

## 아그로박테리움을 이용한 *Actinobacillus pleuropneumoniae* *ApxIIA* (ApxII toxin) 유전자 발현 옥수수 형질전환체 개발

김현아 · 유한상 · 양문식 · 권석윤 · 김진석 · 최필선

### The development of transgenic maize expressing *Actinobacillus pleuropneumoniae* *ApxIIA* gene using *Agrobacterium*

Hyun A Kim · Han Sang Yoo · Moon Sik Yang · Suk Yoon Kwon · Jin Seog Kim · Pil Son Choi

Received: 18 August 2010 / Accepted: 27 August 2010

© Korean Society for Plant Biotechnology

**Abstract** To develop edible vaccines for swine, the embryogenic calli (type II) derived from HiII genotype were inoculated with *A. tumefaciens* strain C58C1 containing the binary vector pMYV611, 613, 616, and V621, 622 and 623 respectively. Six of those vectors carry *nptII* gene which confers resistance to paromomycin and *apxIIA* gene producing ApxII toxin which is generated in various serum types of *A. pleuropneumoniae* as a target gene. The 4,120 callus clones for pMYV611, 5,959 callus clones for pMYV613, 7,581 callus clones for pMYV616, 52,329 callus clones for V621, 48,948 callus clones for V622, and 56,188

callus clones for V623 were inoculated. The frequency of positive response clone was confirmed into range of 2.3% – 4.4% for each vectors by NPTII ELISA kit assay, and the selected callus clones of them were finally 3 callus clones from pMYV611 (0.07%), 4 callus clones from pMYV613 (0.07%), 2 callus clones from pMYV616 (0.03%), 51 callus clones from V621 (0.1%), 72 callus clones from V622 (0.15%), and 102 callus clones from V623 (0.18%) respectively. From the selected callus clones of each binary vector, the integration of the *apxIIA* gene into maize genome was detected from 2 plants of pMYV613 and 2 plants of V623 by Southern blot analysis.

H. A. Kim · P. S. Choi (✉)

남부대학교 한방제약개발학과  
(Department of Medicinal Plant Resources, Nambu University,  
Gwangju 506824 Korea)  
e-mail: cps6546@hanmail.net

H. S. Yoo

서울대학교 수의학과  
(Department of Infectious Diseases, College of Veterinary, Seoul  
National University, Seoul 151742, Korea)

S. Y. Kwon

한국생명공학연구원  
(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 52  
Eoeun-dong, Daejeon 305606, Korea)

J. S. Kim

한국화학연구원  
(Korea Research Institute of Chemical Technology, Shinsung-dong,  
Daejeon 305600, Korea)

M. S. Yang

전북대학교 분자생물학과  
(Division of Biological Science, Chonbuk National University,  
Doekjin-dong, Jeonju 561756, Korea)

**Keywords** *A. pleuropneumoniae*, *apxIIA* gene, edible vaccine, paromomycin, type II embryogenic callus, transgenic maize

### 서론

국내 양돈산업에서 호흡기 질병에 의한 피해는 연간 500억 이상으로 추정되고 있으며, 가장 보편적인 예방법으로 백신을 사용하고 있다. 현재 상업적으로 사용되는 백신의 대부분은 비활성화 혹은 병원성이 약화된 항원이나 바이러스로부터 분리한 특정단백질을 주사, 분무 혹은 경구투여 등의 방법을 통해 접종하는 것이 대부분이다. 그러나 이러한 형태의 백신은 단백질이 변성되거나 변성으로 인해 항체와 결합하지 못하는 취약점을 갖고 있을 뿐 아니라 충분한 양의 단백질을 얻기 위해서는 염

격한 정제과정과 고 비용이 수반된다. 반면 재조합백신은 항원단백질을 발현하면서도 숙주에 위험을 수반하지 않기 때문에 현재 대부분의 백신개발 연구는 재조합백신 개발에 초점이 맞추어져 진행 되고 있다. 대표적인 예로 담배에 항원유전자를 형질전환하여 이종단백질 발현 연구가 시도된 이래 (Curtiss and Cardineau 1990), 인간의 B형 간염 바이러스 표면단백질을 발현하는 담배와 상추 (Mason et al. 1992), Norwalk virus capsid 단백질을 발현하는 담배와 감자 (Mason et al. 1996) 및 합성 LT-B 유전자를 발현하는 감자 (Mason et al. 1998) 등 식물유래 경구백신의 기초연구가 수행 되어 왔다.

식물체에 도입된 항원유전자의 항원단백질 발현에 이어 그 항원성 입증은 백신생산 숙주로서의 적합성을 결정 지을 수 있다. Mason 등 (1998)은 합성 LT-B 유전자를 도입한 감자 괴경에서 박테리아 유래 LT-B 유전자를 도입한 것보다 LT-B 함량이 높아지는 연구 결과를 얻었으며, 식물유래 enterotoxigenic *Escherichia coli* 의 labile toxin B subunit (LT-B)와 Norwalk virus의 capsid 단백질을 동물에게 경구투여 했을 때 면역반응을 일으킬 수 있음을 확인 하였다 (Haq et al. 1995; Mason et al. 1996, 1998). 그 외에도 식물유래 HBsAg (Hepatitis B surface antigen)는 mice의 구강면역원에 대한 면역반응 촉발과 증대에 있어 효모유래 항원단백질보다 훨씬 우월함을 보고함으로써 (Kong et al. 2001; Richter et al. 2000) 주사접종을 통한 식물유래 항원단백질의 이용 가능성을 한층 가능케 하였다.

곡물을 이용한 식물유래 항원단백질의 경우 seed storage protein이 종자의 액포에 저장되어 있고, 저장 및 운송과정에서 항원단백질 자체의 안정성을 갖기 때문에 (Chikwamba et al. 2002) 주요 사료작물로 이용 되는 옥수수에서 돼지의 Transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) 항원단백질을 발현시키기 위한 연구가 진행되어 왔다. 또한 LT-B 유전자 발현 옥수수 형질전환체에서 *Escherichia coli* heat labile enterotoxin과 cholera toxin에 대한 항원성을 동물실험을 통해 확인하기도 하였다 (Chikwamba et al. 2002).

따라서 본 연구에서는 Kim 등 (2009)에 의해 개발된 옥수수 형질전환방법을 이용하여 국내 양돈산업에 경제적 손실을 유발하는 호흡기 질병 중 하나인 돼지 흉막 폐렴의 항원유전자 (*apxIIA*)를 도입 시켜 형질전환체를 개발 하였기에 보고 하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

HiII 계통 옥수수식물체로부터 수정 후 10~13일째에 1.5~2.0 mm 크기의 미숙배를 얻었다. 미숙배를 무균적으로

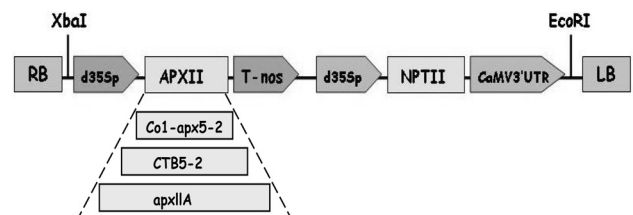
분리하여 캘러스 유도배지 (CIM: MS salts, Eriksson's vitamins, 0.5 mg/L Thiamine-HCl, 1 mg/L 2,4-D, 3 mM MES, 25 mM L-proline, 2% sucrose, 100mg/L myo-inositol, 100 mg/L casamino acid vitamin assay, 0.7% BBL agar, and 1.7 mg/L AgNO<sub>3</sub>; pH 5.8, Murashige and Skoog 1962)에 치상한 후 24°C에서 6주 이상 암 배양 하면서 Type II 배발생 캘러스를 유도하였다. 유도한 Type II 배발생캘러스를 4주 간격으로 계대 배양하면서 충분히 증식한 후 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환용 배양재료로 이용하였다.

### 유전자 발현벡터

*ApxIIA* 유전자 발현 벡터로 pMYV611, pMYV613, pMYV616, V621, V622와 V623을 사용하였으며, 각 벡터는 *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1에 각각 freeze-thaw 방법으로 형질전환하여 균주로 사용하였다. 각 벡터의 T-DNA에는 2개의 cassettes가 위치한다 (Fig. 1). *A. pleuropneumoniae apxIIA* 유전자는 ApxII toxin을 생산하는데 이 독소는 *A. pleuropneumoniae*의 다양한 혈청형에서 만들어지며 각 벡터는 다른 크기의 *apxIIA* 유전자 fragment를 운반한다. 즉 pMYV611과 V621은 CO1-*apx5-2* (0.75 kb)를, pMYV613, V622와 V623은 CTB5-2 (0.93 kb)를, pMYV616은 full-length의 *apxIIA* 유전자 (1.7 kb)를 각각 운반하도록 재조합하여 구축하였다. pMYV611의 경우 3'에 ER retention signal과 5'에 Col (M cell binding ligand) sequence를 재조합하여 구축한 반면, V621은 3' ER retention signal대신 식물 유래 BIP signal sequence로 구축하였다. 그리고 pMYV613은 pMYV611에서 Col대신 CTB 단백질이 fusion된 것이고, V622는 V621에서 Col대신 CTB 단백질이 fusion된 것이다. V623은 V622에서 plant 유래 BIP signal sequence대신 Cab signal sequence를 재조합하여 각각 구축하였다.

### *A. tumefaciens* culture 준비

형질전환된 각각의 콜로니를 50 mg/L rifampicin, 50 mg/L gentamicin과 50 mg/L kanamycin이 첨가된 YEP배지



**Fig. 1** T-DNA region of the binary vector pMYV611, 613, 616 and V621, 622 and 623; 0.75kb size of Co1-*apx5-2* fragment for pMYV611 and V621, 0.93kb size of CTB5-2 fragment for pMYV613, V622 and 623, 1.7kb size of the full-length *apxIIA* gene for pMYV616

에 접종하여 28°C에서 2일간 배양하였다. *Agrobacterium* 배양액을 3000rpm에서 10분간 원심분리한 후 박테리아 pellet을 공동배양액 (CCM: 1/2 MS salts, MS vitamins, 20 mM MES, 0.115 g/L L-proline, 2% sucrose, 1% glucose, 200 uM acetosyringone, 100 mg/L L-cysteine, pH 5.4.)으로 다시 희석하여 (OD<sub>650</sub> 0.6-0.9) 접종액으로 사용하였다.

**Type II 배발생캘러스 공동배양 및 선발**

왕성하게 자라는 type II 배발생캘러스 (Fig. 2a)를 무균 상태의 페트리 디쉬에 옮기고 spatula로 캘러스 덩어리를 잘게 으갠 후 준비한 *Agrobacterium* 현탁액을 넣고 30분간 접종하였다. 아그로박테리움 용액을 피펫으로 제거한 후 무균 filter paper를 올려놓은 고체 공동배지 (CCM: 1/2 MS salts, MS vitamins, 0.5 mg/L thiamine-HCl, 1 mg/L 2,4-D, 20 mM MES, 0.115 v g/L L-proline, 2% sucrose, 1% glucose, 200 uM acetosyringone, 5.5 g/L agarose, 20 uM AgNO<sub>3</sub>, pH 5.4)에 캘러스를 치상하여 28°C에서 2일간 공동 배양하였다 (Fig. 2b). 48시간 동안 공동배양 후 각각의 캘러스 클론을 분리하여 delay medium (MS salts, Eriksson’s vitamins, 0.5 mg/L Thiamine-HCl, 1 mg/L 2,4-D, 3 mM MES, 25 mM L-proline, 2% sucrose, 100 mg/L myo-inositol, 100 mg/L casamino acid vitamin assay, 0.7% BBL agar, 1.7 mg/L AgNO<sub>3</sub>, 300 mg/L cefotaxim sodium, pH 5.8)에 치상하여 5~7일간 25°C에서 암 배양 하였다 (Fig. 2c). 배양 후 각각의 캘러스 클론을 100 mg/L paromomycin이 포함된 선발 배지로 옮겨 암 조건에서 2주간 간격으로 계대배양 하면서 왕성하게 자라는 캘러스를 선발하였다 (Fig. 2d).

**형질전환된 캘러스로부터 식물체 유도과 순화**

8주 이상 계대배양 하면서 선발된 캘러스를 1차 재분화 배지 (MS salts, MS vitamins, 0.1 mg/L 2,4-D, 3 mM MES, 2% sucrose, 100 mg/L myo-inositol, 0.1 mg/L ABA, 150 mg/L asparagine, 0.8% BBL agar, 100 mg/L cefotaxim sodium, 50 mg/L paromomycin, pH 5.8)에 옮겨 25°C, 16시간 광주기 조건에서 2주간 배양하면서 체세포 배를 유도하였다 (Fig. 2e). 유도된 체세포 배를 다시 2차 재분화 배지 (N6 salts, Eriksson’s vitamins, 0.5 mg/L thiamine-HCl, 6% sucrose, 0.625 g/L malonic acid, 100 mg/L casamino acid vitamin assay, 0.35% phyta gel, 100 mg/L cefotaxim sodium, 50 mg/L paromomycin, pH 5.8)로 옮겨 잎 혹은 뿌리 형태를 갖는 유식물체를 얻었으며 (Fig. 2f,g), 이후 발아배지 (MS salts, MS vitamins, 3mM MES, 2% maltose, 100 mg/L myo-inositol, 1% glucose, 150 mg/L asparagine, 0.5% agarose, 50 mg/L cefotaxim sodium, pH 5.8)에서 완전한 식물체로 재생시켰다 (Fig. 2h). 15-20일 후 유식물체들을 토양에 순화 한 후 온실에서 생육시키면서 T<sub>1</sub>종자를 수확하였다 (Fig. 2i,j,k).

**NPTII ELISA Kit assay**

각 발현벡터 (pMYV611, pMYV613, pMYV616, V621, V622 및 V623)로 형질전환된 *Agrobacterium*과 공동 배양한 후 선발배지에서 왕성하게 자라는 캘러스 일부를 선발하여 NPTII ELISA kit assay (Agdia, catalog #PSP73000)로 *nptII*유전자 발현 여부를 분석하였다. 캘러스 클론으로부터 kit에서 제공한 buffer를 이용하여 단백질을 추출한 후 antibody가 코팅된 96-well plate에 각각 분주한 후 Agdia방법에 따라 분석하였다.

**Southern-blot analysis**

NPTII ELISA kit assay (Agdia, catalog #PSP73000) 분석에 의해 양성반응을 나타낸 형질전환 캘러스로부터 유도된 식물체에서 T<sub>1</sub>종자를 수확한 후 다시 온실에서 발아시켜 유식물체를 Southern분석을 위한 재료로 사용하였다. 온실에서 건강하게 자라는 어린 잎 절편 약 2 g을 채취하여 genomic DNA를 추출하였으며 (Dellaporta et al. 1983), 약



**Fig. 2** Selection of paromomycin-resistance calli and plant regeneration from the selected callus clones after *Agrobacterium* strain (C58C1) carrying pMYV vectors cocultivated. a: Embryogenic calli of Hi II genotype, bar = 1 cm. b: Embryogenic calli infected with *A.tumefaciens* strain C58C1 carrying one of six cloning vectors, respectively. bar = 1 cm. c: Callus clones divided from co-cultivated embryogenic calli on delay medium, bar = 1 cm. d: Outgrowth of putatively transformed callus clone on selection medium containing 100mg/L paromomycin, bar = 1 cm. e: Somatic embryos induced from selected callus clones, bar = 3 mm. f (bar = 3 mm), g (bar = 1 cm): Shoot and root formation of somatic embryo from selected callus clones on 1st regeneration medium. h: Regenerated plantlets from somatic embryos on germination medium, bar = 3.5 cm. i: Transgenic plantlet in small pots, bar = 1cm. j: Transgenic plants in greenhouse. k: Pollinated transgenic plants, bar = 15 cm

10  $\mu$ g의 DNA를 *EcoRI* 제한효소 반응액에 37°C에서 16시간 동안 반응시켜 절단한 후 0.8% agarose 겔에 전기영동하였다. Agarose 겔상의 DNA 밴드를 Zeta<sup>R</sup>-Probe nylon membrane (Bio-Rad, catalog #162-0196)에 옮겨 <sup>32</sup>P-dCTP (Stratagene, catalog #300385)로 표지된 약 0.55 kb *apxIIA* probe를 이용하여 Southern 분석하였다 (Southern 1975). Probe는 forward primer 5'-GATAATGTATTTGTTGGG-3'와 reward primer 5'-TGTAATAGAATCATTTC-3'를 이용하여 550 bp 크기의 PCR product *apxIIA* 유전자를 gel elution하여 사용하였다.

## 결과 및 고찰

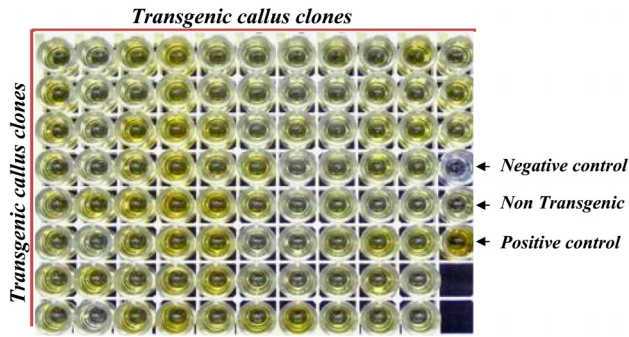
세계적으로 주요 사료작물인 옥수수에서 돼지 흉막폐렴의 항원유전자가 발현되는 형질전환체를 개발하는 것은 돼지 흉막폐렴을 예방할 수 있을 뿐 아니라 국내 양돈산업에 있어서도 가치 있는 일이라 할 수 있다. *Agrobacterium*과 공동배양 한 HiII genotype의 type II 옥수수 배발생 캘러스는 (Fig. 1a) delay배지를 거쳐 1 mg/L 2,4-D와 100 mg/L paromomycin항생제가 첨가된 선발배지에서 2주 간격으로 암 조건에서 계대 배양 하면서 선발한 결과 약 6~8주 후부터 육안으로도 비교될 만큼 생장속도가 빠른 캘러스가 선발되었으며, 이러한 캘러스를 putative transgenic 캘러스로 선정하여 3달이상 충분히 증식시켰다 (Fig. 2d). 증식된 putative transgenic 캘러스의 일부를 1차 재분화 배지에 옮겨 16시간 광주기 조건으로 2주간 배양하면서 부드러운 배발생캘러스 표면에서 흰색의 단단한 체세포배가 형성되는 것을 관찰 하였고 (Fig. 2e), 이러한 체세포배를 분리하여 2차 재분화 배지와 발아배지에 순차적으로 배양하면서 완전한 유식물체로 분화시켰다 (Fig. 2f, g, h). 유식물체를 토양에 옮겨 5~6일간 배양실에서 충분히 적응시킨 후 온실로 옮겨 점차 순화시켰고 (Fig. 2i), 이후 식물체는 온실에서 생육시키면서 후대종자 (T<sub>1</sub>) 종자를 얻었다 (Fig. 2j, k).

옥수수의 식물체 재분화 시스템 및 형질전환 연구는 일반적으로 미숙배를 이용하고 있으나, 미숙배를 생산하기 위해서는 많은 노동력과 시간 그리고 계절적 장애 요인 등의 제한을 받고 있기 때문에 그러한 단점을 극복하기 위해 최근에 type II형태의 배발생캘러스를 (Armstrong et al. 1991) 이용한 새로운 형질전환 방법이 구축되었다 (Kim et al. 2009). 또한 *neomycin phosphotransferase II*효소는 배지에 첨가된 paromomycin 항생제의 작용을 불활성화 시킴으로서 형질전환세포를 생존할 수 있게 한다 (Roa-Rodriguez and Nottenburg 1999). 특히 단자엽식물인 옥수수의 경우 다른 선발마커에 비해 매우 효과적인 선발마커로 이미 확인 되었다 (Cho et al. 2005). 본 연구에서도 미숙배의 경우보다 type II배발생캘러스의 경우 증식 및 유지가 매우 편리하였으며, 특히 계절적 요인으로 실험적 제한을 받지 않고 연속적인 실험을 수행할 수 있었다. 그뿐만 아니라 선발제로서 paromomycin이 첨가된 배지에서 *Agrobacterium*과 공동배양된 type II 배발생캘러스 클론은 비 형질전환세포와 형질전환 세포 간에 뚜렷하게 구분되었으며, 특히 형질전환 가능성이 있는 클론의 경우 매우 빠른 생장속도를 보여 줌으로서 기 보고의 연구결과와 일치되어 안정적으로 형질전환 식물체를 얻을 수 있는 효과적인 방법으로 사료된다.

각 벡터 즉 pMYV611, pMYV613, pMYV616, V621, V622 및 V623의 경우 각각 4,120개, 5,959개, 7,581개, 52,329개, 48,948개 및 56,188개의 캘러스 클론을 *Agrobacterium*과 공동배양한 후 4주 후 선발배지에서 선발한 putative transgenic 캘러스를 선발하였고, 이 중 무작위로 선발된 캘러스를 대상으로 NPTII ELISA kit assay를 수행한 결과 양성대조군 수준에서의 반응 정도를 갖는 클론은 pMYV611벡터의 경우 3.0%, pMYV613은 4.4%, pMYV616은 2.3%, V621은 2.4%, V622은 2.3% 및 V623은 2.5% 수준으로 벡터에 따라서 큰 차이가 없이 항체결합 양성반응을 보여 주었으며 (Table 1), 반면 비형질전환 세포의 경우 음성반응으로 나타났다 (Fig. 3). 또한 NPTII ELISA kit assay법에 의해 1차 선별을 통해 얻은 형질전환 캘러스 클론을 8주 이

**Table 1** Production of paromomycin-resistance calli and transgenic maize from the cultures of type II embryogenic callion selection medium amended with 100 mg/L paromomycin after *Agrobacterium* strain (C58C1) carrying pMYV vectors cocultivated

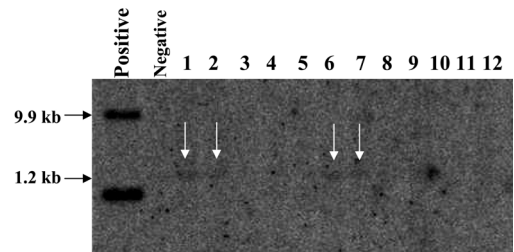
Expression vectors	No. of infected callus clones	No. of nptII-assay positive clones / tested clones (%)	No. of selected calli (%) on selection medium	No. of regenerated plantlets	No. of transgenic maize plants confirmed by Southern blot analysis
pMYV611	4,120	19/620 (3.0)	3 (0.07)	27	—
pMYV613	5,959	19/430 (4.4)	4 (0.07)	168	2
pMYV616	7,581	5/210 (2.3)	2 (0.03)	158	—
V621	52,329	18/750 (2.4)	51 (0.1)	181	—
V622	48,948	14/590 (2.3)	72 (0.15)	187	—
V623	56,188	17/670 (2.5)	102 (0.18)	131	2



**Fig. 3** Screening for the positive response (yellow color) of callus clones grown on selection medium supplemented with 100 mg/L paromomycin by NPTII assay kit

상 2주 간격으로 계대배양 하면서 선발배지에서 완전하게 적응된 캘러스 클론을 다시 선발하였다. 최종적으로 pMYV611 벡터에서 3개 캘러스 클론 (0.07%), pMYV61 벡터에서 4개 (0.07%), pMYV616에서 2개 (0.03%), V621에서 51개 (0.1%), V622에서 72개 (0.15%) 및 V623에서 102개 (0.18%)를 각각 얻어 선발과정에서 많은 수의 클론이 도태되는 것으로 또한 알 수 있었다 (Table 1). 또한 각 벡터 별로 선발된 캘러스 클론으로부터 많은 식물체를 얻을 수 있었으며, 이 중 약 125개체의 형질전환체의 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 Southern blot을 수행한 결과, pMVY613 벡터가 도입된 2개체와 V623이 도입된 2개체에서 *apxIIA* 유전자의 도입을 약한 밴드형태로 확인할 수 있었다 (Table 1, Fig. 4).

각 발현벡터의 선발마커 유전자인 *nptII* 유전자가 식물체의 genomic DNA에 정상적으로 도입되어 발현될 경우 neomycin phosphotransferase II 효소를 생산할 수 있다. 이러한 효소의 발현여부를 확인하기 위해 개발된 NPTII ELISA kit assay는 매우 편리하며, 형질전환 실험에서 유전자 발현 정도 및 1차 선별을 통한 형질전환세포 선발에 많이 이용된다 (Curtis et al. 2000). 본 연구에서도 캘러스 클론의 선발과정에서 양성 대조군의 발현 정도와 비교 함으로서 형질전환 캘러스 클론을 비형질전환 캘러스 클론과 쉽게 구분 할 수 있는 효과적인 방법임을 알 수 있었지만, 이후 양성반응을 보인 캘러스를 8주 이상 배양할 경우 일부에서 증식되지 못하고 선발배지에서 도태되는 비율이 상당히 높게 나타나는 것으로 보아 항생제의 농도가 높아서 나타나는 현상인지 아니면 다른 요인에 의한 것인지 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다. 또한 선발된 각 캘러스 클론을 1차, 2차 및 발아배지 옮겨 많은 식물체를 얻을 수 있었으며, pMYV611 벡터를 제외하고 모든 벡터에서 100개체 이상의 형질전환체를 얻을 수 있었다. 이중 Southern 분석을 통해 유전자 도입은 단지 4개체에서 확인 됨으로서 매우 낮은 빈도를 보여주었다. 이러한 결과는 Southern 분석에 대한 실험 방법상의 문



**Fig. 4** Southern blot analysis of 12 T<sub>1</sub> progeny of transgenic maize carrying *apxIIA* gene. Total genomic DNA was digested with *EcoRI*. The 0.5 kb *apxIIA* probe labeled with <sup>32</sup>P-dCTP was hybridized with genomic DNA of T<sub>1</sub> progeny. Positive : V623, Negative : Wild type, 1: 613-1, 2: 613-2, 3: 616-1, 4: 616-2, 5: 616-3, 6: 623-1, 7: 623-2, 8: 623-3, 9: 621-1, 10: 621-2, 11: 622-1, 12: 622-2

제인 것으로 판단되어 형질전환체에 대한 분자 수준에서의 지속적인 분석을 수행하고 있다. 향후 본 연구를 통해 개발된 돼지 흉막폐렴 항원유전자가 도입된 옥수수 형질전환체는 쥐와 돼지를 대상으로 임상실험을 수행하기 위하여 T<sub>2</sub> 종자를 대량으로 증식하고 있다.

### 적 요

돼지 흉막폐렴백신을 개발하기 위해 옥수수 HiII genotype 으로부터 유도한 type II형의 배발생캘러스를 식물발현벡터 pMYV611, pMYV613, pMYV616, V621, V622 및 V623 로 형질전환시킨 *Agrobacterium* (C58C1)과 공동배양 하였다. 이들 식물발현벡터는 paromomycin 항생제 저항 유전자인 NPTII 선발마커와 표적 유전자로서 흉막폐렴균의 여러 가지 혈청을 생산하는 *apxIIA* 유전자로 재조합하여 구축하였다. 식물발현벡터 pMYV611, pMYV613, pMYV616, V621, V622 및 V623의 경우 각각 4,120개, 5,959개, 7,581개, 52,329개, 48,948개 및 56,188개의 캘러스 클론을 *Agrobacterium* 과 공동한 후 NPTII assay kit에 의해 *nptII* 유전자의 발현빈도를 조사한 결과 각 벡터별로 2.3-4.4%의 캘러스 클론에서 항체결합 양성반응을 보였고, 이들 중 최종적으로 선발된 형질전환 캘러스 클론은 pMYV611에서 3개 (0.07%), pMYV613에서 4개 (0.07%), pMYV616에서 2개 (0.02%), V621에서 51개 (0.1%), V622에서 72개 (0.15%) 및 V623에서 102개 (0.18%)를 각각 얻었다. 형질전환된 캘러스 클론으로부터 재분화된 식물체에서 유전자 도입여부를 Southern 분석으로 통해 확인한 결과 pMYV613에서 2개 식물체 및 V623에서 얻은 2개 식물체에서 각각 확인되었다.

### 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업과 농림부 농

림기술관리센터 (ARPC)의 지원을 받아 수행 하였다.

## 인용문헌

- Armstrong CL, Green CE, Phillips RL (1991) Development and availability of germplasm with high Type II culture formation response. *Maize Genetics Cooperative Newsletter* 65:92-93
- Chikwamba R, Cunnick J, Hathaway D, McMurray J, Mason HS, Wang K (2002) A functional antigen in a practical crop: LT-B producing maize protects mice against *Escherichia coli* heat labile enterotoxin (LT) and cholera toxin (CT). *Trans Res* 11: 479-493
- Cho MA, Park YO, Kim JS, Park KJ, Min HK, Liu JR, Clemente T, Choi PS (2005) Production of transgenic maize (*Zea mays* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Kor Plant Biotechnol* 32:91-95
- Curtiss RI, Cardineau CA (1990) Oral immunisation by transgenic plants, World Patent Application. WO 90/02484
- Curtis IS, Power JB, Hedden P, Phillips A, Lowe KC, Ward DA, Davey MR (2000) Transformation and characterization of transgenic plants of *Solanum dulcamara* L. –Incidence of transgene silencing. *Ann Bot* 86:63-71
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) Maize DNA miniprep. In: Malmberg R, Messing J, Sussex (eds), *Molecular Biology of Plants: A laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. pp 36-37
- Haq T, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268:714-716
- Kim HA, Utomo SD, Kwon SY, Min SR, Kim JS, Yoo HS, Choi PS (2009) The development of herbicide-resistant maize: stable *Agrobacterium*-mediated transformation of maize using explants of type II embryogenic calli. *Plant Biotechnol Rep* 3: 277-283
- Kong Q, Richer L, Yang YF, Arntzen CJ, Mason HS, Thanavala Y (2001) Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5335-5340
- Mason HS, Dominic Mam-Kit L, Arntzen CJ (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11445-11749
- Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ (1996) Expression of norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5335-5340
- Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ (1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin(LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 16:1336-1343
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nature Biotechnol* 18:1167-1171
- Roa-Rodriguez C, Nottenburg (1999) *NptII* gene in combination with paromomycin as a selective agent. Patent EP 927765A1
- Thanavala Y, Yang YF, Lyons P, Mason HS, Arntzen CJ (1995) Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:3358-3361