

세포융합시 전기하에서 식물세포가 받는 영향에 관한 연구

이상훈·이연민*·차현철*

= Abstract =

Effect of the Electric Field on the Plant Protoplasts During Cell Fusion

Sang-Hoon Lee, Yon-Min Lee, Hyeon-Cheol Cha

The objective of this paper is to investigate the effect of AC field on the protoplast of plant cells. The results of investigation will be the basis for the development of electric cell fusion device. For the experiment, we made the electrode and AC and DC pulse generator and observed the behavior of the protoplasts through the inverted microscope which is connected to the monitor and video recorder by the CCD camera. As a result, the numbers of rotating, moving and destructed protoplasts and viability of the protoplasts have close relation to the amplitude of AC field, while the rotation rate is closely related to the frequency of AC pulse.

Key words : Electrode, Cell fusion, Protoplast, Pulse generator

서 론

전기장에 의해 유도된 원형질체를 융합하는 방법인 전기융합은 광범위한 식물 원형질체를 융합하는데 간단하고 효과적인 방법이다. Senda 등¹⁾이 최초로 융합을 유도하기 위해 전기장을 사용하였으며, 이 기술은 Zimmermann^{2)~5)} 연구팀에 의해 개선되었다. 교류장은 dielectrophoresis로 인하여 원형질체가 두 전극 사이에 사슬을 배열토록 하며, 이 진주상 사슬(Pearl chain)의 길이는 교류진폭과 주파수를 조절하여 임의로 조정할 수 있다. 이러한 전기융합은 화학적 융합방법인 PEG기술보다 몇 가지 중요한 장점을 지닌다. 우선 공정이 빠르고, 매우 동조적이며, 융합률이 높다. 현재 시판되고 있는 전기융합장치는 G.C.A. Corp.과 D.E.P. Systems, Inc.에서 제조한 것으로 초기 set-up과 계산을 극히 단순화시켜 시용에 편리한 점이 있으나 가격이 비싸 대학 연구실에서 사용하기가 용이하지 않다. 따라서 국내에서도 원형질체의 전기적 융합장치를 개발하기 위한 연구들이 일부 진행되었고, 본인들

Class-E 공진인버터를 사용한 세포융합 시스템을 구현한 바 있다⁶⁾. 그러나 이러한 융합시스템을 개발하는데 있어 전기하에서 원형질체가 받는 영향에 관한 연구가 필수적으로 수반되어야 하며, 외국의 경우는 이에 대한 연구가 많이 진행되고 있지만 국내에서의 연구는 전무한 상태이다. 본 논문은 교류전기 하에서 식물세포의 원형질체가 받는 영향에 관한 연구를 진행하였다. 교류전계의 진폭 및 주파수의 변화에 따른 물리적 영향과 생존률 등을 측정하였으며, 특히 주파수의 크기에 따른 원형질체의 상대적 회전속도를 측정하여 보았다. 이러한 결과는 세포융합 시스템의 융합률을 개선시키거나 생존률을 극대화 시키는 데 중요한 정보가 될 것으로 생각된다.

재료 및 방법

Protoplast preparation

담배와 배추의 전개된 잎을 2% hypochlorite 용액으로

단국대학교 의과대학 의공학교실

Dept. of Biomedical Engineering, College of Medicine, DanKook Univ.

* 단국대학교 자연과학대학 생물학과

Dept. of Biology, College of Science, DanKook Univ.

이 논문은 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음

통신저자 : 이상훈, (330-714) 충남 천안시 안서동 산25, Tel. (0417)550-6990 Fax. (0417)550-6993

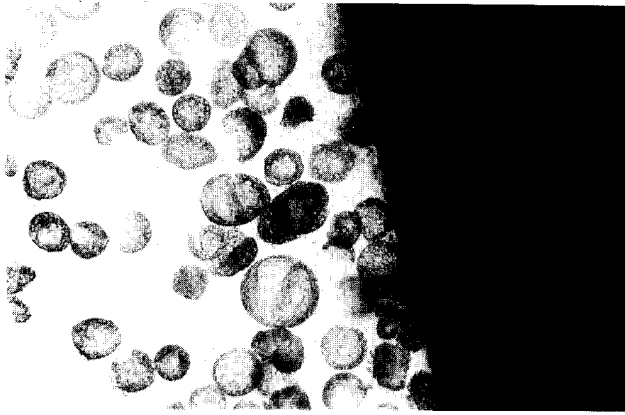


그림 1. 준비한 원형질체의 사진
Fig. 1. A. Photograph of protoplasts after application of AC fields (the blank region of the right means one of the electrodes)

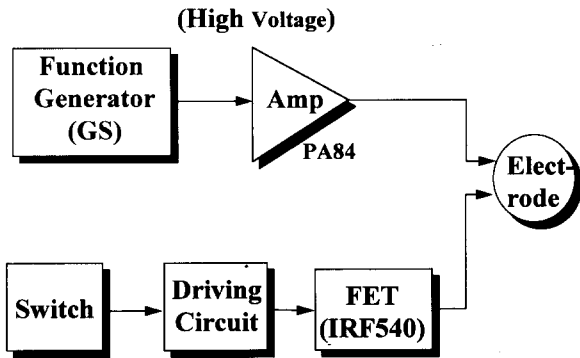


그림 3. 펄스발생장치의 블록도
Fig. 3. Diagram of the pulse generator system

표면살균 후 하표피를 제거하고, 염육조직을 효소용액(1.5% Cellulase(Onozuka R-10), 0.5% Macerozyme R-10, 0.1% Hemicellulase, 10% Mannitol in CPW solution)에 하룻밤 정치한다. 효소-원형질체 현탁액을 45 μ m mesh에 통과시켜 원형질체를 분리하고, 21% sucrose 용액 위에 분리한 원형질체 현탁액을 놓고 600 rpm으로 10분간 원심분리하여 원형질체를 정제하였다. 원형질체의 세척은 300~400 rpm으로 5분간 원심분리하여 침전 후, pellet을 다시 10% mannitol용액으로 현탁시켰으며, 이 과정을 4회 반복한 후 실험에 사용하였으며, 그림 1은 준비한 원형질체를 전극 사이에 둔 그림을 나타낸다.

Electrode

원형질체의 교류전계 하에서의 행태를 관찰하기 위하여 교류전계를 제공할 수 있는 electrode를 그림 2와 같이 제작하였다. Electrode의 제작은 slide glass 위에 백금으

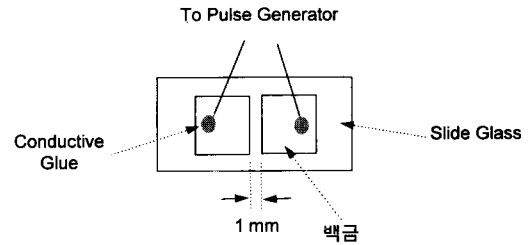


그림 2. 전계를 제공하기 위한 전극
Fig. 2. Planar type of platinum electrode for the application of electric field.

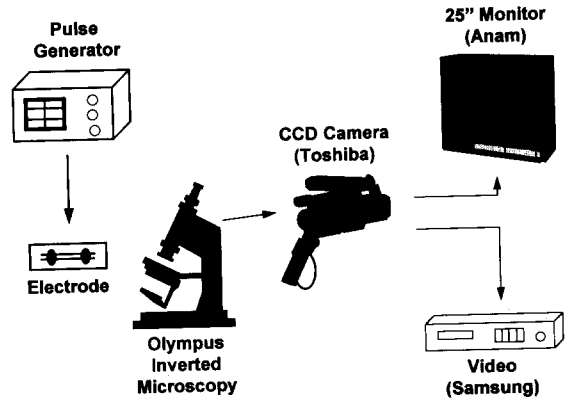


그림 4. 전계하의 세포의 영향을 보기위한 실험장치
Fig. 4. Set-up of whole procedure for the experiment

로된 전극을 1 mm 간격을 두고 유리용 에폭시 및 순간접착제를 사용하여 고정시킨 후, 도전성 접착제를 사용하여 각각의 전극을 AC pulse generator와 연결하였다.

AC & DC pulse 발생기

교류의 발생을 위하여 function generator의 출력을 고압, 고속의 증폭기(PA84)를 통하여 증폭시킨 후 이를 electrode에 연결하였다. 한편 융합용 직류펄스를 발생시키기 위해 switch로 부터 나오는 출력을 monostable multivibrator를 사용하여 1 msec, 2 msec, 5 msec의 펄스가 발생하도록 하였으며, 이 중 한 펄스가 FET를 통과하면서 최대 250 volt의 펄스를 발생시킬 수 있도록 하였다. 그림 3 은 펄스발생장치의 블록도이다.

실험장치

그림 4는 실험을 위한 장치를 나타낸 것이다. 융합용 전극을 도립현미경(Olympus)에 장착한 후 AC 및 DC 펄스 발생기에 연결하였다. 전극사이에 원형질체를 피펫을 사용하여 떨어뜨린 후 도립현미경을 통하여 관찰하였으며, CCD camera(Toshiba)를 현미경에 연결하고, 전계를 가하였을 때 나타나는 행태를 monitor(Anam)로 관찰

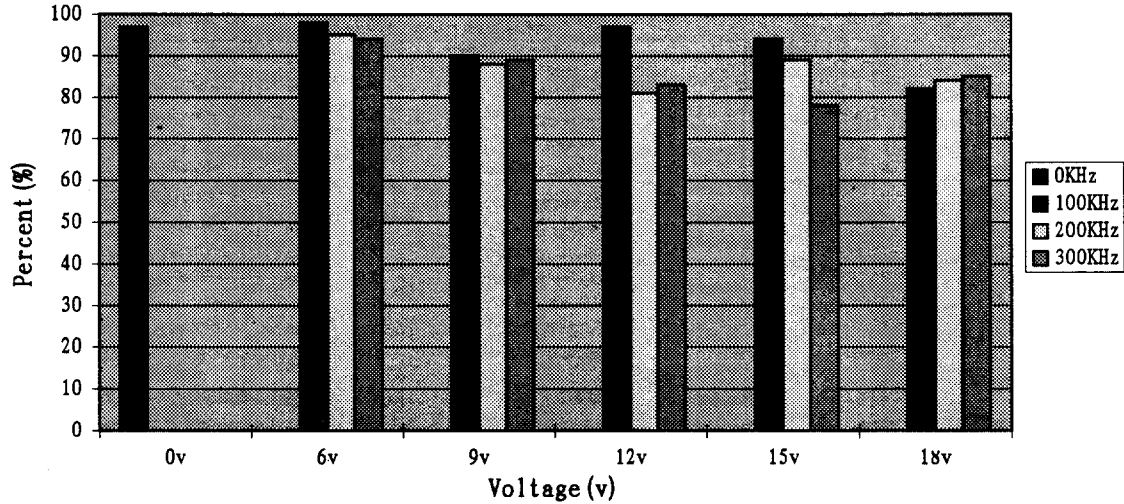


그림 5. 전압 및 주파수에 따른 생존력의 변화
Fig. 5. Changes of viability according to intensity and frequency of AC field

결 과

교류전계 하에서의 원형질체의 행태

AC pulse의 intensity를 200 kHz로 고정하고 전압을 0, 6, 12, 15, 18 V 등으로 각각 인가 후 원형질체의 행태를 관찰하였다. 전계 하에서의 원형질체의 행태는 크게 rotation, movement, destruction, deformation, pearl chain formation 등의 5 형태로 나눌 수 있었으며, 이들 행동은 전압의 세기와 전계 시간에 따라 차이를 보였다. 전계를 인가하고 5~10 초 지난 후 원형질체의 행태는 표 1에서 보는 바와 같이, 전압의 강도가 높아질수록 각 행태의 빈도도 증가하였으며, 특히 destruction과 deformation의 증가가 나타났다. 6V와 9V에서는 원형질체의 변화는 거의 없으나, 12V 이상에서는 활발한 행동을 볼 수 있었다. Movement는 낮은 전압에서는 전혀 관찰되지 않았으나, 12V에서 조금 나타났으며, 15V에서 매우 활발하게 일어나고, 18V에서는 다시 감소하는 것을 볼 수 있었다. Rotation은 6V와 9V에서 미약한 활동을 보이다가 12V, 15V에서 증가하는 양상을 보이다가 18V에서 다소 감소하였다. Pearl chain의 형성은 낮은 전압 하에서는 되지 않으나, 전압이 증가할수록 증가하는 양상을 보이며 18V에서 가장 활발하였다. Destruction과 deformation은 전압의 증가에 따라 증가하며 18V에서 가장 높은 수치가 나타나서 전압의 증가가 원형질체 형태의 변화와 파괴를 초래하여 세포를 죽게 한다.

표 2는 전계의 인가 시간을 5~10분간으로 길게 준 경

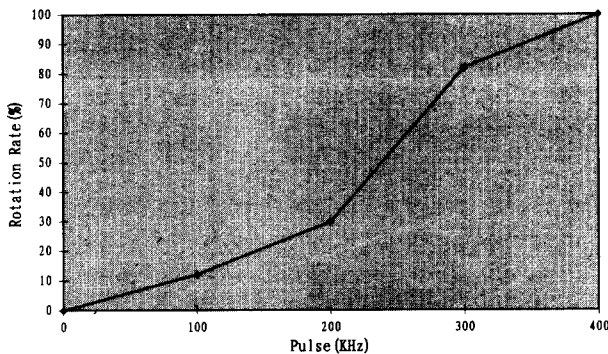


그림 6. 주파수의 증가에 따른 원형질체의 회전속도
Fig. 6. Rotation rate of protoplast by the application of frequency of AC field

하거나 video recorder (Samsung)로 녹화할 수 있도록 하였다.

Protoplast Viability Test

원형질체의 생존력은 Power & Chapman⁷⁾의 FDA (Fluorescein diacetate) 방법으로 조사하였다. 즉 5 mg의 fluorescein diacetate를 1 ml의 acetone에 녹인 후, 10% mannitol 용액과 혼합하여 원형질체에 첨가한 후 형광현미경(Olympus)하에서 관찰하였다. 살아있는 원형질체는 녹색의 형광을 나타내며, 죽은 세포는 적색을 나타내므로 이를 기준으로 생존의 유무를 판단한다.

표 1. 짧은 인가전계하에서 원형질체의 행태

Table 1. Behavior of protoplasts by the short-time pulse application

Behaviors Amplitude	1회					2회					3회				
	M	R	D	DS	P	M	R	D	DS	P	M	R	D	DS	P
6V	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
9V	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
12V	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
15V	++	++	++	-	++	++	++	+	-	++	+	++	++	-	++
18V	-	-	+++	+	+++	++	-	+++	++	+++	-	++	+++	++	+++

M : Movment, R : Rotation, D : Deformation, DS : Destruction, P : Pearl chain
 - : none, + : poor, ++ : moderate, +++ : well

표 2. 전계의 인가시간이 길 때 전압의 증가에 따른 원형질체의 행태

Table 2. Behavior of protoplasts by the long-time pulse application

Behaviors Amplitude	M	R	D	DS	P
6V	0	1.8	0	0	45.9
9V	0.3	1.0	3.4	10.3	55.4
12V	0.3	0	11.6	17.0	57.0
15V	0	0	14.7	28	21.9

M : Movment, R : Rotation, D : Deformation, DS : Destruction, P : Pearl chain
 (all figures mean %)

우를 나타낸 것이며, 앞에서의 짧은 시간의 결과와는 다소 차이를 볼 수 있었다. 전압의 증가에 따라 destruction, deformation은 짧은 인가의 경우와 마찬가지로 증가하였다. Movement는 짧은 인가에 비해 더욱 낮은 전압인 9V에서부터 관찰할 수 있었으며 15V에서는 관찰할 수 없었다. Rotation은 6V, 9V 전압에서 관찰되었으며, 12V, 15V 에서는 관찰되지 않았다. Pearl chain의 형성은 6V, 9V, 12V의 인가로 전압이 증가함에 따라 증가의 양상을 보이다가 15V에서 급격한 감소를 나타내었다.

파장의 변화에 따른 원형질체의 생존력

파장이 원형질체의 생존에 어떠한 영향을 미치는 가를 조사하기 위해 전류의 주파수를 100, 200, 300kHz로 달리하여 생존력을 FDA 방법으로 조사하였으며, 그 결과는 그림 5와 같다. 전혀 전계를 인가하지 않은 대조군의 원형질체의 경우에 있어서는 97%의 생존률을 나타내었다. 전체적인 생존률은 파장의 증가에 따라서 감소함을 나타냈으며, 전압의 증가에 따라서도 생존률의 감소를 볼 수 있었다. 특히하게도 18V에서는 100kHz에 비해 300kHz에서 더욱 높은 생존률을 나타내었다.

주파수의 증가에 따른 원형질체 회전속도

그림 6은 주파수를 100, 200, 400kHz로 변화시킬때 측정된 회전속도의 비를 나타낸 것으로, 주파수의 증가에

따라 원형질체의 회전속도비가 증가됨을 관찰할 수 있었다. 원형질체는 0kHz 상태에서는 전혀 회전하지 않았으나, 주파수를 증가시킬수록 회전속도가 증가하여 100kHz에서 12.1%, 200kHz에서 29.8%, 400kHz에서 100%의 rotatin rate을 나타냈다. 또한 회전하는 원형질체의 빈도도 주파수의 증가에 따라서 계속적인 증가를 나타내었다.

고 찰

원형질체는 교류장 하에서 전압과 주파수의 변화에 따라 rotation, movement, deformation, pearl chain 형성 등의 현상을 보였다. Movement는 전압의 증가에 따라서 일시 증가(9V, 12V)하다가 다시 감소함을 나타내었는데 이는 원형질체의 deformatin, destruction의 증가와 밀접한 연관이 있는 것으로 생각되어 진다. 즉, 원형질체는 단시간의 교류장 하에서 6-12V의 전압을 유지해 줄 때는 deformation과 destruction이 적은 안정한 상태를 나타내다가, 그 이상의 전압을 받으면 세포의 형태 변화와 파괴가 일어나게 된다. 따라서 그 이전에 활발한 활동을 나타내던 rotation이나 movement가 감소하는 효과를 야기하게 되는 것으로 생각된다. 장시간의 교류장에서는 교류장 하에서 머무는 시간의 증가에 따라 미약한 충격의 계속적인 축적에 의해서 단시간의 교류장에서 보다 많은 충격을 받는 것으로 생각된다. 따라서 낮은 전압에서도 destruc-

tion이나 deformation이 많이 생기고 오히려 rotation이나 movement 등은 낮은 빈도로 일어나는 것이다.

원형질체의 rotation rate은 전압의 세기보다 주파수에 의해 더 영향을 받았다. 또한 전압의 증가에 따라 rotation을 하는 세포의 수도 증가 하고 rotation의 속도도 증가함을 보였다. 그러나 일정한 전압(15V 이상)에선 rotation을 하는 세포의 수가 다소 감소 하였으며, 이는 앞서 언급한 바와 마찬가지로 destruction과 deformation의 증가로 인해 세포의 viability가 감소함으로 인해 줄어드는 것으로 생각된다.

Pear chain의 형성은 교류를 인가하여 교류장 형성시 세포막의 전하가 양극과 음극으로 양분되고 이것이 정전기적 인력으로 인하여 electrode의 한 극쪽으로 모이면서 반대 극끼리의 결합에 의한 연속적인 세포의 나열로 인해 생기는 것이다. 이러한 pearl chain의 형성이 단시간의 교류장 하에서는 전압의 증가에 따라 증가하였으며, 이것은 전압의 증가가 세포의 양극화를 더욱 촉진하여 생성되어 지는 것으로 생각되어 진다. 장시간의 교류장에서는 pearl chain의 형성이 15V 이상의 전압에서는 급격히 감소하였으며, 이는 원형질체가 장기간 전압에 노출되어 발생한 세포의 destruction, deformation의 증가에 의한 것으로 생각되어진다.

FDA는 형광을 발하지 않는 화합물이며, 이 분자가 원형질막을 가로 질러 세포내로 들어가면 살아있는 세포만이 esterase의 작용으로 이 분자를 절단하여 fluorescein을 원형질체내로 방출시켜 녹색의 형광을 낸다⁹⁾. 원형질체의 생존은 전압의 증가와 주파수의 증가에 따라 감소하였으며, 주파수의 증가보다는 전압의 증가에서 더욱 뚜렷한 감소 효과를 나타내었다. 그러나 18V의 전압에서는 오히려 약간의 증가를 나타내었는데, 이는 거의 모든 원형질체에서 aggregation이 일어나서 집단을 형성하여, 집단 안 쪽의 원형질체는 바깥 표면 쪽의 원형질체에 의해서 전압의 영향으로부터 보호 받기 때문인 것으로 사료된다.

배추와 담배 엽육세포의 원형질체의 행태로 보아 교류장에서 원형질체를 실험하기 위한 가장 적절한 전압과 파장은 100kHz, 12V 이며 교류장에서 인가 시간은 10초 이내의 단시간이 효과적인 것으로 생각되어진다. 이는 Gaynor & Sawhney⁹⁾의 보고와는 다소 차이가 있는 것이다.

이상의 결과를 볼 때, 제작된 시스템으로 다양한 교류파형 하의 원형질체의 행태를 관찰할 수 있었으며, 위의 연구결과를 토대로하여 교류장에서 배추와 담배의 원형질체의 전기융합에 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

이상의 결과를 토대로 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었으며, 이 결과는 세포의 전기적 융합장치를 제작하는데 있어 중요한 자료가 될 것으로 생각된다.

1. 원형질체는 단시간(5-10초)의 교류장 하에서도 전압과 주파수의 변화에 따라, rotation, movement, deformation, pearl chain 형성 등의 현상을 보였다. 즉, 9V 이하의 낮은 전압에서는 거의 변화가 없다가, 12V 이상에서 회전, 이동, 사슬형성이 보이며, 18V 이상에서 세포 모양의 변형이 일어나 궁극적으로 터졌다.

2. 주파수가 증가할수록 회전 속도가 증가하여 100kHz에 비해, 200kHz에선 1.5배, 300kHz에선 3배, 400kHz 하에서 8배의 증가를 보였다.

3. 원형질체의 생존력은 전압의 세기에 뚜렷이 반응하여, 6V의 97%에 비해 18V에선 82%로 떨어지고, 또한 주파수가 증가할수록 생존력이 약간씩 떨어졌다.

4. 18V에선 오히려 100kHz의 82%보다 300kHz에선 85%로 약간 증가하였는데 이는 거의 모든 원형질체가 aggregation되어 외부의 자극에 보호작용을 받는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. M. Senda, J. Takeda, S. Abe, and T. Nakamura; "Induction of cell fusion of plant protoplasts by electrical stimulation.", *Plant Cell Physiol.* 20, pp. 1441-1443, 1979.
2. U. Zimmermann; "Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena.", *Biochim. Biophys. Acta* 694, pp. 227-277, 1982.
3. U. Zimmermann, and P. Scheurich; "Fusion of *Avena sativa* mesophyll protoplasts by electrical breakdown." *Biochim. Biophys. Acta* 641, pp. 160-165, 1981.
4. P. Scheurich, U. Zimmermann, and H. Schnabl; "Electrically stimulated fusion of different plant protoplasts. Mesophyll cell and guard cell protoplasts of *Vicia faba*.", *Plant Physiol.* 67, pp. 849- 853, 1982.
5. J. Vienken, and U. Zimmermann; "Electric field-induced fusion: Electro-hydraulic procedure for production of heterokaryon cells in high yield.", *FEBS Lett.* 137:11-13.
6. 이상훈, 차현철; "전기적 세포융합기의 제작 및 성능 개선에 관한 연구", *의공학회지* 15/1, pp. 1-8, 1994.
7. J.P. Power, and J.V. Chapman; "Isolation, culture

- and genetic manipulation of plant protoplasts. In : Plant Cell Culture, A practical approach*, IRL Press, 1985.
8. P.J. Larkin; "*Purification and viability determination of plant protoplasts.*", *Planta* 128, pp. 213-216, 1976
9. J.J. Gaynor, R.K. Sawhney; "*Production of novel crops by somatic hybridization. In : Biochemical Basis of Plant Breeding*", CRC Press, 1985.