

## *Agrobacterium*에 의한 *Chlorella vulgaris*의 트레할로즈 생성유전자형질전환에 주는 인자들의 영향

정승주, 한금성, 허명식, 리영철

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《기초과학이 든든해야 나라의 과학기술이 공고한 토대우에서 끊임없이 발전할수 있습니다. 수학, 물리학, 화학, 생물학과 같은 기초과학부문에서 과학기술발전의 원리적, 방법론적기초를 다져나가면서 세계적인 연구성과들을 내놓아야 합니다.》(《조선로동당 제7차대회에서 한 중앙위원회사업총화보고》 단행본 40페이지)

단세포록조류에 속하는 진핵생물인 *Chlorella vulgaris*에는 필수아미노산과 단백질, 기름질, 광물질, 생물활성물질들이 많이 들어있어 건강식품으로뿐만아니라 축산과 양어에서 먹이첨가제, 유충먹이로 널리 이용되고있으며 환경보호와 생물연료생산에도 이용되고있다.[2]

세계적으로 볼 때 거대DNA단편을 쉽게 전이시킬수 있는 *Agrobacterium*감염법으로 *Chlorella*를 형질전환시켜 여러가지 유전자를 조작하는 연구가 활발히 진행되고있다.[3, 5]

그러나 식물을 비롯한 여러 생물체들에서 가물과 염기 등 스트레스에 대한 견딜성을 높여주는것으로 알려진 트레할로즈[2]를 *Chlorella*에 형질전환시킨 연구는 진행된것이 없다.

이로부터 우리는 *Saccharomyces cerevisiae*의 트레할로즈생성유전자를 *Chlorella vulgaris*에 *Agrobacterium*감염법으로 형질전환시켜 형질전환계를 확립하기 위한 연구를 하였다.

### 재료와 방법

#### 1) 재료

미세조류로는 18sRNA에 의한 PCR분석법으로 동정한 *Chlorella vulgaris* sp.를 이용하였다. 효모 *Saccharomyces cerevisiae*의 TPS(트레할로즈-6-린산합성 효소), TPP(트레할로즈-6-린산포스파타제)유전자를 클론화하여 융합시키고 식물발현운반체 pCAMBIA 13011::scTPS-TPP를 제작[1]하였으며 *A. tumefaciens* LBA4404에 형질전환[4]시킨 *A. tumefaciens* LBA4404(pCAMBIA 13011::scTPS-TPP)를 형질전환에 이용하였다.

#### 2) 방법

*A. tumefaciens* LBA4404(pCAMBIA 13011::scTPS-TPP)에 의한 *Chlorella vulgaris* sp.의 형질전환은 선행방법[4, 5]에 준하여 진행하였다. *Chlorella vulgaris* sp.의 배지로는 S배지를 이용하였고 공존배양후 선발배지에 세포탁심 700mg/L, 하이그로미쥘B는 95mg/L로 첨가하였다.

*Agrobacterium*에 의한 형질전환률에 미치는 인자들의 영향을 보기 위하여 *A. tumefaciens* LBA4404(pCAMBIA 13011::scTPS-TPP)의 균체농도(OD<sub>600</sub>이 각각 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2이 되게 배양함.)와 *Chlorella vulgaris* sp.의 공존배양전 배양기일(0, 1, 2, 3, 4, 5일), 공존배

지의 pH(4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5), 공존배양기간(1, 2, 3, 4, 5일), 공존배양온도(20, 25, 30℃), 아세토시링곤의 농도(0, 100, 150, 200, 250, 300 $\mu$ mol/L)를 각이하게 변화시키면서 선발배지에서 살아남은 균무지수(개)/접종세포수(개) $\times$ 100(%)를 조사하여 형질전환률로 평가하였다. *Chlorella vulgaris*의 DNA분리는 선행방법[4]에 따라 진행하였다.

형질전환체들에 대한 PCR분석을 진행하였다.

정방향프라이머(ScTPSP-F) 5'-CACCCGTGATGGTATGAA-3'

역방향프라이머(ScTPSP-R) 5'-ACGCTTAGCCTGCTTGTA-3'

TPS1-TPS2융합효소유전자단편의 증폭은 KOD-Plus-Neo pol을 리용하여 50  $\mu$ L 반응계로 94℃ 3min  $\rightarrow$  98℃ 10s, 68℃ 2min, 35회 순환  $\rightarrow$  68℃ 7min 조건에서 진행하였다.

*Chlorella vulgaris*의 야생형과 형질전환체들을 NaCl이 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5% 들어있는 S배지에 한 백금이썩 접종하고 배양온도 25~28℃, 빛세기 7 000lx에서 6일동안 배양한 후 *Chlorella vulgaris*의 세포수를 측정하여 트레할로즈생성에 의한 염저항성을 판정하였다.

*Chlorella vulgaris*의 형질전환체와 비형질전환체들을 -15℃에 놓아 생존력을 비교평가하였다.

## 결과 및 논의

형질전환률에 미치는 균체농도의 영향 형질전환률에 미치는 *A. tumefaciens* LBA4404 (pCAMBIA 13011::scTPS-TPP)의 균체농도의 영향을 조사하였다.(그림 1)

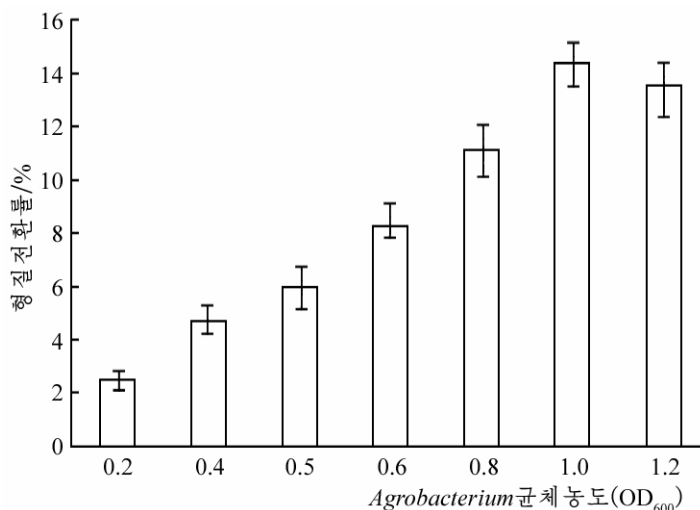


그림 1. 형질전환률에 미치는 *Agrobacterium* 균체농도의 영향

그림 1에서 보는바와 같이 *Agrobacterium*과 *Chlorella vulgaris* 농도비는 T-DNA 전이률에 영향을 주는 주요한 인자이다. *Agrobacterium* 농도가 낮으면 T-DNA 전이률이 감소하였고 균체농도가 너무 높으면 *Chlorella* 세포증식에 영향을 줄수도 있겠지만 형질전환률에 큰 영향은 주지 않았다. *Agrobacterium* 농도를 OD<sub>600</sub>=1.0으로 하였을 때 형질전환률은 14.3%로서 OD<sub>600</sub>=0.2(2.5%)에 비해 5.7배로 높았다.

배양세포들의 감염때 형질전환률의 변화 액체배지에서 자라는 *Chlorella vulgaris* 세포들을 감

염시킬 때와 고체배지에서 일정한 기간 배양한 세포들을 감염시킬 때 형질전환률의 변화를 조사하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 고체배양기간은 *Chlorella*의 T-DNA전이률에 영향을 주었다. *Chlorella*세포들을 고체배지에서 배양하면 액체배양한 세포들을 감염시킬 때(1.4%)보다 형질전환률이 증가하였는데 고체배양기간을 3일로 하였을 때 14배 높았다. 액체배양한 *Chlorella* 세포들과 고체배양한 *Chlorella*세포들은 크기가 다른데 고체배양하면 세포가 커지고 막투과성이 커진다. 따라서 세포당 작용하는 *Agrobacterium*균체수가 고체배양기간이 늘어날수록 증가하였는데 고체배양 4일 후에는 형질전환균이 급격히 적어졌다. 이것은 *Agrobacterium*의 급격한 증식으로 *Chlorella*세포를 뒤덮어 호흡에 부정적영향을 주기때문에 전이률이 감소하는 것과 관련된다고 볼수 있다.

형질전환률에 미치는 공존배지pH의 영향 일반적으로 산성pH가 *Agrobacterium*의 *vir*유전자 발현을 유도하는데 적합한것으로 알려져있으므로 *Agrobacterium*에 의한 형질전환률에 미치는 공존배지pH의 영향을 조사하였다.(그림 3)

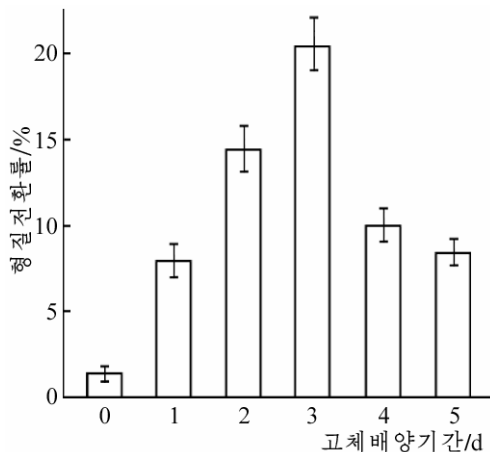


그림 2. 형질전환률에 미치는 고체배양기간의 영향

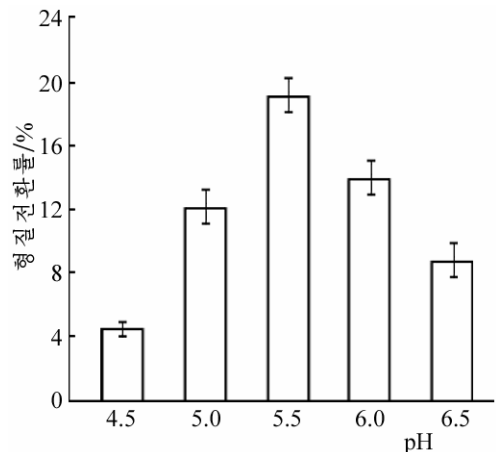


그림 3. 형질전환률에 미치는 공존배지pH의 영향

그림 3에서 보는바와 같이 공존배지의 pH에 따라 T-DNA전이률의 변화가 명백히 나타났는데 공존배지의 pH가 5.5일 때 형질전환률이 가장 높았다. pH가 5.5보다 낮은 구간에서는 *vir*영역활성화에 유리하지만 세포생장이 저해되므로 형질전환률이 급격히 감소하였다.

형질전환률에 미치는 공존배양기간의 영향 공존배양기간은 형질전환률에 영향을 주는 주요한 인자이므로 *Agrobacterium*에 의한 형질전환률에 미치는 공존배양기간의 영향을 조사하였다.(그림 4)

그림 4에서 보는바와 같이 *Agrobacterium*과 *Chlorella*세포들을 3~4일동안 공존배양하였을 때 형질전환률이 가장 높았으며 공존배양을 5일 진행하면 형질전환률이 급격히 감소하였는데 이것은 *Agrobacterium*의 과잉증식으로 *Chlorella*세포들의 생장이 억제되는것과 관련된다.

형질전환률에 미치는 공존배양온도의 영향 *vir*유전자발현은 보다 낮은 온도에서 활성화되며 따라서 T-DNA전이률이 높아진다. 온도에 따라 형질전환률이 달라지므로 형질전환률에 미

치는 공존배양온도의 영향을 조사하였다.(그림 5)

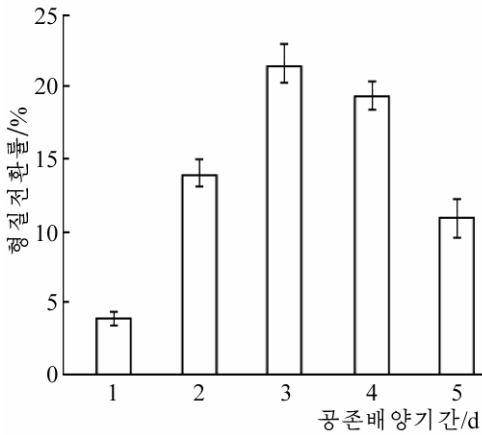


그림 4. 형질전환률에 미치는 공존배양기간의 영향

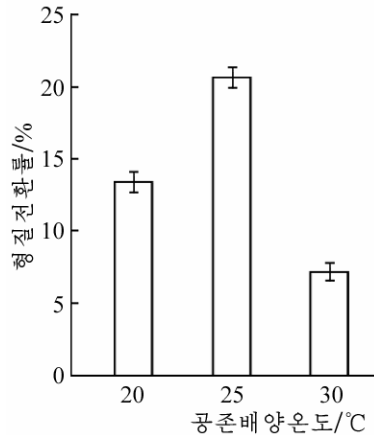


그림 5. 형질전환률에 미치는 공존배양온도의 영향

그림 5에서 보는바와 같이 *Agrobacterium*과 *Chlorella*세포들을 25℃에서 공존배양하였을 때 형질전환률이 20.8%로서 가장 높았다. 공존배양을 20℃에서 진행하였을 때 형질전환률은 13.6%로 감소하였는데 이것은 *Chlorella*세포들의 생육상태와 관련되는것 같다.

형질전환률에 미치는 아세토시링곤농도의 영향 아세토시링곤과 같은 폐놀화합물들은 *Agrobacterium*세균이 *Chlorella*세포에 빨리 부착하도록 하고 형질감염때 *vir*영역의 기능을 높여주어 형질전환률에 영향을 준다. 이로부터 아세토시링곤의 농도를 변화시키면서 형질전환률을 조사하였다.(그림 6)

그림 6에서 보는바와 같이 공존배지에 아세토시링곤을 넣지 않고 *Chlorella*세포를 형질감염시켰을 때 선발배지에서 저항성세포무지가 나타나지 않았다. 이것은 *Chlorella*세포에서 *vir*특이적인 내생성폐놀유도체가 분비되지 않는다는것을 보여준다. 그러나 아세토시링곤을 150μmol/L로 첨가하였을 때에는 형질전환률이 17.6%로서 제일 높았다.

형질전환체들에 대한 PCR분석결과 *Chlorella vulgaris* sp.의 DNA를 분리하였다.(그림 7의 ㄱ))

그림 7의 ㄴ)에서 보는바와 같이 TPS1-TPS2융합 효소유전자의 런결부위에 해당한 535bp의 증폭띠가 형질전환체들에서 명백히 나타났다.

트레할로즈생성에 의한 염저항성변화 *Chlorella vulgaris*의 야생형과 형질전환체들을 NaCl이 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5% 들어있는 S배지에 한 백금이썩 접종하고 배양온도 25~28℃, 빛세기 7 000lx에서 6일동안 배양한 후 *Chlorella vulgaris*의 세포수를 측정하여 트레할로즈생성에 의한 염저항성을 판정하였다.(그림 8)

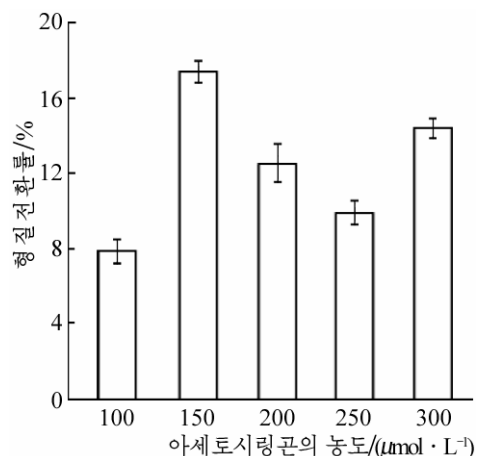


그림 6. 형질전환률에 미치는 아세토시링곤농도의 영향

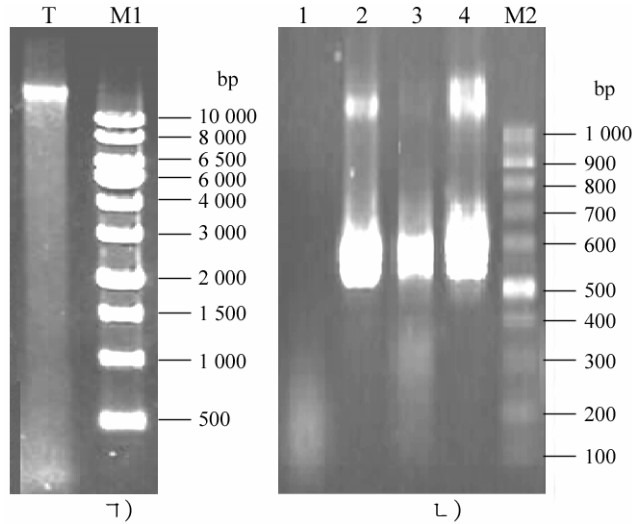


그림 7. 형질전환체에 대한 분석

- 1) 형질전환된 *Chlorella vulgaris*의 게놈DNA 전기영동상,  
 2) pCAMBIA 13011::scTPS-TPP에 대한 형질전환체의  
 PCR검정; M1은 분자크기표식자(1kb DNA ladder),  
 M2는 분자크기표식자(100bp DNA ladder),  
 T는 *Chlorella vulgaris* sp.의 게놈DNA,  
 1—야생형 *Chlorella vulgaris*, 2와  
 4는 형질전환체, 3—양성대조

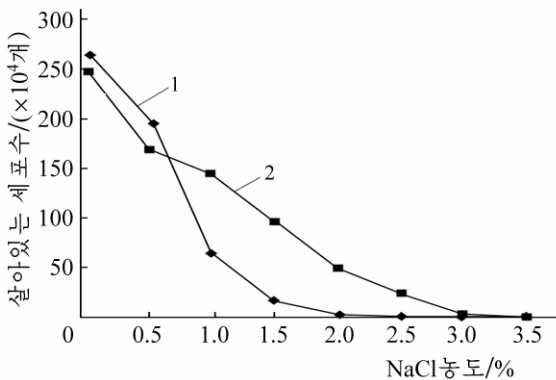


그림 8. *Chlorella vulgaris* 야생형과 형질전환체의  
 생육에 대한 NaCl의 영향비교  
 1—야생형, 2—형질전환체

그림 8에서 보는바와 같이 *Chlorella vulgaris* 야생형은 NaCl농도가 증가함에 따라 생존력이 급격히 감소하였으며 2.5%이상의 농도에서는 거의 증식하지 못하였다. 그러나 형질전환체는 2.5%농도에서도 생장이 유지되었다.

## 맺는 말

1) *A. tumefaciens* LBA4404(pCAMBIA 13011::scTPS-TPP)의 균체를 OD<sub>600</sub>=1.0으로 감염시킬 때 형질전환률은 14.3%로서 OD<sub>600</sub>=0.2 (2.5%)에 비해 5.7배로 높았다.

2) 감염전 고체배지에서 3일 자래울 때 형질전환률은 액체배양한 세포들을 감염시킬 때 보다 14배정도 높았다.

3) *Agrobacterium*과 *Chlorella* 세포들을 배지 pH 5.5, 배양기간 3~4일, 25°C에서 공존배양하였을 때 형질전환률이 가장 높았다. 그리고 아세토시링곤을 배지에 150  $\mu$ mol/L로 첨가하면 형질전환률을 높이는데 좋은 영향을 준다.

4) 형질전환체들은 야생형과 달리 NaCl 2.5%농도에서도 생장이 억제되지 않는다.

## 참 고 문 헌

- [1] 유웅주 등; 생물학, 4, 5, 주체105(2016).
- [2] L. O. Gouveia et al.; Microbiol. Biotechnol., 36, 269, 2009.
- [3] I. Ajjaw et al.; Nat. Biotechnol., 35, 7, 647, 2017.
- [4] K. Wang; Method in Mol. Biol., 2, 421, 2006.
- [5] T. S. Cha et al.; World J. Microbiol. Biotechnol., 28, 1772, 2012.

주체108(2019)년 1월 5일 원고접수

### **Effect of Factors on *Agrobacterium*-Mediated Trehalose Gene-Transformation of *Chlorella vulgaris***

*Jong Sung Ju, Han Kum Song, Ho Myong Sik and Ri Yong Chol*

We transfected *Chlorella vulgaris* with trehalose production gene(scTPS-TPP) through *A. tumefaciens* transformation method and established conditions to increase transfer frequency.

To increase transfer frequency, the density of *A. tumefaciens* LBA4404(pCAMBIA 13011::scTPS-TPP) should be OD<sub>600</sub>=1.0 and at this bacterial density transfer frequency was 14.3%, almost 5.7 times as compared with OD<sub>600</sub>=0.2(2.5%). The pre-culture was one of the factors affecting T-DNA transfer in *Chlorella* cells and the competence for transformation was greatly increased after 3 days of pre-culture on solid medium by almost 14 times. pH 5.5 was optimal for transformation of algae.

The highest percentage of transfer frequency was observed after 3~4 days of co-cultivation with *Agrobacterium* and *Chlorella*. After co-cultivation at temperature of 25°C transformation frequency showed the optimal percentage 20.8%. The transformation frequency was the highest(17.6%) when the acetosyringone concentration was 150μmol/L.

Transformants unlike wild type *Chlorella* kept growing even in 2.5% NaCl concentration.

Key words: *Chlorella vulgaris*, trehalose, *A. tumefaciens*