최 종
연구보고서

Lignin 생합성 관계 유전자 cloning을 통한 저 lignin함량 펄프재의 육성

Development of pulp wood with low lignin content by cloning of OMT gene

연 구 기 관

경 북 대 학 교

농 림 부

최 종 보 고 서

1996년도 농림기술개발사업에 의하여 완료한 Lignin 생합성 관계 유전자 cloning을 통한 저 lignin함량 펄프재의 육성 에 관한 연구의 최종보고서를 별첨과 같이 제출합니다.

첨부 : 1. 최종보고서 10부

2. 최종보고서 디스켓 1매

2000 년 12 월 20 일

주관연구기관 : 경북대학교

총괄연구책임자 : 박 용 구 (인)

주관연구기관장 : 경북대학교 총 장

직 인

농 림 부 장 관 귀 하

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “Lignin 생합성 관계 유전자 cloning을 통한 저 lignin함량 펄프재의 육성”의 최종보고서로 제출합니다.

2000 년 12 월 20 일

주관연구기관명 : 경북대학교
총괄연구책임자 : 박 용 구
세부연구책임자 : 신 동 일
세부연구책임자 : 박 희 성
세부연구책임자 : 최 장 원
연 구 원 : 설 일 환
연 구 원 : 안 인 숙

요 약 문

Ⅰ. 제 목

Lignin 생합성 관계 유전자 cloning을 통한 저 lignin함량 펄프재의 육성

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

93년 현재 일본, 대만, 싱가포르 등 아시아 선진국의 일인당 연간 종이 소비량이 220kg정도이나 우리나라는 130kg밖에 되지 않는다는 사실은 국내에서 종이류의 수요가 계속 될 것임을 나타내고 있으며 또한 증가하는 수요의 충당을 위해 pulp용재 필요량의 상당부분이 수입에 의존해야 할 전망이다 (88년 8%에서 93년 현재 62% 정도가 수입의존).

한편 늘어나는 종이류의 생산과 더불어 pulp, 제지산업에서 배출되고 있는 폐기물 또한 그 양이 계속 증가 추세에 있다. 원목에서 pulp화 공정과정에서 발생하는 lignin폐기물과 독성화학물질 및 악취 등은 심각한 환경오염을 유발하여 pulp산업을 오염산업으로 지칭하게 한다. 하지만 국내 생산 pulp의 2/3이 화학펄프화법에 의해 생산되어지고 있어 이러한 문제의 해결이 상당히 어렵다고 할 수 있다.

Lignin은 식물체의 중요한 구성성분중의 하나로서 식물체의 유지에 필수적인 역할을 하지만 pulp화를 위해서는 많은 화학약품과 energy를 사용하여 cellulose 섬유로부터 제거되어져야 한다. Lignin 제거를 위한 효과적인 대안으로써 lignin성분이 감소된 임목의 개발을 제시 할수 있다. 같은 종의 식물에서도 lignin함량에 있어 상당한 변이를 보이기 때문에 40-50% lignin함량의 감소가 식물체 전체의 성장에는 영향을 미치지 않는다. Lignin합성경로에 관여하는

효소의 활성을 유전공학적 방법(Antisense RNA)을 통해 억제함으로써 저 lignin 함량 pulp, 제지 원재료용 임목개발의 가능성은 이미 검정된 바 있으며, 기술개발시의 기대효과(환경오염감소, 수입대체및 수출, pulp산업의 효율증가)가 매우 크므로 연구 개발의 필요성이 매우 시급하다고 판단된다.

OMT (O-methyl transferase) 유전자는 lignin합성에 가장 중요한 역할을 하며 또한, 다양한 종간에도 homology가 높기 때문에 이들 유전자를 억제함으로써 lignin합성을 감소시킨다는 것이 가능할 것으로 판단되고 있다. 그러나 지금까지의 연구결과는 감소의 정도가 상당히 낮은 것으로 나타났으며 antisense유전자의 발현도 transgenic plant간에 변이가 심한 것으로 나타났다. 임목에 있어 새로운 품종의 육성은 긴 세대기간 때문에 상당한 시간이 소요되며 육종의 효율이 낮다고 할 수 있다. 기존의 육종방식으로는 어렵거나 불가능한 이러한 품종개발을 위해 실용성이 있는 유전공학적방법의 이용은 목적달성에 적절한 방법을 제공 할 것이다. 또한, 아직까지 xylem specific OMT유전자의 발현을 조절하는 promoter에 대한 연구가 되어 있지 않아 형질전환을 위해 consitutive promoter (CaMV 35S 등)을 사용하고 있다. 일반 promoter는 조직 특이성이 아니어서 식물체의 전체적인 성장에 영향을 미칠 수 있다.

따라서 본 연구에서는 xylem-specific promoter의 개발 및 antisense유전자 construction 및 도입에 의해서 lignin형성이 이루어지는 xylem에서의 유전자발현을 연구목적으로 하며 다음과 같은 세부 목적을 이루고자 한다.

가. OMT유전자의 cloning

나. Tissue specific promoter규명

다. 식물의 성장과 발육에 있어서 lignin의 역할연구

라. 저 lignin 식물체개발

1) Pulp제조시 효율적 lignin 제거

2) Cellulose 섬유 회수율 증가

3) Pulp 및 제지산업의 경쟁력 제고

4) Pulp산업에 의한 환경오염 감소

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

구 분	연 구 개 발 목 표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (1996년)	- 수종별 lignin함량 분석 - 조직별 OMT분석 - 재료확보 - OMT 유전자 message 분석 - Library 제조, OMT유전자 분리 - 염기서열검정	· probe 확보 · 식물재료 확보 · 목부, 사부, 외피 등의 조직에서 RNA추출 · Northern blot · Message 정량 · 조직별 발현정도 검색
2차년도 (1997년)	- OMT유전자의 염기서열확정 - 계절별lignin합성분석 - 무균식물재료확보	· Tissue specific mRNA분리 · Oligonucleotide probe 조제 · PCR cloning · Seqeuncing · Genomic library제조 · cDNA, genomic DNA분리
3차년도 (1998년)	- Gene structure분석 - Antisense RNA vector 개발	· Isolation of genomic clones · Sequencing · Vector with 35S promoter · Vector with xylem spestic promoter
4차년도 (1999년)	- vector test - Agrobacterium transformation - Poplar의 형질전환 및 확인	· Agrobacterium을 이용한 형질전환 · 형질전환체 선발 · 형질전환체 증식 · 형질전환 확인분석 · Southern, Northern
5차년도 (2000년)	- 형질전환체의 유전자 - 발현 분석 및 lignin 함량 측정	· Northern blot · Lignin 함량 측정 · 형질전환 개체(저 Lignin함량)와 정상개체의 성장, 발육형태 비교

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

가. 연구개발 결과

1 년차

- ○ 무균식물의 대량증식과 재분화 체계의 확립
- ○ 수종별 lignin 함량 분석과 조직별 OMT 분석
- ○ cDNA library 제조

2 년차

- ○ 계절별 lignin 합성변화 분석 및 형질전환 방법의 확립
- ○ 형질전환체의 분석방법 확립 (PCR 과 GUS 분석)
- ○ genomoc library의 구축

3 년차

- ○ genomic library에서 OMT clone의 선발과 유전자 지도 작성
- ○ subcloning과 염기배열 결정
- ○ antisense vector의 조제와 Agrobacterium의 binary vector의조제
- ○ OMT cDNA 염기서열 결정과 분석

4 년차

- ○ antisense vector의 조제와 Agrobacterium binary vector의 조제
- ○ 포플러 식물의 형질전환체 생성 및 선발
- ○ antisense vector의 조제와 Agrobacterium의 binary vector의조제

5 년차

- ○ 형질전환체의 분자생물학적 검증과 리그닌 분석
- ○ promoter 부분의 염기서열결정과 분석을 성공리에 마쳤다.

나. 활용에 대한 건의

1) Pulp업계의 경쟁력 강화

○ 저 lignin 함량을 가지는 속성수인 포플러수종의 개발로 탈 ligning 효율을 증가시킴으로서 국내의 pulp재 생산과 pulp업계의 생산성 향상을 향상시킬수 있다고 기대된다.

2) 환경오염감소

○ 탈 lignin에 필요한 화학물질의 사용을 줄임으로서 탈 lignin 효율을 증가시킴으로써 lignin 폐기물 생성의 감소 효과와 경제적인 이점이 기대된다.

3) 국내자원확보

○ 저 lignin 함량 임목은 현재 국내외에 등록되어 있지않는 새로운 식물로서 자원의 확보로 인한 수익과 외국에 특허를 등록함으로서 앞으로의 수출에 기여할수 있을 것이다.

4) 임목특유의 유전자원 확보

○ 순수 본 연구진에 의해서 분리된 포플러 OMT 유전자는 앞으로 현재 등록되어 있지 않는 새로운 유전자를 보유함과 동시에 다른 식물체에도 유용하게 사용될수 있으리라 기대된다.

SUMMARY

O-methyltransferase (OMT) encoding gene was isolated from developing secondary xylem of P*opulus nigra* x *maximowiczii*, cDNA clones were functionally characterized, and transgenic *P. nigra* x *maximowiczii* independent lines with antisense OMT gene were successfully achieved.

Three cDNA clones were isolated from direct screening and PCR screening of a cDNA library of *P. nigra* x *maximowiczii* containing a total of 5.0 x 106 pfu/ml with 99% recombinants and various size of insert DNA from 0.5 kb to 5.2 kb as confirmed in *in vivo* excision. The #2 clone from direct screening and A1.1 and B1.4 clones from the PCR screening were selected for sequencing analysis. The full-length sequences from 5'-untranslated region to 3'-noncoding region of *P. nigra* x *maximowiczii* OMT cDNA were obtained by sequence comparison with each other. The OMT cDNA was consisted of 1345 nucleotides in total and the translational start site of the open reading frame (ORF) at nucleotide 21 and the TAA stop site at nucleotide 1116. A possible polyadenylation signal, AATAAC, was located at positions 1277 to 1282. The G+C content of the coding region was 47.6% and the translation product corresponded to a 365 amino acid polypeptides. Although *P. nigra* x *maximowiczii* OMT cDNA was confirmed to have a full-length cDNA containing -20 to poly(A)+ tail, it was depleted 44 bp at 5'-untranslated region and 114 bp in 3'-noncoding region compared with aspen (89% sequence identity). Moreover, histidine (CAT) at the codon 97 and isoleucine (ATT) at the codon 316 were substituted for leucine (CTT) and valine (GTT), respectively. Northern analysis confirmed that the developing secondary xylem is the main tissues where the OMT gene expresses.

The genomic library containing titer of 1,000 pfu was constructed and characterized from highly purified phage clones from genomic DNA extracted from xylem of *P. nigra* x *maximowiczii*. The OMT genomic DNA of *P. nigra* x

maximowiczii was consisted of 4 exons and 3 introns. The first, second, third, and forth exon have been had 419, 311, 65, 511 nucleotides, respectively. The border sequences from all three introns were started at GT and terminated with AG sequences. The *P. nigra* x *maximowiczii* genomic OMT DNAs had 9 restriction sites; 2 internal *Eco*RI sites, *Sal*I, *Bam*HI, *Hpa*I, *Hgi*AI, *Dsa*I, *Bcl*I, and *Rsa*I.

Antisense OMT vectors were constructed and the down-regulation of internal OMT gene by expressing antisense OMT gene was tried by *Agrobacterium*-mediated transformation. The frequency of callus induction and mean number of callus per leaf segment showed to be better on the Method I. However, the condition of cultured leaf was better on the Method II. In GUS histochemical analysis, blue coloring was observed in the veins of leaf segments and on surface or whole part of callus. The plants regenerated from kanamycin resistant callus were obtained by culturing on the 1/2MS medium containing BA 1.0 mg/l. The phenotype of putative transgenic plants was visually indistinguishable with control plants and they also rooted very well. However, the putative transgenic plants showed more weaker shoot characteristic than that of control plants. To confirm that stable integration of the antisense OMT gene had occurred, PCR and southern analysis were carried out using OMT primers. A 0.7 kb DNA fragment was amplified from the PCR method and this band was strongly hybridized with OMT probe. Therefore it was confirmed that antisense OMT gene was integrated into genomic DNA of *P. nigra* x *maximowiczii*.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction 13
Section 1. Objectives 13
Section 2. Research Scope 14
Section 3. Proposals for Practical Use 16

Chapter 2. Establishment of poplar tissue culture and transformation system using antisense vector 19
Section 1. Introduction 19
Section 2. Materials & Methods 22
1. Establishment of clonal multiplication and regeneration in vitro with selected poplar 22
2. Preliminary experiments for producing transgenic poplar plants 22
3. Experiments for obtaining transgenic poplar with antisense OMT gene 23
Section 3. Results & Discussion 26
1. Establishment of clonal multiplication and regeneration in vitro 26
2. Production, selection and proliferation of transgenic poplar and model plants 27
Section 4. References 45

Chapter 3. Analysis of lignin contents and selection of transgenic plants containing antisense OMT gene 48
Section 1. Introduction 48
Section 2. Materials & Methods 52
1. Analysis of transgenic plants 52
2. Analysis of lignin contents and morphologies from the transgenic poplar plants 53
Section 3. Results & Discussion 54
Section 4. References 63

Chapter 4. Patterns of OMT gene expression from different types of tissues and construction of antisense expression vector 65
Section 1. Introduction 65
Section 2. Materials & Methods 66
1. Isolation of total RNA and poly(A+) RNA 66
2. Northern blot analysis 67
3. Construction and analysis of antisense pBIOMT vector 68
4. Cloning and amplification of promoter region using PCR 69
Section 3. Results & Discussion 71
Section 4. References 83

Chapter 5. Analysis of structural OMT gene 85
Section 1. Introduction 85
Section 2. Materials & Methods 85
1. Construction of *P. nigra x maximowiczii* cDNA library and screening OMT gene 86
2. Construction of *P. nigra x maximowiczii* genomic DNA library and screening OMT gene 94
Section 3. Results & Discussion 99
Section 4. References 130

목 차

제 1 장 서 론 13
제 1 절 연구 개발의 목적 13
제 2 절 연구 개발의 범위 14
제 3 절 기대효과 및 활용방안 16

제 2 장 포플러 조직배양과 antisense vector를 사용한 형질전환체계의 개발 19
제 1 절 서 언 19
제 2 절 실험방법 22
1. 선발된 수종들의 clone 별 기내증식과 재분화 체계의 확립 22
2. 형질전환체의 획득에 관한 예비 실험 22
3. antisense OMT를 사용한 형질전환체의 획득에 관한 실험 23
제 3 절 결과 및 고찰 26
1. 선발된 수종들의 clone 별 기내증식과 재분화 체계의 확립 26
2. 포플러와 model 식물의 형질전환체 생성, 선발과 증식 27
제 4 절 참고문헌 45

제 3 장 Antisense OMT 형질전환체의 선발과 리그닌 분석 48
제 1 절 서 언 48
제 2 절 실험 방법 52
1. 형질전환체의 검정 52
2. 형질전환체의 형태분석과 리그닌 분석 53
제 3 절 결과 및 고찰 54
제 4 절 참고문헌 63

제 4 장 조직별 OMT 유전자 발현과 antisense 발현 vector의 구축 65
제 1 절 서 언 65
제 2 절 실험방법 66
1. Total RNA 및 poly(A+) RNA 추출 66
2. Northern blot analysis 67
3. pBI121 vector를 이용한 antisense vector제조 및 분석 68
4. PCR에 의한 Promoter region 증폭 및 Cloning 69
제 3 절 결과 및 고찰 71
제 4 절 참고문헌 83

제 5장 OMT 유전자 구조분석 85
제 1 절 서 언 85
제 2 절 실험방법 86
1. 양황철 cDNA library 제조 및 OMT cDNA screening 86
2. 양황철 genomic DNA library 제조 및 OMT genomic DNA screening 94
제 3 절 결과 및 고찰 99
제 4 절 참고문헌 130

제 1 장 서 론

제 1 절 연구 개발의 목적

현대 산업 사회의 특징인 대량생산, 대량소비 그리고 생활양식의 변화로 인해 각종 폐기물의 종류와 양의 증가와 더불어 국제환경규제의 강화는 이러한 폐기물의 처리를 더욱 어렵게 하고 있다. 종이류 소비량이 한 나라의 산업수준을 나타내는 기준이 될 정도로 고도 산업사회에서 종이류 생산은 산업발전의 한 척도가 되어있다. 93년 현재 일본, 대만, 싱가포르 등 아시아 선진국의 일인당 연간 종이 소비량이 220kg 정도이나 우리나라는 130kg밖에 되지 않는다. 이 사실은 국내에서 종이류의 수요가 계속 될 것임을 나타내고 있다. 또한 증가하는 수요를 충당하기 위해 pulp용재 필요량의 약 65%를 수입에 의존하고 있으며 수입재의 점유율이 계속 늘어 날 것으로 전망되고 있다(88년 8%에서 93년 현재 62% 점유). 한편 늘어나는 종이류의 생산과 더불어 pulp, 제지산업에서 배출되고 있는 폐기물 또한 그 양이 계속 증가 추세에 있다(표 참조).

Table1-1. 제지 산업 폐기물의 종류별 일일발생량

(1994년 현재)

종 류 별	발 생 량 (ton/day)	발 생 율 (%)
슬 럿 지	2,151.18	74.4
연 소 재	370.31	12.8
폐합성수지류	245.14	8.5
폐 유	1.03	-
분 진	2.94	0.1
기 타	122.55	4.2
계	2,893.15	100.0

원목에서 pulp화 공정과정에 있어 환경문제를 유발하는 것으로는 pulp의 원료인 cellulose섬유를 lignin으로부터 분리한 폐기물(lignin폐기물)과 독성화학물질 및 악취 등이다. 하지만 국내 생산 pulp의 2/3이 화학 펄프화법에 의해 생산되어지고 있어 이러한 문제의 해결이 상당히 어렵다고 할 수 있다.

Lignin은 식물체의 중요한 구성성분중의 하나로서 식물체의 유지에 필수적인 역할을 하지만 pulp화를 위해서는 cellulose 섬유로부터 제거 되어져야 한다. 탈 lignin 공정은 많은 전력(4000kwh/ton)과 화학약품(800kg NaOH/ton)등을 필요로 하고 있으며 효과적인 탈 lignin방법의 고안을 위한 많은 노력이 진행중이지만, 현재까지 그 실적이 미미한 상황이다.

이에 대한 하나의 대안으로써 lignin성분이 감소된 임목의 개발을 제시 할 수 있다. 같은 종의 식물에서도 lignin함량에 있어 상당한 변이를 보이기 때문에 40-50% lignin함량의 감소가 식물체 전체의 성장에는 영향을 미치지 않음이 보고된 바 있다. Lignin합성경로에 관여하는 효소의 활성을 유전공학적 방법(Antisense RNA)을 통해 억제함으로써 저 lignin함량 pulp, 제지 원재료용 임목개발의 가능성은 이미 검정된 바 있으며, 기술개발시의 이용성(환경오염감소, 수입대체및 수출, pulp산업의 효율증가)이 매우 크므로 연구 개발의 필요성이 매우 시급하다고 판단된다. 올해 일본의 유수제지업체인 일본제지가 미국의 유전공학기업과의 기술개발 계약체결은 이 연구의 실용적 이용가능성을 크게 암시한다고 할 수 있다.

비록, 국내의 임목육종기술이 선진국 수준에 근접해 있다고 하나, 유전공학적 기술의 이용과 유전공학적 방법에 의해 실제적 산업에 이용 될 수 있는 기술개발 실적은 미미하다고 판단된다. 제안된 본 연구개발 계획은 실제적 산업에 이용 될 수 있는 유전공학 방법의 개발을 통해 선진국과의 기술력 차이를 극복할 수 있는 사례를 제시하고 있다.

제 2 절 연구 개발의 범위

식물체의 lignin은 lignin화 되는 조직의 세포내에서 monomeric unit가 생합성되어 중합을 거쳐 세포간극, 세포벽 및 원형질막 사이로 침적된다. 식물세포벽의 성분으로 lignin은 cellulose섬유의 외피역할을 하므로써 세포벽에 견고성을 주며 목부에서는 세포간의 영구적 결합을 가능케 한다. 고등식물체에서 lignin합성은 monomeric unit 인 monolignol (cinnamyl alcohol)의 유용가능성에 의해 좌우된다고 할 수 있다. 즉, monolignol합성경로에 관여하는 효소의 활성을 조절함으로써 lignin의 형성과 식물체의 발육에 영향을 미치게 할 수 있다 (합성경로 그림 참조).

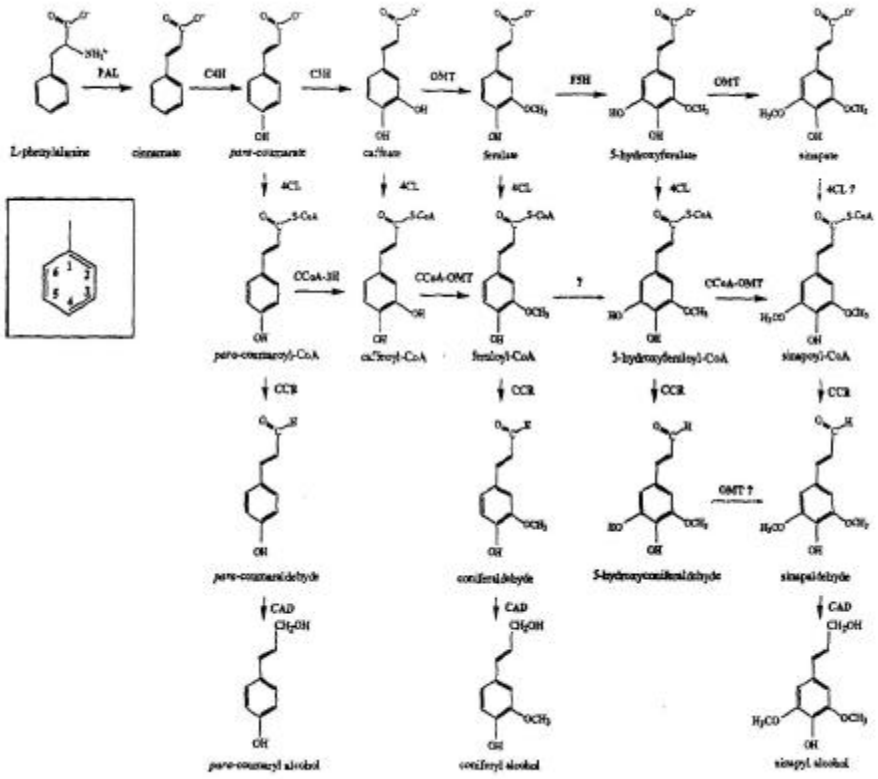


Figure 1-1. Pathway of Lignin Biosynthesis

Lignin의 전구체들로는 p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol과 sinapyl alcohol등이 알려져 있다. 이 전구체들은 광합성결과 생긴 glucose에서 시작하여 shikimic

acid pathway, cinnamic acid pathway등을 거쳐 각각의 전구체들로 합성된다. 이 경로에 관계되어 특히 중요한 역할을 하는 효소들로는 phenylalanine ammonia lyase(PAL), cinnamyl alcohol dehydrogenase(CAD), O-methyltransferase(OMT)등이다. Lignin전구체 합성의 초기에 hormone과 광에 의한 PAL의 활성과 lignin합성의 조절에 대해서는 1970년대에 이미 알려진 바 있다. 하지만 직접적인 영향을 미치는 것은 OMT인 것으로 알려져 있으며, 유전공학적 approach도 이 효소를 code하는 유전자를 cloning하여 조작하는 것이 효율적이라고 판단된다.

OMT는 dihydroxy cinnamic acid의 methylation이 촉매역할을 하여 lignin생합성에 관여한다. Monolignol이 유래되는 phenylpropanoid pathway에서 OMT는 caffeic acid를 ferulic acid와 5-hydroxyferulic acid로의 전환을 촉매한다. 이 과정에 효소의 활성을 antisense RNA기법을 사용하여 조절함으로써 lignin생합성 단위인 monolignol의 합성을 억제할 수가 있다. 그리고 lignin전구체의 합성에 관계된 이들 효소들은 tissue-specific 특히, 목질화 되고 있는 xylem세포들에서 특정하게 작용하는 것으로 밝혀져 있다.

일반적으로 lignin성분은 식물의 목본조직의 15-30%를 구성하고 있으며, 자연상태의 식물에 있어 lignin의 함량변이가 크다는 것은 어느 정도까지 그 성분을 줄여도 식물체의 성장과 발육에 장애가 되지 않을 것이라는 것을 암시하고 있다.

제 3 절 기대효과 및 활용방안

Pulp재의 계속적인 수요증가가 예측되며 93년 현재의 국내 pulp생산량은 기계펄프와 화학펄프를 합쳐 약 46만ton에 이르는 것으로 알려져 있다. 이중 화학펄프에 의해 약 31만ton이 생산되고 있다. 그러나 국내수유에 필요한 활엽수 pulp재의 90%는 수입에 의존하고 있는 실정이다. 더욱이 막대한 양의 energy와 환경오염이라는 대가를 치루고 추출된 lignin 그 자체는 아무런 용도가 없이 단순히 폐기물로 남는다. 이러한 폐기 lignin을 이용하고자 하는 시도가 계속되어 왔으나 아직 아무런 성과를 얻지 못하고 있으며, 그 전망 또한 없는 것으로 전망되고 있다. 즉 lignin문제 해결에 대한 방법은 획기적 신공정을 개발하거나, lignin함량 자체가 감소된 새로운 임목을

개발하는 방법일 것으로 판단된다. Lignin함량이 낮은 transgenic임목은 임산업 및 pulp제조업에 있어서 현재 90%이상 수입에 의존하고 있는 pulp의 자급능력 향상, 현재 62%에 이르는 pulp용재의 국내생산 기반강화등을 통해 생산효율을 높혀 pulp산업의 생산성 향상을 크게 높힐 것이다.

환경오염에 대한 사회적 관심이 높아지고 그 방지책 또는 개선책강구를 위한 산업체의 관심 또한 증가하고 있다. 이러한 경향은 더이상 방치 할 수 없는 심각한 환경오염에 대한 실질적 해결책을 촉구한다고 볼 수 있다. 제안된 연구의 결과는 이러한 범사회적 관심에 대해 실제적으로 달성 가능한 하나의 사례를 제공 할 것으로 사료된다.

현재 국내외의 문제점을 간략히 서술하며, 유전자 cloning, antisense DNA등 유전공학을 이용한 임목의 lignin합성에 대한 연구가 거의 되어 있지 않다. 본 연구의 연구책임자들은 국내, 외에서 다년간 식물체의 유전자 cloning, gene construct개발, 형질전환, 조직배양 및 재래방법을 이용한 임목육종 등의 분야에서 연구를 해오고 있으며 연구실적 또한 본 연구에 필요한 모든 분야를 포괄하고 있어 연구수행능력이 충분하다고 판단된다. 국외에서 보면 지금까지 분리된 lignin생합성관련 유전자는 4가지가 있다. Phenylalanine ammonia -lyase (PAL), OMT, CAD및 anionic peroxidase (POD)의 유전자로서 이들 유전자는 임목을 포함한 몇 개의 식물종에서 연구되었다. Lignin합성에 있어 이들 4가지 유전자는 각각의 역할이 알려져 있지만 조직내에서 lignin함량과 각각의 효소함량의 관계를 조사한 결과 상관관계가 가장 중요하게 나타나는 것은 OMT와 CAD이다. 이 상관관계는 lignin함량이 낮은 mutant식물체는 이 효소의 함량이 낮게 나타난 사실로 증명 된 바 있다. 1986년 Ecker와 Davis에 의해 CAT 유전자를 antisense RNA방법에 의한 성공적 조절이래로 antisense technique에 의한 유전자 표현 및 효소기능의 조절에 관한 많은 성공적인 연구사례가 있다. Chalcone synthease유전자 발현 조절에 의한 꽃색깔의 변화, tomato의 성숙 ripening관련유전자의 표현조절에 의한 수확 후 저장기간의 연장 등의 실용적 사례도 있다.

OMT 유전자는 lignin합성에 가장 중요한 역할을 하며 또한, 다양한 종간에도 homology가 높기 때문에 이들 유전자의 억제로써 lignin합성을 감소시킨다는 것이 가능할 것으로 판단된다. 그러나 지금까지의 연구결과는 감소의 정도가 상당히 낮은 것으로 나타났다. 또한 Antisense유전자의 발현도 transgenic plant간에 변이가 심한 것으로 나타났다. 임목에 있어 새로운 품종의 육성은 긴 세대기간 때문에 상당한 시간이 소요되며 육종의 효율이 낮다고 할 수 있다. 기존의 육종방식으로는 어렵거나 불가능한 이러한 품종개발을 위해 실용성이 있는 유전공학적 방법의 이용은 목적달성에 적절한 방법을 제공 할 것이다.

또한, 아직까지 xylem specific OMT유전자의 발현을 조절하는 promoter에 대한 연구가 되어 있지 않아 일반 promoter(CaMV 35S 등)를 사용하고 있다. 즉 일반 promoter는 조직 특이성이 아니어서 식물체의 전체적인 성장에 영향을 미칠 수 있다. 본 연구에서는 genomic library를 만들어 xylem에 특이하게 발현하는 promoter를 찾아내어 antisense유전자 construct를 만듦으로서 lignin형성이 이루어지는 xylem에서만 도입유전자가 발현하게 하여 도입유전자의 부정적 영향을 최소화 할 것이다. 국내의 pulp수요가 계속적으로 증가하고 있으며 국내 pulp재 생산량은 제한되어 있다. 반면 외국 pulp재의 수입은 88년 이래로 계속 증가하여 93년 현재 국내수요량의 62%를 차지하고 있다. 본 실험에 사용될, pulp재로 가장 많이 이용되고 있는 poplar류는 속성수, 짧은 섬유장, 조직배양 용이 그리고 유전자 조작용이 등의 잇점을 가지고 있다. 최근 미국에서는 poplar류에 대해서 임업이 아닌 농업수준에서 재배하여(Intensive, Short Rotation cultivation) 단기간에 대량의 biomass생산을 노리고 있다. pulp원료용 목재중 침엽수는 거의 전량 국내재에 의해 공급되나 화학pulp의 원료로 사용되는 활엽수의 대부분이 chip의 형태로 외국에서 수입되고 있다. 산림청에서도 현재 pulp재의 안정적 공급과 국내자원의 확보를 위해 속성활엽수의 조림을 적극 고려하고 있다. 제안된 본 연구결과 얻어질 transgenic poplar도 삽목을 통해 대량 증식하여 휴, 폐경지, 하천부지등에 대량식재하면 현재의 pulp재 수급상황을 호전시킬 수 있을 것이다. 여러수종에서 clone된 유전자를 도입하여 우리의 연구대상 수종 고유의 유전자 cloning에 이용할 수는 있으나 도입유전자를 학술적 실험의 목적외에는 이용할 수가 없음이 법으로 제한되어 있다. Vector system 또한 실험실에서 학술적 실험목적이외에는 사용이 금지되어 있다. 우리 자체에서 clone된 유전자, vector로서만이 학술적 실험 이외의 목적 즉, 실제적목적 등에 무제한적으로 이용할 수 있다. 또한 transgenic plant가 생산되어 그 효율이 검정되면 국내의 pulp제지업계에서 저 lignin 함량 수종의 대량식재 및 pulp재로의 이용에 적극 참여 할 수 있을 것이다.

제 2 장 포플러 조직배양과 antisense vector를 사용한 형질전환체계의 개발

제 1 절 서 언

포플라는 한국뿐만 아니라 전세계적으로 분포하고 있는 넓은 식생을 가지고 있으며 임목에 있어서 가장 중요한 수종의 하나로서 간주된다. 특히 이들은 휴양림, 펄프재의 원료, 목재 그리고 무한한 biomass의 잠재력을 가지고 있어서 많은 연구자들에 의해서 유전, 육종 그리고 목재가공의 다양한 분야에 연구가 진행되고 있는 것이 사실이다.

국내에서는 펄프재의 원료로 사용되는 목재의 대부분은 수입에 의존하고 있는 것이 사실이다. 따라서 매년 늘어나는 종이류의 생산과 더불어 pulp, 제지산업에서 배출되고 있는 폐기물 또한 그 양이 계속 증가 추세에 있다. 원목에서 pulp화 공정과정에서 발생하는 lignin폐기물과 독성화학물질 및 악취 등은 심각한 환경오염을 유발하여 pulp산업을 오염산업으로 지칭하게한다. 하지만 국내 생산 pulp의 2/3이 화학 펄프화법에 의해 생산되어지고 있어 이러한 문제의 해결이 현재 상당히 어렵다고 할 수 있다.

Lignin은 식물체의 중요한 구성성분중의 하나로서 식물체의 유지에 필수적인 역할을 하지만 pulp화를 위해서는 많은 화학약품과 energy를 사용하여 cellulose 섬유로부터 제거 되어져야 한다. 따라서 Lignin 합성경로에 관여하는 효소의 활성을 유전공학적 방법 (Antisense RNA)을 통해 억제함으로써 저 lignin함량 pulp, 제지 원재료용 임목개발의 가능성은 이미 검정된 바 있으며, 기술개발시의 기대효과 (환경오염감소, 수입대체 및 수출, pulp산업의 효율증가)가 매우 크므로 연구 개발의 필요성이 매우 시급하다고 판단된다.

OMT (O-methyl transferase) 유전자는 lignin 합성에 가장 중요한 역할을 하며 또한, 다양한 종간에도 homology가 높기 때문에 이들 유전자를 억제함으로써 lignin 합성을 감소시킨다는 것이 가능할 것으로 판단되고 있다. 임목에 있어 새로운 품종

의 육성은 긴 세대기간 때문에 상당한 시간이 소요되며 육종의 효율이 낮다고 할 수 있다. 기존의 육종방식으로는 어렵거나 불가능한 이러한 품종개발을 위해 실용성이 있는 유전공학적 방법의 이용은 목적달성에 적절한 방법을 제공 할 것이다. 본 세부연구에서는 양황철에서 분리된 antisense OMT 유전자를 사용하여 동 포플러 식물에 Agrobacterium을 사용하여 재도입한 후 형질전환체를 선발함으로서 lignin 형성을 감소시켜 저리그닌을 가지는 포플러 식물체를 생성하는데 있다. 본 세부과제는 양황철 포플러 식물의 기내증식과 항생제를 사용한 형질전환체의 선발 및 증식에 초점을 맡추었다.

세부과제 연구체계 모식도

제 2 절 실험방법

1. 선발된 수종들의 clone 별 기내증식과 재분화 체계의 확립

속성수로서 전국적으로 많이 식재되어 있고 펄프재로 이용되고있는 양황철 (*Populus nigra x maximowiczii*)를 실험대상수종으로 선정하였다. 경북산림환경연구소의 시험포에서 건강한 모수를 선정하여 96년 2월에 삽수를 채취하여 발근된 삽목을 직경 30 cm의 pot에 이식하여 성장시키고 있다. 또한 당해년도의 실험을 위해 성장이 시작되기 전인 2월말과, 성장 시작후인 3월말부터 한달 간격으로 모수로 부터 가지를 채취하여 형성층과 secondary xylem을 채취하였다. 기내증식된 시료 획득을 위하여 액아가 2개씩 포함되도록 절단한 신초에 세제와 Tween 20를 처리하여 표면 세척을 하였고, 흐르는 물에서 30분간 수세한 후, 무균상에서 70% 에탄올로 1분, 3% NaClO로 10분간 살균한 다음 멸균수로 각각 3번씩 세척하였다. 100 mg/l myo-inositol, 2% sucrose (이하 모든 배양 배지에 사용), 그리고 응고제로서 0.8% agar가 첨가된 생장조절제 무첨가 1/2MS 고체 배지에 액아를 배양하여 25 ± 1℃, 명암주기가 16/8 시간인 배양실에서 shoot를 유도한 후 계속적으로 유지하면서 형질전환을 위한 재료로 사용하였다.

2. 형질전환체의 획득에 관한 예비 실험

다량의 형질전환체의 획득을 위해서 먼저 *Agrobacterium* strain 들에 대한 식물체의 감수성에 대해서 조사를 실시하였다. 기내에서 증식된 *P. nigra x maximowiczii* (양황철), 그리고 *P. grandulosa* (수원사시)의 잎절편과 single nodal 절편들을 *Agrobacterium* strain들 (ALG-1 과 A281) 과 공배양 시킨후, 항생제를 첨가한 재분화 배지에서 계속적으로 측아와 재분화를 유기하였다. 약 3 주후, 임의로 선

발한 잎절편과 single nodal 절편에서 유기된 줄기를 GUS의 substrate인 x-gluc와 배양한 결과 GUS의 유전자의 발현을 감지 할수 있었다. 사용된 수종의 시료들은 ALG-1 과 A281 strain들에 예민한 감수성을 보여주고 있었으며 계속적인 분석을 위해서 기내에서 재분화를 유기시켰다. 이러한 형질전환 방법을 사용하면 antisense OMT의 유전자를 *Agrobacterium*의 binary vector에 삽입시켜서 저 lignin을 가진 형질전환체를 얻을 수 있다고 판단되었다. 또한 획득할 형질전환체들은 non-isotope을 사용하는 southern 분석으로 전환된 유전자의 확인을 수행하였다. 사용된 *Agrobacterium tumefaciens* (ALG-1 과 A281)는 각각 pBI121, p35SGUSINT 그리고 pZAc1을 가지고 있는 binary vector이다. 이 plasmid들은 reporter 유전자로서 β-glucuronidase (GUS) 와 selection marker 로서 Neomycin phosphotransferase II (NPTII)를 포함하고 있으며, 특히 p35SGUSINT은 GUS의 leader sequence에 intron이 삽입되어서 박테리아내에서 GUS 유전자의 발현을 방해함으로써 박테리아에 의한 X-gluc의 staining을 방지하여 잘못된 GUS의 staining을 제거해주는 이점이 있다. 하지만 식물체내에 T-DNA가 삽입되면 RNA splicing 기작에 의해서 intron이 제거되면서 완전한 발현을 야기시킬 수 있다.

3. antisense OMT를 사용한 형질전환체의 획득에 관한 실험

3년차 연구에서 조제된 antisense pBI121OMT vector를 *A. tumefaciens* LBA4404 strain으로 도입하여 poplar 형질전환에 사용하였다. 먼저, *A. tumefaciens* LBA4404의 single colony를 3 ml의 LB 액체배지에 접종하고 28℃에서 2일간 배양한 후, 200 μl를 취하여 100 ml의 LB 액체 배지에 새로 접종하고 28℃에서 overnight으로 배양하였다. Cell 밀도가 O.D.$_{540}$에서 0.3 - 0.5 정도 되었을 때 균주 배양액 40 ml을 취하여 8,000 rpm에서 5분간 원심분리 함으로서 cell을 모은 후, 0.01M Tris·HCl 25 ml을 첨가하여 다시 현탁시켰다. 현탁액을 8,000 rpm에서 5분간 원심하여 cell을 회수하였고, 1 ml의 LB 액체배지를 첨가한 후, antisense pBI121OMT plasmid DNA 1 μl와 LTE 24 μl가 들어 있는 microcentrifuge tube에 현탁액 100 μl를 첨가하여 잘 섞어주었다. 액체질소에서 5분, 그리고 37℃ 수조에서 25분간 incubation 한 후 LB 액체배지 1 ml을 첨가하고 혼합하여 28℃에서 2 시간 배양하였다. 배양이 끝난 후 10,000 rpm에서 1 분간 원심하여 900 μl의 상등액을 제거하고 나머지는 다시 현탁시켜 kanamycin과 streptomycin이 첨가되어 있는 LB 배지에 plating 하여 28℃에서 2일간

배양하였다. 형성된 colony로부터 DNA를 분리하여 제한효소를 처리함으로서 형질전환 된 colony를 선발하였다.

50 mg/l kanamycin이 처리된 LB 액체 배지에서 200 rpm으로 2 일간 배양된 균주를 조금 취하여 II 방법에 사용하였고, 나머지 배양액은 8,000 rpm에서 5분 원심하여 cell을 회수하고, 생장조절제 무첨가 1/2MS 액체 배지에 재현탁하여 I 방법의 공배양에 사용하였다.

pBI121OMT vector를 가지고 있는 A. tumefaciens strain LBA4404를 이용하여 poplar의 형질전환을 수행하였다. 형질전환은 두 가지 방법 (I 방법, II 방법)으로 진행되었다 (**Figure 2-1)**. 기내 확립된 poplar에서 전개가 잘 된 잎을 취하여 5 mm segment로 만든 후, *Agrobacterium*이 재현탁 된 생장조절제 무첨가 1/2MS 액체배지에 침적하여 30분간 균을 접종하였다. 멸균된 paper towel에서 수분을 제거한 후 1.0 mg/l 2,4-D, 0.1 mg/l BA가 처리된 1/2MS 고체배지 (callus 유도배지; CIM)에서 2일간 공배양 하였고, 100 mg/l carbenicillin이 첨가된 CIM 배지로 계대하여 1 주일 배양한 다음 50 mg/l kanamycin과 100 mg/l carbenicillin이 첨가된 CIM 배지에 계속적으로 배양하여 segment로부터 callus를 유도하였다. II 방법은 균주 배양액이 첨가된 (100 ㎕/100 ml) CIM 배지에 잎 segment를 치상하여 일주일 간 암배양 한 후 균주 배양액과 50 mg/l kanamycin이 첨가된 CIM 배지로 계대하여 계속적으로 암배양 하였다. 균주 배양액과의 공배양은 1개월 간 수행하였고, 그 후 균주 배양액을 제거하고 50 mg/l kanamycin과 100 mg/l carbenicillin이 첨가된 CIM 배지에 계속적으로 암배양 하여 callus를 유도하였다. I 방법과 II 방법에서 유도된 callus는 segment로부터 분리하여 1.0 mg/l BA가 첨가된 1/2MS 고체배지 (재분화 배지; SIM)로 옮기고 명배양 하여 shoot의 재분화를 유도하였다.

Kanamycin 첨가 배지에서 선발된 재분화 개체 가운데 무작위로 5개체를 선발하여 antisense OMT 유전자의 존재 유무를 확인하였다. 재분화체에서 엽장이 10 mm, 엽폭이 5 mm 정도인 작은 잎 하나를 취하여 45 ㎕ ddH_2O와 5 ㎕ 0.5 N NaOH가 든 microcentrifuge tube에 넣고 pestel을 이용하여 간 후, 전자레인지에서 5분간 가열하였다. 12,000 rpm에서 3분간 원심한 다음 20 ㎕의 상등액을 취하여 4 ㎕ 0.25 N HCl과 섞고 즉시 얼음에 담그어 PCR 분석에 이용되는 template DNA로 사용하였다.

GUS staining에 의해 선발된 형질전환체나 callus에서 변형된 CTAB 방법을 사용하여 total genomic DNA를 분리한후에 GUS의 primer 들을 가지고 무작위로 선발된 형질전환체의 증폭을 하여 계속적인 형질전환체 선발하였다. 사용된 GUS의 primer sequence 들은 다음과 같다.

primer 1: 5'GGTGGGAAAGCGCGTTACAAG3'

primer 2: 5'GTTTACGCGTTGCTTCCGCCA3'

PCR (Techne)은 20 ng template DNA, 1 μM NPTII primers, 25 mM $MgCl_2$, 10 mM dNTPs, 10X reaction buffer, 그리고 1 unit Taq DNA polymerase를 혼합하여 25 μℓ로 만든 후 수행하였다. 먼저 94℃에서 1분 30초간 denaturation 시킨 후, 92℃에서 50초, 52℃에서 50초, 74℃에서 50초간 30회 반응시켰고, 마지막으로 75℃에서 5분간 반응시켰다. 증폭된 DNA를 1% agarose gel에서 전기영동 한 후, ethidium bromide로 염색하였고 UV transilluminator 상에서 나타난 band를 관찰하였다.

PCR 분석을 통하여 나타난 5개 재분화체의 PCR product를 이용하여 southern 분석을 실시하였다. Gibco BRL의 PhotoGene™ Nucleic Acid Detection System을 사용하여 southern 분석을 수행하였고, OMT plasmid에서 증폭된 0.7 kb의 PCR product를 Gibco BRL의 BioNick™ Labeling System 으로 probe를 만든 후 hybridization에 이용하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. 선발된 수종들의 clone 별 기내증식과 재분화 체계의 확립

가. 포플러종의 기내증식과 재분화

양황철 (*P. nigra x maximowiczii*) 그리고 수원사시를 실험 대상수종으로 1차년도에 선정하여 실험의 대상으로 하였다. Clone별로의 기내식물의 확보를 성공적으로 수행하여 기내식물을 대량으로 증식시켰으며 **(Figure 2-2)**. 확보된 기내시료에서 측아를 1개내지 2개를 포함하는 nodal segment들을 BA 0.5 mg/l를 첨가한 MS 배지에 수평으로 치상 하였다. 약 6주에서 8주 정도후의 배양결과, 측아에서 대량의 줄기가 형성된 것을 관찰하였다 **(Figure 2-3)**. 같은 방법을 사용하여 나머지 수종을 기내에서 대량증식 시켜서 1년차와 2년차 동안 기내시료를 충분히 확보하였다. 유기된 기내시료들을 더욱 발육시키기 위해서 식물 성장 촉진제를 첨가하지 않은 1/2MS 배지에 치상하여 잎, 줄기 그리고 뿌리 성장의 발달을 촉진시켰다. 계속적인 기내증식을 통하여 재분화와 형질전환에 필요한 기내 시료들을 충분히 확보하였다.

기내에서 성장시킨 포플러 잎을 사용하여 clone별로의 재분화 체계를 확립시킨후 기내에서 성장시킨 양황철에서 약 1cm 길이의 잎을 선발하여, 침으로 10 번 정도 자극하여 재분화 배지 (MS + BA 0.4 mg/l)에 치상하여 약 6 주정도 배양한 결과 다량의 재분화 개체를 획득하였다 **(Figure 2-4)**.

나. model 식물의 기내증식과 재분화 유도

포플러 식물의 형진전환체계의 실험과 병행하여 담배 식물을 model로 선정하여 기내증식과 재분화 그리고 형질전환에 대한 여러 가지 실험을 수행하였다. 먼저 담배종자를 소독한 후에 MS 배지에 치상하여 발아를 유도하였다. 약 1 주후 발아된 담배를 같은 MS배지에 치상하여 성장을 유도하였다. 약 2개월후, 성장한 담배줄기를 1 cm 로 절단하여 BA 2 mg/l를 첨가한 배지에 치상하여 기내증식을 유도한 바 기내 대량증식을 유도하였으며, 동시에 엽육조직에서 약 1cm 정도로 절단한 후 침으로 10

번 정도 자극하여 담배 재분화 배지 (MS + BA 4 mg/l)에 치상하여 약 3 주정도 배양한 결과 다량의 재분화 개체를 획득 할 수 있었다 **(Figure 2-5)**.

2. 포플러와 model 식물의 형질전환체 생성, 선발과 증식

다량의 형질전환체의 획득을 위해서 먼저 *Agrobacterium*에 대한 식물체의 감수성에 대해서 조사를 실시하였다. 현재까지 기내에서 증식된 양황철 (*P. nigra x maximowiczii*) 잎과 single nodal 절편들을 *Agrobacterium* strain (ALG-1)과 LBA4404와 공배양 시킨 후, 항생제를 첨가한 재분화 배지에서 형질전환체 생성을 유기하였다. 약 3 주후, 임의로 선발한 잎절편과 single nodal 절편에서 유기된 줄기를 GUS의 substrate인 x-gluc와 배양한 결과 GUS의 유전자의 발현을 감지 할 수 있었으며 사용된 수종의 시료들은 모두ALG-1 그리고 LBA4404 strain에 예민한 감수성을 보여주고 있는 것을 관찰하였다. 또한 계속적인 분석을 위해서 기내에서 형질전환체로 추측되는 callus들을 계속적으로 항생제를 첨가한 배지에서 선발하였다. 또한 callus들의 일부분을 항생제를 첨가한 재분화 배지에 치상하여 재분화를 유기시킨 바, 약 12 주후부터 callus에서 부정줄기들의 생성을 관찰 할 수 있었다. 하지만 이들 callus에서 생성된 형질전환체 선발체들은 항생제 즉 kanamycin을 첨가한 배지에 계속적으로 배양하기 때문에 성장과 발육이 상당히 저하되며 성장률도 대조구와 비교해 볼 때 아주 낮은 것이 관찰되었다.

예비실험에 사용된 *Agrobacterium tumefaciens* strains and binary vectors

P. nigra x maximowiczii (양황철)는 재분화시스템 (1/2 MS + 0.1 m/l BA)이 확립되어 있기 때문에 비교적 단기간에 많은 기내 배양 식물체를 유기시킬 수 있으며, 공배양후 재 분화된 형질전환체를 얻기에도 유리하다. 이 재분화 시스템을 이용하여 형질전환의 예비실험을 수행했다. 본 실험에서는 기내배양을 통해 증식된 잎과 single nodal 절편들을 사용하였다. 잎은 pin으로 상처를 준 후, 2 - 3분 정도 *Agrobacterium* 용액에 담가두었다. 이러한 시료들은 BA 0.1 mg/l 가 첨가된 1/2MS 고체배지(재분화배지)에 치상하여 하루 또는 이틀정도 암상태에서 공배양 시켰다. 이들을 다시 항생제(kanamycin 100 μg/ml, carbenicillin 500 μg/ml)를 첨가한 재분화

배지에 치상하여 *Agrobacterium*의 성장을 억제시키는 동시에 형질전환된 조직이나 세포에서 재분화를 유도하였다. 계속적인 *Agrobacterium*의 성장을 억제하기 위하여 일주일 간격으로 지속적인 계대배양을 해주었다.

형질전환체의 선발은 먼저 시료를 Agrobacterium 과 공배양후의 잎이나 single nodal 절편들을 약 2-3주 정도의 간격으로 GUS의 substrate인 x-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyly
-beta-D-glucuronidase) 를 사용하여 GUS의 발현정도를 조사하였다. 첨부한 사진에서 보는 바와 같이 p35SGUSINT을 가지고 있는 *Agrobacterium* strain과 공배양한 측아에서 생성된 줄기가 파란색으로 staining이 됨으로, GUS 유전자의 발현을 감지할 수 있었다 **(Figure 2-6 & 2-7)**. 또한 임의로 선발한 leaf disk에 x-gluc와 staining 한 결과 유기된 callus들에서 파란색으로 변한것으로 보아 형질전환된 것으로 추정된다 (Figure 8). 나머지 시료들은 계속적으로 항생제를 첨가한 재분화배지에 배양하여 부정줄기를 유도하였다. **(Figure 2-9)**. 본 실험에서 나타난 바와 같이 잎절편 뿐만 아니라 측아에서 생성된 줄기에서도 형질전환체의 획득가능성을 보여주고 있는 것을 알수 있었다.

Antisense OMT 유전자를 가지고 있는 *A. tumefaciens*와 공배양 된 잎 segment를 CIM 배지에 배양한지 1개월 후부터 잎 segment가 조금씩 팽창하기 시작하였다. 가장자리 부위에서 먼저 반응이 일어났고, 차츰 pin으로 상처를 준 부위도 반응하였다. 2개월 후부터 탈분화 반응이 시작되었고 암배양한지 5개월 후에 잎 segment로부터 callus가 형성되었다. 형질전환 되지 않은 정상개체의 callus와 비교했을 때, callus가 유도되는 시기도 늦었으며, callus의 생장도 저조하였다. 초기에 callus가 형성될 때에는 대부분 엽맥 끝부분에서 유도되었고, 잎의 크기가 커졌지만 callus가 유도되지 않은 segment들도 있었다. 뿌리가 유도된 경우도 있었는데 이 경우 callus 단계를 거치지 않고 잎 조직으로부터 바로 유도되었다. II 방법과 I 방법을 비교했을 때 잎 segment의 상태는 II 방법이 더 좋았지만 반응은 I 방법이 더 빠르게 나타났다. I 방법의 경우 배양된 191개의 잎 segement 중 88개에서 callus가 유도되어 46.1%의 빈도를 보였으며, II 방법은 200개 중 88개가 반응하여 44%로 나타났다 **(Figure 2-10, Table 2-1)**. 또한, 같은 segment이지만 여러 부위에서 동시에 callus가 유도된 경우도 있었다.

Adventitious shoot를 유도하기 위하여 segment로부터 callus 들을 분리하여 SIM 배지로 계대하여 명배양 하였다. SIM 배지에서도 callus 들은 조금씩 생장하였고 1 주일 후부터 녹색으로 변하였다. 그러나, callus에 따라서 반응 정도는 달랐는데 녹색으로 변하는 callus가 있는 반면 계속적인 명배양 하에서도 녹색을 띠지 않는 callus 들도 있었다. 명배양 된 지 6개월 후에 callus로부터 shoot가 재분화 되었는데, 전체가 녹색인 callus 보다는 부분적으로 녹색을 띠는 callus에서 우선적으로 유도되었지만, 재분화되는 shoot의 수는 전체가 녹색인 callus가 더 많았다. 녹색을 띠지 않는 callus 들에서는 재분화가 관찰되지 않았고, friable 한 callus 보다는 compact 한 callus에서 재분화가 되는 것을 관찰하였다 **(Figure 2-11)**

재분화된 shoot들을 callus로부터 분리하여 생장조절제 무첨가 1/2MS 배지로 옮겨 길이 생장을 유도하였다. 배양된 shoot들은 외관상으로는 정상개체와 차이가 없었으나, 줄기가 정상개체보다 약하여 약간 휘는 경향이 있었다 **(Figure 2-12)**. 그러나, 생장은 정상개체보다 빨랐으며, 발근도 정상개체와 비슷하였다. 이들의 선발된 형질전환체들은 기외에 이식하여 계속적인 성장을 유도하여 리그닌분석에 사용하였다 **(Figure 2-13 & 2-14)**.

성장한 형질전환체를 무작위로 추출하여 genomic DNA를 분리한후 NPTII primer를 사용하여 PCR 증폭을 하였다. 선발된 형질전환체 모두에서 NPTII 유전자가 증폭된 것을 보아 이들 모두 외부에서 antisense OMT 유전자를 가지고 있다는 것을 추측하게 할수 있었다 **(Figure 15)**. 이들 형질전환체들은 더욱 증식시켜 northern 분석을 타 세부과제에서 분석을 수행하였다.

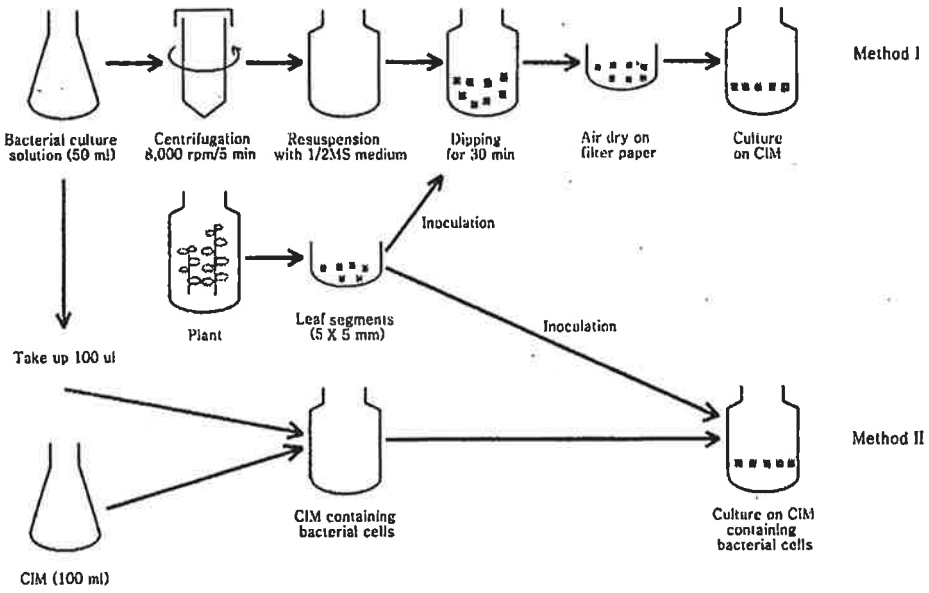


Figure 2-1. Schematic drawing of transformation methods (Method I and Method II).

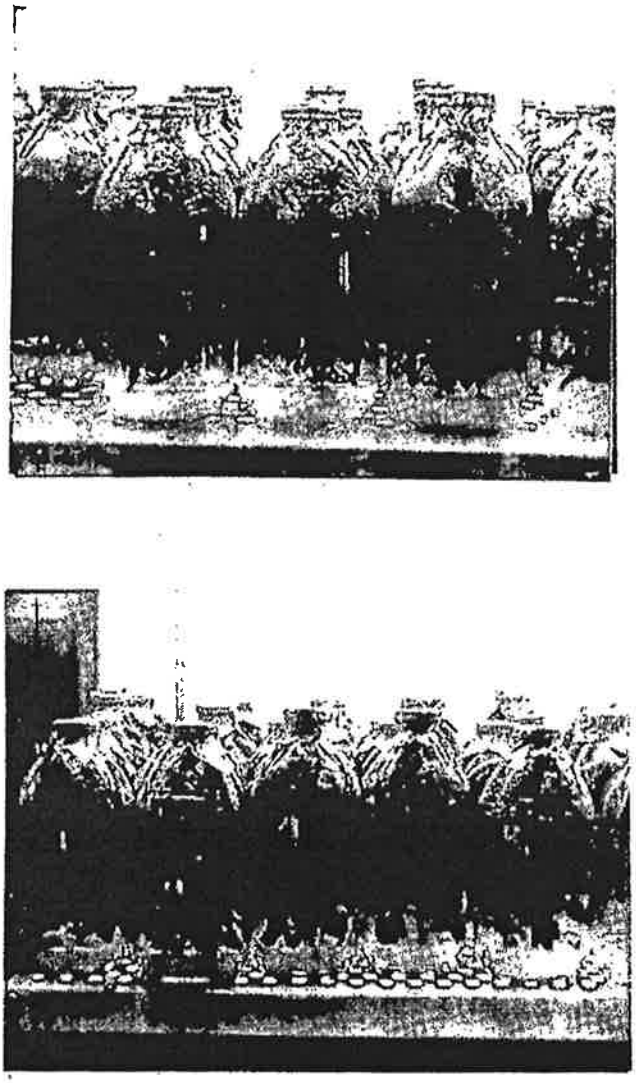


Figure 2-2. Multiple shoot proliferation and shoot elongation of *Populus* species in the culture room

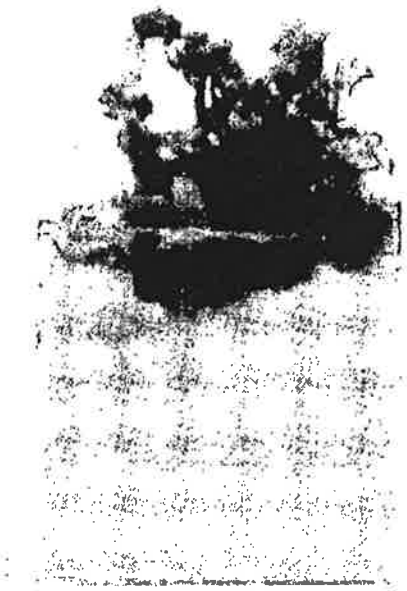


Figure 2-3. Mass micropropagation of *P. nigra x maximowiczii* derived from proliferating axillary shoots from nodal segments.

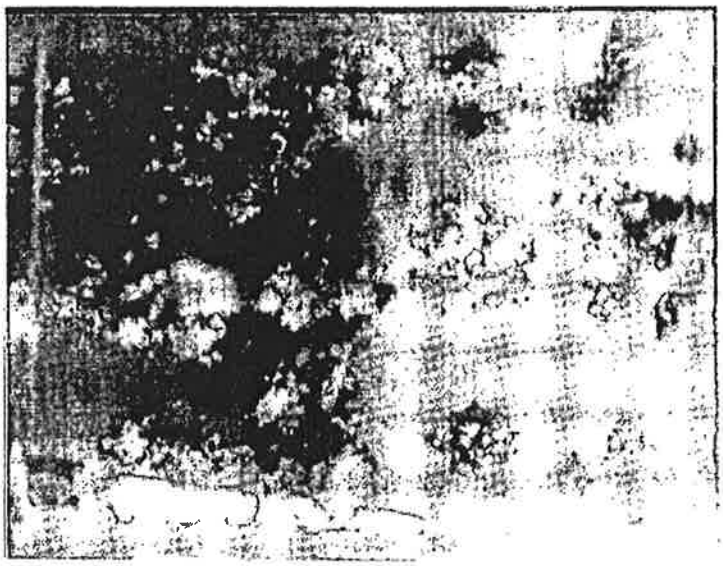


Figure 2-4. High frequency of regeneration from leaf tissues of *P. glandulosa* and *P. nigra* x *maximowiczii*

Figure 2-5. Multiple shoot induction from model plant (tobacco) and subsequent shoot elongation in vitro.

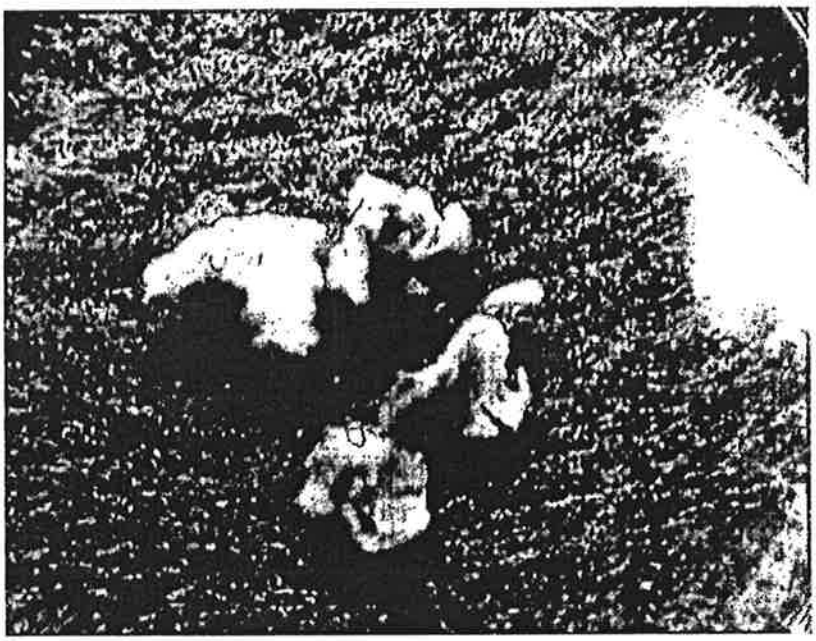


Figure 2-6. Gus expression of trangenic tobacco plants showing blue-staining whole plant.

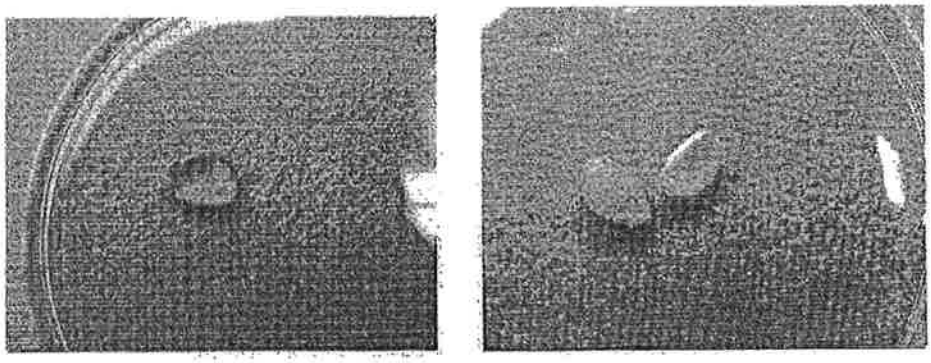


Figure 2-7. Gus expression of developing callus from leaf tissues cultured on the MS medium supplemented with BA 0.5 mg/l and kanamycin 50 ug/ml

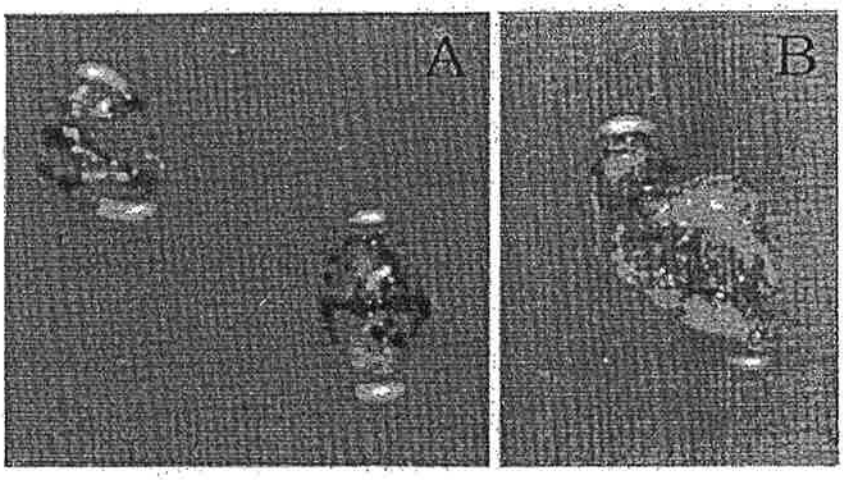


Figure 2-8. GUS histochemical assay after 2 month induction.
A, intact status of callus before excising from leaf segments;
B, samples from callus mass.

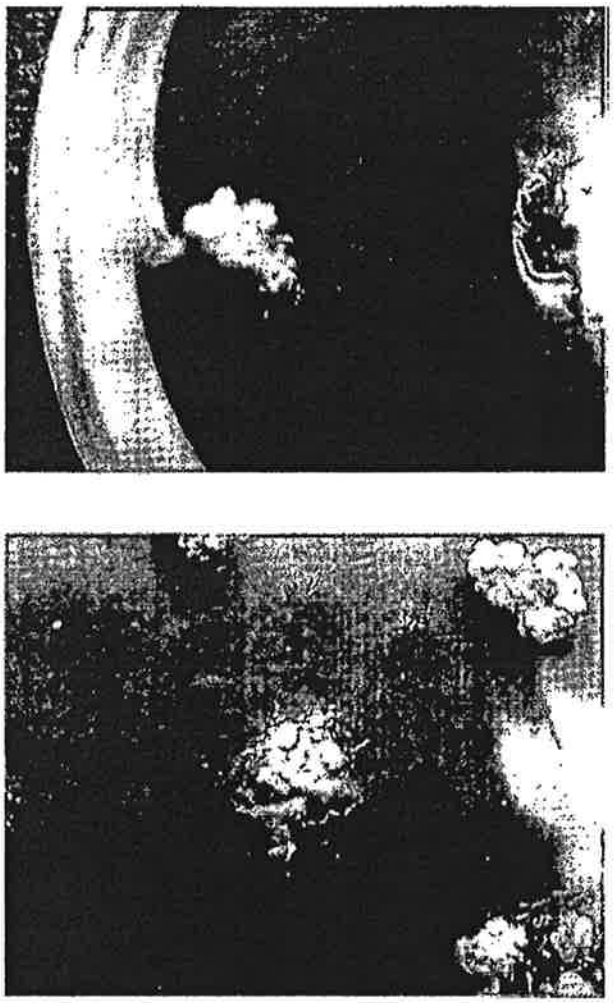


Figure 2-9. Induction of putative transgenic calli and transgenic adventitious shoots from leaf segments of *Populus nigra* x *maximowiczii*

	Control 1	Control 2	Method I	Method II
Total leaf no.	50	25	191	200
Leaf no. with callus	49	8	88	88
Mean	0.98	0.32	0.46	0.44
%	98	32	46.1	44

Table 2-1. Frequency analysis of callus induction after *Agrobacterium* transformation.
Control 1 is uninfected leaf segments cultured on CIM without kanamycin and
Control 2 is uninfected leaf segments cultured on CIM with kanamycin.

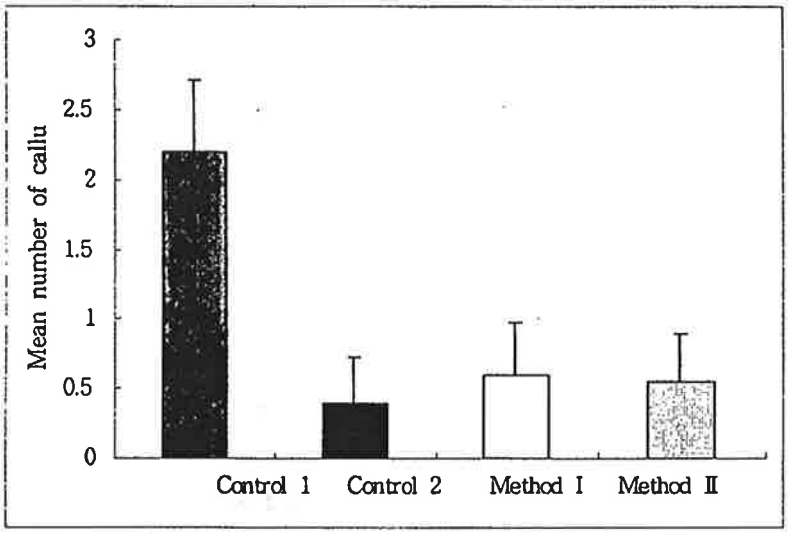


Figure 2-10. Induction of callus from poplar leaf segments.
Mean numbers of callus induced from leaf segments on CIM with 50 mg/l kanamycin. Bars indicate standard error.

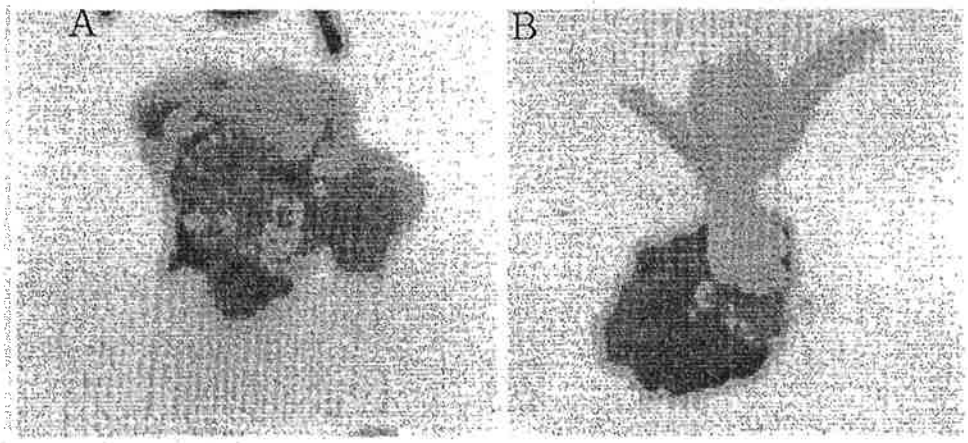


Figure 2-11. Induction of callus and putative transgenic plant.
A, callus induced from leaf segment;
B, induction of adventitious shoot from callus.

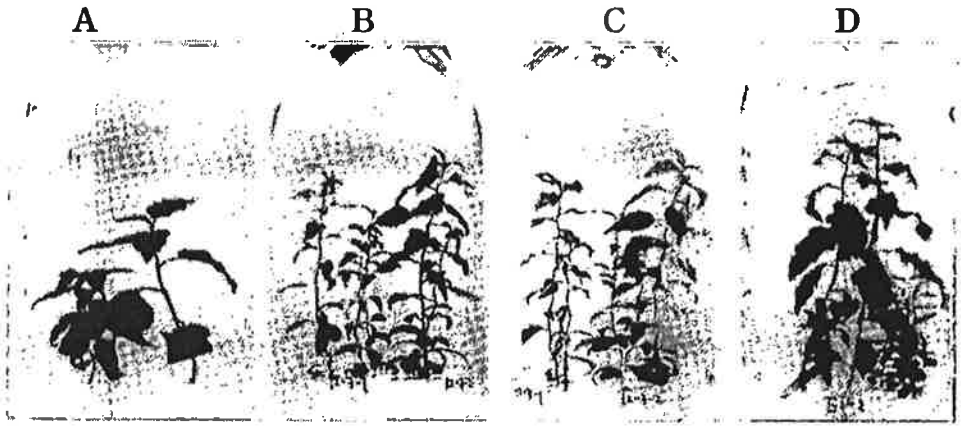


Figure 2-12. Development of putative transgenic poplar in *in vitro*.
Putative transgenic poplars were screened
from kanamycin resistant calli.
A, untransformed control plant; B, to D, transgenic plants

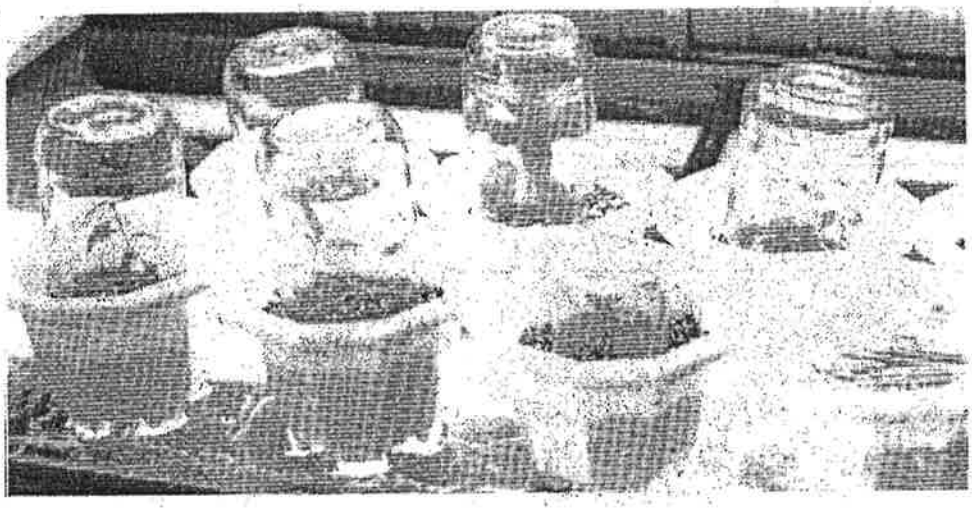


Figure 2-13 . Acclimatization of selected transgenic poplars in the growth chamber.

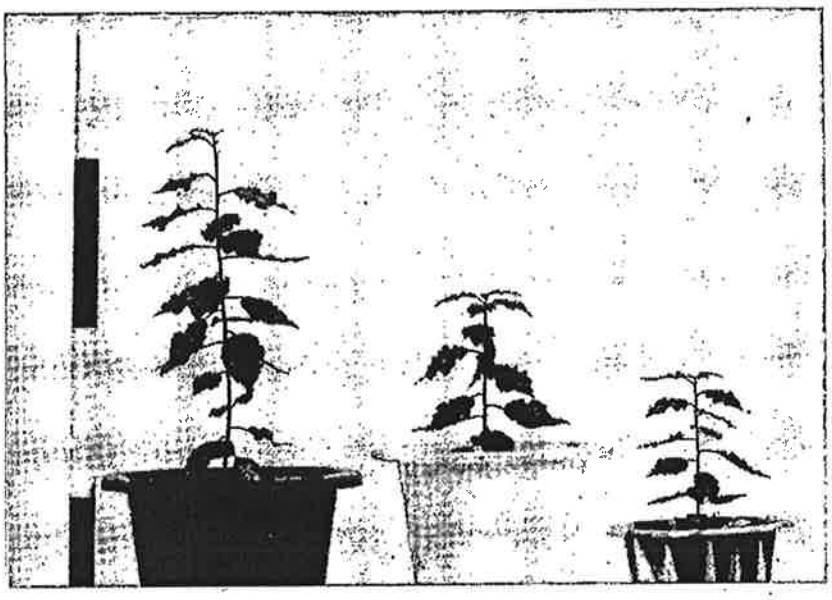


Figure 2-14. Further growth of transgenic populus in greenhouse to analyze OMT lingnin contents.

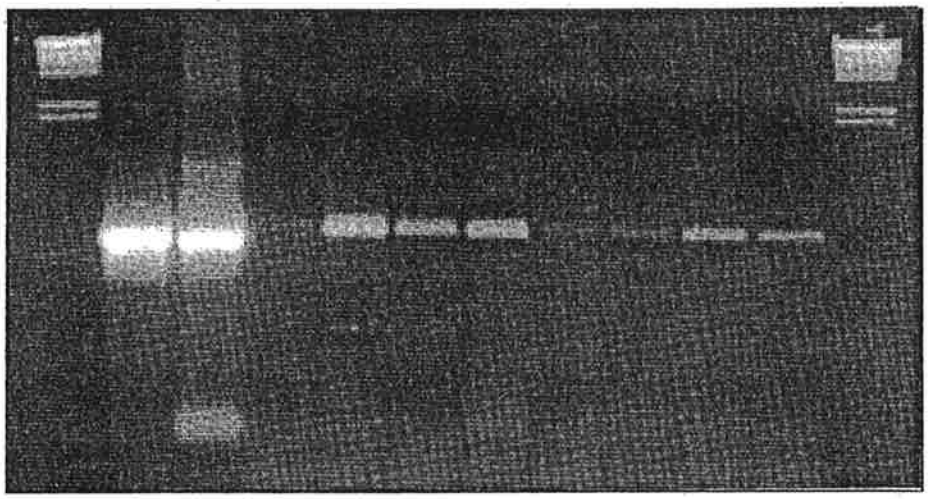


Figure 2-15. PCR amplification with OMT primer.
Template DNAs were isolated from putative calli

제 4 절 참고문헌

Ahuja M.R. 1987. In vitro propagation of poplar and aspen. In: Bonga, J.M.; Durzan D.J., eds. Cell and tissue culture in forestry, Vol. 3 Case histories: Gymnosperms, angiosperms and palms. Dordsrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers: 207-223.

Atanassova R., Favet N., Martz F., Chabbert B., Tollier M.T., Monties B., Fritig B., & Legrand M. 1995. Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing *O*-methyltransferase sequences in sense and antisense orientation. Plant J. 8: 465-477.

Baucher M., Bernard-Vailhé M.A., Chabbert B., Besle J.M., Opsomer C., Montagu M.V., & Botterman J. 1999. Down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.) and the effect on lignin composition and digestibility. Plant Mol. Biol. 39: 437-447.

Baucher M., Chabbert B., Pilate G., van Doorsselaere J., Tollier M.T., Petit-Conil M., Monties B., van Montagu M., Inzé D., Jouanin L., & Boerjan W. 1996. Red xylem and higher lignin extractability by down-regulating a cinnamyl alcohol dehydrogenase in poplar. Plant Physiol. 112: 1479-1490.

Bugos R.C., Chiang V.L., & Campell W.H. 1991. cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin-bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase of aspen. Plant Mol. Biol. 17: 1203-1215.

Bugos R.C., Chiang V.L., & Campell W.H. 1992. Characterization of bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid *O*-methyltransferase of aspen. Phytochemistry 31: 1495-1498.

Clough S.J. & Bent A.F. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 16: 735-743.

Collazo P., Montoliu L., Puigdomènech P., & Rigau J. 1992. Structure and expression of the lignin *O*-methyltransferase gene from *Zea mays* L. Plant Mol. Biol., 20: 857-867.

De Block M. 1990. Factors influencing the tissue culture and the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of hybrid aspen and poplar clones. Plant Physiol. 93: 1110-1116.

Drake P.M.W., John A., Power J.B., & Davey M.R. 1997. Cytokinin pulse-mediated shoot organogenesis from cotyledons of Sitka spruce [*Picea sitchensis* (Bong) Carr.] and high frequency *in vitro* rooting of shoots. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 50: 147-151.

Ellis D.D., McCabe D.E., Mclnnis S., Ramachandran R., Russell D.R., Wallace K.M., Martinell B.J., Roberts D.R., Raffa K.F., & McCown B.H. 1993. Stable transformation of *Picea glauca* by particle acceleration. Bio/Technology 11: 84-89.

Fillatti J.J., Sellmer J., McCown B., Haissig B., & Comai L. 1987. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of *Populus*. Mol. Gen. Genet. 206: 192-199.

Grisebach H. 1981. Lignins. In The Biochemistry of Plants. Vol 7, Conn E.E., ed (New York: Academic Press), pp. 457-478.

Kuroda H., Shimada M., & Higuchi T. 1975. Purification and properties of *O*-methyltransferase involved in the biosynthesis of gymnosperm lignin. Phytochemistry 14: 1759-1763.

Kuroda H., Shimada M., & Higuchi T. 1981. Characterization of a lignin-specific *O*-methyltransferase in aspen wood. Phytochemistry 20: 2635-2639.

Murashige T., & Skood F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 73-97.

Ni. W., Paiva, N.L., & Dixon, R.A. 1994. Reduced lignin in transgenic plants containing a caffeic acid *O*-methyltransferase antisense gene. Transgenic Res. 3: 120-126.

Park Y.G., & Son S.H. 1992. *In vitro* shoot regeneration from leaf mesophyll protoplasts of hybrid poplar (*Populus nigra* x *maximowiczii*). Plant Cell Rep. 11: 2-6.

Portrykus I. 1990. Gene transfer to cereals: an assessment. Bio/Technology June: 535-542.

Sambrook J., Fritsch E., & Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. NY.

Walter C., Carson S.D., Menzies M.I., Richardson T., & Carson M. 1998. Review: Application of biotechnology to forestry-molecular biology of conifers. World J. Microb. & Biotech. 14: 321-330.

Zobel B.J., & van Buijtenen J.P. 1989. Wood variation. Its causes and control. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.

제 3 장 Antisense OMT 형질전환체의 선발과 리그닌 분석

제 1 절 서 언

리그닌은 모든 고등 식물에서 발견되는 방향족 고리를 가진 poly-phenyl propanoid 중합체로서 이차 세포벽의 중요한 구성성분중 하나이다. Cellulose 다음으로 많은 양이 존재하며, 전체 건중량의 15 - 36%를 차지하는 것으로 알려져 있다. 리그닌은 cellulose 및 세포벽내의 다른 다당류와 강하게 결합되어 있어 식물체로부터 분리하기가 어렵기 때문에 정확한 구조를 알 수는 없지만, 일반적으로 *p*-coumaryl, coniferyl, 그리고 sinapyl alcohol의 세 가지 phenylpropane alcohol로 구성되어 있다고 알려져 있다. 이들은 몇 가지 종류의 peroxidase에 의해서 산화되고 random fashion으로 결합하여 p-hydroxyphenyl, guaiacyl, syringyl 리그닌을 형성한다. 세포벽에 축적된 리그닌은 식물체 지지, impermeabilization에 중요한 역할을 담당하며, 병원균에 대한 화학적, 기계적 방어 작용을 한다.

리그닌을 구성하는 monolignol precursor는 여러 반응 단계를 거치는 복잡한 phenylpropanoid pathway를 통하여 형성된다. 개개의 monolignol은 methoxylation의 정도에 따라 구분되며, 이로 인해 중합시 다양한 결합이 가능하게 된다. 세포질에서 생합성된 리그닌은 이동하여 이차세포벽에 축적되는데 이 과정에서 리그닌의 heterogeneity가 조절된다. 세포벽에서의 위치, 세포나 조직의 발달 단계, 환경적 stress 등에 따라 리그닌 subunit의 조성이나 양이 달라지며, 이러한 차이는 같은 종 내에서, 또는 서로 다른 종간에서 나타날 뿐만 아니라 동일한 개체일지라도 세포나 조직의 차이에 따라서도 나타나게 된다. 또한, wounding, fungal attack, specific enzyme inhibitors, mutations, hormones, metal ions, 그리고 light와 같은 인자들에 의해서도 조성이 달라진다 (Baillieul et a., 1995; Diallinas & Kanellis, 1994; Gowri *et al.*, 1991; Grand *et al.*, 1982; Gregersen *et al.*, 1994; Pellegrini *et al.*, 1993; Pellegrini *et al.*, 1994; Whetten & Sederoff, 1995)). 리그닌 조성의 차이는 나자식물과 피자식물 사이에서도 나타나게 되는데 피자식물의 경우 guaiacyl 리그닌만을 가지는 반면, 나자식물은 syringyl 리그닌과 guaiacyl 리그닌을 모두 가진다 (ref). syringyl 리그닌은 pulping 과정에서 guaiacyl 리그닌보다 추출하기가 더 용이하기 때문에 나자식물이 pulp와 제지 산업에서 더 선호되고 있다.

리그닌 합성에는 여러 가지 효소가 관여하고 있는데 그 가운데 phenylpropanoid pathway의 첫 반응을 촉매하는 phenylalanine ammonia lyase (PAL), methylation에 관여하는 O-methyltransferase (OMT), 그리고 monolignol 합성의 마지막 단계에 속하는 cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)가 가장 많이 연구되어 왔다.

PAL은 phenylalanine의 deamination을 유도하여 cinnamic acid로 되는 반응을 촉매한다. Multiple gene에 의해서 encoding 되는 PAL subunit은 조직특이성을 나타내지만 서로 다른 kinetic 특성을 보이는 여러 가지 isoform이 phenylpropanoid 대사과정에서 다른 역할을 한다는 실험적 증거는 많지 않다.

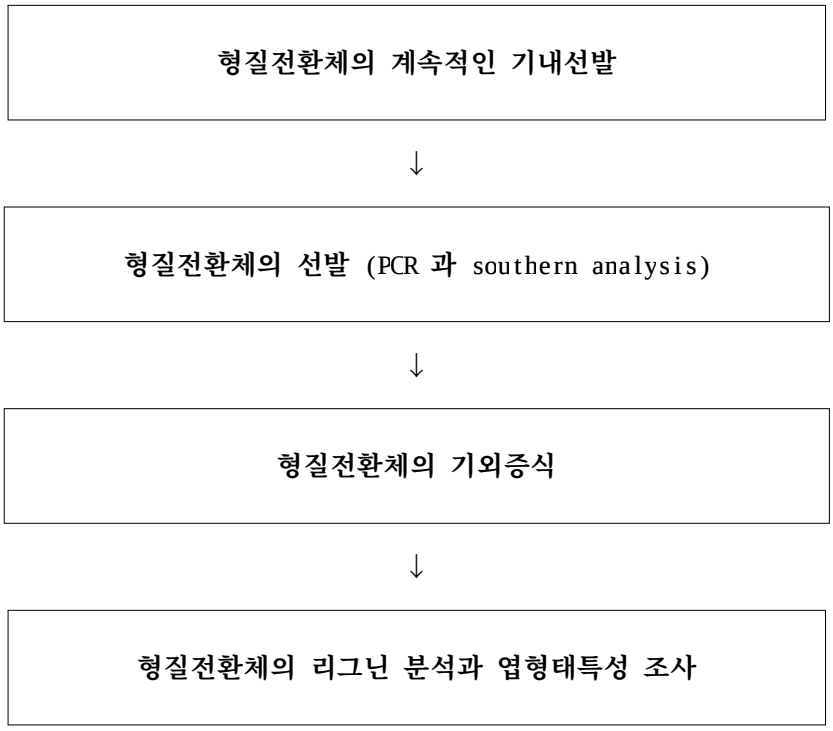
Cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD)는 aldehyde에 작용하여 세 가지 형태의 alcohol (p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol, 그리고 sinapyl alcohol)을 유도한다. CAD가 나타내는 기질 친화성의 차이는 서로 다른 종류의 리그닌이 합성될 수 있는 조절 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 여러 종류의 isoform이 밀, 콩, Salix, Eucalyptus 등에서 발견되었고, 다양한 연구가 진행되었다. CAD activity는 피자식물과 나자식물에서 차이를 보이는데 피자식물의 경우 coniferaldehyde에 더 효과적으로 작용하지만, 나자식물에서는 coniferaldehyde와 sinapaldehyde에서 비슷한 activity를 가진다. 비록, CAD 유전자가 리르닌 형성과 관련되어 있지만 lignification 반응이 일어나지 않는 세포내에서도 CAD는 발현되며, 또한 강한 stress성 환경, 병원균 elicitor 및 상처에 의해서도 발현된다.

O-methyltransferase (OMT)는 S-adenosyl-L-methionine의 methyl group을 이용하여 caffeic acid를 ferulic acid로, 5-hydroxyferulate를 sinapate로 각각 methylation 시킨다. 3-hydroxyl group의 methylation은 방향성 고리의 반응 site를 감소시켜 중합반응 동안에 다른 종류의 monolignol을 형성할 수 있게 한다. CAD와 유사하게 OMT 역시 기질에 대한 친화성에 있어서 차이를 보이는데 이것은 리그닌 monomer 조성을 결정하는 역할을 한다. 나자식물 OMT가 ferulate와 sinapate로의 conversion을 모두 촉매하는 bifunctional (Bugos *et al.*, 1992)한 유전자인 반면, 피자식물 OMT는 ferulate로의 conversion만을 촉매하는 monofunctional (Shimada *et al.*, 1972; kuroda *et al.*, 1975)한 유전자이다. OMT는 특히 식물이 병원균에 의해 침입을 받게되면 lignin precursor를 형성하거나 (Jaeck *et al.*,1992; Schmitt *et al.*, 1991) phytoalexin이라고 총칭되는 다양한 antimicrobial 이차대사산물을 합성하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다 (Hauffe *et al.*, 1986; Dalkin *et al.*, 1990). OMT 활성은 병원균이나 elicitor 처리에 의해 증가하였는데, fungal-elicitor 처리된 Jact pine의 cell culture에서 monolignol 생합성 효소 활성의 변화와 함께 guaiacyl 리그닌의

축적이 관찰되었고, OMT 활성은 리그닌 축적과 유사하게 점차적으로 증가하였다 (Campbell and Ellis, 1992ab). 그러나, caffeic acid와 methyl-^{14}C-SAM을 이용한 *in vitro* 실험에서 OMT는 basal medium과 induction medium에서 모두 비슷한 증가를 보여 lignification 시기와는 관련이 없으며, 적어도 in vitro tracheary element의 형성 동안에는 lignification에 관여하지 않는 것으로 나타났다 (Ye *et al.*, 1994).

본 세부과제에서는 양황철 수종을 시료로 하여 생성된 형질전환체에 대한 분자생물학적인 방법을 통한 선발과 이들 선발된 개체에 대한 형태분석과 리그닌 분석에 촛점을 맡추고 있다.

연구수행내용


형질전환체의 계속적인 기내선발
↓
형질전환체의 선발 (PCR 과 southern analysis)
↓
형질전환체의 기외증식
↓
형질전환체의 리그닌 분석과 엽형태특성 조사

제 2 절 실험 방법

1. 형질전환체의 검정

가. DNA 분리

형질전환을 통하여 얻어진 개체가운데 기내에서의 생장이 좋은 5개 개체를 무작위로 선발하여 OMT 유전자의 존재 유무를 PCR과 Southern 분석으로 확인하였다. 먼저 선발된 5개 개체와 대조구로서 형질전환되지 않은 개체를 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 엽장이 약 1cm 정도되는 잎 하나를 취하여 5 ㎕의 0.5N NaOH와 45 ㎕의 ddH_2O가 들어있는 microcentrifuge tube에 넣고 pestle을 이용하여 잘 갈아주었다. 이 tube들을 전자렌지에서 5분간 가열한 후 12,000 rpm으로 원심분리하여 상등액만을 취하였다. 20 ㎕의 상등액을 5 ㎕의 0.25N HCl이 들어있는 microcentrifuge tube에 넣은 후 tapping을 하여 mix 한다음 즉시 얼음에 담그어 이들의 추출용액을 template DNA로 사용하였다.

나. Polymerase Chain Reaction

형질전환 개체와 대조구 개체에서 분리된 genomic DNA를 사용하여 PCR을 다음과 같이 수행하였다. 상기의 방법으로 분리한 template DNA 중 1 ul를 취하여 10X PCR buffer, 25 mM $MgCl_2$, 25 pmole primer, 10 mM dNTPs, 1 unit DNA polymerase를 혼합한 후, 물로 25 ㎕로 총 volume을 맞추어 PCR을 수행하였다. 기내에서 계속적인 선발을 위하여 kanamycin 항생제를 사용하여 선발함과 동시에, PCR을 사용하여 계속적으로 형질전환 callus와 재분화 개체인 형질전환체의 선발을 하였다. 사용된 primer는 kanamycin 내성을 나타내는 NPTII 유전자로 이들의 내부구조의 sequence의 일부분을 PCR 증폭 primer로 사용하였다.

npt 1: 5'GAGGCTATTCGGCTATGACTG3'

npt 2: 5'ATCGGGAGCGGCGATACCGTA3'

PCR 증폭조건은 94 ℃ 에서 30 초, 52 ℃ 에서 30초, 그리고 72 ℃ 에서 30 초로 25 cycle 를 수행한 후 1% agarose gel 상에서 전기영동을 수행하였다.

다. Southern analysis

PCR에 의하여 증폭된 DNA band가 OMT 유전자의 증폭에 의한 것인지를 확인하기 위하여 재분화체의 PCR product로 southern 분석을 수행하였다. Southern 분석은 Gibco BRL사의 PhotoGene™ Nucleic Acid Detection System을 사용하여 수행하였고, OMT plasmid에서 증폭된 약 0.7 kb의 PCR product를 Gibco BRL사의 BioNick™ Labeling System으로 probe를 만든 후 hybridization에 이용하였다.

2. 형질전환체의 형태분석과 리그닌 분석

기내에서 선발된 형질전환체를 기외에 이식시켜 증식시킨후 이들 형질전환체들의 엽형분석을 엽장, 엽폭, 거치정도, 엽밀도등에 관하여 관찰조사하였다. 리그닌 분석을 위해서 생재(生材)시료를 채취하여 수피(bark)와 수(pith)를 제거하고 가위로 잘게 썰어서 dry oven에 24시간 건조시킨 후 완전히 건조된 시료를 homogenizer로 분쇄하여 미립자 mesh (425㎛, 212㎛)로 2회에 걸쳐 분리한다. 이들 미립자 분말을 리그닌 분석에 사용하였다. Mesh를 사용하여 걸러낸 미립자 분말을 상온에 3 4시간 방치하여 그때의 중량을 먼저 측정한 후 dry oven에 12시간 건조시킨 뒤의 중량을 측정하여 시료의 함수율을 측정한다.

즉, (생중량 g - 건중량 g)/건중량 g × 100% = 함수율(%).

미립자 분말을 0.5g 정량하여 비이커에 넣고, 10mL 72% H_2SO_4 첨가하여 4시간 동안 상온에서 교반하고(황산을 첨가하면 흰색의 미립분말이 검은색을 띄며 가수분해가 됨) 증류수 382.5mL 첨가하여 최종 3% H_2SO_4 농도로 만들어 호일로 비이커의 입구를 밀봉하고 고압멸균기(1.5기압, 121℃)로 120분동안 가수분해를 시킨다. 그리고 충분히 식힌 상태의 가수분해된 용액을 1G4 glass filter를 정량하고 suction pump를 이용하여 걸러주었다. 이때 glass filter상에 남는 물질은 산불용성 lignin이고 glass filter를 통과한 용액중에 산가용성 lignin도 UV-photometer로 재정량한다. 이때 걸러진 1G4 glass filter를 dry oven에 overnight 처리후 정량하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

본 세부과제에서 antisense vector를 사용하여 포플러 식물에서 저리그닌 함량을 가질수 있는 형질전환체를 생성하였다. Antisense OMT RNA를 사용하여 포플러에 형질전환시켜 다양한 방법으로 검정 (항생제선발, PCR, southern 분석, 표현형의 특성) 하여 확인하였다.

계속적인 항생제 선발하에서 유기된 재분화개체들은 성장조절 무첨가 배지에 치상하여 발육을 유기하였다. 이들 배지는 저농도의 kanamycin (10 μg/l)를 사용하였기 때문에 성장속도는 다소 빠르기는 하지만 대조구와 비교 해 볼 때 이들의 성장이 상당히 느린 것을 알수 있다 **(Figure 3-1).** 저농도의 항생제일지라도 포플러식물의 성장에 많은 영향을 미치는 것으로 보아 이들 식물은 항생제에 상당한 감수성을 가지고 있다고 판단된다. 따라서 기내성장을 더욱 촉진시키기 위해서 치상 6개월후 부터 계대배양시 항생제 무첨가 배지에 치상하였다. 치상 4주후부터 대조구와 antisense가 도입되 형질전환체와의 성장속도를 비교해 본 결과 이들의 재분화 개체들은 성장속도가 다소 빠른것을 알 수 있다. 이는 보고된 논문과 일치하는 것으로 antisense OMT 유전자를 가지는 식물을 리그닌 함량이 줄어든 반면 cellulase 함량의 증가와 성장속도가 증가된 것으로 현재의 연구에서는 성장속도 뿐만 아니라 발근도 100%되는 것이 관찰되었다.

기내에서 계속적인 선발을 위해 재분화된 개체들을 변형된 CTAB 방법에 의해서 genomic DNA를 분리하여 NPTII와 OMT primer을 사용하여 PCR을 수행하여 기내에서 선발을 계속수행하였다. 특히 본연구에서 개발한 genomic DNA 분리기법을 사용하면 극소량의 조직 (엽육조직이나 callus)을 사용하여 PCR 증폭에 충분히 필요한 template DNA를 확보할 수 있었다. 따라서 효율적인 형질전환체의 선발을 가능하게 할수 있었다. 먼저 NPTII prmier를 사용하여 PCR 한 결과 모두 같은 크기의 DNA가 증폭된 것이 관찰되었다 **(Figure 3-2)**. 이들 gel을 NPTII DNA 단편조각을 Bionick translation kit를 사용하여 probe를 조제한후 southern 분석한 결과 모두 hybridization이 된 것을 알수 있었으며 이는 선발된 재분화 식물체들 모두 도입된 NPTII 구조유전자를 가지고 있다고 판단된다 **(Figure 3-3)**.

상기의 방법으로 확신한 재분화 개체들은 화분에 이식하여 온실에서 계속적인 성장을 유도하였다 **(Figure 3-4)**. 온실에서 성장한 포플러에 대한 엽형분석과 리그닌 분석을 수행하여 data를 수집하였다. 형질전환체들의 엽형분석을 한 결과, 형질전환체의 엽장은 평균이 8.61cm로 대조구의 평균 6.98cm보다 훨씬 더 길었으며 최대치에 있어서는 형질전환체가 12.46cm, 대조구는 8.90cm로 조사되어 엽장은 형질전환체가 control에 비해 상대적으로 긴 것으로 조사되었다 (Table 2). 엽폭에 있어서는 형질전환체의 평균이 5.39cm, control이 4.79로 형질전환체가 훨씬 더 넓었다. 그 최대치 또한 형질전환체가 8.94cm, control이 5.80cm로 형질전환체가 월등히 그 엽폭이 넓은 것으로 조사되었다. 엽장/엽폭비는 형질전환체가 1.65, control이 1.47로 형질전환체가 다소 큰 것으로 조사되었다 (Table 3-1). 그리고 거치정도는 형질전환체가 1.8, control이 1.88로 나타나 control이 형질전환체에 비해 거치가 조금더 많은 것으로 조사되었다. 엽모밀도는 형질전환체가 2.5, control이 1.1로 나타나 형질전환체는 엽모가 상당히 많이 발달해 있으며 이에 반해 control은 육안으로는 엽모가 거의 발견되지 않았다. 위와 같이 엽장, 엽폭 그리고 엽모밀도 조사에 있어서 형질전환체와 control은 상당한 차이를 보였으며, 다른 형태특성은 경미한 차이를 보였다. 이상의 결과로 보아, 형질전환체와 control간에 있어서 외형적인 엽면 형태 특성은 뚜렷한 차이를 보이고 있다. 리그닌함량의 경감으로 인한 포플러 식물체내의 대사변동에 의한 것으로 사료된다.

형질전환체의 리그닌 함량 분석은 함수율은 최초 미립분말을 정량하고 dry oven에 건조한 중량과의 차로 계산하였다.

기본식은

(생중량 g - 건중량 g)/건중량 g × 100% = 함수율(%)을 사용하여 계산한 결과,

대조구는 생중량(9.430g), 건중량(8.970g)이며 OMT 형질전환체의 시료는 생중량; 2.33g 과 건중량; 2.235g 이었다. 함수율은 control이 5.128%로 나타났으며 OMT시료는 4.251%로 조사되어 대조구의 시료가 조금더 함수율이 높은 것으로 조사되었다. glass filter정량은 control이 최초 30.7030g, 최후 30.8067g으로 나타났다. OMT시료는 최초 39.7428g, 최후 39.6430g으로 조사되었다.

lignin함량 공식

(최후 glass filter g - 최초 glass filter g)/함수율보정중량 × 100% = Lignin 함량%을 사용하여 계산한 결과,

대조구는 21.860%로 나타났으며 OMT 형질전환체의 시료는 20.846%로 조사되었다. 그리고 산(H_2SO_4)에 녹는 산가용성 lignin은 UV-photometer로(205nm) detection해서 정량한다.

이 산가용성 lignin정량공식은

AL(%) = DV(As-Ab)/aW × 100%

D: 희석배율, V: 정량여과액의 용량(L)

a: lignin 흡광계수 (ℓ/g・cm, 205 210nm에서의 자작나무 a값 113 ℓ/g・cm

W: 시료중량

을 사용하였다. 이때 glass filter를 빠져나온 용액의 양은 각각 control이 395mL, OMT시료가 386mL이고, 희석배율은 5×이었다. 이상의 공식에 의해 산가용성 lignin

은 최종 control이 2.5324%이고, OMT 시료가 2.2422%이었다.

따라서 최종 Lignin 함량 (산불용성 Lignin + 산가용성 Lignin)은 control이 24.3924%, OMT 시료가 23.0882%로 조사되었다. Antisense OMT 유전자가 들어 있는 형질전환체는 대조구에 비해 약 1.3%정도 lignin 함량이 적은 것으로 조사되었다. 현재의 결과로 보아 리그닌 함량의 차이는 크게 나타나지 않았지만, 이는 포플러 식물체가 아직 성장이 완전히 되지 않는 유묘(幼苗)의 상태의 시료를 사용하여 조사하였기에 이상의 결과가 도출되었으리라 분석된다. 하지만 엽형분석을 통하여 대조구와 비교해 볼 때 이들 형질전환체의 형태적인 차이점들로 미루어 볼 때 이들 식물체들을 온실에서 성장을 계속 유도하여 성숙한 상태에서 리그닌 분석의 조사가 필요하다고 판단된다.

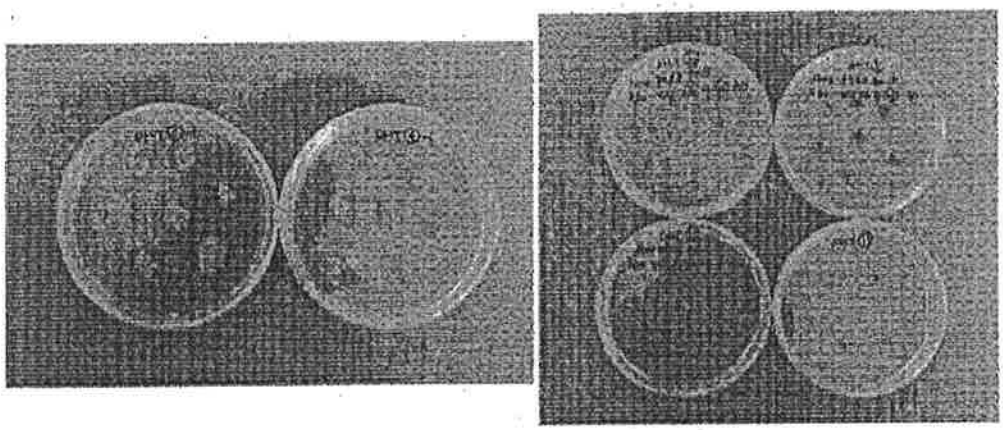


Figure 3-1. Induction of transgenic calli after cocultivation with *Agrobacterium tumefaciences* harboring antisense OMT gene.

개 체	엽 형 특 성					수 고 (지상부)
	엽 장 (cm)	엽 폭 (cm)	엽장/엽폭	거치정도	엽모밀도	
OMTA1(1)	8.10	5.10	1.59	2	3	44.0
OMTA1(2)	7.90	4.80	1.65	2	2	24.0
OMTA-2	6.68	3.78	1.78	2	3	19.5
OMT2	7.02	4.24	1.68	2	3	28.0
OMT2-a	8.04	4.52	1.78	2	2	31.5
OMT3(1)	7.84	4.82	1.64	2	2	46.0
OMT3(2)	7.86	4.18	1.89	1	2	22.5
OMT3-a	7.88	4.66	1.70	2	2	27.5
OMT7	12.46	8.86	1.41	1	3	68.0
OMT7	12.28	8.94	1.37	2	3	79.0
OMT평균	8.61	5.39	1.65	1.8	2.5	
control평균	6.98	4.79	1.47	1.88	1.1	

* 거치정도 : 1(多), 2(中), 3(少), 엽모밀도 : 1(多), 2(中), 3(少)

Table 3-1. OMT antisense 유전자가 삽이된 양황철 형질전환체와 대조구의 엽형태특성 조사

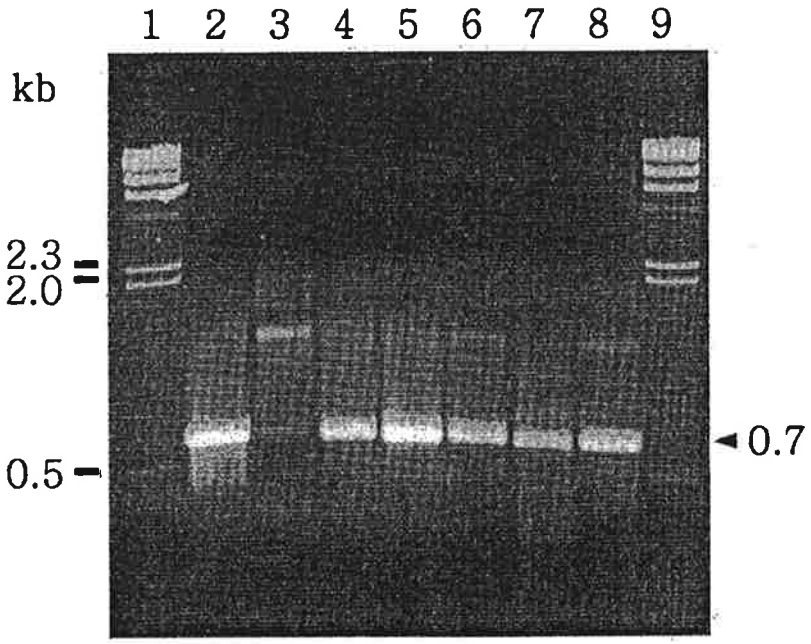


Figure 3-2. Gel electrophoresis of PCR products using NPTII primers
lane 1 and 9, λ/*Hind*III markers;
lane 2, positive control (amplification of plasmid);
lane 3, negative control (untransformed plant);
lane 4 to 8, transformants.

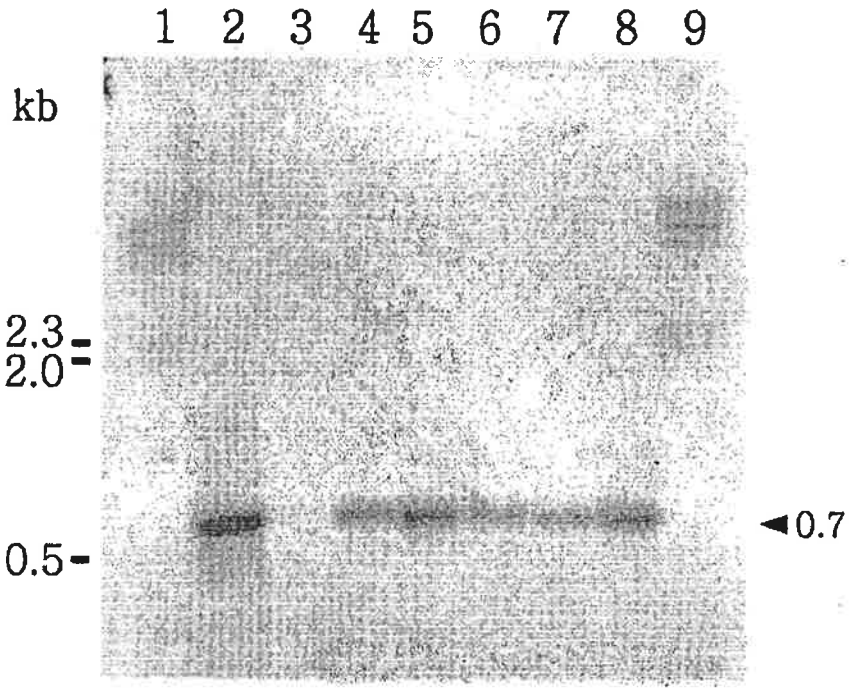


Figure 3-3. Southern analysis of PCR products using NPTII probe
lane 1 and 9, λ/*Hind*III markers;
lane 2, positive control (amplification of plasmid);
lane 3, negative control (untransformed plant);
lane 4 to 8, transformants.

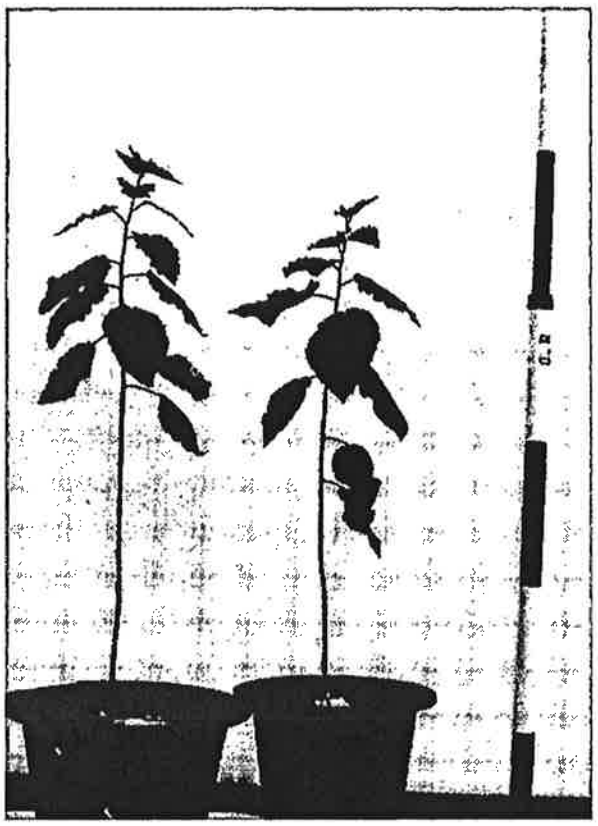


Figure 3-4. Actively growing transgenic poplar with antisene OMT gene in greeenhouse.

제 4 절 참고문헌

Bugos, R. C., Chiang, V. L. C. and Campbell, W H. cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase of aspen. Plant Mol. Biol., 17:1203-1215 (1991).

Dwivedi U. N., Campbell, W. H., Yu, J., Datla, R. S. S., Bugos, R. C., Chiang, V. L. C. and Podila, G. K. : Modification of lignin biosynthesis in transgenic tobacco through expression of an antisense O-methyltransferase gene from *Popusus*. Plant Mol. Biol. 26:61-71.

Elkind Y., Edwards, R., Mavandad, M., Hedrick, S. A., Rivak, O., Dixon, R. A. and Lamb, C. J. : Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 87:9057-9061 (1991).

Halpin, C., Knight, M. E., Foxon, G. A., Campbell, M. M., Boudet, A. M., Boon, J. J., Chabbert, B., Tollier, M. T. and Schuch, M. : Manipulation of lignin quality by down-regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase. Plant J., 6:339-350 (1994).

Higuchi, T. : Biosynthesis of lignin. In T Higuchi, eds, Biosynthesis and biodegradation of wood components. Orlando, Academic Press, pp. 141-160 (1985).

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : Molecular cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor lab. N.Y. (1989).

Nakano, J. M. : The detection of lignin. In S. Y. Lin and C. W. Dence, eds, Methods in lignin Chemistry. Berlin, Springer-Verlag, pp23-32 (1992).

Ni, W. T., Pavia, N. L. and Dixon, R. A. : Reduced lignin in transgenic plants containing a caffeic acid O-methyltransferase antisense gene. Transgen. Res. 3:120-126 (1994).

Parsons, T. J, De Bradshaw H. Jr., Gordon, M. P. : Systemic accumulation of specific mRNAs in response to wounding in poplar trees. Proc. Natl. Acad. Sci., 86:7895-7899 (1989).

Sewalt, V. J. H., Ni, W., Blount, J. W., Jung, H. J., Masoud, S. A. and Howles, P. A. : Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase. Plant Physiology. 115:41-50 (1997).

Ye, J. H. and Varner, J. E : Differential expression of two o-methyltranferases in lignin biosynthesis in *Zinnia elegans*. Plant Physiology 108:459-467 (1995).

Ye, Z. H. : Associarion of caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase expression with lignifying tissue in several dicot plants. Plant Physiology. 115:1341-1350 (1997)

제 4 장 조직별 OMT 유전자 발현과 antisense 발현 vector의 구축

제 1 절 서 언

임목은 경제적 측면 (목재 생산, 종이 및 펄프 재료)에서 그리고 환경 보존적 측면에서 중요한 가치를 가지고 있다. 그러나, 작물이나 원예종과는 달리 긴 생육 기간은 임목의 유전, 육종 분야에 장애가 되어왔으며, 또한 유전적 지도에 대한 지식이 없다는 것이 임목 수종의 이용성을 제한하고 있다 (Tzfira et al., 1998). 생장이 좋은 잡종의 임목이 창출되었으나 이것은 전통적인 육종 방법에 의한 것이 대부분이며, 이형접합성이 강하기 때문에 종자 번식을 통하여 모수의 형질을 차대로 유전시킬 수 없다. 따라서, 선발된 수형목들의 집단인 채종원에서 계속적으로 F1 세대의 종자를 생산하거나, 선발목의 삽목과 같은 방법을 통해서만 증식이 가능하다. 그러나, 채종원을 조성하기 위해서는 개체의 자가교배가 몇세대 이루어져서 동형접합자 상태로 되어야 하는데 임목의 경우는 자가교배가 어려운 경우가 많으며, 또한 자가교배가 가능하다고 하더라도 동형접합자 상태로 되기 위한 기간이 너무 오래 소요된다. 이러한 장애들을 극복하기 위하여 생명공학을 이용한 육종 방법이 개발되고 있다. 조직배양 기술을 이용한 우수 형질의 대량증식 (Naik et al., 1999; Thorpe et al., 1991), 원형질체나 체세포 변이를 이용한 체세포 변이체의 생성 (DeVerno et al., 1994; Eastman et al., 1991; Charest & Michel, 1991), 인위적 돌연변이의 유도, 분자 유전학을 이용한 방법 등은 임목 육종에 새로운 가능성을 제안하고 있다.

생명공학을 이용한 임목육종의 가장 효율적인 방법은 분리된 특정 유전자들의 임목식물체내로의 재도입이다. 현재 식물체 내로 외래 유전자를 삽입시켜 발현시키는 식물 형질전환은 여러 가지 기초 연구를 위한 그리고 상업적으로 중요한 종 내로 유용 형질을 도입하기 위한 일반적인 기술로서, microprojectile bombardment (Biswas et al., 1998; Schulze et al., 1995; Southgate et al., 1995), electroporation (Akella & Lurquin, 1993; Asano et al., 1991)과 같이 DNA를 세포 내로 직접 도입하는 방법과 *Agrobacterium*을 매개로 하여 형질전환을 유도 (Mohanty et al., 1999; Boase et al.,

1998; Puite & Schaart, 1996)하는 두 가지 방법이 보편적으로 많이 사용되고 있으며, 임목에서 어느것이나 적용이 가능하지만, 더 안정적인 형질전환체를 얻을 수 있다는 장점 때문에 *Agrobacterium*을 이용한 방법이 일반적으로 이용되고 있다. *Agrobacterium*은 식물의 상처 부위로 침입하여 자신의 T-DNA를 식물체 chromosome내에 non-homologous recombination 기작으로 자신의 DNA 단편조각을 삽입시키는 토양 박테리아로서 일반적으로 대부분 쌍자엽 식물에 감염이 잘된다고 보고되고 있다. 임목의 형질전환에 대한 연구는 *Populus* 수종에서 많이 이루어 졌는데, 그것은 지금까지 이 수종에서의 기초 연구와 재분화 및 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 체계가 잘 확립되어 있었기 때문이다 (Tzfira et al., 1997).

따라서 본 세부과제는 분리 성격규명된 OMT 유전자를 식물발현 vector에 antisense 방향으로 도입 검증하여 양황철 포플러에 형질전환시킬수 있는 *Agrobacteria*를 구축하는 것을 목표로 하고 있다.

제 2 절 실험방법

1. Total RNA 및 poly(A+) RNA 추출

양황철 total RNA는 잎과 목질로부터 Draper 등(1988)의 phenol-SDS 방법에 따라 추출하였으며 ethanol 침전에 의해 pellet을 얻은 후, DEPC (diethylpyrocarbonate) 처리한 물에 녹여 농도를 측정하여 poly(A+) RNA 추출을 위하여 사용하였다.

포플라에서 분리한 약 1 mg의 total RNA로부터 oligo(dT) cellulose를 사용하여 Molecular cloning 실험 protocol (Maniatis *et al*, Cold Spring Harbor, New York)에 따라 polyadenylated cytoplasmic RNA를 추출하였다. 즉, oligo(dT) powder (Collaborative Biomedical Products) 150 mg을 loading buffer (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA, 0.2% SDS)에 녹여 10분간 방치하여 equlibration 시킨 후, 원심분리(1,500 rpm)에 의해 다시 pellet을 회수하여 5 ml의 같은 buffer에 현탁시켰다. Sample RNA가 녹아있는 용액에 5 M NaCl을 첨가하여 최종적으로 0.5

M의 농도로 조절한 후 oligo(dT)가 녹아있는 buffer에 섞고 실온에서 2시간 shaking 하면서 incubation 하였다. 그 후 원심분리에 의해 pellet을 회수하여 loading buffer로 1회 washing한 다음 같은 buffer에 현탁하여 Econo column (Bio-Rad)에 packing 하였다. Nonpolyadenylated RNA를 제거하기 위하여 washing buffer (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.2% SDS)로 260 nm에서 OD 값이 제로가 될 때까지 washing 한 후 elution buffer (1 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.2% SDS)를 첨가하여 분획을 받아 ethanol 침전에 의해 poly(A+)RNA만을 회수하였다. DEPC (diethylpyrocarbonate)를 처리한 물로 RNA를 녹인 후 spectrophotometer로 260 nm 와 280 nm에서 각각 OD를 측정하여 양과 순도를 결정한 결과 total RNA 1 mg 으로부터 약 150 μg의 poly(A+) RNA를 얻었으며 260 nm 와 280 nm의 OD 값에 대한 비율은 약 1.7의 순도를 갖는 poly(A+)RNA를 얻었다.

2. Northern blot analysis

양황철 OMT mRNA의 정확한 transcript의 크기 및 분포를 조사하기 위하여 xylem과 leaf로부터 추출한 poly(A+)RNA를 사용하여 1% formaldehyde agarose gel 에서 분리한 후, 양황철 cDNA의 부분적 DNA를 probe로 하여 northern blot을 수행하였다. 즉, xylem과 leaf로부터 얻은 poly(A+)RNA 4 μg을 100% formamide 12.5 μl, 30% formaldehyde 5 μl, 10 x MOPS (Morpholinoprane sulfonic acid, 400 mM MOPS, 100 mM sodium acetate, 10 mM EDTA) 1.5 μl와 혼합한 후, 60℃에서 10분간 반응시킨 다음 급속히 얼음에서 냉각시켰다. 그 후 10 x RNA loading buffer (5 ml glycerol, 20 μl 0.5 M EDTA, 40 mg bromphenol blue, 40 mg xylene cyanol in 10 ml DW)를 첨가하여 sample들을 준비하였고 formaldehyde와 MOPS buffer를 첨가하여 만든 1% agarose gel에 각각의 sample을 loaging한 후 fractionation하였다. Blotting, prehybridization, hybridization, washing 등의 과정은 Molecular Cloning (Sambrook *et al.*, 1989)의 실험 방법들에 따라 수행하였다.

3. pBI121 vector를 이용한 antisense vector제조 및 분석

가. 유전자확보 및 Cloning 전략

3차년도 연구수행중 이미 cloning 된 full-length의 양황철 cDNA가 cloning 되어 있는 pBlueKS-A1.1과 pBlueKS-B1.4를 갖는 대장균 세포들을 LB/amp 배지에서 증식시켜 세포들을 회수한 다음 alkaline lysis 방법에 의해 DNA를 추출, 확보하여 식물용 vector에 클로닝을 위해 사용하였다. Figure 4-17에서와 같이 pBlueKS-B1.4 플라스미드를 *Sal*I으로 잘라 elution한 다음 DNA polymerase I large fragment (Klenow)로 protruding 말단을 filling in 하여 양쪽 끝을 무디게 만들었으며 Cauliflower mosaic virus (CaMV)의 35S promoter를 갖는 식물용 vector인 pBI121 plasmid를 *Bam*HI으로 자른 후 마찬가지로 Klenow fragment로 filling하여 pBlu KS-B1.4로부터 얻은 양황철 cDNA와 blunt end ligation 시켰다. Ligate를 대장균에 도입하여 kanamycin 저항성 형질전환체들을 얻은 후 intact pBI121보다 커진 clone들을 우선적으로 agarose gel 상에서 선별한 다음 PCR에 의해 확인한 후 제한효소에 의해 orientation을 확인하였다. 이렇게 확인된 sense 및 antisense vector를 poplar 식물체에 도입하여 양황철 cDNA가 antisense로 도입 되었을 때 lignin 합성에 미치는 영향을 조사하였다.

나. 박테리아 형질전환 및 검색

Figure 4-5의 방법에 따라 얻어진 ligate를 *E. coli* HB101에 형질전환시켜 얻은 형질전환체로부터 plasmid DNA를 분리하여 pBI121 intact DNA를 control로 하여 agarose gel에서 fractionation하여 pBI121 plasmid보다 커진 clone들을 선별하였다 (Figure 4-18). 선별된 clone들은 양황철 cDNA의 168 아미노산부터 174 아미노산까지 정보를 coding 하는 부위의 염기서열을 갖는 OMT-F2 primer (5'GGGGGATCCAAGATTCAACAAG3')와 종결코돈 근처의 염기서열을 포함하는 OMT-R1 primer (5'GGGGTCGACGGCCTTCTTGCGGAA3') 및 3'-noncoding region을 포함하는 OMT-R2 (5'GGGGTCGACTCACTTAATGCTTAG3') primer를 사용하여 PCR을 행하였다. PCR 반응조건은 plasmid DNA의 약 200 ng 정도를 사용하여 primer 농도는 각각 2 pmole이 되도록 첨가하고 *Taq* polymerase는 2 unit을 사

용하였으며, 95 ℃-5 min, 40 ℃-30 sec, 72 ℃-2 min 조건에서 1 cycle, 95 ℃-1 min, 40 ℃-30 sec, 72 ℃-2 min 조건에서 30 cycle, 72 ℃-10 min에서 1 cycle을 수행한 결과 Figure 4-4에서 보는바와 같이 OMT-F2와 OMT-R1 primer를 사용하여 증폭시켰을 때는 약 0.6 kb의 DNA fragment가 증폭되었음을 확인할 수 있었고 OMT-F2와 OMT-R2 primer 경우에는 약 0.9 kb가 증폭되었다. 이렇게 양쪽 primer set를 사용하였을 때 0.6 kb와 0.9 kb가 동시에 증폭된 clone들에 대하여 정방향 및 역방향을 조사하기 위하여 orientation을 확인할 수 있는 제한효소들을 사용하여 분석되었다.

4. PCR에 의한 Promoter region 증폭 및 Cloning

가. Cloning 전략

양황철 포플라에서 분리한 genomic DNA로부터 promoter를 분리하기 위하여 DNA 서열이 알려져 있는 Aspen (*Populus tremuloides*)의 genomic DNA 서열을 참조하여 약 0.5 kb크기의 promoter 부위가 증폭될 수 있도록 primer set를 설계한 다음 genomic DNA와 genomic library를 또는 genomic library screening에 의해 얻어진 클론을 주형으로 하여 polymerase chain reaction을 행한 후 얻어진 PCR product는 T-cloning vector로 도입하고 염기서열을 분석하여 양황철 포플라의 promoter 서열을 밝혔다. 밝혀진 promoter 부위를 적절한 제한효소 (*Hin*dIII & *Bam*HI)로 잘라 분리한 후 같은 효소로 자른 GUS (β-glucuronidase) 유전자를 포함하는 식물용 vector (pBI101 or pBI121)로 도입하여 fusion vector를 제조한 후 포플라 식물체에 도입하여 GUS activity를 측정하므로서 양황철 포플라 promoter의 세기를 분석한다.

나. PCR amplification of OMT promoter region

PCR primer 합성은 OMT DNA 서열이 알려져 있는 사시나무 (Aspen) 염기 서열의 promoter 부분 서열을 참조하여 nucleotide 682-686에 있는(Figure 4-8) CAT box (CCAATA)와 nucleotide 856-861에 있는 TATA signal (TATATA)이 포함될 수 있도록 primer를 설계하여 OMT-ProF1 (5'GGGAAGCTTATACAATACATACAAT3'), OMT-ProF2 (5'GGGGAAGCTTATCGGGTGAATATCTC)와 OMT-ProR1

(5'GGGGGATCCCTTGATCGAGATTGAA3')primer set를 합성하였다. OMT-ProF1과 OMT-ProR1을 사용하여 증폭할 경우에는 978 bp 크기의 DNA 단편이 얻어지며, OMT-ProF2와 OMT-ProR1의 경우에는 547 bp 크기의 DNA 단편이 얻어 지도록 하였다. Primer set의 양쪽 끝에는 제한효소 *Hin*dIII와 *Bam*HI site를 각각 도입하여 계속되는 subcloning 과정을 용이하도록 하였다. PCR 반응은 추출한 genomic DNA를 template로 하는 경우 200, 400, 600, 800 ng을 사용하였으며, genomic library를 주형으로 사용할 경우에는 4 x 105 pfu/㎕의 titer를 갖는 원액 1-20 ㎕까지 사용하면서 phage 농도를 조절하였다. Primer 농도는 각각 2 pmole이 되도록 첨가하고 *Taq* polymerase는 2 unit을 사용하였으며, 95℃-5 min, 40℃-30 sec, 72℃-2 min 조건에서 1 cycle, 95℃-1 min, 40℃-30 sec, 72℃-2 min 조건에서 30 cycle, 72℃-10 min에서 1 cycle을 수행한 결과 약 0.5 kb 크기의 PCR product를 얻었으며, 이렇게 얻어진 양황철 promoter region은 primer set에 의해 flanking 되는 예상 size와 같았다. 얻어진 PCR product는 일반적으로 양쪽 말단에 A 염기가 protruding되는 경향을 가지므로 cloning 효율을 높이기 위하여 pGEM-T vector system을 이용하여 subcloning하였다. 3.0 kb 크기의 T-vector 1 ㎕ (50 ng, 0.025 pmole)와 0.5 kb의 insert DNA 경우 50 ng을 섞어 12℃에서 overnight ligation 반응을 한 다음 *E. coli* JM109 세포에 형질전환을 시켰다. β-galactosidase 의 α-complementation에 의하여 insert DNA의 유무 판정을 위하여 LB/amp 배지에 X-gal과 IPTG를 도말하여 형성된 colony중 white colony들만 선택한 후 rapid plasmid 분리에 의해 DNA를 추출하여 제한효소 *Hin*dIII와 *Bam*HI으로 digestion에 의해 약 0.5 kb 정도의 증폭된 DNA가 cloning 된 재조합 플라스미드를 얻었다 (Figure 4-9). 이렇게 얻어진 plasmid DNA내에 있는 유전자가 실제로 양황철 OMT promoter 부위인지 확인하기 위하여 대장균 내에서 증폭한 후 QIAGEN kit를 이용하여 순수 분리하여 Sanger-dideoxy sequencing에 의해 염기 서열을 분석하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

양황철 xylem 조직에서 분리한 total RNA의 순도를 더욱 높이기 위하여 에탄올을 이용하여 RNA 침전을 반복한 결과, 획득한 RNA에는 cDNA library 합성의 효율을 감소시키는 ribosomal RNA band는 전혀 관찰되지 않았으며 RNA 자체의 integrity 또한 넓게 분포하는 것으로 보아 좋은 상태였으므로 이들 순수한 RNA를 사용하여 1st cDNA 합성의 template로 사용하였다 **(Figure 4-1)**.

분리된 RNA는 OMT 유전자를 probe로 사용하여 Northern 분석을 실시하여 본 결과, 양황철 OMT 전사체는 leaf와 xylem에서 동시에 검출되었으나 주로 xylem에서 높은 수준으로 발현되는 것으로 보여지며 이는 xylem에서 OMT 유전자의 발현이 lignification에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 보여진다 **(Figure 4-2)**. Alfalfa의 경우에도 OMT mRNA는 뿌리나 줄기 조직에서 높게 발현되며 (Gowri *et al.*, 1991), 담배의 경우에도 목질 부분에서 높게 발현되었다 (Jaeck *et al.*, 1992). 또한 전사체의 크기는 약 1.7 kb 정도의 단일 band로서 확인되었으며 기존에 알려져 있는 포플라 OMT 유전자들의 전사체 크기와 동일한 것으로 나타났다 **(Figure 4-2)**. 또한 계절에 따라 수집한 목질 부분에서 보여지는 OMT 유전자의 발현은 6월초와 7월말에 높은 수준으로 발현된다는 보고 (Bugos *et al.*, 1991)와는 달리 4월말부터 9월말까지 일정한 수준으로 발현되었는데 이는 지역에 따른 기후 조건의 차이에 기인하는 것으로 사료된다. 따라서 hybrid 포플라인 양황철 (*Populus nigra* x *maximowiczii*)의 경우에도 OMT 유전자의 전사체는 조직 특이적이며 단일 band의 형태로 발현되며 추출한 poly(A+)RNA의 순도 및 integrity가 좋은 상태라는 것이 입증되었으므로 xylem의 poly(A+)RNA를 사용하여 cDNA library를 합성하였다.

3년차에 cloning 된 양황철 cDNA를 다시 antisense 방향으로 식물발현 vector (pBI121)에 삽입하기 먼저 salI의 효소로 blunt로 말단부분을 절단한 후 같은 효소로 절단하여 정제한 pBI121 vector와 ligation하여 E. coli에 형질도입하였다. 이들 형질도입된 박테리아를 선발하여 먼저 plasmid를 분리하여 전기영동하여 형질전환체를 선발하였다 **(Figure 4-3)**. 선발된 OMT clone들을 조제된 OMT primer들을 사용하여 PCR 증폭한 결과, 약 0.6 kb의 DNA 단편이 증폭되었음을 확인할 수 있었으며

OMT-F2와 OMT-R2 primer 경우에는 약 0.9 kb가 증폭되었다 (**Figure 4-4**). 이렇게 양쪽 primer set를 사용하였을 때 0.6 kb와 0.9 kb가 동시에 증폭된 clone들에 대하여 정방향 및 역방향을 조사하기 위하여 orientation을 확인할 수 있는 제한효소들을 사용하여 분석되었다. Plasmid pBI121내에 도입된 양황철 cDNA의 방향성을 확인하기 위하여 양황철 유전자 내부에 존재하는 *Eco*RI site를 이용하여 clone들을 자른 결과, **Figure 4-6**의 lane 4와 10에서 보듯이 바로 들어간 경우에는 2.43 kb와 0.63 kb의 단편들이 확인되었고 역방향으로 들어간 경우에는 2.55 kb와 0.63 kb DNA 조각들이 확인되었다. 또한 양황철 유전자의 내부에 존재하는 *Bam*HI site를 이용하여 *Hin*dIII와 *Bam*HI으로 동시에 자를 경우에는 정방향 (1.4 kb, lane 6)과 역방향 (1.6 kb, lane 12)의 경우가 확실히 구분되었다 (**Figure 4-6**). 이렇게 확인된 정방향 (pBI-B1.4 IV-5)과 역방향 (pBI-B1.4 d-12)의 재조합 plasmid 벡터들은 양황철 포플라에 도입하여 형질전환체 생성과 유도 및 생합성에 미치는 영향을 본 연구과제에서 실시하였다.

OMT 관련 프로모트의 분리에 대한 cloning 전략을 도식화하였다 (**Figure 4-6**). 먼저 Cauliflower mosaic virus (CaMV)의 35S promoter, β-glucuronidase 유전자, nopaline synthase 유전자 및 terminator를 갖는 기존의 pBI121 (or pBI101) vector를 *Hin*dIII와 *Bam*HI로 잘라 0.8 kb 크기의 35S promoter를 제거한 후, 12.2 kb 크기의 단편을 agarose gel 상에서 elution 하였다. 양황철 xylem (목질부)으로부터 추출한 genomic DNA (genomic library)를 주형으로 하여 이미 염기서열이 밝혀진 Aspen (*Populus tremuloides*)의 genomic DNA 서열을 참조하여 CAT box (CCAATA)와 TATA signal 등이 포함되도록 설계된 primer를 이용하여 0.5 kb 크기의 promoter 부위를 증폭하였다. 이들 DNA fragment는 T-cloning vector에 ligation하여 대장균에 형질전환한 후 0.5 kb 크기의 DNA fragment가 도입된 clone들을 선별한 다음 sequencing에 의해 DNA 서열을 확인한후 clone을 *Hin*dIII와 *Bam*HI으로 잘라 0.5 kb 크기의 단편을 분리한 다음, 35S promoter 부위가 제거된 pBI121 vector에 ligation하여 대장균에 형질전환한 후 바르게 도입된 clone들을 선별하며 제한효소로 다시 잘라 도입된 promoter부위를 agarose gel에서 확인하였다 (**Figure 4-6**). 이들 양황철 promoter 부분이 도입된 plasmid들 중에서 *Hin*dIII와 *Bam*HI으로 잘랐을 때 0.5 kb의 insert DNA를 갖는 P2 클론을 선택하여 M13 forward and reverse sequencing primer를 사용하여 sequencing을 행하였다 (**Figure 4-7**). Aspen (*Populus*

tremuloides)의 promoter와 비교하였을 때 같은 CAT box (CCAATA)와 TATA signal (TATATA)을 가지고 있었으며 몇 군데서 염기서열의 차이는 있었지만 전반적으로는 유사한 서열을 가지고 있었다. 양황철 promoter의 세기를 GUS activity에 의해 조사하기 위하여 식물용 vector에 양황철 promoter 부분의 cloning은 Cauliflower mosaic virus (CaMV)의 35S promoter, β-glucuronidase 유전자, nopaline synthase 유전자 및 terminator를 갖는 기존의 pBI121 vector를 *Hin*dIII와 *Bam*HI로 잘라 0.8 kb 크기의 35S promoter를 제거한 후, 12.2 kb 크기의 단편을 agarose gel 상에서 elution 하였고, 염기서열이 확인된 P2 클론을 같은 효소 (*Hin*dIII와 *Bam*HI)로 잘라 약 0.5 kb 크기의 DNA 단편을 분리한 다음 준비된 vector와 ligation에 의해 12.7 kb 크기의 pBI-ProY 재조합 플라스미드를 구축하였고 **(Figure 4-8)**, *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404에 의해 poplar로 도입되었다.

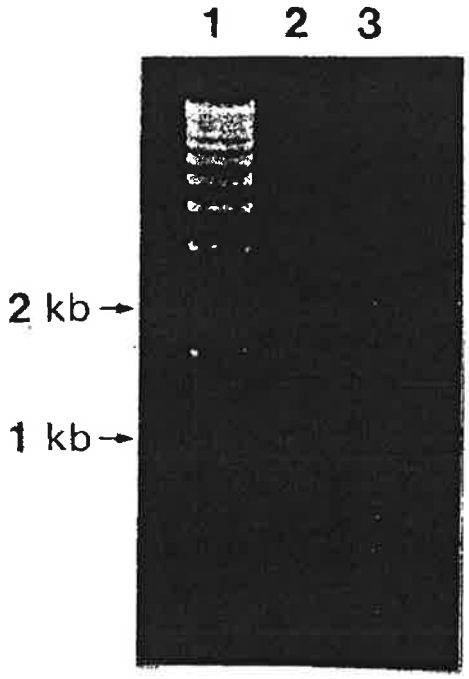


Figure 4-1. Agarose gel pattern of Yanghwangchul poly(A$^+$) RNA

lane 1: 1 kb ladder
lane 2: Poly(A$^+$) RNA(2 $\mu\ell$)
lane 3: Poly(A$^+$) RNA(1 $\mu\ell$)

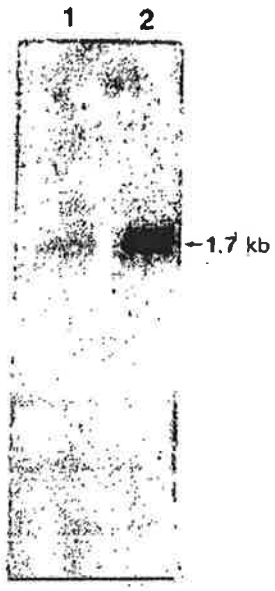


Figure 4-2. Northern blot analysis of Poly(A$^+$) RNA extracted from xylem and leaf of *P. nigra x maximowiczii*

lane 1; Poly(A$^+$)RNA (4 μg) of leaf
lane 2; Poly(A$^+$)RNA (4 μg) of xylem

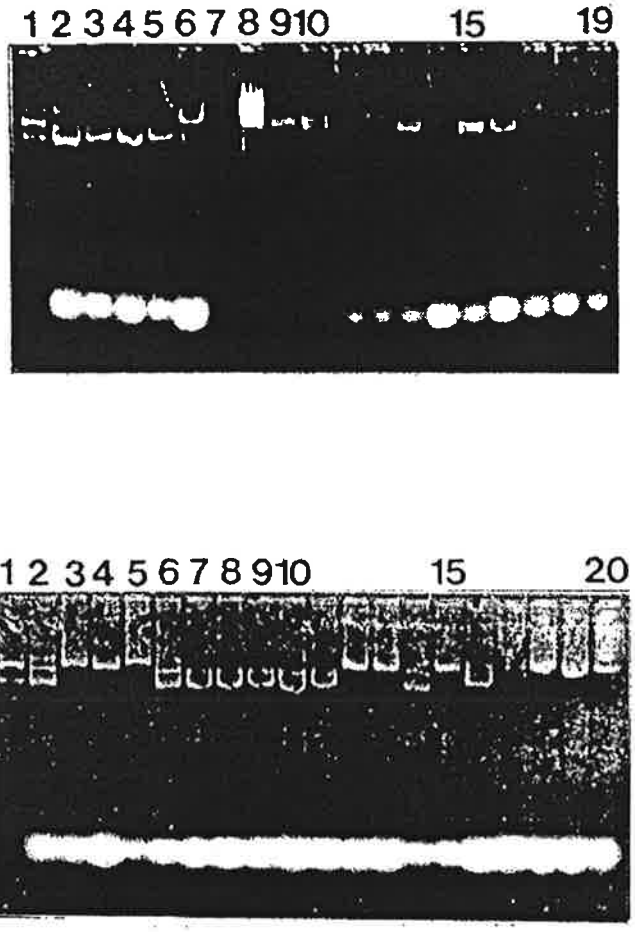


Figure 4-3. Size selection of transformants by agarose gel electrophoresis
lane 1: pBI121 (control, PEG prep.)
lane 2: pBI121 (control, rapid prep.)
lane 3- 20 : plasmid DNA from transformants

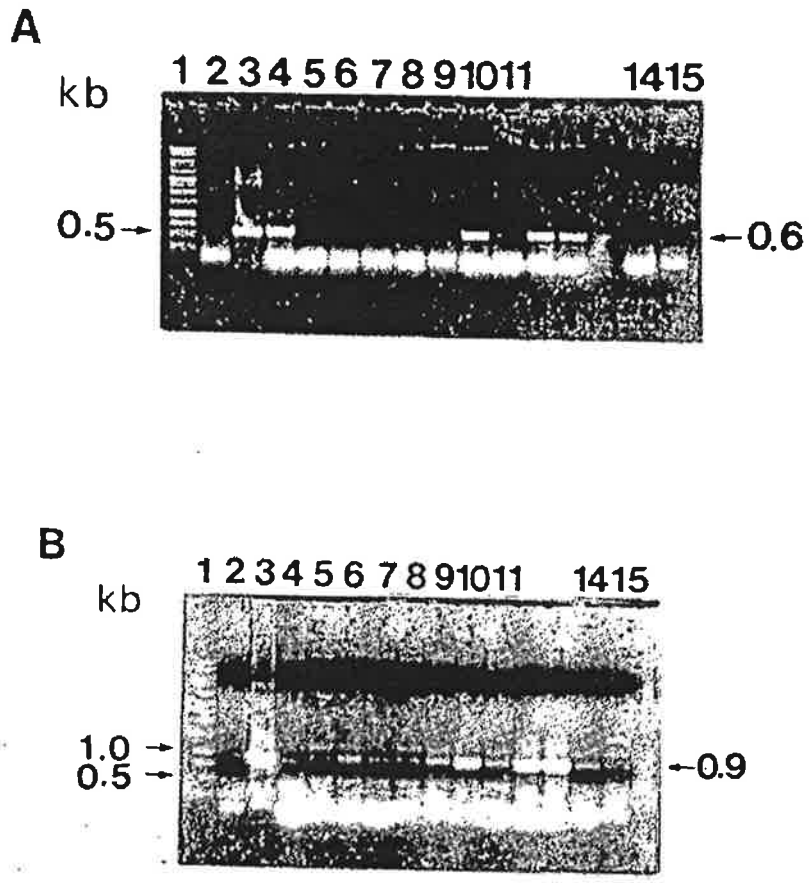


Figure 4-4. Polymerase chain reaction of putative cones using OMT-F2/ R1 (A) and OMT-F2/R2 (B) primer set.

lane 1: 1 kb ladder
lane 2: negative control
lane 3: positive control
lane 4-15: putative clones

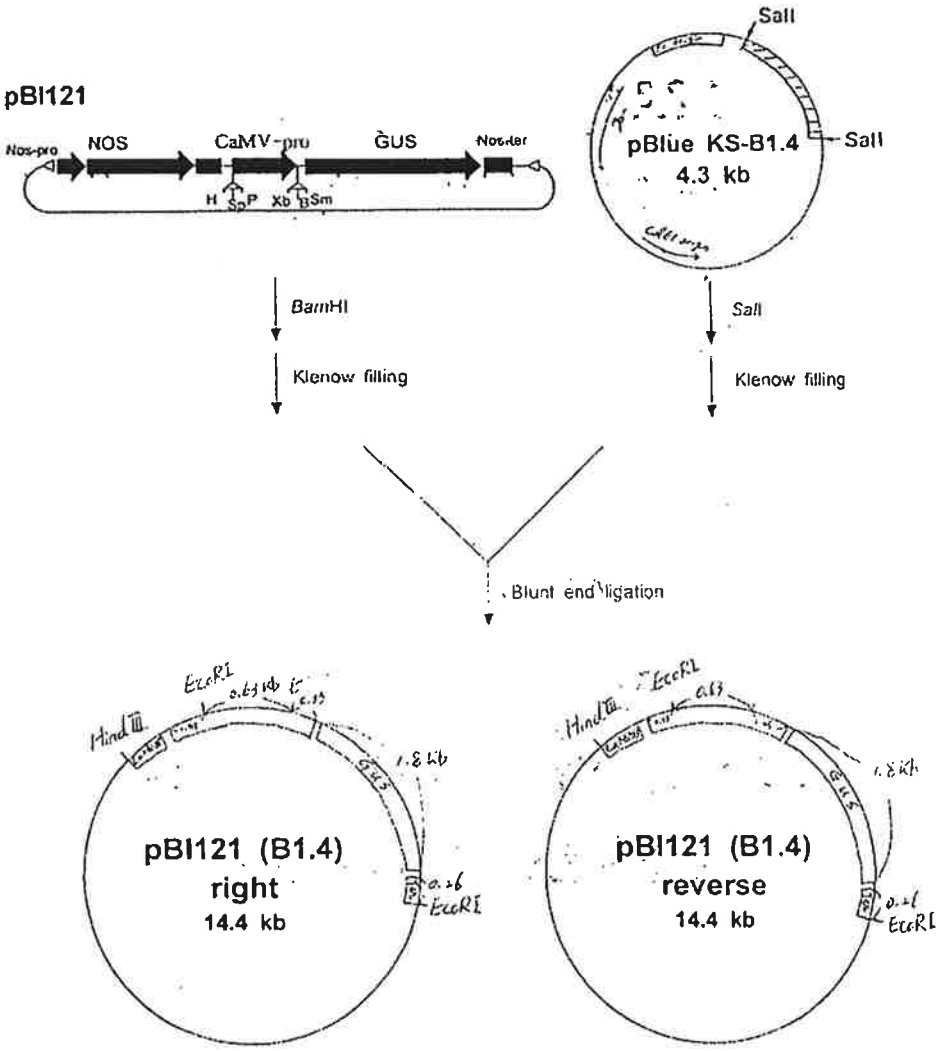


Figure 4-5. Cloning strategy of plant antisense vector containing *P. nigra x maximowiczii* full-length cDNA

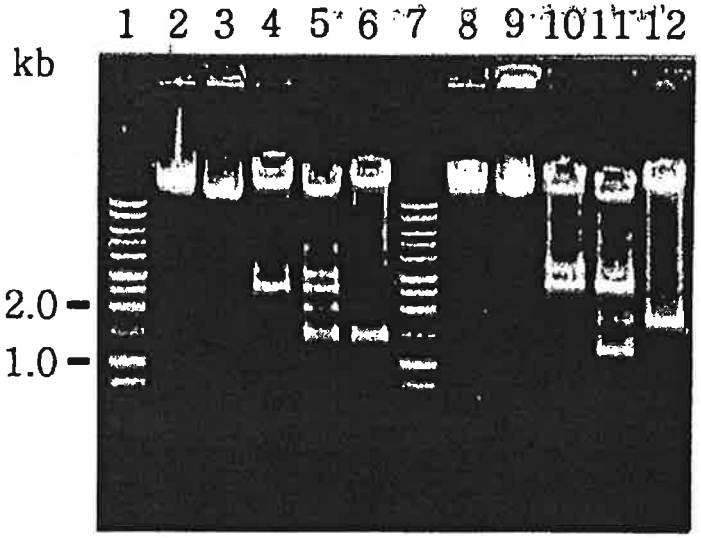


Figure 4-6. Restriction enzyme analysis of antisense vector containing *P. nigra x maximowiczii* full-length cDNA

lane 1: 1 kb ladder
lane 2: pBI121 intact DNA
lane 3: pBI-B1.4 (IV-5 clone) (sense) intact
lane 4: pBI-B1.4 (IV-5 clone) (sense)/EcoRI
lane 5: pBI-B1.4 (IV-5 clone) (sense)/*Eco*RI & *Hin*dIII
lane 6: pBI-B1.4 (IV-5 clone) (sense)/*Hin*dIII & *Bam*HI
lane 7: 1 kb ladder
lane 8: pBI121 intact DNA
lane 9: pBI-B1.4 (d-12 clone) (antisense) intact
lane10: pBI-B1.4 (d-12 clone) (antisense)/EcoRI
lane11: pBI-B1.4 (d-12 clone) (antisense)/*Eco*RI & *Hin*dIII
lane12: pBI-B1.4 (d-12 clone) (antisense)/*Hin*dIII & *Bam*HI

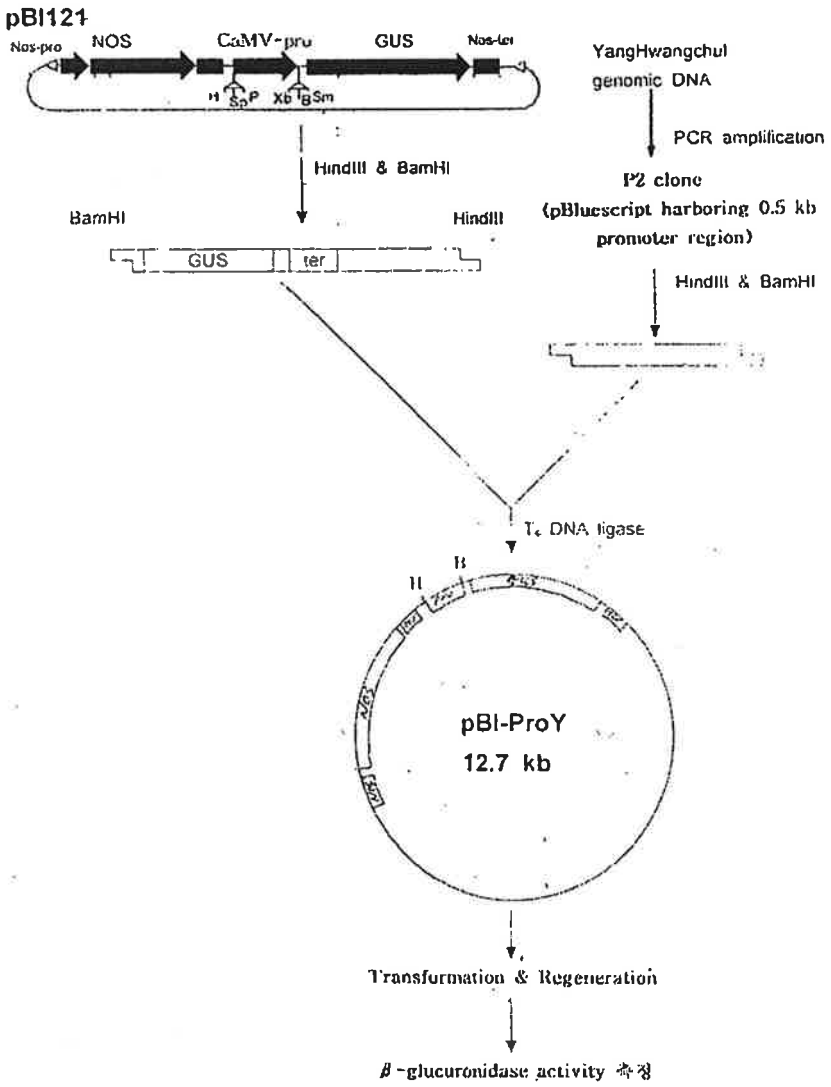


Figure 4-7. Cloning strategy of plant expression vector containing *P. nigra x maximowiczii* promoter region

```
Y:   1 ATCGGGTGAA CATCTCATCA TGTATTTAAA TATCTTAATC TCGATTATTT
P:   1 ATCGGGTGAA TATCTCATCA TGTAATTAAA TATCTTAATC TCCATTATTT

Y:  51 CTAAACTTTT TTTATTCCTT TGTTAGTTAT TGATAATGAT TTTTTTTATT
P:  51 CTTAATTTTT TTTATTTTTT TGTTAGTTAT TGTTAATGAT TTTTTTTATT

Y: 101 TATATACATT ATTATCGATT TATATAATTA GATATTTGTA TAAATTTTAA
P: 101 TATATAAATT ATTATTGATT TATTTAATTA GATATTTGTA TAAATTTTTA

Y: 151 CTTTAAATTT TTTTATCTAC CTGATATATA TTTTATTTAA ATGTAACCCA
P: 151 CTTTAAATTT TTTTATATAC CTGATATATA TTTTTTTTAA ATATAACCCA

Y: 201 TGATAAGGAA GTTCTATAAA CCTTTAGCTG CTTGACATAG TACATCCTGT
P: 201 TGATAAGGAA GTTTTATAAA CCTTTACCTG CTTGACATAG TACATCCTGT

Y: 251 CCACATAGTC TCACGTGAA CAGGTTTTTT TATTTATTTT TTAATACAAT
P: 251 TCCAATAGTC TCACCTGAA CAGGTTTTTT TTTTTTTTTT TTAAAAAAAA

Y: 301 GAGTTTAGCA ACTAAGAAGA GGAAGAATAT ATAGAAGAAA AGGTAGGGAG
P: 301 GAGTTTAGCA AATAAGAAGA GGAAAAATAT ATAGAAGAAA AGGTAGGGAG

Y: 351 TCACGTCACG GAAGAAGCCA TCTGTGCATC AAATAGAGAG TTAGACGAAC
P: 351 TCAGGTCTCG GAAGAAGCCA TTTGTGCATC AATTAGAGAG TTAGACCAAC

Y: 401 CACAACGTGG ATGAGCACTT CACGATATTA TTCACCGACT TTCCATCACC
P: 401 CACAAGGTGG TTGAGCACTT CACCATATAT ATCACCCACT TTCCAACACC

Y: 451 CTAGTCAGTC TTCTCATATC CTCCGAGAGC CTTATCACTT CCTTTCGTCA
P: 451 CTTTTCAGTC TTCTCATATC CTCCGAAAGC CTTTTCACTT CCTTTCCTTA

Y: 501 CACGTTCTAC AAAGTCTTGT TTCGTTGTAG TATTCACTCT CCATCAAG
Y: 501 CACCTTCTTC AACGTTTTGT TTCCTTGTAG AATTCAATCT CGATCAAG
```

Figure 4-8. Nucleotide sequence of the promoter region of *Populus nigra* x *maximowiczii*. The sequence was compared with that of *Populus tremuloides*. Underline means CAT signal and the box indicates TATA sequence

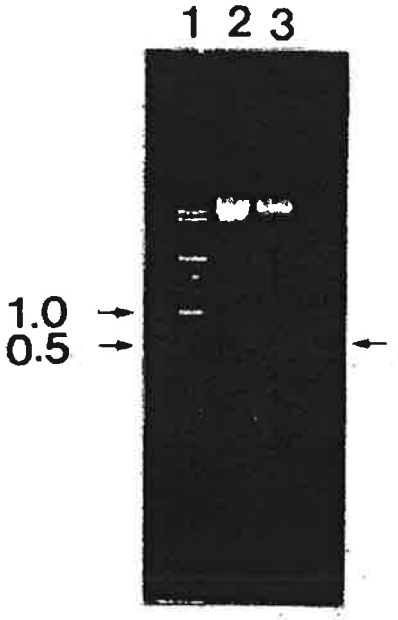


Figure 4-9. Agarose gel pattern of the recombinant plant vector containing promoter region of *P. nigra x maximowiczii* digested with *Hin*dIII & *Bam*HI

lane 1: 1 kb ladder lane 2: pBI-ProY intact
lane 3: pBI-ProY/*Hin*dIII & *Bam*HI

제 4 절 참고문헌

Barceló M., El-Mansouri I., Mercado J.A., Quesada M.A., & Alfaro F.P. 1998. Regeneration and transformation via *Agrobacterium tumefaciens* of the strawberry cultivar Chandler. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54: 29-36.

Bevan, M., Shufflebottom, D., Edwards, K., Jefferson, R., & Schuch, W. 1989. Tissue- and cell-specific activity of a phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic plants. EMBO J. 8: 1899-1906.

Dalkin, K., dewards R., Edington, B., & Sixon R.A. 1990. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). I. Induction of phenylpropanoid biosynthesis and hydrolytic enzymes in elicitor-treated cell suspension cultures. Plant Physiol 92: 440-446.

Goffner, D., Joffroy, I., Grima-Pettenati, J., Halpin, C., Knight, M.E., Schuch, W., & Boudet, A.M. 1992. Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus* xylem. Planta 188: 48-53.

Grand C., Parmentier P., Boudet A., & Boudet A.M. 1985. Comparison of lignins and of enzymes involved in lignification in normal and brown midrib (*bm3*) mutant corn seedlings. Physiol Veg. 23: 905-911.

Ibrahim R.K., Bruneau A., & Bantignies B. 1998. Plant *O*-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. 36: 1-10.

Robertson D., Weissinger A.K., Ackley R., Glover S., & Sederoff R.R. 1992. Genetic transformation of Norway Spruce [*Picea abies* (L.) Karst] using somatic embryo explants by microprojectile bombardment. Plant Mol. Biol. 19: 925-935.

Sciri V., & Sankara Rao K., 1998. Introduction and expression of marker genes in sandalwood (*Santalum album* L.) following *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Sci. 131: 53-63.

Sul I.W. & Korban S.S. 1998b. Influence of bombardment with BA-coated microprojectiles on shoot organogenesis from *Phlox paniculata* L. and *Pinus pinea* L. tissue. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 34: 300-302.

제 5장 OMT 유전자 구조분석

제 1 절 서 언

임목은 경제적 측면 (건축용재, 종이, pulp 생산)과 생태. 환경 보존적 측면 (홍수 조절, 수질보존, 산사태 예방, 야생동물 서식지, 휴양림)에서 인간생활에 아주 중요한 가치와 의미를 제공하고 있다. 그러나, 임목은 일반작물이나 원예식물과는 달리 생육기간이 길며, 육종에 의해 개량된 형질은 성숙기가 되어야 평가되기 때문에 육종 분야에 큰 장애가 되어 왔다. 또한 이형접합성이 강하여 종자번식을 통한 증식이 어려운 실정이다. 생명공학 기법은 전통적인 육종에서 나타나는 이러한 여러 가지 문제점들을 극복할 수 있는 하나의 대안이 되고 있다.

리그닌은 모든 고등 식물에서 발견되는 방향족 고리를 가진 poly-phenyl propanoid 중합체로서 이차 세포벽의 중요한 구성성분중 하나이다. 리그닌은 cellulose 및 세포벽내의 다른 다당류와 강하게 결합되어 있어 식물체로부터 분리하기가 어렵기 때문에 정확한 구조를 알 수는 없지만, 일반적으로 *p*-coumaryl, coniferyl, 그리고 sinapyl alcohol의 세 가지 phenylpropane alcohol로 구성되어 있으며, 이들은 중합과정을 거쳐 *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl, syringyl 리그닌을 형성한다. 세포벽에 축적된 리그닌은 식물체의 지지, impermeabilization에 중요한 역할을 담당하며, 병원균에 대한 화학적, 기계적 방어 작용을 한다.

Pulp나 제지산업에서의 탈리그닌 과정은 에너지가 많이 요구되고, 환경적으로 유독한 화학 약품을 사용하는 단계이다. 따라서 저리그닌 함량의 식물체 창출은 탈리그닌 과정을 용이하게 하여 경제적, 환경적 문제를 감소시키는 이점을 제공한다.

리그닌 합성에는 여러 가지 효소가 관여하고 있는데 그 가운데에서도 hydroxylated monomeric 리그닌 precursor의 methylation은 리그닌 생합성 과정에서 중요한 단계에 속하기 때문에, S-adenosyl-L-methionine의 methyl group을 이용하여 caffeic acid를 ferulic acid로, 5-hydroxyferulate를 sinapate로 각각 methylation 시키

는 *O*-methyltransferase (OMT)가 많이 연구되었다.

Antisense RNA를 이용한 유전자의 down-regulation은 특정 유전자의 작용을 억제하거나 조절하여 발현에 영향을 주는 기법으로서, 리그닌 생합성에 관련된 효소의 활성을 억제하여 리그닌 함량을 감소시키기 위해 응용될 수 있다. *Populus* 종은 임목에서 다양한 이용성을 가진 수종으로서 저리그닌 함량 *Populus* 종의 창출은 경제적, 환경적 측면에서 필요한 일이라고 사료된다. 본 세부연구는 리그닌 생합성과 관련된 OMT 유전자를 양황철나무 (*Populus nigra* x *maximowiczii*)의 genomic DNA와 cDNA로부터 분리하여 그 특성을 규명함으로서 antisense OMT를 식물발현 vector에 구축하여 양황철나무를 형질전환 시킴으로서 저리그닌 함량의 poplar를 육성하기 위해 시도되었다.

제 2 절 실험방법

1. 양황철 cDNA library 제조 및 OMT cDNA screening

가.양황철 cDNA library 제조

포플라로부터 분리한 poly(A+)RNA에 대한 cDNA library 제조는 ZAP-cDNA Synthesis Kit(Startagene, La Jolla, Calif.)를 이용하여 약간의 실험방법을 변형하여 제조하였다.

1) First cDNA 제조

First cDNA의 제조는 10 ㎍의 poly(A+)RNA를 사용하여 oligo(dT) tail에 *Xho*I 제한효소 부위를 갖는 oligo(dT) primer-adapter를 이용하여 50 ㎕의 reaction volume 하에서 제조하였다. 즉, 2.8 ㎍의 linker-primer, 적당량의 DEPC-treated 물, 5 ㎕의 1st strand 반응buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 8 mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 50 ㎍/ml of RNase free-BSA), 5-methyl dCTP를 함유하는 10 mM dNTPs 3 ㎕, RNase Block Ribonuclease inhibitor 1 ㎕ (40 u/㎕)를 첨가한 후, 10 ㎍의

poly(A+)RNA와 잘 섞어 실온에서 10분간 방치하면서 annealing 시켰다. 그 후 Molony murine leukemia virus 역전사효소 1.5 μℓ(50 u/μℓ)를 넣고 37℃에서 1시간 반응시켰다. First cDNA의 합성된 양을 측정하기 위하여 0.5 μℓ의 α-32P-dATP (800 Ci/mmol)가 들어있는 다른 tube로 상기의 반응 mixture 5 μℓ를 취하여 옮긴 후 같이 반응하였다. 반응이 끝난 후 합성된 양을 측정하기 위하여 glass microfiber filter를 사용하여 TCA 침전에 의해 표지된 방사성 동위원소의 양을 counting 하여 계산한 결과 약 12% (1.2 μg 1st cDNA/10 μg polyA+RNA)의 좋은 효율로 first cDNA가 만들어졌고 그 중 일부는 alkaline agarose gel 분석을 위해 사용하였다.

2) Second cDNA 제조 및 size fractionation

Second strand cDNA의 제조는 좋은 수율로 합성된 first cDNA의 반응 mixture에 second strand buffer (20 mM Tris-HCl, pH 6.9, 90 mM KCl, 4.5 mM $MgCl_2$, 0.15 mM β-NAD, 10 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM dNTPs, α-32P-dATP, RNase H (3 unit), DNA polymerase (100 unit)를 첨가한 후 물로 반응 volume을 400 μℓ로 맞춘 후 16℃에서 2.5 시간 반응하였다. 반응이 끝난 후 일정량을 취하여 second cDNA 합성효율을 TCA침전에 의해 측정한 결과 2.46 μg의 cDNA가 만들어졌음을 확인하였고 그 반응 mixture내의 합성된 cDNA의 5'-말단 부위를 *pfu* polymerase 효소를 사용하여 72℃에서 30분간 blunting 한 다음 cDNA는 phenol-chloroform 추출과 ethanol 침전에 의해 회수하였다. 또한 cDNA의 방향성을 부여하기 위하여 *Eco*RI 제한효소 부위를 포함하는 adaptor를 첨가하여 만들어진 cDNA들과 blunt-end ligation을 한 후 polynucleotide kinase로 5'-말단부위를 인산화 시켰다. 3'-말단 linker내에 있는 *Xho*I 제한효소 부위를 sticky end로 만들기 위하여 120 unit의 *Xho*I을 처리하였고 phage vector내로 cloning 효율을 높이기 위하여 cDNA size fractionation column (GIBCO BRL, Bethesda, MD)을 사용하여 cDNA의 크기별로 분획을 회수한 후 그 중 일부를 취하여 TAE buffer를 사용한 agarose gel 에서 cDNA 분포를 확인하였다. 분획중 0.5 kb 이상 되는 cDNA만을 모아 phenol-chloroform 추출정제 후 ethanol 침전에 의해 cDNA를 회수한 다음 EtBr agarose plate상에서 정량하여 그 중 100 ng을 1 μg의 Uni-ZAP vector와 12℃에서 overnight ligation하여 packaging을 위해 사용하였다.

3) Phage vector ligation 및 packaging

재조합 phage vector의 packaging은 Gigapack Gold III packaging kit (Stratagene, La Jolla, CA)를 이용하여 제조하였다. 즉, ligation mixture 1 ㎕를 kit에 의해 제공된 packaging extract에 넣어 잘 섞고 22℃에서 2시간 동안 반응한 다음 SM buffer (5.8 g NaCl, 2 g $MgSO_4$, 50 ml of 1 M Tris-HCl, pH 7.5, 5 ml of 2% gelatin/liter) 500 ㎕ 와 20 ㎕의 chloroform을 첨가하여 반응을 중지하였고 짧은 시간 동안 원심분리에 의해 pellet으로부터 상등액을 분리하여 host cell로 infection을 위해 사용하였다. 재조합된 cDNA의 효율을 측정하기위하여 XL1-Blue MRF' host cell에 packaged phage 0.1 ㎕와 1 ㎕를 각각 첨가 한 후 IPTG와 X-Gal이 포함된 top agarose로 plating 한 결과 재조합 plaques (white color)이 99%로 높은 cloning 효율을 나타내었다. 또한 titering에 의한 cDNA library size를 측정한 결과 전체 size는 8 x 106 pfu/㎍ of cDNA로 큰 size의 library를 얻었다.

4) Amplification 및 *in vivo* excision

Packaging extract에 의해 형성된 phage는 불안정하므로 안정하고 높은 titer를 갖는 library를 만들기 위해 packaged phage를 plate (150 mm)당 50,000 plaques 정도가 형성 되도록 host cell에 infection 하여 NZY bottom agar를 포함하는 150 mm plate에 top agarose를 도말하여 1회 amplification을 하였다. Confluent lysis가 일어난 plate에 SM buffer 10 ml을 넣고 실온에서 2시간 정도 shaking 하면서 phage들이 스며 나오도록 한 다음 SM buffer를 회수하여 chloroform이 5%가 되도록 첨가하여 bacteria를 제거하였다. 제조된 cDNA library에 7% DMSO (dimethylsulfoxide)를 첨가하여 -80℃ 보관하였고 필요시 일부를 취하여 실험에 사용하였다. 구축된 library내의 재조합 phage들의 최종 titer를 조사한 결과 약 1 x 108 pfu/㎕로 높은 phage titer를 갖는 cDNA library가 제조되었다. Phage library내에 도입된 insert DNA size 분포를 알아보기 위해 phage stock 250 ㎕. XL1-Blue MRF (OD=1.0) 200 ㎕, ExAssist helper phage (1 x 106 pfu/㎕) 1 ㎕를 섞어 37℃에서 15분간 흡착시킨 후 LB 배지 3 ml을 첨가하여 37℃에서 2.5시간 배양하였다. 그 후 70℃에서 20분간 반응시켜 filamentous phage particle로 packaging 된 pBluescript phagemid를 갖는 상등액을 회수하였다. 상등액 100 ㎕를 SOLR cell (OD=1.0) 200 ㎕에 섞고 37℃에서 15분간 반

응시킨 후, ampicillin을 함유하는 LB 배지에 도말하여 phagemid를 갖는 bacteria colony들을 얻었다. 이런 colony들 중 임의로 18개를 선정하여 LB 액체배지에서 키워 플라스미드를 추출하여 *Eco*RI과 *Xho*I으로 잘라 agarose gel에서 확인하였다.

나. Total Phage DNA 추출 및 partial OMT cDNA 증폭

1) Total phage DNA 추출

양황철 cDNA library로부터 phage total DNA의 추출은 Molecular Cloning (Sambrook *et al*., 1989)의 실험 방법들에 따라 수행하였다. 즉, confluent lysis가 일어난 plate에 λ diluent (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM $MgSO_4$)를 넣어 phage 현탁액을 회수한 다음, 4000g 에서 10분간 원심분리에 의해 bacterial debris를 제거하였다. 상등액을 새로운 튜브로 옮겨 RNaseA (1 mg/ml) 1 ㎕와 DNase I (1 mg/ml) 1 ㎕를 각각 넣고 37℃에서 15분간 배양한 다음, 동량의 PEG 용액 (20% PEG8000 & 2 M NaCl)을 첨가하여 섞고 얼음에서 1시간동안 방치하였다. Phage 입자들은 원심분리 (10,000g, 10분, 4℃)에 의해 침전시켜 상등액은 완전히 제거한 다음, pellet은 건조시켜 TE buffer (pH 8.0) 0.5 ml에 현탁시키고 10% SDS 5 ㎕를 첨가하여 68℃에서 5분간 배양하였다. 5 M NaCl 10 ㎕를 넣은 다음 phenol:chloroform 과 chloroform으로 정제하여 isopropanol로 DNA를 침전시켜 pellet를 얻은 후 TE buffer에 녹여 PCR 증폭을 위한 주형으로 사용하였다. 다른 DNA 주형으로서 insert DNA를 포함하는 pBluescript phagemid를 분리하기 위해 *in vivo* excision 과정을 수행하여 얻은 filamentous phage particle을 갖는 상등액 100 ㎕와 200 ㎕의 SOLR 세포를 eppendorf tube에 넣고 37℃에서 15분간 배양한 후 ampicillin (50 ㎍/ml)을 포함하는 500 ml의 액체배지에 접종하여 overnight 배양하였다. 그 다음날 균을 원심분리에 의해 수거한 다음 alkaline lysis 방법에 의해 solution I, II, III를 처리하고 (Birnboim & Doly, 1979) PEG 방법 (Sambrook *et al*., 1989)에 의해 plasmid DNA를 분리하여 적절히 희석한 후 PCR 반응의 template로 사용하였다.

2) PCR에 의한 부분 유전자 증폭

양황철 OMT 유전자를 cDNA library로부터 screening하기 위하여 사용할 부분 유전자는 OMT DNA 서열이 알려져 있는 사시나무(Aspen) 염기 서열의 부분 서열을 참조로 하여 새로운 2 set의 primer oligonucleotide를 합성하였다.

OMT F2 (5'GGGGGATCCAAGATTCAACAAG3')와
R1 (5'GGGGTCGACGGCCTTCTTGCGGAA3')

PCR 반응은 추출한 total cDNA를 template로 하여 가장 효율이 좋았던 100 ng을 사용하였으며 primer 농도는 각각 2 pmole이 되도록 첨가하고 *Taq* polymerase는 2 unit을 사용하여 95℃-5 min, 44℃-30 sec, 72℃-2 min 조건에서 1 cycle, 95℃-1 min, 44℃-30 sec, 72℃-2 min 조건에서 30 cycle, 72℃-10 min에서 1 cycle을 수행하였다. PCR에 의해 증폭된 약 0.59 kb 또는 0.9 kb 단편을 elution하여 분리한 DNA 25 ng을 사용하여 50 μCi 의 α-P^{32}-dCTP 넣고 polymerization을 위해 Klenow 효소를 이용하는 Prime-a-Gene Labelling System (Promega)에 의해 DNA를 labelling 시켜 양황철 OMT cDNA screening을 위한 probe DNA로 사용하였다.

다. 양황철 full-length OMT cDNA의 screening

양황철 OMT cDNA의 screening 과정은 다음과 같다.

1) cDNA library 증폭

7% DMSO에 섞어 -80℃에 보관중인 cDNA library의 titer를 재결정 한 후 150 mm NZY agar plate에 약 60,000 plaques을 형성하도록 titer를 조절하여 plating 하였다. 즉 0.2% maltose와 10 mM $MgSO_4$를 포함하는 LB 배지에서 자란 XL1-Blue MRF (*rec*A-, *mcr*A-, *mcr*CB-, *mrr*-) 세포들의 밀도를 0.5로 조절한 후, 세포 600 μℓ와 SM buffer에 phage stock을 희석하여 titer를 조절한 phage 희석액을 섞어 37℃에서 15분간 배양한다. 그 후 48℃로 식힌 NZY top agarose 8 ml 을 감염된 세포와 섞은 다음 150 mm NZY plate에 붓고 37℃에서 confluent lysis가 일어나도록 배양하였다.

2) Blotting 및 filter 전처리

Plaque hybridization을 위한 일련의 과정들은 Grunstein and Hogness 방법에 따라 수행하였다. Lysis가 일어난 plate를 4℃에서 약 1시간 정도 방치한 후, 멸균된 137 mm plaque screen membrane disc (NEN, Du Pont)를 agar plate에 2-3분 정도 올려놓고 needle을 이용하여 위치를 표시하였다. False positive plaque을 방지하기 위하여 duplicate filter를 약 4분간 같은 agar plate에 올려놓고 blotting을 하여, 1차 screening 과정을 위해 2 개의 filter를 사용하였다. 사용한 master agar plate는 최종적으로 autoradiography에 의한 positive plaque picking을 의해 4℃에 보관하였으며, 이렇게 준비된 filter는 1.5 M NaCl과 0.5 M NaOH를 포함하는 denaturation 용액에 2-3분간 방치하여 phage DNA를 변성시키고 그 다음 변성된 DNA를 중화시키기 의하여 1.5 M NaCl과 0.5 M Tris-Cl (pH 8.0)의neutralization 용액으로 옮겨 약 5 분간 방치한 후, 3 MM paper로 옮겨 수분을 제거하였다. 젖은 상태의 membrane에 DNA를 더욱 견고하게 binding 시키기 위하여 UV crosslinker (120,000 μJ of UV energy)로 약 30초간 crosslink 시켰다.

3) Probe DNA 제조 및 hybridization

준비된 membrane들은 prehybridization buffer (2 x PIPES, 50% deionized formamide, 0.5% SDS, 100 μg/ml denatured salmon sperm DNA)를 포함하는(3 ml/membrane) glass dish에 넣고 42℃에서 2 시간 이상 반응시켰다. Probe DNA는 사시나무 (*Populus tremuloides*)의 염기서열을 참조로 하여 합성된 primer를 이용하여 증폭된 0.59 kb와 0.9 kb DNA 절편을 agarose gel 에서 fractionation 하여 각각의 DNA 조각을 elution 하였다. 분리한 DNA 25 ng을 변성시킨 후, 50 μCi 의 α-P32-dCTP, dNTPs, 10x buffer, BSA, Klenow 효소를 첨가하여 잘 섞고 실온에서 1시간동안 반응시킨 다음, 95℃에서 열처리에 의해 반응을 중지시켰다. 반응액에 EDTA를 20 mM이 되도록 첨가하고 Sephadex G-50 gel이 packing된 spun column에 반응액을 loading하여 fraction 1과 2를 원심분리에 의해 모으고 결합되지 않은α-P32-dCTP를 제거하였다. 이렇게 만들어진 probe DNA는 100℃에서 5분간 heating 한 후, 급속히 얼음에 담궈 single strand로 변성시키고 hybridization 용액 1 ml 당 약 1 x 106 cpm이 되도록 probe DNA를 첨가한 다음, 42℃에서 8시간 이상 반응시켰

다. 반응이 끝난 후 hybridization 용액을 제거하고 실온에서 2 x SSC and 0.5% SDS 용액으로 10분씩, 2회 washing 한 후, 0.5 x SSC and 0.5% SDS 용액으로 30분씩 55 - 60℃에서 2회 세척하였다. 최종적으로는 0.1 x SSC and 0.1% SDS 용액으로 background를 줄이는 high stringency하에서 washing한 다음 filter들을 말리고 saran wrap으로 덮어 intensifying screen이 있는 cassette folder에 넣은 후 -80℃에서 X-ray film에 overnight 노출시켰다.

라. Total cDNA로부터 PCR에 의한 full length OMT cDNA 증폭

OMT DNA 서열이 알려져 있는 사시나무(Aspen) 염기 서열의 5'-말단과 3'-말단의 부분 서열을 참조로 하여 상당한 유사성을 갖고 있을 것이라고 예상되는 부위를 기점으로 하여 Figure 5-4A에서 보는 바와 같이 새로운 2 set의 primer oligonucleotide를 합성하였다. OMT F1 (5'GGGGTCGACAAGATGGGTTCAACA3') 과 R1 (5'GGGGTCGACGGCCTTCTTGCGGAA3') primer set의 경우 start codon에서 stop codon 까지만 amplification되도록 design 되었으며 양쪽 끝에는 제한효소 *Sal*I site를 도입하여 계속되는 subcloning 과정에 용이하도록 하였다. 또 다른 set인 primer F1 과 R2 (5'GGGGTCGACTCACTTAATGCTTAG3')의 경우에는 3'-noncoding region 324 bp가 더 들어가도록 설계되었으며 양쪽 말단은 첫 번째 primer set와 마찬가지로 *Sal*I site가 도입되었다. PCR 반응은 추출한 total cDNA를 template로 하여 가장 효율이 좋았던 100 ng을 사용하였으며 primer 농도는 각각 2 pmole, dNTPs 는 0.5 mM, MgSO4 는 1 mM이 되도록 첨가하고, vent DNA polymerase (NEB)는 2 unit을 사용하여 95℃-5 min, 44℃-30 sec, 72℃-2 min 조건에서 1 cycle, 95℃-1 min, 44℃-30 sec, 72℃-2 min 조건에서 30 cycle, 72℃-10 min에서 1 cycle을 수행하였다.

1) Cloning of PCR product using pGEM-T vector system

PCR product는 pGEM-T vector system을 이용하여 subcloning하였다. 3.0 kb 크기의 T-vector 1 μℓ (50 ng, 0.025 pmole)와 1.1 kb의 insert DNA 경우 50 ng (0.075 pmole), 1.4 kb의 경우 70 ng에 해당하는 양을 섞어 4℃에서 overnight ligation 반응후, 각각 1 μℓ를 *E. coli* JM109 세포에 도입시켰다. β-galactosidase의 α-complementation에 의한 insert DNA의 유무 판정을 위하여 LB/amp 배지에 X-gal

과 IPTG를 도말하여 형성된 colony중 white colony들만 선택한 후 rapid plasmid 분리에 의해 DNA를 추출하여 제한효소 *Sal*I으로 digestion 후 insert를 검증하였다.

2) Subcloning of OMT cDNAs into pBluescript-KS vector

Vector pGEM-T에 cloning 되어있는 OMT cDNA 각각 (A'10 & B'1)의 염기서열을 분석하기 위하여 *Sal*I으로 자른 후 1.1 kb와 1.4 kb를 각각 elution하여 T3 와 T7 primer로 염기서열 분석이 가능한 pBluescript-KS vector로 다시 subcloning하여 얻은 clone들 (pOMTA1.1 & pOMTB1.4)을 Sanger-dideoxy sequencing에 의해 5'-말단과 3'-말단의 염기 서열을 분석하였고 그 cDNA들의 중간부분에 대한 서열은 T3와 T7primer에 의해 읽은 서열을 참조하여 F1 (ACCAAGAACGAGGAC)과 R1 (GGCATATCCACTTCA) primer를 합성한 후 전체 서열을 확인하였다. 그 다음 library로부터 screening에 얻은 #2 clone의 서열과 비교하여 양황철 cDNA 완전한 염기서열을 밝혔다.

마. 염기서열 분석

1) Sequencing reaction

양황철 OMT 유전자가 cloning 되어있는 각각의 plasmid DNA (pOMTA1.1, pOMTB1.4, and #2)를 갖는 세포들을 배양하여 균체를 회수한 후, QIAGEN plasmid extraction kit를 사용하여 DNA를 깨끗하게 추출하였으며 Sanger-dideoxy 방법에 의한 염기서열 분석에 double strand DNA를 template로 하여 sequencing 반응은 sequenase kit (United States Biochemical)를 사용하여 수행하였다. 즉, 각 clone들의 DNA 5 μg을 0.2 N NaOH and 0.2 mM EDTA 용액과 섞어 37℃에서 30분간 반응시킨 후 3 M sodium acetate를 0.1 volume 첨가하여 중화시키고 2 volume의 ethanol을 첨가하여 변성된 상태로 DNA를 회수하였다. 변성된 DNA를 7 μℓ의 물에 녹인 후 각각의 primer (0.5 pmole/3 ng/μℓ) 1 μℓ와 5 x sequenase buffer (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM $MgCl_2$, 250 mM NaCl) 2 μℓ를 첨가하여 37℃에서 30분간 annealing시켰다. Annealing된 DNA 10 μℓ에 5 x Labeling Mix (7.5 μM dGTP, 7.5 μM dCTP, 7.5 μM dTTP)를 물로 5배 희석한 mixture 2 μℓ, 0.1 M DTT 1 μℓ,

〔α-^{35}S〕dATP (1,000 Ci/mmol) 0.5 ㎕, enzyme dilution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM DTT, 0.5 mg/ml BSA)로 9배 희석한 sequenase 2 ㎕를 첨가하여 잘 섞은 후, 실온에서 약 2-3분간 방치하였다. 그 다음 dNTP와 각각의 termination nucleotide (ddGTP, ddTTP, ddCTP, ddATP)를 함유하는 termination mixture를 4개의 E-tube에 각각 2.5 ㎕씩 넣은 후 상기 반응액을 3.5 ㎕씩 각각의 tube(A, C, G, T reaction)에 옮겨 37℃에서 약 5분간 반응시킨 다음 stop solution (95% formamide, 20 mM EDTA, 0.05% bromphenol blue, 0.05% xylene cyanol) 4 ㎕를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 반응이 끝난 A, C, G, T 각각의 반응액은 80℃에서 2분간 변성시킨 후 urea를 포함하는 6% denatured polyacrylamide gel에서 3 tracks으로 loading 하여 fractionation 하였다. Running이 끝난 gel은 urea를 제거하기 위하여 적당량의 fixing solution (300 ml methanol, 100 ml Acetic acid, 1600 ml DW) 에 30분간 담근 후 80℃로 setting한 gel dryer에서 gel을 말려 X-ray film에 하루동안 expose하여 현상한 결과 같은 각 clone들의 염기서열을 얻었다.

2. 양황철 genomic DNA library 제조 및 OMT genomic DNA screening

가. Genomic DNA 추출

양황철 xylem (목질부)으로부터 genomic DNA의 추출은 Murray and Thompson (1980)의 방법에 따라 추출하였다. 조직을 액체질소에 얼린 후 미리 냉각시킨 막자사발에 넣고 액체질소를 첨가시킨 상태에서 분쇄하고 녹지 않은 상태의 고운 가루를 20 mM 2-mercaptoethanol이 첨가된 CTAB extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 70 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% CTAB)를 포함하는 tube에 넣고 잘 섞고, 그 다음 즉시 55℃ 수조로 옮겨 약 20분간 배양하였다. 동량의 chloroform/isoamylalcohol (24 : 1) 을 첨가하여 섞은 후 원심분리 (1,300 x g, 10 min) 하고 상등액을 새로운 tube로 옮긴 다음 동량의 CTAB precipitation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 1% CTAB) 를 넣고 실온에서 20분 방치한 다음, 2,000 x g 에서 15분간 원심분리하여 침전물을 얻어 1 M NaCl 용액에 녹인 후 2 volume 의 ethanol을 첨가한 다음 -20℃ 에 2시간 이상 방치하였다. 이후 1,300 x g 에서 5분간 원심분리하여

DNA pellet을 얻고 70% ethanol로 염을 제거한 후 침전물을 말려 증류수에 녹인 다음 genomic library 구축을 위해 사용하였다.

나. Southern blot analysis

Murray and Thompson (1980)의 방법에 따라 양황철로부터 추출 정제한 genomic DNA 20 μg을 여러 가지 제한효소 (*Bam*HI, *Eco*RI, *Hin*dIII)를 각각 처리하여 37°C에서 반응시킨 다음, 0.8% agarose gel에서 전기영동에 의해 fractionation 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 분자량이 큰 DNA의 이동을 용이하게 하기 위하여 0.25 N HCl에 15분 동안 담구어 depurination 시키고, denaturation 용액(0.5 N NaOH & 1.5 M NaCl)에서 20분간 DNA를 변성시키고, neutralizing 용액 (0.5 M Tris-HCl, pH 7.5 & 1.5 M NaCl)에서 20분간 처리하여 다시 DNA를 중화시킨 다음, 분리된 DNA들은 capillary reaction에 의해 gene screen plus membrane으로 이동시켰다. Probe DNA는 pOMTB1.4 플라스미드를 *Sal*I으로 잘라 1.4 kb의 절편을 elution 하였고, 60 μCi 의 α-P32-dCTP, dNTPs, 10x buffer, BSA, Klenow 효소를 첨가하여 잘 섞고 실온에서 1시간동안 반응시킨 다음, 반응액에 EDTA를 20 mM이 되도록 첨가하여 반응을 중지시켰다. 결합되지 않은α-P32-dCTP는 Sephadex G-50 gel이 packing된 spun column에 의해 제거한 후, 만들어진 probe DNA는 100°C에서 5분간 heating 한 후, 급속히 얼음에 담궈 single strand로 변성시키고 2 x PIPES (0.8 M NaCl & 20 mM PIPES, pH 6.5) hybridization 용액 (2 x PIPES, 50% deionized formamide, 0.5% SDS, 100 μg/ml denatured salmon sperm DNA) 1 ml 당 약 1 x 106 cpm이 되도록 probe DNA를 첨가한 다음, 42°C에서 8시간 이상 반응시켰다. 반응이 끝난 후 hybridization 용액을 제거하고 실온에서 2 x SSC and 0.5% SDS 용액으로 10분씩, 2회 washing 한 후, 0.5 x SSC and 0.5% SDS 용액으로 30분씩 55 - 60°C에서 2회 세척하였다. 최종적으로는 0.1 x SSC and 0.1% SDS 용액으로 background를 줄이는 high stringency하에서 washing한 다음 filter들을 말리고 saran wrap으로 덮어 intensifying screen이 있는 cassette folder에 넣은 후 -80°C에서 X-ray film에 overnight 노출시켰다.

다. Genomic DNA library 제조

1) Insert DNA 준비

양황철 포플라로부터 분리한 genomic DNA를 사용한 library 구축은 9 kb 에서부터 23 kb까지 replacement가 가능한 Lambda FIX II vector system (Stratagene)을 이용하였고 *in vitro* packaging은 Gigapack Gold III Packaging Extracts (Stratagene)를 사용하여 1 회 amplification에 의해 genomic library를 구축하였다. 염기 TC가 돌출 되어있는 Lambda FIX vector와 compatible end (*Xho*I digested, filled in with dCTP and dTTP)를 만들기 위해 GATC의 sticky end를 갖는 각 크기별의 genomic DNA는 dATP와 dGTP를 사용하여 klenow 효소에 의해 TC 염기만을 부분적으로 filling 시켰고 GA 염기가 돌출 되도록 하여 vector의 TC 염기와 수소결합이 가능한 형태로 만들었다. Phenol/chloroform에 의한 정제 후 ethanol 침전에 의해 각 크기별로 분포하는 genomic DNA를 얻었고, 이미 탈인산화가 되어 있는 vector DNA 1 μg과 각 크기별 genomic DNA 1 μg을 섞고 T4 DNA ligase 2 weiss unit 을 첨가하여 16℃에서 overnight 동안 ligation 반응을 수행하였다. Ligation이 끝난 후 일부를 취하여 agarose gel에서 ligation efficiency를 확인한 다음 1 μl ligate를 사용하여 *in vitro* packaging 하였다.

2) *In vitro* packaging 및 titering

In vitro packaging은 Gigapack III Gold Packaging Extract Stratagene, #200203)를 사용하여 수행하였다. Deep freezer에 보관 중인 packaging extract를 녹인 후 ligate 1 μl (약 200 ng)를 첨가하고 실온에서 1.5시간동안 반응시킨 다음, 500 μl의 SM buffer와 20 μl의 chloroform을 첨가하여 잘 섞고 원심분리에 의해 debris들을 제거한 다음 titering을 위해 4℃에 보관하였다. Maltose (0.2%)와 10 mM $MgSO_4$를 포함하는 LB 배지에서 자란 XL1-Blue MRF(P2) 세포들의 밀도를 (OD_{600}) 10 mM $MgSO_4$로 0.5가 되도록 희석한 후 숙주세포 200 μl와 final packaging extract를 연속적으로 희석한 후 섞어 37℃에서 15분간 배양하였다. 그 후 48℃로 식힌 NZY top agarose 4 ml을 감염된 세포와 섞은 다음 100 mm NZY agar plate에 붓고 37℃에서 10시간 배양한 후, titer를 결정하였다.

3) Genomic DNA library 증폭

Genomic library의 high titer stock을 안정하게 많은 양 얻기 위하여 lambda vector에 cloning 된 genomic DNA를 함유하는 phage를 1회 증폭하였다. 상기와 같이 준비된 숙주세포 600 ㎕에 150 mm plate에 1 x 105 plaques(15 ㎕ of final packaging extract)이 형성되도록 phage를 섞고 37℃에서 15분 배양한 후, 10 ml의 top agarose 용액을 넣어 섞은 후 150 mm plate에 부어 37℃에서 confluent lysis가 일어날 때까지 배양하였다. 그 후 lysis가 일어난 plate에 SM buffer 10 ml을 첨가한 후 phage가 스며 나올 수 있도록 shaking 하면서 4℃에서 overnight 배양한 다음, 각각의 plate로부터 SM buffer를 회수하여 chloroform을 5% 되게 넣고 실온에서 15분간 배양한 후 원심분리에 의해 debris를 제거하였고, 그 중 일부는 DMSO가 7% 되게 첨가하여 -80℃에 stock으로 보관하였으며 나머지는 chloroform을 0.3% 되게 넣은 다음 OMT genomic DNA의 screening을 위해 사용하였다.

라. OMT genomic DNA screening

1) Plating, Blotting 및 filter 전처리

4℃에 보관중인 genomic DNA library의 titer를 재결정한 후 150 mm NZY agar plate 에 약 80,000 plaques을 형성하도록 titer를 조절하여 plating 하였다. 상기의 방법과 같이 숙주세포를 만들고 XL1-Blue MRF (P2) 세포들의 밀도를 흡광도 600 (A=600)에서 0.5로 조절한 후 세포 600 ㎕ 와 SM buffer에 phage stock을 희석하여 titer를 조절한 phage 희석액을 섞어 37℃에서 15분간 배양 한 후, 48℃로 식힌 NZY top agarose 8 ml을 감염된 세포와 섞은 다음 150 mm NZY plate에 붓고 37℃에서 confluent lysis가 일어나도록 배양하였다. Plaque hybridization을 위한 일련의 과정들은 OMT cDNA screening 할 때와 마찬가지로 Grunstein and Hogness (1975) 방법에 따라 수행하였으며, lysis가 일어난 plate를 4℃에서 약 1시간 정도 방치한 후, 멸균된 137 mm plaque screen membrane disc(NEN , Du Pont)를 agar plate에 2-3분 정도 올려놓고 needle을 이용하여 위치를 표시하였다. False positive plaque을 방지하기 위하여 duplicate filter를 약 4분간 같은 agar plate에 올려놓고 blotting을 하였고 사용한 master agar plate는 최종적으로 autoradiography에 의한 positive plaque

picking을 의해 4℃에 보관하였다. 이렇게 준비된 filter는 denaturation 용액에 2-3분간 방치하여 phage DNA를 변성시킨 다음 변성된 DNA를 중화시키기 의하여 neutralization 용액으로 옮겨 약 5분간 방치한 후, 3 MM paper로 옮겨 수분을 제거하여 건조시켰다.

2) Probe DNA 제조 및 hybridization

준비된 membrane들은 prehybridization buffer (2 x PIPES, 50% deionized formamide, 0.5% SDS, 100 μg/ml denatured salmon sperm DNA)를 포함하는(3 ml/membrane) glass dish에 넣고 42℃에서 2시간 이상 반응시켰다. Probe DNA는 양황철 OMT의 full length cDNA를 갖는 pOMTB1.4 plasmid를 *Sal*I으로 잘라 agarose gel에서 fractionation 하여 1.4 kb DNA 조각을 elution 하였다. 분리한 DNA 25 ng을 사용하여 50 μCi 의 α-P32-dCTP 넣고 polymerization을 위해 Klenow 효소를 이용하는 Prime-a-Gene Labelling System (Promega)을 이용하여 DNA를 labelling시켜 양황철 genomic DNA screening을 위한 probe DNA로 사용하였다. 만들어진 probe DNA는 100℃에서 5분간 heating 한 후 급속히 얼음에 담궈 single strand로 변성시키고 hybidization 용액 1 ml 당 약 1 x 106 cpm이 되도록 첨가하여 42℃에서 8시간 이상 반응시켰다. 반응이 끝난 후 hybridization 용액을 제거하고 실온에서 2 x SSC and 0.5% SDS 용액으로 10분씩, 2회 washing 한 후 0.5 x SSC and 0.5% SDS 용액으로 30분씩 55-60℃에서 2회 세척하였고 최종적으로는 0.1 x SSC and 0.1% SDS 용액으로 background를 줄이는 high stringency하에서 washing 한 다음 filter들을 말리고 intensifying screen이 있는 cassette folder에 넣은 후, -80℃에서 X-ray film에 overnight 노출시켰다.

3) Lambda phage DNA 분리 및 염기서열 분석

Confluent lysis가 일어난 plate에 λ diluent (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM $MgSO_4$) 10 ml을 넣고 교반하여 phage 현탁액을 회수한 다음, 4000g 에서 10분간 원심분리에 의해 bacterial debris를 제거하였다. 상등액을 새로운 튜브로 옮겨 RNaseA (1 mg/ml) 1 μl와 DNase I (1 mg/ml) 1 μl를 각각 넣고 37℃에서 15분간 배양한 다음, 동량의 PEG 용액 (20% PEG8000 & 2 M NaCl)을 첨가하여 섞고 얼음에서 1시간

동안 방치하였다. Phage 입자들은 원심분리 (10,000g, 10분, 4℃)에 의해 침전시켜 상등액은 완전히 제거한 다음, pellet은 건조시켜 TE buffer (pH 8.0) 0.5 ml에 현탁 시키고 10% SDS 5 μℓ를 첨가한 후, 68℃에서 5분간 배양하였다. 5 M NaCl 10 μℓ를 넣은 다음 phenol:chloroform 과 chloroform으로 정제하여 isopropanol로 DNA를 침전시켜 pellet를 얻은 후 TE buffer에 녹여 제한효소 처리에 의한 restriction enzyme pattern을 분석하기 위하여 사용하였다.

4) PCR amplification of OMT genomic DNA

Library로부터 screening에 의한 양황철 genomic DNA를 확보하는 것과 병행하여 양황철 genomic DNA를 직접 template로 하여 cDNA를 amplification 할 때 primer로 사용한 OMT-F1과 OMT-R1을 이용하여 약 2.5 kb의 genomic DNA가 증폭 되도록 polymerase chain reaction을 수행하였다. 즉, 추출한 genomic DNA는 100 ng, 200 ng, 400 ng을 사용하였고 primer 농도는 각각 2 pmole이 되도록 첨가하고 size가 큰 DNA를 얻을 수 있는 Ex-*Taq* polymerase (TAKARA)는 2 unit을 사용하여 95℃-5 min, 45℃-30 sec, 72℃-2 min 조건에서 1 cycle, 95℃-1 min, 45℃-30 sec, 72℃-2 min 조건에서 30 cycle, 72℃-10 min에서 1 cycle을 수행하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

양황철 cDNA library를 구축하기 위하여 먼저 순순 분리 정제한 polyA RNA에서 1st cDNA와 이어서 2nd cDNA를 합성하였다. 이들 second strand의 일부는 alkaline agarose gel 분석을 위해 사용하여 인공적이 cDNA 합성여부를 검정하였다 **(Figure 5-1)**. 합성된 ds cDNA 방향성을 *Eco*RI 제한효소 부위를 포함하는 adaptor를 첨가하여 생성하였으며 3'-말단 linker내에 있는 *Xho*I 제한효소 부위를 sticky end로 만들후 cDNA size fractionation column (GIBCO BRL, Bethesda, MD)을 사용하여 cDNA의 크기별로 분획을 회수한 후 그 중 일부를 취하여 TAE buffer를 사용한 agarose gel 에서 cDNA 분포를 확인하였다 **(Figure 5-2)**. 성공적으로 합성된 ds cDNA를 library를 구축하는데 사용하였다. cDNA library는 lamda ZAP DNA에 구축하였으며 이들을 임의로 18개를 선정하여 LB 액체배지에서 키워 플라스미드를 추

출하여 *Eco*RI과 *Xho*I으로 잘라 agarose gel에서 확인한 결과 0.5 kb로부터 5.2 kb까지 다양한 크기의 insert DNA가 도입된 것을 확인하였다 **(Figure 5-3)**.

양황철 OMT 유전자를 cDNA library로부터 screening하기 위해 먼저 OMT DNA 서열이 알려져 있는 사시나무(Aspen) 염기 서열의 부분 서열을 참조로 하여 새로운 2 set의 primer oligonucleotide를 합성하여 증폭하였다 **(Figure 5-4A & 4B)**. 이들 primer set의 경우 아미노산 169번을 coding하는 부분부터 stop codon 까지만 amplification되도록 design 되었으며 양쪽 끝에는 제한효소 *Bam*HI과 *Sal*I site를 도입하여 계속되는 subcloning 과정에 용이하도록 하였다. 또 다른 set인 primer F2와 R2(5'GGGGTCGACTCACTTAATGCTTAG3')의 경우에는 3'-noncoding region 324 bp가 더 들어가도록 설계되었으며 R2 말단은 첫 번째 primer set와 마찬가지로 *Sal*I site가 도입되었다. PCR 증폭후 전기영동상에서 primer F2& R1의 경우(lane 3) 약 0.59 kb 크기의 OMT 부분유전자를 얻었으며 primer F2 & R2의 경우(lane 4) 3'-말단의 324 bp가 더 첨가된 약 0.9 kb의 PCR product를 얻었다 **(Figure 5-4B)**.

양황철 xylem으로부터 추출한 poly(A+)RNA를 사용하여 구축된 λZAP cDNA library (1 x 108 pfu/㎕)로 부터 lignin-specific O-methyltransferase (OMT) 유전자를 분리하기 위하여 높은 DNA 서열 유사성을 갖는 사시나무 (*Populus tremuloides*)의 염기서열을 참조로하여 합성한 primer에 의해 증폭된 DNA를 probe로 사용하여 plaque hybridization을 수행한 결과, 1차 screening에서 15종의 putative 클론을 얻었으며 2차, 3차 screening을 통하여 최종적으로 5종류의 positive clone들을 얻었다. 그러나 그 클론들 중 제한효소 (*Eco*RI)를 처리하였을 때, 예상되는 DNA pattern을 보이면서 full-length OMT 유전자를 함유하는 클론의 염기서열과 PCR에 의해 증폭된 유전자들의 염기서열을 비교 분석하였으며, 다른 종의 OMT 유전자들과도 비교하였다. 즉 autoradiography에 의해 얻은 하나의 plate에 대한 duplicate film (total 10 films/5 plates, 300,000 plaques)들을 비교하여 같은 위치에 있는 plaque을 master plate와 대조한 다음 pasteur pipette을 이용하여 선택된 plaque을 picking 하여 SM buffer에 넣고 agarose로부터 bacteriophage particle이 스며 나오도록 4℃에 overnight 방치하였다 **(Figure 5-5)**. 이차 screening을 위해 phage titer를 결정한 다음 150 mm plate에 300-500 plaques이 형성될 수 있도록 titer를 조절하여 bacteria에 infection 시키고. 그 후 상기 과정과 동일하게 hybridization을 수행하여

autoradiography에 의해 film을 현상한 후 (Figure 5-6) 하나의 잘 분리된 positive plaque을 5 종류 picking 하였다. Picking한 single plaque으로부터 재감염 시 모든 plaque에서 동일하게 spot이 나오는 것을 확인하기 위하여 agar plate 에 20-100 plaques을 형성하도록 titer를 조절하여 bacteria에 infection 한 후 또 다시 hybridization 과정을 반복하였다. Tertiary screening에서 모든 plaque들이 OMT probe DNA와 hybridization 되는 것을 확인한 다음 (Figure 5-7), picking하여 양황철로부터 분리된 OMT cDNA phage stock으로 사용하였다. 5종류의 putative 클론들 중에서 full length 크기를 보이는 2개 클론을 선별하였고, 그 중 *Eco*RI에 의해 잘리는 insert DNA를 갖는 #2 clone을 선택하여 그 cDNA의 염기서열을 sanger-dideoxy chain termination 방법에 의해 분석하였으며 또한 PCR에 의해 증폭된 클론들과 서열을 비교하여 OMT 유전자의 염기서열을 이중으로 확인하였다.

구축된 양황철 cDNA library로부터 OMT full-length cDNA를 PCR에 의해 분리하기 위하여 이미 그 DNA 서열이 알려져 있는 Aspen(*Populus tremuloides*)의 OMT 유전자의 5'-말단과 3'-말단의 부분 서열을 참고하여 PCR을 위한 새로운 primer들을 합성한 후 양황철 cDNA library로부터 total DNA를 rescue 한 다음 template로 사용하여 OMT 유전자를 증폭하여 염기서열을 분석한 후 library screening에 의해 얻은 clone의 DNA서열과 비교하여 완전한 양황철 cDNA 서열을 밝혔다. PCR product를 전기용동후 UV에서 관찰한 바 primer F1& R1의 경우(lane 3) 약 1.1 kb 크기의 full-length OMT cDNA를 얻었으며 primer F1 & R2의 경우(lane 4) 3'-말단의 324 bp가 더 첨가된 약 1.44 kb의 PCR product를 얻었다. 이렇게 얻어진 양황철 DNA는 primer set에 의해 flanking 되는 예상 size와 같았다 (Figure 5-8). 얻어진 PCR product는 일반적으로 양쪽 말단에 A 염기가 protruding되는 경향을 가지므로 cloning 효율을 높이기 위하여 pGEM-T vector system을 이용하여 subcloning하였다. plasmid 분리에 의해 DNA를 추출하여 제한효소 *Sal*I으로 digestion에 의해 1.1 kb (A'10)와 1.4 kb (B'1)가 cloning 된 재조합 플라스미드를 획득하였다. (Figure 5-9). 이들의 단편을 각각의 plasmid에 subcloning 하여 염기서열을 하는데 사용하였다 (Figure 5-10).

각각의 clone (A1.1, B1.4, #2)들로부터 sequencing에 의해 얻은 염기서열 (Figure 5-11)은 A1.1의 경우 ATG initiation codon부터 TAA termination codon까

지의 서열을 가지고 있었으며, B1.4의 경우는 ATG codon부터 3'-noncoding region 까지, library screening에 의해 찾은 #2 clone은 5'-untranslated region부터 3'-noncoding region까지의 염기서열을 가지고 있었다. 이들 3 clone들의 서열을 비교 분석 해본 결과 모든 clone들이 같은 서열을 가지고 있었으며 서로의 서열을 종합하여 5'-untranslated region부터 3'-noncoding region까지 완전한 full-length 양황철 cDNA의 염기서열을 확보할 수가 있었다 **(Figure 5-12)**. 클로닝 된 양황철 OMT cDNA의 전체 길이는 1503 nucleotide이며 1098 nucleotide로 구성된 하나의 reading frame을 갖는 365 개의 아미노산에 대한 정보를 갖는 유전자로 구성되어 있다. OMT 단백질의 예상 분자량은 39,800 dalton이며 등전점 (Isoelectric point)은 5.57로 분석되었다. 5'-untranslated region은 64 염기로 구성되어 있으며, 3'-noncoding region은 322 nucleotide와 19 nucleotide의 poly(A+) tail로 되어 있으며 추정의 polyadenylation 인식서열이 발견되어 진다.

양황철 cDNA 염기서열 및 추정의 아미노산 서열은 이미 DNA 서열이 밝혀진 *Populus tremuloides* (Bugos *et al.*, 1991)의 염기서열과 비교분석 하였다 **(Figure 5-13 & 14)**. Open reading frame (AUG)으로부터 termination codon (TAA) 까지 coding region은 365 아미노산에 대한 유전정보를 가지고 있었지만 여러 부분에서 *Populus tremuloides*와는 다른 codon usage를 갖는 것으로 나타났다. 즉, codon 97에서는 leucine (CTT) → histidine (CAT)으로, codon 191에서는 isoleucine (ATT) → leucine (CTT)으로, codon 216에서는 asparagine (AAC) → serine (AGC)으로, codon 316에서는 valine (GTT) → isoleucine (ATT)으로 변화되었다. 아미노산의 변화없이 codon usage에서 차이를 보이는 부분은 codon 81 leucine (CTG → TTG), 91번 threonine (ACC → ACT), 101번 lysine (AAG → AAA), 202번 threonine (ACG → ACA), 213번 alanine (GCC → GCT), 225번 isoleucine (ATC → ATT), 230번 phenylalanine (TTC → TTT), 244번 glycine (GGA → GGT), 274번 alanine (GCC → GCA), 286번 alanine (GCG → GCC), 318번 valine (GTC → GTT), 332번 glutamic acid (GAG → GAA), 344번 phenylalanine (TTC → TTT)에서 나타났다. 3'-noncoding region의 염기서열의 경우에도 10 군데에서 다른 염기로 치환되어 있는 것이 관찰되었다. *Populus tremuloides*의 서열과 비교시 DNA 염기서열의 경우 98.2%, 아미노산 서열의 경우 98.9%의 유사성을 보이는 것으로 분석되었다. 양황철 cDNA에서 이런 염기서열의 변화는 기존에 발표된 OMT cDNA의 nucleotide

sequence와는 여러 부분에서 다른 것으로 나타났다.

양황철 genomic DNA를 분리하기 위하여 먼저 OMT cDNA를 사용하여 southern 분석을 실시하였다. OMT cDNA 유전자 내부 중간에 하나만 존재하는 *Bam*HI의 효소로 genomic DNA를 절단하였을 는 약 2.8 kb와 5.8 kb의 band들이 검출되었으며, *Eco*RI에 의해서는 OMT 유전자 내부에 존재하는 3개의 *Eco*RI site에 의해 2 개의 DNA 절편 (1.6 kb와 0.9 kb)이 확인되었다. 또한 OMT genomic DNA의 시작부위에 하나만 존재하는 *Hin*dIII의 경우에는 약 6 kb 크기의 band만이 검출되었다. 이런 pattern들은 hybrid poplar인 양황철의 경우 OMT genomic DNA는 single copy gene으로 염색체내에 존재하는 것을 의미한다고 볼 수 있다 **(Figure 5-15)**.

genomic library를 구축하기 위하여 양황철 genomic DNA 50 μg을 *Bam*HI 효소로 partial digestion 하여 0.6% agarose gel에서 확인한 후 **(Figure 5-16A,16B)**, 2 kb에서 6 kb에 이르는 band들을 gel로부터 elution 하여 분리 정제하였다. Gigapack III Gold Packaging Extract를 사용하여 genomic library를 구축한 겸과 titer은 사용한 원액 1 μℓ에 대하여 약 3,500 plaques을 얻었다. 따라서 genomic library의 average size는 1.75 x 10⁶으로 예상되었으며 상당히 좋은 효율로 library가 만들어졌다.

OMT probe를 사용하여 1차 screening 과정에서 320.000 plaques을 사용하여 hybridization 한 결과 11 개의 putative plaque들을 얻었으며 **(Figure 5-17)**, blue tip을 사용하여 film과 master plate를 대조하여 정확한 위치의 plaque들을 picking 하여 0.5 ml의 SM buffer에 넣고 phage들이 스며 나오도록 한 다음, 그 중 signal이 강한 4 plaque으로부터 single plaque을 분리하기 위하여 150 mm plate 당 300-500 plaques이 형성되도록 titer를 조절하여 숙주세포에 감염시켰다. 2차 screening 과정은 1차 screening 과정과 마찬가지 방법으로 행하였으며 **Figure 5-18**에 보는 것과 같이 각 plate로부터 OMT genomic DNA를 가지고 있다고 판단되는 single plaque들을 2 개씩 picking하였고, 이들 plaque들이 OMT genomic DNA를 가지는지 분석하기 위하여 XL1-Blue MRF (P2) 세포에 다시 감염시킨 후, lambda phage DNA를 분리하였다. 우선적으로 OMT genomic DNA 내부에 존재하는 *Eco*RI 제한효소에 의해 잘렸을 때 예상되는 DNA 절편, 즉 OMT 유전자의 169번째 아미노산을 coding하는 염기서열

에 존재하는 *Bam*HI site의 upstream 부분이 Lambda FIX II vector로 도입되었을 경우에 *Eco*RI에 의해 1.57 kb DNA 절편이 나오는 클론을 확인한 결과, **Figure 5-19**에서와 같이 4개의 클론(1-3-1, 2-4-1, 2-1-2, 2-4-2)에서 유사한 크기의 band pattern이 확인되었다. 또한 전체 클로닝된 insert DNA를 확인하기 위하여 (*Sal*I, *Xba*I, *Sac*I) 등의 제한효소로 digestion 결과 **Figure 5-20**에서 보는 바와 같이 다양한 형태의 insert DNA가 도입되어 진 것으로 확인되었다. 이들 클론 중 서로 다른 pattern을 보이는 1-3-1과 2-4-1 클론의 DNA 절편을 pBluescript로 subcloning 후 PCR에 의해 증폭된 클론과 같이 염기서열을 분석하였다. 중복검증을 위해서 cDNA를 amplification 할 때 primer를 사용하여 즉 OMT-F1과 OMT-R1을 이용하여 약 2.5 kb의 genomic DNA가 증폭 되도록 polymerase chain reaction을 수행하였다. **Figure 5-21**보는 바와 같이 약 2.5 kb 정도의 PCR product를 얻었다. 이렇게 얻은 DNA band는 elution하여 pGEM-T vector system을 이용하여 subcloning하였고 genomic DNA의 염기서열을 Sanger-dideoxy chain termination 방법에 염기서열을 결정하였다. 양황철 OMT-genomic DNA는 4 exon과 3 intron으로 구성되어 있으며 첫 번째 exon은 419 염기, 두 번째 exon은 311 염기, 세 번째 exon은 65 염기, 네 번째 exon은 617 염기로 각각 구성되어 있었다 **(Figure 5-22)**. Intron부위들은 GT 염기로 시작하여 AG 염기로 끝나며 첫 번째 intron은 1102 염기로 구성되어 가장 큰 intron인 것으로 나타났다. Plasmid pGEM-T에 cloning되어있는 2.7 kb 양황철 genomic DNA를 여러 제한효소들로 분석한 결과 2 internal *Eco*RI 부위와 *Sal*I, *Bam*HI, *Hpa*I, *Hgi*AI, *Dsa*I, *Bcl*I, *Rsa*I 등의 제한효소 부위는 각각 1 개씩 존재하였다.

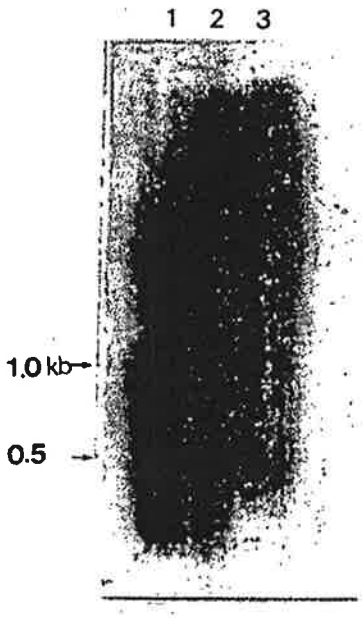


Figure 5-1. Alkaline agarose gel electrophoresis of first & second strand cDNA

lane 1: γ-^{32}P-labelled ϕx174 DNA
lane 2: 1st cDNA from popula poly(A$^+$)RNA
lane 3: 2nd cDNA

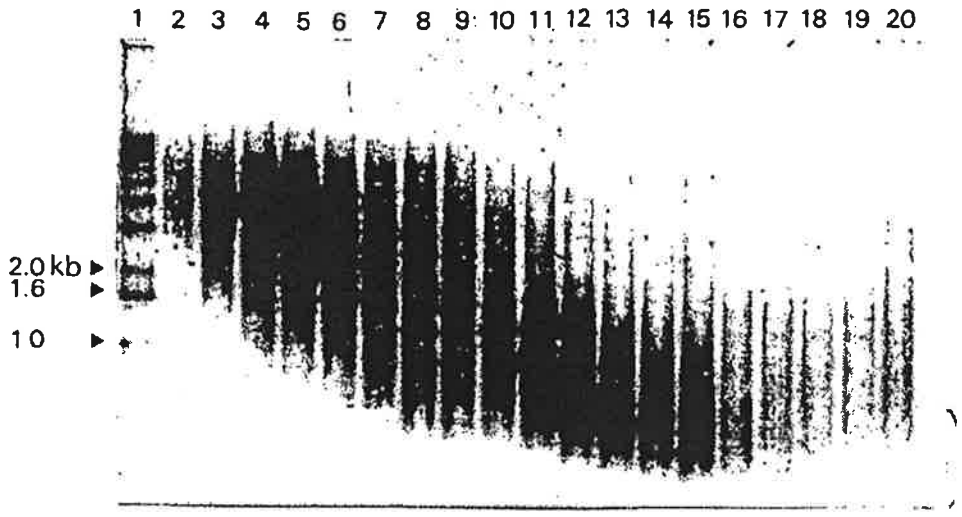


Figure 5-2. Electrophoretic analysis of size-fractionated cDNA

lane 1: γ-^{32}P-labelled 1kb ladder
lane 2 - 20: fractionated tube number

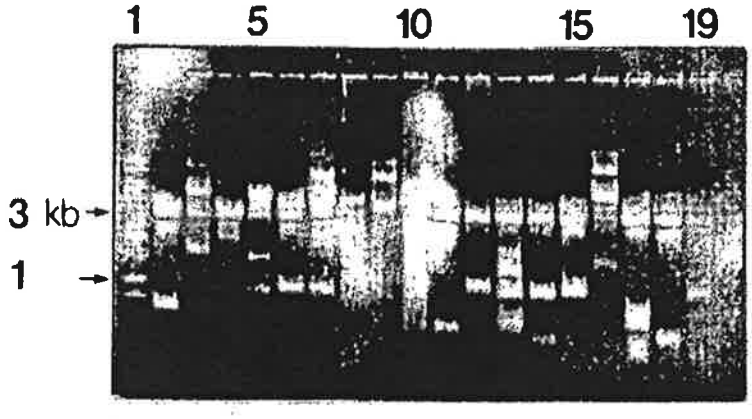


Figure 5-3. Size distribution of cDNA insert of recombinant λ-ZAP phage DNA
lane 1: 1 kb ladder, lane 2-19: phagemid/*Eco*RI & *Xho*I

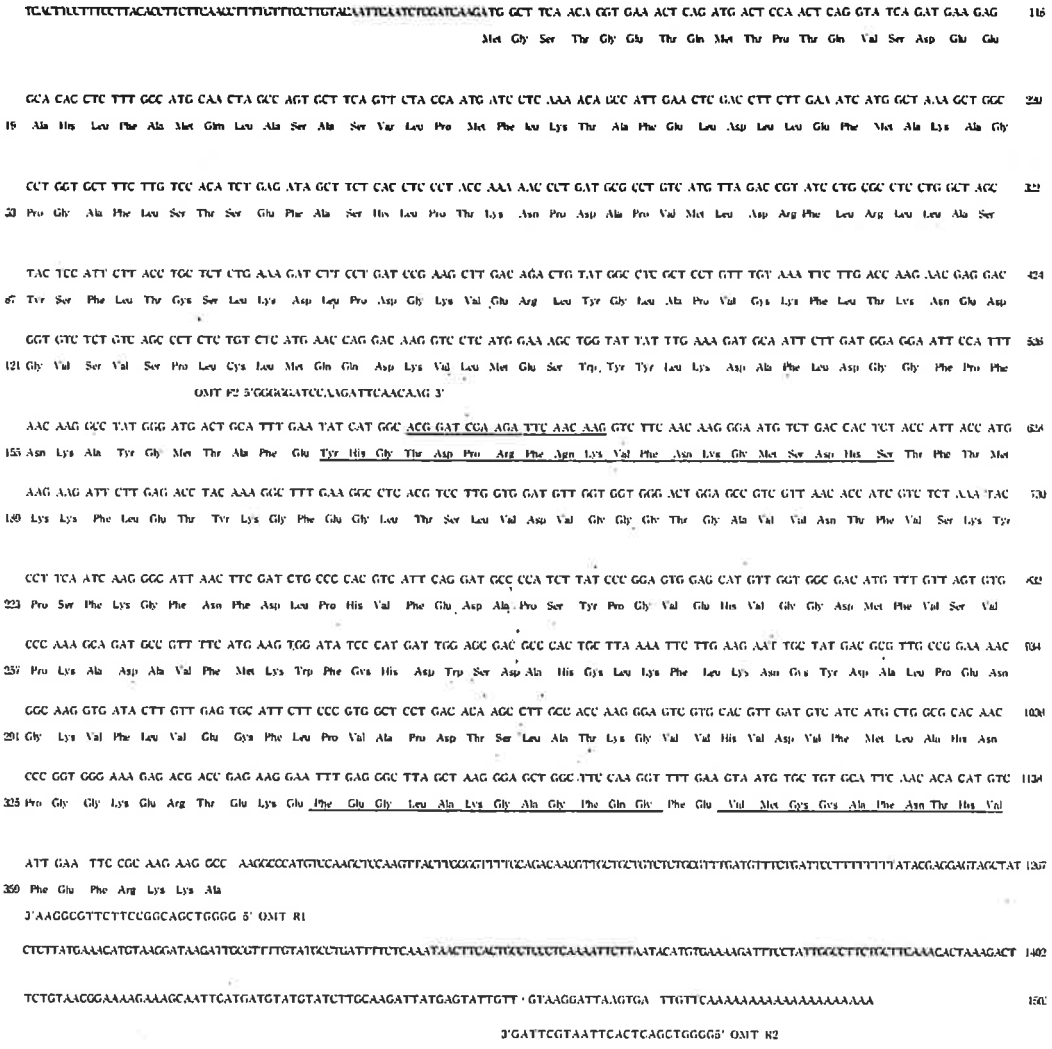


Figure 5-4A. Position of primer set referred with the sequence of Aspen (*Populus tremuloides*) for amplifying the probe DNA

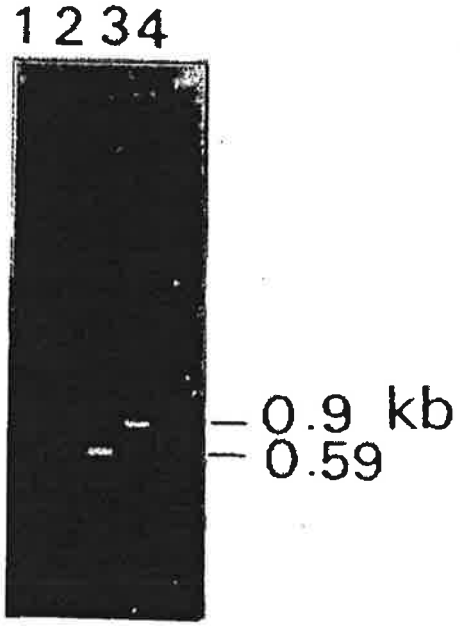


Figure 5-4B. Agarose gel pattern of the amplified DNA using polymerase chain reaction
lane 1: 1 kb ladder lane 2: negative control (no template)
lane 3: 0.59 kb DNA by OMT F2 & R1 primer
lane 4: 0.9 kb DNA by OMT F2 & R2 primer

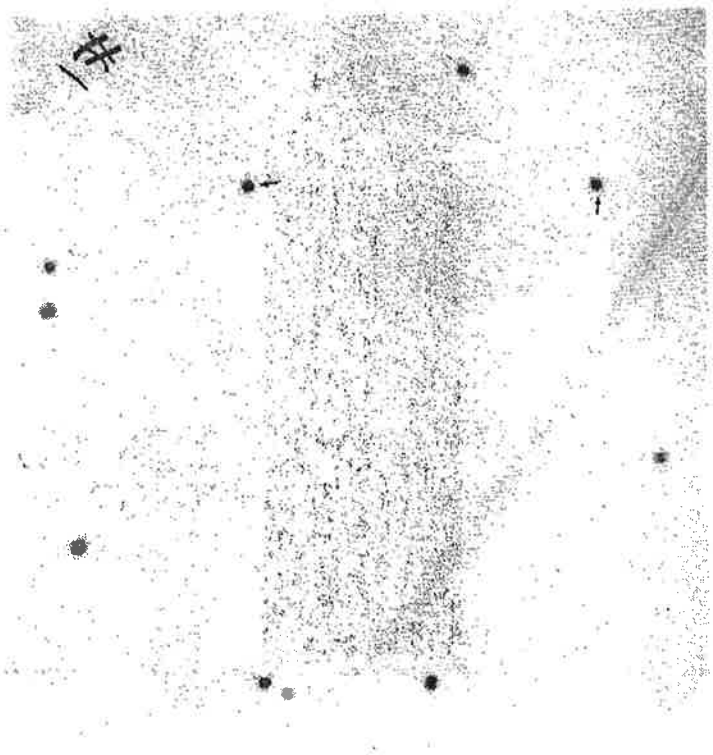


Figure 5-5. Autoradiography of primary screening for OMT cDNA. The arrow indicates the putative OMT cDNA

Figure 5-6. Autoradiography of secondary screening for OMT cDNA
The arrow indicates the putative OMT cDNA

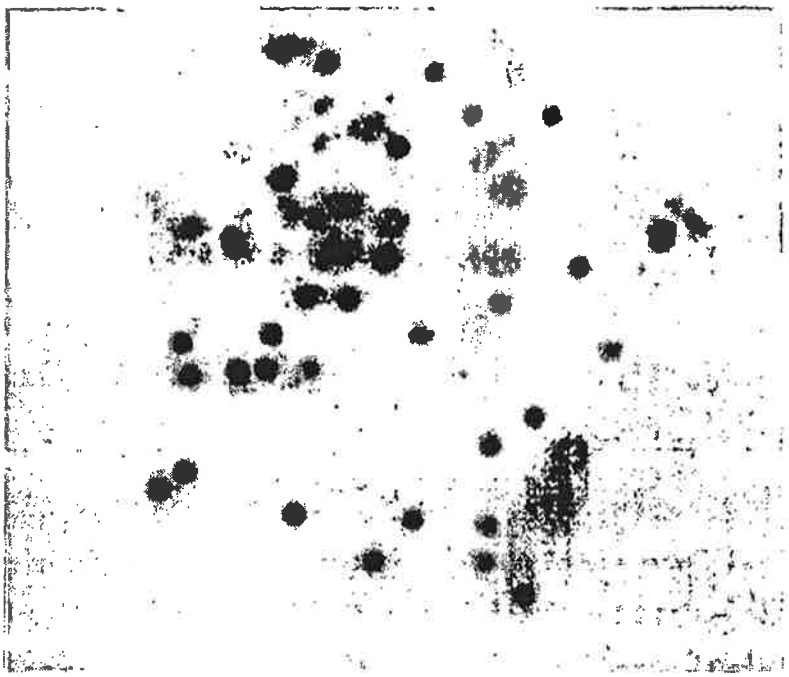


Figure 5-7. Autoradiography of tertiary screening for OMT cDNA
All plaques were hybridized with OMT cDNA probe

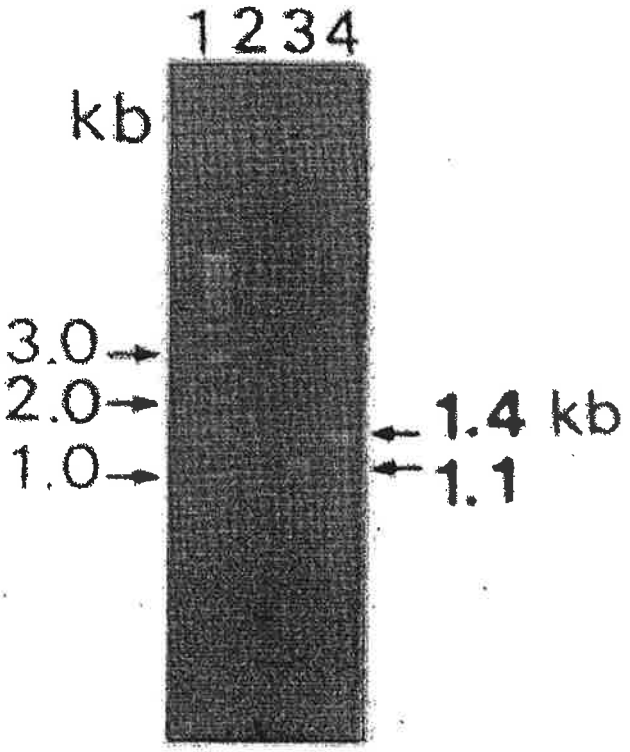


Figure 5-8. Agarose gel pattern of the amplified *P. nigra x maximowiczii* cDNA using polymerase chain reaction
lane 1: 1 kb ladder
lane 2: negative control (no template)
lane 3: 1.1 kb of the amplified cDNA (OMT F1 & R1 primer)
lane 4: 1.4 kb of the amplified cDNA (OMT F1 & R2 primer)

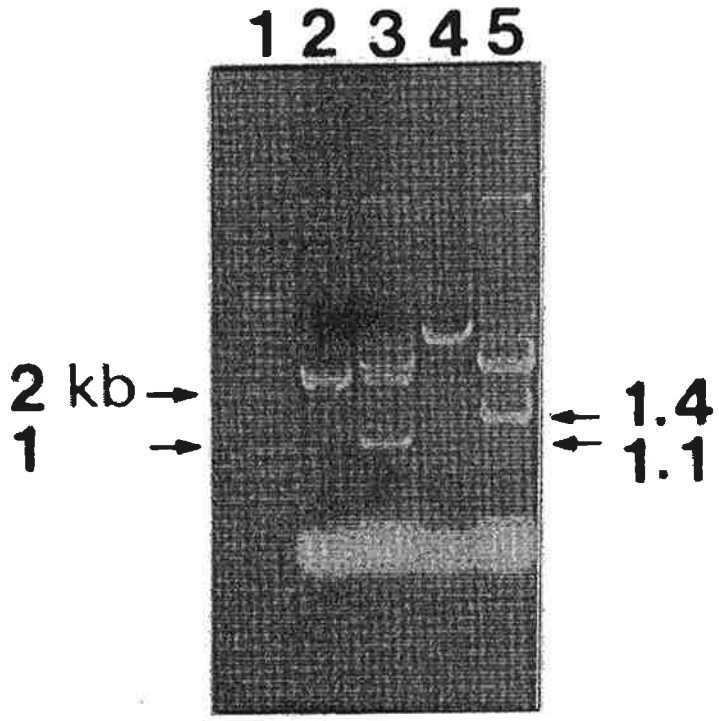


Figure 5-9. Restriction pattern of pGEM-T vector containing the PCR amplified OMT cDNA, A'10-6 and B'1
lane 1: 1 Kb ladder lane 2: A'10-6 intact
lane 3: A'10-6/*SalI* lane 4: B'1 intact
lane 5: B'1/*SalI*

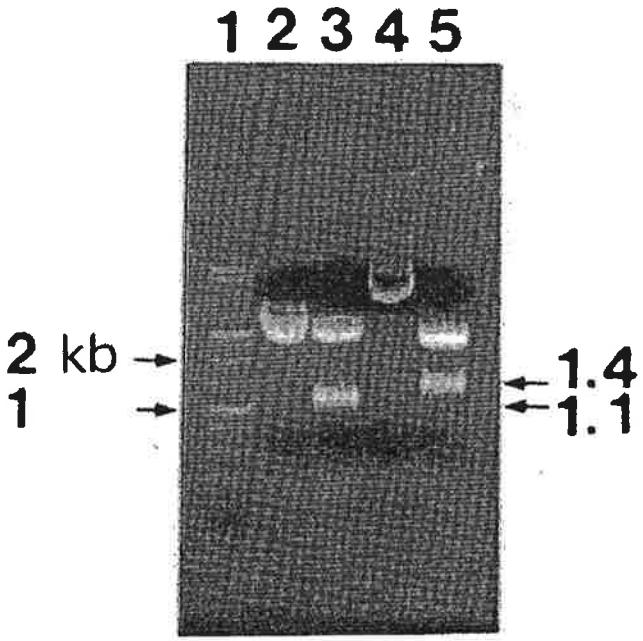


Figure 5-10. Restriction pattern of pBluescript-KS vector containing the amplified OMT cDNA, pOMTA1.1 and pOMTB1.4.
lane 1: 1 kb ladder lane 2: pOMTA1.1 intact
lane 3: pOMTA1.1/*Sal*I lane 4: pOMTB1.4 intact
lane 5: pOMTB1.4/*Sal*I

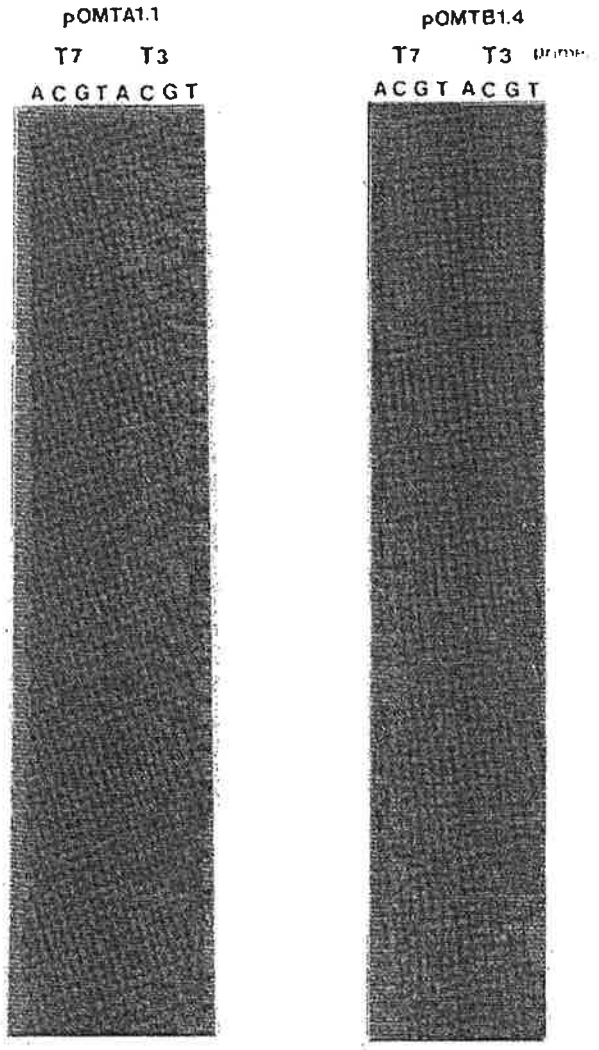


Figure 5-11. Nucleotide sequence of full-length *P. nigra x maximowiczii* OMT cDNA. Sequencing of the OMT cDNA was performed by the dideoxy chain termination method on double-stranded template and the reaction mixtures were applied to a 6% polyacrylamide gel containing 8 M urea

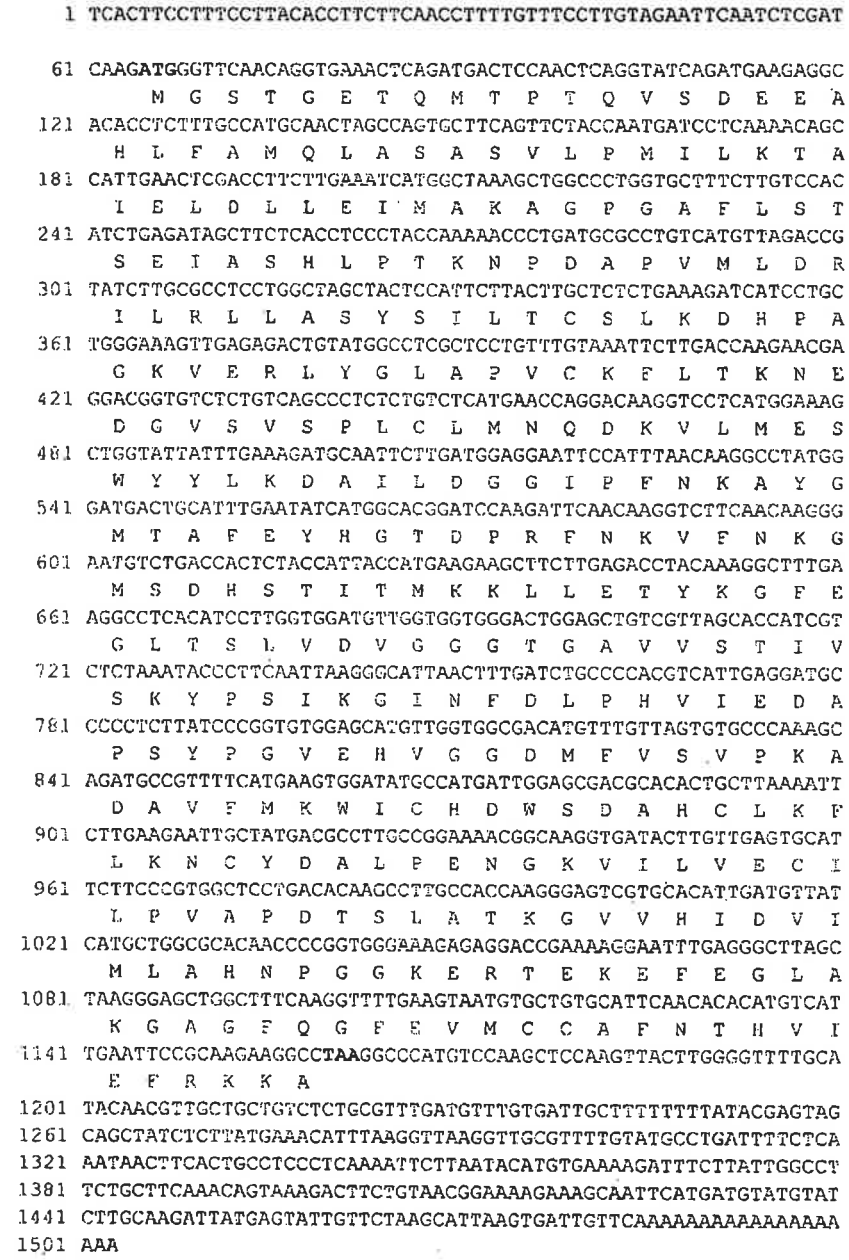
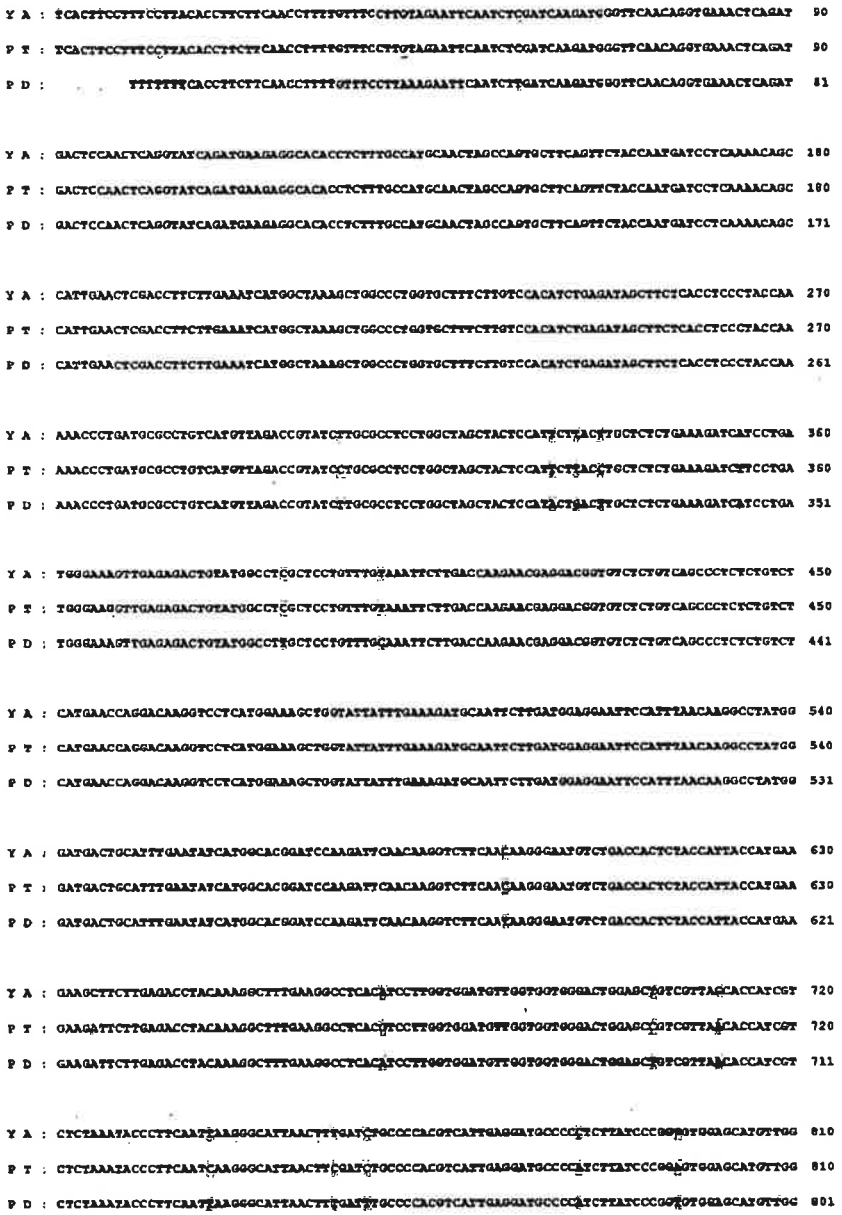


Figure 5-12. Nucleotide and deduced amino acid sequence of full-length *P. nigra x maximowiczii* OMT cDNA



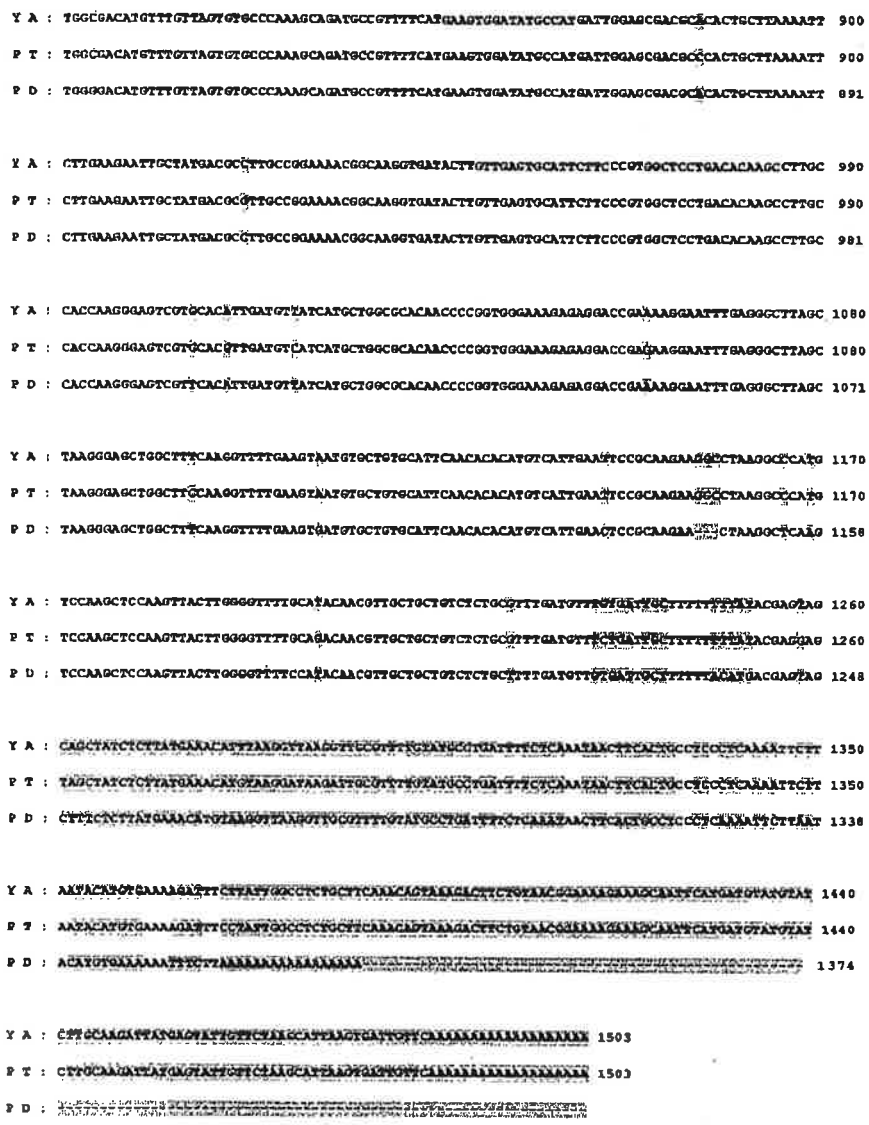


Figure 5-13. Comparison of the nucleotide sequence of *P. nigra x maximowiczii* OMT cDNA to *Populus tremuloides* and *Populus deltoides* x *trichocarpa*
YA : YangHwangchul (*Populus nigra* x *maximowiczii*)
PT : *Populus tremuloides*
PD : *Populus deltoides* x *trichocarpa*

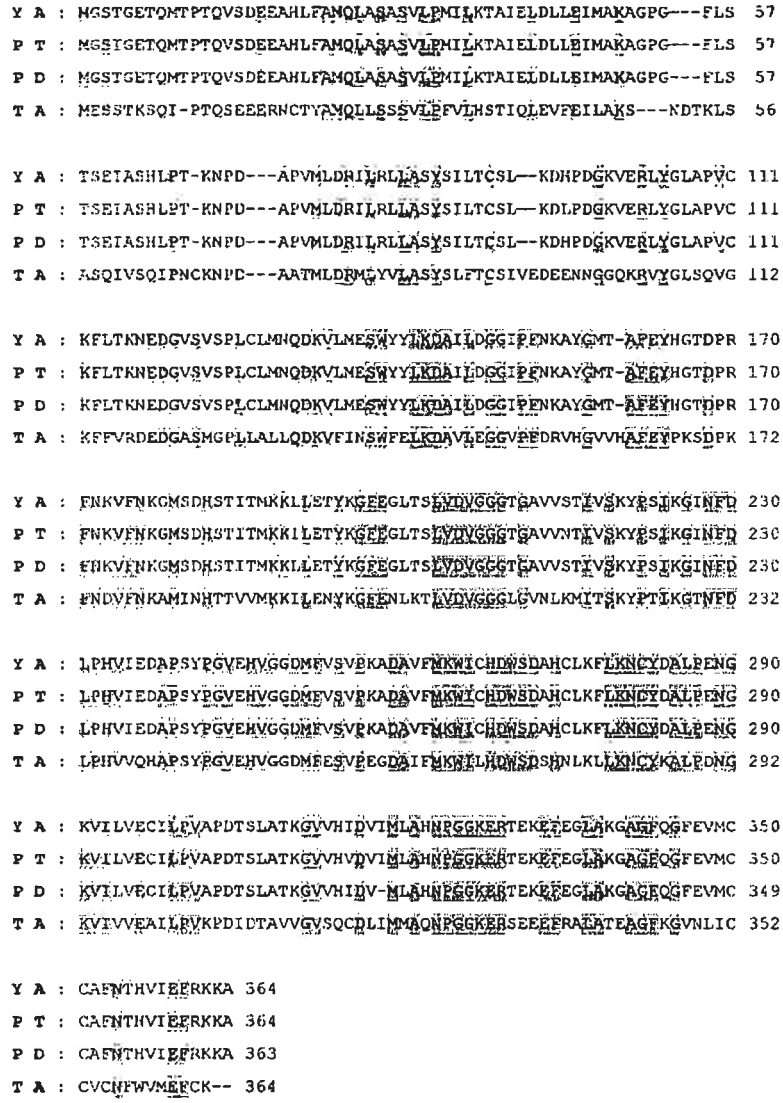


Figure 5-14. Comparison of the amino acid sequence of *P. nigra x maximowiczii* OMT cDNA to *Populus tremuloides* and *Populus deltoides* x *trichocarpa*
YA : YangHwangchul (*Populus nigra* x *maximowiczii*)
PT : *Populus tremuloides*
PD : *Populus deltoides* x *trichocarpa*
TA : *Nicotiana tabacum*

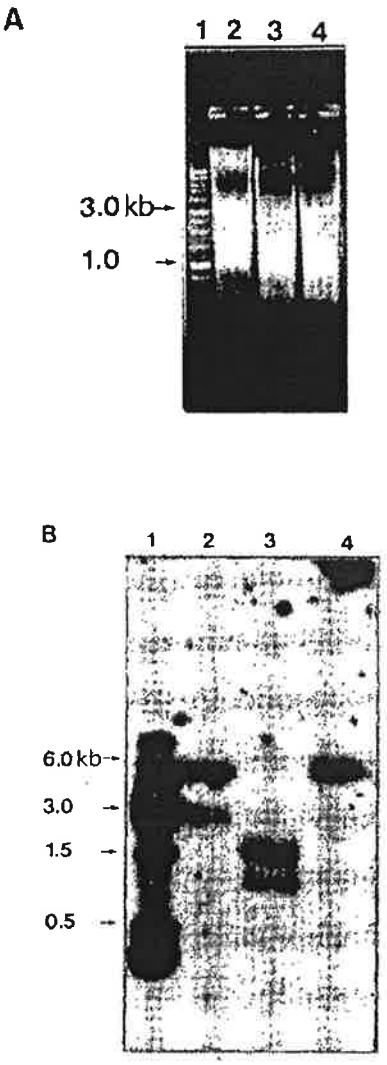


Figure 5-15. Southern blot analysis of *P. nigra x maximowiczii* genomic DNA digested with *Bam*HI, *Eco*RI, and *Hin*dIII, rsepectively
Panel A: Agarose gel pattern Panel B: Autoradiography film
lane 1: 1 kb ladder lane 2: genomic DNA/*Bam*HI
lane 3: genomic DNA/*Eco*RI lane 4: genomic DNA/*Hin*dIII

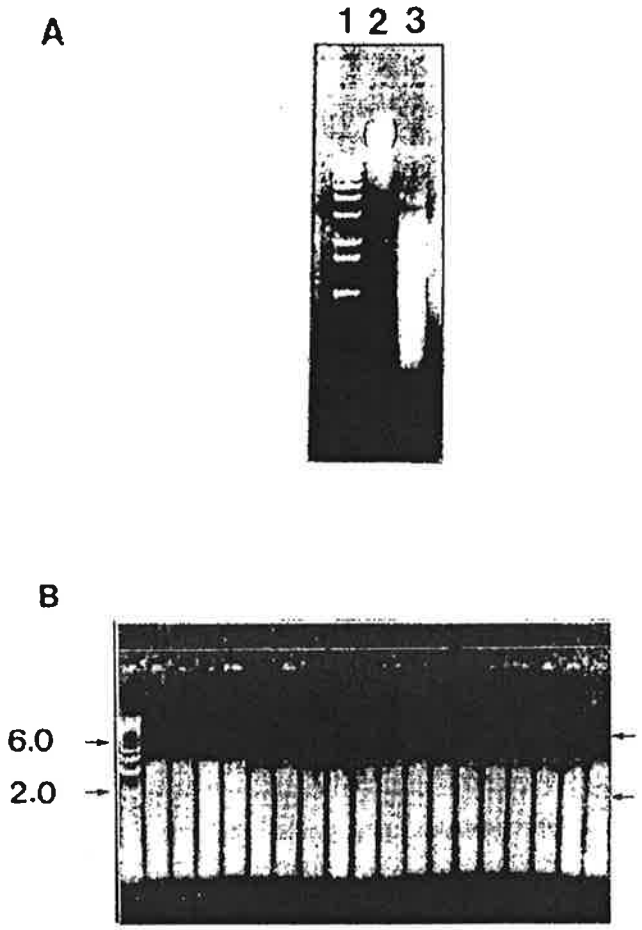


Figure 5-16. Agarose gel electrophoresis of genomic DNA from *P. nigra x maximowiczii* (Panel A) and Size fractionation of Yanghwangchul genomic DNA after partially digesting with *Bam*HI (Panel B)
lane 1: 1 kb ladder DNA
lane 2: Intact genomic DNA
lane 3: Genomic DNA partially digested with *Bam*HI

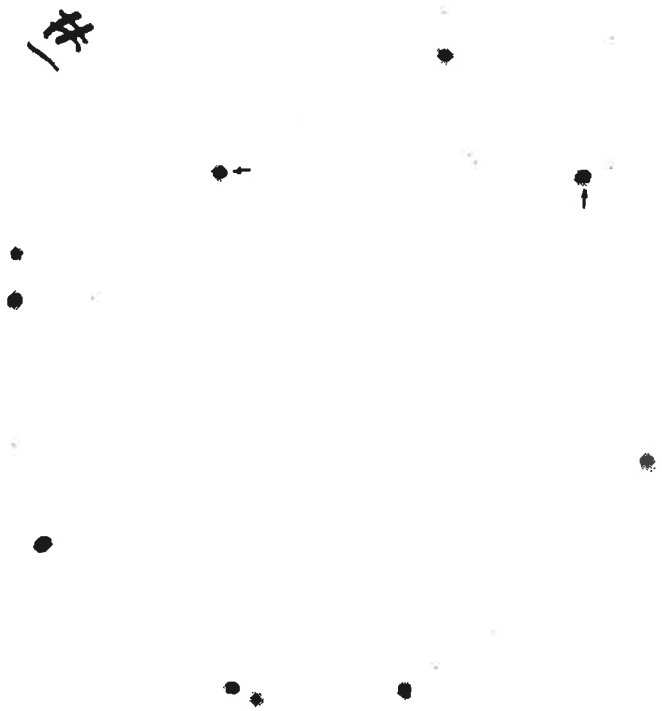


Figure 5-17. Autoradiography of primary screening for OMT genomic DNA.
The arrows indicate the putative plaques harboring OMT genomic DNA

Figure 5-18. Autoradiography of secondary screening for OMT genomic DNA.
The arrows indicate the putative plaques harboring OMT genomic DNA

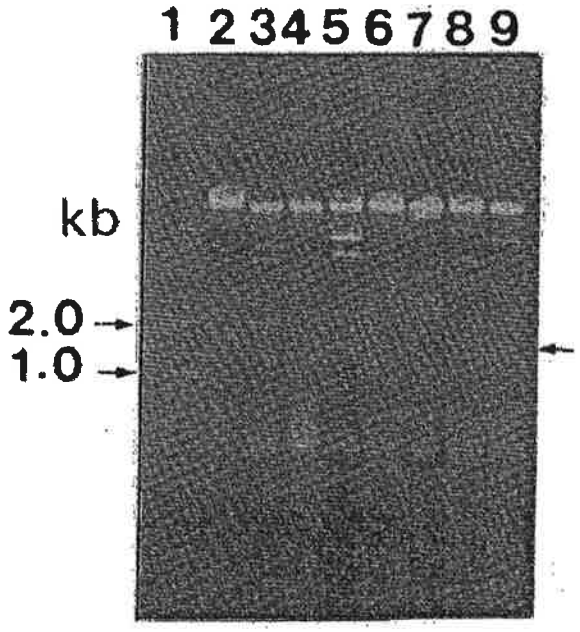


Figure 5-19. Restriction enzyme pattern of the putative clones digested with *Eco*RI
lane 1: 1 kb ladder, lane 2: 1-3-1/*Eco*RI, lane 3: 1-4-1/*Eco*RI
lane 4: 2-1-1/*Eco*RI, lane 5: 2-4-1/*Eco*RI, lane 6: 1-3-2/*Eco*RI
lane 7: 1-4-2/*Eco*RI, lane 8: 2-1-2/*Eco*RI, lane 9: 2-4-2/*Eco*RI

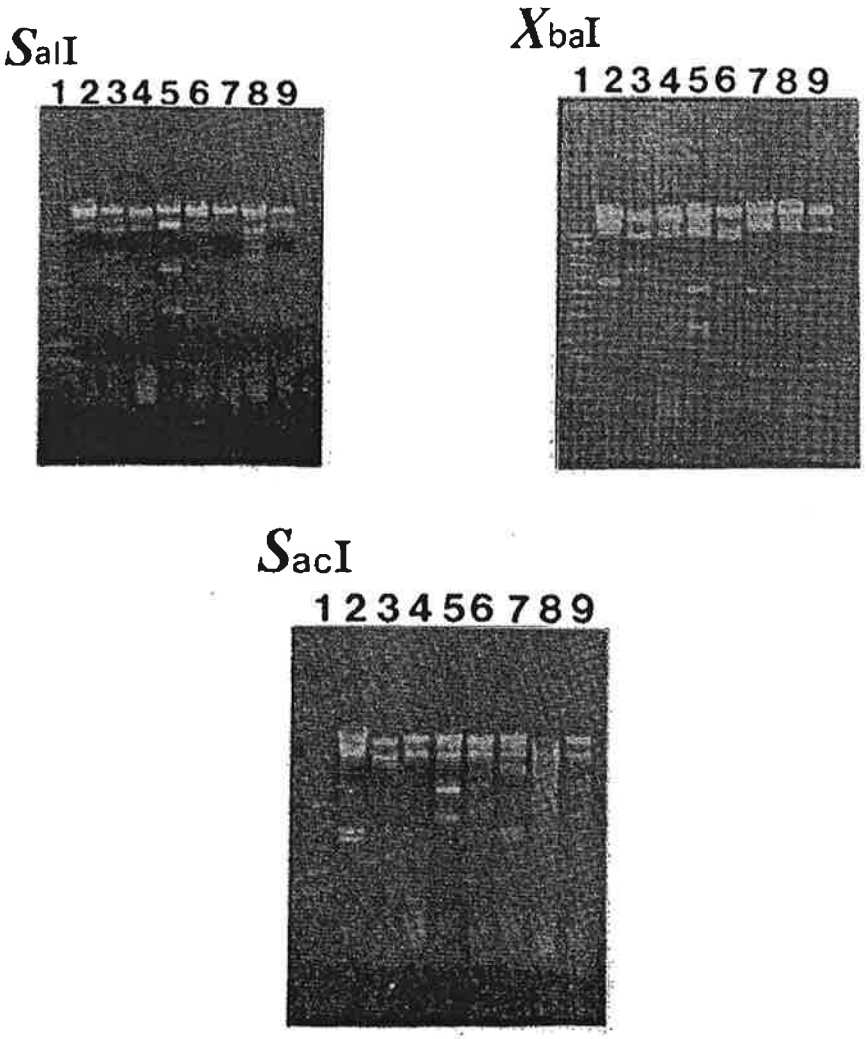


Figure 5-20. Restriction enzyme pattern of the putative clones digested with *SalI*, *XbaI*, and *SacI*, respectively
lane 1: 1 kb ladder, lane 2: 1-3-1/RE, lane 3: 1-4-1/RE
lane 4: 2-1-1/RE, lane 5: 2-4-1/RE, lane 6: 1-3-2/RE
lane 7: 1-4-2/RE, lane 8: 2-1-2/RE, lane 9: 2-4-2/RE
RE means each restriction enzyme

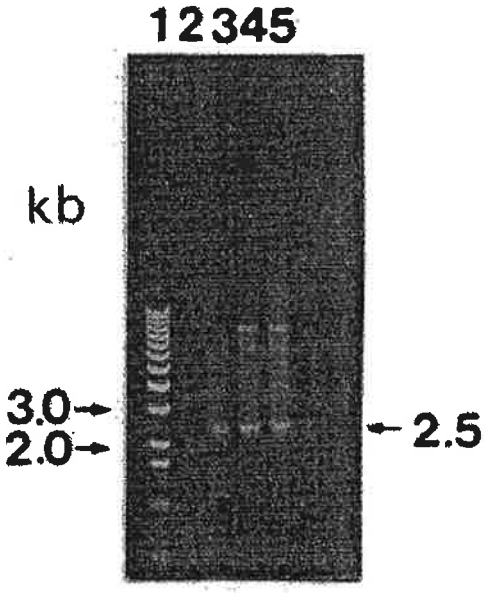


Figure 5-21. Agarose gel electrophoresis of PCR products for *P. nigra x maximowiczii* genomic DNA using OMT-F1 and OMT-R1 primer set

lane 1; 1kb ladder, lane 2; negative control (no template)
lane 3; 100 ng of genomic DNA, lane 4; 200 ng of genomic DNA
lane 5; 400 ng of genomic DNA
The arrow indicate the position of the amplified OMT genomic DNA

Figure 5-22. Nucleotide sequence of *P. nigra x maximowiczii* OMT genomic DNA amplified by PCR using OMT-F1 & OMT-R1 primer set.

Bold characters indicate exon region of genomic DNA

제 4 절 참고문헌

Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1515

Bugos, R. C., Chiang, V. L., and Campbell, W. H. 1991. cDNA cloning, sequence analysis and seasonal expression of lignin-bispecific caffeic acid/5-hydroxyferulic acid O-methyltransferase of aspen. *Plant Mol. Biol.* **17**, 1203-1215.

Draper, J., Scott, R., Armitage, P., and Walden, R. 1988. Plant genetic transformation and gene expression. Oxford, The Alden Press

Gowri, G., Bogos, R. C., Campbell, W. H., Maxwell, C. A., and Dixon, R. 1991. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.).X. Molecular cloning and expression of S-adenosyl-L-methionine: caffeic acid 3-O-methyl-transferase, a key enzyme of lignin biosynthesis. *Plant Physiol.* **97**, 7-14.

Grunstein, M. and Hogness, D.S. 1975. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **72**, 3961-3965

Jaeck, E., Dumas, B., Geoffroy, P., Favet, N., Inze, D., Van Montagu, M., Fritig, B., and Legrand, M. 1992. Regulation of enzymes involved in lignin biosynthesis: induction of O-methyltransferase mRNAs during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 294-300

Murray, M.G and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl. Acids Res. 8, 4321-4325

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 1989. In Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press

주 의

1. **이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.**

2. **이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.**

3. **국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.**

자체평가의견서

사업 구분	□ 현장애로기술 x 첨단기술				
연구개발분야	임 업				
연구과제명	Lignin 생합성 유전자의 cloning을 통한 저 lignin 함량 펄프재의 육성				
주관연구기관	경 북 대 학 교				
연구담당자	총괄책임자	박 용 구			
	협동·위탁·세부 연구책임자	기관(부서)	대구 효성카톨릭 대학	성 명	신 동 일
		〃	대구 효성카톨릭 대학	〃	박 희 성
		〃	대구 대학교	〃	최 장 원
		〃		〃	
연구 기간	총 기 간	1996 - 2000		당해년도기간	5 년차
연구비(천원)	총 규 모	350,000 천원		당해년도규모	60,000 천원

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

□ 당초계획 이상으로 진행 x 계획대로 진행 □ 계획대로 진행되지 못함

계획대로 수행되지 않은 원인은? (해상사항 없음)

현재 형질전환개체의 성장이 예상외로 느림으로 인해 전체적인 연구진척이 조금 지연되고 있음.

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

□ 예상외 성과얻음 x 어느 정도 얻음 □ 얻지 못함

3. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

x 공헌했음 □ 현재로서 불투명함 □ 그렇지 않음

4. 경제적인 측면에서 농림어가의 소득증대에 공헌했다고 보는가?
□ 공헌했음 x 현재로서 불투명함 □ 그렇지 않음

5. 얻어진 성과와 발표상황

5-1 경제적 효과
□ 기술료 등 수익 수 익 :
□ 기업등에의 기술이전 기업명 :
□ 기술지도 등 기업명 :

5-2 산업•지적재산권 등
□ 국내출원/등록 출원 건, 등록 건
□ 해외출원/등록 출원 건, 등록 건

5-3 논문게재•발표 등
x 국내학술지 게재 1 건
x 해외학술지 게재 1 건
x 국내학•협회 발표 1 건
x 국내세미나 발표 1 건
x 기 타 (외국인과학자초빙) 1 건

5-4 인력양성효과
x 석 사 4 명
x 박 사 1 명
□ 기 타 명

5-5 수상 등
□ 있 다 상 명칭 및 일시 :
x 없 다

5-6 매스콤등의 PR
□ 있 다 건
x 없 다

6. 연구개발착수이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?
x 없다 □ 약간 감소되었다 □ 크게 감소되었다

감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시요?

7. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

x 없다 □ 약간 조정필요 □ 전반적인 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은? (해당사항 없음)

연구개발에 있어서 양황철 포플러 CMT 유전자의 분리와 성격규명에는 별다른 문제는 없었으나 antisense CMT 유전자를 가진 형질전환체의 생성, 선발 및 성장기간이 다소 연장되고 있어 기간 조정이 필요하다고 판단된다. 이는 초본과는 달리 임목 자체가 가진 문제점으로서 성장이 상당히 느린 것을 감안해 볼 때 향후 2 - 3 년의 기간이 더 필요하다고 사료된다. 지속적인 연구비 지원이 추정되는 기간에 지원되었으면 하는 바람이다.

(아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)

1. 연구개발 목표의 달성도는?
□ 만족 □ 보통 □ 미흡
(근거 :)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?
□ 충분 □ 보통 □ 불충분

나. 연구성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?
□ 충분 □ 보통 □ 불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?
가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?
□ 충분 □ 보통 □ 불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?
□ 충분 □ 고려중 □ 중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?
□ 확대 □ 동일 □ 축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?
□ 즉시 기업화 가능 □ 수년내 기업화 가능 □ 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

작 성 자

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
총 괄 연구책임자	경 북 대 학 교	교 수	박 용 구 (인)
참여 기업대표			(인)

연구개발보고서
초록

<table>
<tr><td rowspan="2">과제명</td><td colspan="4">(국문) Lignin 생합성 유전자의 cloning을 통한 저 lignin 함량 펄프재의 육성</td></tr>
<tr><td colspan="4">(영문) Development of pulp wood with low lignin content by cloning of OMT gene</td></tr>
<tr><td>주관
연구기관</td><td colspan="2">경 북 대 학 교</td><td>총 괄 연 구
책 임 자</td><td>(부서) 경 북 대 학 교
(성명) 박 용 구</td></tr>
<tr><td>참여기업</td><td colspan="2"></td></tr>
<tr><td rowspan="4">총 연 구
개 발 비</td><td>정부출연금</td><td>350,000 천원</td><td>총 연 구 기 간
연 구 년 차</td><td>1996 - 2000 년
5 년차</td></tr>
<tr><td>기업부담금</td><td></td><td rowspan="2">총 참 여
연 구 원 수
(명)</td><td rowspan="2">(내부 4 명)
총 9 명
(외부 5 명)</td></tr>
<tr><td>계</td><td>350,000 천 원</td></tr>
</table>

□ 연구개발 목표 및 내용

⑴ Lignin 함량이 낮은 식물체 개발과 Pulp 제조시 효율적 lingnin 제거
⑵ Cellulose 섬유 회수율 증가와 Pulp 및 제지산업의 경쟁력 제고
⑶ Pulp 산업에 의한 환경오염 감소

□ 연구결과

1 년차
- ○ 무균식물의 대량증식과 재분화 체계의 확립
- ○ 수종별 lignin 함량 분석과 조직별 OMT 분석
- ○ cDNA library 제조 및 PCR cloning

2 년차
- ○ 계절별 lignin 합성변화 분석 및 형질전환 방법의 확립
- ○ 형질전환체의 분석방법 확립 (PCR 과 GUS 분석)
- ○ genomoc library의 구축

3 년차
- ○ genomic library에서 OMT clone의 선발과 유전자 지도 작성
- ○ subcloning과 염기배열 결정
- ○ antisense vector의 조제와 Agrobacterium의 binary vector의조제
- ○ OMT cDNA 염기서열 결정과 분석

4 년차
- ○ OMT 유전자의 promoter 영역의 분리와 성격규명
- ○ OMT cDNA 유전자의 분리와 성격규명, sense와 antisense vector의 조제
- ○ Agrobacteria 내로의 vector 도입
- ○ 포플러 형질전환 개시

5 년차
- ○ OMT 유전자의 promoter 영역의 분리와 성격규명 완성
- ○ 형질전환체의 선발 및 증식 (기내와 온실)
- ○ 형질전환체의 분석 (DNA 수준, lignin 분석, 형태분석)

□ 연구성과 활용계획(실적)

⑴ Pulp업계의 경쟁력 강화
- ○ 저 lignin 함량 포플러 개발로 탈 ligning 효율을 증가시킴으로서 국내의 pulp재 생산과 pulp 업계의 생산성 향상시킬것으로 사료됨

⑵ 환경오염감소
- ○ 탈 lignin에 필요한 화학물질의 사용을 줄임으로서 탈 lignin 효율을 증가시킴으로써 lignin 폐기물 생성의 감소 효과와 경제적인 이점이 있다고 판단됨

⑶ 국내자원확보
- ○ 저 lignin 함량 임목은 현재 국내외에 등록되어 있지 않는 새로운 식물로서 자원의 확보로 인한 수익과 외국에 특허를 등록을 취득예정에 있음