

## 유전자총을 이용한 상추 내로의 배추 Glutathione Reductase (GR) 유전자의 도입

정재동<sup>1</sup> · 이부자<sup>1</sup> · 이효신<sup>1</sup> · 김창길\*  
상주대학교 원예학과, <sup>1</sup>경북대학교 농과대학

### Transformation of Chinese Cabbage Glutathione Reductase (GR) gene into Lettuce (*Lactuca sativa* L.) with Particle Bombardment

CHUNG, Jae-Dong<sup>1</sup> · LEE, Boo-Ja<sup>1</sup> · LEE, Hyo-Shin<sup>1</sup> · KIM, Chang-Kil\*  
Dept. of Horticulture, Sangju National University, Sangju 742-711, Korea  
<sup>1</sup>College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

**ABSTRACT** The cytosolic glutathione reductase (GR) gene of Chinese cabbage was introduced into Lettuce (*Lactuca sativa* L.) with particle bombardment method. When cotyledon explants were treated with osmoticum-conditioning medium (0.6 M sorbitol/mannitol) 4 hours prior to and 16 hours after bombardment, it was identified by GUS assay that this condition was the most efficient one for introduction of foreign genes into cotyledon tissue of lettuce with particle bombardment. The stable integration of a GR gene was confirmed by the PCR analysis. 0.3, 0.6, 1.5 kbp PCR fragments of transgenes were obtained by three types of primers designed on the basis of GR sequence. To know whether the expression of the GR gene of pBKs-GR1 can be stably maintained in the next generation, T<sub>2</sub> selfing seeds obtained from the transformed mother plants were sowed on MS medium supplemented with 200 mg/L kanamycin sulfate. 70% of seedlings showed resistance to kanamycin.

Key words: Cytosolic glutathione reductase, Osmoticum-conditioning, Particle bombardment

#### 서 론

최근, 산업화 과정에서 발생하는 각종 오염물질들은 식물의 생활 환경을 크게 변화시켜 농작물에 커다란 피해를 주게 되는데, 이들 중 대기오염물질들은 대부분 가스상태로 대기 중에 존재하여 식물의 기공을 통해 흡수되어 식물체 내에 장해를 주는 것으로 알려져 있으며 (Allen 1995) 이들 대기 오염물질에 대한 저항성 식물체를 개발하기 위해 유전공학적 방법에 관한 연구가 최근 활발하게 이루어지고 있다 (Bowler et al. 1991; Pitcher et al. 1996).

외래의 유용 유전자를 선택적으로 고등 식물체 내로 도입시켜 관련 형질을 전환시키는 형질전환법 중 particle

bombardment를 이용하는 방법은 helium gas 등을 사용하여 식물세포에 직접 쏘아 넣는 방법으로서 분화가 왕성한 세포 조직에 최소한의 영향을 주면서 외래 유전자를 직접 전이시킬 수 있고 형질전환율도 높은 것으로 알려져 있다 (Sanford 1990).

따라서 본 실험은 particle bombardment (Biolistic<sup>®</sup> PDS-1000/He system)를 이용하여 세계적으로 가장 중요한 위치를 차지하고 있는 샐러드용 채소인 상추의 형질전환율을 높이기 위한 몇 가지 요인을 검정하였으며 그 결과를 토대로 배추에서 분리된 오존유도성유전자 (Glutathione Reductase gene, GR; Lee et al. 1998)를 형질전환 후 재분화시켜 최종적으로 GR 유전자가 형질전환된 상추를 개발하고자 실시하였다.

\* Corresponding author. Tel 054-530-5236

E-mail ckkim@sangju.ac.kr

## 재료 및 방법

### 식물재료 및 Plasmids

청치마 상추 (*Lactuca sativa* L.)의 종자를 1% NaOCl (유한락스, 유효 염소 4%) 용액에 15분간 살균하고 멸균수로 수세한 후 MS배지 (Chung et al. 1998)에 파종하여  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 1일 16시간 명배양한 4일 후의 자엽을 형질전환 실험 재료로 사용하였다. PDS-1000/He system (Bio-rad, USA)을 이용하여 형질전환에 필요한 최적 조건을 구명하고 GR유전자를 상추 자엽에 도입시키기 위하여 사용한 plasmids pIG121-HM과 pBKS-GR1은 각각 *E. coli* host JM109와 HB101에 클로닝된 것이며, 경북대학교 동물자원학과 목초생리생화학연구소로부터 분양받았다. pIG121-HM은 kanamycin과 hygromycin에 내성을 가지는 유전자 운반체로 X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide, USB, USA)에 발광반응하는 GUS ( $\beta$ -glucuronidase) 유전자가 35S promoter 사이에 삽입되어져 있다. pBKS-GR1은 배추에서 분리된 1,782 bp의 오존 내성에 관련된 황산화 효소인 Glutathione Reductase 유전자의 cDNA가 35S promoter와 nopaline synthase의 terminator (Tnos) 사이에 삽입되어져 있고, kanamycin에 내성을 나타내는 neomycin phosphotransferase gene II (NPT II)를 가졌다.

### Biolistic transformation

GUS와 GR유전자를 가진 pIG121-HM과 pBKS-GR1 plasmid DNA를 코팅하기 위하여 tungsten 입자 60 mg을 70% EtOH로 세척하고 50% glycerol 1 mL로 현탁하였다. 현탁액을 진탕하여 잘 섞은 다음, 새 튜브에 50  $\mu$ L씩 분주하고 plasmid DNA 5  $\mu$ L (1  $\mu$ g/ $\mu$ L), CaCl<sub>2</sub> (2.5 M) 50  $\mu$ L, spermidin (0.1 M) 20  $\mu$ L를 차례로 넣어 각각의 입자에 코팅하였다. 70% EtOH로 세척하고 100% EtOH 48  $\mu$ L를 첨가하여 현탁한 다음 macrocarrier에 1회에 8  $\mu$ L씩 도말하여 사용하였다. GR 유전자의 상추자엽 내로의 형질전환은 pBKS-GR1을 tungsten 10으로 코팅한 다음 1,100 psi의 helium압으로 사출거리를 9 cm로 하여 실시하였다. 사출 후 chamber 내의 vacuum을 제거하고 sample을 꺼내어 2일간 배양한 후 kanamycin sulfate 50 mg/L가 첨가된 MS배지에 옮겨 재분화시켰다.

### 삼투 조절제 처리

삼투조절제의 첨가가 유전자 사출 후 GUS 유전자의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위하여 0, 0.4, 0.6 M sorbitol/mannitol을 MS배지에 첨가하여, 사출하기 전 0, 4시간, 사출한 후 0, 16시간, 전후 각각 4, 16시간 처리하여 GUS

활성을 검정하였다. Plasmid는 pIG121-HM을 사용하였고 helium압 1,100 psi에 사출거리는 9 cm로 하였다.

### Histochemical assay

상추의 자엽조직에 대한 GUS 발현 분석은 Jefferson 등 (1987)의 방법에 따라 수행하였다. 상추의 자엽을 well plate에 넣고 GUS염색액 (2 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide in 50 mM NaPO<sub>4</sub>, pH 7.0)을 well당 300  $\mu$ L씩 첨가하였다. 그 후 plate를 parafilm으로 봉한 다음 37°C에서 48시간 처리하고 GUS 유전자의 발현여부를 확인한 후 70% EtOH로 여러번 씻어 염색소를 제거한 다음 실체현미경으로 검정하였다.

### PCR analysis

GR 유전자가 식물체의 염색체 내에 35S promoter와 BcGR1 유전자 모두가 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 PCR 분석을 수행하였다. 식물체의 잎으로부터 DNA를 분리하여 sterilized-H<sub>2</sub>O 용액에 1 ng/ $\mu$ L 농도로 하여 template DNA로 이용하였고, PCR 반응용액은 10 $\times$ buffer 2.5  $\mu$ L, dNTPs 2  $\mu$ L, Taq polymerase 0.2  $\mu$ L를 첨가하고 primer 1·2를 각각 0.5  $\mu$ L, template DNA 2  $\mu$ L (2 ng/ $\mu$ L)를 넣고 전체 용액을 25  $\mu$ L로 하여 반응시켰다. Thermo Cycler (Gene Amp PCR System 2400)를 이용한 첫 DNA 변성은 95°C에서 2분간, 그후의 변성은 94°C에서 30초간, annealing은 55°C에서 1분간 그리고 DNA 합성은 72°C에서 1분 30초로 30 cycle을 실행했으며, 최종 DNA 합성은 72°C에서 3분간 하였다. 반응시킨 용액은 1.4% agarose gel에 전개시켜 UV lamp에서 band를 확인하였다. GR분석에 사용된 primer는 3종으로 예상되는 증폭산물이 1.5 kbp인 sense primer (5'-AACCATGGCGAGGAAGATGC-3')와 antisense primer (5'-GTCTGAGGATCCGACCAAAC-3'), 0.6 kbp인 sense primer (5'-CCCACCCACGAGGAGCATC-3')와 antisense primer (5'-CTAGCATCCTCAAGTTCACC-3') 그리고 0.3 kbp인 sense primer (5'-TTCAACAAAGGGTAATATCCGG-3')와 antisense primer (5'-CGAAGGATAGTGGGATTGTGC-3')이다.

### 형질전환체 종자(T<sub>2</sub>)의 kamamycin 내성 검정

형질전환 후 재분화된 T<sub>1</sub>세대 식물체를 27°C 이상의 고온에서 30~40일간 화아분화를 유도한 후 온실에서 추대한 것을 자가수분하여, 채종한 종자를 1% NaOCl (유한락스, 유효 염소 4%) 용액에 15분간 살균하고 멸균수로 3회 수세하여 kanamycin sulfate가 200 mg/L 함유된 MS배지에 파종하여 배양한 30일 후에 생존율을 조사하였다.

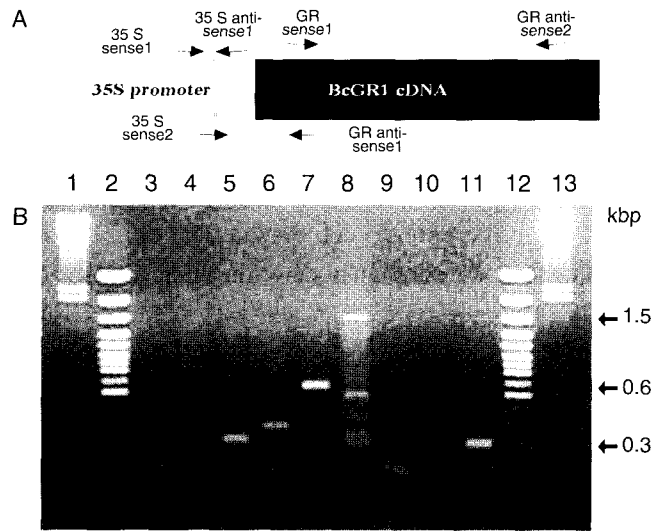
**결과 및 고찰**

Particle bombardment를 이용한 형질전환시 배지 내에 삼투조절제를 첨가하여 사출전후 삼투조절제의 처리농도와 시간을 달리함으로써 GR 유전자의 형질전환시 어떠한 상승적 효과를 줄 수 있는지 알아보기 위해 실험한 결과 (Table 1), sorbitol과 mannitol을 각각 0.6 M 첨가한 처리구에서는 무처리구보다 GUS 반응 spot이 더 많이 나타났고, 처리 시간별로는 사출전 4시간과 사출후 16시간 동안 처리했을 때가 사출전 4시간 처리 혹은 사출후 6시간 처리 및 무처리보다 더 많은 GUS 반응 spot을 보였다. 일반적으로 particle bombardment를 이용한 형질전환시 외래 유전자를 코팅한 입자가 대상식물세포의 세포벽 내에 침투하게 되면 원형질이 세포 밖으로 밀려나오게 되는데 삼투조절제를 이용함으로써, 원형질이 분리된 세포는 이러한 입자에 의한 원형질 용출의 가능성이 적어져 (Russell et al. 1992; Vain et al. 1993), particle bombardment에 의해 삽입된 외래유전자의 발현을 증가시킬 수 있다고 보고 된 바 있다 (Takeuchi et al. 1992). 이러한 삼투조절제 외에도 대상 식물 조직을 부분적으로 건조시킴으로써 osmotic conditioning을 할 수 있다는 보고도 있다 (Finer and McMullan 1990). 따라서 본 실험에서와 같이 particle bombardment를 이용한 형질전환시 사출전후 상추 조직에 sorbitol과 mannitol을 0.6 M을 각각 처리하여 주면, 상추 자엽 조직의 부피를 줄여주고 세포를 일시적으로 탈수시켜 DNA가 코팅된 입자의 사출시 발생하는 원형질의 용출을 방지함으로써 형질전환에 효과적일 것으로 생각되었다.

상기의 조건을 이용하여 GR 유전자를 사출시킨 후 kanamycin 50 mg/L가 함유된 배지에서 재분화된 상추에서 35S promotor와 BcGR1이 모두 삽입이 되었는지를 확인하기 위해 PCR한 결과 (Figure 1), 형질전환된 식물체에서는 0.3, 0.6, 1.5 kbp의 band가 나타났으나, 형질전환이 되지 않은 식

물체에서는 어떠한 band도 나타나지 않았다. 그리고 GR 유전자 형질전환 개체에 대한 PCR 분석시 형질전환 개체에서 원하는 band 이외에 여러 가지 background 들이 나타났는데 이는 아마도 식물의 genomic DNA속에 합성한 primer와 비슷한 homology를 가진 sequence들이 존재할 수 있기 때문에 이러한 현상이 나타난 것으로 추측되었다.

PCR분석을 통하여 형질전환이 되었음을 확인한 상추의 T<sub>2</sub> 종자의 kanamycin의 내성 여부를 조사하였는데 (Figure 2), 채종된 종자에서 약 70%가 kanamycin 내성을 나타내어 particle bombardment에 의해 상추의 genome속으로 삽입된 GR유전자는 Mendelian의 법칙에 따라 유전된 것으로 추정

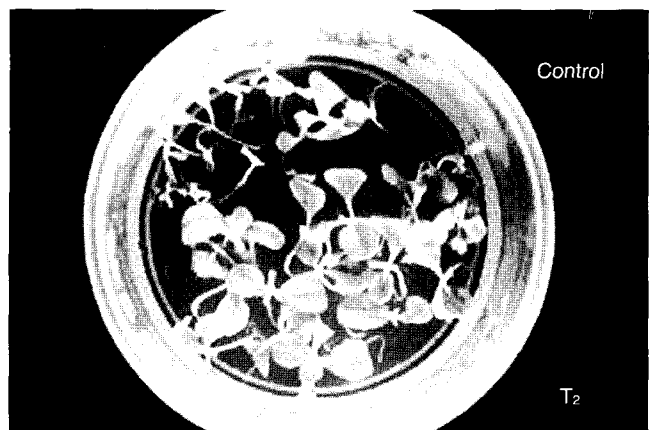


**Figure 1.** PCR primer design (A) and amplification of the GR gene in control, transformed and nontransformed *Lactuca sativa* L. (B). 0.3 kbp : PCR with 35S sense1 and 35S antisense 1 primers 0.6 kbp : PCR with 35S sense 2 and GR antisense 1 primers 1.5 kbp : PCR with GR sense 1 and GR antisense 2 primers (A). Lane 1, 2, 12, 13 : size marker, Lane 3, 4, 5 : control, Lane 6, 7, 8 :GR positive regenerant, 0.3, 0.6, 1.5 kbp, Lane 9, 10, 11 : GR negative regenerant (B).

**Table 1.** The effect of various concentrations of osmoticum on GUS expression in the bombarded cotyledon of *Lactuca sativa* L.

Concentration (Sorbitol/Mannitol)	Treatment(hour)		GUS blue spot
	Before	After	
0M	-	-	+ <sup>a</sup>
	4	0	+
0.4M	4	16	+++
	0	16	++
	4	0	++
0.6M	4	16	++++
	0	16	+++

<sup>a</sup> +; poor, ++; moderate, +++; good, ++++; very good.



**Figure 2.** Seed germination of transgenic *Lactuca sativa* L. on growth regulator free MS medium supplemented with 200 mg/L kanamycin. Control; nontransgenic seedlings, T<sub>2</sub>; transgenic seedlings.

된다.

본 실험 결과, NADPH존재에서 산화형 glutathione (GSSG)을 환원형 glutathione (GSH)로 변환시켜줌으로써 식물세포 내에서 활성 산소종을 해독시키는 것으로 알려져 있는 배추의 BcGR1 유전자를 particle bombardment를 이용하여 형질전환시킬 수 있었다. 따라서 얻어진 형질전환체를 이용하여 도입된 BcGR1 유전자의 발현이 최근 산업화에 따른 환경의 파괴로 그 발생빈도가 급증하고 있는 오존을 포함한 환경스트레스에 미치는 영향 등에 대하여 보다 많은 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

## 적 요

상추에 particle bombardment를 이용한 배추 Glutathione Reductase (GR) 유전자의 형질전환효율 향상 및 형질전환체의 유전분석에 관한 실험을 수행하여 얻은 결과를 요약하면 다음과 같다. Particle bombardment 이용시 사출 전 4시간, 사출 후 16시간 동안 삼투조절제인 0.6 M sorbitol/mannitol 을 처리하여 형질전환시킨 상추 자엽조직에서 GUS 반응 spot이 가장 많았다. 0.3, 0.6, 1.5 kbp로 나타나는 3가지 종류의 primer를 사용하여 PCR한 결과 각각의 primer에 homology를 타나내는 band를 확인하여 35S promoter와 BcGR1 유전자가 삽입이 된 것을 확인하였다. 형질전환된 상추의 자식 종자를 채종하여 kanamycin 200 mg/L이 첨가된 MS배지에 파종하여 형질전환시키지 않은 상추의 자식 종자와 비교해 본 결과, 형질전환된 상추의 종자에서 발아된 유묘의 약 70% 정도가 kanamycin에 대해 내성을 나타내었다.

## 인용문헌

Allen RD (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using

transgenic plants. *Plant physiol.* **107**:1049-1054.

Bowler C, Slooten L, Vanderbranden S, Rycke DR, Botterman J, Sybesma C, Mantague VM, Inze D (1991) Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants. *EMBO. J.* **10**:1723-1732.

Chung JD, Kim CK, Jo JK (1998) Expression of Chinese Cabbage Glutathione Reductase Gene in Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Kor. J. Plant Tiss. Cult.* **25**(4):267-271.

Finer JJ, McMullen MD (1990) Transformation of cotton (*Gossypium Hirsutum* L.). *Plant Cell Rep.* **8**:586-589.

Jefferson R, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusion :  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal.* **6**(13):3901-3907.

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.

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.

Russell JA, Roy MK, Sandford JC (1992) Physical trauma and tungsten toxicity reduce the efficiency of biolistic transformation. *Plant Physiol.* **98**:1050-1056.

Sanford JC (1990) Biolistic plant transformation. *Physologia Plantarum.* **79**:206-209

Takeuchi Y, Dotson M, Keen NT (1992) Plant transformation a simple particle bombardment device based on flowing helium. *Plant Mol. Biol.* **18**:835-839.

Vain P, McMullen MD, Finer JJ (1993) Osmotic treatment enhances particle bombardment-mediated transient and stable transformation of maize. *Plant Cell Reports.* **12**:84-88.

(접수일자 2000년 10월 17일)