

Phenylethylisothiocyanate 함량이 증진된 형질전환 배추에서의 도입유전자의 후대 유전 및 발현 안정성 검정

박지현¹ · 김형석² · 이기호¹ · 유재경¹ · 박영두^{1*}

¹경희대학교 생명과학대학 원예생명공학과

²한국과학기술연구원 강릉분원

Stable Inheritance of an Integrated Transgene and Its Expression in Phenylethylisothiocyanate- Enriched Transgenic Chinese cabbage

Ji-Hyun Park¹, Hyoung-Seok Kim², Gi-Ho Lee¹, Jae-Gyung Yu¹, Young-Doo Park^{1*}

¹Department of Horticultural Biotechnology, Kyunghee University, Yongin 446-701, Korea

²Korea Institute of Science and Technology Gangneung Institute, Gangneung 210-340, Korea

*Corresponding author: ydpark@khu.ac.kr

Abstract

Development of genetically-modified (GM) crops enables the introduction of new traits to the plant to confer characteristics such as disease resistance, herbicide resistance and human health-promoting bioactivity. Successful commercialization of newly developed GM crops requires stable inheritance of integrated T-DNA and newly introduced traits through the multiple generations. This study was carried out to confirm the stable inheritance of the integrated T-DNA in T₁ and T₂ transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) that was genetically modified to increase concentrations of phenylethylisothiocyanate (PEITC), which is a potential anti-carcinogenic phytochemical. For this purpose, the IGA 1-3 (T₁ generation) and IGA 1-3-5 (T₂ generation) lines were selected by PCR and a IGA 1-3 transgenic plant (T₁ generation) was analyzed to confirm the T-DNA insertion site in the Chinese cabbage genome by VA-TAIL PCR. The results of this study showed that the introduced T-DNA in IGA 1 line was stably inherited to the next generations without any variations in terms of the structure of the transgenes, and this line also showed the expected transgene function that resulted in increased concentration of PEITC through the multiple generations. Finally, we confirmed the increased QR activity in IGA 1 T₁ and T₂ transgenic lines, which indicates an enhanced potential anti-carcinogenic bioactivity and its stable inheritance in IGA1 T₁ and T₂ transgenic lines.

Additional key words: flanking DNA sequence, glutathione S-transferase, integrated T-DNA, quinone reductase activity

Korean J. Hortic. Sci. Technol. 34(1):112-121, 2016
http://dx.doi.org/10.12972/kjhst.20160013
pISSN : 1226-8763
eISSN : 2465-8588

Received: June 25, 2015

Revised: June 29, 2015

Accepted: July 11, 2015

Copyright©2016 Korean Society for Horticultural Science.

본 논문은 농촌진흥청 차세대바이오그린21사업(PJ01112301)의 지원에 의해 이루어진 것임.

서 언

현재 유전자 변형(GM) 작물은 해충 및 제초제 저항성, 각종 스트레스 저항성, 그리고 기능성 물질 합성 증진 등을 위해 활발히 개발되고 있으며 전 세계적으로는 옥수수, 밀, 콩, 면화 등의 여러 작물이 상업적으로 재배되고 있고 그 면적도 계속 증가하고 있다(Bhalla, 2006; Chen et al., 2012; Stoger et al., 2005). 배추의 경우 2011년 배추개놈 프로젝트의 완료로 기존보다 더 좋은 품질의 품종을 개발하기 위한 유전자 기능 연구가 가속화되었으며(Wang et al., 2011) 이를 기반으로 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환으로 다양한 저항성 증진 및 기능성 물질 다량 합성배추 등의 개발을 위한 연구가 진행되고 있다(Park et al., 2011; Yu et al., 2010, Yu et al., 2014). 특히 Park et al.(2011)은 glucosinolate의 2차 대사 산물 중 isothiocyanate의 한 종류인 phenylethylisothiocyanate(PEITC)를 glutathione으로 전환해주는 *glutathione S-transferase(GST)* 유전자를 RNAi 벡터로 발현 억제시킴으로써 암 예방 물질인 PEITC의 양이 wild type 배추보다 2-3배 가량 증가한 형질전환 배추를 보고하였다. 이와 같이 농업적 형질의 개선을 위해 개발된 GM 작물들은 품종화를 위해서 도입된 전이유전자(transgene)와 표현 형질의 발현이 세대를 거쳐 안정적으로 유전되어야 하며 이를 위해 도입유전자의 삽입 위치, 구조의 변화 유무 및 전이유전자의 안정적인 발현을 반드시 확인해야 한다(Kumpatla et al., 1998; Matzke et al., 1995; Qin et al., 2014; Vain et al., 1999).

본 연구에서는 암 예방 효과가 있는 PEITC 물질이 증가한 배추 형질전환체 IGA 계통에 도입된 전이유전자와 표현형질인 PEITC 물질 증가의 후대 안정성을 확인하기 위하여 IGA 계통의 T₁ 및 T₂ 세대를 분석하였다. 먼저 도입된 전이유전자의 후대 안정성을 분석하기 위해 T-DNA의 삽입위치를 확인한 후 개놈 내로 도입된 전이유전자의 구조 변화 유무를 확인하기 위하여 T₁ 및 T₂ 세대에서 T-DNA의 내부 구조를 분석하였다. 또한 IGA 계통에서 *GST* 유전자의 발현조절로 인해 증가된 PEITC 함량의 안정적인 발현 양상을 분석하고 최종적으로 PEITC의 암 예방 관련 활성을 확인하기 위해 IGA T₁ 및 T₂ 계통에서 쥐의 간 암세포를 이용하여 Quinone Reductase(QR) 활성을 측정하였다.

재료 및 방법

형질전환체 IGA 1번 계통의 T₁ 및 T₂ 세대 확보

Park et al.(2011)이 육성한, *GST* 유전자가 JYGST RNAi 벡터(Fig. 3A)로 발현억제 되어 PEITC 함량이 증가된 IGA 계통 중 T-DNA가 1 copy로 삽입된 IGA 1번 계통을 뇌수분 방법으로 T₁ 및 T₂ 세대로 진전시켜 본 연구에 이용하였다. T₁ 및 T₂ 계통의 분석을 위해 세대 진전된 T₁ 및 T₂ 세대의 종자를 각각 14립씩 파종하여 선발 마커인 hygromycin 저항성 유전자(*hpt*)를 대상으로 Park et al.(2011)에서 제시한 방법으로 PCR 분석을 수행하였다.

도입된 전이유전자의 삽입위치 확인

IGA 1 T₁ 계통(IGA 1-3)에서 T-DNA가 삽입된 위치를 확인하였다. 전이유전자의 삽입 위치 분석은 Lee et al.(2015)에서 제시한 방법에 따라 VA-TAIL(Variable Argument-Thermal Asymmetric Interlaced) PCR 방법으로 실시하였다. VA-TAIL PCR은 Lui and Whittier(1995)와 Lui and Chen(2007)이 제시한 8개의 AD primer와 pJYGST(Park et al., 2011; Fig. 2) 벡터를 기반으로 left border 방향에서 작성한 LSP1, LSP2, LSP3 및 LSP4, 그리고 right border 방향에서 작성한 RSP1, RSP2, RSP3 및 RSP4 등 8개의 specific primer(SP)를 이용하여 수행하였다(Table 1). PCR 반응은 총 3차에 걸쳐 진행하였으며 1차 PCR은 추출된 T₁ 세대의 IGA 1번 계통의 DNA, AD primer, LSP1 또는 RSP1 primer를 넣고 진행하고 1/10로 희석한 1차 PCR 반응 산물과 AD primer, LSP2 또는 RSP2 primer를 넣어 2차 PCR을 진행하였다. 마지막으로 3차 PCR의 경우 SP3와 SP4 primer를 이용하였다. VA-TAIL PCR을 통해 생성된 PCR 산물은 pGemT-easy vector(Promega, USA)에 삽입한 후 염기서열을 분석(Macrogen Co., Korea)하였다. 확인된 flanking DNA 염기서열은 “Flanking Sequence Tag Validator(FSTVAL)” 프로그램

Table 1. Specific primers (SPs) in pJGST for VA-TAIL PCR.

Direction	Primer	Sequence (5'→3')	GC %	T _m [°C]	ΔG	Dimer ΔG [kal/mol] ^y	Hairpin ΔG
Left border	LSP1	5'- ATAGTGGAAACCGACGCCCCAGCA-3' ^z	58.3	71.9	-46.4	0.0	-0.4
	LSP2	5'- <u>CCAGCACTCGTCCGAGGGCA</u> AAAG-3'	65.2	71.5	-44.3	-1.8	-
	LSP3	5'- <u>GCAAAGAAATAGAGTAGATGCCGACCGG</u> -3'	50.0	69.5	-49.6	-1.7	0.8
	LSP4	5'- TCGATCGACAAGCTCGACGGATCTTC-3'	53.8	71.1	-46.1	1.5	0.8
Right border	RSP1	5'- TGTCGAGGCTCAGCAGGAC <u>CTGCA</u> -3'	62.5	72.8	-44.0	0.3	-0.4
	RSP2	5'- <u>CCTGCA</u> GGCATGCAAGCTT <u>GGC</u> -3'	63.6	71.5	-43.4	-0.1	-1.1
	RSP3	5'- <u>GGCACTGGCCGTCGTTTACAACGT</u> -3'	56.0	71.4	-47.1	-1.9	-0.8
	RSP4	5'- GGGAAAACCTGGCGTTACCCAAC-3'	56.0	70.5	-48.0	1.7	1.0

^zUnderlined nucleotide sequences denote the overlapping sequence for each primer.

^yCalculation of the Gibbs free energy (ΔG) for dimer hybridization and hairpin structure formation during the annealing step using the Vector NTI oligo-calculator (VectorNTI Advance™; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

(GreenGene Bio Tech Inc., Korea)을 이용하여 배추 게놈 내 삽입 위치를 분석하였다(Kim et al., 2012).

T₁ 세대에서의 T-DNA 내부 구조 분석

IGA 1번 계통의 T₁ 세대(IGA 1-3)로 도입된 T-DNA가 GST 유전자를 포함하는 JGST RNAi 벡터와 다름없이 안정적인지를 확인하기 위해 내부 구조를 PCR로 확인하였다. PCR을 실시하기 위해 IGA 1-3번 계통에서 확인된 flanking DNA sequence(FDS)를 바탕으로 left border쪽 FDS부터 JGST 벡터의 *hpt* 영역까지, T-DNA 지역을 mapping 할 수 있는 9 조합의 지역, OCS terminator부터 right border쪽 FDS영역까지 등 총 11 지역을 확인 할 수 있는 11 조합의 primer를 작성하였다(Table 2 and Fig. 3A). 각 primer는 700 bp-1 KB 정도의 PCR 산물을 획득하도록 하였으며 T_m 값은 57-62°C가 되도록 하였다. PCR은 PCR Premix(Maxime™ PCR Premix, iNtRON biotechnology, Korea)를 이용하였으며 PCR 조건은 초기 denaturation 95°C 5분, denaturation 97°C 50초, annealing 57-62°C 30초, extension 72°C 1.5분으로 수행하였고 얻어진 PCR 산물은 아가 로즈 젤에 전기영동하여 목적 밴드를 확인 후 추출하여 T-DNA 내부 염기서열 분석(Macrogen Co., Korea)을 하였다.

T₂ 세대에서의 T-DNA 삽입 위치 확인 및 내부 구조 분석

IGA 1-3 계통에 도입된 T-DNA가 T₁ 세대에서 T₂ 세대로 진전된 후 동일 위치상에 존재하는지 여부와 내부 구조를 확인하기 위해 IGA 1-3-5번 계통에서 T₁ 세대의 분석과 동일한 11개의 primer 조합(Table 2)을 이용하여 PCR 분석을 하였다. 먼저 삽입 위치의 안정성을 확인하기 위하여 T₁ 세대에서 확인된 flanking DNA sequence(FDS)를 바탕으로 left border쪽 FDS부터 *hpt* 영역까지의 primer(F: 5'-TTGTGACACATTCGAA AATGCAG-3', R: 5'-GTATATGCTCCGCATTGGT CTTG-3')와 OCS terminator부터 right border쪽 FDS영역까지의 primer(F: 5'-GCTCACTGAAGGGAAC TCCGGT-3', R: 5'-CGCAA CTAACCAAAGTCCCACC-3')를 작성하였다(Table 2). 또한 T₂ 세대로 도입된 T-DNA 구조의 변화 유무를 확인하기 위해서는 T₁ 세대에서 적용한 9 세트의 primer를 이용하였다. PCR 조건, 확인 및 염기서열 분석은 T₁ 세대 분석 시 이용한 방법과 동일하였다.

IGA 1 계통의 세대별 PEITC 함량 분석

IGA 1번 계통의 T₁ 세대(1-3, 1-4, 1-5) 및 T₂ 세대(1-3-1, 1-3-5, 1-3-7)와 대조구인 CT001의 PEITC 함량을 HPLC 방법으로 측정하였다. 함량분석을 위해 IGA 1번 계통의 T₁ 및 T₂ 세대의 잎을 동결건조 시킨 후 75mg의 powder를 1.5mL 증류

Table 2. Primer sets for confirmation of T-DNA internal structure and flanking DNA region

	Primer sets		Sequence		T _m (°C)	Product size (bp)
1	F	5'	TTGTGACACATTCGAAAATGCAG	-3'	59.3	626
	R	5'	GTATATGCTCCGCATTGGTCTTG	-3'	62.9	
2	F	5'	ATCGGACGATTGCGTCGCAT	-3'	61.7	760
	R	5'	CCGCTGTTCTGCAGGTAAATTTTC	-3'	59.1	
3	F	5'	AAAAAGAGAAAAGGGTCCTAACCAA	-3'	57.7	906
	R	5'	TGATGTGATAACATGGTGGAGCAC	-3'	58.1	
4	F	5'	GTGCTCCACCATGTTATCACATCA	-3'	58.1	812
	R	5'	TGTATACGCGTCAGCTGCTGCT	-3'	59.0	
5	F	5'	ACGTCGTGTATAACGGACCTCATG	-3'	59.0	833
	R	5'	CACCATGTTGACGAAGATTTTCTTC	-3'	58.1	
6	F	5'	TAAGGCCATGCATGGAGTCTAAGAT	-3'	59.6	956
	R	5'	TGCAAGTTGCAACATTCTTAGATCA	-3'	58.0	
7	F	5'	CTCGATGTAACATCGTCCAGCACTG	-3'	61.8	813
	R	5'	CAGCCCAACACCTTACAGAAATTAG	-3'	57.8	
8	F	5'	TTCTTTGTTTCCCTCTTATTCAGA	-3'	57.1	995
	R	5'	TTGGGGATTAGAATTTGAAGCTACA	-3'	57.8	
9	F	5'	ATCATTATCTGATCTGCTCAAAGC	-3'	57.9	845
	R	5'	TTAGAATGAACCGAAACCGGC	-3'	57.8	
10	F	5'	CGGGAGAGGAAGGGCTCTTT	-3'	58.2	759
	R	5'	CTGCTGAGCCTCGACATGTTG	-3'	57.4	
11	F	5'	GCTCACTGAAGGGA ACTCCGGT	-3'	65.9	988
	R	5'	CGCAA ACTAACCAAAGTCCCACC	-3'	64.7	

수와 혼합하고 상온 조건에서 암상태로 18시간 동안 반응시킨 후 10분 동안 17000rpm으로 원심분리하여 상등액을 분리하였다. 분리된 상등액 1.2mL에 20μL benzyl isothiocyanate(BITC)와 500μL methylene chloride(MC)를 첨가하여 다시 17000rpm에서 5분 동안 원심분리하고 200μL의 하층(MC층)을 추출하였다. 추출한 MC층을 100μL의 derivatization reagent와 혼합하여 30°C에서 한 시간 동안 유도체화를 진행한 후 질소 하에서 농축하여 200μL의 acetonitrile/water(1:1)에 용해하고 syringe filtering 후 HPLC로 측정하였다.

HPLC 측정에 사용된 LC column은 Atlantis T3(250×4.6mm i.d., 5μm, Millford, MA)이며 flow rate는 0.8mL·min⁻¹로 252nm의 파장에서 BEITC와 PEITC를 검출하였다. HPLC 반응 후 BITC와 PEITC의 standard curve를 작성하고 그에 따른 PEITC 함량을 계산했다.

Quinone reductase(QR) 활성 측정

IGA T₁ 및 T₂ 세대 형질전환체에서 Quinone reductase(QR) 활성을 측정하기 위해 쥐의 간암세포인 hepa1c1c7를 이용하여 Benson(1980)의 방법을 따라, 2-dichlorophenolindophenol(DCIPI)를 환원시키는 정도를 측정하였다. QR 활성은 1분간 감소되는 흡광도와 DCIPI의 molar extinction coefficient로부터 환원된 DCIPI 양을 계산하고 세포 균질액의 단백질 함량을 측정하여 계산하였다.

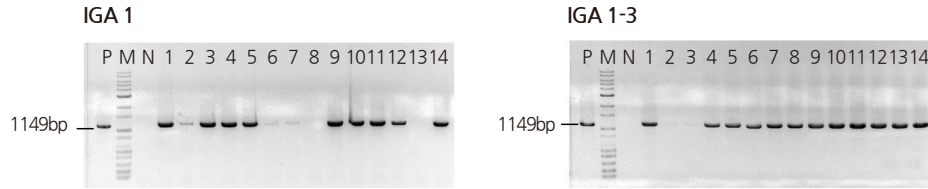


Fig 1. Selection of transgenic T₁ and T₂ lines by PCR analysis. PCR analysis was conducted using transgenic IGA 1 from 1-1 to IGA 1-14 (left) and IGA 1-3 from 1-3-1 to IGA 1-3-14 (right). P: positive control; pJGGSST, M: 1 kb DNA ladder, N: negative control, CT001.

결과 및 고찰

형질전환체 IGA 1번 계통의 T₁ 및 T₂ 세대 확보

GST 유전자를 RNAi 방법으로 발현 억제시켜 PEITC 함량이 증가된 IGA 계통 중 T-DNA가 1 copy로 삽입되었으며 PEITC 물질함량이 높은 IGA 1번 계통을(Park et al., 2011) 뇌수분 방법으로 자가 수분하여 T₁ 및 T₂ 세대로 진전시켰다. 세대 진전 후 T-DNA가 유전된 T₁ 세대의 선발은 IGA 1번 종자를 14립 파종 후 본엽이 5-6잎 생성 시 DNA를 추출한 후 PCR 방법으로 수행하였다. PCR 분석은 T₁ 세대 내로 도입된 pJGGSST RNAi 벡터의 선발마커인 *hpt* 내의 1149bp의 지역을 대상으로 하는 primer를 이용하였으며 T₁ 세대에서는 14개의 개체 중 9개 개체에서 후 T-DNA가 유전된 것으로 확인되었으며(Fig. 1) 이 개체들 중 한 개체(IGA 1-3)를 선발하여 T₂ 세대로 진전시켰다. T₂ 세대에서도 T₁ 세대와 같은 방법으로 확인 결과 14개체 중 12개의 개체에서 T-DNA 삽입을 확인하였으며(Fig. 1) 확인된 개체들로 후대 유전 안정성 및 물질 검정에 이용하였다. 일반적으로 *Agrobacterium*에 의한 형질전환 시 heterozygous 하게 도입된 유전자는 T₁ 및 T₂ 세대로 진전되면 분리가 되어 비형질전환체를 제외하는 선발과정이 필요하며 본 연구에서도 각 세대별 분리가 발생되어 선발 과정을 수행하였다.

도입된 T-DNA 삽입위치 분석

IGA 1-3번 계통의 계놈 내부로 도입된 T-DNA의 삽입위치를 확인하기 위해 VA-TAIL PCR을 실시 한 후 SP3 primer 및 SP4 primer가 사용된 3차 PCR 반응산물을 인접하여 로딩하고 특이적 밴드를 선발하였다(Fig. 2A). 특이적 밴드로는 PCR 산물의 크기가 500 bp 이상이며 SP3의 반응산물보다 아래쪽에 위치한 SP4의 반응산물을 선발하였다. 이는 양쪽 border로부터 SP primer 작성시 SP4 primer 부터 border까지 대략 400 bp 정도로 하였기 때문에 배추 계놈 내 AD primer 인지 지역과 border의 안쪽 SP4 primer 인지지역이 적어도 500 bp 이상일 것으로 예상되기 때문이었다. 따라서 IGA 1-3번 계통의 VA-TAIL PCR 결과 left border 쪽은 AD primer 3번, 5번, 6번에서 특이적인 밴드를 선발하였으며 right border 쪽은 AD primer 1번, 2번, 3번에서 특이적인 밴드를 선발하였다(Fig. 2A). 선발된 특이적 PCR 밴드는 추출하여 염기서열 분석을 통해 T-DNA가 삽입된 근처의 flanking DNA sequence(FDS)를 확인하였다. 확인된 FDS를 FSTVAL을 통해 분석한 결과 IGA 1-3번 계통에 도입된 pJGGSST의 T-DNA는 배추의 6번 염색체의 353,144-353,155 지역에 위치함을 알 수 있었으며(Fig. 2B) 이는 Bra037972 유전자(unknown)와 Bra007971 유전자(unknown) 사이의 intergenic region(Fig. 2C)으로 확인할 수 있었다.

GM 작물의 상업화를 위한 안정성 확인은 도입유전자의 삽입위치의 확인이 필수적으로 요구된다. 도입유전자의 삽입 위치는 1-copy로 작물의 계놈 내로 전이되었을 때 확인이 용이하며 또한 T-DNA의 삽입이 low copy일수록 GM 작물의 안정성을 확보할 수 있다(Pla et al., 2012). *Agrobacterium*을 매개로 한 식물형질전환은 자연상태에서 발생하는 현상을 응용한 것으로 원하는 유전자가 포함된 T-DNA가 plasmid로부터 대상식물의 계놈 내부로 도입되도록 하는 방식이며 유전자 총을 이용한 형질전환보다 적은 copy수로 T-DNA가 도입되는 장점이 있다(Brenda et al., 2009; Dai et al., 2001; Shou et al., 2004). T-DNA의 low copy수 도입은 multi-copy수의 도입보다 도입유전자의 silencing 현상으로 인한 발현억제의 확률이 낮게 존재하므로(Iyer

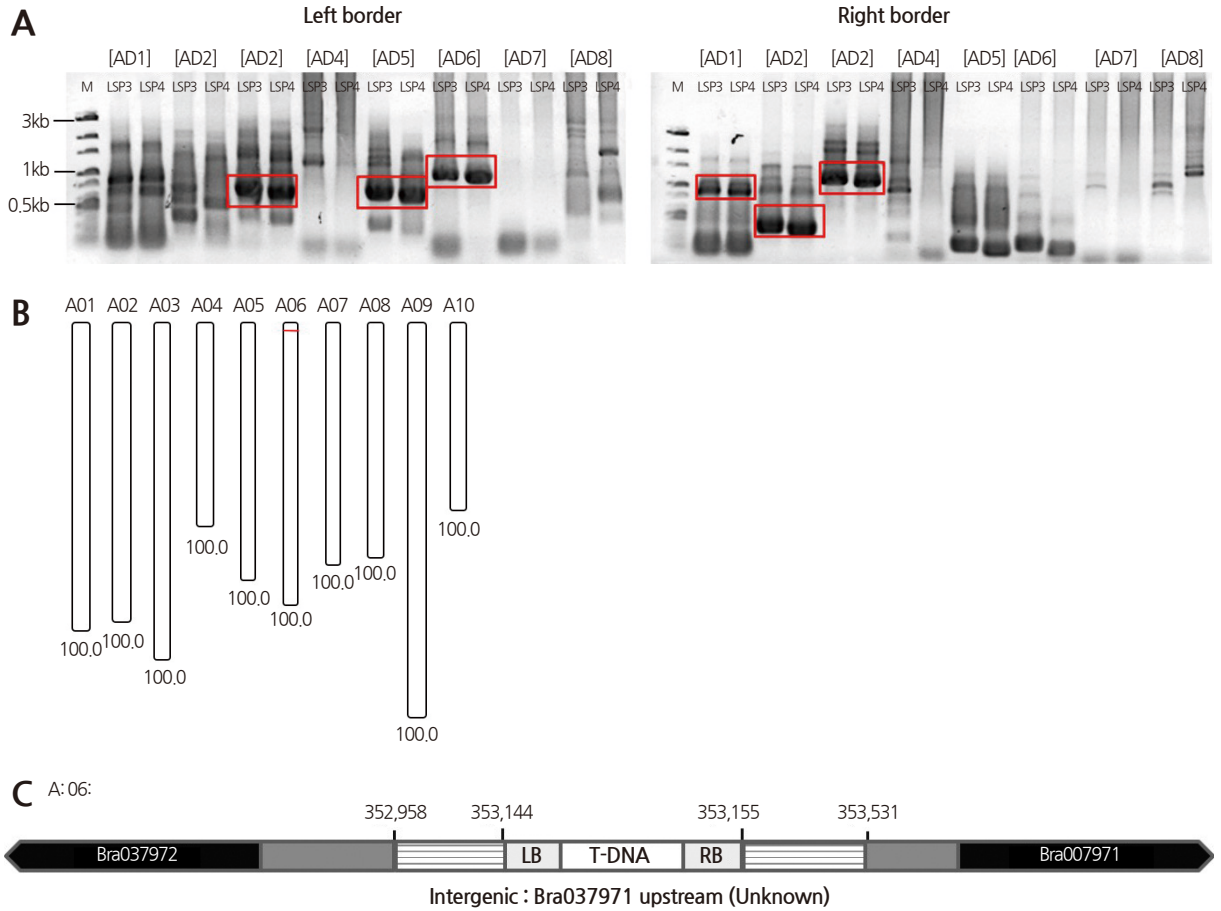


Fig 2. Analysis of VA-TAIL PCR and flanking DNA sequence of IGA 1-3 (T₁). (A) VA-TAIL PCR products from right or left border. Candidate flanking DNA sequences are indicated in red boxes, (B) Analysis of flanking DNA sequence using FSTVAL program. The T-DNA of pJGST is located in chromosome 6. Each number under the chromosome means the drawing scale (kb/px), (C) Schematic diagram of the T-DNA insertion. The T-DNA is inserted in the intergenic region between Bra037972 and Bra007971 and stripe boxes are flanking DNA region.

et al., 2000; Vaucheret et al., 1998) GM 작물의 안정성의 필수 조건이라 할 수 있다. 또한 외래 유전자의 도입으로 인하여 내부 유전자의 변형이 유기될 수 있어 T-DNA 삽입이 유전자 부위가 아닌 intergenic 부위에 삽입될 때 작물의 안정성을 확보할 수 있으며 이를 위해 계통 내로 도입된 T-DNA의 위치를 확인하는 것은 필수적이라 할 수 있다.

따라서 IGA 1-3번 계통은 T-DNA pJGST가 배추 계통 내로 1 copy로 도입되었으며 도입 위치 또한 6번 염색체에서 유전자와 유전자 사이인 intergenic 부위에 삽입된 것으로 분석되어 T-DNA의 삽입이 안정적으로 이루어졌다고 판단된다.

도입된 T-DNA의 안정적 유전의 확인

IGA 1-3번 계통의 세대진전에 따른 T-DNA 삽입위치의 동일성을 확인하고 T-DNA의 내부 구조를 확인하기 위해 IGA 1-3 계통과 IGA 1-3-5 계통에서 PCR을 실시하였다. 먼저 세대 진전에 따른 T-DNA의 유전이 변이 없이 이루어짐을 확인하기 위해 IGA 1-3 계통에서 확인된 flanking DNA sequence(FDS)를 바탕으로 FDS부터 left border 쪽 지역(Fig. 3A①)과 right border 쪽에서 FDS 영역까지(Fig. 3A②)의 primer를 작성하였다. 한편 도입된 T-DNA의 내부의 변이 여부를 확인하기 위해 T-DNA 내부를 mapping할 수 있는 9 조합의 primer를 추가적으로 작성하였으며 총 11개의 PCR primer sets를 통해 도입된

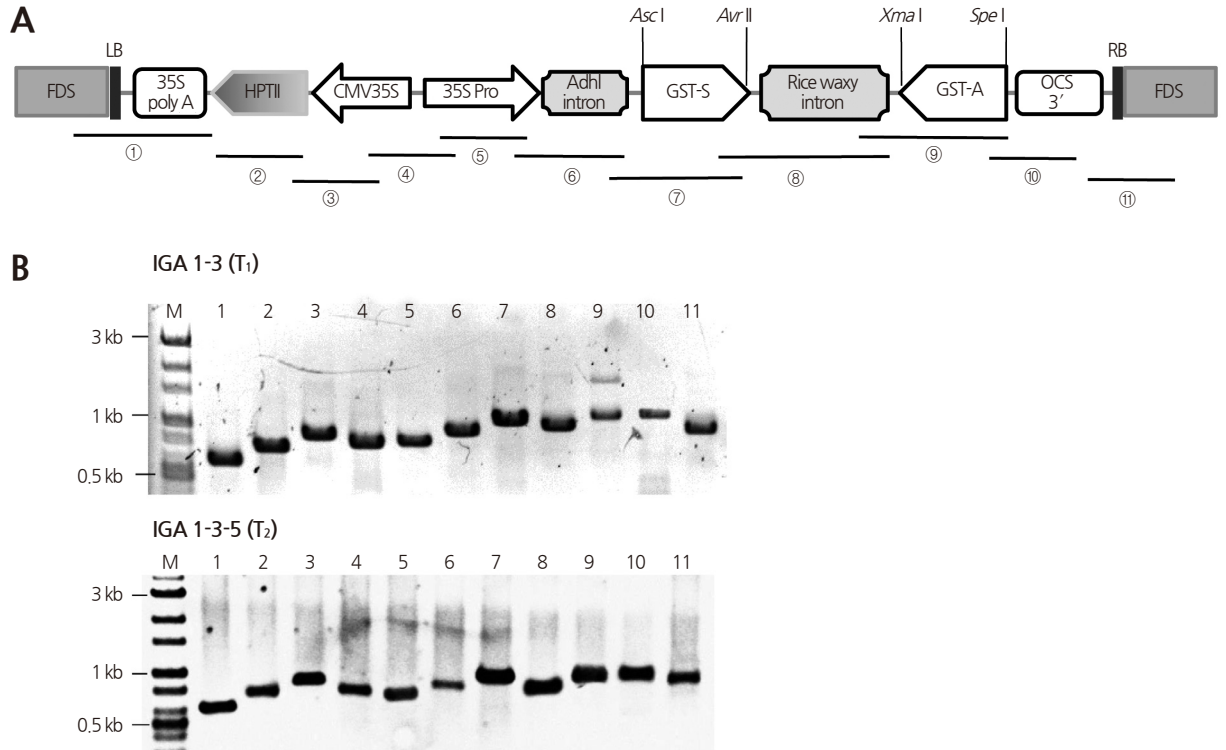


Fig 3. Confirmation of stable inheritance of the transgene and T-DNA inside structure in IGA1-3 (T_1 generation) or IGA 1-3-5 (T_2 generation) using PCR analysis. (A) Map of pJGST and 11 PCR product regions. Sizes of PCR products are indicated in Table 2. (B) Electrophoresis of PCR products. The numbers for the PCR products match the regions indicated in (A). FDS: Flanking DNA Sequence. M: 100 bp DNA ladder.

T-DNA의 안정성을 분석하였다. PCR 결과(Fig. 3B) IGA 1-3 계통과 IGA 1-3-5 계통의 PCR 반응산물 중 1번과 11번 lane의 위치가 각 626 bp, 988 bp에서 확인된 것으로 보아 IGA 1-3 계통으로 도입된 T-DNA가 세대진전을 통해 안정적으로 IGA 1-3-5 계통으로 유전되었음을 확인하였다. 또한 2-10번 lane의 PCR 반응산물 역시 Table 2에 제시한 목적 크기와 같은 위치에서 확인되는 것으로 보아 배추 유전체 내로 T-DNA의 내부 구조 변화 없이 안정적으로 삽입이 이루어졌음을 확인하였다. 마지막으로 각각의 PCR 밴드를 추출하여 확보된 염기서열을 연결하여 pJGST 벡터와의 상동성을 확인하기 위해 BLAST Align을 실시한 결과 T-DNA의 후대 유전이 매우 안정적임을 확인할 수 있었다.

PEITC 함량 조사와 암 예방 효과 확인

IGA 1번 계통의 T_1 세대 및 T_2 세대와 대조구인 CT001의 PEITC 함량을 측정하기 위해 HPLC 분석을 실시하였다. 배추시료에서 PEITC 함량을 정확하게 측정하기 위해 benzyl isothiocyanate(BITC)를 첨가하여 내부 보정 물질로 사용하였으며 BITC는 21.17분, PEITC는 22.26분에 peak가 검출되었다(Fig. 4A). HPLC로 BITC와 PEITC의 peak area를 계산하기 위해 농도 별로 각각의 standard curve를 작성 하였으며 T_1 세대 및 T_2 세대의 PEITC 함량 분석은 각 세대별로 3개의 개체들을 선발하여 IGA 1번 계통의 T_1 세대(IGA 1-3, 1-4, 1-5) 및 T_2 세대(IGA 1-3-1, 1-3-5, 1-3-7)와 대조구인 CT001의 PEITC 함량을 계산하여 그래프로 나타냈다(Fig. 4B). HPLC로 PEITC 함량의 분석결과 대조구인 비형질전환체 CT001은 PEITC 함량이 건조질량 당 $2.08\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$ 이 검출되었으며 IGA T_1 및 T_2 세대 형질전환체에서는 건조 질량 당 $3.51\text{--}6.20\mu\text{M}\cdot\text{g}^{-1}$ 의 PEITC가 측정되었다. 따라서 IGA 1번의 T_1 및 T_2 계통에서 PEITC 함량이 CT001 보다 2-3배 증가한 것을 확인 하였으며, 이 계통들의 암

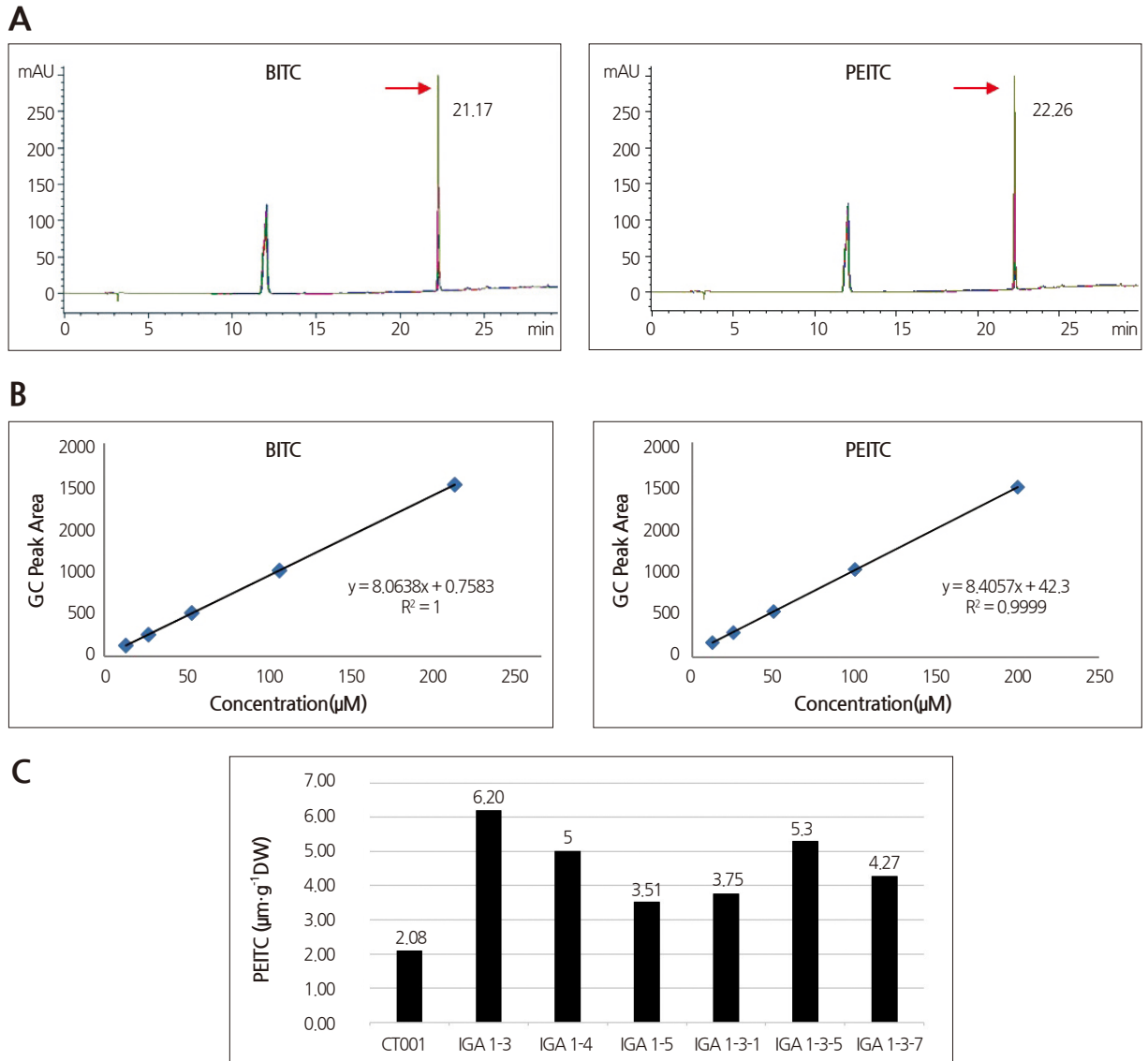


Fig. 4. Analysis of PEITC concentration. (A) Preparative HPLC separation of benzyl isothiocyanate (BITC) using refractive index phenylethylisothiocyanate (PEITC) at UV 252 nm, (B) Standard curve for HPLC analysis, (C) Comparison of PEITC concentrations in CT001 (non-transgenic), IGA 1 and IGA 1-3, each generation consists of 3 transgenic Chinese cabbages.

예방 효과를 확인하기 위하여 Quinone Reductase(QR) 활성을 확인하였다. QR 활성은 활성산소 등에 의해 발생하는 발암원들을 제거하는데 효과적으로 알려져 있는 Phase II detoxification 증진 기능으로 알려져 있어, 암 예방 효과를 확인하기 위한 기내 실험에 많이 활용되고 있다(Ku et al., 2014). PEITC 농도와 유사하게, QR 활성도 비형질전환체 CT001에 비해 IGA T₁ 및 T₂ 세대 형질전환체에서 비교적 높은 QR 활성 경향을 보인바, 형질전환체에서 증가된 PEITC 농도가 QR 활성의 증가를 나타낸 것으로 판단된다. QR 활성 실험에 있어 SFN은 브로콜리 등에서 잘 알려져 있는 QR 유도 isothiocyanate 성분으로 본 실험에서는 PEITC에 의한 QR 유도능 분석에 대한 positive control로서 사용되었다(Fig. 5).

GM 작물의 안정성은 형질전환 대상 작물로 도입된 T-DNA에 대한 정보를 분자수준에서의 확인 뿐만 아니라 비형질전환체와 비교하여 조절된 도입유전자에 의해 변화된 표현형 특징들이 세대가 진전됨에도 안정적으로 발현됨과 동시에 기존의 형질들은 유지되어야 한다(Chen et al., 2012; Pla et al., 2012; Qin et al., 2014). 기 보고된 IGA 1 번 계통은 Park et al.(2011)의 연

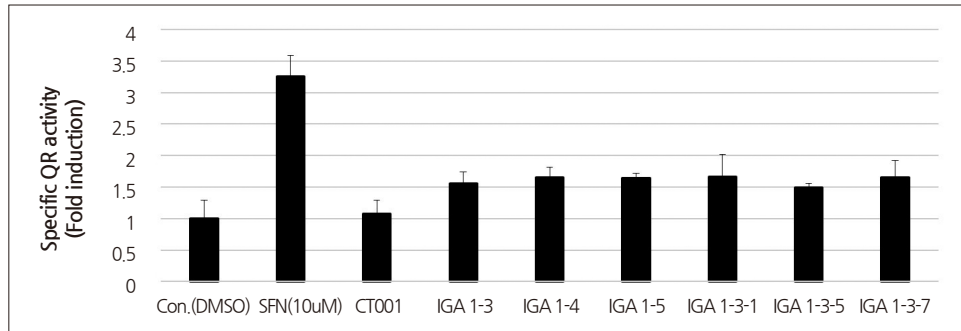


Fig. 5. Induction of quinone reductase in Hepalcl7 cell by extracts of IGA 1 T₁ and T₂ generation transgenic plants. DMSO, Non-treated control; SFN, Positive control; CT001, Plant control.

구에서 비형질전환 개체인 CT001(Inbred line)와 비교하여 표현형으로 나타나는 원예적 형질의 차이가 없음을 확인하였고 *GST* 유전자가 RANi 벡터에 의해 발현 억제됨을 real-time RT PCR로 확인하였으며 *GST*의 발현량 감소에 따른 PEITC 함량의 증가됨을 확인 하였다. 본 연구에서는 세대 진전으로 확보된 T₁ 세대의 형질전환체인 IGA 1-3, 1-4, 1-5번 계통과 T₂ 세대의 1-3-1, 1-3-5, 1-3-7번 계통에서 도입유전자로 인한 *GST*의 발현 억제에 따른 PEITC 함량을 분석한 결과 비 형질전환체인 CT001보다 2-3배 가량 증가함은 물론 세대진전이 되어도 안정적으로 유지되는 것을 확인하였다. 또한 QR 활성 분석으로 확인된 암 예방 효과도 우수하며 안정적으로 유지됨을 볼 수 있었다.

초 록

GM작물의 개발은 병 저항성, 제초제 저항성, 스트레스 저항성, 기능성 물질의 증진 등의 목적으로 기존 작물에 존재하지 않은 새로운 형질을 도입시킬 수 있게 하였다. 이렇게 개발된 GM작물의 상업화를 위해서는 형질전환 식물체에 도입된 T-DNA가 여러 세대에 걸쳐 안정적인 유전과 표현형의 발현이 요구된다. 본 연구는 암 예방 효과가 있는 PEITC 물질이 증가된 형질전환체, IGA 계통의 T₁ 및 T₂ 세대에서 도입된 T-DNA의 안정성을 확인하였다. 이를 위해 T₁ 세대의 IGA 1-3번 계통과 T₂ 세대의 IGA 1-3-5번 계통을 PCR로 선발하였으며 선발된 T₁ 세대의 IGA 1-3번 계통에서 도입된 T-DNA의 삽입위치를 VA-TAIL PCR로 확인한 결과 배추 게놈 내 intergenic 부위에 삽입되었음을 확인하였다. 또한, 도입 유전자의 세대별 안정성은 IGA 1-3번 계통과 IGA 1-3-5번 계통에서 T-DNA의 내부구조와 flanking 지역을 PCR 분석으로 비교함으로써 확인하였다. 결과적으로 본 연구에서 IGA 1번 계통으로 도입된 T-DNA는 구조의 변이 없이 안정적으로 후대로 유전 되었으며, IGA 1번 계통의 T₁ 및 T₂ 세대의 PEITC 함량의 증가로 표현형적 형질 또한 안정적으로 유전 되는 것으로 확인하였다. 마지막으로 IGA 1번 계통의 T₁ 및 T₂ 세대에서도 QR 활성을 확인하여 암 예방 효과 또한 확인하였다.

추가주요어: 인접 DNA 염기서열, glutathione S-transferase, 도입유전자, quinone reductase 활성

Literature Cited

- Benson, A.M., M.J. Hunkeler, and P. Talalay. 1980. Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants: possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:5216-5220.
- Bhalla, P.L. Genetic engineering of wheat-current challenges and opportunities. 2006. Trends biotechnol. 24:305-311.
- Brenda A.L., N.S. Prakash, M. Way, M.T. Mann, T.M. Spencer, and R.S. Boddupalli. 2009. Enhanced single copy integration events in corn via particle bombardment using low quantities of DNA. Transgenic Res. 18:831-840.
- Chen, S., J. Zhang, H. Pu, A. Shen, X. Zhou, W. Long, M. Hu, and C. Qi. 2012. Analysis of insertion copy number and integration site

- of T-DNA in the genome of transgenic high oleic rapeseed (L.). *Plant Gene Trait* 2:15-22.
- Dai, S., P. Zheng, P. Marmey, S. Zhang, W. Tian, W., S. Chen, R.N. Beachy, and C. Fauquet. 2001. Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol. Breed.* 7:25-33.
- Iyer, L.M., S.P. Kumpatla, M.B. Chandrasekharan, and T.C Hall. 2000. Transgene silencing in monocots. Springer Netherlands 43:323-346.
- Kim, J.S., J. Kim, T.H. Lee, K.M. Jun, T.H. Kim, Y.H. Kim, H.M. Park, J.S. Jeon, G. An, U.H. Yoon, B.H. Nahm, and Y.K. Kim. 2012. FSTVAL: a new web tool to validate bulk flanking sequence tags. *Plant Methods* 8:19.
- Ku, K.M., E.H. Jeffery, and J.A. Juvik. 2014. Optimization of methyl jasmonate application to broccoli florets to enhance health-promoting phytochemical content. *J. Sci. Food Agriculture.* 94:2090-2096.
- Kumpatla, S.P., M.B. Chandrasekharan, L.M. Iyer, G. Li, T.C. Hall. 1998. Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing. *Trends Plant Sci.* 3:97-104.
- Liu, Y. and R. Whittier. 1995. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25:674-681.
- Liu, Y.G. and Y. Chen. 2007. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. *Biotechniques* 43:649-656.
- Lee, G.H, J.G. Yu, and Y.D. Park. 2015. Development of an effective PCR technique for analyzing T-DNA integration sites in *Brassica* species and its application. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 33:242-250.
- Matzke, M. A. and A.J.M. Matzke. 1995. How and why do plants inactivate homologous (trans) genes?. *Plant Physiol.* 107:679-685.
- Park, J.H., S.J. Lee, B.R. Kim, E.T. Woo, J.S. Lee, E.H. Han, Y.H. Lee, and Y.D. Park. 2011. Isolation of myrosinase and glutathione S-transferase genes and transformation of these genes to develop phenylethylisothiocyanate enriching Chinese cabbage. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 29:623-632.
- Pla, M., J.L. La Paz, and C. Vicent. 2012. Insert stability and transgenic plant risk. *Encyclopedia Biotechnol. Agriculture Food.*
- Qin, Y., H.I. Ahn, S.Y. Park, M.H. Lim, H.J. Woo, K.S. Shin, J.H. Lee, H.S. Cho, S.H. Baek, S.K. Park and S.J. Kweon. 2014. T-DNA inheritance stability of resveratrol rice Iksan526 over multi-generations. *Plant Breed. Biotechnol.* 2:268-275.
- Shou, H., B.R. Frame, S.A. Whitham, and K. Wang. 2004. Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mol. Breed.* 13:201-208.
- Stoger, E., J.K. Ma, R. Fischer, and P. Christou. 2005. Sowing the seeds of success: pharmaceutical proteins from plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16:167-173.
- Vain, P., B. Worland, A. Kohli, J.W. Snape, P. Christou, G.C. Allen, and W.F. Thompson. 1999. Matrix attachment regions increase transgene expression levels and stability in transgenic rice plants and their progeny. *Plant J.* 18:233-242.
- Vaucheret, H., C. Béclin, T. Elmayer, F. Feuerbach, C. Godon, J.B. Morel, P. Mourrain, J.C. Palauqui, and S. Vernhettes. 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J.* 16:651-659.
- Wang, X., H. Wang, J. Wang, R. Sun, J. Wu, S. Liu, Y. Bai, J.H. Mun, I. Bancroft, F. Cheng, S. Huang, X. Li, W. Hua, J. Wang, X. Wang, M. Freeling, J.C. Pires, A.H. Paterson, B. Chalhou, B. Wang, A. Hayward, A.G. Sharpe, B.S. Park, B. Weisshaar, B. Liu, B. Li, B. B. Liu, C. Tong, C. Song, C. Duran, C. Peng, C. Geng, C. Koh, C. Lin, D. Edwards, D. Mu, D. Shen, E. Soumpourou, F. Li, F. Fraser, G. Conant, G. Lassalle, G.J. King, G. Bonnema, H. Tang, H. Wang, H. Belcram, H. Zhou, H. Hirakawa, H. Abe, H. Guo, H. Wang, H. Jin, I.A. Parkin, J. Batley, J.S. Kim, J. Just, J. Li, J. Xu, J. Deng, J.A. Kim, J. Li, J. Yu, J. Meng, J. Wang, J. Min, J. Poulain, J. Wang, K. Hatakeyama, K. Wu, L. Wang, L. Fang, M. Trick, M.G. Links, M/ Zhao, M. Jin, N. Ramchiary, N. Drou, P.J. Berkman, Q. Cai, Q. Huang, R. Li, S. Tabata, S. Cheng, S. Zhang, S. Zhang, S. Huang, S. Sato, S. Sun, S.J. Kwon, S.R. Choi, T.H. Lee, W. Fan, X. Zhao, X. Tan, X. Xu, Y. Wang, Y. Qiu, Y. Yin, Y. Li, Y. Du, Y. Liao, Y. Lim, Y. Narusaka, Y. Wang, Z. Wang, Z. Li, Z. Wang, Z. Xiong, Z. Zhang and H. Abe. 2011. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. *Nat. Genet.* 43:1035-1039.
- Yu, J.G., G. H. Lee, J.S. Kim, and Y.D. Park. 2010. An insertional mutagenesis system for analyzing the Chinese cabbage genome using *Agrobacterium* T-DNA. *Molecules and Cells* 29:267-275.
- Yu, J.G., G.H. Lee, J.H. Park, and Y.D. Park. 2014. Characterization and gene co-expression network analysis of a salt tolerance-related gene, BrSSR, in *Brassica rapa*. *Korean J. Hortic. Sci. Technol.* 32:845-852.