원예 1951-38

최 종
보 고 서

대사제어에 의한 사과당도 증진에 관한 연구

An increment of sugar content in the apple fruit
by the metabolic engineering

연 구 기 관

한 국 과 학 기 술 원

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “대사제어에 의한 사과당도 증진에 관한 연구”의

최종보고서로 제출합니다.

1998. 12. 28.

주관연구기관명 : 한국과학기술원
총괄연구책임자 : 정 원 일
연 구 원 : 김 인 중
연 구 원 : 오 동 하
협동연구기관명 : 원예연구소
협동연구책임자 : 신 용 억
연 구 원 : 송 관 정
연 구 원 : 전 지 혜

요 약

사과는 우리 나라에서 몇 안 되는 국제 경쟁력이 있는 원예 작물이다. 그러나 영년생 목본성 작물이기 때문에 사과의 품종 개량은 어렵고 시간이 많이 걸린다. 최근 분자생물학과 식물 형질 전환 기술의 발달로 식물체에 특정 유전자를 도입하거나 그 활성을 조절하는 것이 가능하게 되었다. 본 연구에서는 이러한 분자 육종학적 방법을 써서 사과의 탄수화물 대사 과정을 조작함으로써, 사과 과일의 품질을 결정하는 중요한 요소인 당도를 높인 형질 전환 사과를 개발하는 것을 목표로 하였다.

ADP-glucose pyrophosphatase(AGPase)는 glucose를 starch 생합성의 precursor인 ADP-glucose로 변화시켜주는 enzyme으로서, 이 효소의 활성을 저해할 경우, 식물의 starch 함량은 줄어들고 sucrose가 축적될 것으로 예상된다. 따라서 본 연구에서는 사과의 당도를 높이기 위해 사과에서 AGPase의 활성을 줄이는 방법을 택하였다.

AGPase의 활성을 조절하기 위해, 우선 사과 과육에서 AGPase의 large subunit과 small subunit을 code 하는 각각의 유전자를 cloning 하였다. Cloning 한 AGPase 유전자를, 식물 virus 유래의 promoter인 35S promoter를 갖고 있는 plasmid에 antisense 방향으로 도입하여, 사과의 형질 전환을 위한 vector를 만들었다.

이 형질 전환용 vector를 사과 식물체에 도입하기 위해, Agrobacterium 감염에 기초한 사과 식물체 형질 전환 방법을 확립하였으며, 성공적으로 형질 전환된 사과 식물체를 얻을 수 있었다.

그런데 형질 전환 방법을 확립하기 위한 vector에서 사용한 35S promoter는 non-specific promoter이기 때문에 사과 식물체의 모든 조직에서 AGPase 활성을 저해하게 된다. 이는 자칫 사과 식물체 전체의 성장, 영양의 균형 파괴를 초래할 수도 있다. 사과 과육에서만 특이적으로 AGPase의 활성을 저해하여 당도를 높이기 위해서는, 사과 과육에서만 특이적으로 강하게 발현하는 promoter의 개발이 필요하다. 이를 위해 사과 과육 특이적으로 다량 발현하는 단백질을 분리하고 그 단백질을 code하는 유전자를 찾고자 하였다. 사과 과육과 잎의 전체 단백질을 분석한 결과 31kDa의 과육 특이적인 단백질을 분리했고 그 유전자를 cloning하였으며 이 단백질이 PR5/TL(pathogenesis-related group 5/thaumatin-like) 단백질 중의 하나임을 밝혀내어 Mdtl1(Malus domestica thaumatin-like protein 1)로 명명하였다. Mdtl1은 mRNA 단계에서 보았을 때, 과육에서 특이적으로 강하게 발현되었으며, 특히 과일이 익어가면서 점점 더 강하게 발현되었다. Mdtl1은 genome 상에서 1 copy로 존재하는 것으로 추정되어, 그 promoter를 분리하여 사과 과육에서 유전자 조작을 하기 위한 promoter로 사용할 수 있을 것으로 생각한다.

SUMMARY

Apple is an economically important crop in Korea. But breeding of apple is a very difficult and time-consuming job because apple is an woody plant. In this research, we used genetic engineering techniques to increase the sweetness, an important quality in apple fruit, of apple fruit by changing the sugar metabolism pathway.

To achieve this goal, we first cloned the ADP-glucose pyrophosphatase(AGPase) gene. AGPase is a key enzyme which converts glucose to ADP-glucose, the precursor for starch synthesis. By down regulating this enzyme, it is expected that the starch content of apple fruit will decrease and the sucrose will be increased in the fruit.

Using the cloned AGPase genes, we constructed apple transforming vectors which had the AGPase gene in the antisense direction and a strong CaMV 35S promoter. To introduce these antisense AGPase genes to apple plant, we developed an agrobacterium-mediated transformation method for apple and produced successfully transformed apple plants.

The 35S promoter we used to develop the transformation protocol is a non-specific promoter and may decrease the AGPase activity in every part of the apple plant. To regulate the AGPase activity specifically in fruit tissue only, we need a strong apple fruit-specific promoter. In order to develope an apple fruit-specific promoter, we sought a gene which expressed exclusively and strongly in fruit tissue, by comparing the whole protein from the apple leaf and fruit tissue. We isolated a pathogenesis-related group 5/thaumatin-like protein and cloned the gene coding this protein. The gene was named Mdtl1(*Malus domestica* thaumatin-like protein 1). Mdtl1 was strongly expressed specifically in fruit tissue and accumulated during fruit ripening. Mdtl1 existed as one copy in the apple genome. We are now trying to isolate the promoter region of Mdtl1.

CONTENTS

목 차

서 론

사과는 우리 나라의 주요 원예 과수 작물로 국제 경쟁력이 있는 몇 안 되는 작목이다. 다른 작물도 그러하지만 사과의 경우 그간의 교배 육종의 결과 맛과 저장성 등 품질이 크게 개선되었다. 하지만 사과는 목본성 작물이므로, 새로운 품종을 육성하는 데 최소한 10년 이상의 긴 기간이 요구되어 새로운 품종의 육성이 매우 어려운 작물이다.

최근 생화학의 발달로 과일의 단맛과 저장성을 지배하는 주요 metabolic pathway가 알려지게 되었고, 또 분자생물학의 발달로 이들 pathway에서 key role을 수행하는 유전자도 비교적 손쉽게 cloning 하는 기술도 개발되었다. 그리고 또, 식물 조직배양기술의 발달로 외래 유전자를 식물체에 도입시키는 기술도 개발되었다.

이에 본 연구에서는 사과를 공시재료로 하여, 사과의 품질결정요소 가운데 매우 중요한 factor인 단맛이 증진된 사과를 생산할 수 있는 사과 품종을, biotech 기법을 이용하여, 육성하고자 했다.

주지하는 바와 같이, 사과를 비롯한 장미과 식물에서는 잎에서 생산된 탄수화물이 주로 sorbitol의 형태로 sink 기관인 과일로 전류 되지만, 여러 단계의 변형을 거쳐 sucrose, fructose, glucose는 물론 starch의 형태로 과일에 저장되게 된다. 그런데 이때 sucrose와 fructose는 단맛을 내는 탄수화물이지만, glucose와 starch는 단맛을 내지 못한다. 따라서 유전자조작 기법을 이용하여 과일 내의 starch 함량을 최소화시키면 sucrose 와 fructose의 함량이 증가되어 과일의 단맛이 증진된 사과를 생산할 수 있는 품종을 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

따라서 본 실험에서는 glucose가 starch로 전환되는 과정에서 key role을 수행하는 것으로 알려진 AGPase의 활성을 과일에서만 특이적으로 억제시키는 연구를 수행하였으며, 이를 위해 AGPase 유전자의 분리와 발현 제어용 vector의 개발, 사과의 형질전환체 생산과 확인 시스템 개발 및 사과 과육에서만 AGPase의 활성을 제어할 수 있는 사과 과육 특이 발현 promoter의 개발 등 크게 3 부분으로 나누어 연구를 진행시켰다.

제1장 AGPase 유전자의 분리와 발현제어용 vector의 제작

제1절 연구목적 및 연구 내용

사과를 비롯한 장미과 식물에서는, 잎에서 광합성 작용에 의해 만들어진 탄수화물은 주로 sorbitol의 형태로 과일에 전류된 후, 여러 단계를 거치는 과정에서 다양한 효소의 도움을 받아 탄수화물의 일부를 starch의 형태로 sink 기관인 과일에 저장한다(그림 1). 주지하는 바와 같이 starch는 glucose가 중합된 것으로, 이 반응에는 glucose에 ATP를 붙여 ADP-glucose로 만드는 과정이 필요한데, AGPase(ADP-glucose pyrophosphorylase)가 이 과정에서 key role을 하는 효소이다(그림 2).

따라서 사과(과일)에서 AGPase의 활성이 down regulation되게 유전자조작을 가한다면, 과일 내에는 단맛이 없는 starch가 줄어드는 대신, sucrose나 fructose와 같은 단맛을 내는 탄수화물의 량이 증가될 것으로 사료된다. 이에 본 실험에서는 사과의 AGPase를 code하는 유전자를 cloning하고, 그것이 과일에서 down regulation되게 조작된 DNA를 사과 식물체에 재도입시키기 위한 vector의 제작에 연구의 목적을 두었다.

제2절 연구 방법

앞에서 언급한 연구 목적을 달성하기 위해 다음과 같은 연구 방법을 사용하였다.

1. Total RNA의 분리

Clonetech의 Extract-A-Plant™ Kit의 방법을 변형시킨 hot-phenol method로 RNA를 분리하였다. 개화하여 6주 된 사과를 채취하여 씨를 분리하고 과육 만을 -70℃에 저장해 두었다가 공시재료로 사용하였다. 즉, 두 개의 250ml centrifuge bottle에 citrate buffer(pH 5.2)로 equilibration된 phenol과 extraction buffer를 50mL 씩 넣어 섞고 80℃로 데워 놓는다. 그리고 저장해둔 사과 과육 50g을 취하여 액체 질소를 부어 가며 막자와 막자 사발로 갈아 powder 상태로 만들고, 미리 데워 놓은 phenol과 extraction buffer가 들어있는 bottle에, bottle 당 25g씩 빠르게 옮긴다. 30초간 vortexing 하여 섞어준 다

음, 같은 부피의 chloroform : isoamyl alcohol (24:1)을 넣고, 다시 30초간 vortexing 한다. 4℃, 10,000×g에서 15분간 원심분리한 후, 상층액을 조심스럽게 분리하여 새 bottle로 옮기고, 1.1배 부피의 4M LiCl를 첨가하여 섞어준 다음, -70℃에서 하룻밤 방치한다. 다시 4℃, 10,000×g에서 15분간원심분리하여 RNA를 침전시키고 70% ethanol로 한 번 washing해서, 진공에서 잘 말린 다음 500ul의 DDW에 녹였다. TBE(0.09M Tris-Borate, 1mM EDTA) buffer로 만든 1.0% agarose로 전기영동하거나 spectrophotometer로 260nm에서 absorbance를 측정하여 정량한다. RNA를 다루는 모든 실험에서 유리 기구는 200℃에서 12시간 동안 열처리하여 사용하였으며, 플라스틱 기구와 모든 시약에는 DEPC를 처리하여 RNase activity를 제거하였으며, 실험 도중에도 RNase에 의한 오염에 극도로 주의하였다.

2. mRNA 분리

Total RNA로부터 Promega의 PolyATtract® mRNA isolation system III kit을 이용하여, instruction에 따라 mRNA를 분리하였다.

3. cDNA library 제작

Stratagene의 ZAP-cDNA® kit를 이용하여 cDNA library를 만들었다. First strand cDNA 합성은 실험 2에서 분리한 5ug의 mRNA를 template로 하여, reverse transcriptase(100U/ul)을 첨가하고 37℃에서 1 시간 동안 반응시켰다. 이렇게 만들어진 first strand cDNA에 RNase H(1.0U/ul), DNA polymerase Ⅰ(5.6 U/ul), dNTP를 첨가하여 16℃에서 2.5hr 동안 second strand DNA를 합성하였다. 그리고 이 cDNA에 blunting dNTP, pfu DNA polymerase를 첨가하고 72℃에서 30min. 반응시켜 blunted cDNA termini를 제작한 후, EcoRⅠ adaptor를 ligation하고, T4 polynucleotide kinase(10U/ul)로 EcoRⅠ adapter ends를 kination시킨 후 XhoⅠ(4U/ul)로 절단하여 Uni-Zap XR vector 에 연결하였다. 끝으로 vector에 연결된 cDNA를 packaging시켜 cDNA library를 제작하였다.

4. Primer 제작 및 RT-PCR.

이미 보고된 여러 다른 식물 AGPase의 large subunit와 small subunit를 code하는 유전자들의 상동성 비교를 통해, 비교적 잘 보존된 부위에 해당하는 곳에서 downstream과 upstream primer로 20-mer oligonucleotide를 합성하였다(그림 3). 그리고 실험 2의 방법

에 의해서 분리한 mRNA에 reverse transcriptase를 첨가하고 37℃에서 30min 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 template로 하여 PCR(94℃→55℃→72℃, 35 cycle)을 수행하였다(그림 4).

5. AGPase 유전자 단편의 subcloning

실험 4에서 PCR하여 얻은 DNA 절편을, GeneClean kit(Bio101)를 사용하여 추출해 낸 다음, 통상적인 방법으로 pGEM-T® vector에 삽입하여 subcloning 하였다. 이 plasmid를 *E. coli* (JM109)에 transformation 시키고, LB(+ampicillin) plate에서 insert가 들어간 vector에 의해 transformation된 colony를 선발한 후, 37℃ shaking incubator에서 12 16hr. 배양시켰다. Promega의 Wizard MiniPrep kit를 써서 plasmid DNA를 분리하고 EcoR Ⅰ, Xho Ⅰ 또는 Sph Ⅰ, Sal Ⅰ 으로 이중절단하여 확인하였다. USB사의 sequenase version 2.0 DNA sequencing kit를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

6. Probe 제작

Promega의 Prime-a-Gene system을 사용하여 [α-*32*P]로 label 된 probe를 제작하였다. dCTP와 dDTP(dATP, dGTP, dTTP의 mix)를 nucleotide로 사용하였으며, Klenow fragment를 polymerase로 사용하여 probe를 합성하였다. 실험 5에서 AGPase gene으로 확인된 subcloned DNA fragment를 다시 제한 효소로 이중 절단하고 elution해서 그 중 25μg를 100℃에서 2분 가열하여 denaturation 시켰다. 여기에 labeling 5× buffer, mixture of unlabeled dDTP, acetylated BSA, [α-32P]dCTP를 첨가하고 Klenow enzyme으로 room temperature에서 1hr 동안 반응시켰다. 반응 후 100℃에서 2분 가열해 denaturation 시킨 다음 바로 얼음에 옮겨 두었다가 EDTA를 final 1mM 농도로 첨가하여 probe로 사용하였다.

7. Plaque hybridization에 의한 AGPase gene cloning

실험 3에서 제작한 사과 cDNA library로부터 full AGPase gene을 cloning 하기 위해 실험 6에서 만든 Probe를 사용하여 통상적인 방법으로 first screening과 second screening을 통해 AGPase gene을 갖는 plaque를 선별하였다(그림 5). Stratagene의 ZAP-cDNA® kit에서 제공하는 방법대로 *in vivo* excision에 의해 선별된 plaque에서 plasmid 형태로 DNA를 분리하고 *Eco*R Ⅰ, *Xho* Ⅰ로 이중절단하여 insert DNA의 크기를 확인하고, 실험 4에서 만든 primer로 PCR을 수행하여 이 DNA가 AGPase gene이 맞는

지 확인하였다.

8. AGPase 유전자의 sequencing

실험 7에서 얻은 AGPase gene을 여러 종류의 제한 효소를 사용하여 fragment들을 만들고 그들을 각각 pBluescript vector에 subcloning 하거나, 또는 Promega의 Erase-A-Base system을 사용하는 방법을 써서 sequencing에 적합한 크기로 절단하였다. 절단된 각 조각들은 각각 USB의 sequenase version 2.0 DNA sequencing kit를 이용하여 염기서열을 분석하였다(그림 6과 7).

9. 식물형질전환용 vector 제작

AGPase의 small subunit를 code하는 유전자의 경우, 식물의 형질전환에 많이 사용되는 binary vector인 pBI121 을 XhoI과 Sma I 으로 처리하여 GUS gene을 제거하고, 그 자리에 실험 7에서 cloning한 AGPase 유전자를 Antisense 방향으로 끼워 넣는 방법으로 식물 형질전환용 vector를 제작하였다(그림 8). 그리고, large subunit를 code하는 유전자의 경우, 제초제 내성 유전자인 bar gene을 selection marker로 이용하기 위해 bar gene을 하나 더 삽입하였다(그림 9).

제3절 연구 결과 및 고찰

앞에서 설명한 연구 방법에 따라 실험을 수행한 결과, 연구 목적에서 언급한 AGPase를 code 하고 있는 유전자를 분리해낼 수 있었다(그림 6과 7). AGPase는 large subunit 2개와 small subunit 2개가 모인 heterotetramer로 작용하는데(그림 2), 본 실험에서는 large subunit을 code하는 유전자와 small subunit을 code하는 유전자를 각각 1개씩 분리하였다. Large subunit을 code하는 유전자는 2366개의 염기쌍으로 되어 있었고, 1551개의 염기쌍으로 된 ORF(open reading frame)을 갖고 있었다(그림 7). 그리고 small subunit을 code 하는 유전자는 1794개의 염기쌍으로 되어 있고 1548개의 염기쌍으로 된 ORF를 갖고 있었다(그림 6).

사과 식물체에 존재하는 AGPase의 활성을 down regulation 하기 위해, 위에서 얻은 AGPase gene들을 antisense 방향으로 식물형질 전환용 vector에 삽입시켰다. 즉, AGPase의 small subunit을 code하는 gene은 pBI121 vector의 GUS gene 자리에 antisense 방향으로 삽입시켰다(그림 8). 그리고 large subunit을 code하는 유전자의 경우, 같은 방법으로 pBI121 vector에 삽입한 후, 형질전환체의 selection marker로 사용하

기 위해 제초제 내성 유전자인 bar gene을 한 번 더 삽입시켰다(그림 9). 그리고 이들 vector들을 사과의 형질전환체 유도에 사용하였다.

제2장 사과의 형질전환체 생산

제1절 연구목적 및 연구내용

서론에서 언급한 바와 같이 사과는 우리 나라에서 재배되는 원예작물 중에서 국제 경쟁력이 있는 몇 안 되는 작물이지만, 신품종의 육성에 오랜 기간을 요하는 목본성 작물인 관계로 육종이 매우 어렵다.

최근 분자생물학과 식물조직배양기술의 발달로 특정 유전자를 식물체에 직접 도입할 수 있는 길이 열렸으며, 이 기술이 육종 연한을 크게 단축할 수 있을 것으로 사료되어, 분자 육종가들은 이 기술의 발전에 크게 관심을 갖고 있다.

이에 본 연구에서는 제 1장에서 언급한 바와 같이, 사과 품질 평가의 주요 요소인 단맛을 control 할 것으로 사료되는 AGPase의 활성을 조절하기 위한 수단으로, 사과의 antisense AGPase gene을 사과에 재도입시키는 방법을 확립하고자 한다.

제2절 연구방법

사과의 antisense AGPase gene을 사과에 재도이하기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

1. 사과 형질전환체 유도

가. Agrobacterium 준비

목적 유전자의 벡터(그림 8과 9)를 갖고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 kanamycin(50㎎/ℓ)이 들어 있는 액체 YEB배지에서 24시간 진탕 배양하고, 원심분리(7,000rpm, 10분간)하여 Agrobacterium을 회수한 후, 다시 MS(LS) 액체배지(Acetosyringone(AC), 0.1mM, Betaine 1.0mM 함유)에 녹여 OD600 0.7정도가 되도록 희석하였다.

나. 사과 잎의 준비

1)갈라 품종 : 4주 간격으로 계대배양하여 증식 중인 신초로부터 전개 직전의 잎을 채취하였다.

2)후지 및 M.W. 품종 : 4주 간격으로 계대배양한 증식 중인 신초를 발근배지에 옮겨 발근을 유도하고 새로이 전개된 어린 잎을 채취하였다.

다. 접종 및 공조배양

준비된 잎에 nontraumatic 핀셋을 써서 상처를 낸 후, Agrobacterium용액에 5-10분간 침적시키고 멸균된 여과지로 여분의 용액을 제거하였다. Gelite로 만든 고체 LS 배지(TDZ 2㎎/ℓ, AC 0.1mM, Betaine 1.0mM 첨가)에서 앞면이 위로 향하도록 치상하여 암상태, 25℃, 3일간 배양하였다.

라. 재분화

공조배양 후 잎을 꺼내 액체 MS배지(Cefotaxime 500ug/ml)에서 10분간 제균하였다. 멸균된 여과지로 용액을 제거하고 moist chamber에서 잎을 3등분한다. 항생제가 첨가(Cf 350, Km 75ug/ml)된 고체 MSLS(TDZ 2㎎/ℓ, IBA 0.3㎎/ℓ)에서 잎의 뒷면이 위로 향하도록 치상하여 3주간 25℃에서 암배양 하였다. 약광 태 2주 배양 강광 상태에서 배양을 계속하여 신초 재분화를 유도하였다.

마. 재분화 신초의 증식 및 발근 유도

재분화 신초는 Cefotaxime 250ug/ml이 첨가된 사과 증식배지(MS+BA 1.0mg/ℓ + IBA 0.3mg/ℓ +GA 0.5mg/ℓ)에서 증식을 유도하였다. 증식된 신초를 Kanamycin 20ug/ml이 첨가된 사과 발근배지에서 발근을 유도하였다.

2. 사과 형질전환체 확인

가. 식물체 순화 및 육묘

증식된 신초를 기내접목하고 순화하여 식물체의 생장을 촉진시켰다.

나. 육묘된 식물체로 부터의 DNA 추출

관행의 DNA추출법에 의하여 수행하였다.

다. Agrobacterium으로부터 plamid DNA 추출

AGPase antisense가 들어있는 plasmid를 지니고 있는 Agrobacterium을 alkaline lysis법을 이용하여 plasmid를 분리 및 DNA를 추출하였다.

라. PCR 반응

1) 반응용액 조성(100㎕) : DNA 50ng, primer 2㎕, buffer 10㎕, 1mM dNTP 20㎕, 25mM MgCl2 10㎕, BSA 1㎕, Taq DNA polymerase 5unit, dH2O
2) PCR condition : 30cycles(95℃ 1분30초, 45℃ 1분30초, 72℃ 1분30초)후 최종 extension 72℃ 10분

마. 특정밴드 확인

0.8% agarose gel상에서 90분 running후 ethidium bromide로 염색하여 transilluminator로 밴드를 확인하였다.

제3절 연구결과 및 고찰

1. 형질전환체 재분화 유도

연구방법에서 언급된 사과 형질전환체 유도법에 따라 잎으로부터 형질전환 추정의 신초 재분화를 유도하였다(그림 10).

2. 신초의 발근 유도

재분화된 신초를 항생제(20㎍/ml Kanamycin)가 함유된 배지에서 발근을 유도하였다(그림 11).

3. 식물체 순화 및 육묘

재분화 신초를 기내 접목하여 식물체를 양성하고 순화한 후, 격리실험실에서 육묘과정을 거쳤다(그림 12와 13).

4. DNA 추출 및 PCR을 통한 삽입유전자 확인

육묘과정의 식물체로부터 DNA를 추출하고 NPTII(Kanr) 유전자 부위를 증폭하는 20mer primer를 합성하여 PCR 분석을 수행한 결과 3개의 식물체에서 800bps 크기의 특정 밴드를 확인하였다(그림 14). 또 AGPase 유전자 부위를 증폭하는 20mers primer를 합성하여 PCR 분석을 수행한 결과에서는 3개 식물체중 한 개에서만 350bps 정도 크기의 특정 밴드를 확인하였다(그림 15).

이상의 결과로 보아(그림 14와 15), 본 연구를 통해 사과의 형질전환기술이 국내에서도 확립되었음을 확인하였다. 조직배양 기술의 발달로 벼를 비롯한 초본성 작물에서는 외래 유전자의 도입법이 보편화되고 있지만, 사과를 비롯한 목본성 작물에서는 외래 유전자의 도입이 쉽지 않다. 사과의 경우 미국과 일본 등 이 분야에 앞선 극소수의 연구실들을 제외하고는 사과에 외래 유전자를 도입했다는 보고가 없다.

본 연구를 통해 국내에서도 사과의 형질전환 기술이 확립되었으므로, 앞으로 외래 유전자의 도입에 의한 사과의 분자 육종 기술 발달에 기대되는 바가 크다.

제3장 과일특이 발현 단백질과 유전자의 분리.

제1절 연구목적 및 연구 내용

사과의 AGPase activity를 사과 과육에서만 효과적으로 조절하기 위해서는, 사과 과육에서 특이적으로 강하게 발현하는 promoter가 필요하다. 본 연구에서는 사과 과육에서 특이적으로 강하게 발현하는 promoter를 분리하기 위해, 우선 사과 과육에서만 특이적으로 발현하는 단백질을 분리하고 그 단백질을 code하는 유전자를 cloning 하였다. 이어 사과 과육에서 만든 genomic DNA library에서 이 유전자를 code 하는 genomic DNA의 fragment를 찾아내어, 그 promoter 부분을 분리해내는 것이 본 연구의 목적이다. 분리된 promoter를, 앞서 만든 식물형질전환용 vector에서 AGPase를 antisense 방향으로 삽입한 바로 앞부분, 즉 35S promoter의 자리에 끼워 넣으면, 그 vector를 이용해 좀더 효과적으로 사과 과육에서만 AGPase activity를 down regulation 할 수 있게 될 것이다.

제2절 연구방법

위의 연구목적을 효율적으로 수행하기 위해 다음과 같은 실험 방법을 사용하였다.

1. Total protein extraction

Harkman, W. J. and Tanaka, C. K. (1986)의 방법을 변형시킨 방법으로 사과의 과육과 잎으로부터 각각 protein을 추출하였다. 즉 20g의 사과 과육과 10g의 사과 잎 조직을 액체질소로 막자와 막자사발로 곱게 간 다음, 250ml centrifuge bottle로 옮기고 5배 volume의 extraction buffer(0.7M sucrose, 0.5M Tris-HCl, 30mM HCl, 50mM EDTA, 0.1M KCl, 2%(v/v) 2-mercaptoethanol, 12mg/ml polyvinylpolypyrrolidone)를 넣어 4℃에서 10분 방치해 녹인다. 여기에 같은 부피의 water-saturated phenol을 넣고 10분간 흔들어 섞고, 4℃, 10,000×g 15분 centrifugation 한 다음, 단백질이 녹아 있는 phenol phase를 조심스럽게 새 bottle로 옮긴다. 한 번 더 같은 방법으로 extraction buffer로 extraction 하고, phenol phase를 분리해 새 bottle로 옮기고, 여기에 5배 부피의 0.1M NH4OAC (in methaol)을 넣고 -20℃에서 하룻밤 방치해서 단백질을 침전시켰다. 이를 4℃, 10,000×g 15분 centrifugation 해서 pellet을 0.1M NH4OAC (in methaol)로 3회,

80% acetone으로 1회 washing 한 다음, 진공 상태에서 pellet을 완전히 말리고, 500ul의 DDW에 녹였다.

2. SDS-PAGE

분리한 단백질을 Bio-Rad의 Mini-Protein® II 2-D Cell system을 이용하여 각 sample 10 15μg을 isoelectric focusing과 SDS-PAGE로 2 dimensional gel electrophoresis를 수행하였다. 이렇게 얻어진 사과의 과육과 잎 조직의 2-D 결과를 비교해서 사과에서만 특이적이면서, 우세하게 발현되는 단백질 spot을 찾아내어(그림 16), 그 spot을 gel로부터 잘라낸다. 잘라낸 조각들을 모아, 15% acrylamide로 만든 SDS-PAGE gel 위에 얹고 다시 전기 영동한 다음, Hoefer 사의 TE22 Mighty Small Transphor system을 써서 단백질을 PVDF mambrane으로 electrotransfer하였다. N-terminal sequencing은 기초과학센터에 의뢰하여 수행하였다.

3. primer 제작

위에서 분리한 31kDa 단백질의 N-terminal 아미노산 서열(그림 17, 제일 윗줄 서열)은, 이미 보고된 plant pathogenesis-related protein group 5/thaumatin-like protein 들과 높은 homology를 나타내고 있어, 31kDa 단백질이 이 group에 속하는 단백질일 것으로 예상되었다. 따라서 31kDa 단백질을 coding하는 유전자를 cloning 하기 위해, 이미 알려진 N-terminal 아미노산 서열로부터 degenerated primer를 예측해내는 한편, 또 이미 알려진 pathogenesis-related protein group 5/thaumatin-like protein들을 multiple alignment 하여 homology가 특히 높은 부분으로부터 primer를 제작하였다(그림 18).

4. 유전자 cloning

우선 31kDa 단백질을 coding 하는 유전자를 cloning 하기 위한 probe 제작을 위해서, RT-PCR(Reverse Transcription - Polymerase chain reaction) 방법을 썼다. 즉, 다음과 같이 사과 과육에서 mRNA를 뽑아 first strand cDNA를 만들고, 위에서 만든 primer로 PCR을 수행하여 probe를 얻었다.

제1장의 실험 1, 2와 같은 방법으로 사과 과육에서 mRNA를 분리한 다음, 그 중 1μg을 취해 GibcoBRL의 SuperscriptTM II RT system과 random hexamer를 primer로 써서 42℃에서 first strand DNA를 합성하였다. 2μℓ의 first strand DNA에 50 pmol degenerated primers, 2μℓ 2.5mM dNTP, 2.5μℓ 10× Taq. reaction buffer, 1U Takara

Taq polymerase를 넣고 25㎕로 volume을 맞춘 다음 Perkin Elmer GeneAmp® PCR을 써서 94℃ 5분 predenaturation 후, 94℃ 30초, 54℃ 30초, 72℃ 30초로 33 cycle을 돌려 PCR을 수행하여 PCR product를 얻었고(그림 19), 이를 pGEM-TEasy vector에 cloning 하고 sequencing 하여 TL(thaumatin-like) gene임을 확인했다. 이미 만들어진 사과 과육 cDNA library에서 위에서 기술한 방법으로 plaque hybridization을 수행하여 유전자를 cloning 하였으며, 이미 sequencing이 된 PCR fragment로부터 다섯 종류의 sequencing primer를 합성해서, 이를 이용해 전체 유전자의 sequencing을 마쳤다(그림 20).

5. Northern blotting

위에서 분리한 TL 유전자의 발현 양상을 조사하기 위해, 통상의 방법으로 northern blotting을 수행하였다. 즉 어린 잎과 성숙한 잎을 채취하고 개화 후 3주된 사과(지름 1.5cm)에서부터 한달 간격으로 사과를 채취하여, 그들로부터 각각 앞에서 기술한 방법으로 RNA를 분리했다. 분리한 RNA를 6ul DDW, 12.5ul Formamide, 2.5ul 10×MOPS buffer(0.2M MOPS, 0.5M Sodium Acetate, 0.01M EDTA, pH 7.0), 4ul Formaldehyde에 녹이고 1×TBE buffer로 만든 1.0% agaraose gel에 걸어 purity와 양을 측정했다. 각 sample 당 약 5ug 정도의 RNA를 65℃에서 5분 incubation 하여 denaturation 한 다음, 1g agarose, 10ml 10×MOPS buffer, 73ml DDW, 17ml formaldehyde(formaldehyde는 독성이 강하므로, 다른 것들을 먼저 모두 섞어 열을 가해 녹였다가, 적당히 식었을 때 hood 안에서 재빨리 섞어서 gel을 만든다)로 만든 gel에 걸어 3 4V/cm의 전압을 걸어 전기 영동을 수행했다.

전기 영동이 끝난 gel에서 통상의 capillary blot 방법으로 nitrocellulose membrane으로 RNA를 transfer했다. UV를 쬐여 RNA를 membrane에 crosslinking 시킨 다음, prehybridization solution(12.5ml 20×SSPE, 5ml 50×Denhert solution, 2.5ml 10% SDS, 100ul 10mg/ml salmon sperm DNA, 25ml formamide, 5ml DDW/total 50ml)에 넣어 42℃에서 약하게 흔들어 주면서 pre-hybridization을 하면서, 앞에서 기술한 방법 대로 cloning 된 TL 유전자의 ORF(open reading frame)으로 probe를 만들었다. 1 2시간 prehybridazation을 수행한 다음, probe를 넣고 42℃에서 계속 12시간 이상 hybridization 을 시켰다. Hybridization이 끝나면 hybridization solution을 조심스럽게 버리고, 2×SSPE, 0.1% SDS로 RT에서 10분씩 2회, 1×SSPE, 0.1% SDS로 65℃에서 15분씩 1회, 0.1×SSPE, 0.1% SDS로 65℃에서 10분씩 2 3회 washing 하여 binding 하지 않은 probe를 씻어내고 X-ray autoradiography로 northern blotting의 결과를 보았다(그림 21). 18S rRNA로 만든 probe를 써서 각 lane마다 동량의 RNA가 걸렸는지도 확인하였다.

6. Southern blotting

분리한 TL 유전자가 genome 속에 몇 개의 copy로 존재하는가를 보기 위해, Southern blotting을 수행하였다. 10g의 사과 어린 잎을 액체 질소를 부어 가며 잘게 갈아 powder로 만든 다음, 50ml centrifuge tube에 넣고 40ml의 통상의 extraction buffer와 섞어주었다. RT에서 1시간 incubation 후 final 6%(w/v)이 되도록 PVP-10을 넣고, 다시 1.5배 부피의 7.5M ammonium acetate를 넣고 얼음 속에서 30분 방치했다가 4℃, 10,000×g 에서 15분간 centrifuge 하여 단백질들을 침전시켰다. 그 상등액을 분리하여 새 tube에 옮기고 같은 부피의 2-propanol을 첨가해 -20℃에 10분 방치했다가 4℃, 10,000×g 에서 15분간 centrifuge 하여 이번에는 nucleic acid를 모두 침전시켰다. pellet을 5ml의 DDW에 녹인 다음 RNase를 적당량 첨가하고 37℃에서 15분 정도 incubation 해서 RNA를 제거했다. 남아 있는 단백질과 phenolic compund를 제거하기 위해, 같은 부피의 chloroform:isoamyl alcohol(24:1)로 두번 extracton 했다. 다시 2-propanol로 한번 concentration 해서 0.5 1ml의 DDW에 최종적으로 녹였다.

이렇게 녹인 genomic DNA 10ug 씩을 각각 Apa1 + Sac1, EcoR1, Hind3, Xho1 + Xba1으로 complete digestion 시킨 다음, 0.8% agarose gel에 걸어 2V/cm의 낮은 전압으로 천천히 전기 영동 했다. 전기 영동이 끝난 gel은 EtBr로 staing하여 사진을 찍어두고, Denaturing solution(1.5M NaCl, 0.5M NaOH)에 30분, Neutralization solution(1M Tris-HCl, pH 8.0, 1.5N NaCl)에서 15분 담구어 둠으로써 gel에 들어있는 genomic DNA를 denaturation 시켰다. 그런 다음 northern blotting을 수행할 때와 같은 방법으로 capilliary transfer에 의해 nitrocellulose membrane에 옮기고 TL 유전자의 ORF나 *Pst*1으로 digestion 시킨 3`-UTR region으로 probe를 만들어 hybridization을 수행했다(그림 22).

제3절 연구결과 및 고찰

사과 과육과 잎으로부터 total protein을 뽑아 2D gel에 걸어보았을 때, 31kDa의 단백질이 과육에서 특이적으로 많이 발현됨을 알 수 있었다(그림 16). 이 단백질의 N-terminal sequence를 분석한 결과, 이 단백질은 PR-5/TL 단백질들과 높은 homology를 나타내었다(그림 17). 분석된 N-terminal sequence와, 이미 밝혀진 PR-5 단백질들의 multiple sequence alignment를 수행하여 높은 homology를 보이는 부분의 sequence로부터 primer를 합성(그림 18)하여 RT-PCR을 수행한 결과, 약 400bps의 PCR fragment를 얻어 subcloning 할 수 있었고(그림 19), sequencing 결과 이 fragment는 밝혀진 TL gene들과 높은 homology를 보였다. 이 PCR fragment를 probe로 사과 과육에서 만든 cDNA

library를 screening 하여, 944bps의 cDNA를 cloning하여 sequencing하고 이를 Mdtl1(*Malus domestica* thaumatin-like protein 1)이라고 명명하였다(그림 20).

Mdtl1은 northern 결과 사과 과육에서 특이적으로 발현하며, 사과 과육이 익어갈수록 다량으로 축적되었으며(그림 21), southern 분석 결과 1개의 copy로 genome에 존재하는 유전자인 것으로 추정된다(그림 22).

따라서 우리가 cloning 한 Mdtl1 유전자의 promoter는 사과 과육 품질 향상을 위한 유전자 도입용 promoter로 이용할 수 있을 것으로 사료된다.

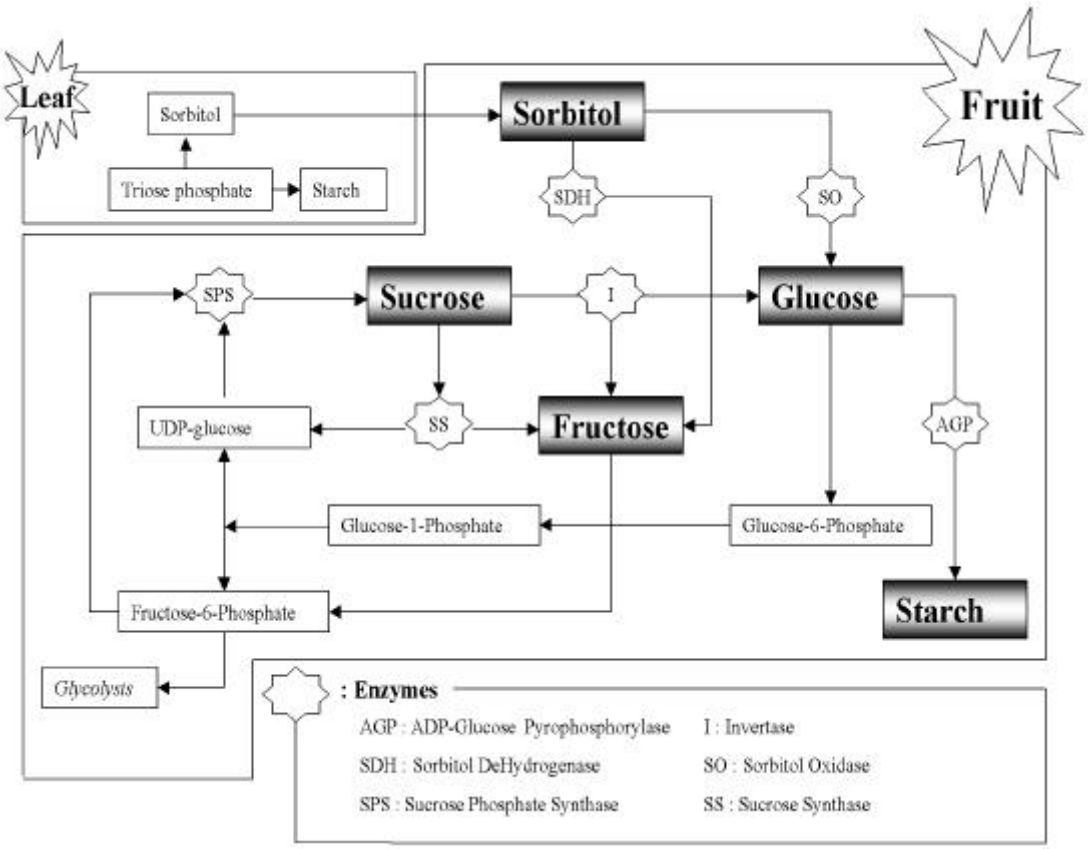


그림 1) 사과의 주요 탄수화물 대사 경로.

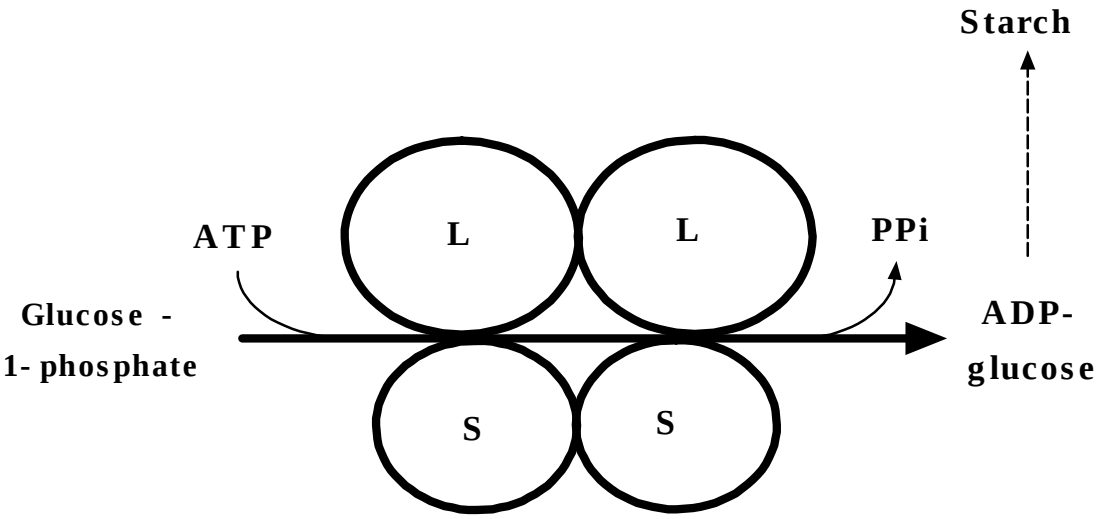


그림 2) AGPase의 구조와 기능

L : AGPase large subunit.
S: AGPase small subunit

A: 사과 AGPase small subunit을 cloning 하기 위한 PCR primer.

U1 ; 5'-ATGGAYTAYGARAARTTYATHCA-3' (upper primer)
AL1 ; 5'-GTACCAATATCTTCCCAGTA-3' (lower primer)

B: 사과 AGPase large subunit을 cloning 하기 위한 PCR primer.

AGLU2 ; 5'-CCNATGAGYAAYTGYYTHAA-3' (upper primer)
AGLL2 ; 5'-GAYTAYTGGGARGAYATHGG-3' (lower primer)

그림 3) 사과 AGPase cloning을 위한 primer design.

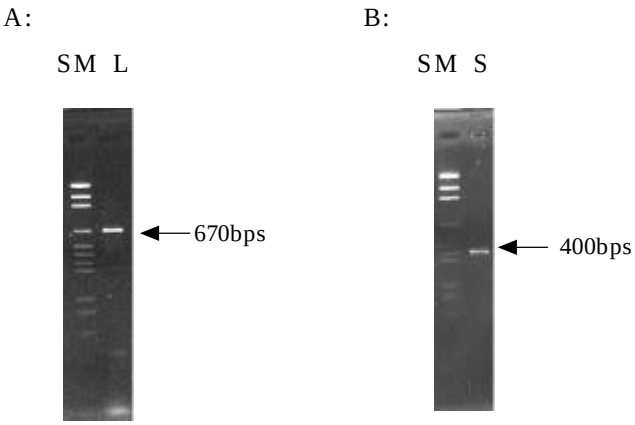


그림 4) RT-PCR에 의해 증폭된 AGPase 단편들.

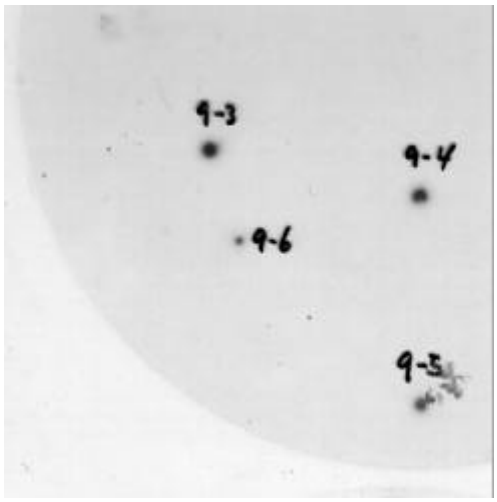
A: Apple AGPase large subunit를 cloning 하기 위해 만든 primer로 RT-PCR한 product.

B: Apple AGPase small subunit를 cloning 하기 위해 만든 primer로 RT-PCR한 product.

SM : pGEM size marker.

S, L : RT-PCR products.

A:



B:

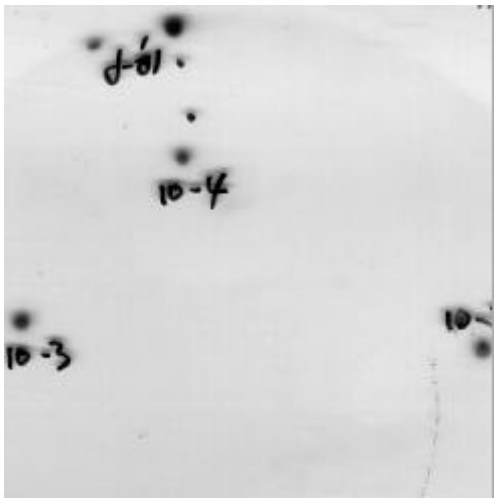
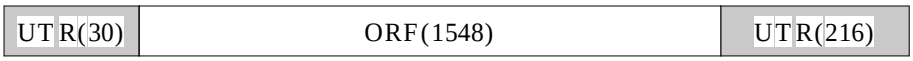


그림 5) Plaque hybridization 결과.

A: AGPase large subunit cDNA를 갖고 있을 것으로 예상되는 plaques. (secondary screening)

B: AGPase small subunit cDNA를 갖고 있을 것으로 예상되는 plaques. (secondary screening)

A:



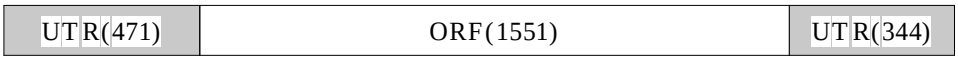
B:

TGAAATTCTC TCTCTGGATT TTCTTCTTCC ATGGCGTCCT CTTCGATGTC AGCAAGCGGA GTGCTCACCT
CCCGATCGTC GGTGTTGCGG AACTCGAAGC AGAACCATAA CATCAGCCGC CTCTCGTTCA GTGGCTCTCA
TCTCTCCGGG ACCAAAATCT CCGCGCCCAG CACCTGTTTG AGGAGATCGC CCACTAACAG AGTCCCGCCG
CTGGTTGTGT CTCCCAAAGC TGTTTCCGAT TCCAAGAACT CTCAGACGTG TCTTGATCCC GATGCGAGCC
GGAGTGTGTT GGGGATTATA CTGGGTGGGG GAGCTGGGAC GAGGCTTTAC CCATTGACAA AGAAGCTTGC
GAAACGTGCT GTTCCATTGG GAGCAAACTA CAGGCTGATC GATATCCCAG TCAGTAATTG CCTCAACAGC
AACGTATCAA AGATCTATGT GCTGACCCAG TTCAATTCTG CTTCGCTCAA TCGCCATCTT TCTCGTGCTT
ATGCTAGTAA CATGGGTGGC TACAAAAACG AAGGCTTTGT TGAGGTTCTT GCTGCCCAGC AGAGCCCTGA
GAATCCCAAT TGGTTTCAGG GTACCGCGGA TGCCGTGAGG CAGTACTTGT GGTTGTTTGA GGAGCACAAT
GTGTTGGAGT TTTTGGTTCT TGCTGGGGAC CACTTGTATA GGATGGACTA TGAGAGGTTT ATTCAGGCAC
ATAGAGAAAC TGATGCAGAC ATCACTGTGG CTGCTCTGCC CATGGATGAG AAGCGTGCTA CCGCCTTTGG
TTTGATGAAG ATTGATGAAG AGGGAAGGAT TATTGAGTTT GCTGAGAAAC CTAAAGGGGA GCAACTCAAA
GCTATGAAGG TTGATACTAC TATCTTGGGT CTTGATGATG AGAGAGCTAA AGAGATGCCT TATATTGCCA
GTATGGGTAT ATATGTTGTG AGCAAAAATG TCATGTTAGA TCTACTTCGA GACAAGTTTC CTGGTGCAAA
TGATTTCGGG AGTGAAGTTA TTCCAGGCGC AACTTCCATT GGTTTGAGGG TTCAAGCTTA TCTGTATGAT
GGCTACTGGG AAGATATTGG TACCATTGAG GCTTTCTACA ATGCAAACTT GGGGATAACA AAAAAACCAG
TTCCAGATTT CAGCTTTTAT GATCGTTCAT CCCCAATCTA CACCCAACCT CGGTATTTAC CTCCATCAAA
AATGCTTGAT GCTGATGTCA CAGATAGTGT TATTGGCGAG GGATGTGTAA TAAAGAACTG TAAAATTCAC
CATTCAGTCG TTGGGCTTCG GTCTTGCATA GCGGAGGGTG CTGTCATTGA AGACACATTA CTGATGGGAG
CTGACTACTA TGAGACTGAT GCTGACAGGA GGTTTCTAGC TGCCAAGGGT AGCGTTCCAA TCGGTATTGG
CAAGAATTCT CACATTAGGA GAGCTATAAT TGATAAGAAT GCTCGGATTG GAGAAAATGT TAAGATTATC
AATATCGACA ATGTGCAAGA AGCAGCAAGA GAAACAGACG GATATTTCAT AAAGAGCGCG ATTGTCACAG
TGATCAAGGA TGCCTTGATT CCTAGTGGAA CAGTAATCTA GCCACCTTAT TTTCCACTCG TTTATTGCTG
ACAGCGGAGG TTCTTTCTAG TTACTGGGCT GAGAGGAGCC ACGAGTACGC AGCTACAGCA ACTTAACGAG
CACTTTGAGC GGTTCTGTCT TCTGTTCTTG TAACGTACAT TTCACGGAAC TACGATGTAA TTATTGAGGA
AGAGACCTCA GGAATTTGCT CTGTAGATGC TCTATTTCTA TCTCAAATAA AAGTTTTTTG CC

그림 6) AGPase의 small subunit를 code한 유전자의 구조와 염기서열.

A: AGPase의 small subunit을 code하는 cDNA의 구조
B: AGPase의 small subunit을 code하는 cDNA의 염기 서열

A :



B :

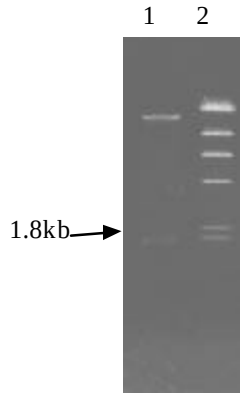
GTTTCTTTCA AAATCATTCA CGTATTTCAC TCCACTCTGA CTTTCACTTG TCTCAACTCA ACCGATCACT
TCTAAGGTTC TCCCTAAATT TTAAATTTTT GCAGATTATA CAGCTCACAA TACCACCTAT CTTCACTCTC
ACTCTCTTGA CTGTGAAAAT ATTTGGTTGC ACTCCTGGCT CCTTTGAGAT TCTACTTTTG AGGAGTAGTT
TTGATCTGAG TATCTTCACT TTGCTCAGGA TCCATTTCCA ACCTTCCTTT AGATTCTCCT TTTTTCATTC
AGAAACTCTG TTTTGTTTTC TATGGTTTGA TATTAATATT CTAGTTATGG CTTTGAGTAT TATAATCCTT
GTGTGATCTT TACTTTACTT TGGTAATTAG ATCACATCTC TTTACTGGGA TTTTGGTTTA AATGCCTTTT
GAGTGCCACG ATTTCTGATC GATTAGTATT CTATCAGAGT TGGTAACGGG AATGGATTCT TGCTGTGTGG
CTTTGAAACC CAATACCCAT TTGGGAAACG CAAGTGGTTT CTGCAATGGT GATCCTGGGT TTTTGGGGGA
GAGTGTTAGA GGGAGTTCTA ATCACAGGCT TTGGGCCAAT CAGTTGAGAA CTGACAAGAG GAAGGTGAAA
CCTGGAGCTA TTCTTGCTGT TCTTACATCA AACGACACCG AGGCTGTCAC TCTGCAAATG CCAATGTTTA
GACGGAGAGT AGACCCGAAA AATGTAGCTT CAATTATATT AGGAGGCGGT GCAGGGACAC AGCTCTTTCC
TCTTACCAAA AGATCAGCGA GCCCCGCGGT CCCAGTTGGA GGATGCTACC GGCTTATAGA CATTCCAATG
AGCAATTGCA TCAACAGCAA TATAAACAAG ATATTTGTAC TGACGCAGTT TAATTCTGCT TCTCTCAATC
GTCACATTGC TCGCACCTAT TTTGGAAATG GTATCAACTT TGGAGATAGA TTTGTAGAGG TGCTAGCAGC
CACTCAAACG CAGGGTGAAG CAGGAATGAA TTGGTTCCAA GGAACAGCAG ATGCTGTGAG GCAATTTACA
TGGGTATTTG AGGATGCCAA GAACAGGGAT GTTGAGAATA TAGTGATTTT GTCTGGCGAT CATCTTTACC
GAATGGATTA TATGGACTTT GTGCAGAGTC ACGTTGATAG AAATTCCGAT ATTACAATTT CTTGTACAGC
AGTGGGTGGC AGCCGCGCGT CTGATTATGG GTTGGTGAAG ATCGATAGCA GAGGTAAAGT AATCCAGTTT
GCTGAAAAAC CAAGGGGAGC TGATCTAAAA GCAATGCAAG CAGATACCAC GCTTCTGGGA TTGTCACCAC
AAGATGTATT GAAAACCCCC TATGTTGCAT CAATGGGAGT TTATGTATTT AAGACAGAAA TTTTGCTAAA
TCTTCTGAGG TGGAGATATC CAACATCCAA TGACTTTGGA TCTGAAATCA TTCCTGCAGC AGTGAGAGAG
CACAAGGTCC AGGCATATAT GTTCAGAGAC TACTGGGAGG ACATTGGAAC TATAAAGTCT TTCTATCATC
CTAACTTGGC CCTCACCGAA GAGATTCCGA AGTTTGAGTT TTATGACCCA AAGACACCAA TCTTTACCTC
TCCTCGATTC TTACCACCAA CAAAGATTGA CAAGTGCCGG ATTGTGGATG CAATAATCTC ACATGGATGT
TTCTTGCAAG AATGTAGTGT CCAACATTCA ATTGTGGGTG AACGTTCACG GTTGAATTAT GGTGTCGAAC
TCAAGGATGC CATAATGATG GGTGCTGACA ATTACCAAAC GGAATCTGAA ATCGCGTCTC TGCTTGCAGA
CGGGGAGGTC CCAATTGGCA TTGGAAGCAA TACAAAGATT AGGAATTGCA TAATCGATAA GAATGCCAAG
ATAGGGAAGG ACGTTATGAG CGTGAACAAA GAAGGGGTTC AAGAAGCAGA CAGGCCAGAA GACGGATTTT
ACATTCGCGA GGGGATCACA ATTATTCTGG AGAAGGCAAC AATAGAAGAC GGCATGATTA TATAATGGTA
TTACCATCTC AACTACTTTC GGAGGACAGT TGAAAAAGGG TAACGAGAAA AGACTCTTGC GGTCGTGTGC
ACATTTGGCA TGAGCAAACA GCTTCTGCAG GACTTTTTAC AATAGACAAG TACCACCTTT GTTACTGTGT
TTAAACTAGG AAAATCCTTC AGAACTCGTG AAAATGGATT TTATAAGCTT AAGAGTCGCG AGATGTACAA
AAATAAGCTA AGAGAGCTGA TCGCCGGCTT CTTTTATCTT TCGTGGAGCT GATATATCCC TAAGAACCTA
TGAACTTCTG TATCAATATT TGATTTATGC GTATGAATAA TTGCAGTGAG TTTGAAAT

그림 7) AGPase 의 large subunit를 code 하는 유전자의 구조와 염기서열

A. AGPase의 large subunit을 code 하는 DNA의 구조.

B. AGPase의 large subunit을 code 하는 cDNA의 염기서열.

A:



B :

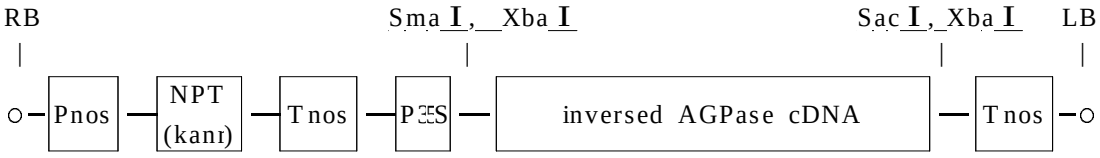


그림 8) AGPase의 small subunit을 code 하는 유전자를 antisense 방향으로 삽입시킨 형질전환용 vector의 구조.

A: antisense vector의 전기영동상

1 : Xba I 처리한 antisense vector
2 : λ/HindIII size marker

B: antisense vector의 개략도

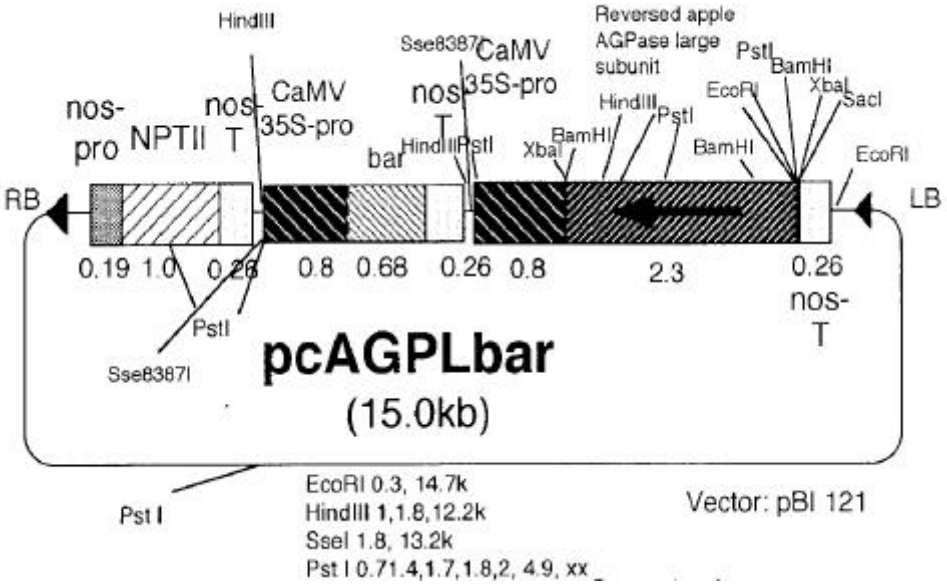


그림 9) AGPase의 large subunit을 code 하는 유전자를 antisense 방향으로 도입한 형질전환용 vector의 구조.

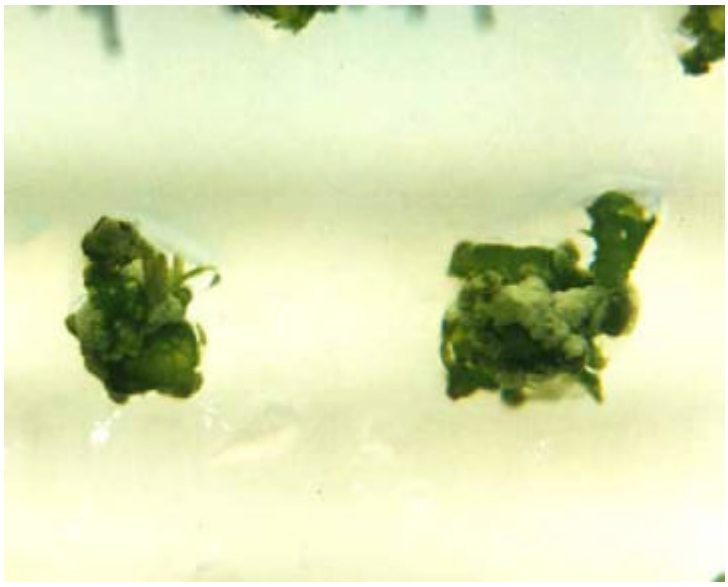
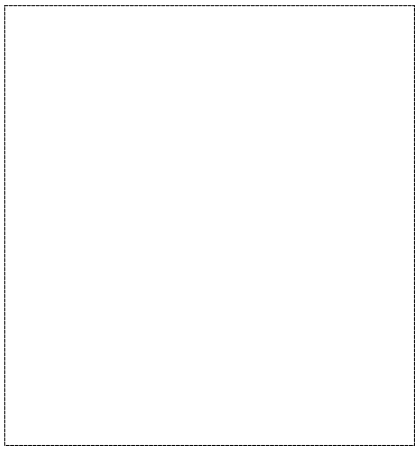


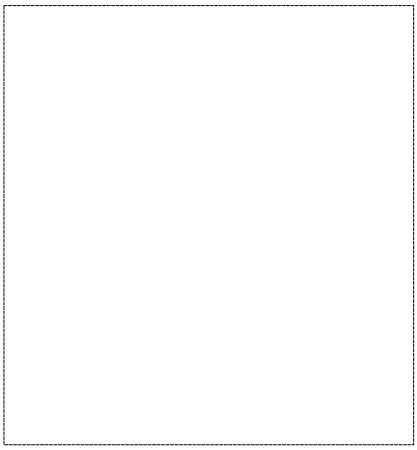
그림 10) 신초 재분화가 진행중인 사과 형질 전환체.

그림 11) 발근 유도 배지에서 뿌리가 나고 있는 형질 전환체.

A:



B:



C:

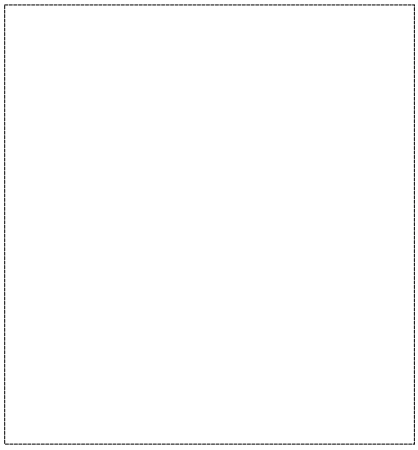


그림 12) 순화 중인 사과 형질전환체 식물.

A, C : **사과 후지 품종의 형질전환 식물체**.
B : **사과** McIntosh Wijcik **품종의 형질전환 식물체**.

그림 13) 순화가 끝난 사과 형질전환 식물체.

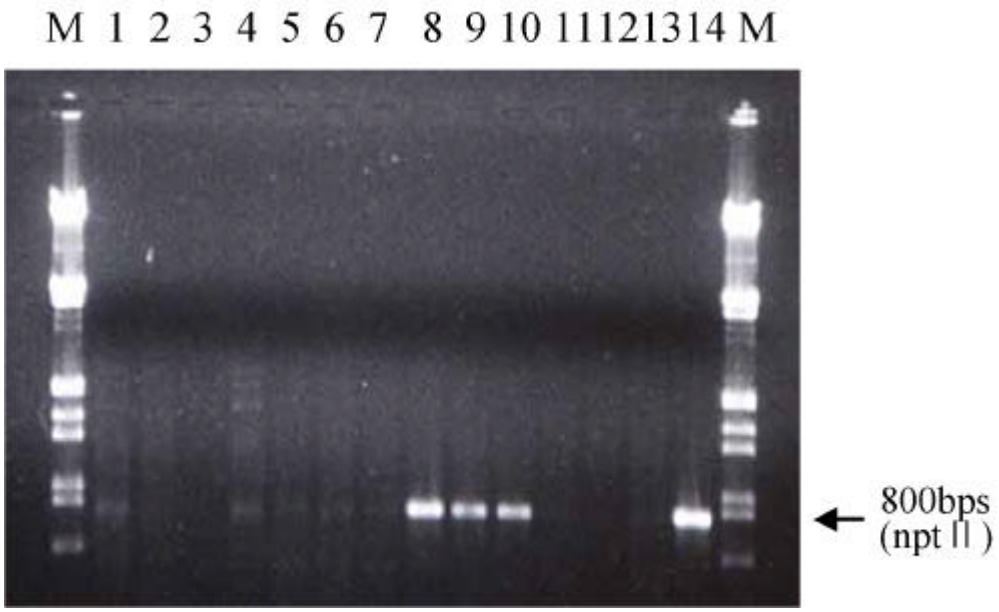


그림 14) PCR analysis of transgenic apple plant for AGPase antisense.

PCR bands were detected for the nptⅡ gene.

M ; size marker of λ/HindⅢ
lane1-7 ; non-transgenic plants
lane 8-10 ; transgenic clones
lane 11-13 ; negative control, lane 14 ; positive control.

A :

AGU1608 5'-CTCTCCTCgATTCTTACCAC-3' (upper primer)
AGL1987 5'-TCTATTgTTgCCTTCTCCAg-3' (lower primer)

B :

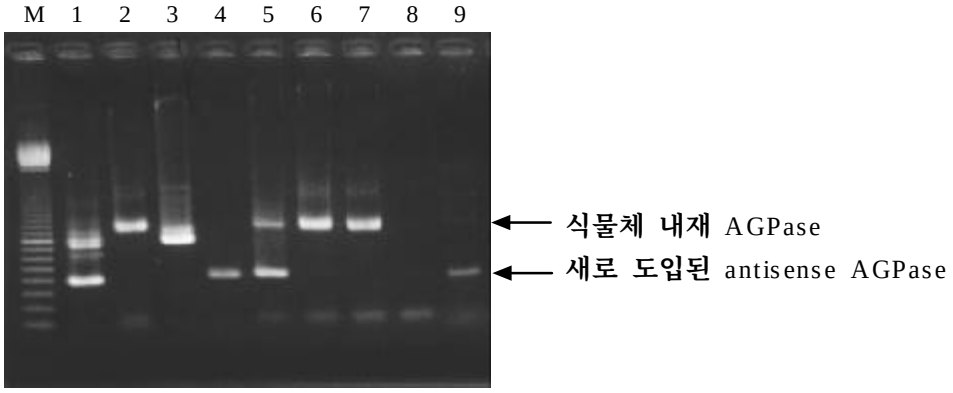


그림 15) AGPase의 large subunit gene이 antisense 방향으로 들어간 식물체의 형질전환 확인

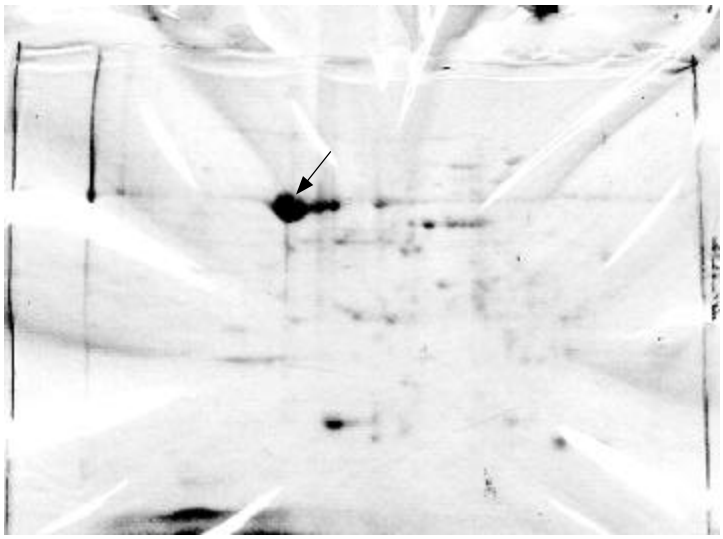
형질전환체의 genomic DNA**를** template**로** antisense AGPase**의** primer**로** PCR**하여 확인하였다**.

A: **형질전환체 확인을 위해 사용한** AGPase**의** primer

B: antisense AGPase gene **확인을 위한** PCR **전기영동상**

1, 5 : **형질전환체**
2, 3, 6, 7 : negative control
4, 9 : positive control
M : size marker

A: Total protein from apple leaf.



B: Total protein from apple fruit.

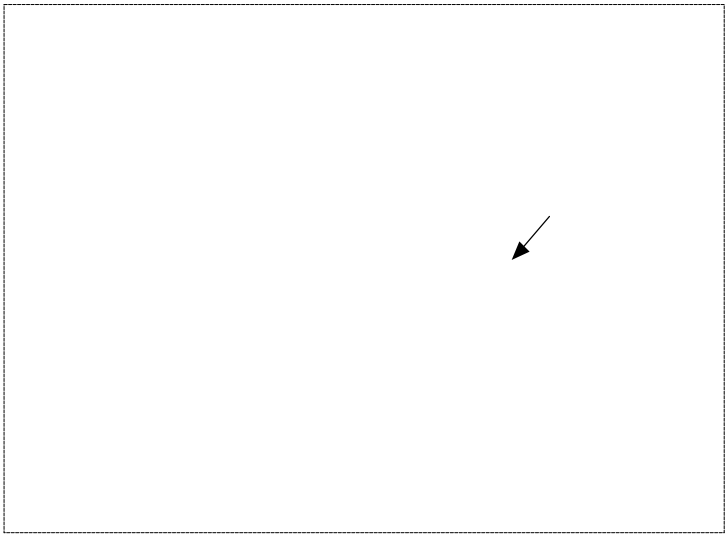


그림 16) Total proteins from apple leaf and fruit.

A: Total proteins from leaf, **화살표는** RUBISCO protein.
B: Total proteins from apple, **화살표는 실험에 사용한**
31kDa fruit-specific protein

```
1__AKITFTNNXPNTVXP 15   :apple 31kDa protein
24_ATISFKNNCPYMVWP 38   :PATL
24_AKFTFTNKCPNTVWP 38   :PPTL
1__AKVTFTNXCSYTVWP 15   :IF1
24_ATISFKNC_PYMVWP 38   :CHTL
1__ATFDILNKCTYTVW 14    :VVTL1
```

그림 17) N-terminal sequence of the 31kDa apple fruit-specific protein

apple 31kDa protein : **이 실험에서 분석한 단백질의** N-terminal sequence
PATL : thaumatin-like protein precursor (*Prunus avium*).
PPTL : thaumatin-like protein precursor (*Pyrus pyrifolia*).
IF1 : thaumatin family protein homolog (*Lupinus albus*).
CHTL : 29kDa thaumatin-like protein in ripening cherry.
VVTL1 : 24kDa thaumatin-like protein in ripening grape berry.

A. 5' primer deduced from the N-terminal amino acid sequence

5'- G CAT GCH AAR ATH ACH TTY ACH - 3'
A K I T F T

B. 3' primer from the homologous region of aligned TL sequences.

```
674 TGCCCTGACGCCTATAGCTACGCTTATGACGACGAAACGAGCACCTTCAC 723 AtTL
657 TGCCCCGACGCTTACAGCTATGCTTATGATGACAAAAGGGGTACATTTAC 706 PaTL
604 TGCCCCGACGCCTATAGCTATGCGAAGGACGACCAGACCAGCACCTTCAC 653 HvPR5
564 TGTCCCGATGCTTATAGCTACCCACAAGACGATCCTACAAGCACATTTAC 613 NP24
    **-**-**-**-**-*****--*--*-**-**----*---*-**-**-**
```

TGyCCyGAyGCyTAyAGCTA : homologous sequence

5'- TAG CTr TAr GCr TCr GGr CA - 3'

그림 18) 31kDa protein을 code 하는 유전자를 cloning 하기 위한 primer design.

A : N-terminal 아미노산 서열로부터 유추한 5' degenerated primer

밑줄 아래에 아미노산 서열을 표시하였다.
음영 처리된 부분은 cloning을 용이하게 하기 위해 삽입한 Sph I site.

B : 기존 알려진 TL gene들을 align하여 만든 3‘ primer

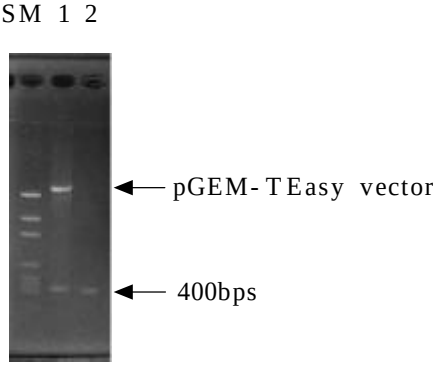


그림 19) RT-PCR에 의한 TL gene fragment

SM : pGEM marker

1 : RT-PCR product를 pGEM-TEasy vector에 subcloning 한 것. EcoR I 으로 잘라 확인했다.

2 : RT-PCR product.

```
TTCGGCACGAGGCAAACAGGCAATTAAGACATATTCAATGTCGATGATGAAGAGCCAAGTAGCTCC -66
-----------------------------------------M--M--K--S--Q--V--A--P

TCGGCCTACCTTGGCCATCCTCTTCTTCTTCTCAGGTGCACATGCAGCGAAAATCACTTTCACAAA -132
--R--P--T--L--A--I--L--F--F--F--S--G--A--H--A--A--K--I--T--F--T--N

CAACTGCCCCAACACTGTCTGGCCAGGAACCTTAACCGGTGACCAAAAACCTCAGTTATCACTCAC -198
--N--C--P--N--T--V--W--P--G--T--L--T--G--D--Q--K--P--Q--L--S--L--T

CGGCTTCGAACTAGCATCCAAAGCTAGCCGATCAGTGGACGCTCCATCTCCATGGTCTGGTCGCTT -264
--G--F--E--L--A--S--K--A--S--R--S--V--D--A--P--S--P--W--S--G--R--F

CTGGGGCCGAACCAGATGCTCCACGGACGCCGCTGGAAAATTCACTTGTGAAACTGCAGACTGTGG -330
--W--G--R--T--R--C--S--T--D--A--A--G--K--F--T--C--E--T--A--D--C--G

CTCTGGCCAGGTCGCATGCAACGGGGCAGGCGCAGTTCCACCAGCAACTTTAGTTGAAATCACAAT -396
--S--G--Q--V--A--C--N--G--A--G--A--V--P--P--A--T--L--V--E--I--T--I

TGCGGCAAACGGGGGTCAAGATTATTATGATGTTAGCCTTGTTGACGGCTTCAACTTGCCTATGTC -462
--A--A--N--G--G--Q--D--Y--D--V--S--L--V--D--G--F--N--L--P--M--S

TGTCGCCCCACAAGGTGGCACGGGCGAGTGCAAGCCCTCGTCTTGCCCTGCCAATGTTAACAAGGT -528
--V--A--P--Q--G--G--T--G--E--C--K--P--S--S--C--P--A--N--V--N--K--V

GTGCCCGGCTCCACTTCAAGTGAAAGCGGCTGATGGGAGTGTCATCAGTTGCAAAAGCGCTTGCCT -594
--C--P--A--P--L--Q--V--K--A--A--D--G--S--V--I--S--C--K--S--A--C--L

TGCGTTTGGTGATTCGAAGTACTGCTGCACTCCGCCGAATAATACGCCGGAGACATGTCCTCCCAC -660
--A--F--G--D--S--K--Y--C--C--T--P--P--N--N--T--P--E--T--C--P--P--T

AGAGTACTCTGAGATCTTTGAGAAGCAGTGCCCTCAAGCTTATAGCTACGCTTATGATGATAAAAA -726
--E--Y--S--E--I--F--E--K--Q--C--P--Q--A--Y--S--Y--A--Y--D--D--K--N

CAGCACATTTACCTGCAGTGGTGGACCTGACTACGTCATTACTTTCTGCCCATAAGCACGAAATGG -792
--S--T--F--T--C--S--G--G--P--D--Y--V--I--T--F--C--P-END

GATTATATATGCAGATGATGATATCTGTTTCTTTATGTAACAATAATGAAGAAGAATAAATTCCGC -858
GGACGTTGACACATTGCTGTTGTCAAGAATTTGTAATACTAATTACACGATCAAATAAAGGAACAA -924
ATATTATATTTAAAAAAAAA
```

그림 20) Mdtl1의 염기서열 및 추정 아미노산 서열.

음영 처리 된 부분은 N-terminal sequencing에 의해 밝혀진 부분이다. (그림 17)

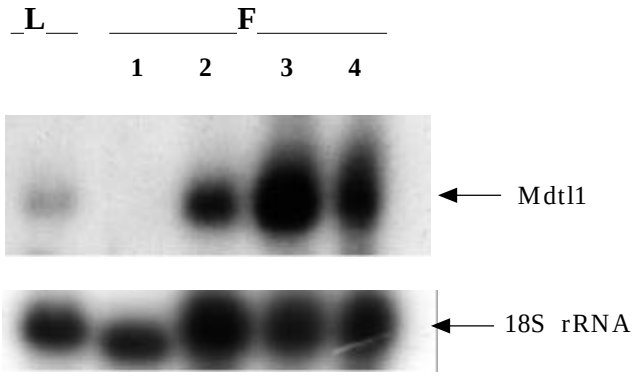


그림 21) Mdtl1의 과육 발달 단계별 mRNA 발현 양상.

L : mature leaf.
F : fruit. (1 : **개화 후** 3주, **지름** 1.5cm
2 : **개화 후** 7주, **지름** 4cm
3 : **개화 후** 12주, Green ripe stage
4 : **개화 후** 16주, Red ripe stage)

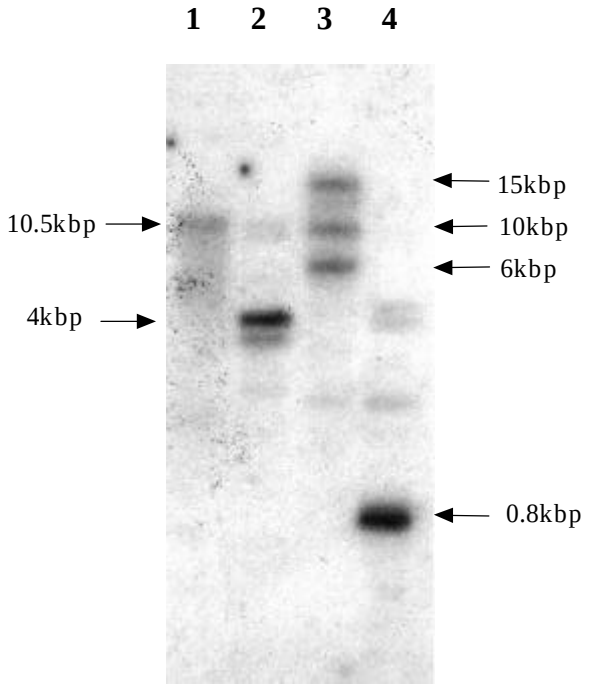


그림 22) Mdtl1의 Genomic blotting 결과.

1 : digested with Apa Ⅰ, Sac Ⅰ.
2 : digested with EcoR Ⅰ.
3 : digested with Xba Ⅰ, Xho Ⅰ.
4 : digested with HindⅢ.