

## Ascorbate Peroxidase 유전자의 도입에 의한 식물의 형질전환

이인애 · 이효신\* · 배은경 · 김기용\*\* · 이병현\*\*\* · 손대영\*\*\*\* · 조진기

### Transformation of A Plant by Ascorbate Peroxidase Gene using *Agrobacterium tumefaciens*

In-Ae Lee, Hyoshin Lee\*, Eun-Kyung Bae, Ki-Yong Kim\*\*, Byung-Hyun Lee\*\*\*,  
Daeyoung Son\*\*\*\* and Jinki Jo

#### ABSTRACT

This study was conducted to obtain the transformed tobacco (*Nicotiana tubacum*) plants with cytosolic ascorbate peroxidase gene (*ApxSC7*) using *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. A cDNA encoding the cytosolic ascorbate peroxidase of strawberry, *ApxSC7*, was introduced into tobacco plants via *Agrobacterium*-mediated gene transfer system. The expression vector, *pIG-AP8*, harboring *ApxSC7* gene was used for production of transgenic tobacco plants. A large number of transgenic plants were regenerated on a medium containing hygromycin. Integration of *ApxSC7* gene was confirmed by PCR and Southern blot analyses with genomic DNA. Northern blot analyses revealed that the *pIGap8* gene was constitutively expressed.

(Key words : *Agrobacterium tumefaciens*, *ApxSC7* gene, Ascorbate Peroxidase, Transformation, Transgenic plant)

#### I. 서 론

항산화 기구에서 중심적인 역할을 하는 ascorbate peroxidase(EC 1.11.1.11)는 식물에서 cytosolic Apx, stromal Apx, thylakoid membrane-bound Apx와 glyoxysomal 형태의 4가지 type(Yoko et al. 1999)으로 존재하며 세포내에서 생성된 superoxide anion radical( $\cdot O_2^-$ ), hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ) 및 hydroxyl free radical( $\cdot OH$ ) 등과 같은 활성 산소종들을 제거

(Kazuya Toshimura et al., 1999)하는데 중요한 역할(Kazuya Toshimura et al., 1998)을 하며 heme을 가지고 있는 효소(Frank Van Breusegem et al. 1995)로 알려져 있다. 지구의 환경 파괴로 인하여 식물체 내에서 superoxide anion radical( $\cdot O_2^-$ ), hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ) 및 hydroxyl free radical( $\cdot OH$ ) 등과 같은 활성 산소종들을 생성하는 환경 스트레스의 발생이 급증하고 있다. 이러한 스트레스에는 최근 그 발생빈도가 급증하고 있는 오존을 비롯하여 고온

이 논문은 한국학술진흥재단 중점연구소과제(2000-005-G00003)의 연구비에 의하여 수행된 결과의 일부입니다. 경북대학교 농업생명과학대학(College of Life Sci. & Agriculture, Kyungpook Natl. Univ, Daegu 702-701, Korea, e-mail: jkjo@knu.ac.kr).

\* 임목육종연구소(Korea Forest Research Institute, Omokchun-Dong, 451-350, Korea).

\*\* 축산기술연구소(National Livestock Research Institute, Suwon, 441-350, Korea).

\*\*\* 경상대학교 축산과학부(Division of Animal Husbandary, Gyeongsang Natl. Uni., Jinju 660-701, Korea).

\*\*\*\* 경상대학교 대학원 분자생물학과(PMBBRC and Dept. Molecular Biology, Gyeongsang Natl. Univ. Jinju 660-701, Korea).

과 저온, 건조 등의 환경 스트레스와 중금속과 이산화황과 같은 가스상의 오염물질, 제초제 그리고 병원균의 감염 등이 있으며, 이들에 의해 생성된 활성 산소종들은 강한 산화력으로 세포막 분해, 단백질 분해, DNA 합성 억제, 광합성 억제, 엽록체 파괴 등을 유발하여 식물을 포함한 생체에 심각한 피해를 일으킨다(Foyer와 Mullineaux, 1994; Levine 등, 1994; Foyer 등, 1997). 이미 우리나라의 경우도 오존, 이산화황 등과 같은 대기오염물질과 고온, 저온, 가뭄 등의 기상이변에 따른 환경 스트레스의 발생이 증가 추세에 있다. 식물세포는 이러한 활성 산소종들에 의한 피해로부터 자신을 보호하고 광합성을 무리 없이 진행시켜 항상성(homeostasis)을 유지하기 위하여 진화과정을 통해 항산화 기구를 발전시켜 왔다. 이러한 항산화 기구는 ascorbic acid(AsA), glutathione(GSH),  $\alpha$ -tocopherol 등의 저분자량 항산화 물질과 ascorbate peroxidase(APx), superoxide dismutase(SOD) 및 glutathione reductase(GR) 등의 항산화 효소로 구성되어 있다.

따라서 본 연구에서는 최근 산업화에 따른 환경의 파괴로 그 발생빈도가 급증하고 있는 오존과 같은 환경 스트레스에 대하여 내성을 가지는 식물의 개발을 위하여 모델식물인 담배에 딸기로부터 분리한 cytosolic APx 유전자를 도입하여 그 발현을 조사하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 식물재료

식물재료는 담배(*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun)를 사용하였으며, 25°C, 350  $\mu$ Em<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> 광조건에서 성장시켰다.

### 2. 발현 vector의 구축과 *Agrobacterium*의 형질전환

APx cDNA는 한국과학기술원의 김인중 박사

가 딸기로부터 분리한 *ApxSC* clone을 분양 받아 식물체 내에 도입하기 위하여 식물체 형질 전환용 binary vector인 pIG121-Hm에 클로닝하였다. 먼저, 양 말단이 *XbaI/XhoI*인 *ApxSC7* cDNA를 pGEM-11ZF vector(Promega, USA)에 도입하여 pGEM-A8을 구축한 다음, 제한효소 *XbaI/SacI* 절단하여 *ApxSC7* cDNA를 포함하는 1.0kb의 DNA 단편을 회수하였다. 회수한 DNA 단편을 제한효소 *XbaI/SacI*으로 절단하여 GUS 유전자를 제거한 pIG121-Hm의 cauliflower mosaic virus(CaMV) 35S promoter의 하류에 도입하여 최종적으로 발현 vector pIG-AP8을 구축하였다. pIG-AP8을 freezing-thawing 방법(Horsch 등, 1984)으로 *Agrobacterium tumefaciens*(*A. tumefaciens*) LBA4404에 형질전환하였다.

### 3. 담배의 형질전환

담배의 형질전환은 Lee 등 (2001)의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. pIG-AP8로 형질전환된 *Agrobacterium*(An G. 1987)을 YEP 한천배지에 도말한 다음, 28°C, 암상태에서 3일간 배양하였다. acetosyringone(100  $\mu$ M)과 hygromycin이 첨가된 YEP 액체배지에서 암상태로 2일간 배양한 균체를 MS 배지에 현탁(OD600=0.4)하여 담배잎 disc 형질전환법(Hoesch et al. 1978)으로 담배에 도입하였다. 담배잎 disc을 *Agrobacterium* 현탁액에 20분 이상 침지한 다음, acetosyringone(100  $\mu$ M)이 첨가된 N6 공동배양 배지에 치상하여 28°C, 암상태에서 3일간 배양하였다. 감염된 담배잎 disc을 250mg/l의 cefotaxime과 40mg/l의 hygromycin이 첨가된 N6 선발배지로 옮겨 28°C, 광상태에서 4주간 다시 계대배양 하였다. Hygromycin으로 선발된 담배를 1mg/l의 NAA, 5mg/l의 kinetin, 250mg/l의 cefotaxime 및 50mg/l의 hygromycin이 첨가된 MS 재분화배지로 옮겨 형질전환된 식물체의 재분화를 유도하였다. 재분화된 식물체는 호르몬을 첨가하지 않은 half-strength

의 MS 배지로 옮겨 뿌리의 발육과 정상적인 식물체로의 생육을 유도한 다음, 원예용 상토(5호, 부농)를 담은 화분으로 옮겨 수분을 충분히 공급한 상태에서 랩으로 봉하여 일주일간 순화시켰다.

#### 4. PCR 및 Southern blot 분석

PCR 분석을 위한 primer는 2종을 사용하여 CaMV 35S promoter의 염기서열에 근거한 sense primer(35Ss1; 5'-TTCAACAAAGGGTAATATCCGG-3')와 antisense primer(35Sas; 5'-CGAAGGATAGTGGGATTGTGC-3'), 또 다른 하나는 sense primer(35Ss2; 5'-CCCACCCACGAGGAGCATC-3')와 ApxSC7 cDNA의 염기서열에 근거한 antisense primer(Apxas; 5'-CCAAGCTCAGAGACCTCTG-3')를 사용하였으며 증폭 산물은 0.8% agarose gel 전기영동으로 확인하였다. Southern blot 분석은 담배 잎으로부터 CTAB 방법(Murray와 Tompson, 1980)으로 genomic DNA를 분리하였다. DNA 5 $\mu$ g을 제한효소 *Xba*I과 *Sac*I으로 절단하여 0.8% agarose gel에 전기영동한 다음, capillary transfer 방법(Southern, 1975)으로 nylon membrane에 전이시켰다. Membrane은 5 $\times$  SSC, 5 $\times$  Dengardt's solution, 0.1% SDS, 50mM Na-Pi(pH 6.5), 0.1mg/ml denatured herring sperm DNA, 50% dextran sulfate가 첨가된 용액에서 3시간(42 $^{\circ}$ C) 동안 prehybridization한 다음, [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP로 표식된 ApxSC7 DNA를 첨가하여 12시간 이상 hybridization하였다. Membrane은 2 $\times$  SSC, 0.1% SDS 용액(50 $^{\circ}$ C)에서 10분간, 그리고 0.2 $\times$  SSC, 0.1% SDS 용액(50 $^{\circ}$ C)에서 1시간 동안 세정한 다음, -70 $^{\circ}$ C에서 2~3일간 X-ray film(Kodak)에 노출시켰다.

#### 5. Northern blot 분석

담배 잎으로부터 guanidine thiocyanate 방법

(McGookin, 1984)으로 total RNA를 분리하였다. Total RNA 10 $\mu$ g을 1.2% formaldehyde agarose gel에 전기영동한 다음, Southern blot 분석에서와 동일한 방법으로 분석을 실시하였다.

### III. 결과 및 고찰

식물체 형질전환용 binary vector인 pIG121을 사용하여 딸기 유래의 Cytosolic ascorbate peroxidase의 full-length cDNA를 담배에 도입하였다. pIG121은 선발표지로서 항생제 (kanamycin) 저항성 유전자인 neomycin phosphotransferase (*NPTII*) 유전자를 가지고 있으며, 식물세포 내에서 항상적으로 발현되는 strong promoter인 cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter를 가지고 있다. pIG121-Hm의 CaMV 35S promoter의 하류의 *GUS* 유전자를 제거하고 Apx유전자를 sense 및 antisense 방향으로 삽입하여 발현 vector pIG-AP8을 구축한 다음(Fig. 1A), *A. tumefaciens* LBA4404에 형질전환하였다. 형질전환된 *Agrobacterium*으로부터 plasmid DNA를 분리하여 제한효소로 분해한 다음, agarose gel 전기영동(Fig. 1B)하여 vector의 구조를 확인하고 담배의 형질전환에 이용하였다.

식물 형질전환 효율은 식물재료, vector, *Agrobacterium* strain, selective agent 및 배지 조성 등의 요인이 영향을 미치는데, *Agrobacterium* 현탁액에 감염시킨 다음, hygromycin이 첨가된 N6 선발배지에서 2주간 배양하고 동일 배지로 계대하여 2주간 다시 배양하였다. 선발 과정을 통하여 hygromycin에 의해 갈변되어 고사하지 않고 저항성을 나타내는 신초를 재분화 배지로 옮겨 신초의 분화를 유도하였다(Fig. 2A). 유도된 신초를 half-strength의 MS 배지로 옮겨 뿌리의 발육과 정상적인 식물체로의 생육을 유도한 다음(Fig. 2B), 화분으로 옮겨 생장실에서 생육시켰다. 재분화된 식물체는 환경 스트레스 내성 관련 유전자의 형질전환 시에

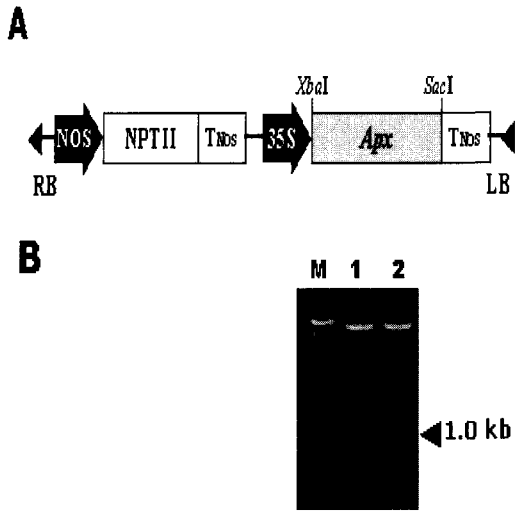


Fig. 1. Construction of the expression vector. For the construction of expression vector, Apx cDNA has replaced *GUS* in pIG121 vector. (A) Structure of pIG121-AP8. (B) Identification of recombinant expression vector. Restriction enzyme analysis of the construct, pIG121-AP8.

빈번하게 나타나는 것으로 알려진 위조현상과 같은 표현형상의 뚜렷한 변이(Lagrimini, 1991; Lagrimini 등, 1997)는 나타내지 않았다(Fig. 2C).

Hygromycin이 첨가된 배지에서 재분화된 식물체로부터 genomic DNA를 분리한 후 PCR법으로 형질전환 여부를 확인하였다. 담배의 endogenous ascorbate peroxidase 유전자와의 구별을 위하여 35S promoter 유전자에 특이적인 sense 및 antisense primer를 합성하여 PCR 증폭을 하였으며, 이때 예상되는 증폭산물의 크기는 0.3kb로 Fig. 3B에서 나타낸 바와 같이 형질전환되지 않은 야생형에서는 증폭산물이 관찰되지 않았으나, 형질전환 식물체의 genomic DNA에서는 예상크기와 동일한 0.3kb의 35S promoter 단편이 증폭되었고, 35Ss2와 Apx primer 조합에서는 1.0kbp의 증폭산물을 확인하였다. 또한 PCR 증폭으로 ApxSC7 유전자의 도입이 확인된 형질전환 식물체의 염색체 내에 pIG-AP8의 도입을 확인하기 위하여 Southern

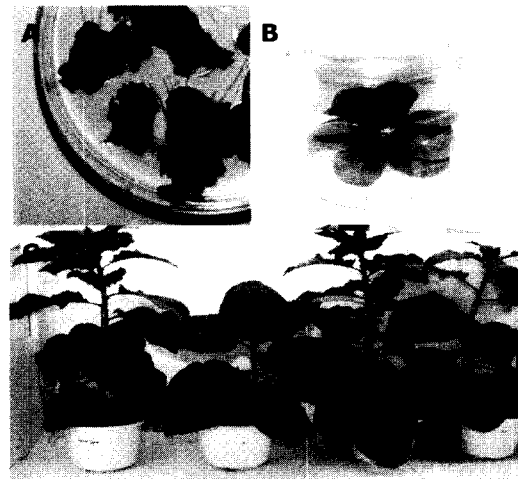


Fig. 2. Production of transgenic tobacco plants. (A) Shoot formation on selection medium. (B) Hygromycin-resistant plantlets with roots and shoots. (C) Normal green plants transformed with pBI-AP8.

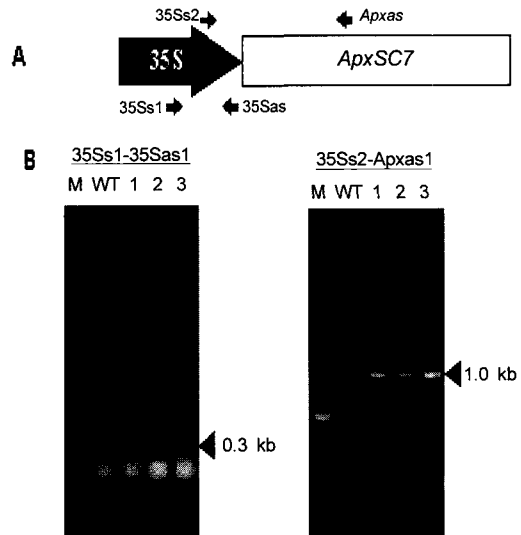


Fig. 3. Identification of transformation of regenerated tobacco plants by genomic PCR amplification. (A) Schematic diagram for PCR amplification of CaMV 35S promoter and *ApxSC7* cDNA fragments for identification of transformation. (B) Agarose gel electrophoresis of PCR products. Numbers indicate independent transgenic lines.

blot 분석을 하였다. Genomic DNA를 제한효소 *XbaI*과 *SacI*으로 절단한 다음, ApxSC7 유전자를 probe로 하여 hybridization한 결과 PCR 증폭에서와 마찬가지로 모든 형질전환 식물체에서 도입된 ApxSC7 cDNA의 크기와 동일한 1.0kb의 hybridization band를 확인하였다(Fig. 4A).

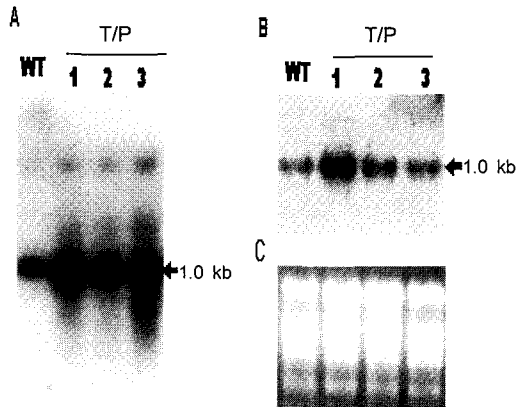


Fig. 4. Southern and Northern blot analyses of transgenic tobacco plants.

(A) Southern blot analysis. Genomic DNA(15 $\mu$ g) from wild-type(WT) and transgenic plants digested *XbaI* and *SacI* and was hybridized with the <sup>32</sup>P-labeled ApxSC7 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 of Fig. 4B.

형질전환된 담배 내에서 딸기 유래의 cytosolic ascorbate peroxidase 유전자가 지속적으로 발현되는지를 확인하기 위하여 야생형과 형질전환 식물체의 잎으로부터 total RNA를 분리하여 Northern blot 분석을 하였다. Fig. 4B에서 나타난 바와 같이 wild-type 식물체의 경우도 ApxSC7 probe와 hybridization하는 전사체가 약하게 관찰되었으며, 형질전환 식물체에서는 1.0kb의 전사체의 축적이 관찰되어 도입된 유전자가 지속적으로 발현된다는 사실을 나타내었다. Northern blot 분석에서 형질전환하지 않

은 야생형 식물체에서도 ApxSC7 probe와 hybridization하는 band가 약하게 나타나는 이유는 담배가 원래부터 가지는 ascorbate peroxidase 유전자가 지속적으로 발현되거나 ApxSC7 유전자와의 상동성이 높기 때문일 것으로 추정된다. 또한 형질전환 식물체의 Southern 및 Northern blot 분석에서 hybridization band의 강도가 개체별로 차이를 나타내었는데, 이는 도입된 유전자의 copy number의 차이, 삽입된 위치 및 integration되는 과정에서 chromosome rearrangement 현상 등이 관여한 것을 추정된다.

이상의 결과를 종합하면, 오존 등과 같은 환경 스트레스에 내성을 가지는 식물의 개발을 위하여 *Agrobacterium*을 매개로 한 형질전환에 관한 실험을 수행하여 딸기유래의 cytosolic ascorbate peroxidase 유전자가 정상적으로 도입되어 발현되는 형질전환 담배 식물체(T<sub>0</sub>)를 구축되었음이 확인되었다. APx을 과량 발현하는 형질전환 식물체는 일반적으로 hydrogen peroxide, paraquat, 중금속 등과 같은 여러 가지 환경 스트레스에 내성을 나타내는 것이 보고되고 있다(Assada K. et al. 1994). 최근 우리나라의 경우도 오존, 고온, 가뭄 등의 환경 스트레스의 발생이 증가하는 추세에 있다는 것을 고려하면 본 연구에서 개발한 형질전환 담배를 이용하여 여러 가지 환경 스트레스 조건에서 cytosolic ascorbate peroxidase 유전자의 지속적 발현이 항산화 효소계에 미치는 영향과 환경 스트레스에 대한 내성 특성을 규명할 필요가 있다고 생각된다.

#### IV. 요약

환경 스트레스에 의해 야기되는 활성 산소종에 의한 피해에 내성을 가지는 식물의 개발을 위하여 딸기 유래의 cytosolic ascorbate peroxidase 유전자(ApxSC7)를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 매개로 형질전환 시켰다. Hygromycin으로 선발된 캘러스로부터 재분화

된 식물체는 야생형과 비교하여 형태적으로 차이를 나타내지 않았다. PCR 및 Southern blot 분석을 통하여 형질전환 식물체의 염색체 내에 ApxSC7 유전자가 integration 되었음을 확인하였다. 담배 잎으로부터 total RNA를 분리하여 Northern blot 분석을 실시한 결과, 도입된 유전자가 형질전환 식물체 내에서 지속적으로 발현된다는 것을 확인하였다.

## V. 인 용 문 헌

- An, G. 1987. Binary Ti Vectors for plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymology*. Vol. 153. 292-305.
- Assada K. 1994. Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. CH. Foyer, PM. Mullineaux, eds, *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 77-104.
- Chilton, M.D., T.C. Currier, S.K. Farrand, A.J. Bandich, M.P. Gordon and E.W. Nester. 1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:3672-3676.
- Foyer, C.H., H. Lopez-Delgado, J.F. Dat and I.M. Scott. 1997. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanism of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* 100: 241-254.
- Foyer, C.H. and P.M. Mullineaux. 1994. Causes of Photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. CRC press, Boca Raton, FL. pp. 343-364.
- Frank Van Breusegem, Raimundo Villarreal, Marc Van Montagu, and Dirk Inze. 1995. Ascorbate Peroxidase cDNA from Maize. *Plant Physiol.* 107:649-650.
- Hiei, Y., S. Ohta, T. Komari and T. Kumashiro. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant J.* 6(2):271-282.
- Horsch, R.B., J.E. Fry, N.L. Hoffmann, D. Eichholtz, S.G. Rodgers and R.T. Fraley. 1984. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 223:496.
- Kazuya Yoshimura, Takahiro Ishikawa, Yoshihiro Nakamura, Masahiro Tamoi, Yoru Takada, Toshiji Tada, Keiichi Nishimura, and Shigeru Shigeoka. 1998. Comparative Study on Recombinant Chloroplastic and Cytosolic Ascorbic Peroxidase Isozymes of Spinach. *Archives of Biochemistry and biophysics* 353, No. 1., May. 55-63.
- Kazuya Yoshimura, Yokinori Yabuta, Masahiro Tamoi, Takahiro Ishikawa, and Shigeru Shigeoka. 1999. Alternatively spliced mRNA variants of chloroplast ascorbate peroxidase isoenzymes in spinach leaves. *Biochem. J.* 338:41-48.
- Lagrimini, L.M. 1991. Wound-induced deposition of polyphenols in transgenic plants overexpressing peroxidase. *Plant Physiol.* 96:577-583.
- Lagrimini, L.M., R.J. Joly, J.R. Dunlap and T.T. Liu. 1997. The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. *Plant Mol. Biol.* 33:887-895.
- Levine, A., R. Tenhaken, R. Dixon and C. Lamb. 1994. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593.
- Lee H.S. and J.K. Jo. 2001. Expression of Glutathione Reductase Gene in Transgenic Tobacco Plant. *Korean J. of Plant Tissue Culture.* 28(2):87-90.
- 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.
- Muller, A.J. and R. Grafe. 1978. Isolation and characterization of cell lines of *Nicotiana tabacum* lacking nitrate reductase. *Mol. Gen. Genet.* 161:67-76.
- Murray, M.G. and W.F. Ghompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8:4321-4325.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.
- Yoko Morimura, Koji Iwamoto, Toshihide Ohys, Tkao Igarashi, Yoshiko Nakamura, Akihiro Kubo, Kiyoshi Tanaka, and Tomoyoshi Ikawa. 1999. Light-enhanced induction of ascorbate peroxidase in Japanese radish roots during postgerminative growth. *Plant Science* 142:123-132.