

## 알칼리 상해에 의한 순무 유묘에서의 일시유전자 발현 증대

신동일 · 박희성\*

대구가톨릭대학교 생명공학과

# Enhancement of Transient Gene Expression in Turnip Seedlings by Alkali Injury

Dong-Il Shin and Hee-Sung Park\*

Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Kyungsan Kyungbuk 712-702, Korea

Received October 31, 2007; Accepted November 14, 2007

**Key words:** Alkali injury, ELISA, GUS, transient expression, turnip seedling

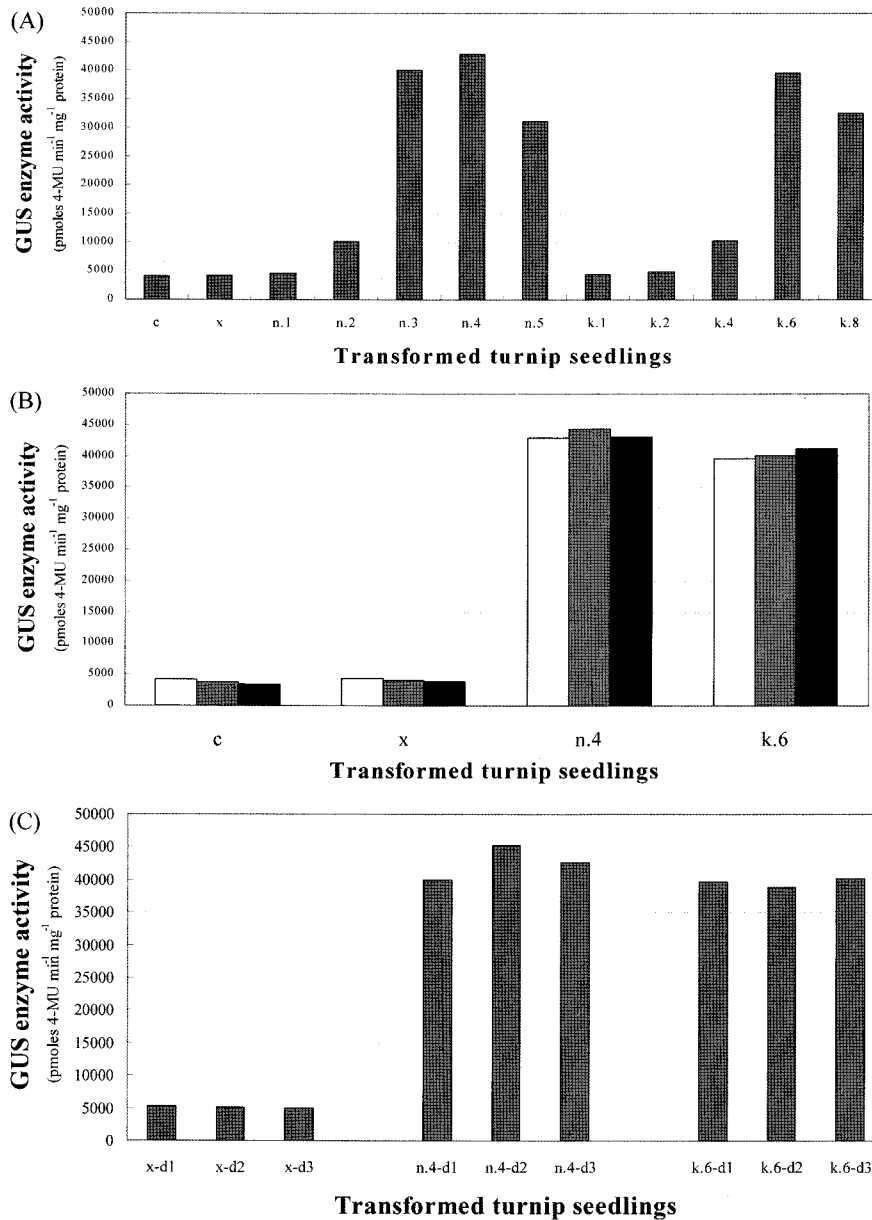
*Brassica* 작물들 중에서 채소용 또는 동물 사료용으로 재배 되는 순무(*Brassica campestris* L. var. *rapifera*)는 주로 뿌리 부위가 이용되는데 순무의 어린 싹은 근래 새싹채소(sprout vegetable)로서도 애용되고 있다. 많은 종류의 *Brassica* 식물들은 그 산업적 중요성(유지 및 식용)으로 인하여 이들에 대한 신품종 제조와 관련한 분자유종 연구가 꾸준히 이어져 왔으며 이를 위한 *Agrobacterium* 등을 이용한 형질전환연구가 지속적으로 보고되어 왔다.<sup>1-4)</sup> 한편, 유지용의 *B. napus*나 *B. campestris*에 비해서 순무의 경우에는 상대적으로 형질전환 관련연구가 매우 적은 편인데<sup>5)</sup> 단 기간에 걸쳐 경제적으로 재배할 수 있는 순무 유묘의 장점 및 효율적 형질전환방법의 개발을 가정할 경우 일시발현을 통한 재조합단백질 생산용 biofactory로서도 기대해볼 수 있다. 식물을 이용한 일시발현은 particle bombardment, electroporation, *Agrobacterium*, 또는 바이러스 벡터 방법들 중 적절한 수단을 이용하여 유전자도입을 수행할 수 있는데 근래에는 상당한 시간과 비용이 소요되는 형질전환식물을 이용한 분자유종을 대신하려는 목적으로도 수행되고 있다.<sup>6-8)</sup> 일시발현은 주로 담배 잎이나 담배식물체를 이용하지만<sup>9,10)</sup> 식용으로 적합하지 않다는 점으로 인하여 특히 식용백신의 생산 등에는 고려되지 않고 있다.

본 연구에서는 agroinfiltration<sup>11)</sup> 방법을 이용하여 순무 유묘에서의  $\beta$ -glucuronidase(GUS) 유전자의 일시발현을 분석하였다. 즉, 알칼리 상해(alkali injury)를 가한 순무 유묘와 그렇지 않은 유묘에 대하여 agroinfiltration를 수행하여 결과적인 형질전환 효율을 GUS효소 활성으로 비교하였다. 현재까지 세포벽에 대한 인위적 상해(초음파, 미세 견고임자, 효소, 산화/환원제 등의 이용)가 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환 효율을 증가시킬 수 있

다는 보고가 있으나<sup>12-15)</sup> 본 연구에서는 NaOH 등의 알칼리 처리가 식물 세포벽에 화학적 상해를 일으킬 수 있다는 점을 이용하였다.<sup>16)</sup> 먼저 알칼리에 의한 유묘의 성장저해 정도를 분석하였다. 순무(*Brassica campestris* L. var. *rapifera*) 종자를 실온에서 24 hr 침지 후 0.4% sodium hypochlorite 용액으로 표면 살균처리하고(3 min) 멸균수로 2 회 세척하였으며 생육장치(25°C, 암 조건)에 파종하였다. 발아 후 2일 째의 순무유묘에 대하여 NaOH(0.1-1.0%)와 KOH(0.1-1.0%) 용액을 처리(3 min) 후 증류수로 충분히 세척하고 생육장치로 옮겼다. 이 후 5일간의 생육기간이 경과했을 때 순무 유묘의 성장 상태를 육안으로 또는 생중량으로 분석하였다. 동일한 농도 처리 시 KOH가 NaOH에 비해 생육억제가 적은 편으로 나타났으며 0.8% KOH와 0.5% NaOH의 처리 결과 무처리 군의 30% 정도 생중량의 감소가 측정되었다. 그러나 이들 농도보다 높은 경우 심한 생육저해가 초래됨으로써(자료 미제출) KOH의 경우 0.8% 또는 그 이하 그리고 NaOH는 0.5% 또는 그 이하 농도의 처리를 결정하였다.

Fig. 1(A)에는 발아 후 2일 째의 유묘에 대하여 KOH 및 NaOH를 농도별로 처리 후 agroinfiltration 및 3일간의 유묘 생장(동시배양 기간) 후 GUS효소 활성을 측정된 결과가 나타나 있다. 이를 위하여 GUS reporter gene을 지니는 pBI121 (Clontech, USA)을 지니는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 배양하였으며(18 hr, 28°C, 220 rpm), 배양액 1 ml을 10 g 정도의 알칼리를 처리한 또는 처리하지 않은 순무 유묘를 담은 100 ml의 1/2×MS배양액에 섞고 vacuum-infiltration(10 min)을 시행하였다. 알칼리 처리 유묘의 경우 agroinfiltration 이전에 증류수로 충분히 세척 후 1/2×MS배지(pH 5.7)로 2회 세척하여 준비하였다. Agroinfiltration 이후 유묘는 paper towel을 이용하여 물기를 충분히 제거시켰으며 곧 clean bench 내에서 air-dry(30 min)를 거쳐 생육장치(25°C, 암 조건)에 옮겼다. 이 후 3일이 경과했을 때 0.4% sodium hypochlorite 용액으로 표면살균

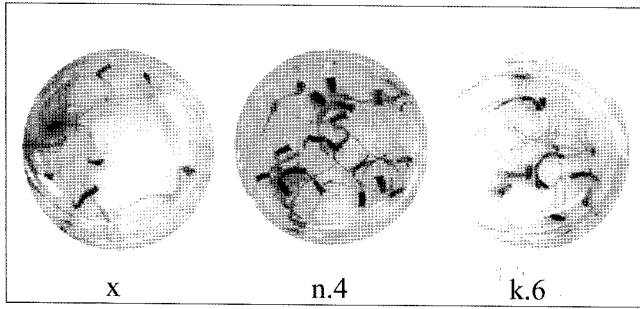
\*Corresponding author  
Phone: +82-53-850-3245; Fax: +82-53-3548  
E-mail: hspark@cu.ac.kr



**Fig. 1. Fluorometric analysis of GUS enzyme activity in transformed turnip seedling.** A. Two day-old turnip seedlings with or without NaOH or KOH treatment were agroinfiltrated, grown for 3 days of cocultivation and then analyzed for GUS enzyme activity. c, non-transformed seedling; x, transformed seedling; n.1-n.5, transformed seedlings treated with NaOH (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5%); k.1-k.8, transformed seedlings treated with KOH (0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8%). B. Two day-old turnip seedlings with or without 0.4% NaOH or 0.6% KOH treatment were agroinfiltrated, grown for 3 (white bar), 5 (grey bar), 7 (black bar) days of cocultivation and then analyzed for GUS enzyme activity. C. One, two and three day-old seedlings (d1, d2 and d3, respectively) with or without 0.4% NaOH or 0.6% KOH treatment were agroinfiltrated, grown for 5 days of cocultivation and then analyzed for GUS enzyme activity.

처리하고(5 min) 멸균수로 2회 세척 후 GUS 발현을 분석하였다. GUS효소의 형광분석<sup>17)</sup>을 위하여 순무유묘를 cold GUS extraction buffer(50 mM NaPO<sub>4</sub> [ph 7.0], 10 mM EDTA, 0.1% sarkosyl, 0.1% Triton X-100, and 10 mM DTT)에 넣어 균질화 후 원심분리(14,000 rpm, 5 min, 4°C, 2회)에 의하여 얻은 상등액을 이용하였다. 10 µl의 상등액을 90 µl의 assay buffer (1 mM 4-methylumbelliferyl β-D-glucuronide를 포함한 extraction buffer)와 섞고 반응(37°C, 3 hr)시켰으며 이어서 200 µl의 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>을 첨가하여 반응을 종료시킨 후 microtiterplate reader (PerkinElmer VIVTOR 3, USA) 를 사용하여 분석하였다. 단백질

질 정량은 Bio-Rad protein assay용액을 이용하여 결정하였다. 실험적 오차를 줄이기 위해 각 실험은 독립적으로 3회 실시한 후 나타난 수치를 평균하였다. 분석 결과 비형질전환 유묘의 경우 평균 4152 pmoles 4-methylumbelliferone(4-MU) min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein이 측정되었으며 알칼리 상태를 거치지 않은 형질전환 유묘 또한 비슷한 수준(4224 pmoles 4-MU min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein)으로 측정됨으로써 *Agrobacterium*에 의한 형질전환이 순무유묘를 대상으로 하는 경우 쉽지 않다는 것을 제시하고 있었다. 한편 NaOH 처리 시 0.2% 농도에서부터 유의적인 GUS 효소 활성의 증가가 관찰되었는데 0.4% NaOH 처리 시 42885



**Fig. 2. Histochemical GUS staining of transformed turnip seedling.** Two day-old turnip seedlings were agroinfiltrated, grown for 5 days of cocultivation and then analyzed for GUS enzyme activity by histochemical staining. x, transformed seedling; n.4, transformed seedling with 0.4% NaOH treatment; k.6, transformed seedling with 0.6% NaOH treatment.

pmoles 4-MU min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein로 나타났다. 0.5% NaOH에서는 이보다 감소한 수치가 나타났는데 비교적 고 농도인 NaOH에 의한 유묘의 성장저해와 관련된 것으로 보고 있다. KOH의 경우에도 0.6-0.8% 처리 시 형질전환효율이 상당히 증가되는 것으로 측정되었으나 NaOH 처리와의 비교 시 그 효과는 약간 낮은 편이었다. 이러한 결과는 무처리 형질전환유묘체에 비해 NaOH나 KOH처리 시 10배 정도의 GUS효소 활성 증가를 계산할 수 있다. 또한 비형질전환 유묘의 background 수준을 감안하여 이를 제외할 경우 알칼리 상해에 의한 효과는 10배 보다 훨씬 높을 것으로 추정할 수 있다. 이러한 결과는 순무 유묘에 대하여 생육저해를 최소한으로 하는 일정 농도의 NaOH나 KOH 용액을 처리 시 유묘체 외부의 전반적 세포벽의 용해, 이에 따른 화학적 상해 발생, 이를 통한 보다 효율적인 *Agrobacterium* 감염 그리고 결과적인 형질전환효율의 증가로 이해할 수 있다. Agroinfiltration과정을 거친 순무유묘의 단기 재배 및 동시배양과정에서는 kanamycin 등을 이용한 형질전환 세포의 선별과정을 거치지 않음으로 결국 도입 유전자의 일시적 발현을 고려할 수밖에 없다. 따라서 일정한 유전자발현율의 지속기간의 결정 및 이에 따른 유묘 수확기의 결정이 중요할 것이다. Fig. 1(B)에서는 agroinfiltration과정 후 3-7일 생육기간 동안의 GUS 발현에 의한 효소 활성을 나타내고 있다. 결과적으로, 실험 기간 중에는 발현정도의 변화가 크게 나타나지 않음으로써 발아 후 형질전환 순무의 수확까지 10일 정도 기간 소요가 예상되는 바이다. 한편, 발아 후 2일 째의 순무유묘를 대상으로 한 알칼리 상해의 생육저해를 결정한 바 있으나 적정 농도의 알칼리 처리 시 유묘의 나이 별 반응 및 형질전환율 (seedling age-dependent transformation efficiency)의 차이를 의심할 수 있다. 이를 위하여 발아 후 각 1, 2 또는 3일 째의 유묘에 대하여 각각 0.4% NaOH 및 0.6% KOH를 처리 후 agroinfiltration 및 5일 간의 생육/동시배양을 거쳐 GUS 효소 활성을 측정하였다. 그 결과는 Fig. 1(C)에 나타나고 있다. 발아 후 3일 동안의 기간 내에서는 그 시기에 관계 없이 거의 동일한 알칼리 상해효과가 나타났는데 이는 순무유묘에 대한 알칼리 처리 시기의 유연한 선택을 제공한다고 볼 수 있다. Fig. 2는 순무 유묘체에 대한 histochemical GUS staining<sup>17)</sup>을 실시

한 결과를 보이고 있다. 이를 위하여 sodium hypochlorite용액을 이용한 유묘체를 표면살균 후 cold 70% acetone 처리(30 min)를 실시하고 이들을 GUS substrate 용액(100 mM sodium phosphate pH 7.0, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 0.1% Triton X-100, 1 mM EDTA, X-GlcA 5 mg/10 ml)에 담겨 37°C에서 반응시켰다. 예상한 바와 같이 단순 형질전환 유묘의 경우 발색반응이 거의 나타나지 않고 있는 반면 0.4% NaOH나 0.6% KOH를 처리 유묘는 강한 발색현상이 잘 나타나는 것이 관찰됨으로써 알칼리 상해에 의한 형질전환효율 증대 효과를 재차 확인해 주고 있다.

형질전환 식물체를 이용한 재조합단백질의 생산 즉, 분자농업에서의 주요 쟁점 중의 하나는 단백질 발현 정도의 고저와 단백질 정제과정의 난이도를 꼽을 수 있다.<sup>18)</sup> 발현수준의 정량적 분석을 위하여 hepatitis B virus surface antigen(HBsAg) DNA를 지니는 pBIHBsAg를<sup>19)</sup> 0.4% NaOH 처리를 거친 발아 후 2일 째의 순무유묘에 agroinfiltration방법으로 도입하고 5일의 생육 기간 후 HBsAg 단백질 생산량을 측정하였다. 이를 위하여 형질전환 유묘는 extraction buffer(20 mM sodium ascorbate, 0.1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 × protease inhibitor[Roche])에 담아 균질화 및 원심 분리(12,000 g 15 min, 4°C) 후 그 상등액을 ELISA reader (Abbott IMx system, USA)로 측정하였다. 그 결과 총 용해단백질의 0.01% 정도로 측정되었으며 무처리 형질전환유묘체의 경우 background 수준으로 나타났다. 이러한 수치는 산업적 적용을 감안할 때 못 미치는 수준이다.<sup>18)</sup> 그러나 형질전환식물의 제조 및 단백질 생산체계와의 비교 시 1-2주 이내에 종료될 수 있는 일시발현체계임을 감안할 때 현재 형질전환식물을 대상으로 한 다양한 유전자발현 증대 기술(inducible promoter, signal peptide, ER retention signal 등의 적용)의 신속한 적용 및 결과분석을 통한 발현증대를 용이하게 도모할 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 또한 발달단계 상 유묘는 아직 본엽이 출현하지 않은 상태로서 주로 하배축(hypocotyl)과 자엽이 주를 이룸으로 단백질 정제와 관련하여 보다 용이할 수 있을 것으로 내다보고 있다. 결론적으로 알칼리 상해라는 단순한 과정을 적용함으로써 손쉽게 대량으로 단기간 내에 재배할 수 있는 식용의 순무 유묘를 이용하여 앞으로 유전자 발현수준 관련사항을 보완 발전시킴으로써 재조합 의약단백질 등의 경제적 생산에 적용할 수 있을 것으로 기대한다.

## 참고문헌

1. De Block, M., De Brower, D. and Tenning, P. (1989) Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants. *Plant Physiol.* **91**, 694-701.
2. Jun, S. I., Kwon, S. Y., Paek, K. Y. and Paek, K. H. (1995) *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of fertile transgenic plants of chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv 'Spring flavor'). *Plant Cell Rep.* **14**, 620-625.
3. Knutzon, D. S., Thompson, G. A., Radke, S. E., Jhonson, W.

- B., Knauf, V. C. and Kridl, J. C. (1992) Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carries protein desaturase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2624-2628.
4. Mukhopadhyay, A., Armugam, N., Nandakumar, P. B. A., Pradhan, A. K., Gupta, V. and Pental, D. (1992) *Agrobacterium*-mediated transformation of oil seed *Brassica campestris*: transformation frequency is strongly influenced by the mode of shoot regeneration. *Plant Cell Rep.* **11**, 506-513.
  5. Christey, M. C. and Sinclair, B. K. (1992) Regeneration of transgenic kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*), rape (*B. napus*) and turnip (*B. campestris* var. *rapifera*) plants via *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation. *Plant Sci.* **87**, 161-169.
  6. Fisher, R., Vaquero-Martin, C., Sack, M., Drossard, J., Emans, N. and Commandeur, U. (1999) Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **30**, 113-116.
  7. Negrouk, V., Eisner, G., Lee, H. I., Han, K., Taylor, D. and Wong, H. C. (2005) Highly efficient transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce. *Plant Sci.* **169**, 433-438.
  8. Giddings, G. (2001) Transgenic plants as protein factories. *Curr. Opin. Biotech.* **12**, 450-454.
  9. Vaquero, C., Sack, M., Chandler, J., Drossard, J., Schuster, F., Monecke, M., Schillberg, S. and Fisher, R. (1999) Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11128-11133.
  10. Andrews, L. B. and Curtis, W. R. (2005) Comparison of transient protein expression in tobacco leaves and plant suspension culture. *Biotechnol. Prog.* **21**, 946-952.
  11. Bechtold, N., Ellis, J. and Pelletier, G. (1993) In planta *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Acad. Sci. Paris.* **316**, 11941-1199.
  12. Alibert, B., Lucas, O., Gall, L. V., Kallerhoff, J. and Alibert, G. (1999) Pectolytic enzyme treatment of sunflower explants prior to wounding and 동시배양 with *Agrobacterium tumefaciens*, enhances efficiency of transient  $\beta$ -glucuronidase expression. *Physiol. Plant* **106**, 232-237.
  13. Flores Solís, J., Mlejnek, I. P., Studená, K. and Procházka, S. (2003) Application of sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation in *Chenopodium rubrum* L. *Plant Soil Environ.* **49**, 255-260.
  14. Kim, S. S., Shin, D. I. and Park, H. S. (2007) Transient  $\beta$ -glucuronidase expression in lily (*Lilium longiflorum* L.) pollen via wounding-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation. *Biotech. Lett.* **29**, 965-969.
  15. Shin, D. I. and Park, H. S. (2005) Transient expression in Chinese cabbage by hydrogen peroxide-aided agroinfiltration. *Agric. Chem. Biotech.* **48**, 229-230.
  16. Floros J. D., Wetzstein, H. Y. and Chinnan, M. S. (1987) Chemical (NaOH) peeling as viewed by scanning electron microscopy: pimiento peppers as a case study. *J. Food Sci.* **2**, 1312-1316.
  17. Jefferson, R. A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the *gus* gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**, 387-405.
  18. Doran, P. M. (2000) Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr. Opin. Biotech.* **11**, 199-204.
  19. Shin, D. I. and Park, H. S. (2005) Hydrogen peroxide effect on *Agrobacterium*-mediated alfalfa sprouts transformation. *Agric. Chem. Biotechnol.* **48**, 226-228.