

형질전환 상추에서 배추 Glutathione Reductase 유전자의 발현

정재동* · 김창길¹ · 조진기²

경북대학교 원예학과, ¹경북농촌진흥원, ²경북대학교 동물자원학과

Expression of Chinese Cabbage Glutathione Reductase Gene in Lettuce (*Lactuca sativa* L.)

CHUNG, Jae Dong* · KIM, Chang Kil¹ · JO, Jin Ki²

Department of Horticulture, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea:
¹Kyungbuk Provincial RDA, Taegu, 302-301, Korea: and ²Department of Animal
Science, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea. *Corresponding author

Cotyledon explants of lettuce were cocultured with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404::pBKS-GR1 harboring glutathione reductase (GR) gene in MS medium supplemented with 0.1 mg/L NAA and 1.0 mg/L 2ip for 48 hr. These explants were transferred to MS medium supplemented with 0.1 mg/L NAA and 1.0 mg/L 2ip, 50 mg/L kanamycin, and 500 mg/L carbenicillin. After 4 weeks of subculture, kanamycin-resistant shoots were obtained on selection medium. Leaves of putative transformants survived on selection medium containing 100 mg/L kanamycin. Incorporation of the GR gene into lettuce was confirmed by PCR analysis of genomic DNA. Southern blot analysis showed that ECL-labeled GR gene was hybridized to the expected amplified genomic DNA fragment of about 1.8 kb from transgenic lettuce. The presence of mRNA in transgenic lettuce was confirmed by RT-PCR with total RNA of transgenic lettuce. In progeny test of transformants, R₁ seeds were resistant to kanamycin (200 mg/L) on MS medium.

Key words; *Agrobacterium tumefaciens*, ozone, transformant, progeny

산업화 과정에서 발생하는 각종 오염물질은 식물의 생활 환경을 크게 변화시켜 농작물에 커다란 피해를 주게되며, 직·간접적으로 인간에게도 피해를 나타내는 것으로 알려져 있다. 특히 대기오염은 오염물질들이 대부분 가스상태로 대기중에 존재하여 식물의 기공을 통하여 흡수되어 식물체 내에 장애를 주는 것으로 알려져 있으며(Allen, 1995; Runeckless and Krupa, 1994) 이들 오염물질에 대한 저항성 식물체를 개발하기 위한 유전공학적 방법에 대한 연구(Bowler et al., 1991; Pitcher and Zilinskcas, 1996)가 최근 활발하게 이루어지고 있다.

오존에 대한 피해보고는 이미 미국에서 콩 재배기간 동안에 50 nl/L의 오존농도가 하루평균 7시간 정도 지속되면 콩의 수량은 10% 혹은 그 이상 감소된다고 하였다(Heck et al., 1991). 우리 나라에서도 94년 7월에 35°C 이상의 고온 건조한 날이 연일 계속되면서 벼의 하위엽이 심한 갈변반점을 나타내는 증상이 경북 동해안 일원과 경주지역에서 발견되었는데 그 원인이 오존에 의한 피해로 규명된 바 있다.

이러한 오존으로 인한 농작물의 피해는 현 단계에서 적절한 대책이 강구되지 않으면 앞으로 지역에 따라 한층 더 심각한 피해를 유발할 가능성이 높을 것으로 지적되고 있다.

식물육종의 궁극적 목표는 기존의 식물육종방법을 개량하여 보다 실용가치가 높은 신품종을 육성하고 증식, 보급하는데 있다. 이러한 육종목표를 달성하기 위해서는 지금까지 유용한 변이체를 선발, 고정하거나 인위적인 교잡을 통하여 이루어져 왔다고 할 수 있으며 그 성과 또한 매우 컸음을 부인할 수 없다. 그러나, 관행육종방법으로는 동일 종 혹은 근연 종간의 유전자 전이가 가능하지만 최근에 널리 쓰이고 있는 형질전환법은 어떤 종류의 유용유전자도 성적 불화합성을 극복하여 식물체에 도입할 수 있을 뿐만 아니라 육종년한을 단축시킬 수 있는 장점이 있다.

본 연구는 세계적으로 가장 중요한 위치를 차지하고 있는 샐러드용 채소로서 최근 우리나라에서도 그 수요가 증가 추세에 있는 상추에 오존내성을 부여하기 위하여 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용하여 배추에서 분리된 오

존 유도성 유전자(glutathion reductase, GR) (Lee et al, 1998)를 도입하고 재분화시킨 후 유전자 도입을 확인하여 최종적으로 GR 형질전환 상주를 개발하였다.

재료 및 방법

형질전환 및 식물체 재분화

상추(*Lactuca sativa* L.)의 종자를 1% NaOCl (active chlorine, 10~12%) 용액에 15분간 살균하고 멸균수로 수세한 후 sucrose 3%와 한천 0.8%를 함유한 MS배지에 파종하여 25±2°C, 1일 16시간 명배양하였다. 무균배양 4일후 자엽을 생장점이 포함되지 않도록 조심스럽게 잘라 공동배양 재료로 사용하였다. 균주는 binary vector 시스템으로 클로닝된 pBKS-GR1과 helper plasmid로 pAL4404를 가진 *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA 4404를 사용하였다. pBKS-GR1의 구조는 배추에서 분리된 1,782 bp의 GR 유전자의 cDNA (Lee et al., 1998)가 35S promoter와 nopaline synthase의 terminator (Tnos)사이에 삽입되어 있다. 형질전환식물체를 선별할 수 있는 표지유전자로는 neomycin phosphotransferase gene II (NPT-II)를 Ti-plasmid의 T-DNA border sequence사이에 가지는 구조이다(Figure 1). pBKS-GR1 유전자가 들어있는 *A. tumefaciens*를 kanamycin 25 µg/mL가 첨가된 YEP (1% peptone, 1% yeast extract, 0.5% NaCl) 액체배지에서 28°C, 암상태로 48시간 동안 분당 160 rpm으로 진탕배양한 다음 spectrophotometer 600 nm에서 optimal density가 0.6일때 자엽과 2일간 공동배양하여 형질전환시켰다. *Agrobacterium*과 공동배양후 자엽으로부터 균을 제거하기 위하여 carbenicillin 500 mg/L와 kanamycin 50 mg/L가 첨가된 재분화배지에 옮긴 후 25°C, 16시간 일광하에서 배양하였으며 2주마다 새로운 배지로 옮겨 주었다. 재분화된 shoot는 250 mg/L의 carbenicillin과 25 mg/L의 kanamycin이 첨가된 MS 배지에 이식하여 뿌리를 유도하고 뿌리가 형성된 식물체는 포트에 이식하여 온실에서 순화시킨 다음 유전분석에 사용하였다.

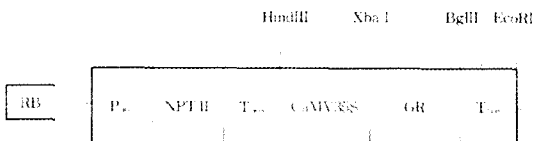


Figure 1. Partial structure of the binary vector pBKS-GR1. Abbreviations used are : Pnos, nopaline synthase promoter; NPT II, neomycin phosphotransferase gene II; Tnos, polyadenylation signal of the nopaline synthase gene; CaMV35S, 35S promoter of cauliflower mosaic virus; GR, coding region of the glutathione reductase cDNA of chinese cabbage; RB, T-DNA right border; LB, T-DNA left border.

재분화된 식물체의 kanamycin 내성검정

재분화된 식물체의 kanamycin내성을 조사하기 위하여 온실에서 완전히 순화시킨 형질전환된 식물체의 잎을 0.5% NaOCl용액에 15분간 살균하고 멸균수로 3회 이상 수세한 다음 5×5 mm 크기로 잘라 kanamycin 100 mg/L가 첨가된 재분화 배지에 배양하고 3주후에 생존율을 조사하였다.

PCR에 의한 유전분석

GR 유전자가 대상식물체의 염색체내에 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 PCR분석을 수행하였다. Kanamycin 내성검정에 의해 형질전환이 확인된 식물체의 잎으로부터 DNA를 분리(Murray and Thompson, 1980)하여 TE용액에 1 µg/µL 농도로 하여 template DNA로 이용하였다. PCR 반응용액은 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 15 mM MgCl₂, 200 µM dNTP (GIVBCO BRL), 100 ng primer, 50 ng template DNA 및 25 unit Tag 와 DNA polymerase (Promega)를 넣고 전체 반응용액은 50 µL가 되게 하였다. HYBAID Thermal Cycler를 이용한 첫 DNA 변성은 95°C에서 5분간, 그후의 DNA변성은 95°C에서 1분간, annealing은 58°C에서 2분간 그리고 DNA 합성은 72°C에서 2분으로 35 cycle을 실행했으며, 최종 DNA합성은 72°C에서 5분으로 하였다. 합성된 DNA는 1.2% agarose gel로 전기영동하고 EtBr에 염색하여 UV lamp에서 band를 확인하였다.

Southern blot 분석

PCR 방법으로 상추의 염색체 내에 삽입되어 있는 것으로 확인된 GR 유전자가 형질전환시 사용된 *Agrobacterium* 내의 binary vector 시스템으로 cloning된 유전자 인지를 확인하기 위하여, 도입된 GR 유전자를 PCR방법으로 증폭시킨 후, 1.8 kb의 GR 절편을 ECL-labelling과 Detection Kit (Amersham)을 이용하여 labelling하여 probe로 사용하였다. PCR방법에 의해 증폭된 DNA를 1X TAE buffer를 사용하여 1.2% agarose gel에서 전기영동하고 0.5 µg/mL ethidium bromide 용액에 염색한 후, capillary transfer 방법(Southern, 1975)으로 nylon membrane에 전이 시켰다. DNA가 전이된 membrane을 prehybridization 용액 (ECL golden buffer, 0.5 M NaCl, 5% blocking reagent)에서 3시간동안 전처리한 후 ECL labelling kit로 표시된 탐침을 첨가하여 42°C에서 8시간 반응시켰다. Hybridization이 완료된 membrane은 42°C에서 washing buffer (0.4% SDS, 20X SSC, 3.6% urea)용액으로 20분간 2번 세척하였다. 그리고 상온에서 2X SSC 용액으로 5분간 2번 세척하였다. 세척된 membrane은 상온에서 X-ray film에 노출시켰다.

RT-PCR조사

형질전환된 상추조직에서 total RNA를 Vries 등(1988)의 방법을 이용하여 분리하였으며, total RNA 500 ng을 template로 하여 reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)을 수행하였다. Molony murine leukemia virus (Mo-MLV) RNA dependent DNA polymerase를 사용하여 RT-PCR의 cDNA를 합성하였다. 합성조건은 10 mM DDT, 0.2 M dNTP, 2 nM random hexamer, 1/100 diluted RNA inhibitor, 4 unit/ μ L reverse transcriptase를 사용하여 위와 같은 조건에서 PCR을 수행하였다.

종자(R₁)의 항생제 내성검정

형질전환 후 재분화된 R₀ 세대 식물체로부터 자가수분에 의해 채종된 종자를 kanamycin이 200 mg/L 포함된 MS 고체배지에 파종한 다음 10, 20, 30일 후에 발아율 및 생존율을 각각 조사하여 R₁ 세대 종자에서의 유전자 발현 여부를 확인하였다.

결과 및 고찰

GR cDNA가 도입된 식물발현 벡터인 pBKS-GR1을 *A. tumefaciens* LBA 4404를 이용하여 상추의 자엽조직에 형질전환하여 식물체를 재분화 시켰다(Figure 2A). 이들 식물체를 온실에서 순화시킨 다음 잎을 절취하여 kanamycin 내성 정도를 조사하였다. 배양 2주후 형질전환된 꽃양배추의 잎은 kanamycin이 첨가된 배지에서도 짙은 녹색을 띄거나 캘러스가 형성된 반면 형질전환되지 않은 대조구의 잎은 고사하였다(Figure 2B). 일반적으로 kanamycin을 선발 표시인자로 이용하여 형질전환된 식물체가 kanamycin에 내성을 갖는다는 것은 감자(De Block, 1988), 꽃양배추(Kim et al., 1998) 등에서 잘 알려져 있으며 복잡한 분자수준의 유전분석 이전에 일차적으로 형질전환여부를 판단하는 수단으로 유용하게 활용되어지고 있을 것으로 판단된다.

재분화된 식물체의 kanamycin 내성검정 결과 형질전환이 된 것으로 추정되는 상추에서 오존 유도성 유전자 GR이



Figure 2. Putative transgenic plant on pot (A) and leaf disc assay of putative transgenic plant (B, left) and normal plant (B, right) on shoot regeneration media containing 100 mg/L kanamycin.

식물체 게놈상에 정확히 삽입되어 있는지를 확인하기 위하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 대조구에서는 어떤 band도 확인할 수 없었지만 형질전환된 식물체에서는 약 1.8 kb의 GR band들이 존재함을 확인할 수 있었다(Figure 3A).

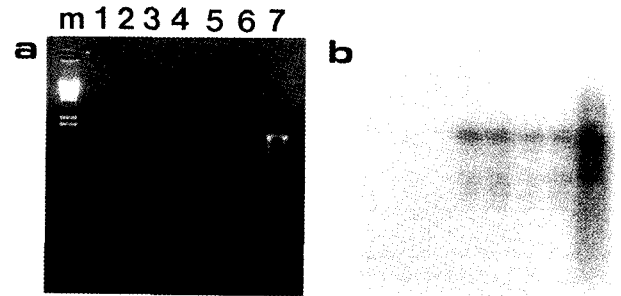


Figure 3. Agarose gel electrophoresis (a) and Southern blot analysis (b) of PCR amplification products. m, marker: lane 1, sterilized H₂O: lane 2, amplified product from genomic DNA of nontransformed plant: lanes 3, 4, 5, and 6, amplified products from genomic DNA of transgenic plants transformed with pBKS-GR1: lanes 7, amplified product from plasmid pBKS-GR1. The arrow indicates approximately 1.8 kb of amplified GR product.

Lane 7은 토마토 cDNA library로부터 분리한 GR 유전자를 증폭한 것이며, lane 3, 4, 5, 6은 형질전환된 상추로부터 증폭된 PI-Ⅱ 유전자이다. 이들 모두에서 약 1.8 kb의 절편을 볼 수 있었으나, 형질전환되지 않은 상추(lane 2)에서는 이 절편이 보이지 않아 GR 유전자가 상추 게놈상에 삽입되어 있음을 알 수 있었다. 또한 PCR로 증폭한 절편이 배추에서 분리된 GR 유전자인지를 검정하기 위하여 Southern blotting을 수행한 결과 형질전환된 상추(lane 3, 4, 5, 6)와 GR 유전자를 증폭한 것(lane 7)에서 모두 band가 나타나 증폭된 DNA가 GR 유전자임을 확인하였다(Figure 3B). 형질전환 식물체에 존재하는 GR cDNA의 세포내 발현 유무를 조사하기 위하여 DNA primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하여 1.8 kb의 cDNA를 확인하였다(Figure 4). 그 결과 형질전환된 식물체의 잎에서 분리된 RNA에서는 GR 유전자가 전사된 것을 확인할 수 있었으나 형질전환되지 않은 정상조직에서는 확인할 수 없었다. 형질전환된 상추로부터 자가수분에 의해 종자를 획득하였다(Figure 5A). 형질전환된 상추식물체로부터 채종된 종자의 발아 정도를 조사한 결과 대부분의 종자가 90% 이상의 발아율을 나타내었으며, 또한 pBKS-GR1 벡터에는 GR유전자 이외에 선발인자로 NPTⅡ 유전자가 함께 삽입되어 있으므로 NPTⅡ 유전자의 형질전환 여부를 조사하기 위하여 kanamycin 200 mg/L이 첨가된 배지에서 생존율을 조사하였다(Table 1). 파종 후 20일까지는 모든 어린 묘들이 50.9~92.7%까지 살아 남았으나 파종 30일 후에는 대조구는 kanamycin의 영향으로 본엽이 완전히 백색으로 변하는 반면(Figure 4B) 형질전환식물체에서 채종된 종자는 파종 30일 후에도 80.5~92.1%로 평균

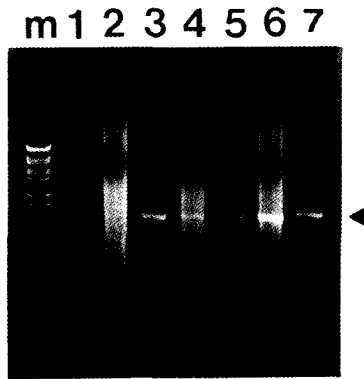


Figure 4. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplification products. m, marker: lane 1, sterilized H₂O: lane 2, amplified product from genomic DNA of nontransformed plant: lanes 3, 4, 5, and 6, amplified products from genomic DNA of transgenic plants transformed with pBKS-GR1: lanes 7, amplified product from plasmid pBKS-GR1. The arrow indicates approximately 1.8 kb of amplified GR product.

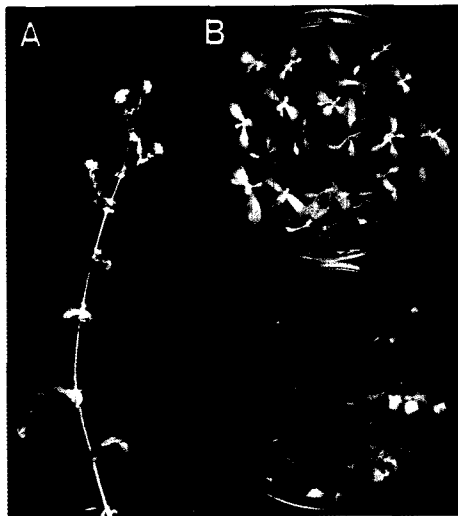


Figure 5. seeds germination of transgenic lettuce plant. A, seeds of transgenic lettuce just before harvest: B, normal (upper) and transgenic (lower) seeds on the hormone free MS medium supplemented with 200 mg/L kanamycin.

Table 1. Germination frequency and survival rate of self fertilized transgenic lettuce seeds.

| Plant | Germination rate ^a (%) | % Survival rate after germination (days) | | |
|-----------------|-----------------------------------|--|------|------|
| | | 10 | 20 | 30 |
| T1 ^b | 96.0 | 79.6 | 50.9 | 0.0 |
| T2 | 94.0 | 92.7 | 92.7 | 90.5 |
| T3 | 99.2 | 95.0 | 90.0 | 90.0 |
| T4 | 95.7 | 86.0 | 80.5 | 80.5 |
| T5 | 97.5 | 92.8 | 90.0 | 90.0 |
| T6 | 98.0 | 94.1 | 85.1 | 85.1 |

^aThe germination medium supplemented with 200 mg/L kanamycin.

^bSelf-fertilized R₁ transgenic plant seeds.

83.04%가 본엽이 계속적으로 녹색을 띄며 생존하였다 (Figure 5B). *Agrobacterium*을 이용하여 식물체에 도입된 외래유전자는 우성으로서 후대에 유전된다. 따라서 삽입되는 외부유전자가 식물의 핵속에 한 개가 삽입된다면 멘델법칙에 의해 이론적으로는 3:1 분리가 가능하다. 그러나 종종 이들 형질전환 식물체들의 표현형이 멘델법칙을 따르지 않는 예가 많다(Heberle-Bors et al., 1988; Topping et al., 1991). Shon 등(1995)은 오이모자이크바이러스 외피단백질 유전자를 담배에 도입한 후 후대검정을 실시한 결과 1개의 유전자가 삽입된 형질전환체가 가장 많았으나 2개의 유전자가 삽입된 형질전환체의 비율이 39%, 3개 이상이 삽입된 경우도 11%나 된다고 하여 *Agrobacterium*에 의해 외래유전자가 식물체에 도입되는 유전자수가 다르다고 하였다. 지금까지 오존내성과 관련하여 밝혀진 황산화효소는 GR 이외에도 superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) 등 (Alscher and Hess, 1993)이 있다. Pitcher와 Zilinskas (1996)는 cytosolic Cu/Zn-SOD가 형질전환된 담배의 경우에는 오존에 대한 내성을 나타내는 반면, chloroplastic Cu/Zn-SOD가 형질전환된 담배의 경우에는 형질전환되지 않은 식물체보다 SOD활성이 15배정도 높은데도 불구하고 오존에 대한 내성을 나타내지 않는다고 하였다. 본 실험은 배추에서 분리된 GR의 cDNA를 상추에 형질전환시켜 오존 유도성 유전자인 GR 유전자의 도입과 발현을 확인하였다. 그러나 이들 형질전환체를 대상으로 상추에 도입된 GR 유전자가 실질적으로 오존에 대해 어느 정도 내성을 나타내는지에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

적 요

상추의 자엽 조직을 GR 유전자가 도입된 *A. tumefaciens* LBA 4404와 2일간 공동배양후, carbenicillin 500 mg/L, kanamycin 50 mg/L, NAA 0.1 mg/L와 Zip 1.0 mg/L가 함유된 MS 재분화배지에 옮겨 약 4주후에 kanamycin 저항성 개체를 얻었다. 형질전환된 것으로 추정되는 식물체는 kanamycin 100 mg/L가 함유된 MS선발배지에서 생존하였다. PCR 분석결과, GR 유전자가 형질전환체의 개능상에 삽입되어 있음을 확인하였다. 형질전환체의 Southern blot 분석을 통하여 ECL-labelling된 GR 유전자와 동일한 것으로 판단되는 약 1.8 kb 위치에서 밴드를 확인할 수 있었다. RT-PCR 분석으로 GR 유전자가 전사됨을 확인할 수 있었다. 개화후 이들 개체의 종자를 받아 NPT II 유전자의 발현여부를 조사한 결과 R₁세대에서도 NPT II 유전자가 발현됨을 확인하였다.

사사 - 본 논문은 1996~1997년 학술진흥재단 대학부설연구소 지원과제로 수행되었던 연구결과와 일부부분으로 연구비 지원에 감사한다.

인 용 문 헌

- Allen RD** (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol* 107:1049-1054
- Alscher RG, Hess JL** (1993) Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton, pp 1-17
- Bowler C, Slooten L, Vandenbranden S, De Rycke R, Botterman J, Sybesma C, Van Montague M, Inze D** (1991) Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO J* 10:1723-1732
- De Block M** (1988) Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum Tuberosum*) using *Agrobacterim tumefaciens*. *Theor Appl Genet* 76:767-774
- Heberle-Bors E, Charvat B, Thompson D, Schemthaler JP, Barta AJM, Matzke MA** (1988) Genetic analysis of T-DNA insertions into the tobacco genome. *Plant Cell Reports* 7:571-574
- Heck WW, Heagle AS, Miller JE, Rawling JO** (1991) A national program to assess the impact of ozone on agricultural resources. In: Berglund et al., ed. Tropospheric Ozone and Environment. Air and Waster Manage, PA, pp 225-254
- Kim CK, Chung JD, An GH** (1998) The introduction of proteinase inhibitor II (PI-II) gene into flowering cabbage, *Brassica oleracea* var. *acephala* DC. *Korean J Plant Tissue Culture* 25:45-50
- Lee HS, Jo JK, Son DY** (1998) Molecular cloning and characterization of the gene encoding glutathione reductase in *Brassica campestris*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1395:309-314
- Murray MG, Thompson WF** (1980) Rapid isolation of molecular weight plant DNA. *Nud Acids Res* 8:4321-4325
- Pitcher LH, Zilinskas BA** (1996) Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in the cytosol of transgenic tobacco confers partial resistance to ozone-induced foliar necrosis. *Plant Physiol* 110:583-588
- Runeckless VC, Krupa SV** (1994) The impact of UV-B radiation and ozone on terresrtial vegetation. *Environ Pollut* 83:1991-213
- Sohn SH, Kim KH, Kim YT, Park JS, Kim JK, Lee KW, Hwang YS** (1995) Isolation of coat protein gene from cucumber nosaic virus and Its introduction into tobacco. *Korean J Plant Tissue Culture* 22:149-155
- Southern E** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98:503-512
- Topping JF, Wei W, Lindesey K** (1991) Functional tagging of regulatory elements in the plant genome. *Development* 112:1009-1019
- Vries SD, Hoge H, Bisseling T** (1988) Isolation of total and polysomal RNA from plant tissues. In: SB Gelvin and RA Schilperoort, eds. *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer Academic Publesgers. Dordrecht, pp B6:1-13

(1998년 4월 17일 접수)