식물조직배양학회지 제21권 제1호
Korean J. Plant Tissue Culture
Vol. 21, No. 1, 29~34 (1994)

제라니움 세포벽을 통한 유전물질의 전이

유장걸* · 소인섭 · 홍경애
제주대학교 방사능 이용연구소

Transfer of Genetic Substance Through the Cell Wall of Geranium (*Pelargonium zonale* hybrids, 'Pinto Scarlet') Callus

Zang Kual U.*, In Sup SO, and Kyung Ae HONG
Cheju Applied Radioisotope Research Institute, Cheju National University Cheju-shi, 690-756. *Corresponding author.

The possibility that DNA could move out of the single cells isolated from geranium (*Pelargonium zonale* hybrids, 'Pinto Scarlet') callus was determined by the electrophoretic DNA analysis after treatments of low pH, various concentrations of KNO_3, 2,4-D, and GA_3 followed by the centrifugal force, all of which are known to affect the physico-chemical properties of the cell wall. The centrifugal force of 1,800 x g was needed for DNA migration after the above treatments, but 7,300 x g was required without the treatments. In this experiment the optimum concentration (300 mg/L) of sodium dodecyl sulfate (SDS) used as an anion detergent to collect the negatively charged DNA was very critical not to damage the cell wall. It can be concluded that the centrifugal force played a key role for the DNA migration through the cell wall, and the treatments of low pH (4.0), 0.5% KNO_3, 1.5 mg/L GA_3 and 1 mg/L 2,4-D further increased the DNA migration.

Key words : 2,4-D and GA_3, centrifugal force, cell wall, DNA migration, low pH and high K^+

식물체의 형질을 전환하고자 하는 시도가 많이 이루어졌으며 세포벽을 효소처리 하는 기술이 개발됨과 더불어 원형질체 분리(Cocking, 1960) 및 세포 융합에 대한 연구가 가속화 되었으나 효소처리에 따른 세포활성의 감소가 문제로 대두되어 왔다(Palta et al., 1978). 즉 원형질막이 효소 처리시에 손상을 당하게 되어 막활성 내지는 막특성이 변화되므로 세포의 분열과 재분화에 나쁜 영향을 주기 때문이다(Ahuja, 1982). 그러므로 세포벽을 제거하지 않은 상태에서 유전물질을 삽입하거나 세포융합을 시도하는 것이 요구된다. Wu 등(1988)은 서로 다른 종류의 단세포를 혼합배양하여 캘러스를 만들고 원심분리법을 이용해서 담배(*N. tabacum*)와 시금치(*S. oleracea*)의 잡종을 만들었다. 그러나 원심분리법에 관한 자세한 기작이 밝혀져 있지 않기 때문에 본 연구에서는 캘러스에서 분리된 세포의 벽구조에 영향을 주는 낮은 pH, 고농도의 K^+, GA_3 및 2,4-D, 그리고 원심력을 처리해서 유전물질인 DNA가 세포벽 밖에서 검출될 수 있는 지를 전기영동법으로 검토해 보았다.

재료 및 방법

캘러스 유기

제라니움(*Pelargonium zonale* hybrids, 'Pinto Scarlet') 종자를 구입하여 1% NaOCl로 표면 살균하고 25°C, 2,000 lux에서 발아시켰다. 4주일 후 엽조직을 사용해서 NAA 3 mg/L, BA 1 mg/L를 혼합 처리한 Murashige와 Skoog (MS) 배지에서 캘러스를 유기시켰다.

캘러스로 부터 단세포 분리

유기된 캘러스는 유리막대를 이용하여 작은 조각으로 만들고 이것을 0.3 M-sorbitol washing solution[WS(KH_2PO_4 22.7 mg/L, KNO_3 101.0 mg/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1480 mg/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 246 mg/L, KI 0.16 mg/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.025 mg/L)] 2 mL가 들어 있는 10 mL 시험관으로 옮겨 vortex mixer로 부드럽게 진탕시킨 후에 50 μm 나일론망으로 찌꺼기를 걸러냈다. 여액은 1,000 x g에서 1분간 원심분리하여 깨진 세포 조각들을 제거한 뒤 pellet에 0.3 M-sucrose WS 2 ml를 가하여 부드럽게 현탁시킨 뒤 1,000 x g에서 30초간 원심분리하여 불순물을 제거하였는데 이 조작을 3번 반복하여 캘러스를 단세포화시켰다.

SDS의 적정 농도 설정

세포막이나 세포벽이 SDS에 의해서 손상을 받을 수 있기 때문에 SDS의 적정 농도를 설정하기 위하여 시료에 최종농도로서 500 mg/L, 400 mg/L, 300 mg/L, 200 mg/L, 100 mg/L가 되도록 각각 처리한 뒤에 FDA staining법으로 세포의 활성도를 경시적으로 측정하고 DNA를 분석함으로서 세포막에 손상을 주지 않고 세척제로서의 역할을 수행할 수 있는 SDS의 적정 농도를 검토하였다.

유전물질 이동 촉진 처리

K^+와 수소이온 효과를 보기 위하여 MS배지에서 KNO_3만을 달리한(KNO_3 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0%) 배지를 pH 4.0과 pH 5.8로 각각 조절하고 이 용액 5ml에 분리된 세포를 현탁시키고 시간의 경과에 따른 세포의 활성도를 측정했으며 K^+ 농도에 의한 DNA 유출효과를 보기 위해서 pH 5.8에서만 DNA 검출실험을 수행하였다. 원심분리 처리 효과를 보기 위해서 세포를 pH 5.8의 0.5% KNO_3 MS 용액 5 mL에 1시간 침적한 후 1,800 x g, 4,000 x g, 7,300 x g에서 원심분리하여 원심력의 세기에 따른 DNA 유출여부를 조사하였다. GA_3와 2,4-D의 효과를 보기 위해서 0.5 mg/L, 1.5 mg/L, 3.0 mg/L의 GA_3와 0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 2.0 mg/L의 2,4-D를 포함하는 MS 용액을 pH 5.8로 조절한 후 여기에 세포를 1시간 처리하였다.

유전물질의 세포 외부로의 이동 검증을 위한 DNA 분석

세포와 세포 사이로 유전물질이 전이된다는 것은 어떤 경로이든 한 세포로 부터 일단 유전물질이 밖으로 나온다는 뜻인데 세포간의 전이를 관찰한다는 것은 어려울뿐만 아니라 장시간이 소요되기 때문에 이상의 처리를 해주고 DNA가 세포 밖으로 유출되는지를 알아보기 위해서 세포를 파괴시키지 않는 조건에서 DNA를 검출하였다. DNA 분석 조작은 이상의 처리가 끝난 단세포를 원심분리관에서 최종농도가 300 mg/L 되도록 SDS를 가하고 현탁시킨 후 3분간 1,000 x g에서 원심분리하여 DNA가 들어있는 상징액을 분리해내고 Draper와 Scott(1988)의 방법에 따라 DNA 분석을 수행하였다. 건조된 DNA를 TE buffer에 녹여 0.6% agarose에서 50 V로 전개시킨 후 UV-illuminator(Fischer Biotech, FBTI 88)로 DNA band를 관찰하고 포라로이드 사진을 촬영했다.

결과 및 고찰

캘러스로 부터 단세포의 분리

Figure 1-A와 1-B에서 보는 바와 같이 캘러스에서 분리한 단세포는 세포괴가 거의 없는 것이었으며 좋은 활성을 유지하고 있었다.

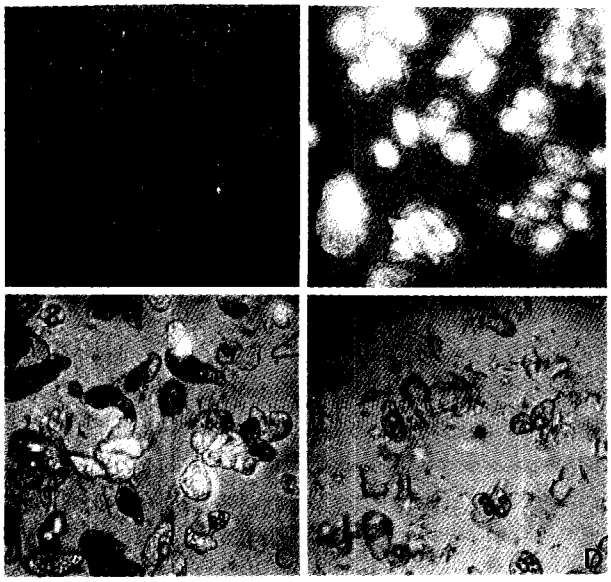

Figure 1. Single cells from callus and different viability observed by the FDA method. A: Single cells isolated from geranium callus B: Single cells with good viability C: Single cells with bad viability caused by the treatments of acid, K^+, SDS or centrifugation D: Single cells disrupted with the treatments of acid, K^+, SDS or centrifugation.

SDS의 영향

SDS는 cetyltrimethylammonium bromide(CTAB)와 함께 식물세포의 총 DNA를 분리하는 과정에서 마쇄된 세포조각들에 붙어 있는 DNA를 효율적으로 씻어내기 위해 사용하는 음이온 세척제로서(Draper and Scott, 1988) 단백질을 제거하는 능력도 있기 때문에 세포막의 선택적 투과성을 상실시키며 조건에 따라서는 세포벽도 파괴할 수 있다. 따라서 SDS의 농도별로 시간경과에 따른 세포의 활성변화를 조사한 결과(Fig. 2) 300 mg/L 이하에서는 활성저하가 적었지만 400 mg/L 이상의 경우에는 5분 후부터 활성이 급격하게 떨어질뿐 아니라 세포벽의 붕괴가 관찰되었다. 일반적으로 식물세포에서 DNA를 분리할때 사용되는 SDS 농도는 1-2%(Draper and Scott, 1988)인데 본 실험에서와 같이 원심력등의 처리에 의해서 세포밖으로 유출되어 세포외벽에 붙어 있을 것으로 생각되어지는 DNA를 분리하는 경우에는 세포를 파괴하지 않는 농도의 설정이 중요하게 된다. 캘러스를 단세포로 만들고 100 mg/L 이하의 SDS를 사용하여 DNA를 세척하여 분리하면 그 수율이 현저하게 감소되어 전기영동상에서 검출이 불가능 하였으며 200 mg/L에서 약간 검출되었고 300 mg/L와 400 mg/L에서는 DNA가 잘 관찰되었기(Fig. 3) 때문에 본 실험에서 세포벽에 물리화학적 처리를 한 뒤에 단세포로부터 DNA를 분리 할때는 SDS의 최종농도가 300 mg/L 되도록 조절했고 세포의 활성유지를 고려해서 상징액를 분리하기 위한 원심분리 시간을 3분으로 정했다.

그러나 이와 같은 조건은 식물의 조직이나 생육조건등에 따라 달라질 것으로 생각된다.

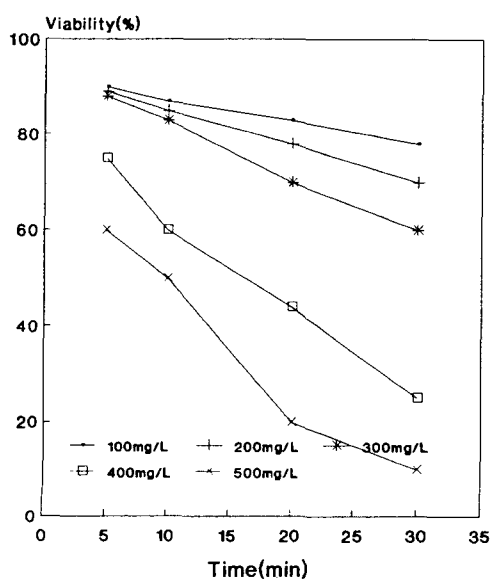

Figure 2. Cell viability change with time, influenced by the various concentrations of SDS.

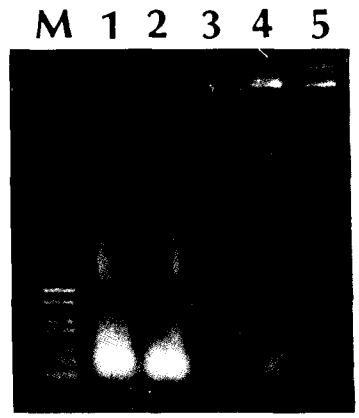

Figure 3. DNA washing efficiency and SDS concentrations. M: Marker(mix of pBR 328/Bgl 1 and Hinf 1) Lane 1: Washed with 300 mg/L SDS(fltrate from single cell preparation, at 1,000 x g) Lane 2: Same as lane 1 Lane 3: Washed with 200 mg/L SDS (7,300 x g) Lane 4: Washed with 300 mg/L SDS(7,300 x g) Lane 5: Washed with 400 mg/L SDS(7,300 x g)

세포벽의 물리화학적 성질에 관여하는 인자들의 영향

세포내의 거대분자인 DNA가 외부로 빠져 나오기 위해서는 유연성과 신축성이 좋은 원형질막 보다는 세포벽이 주된 장해요인이라고 생각되기 때문에 세포벽을 느슨하게(cell wall loosening) 해주는 효과가 있다고 알려진 몇가지 요인들의 효과를 검토하였다.

MS배지를 pH 2.0, pH 3.0, pH 4.0, pH 5.8로 각각 조절하고 여기에 세포를 침적처리하여 시간 경과에 따른 활성도 변화를 FDA 방법으로 관찰한 결과 pH 2.0 이하에서는 침적 후 1시간 이내에 대부분의 세포가 형광을 발하지 않았으며 세포의 일부가 파괴됨을 관찰할 수 있었다. 따라서 pH 3.0 이상에서 원심분리하여(7,300 x g) DNA 분리 실험을 수행했던 바, pH 3.0에서는 pH 4.0과 5.8에 비해서 DNA가 훨씬 더 많이 관찰되었는데(Fig. 4) 이는 높은 수소이온에 의한 세포벽의 연화때문일 것으로 사료된다. 그러나 pH 3.0 에서의 세포활성이 pH 4.0 보다는 좋지 않을 뿐더러 세포벽의 지나친 연화에서 기인할 수 있는 벽손상에 의한 DNA 유출의 가능성을 고려해서 원심력을 처리할 때는 pH 4.0 이상에서 실험했다. Wu 등(1988)이 시금치의 캘러스에서 분리한 세포를 pH 2.0에서 1시간 처리한 뒤 배양할 수 있었다고 보고했으나 본 실험으로부터 관찰된 결과와는 세포활성 여부의 측면에서 일치하지 않고 있다.

pH 4.0에서 KNO_3 농도와 경과시간에 따른 세포의 활성변화를 보면(Fig. 5) 2.0%에서는 1시간 후에 이미 60%이하로 활성이 감소했으며 0.1, 0.5, 1.0%의 경우 1시간 이상 경과되면 대조구(KNO_3 무처리)보다는 활성감소가 빨랐다.

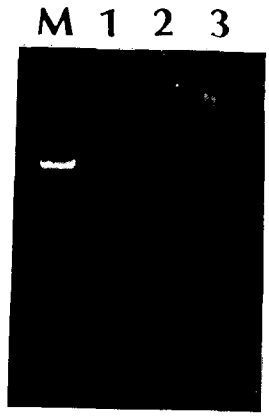

Figure 4. pH effect on DNA migration. M: Marker (λ DNA/Hind III) Lane 1: pH 5.8(7,300 x g) Lane 2: pH 4.0(7,300 x g) Lane 3: pH 3.0(7,300 x g)

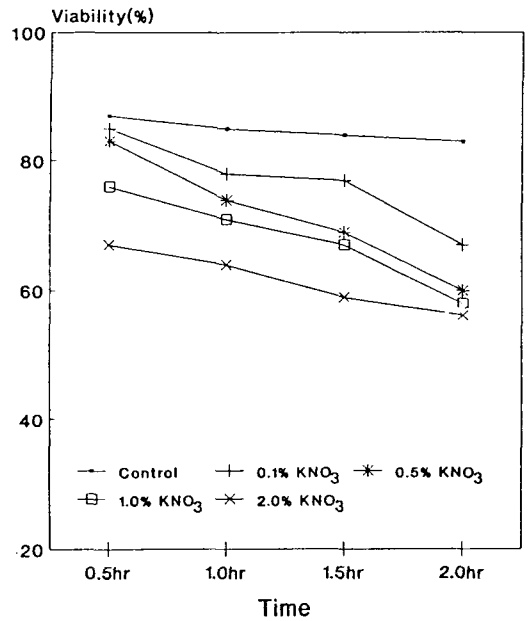

Figure 6. Time course of cell viability change with the KNO_3 treatment at pH 5.8.

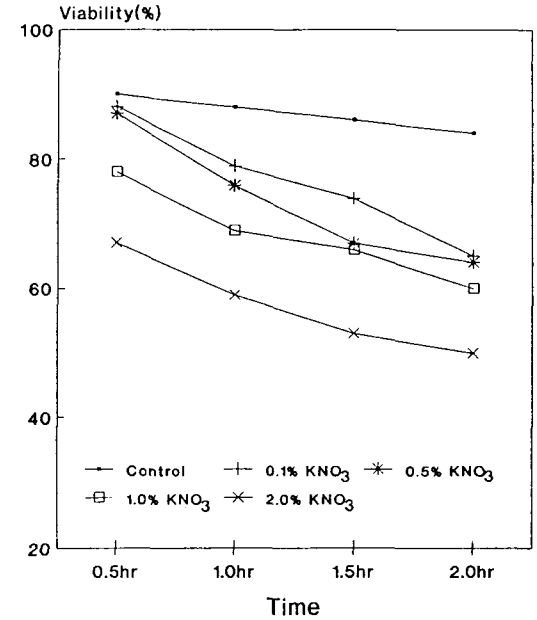

Figure 5. Time course of cell viability change with the KNO_3 treatments at pH 4.0.

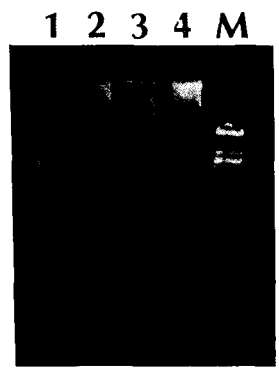

Figure 7. Effect of KNO_3 on DNA migration. Lane 1: 0.1% KNO_3(pH 5.8, 7,300 x g) Lane 2: 0.5% KNO_3(pH 5.8, 7,300 x g) Lane 3: 1.0% KNO_3(pH 5.8, 7,300 x g) Lane 4: 2.0% KNO_3(pH 5.8, 7,300 x g) M: Marker(λ DNA/Hind III)

세포의 활성도는 KNO_3 농도가 높고 시간이 경과될수록 모두 감소되었는데 한시간 이내에서는 70% 이상의 활성을 보였으며 KNO_3 2.0%를 제외하고는 pH 5.8에서도 pH 4.0와 비슷한 경향을 보였다(Fig. 6). 한편 DNA 분석결과(Fig. 7)를 보면 KNO_3 농도가 증가하면 검출된 DNA양이 증가됨을 볼 수 있었으며 특히 0.1%에서는 DNA가 아주 적은 양만 관찰되었다. K^+에 의한 세포벽 연화는 구체적 설명이 아직 되지 않고 있으나 세포벽 내에서 펙틴과 결합하여 존재하는 다량의 Ca^{++}과 치환작용을 함으로써 벽구성 물질의 변성을 초래할 것으로 생각되는데 앞으로 이에 관한 실증적 실험이 요구된다.

원심력으로 물리적인 힘을 가하여 세포내의 거대분자를 밖으로 이동시킬 수 있는지에 대해서는 거의 연구된 바 없지만 식물세포의 미토콘드리아를 원심분획하기 위해서는 10,000 x g에서 10분간 원심분리해야 하는 반면에 핵은 600 x g에서 5분간이면 충분하다는 사실(Anderson and Beardall, 1991)을 감안하면 Wu 등(1988)이 낮은 pH(2.0), 높은 농도(0.1-0.2 M)의 KNO_3를 처리한 뒤 4,000-6,000 rpm으로 원심분리 함으로써 핵 DNA를 이종의 세포로 옮겨 잡종식물을 얻었다는 보고가 납득될 수 있다고 생각하는데 원심분리

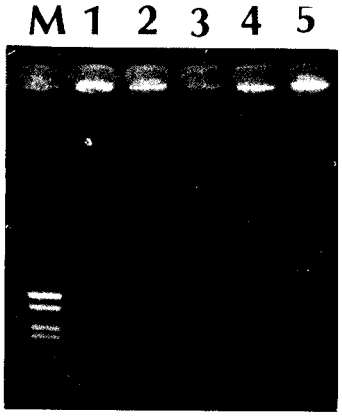

Figure 8. Individual or combined effects of K^+ and centrifugal force on DNA migration. M: Marker(λ DNA/Hind III) Lane 1: 7,300 x g(with 0.5% KNO_3, pH 4.0) Lane 2: 7,300 x g(without KNO_3, pH 5.8) Lane 3: 4,000 x g(without KNO_3, pH 5.8) Lane 4: 4,000 x g(with 0.5% KNO_3, pH 4.0) Lane 5: 1,800 x g(with 0.5% KNO_3, pH 4.0)

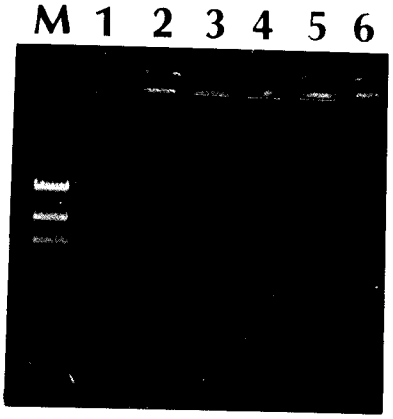

Figure 9. Effects of GA_3 and 2,4-D on DNA migration. M: Marker(λ DNA/Hind III) Lane 1: 0.5 mg/L GA_3(pH 5.8, 7,300 x g) Lane 2: 1.5 mg/L GA_3(pH 5.8, 7,300 x g) Lane 3: 3.0 mg/L GA_3(pH 5.8, 7,300 x g) Lane 4: 0.5 mg/L 2,4-D(pH 5.8, 7,300 x g) Lane 5: 1.0 mg/L 2,4-D(pH 5.8, 7,300 x g) Lane 6: 2.0 mg/L 2,4-D(pH 5.8, 7,300 x g)

조건이 xg단위로 표기되지 않았기 때문에 직접 비교가 불가능했다. 본 실험의 경우 KNO_3를 첨가하지 않은 pH 5.8 배지에 세포를 현탁시켜 4,000 x g와 7,300 x g의 원심력만을 각각 1시간 처리한 결과 4,000 x g에서는 DNA를 관찰할 수 없었던 반면에 7,300 x g에서는 DNA를 관찰할 수 있었는데, pH 4.0에서 0.5% KNO_3를 처리한 세포는 1,800 x g에서 원심분리해도 DNA가 관찰되었다(Fig. 8). 한편 pH 4.0과 0.5% KNO_3를 처리하고 7,300 x g로 원심분리했을 경우 이들의 협동 효과에 의해서 많은 DNA가 검출되었음을 볼 수 있었다(Fig. 8). 4,000 x g와 7,300 x g에서 원심분리한 후 세포의 활성도는 대조구와 비교해서 별다른 차이 없이 양호하였으나 10,000 x g 이상에서 원심분리 하였을 경우는 현미경 검정 결과 세포의 대부분이 손상 받는 것을 알 수 있었다.

이처럼 원심력에 의해서 거대분자인 DNA가 세포벽 밖으로 나올 경우 원형질연락사(plasmodesmata)를 통과할 것이라고 생각하나 이 점에 관해서는 앞으로 더 깊은 연구가 필요하다고 생각된다. Symplasm 가설(Ting, 1982), 관구조(Robards and Lucas, 1990: Robards, 1975)등에 관해서는 많이 연구되어 있으며 직경은 40-60 nm 정도이고 세포벽면 1 mm^2당 약 일백만개가 존재하는 것으로 알려져 있다(Salisbury and Ross, 1992). DNA가 세포 밖으로 이동되는 현상이 정상적인 세포벽의 조건에서는 설명되기 힘들지만 식물세포에서의 바이러스 감염이 원형질연락사 구조와 "movement protein" 상호작용에 의해서 이루어지며(Lucas, 1993), 대사저해 물질인 azide나 질소분자는 원형질연락사의 "size exclusion limit"을 한시간 이내에 800-900Da에서 5-10kDa으로 까지 증가시킨다는 보고(Robert and Lucas, 1993)를 고려하면 원심력과 같은 물리적 힘을 외부에서 가해 주면 원형질연락사의 크기가 증대될 수 있다는 가능성이 있다.

세포벽의 확장성과 관련되어 외부로부터 가해지는 화합물이나 홀몬 그리고 pH 등의 구체적 작용기작은 잘 알려져 있지 않다. Auxin을 완두 줄기와 옥수수의 자엽에 처리하면 이 조직의 자유공간(free space)의 pH가 약 30분 후에 1단위 감소하며 이 현상은 auxin에 의한 세포의 신장과 직접 관련된다고(Jacob and Ray, 1976)했으나, Coartney와 Morre(1980)는 세포막이 느슨해지는 것이 다당류가 비가역적인 분해를 일으키기 때문에 주도되는 것 같지는 않다고 했다. Auxin류로서 강력한 활성을 갖고 있는 2,4-D를 일반적 사용 농도인 1.0 mg/L 처리했을 때 DNA 유출이 좀 더 많이 보이는 것(Fig. 9)은 auxin에 의해서 세포밖으로 수소이온이 방출되고(Rayle, 1973) 이에따른 세포벽의 산성화(acidification)로 세포벽이 느슨해 진다는 사실(Coartney, 1980)과 연관이 있을 것으로 생각된다.

GA_3는 세포액의 삼투압에 직접적인 영향을 주거나 세포내의 pH를 감소시키지도 않지만 세포벽을 연화시키며 그의 확장성을 증가시키는 효과가 있다(Metraux, 1987). 상용농도인 1.5 mg/L에서 0.5 mg/L 나 3.0 mg/L 보다 더 많은 DNA가 관찰되었는데(Fig. 9) 이는 GA_3 처리가 세포벽의 연화에 작용한다는 보고와 연관시켜 보면 원심력에 의한 유전물질의 이동에 부가적인 효과를 더해 주는 것으로 생각된다.

적 요

제라니움(*Pelargonium zonale* hybrids, 'Pinto Scarlet') 엽조직으로부터 캘러스를 유기시킨 뒤에 이를 단세포로 만들고 여기에 세포막의 물리화학적 성질을 변화시킬 수있는 요인들 즉 낮은 pH, 고농도의 K^+ 그리고 GA_3 와 2,4-D를 처리한 다음 원심력을 가하여 DNA가 세포 밖으로 나올 수 있는지의 가능성을 검토했다. 음하전을 갖고 있는 DNA를 세포벽을 손상시키지 않으면서 분리해 내기 위해 사용되는 SDS의 최적농도는 300 mg/L였다. pH 4.0에서 0.5 % KNO_3를 처리했을 경우 1,800 x g의 원심력만 가해줘도 DNA가 검출되었으나 아무런 처리도 안했을 경우는 7,300 x g가 필요했다. 또 pH 5.8 보다는 pH 4.0일때 그리고 KNO_3 농도에 따라 더 많은 DNA가 이동된 것이 검출되었으며 GA_3는 1.5 mg/L, 2,4-D는 2.0 mg/L를 한시간 처리했을 때가 그 이상 또는 그 이하인 경우 보다 더 효과적 이었다. 이상의 사실을 종합해 보면 원심력에 의해서 DNA를 세포벽 밖으로 유출시킬 수 있으며 수소이온과 K^+ 그리고 GA_3나 2,4-D 처리가 DNA 이동을 부가적으로 촉진시킨다고 말할 수 있다.

사 사

본 논문은 1990년도 교육부 학술연구 조성비(유전공학)에 의해서 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

Ahuja M(1982) Isolation, culture and fusion of protoplasts:problems and prospects. Silvas Genet **31** : 66-77

Anderson JW, Beardall J(1991) Molecular Activities of Plant Cells : An introduction to plant biochemistry. Blackwell, Oxford, pp.47

Coartney JS, Morre DJ(1980) Studies on the chemical basis of auxin-induced cell wall loosening. Bot. Gaz. **141**(1) : 63-68

Cocking EC(1960) A method for the isolation of plant protoplasts and vacoules. Nature **187** : 962-963

Draper J.,Scott R(1988) The isolation of plant nucleic acid. *In* J Draper, R Scott, P Armitage, R Walden, eds, Plant Genetic Transforamtion and Gene Expression, Blackwell, Boston, pp 199-236

Jacobs M, Ray PM(1976) Rapid auxin-induced decrease in free space pH and its relationship to auxin-induced growth in maize and pea. Plant Physiol. **58** : 203-209

Lucas WJ(1993) Virus-plasmodesmata interactions probed using transgenic plants expressing the TMV 30 kDa and other viral movement proteins. XV International Botanical Congress, Yokohama, Aug 28-Sep 3, 1993, Symposium abstract 8.9.1-5

Metraux JP(1987) Gibberellins and plant cell elongation. *In* P. J. Davies, ed, Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development, Kluwer, Boston, pp 296-317

Palta JP, Levitt J, Stadelmann EJ(1978) Plant viability assay. Cryobiology **15** : 249-255

Rayle DL(1973) Auxin-induced hydrogen-ion secretion in *Avena* coleoptiles and its implications. Planta **114** : 63-73

Robert EC, Lucas WJ(1993) ATP regulation of the plasmodesmal size exclusion limit in wheat roots. Plant Physiology Supplement **110**

Robard AW(1975) Plasmodesmata. Ann Rev Plant Physiol. **26** : 13-29

Robards AW, Lucas WJ(1990) Plasmodesmata. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, **41** : 369-419

Salisbury FB, Ross CW(1992) Plant Physiology. Wadsworth, Belmont, pp.141

Ting IP(1982) Plant Physiology. Addison Wesley, Philippines, pp.132-134

Wu B, Yaya C, Yiping C(1988) Forcing intercellular chromatin migration between the embriogeniccells of *N. tabacum* and *S.oleraceae* by artificial motive force and the subsequent-regeneration of hybrid plants. Scientia Sinica(series B) **31** : 187-194

(1993년 12월 22일 접수)