외래 유전자의 고발현을 위한 식물 형질전환용 벡터
pRI 101 DNA 시리즈

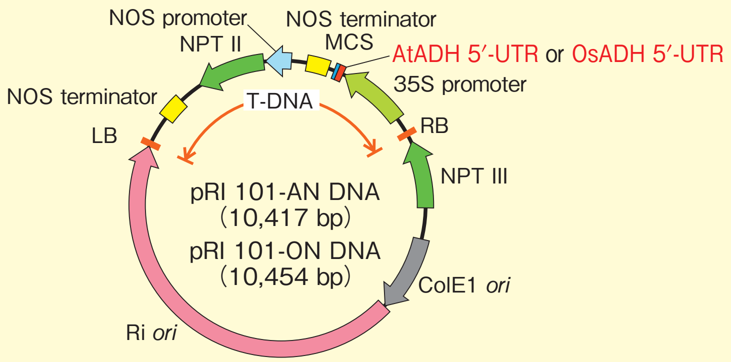
- 35S 프로모토와 ADH (Alcohol dehydrogenase) 유전자 유래의 5'-UTR을 탑재
- 5'-UTR 영역의 enhancer 기능에 의해 식물체에서 목적 유전자가 고발현됨
- 쌍떡잎식물용(-AN : 애기장대, 담배 등)과 외떡잎식물용(-ON : 벼 등)의 2 종류

유전자 재조합에 의한 식물의 형질전환이나 재조합 식물에 의한 물질생산 등은 도입한 유전자를 식물체에서 안정적으로 고발현시키는 것이 중요하다. pRI 101 DNA 시리즈는 형질전환 식물에서 외래 유전자를 고발현시키는 목적으로 사용하는 바이너리 벡터이다. ADH 유전자 유래의 5'-UTR을 탑재하고 있고, 해당 영역의 enhancer 기능에 의해 식물체에서 목적 유전자를 고발현시킬 수 있다[1).
애기장대의 ADH 5'-UTR (AtADH 5'-UTR)을 탑재한 **pRI 101-AN DNA** (TaKaRa Code 3262)와 벼의 ADH 유전자 유래 5'-UTR (OsADH 5'-UTR)을 탑재한 **pRI 101-ON DNA** (TaKaRa Code 3263) 총 2 종류가 있으며, 사용하는 식물종에 따라 선택할 수 있다(그림 1).

또한, 본 제품은 대장균에서 취급이 용이한 식물 형질전환용 바이너리 벡터 pRI 910 DNA를 기반으로 하고 있다. *Rhizobium rhizogenes* 의 Ri 플라스미드 유래 변이형 복제 기점(Ri *ori*)[2) 과 pUC계의 플라스미드와 동일한 복제 기점(ColE1 *ori*)을 보유하고 있어, 대장균에서 높은 카피수의 플라스미드로 유지되고 식물 염색체에 목적 유전자의 안정적인 재조합이 가능한 점 등의 pRI 910 DNA의 특징을 모두 가지고 있다.

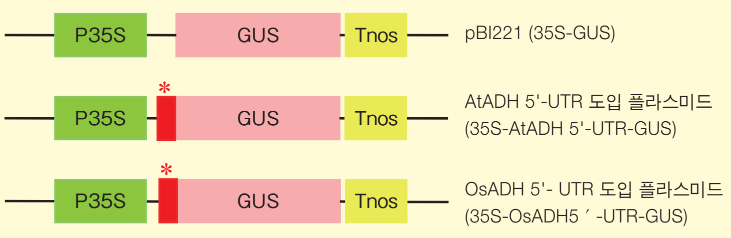
■ 실험예 1 : 5'-UTR 의 enhancer 기능 확인 (pUC계 플라스미드를 사용한 일과성 발현)

【방법】
담배 배양세포 BY-2, 애기장대 배양세포 T87 및 벼(*Oryza sativa*)의 원형질체를 조제해, electroporation법에 의해 그림 2에 표시된 GUS (β-glucosidase) 유전자 서열을 가지는 플라스미드를 도입하였다. 플라스미드를 도입 하여 16~18시간 배양후 원형질체를 파쇄하여 얻은 추출물의 GUS 활성을 측정했다. GUS 활성은 기질인 MUG (4-Methylumbelliferyl β-D-glucuronide)가 분해되어 발생하는4 MU (4-Methylumbelliferone)의 형광강도를 측정하여 수치화하였다.



Ri *ori*	: *Rhizobium* (*Agrobacterium*)으로의 복제 기점
RB, LB	: 식물체에 재조합되는 T-DNA의 border sequence
NOS promoter	: 식물에서 선택 마커 유전자 발현을 위한 프로모터
NOS terminator	: 식물에서 유전자 발현을 위한 터미네이터
NPT II	: 식물에서 선택 마커 유전자 (카나마이신 내성)
35S promoter	: 식물에서 목적 유전자 발현을 위한 프로모터 (CaMV 유래)
AtADH 5′ - UTR	: translational enhancer 영역 (pRI 101-AN)
OsADH 5′ - UTR	: translational enhancer 영역 (pRI 101-ON)
ColE1 *ori*	: 대장균에서 복제 기점
NPT III	: 대장균 및 *Rhizobium* (*Agrobacterium*)에서 선택 마커 유전자 (카나마이신 내성)

그림 1. **벡터 맵**
주) enhancer와 start codon의 위치는 translation 활성에 영향을 주는 경우가 있다 [1, 3)



P35S : 35S promoter
GUS : β - glucosidase
Tnos : NOS terminator

* { AtADH 5' - UTR : translational enhancer 영역
  OsADH 5' - UTR : translational enhancer 영역 }

그림 2. **pUC 플라스미드에 포함되는 도입 유전자**

continued...

【결과】

5'-UTR을 탑재한 pUC계 플라스미드를 이용한 경우, CaMV35S 프로모터 단독일때보다 수십배 이상의 GUS 활성을 나타냈다(그림 3).

애기장대 ADH 5'-UTR (AtADH 5'-UTR)의 경우 BY-2 세포와 T87 세포에서는 높은 활성을 나타냈지만, 벼에서는 거의 효과를 볼 수 없었다. 한편, 벼 ADH 5'-UTR (OsADH 5'-UTR)는 BY-2 세포, T87 세포에서 뿐만 아니라 벼의 원형질체에서도 효과를 나타냈다

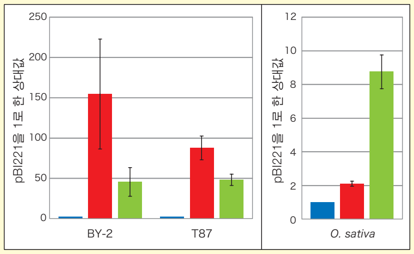
■ 실험예 2 : 식물에서 목적 단백질의 발현 (바이너리 벡터 사용)

【방법】

실험예 1과 동일하게, pRI 101-AN DNA 및 pRI 101-ON DNA에 GUS 유전자를 삽입하여 (그림 4), *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 Electro-Cells에 electroporation법으로 도입했다. 이를 통해 얻은 형질전환 agrobacterium을 이용해 담배 배양세포 BY-2를 형질전환하여 항생물질 내성으로 선발한 형질전환체에서 GUS 활성을 실험예 1과 동일한 방법으로 측정했다.

【결과】

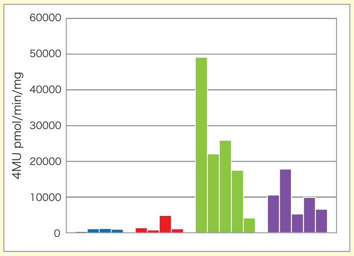
CaMV 35S 프로모터 단독의 벡터 [pBI 121 (35S-GUS) 및 pRI 910 (35S-GUS)]로 형질전환했을 경우와 비교하여, ADH 5'-UTR을 도입한 벡터에 의한 형질전환체에서 높은 GUS 활성을 발현하는 클론을 다수 취득할 수 있었다(그림 5).



- pBI221 (35S-GUS)
- AtADH 5'-UTR 도입 플라스미드 (35S-AtADH 5'-UTR -GUS)
- OsADH 5'-UTR 도입 플라스미드 (35S-OsADH 5'-UTR -GUS)

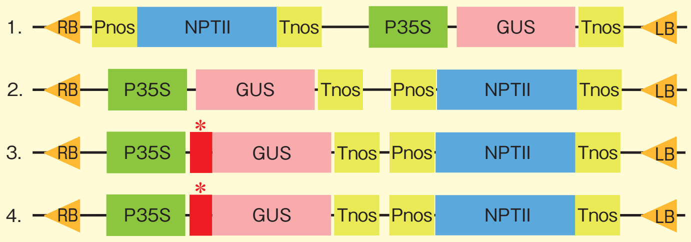
Kato, K., *et al*. (2008) *J. Bioscience and Bioengineering*., 105(3) 300~302에서 인용

그림 3. 담배 BY-2 세포, 애기장대 T87 세포 와 벼 (*O. sativa*) 세포에서의 GUS 활성 측정결과



- pBI 121 (35S-GUS)
- pBI 910 (35S-GUS)
- pBI 101-AN-GUS (35S-OsADH 5'-UTR -GUS)
- pBI 101-ON-GUS (35S-AtADH 5'-UTR -GUS)

그림 5. 형질전환한 담배 BY-2 세포에서 GUS 활성 측정결과



1. pBI 121 (35S-GUS)
2. pRI 910 (35S-GUS)
3. pRI 101-AN-GUS (35S-AtADH5'-UTR-GUS)
4. pRI 101-ON-GUS (35S-OsADH5'-UTR-GUS)

RB, LB : 식물체에 재조합되는 T-DNA의 border sequence
Pnos, Tnos : NOS promoter, NOS terminator
NPT II : 식물에서 선택 마커 유전자 (카나마이신 내성)
P35S : 35S promoter

* { AtADH 5'- UTR : translational enhancer 영역
OsADH 5'- UTR : translational enhancer 영역 }

그림 4. 형질전환용 바이너리 벡터에 포함되는 도입 유전자

■ 참고문헌

1) Sugio, T., Satoh, J., Matsuura, H., Shinmyo, A. and Kato, K.: The 5'–untranslated region of the Oryza sativa alcohol dehydrogenase gene functions as a translational enhancer in monocotyledonous plant cells. (2008) *J. Bioscience and Bioengineering*, 105(3), 300–302.

2) Nishiguchi, R., Takanami, M. and Oka, A.: Characterization and sequence determination of the replicator region in the hairy–root–inducing plasmid pRiA4b. (1987) *Molecular and General Genetics*, 206(1), 1–8.

3) Satoh, J., Kato, K. and Shinmyo, A.: The 5'–untranslated region of the tobacco alcohol dehydrogenase gene functions as an effective translational enhancer in plant. (2004) J. *Bioscience and Bioengineering*, 98(1), 1–8

■ 관련 제품

제품명	용량	TaKaRa Code
pRI 909 DNA	10 μg	3260
pRI 910 DNA	10 μg	3261
Agrobacterium tumefaciens LBA4404 Electro-Cells	40 μl × 5	9115