

3. 돼지 콜레라 백신생산 유전자 도입한 Birdsfoot trefoil 형질전환 식물체 생산

김기용¹ · 최영진¹ · 성병렬¹ · 임근발¹ · 김원호¹ · 양주성² · 한범수³ · 김종범³
(농촌진흥청 축산연구소¹, 성균관대학교², 농업생명공학연구원³)

Production of Transgenic Birdsfoot trefoil(*Lotus corniculatus* L.) with Vaccine Producing Gene Against Against Pig Cholera

K. Y. Kim¹, Y. J. Choi¹, B. R. Sung¹, G. B. Lim¹, W. H. Kim¹, S. J. Lee¹, B. S. Han² and J. B. Kim²
(National Livestock Research Institute, Chonan 331-801, Korea¹, Sung Kyun Kwan Univ., Suwon 440-746, Korea²,
National Institute of Agricultural Biotechnology, Suwon 441-707, Korea³)

Key words : Transgenic birdsfoot trefoil, Edible vaccine, Pig cholera, New variety

<목적>

돼지 콜레라는 병인체가 돼지콜레라 바이러스(Flaviviridae의 Pestivirus)이며, 오직 돼지에서만 발병하는 특징이 있다. 국제수역사무국(OIE) List에는 A질병으로 분류되며, 국내에서는 법정 제 1종 가축전염병으로 분류된다. 감염경로는 주로 소화기로 경구 감염되며, 보통 6~11일 정도의 잠복기를 갖는다. 주요증상은 고열, 식욕결핍 후 높은 치사율 등을 들 수 있으며, 일단 발병하면 치료방법이 없다. 농촌진흥청에서 주관하는 바이오그린21사업의 일환으로 본 연구에서는 돼지 콜레라를 예방하기 위해, 예방백신을 생산하는 사료작물을 개발하고자 한다. 관련 유전자의 합성 및 형질전환용 발현벡터 개발과 버즈풋 트레포일의 재분화체계 및 형질전환체계는 이미 확립되었으며, 현재는 구제역 백신생산 유전자를 도입한 형질전환체 생산을 수행하고 있다. 이 후 형질전환체의 분석, 백신생산 검정 및 동물실험 등 일련의 연구를 진행할 계획이다.

<재료 및 방법>

○ 공시재료

- 버즈풋 트레포일(*Lotus corniculatus* L.)

○ 유전자, 발현벡터, *Agrobacterium*

- 돼지 콜레라 백신생산 유전자 : E2.S 및 E2.Y

- 버즈풋 트레포일 형질전환에 이용한 발현벡터 : pCK-Bar

- *Agrobacterium tumefaciens* strain : EHA105

- 유전자 및 발현벡터 분양 : 농업생명공학연구원 김종범 박사로부터 분양받았음

○ 시험방법

- 1) 버즈풋 트레포일 종자를 소독하여 2,4-D 3 mg/l 를 첨가한 SH-3 배지에서 캘러스를 유도
- 2) 상기의 유전자를 갖는 발현벡터로 *Agrobacterium* 을 형질전환 후 전기영동으로 확인
- 3) 형질전환 *Agrobacterium* 과 버즈풋 트레포일 캘러스를 공배양하여 유전자 도입
- 4) *Agrobacterium* 으로 감염된 캘러스를 hygromycin 및 cefotaxim 첨가배지에서 배양
- 5) 형질전환 캘러스를 선발하여 BOi2Y 배지에서 20~30일 간격으로 계대배양
- 6) 형질전환 캘러스로부터 shoot 및 root를 유도하여 형질전환된 식물체를 생산
- 7) Genomic DNA 분리하여 PCR 및 Southern blot 분석 실시하여 유전자 도입 확인

- 8) Total RNA 분리하여 northern blot 분석 실시하여 도입 유전자의 발현 확인
- 9) 형질전환체의 온실순화, 계통조성, 특성검정 및 포장에서 재배시험 실시

<결과 및 고찰>

- 돼지 콜레라 백신 유전자(E2.S 및 E2.Y)의 두과목초 형질전환 운반체를 제작하여 *Agrobacterium* 과 co-cultivation 방법으로 birdsfoot trefoil의 callus에 유전자를 도입하여 shooting 및 rooting 과정을 거쳐 E2.S 및 E2.Y 유전자가 도입된 것으로 추정되는 7개체를 획득하였음.
- 한편 미생물 발현 운반체를 제작하여 백신단백질의 대량발현을 유도하고, 이를 분리, 정제하여 복합항체생산을 준비 중.
- 돼지 콜레라 바이러스 유전자(E2.S 및 E2.Y)의 배양세포 내에서 단백질 발현을 검정하였음(농업생명공학연구원 공동).

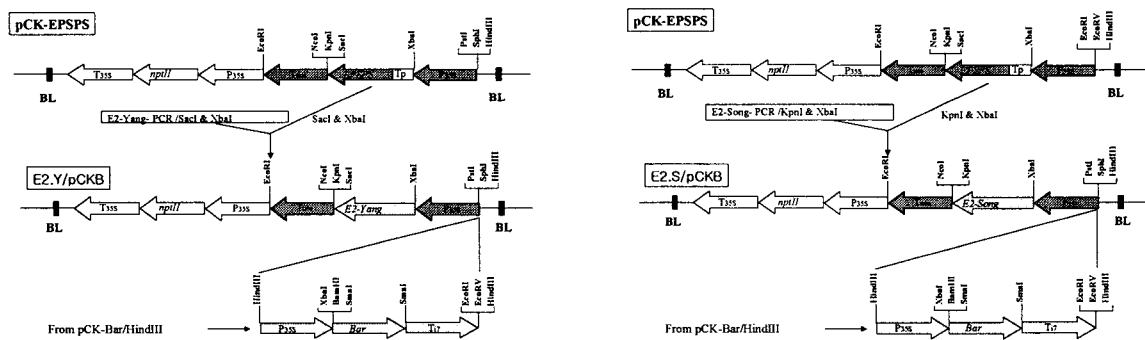


Fig. 1. The strategies of plant transformation vector containing E2.Y and E2.S genes. pCambia2300 is used as a backbone vector. The E2.Y and E2.S genes are inserted between 35S promoter and Tnos terminator. For selection of transformed plant, bar gene cassette is introduced.

- E2.Y 및 E2.S 유전자를 도입한 birdsfoot trefoil은 GMO 격리포장에서 계통조성하여 재배 중이며, 이들로부터 genomic DNA를 분리하여 PCR 및 southern blot 분석 방법으로 형질전환 여부를 확인 중에 있음.
- GMO 격리포장 이식 시기 : '05년 3월 중순

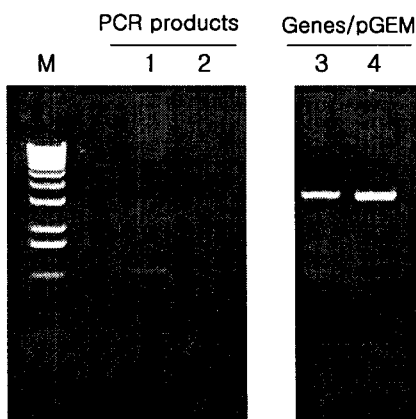


Fig. 2. PCR Cloning of Vaccine Genes(E2.Y and E2.S) to pGEM. M, Marker DNA; Lane 1, E2.Y; Lane 2, E2.S; Lane 3, E2.Y; Lane 4, E2.S; pGEM size is 3 kb.

- 돼지 콜레라 백신 유전자(E2.Y 및 E2.S)의 발현벡터 제작 및 미생물에서 단백질 발현을 확인하였고, 이들 유전자를 도입한 형질전환 birdsfoot trefoil을 제작하였다. 형질전환 여부가 확인되면 식물체 내에서 단백질 발현을 조사할 예정이며, 이 후 GMO 격리포장에서 형질전환 종자 생산, 계통의 특성조사 및 계통간 교배를 통해 돼지 콜레라 백신을 생산하는 품종으로 특허 및 품종출원을 계획하고 있다.