

최 종
연구보고서

분자육종기술을 이용한 기능성
채소 개발 연구

Development of functional lettuce by
molecular breeding technique

연구 기관

경희대학교

농림부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “분자유종기술을 이용한 기능성 채소 개발 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004년 8월 일

주관연구기관명 : 경희대학교

총괄연구책임자 : 박 영 두

세부연구책임자 : 박 영 두

연 구 원 : 이 미 경

연 구 원 : 김 형 석

연 구 원 : 김 수 윤

연 구 원 : 정 귀 미

연 구 원 : 이 주 안

연 구 원 : 김 보 령

협동연구기관명 : 중앙대학교

협동연구책임자 : 정 규 환

연 구 원 : 박 태 성

연 구 원 : 조 동 욱

요 약 문

I. 제 목

분자유종기술을 이용한 기능성 채소 개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

현재 농업은 생산성 및 부가가치의 증가가 한계에 이르고 있어 유용유전자를 주요 채소작물에 직접 도입하여 신기능성 작물을 개발이 절실히 요구되고 있다. 그러나 현재 채소작물은 주로 고전적인 방법에 의해서 육종이 이루어지고 있으며 이는 시간이 많이 소요되기 때문에 분자유종기술을 구사하여 단기간에 새로운 특성을 가진 품종을 육성할 수 있는 기술개발이 시급히 요구되는 실정이다. 최근에 널리 이용되고 있는 형질전환방법은 어떤 종류의 유용유전자도 불화합성을 극복하여 작물에 도입할 수 있을 뿐만 아니라 육종 년한을 단축시킬 수 있는 장점이 있다.

철은 인체 내에서도 꼭 필요한 영양소로 각 기관이 산소를 공급받기 위해서는 절대적으로 필요하다. 우리 몸에 있는 철분은 두 가지로 분류할 수 있는데 하나는 몸 안에 저장되어 있는 철분으로 이것은 단백질과 99%복합체로 존재하고 있으며 이것은 그리 문제가 되지 않으나 몸 안에서 다른 것과 결합되지 않고 따로 돌아다니는 철분은 독성 산소와 결합하여 그 파괴력을 촉진시켜서 위험에 빠뜨린다. 그러므로 철분은 단백질과 결합된 식품의 형태로 인체 내에 공급되는 것이 인체에 매우 유익하다고 할 수 있다. 철 저장단백질 ferritin은 지금까지 그 작용과 기능에 대해서는 많은 연구가 진행되었지만 직접적인 철분제재로서의 이용성은 최근에 이르러 연구 개발되기 시작하였다. 최근에 제약회사를 중심으로 천연철분제재로서 ferritin을 말이나 소에서 직접 분리한 상태로 시판하고 있으나 이는 광우병과 같은 질병의 감염에 주의해야 되며 사람으로부터 유래된 ferritin 유전자를 이용함으로써 이 문제를 해결할 수 있다. 그런면에서 생식용 채소인 상추에 ferritin 유전자를 이용해 철분을 강화시켜주면 철분이 부족한 빈혈환자나 임산부는 물론 일반인들에게 안정적으로 철분을 공급할 수 있어 건강에 크게 이바지 할 것으로 보인다.

인구증가로 야기되는 문제점은 식량 소비량의 증가뿐 만 아니라 약용으로 이용

되는 식물의 소비량도 함께 증가하게 함으로서 이들에 대한 소비량과 자연의 공급이 균형을 이루는 한은 식물자원은 무제한 공급될 수 있지만 특종 식물자원의 소비와 공급간의 균형이 깨질 경우 일부 약용식물의 멸종등의 심각한 문제를 초래하게 된다. 이러한 문제를 방지하기 위한 해결책 중 하나로 ‘약용식물의 효율적 이용’을 들 수 있는데, 실질적으로 약용식물내에서 그 식물만의 특이한 약효성분은 그 식물전체를 섭취한다고 해도 아주 적은 양밖에 취할 수 없다. 한 예로 항말라리아성 물질인 atemisinin 합성에 관여하는 terpene synthase 유전자에 관한 연구도 몇몇 모델작물에만 국한되어 있다.

또한 최근 들어 농산물 수입개방 등 국내·외의 농업사정이 급변함에 따라서 국민 총생산액중 농업 부문의 비중이 점차 감소하는 추세이어서 신기능성을 가진 고부가가치 품종을 개발하는 것이 중요하다. 상추는 세계적으로 중요한 위치를 차지하고 있는 샐러리용 채소로 최근 소득증가로 육류 소비가 증가하면서 상추의 소비량도 같이 증가하고 있는 추세이다. 이는 국민소득의 향상에 따라 실생활의 변화로 인하여 곡류의 소비가 둔화되고 육류의 소비가 증가되고 있는 현 시점에서 상추와 같이 신선하고 영양가치 높은 채소에 대하여 품질이 우수한 채소를 육종하려는 연구를 요구하게 되었다. 또한 생식용 채소인 상추는 식물체내에 있는 영양소를 그대로 우리가 섭취할 수 있다는 장점이 있어 식물의 안정성이 확인된다면 기능성 원예작물이용에 유용하다. 더 나아가 WTO 체제하의 농산물 수입개방은 채소작물분야에도 완전 경쟁체제가 도래함을 의미하며 UPOV 가입과 지적재산권 보호의 강화 및 최근 개정된 품종등록제 등으로 채소 품종생산에도 품종권 보호에 따른 로열티 문제가 제기될 것이므로 이에 대한 적극적 대처가 절실하게 느끼고 있는 실정이다. 또한 국내 분자유종분야는 자체개발기술 및 유용한 유전자가 미흡한 실정으로 작물의 유용유전자에 대한 지적소유권 보호대책이 전무한 실정이며 WTO에 대한 대응은 기술의 선진화가 필수적이며 지적소유권 보호를 강화하여 개발기술 및 유전자를 보호할 필요가 있다.

따라서 본 연구는 국민 건강증진을 위하여 사람으로부터 분리한 철저장 단백질, ferritin 유전자와 항말라리아성 물질인 atemisinin 합성에 관여하는 terpene synthase 유전자를 대표적인 엽채류인 상추에 도입시킴으로서 작물의 기능성을 증가시키기 위하여 수행되었으며 이와 더불어 분자유종기술에 의한 기능성 상추의 개발은 이들 작물의 새로운 수요를 창출할 뿐만 아니라 국제적으로도 경쟁력이 강화되어 농가 소득증대에 기여하게 될 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 분자유종기술을 이용하여 국민 건강증진을 목적으로 사람으로부터 분리한 철저장 단백질, ferritin 유전자와 항말라리아성 물질인 artemisinin 합성에 관여하는 terpene synthase 유전자를 대표적인 엽채류인 상추에 도입시킴으로써 작물의 기능성을 증가시켜 이들 작물의 새로운 수요를 창출할 뿐만 아니라 국제적으로도 경쟁력을 강화시켜 농가 소득증대에 기여코자 하는데 있다.

Ferritin유전자와 개똥썩에서 분리한 terpene synthase 유전자를 상추에 형질전환시키고 이를 발현시킬 수 있다면 고부가가치를 가진 기능성 상추를 육성함으로써 식물 천연의 철분을 안정적으로 공급하고 약용물질인 artemisinin을 공급함으로써 국민 건강에 크게 기여할 수 있다. 또한 분자유종기술의 핵심기술인 유전자 cloning과 형질전환시스템을 확립하고 형질전환 상추에 도입된 외래유전자의 후대 유전분석을 실시하고 우량 품종을 고정함으로써 새로운 품종을 개발하는데까지의 체계적인 연구를 통하여 분자유종의 실용화를 기할 수 있다.

표 1. 연구개발 내용 및 범위

연구개발내용	연구범위
사람 ferritin 유전자와 terpene synthase 유전자의 식물발현용 vector 개발 및 형질전환	<ul style="list-style-type: none"> - 사람 ferritin유전자와 terpene synthase 유전자를 운반하는 다양한 식물 발현용 벡터제작 - Terpene synthase 유전자 분리 - 상추의 형질전환 시스템 확립 - 사람 ferritin유전자와 terpene synthase 유전자로 상추의 형질전환 및 확인
사람 ferritin 유전자와 terpene synthase 유전자의 상추내에서의 발현양상 구명	<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 상추의 순화체계 확립 및 증식 - Mannose를 이용한 상추 형질전환 - 형질전환 상추의 발현양상 분석 - 사람 ferritin유전자를 이용한 상추의 double transformation
고기능성 상추의 육성기술확립 및 보급	<ul style="list-style-type: none"> - 이중형질전환된 상추의 발현양상 분석 - 형질전환 상추의 후대 검정 - 유용물질 분석

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

본 연구는 사람으로부터 유래된 ferritin 유전자와 개똥쑥에서 분리한 terpene synthase 유전자를 엽채류인 상추에 도입하고자 수행하였다. 형질전환을 위하여 kanamycin, hygromycin 등 selection marker를 달리하는 다양한 식물 발현용 vector를 제작하고 최적의 형질전환체계를 확립한 후 이들 유전자를 상추에 도입하였다. 또한 항생제저항성 유전자 보다 안전한 marker 유전자를 사용한 positive selection을 시도하기 위하여 phosphomannose-isomerase(PMI) 유전자를 이용하여 상추 형질전환체를 선발하는 일련의 PMI system의 상추에 적용 가능성을 확인하였다. 형질전환후 각각의 유전자가 도입된 상추 형질전환체내에서의 유전자 발현양상을 분석하고 후대에서의 발현양상과 유전 분석을 수행하였다. 또한 H-chain과 L-chain 두 종류의 ferritin 유전자를 이중 형질전환을 통하여 한 개체에 도입하고 두 유전자의 발현이 한 개체내에서 정상적으로 되는가를 분석하여 그 효용성을 증대하려고 하였다. 최종적으로 고농도의 ferritin과 artemisinin 함유 상추를 선발하기 위하여 물질함량을 분석하였으며 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

제 1 절 *Agrobacterium*을 이용한 상추 형질전환을 위한 재분화체계 확립

1. 품종선발을 위한 종자발아율 검정

특점적축면 (동부한농종묘 (주))과 청치마 (중앙종묘 주식회사) 및 적치마 (동원농산종묘(주)) 종자의 발아율은 청치마 품종이 가장 좋아 추후 형질전환에 이용하였다.

2. 성장조절물질이 상추 자엽의 재분화에 미치는 영향

Shoot 형성은 BA 1.0mg/L와 NAA 1.0mg/L 처리구에서 가장 높은 형성수를 보였고 뿌리의 형성은 BA 0.5mg/L와 NAA 1.0mg/L 처리구에서 가장 좋았다.

3. 항생제 및 제초제가 shoot 형성에 미치는 영향

상추의 형질전환 세포를 선발하기 위하여 항생제 kanamycin, hygromycin 과 제초제 phosphinotricin이 자엽 절편체로부터의 shoot발생에 미치는 영향을 조사하였다. Kanamycin의 경우 30 mg/L처리부터는 shoot가 전혀 발생되지 않

았으며 hygromycin은 5 mg/L처리부터 shoot형성이 억제되어 10 mg/L처리부터는 shoot가 전혀 발생되지 않음을 알 수 있었다. Cephalosporin type의 항생제인 carbenicillin과 cefotaxime은 shoot형성에 아무런 영향을 주지 않는 결과를 보여주어 *Agrobacterium*과의 공동배양 후 이를 제거하는데 적당한 항생제라 할 수 있었다. 제초제인 phosphinotricin의 경우 2 mg/L이상부터는 완전히 억제되어 항생제와 더불어 형질전환 세포의 선발에 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

제 2 절 Phosphomannose-isomerase (PMI) 유전자를 이용한 상추의 *Agrobacterium* 형질전환체계 확립

1. 형질전환 세포 선발을 위한 적정 mannose 농도 결정

상추의 재분화에 mannose가 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에서 sucrose 20 g/L와 mannose 15 g/L 조합에서 2.67개로 높은 shoot발생률을 보였으나 sucrose 20 g/L와 mannose 20 g/L 조합에서는 mannose에 의해 식물의 shoot가 전혀 발생하지 않았다.

2. PMI 유전자를 운반하는 pNOV2819 vector를 이용한 상추형질전환

PMI 유전자를 이용한 상추형질전환은 MS 배지에 NAA 1.0 mg/L, BA 1.0 mg/L, sucrose 20 g/L, mannose 20 g/L를 첨가하여 실시하였다. 상추의 자엽에 PMI 유전자를 운반하는 pNOV2819 vector를 포함하는 *Agrobacterium*의 접종이 이루어진 뒤 약 2주 후에 callus가 관찰되기 시작했으며 6주 뒤에 shoots가 관찰되기 시작했다. 재분화된 shoot는 다시 rooting 배지에 옮겨주었다. 형질전환 상추는 PMI 유전자 확인용 primer PMI-1(5'-ACAGCCACTCTCCATTC A-3')과 PMI-2(5'-GTTTGCCATCAC TTCCAG-3')를 이용해 PCR 분석으로 형질전환 여부를 확인하였다.

3. PMI와 rice ferritin 유전자를 포함하는 pNFE vector 작성 및 상추 형질전환

형질전환체의 positive selection을 위한 PMI 유전자와 ferritin의 over expression을 위한 rice ferritin 유전자를 운반하는 binary vector를 제작하기 위해 총 두 단계의 과정을 수행하였으며 작성된 binary vector는 pNFE로 명명하였다. 작성된 vector를 이용하여 mannose 20g/L가 첨가된 배지에서 상추 형질전환체를 선발하였다.

제 3 절 Ferritin 유전자를 이용한 기능성 상추 개발

1. 철분 농도 측정을 통한 상추 품종 선발

상추 12 품종의 철분 함량을 측정한 결과 최고 1.244mg/g (Sinkichu)부터 최하 0.152mg/g (양상추)까지의 분포를 보였으며 평균 함량은 0.639 mg/g으로 나타났다.

2. 형질전환을 위한 human ferritin 유전자를 운반하는 binary vector 작성

가. Human H-chain ferritin 유전자를 운반하는 FHV binary vector 작성

상추 형질전환을 위해 pET-5b가 운반하는 human H-chain ferritin 유전자를 pILTAB 357에 삽입하였다. 최종적으로 확인·작성된 FHV는 *Agrobacterium* LBA4404에 형질전환 후 확인과정을 거쳐 상추 형질전환에 사용하였다.

나. Human L-chain ferritin 유전자를 운반하는 FLV binary vector 작성

상추 형질전환을 위해 pET-5b가 운반하는 human L-chain ferritin 유전자를 pCAMBIA 1302에 삽입하였다. 최종적으로 확인·작성된 FLV는 *Agrobacterium* LBA4404에 형질전환 후 확인과정을 거쳐 상추 형질전환에 사용하였다.

다. Rice ferritin 유전자를 운반하는 RFV binary vector 작성

pBI-101-Hm binary vector에 삽입되어 있는 rice ferritin 유전자는 충북대학교 조용구 교수 연구팀으로부터 공여받았으며 본 실험을 위해 RFV로 명명하고 *Agrobacterium* LBA4404에 형질전환 후 확인과정을 거쳐 상추 형질전환에 사용하였다.

3. Ferritin 유전자로 상추의 형질전환

상추에 ferritin 유전자를 도입시키기 위하여 발현 vector를 포함하고 있는 *A. tumefaciens* LBA4404를 자엽 절편에 5분간 접종한 후 40 mg/L kanamycin 혹은 20 mg/L hygromycin이 포함된 선발배지에서 배양한 결과 배양 15일경부터 치상된 절편체의 상처난 부위로부터 kanamycin 혹은 hygromycin에 저항성을 갖는 callus와 신초가 형성이 되기 시작하였다. 재분화된 신초를 callus와 절편체를 제거하고 새 배지에 옮겨준 후 일정크기로 자라면 rooting배지에 옮겨 뿌리가 분화되어 재분화 개체를 획득할 수 있었다.

4. 형질전환체의 유전자 도입 확인

선발배지에서 유기된 상추 신초는 genomic DNA를 분리한 뒤, 형질전환체임을 확인하기 위해 PCR을 수행하였다. PCR로 확인된 형질전환 개체는 순화시켜 온실에서 재배하였다. 재배된 형질전환 상추는 Southern hybridization, RT-PCR, western blot analysis 등을 통하여 transgene의 전이 여부 및 전이된 유전자의 발현 여부 등을 분석하였다.

가. PCR 분석에 의한 유전자 도입 확인

세 종류의 ferritin 유전자가 전이된 상추 single transformants의 genomic DNA에 전이되었는지 확인하기 위해 선발배지에서 선발되어 온실에서 재배된 재분화 개체의 본엽으로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR 방법으로 확인하였다. 이와 더불어 human H-chain과 L-chain ferritin 유전자로 형질전환된 상추 double transformants도 PCR로 형질전환여부를 확인하였다. PCR방법을 수행한 결과 600bp(human H-chain ferritin), 550bp(human L-chain ferritin) 및 750bp(rice ferritin)의 PCR 산물을 확인하였다. 한편 상추 double transformants에서는 human H-chain ferritin 유전자의 600bp와 human L-chain ferritin 유전자의 500bp product를 한 개체로부터 확인할 수 있어 두 개의 유전자가 한 개체에 존재하는 것을 확인하였다. 반면에 형질전환을 시키지 않은 상추에서는 PCR product를 확인할 수 없었다.

나. Southern hybridization에 의한 형질전환체의 분석

Southern hybridization 분석은 PCR 분석에 의하여 일차적으로 유전자 도입이 확인된 형질전환체 10개 line을 각 유전자별로 선발하여 실시하였다. *EcoRI* enzyme 처리 후 ferritin 혹은 hygromycin으로부터 작성된 probe를 이용하여 확인을 한 결과 기대했던 size인 550bp (ferritin) 혹은 700bp (hygromycin)의 signal을 확인할 수 있었다. Southern hybridization 분석의 결과로 PCR로 확인된 line들로의 ferritin 유전자의 도입이 확인되었고 이들의 copy수는 1-3개인 것으로 확인되었다.

다. RT-PCR 분석에 의한 형질전환체의 발현 조사

유전자의 발현여부를 확인하기 위하여 우선 형질전환 상추로부터 total RNA를 분리한 뒤 RT-PCR을 실시하였다. 그 결과 기대했던 550bp(human H-chain ferritin), 520bp(human L-chain ferritin) 그리고 750bp(rice ferritin 유전자)의 RT-PCR 산물을 확인하였고 상추 double transformants로부터도 550bp(human H-chain ferritin)와 520bp(human L-chain ferritin) 산물을 동일

한 개체로부터 확인하였다. 이로서 각각의 형질전환체로부터 ferritin 유전자의 발현을 확인하였으며 특히 인간으로부터 분리한 유전자도 식물에서 발현됨을 확인할 수 있었으며 두 개의 유전자가 동시에 형질전환된 상추 형질전환체에서도 두 개의 유전자가 동시에 발현됨을 확인할 수 있었다.

라. Western blot 분석에 의한 형질전환체의 단백질 발현

상추 형질전환체에서의 ferritin 유전자의 발현 유무를 확인하기 위해 SDS-PAGE를 수행하였다. 상추 형질전환체 6개와 negative control로 비형질전환체인 상추 sample 1개, 그리고 positive control로 대장균에서 발현시킨 ferritin sample 1개를 SDS-PAGE로 각각 비교하였다. 실험결과 상추 형질전환체에서 약 42kDa위치의 signal을 확인할 수 있었고, 대장균 ferritin sample에서는 약 21kDa과 42kDa위치 두 곳에서 ferritin signal을 확인할 수 있었다. 반면 negative control 상추sample에서는 signal을 확인할 수 없었다.

5. 전이유전자의 후대 유전 분석

형질전환체의 종자는 homozygous 개체를 확보하고자 자가수분에 의해 얻었다. T₁ 세대에서 전이유전자의 분리비를 확인하기 위한 본 실험은 수확 종자수가 100개 이상인 6개의 형질전환체를 대상으로 kanamycin에 저항성을 보이는 종자와 그렇지 않은 종자의 비율을 조사하였다. 그 결과 kanamycin에 저항성을 보이는 종자의 발아를 기초로 전이유전자가 후대로 유전함을 확인할 수 있었으며 kanamycin에 저항성을 보이는 종자와 그렇지 않은 종자의 비율로 전이유전자의 copy수를 추정할 수 있었다. 그 결과 line 4는 3:1의 분리비를 보여 Mendel의 유전법칙에 따라 1 copy가 존재할 것으로 예측되었으며 copy수를 예측할 수 없는 line 2를 제외하고는 2 copy 이상이 도입됐음을 예측할 수 있었다.

6. 형질전환 상추의 생육 조사

순화과정을 거쳐 온실에서 재배된 상추는 초장을 일주일마다 측정하였으며 6주 후에 최종 조사를 하였다. 6주후의 초장에서 순화할때의 초장의 차이를 비교한 바 nontransformed 상추의 초장변이의 평균은 20 cm인 반면에 human H-chain ferritin 유전자를 이용한 형질전환 상추의 초장변이는 평균 23.1 cm, human L-chain ferritin 유전자는 23.75 cm, rice ferritin 유전자는 24.95 cm, 그리고 H-chain과 L-chain ferritin 유전자를 동시에 형질전환한 이중형질전환체는 29.2 cm이었다. 그러나 각각의 유전자를 이용한 형질전환에서 선발된 line들의 변이가 다양하여 (H-chain: 13~38.5 cm, L-chain: 10~38 cm, rice ferritin:

12~41 cm, 이중형질전환체: 17~42 cm) 이들 중 육성목적에 적합한 line의 선발이 필요하다고 판단되며 이를 위해 line을 선발 유지 중에 있다.

7. 형질전환 상추의 Fe⁺⁺ 이온 함량 조사

PCR, Southern hybridization 분석 및 RT-PCR등으로 확인된 single transformed 상추(세 종류의 ferritin 유전자)와 double transformed 상추의 철분 함량을 inductively coupled plasma (ICP) spectrometry로 측정된 결과는 Table 3과 같다. 평균 Fe⁺⁺ 이온 함량은 nontransformed 상추의 경우 0.420 mg/g인 반면에 human H-chain ferritin 유전자로 형질전환된 상추가 0.834 mg/g으로 약 2배정도 높았다. Human L-chain ferritin 유전자(0.536 mg/g), rice ferritin 유전자(0.553 mg/g), double transformed 상추(0.534 mg/g)등으로 형질전환된 상추도 약간의 높은 경향은 보였으나 많은 차이를 보이지는 않았다. 그러나 각각의 유전자별로 형질전환 line별 차이(H-chain ferritin: 0.260~1.165 mg/g, L-chain ferritin: 0.241~1.037 mg/g, rice ferritin: 0.260~1.165 mg/g, double transformants: 0.249~0.837 mg/g)가 크게 나타나 고함량을 보이는 line은 선발하여 고정중에 있다.

제 4 절 Sesquiterpene 생합성 관련 유전자의 분리 및 *Agrobacterium*을 이용한 상추로의 도입

1. 상추로부터의 germacrene A synthase를 코딩하는 유전자의 분리

청치마 상추로부터 germacrene A synthase를 코딩하는 유전자를 분리하기 위해 우선 primer를 작성하였고 이를 이용하여 RT-PCR 과정을 거쳐 일부 단편을 분리한 뒤 5', 3-RACE 방법을 이용하여, 전체의 유전자를 분리하였다. 분리된 1741bp의 full length germacrene A 합성유전자는 국화과 작물인 치커리와 썸바귀의 것과 높은 상동성을 보이고 있다.

2. *Agrobacterium*을 이용한 청치마 상추 germacrene A synthase 유전자의 식물체내로의 도입

분리된 full length의 germacrene A synthase 유전자 단편은 식물발현벡터인 pILTAB 357에 삽입되었고 그 후 *Agrobacterium*을 이용해 상추내로 도입되었다. 상추 자엽을 이용한 형질전환 후 kanamycin 선발배지에서 형질전환 신초를 유기하고, 그리고 rooting배지에서 2차 선발을 실시하였다. Rooting 배지에서 선발된 상추 형질전환체들은 vector 내 kanamycin 저항성 유전자를 증폭할 수

있는 primer인 NPTII F(5'-GAG GCT ATT CGG GCT ATG AAC TG-3') / R(5'-TAC GGT TAT CGC CGC TCC CGA-3')로 T-DNA의 상추 genome내로의 삽입을 확인하였다.

제 5 절 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 상추로의 terpene synthase 유전자 도입

1. 형질전환용 binary vector 작성

먼저 pET5a vector로부터 분리한 amorpho-4,11-diene synthase(terpene cyclase gene) 유전자를 중간 vector인 pBluescript II KS(+/-) 벡터의 *EcoRI*과 *BamHI* 자리에 삽입시켰다. 그 후 pILTAB 357 vector에 유전자가 sense 방향으로 삽입될 수 있도록, 그 상태에서 바깥쪽 제한효소 site인 *EcoRI*과 *XbaI*으로 처리하여 동일하게 처리된 pILTAB 357 vector와 연결시킴으로서 sense 방향으로 유전자가 삽입된 식물발현용 binary vector를 작성할 수 있었다. 이 binary vector는 freeze-thaw 방법을 이용해 *Agrobacterium* LBA4404로 도입되었다. *Agrobacterium*으로의 vector 도입은 PCR을 통해 1.64kb의 유전자가 삽입된 것을 확인하였다.

2. 형질전환 상추의 확인

선발배지에서 재분화된 신허로부터 genomic DNA를 분리한 뒤, 형질전환체임을 확인하기 위해 amorpho-4,11-diene synthase 유전자 내부의 일부를 증폭할 수 있는 primer(5'-AGA AGA AAA ACC TAT TCG CC-3', 5'-GTC TCC CAT ACG TGT GAA GT-3')로 PCR을 수행하였다. 그 결과, 9개체의 재분화체로부터 1.6kb의 band를 확인하였다.

또한 유전자의 후대유전 양상을 분석하기 위하여 확인된 9개체의 형질전환체를 자가수분하고 총 126개체의 T₁세대에 대하여 위 primer를 이용하여 PCR 반응으로 조사하였다. 그 결과, 9개체의 형질전환체 모두에서 T-DNA의 후대 전이를 확인하였고 그 비율은 1:1을 나타내었다.

3. T₁ 종자의 항생제 저항성 분석

9개체의 형질전환체로부터 채종된 종자를 종자 발아 배지에 kanamycin의 농도를 각각 0, 50 그리고 100 mg/L의 세 수준으로 조절하고 발아율을 조사하였다. Kanamycin 저항성을 나타내며 발아하는 종자의 비율을 조사한 바 항생

제를 첨가하지 않은 배지에서는 형질전환체 2번 및 5번에서 채종한 T₁ 종자가 75.0%, 77.8%의 발아율을 나타내었으며, 나머지 형질전환체들은 89% 이상의 높은 발아율을 나타내었다. Kanamycin의 농도를 50 mg/L로 조절한 실험군의 경우, 7번 형질전환체가 46.6%의 발아율을 보인 것과는 달리 다른 형질전환체는 75% 이상의 발아율을 나타내었다. Kanamycin을 100 mg/L의 농도로 조절한 실험군에 있어서는 모든 형질전환체에서 57% 이상의 발아율을 나타내었다. 특히 형질전환체 7번은 종자 발아 배지에 첨가한 항생제의 농도가 2배 높음에도 불구하고 67%의 발아율을 나타내었다.

4. 형질전환 상추내의 artemisinin 함량 분석

Artemisinin은 GC 분석에서 retention time이 10분 7초로 나타났으며 이 peak가 artemisinin인지 확인하기 위하여 GC/MS를 측정된 결과 m/z 282가 정확하게 나타나 artemisinin으로 확인되었다. 각 상추시료에 대하여 GC chromatogram를 이용하여 artemisinin을 분석한 결과 대조구 상추시료의 GC chromatogram에서 artemisinin의 retention time인 10분 7초 부근에서 여러 peak가 겹쳐서 나타나 확실히 어떤 peak가 artemisinin의 것인지 구별이 어려웠고 각 peak에 대하여 상추로부터 용매 추출 및 분획물의 수율을 확인하였다. 그러나 상추를 GC/MS로 측정된 결과 m/z 282을 나타내는 peak가 관측되지 않아 일반 상추에는 artemisinin이 함유되어 있지 않은 것으로 확인되었다. 또한 형질전환 상추시료의 GC chromatogram에서도 artemisinin의 retention time인 10분 7초 부근에서 여러 peak이 겹쳐서 나타나 각 peak에 대하여 GC/MS를 측정하였으나 m/z 282을 나타내는 peak는 관측되지 않아 형질전환 상추에도 artemisinin이 함유되어 있지 않은 것으로 확인되었다.

2. 기대효과 및 활용방안

가. 기대효과

1). 기술적 측면

- 현재 채소작물은 주로 고전적인 방법에 의해서 육종이 이루어지고 있으나 시간이 많이 소요되기 때문에 분자유종기술을 구사하여 단기간에 새로운 특성을 가진 품종을 육성할 수 있는 기술개발이 시급히 요구되는 실정이며 본 연구에서 확립된 유전자 분리, vector 작성, 상추의 재분화체계, 형질전환체계, double transformation, 순화 및 선발 등의 기술을 개발함으로써 국내 품종 육성의 기틀을 제공함.
- 상추의 형질전환체계 확립으로 본 과제에서 이용된 유전자 뿐만 아니라 어떤 종류의 유용유전자도 불화합성을 극복하여 작물에 도입할 수 있어 육종 년한의 단축을 가능케 하여 신품종 육성에 기여함.
- 현재 농업은 생산성 및 부가가치의 증가가 한계에 이르고 있어 유용유전자를 주요 채소작물에 직접 도입하여 신기능성 작물을 개발할 필요성이 있으며 본 연구에서 확립된 품종육성기술확립은 상추 뿐만 아니라 채소작물의 신품종 육성에 응용될 수 있어 채소산업전반에 크게 기여함.

2). 경제·산업적 측면

- 사람 ferritin 유전자와 terpene synthase 유전자의 이용으로 국민 건강 증진을 위한 의약품의 대체 효과를 가져올 수 있음.
- 육성기술의 개발로 및 고기능성 품종개발로 소비와 생산이 증가하여 새로운 고소득 작물로 자리 잡을 수 있음.
- 농산물 개방에 대응할 수 있는 국제적인 경쟁력을 갖춘 수출유망 품목으로 기대됨.

- 상추는 세계적으로 중요한 위치를 차지하고 있는 샐러리용 채소로 최근 소득증가로 육류 소비가 증가하면서 상추의 소비량도 같이 증가하고 있는 추세이다. 따라서 기능성 상추의 육성은 국민 건강 증진 뿐만 아니라 식생활이 비슷한 이웃 일본으로의 수출 가능성 등으로 농가의 고소득 대체작물로서 전망이 밝음.
- 분자유종기술에 의한 기능성 상추의 개발은 이들 작물의 새로운 수요를 창출할 뿐만 아니라 국제적으로도 경쟁력이 강화되어 농가 소득증대에 기여할 수 있음.
- 농산물 수입개방 등 국내·외의 농업사정이 급변함에 따라서 국민 총 생산액중 농업 부문의 비중이 점차 감소하는 추세이어서 신기능성을 가진 고부가가치의 품종을 개발 가능케함.

3). 사회·문화적 측면

- 농산물 수입개방 등 국내·외의 농업사정이 급변함에 따라서 농민들의 농업에 대한 의욕을 고취할 수 있음.
- 고부가가치 기능성 작물을 생산하면 농가의 소득이 증가되어 이농을 막고 농업에 대한 애착심과 긍지를 갖게 해 줄 것이다.
- WTO 출범으로 막대한 자본과 기술을 앞세운 외국기업이 진출하여 국내 농업 및 관련 업체에 큰 변화를 가져올 것이다. 이에 대처해 기능성 작물을 육성하는 기술을 자체적으로 개발하여 외국과 경쟁해야 함.

나. 활용방안

- 철 저장단백질 ferritin은 지금까지 그 작용과 기능에 대해서는 많은 연구가 진행되었지만 직접적인 철분제재로서의 이용성은 최근에 이르러 연구 개발되기 시작하였으며 본 연구의 결과도 충분히 활용 가능함.
- 최근에 제약회사를 중심으로 천연철분제재로서 ferritin을 말이나 소에서 직접 분리한 상태로 시판하고 있으나 이는 광우병과 같은 질병의 감염

에 주의해야 되며 사람으로부터 유래된 ferritin 유전자를 이용함으로써 이 문제를 해결할 수 있음.

- 항말라리아성 물질인 atemisinin 합성에 관여하는 terpene synthase 유전자에 관한 연구는 몇몇 모델작물에만 국한되어 있으나 본 연구에서 그 이용 가능성을 제시함.
- 따라서 국민 건강증진을 위하여 사람으로부터 분리한 철저장 단백질, ferritin 유전자와 항말라리아성 물질인 atemisinin 합성에 관여하는 terpene synthase 유전자를 대표적인 엽채류인 상추에 도입시킴으로서 작물의 기능성을 증가시키기 위한 연구가 수행되어 추후 충분히 활용 가능한 결과를 제시하여 그 활용가치가 충분하다고 판단됨.

SUMMARY

Section 1. Establishment of regeneration system for *Agrobacterium*-mediated transformation system of lettuce

1. Seed germination ratio test to select lettuce variety for this study

Seed germination ratio of Chungchima (ChoongAng Co.) was best among three lettuce varieties: Jeokchookmyeon (DongBu Co.), Chungchima (ChoongAng Co.) and Jeokchima (DongWon Seed Co.). Seeds of Chungchima were used for in vitro germination to transform cotyledon of lettuce.

2. Effect of plant growth regulators on regeneration from cotyledon explants of lettuce

For cotyledon, the best shoot induction medium contained 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L BA. And the root induction medium with 0.5 mg/L BA and 1.0 mg/L NAA was best for root induction.

3. Effect of antibiotics and herbicide on regeneration from cotyledon explants of lettuce

To select transformed cells, effects of four antibiotics (kanamycin, hygromycin, carbenicillin, and cefotaxime) and herbicide (phosphinotricin) on shoot regeneration from cotyledon explants of lettuce were examined. First of all no shoots were induced from any explants at 30 mg/L kanamycin or higher. Shoot induction of all explants was not affected by hygromycin at 1 or 2 mg/L, but was significantly reduced in presence of 5 mg/L and completely inhibited by 10 mg/L or higher. Carbenicillin and cefotaxime, which showed no toxicity to shoot regeneration, were suitable for use in tissue culture to eliminate *Agrobacterium* in transformation experiments after co-cultivation. Shoot regeneration from cotyledon was significantly reduced in the presence of 1 mg/L phosphinotricin and completely inhibited by 2 mg/L or higher. As a result, PPT at 2 mg/L may also be used to select transformed cells.

Section 2. Establishment of *Agrobacterium*-mediated transformation system of lettuce using phosphomannose-isomerase (PMI) gene

1. Determination of best concentration to select transformed cell

The effect of mannose on regeneration from cotyledon explant of lettuce was identified. As the results, shoot induction medium supplemented with 20 mg/L sucrose, 15 mg/L mannose showed 2,67 regenerants from cotyledon tissue. But shoot induction medium supplemented with 20 mg/L sucrose, 20 mg/L mannose did not show any shoot.

2. Lettuce transformation using pNOV2819 vector with PMI gene

Transformation of lettuce with PMI gene was conducted using MS medium with NAA 1.0mg/L, BA 1.0 mg/L, sucrose 20 g/L and mannose 20g/L. Cotyledon explants were infected by immersing them in the *A. tumefaciens* LBA4404 inoculum containing pNOV2819 vector with PMI gene. After six weeks shoots were induced and regenerated shoots were transferred to rooting medium. To confirm the transfer of PMI gene to the genome of lettuce plants, PCR was conducted using specific primers; PMI-1(5'-ACAGCCACTCTCCATTCA-3') and PMI-2(5'-GTTTGCCATCAC TTCCAG-3'). PCR analysis revealed the presence of PMI gene in the transgenic lettuce plants.

3. Construction of pNEF vector with PMI and rice ferritin gene and transformation of lettuce

For positive selection of transgenic lettuce plants and overexpression of ferritin gene, new binary vector containing PMI and rice ferritin gene was constructed by two steps and designated to pNFE. transgenic lettuce plants were selected onto selection medium with 20g/L mannose using constructed pNFE vector.

Section 3. Development of functional lettuce using ferritin genes

1. Iron concentration analysis to select lettuce variety for this study

Iron concentration in the 12 lettuce varieties was ranged from maximum 1.244mg/g (Sinkichu) to minimum 0.152mg/g (Yagsanchu) and average concentration was 0.639 mg/g.

2. Construction of binary vector with ferritin gene for transformation

1) Construction of FHV binary vector with human H-chain ferritin

For lettuce transformation human H-chain ferritin gene in pET-5b was cut and inserted into the pLTAB 357. After confirmation of constructed FHV and transformation of *Agrobacterium* LBA4404, this binary vector was used to lettuce transformation.

2) Construction of FLV binary vector with human L-chain ferritin

For lettuce transformation human L-chain ferritin gene in pET-5b was cut and inserted into the pCAMBIA 1302. After confirmation of constructed FLV and transformation of *Agrobacterium* LBA4404, this binary vector was used to lettuce transformation.

3) Construction of RFV binary vector with rice ferritin

pBI-101-Hm binary vector with rice ferritin gene was distributed by Dr. Yong-Goo, Cho, ChoonBuk University. This vector was designated to RFV and transformed to *Agrobacterium* LBA4404. After confirmation by PCR and restriction enzyme mapping of transformed *Agrobacterium* LBA4404. RFV was used to lettuce transformation.

3. Transformation of lettuce with ferritin gene

To transform lettuce with ferritin gene, cotyledon explants were infected by immersing them in the *A. tumefaciens* LBA4404 inoculum containing expression vector for 5 min. After infection, they were embedded in cocultivation medium with MS salts, 1.0 mg/L BA, 1.0 mg/L NAA, 3% sucrose and 0.8% agar at pH 5.7. After 3 days co-cultivation in the dark, the inoculated cotyledon explants were transferred to selective regeneration

medium, containing MS salts, 200 mg/L cefotaxim, and 30 mg/L kanamycin or 10 mg/L hygromycin. After cultivation for 15 days, kanamycin or hygromycin resistant callus and shoots were induced. The regenerated shoots were transferred to rooting medium, and rooted shoots were transplanted to soil after roots were appeared.

4. Confirmation of gene transfer to transgenic plants

Genomic DNA was isolated from each tissues of transformants selected onto selection medium and PCR was conducted to revealed the presence of ferritin gene. Transgenic lettuce plants confirmed by PCR were acclimated and grown in the green house. Transgenic lettuce plants grown in the green house were analyzed by Southern hybridization, RT-PCR, and western blot analysis to confirm transfer and expression of T-DNA.

1) Confirmation of gene transfer by PCR analysis

To confirm the transfer of three types of ferritin genes to the genome of single transgenic lettuce plants, PCR was conducted using specific primers designed from the three type of ferritin genes. Genomic DNA was isolated from each tissues of three types of single transformants and PCR analysis revealed the presence of three types of ferritin genes. Double trnasformed lettuce plants with human H-chain ferritin and human L-chain ferritin were also analyzed by PCR. PCR analysis revealed the presence of the expected 600bp, 530bp and 750bp products for human H-type ferritin, human L-type ferritin and rice ferrtin genes, respectively, but not from non trnasformed plant. In double transgenic lettuce plants, PCR products with 600bp and 500bp were observed in the same plants. This is meant that two types of ferritin genes were present in the same plant.

2) Analysis of transgenic plants by Southern hybridization

Southern hybridization analysis was performed on the total genomic DNA of the ten transformants confirmed by PCR analysis. When the genomic DNA was digested with *Xho*I and hybridized ferritin or hygromycin probe, a band of the expected 550b and 700b length was observed from the transgenic plants for human H-chain ferritin and hygromycin resistance genes, respectively, whereas no hybridization signals were detected in the

DNA of non-transformed plants. As the results, Southern hybridization revealed that ferritin gene was integrated to transgenic lettuce plants and the copy number of integrated genes varied from one to three.

3) Analysis of transgene expression by RT-PCR

Total RNA obtained from transgenic lettuce was analyzed by RT-PCR for expression of three types of ferritin genes. RT-PCR product was obtained from each transgenic plants, which is the predicted size but not from non transformed plant. RT-PCR analysis revealed the presence of the expected 550bp, 520bp and 750bp products for human H-type ferritin, human L-type ferritin and rice ferritin genes, respectively. These results showed that ferritin gene isolated from human could be expressed in plants. In double transgenic lettuce plants, PCR products with 600bp and 500bp were observed in the same plants. This is meant that two types of ferritin genes could be expressed in the same plant.

4) Analysis of protein expression by western blot analysis

SDS-PAGE was carried to identified protein expression in transgenic lettuce plants. Six transgenic lettuce plants, one nontransformed lettuce plant as negative control, and positive control ferritin expressed from *E. coli* were compared using western blot analysis. As a result, 42kDa signal from transgenic lettuce plants and two (21kDa and 42kDa) ferritin signals from *E. coli* were detected. But there was no signal from negative control lettuce.

5. Inheritance analysis of transgene in T₁ progenies

To obtain homozygous T₁ progeny, transformants with normal growth were selfed by self-pollination. In order to examine the segregation ratio of transgene in T₁ generation, six transgenic plants with more than 100 seeds were tested for the kanamycin resistance. T₁ seeds from selfed transformants were germinated on MS medium containing 100 mg/L kanamycin. And the number of seedling that were resistant and susceptible to kanamycin were counted. From this data we confirmed that transgene was inherited to the next generation and estimated the copy number of transgene. As the results, line 4 showed a progeny segregation ratio of 3:1 for resistance, which is the expected Mendelian inheritance of one

independent locus. Rest lines except line 2, were expected to the transgenic plants with multiple copies.

6. Analysis of plant growth of transgenic lettuce plants

In the T₀ generation of transgenic lettuce plants, plant heights were measured every 1 week and finally measured 6 weeks after acclimation. Differences of plant height of transgenic lettuce plants were compared to those of nontransformed plants. As the results double transformants with human H- and L-chain ferritin genes showed most increased plant height. However, plant heights of each lines transformed with different types of ferritin genes were dramatically varied: H-chain, 13~38.5 cm; L-chain, 10~38 cm; rice ferritin, 12~41 cm, double transformants, 17~42 cm.

7. Analysis of iron concentration in transgenic lettuce plants

To identify the difference of iron concentration between nontransformed plant and transgenic plants, the leaves from transgenic lettuce plants were analyzed by inductively coupled plasma (ICP) spectrometry.

Average Fe⁺⁺ concentration of transgenic lettuce plants with human H-chain ferritin gene contained 0.834 mg/g showing two times higher than 0.420 mg/g of nontransformed lettuce. Average Fe⁺⁺ concentration of transgenic lettuce plants with human L-chain ferritin gene, rice ferritin gene and double transformed were 0.536 mg/g, 0.553 mg/g, and 0.534 mg/g, respectively. However, iron concentration of lines transformed with different types of ferritin genes were dramatically varied: H-chain ferritin: 0.260~1.165 mg/g, L-chain ferritin: 0.241~1.037 mg/g, rice ferritin: 0.260~1.165 mg/g, double transformants: 0.249~0.837 mg/g. Valuable lines with high iron concentration were selected and grown for next generation.

Section 4. Isolation of gene related to sesquiterpene synthase and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of lettuce

1. Isolation of full length of germacrene A synthase gene from lettuce

First of all, to isolate full length of germacrene A synthase gene from

Chungchima lettuce, degenerate primers were designed based on consensus sequence by BLAST homology search using reported nucleotide sequences of same genes isolated already from other plants. As a result, full length (1741 bp) of germacrene A synthase gene of lettuce was isolated by RT-PCR using designed primers, and 5'-and 3'-RACE methods. Alignment of the nucleotide sequence (1741bp) of the germacrene A synthase gene with the known gene showed relatively high homologies with those of *Cichorium intybus* and *Ixeris dentata*L.

2. Transformation of Chungchima lettuce with *Agrobacterium tumefaciens* containing germacrene A synthase gene

Isolated full length of germacrene A synthase gene was inserted into plant expression binary vector, pILTAB 357. Transformed shoots were obtained by incubating cotyledon explants of Chungchima lettuce with *A. tumefaciens* containing pILTAB 357 binary vector with full length of germacrene A synthase gene. Selected shoots from kanamycin medium were transferred to rooting medium. After then, PCR analysis of genomic DNA from rooted shoots was performed to confirm that transgenic plants contained the expected T-DNA fragments. PCR analysis using NPTII primers (F:5'-GAG GCT ATT CGG GCT ATG AAC TG-3', R:5'-TAC GGT TAT CGC CGC TCC CGA-3') revealed the presence of the expected 700bp products of *nptII* gene.

Section 5. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of lettuce with terpene synthase gene

1. Construction of binary vector for plant transformation

To introduce amorpha-4,11-diene synthase (terpene synthase gene) to plant, binary vector pILTAB 357 was used. First of all, amorpha-4,11-diene synthase (terpene synthase gene) gene isolated from pET5a vector was inserted to *EcoRI* and *BamHI* site of intermediate vector, pBluescript II KS(+/-). After then, pILTAB 357 binary vector in a sense orientation was constructed by ligation of insert cleaved by *EcoR* and *XbaI* from pBluescript II KS(+/-) to *AscI* and *SwaI* sites in pILTAB 357 binary vector. Constructed

binary vector was introduced into *A. tumefaciens* strain EHA105 by freeze-thaw method and confirmed 1.64kb product by PCR analysis.

2. Confirmation of transgenic lettuce plants

PCR of genomic DNA was performed to confirm expected T-DNA fragments in the transgenic lettuce plants. Genomic DNA was isolated from regenerated shoots from selection medium and PCR was performed using primers designed from internal sequence of amorpho-4,11-diene synthase gene. PCR revealed the presence of the expected 1.6kb product from the nine regenerants. In order to examine the inheritance pattern in T₁ transformants, total 126 T₁ progenies from nine selfed transformants were analyzed by PCR using above primers. As a result, transgene inheritance was identified from all nine selfed transformant and the segregation ratio was 1:1.

3. Antibiotic resistance test of T₁ seeds

T₁ seeds from nine selfed transformants were germinated on MS seed germination medium containing three levels (0, 50 and 100 mg/L) of kanamycin and investigated germination ratio. As the results, on the medium without kanamycin, germination ratio of T₁ seed from transgenic lines 2 and 5 were shown 75.0% and 77.8%, respectively. Rest of transgenic lines were shown higher germination ratio with over 89%. At the 50 mg/L kanamycin, all transgenic lines, except transgenic line 7 with 46.6%, had over 75% of germination ratio. All transgenic lines were shown 57% of germination ratio or higher at the 100 mg/L kanamycin. Especially, transgenic line 7 had 67% of germination ratio, even though germination medium contained 2 times more kanamycin concentration than 50 mg/L kanamycin.

4. Analysis of artemisinin concentration in transgenic lettuce plants

Artemisinin in lettuce was identified by GC and GC/MS analysis. Standard artemisinin was found at 10 min. 7sec. (retention time) by GC analysis and confirmed m/z 282 by GC/MS. There were several peak points at retention time, however, both of nontransformed and transformed lettuce plants did not show peak point with m/z 282 in GC/MS analysis. This is meant that those lettuce plants do not have artemisinin.

CONTENTS

Summary (in Korean).....	1
Summary.....	15
Contents	23
Contents (in Korean)	25
Chapter 1. General Introduction.....	27
Chapter 2. Current Status of Technical Development	35
Chapter 3. Contents and Results of Research and Development	41
Section 1. Establishment of Regeneration System for <i>Agrobacterium</i> -mediated Transformation System of Lettuce.....	41
1. Introduction	41
2. Materials and Methods.....	42
3. Results and Discussions	43
Section 2. Establishment of <i>Agrobacterium</i> -mediated Transformation System of Lettuce Using Phosphomannose-Isomerase (PMI) Gene	50
1. Introduction	50
2. Materials and Methods	53
3. Results and Discussions.....	54
Section 3. Development of Functional Lettuce Using Ferritin Genes	65
1. Introduction	65
2. Materials and Methods	66
3. Results and Discussions	72

Section 4. Isolation of Gene Related to Sesquiterpene Synthase and <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Mediated Transformation of Lettuce.....	105
1. Introduction	105
2. Materials and Methods	108
3. Results and Discussions	111
Section 5. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Mediated Transformation of Lettuce with Terpene Cyclase Gene.....	125
1. Introduction.....	125
2. Materials and Methods	127
3. Results and Discussions.....	133
Chapter 4. Future Plan Due to the Results of Research and Development.....	153
Chapter 5. References.....	156

목 차

요약문 (국문).....	1
요약문 (영문).....	15
목차 (영문).....	23
목차 (국문).....	25
제 1 장 연구개발과제의 개요	27
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	35
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	41
제 1 절 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 를 이용한 상추 형질전환을 위한 재분화체계 확립.....	41
1 항 서론	41
2 항 재료 및 방법.....	42
3 항 결과 및 고찰.....	43
제 2 절 Phosphomannose-isomerase(PMI) 유전자를 이용한 상추 의 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 를 형질전환체계 확립.....	50
1 항 서론	50
2 항 재료 및 방법.....	53
3 항 결과 및 고찰.....	54
제 3 절 Ferritin 유전자를 이용한 기능성 상추 개발.....	65
1 항 서론	65
2 항 재료 및 방법.....	66
3 항 결과 및 고찰.....	72
제 4 절 Sesquiterpene synthase 관련 유전자의 분리 및 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> 를 이용한 상추로의 도입.....	105
1 항 서론	105
2 항 재료 및 방법.....	108
3 항 결과 및 고찰.....	111

제 5 절	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 를 이용한 상추으로의 terpene synthase 유전자 도입.....	125
1	항 서론	125
2	항 재료 및 방법.....	127
3	항 결과 및 고찰.....	133
제 4 장	연구개발결과의 활용계획.....	153
제 5 장	참고문헌.....	156

제 1 장 연구개발과제의 개요

국내 채소의 육종에 대한 연구는 과거에는 종내 계통 및 품종간의 교잡과 변이에 의존하여 잡종강세와 자가불화합성을 이용, 다수확 품종의 육종에 주력한 것에 비하여 근래에는 양적인 개량보다 내서성, 내병성, 내한성 등의 질적 형질에 대한 연구에 관심이 집중되고 있다. 그러나 채소의 육종은 고전적인 방법에 의해서 이루어지고 있어 시간이 많이 소요되기 때문에 단기간에 새로운 특성을 가진 품종을 육성할 수 있는 기술개발이 시급히 요구되어 이에 관한 연구가 여러 각도로 진행되고 있으며 분자생물학적인 방법을 이용한 접근 방법 또한 활발히 진행되고 있다. 또한 농업은 최근에 들어 생산성 및 부가가치의 증가가 한계에 이르고 있어 유용유전자를 주요 채소작물에 직접 도입하여 고품질 작물을 개발할 필요성이 있으며 최근에 널리 이용되고 있는 형질전환방법은 어떤 종류의 유용유전자도 불화합성을 극복하여 작물에 도입할 수 있을 뿐만 아니라 육종 년한을 단축시킬 수 있는 장점이 있다.

상추(*Lactuca sativa* L.)는 전세계적으로 샐러드용으로 가장 많이 이용되는 국화과 채소로써 원산지는 아시아 내륙지방으로 알려져 있고 재배역사가 오래되어 기원전 500년경부터 그 기록을 찾아볼 수 있을 정도로 세계인의 식용작물로 알려져 왔다. 최근에는 소득증가로 육류 소비가 증가하면서 상추의 소비량도 같이 증가하고 있는 추세이다.

철은 모든 생물체에 있어 매우 중요한 무기원소로써 동물 및 식물체 내에서 여러 생리현상에 영향을 미치는 것으로 알려져 있고 식물체 중에서는 전자운반과 호흡요소 및 단백질 구성 성분이 되며 질산과 황산의 환원작용, N_2 의 동화, NADP의 생성에 관여하며 엽록소 형성에 관여하고 효소의 구성성분 및 촉매역할을 하며 단백질 합성이나 뿌리의 생장에 관여하고 동물체 내에서는 절반 이상이 적혈구인 헤모글로빈의 성분으로 산소운반에 관여한다. 식물체 내에서 대부분 철은 ferric phosphoprotein의 형태(Fe^{+3})이며, ferrous(Fe^{+2})이온의 형태는 물질대사 과정에서 활성형태로 작용한다(Blackwell et al. 1969). 식물체 중 인산함량이 높아져 Fe의 흡수를 감소시키며 일반적으로 식물체내에서는 P : Fe의 비가 29 : 1 정도로 나타나며, K는 Fe의 흡수와 이동을 촉진시키고 N은 생육촉진과 함께 Fe의 결핍을 불러 일으키고 있는 것으로 알려지고 있다. 철은 식물체에 있어서 feretoxin 등의 기능분자로서 이용되는 것 이외에 ferritin이라고 불리며, 내부에는 철을 저장하고 있는 단백질로 알려져 있다.

Ferritin은 동물, 식물 그리고 박테리아에서 발견된 iron-storage protein으로 분자량이 약 450kDa의 거대 단백질이며 두 개의 주요 subunit인 heavy-chain

ferritin(21kDa)과 light-chain ferritin(19kDa)으로 구성되어 있다. 최근 이러한 ferritin 유전자의 발현을 통한 직접적인 철분 함량 증가로서의 이용 가능성이 널리 연구되고 있다. 철은 인체 내에서도 꼭 필요한 영양소이다. 만약 철분이 없다면 우리 몸에 산소를 운반하는 적혈구의 헤모글로빈이 만들어지지 않는다. 따라서 각 기관이 산소를 공급받기 위해서는 철분이 절대적으로 필요하다. 우리 몸에 있는 철분은 두 가지로 분류하고 있다. 하나는 몸 안에 저장되어 있는 철분으로 이것은 단백질과 99%복합체로 되어 있다. 이것은 그리 문제가 되지 않으나 몸 안에서 다른 것과 결합되지 않고 따로 돌아다니는 철분이 독성 산소와 결합하여 그 파괴력을 촉진시켜서 위험에 빠뜨리는 경우가 있다. 그러므로 철분은 단백질과 결합된 식품의 형태로 인체 내에 공급되는 것이 인체에 매우 유익하다고 할 수 있다. 그런면에서 생식용 채소인 상추에 ferritin 유전자를 이용해 철분을 강화시켜주면 철분이 부족한 빈혈환자나 임산부는 물론 일반인들에게 안정적으로 철분을 공급할 수 있어 건강에 크게 이바지 할 것으로 보인다.

항말라리아 효과의 artemisinin은 개똥쭉(*Artemisia annua* L.)이라는 국화과 작물에서 주로 생산되지만, 그 함유량은 건물중의 0.01%에서 0.5%밖에 지나지 않는다(Wallaart et al. 2000). 따라서, artemisinin이 많은 약에 대해 저항성을 갖는 *Plasmodium falciparum* 계통의 모기에 특히 효과가 있는 성분이라 할지라도(Steven et al. 2002) 주로 생산되는 야생 식물인 개똥쭉(*Artemisia annua* L.)에만 의지해서는 약품가격의 상승, 개똥쭉의 멸종으로까지 이어질 수 있다.

최근에는 유전자 재조합 기법의 발달과 더불어 *Agrobacterium tumefaciens*가 자연상태에서 식물체에 감염되어 형질을 전환시키는 현상이 분자 생물학적으로 이해되면서 유전자도입에 의한 인위적인 식물의 형질전환이 가능하게 되었다. 세포에 외래 유전자를 주입시키는 방법은, 생물적인 방법으로 자연상태에서 세포에 잘 침입하는 병원성 박테리아인 *A. tumefaciens*나 *A. rhizogenes*를 매개체로 이용하는데 *A. tumefaciens*는 토양 중에 서식하며 쌍자엽 식물이나 나자 식물의 상처를 통하여 숙주 식물체의 뿌리나 줄기에 감염이 되어 기주식물에 근두암증병(Crown gall disease)을 유발시키는 토양 미생물이다. 이 미생물은 약 200kb정도의 tumor inducing plasmid(Ti-plasmid)를 가지고 있으며 이 plasmid 내의 transfer-DNA(T-DNA)가 식물체의 염색체로 삽입되어 형질전환을 유도한다(Choi and Yang, 1988; Choi and Kim, 1992; Park et al., 1992). 이러한 성질을 이용해서 wild type Ti-plasmid에서 식물의 재분화에 영향을 미치지 않게 성장조절물질 유전자를 제거하고 그 자리에 우성이면서 선발 marker로 사용할 수 있는 kanamycin, hygromycine 등의 항생제 저항성 유전자, GUS 등의 유전자를 삽입시켜 형질전환에 사용하고 있다. *A. tumefaciens*을 이용한 형

질전환에는 vector의 크기가 크다는 단점이 있는데 이 단점은 binary vector system으로 보완하였다(Brown, 1995; Bruno, 1996; Kim et al., 1990). 이러한 식물형질전환 기술은 식물분자생물학 및 식물분자유종 분야 등 식물학 여러 분야의 연구에 이용되어 이들 분야에 상당한 발전을 가져왔다. 식물형질전환은 학문적인 측면에서 식물유전자의 구조, 기능 및 발현조사 연구에 주요 도구로 이용되어 식물분화 및 발달 등에 관여하는 여러 생명현상을 구명하는데 큰 역할을 해 왔을 뿐만 아니라 식물형질전환기술의 농업분야에 응용은 식물육종에 새로운 혁신을 일으킨 계기가 되었다. 즉 재래적인 육종방법으로는 얻기 어려웠던 고품질을 지닌 신품종 개발이 유용 유전자의 도입을 통하여 가능하게 되었다.

따라서 본 연구는 분자유종기술을 이용하여 국민 건강증진을 목적으로 사람으로부터 분리한 철저장 단백질, ferritin 유전자와 항말라리아성 물질인 artemisinin 합성에 관여하는 terpene synthase 유전자를 대표적인 엽채류인 상추에 도입시킴으로서 작물의 기능성을 증가시켜 이들 작물의 새로운 수요를 창출할 뿐만 아니라 국제적으로도 경쟁력을 강화시켜 농가 소득증대에 기여코자 수행하였다.

제 1 절 연구의 필요성

1. 기술적 측면

현재 농업은 생산성 및 부가가치의 증가가 한계에 이르고 있어 유용유전자를 주요 채소작물에 직접 도입하여 신기능성 작물의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 그러나 현재 채소작물은 주로 고전적인 방법에 의해서 육종이 이루어지고 있으며 이는 시간이 많이 소요되기 때문에 분자유종기술을 구사하여 단기간에 새로운 특성을 가진 품종을 육성할 수 있는 기술개발이 시급히 요구되는 실정이다. 최근에 널리 이용되고 있는 형질전환방법은 어떤 종류의 유용유전자도 불화합성을 극복하여 작물에 도입할 수 있을 뿐만 아니라 육종 년한을 단축시킬 수 있는 장점이 있다.

철은 인체 내에서도 꼭 필요한 영양소로 각 기관이 산소를 공급받기 위해서는 절대적으로 필요하다. 우리 몸에 있는 철분은 두 가지로 분류할 수 있는데 하나는 몸 안에 저장되어 있는 철분으로 이것은 단백질과 99%복합체로 존재하고 있으며 이것은 그리 문제가 되지 않으나 몸 안에서 다른 것과 결합되지 않고 따로 돌아다니는 철분은 독성 산소와 결합하여 그 파괴력을 촉진시켜서 위험에 빠뜨린다. 그러므로 철분은 단백질과 결합된 식품의 형태로 인체 내에 공급되는 것이 인체에 매우 유익하다고 할 수 있다. 철 저장단백질 ferritin은 지금까지 그 작용과 기능에 대해서는 많은 연구가 진행되었지만 직접적인 철분제재로서의 이용성은 최근에 이르러 연구 개발되기 시작하였다. 최근에 제약회사를 중심으로 천연철분제재로서 ferritin을 말이나 소에서 직접 분리한 상태로 시판하고 있으나 이는 광우병과 같은 질병의 감염에 주의해야 되며 사람으로부터 유래된 ferritin 유전자를 이용함으로써 이 문제를 해결할 수 있다. 그런면에서 생식용 채소인 상추에 ferritin 유전자를 이용해 철분을 강화시켜주면 철분이 부족한 빈혈환자나 임산부는 물론 일반인들에게 안정적으로 철분을 공급할 수 있어 건강에 크게 이바지 할 것으로 보인다.

인구증가로 야기되는 문제점은 식량 소비량의 증가뿐 만 아니라 약용으로 이용되는 식물의 소비량도 함께 증가하게 함으로서 이들에 대한 소비량과 자연의 공급이 균형을 이루는 한은 식물자원은 무제한 공급될 수 있지만 특종 식물자원의 소비와 공급간의 균형이 깨질 경우 일부 약용식물의 멸종등의 심각한 문제를 초래하게 된다. 이러한 문제를 방지하기 위한 해결책 중 하나로 '약용식물의 효율적 이용'을 들 수 있는데, 실질적으로 약용식물내에서 그 식물만의 특이한 약효성분은 그 식물전체를 섭취한다고 해도 아주 적은 양 밖에 취할 수 없다. 향말라리아성 물질

인 atemisinin 합성에 관여하는 terpene synthase 유전자에 관한 연구는 몇몇 모델 작물에만 국한되어 있다.

따라서 국민 건강증진을 위하여 사람으로부터 분리한 철저장 단백질, ferritin 유전자와 항말라리아성 물질인 atemisinin 합성에 관여하는 terpene synthase 유전자를 대표적인 엽채류인 상추에 도입시킴으로서 작물의 기능성을 증가시키기 위한 연구가 국내에서 수행되어야만 한다.

2. 경제·산업적 측면

농산물 수입개방 등 국내·외의 농업사정이 급변함에 따라서 국민 총생산액중 농업 부문의 비중이 점차 감소하는 추세이어서 신기능성을 가진 고부가가치 품종을 개발하는 것이 중요하다. 상추는 세계적으로 중요한 위치를 차지하고 있는 샐러리용 채소로 최근 소득증가로 육류 소비가 증가하면서 상추의 소비량도 같이 증가하고 있는 추세이다. 이는 국민소득의 향상에 따라 실생활의 변화로 인하여 곡류의 소비가 둔화되고 육류의 소비가 증가되고 있는 현 시점에서 상추와 같이 신선하고 영양가치 높은 채소에 대하여 품질이 우수한 채소를 육종하려는 연구를 요구하게 되었다. 또한 생식용 채소인 상추는 식물체내에 있는 영양소를 그대로 우리가 섭취할 수 있다는 장점이 있어 식물의 안정성이 확인된다면 기능성 원예작물이용에 유용하다.

WTO 체제하의 농산물 수입개방은 채소작물분야에도 완전 경쟁체제가 도래함을 의미하며 UPOV 가입과 지적재산권 보호의 강화, 및 최근 개정된 품종등록제 등으로 채소 품종생산에도 품종권 보호에 따른 로열티 문제가 제기될 것이므로 이에 대한 적극적 대처가 절실하게 느끼고 있는 실정이다. 또한 기능성 상추의 육성은 국민 건강 증진 뿐만 아니라 식생활이 비슷한 이웃 일본으로서의 수출 가능성 등으로 농가의 고소득 대체작물로서 전망이 밝다.

따라서 분자유종기술에 의한 기능성 상추의 개발은 이들 작물의 새로운 수요를 창출할 뿐만 아니라 국제적으로도 경쟁력이 강화되어 농가 소득증대에 기여하게 될 것이다.

3. 사회·문화적 측면

WTO 출범으로 막대한 자본과 기술을 앞세운 외국기업이 진출하여 국내 농업 및 관련 업체에 큰 변화를 가져올 것이다. 또한 농산물 수입개방 등 국내·외의 농업사정이 급변함에 따라서 농민들의 농업에 대한 의욕이 점차 감소하고 있다. 따라서 고부가가치 기능성 작물을 생산하면 농가의 소득이 증가되어 이농을 막고

농업에 대한 애착심과 긍지를 갖게 해 줄 것이다.

또한 우리나라는 분자유종분야에서 자체개발기술 및 유용한 유전자가 미흡한 실정으로 작물의 유용유전자에 대한 지적소유권 보호대책이 전무한 실정이며 WTO에 대한 대응은 기술의 선진화가 필수적이며 지적소유권 보호를 강화하여 개발기술 및 유전자를 보호할 필요가 있다. 최근에 들어 이 분야의 연구수준이 많이 향상되었다고는 하나 아직도 그 기술수준이 단편적이어서 유전자분리에서 형질전환을 거쳐 새로운 품종으로 완전히 개발하는데까지 체계적이고 집중적인 연구가 필요하고의 실용화 기술의 확보가 요구되고 있다.

따라서 ferritin과 terpene synthase 유전자를 도입하여 철분과 artemisinin의 함량이 높은 기능성 상추 품종을 육성하는 기술을 자체적으로 개발하여 외국과 경쟁해야 한다.

제 2 절 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 분자유종기술을 이용하여 국민 건강증진을 목적으로 사람으로부터 분리한 철저장 단백질, ferritin 유전자와 항말라리아성 물질인 artemisinin 합성에 관여하는 terpene synthase 유전자를 대표적인 엽채류인 상추에 도입시킴으로서 작물의 기능성을 증가시켜 이들 작물의 새로운 수요를 창출할 뿐만 아니라 국제적으로도 경쟁력을 강화시켜 농가 소득증대에 기여코자 하는데 있다.

Ferritin유전자와 개똥썩에서 분리한 terpene synthase 유전자를 상추에 형질전환시키고 이를 발현시킬 수 있다면 고부가가치를 가진 기능성 상추를 육성함으로써 식물 천연의 철분을 안정적으로 공급하고 약용물질인 artemisinin을 공급함으로써 국민 건강에 크게 기여할 수 있다. 또한 분자유종기술의 핵심기술인 유전자 cloning과 형질전환시스템을 확립하고 형질전환 상추에 도입된 외래유전자의 후대 유전분석을 실시하고 우량 품종을 고정함으로써 새로운 품종을 개발하는데까지의 체계적인 연구를 통하여 분자유종의 실용화를 기할 수 있다.

따라서 본 과제는 표 1과 같이 연도별 주요 연구개발 내용 및 범위를 설정하여 수행하였다. 기 확보된 사람으로부터 유래된 ferritin유전자와 개똥썩에서 분리한 terpene synthase 유전자를 엽채류인 상추에 도입하고자 하였다. 형질전환을 위하여 kanamycin, hygromycin 등 selection marker를 달리하는 다양한 식물 발현용 vector를 제작하고 최적의 형질전환체계를 확립한 후 이들 유전자를 상추에 도입하였다. 또한 항생제저항성 유전자 보다 안전한 marker 유전자를 사용한 positive selection을 시도하기 위하여 phosphomannose-isomerase(PMI) gene을 이용하여 상추 형질전환체를 선발하는 일련의 PMI system의 상추에 적용 가능성을 확인하였다. 형질전환후에는 각각의 유전자가 도입된 상추 형질전환체내에서의 유전자 발현양상을 분석하고 후대에서의 발현양상과 유전 분석을 수행하였다. 또한 H-chain과 L-chain 두 종류의 ferritin 유전자를 이중 형질전환을 통하여 한 개체에 도입하고 두 유전자의 발현이 한 개체 내에서 정상적으로 되는가를 분석하여 그 효용성을 증대하려고 하였다. 최종적으로 고농도의 ferritin과 artemisinin 함유 상추를 선발하기 위하여 물질함량을 분석하였다.

표 1. 연도별 연구개발 내용 및 범위

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2001~2002)	사람 ferritin 유전자와 terpene synthase 유전자의 식물발현용 vector 개발 및 형질전환	<ul style="list-style-type: none"> - 사람 ferritin유전자와 terpene synthase 유전자의 cloning - 사람 ferritin유전자와 terpene synthase 유전자를 운반하는 다양한 식물 발현용 벡터제작 - 상추의 형질전환 시스템 확립 - 사람 ferritin유전자와 terpene synthase 유전자로 상추의 형질전환 및 형질전환체 확인
2차 년도 (2002~2003)	사람 ferritin 유전자와 terpene synthase 유전자의 상추내에서의 발현양상 구명	<ul style="list-style-type: none"> - 형질전환 상추의 순화체계 확립 및 증식 - 형질전환 상추의 발현양상 분석 - 유용물질 분석 - 사람 ferritin유전자와 terpene synthase 유전자를 이용한 상추의 double transformation
3차 년도 (2003~2004)	고기능성 상추의 육성 기술확립 및 보급	<ul style="list-style-type: none"> - 이중 형질전환된 상추의 발현양상 분석 - 고기능성 상추의 선발 및 고정 - 형질전환 상추의 후대 검정

제 2 장 국내외 기술개발 현황

철은 사람을 포함한 모든 생물체에 없어서는 안될 무기원소로 특히 동물 및 식물체내에서 호흡, 광합성, 질소고정, 세포분열 등 여러 생리활성에 영향을 미치며 이러한 철의 대사과정에 관여하는 효소, 단백질, 질병 등이 연구되고 있다. 철은 70% 정도가 hemoglobin 및 myoglobin 등의 heme 구성분으로 체내에 분포하고 있으며 약 30% 정도가 심장, 간 비장, 골수 등에 ferritin의 형태로 들어 있어 유사시 단백질의 생합성 및 효소의 활성화에 이용된다. 이러한 철을 이용하기 위해 체내에서 철의 섭취시 heme 철은 바로 소장으로 흡수되는 반면 nonheme 철의 경우 여러 산화환원 과정을 거쳐 apoferritin과 결합하여 철 저장 단백질인 ferritin의 형태로 존재하게 된다. Ferritin은 식물, 동물 그리고 박테리아 등 거의 모든 생물에 넓게 존재한다. Ferritin은 약 450KDa의 거대 단백질이며 하나의 분자당 최고 4,500개의 Fe atoms를 저장할 수 있다. Ferritin은 432 symmetry, 24 subunits로 구성되어 있으며 약 4500 Fe atom을 중심으로 구형의 껍질모양으로 subunits가 둘러싸여 있고 8개의 hydrophilic channel과 6개의 hydrophobic channel을 가지고 있다(Kim et al., 1998).

Ferritin 유전자에 관한 연구는 대장균, 쥐 등의 다양한 세포에서 시작되어(Theil, 1987) 주로 동물에서의 발현이 연구되었고 식물에서의 연구는 아주 최근에서야 이루어졌다. 콩에서 분리된 ferritin 유전자를 밀에 도입하였으나 중자에서는 발현되지 않고 vegetative 세포에서만 발현되어 철의 농도를 높혔다(Drakakaki, 2000). 또한 형질전환 벼의 경우 종자특이 프로모터에 의한 콩의 ferritin 유전자가 대조구에 비해 3배 정도 높은 농도의 철을 축적하는 효과를 보였다(Goto et al., 1999). 모델 식물인 담배의 경우 콩으로부터 분리된 ferritin 유전자를 CaMV35S 프로모터에 조작하여 형질전환한 식물체에서 대조구보다 많은 량의 철이 축적되는 것으로 보고되었다(Goto et al., 1998; Wuytswinkel et al., 1999).

Human ferritin은 Heavy(H-)-chain ferritin(21kDa)과 Light(L-)-chain ferritin(19kDa)의 2개의 주요 subunit으로 나뉜다. H-chain ferritin과 L-chain ferritin은 각각 심장과 적혈구, 간과 비장에 많이 분포되어 있는 것으로 알려져 있다. 두 subunit간에는 55%의 amino acid sequence의 일치율을 보이고 기능적으로도 차이를 보이는데 H-chain ferritin은 낮은 isoelectric points(pI)와 iron content를 보이고 L-chain ferritin은 높은 pI와 iron content를 보이므로 H-chain ferritin이 L-chain ferritin 보다 더 빠르게 철을 흡수하고 방출한다고 알려져 있다(Ryu, 1999). Ferritin의 기능은 앞서 말했듯이 철 저장기능이 있고 산화적 스

트레스등의 생물학적 비생물학적 스트레스의 방어 기능, 중금속을 무독성화 시키는 기능이 있다(Briat, 1996; Goto et al. 1998, 2000). 그러나 사람에서 유래된 철 저장 단백질 ferritin 유전자가 대장균내에서 발현된 바는 있으나 (Lee et al., 1998) 식물에 적용된 연구는 국내·외에서 아직 없으며 식물에서 분리된 ferritin 유전자도 식량작물을 대상으로 했을 뿐 엽채류를 대상으로 한 연구는 보고되지 않았다.

항말라리아 효과를 가지고 있는 artemisinin은 개똥쭉(*Artemisia annua* L.)이라는 국화과 식물에서 주로 생산되지만, 그 양은 건물중에 대해 0.01%에서 0.5%밖에 지나지 않는다(Wallaart et al. 2000). 따라서, 아무리 artemisinin이 많은 약에 대해 저항성을 갖는 *Plasmodium falciparum* 계통의 모기에 특히 효과가 있는 성분이라 할 지라도(Steven et al. 2002) 주로 생산되는 야생 식물인 개똥쭉(*Artemisia annua* L.)에만 의지해서는 약품가격의 상승, 개똥쭉의 멸종으로 까지 이어질 수 있다. 개똥쭉으로부터 많은 양의 artemisinin을 얻기 위한 노력은 여러 방면에서의 연구에 의해 시도되어졌다. 예를 들어, 기후에 따른 개똥쭉 내의 artemisinin함량을 분석한다거나(Wallaart et al. 2000), 생육단계별로 생합성량 분석(Laughlin 1994)을 통해 많이 생산하는 개체를 선발하여 약용성분생산 및 이용에 활용한다거나 혹은 부위별 분석을 통해 artemisinin이 많이 생성되는 부위인 뿌리털을 아그로박테리움(*A. rhizogenes*)을 이용, 대량 유도시켜 그 성분을 다량 획득하고자 하였다(Cai et. al., 1995, Liu et. al., 1998). 그러나 이러한 시도들은 결국 실패로 이어졌다. 그 결과, 최근엔 유전공학적 방법과 접목한 또 다른 새로운 시도가 나타났는데, 새로운 방법은 artemisinin이 식물체내에서 생합성되는 2차대사 경로에 대한 연구와 그 생합성에 결정적인 유전자 분리 및 이용을 통해 생합성을 조절하고자 하는 연구이다. Artemisinin생합성에 결정적으로 관여하는 유전자는 이미 2000년 초부터 국내외 연구진들에 의해 분리되어 그 염기서열과 그 유전자에 의해 codon화된 효소의 분석도 이루어진 상태에 있다(Chang et. al., 2000, Mercke et. al., 2000, Wallaart et. al., 2001). 하지만, 이 유전자가 실질적으로 식물에 적용되어 artemisinin 대량 생성에 이용된 경우는 드물다고 할 수 있다. 단지, 네덜란드의 Wallaart 연구팀에 의해 분리된 유전자는 담배에 도입되어 형질전환되지 않은 개체에서는 전혀 얻을 수 없었던 artemisinin이 생체중 그램당 0.2에서 0.7나노그램을 얻었다는 보고가 있다(2001).

Artemisinin은 sesquiterpene의 일종으로 일반적으로 그 전구체는 일반 sesquiterpene과 마찬가지로 farnesyl diphosphate(FDP)로부터 합성되며 amorpha-4,11-diene synthase에 의해 일단 그것이 amorpha-4,11-diene형태로 고리화 되면 그 후엔 산화·환원등의 효소가 없이 artemisinin은 생합성 된다고

알려져 있다(Wallaart et al. 2001). 그림 1은 artemisinin 생합성과정을 나타낸 것이며, 결국, amorpha-4,11-diene synthase 유전자에 의한 고리화 단계는 artemisinin 생합성에 있어서 결정적인 단계라 할 수 있으며 이 과정에 terpene cyclase가 관여하고 있다. Artemisinin의 합성에 관여하는 terpene synthase 유전자를 개똥쭉(*Artemisia annua*)에서 분리하여 대장균에서 발현을 유도한 보고가 있으며 (Chang et al., 2000) 담배 (Facchini and Chappell, 1992)와 감자 (Yoshioka, et al., 1999)등에서 terpene cyclase 유전자의 분리를 보고하였으나 채소작물로의 적용과 발현에 관한 연구는 수행되지 않았다.

T.E. Wallaart et al.: Amorpha-4,11-diene synthase

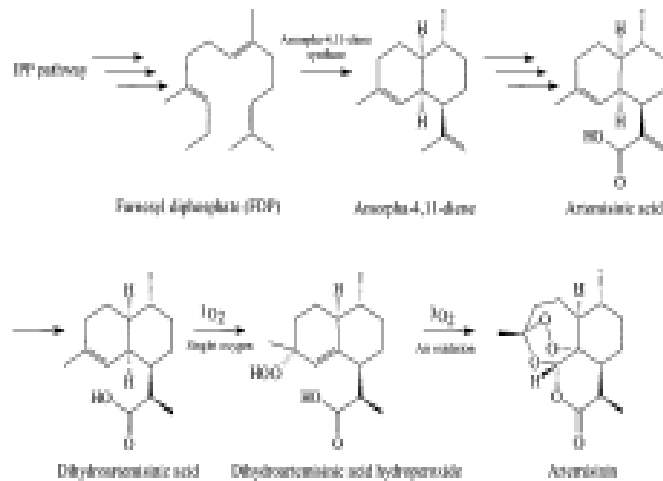


Fig. 1. Biosynthetic pathway of artemisinin

외래의 유전자를 다른 세포에 전이시켜서 이들이 그 곳에서 발현하도록 유도하는 형질전환은 유해곤충, 질병, 한냉, 한발 등 환경 스트레스에 대해서 저항성이 있는, 보다 영양가가 높은 작물을 수확함으로써 농업발전에 큰 가능성을 가져왔다. 식물체는 형질전환을 받은 단일세포로부터 번식력이 있는 식물체가 될 수 있으며 식물세포에 도입된 유전자는, 최종적으로 종자를 통해 몇 세대에 걸쳐서 후손에 전해지게 된다.

*A. tumefaciens*는 토양 중에 서식하며 쌍자엽식물이나 나자식물의 상처를 통하여 숙주 식물체의 뿌리나 줄기에 감염이 되면 감염원인 *Agrobacterium*을 제거하여도 탈분화된 세포가 계속 분열하여 종양이 형성되는 근두암중병(crown gall disease)이 유발된다(Zambryski et al., 1989). 이는 식물과 bacteria간의 어떠한 유전물질의 전이로 형질전환이 일어났음을 말하며 이러한 현상을 이용하여 *Agrobacterium*을 효과적으로 이용하여 식물체내에 외래 유전자를 전이하는 방법에 관한 연구들이 진행되어 졌다(van Kavaveke et al., 1974). *Agrobacterium*의 Ti-plasmid(tumor-inducing plasmid)가 자연계에서 식물체에 자신의 DNA 일부를 전이시키는 과정이 구명되고 Ti-plasmid의 개발이 이루어져 원하는 외래의 유전자를 이 Ti-plasmid 내에 삽입하여 이용 가능하게 되었다. 그러나 Ti-plasmid 자체는 암조작을 유발할 뿐만 아니라 그 크기가 너무 커서 식물형질전환용 vector로 직접 이용하는 것이 불가능하다. 따라서 도입하고자 하는 유전자를 *Escherichia coli*의 복제 가능한 plasmid에 삽입하고 이 재조합 plasmid를 *Agrobacterium*으로 옮겨 *Agrobacterium*의 *vir* 유전자의 전이 능력을 이용하여 식물체로 삽입시키는 binary vector system이 개발되었다(Bevan, 1984; Hoekema and Schilperot, 1983; Hoekema et al., 1984). Binary vector system은 외부유전자가 삽입된 T-DNA 부위를 지닌 plasmid와 *vir* 기능을 부여하는 disarmed Ti-plasmid 두 가지 plasmid가 존재하여도 T-DNA 부위가 식물체로 도입되는 결과를 보여 다양한 형질전환 식물체의 획득이 가능하게 되었다. 이러한 vector의 개발로 형질전환 연구가 활성화되었으며 이를 이용한 바이러스 저항성 식물의 획득 등 다양한 형질전환 식물체의 획득이 가능하게 되었다(Abel et al., 1986; Chia et al., 1992; Cuozzo et al., 1988; Harrison et al., 1987; Tumer et al., 1987).

형질전환된 식물체를 배지 안에서 선발하기 위해서 널리 사용되는 selection marker로는 kanamycin 저항성을 갖는 neomycin phosphotransferase, type II (NPT II) 유전자와 hygromycin 저항성을 갖는 유전자가 있다. NPT II gene은 식물 transcriptional promoters(NOS or CaMV 35S)와 결합되어 수많은 식물종에서 형질전환에 효과적으로 이용되었다(Beck et al., 1982). 또 다른 selectable marker인 hygromycin B는 원핵세포와 진핵세포안의 단백질 합성을 억제하는 aminocyclitol antibiotic으로(Kaster et al., 1983) hygromycin phosphotransferase의 활성(aph IV)에 대해 저항력을 갖는 것으로 *E. coil*의 구조에서 처음 발견되었다(Rao et al., 1983). Reporter 유전자로는 chloramphenical acetyl transferase(CAT) gene (Ward et al., 1988)과 β-glucuronidase(GUS) gene 등이 있는데 이를 확인하는 다양한 분석방법들이 보고(Jefferson et al., 1987) 되었다.

최근에는 제초제 저항성 유전자인 *bar* gene을 이용한 선발은 기존의 selectable marker에 비해 그 선발법과 정확성이 상당히 높다고 보고되었다. 제초제 저항성 유전자인 *bar* gene을 이용하여 제초제의 주성분인 phosphinotricin(PPT)을 직접 배지에 첨가하여 보다 확실한 선발을 하고자 하였는데(de Block et al., 1995), *bar* gene은 phosphinotricin acetyltransferase를 생산하는 유전자로서 PPT의 free NH₄ group을 acetylation하여 autotoxicity를 막아 줌으로써(Pigeaire et al., 1997) 기존의 selectable marker에 비해 그 선발법과 정확성이 상당히 높다고 보고되었고 더 나아가 제초제 저항성 유전자를 이용한 형질전환식물체를 금어초(Hoshino et al., 1998)와 고추(Park, 1999) 등으로부터 획득하였다.

그러나 최근 GM 작물이 대량으로 상업화되면서 유전자 재조합에 사용하는 selection marker들이 다른 식물이나 미생물로 전이될지도 모른다는 우려가 제기되기 시작하였다(Kuvshinov et al., 2001; Ritala et al., 2002). 가능성이 매우 희박하지만, 제초제 저항성을 주는 selection marker 유전자는 사람이나 동물이 섭취했을 경우에 장내 미생물로 전이될 수도 있지 않을까 하는 의구심이 생겨났다(Nap et al., 1992). 이러한 우려들은 실제로 여러 유럽 국가들에서는 GM작물 개발은 물론 재배도 금지시키는 법이 통과되는 등 세계 환경단체들의 GMO 반대 이유가 되고 있다.

따라서 marker-free 형질전환 기술이 요구되기 시작했다. 현재까지 marker를 쓰지 않는 방법, 마커를 쓰더라도 추후 형질전환체에서 제거하는 방법, 안전한 marker를 사용하는 방법 등이 고안되었다(Hohn et al., 2001). 또한 marker만 포함하는 벡터를 목적유전자 벡터와 섞어서 이식한 후 선발 확인하고 다음 세대에서 교배에 의해 제거시키는 방법이 시도되고 있으나 이 경우 동시형질전환이 전제되어야 하고 교배를 통한 선발이 매우 단순 반복적으로 지루하게 진행되어야 하는 단점이 있으며 효율이 낮다(Hansen et al., 1997; Yoder and Goldsbrough, 1994). 최근에는 *Cre*에 의한 재조합의 신호로 인식되는 *loxP* 부위에서 재조합을 일으키게 하여 그 사이에 있던 항생제 저항성 선별유전자를 제거하는 방법 등이 담배와 *arabidopsis* 등 모델 식물에서 시도되었다.

최근에는 항생제저항성 유전자 보다 안전한 marker 유전자를 사용한 positive selection이 시도되고 있다. 대표적인 예로서 phosphomannose-isomerase(PMI) gene을 이용한 식물 형질전환 방법(Positech)이 Syngenta에 의해 실용화 되고 있다. 대부분의 식물세포는 배지에 mannose를 첨가했을 경우 glucokinase 등에 의해 mannose 6-phosphate (M6P)를 생산하게 되는데 결국 이를 대사할 수 없기 때문에 더 이상 분화하지 못하고 carbon 부족으로 고사하게 된다. 하지만 PMI gene을 selection marker로 이용해 형질전환 하면 PMI 효소를 생산해

M6P를 F6P로 전환하여 대사할 수 있는 화합물로 바꾸어 준다. 따라서 이를 대사하여 성장할 수 있는 형질전환체를 선발할 수 있다.

상추의 형질전환에 대한 국내 보고는 있으나 그 효율이 높지 않은 편이고 (Chung et al., 1998a,b; Jeong et al., 2000) 효율적인 형질전환체계확립을 위한 연구는 보고되지 않았고 주로 형질전환체를 얻는 것에 그쳐 이에 대한 연구를 실시하여 좀 더 빠른 기간 내에 형질전환체를 유도할 수 있는 방법을 제시하면 상추를 이용한 유용유전자의 도입이 더욱 활성화되리라고 판단된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 *Agrobacterium*을 이용한 상추 형질전환을 위한 재분화체계 확립

1 항 서 론

*Agrobacterium*의 Ti-plasmid(tumor-inducing plasmid)가 자연계에서 식물체에 자신의 DNA 일부를 전이시키는 과정이 규명되고 이를 이용해 한 작물로 새로운 형질을 직접 도입하고자 하는 시도가 이루어져 왔다. *Agrobacterium tumefaciens*는 토양중에 서식하며 쌍자엽식물이나 나자식물의 상처를 통하여 숙주 식물체의 뿌리나 줄기에 감염이 되면 감염원인 *Agrobacterium*을 제거하여도 탈분화된 세포가 계속 분열하여 세포로 구성된 종양이 형성되는 근두암종병(crown gall disease)이 유발된다(Zambryski et al., 1989). 이는 식물과 bacteria간의 어떠한 유전물질의 전이로 형질전환이 일어났음을 말하며 이러한 현상을 이용하여 *Agrobacterium*을 효과적으로 이용하여 식물체내에 외래 유전자를 전이하는 방법에 관한 연구들이 진행되어 졌다(van Kavaveke et al., 1974).

형질전환된 식물체를 배지 안에서 선발하기 위해서 널리 사용되는 selectable marker로는 전이된 callus나 shoot의 선발이 가능한 kanamycin 저항성을 갖는 neomycin phosphotransferase, type II(NPT II) 유전자와 hygromycin 저항성을 갖는 유전자가 있다. NPT II 유전자는 식물 transcriptional promoters(NOS or CaMV 35S)와 결합되어 수많은 식물종에서 형질전환에 효과적으로 이용되었다(Beck et al., 1982). 또 다른 selectable marker인 hygromycin B는 원핵세포와 진핵세포안의 단백질 합성을 억제하는 aminocyclitol antibiotic으로(Kaster et al., 1983) hygromycin phosphotransferase의 활성(aph IV)에 대해 저항력을 갖는 것으로 *E. coil*의 구조에서 처음 발견되었다(Rao et al., 1983). Reporter 유전자로는 chloramphenical acetyl transferase(CAT) gene(Ward et al., 1988)과 β -glucuronidase(GUS) gene 등이 있는데 이를 확인하는 다양한 분석방법들이 보고(Jefferson et al., 1987) 되었다.

최근 제초제 저항성 유전자인 bar gene을 이용하여 제초제의 주성분인 phosphinothricin(PPT)을 직접 배지에 첨가하여 보다 확실한 선발을 하고자 하였는데(de Block et al., 1995), bar gene은 phosphinothricin acetyltransferase를

생산하는 유전자로서 PPT의 free NH₄ group을 acetylation하여 autotoxicity를 막아 줌으로써(Pigeaire et al., 1997) 기존의 selectable marker에 비해 그 선발법과 정확성이 상당히 높다고 보고되었고 더 나아가 제초제 저항성 유전자를 이용한 형질전환식물체를 금어초(Hoshino et al., 1998)와 고추(Park, 1999) 등으로부터 획득하였다.

본 연구는 *A. tumefaciens*를 이용한 상추의 형질전환체 획득을 최종 목적으로 상추의 자엽을 이용한 재분화 체계와 항생제 감응성을 조사하고자 수행되었다.

2 항 재료 및 방법

가. 품종선발을 위한 종자발아율 검정

상추종자는 시중에서 구입한 뚝섬적축면 [동부한농종묘 (주)]과 청치마 (중앙종묘 주식회사) 및 적치마 [동원농산종묘(주)] 종자를 MS (Murashige & Skoog) 기본배지 (2.2g/L MS medium, 15g/L sucrose, 8g/L agar)에 치상하여 20℃, 16시간 광 조건, 8시간 암조건으로 처리, 4일간 발아시켜 발아율을 조사하였다. 종자소독은 70% 에탄올에 10-20초 정도 전 처리한 후 25% clorox에 15분 처리하고 멸균수로 3-4회 세척하였다.

나. 성장조절물질이 상추의 재분화에 미치는 영향

공시재료로는 청치마상추(중앙종묘)를 이용하였으며, 성장조절물질로는 BA와 NAA를 이용하였다. 종자의 발아는 MS(Murashige & Skoog) 배지에 30 g/L의 sucrose와 8 g/L의 agar가 첨가된 발아배지에서 실시하였다. 1-2주후 발아된 자엽을 30 g/L sucrose와 8 g/L agar가 첨가된 MS배지에 5수준의 BA (0 mg/L, 0.1 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 1.5 mg/L, 2.0 mg/L)와 5수준의 NAA (0 mg/L, 0.1 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 1.5 mg/L, 2.0 mg/L)를 이용한 25 조합을 각각 첨가한 재분화배지에 plate당 7-8개씩 치상하고 각 처리당 3반복을 실시하였다. 조사는 매 1주마다 callus, shoots, roots의 형성수를 기록하고 최종 조사는 치상후 6주후 실시하였으며 재분화된 shoot는 길이가 5 mm 이상의 것을 조사하였다

다. 항생제 및 제초제가 shoot 형성에 미치는 영향

본 실험은 상추의 재분화에 최소한의 영향을 주며 형질전환체를 선발할 수 있는 최소의 항생제와 제초제 농도를 구명하기 위하여 실시하였다. 항생제 및 제초제 감응성 실험에서는 기 확인된 최적의 성장조절물질 조합, NAA 1.0 mg/L + BA 1.0 mg/L를 MS 기본배지에 첨가한 shoot 유기 배지에 kanamycin은 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 및 200 mg/L를, hygromycin은 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 및 200 mg/L를, carbenicillin은 0, 500, 및 1000mg/L를, cefatoxime은 0, 200 및 400 mg/L를, 그리고 phosphinothricin 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 및 100 mg/L를 각각 0.45 μ m filter로 소독한 후 autoclave된 배지에 첨가하여 사용하였다. 자엽은 petri dish당 5개를 3반복으로 시기가 다르게 3회를 실시하였으며 치상 6주 후 shoot의 길이가 5 mm 이상의 것을 조사하였다.

3 항 결과 및 고찰

가. 품종선발을 위한 종자발아율 검정

뚝섬적축면 [동부한농종묘 (주)]과 청치마 (중앙종묘 주식회사) 및 적치마 [동원농산종묘(주)] 종자를 MS 기본배지 (2.2 g/L MS medium, 15 g/L sucrose, 8 g/L agar)에 치상하여 각각에 대한 발아율을 조사한 결과 청치마는 종자 발아 및 생장이 모두 양호하였으나 뚝섬적축면과 적치마의 경우는 종자발아율은 양호하나 생장이 청치마에 비해 저조한 결과를 보여 청치마 품종이 추후 형질전환에 이용하였다.

나. 성장조절물질이 상추 자엽의 재분화에 미치는 영향

상추 자엽을 BA와 NAA의 여러 가지 농도별 조합이 첨가된 MS배지에 치상한 6일후부터 BA와 NAA처리구에서는 callus와 roots가 형성되었으나 무처리구에서는 roots와 callus 형성이 관찰되지 않았다. BA 무처리시 NAA처리는 미미하긴 하지만 callus 형성에 영향을 미쳤다. 반대로 NAA의 무처리시 BA처리 는 농도 증가에 따라 callus 형성도 증가되어 callus 형성에는 BA의 영향이 더 큰 것으로 보인다. 이는 BA의 농도가 2.0 mg/L 일 때 대체적으로 높은 callus 형성을 보이는 것으로도 알 수 있다. 그러나 BA 1.5 mg/L와 NAA 2.0 mg/L 처리구에서 오히려 callus 형성이 감소추세를 나타내는 것으로 보아 고농도의 식물호르몬의 혼용처리는 callus 형성에 있어 효율이 떨어짐을 알 수 있었다. 가

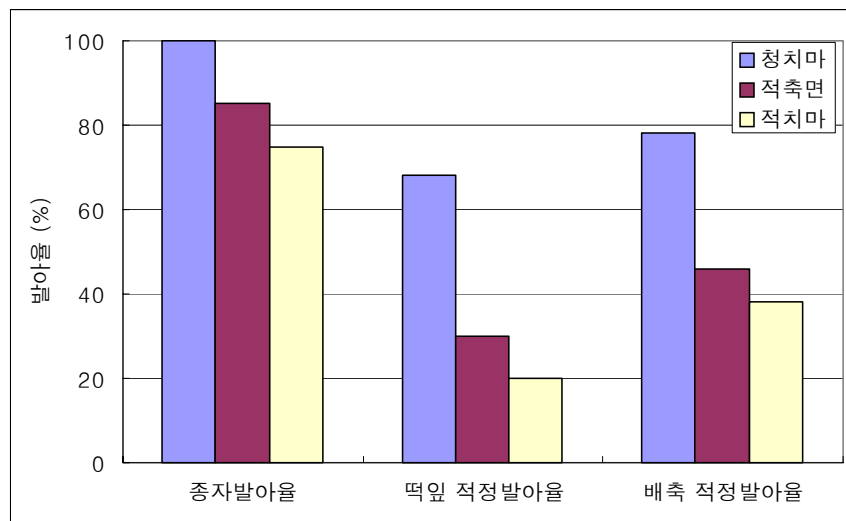


Fig. 1. Germination ratio of lettuce seeds

* 떡잎 적정 발아율: 떡잎의 길이가 *Agrobacterium*을 infection 시키기에 적당한 수준의 것으로 본 실험에서는 약 0.5 ~ 0.7 cm 길이의 떡잎을 사용하였으며 전체 종자 발아량 중 앞의 기준에 해당하는 것의 比로 나타낸 것.

* 배축 적정 발아율 : 배축의 길이가 *Agrobacterium*을 infection 시키기에 적당한 수준의 것으로 본 실험에서는 약 0.7 ~ 1.0 cm 길이의 배축을 사용하였으며 전체 종자 발아량 중 앞의 기준에 해당하는 것의 比로 나타낸 것.

장 높은 callus 형성을 보인 처리구는 BA 1.0 mg/L와 NAA 0.5 mg/L 였으며 BA 2.0 mg/L와 NAA 1.0 mg/L에서도 높은 결과를 나타내었다(자료 미제시). 또한 BA 0.5 mg/L와 NAA 0.5 mg/L 처리구에서는 낮은 농도 혼용에도 불구하고 다른 높은 농도조합에서와 비슷한 결과가 나왔으므로 경제성 측면을 생각했을 때 의미가 있다 하겠다.

Shoot의 형성에 있어 BA와 NAA의 영향을 살펴보면 무처리구보다 처리구에서 shoots 형성이 더 높았다(Table 1). Shoot 형성에 있어서 NAA 무처리시 BA의 농도 증가함에 따른 shoot 형성이 관찰되지 않아 BA 단독처리로는 shoot의 형성이 어려운 것이므로 나타난다. 반면에 혼용처리시 즉 BA 1.0 mg/L와 NAA 1.0 mg/L 처리구에서 가장 높은 형성수를 보여 본 연구의 형질 전환에는 BA 1.0 mg/L와 NAA 1.0 mg/L의 성장조절물질을 혼용처리하여 실시하였다.

뿌리의 형성에 있어 BA와 NAA의 효과가 제일 적게 나타났다 (자료 미제시). 무처리시구에서는 뿌리가 전혀 형성되지 않았으며 BA 0.5 mg/L와 NAA 0.5 mg/L 단용처리구에서도 역시 뿌리가 형성되지 않았는데 이는 callus와 shoot의 형성에서와 마찬가지로 혼용처리가 오히려 좋지 않은 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 가장 좋은 처리구는 NAA 1.0 mg/L 였다.

식물의 기관 분화는 식물 조직의 절편을 배양하는 배지내 성장조절물질의 조성비에 좌우되며 성장조절물질의 비율이 높은 경우 shoot, callus, 뿌리가 형성된다(Skoog and Miller, 1957; Cho and Soh, 1981; Cho, 1985). 이와 같이 조직 배양에서 기관분화에 대한 초기 연구 이후 외래 성장조절물질은 물론 조직절편의 내재 식물호르몬이 callus, shoot, 뿌리의 발생에 미치는 연구는 많은 성과를 거두고 있다(Doerschug and Miller, 1967; Cho, 1985; Cho and Soh, 1989; Nigra et al., 1989; Thorpe, 1993).

본 실험에서는 auxin류인 NAA와 cytokinin류인 BA가 callus와 shoot 발생의 전 과정을 통하여 볼 때 촉진적이었으며 결과적으로 추후 형질전환 실험에는 재분화를 위해 BA 1.0 mg/L와 NAA 1.0 mg/L의 성장조절물질을 혼용처리하여 실시하기로 하였다.

다. 항생제 및 제초제가 shoot 형성에 미치는 영향

상추의 형질전환 세포를 선발하기 위하여 항생제 kanamycin, hygromycin과 제초제 phosphinotricin이 자엽 절편체로부터의 shoot발생에 미치는 영향을 조사하였다. 자엽의 경우 kanamycin은 10 mg/L처리까지 shoot발생에 아무 영향을 받지 않았으나 20 mg/L처리부터 발생수가 감소하여 30 mg/L처리부터는 shoot

Table 1. Effect of BA and NAA on number of shoots induced from cotyledon explants of 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.).

BA (mg/L)	Number of shoots regenerated per explant ^z				
	NAA (mg/L)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
0	0.000 c ^y	0.000 c	0.310 bc	0.322 bc	0.939 ab
0.5	0.000 c	1.211 ab	0.694 bc	0.905 ab	1.017 ab
1.0	0.000 c	1.305 ab	1.697 a	0.330 bc	0.946 ab
1.5	0.000 c	1.590 ab	1.263 ab	0.618 bc	0.613 bc
2.0	0.000 c	0.955 ab	1.213 ab	0.902 ab	1.249 ab

^zTotal number of regenerated shoots / total number of explants.

^yMean separation within column and row by Duncan's multiple range test at 5% level.

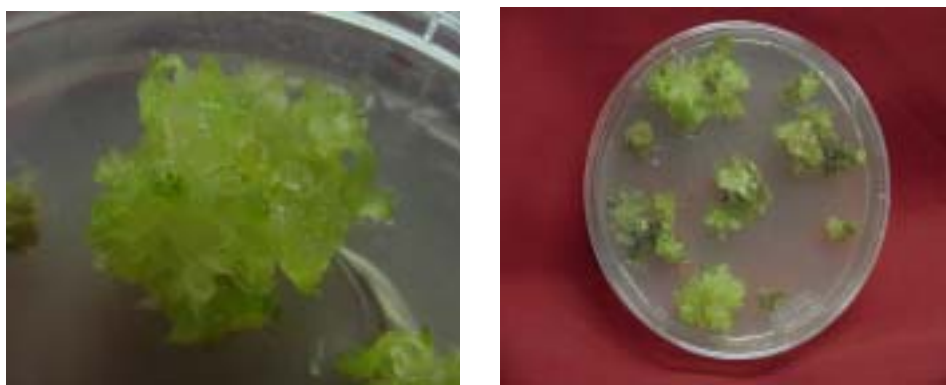


Fig. 2. Callus and shoots regeneration from cotyledon explants of 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.).

가 전혀 발생되지 않았다(Table 2). Hygromycin은 5 mg/L처리부터 shoot형성이 억제되어 10 mg/L처리부터는 shoot가 전혀 발생되지 않아 상추 형질전환을 위해서는 10 mg/L 이상의 농도를 사용할 수 있음을 알 수 있었다(Table 2). Hygromycin은 kanamycin보다도 낮은 농도에서 선발이 가능하다고 생각되며 선발이 가능한 농도 이상에서 배양된 절편체 조직은 모두 흰색으로 변환 후 생장이 완전히 멈췄다. Callus의 형성은 shoot유기를 억제하는 농도인 10mg/L에서도 약간씩 유기되었으나 시간이 지남에 따라 결국 흰색으로 변환 후 생장이 멈췄다. 본 실험에서 선발 가능 농도로 결정된 kanamycin 30 mg/L와 hygromycin 20 mg/L는 타 작물의 형질전환시 사용되는 kanamycin 50 mg/L 또는 100 mg/L와 hygromycin 20 mg/L 또는 30 mg/L와 비슷하거나 약간 낮은 농도이다. Cephalosporin type의 항생제인 carbenicillin과 cefotaxime은 shoot형성에 아무런 영향을 주지 않는 결과를 보여주어(Table 2) *Agrobacterium*과의 공동배양 후 이를 제거하는데 적당한 항생제라 할 수 있었다. *Agrobacterim* 제거에는 일반적으로 carbenicillin 500 mg/L 혹은 cefatoxime 200 mg/L를 사용하는데 본 실험의 결과를 볼 때 이 농도는 shoot형성에 아무런 영향을 주지 않으면서 효과적으로 제거할 수 있으리라 판단된다.

제초제인 phosphinotricin의 경우 1 mg/L처리부터 shoot형성이 감소하기 시작하여 2 mg/L이상부터는 완전히 억제되어 항생제와 더불어 형질전환 세포의 선발에 이용될 수 있음을 알 수 있었다(Table 3). 최근에 들어 사용되고 있는 phosphinotricin은 아주 낮은 농도에서 선발이 가능한 새로운 선발 marker로 형질전환 vector의 bar gene을 이용하여 선발이 가능하다. 상추에서도 역시 이 선발 marker의 이용이 가능하다고 생각되나 너무 낮은 농도에 의한 선발이라 escape률이 증가할 수 있다는 단점이 있다고 생각된다.

Table 2. Effect of kanamycin, hygromycin, carbenicillin, and cefatoxime on shoot regeneration from cotyledon explants of Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.).

Antibiotics (mg/L)	Number of shoots regenerated per explant ^z
Kanamycin ^y	
0	1.84 a ^x
5	1.55 a
10	1.66 a
20	0.93 b
30	0.00 c
40	0.00 c
Hygromycin	
0	1.78 a
5	0.81 b
10	0.00 c
20	0.00 c
30	0.00 c
40	0.00 c
Carbenicillin	
0	1.67 a
500	1.85 a
1000	1.54 a
Cefatoxime	
0	1.55 a
200	1.49 a
400	1.57 a

^zTotal number of regenerated shoots / total number of explants.

^yData on kanamycin and hygromycin concentrations of 50, 60, 70, 80, 90, 100, and 200 mg/L were not shown, where no single shoot regeneration in all media with cotyledon explants.

^yMean separation within column by Duncan's multiple range test at 5% level.

Table 3. Effect of phosphinotricin (PPT) on shoot regeneration from cotyledon explants of 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.).

Phosphinotricin ^y (mg/L)	Number of shoots regenerated per explant ^z
0	1.49 a ^x
1	0.87 b
2	0.00 c
3	0.00 c
4	0.00 c
5	0.00 c

^zTotal number of regenerated shoots / total number of explants.

^yData on phosphinotricin concentrations of 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50 and 100 mg/L were not shown, where no single shoot regeneration in all media with cotyledon explants.

^xMean separation within column by Duncan's multiple range test at 5% level.

제 2 절 Phosphomannose-isomerase (PMI) 유전자를 이용한 상추의 *Agrobacterium* 형질전환 체계 확립

1 항 서 론

식물형질전환에 쓰이는 selection system은 통상적으로 hygromycin이나 kanamycin과 같은 항생물질을 이용한 방법이 대부분이었다. 하지만 항생제저항성 유전자를 selection marker로 이용해 형질전환 되지 않은 세포는 죽이고 항생제저항성 유전자를 가진 세포는 살리는 방법에 대해 여러 가지 문제가 제기되고 있다. 형질전환의 궁극적인 목표는 유용 유전자를 가진 우수한 식물체를 육성하여 인간이 이용하는데 있다. 하지만 이 우수한 식물체에 들어있는 항생제저항성 유전자로 인해 오히려 인간과 환경에 해를 끼칠 수 있다는 우려가 높아지고 있다.

또한 최근 GM 작물이 대량으로 상업화되면서 유전자 재조합에 사용하는 selection marker들이 다른 식물이나 미생물로 전이될지도 모른다는 우려도 제기되기 시작하였다(Kuvshinov et al., 2001; Ritala et al., 2002). 가능성이 매우 희박하지만, 제조제 저항성을 주는 selection marker 유전자는 사람이나 동물이 섭취했을 경우에 장내 미생물로 전이될 수도 있지 않을까 하는 의구심도 생겨났다(Nap et al., 1992). 이러한 우려들은 실제로 여러 유럽 국가들에서는 GM작물 개발은 물론 재배도 금지시키는 법이 통과되는 등 세계 환경단체들의 GMO 반대 이유가 되고 있다. 따라서 marker-free 형질전환 기술이 요구되기 시작했다. 현재까지 marker를 쓰지 않는 방법, 마커를 쓰더라도 추후 형질전환체에서 제거하는 방법, 안전한 marker를 사용하는 방법 등이 고안되었다(Hohn et al. 2001). 또한 marker만 포함하는 벡터를 목적유전자 벡터와 섞어서 이식한 후 선발 확인하고 다음 세대에서 교배에 의해 제거시키는 방법이 시도되고 있으나 이 경우 동시형질전환이 전제되어야 하고 교배를 통한 선발이 매우 단순 반복적으로 지루하게 진행되어야 하는 단점이 있으며 그 효율이 낮다(Hansen et al. 1997; Yoder와 Goldsbrough, 1994). 또 다른 방법의 하나로 *Cre*에 의한 재조합의 신호로 인식되는 *loxP* 부위에서 재조합을 일으키게 하여 그 사이에 있던 항생제 저항성 선별유전자를 제거하는 방법 등이 담배와 *arabidopsis* 등 모델 식물에서 시도되었다.

최근에는 항생제저항성 유전자 보다 안전한 marker 유전자를 사용한 positive selection이 시도되고 있다. 대표적인 예로서 phosphomannose-isomerase(PMI) 유전자를 이용한 식물 형질전환 방법(Positech)이 Sygenta에 의해 실용화 되고

있다. 대부분의 식물세포는 배지에 mannose를 첨가했을 경우 glucokinase 등에 의해 mannose 6-phosphate (M6P)를 생산하게 되는데 결국 이를 대사할 수 없기 때문에 더 이상 분화하지 못하고 carbon 부족으로 고사하게 된다. 하지만 PMI 유전자를 selection marker로 이용해 형질전환 하면 PMI 효소를 생산해 mannose-6-phosphate를 fructose-6-phosphate로 전환하여 대사할 수 있는 화합물로 바꾸어 준다(Fig. 1). 이런 성질을 이용해 PMI유전자로 형질전환하고 배지에 mannose를 넣어주면 형질전환 된 세포는 배지로부터 carbon을 공급받아 살아남고 형질전환 되지 않은 세포는 죽게 된다. PMI를 이용한 선발은 corn(*Zea mays*), rice(*Oryza sativa*), wheat(*Triticum aestivum*), soybean(*Glycine max*), tomato(*Lycopersicon esculentum*) 등의 작물에서 성공적으로 이루어졌으나 상추에 mannose를 이용한 형질전환방법에 관한 연구는 아직 미흡하다.

본 연구는 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 상추의 형질전환체 획득을 최종 목적으로 phosphomannose-isomerase (PMI) 유전자를 이용한 positive selection 방법 상추로의 적용 가능성을 확인하기 위하여 수행하였다.

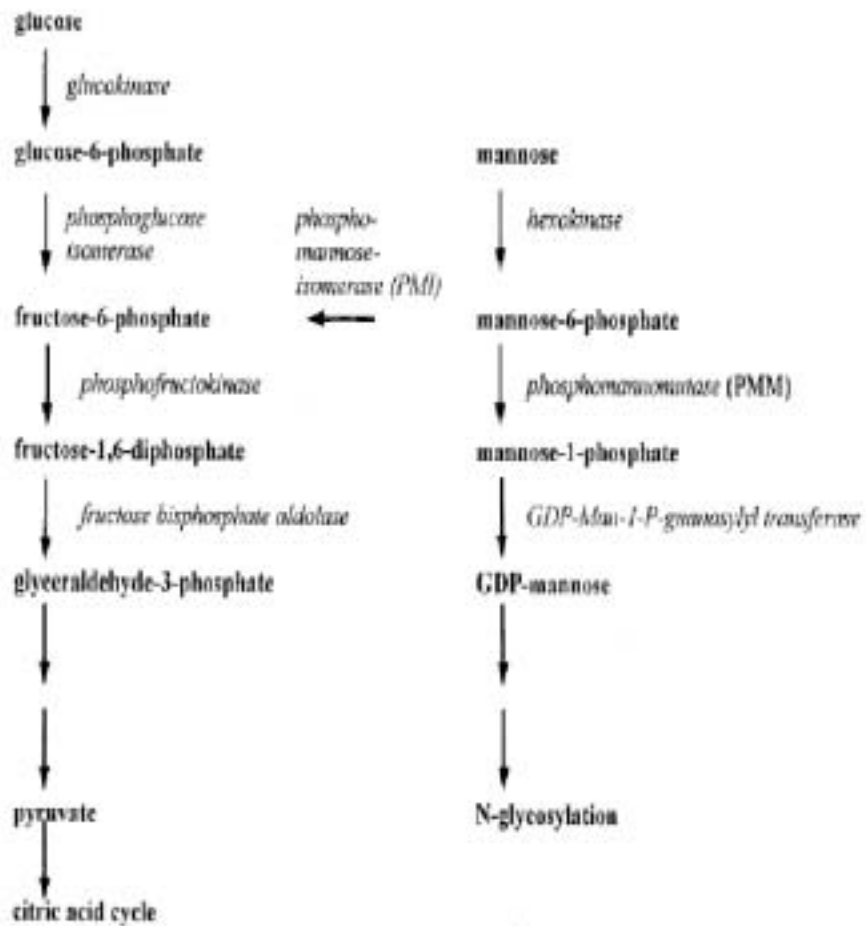


Fig. 1. Step in the interconversion of glucose and mannose

2 항 재료 및 방법

가. 형질전환 세포 선발을 위한 적정 mannose 농도 결정

상추 청치마(*Lactuca sativa* L. cv. Green Skirt.) 종자를 70% ethanol에 1분간 소독한 뒤 멸균수로 2~3회 씻어준 뒤 30% clorox로 10분간 소독을 실시한 다음 멸균수로 3~4회 세척하였다. 소독이 끝난 종자를 호르몬이 포함되지 않은 0.8% ager의 MS 고체배지에 치상하였다. 치상 후 22℃의 배양실에서 16시간 광조건하에서 발아시켰다. 발아 후 6~7일 된 자엽을 호르몬 NAA 1.0 mg/L 와 BA 1.0 mg/L가 첨가된 재분화 배지에 4 수준 (0, 10, 20, 30 mg/L)의 sucrose와 5수준(0, 5, 10, 15, 20 mg/L)의 mannose가 포함된 총 20 조합의 배지에 생장점이 포함되지 않도록 잘라서 치상하였다. 사용된 자엽절편들은 petri dish 당 4개씩 치상하여 4반복으로 수행하였으며 오차를 줄이기 위하여 시기가 다르게 총 5회를 실시하였고 조사는 치상 6주후 shoot의 길이가 5mm 이상의 것을 조사하였다.

나. PMI 유전자를 운반하는 pNOV2819 vector를 이용한 상추형질전환

PMI(phosphomannose-isomerase) 유전자를 포함하는 pNOV2819 vector를 Sygenta로부터 공여 받은 후 형질전환에 사용하였다. pNOV2819 vector를 운반하는 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404의 single colony를 spectinomycin 50 mg/L가 첨가된 5 mL의 액체 Luria-Broth(bacto agar 1.5%, bacto yeast extract 1%, NaCl 1%, trypton 0.5%)배지에 접종하여 28℃에서 225rpm의 속도로 48시간 진탕배양하여 OD₆₀₀=0.8~1.0 될 때까지 배양하였다. 공동배양은 대수 증식기까지 증식시킨 *Agrobacterium*을 원심분리후 pellet을 항생제가 없는 액체 LB배지로 2회 세척한 후 접종에 사용하였다. 상추의 자엽을 *Agrobacterium*에 5분간 침지 시킨 후 멸균된 filter paper에서 건조시키고 NAA 1.0 mg/L, BA 1.0 mg/L가 첨가된 MS 배지에 치상하여 3일동안 암상태로 공동배양 하였다. *A. tumefaciens*와의 공동배양을 마친 자엽을 cefatoxime 200 mg/L가 첨가된 액체배지에서 표면에 묻어있는 *Agrobacterium*이 제거될 수 있도록 2번의 세척 과정을 거치고 멸균된 filter paper에서 건조한 후 mannose 20 mg/L, sucrose 20 mg/L, NAA 1.0 mg/L, BA 1.0 mg/L, cefatoxime 200 mg/L를 첨가한 선발배지에 치상하여 25±2℃, 16시간 명상태에서 배양하였다. 일정 기간이 지난 뒤 유기된 싹은 MS기본 배지에 cefatoxime 200 mg/L가 첨가된 발근배지에 옮겨 뿌리를 유도하였다.

다. PMI와 rice ferritin 유전자를 포함하는 binary vector 작성

PMI 유전자와 rice ferritin 유전자를 운반하는 binary vector를 제작하기 위해 총 두 단계의 과정을 수행하였다. 자세한 vector 작성 방법과 결과는 결과 및 고찰 부분에서 설명코자 한다.

라. pNFE binary vector를 이용한 상추 형질전환

PMI와 rice ferritin 유전자를 포함하는 pNFE vector를 이용한 형질전환은 상기 2번의 pNOV2819 vector를 이용한 형질전환 방법과 같이 수행하였다.

3 항 결과 및 고찰

가. 형질전환 세포 선발을 위한 적정 mannose 농도 결정

상추의 재분화에 mannose가 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에서 배양 2주 후부터 callus가 형성되기 시작하여 4주 이후에는 shoots가 발생하기 시작하였고 배양 후 6주 이후에 순화가 가능할 정도로 shoots가 발생하였다. Sucrose 0 g/L 처리구에서는 mannose의 양과 상관없이 shoot가 전혀 발생하지 않았다. Mannose 15 g/L 처리까지는 sucrose 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L 공통적으로 어느 정도 shoot 발생율을 보이지만 mannose 20 g/L 이상에서는 shoot 발생율이 현저히 저하되었다. 특히 sucrose 20 g/L 와 mannose 15 g/L 조합에서 2.67개로 높은 shoot발생률을 보이나 sucrose 20 g/L 와 mannose 20g/L 조합에서 mannose에 의해 식물의 shoot가 전혀 발생하지 않았다(Table 1과 Fig. 2). 이 결과를 바탕으로 sucrose 20 g/L와 mannose 20 g/L 조합을 pNOV2819 vector를 이용한 상추 형질전환 실험에서 형질전환체 선발 농도로 결정하였다. 또한 sucrose 20 g/L와 mannose 15 g/L 조합과 sucrose 30 g/L 와 mannose 10 g/L 농도에서 control 조합인 sucrose 30 g/L와 mannose 0 g/L에서 보다 오히려 다소 높은 shoots 발생률을 보였다. 이것은 이 조합에 속한 일부 explant가 특이하게 높은 재분화능을 보여서 나타난 결과로 실험 목적에 크게 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다.

나. PMI 유전자를 운반하는 pNOV2819 vector를 이용한 상추형질전환

PMI 유전자를 이용한 상추형질전환은 본 연구에서 결정된(제1절 참고) 최적의 재분화 조건과 본 실험에서 결정된 mannose의 농도를 이용하여 수행하였다. 최적의 재분화 조건은 자엽을 이용해 MS 배지에 NAA 1.0 mg/L, BA 1.0 mg/L, sucrose 20 g/L를 첨가하는 것으로 결정되었으며 형질전환 세포를 선발할 수 있는 mannose의 농도는 20 g/L로 결정되었다. Mannose가 상추 재분화에 미치는 영향에 관한 실험에서 sucrose 20 g/L와 mannose 20 g/L 처리구에서는 재분화가 일어나지 않는 것을 알 수 있었고 이 농도에서 형질전환체의 선발이 가능할 것으로 판단되어 사용을 결정하게 되었다. 이들 조건을 이용하여 형질전환을 실시한바 결과는 다음과 같다.

상추의 자엽에 PMI 유전자를 운반하는 pNOV2819 vector(Fig. 3과 4)를 포함하는 *Agrobacterium*의 접종이 이루어진 뒤 약 2주 후에 callus가 관찰되기 시작했으며 6주 뒤에 shoots가 관찰되기 시작했다. 상추는 치상 후 5주까지는 계대배양이 필요 없었으며 한번의 계대배양 후 바로 rooting 배지에 옮겨주었다(Fig. 5). 뿌리의 분화는 다른 작물에 비해 굉장히 빠른 편으로 rooting 배지에 옮긴 후 이틀 후부터 뿌리의 분화가 관찰되었다. Rooting된 형질전환 상추의 어린잎에서 DNA를 분리하여 cloning 과정에서 제작해 놓은 PMI 유전자 확인용 primer PMI-1(5'-ACAGCCACTCTCCATTCA-3')과 PMI-2(5'-GTTTGCCATCAC TTCCAG-3')를 이용해 PCR 분석으로 형질전환 여부를 확인하였다 (Fig. 6).

Table 1. Effect of mannose on shoot induction from cotyledon explants of 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.).

Sucrose (g/L)	Mannose (g/L)				
	0	5	10	15	20
0	0.00 ^z	0.00	0.00	0.00	0.00
10	0.17	1.50	1.50	1.50	0.00
20	0.50	1.00	1.40	2.67	0.00
30	2.50	1.33	2.67	0.87	1.17

^zTotal number of regenerated shoots / total number of explants.



Fig. 2. Effect of mannose on shoot induction from cotyledon explants of 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.).

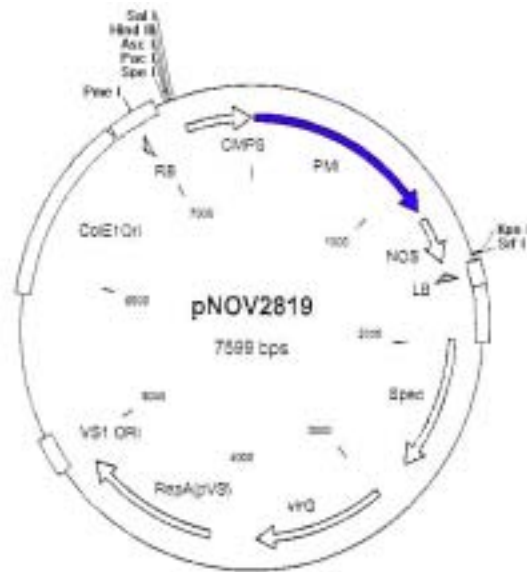


Fig. 3. Plasmid map of pNOV2819 vector with phosphomannose-isomerase (PMI) gene

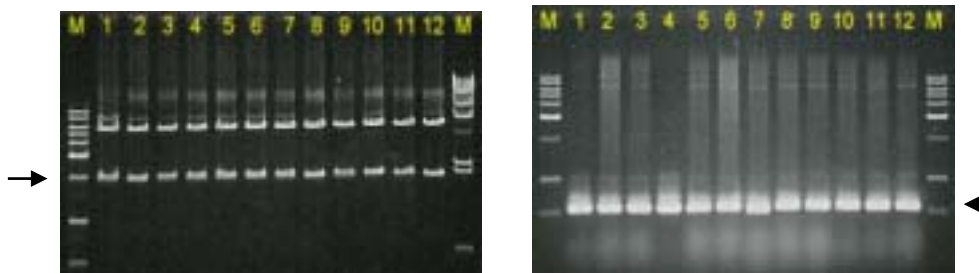


Fig. 4. Detection of phosphomannose-isomerase (PMI) gene with digestion of *SalI* and *KpnI* (left), and PCR (right) in pNOV2819. For PCR analysis, PMI-1 (5'-ACAGCCACTCTC CATTCA-3') and PMI-2 (5'-GTTTGCCATCACTTCCAG -3') primers were used to identify the PMI gene.

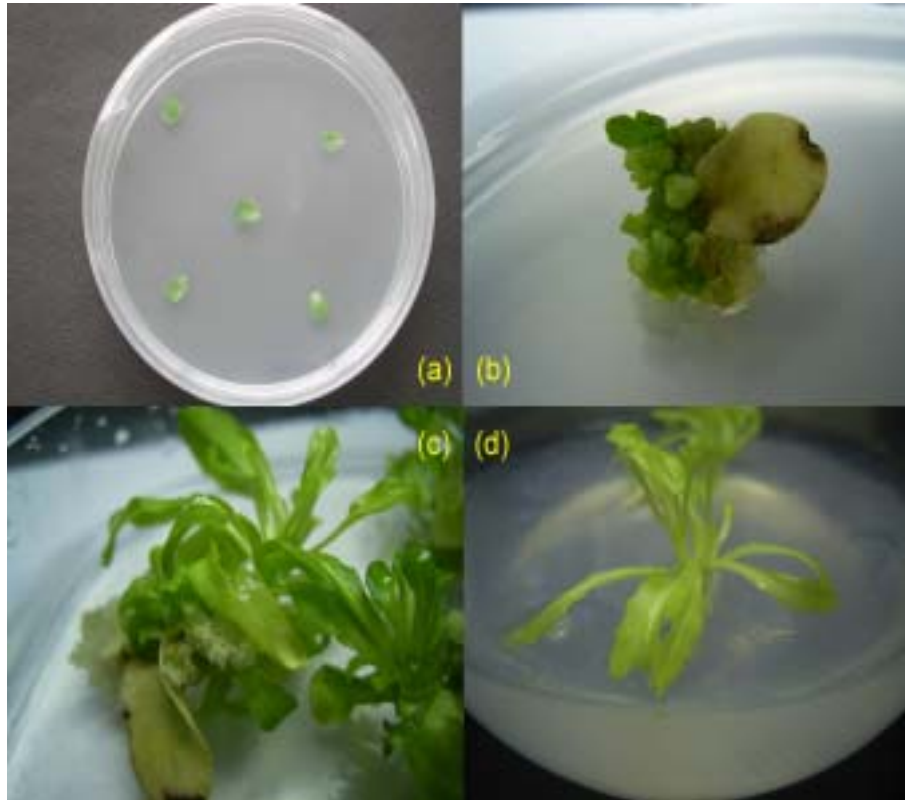


Fig. 5. Transformation of lettuce with *A. tumefaciens* LBA4404 containing pNOV2819.

- a: Infected cotyledon explants on selection medium with mannose;
- b: Transgenic shoots were induced onto selection medium;
- c: Transgenic shoot was grown onto selection medium;
- d: Roots from transgenic shoot were induced in rooting medium.

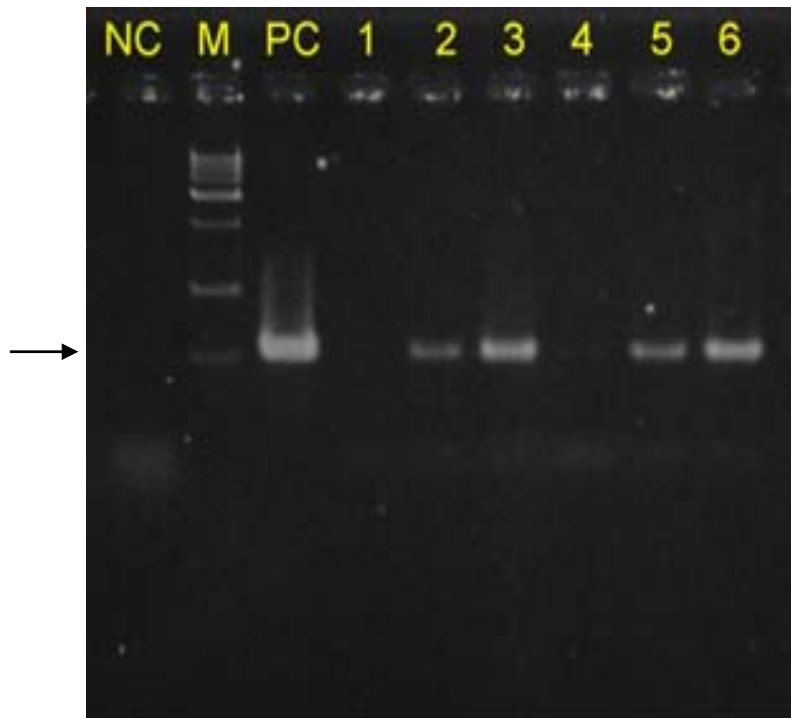


Fig. 6. PCR analysis of transgenic lettuce plants with pNOV2819. For PCR analysis, PMI-1(5'-ACAGCCACTCTCCATTCA-3') and PMI-2 (5'-GTTTGCCATCACTTCCAG-3') primers were used

to identified PMI gene.

NC: Non transformed lettuce plant

M: Size marker (Lambda DNA/*Hind*III)

PC: pNOV2819 (positive control)

Lane 2, 3, 5, 6 : Transgenic lettuce plants confirmed by PCR

Lane 1, 4: Selected shoots onto selection medium, but without PCR products.

다. PMI와 rice ferritin 유전자를 포함하는 binary vector 작성

형질전환체의 positive selection을 위한 PMI 유전자와 ferritin의 over expression을 위한 rice ferritin 유전자를 운반하는 binary vector를 제작하기 위해 총 두 단계의 과정을 수행하였다 (Fig. 7). 우선 PMI 유전자를 운반하는 pNOV2819 vector에 pBIN35S vector에서 분리한 35S promoter와 NOS terminator를 삽입하였다. pNOV2819 vector에 삽입시 enzyme site의 불일치로 인해 pBluescript(pBS)를 중간 vector로 하여 enzyme site를 일치시킨 후 삽입하였다. 이를 위해 pBin35S에서 *Hind*III와 *Eco*R I 을 이용하여 promoter와 terminator 분리하고 분리된 단편을 *Hind*III와 *Eco*RI을 처리한 pBSKS(+)에 삽입하였다. 정확한 ligation의 확인을 위해 35S promoter와 NOS terminator의 sequence를 확인하였고 35S promoter와 NOS terminator 확인용 primer를 제작하고 PCR을 수행하였다(Fig. 8). 확인 후 pBSKS(+)로부터 *Sal* I 과 *Spe* I 을 처리해 promoter와 terminator를 분리하여 pNOV2819에 삽입하고(Fig. 7) promoter와 terminator 사이의 multiple cloning sites에 pBII01-Hm 에 삽입되어 있는 rice ferritin 유전자(Fig. 9, 10)의 PCR product를 *Xba*I과 *Sac*I을 이용해 삽입하였다(Fig. 7). 그 결과 PMI 유전자와 rice ferritin 유전자를 동시에 운반하는 recombinant vector를 작성하고(Fig. 11) PCR로 확인한 후(Fig. 12) pNFE로 명명하였다(Fig. 13).

라. pNFE binary vector를 이용한 상추 형질전환

PMI와 rice ferritin 유전자를 포함하는 pNFE vector를 이용한 형질전환은 상기 2번의 pNOV2819 vector를 이용한 형질전환 방법과 같이 수행하였다. 현재 mannose가 포함된 선발배지에서 callus와 shoots가 유기되고 있으며 선발된 shoots는 PCR과 Southern blot 분석으로 형질전환을 확인 후 PMI 유전자를 이용한 형질전환체의 선발가능성을 확인코자 한다.

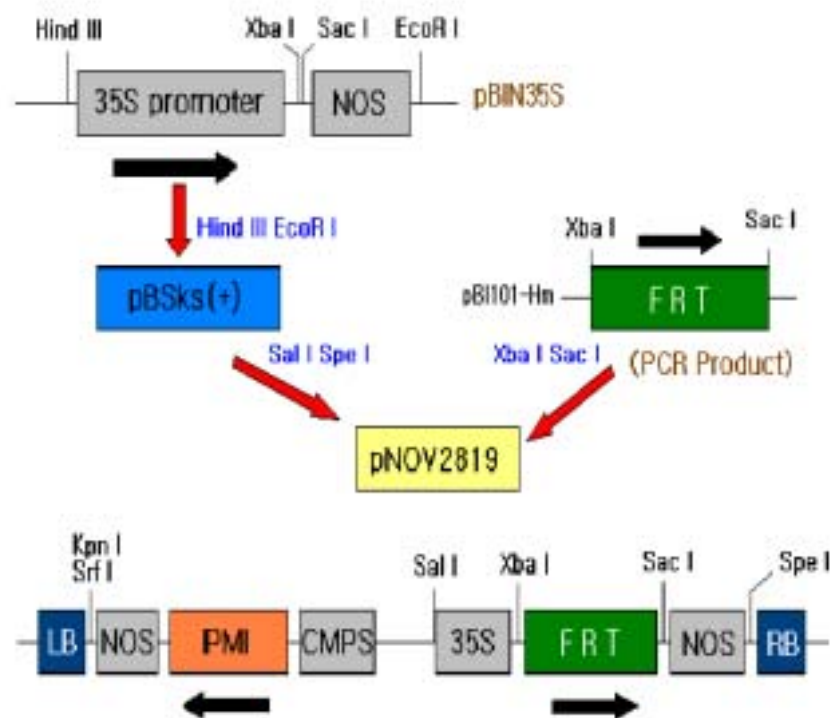


Fig. 7. Construction strategy of the binary vector, pNFE, used for transformation of lettuce plants using mannose selection. The PMI was placed under Nos promoter and ferritin gene under CaMV35S promoter.

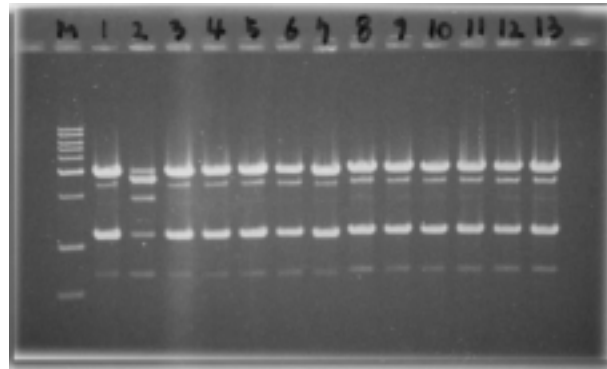


Fig. 8. Detection of inserted fragment in pBSKS(+) with digestion of *HindIII* and *EcoRI* .

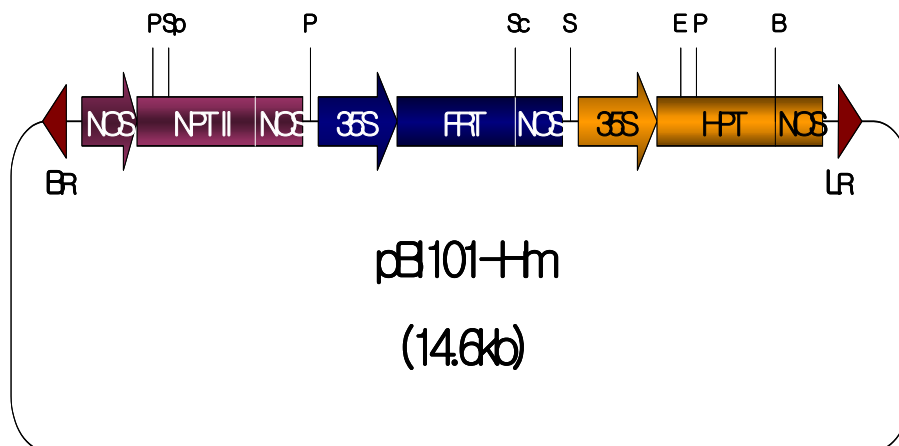


Fig. 9. Plasmid map of pBI101-Hm vector with rice ferritin gene

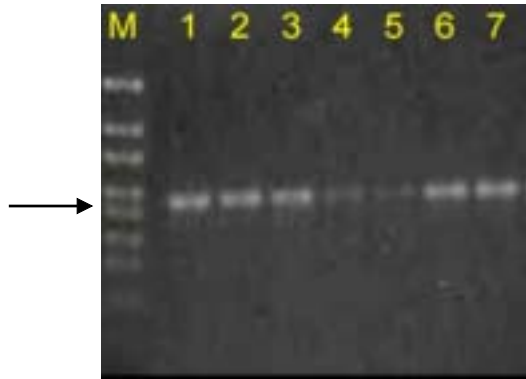


Fig. 10. Detection of rice ferritin gene in pBI101-Hm by PCR. For PCR analysis, PMI-1 (5'-ACAGCCACTCTCCATTCA-3') and PMI-2 (5'-GTTTGCCATCACTTCCAG-3') primers were used to identify rice ferritin gene.

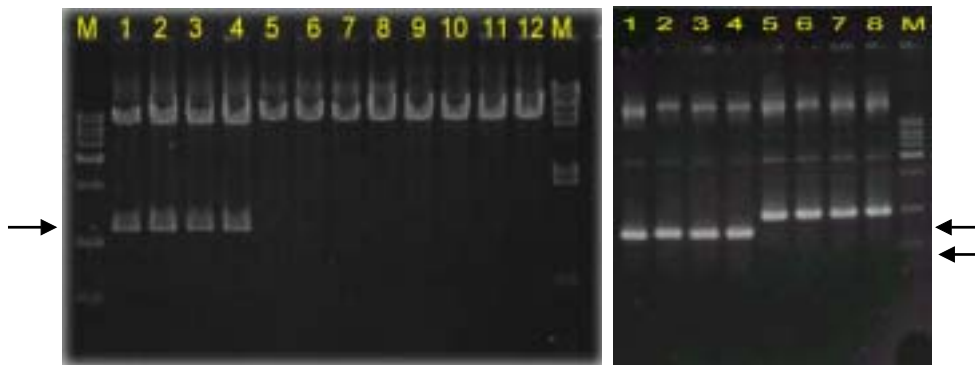


Fig. 11. Detection of inserted fragment and enzyme site in pMNOV. The 1~4 samples were digested with *SacI* and *XbaI*. The 5~8 samples were digested with *SacI* only. The 9~12 samples were digested with *XbaI* only.

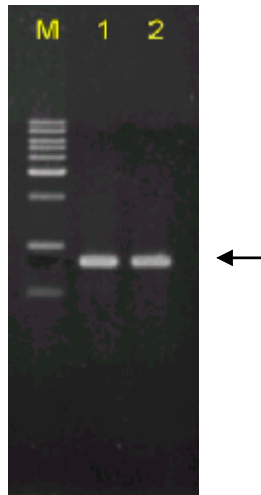


Fig. 12. Detection of rice ferritin gene in pNFE binary vector by PCR. For PCR analysis, PMI-1 (5'-ACAGCCACTCTCCAT TCA-3') and PMI-2 (5'-GTTTGCCATCACTTCCAG-3') primers were used to identify rice ferritin gene.

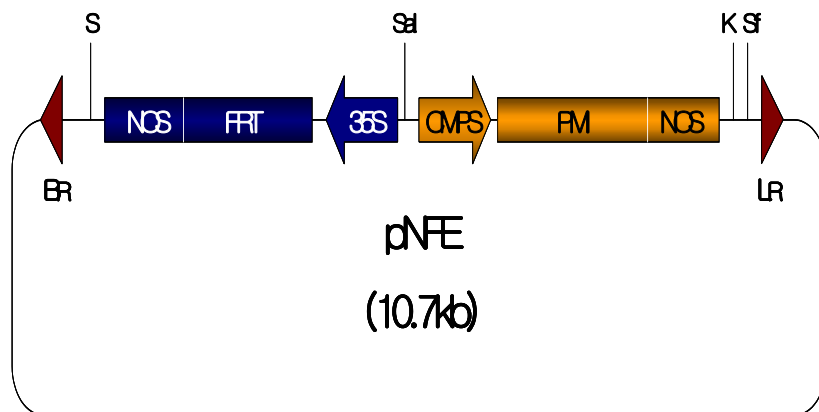


Fig. 13. Plasmid map of pNFE vector with rice ferritin and PMI genes.

제 3 절 Ferritin 유전자를 이용한 기능성 상추 개발

1 항 서 론

철은 모든 생물체에 있어 매우 중요한 무기원소로써 동물 및 식물체 내에서 여러 생리현상에 영향을 미치는 것으로 알려져 있고 식물체 중에서는 전자운반과 호흡요소 및 단백질 구성 성분이 되며 질산과 황산의 환원작용, N₂의 동화, NADP의 생성에 관여하며 엽록소 형성에 관여하고 효소의 구성성분 및 촉매역할을 하며 단백질 합성이나 뿌리의 생장에 관여하고 동물체 내에서는 절반 이상이 적혈구인 헤모글로빈의 성분으로 산소운반에 관여한다. 식물체 내에서 대부분 철은 ferric phosphoprotein의 형태(Fe⁺³)이며, ferrous(Fe⁺²)이온의 형태는 물질대사 과정에서 활성형태로 작용한다(Blackwell et al. 1969). 식물체 중 인산 함량이 높아지면 Fe의 흡수를 감소시키며 보통 식물에서는 P : Fe의 비가 29 : 1 정도로 나타나며, K는 Fe의 흡수와 이동을 촉진시키고 N은 생육촉진과 함께 Fe의 결핍을 불러일으킨다. 사람의 경우 철은 70% 정도가 hemoglobin 및 myoglobin 등의 heme 구성성분으로 체내에 분포하고 있으며 약 30% 정도가 심장, 간 비장, 골수 등에 ferritin의 형태로 들어있어 유사시 단백질의 생합성 및 효소의 활성화에 이용된다. 이러한 철을 이용하기 위해 체내에서 철을 섭취시 heme 철은 바로 소장으로 흡수되는 반면 nonheme 철의 경우 여러 산화환원 과정을 거쳐 apoferritin과 결합하여 철 저장 단백질인 ferritin의 형태로 존재하게 된다. Ferritin은 약 450KDa의 거대 단백질이며 하나의 분자당 최고 4,500개의 Fe atoms를 저장할 수 있다. Ferritin은 432 symmetry, 24 subunits로 구성되어 있으며 약 4500 Fe atom을 중심으로 구형의 껍질모양으로 subunits가 둘러싸여 있고 8개의 hydrophilic channel과 6개의 hydrophobic channel을 가지고 있다(Kim et al., 1998).

Ferritin은 동물, 식물 그리고 박테리아에서 발견된 iron-storage protein으로 분자량이 약 450kDa의 거대 단백질이며 두 개의 주요 subunit인 heavy-chain ferritin(21kDa)과 light-chain ferritin(19kDa)으로 구성되어 있다. H-chain ferritin과 L-chain ferritin은 각각 심장과 적혈구, 간과 비장에 많이 분포되어 있는 것으로 알려져 있다. 두 subunit간에는 55%의 amino acid sequence의 일치율을 보이고 기능적으로도 차이를 보이는데 H-chain ferritin은 낮은 isoelectric points(pI)와 iron content를 보이고 L-chain ferritin은 높은 pI와 iron content를 보이므로 H-chain ferritin이 L-chain ferritin 보다 더 빠르게 철을 흡수하고 방출한다고 알려져 있다(Ryu, 1999). Ferritin의 기능은 앞서 말했듯이 철 저장기

능이 있고 산화적 스트레스등의 생물학적 비생물학적 스트레스의 방어 기능, 중금속을 무독성화 시키는 기능이 있다(Briat, 1996; Goto et al., 1998, 2000). 최근 이러한 ferritin 유전자의 발현을 통한 직접적인 철분 함량 증가로서의 이용 가능성이 널리 연구되고 있다. 그런면에서 생식용 채소인 상추에 ferritin 유전자를 이용해 철분을 강화시켜주면 철분이 부족한 빈혈환자나 임산부는 물론 일반인들에게 안정적으로 철분을 공급할 수 있어 건강에 크게 이바지 할 것으로 보인다.

본 연구는 사람에서 유래된 철 저장 단백질 ferritin 유전자를 엽채류인 상추에 도입하기 위하여 형질전환용 binary vector를 작성하고 형질전환을 통하여 기능성이 증가된 상추를 개발코자 수행하였다.

2 항 재료 및 방법

가. 철분 농도 측정을 통한 상추 품종 선발

본 실험의 재료를 결정하기 위하여 시중에서 구입한 상추 12 품종의 철분 함량을 측정하였고 측정 후 선발된 세 품종의 종자 발아율도 조사하였다. 철분 함량측정을 위하여 상추 잎을 수집하여 70℃에서 1주일 동안 건조시킨 후 분쇄하였다. 분쇄 후 105℃에서 1일 동안 다시 건조시킨 후 건물중 1g의 철분 함량을 Atomic absorption spectrophotometer (Z-8230, HITACHI)로 측정하였다.

나. 형질전환을 위한 ferritin 유전자를 운반하는 binary vector 작성

기 확보된 사람으로부터 유래된 ferritin유전자 H-chain과 L-chain을 각각 selection marker를 kanamycin 저항성 유전자와 hygromycin 저항성 유전자로 달리하여 cloning하였으며 rice ferritin 유전자는 충북대 조용구 교수 연구팀으로부터 제공받았다. 자세한 vector 작성 방법과 결과는 결과 및 고찰에서 설명코자 한다.

다. Binary vector의 *Agrobacterium*으로의 형질전환

재조합된 binary vector (FHV, FLV)와 rice ferritin vector는 freeze-thaw 방법 (An, 1987)으로 *A. tumefaciens* LBA4404에 직접 형질전환하였다. 자세한 vector 작성 및 확인 방법과 결과는 결과 및 고찰에서 설명코자 한다.

라. Ferritin 유전자로 상추의 형질전환

제3장 1절에서 확립된 재분화체계와 결정된 selection marker의 농도를 이용하여 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 통한 형질전환을 실시하였다. 형질전환을 위한 배지 조성과 selection marker의 농도는 table 1과 같다.

형질전환은 완성된 vector와 유전자를 포함한 *Agrobacterium*을 우선, 50 mg/L의 kanamycin과 10 mg/L의 streptomycin이 함유된 고체 YEP배지에서 48 시간동안 28°C 암조건하에서 배양하였다. 그 배양된 colony들중 한 colony를 취한 뒤 동일한 종류와 동일한 농도의 항생제가 포함된 5 ml의 액체 YEP배지에서 역시 48시간동안 28°C 암조건하에서 진탕배양하였다. 그 후 그 박테리아 배양액에서 1ml을 취한 뒤 50ml의 마찬가지로의 항생제가 포함된 액체배지에서 24 시간 동안 OD₆₀₀값이 1.0이 될 때까지 배양하였다. 이 배양액은 식물형질전환에 이용되기에 앞서, 우선 4°C, 5000rpm에서 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤, 다시 새 배지로 한번 더 세척한 뒤 다시 원심분리하여 상층액을 제거하고 30 ml의 새 배지를 첨가하여 식물형질전환 실험에 사용하였다.

형질전환에 사용된 식물절편은 상추의 자엽을 엽병부분을 제거하고 성장점 부위를 포함시키지 않은 상태에서 그 가운데에는 멸균칼로 상처를 주어 사용하였다. 이 절편을 앞에서 만든 최종 박테리아 배양액에 5분정도 담가 핀셋으로 흔들어서 준 뒤 멸균된 필터페이퍼로 여분의 용액을 제거하고 항생제가 포함되지 않은 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L BA가 포함된 재분화용 배지에서 이를 동안 암조건하에서 공동배양하였다. 그리고 3일째, 그 접종된 잎 절편들은 cefotaxime 200 mg/L, 그리고 각가 vector에 적당한 농도의 selection marker가 포함된 액체 MS배지에서 3번 정도 세척한 뒤, 공동배양배지에 포함된 호르몬 농도에 세척배지와 동일한 종류와 양의 항생제가 포함된 MS 고체선발배지에서 배양하였다. 선발배지로 옮긴 후엔 매 4주마다 새 선발배지로 옮겨줌으로서 항생제효력을 유지시켰다. 최종적으로 선발배지에서 유기된 신초는 cefotaxime 200 mg/L이 포함된 1/2 MS배지에서 뿌리를 유기시켰다. 그리고 어느 정도 성장한 식물체는 화분으로 이식하였다.

마. 식물체 genomic DNA 추출

각각의 형질전환체로부터 1g의 잎을 채취하여 genomic DNA를 추출하였다. 채취한 1g의 잎을 막자사발에 넣고 액체질소(LN₂)를 부어 분쇄하였다. 분쇄된 잎 절편을 추출 완충액 [0.5M NaCl, 0.1M Tris-Cl (pH8.0), 0.05M EDTA, 2% SDS, β-mercapto ethanol 1%] 9 mL에 첨가 한 후 55°C의 항온 수조에서

Table 1. Composition of selection medium

	Type of vector		
	FHV ^z	FLV ^y	RFV ^x
Media composition	MS salt	MS salt	MS salt
	3% sucrose	3% sucrose	3% sucrose
	NAA 1.0mg/L	NAA 1.0mg/L	NAA 1.0mg/L
	BA 1.0mg/L	BA 1.0mg/L	BA 1.0mg/L
	Cefotaxime	Cefotaxime	Cefotaxime
	200 mg / L	200mg/L	200mg/L
	0.8% agar	0.8% agar	0.8% agar
Antibiotic concentration	Kanmycin 50mg/L	Hygromycin 5mg/L	Hygromycin 5mg/L
pH	5.7		

^zFHV : Vector with human-H chain ferritin gene

^yFLV : Vector with human-L chain ferritin gene

^xRFV : Vector with rice ferritin gene

30분간 반응하였다. 반응액에 phenol:chloroform (25:24, V:V)의 용액을 20 mL 첨가하여 혼합하였다. 혼합 후 8000rpm에서 10분간 원심분리하여 8 mL의 상층액을 새로운 tube로 옮긴 후 두 배 부피의 abs. ethanol을 첨가하였다. 첨가 후 -20°C에서 18 시간을 반응시킨 후 8000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 70% ethanol을 이용하여 일회 세척하고 건조시켰다. 건조 후 1 mL의 TE 완충액 또는 멸균수를 첨가하여 genomic DNA를 용해하고 DNA 분석에 이용하였다.

바. 형질전환체의 확인

형질전환 선발배지에서 선발된 shoot는 다음과 같은 방법으로 형질전환체임을 확인하였으며 순화 후 온실에서 재배하였다. 재배된 형질전환 상주는 Southern hybridization, RT-PCR, SDS-PAGE 등을 통하여 transgene의 전이 여부, 전이된 유전자의 발현 여부등을 분석하였다.

1) PCR 분석

선발배지에서 유기된 상추 shoot는 우선, genomic DNA를 분리한 뒤, 형질전환체임을 확인하기 위해 H-chain ferritin 유전자 혹은 hygromycin 저항성 유전자를 증폭할 수 있는 primer로 각각을 PCR하였다. PCR조건은 95°C에서 2분간 변성시킨 후 95°C에서 1분, 55°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분 30초를 30회 처리한 뒤 72°C에서 10분간 최종 확장하는 조건에서 수행하였다. 그 후 그 산물들은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 UV광 하에서 그 산물의 존재유무와 크기를 확인하였다. PCR로 확인된 형질전환 개체는 순화시켜 온실에서 재배하였다.

2) Southern hybridization 분석

형질전환 상추 식물체와 non-transformed 식물체로부터 0.5 g의 본엽을 취하여 막자사발에 액체질소를 넣고 분쇄한 후 McCouch 등(1988)의 방법을 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분쇄된 sample은 extraction buffer (0.5 M NaCl, 0.1M Tris-HCl / pH 8.0, 50mM EDTA / pH 8.0, 1.25% SDS)와 섞은 후 65°C에 20분 처리하였다. 처리 후 phenol과 chloroform, 그리고 isopropanol로 응축시켰다. 응축된 DNA는 70% EtOH로 세척한 후 건조시켰으며 건조된 DNA TE buffer에 녹여 농도를 측정 후 분석에 사용하였다. 10 μ g DNA를 *Xba*I과 *Eco*RI 등의 제한효소로 절단한 후 0.8% agarose gel에서 전기영동하였다. 전기영동 후 Sambrook과 Russell(2000)의 방법에 따라 nylon membrane에 transfer하였다. Probe DNA는 Ladderman labelling kit (Takara)를 이용하여 (α -³²P)dCTP로 labelling하였다. Hybridization은 Church와 Gilbert(1984)의 방법에 의하여 수행하였으며 hybridization을 마친 membrane은 2X SSC / 0.1% SDS 용액으로 상온에서 2번 세척한 후, 0.1X SSC / 0.1% SDS 용액으로 상온에서 한번, 68°C 에서 한번 세척하였다. 세척된 membrane은 X-ray film에 노출시키고 현상을 통해 signal을 확인하였다.

3) RT-PCR 분석

유전자의 발현여부를 확인하기 위하여 우선 형질전환 상추로부터 GibcoBRL사의 Trizol시약을 사용하여 전체 RNA를 제시된 방법에 따라 분리한 뒤 oligo dT primer와 reverse transcriptase을 이용, cDNA를 합성하였다. cDNA 합성 프로그램 조건은 1 μ g의 RNA를 oligo dT primer를 첨가한 후 70°C

에서 RNA 이차구조를 제거한 뒤 42°C에서 30분간 역전사 시키고 사용된 역전사효소를 불활성화시키기 위해 75°C에서 10분간 두었다. 그 후 합성된 cDNA 1 µg을 사용, 각 유전자의 발현 확인을 위하여 제작된 primer와 *taq* polymerase로 PCR하였는데 그 프로그램은 96°C에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 96°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 40 cycle을 실행하고 마지막으로 72°C에서 10분간 최종 연장시킨 후 4°C를 유지하여 전체 반응을 종료하였다. 각각의 primer 들로 증폭된 단편들은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 UV광 하에서 그 산물의 존재유무와 크기를 확인하였다. RT-PCR 분석을 위해 세 종류의 primer 조합; human H-chain ferritin (FH-f1: 5'-atg acg acc gcg tcc acc tc-3', FH-r1: 5'-tta gct ttc att atc act gtc tcc-3'), human L-chain ferritin 유전자 (FL-f1: 5'-atg agc tcc cag att cgt ca-3', FL-r1: 5'-tag tcg tgc ttg aga gtg ag-3') and rice ferritin (CRF-f1: 5'-atg gct ctt get cca tcc aaa g-3', CRF-r1: 5'-cta ttc aag att aag gag cat-3')을 이용하였다.

4) Western blot 분석

Ferritin의 발현정도를 확인하기 위해 발현후의 추출한 각각의 단백질을 1ml씩 취하여 원심분리 시킨 후 침전물은 제거하였다. 단백질 sample에 동량의 2X-sample buffer를 첨가하여 단백질을 변성시킨 뒤 sample을 loading하고 표준물질로 molecular weight high (Gibco BRL, USA)를 사용하였다. 전기영동을 수행하기 위해 Mini-protein II cell kit (Bio-Rad, USA)를 이용하였다. SDS-PAGE는 13%를 이용하였고 gel running후 단백질은 coomassie blue brilliant R- 250(GIBCO BRL, USA)로 염색시킨 뒤, 탈색시켰다.

사. 형질전환체의 T₁ 종자 획득

선발된 재분화 개체는 순화과정을 거쳐 온실에서 재배하였다. 온실에서의 재배는 개화하여 종자 결실이 될 때까지 계속되었으며 종자는 homozygous 개체를 확보하고자 자가수분에 의해 얻었다. 자가수분은 개화가 시작된 후 암술과 수술이 노출되기 전에 봉투를 씌워 타가수분이 이루어지지 않게 하였다.

아. 전이유전자의 후대 유전 분석

HFV로 형질전환된 상추를 자가수분하여 획득한 종자를 100mg/L kanamycin이 첨가된 MS배지에 파종하고 발아수를 확인하여 kanamycin에 저

항성을 보이는 종자와 그렇지 않은 종자의 비율을 조사하였다.

자. Double transformation

H-chain ferritin 유전자와 L-chain ferritin 유전자를 상추 한 개체에 같이 전이시키기 위하여 double transformation을 시도하였다. 먼저 FHV vector로 형질전환시키고 형질전환이 확인된 개체로부터 분엽을 1cm² 크기로 채취하여 농도가 OD₆₀₀=1.0인 *A. tumefaciens* 용액에 30초간 접종시킨 후 멸균된 여과지에서 건조시키고 1.0 mg/L BA와 1.0 mg/L BA가 첨가된 MS기본배지에 절편체의 윗면이 아래로 가도록 치상하여 3일간 암상태에서 co-cultivation하였다. *A. tumefaciens*는 상처부위를 통하여 감염이 이루어지므로 절단면의 면적을 넓히기 위하여 상추 절편체 내부에 상처를 주었다. *A. tumefaciens*과의 co-cultivation을 마친 상추 절편체는 1.0 mg/L BA, 1.0 mg/L NAA와 200 mg/L cefotaxim이 첨가된 세척용 MS기본배지로 절편체 표면의 *A. tumefaciens*를 완전히 제거한 후 멸균된 여과지에서 건조시켰다. 이를 1.0 mg/L BA, 1.0 mg/L NAA, 30 mg/L hygromycin 및 200 mg/L cefotaxim 이 첨가된 1차 선발배지에 치상하여 25±1℃, 16시간 일장의 조건으로 배양실에서 배양하였다. 1차 선발배지에서 재분화된 싌초는 일정기간 성장시킨 후 식물생장조절물질을 첨가하지 않은 1/2 MS배지에 20 mg/L hygromycin 과 200 mg/L cefotaxim이 첨가된 2차 선발배지에서 rooting을 유도하였다.

차. 형질전환 상추의 생육 조사

순화과정을 거쳐 온실에서 재배된 상추는 초장을 일주일마다 측정하였으며 6주 후에 최종 조사를 하였다. 최종 조사후 6주후의 초장과 순화초기의 초장의 차이를 비교하여 생장률을 조사하였다.

카. 형질전환 상추의 철분 함량 조사

10g의 잎 조직을 취하여 70℃에서 1주일동안 건조한 후 분쇄하였다. 분쇄후 105℃에서 1일 다시 건조시키고 0.5g의 잎 조직에 5 ml의 황산을 첨가하고 혼합 후 상온에 24시간 방치하였다. 분쇄를 촉진하기 위하여 과산화수소수를 조금씩 첨가하여 시료가 맑고 투명하게 될 때까지 분쇄하였다. 분쇄가 완료된 후 분해액을 Whatman No.2 여과지를 이용하여 여과시킨 후 철분을 측정하였다. 측정시 분석 용액을 0.45μm membrane filter를 통과시켜 inductively coupled

plasma (ICP) spectrometry (Direct Reading Echelle ICP, LEEMAN ABS. INC., USA)로 측정하였다.

3 항 결과 및 고찰

가. 철분 농도 측정을 통한 상추 품종 선발

상추 12 품종의 철분 함량을 측정한 결과 최고 1.244mg/g (Sinkichu)부터 최하 0.152mg/g (양상추)까지의 분포를 보였으며 평균 함량은 0.639 mg/g을 나타냈다 (Fig. 1). 철분 함량 측정 후 선발된 세 품종 (적치마 상추, 청치마 상추, 적측면 상추)의 종자 발아율도 조사하였다. 종자발아율의 결과는 제3장 1 절에서 설명하였으며 그 결과 평균 철분함량에 가까우며 발아율이 가장 좋은 청치마 상추(*Lactuca sativa* L. cv Green leaf)를 형질전환의 재료로 사용하였다.







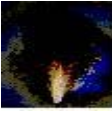





						
Variety	Lolla rosa	Lollo	Caesar red	Sengchae	Minissam	Jeokchook myeon
Iron con.	0.933mg	0.952mg	0.718mg	0.344mg	0.158mg	0.356mg
						
Variety	Sinkichu	Oak leaf	Caesar green	Jeokcose	Yangsang chu	Chung chima
Iron con.	1.244mg	0.479mg	0.786mg	1.107mg	0.152mg	0.433mg

Fig. 1. Iron concentrations of 12 different lettuce varieties

나. 형질전환을 위한 ferritin 유전자를 운반하는 binary vector 작성

1) Human H-chain ferritin 유전자를 운반하는 FHV binary vector 작성

상추 형질전환을 위해 pET-5b가 운반하는 550bp의 human H-chain ferritin 유전자(Fig. 2)를 pILTAB 357에 삽입하였다(Fig. 3). pET-5b- Human H-chain ferritin 단편은 *Xba*I과 *Eco*RI site가 5'과 3' 양끝에 부착되게 디자인한 primer(CFH-f1, CFH-r1)을 이용하여 PCR을 실시하였다. 증폭된 PCR product은 electrophoresis로 size를 확인 후 insert로 사용할 단편을 포함하는 gel을 분리하여 gel extraction kit(QIAgen)로 DNA를 분리 정제후 *Xba*I과 *Eco*RI으로 절단하여 insert를 확보하였다(Fig. 4). 한편 pILTAB 357 역시 *Xba*I과 *Eco*RI으로 절단하여 전기영동하여 정제하였다. 이렇게 확보된 vector와 insert를 적정농도로 혼합하고 T4 DNA ligase를 사용하여 4°C에서 16시간 두어 ligation 시킨 후 *E. coli* DH5α에 형질전환시켰다. 형질전환된 *E. coli*는 kanamycin(50mg · L⁻¹)이 첨가된 고체 LB배지에서 배양하여 저항성을 보이는 colony를 선발하였다. Ligation 시킨 후 선발된 colony는 restriction enzyme(Fig. 5)과 PCR(Fig. 6)로 정확한 삽입이 이루어졌는지 확인하고 recombinant plasmid vector를 완성한 후 sequencing(Fig. 7)을 통해 정확한 site에 삽입되었는지를 확인하고 FHV로 명명하였다(Fig. 8). 최종적으로 확인 작성된 FHV는 *Agrobacterium*인 LBA4404에 형질전환 후 확인작업을 거쳐 상추 형질전환에 사용하였다.

<Human H-chain ferritin nucleotide sequence>

```
1 atgacgaccg cgtccacctc gcaggtgogc cagaactacc accaggactc agaggccgcc
61 atcaaccgcc agatcaacct ggagctctac gctcctacg tttacctgtc catgtcttac
121 tactttgacc gcgatgatgt ggctttgaag aactttgcca aatactttct tcaccaatct
181 catgaggaga ggaacatgc tgagaaactg atgaagctgc agaaccaacg aggtggccga
241 atcttctctc aggatatcaa gaaaccagac tgtgatgact gggagagcgg gctgaatgca
301 atggagtgtg cattacattt ggaaaaaat gtgaatcagt cactactgga actgcacaaa
361 ctggccactg acaaaaatga cccccattg tgtgacttca ttgagacaca ttacctgaat
421 gagcaggtga aagccatcaa agaattgggt gaccacgtga ccaacttggc caagatggga
481 gcgcccgaat ctggcttggc ggaatatctc tttgacaagc acacctggg agacagtgat
541 aatgaaagct aa
```

<Human H-chain ferritin amino acid sequence>

```
1 mttastsqvr qnyhqiseaa inrqinlely asyvylmsy yfdrddvalk nfakyfilhqs
61 heerehaekl nklngrgrgr iflqdkkpd cddwesglna mecalhlekn vngsillehk
121 latdkndphl cdfiethyln eqvkaikelg dhvtnlrkng apesglaeyl fdkhtlgdsd
181 nes
```

Fig. 2. Nucleotide and amino acid sequences of human H-chain ferritin gene

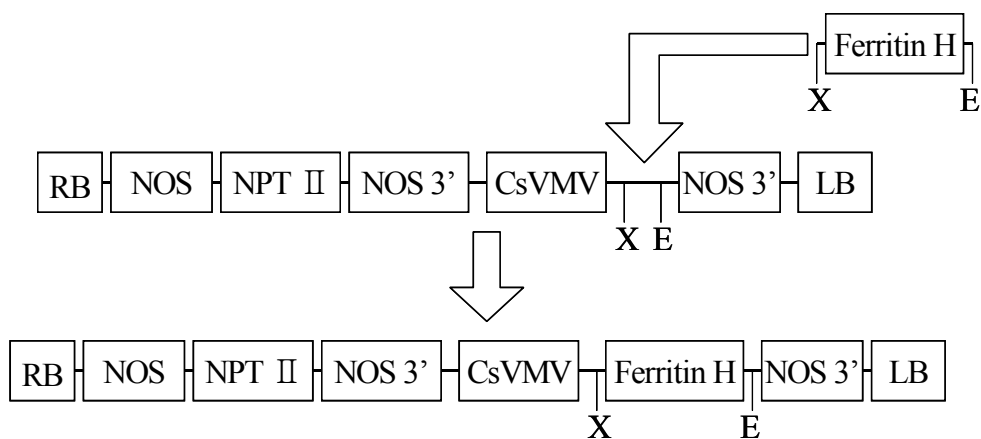


Fig. 3. Construction strategy of the binary vector, FHV, used for transformation of lettuce plant. The human H-chain ferritin gene was placed under CsVMV promoter. Plasmid map is abbreviated as follows: X: *Xba* I; E: *EcoR* I. NOS: Nos promoter; NOS 3': Nos terminator; CsVMV: CsVMV promoter; NPT II: kanamycin resistant gene; RB: right border; LB: left border

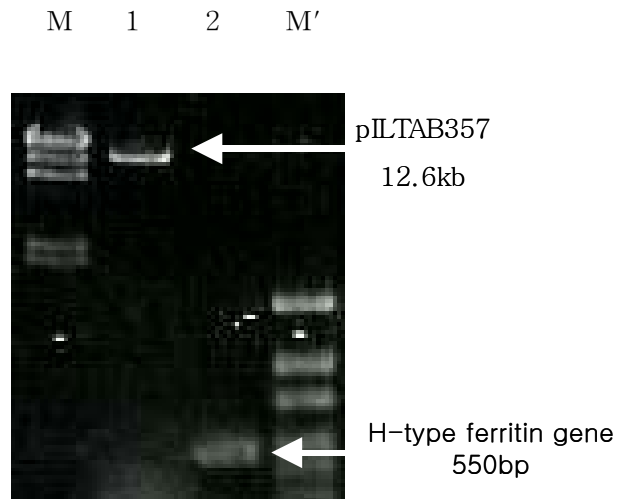


Fig. 4. Preparation of pILTAB 357 and insert (Human H-chain ferritin gene) for construction of FHV binary vector. H-chain ferritin gene was amplified by PCR using CFH-f1 (5'-agt tct aga atg acg acc acg tcc acc t-3') and CFH-r1 (5'-agt gaa ttc tta gct ttc att atc act gtc tc-3') primers. pILTAB 357 was also double digested with the *Xba* I and *EcoR* I .

M: DNA/*Hind*III marker

Lane 1: pILTAB 357 (*Xba* I/*EcoR* I)

Lane 2: Human H-chain ferritin (*Xba* I/*EcoR* I)

M': 100bp-1kb ladder

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M'

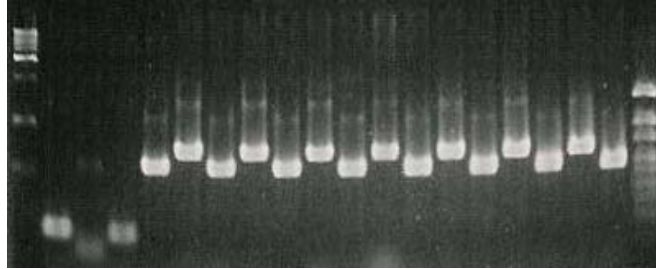


Fig. 5. Confirmation of FHV binary vector with digestion of *Xba* I /*Eco*R I

M: λ DNA/*Hind*III marker

lane 1: pILTAB (*Xba* I)

lane 2: pILTAB (*Eco*R I)

lane 3: pILTAB (*Xba* I / *Eco*R I)

lane 4 -18: CH1~5 (*Xba* I, *Eco*R I, *Xba* I / *Eco*R I)

M' 100bp-1kb ladder

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 M

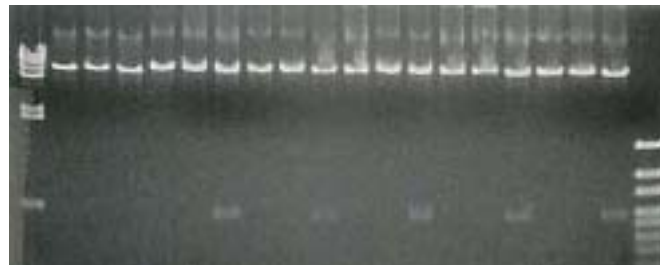


Fig. 6. Confirmation of FHV binary vector with PCR analysis. For PCR analysis a pair of primers CV-f1 (5'-tga agt act gag gat aca act tca-3') and CV-r1 (5'-gca aga ccg gca aca gga ttc-3') were designed from the part of vector.

M: KB Ladder marker

lane 1: pILTAB (CVMV primer)

lane 2: pILTAB (FH primer)

lane 3: pET-5b-Human H-chain ferritin (CVMV primer)

lane 4: pET-5b-Human H-chain ferritin (FH primer)

lane 5-18: CH1~6 (CVMV primer, FH primer)

M' 100bp-1kb ladder

GNANANTTTG TAAGTTTGTA GATCTCGATT CTAGATGAC GACCGCGTCC ACCTCGCAGG
 TGC GCCAGAA CTACCACCAG GACTCAGAGG CCGCCATCAA CCGCCAGATC AACCTGGAGC
 TCTACGCCTC CTACGTTTAC CTGTCCATGT CTTACTACTT TGACCGCGAT GATGTGGCTT
 TGAAGAACTT TGCCAAATAC TTTCTTCACC AATCTCATGA GGAGAGGGAA CATGCTGAGA
 AACTGATGAA GCTGCAGAAC CAACGAGGTG GCCGAATCTT CCTTCAGGAT ATCAAGAAAC
 CAGACTGTGA TGACTGGGAG AGCGGGCTGA ATGCAATGGA GTGTGCATTA CATTGGAAA
 AAAATGTGAA TCAGTACTA CTGGAAGTGC ACAAACTGGC CACTGACAAA AATGACCCCC
 ATTTGTGTGA CTTCATTGAG ACACATTACC TGAATGAGCA GGTGAAAGCC ATCAAAGAAT
 TGGGTGACCA CGTGACCAAC TTGCGCAAGA TGGGAGCGCC CGAATCTGGC TTGGCGGAAT
 ATCTCTTTGA CAAGCACACC CTGGGAGACA GTGATAATGA AAGTAAGA ATTCGAGCTCG
 GTACCGGATC CAATCCCCGA TCGTTCAAAC ATTTGGCAAT AAAGTTTCTT AAGATTGAAT
 CCTGTTGCCG GTCTTGCGAT GATTATCATA TAATTTCTGT TGAATTACGT TAAGCATGTA
 ATAATTAACA TGTAATGCAT GACGTTATT ATGAGATGGG TTTTATGAT TAGAGTCCCC
 AATTATACAT TTAATACGCG ATAGAAAACA AAATATAGCG CGCAAACCTAN GNATAAATTA
 TCGCGCGCGG TGTCATCTTT GTTACTAGAT CGGGGGATCG ATNCCCCATT TACTGGCCGT
 CGTTTTAN

Fig. 7. Confirmation of ligation of pILTAB with H-chain ferritin gene. Restriction enzyme site was underlined. Start and stop codon were marked with rectangles.

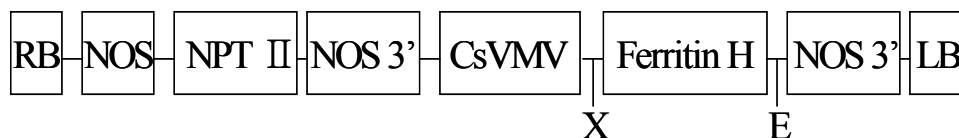


Fig. 8. Plasmid map of HFV binary vector used for transformation of lettuce. The human H-chain ferritin gene was placed under the control of CsMV promoter. Plasmid map is abbreviated as follows: X, *Xba*I; E, *Eco*RI; NOS, Nos promoter; NOS 3', Nos terminator; NPT II: kanamycin resistant gene; CsVMV, CsVMV promoter; RB: right border; LB: left border

2) Human L-chain ferritin 유전자를 운반하는 FLV binary vector 작성

Cloning을 위해 pET-5b가 운반하는 528bp의 Human L-chain ferritin 유전자(Fig. 9)을 pCAMBIA 1302에 삽입하였다(Fig. 10). pET-5b-Human L-chain ferritin 단편은 *Bgl*II와 *Bbr*P I site가 5'과 3' 양끝에 부착되게 디자인한 primer(CFH-f2:5'-agt aga tct atg agc tcc cag att cgt cag-3', CFH-r2:5'-agt cac gtg tta gtc gtg ctt gag agt gag-3')을 이용하여 PCR을 실시하였다. 증폭된 PCR product은 electrophoresis로 size를 확인 후 insert로 사용할 단편을 포함하는 gel을 분리하여 gel extraction kit(QIAgen)로 DNA를 분리 정제 후 *Bgl*II와 *Bbr*P으로 절단하여 insert를 확보하였다(Fig. 11). 한편 pCAMBIA 1302 역시 *Bgl*II와 *Bbr*P으로 절단하여 전기영동하여 정제하였다. 이렇게 확보된 vector와 insert를 적정농도로 혼합하고 T4 DNA ligase를 사용하여 4°C에서 16시간 두어 ligation 시킨 후 *E. coli* DH5 α 에 형질전환시켰다. 형질전환된 *E. coli*는 kanamycin(50mg · L⁻¹)이 첨가된 고체 LB배지에서 배양하여 저항성을 보이는 colony를 선발하였다. Ligation시킨 후 선발된 colony는 restriction enzyme(Fig. 12)과 vector로부터 작성된 primer (SFL-f1: 5'-ttt gga gag aac acg ggg ga-3', SFL-r1: 5'-gga aat tcg agc tgg tca cc-3')로 PCR(Fig. 11)을 실시하여 정확한 삽입이 이루어졌는지 확인하고 recombinant plasmid vector를 완성한 후 sequencing(Fig. 13)을 통해 정확한 site에 삽입되었는지를 확인한 후 FLV로 명명하였다(Fig. 14). 최종적으로 확인 작성된 FLV는 *Agrobacterium*인 LBA4404에 형질전환 후 확인작업을 거쳐 상추 형질전환에 사용하였다.

<Human L-chain ferritin nucleotide sequence>

```
1 atgagctccc agatttgtca gaattattcc accgacgtgg aggcagccgtc aacagccctg
61 gtcaatttgt acctgcaggc ctctacacc tacctctctc tgggettcta ttctgacgcg
121 gatgatgtgg ctctggaagg cgtgagccac ttcttcogcg aactggccga ggagaagcgc
181 gaggctacg agcgtctcct gaagatgcaa aaccagcgtg gcggccgcgc tctcttcacg
241 gacatcaaga agccagctga agatgagtgg ggtaaaacct cagacgccat gaaagctgcc
301 atggccctgg agaaaaagct gaaccaggcc cttttggatc ttcatgccct gggttctgcc
361 cgcacggacc cccatctctg tgacttctctg gagactcact tcttagatga ggaagtgaag
421 cttatcaaga agatgggtga ccacctgacc aacctccaca ggctgggtgg cccggaggct
481 gggctggggc agtatctctt cgaaggctc actctcaagc acgactaa
```

<Human L-chain ferritin amino acid sequence>

```
1 mssqirgys tdveaavnsl vnlylqasyt ylslgfyfdr ddvalegvsh ffrelaeekr
61 egyerllknq nrgggralfg dikkpaedew gktpdankaa mtlekkinga lldlhalgsa
121 rtdphlcdfi ethfideevk likknghilt nlhrlggpea glgeylferl tikhd
```

Fig. 9. Nucleotide and amino acid sequences of human L-chain ferritin gene

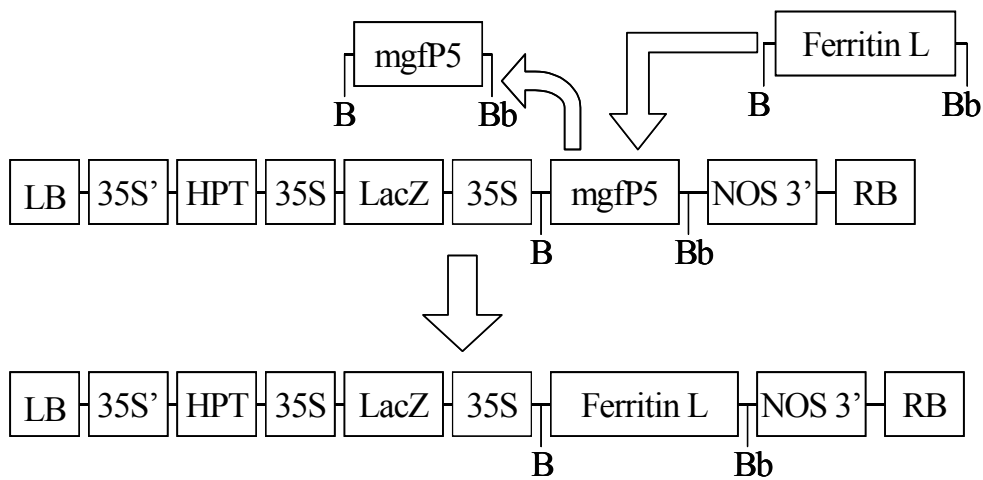


Fig. 10. Construction strategy of the binary vector, FHV, used for transformation of lettuce plant. The human L-chain ferritin gene was placed under CaMV 35S promoter. Plasmid map is abbreviated as follows: B, *Bgl*II; Bb, *Bbr*P ; NOS, Nos promoter; NOS 3', Nos terminator; 35S, CaMV 35S promoter; HPT, hygromycin resistant gene; RB, right border; LB, left border

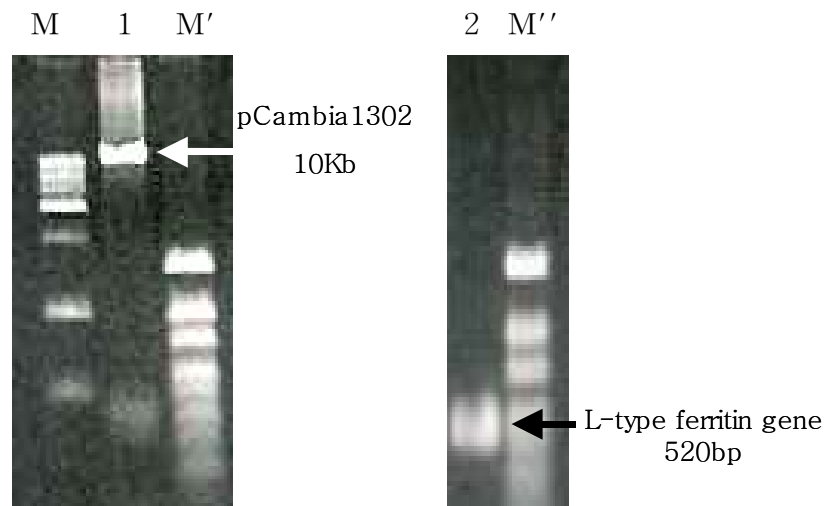


Fig. 11. Preparation of pCAMBIA 1302 and insert (Human L-chain ferritin gene) for construction of FLV binary vector. L-chain ferritin gene was amplified by PCR using CFH-f2 (5'-agt aga tct atg agc tcc cag att cgt cag-3') and CFH-r2 (5'-agt cac gtg tta gtc gtg ctt gag agt gag-3') primers. pCAMBIA 1302 was also double digested with the *Bgl*II/*Pml*I.

M: λ DNA/*Hind*III marker

Lane 1: pCAMBIA1302(*Bgl*II/ *Bbr*PI)

Lane 2: Human L-chain ferritin(*Bgl*II/ *Bbr*PI)

M': 100bp-1kb ladder

M'': 100bp-1kb ladder

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M'' M''' 13 14 15 16 17 18 19 20

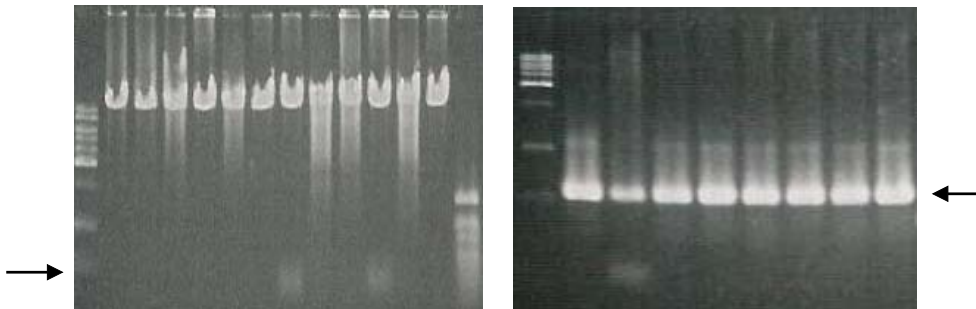


Fig. 12. Confirmation of binary vector FHV by enzyme mapping analysis (left) and by PCR (right). For enzyme mapping analysis vector was digested with *Bgl*II and *Nco*I. For PCR analysis a pair of primers SFL-f1 (5'-ttt gga gag aac acg ggg ga-3') and SFL-r1 (5'-gga aat tcg agc tgg tca cc-3') were designed from the internal part of vector.

M: λ DNA/*Hind*III marker

Lane 1: pCAMBIA1302 (*Bgl*II)

Lane 2: pCAMBIA1302 (*Nco*I)

Lane 3-6: CL1~2 (*Nco*I)

lane 7: CL3 (*Nco*I)

Lane 8: CL3 (*Bgl*II)

Lane 9: CL4 (*Bgl*II)

Lane 10: CL4 (*Nco*I)

Lane 11-12: 100bp-1kb ladder

M'': 100bp-1kb ladder

M''': KB Ladder marker

Lane 13: pET-5b-Human L-chain ferritin (FL primer)

Lane 14: pCAMBIA1302 (FL primer)

Lane 15-20: CL1~6 (FL primer)

```

TNTTGNCTG GTAGATCTAT GAGCTCCCAG ATTGTCAGA ATTATTCCAC CGACGTGGAG
GCAGCCGTCA ACAGCCTGGT CAATTTGTAC CTGCAGGCCT CCTACACCTA CCTCTCTCTG
GGCTTCTATT TCGACCGCGA TGATGTGGCT CTGGAAGGCG TGAGCCACTT CTTCCGCGAA
CTGGCCGAGG AGAAGCGCGA GGGCTACGAG CGTCTCCTGA AGATGCAAAA CCAGCGTGGC
GGCCCGCTC TCTTCAGGA CATCAAGAAG CCAGCTGAAG ATGAGTGGGG TAAAACCCCA
GACGCCATGA AAGCTGCCAT GGCCCTGGAG AAAAAGCTGA ACCAGGCCCT TTTGGATCTT
CATGCCCTGG GTTCTGCCCG CACGGACCCC CATCTCTGTG ACTTCCTGGA GACTCACTTC
CTAGATGAGG AAGTGAAGCT TATCAAGAAG ATGGGTGACC ACCTGACCAA CCTCCACAGG
CTGGGTGGCC CGSAGGCTGG GCTGGGCGAG TATCTCTTGG AAAGGCTCAC TCTCAAGCAC
GACFAACACG TGTGAATTGG TGACCAGCTC GAATTTCCCC GATCGTTCAA ACATTTGGCA
ATAAAGTTT TTAAGATTGA ATCCTGTTGC CGGTCTTGGC ATGATTATCA TATAATTTCT
GAGNGAATTA CBTAAAGCAT GTAATAATTA ACATGTAATG CATGACGTTA TTTATGAGAT
GGTTTTTAT GATTAGAGTC CCGCAATTAT ACATTTAATA CGCGATAGAA AACAAAATAT
AGCCCGCAAA CTAGGATAAA TTATCGCGCG CGGNGTCATC TATGTTACTA GATCGGGAAT
TAACTATCA GTGTTTGGG CAGGATATAT TGGCCGGGTA AAAC

```

Fig. 13. Confirmation of ligation of pCAMBIA 1390 with L-chain ferritin gene. Restriction enzyme site was underlined. Start and stop codon were marked with rectangles.

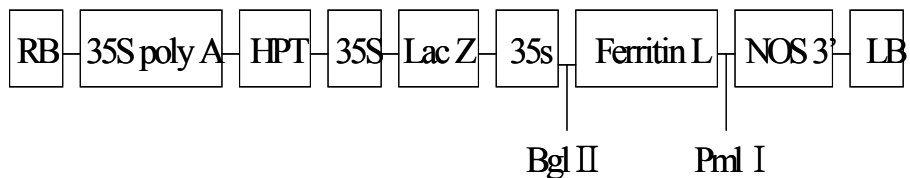


Fig. 14. Plasmid map of HLV binary vector used for transformation of lettuce. The human L-chain ferritin gene was placed under the control of CaMV35S promoter. Plasmid map is abbreviated as HPT, hygromycin resistance gene. 35S, CaMV 35S promoter; RB, right border; LB, left border

3) Rice ferritin 유전자를 운반하는 RFV binary vector 작성

pBI-101-Hm binary vector에 삽입되어 있는 773bp의 rice ferritin 유전자 (Fig. 15)는 충북대학교 조용구 교수 연구팀으로부터 공여받았으며 본 실험을 위해 RFV(Fig. 16)로 명명하였다. 공여 받은 RFV plasmid는 freeze-thaw 방법(An et al., 1988)으로 *Agrobacterium tumerfaciens*에 형질전환하고 RFV plasmid에 포함되어 있는 selection marker 및 ferritin 유전자를 확인하기 위하여 PCR을 실시하였다. PCR 분석을 위하여 세 종류의 primer 조합을 이용하였고 각각의 primer sequence는 다음과 같다.

Rice ferritin 유전자: CRF-fl: 5'-atg gct ctt gct cca tcc aaa g-3',
CRF-r1 5'-cta ttc aag att aag cag cat-3'
NPT II 유전자: NPT1 5'-caa gat gga ttg cac gca ggt tct-3'
NPT2 5'-tcc aga tca tcc tga tgc aca aga-3'
HPT 유전자: HPT1 5'-agc ctg acc tat tgc atc tcc-3'
HPT2 5'-tgt ccg tca gga cat tgt tgg-3'

PCR 결과 예상했던 750bp(rice ferritin 유전자), 550 bp(NPTII), 350bp (HPT)의 PCR product를 확인하였으며(Fig. 17) 확인된 vector는 상추 형질전환에 이용하였다.

```

atggctcttg ctccatccaa agtttccacc tttctgggt tttctccaa acccagtgtt
gggggtgctc agaaaaacc aacttgctct gttctctga gctttgogaa tgtgaaactt
ggaagcagaa accttaggtt ttgtgctca actgtgctc tctcaggggt gatattcgaa
cccttcgagg aggttaagaa gggtgaactt gctgttccaa cggccccca agtctcgctt
gocgtaagaa ctacgctgat gagtgtgaat ctgccattaa cgagcagata aatgtggaat
acaatgcttc ctatgogtac cactccttgt ttgogtacet tgacagggac aacgtggctc
tcaagggatt tgccaagttc ttcaagaaat ctagtgagga agaaagagag cacgctgaaa
agctcatgaa atatcagaat actcgggtg gaagggttgt tcttcacgcc atcaagaatg
tccctcaga atttgagcat gtggaaaagg gggatgcatt gtatgcattg gaattagctt
tgtctttgga gaagttagt aatgagaaac ttctgaatgt gcacagtgtg gcagatcgca
acaatgacc tcaaatggcc gacttcattg aaagcgagtt tttgtctgaa caggttgaat
gaattaagaa aatttcagag tatgtggctc agttgagaag ggttgaggtc acggtgtttg
gcactttgat caaagacttc ttgattagga agatgctgct taatctttaa tag

```

Fig. 15. Nucleotide and amino acid sequences of human L-chain ferritin gene

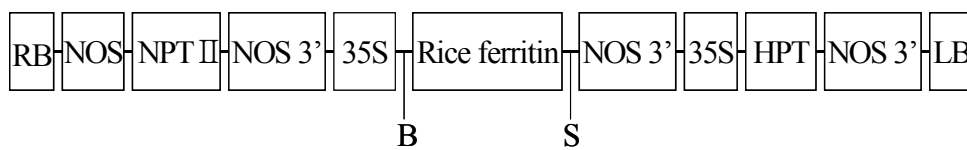


Fig. 16. Vector map of RFV with rice ferritin gene.

Plasmid is abbreviated as follows: B, *Bam*H I ; S, *Sst* I . NOS, Nos promoter; NOS 3', Nos terminator; 35S, CaMV 35S promoter; NPT II, kanamycin resistant gene; HPT, hygromycin resistant gene; RB, right border; LB, left border

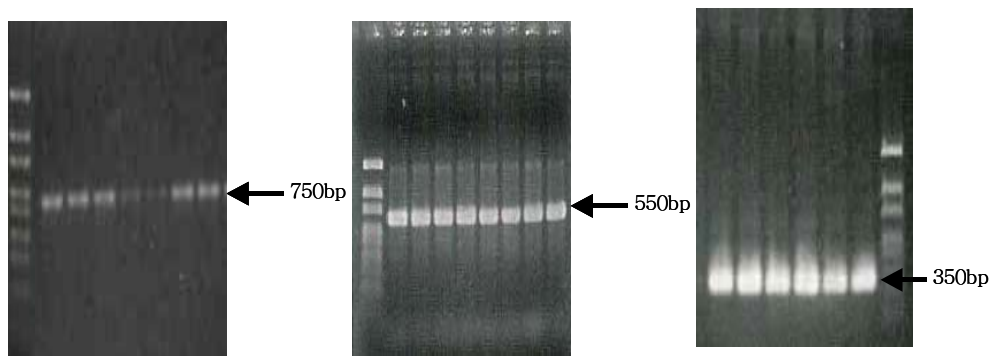


Fig. 17. Confirmation of binary vector RFV with rice ferritin gene.

PCR analysis revealed the presence of the expected 750bp, 550bp and 350bp products for rice ferritin (left), NPT II (center) and *hpt* (right) genes, respectively. For PCR analysis, three different pairs of primers; rice ferritin gene (CRF-f1 5'-atg gct ctt gct cca tcc aaa g-3', CRF-r1 5'-cta ttc aag att aag cag cat-3'), NPTII (NPT1 5'-caa gat gga ttg cac gca ggt tct-3', NPT2 5'-tcc aga tca tcc tga tcg aca aga-3') and hygromycin resistance gene (HPT1 5'-agc ctg acc tat tgc atc tcc-3', HPT2 5'-tgt ccg tca gga cat tgt tgg-3') were used to amplify each gene in the vector.

다. Ferritin 유전자로 상추의 형질전환

상추에 ferritin 유전자를 도입시키기 위하여 발현 vector를 포함하고 있는 *A. tumefaciens* LBA4404를 자엽 절편에 5분간 접종한 후 50 mg/L kanamycin 혹은 20 mg/L hygromycin이 포함된 선발배지에서 배양한 결과 배양 15일경부터 치상된 절편체의 상처난 부위로부터 kanamycin 혹은 hygromycin에 저항성을 갖는 callus와 신초가 형성이 되기 시작하였다(Fig. 18). 상추 형질전환의 경우 callus를 거친 후의 재분화되는 간접 재분화보다는 직접 신초가 형성되는 직접 재분화의 양상을 보여 주었다. 발달한 신초를 callus와 절편체를 제거하고 새 배지에 옮겨준 후 일정크기로 자라면 rooting배지에 옮겨 뿌리가 분화되어 재분화 개체를 획득할 수 있었다.

라. 형질전환체의 유전자 도입 확인

선발배지에서 유기된 상추 신초는 genomic DNA를 분리한 뒤, 형질전환 체임을 확인하기 위해 PCR을 수행하였다. PCR로 확인된 형질전환 개체는 순화시켜 온실에서 재배하였다. 재배된 형질전환 상추는 Southern hybridization, RT-PCR, western blotting 등을 통하여 transgene의 전이 여부 및 전이된 유전자의 발현 여부 등을 분석하였다.

1) PCR 분석에 의한 유전자 도입 확인

세 종류의 ferritin 유전자가 전이된 상추 single transformants의 genomic DNA에 전이되었는지 확인하기 위해 선발배지에서 선발되어 온실에서 재배된 재분화 개체의 본엽으로부터 genomic DNA를 추출하여 PCR 방법으로 확인하였다. 이와 더불어 human H-chain 과 L-chain ferritin 유전자로 형질전환된 상추 double transformants도 PCR로 형질전환여부를 확인하였다. 각각 유전자에 specific한 primer; human H-chain ferritin 유전자(CV-f1 5'-tga agt act gag gat aca act tca-3', CV-r1 5'-gca aga ccg gca aca gga ttc-3'), human L-chain ferritin 유전자 (SFL-f1 5'-t tt g ga gag aac acg ggg ga-3', SFL-r1 5'-gga aat tcg agc tgg tca cc-3') 및 rice ferritin 유전자(CRF-f1 5'-atg gct ctt gct cca tcc aaa g-3', DRF-r1 5'-att gcc aaa tgt ttg aac gat c-3')를 이용하여 PCR방법을 수행한 결과 600bp(human H-chain ferritin), 550bp(human L-chain ferritin) 및 750bp(rice ferritin)의 PCR product를 확인하였다. 한편 H-chain ferritin 유전자와 L-chain ferritin 유전자를 상추 한 개체에

같이 전이시키기 위하여 double transformation을 시도하고 kanamycin과 hygromycin 배지에서 선발한 상추 double transformants에서는 human H-chain ferritin 유전자의 600bp와 human L-chain ferritin 유전자의 500bp product를 한 개체로부터 확인할 수 있어 두 개의 유전자가 한 개체에 존재하는 것을 확인하였다. 반면에 형질전환을 시키지 않은 상추에서는 PCR product를 확인할 수 없었다(Fig. 19).

2) Southern hybridization에 위한 형질전환체의 분석

Southern hybridization 분석은 PCR 분석에 의하여 일차적으로 유전자 도입이 확인된 형질전환체 10개 line을 각 유전자별로 선발하여 실시하였다. *EcoRI* enzyme 처리 후 human H-chain ferritin 혹은 *hpt* gene으로부터 작성된 probe를 이용하여 확인을 한 결과 기대했던 size인 550bp (ferritin) 혹은 700bp (hygromycin)의 signal을 확인할 수 있었다. Southern hybridization 분석의 결과로 PCR로 확인된 line들로의 ferritin 유전자의 도입이 확인되었고 이들의 copy수는 1-3개인 것으로 확인되었다.

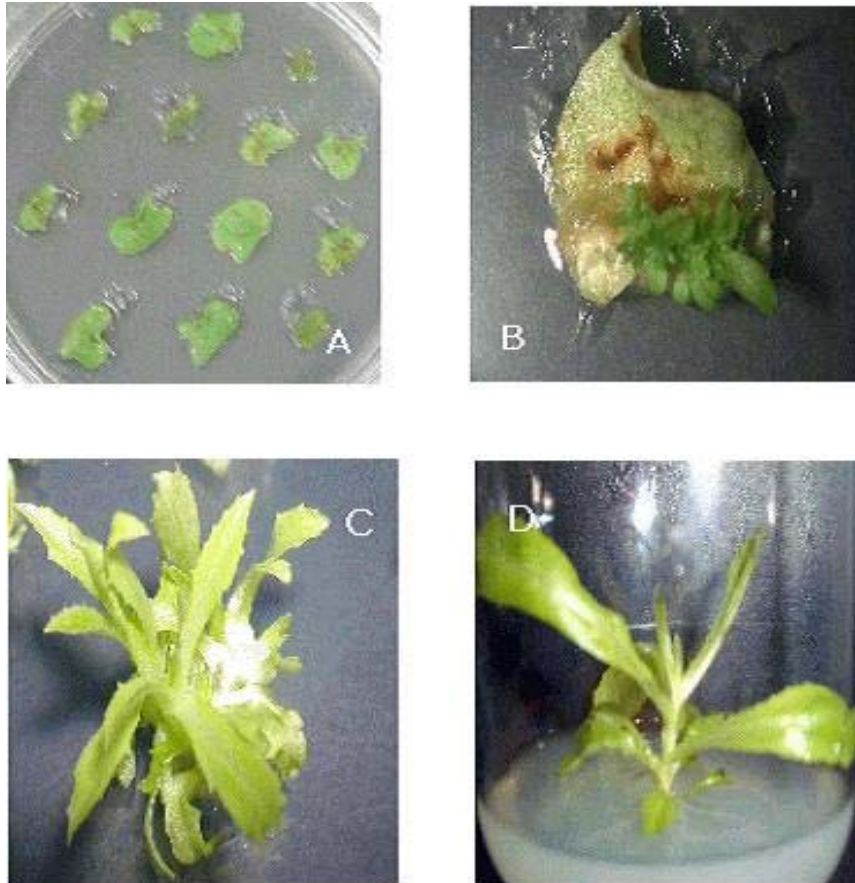


Fig. 18. Transformation of lettuce with *A. tumefaciens* LBA4404 containing FHV, FLV or RFV. A: infected cotyledon explants on selection medium; B: transgenic shoots were induced onto selection medium; C: transgenic shoot was grown onto selection medium; D: roots from transgenic shoot were induced in rooting medium.

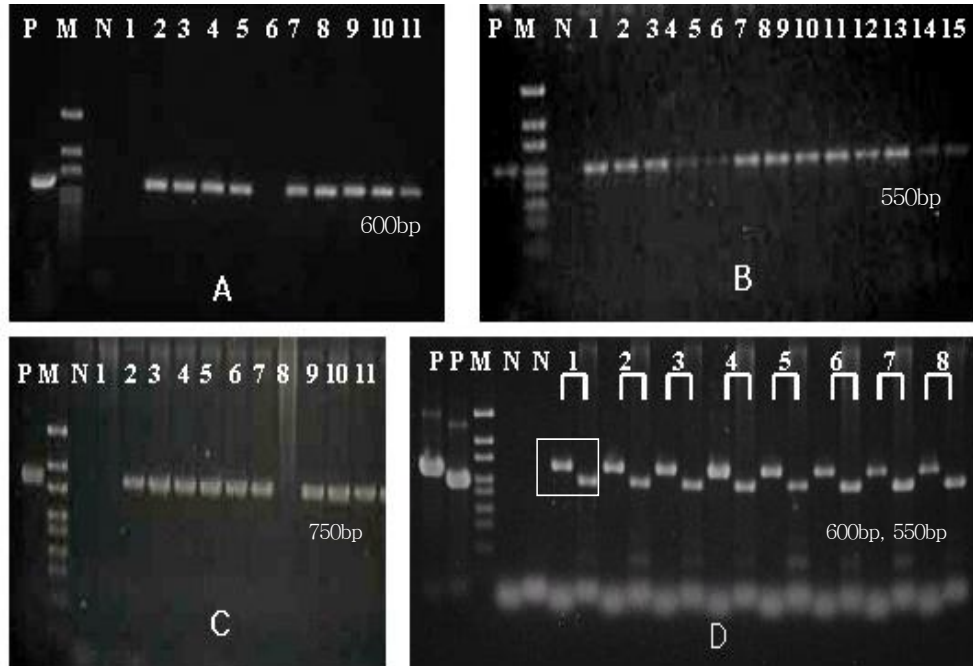


Fig. 19. Confirmation of transgenic lettuce plants by PCR analysis.

PCR analysis revealed the presence of the expected 600bp (human H-chain ferritin, A), 550bp (human L-chain ferritin, B), 750bp (rice ferritin, C), and 600 & 500bp (human H + L ferritin gene double transformation, D) products. For PCR analysis, three different pairs of primers were used; human H-chain ferritin gene (CV-f1 5'-tga agt act gag gat aca act tca-3', CV-r1 5'-gca aga ccg gca aca gga ttc-3'), human L-chain ferritin gene (SFL-f1 5'-t tt g ga gag aac acg ggg ga-3', SFL-r1 5'-gga aat tcg agc tgg tca cc-3'), and rice ferritin (CRF-f1 5'-atg gct ctt gct cca tcc aaa g-3', DRF-r1 5'-att gcc aaa tgt ttg aac gat c-3').

P: positive control; N: negative control

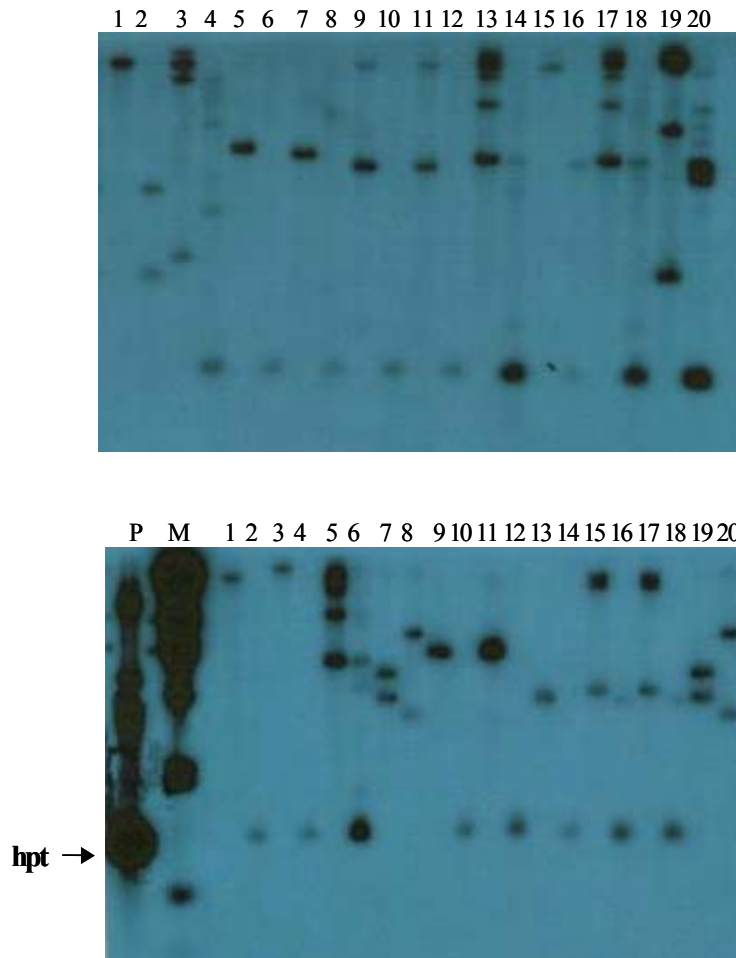


Fig. 20. Southern hybridization of DNA from transgenic lettuce plants with human H-chain (top) and L-chain (bottom) ferritin genes. Genomic DNA of each transgenic lines were digested with *Bam*HI (odd number) and *Xho*I (even number), respectively. Digested genomic DNA was probed with [³²P]-labeled 550b and 700bp fragment for H-chain ferritin gene(top) and *hpt* gene (bottom), respectively. (M: Size marker, Lamda DNA digested with *Hind*III; P: positive control, lane 1-20: transgenic lettuce line)

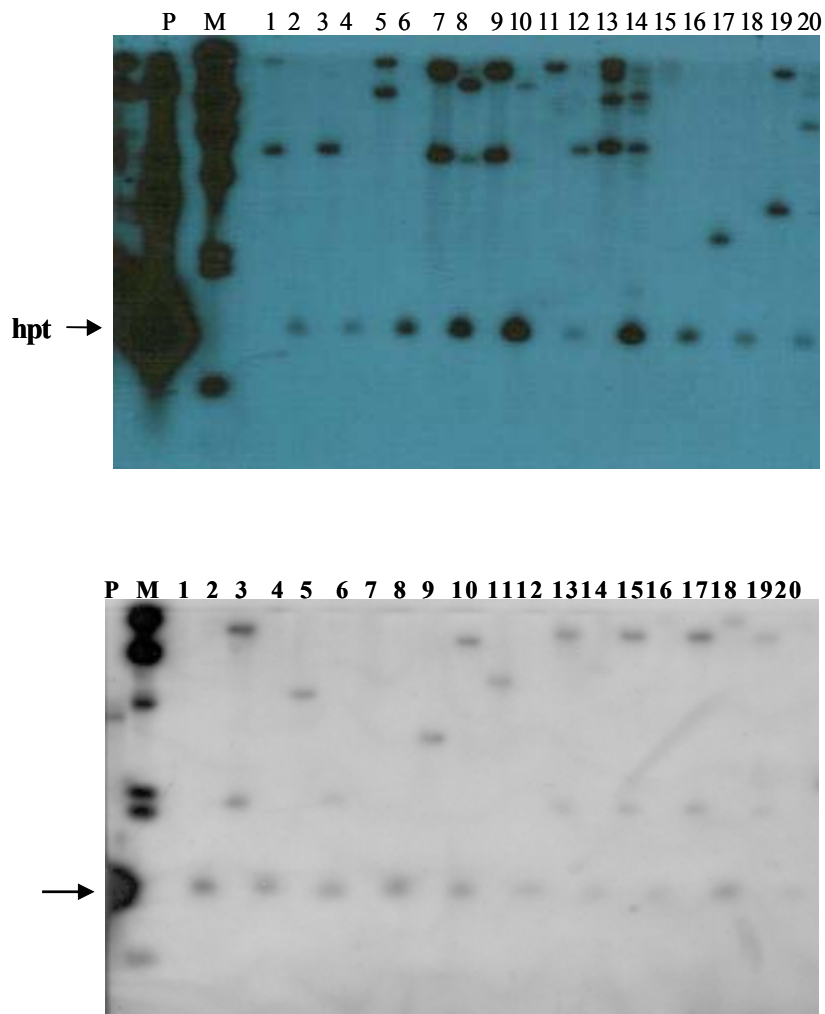


Fig. 21. Southern hybridization of DNA from transgenic lettuce plants with rice (top) and double transformants with human H- and L-chain ferritin genes (bottom). Genomic DNA of each transgenic lines were digested with *Bam*HI (odd number) and *Xho*I (even number), respectively. Digested genomic DNA was probed with [³²P]-labeled 700bp fragment. (M: Size marker, Lamda DNA digested with *Hind*III; P: positive control, *hpt* fragment from each plasmid; lane 1-20: transgenic lettuce line)

3) RT-PCR 분석에 의한 형질전환체의 발현 조사

유전자의 발현여부를 확인하기 위하여 우선 형질전환 상추로부터 total RNA를 분리한 뒤 oligo dT primer와 reverse transcriptase을 이용, cDNA를 합성하였다. 그 후 합성된 cDNA 1 μ g을 사용, 각 유전자의 발현 확인을 위하여 제작된 primer와 *taq* polymerase로 PCR을 시도하였으며 그 결과 기대했던 550bp(human H-chain ferritin), 520bp(human L-chain ferritin) 그리고 750bp(rice ferritin 유전자)의 RT-PCR 산물을 확인하였고 상추 double transformants로부터도 550bp(human H-chain ferritin)와 520bp(human L-chain ferritin) 산물을 한 개체로부터 확인하였다. 이로서 각각의 형질전환체로부터 ferritin 유전자의 발현을 확인하였으며 특히 인간으로부터 분리한 유전자도 식물에서 발현됨을 확인할 수 있었으며 두 개의 유전자가 동시에 형질전환된 상추 형질전환체에서도 두 개의 유전자가 동시에 발현됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 22).

4) Western blot 분석에 의한 형질전환체의 단백질 발현

상추 형질전환체에서의 ferritin 유전자의 발현 유무를 확인하기 위해 SDS-PAGE를 수행하였다. 상추 형질전환체 6개와 Negative control로 비형질전환체인 상추 sample 1개, 그리고 positive control로 대장균에서 발현시킨 ferritin sample 1개를 western blotting으로 각각 비교하였다. 실험결과 Fig. 23에서와 같이 Lane 1-6까지 상추 형질전환체에서 약 42kDa 위치의 signal을 확인할 수 있었고, Lane 8의 대장균 ferritin sample에서는 약 21kDa과 42kDa 위치 두 곳에서 ferritin signal을 확인할 수 있었다. 반면 negative control 상추 sample에서는 signal을 확인할 수 없었다. 이상과 같은 결과로 상추 ferritin 형질전환체에서는 ferritin이 dimer 크기의 분자량에서 발현이 되는 것으로 추측된다. 하지만 *E. coli*의 결과에서처럼 monomer위치의 signal이 없어서 식물에서의 단백질은 좀더 복잡한 post-translational modification pathway를 거칠 것으로 추측되며 이에 대한 명확한 연구가 좀더 심화되어야 한다고 판단된다.

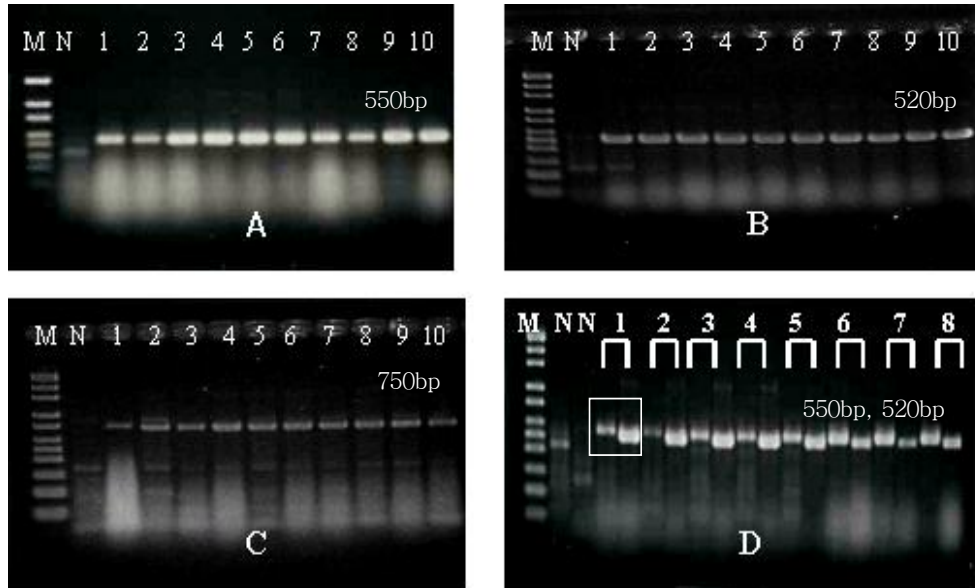


Fig. 22. Confirmation of transgene expression of transgenic lettuce plants by RT-PCR.

RT-PCR analysis revealed the presence of the expected 550bp, 520bp, 750bp, and 550 & 520bp products for human H-chain ferritin gene(A), human L-chain ferritin gene(B), rice ferritin gene(C), double transformation (human H- and L-chain ferritin genes)(D). For RT-PCR analysis, three different pairs of primers were used, human H-chain ferritin gene (FH-f1: 5'-atg acg acc gcg tcc acc tc-3', FH-r1: 5'-tta gct ttc att atc act gtc tcc-3'), human L-chain ferritin gene (FL-f1: 5'-atg agc tcc cag att cgt ca-3', FL-r1: 5'-tag tcg tgc ttg aga gtg ag-3'), and rice ferritin gene (CRF-f1: 5'-atg gct ctt gct cca tcc aaa g-3', CRF-r1: 5'-cta ttc aag att aag cag cat-3'). N: negative control.

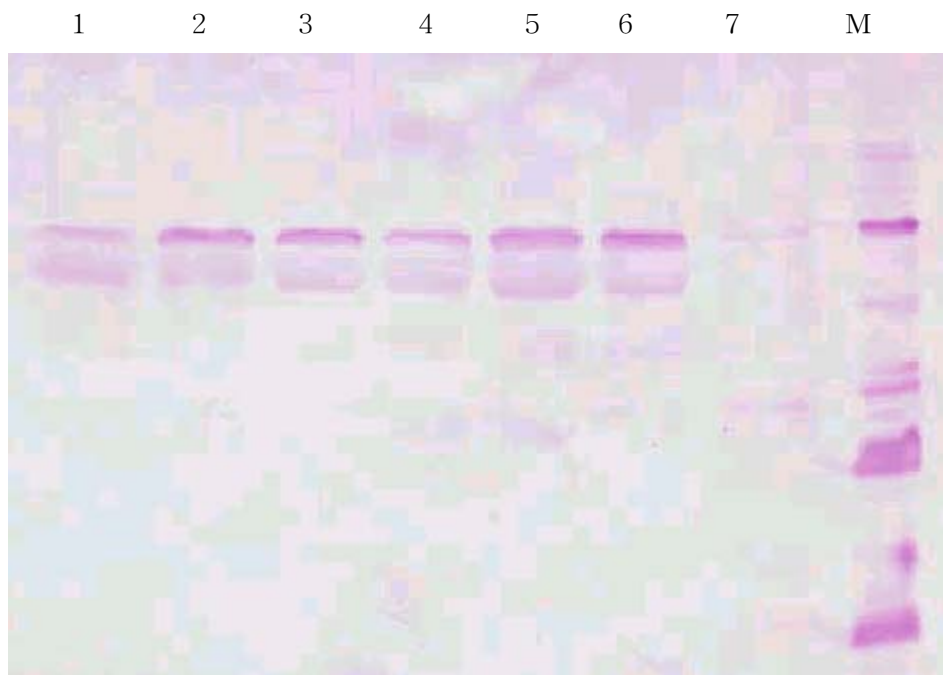


Fig. 23. Analysis of protein expression by western blot analysis.
Lane 1~6: Transgenic lettuce plants
Lane 7: Non transformed lettuce plants
Lane 8: *E-coli*.

마. 전이유전자의 후대 유전 분석

온실에서 재배된 형질전환체의 종자는 homozygous 개체를 확보하고자 자가수분에 의해 얻었다. 자가수분은 개화가 시작된 후 암술과 수술이 노출되기 전에 봉투를 씌워 타가수분이 이루어지지 않게 하였다.

Human H-chain ferritin 유전자로 형질전환된 상추를 자가수분하여 획득한 종자를 100mg/L kanamycin이 첨가된 MS배지에 파종하고 발아수를 확인하였다. T₁ 세대에서 전이유전자의 분리비를 확인하기 위한 본 실험은 수확 종자수가 100개 이상인 6개의 형질전환체를 대상으로 kanamycin에 저항성을 보이는 종자와 그렇지 않은 종자의 비율을 조사하였다. 그 결과 kanamycin에 저항성을 보이는 종자의 발아를 기초로 전이유전자가 후대로 유전함을 확인할 수 있었으며 kanamycin에 저항성을 보이는 종자와 그렇지 않은 종자의 비율로 전이유전자의 copy수를 추정할 수 있었다 (Table 2). 그 결과 line 4는 3:1의 분리비를 보여 Mendel의 유전법칙에 따라 1 copy가 존재할 것으로 예측되었으며 copy수를 예측할 수 없는 line 2를 제외하고는 2 copy 이상이 도입됐음을 예측할 수 있었다. 보다 정확한 전이유전자의 copy수는 Southern blot 분석으로 정확하게 분석할 수 있었다. 한편 kanamycin 배지에서 저항성을 보인 종자는 선발하여 T₁세대를 온실에서 재배하고 형질전환시키지 않은 모식물체와 타가수분시키고 그 종자의 발아 검정을 통하여 homozygous 개체를 확보하고자 하였으며 이들 homozygous 개체들의 ferritin 유전자 발현 정도도 확인할 예정이다.

Table 2. Segregation of kanamycin resistance in progenies from selfing transformants with human H-chain ferritin gene.

Transgenic plant	Copy number ^z	Germination no. Km ^y / Km ^x	Segregation ratio Km ^y : Km ^x
1	≥2	132/18	7.33:1
2	ND ^w	89/61	1.45:1
3	≥2	86/14	6.14:1
4	1	70/30	2.33:1
5	≥2	127/23	5.52:1
6	≥2	87/13	6.69:1

^zCopy number of H-chain ferritin gene was expected by segregation ratio of Km^R.

^yKm^R: No. of kanamycin resistance seeds.

^xKm^S: No. of kanamycin sensitive seeds.

^wNot determined.

바. 형질전환 상추의 생육 조사

순화과정을 거쳐 온실에서 재배된 상추는 초장을 일주일마다 측정하였으며 6주 후에 최종 조사를 하였다. 6주후의 초장에서 순화할때의 초장의 차이를 비교한 바 nontransformed 상추의 초장변이의 평균은 20 cm인 반면에 human H-chain ferritin 유전자를 이용한 형질전환 상추의 초장변이는 평균 23.1 cm, human L-chain ferritin 유전자는 23.75 cm, rice ferritin 유전자는 24.95 cm, 그리고 H-chain과 L-chain ferritin 유전자를 동시에 형질전환한 이중형질전환체는 29.2 cm이었다(Fig. 26). 본 결과는 ferritin 유전자가 상추의 생육 즉 초장에 영향을 주는 것으로 보여지며 그 효과는 이중형질전환 상추가 가장 좋았으며 그 다음으로 rice ferritin, human L-chain ferritin, human H-chain ferritin 순으로 나타났다. H-chain과 L-chain ferritin 유전자를 이용한 형질전환체의 평균 초장의 차이는 없었으나 이중형질전환체에서 월등히 초장의 증가를 보여 아마도 상승효과가 있었으리라 판단되나 이를 위한 보완 실험이 필요하다고 생각된다. 그러나 각각의 유전자를 이용한 형질전환에서 선발된 line들의 변이가 다양하여 (H-chain; 13~38.5 cm, L-chain: 10~38 cm, rice ferritin: 12~41 cm, 이중형질전환체: 17~42 cm) 이들 중 육성목적에 적합한 line의 선발이 필요하다고 판단되며 이를 위해 line을 선발 유지 중에 있다(Fig. 24, 25).

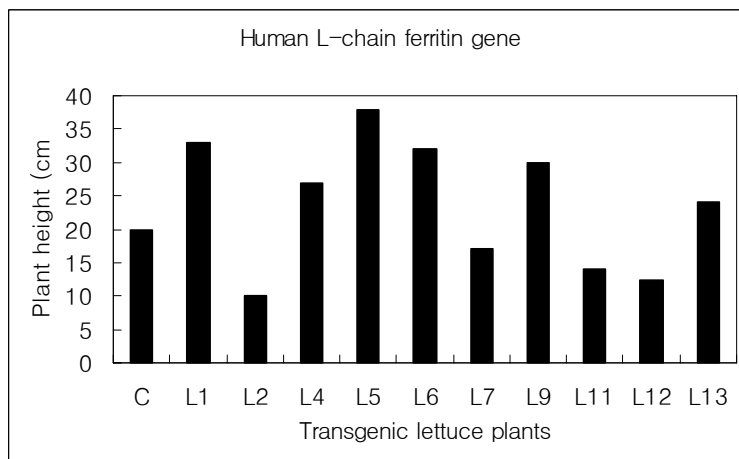
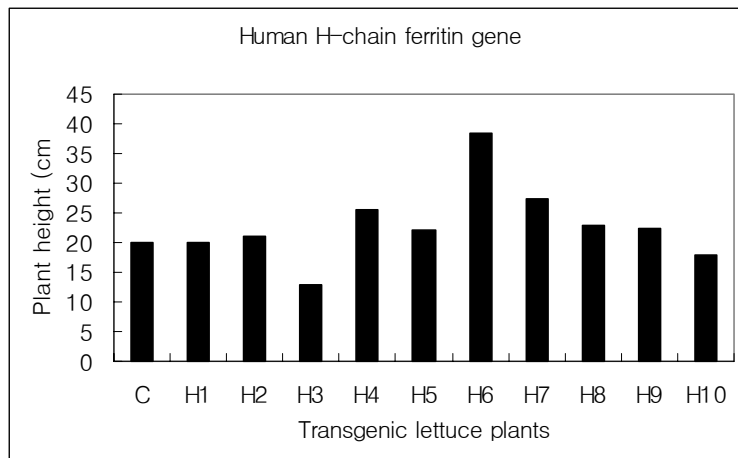


Fig. 24. Differences of plant height of transgenic lettuce plants with human H-chain ferritin gene (top) and with human L-chain ferritin gene (bottom).

Differences of plant height = plant height after 6 weeks from being transplanted to the pot - plant height at first day from being transplanted to the pot

Con : Non-transgenic plant

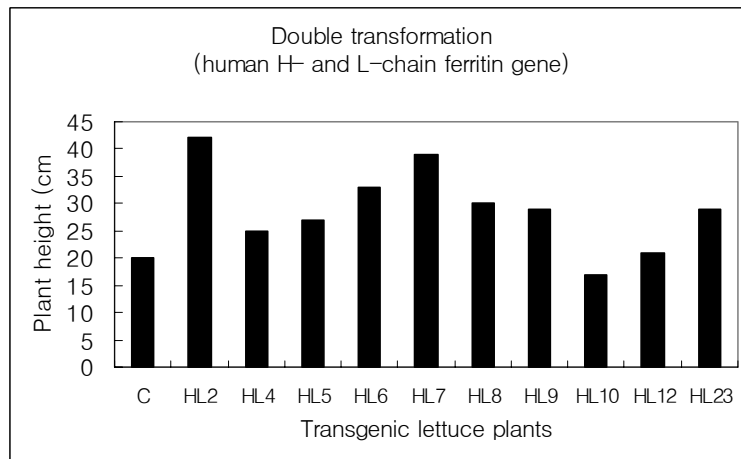
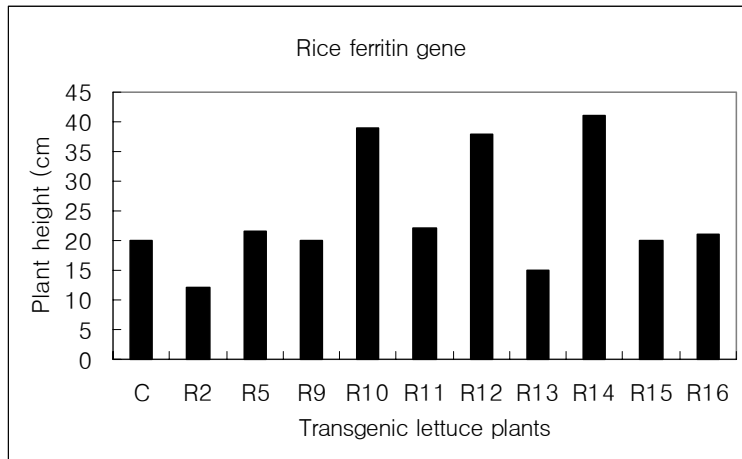


Fig. 25. Differences of plant height of transgenic lettuce plants with rice ferritin gene (top) and double transformants with human H- and L-chain ferritin genes (bottom).

Differences of plant height = plant height after 6 weeks from being transplanted to the pot - plant height at first day from being transplanted to the pot

Con: Non-transgenic plant

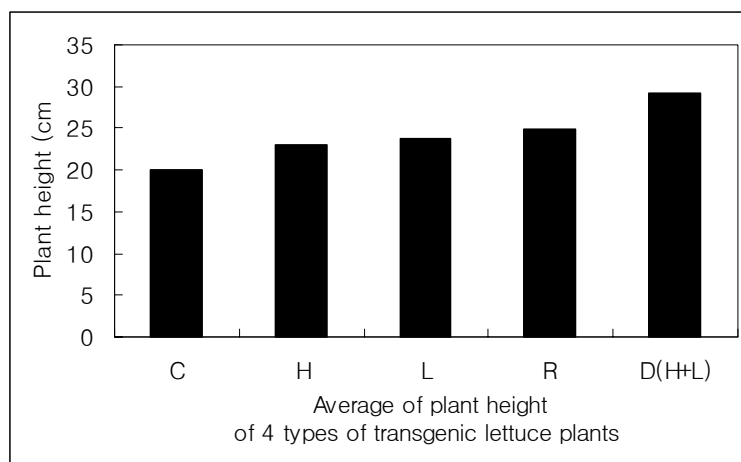


Fig. 26. Average plant heights of 4 types of transgenic lettuce plants.
Average of plant height = Sum of plant height differences of transgenic plants / total number of transgenic plants
Con : Non-transgenic plant
H: Transgenic lettuce plants with human H-chain ferritin gene;
L: Transgenic lettuce plants with human L-chain ferritin gene;
R: Transgenic lettuce plants with rice ferritin;
D(HL): Transgenic lettuce plants with human H and L-chain ferritin gene.

사. 형질전환 상추의 Fe⁺⁺ 이온 함량 조사

PCR, Southern hybridization 분석 및 RT-PCR등으로 확인된 single transformed 상추(세 종류의 ferritin 유전자)와 double transformed 상추의 철분 함량을 inductively coupled plasma (ICP) spectrometry로 측정한 결과는 Table 3과 같다. 평균 Fe⁺⁺ 이온 함량은 nontransformed 상추의 경우 0.420 mg/g인 반면에 human H-chain ferritin 유전자로 형질전환된 상추가 0.834 mg/g으로 약 2배정도 높았다. Human L-chain ferritin 유전자(0.536 mg/g), rice ferritin 유전자(0.553 mg/g), double transformed 상추(0.534 mg/g)등으로 형질전환된 상추도 약간의 높은 경향은 보였으나 많은 차이를 보이지는 않았다. 그러나 각각의 유전자별로 형질전환 line별 차이(H-chain ferritin: 0.260~1.165, L-chain ferritin: 0.241~1.037, rice ferritin: 0.260~1.165, double transformants: 0.249~0.837)가 크게 나타나 고품량을 보이는 line은 선발하여 고정중에 있다.

Table 3. Iron concentrations of transgenic lettuce plants

Iron concentrations (mg/g)									
H		L		R		D		C	
Line no.	Iron conc.	Line no.	Iron conc.	Line no.	Iron conc.	Line no.	Iron conc.	Line no.	Iron conc.
H1	0.260	L1	0.681	R2	0.656	HL2	0.808	C1	0.485
H2	1.165	L2	0.427	R5	0.363	HL4	0.577	C2	0.393
H3	0.641	L4	0.702	R9	0.382	HL5	0.249	C3	0.381
H4	1.041	L5	0.428	R10	0.906	HL6	0.707		
H5	1.207	L6	0.478	R11	0.526	HL7	0.403		
H6	0.887	L7	0.462	R12	0.670	HL8	0.837		
H7	0.829	L9	0.241	R13	0.756	HL9	0.752		
H8	1.165	L11	1.037	R14	0.158	HL10	0.529		
H9	0.415	L12	0.365	R15	0.624	HL12	0.309		
H10	0.732	L13	0.541	R16	0.488	HL23	0.168		
Average	0.834	Average	0.536	Average	0.553	Average	0.534	Average	0.420

²H: Transgenic lettuce plants with human H-chain ferritin gene

L: Transgenic lettuce plants with human L-chain ferritin gene

R: Transgenic lettuce plants with rice ferritin gene

D: Transgenic lettuce plants with human H & L-chain ferritin gene

제 4 절 Sesquiterpene 합성유전자의 분리 및 *Agrobacterium*을 이용한 상추로의 도입

1 항 서 언

식물체내에서 일어나는 대사활동은 크게 일차대사와 이차대사로 분리된다. 일차대사란 식물이 기본적으로 살아가기 위해 일어나는 대사활동으로 빛을 이용해 당을 합성해 내는 광합성작용과 그것을 에너지원으로 사용하는 호흡작용이 이에 포함되며 모든 식물체내에서 공통적으로 일어나는 대사 활동이라 할 수 있다. 반면, 이차대사란 일차대사를 통해 만들어지고 사용되어진 후 남아 있는 영양소를 기본으로 식물중 별로 기관 특이적으로 물질을 생합성 및 활용하는 과정이라 할 수 있는데 이렇게 이차대사를 통해 생합성되는 물질은 크게 terpenoids, alkaloids, phenylpropanoid flavonoids 화합물 등으로 나뉘며 이중에서도 특히 terpenoid 화합물은 식물내에서 생성되는 2차 대사산물 중 가장 구조적으로 다양한 류를 포함하는 것으로 알려져 있다(Buchanan et al. 2000). Terpenoid 화합물은 다시 탄소 다섯개로 구성된 isoprene을 한 단위로 그 단위가 모여진 개수에 따라 한 개의 경우 hemiterpene, 두 개가 모인 monoterpene, 세 개가 모여 총 15개의 탄소를 이루어진 sesquiterpene 그리고 4개의 diterpene, sesquiterpene 두개로 구성된 triterpene, 8개의 isoprene 단위로 구성된 tetraterpene, 8개 이상의 isoprene으로 구성된 polyterpene으로 분류된다. Terpenoid 화합물 가운데 isoprene 3개가 모여 이루어진 sesquiterpene은 특히 최근 들어 다양한 약효를 보이는 것으로 알려져 많은 관심을 끌고 있는데, 그 대표적 예로서 국화과 식물인 개똥쑥(*Artemisia annua* L.)에서 생합성되는 artemisia라는 물질은 항말라리아를 위한 특효성분으로 알려져 있다.

상추는 국화과의 1년초 작물로 비타민류와 mineral을 다량 함유하며 샐러드, 쌈 채소등으로 이용되는 주 원예채소작물이라 할 수 있다. 이 상추내에는 특유의 씹살한 맛을 내는 성분이자 위궤양, 발열, 최면, 진통효과가 있어 불면증에 좋다고 알려진 성분들 즉, lactucin($C_{15}H_{16}O_5$, MW : 276.3), 8-doxy-lactucin($C_{15}H_{16}O_4$, MW : 260.3) 및 lactucopicrin($C_{23}H_{22}O_7$, MW : 410)이 함유되어 있는데 이들은 terpenoid계통의 sesquiterpene lactone으로 알려져 있다. 이와 유사하게 쓴맛을 내는 sesquiterpene lactone 성분은 상추외에도 같은 국화과 식물인 chicory(*Chichorium intybus*), radicchio(*Cichorium intybus*), endive(*Cichorium endive*), artichoke (*Cynara scolymus*) 등에도 함유되어있으

며 이들은 곤충에 대한 기피물질, 항 곰팡이, 항 박테리아 성분으로 작용하기도 한다고 보고되어져 있다. 이들 물질은 기본적으로 sesquiterpene의 공통 전구체인 farnesyl pyrophosphate(FPP)를 기본 전구체로 하는 동시에 guanine, germacran, eudusmane등의 국화과 특유의 물질을 기반으로 생합성 되는데 이들 역시 동일한 전구체인 FPP로부터 germacrene A 합성효소에 의해 형성된 (+)-germacrene A를 전구체로 한 acetate-mevalonate-FPP-germacradiene 경로를 거쳐 생합성된다고 알려져 있다(de Kraker et al. 1998). Fig. 1은 FPP가 germacrene A 합성효소에 의해 germacrene A로 전환된 후 상추를 포함한 국화과 작물 특유의 sesquiterpene lactone으로 생합성되는 과정을 나타내고 있다.

상추 및 국화과 작물내에서는 특이하고 인간에게 유용한 sesquiterpene lactone이 생합성된다고는 알려져 있으나, 그 생합성량은 같은 식물체내일지라도 기관 부위별로 재배방식에 따라 다르다고 알려져 있다. 따라서 함량에 대한 연구는 여러방면으로 이루어져, 부위별에 있어서는 치커리의 경우 뿌리에 가장 높은 함량이 존재하며 줄기의 경우, 위에서 아래순으로 그 함량이 낮았다고 보고 되어있다(Rees와 Harborne, 1985). 또한 그 양은 식물의 재배지역과 질소수준에 의해 영향을 받으며(Peters와 Amerongen, 1997) 그 식물체의 이용방식, 즉 조리법에 의해서도 주 sesquiterpene lactone 함량이 감소하는 등 영향을 받는다고 알려져 있다(Peters와 Amerongen, 1998).

하지만 특효 성분만을 대량으로 얻기 위해 재배방식의 조절, 특정 식물체의 기관만의 의존만으로는 한계에 놓일 수밖에 없다. 이 한계를 극복하기 위한 가장 효율적인 방법으로 생명공학적인 방법을 들 수 있으며 그것의 기본전략의 하나로 그 물질이 생합성되는데 있어 중요한 전구물질을 대량 생합성시킴으로서 그로부터 생성되는 최종물질의 생합성량을 증가시키는 방식을 들 수 있다. 이를 위해 전구 물질의 생합성에 관련한 유전자를 분리하고 이 유전자가 작용하도록 식물체에 도입하는 것은 식물 2차대사관련 연구에 있어 가장 기본적인 방식이라 할 수 있다. 본 연구에서는 우선, 국내 상추 품종인 청치마상추를 이용, 청치마 특유의 유용 sesquiterpene lactone 생합성의 중요 전구체인 germacrene A 생합성에 관련한 유전자를 분리하였고, 이 유전자의 직접적인 생산물질인 germacrene A와 그것으로부터 파생된 sesquiterpene lactone을 식물체내에서 대량 생합성하기 위해 실질적으로 germacrene A 생합성 유전자를 *Agrobacterium*을 이용하여 상추내로 도입하였다.

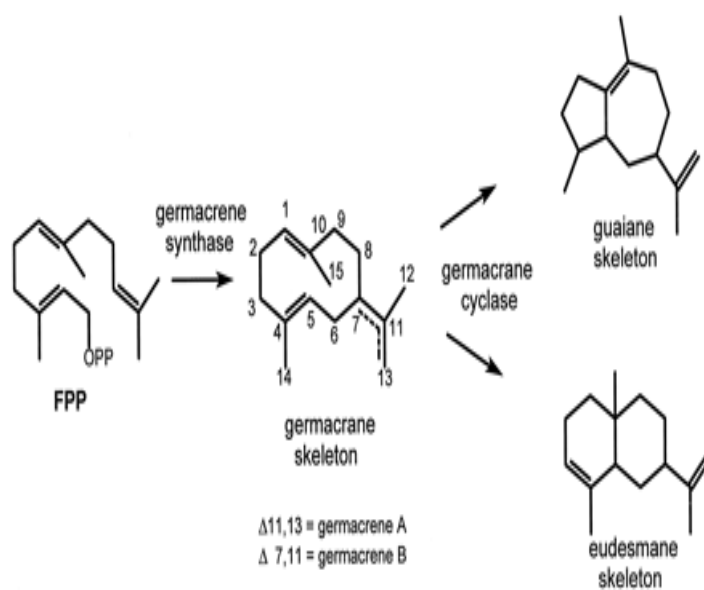
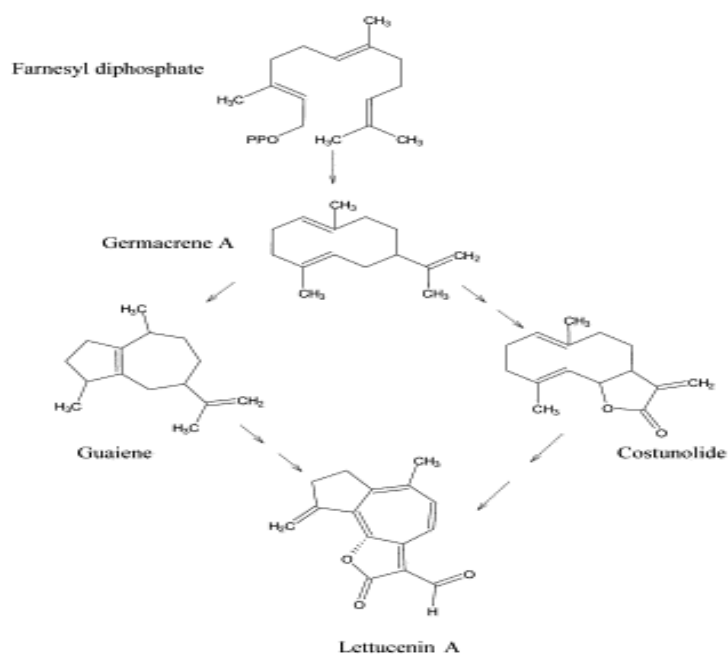


Fig. 1. Proposed biochemical route for the germacrene-derived sesquiterpene lactones in plants by Bennett et al. (2002)

2 항 재료 및 방법

가. 식물재료 및 배양 조건

유전자 분리 시 사용된 상추는 기내의 무균상태에서 종자를 파종하고 발아 후 식물체의 본엽을 재료로 사용하였으며, 형질전환은 종자 파종 후 1주 후의 자엽을 이용하여 이루어졌다. 파종은 종자를 우선 70% 에탄올에 1분동안 진탕한 후, 30% clorox와 0.1%의 Tween-20이 포함된 액체에 넣고 15분 동안 다시 흔들어 주고 그것을 멸균수로 여러 번 세척하여 멸균 처리한 뒤 3%의 sucrose와 8g/L의 agar가 포함된 pH5.8의 MS (Murashige and Skoog) 배지가 들어있는 마요네즈병에 병당 20립씩 파종하였다. 모든 식물체는 25°C, 16시간 광주조건 하에서 배양되었으며 형질전환용 자엽을 제외한 식물체는 생장함에 따라 한달 간격으로 새 배양배지로 계대되었다.

나. 유전자 분리를 위한 primer 작성

Sesquiterpene 유전자의 공통된 부분을 찾기 위하여 기존에 발표되어 있는 작물별 sesquiterpene synthase 유전자를 'National Center for Biotechnology Information(NCBI) Genbank'에서 검색하였고 유전자의 전체 염기서열을 수집하기 위해 'Entrez program'을 사용하였다.

수집된 sesquiterpene synthase 유전자 가운데, 채소작물 중 가지 (*Lycopersicon hirsutum*), 토마토(*Lycopersicon esculentum*), 감자(*Solanum tuberosum*), 고추(*Capsicum annum*), 치커리(*Chichorium intybus*)들의 염기서열을 선별하였고 이들은 각각 같은 작물 내에서도 2종류 이상의 sesquiterpene synthase 염기서열을 갖고 있어서 그들 중 대표 염기서열로서 1번의 염기서열을 선택하고 그것들 중 homology를 많이 보이는 부분을 BLAST program으로 찾은 뒤 그 부분을 중심으로 primer를 제작하였다.

다. Reverse transcriptase (RT)-PCR

유전자 분리를 위해 우선 상추로부터 GibcoBRL사의 Trizol시약을 사용하여 전체 RNA를 제시된 방법에 따라 분리한 뒤 oligo dT primer와 reverse transcriptase을 이용, cDNA를 합성하였다. cDNA 합성 조건은 1µg의 RNA를 oligo dT primer를 첨가한 후 70°C에서 RNA 이차구조를 제거한 뒤 42°C에서 30분간 역전사 시키고 사용된 역전사효소를 불활성화시키기 위해 75°C에서 10

분간 두었다. 그 후 합성된 cDNA 1 μ g을 사용, 유전자 분리를 위해 작성한 primer와 *taq* polymerase로 PCR하였으며 그 프로그램은 96°C에서 2분간 초기 변성 시간을 둔 뒤 96°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 40 cycle을 실행하고 마지막으로 72°C에서 10분간 최종 연장시킨 후 4°C를 유지하여 전체 반응을 종료하였다. 각각의 primer들로 증폭된 단편들은 그 각각의 염기서열을 분석하기 위해 PCR산물을 pGEM-T easy vector에 삽입하고 T7와 SP6 primer를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

라. RACE 방법

작성한 primer로 확보한 유전자의 일부 단편을 기본으로 full length 유전자를 확보하기 위해 RACE 방법을 이용하였다. 3'쪽의 경우 T가 18개 포함된 GeneRacer™ oligo dT primer로 청추 RNA를 우선 역전사 시킨 뒤 유전자 단편의 상류 primer(ses 11)와 GeneRacer™ oligo dT primer내의 일부 서열을 바탕으로 만들어 진 GeneRacer™ 3' primer로 PCR을 수행하여 확보하였으며 5'쪽의 경우 이미 그 sequence를 알고 있는 GeneRacer™ RNA Oligo를 T4 RNA ligase로 상추 RNA 5'쪽에 부착한 뒤 그 부분으로부터 유래된 GeneRacer™ 5' primer와 이미 확보된 부분의 하류 primer(ses 12)로 RT-PCR을 수행하여 확보하였다. 사용된 GeneRacer™ Oligo dT, 3', 5' 그리고 RNA oligo primer sequence는 Invitrogen에 의해 제공되었으며 그 염기서열은 다음과 같다.

GeneRacer™ oligo dT primer;

5'gct gtc aac gat acg cta cgt aac ggc atg aca gtg(t)₁₈3'

GeneRacer™ RNA primer;

5'cga cug gag cac gag gac acu gac aug gac uga agg agu aga aa3'

GeneRacer™ 5' primer;

5'cga ctg gag cac gag gac act ga3'

GeneRacer™ 3' primer;

5'gct gtc aac gat acg cta cgt aac g3'

마. 식물형질전환을 위한 binary vector 작성 및 *agrobacterium*으로 형질전환

상추로부터 분리된 germacrene A synthase 유전자를 상추 식물체내로 도입하기 위한 발현 재조합 binary vector를 작성하였다. 자세한 vector 작성 방법

과 결과는 결과 및 고찰에서 설명코자 한다.

바. *Agrobacterium*을 이용한 상추의 형질전환

위에서 완성된 vector와 유전자를 포함한 *Agrobacterium*은 우선, 50 mg/L의 kanamycin과 10 mg/L의 streptomycin이 함유된 고체 YEP 배지에서 48시간 동안 28°C 암조건하에서 배양하였다. 그 배양된 colony들중 한 colony를 취한 뒤 동일한 종류와 동일한 농도의 항생제가 포함된 5 ml의 액체 YEP배지에서 역시 48시간동안 28°C 암조건하에서 진탕배양하였다. 그 후 그 박테리아 배양액에서 1 ml을 취한 뒤 50 ml의 동일한 항생제가 포함된 액체배지에서 24시간 동안 OD₆₀₀값이 1.0이 될 때까지 배양하였다. 이 배양액은 식물형질전환에 이용되기 앞서, 우선 4°C, 5000rpm에서 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤, 다시 새 배지로 한번 더 세척한 뒤 다시 원심분리하여 상층액을 제거하고 30 ml의 새 배지를 첨가하여 식물형질전환 실험에 사용하였다.

형질전환에 사용된 식물절편은 상추의 자엽을 엽병부분을 제거하고 성장점 부위를 포함시키지 않은 상태에서 그 가운데에는 멸균칼로 상처를 주어 사용하였다. 이 절편을 앞에서 만든 최종 박테리아 배양액에 5분정도 담가 핀셋으로 흔들어 준 뒤 멸균된 필터페이퍼로 여분의 용액을 제거하고 항생제가 포함되지 않은 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L BA가 포함된 재분화용 배지에서 이를 동안 암조건하에서 공동배양하였다. 그리고 3일째, 그 접종된 자엽 절편들은 cefotaxime 200 mg/L, kanamycin 30 mg/L이 포함된 액체 MS배지에서 3번 정도 세척한 뒤, 공동배양배지에 포함된 호르몬 농도에 세척배지와 동일한 종류와 양의 항생제가 포함된 MS고체선발배지에서 배양하였다. 선발배지로 옮긴 후엔 매 4주마다 새 선발배지로 옮겨줌으로서 항생제효력을 유지시켰다. 최종적으로 선발배지에서 유기된 신초는 cefotaxime 200 mg/L이 포함된 1/2 MS배지에서 뿌리를 유기시켰다. 그리고 어느 정도 성장한 식물체는 화분으로 이식하였다.

사. 식물체 genomic DNA 추출

각각의 형질전환체로부터 1g의 잎을 채취하여 genomic DNA를 추출하였다. 채취한 1g의 잎을 막자사발에 넣고 액체질소(LN₂)를 부어 분쇄하였다. 분쇄된 잎 절편을 추출 완충액 [0.5M NaCl, 0.1M Tris-Cl (pH8.0), 0.05M EDTA, 2% SDS, β-mercapto ethanol 1%] 9 mL에 첨가 한 후 55°C의 항온 수조에서 30분간 반응하였다. 반응액에 phenol:chloroform (25:24, V:V)의 용액을 20 mL 첨가하여 혼합하였다. 혼합 후 8000rpm에서 10분간 원심분리하여 8 mL의 상층

액을 새로운 tube로 옮긴 후 두 배 부피의 abs. ethanol을 첨가하였다. 첨가 후 -20°C에서 18시간을 반응시킨 후 8000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 70% ethanol을 이용하여 일회 세척하고 건조시켰다. 건조 후 1 mL의 TE 완충액 또는 멸균수를 첨가하여 genomic DNA를 용해하고 DNA 분석에 이용하였다.

아. 형질전환체의 확인

선발배지에서 유기된 상추 신초는 우선, genomic DNA를 분리한 뒤, 형질전환체임을 확인하기 위해 kanamycin 저항성 유전자를 증폭할 수 있는 primer로 각각을 PCR하였다. PCR조건은 95°C에서 2분간 변성시킨 후 95°C에서 1분, 55°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분 30초를 30회 처리한 뒤 72°C에서 10분간 최종 확장하는 조건에서 수행하였다. 그 후 그 산물들은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 UV광 하에서 그 산물의 존재유무와 크기를 확인하였다.

2 항 결과 및 고찰

본 연구는 우리나라에서 주요 쌈 채소로 이용되는 청치마 상추(*Lactuca sativa* L.)로부터 sesquiterpene 합성 효소의 일종인 germacrene A synthase를 코딩하는 유전자를 분리하고 이를 식물발현 벡터에 cloning 한 후, 식물체내에서 과다발현시킴으로서 기능채소 작물의 육성을 주 목적으로 하였다.

가. 상추의 total RNA로부터 germacrene A synthase를 코딩하는 유전자의 단편 분리와 RACE방법을 이용한 유전자 전체의 확보

청치마 상추로부터 germacrene A synthase를 코딩하는 유전자를 분리하기 위해 우선 primer를 작성하였고 이를 이용하여 RT-PCR 과정을 거쳐 일부 단편을 분리한 뒤 5', 3'-RACE 방법을 이용하여, 전체의 유전자를 분리하였다. 본 연구에 사용된 청치마상추는 기내의 무균상태에서 배양하고 sample을 채취하여 RNA분리에 사용하였다. 유전자 단편 분리시 사용된 primer는 기존에 이미 보고되어 있는 작물별 sesquiterpene synthase 유전자 염기서열들 중 채소작물, 그 중에서도 가지(*Lycopersicon hirsutum*), 토마토(*Lycopersicon esculentum*), 감자(*Solanum tuberosum*), 고추(*Capsicum annum*), 치커리(*Chichorium intybus*)들의 염기서열을 수집하였고 이들은 각각 같은 작물 내에서도 2종류 이

상의 sesquiterpene synthase 염기서열을 갖고 있어 그들 중 대표 염기서열로서 1번의 염기서열을 선택하고 그것들 중 homology를 많이 보이는 부분을 BLAST program으로 찾은 뒤 그 부분을 중심으로 primer를 제작하였다(표 1). 또한 이 primer조합들에 *Artemisia annua* L.로부터 amorpho-4,11-diene synthase gene 분리시 사용되었던 primer조합을 추가하여, 총 12 primer를 각각 조합을 달리해나가면서 RT-PCR을 수행하고 있고 (Fig. 2), RT-PCR로 나온 band들은 gel extraction을 통해 DNA를 elution한 뒤 T-vector에 ligation하고 *E.coli* DH5 α 에 transformation시켰다. 이후 선발된 colony들은 PCR 및 제한효소 mapping으로 확인을 거친 뒤 sequencing하였다.

이들 primer를 각각 조합을 바꾸면서 RT-PCR을 수행한 결과, ses11/ses12 primer에 의해 약122bp product의 단편을 확보할 수 있었으며 이를 pGEM-T vector에 삽입한 뒤 염기서열과 아미노산 서열을 분석한 결과 *Cichorium intybus* germacrene A synthase long form mRNA와 95%로 가장 높은 상동성을 보였으며, short form mRNA와는 85%를, *Lactuca sativa*의 유전자와는 83%의 상동성을 보임으로서 염기서열을 가진 청치마 상추 Germacrene A 합성유전자 내부에 이 부분이 포함되어 있음을 확인할 수 있었다. 즉, RNA를 대상으로 ses11/12를 이용해 RT-PCR을 수행한 결과 청치마 상추의 Germacrene A 합성유전자의 일부분이 증폭된다는 것을 확인할 수 있었다. Fig. 3는 ses11/ses12 primer에 의해 확보된 RT-PCR산물을 전기영동한 사진을 나타낸 것이고, Fig. 4는 그 염기서열을 NCBI의 blast 프로그램을 이용, 상동성 비교를 나타낸 것이다.

이렇게 확보된 일부 단편을 기본으로 하여, full length 유전자를 확보하기 위해 RACE 방법을 이용하였다. 즉, 유전자의 5' 말단과 3' 말단을 각각 race로 따로 분리, 마찬가지로 염기서열 분석용 pGEM-T easy vector 내부에 각각 cloning한 뒤 그 염기서열을 확인하고, 그 염기서열의 공통된 부분을 제외하고 연결하여 상동성을 비교한 결과 *Chichorium intybus* germacrene A synthase long form mRNA와 가장 높은 상동성을 보임으로서 청치마 상추로부터 1741bp의 full length germacrene A 합성유전자가 확보되었음을 확인하였다. 이 염기서열을 바탕으로 우선 start codon과 stop codon을 결정하고 start codon쪽에는 *Xba*1 절단서열을 stop codon쪽에는 *Eco*R1 절단서열을 부착한 primer를 새로 작성, 유전자의 codon 부분을 cDNA로부터 한꺼번에 분리, cloning한 뒤 다시 한번 염기서열을 확인으로서 상추로부터 germacrene A synthase를 coding하는 full length 유전자 단편과 염기서열을 확보 및 재확인 할 수 있었다. Fig. 5은 상추로부터 분리된 full length germacrene A synthase 유전자 염기서열을 나타내고 Fig. 6은 분리된 full length germacrene A synthase 유전자를 NCBI

blast 프로그램을 이용, 상동성을 비교한 결과를 나타낸다.

Table 1. The sequences of degenerated primers used for isolation of germacrene A synthase gene.

Primer	Sequence
Ses1	5'-GTG GTG GAA AGA TTT GGA TTT-3'
Ses2	5'-GGC TCA AAA TAA ACT CCT AA-3'
Ses3	5'-CCA TAT GCA AGA GAT AGA GTT G-3'
Ses4	5'-TAT GTA TCA TCT ACA ATA GAT GCC-3'
Ses5	5'-TGC AAG AGA TAG AAT GGT TGA ATG-3'
Ses6	5'-TTC AGG TAT TCT GGA AGC ATA TCT-3'
Ses7	5'-ATT TGC CAA ATT GGA TTT CAA CTT G-3'
Ses8	5'-GGC TCA TAA TAG ACT CCT AAT GC-3'
Ses9	5'-CTG GTG GAA AAG TTT CGA TGT TG-3'
Ses10	5'-AGA ATA TTG AGG CTC GAA GT-3'
Ses11	5'-TGG AAA GAT TTG GAT TTT-3'
Ses12	5'-CATA AGC ATC GAA TGT GTC ATC TA-3'

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 M

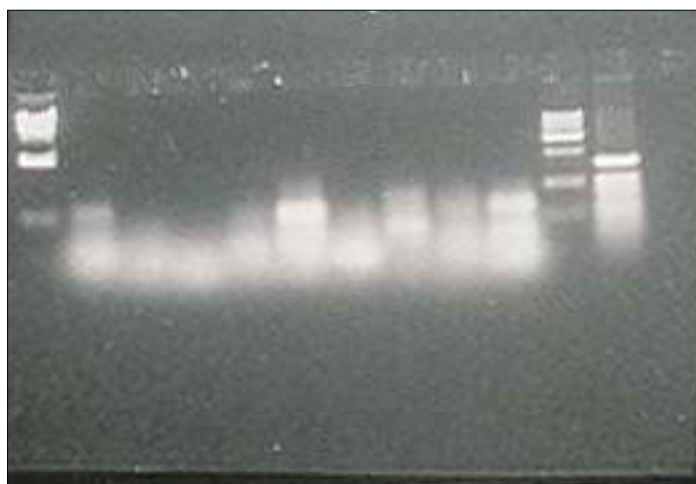


Fig. 2. Detection of germacrene A synthase gene in 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.) by RT-PCR using 12 different primer combinations

1. λ DNA/HindIII Marker, 2. Ses1/Ses2 3. Ses3/Ses4,
4. Ses5/Ses6, 5. Ses7/Ses8, 6. Ses9/Ses10,
7. Ses1/Ses4, 8. Ses1/Ses6, 9. Ses11/Ses12
10. DNA 1 KB-Ladder, 11. 100bp-1kb DNA Ladder

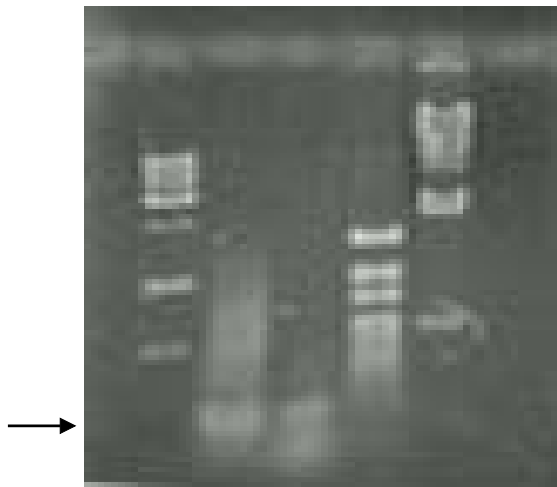


Fig. 3. Detection of germacrene A synthase gene in 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.) by RT-PCR using ses 11 and ses 12 primers. The expected size, about 122bp of RT-PCR products were separated.

Primer ses11: 5'-TGG AAA GAT TTG GAT TTT-3'

Primer ses12: 5'-CAT AAG CAT CGA ATG TGT CAT
CTA-3'

A: AF497999 1752 bp mRNA *Cichorium intybus* germacrene A synthase
long form mRNA, complete

```
상추: 1 gtcocctacataagagatagagtaccggagatatacctatggattttggggttatatttc 60
      |||
A: 874 gtcocctacataagagatagagtaccggagatatacctatggattttggggttatatttc 933

상추: 61 gagccgtattactctcgggcnacgtatcatagccactaaaatcacgttgttcttgggtggt 120
      |||
A: 934 gagccgtattactctcgggc-acgtatcatagccactaaaatcacgttgttcttgggtggt 992

상추: 121 ttt 123
      |||
A: 993 ttt 995
```

B: AY082672 1755 bp mRNA *Ixeris dentata* var. *albiflora* guaiadiene
synthase (ISC1) mRNA, complete cds.

```
상추: 4 ccttacataagagatagagtaccggagatatacctatggattttggggttatatttcgag 63
      |||
B: 877 ccttacataagagatagagtaccggagatatacctatggattttggggttataactttgag 936

상추: 64 ccgtattactctcgggcnacgtatcatagccactaaaatcacgttgttcttgggtggtttt 123
      |||
B: 937 ccatattactctcgggc-acgtatcatagcaaaaaatcacgttgttcttgggtggtttt 995
```

Fig. 4. Alignments of 122bp nucleotide sequences from RT-PCR
derived from 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.).

C: AF489964 1680 bp mRNA *Lactuca sativa* germacrene A synthase LTC1
mRNA, complete cds.

```

상추: 10 ataagagatagagtaccggagatatacctatggattttggggttatatttcgagccgtat 69
      ||||| ||||||||||||||||| ||| ||||||||||||| || || || ||||| |
C: 820 ataaggatagagtaccagagatttacttatggattttgggattgtactttgagccctcgt 879

상추: 70 tactctcgggcnacgtatcatagccactaaaatcacgttggt 111
      || || | ||| ||| ||||| ||||| ||||| || |||||
C: 880 tattccttggc-acgaatcatcgccacaaaaattacattggt 920

```

Fig. 4. Alignments of 122bp nucleotide sequences from RT-PCR derived from 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.).

이를 보면 알 수 있듯이 국내의 청치마 상추로부터 분리한 germacrene A synthase 유전자의 염기서열은 같은 국화과 작물인 치커리와 씬바귀의 것과 높은 상동성을 보이고 있다. 반면, 이미 보고 되어있는 상추의 것과는 비교적 낮은 상동성을 보이고 있다. 이를 볼 때 본 연구에서 분리된 청치마 상추의 germacrene A synthase 유전자의 염기서열은 영국팀에 의해 재료로 사용된 상추품종과 다른 국내 품종 특유의 염기서열을 지니고 있음을 짐작할 수 있다.

1 atggctctcg ttagaacaa cagcagcaat ggfcgggagc cagttctcag cccagaagt
61 ctcaaaagtc ctogaggctt aaccagcccc cgaccgttgt ctgtccaacc gactccagag
121 cgggttegac ctttgccaa ctcccaact togatctggg ctgatogctt catctcattc
181 tetcttgata actctcaatt ggaagcttat gcaaatgcac ttgaagaacc aaaagaagca
241 gtgaagagtt taataaccga cactaccatt gatgcaaca caaaactgaa attgatttat
301 tcagtgcacc gtcttggtt gtcgtatctt tatccagatg agattgatgc cgaactcaac
361 aaactcttcg agaagattga cttacagtat tacgaacaag ttgatttga cactattgca
421 gtacaatttc aagttttcag acaccatggt tataaaattt cttctgatgt gtttaaaaag
481 ttcaaggaca gtactacggg tacattcacg gatgatgtaa caaaagacgt gaagggtatg
541 ctgagtttat acgaatcagc acacttaagg ctacacggtg aagatatctt agatgaagct
601 ttagcattca cogaagctca ccttaaaaaa atcctaacca cacttgaagg agatcttgca
661 cgccaagtga accaagtctt aaaaagaccc ttccacactg gaatgccaat ggtagaggca
721 cggctatatt ttatcacaca cgaagaagat ttttcaagcc atgagtcggt tgtaaaagcta
781 gctaaagtcc acttcaacta tttgcaacta caacaaaaag aagaactacg actcgtgtca
841 cagtggtgga aagatatgca attccaacaa tccgtccctt acataagaga tagagtaccg
901 gagatatacc tatggatttt ggggttatat ttogagccgt attactctcg ggcacgtatc
961 atagccacta aaatcaagtt gttcttggtg gttttggaag atacatatga cgcgtatgct
1021 acaattgacg agatccgacg gatcacagat gcgattaata ggtgggaaat tagcgcgac
1081 gaccaacttc ctgaatatat caaacgcttc tacagaattc tctcaacga atatgatgac
1141 ctogagaaaag aatactcaaa ggaacgaaga gcgttcagtg tccacgcttc aaaaacaagc
1201 tttcaagaaa tccgagagg gtatcttgaa gaggcggagt ggttacaca cggttatgtg
1261 gcaacatttc ccgagtatat gaggaatggt ttgattactt cggcttataa tgtcatttca
1321 aaatccgcat tgggtggaaat ggggtcgatt gcagatgaag agcctcttgc ttggtatgaa
1381 acacatccga aaattttgaa agcttcagag ttgatttcaa ggcctcaaga cgatggtatg
1441 actttccagt ttgagagaaa acgaggacaa tcagcaactg gtrtgatgac ttatatcaag
1501 gaatacaatg tatccgaaga agtagcgatc aaagagctca tgaagatgat tgaaaacgca
1561 tggaaagata taaatgaggg atgcttgaag cccactgagg tctcgggtgc tctactaact
1621 cctattttga atctcggag aatgatagat gtcgtataca aattcgatga tggattccac
1681 tttccggga aaaccctaaa agactatatt acccttttgt tegttagtcc tccaccgagt
1741 ctgaaaact ga

Fig. 5. Nucleotide sequences of full length germacrene A synthase gene isolated from 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.).

Sequences producing significant alignments:	(bits)	Value
gi 20386401 gb AF497999.1 <i>Cichorium intybus</i> germacrene A s...	3416	0.0
gi 37543465 gb AY062672.1 <i>Ixeris dentata</i> var. <i>albiflora</i> gu...	1804	0.0
gi 20386403 gb AF498000.1 <i>Cichorium intybus</i> germacrene A s...	149	2e-32
gi 20136334 gb AF489964.1 <i>Lactuca sativa</i> germacrene A synt...	101	5e-18
gi 20136336 gb AF489965.1 <i>Lactuca sativa</i> germacrene A synt...	82	4e-12
gi 606417 gb L32134.1 RCCASSYNT <i>Ricinus communis</i> casbene	66	3e-07
gi 25013342 gb AC087416.18 <i>Mus musculus</i> chromosome 2 clone...	52	0.004
gi 23395461 emb AL805918.5 Mouse DNA sequence from clone R...	52	0.004
gi 28828686 gb AC116984.2 <i>Dictyostelium discoideum</i> chromos...	46	0.24
gi 20258410 gb AC079015.8 <i>Homo sapiens</i> chromosome 8, clone...	46	0.24
gi 13811657 gb AF356600.1 AF356600 <i>Dictyostelium discoideum</i> ...	46	0.24
gi 10440573 gb AC024900.20 <i>Homo sapiens</i> 12 BAC RP11-549E9 ...	44	0.96
gi 42627420 emb BX537121.4 Zebrafish DNA sequence from clone	42	3.8
gi 41529676 emb BX469886.5 Zebrafish DNA sequence from clone	42	3.8
gi 22204292 emb AL645470.20 Mouse DNA sequence from clone	42	3.8

Fig. 6. Alignment search result of full length germacrene A synthase gene isolated from 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.).

나. 식물형질전환을 위한 binary vector 작성 및 *Agrobacterium*으로의 형질 전환

형질전환용 binary vector를 작성하기 위해 insert가 될 청치마상추의 germacrene A synthase를 코딩하는 full length 유전자를 포함하고 있는 pGEM-T easy vector를 *Xba*1과 *Eco*R1으로 절단하고 전기영동을 통하여 유전자 단편의 크기를 확인한 후 gel에서 추출하는 방법으로 insert를 준비하였다. 같은 방법으로 벡터인 pILTAB 357도 *Xba*1과 *Eco*R1으로 절단하고 DNA 단편의 크기를 확인하고 gel에서 추출하는 방법으로 vector를 준비하였다. 준비한 vector와 insert를 적정농도로 혼합한 후 T4 DNA ligase를 이용하여 ligation시키고 DH5 α 에 형질전환시켰다. 작성 과정은 Fig. 7에 도식화하였다. 형질전환을 통해 얻은 colony는 kanamycin 배지에서 배양하여 그것으로부터 재조합 DNA를 추출한 뒤 그것을 *Xba*1과 *Eco*R1으로 절단, 전기영동을 통하여 vector와 insert의 크기와 존재를 확인하고 PCR과 sequencing을 통해 제대로 결합했는지 확인하였다(Fig. 8). 이 결과로서 vector와 insert의 결합이 확인된 binary vector를 *A. tumefaciens* LBA4404에 freeze-thaw법(An, 1987)에 의하여 형질전환시켰다. 형질전환 후 *Agrobacterium* 역시 colony를 배양하여 재조합 vector가 포함되었는지 PCR과 제한효소 mapping 방법으로 확인하였다(Fig. 8). 이때 PCR은 plasmid를 template로 하는 대신 반응액에 colony를 접종한 후 *Tag* polymerase, 유전자전체를 분리할 수 있는 primer 즉, Blue Germ F: 5'-atggctc tcgtagaacaacagcagcaat-3', BlueGerm R:5'-tcagttttcgagactcggtgga-3'와 10X *taq* buffer, 그리고 MgCl₂ 용액을 혼합한 뒤 PCR 반응을 수행하여 원하는 유전자가 삽입된 발현 vector의 도입이 확인된 *A. tumefaciens* LBA4404를 식물형질 전환에 사용하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 3분 반응 후 30 cycle의 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 1분 처리 그리고 마지막으로 72°C에서 3분 반응시켰다.

다. *Agrobacterium*을 이용한 germacrene A synthase 유전자의 식물체내로의 도입

상추 자엽을 이용한 형질전환 후 kanamycin 선발배지에서 형질전환 신초를 유기하고, 그리고 rooting배지에서 2차 선발을 실시하였다(Fig. 10). Rooting 배지에서 선발된 상추 형질전환체들은 vector 내 kanamycin 저항성 유전자를 증폭할 수 있는 primer인 NPTII F(5'-GAG GCT ATT CGG GCT ATG AAC TG-3') / R(5'-TAC GGT TAT CGC CGC TCC CGA-3')로 T-DNA의 상추 genome내로의 삽입을 확인하였다 (Fig. 11).

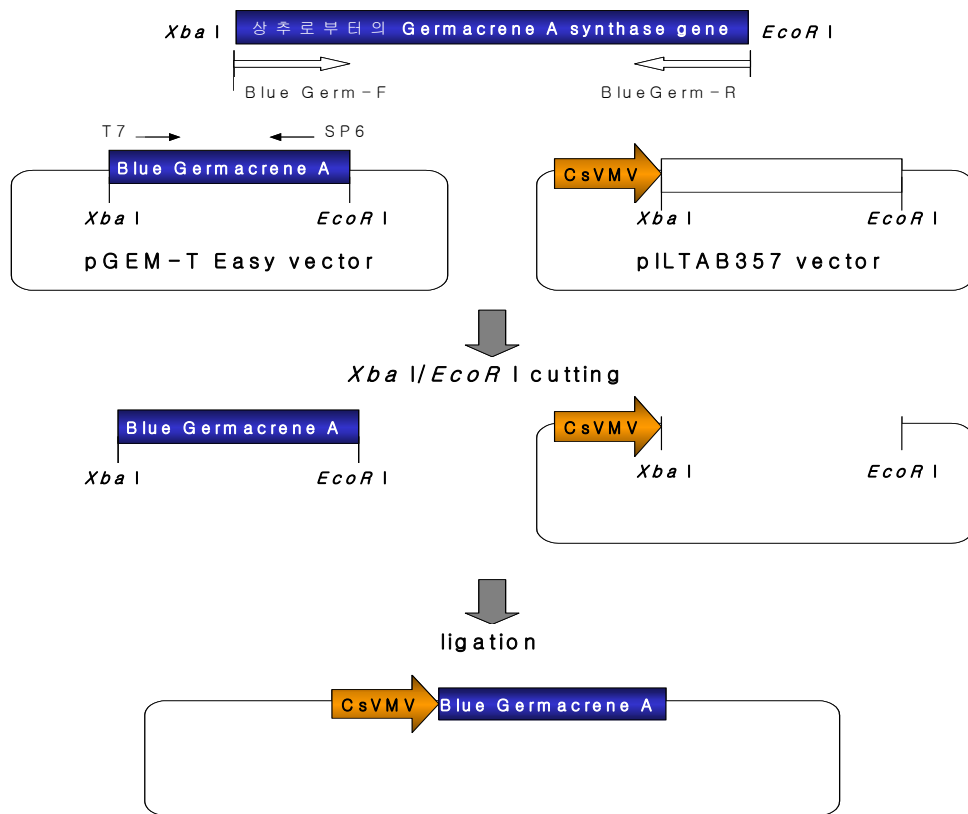


Fig. 7. Construction Strategy of full length of germacrene A synthase gene into pILTAB binary vector

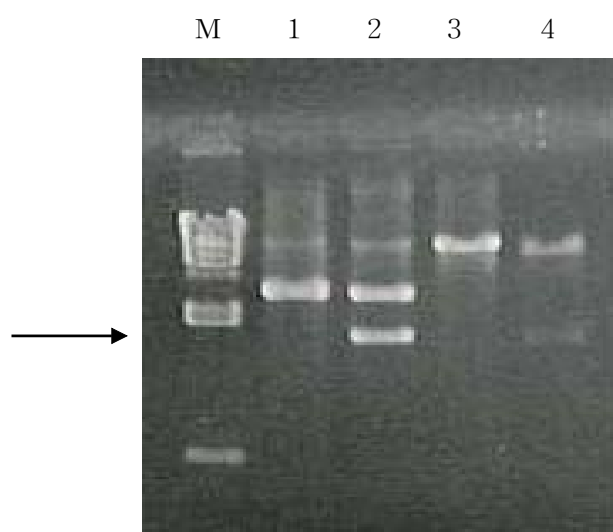


Fig. 8. Confirmation of germacrene A synthase gene in pGEM-T and pILTAB357 vector containing by enzyme digestion with *EcoRI* and *XbaI*.

M: 1-kb Ladder

1: pGEM-T vector

2: pGEM-T vector containing germacrene A synthase gene.

3: pILTAB vector

4: pILTAB vector containing germacrene A synthase gene.

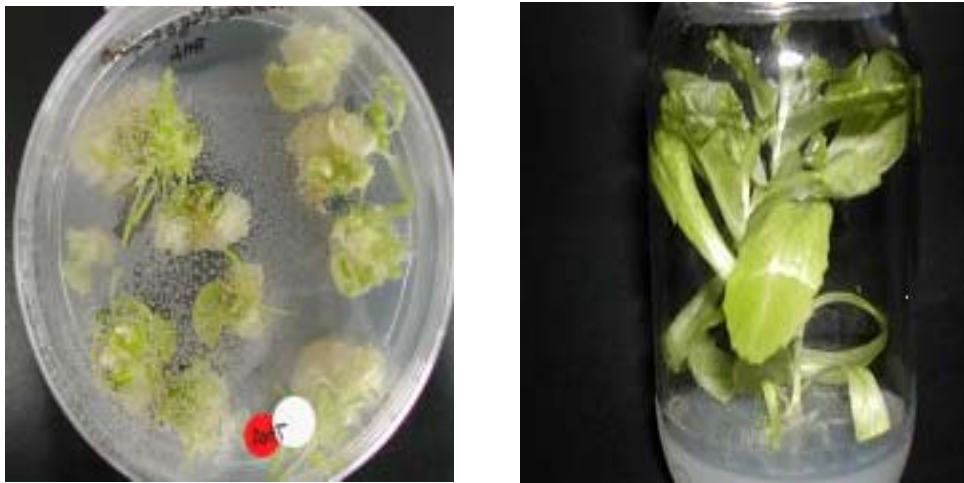


Fig. 9. Shoots regeneration from cotyledon explants of 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.) transformed with *A. tumefaciens* and the process of the shoot growth and rooting.

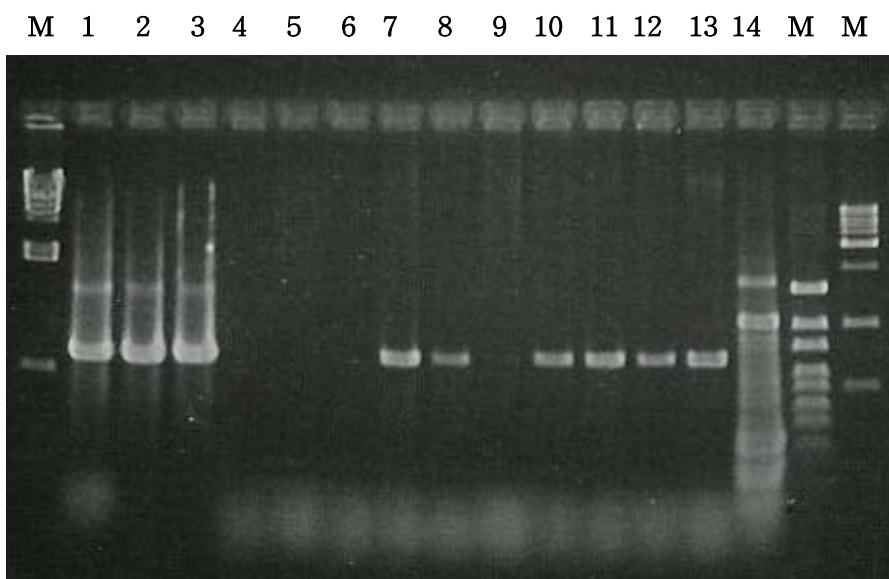


Fig. 10. PCR confirmation of transformed lettuce plants by PCR analysis.

M: Size marker,

lane 1~14: regenerated shoots onto selection medium with 30 mg/L kanamycin.

제 5 절 *Agrobacterium tumefaciens*를 이용한 상추으로의 terpene synthase 유전자 도입

1 항 서 언

인구증가로 야기되는 문제점은 식량 소비량의 증가뿐 만 아니라 약용으로 이용되는 식물의 소비량도 함께 증가하게 함으로서 이들에 대한 소비량과 자연의 공급이 균형을 이루는 한은 식물자원은 무제한 공급될 수 있지만 특종 식물자원의 소비와 공급간의 균형이 깨질 경우 일부 약용식물의 멸종 등의 심각한 문제를 초래하게 된다. 이러한 문제를 방지하기 위한 해결책 중 하나로 '약용식물의 효율적 이용'을 들 수 있는데, 실질적으로 약용식물내에서 그 식물만의 특이한 약효성분은 그 식물전체를 섭취한다고 해도 아주 적은 양밖에 취할 수 없다. 본 연구에서 주로 다루고자 하는 향말라리아 효과의 artemisinin 역시 개똥쑥(*Artemisia annua* L.)이라는 국화과 작물에서 주로 생산되지만, 그 양은 건물중에 대해 0.01%에서 0.5%밖에 지나지 않는다(Wallaart et al., 2000). 따라서, 아무리 artemisinin이 많은 약에 대해 저항성을 갖는 *Plasmodium falciparum* 계통의 모기에 특히 효과가 있는 성분이라 할 지라도(Steven et al., 2002) 주로 생산되는 야생 식물인 개똥쑥(*Artemisia annua* L.)에만 의지해서는 약품가격의 상승, 개똥쑥의 멸종으로까지 이어질 수 있다.

개똥쑥으로부터 가능한 많은 양의 artemisinin을 얻기 위한 노력은 여러 방면에서의 연구에 의해 시도되어졌다. 예를 들어, 기후에 따른 개똥쑥 내의 artemisinin함량을 분석한다거나(Wallaart et al., 2000), 생육단계별로 생합성량 분석(Laughlin, 1994)을 통해 많이 생산되는 개체를 선발하여 약용성분 생산 및 이용에 활용한다거나 혹은 부위별 분석을 통해 artemisinin이 많이 생성되는 부위인 뿌리털을 *Agrobacterium rhizogenes*을 이용, 대량 유도시켜 그 성분을 다량 획득하고자 하였다(Cai et al., 1995, Liu et al., 1998). 그러나 이러한 시도들은 결국 실패로 이어졌다. 그 결과, 최근엔 유전공학적 방법과 접목한 또 다른 새로운 시도가 나타났는데, 그것은 artemisinin이 식물체내에서 생합성되는 2차 대사 경로에 대한 연구와 그 생합성에 결정적인 유전자 분리 및 이용을 통해 생합성을 조절하고자 하는 연구이다. Artemisinin 생합성에 결정적으로 관여하는 유전자는 이미 2000년초 부터 국내외 연구진들에 의해 분리되어 그 염기서열과 그 유전자에 의해 코돈화 된 효소의 분석도 이루어진 상태에 있다(Chang

et al., 2000, Mercke et al., 2000, Wallaart et al., 2001). 하지만, 이 유전자가 실질적으로 식물에 적용되어 artemisinin 대량 생성에 이용된 경우는 드물다고 할 수 있다. 단지, 네덜란드의 Wallaart 연구팀에 의해 분리된 유전자는 담배에 도입되어 형질전환되지 않은 개체에서는 전혀 얻을 수 없었던 artemisinin을 생체중 g당 0.2에서 0.7ng까지 얻었다는 보고가 있다(2001). 이러한 결과를 볼 때, 분리된 유전자를 식물체내에서 실제 발현하도록 하는 데 있어서 어떤 식물체를 선택하는가가 중요한 요소로 작용하게 된다. 물론 artemisinin의 생합성이 이루어지는 개똥쭉에 적용시켜 과다 발현시키면 되지 않을까 하지만 여기엔 문제점이 있다. 그것은 동일 유전자를 인위적으로 도입할 경우 염기서열상 상동성에 의해 야기될 수 있는 gene silencing 현상이다. 또한 주로 야생으로 성장하는 개똥쭉을 기내에 도입, 일반적인 방식의 *Agrobacterium*을 이용하여 그것으로부터 새로운 형질전환개체를 확보한다는 것에는 많은 시간과 어려움이 따른다. 결국, 이러한 문제점들을 보완할 수 있는 식물을 선택하는 가운데, 담배 외 고려해 본 결과 개똥쭉과 같은 계통의 국화과 식물이 더 높은 가능성이 있지 않을까 기대되어, 종자로 번식하고, 본 연구과제에서 확립된 형질전환체계를 적용할 수 있는 상추에 적용하게 되었다. 상추는 주로 쌈채소로 식용되는 채소작물이기 때문에 "edible vaccin"으로서의 이용효과로도 그 기대가치는 높다고 할 수 있다.

Terpene synthase 유전자 (또는 terpene cyclase)는 menthols 및 camphor과 같은 향미료 및 방향, 식물 방어 화학물질인 capsidiol 및 lubimin 등의 환형 terpenes의 합성을 조절하는 효소이다. 또한 steroids와 lipid-soluble 비타민의 합성에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 위와 같은 기능을 가진 terpene synthase는 미생물, 균류 및 식물에서 동정되었으며, 이 효소들간의 아미노산 서열 유사성은 매우 낮은 것으로 알려져 있다. Terpene synthase는 soluble enzyme으로 분자량은 약 40,000에서 100,000 정도의 효소이다. 이 효소에 의하여 비환형의 isoprenoid diphosphate (GPP, 10 carbon), farnesyl diphosphate (FPP, 15 carbon) 및 geranylgeranyl diphosphate (GGPP, 20 carbon)가 환형의 monoterpenes, sesquiterpenes과 diterpenes으로 변형 된다.

본 연구의 목적 물질인 artemisinin은 sesquiterpene의 일종으로 일반적으로 그 전구체는 일반 sesquiterpene과 마찬가지로 farnesyl diphosphate(FDP)로부터 합성되며 이 효소, 즉 amorpha-4,11-diene synthase 효소에 의해 일단 그것이 amorpha-4,11-diene형태로 고리화 되면 그 후엔 산화 환원등의 효소가 없이 artemisinin은 생합성 된다고 알려져 있다(Wallaart et al. 2001). Fig. 1은 그 생합성과정을 나타낸 것이며, 결국, amorpha-4,11-diene synthase 유전자에 의한 고리화 단계는 artemisinin 생합성에 있어서 결정적인 단계라 할 수 있다.

따라서, 본 연구에서는 개똥쑥에서 분리한 terpene synthase 유전자 (Amorpha-4,11-diene synthase 유전자)를 개똥쑥과 같은 국화과 식물인 상추 (*Lactuca sativa* L.)에 기능성 약용식물을 제작하는데 그 목적을 두고 있다.

T.E. Wallart et al.: Amorpha-4,11-diene synthase

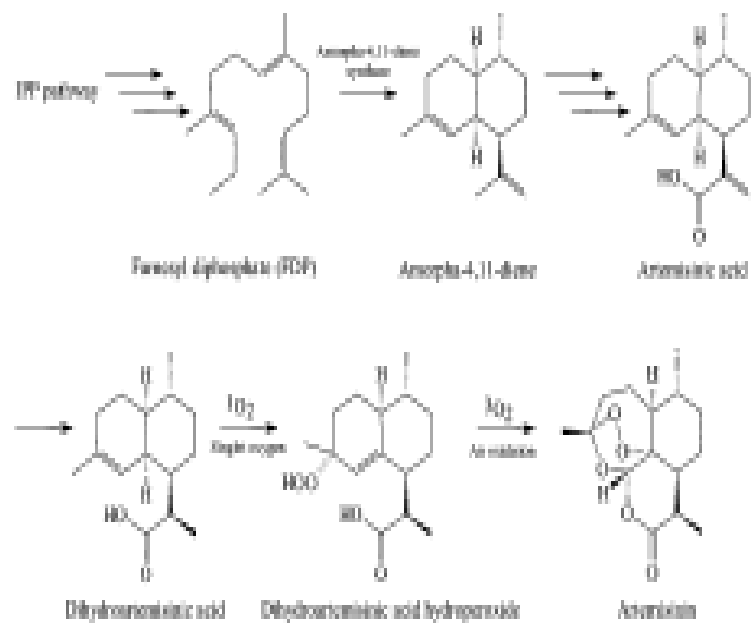


Fig. 1. Biosynthetic pathway of artemisinin

2 항 재료 및 방법

가. 식물재료 및 배양 조건

본 실험에 사용된 상추는 청치마종자를 우선 70% 에탄올에 넣고 1분 동안 진탕한 후, 30% clorox와 0.1%의 Tween-20이 첨가된 멸균수에 15분 동안 소독

하고 소독 후 멸균수로 여러번 washing한 후 파종하여 발아시킨 후 자엽을 이용하였다. 파종은 3%의 sucrose와 8g/L agar가 첨가된 pH5.8의 MS (Murashige and Skoog) 배지가 들어있는 마요네즈병에 병당 20립씩 파종하였다. 모든 식물체는 25℃, 16시간 광주조건하에서 배양되었으며 식물이 성장함에 따라 한달에 한번씩 새 배양배지로 계대하였다.

나. 유전자와 형질전환용 binary vector 작성

본 실험에 사용된 유전자는 개똥쭉(*Artemisia annua* L.)으로부터 분리된 1.64kb의 amorpho-4,11-diene synthase 유전자로 *E. coli* 발현벡터인 pET5a에 삽입되어 있는 상태로 서울대 김수연 교수 연구팀에 의해 제공되었다. 이것을 식물에 도입하기 위한 binary vector로는 kanamycin 항생제 저항성과 CaMV프로모터를 갖는 pILTAB 357 벡터를 선택하였다. 자세한 binary vector 작성과정은 결과 및 고찰 부분에서 설명코자 한다. 작성된 binary vector(Fig. 1)는 식물로의 도입을 위해 *Agrobacterium* LBA4404로 도입되었다. *E. coli* DH5α와 *Agrobacterium*에 포함되어 있는 유전자를 포함한 vector는 *E. coli* DH5α의 경우, 염기서열분석과, 제한효소 처리 및 PCR을 통해, *Agrobacterium*의 경우는 PCR을 통해 제대로 삽입되었는지 여부를 확인하였다.

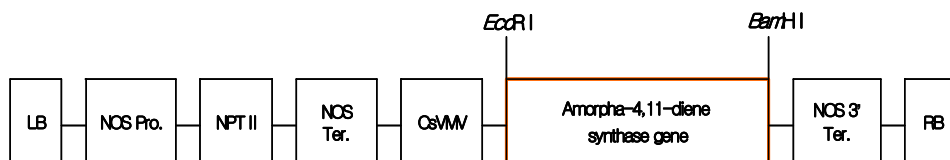


Fig. 1. T-DNA region with terpene synthase gene used to lettuce transformation.

LB: left border, RB: right border,

NPT II: neomycin phosphotransferase II gene,

Amorpho-4,11-diene synthase gene: terpene synthase gene

다. *Agrobacterium*을 이용한 상추의 형질전환

완성된 binary vector와 유전자를 포함한 *Agrobacterium*은 우선, 50 mg/L의 kanamycin과 10 mg/L의 streptomycin이 함유된 고체 YEP 배지에서 48시간 동안 28°C, 암조건하에서 배양하였다. 배양된 colony들 중 한 개의 colony를 선발한 뒤 10 mg/L의 kanamycin과 10 mg/L의 streptomycin이 포함된 5 ml의 액체 YEP배지에서 역시 48시간동안 28°C, 암조건하에서 진탕배양하였다. 그 후 그 박테리아 배양액에서 1 ml을 취한 뒤 50 ml의 동일한 항생제가 포함된 액체 배지에서 24시간 동안 OD₆₀₀값이 1.0이 될 때까지 배양하였다. 이 배양액은 식물형질전환에 이용되기 앞서, 우선 4°C 5000rpm에서 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤, 다시 새 배지로 한번 더 세척한 뒤 다시 원심분리하여 상층액을 제거하고 거기에 30ml의 새 배지를 첨가한 뒤 식물형질전환 실험에 사용하였다.

형질전환에 사용된 식물절편은 상추의 자엽을 엽병부분을 제거하고 성장점 부위를 포함시키지 않은 상태에서 그 가운데에는 멸균칼로 상처를 주어 사용하였다. 이 절편을 앞의 방법으로 준비한 최종 박테리아 배양액에 5분 정도 침지한 후 핀셋으로 흔들어 준 뒤 멸균된 필터페이퍼로 여분의 배양액을 제거하고 항생제가 포함되지 않은 공동배양배지(MS 배지 + 1.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L BA + 30 g/L Sucrose + Phyto-Agar 0.6%)에서 이틀 동안 암조건하에서 공동배양하였다. 그리고 3일째, 접종된 자엽 절편들은 cefotaxime 200 mg/L, kanamycin 30 mg/L이 포함된 액체 MS배지에서 3번 정도 세척한 뒤, 항생제가 포함된 MS 고체선발배지(MS 배지 + 1.0 mg/L NAA + 1.0 mg/L BA + 30 g/L sucrose + 50 mg/L kanamycin + 200 mg/L cefotaxime + 6 g/L Phyto-agar)에서 배양하였다. 선발배지로 옮긴 후엔 매 4주마다 새 선발배지로 옮겨줌으로서 항생제효력을 유지시켰다. 최종적으로 선발배지에서 유기된 신흔초는 cefotaxime 200 mg/L이 포함된 뿌리 유도배지(1/2 MS 배지 + 30 g/L sucrose + 50 mg/L kanamycin + 200 mg/L cefotaxime + 6 g/L Phyto-agar)에서 뿌리를 유기시켰다. 뿌리가 유기된 형질전환체를 상대습도 70%의 식물생장상에서 배양용기의 뚜껑을 제거하여 약 5일간 방치한 후, 상토 (부농, 원예 3호)에 이식하고 온실에서 성장시켰다. 온실에서 재배된 형질전환체는 자가수분을 통하여 T₁ 종자를 채종하였다.

라. 식물체 genomic DNA 추출

각각의 형질전환체로부터 1 g의 잎을 채취하여 genomic DNA를 추출하였다. 채취한 1 g의 잎을 막자사발에 넣고 액체질소(LN₂)를 부어 분쇄하였다. 분

채된 잎 절편을 추출 완충액 [0.5M NaCl, 0.1M Tris-Cl (pH8.0), 0.05M EDTA, 2% SDS, β -mercapto ethanol 1%] 9 mL에 첨가한 후 55°C의 항온 수조에서 30분간 반응시킨 후 반응액에 phenol:chloroform (25:24, V:V)의 용액을 20 mL 첨가하여 혼합하였다. 혼합 후 8000rpm에서 10분간 원심분리하여 8mL의 상층액을 새로운 tube로 옮기고 두 배 부피의 abs. ethanol을 첨가하였다. 첨가 후 -20°C에서 18시간을 반응시킨 후 8000rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 70% ethanol을 이용하여 일회 세척하고 건조시켰다. 건조 후 1 mL의 TE 완충액을 첨가하여 genomic DNA를 용해하고 DNA 분석에 이용하였다.

마. 형질전환 상추의 유전자 도입 확인

1) PCR analysis

선발배지에서 재분화된 신초로부터 genomic DNA를 분리한 뒤, 형질전환체임을 확인하기 위해 유전자 내부의 일부를 증폭할 수 있는 primer와 kanamycin 저항성 유전자를 증폭할 수 있는 primer로 각각을 PCR하였다. 이때 PCR조건은 95°C에서 2분간 변성시킨 후 95°C에서 1분, 55°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분 30초를 30회 반응시킨 뒤 72°C에서 10분간 최종 확장하는 조건에서 수행하였다. 그 후 그 산물들은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 UV광하에서 반응 product의 존재유무와 크기를 확인하였다. 또한 형질전환체로 확인된 9개체로부터 채종된 종자들 중 각 개체별로 14립씩의 종자를 무작위로 선별하여 상토(부농, 원예3호)를 포함한 포트에 과중하여 생장시킨 후 126개체의 형질전환 제 1세대에 대한 유전자의 후대 전이 양상 역시 위 primer를 이용하여 PCR 반응으로 조사하였다.

2) Southern hybridization 분석

형질전환 상추 식물체와 non-transformed 식물체로부터 0.5 g의 분엽을 취하여 막자사발에 액체질소를 넣고 분쇄한 후 McCouch 등(1988)의 방법을 이용하여 genomic DNA를 분리하였다. 분쇄된 sample은 extraction buffer (0.5 M NaCl, 0.1M Tris-HCl / pH 8.0, 50mM EDTA / pH 8.0, 1.25% SDS)와 섞은 후 65°C에 20분 처리하였다. 처리 후 phenol과 chloroform, 그리고 isopropanol로 응축시켰다. 응축된 DNA는 70% EtOH로 세척한 후 건조시켰으며 건조된 DNA는 TE buffer에 녹여 농도를 측정한 후 분석에 사용하였다. Southern

blotting을 위해 10 μ g DNA를 *EcoRI*으로 절단한 후 0.8% agarose gel에서 전기영동하였다. 전기영동 후 Sambrook과 Russell(2000)의 방법에 따라 nylon membrane에 transfer하였다. Probe DNA는 Ladderman labelling kit (Takara)를 이용하여 (α -³²P)dCTP로 labelling하였다. Hybridization은 Church와 Gilbert(1984)의 방법에 의하여 수행하였으며 hybridization을 마친 membrane은 2X SSC / 0.1% SDS 용액으로 상온에서 2번 세척한 후, 0.1X SSC / 0.1% SDS 용액으로 상온에서 한번, 68 $^{\circ}$ C에서 한번 세척하였다. 세척된 membrane은 X-ray film에 노출시키고 현상을 통해 signal을 확인하였다.

바. T₁ 종자의 항생제 저항성 분석

9개체의 형질전환체를 자가수분하고 채종된 종자를 4 $^{\circ}$ C에서 30일간 보관한 후, 종자 발아 배지(MS 배지 + 30 g/L sucrose + 8 g/L Phyto-agar)에 kanamycin의 농도를 각각 0, 50 그리고 100 mg/L의 세 수준으로 조절하고 형질전환체 9개체로부터 취득한 종자 중 수확량이 적은 3번과 9번을 제외한 7개체의 형질전환체 및 wild type을 파종하고 23 $^{\circ}$ C, 16시간 광주기로 식물생장상에서 7일간 배양하여 발아율을 조사하였다.

사. 상추종의 artemisinin 분석

1) Artemisinin의 용매 분획 추출 수율 결정

Artemisinin(10 mg)을 유기용매 {*n*-hexane 또는 *n*-hexane-EtOAc (1:1), 100 ml \times 2} 와 H₂O(100 ml)로 분배 추출하였다. 얻어진 유기층 분획을 감압·농축하여 수율을 측정하였다.

2) GC (Gas chromatography) 분석용 시료 조제

형질전환 상추시료 9종 및 대조구로 일반상추 (청치마) 1종을 각각 20 g (생체중)씩 취하여 MeOH (150 ml \times 2)로 실온에서 4시간, 2번 반복하여 추출하였다. 추출물을 여과, 감압·농축하고, 얻어진 MeOH 농축물의 무게를 측정하였다. 무게 측정후 MeOH 추출물을 *n*-hexane-EtOAc (1:1) (40 ml \times 2)와 H₂O(40 ml)로 분배·추출하였다. 추출 후 유기층을 감압·농축하고 얻어진 농축물의 무게를 측정하고 농축물을 CHCl₃ (200 μ l)로 녹여서 GC 분석용 시료로 사용하였다.

3) GC를 이용한 상추중의 artemisinin의 분석

Artemisinin과 위에서 얻어진 분석용 시료 용액 각 3 μ l를 취하여, FID가 설치된 GC(GC-14B, Shimadzu, Japan)로 분석하였다. 분리용 DB-5(30 m \times 0.32 mm ID \times 0.25 μ m, J&W, Folsom, CA, USA)을 사용하였고, 초기 오븐 온도는 200 $^{\circ}$ C에서 10분간 유지한 후에, 10 $^{\circ}$ C/min씩 상승시켜 최종온도 320 $^{\circ}$ C에서 5분간 유지하였다. Artemisinin의 동정을 위해서는, GC(HP-6890)와 연결된 mass spectrometer(HP 5973, Hewlett-Packard Alto, CA, USA)를 사용하였고, column(HP-5, 30 m \times 0.53 mm ID \times 1.5 μ m, USA)이외의 모든 분석 조건은 GC 조건과 동일하였다. MS의 이온화는 EI법 (70 eV) 으로 수행하였다.

3 항 결과 및 고찰

가. 형질전환용 binary vector 작성

먼저 pET5a내의 유전자가 삽입되어있는 제한효소 site와 도입하고자 하는 pILTAB 357 vector의 제한효소 site를 점검한 결과, pET5a vector상의 유전자는 Fig.1에서처럼 5'쪽이 *Bam*HI, 3'쪽은 *Eco*RI site인 반면, 도입하고자 하는 pILTAB 357벡터는 5'쪽이 *Eco*RI, 3'쪽은 *Bam*HI으로 반대방향으로 되어 있었다. 따라서 pILTAB 357벡터에 그 제한효소 site대로 유전자를 cloning하면 antisense 방향으로 삽입되므로 유전자를 sense으로 삽입하여 over-expression 하려는 본 연구의 목적에는 적합하지 않아 제한효소 site를 바꿔야 할 필요가 있었다. 본 연구에서는 그 바꾸는 방법으로서 pILTAB 357벡터에 직접 cloning 하기에 앞서 우선 *Eco*RI과 *Bam*HI으로 처리해 pET5a vector로부터 분리한 유전자를 중간 vector인 pBluescript II KS(+/-)벡터의 *Eco*RI과 *Bam*HI자리에 삽입시켰다. 그 후 pILTAB 357 vector에 유전자가 sense 방향으로 삽입될 수 있도록, 그 상태에서 바깥쪽 제한효소 site인 *Eco*RI과 *Xba*I으로 처리하여 동일하게 처리된 pILTAB 357 vector와 연결시킴으로서 sense 방향으로 유전자가 삽입된 식물발현용 binary vector를 작성할 수 있었다. 이 binary vector는 식물로의 도입을 위해 *Agrobacterium* LBA4404로 도입되었다(Fig. 2). *E. coli* DH5a와 *Agrobacterium*에 포함되어 있는 유전자를 포함한 vector는 *E. coli* DH5a의 경우, 염기서열분석과, PCR 및 제한효소를 통해, *Agrobacterium*의 경우는 PCR을 통해 제대로 삽입되었는지 여부를 확인하였다(Fig. 4). 즉, Fig. 2의 경우 cloning하기 전, pET5a에 삽입된 amorpho-4,11-diene synthase 유전자(terpene synthase gene)를 유전자전체를 증폭시킬수 있는 primer terpene F/R로 증폭하여 그 크기를 확인하고, pBluescriptII vector에 넣기 전 vector 확인을 위해 vector의 primer인 M13F/R와 유전자 primer로 어떤 다른 유전자도 cloning 전엔 multi cloning site에 삽입되지 않았음을 확인, 또한 거기에 유전자가 삽입되었을 때 그 삽입된 유전자의 크기를 다시 유전자 primer로 증폭하여 확인한 것이다. Fig. 3의 경우는 pILTAB 357 vector와 pBluescriptII vector에 amorpho-4,11-diene synthase 유전자(terpene synthase gene)를 삽입한 후 그것을 삽입할 때 사용했던 제한효소로 처리하여 제대로 삽입되었는지 확인한 것이다. 마지막으로 작성된 식물형질발현용 vector인 pILTAB 357은 freeze-thaw 방법을 이용해 *Agrobacterium* LBA4404로 형질전환하였다. 형질전환을 확인하기 위해 vector는 NPT II primer, CsVMV primer로 그리고 유전자에 대해선 enzyme site를 포함한 유전자 양끝부분의 primer를 이용하여 PCR로 확인하였

다. Fig. 4의 경우는 *Agrobacterium* LBA4404와 *E. coli*에 도입된 pILTAB 357 vector의 amorpho- 4,11-diene synthase 유전자를 유전자의 primer와, 유전자 바깥의 vector primer 그리고 kanamycin 저항성 유전자의 primer로 각각 증폭 시킴으로서, vector내에 삽입된 유전자는 amorpho-4,11-diene synthase 유전자로 그 크기가 1.64kb이며 vector엔 그 유전자가 하나만 들어있고 삽입된 vector는 kanamycin 저항성 유전자도 존재함을 확인한 것이다. 사용된 primer는 Table 1에서 제시하고 있다.

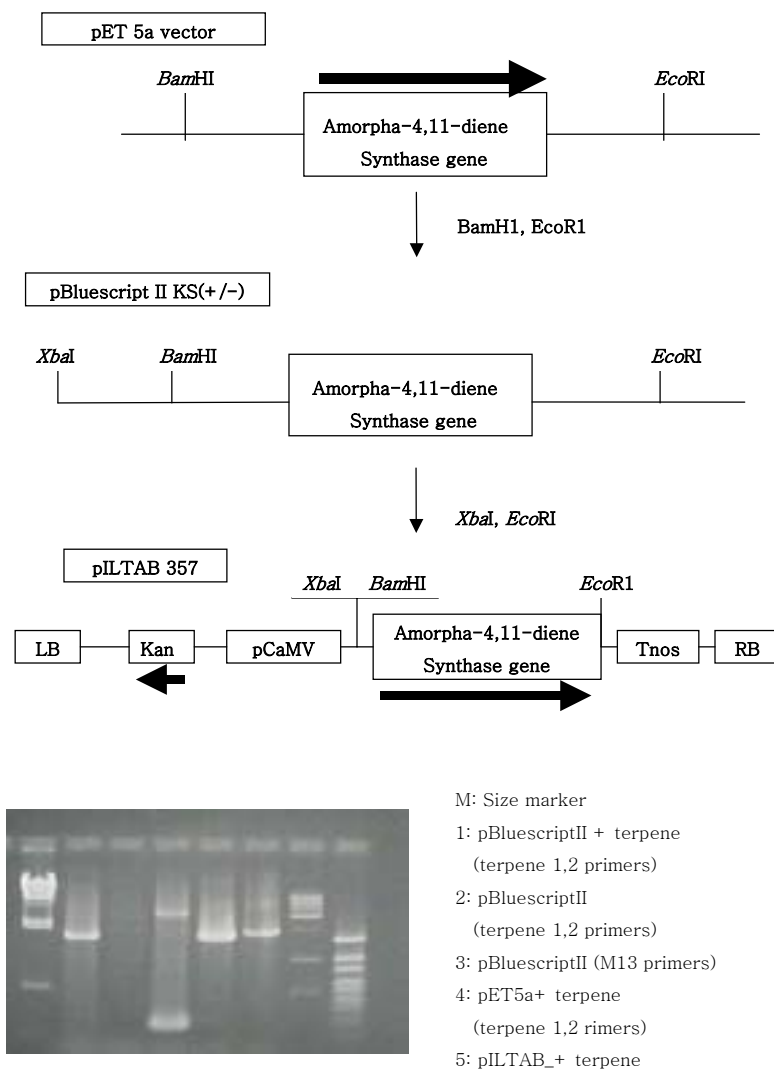


Fig. 2. Construction strategy of pILTAB binary vector with terpene synthase gene (top) and confirmation of terpene synthase gene in pBluescriptII, pET5a, and pILTAB357 by PCR analysis

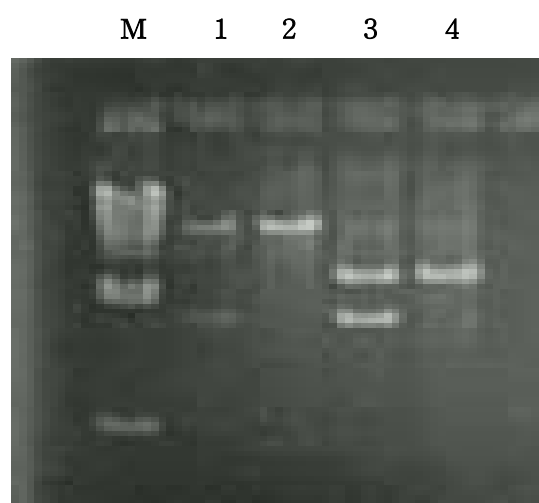


Fig. 3. Confirmation of terpene synthase gene in pILTAB357 and pBluescript vector containing by enzyme digestion with *EcoRI* and *XbaI*.

M: Size marker (Lambda DNA/*HindIII*)

1: pILTAB sense terpene synthase gene (*EcoRI/XbaI*)

2: pILTAB357 (*EcoRI/XbaI*)

3: pBluescript + terpene (*EcoRI/XbaI*)

4: pBluescript (*EcoRI/XbaI*)

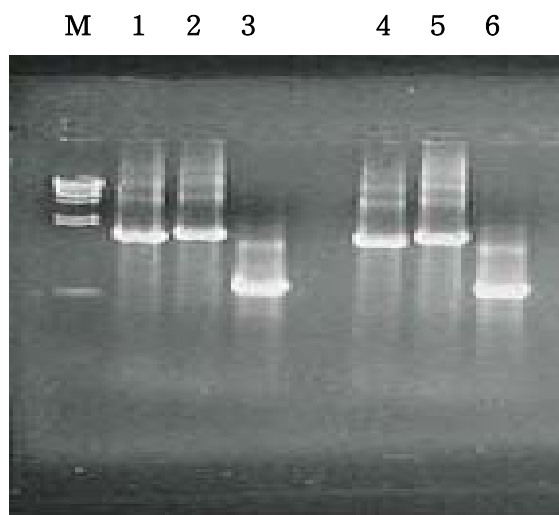


Fig. 4. Confirmation of pILTAB357 with terpene synthase gene in *E. coli* DH5 α ' and *Agrobacterium* by PCR analysis

M: Size marker (Lambda DNA/*Hind*III)

1: *E. coli* DH5 α ' pILTAB sense terpene synthase gene (terpene F/R)

2: *E. coli* DH5 α ' pILTAB with pILTAB containing CVMV promoter (CVMV F/R)

3: *E. coli* DH5 α ' with pILTAB containing NPTII gene (NPTII F/R)

4: *Agrobacterium* pILTAB sense-oriented terpene synthase gene (terpene F/R)

5: *Agrobacterium* with pILTAB containing CVMV promoter (CVMV F/R)

6: *Agrobacterium* with pILTAB containing NPTII gene (NPTII F/R)

Table 1. The sequences of primers used for confirmation of terpene synthase gene, CVMV promoter and NPTII gene.

	Terpene synthase gene
Forward	5'-TCT AGA ATG TCA CTT ACA GAA G-3'
Reverse	5'-GAA TTC TCA ATG ATG ATG ATG ATG ATG TAT ACT CAT AGG ATA AAC-3'
	CVMV promoter
Forward	5'-GCA AGA CCG GCA ACA GGA TTC-3'
Reverse	5'-TGA AGT ACT GAG GAT ACA ACT TCA-3'
	NPTII gene
Forward	5'-GAG GCT ATT CGG GCT ATG AAC TG-3'
Reverse	5'-TAC GGT TAT CGC CGC TCC CGA T-3'

나. 형질전환 상추의 확인

선발배지에서 재분화된 신초로부터 genomic DNA를 분리한 뒤, 형질전환체임을 확인하기 위해 유전자 내부의 일부를 증폭할 수 있는 primer와 kanamycin 저항성 유전자를 증폭할 수 있는 primer로 각각을 PCR하였다. 60개체 이상의 shoot가 발생하여 발근을 유도하였으나 이들 중 13개체만이 발근이 되어 순화 과정을 진행 하였다. 순화 과정 중 3개체의 재분화체가 소실되었고 그로 인하여 10개체만을 온실에서 재배하여 채종 및 PCR을 통한 유전자 도입 여부를 조사하였다. 유전자 도입 여부 확인을 위한 PCR 분석을 위해 amorpho-4,11-diene synthase 유전자의 염기서열에 기초하여 primer를 제작하였다 (Fig. 5). Forward primer는 5'-AGA AGA AAA ACC TAT TCG CC-3'의 염기서열을 가진 20mer이고 reverse primer는 5'-GTC TCC CAT ACG TGT GAA GT-3'의 염기서열로 이루어진 20mer이다. Annealing temperature는 50°C로 제작하였으며 PCR 산물의 크기는 약 1.6kb가 되도록 하였다. 선발배지에서 재분화된 총 10개체에 대하여 유전자 도입을 PCR을 통해 조사하여 본 결과, 9개체의 재분화체로부터 1.6kb의 band를 확인하였다(Fig. 6). 또한 Southern hybridization 분석은 PCR 분석에 의하여 일차적으로 유전자 도입이 확인된 형질전환체 9개 line을 각 유전자별로 선발하여 실시하였다. *EcoRI* enzyme 처리 후 *NPTII* gene으로부터 작성된 probe를 이용하여 확인을 한 결과 기대했던 size인 550bp의 signal을 확인할 수 있었다. Southern hybridization 분석의 결과로 PCR로 확인된 line들로의 ferritin 유전자의 도입이 확인되었고 이들의 copy 수는 1-3개인 것으로 확인되었다(Fig. 7).

또한 유전자의 후대유전 양상을 분석하기 위하여 확인된 9개체의 형질전환체를 자가수분하고(Fig. 8) 채종된 종자들 중 각 개체별로 14립씩의 종자를 무작위로 선별하여 상토 (부농, 원예3호)를 포함한 포트에 파종하여 생장시킨 후 총 126개체의 T1세대에 대하여 위 primer를 이용하여 PCR 반응으로 조사하였다 (Fig. 9). 그 결과, 9개체의 형질전환체 모두에서 T-DNA의 후대 전이를 확인하였고 그 비율은 1:1을 나타내었다(Table 2).

¹ATGTCACCTTAC **AGAAGAAAAACCTATTGCGC**CCATTGCCAACTTTCTCTCC
AAGCATTGGGGGAGATCAGTTTCTCATCTATGAAAAGCAAGTAGAGCAAG
GGGTGGAACAGATAGTGAATGATTTAAAAAAGAAGTGCGGCAACTACTA
AAAGAAGCTTTGGATATTCCTATGAAACATGCCAATTTGTTGAAGCTGAT
TGATGAAATCCAACGCCTTGAATACCGTATCACITTTGAACGGGAGATTG
ATCATGCATTGCAATGTATTTATGAAACATATGGTGATAACTGGAATGGT
GACCGCTCTTCCTTATGGTCCGTCTTATGCGAAAAGCAAGGATATTATGT
TACATGTGATGTTTTCAATAACTATAAAGACAAAAATGGAGCGTTCAAGC
AATCGTTAGCTAATGATGTTGAAGGTTTGCTTGAGTTGTACGAAGCAACT
TCTATGAGGGTACCTGGGGAGATTATATTAGAAGATGCTCTTGGTTTTAC
ACGATCTCGTCTTAGCATGATGACAAAAGATGCTTTTTCTACAAACCCCG
CTCTTTTTACCGAAATACAACGGGCACTAAAGCAACCCCTTTGAAAAAGG
TTGCCAAGAATAGAGGGCGGCAGTACATTCTTTCTATCAACAACAAGA
TTCTCATAACAAGACTTTACTTAAACTTGCTAAGTTAGAGTTCAATTTGC
TTCAGTCATTGCACAAGGAAGAGCTCAGCCATGTGTGCAAATGGTGGAAA
GCTTTTCGATATCAAGAAGAACGCACCTTGTTTAAGAGATAGAATTGTTGA
ATGCTACTTTTGGGGACTAGGTTCCAGGCTTTGAGCCACAGTATCCCGGG
CTAGAGTTTTCTTCAAAAAAGCTGTTGCTGTTATAACTCTTATAGATGAC
ACTTATGATGCGTATGGTACTTATGAAGAAGCTTAAGATCTTTACTGAAGC
TGTTGAAAGGTGGTCAATTACATGCTTAGACACACTTCCAGAATACATGA
AACCAGATATACAAATTTATCATGGATACATACACAGAAATGGAAGAATTT
CTTGCAAAGGAGGGGAAGAACAGATCTATTTAACTGCGGCAAAGAATTTGT
GAAAGAGTTTGTAGAAACCTGATGTTGAAGCAAAATGGGCAAATGAGG
GACACATACCAACCACTGAAGAGCATGATCCAGTTGTAATCATTACTGGC
GGTGCTAACCTGCTTACAACAACCTTGTATCTTGGCATGAGTGATATATT
CACAAAAGAGTCTGTGCAATGGGCTGTCTCTGCACCTCCTTTTTAGAT
ACTCAGGTATACTTGGTTCGACGCCTAAATGATCTCATGACCCACAAGGCC
GAGCAAGAAAAGAAAACATAGTTCATCGAGCCTTGAAAGTTATGAAGGA
ATATAATGTCAATGAGGAGTATGCCCAAACCTTGATTTACAAGGAAGTAG
AAGATGTGTGAAAGATATAAACCGAGAGTACCTCACAACTAAAAACATT
CCAAGGCCGTTATTGATGGCT**GTGATCTATTTGTGCCAGTTTCTTGAAGT**
TCAATATGCAGGAAAGGATA**ACTTCACACGTATGGGAGAC**GAATACAAC
ATCTCATAAAGTCTACTCGTTTATCTATGAGTAT**ATGA** 1641

Fig. 5. DNA sequence of amorpho-4,11-diene synthase gene.
Amorpho-4,11-diene synthase gene is 1641 bp length nucleotides. Forward primer's 5' end starts from 12th base and reverse primer's 3' end starts from 1590th base.

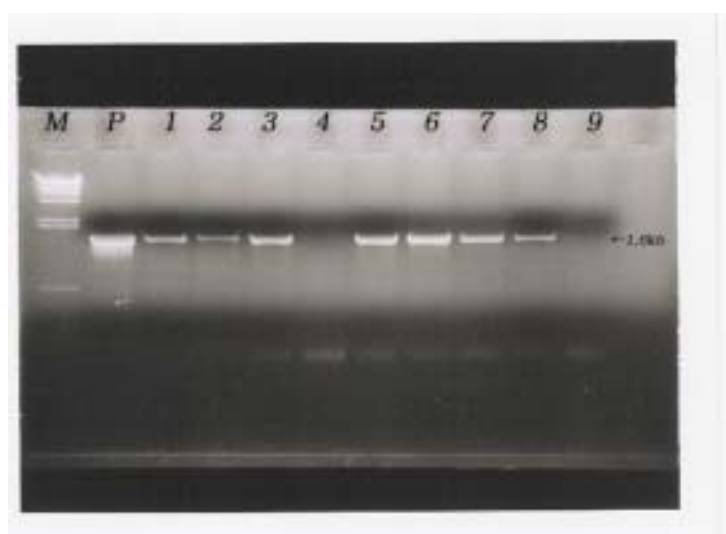


Fig. 6. PCR analysis of terpene synthase gene in transformed 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.).

M: Lambda DNA/*Hind*III size marker,

P: pILTAB/*Eco*RI digestion (positive control),

1: regenerated plants No.1, 2: No.2, 3: No.3, 4: No.4,
5: No.5,

6: No.6, 7: No.7, 8: No.8, 9: No.9.

※ Lane no. 4 and 9 showed 1.6kb product even though they were not clear in the film.

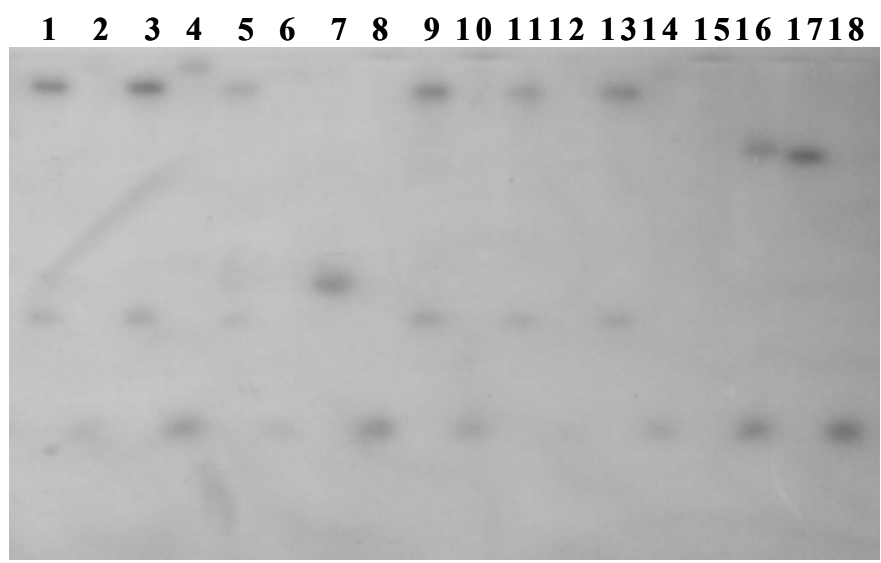


Fig. 7. Southern hybridization of DNA from transgenic lettuce plants with terpene synthase gene. Genomic DNA of each transgenic lines were digested with *EcoRI* (odd number) and *BamHI* (even number), respectively. Digested genomic DNA was probed with [³²P]-labeled 550b fragment for *NPTII* gene.



Fig. 8. Self pollination and harvest of T₁ seed from transformed 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.) plants in the green house.

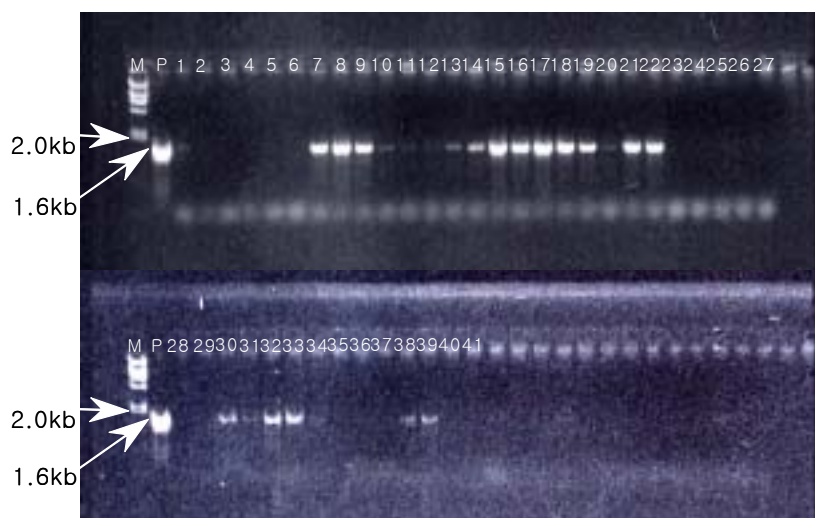


Fig. 9. PCR analysis of terpene synthase gene in T₁ generation.

M : DNA size marker (λ /*Hind*III),

P : positive control,

Lane 1-14 : T₁ transformants from T₀ 1,

Lane 15-27 : T₁ transformants from T₀ 2,

Lane 28-41 : T₁ transformants from T₀ 3.

Table 2. Results of PCR analysis for terpene synthase gene in T₁ generation.

	Line number of T ₁ progeny								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Germinated seed no.	14	14	14	14	14	14	14	14	14
No. of PCR analysis	14	13	14	14	13	14	14	14	14
PCR (+)	8	8	7	7	7	6	7	8	6

PCR (+) : PCR product was appeared at 1.6kb size

다. T₁ 종자의 항생제 저항성 분석

9개체의 형질전환체로부터 채종된 종자를 종자 발아 배지에 kanamycin의 농도를 각각 0, 50 그리고 100mg/L의 세 수준으로 조절하고 형질전환체 9개체로부터 취득한 종자 중 수확량이 적은 3번과 9번을 제외한 7개체의 형질전환체 및 wild type을 파종하고 wild type을 파종하고 23℃, 16시간 광 주기로 식물생장상에서 7일간 배양하여 (Fig. 10) 발아율을 조사하였다.

Kanamycin 저항성을 나타내며 발아하는 종자의 비율을 조사한 바 (Table 3 및 Fig. 11). 항생제를 첨가하지 않은 배지에서는 형질전환체 2번 및 5번에서 채종한 T₁ 종자가 75.0%, 77.8%의 발아율을 나타내었으며, 나머지 형질전환체 들은 89% 이상의 높은 발아율을 나타내었다. Kanamycin의 농도를 50mg/L로 조절한 실험군의 경우, 7번 형질전환체가 46.6%의 발아율을 보인 것과는 달리 다른 형질전환체는 75% 이상의 발아율을 나타내었다. Kanamycin을 100mg/L의 농도로 조절한 실험군에 있어서는 모든 형질전환체에서 57% 이상의 발아율을 나타내었다. 특히 형질전환체 7번은 종자 발아 배지에 첨가한 항생제의 농도가 2배 높음에도 불구하고 67%의 발아율을 나타내었다.

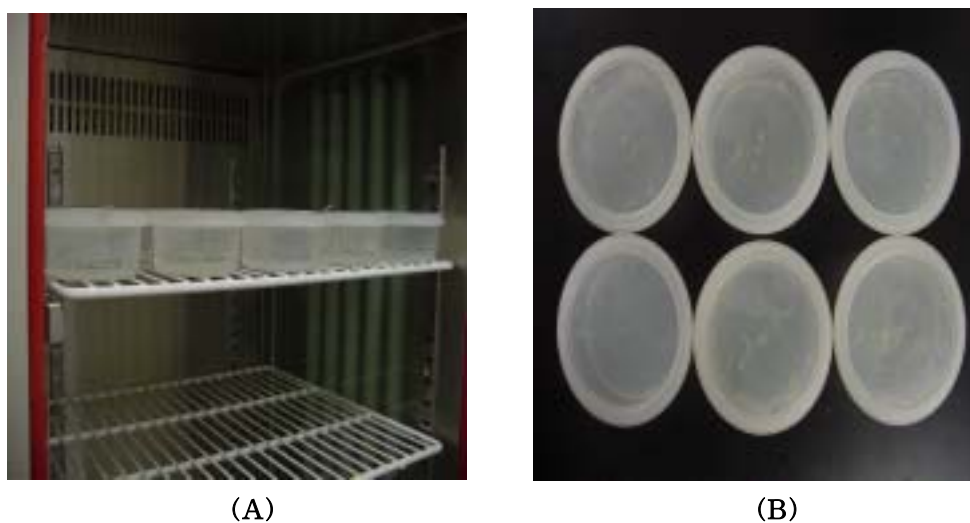


Fig. 10. Seed germination analysis of 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.).

- A: Growth in plant growth chamber,
 B: Germinated seeds after 7 days,
 1: T₁ seeds from transformant 4 (without kanamycin),
 2: T₁ seeds from transformant 8-1
 (with 50mg/L kanamycin),
 3: T₁ seeds from transformant 8-1
 (with 100mg/L kanamycin),
 4: T₁ seeds from transformant 8 (without kanamycin),
 5: T₁ seeds from transformant 8-2
 (with 50mg/L kanamycin),
 6: T₁ seeds from transformant 8-2
 (with 100mg/L kanamycin).

Table 3. Germination ratio analysis of T₁ transformed 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.) progeny

Transformant line	Number of scattered seeds			Number of germinated seeds			Germination rate (%)		
	0	50	100	0	50	100	0	50	100
wild	50	136	115	30	10	5	100.0	7.4	4.4
1	45	40	37	40	30	25	88.9	75.0	67.6
2	40	53	47	30	40	37	75.0	75.5	78.7
4	50	70	29	50	57	22	100.0	81.4	75.9
5	45	90	85	35	69	48	77.8	76.7	56.5
6	50	95	105	45	84	74	90.0	88.4	70.5
7	45	58	45	40	27	30	88.9	46.6	66.7
8	50	61	60	50	52	44	100.0	85.3	73.3

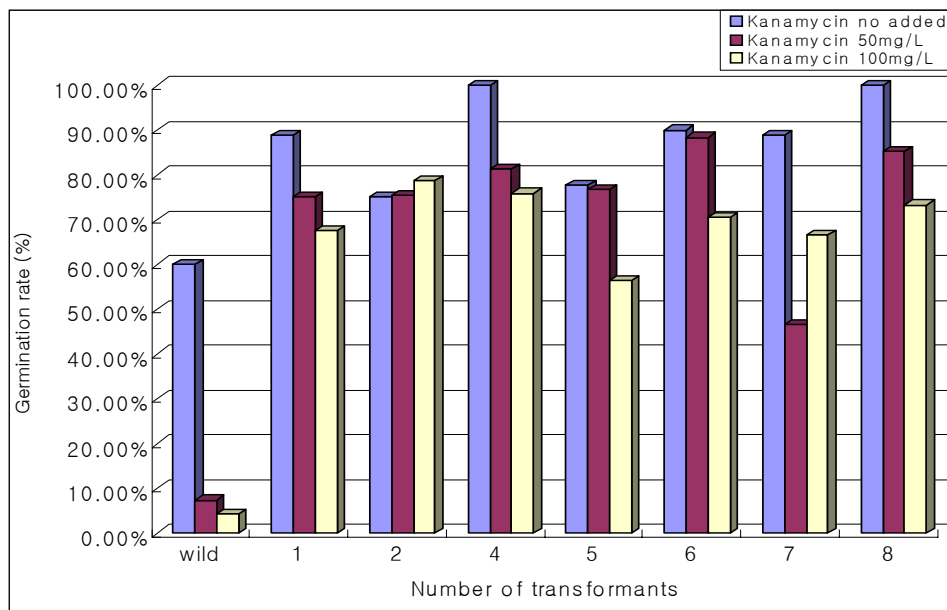


Fig. 11. Germination ratio of T₁ transformed 'Chungchima' lettuce (*Lactuca sativa* L.) progeny

라. 상추중의 artemisinin 분석

1) Artemisinin의 추출 회수율 결정

n-Hexane으로 추출하였을 때, 8 mg이 얻어져 80%의 회수율을 보였으며, n-hexane- EtOAc (1:1)의 혼합용매를 사용하였을 때 10 mg이 얻어져 100%의 회수율을 보였다. 따라서 artemisinin을 용매추출하고자 할 때 n-hexane-EtOAc (1:1)의 혼합용매를 사용하기로 하였다.

2) 상추로부터 용매 추출 및 분획물의 수율

		대조구	1	2	3	4	5	6	7	8	9
MeOH 추출물	양 (mg)	485	490	616	561	477	435	481	429	484	500
	수율 (%)	0.24	0.24	0.31	0.28	0.24	0.22	0.24	0.21	0.24	0.25
용매 분획물	양 (mg)	280	161	112	148	151	160	130	261	219	176
	수율 (%)	0.140	0.081	0.056	0.074	0.076	0.080	0.065	0.131	0.110	0.088

3) GC를 이용한 각 상추 시료중의 artemisinin 정량 분석

Artemisinin은 재료 및 방법에서 제시한 GC 분석조건에서는 retention time이 10분 7초로 나타났다 (Fig. 12). 이 peak가 artemisinin인지 확인하기 위하여 GC/MS를 측정된 결과 m/z 282가 정확하게 나타나 artemisinin으로 확인되었다(Fig. 13). 각 상추시료에 대한 분석한 결과 대조구 상추시료의 GC chromatogram에서 artemisinin의 retention time인 10분 7초 부근에서 여러 peak가 겹쳐서 나타났으나(Fig. 14) 어떤 peak가 artemisinin인지 구별이 어려웠고 각 peak에 대하여 상추로부터 용매 추출 및 분획물의 수율을 확인하였다. 그러나 상추를 GC/MS로 측정된 결과 m/z 282을 나타내는 peak가 관측되지 않아 일반 상추에는 artemisinin이 함유되어 있지 않은 것으로 확인되었다(Fig. 14). 또한 형질전환 상추시료의 GC chromatogram(Fig. 15)에서도 artemisinin의 retention time인 10분 7초 부근에서 여러 peak이 겹쳐서 나타나 각 peak에 대하여 GC/MS를 측정하였으나 m/z 282을 나타내는 peak는 관측되지 않아 형질전환 상추에도 artemisinin이 함유되어 있지 않은 것으로 확인되었다.

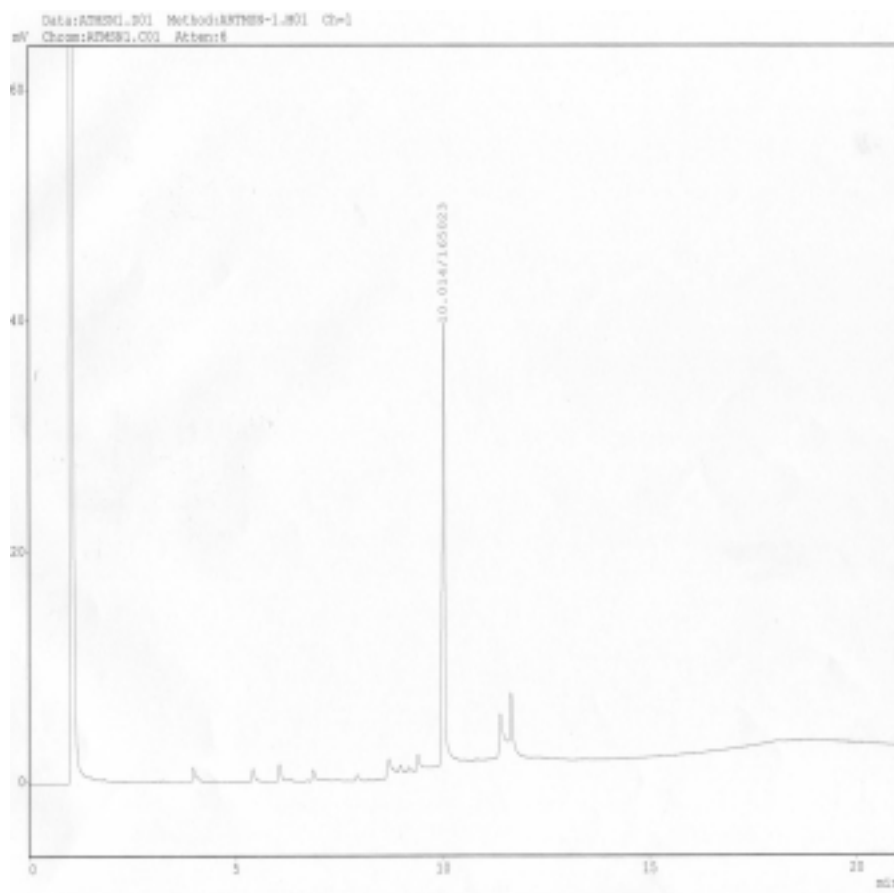


Fig. 12. GC chromatogram of artemisinin

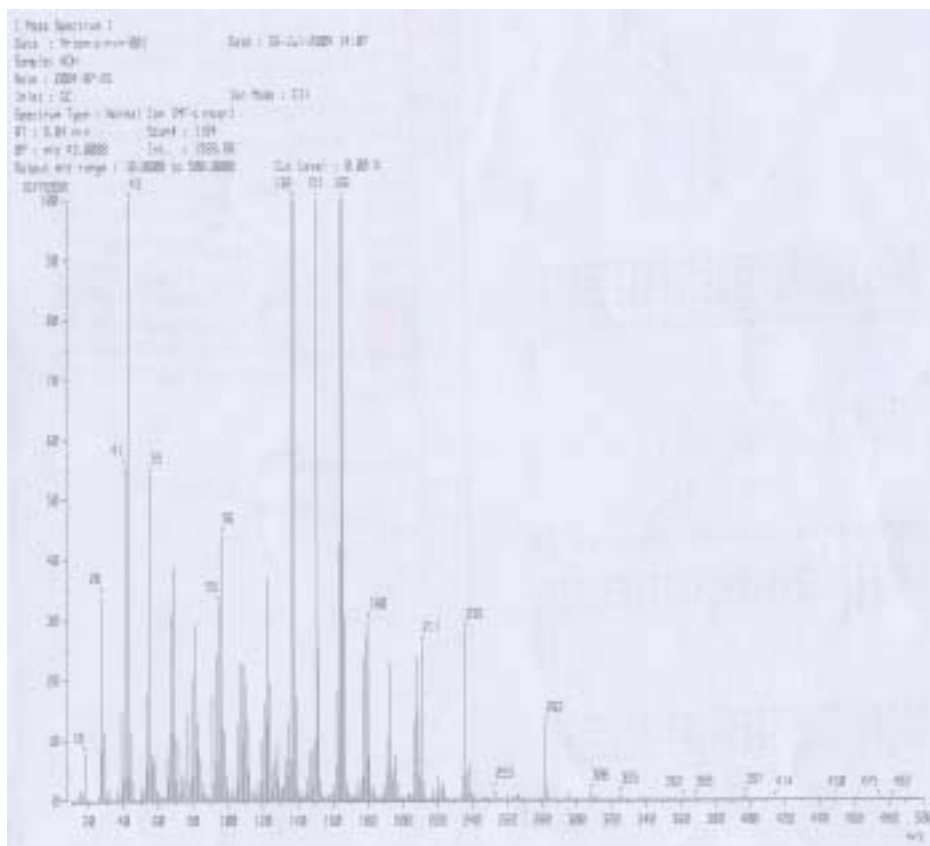


Fig. 13. Mass spectrum of artemisinin

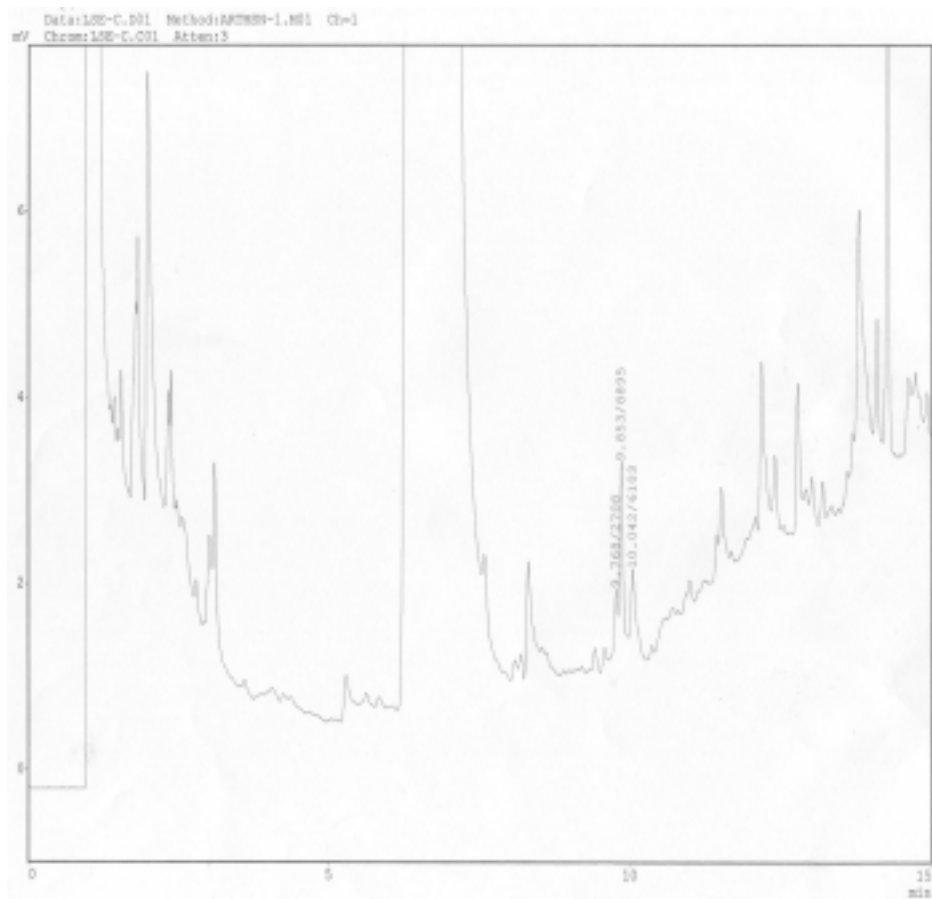


Fig. 14. GC chromatogram of nontransformed lettuce plant

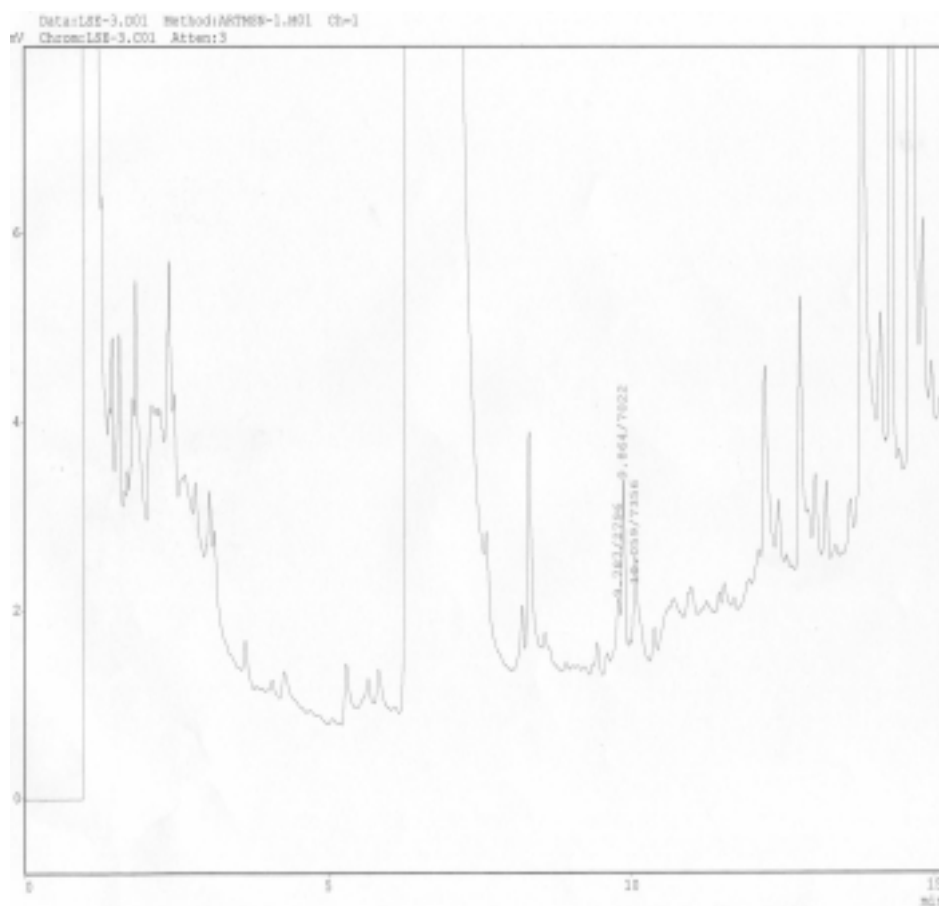


Fig. 15. GC chromatogram of transgenic lettuce plant

제 4 장 연구개발결과의 활용계획

현재 농업은 생산성 및 부가가치의 증가가 한계에 이르고 있어 유용유전자를 주요 채소작물에 직접 도입하여 신기능성 작물을 개발할 필요성이 있다. 그러나 채소작물은 주로 고전적인 방법에 의해서 육종이 이루어지고 있으며 시간이 많이 소요되기 때문에 분자유종기술을 구사하여 단기간에 새로운 특성을 가진 품종을 육성할 수 있는 기술개발이 시급히 요구되는 실정이다. 또한 농산물 수입 개방 등 국내·외의 농업사정이 급변함에 따라서 국민 총 생산액중 농업 부문의 비중이 점차 감소하는 추세이어서 신기능성을 가진 고부가가치의 품종의 요구도가 커지고 있다. 더 나아가 WTO 출범으로 막대한 자본과 기술을 앞세운 외국기업이 진출하여 국내 농업 및 관련 업체에 큰 변화를 가져올 것이며 이에 대처해 기능성 작물을 육성하는 기술을 자체적으로 개발하여 외국과 경쟁해야 할 필요성 역시 요구되고 있다.

본 연구에서는 사람으로부터 유래된 ferritin 유전자와 항말라리아성 물질인 atemisinin 합성에 관여하는 terpene synthase 유전자를 분자유종기술을 이용하여 기능성 상추를 개발코자 수행하였다.

철 저장단백질 ferritin은 지금까지 그 작용과 기능에 대해서는 많은 연구가 진행되었지만 직접적인 철분제재로서의 이용성은 최근에 이르러 연구·개발되기 시작하였다. 이러한 연구 또한 제약회사를 중심으로 천연철분제재로서 ferritin을 말이나 소에서 직접 분리한 상태로 시판되어 광우병과 같은 질병의 감염에 문제가 제기되고 있다. 본 연구는 이러한 문제점을 해결코자 사람으로부터 유래된 ferritin 유전자를 상추에 적용하였으며 결과적으로 철분 함량이 증가된 상추를 개발함으로써 충분히 활용할 수 있는 기반을 마련하였다.

인구증가로 야기되는 문제점은 식량 소비량의 증가뿐만 아니라 약용으로 이용되는 식물의 소비량도 함께 증가하게 함으로서 이들에 대한 소비량과 자연의 공급이 균형을 이루는 한은 식물자원은 무제한 공급될 수 있지만 특종 식물자원의 소비와 공급간의 균형이 깨질 경우 일부 약용식물의 멸종 등의 심각한 문제를 초래하게 된다. 이러한 문제를 방지하기 위한 해결책 중 하나로 '약용식물의 효율적 이용'을 들 수 있는데, 실질적으로 약용식물내에서 그 식물만의 특이한 약효성분은 그 식물전체를 섭취한다고 해도 아주 적은 양밖에 취할 수 없다. 본 연구에서 주로 다루고자 하는 항말라리아 효과의 artemisinin 역시 개똥쑥 (*Artemisia annua* L.)이라는 국화과 작물에서 주로 생산되지만, 그 양은 건물중에 대해 0.01%에서 0.5%밖에 지나지 않는다. 따라서, 아무리 artemisinin이 많은 약에 대해 저항성을 갖는 *Plasmodium falciparum* 계통의 모기에 특히 효과

가 있는 성분이라 할 지라도 주로 생산되는 야생 식물인 개똥쑥(*Artemisia annua* L.)에만 의지해서는 약품가격의 상승, 개똥쑥의 멸종으로까지 이어질 수 있다. 본 연구에서는 항말라리아성 물질인 atemisinin 합성에 관여하는 terpene synthase 유전자를 대표적인 엽채류인 상추에 적용하여 작물의 기능성을 증가시키기 위한 연구를 수행함으로써 몇몇 모델작물에만 국한되어 왔던 연구를 추후 실용작물에 활용 가능한 결과를 제시하였다.

또한 본 연구에서는 상추의 재분화체계, 형질전환체계, double transformation, 순화 및 선발 등의 기술을 개발함으로써 국내 품종 육성의 기틀을 제공하였다. 상추의 형질전환체계 확립으로 본 과제에서 이용된 ferritin 유전자와 terpen cyclase 유전자 뿐만 아니라 어떤 종류의 유용유전자도 불화합성을 극복하여 작물에 도입할 수 있어 육종 년한의 단축을 가능케 하여 신품종 육성에 기여할 수 있으리라 기대되며 더 나아가 이러한 일련의 품종육성기술확립은 상추 뿐만 아니라 타 채소작물의 신품종 육성에 응용될 수 있어 채소산업전반에 크게 기여하리라 기대된다.

이와 더불어 사람 ferritin 유전자와 terpene synthase 유전자의 이용으로 국민 건강 증진을 위한 의약품의 대체 효과를 가져올 수 있고 이러한 고기능성 품종개발 및 육성기술의 개발로 소비와 생산이 증가하여 새로운 고소득 작물로 자리 잡을 수 있으리라 기대된다. 국내 소비면에서 새로운 수요를 창출할 뿐만 아니라 농산물 개방에 대응할 수 있는 국제적인 경쟁력을 갖춘 수출유망 품목으로도 기대된다. 상추는 세계적으로 중요한 위치를 차지하고 있는 셀러리용 채소로 최근 소득증가로 육류 소비가 증가하면서 상추의 소비량도 같이 증가하고 있는 추세이다. 따라서 기능성 상추의 육성은 국민 건강 증진 뿐만 아니라 식생활이 비슷한 이웃 일본으로의 수출 가능성 등으로 농가의 고소득 대체작물로서 전망이 밝으며 궁극적으로 농산물 수입개방 등으로 인한 농민들의 농업에 대한 의욕 저하를 고취할 수 있는 전기를 마련할 수 있으며 고부가가치 기능성 작물을 생산하면 농가의 소득이 증가되어 이농을 막고 농업에 대한 애착심과 긍지를 갖게 해 줄 것으로 기대한다.

제 5 장 참 고 문 헌

Abel, P.P., R.S. Nelson, D.B.N. Hoffman, S.G. Roger, R.T. Fraley, and R.N. Beachy. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-743.

Aisen. P. and I. Listowsky. 1980. Iron transport and storage proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 49:357-393.

An, G. 1987. Binary Ti vector for plant transformation and promoter analysis. *Methods in enzymology* 153:292-305.

Aziz, N. and H.N. Munro. 1987. Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its untranslated region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8478-8482.

Barton, R. 1964. Electron microscope studies on the uptake of ferritin by plant roots. *Experimental Cell Research* 36:432-434.

Barton, R. 1970. The production and behavior of phytoferritin particles during senescence of *Phaseolus* leaves. *Planta* 94:73-77.

Beck, E., G. Ludwig, E.A. Auerswald, B. Reiss, and H. Schaller. 1982. Nucleic acid sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene* 19:327-335.

Behnke, E. 1977. Regular occurring massive deposits of phytoferritin in the phloem of succulent Centrospermae. *Z. Pflanzenphysiol.* 85:89-82.

Benfey, P.N. and N.H. Chun. 1989. Regulated genes in transgenic plants. *Science* 244:174-181.

Bergersen, F.J. 1963. Iron in the developing soybean nodule. *Aust. J. Sci.* 16: 916-919.

- Bevan, M. 1984. Binary *Agrobacterium* vectors for transformation. *Nucleic Acid Research* 12:8709-8720.
- Bienfait, H.F. and M.L. van den Briel. 1980. Rapid mobilization of ferritin iron by ascorbate in the presence of oxygen. *Biochim. Biophys. Acta* 631: 507-509.
- Bomford, A., C. Conlon-Hollingshead, and H.N. Munro. 1981. Adaptive responses of rat tissue isoferritins to iron administration. *J. Biol. Chem.* 256: 948-955.
- Boyd, D., C. Vecoli, D.M. Belcher, S.K. Jain, and J.W. Drysdale. 1985. Structural and functional relationships of human ferritin H and L chains deduced from cDNA clones. *J. Biol. Chem.* 260:11755-11761.
- Bozarth, R.F. and A. Goenaga. 1972. Purification and properties of mycoferritin from *Mortierella alpina*. *Can. J. Microbiol.* 18:619-622.
- Branton, D. and L. Jacobson. 1962. Iron localization in pea plants. *Plant Physiol.* 37:546-551.
- Briat, J.F. 1996. Roles of ferritin in plants. *Journal of plant nutrition* 19(8&9):1331-1342.
- Briat, J.F., O. Massenet, and J.P. Laulhere. 1989. A Jack Bean protein similar to seed ferritin and unrelated to concanavalin A is the only iron storage protein in Jack Bean seeds, although concanavalin A can form ferritin-like iron cores *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 264:11550-11553.
- Brown, J.C.R., S. Holmes, and L.O. Tiffin. 1961. Iron chlorosis in soybeans as related to the genotype of rootstalk: III. Chlorosis susceptibility and reductive capacity at the root. *Soil Sci.* 91:127-132.
- Buchanan, B.B., W. Gruissem, and R.L. Jones. 2000. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Chap. 24. Natural Products 1250-1318.

Cai, G., G. Li, H. Ye, and G. Li. 1995. Hairy root culture of *Artemisia annua* L. by Ri plasmid transformation and biosynthesis of artemisinin. *Chin. J. Biotechnol.* 11(4):227-235.

Cairo, G., L. Bardella, L. Schiaffonati, P. Arosio, S. Levi, A. Bernelli-Zazzera. 1985. Multiple mechanisms of iron-induced ferritin synthesis in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 133:314-321.

Cardwell, H.M.E. and S. Smith. 1953. The structure of digoxigenin. *Experientia* 9:267-368.

Cardwell, H.M.E. and S. Smith. 1954. Digitalis gluosides. VII. The structure of digitalis anhydrogenins and the orientation of the hydroxy-groups in digoxigenin and gioxigenin. *J. Chem. Soc.* 1954:2012-2023.

Chang, Y.J., S.H. Song, S.H. Park, and S.U. Kim. 2000. Amorpho-4,11-diene synthase of *Artemisia annua*: cDNA isolation and bacterial expression of a terpene synthase involved in artemisinin biosynthesis. *Archives of Biochem. Biophys.* 383(2):178-184.

Charest, P.J., L.A. Holbrook, J. Gabard, V.N. Iyer, and B.L. Miki. 1988. *Agrobacterium*-mediated transformation of thin cell layer explants from *Brassica napus* L. *Theor. Appl. Genet.* 75:438-445.

Chia, T.F., Y.S. Chan, and N.H. Chua. 1992. Characterization of cymbidium mosaic virus coat protein gene and its expression in transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* 18:1091-1099.

Cho, H.S., J. Cao, J.P. Ren, and E.D. Earle. 2001. Control of Lepidopteran insect pests in transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) transformed with a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1C* Gene. *Plant Cell Reports* 20:1-7.

Cho, Y.H., D.H. Kim, H.S. Lee, S.C. Suh, and H.I. Kim. 1995. Plantlet regeneration of hygromycin resistant Chinese cabbage (*Brassica campestris*

ssp. *pekinensis*) from callus induced from *Agrobacterium* infected hypocotyls. RDA. J. Agri. Sci. 37(1):161-166.

Chung, J.D., C.K. Kim, and J.K. Jo. 1998b. Expression of Chinese cabbage glutathione reductase gene in lettuce (*Lactuca sativa* L.) Korean J. Plant Tissue Culture 25(4):267-271.

Chung, J.D., C.K. Kim, and K.M. Kim. 1998a. Expression β -glucuronidase (GUS) gene in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) and its progeny analysis. Korean J. Plant Tissue Culture 25(4):225-229.

Chung, J.H., D.C. Yang, H.G. Jang, and K.Y. Paek. 2000. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) using cold regulated gene (*BN115*). Korean J. Plant Tissue Culture 27(1):7-12.

Clarkson, D.T. and J.B. Hanson. 1980. The mineral nutrition of higher plants. Ann. Rev. Plant Physiology 31:238-298.

Cocking, E.C. 1965. Ferritin and tobacco mosaic virus uptake and nuclear cytoplasmic relationships in isolated tomato fruit protoplasts. Biochem. J. 95: 28-29.

Craig, A.S. and K.I. Williamson. 1969. Phytoferritin and viral infection. Virology 39:616-617.

Crichton, R.R. 1990. Proteins of iron storage and transport. Adv. Protein Chem. 40:281-353.

Crichton, R.R., Y. Ponce-Ortiz, M.H.J. Koch, R. Parfait, and H.B. Stuhmann. 1978. Isolation and characterization of phytoferritin from pea and lentil. Biochem. J. 171:349-356.

Cuozzo, M., K.M.O. Connell, W. Kaniewski, R.X. Fang, N.H. Chua, and N.E. Tumer. 1988. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. EMBO J.

7:1273-1280.

David, C.N. 1974. Ferritin and iron metabolism in phycomyces. In: Microbial iron metabolism. pp. 149-158, Nedlands. J. B. ed. Academic Press, New York London.

David, C.N. and K. Easterbrook. 1971. Ferritin in the fungus phycomyces. J. Cell. Biol. 48:15-28.

de Block, M., D.D. Brouwer, and P. Tenning. 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.

de Kraker, J.W., M.C.R. Franssen, A. de Groot, W.A. König, and H.J. Bouwmeester. 1998. (+)-Germacrene A biosynthesis the committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. Plant Physiol. 117:1381-1392.

Dickey, L.F., S. Sreedharan, E.C. Theil, J.R. Didsbury, Y.H. Wang, and R.E. Kaufman. 1987. Differences in the regulation of messenger RNA from housekeeping and specialized-cell ferritin. J. Biol. Chem. 262:7907-7907.

Dickey, L.F., Y.H. Wang, G.E. Shull, I.A. Wortman, and E.C. Theil. 1988. The importance of the 3'-untranslated region in the translational control of ferritin mRNA. J. Biol. Chem. 263:3071-3074.

Drysdale J.W. and D.A. Shafritz. 1975. Induction of ferritin by iron. IN: Protrins of Iron Storage and Transport in Biochemistry and Medicine, Ed. R. R. Crighton, North Holland Pub. Co. 319-326.

Drysdale, J.W. and H.N. Munro. 1966. Regulation of synthesis and ferritin turnover of ferritin in rat liver. J. Biol. Chem. 241:3630-3637.

Edding, J.L. and A.L. Brown. 1967. Absorption and translocation of foliar

applied iron. *Plant Physiol.* 42:15-19.

Engler-Blum, G., M. Meier, J. Frank, and G.A. Müller. 1993. Reduction of background problems in nonradioactive northern and Southern blot analyses enables higher sensitivity than ³²P-based hybridizations. *Analytical biochemistry* 201:235-244.

Escudero, J. and B. Hohn. 1997. Transfer and integration of T-DNA without cell injury in the host plant. *The Plant Cell* 9:2135-2142.

Facchini, P.J. and J. Chappell. 1992. Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11088-11092.

Frank M.T. and V.T. Suzy. 2002. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 99:3505-3516.

Fry, J., A. Barnason, and R.B. Horsch. 1987. Transformation of *Brassica napus* with *Agrobacterium tumefaciens* based vectors. *Plant Cell Reports* 6:321-325.

Godwin, I., G. Todd, B. Ford-Lloyd, and H.J. Newbury. 1991. The effects of acetosyringone and pH on *Agrobacterium*-mediated transformation vary according to plant species. *Plant Cell Reports* 9:671-675.

Goto, F., T. Yoshihara, and H. Saiki. 1998. Iron accumulation in tobacco plants expressing soybean ferritin gene. *Transgenic Res.* 7:173-180.

Goto, F., T. Yoshihara, and H. Saiki. 2000. Iron accumulation and enhanced growth in transgenic lettuce plants expression the iron-binding protein ferritin. *Theor. and Appl. Genet.* 100:658-664.

Goto, F., T. Yoshihara, N. Shigemoto, S. Toki, and F. Takaiwa. 1999. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnol.* 17:282-286.

Goto, F., T. Yoshihara, T. Mausda, and F. Takiwa. 2001. Genetic improvement of iron content and stress adaptation in plants using ferritin gene. *Biotechnology and Genetic Engineering Review* 18:351-371.

Granick, S. 1946. Protein apoferritin and ferritin in iron feeding and absorption. *Science* 103:107.

Guerche, P., L. Jouanin, D. Tepfer, and G. Pelletier. 1987. Genetic transformation of oilseed rape (*Brassica napus*) by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* and analysis of inheritance of the transformed phenotype. *Mol. Gen. Genet.* 206:382-386.

Gurzau, E.S., C. Neagu, and A.E. Gurzau. 2003. Essential metal-case study on iron. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56:190-200.

Hansen, G., R.D. Shilloito, and M.D. Chilton. 1997. T-strand integration in maize protoplast after code livery of T-DNA substrate and virulence gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 94:11726-11730.

Harrison, B.D., M.A. Mayo, and D.C. Baulcoombe. 1987. Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature* 328:799-802.

Harrison, P.M. and P. Arosio. 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1275: 161-203.

Harrison, P.M., P.J. Artymiuk, G.C. Ford, D.M. Lawson, J.M.A. Smith, A. Treffry, and J.L. White. 1989. Ferritin: function and structural design of an iron storage protein. In: Mann, S., Webb, J., Williams, R.J.P. (eds) *Biom mineralization: Chemical and Biomedical prespectives*, pp. 257-294. VCN, Weinheim.

Harrison, P.M., T.G. Hoy, and R.J. Hoare. 1975. Towards a mechanism of iron uptake and release by ferritin molecules. IN: *Proteins of Iron Storage*

and Transport in Biochemistry and Medicine, Ed. R.R. Crichton, North Holland Pub. Co. 271-278.

Hegenauer, R. 1971. Pflanzstoffe und pflanzensystematik. *Naturwissenschaften* 58:585-598.

Hentze, M.W., T.A. Rouault, S.W. Caughman, A. Dancis, J.B. Harford, and R.D. Klausner. 1987. A cis acting element is necessary and sufficient for translational regulation of human ferritin expression in response to iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:6730-6734.

Hoekema, A. and R.A. Schilperort. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature* 303:179-180.

Hoekema, A., P.W. Roelvink, and R.A. Schilperort. 1984. Delivery of T-DNA from the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome into plant cells. *EMBO J.* 11:2485-2490.

Hooykaas, P.J.J. and R.A. Schilperort. 1992. *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol. Biol.* 19:15-38.

Horsch, R.B., J.E. Fry, N.L. Hoffmann, D. Eichholtz, S.G. Rogers, and R.T. Fraley. 1984. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 223:496.

Hoshino, Y., I. Turkin, and M. Mii. 1998. Transgenic bialaphos-resistant snapdragon (*Antirrhinum majus* L.) produced by *Agrobacterium rhizogenes* transformation. *Sci. Hort.* 76:37-57.

Hoy, T.G. and P.M. Harrison. 1976. The uptake of ferritin iron by rat liver ferritin *in vivo and in vitro*. *Br. J. Haematol.* 33:497-504.

Hunter, D.C. and D.J. Burritt. 2002. Improved adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.) *Sci. Hort.* 95:269-276.

Jain, D.C., A.K. Mathur, M.M. Gupta, A.K. Singh, R.K. Verma, A.P. Gupta, and S. Kumar. 1996. Isolation of high artemisinin-yielding clones of *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 43:993-1001.

Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh, and M.W. Bevan. 1987. GUS fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion maker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901-3907.

Jeong, J.H., D.C. Yang, H.G. Jang, and K.Y. Paek. 2000. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) using cold regulated gene (*BN115*). *Korean J. Plant Tissue Culture* 27(1):7-12

Jun, S.I., S.Y. Kwon, K.Y. Paek, and K.H. Paek. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of fertile transgenic plants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis* cv. 'springflavor'). *Plant Cell Reports* 14:620-625.

Kaster, K.R., S.G. Burgett, R.N. Rao, and T.D. Ingolia. 1983. Analysis of a bacterial hygromycin B resistance gene by transcriptional and translational fusions and by DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.* 11:6895-6899.

Kang, B.K., C.W. Lim, K.W. Chung, and Y.D. Park. 2001. Plant regeneration from cotyledon and hypocotyl tissues of Chinese cabbage. *Kor. J. Horti. Sci. & Tech.* 19(3):315-319.

Kim, S.H., I.S. Nou, C.S. Choi, and K.K. Kang. 2001. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa* L.) using iron storage protein ferritin gene. *Korean J. Plant Tissue Culture* 28(3):147-151.

Kim, T.G. and Y.S. Kim. 2000. Heterologous expression of *AmA1* gene encoding storage protein of amaranthus in transgenic lettuce (*Lactuca sativa*). *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 41(5):495-498.

Kim, Y.S., M.Y. Kim, T.H. Kwon, and M.S. Yang. 2003. Production of hGM-CSF from cell suspension culture of transformed lettuce using

Agrobacterium-mediated transformation system. Korean J. Plant Tissue Culture 30(1):97-102.

Kimura, M., L. Seveus, and K. Maramorosch. 1975. Ferritin in insect vectors of the Maize streak disease agent: Electron microscopy and electron microprobe analysis. J. Ultrastr. Res. 53:366-373.

Knoth, R., M. Wrischer, and J. Vetter. 1980. Phytoferritin accumulating plastids in the male generative cell of *Pelargonium X Hortorum* Bailey. Z. Pflanzenphysiol. 98:365-370.

Koeller, D.M., J.L. Casey, M.W. Hentze, E.M. Gerhardt, L.N. Chan, R.D. Klausner, and J.B. Harford. 1989. A cytosolic protein binds to structural elements within the iron regulatory region of the transferritin receptor mRNA. Proc Natl. Acad. Sci. USA 86:3574-3578.

Laughlin, J.C. 1994. Agricultural production of artemisinin--a review. Trans R Soc Trop Med. 88(1):S21-2.

Laulhere, J.P., A.M. Lescure, and J.F. Briat. 1988. Purification and characterization of ferritins from maize, pea and soybean seeds. J. Biol. Chem. 263:10289-10294.

Laulhere, J.P., A.M. Lescure, and J.F. Briat. 1989. Mechanism of the transition from plant ferritin to phytosiderin. J. Biol. Chem. 264:3629-3635.

Lazo, G.E. and P.A. Ludwig. 1991. A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. Bio. Technology 9:963-967.

Legue, V., F. Vilaine, M. Tepfer, and G. Perbal. 1994. Modification of the gravireopic response of seedling roots of rapeseed (*Brassica napus* transformed by *Agrobacterium rhizogenes* A4. Physiol. Plant. 91:559-566.

Lescure, A.M., D. Proudhon, H. Pesey, M. Ragland, E.C. Theil, and J.F. Briat. 1991. Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell

cultures. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:7958-7962.

Liu, B., H. Ye, G. Li, D. Chen, S. Geng, Y. Zhang, J. Chen, and J. Gao. 1998. Studies on dynamics of growth and biosynthesis of artemisinin in hairy roots of *Artemisia annua* L. Chin. J Biotechnol. 14(4):249-254.

Liu, W., W.A. Parrot, D.F. Dildebrand, G.B. Collins, and E.G. Williams. 1990. *Agrobacterium* induced gall formation in bell pepper (*Capsicum annum* L.) and formation of shoot-like structures expressing introduced genes. Plant Cell Reports 9:360-363.

Lobréaux, S. and J. Briat. 1991. Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. Biochem. J. 274:601-606.

Lobréaux, S., O. Massenet, and J.F. Briat. 1992. Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. Plant Mol. Biol. 19:563-575.

Lobréaux, S., T. Hardy, and J.F. Briat. 1993. Absciscic acid is involved in the iron-induced synthesis of maize ferritin. EMBO J. 12:651-657.

Loisy, I.F., L. Aussel, and J.F. Briat. 1996. Post-transcriptional regulation of plant ferritin accumulation on response to iron as observed in the maize mutants *ys1*. FEBS letters 397:149-154.

Longnecker, N. and R.M. Welch. 1990. Accumulation of apoplastic iron in plant roots. Plant Physiol. 92:17-22.

Maanich, C. and W. Schneider. 1941. Under die glykoside con *Digitalis orientalis* L. Arch. Pharm. 279:223-248.

Macouch, S.R., G. Kochert, Z.H. Yu, Z.Y. Wang, G.S. Khush, W.R. Coffman, and S.D. Tanksley. 1998. Molecular mapping of rice chromosomes. Theor. Appl. Genet. 76:815-829.

- Maramorosch, K. and H. Hirumi. 1973. Phytoferritin accumulations in leaves of diseased coconut palms. *Protoplasma* 78:175-180.
- Maria, R., J.-F. Briat, J. Gagnon, J.-P. Laulhere, O. Massenet, and E.C. Theil. 1990. Evidence for conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean. *J. Biol. Chem.* 265: 18339-18344.
- Mark, F.V.D., F. Bienfait, and H.V.D. Ende. 1983. Variable amounts of translatable ferritin mRNA in bean leaves with various iron contents. *Biochem. and Biophys. Res Comm.* 115(2):463-469.
- Marton, L. and J. Browse. 1991. Facile transformation of *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports* 10:235-239.
- Massover, W.H., J.C. Lacaze. and L. Durrieu. 1973. The ultrastructure of ferritin macromolecules. II Ultrahigh voltage electron microscopy (1-3 Mev). *J. Ultrastr. Res.* 43:460-475.
- Michael, J.S., M.T. Henzl, and P.J. Lammers. 1991. The structure of a *Phaseolus vulgaris* cDNA encoding the iron storage protein ferritin. *Plant Mol. Biol.* 17:499-504.
- Miki, B.L., H. Labbe, J. Hattori, T. Ouellet, J. Gabard, G. Sunohara, P.J. Charest, and V.N. Iyer. 1990. Transformation of *Brassica napus* canola cultivars with *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase genes and analysis of herbicide resistance. *Theor. Appl. Genet.* 80:449-458.
- Muir, A.R. 1960. The molecular structure of isolated and intracellular ferritin. *Quart. J. Exper. Physiol.* 45:192-201.
- Mullis, K.B. and F.A. Fallona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350.
- Mullner, E.W. and L. Kuhn. 1988. A stem loop in the 3' untranslated region

mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm. *Cell* 53:815-825.

Munro, H.N. and M.C. Linder. 1978. Ferritin: Structure, biosynthesis and role in iron metabolism. *Physiol. Rev.* 58:317-396.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.

Nam, H.K. and J.H. An. 1999. *Plant Molecular Biology Protocol*. Academic Publishers, Seoul Korea. pp.15-16.

Narasimhulu, S.B. and V.L. Chopra. 1988 Species specific shoot regeneration response of cotyledonary explants of Brassicas. *Plant Cell Reports* 7:104-106.

Neuhaus, G., G. Spangenberg, O.M. Scheid, and H.G. Schweiger. 1987. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryoid. *Theor. Appl. Genet.* 75:30-36.

Ooms, G., A. Bains, M. Burrell, A. Karp, D. Twell, and E. Wilcox. 1985. Genetic manipulation in cultivars of oilseed rape (*Brassica napus*) using *Agrobacterium*. *Theor. Appl. Genet.* 71:325-329.

Palmer, C.E. 1992. Enhance shoot regeneration from *Brassica campestris* by silver nitrate. *Plant Cell Reports* 11:541-545.

Park, H.Y. 1999. Studies on transformation of herbicide-resistance gene (*bar*) in hot pepper (*Capsicum annuum* L.). Dissertation for the degree of Master of Science of Seoul National University.

Pataki, S., K. Meyer, and T. Reichstein.. 1953. Die konfiguration des digoxygenins. *Experientia.* 9:253-254.

Pawlick, M., R.S. Sangwan, and B.S. Sangwon. 1992. Factors influencing the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of carrot (*Daucus carota*

- L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 31:129-139.
- Peat, A. and G.H. Banbury. 1968. Occurrence of ferritin-like particles in a fungus. *Planta* 79:268-270.
- Pechan, P.M. 1989. Successful cocultivation of *Brassica napus* microspore and proembryos with *Agrobacterium*. *Plant Cell Reports* 8:387-390.
- Peters, A.M. and A. van Amerongen. 1997. A study on the effects of sample pre-treatment on the amount of sesquiterpene lactones found in chicory (*Cichorium intybus* L.) by ELISA and by HPLC. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.* 1997. 204:189-193.
- Peters, A.M. and A. van Amerongen. 1998. Relationship between levels of sesquiterpene lactones in chicory and sensory evaluation. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123(2):326-329.
- Pigeaire, A., D. Abernethy, P.M. Smith, K. Simpson, N. Fletcher, C.Y. Lu, C.A. Atkins, and E. Cornish. 1997. Transformation of a grain legume (*Lupinus angustifolius* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer to shoot apices. *Molecular Breeding* 3(5):341-349.
- Ponce-Ortiz, Y. and R.R. Crichton. 1977. Isolation and characterization of plant ferritin. *Biochem. Soc. Trans.* 5:1128-1129.
- Proudhon, D., J.F. Briat, and A.M. Lescure. 1989. Iron induction of ferritin synthesis in soybean cell suspensions. *Plant Physiol.* 90:586-590.
- Radke, S.E., B.M. Andrews, M.M. Moloney, M.L. Crouch, J.C. Kridl, and V.C. Knauf. 1988. Transformation of *Brassica napus* L. using *Agrobacterium tumefaciens* developmentally regulated expression of a reintroduced napin gene. *Theor. Appl. Genet.* 75:685-694.
- Radke, S.E., J.C. Turner, and D. Facciotti. 1992. Transformation and regeneration of *Brassica rapa* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell*

Reports 11:499-505.

Ragland, M., J.F. Briat, J. Gagnon, J.P. Laulhere, O. Massenet, and E.C. Theil. 1990. Evidence for a conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean. *J. Biol. Chem.* 265:18339-18344.

Rao, R.N., N.E. Allen, J.N. Hobbs, W.E. Alborn, H.A. Kirst, and J.W. Paschal. 1983. Genetic and enzymatic basis of hygromycin B resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 24:689-695.

Rees, S.B. and J.B. Harborne. 1985. The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochemistry.* 24:2225-2231.

Reichstein, T. 1962. Besonderheiten der Zucker von herzartigen Glukosiden. *Angew Chem.* 74:887-918.

Riggs, C.D. and G.W. Bates. 1986. Stable transformation of tobacco by electroporation: Evidence for plasmid conjugation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83:5602-5606.

Robards, A.W. and P.G. Humpherson. 1967. Phytoferritin in plastids of the cambial zone of willow. *Planta* 76:169-178.

Rothenberger, S., E.W. Mullner, and L.C. Kuhn. 1990. The mRNA binding protein which controls ferritin and transferritin receptor expression is conserved during evolution. *Nucl. Acids Res.* 18:1175-1179.

Rouault, T.A., C.K. Teng, S. Kaptain, W.H. Burgess, D.J. Haile, F. Samaniego, O.W. McBride, J.B. Harford, and R.D. Klausner. 1990. Cloning of the cDNA encoding an RNA regulatory protein—the human iron-responsive element-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7958-962.

- Ryu, J.A., C.K. Kim, H.S. Lee, K.B. Chol, and D.C. Yang. 2001. Transformation of PAT gene into lettuce (*Lactuca sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. Korean J. Plant Tissue Culture 28(4):197-200.
- Saiki, R.K., S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for sickle cell anemia. Science 230:1350-1354.
- Seckbach, S. 1968. Studies on the deposition of plant ferritin as influenced by supply of iron to iron-deficient beans. J Ultrastructure Res. 22:313-423.
- Shull, G.E. and E.C. Theil. 1982. Translational control of ferritin synthesis by iron in embryonic reticulocytes of the bullfrog. J. Biol. Chem. 257:14187-14191.
- Singh, A.P. and M. Greer. 1980. Nicotine induced accumulation of phyto-ferritin in root tip cells of alfalfa (*Medicago sativa*). Cytologia 45:185-188.
- Sohn, J.K. and H.S. Cho. 1991. Transformation of *Brassica napus* using cotyledon tissue cocultivated with *Agrobacterium tumefaciens*. Korean J. Plant Tissue Culture 18:113-118.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.
- Spence, M.J., M.T. Henzl, and P.J. Lammers. 1991. The structure of a *phaseolus vulgaris* cDNA encoding the iron storage ferritin. Plant Mol. Biol. 117:499-504.
- Sprey, B., G. Gliem, and A.G.S. Janossy. 1977. Changes in the iron and phosphorus content of stroma inclusions during etioplast-chloroplast development in *Nicotiana*. Z. Naturforsch. 32c:138-139.
- Stephane, L., O. Massenet, and J.-F. Briat. 1992. Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. Plant Mol. Biol. 19:563-575.

Steven, R., G. Sczekan, and G.J. Jayant. 1987. Isolation and characterization of ferritin from soybeans (*Glycine max*). *The J. of Biological Chemistry* 262: 13780–13788.

Steven, R. and M. Meshnick. 2002. Invited review artemisinin: mechanisms of action, resistance and toxicity. *International Journal for Parasitology* 32:1655–1660.

Swanson, E.B. and L.R. Erickson. 1989. Haploid transformation in *Brassica napus* using an octopine-producing strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *Theor. Appl. Genet.* 78:831–835.

Theil, E.C. 1987. Ferritin: structure, gene, regulation, and cellular function in animals, plants and microorganisms. *Annu. Rev. Biochem.* 56:289–315.

Theil, E.C. 1990. Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. *J. of Biological Chemistry* 265:4771–4774.

Tiffin. L.O. 1966. Iron translocation. I. Plant culture, exudaic sampling, iron-citrate analysis. *Plant Physiol.* 41:510–514.

Tiffin. L.O., R.L. Chaney, and J.E. Ambler. 1973. Translocation. of iron from soybean cotyledons. *Plant Physiol.* 52:393–396.

Torres, A.C., D.J. Cantliffe, B. Langhner, M. Bienick, R. Nagata, M. Ashraf, and R.J. Ferl. 1993. Stable transformation of lettuce cultivar South Bay from cotyledon explants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 34:279–285.

Tumer, N.E., K.M.O. Connell, R.N. Nelson, P.R. Sanders, R.N Beachy, R.T. Fraley, and D.M. Shah. 1987. Expression of alfalfa mosaic virus coat gene confers cross-protection in transgenic tobacco and tomato. *EMBO J.* 6:1181–1188.

van der Mark, F., H.F. Bienfait, and H. van den Ende. 1983. Variable amounts of translatable ferritin mRNA in bean leaves with various iron

- contents. Biochemical and Biophysical Research Communications 115:463-469.
- van der Mark, F., M.L. van den Briel, J.W.A.M. van Oers, and H.F. Bienfait. 1982. Ferritin in bean leaves with constant and changing iron status. *Planta* 156:341-344.
- van der Mark, F., T. de Lange, and H.F. Bienfait. 1981. The role of ferritin in developing primary bean leaves under various light conditions. *Planta* 153:338-342.
- van der Mark F., W. van der Briel, and H.G. Huisman. 1983. Phytoferritin is synthesized in vitro as a high molecular weight precursor. *Biochem. J.* 214: 943-950.
- van Kavaveke, N., G. Engler, M. Holsters, S. van den Elsacker, I Zaenen, R.A. Schilperoort, and J. Schell. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* 252:169-170.
- Vartanian, N. and A. Berkloff. 1989. Drought adaptability of *Agrobacterium rhizogenes*-induced roots in oilseed rape (*Brassica napus* var. *oleifera*). *Plant Cell and Environment* 12:197-204.
- Vasconcelos, M., K. Datta, N. Oliva, M. Khalekuzzaman, L. Torrio, S. Krishnan, M. Oliverira, F. Goto, and S.K. Datta. 2003. Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the *ferritin* gene. *Plant Science* 164:371-378.
- Walden W.E., M.M. Patino, and L. Gaffeld. 1989. Purification of a specific repressor ferritin mRNA translation from rabbit liver. *J. Biol. Chem.* 264: 13765-13769.
- Wallaart, T.E., H.J. Bouwmeester, L. Poppinga, and N.C.A. Maijer. 2001. Amorpho-4,11-diene synthase: cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. *Planta* 212:460-465.

Wallaart, T.E., N. Pras, and W.J. Quax. 2000. Seasonal variations of artemisinin and its biosynthetic precursors in tetraploid *Artemisia annua* plants compared with the diploid wild-type. *Planta Med.* 66:57-62.

Wang, Y.H., S.R. Szcekan, and E.C. Theil. 1990. Structure of the 5' untranslated regulatory region of ferritin mRNA studied in solution. *Nucl. Acids Res.* 18:4463-4468.

Wei, J. and E.C. Theil. 2000. Identification and characterization of the iron regulatory element in the ferritin gene of plant (soy bean). *Journal of Biological Chemistry* 275:17488-17493.

White, K. and H.N. Munro. 1988. Induction of ferritin subunit synthesis by iron is regulated at both the transcriptional and translational levels. *J. Biol. Chem.* 263:8938-8942.

Wuytswinkel, O.V., G. Vansuyt, N. Grignon, P. Fouecroy, and J.F. Briat. 1998. Iron homeostasis alteration in transgenic tobacco overexpressing ferritin. *Plant J.* 17(1):93-97.

Zambryski, P., J. Tempe, and J. Schell. 1989. Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* 56:193-201.

Zahriger, J., B.S. Baliga, and H.N. Munro. 1976. Novel mechanism for translational control in regulation of ferritin synthesis by iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:857-861.