

담배 원형질체의 전기융합을 위한 pH 및 Ca^{2+} 농도 최적조건 결정

오 인 숙 · †소 상 섭 · 김 환 규

전북대학교 생물과학부

(접수 : 1998. 3. 18., 게재승인 : 1998. 8. 18.)

Optimum Conditions of pH and Ca^{2+} Concentration for Electrofusion of Tobacco Protoplasts

In-Suk Oh, Sang-Sup So†, and Hwan-Gyu Kim

Faculty of Biological Sciences, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, Korea.

(Received : 1998. 3. 18., Accepted : 1998. 8. 18.)

This study was carried out to optimize the concentration of Ca^{2+} and pH of fusion medium which affected electrofusion frequency of protoplasts isolated from *Nicotiana tabacum* L. (cv. BY4) mesophyll cells and callus. The protoplasts were electrofused in the fusion media containing two different Ca^{2+} concentrations and three different pH regions. Fusion frequency was lower in the fusion medium containing only 13% mannitol as osmotic stabilizer. However, higher degree of fusion frequency (47.3%) was observed in the fusion medium containing 50mM $CaCl_2$ at pH 10.5 than any other conditions. Cell viability was decreased by Ca^{2+} and high pH treatment in the fusion media, while fusion frequency was increased. It is concluded that Ca^{2+} is involved in electrofusion of protoplasts.

Key Words : protoplast, callus, electrofusion

서 론

고등식물의 세포로부터 많은 양의 원형질체를 효율적으로 분리할 수 있는 가능성이 증명(1)된 이래 다각적인 측면에서 원형질체를 이용한 연구가 시도되고 있다. 원형질체는 단순히 세포벽이 없는 세포가 아니라 식물세포가 가지는 전체형성능이 있어 세포수준의 많은 연구에 하나의 중요한 재료로 이용되어지고 있다. 특히 원연관계에 있는 서로 다른 두종의 원형질체를 융합시킴으로써 종래 육종방법으로는 불가능했던 체세포잡종의 형성이 가능해졌으며, 나출원형질체에 의해 이물질 - DNA, 바이러스, 엽록체, 핵 및 세균 등을 용이하게 이식시킬 수 있는 장점(2-5)이 있어 현재 유전, 육종학, 병리학, 분자생물학 및 유전공학 등의 분야에서 널리 이용되어지고 있다.

원형질체융합은 그동안 가장 넓게 사용 되어지는 화학융합제인 polyethylene glycol(PEG)을 이용한 방법(6,7)과 세포융합을 위한 칼슘 등의 이온을 이용한 방법(8) 등이 보편적이었다. 그러나 이들 융합제는 그 자체의 독성을 포함해서 비교적 낮은 융합률(9)과 융합되어지는 세포들의 형태에 관한 조정

(10)의 어려움으로 현재 권장되어지고 있는 방법은 아니다. 이와 같은 단점을 보완하기 위해 새로이 시도되고 있는 방법이 세포막에 전기충격을 주어 원형질체를 융합시키는 기술이다(11).

이 전기융합 방법은 융합빈도가 높고, 융합조건을 즉각적으로 수정하고 조정할 수 있으며, 융합시 세포구성 성분들의 손실을 최소로 할 수 있어 세포의 생존률이 높으며 융합이 동시적으로 유도되어 현미경적인 관찰이 가능하다(12, 13). 이와 같은 장점으로 식물 원형질체의 전기융합에 관하여 많은 관심이 집중되고 있는바 보다 효율적인 융합체의 형성을 위하여 융합기기가 개선되고(12), 전기적 충격이 세포에 미치는 영향들, 즉 세포의 생존력(14), 세포벽 생성 및 세포의 분열능력(15) 등이 밝혀짐으로써 원형질체의 전기융합에 의한 체세포 잡종생성의 가능성이 커지게 되었다.

또한 전기충격에 의한 원형질체 융합시 융합률은 원형질체의 기원과 크기의 영향(14), 전기장의 세기와 충격시간 그리고 융합용액의 조성(16) 및 온도(17) 등 여러 가지 요인에 의하여 좌우된다고 알려져 있다.

따라서 본 연구에서는 쌍자엽식물의 담배 엽육 및 캘러스(callus)조직을 사용하여 융합의 기본재료로 쓰일 원형질체의 분리율을 높이고 동시에 생존력을 지속시킬 수 있는 최적조건을 구명함과 동시에 기존 PEG를 이용한 화학융합 방식의 단점을 보완하고 현재 방법적인 측면에서 보편화되지 않은

† Corresponding Author : Faculty of Biological Sciences, Chonbuk National University, Chonju, Chonbuk 561-756, KOREA

Tel : 0652-270-2786, Fax : 0652-270-3362

전기융합기술의 개선과 융합률 및 융합세포의 생존력 등을 높히는데 그 목적을 두고 있다. 특히 본 실험에서는 전기충격에 의한 융합방식을 채택함과 동시에 일반적으로 세포간 응집을 방해하는 원형질체 표면의 음전하(18,19)를 제거시키기 위해 H^+ 및 Ca^{++} 등의 양이온을 융합매체에 적용시키면서 보다 상승된 융합효과를 기대코자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

가지과 식물인 담배(*Nicotiana tabacum* L. cv. BY4)를 온도 $27 \pm 2^\circ C$, 습도 70%의 온실에서 8-12주 재배하면서 완전히 전개된 중엽과 이로부터 MS(Murashige and Skoog) 배지(20)에서 유도 재배배양한 캘러스조직을 원형질체 나출재료로 이용하였다. 담배의 종자 및 유식물은 한국인삼연구소로부터 분양받은 것을 사용하였다.

원형질체 분리

완전히 전개된 잎의 엽육조직을 70% ethanol과 1% sodium hypochlorite 용액으로 표면 살균하고 멸균수로 수차 세척한 후 1mm 정도 넓이로 잘게 자른 다음 13% mannitol이 첨가된 세포 및 원형질체 세척용액(cell and protoplast washing solution, CPW : 0.2mM KH_2PO_4 , 1mM KNO_3 , 1mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 μM KI, 0.1 μM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 및 1mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$)에 1시간 가량 침지시킨 후 효소용액(1% cellulase와 0.1% macerozyme)에서 10시간 배양시켰다. 캘러스조직에서 원형질체 분리는 캘러스를 1mm의 coarse sieve를 통과시킨 후 CPW에 1시간 정도 처리하여 원형질분리 현상을 일으킨 다음에 효소용액(2% cellulase, 2% macerozyme 그리고 2% driselase)에서 12시간 처리 하였고, 이때 치상조건으로는 $28-32^\circ C$ 암조건에서 35 rpm으로 진탕배양시켰다. 그리고 원형질체를 정제하기 위하여 원형질체와 효소 혼합용액을 60 μm sieve에 통과시켜 세포 덩어리를 제거시키고, 유리된 원형질체를 13% mannitol이 첨가된 CPW 용액으로 2-3회 세척한 후 CPW에 21% sucrose를 녹인 용액으로 원심분리하여 원형질체와 잔여물을 분리시켰다.

전기융합

엽육 및 캘러스조직으로부터 정제된 각 원형질체는 pH와 Ca^{++} 양이 서로 다른 9개의 융합용액에 현탁하여 150g에서 5분간 원심분리에 의하여 2회 세척한 후 각각의 원형질체 농도를 hemacytometer로 계수하여 5×10^5 protoplasts/ml로 조정된 후 이를 융합재료로 이용하였다.

전기융합은 Tempelaar 등(14)의 방법을 수정하여 다음과 같이 실시하였다. 즉, 9개의 융합용액에 5×10^5 protoplasts/ml의 농도로 조절된 엽육 및 캘러스 조직의 각 원형질체를 1:1의 비율로 섞은 5ml의 원형질체 혼합액을 electrofusion system(Invitrogen, Electroporator II)의 fusion chamber로 사용된 분획 페트리디쉬 각각에 넣은 후 전극을 넣어 교류 550V/cm와 800KHz를 통과시켜 원형질체사슬(pearl chain)을 형성시킨 후 직류 1.5kV/cm에서 13.6 μsec 동안 전기 충격을 주어 융합시켰다.

전기융합 후 생존률과 융합률

전기융합을 받은 원형질체의 생존상태는 융합용액내의 원형질체를 fluorescein diacetate(FDA)로 2-3분간 염색(21)한 후 형광현미경하에서 hemacytometer를 이용하여 측정하였다. 융합률은 carbol fuchsin 용액으로 3-5분간 핵 염색(22)을 한 후 hemacytometer를 사용하여 광학현미경하에서 하나의 원형질체내의 염색된 핵의 수로서 확인하였다.

결과 및 고찰

원형질체 분리

엽육 및 캘러스조직으로부터 분리한 각각의 원형질체는 Figure 1, 2와 같다. 엽육조직에서 얻어진 원형질체(Figure 1)는 많은 엽육체를 갖고 있어서 녹색을 띄고, 그 크기는 $32 \pm 5 \mu m$ 정도로 비교적 균일하였다. 한편 캘러스조직으로부터 분리한 원형질체(Figure 2)는 엽육체의 관찰이 거의 되지 않아 백색에 가까웠으며 크기는 $40 \pm 30 \mu m$ 정도로 매우 다양하였다. Figure 3은 배양시간에 따른 분리율을 나타낸 것으로서 최고치를 나타낸 것은 엽육 및 캘러스조직에서 각각 신선중(fresh weight) 그람당 6.3×10^5 및 5.4×10^5 개였다. 원형질체 분리율은 효소용액의 물리 화학적인 조건에 따라 달라지는 것이 일반적이거나(23), 본 실험에서는 배양 후 10시간 경과 후에 최고치를 나타냈는데, 기보의 결과 (24, 25)에 비하여 비교적 긴 시간이 소요된 것은 전기융합에 사용될 재료로서 삼투물질의 유지를 위하여 효소액의 농도를 낮춘 결과였다.

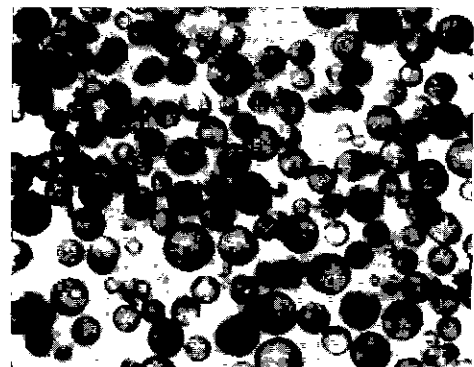


Figure 1. Protoplasts isolated from *Nicotiana tabacum* L. (cv. BY4) mesophyll cells (200X).

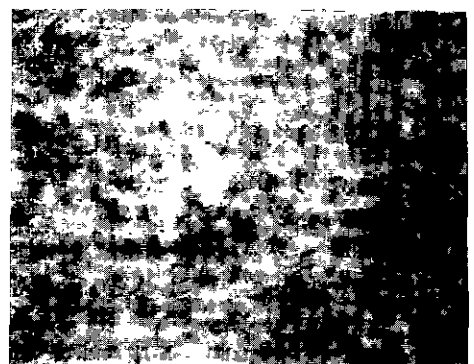


Figure 2. Protoplasts isolated from *Nicotiana tabacum* L. (cv. BY4) callus (200X).

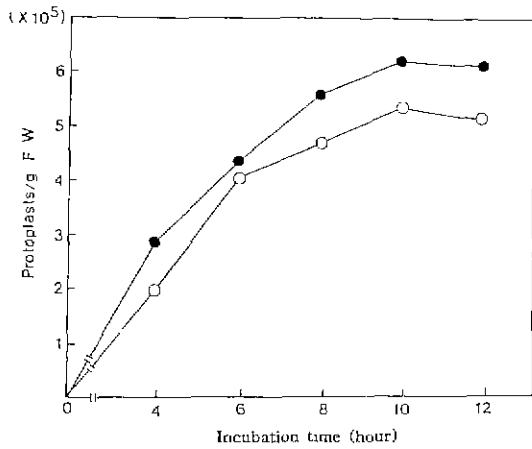


Figure 3. Effects of induction time on the yields of protoplasts isolated from mesophyll cells (●) and callus(○) of *Nicotiana tabacum* L. (cv. BY4) in the enzyme solution

전기융합

담배의 엽육과 캘러스조직으로부터 각각 분리한 원형질체를 pH 5.8, 7.0 및 10.5에서 Ca²⁺의 농도가 50mM과 100mM로 각각 첨가된 9개의 시험구를 약 1시간 가량 현탁 배양한 후 전기융합시켰다. Figure 4는 엽육과 캘러스조직의 원형질체양을 각각 5×10⁷ protoplast/ml로 조정후 각 배지에서 혼합된 상태를 나타낸 것이다. 각 배지의 융합률과 융합 이후 생존률은 다르나 전기충격에 의한 각 배지에서 원형질체의 융합기작은 동일하다(26, 27). 즉, 세포막에 존재하는 음전하가 교류 전기장의 밀도가 높은 곳으로 이동하여 나열되는데, 이러한 dielectrophoresis 현상에 의하여 세포들이 전기장을 따라 밀접하게 접촉된 후, 짧은 시간 동안의 직류를 주면 세포막의 파괴가 일어나고 이어서 세포막의 재유착 과정에 의하여 두세포간에 융합이 일어나게 된다. Figure 5는 동일한 융합형태를 갖는 13% mannitol(pH 5.8) 배지에서의 원형질체 융합과정을 나타내고 있는데, 먼저 교류 550V/cm에서 dielectrophoresis 현상에 의하여 원형질체들이 원형질체사슬을 형성하고 있으며(Figure 5a), 이어 직류를 주었을 때 원형질체사슬 중의 접촉된 원형질체간의 융합이 이루어지는 것이 관찰 되었다(Figure 5b, c, d). 담배 원형질

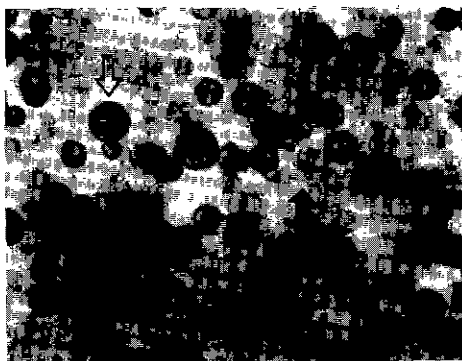


Figure 4. Mixture of protoplasts isolated from *Nicotiana tabacum* L.(cv. BY4) mesophyll cells and callus(⇔:mesophyll protoplasts, ⇨:callus protoplasts) (200X).

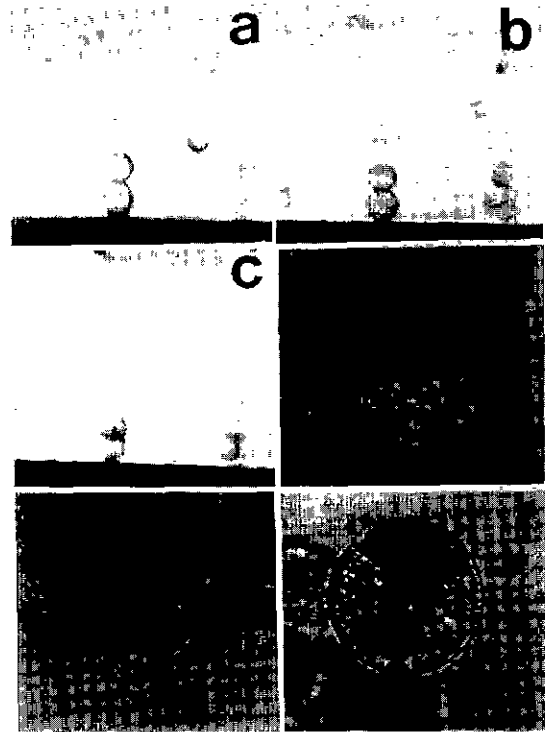


Figure 5. The electrical fusion-process between mesophyll and callus protoplasts of *Nicotiana tabacum* L. (cv. BY4). a : Pearl chains of protoplasts arranged in parallel by dielectrophoresis (200X). b, c, d, e : The fusion-process of protoplasts within pearl chains of tobacco (b, c : 200X; d, e : 400X). f : A completely fused cell by electrofusion (400X)

체간의 융합은 1.5kV/cm의 직류를 13.6μsec 동안 가함으로써 완전히 융합된 것을 관찰하였다(Figure 5e, f).

융합률

Table 1은 엽육 및 캘러스조직으로부터 분리된 원형질체의 융합률을 각 배지별로 나타낸 결과이다 배지의 pH 조건은 기본배지 및 Keller 등(8)의 실험에 준하여 각각 pH 5.8, 7.0 및 10.5로 설정하였다. 각 세포의 융합은 carbol fuchsin으로 핵 염색한 결과 Figure 6에서와 같이 2개의 핵을 확인할 수 있었다. Table 1의 결과에서처럼 pH의 상승은 융합률을 높였는데, 특히 50mM Ca²⁺이 첨가된 pH 10.5의 조건에서 47.3%로서 최고치를 나타냈으며, 100mM Ca²⁺ 첨가구의 pH 10.5 조건에서는 41%를 나타내 첨가한 Ca²⁺의 한계를 보이고 있다. 이러한 결과로부터 비교적 높은 pH(pH>7)에서 Ca²⁺의 첨가는 융합률을 상승시킴을 확인할 수 있었다.

전기적 자극에 의한 융합률은 여러가지 요인에 의하여 좌우되는데 본 실험에서 융합배지 조성시 사용한 Ca²⁺은 원형질체의 분해에 대한 안정성과 원형질체 융합시 막의 특성을 응집하기에 좋은 상태로 만들어 융합을 촉진하는 것으로 여겨졌다(18, 19). 비록 동물세포의 경우이기는 하나 Yasunobu 등(28)의 보고에서도 Ca²⁺은 전기적으로 유도되는 세포융합에

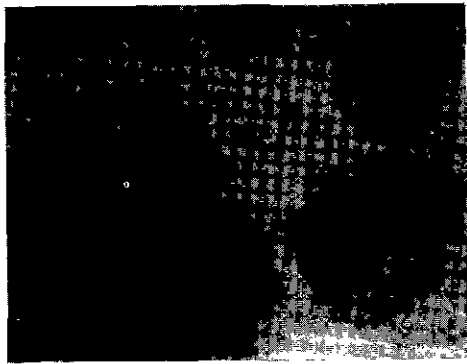


Figure 6. Nuclei of fused protoplasts detected by staining with carbol fuchsin (400X).

Table 1. The rates of electrofusion between mesophyll and callus protoplasts of *Nicotiana tabacum* L.(cv. BY4) under different chemical conditions of media.

Fusion media composition	pH	Fusion rate(%)
13% mannitol	5.8	25.8
	7.0	28.0
	10.5	28.5
13% mannitol + 50mM CaCl ₂	5.8	39.2
	7.0	40.4
	10.5	47.3
13% mannitol + 100mM CaCl ₂	5.8	38.6
	7.0	38.3
	10.5	41.5

Fusion rate(%) : (No. of fused protoplasts) / (No. of protoplasts before fusion) × 100

필수적임을 지적하고 있다. 한편, pH 효과에 대한 본 실험 결과는 pH 상승이 음전하를 띠는 식물원형질체의 막전위를 중화시킴으로써 융합을 촉진한다는 Keller 등(8)의 실험 결과와, 높은 농도의 무기염류가 존재하는 상태에서 고분자의 dextran sulfate와 dextran이 원형질체의 응집과 융합을 유도한다는 Toshaki 등(29)의 결과와 일치된다. 그러나 높은 pH(pH 11 이상)는 원형질체의 생존력을 감소시키므로 지적치 못한 것으로 판단되었다(8, 29).

생존률

전기융합 후 융합세포의 생존률은 Table 2와 같다. 각 배지의 조성은 앞의 융합용액과 동일하게 사용하였으며 pH의 조성 또한 기준배지의 pH 5.8과 7.0, 그리고 비교적 높은 pH에서 융합이 촉진되고 있는 Keller등(8)의 실험에 근거하여 pH 10.5까지로 조정하였다. Table 2에서와 같이 생존률은 pH 증가에 반비례 하는 것으로 나타났고 이는 pH 상승에 따른 생존률의 당연한 감소(8,29)로서, 앞의 융합율과는 상반된 결과를 보여 주었다. 또한 CaCl₂의 첨가는 삼투조절제인 mannitol

Table 2. The rates of viability of electrically fused cells between mesophyll and callus protoplasts of *Nicotiana tabacum* L. (cv. BY4).

Fusion media composition	pH	Viability rate(%)
13% mannitol	5.8	89.0
	7.0	86.2
	10.5	85.1
13% mannitol + 50mM CaCl ₂	5.8	87.5
	7.0	85.0
	10.5	80.1
13% mannitol + 100mM CaCl ₂	5.8	88.9
	7.0	82.7
	10.5	75.5

Viability rate(%) : (No. of stained protoplasts) / (No. of total protoplasts) × 100.

만이 첨가된 경우 보다 대체로 낮은 생존률을 보여 Ca²⁺의 역할은 단지 융합촉진에 필요한 요인인 것으로 확인할 수 있었다. 그러나 Meyer(30)는 이온성 삼투조절제인 KCl 및 MgSO₄로써 삼투능도를 유지시켰을 경우 오히려 Ca²⁺ 존재가 생존력을 높이는 것으로 보고하였는데 이는 융합세포의 배양 시 이들 이온이 배지내에서 무기영양소로서의 역할에 차이를 나타내기 때문이다.

요 약

본 연구는 담배 원형질체의 전기융합시 융합률 향상에 미치는 융합배지의 pH와 Ca²⁺의 영향을 밝히기 위하여 융합배지에 여러가지 농도의 Ca²⁺과 pH를 단독 혹은 혼용하여 전기 융합시켰다.

담배의 엽육 및 칼러스조직으로부터 정제된 원형질체를 pH와 Ca²⁺ 농도가 서로 다른 융합배지에서 전기융합시켰다. 각 배지에서의 융합률은 높은 pH (5.8 < pH ≤ 10.5)와 Ca²⁺ 첨가구가 원형질체의 최적 삼투조절제인 13% mannitol만을 첨가한 구보다 높았다. 특히 pH 10.5 의 50mM Ca²⁺ 첨가구에서 47.3%로 최고치를 나타냈다. 생존률은 pH 5.8배지에서 상대적으로 높은 pH 조건의 배지보다 높게 나타났으며 첨가된 Ca²⁺은 세포의 생존력 유지보다는 융합촉진을 위해 필요한 요인이다.

참 고 문 헌

- Cocking, E. C. (1960), A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles, *Nature*, **187**, 927-929.
- Davey, M. R. and E. C. Cocking (1972), Uptake of bacteria by isolated higher plant protoplasts, *Nature*, **239**, 455-456.
- Bonnett, H. T. and T. Eriksson (1974), Transfer of algal chloroplasts into protoplasts of higher plants, *Planta*, **120**,

- 71-79.
4. Otsuki, Y. and I. Takebe (1973), Infection of tobacco mesophyll protoplasts by cucumber mosaic virus, *Virology*, **52**, 433-438.
 5. Ohgaware, T., H. Uchimiya and H. Harada (1983). Uptake of liposome-encapsulating plasmid DNA by plant protoplast and molecular fate of foreign DNA, *Protoplasma*, **116**, 145-148.
 6. Kao, K. N. (1976), A method for fusion of plant protoplasts with polyethylene glycol, *Cell Genetics in Higher Plants*, (D. Dudits *et al.*, eds), pp.233-237, Akad. Kiado, Budapest.
 7. Hayashimoto, A., Z. Li and M. Norimoto (1990), A polyethylene glycol mediated protoplast transformation system for production of fertile transgenic rice plants, *Plant Physiol*, **93**, 857-863.
 8. Keller, W. A. and G. Melchers (1973), The effect of high pH and calcium on tobacco leaf protoplast fusion, *Planta*, **151**, 26-32.
 9. Zachrisson, A. and C. H. Bormann (1986), Electromanipulation of plant protoplasts, *Physiol. Plant*, **67**, 507-516.
 10. Saunders, J. A. (1985), Electrically induced fusion of cells and protoplasts. *Frontiers of Membrane Research Agriculture* (Beltsville symposium 9, Judith B. St. John, E. Berlin, and P. C. Jackson, eds), pp. 147-156, Rowman & Allanheld, Totowa, New Jersey.
 11. Zimmermann, U. and P. Scheurich (1981), High-frequency fusion of plant protoplasts by electric fields, *Planta*, **151**, 26-32.
 12. Bates, G. W., J. J. Gaynor and N. S. Shekhawat (1983), Fusion of plant protoplasts by electric fields, *Plant Physiol.*, **72**, 1110-1113.
 13. Finaz, C., A. Lefevre and J. Teissie (1984), Electrofusion : A new highly efficient technique for generating somatic cell hybrids, *Exp. Cell Res*, **150**, 477-482.
 14. Tempelaar, M. J. and M. G. K. Jones (1985), Fusion characteristics of plant protoplasts in electric fields, *Planta*, **165**, 205-216.
 15. Suh, J. W. and K. W. Lee (1986), Electrofusion of tobacco and pea protoplasts, *Korean J. Bot.*, **29**(1), 1-10.
 16. Tempelaar, M. J., A. Duyst, S. Y. Devlas, G. Krol, C. Symmonds and M. G. K. Jones (1987), Modulation and direction of the electrofusion response in plant protoplasts, *Plant Science*, **48**, 99-105.
 17. Ahkong, Q. F., D. Fisher, W. Tampion and J. A. Lucy (1975), Mechanisms of cell fusion. *Nature*, **225**, 66-67.
 18. Grout, B. W. W., J. H. M. Willison and E. C. Cocking (1972), Interaction at the surface of plant cell protoplasts : an electrophoretic and freeze-tech study, *J. Bioenerg.*, **4**, 311-328.
 19. Nagata, T. and G. Melchers (1978), Surface charge of protoplasts and their significance in cell-cell interaction, *Planta*, **142**, 261-262.
 20. Murashige, T. and F. Skoog (1968), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
 21. Larkin, P. J. (1976), Purification and viability determination of plant protoplasts. *Planta*, **128**, 213-216.
 22. Miller, R. A., O. L. Gamborg, W. A. Keller and K. N. Kao (1971), Fusion and division of nuclei in multinucleated soybean protoplasts, *Can. J. Genet. Cytol.*, **13**, 347-353.
 23. Uchimiya, H. and T. Murashige (1974), Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells, *Plant Physiol.*, **54**, 936-944.
 24. Seong, T. S., U. D. Yeo, W. Y. Soh and J. H. Kim (1985), Isolation and fusion of protoplasts from *Nicotiana glauca* mesophyll cell and *N. tabacum* tumor callus, *Korean J. Plant Tissue Culture*, **12**, 71-78.
 25. So, S. S., U. D. Yeo and W. Y. Soh (1986), Isolation and fusion of protoplasts from acacia and bush clover cultured cells, *Korean J. Plant Tissue Culture*, **13**(2), 137-142.
 26. Zimmermann, U., J. Vienken, G. Pilwat and M. Arnold (1984), Electro-fusion of cells : principles and potential for the future, *Cell Fusion* (Ciba Foundation symposium 103, D. Evered and J. Whelan, eds), pp. 60-85, Pitman Books, London.
 27. Kuta, A. E., R. S. Rhine and G. M. Heebner (1985), Electrofusion, *American Biotechnology Laboratory*, **3**(3), 31-37.
 28. Yasunobu O., O. S. Takako and S. Oiki (1984), Ca²⁺ is prerequisite for cell fusion induced by electric pulses, *Biomedical Research*, **5**(6), 511-516.
 29. Toshiaki, K. (1983), Studies on plant cell fusion by dextran : Effects of pH, inorganic salts and electrical stimulus, *Cytologia*, **48**, 873-878.
 30. Meyer, Y. (1974), Isolation and culture of tobacco mesophyll protoplasts using a saline medium, *Protoplasma*, **81**, 363-372.