

애기장대(*Arabidopsis thaliana*)에서 안티센스*BnDAD1*유전자의 발현

박 학 성

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《나라의 과학기술을 세계적수준에 올려세우자면 발전된 과학기술을 받아들이는것과 함께 새로운 과학기술분야를 개척하고 그 성과를 인민경제에 적극 받아들여야 합니다.》

(《김정일선집》 증보판 제11권 138~139페이지)

애기장대에서 자스몬산생합성의 첫 단계에서 중요한 역할을 하는 포스포리파제 A1을 암호화하고있는 *DAD1*(defective in anther dehiscence 1)유전자는 꽃가루성숙이나 꽃가루집터치기에 관계하는 유전자[2]이며 이 유전자가 결실된 갑작변이체는 리놀렌산이나 자스몬산처리에 의하여 염성이 회복된다는것이 알려져있다.[3]

우리는 짧은 기간에 농작물의 1대잡종에 리용될수 있는 수성불염계통을 육성하기 위하여 *BnDAD1*유전자를 안티센스방향으로 식물발현운반체에 재조합[1]하고 재조합된 *BnDAD1*유전자의 발현을 애기장대에서 연구하였다.

재료와 방법

연구재료로는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)의 생태형Columbia를 리용하였다.

애기장대키우기 종자를 먼저 70% 에틸알콜에서 30~60s동안 소독하고 무균수로 두번 씻은 다음 0.5%의 트윈 20이 포함되어있는 2% 차아염소산나트륨에서 5min동안 처리하였다. 다음 무균수로 4~5차 다시 씻고 4°C에서 4일동안 봄맞이처리를 하였다.

애기장대는 하루 16h 빛, 8h 어둠조건과 빛세기 14 000lx, 상대습도 80%인 생장실에서 키웠다.

유전자전이를 위한 아그로박테리움준비 안티센스*BnDAD1*유전자를 가진 아그로박테리움(pCAMBIA1301-BnDAD1)을 활성화하고 단클론을 선택하여 항생소(리파미핀과 카나미핀)를 넣은 LB액체배지에서 선발하여 유전자전이에 리용하였다.

애기장대에서 꽃침종법에 의한 유전자전이방법 애기장대에서 첫 꽃대를 잘라버리면 자극으로 되어 많은 꽃들을 동시에 얻어낼수 있다. 기본꽃대를 자른 후 4~8일사이에 꽃들이 제일 많이 필 때 아그로박테리움용액으로 감염시켰다. 식물체를 옆으로 눕혀 아그로박테리움용액에 2~3min동안 잠그어 가볍게 흔들었다. 식물체를 비닐주머니에 넣어 어둠조건에서 하루밤 놓아두었다. 다음날부터는 정상개체와 같이 물을 주고 식물체를 키웠다. 종자를 수집하여 원심관안에 넣어 4°C에서 말리워 보관하였다.

T₁에서 항생소에 의한 선발과 형질관찰 T₁의 종자를 소독하고 4°C에서 2일동안 령처리하였다.

다음 1/2MS, 0.8% 우무와 15 μ g/mL의 하이그로미딘(Hyg)이 포함된 선발배지에 옮겨 선발하였다. 선발한 개체들을 생장실조건에서 키우면서 일부 개체들의 잎에서 PCR에 의한 목적 유전자의 검증과 형질관찰을 진행하였다. 형질관찰은 싹트기와 자라기특성을 보면서 꽃형질특성을 기본으로 관찰하였다.

T₁에서 선발된 개체에서 프로모터배열의 PCR증폭과 GUS검정 T₁에서 선발된 개체의 잎에서 DNA를 분리하여 PCR를 진행하였다. 암호배열검증을 위한 정방향프라이머(FP1)는 5'-ATTGAGCTCATGAGATTCTCTTTTCTCCC-3'이고 거꿀방향프라이머(RF1)는 5'-ATTTCTAGAGTAGATACGTCTTAGCTCGT-3'이다. PCR에 리용되는 총액은 20 μ L인데 그중 0.4 μ L dNTP(200 μ mol/L), 1.0 μ L 프라이머(2.0 μ mol/L), 1 μ L의 DNA주형, 0.2 μ L TaqDNA폴리메라제, 2.0 μ L의 ddH₂O이다. PCR조건은 94 $^{\circ}$ C 4min→30회 순환의 94 $^{\circ}$ C 변성 30s, 50 $^{\circ}$ C 아닐링 30s, 72 $^{\circ}$ C 연장 60s→72 $^{\circ}$ C 연장 5min이다.

선발된 전이그루의 꽃을 GUS염색액에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 하루밤 방치하였다. 염색정도를 확인한 다음 시료를 70% 에틸알콜로 탈색시키고 꽃기관들에서 GUS염색액의 물든 정도를 관찰하였다.

전이식물그루의 염성회복실험 전이식물체가 꽃핀 후에 수성불염성을 확인한 다음 이미 꽃핀 개체들이 있는 가지를 잘라버리고 다시 나온 가지에서 성숙되지 않은 꽃망울을 50 μ mol/L 메틸자스몬산(MeJA)에 1min동안 담그었다. 3~4일후에 전이식물체에서 꽃가루집의 성숙도와 꽃가루의 발아상태, 수꽃술의 성장상태를 관찰하여 염성회복을 확인하였다.

결과 및 논의

애기장대에서 안티센스방향으로 식물발현운반체에 재조합시킨 *BnDAD1*유전자를 꽃침종법으로 전이시켜 얻은 종자를 T₁로 하고 T₁에서 유전자전이유무를 검증하였다.

1) T₁에서 항생소에 의한 선발과 형질관찰

먼저 선발배지에 적합한 Hyg의 농도를 결정하였다.(표 1)

표 1에서 보는바와 같이 애기장대에서 유전자전이후 선발에 적합한 Hyg의 농도는 15 μ g/mL였다. 그러므로 우리는 15 μ g/mL의 Hyg가 포함된 선발배지에서 유전자전이계통을 선발하였다.(그림 1)

표 1. 애기장대에서 Hyg의 감수성농도결정

지표	Hyg농도 /(μ g·mL ⁻¹)						
	0	1	5	10	15	20	25
총처리	71.3	81.0	62.0	65.0	73.3	66.7	48.7
알수/알	± 13.3	± 10.2	± 16.3	± 16.8	± 19.4	± 6.5	± 9.2
푸른 식물체수	69.3	76.3	52.7	18.0	0	0	0
/개	± 11.9	± 11.1	± 15.5	± 4.2			
생존률	97.4	93.9	84.2	27.9	0	0	0
/%	± 1.4	± 2.1	± 2.8	± 3.5			

1/2MS배지, 배양 5d후 관찰

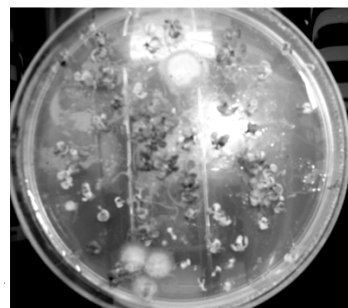


그림 1. 15 μ g/mL Hyg를 첨가한 선발배지에서 선발

자래위 꽃피는 시기에 꽃형질들을 관찰하고 꽃기관과 꽃가루관찰에 의하여 수성불염 전이개체들을 확증하였다.(표 2)

표 2. 애기장대에서 유전자전이를

총처리알수/알	Hyg선택개체수/개	전이개체수/개	전이를/%
218	16	6	2.8

표 2에서 보는바와 같이 T₁에서 선발한 종자 218개중에서 하이그로미쥬저항성(Hyg⁺)개체는 16개 나타났으며 16개 개체중 6개 개체에서 수성불염성이 나타났으므로 전이률은 2.8 %이다.

2) T₁에서 선발한 유전자전이개체에서 PCR와 GUS검정

T₁에서 선발한 유전자전이개체에서 PCR분석을 진행하였다.

유전자전이를 하지 않은 개체를 대조로 하고 Hyg⁺을 가지면서 수성불염성을 가진 6개의 유전자전이개체에 대한 PCR분석을 진행하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 전기영동띠의 크기는 대략 1.2kb였다. 목적하는 유전자의 크기가 1 270bp[1]이므로 PCR검증에 리용한 6개 전이개체에서 모두 목적유전자가 재조합되었다는것을 보여주었다.

또한 6개의 유전자전이그루에서 GUS검정을 진행하였는데 그 결과는 표 3과 같다.

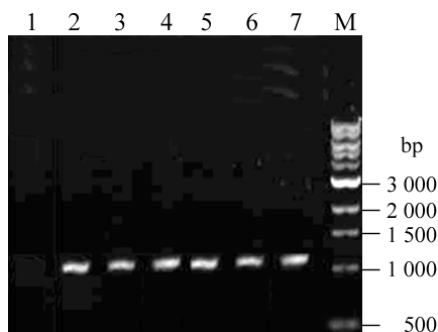


그림 2. T₁에서 전이된 개체에서 PCR검정

M은 분자표식자, 1-양성대조, 2-7은 유전자전이개체

표 3. 전이된 개체에서 GUS검정결과

전이개체 번호	관찰한 꽃기관					
	꽃잎	자방	암꽃술	꽃가루집	꽃가루	수꽃술대
1(대조)	—	—	—	—	—	—
2	—	—	—	++	++	++
3	—	—	—	++	++	+
4	—	—	—	+	+	+
5	—	—	—	+	+	+
6	—	—	—	+	+	+
7	—	—	—	++	++	+

++ 염색정도가 진함, + 염색정도가 약함, — 염색되지 않음

표 3에서 보는바와 같이 6개의 전이된 개체에서 GUS검정결과 목적유전자발현정도는 차이가 있으며 다같이 꽃기관에서 꽃잎, 자방과 암꽃술에서는 발현되지 않지만 수성꽃기관들인 꽃가루집, 꽃가루와 수꽃술대에서는 발현되었다. 이것은 *BnDAD1* 유전자가 애기장대의 꽃기관에서도 수성꽃기관들에서만 발현된다는것을 알수 있다.

3) 유전자전이개체의 꽃형질특성과 MeJA처리후 수성불염성의 회복

유전자전이개체들의 꽃형질특성은 다같이 수꽃술길이가 대조에 비하여 짧고 꽃가루집이 미성숙된 개체였다.(그림 3의 ㄴ))

전이개체들의 꽃형질관찰을 통하여 유전자전이가 인정된 6개 개체에서 이미 꽃핀 개체들이 있는 가지를 잘라버리고 다시 나온 가지에서 성숙되지 않은 꽃망울을 50μmol/L MeJA



그림 3. T₁에서 유전자전이가체체의 꽃형질과

MeJA처리후 수성불염성회복

㉠) 대조, ㉡) 유전자전이가체, ㉢) MeJA처리후 수성불염성회복개체

에 1~2min동안 담그었다 꺼내어 3일후에 검사하였다. 검사결과 본래 꽃가루집이 미성숙된 개체였거나 수꽃술이 짧아져 수성불염으로 나타났던 전이가체(그림 3의 ㉡))에서 염성이 회복되었다.(그림 3의 ㉢)) 꽃가루집이 터지지 못하고 꽃가루가 비정상이던 전이가체(그림 4의 1)에서 꽃가루집정상으로 터지면서 꽃가루가 생활력을 가져 정상수분하여 열매를 맺으며 정상꼬투리를 가졌다.(그림 4의 2)

이와 같이 애기장대에서 안티센스방향으로 식물발현운반체에 재조합시킨 *BnDAD1*유전자를 꽃침종법으로 전이시키면 꽃피는 시기에 수꽃술길이가 대조에 비하여 짧고 꽃가루집이 미성숙된 수성불염체통이 얻어진다.

이러한 유전자전이가체는 MeJA처리에 의하여 다시 염성이 회복될수 있는 특성을 가지고있으므로 이 원리를 농작물의 1대잡종강세에 리용하면 인공적으로 염성을 조절할수 있는 수성불염체통을 짧은 시간에 얻어낼수 있다. 이러한 수성불염체통은 농작물 1대잡종의 2계법확립에서 중요한 의의를 가지게 될것이다.

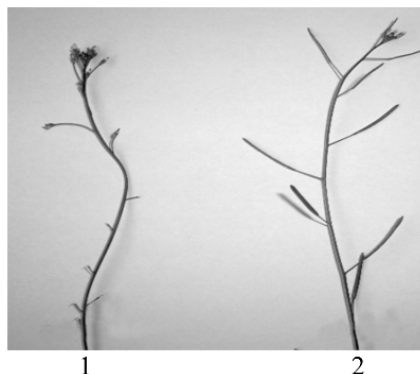


그림 4. 유전자전이가체에서
꼬투리특성과 MeJA처리후
수성불염성회복

1-유전자전이가체, 2-MeJA처리후
수성불염성회복개체

맺 는 말

- 1) 애기장대에서 T₁의 선발에 적합한 하이그로미핀의 농도는 15μg/mL이다.
- 2) T₁에서 유전자전이율은 2.8%이다.
- 3) 수성불염성유전자전이가체들은 50μmol/L MeJA처리후 염성이 회복된다.

참 고 문 헌

- [1] 김일성종합대학학보(자연과학), 59, 1, 118, 주체102(2013).
- [2] P. M. Sanders et al.; Plant Cell, 12, 1041, 2000.
- [3] S. Ishiguro et al.; Plant Cell, 13, 2191, 2001.

주체103(2014)년 11월 5일 원고접수

**The Expression of an Antisense Inhibition of a Nuclear Gene,
BnDAD1, in *Arabidopsis thaliana***

Pak Hak Song

The expression characteristics of an antisense inhibition of a nuclear gene, *BnDAD1* in *Arabidopsis thaliana* was considered. Out of 6 plants transformed with an antisense inhibition of a nuclear gene, *BnDAD1*, showed the defect of anther dehiscence at the flower bud opening stage and produced inviable pollen. So these 6 plants showed male sterility. The transplants, like these, were rescued by the application of 50 μ mol/L MeJA.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, *BnDAD1* gene