
碩士學位論文

微細粒子投射法에 의한 柑橘(*Citrus sinensis*
Osbeck 'Yoshida') Callus 細胞의 形質轉換

濟州大學校 大學院

農化學科



1997年 12月

微細粒子投射法에 의한 柑橘(*Citrus sinensis*
Osbeck 'Yoshida') Callus 細胞의 形質轉換

指導教授 柳 基 中

秦 性 範

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함

1997년 12월

秦性範의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長: _____

委 員: _____

委 員: _____

濟州大學校 大學院

1997년 12월

Transformation of Citrus(*citrus sinensis* Osbeck
'Yoshida') Callus Cell by Microprojectile
Bombardment

Seong-Beom Jin

(Supervised by professor Key-Zung Riu)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE

DEPARTMENT OF AGRICULTURAL CHEMISTRY

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1997. 12.

목 차

Summary

I . 서	론	-----	1
II. 재료 및 방법		-----	3
1. 식물 재료		-----	3
2. DNA 클로닝 및 분리정제		-----	4
3. 미세입자의 DNA 피복		-----	5
4. 식물세포내 DNA 도입		-----	6
5. GLS 분석		-----	6
6. 형질전환체 선발		-----	7
7. PCR에 의한 DNA 분석		-----	7
III. 결과 및 고찰		-----	9
1. 식물발현 벡터 및 PCR primer		-----	9
가) 식물발현 벡터		-----	9
나) PCR primer		-----	11
2. DNA의 세포내 도입조건		-----	14
3. 세포내 도입된 GLS 유전자의 발현		-----	19
4. 형질전환체 선발		-----	21
5. 형질전환체의 FAD3 유전자 확인		-----	26
6. 형질전환체의 FAD7 유전자 확인		-----	28
7. 형질전환체의 CTV 유전자 확인		-----	29
IV. 요	약	-----	30
V. 참 고 문 헌		-----	31

Summary

The conditions of DNA introduction into callus cells by microprojectile bombardment were optimised to establish a transformation system for citrus species. The callus cells of *Citrus sinensis* Osbeck 'Yoshida' were transformed with FAD3 and FAD7 genes which are related with fatty acid desaturation, and CTVcp which is a cDNA of coat protein gene of citrus triteza virus. The transformants were selected on a kanamycin medium and each of the introduced gene was analyzed by PCR.

1. The highest efficiency of DNA introduction into callus cells was obtained when the cells were bombarded with 1.11 μm of DNA-coated tungsten particle at 1100 psi of helium gas pressure, 6.4 mm of gap distance and 7.0 cm of target distance, and 27 inch Hg of chamber vacuum.

2. The citrus callus cells were bombarded with pBI121 harbouring FAD3, FAD7 or CTVcp. The cells bombarded with each DNA's were cultured on a medium containing 100 mg/L of kanamycin and the clones growing on the medium were selected as transformants.

3. The introduced FAD3 gene was identified by PCR in two clones from the callus cells bombarded with pBI121 harbouring FAD3.

4. The introduced FAD7 gene was identified by PCR in two clones from the callus cells bombarded with pBI121 harbouring FAD7.

5. The introduced CTVcp gene was identified by PCR in two clones from the callus cells bombarded with pBI121 harbouring CTVcp.

I. 서론

지금까지의 감귤품종개량은 주로 재배품종중 자연돌연변이 가지의 선발에 의존해 왔는데, 이 방법은 자연돌연변이 발생율이 높지 않을 뿐만 아니라 우연적인 요소가 많아 계획적인 육종체계를 수립하기가 어려운 단점이 있다. 부분적으로 교잡에 의한 신품종 육성이 시도되고 있으나 온주밀감을 비롯한 감귤류의 주요 품종들이 융성불임(male sterile)이기 때문에 종자를 얻을 수 없고, 다른 품종과 교잡하여 종자를 얻어도 다배성(polyembryonic) 때문에 목표형질이 도입된 개체를 얻을 수 있는 확률이 지극히 낮다. 그리고 전통적 방법으로 감귤을 육종할 때 가장 큰 어려움은 결실수령이 길기 때문에 육종에 소요되는 시간도 길어 약 20년이나 걸린다는 점이다(김한용, 1994).

유전자조작을 통한 식물형질전환방법 즉 분자육종법은 전통적 육종방법에 비해 다양한 생물자원의 유전형질을 이용할 수 있고, 특정 유전자만을 도입함으로써 목표형질을 선택적으로 도입할 수 있는 장점이 있다. 또 조직배양 단계 혹은 유묘단계에서도 형질을 검정할수 있기 때문에 육종기간을 크게 단축할 수 있는 잇점이 있다. 그러므로 감귤과 같이 결실수령에 이르는 시간이 긴 목본류의 품종개량에는 특히 효과적인 방법으로 생각되고 있다.

식물형질전환을 위해서는 목표유전자의 DNA를 식물세포내에 도입하여야 하는데, DNA의 세포내 도입에는 *Agrobacterium*을 매개로 하는 방법이 가장 보편적으로 쓰이고 있다(Aragao et al., 1993; Chibbar et al., 1991; Hooykaas, 1989; Rainieri et al., 1990; Kaneyoshi et al., 1994). 그러나 이방법은 숙주범위의 한계 때문에 쌍자엽이 아닌 식물에서는 그 활용성이 제한되어 왔다 (Morrish et al., 1993; Oard, 1991; Liang et al., 1994; Pena et al., 1995; Schroeder et al., 1993; Wilmink et al., 1992; Chung et al., 1993). 또한 *Agrobacteria* 에서 발생하는 독성과 *Agrobacterium* 을 제거하기 위해서 사용되는 carbenicillin 과 같은 항생제 때문에 식물체 재생 효율이 감소하는 단점이 있어 형질전환율을 떨어 뜨리는 단점과(Chee 와 Jerry, 1992) Citrus의 품종에 따라 이 박테리아에 대한 감수성이 다르고, transformation 효율이 여전히 낮아 문제로 남아있다(Moore et al., 1992).

근래에는 금속들의 미세입자에 DNA를 피복하여 물리적 방법으로 식물세포내에 유전자를 도입하는 미세입자투사법(microprojectile bombardment method)이 식물형질전환에 이용되고 있다. 미세입자 투사법은 물리적 방법으로 DNA를 세포내에 투사하기 때문에 Agrobacterium법에서와 같은 숙주범위의 제한이 없어 동물, 조류, 효모 그리고 쌍자엽이나 단자엽 식물 모두에게 적용될 수 있는 장점이 있다(Charest et al., 1992). 또 원형질체를 이용하는 방법과는 달리 세포막을 제거하여 원형질체를 만들 필요가 없으므로 효소 처리에 따른 부작용이 없고, 원형질체의 배양에 따르는 번거로움이 없다는 장점이 있다(Campbell et al., 1992; Casas et al., 1993; Hebert et al., 1993; Sanford et al., 1990; Daniell et al., 1993; Fromm et al., 1990; Zhong et al., 1993).

본 연구는 미세입자 투사법에 의한 감귤류 식물의 형질전환계를 확립하는데 1차적인 목표를 두고, 감귤 callus 세포에 유전자를 도입할 때 DNA도입효율에 영향을 주는 미세입자투사조건을 검토하여 DNA의 세포내 도입을 위한 적정 조건을 확립하였다. 그리고 이어서 지방산불포화효소 유전자(FAD3 와 FAD7)와 감귤 트리스테자 바이러스(citrus tristeza virus, CTV) 외피단백질의 cDNA를 각각 감귤세포내에 도입하여 형질전환체를 얻은 다음 형질전환체 내에 도입된 유전자들의 DNA를 polymerase chain reaction(PCR)로 확인하였다.



II. 재료 및 방법

1. 식물 재료

네블오렌지(*Citrus sinensis* Osbeck 'Yoshida') 미성숙 종자로 부터 유도된 체세포 배분화능이 있는 callus를 형질전환에 사용하였다. Callus는 BA 10mg/L를 첨가한 MT(Murashige and Tucker, 1969)(Table 1)배지에서 3주간격으로 계대배양하였으며, 20℃ ± 2, 5000Lux, 16hr의 조건에서 배양하였다.

Table 1. Composition of Murashige-Tucker medium.

Component	Concentration
	mg/L
Macronutrients	
NH ₂ NO ₃	1,650
KNO ₃	1,990
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Micronutrients	
KI	0.83
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
H ₃ BO ₃	6.2
Iron / EDTA	
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	27.3
Vitamins	
Myo-inositol	100
Nicotinic acid	5
Pyridoxine-HCl	10
Thiamine-HCl	10
Glycine	2
Carbon source	
Sucrose	30 g/L
Others	
Agar	7.5 - 8.0 g/L
pH	5.8

2. DNA 클로닝 및 분리정제

pB1121, pFAD3, pFAD7, pBDCTV_{CP}의 4종류 plasmid 중에서 pB1121, pFAD3, pBDCTV_{CP}는 *E. coli* HB101에, pFAD7은 *E. coli* JM109에 형질전환 시키고, 형질전환된 *E. coli*를 LB 배지에서 20시간 배양하였다. 이때 LB 배지의 조성은 Bacto-tryptone 10 g, Bacto-Yeast extract 5g, NaCl 5 g, pH7.0, kanamycin 50 mg/L, 배양 온도는 37°C 였다.

배양된 *E. coli* 1000 ml 를 250 ml의 원심분리관 (Nalgene, USA)에 나누어 고속 원심분리기 (Supra 22K, Hanil Science Industrial, Korea)로 5,000 x g 에서 20 분간 원심분리하여 pellet을 얻었다. 이 pellet 에 Mega-prep kit (Promega co., USA) 의 Cell resuspension solution (Table 2) 30 ml 를 가하여 현탁액을 만든 후 다시 Cell lysis solution (Table 2) 30 ml 를 가하여 부드럽게 혼합시켰다. 이 혼합액에 Neutralization solution (Table 2) 30 ml 를 넣어 즉시 혼합하고 5,000 x g 에서 15 분간 원심분리시켰다. 상정액을 취하여 상정액의 0.5 배에 해당하는 isopropanol 을 가하여 부드럽게 혼합한 후 5,000 x g 에서 20분간 원심분리시켰다. 상정액은 버리고 pellet에 TE buffer 4 ml를 가하여 DNA pellet을 현탁시켰다.

위에서 얻은 DNA 용액에 Wizard megapreps DNA purification resin solution (Table 2) 20 ml 를 가한 후 Wizard column 끝을 진공계에 연결시켜 용액을 추출하였다. 여기에 column 세척액 25 ml 를 가하여 column 에 남아있는 불순물을 세척하고 80% ethanol 10 ml를 가하여 column을 통과시킨 후 다시 진공계에 연결하여 column을 10분간 건조시켰다. column을 진공계로 부터 제거하고 reservoir 에 놓은 후 65-70°C 로 예열된 TE buffer 3 ml를 가하여 1,300 x g 에서 원심분리하여 plasmid DNA를 얻었다.

Table 2. Composition of Wizard mega-prep DNA purification system.

Solution name	Concentration	Amounts added
Cell resuspension solution		30 mL
Tris-Cl, pH 7.5	50 mM	
EDTA	10 mM	
RNase A	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
Cell lysis solution		30 mL
NaOH	0.2 M	
SDS	1 %	
Wizard megapreps DNA purification resin		
Neutralization solution		
Potassium acetate, pH 4.8	1.32 M	30 mL
Wizard column wash solution		25 mL
Potassium acetate	80 mM	
Tris-Cl, pH 7.5	8.3 mM	
EDTA	40 μM	

3. 미세입자의 DNA 피복

미세입자의 피복은 Sanford 등 (1993) 의 방법에 따라 수행하였다. 텅스텐 입자 (Bio-Rad, USA) 60 mg을 'Treff' 미량 원심분리관 (Tekmar Co., Cincinnati, Ohio, USA) 에 넣어 1 mL 에탄올을 가한 뒤 격렬하게 흔들어 준 다음 실온에서 15분간 방치하고 10,000xg 에서 15분간 원심분리하여 얻어진 pellet을 살균수로 3회 반복 세척하고 50% glycerol 1 mL (Daniell, 1993) 를 가해 저장용액으로 만들고 텅스텐의 산화를 방지하기 위하여 1-2 주 동안 -20°C 에서 보관하면서 사용하였다.

위의 텅스텐 현탁액 50 μl 에 DNA 용액 5 μl (1 $\mu\text{g DNA}/\mu\text{l}$), 2.5 M CaCl_2 용액

50 μ l, 0.1 M spermidine (Sigma Co., St Louis, Mo, USA) 용액 20 μ l 를 계속 교반하면서 가해 준 후 5분간 교반한 후 8,000xg 5분간 원심분리하였다. 이 pellet에 70% 에탄올 140 μ l 를 가하고 10,000xg 로 1 분간 원심분리한 뒤 다시 100% 에탄올 200 μ l 을 가한 후 격렬하게 혼합하여 10,000xg 에서 1 분간 원심분리하였다. 미세입자를 균일하게 얻기 위하여 ultrasonic cleaner (RK102, Bandelin, USA) 에서 진탕하면서 6 μ l 를 취한 뒤 macrocarrier에 신속하게 옮겨 건조시킨후 1-2시간 내에 사용하였다.

4. 식물세포내 DNA 도입

미세입자에 피복된 DNA는 Particle Delivery System (PDS) 1000/He (Bio-Rad Lab, USA)으로 감귤 callus 세포에 투사하여 도입하였다. Callus 세포는 계대배양 후 3 주가 된 것을 사용했는데, 충격완화용 고체배지(MT 기본배지)가 들어있는 petri dish (직경 8.7 Cm)의 가운데를 중심으로 callus 세포들을 균일하게 배열한 다음 DNA 피복 미세입자를 투사하였다.

5. GUS 분석



GUS 검정은 Jefferson 등 (1987) 의 방법으로 *in situ* 에서 수행하였다. DNA 피복입자를 투사한 세포를 24시간 정도 암배양후, 시료를 1.5 ml microtube에 옮겨 Table 3 의 GUS expression solution 500 μ l 를 가한 후, 다시 37°C에서 암배양하였다. 이후 광학현미경 하에서 GUS 유전자가 발현되어 나타나는 청색반점을 관찰하였다.

Table 3. GUS expression solution.

Reagents	Added amounts
N,N-dimethyl formamide	1-2 drops
X-Gluc (5-Bromo-4 chloro-3-indolyl glucuronide)	1 mg
0.1 M Phosphate buffer (pH7.0)	980 μ l
0.2 M KH ₂ PO ₄	87 ml
0.2 M K ₂ HPO ₄	122 ml
Distilled water	209 ml
5 mM Potassium ferricyanide	10 μ l
5 mM Potassium ferrocyanide	10 μ l
Triton X-100	1 μ l
total volume	1 mL

6. 형질전환체 선발

MT 기본배지 조성을 가진 agar 배지위에 배열하여 DNA 피복입자를 투사한 감귤 callus 세포들은 그대로 24시간 암조건으로 배양한 다음 kanamycin 농도가 100 mg/L 인 MT 배지에 옮겨 광조건으로 배양하였다. 약 4주 후 관찰했을 때 kanamycin 배지에서 계속 성장하는 clone 들을 선발하였다.

7. PCR에 의한 DNA 분석

형질전환된 callus 세포의 genomic DNA는 Chee 등 (1991) 의 방법으로 분리하였다. Callus cells 100-200 mg 을 알루미늄 호일에 포장하여 동결시킨 후 진공 냉동 건조기 (FD 1, 0-110, Heto Lab. Equipment, Denmark) 에서 건조시켰다. 막자사발에 액체질소를 넣어 곱게 분쇄한 후 여기에 5 ml CTAB 추출 완충용액 [(H₂O 703 ml, 1 M

Tris-HCl(pH7.5) 100 ml, 5 M NaCl 140 ml, 0.5 M EDTA(pH8.0) 20 ml, CTAB 10 g, β -mercaptoethanol 10 ml]] 을 가하여 부드럽게 혼합한 후 65°C 중탕기에서 90 분 동안 배양하면서 30분 마다 한번씩 흔들어 주었다. 실온에서 4-5 분 정도 식힌 후 4.5 ml 의 chloroform/octanol (24:1) 을 가하여 몇 번 흔들어 준 다음 4,000xg에서 10분 동안 원심분리하여 상장액을 취하였는데 이 과정을 두번 반복하여 수행하였다. 상장액에 차가운 6 ml isopropanol (2-propanol) 을 가하여 혼합시켜 10-15 분 동안 정치한 뒤 0.2 M NaOAc와 76% EtOH 가 혼합된 용액 3 ml 를 가하여 5,000xg 에서 원심분리하여 DNA pellet 을 얻었다. 이것을 76% EtOH 와 10 mM NH₄OAc 를 포함하는 용액 1 ml 로 DNA를 세척하고 여기에 200 μ l 의 TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 를 가하여 PCR 분석용 template DNA로 사용하였다.

PCR 반응 용액은 Table 4 와 같다. PCR은 96°C/5min - 58°C/3min - 72°C/1min 1회 를 수행한 다음 96°C/1min - 58°C/30sec - 72°C/1min 30회 수행 하였고, 끝으로 72°C/10min 1회 수행 하였다. 증폭된 DNA band 를 확인하기 위하여 반응액중 10 μ l 를 취하여 1.2% agarose gel 에서 전기영동을 실시하였다.

Table 4. Reaction mixture for PCR

Components	Final concentration
[10X] reaction buffer	[1 X]
100 mM Tris-HCl(pH 8.3 at 25°C)	
500 mM KCl	
15 mM MgCl ₂	
dNTP's mix , 2.5 mM each	200 μ M each dNTP
5-primer 1 , 10 μ M	0.25 μ M
3-primer 2 , 10 μ M	0.25 μ M
template DNA	~1 μ g/50 μ l
Taq DNA polymerase	2.5 u/50 μ l
total volume	50 μ l

IV. 결과 및 고찰

1. 식물발현 벡터 및 PCR primer

가) 식물발현 벡터

본 실험에 사용된 GUS, FAD3, FAD7 및 CTVcp의 네가지 유전자는 pBI121에 재구성된 것으로서 이들의 유전자 지도는 각각 Fig. 1 와 같다.

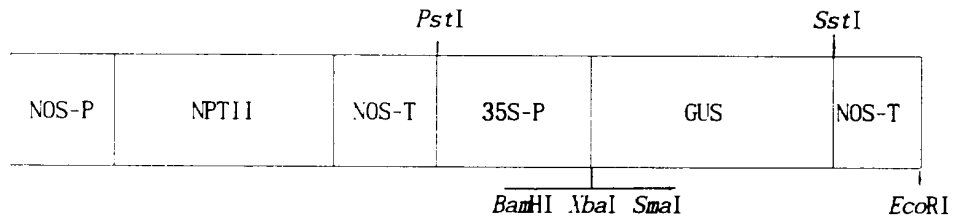
Plasmid pBI121 은 NOS-Promoter, NPTII, NOS-terminator, CaMV 35S promoter, GUS 로 구성되어 있는데 kanamycin 저항성 유전자인 NPTII가 있고, reporter gene으로서 GUS를 가지고 있다. 그리고 *HindIII*, *SphI*, *SmaI*, *EcoRI* 등의 cloning site가 있다.

pFAD3은 pBI121의 GUS 위치에 fatty acid desaturase 유전자 FAD3를 갖고 있는 것으로 그 구성은 neomycin phosphotransferase (NPTII), NOS-terminator, CaMV 35S promoter 및 FAD3로 되어 있으며 kanamycin 저항성 유전자 NPTII를 함유하며 *Pst* I, *SacI*, *EcoRI*, *XbaI* 그리고 *BglII* 등의 cloning site가 존재한다.

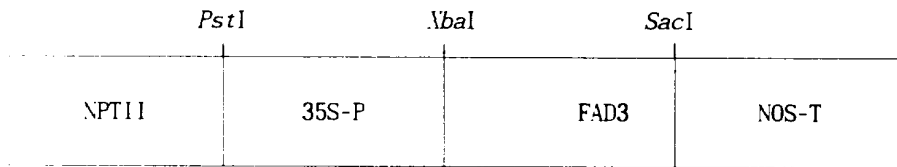
pFAD7은 pBI121의 GUS 위치에 fatty acid desaturase 유전자 FAD7을 가지고 있는 것으로, 그 구성은 neomycin phosphotransferase(NPTII), NOS-terminator, CaMV 35S promoter 및 FAD7으로 되어 있다. Kanamycin 저항성 유전자 NPTII 유전자를 함유하며 *PstI*, *SmaI*, *PvuII*, *EcoRI* 등의 cloning site가 있다.

pCTVcp은 pBI121의 GUS 위치에 citrus triteza virus 외피단백질의 cDNA인 CTVcp를 갖고 있는 것으로 그 구성은 neomycin phosphotransferase(NPTII), NOS-terminator, CaMV 35S promoter 및 CTVcp로 되어 있으며, NPTII 유전자도 지니고 있다. 그리고 *HindIII*, *BamHI*, *SacI*, *EcoRI* 등의 cloning site가 있다.

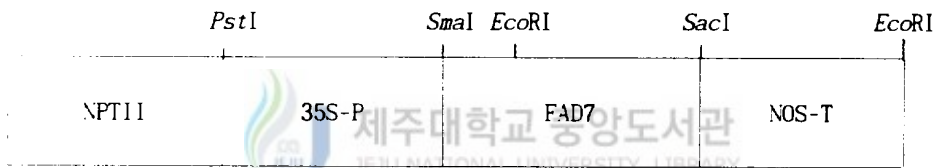
pBI121



pFAD3



pFAD7



pCTVcp

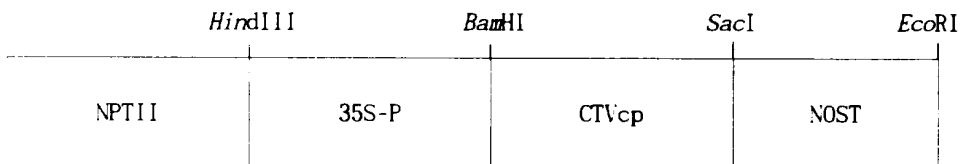


Fig. 1. Genetic maps of pBI121, pFAD3, pFAD7 and pCTVcp

나) PCR Primer

NPTII 유전자 DNA의 증폭에 사용된 primer 쌍은 Fig.2 의 NPTII 유전자 염기서열 중 밑줄친 서열을 기초로 795 bp 크기의 DNA 단편이 증폭되도록 설계하였으며 이들 primer의 염기서열은 다음과 같다.

5'-ATG ATT GAA CAA GAT GGA TT-3'

5'-TCA GAA GAA CTC GTC AAG AA-3'

1	ACAGCAAGGG	AACCGGAATT	GOCAGCTGGG	GCGCCCTCTG	GTAAGGTTGG	GAAGCCCTGC
61	AAAGTAAACT	GGATGGCTTT	CTTGCCGCCA	AGGATCTGAT	GGCGCAGGGG	ATCAAGATCT
121	GATCAAGAGA	CAGGATGAGG	ATCGTTTGGC	<u>ATGATTGAAC</u>	<u>AAGATGGAIT</u>	GCACGCAGGT
181	TCTCCGGCCG	CTTGGGTGGA	GAGGCTATTC	GGCTATGACT	GGGCACAACA	GACAATCGGC
241	TGCTCTGATG	CCGCCGTGTT	CCGGCTGTCA	GCGCAGGGGC	GCCCGGTTCT	TTTTGTCAAG
301	ACCGACCTGT	CCGGTGCCTT	GAATGAACTG	CAGGACGAGG	CAGCGCGGCT	ATCGTGGCTG
361	GCCACGACGG	GCGTTCCTTG	OGCAGCTGTG	CTCGACGTTG	TCACTGAAGC	GGGAAGGGAC
421	TGGCTGCTAT	TGGGCGAAGT	GCCGGGGCAG	GATCTCCTGT	CATCTCACCT	TGCTCCTGCC
481	GAGAAAGTAT	CCATCATGGC	TGATGCAATG	CGGGGGCTGC	ATACGCTTGA	TCCGGCTACC
541	TGCCCATTCG	ACCACCAAGC	GAAACATCGC	ATCGAGCGAG	CACGTACTCG	GATGGAAGCC
601	GGTCTTGTGG	ATCAGGATGA	TCTGGACGAA	GAGCATCAGG	GGCTCGCGCC	AGCCGAACGT
661	TTCGCCAGGC	TCAAGGGCGG	CATGCCCGAC	GGCGAGGATC	TCGTGCTGAC	CCATGGCGAT
721	GCCTGCTTGC	CGAATATCAT	GGTGGAAAAT	GGCCGCTTTT	CTGGATTTCAT	CGACTGTGGC
781	CGGCTGGGTG	TGGCGGACCG	CTATCAGGAC	ATAGCGTTGG	CTACCCGTGA	TATTGCTGAA
841	GAGCTTGGCG	GCGAATGGGC	TGACCGCTTC	CTCGTGCTTT	ACGGTATCGC	CGCTCCCGAT
901	TCGCAGCGCA	TCGCCTTCTA	TCGCC <u>TCTTT</u>	<u>GACGAGTTCT</u>	<u>TCTGAC</u> CGGG	ACTCTGGGGT
961	TCGAAATGAC	CGACCAAGCG	ACGCCCAACC	TGCCATCACG	AGATTTGGAT	TCCACCGCCG
1021	CTTCTATGA	AAGGTTGGGC	TTCGGAATCG	TTTTCCGGGA	CGCAGGCTGG	ATGATCCTCC
1081	AGCGCGGGGA	TCTCATGCTG	GAGTTCCTCG	CCCAACCCGG	GCTCGATCCC	CTCGCGAGTT

Fig. 2. Nucleotide sequence of NPTii gene

FAD3 유전자 DNA의 증폭에 사용된 primer 쌍은 Fig.3 의 FAD3 유전자 염기서열중 밑줄친 서열을 기초로 700 bp 크기의 DNA 단편이 증폭되도록 설계하였으며 이들 primer의 염기서열은 다음과 같다.

5'-ATG GTT GTC GCT ATG GAC CA-3'

5'-GAA CTG TGA CTG GAC CAA CG-3'

1	ACCACATTT	ACTCAGAGCC	CACACAGTTT	TAGAGAGAGA	GAGAAACATC	CCTCAAAGCT
61	CTCTCTCTTT	<u>CTCOGGGAT</u>	<u>GGTTGTCGCT</u>	<u>ATGGACCAGC</u>	GTAGCAATGC	GAACGGAGAC
121	GAAAGGTTTG	ATCOGAGCGC	ACAACCACCG	TTCAAGATCG	GAGATATAAG	GGCGGCCATT
181	CCTAAGCATT	GTTGGGTAAG	GAGTCCCTTG	AGATCCATGA	GCTATGTCGC	CAGAGACATT
241	TTGCGCGTCG	TGGCTCTTGE	CGTCGCCGCC	GTGTATTTTG	ATAGCTGGTT	CTTTTGGCCT
301	CTTTATTGGG	CCGCCAAGG	AACCCGTGTC	TGGGCTATCT	TCGTAATCGG	CCACGACTGT
361	GGACATGGGA	GCTTCTCAGA	CATTCOCCTT	CTGAATACTG	CGGTGGTCA	TATTCTTCAT
421	TCCTTCATTC	TCGTTCCATA	CCATGGTTGG	AGAATAAGCC	ATCGGACACA	CCACCAGAAC
481	CATGGCCATG	TTGAAAACGA	CGAGTCTTGG	GTTCGGTTGC	CAGAAAAATT	ATACAAGAAT
541	TTGTCCACAA	GTACACGGAT	GCTCAGATAC	ACTGTCCCTC	TCCCATGCT	CGCTTACCCT
601	CTCTATCTGT	GGTACAGAAG	TCCTGGTAAA	GAAGGGTCAC	ATTATAACCC	ATACAGTAGT
661	TTATTTGCCC	CAAGCGAGAG	AAAGCTTATT	GCAACTTCAA	CTACTTGCTG	GTCGATCATG
721	TTGGCCACTC	TTGTTTATCT	<u>ATCATTCCTC</u>	<u>GTTGGTCCAG</u>	<u>TCACAGTTCT</u>	AAAAGTCTAT
781	GGTGTTCCTT	ACATTATCTT	TGTAATGTGG	TTGGACGCTG	TCAOGTACTT	GCATCATCAT
841	GGTCACGATG	ATAAGTTGCC	TTGGTACAGA	GGCAAGGAAT	GGAGTTATTT	ACGTGGAGGA
901	TTAACAACCTA	TTGATAGAGA	TTACGGGATC	TTCAACAACA	TTCATCACGA	TATTGGAATC
961	CACGTGATCC	ATCATCTTTT	CCCACAAATC	CCTCACTATC	ACTTGGTTGA	TGCCACGAAA
1021	TCAGCTAAAC	ATGTGTTGGG	AAGATACTAC	AGAGAACCAA	AGACGTCAGG	AGCAATACCG

Fig. 3. Nucleotide sequence of FAD3 gene

FAD7 유전자 DNA의 증폭에 사용된 primer 쌍은 Fig.4 의 FAD7 유전자 염기서열중 밑줄친 서열을 기초로 1.0 kb 크기의 DNA 단편이 증폭되도록 설계하였으며 이들 primer의 염기서열은 다음과 같다.

5'-ATG GCG AAC TTG GTC TTA TCA-3'
 5'-TAC CAA GGA AGC TTA TCT TCA-3'

1	CAAGTTCTAA	<u>TGGCGAACTT</u>	<u>GGTCTTATCA</u>	GAATGTGGTA	TACGACCTCT	CCCCAGAATC
61	TACACAACAC	CCAGATCCAA	TTTCCTCTCC	AACAACAACA	AATTCAGACC	ATCACTTTCT
121	TCTTCTTCTT	ACAAAACATC	ATCATCTCCT	CTGTCTTTTG	GTCTGAATTC	ACGAGATGGG
181	TTCACGAGGA	ATTGGGCGTT	GAATGTGAGC	ACACCAATAA	CGACACCAAT	ATTTGAGGAG
241	TCTCCATTGG	AGGAAGATAA	TAAACAGAGA	TTGGATCCAG	GTGGCCCTCC	TCCGTTCAAT
301	TTAGCTGATA	TTAGAGCAGC	TATAOCTAAG	CATTGTTGGG	TTAAGAATCC	ATGGAAGTCT
361	TTGAGTTATG	TCGTGAGAGA	CGTCGCTATC	GTCTTTGCAT	TGGCTGCTGG	AGCTGCTTAC
421	CTCAACAATT	GGATTGTTTG	GOCTCTCTAT	TGGCTGCTC	AAGGAACCAT	GTTTTGGGCT
481	CTCTTTGTTT	TTGGTCATGA	CTGTGGACAT	GGTAGTTTCT	CAAATGATCC	GAAGTTGAAC
541	AGTGTGGTGG	GTGATCTTCT	TCATTCCTCA	ATTCTGGTCC	CATACCATGG	CTGGAGAATT
601	AGTCACAGAA	CTCACCACCA	GAACCATGGA	CATGTTGAGA	ATGACGAATC	TTGGCATCCT
661	ATGTCTGAGA	AAATCTACAA	TACTTTGGAC	AAGCCGACTA	GATTCTTTAG	ATTTACACTG
721	CCTCTCGTGA	TGCTTGATA	CCCTTTCTAC	TTGTGGGCTC	GAAGTCCGGG	GAAAAAGGGT
781	TCTCAATTACC	ATCCAGACAG	TGACTTGTTT	CTCCCTAAAG	AGAGAAAGGA	TGTCCTCACT
841	TCTACTGCTT	GTTGGACTGC	AATGGCTGCT	CTGCTTGTTT	GTCTCAACTT	CACAATCGGT
901	CCAATTCAAA	TGCTCAAACT	TTATGGAATT	CCTTACTGGA	TAAATGTAAT	TAAATGTAAT
961	TTTGTGACTT	ACCTGCATCA	CCATGGTCAT	<u>GAAGATAAGC</u>	<u>TTCTTGGTA</u>	CCGTGGCAAG
1021	GAGTGGAGTT	ACCTGAGAGG	AGGACTTACA	ACATTGGATC	GTGACTACGG	ATTGATCAAT
1081	AACATCCATC	ATGATATTGG	AACTCATGTG	ATACATCATC	TTTTCCCGCA	GATCCCATAT
1141	TATCATCTAG	TAGAAGCAAC	AGAAGCAGCT	AAACCAGTAT	TAGGAAGTA	TTACAGGGAG

Fig. 4. Nucleotide sequence of FAD7 gene

CTVcp 유전자 DNA의 증폭에 사용된 primer 쌍은 Fig. 5 의 CTVcp 유전자 염기서열 중 밑줄친 서열을 기초로 692 bp 크기의 DNA 단편이 증폭되도록 설계하였으며 이들 primer의 염기서열은 다음과 같다.

5' -CGGGATCCATGGACGACGAAAC-3'

5' -CGCGAGCTCTCAACGTGTGTTG-3'

1	<u>ATGGACGACG</u>	<u>AAACA</u> AAGAA	ATTGAAGAAC	AAAAACAAGG	AAACGAAAGA	AGGCGACGAC
61	GTTGTTGCCG	CTGAGTCTTC	TTTCAGTTCC	ATAAACTTAC	ACATCGATCC	AACITTTGATA
121	GCGATGAATG	ATGTGGGTCA	GTTGGGTACC	CAACAGAACG	CTGCTTTAAA	CAGAGACTTA
181	TTTCTTACTT	TGAAAGGGAA	GCATCCTGAC	TTACTTGATA	AAGATAAAGA	CTTTCACATA
241	GCTATGATGT	TGTATCGTTT	AGCAGTTAAG	AGTTCATCAT	TACAAAGCGA	AGACGACACT
301	ACGGGTATAA	CGTACACTCG	GGAGGGTGT	GAAAGTGATT	TGCGTGACAA	ACTTTGGACT
361	GACGTCGTGT	TTAACTCCAA	GGGTATTGGC	AACCGTACAA	ACGCCCTTCG	AGTTTGGGGT
421	AGAACTAACG	ATGCCCTTTA	CTTAGCTTTT	TGTAGACAGA	ATCGCAITTT	GAGTTATGGC
481	GGACGTCGGC	TAGATGCAGG	GATTCGGGCC	GGGTATCATT	ACTTGTGTGC	AGAITTCTTG
541	ACCGGAGCTG	GCTTGACTGA	TTTAGAATGT	GCTGTGTACA	TACAAGCTAA	AGAACAATTG
601	TTGAAGAAGC	GAGGGGCTGA	TGATGTCGTA	GTTACTAATG	TCAGGCAGCT	TGGGAAATTC
661	<u>AACACACGTT</u>	<u>GA</u>				



Fig. 5. Nucleotide sequence of coat protein gene of citrus tristeza virus

2. DNA의 세포내 도입조건

1) 미세입자 크기

DNA의 세포내 도입효율은 DNA운반체로 사용되는 미세입자의 크기에 따라 달라지기 때문에, 입자의 크기가 DNA도입효율에 미치는 영향을 조사하였다. Table. 5에서 보는 바와 같이 감귤 callus 세포의 경우에 tungsten 0.73, 1.11, 1.32, 1.63 μm 와 Gold

1.1 μm 중에서 1.11 μm 의 tungsten 입자에 GUS DNA를 피복하여 투사하였을 때 세포의 GUS 발현율이 가장 높아 DNA 도입효율이 가장 좋은 것으로 나타났다. Duchesne 와 Pierre(1991)도 본 실험 결과와 유사하게 *Picea nariana* callus의 경우에 1.11 μm 의 크기가 가장 적합한 것으로 보고하였다.

Table 5. Effects of size of particles used as DNA carrier on GUS expression of the citrus callus cells bombarded with pBI121 harbouring GUS gene.

DNA carrier particle	Helium Pressure (psi)	Gap distance (mm)	Target distance (Cm)	Plasmid	Chamber vacuum (inchHg)	GUS expression score
0.73 μm tungsten	77.33	6.350	7.0	pBI121	27	++
1.11 μm tungsten						++++
1.32 μm tungsten						+
1.63 μm tungsten						-
1.1 μm Gold						++

GUS score : -: no expression, +: poor expression, ++: moderate expression, +++: good expression, ++++: very good expression



2) He 가스 압력

DNA 피복 미세입자를 투사할 때 적정 헬륨가스압력은 세포의 종류나 상태에 따라 달라지는 것으로 알려져있기 때문에 감귤 callus 세포에 있어서 DNA도입효율에 미치는 헬륨가스압력의 영향을 조사하였다. 그 결과 He 가스 압력이 1100 psi일 때 GUS score가 가장 높았다(Table. 6). Russell등(1992)에 의하면 대부분의 시료의 경우 1000 psi 부근이 적합하다고 한점에서 본실험의 결과와 유사하였다. 900 psi의 경우에 비록 110 psi에서 보다는 다소 낮았지만 GUS score가 높은 편이었다. 필요 이상의 높은 압력으로 투사하면 DNA도입효율은 높으나 높은 압력에서 세포의 손상이 크다는 점에서, 비록 1100 psi가 GUS 발현은 좋았지만 형질전환 전과정을 감안하면 900 psi의 압력이 더 좋은 것으로 판단되었다.

Table 6. Effects of helium pressures on GUS expression of the citrus callus cells bombarded with pBI121 harbouring GUS gene.

DNA carrier particle	Helium Pressure (psi)	Gap distance (mm)	Target distance (Cm)	Plasmid	Chamber vacuum (inchHg)	GUS expressio score
1.11 μ m tungsten	63.27	6.350	7.0	pBI121	27	+++
	77.33		7.0			++++
	91.39		7.0			++

GUS score : -: no expression, +: poor expression, ++: moderate expression, +++: good expression, ++++: very good expression

3) 갭거리

갭거리는 6.350 mm 에서 가장 좋았다(Table. 7). 그러나 Rasmussen등(1994)은 담배의 현탁세포에서는 10 mm 일 때가 가장 좋았다고 하였고, Pereira와 Ericksom(1995)은 알팔파의 엽병과 줄기절편에서 7 mm 일 때가 좋았다고 하여 본실험 결과와는 차이가 있었다. 그러므로 시료종류에 따라 적정 갭거리는 상이한 차이가 있음을 알수 있다. 갭거리가 짧으면 미세입자가 한쪽으로 몰리는 경향이 있어 2 회 정도 투사할 경우 폐이는 경향이 있으며, 갭거리가 9.525 mm 에서는 세포시료가 틈는 경향이 있거나 세포에 해를 주는 것으로 보여 문제가 되었다.

Table 7. Effects of gap distances on GUS expression of the citrus callus cells bombarded with pBI121 harbouring GUS gene.

DNA carrier particle	Helium Pressure (psi)	Gap distance (mm)	Target distance (Cm)	Plasmid	Chamber vacuum (inchHg)	GUS expressio score
1.11 μ m tungsten	77.33	3.175	7.0	pBI121	27	++
		6.35				++++
		9.525				+++

GUS score : -: no expression, +: poor expression, ++: moderate expression, +++: good expression, ++++: very good expression

4) 표적거리

표적거리는 Table. 8 에서 보는바와 같이 7.0 cm 에서 가장 높은 GUS 발현을 관찰할수 있었다. Oard등(1990)에 의하면 Rice callus 세포를 사용했을 때 7.0 cm일 때 최적이었으나 표적거리가 4.3 cm로 짧아지면 petri dish가 파열되거나 세포들이 띄는 경향이 있으며, 표적거리가 10.5 cm로 길어지면 분산은 잘 되지만 입자의 충격력이 떨어지게 되어 GUS 발현이 검출되지 않는 경향이 있다고 하였다. Zhong등(1993)은 turfgrass의 배세포의 경우 최적 표적거리가 12 cm라고 보고하였으나, vasil등(1992)은 밀의 배발생 캘러스의 경우에 최적 표적거리는 13 cm 인 것으로 보고하였다.

Table 8. Effects of target distances on GUS expression of the citrus callus cells bombarded with pBI121 harbouring GUS gene.

DNA carrier particle	Helium Pressure (psi)	Gap distance (mm)	Target distance (Cm)	Plasmid	Chamber vacuum (inchHg)	GUS expression score
1.11 μ m tungsten	77.33	6.35	3.8	pBI121	27	+++
			7.0			++++
			10.2			+

GUS score : -: no expression, +: poor expression, ++: moderate expression, +++: good expression, ++++: very good expression

5) 시료 상자내의 진공도

시료상자 내의 진공도는 10, 20, 25, 27 inHg 중에서 27 inHg 에서 GUS 발현율이 가장 좋았다 (Table. 9). Klein등(1988)은 시료상자내의 진공도는 28 inHg일 때 가장 좋았다 하였고, 20 이하로 떨어질수록 급격하게 GUS발현이 감소함을 보인점에서 본실험과 유사하였다. 대부분의 연구자들(Robertson et al : 1992, Zhong et al: 1993, Birch and Franks: 1991)은 26~28 inHg 부근을 투사조건으로 잡았는데, 시료상자에 대한 진공의 정도는 미세입자의 퍼짐과 충격력을 좌우하므로 시료의 종류나 상태에 따라 진공도를 정하는 것이 바람직 하다고 생각된다.

Table 9. Effects of vacuum on GUS expression of the citrus callus cells bombarded with pBI121 harbouring GUS gene.

DNA carrier particle	Helium Pressure (psi)	Gap distance (mm)	Target distance (Cm)	Plasmid	Chamber vacuum (inchHg)	GUS expressio score
1.11 μ m tungsten	77.33	6.35	7.0	pBI121	10	-
					20	+
					25	++
					27	++++

GUS score : -: no expression, +: poor expression, ++: moderate expression, +++: good expression, ++++: very good expression

6) 삼투압 조절제의 영향

Russell등(1992)은 투사전에 식물세포 시료를 일정 삼투압조건으로 조절했을 때 형질전환율을 높일수 있다고 보고하였다. 그러므로 본실험에서도 삼투압 조절제로 사용된 manitol 0 ~ 0.8 M 농도가 형질전환율에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 Table. 10 에서 보는 바와 같이 삼투압제를 0.2 M 이상 일 때 GUS발현이 전혀 관찰되지않았다. 그러므로 본 실험에서 사용한 감귤세포의 경우에는 삼투압제를 별도로 첨가하지 않는 것이 오히려 좋은 것으로 나타났다.

Table 9. Effects of osmol concentration of cell culture medium on GUS expression of the citrus callus cells bombarded with pBI121 harbouring GUS gene.

DNA carrier particle	Helium Pressure (psi)	Gap distance (mm)	Target distance (Cm)	Plasmid	Chamber vacuum (inchHg)	Osmol concentration (M)	GUS expressio score
1.11 μ m tungsten	77.33	6.35	7.0	pBI121	27	0	++++
						0.2	-
						0.4	-
						0.6	-
						0.8	-

GUS score : -: no expression, +: poor expression, ++: moderate expression, +++: good expression, ++++: very good expression

3. 세포내 도입된 GUS유전자의 발현

도입된 GUS 유전자가 감귤세포내에서 발현되는 시기를 확인하기위여 GUS 유전자를 지닌 pBI121 DNA를 투사하여 24 시간 암배양한 다음 GUS발현 용액을 첨가하고 GUS유전자의 발현에 의해 청색반점이 나타나는 시기를 조사하였다. 그 결과 세포에 GUS발현 용액을 첨가한 후 3일 정도가 지나서 청색반점이 관찰되기 시작했다.

Jeon등(1994)에 의하면 벼의 세포는 24~48시간, Iida등(1990)은 담배의 현탁세포에서 1시간, Gordon-kamm등(1990)은 maize현탁세포에서 48 시간으로 GUS 유전자의 발현이 빨랐다. 본 실험 결과 감귤 callus 세포의 경우 GUS발현은 3일 후에 관찰되어 GUS발현에 걸리는 시간이 비교적 길었다. 간혹 24시간 내에 GUS발현을 육안으로 관찰할수 있었으나 반복간에 재현성이 없었다. 감귤세포의 GUS발현이 늦은 이유는 다른 종류의 식물세포에 비해 감귤세포의 생육이 늦은 것과 관련이 있는 것으로 생각되었다. Fig. 6은 GUS발현 용액을 첨가한 후 4일경 감귤 callus 세포의 GUS유전자가 발현된 모습이다.



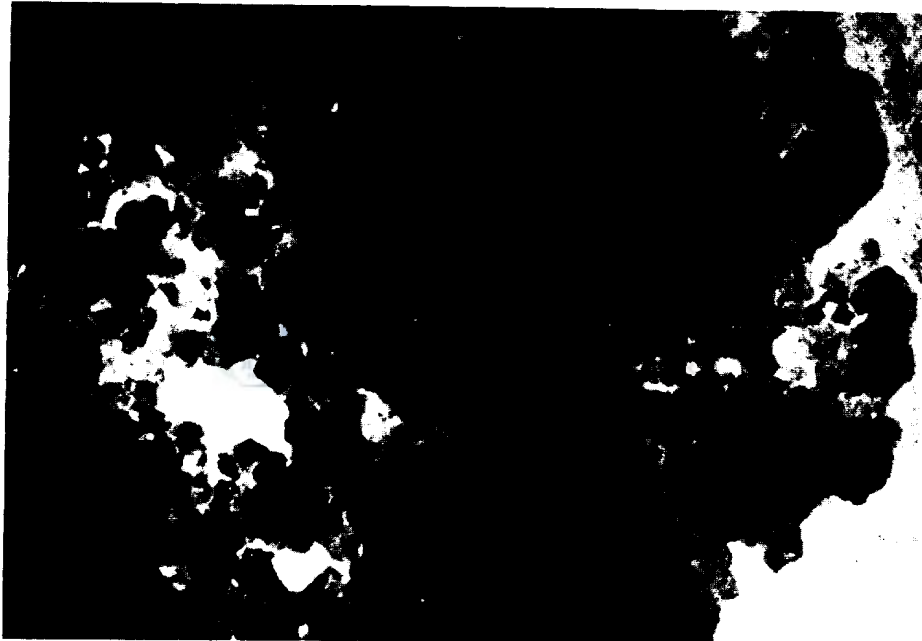


Fig. 6. Expression of the introduced GUS gene in the callus cells bombarded with pBI121 carrying GUS gene.

4. 형질전환체 선발

Kanamycin저항성 유전자인 NPTII를 가지고 있는 형질전환체를 선발하는데 적당한 배지의 항생제 농도를 규명하기 위해서 NPTII를 투사하지 않은 감귤 callus 세포의 kanamycin에 대한 감수성을 조사하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 대부분의 callus 세포들은 kanamycin농도 50 mg/L 수준에서 생장이 억제되었으나 몇몇 clone은 계속 성장을 보였다. 그러나 kanamycin 100 mg/L 배지에서 계속 성장하는 clone은 없었다. 그러므로 50 mg/l의 kanamycin을 첨가한 배지에서는 형질전환되지 않은 세포도 형질 전환된 세포와 함께 성장할 가능성이 있어 형질전환체의 선발농도로는 미흡한 것으로 판단되었고, NPTII 유전자가 도입된 형질전환체는 100 mg/l의 kanamycin 배지에서 선발하는 것이 적당할 것으로 판단되었다. 이후의 실험에서 NPTII를 목표유전자와 함께 도입한 형질전환체의 선발에는 kanamycin 100 mg/l을 사용했다.

FAD3 유전자를 NPTII 유전자를 가진 pBI121에 재구성하여 만든 plasmid pFAD3를 감귤세포에 투사한 다음 kanamycin 배지에 옮겨 배양했을 때 Fig. 8에서 보는 바와 같이 많은 세포들이 죽거나 성장을 멈추었지만 pFAD3가 도입된 것으로 추정되는 일부 세포들은 계속 성장하였다.

FAD7 유전자를 NPTII 유전자를 가진 pBI121에 재구성하여 만든 plasmid pFAD7를 감귤세포에 투사한 다음 kanamycin 배지에 옮겨 배양했을 때 Fig. 9에서 보는 바와 같이 많은 세포들이 죽거나 성장을 멈추었지만 pFAD7가 도입된 것으로 추정되는 일부 세포들은 계속 성장하였다.

CTVcp 유전자를 NPTII 유전자를 가진 pBI121에 재구성하여 만든 plasmid pCTVcp3를 감귤세포에 투사한 다음 kanamycin 배지에 옮겨 배양했을 때 Fig. 10에서 보는 바와 같이 많은 세포들이 죽거나 성장을 멈추었지만 pCTVcp가 도입된 것으로 추정되는 일부 세포들은 계속 성장하였다.

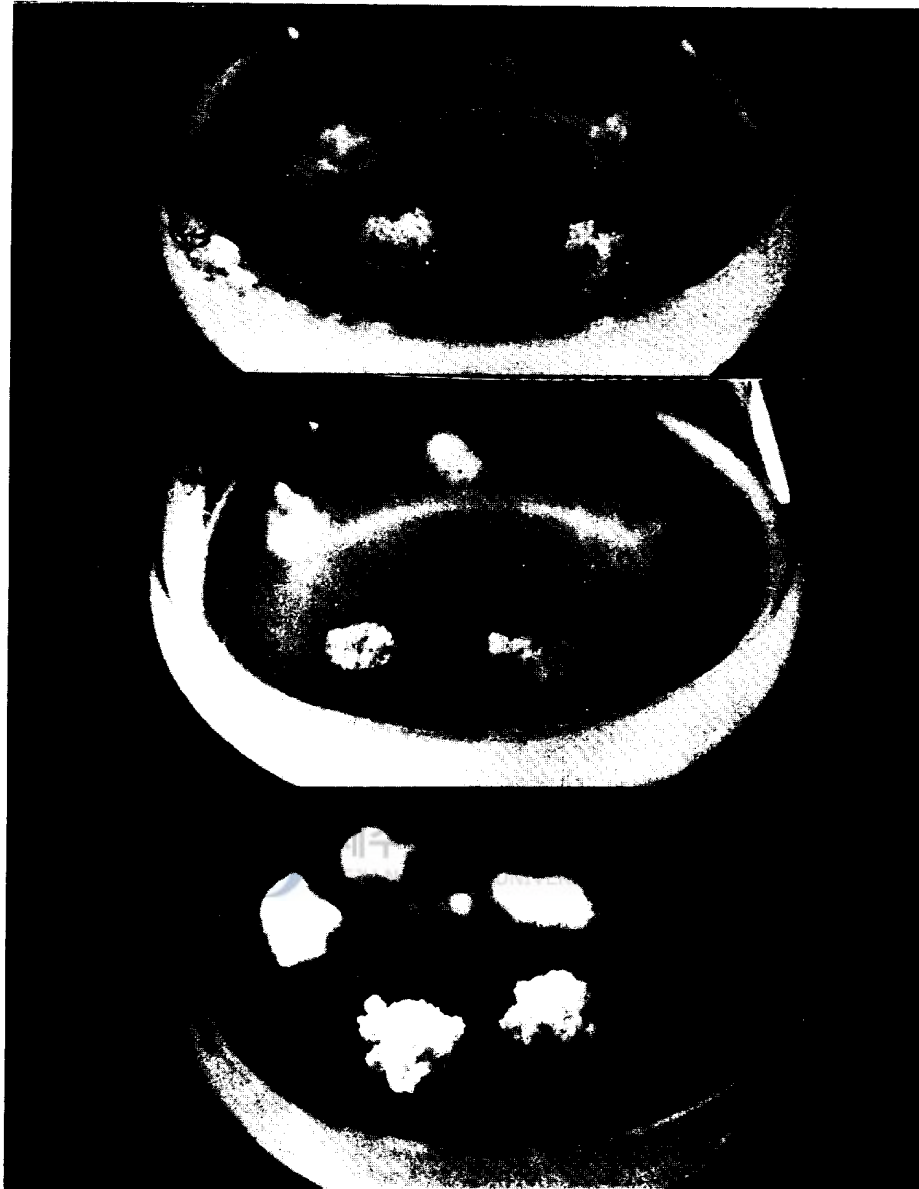


Fig. 7 Growth of nontransformed citrus callus cells on the medium containing kanamycin. Kanamycin concentration: Upper: 100 mg/L, Middle : 50 mg/L, Lower : 0 mg/L



Fig. 8. Selective growth of citrus callus cells on MT medium containing kanamycin 100 mg/L after bombardment with pBI121 containing both of NPTII and FAD3 gene.



Fig. 9 Selective growth of citrus callus cells on MT medium containing kanamycin 100 mg/L after bombardment with pBI121 containing both of NPTII and FAD7 gene.



Fig. 10. Selective growth of citrus callus cells on MT medium containing kanamycin 100 mg/L after bombardment with pBI121 containing both of NPTII and CTVcp gene.

5. 형질전환체의 FAD3 유전자 확인

Kanamycin배지에서 선발한 형질전환체 세포의 genomic DNA를 분리하고 PCR로 도입유전자의 DNA를 확인하였다. Fig. 11은 NPTII와 FAD3유전자를 동시에 지닌 pBI121 DNA를 투사하여 얻은 clone들의 genomic DNA를 NPTII와 FAD3염기서열에 특이한 각각의 primer를 사용하여 PCR로 증폭한 결과이다. DNA 피복입자를 투사시키지 않은 callus로부터 추출한 DNA로부터는 NPTII와 target gene FAD3 band가 없어 본실험에 사용된 primer들은 NPTII와 목표유전자 FAD3 이외의 비특이적인 DNA를 증폭하지 않는다는 것이 확인되었다.

NPTII와 FAD3 유전자를 도입하여 얻은 5개 clone들의 genomic DNA를 template로 사용한 lane 8-12 중에서 lane 8과 9에서 700 bp의 DNA fragment가 증폭되어 FAD3유전자가 들어있음이 확인되었고 나머지 3 clone에서는 해당 DNA fragment가 보이지 않았다. FAD3 유전자 검색에 사용된 동일한 clone의 genomic DNA를 NPTII specific primer로 증폭한 lane 13-17 중에서 lane 8과 lane 9에 해당하는 lane 13과 14에서 흐리지만 NPTII DNA fragment인 795bp band가 관찰되어 이 두 clone은 FAD3와 NPTII 유전자를 모두 가지고 있는 것으로 나타났다.

lane 15와 16에서 NPTII DNA fragment가 나타나 이들은 NPTII 유전자가 들어 있는 것으로 나타났으나 이 clone의 genomic DNA를 FAD3 primer로 증폭한 lane 10과 11에서는 나타나지 않아 이 clone들은 FAD3유전자가 없는 것으로 생각되었다.

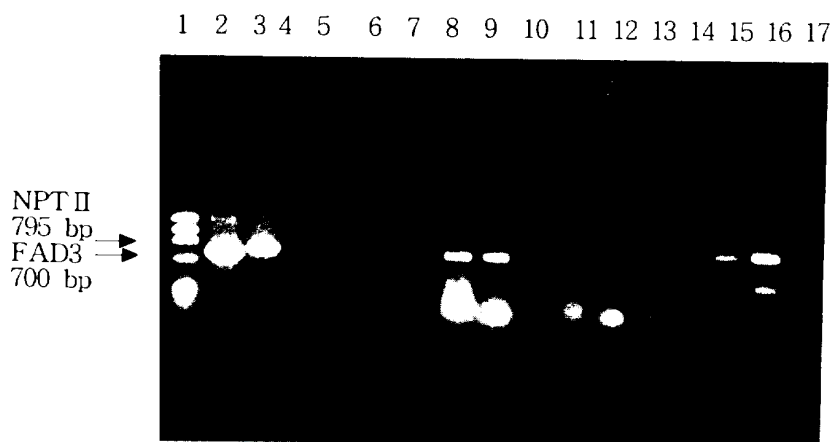


Fig. 11. PCR-amplified DNA fragments of NPTII and FAD3 genes from the clones bombarded with pB1121 containing both of NPTII and FAD3.

lane 1: marker, 2: positive control (FAD3 DNA), 3: positive control (+NPTII DNA), 4: negative control (-FAD3 DNA), 5: negative control (-NPTII DNA), 6-7: non-bombarded cells, 8-17: clones bombarded with NPTII-FAD3.

6. 형질전환체의 FAD7 유전자 확인

DNA 피복입자를 투사시키지 않은 callus로부터 추출한 DNA로부터는 NPTII와 target gene FAD7 band (lane 6-7)가 관찰되지 않았으나, NPTII와 FAD3 유전자를 도입하여 얻은 5개 clone들의 genomic DNA를 template로 사용한 lane 8-12 중에서 lane 8과 9에서 1.0 kb의 DNA fragment가 증폭되어 FAD7 유전자가 들어있음이 확인되었고 나머지 3 clone에서는 해당 DNA fragment가 보이지 않았다. FAD7 유전자 검색에 사용된 동일한 clone의 genomic DNA를 NPTII specific primer로 증폭한 lane 13-17 중에서 lane 8과 lane 9에 해당하는 lane 13과 14에서 NPTII DNA fragment인 795bp band가 관찰되어 이 두 clone은 FAD3와 NPTII 유전자를 모두 가지고 있는 것으로 나타났다 (Fig. 12).

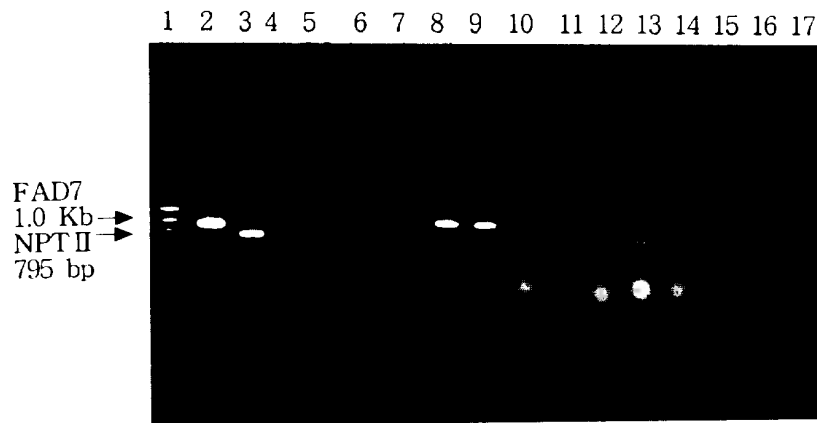


Fig. 12. PCR-amplified DNA fragments of NPTII and FAD7 genes from the clones bombarded with pBI121 containing both of NPTII and FAD7.

lane 1: marker, 2: positive control (FAD7 DNA), 3: positive control (+NPTII DNA), 4: negative control (-FAD7 DNA), 5: negative control (-NPTII DNA), 6-7: non-bombarded cells, 8-17: clones bombarded with NPTII-FAD7.

7. 형질전환체의 CTV 유전자 확인

DNA 피복입자를 투사시키지 않은 callus로부터 추출한 DNA로부터는 NPTII와 target gene CTVcp band가 관찰되지 않았으나, NPTII와 CTVcp DNA를 도입하여 얻은 5개 clone들의 genomic DNA를 template로 사용한 lane 8-12 중에서 lane 8과 9에서 692 bp의 DNA fragment가 증폭되어 CTVcp DNA가 들어있음이 확인되었고 나머지 3 clone에서는 해당 DNA fragment가 보이지 않았다.

CTVcp DNA 검색에 사용된 동일한 clone의 genomic DNA를 NPTII specific primer로 증폭한 lane 13-17 중에서 lane 8과 lane 9에 해당하는 lane 13과 14에서 NPTII DNA fragment인 795bp band가 관찰되어 이 두 clone은 CTVcp DNA와 NPTII 유전자를 모두 가지고 있는 것으로 나타났다(Fig 13).



Fig. 13. PCR-amplified DNA fragments of NPTII and CTVcp genes from the clones bombarded with pB1121 containing both of NPTII and CTVcp.

lane 1: marker, 2: positive control (CTVcp DNA), 3: positive control (+NPTII DNA), 4: negative control (-CTVcp DNA), 5: negative control (-NPTII DNA), 6-7: non-bombarded cells, 8-17: clones bombarded with NPTII-CTVcp.

IV. 요약

미세입자투사법에 의한 감귤류 식물의 형질전환계를 확립하기 위하여, 감귤 (*Citrus sinensis* Osbeck 'Yoshida')의 callus 세포에 대한 DNA 도입조건을 적정화하고 fatty acid desaturase 유전자인 FAD3 와 FAD7, 그리고 citrus tristeza virus의 외피단백질 cDNA(CTVcp)를 각각 세포내에 도입하여 형질전환체를 만들고 도입 유전자를 PCR로 확인하였다.

1. 미세입자투사법으로 DNA를 callus 세포내에 도입할 때 투사조건으로서 1.11 μm 의 텅스텐입자를 사용하고, 헬륨가스압력을 1100 psi, 갭거리를 6.4 mm, 표적거리를 7.0 cm, 시료상자내의 진공도를 27 inch Hg로 했을 때 DNA의 세포내 도입효율이 가장 높았다.

2. 벡터 pBI121에 재구성한 FAD3, FAD7, CTVcp cDNA를 각각 감귤 callus 세포에 투사하고, DNA를 투사한 세포들을 kanamycin 100mg/L를 포함하는 선발배지에서 배양하여 생장이 계속되는 클론들을 선발하였다.

3. FAD3 DNA를 투사하여 선발한 클론들의 genomic DNA를 PCR로 분석한 결과 2개의 클론에서 FAD3 유전자가 확인되었다.

4. FAD7 DNA를 투사하여 선발한 클론들의 genomic DNA를 PCR로 분석한 결과 역시 2개의 클론에서 FAD7 유전자가 확인되었다.

5. CTVcp cDNA를 투사하여 선발한 클론들의 genomic DNA를 PCR로 분석한 결과 2개의 클론에서 CTVcp cDNA가 확인되었다.

V. 참고 문헌

- Aragao, F. J. L., M. F. G. de Sa, M. R. Davey, A. C. M. Brasileiro, J. C. Faria, and E. L. Rech, 1993. Factors influencing transient gene expression in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an electrical particle acceleration device. *Plant Cell Reports*, 12:483-490.
- Birch, R. G., and T. Franks. 1991. Gene Transfer into intact sugarcane cells using microprojectile bombardment. *Aust. J. Plant Physiol.* 18, 471-480.
- Campbell, M. A., C. S. Kinlaw, and D. B. Neale. 1992. Expression of luciferase and β -glucuronidase in *Pinus radiata* suspension cells using electroporation and particle bombardment. *Can. J. For. Res.* 22:2014-2018.
- Casas, A. M, A. K. Kononowicz, U. B. Zehr, D. T. Tomes, J. D. Axtell, L. G. Butler, R. A. Bressan, and P. M. Hasegawa. 1993. Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment.. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 11212-12276.
- Charest, P. J., N. Calero, D. Lachance, R. S. S. Datla, L. C. Duchesne, and E. W. T. Tsang. 1992. Microprojectile-DNA delivery in conifer species: factors affecting assessment of transient gene expression using the β -glucuronidase reporter gene. *Reports*.
- Chee, P. P, R. F. Drong and J. L. Slightom. 1991. Using polymerase chain reaction to identify transgenic plants. *Plant Molecular Biology Manual* C3: 1-28.
- Chee, P. P, and J. L. Slightom. 1992. Transformation of cucumber tissues by microprojectile bombardment identification of plants containing

functional and non-functional transferred genes. *Gene*, 118:255-260.

Chibbar, R. N., K. K. Kartha, N. Leung, J. Qureshi, and K. Caswell. 1991. Transient expression of marker genes in immature zygotic embryos of spring wheat (*Triticum aestivum*) through microprojectile bombardment. *Genome*, vol. 34:453-460.

Chung, J. D., C. K. Kim, M. Y. Kwon, and S. O. Jee. 1992. *Korean J. Plant Tissue Culture*, 19(1):7-11.

Daniell, H. 1993. Foreign gene expression in chloroplasts of higher plants mediated by tungsten particle bombardment. *Methods In Enzymology*, 217:536-556.

Duchesne, L. C. and P. J. Charest. 1991. Transient expression of the β -glucuronidase gene in embryogenic callus of *Picea mariana* following microprojection. *Plant Cell Reports*, 10(4):191-194.

Fromm, M. E., F. Morrish, C. Armstrong, R. Williams, J. Thomas, and T. M. Klein. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technology*, vol 8:833-839.

Gordon-Kamm, W. J., T. M. Spencer, M. L. Mangano, M. L. Adams Jr., W. R. Willetts, N. G. Rice, T. B. Mackey, C. J. Krueger, R. W. Kausch, P. G., A. P. and Lemaux. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell*, 2:603-618.

Hebert, D., J. R. Kikkert, F. D. Smith, and B. I. Reisch. 1993. Optimization of biolistic transformation of embryogenic grape cell suspensions. *Plant Cell Reports*, 12:585-589.

Iida, A., H. Morikawa, and Y. Yamada. 1990. Stable transformation of cultured tobacco cells by DNA-coated gold particles accelerated by gas-pressure-driven particle gun. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 33:560-563.

Iida, A., M. Seki, M. Kamada, Y. Yamada, and H. Morikawa. 1990. Gene delivery into cultured plant cells by DNA-coated gold particles accelerated by a pneumatic particle gun. *Theor Appl. Genet.* 80:813-816.

Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal.* vol. 6(13):3901-3907.

Jeon, J. S., H. S. Jung, S. K. Sung, J. S. Lee, Y. D. Choi, H. J. Kim, and K. W. Lee. 1994. Introduction and expression of foreign genes in rice cells by particle bombardment. *J. Plant Biol.* 37(1):27-36.

Kaneyoshi, K., S. Kobayashi, Y. Nakamura, N. Shigemoto, and Y. Doi. 1994. A simple and efficient gene transfer system of trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* Raf.). *Plant Cell Reports.* 13:541-545.

김한용(1994). "감귤의 품종 및 재배기술 개발방향", 국제 화시대 제주농업의 발전방향, 제주대학교 농과대학 농업과학 세미나. pp. 95-104

Klein, T. M., T. Gradziel, M. E. Fromm, and J. C. Sanford. 1988. Factors influencing gene delivery into *Zea Mays* cells by high-velocity microprojectiles. *Bio/Technology.* Vol 6:559-563.

Liang, X. Y., Y. X. Zuh, J. J. Mi, and Z. L. Chen. 1994. Production of virus resistant and insect tolerant transgenic tobacco plants. *Plant Cell Reports.*

14:141-144.

Moore, G.A., Jacono, C.C., Neidigh, J.L., Lawrence, S.D. Cline, K. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of Citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports*. 11: 238-242

Murashige, T. and D. P. H. Tucker. 1969. *Proc. 1st Intl. Citrus Symp.* 3: 1155-1161.

Oard, J. H. 1991. Physical methods for the transformation of plant cells. *Biotech. Adv.* vol. 9. 1-11.

Pena, L., M. Cervera, J. Juarez, C. Ortega, J. A. Pina, N. Duran-Vila, and L. Navarro. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. *Plant Science*. 104:183-191.

Pereira, L. F, and L. Erickson. 1995. Stable transformation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) by particle bombardment. *Plant Cell Reports*. 14:290-293.

Rainieri, D. M., P. Bottino, M. P. Gordon, and E. W. Nester. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice *Oryza sativa* L. *Bio/Technology*. 8:33-38.

Rasmussen, J. L., J. R. Kikkert, M. K. Roy, and J. C. Sanford. 1994. Biolistic transformation of tobacco and maize suspension cells using bacterial cells as microprojectiles. *Plant Cell Reports*. 13:212-217.

Robertson, D., A. K. Weissinger, R. Ackley, S. Glover, and R. R. Sederoff. 1992. Genetic transformation of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst)

using somatic embryo explants by microprojectile bombardment. *Plant Molecular Biology*. 19:925-935.

Russell, J. A., M. K. Roy, and J. C. Sanford. 1992. Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiol*. 98, 1050-1056.

Russell, J. A., M. K. Roy, and C. Sanford. 1992. Major improvements in biolistic transformation of suspension-cultured tobacco cells. *Tissue Association*. 97-105.

Sanford, J. C. 1990. Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant*. 79:206-209.

Sanford, J. C., F. D. Smith, and J. A. Russell. 1993. Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Methods in enzymology*. vol. 217. 483-507.

Schroeder, H. E., A. H. Schotz, T. Wardley-Richardson, D. Spencer, and T. J. V. Higgins. 1993. Transformation and regeneration of two cultivars of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol*. 101:751-757.

Wilmink, A., B. C. E. van de Ven, and J. J. M. Dons. 1992. Expression of the gus-gene in the monocot tulip after introduction by particle bombardment and *Agrobacterium*. *Plant Cell Reports*. 11:76-80.

Zhong, H., M. G. Bolyard, C. Srinivasan, and M. B. Sticklen. 1993. Transient plants of turfgrass (*Agrostis palustris* Huds.) from microprojectile bombardment of embryogenic callus. *Plant Cell Reports*. 13:1-6.

감사의 글

본 논문이 완성되기까지 아낌없는 지도와 편달을 하여 주신 류기중교수님께 진심으로 감사 드립니다. 그리고 바쁘신 가운데에서도 본 논문의 심사를 맡아 주신 유장걸교수님, 김찬식교수님께도 감사 드립니다.

아울러 늘 깊은 관심을 가지고 지켜보아 주신 강순선교수님, 고정삼교수님, 현해남교수님, 이옥영박사님께도 감사 드립니다.

또한 본 논문이 이루어지도록 많은 격려와 성원을 보내주신 송성준박사님, 홍경애박사님, 양철신선배님, 윤수현선배님, 이창훈선배님, 오상호선배님, 한태완선배님에게도 감사 드립니다.

그리고 본 논문을 완성하는데 있어 곁에서 많은 관심과 도움을 준 친우 박승찬, 양경만, 이건희, 강경철, 강석훈, 부경환, 전승엽과 채현병선배, 오명협선배, 이도승, 양경애, 고광섭후배들과 유기화학실험실팀들 모두에게 지면을 통해 서나마 감사의 뜻을 전합니다.

끝으로 오늘이 있기까지 항상 곁에서 사랑으로 돌보아 주신 어머니와 동생들 그리고 비록 지금은 이 세상에 안계시지만 이 논문이 이루어지는데 큰 힘이 되어주시던 아버지와 함께 기쁨을 나누고 싶습니다.