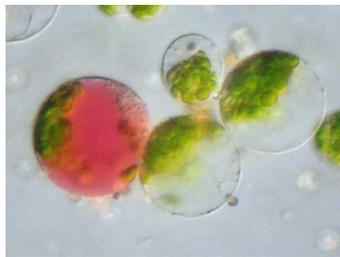


13장. 원형질체의 융합

1절. 원형질체 융합 방법

원형질체(protoplast)는 세포벽이 없으므로, 세포 간의 융합에 의해서 다핵세포가 될 수 있는 성질을 갖고 있다. 예를 들면 단백질이나 핵산 등과 같은 고분자 물질을 쉽게 받아들일 뿐만 아니라 bacteria의 spheroplast(세포벽이 거의 제거된 것)나 ribosome, 세포 내에 존재하는 chloroplast, mitochondria와 같은 세포 내 소기관 등 비교적 큰 것도 받아들일 수 있다. 또한 원형질체끼리 서로 융합하는 것도 특징 중의 하나인데, 이것을 체세포 융합(somatic fusion) 또는 원형질체 융합(protoplast fusion)이라 한다.

이러한 융합을 통해 새로운 합성 식물을 얻기 위하여 융합을 유도하고 있는데, 융합에는 작물의 특성에 따라 원형질체가 나출되면 나출원형질체간에 스스로 융합이 일어나는 자발적 융합과 화학약품의 처리와 전기충격에 의해서 융합을 유도하는 인위적 융합으로 구분된다.



<leaf cell의 엽록체와 petal의 색을 띠고 있는 vacuole이 융합한 것으로 가장 왼쪽이 융합된 원형질체이다>



<원형질체 융합 과정>

1. 자발적 융합(spontaneous fusion)

원형질체를 만드는 과정에서 세포벽 분해효소의 자국과 삼투압의 변화로 일부 원형질체가 스스로 융합되는 자발적인 융합이 일어날 수 있다. 이것은 세포 간의 원형질연락사(plasmodesmata)가 팽창하여 접촉함으로써 일어나는 것이다. 이와 같이 2개 이상의 같은 원형질체가 융합되면 동종의 핵이 2개 이상 되는 homokaryon 또는 homokaryocyte라고 한다. 자발적인 융합은 같은 기원의 원형질체 사이에서 일어나는 것이기 때문에 아무런 의미가 없으며 오히려 이 비율이 높아지면 쓸모 있는 원형질체의 수가 감소됨으로 이를 억제

시켜야 한다.

2. 인위적 융합(유도 융합 : induced fusion)

서로 다른 기원의 원형질체를 융합시키기 위해 인위적인 융합이 이루어져야 하는데, 이를 위해서는 원형질체가 서로 모이고 접촉되도록 하여야 한다. 융합의 방법에 따라 융합 촉진제가 필요한 화학적 융합(chemical induced fusion)과 전기적 융합(electro fusion)이 있다.

① 화학적 융합(chemical induced fusion)

화학적으로 다양한 융합 촉진제가 사용되어지는데, 여기에는 NaNO_3 , 높은 pH, PEG, DMSO, PV(polyvinyl acetate) 등이 있다. 융합하기 위해서는 서로 접촉되도록 해야 하지만, 식물원형질체는 표면에 음전하(-10~30mV)를 띄고 있고 원형질막에는 lipid가 있어서 서로간의 접촉이 어렵다. 융합 촉진제는 접촉이 어렵게 하는 음전하를 제거함으로써 원형질체의 접촉을 유도한다.

(a) 높은 pH와 Ca^{2+} 처리 융합 방법

원형질체가 Ca^{2+} 이온 속에서 서로 응집되는 성질을 이용한 것이다. 구체적인 방법은 분리한 0.05M의 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 0.4M의 Mannitol에 용해시키고 pH를 10.5로 조절한 다음 분리된 원형질체를 현탁시켜 50×g에서 3분 동안 원심분리 시킨 다음 37℃ 항온수조에서 30~40분 동안 처리한 후 다시 현탁하여 배양한다.

(b) PEG(polyethylene glycol)와 DMSO(dimethyl sulfoxide)처리 융합 방법

PEG 처리 융합시 일반적으로 융합산물이 용기의 표면 부근에 수 일 동안 떠 있어서 융합이 확인될 때에 이들을 즉시 분리하는 데 어려움이 있다. 이를 개선하기 위해 PEG와 DMSO를 함께 처리한 것이다. 즉, PEG로 원형질체를 처리한 후 세척용액에 DMSO를 처리함으로써 개체별 융합 산물을 쉽게 분리하여 융합 빈도를 현저하게 증가 시켰다.

(c) PEG(polyethylene glycol)와 Ca^{2+} 처리 융합 방법

PEG는 대부분의 세포에 독성이 낮고 heterokaryon의 형성율이 높다. PEG를 처리하면 원형질막이 순식간에 응집하여 두 개 이상의 덩어리로 되는데, PEG가 약한 음성을 띄므로 양의 극성을 가진 물, 단백질, 탄수화물 등과 수소결합을 하며, PEG분자의 고리가 충분히 크면 인근 원형질체 표면사이에 분자적인 다리 역할을 하여 유착이 일어나는 것이다. 또한 PEG는 Ca^{2+} 와 기타 양이온을 결합하여 음으로 극성을 이룬 원형질막의 단백질 무리 또는 인지질 사이에 다리를 놓아서 유착을 촉진시킨다. 세척과정에서 Ca^{2+} 와 결합된 PEG분자는 제거되면서 전기적 하전이 재배열 된다. 막이 밀접하게 접촉해 있는 부위에서 전하의 재배열은 양으로 하전된 원형질체들을 음으로 하전된 다른 원형질체에 연결시키면 원형질체를 융합시킬 수 있다. PEG 융합방법은 2~3개의 응집된 원형질체 사이에서 융합이 일어나기 때문에 융합빈도가 높다.

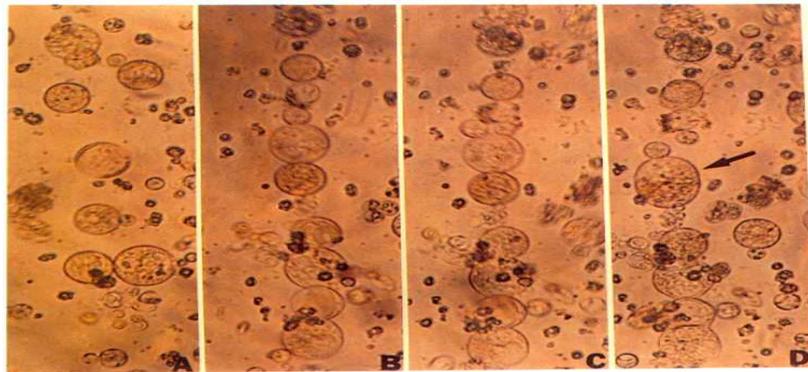
② 전기적 융합(electro fusion) 방법

전기적 자극에 의한 물리적인 방법으로 원형질체가 알맞은 전기(electro field)에 놓이면

전기 자극에 의하여 쉽게 융합된다. 물리적인 융합방법은 화학적인 융합방법에 비하여 독성이 없으며 실험방법이 간단하다. 전기 융합방법은 특수한 장치가 필요하기 때문에 일반적으로 화학 시약방법을 더 많이 사용한다. 전기융합은 생물학적, 물리화학적 과정으로서 두 단계로 완성된다.

첫 번째는 현탁된 원형질체를 두 전극 사이에 넣고 교류전류를 통과시키면 배지에 아주 불균일한 교류 전계가 형성된다. 이렇게 되면 입자 양쪽이 전계강도가 서로 다르기 때문에 dielectrophoresis 현상을 일으킨다. 이들은 전기 영동과는 달리 입자 외부의 전압이 역전되어도 이에 따르지 못하므로 서로 밀착하여 전극에 몇 개씩 붙거나 전극 사이에서 연결되어 원형질체가 진주 목걸이 모양으로 배열된다.

두 번째 단계에서는 연결된 원형질체에 매우 짧은 직류 pulse를 보내면 양편의 막이 파괴되어 융합이 일어날 수 있다. 융합이 되었을 때 밀접하게 접촉된 상태를 유지시키기 위하여 교류전압을 짧게 보내고 난 후 완전히 끊는다. 때로는 첫 단계의 응집과정을 거치지 않고 바로 직류 펄스를 사용하기도 하지만 잘못 조정되어 실패할 경우도 있다.



<전기적 충격에 의한 원형질체 융합>

2절. 잡종세포의 선별

원형질체 융합에 의해 형성된 것이 잡종으로 되어 있는지에 대해서는 재분화 식물체의 잎이나 꽃의 형태가 중간적이냐 아니냐에 따라서 구분이 된다. 그러나 개체로 되돌리지 않더라도 세포 수준에서 잡종 여부를 알 수 있다면 보다 유효하다.

원형질체 융합 후 잡종 세포를 확인하여 우리가 원하는 융합체를 선별해 내는 것이 중요하다. 확인 방법에는 여러 가지가 있다.

1) 현미경 - 가장 기본적인 방법으로 현미경으로 확인하는 방법.

2) 형광성 색소(FAD-fluorescein diacetate)

두 가지 형의 원형질체를 상이한 형광성 색소로 염색하여 확인하는 방법.

3) 흡입식 선별

micro-pipette을 이용하여 융합된 원형질체를 흡입하여 선별하는 방법이다. 이 방법을 이용하기 위해서는 융합체 내의 염록체, 전분립 또는 색소체 같은 외형적으로 구분이 뚜렷한 marker(표지)가 있어야 한다.

-Rubisco : 녹색잎의 세포 염록체 내에 들어 있으며 광합성에 있어서 이산화탄소를 고

정시키는 역할을 담당하고 있는 Rubisco는 자주 사용 되는 지표이다. Rubisco는 핵의 유전 정보로 합성되는 작은 subunit과 엽록체의 유전 정보로 합성되는 큰 subunit으로 구성되어 있어 전기영동을 시키면 작은 subunit과 큰 subunit으로 분리되어 각 subunit은 몇 개의 band로 검출된다. 또 각 band는 종에 따라 다르기 때문에 잡종여부는 각 band를 비교하면 된다. Rubisco는 핵과 세포질에 대해서 동시에 잡종성이 확인되기 때문에 매우 편리하다.

4) protein을 marker로 하는 방법

peroxidase, acid phosphatase, esterase와 같이 많은 isozyme을 갖는 효소를 사용하는 방법.

5) 기타방법

-핵의 유전자에 대해서 리보솜 RNA 유전자나 반복 배열 DNA와 같이 염색체 중에 다수의 유전자 복사가 존재하는 것을 지표로 하는 방법

-in situ hybridization, 염색체를 직접 보는 핵형 분석

(in situ hybridization : 방사성 동위원소로 표지된 DNA를 변성하여 1개의 사슬로 한 후 고정된 염색체를 혼합하면 DNA의 염색체 상에서의 위치가 결정된다.)

-세포질 유전자에 대해서는 미토콘드리아나 엽록체를 분리하여 DNA를 추출하고 특이적으로 DNA를 절단하는 제한효소를 사용하여 절단, 패턴을 비교하는 방법 등이 있다.

3절. 원형질체 배양의 유지와 식물체 재생

1) 원형질체 배양의 유지 및 배양 조건

원형질체 배양의 최적조건은 식물의 종이나 때로는 품종에 의해 좌우된다. 대부분의 원형질체는 분열을 시작하는데 빛을 필요로 하지 않으나, 어떤 것은 빛에 민감하다. 온도 범위는 보통 25~30℃로 유지되도록 하고, petri dish는 형광등을 이용하여 1000ux로 계속 조명될 수 있도록 한다.

체세포 잡종의 식물체를 성공적으로 얻는 데는 많은 경우에 원형질체의 분열을 촉진시키든지 아니면 부모의 한쪽은 성장을 억제하지만 다른 쪽은 영향이 없는 것과 같은 일방적으로 성장을 억제하는 배지를 개발할 필요가 있다. 그렇게 되면 체세포 잡종의 성장이 선택적으로 촉진될 수 있으며, 또 평가하고자 하는 다수의 배지를 바꾸어 사용할 수 있는 간단한 방법을 채택할 수 있다.

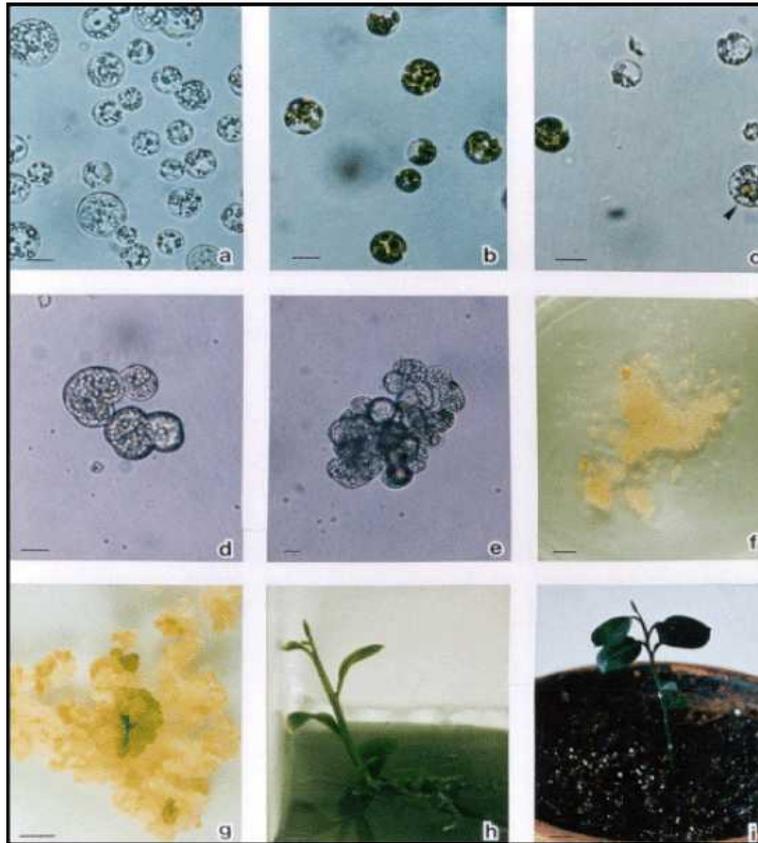
2) 원형질체의 분열

배양된 세포 원형질체는 평판배양 후 24~36시간에 1차 분열을, 그리고 21일 후에는 colony를 기대할 수 있다. 한천이나 agarose내에 있는 원형질체의 분열을 촉진하기 위해 배지의 삼투압을 줄이거나, 분열중인 원형질체가 포함된 작은 덩어리로 더 낮은 수준의 원형질 분리 촉진제가 들어 있는 배지의 표면에 옮긴다. 원형질체의 재생배양에서는 한 감수 분열기에 보통 25% 이상을 희석하지 않는다.

3) 식물체 재생

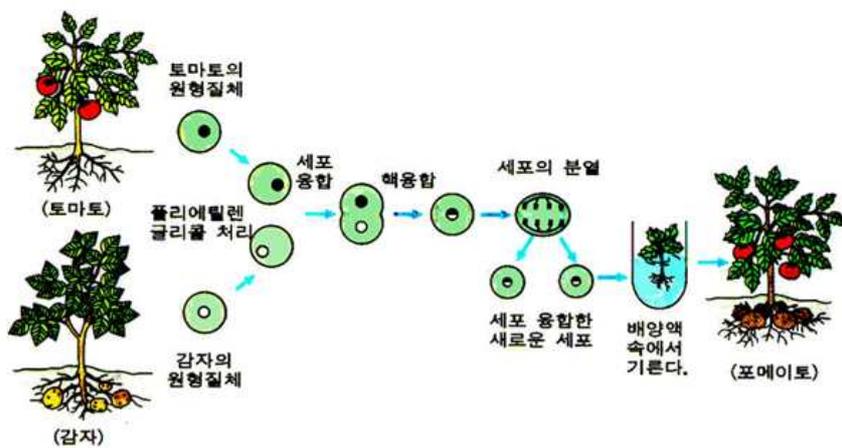
2주 후에는 colony를 이식하기에 충분할 만큼 커지므로 해부용 칼의 끝을 이용하여 한천으로 굳혀진 재분화 배지의 표면에 옮긴다. 이 시기에 세포 균락과 callus는 petri dish나

병에 유지될 수 있으며, 대개 계대배양을 규칙적으로 하여 shoot를 생산하게 된다. 짙은 호르몬의 수준이 낮거나 없는 배지에 옮겨서 발근시킨다.



a.식물체A로부터 원형질체를 분리, 정제
c.PEG solution의 첨가: protoplast fusion
e.cell culture & small colonies
g.somatic embryo induction

b.식물체B로부터 원형질체를 분리, 정제
d.cell division : protoplast fusion 후10일
f.고체 배지로 옮긴 후자라는 colony들
h.rooting 배지로 shoot를 옮김



[세포 융합으로 만들어진 포메이토]