

# 페놀화합물 처리 *Agrobacterium* 및 세포벽 약화 들깨새싹을 이용한 형질전환과 재조합 단백질 발현

정일경 · 신동일 · 박희성\*

대구가톨릭대학교 생명공학과

## Transformation of Cell Wall-weakened Perilla Seedlings Using Phenolic Compound-treated *Agrobacterium* Cells and Recombinant Protein Expression

Il-Kyung Chung, Dong-Il Shin, and Hee-Sung Park\*

Department of Biotechnology, Catholic University of Daegu, Kyungsan, Kyungbuk 712-702, Korea

**Abstract** Perilla [*Perilla frutescens* (L.) Britt] seedlings are easy to grow and eaten as the health vegetable sprout. Two day old perilla seedlings since germination were given a mild wounding using cell wall lytic NaOH/SDS solution for infiltration with recombinant *Agrobacterium* cells treated with phenolic compounds. In the analysis of fluorometric GUS gene expression for the transformed perilla seedlings, GUS enzyme activity was the highest by the combined treatments of 50 mM acetosyringone and 0.5% NaOH solution containing 0.01% SDS implying a synergic effect. This result could be successfully applied for demonstrating hepatitis B virus antigen (HBsAg) protein expression.

**Keywords:** perilla seedling, phenolic compounds, wounding, protein, protein expression

### 서 론

일년생 작물인 들깨 (*Perilla frutescens* L. Britt)는 잎과 종실유를 목적으로 널리 재배되고 있는데 식용의 잎은 독특한 향으로 특히 각광받고 있다. 한편, 들깨의 어린 싹의 경우 건강 새싹채소로도 각광받고 있는데 간단한 실내 또는 온실 조건에서 10일 이내의 생육기간을 거쳐 그 이용이 가능하다. 이미 보고된 바 있는 들깨 관련형질전환 기술 [1-3], 담배나 상추 잎을 이용한 일시유전자발현 및 재조합단백질의 신속한 생산 연구 [4,5] 들을 감안해 볼 때 들깨 새싹을 이용한 간편하고 신속한 일시발현용 biofactory의 개발도 충분히 제시할 수 있는 시점에 있다 [6]. 다만 형질전환 및 발현 효율성이 전제되어야 할 것이다. 식물 형질전환은 *Agrobacterium*

이용법이 선호되고 있으며 그 편이성과 효율성이 우수하기 때문인데 식물의 종류에 따라 그 효율성면에서 많은 차이를 보이고 있다. *Agrobacterium* 감염 및 T-DNA 전이관련 효율을 충분히 개선시키기 위한 초음파, 미세 견고입자, 효소, 산화제 등의 다양한 물리적, 효소적, 화학적 상해방법이 적용되고 있으며 이들은 세포벽의 구조적 변화를 초래하여 *Agrobacterium*의 감염을 좀 더 용이하게 하는 것으로 판단되고 있다 [7]. 이들의 처리에 의하여 식물체로부터의 phenolic compound 분비를 기대할 수 있는데 이러한 화학적 신호에 의하여 *Agrobacterium vir* genes의 효과적 발현 및 T-DNA 이동과 식물유전체로의 T-DNA 삽입이 보다 용이해 질 수 있다 [8,9]. 현재까지 *vir* genes 유도를 위한 다양한 phenolic compound가 알려져 있으며 acetosyringone 이 대표적이다. 이 외에도 syringaldehyde, syringic acid, acetovanillone, vanillin 등 매우 다양한데 이들에 의한 *vir* genes 유도발현 수준은 *Agrobacterium* strain에 따라서 차이가 나는 것으로 알려져 있다 [10]. 본 연구에서는 i) chemotactic

### \*Corresponding author

Tel: +82-53-850-3245, Fax: +82-53-850-3548

e-mail: hspark@cataegu.ac.kr

signal인 phenolic compound의 *Agrobacterium* 세포에 대한 처리에 따른 T-DNA 전이 및 들깨 새싹에서의 GUS reporter gene의 발현 변화의 분석을 실시하였으며 ii) 세포벽 용해가 가능한 NaOH/SDS 용액을 들깨 새싹에 처리함으로써 *Agrobacterium* 감염 및 GUS reporter gene의 발현 변화를 분석하였다. 또한 i)과 ii)의 복합 적용을 통한 발현을 변화를 분석하였다. 이러한 실험 결과는 식용 또는 주사용 간염 백신 연구의 주요 연구 대상인 hepatitis B virus antigen (HBsAg) 단백질 발현에 적용시켜봄으로써 일시적 biofactory로서의 들깨 새싹의 가능성을 시험하였다.

## 재료 및 방법

들깨 새싹은 아시아종묘로부터 구입한 들깨 종자의 살균 (70% ethanol, 1 min; 0.8% sodium hypochlorite, 10 min) 을 실시하였다. 종자 oil 성분으로 인하여 침지가 어려움으로써 강한 교반 작업을 동시에 실시하였다. 멸균수 세척 및 멸균수 침지 (> 4 h)를 거친 후 25°C 암 조건의 배양기에서 발아를 유도하였으며 radicle이 출몰한 발아 시점으로부터 2일의 생육기간이 경과한 새싹을 형질전환에 이용하였다. GUS reporter gene을 지니는 pBI121 (Clontech, USA)을 포함한 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404는 28°C, 220 rpm의 조건에서 배양하였으며 OD<sub>600</sub>=0.5 상태에서 acetosyringone (10, 50 및 200 µM 최종농도), syringaldehyde (5, 10 및 40 µM 최종농도) 그리고 ethyl vanillin (10, 50 및 100 µM 최종농도)를 처리하였다. 2 h 경과 시 bacterial cell을 수확하고 1/2 x MS배지 (0.005% Tween 20 포함) [11]에 재현탁시켜 발아 후 2일이 경과한 들깨 새싹의 agroinfiltration (20 min) [12]에 이용하였다. 형질전환 새싹은 암 조건 (22°C)에서 3일간의 생육기간을 거친 후 fluorometric GUS assay에 의하여 형질전환율을 비교하였다 [13]. 이를 위하여 extraction buffer (50 mM NaPO<sub>4</sub> [pH 7.0], 10 mM EDTA, 0.1% sarkosyl, 0.1% Triton X-100, and 10 mM DTT)를 이용한 형질전환 새싹의 homogenate를 원심분리 (14,000 rpm, 5 min, 4°C) 후 얻은 상등액 10 µL를 90 µL assay buffer (1 mM 4-methylumbelliferyl β-D-glucuronide를 포함한 extraction buffer)에 첨가해 반응 (37°C, 3 h)시키고 반응 종료 (200 µL 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 첨가) 시킨 후 PerkinElmer VIVTOR 3 microtiterplate reader를 이용하여 fluorescence를 측정하였다. Total protein 정량은 Bio-Rad protein assay에 의하였다.

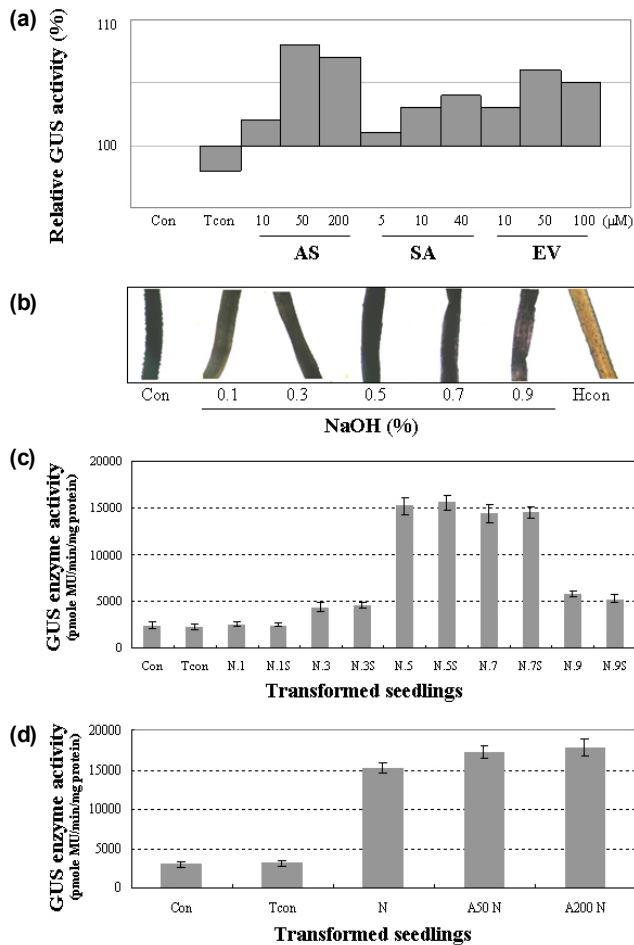
## 결과 및 고찰

Fig. 1(a)에 GUS활성도 변화를 보여주고 있다. 무처리 *Agrobacterium* 이용을 이용한 형질전환체와 비형질전환체의 상대적 비교 시 차이가 별로 나타나지 않고 있으며 들깨 새싹의 *Agrobacterium* 이용 형질전환 효율이 매우 낮은 것

으로 판단되었다. 한편, phenolic compound 처리의 경우 상대적으로 background 수치에 비해 7-8% 증가까지 측정되었으며 50 및 200 µM의 acetosyringone 처리 효과가 상대적으로 높게 측정되었다.

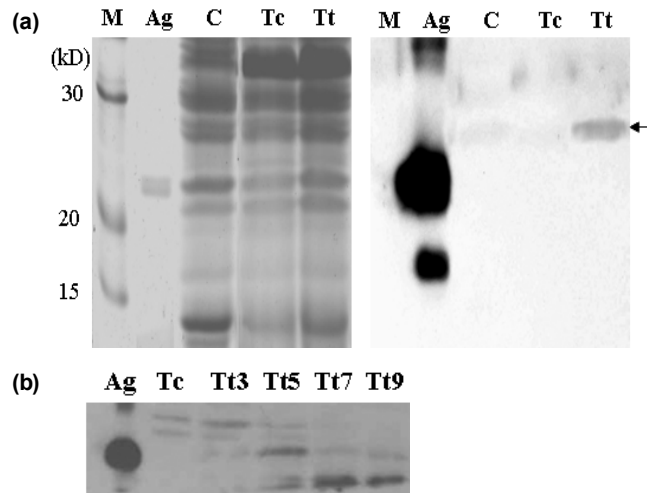
식품산업에서의 NaOH는 채소 또는 과일의 박피 또는 세척에 이용되고 있는데 [14] cellulose, hemicellulose, pectin, wax, cutin, suberin, lignin 등의 세포벽 용해 능력을 지니고 있기 때문이다. 먼저 들깨 새싹에 대한 NaOH 처리농도의 결정을 위하여 MTT assay [15]를 수행하였다. 들깨 새싹을 농도별 NaOH로 처리 (3 min) 후 증류수로 충분히 세척하고 이를 MTT용액 (1 mg/mL)에 담근 후 16°C에서의 발색 변화를 관찰하였다. Fig. 1(b)에서와 같이 0.9% NaOH 처리 (3 min)를 실시하는 경우 그 발색정도가 가장 약하게 관찰되었으며 세포독성 작용이 큰 것으로 판단되었다. 따라서 보다 저 농도 처리가 제시되었는데 처리 후 5일 생육 후 0.9% 처리뿐 아니라 0.7% NaOH 처리에도 육안으로 구분할 수 있는 생육억제 또는 저해현상이 나타났다. 0.001-0.1% SDS 처리의 경우 세포 독성 및 생육저해는 나타나지 않았다. SDS의 경우 detergent의 특성 상 *Agrobacterium* infiltration을 보다 용이하게 할 것으로 기대할 수 있다. 들깨 새싹에 대하여 0.01% SDS가 포함 또는 미포함의 0.1-0.7% NaOH를 처리하고 *in planta* 형질전환을 실시 후 co-cultivation 5일이 경과되었을 때 fluorometric GUS assay를 실시하였다. 그 결과는 Fig. 1(c)에서 보여주고 있다. 모든 결과는 3회 반복실험을 통한 평균값이다. 비형질전환체와 형질전환체 각각의 GUS 활성은 2451 및 2256 pmoles 4-methylumbelliferone (MU)/min/mg protein으로 측정되었는데 이에 비해서 0.3-0.7% NaOH 처리를 거친 형질전환체는 매우 높은 GUS활성이 측정되었다. 0.3, 0.5 및 0.7% NaOH 처리의 경우 각각 4,355, 15,223 및 14,428 pmoles MU/min/mg protein GUS활성이 측정되었으며 0.1% NaOH의 경우 무처리와 별 차이를 보이지 않았다. 0.5% 및 0.7% NaOH의 경우 무처리에 비해 상대적으로 6배 높은 GUS 활성이 계산되었다. 0.7% NaOH의 경우 생육저해현상에 따라 0.5% NaOH 처리보다 GUS활성이 낮은 것으로 판단할 수 있었다. SDS (0.01%)를 포함하여 처리하는 경우 NaOH 단독 처리에 비해 일부 증가된 GUS활성이 측정되었다. Cocultivation 기간이 5일 이상 경과할 경우에는 GUS 활성이 전반적으로 감소하는 경향이 나타났는데 GUS 유전자발현이 일시적이라는 것을 시사하고 있다. 이어진 실험에서는 *Agrobacterium cell* 및 들깨 새싹에 대한 acetosyringone 및 NaOH/SDS 각각의 처리가 GUS 활성을 복합적으로 증대시킬 수 있는지에 대하여 실험하였으며 Fig. 1(d)에서 결과를 보여주고 있다. 결과적으로 NaOH 단독처리에 비하여서는 전반적으로 GUS활성이 증가하였으며 증가율은 50 및 200 µM acetosyringone 처리 *Agrobacterium* 및 0.5% NaOH 처리 들깨 새싹의 경우 17,338 및 17,723 pmoles MU/min/mg protein으로 측정되었다. 이러한 결과를 통하여 각 생물체에 대한 처리가 최종적으로 GUS발현을 위한

공동 상승효과를 나타낸 것으로 판단되었다. 다만 phenolic compound의 *Agrobacterium*에 대한 단독처리는 들깨 새싹에 대한 NaOH 단독처리 효과에 비해 상대적으로 낮은 증대 효과를 나타냄으로써 들깨 새싹을 이용한 일시발현에서 식물체 세포벽구조 약화가 보다 효과적임을 제시하고 있다. 이상의 실험을 통하여 0.5% NaOH 및 0.01% SDS를 처리한 발아 후 2일째의 들깨 새싹에 대한 *in planta* 형질전환을 위하여 50  $\mu$ M acetosyringone 처리 *Agrobacterium*의 이용이 일시발현을 통한 재조합단백질의 최적발현을 위하여 제시되었다.



**Fig. 1.** Effects of phenolic compounds and chemical injury on perilla seedling transformation and GUS expression. (a) GUS activities in perilla seedlings transformed using *Agrobacterium* treated with various concentration of phenolic compounds (AS, acetosyringone; SA, syringaldehyde; EV, ethyl vanillin). Con, nontransformed. Tcon, transformed control. (b) Cytotoxic effects by NaOH on perilla seedling hypocotyls. Con, no treatment. Hcon, boiled control. (c) GUS activities in perilla seedlings treated with NaOH (N.1-N.9; 0.1-0.9%) in the absence or presence of 0.01% SDS(S). (d) GUS activities in perilla seedlings with 0.5% NaOH(N) treatments with or without treatment of acetosyringone (A; 50, 200  $\mu$ M).

Hepatitis B virus (HBV)는 전 세계적으로 위협하고 있는 치명적 병원체로서 재조합 HBV surface antigen (HBsAg) 단백질을 이용한 백신예방접종이 필수적으로 요구되고 있다 [16]. 본 실험에서는 이미 제시된 GUS 발현을 위한 최적 조건을 HBsAg DNA도입 식물발현vector를 지니는 *A. tumefaciens* LBA 4404 세포 [17]를 들깨 새싹에서의 형질전환에 이용하였다. 이를 위하여 GUS gene 최적발현을 위한 50  $\mu$ M acetosyringone 및 0.4% NaOH (0.01% SDS 포함) 처리조건을 적용하였다. 들깨 새싹은 extraction buffer [20 mM sodium phosphate, pH 7.0, 0.15 M NaCl, 20 mM sodium ascorbate, 0.1% Triton X-100, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1x protein inhibitor (Roche, Germany)]를 이용하여 균질액을 준비 후 원심분리 (12,000 x g, 15 min)를 통한 상등액에 대하여 3배의 ethanol을 첨가하고 이어서 원심분리 (12,000 rpm, 10 min)를 통하여 protein pellet을 준비하였다. 이를 extraction buffer에 현탁시킨 후 SDS-PAGE 및 western blotting에 이용하였다. 결과는 Fig. 2(A)에서 보여주고 있다. 비형질전환체 및 무처리 형질전환체의 경우 monoclonal anti-HBsAg IgG 반응 antigen 단백질이 보이지 않고 있으나 phenolic compound/NaOH 처리를 통한 형질전환체에서는 비교적 잘 나타나고 있다. Fig. 2(B)의 경우에는 채-cultivation 기간이 경과할수록 발현 감소현상이 나타나는 것을 보여주고 있다.



**Fig. 2.** Detection of HBsAg protein expression by immuno blotting. (a) 10% SDS-PAGE (left) and the corresponding western blot (right). M, size marker; HBsAg control protein, C, nontransformed; Tc, transformed control; Tt, transformed with treatments of acetosyringone and NaOH/SDS. (b) HBsAg expression during the time course (3-9 days) of co-cultivation.

현재까지 *Agrobacterium*을 이용한 형질전환율을 높이기 위한 다양한 방법 가령 vacuum infiltration, sonication, desiccation, osmosis (glucose, sucrose 등), anti-necrotic compound (cystine, ascorbic acid, dithiothreitol 등), phenolic

compound (acetosyringone, vanillin, syringaldehyde 등), *Agrobacterium* cell density, co-cultivation기간 등의 적용 등이 지속적으로 보고되어 왔으나 본 연구에서는 특히 phenolic compound 처리에 의하여 예상되는 T-DNA 전이 활성화와 MTT assay 및 성장억제 정도를 근거로 한 NaOH/SDS에 의한 세포벽 약화를 들깨 새싹의 일시발현 증대효과 면에서 실험하였다. 그 결과 GUS 활성화와 HBsAg 단백질 발현 결과에서 볼 때 형질전환효율 증대 가능성이 충분히 제시되고 있다. 이는 또한 경제성, 신속성, 용이성 면에서 들깨 새싹의 일시발현용 biofactory로서의 가능성을 보여주고 있다. 재조합단백질의 발현을 양적으로 판단할 경우 western blot에서의 control HBsAg antigen과의 상대적 비교 시 total soluble protein의 0.02% 정도로 측정되었으며 이는 단백질의 정제 및 생산 목적보다 현재로서는 edible vaccine 생산과 관련된 연구에 우선적 적용이 유리할 것으로 판단되고 있다.

## 요 약

들깨묘는 재배가 용이하며 건강채소로 애용되고 있다. 본 연구에서는 발아 후 2일째의 들깨묘에 대하여 세포 상해를 일으킬 수 있는 NaOH/SDS 용액을 처리하고 페놀 화합물을 처리한 재조합 *Agrobacterium* 세포를 이용하여 형질전환을 수행하였다. 형광분석에 의한 GUS 유전자발현 분석에서 50 mM acetosyringone 처리 및 0.5% NaOH /0.01% SDS 처리의 복합처리에 의하여 가장 높은 GUS활성이 나타났으며 상승효과를 제시할 수 있었다. 이러한 결과는 hepatitis B virus antigen (HBsAg) 단백질 발현으로 성공적으로 확인할 수 있었다.

접수 : 2009년 11월 12일, 게재승인 : 2009년 12월 20일

## REFERENCES

- Kim, K. H., Y. H. Lee, D. H. Kim, Y. H. Park, J. Y. Lee, Y. S. Hwang, and Y. H. Kim (2004) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Perilla frutescens*. *Plant Cell Rep.* 23: 386-390.
- Lee, B. K., S. H. Yu, Y. H. Kim, B. O. Ahn, H. S. Hur, S. C. Lee, Z. Zhanyuan, and J. Y. Lee (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of perilla (*Perilla frutescens*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 83: 51-58.
- Lee, B. K., S. L. Kim, K. H. Kim, S. H. Yu, S. C. Lee, Z. Zhanyuan, M. S. Kim, H. M. Park, and J. Y. Lee (2008) Seed specific expression of perilla  $\gamma$ -tocopherol methyltransferase gene increases  $\alpha$ -tocopherol content in transgenic perilla (*Perilla frutescens*). *Plant Cell. Tiss. Org. Cult.* 92: 47-54.
- Vaquero, C., M. Sack, J. Chandler, J. Drossard, F. Schuster, M. Monecke, S. Schillberg, and R. Fisher (1999) Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11128-11133.
- Negrouk, V., G. Eisner, H. I. Lee, K. Han, D. Taylor, and H. C. Wong (2005) Highly efficient transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce. *Plant Sci.* 169: 433-438.
- Fisher, R., C. Vaquero-Martin, M. Sack, J. Drossard, N. Emans, and U. Commandeur (1999) Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants. *Biotech. Appl. Biochem.* 30: 113-116.
- Opabode, J. T. (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 1: 12-20.
- Zupan, J. R. and P. C. Zambryski (1995) Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* 107: 1041-1047.
- Binns, A. N. and M. F. Thomashaw (1988) Cell biology of *Agrobacterium* infection and transformation of plants. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 575-606.
- Vinod Kumar, S. and M. V. Rajam (2005) Polyamines enhance *Agrobacterium tumefaciens vir* gene induction and T-DNA transfer. *Plant Sci.* 168: 75-80.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Bechtold, N., J. Ellis, and G. Pelletier (1993) *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR. Acad. Sci. Paris* 316: 1194-1199.
- Jefferson, R. A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the gus gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.
- Floros, J. D., H. Y. Wetzstein, and M. S. Chinnan (1987) Chemical (NaOH) peeling as viewed by scanning electron microscopy: pimiento peppers as a case study. *J. Food Sci.* 52: 1312-1316.
- Watts, M. E., I. J. Roberts, and M. A. Woodcock (1989) Comparison of colorimetric and clonogenic assays for hypoxic-specific toxins with hamster and human cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Bio. Phys.* 16: 939-942.
- Richter, L. J., Y. Thanavala, C. J. Arntzen, and H. S. Mason (2000) Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat. Biotechnol.* 18: 1167-1171.
- Shin, D. I. and H. S. Park (2006) Transient expression in Chinese cabbage by hydrogen peroxide-aided agroinfiltration. *Agric. Chem. Biotechnol.* 48: 229-230.