

# 다채 (*Brassica campestris* var. *narinosa*) 유묘의 형질전환 및 일시발현의 정량적 분석

신동일, 박희성\*  
대구가톨릭대학교 생명공학과

## Quantitative Analysis of Transient Expression in Tah Tasai Chinese Cabbage (*Brassica campestris* var. *narinosa*) Seedlings Following *Agrobacterium*-Mediated Transformation

Dong-II Shin, Hee-Sung Park\*

Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Kyungsan 712-702, Korea

**ABSTRACT** Tah tasai chinese cabbage (*Brassica campestris* var. *narinosa*), a vegetable plant popularly consumed as several-days-old seedlings in oriental countries, can be easily cultivated using a simple appliance. We demonstrated that *Agrobacterium*-mediated transformation via vacuum infiltration (agroinfiltration) resulted in a successful transient GUS gene expression in tah tasai chinese cabbage seedlings. Pre-germinated seeds were found to be more susceptible to *Agrobacterium* infection than one-day-old or two-days-old seedlings. We also demonstrated that hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) treatment increased GUS expression especially for two-days-old seedlings. In ELISA using seedlings transformed with hepatitis B surface antigen (HBsAg) DNA by agroinfiltration, HBsAg protein synthesis increased more than two folds by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment to two-days-old seedlings in comparison to the mock-treated pre-germinated seeds.

**Key words:** *Agrobacterium*-mediated transformation, *Brassica campestris* var. *narinosa*, GUS, hydrogen peroxide, seedlings, transient expression

### 서 론

다채 (*Brassica campestris* var. *narinosa*)는 carotene, vitamin B1, B2, 철분, 칼슘 성분 등이 풍부한 녹색채소로서 근래에 건강에 대한 관심이 높아지면서 그 싹의 이용이 크게 증가하고 있다. 이 채소는 재배가 매우 용이하며 재배기간도 일주일이면 충분하다. *Brassica* species는 유지 또는 식용채소 등으로서의 의미가 중요한 작물로서 이들에 대한 *Agrobacterium*을 이용한 유전자도입 및 재분화를 통한 신품종 개발연구는 매우 활발하며 유체를 이용한 성공적인 연구가 많이 보고되었다 (Radke et al. 1988; Swanson and Erickson 1989; De Block et al. 1989;

Knutzon et al. 1992). 한편, *B. campestris* ssp.는 유지용 또는 식용채소용 등 다양한데 이들의 형질전환 및 재분화체의 제조는 상대적으로 어려운 것으로 보고되었다 (Jain et al. 1988; Narashimhulu and Chopra 1988; Mukhopadhyay et al. 1992; Jun et al. 1995; Xiang et al. 2000).

식물을 이용한 transient expression system은 특정 유전자의 기능을 분석하기 위한 간편하고 유용한 수단인데 이를 위하여 particle bombardment, electroporation, *Agrobacterium*, 또는 재조합 바이러스 벡터 방법들 중 적절한 수단을 이용하여 유전자도입을 수행하게 된다 (Fisher et al. 1999). Transient expression system은 상당한 시간과 비용이 소요되는 대규모 형질전환식물체의 효율적 제조를 위한 예비 분석 또는 식물을 이용한 재조합 의약품 단백질의 용이한 생산을 목적으로 수행되어 왔다 (Doran 2000; Giddings 2001).

\*Corresponding author Tel 053-850-3245 Fax 053-850-3459  
E-mail: hspark@cu.ac.kr

본 연구에서는 agro-infiltration으로도 표기되는 *Agrobacterium*-mediated vacuum infiltration (Bechtold et al. 1993) 방법을 이용하여 다채종자 표면으로의 유전자도입을 시도하였다. 즉, 발아 전 및 후의 종자를 이용하여 형질전환을 시도하였으며 그 일시발현의 결과를 GUS histochemistry에 의하여 분석하였다. 또한, 발아 전 및 후의 종자표면에 hydrogen peroxide를 처리하여 화학적 상처를 유발한 후 *Agrobacterium*에 의한 형질전환 및 GUS 발현을 비교하였다. hydrogen peroxide는 산업적으로는 화학적 표백제로서 이용되며 특히 펄프생산 시 많은 양이 사용된다. 또한 일반적으로는 살균소독제로서 이용되어 왔다. 형질전환 효율은 다채종자에 대한 hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) 유전자도입을 실시한 후, ELISA에 의한 HBsAg protein 정량에 의하여 비교하였다. 이로써 저렴한 비용으로 손쉽게 짝으로 생육 및 재배할 수 있는 *B. campestris* var. *narinosa*에 대한 transient expression system으로서의 개발 가능성을 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료, 발아, 생장

다채종자는 아시아종묘로부터 입수하였으며 이의 발아를 위하여 멸균수에 담근 후 4°C에서 24 hr 처리하였다. 침지시킨 종자는 0.4% sodium hypochlorite 용액으로 1 min 처리한 후 멸균수로 충분히 세척하고 멸균 증류수로 적신 paper towel위에 파종하였다. 파종 용기는 plastic wrap으로 덮은 후 약간의 공기 통로를 만들어 주고 27°C의 암 조건에 설치하였다.

### Agroinfiltration

짜에서의 일시발현을 위한 식물발현용벡터로서 GUS 유전자를 지니는 pBI121 (Clontech, USA)을 이용하였다. 한편, hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) DNA의 cloning을 위하여 ATCC로부터 입수한 pAM6 (ATCC 40101)를 주형으로 이용한 PCR을 수행하였다. *Bam*HI 및 *Sma*I 제한효소 위치를 포함한 forward primer (5'-ACG GAT CCC GGG TCA ACG AAC ATG GAG AAC ATC ACA TCA GGA-3') 및 *Sac*I 제한효소 위치를 포함한 reverse primer (5'-CCG GAG CTC TAG GGT TTA AAT GTA TAC CCA AAG AC-3')를 사용하여 30 cycle의 PCR (95°C, 30 sec; 50°C, 30 sec; 72°C, 1 min)을 수행하였다. 0.7 kb의 PCR산물은 pST-blue로 일차 cloning하여 pSTHBsAg를 제조하였으며 DNA 염기서열분석을 통하여 확인하였다. pSTHBsAg를 *Bam*HI 및 *Sac*I로 절단하여 얻은

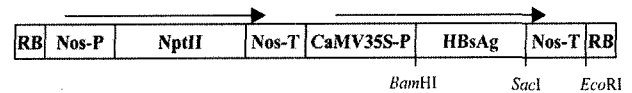


Figure 1. HBsAg expression vector construct.

0.7 kb DNA 단편은 pBI121ΔGUS에 cloning하여 pBIHBsAg를 제조하였다 (Figure 1). pBI121 또는 pBIHBsAg를 지니는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404는 28°C, 220 rpm의 조건에서 배양하여 그 배양액 100 μl (OD<sub>600</sub>=1.2)를 종자 또는 짝을 담구어 놓은 20 mL의 멸균 증류수에 투여하였다. 이어서 aspirator 장치 (Iwaki, AP-13)를 이용한 vacuum-infiltration (10 min)을 시행한 후 paper towel을 이용하여 물기를 가볍게 제거하고 파종하였다.

### Histochemistry

식물재료는 0.2% sodium hypochlorite용액에서 1 min 처리 후 0.2% Tween-20이 포함된 멸균수로 3회 세척하고 멸균수로 최종 세척하였다. 이어서 50 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7.0 용액에 10 min 침지시킨 식물재료는 paper towel로 물기를 가볍게 제거한 후 GUS histochemistry에 이용하였다. X-GlcA (5 mg/100 μl dimethylformamide)을 10 ml의 sodium phosphate용액 (100 mM, pH 7.0)에 첨가하고 potassium ferricyanide와 potassium ferrocyanide 각각 최종 0.5 mM이 되도록 첨가하였다. 준비한 GUS substrate 용액에 세척한 짝을 넣어 37°C에서 반응시켰다 (Jefferson 1987).

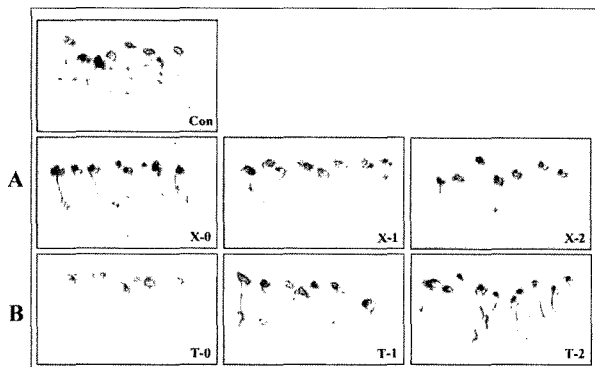
### HBsAg 정량

식물재료는 액체질소를 이용하여 곱게 갈아 이를 extraction buffer [20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.15 M NaCl, 20 mM sodium ascorbate, 0.1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1x protein inhibitor (Roche)]에 섞은 후 원심분리 (12,000 x g 15 min, 4°C)를 2회 실시하여 단백질용액을 회수한 후 Abbott IMx system을 이용한 HBsAg ELISA에 이용하였다.

## 결과 및 고찰

Transient expression system은 유전적으로 안정된 형질전환 식물체의 제조에 비해 도입유전자 발현산물에 대한 기능성 및 안정성을 빠르고 손쉽게 확인할 수 있다는 점에 있는데 근래에는 molecular farming의 목적으로 연구되기도 하였다 (Fisher et al. 1999). 다만 particle gun이나 agroinfiltration방법을 이용하는 경우 DNA 도입부위나 *Agrobacterium*의 감염 부위에서의 제한적 발현만이 예상된다. 한

편, viral vector를 이용하는 경우 viral progeny의 systemic infection이 예상되어 발현부위가 증대될 수 있다는 장점이 주장되고 있다 (Fisher et al. 1999). 본 연구에서는 agroinfiltration 방법을 받아 전후의 종자에 적용하여 다채 종자 또는 받아 중인 종자 중 상대적으로 우수한 시기의 *Agrobacterium* 감염 대상을 선정하고 싹의 왕성한 분얼에 비례한 형질전환 세포들의 증대에 따라 양적 발현증대를 목표로 하였다. 또한 형질전환 효율을 높이기 위한 시도로서 소독제나 표백제로 사용되는 hydrogen peroxide를 시기 별 종자에 화학적 상처를 발생시킨 후 형질전환을 수행하였다. 4°C에서 24 hr 침지시킨 종자를 0 day의 것으로 정하고 (0-day-old seeds: 0ds) 파종 후 1, 2 일 째 [각각 1-day-old (1ds) 및 2-days-old seeds (2ds)]의 것에 대하여 각각 agroinfiltration에 의한 형질전환을 시도하였다. 각 처리 종자는 총 6일의 생육기간을 끝으로 수확하였으며 X-Glc를 이용한 histochemistry 분석을 수행하였다 (Figure 2). 일반적인 agroinfiltration을 수행하였을 경우에는 0ds (Figure 2-A, X-0)에서만 GUS 발현이 주로 나타나고 있으며 1ds나 2ds의 형질전환에서는 발현이 거의 관찰되지 않았다 (각각 X-1, X-2). 한편, hydrogen peroxide를 처리한 경우 상반된 결과를 나타냈다. Hydrogen peroxide를 5% 및 10%를 2 min 또는 4 min 처리하고 형질전환을 실시하였을 때 처리 농도와 처리 시간에 다른 차이가 관찰되었는데 대체적으로 0ds보다는 1ds, 1ds보다는 2ds에서 훨씬 더 많은 GUS 발현이 관찰되었다. 다채에 대한 agroinfiltration은 대체적으로 발아 전의 종자가 발아하기 시작하거나 발아가 매우 진행된 싹보다 상대적으로 효율적인 것을 시사하고 있다. 따라서 transient expression을 위한 형질전환 작업은 침지시킨 종자를 이용할 경우 훨씬 더 효과적일 수 있을 것으로 예상된

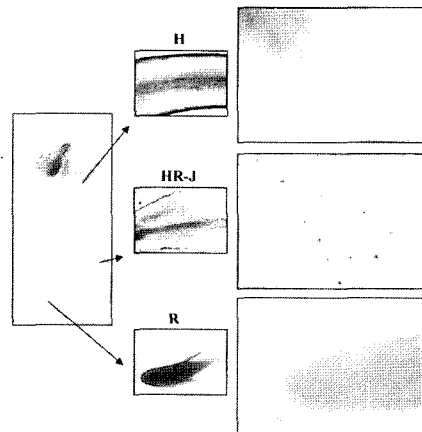


**Figure 2.** Histochemical GUS expression analysis of *B. campestris* var. *narinosa*. Con; non-transformed seedlings. A; Agroinfiltration for GUS gene transformation was performed for pre-germinated seeds (X-0), one-day old seedlings (X-1) and two-days old seedlings (X-2). B; Hydrogen peroxide (10%, 4 min) was treated prior to agroinfiltration for pre-germinated seeds (T-0), one-day old seedlings (T-1) and two-days old seedlings (T-2). All seedlings shown here were cultivated for 6 days.

다. 그러나 hydrogen peroxide로 화학적 상처를 주는 경우는 2ds가 훨씬 더 효과적일 것으로 판단된다.

Figure 3은 0ds의 형질전환된 모습을 현미경으로 관찰한 것이다. GUS 발현은 주로 하배축과 하배축/뿌리 junction 부위이며 종종 떡잎에서도 부분적으로 나타나고 있다 (확대사진 참조). 그러나 뿌리부위에서는 GUS 발현 spot이 전혀 관찰되지 않고 있다. 이러한 현상은 hydrogen peroxide를 처리한 경우에서도 마찬가지로 관찰되었다. 이러한 결과는 *B. campestris* var. *narinosa* 형질전환체 제조를 목표로 할 경우 hydrogen peroxide 무처리 0ds나 처리 2ds에 대한 agroinfiltration을 수행 후 이로부터의 하배축 또는 junction 부위의 explant를 선별 및 재분화의 재료로 이용하는 것도 좋은 시도가 될 것으로 보인다.

ELISA를 이용한 형질전환 싹의 유전자발현 측정을 수행하여 싹의 생육시기별 형질전환 효율을 정량 비교하였으며 transient expression system의 개발을 위한 기반으로 이용하였다. 식물조직에서의 histochemistry에 의한 GUS reporter 활성검정은 여러 가지 이유로 인하여 때로 false positive로 또는 false negative로 판단될 수 있다 (Vitha et al., 1995). 따라서 *in vitro*와 *in situ*의 결과를 비교하는 것이 바람직한데 *in vitro*에서의 4-methylumbelliferyl  $\beta$ -D glucuronide를 이용한 fluorometric assay가 그것이다 (Jefferson et al., 1987). 그러나 본 연구실에서는 현재까지 hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) 형질전환식물체 이용에 관한 연구를 위하여 HBsAg 발현vector (pBIHBsAg)의 제조 및 그 발현 검증을 완료한 상태로서 (결과 미발표) 이를 형질전환효율의 정량적 비교에 이용하였다. 즉, pBIHBsAg와 pBI121을 각각 지니는 *A. tumefaciens* LBA4404를 동일 조건의 *B. campestris* var. *narinosa* 종자 및 싹에 agroinfiltration에 이용하고 그 유전자 발현을 비교분석하였다 (Table 1). Bio-Rad protein 분석 kit를 이용한 total soluble protein (TSP)



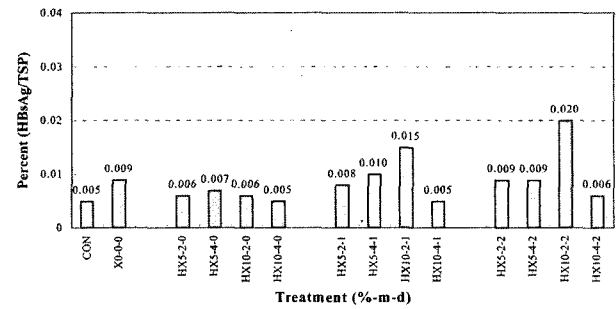
**Figure 3.** Magnified view of histochemical detection of GUS expression in *B. campestris* var. *narinosa*. H, hypocotyl; HR-J, junction area of hypocotyl and root; R, root.

**Table 1.** HBsAg expression level determined by ELISA. Numbers attached to sprouts X (hydrogen peroxide not treated) or HX (hydrogen peroxide treated) mean, in the order, hydrogen peroxide concentration (0, 5 or 10%), treatment duration (0, 2 or 4 min) and age of seedling (0, 1, or 2 day). Total soluble protein (TSP) prepared from 0.5 - 1.0 g of seedlings was determined using Bio-Rad protein assay. From this, HBsAg protein was quantitated using Abbott IMx ELISA system

	Seedlings	TSP ( $\mu\text{g/mL}$ )	HBsAg (ng/mL)
no HX-treated (Day 0)	CON	300.0	14.57
	X-0-0-0	222.5	19.32
HX-treated (Day 0)	HX5-2-0	194.5	11.13
	HX-5-4-0	273.5	19.56
	HX10-2-0	124.0	7.91
	HX10-4-0	273.5	13.22
HX-treated (Day 1)	HX5-2-1	309.5	26.67
	HX-5-4-1	238.0	24.27
	HX10-2-1	194.5	28.51
	HX10-4-1	222.5	11.77
HX-treated (Day 2)	HX5-2-2	297.7	27.87
	HX-5-4-2	341.0	31.64
	HX10-2-2	204.5	40.45
	HX10-4-2	238.5	13.13

의 측정량과 ELISA에 의해 측정된 HBsAg 생산량을 보여 주고 있으며 이러한 결과를 HBsAg/TSP의 percent 값으로 전환시켰다 (Figure 4). Figure 2에서 GUS positive로 잘 나타나고 있는 0ds의 X-0는 HBsAg 발현의 경우 TSP의 0.009% (Table 1, Figure 4, X0-0-0)로 나타나고 있다. 비형질전환의 경우에는 0.005%의 값으로 나타나고 있다. X0-0-0에 대한 수치만을 적용해 볼 때 이를 hydrogen peroxide 처리농도 및 시간별의 0ds, 1ds, 2ds와 비교하였다. 이미 Figure 2의 T-3에서 관찰한 바와 같이 0ds보다 1ds, 1ds보다 2ds의 처리구에서 상대적으로 높은 HBsAg 단백질이 측정되었다. 가령 hydrogen peroxide 10% 용액을 2 min 동안 1ds 싹에 처리했을 때 (Table 1, Figure 4, HX10-2-1) TSP의 0.015% HBsAg가 측정되었으며 2ds 경우 (HX10-2-2) 0.02%를 보여주고 있다. 0.02%의 발현양은 계산적으로는 X0-0-0의 0.009%에 비해 2배 이상인데 만약 비형질전환체의 0.005%를 감안한다면 3배 이상도 기대할 수 있다.

본 연구에서는 발색에 의한 정성적 GUS 발현분석과 ELISA에 의한 HBsAg의 정량적 발현분석을 비교하여 수행함으로써 효율적인 다채종자/싹의 형질전환 조건을 수립하였다. 특히 hydrogen peroxide 처리에 의한 정량적인 발현 증대를 2-3 배 증대시킬 수 있으므로 다채싹을 이용한 일시유전자 발현체계의 개발을 위한 가반을 마련하였다.



**Figure 4.** Percent value of HBsAg protein contained in total soluble protein.

## 적 요

*Brassica campestris* var. *narinosa*는 새싹채소로 애용되는 식물로서 간단한 용기에서 손쉽게 재배할 수 있다. 본 연구에서는 vacuum-infiltration을 통한 *Agrobacterium*-mediated transformation에 의해서 *B. campestris* var. *narinosa* 싹에서의 GUS일시발현을 성공적으로 확인하였다. 발아전의 종자가 발아를 이미 시작한 종자보다 그 형질전환 효율이 높게 나타났다. 한편, hydrogen peroxide를 2일 생장시킨 싹에 처리한 후 형질전환 하였을 때 GUS 발현이 증가되는 것을 관찰하였다. 간염항원유전자의 형질전환과 ELISA에 의한 항원단백질의 발현량 분석 시 hydrogen peroxide 처리 싹이 비처리 형질전환 싹에서 보다 2배 이상의 발현량이 측정되었다.

## 인용문헌

- Bechtold N, Ellis J, Pelletier, G (1993) *In planta* *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. CR Acad Sci Paris 316: 1194
- De Block M, De Brower D, Tenning P (1989) Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants. Plant Physiol 91: 694-701
- Doran PM (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. Curr Opin Biotech 11: 199-204
- Fisher R, Vaquero-Martin C, Sack M, Drossard J, Emans N, Commandeur U (1999) Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. Biotechnol Appl Biochem 30: 113-116
- Giddings G (2001) Transgenic plants as protein factories. Curr Opin Biotech 12: 450-454
- Jain RK, Chowdhury JK, Charma DR, Friedt W (1988) Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant cultures of some *Brassica* species. Plant Cell Tissue Organ Cult 14: 197-206

- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the gus gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387-405
- Jun SI, Kwon SY, Paek KY, Paek KH (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of fertile transgenic plants of chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv 'Spring flavor'). *Plant Cell Rep* 14: 620-625
- Knutzon DS, Thompson GA, Radke SE, Jhonson WB, Knauf VC, Kridl JC (1992) Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carries protein desaturase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 2624-2628
- Mukhopadhyay A, Armugam N, Nandakumar PBA, Pradhan AK, Gupta V, Pental D (1992) *Agrobacterium*-mediated transformation of oil seed *Brassica campestris*: transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. *Plant Cell Rep* 11: 506-513
- Narashimhulu SB, Chopra VL (1988) Species specific shoot regeneration response of *Brassicac*s. *Plant Cell Rep* 7: 104-106
- Radke SE, Andrews BM, Moloney MM, Crouch ML, Kridl JC, Knauf VC (1988) Transformation of *Brassica napus* L. using *Agrobacterium tumefaciens*: developmentally regulated expression of a reintroduced napin gene. *Theor Appl Genet* 75: 685-694
- Swanson EB, Erickson LR (1989) Haploid transformation in *Brassica napus* using an octopine-producing strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor Appl Genet* 78: 831-835
- Vitha S, Benes K, Phillips JP, Gartland KMA (1995) Histochemical GUS analysis. In *Agrobacterium Protocols*, K. M. A. Gartland and M. R. Davey, eds (Totowa, NJ: Humana Press), pp 185-193
- Xiang Y, Wong WKR, Ma MC, Wong RSC (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica campestris* ssp. *Parachinensis* with synthetic *Bacillus thuringiensis cry1Ab* and *cry1Ac* genes. *Plant Cell Rep* 19: 251-256

(접수일자 2005년 10월 26일, 수리일자 2005년 12월 14일)