

고구마 뿌리절편에서의 β -glucuronidase 일시발현

신동일 · 박희성*

대구가톨릭대학교 생명공학과

Transient β -Glucuronidase Expression in Root Slices of Sweet Potato

Dong-II Shin and Hee-Sung Park*

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

Received November 1, 2007; Accepted November 15, 2007

Key words: chemical wounding, root slice, sweet potato, transient gene expression

고구마(*Ipomoea batatas* L.)는 국내외적으로 매우 잘 알려져 있는 뿌리 작물로서 그 뿌리는 식용 외에도 전분 및 알코올 원료 또는 사료로서도 효용가치가 높다. 고구마의 생산은 전 세계적으로 벼, 보리, 옥수수, 감자에 이어 다섯 번째에 이를 만큼 그 규모가 크며¹⁾ 이러한 산업적, 경제적 중요성 때문에 내충성 제초제 저항성 등 신품종개발과 관련된 분자유종학적 연구가 활발히 진행되어 왔다.^{2,3)} 고구마의 형질전환은 genotype에 따라 상당한 차이가 나는 것으로 보고되어 있다.⁴⁾ 일반적으로 식물 형질전환의 주요 목적은 바람직한 신품종의 제조 또는 molecular farming을 위한 것으로서 이 때, 안정된 형질전환체의 제조는 상당한 시간과 노력이 소요되는 힘든 작업인 만큼 일시발현시스템(transient expression system) 등을 이용한 유전자 도입 및 발현에 대한 예비분석이 매우 중요하다. 근래, 일시발현시스템은 그 신속성과 용이성을 장점으로 형질전환식물체를 대신한 재조합단백질의 생산 목적으로도 연구되고 있다.⁵⁻⁷⁾ 본 연구에서는 고구마 뿌리 절편을 이용한 일시발현시스템의 가능성을 연구하였는데 고구마의 장기 저장 가능성 및 양적 확보 용이성 등이 우수한 만큼 효율적인 형질전환방법을 개발할 경우 재조합단백질생산을 위한 일시발현시스템으로서의 가치가 높을 것으로 기대하고 있다.

일차적으로 기존의 agroinfiltration법을 이용한 고구마 뿌리절편의 형질전환을 실시하고 일시발현에 대한 분석을 수행하였다. 인근 시장에서 입수한 고구마 뿌리를 깨끗이 세척하여 0.4% sodium hypochlorite 용액을 이용하여 표면 살균처리(5 min) 및 멸균수 세척 후, 채칼을 이용하여 두께 1.0 mm 내외의 원형 절편(직경 5-7 cm)을 준비하였다. 10개 정도의 절편을 100 ml의 1/2 × MS배지에 넣고 β -glucuronidase(GUS) reporter gene이 들어있는 pBI121 을 지니는 *A. tumefaciens* LBA4404 배양액 2

ml($OD_{600}=1.2$)과 섞어 agroinfiltration(10 min)을 실시하였다. 절편의 지나친 물기는 paper towel로 충분히 제거하고 이를 밀폐 조건에서 3일 간 cocultivation(22°C, 암 상태)이 이루어지도록 하였다. 발현정도는 fluorometric assay에 의한 GUS효소 활성분 석으로 비교하였다.⁸⁾ 이를 위하여 형질전환 고구마 절편을 상기와 같이 살균 및 세척 후 액체질소가 들어 있는 막자사발에 옮겨 고온 분말 상태로 분쇄하였다. 이어서 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)에 옮겨 균질화 시킨 후 원심분리(14,000 rpm, 5 min, 4°C)에 의하여 얻은 상등액을 분석에 이용하였다. 10 μ g total protein/70 μ l extract, 20 μ l methanol 및 10 μ l assay buffer(1 mM 4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide를 포함한 extraction buffer)를 섞고 반응(37°C, 3 hr) 시켰으며 이어서 200 μ l의 0.2 M Na₂CO₃을 첨가하여 반응을 종료시켰다. Fluorescence의 측정을 위하여 microtiterplate reader(PerkinElmer VIVTOR 3, USA)를 사용하였다. Total protein양은 Bio-Rad protein assay용액을 이용하여 결정하였다. GUS 형질전환 절편과 비형질전환 절편의 GUS 효소활성의 분석결과는 Fig. 1(A)에서 보여주고 있다. 이는 3회에 걸친 독립적인 실험의 결과를 평균한 값으로서 비형질전환 고구마 절편의 경우 GUS 활성은 평균 2750 pmoles 4-methylumbelliferone(MU) min⁻¹ mg⁻¹ protein 정도임에 비해 형질전환 절편의 경우 5152 pmoles 4-MU min⁻¹ mg⁻¹ protein으로 나타났으며 이는 고구마에 대한 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환이 이루어졌음을 시사하고 있다.

*Agrobacterium*을 이용한 식물의 형질전환 시 형질전환율을 증대시키기 위해 때로 explant에 대한 인위적 상해를 발생시키기도 한다. 가령, 초음파, 미세 견고입자, 효소 등의 처리가 그 예이다.⁹⁻¹¹⁾ 또한 강력한 산화/환원제를 이용한 화학적 상해도 효과가 있는 것으로 나타나고 있다.¹²⁾ 식물의 세포벽은 cellulose, hemicellulose, pectin 등이 주성분이며 이 외에도 식물, 식물부위, 발달정도에 따라 lignin, cutin, suberin, wax 등의 물질이 포

*Corresponding author

Phone: +82-53-850-3245; Fax: +82-53-850-3459

E-mail: hspark@cu.ac.kr

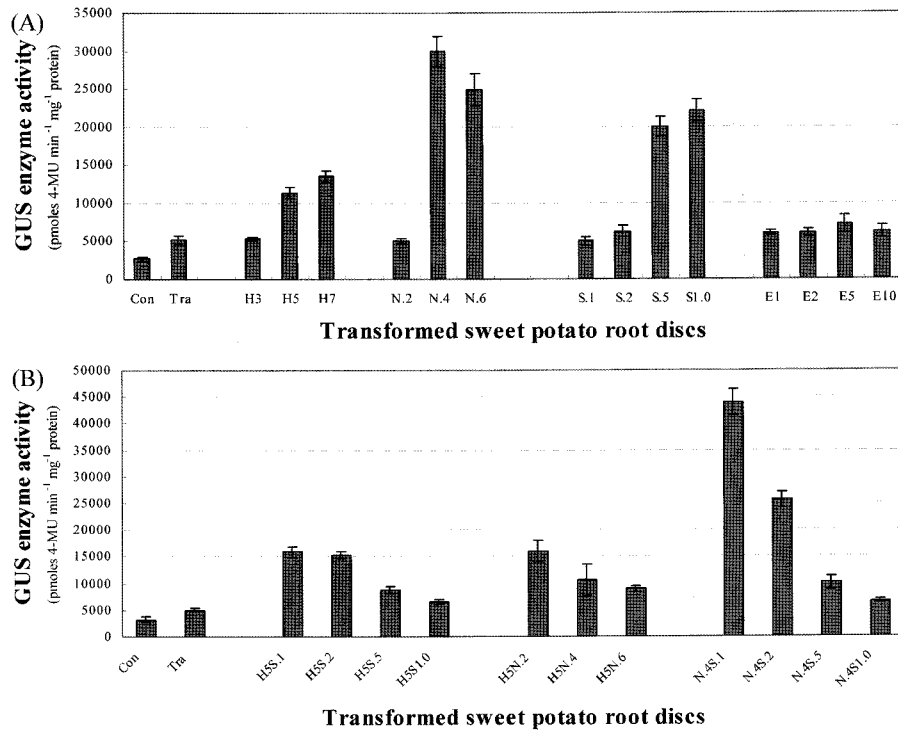


Fig. 1. Fluorometric analysis of GUS enzyme activity in transformed sweet potato root slices. A. GUS enzyme activity in transformed sweet potato root slice with single chemical treatment. Con; non-transformed slice. Tra; transformed slice. H3, H5 and H7; transformed slice with treatment of 3, 5 and 7% H₂O₂. N.2, N.4 and N.6; transformed slice with treatment of 0.2, 0.4 and 0.6% NaOH. S.1, S.2, S.5 and S1.0; transformed slice with treatment of 0.1, 0.2, 0.5 and 1.0% SDS. E1, E2, E5 and E10; transformed slice with treatment of 1, 2, 5 and 10 mM EDTA. B. GUS enzyme activity in transformed sweet potato root slice with double chemical treatment.

함된다. 세포벽 성분은 강알칼리 및 산, 산화/환원제, detergent, calcium chelating EDTA 등을 적절히 처리할 경우 그 추출 및 용해가 가능하다. 가령, 강력한 산화제인 H₂O₂는 bleaching agent로서 펄프산업 등에서 다양하게 이용되는데 일반의 경우 살균소독제로서도 잘 알려져 있다. NaOH는 강알칼리 물질로서 펄프, 섬유, 음용수, 세제 등과 관련된 산업에 폭 넓게 이용되고 있으며 또한 식품산업에서는 과일이나 채소의 화학적 박피 또는 세척에 이용되기도 한다.¹³⁾ 상기한 화학물들의 처리는 결국 세포벽에 대한 상해를 가하고 그 구조를 약화시킬 것이며 *Agrobacterium* 감염에 많은 영향을 미칠 것으로 짐작할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 H₂O₂, NaOH, EDTA, anionic surfactant인 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 고구마 절편에 처리하고 멸균수 및 1/2 × MS 액체배지(pH 5.7)로 충분히 세척하고 agroinfiltration을 수행함으로써 단순 형질전환 절편체와의 GUS 발현 차이를 비교 분석하였다. 그 결과는 Fig. 1(A)에서 역시 보여주고 있다. H₂O₂ 3, 5, 7%처리 경우 각각 평균 5331, 11352, 13552 pmoles 4-MU min⁻¹ mg⁻¹ protein으로 나타나고 있다. NaOH의 경우에서는 0.4% 농도처리에서 29958 pmoles 4-MU min⁻¹ mg⁻¹ protein으로 나타났는데 이보다 고농도 (0.6%)인 경우 약간 감소하였다. 7% H₂O₂ 또는 0.6% NaOH의 처리는 비교적 높은 GUS발현 결과를 보여주고 있으나 절편조직에 대한 화학적 상해 및 와해현상을 부분적으로 초래함으로써 이 보다 낮은 농도의 처리 즉, 0.4% NaOH 및 5% H₂O₂가 제시되었다. SDS의 경우에는 1.0% 농도 처리에 의해 22056 pmoles 4-MU min⁻¹ mg⁻¹ protein으로 측정되었는데 절편조직에 대한 상해는

전혀 나타나지 않았다. EDTA 처리는 기타 화학물의 처리에 비해 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환에 별 효과를 나타내지 못하였다. Fig. 1(B)에서는 화학물들의 복합적인 처리에 의한 GUS 형질전환효율의 변화를 보여주고 있다. 5% H₂O₂를 기준으로 SDS나 NaOH 등을 첨가하여 복합 처리하는 경우 단독 처리에 비해 기대치 이상을 보여주지 않고 있다. 0.1-0.2% SDS나 또는 0.2% NaOH의 첨가 시에 5% H₂O₂ 단독처리 효과를 상회하였는데(>15000 pmoles 4-MU min⁻¹ mg⁻¹ protein) 기타 처리는 오히려 감소하는 경향을 보여주고 있다. 이는 절편조직에 대한 정도 이상의 지나친 상해에 따른 조직세포의 활성 감소로 이해되고 있다. 한편, 0.4% NaOH를 기준으로 SDS를 같이 처리하는 경우 특히 0.1% SDS 복합처리 시 43958 pmoles 4-MU min⁻¹ mg⁻¹ protein으로 측정되었다. 복합처리 시 대조군으로서의 비 형질전환 및 단순 형질전환 절편은 각각 3254 및 5049 pmoles 4-MU min⁻¹ mg⁻¹ protein으로 측정되었는데 비형질전환 절편의 background level을 제외하는 경우 0.4% NaOH/0.1% SDS 복합처리 형질전환 절편은 20배 이상의 GUS효소 활성 증가로 계산된다. 이상의 결과를 바탕으로 promoter, UTR, ER retention signal 등을 이용한 genetic engineering에 의한 발현증대를 고려하지 않았을 경우 몇 가지 간단한 보완 연구를 통하여 보다 효율적인 고구마 절편에서의 일시발현 및 재조합 단백질의 생산체계를 확립할 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 가령, 비율적으로 보다 많은 조직세포가 화학물 처리를 받을 수 있도록 하기 위한 1 mm 이하의 절편 두께 최소화나 cocultivation 온도 및 기간 등의 조절 등이다.

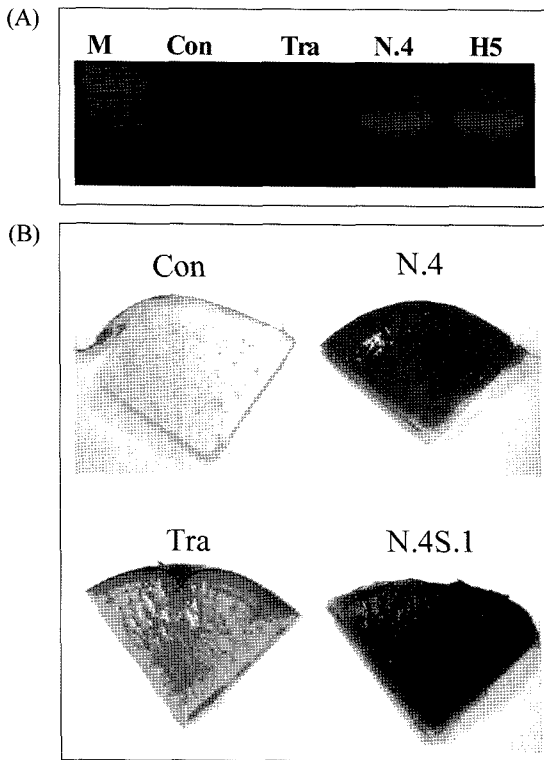


Fig. 2. Detection of GUS gene expression in transformed sweet potato root slice. A. Detection of GUS mRNA expression in transformed slices by RT-PCR. PCR products were resolved in 1% agarose gel electrophoresis. Con and Tra; non-transformed and transformed slice, respectively. N.4 and H5; transformed slice with treatment of 0.4% NaOH and 5% H₂O₂, respectively. M; DNA size marker. B. Histochemical detection of GUS enzyme activity in sweet potato root slices. Con and Tra; non-transformed and transformed slice, respectively. N.4 and N.4/S.1; transformed slice with treatment of 0.4% NaOH and 0.4% NaOH/0.1% SDS, respectively.

측정된 GUS효소 활성을 GUS mRNA생성으로 확인하였다. 즉, 액체질소를 이용하여 고구마절편을 곱게 갈은 후 Tri-Reagent(MRC Inc., USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였으며 이로부터 Chemagic mRNA kit(Chemagen Inc., USA)를 이용하여 mRNA를 분리하였다. mRNA는 M-MuLV reverse transcriptase 및 oligo-dT primer 등과 반응시켜(42°C, 1 hr) 1st strand cDNA를 합성하였으며 이를 PCR에 이용하였다. Primer는 5'-cattacagtctggatcgcaa-3'(forward)와 5'-aagttcatgccagtcagcg-3'(reverse)를 사용하여 1.7 kb DNA증폭이 이루어지도록 하였다. PCR 반응(30 cycle, 94°C, 45 sec/52°C, 45 sec/72°C, 2 min)에 의한 DNA product는 Fig. 2(A)에 나타나고 있다. 단순 형질전환 절편 보다 0.4% NaOH나 5% H₂O₂ 처리 형질전환 절편에서 보다 진한 PCR 산물이 관찰되고 있는데 측정된 GUS효소 활성과의 상관성을 잘 나타내고 있음을 알 수 있다. 최종적으로 histochemical assay에 의한 GUS staining을 수행함으로써 발색정도에 의한 비교를 실시하였다. Cocultivation을 실시한 고구마 절편재료는 우선 *Agrobacterium*을 최대한 제거하기 위하여 0.8% sodium hypochlorite용액에서 살균처리(5 min) 후 0.2% Tween-20이 포함된 멸균수로 충분히 세척하였다. 이어서 70%의 cold acetone 용액에 30 min 처리한 후 X-GlcA(10

mg/100 μ l dimethylformamide)를 포함하는 10 ml GUS substrate 용액(100 mM sodium phosphate(pH 7.2), 2 mM potassium ferricyanide, 2 mM potassium ferrocyanide, 0.1% Triton X-100)에 담겨 37°C에서 발색 때까지 반응시켰다.⁸⁾ 그 결과는 Fig. 2(B)에서 보여주고 있다. 단순 형질전환 절편은 비형질전환 절편에 비해 부분적으로 약한 발색현상이 나타나고 있으며 대조적으로 0.4 NaOH 단일처리 또는 0.4% NaOH 및 0.1% SDS 복합처리의 형질전환 절편은 매우 강한 발색현상을 보이고 있는데 fluorometric assay나 RT-PCR의 결과를 재확인시켜 주고 있다.

본 연구에서는 H₂O₂, NaOH, SDS, EDTA 등의 단독 또는 복합처리에 의한 화학적 상해가 *Agrobacterium*을 이용한 고구마 절편의 형질전환에 미치는 효과를 분석하였다. 그 결과 화학물질 처리를 통하지 않은 단순한 *Agrobacterium*이용 형질전환 절편에 비해 0.4% NaOH와 0.1% SDS의 복합처리를 받은 형질전환 절편에서 20배 이상의 GUS효소 활성의 증가가 나타났으며 이는 고구마 절편을 이용한 재조합단백질 생산이 용이하고 신속하게 수행될 수 있다는 가능성을 강하게 제시하고 있다. 한편, 품종, 저장 기간 등에 따른 형질전환효율 차이 또는 고구마 뿌리에서의 특이 발현 promoter¹⁴⁾ 등을 고려해 볼 때 보다 효율적인 일시발현시스템으로 개발할 수 있을 것이다.

참고문헌

- Jansson, R. K. and Raman, K. V. (1991) Sweet potato pest management: a global overview. In: Jansson, R. K. and Raman, K. V. (ed.). Sweet potato pest management: a global perspective. Westview Press, Boulder, pp. 1-12.
- Newell, C. A., Lowe, J. M., Merryweather, A., Rooke, L. M. and Hamilton, W. D. O. (1995) Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam) with *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of plants expressing cowpea trypsin inhibitor and snowdrop lectin. *Plant Sci.* **107**, 215-227.
- Yi, G., Shin Y. M., Choe, G., Shin, B., Kim, Y. S. and Kim, K. M. (2007) Production of herbicide-resistant sweet potato plants transformed with the bar gene. *Biotech. Lett.* **29**, 669-675.
- Lowe, J. M., Hamilton, W. D. O. and Newell, C. A. (1994) Genetic transformation in *Ipomoea batatas* (L.) Lam (sweet potato) In: Bajaj, Y. B. S. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 29. Plant protoplasts and genetic engineering. V. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, pp. 308-320.
- Andrews, L. B. and Curtis, W. R. (2005) Comparison of transient protein expression in tobacco leaves and plant suspension culture. *Biotechnol. Prog.* **21**, 946-952.
- 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.
- Vaquero, C., Sack, M., Chandler, J., Drossard, J., Schuster, F., Monecke, M., Schillberg, S. and Fisher, R. (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.
- Jefferson, R. A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the

- gus gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387-405.
9. Alibert, B., Lucas, O., Gall, L. V., Kallerhoff, J. and Alibert, G. (1999) Pectolytic enzyme treatment of sunflower explants prior to wounding and cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*, enhances efficiency of transient β -glucuronidase expression. *Physiol. Plant* **106**, 232-237.
 10. Flores Solís, J., Mlejnek, I. P., Studená, K. and Procházka, S. (2003) Application of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation in *Chenopodium rubrum* L. *Plant Soil Environ.* **49**, 255-260.
 11. Kim, S. S., Shin, D. I. and Park, H. S. (2007) Transient β -glucuronidase expression in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen via wounding-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotech. Lett.* **29**, 965-969.
 12. Shin, D. I. and Park, H. S. (2005) Transient expression in Chinese cabbage by hydrogen peroxide-aided agroinfiltration. *Agric. Chem. Biotech.* **48**, 229-230.
 13. Floros, J. D., Wetzstein, H. Y., Chinnan, M. S. (1987) Chemical (NaOH) peeling as viewed by scanning electron microscopy: pimiento peppers as a case study. *J. Food Sci.* **52**, 1312-1316.
 14. Hattori, T., Nakagawa, S. and Nakamura K. (1990) High-level expression of tuberous root storage protein genes of sweet potato in stems of plantlets grown *in vitro* on sucrose medium. *Plant Mol. Biol.* **14**, 595-604.