

기내배양과 재조합단백질생산을 위한 화분 Biofactory의 저장기술의 개발

박희성 · †고재철
대구가톨릭대학교 생명자원학부
(접수 : 2003. 11. 20., 게재승인 : 2004. 6. 24.)

Storage of Pollen Biofactory for *in vitro* Growth and rProtein Synthesis

Hee Sung Park and Jae Chul Koh†
Division of Life Resource, Catholic University of Daegu, Kyungsan, Kyungbuk 712-702, Korea
(Received : 2003. 11. 20., Accepted : 2004. 6. 24.)

A method of collection and long-term storage of viable lily (*Lilium longiflorum*) pollen grains were developed for their *in vitro* growth and transformation in consistency. Petroleum ether, n-heptane, cyclohexane and benzene, as pollen collection medium, were determined less toxic to pollen growth *in vitro* than others tested. Pollen grains, however, lost their growth activity if stored in these solvents more than a week. So, a serial performance, that is, pollen grain collection in these solvents, air-drying and immediate transfer to low temperature condition was determined desirable for keeping the viability much longer. Pollen grains from this storage showed a successful transformation *in vitro* with a cDNA encoding tissue plasminogen activator (TPA) protein using *Agrobacterium* via vacuum infiltration according to western blotting analysis.

Key Words : Lily pollen, storage, *in vitro* growth, TPA transformation, western blotting

서론

식물의 화분은 수분, 영양세포의 화분신장을 통하여 정핵 세포를 배주에 제공하며 그 결과 암수 배우자체 사이에서 수정이 발생한다(1, 2). 한편, 화분생물공학분야에서는 화분을 외래유전자의 운반체로 이용하는 바, *Agrobacterium*이나 particle bombardment(3, 4) 등의 방법을 통하여 기내에서 화분형질전환을 실시한 후, 이들을 암수에 수분 및 수정시킴으로써 형질전환식물체의 개발을 행하여 왔다(6-8). 이러한 과정에서는 화분의 발아능력 검정과 화분도입유전자의 확인을 위한 기내배양이 필수적이며 설탕, 붕소, 칼슘 등 3-5종의 물질이 포함된 배지에서 그 배양이 가능하다. 화분의 형질전환과 기내배양이 매우 용이하다는 점을 주목할 때, 화분을 외래유전자의 발현 및 그 단백질생산을 위한 일회용 숙주로서의 이용성을 가능하여 볼 수 있다. 이를 위하여서는 우선적으로 충분한 화분의 양적 확보, 장기간 저장 및 화분활성의

유지가 요구되는데, 화분은 식물의 종류에 따라 그 생산량이 매우 다양하며 소나무, 오리나무, 참나무, 삼나무 등의 임목류의 경우 상당량의 화분을 생산한다. 화분의 수명은 자연상태에서는 비교적 짧은 편이지만 적절한 수확 및 저장방법이 적용되면 수 년 이상 그 생명력을 보존할 수 있다. 따라서 용매, 냉동건조, 저온 등의 여러 방법 등이 식물화분의 종류에 따라 다양하게 적용되고 있다(9). 국내 원예산업에서의 주요 생산품목의 하나인 백합은 년 간 1억본 정도가 생산되며 특히 경남지역에 그 재배단지가 많이 분포되어 있다. 백합은 상기한 임목류에는 미치지 못하지만 재배할 수 있는 식물로서는 상당히 많은 화분을 생산하며 (5-10 g/100 花) 화분에 대한 생화학적 또는 생명공학적 연구가 많이 이루어져 있다. 본 연구에서는 오염되지 않는 재배백합으로부터의 화분을 용매를 이용한 수확 및 저장방법을 시험하고 이로 인한 기내 발아력의 변화 그리고 진공침윤이용 *Agrobacterium* 형질전환에 의한 도입유전자의 발현저해여부를 분석함으로써 재조합 단백질 생산을 위한 일회용 biofactory 개념으로서 적합할 수 있는 백합화분의 장기보관법을 개발하였다. 이들 화분립의 형질전환능력은 재조합 tissue plasminogen activator (TPA) cDNA를 모델로 사용하여 western blotting의 결과에 의하여 비교하였다(10, 11).

† Corresponding Author : Division of Life Resource, Catholic University of Daegu, Kyungsan 712-702, Korea
Tel : +82-53-850-3240, Fax : +82-53-850-3449
E-mail : jckoh@cu.ac.kr

재료 및 방법

백합화분의 수집 및 보관

일반 재배포장으로부터 구입한 개화 직전의 백합 (*Lilium longiflorum*) 500 본을 이용하여 이들로부터의 개화한 백합꽃에서 완전히 발달한 꽃밥(약)을 채취하여 냉동고 (-70°C)에 직접 보관하거나 또는 다양한 용매에 담아 꽃가루를 분리 저장하였다. 사용한 용매는 cyclohexane, benzene, petroleum ether, n-heptane, acetone, ethyl acetate, xylene 등이다.

화분의 기내배양 및 발아

100 mg 화분을 20 ml (80 mm petri dish 사용) 생장배지에서 또는 500 mg의 화분을 50 ml (150 mm petri dish 사용) 배지에서 배양하였으며 화분생장배지 (pollen growth media, PGM)의 구성은 1.6 mM H₃BO₃, 1.8 mM Ca(NO₃)₂, 7% sucrose, pH 5.7로 조성하였다(12). 화분을 배지에 투여한 후 매우 조심스럽게 현탁하고 암 상태에서 27°C, 16~24 hr 배양하였다. 화분의 발아력은 발아 및 신장까지 완전히 이른 화분관 덩어리만을 수집한 후, 그 부피 (wet volume) 측정에 의하여 비교 및 분석하였다.

화분의 형질전환 및 단백질발현의 검색

본 실험에서 이용한 재조합 DNA는 사람의 tissue plasminogen activator (TPA) cDNA를 pBI121 (Clontech, CA)의 GUS DNA를 대체하여 제조한 pBI/TPA(11)로서 이는 freeze-thaw 방법에 의하여 *Agrobacterium tumefaciens* A136에 도입 후 kanamycin (km)을 포함하는 LB agar 배지에서 선발하였다. 화분으로의 형질전환을 위하여 pBI/TPA를 지니는 *Agrobacterium*을 1-2 시간 미리 배양하여 발아초기에 도달한 백합화분과 섞어 vacuum infiltration(10)을 실시하였다. km과 streptomycin (sm)이 각각 50 mg/l가 첨가된 LB 액체배지에서 균체를 배양하고 이를 원심분리 (13,000 rpm, 2 min)하여 균체를 배양액과 동량의 PGM에 재현탁한 후 이를 백합화분 배양액에 첨가 및 균일화하고 진공장치 (0.01 mmHg)로 옮겨 20 min 처리하였다. 이어서, 화분을 멸균수로 충분히 세척하고 cefotaxime (cf, 250 mg/l) 및 km (50 mg/l)이 포함된 50 ml의 PGM으로 이전하였으며 27°C에서 16-24 hr 신장시켰다. 충분히 신장한 화분관을 건져내어 액체질소에 얼려 분쇄하여 분말로 만든 후 추출 buffer (50 mM Tris-Cl, pH 7.5, 5 mM EDTA, 0.1% Tween 80, 2 mM PMSF)에 넣어 섞고 원심분리(14,000 rpm, 15 min, 4°C)를 실시하고 이로부터의 상등액을 단백질 분석에 이용하였다. 즉 SDS-10% polyacrylamide gel 전기영동에 의한 단백질분리와 PVDF membrane로의 단백질 전이 및 western blotting 분석에 이용하였다. Western blotting을 위하여 사람의 melanoma 세포배양액으로부터 생산된 single-chain TPA (Sigma, Mo.) 표준항원, tPA에 대한 단일항체 (mAb-TPA, Bidesign, ME), HRP-conjugated anti-mouse IgG, 발현측정을 위한 ECL detection system (Amersham, NJ)을 사용하였다. 결과는 autoradiography에 의하여 얻었다.

결과 및 고찰

백합화분의 채취와 저장

재배포장에 식재되어 있는 이미 개화한 백합으로부터의 직접적인 화분의 채취는 많은 노동력이 요구된다. 따라서 개화기 직전의 백합을 재배단지에서 절화상태로 대량 입수하여 이들을 식물배양실 (26°C, 16 hr 광주기)의 수조에 배치하여 7일 이내에 대부분의 개화가 이루어지도록 조절함으로써 단기간에 집중적으로 화분채취가 가능하게 되었다. 꽃밥(anther)이 발달하여 충분히 벌어진 상태에서 화분립 노출되었을 때 수술을 수작업으로 떼어내 수집하였다(Fig. 1). 이로써 500 본의 절화백합으로부터 약 100 g 정도의 화분을 채취할 수 있었으며 떼어낸 꽃밥은 용매 (cyclohexane, benzene, petroleum ether, n-heptane, acetone, ethyl acetate, xylene) 안에 직접 넣어 화분이 자연스럽게 분리되도록 한 후, 이들을 밀봉하여 냉장실에서 보관하였다. 일정 기간이 경과하면 여과지를 사용하여 분리한 화분을 건조시키고 발아실험을 시행하거나 또는 -70°C에 보관한 후 발아실험을 행하였다. 한편, 화분이 있는 상태의 꽃밥을 채취하여 냉동고에 직접 보관하는 경우, 발아력 시험 시 화분립을 steel sieve로 통과시켜 수집한 후 이용하였다. 이들 화분립의 발아력은 16주까지 기간 별로 저장한 후에 기내배양에서의 발아율을 비교하였다.

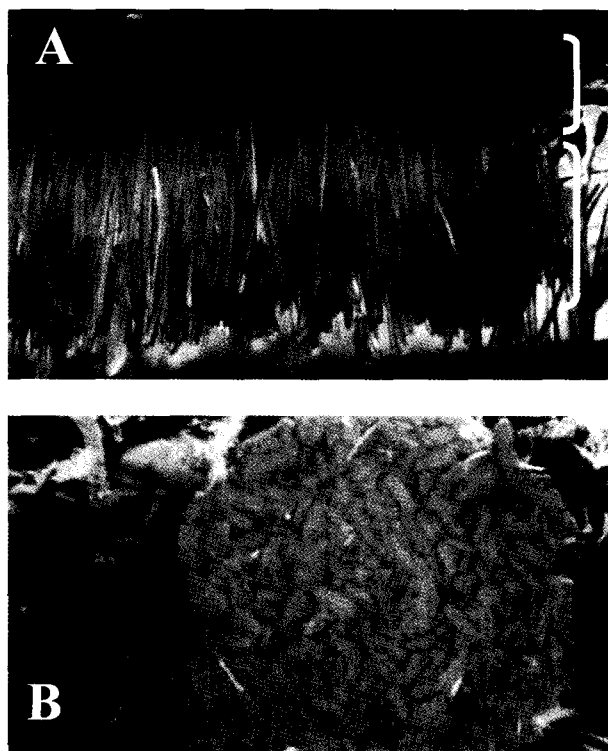


Figure 1. Collected Stamens from lily flower (A; total stamens (anther + filament), B; collected anthers only).

Fig. 2에서는 용매에 보관 후 1일이 경과했을 때의 화분을 분리/건조한 후 배양을 통한 발아상태를 관찰한 것이다. Xylene, ethyl acetate, acetone 등의 것은 발아력이 거의 상실되는 것으로 나타나 이들은 저장 용매로서 바람직하지 않은

것으로 판단되었다. 한편 petroleum ether, n-heptane, benzene, cyclohexane 등에 보관하였던 화분은 1일 경과 후에 정상적으로 기내발아 되었는데 따라서 이들 용매에 보관한 화분을 일정한 기간 저장 후에 그 발아력을 비교하였다. 저장 후 1주일 경과시 이들 용매에서의 화분은 발아력이 점차 감소하여 70% 정도에 머물렀으며 보통 24 h 내로 이루어지는 완전한 화분신장이 지연되어 48 h 정도가 소요되었다. 이는 이들 용매가 화분세포의 신장에 대한 억제작용을 미치는 것으로 보여지며 따라서 이들 용매 내에서의 장기보관은 바람직하지 않은 것으로 판단되었다. 용매 중에서 petroleum ether만을 이용하여 2, 4, 8, 16주 저장에 따른 백합화분의 발아율을 측정하였으며 2주째에는 거의 발아력을 상실하는 것으로 관찰되었다(Fig. 3).

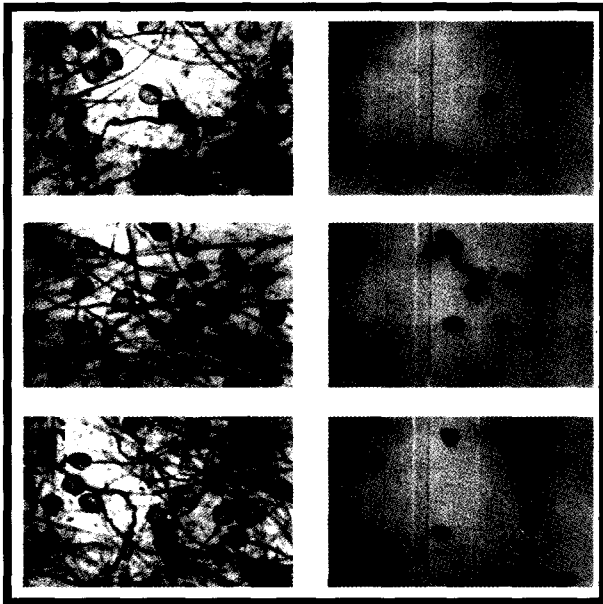


Figure 2. Lily pollen germination *in vitro* following storage in various solvents for 24 hr (A; petroleum ether, B; ethyl acetate, C; benzene, D; acetone, E; n-heptane, F; xylene).

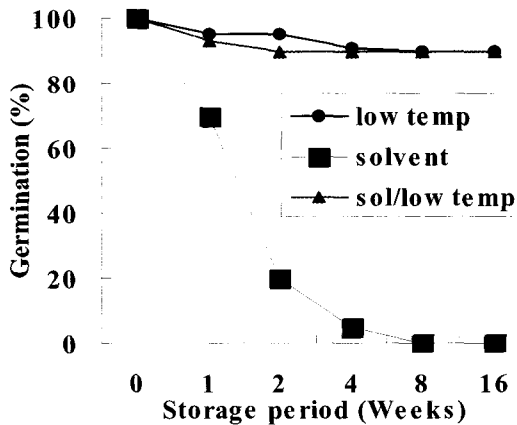


Figure 3. Germination of pollen grains under different storage conditions (low temp, stored at -70°C; solvent, petroleum ether; sol/low temp, collected in petroleum ether then transferred to -70°C immediately).

한편 냉동조건 (-70°C)에 보관하였던 백합화분의 발아력은 16주에서 90~95% 정도의 발아력을 그대로 유지함에 따라 저온보관이 훨씬 효율적인 것으로 판명되었다. 그러나 저온보관에서의 문제점은 꽃밥을 수확한 후 배양을 위한 화분립의 준비 과정에서 특히 양적인 손실이 많으며 또한 작업의 번거롭다는 점이며 이에 비해서 꽃밥을 수확하여 용매에 직접 넣는 경우에는 손쉽게도 완벽하게 화분을 회수할 수 있다는 장점이 있다. 따라서 일단 용매에 넣은 후 화분을 모아 24 h 이내에 여과지에서 건조한 후에 냉동고에 보관하고 이들의 시간 경과에 따른 발아율을 측정하였다. 그 결과, 냉동고에서 직접 보관하는 경우와 비교시 거의 동등한 발아력을 유지하는 것으로 나타났으며 따라서 본 연구에서의 백합화분의 장기저장 방법으로는 상기한 용매에서 일단 화분을 손쉽게 분리/수집하고 이들을 건조 및 냉동보관의 절차를 진행하는 것이 바람직하다는 것으로 판단되었다.

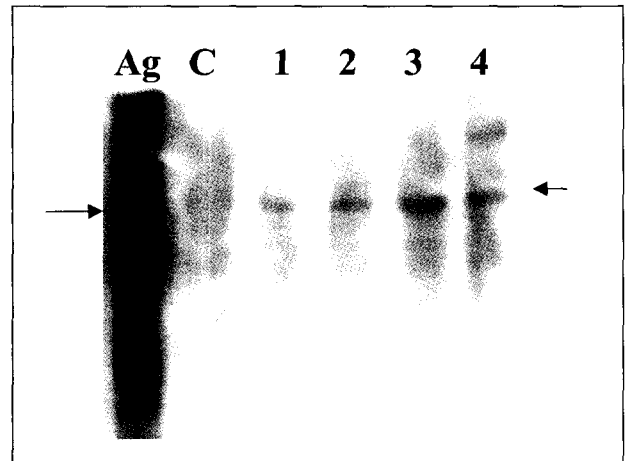


Figure 4. Western blotting of pBI/TPA transformed pollen (Ag, TPA protein standard; C, pBI121 transformed pollen; 1, 2, 3, and 4 represent pBI/TPA transformed pollens which were collected in solvents (petroleum ether, n-heptane, cyclohexane and benzene, respectively) and then stored at -70°C. Left and right arrows represent the standard TPA antigen and the expressed TPA protein from the transformed pollen, respectively).

백합화분의 형질전환 및 유전자발현의 비교

상기한 용매를 이용하여 수집하여 냉동보관을 거친 화분과 직접 냉동보관한 화분을 이용하여 pBI/TPA(10)로 형질전환시킨 후에 TPA 단백질발현에 미치는 영향을 western blotting의 분석에 의하여 비교하였다. 본 실험의 목적은 용매를 이용하여 화분을 수집하는 경우, 직접 냉동저장된 화분을 형질전환하는 경우와 비교 시, 이러한 과정이 *Agrobacterium*에 의한 유전자도입에 미칠 수 있는 영향을 분석하기 위함이었다. 이를 위하여 petroleum ether, benzene, n-heptane, cyclohexane에서 수집 및 건조되어 1일 이내에 냉동보관을 시작한 후, 16주가 경과되었을 때의 백합화분과 또한 직접 냉동보관되어 경과된 화분을 각기 형질전환시켰다. 약 500 mg 정도의 화분을 50 ml의 PGM에서 발아초기까지 배양 후 이에 대한 vacuum infiltration 및 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환을 시도하였으며 형질전환된 화분만의 생장을 도모하기 위하여 km을 그리고 *Agrobacterium*의 생장제어를 위하여 cefotaxime

을 배지에 첨가하였다. 화분관이 충분히 신장되어 영겨있는 상태에서 이들을 걷어낸 후 이에 대한 TPA 발현을 western blotting에 의하여 비교적으로 분석하였다(Fig. 4). 냉동저장을 거친 후 GUS reporter 유전자를 지니는 pBI121을 동일한 과정을 거쳐 형질전환시킨 화분에서는 TPA standard protein과 유사한 위치에서 TPA 단일항체에 의하여 인식되는 단백질이 포착되지 않았다. 한편 냉동저장만을 거친 화분이나 또는 용매수집 후 냉동저장된 화분을 pBI/TPA로 형질전환 시켰을 경우에는 모두 TPA protein과 유사한 위치의 단백질이 확인되었다. 단일항체에 의하여 인식되는 단백질의 크기 차이는 사람과 식물단백질의 당화 정도에 의한 차이로 해석되고 있는데 TPA 유전자구조에는 signal peptide 정보가 존재하며 식물에서도 마찬가지로의 역할을 나타내면서 당화과정을 거치는 것으로 판단된다. 이로써 용매를 이용하여 수집한 화분을 유전자도입 및 발현을 위한 일시적 숙주로서 사용할 경우 본 TPA protein 발현분석에 근거하여 기타 유전자를 이용한 연구에서도 정상적으로 적용될 것으로 예상하고 있다. 본 연구를 통하여 petroleum ether, benzene, n-heptane, cyclohexane 등의 용매에 의한 백합화분립의 수집은 재조합단백질의 생산을 목적으로 한 백합화분 biofactory의 장기적인 냉동보관을 위한 용이하고 효과적인 절차로서 제시될 수 있다.

요 약

기내에서의 발아 및 형질전환 활성을 지닐 수 있는 백합 (*Lilium longiflorum*) 화분의 장기보존조건을 얻기 위하여 용매를 이용한 연구를 수행하였다. 화분의 용이한 수집을 위하여 용매를 사용했을 때, petroleum ether, n-heptane, benzene 등의 경우 화분의 기내발아에는 영향을 미치지 않는으나 수집과정 후 바로 화분건조 및 냉동보관함으로써 발아활성을 유지할 수 있었다. 이들의 활성유지는 또한 vacuum infiltration 및 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 따른 외래유전자인 tissue plasminogen activator의 발현에 의하여 확인하였다.

감 사

본 연구는 2001년도 대구가톨릭대학교의 특성화연구비지원에 의하여 수행하였음.

REFERENCES

- McCormick, S. (1993), Male gametophyte development, *Plant Cell* **5**, 1265-1273.
- Taylor, L. P. and P. K. Helper (1997), Pollen germination and tube growth, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 461-491.
- Bethold, N., J. Ellis, and G. Pelletier (1993), *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants, *CR. Acad. Sci. Paris Life Sci.* **316**, 1194-1199.
- Fernando, D. D., J. N. Owens, and S. Misra (2000), Transient gene expression in pine pollen tubes following particle bombardment, *Plant Cell Rep.* **19**, 224-228.
- Aronen, T. S., T. O. Nikkanen, and H. M. Haggman (1998), Compatibility of different pollination techniques with microprojectile bombardment of Norway spruce and Scots pine pollen, *Can. J. For. Res.* **28**, 79-86.
- Haggman H. M., T. S. Aronen, and T. O. Nikkanen (1997), Gene transfer by particle bombardment to Norway spruce and Scots pine pollen, *Can. J. For. Res.* **27**, 928-935.
- Hess, D., K. Dressler, and R. Nimmrichter (1990), Transformation experiments by pipetting *Agrobacterium* into the spikelete of wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant Sci.* **72**, 233-244.
- Luo, Z. X. and R. Wu (1989), A simple method for the transformation of rice via the pollen-tube pathway, *Plant Mol. Biol. Rep.* **7**, 69-77.
- Stanley, R. G. and H. F. Linskens (1974), *Pollen Biology Biochemistry Management*, pp56-66, Springer-Verlag, Heidelberg.
- Park, I. H. and H. S. Park (2002), Analysis of tissue plasminogen activator expression using pollen culture *in vitro*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 582-585.
- Harris, T. J., T. Patel, F. A. Marston, S. Little, J. S. Emtage, G. Opdenakker, G. Volckaert, W. Rombauts, A. Billiau, and P. DeSommer (1986), Cloning of cDNA coding for tissue-type plasminogen activator and its expression in *E. coli*, *Mol. Biol. Med.* **3**, 279-292.
- Park, H. S. and I. H. Park (2002), Analysis of UreB protein synthesis from transgenic lily pollen, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 577-581.