

# Organomercurial lyase 유전자를 도입한 환경정화용 형질전환 까마중(*Solanum nigrum*) 선발

최경화<sup>1,2</sup>, 김용호<sup>1\*</sup>, 정현미<sup>1</sup>, 최영임<sup>3</sup>, 노은운<sup>3</sup>, 김현순<sup>4</sup>, 전재홍<sup>4</sup>

<sup>1</sup>국립환경과학원 환경바이오안전과, <sup>2</sup>한국생명공학연구원 바이오평가센터, <sup>3</sup>국립산림과학원 생물공학과,  
<sup>4</sup>한국생명공학연구원 식물유전체연구센터

## Selection of transgenic *Solanum nigrum* L. used environmental remediation expressing organomercurial lyase

Kyung Hwa Choi<sup>1,2</sup>, Yongho Kim<sup>1\*</sup>, Hyen Mi Chung<sup>1</sup>, Young Im Choi<sup>3</sup>, Eun Woon Noh<sup>3</sup>, Hyun Soon Kim<sup>4</sup>,  
and Jae Heung Jeon<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Environmental Biosafety Division, National Institute of Environmental Research, Incheon 404-708, Korea

<sup>2</sup>Bio-Evaluation Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Cheonwon 363-883, Korea

<sup>3</sup>Biotechnology Division, Korea Forest Research Institute, Suwon 441-350, Korea

<sup>4</sup>Plant genome research center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-806, Korea

**ABSTRACT** Methylmercury, an organic derivative, is the principal form of mercury that biomagnifies and causes neurodegenerative symptoms in animals. In recent years, living modified organism (LMO) resulting from biotechnology has played a highly visible and controversial role. Despite the potential benefits of this technology, public concerns have been raised about the environmental risk of LMO. The concern on the risk from LMO release has urged efforts to evaluate and manage the risks of the LMO. To build up the capacity building of risk assessment method for LMO used environmental remediation, we engineered *Solanum nigrum* L., expressing the modified bacterial gene, *merB*, encoding organomercurial lyase. Two independently isolated transgenic lines produced *merB* RNA. Transgenic *Solanum nigrum* leaf discs expressing *merB* gene showed organic mercury resistance, forming shoots well on growth medium containing 0.5  $\mu$ M methylmercury (II) chloride and 1  $\mu$ M phenylmercuric acetate while control plants breached. Transgenic *merB* seeds germinated and grew on growth medium containing 2  $\mu$ M methylmercury (II) chloride and phenylmercuric acetate. The *merB* transgenic plants will be used for risk assessment of natural environment.

### 서 론

미나마타병의 원인물질로 잘 알려진 수은 (Hg)은 자연생태계에서 토양과 하천 등 수계에 낮은 농도로 널리 분포하고

있으나, 산업이 발달함에 따라 방출량이 늘어나고 이로 인해 자연생태계의 먹이사슬에 의한 생물학적 축적 (bioaccumulation)으로 결국 인간에게 강한 독성을 나타내게 된다 (Bizily et al. 2000). 특히, 수은의 위해도는 생태계에 존재하는 형태에 따라 크게 좌우되는데, 유기수은 형태 ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ )로 존재하는 것이 무기수은 형태로 존재하는 것보다 위해도가 크며, 독성은 약 200배 이상 강한 것으로 알려져 있다 (Ruiz et al.

\*Corresponding author Tel 032-560-7495 Fax 032-560-7482

E-mail: gaegury71@me.go.kr

2003). 독성이 강한 유기수은은 자연상태에서 organomercurial lyase (*merB*)에 의해 비교적 독성이 약한 무기수은으로 전환되며, 이러한 무기수은 ( $Hg^{2+}$ )은 수은이온 환원 유전자인 mercuric ion reductase gene (*merA*)에 의해 비독성인 금속 수은 ( $Hg^0$ )형태로 전환된다 (Bizily et al. 1999).

최근에는 광범위한 오염지역 정화에 적용하기 힘든 토목학적, 물리·화학적 방법 대신 식물을 이용하여 중금속을 흡수·무독화하거나 농도를 저감시키기는 phytoremediation 기술이 시도되고 있다. Phytoremediation은 광산 및 공장지대 등 중금속 오염이 심한 토양에 식물체를 식재하여 오염된 토양을 정화할 수 있는 친환경적 기술로 알려져 있다 (Eapen and D'Souza 2005; 김용호 2008). 그러나 중금속 오염 토양이 중금속 자체의 독성과 함께 적박한 토양의 물리성을 나타내는 경우가 많으므로 (Ok et al. 2004) 중금속 내성 식물의 생육이 저조하거나 오염지역 복원에 소요되는 기간이 매우 길다. 이런 단점을 보완하기 위하여 수은 정화관련 유전자를 식물에 도입하여 수은을 정화하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다. Bizily 등(2000)은 *merB* 유전자를 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*)에 도입하고 수은 정화가능성을 조사하였고, *merA*와 *merB* 유전자를 동시에 발현시키기도 하였다. 애기장대 외에도 벼 (*Oryza sativa*) (Heaton et al. 2003), 담배 (*Nicotiana tabacum*) (Ruiz et al. 2003), 호화미초 (*Spartina alterniflora*) (Czako et al. 2005; Czako et al. 2006), 클로렐라 (*Chlorella* sp.DT) (Huang et al. 2006), 갈대 (*Phragmites communis Trinus*) (Seul et al. 2003) 등에 *merA* 또는 *merB* 유전자를 도입한 형질전환체 연구가 이루어졌고, Rugh 등 (1996), Bizily 등 (2000) 및 Che 등 (2003)은 *merA* 유전자를 삽입한 형질전환 포플러 (*Liriodendron tulipifera*)와 미루나무 (*Populus deltoides*)를 개발하여 오염지역에 시험 재배하기도 하였다. 국내에서도 중금속 내성유전자를 이용한 환경정화용 포플러와 아카시아를 개발하였고 (노은운 2008), 중금속 내성 *YCF1* 유전자를 식물체에 도입하여 실험실 수준에서 식물의 중금속 정화능력을 시험한 바 있다 (Song et al. 2003). 이러한 환경정화용 유전자변형식물체는 중금속정화 효과 검정을 위하여 오염된 환경에 방출되거나, 그 외에도 여러 가지 경로를 통하여 환경에 방출될 가능성이 있다.

유전자변형생물체를 환경에 방출하거나 상업화하기 위해서는 유전자변형생물체의 안전관리를 위하여 제정된 「유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률」에 따라 위해

성 평가 및 심사를 받아야만 하는데, 법에서는 유전자변형 생물체를 시험·연구용, 농업용, 산업용, 보건의료용, 환경정화용, 해양·수산용으로 구분하여 관련 부처별로 관리하고 있다. 유전자변형생물체의 환경위해성 평가는 유전자변형 생물체가 환경에 미치는 잠재적 위해성을 과학적으로 검증하는 것이며, 유전자변형생물체의 분자생물학적 특성, 생리·생태적 특성, 유전·육종적 특성, 독성 및 타생물체에 대한 영향 등을 비변형생물체와 비교하여 위해성 여부를 판단하게 된다 (Kim and Kim 2003). 환경위해성 평가의 첫 단계는 형질전환된 평가대상 유전자변형생물체의 유전자 도입 및 발현과 생물학적 특성 (분류, 생리, 유전, 생태)을 확인하고 분석하는 것이다. 그 후 실험실과 온실, 격리포장에서 이루어지는 노출평가와 부작용 정도 검증과정을 거치며 최종적으로 전반적인 위해성을 판단하게 된다 (박홍재 2008).

현재까지 국내에서 상업화를 위하여 승인된 유전자변형 생물체는 국내 수입 콩, 옥수수, 면화, 유채, 감자, 알팔파 등 농업용 작물이 대부분이다. 국내에서도 다양한 유전자변형 생물체 연구가 수행되고 있으나 아직 실용화 단계에는 이르지 못하고 있으며 (Woo et al. 2006), 격리포장 단계에서 환경위해성을 평가 중인 유전자변형생물체도 벼, 고추, 배추, 들깨 등 농업용이다 (김동현 2008). 환경정화용 유전자변형 생물체는 식물수목류를 대상으로 개발단계이고, 아직 환경위해성 평가가 이루어지고 있지는 않지만 환경정화용이 환경정화 효과 검정을 위하여 환경에 방출될 가능성에 대비하여 환경정화용 유전자변형생물체의 환경위해성 평가기술 개발 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

본 연구에서는 환경정화용 유전자변형생물체의 환경위해성 평가연구를 위한 형질전환 식물체를 확보하기 위하여 생태 환경변화에 따른 유전자 변화 연구 모델식물로 이용되는 까마중에 수은 무독화 관련 유전자인 Organomercurial lyase 유전자 (*merB*)를 도입하여 형질전환체를 선발하고 그 특성을 조사하기 위한 것이다.

## 재료 및 방법

### 식물체 재료

한국생명공학연구원 식물유전체연구센터로부터 분양받은 까마중 종자를 증성세제에 5-10분 세척하고, Tween 20<sup>TM</sup>이 2-3방울 첨가된 2% sodium hypochlorite에 7분간 침지한

후 멸균수로 세척하였다. 멸균 처리한 종자를 MS 기본 고체배지 (Murashige and Skoog 1962)에 치상하여 발아 (25±1°C, 16hr day/8hr dark) 시켰다. 발아 후 1주일된 잎 절편을 *Agrobacterium* 과 공동 배양 하였다.

#### 균주

본 실험에 사용된 *A. tumefaciens* 균주는 환경정화용 관련 수은무독화 유전자인 *merB* 유전자를 함유하고 있으며 (Choi 2007), 국립산림과학원 형질전환연구실로부터 공여 받았다. *Agrobacterium tumefaciens* 균주는 kanamycin 50 µg/ml, rifampicin 50 µg/ml가 함유된 50 mL LB배지에서 균 농도가 OD<sub>600</sub> = 0.7 인 대수기까지 배양하여 한번 원심분리한 후 20 mL의 0.85% NaCl로 세척하고, 잎 절편과 공동 배양하였다.

#### 형질전환

공동배양을 위해 0.85% NaCl로 세척한 *Agrobacterium tumefaciens* 현탁액에 0.5 cm × 0.3 cm 크기로 자른 잎 절편을 넣고 10분간 공동배양 한 후 잎 절편을 멸균된 여과지에서 10분간 건조 시켰다. 건조된 잎 절편을 공동배양배지에서 (MS, sucrose 3%, 2 mg/L 2,4-D) 2일간 배양한 후 재분화 선발배지 (MS, sucrose 3%, 40 mg/L hygromycin, 500 mg/L carbenicillin, 0.1 mg/L NAA, 1 mg/L BA)로 옮기고 8주간 배양하여 신초를 형성시켰다. 형성된 신초는 PCR로 *merB* 유전자를 확인하고 유전자가 확인된 신초들만 뿌리 유도배지 (1/2 MS, sucrose 1%, 40 mg/L hygromycin, 500 mg/L carbenicillin, 0.1 mg/L IBA)에 이식하여 발근시켰다.

#### 유전자 발현 확인

항생제가 포함된 선발배지에서 자라는 식물체에 *merB* 유전자가 도입되어 발현되는지 확인하기 위하여 PCR과 northern blot analysis를 실시하였다. 발근된 까마중 식물체의 어린잎으로부터 genomic DNA를 추출하였다. PCR 조건은 1단계: 95°C 2분, 2단계: 94°C 20초, 3단계: 58°C 40초, 4단계: 72°C 80초, 5단계: 72°C 10분이며, 2, 3, 4단계가 34번 반복 되도록 하였다. PCR 반응에 사용된 *merB* 유전자의 primer는 *merB*-F: 5'-CGT CGA GGA AGT TAA GCA AGT CC-3', *merB*-R: 5'-AAC GCT CGA CTC AGG GTG TTG G-3'을 사용하였다. PCR 산물은 1% 아가로스 겔에 로딩 (loading)하

여 *merB* 유전자 증폭 밴드 유무를 확인하였다. 또한 RNA 발현을 확인하기 위하여 총 RNA를 추출하여 정량한 RNA 30 µg을 1% formaldehyde 겔에 전기영동하여 나일론 membrane (Schleicher & Schuell, Japan)으로 전이시켰다 (Turbo blotter system, Schleicher & Schuell). 전이된 RNA를 고정시키기 위하여 UV crosslink (1200 × µJ/cm<sup>2</sup>)를 2회 실시하고 이 membrane을 DIG easy hybridization solution (Roche, Germany)으로 68°C에서 1시간 정도 pre-hybridization 한 다음 PCR Dig Labeling Mix (Roche)와 제공된 제작방법에 따라 만든 probe로 50°C에서 6시간 이상 hybridization시켰다. Membrane을 2× SSC, 0.1% SDS-buffer로 세척한 다음 Dig detection kit (Roche)와 제공된 방법으로 NBT/BCIP에 의한 발색 정도를 관찰하였다.

#### 형질전환 까마중의 수은 저항성 검증

유전자 발현이 확인된 형질전환 까마중의 수은저항성을 확인하기 위하여 잎을 약 0.5 cm × 0.3 cm로 잘라서 유기수은 제제인 methylmercury (II) chloride (MMC; CH<sub>3</sub>HgCl, Aldrich, Germany)와 phenylmercuric acetate (PMA; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>HgOCOCH<sub>3</sub>, Sigma, Germany)가 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60 µM 농도별 처리된 MS 재분화 배지 (MS, sucrose 3%, 0.1 mg/L NAA, 1 mg/L BA)에 치상하였다. 20일후 잎 절편의 재분화 정도를 조사함하여 수은저항성을 알아보았다. 또한 수은저항성이 확인된 까마중은 온실에서 3개월 간 재배한 후 종자를 수확하였다. 수확한 종자는 70% ethanol과 2% sodium hypochlorite 용액으로 소독하여 MMC와 PMA가 각각 2 µM 농도로 첨가된 발아배지에 치상하였으며, 치상 후 10일째 생육상태를 조사하였다.

#### 형질전환 까마중의 형질전환 1세대 (T<sub>1</sub>) 종자형성과 유전자 분리비 조사

유전자 발현과 수은저항성이 확인된 까마중을 배양실에서 순화시킨 후 온실의 포트에 이식하고 약 3개월 동안 재배하였다. 3개월 후 화서당 열매수, 열매의 개당 종자수를 대조구와 비교하였고, 수확 후 자연 건조시킨 형질전환 1세대 (T<sub>1</sub>) 종자 100립의 건조 중량도 측정하였다. *merB* 유전자가 후대로 안정되게 유전되는지를 확인하기 위하여 건조된 T<sub>1</sub> 종자를 70% ethanol에 30초, 2% sodium hypochlorite 용액에 20분간 표면살균하고 멸균수로 세척한 후 물기를 제거한 다

음 항생제 hygromycin (Sigma)이 첨가 발아배지 (1/2MS, 50 mg/L hygromycin)에 치상하였다. 10일 동안 배양 (25±1°C, 16 hr day/8 hr dark) 한 후 발아되어 생장하는 항생제 저항성 종자와 발아하지 못하는 감수성인 종자 수를 조사하였다.

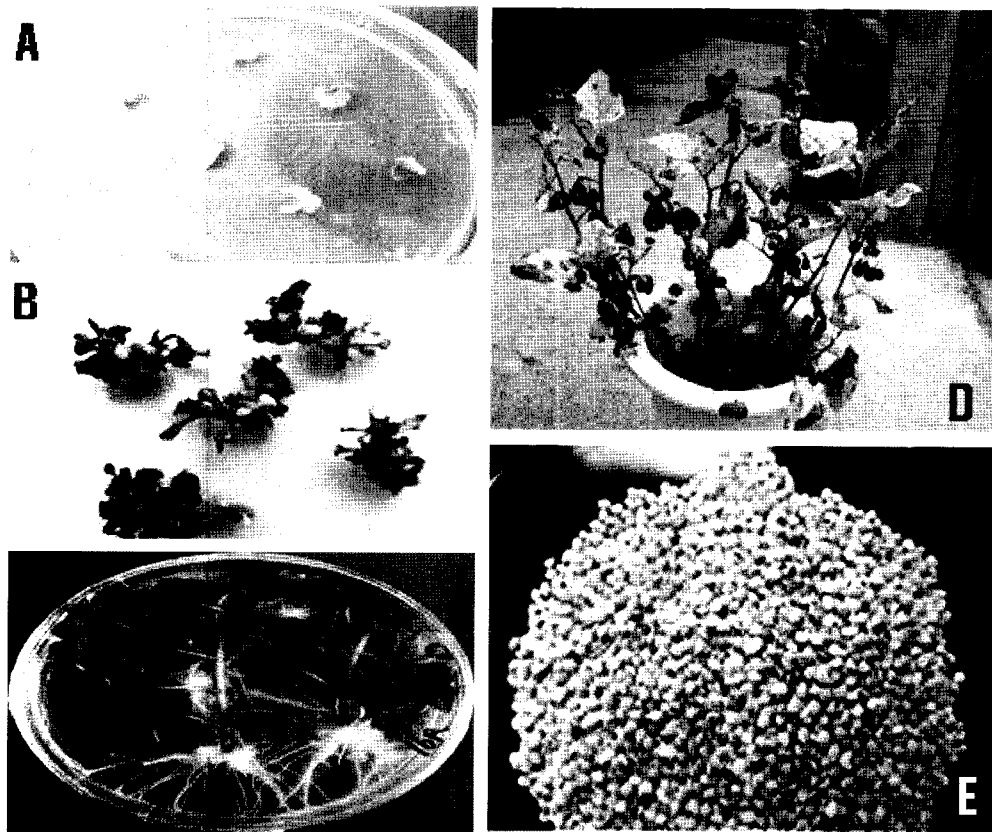
## 결과 및 고찰

### 형질전환체 육성

환경정화용 유전자변형생물체의 환경위해성 평가연구를 위한 형질전환 식물체를 선발하기 위하여 유기수은을 무기수은으로 전환시켜서 독성을 저감시키는 organomercurial lyase 유전자 (*merB*)를 까마중에 도입하여 형질전환하였다. *Agrobacterium*과 공동배양한 까마중 잎 절편을 2,4-D 2 mg/L가 첨가된 동시배양 배지에서 2일간 배양한 후 항생제가 첨가된 선발배지로 옮기는 것이 공동배양한 후 잎 절편을 곧바로 항생제가 첨가된 배지로 옮기는 것보다 캘러스 (callus) 생성과 재분화가 빠르게 일어났다. 이것은 2,4-D가 식물체의 상처부위에서 체세포배 (somatic embryo)를 유도하여 캘

러스가 왕성하게 유도된 것으로 사료된다. 이러한 결과는 Choi 등 (1996)이 감자 (*Solanum tuberosum*)의 잎 절편을 2,4-D 2 mg/L가 첨가된 동시배양 배지에서 2일간 배양한 후 선발배지로 옮기는 것이 효과적이라는 보고와 같았다. 또한 배양한 *Agrobacterium* 균주를 원심 분리하여 배양액을 버리고 0.85% NaCl로 세척하여 잎 절편과 공동 배양한 것이 비세척 시보다 2배정도 많은 형질전환 신초가 형성되었다. 이는 0.85% NaCl이 식물체 잎 조각 상처조직의 삼투압을 조절하면서 *Agrobacterium*의 감염성을 유지시키는 역할을 했기 때문인 것으로 보고 있으며, Choi 등 (2005)도 포플러의 잎 절편 형질전환 시 *Agrobacterium* 균주를 0.85% NaCl로 세척하는 것이 효과적이라고 보고한 바 있다.

재분화 선발배지 (MS, sucrose 3%, 40 mg/L hygromycin, 500 mg/L carbenicillin, 0.1 mg/L NAA, 1 mg/L BA)로 옮긴 잎 절편은 1 주일 후 캘러스가 형성되기 시작하여 3주후부터 신초가 재분화되기 시작하였다 (Fig. 1A, B). 재분화된 신초로부터 뿌리를 형성하는데는 1/2MS와 sucrose를 1%로 낮춘 배지가 효과적이었다 (Fig. 1C). 발근된 까마중을 지피포트에 옮겨 순화시킨 후 온실의 큰 포트에 이식하고 약 3개월



**Figure 1.** Development stages of transformed *merB Solanum nigrum*. A: Leaf explants; B: Callus and shoot induction on selection medium; C: Root establishment; D: Bearing fruits; E: Harvested seeds

동안 생육시킨 후 종자를 수확하였다 (Fig. 1D, E).

유전자 발현 확인

대조구 식물체 잎 절편이 백화되어 고사하는 농도의 항생제가 포함된 재분화 선발배지 (MS, sucrose 3%, 40 mg/L hygromycin, 500 mg/L carbenicillin, 0.1 mg/L NAA, 1 mg/L BA)에서 정상적으로 자라는 식물체는 유전자가 도입된 형질전환체라고 1차적으로 판단을 할 수 있었다. 좀 더 명확히 유전자 도입 및 발현을 확인하기 위하여 PCR analysis를 실시하였다. 그 결과, 대조구는 증폭된 *merB* 유전자 밴드를 찾아볼 수 없었고 5개의 형질전환체에서는 403 bp의 *merB* 유전자 단편이 증폭된 것을 확인하였다 (Fig. 2).

또한 *merB* 유전자의 mRNA 수준에서의 발현을 확인하기 위해서 northern blot 분석을 실시한 결과, 형질전환 두 개 라인 (*merB1*, *merB4*)에서 *merB* 유전자의 발현을 확인 할 수 있었다 (Fig. 3). 이 결과를 바탕으로 향후 *merB1*, *merB4* 두 라인을 연구재료로 사용 하였다.

형질전환 까마중(*Solanum nigrum*)의 수은 저항성 검정

PCR 분석과 northern blot 분석을 통하여 유전자가 식물체에 안정적으로 삽입되고 발현되는 *merB1*, *merB4* 두 라인을 선발하였다. 이러한 분자유전학적 확인 이외에도 *merB* 유전자 발현에 의해서 실제로 수은에 저항성을 나타내는지 확인

하기 위하여 MS 재분화 배지 (MS, sucrose 3%, 0.1 mg/L NAA, 1 mg/L BA)에 유기수은 제제인 MMC와 PMA를 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 40, 60  $\mu$ M 농도로 처리하고 *merB1*, *merB4* 라인 까마중 잎 절편의 재분화를 유도하여 수은저항성 정도를 알아보았다. 그 결과 *merB1*, *merB4* 라인은 최고 2  $\mu$ M 까지 MMC에 저항성을 보이며 잎 조직으로부터 재분화가 일어났다. 반면 대조구 잎은 0.5  $\mu$ M MMC에서도 잎 절편이 흰색으로 백화되어 고사하였다 (Fig 4).

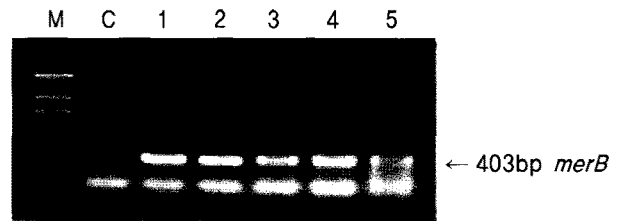


Figure 2. PCR analysis. M: Marker; C: Non-transformed control plant; 1-5: Transgenic plants

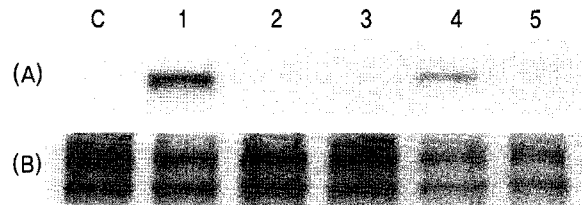


Figure 3. Northern blot analysis. (A): Lane 1 and 4, production of *merB* RNAs in transgenic plants; (B): EtBr staining of total RNA (30  $\mu$ g) was used as a control for equal RNA loading.

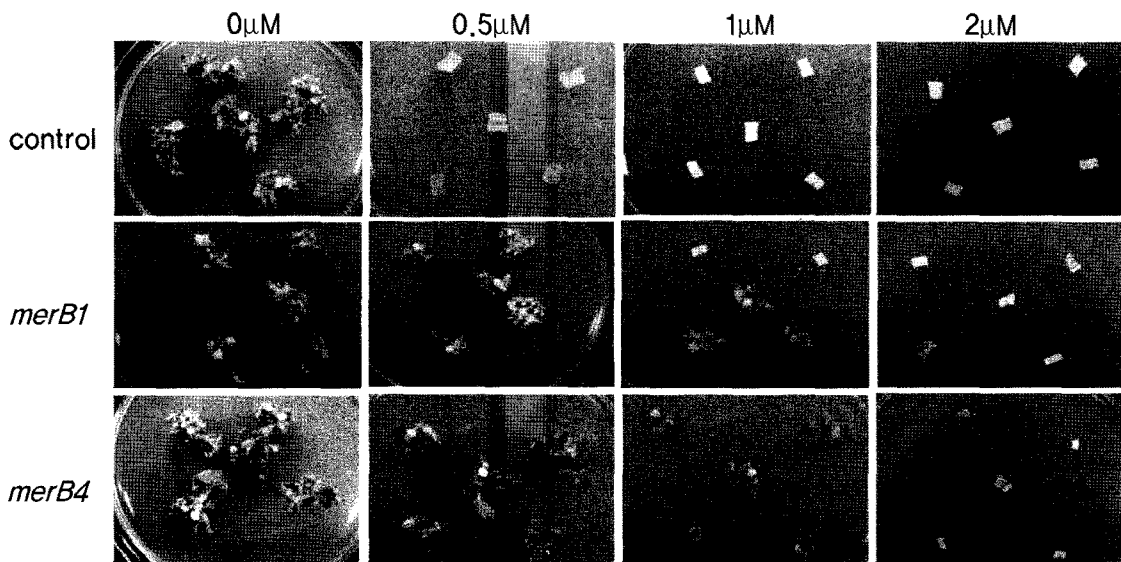


Figure 4. Transgenic plants containing the *merB* gene were resistant to methylmercury (II) chloride ( $\text{CH}_3\text{HgCl}$ ). Leaf disc from *merB1* and *merB4* line regenerated and grew on growth medium containing 0.5, 1 and 2  $\mu$ M methylmercury (II) chloride. Control died on medium with 0.5  $\mu$ M methylmercury (II) chloride.

또한 PMA를 처리한 배지에서도 대조구는 저 농도 (0.5  $\mu$ M) 에서부터 황변이 시작되는 반면, 형질전환 계통의 경우 최고 10  $\mu$ M까지 저항성을 나타내었는데 (Fig. 5), *Arabidopsis*에 *merB* 유전자를 도입한 경우에도 비슷한 결과를 나타낸다는 보고가 있다 (Bizily et al. 1999).

형질전환 까마중의 종자형성과 유전자 분리비 조사

형질전환된 계통을 선발한 후 유전자의 후대 안정성 검정 등 지속적인 환경위해성 평가 연구를 위하여 *merB* 유전자가 발현되고 수은저항성을 나타내는 *merB1*, *merB4* 식물체를 온실에서 3개월 동안 생육 시키며 종자 형성 특징을 대조구와 비교하였다. 그 결과 화서 당 맺힌 열매수와 1개 열매 속에 생성된 종자의 개수는 대조구와 차이가 없었으나 건조종자 100개의 무게는 대조구가 약간 무거웠는데 이는 기내 배양한 식물의 순화적응에 따른 차이로 생각되며 형질전환 과정을 통하여 완전히 불임인 개체가 되는 등의 특이점은 없었다 (Table 1). Schuh 등 (1993)은 벼의 형질전환체의 세대 간 형태적인 차이가 크게 나타나지 않는다고 보고하였으며,

형질전환 까마중의 세대간 형태적 변이 등에 대해서는 보고된바 없다.

형질전환 과정을 통하여 삽입된 *merB* 유전자가 후대로 안정적으로 유전되는지를 확인하기 위하여 멘델의 유전법칙에 근거하여 삽입 유전자의 분리비를 조사하였다. 유전자 분리비는 항생제 저항성을 이용하였는데 형질전환시 항생제인 hygromycin 저항성 유전자와 *merB* 유전자를 함께 삽입하였으므로 형질전환된 까마중은 *merB*의 유전에 따라 항생제 저항성도 함께 나타나게 된다. 형질전환 까마중 종자는 hygromycin 50 mg/L 농도가 첨가된 발아배지에서 저항성을 띄며 잘 자라는 종자와 성장하지 못하고 고사하는 감수성 종자로 그 표현형이 나뉘진다. 소독한 200개의 T<sub>1</sub>종자를 hygromycin 50 mg/L 농도가 첨가된 종자 발아배지에 치상하고 10일 후에 저항성과 감수성을 나타내는 종자의 수를 세어서 분리 비를 산출한 결과는 Table 2와 같다.

*MerB1* 종자의 3:1 분리비 검정은 기댓값이 147.8 : 49.3이었고, 카이제곱 값은 28.2 (P=0.0001)로 카이제곱의 통계적 유의차를 검정한 5% 유의수준인 3.84 (P=0.05)보다 높은 값을 나타내어 통계적 유의차가 있었다. 반면 15:1 분리비 검

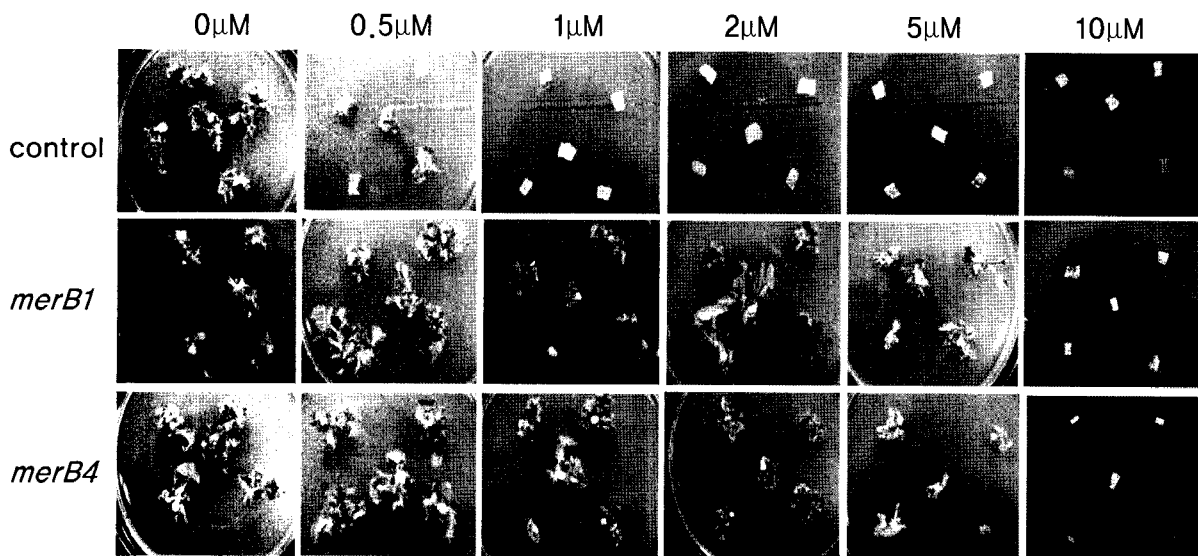


Figure 5. Transgenic plants containing the *merB* gene were resistant to PMA. Leaf disc from *merB1* and *merB4* line regenerated and grew on growth medium containing 0.5, 1, 2, 5, 10  $\mu$ M PMA. Control died on medium with 1  $\mu$ M PMA.

Table 1 The characterization of the first generation's seeds of transgenic *Solanum nigrum*

Lines	No. of fruits/Inflorescence	No. of seeds/fruits	Fresh weight (mg/100 seeds)
Control	7.0±0.9 *	39.4±10.8	77.8±1.3
<i>merB1</i>	8.0±1.4	47.1±8.2	73.3±1.0
<i>merB4</i>	6.9±0.8	46.3±7.5	73.2±0.9

\* M±SE

Table 2 Segregation pattern of transformant on the medium containing hygromycin

Lines	Observed		Expected	Expected segregation ratio	X <sup>2</sup> -value	P-value
	Hyg <sup>R</sup> .	Hyg <sup>S</sup> .				
control		198	-	-	-	-
<i>merB1</i>	180	17	184.7:12.3	15:1	1.9	0.1677
			147.8:49.3	3:1	28.2	0.0001
<i>merB4</i>	151	46	184.7:12.3	15:1	98.3	0.0001
			147.8:49.3	3:1	0.3	0.5928

정은 기댓값이 184.7 : 12.3이었고 카이제곱의 통계적 유의차를 검정한 결과는 5% 유의수준에서 관찰값과 기대값이 일치하였다. 따라서 *merB1* 종자는 15:1로 유전적 분리가 되었음을 알 수 있었다. *merB4* 종자의 3:1 분리비 검정은 기댓값이 147.8:49.3이었고 카이제곱 값은 0.3으로 5% 유의수준에서 관찰값과 기댓값이 일치하였으므로 *merB4* 종자는 3:1로 유전적 분리가 나타났다. 이들 T<sub>1</sub> 종자는 후대번식을 통하여 *merB* 유전자 형질이 고정된 계통을 확보할 것이다.

형질전환 1세대 까마중 종자의 수는 저항성

*merB1*, *merB4* 두 라인의 형질전환 1세대 종자의 수는 저항성을 확인하기 위하여 유기수은 제제인 MMC와 PMA가 2 μM 첨가된 종자 발아배지에 치상한 결과, 형질전환체는 발아후 뿌리를 내리며 성장하였으나 대조구는 발아 후 뿌리를 내리지 못하고 결국 갈변되어 고사하였다 (Fig. 6).

이상의 결과, *merB* 유전자가 형질전환 1세대로 안정되게 유전되어 수은 저항성을 나타내는 두 개의 형질전환 라인 (*merB1*, *merB4*)을 선발하였다. 향후 이들 두 라인은 후대번식을 통하여 *merB* 유전자 형질이 고정된 계통을 확보하고 유전자 전이 평가, 독성 대사산물 생산가능성 분석, 주변 생물체와의 상호작용 조사 등 다양한 환경영향평가 실험을 수행하는데 활용할 것이다.

## 적 요

수은은 산업화될수록 방출량이 많아지고 자연생태계의 먹이사슬에 의한 생물학적 축적에 의하여 결국 인간에게 강한 독성을 나타내게 된다. 최근 중금속 무독화관련 유전자를 도입한 유전자변형식물체를 이용하여 중금속의 독성을 제거하거나 저감하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그러나 유전자변형생물체는 자연생태계에 미치는 환경위해성을 평가하여 안전성을 검증한 후 환경에 방출해야만 한다.

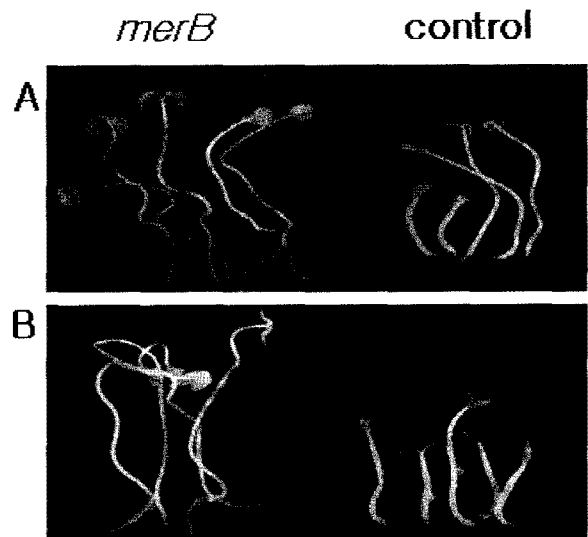


Figure 6. Growth of transgenic plant on PMA (A) and MMC (B). Transgenic *merB* seeds (Left) germinated and grew on growth media containing 2 μM PMA (A) and MMC (B). Control seeds (Right) do not grow on these concentrations of PMA (A) and MMC (B).

환경정화용 유전자변형생물체의 환경위해성 평가기술개발 연구에 이용하기 위한 형질전환 식물체 생산을 위하여 까마중에 유기수은 (organic mercury)을 무기수은 (ionic mercury)으로 전환시켜서 독성을 저감시키는 organomercurial lyase (*merB*) 유전자를 도입하여 형질전환 시켰다. 유전자 도입 및 발현이 확인된 2개의 형질전환 라인 (*merB1*, *merB4*)은 유기수은제제인 MMC 0.5 μM, PMA 1 μM에서 저항성을 나타내었다. 또한 형질전환 1세대 종자도 2 μM MMC와 PMA에 저항성을 나타내는 것을 확인하였다. 향후 이들 형질전환체를 이용하여 환경정화용 유전자변형생물체의 환경위해성 평가 방법 개발 연구를 수행 할 것이다.

## 인용문헌

김동현 (2008) 유전자변형작물의 연구 및 재배동향. In: 바이오안전성백서. 한국생명공학연구원

- 김용호 (2008) 환경정화용 유전자변형생물체의 연구 및 환경방출의 위해성 고찰. *Biosafety* 34: 27-41
- 노은운 (2008) 국내 유전자변형 임목의 연구개발 동향. In: 바이오안전성백서. 한국생명공학연구원
- 박홍재 (2008) 환경위해성 평가 및 심사. In: 바이오안전성백서. 한국생명공학연구원
- Bizily SP, Rugh CL, Summers AO, Meagher RB (1999) Phytoremediation of methylmercury pollution: *merB* expression in *Arabidopsis thaliana* confers resistance to organomercurials. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6808-6813
- Bizily SP, Rugh CL, Meagher RB (2000) Phytodetoxification of hazardous organomercurials by genetically engineered plants. *Nat Biotechnol* 18: 213-217
- Che D, Meagher RB, Heaton ACP, Lima A, Rugh CL, Merkle SA (2003) Expression of mercuric ion reductase in Eastern cottonwood (*Populus deltoids*) confers mercuric ion reduction and resistance. *Plant Biotech. J.* 1: 311
- Choi KH, Yang DC, Jeon JH, Kim HS, Joung YH, Joung H (1996) Expression of cold regulated gene in transgenic *Solanum tuberosum* L. *Korean J Plant Tissue Culture* 23: 311-315
- Choi YI, Noh EW, Lee HS, Han MS (2007) Mercury-tolerant transgenic poplars expressing two bacterial mercury-metabolizing genes. *J. Plant Biol.* 50(6): 658-662
- Choi YI, Noh EW, Lee HS, Han MS, Lee JS, Choi KS (2005) An efficient and novel plant selectable marker based on organomercurial resistance. *J Plant Biol* 48: 351-355
- Czako M, Feng X, He Y, Liang D, Marton L (2005) Genetic modification of wetland grasses for phytoremediation. *Z Naturforsch[C]* 60: 285-291
- Czako M, Feng X, He Y, Liang D, Marton L (2006) Transgenic *Spartina alterniflora* for phytoremediation. *Environ Geochem Health* 28: 103-110
- Eapen S, D'Souza SF (2005) Prospects of genetics engineering of plants for phytoremediation of toxic metals. *Biotech Advances* 23: 97-114
- Heaton ACP, Rugh CL, Wang NI, Meagher RB (2003) Toward detoxifying mercury-polluted aquatic sediments with rice genetically engineered for mercury resistance. *Environ Toxicol Chem* 22: 2940-2947
- Huang CC, Chen MW, Hsieh JL, Lin WH, Chen PC, Chien LF (2006) Expression of mercuric reductase from *Bacillus megaterium* MB1 in eukaryotic microalga *Chlorella* sp. DT: an approach for mercury phytoremediation. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 197-205
- Kim HC, Kim HM (2003) Risk assessment of genetically modified organism. *J Toxicol Pub Health* 19: 1-12
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Ok YS, Kim JG, Yang JE, Kim HY, Yoo KY, Park CJ, Chung DY (2004) Phytoremediation of heavy metal contaminated soils using transgenic plants. *Korean J Soil Sci Fert* 37: 396-406
- Rugh CL, Wilde HD, Stack NM, Thompson DM, Summers AO, Meagher RB (1996) Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3182-3187
- Ruiz ON, Hussein HS, Terry N, Daiell H (2003) Phytoremediation of organomercurial compounds via chloroplast genetic engineering. *Plant Physiol* 132: 1-9
- Schuh W, Nelson MR, Bigelow DM, Orum TV, Orth CE, Lynch PT, Eyles PS, Blackhall NW, Jones J, Cocking EC, Davey MR (1993) The phenotypic characterization of R<sub>2</sub> generation transgenic rice plants under field conditions. *Plant Sci* 89: 69-79
- Seul EJ, Kim TR, Choi KS (2003) *Agrobacterium*-mediated transformation of mercury resistance gene via somatic embryogenesis of *Phragmites communis* Trinius. *Bull Biotech CNU* 9: 43-49
- Song WY, Sohn EJ, Martinoia E, Lee YJ, Yang YY, Jasinski M, Forestier C, Hwang I, Lee Y (2003) Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. *Nature Biotechnol* 21: 914-919
- Woo HJ, Lim SH, Lee KJ, Won SY, Kim TS, Cho HS, Jin YM (2006) Current development status on the genetically modified crops in Korea. *Korean J Intl Agri* 18: 221-229

(접수일자 2008년 10월 27일, 수리일자 2008년 11월 10일)