

감자절편의 *Agrobacterium* 이용 형질 전환효율의 증대

신동일 · 박희성*

대구가톨릭대학교 생명공학과

Enhancement of *Agrobacterium*-Mediated Transformation Frequency in Potato Slices

Dong-Il Shin and Hee-Sung Park*

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

Received October 9, 2008; Accepted October 15, 2008

Key words: agroinfiltration, potato slice, transformation rate

감자(*Solanum tuberosum* L.)는 주요 식용작물로 잘 알려져 있으며 이에 관한 내병성, 내충성, 고생산성 식품중독성은 유전체의 기능적 분석을 바탕으로 활발히 진행되고 있다. 한편, 형질전환감자는 Norwalk virus capsid protein, HIV-1 envelope glycoprotein, HBsAg, foot and mouth disease virus VP1 structural protein 등의 생산을 위한 biofactory로서도 개발되어 왔다.¹⁻³⁾ 그러나, 감자는 저렴하면서도 장기 저장이 가능한 장점이 있음에도 불구하고 담배나 상추 잎 등을 이용한 일시발현^{4,5)}과 같은 연구는 보고된 바 없다. 이는 형질전환효율이 낮은 이유 때문 등으로 이해할 수 있는데 다양한 식물로의 유전자도입을 위한 *Agrobacterium*의 이용에 있어서 특히 형질전환 효율을 높이기 위한 지속적 연구결과의 적용으로 그 해결을 기대할 수 있을 것이다.⁶⁾ 이와 관련하여 본 연구에서는 감자체에 대한 화학적 상해유발 및 agroinfiltration을 수행하여 GUS유전자의 발현정도를 비교하고 적정 조건의 수립을 통하여 일시발현 및 재조합 단백질의 생산 가능성을 제시하였다.

본 실험에 사용한 감자는 근처 시장에서 구입하였으며 이는 충분한 세척 및 표면살균(1% sodium hypochlorite, 5 min) 후 이용하였다. 감자는 채칼을 이용하여 1 mm 두께의 감자채로 준비하였다. Agroinfiltration을 위해 감자채는 먼저 표면상해를 유도하기 위하여 NaOH 용액으로 처리하고 멸균수로 세척하였으며 1/2×MS(pH 5.7)배지에 넣어 두었다. 이 시점에서 NaOH

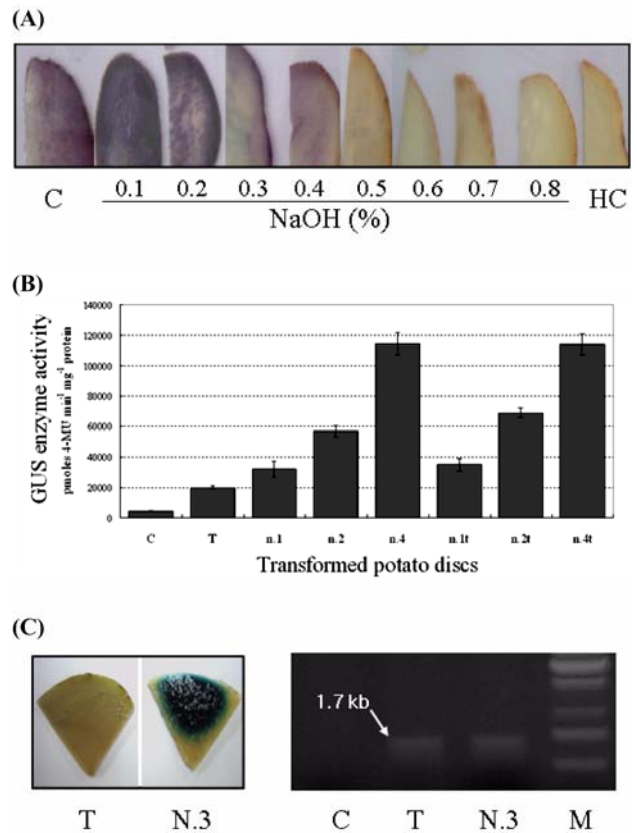


Fig. 1. Wounding-assisted agroinfiltration-mediated GUS transformation of potato slice. (A) NaOH toxicity to potato tissues determined by MTT assay: C, non-treated; HC, treated in boiling water for 1 min. (B) Fluorometric GUS enzyme activity: C and T, non-transformed and transformed; n.1-n.4, NaOH (0.1-0.4%) treated and transformed; n.1t-n.4t, NaOH (0.1-0.4%) together with tween-20 (0.01%) treated and transformed. (C) Histochemical GUS staining (left figure) and RT-PCR of GUS mRNA (right): C, non-transformed; T, transformed; N.3, NaOH (0.3%) treated and transformed; M, DNA size marker.

용액처리에 의한 세포활성의 저하를 관찰하기 위하여 MTT assay⁷⁾를 수행하였다. 여러 다른 농도의 NaOH용액으로 3 min 처리한 후, 증류수로 세척하고 MTT용액(5 mg/ml distilled water)으로 적셔 18시간(16°C)을 경과시켰을 때 Fig. 1A와 같은 결과를 얻을 수 있었다. NaOH 처리농도가 높아질수록 발색정도가 비례하여 감소하였으며 0.5% NaOH 처리부터 급격히 발색이 저하하였다. 따라서 세포활성이 일부 감소하는 0.1-0.4% NaOH 처리가 감자채 형질전환에 제시되었다.

형질전환을 위하여서는 GUS reporter 유전자를 지니는 pBI121 (Clontech, USA)로 형질전환한 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 세포를 배양(28°C, 200 rpm)하여 1/2×MS액배지로 희석(OD₆₀₀=0.5)한 후 5 ml/을 50 g 정도의 감자채를 담아 놓은 200 ml의 1/2×MS(pH 5.7) 배지에 투여하였다. 이에 대해 vacuum(20 min)을 실시하고 물기를 충분히 제거하고 보습용기에 담아 22°C 압 조건에서 3일간 방치하였다. 이후 0.4% sodium hypochlorite 용액을 처리(5 min)하고 이어서 멸균수로 세척한 후 발현분석에 이용하였다. Fluorometric GUS assay는

*Corresponding author

Phone: +82-53-850-3245, Fax: +82-53-850-3548

E-mail: hspark@cu.ac.kr

Jefferson⁸⁾의 방법에 준하여 실시하였으며 fluorescence의 측정은 PerkinElmer VIVTOR 3 microtiterplate reader를 이용하였다. 결과는 Fig. 1B에서 보여주고 있다. 비형질전환의 경우 4627 pmoles 4-methylumbelliferone(MU) min/mg protein인데 형질전환의 경우 19942 pmoles MU min/mg protein으로 측정되었다. 이는 일반적 agroinfiltration에 의하여 감자채 형질전환이 이루어진다는 것을 제시하고 있다. 한편, NaOH를 0.1, 0.2 및 0.4% 처리한 형질전환 감자채에서는 각각 32201, 56954 및 114529 pmoles MU min/mg protein로 측정되었다. 무처리에 비해할 때 0.4% 처리 경우 GUS activity 가 1.5-5.5배 정도 증가하였다. 0.4% 처리의 경우 3일간의 co-cultivation이 경과하면 조직의 연화가 심해짐으로써 보다 저농도의 처리가 제안되었다. 한편, 0.2% NaOH처리 및 agroinfiltration 과정에서 Tween 20, SDS 및 Triton X-100 등의 detergent를 각기 0.01%를 첨가함으로써 그 결과를 측정하였는데 감자채에 대한 NaOH 작용과 또한 *Agrobacterium*의 집축 증진을 위한 목적이었다. 이들 처리에 의하여 NaOH만을 처리하는 경우보다 비슷하거나 약간 높은 GUS activity가 측정되었는데 다만 Tween-20의 경우 상대적으로 보다 효과가 있었다(Fig. 1B 참조). 한편, detergent의 농도를 0.1%로 높이는 경우 조직이 심하게 연화되는 결과를 초래하였다. Agroinfiltration에 의한 형질전환에서 그 효율 증대를 위해 고려해 볼 것은 vacuum infiltration 지속 시간, *Agrobacterium* cell density 또는 co-cultivation 기간 등이 있다. 또는 *Agrobacterium* 세포의 유도화합물인 phenolic compound 첨가⁶⁾ 등이다. 결론적으로 10-30 min의 vacuum infiltration, OD₆₀₀=0.5-1.5의 cell density 또는 acetosyringone, syringaldehyde, vanilin, ethyl vanilin 등의 phenolic compound의 첨가로 인한 커다란 변화는 나타나지 않았다. Fig. 1C의 왼쪽은 histochemical GUS staining의 결과로서 무처리 형질전환 감자채에서는 발색이 미약하였으며 0.3% NaOH처리에 의하여 강한 발색현상이 관찰되었다.

GUS mRNA 발현비교를 위하여 RT-PCR을 실시하였다. 액체질소를 이용하여 감자채를 곱게 갈은 후 Tri-reagent(MRC Inc.)를 이용하여 total RNA를 분리하고 이로부터 Chemagic mRNA kit(Chemagen Inc.)를 이용한 poly(A) mRNA 분리를 수행하였다. 1st-strand cDNA 합성은 M-MuLV reverse transcriptase 및 oligo-dT₁₅ primer를 이용하여 수행(42°C, 1 hr)하였다. PCR (94°C, 30 sec; 52°C, 30 sec; 72°C, 2 min: 30 cycle)을 위하여 forward strand(5'-cattacagtctggatcgcaaa-3')와 reverse strand(5'-aagttcatgccagtcagcg-3')를 이용하여 1.7 kb GUS DNA증폭을 예측하였는데 그 결과는 Fig. 1C의 오른쪽에 나타나고 있다. 무처리나 NaOH 처리 형질전환 감자채 모두에서 PCR산물이 확인되고 있으며 PCR 특성상 농도 차이는 크지 않았다.

본 연구에서는 1 mm 두께의 얇은 감자채를 준비하여 *Agrobacterium*의 감염부위가 최대한 생성되도록 하였으며 또한 *Agrobacterium* 감염의 필수 요건인 세포벽 상처를 제공하기 위하여 NaOH처리를 실시하였다. Agroinfiltration 및 cocultivation을 거친 후 fluorometric GUS assay, GUS staining 및 RT-

PCR을 통하여 0.3% NaOH 처리가 형질전환 효율을 크게 증대시킬 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 한편, MTT assay를 통하여 이러한 처리는 감자채 세포 활성 일부를 약화시킨다는 것이 확인되었다. 본 연구의 주목적은 bio-farming을 위한 형질전환 감자를 대신할 수 있는 일시발현 감자채 biofactory를 개발함에 있다. 형질전환 식물체는 경제성, 안전성 면에서 그 장점이 부각되고 있으나 개발과 관련된 형질전환, 재분화, 검정, 식물체 번식 및 선발 등에 오랜 시간이 소요된다. 상대적으로 일시발현은 이를 이용한 재조합단백질 생산이 신속하며 중소 규모의 biofactory system으로 기대할 수 있다.⁹⁾ 이미 보고된 일시발현 시스템 즉, leafy plant인 담배나 상추 앞에서의 *Agrobacterium*이용 일시발현, 또는 viral vector의 systemic infection을 이용한 일시발현을 이용한 재조합 단백질 생산 등과 더불어 감자채의 개발 가능성을 기대할 수 있다.

참고문헌

- Carrillo, C., Wigdorovitz, A., Trono, K., Dus Santos, M. J., Castanon, S., Sadir, A. M., Ordas, R., Escribano and Borca, M. V. (2001) Induction of a virus-specific antibody response to foot and mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants. *Vir. Immu.* **14**, 49-57.
- Kim, T., Agruber, A. and Langridge, W. H. R. (2004) HIV-1 gp120 V3 cholera toxin B subunit fusion gene expression in transgenic potato. *Protein Expr. Purif.* **37**, 196-202.
- Shulga, N. Y., Rukavtsova, E. B., Krymsky, M. A., Borisova, V. N., Melnikov, V. A., Bykov, V. A. and Buryanov, Y. I. (2004) Expression and characterization of Hepatitis B surface antigen in transgenic potato plants. *Biochemistry (Moscow)* **69**, 1158-1164.
- 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.
- Negrout, V., Eisner, G., Lee, H. I., Han, K., Taylor, D. and Wong, H. C. (2005) Highly efficient transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce. *Plant Sci.* **169**, 433-438.
- Opabode, J. T. (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotech. Mol. Biol. Rev.* **1**, 12-20.
- Watts, M. E., Roberts, I. J. and Woodcock, M. A. (1989) Comparison of colorimetric and clonogenic assays for hypoxic-specific toxins with hamster and human cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Bio. Phys.* **16**, 939-942.
- Jefferson, R. A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the gus gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387-405.
- 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. *Biotechl. Appl. Biochem.* **30**, 99-100.