

## Biofactory로서의 미나리 엽조직을 이용한 재조합단백질 발현

신 동 일 · † 박 희 성  
대구가톨릭대학교 생명공학과  
(접수 : 2008. 10. 9., 게재승인 : 2008. 12. 22.)

### Expression of recombinant protein from *Oenanthe javanica* DC. leaf tissues as a biofactory

Dong-Il Shin and Hee-Sung Park†  
Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Kyungsan, Kyungbuk 712-702, Korea  
(Received : 2008. 10. 9., Accepted : 2008. 12. 22.)

Fresh *Oenanthe javanica* DC. leaves still attached to stem architecture were immersed in NaOH solution for 3 min before agroinfiltration and co-cultivation. MTT assay revealed that NaOH solution containing up to 0.7% was still safe for the leaf viability. Fluorometric GUS enzyme analysis showed that 0.5% NaOH-treated leaf tissues were efficiently transformed by vacuum infiltration for 20 min with *Agrobacterium* cells at a density of OD<sub>600</sub>=0.5 to 1.0. These conditions worked well for the expression of HBsAg, which was confirmed by western blotting and ELISA.

**Key Words** : *Oenanthe javanica* DC, leafy tissue, MTT, biofactory, HBsAg

#### 서 론

미나리 (*Oenanthe javanica* DC.)는 매우 흔한 채소식물로서 간 기능 개선 등 다양한 건강기능성을 지니고 있다(1). 미나리는 사계절에 걸쳐 수경재배나 밭 재배를 통해 풍부하게 생산되고 있으며 품종개발을 위한 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 및 재분화가 가능하다(2). 그러나 현재까지 biofactory로서의 미나리 관련 연구는 보고된 바 없다. 식물 biofactory를 기반으로 한 재조합 의약품단백질 생산은 형질전환식물체 방식과 또는 일시발현 방식이 시도되고 있다. 이 중 일시발현은 형질전환식물체 확립에 필요한 신속한 발현검정이 목적이었으나 근래에는 엽조직에 대한 agroinfiltration을 실시 후 며칠 내 *Agrobacterium* 감염부위에서의 재조합단백질 생산을 목표로도 연구되고 있다(3-6). 일시 발현 방식은 단기간 내 그 과정이 완료되며 도입 유전자가 염색체에 integration이 되지 않은 상태로서도 발현될 수 있다(7). *Agrobacterium*을 이용한 형질전환은 그 효율을 증가시키기 위하여 다양한 방법이 개발되어 왔으며 가령, vacuum infiltration, sonication, desiccation, osmosis (glucose, sucrose 등), anti-necrotic compound (cystine, ascorbic acid, dithiothreitol 등), phenolic

compound (acetosyringone, vanillin, syringaldehyde 등), *Agrobacterium* cell density, co-cultivation기간이 그 예이다. 그러나 이들 방법은 식물의 종, 식물조직, 식물발달단계에 따라 효율성이 크게 달라질 수 있다(8). 본 연구에서는 이들 방법 중에서 *Agrobacterium* cell density를 달리한 vacuum-infiltration을 미나리 엽조직에 적용하였는데 이 때, 엽조직은 NaOH 용액을 처리함으로써 화학적 상해를 발생시켜 사용하였다. NaOH는 강알칼리로서 세포벽 성분을 용해 및 추출할 수 있다(9).

Hepatitis B virus성 간염은 전 세계인의 건강을 위협하고 있는 치명적 감염성 질병으로서 이에 대한 치료는 매우 높은 비용을 요구하면서도 그 치료율은 매우 낮은 것으로 나타나고 있다. 따라서 vaccine 투여에 따른 예방이 최선책으로 인식되고 있는데 현재 주로 효모를 이용한 재조합 HBsAg 단백질이 주로 사용되고 있다. 그러나 높은 가격이 문제이며 따라서 식물을 biofactory로 이용한 저렴한 생산이 기다려지고 있는 상황이다(10-12). 본 연구에서는 미나리에서의 효율적 형질전환을 통한 HBsAg 단백질의 일시발현을 수행함으로써 새로운 일시발현용 biofactory로서의 가치를 제시하였다.

† Corresponding Author : Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Kyungsan, Kyungbuk 712-702, Korea  
Tel : +82-53-850-3245, Fax : +82-53-850-3548  
E-mail : hspark@cu.ac.kr

#### 재료 및 방법

##### 식물재료

일반 시장에서 구입한 미나리는 증류수로 세척 후 표면살균

(1% sodium hypochlorite 용액, 5 min)을 실시하고 멸균수로 세척하였다. 엽조직 표면 상해는 NaOH 용액 처리 (3 min)를 거쳐 멸균수로 세척하고 형질전환을 위하여 1/2 MS 배지 (pH 5.7)에 넣어두었다.

**세포사멸분석**

세포활성의 측정은 MTT assay(13)를 이용하였다. MTT (5 mg/ml DW)용액을 엽조직 표면에 골고루 투여한 후 petri dish에 넣고 16°C에서 18 hr 경과시킨 후 발색을 관찰하였다.

**Agroinfiltration**

GUS reporter gene을 지니는 pBI121이나 HBsAg DNA를 지니는 pBIHBsAg(14)가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 LB medium (kanamycin 및 streptomycin 각 50 µg/ml 포함)에서 배양 후 미나리 엽조직의 infiltration (30 min)에 이용하였다. 이어서 멸균수로 가볍게 행군 후 물기를 지닌 paper towel이 깔린 배양장치에 옮겨 22°C, 암 조건에서 co-cultivation을 실시하였다.

**GUS 효소능 분석**

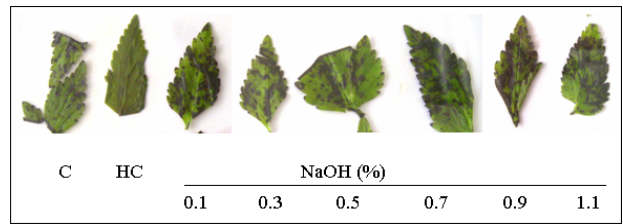
식물재료는 추출 buffer (50 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.0; 5 mM EDTA; 0.1% Sarkosyl; 0.1% Triton X-100, 10 mM β-mercaptoethanol)에 넣어 균질화 시켰으며 원심분리 (14,000 rpm, 15 min, 4°C)로 상등액을 수집하였다. 단백질 농도는 Bradford assay에 의하였고 GUS 효소활성 정량화는 Jefferson(14)의 방법에 의하였다.

**Western blotting과 ELISA**

SDS-12%PAGE를 실시하여 분리한 단백질은 PVDF membrane으로 옮긴 후 mouse anti-HBsAg polyclonal serum과 반응시켰다. Peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG와의 반응을 위하여 ECL (Emersham, USA)을 이용하였다. HBsAg 정량화를 위한 ELISA는 IMx detector (Abbott, USA)를 이용하였다.

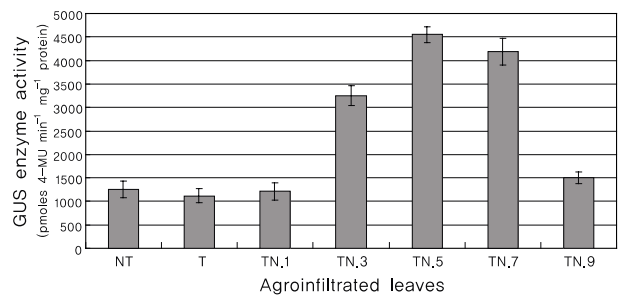
**결과 및 고찰**

강알칼리인 NaOH는 식물세포벽 성분인 hemicellulose, lignin 또는 lipids (cutin, suberin, wax)등을 용해 및 추출할 수 있는 물질로서 강한 알칼리 물질이다. 따라서 식물 엽조직에 대한 처리농도가 지나칠 경우 세포벽 용해 및 세포구조 파괴에 따른 세포활성에 치명적 결과를 예측할 수 있다. 따라서 NaOH 처리에 의한 세포활성의 변화를 MTT assay에 의하여 관찰하였다. 처리시간은 3 min으로 정하고 처리 농도는 0.1-1.1% (w/v)로서 그 결과는 Fig. 1에 나타나고 있다. 처리한 여러 농도의 NaOH는 무처리 보다 발색부위가 증가하는 것으로 나타났는데 그 이유는 우선 조직 표면 용해로 인하여 MTT 흡수가 훨씬 용이해진 것으로 판단되었다. 그러나 0.9% 이상에서는 조직 강도가 시간이 경과하면서 급격히 저하하였으며 결국 세포활성의 저하에 인한 것으로 판단되었다. MTT assay 및 조직 강도변화의 결과에 의하여 NaOH 처리농도는 0.9% 이내가 제시되었다.



**Figure 1.** Toxicity of NaOH to *O. javanica* DC. leaf tissue determined by MTT cell viability test. C, control leaf. HC, Control leaf boiled for 1 min. The others were treated with NaOH solution (0.1-1.1%) for 3 min.

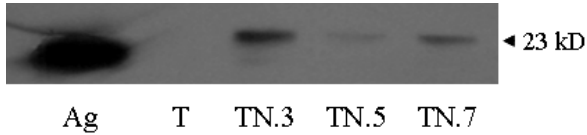
NaOH를 처리한 미나리 엽조직에 대하여 *Agrobacterium*을 이용한 GUS 형질전환을 실시하고 발현 차이를 비교하였다. Fig. 2는 3일간의 co-cultivation 후 수확한 미나리 엽조직의 용해 단백질에 대한 fluorometric GUS assay의 결과를 보여 주고 있다. 무처리의 경우 1117 pmoles 4-MU min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein으로 측정되었으며 0.1% NaOH처리의 경우 1214 pmoles 4-MU min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein으로 무처리와 유사한 수치가 나타났다. 0.3, 0.5 및 0.7% 경우 각각 무처리 형질전환보다 약 3-4 배의 GUS 효소활성 증가가 측정되었다. 그러나 NaOH 처리농도가 0.7% 이상일 경우 GUS 활성이 급격히 감소하였으며 NaOH에 의한 조직 및 세포의 지나친 손상이 원인으로 판단되었다. 한편, NaOH 0.5%처리를 기준으로 vacuum infiltration 처리시간과 *Agrobacterium*의 cell density를 달리한 infiltration에 의한 GUS발현의 변화를 측정하였다. OD<sub>600</sub>=1.0의 *Agrobacterium* cell 용액을 10, 20, 30 min의 vacuum infiltration을 실시했을 때 발현 차이는 크게 나타나지 않았다. 한편, vacuum infiltration (20 min)을 위하여 OD<sub>600</sub> value가 0.1, 0.5, 1.0 및 1.5인 *Agrobacterium* cell 용액을 각각 이용했을 때 0.1의 경우 GUS발현수준이 매우 낮은 것으로 나타났으며 기타의 경우 큰 차이는 나타나지 않았다.



**Figure 2.** Fluorometric GUS enzyme activity of agroinfiltrated *O. javanica* DC. leaves following several NaOH treatments. NT and T, non-transformed and transformed leaves. TN.1-TN.9, transformed leaves with 0.1-0.9% NaOH treatment.

이상에서 결정된 적정 형질전환 조건을 미나리에서의 HBsAg 단백질 발현에 시험하였다. 즉, 0.3-0.7% NaOH를 처리한 미나리 엽조직에 대해 pBIHBsAg를 지니는 *Agrobacterium* cell (OD<sub>600</sub>=1.0) 용액을 infiltration (20 min)시키고 3일 간의 co-cultivation을 수행하였다. 엽조직 분쇄 후 모든 crude protein extract의 농축액에 대한 western blotting을 실시하였다. 그 결과는 Fig. 3에 나타나고 있다. 무처리 형질전환의 경우 mouse polyclonal anti-HBsAg serum과 반응하는 protein band는 확인되지 않았으며 이는 HBsAg발현이 매우 낮은 수준이거나 또는 거의 없다는 것을

시사하고 있다. 대조적으로 0.3-0.7% NaOH처리를 시행한 경우 antibody와 면역반응을 나타내는 23 kD protein band가 확인되었다. 실제 HBsAg antigen의 농도를 ELISA를 이용하여 측정하였을 때 total soluble protein의 0.01-0.005% 정도로 측정되었다.



**Figure 3.** *O. javanica* DC. leaf soluble proteins reacting to mouse polyclonal anti-HBsAg serum.

Ag, HBsAg antigen protein (0.2  $\mu$ g); T, transformed leaves; TN.3-TN.7 represent transformed leaves with 0.3-0.7% NaOH treatment.

근래, 식물체를 이용한 일시발현 및 효율적인 단백질 생산을 위하여 유전자 도입 방법 (particle bombardment, electroporation, microinjection, viral vector infection, agroinfiltration 등), biofactory로서의 엽조직의 선택 (담배, 상추 등), DNA 재조합 등에서 다양한 시도가 이루어지고 있다. 본 연구에서는 기능성 채소로 애용되고 있는 미나리의 엽조직을 이용한 일시발현용 biofactory 시스템의 개발을 시도하였다. 형질전환을 위하여 agroinfiltration을 실시하였으며 특히, *Agrobacterium*의 감염 및 형질전환율을 높이기 위한 적정 NaOH 처리 농도, vacuum infiltration 처리 시간 및 *Agrobacterium* cell density의 적정조건을 GUS 발현검정을 통하여 수립할 수 있었다. 이러한 형질전환조건은 HBsAg 단백질 발현으로 확인할 수 있었으며 따라서 사계절 확보가 가능한 미나리를 이용한 biofactory의 개발 가능성을 제시하였다.

## 요 약

미나리의 엽조직을 agroinfiltration 및 동시배양을 수행하기 전에 NaOH 용액에서 3 min 처리를 실시하였다. MTT를 이용한 세포사멸실험에서 0.7% NaOH 용액처리까지는 엽조직 세포활성에 안전한 것으로 판단되었다. GUS 효소활성의 형광분석 결과 0.5% NaOH를 처리한 미나리 엽조직에 대하여 *Agrobacterium* cells (OD<sub>600</sub>=0.5에서 1.0)을 이용한 vacuum infiltration (20 min)을 실시할 경우 효율적 형질전환이 이루어짐을 알 수 있었다. 이러한 조건은 western blotting과 ELISA에 의한 HBsAg의 발현검정에서 확인할 수 있었다.

## REFERENCES

- Hana, Y. Q., Z. M. Huang, X. B. Yang, H. Z. Liud, and G. X. Wua (2008), *In vivo* and *in vitro* anti-hepatitis B virus activity of total phenolics from *Oenanthe javanica*, *J. Ethnopharm.* **118**, 148-153.
- Endo, R., N. Shirasawa, and A. Ykanahama (2002), *Agrobacterium*-mediated transformation of *Oenanthe javanica* (Blume) DC. plants, *K. Plant Biotechnol.* **19**, 365-368.
- Andrews, L. B. and W. R. Curtis (2005), Comparison of transient protein expression in tobacco leaves and plant suspension culture, *Biotechnol. Prog.* **21**, 946-952.
- 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**, 113-116.
- Negrouk, V., G. Eisner, H. I. Lee, K. Han, D. Taylor, and H. C. Wong (2005), Highly efficient transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce, *Plant Sci.* **169**, 433-438.
- 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.
- Escudero J. and B. Hohn (1997), Transfer and integration of T-DNA without cell injury in the host plant, *Plant Cell* **9**, 2135-2142.
- Riva, G. A., J. Gonzalez-Cabrera, J. Vasqu-Padru, and C. Ayra-Pardo (1998), *Agrobacterium tumefaciens* gene transfer to plant cell, *Elect. J. Biotechnol.* **2**, 488-495.
- Floros J. D., H. Y. Wetzstein, and M. S. Chinnan (2006), Chemical (NaOH) peeling as viewed by scanning electron microscopy: Pimiento peppers as a case study, *J. Food Sci.* **52**, 1312-1316.
- Shulga, N. Y., E. B. Rukavtsova, M. A. Krymsky, V. N. borisova, V. A. Melnikov, V. A. Bykov, and Y. I. Buryanov (2004), Expression and characterization of Hepatitis B surface antigen in transgenic potato plants, *Biochemistry (Moscow)* **69**, 1158-1164.
- Kong, Q., L. Richter, Y. F. Yang, C. J. Arntzen, H. S. Mason, and Y. Thanavala (2001), Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 11539-11544.
- Richter, L. J., Y. Thanavala, C. J. Arntzen, and H. S. Mason (2000), Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization, *Nat. Biotechnol.* **18**, 1167-1171.
- Watts, M. E., I. J. Roberts, and M. A. Woodcock (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.
- Shin, D. I. and H. S. Park (2006), Transient expression in Chinese cabbage by hydrogen peroxide-aided agroinfiltration, *Agric. Chem. Biotechnol.* **48**, 229-230.
- Jefferson R. A. (1987), Assaying chimeric genes in plants: the gus gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387-405.