

대장균에서 구축이 용이한 신규 vector

식물 형질전환용 binary vector!

pRI 909 DNA	TaKaRa Code 3260	10 µg
pRI 910 DNA	TaKaRa Code 3261	10 µg

- Binary vector로 아그로박테리아에 의한 식물 형질전환에 사용 가능
- 목적 유전자를 식물 염색체에 안정하게 재조합 가능
- 10종류의 제한효소 사이트를 포함한 MCS (multi-cloning site) 탑재

Agrobacterium tumefaciens (*Rhizobium radiobacter*) 및 *A. rhizogenes* (*R. rhizogenes*)는 각각 Ti 플라스미드와 Ri 플라스미드로 불리는 큰 플라스미드를 가지고 있어, 그 일부인 T-DNA (transfer DNA)를 숙주식물의 세포 안으로 전달시켜 식물 염색체 DNA에 삽입한다. T-DNA 상의 유전자가 발현하면, 감염 부위에는 근두암증(Crown gall) 및 모상근(Hairy root)이 형성된다. 이러한 메커니즘을 이용하여, T-DNA 상의 병원성 유전자를 제거하고, 선택마커 유전자와 목적하는 외래유전자를 삽입하여 숙주식물의 세포, 핵 DNA에 외래 유전자를 전달(*Agrobacterium*-mediated gene transfer), 삽입시키는 식물 형질전환이 가능하다. Ti 플라스미드 및 Ri 플라스미드의 *vir* 영역에 있는 복수 유전자가 T-DNA의 식물로의 전달에 관여하지만, 이 기능은 다른 플라스미드 상에 있어서 발휘되는 것으로 알려져 있다. 이상으로부터 T-DNA 영역을 가진 아그로박테리아 중에서 안정을 유지하고 벡터를 구축하기 쉬운 크기의 플라스미드 DNA를, *vir* 영역을 탑재한 다른 플라스미드를 갖고 있는 아그로박테리아에 도입해 식물에 감염시키는 binary vector 방법이 도출된 것이다¹⁾. 처음에는 사용할 수 있는 숙주식물이 한정되어 있었지만, *vir* 영역에 있는 복수 유전자의 발현 유도물질(Acetosyringone 등)이 밝혀지면서 비약적으로 숙주 범위가 넓어져, 식물 뿐만 아니라 누룩곰팡이 등의 사상균이나 버섯 등 담자균에까지 응용되고 있다²⁾. 지금까지 제품으로 판매되고 개량되어 많이 이용되는 벡터는 pBIN19 유래의 pBI101, pBI121과 이것을 새롭게 개량한 벡터이다. 이번 Takara 가 새롭게 발매하는 pRI 909 DNA, pRI 910 DNA는 종래의 벡터와는 달리, high copy number의 대장균 replication origin을 탑재하고 있다. 이 신규 벡터를 이용해 담배 BY-2 배양 세포 및 애기장대 (*Arabidopsis*), 토마토, 벼의 식물체에 유전자를 도입한 예를 아래에 소개한다.

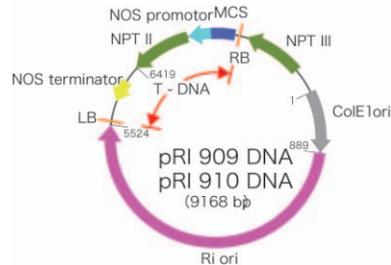
■ 제품 개요

pRI 909 DNA, pRI 910 DNA는 *A. rhizogenes* (*R. rhizogenes*)의 Ri 플라스미드³⁾ 유래이지만, *vir* 영역은 포함하지 않고 개량한 Ri ori 및 T-DNA 영역을 포함한다. 따라서, binary vector 방법을 이용한 *Agrobacterium*-mediated gene transfer에 이용할 수 있다. 대장균에서는 high copy number의 플라스미드이며 MCS (multi-cloning site)에 10 종류의 제한효소 사이트를 포함하고 있기 때문에, 벡터 구축이 용이하다. T-DNA가 식물 염색체로 삽입될 때는 방향성이 있고, T-DNA의 Left Border (LB) 측이 자주 끊어져 완전하게 삽입되지 않는 것이 알려져 있다⁴⁾. 그러나 pRI 909 DNA 및 pRI 910 DNA 벡터는 MCS가 식물에서의 선택마커에 비해 T-DNA의 Right Border (RB) 측에 위치하고 있기 때문에, 선택마커에 의해서 선별된 형질전환체는 목적유전자가 식물의 염색체 DNA에 완전한 형태로 삽입되어 있을 확률이 높다.

대장균 및 아그로박테리아에서 자율적으로 복제하는 서열 벡터인 pRI DNA (그림 1)는 pUC ori를 포함하고 있기 때문에, 대장균에서 high copy number의 플라스미드로 유지된다 (그림 2). 또한, 개량형 Ri ori에 의해 아그로박테리아에서도 안정적으로 유지된다. 대장균 및 아그로박테리아에서 선택마커로

는 카나마이신 내성 유전자인 NPT III를, 식물에서 선택마커로는 개량형 카나마이신 내성 유전자 NPT II를 포함하고 있다. 클로닝 사이트는 pUC계의 플라스미드에 사용되는 제한효소 절단 부위를 사용할 수 있다.

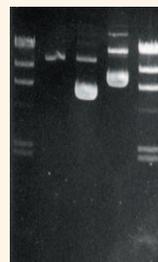
pRI 909 DNA와 pRI 910 DNA의 MCS 및 그 주변 서열은 역방향이다.



ColE1 ori	: 대장균에서 replication origin
Ri ori	: <i>Rhizobium</i> (<i>Agrobacterium</i>)에서 replication origin
RB, LB	: 식물 염색체에 재조합하는 T-DNA의 border 서열
NOS-promoter	: 식물에서 선택마커 유전자 발현을 위한 프로모터
NOS-terminator	: 식물에서 선택마커 유전자 발현을 위한 터미네이터
NPT II	: 식물에서 선택마커 유전자
NPT III	: 대장균 및 <i>Rhizobium</i> (<i>Agrobacterium</i>)에서 선택마커 유전자 (카나마이신 내성)

그림 1. 벡터 맵

M 1 2 3 M



1 : pBI 121
2 : pRI 910
3 : pRI 910 (35S-GUS)
M : λ-*Hind* III digest

그림 2. 대장균에서 플라스미드 mini-prep 결과
pRI 벡터는 대장균에서 copy 수가 높기 때문에 mini-prep으로 확인 및 플라스미드 정제가 간편하여 목적유전자를 탑재한 벡터의 조제가 용이하다.

■ 형질전환 프로토콜

● 아그로박테리아의 형질전환 프로토콜 (Bio-Rad 사의 Gene Pulser II를 사용하는 경우)

- ① *A. tumefaciens* (*R. radiobactor*) LBA4404의 electroporation용 competent cell¹을 얼음상에서 천천히 용해한다.
- ② 본 제품 또는 본 제품을 이용하여 제작한 플라스미드 DNA 1 µl²를 1.5 ml 튜브에 넣고 ice에 둔다.
- ③ ②의 튜브에 ①에서 용해한 competent cell 20 µl를 첨가해 혼합한다.
- ④ 0.1 cm electroporation · cuvette을 얼음에 준비한다.
- ⑤ Gene Pulser II의 조건을 25 µF, 200 Ω, 2.4 kV로 설정한다.
- ⑥ Competent cell과 DNA의 혼합액(③)을 electroporation-cuvette에 옮겨, cuvette을 손가락으로 가볍게 쳐서 혼합액을 바닥에 모은다. Cuvette을 Gene Pulser II에 세팅해, Pulse 버튼을 누른다.
- ⑦ Cuvette을 꺼내, 1 ml의 YM 배지³를 더해 15 ml 튜브로 옮긴다.
- ⑧ 30℃, 1시간 진탕 배양 후, 카나마이신을 포함한 YM 한천배지에 접종하여, 30℃에서 48시간 배양한다.

* 1 : *A. tumefaciens* (*R. radiobactor*) LBA4404는 binary 방법의 개발자인 네델란드의 라이덴 대학의 P. J. J. Hooykaas 교수가 개발한 균주로, 많은 실적이 있다. 본 균주는 T-DNA의 *vir* 영역만을 포함한 플라스미드 pAL4404 (스텝토포마이신 내성 유전자 포함)를 보유하고 있다.

* 2 : 실험에 1에서는 약 20 ng의 DNA를 사용.

* 3 : YM 배지 : Yeast Extract 0.4 g, Mannitol 10 g, NaCl 0.1 g, MgSO₄ 0.1 g, K₂HPO₄ · 3H₂O 0.5 g를 1 L의 물에 녹인 후, pH 7.0으로 조정하여 autoclave.

* 3 : LB 배지로 대체도 가능하지만 형질전환 효율은 저하된다.

● 담배 BY-2 세포의 형질전환 프로토콜

- ① 담배 BY-2 배양세포¹의 배양 후 4일째 배양액 4 ml에, 이를 동안 배양한 형질전환 *A. tumefaciens* LBA4404 (OD≥1.5)의 배양액 100 µl를 첨가한다.
- ② 60 mm 배양 살레(Schale)에서 2일간 배양시킨다 (25℃, 어두운 곳).
- ③ 배양한 세포를 15 ml의 튜브에 LSD 배지¹로 씻으면서 모아 10 ml로 조정한다.
- ④ 탁상용 저속 원심분리기로 원심분리하여 [1,000 rpm (160×g), 2분], 상청을 버린다. 이때의 세포 pellet은 1.5~2 ml PCV (Packed Cell Volume)가 된다.
- ⑤ LSD 배지로 세포 pellet을 씻어, 10 ml로 조정한다.
- ⑥ ④와 ⑤를 2회 반복하여, 최종적으로 3 ml의 LSD 배지 세포 현탁액으로 조정한다.
- ⑦ 세포 현탁액 1 ml를 새로운 15 ml 튜브에 넣고, LSD 배지 4 ml, carbenicilin 보존액 (100 mg/ml) 50 µl, 카나마이신 보존액 (50 mg/ml) 10 µl, 50℃의 1.2% LSD 한천배지 5 ml를 첨가해 잘 혼합하여 10 ml가 되게 한다.
- ⑧ 굳기 전에, 90 mm 살레에 뿌려, 가만히 놔둔다.
- ⑨ 굳어진 후, 신속하게 25℃로 옮겨 약 2주간 배양한다.

* 1 : 담배 BY-2 배양 세포는 이화학연구소 · 바이오자원센터 · 실험식물개발실로부터 제공받았고, (RPC 번호: RPC00001). LSD 배지는 이 연구소에서 추천하는 배지와 동일한 것이다.

[실험예 1] : 담배 BY-2 배양 세포의 형질 전환

[방법]

pRI 910 DNA의 MCS에 35S 프로모터 : β-glucuronidase 유전자 (GUS) : NOS terminator 가 포함된 유전자 카세트를 도입한 플라스미드 벡터 pRI 910 (35S-GUS)를 대장균을 이용해 클로닝하였다. 다음으로는, 상기 프로토콜에 따라, pRI 910 (35S-GUS) 및 control pBI 121 DNA (35S-GUS 및 카나마이신 내성 유전자 NPTII 포함)를 이용해 *A. tumefaciens* (*R. radiobactor*) LBA4404의 형질전환을 실시하였다. 또한 각각의 형질전환 아그로박테리아를 담배 BY-2 배양세포와 함께 배양해, 담배 BY-2 세포의 형질전환을 실시하였다.

[결과]

배양 2주일 후의 선택 한천 배지상에 증식한 담배 배양세포를 관찰했는데 (그림 3), pRI 910 (35S-GUS)는 control pBI 121과 동등의 형질전환 효율을 나타내었다.



그림 3. 담배 BY-2 세포의 형질전환 (선택배지에서 배양)

[실험예 2] : 담배 BY-2 배양세포에 도입한 β-glucuronidase (GUS)의 활성 염색

[방법]

실험예 1의 선택 한천배지에서 증식한 카나마이신 내성의 담배 BY-2 세포를 96-well plate로 옮겨, 일반적인 방법에 따라 GUS 염색을 실시하였다.

[결과]

본 제품을 이용하여 구축한 pRI 910 (35S-GUS)에서 더 많은 수의 GUS 염색 양성인 클론을 얻을 수 있었다 (그림 4).

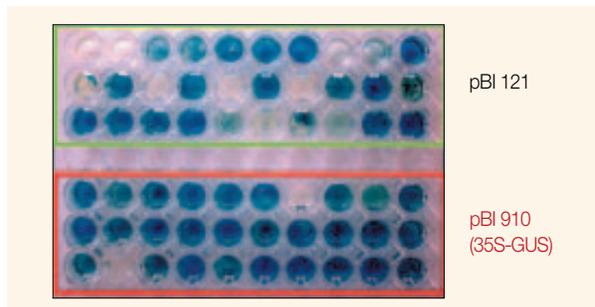


그림 4 형질전환 담배 BY-2 세포의 GUS 염색

[실험예 3] : 식물에의 유전자 도입에

[방법]

실험예 1에서 구축한 pRI 910 (35S-GUS) 및 control pBI 121 DNA를 이용해 *A. tumefaciens* (*R. radiobacter*) LBA4404의 형질전환한 후, 각 형질전환 아그로박테리아를 애기장대나, 토마토 및 벼에 감염시켜 각각의 형질전환 프로토콜에 따라서 형질전환체를 얻었다.

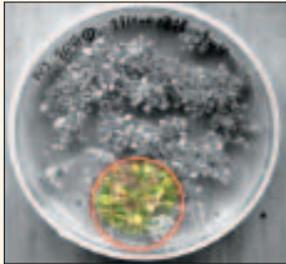
[결과]

실험한 모든 식물에서 도입 유전자의 발현이 확인되었다 (그림 5A-5C).

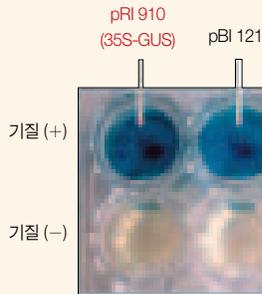
(A) 애기장대

형질전환체의 선발

pRI 910 (35S-GUS)



GUS 활성 측정



pRI 910 (35S-GUS) 및 pBI 121 모두 GUS 염색 양성인 클론을 얻을 수 있었다.

그림 5A. 애기장대에서의 유전자 도입과 GUS 염색 실험예

[참고문헌]

- 1) G. Ooms, P. J. J. Hooykaas, R. J. M. V. Veen, P. V. Beelen, T. J. G. Regensburg-Tuink, R. A. Schilperoort, (1982) *Plasmid*, 7, 15-29.
- 2) M. J. A. Groot, P. Bundock, P. J. J. Hooykaas, A. G. M. Beijersbergen, (1998) *Nature Biotech.*, 16, 839-842.
- 3) R. Nishiguchi, M. Takanami, A. Oka., (1987) *MGG* 206, 1-8.
- 4) T. Ohba, Y. Yoshioka, C. Machida, Y. Machida, (1995) *Plant J.*, 7, 157-164.

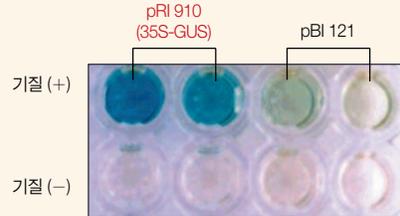
(B) 토마토

형질전환체의 선발

pRI 910 (35S-GUS)



GUS 활성 측정



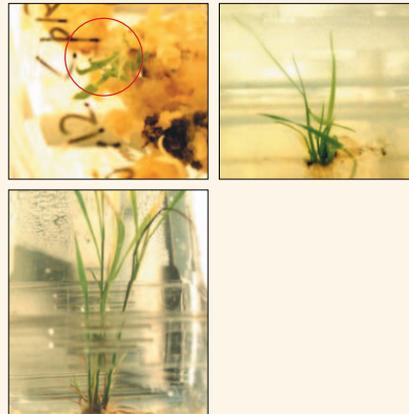
pRI 910 (35S-GUS) 및 pBI 121 양쪽 클론 모두 GUS 양성이었지만, pRI 910 (35S-GUS)에서는 2개의 클론 모두 보다 강한 GUS 양성을 나타내었다.

그림 5B. 토마토에서의 유전자 도입과 GUS 염색 실험예

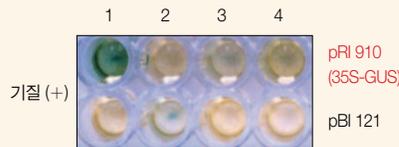
(c) 벼

형질전환체의 선발

모두 pRI 910 (35S-GUS)



GUS 활성 측정



pRI 910 (35S-GUS)에서는 4클론 중 3클론이 GUS 염색 양성을 나타내었고, pBI 121에서는 4클론 중 1클론이 GUS 염색 양성을 나타내었다.

그림 5C. 벼에서의 유전자 도입과 GUS 염색 실험예

신개념 Cloning Technology의 완결판!

In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kits

- Y 빠르고 쉽게 PCR 산물을 cloning
- Y Insert PCR fragment의 제한효소 처리 및 별도의 정제과정 불필요
- Y 염기 추가 없이 어떤 vector라도 cloning 가능
- Y 모든 DNA Polymerase 사용가능 (high fidelity polymerase 가능)

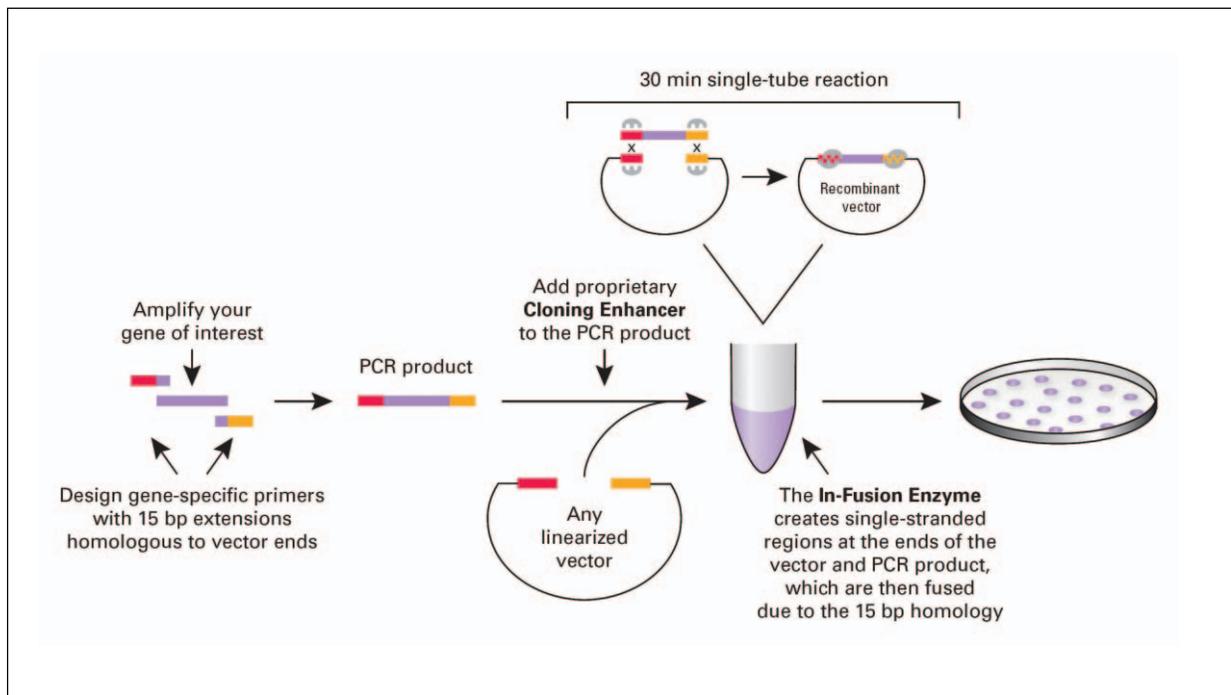


Figure 1. The In-Fusion cloning protocol.

■ <신제품> In-Fusion™ Advantage PCR Cloning Kit 시리즈

Product	Size	TaKaRa Code
In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit	10 rxns	639619
	50 rxns	639620
	100 rxns	639621
In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit w/Cloning Enhancer	10 rxns	639616
	50 rxns	639617
	100 rxns	639618
In-Fusion Advantage PCR Cloning Kit w/NucleoSpin	0 rxns	639622
	50 rxns	639623
	100 rxns	639624