

유채유묘의 형질전환을 통한 일시발현시스템의 개발

신 동 일 · † 박 희 성

대구가톨릭대학교 생명공학과

(접수 : 2006. 11. 3., 게재승인 : 2006. 11. 20.)

Development of Transient Expression System Using Transformed Seedlings of *Brassica napus* var. *napus*

Dong-Il Shin and Hee-Sung Park†

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

(Received : 2006. 11. 3., Accepted : 2006. 11. 20.)

For molecular breeding purpose, genetic transformation of *Brassica napus* cultivars has been extensively performed using *Agrobacterium* method. *B. napus* cv. *napus*, one of major oil crops, can be transformed via *Agrobacterium*-based method. We demonstrated that *Agrobacterium*-mediated transformation via vacuum infiltration slightly worked for the seedlings of *B. napus* cv. *napus* according to fluorometric GUS enzyme analysis. In contrast, transformation efficiency was highly enhanced when the seedlings, prior to agroinfiltration, were treated with sodium hydrosulfite solution as a chemical wounding agent. GUS gene expression in transformed seedlings that was confirmed by RT-PCR suggests their usefulness for the development of transient expression system.

Key Words : *Brassica napus* cv. *napus*, transient expression system, sodium sulfite, chemical wounding, agroinfiltration

서 론

Brassica species는 유지 또는 식용채소 등으로서의 의미가 중요한 작물로서 이들에 대한 *Agrobacterium*을 이용한 유전자도입에 따른 새로운 품종의 개발연구가 매우 활발하다. 특히, 산업적 경제적 이유로 인하여 유지식물인 canola (*B. napus* L.)를 이용한 성공적인 연구가 많이 보고되었다(1-4). 한편, *B. napus* cv. *napus*는 유채로 흔히 불리며 油脂 또는 새싹채소용으로 재배되고 있는데 이 또한 *Agrobacterium*법에 주로 의존한 형질전환, 재분화체의 제조관련연구가 다양하게 이루어져 왔다. 유채의 형질전환은 자엽축을 많이 이용하는 편이다(5).

본 연구에서는 *Agrobacterium*-mediated vacuum infiltration (agroinfiltration)(6) 방법을 이용하여 유채 유묘로의 유전자도입을 시도하였다. 이를 위하여 기존의 보편적인 agroinfiltration 방법과 화학적 상해를 유발시킨 유묘를 이용한 agroinfiltration을 수행함으로써 결과적인 형질전환정도를 양적으로 비교분석하였다. Hydrogen peroxide (HPX)는

강력한 산화력을 가진 물질이며 그리고 sodium hydrosulfite (SHS)는 강력한 환원력을 가진 물질인데 두 화학물질 모두 chemical abrasive로서 이들의 강력한 표백특성을 이용하여 다양한 산업분야에 사용하고 있다. 이들 물질은 고농도에서는 식물체에 대하여 독성작용을 당연히 나타낼 것으로 예상할 수 있다. 그러나 본 연구에서는 일차적으로 유채 유묘에 이들 물질을 처리시 생육저해를 일으키지 않는 저농도 처리조건을 결정하였으며 이러한 저농도의 HPX 또는 SHS처리에 따른 약한 화학적 상해 발생을 기대하였다. 또한 그에 따른 *Agrobacterium* 감염효율의 증가를 기대하면서 그 결과인 유묘에서의 형질전환정도를 fluorometric assay 및 RT-PCR에 의한 GUS 효소활성 및 GUS mRNA의 생성분석으로 비교하였다. 본 연구의 결과를 통하여 유채 유묘를 이용한 일시발현체계의 개발가능성을 제시하였다.

재료 및 방법

유묘생육

유채종자 (아시아종묘)는 표면살균을 위하여 Tween-20 3~4 방울을 첨가한 0.4% sodium hypochlorite 용액에 5 min 처리한 후 멸균수로 충분히 세척하였다. 살균된 종자는 멸

† Corresponding Author : Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Kyungsan, Kyungbuk 712-702, Korea

Tel & Fax : Tel : +82-53-850-3245

E-mail : hspark@cu.ac.kr

균수에 담겨 4°C에서 24 hr 침지시킨 후 멸균 증류수로 적신 paper towel 위에 과중하였으며 25°C 암 상태의 발아 및 생육환경을 제공하였다.

형질전환 및 화학적 상태

유묘에 대한 형질전환을 위하여 agroinfiltration을 수행하였으며 유묘에서의 일시발현을 위한 식물발현용벡터로서 GUS 유전자를 지니는 pBI121 (Clontech, USA)을 이용하였다. pBI121을 지니는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404는 28°C, 220 rpm의 조건에서 배양하여 그 배양액 1 ml ($OD_{600} = 1.2$)을 20~30 g의 유묘를 담귀 놓은 200 mL의 1/2 x MS 배지에 혼합하였다. 이어서 aspirator 장치를 이용한 vacuum-infiltration (20 min)을 시행한 후 paper towel을 이용하여 물기를 가볍게 제거하고 생육을 지속시켰으며 과중 일로부터 이를 포함하여 총 8일간 생육기간이 주어졌다. 유채 유묘에 대한 화학적 상처 (chemical wounds)를 발생시키기 위하여 3, 5, 7%의 HPX 용액 또는 1, 2% SHS 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 실시한 후 생육을 지속시켰다.

GUS 효소활성분석

형질전환 유묘체에서의 GUS 효소활성 측정은 fluorometric assay에 의하였다(7). 막자사발을 이용하여 유묘체에 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 균질화시키고 원심분리 (14,000 rpm, 5 min, 4°C)에 의하여 상등액을 모아 분석에 이용하였다. 10 μ l의 상등액을 90 μ l의 assay buffer (1 mM 4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide를 포함한 extraction buffer)와 섞고 37°C, 3 h 동안 반응시켰으며 이어서 200 μ l의 0.2 M Na₂CO₃을 첨가하여 반응을 종료시켰다. Fluorescence의 측정을 위하여 PerkinElmer VIVTOR 3 microtiterplate reader를 사용하였다. Total protein양은 Bio-Rad protein assay용액을 이용하여 결정하였다.

GUS mRNA 분석

GUS mRNA의 발현분석을 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 액체질소를 이용하여 유묘체를 곱게 갈은 후 이로부터의 total RNA는 Tri-reagent (MRC Inc.)를 이용하여 분리하였다. 순수 mRNA는 Chemagic mRNA kit (Chemagen Inc.)를 이용하여 분리하였으며 500 ng의 mRNA를 template로 이용한 1st-strand cDNA합성은 M-MuLV reverse transcriptase 및 oligo-dT₁₅ primer를 이용하여 42°C, 1 h 동안 수행하였다. PCR primer로서 5'-cattacgtctgcatcgcaa-3'는 forward strand용 그리고 5'-aagttcatgccagtcgagc-3'는 reverse strand용으로 준비하였으며 1.8 kb GUS DNA 중에서 1.7 kb DNA 증폭이 이루어질 수 있도록 design하였다. PCR 반응 (94°C, 45 sec / 52°C, 45 sec / 72°C, 2 min)은 30 cycle을 진행시켰다.

결과 및 고찰

식용 또는 산업용 유지작물로서 또는 녹색 채소용으로서의 *Brassica* 식물에 대한 분자육종 연구는 근래 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 및 재분화의 방법으로 이루어지고 있으며 oil 성분의 변화, 제초제 저항성, 해충 저항성, 단백질 성분 변화 등에 초점이 맞추어져 왔다. *Brassica* 식물의 형질전환을 위한 재료는 다양한 explant를 사용하는데 형질전환효율은 높지 않은 편이다(8-10). 본 연구에서는 새싹채소로도 애용되는 *B. napus* cv. *napus* (이하 유채) 유묘를 대상으로 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 (agroinfiltration)을 시도하였다. 또한 *Agrobacterium*의 감염이 상처부위를 통하여 좀 더 효율적으로 발생한다는 점에 착안하여 화학적 상해제 (chemical wounding agent)로서의 HPX 및 SHS처리에 따른 형질전환율을 비교분석하였다.

우선 유채 유묘에 대하여 HPX 및 SHS의 농도 및 시간 별로 처리하고 이에 따른 생육저해정도를 측정하였다. 발아부터 3일이 경과된 유묘에 대하여 실시하였으며 그 결과는 처리 후 5일째 유묘의 생체중량으로 비교하였다(Fig. 1). 10% 또는 그 이상의 HPX 및 3% 또는 그 이상 농도의 SHS를 처리할 경우 상당한 생육저해를 초래하였으며 정상적인 대조군과 비교시 60% 또는 그 이상의 상당한 감소가 관찰되었다. 이는 강력한 산화 또는 환원력에 의한 표백작용에 의한 생장 저해로 쉽사리 판단될 수 있었다. 7% HPX 또는 2% SHS의 경우 정상군의 80% 정도의 생체중량이 측정되었고 그 이하 농도에서는 90% 이상의 생육상태에 이르렀다. 처리시간에 있어서는 1-5 min으로 하였을 때 7% HPX 또는 2% SHS의 경우에도 3 min 이상 처리 시 생육저해가 훨씬 두드러지게 나타났다.

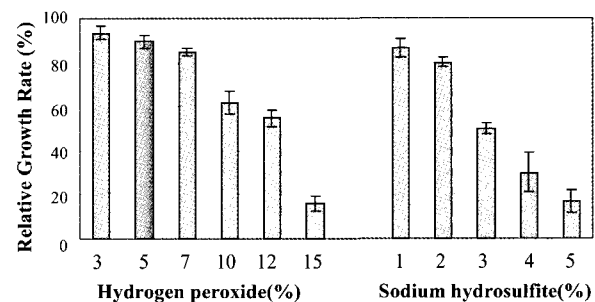


Figure 1. Effect of HPX and SHS solution on the growth of *B. napus* cv. *napus* seedling (1-day old seedlings were treated with 3-15% HPX and 1-5% SHS. After 6 days of growth, their fresh weight was converted to % value in relevance to that of the control growth).

Fluorometric assay에 의하여 발달단계별 유묘 즉 radicle 발현시부터 3일만에 걸친 유채유묘에 대하여 agroinfiltration을 이용한 형질전환과 cocultivation을 수행 후 GUS효소활성을 측정하였다(Fig. 2). HPX 및 SHS 농도별 처리 후 형질전환된 유묘, 비처리 형질전환 유묘 및 비형질전환체에서의 GUS효소활성 차이가 보여지고 있다. 발아 첫째일의 유묘인 D1S (Day 1 seedling) 그리고 D2S (Day 2 seedling) 및 D3S (Day 3 seedling)에 대하여 각각 형질전환시켰을 때 이

들은 비형질전환유묘 (non-transformed seedling)에 비하여 4-MU product의 수준이 D1S에서는 비슷하게 D2S 와 D3S의 경우에는 약간 높게 나타남으로써 형질전환 및 일시 발현을 위한 유체유묘재료는 D2S와 D3S가 비교적 높이 평가되었다. 본 연구에서는 cotyledon과 hypocotyl 각각에서의 GUS활성을 구분하지 않았다. 한편, HPX 및 SHS의 처리에 따른 형질전환 시 D1S-D3S에서는 각기 다른 결과가 나타났다. 즉 D1S 및 D2S의 경우 처리에 따라 GUS효소활성이 비처리 형질전환체의 background 수준에 비하여 약간 증가하는 것으로 나타났으나 충분한 차이를 나타내지 않고 있다. 다만 SHS의 처리가 HPX 처리에 비해 약간 높은 활성을 보여주었다. 한편, D3S의 경우 특히 SHS 처리효과가 증폭되는 것을 보여주었으며 HPX의 경우 D1S 또는 D2S에 대한 처리와 차이를 나타내지 않았다. D3S에 대한 2% SHS의 처리는 결과적으로 GUS 활성이 비처리형질전환유묘와 비교시 2~3배 정도 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 SHS용액을 D3S에 대하여 적절하게 처리할 경우 유체의 형질전환이 효율적으로 이루어질 수 있음을 짐작하게 한다. 또한 유체의 형질전환 및 재분화를 통한 신품종의 개발에 있어서 발아 시점에서 3일째 또는 그 이후의 유묘에 대한 SHS의 처리가 매우 효과적일 수 있음을 제시하고 있다.

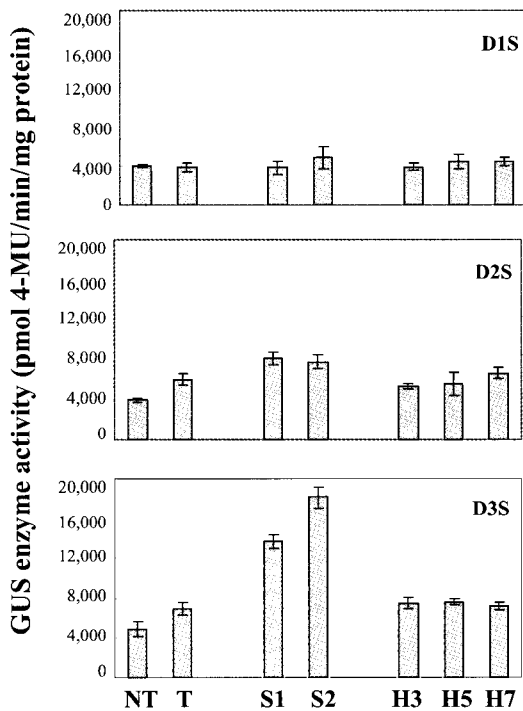


Figure 2. Fluorometric analysis of GUS enzyme activity (GUS enzyme activity was evaluated for each of seedlings (D1S-D3S): NT, non-transformed; T, transformed; H3, H5 and H7, transformed seedlings following treatment of 3, 5 and 7% HPX; S1 and S2, transformed seedlings following treatment of 1 and 2% SHS).

SHS 처리 및 비처리 형질전환유묘를 이용하여 RT-PCR에 의한 GUS mRNA의 발현수준을 측정하였다. 그 결과는 Fig. 3에서 보여주고 있다. 비형질전환 유묘체(Fig. 3, NT)에서는

PCR에 의한 DNA 산물이 나타나지 않고 있으며 이에 반해 D3S 형질전환체 (T)의 경우 1.7 kb DNA product가 관찰되었다. 이는 일반적 *Agrobacterium* 방법을 이용한 유체의 형질전환이 충분히 가능하다는 것을 확인시켜주고 있다. 한편, SHS를 처리한 형질전환 유묘체 (S2)의 경우 1.7 kb DNA product가 관찰되는데 density면에서 보다 강하게 관찰되고 있다. 이러한 상대적 차이는 형질전환 유전자의 절대적 차이로 결정지을 수는 없으나 fluorometric assay에 의한 GUS enzyme activity차이를 감안할 때 보다 효율적인 형질전환 및 그에 따른 GUS발현의 결과라는 것을 시사하고 있다.

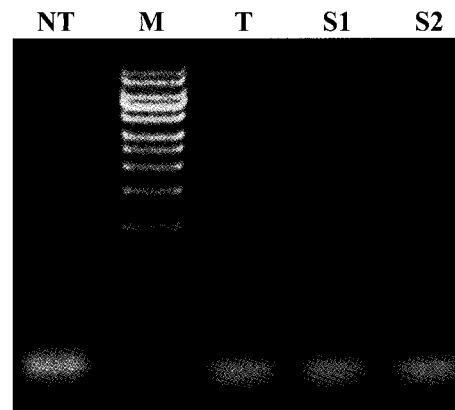


Figure 3. RT-PCR analysis for GUS mRNA expression (In 1% agarose gel electrophoresis, cDNA product was analyzed using non-transformed seedlings (NT), transformed D3S (T), 1 and 2% SHS-treated and then transformed D3S (S1 and S2). M denotes DNA size marker).

본 연구는 화학적 상해제를 처리한 유체 유묘와 처리하지 않은 유묘를 *Agrobacterium* 이용 형질전환을 실시하였을 때 그 차이를 GUS 효소활성과 mRNA 발현분석으로 비교하였다. 그 결과, SHS가 처리된 유묘가 비처리된 형질전환유묘에서보다 GUS 유전자의 발현정도가 훨씬 증가한다는 것을 보여주고 있는데 특히 발아 후 3일째의 유묘가 본 실험조건 하에서는 가장 높은 GUS 발현정도를 보여주고 있다. 이러한 결과는 농업적 또는 산업적으로 경제적 가치가 높은 *Brassica* 식물들의 형질전환 효율을 높일 수 있는 가능성을 제시하고 있으며 특히, 유체의 유묘를 이용한 일시발현체계의 개발 및 일시발현을 이용한 재조합단백질의 생산(11, 12)을 위한 화학적상해의 필요성을 입증하고 있다.

요 약

분자육종의 목적을 위하여 *Agrobacterium*을 이용한 *Brassica napus* 식물의 유전적 형질전환은 폭 넓게 시행되어 왔다. *B. napus* cv. *napus*는 유지작물의 하나이면서 이 또한 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환이 가능하다. 본 연구에서는 agroinfiltration방법을 이용시 유체유묘의 형질전환이 낮은 효율로 나타나고 있으며 이는 fluorometric GUS assay에 의하여 판단되었다. 대조적으로 유체유묘에 대하여

sodium hydrosulfite 용액을 agroinfiltration 과정 이전에 처리할 경우 형질전환율이 상당히 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. RT-PCR에 의한 GUS유전자발현의 확인을 통하여 유채유도를 이용한 일시발현체계의 개발가능성을 제시하였다.

REFERENCES

1. Radke, S. E., B. M. Andrews, M. M. Moloney, M. L. Crouch, J. C. Kridl, and V. C. Knauf (1988), Transformation of *Brassica napus* L. using *Agrobacterium tumefaciens*: developmentally regulated expression of a reintroduced napin gene, *Theor. Appl. Genet.* **75**, 685-694.
2. Swanson, E. B. and L. R. Erickson (1989), Haploid transformation in *Brassica napus* using an octopine-producing strain of *Agrobacterium tumefaciens*, *Theor. Appl. Genet.* **78**, 831-835.
3. Knutzon, D. S., G. A. Thompson, S. E. Radke, W. B. Jhonson, V. C. Knauf, and J. C. Kridl (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.
4. De Block, M., D. De Brower, and P. Tenning (1989), Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleacea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants, *Plant Physiol.* **91**, 694-701.
5. Moloney, M. M., J. M. Walker, and K. K. Sharma (1989), High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors, *Plant Cell Rep.* **8**, 238-242.
6. Bechtold, N., J. Ellis, and G. Pelletier (1993), *In planta* *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants, *CR Acad. Sci. Paris* **316**, 1194-1199.
7. Jefferson, R. A. (1987), Assaying chimeric genes in plants: the gus gene fusion system, *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387-405.
8. Pua, E. C., A. Mehra Palta, F. Nagey, and N. H. Chua (1987), Transgenic plants of *Brassica napus* L., *Biotechnology* **5**, 815-817.
9. Stewart, C. N. Jr., M. J. Adang, J. A. All, P. L. Raymer, S. Rhamachandran, and W. A. Parrott (1996), Insect control and dosage effects in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis* cryIAC gene, *Plant Physiol.* **112**, 115-120.
10. Jain R, K., J. K. Chowdhury, D. R. Charma, and W. Friedt (1988), Genotypic and media effects on plant regeneration from cotyledon explant cultures of some *Brassica* species, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **14**, 197-206.
11. Fisher, R., C. Vaquero-Martin, M. Sack, J. Drossard, N. Emans, and U. Commandeur (1999) Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**, 99-100.
12. Vaquero, C., M. Sack, J. Chandler, J. Drossard, F. Schuster, M. Monecke, S. Schillberg, and R. Fisher (1999), Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11128-11133.