

아스파라긴 고 함량 나물 콩 중간모본 개발

Development of bean-sprout soybean population with high
asparagine content

동 아 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “아스파라긴 고 함량 나물 콩 중간모본 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2007년 5월 21일

주관연구기관명 : 동아대학교

총괄연구책임자 : 이 재 현

세부연구책임자 : 정 영 수

연 구 원 : 김 혜 정

연 구 원 : 박 민 정

협동연구기관명 : 경상대학교

협동연구책임자 : 정 종 일

요 약 문

I. 제 목

아스파라긴 고 함량 나물 콩 중간모본 개발을 위한 분자유종학적 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 나물 콩은 오래 전부터 식탁 음식 및 숙취해소용 등 식품 및 영양학적 기능 외에 저렴한 가격을 갖고 있기 때문에 건강 기능성 관련 유전자에 대한 클로닝 및 분석이 필요하다.
2. 국내 콩 유전자원을 germplasm source로 이용하여 아스파라긴 함량에 대한 유전양상신품종으로 육성하기 위하여 콩에 대한 종합적이고 체계적인 분류와 건강기능성 성분에 대한 실용적 기초조사가 필요하다.
3. 수집 · 분석된 나물콩 유전자원에서 콩나물 고 품질 · 수량 중간 모본의 선발이 필요하다.
4. 농업적으로 우수한 형질을 가진 소립나물콩 계통의 선발이 필요하다.
5. 식물체내에서 아스파라긴 함량을 축적시키기 위하여 아스파라기나제 유전자 클로닝 및 anti-sense gene construction을 하여 형질전환 식물에서 아스파라긴 함량을 측정이 필수적이다.
6. 아스파라기나제 형질전환체 나물콩의 중간모본을 선발하며, 고 아스파라긴 함량 나물 콩 중간 부 · 모본 이용 체계를 확립한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 아스파라기나제 유전자 클로닝 및 기능 분석
2. 수집된 야생종 및 재배종 콩에서 아스파라긴 함량 분석
3. 콩 형질전환 : 국내 콩 품종 재분화 검정
4. 아스파라기나제 antisense 콩 형질전환체의 아스파라긴 함량 분석

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 본 연구의 결과로 확보하게 될 콩 유전자원에 대한 체계적인 분류와 정보 및 유전자 database는 건강 기능성을 가진 콩 신품종을 육성하는데 매우 유용하게 쓰일 것이다.
2. 본 연구의 결과로 다양하고 종합적인 연구에 의한 콩의 유전자 클로닝 및 형질 전환 체계가 확립됨으로써, 기능성유전자에 대한 분자유전학, 생리생화학 및 생리유전학 등 생물 기초 연구분야 및 본 연구를 통하여 분자유전학과 유전학 혹은 유전학과 생리학 사이의 학문적 Gap을 제거 할 수 있는 교량역할을 함으로써, 기초 학문분야와 응용학문분야의 활성화에도 파급효과가 있을 것이다.
3. 콩에 대한 형질전환 체계가 확립됨으로써, 생명공학 기술을 도입한 콩 육성에 획기적인 기여를 하게 될 것이다.

SUMMARY

In order to obtain new soybean cultivar with high asparagine content for soybean sprout, we conducted molecular genetic analysis and soybean transformation technique and a traditional breeding method among collected various soybean pool. The active genome projects from several academically and economically important plants have provided sequence data of many genes and accumulated in Gene Bank data base promptly. However, molecular study of soybean has been extensively carried out.

Using subtractive suppression hybridization technique, we were able to isolate novel genes induced by low temperature stress in soybean. Among these genes, soybean asparaginase was characterized further to understand asparagine metabolism and make a use of it for soybean molecular breeding approach. Soybean asparaginase was induced by abiotic stresses and its enzymatic function was identified in *E. coli* cells by using expression system. Further, we constructed asparaginase antisense construct for soybean transformation.

Soybean transformation technique is very difficult and not consistently reproducible. However, difficulties to achieve the successful introduction of those valuable genes into plant can be found in recalcitrant genetic transformation procedure of some agriculturally important crops. Especially none of research group in Korea have succeeded to report any formal results on the production of genetically engineered soybean variety or research publication, even though there have been several GMO soybean varieties released from abroad soybean seed companies. To achieve long term goal for producing high-value soybean variety by genetic transformation, there are couple of procedures to be improved. First, genotype screen of Korean soybean varieties whether they are amenable to

Agro-infection and tissue culture responsive has to be done. Second, efficiency for genetic transformation has to be increased. In this study various experiments have been carried to achieve both proposed goals.

At last, we tried to collect a wide variety of soybean cultivar and crossed these to produce new lines. As a result, we were able to screen several lines with good agronomical traits. Furthermore, we found three lines showing higher asparagine content compared to that of Myoungjoo cultivar.

This study will provide new soybean cultivar with high asparagine content and good quality of agronomic traits.

C O N T E N T S

Chapter 1. Summary of research	7
Chapter 2. Current status of research area	10
Chapter 3. Results	13
Chapter 4. Achievements and contributions of results	58
Chapter 5. Application of results	60
Chapter 6. Scientific information from foreign research	62
Chapter 7. References	64

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	7
제 2 장 국내외 기술개발 현황	10
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	13
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	58
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	60
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	62
제 7 장 참고문헌	64

제 1 장 연구개발과제의 개요

I. 연구개발의 필요성

1. 연구의 배경

한반도에서 콩 (대두, soybean)은 약 기원전 1,500년경부터 재배되었을 것으로 추정되며, 쌀, 보리, 밀과 더불어 식생활에 중요한 식용작물이다. 또 인간 및 가축을 위한 주요 단백질 및 지방 공급원으로 이용가치가 점점 증가되고 있을 뿐만 아니라, 질소 고정균인 뿌리혹 박테리아가 콩의 뿌리에 공생하기 때문에 토양의 지력을 유지시키는 데 크나큰 역할을 해왔다. 콩은 극히 일부 지방을 제외하고는 기후가 알맞아 한반도 전역에 재배되고 있으며, 특히 남한에서는 어디에서나 널리 재배되고 있다. 또 시비량이나 농약의 투입이 적어서 환경 보존 면에서도 유리하며, 맥후작이나 간혹작 및 주위작 등 작부체계 면에서도 매우 유리한 특성을 지니고 있다. 그러나 오랜 재배 역사와 유리한 재배환경을 가지고 있음에도 불구하고, 최근 들어 콩의 수요가 크게 늘어나면서 전체 식용 콩 자급율은 35% 수준에 불과한 실정이다. 그래서 정부에서는 향후 세계 식량위기에 대처하기 위하여 2002년까지 45% 이상 식용 콩의 자급률을 높이기 위하여, 콩 육종사업에 많은 투자를 계획하고 있다.

일반적으로 콩 육종 목표는 시대적 요구에 따라 변화되며, 그 때의 농업 사정의 영향을 강하게 받는데, 무엇보다도 중요한 목적은 인간이 보다 효율적으로 이용할 수 있게 유전적인 특성을 개량하여, 양적 질적으로 우수한 품종을 만드는 것이 첫 번째 목표가 된다. 지금까지 선진국에서의 콩 육종 목표는 주로 수량증가, 단백질 및 지질의 질적 양적 개량 및 병해충 저항성 품종 육성을 위하여 많은 연구가 수행되어 왔다. 그러나 재배면적이 협소하고, 연구투자가 선진국에 비하여 적은 우리나라에서 콩 육종은 부가가치를 높일 수 있는 특수한 성분을 갖고 있는 건강기능성 품종육성을 통하여 연구의 차별화 및 연구의 선점을 이룸으로써, 콩 재배의 확대와 농가소득 증대를 꾀할 수 있다.

콩이 포함하고 있는 건강 기능성으로는 항암·항산화 효능, 그리고 골다공증, 신부전, 심장질환 등과 같은 만성질환에 대한 탁월한 예방효과가 있고 이와 같은 기능은 콩에 포함된 아이소플라본, 안토시아닌, 콩단백질, 펩타이드, 트립신 저해제, 사포닌 등과 같은 성분에 기인하는 것으로 알려져 왔다. 우리민족의 전통식품인 된장, 청국장, 콩나물 등과 두부, 두유 등과 같은 형태로 우리국민의 식생활과 선조 대대로 함께 해온 콩은 우리가 계속 섭취하고 식문화를 발전시켜야하는 중요한 농산

물임에 틀림없다. 이런 관점에서 국민들의 건강과 대두에 대한 관심과 소비증대를 위하여 콩의 건강기능성에 보다 초점이 맞춰진 신품종의 육성이 시급한 현실이라 하겠다. 특히 나물 콩은 예부터 가정에서 손쉽게 기를 수 있고 식품 영양학적 기능이 좋으며, 아스파라긴이 콩나물 뿌리에 높은 함량으로 존재하므로 숙취해소에 탁월한 효과가 있는 것으로 알려져왔다. 아스파라긴은 아스파라기나제에 의해 아스파테이트로 변환되는 것으로 알려져 있다. 아스파라기나제 유전자를 억제함으로써 아스파라긴이 아스파테이트로 변환되는 것을 방지하여 아스파라긴 함량을 분자유전학 및 생명공학적 방법을 이용하여, 고 아스파라긴 함량 나물 콩을 개발하며, 재래 육종학적 방법으로 만들어질 육종집단과, 생명공학적 방법으로 개발 될 형질전환체의 교잡을 통하여, 나물 콩에서 아스파라긴 함량이 높은 건강기능성 콩 신품종 생산을 위한 기초를 마련하기 위하여 이 연구를 수행하고자 한다.

2. 연구의 필요성

가. 기술적 측면

- 1) 나물콩은 오래 전부터 한방약으로 사용할 만큼, 식품 및 영양학적 기능 외에 탁월한 약효를 갖고 있기 때문에 건강 기능성 관련 유전자에 대한 클로닝 및 분석이 필요하다.
- 2) 국내 콩 유전자원을 germplasm source로 이용하여 신품종으로 육성하기 위하여 콩에 대한 종합적이고 체계적인 분류와 건강기능성 성분에 대한 실용적 기초조사가 필요하다.
- 3) 아스파라기나제 유전자 분리를 통하여 antisense 용 벡터 개발이 필요하다.
- 4) 생명공학기술을 실제적인 작물분자유종분야에 접목시키기 위해서는 형질전환기술의 개발이 필수적이다.
- 5) 세계적으로 유전자조작식물(GMO)에 대한 거부감에도 불구하고 각국의 농업관계연구기관과 회사들은 품종특성이 향상된 유전자조작식물 생산의 연구에 박차를 가하고 있는 실정이다.
- 6) 한반도는 세계적인 콩 유전자원의 원산지이며, 20,000여점이 넘는 다양한

germplasm을 확보하고 있음에도 불구하고 국내에서는 형질전환과 같은 바이오텍 기술을 이용한 콩 분야의 연구가 전무한 실정이다.

나. 경제·산업적 측면

1) WTO 체제 출범으로 농산물 수입 자유화에 따라 국내에서 생산되는 농작물은 일부를 제외하고는 국제경쟁력이 없으나, 기능성물질을 함유한 농작물의 개발은 국제경쟁력의 우위를 확보할 수 있는 고 소득작물로 인식되고 있다.

2) 농업분야의 치열한 국제 경쟁 속에 국내 농업의 경쟁력을 향상시키기 위하여 콩 유전자원의 효율적인 관리가 필요하며, 콩 유전자원을 학문적이고 체계적인 분류법에 의해 자원등록 함으로써, 국내 유전자원의 유출을 막고 국제적으로 유전자원의 권익을 보호받아야 한다.

3) 풍부한 유전자원의 효율적인 관리를 통하여, 품질 및 기능성이 향상된 21세기형 콩 신제품 생산의 기초를 마련함으로써 국내 콩 생산 및 수요 증대를 통해 농가소득 증대를 이루어야 한다.

4) 형질전환체 생산을 위하여 농업적으로 유용한 유전자나 프로모터를 이용해야 하는데, 이들은 대부분 국제특허로 묶여 있어서, 비싼 로열티를 주고 이용해야하는 실정이므로, 국내에서도 유전자 클로닝 및 프로모터 개발이 시급한 실정이다.

다. 사회·문화적 측면

1) 된장, 간장, 두부, 콩나물 등과 같은 다양한 형태의 민족전통음식의 재료로 쓰이고 있는 콩은 우리민족에게 없어서는 안될 한국 특이적이고 독특한 작물이다.

2) 국민의 건강과 직접 연관된 중요작물로서 콩 유전자원내 항암, 항산화 등 기능성 물질의 발굴을 통하여 식생활을 통한 국민건강을 증진시켜야 한다.

3) 근래에 식문화의 서구화로 어린 세대에서도 당뇨나 비만과 같은 성인병증세가 증가하고 있는데, 건강 기능성 품종개발을 통하여 건전한 식문화를 유도해야 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

I. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

1. 국내·외에서 기능성물질 관련 유전자의 기작에 대한 연구는 활발히 진행되고 있지만, 나물콩에서 기능성 물질인 아스파라긴 증가를 위한 연구는 시도되어진 바가 없다.
2. 나물콩의 아스파라긴은 다른 식물보다 양적 질적인 면에서 극히 우수하나, 국제적으로 나물콩 아스파라긴에 대한 연구는 극히 미약하므로, 국내에서 아스파라긴에 대한 연구가 선행된다면, 국제적 경쟁력을 선 점 할 수 있다.
3. 검정콩에서 형질전환을 이용하여 고 함량의 기능성 물질을 지닌 품종의 개발은 이루어진 적이 없다.
4. 현재 국내에서 콩 형질전환에 대한 연구는 전혀 이루어지고 있지 않음.
5. 형질전환체계의 확립을 위하여 품종들에 대한 조직배양적응성과 *Agrobacterium*의 감염여부에 대한 기초 스크린이 있어야 하는데 이와 같은 기초연구가 전무한 실정임
6. 미국에서는 이미 제초제 저항성 콩과 해충저항성 콩을 생산하여 품종화 하였으며, 최근에는 듀폰사에서 콩에 항암·항산화 성분이 보강된 건강 기능성 콩 품종을 육성하여 곧 시판할 예정임.

II. 앞으로의 전망

본 연구는 콩에서 스트레스를 주었을 때 특이적으로 발현되는 유전자를 선별하는 기초연구 뿐 아니라, 콩의 원산지인 만주 및 한반도 일대에 산재해 있는 수많은 야생종 및 재배종의 아스파라긴 함량 및 특성을 측정하여 asparagine pathway를 지배하는 유전자의 유전학적 연구를 기반으로 실제 육종 프로그램에 응용 가능한 토대를 마련하며, 클로닝된 농업적으로 유용한 유전자를 형질전환 하고, 안토시아닌의 기능성 연구, 품종 및 가공에 따른 함량변화와 특성을 규명하는데 목적이 있기 때문에, 식물

분자유전학 전공자, 작물육종학 전공자, 식품화학 전공자가 밀접하게 협력하여야 가능하다. 따라서 동아대학교 BK21 작물유전자원개발 팀에서 수행하고 있는 cDNA cloning, EST sequencing, Southern 및 Northern 분석, 형질전환 등 분자유전학적 접근방법과, 경상대학교에서 수행하고 있는 콩 육종연구 팀의 온실 및 포장실험 결과를 종합하고, 영남농업시험장에서 안토시아닌의 함량변이와 특성을 규명하여, 보다 체계적이며 전문적인 연구를 실시함으로써 장기적으로 콩의 건강기능성 및 내재해성 육종 모본을 만드는 토대를 마련할 수 있다.

앞으로 선진국의 바이오텍 기술은 계속 향상될 것으로 예상되며, 신기술의 개발과 더불어 바이오텍을 이용한 신품종 육성이 가속화 될 것으로 보이며, 신품종 육성의 방향도 고부가가치를 창출하기 위하여 기능성이 첨가된 품종 육성쪽으로 많은 연구가 집중될 것으로 전망된다.

III. 기술도입의 타당성

본 연구에 참여하는 연구진은 과제를 수행하기 위한 충분한 연구수행능력을 갖추고 있고, 해외에서도 본 연구진이 수행하려는 것과 같은 콩 유전자원에 대한 종합적이고 체계적인 연구수행시도는 없기에 이와 같은 연구를 수행하기 위한 기술도입의 필요성은 없음.

IV. 현기술의 취약점

1. 국내에는 수 많은 종류의 아스파라긴 고함량 나물 콩 유전자원이 존재 함에도 불구하고, 이에 대한 체계적인 조사와 연구가 미비하였고, 검정콩의 약리작용에 대한 연구가 극히 취약하다.
2. 위에 언급한 유전자들을 이용하여 형질전환 식물체를 만들고자 할 경우 유전자의 충분한 발현을 유도하기 위한 만족할 만한 국부적 식물발현백터가 없는 실정이다. 특히 식물체의 특정 기관 발현 프로모터, 특정 발달단계 발현 프로모터, 유도 발현 프로모터 등의 사용은 유전자의 발현 수준이 낮아 이에 관한 많은 노력이 요구되고 있다.

3. 콩은 재분화나 형질전환이 어려운 작물이며 지금까지 국내에서는 이에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있지 않은 실정이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

I. 연구개발 목표의 달성도

1. 저온스트레스 관련 유전자 library 확보 및 database구축 : 100 % 달성
 - subtractive library 제작 - 100 %
 - partial sequencing을 통한 EST database 구축 - 100 %
2. 수집된 야생종 및 재배종 콩에서 아스파라긴 함량 분석 : 100 %
 - 수집 나물콩 유전자원 증식 : 검정콩 유전자원 100계통 - 100 %
 - 증식 나물콩 유전자원 아스파라긴 분석 : 유전자원 선발 - 100 %
3. 아스파라기나제 유전자의 유전 분석 : 100 %
4. 콩 형질전환 : 국내 콩 품종 재분화 검정 : 100 %
 - 조직배양 배지조건 확립 및 선정 - 100 %
 - 국내 콩 품종 수집 및 재 분화 능력 검정 - 100 %

II. 연구수행 방법

1. 콩에서 저온, 상처 등 스트레스 관련 유전자 및 종피 착색단계별 유전자 선발

스트레스를 처리한 콩(tester)과 처리하지 않은 콩(driver)의 mRNA를 double-stranded cDNA로 전환하고, RsaI으로 digestion하여 일정한 크기로 만들어 tester를 둘로 나누어, 서로 다른 adapter를 ligation한 다음 2차례의 hybridization을 실시한다. 첫 번째 hybridization은 서로 다른 adapter를 가진 tester 각각의 tube에 driver를 넣고 1.5 μ l의 hybridization buffer (50 mM HEPES, pH 8.3, 0.5 M NaCl, 0.02 mM EDTA, pH 8.0, 10% (w/v) PEG 8000)에 혼합하여 98 $^{\circ}$ C에서 2분간 denaturation시키고 68 $^{\circ}$ C에서 8시간 동안 hybridization시킨다. 이들 sample을 denaturation시킨 driver와 함께 섞고, 68 $^{\circ}$ C에서 다시 hybridization한 다음 200 μ l의 dilution buffer (20 mM HEPES, pH 8.3, 50 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, pH 8.0)로 희석시켜 primer를 사용하여 PCR로 증폭시킨 뒤, T/A cloning (Invitrogen)을 하여 library를 제작한다. 종피 착색 전 콩 (1~20DAF)과 착색 후 콩(25~35DAF)의 시료를

채취하여 위와 같은 방법으로 library를 제작한다.

2. Sequencing

Cloning된 cDNA를 정제하여 dye termination method를 이용하여 증폭한 다음 ABI 310 Genetic Analyzer로 automatic sequencing을 한다.

3. Full gene cloning

분석하여 선발된 clone들은 유전자의 일부분이므로 full sequence를 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 기법을 이용하여 확보한다. 일부만이 분석된 sequence로부터 specific primer를 만들어 밝혀지지 않은 부분까지 증폭하는 방법이다. 2 μg 의 mRNA와 1 μl 의 cDNA synthesis primer (10 μM)를 잘 섞은 후 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분간 처리한다. 2 μl 의 5X first strand buffer와 1 μl 의 dNTP (10 mM), 1 μl 의 MMLV reverse transcriptase (100 U/ μl)를 혼합시킨 후에 42 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간동안 반응하여 first-strand cDNA를 만들고, 이어서 16 μl 의 5X second strand buffer와 1.6 μl 의 dNTP (10 mM), 4 μl 의 20X second strand enzyme cocktail을 잘 혼합하여 16 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 반응시킨 후에 10 unit의 T4 DNA polymerase를 넣어서 같은 온도에서 1시간 반응시켜 second-strand cDNA를 만든다. 이렇게 만든 double-stranded cDNA에 2 μl cDNA adaptor (10 μM), 2 μl 의 5X DNA ligase buffer와 1 μl 의 T4 DNA ligase (1 U/ μl)를 잘 섞고 16 $^{\circ}\text{C}$ 에서 overnight ligation을 수행한다. adapter primer와 gene specific primer를 사용하여 PCR을 수행한다.

4. 나물 콩 형질전환 기술개발

가. 재료: 은하, 안평, 백은, 다채, 대원, 장미, 소진, 소명콩 등

나. 실험내용; 종자는 70% ethanol에 30초간 담궈 1차 표면살균을 하고 1% sodium hypochloride에 30분간 shaking 하면서 소독한 후, 10분 간격으로 멸균수로 3회 수세하였다. Petri-dish에 파종 후 24 $^{\circ}\text{C}$ 배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 5일간 발아시켰다.

콩의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 supervector pTOK233을 가지고 있는 LBA4404를 사용하였다. *Agrobacterium*은 형질전환 3일 전 hygromycin 50mg/ ℓ 이 포함된 고체 YEP 배지(yeast 5g/ ℓ , pepton 5g/ ℓ , NaCl 2.5g/ ℓ , pH 7.0)에 streaking 한 후, 28 $^{\circ}\text{C}$ incubator에서 3일간 배양하였다. 공배양 배지로는 100 μM 의

acetosyringone이 포함된 AAM 배지{AAM salts and amino acids(Toriyama and Hinata, 1985), MS vitamins(Murashigs and Skoog, 1962), casamino acid 0.5g/l, sucrose 68.5g/l, glucose 36g/l, pH 5.2}를 사용하였다. 형질전환 당일 왕성히 자란 *Agrobacterium*을 50ml 코닝튜브에 AAM 액체배지를 30ml 채운 후 spetula를 이용하여 OD값 0.5정도의 혼탁액이 되도록 풀어 넣었다. 발아한 식물체의 hypocotyl을 떡잎 밑 약 1cm되는 곳에서 자른 후 양 떡잎 사이로 메스를 넣어 하배축까지 수직으로 자르고 새로 나온 본엽을 제거하였다. 떡잎 기부에서 위로 약 0.5cm와 아래 하배축쪽으로 약 0.1cm 이내의 부위를 scalpel을 이용하여 7-12회 반복하여 상처 내었다. *Agrobacterium*을 희석시킨 AAM 배지에 상처를 낸 떡잎을 20분간 접촉시킨 후 flat side를 배지쪽으로 치상하여 3일 간 24°C에서 암배양시켰다. 3일간 공배양 후 *Agrobacterium*의 제균을 위하여 멸균수로 2회 세척한 후 500mg/l의 cefotaxime과 0.05%의 Triton X-100이 포함된 멸균수로 5회 세척하였다. 30ml의 세척 용액을 넣은 50ml 코닝 튜브에 떡잎을 넣었으며, mini 3D-shaker를 이용하여 매회 20분간 상하로 shaking 하였다. 5회 세척된 떡잎은 SI(shoot induction; B5 salt 3.16g/l, BAP 1.67mg/l, sucrose 3%, Agar 0.6%)-①(cefotaxime 500mg/l, hygromycin 30mg/l) 배지에 치상하여 24°C 배양실에서 신초발생을 관찰하였다. 그후 2주 간격으로 SI-②(cefotaxime 200mg/l, hygromycin 10mg/l), SI-③(cefotaxime 100mg/l, hygromycine 10mg/l)로 옮겨 치상하면서 관찰하였다. 형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronic acid (X-Gluc)을 150 μ l dimethyl formamide에 녹인 후, 850 μ l의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. SI 배지 치상 후 0.5cm 크기로 자란 shoot 및 callus는 절단하여 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37°C incubator에서 overnight 처리 하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4°C에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

5. 아스파라긴 양상 분석 및 안토시아닌 induction 조건설정

<기존 시료 전처리법>

시료 약 10g을 70 % EtOH 50 ml에 혼합하여 초음파를 이용하여 추출한다. 추출이 완료되면 3000 rpm에서 20분간 원심분리하고 상등액 1ml 을 취하여 감압 상태에서 완전 건조한 후 0.5 ml Loading Buffer 로 재용해한다. Filter 후 적량 injection 한다.

<시료 전처리법>

시료 약 2g에 70 % EtOH 10ml를 혼합하여 2시간 정도 초음파를 이용하여 추출하였다. 추출 후 원심분리기를 이용하여 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 상등액 1ml를 취하여 원심진공농축기에서 완전 건조하여 Loading Buffer를 1ml 넣어 재용해한다. 0.2um membrane filter로 filter한 후 40ul를 injection하였다.

<asparagine 함량 분석 program>

- * 장비명 : 아미노산분석기(amino acid analyser)
- * 모델명 : Biochrom 30
- * 제조사 : Biochrom Ltd(영국)
- * 분석시 사용되는 buffer

	Buffer명	Molarity	pH
Buffer 1	Lithium citrate buffer(A)	0.20	2.80
Buffer 2	Lithium citrate buffer(B)	0.30	3.00
Buffer 3	Lithium citrate buffer(C II)	0.50	3.15
Buffer 6	Lithium Hydroxide solution	0.30	-
Reagent	Ninhydrin solution	-	-

- * Flow rate : buffer - 25ml/h
 ninhydrin - 20ml/h

* Program

No	Time	Temp	Buffer	Pump	Nin
1	01:00	31	1	20.0ml/h	ON
2	01:00	31	1	20.0ml/h	ON
3	08:30	31	1	20.0ml/h	ON
4	38:00	31	2	20.0ml/h	ON
5	16:00	42	3	20.0ml/h	ON
6	06:00	80	6	20.0ml/h	ON
7	06:00	80	1	20.0ml/h	ON
8	20:00	31	1	25.0ml/h	OFF
9	08:00	31	1	20.0ml/h	ON

⇒ 총 분석시간 : 104분 30초

Ⅲ. 연구수행 내용 및 결과

제1세부과제: 아스파라기나제 유전자 클로닝 및 분석

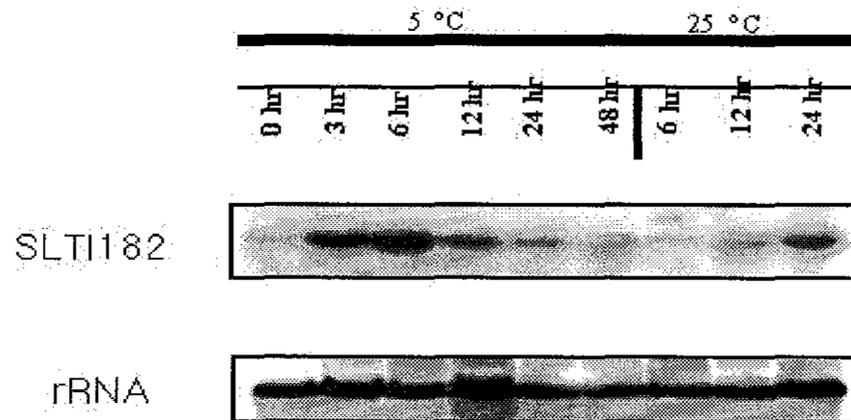
연구에 사용할 재료를 확보하고, 콩에 한발, 저온 및 상처 등 외부 스트레스를 처리한 것을 단계별로 mRNA를 추출하고, SSH방법으로 차별 발현되는 cDNA library를 각각 만든다. 이들의 염기서열을 분석하여 homology search를 하며, 다양한 Northern 분석으로 기능을 확인하여 EST database를 구축.

- 재료 확보 및 처리.
- subtractive library 제작.
- partial sequencing을 통한 EST database 구축.
- 다양한 Northern 분석을 이용한 유전자 기능규명

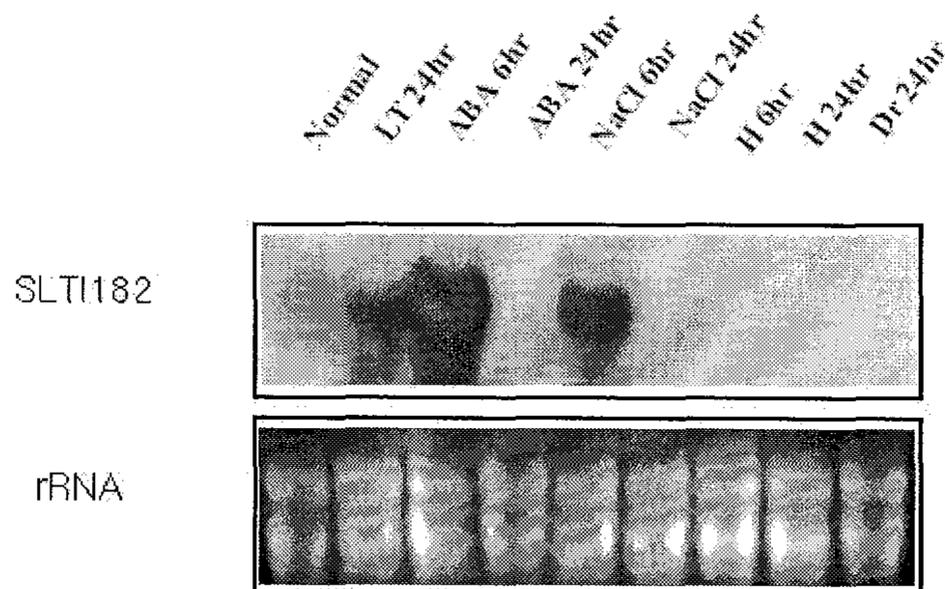
아스파라기나제 유전자 클로닝 및 분석

· I-asparaginase 유전자 : 저온초기에 발현되는 유전자인 LT182 클론은 I-asparaginase를 암호화하는 것으로 나타났다. I-asparaginase는 콩과식물의 질소원 분배에 중요한 역할을 할 것으로 여겨지는 효소로서 아스파라긴을 아스파틱산과 암모니아로 분해하는 기능을 한다. 특히, 아스파라긴은 콩나물 뿌리에 많이 존재하는데, 예로부터 숙취에 콩나물이 좋다고 하는 근거가 바로 아스파라긴 함량에 있다고 하였다. GmASP1 유전자 발현을 억제할 수 있다면, I-asparaginase이 아스파라긴을 분해하는 것을 막음으로서 콩나물의 아스파라긴 함량을 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 GmASP1의 기능을 확인하기 위해 역시 hairy root system을 통해 형질 전환된 hairy root에서의 아스파라긴 함량이 증가하는지를 현재 진행 중에 있다.

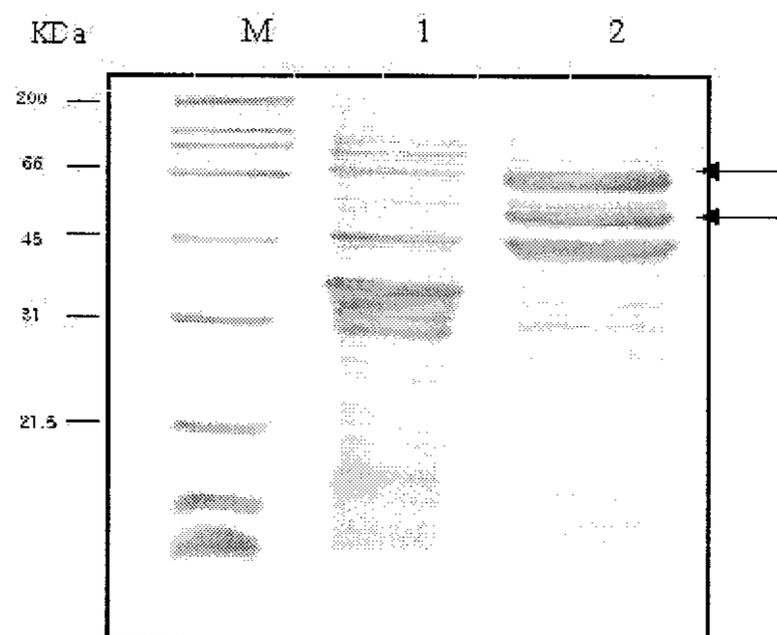
Northern analysis during 5 °C and 25 °C



Northern analysis on various stress treatments

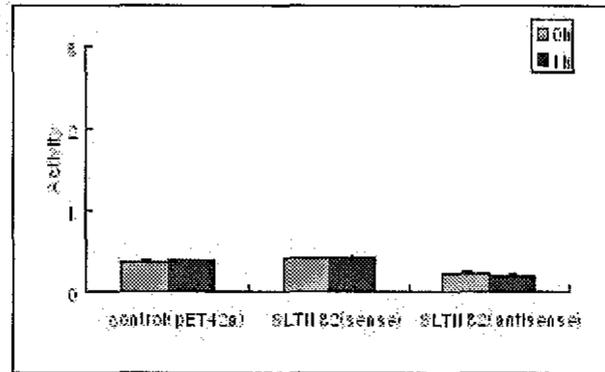


SDS-PAGE analysis of recombinant SLT1182 protein overexpressed in *E. coli*

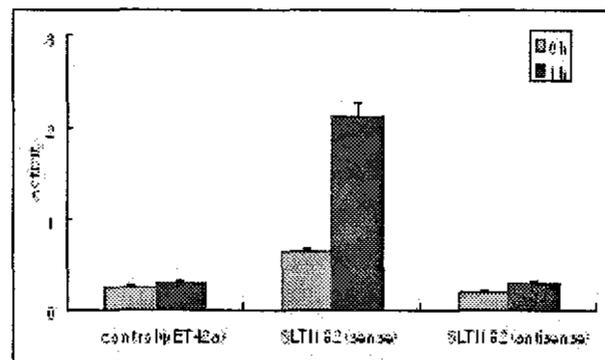


The effect of asparagine on the activity of I-asparaginase

1. (-) asparagine



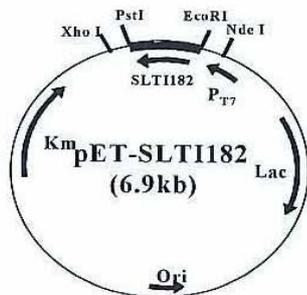
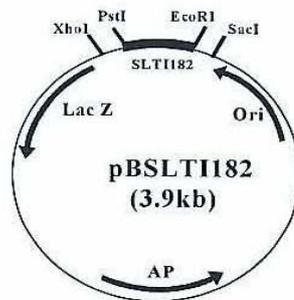
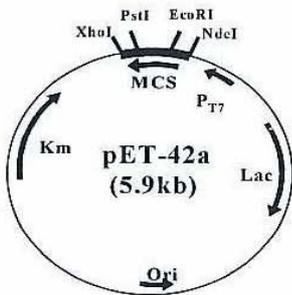
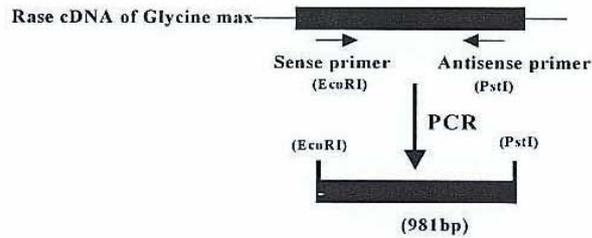
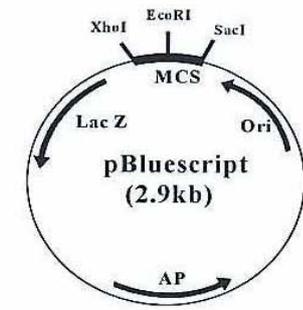
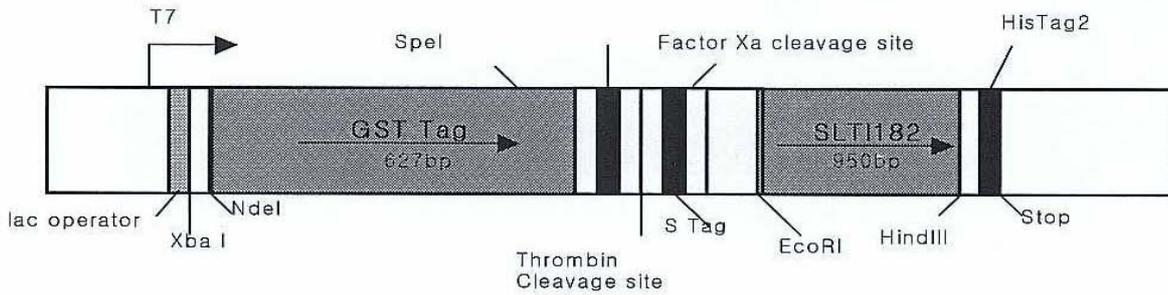
2. (+) asparagine



아스파라긴 함량 측정

- 정제된 단백질을 Bradford법으로 정량하여, 50 μ g를 활성 측정 농도로 이용.
- asparaginase 활성측정은 Fawcett과 Scott의 방법을 이용.
- 기질은 asparagine과 완충용액은 KCl이 첨가된 phosphate buffered saline 이용.
- 반응온도는 25 $^{\circ}$ C, 반응시간은 1시간으로 하고, 정지시약은 trichloroacetic acid (TCA)를 이용.
- 함량 측정은 UV spectrophotometer이용하여, 450nm에서 흡광도를 측정.

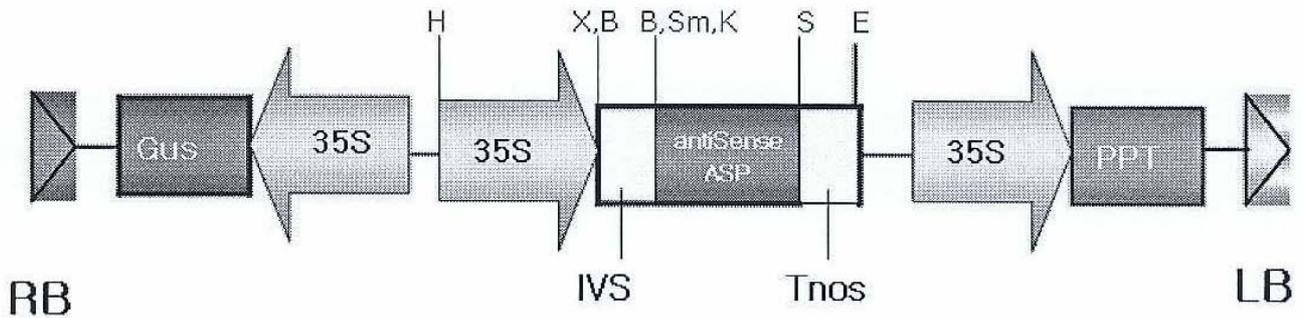
아스파라기나제 유전자 클로닝 및 anti-sense gene construction



제2세부과제 : 나물 콩 형질전환 기술 개발

제 1절 콩 형질전환 도입 유전자 발현 벡터 제작

(그림1)



(그림2)

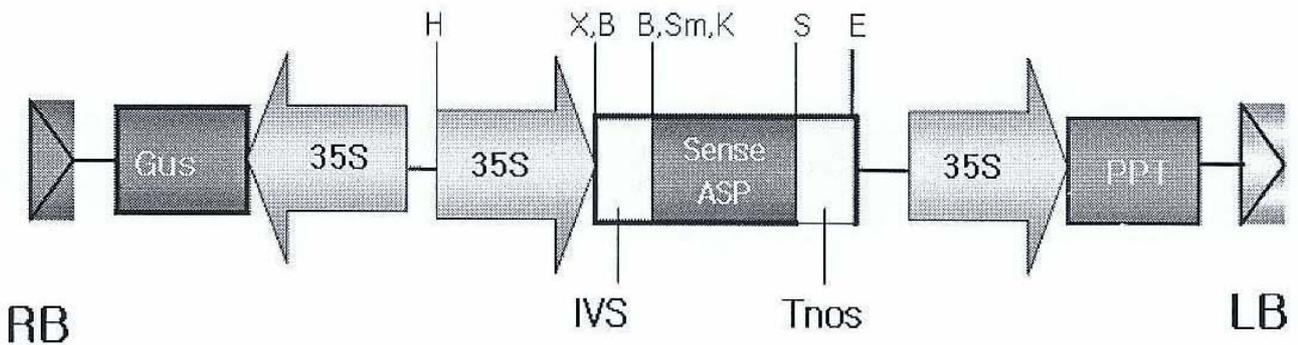


그림1, pCAMBIA3301-182(sense)Asparaginase vector

그림2, pCAMBIA3301-182(antisense)Asparaginase vector

RB, right border; LB, left border; PPT, DL-phosphinothricin resistance;

GUS, β -glucuronidase; 35S, CaMV 35S promoter;

Tnos, terminator of nopaline synthase;

B, BamH I; E, EcoR I; H, Hind III; K, Kpn I; S, Sac I; Sm, Sma I; X,
Xba I

1. pCAMBIA3301-182(sense)Asparaginase Construct

182(sense)Asparaginase는 콩[Glycine max (L.) Merr.] 유래 유전자이며 subcloning을 위한 cDNA fragment는 PCR에 의해 준비되었다. PCR 증폭을 위해 사용된 primer는 182(sense)-5' (5'-GGTACCATGGGAGGGTGGGCTATC-3') 과 182(sense)-3' (5'-GAGCTCTTCCCAGATTCCGACCTC-3')이다. PCR은 TaKaRa사의 TaKaRa LA TagTM을 사용하였으며 혼합용액은 다음과 같다. DNA Library (0.1 μ g/1 μ l) 2 μ l, GSP(Gene-Specific Primer:20pmole) 2 μ l, Tag polymerase 0.5 μ l, 10X LA PCRTM buffer 5 μ l, dNTP(2.5mM) 8 μ l, MgCl₂(2.5mM) 5 μ l, Deionized H₂O 25.5 μ l를 넣은 후 잘 섞어주었다. PCR 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 predenaturation 시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 30초간 denaturation, 55 $^{\circ}$ C에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 90초간 extension을 35cycle, 72 $^{\circ}$ C 5분간 postextension한 후 4 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 그리고 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 postextension하였다.

182(sense)Asparaginase cDNA fragment와 pCAMBIA3301-IVS vector는 Kpn I 과 Sac I을 사용하여 37 $^{\circ}$ C에서 16시간동안 제한효소 처리 되었으며 Gel Purification 과정은 BD Biosciences의 NucleoTrap[®] Nucleic Acid Purification Kit를 사용하였으며 TaKaRa DNA Ligase kit를 이용하여 Ligation하였다. Ligation 후 invitrogen사의 DH5a를 competent cell로 사용하여 Transformation 하였다. Transformation 방법은 다음과 같다. 먼저 ice에서 녹인 30 μ g의 DH5a competent cell에 Ligation 해 놓은 것을 3 μ l를 넣어주었다. Ice에서 30분 동안 처리한 후, 38 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 Heat-Shock을 주고 다시 ice에서 2분 동안 처리하였다. 여기에 SOC medium을 200 μ l 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 250rpm에서 1시간 배양시켰다. Kanamycine 100ppm을 포함하는 LB medium에 배양된 competent cell을 100 μ l씩 구슬을 이용하여 spread 해주고 37 $^{\circ}$ C incubator에서 overnight 하였다. Construct된 pCAMBIA3301-182(sense)Asparaginase vector는 *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105에 transform되었다. Transformation 방법은 다음

과 같다. 먼저 ice에서 녹인 100 μg 의 *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105에 construct된 pCAMBIA3301-182(sense)Asparaginase vector를 2 μl 를 넣어준 후 Bio-RAD사의 Gene Pulser[®] Cuvette로 옮긴다. Bio-RAD사의 Gene Pulser[™]을 사용하여 1.8kv의 전기 충격을 준 후 SOC medium을 600 μl 첨가하여 28 $^{\circ}\text{C}$ 250rpm에서 1시간 배양시켰다. Kanamycine 100ppm, Rifampicin 25ppm을 포함하는 YEP medium에 배양된 competent cell을 100 μl 씩 구슬을 이용하여 spread 해주고 28 $^{\circ}\text{C}$ incubator에서 3일간 배양하였다.

2. pCAMBIA3301-182(antisense)Asparaginase Construct

182(antisense)Asparaginase는 콩[Glycine max (L.) Merr.] 유래 유전자이며 subcloning을 위한 cDNA fragment는 PCR에 의해 준비되었다. PCR 증폭을 위해 사용된 primer는 182(antisense)-5' (5'-GGTACCTTCCCAGATTCCGACCTC-3') 과 182(antisense)-3' (5'-GAGCTCATGGGAGGGTGGGCTATC-3')이다. PCR은 TaKaRa사의 TaKaRa LA Tag[™]을 사용하였으며 혼합용액은 다음과 같다. DNA Library (0.1 $\mu\text{g}/1\mu\text{l}$) 2 μl , GSP(Gene-Specific Primer:20pmole) 2 μl , Tag polymerase 0.5 μl , 10X LA PCR[™] buffer 5 μl , dNTP(2.5mM) 8 μl , MgCl₂(2.5mM) 5 μl , Deionized H₂O 25.5 μl 를 넣은 후 잘 섞어주었다. PCR 조건은 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 predenaturation 시킨 후, 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 denaturation, 55 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초간 annealing, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 90초간 extension을 35cycle, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5분간 postextension한 후 4 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 그리고 마지막으로 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분간 postextension하였다.

182(antisense)Asparaginase cDNA fragment와 pCAMBIA3301-IVS vector는 Kpn I 과 Sac I 을 사용하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 16시간동안 제한효소 처리 되었으며 Gel Purification 과정은 BD Biosciences의 NucleoTrap[®] Nucleic Acid Purification Kit를 사용하였으며 TaKaRa DNA Ligase kit를 이용하여 Ligation하였다. Ligation 후 invitrogen사의 DH5 α 를 competent cell로 사용하여 Transformation하였다. Transformation 방법은 다음과 같다. 먼저 ice에서

녹인 30 μ g의 DH5a competent cell에 Ligation 해 놓은 것을 3 μ l를 넣어주었다. Ice에서 30분 동안 처리한 후, 38 $^{\circ}$ C에서 30초 동안 Heat-Shock을 주고 다시 ice에서 2분 동안 처리하였다. 여기에 SOC medium을 200 μ l 첨가하여 37 $^{\circ}$ C 250rpm에서 1시간 배양시켰다. Kanamycine 100ppm을 포함하는 LB medium에 배양된 competent cell을 100 μ l씩 구슬을 이용하여 spread 해주고 37 $^{\circ}$ C incubator에서 overnight 하였다. Construct된 pCAMBIA3301-182 (*antisense*)*Asparaginase* vector는 *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105에 transform되었다. Transformation 방법은 다음과 같다. 먼저 ice에서 녹인 100 μ g의 *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105에 construct된 pCAMBIA3301-182(*antisense*)*Asparaginase* vector를 2 μ l를 넣어준 후 Bio-RAD사의 Gene Pulser[®] Cuvette로 옮긴다. Bio-RAD사의 Gene Pulser[™]을 사용하여 1.8kv의 전기 충격을 준 후 SOC medium을 600 μ l 첨가하여 28 $^{\circ}$ C 250rpm에서 1시간 배양시켰다. Kanamycine 100ppm, Rifampicin 25ppm을 포함하는 YEP medium에 배양된 competent cell을 100 μ l씩 구슬을 이용하여 spread 해주고 28 $^{\circ}$ C incubator에서 3일간 배양하였다.

제 2 절 국내 콩 품종 형질전환 순응형 genotype 스크린

1. 실험목적

국내 콩 장러품종을 새로운 형질전환 방법으로 재실험하여 아그로박테리움 감염에 순응적이고 형질전환 효율이 높아 형질전환 재료로 사용될 최적의 유전자형을 찾아내기 위하여 실험을 수행하였다.

2. 재료

검정새울콩, 검정올콩, 검정콩 1호, 검정콩 2호, 검정콩 3, 검정콩 4호, 광안콩, 남해콩, 다울콩, 다원콩, 다진꽃콩, 다채콩, 단미꽃콩, 단백콩, 대망콩, 대원콩,

대풍콩, 대황콩, 두유콩, 만리콩, 명주나물콩, 무한콩, 보광콩, 백운콩, 삼남콩, 석량꽃콩, 선녹콩, 선유콩, 선흑콩, 소담콩, 소명콩, 소록콩, 소원콩, 소진콩, 신기콩, 신록콩, 신평달콩, 새알콩, 새올콩, 안평콩, 은하콩, 일미콩, 일품검정콩, 장수콩, 장미콩, 장엽콩, 장원콩, 진율콩, 진품콩, 진품2호콩, 청두1호, 청자콩, 청자콩2호, 청자콩3호, 큰올콩, 태광콩, 푸른콩, 황금콩, 화엄꽃콩 등 총 59개의 품종을 재료로 사용하였다.

3. 방법

가) 파종

종자는 강염산(12N)에 락스를 혼합하여 발생시킨 chlorine gas에 소독을 한 뒤 1% sodium hypochlorite에 30분간 shaking 하면서 2차 소독을 하였다, 10분 간격으로 멸균수로 3회 수세하였다. GM(germination medium; B5 salt 3.16g/ℓ, MES 3mM, sucrose 3%, Agar 0.8%, pH 5.8)에 파종 후 24℃ 배양실에서 16시간 광조건과 8시간 암조건으로 5일간 발아시켰다.

나) *Agrobacterium* preparation

콩의 형질전환을 위하여 이용된 *Agrobacterium*은 expression vector PCAMBIA1301(Hyg^R 포함)과 PCAMBIA3301(PPT^R 포함)이 있는 KYRT1과 EHA105를 사용하였다. 고체 YEP medium [kanamycin 100mg/ℓ, rifampicin 25mg/ℓ, peptone 10g/ℓ, NaCl 5g/ℓ, yeast extract 5g/ℓ, 1.5%(w/v)agar (pH 7.0)]에 streaking 한 후 25℃에서 배양하여 생성된 single colony를 같은 항생제가 들어 있는 액체 YEP medium 10ml에 넣고 OD650 0.8이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다. 다 자란 culture에 30% glycerol stock 10ml을 넣고 vortex한 뒤, 1.5ml tube에 1ml씩 분주하여 액체질소로 급속 냉각하여 -70℃에서 보관하였다. 접종 하루 전에 항생제가 들어있는 액체 YEP medium 200ml에 -70℃에서 보관해 놓은 *Agrobacterium tumefaciens* stock(competent cell)을 1ml 넣고 OD650이 0.8~1.0이 될 때까지 25℃에서 250rpm으로 shaking하였다.

접종 당일에 액체 YEP medium 200ml을 50ml씩 나눠서 20℃, 3270g에서 10

분 동안 centrifuge하였다. 각각의 tube에 있는 *A. tumefaciens* pellet을 액체 CCM(co-cultivation medium; B5 salt 0.316g/ℓ, BA 1.67mg/ℓ, MES 20mM, GA₃ 0.25mg/ℓ, acetosyringone 0.2mM, L-Cysteine 3.3mM, Sodium thiosulfate 1.0mM, DTT 1.0mM, sucrose 3%, pH 5.4)에 고농도와 저농도로 나눠 부유시켰다. 고농도 농축액은 액체 CCM을 3ml 넣고, 저농도 액체 CCM을 25ml 넣어 만들었다.

다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

발아한 식물체의 hypocotyl을 떡잎 밑 약 1cm되는 곳에서 자른 후 양 떡잎 사이로 axillary bud와 cotyledonary node를 현미경으로 보면서 scalpel(#11 blade)로 10회 정도 상처를 내었다. 이 때 scalpel에 3ml 농축액을 묻힌 다음 target 부위에 상처를 내었다. 대략 50개 정도의 explants를 25ml co-cultivation/*A. tumefaciens*에 넣고 sonication 10초, 데시게이터와 다이어프램펌프를 이용해 vacuum 30초 처리를 한 뒤 30분 동안 접종시켰다.

Explants를 tube에서 꺼내 멸균한 filter paper위에 놓고 물기를 제거한 뒤, 고체 CCM(액체와 동일, Agar 0.7%)에도 filter paper를 한 장 깔고 15개체 내외로 올려 두었다(adaxial side down). Micropore로 봉한 뒤 25℃에 5일 동안 암배양하였다.

라) Wash-out and shoot induction

5일간 co-cultivation 후에 제균을 위해서 액체 1/2 SIM(shoot induction medium)에 간단히 wash-out하였다. Explants를 filter paper위에 놓고 물기를 제거한 뒤 선 발항생제가 없는 SI-①(shoot induction; B5 salt 3.16g/ℓ, BA 1.67mg/ℓ, MES 3mM, sucrose 3%, Agar 0.8%, cefotaxime 500mg/ℓ, pH 5.6)에 한 plate당 7개체씩 배지와 직각이 되도록 세워서 치상하였다.

2주 후 shoot이 나온 explants를 선발항생제가 들어있는 SI-②(shoot induction; B5 salt 3.16g/ℓ, MES 3mM, BA 1.67mg/ℓ, sucrose 3%, Agar 0.8%, cefotaxime 500mg/ℓ, hygromycin B 10mg/ℓ or DL-phosphinothricin 10mg/ℓ, pH 5.6)에 치상하였는데, 이 때 shoot을 제외한 나머지 부분

은 잘라버리고 adaxial side down으로 치상하였다.

2주 후 갈변한 shoot/shoot pad는 scalpel(#15 blade)로 깎아내고 선발항생제가 들어있는 SEM(shoot elongation; MS salt 4.4g/l, MES 3mM, GA₃ 0.5mg/l, Asparagine 50mg/l, Pyroglutamic acid 100mg/l, IAA 0.1mg/l, Zeatin-riboside 1mg/l, silver nitrate 10mg/l, sucrose 3%, Agar 0.8%, cefotaxime 500mg/l, hygromycin B 10mg/l or DL-phosphinothricin 5mg/l, pH 5.6)에 치상하였다.

마) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronide (X-Gluc)을 150 μ l dimethyl formamide에 녹인 후, 850 μ l의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. 5일간의 공배양이 끝난 후부터 각 단계마다 식물체와 shoot을 절단하여 GUS 발색용액을 첨가한 후, 37°C incubator에서 overnight 처리하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4°C에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

4. 결과

59개의 국내 콩 품종 형질전환 순응형 스크린 실험의 결과는 아래와 같다. 사용된 59개의 품종 가운데 56개에서 GUS 유전자의 발현이 확인되었으며 소진콩, 광안콩, 다채콩, 백운콩, 청자콩2호에서 높은 수준(+++이상)의 GUS발현이 확인되었다(아래 표, 그림참조). 다원콩, 단백콩, 대원콩, 명주나물콩, 무한콩, 소명콩, 소록콩, 실파달콩, 은하콩, 일품검정콩, 장수콩, 진율콩, 청자콩, 태광콩, 화엄꽃콩도 어느 정도 *Agrobacterium*의 감염에 순응하는 것으로 나타났다. 소진콩은 매우 강한 *Agrobacterium* 감염을 나타내었지만, shoot 형성 능력이 떨어지는 것으로 나타나 유전자 도입과 더불어 품종의 조직배양반응이 형질전환에 영향을 주는 중요한 요인이라는 것을 보여주었다. *Agrobacterium* 감염에 순응적인 품종들은 대부분 나물콩인 것으로 나타났으며 GUS positive,

shoot 발생을 등을 고려하여 은하콩과 광안콩을 이후 형질전환효율을 높이기 위한 실험에 사용하였다.

표 1. 국내 콩 품종 형질전환 순응형 genotype 스크린

품종	GUS효율	품종	GUS효율	품종	GUS효율
검정새울콩	+	보광콩	++	일미콩	+
검정울콩	+	백운콩	+++	일품검정콩	++
검정콩 1호		삼남콩	+	장수콩	++
검정콩 2호		석량꽃콩	+	장미콩	+
검정콩 3호	+	선녹콩	+	장엽콩	+
검정콩 4호	+	선유콩	+	장원콩	+
광안콩	+++	선흑콩	+	진을콩	++
남해콩	+	소담콩	+	진품콩	+
다을콩	+	소명콩	++	진품2호콩	+
다원콩	++	소록콩	++	청두1호	+
다진꽃콩	+	소원콩	+	청자콩	++
다채콩	+++	소진콩	++++	청자콩2호	+++
단미꽃콩	+	신기콩	+	청자콩3호	+
단백콩	++	신록콩	+	큰을콩	+
대망콩	+	신팔달콩	++	태광콩	++

대원콩	++	새알콩	+	푸른콩	+
두유콩	+	새올콩	+	황금콩	+
명주나물콩	++	안평콩	+	화엄꽃콩	++
무한콩	++	은하콩	++		

제 3 절 현미경을 이용한 콩 형질전환

1. 목적

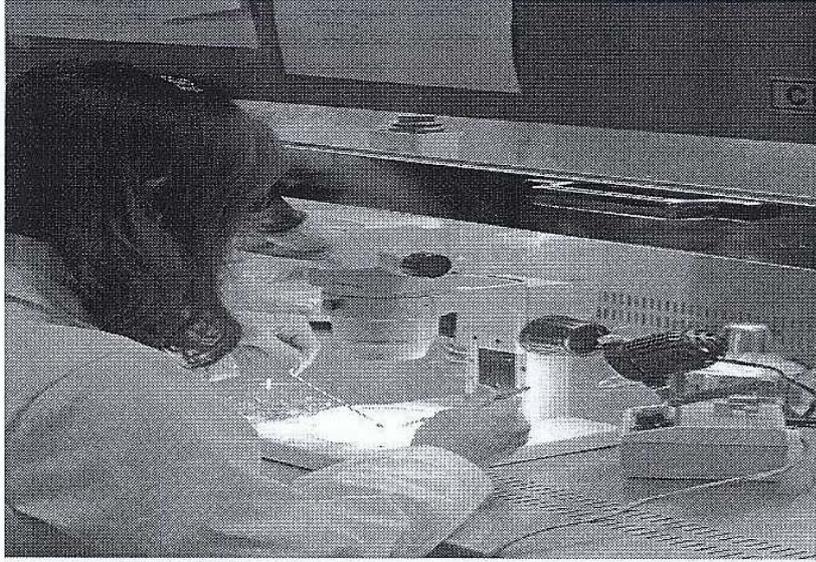
고효율의 형질전환기술개발을 위하여서는 정확한 목표부위로 형질전환이 되어야 하는데 이러한 결과를 얻기 위하여 현미경이 사용되었다.

2. 재료

이 실험을 위하여 은하콩과 비교품종으로 미국품종 Bert의 떡잎을 재료로 형질전환을 수행하였다.

3. 방법

위에 언급된 방법과 동일하게 수행



< 현미경을 이용한 형질전환 실험 수행 >

4. 결과

Transient GUS 분석 결과, 현미경을 이용하기 전에는 은하콩과 Bert의 콩 형질전환 빈도가 각각 18%와 24% 정도였으나 현미경을 이용하고 나서는 72%, 77%의 높은 빈도를 나타내었다. 발생한 대부분의 shoot에서도 현미경을 사용했을 때가 높은 GUS positive를 나타내었고, 콩 형질전환에 있어서 중요한 multiple shoot 형성을 또한 더 높게 나타냈다. 현미경을 이용하는 것이 보다 정확한 부위에 유전자 도입이 가능케 하여 형질전환 효율을 높일 수 있음을 보여주었다.

표2. 현미경 사용에 따른 콩 형질전환 빈도

	Eunha		Bert	
	Not used Microscope	Microscope	Not used Microscope	Microscope
transient GUS	18%	72%	24%	77%

제 4 절 Vacuum 처리를 위한 콩 형질전환

1. 목적

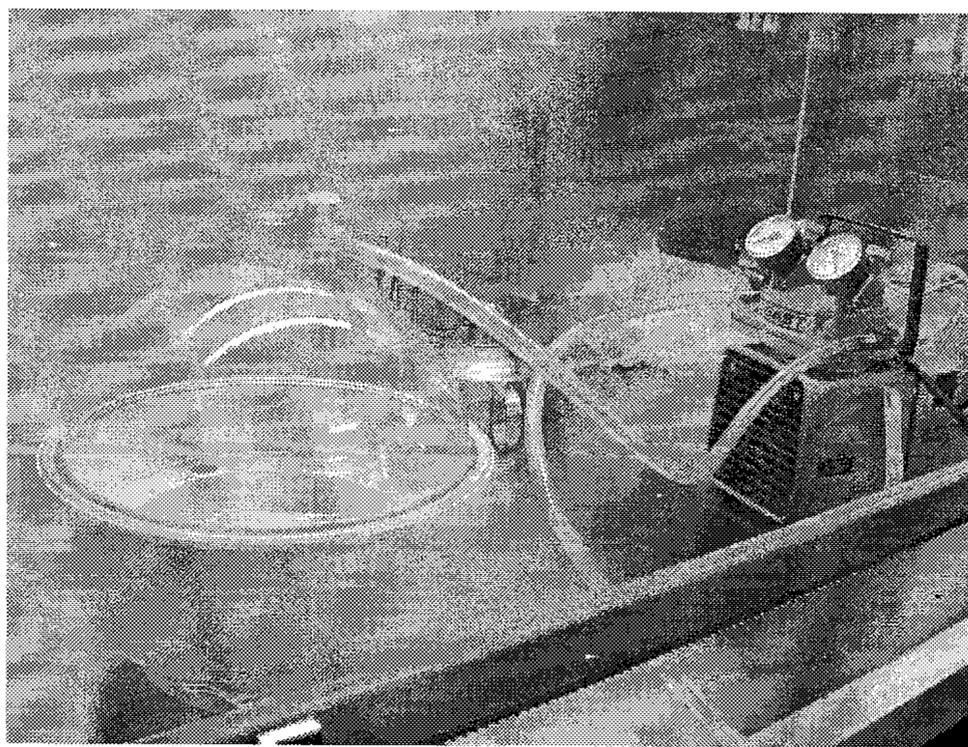
고효율의 형질전환기술개발을 위한 다양한 처리조건 확립을 위하여 형질전환 과정 중, 진공(vacuum) 처리에 따른 형질전환 효율증대를 알아보기 위하여 실험이 진행되었다.

2. 재료

이 실험을 위하여 은하콩과 비교품종으로 미국품종 Bert의 떡잎을 재료로 형질전환을 수행하였다.

3. 방법

위에 언급된 방법과 동일하게 수행



< 진공장치를 이용한 형질전환 실험 수행 >

4. 결과

현미경과 농축액을 공통적으로 사용하는 조건 하에 vacuum 처리의 효과를 알아보았는데 은하콩과 Bert 품종 둘 다 비처리보다 형질전환 효율이 월등히 증대되었다. GUS positive의 퍼센트가 현미경만 사용했을 때보다 평균 10%

정도 향상되었고 SI-② 이후 시작되는 선발과정에도 shoot 생존율이 높은 것으로 나타났다. Vacuum 처리 시간은 30초가 가장 효율이 높았으며 30초 초과 시에는 multiple shoot 형성율이 현저히 떨어졌다. 공배양 초기에 하는 Vacuum 처리가 형질전환 효율을 증대시킬 수 있는 새로운 방법이 될 수 있음을 확신하고 특허를 준비중이다.

표3. Vacuum 처리에 따른 콩 형질전환 빈도

	Eunha		Bert	
	Non-Treat Vacuum	Vacuum	Non-Treat Vacuum	Vacuum
transient GUS	72%	82%	77%	86%

제 5 절 Dipping 처리를 이용한 콩 형질전환

1. 목적

고효율의 형질전환기술개발을 위한 다양한 처리조건 확립을 위하여 형질전환 과정 중, dipping 처리가 형질전환빈도에 미치는 영향을 규명하기 위하여 실험을 수행하였다.

2. 재료

이 실험을 위하여 은하콩과 비교품종으로 미국품종 Bert의 떡잎을 재료로 형질전환을 수행하였다.

3. 방법

위에 언급된 방법과 동일하게 수행

4. 결과

Dipping 처리를 한 후 접종시킨 explants와 처리 과정을 생략한 explants의 형질전환 빈도를 측정한 결과 은하콩과 Bert 모두 높게 나타났다. 잠정적인 형질전환체 분석이긴 하지만 표에서도 나타났듯이 80%에 가까운 높은 빈도를 나타내었다. 그리고 강한 GUS 유전자 발현을 shoot에서도 관찰할 수 있었다. 이는 농축액을 따로 만들어 상처를 내는 dipping 방법이 axillary bud와 cotyledonary node에 *Agrobacterium* 접근을 좀더 용이하게 만들어 형질전환 효율을 높이는 것으로 보인다.

표4. Dipping 처리에 따른 콩 형질전환 빈도

	Eunha		Bert	
	Agro-Density Low	Agro-Density High	Agro-Density Low	Agro-Density High
transient GUS	61%	74%	62%	76%

제 6 절 유전자 도입 형질전환체 생산

1. 목적

최근에 보고된 형질전환 방법을 국내 콩 품종에 맞게 수정하고 개선하여 목표유전자인 콩 아스파라긴합성유전자가 도입된 형질전환체를 생산하기 위하여 실험이 실행되었다.

2. 재료

기초실험 결과를 바탕으로 광안콩의 떡잎을 재료로 사용하였으며 비교품종으로 미국품종 Bert도 함께 사용하여 형질전환 실험을 수행하였다.

3. 방법

가) 종자 소독 및 침지

종자는 강염산(12N HCl 5ml)에 락스(12% sodium hypochlorite 100ml)를 혼합하여 발생시킨 chlorine gas에 20시간 소독을 한 뒤 1% sodium hypochlorite에 10 분간 shaking 하면서 2차 소독을 하였다, 10분 간격으로 멸균수로 3회 수세하였다. 소독한 종자를 50ml corning tube에 넣고 멸균수를 부어 20시간 동안 상온에서 침지시켰다.

나) *Agrobacterium* preparation

콩 형질전환 실험에는 *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105에 construct된 pCAMBIA3301-182(sense, PPT^R 포함)asparaginase vector와 pCAMBIA3301-182(antisense, PPT^R 포함)asparaginase vector를 사용하였다.

고체 YEP medium [kanamycin 100mg/l, rifampicin 25mg/l, peptone 10g/l, NaCl 5g/l, yeast extract 5g/l, 1.5%(w/v)agar (pH 7.0)] 에 streaking 한 후 25°C에서 배양하여 생성된 single colony를 같은 항생제가 들어 있는 액체 YEP medium 10ml에 넣고 OD650 0.8이 될 때까지 25°C에서 250rpm으로 shaking하였다. 다 자란 culture에 30% glycerol stock 10ml을 넣고 vortex한 뒤, 1.5ml tube에 1ml씩 분주하여 액체질소로 급속 냉각하여 -70°C에서 보관하였다. 접종 하루 전에 항생제가 들어있는 액체 YEP medium 200ml에 -70°C에서 보관해 놓은 *Agrobacterium tumefaciens* stock(competent cell)을 1ml 넣고 OD650이 0.8~1.0이 될 때까지 25°C에서 250rpm으로 shaking하였다.

접종 당일에 액체 YEP medium 200ml을 50ml씩 나눠서 20°C, 3270g에서 10분 동안 centrifuge하였다. 각각의 tube에 있는 *A. tumefaciens* pellet을 액체 CCM(co-cultivation medium; B5 salt 0.316g/l, BA 1.67mg/l, MES 20mM, GA3 0.25mg/l, acetosyringone 0.2mM, L-Cysteine 3.3mM, Sodium

thiosulfate 1.0mM, DTT 1.0mM, sucrose 3%, pH 5.4)에 고농도와 저농도로 나눠 부유시켰다. 고농도 농축액은 액체 CCM을 3ml 넣고, 저농도 액체 CCM을 25ml 넣어 만들었다.

다) *Agrobacterium* infection and Co-cultivation

침지해 놓은 종자의 양 떡잎 사이로 scalpel를 넣어 하배축까지 수직으로 자르고 종피를 제거하였다. Hypocotyl을 떡잎 밑 약 1cm되는 곳에서 자른 후 embryonic axis가 붙어있는 한 쪽을 현미경으로 보면서 scalpel(#11 blade)로 6·7회 정도 상처를 내었다. 이 때 scalpel에 3ml 농축액을 묻힌 다음 target 부위에 상처를 내었다. 대략 50개 정도의 explants를 25ml co-cultivation/*A. tumefaciens*에 넣고 sonication 20초, 데시게이터와 다이어프램펌프를 이용해 vacuum 30초 처리를 한 뒤 30분 동안 접종시켰다.

Explants를 tube에서 꺼내 멸균한 filter paper위에 놓고 물기를 제거한 뒤, 고체 CCM(액체와 동일, Agar 0.7%)에도 filter paper를 한 장 깔고 10개체를 올려두었다(adaxial side down). Micropore로 봉한 뒤 25℃, 18시간 광주기에 5일 동안 공배양하였다.

라) Wash-out and shoot induction

5일간 co-cultivation 후에 제균을 위해서 액체 1/2 SIM(shoot induction medium; B5 salt 1.6g/l, BA 835µl/l, MES 1.5mM, sucrose 1.5%, cefotaxime 250mg/l, vancomycin 50mg/l, ticarcillin 100mg/l, pH 5.6)에 10분 동안 간단히 wash-out하였다. Explants를 filter paper위에 놓고 물기를 제거한 뒤 선발항생제가 없는 SI-①(shoot induction medium; B5 salt 3.2g/l, BA 1.67mg/l, MES 3mM, Agar 0.8%, sucrose 3%, cefotaxime 250mg/l, vancomycin 50mg/l, ticarcillin 100mg/l, pH 5.6)에 한 plate당 5개체씩 hypocotyl 부분이 배지에 고착되고 재분화될 부분이 30° 정도의 각도로 flat side up 되도록 치상하였다. 각각의 plate를 micropore로 봉한 뒤 25℃, 18시간 광주기에서 배양시켰다.

2주 후 shoot이 나온 explants를 선발항생제가 들어있는 SI-②

(DL-phosphinothricin 10mg/ℓ)에 치상하였는데, 이 때 shoot을 제외한 나머지 부분은 잘라버리고 치상하였다.

마) Shoot elongation

2주 후 갈변한 shoot/shoot pad는 scalpel(#15 blade)로 깎아내고 선발항생제가 들어있는 SEM(shoot elongation medium; MS salt 4.4g/ℓ, MES 3mM, GA₃ 0.5mg/ℓ, Asparagine 50mg/ℓ, Pyroglutamic acid 100mg/ℓ, IAA 0.1mg/ℓ, Zeatin-riboside 1mg/ℓ, sucrose 3%, Agar 0.8%, cefotaxime 250mg/ℓ, vancomycin 50mg/ℓ, ticarcillin 100mg/ℓ, DL-phosphinothricin 5mg/ℓ, pH 5.6)에 치상하였다. 2주 마다 새로운 SEM으로 옮겨주면서 shoot의 갈변부위는 덜 뽕족한 scalpel(#15 blade) 윗면으로 쳐서 제거하고 shoot pad는 조금씩 계속 깎아내어 배지가 잘 흡수되도록 하였다.

바) Rooting and leaf painting

SEM에서 선발을 거치면서 신장된 shoot이 4cm 이상 일 때 scalpel(#11 blade)로 잘라 RM(rooting medium; MS salt 4.4g/ℓ, MES 3mM, Asparagine 25mg/ℓ, Pyroglutamic acid 25mg/ℓ, sucrose 3%, Agar 0.8%, cefotaxime 50mg/ℓ, vancomycin 50mg/ℓ, ticarcillin 50mg/ℓ, pH 5.6)으로 옮겼다. 이 때 잘라서 분리해낸 신장된 shoot의 밑부분을 1mg/ml IBA에 3분 동안 담가뒀다가 빼내어 RM이 들어있는 test tube에 넣었다. 1~2주가 경과한 후 2개 이상의 뿌리가 나오면 3차 증류수로 배지를 씻어내고 상토(바이오 프리그 2호, 흥농종묘)와 버미큘라이트를 2:1로 섞어 넣은 small pot(6cm×6cm×5.6cm)에 심었다. 이 small pot는 다시 Magenta box 안에 넣어 25℃, 18시간 광주기에서 생장시켰다. 10일 정도 경과 후 100mg/ℓ DL-phosphinothricin로 leaf painting을 하였다.

사) Basta 처리 및 종자수확

Leaf painting으로 유전자 도입을 확인한 식물체를 big pot(20cm×20cm

×20cm)로 옮겨 심고 투명한 플라스틱 덮개(12cm×12cm×18cm)에 2, 4, 10개의 구멍을 만들어 3일 마다 개수가 적은 것에서부터 많은 것으로 바뀌어 썩었다. 10일 후 식물체에 basta(BAYER사)처리를 하고 단일처리(8시간 명조건, 16시간 암조건, 종이 box 이용)로 화아 분화를 유도하여 개화시켰다. 종자를 수확하여 분석을 실시했다.

아) GUS expression assay

형질전환의 효율을 검정하기 위하여 GUS 발색반응을 수행하였다. GUS 발색반응은 Jefferson(1987)의 방법을 사용하였다. 1ml의 GUS 발색용액을 만들기 위하여 3mg의 5-bromo-4-chloro-indolyl glucuronide (X-Gluc)을 150 μ l dimethyl formamide에 녹인 후, 850 μ l의 solution B(1% Triton X-100, 0.1M phosphate buffer, pH 7.0, 5mM potassium ferrocyanide)를 첨가하였다. 공배양이 끝난 단계, SIM, SEM, RM에 치상한 각 단계 마다 식물체를 채취하였고 잎과 종자도 채취하여 GUS 발색 용액을 첨가한 후, 37°C incubator에서 overnight 처리하였다. 처리 후 destaining solution (ethanol 2.5ml, 10% formaldehyde 5ml, 5% glacial acetic acid 2.5ml)을 첨가하여 4°C에 보관하며 GUS 발현 여부와 정도를 관찰하였다.

자) Genomic DNA 추출

잠정적인 형질전환체들의 잎을 1g 정량한 후 액체질소로 얼리고 막자사발에 액체질소를 부어 사발을 차갑게 만든 후, 얼린 잎을 넣고 곱게 갈아 주었다. DNA extract Buffer [7M urea(210g/500ml), 0.3M NaCl(30ml/5M stock 500 ml)]를 6ml 첨가하여 잘 섞어 준 후, phenol/chloroform 6ml을 첨가하고 천천히 뒤집으면서 완전히 섞어 주었다. 12000rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상층액을 따서 새 tube에 옮겨주었다. 동일 volume의 chloroform첨가 후, 천천히 뒤집으며 섞고, 12000rpm으로 10분간 원심분리 한 후 상층액을 따서 새 tube에 옮겨주었다. 1ml의 4.4M ammonium acetate(pH5.2)를 넣고, 2배 부피의 에탄올을 첨가한 후, 잘 교반하여, 냉동고에서 20분 이상 보관하였다.

12000rpm으로 15분간 원심분리하여 pellet을 모으고, 상층액을 버린 후, pellet을 10 분간 말렸다. TE buffer 0.5ml에 녹이고, RNase 1 μ l를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에 1시간 동안 처리하였다. 처리 후, phenol/chloroform 0.5ml을 넣고 천천히 섞어 주었다. 용액을 12000rpm으로 10분간 원심분리 하였고 상층액을 따서 새 tube에 옮긴 후, 동일 volume의 chloroform첨가하여 서서히 교반을 진행하였다. 다시 12000rpm으로 10분간 원심분리한 후, 상층액에 1/10 volume의 sodium acetate와 1ml의 100% ethanol을 넣어 냉동고에 20분 이상 보관하였다. 12000rpm으로 15분간 원심분리하여 DNA를 pellet으로 만든 다음 TE buffer 50 μ l에 DNA를 녹였다. 최종적으로 흡광도를 측정하여 DNA의 양을 측정하여 southern을 실시하였다.

차) PCR 및 Northern 분석

유전자의 도입여부를 알아보기 위하여 PCR 분석을 실시하였다. PCR 증폭을 위해 사용된 primer는 182(sense)-5'(5' -GGT ACC ATG GGA GGG TGG GCT ATC- 3')과 182(sense)-3'(5' -GAG CTC TTC CCA GAT TCC GAC CTC- 3'), 182(antisense)-5'(5' -GGT ACC TTC CCA GAT TCC GAC CTC- 3')과 182(antisense)-3'(5' -GAG CTC ATG GGA GGG TGG GCT ATC- 3') . PCR 조건은 먼저 94 $^{\circ}$ C에서 5분간 predenature를 하고, 다시 denature를 위하여 94 $^{\circ}$ C에서 30초, annealing을 위하여 55 $^{\circ}$ C에서 30초, postextension 72 $^{\circ}$ C 1분 30초 처리한 과정을 35회 반복한 후, 마지막으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리하였다. 또한 도입유전자의 발현 여부를 알아보기 위하여 잠정적인 형질전환체로부터 RNA를 추출하였고 Northern blot을 하였다. RNA 추출을 위하여 SOLD(4M guanidinium thiocyanate 23.63g, 25mM sodium citrate pH 7.0 1.67ml of 0.75M, 0.5% sarcosyl 2.5ml of 10%, DEPC-treated water up to make 50ml) 10ml/g와 2-Mercaptoethanol 75 μ l를 넣은 50ml짜리 tube에 시료 1g을 액체질소를 부어가며 곱게 갈아 넣어 vortex하여 실온에 10~15분 둔 후, 2M Sodium acetate(pH 4.0)를 0.1 volume(1ml)을 넣었다. 그 후, phenol (water saturated)을 1 volume(10ml)을 넣고, chloroform/isoamyl

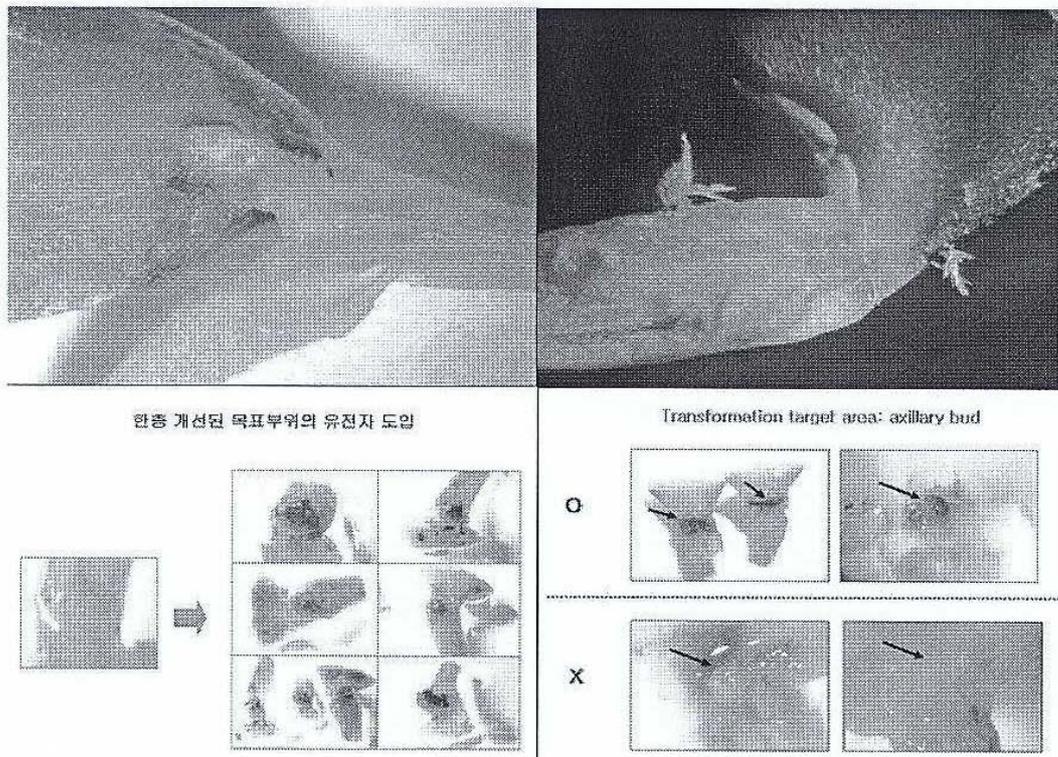
alcohol (49:1)을 0.2 volume(2ml)을 넣고, 1분 동안 inversion하여 ice에 15분간 처리한 후, 4°C, 12000rpm으로 20분간 centrifuge하였다. centrifuge를 한 후 상층액을 따서 새 tube에 옮기고 chloroform/lisoamyl alcohol (49:1)을 상등액의 0.5~1 volume의 양만큼 넣고 1분 동안 inversion하였다. 그 후 4°C, 12000rpm으로 20분간 한 번 더 centrifuge하였다. Centrifuge를 한 후 상층액을 따서 새 tube에 옮기고, 1 volume의 isopropanol을 넣고 inversion하여 고무 섞어서 -20°C에서 1시간 처리하였다. 그 후, 4°C, 12000rpm으로 20분간 centrifuge하였다. centrifuge를 한 후 상층액을 버리고 RNA를 모아서 750 μ l의 solution D(or DEPC water)를 넣어 pellet을 녹였다. Isopropanol을 동일 volume으로 넣은뒤 4°C, 1200rpm에서 15분 간 centrifuge하였다. 상등액을 버리고, 70% ethanol을 1ml넣고 4°C, 8000rpm에서 10분간 centrifuge하여, 70% ethanol을 버리고 깨끗이 말렸다. 그 후, DEPC- treated water를 500 μ l 넣고 잘 녹인 뒤 정량한 뒤 membrane을 만들어 northern blot을 실시하였다. Nylon membrane을 만들었으며 그 방법은 다음과 같다. 전기영동한 젤을 필요한 만큼 잘라서 nylon membrane은 transfer 용액에 5분 담귀서 downward alkaline transfer방법으로 설치한 후 overnight동안 transfer하였다. 그 후, Neutralization용액에 10분간 처리한 후, 10분간 건조시켜 UV처리하였다. Northern에 필요한 prove를 만들기 위해 GUS 유전자를 PCR하여 Accuprep[®] Gel Purification Kit(Bioneer)를 사용하여 elution하였다. PCR 조건은 denaturation 94°C 45초, annealing 55°C 45초, extention 72°C 1분 30초 처리한 과정을 35회 반복하였으며 1% agarose gel을 만들어 전기영동하였다.

4. 결과

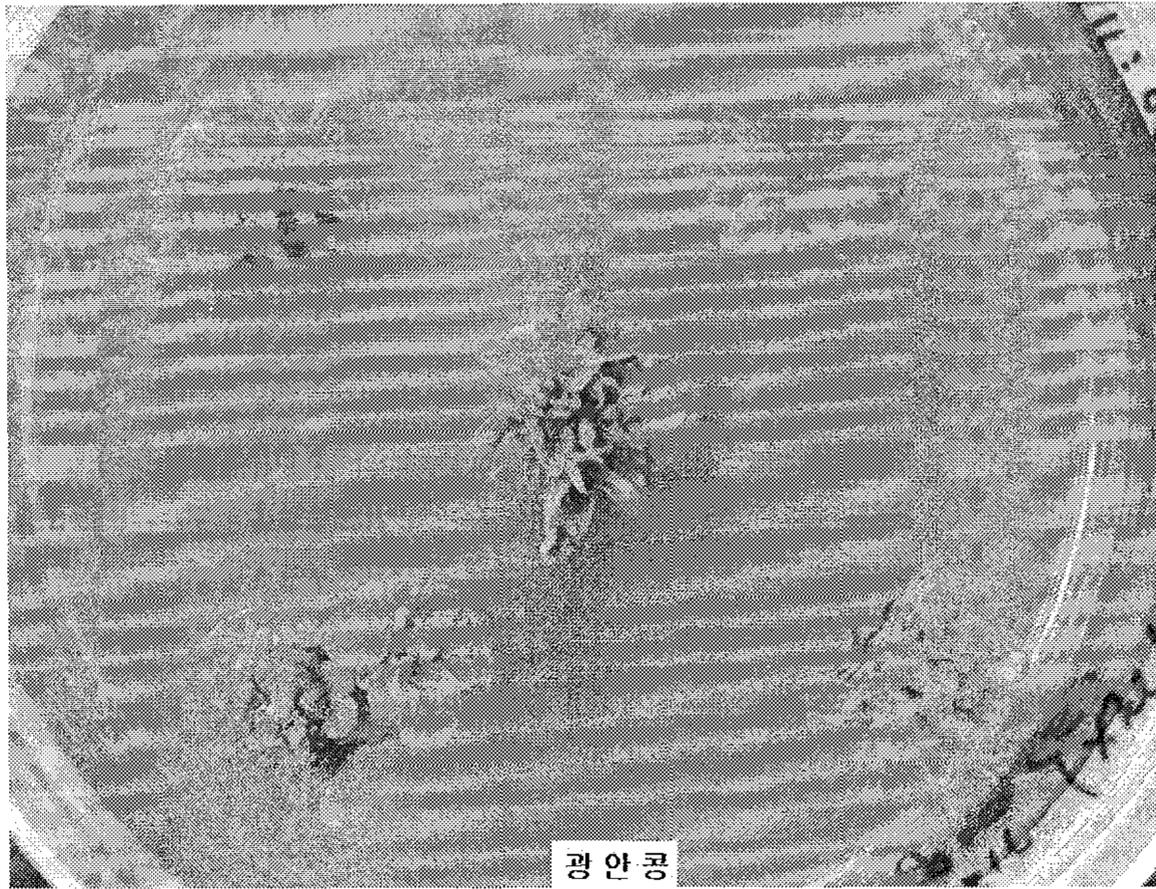
Iowa에서 보고된 형질전환 방법을 좀 더 효율적이고 국내 품종에 맞도록 변형시켜 다양한 처리들을 한 결과 높은 형질전환 효율을 가져올 수 있었다. 뿐만 아니라 기존의 방법들이 초기 *Agrobacterium* 감염률은 높았으나 shoot 신장과 발근에 어려움이 있었던 반면에 새롭게 확립한 방법은 그러한 어려움을 없앴으며 빈도 또한 높아졌다. 세 가지 제균항생제(cefotaxime, vancomycin, ticarcillin)를 최적의 농도로 사용하여 그 동안 해결되지 못했던

Agrobacterium overgrowth도 억제할 수 있었다. 빠른 신장과 발근으로 순화가 용이해졌으며 종자까지 수확할 수 있었다. Shoot, 잎, 종자 모두에서 강한 GUS 발현이 나타났으며 leaf painting과 basta 처리 후에도 높은 생존율을 보였다. 그리고 PCR과 Northern 분석으로 유전자 도입을 확인할 수 있었다.

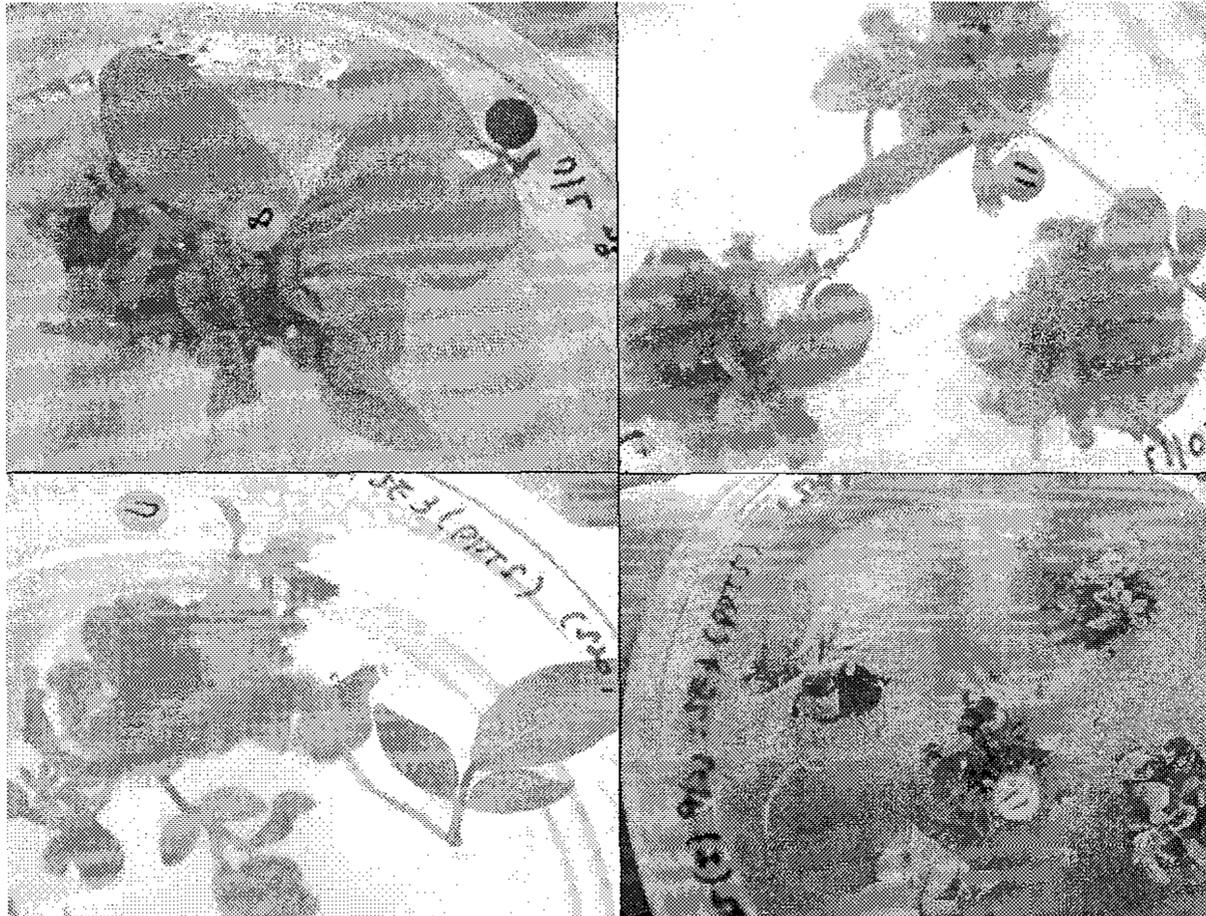
최적합화된 조합과 농도의 황화합물을 형질전환 초기에 첨가하여 갈변을 억제시키고 현미경 사용과 vacuum 처리, dipping 처리까지 실시하여 정확한 부위에 *Agrobacterium* 감염을 최대화시킴으로써 10% 이상의 고효율 형질전환 방법의 체계를 마련하였다.



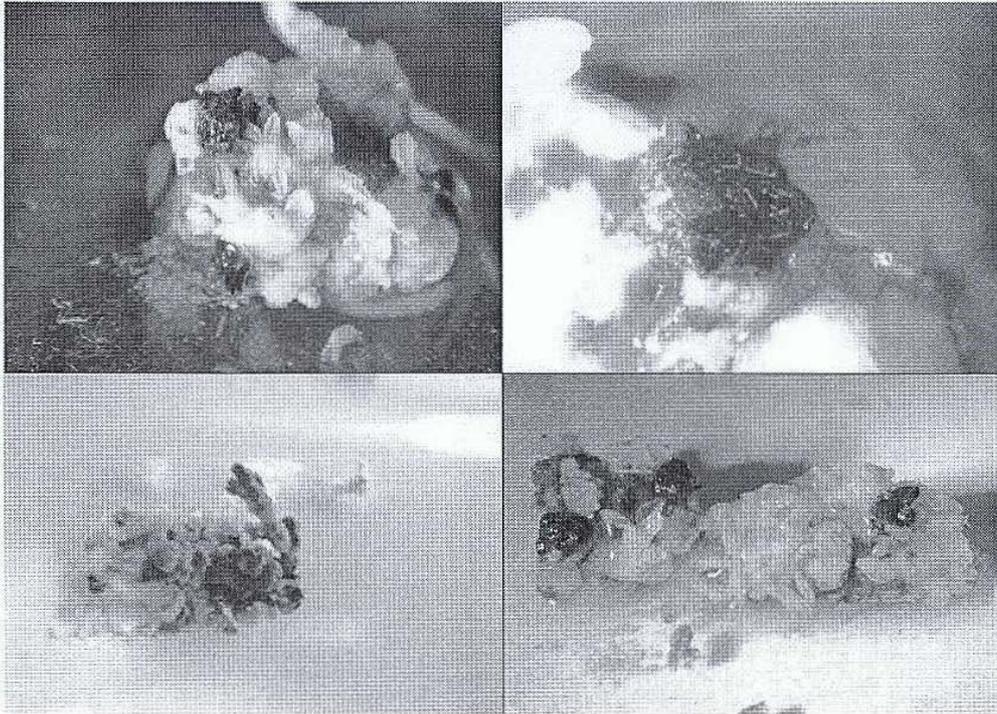
< 목표부위로의 유전자 도입 >



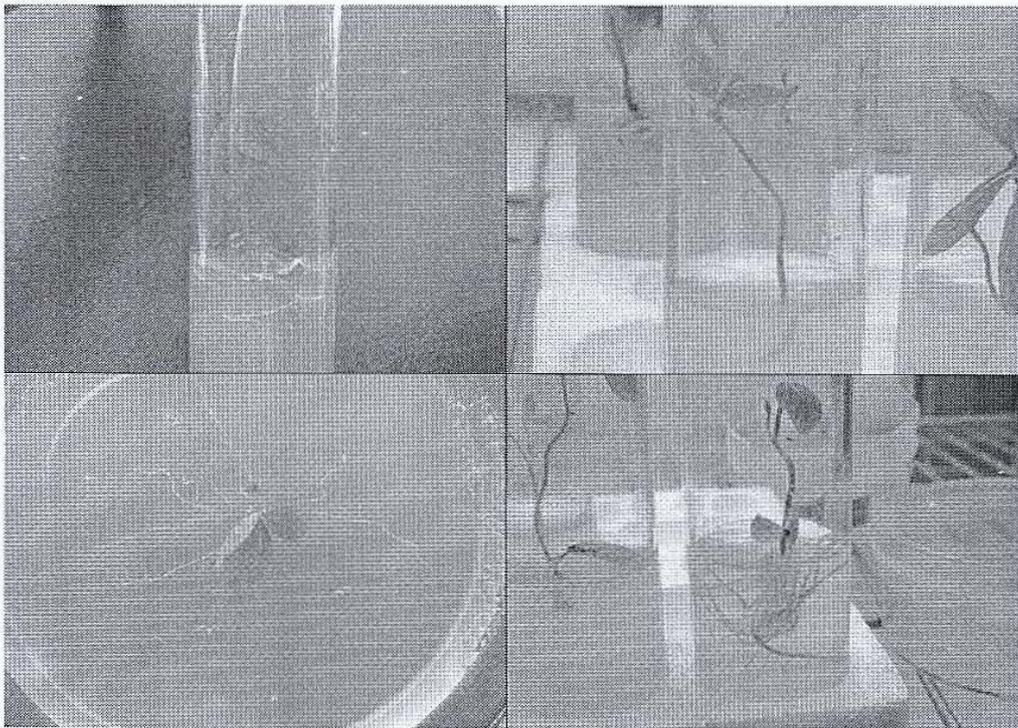
< 형질전환 광안콩(나물콩)의 multiple shoot 형성 >



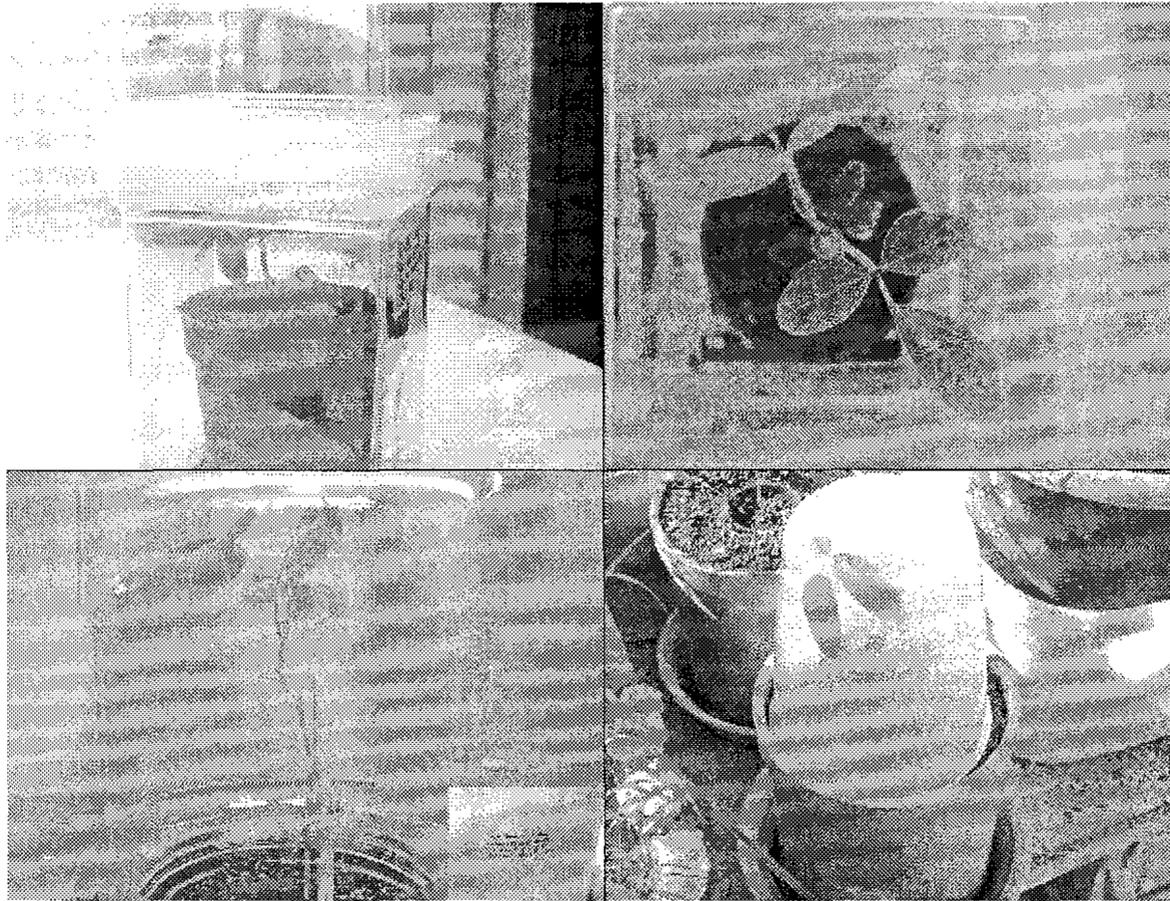
< 형질전환 후 shoot elongation >



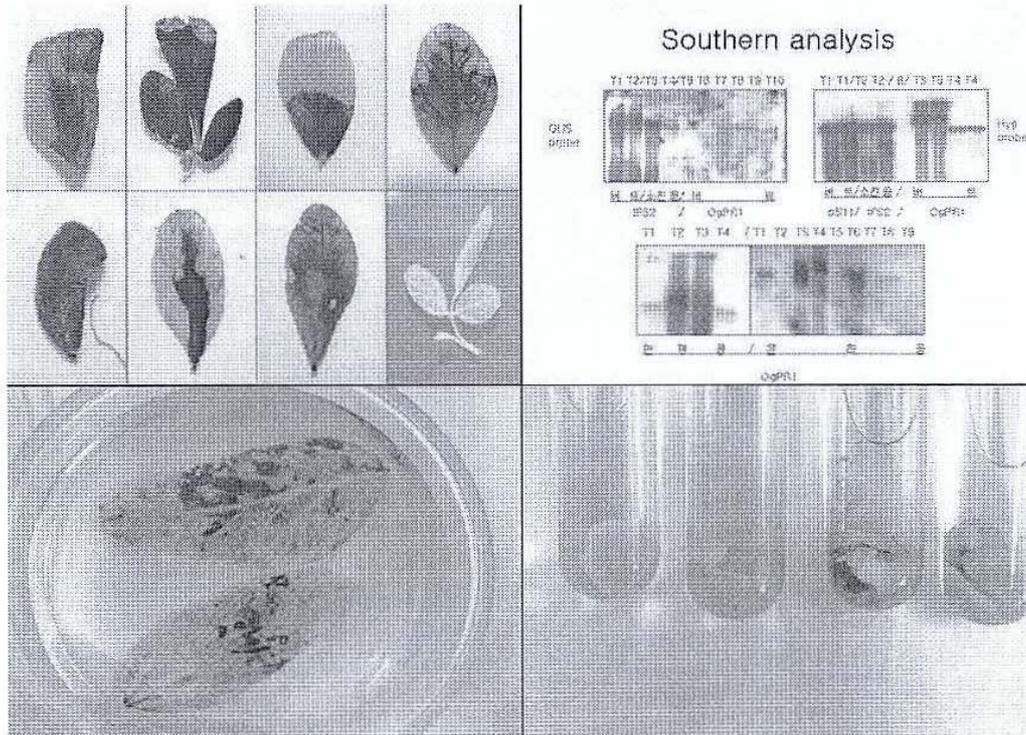
< 유전자 도입과 성공적인 clonal bud 형성 확인 >



< 형질전환체 발근 유도 및 뿌리 형성 >



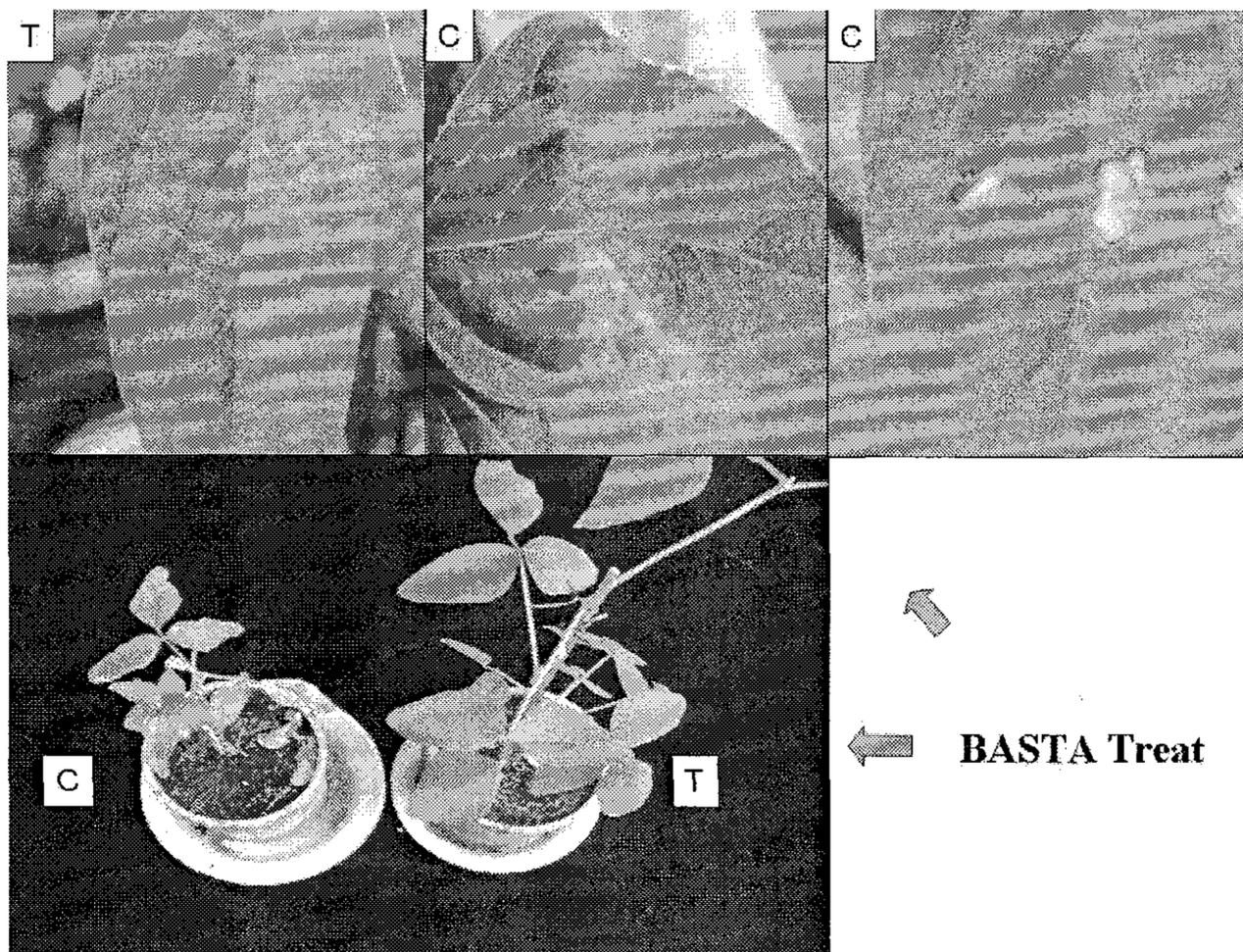
< 형질전환콩의 순화과정 >



< 형질전환체의 어린잎, 성체잎, 종자에서의 유전자 도입 확인 >



< 콩 형질전환체의 온실 재배 >



< 제초제살포를 통한 유전자 동비 확인 >

제3세부과제 : 나물 콩 유전자원 분석 및 모본 개발

1) 연구개발 내용 및 결과

- 연구개발 내용

콩나물용으로 이용되는 콩 품종은 백립종이 소립이고 콩나물에 함유된 아스파라긴의 함량은 콩나물의 품질을 좌우하는 매우 중요한 요인으로 평가된다. 현재 국내에서 재배되고 있는 콩나물용 콩 품종은 농업적 형질 및 콩나물 수율등은 우수하나 아스파라긴의 함량에 대한 정보는 밝혀져 있지 않아, 농업적 형질이 우수하고 아스파라긴의 함량이 높은 소립콩 계통을 선발하기 위하여 실험이 진행되었다.

1. 소립콩 계통 육성용 집단의 창성

현재 재배되고 있는 소립 나물용콩 및 종자크기가 매우 작은 유전자원을 모본으로 하여 최종적으로 농업적 형질이 우수하고 아스파라긴의 함량이 현재 재배되고 있는 나물용콩 품종보다 높은 계통을 선발하기 위한 육종집단을 창성하였다. 경상대학교 부속농장 온실에 모본을 파종한 후 교배를 실시하였으며 F1 종자를 얻은 후 곧바로 파종하여 F2종자를 획득하였다. 얻어진 F2 종자는 포장에 파종하여 초형, 성숙기, 수량, 수확 후 종자의 상태등을 고려하여 매 세대마다 포장에서 선발이 계속 되었다. 아래 표는 이용된 모본 및 선발목표를 나타낸다.

표 1. 소립 계통 선발을 위한 모본 및 선발의 목표

(Table 1. Parental crossing and selection objective for soybean sprout with small seed size trait)

모본	선발목표
한남 x PI507088	소립 고품질 기능성
명주나물콩 x PI205085	소립 고품질 기능
명주나물콩 x PI536636	소립 고품질 기능
명주나물콩 x PI408251	소립 고품질 기능
한남 x PI179825	소립 고품질 기능
소명콩 x PI423949	소립 고품질 기능
소명콩 x FC32176	소립 고품질 기능

2. 육종집단으로부터의 소립콩 계통의 선발

농업적 형질이 우수하고 아스파라긴의 함량이 높은 소립콩 계통을 선발하기 위하여 연구 1차년도 및 이미 창성되어진 육종집단을 매년 포장에 전개하여 농업적 형질이 우수하며 수확후 종자의 상태가 양호한 소립 계통을 선발하였다.

3. 선발 소립콩 계통의 아스파라긴 함량 평가

연구 3차년도(2006년도) 포장에서 수확 후 농업적 형질이 우수한 것으로 평가된 소립 계통의 아스파라긴 함량을 평가하였다.

- 연구 결과

가. 농업적 형질 우수 소립 F3 계통의 선발

2차년도에서 비교적 농업적 형질이 우수하고 종자 크기가 소립이었던 선발 6 계통 (한남 x PI548506 유래)은 2006년 포장평가에서 농업적 형질은 다소 우수하였으나 백립중에서 거의 중립을 보여 선발되지 않았다. 그러나 한남 x PI179825 교배집단중에서 농업적 형질이 비교적 우수하고 중. 소립인 1 계통 (F3 plant, F4 seed) 을 선발하였다. 아래 그림은 2006년 포장에서 전개되고

있는 생육모습을 나타낸다.



그림 1. F3 계통 (2006년 포장)

Fig 1. Phenotype of F3 plants (Field in 2006)

선발된 계통에 대한 형질은 다음과 같다.

육성 모본	계통명	수확일	종피	백립중
한남x PI179825	05S-88(1)	10월4일	노란색	14.4

아래 그림은 선발된 계통에 대한 종자모양이며, 선발된 F3 계통 (F4 종자)은 2007년 포장에 파종하여 농업적 형질을 계속 평가 하면서 소립인 계통을 선발 할 예정이다.

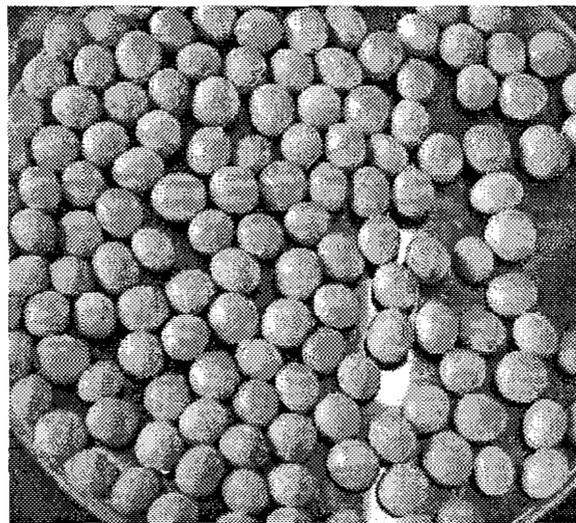


그림 2. 선발 계통의 종자 (2006년 포장 수확)

(Fig 2. F4 Seed selected (harvested in 2006 field))

나. 농업적 형질 우수 소립 F4 계통의 선발

2003년 온실에서 교배된 후 1차년도 및 2차년도를 통하여 선발된 F3 계통을 2006년 포장에 파종하여 F4 계통을 전개시켰다. 생육과정을 관찰하면서 초형, 수확기, 종자상태 등 농업적 형질이 다소 우수한 몇 개의 계통을 선발하였다. 아래 그림은 2006년 포장에서 전개되고 있는 생육모습을 나타낸다.



그림 3. F4 계통 (2006년 포장)

Fig 3. Phenotype of F4 plants (Field in 2006)

선발된 5 계통 (한남 x PI507088 유래, F5 seed)에 대한 형질은 다음과 같다.

육성 모본	계통명	수확일	종피	백립중
한남 x PI507088	04S-6(1)	10월4일	노란색	12.1
	04S-6(2)	10월4일	노란색	
	04S-7	10월1일	노란색	
	04S-8	9월26일	노란색	
	04S-11	10월4일	노란색	

선발 계통의 종자 모양은 아래 그림과 같으며 2007년 포장에 세대를 진전시키면서 형질을 계속 평가 할 예정이다.

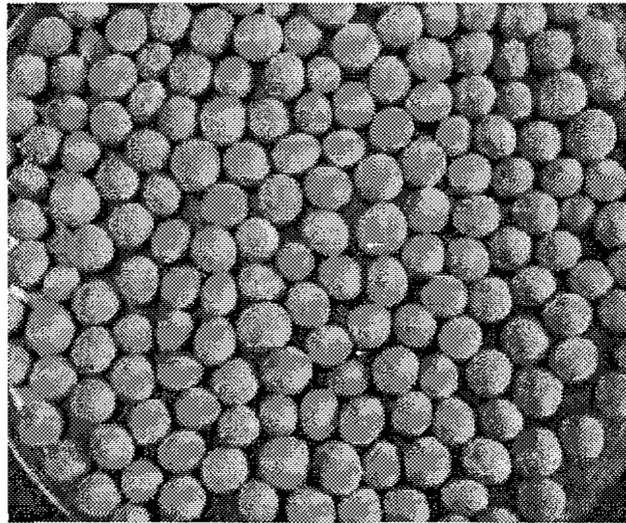


그림 4. 선발 계통의 종자 (2006년 포장 수확)

(Fig 4. F5 Seed selected (harvested in 2006 field))

진2 x PI508269 유래 선발된 F4 1계통 (F5 seed)에 대한 형질은 다음과 같다

육성 모본	계통명	수확일	종피	백립중
진2 x PI508269	04S-69	9월26일	노란색	9.6

이 선발 계통의 2006년 포장에서 수확된 종자 모양은 아래 그림과 같다.

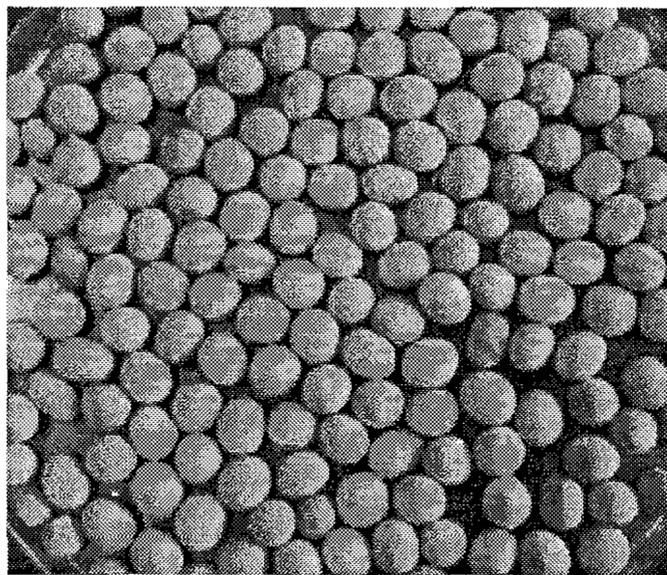


그림 5. 선발 계통의 종자 (2006년 포장 수확)

(Fig 5. F5 Seed selected (harvested in 2006 field))

다. 농업적 형질 우수 소립 F5 계통의 선발

2002년 온실에서 교배된 후 1차년도 및 2차년도를 통하여 선발된 F4 계통을 2006년 포장에 파종하여 F5 계통을 전개시켰다. 생육과정을 관찰하면서 초형, 수확기, 종자상태 등 농업적 형질이 다소 우수한 몇 개의 계통을 선발하였다. 아래 그림은 2006년 포장에서 전개되고 있는 생육모습을 나타낸다.



그림 6. F5 계통 (2006년 포장)

Fig 6. Phenotype of F5 plants (Field in 2006)

선발된 6 계통 (F6 seed)에 대한 형질은 다음과 같다.

육성 모본	계통명	수확일	종피	백립중
한남 x PI399078	76F5-2	10월4일	노란색	11.1
	76F5-4	9월26일	노란색	10.7
	76F5-5	10월4	노란색	10.8
단백 x PI408155	85F5-3	10월4일	노란색	10.3
M120 x PI408155	86F5-2	10월4일	노란색	9.5
명주나물 x PI475824B	87F5-1	10월4일	노란색	9.4

선발 계통의 종자 모양은 아래 그림과 같으며 2007년 포장에 세대를 진전시키면서 형질을 계속 평가 할 예정이다.

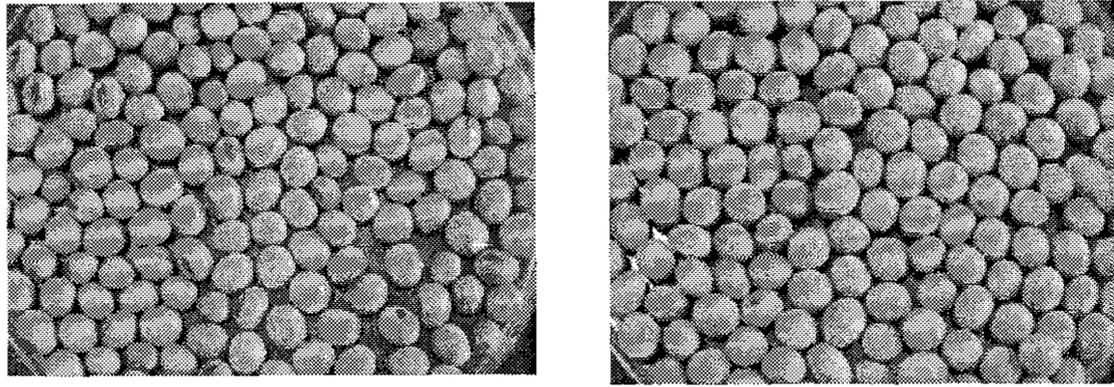


그림 7. 선발 계통의 종자 (2006년 포장 수확)
 (Fig 7. F6 Seed selected (harvested in 2006 field))

라. 농업적 형질 우수 소립 F6 계통의 선발

2001년 온실에서 교배된 후 1차년도 및 2차년도를 통하여 선발된 F5 계통을 2006년 포장에 파종하여 F6 계통을 전개시켰다. 아래 그림은 2006년 포장에서 전개되고 있는 생육모습을 나타낸다.



그림 8. F6 계통 (2006년 포장)
 Fig 8. Phenotype of F6 plants (Field in 2006)

선발 계통 (F7 seed)에 대한 형질은 다음과 같다.

육성 모본	계통명	수확일	종피	백립중
m120 x 광고	016F6-1	9월26일	노란색	12.8

아래 그림은 수확된 계통에 대한 종자모양이며. 2007년 포장에 파종하여 농

업적 형질을 계속 평가 할 예정이다.



그림 9. 선발 계통의 종자 (2006년 포장 수확)
 (Fig 9. F7 Seed selected (harvested in 2006 field))

진2 x PI408155 유래 선발된 F6 1계통 (F7 seed)에 대한 형질은 다음과 같다.

육성 모본	계통명	수확일	종피	백립중
진2 x PI408155	S-015	10월2일	노란색	11.0

이 선발 계통의 2006년 포장에서의 생육 모습 및 수확된 종자 모양은 아래 그림과 같다.



그림 10. 선발 계통의 생육 (2006년 포장)
 Fig 10. Phenotype of F6 plants (Field in 2006)

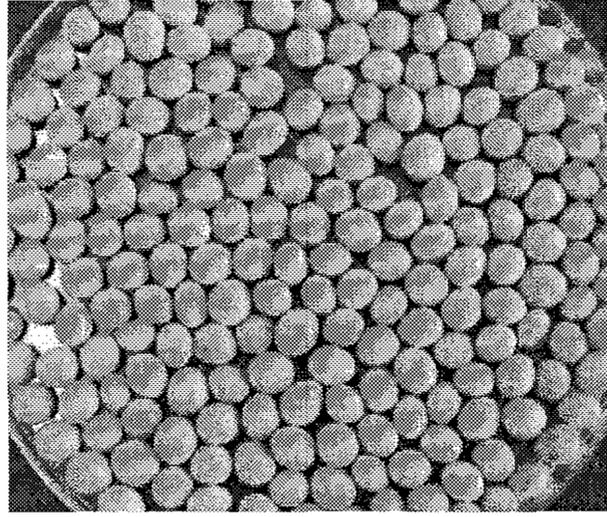


그림 11. 선발 계통의 종자 (2006년 포장 수확)
 (Fig 11. F7 Seed selected (harvested in 2006 field))

표 2. 선발 계통의 아스파라긴 함량
 (Table 2. Asparagine content of selected lines in 2006)

시료명	농도(nmol)	sample(g)	함량%(w/w)
S-015	240.086	0.0821	0.0386
GS04	273.317	0.0806	0.0448
04S-6(1)	267.786	0.0825	0.0429
04S-6(2)	335.981	0.0815	0.0545
04S-7	277.483	0.0816	0.0449
04S-8	388.525	0.0852	0.0603
04S-11	326.234	0.0870	0.0495
04S-69	260.646	0.0853	0.0404
05S-88(1)	399.297	0.0838	0.0630
016F6-1	305.549	0.0820	0.0492
76F5-2	310.75	0.0839	0.0489
76F5-4	310.149	0.0837	0.0489
76F5-5	275.642	0.0825	0.0441
85F5-3	186.262	0.0832	0.0296
86F5-2	266.483	0.0840	0.0419
87F5-1	250.816	0.0826	0.0401

명주나물	322.729	0.0809	0.0527
------	---------	--------	--------

마. 선발 계통의 아스파라긴 함량

2006년 포장에서 수확된 계통중에서 농업적 형질이 다소 우수했던 종자를 이용하여 아스파라긴 함량을 조사한 표 2는 위와 같다.

나물콩인 명주나물콩 보다 3 계통이 아스파라긴의 함량이 높은 것으로 보였다. 3 계통 및 타 계통을 포장에 지속적으로 전개하면서 농업적 형질 및 아스파라긴의 함량을 조사하여 최종적으로 우수한 계통을 선발하여 품종화 할 계획이다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

I. 목표 달성도

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	달성도 (%)
1차년도 (2001)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 충분한 수의 유전자원계통 확보(100계통) ○ 아스파라긴 분석 ○ 형질전환 예비 실험 ○ 저온스트레스 관련 유전자 library 확보 및 database 구축 	<p>100</p> <p>150</p> <p>100</p> <p>150</p>
2차년도 (2002)	<ul style="list-style-type: none"> ○ F1, F2 유전집단 확립 ○ 아스파라긴 분석 ○ 유전자 기능 확인 ○ RACE 기법을 이용한 아스파라기나제 full sequence 확보. ○ 형질전환을 위한 vector 제작 및 형질전환. 	<p>100</p> <p>100</p> <p>130</p> <p>120</p> <p>120</p>
3차년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 유전 집단확보 ○ 형질전환 식물체 확보 및 분석 ○ 다양한 Northern 분석을 이용한 유전자 기능 확인 ○ 형질전환체 아스파라긴 분석 	<p>100</p> <p>100</p> <p>150</p> <p>100</p>
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 콩 형질전환 체계확립 및 형질전환 식물체 확보 ○ 신품종 육성을 위한 유전집단 개발 	<p>100</p> <p>100</p>

II. 관련분야에의 기여도

1. 콩 유전자원의 정밀한 분석과 분류로 육종에 필요한 기초자료제공
2. 건강 기능 성분에 대한 정보제공으로 아스파라긴 성분이 고농도로 포함된 건강 기능성 신 품종육종
3. 건강 기능성이 추가된 신품종의 재배 및 생산 확대
4. 영양 및 약용 기능을 가미한 식품 개발
5. 개발된 고효율의 형질전환 기술은 콩 뿐만 아니라, 형질전환이 어려운 유용 과채류 등 농작물과 산업적으로 가치가 높은 작물의 형질전환에 그 기술이 활용될 것이다.
6. 기능성 물질을 추출하여 상품화 할 경우, 전량을 수입에 의존하고 있는 현 시점에서 고 부가가치 산업으로서의. 전망을 가지고 있다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

I. 기술적 측면

1. 본 연구의 결과로 확보하게 될 콩 유전자원에 대한 체계적인 분류와 정보 및 유전자 database는 건강 기능성을 가진 콩 신품종을 육성하는데 매우 유용하게 쓰일 것이다.
2. 본 연구의 결과로 다양하고 종합적인 연구에 의한 콩의 유전자 클로닝 및 형질 전환 체계가 확립됨으로써, 기능성유전자에 대한 분자유전학, 생리생화학 및 생리유전학 등 생물 기초 연구분야 및 본 연구를 통하여 분자유전학과 유전학 혹은 유전학과 생리학 사이의 학문적 Gap을 제거 할 수 있는 교량역할을 함으로써, 기초 학문분야와 응용학문분야의 활성화에도 파급효과가 있을 것이다.
3. 콩에 대한 형질전환 체계가 확립됨으로써, 생명공학 기술을 도입한 콩 육성에 획기적인 기여를 하게 될 것이다.

II. 경제 · 산업적 측면

1. 유용 유전자원의 확보로 국가 미래 농업의 안정적 위치 확보 및 국가 농업기반의 국제경쟁력 강화
2. 작물에 건강 기능성 개념 도입으로 국내농업의 국제적 차별화 유도
3. 기능성이 담긴 신품종개발로 농가소득향상 및 국민 건강 증진
4. 콩에서 농업적으로 유용한 유전자의 정밀한 분석과 분류로 육종에 필요한 기초자료 제공
5. 본 연구는 분자유전학, 생리유전학, 유전학, 식품영양학 및 형질전환에 대한 연구로써, 다양한 각 분야의 전문인력을 양성할 수 있는 효과가 있다.

III. 활용방안

1. 콩 유전자원의 정밀한 분석과 분류로 육종에 필요한 기초자료제공
2. 건강 기능 성분에 대한 정보제공으로 아스파라긴 성분이 고농도로 포함된 건강 기능성 신 나물 콩 품종육종
3. 건강 기능성이 추가된 신품종의 재배 및 생산 확대
4. 영양 및 약용 기능을 가미한 식품 개발
5. 개발된 고효율의 형질전환 기술은 콩 뿐만 아니라, 형질전환이 어려운 유용 과채류 등 농작물과 산업적으로 가치가 높은 작물의 형질전환에 그 기술이 활용될 것이다.
6. 기능성 물질을 추출하여 상품화 할 경우, 전량을 수입에 의존하고 있는 현지점에서 고 부가가치 산업으로서의 전망을 가지고 있다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

I. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

1. 국내·외에서 기능성물질 관련 유전자의 기작에 대한 연구는 활발히 진행되고 있지만, 나물 콩에서 기능성 물질인 아스파라긴 증가를 위한 연구는 시도되어진 바가 없다.
2. 나물 콩의 아스파라긴은 다른 식물의 것보다 양적 질적인 면에서 극히 우수하나, 국제적으로 아스파라긴에 대한 연구는 극히 미약하므로, 국내에서 아스파라긴에 대한 연구가 선행된다면, 국제적 경쟁력을 선 점 할 수 있다.
3. 나물 콩에서 형질전환을 이용하여 고 함량의 기능성 물질을 지닌 품종의 개발은 이루어진 적이 없다.
4. 현재 국내에서 콩 형질전환에 대한 연구는 전혀 이루어지고 있지 않음.
5. 형질전환체계의 확립을 위하여 품종들에 대한 조직배양적응성과 *Agrobacterium*의 감염여부에 대한 기초 스크린이 있어야 하는데 이와 같은 기초연구가 전무한 실정임
6. 미국에서는 이미 제초제 저항성 콩과 해충저항성 콩을 생산하여 품종화 하였으며, 최근에는 듀폰사에서 콩에 항암·항산화 성분이 보강된 건강 기능성 콩 품종을 육성하여 곧 시판할 예정임.

II. 앞으로의 전망

본 연구는 콩에서 스트레스를 주었을 때 특이적으로 발현되는 유전자를 선 발하는 기초연구 뿐 아니라, 콩의 원산지인 만주 및 한반도 일대에 산재해 있

는 수많은 야생종 및 재배종의 아스파라긴 함량 및 특성을 측정하여 실제 육종 프로그램에 응용 가능한 토대를 마련하며, 클로닝된 농업적으로 유용한 유전자를 형질전환 하고, 아스파라긴의 기능성 연구, 품종 및 가공에 따른 함량 변화와 특성을 규명하는데 목적이 있기 때문에, 식물분자유전학 전공자, 작물육종학 전공자, 식품화학 전공자가 밀접하게 협력하는 연구 체제가 필요하다.

아스파라긴의 함량변이와 특성을 규명하여, 보다 체계적이며 전문적인 연구를 실시함으로써 장기적으로 콩의 건강기능성 및 내재해성 육종 모본을 만드는 토대를 마련할 수 있으며, 앞으로 선진국의 바이오텍 기술은 계속 향상될 것으로 예상되므로, 신기술의 개발과 더불어 바이오텍을 이용한 신품종 육성이 가속화 될 것으로 보이며, 신품종 육성의 방향도 고부가가치를 창출하기 위하여 기능성이 첨가된 품종 육성쪽으로 많은 연구가 집중될 것으로 전망된다.

제 7 장 참고문헌

- Atkins C.A., Pate J.S., Sarkey P.J. 1975. Asparagine metabolism - key to nitrogen nutrition of developing legume seeds. *Plant Physiology*, 56: 807-812
- Boos J., Werber G., Ahlke E., Schulze-Westhoff P., Nowak-Gottl U., Wurthwein G., Verspohl E.J., Ritter J.J. 1996. Monitoring of asparaginase activity and asparagine levels in children on different asparaginase preparations. *European Journal of Cancer*, 32A(9): 1544-1550
- Bruneau L., Chapman R., Marsolais F. 2006. Co-occurrence of both L-asparaginase subtypes in *Arabidopsis*: At3g16150 encodes a K⁺-dependent L-asparaginase. *Planta*, 224: 668-679
- Chang K.S., Farnden K.J.F. 1981. Purification and properties of asparaginase from *lupinus arboreus* and *lupinus angustifolius*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 208: 49-58
- Lea P.J., Mifflin B.J. 1980. Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. *In* PK Stumft, EE Conn, eds, *The Biochemistry of Plants*, Vol 5. Academic Press, New York, pp 569-607
- Lea P.J., Fowden L., Mifflin B.J. 1978. The purification and properties of asparaginase from *Lupinus* species. *Phytochemistry*, 17: 217-222
- Lough T.J., Chang K.S., Carne A., Monk B.C., Reynolds P.H.S., Farnden K.J.F. 1992. L-asparaginase from developing seeds of *lupinus arboreus*. *Phytochemistry*, 31: 1519-1527
- Sieciechowicz K.A., Joy K.W., Ireland R.J. 1988. The metabolism of asparagine in plants. *Phytochemistry*, 27: 663-671
- Soares A.L., Guimaraes G.M., Polakiewicz B., de Moraes Pitombo R.N., Abrahao-Neto J. 2002. Effects of polyethylene glycol attachment on physicochemical and biological stability of *E. coli* L-asparaginase. *International Journal of Pharmaceutics*, 237(1-2): 163-170
- Tonin G.S., Sodek L. 1990. Asparaginase, allantoinase and glutamine synthetase activities in soybean cotyledons grown in vitro. *Phytochemistry*, 29: 2829-2831
- Margie M. Paz, Juan Carlos Martinez, Andrea B. Kalvig, Tina M. Fonger, Kan

Wang.

2005. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. Plant Cell Rep 00

Margie M. Paz, Huixia Shou, Zibiao Guo, Zhanyuan Zhang, Anjan K. Banerjee, Kan Wang. 2004. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. Euphytica 136: 167-179

Paula M. Olhoft, Lex E. Flagel, Christopher M. Donovan and David A. Somers. 2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. Planta 216: 723-735

P. Zeng, D. A. Vadnals, Z. Zhang, J. C. Polacco. 2004. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max*(L.) Merrill]. Plant Cell Rep 22: 478-482

Ren-Gao Xue, Hong-Feng Xie, Biao Zhang. 2006. A multi-needle-assisted transformation of soybean cotyledonary node cells. Biotechnol 28: 1551-1557

Zhihui Shan, Krit Raemakers, Emmanouil N. Tzitzikas, Zhengqiang Ma, Richard G. F. Visser. 2005. Development of a highly efficient, repetitive system of organogenesis in soybean [*Glycine max*(L.) Merr]. Plant Cell Rep 24: 507-512