

제주산 파인애플 유래 Bromelain관련 유전자 (BL1)를 이용한 형질전환 상추의 특성

정유진¹, 김기훈¹, 최장선¹, 이순열², 노일섭³, 박진희¹, 강권규^{1*}
¹한경대학교 원예학과, 일본 나라침단대학, 한경대학교 생명공학과, 순천대학교 원예학과

Characterization of Transgenic Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Using a BL1 Gene Encoding Bromelain Isolated from Pineapple

Yu Jin Jung¹, Kim Gi Hyun¹, Jang Sun Choi¹, Soon Youl Lee², Il Sup Nou³,
Jin Heui Park¹ and Kwon Kyoo Kang^{1*}

¹Department of Horticulture, Hankyong National University, 67 Seokjeong-dong, Ansong city, Kyonggi-do 456-749, South Korea,
²Department of Genomic Engineering, Hankyong National University, 67 Seokjeong-dong, Ansong city, Kyonggi-do 456-749, South Korea,
³Faculty of Plant Science and Production, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

ABSTRACT To clarify the roles of bromelain in plants, we isolated BL1 gene encoding bromelain from pineapple stem tissues and sequenced. The full length cDNA is 933 bp and encodes a polypeptide of 311 amino acid residues. The cDNA is most similar 94% at the amino acid level to bromelain previously isolated from pineapple (BAA21929). Explants of *Lactuca sativa* were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 strains containing *nptII* and BL1 gene for transformation. Through initial selection of regenerated explants by culturing on a kanamycin and carbenicillin containing MS medium, multiple shoots were obtained after 2 months of culture. For a complementary step of selection, putative transgenic shoots were transferred to 1/2 Ms basal medium supplemented with 100 mg/L kanamycin and 500 mg/L carbenicillin. The selected shoots were obtained T1 generation seeds with emasculation, and tested with PCR analysis using 35S promoter and BL1 specific primers whether BL1 gene was introduced to genome of the plants. These results confirmed that produced the specific PCR bands in the putative transgenic lines. Additionally the Northern blot and endo protease activity showed that transcripts of BL1 gene were detected in transgenic lines. These results suggest that BL1 gene be successfully integrated and transcribed in the transgenic lettuce plants.

Key words: Bromelain, overexpression, protease activity, transgenic Lettuce

서 론

파인애플 (*Ananas comosus*) 줄기에서 얻어지는 bromelain은 단백질 분해효소 중 cystein protease로 분류되는 protease의 복합체로 파인애플에 고농도로 존재함이 밝혀져 있다. 파인애플은 중세 시대부터 세계 여러 곳에서 민간

약용물질로서 사용이 되어왔으며, 파인애플로부터 추출되어진 bromelain은 보조소화제, 소염제 (Mynott et al., 2002 ; Manhart et al., 2002 ; Gaspani et al., 2002 ; Maurer 2001), 항 혈청 응고제, 항암작용, cytokines 조절 및 면역 작용, 피부 좌멸조직 제거, 순환계 활성화 증강등의 의약품으로써 효과가 있는 것으로 보고되어져 있다 (Engwerda et al., 2001). Bromelain은 보통 얻어진 기원으로부터 과일 bromelain과 줄기 bromelain으로 대별 되는데, 현재 줄기로부터 얻어진 bromelain이 의약품으로 널리 이용되어지고

*Corresponding author Tel 031-670-5104 Fax 031-670-5100
E-mail: kykang@hknu.ac.kr

있다. 또한 bromelain 은 단백질 분해 효소외에 peroxidase, acid phosphatase, protease inhibitor 등 여러 물질이 함유되어 있기 때문에 단백질 분해능은 동일해도 그 유래에 따라서 다른 효과를 보이는 것으로 보고되었다 (Manhart et al., 2002; Gaspani et al., 2002). Khan 등 (Khan et al., 2003)은 이들 효과를 단백질 합성과정이나 저장과정에서 glycosylation의 정도에 따라 활성의 변화를 보인다고 하였다. 일반적으로 bromelain 은 안정성이 매우 높아 부작용이나 독성이 없고 가장 중요한 특징 중 하나는 계속 사용하더라도 신체 내에 내성이 생기지 않으며, 섭취량의 40% 정도가 전혀 변화되지 않은 채로 흡수되고, 주로 섭취후 1시간 후에 혈액에서 가장 많이 발견이 된다. 또 다른 특징 중 하나는 이 물질은 351개의 amino acid 로 구성되어 있는 단백질이므로 다른 단백질과 같이 대사가 되어 분해가 되는 물질로 인체에 해가 없으나 열에는 안정되지 않는 것으로 알려져 있다 (Mynott et al., 2002). 본 연구에서는 파인애플 줄기로부터 분리한 bromelain 관련 BL1 유전자의 기능을 분석하기 위하여 상추에 형질전환체를 육성하여 그 특성을 살펴보았다

재료 및 방법

RT-PCR분석에 의한 BL1유전자의 분리

제주산 파인애플 줄기 (직경 0.5cm²)을 잘게 자른 15 g의 시료를 이용하여 Guanidine 방법 (Chirgwin et al. 1979)으로 total RNA를 추출한 후 oligo (dT)-column에 의해 poly(A)⁺ RNA를 조제하였다. RT-PCR 분석은 Gibco Superscript II Rnase H-Reverse Transcriptase protocol 에 따라 수행하였다. First strand cDNA는 5 µg RNA로부터 합성하였으며, primer 는 NCBI database로부터 얻어진 정보로부터 개시 codon과 종결 codon이 함유된 forward primer (5'-ATGGCTTCC-AAAGTTCAACTCGTG-3') 및 reverse primer (5'-TCAA-GTTTCAGAAACCATCTT-3')를 합성하여 사용하였다. PCR반응은 95℃ 에서 1분간 denaturation, 55℃에서 1분간 annealing, 72℃ 에서 2분간 extension 과정을 35cycle로 하였으며, 얻어진 산물을 1.5% 아가로스 겔 상에 영동한 후, ethidium bromide로 염색하여 band를 확인하였다. 증폭산물은 TA Cloning Vector (Promega)에 cloning 하여 염기서열을 조사하였고, 유전자간 상동성 비교는 BIAST 분석에 의하여 실시하였다.

식물 발현벡터의 구축

GUS 유전자를 포함하고 있는 pBI 121을 *Bam*H I 과 *Sac* I

처리에 의해 GUS 유전자를 제거한 후, 그 위치에 936 bp 의 BL1 유전자를 삽입시켰다. 이 재조합된 vector는 *E. coli* (XLI-Blue)에 형질전환 시킨 후, kanamycin 50 mg/L을 포함한 LB배지에서 선발된 단일 colony로부터 plasmid를 추출하여 insert DNA의 유무를 확인하였다. 확인된 plasmid는 액체질소를 이용하여 freeze-thaw method (An et al. 1988)에 의해 *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404와 EHA 101에 형질전환시켰다. 균주의 배양은 50 mg/L kanamycin 이 첨가된 LB 액체배지에 접종한 후, 2~3일 동안 28℃ 에서 배양하였다.

형질전환체 육성

무균 상태로 자란 상추 잎을 가로 0.5 cm, 세로 0.5 cm로 자른 뒤, NAA 0.5 mg/L, BA 0.1 mg/L을 포함한 MS고체배지에서 1일간 전배양 하였다. 전배양이 끝난 잎은 *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404, EHA101)을 전배양과 동일한 MS 액체배지에 OD=0.8로 조정된 후 5분간 침적하여 감염시켰다. 감염된 잎을 멸균된 filter paper로 여분의 *Agrobacterium* 을 제거하고 상기와 동일한 hormone 조성의 MS고체배지 위에 멸균된 filter paper를 한 장 깔고 그 위에 잎을 치상하여 2일간 28℃ 에서 암상태에서 공동배양하였다. 공동배양 후, 감염된 잎 절편의 *Agrobacterium tumefaciens*을 제거하기 위하여 500 mg/L의 carbenicillin이 포함된 멸균수에 3회 세척한 후, NAA 0.5 mg/L, BA 0.1 mg/L, kanamycin 100 mg/L, carbenicillin 500 mg/L을 포함한 MS배지에 치상하고 25℃ 에서 명 배양하여 callus를 유지 하였다. Callus로부터 재분화된 shoot는 kanamycin 100 mg/L이 포함된 MS hormone free 배지에서 뿌리를 유도하고 뿌리가 형성된 식물체는 포트에 이식하여 순화시켰다.

형질전환체의 검정

재분화된 식물체에서 BL1 유전자의 도입여부를 확인하기 위하여, 포트에 이식하기 전 50 mg~100 mg의 잎을 채취하여 total DNA를 추출하였다. PCR반응은 20 ng의 template DNA, 35S promoter 특이적인 primer (fw; 5'-TTCAACA-AAGGGTAATATCCGG-3')와 (rv; 5'-CGAAGGATAG-TGGGATTGTGC-3'), BL1 유전자 특이적인 primer (fw; 5'-ATGGCTTCCAAAGTTCAACTCGTG-3')와 (rv; 5'-TCAA-GTTTCAGAAACCATCTT-3')를 합성하여 각각 이용하였다. PCR 반응조건은 94℃ 에서 1분간 denaturation, 60℃ 에서 1분간 annealing, 72℃ 에서 2분간 extension 과정을 35 cycle 실시하여 증폭하였으며, 1% agarose gel 에서 전기영동으로 35S promoter와 bromelain 유전자의 도입여부를 확인하였다.

형질전환 상추의 유전자 분석 및 후대육성

PCR 분석에 의해 유전자가 도입된 형질전환체로부터 자식종자 (T1)를 획득하여 계통별로 25립씩 kanamycin 100 mg/L이 포함된 1/10 MS배지에 치상하여 형질전환체의 분리 양상을 살펴 보았다. 유전자 분석은 맨델법칙에 따라 Chi-square로 검정하였으며, 배지에서 살아남은 계통은 pot에 이식하여 후대를 육성하였다.

Northern blot에 의한 형질전환체의 유전자 발현 검정

형질전환체 후대 (T1) 에서 유전자의 발현을 확인하기 위해 kanamycin 100 mg/L이 포함된 1/10 MS 배지에서 생장한 어린잎으로부터 Trizol Reagent (Life Technologies)을 사용하여 total RNA를 추출하였다. Northern Blot 분석을 위하여 Total RNA 10 µg을 1.2% (w/v) agarose gel (1 x MOPS, 8% (w/v) formaldehyde)에 전기영동한 후, 나이론 membrane에 0.05 N NaOH 용액으로 하룻밤동안 RNA를 옮겨 고정시킨 후 사용하였다. Prehybridization 및 hybridization은 68°C에서 행하였으며, probe 는 PCR DIG synthesis kit (Roche)에 의해 labelling 하였다. Washing 및 Detection은 DIG system (Roche)에서 권장하는 방법에 의해 수행하였다.

Endo-protease 활성

형질전환체 후대 (T1) 계통의 endo-protease 활성은 azo-casein (Megazyme Ltd. Co) 방법에 의해 결정하였다. 조직 100 mg 을 1 ml phosphate buffer (100 mM sodium phosphate, 30mM cysteine, 30 mM EDTA, pH 7.0)에서 마쇄한 후, 2시간동안 4°C에서 Voltex 하여 protease를 추출하였다. 그후, 4°C에서 14,000 rpm으로 30분간 원심한 후, 상층을 동량의 2% azo-casein과 함께 40°C에서 24시간 방

치하였다. 그리고 3 ml trichloroacetic acid (5%, w/v) 첨가하여 반응을 정지 시킨 후, 상층을 440 nm의 흡광도를 측정하여 Protease 활성을 결정하였다.

결과 및 고찰

RT-PCR에 의한 BL1 유전자 분리

제주산 파인애플 줄기 유래 mRNA로부터 bromelain 관련 유전자를 분리하기 위하여, RT-PCR를 수행한 결과 단일 band가 얻어졌다. PCR 증폭산물은 TA-Cloning벡터에 cloning하여 염기서열을 조사한 결과 933 bp의 크기로서 개시코돈 및 종지코돈을 포함하고 있었다 (Figure 1). 분리된 유전자를 BL1유전자로 명명하고, NCBI 검색한 결과 BL1유전자는 기존에 알려진 유전자들과 90-96% 상동성을 보였다. 또한 아미노산 배열에서 BL1 유전자는 BAA21929

ATGGCAGAGTACGGCCGAGTGTACAAGGACAACGACGAGAAGATCGCCGGTTTCAGATA	60
M A E V G R V Y K D D E K M R F P G I	
TTCAAGAACACGTCGACCATATCGAARCTTTTACCATCGCAACGGAAATTCGTCACT	120
F K N H V H H I E T F N S R N G N S Y T	
CTCGGTCAATCAAGTTCACGGATATGACAAAGCGAATTTGTGCTCAATATACCGGC	180
L G I N Q P T D M T K S E F V A Q Y T G	
GTATCTCTCCCAATAATCGAGAGAGCCAGTGGTGTCAITTTGATGACCTAAACATC	240
V S L P L N I E R E P V V F D D V N I	
TCCGCGTCCCAAGATATTGATTTGGAGAGACTATGGTCCGCTAAACAGGTCGAAGAT	300
S A V P Q S I D W R D Y G A V N E V K N	
CAAAACCCTGTGGTTCCTGGTGTTCGCTGCAATTCGCGAGCTGGAGGGAATCTAC	360
Q N P C G S C W S F A A I A T V E G G I Y	
AAGATCAAACAGGATTTAGTATCTTTATCGGAGCAAGAAGTTCCTGATTTGCTGCTT	420
K I K T G T L V S L S E Q E V L D C A V	
AGCTRCGGTCCAAAGGCGCTGGGTGACCAAGCCCTACGATTCATCATATCTAACAC	480
S Y G C K G W V N K A Y D F I S H N	
GGTGTGACACCGAAGAACTATCCTTATCAAGCATACCAAGGCACTGCAACGCCAAT	540
G V T T E E N Y P Y Q A Y Q G T C H A N	
AGTTCCTAATTCAGCTTACATTAAGTGTATTCATATGCGAAGGAACGACGAAACCG	600
S F P N S A Y I T G Y S Y V R R N D E R	
AGTATGATGACGCTGCTGCGAATCAACCAATAGCTGCTTATCGATGCCAGTGAAAAC	660
S M M Y A V S N Q P I A A L I D A S E N	
TTTCAATTTACAATGGCGGTGTGTTAGTGGCCCTGGAACTAGTCTCAATCATGCC	720
F Q Y Y N G G V F S G P G C T S L H N H	
ATCACCATTATAGTTACGGCGGATAGCAGCAACACACATTTGGATTGTAAGAAC	780
L T I I G Y G Q D S G T G Y I V K N	
TCATGGGTAGCTCATGGGTGAACCTGGATACATCCGTATGGCAGAGGCTGTGCTTCG	840
S W G S S M G E R G Y I R N A R G V S S	
TCTGGATTATGGAATGCCATGGATCCCTCTATCCACTCTCAATCAGGGGCTAAT	900
S G L C G I A M D P L Y P T L Q S G A N	
GTCGCGATTATAGATGGTTCTAAACTTGA	933
V A V I K M V S K T *	

Figure 1. Nucleotide and deduced amino acid sequences of the BL1 gene encoding bromelain isolated from pineapple.

BL1	1	-----MIAEYGRVYKDDERKRRRFQIFKRRVHHIETFHRRHNSYTLGILNFTDHTKSE	53
BAA21849	1	--HASKVQLVFLFLFCVHWASP-----SAASRDEPNDPDKRKEEMIAEYGRVYKDDERKRRRFQIFKRRVHHIETFHRRHNSYTLGILNFTDHTKSE	93
BAA21929	1	-----MIAEYGRVYKDDERKRRRFQIFKRRVHHIETFHRRHNSYTLGILNFTDHTKSE	53
T10516	1	--HASKVQLVFLFLFCVHWASP-----SAASRDEPNDPDKRKEEMIAEYGRVYKDDERKRRRFQIFKRRVHHIETFHRRHNSYTLGILNFTDHTKSE	93
ABA97421	1	MCATSKPELLAILLCCIVCLYSSGCAIVANRELGDRAHARHERHMAHQGRVYKDDERKRRRFQIFKRRVHHIETFHRRHNSYTLGILNFTDHTKSE	100
BL1	54	FVAQYTG--VSLPLNIEKPEVVSFDDVHISAVQSIDWRDYGAVREVQKQNPCCGCSFAALATVEGLYKIKTGVLSLSEQEVLDCAVS---YGCCKG	146
BAA21849	94	FVAQYTG--VSLPLNIEKPEVVSFDDVHISAVQSIDWRDYGAVREVQKQNPCCGCSFAALATVEGLYKIKTGVLSLSEQEVLDCAVS---YGCCKG	186
BAA21929	54	FVAQYTG--VSLPLNIEKPEVVSFDDVHISAVQSIDWRDYGAVREVQKQNPCCGCSFAALATVEGLYKIKTGVLSLSEQEVLDCAVS---YGCCKG	147
T10516	94	FVAQYTG--VSLPLNIEKPEVVSFDDVHISAVQSIDWRDYGAVREVQKQNPCCGCSFAALATVEGLYKIKTGVLSLSEQEVLDCAVS---YGCCKG	186
ABA97421	101	GEIDTGRSKPESTPDRVVRVSTTFKZLTVSADALPSSVDNRKGVAVTRIDQVCCGCTAESAAALIEGLVKSIGRQLSLSEQELDQVGDHGGCGG	200
BL1	147	GVNKAYDFIISHNGVITDENIPYAYGDTCAHSEPN-SAYITGYSYVRNDERSHWRVAVSHQPLAALIDAS-ENFYNYNGGVFSGPCGTSLHHAITII	244
BAA21849	147	GVNKAYDFIISHNGVITDENIPYAYGDTCAHSEPN-SAYITGYSYVRNDERSHWRVAVSHQPLAALIDAS-ENFYNYNGGVFSGPCGTSLHHAITII	284
BAA21929	148	GVNKAYDFIISHNGVASEDRPYAYGDCGANSFEN-SAYITGYSYVRNDERSHWRVAVSHQPLAALIDAS-ENFYNYNGGVFSGPCGTSLHHAITII	246
T10516	187	GVNKAYDFIISHNGVASEDRPYAYGDCGANSFEN-SAYITGYSYVRNDERSHWRVAVSHQPLAALIDAS-ENFYNYNGGVFSGPCGTSLHHAITII	285
ABA97421	201	GEIDTGRSKPESTPDRVVRVSTTFKZLTVSADALPSSVDNRKGVAVTRIDQVCCGCTAESAAALIEGLVKSIGRQLSLSEQELDQVGDHGGCGG	298
BL1	245	GYGQDSSGTRHIVKHSWGSWGGRCYIHRARGVSS--GLCGIAMPLEPYTLQSGAHAVIVIKRVSKT	310
BAA21849	285	GYGQDSSGTRHIVKHSWGSWGGRCYIHRARGVSS--GLCGIAMPLEPYTLQSGAHAVIVIKRVSKT	351
BAA21929	247	GYGQDSSGTRHIVKHSWGSWGGRCYIHRARGVSS--GLCGIAMPLEPYTLQSGAHAVIVIKRVSKT	312
T10516	286	GYGQDSSGTRHIVKHSWGSWGGRCYIHRARGVSS--GLCGIAMPLEPYTLQSGA	340
ABA97421	299	GYGQDSSGTRHIVKHSWGTWGGRCYIHRARGVSS--GLCGIAMPLEPYTLQSGA	350

Figure 2. Alignment of the deduced amino acid sequences of several genes encoding bromelain in plant. BL I is isolated protein in this study.

유전자와 95%, T10516 유전자와 90%의 높은 상동성을 보였다 (Figure 2). 이들 결과로부터 제주산 파인애플로부터 분리한 BL1 유전자는 bromelain에 관련되어 있으며, 지금까지 알려진 유전자와 다른 새로운 유전자라고 시사하고 있다.

Bromelain 유전자의 계통주 작성

이미 보고 되어져 있는 bromelain 관련 유전자들의 아마노산 배열과 본 실험에서 분리된 BL1 유전자의 아미노산 배열을 이용해 계통주를 작성 하였다. 계통주 작성에는 NCBI 검색 결과 얻어진 bromelain 관련 유전자의 accession number를 유전자 이름으로 대신하였다. 계통주 작성 결과, 현재 보고되어진 bromelain 관련 유전자군은 크게 두개의 그룹으로 나뉘어지는 것을 알 수 있었다. 유전자 기능에 대한 정보가 거의 없는 실정이라 그 기능은 예측 할 수 없으나, 두 그룹의 유전자그룹이 기능적으로 분리되어 있을 가능성을 시사하고 있다. 본 실험에서 분리된 BL1은 파인애플로부터 분리된 accession number BAA21849, T10516, BAA21929 유전자와 같은 clade를 형성하고 있는 것이 확인되어졌다 (Figure 3). 이러한 결과들로부터 본 실험에서 얻어진 BL1 유전자는 파인애플로부터 분리된 accession number BAA21849, T10516, BAA21929 유전자와 유사한 기능을 갖을 것으로 생각되어진다.

형질전환체 육성

형질전환체 육성은 pIG121-BL1 벡터가 함유된 *Agrobacterium*

을 상추 잎절편에 감염시킨후, MS 선발배지에 치상하여 배양 10일 후에 잎 절편체로부터 callus가 형성되기 시작하였다. 잎 절편체에서 형성된 callus를 MS 선발배지에 계대배양 하였는데 빠른 개체에서는 배양 후 3주부터 부정아가 형성되기 시작하였다. 부정아를 잘라 kanamycin 100 mg/L이 포함된 MS hormone free 배지에 치상 하여 신초를 유도하였으며, 발생된 신초로부터 뿌리의 형성을 유도하였다. 뿌리가 형성된 개체는 pot에 옮겨 순화시켰다 (Figure 4).

유전분석 및 후대육성

형질전환체들에서 도입유전자의 유전분석은 순화하여 생장시킨 T0 식물체로부터 얻어진 T1 종자를 kanamycin 50 mg/L이 포함된 1/10 MS배지에 계통별로 25립씩 파종하여 저항성 여부를 확인하였다. 총 10계통을 파종한 결과 대부분은 kanamycin에 내성을 보인 개체가 멘델법칙에의해 3:1 또는 15:1로 분리하였으나, 몇몇 계통에서는 분리비율이 멘델법칙으로 해석할 수 없었다. 도입유전자가 single copy로 도입되어 3:1로 분리되는 저항성개체는 T2종자를 획득하였다. 왜래유전자를 식물 세포에 도입할 경우 임의적으로 게놈내에 integration 되기 때문에 도입유전자의 copy수가 매우 중요하며, 호모개체를 육성하기위해 single copy로 도입되는것이 바람직하다. 본 연구에서 육성한 형질전환체들 중에 single copy로 도입된 형질전환체는 5계통으로 조사한 것중의 절반에 해당되었다. Cho 등 (Cho et al. 2004)의 보고에서도 *Agrobacterium*을 매개로 형질전환하였을 경우 particle gun법보다 single copy로 도입될 수 있는 확률이 높다고 하였다.

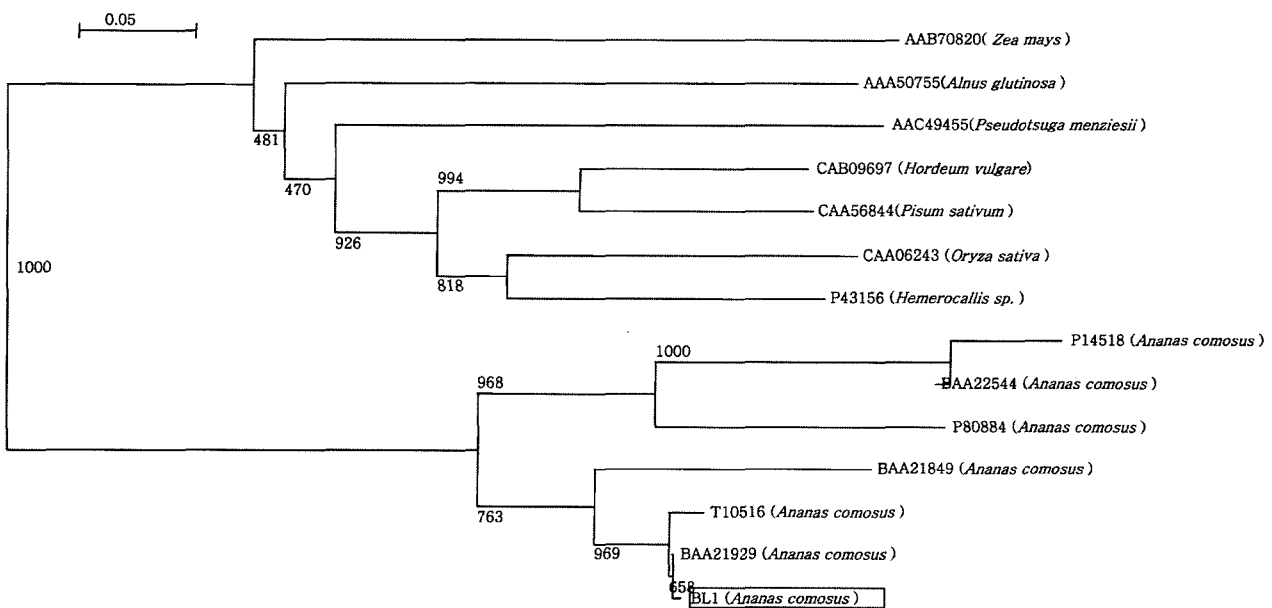


Figure 3. Phylogenetic tree of plant bromelain genes. Phylogenetic tree was generated by Clustal W. The number next to the nodes give bootstrap values from 1000 replicates. BL1 is boxed.

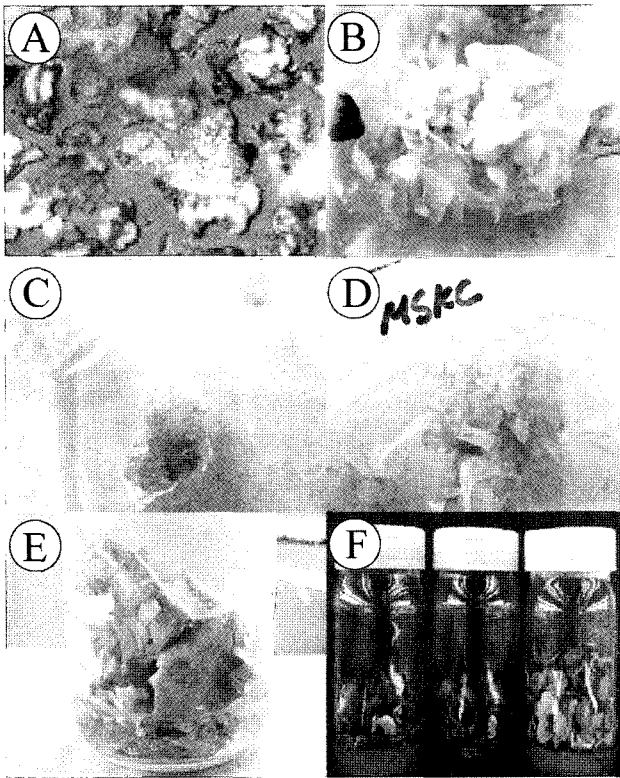


Figure 4. Lettuce plants transformed with pIG121 vector including BL1 gene. A, Infected with *Agrobacterium*; B, Selection; C and D, Shoot differentiation; E and F, Regeneration plants. Initial selection of regenerated explants by culturing on a kanamycin and carbenicillin containing MS medium, multiple shoots were obtained after 2 months of culture. For a complementary step of selection, putative transgenic shoots were transferred to 1/2 MS basal medium supplemented with 100mg/L kanamycin and 500mg/L carbenicillin.

형질전환상추의 검정 및 Bromelain 유전자의 발현여부 확인

형질전환체임을 확인하기 위하여 kanamycin에 저항성을 보이는 T1 식물체와 유전자를 도입하지 않은 식물체의 total DNA를 추출하여 35S promoter 특이 primer set 와 BL1 유전자 특이 primer set를 이용하여 PCR 반응을 실시하였다. 그 결과, 유전자를 도입하지 않은 식물체인 non-transformant 에서는 35S promoter 영역의 PCR product가 발견되지 않았으나 T1 식물체들에서는 300bp 상에 PCR product가 확인되었으며, BL1 유전자 특이 primer set를 사용하여 PCR 한 결과 형질전환체에서 620bp의 증폭산물을 확인할 수 있었다 (Figure 5).

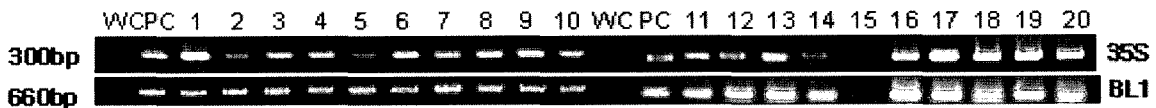


Figure 5. Electrophoresis patterns of PCR products on transgenic and non transgenic plants. (PCR products using the specific primer for 35S promoter and BL1 gene. WC; wild type control, PC; plasmid M, Lane 1 to 20; T1 generation lines.

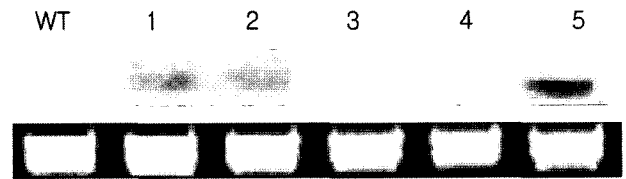


Figure 6. Northern blot analysis of RNA isolated from transgenic plants and non transgenic plant. RNA was isolated from young leaves. WT; wild type, Lane 1 to 5, transgenic plants.

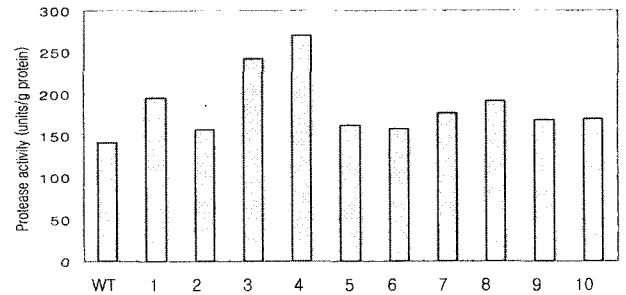


Figure 7. Endo-protease activity in wild type and transgenic plants. WT; wild type control, Lane 1 to 10; transgenic plants

형질전환체에서 BL1 유전자의 발현 여부를 확인하기 위하여, 각 계통에서 Total RNA를 추출하여 northern blot 분석을 실시한 결과 형질전환체에서 도입한 BL1 유전자가 정상적으로 기능을 발휘하여 전사되고 있음을 확인하였다. 형질전환체간에서도 BL1 유전자의 발현 정도가 현저한 차이를 보였다 (Figure 6). 이상의 결과로부터 제주산 파인에플로부터 분리된 BL1 유전자가 상추계종내에 single copy로 도입되어 안정적으로 발현하고 있는 것으로 미루어 볼 때, 호모계통육성을 통한 육종소재로 활용 한다면 상업적으로 이용가치가 클 것으로 사료된다.

Endo-protease 활성

Bromelain은 cysteine protease의 복합체로 이를 coding 하고 있는 BL1 유전자가 과잉발현된 형질전환체에서 protease 활성을 측정하였다. 거의 대부분의 형질전환체에서는 비형질전환체보다 비슷하거나 약간 높은 활성을 보였으나, 형질전환체 중의 3 계통에서 endo protease 활성이 높게 나타났다 (Figure 7). 이들 결과로부터 형질전환체들에서 유

전자 도입 및 mRNA의 level 에서 극히 정상적임에도 불구하고 최종산물인 효소의 활성의 변화가 없는 것은 왜래유전자가 전사후 번역단계에서 역할을 담당하지 못한것으로 생각된다. 또한 Endo protease활성은 serine proteases 및 cysteine protease 등 여러종류의 protease의 값으로 형질전환체들간 세포내에서 protease간 상호작용에의해 비형질전환체와 비슷한 활성을 보인것으로 생각된다.

적 요

파인애플 (*Ananas comosus*) 줄기에서 얻어지는 bromelain 은 단백질 분해효소 중 cysteine protease의 복합체로 알려져 있다. 본 연구에서는 제주산 파인애플 줄기를 이용하여 bromelain 관련 유전자를 분리하였다. 분리된 BL1 유전자는 총 933개의 염기서열로 311개의 아미노산을 coding 하였다. 지금 까지 알려진 식물 유래 bromelain 관련 유전자와의 alignment 분석한 결과 BAA21929 유전자와 94%, T10516 유전자와 93% 및 P14518 유전자와 81%의 상동성을 보였다. BL1 유전자를 상추 게놈내에 도입하고자 NPTII 유전자 와 BL1 유전자로 제작한 pBI 121 BL 벡터를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404에 도입한 후, 상추 잎 절편에 감염시켜 embryogenic callus 및 재분화 식물체를 육성하였다. 이들식물체로부터 T1세대를 육성하여 PCR 분석 을 통해 왜래유전자의 도입 여부를 확인하였다. 또한 형질전환체의 발현여부는 Northern blot분석 및 eno protease활성을 통해 형질전환체에서 BL1 유전자가 안정적으로 상추세포내에서 발현되고 있음을 확인하였다. 따라서 본 실험에서 육성된 bromelain 관련 BL1 유전자가 도입한 형질전환 상추를 육종소재로 활용한다면 상업적으로 유용한 단백질을 분해하는 가수분해효소로써 건강 보조제, 사료첨가제 등에 널리 사용할 수 있을 것으로 생각되어진다.

사 사

이 논문은 2004년도 농림기술 개발 연구과제비 (과제관리번호: 204068-3) 에 의하여 수행된 연구결과의 일부임

인용문헌

- Cho MA, Choi DW, Liu JR, Tom C and Choi PS (2004) Development of transgenic soybean using *Agrobacterium tumefaciens* Kor J Plant Biotech 31: 255-259
- Engwerda CR, Andrew D, Ladhams A, Mynott TL (2001) Bromelain modulates T cell and B cell immune responses in vitro and in vivo. Cell Immunol 25;210(1): 66-75
- Gaspani L, Limiroli E, Ferrario P, Bianchi M (2002) In vivo and in vitro effects of bromelain on PGE(2) and SP concentrations in the inflammatory exudate in rats. Pharmacology 65: 83-86
- Khan RH, Rasheedi S, Haq SK (2003) Effect of pH, temperature and alcohols on the stability of glycosylated and deglycosylated stem bromelain. J Biosci 28: 709-714
- Ko K, Tekoah Y, Rudd PM, Harvey DJ, Dwek RA, Spitsin S, Hanlon CA, Rupprecht C, Dietzschold B, Golovkin M, Koprowski H (2003) Function and glycosylation of plant-derived antiviral monoclonal antibody. Proc Natl Acad Sci U S A 24: 100: 8013-8018
- Manhart N, Akomeah R, Bergmeister H, Spittler A, Ploner M, Roth E (2002) Administration of proteolytic enzymes bromelain and trypsin diminish the number of CD4+ cells and the interferon-gamma response in Peyer's patches and spleen in endotoxemic balb/c mice. Cell Immunol. 215: 113-119
- Maurer HR (2001) Bromelain: biochemistry, pharmacology and medical use. Cell Mol Life Sci 58: 1234-1245
- Mynott TL, Crossett B, Prathalingam SR (2002) Proteolytic inhibition of *Salmonella enterica* serovar typhimurium-induced activation of the mitogen-activated protein kinases ERK and JNK in cultured human intestinal cells. Infect Immun 70: 86-95

(접수일자 2005년 6월 17일, 수리일자 2005년 12월 18일)