

## 형질전환 담배 식물체에서 Glutathione Reductase 유전자의 발현

이효신 · 조진기\*

경북대학교 농과대학 동물공학과

### Expression of Glutathione Reductase Gene in Transgenic Tobacco Plant

LEE, Hyo Shin · JO, Jin Ki\*

Department of Animal Science and Biotechnology, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea

**ABSTRACT** BcGR1 gene encoding cytosolic glutathione reductase of Chinese cabbage (*Brassica campestris* var. *Pekinensis* cv. Seoul) was placed under the control of the CaMV 35S promoter and introduced into tobacco (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun) via *Agrobacterium*-mediated transformation. T<sub>0</sub> 32 independent plants transformed with BcGR1 gene were selected with kanamycin and they were confirmed by polymerase chain reaction (PCR) and Southern blot analysis. Northern blot analysis revealed that the constitutive expression of BcGR1 gene and there was no relationship between the copy number of introduced gene and the levels of BcGR1 transcripts.

**Key words:** *Agrobacterium*, glutathione reductase, oxidative stress, transformation

#### 서 론

Glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2)는 대부분의 호기성 생물에 존재하며, 전자공여체로 NADPH를 사용하여 산화형의 glutathione (glutathione disulfide, GSSG)을 환원형의 glutathione (GSH)으로 환원시키는 효소이다. GSH는 대부분의 식물에서 대표적인 저분자량 thiol compound로서 (Alscher 1989), sulfur transport, protein disulfide reductant, 제조제와 같은 xenobiotic의 해독 및 유전자 발현 조절 등의 기능을 가지는 필수대사산물이며 (Foyer et al. 1997), 일부 콩과식물에서는 homogluthathione ( $\gamma$ -glutamyl-cysteinyl alanine)이 부분적 또는 전적으로 GSH의 기능을 대신한다 (Klapheck 1988). 또한 GSH와 GR은 ascorbate-glutathione cycle에 참여하여 식물세포 내에서 세포막 분해, 단백질 분해, DNA 합성 억제, 광합성 억제, 엽록체 파괴 등을 유발하여 생체에 심각한 피해를 일으키는 oxidative stress인 오존, 고온과 저온, 방사선, 중금속, 건조, 이산화황과 같은 가스상의 오염물질, 제조제, 물리적 스트레스 그리고 병원균 감염 등의 피해로부터 식물체를 보호한다 (Foyer and Mullineaux 1994;

Levine et al. 1994; Foyer et al. 1997).

최근, GR의 발현 증가와 oxidative stress에 대한 내성과의 관계를 분석하기 위하여 식물 형질전환시스템을 이용한 이 유전자의 기능 해명에 관한 많은 연구가 수행되고 있다. 그 결과, 대장균 유래의 GR (*gor*) 유전자가 도입된 형질전환 담배의 내성 분석 결과 1  $\mu$ M 수준의 paraquat에 대한 가시적 피해가 감소되었다고 보고되었으며 (Aono et al. 1991, Foyer et al. 1991), *gor* 유전자에 chloroplast transit peptide를 연결하여 형질전환된 담배의 내성 분석 결과, sulfur dioxide와 paraquat (1.6  $\mu$ M)에 대한 내성이 증가하였다고 보고되었다 (Aono et al. 1995). 이들의 연구가 원핵생물인 대장균 유래의 유전자를 이용한 반면에, 완두 유래의 chloroplastic GR 유전자를 담배에 도입하여 내성의 증가를 확인한 결과, paraquat에 대한 내성이 Aono 등 (1991, 1995)의 보고에 비해 10배 이상의 증가를 나타내었다고 보고되었다 (Broadbent et al. 1995). 이러한 결과는 oxidative stress에 내성을 가지는 식물체의 구축에 있어 원핵생물보다는 진핵생물인 고등식물 유래의 유전자가 더 효율적임을 의미한다. 그러나, GR에 관한 최근의 연구결과를 종합하면, 식물세포는 chloroplastic isoform과 cytosolic isoform을 암호화하는 GR 유전자를 각각 하나씩 가지고 있는 것으로 추정되고 있으며 (Serrano and Llobell 1993), chloroplastic isoform의 GR은 엽록체에서의 광

\*Corresponding author. Tel 053-950-5756 Fax 053-950-6750  
E-mail jkjo@knu.ac.kr

합성에 의해 생성된 활성산소의 해독을 위한 지속적 발현의 필요성에 기인하여 그 발현이 외부의 stress에 크게 영향을 받지 않는 것으로 밝혀졌다 (Edwards et al. 1994).

따라서, 본 연구에서는 오존, 저온, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 paraquat 등의 stress에 의해 발현이 증가하는 것으로 밝혀진 배추 유래의 cytosolic GR 유전자 (BcGR1, Lee et al. 1998)의 지속적 발현에 따른 oxidative stress에 대한 내성과의 관계를 규명하고자 형질전환 담배 식물체를 이용하여 그 발현을 조사하였다.

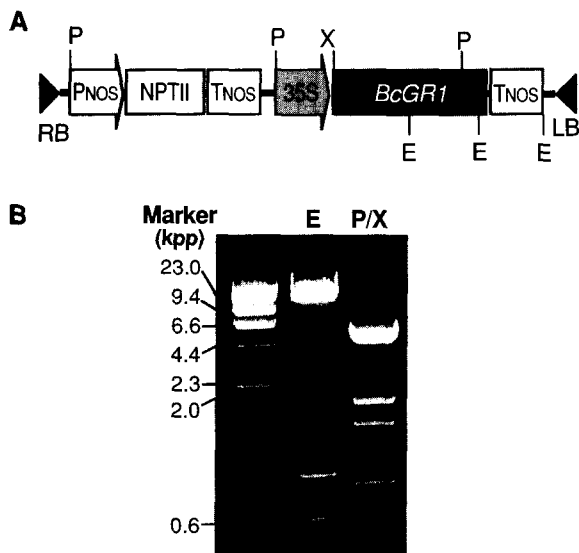
## 재료 및 방법

### 식물재료

식물재료는 담배 (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun)를 사용하였으며, 25°C, 16 시간, 350  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$  광조건에서 성장시켰다.

### 발현 vector의 구축과 식물체 형질전환

Glutathione reductase 유전자 (BcGR1)는 배추 (*Brassica campestris* var. *Pekinensis* cv. Seoul)로부터 분리한 full-length cDNA를 사용하였다 (Lee et al. 1998). 식물체 형질전환용 binary vector인 pBKS1-1의 *Sma*I 부위에 제한효소 *Sma*I과 *Xho*I으로 절단 후 end-filling한 BcGR1 cDNA를 삽입하였다 (Figure 1). 구축된 발현 vector인 pBKS-GR1을 direct *Agrobacterium* transformation 방법으로 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입한 다음, leaf disc 형질전환법 (Horsch et al. 1978)으로 담배에 도입하였다.



**Figure 1.** Construction of the expression vector, pBKS-GR1. The BcGR1 cDNA was placed under the control of the CaMV 35S promoter. A, Physical map of pBKS-GR1. Restriction site of *Pst*I (P), *Eco*RI (E), and *Xba*I (X) are shown. B, Agarose gel electrophoresis of pBKS-GR1 DNA after enzyme digestion.

### T<sub>1</sub> 세대의 kanamycin 저항성 검정

PCR 및 Southern blot 분석을 통하여 형질전환이 확인된 담배 37개체의 T<sub>0</sub> 식물체로부터 종자를 수확하였다. 채종된 종자를 200 mg/L의 kanamycin이 첨가된 MS 배지에 파종하여 배양 14일 후에 저항성 개체와 감수성 개체의 분리비를  $\chi^2$  검정에 준하여 추정하였다.

### PCR 및 Southern blot 분석

재분화된 식물체의 잎으로부터 Murray와 Thompson의 방법 (1980)에 따라 genomic DNA를 분리한 다음, PCR 및 Southern blot 분석을 실시하였다. PCR 분석에 사용된 primer는 2종으로 예상되는 증폭산물이 0.3 kbp인 정방향 primer (35Ss1; 5'-TTCAACAAAGGGTAATATCCGG-3')와 역방향 primer (35Sas1; 5'-CGAAGGATA GTGGGATTGTGC-3') 그리고 0.6 kbp인 정방향 primer (35Ss2; 5'-CCCACCCACGAGG AGCATC-3')와 역방향 primer (GRas1; 5'-CTAGCATCCTCAAGTTCACC-3')이며, PCR 산물은 1.2% agarose gel 전기영동으로 확인하였다. Southern blot 분석을 위하여 genomic DNA를 제한효소 *Xba*I과 *Pst*I으로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동한 다음, capillary transfer 방법으로 nylon membrane에 전이시켰다. Membrane은 5×SSC, 5×Denhardt's solution, 0.1% SDS, 50 mM Na-Pi (pH 6.5), 0.1 mg/mL denatured salmon sperm DNA, 50% dextran sulfate가 첨가된 용액에서 3시간 (42°C) 동안 prehybridization 한 다음, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP로 표식된 BcGR1 cDNA를 첨가하여 12시간 이상 hybridization하였다.

### Northern blot 분석

형질전환이 확인된 식물체의 잎으로부터 guanidine thiocyanate 법 (McGookin 1984)으로 total RNA를 분리하였다. 분리한 total RNA를 1.2% formaldehyde agarose gel에 전기영동한 다음, capillary transfer 방법으로 nylon membrane에 전이시켰다. Prehybridization 용액에 50% dextran sulfate를 첨가하지 않는 것을 제외하고는 Southern blot 분석에서와 동일한 방법으로 실시하였다.

## 결과 및 고찰

배추로부터 분리한 cytosolic GR cDNA (BcGR1)를 식물체 형질전환용 binary vector인 pBKS1-1의 CaMV 35S promoter의 하류에 연결하여 재조합된 vector, pBKS-GR1을 구축한 다음, *A. tumefaciens* LBA4404에 도입하여 담배의 형질전환에 사용하였다. Kanamycin이 첨가된 재분화배지

에서 선발된 담배 식물체는 환경 스트레스 내성 관련 유전자의 형질전환 시에 빈번하게 나타나는 것으로 알려진 위조현상과 같은 표현형상의 뚜렷한 변이 (Lagrimini et al. 1990)는 나타나지 않았다.

재분화된 식물체의 genome에 BcGR1 유전자가 도입되었는지를 확인하기 위하여, PCR 및 Southern blot 분석을 실시하였다. 형질전환 식물체로부터 분리한 genomic DNA를 template로 하여 PCR 증폭을 실시한 결과, Figure 2B에서 나타낸 바와 같이 35SSs1과 35Sas1 primer 조합에서 예상크기와 동일한 0.3 kbp의 35S promoter 영역의 PCR 증폭산물을 확인하였으며, 35Ss2와 GRas1 primer 조합에서는 35S promoter-BcGR1의 0.6 kbp의 특이적 증폭산물을 확인하였다.

또한 genomic DNA를 제한효소 *Xba*I과 *Pst*I으로 절단한 후, Southern blot 분석을 실시하여 1.5 kbp의 GR cDNA 단편의 존재를 확인하였다 (Figure 3A). 배추 유래의 BcGR1 cDNA의 크기가 1.8 kbp인 데 반하여, Southern blot 분석에서 1.5 kbp의 band가 나타난 것은 pBKS1-1에 BcGR1 cDNA의 도입과정에서 *Sma*I 부위가 없어져서 BcGR1 cDNA의 1.5 kbp 위치에 존재하는 *Pst*I 부위를 절단하였기 때문이다. PCR 증폭과 Southern blot 분석을 통하여 32개체의 형질전환체를 얻을 수 있었다.

형질전환 담배에서 도입된 BcGR1 유전자가 지속적으로 발현하고 있는지의 여부를 확인하기 위하여 Northern blot 분석을 실시한 바 (Figure 3B), wild-type에서 보이지 않는 1.8 kbp의 전사체가 모든 형질전환 식물체에서 축적되었다. 한편 wild-type 담배에서는 BcGR1 cDNA와 hybridization하는 전사체가 존재하지 않았는데, 그 이유로는 담배의 GR 유전자는 지속적으로 발현하지 않거나, 담배의 GR 유전자의 염기서열과 BcGR1 cDNA의 상동성이 낮기 때문에 hybridization

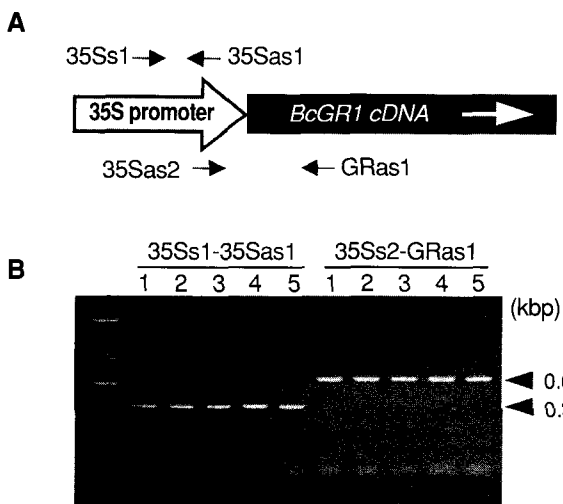
되지 않은 결과로 추측된다. 이러한 결과는 배추의 BcGR1에 대한 항체를 이용한 immunoblot 분석의 결과와도 완전히 일치하였다 (결과 미제시). 따라서 wild-type에서 GR의 전사체가 관찰되지 않았던 이유는, 담배의 GR 유전자 자체가 발현되지 않는다고보다는 배추와 담배의 GR 유전자간의 상동성이 낮기 때문으로 추정된다.

PCR 및 Southern blot 분석을 통하여 형질전환이 확인된 개체 가운데 T<sub>0</sub> 세대의 32계통의 종자를 채종하여 200 mg/L의 kanamycin이 첨가된 MS 배지에 배양하여 저항성 정도를 조사하였다 (Figure 4). 그 결과, 배지오염과 발아불량 등으로 조사가 불가능하였던 5계통을 제외한 27계통 가운데, 12계통은 15:1 이상의 분리비를 나타내어 2 copy 이상의 유전자가 삽입된 것으로 나타났으며, 15계통은 3:1의 이론적 분리비에 적합하게 나타나 1 copy의 BcGR1 유전자가 삽입된 것으로 분석되었다.

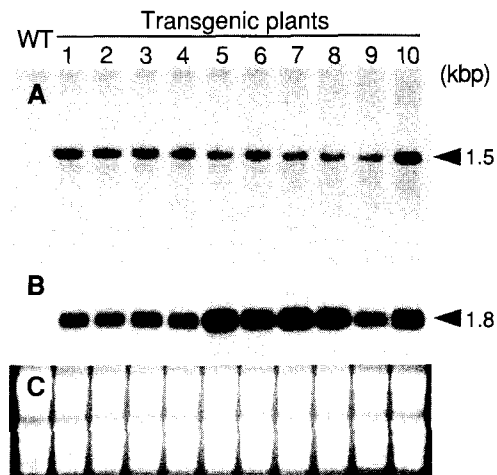
Northern blot 분석을 통하여 나타난 계통별 발현량과 kanamycin 감수성 분석결과 나타난 도입된 유전자의 copy number를 비교한 결과, 삽입된 GR 유전자의 copy number와 발현량 사이에는 정적 상관관계가 지켜지지 않는 것으로 나타났다. 일반적으로 형질전환 식물체의 계통 간의 차이는 도입된 유전자의 삽입된 위치, copy number 및 체세포배 변이 등의 요인이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있다 (Larkin and Scowcroft 1981; Kuhlemeier et al. 1987; Feldmann 1991).

적 요

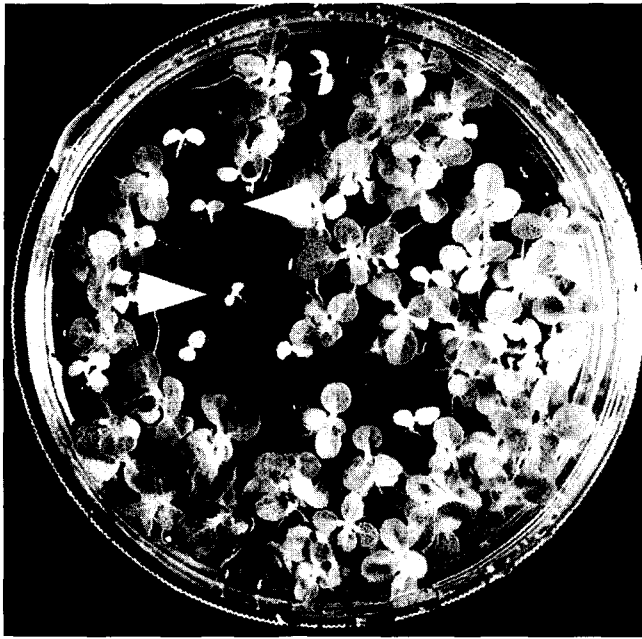
배추 유래의 cytosolic glutathione reductase 유전자



**Figure 2.** Identification of transformation of regenerated tobacco plants by genomic PCR amplification. A, Schematic diagram for PCR amplification of CaMV 35S promoter and BcGR1 cDNA fragments for identification of transformation. B, Agarose gel electrophoresis of PCR products. Numbers indicate independent transgenic lines.



**Figure 3.** Southern and Northern blot analyses of transgenic tobacco plants. A, Southern blot analysis. Genomic DNA (15 µg) from wild-type (WT) and transgenic plants was digested with *Xba*I and *Pst*I and was hybridized with the <sup>32</sup>P-labeled BcGR1 cDNA. B, Northern blot analysis. Total RNA was isolated from the leaves of wild-type (WT) and transformed tobacco plants. Numbers indicate independent transgenic lines. C, Ethidium-bromide staining gel of Figure 3B.



**Figure 4.** Selection of transgenic tobacco plants on MS medium containing kanamycin (200 mg/L). Arrowheads indicate non-transformed albino seedlings.

(BcGR1)의 지속적 발현과 형질전환 식물체의 oxidative stress에 대한 내성과의 관계를 분석하기 위하여, BcGR1 유전자를 CaMV 35S promoter의 하류에 연결한 다음, 담배에 형질전환하였다. PCR 및 Southern blot 분석을 통하여 BcGR1 유전자가 정상적으로 삽입된 32 계통의 T<sub>0</sub> 식물체를 선발하였다. Northern blot 분석 결과, 도입된 유전자가 형질전환 식물체 내에서 항상적으로 발현된다는 것을 확인하였으며, 도입 유전자의 copy number와 발현량 사이에는 정의 상관관계를 보이지 않았다.

사사 - 본 연구는 한국과학재단 특정기초연구비 지원 (1999-2-209-003-3) 및 2000년도 경북대학교 Post-Doc. 연구수지에 의하여 수행되었음.

## 인용문헌

Alscher RG (1989) Biosynthesis and antioxidant function of glutathione in plants. *Physiol Plant* **77**:457-464

Aono M, Saji H, Fujiyama K, Sugita M, Kondo N, Tanaka K (1995) Decrease in activity of glutathione reductase enhances paraquat sensitivity in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol* **107**:645-648

Aono M, Kubo A, Saji H, Natori T, Tanaka K, Kondo N (1991) Resistance to active oxygen toxicity of transgenic *Nicotiana tabacum* that expresses the gene for glutathione reductase from *E. coli*. *Plant Cell Physiol* **32**:691-697

Broadbent P, Creissen GP, Kular B, Wellburn AR, Mullineaux PM (1995) Oxidative stress responses in transgenic tobacco containing altered levels of glutathione reductase activity. *Plant J* **8**:247-255

Edwards EA, Enard C, Creissen GP, Mullineaux PM (1994) Synthesis and properties of glutathione reductase in stressed pea. *Planta* **192**:137-143

Feldmann KA (1991) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant J* **1**:71-82

Foyer CH, Lelanrais M, Galap C, Kunert KJ (1991) Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiol* **97**:863-872

Foyer CH, Mullineaux PM (1994) Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants. CRC press, Boca Raton, FL. pp. 343-364

Foyer CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM (1997) Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* **100**:241-254

Horsch RB, Fry J, Hoffmann N, Neidermeyer J, Rogers SG, Fraley RT (1978) Leaf disc transformation. In *Plant Molecular Biology: Manual*. Gelvin S. B. Ed., Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, **A5**:1-9

Klapheck S (1988) Homoglutathione: isolation, quantification and occurrence in legumes. *Physiol Plant* **74**:727

Kuhlemeier C, Fluhr R, Green PJ, Chua NH (1987) Sequences in the pea rbcS-3A gene have homology to constitutive mammalian enhancers but function as negative regulatory elements. *Genes Dev* **1**:247-55

Lagrini LM, Bradford S, Rothstein S (1990) Peroxidase-induced wilting in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **2**:7-18

Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation-a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* **60**:197-214

Lee HS, Son DY, Jo JK (1998) Molecular cloning and characterization of the gene encoding glutathione reductase in *Brassica campestris*. *Biochim Biophys Acta* **1395**:309-314

Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**:583-593

McGookin R (1984) RNA extraction by the guanidine thiocyanate procedure. In: Walker JM (ed), *Methods in Molecular Biology*. Vol. 2, Humana Press, New Jersey, pp. 113-116

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**:4321-4325

Serrano A, Llobell A (1993) Occurrence of two isoforms of glutathione reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **190**:199-205