bcl-2*도입T1대에서 유전자의 발현분석결과
탐침: *Bcl-2*의 전 배렬을 α -32P-dCTP로 표식, 1-야생형
벼(비전이형), 2-운반체, 3-<Bcl-2-12>, 4-<Bcl-2-36>, 5-<Bcl-2-13>, 6-<Bcl-2-41>, 7-<Bcl-2-45>

그림 2. T2대에서 순계선발을 위한 PCR증폭산물의 전기영동결과

M은 DNA분자량표식자(GeneRuler™ Ladder Mix), 1-양성대조
(재조합플라스미드), 2-음성대조(야생형벼), 3-14는 시험개체들;
1% 아가로스겔, 1×TAE완충액, 영동전압 5V/cm

그림 2에서 보는바와 같이 <Bcl-2-12-3>, <Bcl-2-13-7>, <Bcl-2-36-2>, <Bcl-2-41-5>, <Bcl-2-45-3>에서 두차례의 PCR검정결과 모두 목적유전자의 증폭산물이 나타났다. 이로부터 이 5개의 계통을 같은형접합체로 선발하였다.

맺 는 말

*Agrobacterium*감염법으로 아포토시스억제유전자 *Bcl-2*를 논벼품종 《중화 11》호에 도입한 식물체를 얻었다.

후대에 대한 분석을 통하여 목적유전자가 단교배체로 들어있으며 후대에서 안정하게 유전되어 발현되는 순계품종을 선발하였다.

참 고 문 헌

- [1] B. N. Bonnefoy et al.; Biochim. Biophys. Acta, **1644**, 159, 2004.
- [2] C. M. Holst et al.; Cell Biol. Int., **32**, 66, 2008.
- [3] A. J. Kowaltowski et al.; Cell Death Differ, **7**, 903, 2000.
- [4] 印莉萍 等; 自然科学进展, **16**, 3, 262, 2006.

주제105(2016)년 1월 5일 원고접수

Expression of *Bcl-2* Gene in Rice

Kim Yong Ho, Ri Tong Chol

Bcl-2 gene was transformed into rice(*Oriza sativa* subsp. *japonica* cv. Zhonghua 11) calli by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation.

The incorporation of *Bcl-2* gene into rice genome was detected by Hygromycin selection, PCR relative to target genes and Southern-blotting.

The expression of *Bcl-2* gene was confirmed by Northern-blotting in transgenic lines and as a result, homozygotic lines of transgenic rice were obtained in five lines.

Key words: *Bcl-2* gene, rice