

식물종양유도 플라스미드의 분리 및 동정

陰眞星 · 金桂鉉 · 沈雄燮

고려대학교 이과대학 생물학과

Isolation and Identification of Tumor-inducing (Ti) Plasmids

Eum Jin-Seong, Kye-Hyun Kim and Woong-Seop Sim

Department of Biology, Korea University

Tumor-inducing (Ti) plasmid which may be used in genetic engineering of higher plants, was isolated from *Agrobacterium tumefaciens* in Korea. Among the 7 strains of *A. tumefaciens* isolated from various regions in Korea, KU12, KU13, KU14, and KU49 strains were confirmed to contain plasmid. The isolated Ti plasmids were digested with 4 kinds of restriction enzymes, respectively. According to the result of the cleavage patterns, we confirmed that these plasmids in the KU12, KU13, KU14 and KU49 strains are different.

*Agrobacterium tumefaciens*는 숙주 식물체에 crown gall을 일으키며 이러한 특성은 tumor-inducing (Ti) plasmids에 기인한다 (Van Larebeke et al., 1974; Watson et al., 1975; Chilton et al., 1976; Sciaky et al., 1978). 이 Ti plasmid는 분자량이 매우 커서 약 $98 \times 10^6 \sim 158 \times 10^6$ dalton에 달한다 (Bomhoff et al., 1976; Sciaky et al., 1978). 또한 tumor를 형성한 식물세포내에는 Ti-plasmid의 작은 부분이 존재하는 것으로 알려지고 있으며 이를 T-DNA라고 한다 (Chilton et al., 1978 a, b, 1980; Thomashow et al., 1980; Yang et al., 1980). 이 T-DNA 분자량은 약 15×10^6 dalton에 달하며 (Depicker et al., 1978; Hardy, K., 1981), 어떤 tumor내에서는 2 배체의 식물세포내에서 20 copy 정도를 가지고 있다고 알려져 있다 (Chilton et al., 1977; Yang et al., 1980; Merlo et al., 1980). T-DNA를 함유하고 있는 tumor세포는 정상 식물세포에서는 분리되지 않는

opines라는 물질을 분비하며 (Montoya et al., 1977), 이 T-DNA는 식물세포로 안정하게 전달되어 식물세포 DNA에 결합된다고 보고되었다 (Chilton et al., 1977; Thomashow et al., 1980).

본 연구에서는 고등식물의 유전공학에 이용할 수 있는 효율적인 Vector system을 개발하기 위하여 한국의 여러 지역에서 분리 동정된 *A. tumefaciens*로부터 Ti plasmid를 분리하여, 이들 Ti plasmid를 4 종류의 제한효소로 각각 처리한 후 전기영동법을 사용하여 Ti plasmid의 동질성 여부를 가렸다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용된 균주는 Cha 등 (1983)이 분리한 15 균주를 실험재료로 사용하였다. 또한 본 실험에 사용한 제한효소는 Eco RI (Bethesda Research Laboratories Inc.), Hind III (Bethesda

Research Laboratories), Pst I (Bethesda Research Laboratories) 및 Sma I (Bethesda Research Laboratories) 이다.

Ti plasmid의 분리 및 전기영동

plasmid 분리; *A. tumefaciens*로부터 Ti plasmid의 분리는 주로 Casse 등(1979)과 Currier와 Nester(1976)의 방법을 사용하였다 (Cha et al., 1983).

제한효소 처리; CsCl-EtBr 밀도구배 원심분리에 의해서 분리된 ccc-plasmid DNA를 다음과 같은 조건 하에서 제한효소와 반응시켰다. 3~5 µg의 ccc-plasmid DNA를 Eco RI 20 unit (1M tris buffer, pH 7.5, 50 mM MgCl₂, 500 mM NaCl, 20 mM 2-mercaptoethanol), Hind III 20 unit (500 mM tris buffer, pH 8.0, 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl) 및 Pst I 20 unit (500 mM tris buffer, pH 8.0, 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl)로 각각 37°C에서 1시간 30분동안 처리하였고, Sma I 20 unit (150 mM tris buffer, pH 8.0, 60 mM MgCl₂, 150 mM KCl)로 처리한 경우는 30°C에서 1시간 30분동안 반응시켰다.

전기영동; 효소 처리된 DNA 표품을 TBE buffer (89 mM tris, 2.5 mM EDTA, 89 mM boric acid)에 녹인 0.7% agarose gel에서 전기영동하였다 (Meyers et al., 1976). 이 때 gel의 두께는 2 mm이고 표품당 dye용액 (0.2% bromophenol blue, 7% SDS, 50% glycerol)은

5:1의 비율로 첨가하였다. 본 실험에서 전기영동은 vertical slab gel을 사용하였으며 gel의 크기는 13×13×2 (mm)이다. 전기영동시 전압은 처음 10분간 100 V, 그 후로는 50 V로 낮추어 5시간 30분간 전개했다. 전개가 끝난 gel은 ethidium bromide 용액 (0.125 µg/ml 증류수) 400 ml에서 20분간 염색시켰다. 염색 후 증류수로 3번 세척하여 gel을 UV-transilluminator (TM 36, polaroid) 위에 올려 놓고, Type 665 (negative), 667 (positive) film을 사용하여 사진을 찍었다.

결 과

plasmid의 분리

A. tumefaciens 15 균주 중 4 균주로부터 CsCl 밀도구배 원심분리에 의해서 plasmid를 분리하였으며, 그 결과는 Fig. 1, 2, 3 및 4와 같다.

제한효소 처리 및 전개형태

KU 12, KU 13, KU 14, KU 49 균주로부터 분리된 Ti plasmid를 각각 pTi 12, pTi 13, pTi 14, pTi 49라고 명명하였으며 이를 4 종류의 제한효소 (Eco RI, Hind III, Pst I, Sma I)로 각각 처리해서 전기영동 후 얻은 전개형태는 그림 5, 6, 7, 8에 나타나 있으며 이들이 함유한 절편들 (fragments)의 수는 Table 1에 표시하였다.

고 찰

본 실험에서는 Casse 등(1979)의 방법을 사용하여 15균주의 *Agrobacterium tumefaciens*

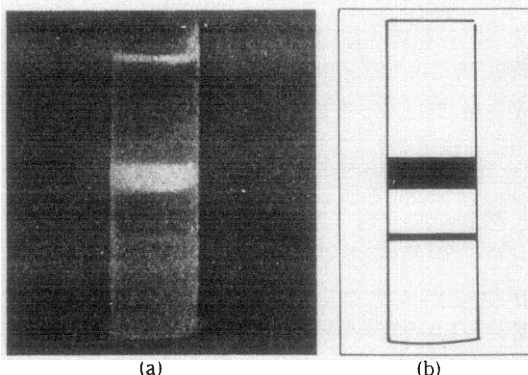


Fig. 1. Two bands isolated from KU12 after CsCl density gradient centrifugation.

(a) Photo. (b) Its diagram.

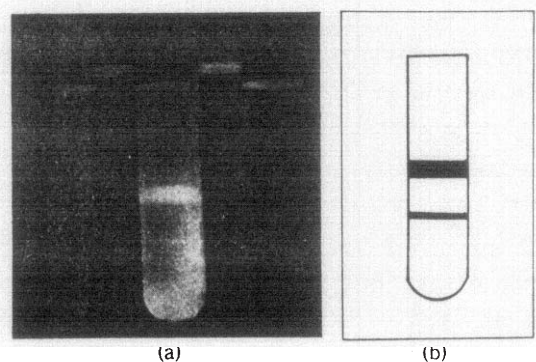


Fig. 2. Two bands isolated from KU13 after CsCl density gradient centrifugation.

(a) Photo. (b) Its diagram.

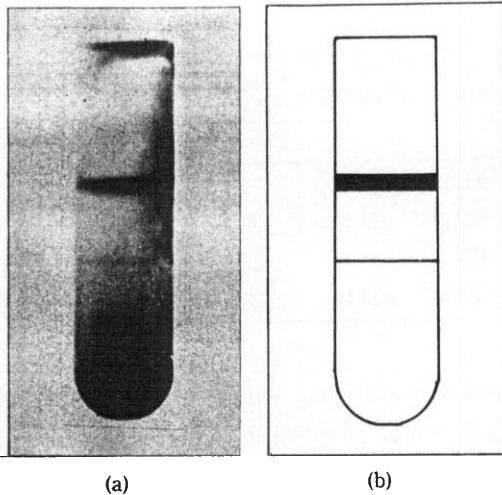


Fig. 3. Two bands isolated from KU14 after CsCl density gradient centrifugation.
(a) Photo. (b) Its diagram.

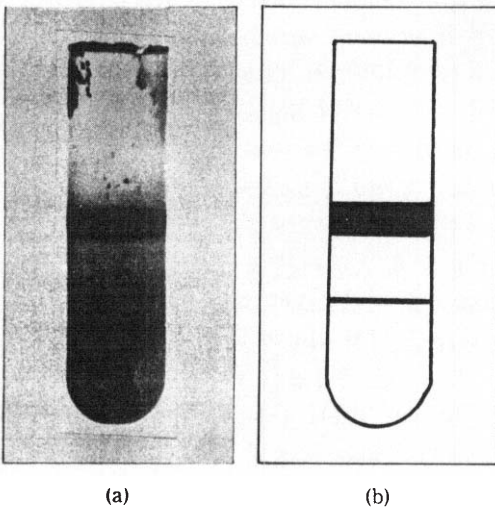


Fig. 4. Two bands isolated from KU49 after CsCl density gradient centrifugation.
(a) Photo. (b) Its diagram.

중 4 균주로부터 Ti plasmid를 분리하였다. *A. tumefaciens*로부터 분자량이 큰 Ti plasmid를 분리하기 위해서 본 실험에서는 Godson과 Vapnek (1973), Currier와 Nester (1976), Hansen과 Olsen (1978) 및 Casse 등 (1979)의 방법을 사용하였는데, 다량의 plasmid를 효과적으로 분리하기 위해서는 주의할 점이 많았다. Godson과 Vapnek (1973)의 방법에 따라서 lysozyme을 사용하여 세포 lysis를 한 후, CsCl-

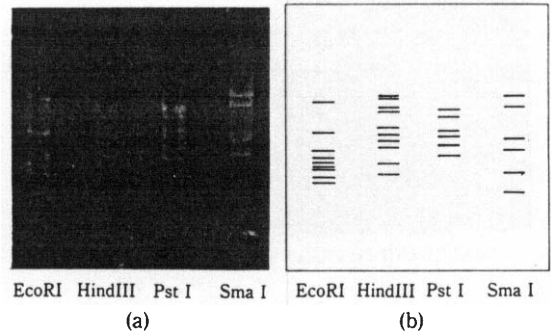


Fig. 5. Cleavage patterns of $pTi-12$ by 4 kinds of restriction enzymes.
(a) Photo (b) Its diagram.

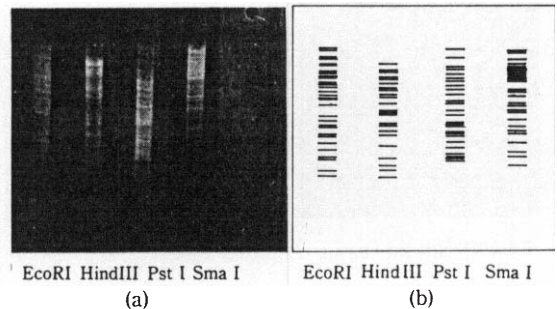


Fig. 6. Cleavage patterns of $pTi-13$ by 4 kinds of restriction enzymes.
(a) Photo (b) Its diagram.

EtBr 밀도구배 원심분리해 본 결과 ccc-plasmid band를 분리할 수 있었다.(Fig. 1, 2, 3, 4). 이는 세포 lysis 과정에서 lysozyme보다는 Alkaline SDS buffer를 사용하는 것이 더 효과적이라는 Freifelder 등 (1971)의 보고와 일치하였다. Casse 등 (1979)은 변성된 DNA와 단백질을 제거하기 위해서 고형의 NaCl을 최종농도가 3% 되게 첨가 하였는데, 본 실험에서는 물리적 힘에 의한 ccc-plasmid의 상실을 우려하여 5M NaCl용액(Hansen과 Olsen, 1978)을 사용하여 최종 농도가 3% 되도록 첨가하였다.

EtBr에 염색된 ccc-plasmid DNA는 Watson 등 (1975)의 방법에 따라 EtBr를 제거하고 TES buffer로 충분히 투석시켰다. 이 때 2시간 이상 투석시키면 Covalently closed circular DNA가 Open circular 또는 linear형태로 전환되는 경우가 있다는 보고(Casse et al., 1979)가 있으며, 본 실험에서도 이와 비슷한 open circular 형태가 존재하는 것으로 추정되었다.

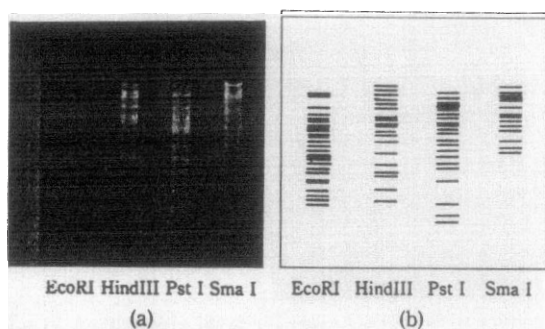


Fig. 7. Cleavage patterns of $pTi-14$ by 4 kinds of restriction enzymes.
(a) Photo (b) Its diagram.

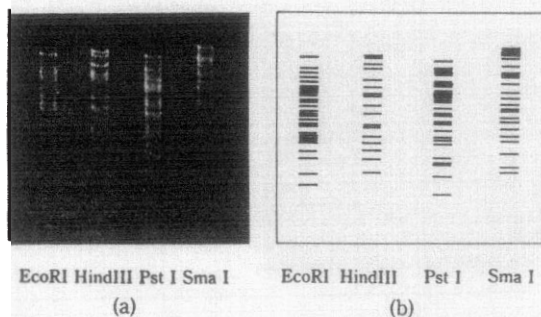


Fig. 8. Cleavage patterns of $pTi-49$ by 4 kinds of restriction enzymes.
(a) Photo (b) Its diagram.

A. tumefaciens KU 12, KU 13, KU 14, KU 49로부터 CsCl-EtBr 밀도구배 원심분리에 의해서 ccc-plasmid DNA를 분리하였으나 나머지 균주에서는 분리되지 않았다. 분리되지 않은 이들 균주에는 ccc-DNA가 결여되어 있거나(Casse 등, 1979) 또는 본 실험 방법으로 분리되지 않을 정도의 높은 분자량을 가진 ccc-plasmid DNA가 존재할 수 있을 것으로 추측된다. 본 실험에서는 plasmid의 양적 문제를 고려하여 이들 균주 중 *A. tumefaciens* KU 1의 배양액을 1500 ml로 늘려 보았으나, ccc-plasmid DNA band는 분리되지 않았다. 따라서 이 ccc-DNA를 분리하기 위해서는 cell lysis과정에서 혼합 시간을 줄이거나 다른 방법을 사용하여야 할 것으로 생각된다.

*A. tumefaciens*로부터 분리된 Ti plasmid를 제한효소에 처리할 때는 Maniatis 등 (1982)의

Table 1. Number of fragments by restriction enzymes.

Strains	Ti plasmids	Restriction enzymes and Number of fragments			
		Eco RI	Hind III	Pst I	Sma I
KU12	pTi 12	9	10	6	6
KU13	pTi 13	30	23	26	28
KU 14	pTi 14	26	19	22	14
KU 49	pTi 49	28	17	28	23

방법을 사용하였다. Fig. 5, 6, 7, 8에서는 조밀하게 전개된 고분자량인 fragment의 band를 좀더 확실하게 분석하기 위해서 10 v/cm로 2시간, 5 v/cm로 5시간 각각 전기영동하여 보았는데, 5 v/cm로 5시간 전기영동했을 경우에 더 뚜렷한 band pattern이 확인되었다. 이는 Sciaky 등 (1978)과 Chilton(1978a)의 보고와도 일치한다.

또한 vertical agarose gel 위에 올려진 DNA 표품이 전기영동시 TBE buffer내로 확산되는 것을 막기 위해서 Sciaky 등(1978)과 Koekman 등 (1979)의 방법에 따라 처음 10분간은 10 v/cm로, 그 후로는 5 v/cm로 전압을 낮추어 전개시킴으로써 DNA 표품의 손실을 방지하였다.

Fig. 5, 6, 7, 8에서 보는 바와 같이 각각의 plasmid를 제한효소에 의해 처리한 cleavage pattern은 각각 다르기 때문에 이들 plasmid들은 서로 다른 종류임을 확인할 수 있었다. 그러나 Fig. 5와 Table 1에서 보는 바와 같이 pTi-12는 다른 plasmid보다 각 효소에 의해 분해된 fragment 수가 현저하게 적은 것으로 보아서 deletion mutant로 추측된다. 그러나 KU 12는 감자 원반에서 tumor를 형성하므로 pTi-12는 T-DNA를 포함하는 deletion mutant로 생각된다.

이와 같이 분리된 4 종류의 plasmid가 각각 다른 종류의 opines를 생산하는 plasmid인지 또는 같은 종류이나 deletion mutant인지는 확실하지 않기 때문에 이에 대한 연구는 계속되어야 하겠다.

적 요

고등식물에 있어서 유전자의 운반체로서 이용 가능성이 많은 것으로 알려지고 있는 Ti plasmid를 한국산 *Agrobacterium tumefaciens*로부터 분리하였다. 한국산 *A. tumefaciens* 15균주 중 4 균주로부터 Ti plasmid를 분리하였으며, 분리된 이들 Ti plasmid를 4 가지 종류의 제한효소로 각각 처리한 후 전기영동을 한 결과 각 균주 내의 plasmid가 서로 다른 것임을 확인하였다.

REFERENCES

1. Bomhoff, G. H., P. M. Klapwijk, H. C. M. Kester, R. A. Schilperoort, J. P. Hernals-teens, and J. Schell, 1976. Octopine and nopaline; synthesis and breakdown genetically controlled by a plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* **145**, 177-181.
2. Casse, F., C. Boucher, J. S. Julliot, M. Michel, and J. Denarie, 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* **113**, 229-242.
3. Cha, Y. J., J. S. Eum, S. B. Hong, and W. S. Sim, 1983. Possible use of Ti plasmid for genetic engineering of higher plants. 1. Isolation of Ti plasmid from *Agrobacterium tumefaciens* in Korea. *Kor. J. Microbiol.* **21**(4), 238-244.
4. Chilton, M.D., A. I. Montoya, D.J. Merlo, M.H. Drummond, R. Nutter, M. P. Gordon, and E. W. Nester, 1978 a. Restriction endonuclease mapping of a plasmid that confers oncogenicity upon *Agrobacterium tumefaciens* strain B6-806. *Plasmid* **1**, 254-269.
5. Chilton, M. D., M. H. Drummond, D. J. Merlo, and D. Sciaky, 1978 b. Highly conserved DNA of Ti-plasmids overlaps T-DNA maintained in plant tumors. *Nature* (London) **275**, 147-149.
6. Chilton, M. D., M. H. Drummond, D. J. Merlo, D. Sciaky, A. L. Montoya, M. P. Gordon, and E. W. Nester, 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells. The molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* **11**, 263-271.
7. Chilton, M. D., R. K. Saiki, N. Yadav, M. P. Gordon, and F. Quetier, 1980. T-DNA from *Agrobacterium* Ti plasmid is in the nuclear DNA fraction of crown gall tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**, 4060-4064.
8. Chilton, M. D., S. K. Farrand, R. L. Levin, and E. W. Nester, 1976. RP4 promotion of transfer of a large *Agrobacterium* plasmid which confers virulence. *Genetics* **83**, 609-618.
9. Currier, T. C., and E. W. Nester, 1976. Isolation of covalently closed circular DNA of high molecular weight from bacteria. *Anal. Biochem.* **76**, 431-441.
10. Depicker, A., M. Van Montagu, and J. Schell, 1978. Homologous DNA sequences in different Ti-plasmids are essential for oncogenicity. *Nature* (London) **275**, 150-153.
11. Freifelder, D., A. Folkmanis, and I. Kirschner, 1971. Studies on *Escherichia coli* sex factors: Evidence that covalent circles exist when cells and the general problem of isolation of covalent circles. *J. Bacteriol.* **105**, 722-727.
12. Godson, G. N., and D. Vapnek, 1973. A simple method of preparing large amounts of ox 174 RF1 supercoiled DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **299**, 516-520.
13. Hansen, J. B., and R. H., Olsen, 1978. Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5. *J. Bacteriol.* **135**, 227-238.
14. Hardy, K., 1981. Bacterial plasmids. Nelson.
15. Koekman, B. P., G. Ooms, P. M. Klapwijk, and R. A. Schilperoort, 1979. Genetic map of an octopine Ti-plasmid. *Plasmid* **2**, 347-357.
16. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook, 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
17. Merlo, D. J., R. C. Nutter, A. L. Montoya, D. J. Garfinkel, M. H. Drummond, M. D. Chilton, M. P. Gordon, and E. W. Nester,

1980. The boundaries and copy numbers of Ti-plasmid T-DNA vary in crown gall tumors. *Mol. Gen. Genet.* **177**, 637-643.
18. Meyers, J. A., D. Sanchez, L. P. Elwell, and S. Falkow, 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **127**, 1529-1537.
19. Montoya, A. L., M. D. Chilton, M. P. Gordon, D. Sciaky, and E. W. Nester, 1977. Octopine and nopaline metabolism in *Agrobacterium tumefaciens* and crown gall tumor cells: Role of plasmid genes. *J. Bacteriol.* **129**, 101-107.
20. Sciaky, D., A. L. Montoya, and M. D. Chilton, 1978. Fingerprints of *Agrobacterium* Ti-plasmids. *Plasmid* **1**, 238-253.
21. Thomashow, M. F., R. Nutter, A. L. Montoya, M. P. Gordon, and E. W. Nester, 1980. Integration and organization of Ti-plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell.* **19**, 729-739.
22. Van Larebeke, N., G. Engler, M. Holsters, S. Van den Elsacker, I. Zaenen, R. A. Schilperoort, and J. Schell, 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall inducing activity. *Nature* (London) **252**, 169-170.
23. Watson, B., T. C. Currier, M. P. Gordon, M. D. Chilton, and E. W. Nester, 1975. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **123**, 255-264.
24. Yang, F., A. L. Montoya, D. J. Merlo, M. H. Drummond, M. D. Chilton, E. W. Nester, and M. P. Gordon, 1980. Foreign DNA sequences in crown gall teratomas and their fate during the loss of the tumorous traits. *Mol. Gen. Genet.* **177**, 707-714.

(Received Oct. 5, 1985)