

형질전환된 고추(*Capsicum annuum* L.) 식물체의 Mouse Adenosine Deaminase 유전자 발현

양덕춘* · 이계연¹ · 유영숙¹ · 최경화² · 임학태¹

한국인삼연초연구원 유전생리부, ¹강원대학교 농업생명과학대학, 식물응용과학부,
²한국과학기술연구원 생명공학연구소 생물자원그룹

Plant Regeneration and Expression of Mouse Adenosine Deaminase Gene in Transgenic Hot Pepper (*Capsicum annuum* L.) Plants

YANG, Deok C.* · LEE, Kye Y.¹ · YOO, Young S.¹ · CHOI, Kyung H.² · LIM, Hak T.¹

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taedok Science Town, Taejeon, 305-345; ¹Division of Applied Plant Sciences, College of Agriculture and Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701; and ²Division of Plant and Animal Cell Technology, KRIBB, KIST, Taejeon, 305-600. *Corresponding author.

*The in vitro regeneration and genetic transformation systems in hot pepper (Capsicum annuum L.) have not been routinely available, which has been a major limiting factor in the application of new genetic manipulations. An efficient procedure to regenerate whole pepper plants and to generate transgenic plants expressing a foreign gene was established. A relatively high frequency of plant regeneration was observed when hypocotyl and cotyledon explants were cultured on MS medium supplemented with NAA 0.1 mg/L plus zeatin 2.0 mg/L or IBA 10.0 mg/L plus BAP 1.0 mg/L. Addition of AgNO₃ 5 μM to these media improved the regeneration frequency up to 8%. For plant transformation, hypocotyl and cotyledon explants of hot pepper were precultured on shoot induction media without kanamycin added for 2 days, and then cocultured with *Agrobacterium tumefaciens* pDY183 for 2 days. Putative transformants were obtained from selection media containing 100 mg/L kanamycin sulfate and 500 mg/L carbenicillin. Putatively selected transformants were confirmed by amplification of selectable marker genes (ADA and NPT II) by polymerase chain reaction. Successful transcripts of ADA gene were detected by Northern blot analysis. Enzyme activity of ADA was also examined by spectrophotometric analysis, and expression of ADA gene in hot pepper suggests the potential application of ADA gene as a selectable marker in plants.*

Key words: ADA activity, *Capsicum annuum* L., PCR, transformation

최근 유전공학분야의 급속한 발전으로 여러 가지 유전자 운반체와 표지유전자가 개발되어 외부의 유용유전자를 쉽게 식물체내로 도입하여 새로운 식물체를 육성할 수 있게 되었다(An, 1987; Hoekema et al., 1986; Horsch et al., 1985) 그러나 기술적인 면에서 외부유전자가 도입되어 형질전환된 세포와 형질전환되지 않은 세포를 조기에 구분하는 방법이 식물형질전환에 매우 중요한 관건으로 대두되고 있다. 이에 우선적으로 작용하는 항생제 내성유전자 등과 제초제 저항성유전자 등을 선발 표지유전자로 사용하는 방법이 개발되었다. 현재 주로 이용되고 있는 항생제 내성 표지유전자는 식물에 따라서 내성을 지니고 있어 표지유전자로서의

사용에 제한이 되고 있다(Vasil et al., 1991).

Adenosine deaminase (ADA) 효소는 purine 대사에 관여한 효소로서 동물의 어느 부위에나 존재하지만 식물세포에는 전혀 존재하지 않으며, 식물세포의 조직배양시 adenosine 대신 독성 adenosine 유도체를 배지에 일정량 첨가하면 ADA 효소가 없거나 부족할 경우에는 조직이 모두 죽게 된다(Fox et al., 1978). 이런 원리를 이용하여 Yang (1995a) 등이 ADA 유전자를 식물형질전환용 표지유전자로서의 유용성이 검토되고 있으며, 이미 연초(Yang et al., 1995b)와 감자(Choi et al., 1996)에서는 그 가능성을 확인한 바 있다. 고추는 우리나라에서 중요한 원예작물의 하나이며, 새로운 육

종의 필요성이 절실히 요구되고 있다. 그러나 고추는 그 품종과 조직절편체의 상태에 따라 재분화시 배지 및 성장조절물질의 조건이 현저하게 다르기 때문에 형질전환빈도가 낮으며(Lee et al., 1993), 타작물에 비해 비교적 형질전환이 어려워 외래 유전자의 도입을 통한 신품종개발에 장애가 되고 있다(Arroyo and Revilla MA, 1991; Phillips and Hubstenberger, 1985). 따라서 본 연구는 보다 효과적인 고추의 재분화 조건을 규명함과 동시에 *Agrobacterium*를 이용한 형질전환 체계를 구축하고자 형질전환체의 재분화와 동물 유전자인 ADA 유전자의 발현여부를 조사하였다.

재료 및 방법

공시재료

중앙종묘로부터 분양받은 가락김장 2호 고추(*Capsicum annum* L. cv Kalag-KimJang 2) 종자를 사용하였다. 종자 소독은 95% 에탄올에 15초간, 2.5% sodium hypochloride 와 tween-20을 몇 방울 첨가한 용액에서 15분간 소독한 후 멸균 증류수로 3회 세척하였다. 소독한 종자는 멸균수가 담긴 병에 넣어 30-32°C에서 5-6일간 최아시킨 후 1/2 MS, pH 5.7로 조성된 종자발아 배지에 치상하여 25±1°C, 16/8 h의 광조건에서 배양하였다.

고추의 재분화 및 형질전환

엽원기를 포함하지 않는 자엽 절편과 7-10 mm 크기의 하배측에 상처를 주어 MS 무기염, B5 vitamin, 3% sucrose, pH 5.7, agar 0.8%의 배지에서 배양하여 재분화율을 조사하였다. 식물 성장조절물질은 zeatin 2.0 mg/L와, NAA 0.05 mg/L, zeatin 2.0 mg/L와, NAA 0.1 mg/L, zeatin 3.0 mg/L와, IAA 0.02 mg/L, BAP 1.0 mg/L와, IBA 10.0 mg/L, BAP 0.2 mg/L와 IAA 0.2 mg/L의 5가지 혼용처리를 하였으며, 이들 중 가장 좋은 재분화율을 가진 조합을 이용하여 AgNO₃의 농도별(0, 1, 2.5, 5, 10, 20 μM)로 추가 첨가하여 재분화율을 조사하였다.

고추의 재분화 실험에서 가장 좋은 효과를 나타낸 조합을 이용하여 형질전환실험을 하였다. ADA와 NPT I 유전자가 도입된 *Agrobacterium tumefaciens* pDY183(Yang et al., 1995a)를 이용하여 AgNO₃가 포함되지 않은 배지에서 2일간 공동배양하였다. 균주는 kanamycin 25 mg/L를 함유한 2YT배지에서 2일간 키운 후, 반으로 희석하여 고추 절편체와 5분간 접촉한 후 paper blot-dry를 하였다. 재분화 배지에 kanamycin sulfate 100 mg/L와 carbenicillin 500 mg/L을 첨가하여 *Agrobacterium* 공동배양한 고추절편체를 치상하여 신초를 유도하였다. 배양 약 3주후 발생한 신초를 식물생장조

절물질이 첨가되지 않고, kanamycin sulfate 100 mg/L과 carbenicillin 500 mg/L이 첨가되어 있는 배지에서 신초를 신장시켰다. 발근을 시키기 위하여 상기 신초신장배지에 NAA 0.1 mg/L 를 추가로 첨가하여 배양하였다.

형질전환체의 유전적 특성검정

고추의 잎조직으로부터 외부에서 도입된 ADA와 NPT II 유전자의 존재 여부를 확인하기 위하여 PCR (Perkin Elmer Cetus)을 사용하였다. PCR (polymerase chain reaction)을 위한 빠르고 간편한 DNA 추출방법은 Edwards (1991) 등의 방법에 준하여 수행하였으며, primer 제작은 The whitehead Institute for Biomedical Research (Stephen E, Nine Cambridge Center, Cambridge, Massachusetts, USA) 에서 제작한 primer version 0.5를 사용하였다. Primer sequence는 5'-AACCCAAAGTAGAGTTACACGTC-3'와 5'-TTCCA GAAGTTCCTTCTTCTCTTC-3'이며 PCR 조건은 한국생공의 Pre-Mix[™]을 사용하여 96°C에서 2분간 pre-heating 한 후, 94°C에서 30초, 60°C에서 30초, 72°C에서 2 분으로 하여 36 cycle을 반응시켰으며, 이어서 72°C에서 15 분간 heating 하고 4°C에서 저장하였다. 형질전환된 고추로부터 ADA 유전자의 전사여부를 확인하기 위해서 우선 RNA의 추출은 Ultraspec[™]-II RNA isolation system (Biotecx Laboratories, Inc.)를 사용하였으며, Northern blot은 추출한 RNA 30 μg 1% GTE agarose gel에서 4 V/cm로 전기영동한 후 nylon membrane (Turboblotter, Schleicher & Schuell)에 blot시키고 DIG probe를 이용하여 수행하였다. ADA 효소활성도의 측정은 adenosine를 substrate로 하여 생성된 암모니아의 함량을 조사한 Yang (1996) 등의 방법을 따랐다. ADA 활성도의 단위는 시간당 형질전환체의 잎의 mg 단백질함량에서 생성된 암모니아함량을 635nm에서 측정하여 unit로 환산하였으며 단백질의 정량은 Bio-rad protein assay (Bio-rad cat. 500-0006)를 이용하였다.

결과 및 고찰

고추의 재분화 및 형질전환

고추의 재분화는 zeatin 2.0 mg/L와 NAA 0.1 mg/L의 처리구(I)에서 51.0%, BAP 1.0 mg/L와 IBA 10.0 mg/L의 처리구(II)에서 45.1%로 높은 재분화율을 보였다(Table 1). 하배측이 자엽에 비하여 신초형성 기간이 짧지만 그 절편체의 재분화율에서는 차이가 없었다. Table 1의 재분화율은 하배측과 자엽의 혼합율이다. 이 두 조건에 AgNO₃ 농도별 처리구의 효과는 BAP 1.0 mg/L와 IBA 10.0 mg/L에 AgNO₃ 5 μM 처리구에서 53.0%로 가장 높게 나타났다(Table 2).

Table 1. Regeneration frequency of hot pepper explants as influenced by combinations of plant growth regulators.

Growth regulators (mg/L)			Regeneration frequency (%)
NAA	0.05	Zeatin 2.0	40.0
NAA	0.1	Zeatin 2.0	51.0
IAA	0.02	Zeatin 3.0	42.0
IBA	10.0	BAP 1.0	45.1
IAA	0.2	BAP 0.2	10.0

Table 2. AgNO₃ effect on regeneration frequency of hot pepper explants.

Concentration of AgNO ₃ (μM)	Regeneration frequency (%) ^a	
	I	II
0	51.0	45.1
1	30.0	31.0
25	37.0	37.0
5	41.0	53.0
10	48.0	49.0
20	0.0	30.0

^a I : Zeatin 2 mg/L and NAA 0.1 mg/L; II : BAP 1.0 mg/L and IBA 10.0 mg/L.

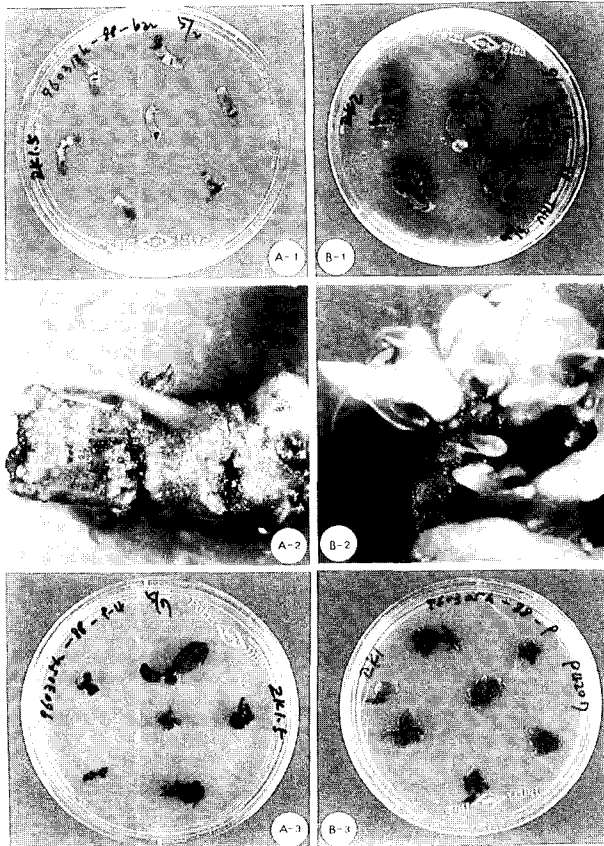


Figure 1. Regeneration scheme in hot pepper plants transformed with *A. tumefaciens* pDY183. A: Hpcotyl, B: Cotyledon: A-1, B-1: Shoot emergency on selection medium. A-2,B-2: Regenerated shoots or buds under the microscope. A-3, B-3: Shoot elongation on the selection medium.

두 배지에 AgNO₃ 5 μM을 첨가하였을 때 I의 배지에서 보다 건강한 식물체를, II의 배지에서는 재분화율이 증가함을 보였다. 따라서 II의 배지 조건은 가격이 비싼 zeatin의 효과를 대체할 수 있었다.

따라서 형질전환을 시키기 위하여 고추의 자엽과 하배축을 zeatin 2 mg/L와 NAA 0.1 mg/L, AgNO₃ 5 μM와 BAP 1.0 mg/L와 IBA 10.0 mg/L에 AgNO₃ 5 μM이 첨가된 배지에서 2일간 전처리하고 전처리 배지조성중 AgNO₃가 빠진 배지에서 2일간 공동배양을 한 후, 100 mg/L kanamycin

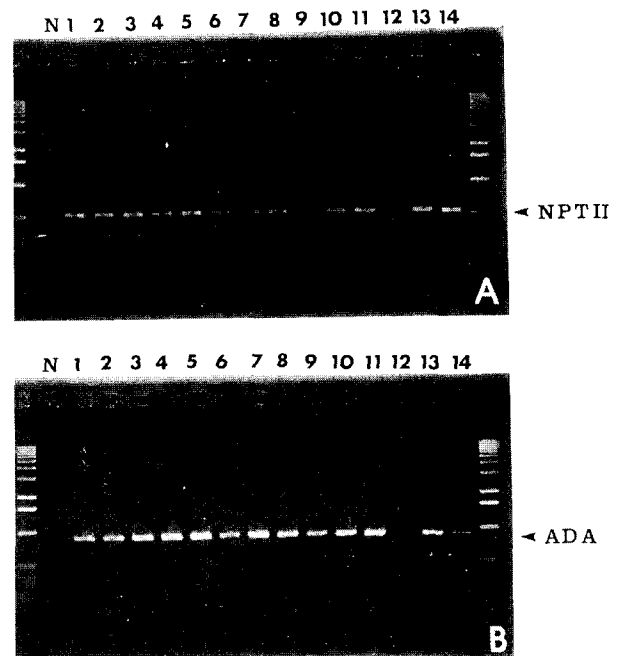


Figure 2. Amplification of (A) NPT II gene and (B) ADA gene in putative transgenic hot pepper plants by PCR (N: normal plant, 1-14: putative transgenic plants).

와 500 mg/L carbenicillin가 함유된 선발배지에서 3주 이상 배양하여 잠정적 형질전환체를 얻었다(Figure 1).

형질전환체의 특성검정

Kanamycin이 100 mg/L 첨가된 배지에서 일차적으로 선발된 고추의 잎조직으로부터 외부에서 도입한 ADA 유전자의 존재여부를 확인하기 위해서 PCR을 수행하였다. 형질전환된 고추와 형질전환되지 않은 정상 고추에서 DNA를 추출하여 PCR로 증폭된 ADA와 NPT II 유전자의 존재여부를 확인하였다. 그 결과, 형질전환된 식물체에서는 12번 lane을 제외한 모든 lane에서 ADA 유전자(950bp)와 NPT II 유전자(500bp)를 확인할 수 있었으며, 정상식물체에서는

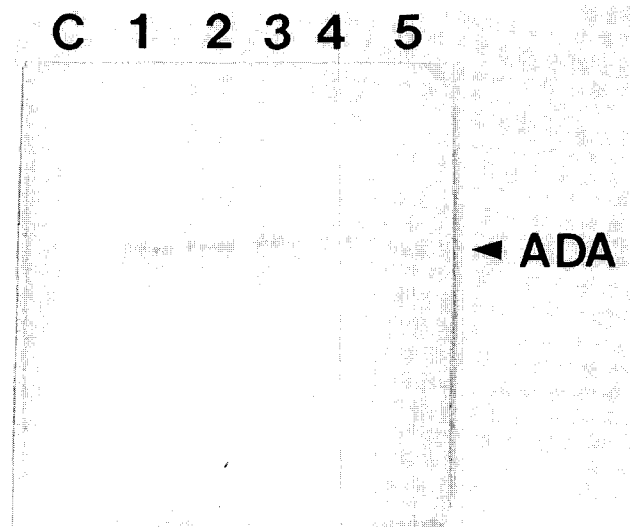


Figure 3. Northern blot analysis of the ADA gene transcripts in transformed plant lines. Total RNA (30 µg) was isolated from cultured control (lane C) and transgenic plants (lanes 1-5). The total RNA were run on a 1% agarose gel containing formaldehyde and transferred to Nylon membrane. Transformant lanes probed with DIG labelled ADA gene. The arrows point to the expected ADA transcripts.

ADA 유전자와 NPT II 유전자가 존재하지 않았다(Figure 2). 그러므로 lane 1-11, 13과 14번은 모두 ADA 유전자에 의해 형질전환되었음을 알 수 있었다.

PCR에 의하여 고추에서 ADA gene의 삽입이 확인된 13 개체중에서 5개체를 선발하여 다시 전사여부를 확인하기 위해서 RNA를 추출하여 Northern blot를 한 결과 5개체 공히 ADA 유전자의 전사체를 확인할 수 있었다(Figure 3).

ADA 효소의 활성 측정

PCR 및 Northern blot에 의하여 ADA 유전자가 형질전환된 고추에 도입 및 전사됨을 확인할 수 있었지만(Figures 2, 3), 실제로 ADA 유전자가 고추에서 정상적으로 발현되는지 여부를 조사하기 위해서 Yang (1996) 등의 방법에 의하여 효소를 추출한 후, O.D (A= 595) 값을 측정한 결과 형질전환체들 사이에서 다양한 ADA의 활성이 나타났다(Figure 4). 그 중 11번이 다른 개체에 비하여 평균 3배 이상의 활성을 나타냈다. 그러므로 ADA가 연초의 세포(Yang et al., 1995)에서와 같이 고추의 세포에서도 정상적인 전사를 거쳐 다량의 단백질로 합성됨을 알 수 있었다. 그러나 정상식물체에서는 ADA의 활성이 나타나지 않았으므로 Fox와 Kelley (1978)와 그리고 Yang 등(1995)의 결과와 마찬가지로 자연상태의 고추에는 ADA효소가 존재하지 않음을 알 수 있었다. 따라서 ADA 동물유전자를 고추의 형질전환시 표시유전자로서 활용가능성을 확인할 수 있었다.

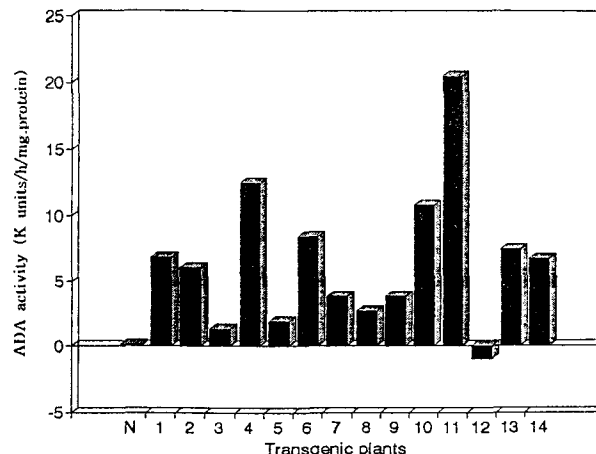


Figure 4. ADA activity of transgenic plants (*Capsicum annum* L. cv Kalag-Kimjang 2) transformed with mouse adenosine deaminase gene. (N: normal plant, 1-14: Putative transformants). Enzyme assay and definition of unit activity are described in material and methods.

적 요

고추의 형질전환율을 높이기 위하여 우선적으로 효율적인 재분화조건을 구명하였다. 고추의 하배측과 자엽 모두 2 mg/L zeatin과 0.1 mg/L NAA (I)에서 51%, 1.0 mg/L BAP와 10.0 mg/L IBA (II)는 45.1%의 재분화율을 보였으며, 두 배지에 5 µM AgNO₃을 첨가하였을 때 I의 배지에서 보다 건강한 식물체를, II의 배지에서는 재분화율이 약 8%로 증가함을 보였다. 따라서 II의 배지 조건은 가격이 비싼 zeatin의 효과를 대치할 수 있었다. 이렇게 얻어진 효율적인 재분화배지에 고추의 하배측과 자엽을 ADA와 NPT I 유전자를 함유한 *Agrobacterium tumefaciens* pDY183을 이용하여 형질전환을 유도하여, kanamycin 100 mg/L에서 선발하여 성공적으로 형질전환체를 얻었다. 식물체내로의 ADA와 NPT II 유전자의 도입은 PCR을 이용하여 확인하였으며, Northern blot에 의하여 ADA 유전자의 전사여부를 확인하였다. ADA 효소의 활성도는 spectrophotometer를 이용하여 측정하여 본 결과 고추세포내에서 정상적으로 발현하였으므로 동물유전자인 ADA가 식물체 형질전환시 표시유전자로서의 사용가능성이 확인되었다.

인용문헌

An G (1987) Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. *Methods in Enzymology* 153: 292-305
 Arroyo R, Revilla MA (1991) In vitro plant regeneration from cotyledone and hypocotyl segment in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Report* 10: 414-416

- Choi KH, Jeon JH, Kim HS, Joung YH, Yang DC, Joung H (1996) An effective method for the selection of transgenic potato using mouse adenosine deaminase gene. *Korean J Plant Tissue Culture* 23: 97-101
- Edwards K, Johnston C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* 19: 1349-1352
- Fox IH, Kelley WN (1978) The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Ann Rev Biochem* 47: 655-686
- Hoekema A, Van Haaren MJJ, Fellingner AJ, Hooykaas PJJ, Schilperoort RA (1986) Non-oncogenic plant vectors for use in the *Agrobacterium* binary vector system. *Plant Molecular Biology* 5: 85-89
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Wallroth M, Eichholt D, Rogers SG, Fraley RT (1985) A simple and general method from transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231
- Kellems RE, Yeung CY, Ingolia DE (1985) Adenosin deaminase deficiency and severe combined immunodeficiencies. *Trend genet* 1: 278-283
- Lee SJ, Kim BD, Pack KH (1993) In vitro plant regeneration *Agrobacterium*-mediated transformation form cotyledone explants of hot pepper. *Korean J Plant Tissue Culture* 20: 289-294
- Phillips GC, Hubstenberger JF (1985) Organogenesis in pepper tissue cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult* 4: 261-269
- Vasil V, Brown SM, Re D, Fromm ME, Vasil IK (1991) Stably transformed callus lines from micro projectile bombardment of cell suspension cultures of wheat. *Bio/Technology* 9: 743-747
- Yang DC, Han SS, Yoon ES (1995a) Adenosin deaminase gene: possible selectable marker for tobacco transformation. *Korean J Plant Tissue Culture* 22: 235-240
- Yang DC, Park JC, Choi KT, Lee JM (1995b) Expression of mouse adenosine deaminase gene in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Korean J Plant Tissue Culture* 22: 195-200
- Yang DC, Bang KS, Choi KH (1996) Extraction and activity assay of mouse adenosine deaminase from transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Korean J Plant Tissue Culture* 23: 55-60

(1996년 6월 6일 접수)