

목화 Glutathione S-Transferase (GST) 유전자로 형질 전환된 현삼의 내병성 특성

강원희 · 임정대 · 이성호 · 유창연*
강원대학교 농업생명과학대학 식물응용과학부

Pathogene Resistance of cotton GST cDNA in Transgenic *Scrophularia buergeriana* Misrule

KANG, Won Hee · LIM, Jung Dae · LI, Cheng Hao · YU, Chang Yeon*

Division of Applied Plant Science, College of Agriculture & Life Sciences, Kangwon National University, Chuchon, 200-701, Korea

ABSTRACT *Scrophularia buergeriana* Misrule has been contaminated with various pathogens in condition of field and storage period. This study was carried out for production of multiple stress resistance plant containing disease resistance that CGST gene expressed in transgenic *Scrophularia buergeriana* Misrule genome. Glutathione S-Transferases (GSTs) detoxify endobiotic and xenobiotic compounds by covalent linking of tripeptide glutathione to hydrophobic substrate. GST enzymes have been identified and characterized in insects, bacteria, and many plant species. A cDNA clone of GST was introduced into *Scrophularia buergeriana* Miquel by transformation with *Agrobacterium tumefaciens*. In coporation of the CGST gene into *S. buergeriana* Misrule was confirmed by PCR analysis of genomic DNA. Influence of exposure to darkness on the regeneration potential and transformation frequency were assessed. The activity of GST in transgenic plants was two times higher than that of non-transgenic plants. As a result of anti-microbe assays, the crude extract protein of transgenic plants showed the antimicrobial effects higher than control plants.

Key words: Anti-microbial activity, Glutathione S-Transferase (GST) Enzyme activity, *Scrophularia buergeriana* Miquel

서 론

현삼 (*Scrophularia buergeriana* Miquel)은 현삼과 (Rhinanthaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 흑삼 (黑參), 원삼 (元參), 정마 (正馬) 또는 현대 (玄臺)라고도 불리고 있는 유망한 약용작물 중의 하나이다. 보통 가을철에 채취하여 화력 (火力)으로 黑變시켜 햇볕에 말려 사용한다. 현삼은 증자 후 탕전 (湯煎)하거나 환 (丸) 또는 산제 (散劑)로 하여 내복 (內服)하거나 짓뭉어 환처에 붙여 사용하며 주요 성분은 p-methoxycinnamic acid, harpagide, phytosterol로서 소

염, 인후염, 비염, 혈압강하, 강심작용에 쓰인다 (육 1989). 한 방제제로 쓰이는 현삼은 현재 매년 전량을 수입에 의존하고 있으며 국내에서는 일부 농가에 소량으로 재배되고 있으며 아직 품종으로서 명명된 것은 없다 (최 1994). 현삼 번식은 주로 묘두 또는 묘근을 이용하며, 종자로도 번식하지만, 종자 번식법으로 번식하고자 할 경우 발아와 생육이 불균일하며 1년간의 육묘를 거쳐 이식을 해야 하는 단점이 있으며 뿌리가 작아서 수확량이 적은 때가 많다. 그러므로 처음 재배할 때에는 종자번식법을 이용하고 그 이외에는 묘두, 묘근으로서 번식하는 것이 다수확을 기대할 수 있으나 증식률이 낮고 묘두, 묘근의 보관이 어려우며 (김 등 1995) 저장 시 병원균에 의한 감염과 발병률이 매우 높을 뿐 아니라 저장된 묘두, 묘근으로 번식하는 경우 극한 온도와 높은 광도, 가뭄, UV radiation,

*Corresponding author Tel 033-250-6474 Fax 033-242-6497
E-mail cyyu@cc.kangwon.ac.kr

중금속, 병원체 감염, 잡초와의 경합 등의 자연적인 요소뿐 아니라 인위적인 요소인 제초제 등 여러 가지 환경적인 stress에 노출될 우려가 있다. 이러한 환경적 스트레스는 식물체의 대사를 멈추게 하고 성장과 발육을 저해하여 대상 자생식물을 재배화하는 데 있어서 장애가 되고 있다.

식물체는 이러한 자연적이거나 인위적으로 형성된 스트레스에 의해 합성된 세포 독소들에 대항하여 다양한 용도의 detoxification system을 가지고 있으며 세포 조직의 ROS (Reactive Oxygen Species)를 빠르고 효과적으로 제거할 수 있는 고분자 항산화 효소와 항산화 물질들을 만들어 낸다 (Allen et al. 1994; Allen 1995). 그 중 제초제 저항성, 다양한 스트레스 및 중금속 독성 발현에 영향을 미치는 GST (Glutathione S-transferase) 유전자가 관심의 대상이 되고 있다. GST 효소는 친전자적 중심을 가지고 있으며 지방에 친화적인 생체 이물과 내부에서 생산된 독성물질들을 환원된 glutathione과 결합을 형성하게 하는 효소이다 (Coles et al. 1990; Mannervik et al. 1985; Pickett et al. 1989). GST들은 환원된 형태의 glutathione (GSH)과 친전자적 물질 사이에 phase II conjugation을 형성하도록 촉매하며 이렇게 형성된 conjugate들은 분자량이 커져서 세포의 액포 또는 세포질로 이동하여 불활성이며 수용성이고 모성분보다 덜 독성이 있는 물질을 생성한다. 또한 GST는 세포 내 돌연변이원의 독소와 발암물질, 또는 다른 독성이 있는 물질을 제거한다 (Mannervik et al. 1985; Pickett et al. 1983).

기생균이 식물체 내에 침입하였을 때 숙주인 식물조직의 세포들은 항균성 물질을 합성 또는 활성화시키는데 이러한 물질을 phytoalexin (Barz et al. 1990)이라 하며, 대부분의 phytoalexin들은 일부 isoprenoid 성분과 약간의 polyacetylene이 있기도 하지만 shikimic acid pathway에 의해서 생성되는 phenolic phenylpropanoid이다. 그리고 이런 세포 내의 유해한 성분들의 축적은 cytochrome p450들과 UDP (uridine diphosphate), glucosyltransferase, glutathione S-transferase (GST) 같은 효소를 생합성하여 작용이 끝난 항균성 물질들을 무독화시킨다. 예를 들어 Glutathione S-cinnamoyl transferase (GCSTs)는 강낭콩과 완두콩 그리고 옥수수에서 발견되었으며 fungal elicitor에 의하여 유도될 수 있다. GCST는 GSH와 cinnamic acid를 conjugation을 형성하도록 촉매하고 phytoalexin 합성과정의 초기에 cinnamic acid를 제거하며 (Edward and Dixon 1991) 스트레스 상태에서 생성된 다른 phenolic compound의 축적을 감소시킨다 (Dean et al. 1990). 본 연구는 병원균의 감염에 의해 생성되는 phytoalexin과 GST enzyme의 상관관계를 이해하고 GST 유전자를 과발현시켜 식물체에서 병원균에 대한 저항성을 증가시킬 수 있으리란 가정 하에 수행되었으며 목화로부터 분리한 GST cDNA를 현삼에 형질전환시키고 형질전환된 식물체의 GST 효소 활성과 항미생물 검정을 수행하였으며 나아가서 광범위한 스트레스에 대한 저항성을 갖는 품종을

육성하기 위하여 실시되었다.

재료 및 방법

기내배양에 의한 현삼 식물체 재분화

식물체 재료로는 MS (Murashige and Skoog) 기본배지에서 기내배양되어 성숙되어 있는 현삼의 액아를 제거한 잎부분을 채취하여 실험재료로 이용하였으며 재분화 조건을 구명하기 위하여 MS배지에 성장조절물질 처리는 NAA, 2,4-D, TDZ 3종류를 사용하여, 각각의 배지에 성장조절물질 처리별 농도는 각각 0.01, 0.1, 2 mg/L로 하였으며 NAA, 2,4-D와 TDZ를 성장조절물질로 MS배지에 조합처리하였다. 성장조절물질 처리를 한 배양병에 10반복씩 치상을 해서 4~8주간 배양하였다. 배양조건은 1,000 lux, 16시간 광처리, 8시간 암처리, 25°C에서 배양하였다. 위의 조건으로 처리한 배지에서 shoot가 유기된 것을 1/2MS 기본배지(0.8% agar, 3% sucrose)에 계대배양하여 발근을 유도하였다. 처리된 성장조절물질 이외에 잎의 expansion을 위하여 1 mg/L의 2ip를 추가로 처리하였다(자료 미제시).

Agrobacterium에 의한 형질전환

목화 (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker 312)의 현탁배양 세포로부터 얻은 auxin-induced protein인 Gh-5 protein은 auxin에 의해 발현되며, 또한 auxin의 합성에 관여하는 유전자로서 뿌리 근단에서 특이적으로 발현하는 유전자이며, 941 bp의 origin base sequence (base count A: 280, C: 140, G: 232, T:289)를 가지고 있다. Partial GST fragment Gh-5는 cotton fiber cDNA library (Yamamoto 1995)에서 선별되었으며 pCNT107 clone을 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1.5분의 조건으로 35 cycle로 PCR-based cDNA library screening을 수행하여 증폭된 fragment를 cloning vector인 pCR 2.1 (invitrogen, San Diego, CA)에 ligation시켰으며 이 vector는 NPT II gene을 포함하고 있다. Clone된 GST 유전자 Gh-5 (이하 CGST)의 cDNA 단편을 pCR 2.1 cloning vector에서 Nco I와 Sac I을 사용하여 분리한 후 expression vector인 pRTL2의 Nco I/Sac I site에 도입하였다 (Figure 1). 이러한 vector는 CaMV 35S promoter 하에 tobacco etch virus ribosomal binding site, 35-S terminator polyadenylation signal를 가지고 있다. 이 vector의 Sph I fragment를 분리하여 binary transformation vector인 pCGN 1578 안으로 도입하여 새로운 pCGN-NT107 vector를 구성하였다. 이 vector를 *Agrobacterium* strain EHA 101로 도입하여 형질전환에 사용하였다.

형질전환체를 선별하기 위하여 항생제 kanamycin에 대한

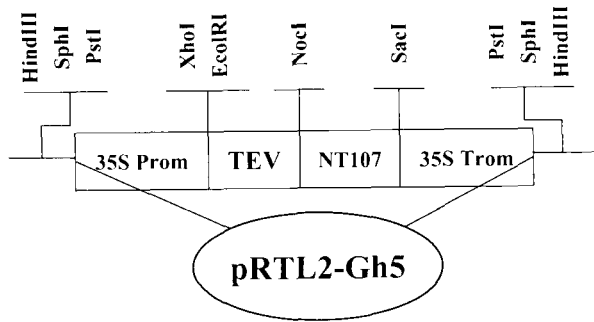


Figure 1. Diagram of the T-DNA region of pRTL2-Gh-5 construction of the chimeric gene Gh-5. 35S Prom, CaMV 35 promoter; TEV, cotton etch virus ribosomal binding site; 35S Term, 35S Terminator polyadenylation signal.

저항성 검정을 수행하여 kanamycin의 적정농도를 알아보았다. MS + 2 mg/L TDZ + 0.2 mg/L NAA 배지에 kanamycin을 0, 50, 100, 200 mg/L를 각각 첨가한 후 현삼 잎조직의 절편체를 치상하고 21~28일간 배양하면서 항생제에 대한 저항성 정도를 알아보았다. GST gene (Gh-5)를 포함하고 있는 *Agrobacterium tumefaciens* EHA101은 28°C shaking incubator에서 24시간 동안 1 mL의 LB liquid medium (Bacto-tryptone 10 g, Bacto-yeast extract 5 g, NaCl 10 g, pH7.0, 50 mg/L Km)에서 암상태로 배양한 후 배양액 1 mL를 취하여 50 mL의 LB배지에서 24~36시간 배양하였다. 박테리아 배양액을 원심분리를 수행하여 침전 부분을 공동배양 배지와 동일한 조건인 액체배지로 Bacterial suspension의 O.D가 대략 A₆₀₀=1.0이 되게 희석하여 식물체를 접종할 준비를 하였다.

무균상태로 배양한 현삼 잎 조직 부위를 절단한 후 전처리 배지 (MS salt + 1 mg/L 2ip + 2 mg/L TDZ + 0.2 mg/L NAA + MS vitamin + 3% sucrose + 0.8% Bacto agar, pH5.8)에 치상하여 2~3일간 배양하였다. 절편체를 *Agrobacterium* 배양에 5~30분간 접종시킨 다음, 표면의 물기를 털균시킨 김와이프스에서 말리고 다시 공동배양배지에서 2~3일 동안 공동 접종하였다. 공동 접종한 후 식물체 절편을 신토 형성 선발배지로 옮겨 주었다.

PCR 분석

CTAB (cetyltrimethyl ammonium bromide)법으로 선발배지에서 자란 현삼 식물체로부터 DNA를 추출하였다. 현삼 식물체의 잎을 채취하여 액체질소를 사용하여 막자사발에서 잘 간 다음 CTAB 용액을 넣은 튜브에 옮기고 흔들어서 잘 섞은 뒤 60°C의 항온수조에서 1시간 동안 배양하였다. Phenol : Chloroform : isoamylalcohol (25 : 24 : 1) 용액을 CTAB 용액과 동일 양으로 넣고 섞은 뒤 5,000 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. DNA 상층액을 분리하여 새 tube로 옮기고 isopropanol을 넣고 10,000 rpm, 15분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고, 증류수를 넣어 침전부분을 녹여 주었다. Chloroform을 넣고 한 번 더 원심분리를 수행하여 상층액을 분리해서 다시 새 tube로 옮기고 100% ethanol을 처리한 후 원심 분리하였다. 상층액을 버린 후 생긴 pellet을 건조시킨 뒤 TE buffer 또는 증류수로 pellet을 녹여준 뒤 RNase를 첨가하여 37°C에서 1시간 배양한 후 0.8% agarose gel상에서 DNA band를 확인하였다.

현삼식물체에 CGST 유전자가 도입되는지를 확인하기 위하여 TOUCHDOWN™ (HYBRID)을 사용하였으며 분석조건은 Table 1과 같다.

증폭된 DNA는 1.5% agarose gel 상에서 전기영동한 후 EtBr (ethidium bromide)로 염색하여 UV를 통해 DNA band를 확인하였다.

암처리에 따른 형질전환 효율 증진

현삼을 대상으로 하는 CGST 유전자 형질전환에서 형질전환 효율을 증가시키기 위하여 형질전환체 선발과정에서 치상 조직을 암상태로 0, 15, 30, 45, 60, 75일로 처리하였으며 각 처리구의 재분화된 식물체를 대상으로 하여 각각 10개의 식물체를 무작위로 선발하여 PCR 분석을 통하여 형질전환율을 확인하였다.

Table 1. The optimal amplification condition of PCR analysis in *Scrophularia buergeriana*.

Mixture of reaction	Primer	Condition of reaction
Template DNA 10 ng 2.5 μM primer 1.25 mM dNTP 10 × buffer (with MgCl ₂ BIOTOOLS), Taq polymerase (BIOTOOLS)	Gh-5-1 (5'-ATTATGCTGAGTGATATCCCGCT-3') Gh-5-2 (5'-TGGTCA AGAGCCAAGAAATA-3')	Denaturation (94°C 1 min) Annealing (55°C 1 min) Extension (72°C 1 min 30 sec) : 35 cycles Post-elongation (72°C 10 min)
Total volume 25 μL		

형질전환체 CGST 효소 활성 측정

CGST 유전자로 형질전환된 현삼 식물체에서의 GST 효소 활성과 성장조절물질 처리에 따르는 GST 활성의 변화를 조사하기 위하여 무처리의 control 식물체와 형질전환된 현삼 식물체를 직경 5 mm의 cork bore를 사용하여 잎절편체를 채취한 후 성장조절물질인 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)를 각각 5, 10, 50, 100, 500 μ M를 포함하고 있는 배양액 [10 mM Hepes (pH 7.5), 0.1 mM $CaCl_2$, 0.5 mM KCl] 내에서 암상태에서 배양하였다. 처리 시간은 6, 12, 24, 48시간으로 하여 조건을 달리하였다.

각각의 처리에서 GST 효소활성의 변화를 조사하기 위하여 Dean 등의 방법 (1990)에 따라 조효소액의 추출 및 GST 활성 검정을 실시하였다. 무처리, 형질전환체, 성장조절물질을 시간에 따라 처리한 시료를 액체질소로 냉각시킨 유발을 이용하여 마쇄한 후 0.1 M의 sodium phosphate buffer 300 μ L가 들어있는 튜브에 넣고 원심분리하였다 (12,000 rpm, 10 min, 4°C). 효소의 활성 검정은 일반적인 GST의 기질로서 사용되는 CDNB (4-chloro-2,4-dinitrobenzene)를 사용하였으며 20 mM의 CDNB, 20 mM의 GSH (glutathione reduced form) 및 조효소액이 포함되어 있는 0.1 M의 sodium phosphate buffer를 사용하였으며 반응액의 총량은 1 mL로 하였다. 반응은 반응액에 조효소액을 가한 직후에 개시되었으며 340 nm에서 반응초기 6분간 흡광도 변화를 검정하였다. 단백질 농도의 측정에는 Bradford assay를 사용하여 수행하였다.

항미생물 활성검정

CGST 유전자로 형질전환된 식물체로부터 추출된 조효소액의 항미생물 활성을 시험하기 위하여 96 well micro assay plate 방법을 변형하여 사용하였다. 사용된 균주는 모두 비병원성 균주를 사용하였으며 효소활성측정법에서와 같이 잎절편에 inducer인 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid)를 각

각 5, 10, 50, 100, 500 μ M로 6시간과 12시간으로 나누어 처리하여 GST효소의 발현을 높게 한 후 항미생물 활성을 시험하였다. 박테리아에 대한 항균 시험은 피검균으로 *Bacillus subtilis*를 이용하였으며 피검균을 LB배지 (Bactotryptone 10 g + Yeast extract 5.0 g + NaCl 10 g) 10 mL를 직경 25 mm 시험관에 접종하여 28°C에서 12시간 동안 배양하였고 얻은 현탁액을 LB배지에 200배로 희석하여 항박테리아 시험에 사용하였다. 형질전환된 식물체의 단백질을 96 well micro assay plate의 제 1번째 구에 1000 ppm의 농도로 넣고 조제된 균체현탁액을 분주하여 2배씩 희석하여 1000 ppm부터 7.8 ppm까지 변화하여 사용하였다. 이것을 28°C에서 24시간 동안 암조건에서 배양하면서 박테리아의 생육을 억제하는 최저농도인 최소억제농도 (MIC, minimum inhibitory concentration)를 구하였다. 효모에 대한 항균 시험은 피검균으로 *Saccharomyces cerevisiae*는 YM (Dextrose 10 g + Yeast extract 3.0 g + Peptone 5 g + Malt extract 3 g)을 사용하여 항효모활성을 실시하였으며 방법은 박테리아에서와 동일하게 수행하였다. 곰팡이에 대한 항균 시험은 *Asperigillus awamori*, *Cladosporium herbarum*을 사용하였으며 곰팡이 배양용 PDB Slant에 곰팡이 포자발아저해시험용 배지 (0.2% glucose, 0.1% yeast extract, 0.1% citric acid, 0.37% $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) 2 mL를 첨가하여 유리병으로 상기 곰팡이 포자를 분리시키고 이를 다시 가제로 여과한 다음 여과액을 96 well plate의 구에 100 μ L씩 분주하고 50개의 포자가 관찰될 때까지 희석한 다음 형질전환된 식물체로부터 추출한 단백질을 농도별로 희석하여 96 well plate에 첨가하였다. 27°C에서 24시간 동안 암배양 후 현미경으로 포자발아가 저해되는 형태와 농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

현삼의 잎조직과 줄기조직을 여러 가지 성장조절물질이 첨

Table 2. Effect of NAA, 2,4-D and TDZ on the regeneration and growth of shoots from leaf and stem explants of *Scrophularia buergeriana* after 45 days.

Growth regulators (mg/L)		No. of shoot		Shoot length (mm)	
		Leaf explant	Stem explant	Leaf explant	Stem explant
NAA	0.01	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.10	0.1±0.1	0.0	7.9±7.9	0.0
	2.00	0.0	0.0	0.0	0.0
2,4-D	0.01	0.1±0.1	2.2±1.5	4.4±4.4	13.0±6.9
	0.10	0.0	0.0	0.0	0.0
	2.00	0.0	0.0	0.0	0.0
TDZ	0.01	1.5±0.7	5.8±1.7	6.8±2.9	28.0±7.1
	0.10	2.1±0.6	8.8±0.9	13.9±4.0	31.0±3.9
	2.00	0.6±0.3	9.0±2.9	5.7±2.6	23.2±5.3
LSD (5%)		0.7	3.1	8.7	10.0

Table 3. Effect of combination treatment with 2,4-D and TDZ on the regeneration and growth of shoots from leaf and stem tissue of *Scrophularia buergeriana* after 45 days.

Growth regulators (mg/L)		No. of shoot		Shoot length (mm)	
2,4-D	TDZ	Leaf explant	Stem explant	Leaf explant	Stem explant
0.01	0.01	0.8±0.3	3.3±0.5	28.0±7.1	21.3±4.8
	0.10	2.5±0.6	4.3±0.8	31.0±3.9	21.5±1.9
	2.00	2.0±1.4	4.0±1.1	23.2±5.3	25.8±5.0
0.10	0.01	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.10	0.0	0.0	0.0	0.0
	2.00	0.0	1.0±1.0	0.0	1.8±1.8
2.00	0.01	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.10	0.0	-	0.0	-
	2.00	0.0	0.0	0.0	0.0
LSD (5%)		1.5	1.7	7.8	7.4

Table 4. Kanamycin resistance of leaf explant in *Scrophularia buergeriana*.

Kanamycin (mg/L)	No. of leaf	No. of survival explant
0	30	18
50	30	4
100	30	0
150	30	0
200	30	0

가된 MS배지에 치상하였을 때 NAA, 2,4-D에서보다 TDZ에서 가장 많은 신초분화를 보이는 것으로 나타났다. 신초 수에 있어서는 줄기를 치상하였을 때 현저하게 많은 수가 나타나는 것을 볼 수 있었고 신초의 길이도 잎을 치상했을 때보다 줄기를 치상했을 때 생장조절물질의 농도에 별다른 관계없이 더 길었다 (Table 2). Thdiazuron (N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5yl-urea)을 사용하였을 때 사과 (Nieuwkerik et al. 1986)와 까마중 (Yu et al. 1994) 등의 많은 식물체의 배양에서와 마찬가지로 다른 사이토키닌들보다 줄기분화에 더 효과적이라는 보고와 같은 결과를 얻었다.

2,4-D와 TDZ을 조합 처리한 MS배지에 현삼의 잎과 줄기 조직을 치상한 결과 낮은 농도의 auxin인 2,4-D 0.01 mg/L와 cytokinin인 TDZ (0.01, 0.1, 2.0mg/L)이 조합처리 시

shoot 분화가 좋았으나, 2,4-D의 농도가 높아질수록 TDZ과 조합처리 시 shoot 분화가 잘되지 않는 결과를 보였다 (Table 3).

항생제 kanamycin에 대한 식물체의 저항성을 알기 위하여 MS + 1 mg/L BAP + 0.1 mg/L NAA 배지에 kanamycin 0, 50, 100, 150, 200 mg/L를 첨가하여 잎 절편체를 치상한 후 21~28일간 배양한 결과 kanamycin 50 mg/L가 첨가된 배지에서 분화가 급격히 감소하고 kanamycin 100 mg/L가 첨가된 배지에서는 분화가 되지 않았다 (Table 4). 이러한 결과로부터 형질전환 시 선발을 위하여 kanamycin 농도를 50 mg/L보다 높은 농도로 사용해야 할 것으로 생각된다.

*Agrobacterium*을 접종한 잎절편체는 4주 후 선발배지에서 캘러스가 형성되었으며 8주 후 줄기분화가 되었다 (Figure 2A). 0.5~1 cm로 자란 줄기를 1/2 MS + Km 20 mg/L로 조성된 발근배지로 옮겨 뿌리를 유도하였으며 (Figure 2B) 기외에 순화하였다 (Figure 2C).

발근배지로 옮겨 3주 후 일정하게 자란 재분화 식물체의 genome에 외래의 DNA (CGST)가 정상적으로 삽입되었는지의 여부를 확인하기 위하여 PCR 분석을 수행한 결과 kanamycin 50 mg/L 첨가된 배지에서 선발된 재분화 식물체에서 C-GST 유전자를 포함한 *Agrobacterium*의 PCR product와 동일한 988 bp의 PCR 산물의 증폭을 확인하였다.

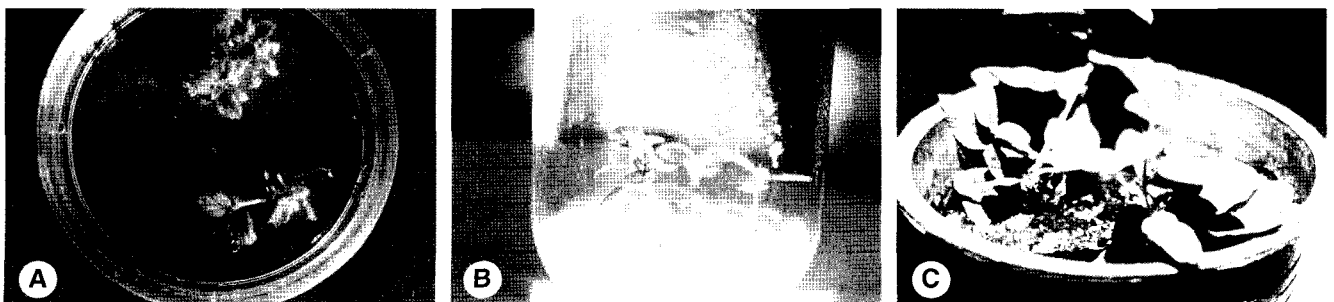


Figure 2. Transgenic shoots transformed with GST in *Scrophularia buergeriana* (A) and plantlets regenerated on 1/2 MS medium (B). Transgenic plantlets transferred in pot (C).

그러나 형질전환되지 않은 식물체에서는 특이적인 증폭산물이 존재하지 않았다 (Figure 3). 이러한 결과는 CGST 유전자가 현삼의 염색체 안으로 삽입되었음을 확인하는 것이며 추후에 Southern blot analysis 등을 이용한 분자생물학적 검정을 수행하여야 할 것이다.

형질전환 효율 증진을 위하여 암처리를 수행한 결과 선발 과정에서 암상태를 30일까지 유지할 경우 높은 형질전환 효율을 나타내었다. 형질전환 효율증대를 위한 암처리는 30일간 처리가 가장 적당하였으며 그 이상의 처리는 오히려 형질전환 효율이 감소하는 결과를 나타내었다 (Table 5).

형질전환된 식물체의 GST 효소 활성을 검정한 결과 유도체 처리를 하지 않은 경우 형질전환된 식물체는 CDNB 기질에 있어서 대조구 식물체보다 약 2배 정도의 GST 활성 증가를

보여 주어 GST 유전자가 현삼 식물체 내로 도입되었다고 사료된다. 식물체에 따라서 GST 유전자를 활성화시킬 수 있는 유도체의 농도가 존재하며 유도체 농도가 일정한 농도 이상이 되면 저해 활성을 갖는다는 보고 (Droog et al. 1995)를 기초로 진행한 실험결과 시간의 차이에 관계없이 기질의 농도가 50 uM일 때 제일 높은 효소 활성을 나타내었으며 그 이상의 농도로 처리되었을 경우 GST 활성이 점차적으로 감소하였다. 유도체 처리하였을 때 시간에 따른 활성을 조사한 결과 모든 농도에서 12시간까지는 효소활성이 점차적으로 증가되어 12시간 되었을 때 제일 높은 활성을 나타냈으며 그 이상의 시간처리에서는 점차적으로 감소하는 것을 보여주었다 (Figure. 4).

GST 유전자로 형질전환 현삼 식물체의 항미생물 활성 검정에 사용된 모든 균주들은 비병원성 균주를 사용하였으며 이러한 균주들은 실제로 현삼에 병을 일으키지는 않지만 GST 효소가 과도발현된 식물체에서 뽑아 낸 조효소 액이 실제로 어떤 미생물의 성장을 억제할 수 있는지의 여부를 확인하기 위하여 수행되었다. Fungus 피검균인 *Asperigillus awamori*에서 형질전환 식물체와 형질전환되지 않은 식물체의 활성은 같은 수준으로 나타났으며 6시간 처리에서는 균사의 굵기가 가늘고 색깔이 검게 나타났고 12시간 처리에서는 plate의 중간에서 멀어져 주위에 균사가 붙어 있었고 가운데가 검은 색깔을 나타내었다. 6, 12시간 처리 시 비교적 높은 활성을 보여주었으며 그 이상의 시간처리에서는 명확한 균사 억제를 나타내지 못하였으며 특히 12시간에서 상대적으로 높은 활성을 나타내었다. *Cladosporium herbarum*에서 형질전환된 식물체의 활성이 훨씬 높게 나타났으며 유도체 처리에서는 균을 멍치게 하여 균사체 성장을 억제하였으며 6시간 처리에서 다른 처리에 비하여 높은 활성을 나타내었다. 피검균인 *Saccharomyces cerevisiae*에서는 형질전환 식물체에서 높은 활성을 보여주었으며 6, 12시간 처리에서 비슷하게 높은 활성을 보여 주었다. 박테리아 피검균 *Bacillus subtilis*에서는 형질전환 식물체가 형질전환 되지 않은 식물체보다 2배 가량의 활성을 보여 주었으며 낮은 농도인 50 μM 이하의 유도체 처리에서 비교적 높은 활성을 나타내었다 (Table 6).

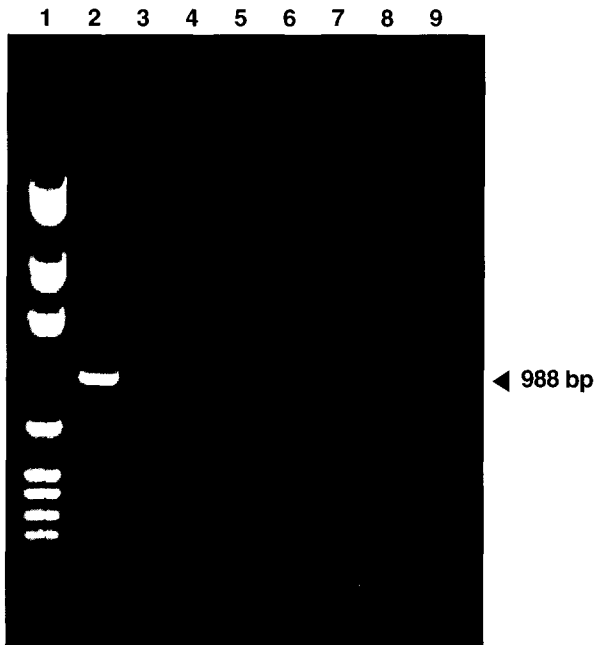


Figure 3. Electrophoresis patterns of PCR products from non-transgenic and transgenic plants of *Scrophularia buergeriana*. Lane 1, pGEM marker DNA; Lane 2, PCR product of C-GST gene; Lane 3, non-transformant plant (control); Lane 4~9, putative transformants plants selected in medium containing Km 50 mg/L.

Table 5. Influence of exposure to darkness on the regeneration potential and transformation frequency. Explants were cocultivated on feeder plates for 3 days and then transferred to the selection medium. Explants were exposed to darkness for 0, 15, 30, 45, 60, 75 days and then transferred to a 16-h photoperiod.

Days	No. of culture	No. of callus (%)	No. of plant regenerants (%)	No. of transgenic plants (confirmed PCR products)
0	180	56 (31)	50 (28)	1
15	230	40 (17)	35 (15)	2
30	200	50 (25)	40 (20)	8
45	210	42 (20)	21 (10)	3
60	250	38 (11)	20 (8)	0
75	190	19 (10)	8 (4)	0

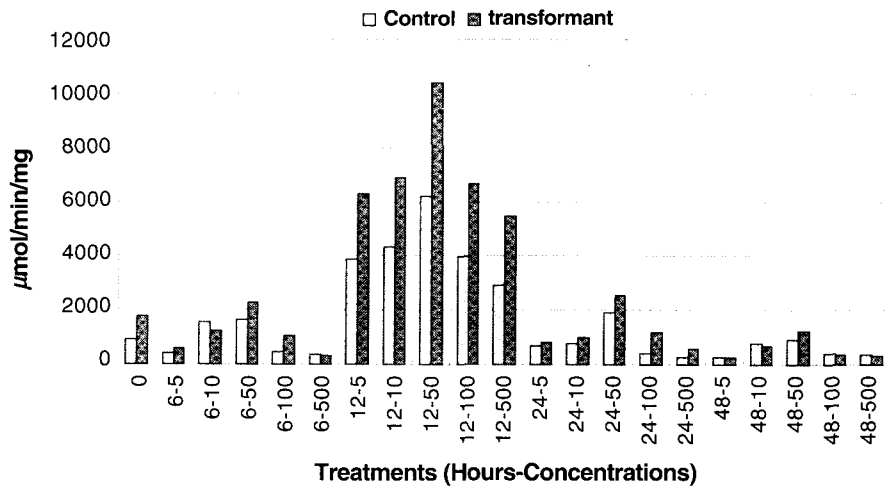


Figure 4. Effect of inducer (2,4-D) concentration and treated time on GST activity in control and transgenic plants of *Scrophularia buergeriana*.

Table 6. Antimicrobial activity of control and transgenic plants by hour-concentration (H-C) of inducer (2,4-D) treatment in *Scrophularia buergeriana*.

H-C	Antimicrobial activity (MIC ^{**} : ppm)							
	<i>A. awamori</i>		<i>C. herbarum</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>B. subtilis</i>	
	Control	Transformant	Control	Transformant	Control	Transformant	Control	Transformant
0	12.5	12.50	25.00	3.13	25.0	6.25	12.5	6.25
6-5	25.0	12.50	6.25	6.25	25.0	12.50	100.0	25.00
6-10	25.0	6.25	12.50	1.56	50.0	6.25	50.0	25.00
6-50	50.0	0.78	25.00	0.78	25.0	6.25	100.0	12.50
6-100	50.0	6.25	25.00	12.50	50.0	12.50	100.0	12.50
6-500	100.0	12.50	100.00	25.00	100.0	50.00	100.0	25.00
12-5	50.0	1.56	100.00	12.50	12.5	3.13	50.0	6.25
12-10	12.5	1.56	50.00	12.50	25.0	3.13	50.0	3.13
12-50	12.5	1.56	25.00	6.25	25.0	12.50	25.0	3.13
12-100	25.0	3.13	25.00	3.13	50.0	25.00	100.0	50.00
12-500	50.0	6.25	50.00	25.00	50.0	50.00	100.0	100.00

MIC^{**}: The MIC value against bacteria, yeast and fungi was determined by the serial 2-fold dilution method. The growth of bacteria and yeast was evaluated by the degree of turbidity of the culture with the naked eye. The spore germination of fungi was examined under a microscopy.

적 요

현삼의 기내배양에서 TDZ처리가 비교적 재분화에 효율적이었고 형질전환 식물체를 선발하기 위하여 선발표지 유전자로 사용되는 NPT II gene이 항생제 kanamycin에 대한 저항성은 50 mg/L가 적당하였다. 선발배지에서 자란 현삼 식물체에서 DNA를 추출하여 PCR 분석을 통하여 특정 유전자 Gh-5 gene을 검정한 결과 형질전환되지 않은 식물체에서는 볼수가 없는 988 bp의 band가 형질전환된 식물체에서는 관찰되어 GST 유전자가 현삼의 염색체 안으로 삽입되었음을 확인하였다. 형질전환 효율 증진을 위하여 선발과정에서 암상태를 30일까지 유지할 경우 높은 형질전환 효율을 나타내었으나 그 이상의 처리는 오히려 형질전환 효율이 감소하는 결과를 나타내었다 (Table 5). 형질전환 식물체에서 GST의 활성

이 형질전환 되지 않은 식물체의 2배로 나타났고 유도체의 적정 처리 농도는 50 µM이며 유도체 처리 시간에 따라서는 12시간까지는 점차적으로 높아지는 경향이었으나 그 이상의 시간에서는 활성이 저하됨이 확인되었다. Fungus 피검균인 *Asperigillus awamori*에서 6, 12시간 처리 시 비교적 높은 활성을 보여주었으며 그 이상의 시간처리에서는 명확한 군사역제를 나타내지 못하였으며, 특히 12시간에서 상대적으로 높은 활성을 나타내었다. *Cladosporium herbarum*에서 형질전환된 식물체의 활성이 훨씬 높게 나타났으며 6시간 처리에서 다른 처리에 비하여 높은 활성을 나타내었다. 피검균인 *Saccharomyces cerevisiae*에서는 형질전환 식물체에서 높은 활성을 보여주었으며 6, 12시간 처리에서 비슷하게 높은 활성을 보여 주었다. 박테리아 피검균 *Bacillus subtilis*에서는 50 µM 이하의 유도체 처리에서 비교적 높은 활성을 나타내었다.

사사 - 본 연구는 한국학술진흥재단의 1998년도 국내 Post-Doc. 연수지원의 결과입니다.

인용문헌

- Allen RD** (1995) Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* **107**:1-7
- Allen RD, Sen-Gupta A, Webb RP, Holaday AS** (1994) Protection of plants from oxidative stress using SODtransgenic: Interaction with endogenous enzyme. In *Frontiers of reactive oxygen species in Biology and Medicine*. Asada K, Yosikawa T(eds). Exerpta Medica, Amsterdam. 321-322
- Barz W, Bles W, Borger-Pappendorf G, Gunia W, Mackenbrock O, Meier DE, Otto CH, Super E** (1990) Phytoalexin as part of induced defence reaction in plants: their elicitation, function, and metabolism. In *Bioactive Compounds From Plants*, C. F. Van Sumere and P. J. Leen 140-156
- Coles B, Ketterer B** (1990) The role of glutathione and glutathione S-transferase in chemical carcinogenesis. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **25**:47-70
- Dean VJ, Gronwald JW, Eberlein CV** (1990) Induction of glutathione S-transferase isozyme in sorghum by herbicide antidotes. *Plant Physiol.* **92**:267-473
- Droog FNJ, Hooykaas PJJ, Van der Zaal EJ** (1995) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and realated chlorinated compounds inhibit two auxin-regulated gene type III tobacco GSTs. *Plant Physiol.* **107**:1139-46
- Edwards R, Dixon RA** (1991) Glutathione S-Cinamoyl transferases in plants. *Phytochemistry* **30**:79-84
- Hernalsteens JP** (1980) The *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid as a host vactor system for introducing foreign DNA in plant cells. *Nature* **287**:654-656
- Katoaka JH, Habuka N, Furuno M, Miyano M.** (1991) DNA Sequence of Mirabilis antiviral protein (MAP) a ribosome-inactivating protein with an antiviral property, from *Mirabilis jalapa* L. and Its expression in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **226(13)**:8426-8430
- Mannervik B** (1985) The isozymes of glutathione S-transferases. *Adv. Enzymol. Relat. Ares. Mol. Biol.* **57**:357-417
- Nieuwkerik JP, Zimmerman RH, Forman I.** (1986) Thidiazuron stimulation of apple shoot propagation in vitro. *Horticulture* **21**:516-518
- Pickett CB, Lu AY.** (1989) Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. *Annu. Rev. Biochem.* **59**:61-86
- Yu, CY, Chae YA, Ahn SD, Cho, DH** (1994) Effect of thidiazuron on regeneration from Long-term cultuerd callus of solanum spp. *K. J. Med. Crop Sci.* **2(1)**:39-43
- 김규원, 백기화, 정근식, 정재동, 최광태 (1996) 식물조직배양 기술 (4):p27-28, p53-54
- 육창수 (1989) 原色韓國藥用植物圖鑑. 아카데미서적
- 최영전 (1994) 약초이용과 재배. 오성출판사

(접수일자 2001년 11월 1일)