

형질전환 식물을 이용한 phyto remediation

김향미, 권태호, 양문식

진북대학교 생물과학부

전화 (063) 270-3339, FAX (063) 270-4334

Abstract

Tobacco plants were transformed by *A. tumefaciens* harboring human ferritin gene and they were subjected to investigate for the expression of transformed gene as well as heavy metal accumulation. Seed from self-fertilized transgenic plants was germinated on media containing toxic level of Cd, Cu, Zn, Fe, Mn and scored for tolerance to this heavy metals. There is difference in growth rate between transgenic and control plants, especially Cd, Cu. And transgenic plants accumulated more heavy metals than control plants.

서론

오늘날 급격한 산업발달로 인한 화석연료 사용의 증가, 광산업과 제련소, 도시의 폐기물, 화학 비료의 사용, 농약의 과다사용 등에 의해 중금속이 직접 토양에 투기되었고 그 결과 토양은 중금속 오염도가 증가했다¹⁾. 일반적으로 오염된 토양을 정화하는데 land-filling, 토양증기추출법, bioventing 등 물리화학적인 기술이 일반적으로 사용되어 왔는데, 이는 막대한 자금이 소요되는 단점이 있다. 최근에는 이러한 기존의 방법을 대신 하는 미생물과 식물을 이용한 bioremediation 방법이 많은 관심을 집중되고 있다²⁾.

Ferritin은 식물, 동물, 미생물등에서 발견되는 iron storage protein이다. 이는 식물, 동물에서 매우 비슷한 구조를 이루는데 약 ferritin 1 분자 당 4500 irons를 흡수할 수 있으며, Cu, Zn, Pb, Cd, Be, Al 등의 중금속과도 *in vivo*, *in vitro*에서 결합이 가능하다³⁾.

본 연구에서는 중금속 결합능력이 있는 human ferritin 유전자를 식물에 도입하고, 형질전환 식물체를 이용하여 중금속의 축적정도를 확인하였다.

재료 및 방법

1) 재조합 유전자 제조 및 형질전환

RT-PCR을 이용하여 human ferritin heavy chain(HFH) cDNA를 cloning하여 CaMV 35S promoter를 포함하는 식물발현 vector인 pMY27에 도입하여 pMYI20을 제조하였다(Fig. 1). pMYI20을 포함하는 *A. tumefaciens*를 이용하여 담배에 형질전환 시켰으며, 항생제를 포함하는 배지에서 재분화된 식물체를 PCR, Northern 및 Western blot analysis를 수행하여 형질전환 및 유전자의 발현여부를 확인하였다.

2) 중금속 배지에서 성장비교

발현이 확인된 형질전환 식물체의 중금속에 대한 내성정도를 확인하기 위하여 0.01, 0.05, 0.1 0.5, 1, 2mM의 $MgSO_4$, 0.01, 0.05, 0.1 0.5mM의 $ZnCl_2$, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1mM Fe-Citrate를 포함하는 1/10 MS 고체배지에서 5주 동안 배양하여 성장을 비교하였다.

3) 중금속 함유량 측정

각각의 농도별 중금속을 함유하는 1/10 MS 고체배지에서 발아하여 5주 동안 배양한 식물체의 중금속 함유량을 Atomic Absorption Spectrophotometer를 사용하여 확인하였다.

결과 및 고찰

1) 형질전환 및 유전자의 발현

담배에 HFH유전자가 안정적으로 도입되었는지를 확인하기 위하여 HFH 유전자에 특이적인 primer를 이용하여 PCR을 수행하였으며 PCR 결과 HFH로 판단되는 570bp정도의 DNA 단편을 확인하였다. 또한, 정상적으로 HFH 유전자가 발현하는지는 Northern blot analysis를 통하여 확인하였으며 유전자의 발현이 가장 높은 식물체 I20-4을 선발하였다. I20-4 식물에서 정상적인 HFH의 단백질 합성은 Western blot analysis를 통하여 HFH의 분자량에 해당하는 25 kDa의 밴드를 확인하였다.

2) 중금속에 대한 생육정도

중금속이 담배의 생육에 미치는 영향을 알아보기 위하여 I20-4 형질전환 식물과 대조구를 각각의 중금속을 포함하는 배지에서 5주 동안 생육시켰다. Mn의 경우 2.0 mM 농도에서는 I20-4와 대조구 모두 Mn 무처리와 비교하여 생육이 심하게 억제되었으나 I20-4의 경우 1 mM 이하의 농도에서는 I20-4의 생육이 현저하게 좋았다. Zn의 경우 1 mM 이상의 농도에서는 형질전환식물과 대조식물 모두 발아가 억제되었으며, 0.1 mM 이하의 농도에서 I20-4의 생육이 대조식물과 비교하여 양호하였다. 한편, Fe-citrate의 경우 1 mM 이상에서 발아가 형질전환식물과 대조식물 모두 발아가 억제되었으며 0.1 mM 이하의 농도에서 Mn과 Zn의 경우와 같이 I20-4의 생육이 대조식물과 비교하여 양호하였다.

3) 중금속 축적량

각각의 중금속을 함유하는 1/10 MS 배지에서 5주 동안 생육한 식물체의 중금속 함유량 확인하였다. Mn의 농도에 따른 Mn의 축적량은 모든 농도에서 I20-4 형질전환체가 대조구보다 축적량이 높았으며, Mn 1 mM의 처리구에서는 I20-4 식물이 생체중 1g 당 약 1,400 ppm의 Mn을 축적하였으나 대조구는 생체중 1g 당 약 900 ppm

의 Mn을 축적하여 형질전환식물이 약 1.5배정도의 많은 Mn을 흡수하였음을 확인하였다(Fig. 4). Zn의 경우 0.05 mM에서는 크게 차이를 보이지 않았으나 0.01과 0.1 mM의 농도에서는 I20-4 형질전환 식물이 약 2배 이상의 Zn을 축적하고 있음을 확인하였다. 대조구에 있어서 0.05 mM 처리보다 0.1 mM 처리구에서 Zn의 축적량이 낮은 것은 높은 농도에서 생육이 저해된 결과로 판단된다. 한편, Fe-citrate의 농도에 따른 축적량은 모든 농도에서 I20-4 형질전환체가 대조구보다 축적량이 높았으며, Fe-citrate 0.5 mM의 처리구에서는 I20-4 식물이 생체중 1g 당 약 700 ppm의 Fe를 축적하였으나 대조구는 생체중 1g 당 약 550 ppm의 Fe를 축적하여 형질전환 식물이 약 1.3배정도의 많은 Fe를 흡수하였음을 확인하였다

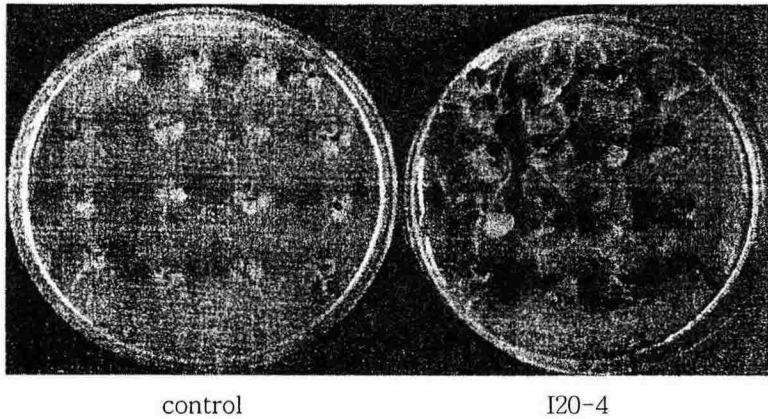


Fig. 1. Growth of tobacco plants in one-ten strength of MS media concentration of 0.01 mM manganese.

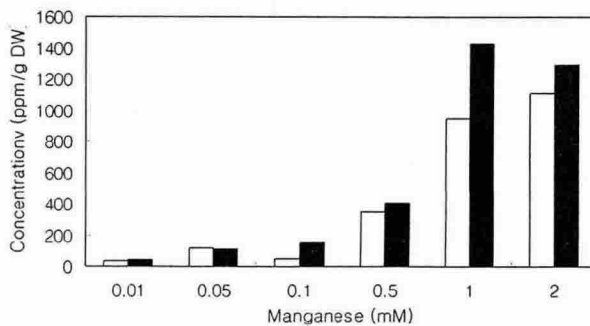


Fig. 2. Comparison of manganese accumulation between transgenic and non-transgenic plants

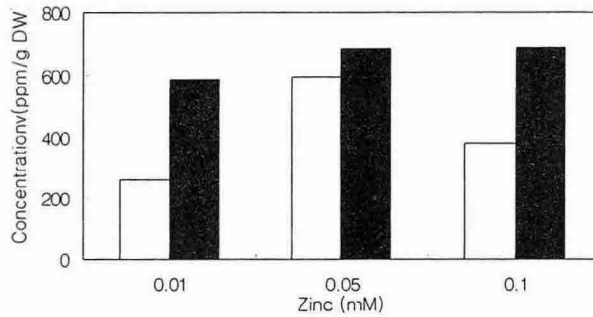


Fig. 3. Comparison of zinc accumulation between transgenic and non-transgenic plants

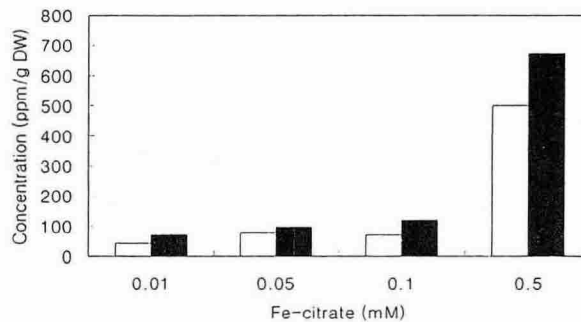


Fig. 4. Comparison of Fe-citrate accumulation between transgenic and non-transgenic plants

감사의 글

본 연구는 과학기술부의 RRC사업(군산대학교 SERC)의 연구비 지원에 의하여 수행되었습니다.

인용문헌

1. Ilya Raskin, PBA Nanda Kuman, S. Dushenkov, David E Salt. Bioconcentration of heavy metal by plants. (1994) *Current opinion in biotechnology* 5:285-290
2. Anne-Marie Stomp, S. D. Cunningham. Genetic Strategies for Enhancing Phytoremediation. (1994) *Annals of the New York Academy of Sciences*. 721:481-491
3. N. Dennis Chasteen, P. M. Harrison. Mineralization in Ferritin: An Efficient Means of Iron Storage. (1999) *Journal of Structure Biology*. 126:182-194