

자외선 照射에 의한 *Agrobacterium tumefaciens* Arginine 要求株의 유도와 선발

李潤·朴魯東·金廣植

전남대학교 농과대학 농화학과
(1985년 5월 10일 수리)

Mutation and Selection of *Agrobacterium tumefaciens* Arginine Auxotroph by UV Irradiation

Yearn-Lee, Ro-Dong Park and Kwang-Sik Kim

Department of Agric. Chem., College of Agriculture, Chonnam National University,
Kwang-ju, Korea

Abstract

UV irradiation method was applied to *Agrobacterium tumefaciens* A 136 to obtain arginine auxotrophic mutant which is applicable as a host of Ti-plasmid.

When the bacterial growth was measured at 600 nm, it showed the exponential phase between 7 and 16 hours after 2% inoculation (v/v) in TY medium and the generation time of 4.8 hours. Survival rate of 1~0.1% was reserved when irradiated at the intensity of 800 $\mu\text{w}/\text{cm}^2$ for 30~50 sec.

Fifteen mutants were selected among 5,000 colonies after UV irradiation. Two of them were identified as arginine auxotrophs, three of them as asparagine auxotrophs, and the other not as arginine, asparagine, glycine nor cysteine auxotrophs.

緒言

1970년 Smith 와 Townsend¹⁾는 식물의 crown gall 이 *Agrobacterium tumefaciens* 라고 불리우는 세균에 의해 기인한다는 것을 발견했다. 그 후 포도 및 햅과류 등에 미치는 경제적 손실을 줄이고자 이에 대한 많은 연구가 이루어져 왔으며²⁾ 대부분의 쌍자엽식물과 일부 단자엽식물 및 나자식물에서 tumor 가 형성될 수 있다는 것이 밝혀졌

다.³⁾ crown gall 은 植物의 토양 표면 근처 부위에서 형성되며, 실험실에서도 감염시켜 만들 수 있는데 식물체에 바로 접종하면 거의 tumor 가 형성되지 않지만 상처를 넣 후에 접종하면 쉽게 tumor 가 생긴다.^{4,5)} tumor 가 생성되는 동안 박테리아는 세포간극과 세포로 들어가 증식하고 인접한 건강한 세포의 세포벽에 있는 특정한 부위에 붙는다.^{6,7)}

별원성이 없는 *Agrobacteria* 는 세포벽의 특정한 결합부위에서 별원성이 있는 *Agrobacteria* 와

경쟁하여 tumor의 생성을 방해한다. 별원성 *Agrobacteria*를 고온에서 배양하는 동안 비별원성 *Agrobacteria*가 많이 생성되는 것이 발견되었는데⁹⁾ 이것은 별원성 *Agrobacteria*가 tumor-inducing(Ti) plasmid라고 하는 large plasmid (1.2×10^6 dalton)를 잃어버리는 데 기인하는 것으로 밝혀졌다.^{7~10)}

crown gall 조직은 auxin과 몇 가지 cytokinin의 생성능이 있기 때문에 식물 생장조절체가 첨가되지 않은 기본적인 식물 조직배양 배지에서 자랄 수 있다.^{11, 12)} 또한 octopine, lysopine, agropine type 등^{13~19)} 특이한 형태의 amino acid 유도체(opines)가 tumor cell에서 발견되었다. 이들 tumor specific amino acid는 식물체에 의해서 합성되어 Ti-plasmid를 보유한 *A. tumefaciens*의 탄소와 질소의 공급원으로 이용되는데 각각의 Ti-plasmid에 의해 유도된 crown gall은 이에 대응하는 형태의 opines를 생성한다.²⁰⁾

1977년 Chilton 등은²¹⁾ southern blotting 방법에 의해 Ti-plasmid의 약 5% (15~20 kb)가 식물세포의 염색체로 끼워 들어감으로써 tumor가 유도됨을 밝혔다. 한 DNA가 다른 DNA로 끼워들어가는 성질을 이용하여 Ti-plasmid를 식물세포에 유전자를 도입시키는 Vector로 이용하려는 연구가 많이 진행되고 있다.

이때 재조합된 Ti-plasmid를 속주 *Agrobacteria*에 移植시켜 형질전환시키는 단계가 필수적이며, 형질전환된 *Agrobacteria*만 선발할 수 있는 적절한 방법이 필요하다.

이와 관련하여 이용할 수 있는 genetic marker는 Ti-plasmid가 移植된 *A. tumefaciens*는 octopine이나 nopaline을 이용할 수 있다는 점이다.^{22~24)} 속주로 이용되는 *A. tumefaciens*를 예를 들면 arginine 영양요구주(auxotroph)로 만들면 arginine source로서 opine을 배지에 첨가했을 때 Ti-plasmid가 移植된 *Agrobacterium*은 生存할 수 있으나²⁵⁾ Ti-plasmid가 移植되지 않은 菌은 arginine을 얻지 못해서 자라지 못하게 될 것이다. 그러므로 arginine 등의 아미노산을 필요로 하는 *Agrobacteria auxotroph*를 Ti-plasmid의 속주로 이용할 수 있다면 형질전환된 *Agrobacteria*를 선발하는 데에 도움이 될 것으로 본다.

바로 여기에 착안하여 본 실험에서는 *A. tumefaciens*를 자외선 조사에 의하여 arginine 영양요구주로 만들고자 하였다.

材料 및 方法

1. 재료

- 균주 : *Agrobacterium tumefaciens* A 136 (Rifampicin resistance, plasmid free)을 농업기술연구소에서 분양받았다.
- 시약 : L-arginine, L-asparagine, L-cysteine, L-glycine, carbenicillin (Cb), lysozyme (Lys), KH_2PO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, glucose, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 미국 Sigma 社의 제품을, tryptone, yeast extract, Bacto agar는 미국 Difco 社제 의품을, NH_4NO_3 , H_3BO_3 , NaMnO_4 는 일본 關東化學 제품을 사용하였다. 이들 시약은 GR 級, EP 級 또는 生化學用이었다.

2. 방법

1) 배지

- (1) TY 배지 : tryptone 5g yeast extract 3g, agar 15g(for solid media)를 증류수에 녹여 1l로 채웠다.

(2) MM(Minimal Media)배지 : K_2HPO_4 2.05g, KH_2PO_4 1.45g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50g, NaCl 0.15g, NH_4NO_3 0.5g, $\text{F}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0025g, Mn $\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0005g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0005g, $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0005g, H_3BO_3 0.0005g, NaMnO_4 0.0005g, glucose 2g, agar 15g(for solid media)를 증류수에 녹여 1l로 채웠다.

(3) MN+Cb+Lys : MN 배지 1l에 carbenicillin 500mg과 lysozyme 100 mg를 넣이고 milipore filter(0.45 μm)를 통하여 제균하였다.

2) 균주배양 : 냉동건조된 균을 TY 배지에 넣고 30°C에서 진탕배양(150 rpm)하여 seed로 사용하였다. 이를 TY 배지에서 배양한 후 4°C 냉장고에 보관하고 1 주 간격으로 계대배양하면서 접종재료로 사용하였다.

3) 생장 측정 : TY 배지에서 하룻밤동안 30°C에서 진탕배양하면서 만든 seed를 2%로 접종하여 30°C로 배양하면서 2 시간마다 3ml 씩 쥐하여 UV-Vis-spectrophotometer(Beckman Model 26)로 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 자외선 조사시간에 따른 생존율 측정 : TY 배지에서 배양한 균($A_{600}=0.8$)을 5ml 씩 취하여 멀균한 원심분리 tube 안에 넣고 6,000 rpm에서 10

분간 원심분리하여 멸균한 증류수 5ml로 씻은 다음 직경 9cm의 petridish에 분산시키고 이를 clean bench 안에서 자외선 등(GL-15, TOKO Electric cooperation) 아래 20cm 떨어진 위치 ($800\mu\text{w}/\text{cm}^2$)에 놓고 잘 혼들어 주면서 시간별로 자외선을 照射했다.

對照는 10^6 배로, 20초 조사한 시료는 10^4 배, 40초와 70초 조사한 시료는 10^3 배로 희석하여 각각 0.1ml씩 취하여 TY plate에 각각 8개씩 도말하고 2일뒤 colony 수를 세어 생존율을 조사했다.

5) 변이의 유도와 변이균주의 검색 : 자외선을 이용한 변이의 유도와 변이균주의 검색은 Fig. 1과 같은 순서로 진행했으며 모든 조작은 clean bench 안에서 무균적으로 수행하였다. Agrobacteria의 변이를 유도할 때는 처음의 생존율 조사시와 같이 처리하고 40초동안 자외선을 조사하고 다음 단계부터는 어두운 조건에서 취급하여 원심분리한 세포를 모아 0.9% NaCl로 씻어 다시 원심분리한 다음 5ml TY 배지에 혼탁시켜 하룻밤 배양하였다. 그리고 다음날 원심분리하여 멸균한 증류수로 두 번 씻고 MM+Cb+Lys 5ml에 넣고 5시간 전탕 배양하였다. 다시 원심분리하여 멸균증류수로 2번 씻고 TY 배지 5ml에 하룻밤 전탕배양했다. 다음 날 1ml를 취하여 멸균수로 희석하여 TY plate에 도말하고 2일후에 colony 하나 하나씩을 멸균한

이쑤시게로 따서 TY plate와 MM plate에 같은 위치에 옮겨 MM에서는 자라지 못하고 TY배지에서는 자라는 변이균주를 선발하고 다시 MM+amino acid 배지에 옮겨 변이균주의 영양요구성을 조사하였다. 이 실험을 할 때 자외선을 조사하지 않은 균주의 실험도 병행하였다.

結果 및 考察

1. 균주의 생장

菌의 生育을 측정하기 위한 기초자료를 얻기 위하여 배지와 균주에 대한 가시광선 영역에서의 흡광도를 조사하였다(Fig. 2). 파장이 짧을수록 배지+세포의 흡광도는 높았으나, 파장 600nm에서 배지의 영향을 최소로 줄이면서 세포의 농도를 비교적 민감하게 측정할 수 있었다. 그래서 이후 *A. tumefaciens*의 생육은 600nm의 흡광도로 측정하였다.

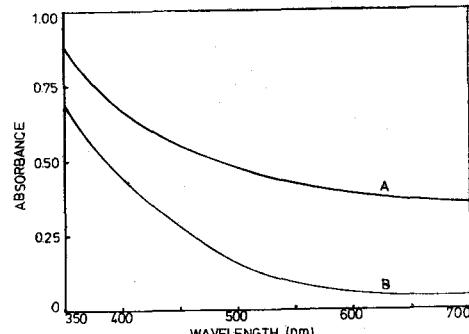


Fig. 2. Absorption spectra of TY medium (B) and *Agrobacteria* suspended in TY medium (A)

흡광도를 측정하여 얻은 *A. tumefaciens*의 생장곡선은 Fig. 3과 같았다. 다른 세균과 마찬가

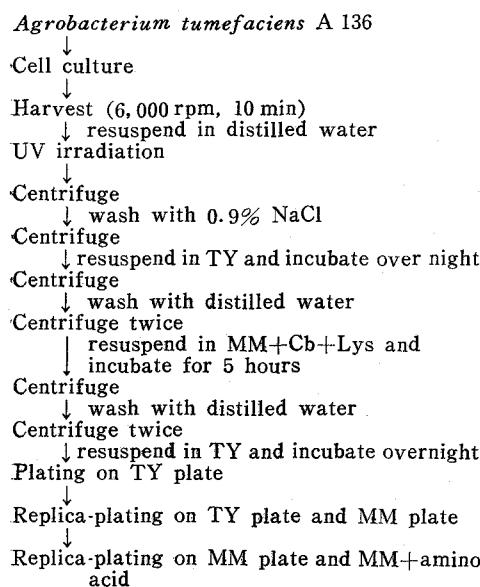


Fig. 1. Flow sheet for the mutation of *A. tumefaciens* by UV irradiation and the selection of the mutants

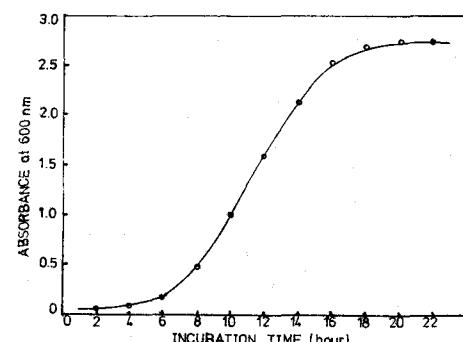


Fig. 3. Growth curve of *A. tumefaciens* A 136 in TY medium at 30°C

지로 유도기, 대수기, 정지기로 구분할 수 있었으며 대수기는 접종 후 7시간부터 16시간 사이였다. Fig. 3에서 구한 generation time은¹⁰⁾ 4.8시간이었다.

2. 자외선 조사시의 생존율

강도 $800\mu\text{w}/\text{cm}^2$ 의 자외선을 조사하여 생존율을 조사한 결과는 Fig. 4와 같았다. 변이를 유발하기 위한 적정생존율 $1\sim0.1\%$ 를 보이는 照射時間은 30초와 50초 사이였다.

3. 변이의 유도와 변이균주의 검색

Fig. 1에 보인 변이유도 과정중 TY배지는 MM+Cb+Lys 처리에 조금만 들어가도 균의 생육에 영향을 미칠 수 있고, 또한 남아있는 MM+Cb+Lys 배지도 다음 단계에 영향을 미치므로 충분한 양의 멀균한 중류수로 2번 씻어줬다.

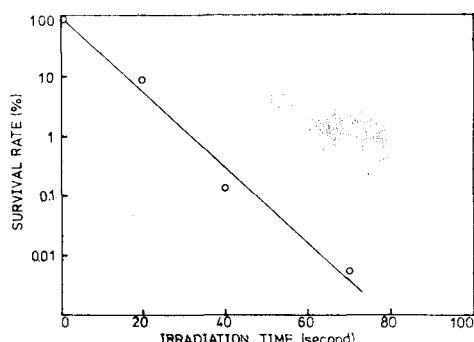


Fig. 4. Relationship between survival rate of *A. tumefaciens* A 136 and UV irradiation time

또한 자외선에 의한 mutation은 광선에 의해 reactivation이 일어날 소지가 있으므로 본 실험에서는 자외선 조사 이후의 단계는 어두운 조건을 택하여 조작하였다. 자외선을 조사하지 않은 균주의 mutation 실험을 병행한 결과 mutant가 발견되지 않아 자연돌연변이는 무시할 수 있었다.

그리고 일반적인 mutation 선발시와는 다르게 mutant의 확률을 높여주기 위해 MM+Cb+Lys 배지를 사용하였던 바, 자외선을 처리하지 않아 MM배지에서 자라는 균은 carbenicillin에 의해 세포벽 합성이 저해되고 lysozyme에 의해 균이 깨져 MM+Cb+Lys 배지 내에서 접성이 상당히 있었으나 자외선을 조사한 균들은 MM+Cb+Lys 배지에서는 외관상으로 이상이 없었다.

자외선 照射로 mutation 시킨 다음 5,000개의 colony에 대하여 TY배지에서는 자라고 MM배지에서는 자라지 못하는 colony를 조사하여 15주의 mutant를 얻었다. 이들에 대한 arginine, cysteine, glycine, asparagine의 4 가지 아미노산에 대한 영양요구성을 조사한 결과는 Table 1과 같았다.

Table 1. Amino acid auxotrophic characterization of 15 mutants selected among 5,000 colonies

Mutants	Amino acids			
	Arg	Cys	Gly	Asn
1	+	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	-	-	+
4	-	-	-	+
5	-	-	-	+
6~15	-	-	-	-

(+ : auxotroph)

mutant 1과 2는 arginine 영양요구주였고 mutant 3~5는 asparagine 영양요구주였다. 나머지 10株의 mutant는 적어도 실험에 사용한 4種 아미노산의 영양요구주가 아닌 것으로 드러났다. arginine 영양요구주의 경우 amino acid acetyl transferase에서 N-acetylnorleucine deacetylase에 이르는 몇 가지 효소의 gene 중에 어느 것이 자외선에 의해 기능을 잃어 됨으로써 arginine을 합성할 수 있는 능력을 상실했다고 생각되었다.⁶⁾

Fig. 5에서는 일어진 mutant의 arginine과 asparagine 영양요구성을 보여주고 있다. TY배지에서는 자라고 MM에서는 생존하지 못하는 3개의 random mutants를 얻었고 이것을 다시 MM

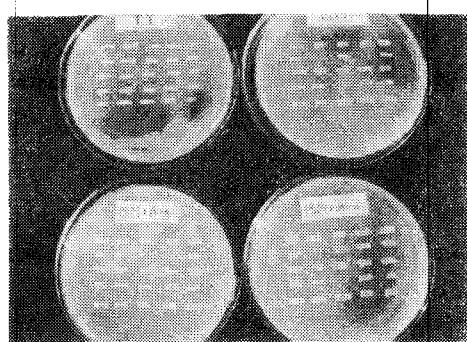


Fig. 5. Photograph showing the selection of amino acid auxotrophic mutants.

+Arg, MM+Asn에 같은 위치에 걸렸을 때 3개의 mutant 중 2개는 arginine 영양요구주이고 1개는 asparagine 영양요구주임을 알 수 있었다.

이렇게 얻은 *Agrobacterium tumefaciens* A/36 arginine 영양요구주를 Ti-plasmid의 속주 bacteria로 사용할 경우 lysopine dehydrogenase^{2,26)}나 nopaline dehydrogenase를 만드는 Ti-plasmid를 가지는 arginine 영양요구주는 arginine 대신 첨가해 준 opines를 분해하여 생장할 수 있지만 Ti-plasmid가 移植되지 아니한 arginine 영양요구주는 opines를 이용하지 못하고 따라서 생장하지 못하게 될 것이다.

그리므로 Ti-plasmid를 이식시킨 다음 형질전환 여부를 일일이 식물체에 균을 접종하여 몇 주 일 후에 tumor의 생성 여부를 확인하여 알아보는 대신에, 그리고 확률이 낮은 Ti-plasmid의 형질전환시 수많은 *Agrobacterium* 중에서 몇개의 형질전환된 *Agrobacterium*를 선발해야 할 때 arginine 영양요구주를 속주박테리아로 이용하면 시간과 노력을 아끼면서 간단하게 Ti-plasmid 보유균주를 선발할 수 있을 것으로 보인다.

摘要

Agrobacterium tumefaciens A 136에 자외선은 照射하여 Ti-plasmid 속주로 이용할 수 있는 arginine 영양요구주를 선발하고자 하였다.

*A. tumefaciens*의 생육을 600 nm에서의 吸光度로 측정할 때 TY 배지에서 2% 접종시 7시간부터 16시간 사이에 대수기를 보였고 generation time은 4.8시간이었다. 800μw/cm²의 자외선 강도로 30~50초 照射에서 1~0.1%의 생존율을 보였다.

자외선 照射로 mutation을 유도한 다음 5,000개의 colony에서 15개의 mutants를 얻었으며 그 중 2개는 arginine 영양요구주였고 3개는 asparagine 영양요구주였다.

引用文

- Smith, E.F. and Townsend, C.O.: Science, 25 : 671(1907).
- Montoya, A.L., Moore, L.W., Gordon, M.P. and Nester, E.W.: J. Bacteriol., 136 : 909 (1978).
- De Cleene, M. and De Ley, J.: Bot. Rev., 42 : 389(1977).
- Lippincott, B.B. and Lippincott, J.A.: J. Bacteriol., 97 : 620(1969).
- Marton, L., Wullems, G.J., Molondijk, L. and Schilperoort, R.A.: Nature, 277 : 129 (1979).
- Lehnninger, A.L.: Biochemistry, Worth Publisher Inc., New York (1975).
- Van Larebeke, N., Engler, N.G., Holsters, M., Van den Alsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A. and Schell, J.: Nature, 252 : 169(1974).
- Hamilton, R.H. and Fall, M.Z.: Experientia, 27 : 229(1971).
- Zaenen, N., Van Larebeke, N., Teuchy, H., Van Montagu, M. and Schell, J.: Mol. Biol., 86 : 109(1974).
- Stainier, R.Y., Adelberg, E.A. and Ingraham, J.L.: Microbial World, Prentice Hall Inc., New Jersey (1976).
- Bamhoff, G.H., Klapwijk, P.M., Kester, H.C.M., Schilperoot, R.A., Hernalsteens, J.P. and Schell, J.: Mol. Gen. Genet., 145 : 177(1976).
- Klapwijk, P.M., Scheulderman, T. and Schilperoot, R.A.: J. Bacteriol., 136 : 775(1978).
- Firmin, J.L. and Fenwick, G.: Phytochemistry, 16 : 761(1977).
- Hooykaas, P.J.J., Klapwijk, P.M., Nuti, M.P., Schilperoot, R.A. and Rorsch, A.: J. Gen. Microbiol., 98 : 477(1977).
- Kemp, J.D.: Biochim. Biophys. Res. Commun., 69 : 815(1976).
- Kemp, J.D.: Plant Physiol., 62 : 26(1978).
- Kerr, A. and Robert, W.P.: Physiol. Plant Pathol., 9 : 205(1976).
- Lippincott, J.A., Lippincott, B.B. and Chang, C.C.: Plant Physiol., 49 : 131(1972).
- Southern, E.M.: J. Mol. Biol., 98 : 503(1975).
- Klapwijk, P.M., Hooykaas, P.J.J., Kester, H.C.M., Schilperoot, R.A. and Rorsch, A.: J. Gen. Microbiol., 96 : 155(1976).
- Chilton, M.D., Drummond, M.H., Merlo, D.J., Sciaky, D., Momtoma, A.L., Gordon,

- M.P. and Nester, E.W.: Cell, 11 : 263(1977).
22. Lippincott, J.A. and Lippincott, B.B.: Ann. Rev. Microbiol., 29 : 377(1975).
23. Milani, V.J. and Heberlein, G.T.: J. Virol., 10 : 17(1972).
24. Montoya, A.L., chilton, M.D., Gordon, M.P., Sciaky, D. and Nester, E.W.: J. Bacteriol., 129 : 101(1977).
25. Klapwijk, P.M., Oudshoorn, M. and Schilperoort, R.A.: J. Gen. Microbiol., 102, 1 (1977).
26. Otten, L.A.B.M., VREUGDENHIL, D. and Schilperoort, R.A.: Biochim. Biophys. Acta, 485 : 268(1977).