

철 저장단백질 관련 Ferritin 유전자를 이용한 상추의 형질전환

김성하 · 노일섭¹ · 최장선 · 강권규^{*}
한경대학교 원예학과, ¹순천대학교 원예학과

Transformation of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Using Iron Storage Protein Ferritin Gene

KIM, Seong Ha · NOU, Ill Sup¹ · CHOI, Chang Sun · KANG, Kwon Kyoo^{*}

Department of Horticulture, Hankyong National University, Ansung, 456-749, Korea

¹School of Plant Science, College of Agriculture and Life Science, Suncheon National University, Suncheon, 540-742, Korea

ABSTRACT Explants of *Lactuca sativa* cultivar, chungchima, were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, EHA101 strains containing *nptII* gene and ferritin gene encoding iron storage protein from soybean for transformation. Through initial selection of regenerated explants by culturing on a kanamycin and carbenicillin containing MS medium, multiple shoots were obtained after 2 months of culture. For a complementary step of selection, putative transgenic shoots were transferred to 1/2 MS basal medium supplemented with 100 mg/L kanamycin and 500 mg/L carbenicillin. The selected shoots were tested with PCR analysis using *nptII*, ferritin specific primers whether ferritin gene was introduced to genome of the plants. These results confirmed that produced the specific PCR bands in the putative transgenic lines. Additionally the Northern blot showed that transcripts of ferritin gene were detected in mature leaf of the transgenic lines. These results suggest that ferritin gene be successfully integrated and transcribed in the putative transgenic lettuce plants.

Key words: Ferritin, gene expression, iron storage protein, *Lactuca sativa*, transformation

서 론

철은 식물체 중에서 전자운반과 호흡효소 및 단백질 구성 성분이 되며 질산과 황산의 환원작용, N₂의 동화, NADP의 생성에 관여한다 (Branton and Jacobson 1962). 또한 철은 엽록소 형성에 관여하고 효소의 구성성분 및 촉매역할을 하며 단백질 합성이나 뿌리의 생장에 관여하고 있다. 식물체 내에서 대부분의 철은 ferric phosphoprotein의 형태 (Fe⁺³) 이며, ferrous (Fe⁺²) 이온의 형태는 물질대사 과정에서 활성형태로 작용하고 있다 (Blackwell et al. 1969). 식물체 중 인산 함량이 높으면 Fe의 흡수를 감소시키며 보통 식물에서는 P : Fe의 비가 29 : 1 정도로 나타나며, K는 Fe의 흡수와 이동을 촉

진시키고 N은 생육촉진과 함께 Fe의 결핍을 불러일으킨다. 철은 식물체에 있어서 feretoxin 등의 기능분자로서 이용되는 것 이외에 ferritin이라고 불리며, 내부에는 철을 저장하고 있는 단백질로 알려져 있으며, 거의 모든 생물에 넓게 존재한다. Ferritin은 분자량이 약 450,000의 거대 단백질이며, 하나의 분자당 최고 4,500개의 철 원자를 저장할 수 있다. (Dickey et al. 1988; Benfey and Chun 1989) 지금까지 식물 ferritin 관련 유전자의 구조분석은 콩 (Lescure et al. 1991), 강낭콩 (Spence et al. 1991), 완두 (Lobreaux et al. 1991), 고추 (Kim et al. 1998), 옥수수 (Lobreaux et al. 1992) 등 많은 식물체에서 알려져 있으며, 이들간의 아미노산 수준에서 50~60%의 상동성을 보였다. 또한 형질전환에 관한 연구는 자엽 절편을 재료로 *Agrobacterium*과의 공동 배양법으로 양상추 (South Bay) (Torres et al. 1993) 및 잎상추 (청축면, 청치마) (Choi et al. 1994)에 β -glucuronidase 유전자 (Chung et al. 1998b), 오존유도성 유전자, glutathion reductase (Chung et

*Corresponding author. Tel 031-670-5104
E-mail kykang@hnu.hankyong.ac.kr

al. 1998a)의 도입이 보고되었다.

국민소득 증대에 의해 식생활의 변화로 인한 곡류의 소비가 둔화되고 육류의 소비가 증가되고 있는 현시점에서 상추는 겉절이, 쌈 등으로 가공을 하지 않고 바로 먹을 수 있는 채소로 그 소비량의 증가가 예상된다. 장래의 농업생산의 중요한 역할을 담당하게 될 야채공장은 온도 및 광조건의 제어에 의한 생산성 향상 및 안정화에 있다고 할 수 있다. 기존 재배 방식과의 차이로 외부환경 조건의 차단과 더불어 수경 방식을 사용하기 때문에 무농약, 청정한 야채의 연중 생산이 가능하다. 이와 같은 야채공장에서 재배를 목표로 하는 품종이 아직 육성되지 못하고 있으며, 기존 토양에서 재배되고 있는 품종을 사용하고 있는 실정이다. 따라서 야채공장의 특징인 물리적 환경 및 식물영양학적 제어기술의 진보에 대응한 식물의 조기육성이 기대되고 있다.

현재 야채공장에서 재배되고 있는 것은 시금치 및 상추 등이 주로 이용되고 있으며, 이들 중 상추는 수경재배에 적합하여 야채공장에서 생산량이 많고, 시판에서도 샐러드용으로 수요가 급증하고 있는 실정이다. 상추는 원래 시금치에 비교할 때 철의 함량이 낮다고 알려져 있으며, 인체에 해로운 성분이 다량으로 포함되어 있지 않기 때문에 품종개발을 통해 철의 함량을 높인다면 철을 많이 포함한 샐러드용 야채로서 소비자에게 새로운 이미지를 가진 신품종으로서 큰 효과를 가져올 수 있다.

따라서 본 실험은 날로 그 소비가 증가하는 대표적인 샐러드용 채소인 상추에 철 저장 관련 ferritin 유전자를 도입하여 고철 함량 상추를 선발하고자 하였다.

재료 및 방법

식물 재료

상추 (*Lactuca sativa* L. cv. Green Skirt. 청치마) 종자를 몇 방울의 Tween 20액을 혼합시킨 1%의 차아염소산나트륨 (NaOCl) 용액에 15분간 표면살균 후, 멸균수로 3~5회 수세하여, 무기염류농도가 1/2로 조절된 MS배지 (1/2MS)에 호르몬을 첨가하지 않은 고체배지에 치상하였다. 발아는 22°C, 16시간 일장의 광 조건하에서 실시하였다. 발아 후 7~10일 된 유식물체의 잎절편을 5×5 mm 크기로 절단하여 *Agrobacterium*과의 공동배양에 사용하였다.

유전자 및 형질전환용 Vector 구축

본 실험에 사용한 ferritin 유전자는 콩 유래 ferritin cDNA를 RT-PCR에 의해 증폭한 후, TA-cloning vector (Promega easy vector)에 cloning하여 사용하였다. 제한효소 *Xba* I과 *Sac* I으로 소화하여 ferritin 단편을 회수한 후, *nptII*를 포함

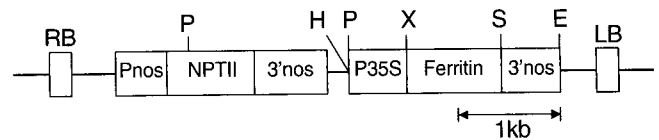


Figure 1. Schematic diagram of the expression vector, pBI 121-ferritin, used for the transformation of lettuce. The ferritin cDNA was placed under the control of the CaMV 35S promoter. P: *Pst* I, H: *Hind* III, E: *Eco*R I, X: *Xba* I, S: *Sac* I

한 단편과 ligase에 의해 연결하여 binary vector pBI121-ferritin을 구축하였다 (Figure 1). 제조조합한 Ti-plasmid를 *A. tumefaciens* LBA4404와 EHA 101에 각각 도입하여, 이를 실험에 사용하였다. 공시 균주의 배양은 50 mg/L kanamycine이 첨가된 AB 액체배지에 접종한 후, 1~2일 동안 28°C에서 배양하였다.

형질전환

공동배양은 대수증식기까지 증식시킨 *Agrobacterium* 배양액을 멸균수로 10배 희석하여 잎절편과 5분간 침적한 후, 여분의 현탁액을 제거하기 위하여 미리 준비한 멸균 여지를 이용하여 건조시킨 후, 공동배양배지 (MS salt + 0.1 mg/L NAA + 0.1 mg/L BA)에서 2일간 암배양하였다. 본 실험에 사용된 공시 균주는 표지유전자로서 kanamycin 저항성을 가지므로 형질전환체의 선별은 MS 기본배지에 100 mg/L kanamycin과 균의 제거를 위해 500 mg/L carbenicillin을 첨가한 재분화용 선별배지에서 4~6주간 실시하였다. 선별배지에서 살아남은 신프는 1/2 MS 기본배지, 100 mg/L kanamycin과 250 mg/L carbenicillin이 첨가된 rooting 배지로 계대하여 완전한 식물체로 재분화시켰으며, 이후 이를 이용하여 형질전환체의 특성을 검토하였다.

형질전환체의 특성 검증

형질전환체로 추정되는 식물체의 유전자 도입 여부를 확인하기 위하여 재분화된 식물체의 잎을 이용하여 MS salt + 0.1 mg/L NAA + 0.1 mg/L BA과 100 mg/L kanamycin 배지에서 callus의 유도 여부를 확인한 후, 이들 잎을 이용하여 PCR 반응을 수행하였다. 식물체의 DNA 추출은 잎 조직을 이용하여 CTAB법에 따라 수행하여 최종적으로 50 µl 멸균수로 녹여 사용하였다. DNA 농도는 spectrophotometer (Pharmascia Ultrospec 3000)으로 정량하여 사용하였다. PCR 반응액 (10 mM Tris-HCl (pH8.3), 40 mM KCl, 1.2 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0.01% Gelatin), 1 unit의 Taq. polymerase (Takara)를 이용하여 전 반응액을 50 µl로 하였다. 표지 유전자인 *nptII* 유전자를 확인하고자 특이적인 염기 배열을 가진 forward primer: 5'-TTGTCAAGACCGACC

TGTCC-3'과 reverse primer: 5'-ACCGTAAAGCACGAG GAA-3'를 제작하여 수행하였다. (Yang et al. 1997) 또한 콩 유래의 ferritin 유전자 상에 존재하는 염기배열을 가진 forward primer: 5'-AGTGAGGAAGAAAGAGAGCA-3'과 reverse primer: 5'-AAAGTGCCGAACACCGTG-3'을 제작하여 수행하였다. (Kim et al. 1998) PCR 반응 조건은 첫 DNA 변성을 94°C에서 3분간, 그 후의 DNA 변성을 94°C에서 1분간, annealing은 55°C에서 2분간, 그리고 DNA 합성을 72°C에서 3분간, 35cycle을 실행하였으며, 최종 72°C에서 10분간 신장반응을 실시하였다. PCR 반응이 끝난 뒤 생성된 PCR산물은 1% agarose gel에서 전기영동 후, EtBr 염색을 하여 UV하에서 확인하였다. 또한 도입된 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여 PCR반응에 의해 확인된 형질전환체의 잎 조직으로부터 Guanidium 방법에 의하여 total RNA를 추출하여 northern hybridization을 행하였다. 이때 Probe의 labelling은 PCR DIG labelling mix kit (Boehringer Mannheim)을 이용하였다. Prehybridization은 50% formamide, 5×SSC, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1% sodiumpyrophosphate, 1% SDS, 0.2% PVP, 0.2% Ficoll, 5 mM EDTA 용액에 68°C에서 4시간 행하였다. 그리고 Hybridization은 probe를 첨가한 prehybridization 용액에서 68°C에서 12시간 수행하였다. Filter는 2×SSC, 0.1% SDS 용액에 15분간 2번 닦은 후, 0.1×SSC, 0.1% SDS 용액에서 15분간 두 번 닦은 후, AMPPD에 노출시켜, Kodak x-ray 필름에 시간별로 감광하여 밴드화하였다.

결과 및 고찰

형질전환체 육성

상추 잎 절편은 콩 유래 철저장 단백질 관련 ferritin 유전자와 표지유전자로서 kanamycin에 저항성이 있는 *nptII* 유전자를 가지는 식물 발현용 binary 벡터 pBI 121-ferritin을 가지고 있는 *Agrobacterium* LBA4404, EHA101균주와 공동배양한 후, 항생제 kanamycin이 첨가된 선발배지에 치상하여 선발하였다. 빠른 개체에서는 배양 30일 후에 부정아의 형성을 볼 수 있었으며, 계대배양 후, 부정아를 잘라 식물생장 호르몬이 첨가하지 않은 배지에 치상하여 발근을 유도하였다 (Figure 2). 배양개시 후 약 2개월 정도에 순화 가능한 식물체로 성장하였다 (Figure 2). 또한 *Agrobacterium* 숙주에 따라 유전자 도입률을 조사한 결과 숙주 균주에 따라 형질전환율의 차이를 보였으며, LBA4404 균주에서 형질전환 개체수는 조사한 식물체 중 12~20% 내외로 나타난 반면, EHA101 균주를 사용하였을 때는 40% 내외로 높게 나타났다 (Table 1).

Table 1. Number of inoculated tissue with *A. tumefaciens* regenerated plants and transgenic plant in Lettuce.

Strains	Number of		
	Inoculated tissues	Regeneration plants	Transgenic plants
EHA101	220	40	18
LBA4404	120	15	3

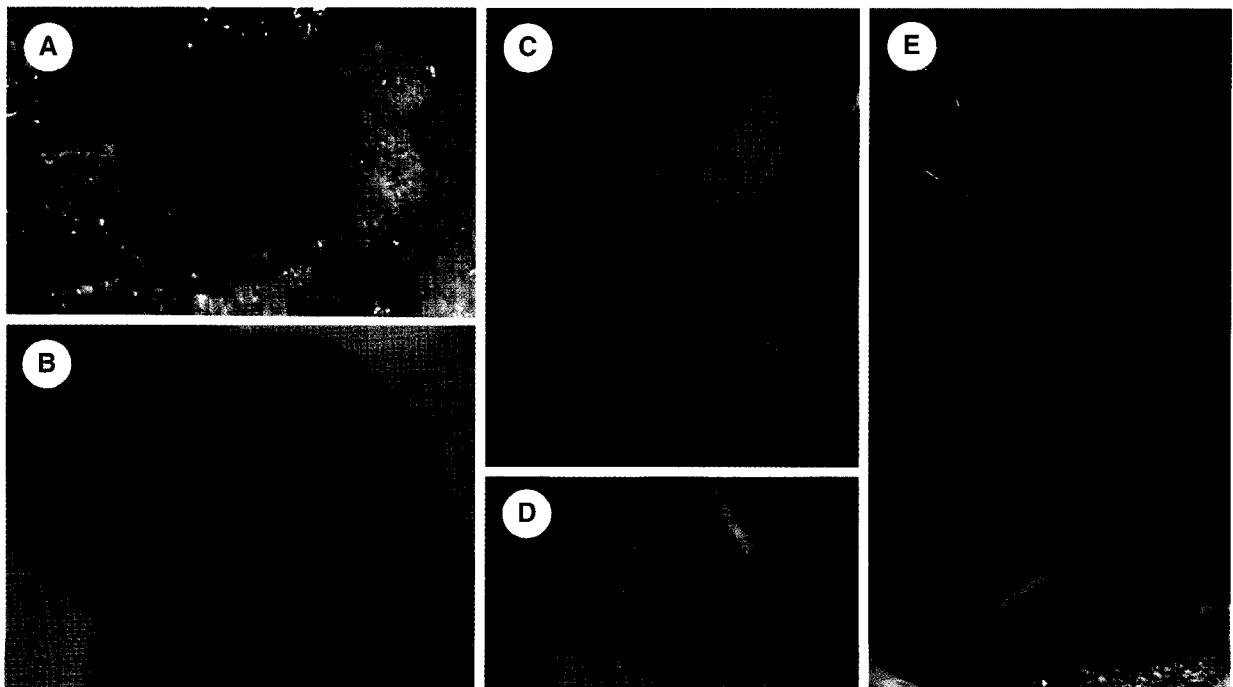


Figure 2. Differentiation of shoots from lettuce leaf tissues inoculation with *A. tumefaciens* containing pBI 121-ferritin vector. Plant transformations (A, B), and regeneration plants (C, D, E) on the selection medium containing 100 mg/L kanamycin.

형질전환체의 특성 검증

Kanamycin 선발배지에서 생존하여 형질전환체로 추정되는 식물체를 온실에서 순화시킨 다음 잎을 절취하여 Kanamycin 100 mg/L과 2, 4-D 1 mg/L를 포함한 MS기본배지에 치상하여 내성 정도를 조사하였다 (Figure 3). 배양 3주 후, 형질전환된 상추 잎은 kanamycin이 첨가한 배지에서도 짙은 녹색의 캘러스가 생성된 반면에 형질전환되지 않은 대조구의 잎은 고사하였다. 일반적으로 kanamycin을 선발표지 인자로 이용하여 형질전환 식물체가 kanamycin 내성을 갖는다는 것은 복잡한 분자수준의 유전분석 이전에 이차적으로 전환여부를 판단할 수 있는 수단으로 유용하게 활용되어지고 있는 것으로 판단된다. 따라서 재분화된 형질전환체에서 *nptII* 유전자가 발현하고 있음을 시사한다. 더 정확한 분자 수준의 유전분석을 하기 위하여 선발배지에서 살아남은 식물체와 정상적인 식물체의 total DNA를 추출하여 표지유전자인 *nptII* 유전자를 증폭하도록 제조된 primer를 이용하여 PCR반응을 실시하였다. 반응결과 정상적인 대조식물체는 *nptII* 유전자의 단편이 증폭되지 않았으나 형질전환체에서는 모두 *nptII* 유전자의 단편이 증폭되었다 (Figure 4).

한편 PCR 반응에 의해 *nptII* 유전자가 확인된 식물체로부터 철저장 단백질 관련 ferritin 유전자의 도입 여부를 확인하고자 ferritin 유전자단편을 증폭하도록 제조된 primer를 이용하여 PCR 반응을 실시한 결과 대조식물체로 사용한 정상적인 식물체에서는 특이밴드가 형성되지 않았으나, 조사한 모든 형질전환체에서 증폭 산물을 확인할 수 있었다 (Figure 4). 이와 같은 결과는 선발된 상추 식물체에서 도입하고자 하는 철저장 관련 ferritin 유전자가 성공적으로 도입되었음을 나타내었다.

따라서 도입된 ferritin 유전자가 상추 잎조직에서 어느 정도로 발현하고 있는지를 알기위하여 total RNA를 추출하여 northern hybridization을 수행하였다. 그 결과 도입유전자가 mRNA level에서 발현되는 것을 확인하였다 (Figure 5). 개체 간의 발현량의 차는 보였으나, 조사한 형질전환체에서 안정적으로 발현하고 있는 것을 확인하였다. 본 연구에서 *Agrobacterium* 균주에 따라 형질전환율은 약간 다르게 나타났으나, kanamycin에서 선발하여 얻어진 개체의 모두가 외래유전자를 보유하고 있는 것으로부터 상추의 형질전환 방법을 확립할 수 있었다. 이전의 상추 형질전환 연구로는 형질전환체의 개발이 주목적이었으며 도입한 유전자가 선발하기 위한 항생물질 내성유전자 및 promoter 기능을 해석하기 위한 reporter 유전자 등이었다 (Torres et al. 1993; Choi et al. 1994; Chung et al. 1998b; Richard et al. 1987). 그러나 최근 들어 실제 농업에서 필요한 형질을 개량할 목적으로 유전자를 도입한 예는 오존유도성 유전자, glutathion reductase (Chung et al. 1998a) 등에 불과하며, 다른 식물에서는 화색제어 유전자 및 내병·내충성 유전자, 광합성 기능을 증강하기

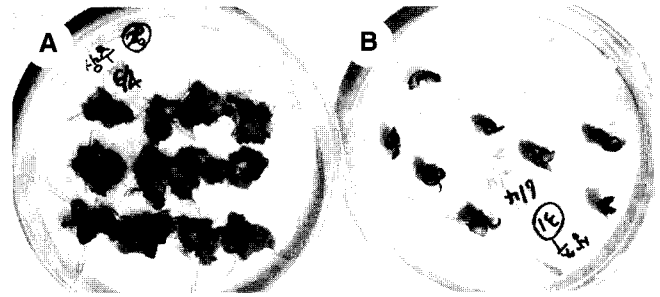


Figure 3. Callus formation of R1 generation lettuce leaves in MS medium containing 100 mg/L kanamycin and 1mg/L 2,4-D. A, Transformant; B, non-transformant.



Figure 4. Amplification of ferritin gene and NPTII gene in putative transgenic lettuce plants by PCR (A, B; normal plant, 1-10; putative transgenic plants).

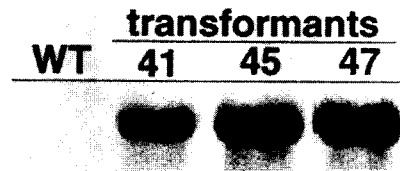


Figure 5. Northern blot analysis of the ferritin gene transcripts in transformed plant lines. Total RNA (40 µg) was isolated from wild type (WT) and transformants (41, 45, 47 line).

위한 유전자 등 상당수가 보고되고 있는 실정이다. 따라서 철저장단백질 관련 ferritin 유전자를 상추 세포 내의 도입은 새로운 성분에 대한 분자육종의 가능성을 시사한다.

인용문헌

Barton R (1964) Electron microscope studies on the uptake of ferritin by plant roots. *Experimental Cell Research* 36:432-434
 Benfey PN, Chun NH (1989) Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244:174-181
 Blackwell SJ, Laetsch WM, Hyde BB (1969) Development of chloroplast fine structure in aspen tissue culture. *Amer J Bot* 56: 457-463
 Branton D, Jacobson L (1962) Iron localization in pea plants. *Plant Physiol.* 37:546-551
 Choi Uo, Yang Ms, Kim MS, Eun JS, Kim KS (1994) Genetic

- transformation of lettuce (*Lactuca sativar* L.) with *Agrobacterium tumefaciens*. Kor J Plant Tiss Cult **21**:55-58
- Chung JD, Kim CK, Jo JK** (1998a) Expression of chinese cabbage glutathione reductase gene in lettuce (*Lactuca sativar* L.). Kor J Plant Tiss Cult **25**:267-271
- Chung JD, Kim CK, Kim KM** (1998b) Expression of glucuronidase (GUS) gene in transgenic lettuce (*Lactuca sativar* L.) and its progeny analysis. Kor J Plant Tiss Cult **25**:225-229
- Crichton RR** (1990) Proteins of iron storage and transport. Adv Protein Chem **40**:281-353 (1990)
- Dickey LF, Wang YH, Shull GE, Wortman IA, Theil EC** (1988) The importance of the 3' untranslated region in the translation control of ferritin mRNA. J Biol Chem **263**:3071-3074
- Kim YH, Lee YO, Nou IS, Kang HW, Kameya T, Saito T, Kang KK** (1998) Isolation and characterization of a cDNA(Fp1) Encoding the iron storage protein in red pepper (*Capsicum annuum* L.). Plant Res **1**(1):6-10
- Lescure AM, proudhom D, Pesey H, Ragland M, Theil EC, Briat JF** (1991) Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures. Proc Natl Acad Sci USA **88**:8222-8226
- Lobreaux S, Massenet O, Briat JF** (1992) Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. Plant Mol Biol **19**:563-575
- Lobreaux S, Briat JF** (1991) Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea(*Pisum sativum*) during development. Biochem J **274**:601-606
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant **15**:473-479
- Richard AJ, Tony AK, Michael WB** (1987) GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. **6**:3901-3907
- Spence MJ, Henki MT, Lammers PJ** (1991) The structure of a *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding the iron storage ferritin. Plant Mol Biol **17**:499-504
- Torres AC, Cantliffe DJ, Laughner B, Bieniek M, Nagata R, Ashraf M, Ferl RJ** (1993) Stable transformation of lettuce cultivar South Bay from cotyledon explant. Plant Cell Tiss Organ Cult **34**:279-285
- Yang DC, Lee KY, Yoo YS, Choi KH and Lim HT** (1997) Plant regeneration and expression of mouse Adenosine Deaminase gene in transgenic hot papper (*Capsicum annuum* L) plants. Kor J Plant Tiss Cult **24**(1):37-41

(접수일자 2000년 4월 20일)