

수수에 *DREB2A* 유전자를 도입한 초기세대에서 유전자도입유무의 검증

김혁철, 김창호, 김명룡

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 지적하시였다.

《기초과학부문을 발전시켜야 나라의 과학기술수준을 빨리 높일수 있고 인민경제 여러 분야에서 나서는 과학기술적문제들을 원만히 풀수 있으며 과학기술을 주체성있게 발전시켜나갈수 있습니다.》(《김정일선집》 제10권 증보판 485페이지)

우리는 혼합전극을 리용하여 염건딜성유전자 *DREB2A*(Dehydration Responsive Element)를 수수(*Holcus sorghum* L.)에 도입하고 그 후대들에서 도입유무를 검증하며 도입개체들을 선발하는 실험을 하였다.

재료와 방법

재료 염건딜성유전자 *DREB2A*를 도입한 수수품종 《찰 9508》과 《능사 1》호를 연구재료로 리용하였다.

유전자도입[1]은 자체로 제작한 생물체와 비생물체로 구성된 혼합전극과 고전압발생장치를 리용하였다.

하이그로마이싱저항성(hyg^r)판정을 위한 선발농도의 결정 *DREB2A*유전자가 들어있는 2원운 반체 pBIN-DREB2A에는 하이그로마이싱저항성선택표식유전자도 들어있다. 그리하여 우리는 28℃에서 20일동안 싹틔운 수수에서 직경이 5mm정도인 원형잎절편을 취하여 각이한 농도의 하이그로마이싱용액(0, 50, 100, 150, 200μg/mL)에 잠그고 5일 지난 다음 색변화를 관찰하는 방법으로 선발농도를 결정하였다.

PCR에 의한 검증 선발개체들에 대한 PCR분석은 선행방법[2, 3]에 따라 진행하였다.

싹틔운 수수잎에서 핵산을 분리하고 CaMV35S프로모터에 의하여 유전자도입유무를 확인하였다.

CaMV35S프로모터의 프라이머는

정방향: 5'-GCT CCT ACA AAT GCC ATC A-3'

역방향: 5'-GAT AGT GGG ATT GTG CGT CA-3'

이다.

NaCl농도에 따르는 수수의 유전자도입개체 선발 *DREB2A*유전자가 도입되는 경우 내염성을 비롯한 탈수스트레스에 대한 견딜성이 높아지며 씨앗이 싹틀 때 염스트레스에 가장 예민하다는 특성을 리용하여 선발농도가 2%인 NaCl용액에서 씨앗의 싹튼률을 관찰하고 유전자도입개체들을 선발하였다.

결과 및 논의

1) T₁에서 유전자도입검증

수수의 잎절편을 각이한 농도의 하이그로마이싱용액에 방치하였을 때 나타나는 잎절편의 색변화를 관찰하였다.(표 1)

표 1. hyg농도와 날자에 따른 잎절편의 색변화(n=10)

품종	hyg농도 (g·mL ⁻¹)	처리날자/d				
		2	3	4	5	6
《찰 9508》	0	—	—	—	—	+
	50	—	—	—	+	++
	100	—	—	+	++	+++
	150	—	—	+	++	+++
	200	—	—	+	+++	+++
	250	—	—	+	+++	+++
《능사 1》호	0	—	—	—	—	+
	50	—	—	—	+	++
	100	—	—	+	++	+++
	150	—	—	+	++	+++
	200	—	—	+	+++	+++
	250	—	—	+	+++	+++

— 잎색변화 없을 때, + 잎절편변두리가 누렇게 되었을 때, ++ 잎절편의 2/3이상이 누렇게 되었을 때, +++ 잎절편전체가 누렇게 되었을 때

표 1에서 보는바와 같이 28℃의 빛조건에서 5일정도 지났을 때 모든 잎절편들이 탈색되어 연한 누런색을 띠었다. 이것은 200μg/mL의 hyg농도에서 5일정도 지나면 수수의 잎절편세포들이 괴사된다는것을 보여준다. 이로부터 하이그로마이싱저항성에 기초한 형질 전환체선발조건을 hyg농도 200μg/mL, 28℃, 5일로 정하였다.

혼합전극을 리용하여 결정한 최적조건으로 *DREB2A* 유전자를 수수에 도입한 당해(T₁)에 2% NaCl용액에서 초기선발된 개체들에 대한 하이그로마이싱저항성을 본 결과는 표 2와 같다.

표 2. 수수품종들에서 하이그로마이싱저항성비율

품종	유전자처리 개체수/개	초기선발 개체수/개	저항성 개체수/개	하이그로마이싱 저항성비율/%
대조(물)	150	0	0	0
《찰 9508》	150	42	28	18.6
《능사 1》호	150	40	23	15.3

표 2에서 보는바와 같이 《찰 9508》과 《능사 1》호의 하이그로마이싱저항성비율은 각각 18.6, 15.3%였다.

실험결과에 의하면 200μg/mL 하이그로마이싱이 들어있는 용액에서 대조구의 잎은 누렇게 되었지만 하이그로마이싱저항성개체들의 잎들은 풀색을 유지하였다.(그림 1)

하이그로마이싱저항성을 나타낸 개체들에 대하여 목적유전자가 정확히 도입되었는가를 확증하기 위해 PCR검증을 진행하였다.(그림 2)

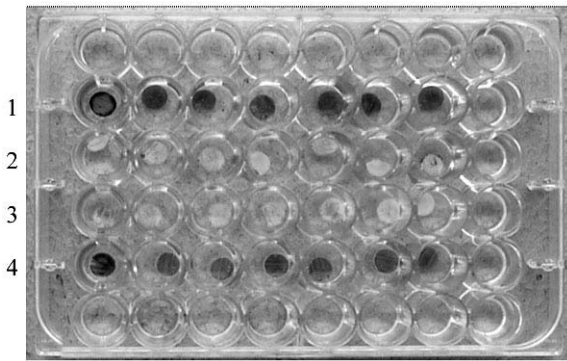


그림 1. 하이그로마이싱선발농도에서의 물색유지를
1-《찰 9508》하이그로마이싱저항성개체,
2-《찰 9508》(대조), 3-《능사 1》호(대조),
4-《능사 1》호하이그로마이싱저항성개체

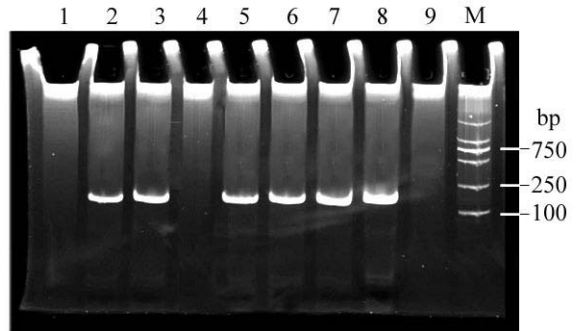


그림 2. 35s프로모터에 의한 PCR전기영동상
1-《능사 1》호(대조), 2-〈ㄴ-10〉, 3-〈ㄴ-11〉,
4-《찰 9508》(대조), 5-〈ㄱ-23〉, 6-〈ㄱ-32〉,
7-〈ㄱ-35〉, 8-양성대조, 9-음성대조,
M-DL-2000

그림 2에서 보는바와 같이 음성대조에서는 증폭산물이 나타나지 않았는데 이것은 PCR조작진행과정에 오염이 없었다는것을 보여준다. 한편 양성대조에서는 195bp 부근에서 증폭띠가 명백히 검출되었다.

〈ㄱ-23〉, 〈ㄱ-32〉, 〈ㄱ-35〉, 〈ㄴ-10〉, 〈ㄴ-11〉번 개체들에서도 35s프로모터에 해당하는 띠가 검출되었지만 대조를 비롯한 나머지 개체들에서는 검출되지 않았다. 이것은 주목한 개체들에서 목적유전자가 정확히 삽입되었다는것을 보여준다.

2) T₂에서 유전자도입개체들의 선발

T₁에서 선발된 개체들의 종자(T₂)를 싹틔운 실험결과는 표 3과 같다.

표 3. 2% NaCl용액에서 선발개체들의 싹튼률과 갈변화

계통명	10d		20d		계통명	10d		20d	
	싹튼률 /%	갈변화	싹튼률 /%	갈변화		싹튼률 /%	갈변화	싹튼률 /%	갈변화
《찰 9508》(대조)	0		0		《능사 1》호(대조)	0		0	
〈ㄱ-8-2〉	6	+	8	++	〈ㄴ-5-7〉	10	+	12	++
〈ㄱ-23-5〉	49	-	54	-	〈ㄴ-10-3〉	36	-	52	-
〈ㄱ-29-11〉	20	-	35	-	〈ㄴ-11-4〉	57	-	70	-
〈ㄱ-32-9〉	29	-	48	-	〈ㄴ-20-14〉	16	-	20	+
〈ㄱ-35-6〉	45	-	62	-					
〈ㄱ-18-14〉	14	-	16	+					

++ 갈변화가 심한것, + 약한것, - 갈변화 없음, n=100

표 3에서 보는바와 같이 2% NaCl용액에서 《찰 9508》품종의 〈ㄱ-23-5〉, 〈ㄱ-32-9〉, 〈ㄱ-35-6〉개체를 제외한 다른 개체들은 거의 싹트지 않았거나 일부 싹튼것들도 갈변화되어 인차 죽어버렸다. 또한 《능사 1》호에서는 〈ㄴ-10-3〉, 〈ㄴ-11-4〉개체들이 다른 개체들보다 싹튼률이 52, 70%로서 훨씬 높았다.

2% NaCl용액에서 싹튼률이 높은 〈ㄱ-23-5〉, 〈ㄱ-32-9〉, 〈ㄱ-35-6〉, 〈ㄴ-10-3〉, 〈ㄴ-11-4〉개체들에 주목을 돌리고 하이그로마이싱저항성을 검정하였다.

표 4. T₂에서 선발개체들의 하이그로마이싱감수성과 저항성개체수

계통명	접종수/개	하이그로마이싱감수성개체수/개	하이그로마이싱저항성개체수/개
《찰 9508》(대조)	20	20	—
〈 $\bar{\alpha}$ -18-14〉	20	18	2
〈 $\bar{\alpha}$ -23-5〉	20	4	16
〈 $\bar{\alpha}$ -29-11〉	20	8	12
〈 $\bar{\alpha}$ -32-9〉	20	1	19
〈 $\bar{\alpha}$ -35-6〉	20	1	19
《능사 1》호(대조)	20	20	—
〈 $\bar{\alpha}$ -10-3〉	20	8	12
〈 $\bar{\alpha}$ -11-4〉	20	1	19
〈 $\bar{\alpha}$ -20-14〉	20	16	4

표 4에서 보는바와 같이 〈 $\bar{\alpha}$ -23-5〉, 〈 $\bar{\alpha}$ -29-11〉, 〈 $\bar{\alpha}$ -32-9〉, 〈 $\bar{\alpha}$ -35-6〉 개체들과 〈 $\bar{\alpha}$ -10-3〉, 〈 $\bar{\alpha}$ -11-4〉개체들은 200 μ g/mL의 하이그로마이싱용액에 대하여 저항성을 나타냈으며 대조를 비롯한 나머지 개체들은 모두 강한 감수성을 나타냈다. 이것을 통하여 T₂에서도 여러 개체들에 유전자가 탈락되지 않고 유지된다는것을 알수 있다.

맺는 말

수수에서 *DERB2A* 유전자가 도입된 개체들에 대한 하이그로마이싱용액선발농도는 200 μ g/ml 이다.

T₁의 《찰 9508》과 《능사 1》호에서 유전자도입개체들의 하이그로마이싱저항성비율은 각각 18.6, 15.3%이다.

참고 문헌

- [1] 김혁철 등; 생물학, 2, 57, 주체102(2013).
- [2] Y. Zhang et al.; Acta Genetica Sinica, 33, 12, 1105, 2006.
- [3] C. Suriyan et al.; Agricultural Sciences in China, 8, 1, 51, 2009.

주체103(2014)년 3월 5일 원고접수

Identification of Target Gene in Transgene Sorghum (*Holcus sorghum* L.) with *DREB2A* Gene

Kim Hyok Chol, Kim Chang Ho and Kim Myong Ryong

In transgene sorghum with *DREB2A* gene, the concentration of selection solution by hygromycin is 200 μ g/mL.

Ratio of the hygromycin resistant is 18.6, 15.3% respectively, in glutinous sorghum “Chal 9508” and “Nungsa 1” of T₁.

Key words: target gene, sorghum, hygromycin resistant