

쪽 (*Polygonum tinctorium*) 세포의 형질전환 및 쪽 세포에서 Sodium Butyrate가 Green Fluorescent Protein 발현에 미치는 영향

박성길 · 정충식 · 이종진 · 이윤형 · 정인식*

경희대학교 식물대사 연구센터

(2001년 8월 21일 접수, 2001년 9월 17일 수리)

쪽 (*Polygonum tinctorium*) 세포에서 외래 단백질 발현을 검토하기 위하여 green fluorescent protein(GFP)가 내재하는 pCAMBIA1302를 형질 전환시켰으며 Western blot 분석에 의해 GFP의 발현을 확인하였다. Sodium butyrate가 GFP 생성에 미치는 효과를 검토한 결과, 10 mM에서 세포성장이 지연되었으며, 15 mM 이상에서는 정지되었다. 세포 내 GFP 생성량은 세포 접종 후 3일째 5 mM sodium butyrate를 첨가하였을 때가 0일째 처리에 비해 120% 증가하였다. 또한 접종후 3일 후 5 mM의 sodium butyrate를 처리한 경우가 10 mM의 경우보다 GFP의 수율이 50% 증가하였다. 본 실험을 통하여 세포 접종 후 3일째, 5 mM의 농도로 처리한 sodium butyrate가 외래 단백질의 발현을 효과적으로 증가시키는 결과를 확인하였다.

Key words : 쪽, 형질전환, sodium butyrate, GFP

서 론

최근 외래단백질들을 식물세포에서 발현시키기 위해 형질전환 식물에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 형질전환 식물세포에서 외래단백질의 발현에 관한 연구들은 interferon 유전자를 쌀의 원형질체에 삽입하여 활성을 확인하고,¹⁾ 담배세포에서 mouse metallothionein I을 삽입하여 식물체에 cadmium 저항성을 부여하거나²⁾ 백신 생산 시스템으로서 형질전환 식물체를 이용하는^{3,4)} 등 일련의 연구로 대표될 수 있다. 그러나 식물세포 발현 시스템에서 외래단백질의 발현 수준은 다른 발현 시스템에 비해 크게 효율이 떨어지는 문제점을 안고 있다. 최근 이러한 문제를 해결하기 위해 다양한 방법으로 연구가 진행되고 있으나 큰 효율을 보이지 못하고 있다.

Sodium butyrate는 유전자 발현에 있어서 다양한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 동물세포배양에 의해 발현된 erythropoietin,⁵⁾ gamma-glutamyl transferase,⁶⁾ tissue plasminogen activator,⁷⁾ monoclonal antibody⁸⁾ 등의 단백질 발현량이 sodium butyrate에 의해 높은 수준으로 조절된다는 것이 이미 여러 논문을 통해 발표되어졌다. 그러나 동물세포 발현 시스템에서 sodium butyrate의 영향에 관한 연구가 다양하게 진행된 것에 반하여 식물세포발현시스템에서는 그 효과가 거의 연구되어지지 않고 있다. Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*)의 기내배양에서 sodium butyrate가 DNA의 복제와 세포분열을 저해한다는 것으로 보고⁹⁾되어 있으나 식물세포 배양 시스템에서 유전자 발현상의 효과에 대한 연구는 자세하게 보고되어 있지 않다.

본 실험에서는 GFP 유전자로 형질전환된 식물세포를 현탁배양하여 외래 단백질인 GFP의 발현 양을 증가시키기 위해 여

러 조건하에서 sodium butyrate가 단백질 생성에 미치는 영향을 연구하였다.

재료 및 방법

식물 발현 벡터 클로닝-GFP 발현 벡터. GFP 발현 벡터는 pCAMBIA1302(CAMBIA, USA) 벡터를 이용하였다(Fig. 1). pCAMBIA1302는 T-DNA border를 가지고 있으며, 양쪽 border 사이에 modified GFP(mGFP)의 cDNA를 가지고 있다. Promoter로는 CaMV 35S promoter를 가지며, GFP의 C-terminal 말단에는 histidine tag를 가지고 있다. 또한 border 사이에 선별 유전자로 hygromycin 저항성 유전자를 가지고 있다. pCAMBIA1302는 *E. coli* DH5 α 균주에 형질전환 후 kanamycin 50 mg/l을 이용하여 선별하였다.

재조합 *Agrobacterium tumefaciens*의 제조. 식물 형질전환에 사용될 재조합 *Agrobacterium tumefaciens*의 제조를 위해 tri-parental mating이라는 방법을 사용하였다. GFP 유전자를 함

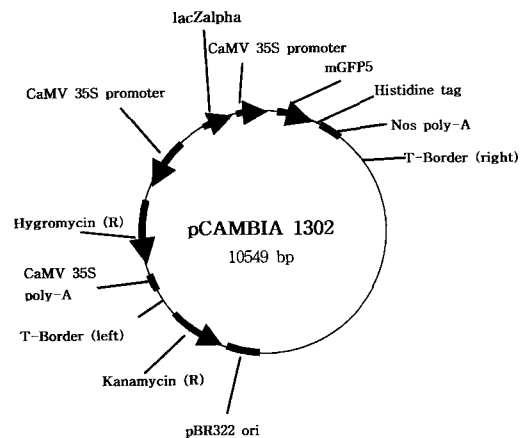


Fig. 1. Map of pCAMBIA 1302(mGFP5) plasmid.

*연락처

Phone: 82-31-201-2436; Fax: 82-31-202-9885

E-mail: ischung@khu.ac.kr

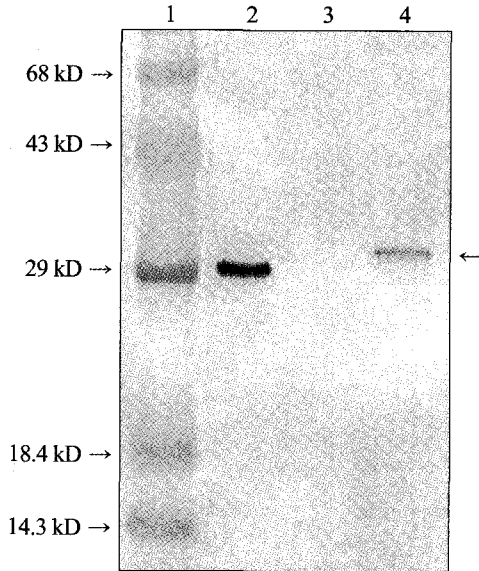


Fig. 2. Expression of GFP in *P. tinctorum* cells. 1. Pre-stained Molecular size Marker; 2. Commercial GFP; 3. Normal cells; 4. Transformed cells.

유한 재조합 *Agrobacterium tumefaciens*은 먼저 항생제가 첨가되지 않은 LB 한천배지에 pCAMBIA1302 벡터가 형질전환된 *E. coli* 균주, rifampicin에 저항성을 가지는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 섞어 30°C에서 24시간 동안 배양한다. 배양 후 형성된 *Agrobacterium* colony를 25 mg/l rifampicin과 50 mg/l kanamycin이 첨가된 LB 한천배지에 streaking하여 *Agrobacterium*의 성장 유무를 확인하고, 2-3번의 계대 배양 후 rifampicin과 kanamycin에 동시에 저항성을 지니는 pCAMBIA1302가 형질전환된 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 선별하였다.

형질전환을 위한 *Agrobacterium*의 준비. *Agrobacterium tumefaciens*는 kanamycin 저항성 유전자와 mGFP 유전자를 지니는 pCAMBIA1302가 들어있는 LBA4404를 이용하여 kanamycin 50 mg/l와 rifampicin 25 mg/l가 함유된 LB 한천배지에 streaking한 후 36시간 동안 온도가 30°C로 조절된 배양기에서 배양하였다. 증식된 colony들은 냉장고에 보관하여 접종 2일 전에 멸균된 50 ml 원심분리기용 튜브에 15 ml의 액체 LB 배지를 넣고 50 mg/l kanamycin과 25 mg/l rifampicin을 첨가한 후 몇 개의 colony를 넣어 36시간 동안 30°C, 150 rpm의 속도로 조절된 진탕 배양기에서 배양하였으며 배양 후 그대로 원심분리기에 넣고 1,200 × g에서 20 분간 원심분리시켰다. 원심 분리된 균을 액체 LB배지로 세척하고 다시 신선한 B5 배지를 넣은 다음 vir 유전자의 발현을 도와주기 위하여 0.1 M acetosyringone을 첨가하여 현탁시켰다.

형질전환 현탁 세포로부터 단백질 추출과 SDS-PAGE. 형질전환된 현탁 세포로부터 단백질의 추출은 액체 질소를 사용하는 물리적 방법을 사용하였다. 먼저 형질전환된 현탁 세포를 액체 질소에서 고운 가루가 될 때까지 간다. 여기에 1 ml의 protein extraction buffer(50 mM Tris-HCl(pH 8), 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 0.5 mM ethyleneglycol-bis

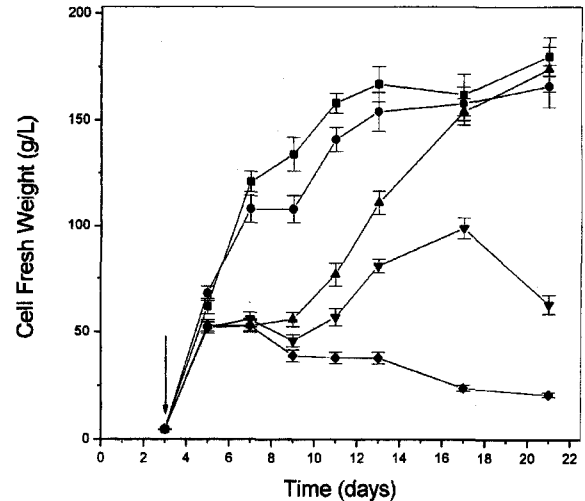


Fig. 3. Effect of sodium butyrate concentration on cell growth. Sodium butyrate was added 3 days after incubation. The arrow indicates the point of sodium butyrate addition. (■ : control, ● : 5 mM, ▲ : 10 mM, ▼ : 15 mM, ◆ : 20 mM).

(β -aminoethyl ether) *N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA), 1 mg/l Aprotinin, 1% Triton X-100)을 첨가하여 3분간 sonication을 실시하였고, 4°C, 10,000 × g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취해 SDS-PAGE 시료로 이용하였다. 식물체로부터 획득한 단백질 용액 40 μ l를 5X SDS sample buffer(60 mM Tris-Cl (pH 6.8), 14.4 mM β -mercaptoethanol, 25% glycerol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue) 10 μ l와 섞은 후 100°C에서 5분간 끓인 다음 12% acrylamide gel에서 2시간 동안 전기영동을 수행하여 분리하였다.

단백질 발현 확인. 형질전환된 현탁 세포에서 재조합 단백질 발현 여부는 SDS-PAGE와 Western blot 분석을 이용하여 확인되었다(Fig. 3). SDS-PAGE 후 단백질은 Transblot cell (BioRad, USA)를 이용하여 nitrocellulose membrane으로 전이시켜(1X transfer buffer, 150 mA, 12-16시간) immunoblotting 분석을 수행하였다. 그 후 nitrocellulose membrane을 먼저 phosphate buffer saline(PBS, 2 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 0.61 g/l Na_2HPO_4 , 0.2 g/l KH_2PO_4)으로 두 차례 씻어낸 후 blocking solution(3% skim milk in PBS)에서 2시간 동안 blocking 시켰다. 그 후 primary antibody를 blocking solution에 희석하여 상온에서 2시간 동안 반응을 시켰다. Primary antibody 반응 후 PBS로 15분간 두 차례 씻어내고 alkaline phosphatase conjugation된 secondary antibody를 blocking solution에 1/1000로 희석한 후 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. Secondary antibody 반응 후 PBS로 두 차례 washing을 시키고 BM purple alkaline phosphatase substrate(Boehringer Mannheim, Germany) 5 ml를 첨가시켜 발색시켰다.

Sodium butyrate 첨가. 1 M sodium butyrate를 물에 녹여 stock solution으로 사용하였으며 배지 첨가 전 여과 하였다. Sodium butyrate의 영향 및 적정 농도를 찾기 위하여 접종 후 3일째에 5, 10, 15, 20 mM의 sodium butyrate를 첨가하여 세포 성장 및 재조합 단백질인 GFP의 발현 정도를 비교 분석하

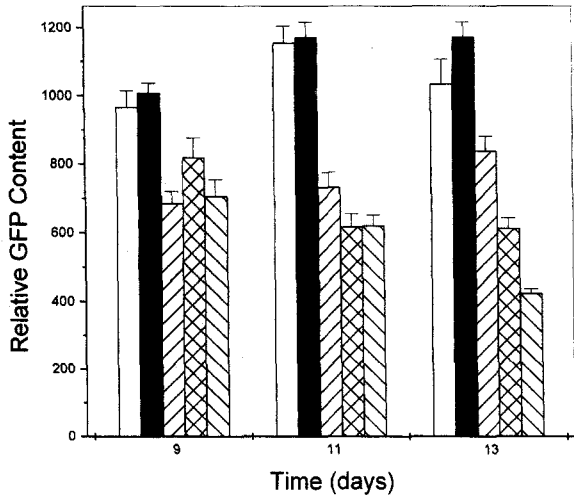


Fig. 4. Effect of sodium butyrate concentration on relative GFP content. (□: control, ■: 5 mM, ▨: 10 mM, ▩: 15 mM, ▭: 20 mM).

였다. 그 후 sodium butyrate의 적정 첨가 시기를 정하기 위하여 5 mM의 sodium butyrate를 접종 후 (초기 PCV 5%) 0, 3, 6, 9 일째 첨가한 후, 첨가일로부터 3일 후에 flask로부터 5 ml의 시료를 취하여 분석하였다.

단백질 정량분석 및 GFP 측정. 측정을 위하여 시료 5 ml을 액체 질소 처리하여 막자 사발로 갈아낸 후, 10 ml의 extraction buffer(50 mM Tris-HCl, pH 8, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, Triton X-100 1%, 1 g/l aprotinin in HEPES)로 처리한 후 3분간 sonication 하여 4°C에서 12시간 보관하였다. 추출액은 세포 파쇄물을 제거하기 위하여 10,000×g에서 10분간 원심분리 하였다.

단백질 정량분석은 Bradford assay로 하였으며, GFP 분석은 fluorometer(Turner Digital Fluorometer, Model 450, Barnstead/Thermolyne, USA)을 사용하여 460 nm에서 excitation시키고 515 nm에서 emission 되는 fluorescence를 측정하였다.

결과 및 고찰

쪽 세포의 형질전환 및 GFP의 발현 확인. Tri-parental mating을 이용하여 rifampicin(25 µg/ml)과 kanamycin(50 µg/ml)이 들어간 LB 한천배지에서 GFP 유전자를 지니는 재조합 *Agrobacterium*이 존재함을 간접적으로 확인할 수 있었다. 쪽 세포는 계대 배양 후 14일째 세포 농도 PCV(Packed Cell volume)가 30% 정도 되었을 때 세포를 sieve로 거른 후 걸러낸 현탁 세포를 3g 채취하여 *Agrobacterium*이 들어가 있는 LB 배지에 넣어 3일간 공동 배양하였다. 그 후 선별 배지인 50 mg/l의 hygromycin과 150 mg/l의 timentin 이 포함된 배지로 옮겨 형질전환된 세포주를 선별하였다. 형질전환된 현탁세포의 Western blot 분석 결과(Fig. 2) GFP가 쪽 세포에서 발현된 것을 확인할 수 있었다. Standard로 사용된 GFP(Clontech, USA)는 28 kDa에서 band를 보였고, 형질전환체로부터 얻은 GFP는 약 29 kDa으로부터 크기에 약간의 차이가 보이는 band를 얻을 수 있었다. 이것은 형질전환 시킨 GFP 단백질의 C-terminal에

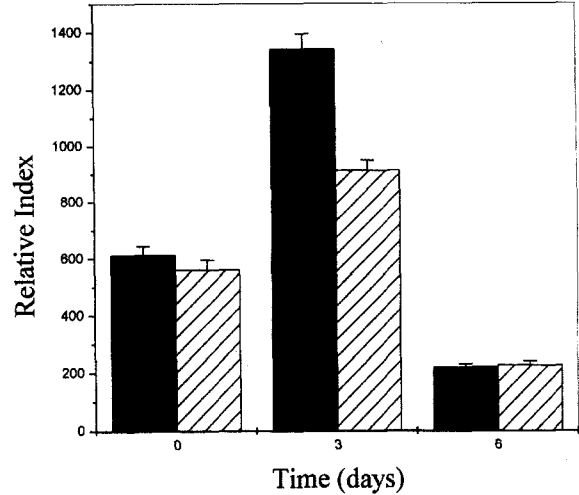


Fig. 5. Effects of sodium butyrate concentration and addition time on GFP production. Relative GFP index and specific GFP content were calculated by the following equations: Relative GFP index = $(C_3 - C_0)/3$; C_3 : specific GFP content on 3 days after sodium butyrate addition; C_0 : specific GFP content on 0 day after sodium butyrate addition; Specific GFP content = (GFP fluorescence)/(cell fresh weight); (■: 5 mM, ▨: 10 mM).

histidine 6개가 첨가되어져 있어 크기가 약간 증가된 것으로 여겨진다. 식물체에서 발현된 재조합 GFP의 분자량은 30 kDa까지 보고된 바 있다.¹⁰⁾ 이 연구 결과는 쪽 세포에서 외래 단백질의 성공적인 발현을 최초로 보여주었으며 다른 유용 단백질 발현 시스템으로서의 응용 가능성을 제시하였다.

Sodium butyrate가 세포 성장에 미치는 영향. Sodium butyrate 농도에 대한 세포 성장 및 GFP 생성의 변화를 조사하기 위하여, 먼저 접종(초기 PCV 5%) 3일 후에 5, 10, 15 및 20 mM sodium butyrate를 첨가한 후 세포의 성장 및 GFP 생성 양상을 조사하였다. Sodium butyrate는 세포의 성장에 영향을 주어 5 mM 첨가 시에는 세포 성장이 2일 정도 지연되었으며, 10 mM 첨가 시는 약 6일 정도 지연되었으나 세포 성장은 회복되었다. 반면에 15 mM 및 20 mM 첨가 시에는 세포 성장은 회복하지 못하고 정지되었다(Fig. 3). 이 실험에서 5 mM과 10 mM이 세포 성장에 저해를 주지 않는 적정 처리 농도임을 알 수 있었다. 그리고 GFP의 생성량은 세포의 성장 저해가 적은 5 mM의 농도에서 가장 높은 값을 보였다 (Fig. 4).

Sodium butyrate의 처리시기에 따른 단백질 생성량의 변화. Fig. 5에서 보는 바와 같이 세포 접종 후 3일 후에 5 mM의 sodium butyrate를 처리하는 경우가 0일째에 처리하는 경우보다 GFP의 발현율에 있어서 120% 정도 증가한 값을 보여 주었다. 세포 접종 후 3일 후에 sodium butyrate를 처리하는 경우가 0, 6일 후에 처리하는 것보다 월등히 높은 GFP 발현율을 보여 주었다. 또한 처리 농도의 경우 세포 성장의 저해가 없는 5 mM과 10 mM을 사용하여 처리한 결과 5 mM의 sodium butyrate를 3일 후에 처리하였을 때, 10 mM의 sodium butyrate를 동일한 조건에서 처리하는 경우보다 약 50% 정도의 GFP 발현 증가를 가져왔다.

지금까지의 결과에서 보듯이, sodium butyrate가 형질전환 쪽

세포에서 외래단백질인 GFP의 발현을 효과적으로 증가시키는 결과를 얻었다. 본 실험에서는 sodium butyrate에 의해 단백질 발현이 유도되는 것에 대한 정확한 기작은 알 수 없었다. 그러나 지금까지 보고된 바에 의하면, sodium butyrate가 동물세포 시스템에서 histones을 hyperacetylation하여 chromatin 구조를 변화시키고, 이러한 변화는 유전자 발현의 조절에 관련되어져 있다고 알려져 있다.^{7,8)} 비록, 식물 세포배양 시스템에서 sodium butyrate에 의한 유전자 발현의 분자 조절 기작에 관해서는 더 많은 연구가 필요하겠지만, 본 실험을 통해 식물 세포 배양 시스템에서 재조합 단백질의 발현을 조절하는데 유용한 방법으로 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

참고문헌

- Zhu, Z., Hughes, K. W., Huang, L., Sun, B., Liu, C., Li, Y., Hou, Y. and Li, X. (1994) Expression of human α -interferon cDNA in transgenic plants. *Plant Cell Tissue Org. Cult.* **36**, 197-204.
- Pen, A., Yang, M., Tie, F., Li, L., Chen, Z. and Ru, B. (1994) Expression of mouse Metallothionein-I gene confers cadmium resistance in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* **24**, 341-351.
- Mason, H. S. and Arntzen, C. J. (1995) Transgenic plants as vaccine production systems. *Tibtech.* **13**, 388-392.
- Dalsgard, K., Uttenthal, A., Jones, T. D., Xu, F., Merryweather, A., Hamilton, W. D. O., Langeveld, J. P. M., Boshuizen, R. S., Kamstrup, S., Lomonosoff, G. P., Porta, C., Vela, C., Casal, J. I., Meloen, R. H. and Rodgers, P. B. (1997) Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nature Biotechnol.* **15**, 248-252.
- Dorner, A. J., Wasley, L. C. and Kaufman, R. J. (1989) Increased synthesis of secreted proteins induces expression of glucose-regulated protein in butyrate-treated chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **264**, 20602-20607.
- Oster, T., Thioudellet, C., Chevalot, I., Masson, C., Wellman, M., Marc, A. and Sicst, G. (1993) Induction of recombinant gamma-glutamyl transferase by sodium butyrate in transfected V79 and CHO chinese hamster cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **193**, 406-412.
- Arts, J., Lansink, M., Grimbergen, J., Toet, K. H. and Kooistar, T. (1995) Stimulation of tissue-type plasminogen activator gene expression by sodium butyrate and trichostatin A in human endothelial cells involves histone acetylation. *Biochem. J.* **310**, 171-176.
- Oh, S. K. W., Vig, P., Chua, F., Teo, W. K. and Yap, M. G. S. (1993) Substantial overproduction of antibodies by applying osmotic pressure and sodium butyrate. *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 601-610.
- Pedersen, T. J. and Minocha, S. C. (1988) Effect of n-sodium butyrate on cell division in Jerusalem artichoke(*Helianthus tuberosus* L.) tuber explants cultured *in vitro*. *J. Plant Physiol.* **132**, 623-630.
- Siemerling, K. R., Golbik, R. S. and Haseloff, J. (1996) Mutation that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol.* **6**, 1653-1663.

Effect of Sodium Butyrate on GFP Expression Level in Transgenic *Polygonum tinctorium* Cells

Sung-Kil Park, Choong-Sik Chung, Jong-Jin Lee, Youn-Hyung Lee and In-Sik Chung* (*Plant Metabolism Research Center & School of Biotechnology, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea*)

Abstract: To examine the expression of foreign protein in *Polygonum tinctorium* cells, plasmid pCAMBIA1302 encoding Green Fluorescent Protein(GFP) was used to transform the cells and the expression was confirmed using Western blot analysis. When the effect of sodium butyrate on the formation of GFP was examined, cell growth was retarded at the addition of 10 mM and was stalled at more than 15 mM. The amount of GFP production was increased by 15% when 5 mM of sodium butyrate was added at three-days after inoculation as compared to at 0-day. Moreover, when sodium butyrate was added at three-days after inoculation, the amount of GFP was increased by 50% at the addition of 5 mM of sodium butyrate as compared to 10 mM.

Key words: *Polygonum tinctorium*, GFP, transgenic plant, sodium butyrate

*Corresponding author