

알팔파유묘에서의 일시유전자발현분석

신동일 · 박희성*

대구가톨릭대학교 생명공학과

Analysis of Transient Gene Expression in Alfalfa Seedlings

Dong-Il Shin and Hee-Sung Park*

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

Received September 29, 2006; Accepted November 14, 2006

Key words: agroinfiltration, alfalfa seedlings, transient expression

알팔파(*Medicago sativa* L.)는 축산업에서의 중요한 단백질 사료원으로서 또는 사람들이 즐겨 찾는 새싹채소용으로서 잘 알려져 있는 재배식물이다. 현재까지 알팔파에 대한 품종개발의 연구는 매우 다양한데 주로 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 의존한 분자유종연구가 활발히 이루어져 왔다.¹⁻³⁾ 일반적으로 새싹채소용의 알팔파 유묘재배의 경우 간단한 생육장치를 이용하면 10일 이내의 단기간 내에 손쉽게 수행할 수 있다. 식물을 이용한 일시발현시스템은 특정 유전자의 기능을 간편히 분석하기 위한 유용한 수단으로서 이용되며 기술적으로 particle bombardment, electroporation, *Agrobacterium*, 또는 재조합 바이러스 벡터 방법들 중 적절한 수단을 이용하여 유전자도입을 수행하게 된다. 이러한 일시발현시스템은 상당한 시간과 비용이 소요되는 형질전환식물체의 효율적 제조를 위한 예비 분석이 주 목적이었으나 근래에는 재조합 의약품 단백질의 신속하고 용이한 생산을 목적으로 형질전환식물체 대체방안으로도 연구되고 있다.⁴⁻⁶⁾ 본 연구에서는 vacuum infiltration을 통한 *Agrobacterium*-mediated transformation(agroinfiltration)을 이용하여 생육과정 중의 알팔파유묘로의 유전자도입을 시도하여 유묘를 이용한 일시발현시스템의 가능성을 연구하였다. 즉, 1) 발아 후 초기생장단계의 유묘에 대하여 보다 효율적 유전자도입방법의 개발, 2) 형질전환 알팔파유묘의 단기 생육과정을 통한 세포분열과 비례한 유전자발현 증대의 실현, 3) 이를 통한 간편한 일시발현시스템의 개발을 목적으로 하였다. 본 연구에서는 일차적으로 발아 후의 성장시기별 알팔파유묘에 대한 전통적인 *Agrobacterium*이용 형질전환을 시도하였으며 그 후 일정 기간 생육시킨 후 일시발현정도를 fluorometric GUS assay 및 RT-

PCR에 의하여 분석하였다. 한편, 이와 비교적으로 유묘 표면에 대한 chemical abrasive로서의 hydrogen peroxide 처리 및 화학적 상해의 유발 그리고 이를 통한 형질전환을 실시하여 유묘에서의 GUS일시발현의 변화를 양적으로 비교분석하였다. Hydrogen peroxide는 그 산화력에 의하여 산업적으로 다양하게 표백제로서 이용되고 있으며 일반적으로는 살균소독제로서도 이용되고 있다. 그 처리 농도에 따라 동식물 및 미생물 세포는 그 생육이 상당히 저하될 수 있으며 식물에 처리할 경우 식물 세포벽의 구조를 느슨하게 하는 역할(cell-wall loosening effect)도 알려져 있다.⁷⁾ 현재까지 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환의 효율을 높이기 위하여 sonication이나 silicon carbide particle에 의하여 야기되는 물리적 상해를 이용한 연구가 보고된 바 있다.⁸⁻¹⁰⁾

알팔파종자(아시아종묘)는 표면살균을 위하여 Tween-20을 첨가한 0.4% sodium hypochlorite 용액에 5 min 처리한 후 멸균수로 충분히 세척하였다. 살균된 종자는 멸균수에 담아 4°C에서 24 hr 침지시킨 후 멸균 증류수로 적신 paper towel위에 파종하였으며 25°C 암 상태의 발아 및 생육환경을 제공하였다. 유묘에 대한 형질전환은 agroinfiltration과정에 의하였다. 유묘에서의 일시발현을 위한 발현용벡터로서 GUS 유전자를 지니는 pBI121(Clontech, USA)을 이용하였다. pBI121을 지니는 *A. tumefaciens* LBA4404를 배양하여 배양액 1 ml(OD₆₀₀=1.2)을 20-30 g의 짝을 담귀 놓은 200 ml의 1/2 × MS배지에 혼합하였다. 이어서 vacuum-infiltration(20 min)을 시행한 후 물기를 가볍게 제거하고 5일간 생장을 지속시켰다. 알팔파유묘에 대한 화학적 상처(chemical wounds)를 발생시키기 위하여 3, 5, 7%의 hydrogen peroxide 용액을 준비하여 이들 용액을 각각 3 min 처리하였다. 이어서 멸균수로 유묘를 충분히 세척 후 laminar flow bench에서 30 min 반건조(semi-air dry)과정을 거친 후 agroinfiltration을 상기와 같이 실시하고 역시 5일간 생장을 지속시켰다. GUS mRNA의 발현분석을 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 액체질소를 이용하여 유묘를 곱게 갈은 후 이로부터의 total RNA는 Tri-reagent(MRC Inc.)를 이용하여 분리하였다. 순수 mRNA는 Chemagic mRNA kit(Chemagen Inc.)를 이용하여 분리하였으며 mRNA를 template로 이용한 1st-strand cDNA 합성은 M-MuLV reverse transcriptase 및 oligo-dT primer를 이용하여 42°C, 1 hr 수행하였다. PCR primer로서 5' = cattacag tctggatcgcgaa-3'는 forward strand용 그리고 5'-aagttcatgccagtcga gcg-3'는 reverse strand용으로 준비하였으며 1.8 kb GUS DNA 중에서 1.7 kb DNA증폭이 이루어질 수 있도록 design하였다. PCR반응(94°C, 45 sec/52°C, 45 sec/72°C, 2 min)은 30 cycle을 진행시켰다. 형질전환 유묘에서의 GUS효소 활성 측정은 fluorometric assay에 의하였다.¹¹⁾ 막사발을 이용하여 유묘에 cold GUS extraction buffer(50 mM NaPO₄ [ph 7.0], 10 mM EDTA, 0.1% sarkosyl, 0.1% Triton X-100, and 10 mM DTT)를 첨가하여 균질화 시키고 원심분리(14,000 rpm, 5 min, 4°C)에 의하여 상등액을 모아 분석에 이용하였다. 10 μl의 assay buffer(1 mM 4-methylumbelliferyl β-D-glucuronide를 포함한

*Corresponding author
Phone: +82-53-850-3245; Fax: +82-53-850-3459
E-mail: hspark@cu.ac.kr

extraction buffer)와 섞고 37°C, 3 hr 반응시켰으며 이어서 200 μ l의 0.2 M Na_2CO_3 을 첨가하여 반응을 종료시켰다. Fluorescence의 측정을 위하여 PerkinElmer VIVTOR 3 microtiterplate reader를 사용하였다. Total protein양은 Bio-Rad protein assay 용액을 이용하여 결정하였다.

알팔파 종자의 발아는 파종 후 24시간 경과 시 활발히 진행 되는 것이 관찰되었으며 이 시기를 포함하여 3일 간에 걸쳐 생육중인 유묘(1, 2, 3일 쯤의 유묘를 각각 D1, D2, D3로 표시)에 대하여 agroinfiltration을 각각 수행하였다. 이들에 대한 독립적인 형질전환작업을 수행한 후 각기 5일간의 *Agrobacterium*과의 cocultivation의 의미를 지니는 생육기간을 거치게 한 후 수확한 형질전환유묘(T-D1, T-D2, T-D3)에 대하여 GUS발현을 분석하였다. Fig. 1에서와 같이 비형질전환 알팔파(NT-D1~D3)를 기준으로 비교 시 형질전환 알팔파유묘의 GUS활성도는 T-D1과 T-D2에서 약간 증가하였으며 상대적으로 T-D3가 높게 나타났다. 이는 *Agrobacterium*이용 일반 알팔파의 형질전환과 재분화체 제조의 목적을 위한 것일 때 explant의 선택은 D3 유묘가 그 효율성이 높은 것으로 가정할 수 있다. 그러나 GUS enzyme 활성도의 편차를 감안하였을 때 agroinfiltration에 의한 알팔파유묘의 형질전환이 매우 효율적이지 않다는 것을 시사하고 있다. 한편, hydrogen peroxide(HX)의 처리에 의한 유묘표면에서의 chemical wound 형성 및 이어진 agroinfiltration에 의한 형질전환을 역시 GUS 활성도 측정에 의하여 비교하였다. HX 처리농도의 결정은 예비실험을 통하여 이루어졌으며 무처리 알팔파유묘의 생육과 비교 시 처리된 유묘의 생육이 80-90%(생체중량) 이상이 유지되는 HX7% 또는 그 이하의 농도인 HX5% 및 HX3%를 정하게 되었다. HX10% 용액 처리의 경우 심한 생육저하(무 처리군 생체중량의 40-50% 수준)가 관찰되었으며 강력한 산화작용에 의한 유묘생장의 저해로 판단되었다. 한편, HX7% 처리 경우에도 종자의 품질상태에 따라 때로는 무 처리의 60-70% 정도의 생육에 그치는 경우도 관찰되었다. 따라서 불량종자를 우선 제거하기 위하여 살균 및 침지과정 이전에 15% NaCl 용액에서 가라앉은 종자만을 사용하고 떠 있는 상태의 것(불량종자)은 제거하였다. Fig. 1에서와 같이 날짜별 유묘에 대한 HX 농도별 처리는 다른 수준의 GUS 발현이 측정되었다. 즉 T-D1의 경우 HX3%의 처리가 HX5% 또는 HX7% 처리에 비해 상대적으로 높은 GUS 효소활성의 결과가 나타났으며 기타의 처리농도에서는 비 처리에서의 경우도 분명한 차이점을 보이지 않았다. T-D2의 경우에는 오히려 고농도인 HX7%처리가 가장 높은 GUS효소활성을 보이고 있으며 기타의 처리는 비처리와 유사한 수치를 보여주고 있다. 한편 T-D3의 경우 중간 농도인 5%에서 가장 높은 수치를 보이고 있으며 기타처리는 역시 비처리와 유사한 결과를 보이고 있다. 본 연구의 결과를 통하여 HX의 처리 및 유묘에 대한 상해유발이 단순한 *Agrobacterium*을 이용한 알팔파유묘의 형질전환에 비해 그 효율을 확연히 증대시킨다는 것을 판단할 수 있었지만 생육 단계와 HX처리농도차이에서의 상관관계는 분명치 않았다. 다만 가장 발아초기단계인 D1 유묘에서 저농도 HX 처리가 *Agrobacterium* 감염을 위한 적정 상해를 발생시키는 한편 고농도 HX처리는 어린 유묘에서의 지나친 화학적 상해 및 세포손

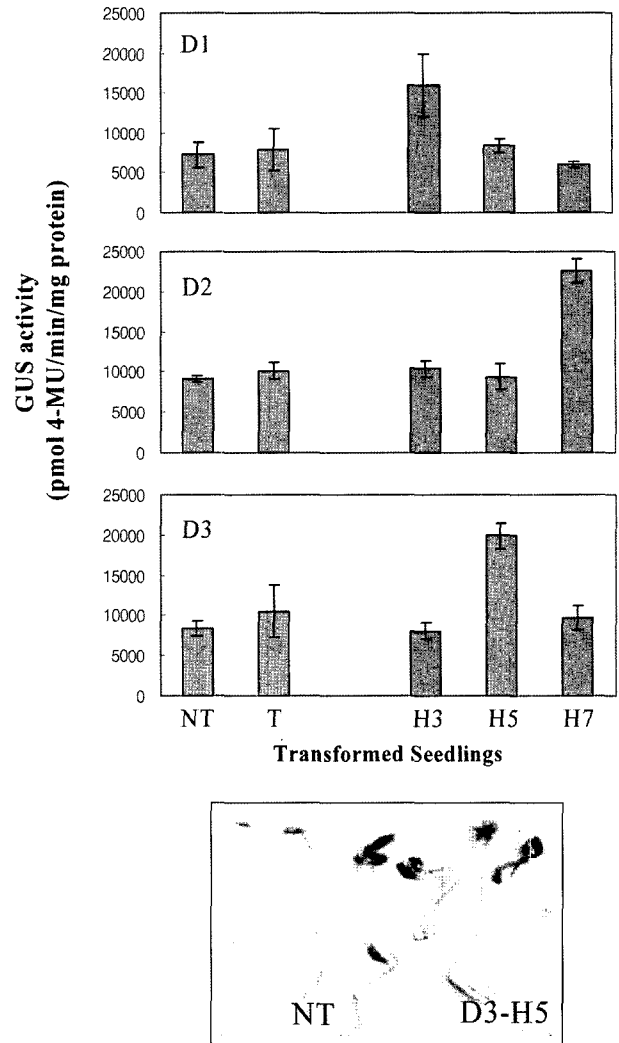


Fig. 1. Fluorometric assay of GUS enzyme activity in transformed alfalfa seedlings. *Agrobacterium*-mediated transformation via vacuum-infiltration was performed to alfalfa seedlings at the age of 1, 2, and 3 day (D1, D2, D3) following germination. After 5 days of cocultivation for each treatment, seedlings were analyzed for GUS enzyme activity by fluorometric assay. NT, non-transformed seedlings; T, transformed seedlings; H3-H7, transformed seedlings following treatment with HX3-7%. Bars represent an average value of three independent experimental batches. GUS-stained non-transformed (NT) and transformed (D3-H5) alfalfa seedlings are seen in the box below the graph.

상을 야기하고 이에 따른 *Agrobacterium* 감염 저하를 추측할 수 있을 뿐이다. 종합적으로 판단 시 발아 후 첫째 날의 D1에 대한 HX3-7% 농도별 처리를 시행하고 가장 높은 유전자발현군을 결정하는 것이 바람직하여 따라서 일시발현유묘를 통한 외래단백질의 생산을 6일 내에 완성할 수 있을 것으로 기대한다. 보통 생육 3일 경과 이후의 유묘에 대한 형질전환 및 발현 비교는 시도하지 않았으며 본 연구의 목적인 단기간(7-8일)에 걸친 유묘생육 및 일시발현의 개발을 고려한 때문이었다.

GUS mRNA의 발현수준측정에 의하여 HX처리 및 무처리 형질전환유묘에서의 발현을 양적으로 분석하였다. 즉, HX를 처리하지 않은 T-D1, T-D2, T-D3의 형질전환체와 fluorometric assay에서 높은 GUS 발현량이 측정된 T-D1/HX3, T-D2/HX7,

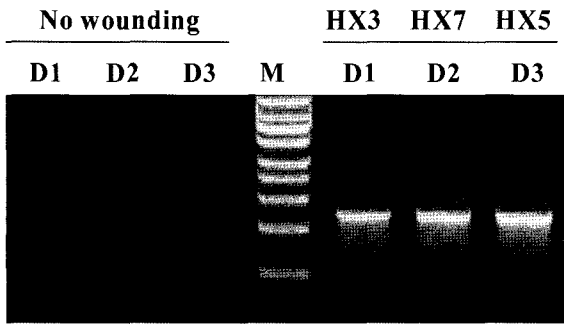


Fig. 2. RT-PCR analysis of GUS mRNA expression in transformed alfalfa seedlings. RT-PCR products of transformed seedlings without (No wounding) and with HX treatment (HX3-HX7) were analyzed in 1% agarose gel electrophoresis. D1-D3 mean the age of seedlings when transformation was processed.

T-D3/HX5에서의 발현을 비교하였다. RT-PCR에 의한 DNA product가 Fig. 2에 나타나고 있다. T-D1, T-D2, T-D3에서의 발현은 약하였지만 형질전환작업 시기와 상관없이 유사한 정도의 DNA산물을 나타내고 있다. 이는 발아 후 3 일간에 걸친 알팔파 유묘에 대하여 agroinfiltration을 실시할 경우 그 형질전환 효율이 비슷한 수준일 것으로 판단되는 부분이다. 한편, T-D1/HX3, T-D2/HX7, T-D3/HX5에서의 PCR산물의 경우 HX무처리 유묘에 비하여 7-10배 정도 높음을 측정할 수 있었다. T-D1/HX3가 T-D2/HX7이나 T-D3/HX5에 비하여 GUS발현이 약간 높은 수준으로 비교 측정되었다. 이러한 결과는 fluorometric GUS assay의 결과를 재차 확인해주고 있는 바이며 본 연구에서 의도한 적절한 화학적 상해를 이용한 형질전환의 효율 증대가 이루어졌음을 제시하고 있다.

본 연구는 HX의 처리를 통하여 알팔파유묘에 화학적 상해를 발생시키고 이를 이용하여 *Agrobacterium*에 의한 형질전환을 실시하였을 때 HX를 처리하지 않은 유묘에서보다 GUS유전자의 일시발현이 증가되는 것을 제시하고 있다. 특히 저농도인 HX 3% 용액을 발아 후 첫째 날 유묘에 처리하는 경우 기타 처리에서보다 상대적으로 높은 발현정도를 확인할 수 있었다. 이는 저렴하게 대량으로 준비할 수 있는 알팔파 종자를 이용 시 6-7일 정도의 짧은 생육기간을 거치게 되면 그 결과물인 형질전환유묘로부터 재조합단백질을 용이하게 생산할 수 있을 것이라는 가능성을 제시하고 있다. 한편, 여러 품종의 알팔파들에 대한 HX처리 및 형질전환에 의하여 유전자발현을 비교할 경우 또는 CaMV35S promoter의 전사증대 요소의 도입과 그

발현 비교에 의하여 보다 효율적인 알팔파유묘를 이용한 일시 발현시스템을 기대해 볼 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Austin-Philips, S. and Ziegelhoffer T. (2001) The production of value-added proteins in transgenic alfalfa. In *Molecular Breeding of Forage Cops.* Ed. G. Spangenberg. Dordrecht: Kluwer Academic pp. 285-301.
2. Deak, M., Kiss, G. B., Koncz, C. and Dudits, D. (1986) Transformation of Medicago by *Agrobacterium* mediated gene transfer. *Plant Cell Rep.* **5**, 97-100.
3. Shahin, E. A., Spielmann, A., Suhkapinda, K., Simpson, R. B. and Yasher, M. (1986) Transformation of cultivated alfalfa using disarmed *Agrobacterium tumefaciens*. *Crop Sci.* **26**, 1235-1239.
4. Khoudi, H., Laberge, S., Ferullo, J. M., Bazin R., Darveau, A., Castonguay, Y., Allard, G., Lemieux, R. and Vezina, L. P. (1999) Production of a diagnostic monoclonal antibody in perennial alfalfa plants. *Biotech. Bioeng.* **64**, 135-143.
5. Doran, P. M. (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr. Opin. Biotech.* **11**, 199-204.
6. Fisher, R., Vaquero-Martin, C., Sack, M., Drossard, J., Emans, N. and Commandeur, U. (1999) Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotech. Appl. Biochem.* **30**, 113-116.
7. Gomez, L. D., Casano, L. M. and Trippi, V. S. (1995) Effect of hydrogen peroxide on degradation of cell wall associated proteins in growing bean hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1259-1264.
8. Flores Solic, J. I., Mlejnek, P., Studena, K. and Prochazka, S. (2003) Application of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation in *Chenopodium rubrum* L. *Plant Soil Environ.* **49**, 255-260.
9. Singh, N. and Chawla, H. S. (1999) Use of silicon carbide fibers for *Agrobacterium*-mediated transformation in wheat. *Curr. Sci.* **76**, 1483-1485.
10. Amoah, B. K., Wu, H., Sparks, C. and Jones, H. D. (2001) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of uidA in wheat inflorescence tissue. *J. Exp. Bot.* **52**, 1135-1142.
11. Jefferson, R. A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the gus gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387-405.