

*Agrobacterium tumefaciens*에 의한 상추 (*Lactuca sativa* L.)의 형질전환

최언옥 · 양문식* · 김미선¹ · 은종선¹ · 김경식²

전북대학교 분자생물학과, ¹전북대학교 원예학과, ²전북대학교 생물학과

Genetic Transformation of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) with *Agrobacterium tumefaciens*

Un Ok CHOI, Moon Sik YANG*, Mi Seon KIM¹, Jong Seon EUN¹, and Kyung Sik KIM²

Dept. of Molecular Biology: ¹Dept. of Horticulture: and ²Dept of Biology,
Chonbuk National University, Chonju 560-756. *Corresponding author.

Agrobacterium tumefaciens LBA4404 harboring plant binary vector, pBI121, was used for genetic transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Cotyledon segments were infected with *A. tumefaciens* LBA4404 by cocultivation method and regenerated. Regenerated lettuce was subject to molecular analyses for integration into plant nuclear genome and expression of β -glucuronidase (GUS) gene. Southern and Northern blot analyses demonstrated that GUS gene was integrated into plant nuclear genome and expressed into its mRNA. The expression of GUS gene into its protein was confirmed by spectrophotometric assay of GUS activity.

Key words: β -glucuronidase, LBA4404

최근 식물의 형질전환을 목적으로 하는 생물공학적인 방법 중에서 가장 널리 쓰이고 있는 방법중 단자엽 식물에서는 사용하지 못한다는 결점이 있음에도 불구하고 높은 형질전환 비율과 도입된 유전자의 안정성때문에 *Agrobacterium*을 이용한 방법이 가장 널리 사용되고 있다(Puont-Kaerlas et al., 1989). *Agrobacterium*은 토양세균으로 세균중에 존재하는 plasmid인 Ti 또는 Ri plasmid중 virulence region의 도움을 받은 transfer-DNA (T-DNA)가 식물의 nuclear genome으로 삽입되는 현상을 이용한 것이다(Klee and Rodgers, 1989).

상추는 세계적으로 가장 중요한 위치를 차지하고 있는 샐러드용 채소로서 우리 나라에서는 재래종으로 치마상추가 많이 재배되었으나 근래에는 결구상추의 수요가 증가하고 있으며, 조직배양 및 유전자 조작을 통한 형질전환 실험에 담배, 토마토 등과 더불어 널리 사용되고 있다.

상추의 조직배양은 Doerschug와 Miller(1967) 등이 몇 종류의 유전자형을 재료로 하여 경엽의 재분화를 처음으로 시도한 이후 Koevary 등(1978)은 결구상추의 자엽 등 여러 가지 조직을 배양하여 절편체로부터 경엽의 재분화에 미치는 광과 온도의 영향을 조사한 바 있으며 Alconero(1983)도 *Lactuca*속에 속하는 몇 종의 잎유래 캘러스로부터 현탁배양을 통하여 식물체로 재분화시킨 연구가 보고된 바 있다. 또한 Englar(1983)는 원형질체배양을 통하여 잎끝마름병과 roset spotting병에 저항성인 계통의 선발을 시도하였다.

본 연구에서는 재분화 기술을 확립한 상추 (Kim and Eun, 1992)를 식물 binary vector인 pBI121 (Jefferson et al., 1987)으로 형질전환 시킨 후 재분화시켰다. pBI121은 *E. coli*의 β -glucuronidase (GUS) 유전자를 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S를 promoter로 하여 reporter 유전자로 함유하고 있으며 neomycin phosphotransferase (NPTII) 유전

자를 selection marker로 함유하고 있다. pBI121으로 형질전환된 *A. tumefaciens* LBA4404와 상추 자엽의 절편을 cocultivation 방법에 의하여 형질전환시킨 후 kanamycin을 함유한 배지에서 형질전환된 상추를 선별하고 재분화하였다. 형질전환 및 재분화된 상추에 GUS 유전자가 도입, 발현된 것을 Southern 및 Northern분석과 GUS활성을 측정함으로써 확인하였다.

재료 및 방법

공시균주

본 연구에 사용된 식물 vector는 binary vector인 pBI121 (Jefferson et al., 1987)이었으며 pBI121의 증식에 사용된 균주는 *E. coli* HB101이었고 식물의 형질전환에 사용된 균주는 pBI121으로 형질전환시킨 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404이었다.

식물재료

공시한 재료는 (주)중앙종묘에서 구입한 잎상추계통 (*Lactuca sativa* var. *crispa*)인 청측면상추와 청치마상추이고 Kim과 Eun(1992)의 방법에 따라 무균발아 시킨 유묘의 자엽을 사용하였다.

*Agrobacterium*의 형질전환

Freeze-thaw 방법 (An, 1987)에 의하여 행하였다. 즉 80 mL의 YEP 배지 (yeast extract 10 g/L, peptone 10 g/L, NaCl 5 g/L, pH 7.5)에서 대수기 증식단계의 *A. tumefaciens*를 약 3,000 x g로 5분간 원심분리하여 수확한 다음 냉각된 10 mL의 0.15 M CaCl₂ 용액에 분산시켰다. 미리 준비된 1 µg의 pBI 121을 200 µL의 현탁액에 첨가하여 액체질소에 1분간 급속 냉동하였으며 5분간 37°C 수조에서 녹인 후 1 mL의 YEP 배지를 첨가하여 28°C에서 2-4시간 배양하였다. 배양액을 50 µg/mL kanamycin을 첨가한 YEP agar 배지에 도말하여 2-3일간 28°C에서 배양한 후 플라스미드 DNA를 plasmid quick screening 방법 (An et al., 1988)에 따라 분리하였다. 분리된 플라스미드 DNA를 제한효소로 잘라 agarose 겔에서 전기영동한 후 밴드를 조사함으로써 pBI121의 *Agrobacterium*내로의 도입을 확인하였다.

식물 형질전환 및 재분화

건조종자는 무수alcohol에 수초간 침적한 후 7% calcium

hypochlorite 수용액에 15분간 살균하고 멸균수에 3회 수세하여 호르몬이 첨가되지 않은 고체배지에서 무균발아 시켰다. 하배측의 길이가 1.5-2cm 신장하고 자엽이 전개하였을 때 자엽을 폭 3mm로 절편을 만들어 치상후 캘러스 유기 및 기관분화 양상을 조사하였다. 하룻밤동안 배양한 *Agrobacterium*을 원심분리하여 MS 기본 액체배지 (Murashige and Skoog, 1962)에 현탁한 액에 자엽절편이 충분히 적시도록 약 10분간 침지하였다. 꺼낸 자엽절편은 멸균된 기름종이로 닦은 후 cefotaxime (250 µg/mL)과 NAA (0.1 mg/L), kinetin (1.0 mg/L)이 첨가된 경엽유도용 MS배지 (MS기본배지+30 g/L sucrose+8 g/L agar)에 25°C, 암소에서 2일간 배양하였다. 배양 후 상기한 배지에 kanamycin (100 µg/mL)을 첨가한 선별 배지에 옮긴 후 16/8시간 명·암조건과 25°C에서 배양하였다.

Southern 분석

재분화된 상추의 잎으로부터 Davis 등(1984)의 방법에 의하여 DNA를 분리하였다. 분리된 DNA 10 µg을 EcoRI 과 BamHI으로 처리한 후 전기영동을 하여 분리하고 Gene screen plus 막으로 전이하였다. Southern hybridization은 Southern(1975)의 방법에 준하여 [α -³²P]dCTP를 사용하여 nick translation을 행하여 표지한 GUS-NOS (2.2 kb) 절편을 probe로 사용하여 행하였다.

Northern 분석

재분화된 상추의 잎으로부터 Kim과 Choi(1989)의 방법에 따라서 총 RNA를 분리한 후 formaldehyde-agarose 전기영동으로 크기별로 분리한 다음 nylon membrane에 전이 하였다. Northern hybridization은 Sambrook의 방법 (1989)에 따라서 행하였으며 이때 사용된 probe는 GUS 유전자를 nick translation하여 표지한 후 사용하였다. Hybridization한 후 nylon membrane은 실온에서 2 X SSC, 0.1% SDS 용액에서 30분 세척하고, 0.1 X SSC, 0.1 % SDS 용액에서 1-2 시간 세척한 후 autoradiography를 행하였다.

GUS 활성의 측정

형질전환 및 재분화된 상추의 잎으로부터 Jefferson 등 (1987)의 방법에 의하여 단백질을 추출한 후 분광분석법 (spectrophotometric assay)에 의하여 GUS의 활성을 측정하였다. 즉 식물의 잎을 액체질소를 부어 얼린 후 막자사발에서 갈고 추출완충액 (50 mM sodium phosphate, pH 7.0, 10 mM β -mercaptoethanol, 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% Sarkosyl)을 시료와 1:5의 비율로 넣어 추출한 후 원

심분리하여 그 상등액을 반응에 사용하였다. 상등액을 Folin 방법에 의하여 단백질을 정량한 후 각각의 시험관에 단백질 35 μg 에 해당하는 단백질 추출액과 1 mM p-nitrophenyl- β -D-glucuronide을 37°C에서 2시간 반응시킨 후 0.4 mL의 1M 2-amino-2-methyl-1, 3-propandiol을 넣어 (총 반응액 1 mL) 반응을 종결시켰다. 반응액을 분광광도계에서 ($\lambda = 415 \text{ nm}$)에서 동량의 기질이 들어있는 용액을 blank 값으로 하여 흡광도를 측정하였다.

결과 및 고찰

Agrobacterium의 형질 전환

식물 binary vector인 pBI121을 freeze-thaw법 (An, 1987)에 의하여 형질전환 후 kanamycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 함유한 YEP 선택 배지에서 선발한 후 액체배지에서 하룻 밤 배양하여 plasmid quick screening 방법 (An et al., 1988)에 의하여 pBI121이 *Agrobacterium*으로 도입된 것을 확인하였다 (자료 제시되지 않았음).

식물형질 전환 및 재분화

*Agrobacterium*으로 감염시킨 상추 자엽은 배양 6일 후부터 배양조직이 비대하기 시작하였고 10일후부터 절단면과 표피에 캘러스가 형성되는 것을 해부현미경하에서 관찰하였다. 배양 20일이후 자엽의 캘러스에서 경엽이 분화되기 시작하여 28일이후 경엽이 정상적으로 발달되었다. 상추는 비교적 재분화가 용이하여 계대배양없이 0.1 mg/L NAA+ 0.005-0.1 mg/L kinetin 첨가배지에서 쉽게 경엽 및 뿌리가 분화되었다. 배양조직으로 부터 부정아 및 부정근의 발생형태는 표피표면, 절단면, 캘러스 등에서 시작되었다. 배양 17일후 자엽에서 형성된 분열조직에서 엽원기가 분화되기 시작하였다. 뿌리는 자엽으로 부터 유기된 캘러스의 표면에서 발생하였고 캘러스에서 발생하는 부정아 역시 캘러스 표면에서 세포들이 밀집되어 분열되기 시작하였다. 5주 배양후 자엽으로 부터 유기된 경엽 및 뿌리의 수는 청치마의 경우에 경엽 2.5+0.9, 뿌리 1.0+0.4 이고 청죽면 결구상추의 경우는 경엽 3.0+0.1, 뿌리 1.7+0.9의 수치를 보였다.

Southern 분석

Reporter로 사용한 GUS 유전자가 형질전환 및 재분화된 상추 nuclear genome안에 삽입된 것을 확인하기 위하여 재분화된 상추 잎으로 부터 nuclear DNA를 분리한 후 Southern(1975) 분석을 행하였다. Figure 1에서 보듯이

BamHI과 EcoRI으로 처리한 경우에 GUS-NOS 부위에 해당되는 2.2 kb 부위에 강한 band가 관찰되었다. 따라서 repoter 유전자인 GUS 유전자가 식물의 nuclear genome 안으로 삽입됨을 확인하였다.

1 2 3 4



Figure 1. Southern blot analysis of transformed and regenerated lettuces. Lane 1: nontransformed lettuce, lane 2: transformed lettuce (Chungchukmyun), lane 3: transformed lettuce (Chungchima), lane 4: positive control (GUS-3'NOS).

Northern 분석

식물의 nuclear genome으로 도입된 reporter 유전자가 mRNA로 발현됨을 확인하기 위하여 재분화된 상추의 잎으로 부터 총 RNA를 분리한 후 Northern 분석을 행하였다. Figure 2에서 보듯이 GUS의 mRNA 크기와 같은 약 2.1 kb에 해당되는 부위에서 강력한 band를 확인하였다. 따라서 reporter 유전자를 사용한 GUS 유전자는 식물의 nuclear genome안으로 삽입됨은 물론 mRNA로 전사됨을 확인하였다.

1 2 3 4



Figure 2. Northern blot analysis of transformed and regenerated lettuces. Lane 1: nontransformed lettuce, lane 2: transformed lettuce (Chungchukmyun), lane 3: transformed lettuce (Chungchima), lane 4: positive control (GUS-3'NOS).

GUS 활성의 측정

식물에 도입된 GUS 유전자가 단백질로 발현되는 것을 확인하기 위하여 형질전환 및 재분화된 상추의 잎으로부터 단백질을 추출하여 Folin 방법에 의하여 단백질을 정량한 후 일정량의 단백질을 이용하여 p-nitrophenyl- β -D-glucuronide를 기질로 분광분석법(spectrophotometric assay)을 행하였다(Richard, 1991). 각각의 시료의 총 단백질 35 μ g를 사용하여 37°C에서 2시간 반응 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정 결과 청치마의 경우에는 0.59+0.02와 청국면의 경우에는 0.56+0.02를 나타내어 각 시료간의 약간의 차이는 있었으나 형질전환 되지 않는 식물에 비하여 현격한 흡광도의 차이를 관찰하였다. 위와 같은 일련의 실험으로 *Agrobacterium* vector를 이용하여 상추를 형질전환 및 재분화 시킬수 있는 시스템을 개발하였으며 도입된 유전자가 식물의 nuclear genome으로 안정하게 도입, 유지될 뿐만 아니라 식물체내에서 mRNA와 단백질로 발현 됨을 확인하였다. 본 시스템은 유전자 조작을 통한 새로운 형질을 가진 상추의 개발에 기초가 될 수 있을 것이다.

적 요

Agrobacterium-based vector를 이용하여 상추를 형질전환 및 재분화 하였다. 즉 CaMV 35S promoter와 GUS 유전자를 reporter로 가지고 있는 pBI121을 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입시킨 후 상추의 자엽 절편과 cocultivation을 통하여 형질전환 시키고 재분화 시켰다. Southern 및 Northern 분석을 통하여 형질 전환 및 재분화된 상추에 GUS 유전자가 안정하게 도입되고 식물체내에서 mRNA로 발현 됨을 확인하였다. 또한 GUS 유전자가 식물체내에서 단백질로 발현됨을 확인하기 위하여 상추 잎의 단백질 추출액을 이용하여 분광분석법에 의하여 GUS의 활성을 측정하였다. 시료간의 약간의 차이는 있으나 시료로부터 유의적인 GUS 활성을 확인하였다.

사 사

본 연구는 학술진흥재단의 유전공학연구비(1989)에 의하여 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Alconero R (1983) Regeneration of plant from cell suspension of *Lactuca saligna*, *Lactuca sativa*, and *Lactuca serriola*. HortScience 18 : 305-307
- An G (1987) Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis. Methods in Enzymology 153 : 292-305
- An G, Ebert A, Ha SB (1988) Binary vectors. In Gelvin G, Schilport RA, eds, Plant Molecular Biology Manual. Kluwer Academy Publishing, Netherland, ppA3/9
- Davis RW, Thomas M, Cavern J, John JP, Scherer S, Padgett RA (1984) Rapid DNA isolation for enzymatic and hybridization analysis. Methods in Enzymology 65 : 404-411
- Doerschug MR, Miller CO (1967) Chemical control of adventitious organ formation in *Lactuca sativa* explant. Amer J Bot 54 : 410-413
- Englar DE (1983) Regeneration lettuce protoplasts into whole plant method development and demonstration of applicability for genetic cultivar improvement. Ph. D. Thesis Univ. of California, Davis
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J 6 : 3901-3907
- Kim CH, Choi YD (1989) Identification of soybean glycinin precursor in vivo. Korean J Bot 32 : 51-65
- Kim MS, Eun JS (1992) The Effect of growth regulators of callus induction and organ differentiation of lettuce (*Lactuca sativa* L.). Bull. Rural Soc., Chonbuk Nat'l Univ 3 : 67-81
- Klee HJ, Rodgers SG (1989) Plant transformation systems based on the use of *A. tumefaciens*. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant 6 : 1-23
- Koevary K, Rappaport L, Morris LL (1978) Tissue culture propagation of head lettuce. HortScience 13 : 39-41
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Plant Physiol 15 : 473-497
- Puonti-Kaerlas J, Stable P, Erickson RJ (1989) Transformation of Pea (*Pisum sativum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell reports 8 : 321-324
- Richard J (1991) GUS gene fusion system user's manual
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments by gel electrophoresis. J Mol Biol 98 : 503-517

(1993년 12월 20일 접수)