

사업구분 : 기본연구	Code 구분 : LS1006	생명공학(전반기)
연구과제 및 세부과제명	연구기간	연구책임자 및 참여연구원(☎)
생명공학 기술을 이용한 가축용 백신작물 생산연구	'00~'07	경기도원 환경농업연구과 소호섭(229-5813)
백신 생산용 작물의 형질전환 표지인자 선별	'05~'06	경기도원 환경농업연구과 소호섭(229-5813) (참여연구원) 한영희, 이지영, 임재욱
색인용어	백신, 형질전환, 표지인자, 설사병, 임상실험	

ABSTRACT

In vitro callus culture was established for production of vaccine against diarrhea disease from seed of birdsfoot trefoil(*Lotus corniculatus L.*). Callus of birdsfoot trefoil was incubated on 2N6 medium supplemented with 2,4-D 2mg L⁻¹. Seed of birdsfoot trefoil formed callus on 2N6 medium with Chu 1bt(3956.53mg L⁻¹) + casamino acid 1g L⁻¹ + sucrose 30g L⁻¹ + 2,4-D 2mg L⁻¹ + glutamin 0.5g L⁻¹ + proline 0.5g L⁻¹ + phytigel 2g L⁻¹ indicated pH 5.8 and proliferated callus on 2N6 medium + glucose 10g L⁻¹ + 100mM AS(acetosyringone) + 0.8% agar indicated pH 5.2. Also survival rate was high. And the more concentration of kanamycin, hygromycin and phosphinothricin increased, the higher withering rate of callus of birdsfoot trefoil became. We selected callus of birdsfoot trefoil transformants cultured in 2N6-AS medium added with 80mg L⁻¹ kanamycin or 10mg L⁻¹ hygromycin or 2.0mg L⁻¹ phosphinothricin.

Key words : Vaccine, Transformation, Marker, Kanamycin, Hygromycin, Phosphinothricin, Diarrhea, Clinical demonstration

1. 연구목표

한우 등 가축은 생리상 매일 일정량 이상의 조사료를 반드시 섭취하여야 한다. 조사료에는 두과 사료작물인 알팔파와 버즈풋트레포일, 화본과사료작물인 오차드글라스, 이탈리아라이그라스, 벧짚 등이 주로 이용되고 있다. 특히 버즈풋트레포일(*Lotus corniculatus L.*)은 우리나라에서 별노랑이로 알려져 있는 목초로서 내서성과 내한성이 아주 강하고, 비가 많은 다습한 지역에서도 잘 적응하는 두과 사료작물로서 외래의 유용유전자를 도입하는 형질전환을 시도하기 위해 재분화에 성공했다고 보고하였다(Kim 등 1999, Robbins 등 1998). 하지만 형질전환체를 기내에서 선별하기 위한 마커인 표지인자에 대한 연구가 없는 실정이다.

한편 소화기 질환인 세균성 설사병은 일부 병원성 세균들이 외부로부터 유입되었거나, 동물에 가해지는 여러가지 내적·외적 스트레스가 요인이 되어 장 또는 체내에 있던 소수의 병원성 세균이 일시에 다량 증식하여 생성된 독소 등에 의하여 설사와 패혈증이 나타나게 되는 것이다. 중요 세균성 설사병에는 대장균증, 살모넬라 감염증 및 증식성 장염 등이 있으며 가축들이 감염이되면 경제적으로 커다란 손실을 초래한다.

이러한 경제적 손실을 초래하는 가축의 설사병에 대한 백신을 생산하는 사료작물을 육성하기 위하여 버즈풋트레포일의 종자로부터 유도된 캘러스에 대한 증식배지와 형질전환 표지인자의 종류별 농도를 구명하고자 본 연구를 수행하였다.

2. 재료 및 방법

가. 버즈풋트레포일 종자의 캘러스 유도

버즈풋트레포일의 종자를 수돗물로 깨끗이 수세한 후 70% EtOH로 1분간 소독하였다. 소독된 종자를 5% NaOCl로 30분간 1차 진탕하고 다시 1% NaOCl로 5분간 2차 살균한 후 멸균수로 3회 세척한 후 살균한 종자를 멸균된 필터페이퍼 위에 올려놓고 수분을 제거하였다. Chu 1bt(3956.53mg L⁻¹), casamino acid 1g L⁻¹, sucrose 30g L⁻¹, 2,4-D 2mg L⁻¹, glutamin 0.5g L⁻¹, proline 0.5g L⁻¹, phytigel 2g L⁻¹을 첨가한 후 pH 5.8로 조정된 2N6 배지에 종자를 치상한 후 28℃에서 1개월간 암배양하였다.

나. 버즈풋트레포일 종자의 캘러스 증식

종자에서 유도된 캘러스는 2N6-AS와 MS3배지에서 증식하였다(표 1). 2N6-AS배지는 acetic acid 1ml당 Acetosyringone(AS) 18μg이 첨가된 stock을 조제한 후 2N6배지에 100mM을 glucose 10g L⁻¹와 함께 첨가하였고, MS3배지는 MS powder(Maxim Bio MB-M4531)에 2,4-D 3mg L⁻¹을 첨가하였다. 캘러스를 2N6-AS와 MS3배지에 치상한 후 28℃에서 암배양하고, 3주 간격으로 계대배양하여 캘러스를 증식하였다.

표 1. 버즈풋트레포일의 캘러스 증식 배지

Medium	Composition(per liter)
2N6-AS	Chu 1bt(3956.53mg), casamino acid 1g, sucrose 30g, 2,4-D 2mg, glutamin 0.5g, proline 0.5g, glucose 10g, 100mM AS, pH 5.2, 0.8% agar
MS3	MS 4.43g, sucrose 30g, 2,4-D 3mg, pH 5.8, 0.8% agar

다. 형질전환 표지인자 종류 및 농도에 따른 버즈풋트레포일 캘러스의 치상

형질전환체 기내 선발을 위하여 kanamycin, hygromycin, phosphinothricin을 표지인자로

2N6-AS배지(표 2)에 첨가하였고, kanamycin은 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100mg L⁻¹을, hygromycin은 0, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0mg L⁻¹을 phosphinothricin은 0, 0.01, 0.05, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0mg L⁻¹을 2N6-AS배지에 잘 섞은 후 일회용 페트리디쉬에 분주하였다. 증식된 캘러스를 약 2mm씩 절단한 후 항생제와 제초제 성분이 첨가된 2N6-AS배지에 치상하였다. 배양환경은 28℃에서 암배양하고, 3주 간격으로 계대배양하였다

3. 결과 및 고찰

가축의 설사병에 대한 백신을 생산하는 작물을 육성하기 위하여 MS배지에 BA 0.0157mg L⁻¹와 2,4-D 2mg L⁻¹을 첨가한 mMS배지와 Chu배지에 2,4-D 2mg L⁻¹을 첨가한 2N6배지에 버즈풋트레포일의 종자를 치상하여 캘러스를 유도하였다. 유도된 버즈풋트레포일 캘러스는 2N6배지에 acetosyringone이 첨가된 2N6-AS배지에서는 79개를 치상하여 53개의 캘러스가 형성되어 67.1%의 증식율을 보였고, MS3배지에서는 149개를 치상하여 84개의 캘러스가 형성되어 56.4%의 증식율을 나타냈다(표 2).

표 2. 배지별 버즈풋트레포일 캘러스 증식율

처리배지	캘러스 치상수(개)	캘러스 형성수(개)	캘러스 증식율(%)
2N6-AS	79	53	67.1
MS3	149	84	56.4

버즈풋트레포일 종자 유래 캘러스는 배지내 kanamycin농도가 높을수록 고사율도 증가하였으며 특히 80mg L⁻¹부터 고사율이 급격히 상승하였다(표 3). 캘러스 지름은 40mg L⁻¹부터 거의 자라지 않았고, 무게도 농도가 높을수록 줄어들다가 40mg L⁻¹부터는 급격히 감소하여 80mg L⁻¹ 처리에서는 2.8mg으로 거의 자라지 않고 고사되었다.

표 3. Kanamycin 농도에 따른 버즈풋트레포일 종자 유래 캘러스의 기내 생육상황

처리농도(mg L ⁻¹)	고사율(%)	캘러스 지름(mm)	캘러스 무게 (mg)
0	2.2	3.6	11.1
10	8.9	3.2	8.4
20	13.3	2.9	6.4
40	44.4	2.5	3.8
60	64.4	2.5	3.2
80	97.8	2.5	2.8
100	100	2.4	2.0

국화 품종의 엽절편체 선발은 kanamycin 50mg L⁻¹이상(소호섭 등, 2004a)을, 나리 인편에 대한 선발은 60mg L⁻¹이상(소호섭 등, 2004b)을 배지에 첨가해야 형질전환체를 선발할 수 있었으나 버즈풋트레포일 종자 유래 캘러스는 국화 엽절편이나 나리 인편 처리 보다는 높은 농도인 80mg L⁻¹부터 고사율이 아주 높아(97.8%) 형질전환체를 선발할 수 있었다. Kanamycin과 마찬가지로 배지내 hygromycin 농도가 높을수록 버즈풋트레포일 종자 유래 캘러스의 고사율은 증가하였으며 캘러스 지름과 무게는 감소하였다(표 4). 특히 hygromycin 10mg L⁻¹처리부터 고사율이 급격히 상승하였다. 캘러스 지름은 1.0mg L⁻¹부터 2.6mg으로 거의 자라지 않았고, 무게도 농도가 높을수록 줄어들다가 10.0mg L⁻¹처리에서는 5.7mg으로 약간 자라다가 고사되었다. 국화 품종의 엽절편체 선발은 hygromycin 농도를 품종에 따라 달리 첨가해야 하며 hygromycin 1.0~2.0mg L⁻¹(소호섭 등, 2004a)을, 나리 인편에 대한 선발은 10~20mg L⁻¹이상(소호섭 등, 2004b)을 배지에 첨가해야 형질전환체를 선발할 수 있었으나 버즈풋트레포일 종자 유래 캘러스는 국화 엽절편 처리보다는 높고 나리 인편 처리와 비슷한 농도인 10mg L⁻¹이상부터 고사율이 아주 높아(97.8%) 형질전환체를 선발할 수 있었다.

표 4. Hygromycin 농도에 따른 버즈풋트레포일 종자 유래 캘러스의 기내 생육상황

처리농도 (mg L ⁻¹)	고사율 (%)	캘러스 지름 (mm)	캘러스 무게 (mg)
0	2.2	3.6	11.1
0.5	6.7	3.1	9.0
1.0	28.9	2.6	8.3
5.0	73.3	2.4	8.0
10.0	97.8	2.4	5.7
20.0	100	2.0	4.8

Phosphinothricin도 hygromycin과 마찬가지로 농도가 높을수록 버즈풋트레포일 종자 유래 캘러스의 고사율은 증가하였으며 캘러스 지름과 무게는 감소하였다(표 5). 특히 1.0mg L⁻¹처리부터 고사율이 급격히 높아져 2.0mg L⁻¹처리에서 가장 높았다(97.8%). 캘러스 지름은 0.2mg L⁻¹부터 2.8mg으로 거의 자라지 않았고, 무게도 농도가 높을수록 줄어들다가 1.0mg L⁻¹처리부터 6.3mg으로 약간 자라다가 고사되었다. 품종에 따라 다르지만 국화의 엽절편체 선발은 0.1~1.0mg L⁻¹(소호섭 등, 2004a)을, 나리의 인편 선발은 0.5~2.0mg L⁻¹ 이상(소호섭 등, 2004b)을 배지에 첨가해야 형질전환체를 선발할 수 있었으나 버즈풋트레포일 종자 유래 캘러스는 국화 엽절편 처리와 나리 인편 처리보다는 높은 농도인 2.0mg L⁻¹이상부터 고사율이 아주 높아(97.8%) 형질전환체를 선발할 수 있었다.

표 5. Phosphinothricin 농도에 따른 버즈풋트레포일 종자 유래 캘러스의 기내 생육상황

처리농도 (mg L ⁻¹)	고사율 (%)	캘러스 지름 (mm)	캘러스 무게 (mg)
0	0	3.6	11.1
0.01	11.1	3.4	12.0
0.05	15.6	3.1	10.4
0.2	24.4	2.8	9.2
0.5	48.9	2.7	7.8
1.0	84.4	2.7	6.3
2.0	97.8	2.5	6.0
5.0	97.8	2.5	5.0

4. 적 요

가축의 설사병에 대한 백신을 생산하는 작물을 육성하기 위하여 버즈풋트레포일의 종자에서 유도된 캘러스에 대한 증식배지와 형질전환 표지인자의 종류별 농도를 구명한 결과는 다음과 같다.

가. 버즈풋트레포일 캘러스는 2N6-AS배지에서는 67.1%, MS3배지에서는 56.4%가 증식하였다.

나. 배지내 kanamycin농도가 높을수록 캘러스의 고사율도 증가하였으며 특히 80mg L⁻¹부터 고사율이 급격히 상승하였고 캘러스도 자라지 않고 고사하였다. hygromycin은 농도가 높을수록 캘러스의 고사율은 증가하였으며 특히 hygromycin 10.0mg L⁻¹처리부터 고사율이 급격히 상승하였고 캘러스도 약간 자라다가 고사되었다. 배지내 phosphinothricin도 농도가 높을수록 캘러스의 고사율은 증가하였으며 특히 2.0mg L⁻¹처리에서 높았으며 캘러스도 약간 자라다가 고사되었다.

따라서 버즈풋트레포일 종자 유래 캘러스에 대하여 형질전환체를 기내에서 선발할 수 있는 표지인자는 kanamycin은 80mg L⁻¹, hygromycin은 10.0mg L⁻¹, phosphinothricin은 2.0mg L⁻¹을 배지내에 첨가해야 형질전환체를 선발할 수 있을 것으로 생각된다.

5. 인용문헌

Kim, K.Y., Shin, J.S., Rim, Y.W., Choi, K.J., Jang, Y.S., Kim, W.H., Lee, B.H., Jo, J., 1999. Callus formation from alfalfa(medicago sativa l.) seed and plant regeneration from alfalfa calli. Journal of the Korean grassland science, 19(1) : 23-30.

- Robbins, M.P., A.D.Bavage, Strudwieke and P. Morris. 1998. Genetic manipulation of condensed tannin, in higher plants. II Analysis of birdsfoot trefoil plants harboring antisense dihydroflavonol reductase constructs. *Plant Physiol.* 116(3) : 1133-1144.
- 소호섭, 한영희, 박경열, 박영두. 2004a. 국화 내충성 신품종 육성 : 국화 형질전환을 위한 마커 선발. 2003년도 시험연구보고서 경기도농업기술원. 532-537.
- 소호섭, 한영희, 박경열, 이부영. 2004b. 나리 바이러스 저항성 신품종 육성 : 나리 형질전환을 위한 마커 선발. 2003년도 시험연구보고서 경기도농업기술원. 542-549.