

博士學位論文

微細粒子 投射法에 의한 春蘭根莖의
形質轉換 條件 適正化와 ω -3 Fatty Acid
Desaturase 遺傳子의 導入

Optimization of Microprojectile Bombardment Conditions for
Cymbidium virescens Transformation and Introduction of ω -3 Fatty
Acid Desaturase



農化學科

洪 京 愛

1996年 12月

微細粒子 投射法에 의한 春蘭根莖의
形質轉換 條件 適正化와 ω -3 Fatty Acid
Desaturase 遺傳子의 導入

Optimization of Microprojectile Bombardment Conditions for
Cymbidium virescens Transformation and Introduction of
 ω -3 Fatty Acid Desaturase

指導教授 柳 長 杰

洪 京 愛

이 論文을 農學 博士學位 論文으로 提出함

1996年 12月

洪京愛의 農學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 : 柳 容 中 (인)
委 員 : 崔 相 鎭 (鎭)
委 員 : 韓 康 完 (完)
委 員 : 蘇 寅 夔 (夔)
委 員 : 柳 長 杰 (長)

濟州大學校 大學院

1996年 12月

Optimization of Microprojectile Bombardment
Conditions for *Cymbidium virescens* Transformation
and Introduction of ω -3 Fatty Acid Desaturase

Kyung-Ae Hong

(Supervised by professor Zang-Kual U.)

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

DEPARTMENT OF AGRICULTURAL CHEMISTRY

GRADUATE SCHOOL

CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

1996. 12.

List of Tables

Table 1. Features of <i>Agrobacterium</i> , electroporation and microprojectile bombardment techniques	3
Table 2. List of the transformants obtained from microprojectile bombardment ...	7
Table 3. Composition of the Murashige-Skoog medium	9
Table 4. Composition of the enriched Hyponex media for rhizome growth	10
Table 5. Composition of Wizard Mega-prep DNA purification system	13
Table 6. GUS assay solution	21
Table 7. Composition of Prime-a-Gene labelling kit	27
Table 8. Composition of prehybridization/hybridization solution	28
Table 9. Composition of polyacrylamide gel.....	30
Table 10. Growth of the sliced rhizome sections under the different medium conditions	32
Table 11. Effects of NAA and Fulmet treatment on growth of the 400 μ m microsectioned rhizomes	33
Table 12. Rhizome regrowth varied with thickness of rhizome section	33
Table 13. Effects of DNA conformation on transient GUS expression	52
Table 14. Different projectiles and their uses	66

List of Figures

Fig. 1. Construction of the vectors used	11
Fig. 2. Diagram of the particle delivery system (PDS) 1000/He	15
Fig. 3. Rhizome formation from the sliced rhizome section	34
Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of pBI121 and pFAD3 gene digested with restriction enzymes	36
Fig. 5. Transient GUS expression in the bombarded rhizomes	37
Fig. 6. Effect of microparticle size on GUS expression	39
Fig. 7. Effect of He gas pressure on GUS expression	40
Fig. 8. Effect of gap distance on GUS expression	41
Fig. 9. Effect of target distance on GUS expression	42
Fig. 10. Effect of chamber vacuum on GUS expression	43
Fig. 11. Effect of plasmid DNA construction on GUS expression	45
Fig. 12. Effect of coating DNA concentration on GUS expression	46
Fig. 13. Effect of osmotic conditions on GUS expression	47

Fig. 14. Effect of spermidine concentration on GUS expression	49
Fig. 15. Effect of He gas pressure, gap distance, and target distance on microprojectile distribution	50
Fig. 16. Effect of target distance and gap distance on bombarding force	51
Fig. 17. Effect of bombarding times on GUS expression	53
Fig. 18. Selective growth of the transformed rhizomes on kanamycin medium ...	55
Fig. 19. Electrophoresis of <i>npt-II</i> gene amplified by PCR	56
Fig. 20. Electrophoresis of <i>fad3</i> gene amplified by PCR	57
Fig. 21. Electrophoresis of <i>fad3</i> gene fragments produced by digestion of restriction enzymes	59
Fig. 22. Southern blot analysis of <i>npt-II</i> gene from transformed <i>Cymbidium</i> <i>virescens</i> after digestion with restriction enzymes	60
Fig. 23. Southern blot analysis of <i>fad3</i> gene from transformed <i>Cymbidium virescens</i> after digestion with restriction enzymes	61
Fig. 24. Analysis of <i>npt-II</i> activity in extracts of transformed rhizome of <i>Cymbidium virescens</i>	62
Fig. 25. Gas chromatogram of fatty acids	63

목 차

Abstract

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	8
1. 공시식물 및 조직배양	8
1) 조직절단 및 배지 조건	8
2) 생장조절 물질의 처리	8
2. 형질전환 조건을 검토하기 위하여 사용한 plasmid DNA 종류, 분리 및 정제 ...	8
1) Plasmid DNA의 종류	8
2) Mega-Prep kit에 의한 plasmid의 분리	12
3) Plasmid DNA의 정제	12
4) Plasmid DNA의 농도측정 및 전기영동	13
3. 유전자 도입 장치 및 입자에 plasmid DNA의 피복	14
1) 유전자 도입 장치	14
2) 입자에 plasmid DNA의 피복	14
(1) 텅스텐 입자의 전처리	14
(2) 입자에 DNA 피복	16
4. DNA 삽입조건	16
1) 입자크기	17
2) 헬륨가스 압력	17
3) Gap 거리	17

4) 목표 시료거리	17
5) 시료 상자 내의 진공도	18
6) Plasmid DNA 종류	18
7) Plasmid DNA의 농도	18
8) 삼투압 조절제의 농도	18
9) Spermidine의 농도	19
10) DNA의 구조	19
11) 투사 입자의 분포양상	19
12) 투사입자의 침투력	19
13) 투사 횟수	19
5. GUS 검정	20
6. 가나마이신 적정농도 설정	21
7. PCR 분석에 의한 <i>npt-II</i> 와 <i>fad3</i> 유전자의 확인	21
1) 근경중의 DNA 분리	21
2) Primer 설계	22
3) PCR 수행	23
8. Southern blot	23
1) 근경으로 부터 염색체 DNA 분리	23
2) 염색체 DNA의 절단 및 전기영동	24
3) Gel blot	24
4) DNA probe 제조	25
5) 방사능 동위원소의 표지	26
6) Hybridization	27
9. Neomycin phosphotransferase-II 분석	29
1) 시료조제	29



2) 단백질 전기영동	29
3) NPT-II 반응	29
10. 지방산 분석	31

III. 결 과

1. 조직배양의 적정 조건	32
1) 배지조건	32
2) 성장조절 물질의 처리	32
3) 절편조직의 두께	32
2. Plasmid DNA 수율 및 확인	33
3. GUS의 발현	35
4. DNA 삽입에 관여하는 조건	35
1) 미세입자 크기	35
2) 헬륨 가스 압력	38
3) Gap 거리	38
4) 목표 시료 거리	38
5) 시료 상자내의 진공도	38
6) Plasmid DNA의 구성	44
7) Plasmid DNA의 농도	44
8) 삼투압 조절제의 농도	44
9) Spermidine의 농도	44
10) 투사입자의 분포 양상	48
11) 투사입자의 침투력	48
12) 투사 횟수	48
13) DNA의 구조	52

5. 가나마이신에 의한 형질전환체 선발	52
6. 유전자 검색	54
1) PCR 분석	54
2) Southern blot	54
3) NPT-II 분석	58
4) 지방산 조성	58
IV. 고찰	64
V. 참고문헌	78
VI. 요약문	99



Abstract

Recent development of plant molecular biology has made it possible to transform plants by the various genetic engineering methods. Among them *Agrobacterium*-mediated transformation system has been used in wide range of plant species to get stable transgenic plants. But it has the disadvantage of biological toxicity of antibiotics which have to be used for killing *Agrobacteria* and can be applicable to only dicots, although some monocots are lately reported to be transformed. Electroporation and chemicals also have been used to insert foreign DNA into protoplasts directly but these techniques essentially require the establishment of protoplast isolation and cultivation which have been reported possible only for the limited plants.

Since 1989 the microprojectile bombardment technique has been introduced, which can be applied to both monocots and dicots, and in which protoplast isolation and cultivation are not necessary, because DNA coated particles (tungsten or gold) can be directly delivered into cells by the accelerating force generated from high voltage electrical discharge, firing of gunpowder or gas pressure. There are many kinds of transgenic plants obtained from this method. A study was conducted to optimize the transformation conditions of *Cymbidium virescens* and to insert a cold resistance gene, *fad3*, into rhizome sections.

The target substance for bombarding was the rhizome sections sliced with a vibratome. To get stable transformation the size of rhizome section should be as thin as possible. It was found that 400 μm was the smallest size for active growth, 200 μm sections being almost dead. Murashige-Skoog media with 1/4 strength and Hyponex media enhanced with peptone were, when 1.0 mg/L NAA and 5 $\mu\text{g/L}$ Fulmet were supplemented, most efficient for rhizome sections to develop into

sizable rhizome.

GUS expression was scored histochemically as an indicator of transient transformation to optimize bombarding factors such as size of microprojectile, He gas pressure, gap distance, target distance, vacuum degree of sample chamber, construction of plasmid DNA, osmoticum of media, concentration and conformation of coating DNA, distribution and penetrating depth of microprojectile in target, and bombarding times.

The optimum size of tungsten particles was 1.11 μm similar to other's reports (1.0 μm). The size of particles found to be one of prominent factors influencing transformation. The proper pressure of He gas was 1100 psi (77.33 kg/cm^2), too high pressure blowing away plant samples and giving damage. Gap distance between rupture disk and macrocarrier was optimized to 6.35 mm ; shorter distance gave stronger bombardment. One of the most important factors was the target distance between stopping screen and target sample: 7.0 cm giving highest GUS scores while longer distance showed low scores and shorter one caused loss of sample due to too strong shock. Penetrating force of tungsten particles depends on mainly gap distance and target distance: the shorter distances, the stronger penetrating force. But there were some negative effects if unnecessarily high penetrating forces were applied : damage of cells occurred. 27 inchesHg of vacuum degree in sample chamber seemed to be good enough for removing air friction. pBI121 among three plasmids used proved to be the most effective vector for transformation of *Cymbidium virescens*. Concentration of 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ plasmid DNA was optimum for coating tungsten particles ; higher concentration resulted in aggregation of particles and inhibition of particle dispersion. Conformation of plasmid DNA, linear or circular, did not appreciably influence the expression of GUS gene. This means that the plasmids isolated from E. coli can be used without conversion to linear form by digestion. Uniform central loading of DNA-coated particle suspension on the macrocarrier seemed to be essential for stable bombardment : reliable loading

technique can be obtained only from repeated practices. GUS scores increased with bombarding times but too much bombarding was harmful to tissues. Two times of bombarding was considered proper.

Under the optimized conditions, fatty acid desaturase 3 (*fad3*) gene with neomycin phosphotransferase-II (*npt-II*) gene was inserted to rhizome sections by the microprojectile bombardment. After the rhizome sections were bombarded, they were cultivated on 100 mg/L kanamycin medium for 3 months to screen transformants. Introduction of plasmids was confirmed by PCR analysis of *fad3* and *npt-II* genes. Southern blot analysis for *npt-II* and *fad3* gene supports that the bombarded rhizomes were transformed. By npt-II assay, expression of npt-II in the bombarded rhizomes was demonstrated. In addition, gas chromatographic analysis of rhizomes screened on kanamycin medium showed that portion of linoleic acid (18:2) decreased while linolenic acid (18:3) increased in the transformed rhizomes, but linoleic acid had higher peak than linolenic acid in the control which was not bombarded. This result indicates that *fad3* gene was successfully introduced into the *Cymbidium virescens* rhizome by the microprojectile bombardment and expressed.



I. 서론

蘭科(Orchidaceae)에 속하는 식물은 약 750 속에 25,000 종이 알려져 있으며 (Arditti, 1982) 이 중에서 東洋蘭屬(*Cymbidium*)은 약 70 여종이고 이들의 自生地는 熱帶 및 亞熱帶 지역이 대부분이며 溫帶 지방인 우리나라, 日本 및 中國에도 몇몇 종이 자생하고 있다(白등, 1989). 東洋蘭 중 특히 春蘭은 慶尙南北道와 全羅南北道 및 忠淸南道, 濟州道の 일부 지역에 주로 分布되어 있으며 같은 自生地域 내에서도 특수한 환경 조건을 갖춘 生態的 適所에 제한되어 分布되어 있다(朴등, 1990). 우리나라에 자생하는 난과 식물중 春蘭은 분포 領域이 대단히 넓기 때문에 遺傳的 變異가 일어날 가능성이 높을 것으로 推定된다(鄭등, 1990).

春蘭은 상록 다년초로 잎은 20~60 cm 로 길고 폭은 0.5~1.5 cm 정도 까지 자라는 것도 있으며 잎은 비교적 좁고 길며 잎가에는 미세한 거치가 있다. 잎의 선은 재배에 따라 직립하거나 늘어지고 꽃의 형태는 꽃잎이 三瓣으로 직경이 3 cm 정도 된다. 삼판의 꽃잎은 녹색으로 삼판 중앙에는 舌瓣이 있으며 이 舌瓣에는 붉은 자색의 점무늬가 있거나 없다. 꽃은 1경 1화로 향기가 있으며 개화기는 2~3월이다. 춘란은 은은하게 퍼져 나가는 향기와 청초한 자태, 꽃의 모양과 色相, 꽃과 잎에 들어 있는 무늬 등을 원예적 가치의 기준으로 삼고 있다. 더욱이 꽃에 향기가 적은 일본 춘란과 한국 춘란은 花物(화색의 변이종)과 柄物(잎무늬종)의 수집 개발에 많은 노력을 하고 있고 품종개발에도 힘쓰고 있다(車, 1995). 춘란의 품종개발은 재래적인 交雜育種法에 주로 의존되어 왔는데 이것은 採種과 發芽등에 소요되는 시간이 너무 길 뿐 아니라, 어느 특정 形質만을 선택적으로 導入시키는 것이 불가능하기 때문에 新品種 創出이 크게 制限되어 왔다. 동양란의 경우는 그 시장성이 날로 증가하는 추세이며 變異種에 대한 기호성은 생활수준의 향상과 더불어 급속히 확대됨에도 불구하고 새로운 품종의 개발은 그 수요를 뒤 따르지 못하고 있는 실정이어서 中國 春蘭과 日本 春蘭은 거의 전량을 외국으로부터 수입해서 공급하고 있다(崔와 鄭, 1989).

최근 分子生物學의 발전과 더불어 식물의 形質轉換 방법이 다양하게 개발되고 있

으며 그 중에서 많이 사용되고 있는 것은 *Agrobacterium*의 接種에 의한 것인데 (Aragao et al., 1993; Chibbar et al., 1991; Hooykaas, 1989; Rainieri et al., 1990; Kaneyoshi et al., 1994) 이것은 host range의 제한 때문에 쌍자엽이 아닌 식물에서는 그 활용성이 제한되어 왔다(Oard, 1991; Liang et al., 1994; Pena et al., 1995; Schroeder et al., 1993; Sawahel and Cove, 1992; Wilmink et al., 1992; Chung et al., 1992). 또한 *Agrobacteria*에서 발생하는 毒性和 *Agrobacterium*을 제거하기 위해서 사용되는 carbenicillin과 같은 抗生劑의 부작용 때문에 식물체 再生 效率이 감소하는 단점이 있어 形質轉換率을 떨어 뜨리고 있다(Chee 와 Jerry, 1992).

原形質體에 직접 외래 遺傳子를 삽입하는 방법인 電氣穿孔法(Bekkaoui et al., 1990; Charest et al., 1991)이나 化學物質 處理法(O'Neill et al., 1993; Suh et al., 1993)도 원형질체의 분리 및 배양이 어렵고 완전한 식물체로의 再生 效率이 떨어지기 때문에 그 適用性이 적은 것으로 생각된다(Genga et al., 1991; Aragao et al., 1992; Finer 와 McMullen, 1990; Van Eck et al., 1995). 穀物중에서는 벼에서 원형질체를 분리하여 電氣穿孔法이나 polyethylene glycol(PEG) 방법으로 형질전환체를 만들었다는 보고도 있었으나 실제로 이 방법은 원형질체의 조작 기술이 어려울 뿐만 아니라 胚(embryo)로 分化될 수 있는 현탁세포 배양도 힘들어 모든 곡물류에 쉽게 적용하기 힘들다는 단점이 있다(Li et al., 1993; Klein et al., 1988).

반면에 최근에 많이 사용되고 있는 微細粒子 投射法은 外來 遺傳子가 被服된 입자에 物理的 압력을 주어 投射시킴으로써 外來 遺傳子가 細胞壁을 통과하여 세포내로 들어가게 하는 방법으로 動物, 藻類, 酵母 그리고 식물등 다양하게 응용되어지고 있다 (Charest et al., 1992). 이 방법은 몇가지 장점을 갖고 있는 바 雙子葉이나 單子葉 식물 모두에게 적용될 수 있을 뿐만 아니라 세포막을 제거하여 원형질체를 만들 필요가 없기 때문에 酵素 處理에 따른 부작용이나 원형질체의 배양을 필요로 하지 않는다는 것이다(Campbell et al., 1992 ; Casas et al., 1993; Hebert et al., 1993, Sanford et al., 1990; Daniell et al., 1993, Fromm et al., 1990). 이 방법은 Sanford 등(1987)에 의해서 처음 소개 되었는데 Table 1에서 보는 바와 같이 *Agrobacterium* 방법과 원형질체를 이용한 電氣穿孔法 보다 몇가지 유리한 점을 갖고 있다 (Birch and Tricia, 1991). 微細粒子 投射法에 의한 외래 유전자 插入 방법은 細胞 현탁배양

을 통해서 생육된 細胞群集, 조직배양에 의해서 자란 캘러스, 그리고 어떤 특정 조직이나 器官 중의 세포등 식물의 다양한 형태에 적용할 수 있다(Cao et al., 1990 ; Castillo et al., 1994; Cao et al., 1991). 이 방법을 통해서 작물에 유전자를 삽입함으로써 品質을 향상시키거나, 바이러스 抵抗性(Abel et al., 1986; Gerlach et al., 1987; Harrison et al., 1987; Cuozzo et al., 1988; Nelson et al., 1988), 耐蟲性(Fischhoff et al., 1987; Hilder et al., 1987; Vaeck et al., 1987)과 除草劑에 대한 抵抗性(Shah et al., 1986; della-Cioppa et al., 1987; Fillatti et al., 1987; Cheung et al., 1988)을 갖도록 하여 附加價値가 높은 新品種을 創出함으로써 농약사용과 영농비를 줄일 수 있을 뿐만 아니라 環境的, 經濟的 측면에서 큰 利得을 가져 올 수 있기 때문에 최근에 많이 연구되고 있다. 그러나 이 방법은 형질전환율이 낮고 non-transformant 또는 chimeric 식물이 많이 만들어 진다는 단점을 갖고 있다.

Table 1. Features of *Agrobacterium*, electroporation and microprojectile bombardment techniques.

Features	Microprojectiles	<i>Agrobacterium</i>	Electroporation
Host range	wide	mainly dicot	wide
Convenience	high	high	low
Protoplast isolation	no	no	yes
Tissue culture duration	short	short	long
Efficiency	medium	high	medium
Consistency	low	high	medium
Integration patterns	complex	simple	complex

微細粒子 投射法은 한 번의 투사로 많은 세포에 외래 유전자를 導入할 수 있지만 目標試料의 面積이 커서 모든 시료에 미세입자가 골고루 분포되도록 하기 위해서는 많은 복합적 인자들을 적정화 시켜야한다. 그렇지 않고서는 반복마다 투사조건을 똑

의 목표점에 정확히 투사해야 하고 미세입자의 透過力과 投射 方向을 정확히 하기 위한 적합한 인자들을 검토하여 형질전환율을 높여야만 한다.

微細粒子 投射法은 다양한 품종의 식물체에 대하여 아무런 前處理 없이 직접 고속 입자가 세포벽을 通過토록 하여 외래 유전자를 도입하는 것으로 안정한 형질전환체 選拔을 위한 다양한 방법들이 개발되고 있다(Russell et al., 1992; Aragao et al., 1992; Birch and Tricia, 1991; Finer et al., 1992; Iida et al., 1991). Bidney 등 (1992)은 담배 잎에서 *Agrobacterium tumefaciens*의 방법으로 형질전환을 시도하고자 할 때 微細粒子 投射 기술로 식물에 傷處를 입힌 후 감염시키면 既存의 방법 보다 그 效率을 100배 이상 증가시킬 수 있다고 하였다. 그러나 이 방법은 식물종, 選拔 표지 인자, 배양 조건, 목표 식물의 상태 등 여러 가지 인자에 의해서 달라질 수 있으므로 다른 방법과의 비교는 어렵다고 생각되어진다.

微細粒子 投射法을 이용하여 식물세포로 유전자를 전이하기 위한 최초의 시도는 1960년대에 바이러스와 核酸을 식물에 삽입하기 위해서 미세입자로 식물 표면에 상처를 만들고져 air-brush를 이용했던 바이러스 학자들(MacKenzie et al., 1966)에 의해서 이루어 졌는데 감염효과는 실용적이지 못했다. 이 시기를 지나 유전자 도입 방법이 급속하게 발전한 것은 식물의 細胞膜과 壁을 통과하기에 충분한 가속화(약 250 m/s) 장치를 고안하여 텅스텐 미세입자(직경 1-4 μm)를 세포로 투입시키는 장치를 개발한 Cornell 대학교의 연구자들(Klein et al., 1988)에 의해서 였다. 실제로 양파의 표피세포에 이 방법으로 投射한 결과 40% 까지 도입효율이 좋았음을 관찰하였다. 그들은 살아있는 세포에 蛋白質(抗體 또는 酵素)이나 合成 巨大分子와 유전물질등을 전이하는데 이 방법이 가장 적합하다고 생각하였다.

'Biolistic bombardment'라는 명칭은 Sanford(1987)에 의해서 처음 명명되어 졌는데 particle bombardment, microprojectile bombardment, particle acceleration, gene gun method, 또는 particle gun 등의 용어는 모두 동일한 의미로 쓰여지고 있다.

이 장치의 변천사를 살펴보면 처음 考案된 기기는 화약의 폭발에 의해서 가스를 방출시켜 이 힘으로 미세입자를 가속시켜 식물세포에 외래 유전자가 삽입되도록 했던 것으로(Klein et al., 1988, Sanford et al., 1987) Biolistic PDS-1000 이라는 상품명

으로 시장에 나왔다. 이 장치는 Sanford 등에 의해서 고안되었는데 DuPont 사가 이를 임대하는 방법으로 공급했다. 또한 미세입자의 충격에 관련되는 정지망, 정지판 등에 대한 특허 등록으로 많은 연구자들은 비슷한 형태의 장치를 각 연구실에서 제작하여 사용하게 되었다. 그러나 이 장치는 투사할 때 추진력을 제어하기가 힘들고 목표시료인 세포에 손해가 크며 안정한 형질전환체를 얻지 못하는 단점이 있었다. 비슷한 장치로 McCabe 등(1988)은 고전압의 방전으로부터 발생하는 가속력을 이용하였는데 이것은 장치의 부속품(capacitor)이 너무 고가이므로 널리 이용되지 못하였고 Morikawa 등(1989)은 소레노이드 발브로 제어시키는 압축공기를 이용하였는데 상품화되지는 못했다. 가장 최근의 모델인 PDS-1000/He 장치는 BioRad사에서 판매하고 있으며 이것은 gunpowder 보다 기능이 향상된 것으로 기본 디자인은 Sanford 등(1991)에 의해서 만들어 졌다. PDS-1000/He는 헬륨 가스압에 의하여 macrocarrier를 가속화시키고 이것이 정지망에 걸렸을때 미세입자가 관성의 힘에 의해서 목표시료에 도달하도록 하는 장치로 gunpowder와 비교해서 PDS-1000/He는 더 깨끗하고 안전하며 투사력을 통제할 수 있으며 시료에 더 골고루 微細粒子를 분포시키며 반복간에 차이가 적어서 4~300 배 더 높은 형질전환체를 얻을 수 있다고 하였다(Sanford et al., 1991).

미세입자 投射法에 의하여 *Chlamydomonas*에서 엽록체 염색체와 효소의 mitochondrial 염색체가 형질전환 되었고(Boynton et al., 1988), Daniell 등(1990)은 담배 세포의 plastid에서 transient expression을 처음 보고하였다. 이밖에도 미세입자 投射法에 의한 형질전환은 곰팡이(Bhairi and Staples, 1992), 귀리(Chibbar et al., 1991; Daniell et al., 1991; Vasil et al., 1992), 사탕수수(Chowdhury and Vasil, 1992; Franks and Birch, 1991), 담배(Svab et al., 1990; Tomes et al., 1990; Yamashita et al., 1991), 목화(Finer and McMullen, 1990; McCabe and Martinell, 1993), 효모(Johnston et al., 1988), 옥수수(Klein et al., 1988; Tagu et al., 1992), 보리(Lee et al., 1991; Ritala et al., 1993), 콩(McCabe et al., 1988; Christou et al., 1989; Genda et al., 1991; Russell et al., 1992; Sato et al., 1993; Takeuchi et al., 1992), *Dendrobium* 속의 난(Kuehnle and Sugii, 1992), 벼(Christou, 1991; Li et al., 1993; Hensgens et al., 1993), 잔디(Zhong et al., 1993), 나자식물(Charest et al.,

1992), 목초(Seki et al., 1991), 고구마(Prakash and Varadarajan, 1992) 등에서 다양하게 이루어져 왔다.

식물이 생육하는데 있어서 주요한 環境的 요인의 하나는 溫度이다. 많은 熱帶와 亞熱帶 식물인 쌀, 옥수수, 수수, 감귤, 토마토 등 冷害에 敏感한 곡물들은 20°C 이하일 때 生育障害를 받는다. 低溫에 대한 식물의 感受性(sensitivity) 또는 耐性(tolerance)은 식물이 본래 適應해 왔던 習慣에 따라 耐性を 가질 수도 있고 또 그렇지 못할 수도 있다. 저온에 대한 감수성의 메카니즘에 관해서는 오래전 부터 論爭의 對象이 되어 왔지만 아직까지 그 메카니즘의 實體에 대한 定義는 내리지 못하고 있는 실정이다(Woda et al., 1990). 그러나 저온 障害에 관한 學說은 植物細胞에 대한 모델 시스템인 *Cyanobacteria*에서 나타난 것 처럼 細胞膜 脂質의 相轉移(phase transition)에 의한다는 것으로 相轉移 온도는 膜脂質을 구성하는 不飽和 脂肪酸의 함량에 의존되기 때문에 식물의 저온 抵抗性은 膜脂質의 지방산에 二重結合이 생기도록 脂肪酸 不飽和度를 유전적으로 조절함에 의해서 變更시킬 수 있다. 식물의 저온에 대한 敏感度는 細胞膜의 phosphatidylglycerol 에서 지방산이 얼마나 不飽和 되었는가에 따라 결정된다(Murata et al., 1992; 1983; Polashock et al., 1992; Tasaka et al., 1990; Kunst et al., 1989a; Wolter et al., 1992). 고등식물의 엽록체 막은 多重 不飽和 지방산을 많이 함유한다. 식물세포에서 18:3 과 16:3 脂肪酸의 合成은 stearate(18:0)와 palmitate(16:0)와 같이 飽和된 지방산의 不飽和化에 의하여 일어난다. 첫 번째 이중결합은 soluble chloroplast 酵素인 stearyl-acyl carrier protein desaturase에 의해서 탄소수가 18개인 지방산으로 插入되어지고 두 번째와 세 번째 이중결합은 지방산의 엽록체 또는 소포체에 있는 glycerolipid로 삽입 되어진 후에 이루어진다(Iba et al., 1993).

각 細胞마다 지방산의 組成은 다양하며 대부분의 脂肪酸 合成은 plastid(Ohlrogge et al., 1994; Harwood, 1988)에서 일어난다. fad3 遺傳子는 ω-3 不飽和 脂肪酸이 부족한 *Arabidopsis*의 突然變異를 교정할 수 있는 *Brassica napus*로 부터 分離(Arondel et al., 1992)된 것인데 지방산의 不飽和 酵素는 細胞膜으로 들어가 수소를 떼어냄으로써 飽和 脂肪酸을 不飽和 脂肪酸으로 만드는 것으로써 18:3의 형태를 갖는 不飽和

脂肪酸인 linolenate 가 더 많이 만들어 짐으로 해서 低溫에 강한 식물이 되는 것으로 알려져 있다.

식물의 脂肪酸 조성중 가장 많이 발견되는 것은 하나 내지 두 개의 二重結合을 가지고 있는 16 또는 18 개의 炭素로 만들어진 構造이며(Ohlrogge, 1994; Kunst et al., 1989b) 不飽和 脂肪酸이 많을수록 低溫에 抵抗하는 능력이 강한데 이는 linolenate(18:3)와 같은 不飽和 脂肪酸이 많으면 녹는점이 낮아지기 때문인 것으로 보인다(Graham과 Patterson, 1982). 식물 지방산중 不飽和 酵素의 대부분은 기질로서 glycerolipid를 이용하는 膜 蛋白質인데 不飽和 反應 酵素 遺傳子를 삽입하면 飽和 脂肪酸이 不飽和 脂肪酸으로 變換되어지고 따라서 식물의 細胞膜 중에서 飽和脂肪酸보다 不飽和脂肪酸이 많아지게 된다. 飽和 脂肪酸이 많으면 細胞膜의 構造가 딱딱해져 低溫에 노출되었을 때 養分을 吸收할 능력이 없어 죽게 되지만 不飽和 脂肪酸이 많은 膜 構造는 二重結合으로 인하여 脂肪酸의 結合이 느슨해지므로 추위에 노출되어도 細胞膜을 통해서 養分을 吸收할 수가 있기 때문에 生存할 수가 있게 되는 것이다. 이러한 이유로 耐寒性 유전자인 *fad3* 유전자를 삽입하면 저온에 강한 식물을 만들 수 있게 되는 것이다. 冷害에 견디는 품종이 만들어 진다면 農業的으로 다양한 應用性을 갖게 되는데 그 중의 하나를 例로 든다면 겨울에 비닐하우스의 暖房 維持에 소요되는 막대한 燃料費를 節減할 수 있어 農家所得에 크게 기여할 수도 있을 것이다.

본 연구에서는 春蘭의 형질전환을 일으키기 위하여 植物種類나 조직부위에 관계 없이 신속 용이하게 응용될 수 있으며 細胞膜을 제거하여 原形質體를 만들 필요가 없어 酵素 處理에 따른 不作用이나 原形質體로 부터 식물체를 재생할 필요가 없는 微細粒子 投射法에 관련된 實驗 條件들을 檢討하였다.

Table 2(Appendix)는 다양한 식물종에서 形질전환을 確立한 例들인데 표에 나타난 바와 같이 春蘭을 試料로 사용한 例는 없었다. 따라서 본 연구는 微細粒子 投射法을 이용하여 春蘭의 根莖 切片으로 外來 遺傳子인 耐寒性 遺傳因子를 導入하여 안정된 形질전환체를 選拔하기 위한 다양한 인자들을 適正化함으로써 새로운 品種을 創出하기 위하여 有用 遺傳子를 導入할 수 있는 기틀을 마련하고자 遂行하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시식물 및 조직배양

본 실험에 사용한 식물은 종자를 기내배양하여 얻은 근경을 계대배양한 춘란 (*Cymbidium virescens*)이 이용되었다.

1) 조직절단 및 배지 조건

Vibratome (Scientific series 1000, USA)을 이용하여 왕성하게 생육하는 춘란 근경을 스티로폼 블럭에서 200 μm , 400 μm , 600 μm , 2 mm, 5 mm 두께로 무균적으로 절단하고 동일배지상에 생육시켜 크기별로 생존율을 조사했다. 미세절단된 조직편의 생육과 식물체 재생에 적합한 배지 조건을 찾기 위해서 MS 기본배지(Table 3)와 1/2 및 1/4배로 희석된 배지, 그리고 일반적으로 난 배양에 널리 이용되고 있는 peptone이 들어있는 Hyponex(村上物産株式会社, Japan) (Table 4) 배지를 비교하였다.

2) 성장조절 물질의 처리

MS와 Hyponex를 기초로 하여 만든 배지에 NAA 0.1, 1.0, 2.0, 5.0 mg/L와 Fulmet(Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd, Tokyo, Japan) 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 μg /L를 단용 혹은 혼용 처리하여 근경조직 절편에 가장 적합한 성장조절 물질의 농도를 검토하였다.

2. 형질전환 조건을 검토하기 위하여 사용한 plasmid DNA 종류, 분리 및 정제

1) Plasmid DNA의 종류

형질전환 조건 적정화 및 내한성 유전자 도입을 위해서 사용된 plasmid DNA의 구성은 그림 1과 같다.

Table 3. Composition of the Murashige-Skoog medium.

Constitute	Concentration	
	mg/L	Mole
Major inorganic nutrients		
NH ₄ NO ₃	1,650	2.06x10 ⁻²
KNO ₃	1,990	1.88x10 ⁻²
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	3.00x10 ⁻³
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	1.50x10 ⁻³
KH ₂ PO ₄	170	1.25x10 ⁻³
Trace elements		
KI	0.83	5.00x10 ⁻⁶
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3	9.99x10 ⁻⁴
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	2.99x10 ⁻⁵
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	1.00x10 ⁻⁵
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	1.00x10 ⁻⁶
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	1.00x10 ⁻⁷
H ₃ BO ₃	6.2	1.00x10 ⁻⁷
Iron source		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	1.00x10 ⁻⁴
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	27.3	1.00x10 ⁻⁴
Organic supplement		
myo-inositol	100	4.90x10 ⁻⁴
nicotinic acid	0.5	4.66x10 ⁻⁶
pyridoxine-HCl	0.5	2.40x10 ⁻⁶
thiamine-HCl	0.5	3.00x10 ⁻⁷
glycine	2	3.00x10 ⁻⁵
Carbon source		
sucrose	30 g/L	8.80x10 ⁻²
Others		
agar	7.5 g/L	
charcoal	2 g/L	
pH	5.8	

Table 4. Composition of enriched Hyponex media for rhizome growth.

Component	Concentrations
Hyponex soln.	3 ml
peptone	3 g/L
sucrose	30 g/L
vitamine	
myo-inositol	100 mg/L
thiamine-HCl	0.1 mg/L
nicotinic acid	0.5 mg/L
pyridoxine-HCl	0.5 mg/L
glycine	2 mg/L
agar	8 g/L
charcoal	2 g/L
pH	5.8

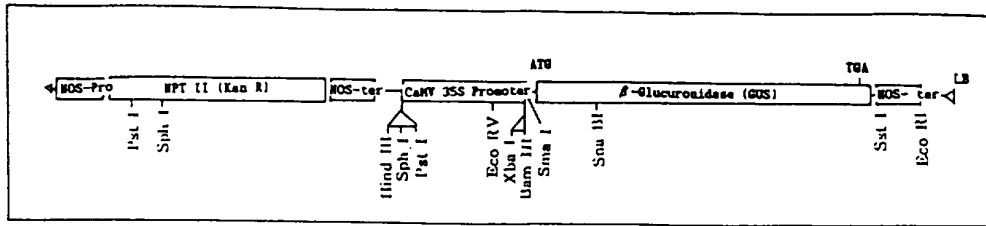
Plasmid pBI121(Clontech Lab., San Francisco, CA, USA)은 NOS-pro, NPT-II, NOS-ter, CaMV 35S promoter 및 GUS로 구성되고 Hind III, Sph I, Sma I 그리고 EcoRI등의 cloning site가 존재한다.

pBI221(Clontech Lab., San Francisco, CA, USA)은 NOS-ter, CaMV 35S promoter 및 GUS로 구성되고 Hind III, Sph I, Sma I 그리고 EcoRV 등의 cloning site가 존재한다.

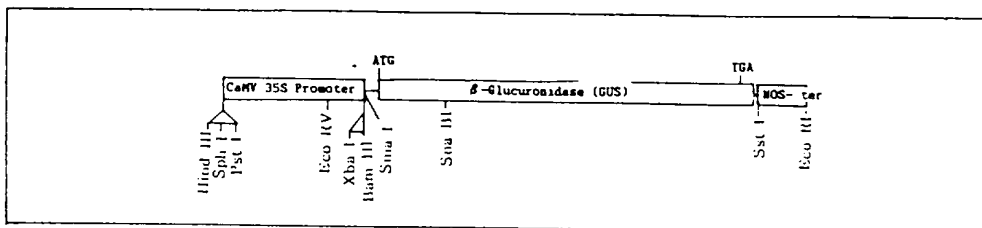
pBarGus(USA)는 CaMV35S promoter, Adh-1 intron, BAR coding region, NOS terminator + Adh-1 promoter, Adh-1 intron, GUS 및 NOS-ter 등으로 구성된다 (Fromm et al., 1990).

pFAD3 내한성 유전자인 fad3를 갖고 있는 것으로 *E.coli* HB101에 plasmid 형태로

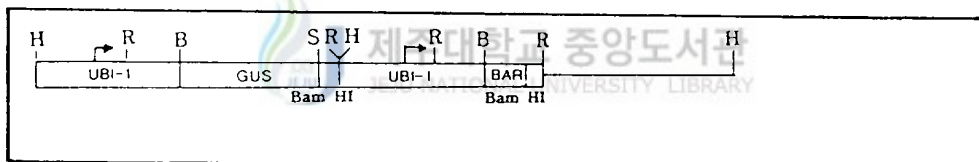
pBI121



pBI221



pBarGus



pFAD3

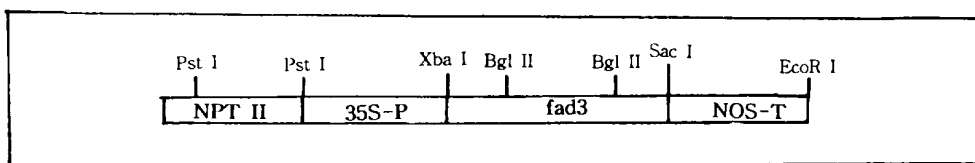


Fig. 1. Construction of the vectors used.

포함되어 있고 그 구성은 neomycin phosphotransferase-II(NPT-II), NOS-ter, CaMV 35S promoter 및 fad3로 되어 있으며 선발 물질로서 NPT-II 유전자를 함유하며 Pst I, Sac I, EcoRI, Xba I 그리고 Bgl II 등의 cloning site가 존재한다.

2) Mega-prep kit (Promega Co., USA)에 의한 plasmid의 분리

미세입자 투사장치의 적정조건을 설정하기 위하여 사용된 통보 유전자는 gus 로써 이 유전자를 갖고 있는 pBI121, pBI221 그리고 pBarGus를 비교하였는데 pBI221 과 pBarGus는 정제된 DNA를 구매하여 사용했지만 pBI121과 내한성 유전자를 포함하고 있는 pFAD3는 *E.coli* HB101 내에서 증폭시킨 뒤에 분리 정제하여 사용하였다.

pBI121과 pFAD3를 *E.coli*로 부터 분리하기 위하여 1000 ml의 LB 배지(Bactotryptone 2 g, Bacto-Yeast extract 1g, NaCl 1 g, pH7.0)에 -70°C의 저온 냉동기(II Sin Engineering Co. Korea)에서 저장했던 해당 plasmid를 함유하고 있는 *E.coli*를 접종하고 최종 농도가 50 mg/L 되도록 가나마이신을 처리하여 37°C에서 하룻밤 진탕 배양하였다. *E.coli* 배양액 1000 ml를 40 ml의 원심분리관(Nalgene, USA)에 나누어 고속 원심분리기(Supra 22K, Hanil Science Industrial, Korea)로 14,000×g에서 20분간 원심분리하여 세포군집을 얻었다. 이 pellet에 세포 현탁액 30 ml를 가하여 현탁시킨 후 다시 세포 용해용 용액 30 ml(Table 5)를 가하여 부드럽게 혼합시켰다. 이 혼합액에 중화용액 30 ml를 넣어 즉시 혼합하고 14,000×g에서 15분간 원심분리 시켰다. 이 중 上澄液을 취하여 上澄液의 0.6 배에 해당하는 isopropanol을 가하여 부드럽게 혼합한 후 14,000×g에서 15분간 원심분리 시켰다. 上澄液은 버리고 pellet에 TE 완충액 5 ml를 가하여 DNA pellet을 현탁시켰다.

3) Plasmid DNA 의 정제

이상에서 얻은 DNA 용액을 Wizard Mega-prep의 DNA 정제용 resin 20 ml에 가한 후 resin/DNA 혼합용액이 들어있는 컬럼 끝을 진공계에 연결시켜 용액을 추출하였다. 여기에 컬럼 세척액 25 ml를 가하여 resin에 남아있는 불순물을 세척하고 80% ethanol 10 ml를 가하여 컬럼을 통과시킨 후 다시 진공계에 연결하여 수지를 10분간 건조시켰다. 컬럼을 진공계로 부터 제거하고 용기에 놓은 후 65~70°C로 예열된 TE

완충액 3 ml를 가하여 1,300×g에서 원심분리하여 순수한 plasmid DNA 용액을 얻었다.

4) Plasmid DNA의 농도측정 및 전기영동

2-3)에서 얻어진 용액중의 DNA 농도를 알아 보기 위하여 분광광도계(Lambda 3, Perkin-Elmer, Germany)에서 260 nm의 파장으로 DNA의 양을 측정하였다. 이 용액은 미세입자 피복용으로 사용하기 위해서 DNA 농도를 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (1.67 $\mu\text{g}/\text{mg tungsten}$)로 희석시킨 후 전기영동하여 plasmid DNA의 분리 및 정제 여부를 확인하였고 260 nm와 280 nm의 흡광도 비를 측정해서 DNA 순도를 재확인하였다.

Table 5. Composition of Wizard Mega-prep DNA purification system.

Type of soln.	Concentration	Amounts added
Cell resuspension solution		30 ml
Tris-HCl, pH7.5	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	2.55 M	30 ml
Wizard column wash solution		25 ml
NaCl	0.2 M	
Tris-HCl, pH7.5	20 mM	
EDTA	5 mM	

3. 유전자 도입 장치 및 입자에 plasmid DNA의 피복

1) 유전자 도입 장치

유전자 단편을 도입하기 위하여 사용된 장치는 Particle Delivery System (PDS) 1000/He (Bio-Rad Lab. USA)으로 그 구성은 그림 2와 같다. 이 장치는 진공계와 연결된 시료상자, 헬륨 가스통과 압축실 및 미세입자 가속기의 3 부분으로 나누어져 있다.

이 기기의 원리는 압축실을 헬륨 가스통의 압력에 의해서 고압으로 만들어 주면 압축실을 막고 있는 파열성 원판(rupture disk)이 그 원판 고유의 압력에 이르렀을 때 파열되면서 그 추진력으로 macrocarrier holder에 투사를 가하게 되어 macrocarrier holder는 macrocarrier를 운반하여 전진하다가 정지판 및 정지망(stopping screen)에 이르면 갑자기 멈추게 된다. 그러나 macrocarrier에 도포되어 있던 DNA는 관성의 힘 때문에 macrocarrier로부터 떨어져 나와서 정지망 사이를 통과하여 계속 전진하게 되고 시료가 들어 있는 상자내는 진공시켜서 가속된 입자들이 공기저항에 의해 감속되지 않게 함으로써 유전자가 피복된 입자가 목표시료에 들어가게 되고 이렇게 하여 외래 유전자가 식물세포로 도입케 되는 것이다.

이 방법으로 세포를 형질전환 시킬때는 다양한 인자에 의해서 형질전환율이 좌우되기 때문에 안정된 형질전환체 체계를 확립하기 위해서는 시료에 적합한 적정 조건을 찾아야만 한다. 따라서 미세입자의 크기 및 재질, 헬륨 가스 압력, gap 거리, 피복 DNA의 유전자 구성, 목표 시료 거리, 시료상자 내의 진공도, 시료 배지의 삼투압 농도, 피복 DNA와 미세입자와의 혼합비등 다양한 요인들을 검토하였다.

2) 입자에 plasmid DNA의 피복

(1) 텅스텐 입자의 전처리

미세입자로는 텅스텐을 사용하였는데 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 15 분간 방치하고 15,000×g에서 15분간 원심분리하였다. Pellet

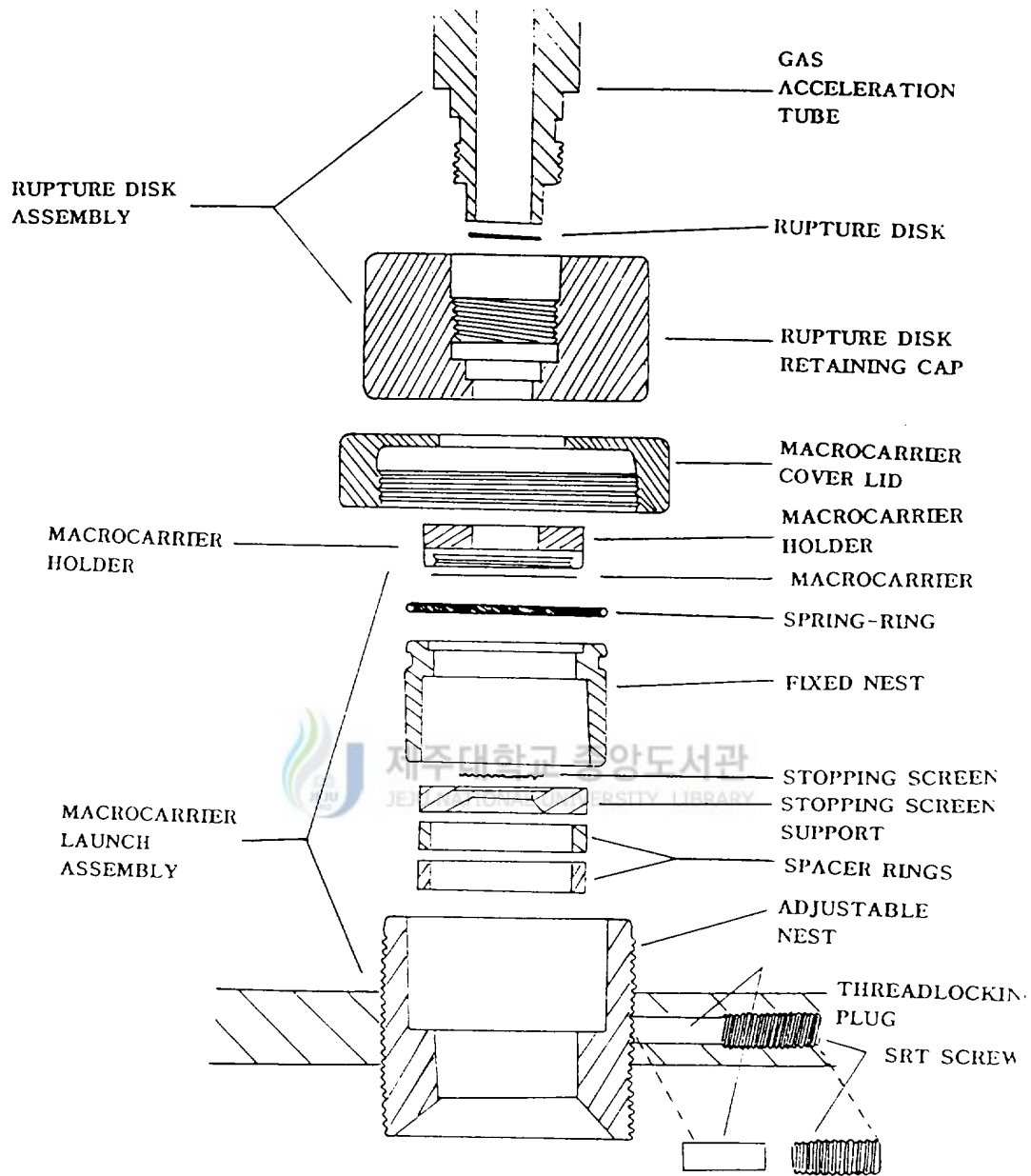


Fig. 2. Diagram of the particle delivery system (PDS) 1000/He.

을 살균수로 3회 반복 세척하고 50% glycerol 1 ml (Daniell, 1993)를 가해서 보관액으로 만들고 텅스텐의 산화를 방지하기 위하여 1~2주 동안 -20°C에서 보관하면서 사용하였다.

미세입자 제조시 미량 원심분리관은 텅스텐 입자가 잘 들어 붙지 않는 재질로 만들어진 것을 사용하는 것이 실험오차를 줄일 수 있기 때문에 'Treff' 미량원심분리관을 사용하였다.

(2) 입자에 DNA 피복

위의 텅스텐 현탁액 25 μ l에 DNA 용액 2.5 μ l (1 μ g DNA/ μ l), 2.5 M CaCl₂ 용액 25 μ l, 0.1 M spermidine 용액 10 μ l를 계속적으로 혼합하면서 가해 준 다음 8,000 × g에서 pellet이 너무 딱딱하게 침전되지 않도록 가볍게 원심분리하였다. 이 pellet에 70% 에탄올 70 μ l를 가하고 10,000 × g로 1분간 원심분리한 뒤 다시 100% 에탄올을 가한 후 격렬하게 혼합하여 10,000 × g에서 1분간 원심분리 하였다. 미세입자를 균일하게 얻기 위하여 초음파 세척기 (RK102, Bandelin, USA)에서 진탕하면서 6 μ l를 취한 뒤 macrocarrier에 신속하게 옮겨 건조시켰다. spermidine은 -20°C에 보관한다 할지라도 너무 오래 저장하면 형질전환율에 영향을 미치므로 한달에 한 번씩 새롭게 조제하여 사용하였다.



4. DNA 삽입조건

형질전환 효율을 좋게 하기 위해서는 우선 미세입자의 투사를 좌우하는 물리적 조건을 적정화하여야 되는데 여기에는 입자의 크기 및 재질을 비롯하여 가스압력, 시료의 위치 등 많은 인자가 관여하는 바 이들을 동시에 조합하여 실험하는 것은 현실적으로 불가능한 작업이기 때문에 각 요인들의 기본 값은 문헌의 자료를 종합하여 최적치라고 예상되는 값을 중심으로 하고 이 값보다 높은 것과 낮은 것을 추가하여 검토하였다.

다음은 목표시료에 알맞는 생물학적 조건을 최적화시켜 조직의 손상은 최소화시키면서 조직의 생육을 활성화시킬 수 있는 조건을 찾아내야 하는데 여기에 관련되는

요인은 시료의 생육상태, 세포밀도, 투사 배지의 삼투압 조건, vector의 종류 및 투사 후 세포의 처리상태 등이 포함된다.

시료의 준비는 두께를 달리하여 무균적으로 절단된 근경 절편을 충격완화를 위하여 제조된 고체배지(Hyponex 배지)가 들어있는 직경 3 cm의 petri 접시 가운데를 중심으로 50개를 배열하였다.

1) 입자 크기

가장 많이 사용되는 미세입자에는 금과 텅스텐으로 만들어진 두가지가 있는데 그들의 크기 및 형태는 다양하다. 미세입자의 투과력은 입자의 크기와 모양 그리고 밀도에 따라 달라지므로 입자를 크기별로 선택하여 균질의 현탁액을 만들어 사용했다.

본 실험에서는 미세입자의 크기를 0.73 μm (Tungsten M10), 1.11 μm (Tungsten M17), 1.32 μm (Tungsten M20), 1.63 μm (Tungsten M25)의 4 가지 수준으로 달리 해서 직경의 크기에 따른 형질전환율의 차이를 비교 검토하였다.

2) 헬륨 가스 압력

춘란의 근경 시료에 대한 헬륨가스(순도 99.999%)의 적정 압력을 알아 보기 위하여 압력에 견디는 정도가 다른 rupture disk (BioRad Lab., USA)를 3가지 사용하였는데 각각의 내압은 63.27 kg/cm^2 (900 psi), 77.33 kg/cm^2 (1100 psi), 91.39 kg/cm^2 (1300 psi) 이었다. 압력 조건을 달리하면서 식물조직에 손상을 주는지의 여부, 시료가 튕겨 나가는지 또는 압력을 많이 받은 부분에 골이 패이는지의 여부등 외관적 조사를 하면서 처리에 따라 GUS 발현에 어떠한 영향을 주는지 관찰하였다.

3) Gap 거리

gap 거리는 rupture disk와 macrocarrier 사이의 거리로 3.175 mm (1/8"), 6.350 mm (1/4"), 9.525 mm (3/8")의 3 수준으로 달리하여 실험하였다.

4) 목표 시료거리(target distance)

정지망으로 부터 시료까지의 거리를 뜻하며 이것은 gap 거리와 헬륨 가스 압력과

의 조합과 더불어 형질전환율에 큰 영향을 미치는 인자이다. 따라서 목표시료 거리를 3.8 cm (1st step), 7.0 cm (2nd step), 10.2 cm (3rd step), 13.4 cm (4th step)의 4단계로 나누어 조사하였다.

5) 시료상자 내의 진공도

시료상자 내의 진공도는 보통 식물세포에서 가장 많이 사용하는 26~30 inchHg 범위를 기준으로 그 이하와 이상인 23, 25, 27, 29 inchHg로 설정하여 조사하였다. 여기서 사용되는 진공단위는 1 기압을 0 inchHg로 하고 진공이 되어 수은주가 내려가는 거리를 inch 또는 mm 로 나타내는 방식으로 표시하였다.

6) Plasmid DNA 종류

미세입자 투사법을 적정화시킬 때 목표시료의 조직에서 형질전환 효율을 높이기 위해서는 사용되는 시료에 적합한 promoter를 갖는 유전자로 구성된 plasmid를 선택해야 한다. 본 실험에서는 세가지 서로 다른 plasmid인 pBI121, pBarGus 그리고 pBI221을 사용했는데 이들은 모두 *gus* 유전자를 갖고 있으며 pBI121과 pBI221은 *npt-II* 유전자의 유무만 다르고 pBarGus는 promoter가 나머지 두 개와 상이한 것이었다.



7) Plasmid DNA의 농도

plasmid DNA와 텅스텐의 상대적 농도가 형질전환율에 미치는 영향을 검토하기 위하여 텅스텐 mg 당 DNA 양을 0.83, 1.67, 2.5, 3.32, 4.15 μ g 으로 처리하여 비교 검토하였다.

8) 삼투압 조절제의 농도

DNA를 삽입하기 전후에 근경절편에 삼투압 조절제를 첨가하였을 때 형질전환에 어떤 영향을 주는지 알아 보기 위하여 삼투압 조절제를 처리하지 않은 것 그리고 0.25, 0.5, 0.75, 1 M의 sorbitol을 미세입자 삽입 하루전에 처리하고 삽입 후 하룻밤 더 방치하여 가장 적합한 삼투압 조건을 조사했다.

9) Spermidine의 농도

미세입자에 DNA를 피복시킬 때 spermidine의 첨가 효과를 조사하기 위하여 1 M의 spermidine을 제조하고 0.25 μm 의 여과지를 사용하여 멸균시킨 뒤 spermidine을 넣지 않은 것과 50, 100, 150, 200 mM의 농도로 처리한 것과 비교하였다.

10) DNA의 구조

DNA의 형태에 따라 형질전환율이 어떻게 달라지는가를 검토하기 위하여 환형과 선형 DNA를 비교하였다. pBI121 DNA에 제한효소인 EcoRI (10 unit/ μl), 10 \times buffer, 멸균수를 처리하여 37°C에서 1시간 배양한 후 68°C로 옮겨 효소반응을 정지시키면 환형 DNA가 선형 DNA로 절단되는데 이를 0.7% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였고 이를 환형과 함께 비교했다.

11) 투사 입자의 분포 양상

헬륨 가스 압력, gap 거리, 목표 시료 거리에 따라서 미세입자가 어떤 형태로 시료에 분포되는가를 알아보기 위하여 시료의 용기와 똑같은 크기로 여과지를 절단하여 시료 용기에 넣었다. 여기에 헬륨 가스 압력, gap 거리, 그리고 목표 시료 거리를 달리하면서 투사시킨 후 흑색 텅스텐의 미세입자가 흰색 여과지 상에 어떻게 분포되는지를 관찰하였다.

12) 투사 입자의 침투력

DNA 도입효율에 영향을 주는 것으로 생각되는 텅스텐 입자의 투과력을 알아보기 위해 텅스텐 입자의 크기와 헬륨 가스 압력을 고정하고 gap 거리와 목표 시료 거리를 달리하여 근경조직 내부로 입자가 침투하는 깊이를 현미경(Diaphot-TMD, Nikon, Japan)으로 측정하였다.

13) 투사 횟수

하나의 시료에 대하여 투사 횟수를 달리했을 때 GUS 발현율의 증감을 조사하기

위하여 한 개의 시료에 한 번, 두 번, 그리고 세 번 연속적으로 투사하여 GUS 발현율을 비교하였다.

5. GUS 검정

통보 유전자인 β -glucuronidase (GUS) 유전자는 식물에서 transient expression을 확인하기 위해서 일반적으로 이용 되어지고 있는데 본 실험에서도 투사 조건을 적정화하기 위하여 GUS 분석을 실시하였다.

만약에 춘란의 근경이 본래부터 내생 GUS 활성을 갖고 있다면 투사 조건을 적정화할 때 외부에서 삽입된 것인지 아니면 본래부터 갖고 있던 것 인가를 구별할 수가 없으므로 내생 GUS 활성의 존재 여부를 조사했다.

춘란의 근경이 내생 GUS 활성을 갖고 있는가를 알아보기 위하여 투사하지 않은 근경의 절편에 X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide, Sigma Co.) 용액을 가하여 GUS 활성을 검정하였다.

gus 유전자는 다른 통보 유전자(CAT, octopine 및 nopaline 합성효소, β -galactosidase, luciferase 등)와는 달리 형광분석법으로 쉽고 민감하게 분석할 수 있고 CAT 분석처럼 복잡하고 시간이 많이 소요되지 않는 장점이 있을 뿐만 아니라 비색법 보다 10~1000배 더 감도가 좋다. 또한 조직 화학적 분석이 가능하여 조직 또는 기관에서 GUS의 기질인 X-gluc를 첨가함에 의해서 효소활성 부위에 청색 침전을 생성함으로써 형질전환 여부를 육안으로도 간편하게 판단할 수 있기 때문에 다른 어떤 통보 유전자 보다도 많이 사용되고 있다 (Kosugi et al., 1990).

GUS 검정은 Jefferson 등(1987)의 방법으로 *in situ* 에서 수행하였다. 외래 유전자가 도입된 식물체 단편에 내생 β -glucuronidase의 활성을 억제하기 위하여 최종농도가 20% 되도록 methanol을 첨가한 GUS 검정 용액 500 μ l (Table 6)를 가하여 37°C에서 48시간 동안 암조건에서 반응시켰다. 시간의 경과에 따라 광학현미경 하에서 청색으로 염색된 조직 단편을 관찰하였는데 몇 개의 이웃하는 세포가 뭉쳐서 동시에 염색된 청색반점의 경우도 하나로 간주하였다(Klein et al., 1988).

Table 6. GUS assay solution.

Reagents	Amounts added	
N,N-dimethyl formamide		1-2 drops
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide (X-Gluc, a chromogenic substrate of GUS)		1 mg
Phosphate buffer 0.1 M (pH7.0)		980 μ l
KH ₂ PO ₄ 0.2 M	87 ml	
K ₂ HPO ₄ 0.2 M	122 ml	
Distilled water	209 ml	
Potassium ferricyanide 5 mM		10 μ l
Potassium ferrocyanide 5 mM		10 μ l
Triton X-100		1 μ l

6. 가나마이신 적정 농도 설정

형질전환체를 선발하기 위하여 선발 표지로 NPT-II를 사용했기 때문에 춘란의 근경 절편에 대하여 가나마이신 농도에 따른 저항성을 조사하였다.

미세입자 투사법에 의해서 외래 유전자가 삽입되지 않은 근경 절편을 15일간 배양한 다음 kanamycin sulfate의 농도를 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200 mg/L로 처리한 가나마이신 배지에서 생육시켜 근경절편이 죽게 되는 농도를 찾아서 이를 가나마이신의 한계농도로 설정하였다.

7. PCR 분석에 의한 *npt-Ⅰ*와 *fad3* 유전자의 확인

1) 근경중의 DNA 분리

형질전환된 근경에 대한 PCR (Polymerase chain reaction)을 수행하기 위하여 Chee등(1991)의 방법으로 DNA를 분리하였다.

춘란의 근경 200 mg을 가아제에 포장하여 동결시킨 후 진공 냉동건조기(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 증탕기에서 90분 동안 배양하면서 30분 마다 한 번씩 흔들어 주었다. 실온에서 4~5분 정도 식힌 후 4.5 ml의 chloroform/octanol (24:1)을 가하여 몇 번 흔들어 준 다음 4,000×g에서 10분 동안 원심분리하여 상정액을 취하였는데 이 과정을 두번 반복하여 수행하였다. 상정액에 차가운 6 ml isopropanol (2-propanol)을 가하여 혼합시켜 10~15 분 동안 정치한 뒤 0.2 M sodium acetate와 76% ethanol이 혼합된 용액 3ml를 가하여 5,000×g에서 원심분리하여 DNA pellet을 얻었다. 이것을 76% ethanol과 10 mM ammonium acetate를 포함하는 용액 1 ml로 DNA를 세척하고 여기에 1 ml의 TE 완충용액 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 가하여 PCR 분석을 위한 시료로 사용하였다.

식물체로부터 염색체 DNA를 분리할 때의 수율은 시료의 생리적 연령이나 추출하기 바로 전의 저장 상태에 따라 차이가 나므로 어린 식물에서 추출하는 것이 좋으며 DNA 분리시 단백질의 오염을 막아야 하는데 isopropanol로 DNA를 침전시킨 후 시간이 너무 경과하면 단백질도 같이 침전하여 단백질이 오염될 가능성이 커지므로 침전 후에 바로 유리봉을 이용해서 DNA를 건져내는 것이 좋았다.

2) Primer 설계

춘란의 근경에 *npt-II*와 *fad3* 유전자가 삽입되었는지를 확인하기 위하여 PCR 분석을 수행하였는데 두가지 유전자 모두 primer를 20 mer 크기로 디자인하였다.

NPT-II DNA 증폭에 사용된 primer 쌍은 다음과 같은 염기서열을 갖도록 설계하였다.

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

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

또한 *fad3* DNA의 증폭을 위해서는 primer를 아래와 같이 설계하였는데 이 primer에 의해서 증폭될 경우 700 bp의 크기를 갖는 DNA 단편이 생성되게 된다.

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

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

3) PCR 수행

춘란의 근경으로 부터 분리된 DNA 중에서 가나마이신과 *fad3* 유전자만을 특이적으로 증폭하기 위하여 10×PCR buffer [10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 100 μg/ml gelatin] 5 μl, dNTP는 각각 200 μM, primer는 각각 0.25 M로 하고, Taq DNA 중합효소는 반응액 50 μl에 대하여 2.5 unit를 사용하였다. 준비된 시료는 핵산증폭기(TCX 20-110/6, Ericomp, Inc. USA)에서 PCR 분석을 수행하였다. 첫번째 반응은 denaturation 과정으로 DNA를 단일가닥으로 만든 후 annealing은 primer가 단일가닥에 붙는 과정으로 상보적인 염기에 붙게되고 이때 온도를 72°C로 올리면 중합효소가 primer에 붙어 DNA 가닥이 합성된다. 각 thermal cycle은 1회에는 96°C/5 min - 58°C/3 min - 72°C/1 min 으로 한 번 실행한 뒤에 2회에는 96°C/1 min - 58°C/30 sec - 72°C/1 min 으로 30번 반복하고 끝으로 72°C/10 min 으로 한 번 처리하였다. 증폭된 DNA 분리대를 확인하기 위하여 반응액중 10 μl를 취하여 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다.

8. Southern blot



미세입자 투사법을 사용하여 외래 DNA 가 근경절편의 핵 DNA로 삽입됐는가를 알아보기 위하여 Southern 분석을 실시하였다.

1) 근경으로 부터 염색체 DNA 분리

춘란의 근경으로 부터 염색체 DNA의 분리는 변형된 CTAB DNA 추출법을 사용하였다 (Gawel 과 Jarret, 1991).

냉동 건조된 근경 200 mg을 액체질소가 들어 있는 막자사발에서 마쇄하여 20 ml의 따뜻한 추출 완충액 [1% (w/v) CTAB, 100 mM Tris-Cl pH8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0.1% (v/v)β-mercaptoethanol]을 넣고 65°C에서 30분 동안 가끔 흔들어

주면서 배양시켰다. 여기에 chloroform : isoamyl alcohol (24:1, v/v) 15 ml를 가하여 15분 동안 위 아래로 흔들어 주면서 혼합시켰다. 실온에서 5,000×g로 원심분리하고 상정액은 가아제로 걸렸다. 동량의 차가운 isopropanol을 넣고 10~20초 동안 DNA가 침전 되도록 위 아래로 흔들어 주었다. 침전된 DNA를 구부러진 Pasteur 피펫으로 걸러낸 후 70% ethanol로 세척하였다. 이 DNA를 Kimwipes (S-150, Yuhan Kimberly, Korea)를 사용하여 건조시키고 100 μl의 TE 완충액 (10 mM Tris, 1.0 mM EDTA, pH8.0)에 녹였다. 여기에 RNA를 제거하기 위하여 최종 농도가 10 μg/ml 되게 RNase를 넣고 실온에서 30분 동안 배양시켰다. 1/10배의 3 M sodium acetate (pH 6.8)와 2배의 95% ethanol을 넣어 Pasteur 피펫으로 DNA를 걸러내고 70% ethanol로 세척한 다음 건조시키고 100 μl의 TE 완충액에 녹였다.

2) 염색체 DNA의 절단 및 전기영동

CTAB 방법에 의해서 각각 분리된 근경의 염색체 DNA를 절단하기 위하여 제한효소인 pstI (10 unit/μl)과 EcoRI (10 units/μl)을 가하고 대조구로 이용될 DNA는 NPT-II인 경우는 PstI, fad3의 경우에는 PstI과 EcoRI의 제한 효소와 10×buffer를 넣어 37°C에서 1시간 배양하여 절단을 완료시킨 후 효소반응을 중지시키기 위하여 65°C에서 10분간 가열하였다. 1.0% agarose gel 상에서 TAE 완충액(40 mM Tris-acetate, 1 mM Na₂-EDTA, pH 8.0)을 사용하여 50 V의 전류로 실온에서 5시간 전기영동하였다.

Southern blot은 Southern(1975)의 방법을 약간 변형하여 수행하였다. 전기영동이 끝난 겔은 ethidium bromide (5 mg/ml)로 염색하여 사진촬영하여 두고 시료의 시작 위치를 표시하여 두기 위해 gel의 좌측 하단 컷통이를 잘라서 윗부분 쪽을 구별할 수 있게 하였다.

3) Gel blot

DNA 단편을 agarose gel로 부터 여지에 흡착하는 방법으로는 모세관 전이 기법을 이용하였다.

Ethidium bromide로 염색된 gel을 증류수로 2번 세척하고 용기에 DNA 변성용액

(1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH, H₂O) 500 μ l를 넣고 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 만들기 위하여 진탕기(PR 70/75-115 V, Hoefer Scientific Instruments, San francisco, USA)에서 45분 정도 실온에서 천천히 진탕시켰다.

중류수로 2회 정도 gel을 씻은 후, 300 μ l의 중화용액(20 \times SSC, 1 N HCl, Tris-HCl, pH8.0)에 넣어 실온에서 30분 정도 천천히 진탕해 준 다음 용기 안에서 blotting을 위한 조작을 하였다.

먼저 용기 위에 gel을 올려 놓을 지지대를 놓은 다음 Whatman 3 MM paper (Whatman International Ltd, Maidstone, England)를 길게 절단하여 유리판 위에서 용기 밑바닥까지 닿도록 접촉시킨다. 이때 용기 내에는 20 \times SSC(3 M NaCl, 0.3 M Na₃citrate \cdot 2H₂O)를 넣어 유리판과 Whatmann 3 MM paper 사이에 공기가 생기지 않도록 적시어 두었다. 중화된 gel을 뒤집어 이 위에 올려 놓고 gel을 통과하지 않고서는 용액이 이동하지 못하도록 비닐랩으로 gel 주위를 덮었다.

gel 면적보다 조금 크게 나이론막(positively charged nylon membranes, Boehringer Mannheim GmbH, Germany)을 절단하여 역시 좌측 하단 컷통이를 자른 뒤 2 \times SSC 용액에 최소 5분 정도 담가 적시어 둔 nitrocellulose filter를 기포가 들어가지 않도록 gel 위에 밀착시킨 후 Whatmann 3 MM paper 3매를 넣고 그 위에 흡습지 20매 정도를 덮고 유리판을 올려 놓은 다음 1 kg 정도의 벽돌로 눌러 주었다. 16 시간 실온에서 방치하여 모세관 현상에 의해 DNA가 gel로부터 nitrocellulose filter로 옮겨 가도록 하였다.

여지를 gel로부터 분리하여 2 \times SSC에서 15분간 씻은 후 흡습지 위에서 물기를 제거하고 편편하게 펴서 실온에서 30분 동안 건조시켰다. 건조된 여지상에 존재하는 DNA를 고정하기 위하여 ultraviolet crosslinker (CL-1000, USA)에서 120 J의 에너지를 주면서 2분 동안 처리하였다.

4) DNA probe 제조

fad3 유전자에 대한 probe를 제조하기 위하여 pFAD3 DNA를 NPT-II의 경우는 *pst*I (10 unit/ μ l)으로 *fad3* 유전자의 경우는 *Bgl*III (10 unit/ μ l)의 제한효소로 절단한 후 1.2% 저용점 agarose (FMC BioProducts, Rockland, USA) gel에서 전기영동

하여 염색한 후 probe로 제조될 fad3 DNA 밴드 부분만을 날카로운 칼로 절단하였다. 여기에 도려낸 gel의 5배(1~1.2 ml)에 해당하는 20 mM Tris-Cl (pH 8.0)과 1 mM EDTA(pH 8.0)를 가하여 65°C 에서 5분간 gel을 녹여 실온에서 식힌 다음 동량의 phenol을 넣어 20 초간 교반하여 4,000×g, 20°C 에서 10분 동안 원심분리(VS-15000 CF, Vision Scientific Co., LTD) 하였다. 이때 중간층에 생기는 하얀물질은 파우더 상태의 agarose 이므로 상정액을 취할 때 같이 따라 나오지 않도록 하였다. 다시 phenol:chloroform (1:1) 혼합액을 넣어 재추출하고 상정액에 남아있는 phenol을 제거하기 위하여 동량의 chloroform:isoamyl alcohol (24:1)을 넣어 원심분리하여 상정액을 취하였는데 완전히 phenol을 제거하기 위해서 이 과정을 3번 반복하여 추출하였다. DNA를 침전시키기 위하여 상정액의 0.2배에 상응하는 10 M ammonium acetate 와 2 배의 ethanol을 가하여 흔들어 준 다음 4°C 에서 10분 방치하여 DNA가 잘 침전되도록 한 다음 4°C, 5,000×g에서 20분 동안 원심분리하여 DNA 침전을 얻어 다시 70% ethanol로 한 번 세척한 후 건조시킨 뒤 TE 완충용액에 녹였다.

5) 방사능 동위원소의 표지

probe에 방사능 동위원소를 표지하기 위하여 Promega사의 random priming kit인 Prime-a-Gene Labelling System을 구입하여 사용하였는데 그 조성은 Table 7과 같다.

순수분리된 DNA를 변성시키기 위하여 95°C에서 5분간 가열한 후 얼음속에서 급냉하여 5분간 방치하였다. 여기에 5×labeling buffer 10 μ l, BSA(10 mg/ml) 2 μ l, [α -32P]dCTP 7 μ l (specific activity: 1×10^9 cpm/ μ g DNA, Amersham), Klenow fragment (5 unit/ μ l) 2 μ l, dNTP 각 1 μ l, 멸균수 15 μ l를 가하여 총부피를 50 μ l로 하여 잘 혼합한 후 실온에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 효소활성을 없애기 위해서 최종농도가 30 mM이 되도록 조제된 buffer A [50 mM Tris (pH 7.5), 50 mM NaCl, 30 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS] 를 200 μ l 가한 후 95°C에서 5분간 가열하고 급냉시켜 DNA를 변성시킨 후 hybridization을 위한 probe로 사용하였다.

Table 7. Composition of Prime-a-Gene labelling kit.

<u>Klenow Enzyme</u>	DNA polymerase I, Large (Klenow) Fragment (5~10 units/ <i>ml</i>) in 50 mM Tris-HCl, pH7.5, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT and 50% (v/v) glycerol
<u>dATP</u>	1.5 mM
<u>dCTP</u>	1.5 mM
<u>dGTP</u>	1.5 mM
<u>dTTP</u>	1.5 mM
<u>5×Labelling Buffer</u>	250 mM Tris-HCl, pH8.0, 25 mM MgCl ₂ , 10 mM DTT, 1 M HEPES, pH6.6 and 26 A260 units/ <i>ml</i> random hexadeoxyribonucleotide
<u>BSA, nuclease-free</u>	10 mg/ <i>ml</i>
<u>Lambda Control DNA</u>	5 µg/ <i>ml</i>
<u>Sterile H₂O</u>	1.25 <i>ml</i>

6) Hybridization

건조된 여지를 50 *ml* 크기의 conical tube에 둥글게 말아 넣어 6 *ml*의 prehybridization 용액 (Table 8)을 가하여 돌려가면서 적신 후 기포를 제거하고 65°C의 hybridization incubator (Robbins Scientific Co., Model 1000, USA)에서 2시간 동안 반응시킨 뒤 prehybridization 용액을 제거하였다. 여기에 5 *ml* 정도의 hybridization 용액과 제조된 probe를 함께 넣고 기포를 제거한 후 hybridizer tube 속

에 코니칼 튜브를 넣고 65°C에서 16시간 반응시켰다.

Hybridization이 끝난 여지를 2×SSC-0.1% SDS의 용액에 넣어 실온에서 15분간 천천히 흔들며 주면서 세척하고, 농도를 낮추어 가면서 0.5×SSC-0.1% SDS에서 15분, 0.3×SSC-0.1% SDS에서 15분, 0.1×SSC-0.1% SDS 용액에서 15분씩 순서대로 천천히 흔들며 주면서 세척을 계속하였는데 세척시간은 GM counter (Series 900, Morgan Electronics Division, England)로 방사능을 측정하면서 50~100 cpm이 되도록 조절하였다. 세척이 끝난 뒤에는 Whatman 3MM paper 위에 올려 놓고 공기 중에서 건조시켰다.

Table 8. Composition of prehybridization/hybridization solution.

Solution	Prehybridization/hybridization 10 ml	Concentration stock soln.
6×SSC	3.0	20×
5×Denharts soln	0.5	100×
Buffer soln	1.0	0.5 M
0.1% SDS	0.2	20%
100 µg/ml salmon DNA	0.1	10 mg/ml
Distilled water	5.2	

건조된 여지를 두장의 비닐랩 사이에 넣고 이것을 Storage Phosphor Screen (Molecular Dynamics, USA)에 밀착시킨 뒤 Phosphorimager Cassette에 넣고 30분 노출시킨 후 Phosphorimager System(Molecular Dynamics, USA)을 사용하여 감광된 band를 ImageQuant Software를 이용하여 컴퓨터 모니터상에 나타나도록 한 다음 프린터에서 출력하여 확인하였다.

9. Neomycin phosphotransferase-II 분석

1) 시료조제

미세입자 투사법에 의해서 춘란의 근경에 도입된 npt-II의 발현 여부를 알아내기 위하여 가나마이신 내성인 *E.coli*를 대바시료로 해서 가나마이신 배지에서 선발되어 가나마이신 유전자를 갖고 있는 것으로 생각되는 춘란의 근경에 대한 NPT-II 분석을 Draper등(1988)의 방법과 Herrera-Strella와 Simpson법(1988)을 변형시켜서 수행하였다.

시료의 조제는 *E.coli*의 경우는 현탁액 20 μ l를 1000 \times g에서 20분 동안 원심분리하여 집균한 후 상정액은 제거하고 추출완충액(100 mM Tris-Cl, pH7.5, 50 mM MgCl₂, 400 mM NH₄Cl, 1 mM DTT) 500 μ l를 미량 원심분리관에 넣어 10초씩 3번 얼음상자에서 초음파로 처리한 후 8,000 \times g로 원심분리하여 찌꺼기를 제거하여 상정액을 사용하였고, 근경의 경우는 100 mg를 취하여 추출용액[(1% β -mercaptoethanol 0.1 μ l, 50 mM Tris-HCl (pH6.8) 0.5 μ l, leupeptin 1.3 mg/10 μ l)] 50 μ l를 뺏족한 유리병으로 마찰에 의해서 잘 마쇄시킨 후 원심분리하여 상정액을 사용하였다.

2) 단백질 전기영동

10% polyacrylamide gel (Table 9)을 제조하여 gel판에 붓고 굳힌 후 준비된 시료 30 μ l와 loading buffer (50% glycerol, 0.5% SDS, 10% β -mercaptoethanol, 0.005% bromophenol blue) 5 μ l를 혼합시킨 뒤 주입했다. 사용한 전기영동 장치는 Protein II xi Cell (LKB 2951, Bio-Rad, USA) 이었으며 running buffer (192 mM Glycine, 49.5 mM Tris)를 완충액조에 넣고 여기에 4°C가 유지되도록 thermostatic circulator (LKB 2219 Multitemp II, England) 를 연결한 다음 20 mA에서 6 시간 동안 단백질 전기영동을 행하였다.

3) npt-II 반응

전기영동이 끝난 후 gel을 꺼내어 stacking 층을 제거하고 4°C 증류수로 5분 동안 두 번 세척한 후 4°C 에서 반응완충액(100 mM Tris-Cl, pH7.5, 50 mM MgCl₂, 400

mM NH₄Cl, 0.6 mM β-mercaptoethanol)를 충분히 넣어 흔들어 주면서 30분 동안

Table 9. Composition of polyacrylamide gel.

	Separating gel		Stacking gel	
	Stock	Volume (ml)	Stock	Volume (ml)
Acr/Bis	30%	10	30%	1.67
Tris-HCl (pH8.8)	1 M	11.2	1 M	1.25 (pH6.8)
H ₂ O		8.56		6.97
APS	10%	0.2	10%	0.1
TEMED		0.04		0.01
Total volume		30		10

Abbreviation: Acr/Bis: acrylamide/bisacrylamide, APS: ammonium persulphate, TEMED: N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine

평형상태에 놓이도록 하였다. 평형에 도달된 뒤 용액을 제거하고 gel의 크기와 비슷한 용기에 gel을 넣고 미리 준비한 agarose gel 용액(reaction buffer 15 ml, dH₂O 15 ml, LGT agarose 0.3 g)에 ³²P-γ-ATP (NEN Research Products, DuPont, Boston, Massachusetts, USA) 30 μl (working activity : 70 μCi)와 25,000 mg/L 농도의 kanamycin monosulfate (Sigma Co., USA) 30 μl를 섞은 뒤 gel 위에 골고루 퍼지도록 부었다. agarose가 충분히 굳도록 20분 방치한 다음 gel과 같은 크기인 P81 Whatman paper (Ion Exchange Chromatography Paper, Whatman International Ltd, Maidstone, England)를 gel 위에 덮어 37°C 에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후 3 MM paper 3장과 흡습지를 5 cm 두께로 쌓아 올리고 유리판으로 덮은 다음 1 kg의 벽돌로 눌러주면서 3 시간 동안 blotting 시켰다. blotting이 끝난 뒤 P81 paper를 취하여 80°C의 세척액(10 mM Na₂PO₄, pH7.6)으로 10분씩 5번 세척한 후 P81 paper를 잘 말려 Molecular Imager System을 이용하여 밴드를 관찰하였다.

10. 지방산 분석

외래 유전자로 삽입된 desaturase 유전자가 발현되는지를 알아보기 위하여 지방산 분석을 실시하였다.

1 g의 식물체를 20 ml의 hexane/isopropanol (3:2) 용액에서 마쇄한 후 여과시킬 때 여과지 위에 한 스푼의 무수 sodium sulfate를 넣어 식물체에서 나온 수분을 제거하였다. 여과된 1 ml의 시료를 시험관에 넣고 용매를 질소가스로 날려 보낸 다음 황산을 메탄올에 6%가 되도록 녹인 용액 2 ml를 가하고 튜브내의 공기를 제거하기 위하여 유리관에 질소개스를 충분히 흘려 주었다. Teflon cap으로 뚜껑을 막은 후 80°C의 heating/stirring block (Thermopet NTT-1100, Tokyo, Japan)에서 1시간 동안 메탄올화 시켰다. 유리관을 물에서 식힌 뒤 여기에 1 ml의 isoctane을 가하고 혼합물을 중성화시키기 위하여 6% potassium carbonate 5 ml를 가하여 15분 동안 1,500 ×g에서 원심분리 시켰다. 지방산 methyl ester를 포함하는 상층액을 미량의 원심분리관에 옮기고 여기에 무수 sodium sulfate를 가하여 용기 내의 수분을 제거한 후에 질소가스로 원심분리관을 채운 다음 뚜껑을 봉하여 시료로 사용하였다.

지방산 분석 조건은 시료의 주입구 온도는 250°C, 검출기 온도는 280°C, 컬럼 head pressure는 112 kPa, 온도 프로그램은 80°C에서 1분, 그 후 1분마다 20°C씩 승온하여 220°C까지 올린 다음 5분, 다시 1분마다 5°C씩 승온하여 240°C까지 올린 다음 10분 놔 두었다. 검출기는 FID (flame ionization detector)를 사용하였으며, split는 20 : 1, 컬럼은 capillary (FFAP 25 m × 0.2 mm × 0.3)를 사용하였으며 기록계의 부분은 chart speed는 0.3 cm, attenuation은 2, threshold는 1, peak 폭은 0.04로 조건을 설정하여 Gas chromatography (GC HP5890 Series 2, Hewlett Packard, USA)로 지방산의 조성을 측정하여 불포화 지방산의 함량에 변화가 있었는지를 알아보았다.

Ⅲ. 결 과

1. 조직배양의 적정조건

1) 배지조건

춘란 근경의 생육을 위해서는 MS 기본배지 보다는 1/2과 1/4로 희석된 MS 배지가 좋았으며 가장 좋았던 조건은 peptone이 첨가된 Hyponex 배지였다 (Table 10).

Table 10. Growth of the sliced rhizome sections under the different medium conditions.

Medium concentrations	1/2 × MS	1/4 × MS	1 × MS	Hyponex
Growth of rhizome	+++	++++	++	+++++

2) 성장조절 물질의 처리

1)에서 peptone이 증강된 Hyponex 배지가 근경절편 생육에 제일 좋았는데 여기에 첨가될 성장조절제로 NAA와 Fulmet의 적정 농도를 알아 본 결과 단용처리 보다는 혼용처리에서 좋은 결과를 나타냈으며 (Table 11) 특히 NAA 1.0 mg/L와 Fulmet 5 μg/L의 조합에서 조직절편으로 부터의 근경 생육이 가장 양호하였다.

3) 절편조직의 두께

춘란 근경의 절편 두께가 200 μm 일때는 모두 죽었으며 400 μm, 600 μm, 2 mm, 5 mm 로 두께가 두꺼워 질수록 더 높은 생존율을 보였다 (Table 12). 미세입자 투사법으로 외래 유전자를 도입할 때는 하나의 접합체로 부터 유래된 세포에서의 식물체 재생이 바람직 하므로 400 μm 이상에서 더 좋은 성장율을 보였지만 가능한 더 미세하게

Table 11. Effects of NAA and Fulmet treatment on growth of the 400 μm microsectioned rhizomes.

Growth regulators	Concentrations(mg/L)				
	NAA Fulmet	0	0.1	1	2
0	-	-	+	+++	+
1	-	+++	+	+	+
5	-	+++	+++++	+++	-
10	-	+++	++++	-	-
20	-	-	-	+	+

Remarks: -: None +: Poor +++: Good +++++: Very good

Table 12. Rhizome regrowth varied with thickness of rhizome section.

Rhizome	Thickness of rhizome section				
	200 μm	400 μm	600 μm	2 mm	5 mm
Growth(%)	0%	55%	64%	78%	89%

조직이 절편되어야 하기때문에 생육할 수 있는 최소 두께인 400 μm 로 조직을 절편하여 본 실험에 사용하였다 (Fig. 3).

2. Plasmid DNA 수율 및 확인

pBI121과 pFAD3를 각각 함유하고 있는 *E.coli*를 1000 ml의 LB 배지에서 생육시킨 뒤 Mega-prep kit를 사용하여 plasmid DNA를 분리했을 때 pBI121은 2,125 μg ,

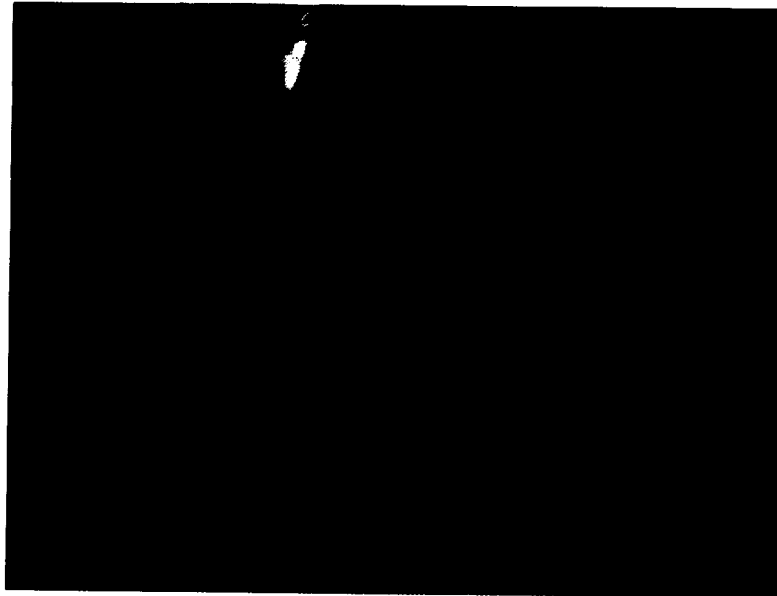


Fig. 3. Rhizome formation from the sliced rhizome section.

pFAD3는 1,876 μg 을 얻을 수 있었다.

분리된 DNA를 전기영동 시켰을때 pBI121의 크기인 약 15 kb에 해당하는 밴드가 나타났는데 이를 제한효소인 EcoRI으로 처리했을때 환형이 선형의 형태로 바뀐 것을 확인할 수 있었다. 이 plasmid는 미세입자 투사법의 조건을 적정화할 때 사용되어졌다. pFAD3는 내한성의 유전자를 갖고 있는 plasmid로 입자총 조건이 설정된 상태에서 400 μm 로 절단된 춘란의 근경에 *fad3* 유전자를 삽입하기 위하여 이 plasmid를 분리하고 XbaI 제한 효소로 처리하여 그 크기를 확인한 결과 14.5 kb에 해당하는 선형의 밴드가 확인되었다 (Fig. 4).

3. GUS의 발현

GUS 통보 유전자는 transient expression을 확인하는데 편리하기 때문에 형질전환 조건을 최적화하는데 널리 이용되어 왔다(Lida et al., 1990; Lonsdale et al., 1990; Oard et al., 1989; Wang et al., 1988).

춘란의 근경에 대한 내생 GUS 활성은 48 시간 배양에도 불구하고 발현되지 않아 춘란의 근경에는 내생 GUS 활성이 없는 것으로 보였다.

미세입자가 투사된 근경 절편에 GUS 분석 용액을 넣은 다음 시간 경과에 따라 청색반점 생성을 관찰한 결과 48 시간 후에 GUS 발현(Fig. 5)을 확인하였다. 이 반점은 경우에 따라 뭉쳐 있는 것도 있는데 이것도 하나의 반점(Russel et al., 1992)으로 계산하였다. 평판 당 GUS 발현 단위는 50 개의 절편중에 나타난 반점의 총수를 말하는 것으로 이것을 기준으로 각 처리간의 형질전환 정도를 표시하였다.

4. DNA 삽입에 관여하는 조건

미세입자 투사법으로 춘란의 근경에 외래 유전자를 도입하기 위해서 필요한 적정 조건을 검토한 결과는 다음과 같다.

1) 미세입자 크기

DNA 운반체로 사용된 텅스텐 입자는 크기에 따라 DNA 도입 효율에 상당한 차이

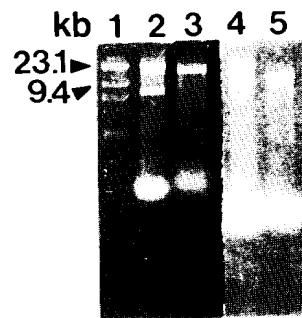


Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of pBI121 and pFAD3 gene digested with restriction enzymes.

1. Molecular marker(λ DNA/Hind III)
2. Intact pBI121 isolated from HB101
3. pBI121 digested with EcoRI
4. Intact pFAD3 isolated from HB101
5. pFAD3 digested with Sac I



Fig. 5. Transient GUS expression in the bombarded rhizomes.

를 보였는데 0.73, 1.11, 1.32, 1.63 μm 중에서 1.11 μm 가 가장 좋았다. 미세입자의 크기가 너무 작으면 무게가 가벼워 충분히 가속되지 못하여 세포 속으로 잘 들어가지 못하고 크기가 너무 크면 미세입자 제조시 DNA의 뭉침을 초래하거나 세포에 너무 많은 손상을 가하게 되어서 GUS 발현율이 좋지 않았던 것으로 생각된다(Fig. 6)

2) 헬륨 가스 압력

춘란의 근경 절편에 대한 헬륨 가스 압력의 최적치는 77.33 kg/cm²(1100 psi)이 좋았는데 가스 압력이 이보다 낮거나 높을 때에는 GUS 발현율이 좋지 않았다(Fig. 7).

3) Gap 거리

gap 거리는 6.35 mm에서 가장 좋았는데(Fig. 8) gap 거리가 짧으면 헬륨 가스가 미치는 힘이 강해져 미세입자가 한쪽으로 몰리기 쉬워 좋지 않으며 또 일정거리 이상 떨어지면 가스가 미치는 힘이 약해져 시료에 미세입자가 박히는 정도가 나빠 GUS 발현율이 좋지 않았던 것으로 생각된다. 이는 사용되어지는 시료의 형태 즉 현탁세포, 캘러스 또는 조직의 부위별에 따라 상이할 것으로 생각된다.

4) 목표 시료 거리(Target distance)

여러 가지 인자중 가장 중요한 요인중의 하나는 정지망(stopping screen)에서 부터 시료 까지의 거리인 목표시료 거리였다.

그림 9에서 나타낸 바와 같이 7.0 cm에서 가장 많은 GUS 발현 반점이 관찰되었다. 이 목표시료의 거리가 길어지면 분산은 잘 되지만 입자의 충격력이 떨어지게 되어 GUS 발현율이 좋지 않았던 것으로 생각된다.

5) 시료 상자내의 진공도

시료상자 내의 진공도는 23, 25, 27, 29 inchHg 중에서 27 inchHg에서 GUS 발현율이 좋았다(Fig. 10). 시료상자에 대한 진공의 정도는 미세입자의 퍼짐과 충격력을 좌우하므로 사용하는 시료에 적합한 진공을 가해 주는 것이 중요하다고 생각된다.

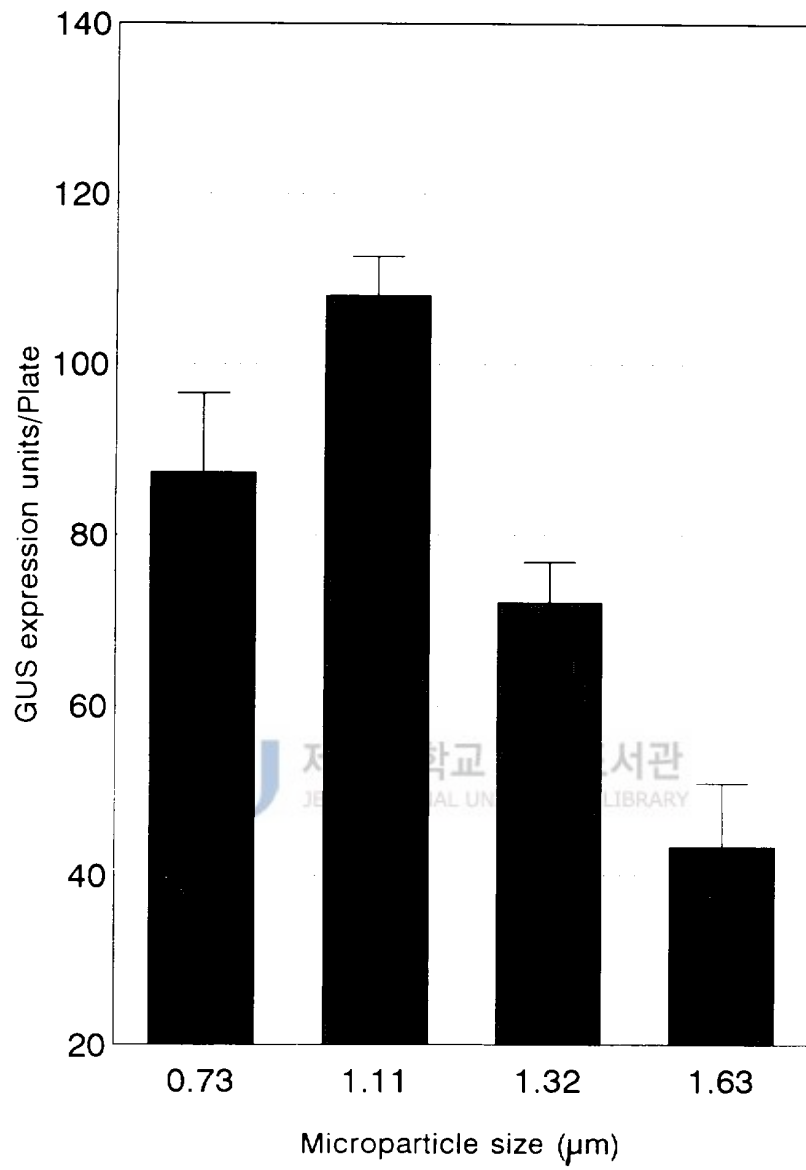


Fig. 6. Effect of microparticle size on GUS expression

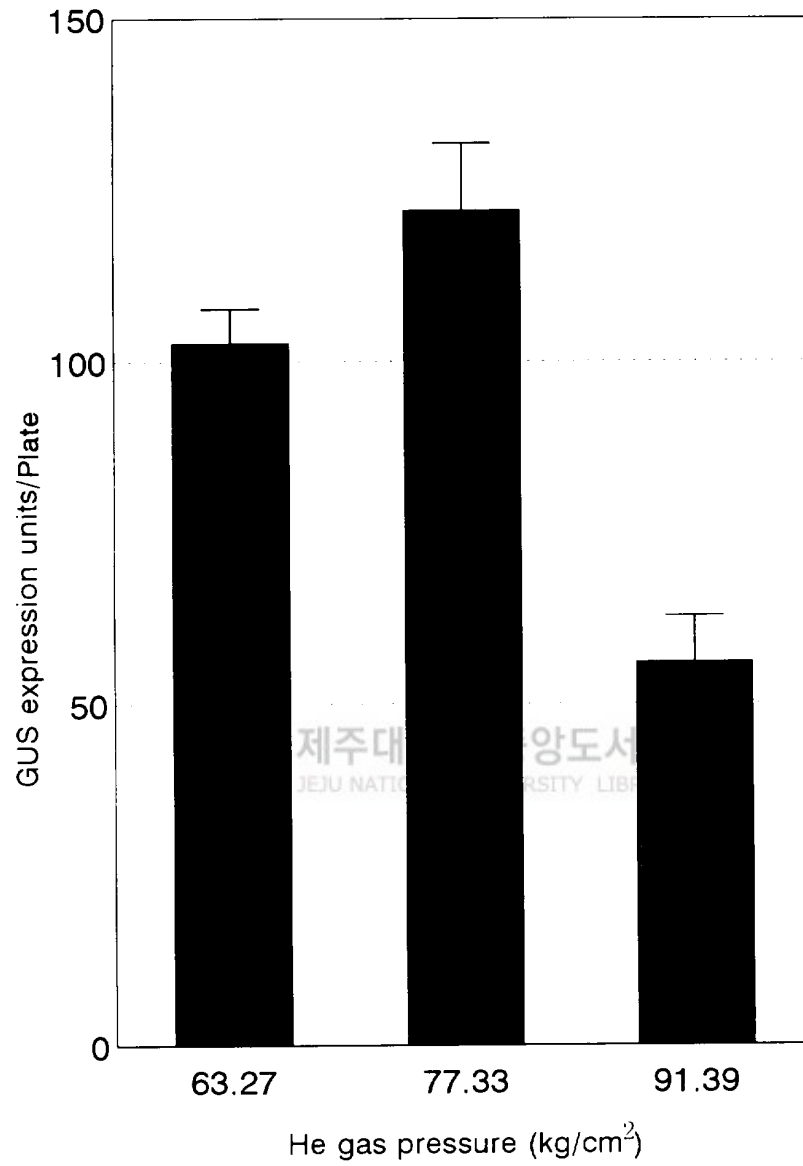


Fig. 7. Effect of He gas pressure on GUS expression.

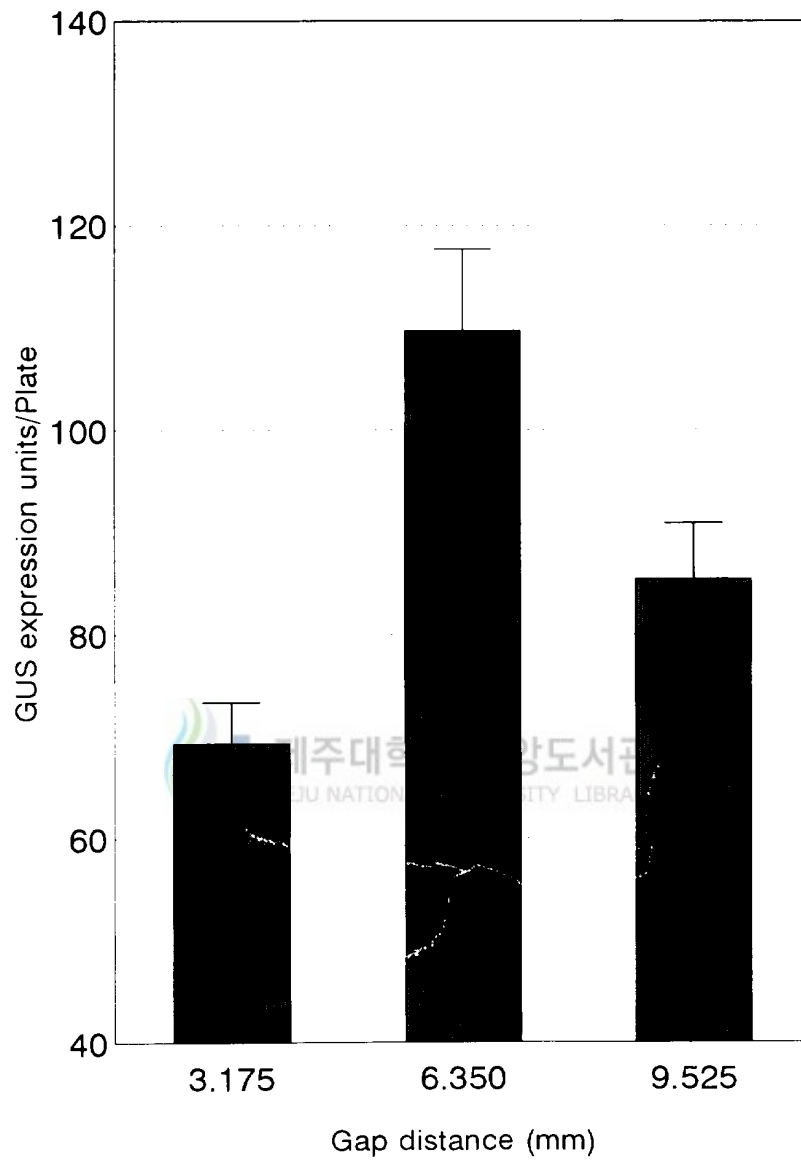


Fig. 8. Effect of gap distance on GUS expression.

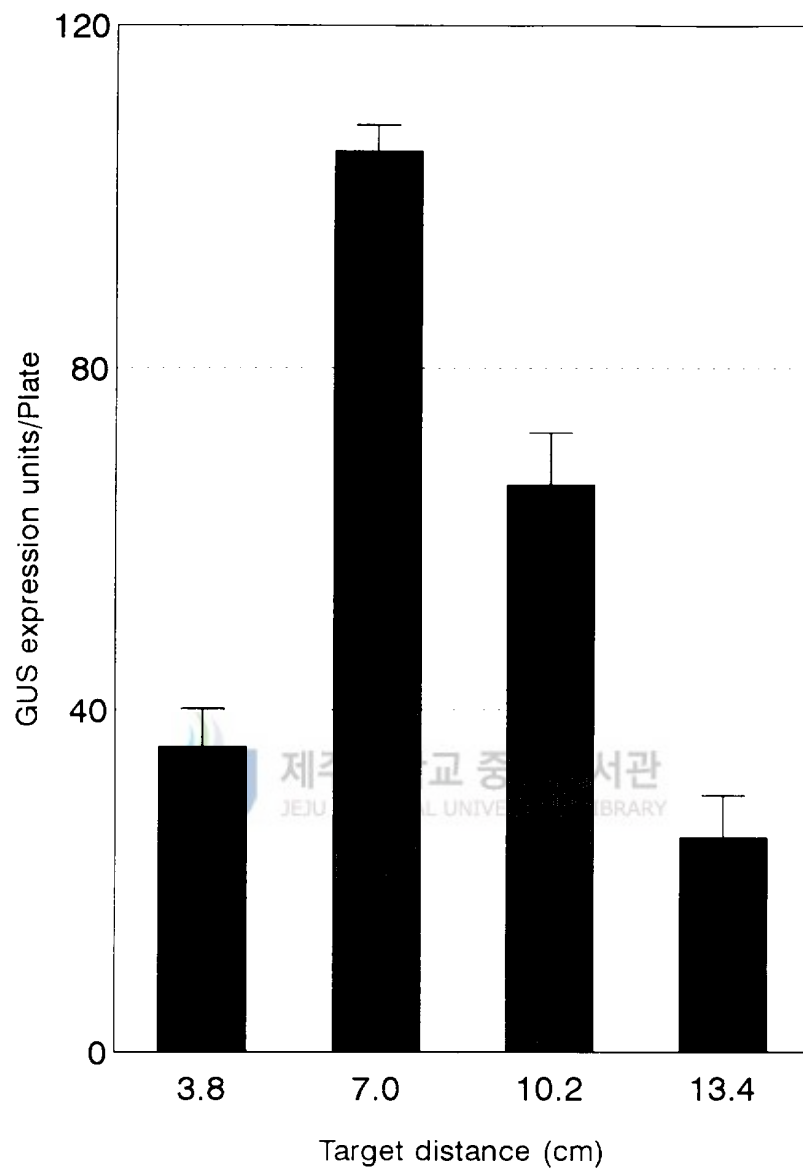


Fig. 9. Effect of target distance on GUS expression.

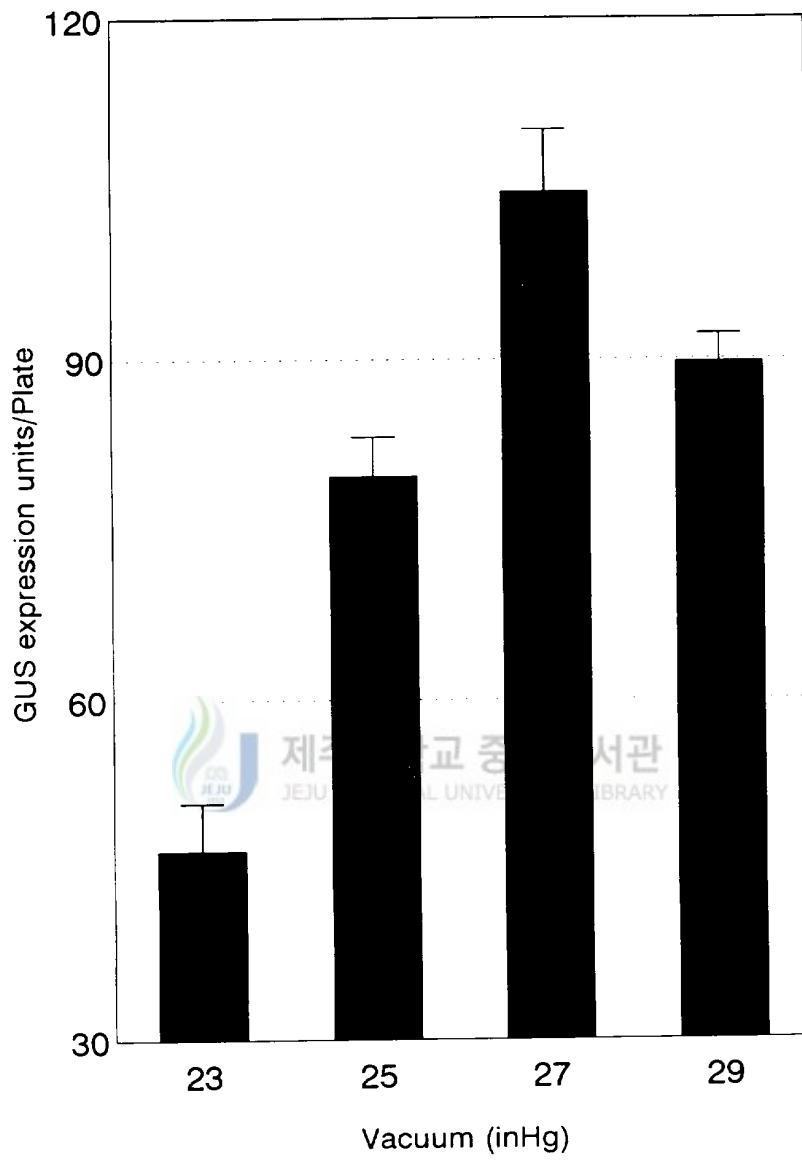


Fig. 10. Effect of chamber vacuum on GUS expression.

6) Plasmid DNA의 구성

투사조건 외에도 목표 유전자(GUS)를 함유하고 있는 plasmid의 종류에 따라서도 GUS 발현율이 다른 것으로 나타났는데 본 실험에서 사용한 pBI121, pBarGUS 및 pBI221 중에서 pBI121의 plasmid가 춘란 근경에서 가장 높은 GUS 발현율을 보였다 (Fig. 11). 이 plasmid DNA의 구조는 사용하는 식물재료에 따라 알맞는 vector 체계를 사용하는 것이 GUS 발현율을 높일 수 있는 방법이라고 생각된다.

7) Plasmid DNA의 농도

DNA를 미세입자에 피복시킬 때 혼합물의 엉김 없이 텅스텐 입자로 잘 피복되어지는 plasmid DNA의 농도는 텅스텐 μg 당 1.67 μg 의 DNA가 포함되어 있을 때 였다 (Fig. 12). 미세입자에 DNA를 피복시킬 때 가해지는 DNA의 양은 텅스텐 입자에 DNA가 잘 피복되게 하는 중요한 인자중의 하나이다. 사용되는 DNA의 농도와 미세입자와의 비가 크면 입자의 뭉침을 초래하여 투사할 때 식물에 골고루 퍼지지 않고 한 곳으로만 충격을 주게 되므로 식물조직에 해를 가져 오게 되어 형질전환율이 감소되므로 DNA를 과량으로 사용하는 것은 좋지 않다고 생각된다.

8) 삼투조절제의 농도

Sorbitol의 농도를 달리하여 투사를 실시하기 하루 전과 후에 시료를 배열한 배지에 삼투압제를 처리했을 때 0.5 M sorbitol 처리구가 가장 좋은 결과를 보였다(Fig. 13). 이는 삼투압제의 처리로 인하여 시료가 원형질 분리를 일으켜 수축됨으로서 미세입자가 세포벽과 세포막을 통하여 투과되면서 일시적으로 만들어지는 세포막의 구멍을 통하여 세포내의 protoplasm이 외부로 방출되는 것을 막아 주기 때문에 세포가 해를 입지 않게 되어 결국 형질전환율을 높였다고 생각된다. 그러나 1 M이 되면 고농도에 의한 세포의 손상때문에 오히려 무처리구 보다도 저조한 GUS 발현율을 보였다.

9) Spermidine의 농도

미세입자 코팅시 spermidine의 농도가 GUS 발현율에 미치는 영향을 조사한 결과

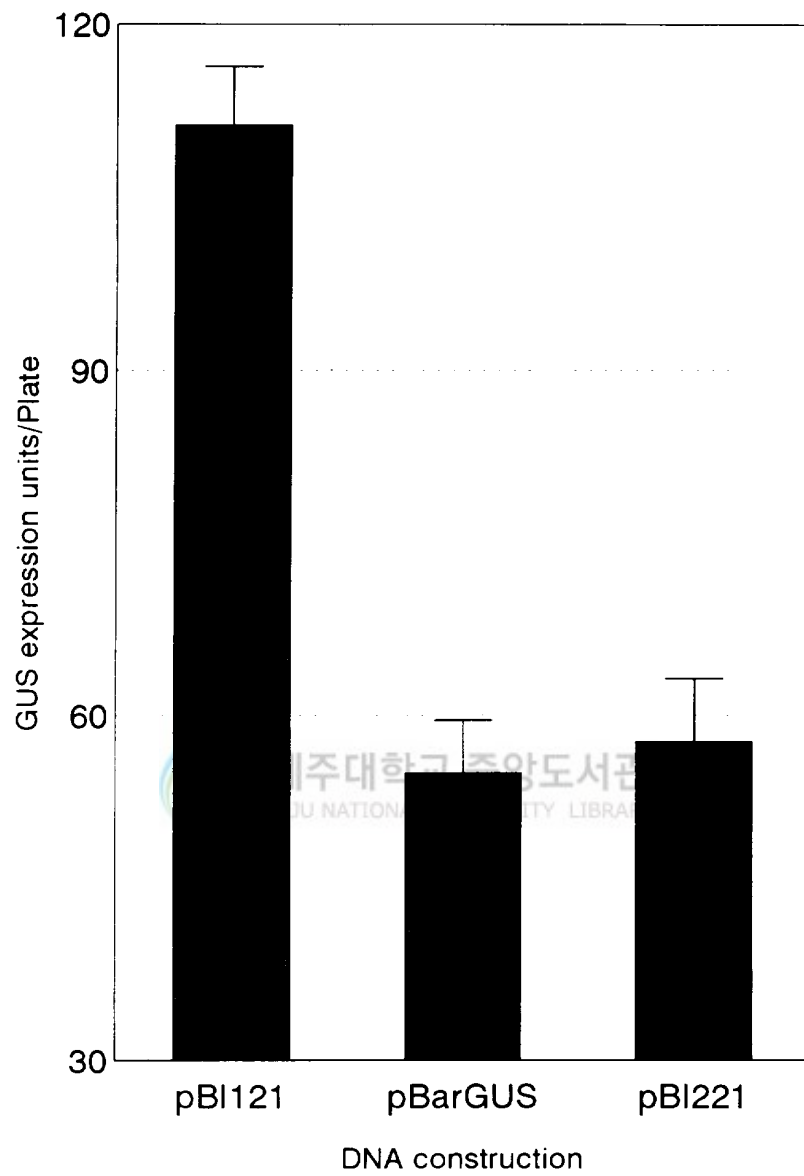


Fig. 11. Effect of plasmid DNA construction on GUS expression.

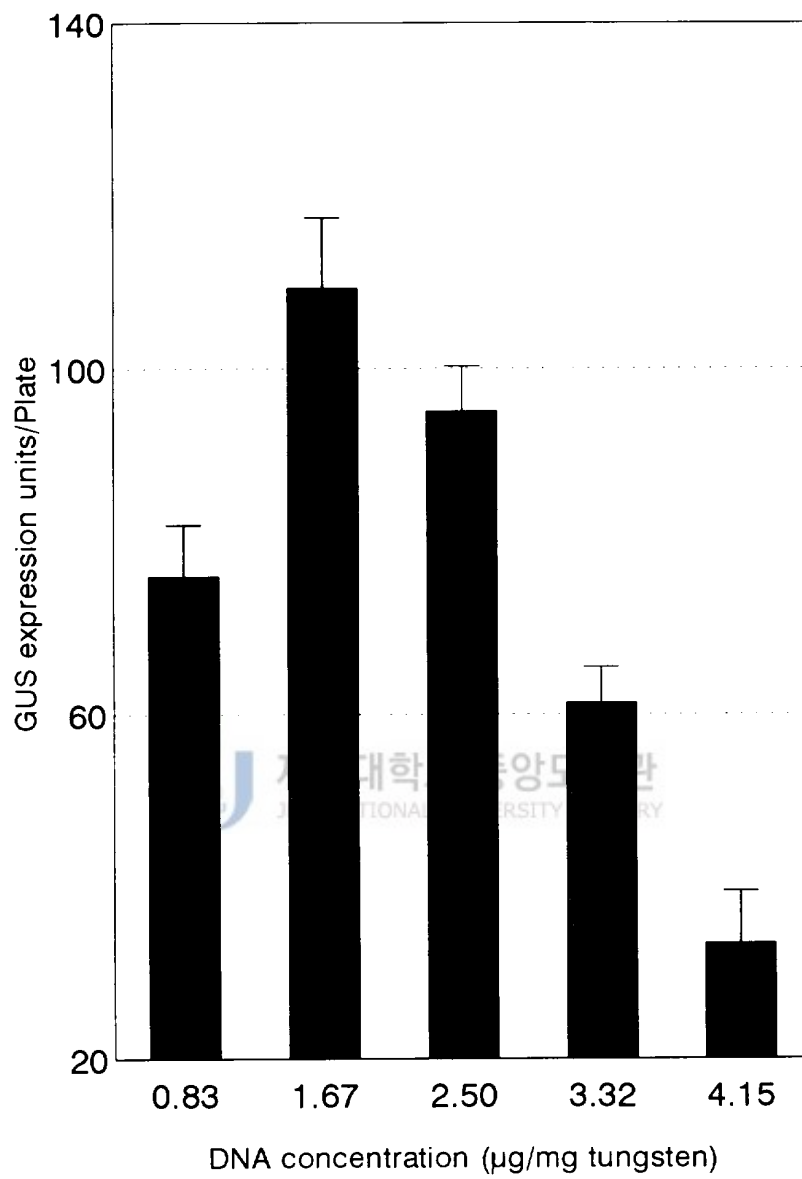


Fig. 12. Effect of coating DNA concentration on GUS expression.

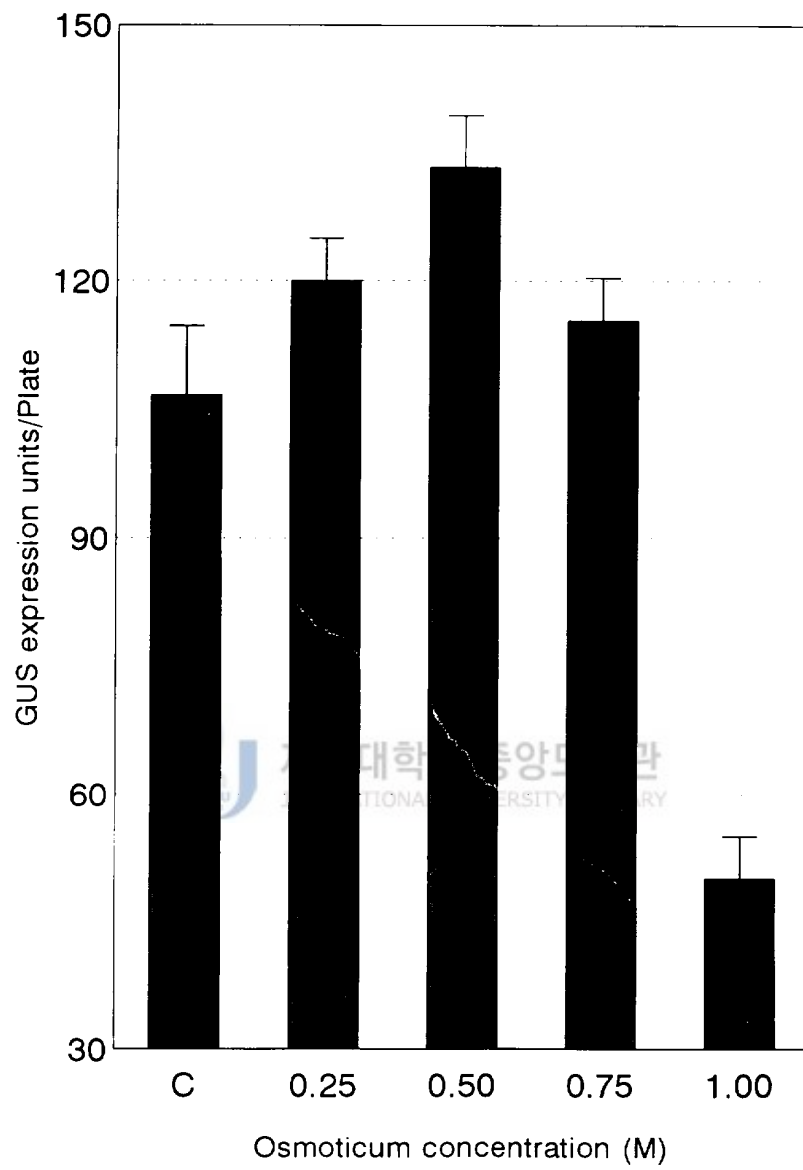


Fig. 13. Effect of osmotic conditions on GUS expression.

100 mM의 농도를 처리했을 때 가장 좋은 결과를 보였다(그림 14). 미세입자 표면으로 DNA를 잘 피복시키는 일은 식물체 내로 DNA 도입을 효과적으로 수행하는 필수적인 사항이다.

Spermidine은 미세입자로 DNA를 코팅시킬 때 미세입자와 DNA 간의 결합을 촉진시켜 주는 것으로 낮은 농도에서는 이 결합이 잘 되지 않아 GUS 발현율이 낮은 것으로 보이며 또 높을 경우에는 결합이 너무 촉진되어 미세입자 끼리의 엉김을 초래하여 좋지 않았던 것으로 생각된다.

10) 투사입자의 분포양상

그림 15는 헬륨가스 압력, gap 거리 및 목표시료 거리를 달리하였을 때 macrocarrier 표면으로 부터 떨어져 나와 목표시료로 향하는 미세입자의 분포 양상이 어떻게 달라지는 가를 본 결과로서 헬륨가스 압력이 높고 gap 거리와 목표 시료거리가 짧을 때는 미세입자에 가해지는 충격이 강해져 미세입자가 물리는 경향이 있었고 헬륨가스 압력이 91.39 kg/cm²(1300 psi) 에서 63.27 kg/cm²(900 psi)으로 낮아지고, gap 거리가 길어질수록 그리고 시료거리가 멀어질수록 미세입자가 분산은 잘 되지만 충격이 작아져 GUS 발현율이 낮았을 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서는 헬륨가스 압력 77.33 kg/cm²(1100 psi), gap 거리 6.35 mm 그리고 목표시료 거리 7 cm 일때가 미세입자들이 시료에 골고루 퍼지고 세포에 해도 적어 좋은 것으로 나타났다.

11) 투사입자의 침투력

조직절편에 대한 입자의 투과력을 조사한 결과 예상한 바와 같이 시료거리가 멀어질수록, gap 거리가 커질수록 입자의 침투력이 약해지는 것을 알 수 있었다(그림 16). 입자의 조직내 침투거리만을 고려할 때는 gap 거리와 시료거리가 짧아도 좋지만 실제로 너무 짧게 하면 가스 충격으로 근경 절편에 충격이 너무 커서 시료가 상하거나 petri 접시 밖으로 튀어 나오기 때문에 좋지 않았다.

12) 투사 횟수

한 시료에 대하여 투사 횟수를 다르게 하여 처리한 결과 투사 횟수에 따라서 유전

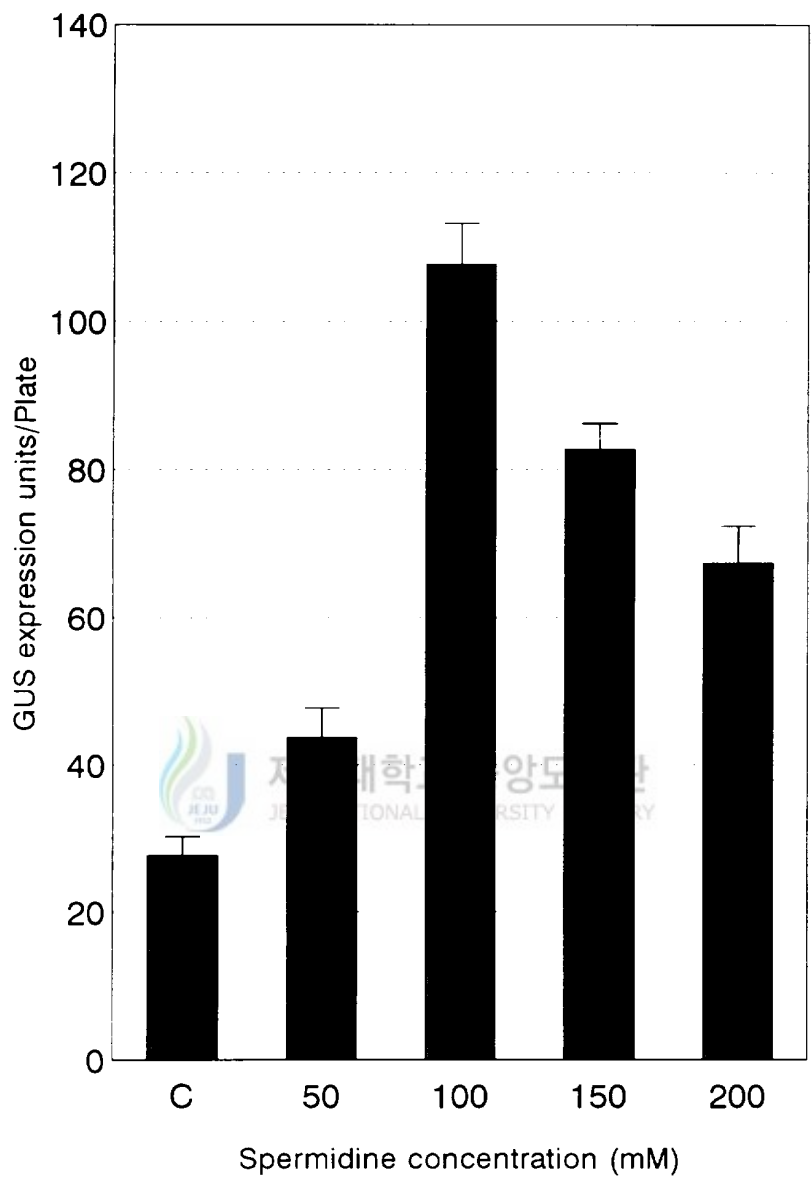


Fig. 14. Effect of spermidine concentration on GUS expression.

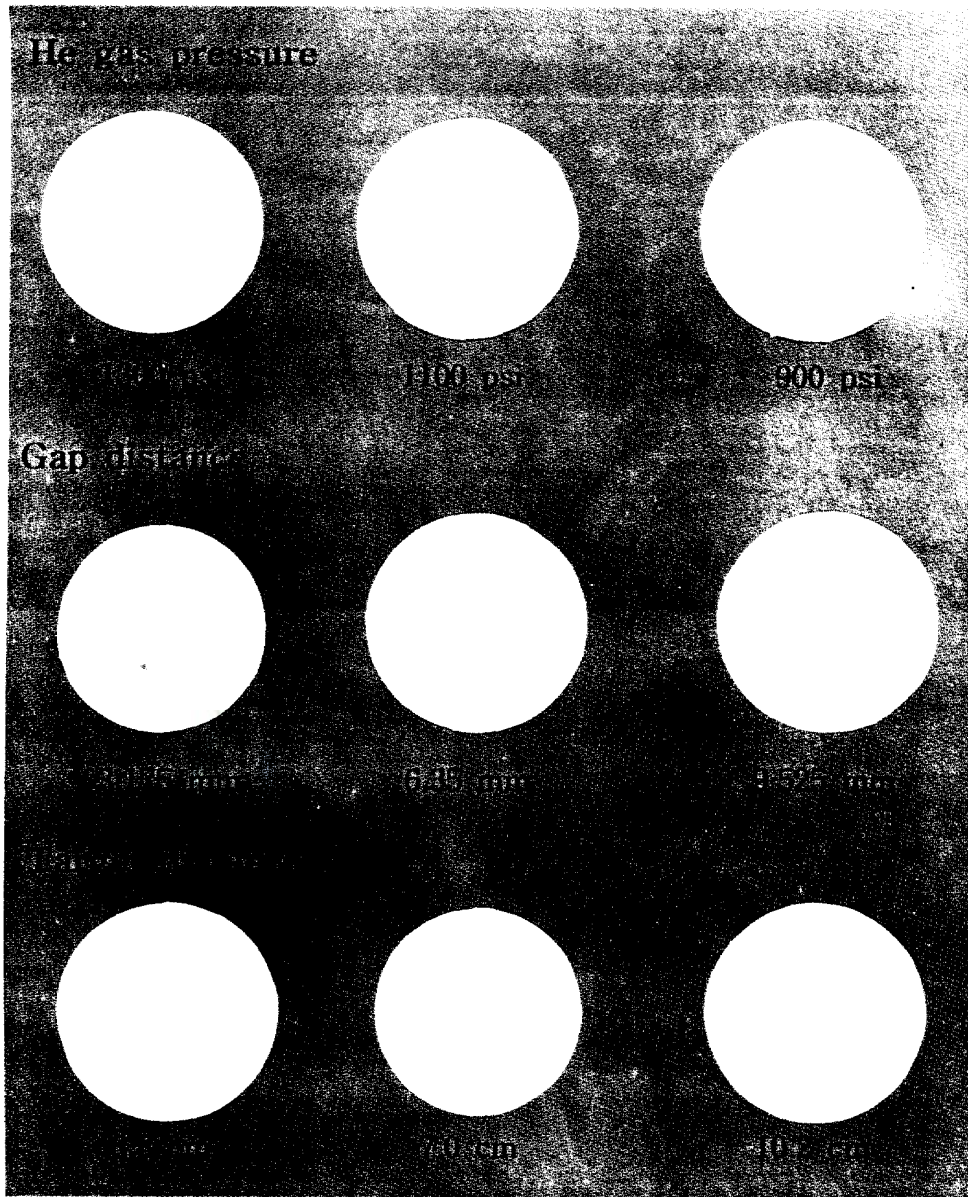


Fig. 15. Effect of He gas pressure, gap distance, and target distance on microprojectile distribution.

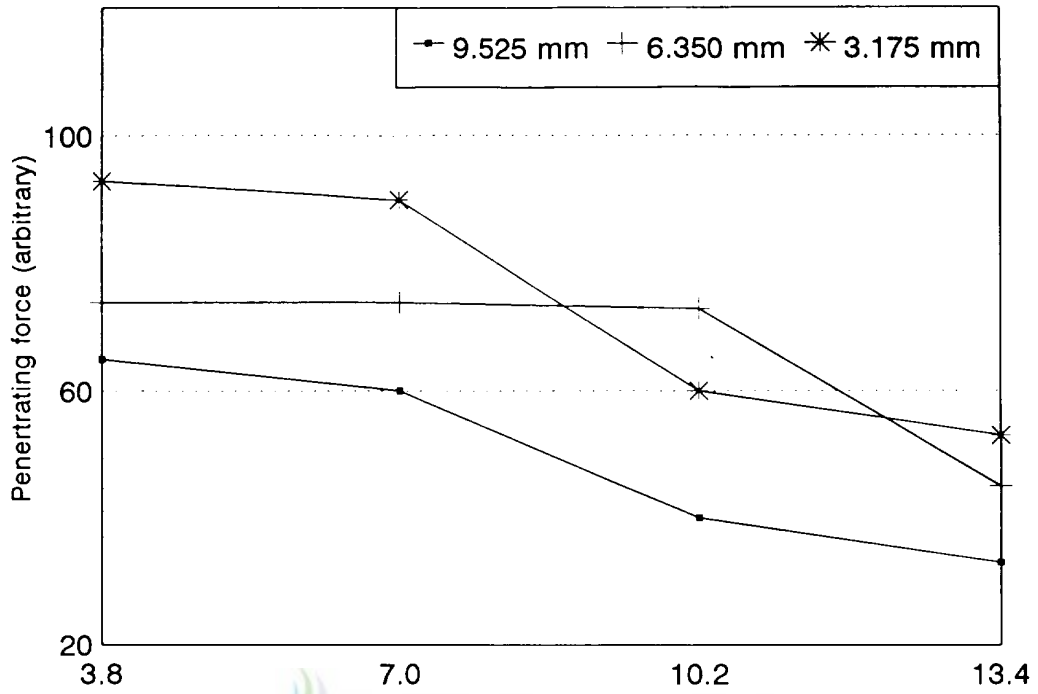


Fig. 16. Effect of target distance and gap distance on bombarding force.

자 발현이 더 잘됨을 알 수 있었다(그림 17). Wang 등(1988)은 투사 횟수에 따라 GUS 발현율이 비례적으로 증가함을 보고하였다. 그러나 투사횟수가 증가할수록 이에 수반하여 세포에 대한 손상은 커지기 때문에 양쪽 인자에 대한 균형을 유지할 수 있는 조건을 선택하는 것이 중요하다.

13) DNA의 구조

환형 DNA에 제한효소를 처리하여 선형 형태로 만들어 환형과 GUS 발현율을 비교했을 때 DNA의 구조에 따라서 별다른 차이가 없었다(Table 13). 따라서 미세입자 투사법을 이용하여 형질전환을 시도할때는 굳이 효소를 이용하여 선형상태로 절단할 필요가 없다고 생각된다.

Table 13. Effects of DNA conformation on transient GUS expression.

DNA conformation	No. of GUS-expression units		
	1	2	3
Closed circular	103.67 ± 6.66	93.33 ± 11.68	90.67 ± 13.32
Linear	97.00 ± 4.58	93.00 ± 15.40	93.67 ± 6.66

5. 가나마이신에 의한 형질전환체 선발

본 연구에 이용된 pBI121과 pFAD3 는 neomycin phosphotransferase-II(*npt-II*) 유전자를 가지고 있으므로 이들 plasmid가 삽입되어 발현되면 가나마이신이 인산화되어 불활성화되므로 이 유전자가 도입된 식물세포는 가나마이신에 대해 저항성을 나타낸다. 400 µm로 절단된 근경 절편에 대한 가나마이신의 치사 농도는 100 mg/L 이었다. 그러므로 100 mg/L의 가나마이신 농도에서 성장하는 근경은 *npt-II* 유전자가 도입된

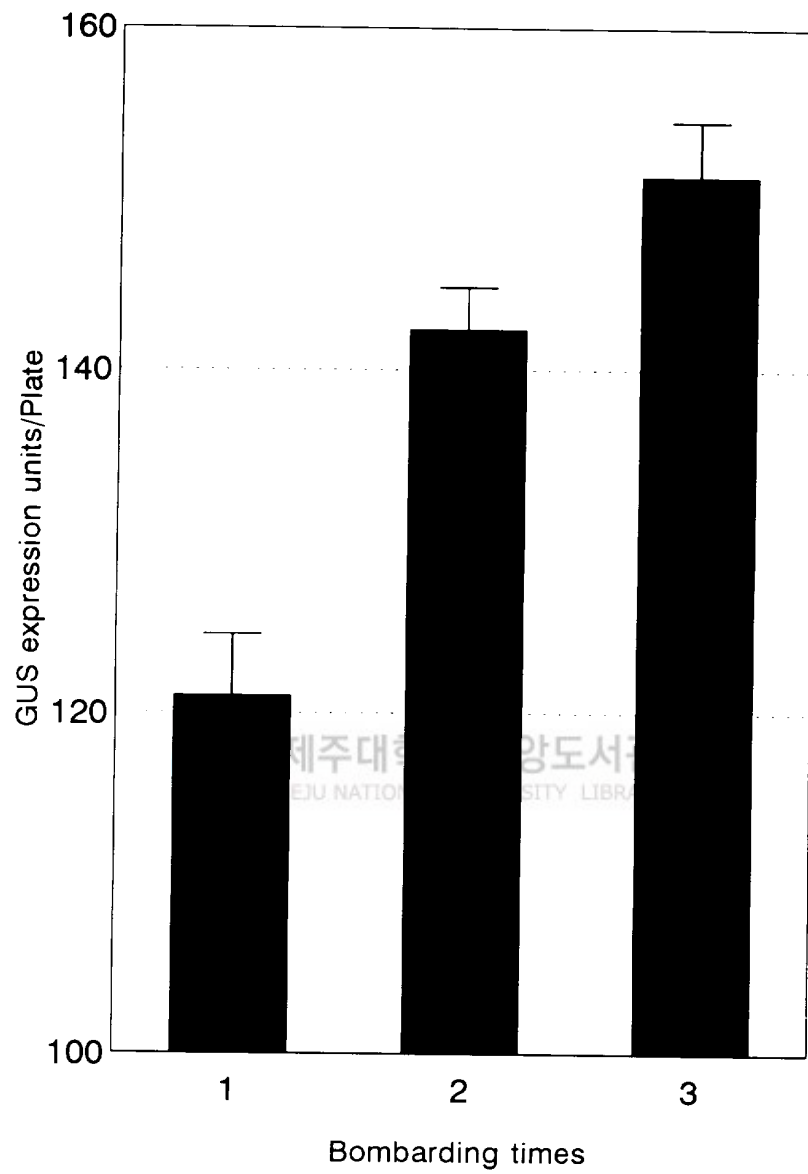


Fig. 17. Effect of bombarding times on GUS expression.

형질전환체로 생각할 수 있는데 400 μm 크기의 절편이 가나마이신 배지에서 약 3~4 cm 정도의 근경으로 생육시키는데 약 8 개월이 소요되었다 (Fig. 18).

6. 유전자 검색

가나마이신 배지에서 죽지 않고 근경으로 생육된 개체 중 무작위적으로 200개를 선택하여 도입된 외래유전자의 형질전환 여부를 알아보기 위하여 유전자 검색을 실시한 결과는 다음과 같다.

춘란의 근경으로 부터 분리한 염색체 DNA의 최종 수율은 100 ng/mg(DNA yield / fresh rhizome) 이었다.

1) PCR 분석

가나마이신 배지에서 선발된 근경 개체에 대한 *npt-II* 유전자를 PCR로 분석하였다. 그림 19에서 보는 바와 같이 DNA 피복 입자를 투사시키지 않은 근경으로 부터 추출한 DNA로 부터는 *npt-II* 유전자에 해당되는 밴드가 관찰되지 않았으나 DNA 피복 입자를 투사하여 가나마이신 배지에서 선발한 근경 DNA를 PCR하여 전기영동 했을 때에는 0.795 kb의 밴드가 관찰하였다.

이 0.795 kb의 DNA 밴드는 *npt-II* 유전자가 들어있는 pBI121를 primer 쌍으로 증폭했을 때 나타난 DNA 단편과 크기가 같아 형질전환체로 선발된 근경에 *npt-II* 유전자가 도입된 것을 알 수 있었다.

fad3 유전자의 경우도 그림 20에서 보는 바와 같이 0.700 kb에서 DNA가 검출되어 *fad3* 유전자가 춘란의 근경에 도입됐음을 확인할 수 있었다.

2) Southern blot

투사한 후 오랫동안 배양하다 보면 transgenic cell에서 외래 유전자가 소실될 수도 있기 때문에 유전 형질전환에서 가장 중요한 것은 수용식물의 염색체 DNA에 도입된 외래 유전자가 안정하게 삽입되어 발현하는지의 여부이다(Tor et al., 1993).

pFAD3 DNA에 여러 가지 제한효소를 처리하여 전기영동한 결과(Fig. 21) probe로



Fig. 18. Selective growth of the transformed rhizomes on kanamycin medium.



Fig. 19. Electrophoresis of *npt-II* gene amplified by PCR.

1. Molecular marker (λ DNA/Hind III)
2. PCR of DNA from nonbombarded rhizome
- 3-7. PCR of DNA from bombarded rhizome
8. Molecular marker (pBR328/BglI-Hinf I)

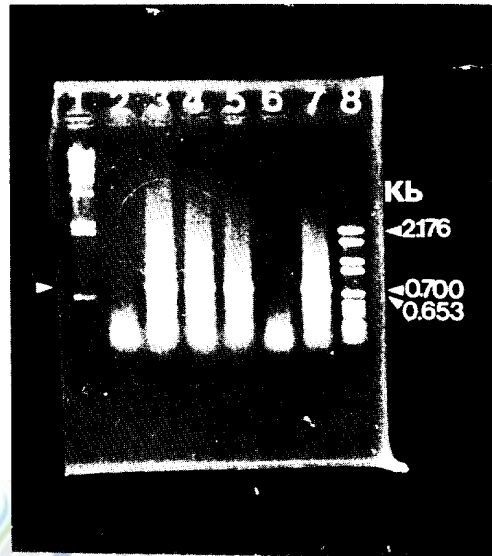


Fig. 20. Electrophoresis of *fad3* gene amplified by PCR.

1. Molecular marker (λ DNA/Hind III)
2. PCR of DNA from nonbombarded rhizome
- 3-7. PCR of DNA from bombarded rhizome
8. Molecular marker (pBR328/Bgl1I-Hinf I)

사용할 수 있는 DNA 단편이 존재하고 있음을 확인할 수 있었다.

npt-II 유전자를 probe로 하여 가나마이신 배지에서 생육된 조직에 대한 Southern blot을 수행한 결과 그림 22에 나타난 바와 같이 양성시료와 비교했을 때 같은 위치에 해당되는 밴드를 관찰할 수 있었고 또 *fad3* 유전자를 probe로 하여 형질전환체에 대한 Southern blot 을 수행한 결과도 그림 23에서 보는 바와 같이 밴드를 확인할 수 있었다.

3) NPT-II 분석

가나마이신에 내성이 있는 것으로 생각되는 근경에 대한 NPT-II 분석 결과는 그림 24와 같다. 가나마이신 배지에서 선발된 근경시료가 NPT-II 분석에서 양성을 나타낸 것은 6개 중에서 하나 뿐 이었다. PCR과 Southern 분석에서 보다 단백질 분석에서 형질전환 효율이 나쁜 것은 가나마이신 배지에서 선발한 다음 가나마이신이 들어 있지 않은 배지에서 3개월 동안 생육시키는 동안 *npt-II* 유전자의 발현 능력이 소멸된 것으로 추정된다.

4) 지방산 조성

Desaturase 유전자가 도입된 춘란의 근경으로 부터 지방산을 추출하여 분석한 결과 대조구에서는 지방산의 비율이 linolenic acid(18:3) 보다 linoleic acid(18:2)가 많았으나 형질전환된 시료에서는 linolenic acid(18:3)가 linoleic acid(18:2) 보다 더 많이 포함되어 있음이 확인되었다(Fig. 24).

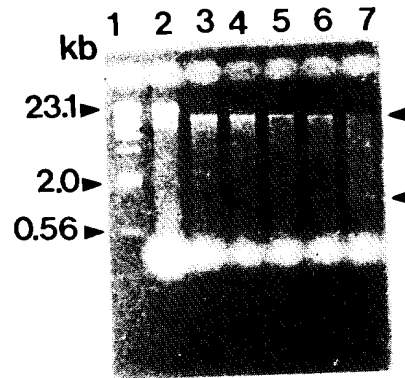


Fig. 21. Electrophoresis of *fad3* gene fragments produced by digestion of restriction enzymes.

1. Molecular marker (λ DNA/Hind III)
2. Intact pFAD3 isolated from HB101
3. pFAD3 digested with Sac I
4. pFAD3 digested with Xba I
5. pFAD3 digested with EcoRI
6. pFAD3 digested with Bgl III
7. pFAD3 digested with Sac I and Xba I

1 2 3 4 5 6 7

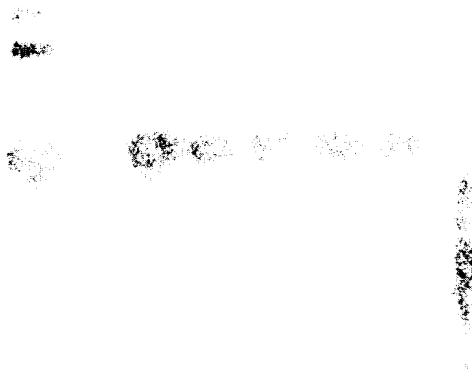


Fig. 22. Southern blot analysis of *npt-II* gene from transformed *Cymbidium virescens* after digestion with restriction enzymes.

1. plasmid FAD3 DNA used as a positive control
2. Non-transformed rhizome
- 3-7. Transformed rhizome

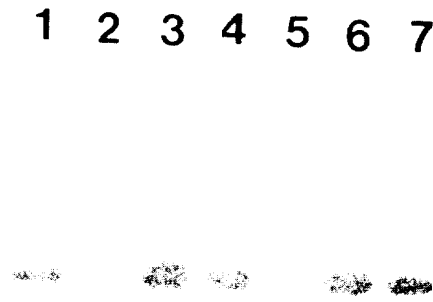


Fig. 23. Southern blot analysis of *fad3* gene from transformed *Cymbidium virescens* after digestion with restriction enzymes.

- 1. plasmid FAD3 DNA used as a positive control
- 2 and 5. Non-transformed rhizome
- 3, 4, 6 and 7. Transformed rhizome

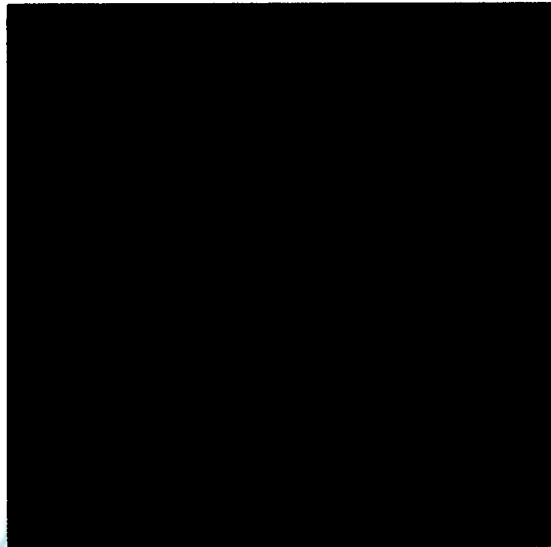


Fig. 24. Analysis of *npt-II* activity in extracts of transformed rhizome of *Cymbidium virescens*.

1. Plasmid FAD3 used as a positive control
- 2-7. Transformed rhizome

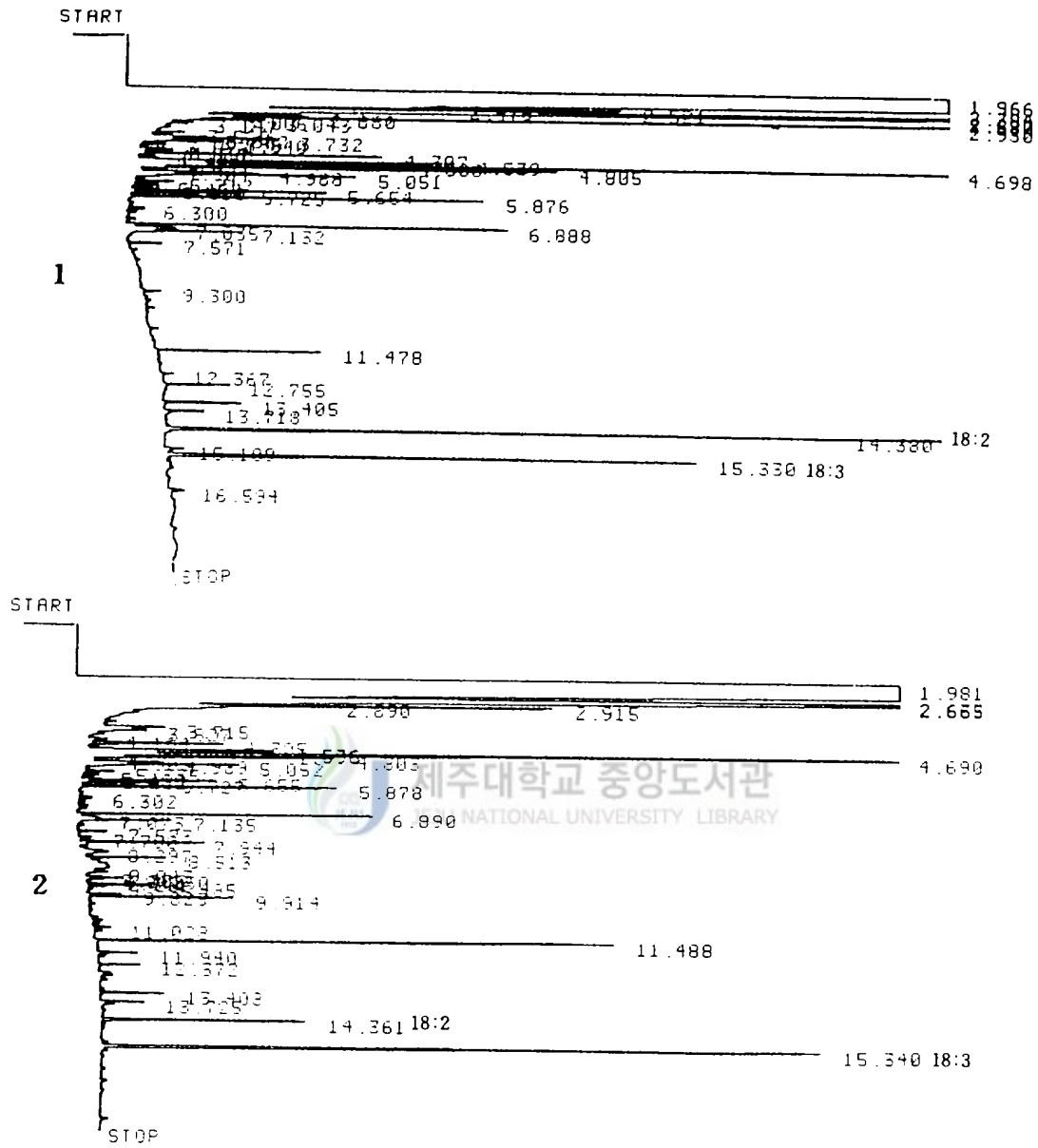


Fig. 25. Gas chromatogram of fatty acids.

1. Non-transformed rhizome

2. Transformed rhizome

IV. 고 찰

최근 식물 분자생물학의 발전과 더불어 식물을 형질전환 시키려는 시도가 다양한 방법으로 연구 되어지고 있다. 형질전환 기술 중에서 *Agrobacterium*을 이용하는 방법은 국한된 식물에서만 가능하고 박테리아를 제거하기 위하여 사용되는 항생제의 독성때문에 형질전환 효율이 감소하는 경향이 있으나 지금까지 쌍자엽의 여러 식물에서 이 방법으로 많은 형질전환체가 만들어 졌으며 최근에는 일부 단자엽 식물까지도 가능한 것으로 보고 되었다. 또 원형질체에 외래 유전자를 삽입하는 방법인 전기천공법(electroporation) 이나 화학물질 처리법도 원형질체의 분리 및 배양이 확립된 경우에만 가능하여 아직 그 응용성은 크게 제한받고 있다.

따라서 근래에 많이 이용되는 형질전환 방법으로는 미세입자 천공법(microprojectile bombardment)이 있는데 이것은 외래 유전자를 텅스텐이나 금입자에 피복시켜 가스의 압력에 의해서 어떤 목표시료에 외래 유전자를 삽입시키는 것으로 많은 작물에서 이 방법으로 안정한 형질전환체를 만들었다.

본 연구에서도 미세입자 투사법을 이용하여 춘란(*Cymbidium virescens*)의 근경에 외래 유전자를 삽입하는 적정조건을 검토하고 내한성 유전자를 삽입시킨 뒤 그에 따른 유전자 발현 여부를 확인하기 위하여 몇가지 분석을 수행하였다.

1) 춘란 근경의 생육조건

춘란 근경절편의 생육을 위해서는 peptone과 vitamine, 그리고 NAA(1 mg/L)와 Fulmet(5 µg/L)가 첨가된 Hyponex 배지가 좋았는데 특히 peptone은 춘란의 생육에 좋은 효과를 주는 것으로 생각되었다. 보통 *Cymbidium*류에 대한 조직배양시 사용되는 성장 조절물질은 주로 NAA 0.1~5 mg/L와 kinetin 0.1~1 mg/L 범위였고(George et al.,1987), 원괴체 단편의 경우는 1.9 mg/L NAA와 0.2 mg/L kinetin의 조합 또는 2 mg/L IAA와 0.2 mg/L kinetin의 조합이 좋다고 하여(Fonnesbech, 1972a & 1972b) NAA는 난의 조직배양에 널리 사용되고 있음을 알 수 있었다.

근경의 절편을 크기별로 배양한 결과 200 µm에서 거의 살지 못하는 것은 절편 양

단에 상처가 있고 그 안에 건강한 상태로 남아 있는 조직의 양이 근경을 재생시키는 데 필요한 한계 질량이 되지 못했던 것으로 생각된다

2) 미세입자의 크기

미세입자에는 텅스텐과 금으로 만들어진 두가지 종류가 있는데, 텅스텐 입자는 그 모양이 불규칙하고 크기가 균일하지 않은 단점이 있지만 값이 저렴하고 크기가 다양(0.36~1.63 μm)하여 선택의 폭이 넓을 뿐만 아니라 입자 표면으로 DNA가 쉽게 피복될 수 있다. 그러나 텅스텐 입자는 세포에 해를 주기도 하고 표면 산화를 일으키는 경우도 있어서 DNA와 혼합했을 때 시간의 경과와 더불어 쉽게 분해된다는 단점이 있어 일단 피복된 것은 빨리 사용하는 것이 좋다. 이에 반하여 금입자는 모양과 크기가 균일하고 세포에 해가 없으며 DNA와의 혼합물이 안정해서 쉽게 분해되지 않는다는 장점이 있다. 그러나 금입자는 가격이 비싸고 수용액 상태에서 안정하지 않아 시간이 지남에 따라서 비가역적으로 영김현상이 일어나므로 사용하기 바로 전에 제조하여야 한다는 단점이 있다.

Table 14는 서로 다른 회사에서 생산되는 여러 가지 형태의 입자들이 각종 세포에 이용되어진 예를 나타낸 것으로(Sanford et al., 1993) 미세입자의 크기는 사용하는 장치나 제조 회사에 따라 크기의 기준이 조금씩 달라서 직접 비교하기가 쉽지 않다.

본 실험 결과에서는 미세입자의 크기가 1.1 μm 일 때 GUS 발현율이 가장 좋았는데, 이는 타연구자들에 의해서 조사된 여러 식물에서도 1.0 μm 내외의 크기가 좋았다는 결과와 잘 일치 하고 있다. Russell 등(1992)은 담배의 현탁세포 실험에서 1.0 μm 입자에 DNA를 피복하였고, Cao 등(1992)은 벼의 현탁세포에서, Duchesne와 Pierre(1991)는 *Picea nariana*의 배발생 캘러스에서 1.11 μm 의 크기가 가장 적합하다고 하였다. Klein 등(1988b)은 옥수수과 담배의 현탁세포(1988)에서 1.2 μm 의 입자로 투사하였을 때 transient expression 효율이 가장 좋았다고 하였고 Johnston 등(1988)은 yeast mitochondria에서 1.0 μm , Heiser(1990)는 양배추의 절편에서 0.7 μm 보다 1.11 μm 가 좋았다고 하였다. Staub와 Maliga(1992)는 담배의 plastid 염색체로 pJS75 DNA를 삽입할 때 1.0 μm 의 텅스텐 입자를 사용하였고, Wang 등(1988)은 *Triticum monococcum*의 현탁세포에서 1.2 μm , Robertson 등(1992)은 Norway 가문비 나무의

체세포 胚에서 1.1 μm , Rasmussen 등(1993)은 담배의 현탁세포에서 1.11 μm 가 적당하다고 하였다. 한편 Li 등(1993)은 가문비 나무의 pollen에서 1.6 μm 의 금입자를 사용했을 때 400 psi(28.12 kg/cm²)와 900 psi(63.27 kg/cm²)의 낮은 압력에서도 GUS 발현율이 좋았다고 하였는 바 식물 종이나 조직에 따라서 사용 미세입자의 크기가 다르다는 것을 알 수 있다. Momtaz와 Madkour(1993)도 목화의 유묘에 외래 유전자를 삽입할 때 입자의 크기와 DNA 도입 효율과는 밀접한 상관이 있었다고 하였다.

Table 14. Different projectiles and their uses (Sanford et al, 1993).

Projectile	Diameter (μm)	Attributes	Proven applications
M5 tungsten (Sylvania)	0.1~1.0	Size heterogeneity irregular shapes	Bacteria, yeast, possibly meristems, with high velocities
M10 tungstenn (Sylvania)	0.2~1.5	Size heterogeneity irregular shapes	Chlamydomonas, yeast,, plant cells, possibly meristems, animal cell cultures
1 μm gold (Bio-Rad)	~ 1	Uniform in size, round	Plant cells, animal cell cultures, yeast, approximately the same as M10
1.7 μm gold (Bio-Rad))	~ 1.71	Uniform in size, round	Larger plant cells, mouse skin
1- to 3 μm gold (Aesar)	1~3	Fairly uniform in size, round	Larger plant cells, mouse skin
2- to 5 μm gold (Aesar)	2~5	Fairly uniform in size, round	Mouse liver, muscle, spleen, intestine
Dried Escherichia coli, bearing plant vectors	~ 1	Very uniform in size, symmetrical	Large plant cells
phage with markers, bearing plant vectors	~ 0.1	Very uniform in size, polyhedrall	Yeast, plant cells
Glass fragments bearing plant vectors	~1 x 3~30	Heterogeneous, glass crystals vary in length	Large plant cells

3) 헬륨 가스 압력

헬륨 가스 압력은 77.33 kg/cm²에서 가장 좋았는데 Seki 등(1991)에 의하면 *A. thaliana* 엽의 헬륨 가스 압력은 115 kg/cm², 뿌리일 경우는 200 kg/cm²에서 가장 좋은 결과를 얻었다고 보고 하였고, Nishihara 등(1993)은 *Lilium longiflorum*, *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana rustica*와 *Paeonia lactiflora*의 화분에 대한 헬륨 가스 압력은 200 kg/cm²가 적합하다고 하였다. Iida 등(1990)은 담배의 현탁세포에서 가스 압력이 115 kg/cm² 일때, Russell 등(1992)과 Rasmussen 등(1993)은 담배의 현탁 세포의 경우 70.3 kg/cm²(1000 psi)에서, Pereira와 Erickson(1995)도 알팔파의 엽병과 줄기 절편에서 70.3 kg/cm²(1000 psi)일 때, Hebert 등(1993)은 포도의 배세포에서 70.3 kg/cm²(1000 psi)과 84.36 kg/cm²(1200 psi)에서 GUS 발현율이 좋았다고 하는 결과를 보고하였던 바 사용하는 가스 압력은 식물의 종류에 따라서 크게 상이함을 알 수 있다. 한편 Li 등(1993)은 가문비 나무의 화분에서 1.6 μm의 금입자를 사용했을 때 28.12 kg/cm²(400 psi)과 63.27 kg/cm²(900 psi)의 낮은 압력에서 GUS 발현율이 좋았던 반면 압력이 높을수록 낮았으나, 동일한 식물의 배조직 세포를 사용했을 때는 이와 반대로 높은 압력인 108.97 kg/cm²(1550 psi)과 126.54 kg/cm²(1900 psi)에서 발현율이 높아 동일한 식물의 경우에도 사용하는 조직부위와 기관에 따라서 사용 압력의 선택에 많은 차이가 있다고 하였다. 이처럼 타 연구자들의 결과와 본 실험의 결과와는 비슷한 점과 상이함이 있었는데 이는 시료조직의 물리성이나 미세입자 충격장치의 구조적 차이에도 기인하는 것으로 생각된다. Russell 등(1992)에 의하면 대부분 시료의 경우 70.3 kg/cm²(1000 psi) 부근이 적합하다고 하였고 더 높은 압력으로 투사하면 미세입자가 세포로 침투하는 것이 용이하여 형질전환율은 좋으나 가스압의 쇼크로 인하여 세포에 더 많은 해를 주는 반면 압력에 따라서 직선적으로 형질전환율이 증가하지는 않는다고 하였으므로(Russell et al, 1992) 세포에는 해가 없고 형질전환율은 좋은 조건을 잡는 것이 바람직하다고 생각되어진다.

4) Gap 거리

Gap 거리는 GUS 발현율에 많은 영향을 주었는데 Russell 등(1992)은 대두의 현탁 세포에서 9 mm, Pereira와 Erickson(1995)은 알팔파의 엽병과 줄기절편에서 7 mm,

Rasmussen 등 (1993)은 담배의 현탁세포에서 10 mm 일때가 가장 좋았다고 하여 본 실험 결과인 3.5 mm와는 상이하나 이는 시료 종류의 차이에 기인하는 것으로 현탁 배양한 세포는 일반 식물조직 보다는 충격에 더 민감하기 때문에 gap 거리가 더 길었을 것으로 생각된다. 미세입자의 투과력은 충분한 관성을 유지할 만큼의 무게에 해당하는 입자의 크기는 물론 gap 거리에 따라서 많은 영향을 받았는데 Russell 등 (1992)도 gap 거리가 형질전환율에 많은 영향을 미친다고 보고하였다. 똑같은 gap 거리에서 가스압력을 달리하였을 때 고압이 저압보다 가나마이신 내성 콜로니가 더 적었는데 gap 거리를 조금 크게하여 처리한 결과는 고압에서도 가나마이신 내성 콜로니가 저압의 경우와 별다른 차이가 없었다. 이는 본 연구와 일치하는 결과로 gap 거리가 너무 가까울때는 세포에 물리적 상해를 줄 뿐만 아니라 입자 분산의 직경이 좁아지므로 어느 한 방향으로 미세입자가 치우칠 가능성이 있어 형질전환효율을 저해하는 요인으로 작용하는 것으로 보인다. Gap 거리는 형질전환율에 큰 영향을 미치므로 사용할 재료에 알맞는 적정치를 다른 인자와도 잘 조합하여 적정화 시키는 것이 중요하다고 생각되어진다.

5) 목표시료의 거리

목표시료의 거리는 7.0 cm에서 좋은 결과를 보였는데 Duchesne와 Pierre(1991)는 *Pieca mariana*의 배발생 캘러스에서 12.5 cm 일 때, Pereira와 Erickson(1995)은 알팔파의 엽병과 줄기절편에서 10 cm, Robertson 등(1992)도 Norway 가문비나무의 체세포 배에서 10 cm, Rasmussen 등(1993)은 담배의 현탁세포에서 12.3 cm 일 때 가장 좋았다고 하여 시료에 따라서 그리고 실험조건의 차이에 따라서 목표시료의 적정거리가 결정됨을 알 수 있다. 목표 시료거리가 형질전환 빈도에 영향을 주는 것은 식물조직에 가해지는 물리적 힘을 좌우하는 입자의 속도가 목표시료까지의 거리에 따라 달라지기 때문인 것으로 보여진다(Gambley et al., 1993; Iida et al., 1990). 이러한 문제는 하나의 인자만에 의해서 결정되어 지는 것이 아님으로 입자의 가속력에 관련되는 여러 가지 인자들 즉 헬륨 가스 압력, gap 거리, 시료상자 내의 진공도 등을 조합하여 고려해야 할 것으로 생각된다.

6) 시료상자내의 진공도 영향

춘란의 근경절편에 미세입자를 투사할 때 시료상자내의 진공도는 27 inchHg(685.8 mmHg)에서 좋은 결과를 보였다. Klein 등(1988)은 투사하는 동안 시료상자 내의 진공도는 28 inchHg 일 때 가장 좋았고, 20 이하로 떨어뜨릴 경우 급격하게 GUS 발현율이 감소함을 보고하였고, Robertson 등(1992)도 Norway 가문비 나무의 체세포 배에서 28 inchHg(3.7 kPa)가 적합하다고 하였다. 그러나 Duchesne와 Pierre(1991)는 *Picea nariana*의 배발생 캘러스에서 진공도가 31.5 inchHg(800 mmHg) 일 때 가장 좋았다고 하였다.

7) Plasmid DNA의 종류

미세입자 투사법으로 식물의 형질전환을 시도할 때에도 vector의 구성에 따라서 형질전환율이 달라지므로 선택된 시료에 맞는 vector를 사용하는 것이 중요하다. 실제로 Cao 등(1992)에 의하면 벼의 현탁세포에서 Act 5'-region을 갖는 vector를 사용했을 때는 형질전환율을 높일 수 있었으며 또한 CaMV 35S promoter 에서도 bar 유전자의 발현율이 좋았다고 보고하였다. 또한 단자엽 식물의 promoter 로써 알려진 wheat EM protein인 ABA-inducible promoter는 *Picea nariana*의 embryogenic callus 에서 35S promoter 보다 4.5 배 정도 GUS 발현율이 높았음을 보고하였다(Duchesne와 Pierre, 1991). Chibbar 등(1993)에 의하면 보리의 현탁세포에 유전자 구조가 (promoter-intron 조합) 다른 여러 가지의 DNA를 삽입한 결과 GUS 발현율이 5 배 까지 차이가 났음을 보고하였고, Franche 등(1991)도 CaMV 35S promoter의 유도체인 Pe35S-GUS-E9가 P40e35S-GUS-E9은 P35S 보다 3배 더 활성이 좋다고 하였다. Jeon 등(1994)도 감자에서 GUS 유전자만을 갖는 pBI121 보다 CaMV 35S promoter 와 GUS 유전자 사이에 Adh1이 삽입된 새로운 구성을 갖는 pLS201로 투사 했을 때 GUS 활성이 30~40 배 높았음을 관찰하였다 (Lee and Sung, 1992). 따라서 promoter 구성에 의해서 형질전환율이 달라질 수 있으므로 목표시료에 적합한 promoter를 갖는 DNA를 선택하는 것이 중요하다고 생각되어진다 (Jeon et al., 1994; Lonsdale et al., 1990; van der Leede-Plegt et al., 1992; Cao et al, 1991). 본 실험에서는 pBI121을 사용했을 때가 pBI221 이나 pBarGUS를 사용했을 때 보다 GUS 발

현율이 더 좋았다.

8) Plasmid DNA의 농도

미세입자에 DNA를 피복시킬 때 가해지는 DNA의 양은 텅스텐 입자에 DNA가 잘 피복되게 하는 중요한 인자중의 하나다. Morikawa 등(1989)은 사용되는 DNA의 농도가 높으면 높을수록 담배의 세포에서 luciferase의 활성은 높아지나 금입자의 μg 당 DNA가 10 μg 이상일 경우는 미세 입자의 뭉침을 초래하여 세포에 해를 줄 수 있다고 하였다. DNA 농도와 미세 입자와의 비가 크면 입자의 뭉침을 초래하여 투사할 때 식물에 골고루 퍼지지 않고 한 곳으로만 몰리게 되어 결국 식물 조직에 해를 가져 와서 형질전환율이 감소되므로 DNA를 과량으로 사용하는 것은 좋지 않다고 생각되어진다(Genga et al., 1991; Aragao et al., 1993; Oard, 1991; Wang et al., 1988).

9) 삼투압 조절제의 농도

목표시료에 적정 농도의 삼투압제를 처리하면 형질전환율을 높이는 효과가 큰 것으로 알려졌는데 이것은 삼투압제의 처리에 의해서 시료가 원형질 분리를 일으켜 수축됨으로써 미세입자가 세포벽과 세포막을 통하여 투과되면서 일시적으로 만들어지는 세포막의 구멍을 통하여 세포내의 세포질이 외부로 방출되는 것을 막아주기 때문에 세포가 해를 입지 않게 되어 결국 형질전환율을 높이는 것으로 보인다. 이같은 삼투압제의 처리는 투사 시작 전에 시료에 따라 몇시간에서 수십시간 처리함으로써 효과를 높일 수 있다(Russell et al., 1992; Vain et al., 1993). 보통 삼투압제의 처리 농도는 0.25 M 부터 1.75 M 까지 식물종에 따라서 다양한 범위를 갖고 있는 바 춘란 근경의 경우는 sorbitol 0.5 M 일때가 제일 좋았다. Russell 등(1992)은 0.125 M mannitol과 0.125 M sorbitol를 처리했을 때가 다른 농도에서 보다 형질전환율이 7배나 더 좋았다고 보고하였고 Jeon 등(1994)은 벼의 배세포에서 0.25 M sorbitol 과 0.25 M mannitol 을 혼용 처리했을 때 가장 좋았다고 보고하였다. Perl 등(1992)은 밀의 胚盤(scutella) 켈러스에서 0.25 M mannitol를 처리했을 때 GUS 활성이 좋았으나 농도가 0.5 M로 높아지면 대조구에 비해서 GUS 발현율이 낮아짐을 보고하였다. Ye 등(1990)도 담배의 현탁세포에 대한 삼투압제의 처리 농도는 0.55 M sorbitol과

0.55 M mannitol이 좋다고 하였고 농도가 높을수록 GUS 발현율이 감소하다가 1.25 M 이상이 되면 급격히 감소한다고 보고하였다. 이는 사용되는 재료에 따라 달랐는데 삼투압의 농도가 적정치 보다 높으면 세포에 삼투압 쇼크를 주어 식물의 성장을 방해하기 때문인 것으로 사료된다. 대부분의 식물에 있어서 삼투압제는 mannitol과 sorbitol을 단용 또는 조합하여 처리하는데 시중에 판매되고 있는 mannitol은 abscisic acid를 약간 함유하고 있기 때문에 Sanford 등(1993)은 대체물질로서 raffinose를 사용해 봤으나 아직까지 팔목할만한 잇점은 확인하지 못하였다고 하였다. 또한 raffinose는 가격이 비싸고 고농도의 용액에서 취급하기가 용이하지 않기 때문에 대체물질로서는 바람직하지 않다고 생각되어진다. 그러나 Vein 등(1993)은 옥수수의 배세포에서 0.4 M mannitol과 sorbitol을 혼용했을때나 각각 0.4 M mannitol과 sorbitol을 단독으로 처리했을 때 차이가 없었다고 하였다. 따라서 단독 또는 혼용으로 적절한 삼투압제를 처리하는 것은 투사로 야기되는 세포의 손상을 최소화하여 세포의 안정성에 기여하므로 형질전환율을 높이는데 도움을 주는 것으로 생각된다.

10) Spermidine 의 영향

미세입자에 대한 DNA의 피복 조건도 형질전환율에 영향을 주는 중요한 인자중의 하나이다.

DNA를 미세입자에 피복 시킬때는 침전과 엉김이 없이 항상 균일하며 재현성이 있도록 해야 한다. DNA를 텅스텐 입자와 혼합시킬 때 spermidine의 첨가 효과를 보면 Perl 등(1992)과 Vasil 등(1993)은 spermidine 무처리구에서 효과가 가장 좋았다고 하였고 농도가 높아질수록 GUS 발현율이 떨어졌다고 보고하여 본 연구와는 상반된 견해를 보이고 있다. 그러나 Lonsdale 등(1990)은 밀의 배세포에서 100 mM의 spermidine을 사용하여 DNA-tungsten 혼합물을 제조하였고, Cao 등(1990)은 미세입자 제조시 0.5 M $CaCl_2$ 와 5 mM spermidine의 혼용, 8% PEG 단용, 그리고 8% PEG와 5 mM spermidine을 혼용하여 사용했을 때 각각 15, 32, 46%의 GUS 발현율을 보여 벼와 옥수수에서는 PEG와 spermidine을 혼용하여 사용하는 것이 좋다고 하였다. Jeon 등(1994)은 벼의 배발생 현탁세포에서 칼슘과 spermidine을 혼용했을때와 중류수를 사용했을 때를 비교 하였는데 후자의 경우를 DAPI (4,6-diamidino-2-

phenylindole)로 염색하여 365 nm 에서 DNA-tungsten 혼합물을 관찰했을 때 전혀 염색되지 않았음을 보고하였다. Klein 등(1988)은 칼슘을 첨가하지 않고 DNA를 피복했을 때 그 결과가 나빴음을 관찰하여 칼슘 이온도 미세입자에 DNA를 결합시킬 때 중요한 역할을 하는 것으로 보인다. 한편 Walter 등(1994)은 *Pinus radiata*의 배세포를 형질전환시키기 위하여 미세입자를 조제할 때 CaCl_2 대신에 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 를 사용하고 spermidine을 사용하지 않았을 때 형질전환율이 감소되었음을 보고한 바 있다. 또한 DNA를 미세입자에 피복시킬 때 DNA가 모두 피복되지 않고 DNA의 상당량이 손실된다고 하였다. 따라서 DNA 피복은 calcium-spermidine을 기본으로 하여 식물의 재료에 맞게 조절하여 제조하는 것이 형질전환율을 높일 수 있는 방법이라고 생각되어진다.

미세입자에 DNA를 침전시키는 기술과 더불어 macrocarrier에 DNA가 피복된 텅스텐 혼합물을 충전하는 작업은 형질전환율이 몇 십배까지 차이 나도록 매우 큰 영향을 끼친다. DNA와 미세입자 혼합물을 초음파 세척기에서 너무 오랫동안 처리하게 되면 DNA가 파괴되기 때문에 가능한한 초음파 처리 시간을 줄인 후 macrocarrier에 도포해 주는 것이 좋다 (Sautter, 1993). 피복된 미세 입자를 macrocarrier 상에서 알콜을 잘 말리지 않고 젖은 상태로 투사하면 조직에 해를 가져오므로(Genga et al., 1991) 주의해야 하고 또 너무 말랐을 경우는 macrocarrier에서 잘 떨어지지 않기 때문에 이 점도 고려해야 할 것으로 보인다. 따라서 본 실험에 사용된 방법과 같이 무수 CaSO_4 가 담겨져 있는 용기 내에서 말린 후 즉시 사용하는 것이 바람직하다고 생각된다.

11) DNA의 입체적 구조

본 실험에서는 외래 유전자를 삽입시킬 때 DNA의 기하학적 구조의 차이 즉 선형 또는 환형에 따라 GUS 발현율에 영향을 주지 않는 것으로 나타났는데 Klein 등(1989, 1990)도 옥수수에서 선형과 환형 DNA를 사용했을 경우 형질전환율에 차이가 나지 않았다고 하였고, Iida 등(1990)도 담배에서 비슷한 결과를 보고 하였으나, Walter 등(1994)은 *Pinus radiata*의 배세포에서는 환형 DNA 보다는 선형 DNA가 더 높은 transient expression을 보였다고 하여 상이한 주장을 하였다.

12) DNA 피복 텅스텐 입자의 분포 양상

미세입자는 갈대기 모양으로 분산되어 방출되기 때문에 시료의 중앙 부분이 확률적으로 가장 많은 입자를 받게 된다. Klein 등(1988)은 화약을 사용한 장치를 사용했을 경우 투사 되는 영역의 센터는 가장 충격이 크기 때문에 세포에 많은 해를 줄 수 있는 위치이므로 “죽음의 지역” 이라고 불렀고(Russell et al., 1992), Sautter 등(1991)도 목표시료의 가운데로 미세 입자가 집중됨을 보고하였다. Sanford 등(1993) 역시 목표시료 중심에서 1 cm 부근의 “epicenter” 지역을 역시 “죽음의 지역” 이라고 하였다. 이처럼 여러 연구자들이 이러한 부분을 “죽음의 지역”으로 부를 만큼 어느 한 곳으로만 충격을 주는 것은 바람직하지 못할 뿐 아니라 급격히 형질전환율을 떨어 뜨리는 큰 요인으로 작용하고 있는 것이다. 헬륨가스 압력을 이용하는 기기는 화약의 폭발에 의해서 작동되는 기기보다 이러한 관점에서 우수하여 미세입자가 더욱 균일하게 퍼지기 때문에 더 많은 세포에서 형질전환체를 기대할 수 있다.

미세입자의 분포형태를 좋게 하려면 미세입자 조제시 입자끼리의 엉김이 없도록 해야 하고 또 macrocarrier에 균일하게 피복시켜야 한다. 미세입자 투사법을 사용할 경우 가장 중요한 요소중의 하나는 DNA 현탁액을 macrocarrier 중심 부근에 얼마나 균일하게 도포 시키느냐에 달려 있다고 생각된다. DNA가 피복된 미세입자 현탁액이 불균일할 경우 한쪽으로 치우쳐 조직절편에 떨어지기 때문에 균일한 형질전환체를 얻을 수 없고 따라서 재현성도 불량하게 된다. 그러므로 DNA 피복이 고르게 되고 DNA 현탁액이 macrocarrier 중심에 균일하게 도포되는 것은 안정된 DNA 도입율을 높게 유지하기 위하여 필수적이라 하겠다.

13) 투사 횟수

한 시료에 대하여 투사 횟수를 늘리면 횟수의 증가에 따라서 유전자의 발현율이 더욱 증가됨을 관찰할 수 있었는데 Wang 등(1988)도 투사 횟수에 따라 GUS 발현율이 증가함을 보고하였다. 그러나 투사수가 증가할수록 이에 수반하여 세포에 대한 해는 커지기 때문에 양쪽 인자에 대한 균형을 유지할 수 있는 조건을 선택하는 것이 중요하다. 본 연구에서는 2회 반복이 적절한 것으로 검토되었다.

14) GUS 발현분석

조직화학적 검증법으로 삽입된 GUS 유전자의 형질 발현 여부를 조사할 때 식물 자체가 갖고 있는 내생 GUS 활성 유무를 반드시 알아 보아야 하는데 본 실험에 사용했던 춘란의 근경은 내생 GUS 활성이 나타나지 않았다. Nishihara 등(1993)에 의하면 투사하지 않은 백합 꽃 화분의 경우 X-glu 용액에 5시간 침지했을 때 청색이 나타나 내생 GUS가 있음을 확인한 바 있는데, 내생 GUS의 존재 여부나 함량의 다소는 식물의 종에 따라 많은 차이가 있으므로 사용하는 식물에 대한 내생 GUS를 조사하여 원래 식물에서 부터 유래한 것인지 투사한 GUS DNA에 의한 것인지를 확인한 후 투사 조건을 최적화 하여야 한다.

투사 후 GUS 발현에 필요한 배양 시간은 Jeon 등(1994)에 의하면 벼의 세포에서 24~48 시간, Iida 등(1990)은 담배의 현탁세포에서 1시간, Chibbar 등(1993)은 보리에서 24시간, Robertson 등(1992)은 Norway 가문비 나무의 체세포 배에서 16시간, Rasmussen 등(1993)은 담배의 현탁세포에서 24시간, Stoger 등(1995)은 담배의 배발생 화분에서 1시간으로 보고하였다. 난의 경우는 생장이 느린 식물이기 때문에 배양 시간이 48 시간으로 타식물 보다 긴 것으로 생각된다.

15) 가나마이신 배지에 의한 형질전환체 선발

형질전환시키지 않은 춘란의 근경은 100 mg/L 가나마이신이 함유된 배지에서 살아 남지 못하였으나 그 이하의 농도에서는 생육할 수 있었기 때문에 형질전환된 춘란 근경을 선발하기 위해서는 100 mg/L 가나마이신이 함유된 배지를 사용하였다. Russell 등(1992)은 담배의 현탁세포에서 350 mg/L의 kanamycin monosulfate(Sigma co., USA)를 처리하였고 Van Eck 등(1995)은 토마토의 현탁세포에서 300 mg/L, Hagio 등(1991)은 수수의 현탁세포에서 500 mg/L, Serres 등(1992)은 *Cranberry*에서 300 mg/L, Klein 등(1988)은 담배의 현탁세포에 투사 후 7일 배양한 다음 100 mg/L의 농도에서 가나마이신 내성 세포를 선발하였고 Knittel 등 (1994)은 해바라기에서 100 mg/L를 처리하였다고 하였는데 이러한 차이는 식물이나 세포 형태에 따라서 가나마이신 항생제에 대한 저항성이 서로 다르기 때문인 것으로 보인다.

항생제로부터 직접 식물체를 선발하는 것은 형질전환율이 낮을 때 많은 chimaeric

식물들을 치사시켜서 위험이 크므로 일단은 통보 유전자로 선발하여 몇 주 생육시킨 후 항생제 배지에서 배양하여 선발하는 것이 형질전환율을 높일 수 있는 방법이라고 생각되어지고 가나마이신을 함유한 배지에서 너무 오랫동안 배양하면 식물체로의 재생이 억제되므로 어느 정도 성체의 상태로 되면 정상배지로 옮겨 생육시키는 것이 좋다고 생각되어 진다.

미세입자 투사법으로 춘란 근경에 *npt-II* 유전자를 삽입시킨 뒤 가나마이신 농도가 100 mg/L 이 되도록 조제된 배지에서 5개월 배양시켜서 형질전환체를 선발하였던 바 33%의 생존율을 나타내었다. 400 μm로 절단한 근경절편을 미세입자 투사법으로 처리하지 않았을 때 증강된 Hyponex 배지에서 55%의 생존율을 나타낸 결과(Table 12)를 고려하면 실질적인 가나마이신 저항성 형질전환체율은 60%(33/55 x 100 = 60%)에 이르는 것으로 계산되어진다. 이는 근경절편을 한개의 단위로 하여 형질전환율을 계산한 것으로 타 연구자들의 현탁배양 세포의 경우와는 형질전환율 계산 방법 상 차이가 있어 직접 비교하기는 곤란하다고 생각된다.

16) PCR 분석

외래 유전자가 목적하는 식물의 핵염색체 속으로 전이 되었는가를 확인하기 위하여 과거에는 Southern blot을 많이 행하였다. 그러나 이 방법은 식물체로부터 핵염색체 DNA 모두를 분리하고, 몇 개의 제한효소로 절단하여 전기영동한 다음 동위원소로 표지시켜야 하는 등 시간과 노력이 많이 소요되는 작업이다(Chee et al., 1991). 그러나 PCR 기술은 DNA의 특정한 부분만을 *in vitro* 에서 합성하고 증폭하는 방법으로 DNA를 순수하게 분리할 필요가 없고 아주 작은 양(100 ng~1 μg)으로도 감지가 되기 때문에 PCR 기술로 일단 외래 DNA의 존재 여부를 확인한 다음 Southern blot을 행하면 더욱 분명하게 된다. 이 기술은 동물세포의 질병을 진단하고, 인간의 염색체에서 돌연변이를 구명하며, 염색체 DNA를 직접 sequencing 하는데 이용되며 mRNA를 증폭시켜 cloning과 sequence 하기 위하여 많이 사용되어져 왔다. 특히 PCR은 아주 작은 DNA 조각을 몇시간 내에 적어도 10⁵ 배 까지로 증폭이 가능하기 때문에 증폭된 DNA를 가지고 여러 가지 다른 용도로 응용할 수도 있다(Saiki et al., 1985; Lassner et al., 1989). 따라서 PCR 기술은 형질전환 식물체에 외래 유전자가

도입되었는지를 간편히 알 수 있는 유용한 방법이다.

PCR은 Southern 분석에 비해서 몇가지 장점을 갖고 있는 바, 몇시간 내에 원하는 DNA 단편만을 증폭한 뒤 염색하여 육안으로 확인할 수 있을 뿐만 아니라 Southern 보다 시간을 많이 단축할 수 있으며 방사성 물질을 사용하지 않기 때문에 건강과 환경에 대한 위험 가능성도 없고 또한 조작이 간편하기 때문에 형질전환체를 빠른 시간내에 많이 검색할 수 있다.

따라서 PCR 법으로 춘란의 형질전환 여부를 알기 위해서 *npt-II*와 *fad3* 유전자를 증폭시켰던 바 전기영동상에서 밴드가 관찰되어 유전자의 삽입을 확인했다.

17) Southern blot analysis

가나마이신이 첨가된 배지에서 선발된 춘란으로부터 DNA를 추출하여 Southern 분석을 수행한 결과 *npt-II*와 *fad3* 유전자가 삽입되어 있음을 확인 할 수 있었던 바 이는 *npt-II*와 *fad3* 유전자가 함께 존재하는 pFAD3 DNA가 춘란 근경에 도입됐음을 말해주는 것이다.

18) NPT-II 분석

본 실험에서 선발마커로 사용했던 가나마이신 유전자가 발현되고 있는지를 확인하기 위하여 NPT-II 활성을 분석했던 바 6개의 시료중 하나에서만 밴드가 관찰되었는데 이는 가나마이신 배지에서 선발한 뒤 가나마이신이 들어 있지 않은 배지에서 생육시키는 동안 NPT-II 활성이 소실되었거나 활성이 너무 적었기 때문인 것으로 생각된다.

Vasil 등(1991)에 의하면 밀의 캘러스에서 NPT-II의 활성을 보았던 바 5개의 시료중 2개는 NPT-II의 활성이 적어 오랫동안 blotting 시킨 후에야 희미하게 밴드를 관찰할 수 있었다고 보고 한 바 있는데 이는 본 실험과 비슷한 결과로 여겨진다.

19) 지방산 분석

Kodama 등(1994)에 의하면 *Arabidopsis thaliana*로 부터 분리된 ω -3 지방산 불포화 효소 유전자가 삽입되어 만들어진 형질전환체 담배에서 이중결합이 3개 존재하는

지방산인 hexadecatrienoic acid(16:3)와 linolenic acid(18:3)는 증가하였고 반대로 hexadecadienoic (16:2)와 linoleic acid(18:2)는 감소되었다고 보고하였다. 또 Polashock 등(1992)에 의하면 담배에 yeast Δ -9 지방산 불포화 효소 유전자를 넣어 가스 크로마토 그래피로 피크 패턴을 본 결과 18:2가 약 17%를 차지한 반면 18:3은 45%로 증가했음을 보고하였다.

본 실험의 경우 형질전환 시키지 않은 춘란 근경의 지방산 분포를 보면 linoleic acid(18:2)가 linolenic acid(18:3)보다 더 많았지만 미세입자 투사법으로 *fad3* 유전자를 삽입시킨 근경 시료는 불포화 지방산의 함량 비율이 변화되어 linolenic acid(18:3)가 linoleic acid(18:2) 보다 많아졌는데 이것은 지방산의 불포화를 촉진시키는 *fad3* 유전자가 세포내로 삽입되어 발현되고 있음을 의미하는 것으로 이러한 결과는 미세입자 투사법에 의해서 춘란의 형질전환체가 만들어졌음을 나타낸다.

미세입자 투사법은 식물의 형질전환을 위한 새로운 기술로 근래에 많은 연구가 이루어 졌고 또한 이루어지고 있지만 아직도 형질전환율을 높이기 위해선 개선되어야 할 점도 많다고 생각된다. 세포의 생리적 상태와 각 시료에 대한 세포벽의 두께, 입자의 크기, DNA의 뭉침, DNA의 피복 방법, DNA의 량, 미세입자의 분포, 그리고 속도 등 여러 가지 인자들의 불균일성은 안정되지 못한 결과를 가져올 뿐만 아니라 이러한 요인들은 형질전환율을 떨어뜨리고 있기 때문에 목표 식물을 형질전환 시키기 위해서는 관련 인자들을 사전에 충분히 검토하여 최적조건을 확립해야만 한다. 본 연구는 미세입자 투사법으로 춘란의 형질 전환을 하기 위한 필요조건을 적정화시키고 이 조건의 적정성을 뒷받침하기 위해서 내한성 유전자의 하나인 *fad3*와 선발용으로 많이 사용되는 *npt-II* 유전자가 함께 들어 있는 pFAD3 plasmid DNA를 삽입 시키고 유전자 분석을 통하여 춘란 근경이 형질전환 되었음을 확인하여 미세입자 투사법을 이용한 춘란의 형질전환 가능성을 제시함으로써 앞으로 이의 활용이 크게 기대된다고 할 수 있겠다.

V. 참고문헌

Abel, P. P., R. S. Nelson, B. De, N. Hoffmann, S. G. Rogers, R. T. Fraley, and R. N. Beachy. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*. 232:738-743.

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.

Aragao, F. J. L., M. F. G. de Sa, E. R. Almeida, E. S. Gander, and E. L. Rech. 1992. Particle bombardment-mediated transient expression of a Brazil nut methionine-rich albumin in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Molecular Biology*. 20:357-359.

Arditti, J. 1982, *Orchid biology : Reviews and perspectives, II*, Cornell University Press. pp.197-212.

Arondel, V., L. B. Hwang, I. Gibson, S. Goodman, H. M. and Somerville, C. R. (1992). Map-based cloning of a gene containing omega-3 fatty acid desaturation in *Arabidopsis*. *Science* 258:1353-1355.

Bekkaoui, F., R. S. S. Datla, M. Pilon, T. E. Tautorus, W. L. Crosby and D. I. Dunstan. 1990. The effects of promoter on transient expression in conifer cell lines. *Theor. Appl. Genet.* 79:353-359.

Bhairi, S. M., Staples, R. C. 1992. Transient expression of the beta-glucuronidase gene introduced into *uroomyces appendiculatus* uredospores by particle bombardment. *Phytopathology*, 82:9, 986-989.

Bidney, D., C. Scelonge, J. Martich, M. Burrus, L. Sims, and G. Huffman. 1992. Microprojectile bombardment of plant tissues increase transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology* 18:301-313.

Birch, R. G., and T. Franks. 1991. Development and optimization of microprojectile systems for plant genetic transformation. *Aust. J. Plant Physiol.* 18, 453-469.

Boynton, J. E., Gilham, N. W., Harris, E. H., Hosler, J. P., Johnson, A. M., Jones, A. R., Randolph-Anderson, B. L., Robertson, P., Klein, T. M., Shark, K. B., and Sanford, J. C. 1988. Chloroplast transformation of *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science* 240, 1534-7.

Bronse, J., Warwick, N., Somerville, C. R. and Slack, C. R. (1986). *Biochem. J.* 235:25



Cao, J., W. Zhang, D. McElory, and R. Wu. 1991. Assessment of rice genetic transformation techniques. *Rice Biotechnology*. Khush and Toenniessen, Philippines & New York. pp. 188-199.

Cao, J., Y-C. Wang, T. M. Klein, J. Sanford, and R. Wu. 1990. Transformation of rice and maize using the biolistic process. *Plant Gene Transfer*. 21-33.

Cao, J. X. Duan, D. McElroy, and R. Wu. 1992. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of

suspension culture cells. *Plant Cell Reports*. 11:585-591.

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.

Castillo, A., V. Vasil, and I. K. 1994. Vasil. Parid production of fertile transgenic plants of rye (*Secale cereale* L.) *Bio/Technology*. vol 12:1366-1368.

차건성. 1995. *동양란*. p151-177.

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*.

Charest, P. J., Y. Devantier, C. Ward, C. Jones, U. Schaffer, and K. K. Klimaszewska. 1991. Transient expression of foreign chimeric genes in the gymnosperm hybrid larch following electroporation. *Can. J. Bot.* 69:1731-1736.

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.

Cheung, A. Y., L. Bogorad, M. van Montagu, and J. Schell. 1988. Relocating a gene for herbicide tolerance : A chloroplast gene is converted into a nuclear gene. *Pro. Nat. Acad. Sci. USA*, 85:391-395.

Chibbar, R. N., K. K. Kartha, R. S. S. Datla, N. Leung, K. Caswell, C. S. Mallard, and L. Steinhauer. 1993. The effect of different promoter-sequences on transient expression of *gus* reporter gene in cultured barley (*Hordeum vulgare* L.) cells. *Plant Cell Reports*, 12:506-509.

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.

Choi, S. O., and J. D. Chung. 1989. Effects of media on multiplication of rhizomes and growth of seedlings through asymbiotic seed germination of oriental *Cymbidium*. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 30(4):294-302.

Chowdhury, M. K. U. and Vasil, I. K. 1992. Stably transformed herbicide resistant callus of sugarcane via microprojectile bombardment of cell suspension cultures and electroporation of protoplasts. *Plant Cell Reports*, 11:10, 494-498.

Christou, P., T. L. Ford, and Kofron. 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic

embryos. *Bio/Technology*. 9, 957-962.

Christou, P., W. F., Swain, Y. S. and McCabe, D. E. 1989. Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86. 7500-7504.

Chung, J. D., J. S. Park, and C. K. Chun. 1990. Karyotype analysis of Korean native *Cymbidiums*. *Korean J. Plant Tissue Culture*. 31(4):414-416.

Chung, J. D., C. K. Kim, M. Y. Kwon, and S. O. Jee. 1992. Putative GUS(β -glucuronidase) gene transfer into *Petunia hybrida* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Korean J. Plant Tissue Culture*. 19(1):7-11.

Cuozzo, M., K. M. O'Connell, W. Kaniewski, R. X. Fang, N. H. Chua, and N. E. Tumer. 1988. Viral protection in transgenic tobacco plants expressing the cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology*. 6:549-558.

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

Daniell, H., J. Vivekananda, B. L. Nielsen, G. N. Ye, K. K. Tewari, and J. C. Sanford. 1990. Transient foreign gene expression in chloroplast of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* vol. 87, 88-92.

Daniell, H., M. Krishnan, and B. F. McFadden. 1991. Transient expression of β -glucuronidase in different cellular compartments following biolistic delivery of foreign DNA into wheat leaves and calli. *Plant Cell Reports*. 9:615-619.

della-Cioppa, G., S. C. Bauer, M. L. Taylor, D. E. Rochester, B. K. Klein, D. M. R. R. Fraley, and G. M. Kishore. 1987. Targeting a herbicide-resistant enzyme from *Escherichia coli* to chloroplasts of higher plants. *Bio/Technology*. 5:579-584.

Draper, J., R. Scott, P. Armitage, R. Walden. 1988. *Olant genetic transformation and gene expression*. Blackwell Scientific Publications. 163-198.(DNA-mediated gene transfer).

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.

Fillatti, J. J., J. Kiser, R. Rose, and L. Comai. 1987. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Bio/Technology*. 5:726-730.

Finer, J. J, and M. D. McMullen. 1990. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment. 8:586-589.

Fischhoff, D. A., K. S. Bowdish, F. J. Perlak, P. G. Marrone, S. M. McCormick, J. G. Niedermeyer, D. A. Dean, K. KusanoKretzmer, E. J. Mayer, D. E. Rochester, S. G. Rogers, and R.0 T. Fraley. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Bio/Technology*. 5:807-813.

Franche, C., D. Bogusz, C. Schopke, C. Fauquet, and R. N. Beachy. 1991. Transient gene expression in cassava using high-velocity microprojectiles. *Plant Molecular Biology*. 17:493-498.

Franks, T., R. G. Birch. 1991. Gene transfer into intact sugarcane cells using microprojectile bombardment. *Australian Journal of Plant Physiology*. 18:5, 471-480.

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.

Fonnesbech. 1972a. Growth hormones and propagation of *Cymbidium* in vitro. *Physiol. Plant*. 27:310-316.

Fonnesbech. 1972b. Organic nutrients in the media for propagation of *Cymbidium* in vitro *physiol. Plant*. 27:360-364.

Gambley, R. L., R. Ford, and G. R. Smith. 1993. Microprojectile transformation of sugarcane meristems and regeneration of shoots expressing β -glucuronidase. *Plant Cell Reports*. 12:343-346.

Gawel, N. J. and R. L. Jarret. 1991. A modified CTAB DNA extraction procedure for *Musa* and *Ipomoea*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 9(3):262-266.

Genga, A. M., A. Allavena, A. Ceriotti, and R. Bollini. 1991. Genetic transformation in *Phaseolus* species by high-velocity microprojectiles. *Acta Horticulturae* 300. 309-313.

George, E. F., D. J. M. Puttock and H. J. George. 1987. *Exegetics limited*. pp62-63.

Gerlach, W. L., D. Llewellyn, and J. Haseloff. 1987. Construction of a plant disease resistance gene from the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Nature*.

328:802-805.

Hagio, T., A. D. Blowers, and E. D. Earle. 1991. Stable transformation of sorghum cell cultures after bombardment with DNA-coated microprojectiles. *Plant Cell Reports*. 10:260-264.

Harwood, J. L. 1988. Fatty acid metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol, Plant Mol. Biol.* 39:101-138.

Harrison, B. D., A. Mayo, and D. C. Baulcombe. 1987. Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature*. 328:799-802.

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.

Heiser, W. 1990. Optimization of biolistic transformation using the Helium-driven PDS-1000/He system. *US/EG Bulletin* 1688. 1-7.

Hensgens, L. A. M., E. P. H. M. de Bakker, E. P. van Os-Ruygrok, S. Rueb, F. van de Mark, H. M. van der Maas, S. van der Veen, M. Kooman-Gersmann, L. Hart, and R. A. Schilperoort. 1993. Transient and stable expression of *gusA* fusions with rice gene in rice, barley and perennial ryegrass. *Plant Molecular Biology*. 22:1101-1127.

Herrera-Estrella, L., and J. Simpson. 1988. Foreign gene expression in plants. *Plant Molecular Biology* (Ed. by C. H. Shaw). IRL Press. 131-160.

Hooykaas, P. J. J. 1989. Transforamtion of plant cells via *Agrobacterium*. Plant Mol. Biol. 13:327-336.

Hilder, V. A., A. N. R. Gatehouse, S. E. Sheerman, R. F. Barker, and D. Boulter. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature. 330:160-163.

Iba, K., S. Gibson, T. Nishiuchi, T. Fuse, M. Nishimura, V. Arondel, S. Hugly, and C. Somerville. 1993. A gene encoding a chloroplast ω -3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana*. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 268. No. 32. Issue of Number 15. pp. 24099-24105.

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.

Iida, A., T. Yamashita, Y. Yamada, and H. Morikawa. 1991. Efficiency of particle-bombardment-mediated transformation is influenced by cell cycle stage in synchronized cultured cells of tobacco. Plant Physiol. 97, 1585-1587.

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.

Johnston, S. A., Anzianno, P. Q., Shark, K., Sanford, J. C., and Butow, R. A. 1988. Mitochondrial transformation in yeast by bombardment with microprojectiles. *Science* 240, 1534-41.

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.

Klein, T. M., E. C. Harper, Z. Svab, J. C. Sanford, M. E. Fromm, and P. Maliga. 1988. Stable genetic transformation of intact *Nicotiana* cells by the particle bombardment process. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*. Vol. 85, 8502-8505.

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.

Knittel, N., V. Gruber, G. Hahne, and P. Lenee. 1994. Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) : a reliable protocol. *Plant Cell Reports*. 14:81-86.

Kodama, H., T. Hamada, G. Horiguchi, M. Nishimura, and K. Iba. 1994. Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast Δ^3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Physiol.* 105:601-605.

Kosugi, S., Y. Ohashi, K. Nakajima, and Y. Arai. 1990. An improved assay for β -glucuronidase transformed cells methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. *Plant Science*. 70:133-140.

Kuehnle, A. R. and N. Sugii. 1992. Transformation of *Dendrobium* orchid using particle bombardment of protocorms. *Plant Cell Reports*. 11:484-488.

Kunst, L., Browse, J. and Somerville, C. 1989a. Altered chloroplast structure and function in a mutant of *Arabidopsis* deficient in plastid glycerol-3-phosphate acyltransferase activity. *Plant Physiol*. 90:846-853.

Kunst, L., Browse, J. and Somerville, C. 1989b. A mutant of *Arabidopsis* deficient in desaturation of palmitic acid in leaf lipids. *Plant Physiol*. 90:943-947.

Lassner, M. W., P. Peterson, and J. I. Yoder. 1989. Simultaneous amplification of multiple DNA fragments by polymerase chain reaction in the analysis of transgenic plants and their progeny. *Plant Molecular Biology Reporter*. vol 7(2):116-128.

Lee, B. T., K. Murdoch, J. Topping, and M. Kreist. 1991. Transient expression of foreign genes introduced into barley endosperm protoplasts by PEG-mediated transfer or into intact endosperm tissue by microprojectile bombardment. *Plant Science*. 78:237-246.

Lee, K. W., and S. K. Sung. 1992. Transformation of plant cells by gene transfer: Construction of a chimeric gene containing deleted maize alcohol dehydrogenase intron and -glucuronidase gene and its expression in potato. *Korean J. Bot.* 35:237-245.

Li, L., R. Qu, A. de Kochko, C. Fauquet, and R. N. Beachy. 1993. An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Reports*. 12:250-255.

Li, Y-H., F. M. Tremblay, and A. Seguin. 1994. Transient transformation of pollen and embryogenic tissues of wheat spruce (*Picea glauca* (Moench.) Voss) resulting from microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports*. 13:661-665.

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.

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

Lonsdale, D., S. Onde, and A. Cuming. 1990. Transient expression of exogenous DNA in intact, viable wheat embryos following particle bombardment. *Journal of Experimental Botany*. vol. 41(230):1161-1165.

MacKenzie, D. R., Anderson, P. M., and Wernham, C. C. 1966. A mobile air blast inoculator for plot experiments with maize dwarf mosaic virus. *Plant Disease Reporter*. 50, 363-6.

McCabe, D. E, and B. J. Martinell. 1993. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems. 1993. 11:596-598.

McCabe, D. E, W. F. Swain, B. J. Martinell, and P. Christou. 1988. Stable

transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Biotechnology*. 6:923-926.

Momtaz, O. A., and M. A. Madkour. 1993. Transfer expression of beta-glucuronidase gene in new hybrid of fine extra-long staple egyptian cotton seedlings following biolistic particle bombardment. *Beltwide Cotton Conferences*. vol 2:624-627.

Morikawa, H., A. Iida, and Y. Yamada. 1989. Transient expression of foreign genes in plant cells and tissue obtained by a simple biolistic device (particle-gun). *Appl. Microbiol Biotechnol*. 31:320-322.

Murashige and Skoog. 1962. MS medium composition. Murata, N., Ishizaki-Nishizawa, O., Higashi, S., Hayashi, H., Tasaka, Y. and Nishida, I. 1992. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature*. 356:710-713.

Nelson, R. S., S. M. McCormick, X. Delannay, P. Dube, J. Layton, E. J. Anderson, M. Kaniewska, R. K. Proksch, R. N. Horsh, S. G. Rogers, R. T. Fraley, and R. N. Beachy. 1988. Virus tolerance, plant growth and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. *Bio/Technology*. 6:403-410.

Nishihara, M., M. Ito, I. Tanaka, M. Kyo, K. Ono, K. Irifune, and H. Morikawa. 1993. Expression of the β -glucuronidase gene in pollen of lily (*Lilium longiflorum*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), and peony (*Paeonia lactiflora*) by particle bombardment. *Plant Physiol*. 102:357-361.

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

Oard, J. H., D. F. Paige, T. M. Gradziel. 1989. Transient gene expression in maize, rice, and wheat cells using an airgun apparatus. *Plant Physiol.* 92:334-339.

Ohlrogge, J. B. 1994. Design of new plant products : engineering of fatty acid metabolism. *Plant Physiol.* 104:821-826.

O'Neill, C., G. V. Horvath, E. Horvath, P. J. Dix, and P. Medgyesy. 1993. Chloroplast transformation in plants : polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. *The Plant Journal.* 3(5), 729-738.

Paek, K. Y., G. B. Shim, J. J. Kim. 1989. Exploitation of temperature *Cymbidiums* and establishment of micropropagation system. I. Asymbiotic germination of temperate *Cymbidiums* and effect of media and growth regulators on organogenesis. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 30(3):234-247.

Park, J. S., J. D. Chung, M. S. Chung. 1990. Regional variation of banding patterns in some isozymes of *Cymbidium goeringii* in Korea. *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 31(2):176-183.

Pena, L., M. Cervera, J. Juarez, C. Ortega, J. A. Pina, N. Duran-Vila, and L. Navarro. 1995. 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.

Polashock, J. J., Chin, C. K. and Martin, C. E. 1992. Expression of the yeast Δ -9 fatty acid desaturase in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol*. 100:894-901.

Prakash, C. S., and U. Varadarajan. 1992. Genetic transformation of sweet potato by particle bombardment. *Plant Cell Reports*. 11:53-57.

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. 1993. Biolistic transformation of tobacco and maize suspension cells using bacterial cells as microprojectiles. *Plant Cell Reports*. 13:212-217.

Ritala, A., L. Mannonen, K. Aspegren, M. Salmenkallio-Marttila, U. Kurten, R. Hannus, J. Mendez Lozano, T. H. Teeri, and V. Kauppinen. 1993. Stable transformation of barley tissue culture by particle bombardment. *Plant Cell Reports*. 12:435-440.

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.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of γ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230:1350-1354.
- Sanford, J. C., T. M. Klein, E. D. Wolf and N. Allen. 1987. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Science and Technology*. 5:27-37.
- Sanford, J. C. 1990. Biolistic plant transformation. *Physiol. Plant*. 79:206-209.
- Sanford, J. C. M. J. DeVit, J. A. Russell, F. D. Smith, P. R. Harpending, M. K. Roy, and S. A. Johnston. 1991. An improved, Helium-driven biolistic device. *Technique*. 3:3-16.
- 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.
- Sato, S., C. Newell, K. Kolacz, L. Tredo, J. Finer, and M. Hinchee. 1993. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems. *Plant Cell Reports*. 12:408-413.
- Sautter, C., H. Waldner, G. Neuhaus-Url, A. Galli, G. Neuhaus, and I. Potrykus. 1991. Micro-targeting: high efficiency gene transfer using a novel approach for the acceleration of micro-projectiles. *Bio/Technology*. 9:1080-1085.

- Sautter, C. 1993. Development of a microtargeting device for particle bombardment of plant meristems. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 33:251-257.
- Sawahel, W. A., and D. J. Cove. 1992. Gene transfer strategies in plants. *Biotech. Adv.* vol. 10, 393-412.
- 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.
- Seki, M., N. Shigemoto, Y. Komeda, J. Imamura, Y. Yamada., and H. Morikawa. 1991. Transgenic *Arabidopsis thaliana* plants obtained by particle-bombardment-mediated transformation. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 36:228-230.
- Seki, M., Y. Komeda, A. Iida, Y. Yamada., and H. Morikawa. 1991. Transient expression of β -glucuronidase in *Arabidopsis thaliana* leaves and roots and *Brassica napus* stems using a pneumatic particle gun. *Plant Molecular Biology*. 17:259-263.
- Serres, R., and E. Stang. 1992. Gene transfer using electric discharge particle bombardment and recovery of transformed cranberry plants. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 117(1):174-180.
- Shah, D. M., R. B. Horsch, H. J. Klee, G. M. Kishore, J. A. Winter, N. E. Tumer, C. M. Jironaka, P. R. Sanders, C. S. Gasser, S. Aykent, N. R. Siegel, S. G. Rogers, and R. T. Fraley. 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science*. 233:478-481.
- Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments

- separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Staub, J. M., and P. Maliga. 1992. Long regions of homologous DNA are incorporated into the tobacco plastid genome by transformation. *The Plant Cell*, vol. 4, 39-45.
- Stoger, E., C. Fink, M. Pfosser, and Heberle-Bors. 1995. Plant Cell Reports. Plant transformation by particle bombardment of embryogenic pollen. *Plant Cell Reports*. 14:273-278.
- Suh, S. C., H. I. Kim, Y. H. Lee, and T. Y. Chung. 1993. Gene expression of β -glucuronidase (GUS) in Rice protoplast. *RDA. J. Agri. Sci.* 35(1):219-225.
- Svab, Z., P. Hajdukiewicz, and P. Maliga. 1990. Stable transformation of plastids in higher plants. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. U. S. A.* 87:8526-8530.
- Tagu, D., N. Walker, L. Ruizavila, S. Burgess, J. A. Martinezizquierdo, J. J. Leguay, P. Netter, and P. Puigdomenech. 1992. Regulation of the maize HRGP gene expression by ethylene and wounding mRNA accumulation and qualitative expression analysis of the promoter by microprojectile bombardment. *Plant Molecular Biology*. 20:529-538.
- Takeuchi, Y., M. Dotson, and N. T. Keen. 1992. Plant transformation : a simple particle bombardment device based on flowing helium. *Plant Molecular Biology*. 18:835-839.
- Tasaka, Y., I. Nishida, S. Higashi, T. Beppu, and N. Murata. 1990. Fatty acid composition of phosphatidylglycerols in relation to chilling sensitivity of woody

plants. *Plant Cell Physiol.* 31(4): 545-550.

Tomes, D. T., A. K. Weissinger, M. Ross, R. Higgins, B. J. Drummond, S. Schaaf, J. Maloneshoneberg, M. Staebell, P. Flynn, J. Anderson, and J. Howard. 1990. Transgenic tobacco plants and their progeny derived by microprojectile bombardment of tobacco leaves. *Plant. Mol. Biol.* 14:261-268.

Tor, Mahmut., C. Ainsworth, and S. H. Mantell. 1993. Stable transformation of the food yam *Dioscorea alata* L. by particle bombardment. *Plant Cell Reports.* 12:468-473. Vaeck, M., A. Reynaerts, H. Hofte, S. Jansens, M. de Beuckeleer, C. Dean, M. Zabeau, M. van Montagu, and J. Leemans. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature.* 328:33-37.

Vain, P., M. D. McMullen, and J. J. Finer. 1993. Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports.* 12:84-88.

van der Leede-Plegt, L. M., B. C. E. van de Ven, R. J. Bino, T. P. M. van der Salm, and A. J. van Tunen. 1992. Introduction and differential use of various promoters in pollen grains of *Nicotiana glutinosa* and *Lilium longiflorum*. *Plant Cell Reports.* 11:20-24.

Van Eck, J. M., A. D. Blowers, and E. D. Earle. 1995. Stable transforamtion fo tomato cell cultures after bombardment with plasmid and YAC DNA. *Plant Cell Reports.* 14:299-304.

Vasil, V., S. M. Brown, D. Re, M. E. Fromm, and I. K. Vasil. 1991. Stably transformation callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension

cultures of wheat. *Bio/Technology*. Vol 9:743-747.

Walter, C., D. R. Smith, M. B. Connett, L. Grace, and D. W. R. White. 1994. A biolistic approach for the transfer and expression of a *gusA* reporter gene in embryogenic cultures of *Pinus radiata*. *Plant Cell Reports*. 14:69-74.

Wang, Y-C. T. M. Klein, M. Fromm, J. Cao, J. C. Sanford, and R. Wu. 1988. Transient expression of foreign genes in rice, wheat and soybean cells following particle bombardment. *Plant Molecular Biology*. 11:433-439.

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.

Woda, J., Gombos, Z. and Murat, N. 1990. Enhancement of chilling tolerance of a *cyanobacterium* by genetic manipulation of fatty acid desaturation. *Nature*. 347:200-203.



Wolter, F. P., Schmidt, R. and Heinz, E. 1992. Chilling sensitivity of *Arabidopsis thaliana* with genetically engineered membrane lipids. *EMBO. J.* 11:4685-4692.

Yamashita, T., A. Iida, and H. Morikawa. 1991. Evidence that than 90% of β -glucuronidase-expressing cells after particle bombardment directly receive the foreign gene in their nucleus. *Plant Physiol*. 97, 829-831.

Ye, G. N., H. Daniell, and J. C. Sanford. 1990. Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts. *Plant Molecular Biology*. 15:809-819.

윤평섭. 1989. 한국 원예식물 도감. 지식산업사. p 717.

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.



VI. 요약문

미세입자 투사법에 의해 춘란의 근경에 GUS 유전자를 삽입하는데 관련된 인자들을 검토하였다. 이들 중에서 가장 효율이 좋은 조건을 조합하여 내한성 유전자를 갖고 있는 pFAD3 DNA를 근경 절편에 투사하여 생육시킨 다음 형질전환여부를 확인하기 위해서 도입된 유전자의 발현 여부를 조사하였다.

미세입자 투사법에 의해서 난의 형질전환을 시도하기 위해서는 DNA 입자를 삽입시켜 주는 춘란의 근경 조직을 가능한 작게 해 주어야 하므로 미세 절단기를 이용해서 절편을 만들었다. 절편의 두께가 두꺼울수록 생존율이 좋았으나 외래 유전자를 도입할때는 한 개의 모체 세포로부터의 분화가 제일 바람직하므로 생존할 수 있는 적정 크기를 검토한 바 400 μm 이었다. 이 절편을 생육시키기 위한 배지 조성은 1/4배로 희석된 MS 기본배지와 peptone이 첨가된 Hyponex 배지가 좋았으며 여기에 첨가되는 성장조절물질의 적정조건은 NAA 1 $\mu\text{g/L}$ 와 Fulmet 5 $\mu\text{g/L}$ 을 조합한 것이었다.

미세입자 투사법으로 춘란의 근경 절편에 외래 유전자를 도입하는데 관련되는 인자들 즉 미세입자의 크기, 헬륨 가스 압력, gap 거리, 목표 시료 거리, 진공도, plasmid DNA의 구조, 삼투압계의 효과, DNA 피복 방법, DNA의 농도, DNA의 형태, 미세입자의 분포형태, 미세입자의 투과력, 그리고 투사 횟수의 영향 등을 검토하였는데 형질전환의 지표로서 GUS 유전자를 표지 유전자(marker gene)로 사용하였다.

DNA 운반체로 사용된 텅스텐 입자는 크기에 따라 DNA 도입효율에 상당한 차이를 보였는데 가장 좋았던 크기는 1.11 μm 이었다.

헬륨 가스 압력은 77.33 kg/cm^2 (1100 psi)가 가장 양호하였는데 압력이 너무 크면 시료에 충격을 많이 주어 세포에 유해하기 때문에 외래 유전자만 삽입되고 세포의 피해를 최소화해야한다. rupture disk와 macrocarrier 사이의 거리인 gap 거리는 6.35 mm에서 가장 좋았는데 gap 거리가 지나치게 짧거나 길면 미세입자가 한쪽으로 몰리거나 세포에 투과되는 정도가 좋지 않았다.

중요한 요인중의 하나로 생각되어지는 목표시료의 거리는 7.0 cm가 적당하였다. 거

리가 이보다 짧은 경우에는 가스 압력의 충격이 커서 시료의 손실이 유발되었으며, 낮은 단계에서는 형질전환율이 감소하였다.

이상에서 검토한 gap 거리와 목표 시료의 거리는 조직 절편에 대한 입자의 투과력에 많은 영향을 주었는데 gap 거리와 목표 시료의 거리가 짧을수록 입자의 침투거리는 길어졌다.

그러나 너무 강한 충격이 가해지면 세포에 손상을 줄 수 있기 때문에 세포에 최소한의 손상을 주면서 세포속으로 안정하게 외래 유전자가 삽입될 수 있도록 투과력을 조정할 필요가 있다.

시료상자 내의 진공도는 타 식물의 경우와 비슷한 27 inchHg에서 형질 전환율이 좋았다.

투사조건 외에도 목표 유전자를 구성하는 plasmid DNA의 종류에 따라서도 형질전환율에 차이를 보였는데 춘란의 근경에서는 pBI121, pBI221 그리고 pBarGus 중에서 pBI121이 가장 높은 GUS 발현율을 보였다.

미세입자 피복시 사용되는 plasmid DNA의 농도는 텡스텐 mg 당 1.67 μ g 일 때 적당하였으며 DNA의 농도가 높으면 미세입자의 뭉침을 초래하여 좋지 않았다.

투사하기 하루 전과 후에 0.5 M의 sorbitol를 처리하면 무처리구 보다 훨씬 좋은 효과를 나타내었다.

목표시료에 골고루 외래 유전자를 삽입하기 위해선 미세입자에 외래 유전자가 뭉침이 없이 잘 피복되어야 하므로 이 과정은 안정한 형질전환체를 얻는데 중요한 요소인 바 본 연구에서는 2.5 M CaCl_2 와 100 mM spermidine을 조합하여 사용했을 때 좋은 결과를 얻었다.

피복 DNA의 형태에 따른 GUS 발현율은 선형과 환형일때 차이를 발견할 수 없었다. 따라서 피복 DNA는 효소를 처리하여 선형으로 변환시킬 필요가 없다고 생각된다.

미세입자가 목표 시료에 분포되는 형태는 macrocarrier의 중심부분에 미세입자를 균일하게 도포시켰을 때 가장 좋은 결과를 얻었는데 이는 반복실험에 의해서 획득되는 기술에 의한 것으로써 안정된 형질전환율을 얻는데 크게 관여하는 인자라고 생각되어진다.

한 시료에 대하여 투사를 연속적으로 반복한 결과 반복 횟수에 따라서 GUS 발현율은 좋아졌으나 너무 지나치면 세포에 계속되는 충격으로 형질전환율이 감소하므로 좋지 않았다.

이상의 모든 조건을 조합하여 춘란의 근경 절편에 내한성 유전자를 갖고 있는 pFAD3 를 삽입한 뒤 이를 100 mg/L의 가나마이신을 처리한 배지에서 생육시켜 형질전환된 근경을 선발하고 이 근경으로부터 DNA 를 분리하여 *npt-II* 와 *fad3* 유전자에 대한 PCR 을 수행한 결과 관련 유전자의 도입이 확인되었다.

가나마이신 배지에서 선발된 근경에 대하여 Southern blot을 실시한 결과 *npt-II* 유전자 및 *fad3* 유전자를 probe로 사용했을 때 각각의 외래 유전자가 도입 되었음을 확인하였고 *npt-II* 분석에서도 형질전환을 확인하였다. Vasil 등(1991)은 밀에 대한 *npt-II* 분석을 수행한 결과 9개의 가나마이신 내성 calli에서 5개의 시료가 감지되어 55.5%의 도입효율을 보였다고 하였는데 본 실험에서도 60%의 효율을 보여 비슷한 양상을 나타냈다.

Desaturase 유전자가 도입된 춘란의 근경에서 지방산을 추출하여 분석한 결과 대조구에서는 지방산의 비율이 linolenic acid(18:3) 보다 linoleic acid(18:2)가 많았으나 형질전환된 개체에서는 linolenic acid(18:3)이 linoleic acid(18:2) 보다 높게 나타나 *fad3* 유전자가 도입되어 발현되었음을 확인하였다.

현재 미세입자 투사법을 이용하여 형질전환체를 만드는 방법의 한계는 반복되는 처리간의 결과가 잘 일치하지 않는다는 것인데 이것은 이 기술을 사용한 많은 연구자들의 공통 견해로써 이러한 문제점을 해결하기 위해선 미세입자 투사법의 입자속도를 정밀하고 재현성 있게 처리하는데 있다고 생각된다.

이러한 것은 미세입자의 모양과 크기의 정확성, DNA가 미세입자에 균일하게 피복되도록 하는 방법, 안정된 가속력을 유지할 수있는 장치의 고안 그리고 투사되는 입자를 골고루 재현성 있게 분포시킬 수 있는 기술이 개량된다면 이 방법의 한계점은 충분히 극복될 수 있다고 생각되어진다.

본 실험을 통하여 확립된 조건으로 춘란 근경에 유용한 외래 유전자를 삽입시키는 시도를 계속하면 새로운 품종을 육성할 수 있는 기틀이 마련될 수 있으리라고 기

대된다.

Key word : *Cymbidium virescens*, Microprojectile bombardment, GUS assay, PCR,
Southern blot, npt-II assay, Fatty acid assay



Appendix

Table 2. List of transformants obtained from microprojectile bombardment.

Name of plant used	Cell type	Type of partilce gun	Microcarrier type	Authors
Tobacco & Egg-plant	Suspension cell	Particle gun system	Gold 1-5 μm	Morikawa 1989
Tobacco	Suspension cell	Pneumatic particle acceleration device	Gold	Iida et al. 1990
Rice maize	Embryo	PDS-1000	Tungsten 1.2 μm	Cao et al. 1990
Cowpea & Cotton	Suspension cell	Biolistics delivery system	Tungsten 1.1 μm	Finer and McMullen, 1990
Maize	Embryogenic calli	Biolistics particle acceleration device	Tungsten 1.0 μm	Fromm et al. 1990
Tobacco	Suspension cell	Pneumatic particle gun	Gold 1-3 μm	Iida et al. 1990
Wheat	Embryo	-	Tungsten 1.1 μm	Lonsdale et al. 1990
Bean	Bean tissue	Home-made gene gun	Tungsten -	Genga et al. 1991
Oryza sativa	L. Suspension cell	PDS-1000	Tungsten 0.7 μm	Cao et al. 1991
<i>Picea mariana</i>	Embryogenic cell	PDS-1000	Tungsten 1.11 μm	Duchesne 1991
Cassav	Leaf	Air-pressure device	Tungsten 0.7 μm	Franche et al. 1991

Table 2. to be continued.

Name of plant used	Cell type	Type of partilce gun	Microcarrier type	Authors
Sorghum	Suspension cell	PDS-1000	Tungsten 1.1 μm	Hagio 1991
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Root tissue	Pneumatic particle gun	Gold 1-3 μm	Seki et al. 1991
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Root tissue	Pneumatic particle gun	Gold 1-3 μm	Seki et al. 1991
Soybean	Shoot tip	PDS-1000	Tungsten -	Sato et al. 1991
Tobacco	Suspension cell	Pneumatic particle gun	Gold	Yamashida et al., 1991
<i>Dendrobium</i>	Protocorm	-	Tungsten 0.7 μm	Kuehnle and Sugii, 1992
<i>Pinus radiata</i>	Suspension cell	Gun power discharge apparatus	Tungsten 1.7 μm	Carnpbell et 1992
Tobacco	Suspension cell	PDS-1000	Tungsten 0.7 μm	Russell et al. 1992
<i>Nicotiana glutinosa</i>	Pollen	PDS-1000	Tungsten 1.6 μm	van der Leede-Plegt et al., 1992
Tulip	Explant	PDS-1000	Tungsten 1.1 μm	Wilmink 1992
Cucumber	Embryogenic callus	BPG	Tungsten 1.0 μm	Chee and Jarry, 1992

Table 2. to be continued.

Name of plant used	Cell type	Type of partilce gun	Microcarrier type	Authors
<i>Picea glauca</i>	Embryogenic cell	PDS-1000/He	Tungsten 1.11 μm Gold 1.6 μm	Charest et al. 1992
<i>Larix</i> spp.	Embryogenic cell	PDS-1000	Tungsten 1.11 μm	Duchesne 1992
Soybean & Corn	Suspension cell	Particle inflow gun	Tungsten 0.7 μm	Finer et al. 1992
Sugarcane	Meristems	-	Gold 1.5-3 μm	Gambley 1992
Wheat	Calli	-	Tungsten 1.1 μm	Perl et al. 1992
American cranberry	Stem section	Electric discharge particle acceleration	Gold -	Serres 1992
Tobacco	Leaf	PDS-1000 gun powder charge	Tungsten 1.0 μm	Stawband Maliga, 1992
Soybean	Shoot tips Suspension cell	PDS-1000	Tungsten 1.1 μm	Sato et al. 1993
Barley	Suspension cell	PDS-1000	-	Ritala 1993
Yam	Suspension cell	Biolytic particle gun device	Tungsten 0.7 μm	Tor et al. 1993
Maize	Embryogenic cell	Particle inflow gun	Tungsten 0.7 μm	Vain et al. 1993

Table 2. to be continued.

Name of plant used	Cell type	Type of partilce gun	Microcarrier type	Authors
Sorghum	Embryo	PDS-1000/He	Tungsten 1.7 μm Gold 1.5-3 μm	Casas 1993
Barley	Suspension cell	PDS-1000	Tungsten 0.7 μm	Chibbar et al. 1993
Sugar beet & Tobacco	-	PDS-1000	Tungsten 0.7 μm	Daniell 1993
Grape	Embryogenic cell	PDS-1000	Tungsten 1.0 μm	Hebert 1993
Lily, Tobacco & Peony	Pollen	Pneumatic particle gun device	Gol 1.1 μm	Nishihara et al. 1993
White spruce	Pollen and embryogenic tissue	PDS-1000/He	Gold 1.6 μm	Li et al. 1993
Rice	Suspension cell	Particle inflow gun	Tungsten 0.7 μm	Jeon et al. 1994
Tomato	Suspension cell	PDS-1000/He	Tungsten 0.7 μm	Van Eck et al 1995
Alfalfa	Petiole and stem section	PDS-1000	-	Pereira 1995

감사의 글

본 논문이 완성되기 까지 아낌없는 사랑과 지도로 이끌어 주신 유장걸교수님께 마음 깊이 감사드립니다. 그리고 바쁘신 중에도 본 논문의 심사를 맡아 주신 류기중교수님, 소인섭교수님, 최상진교수님, 한강완교수님께도 감사한 마음 올립니다.

아울러 늘 깊은 관심으로 지켜 봐 주신 강순선교수님, 고정삼교수님, 현해남교수님, 김찬식교수님께도 감사드립니다.

또한 실험여건을 마련하여 주신 제주대학교 방사능이용연구소 소장님인 김중계교수님, 항상 어려운 일이 있을때마다 가장 가까운 곳에서 많은 지도와 충고를 주었던 선배님인 송성준박사님, 그리고 실험수행과 자료정리에 많은 도움을 준 사랑스런 양경애 후배, 그리고 농화학과 선배님들과 후배들에게도 깊은 감사를 드립니다.

오늘이 있기까지 수많은 세월동안 항상 사랑과 염려로 보살펴 주신 사랑하는 아버님과 어머님께 저의 작은 결실인 이 논문을 드립니다.