

12장. 식물원형질체 분리 및 배양

1절. 원형질체의 정의 및 이용 목적

1. 원형질체의 정의

동물세포와 구별되는 식물세포의 중요한 특징은 하나의 식물세포는 분화(differentiation), 발달(development)하여 자율적이고 완전한 식물체로 재생(regeneration)할 수 있는 전형성능(totipotency)을 갖고 있다는 사실이다. 또한 식물세포는 세포벽으로 둘러싸여 있기 때문에 세포벽이 없는 동물세포는 인위적인 이종 간의 세포를 융합하는 것이 가능하지만 식물세포는 그렇지 못하다. 즉 세포벽으로 인해 식물세포는 종(species)이 다른 암수 생식세포의 융합(수정)에 의해 다음 세대를 얻을 수 없으나, 식물생명공학기술 중에는 식물세포 세포벽 제거하여 체세포를 대상으로 유전적인 구조가 서로 다른 두 가지의 세포를 융합하거나, 다른 세포의 세포기관이나 유전물질을 이식하여 잡종세포를 만드는 원형질체 융합(protoplast fusion) 또는 체세포 잡종(somatic hybridization)이라는 기술이 있다. 이 기술을 활용하여 얻어진 식물체를 체세포 잡종 식물체라고 한다.

2절. 원형질체의 분리 및 정제

2-1. 원형질체의 분리

원형질체 분리에는 물리적인 방법으로 세포를 분리하는 기계적인 방법과 세포벽을 제거하기 위해 여러 가지 효소를 처리하여 대량의 원형질체(protoplast)를 획득할 수 있는 효소적인 방법 등이 있다.

※원형질체 융합 기술에서는 2차 세포벽이 발달하여 세포벽이 두꺼운 식물체는 이미 죽은 세포라 볼 수 있기 때문에 사용하지 않는다.

1) 물리적 . 기계적 방법

식물세포를 농도가 높은 설탕용액에 담그면 원형질체가 줄어들어 세포벽으로부터 떨어지는 원형질 분리 현상이 일어난다. 원형질 분리를 일으킨 후 계속해서 면도칼날 등으로 세포벽의 일부를 절취하여 원형질체만을 떼어낼 수 있다. 이러한 방법은 초기에는 많이 시도되었으나, 원형질체를 분리하는데 많은 노력과 시간이 소요되는 반면에 생산된 원형질체의 양은 아주 적기 때문에 효율이 떨어져서 물리적, 기계적 방법은 거의 사용되고 있지 않다.

2) 효소적 방법

기계적인 방법보다는 효소로 원형질체를 둘러싸고 있는 세포벽 구성 물질을 제거하는 방법이 효율적이다. 하지만 원형질체는 세포를 세포벽 분해효소를 처리하는 것만으로 얻어지는 것이 아니라 효소 처리 전, 후 여러 가지 과정을 통해 세포벽이 제거된다.

① 우선 기내에서 무균적으로 재배된 식물체를 제외하고는 모든 재료는 표면 살균되어야 한다. 이 때 되도록 식물에 유해하지 않은 살균액을 쓰도록 한다. 살균액으로는 차아염

소산 용액(NaOCl : sodium hypochlorite)을 많이 사용하며, 가장 쉽게 표면만 살균하는 방법으로 70% alcohol을 처리하여 식물의 wax층을 벗기고 살균을 한다.

② 표면을 살균하여 무균상태로 만들었으므로, 이 후의 조작은 무균실 또는 clean bench에서 무균적으로 해야 한다. 멸균한 잎을 메스, 핀셋 등을 이용하여 잎의 뒷면에 있는 엽맥을 잡고 효소액이 침투되기 쉽도록 표피를 벗긴 뒤 작은 절편체(explant)로 자른 후, 효소액에 담근다. 만약 잎이 얇거나 표피를 벗길 수 없는 재료일 경우에는 금강사를 이용하여 재료의 뒷면을 문질러 이용한다.

③ 표면을 살균하고, 절편체를 자른 후 효소를 이용하여 원형질체를 나출시킨다. 효소 처리에는 두 가지 단계로 수행된다.

(a) 첫 번째 단계에서는 macerozyme이나 pectinase로 식물조직의 pectin조직을 붕괴시켜 세포들을 분리시켜 세포를 풀어 놓는다.

(b) 두 번째 단계에서는 세포벽 분해효소인 cellulase를 수 시간 처리하여 세포벽이 제거된 원형질체를 얻는다.

하지만 일반적으로 원형질체를 얻기 위해서는 한 번에 두 가지 처리를 동시에 한다. 이유는 효소 처리 시간이 길어짐에 따라 세포에 손상을 주기 쉽고, 조작 도중에 잡균이 유입될 기회가 있으며, 간편하기 때문이다. 따라서 pectinase와 cellulase 양자를 함유한 효소액으로 한 번에 처리하여 원형질체를 얻는 방법이 흔히 쓰이고 있다. 이때, 원형질체의 분리정도는 효소 용액의 양에 따라 크게 좌우되고, 효소의 농도는 식물의 종류나 조직에 따라 차이가 있기 때문에 반드시 예비실험으로 사용할 효소의 종류와 농도를 결정하여야 한다. 효소의 처리는 일반적으로 세포의 생존력을 떨어뜨리는 효과가 있으므로 가능하면 효소의 처리시간을 짧게 하는 것이 좋다.

④ 효소액은 원형질체의 생존에 해가 될 수 있기 때문에 원심분리기를 사용하여 여러번 세척하고, 얻어진 원형질체는 신선한 배지에 현탁한다. 효소 처리로 세포막이 파괴되면 팽압에 의해서 원형질체가 파열될 수 있으므로, 원형질 분리 때는 높은 농도의 삼투압 조절제를 첨가한다. 보통 glucose, sorbitol, mannitol solution이 쓰이는데 필요한 용액의 농도로서 원형질 분리가 일어나는 최소의 농도보다 약간 높은 농도의 용액을 사용하는 것이 최적으로 생각되고 있다. 액포가 큰 세포에서는 일반적으로 농도가 낮은 용액이 그리고 액포가 작고 세포질을 많이 포함한 세포에서는 고농도의 용액이 등장액으로 되기 때문에 각각의 세포에 알맞은 용액에서 효소를 녹여서 사용할 필요가 있다.

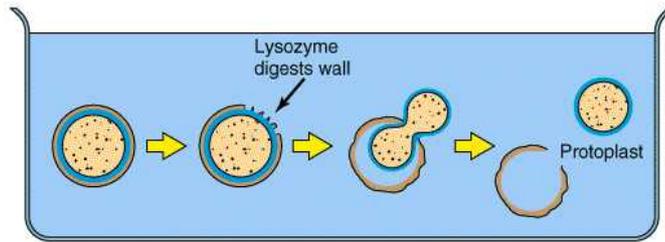
2-2. 원형질체의 정제

① 재료를 효소액에 처리한 후 용기를 흔들거나 재료를 살짝 눌러 짜서 원형질체가 효소액에 나오도록 한다.

② 효소액을 60~70 μ m 공극의 체로 걸러 찌꺼기를 여과한다.

③ 여과물은 CPW액에 재현탁해서 80~120xg로 3~10분간 원심분리한다.

④ 원심분리 후 상층액을 구멍이 큰 피펫으로 뽑아내고 ⑤ 침전된 pellet은 다시 CPW액에 재현탁하여 원심분리를 2회 더 반복한다. 이와 같이 순수 분리된 원형질체를 형질전환이나 융합에 사용한다.



<pre-digestion>

<post-digestion>

<protoplast>

3절. 원형질체의 배양

원형질체는 목적에 따라 여러 가지 사용 방법이 있는데 일반적으로 이것을 배양해서 세포분열을 일으킨 다음 개체로 키우는 것이 중요하다. 원형질체는 세포벽이 없기 때문에 물리적으로 가장 안정된 구형으로 되어 있는데 다시 세포벽을 만든 뒤에도 한참 동안은 구형의 세포로 유지된다. 배양할 때는 원형질체가 과열되지 않도록 등장액 보다 약간 삼투압이 높은 용액 즉 옥신과 시토키닌이 함께 들어 있는 배지에서 배양하면 세포벽의 재생 후에 세포분열을 시작하여 캘러스가 형성된다.

효율적인 원형질체의 성장과 식물체 재분화율을 높이기 위한 원형질체 배양법들이 있다.

1) 액체평판배양(liquid culture)

평판배양은 가장 널리 이용되는 방법으로, 원형질체를 얇게 평판하여 배양하는 방법이다. 이 방법에서 중요한 것은 배양배지로 현탁된 원형질체를 petri dish에 얇게(대략 1mm)평판하여 배양함으로써 원형질체에 일정한 양의 산소 공급을 가능하게 한다. 또한 이 방법은 삼투농도를 효과적 낮추어 줄 수 있어 세포의 재분화율을 높일 수 있다.

2) 급여층배양(Feeder layer culture)

급여층 배양은 저밀도의 원형질체를 배양하는 방법으로 분리한 원형질체의 양이 적을 때 효율적으로 사용될 수 있다. 급여층을 형성하는 급여세포와 배양되어야 할 원형질체 및 여과기로 구성되어 급여층위에 필터를 깔고 그 위에 배지로 현탁된 원형질체를 배양하는 방법이다.

3) 원형질체 고정배양 (immobilization)

원형질체를 고체 혹은 반고체상태로 배양하는 방법은 원형질체의 평판효율을 증가시킨다. 배양배지로 현탁된 원형질체를 두배의 체적으로 하여 녹인 agar 혹은 agarose, Na-Alginate 와 잘 혼합하여 배양한다. 원형질체가 gel 속에 내재되어 있으므로 정기적으로 신선한 배지를 교체해줄 수 있으며 삼투조절도 가능하다.

4) 배양 환경 (culture environment)

분리된 원형질체들은 광에 매우 민감하기 때문에 새로운 세포벽이 합성되고 세포분열이 일어나기 전까지는 암상태나 낮은 광도 하에서 배양해야 된다. 일반적인 원형질체 배양온도는 20-25C 이지만, 최적의 배양환경 조건은 작물에 따라서 다를 수 있다. 원형질체가 배양된 petri dish를 잘 봉하여 배지의 수분 증발로 인한 삼투압의 변화를 막을 수 있다.