

인삼엽에서 Superoxide Dismutase Activity 측정 및 Isozyme Pattern 검정*

양덕조 · 김명식 · 이성종
충북대학교 자연과학대학 생물학과
(1987년 5월 30일 접수)

The Detection of Superoxide Dismutase Activity and Isozyme Pattern of *Panax ginseng* C.A. Meyer Leaves

Deok-Cho Yang, Myeong-Sik Kim and Sung-Jong Lee
Department of Biology, College of Natural Science, Chungbuk National University, Chongju 310,
Korea
(Received May 30, 1987)

Abstract

We studied a assay method on the measurement of superoxide dismutase (SOD Superoxide: superoxide oxidoreductase, EC. 1. 15. 1. 1) activity with photoreduced flavin and nitroblue tetrazolium (NBT) as superoxide (O_2^-) source and detector, respectively. The ΔE ($1000 \text{ ng SOD} \cdot \text{min.})^{-1}$ of photoreduced flavin-NBT system was 0.08, whereas that of xanthine-xanthine-cytochrome system used broadly in experiments was 0.014. Therefore, the new method was regarded more simple and utilizable than xanthine-xanthine cytochrome system method. In the present paper, we also carried out to investigate the SOD activity and isozyme pattern for the purpose of study of leaf-burning disease in ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) leaves.

서 론

인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 직사광선에 장시간 노출되면 잎이 표백화(bleaching)되는 엽소병(leaf burning disease)이 유발된다. 인삼엽소병의 원인에 대하여 양 등¹⁾은 과다한 적색광의 흡수로 인한 photooxidation에 기인 한다고 보고한 이래 윤²⁾은 엽소병의 주요 원인을 hydrogen peroxide(H_2O_2)의 축적에 따른 autooxidation과 singlet oxygen(1O_2)에 의한 photooxidation으로 보고하였으며, 이³⁾는 인삼에서 고광에 의한 superoxide(O_2^-)의 광화학적 생성물이 타식물에 비해 현저히 높기 때문이라고 보고하였다. 따라서 인삼엽소병의 원인을

*본 논문은 1986년도 문교부 학술연구 조성비에 의하여 이룩되었음.

구명하기 위해서는 O_2 대사중에서 광에 의해 생성되는 superoxide와 superoxide를 hydrogen peroxide로 전환시키는 superoxide dismutase(EC. 1. 15. 1. 1, SOD), 그리고 H_2O_2 를 H_2O 와 O_2 로 분해하는 catalase(EC. 1. 11. 1. 6)에 이르는 일련의 protective mechanism에서, 직사광선에 의한 SOD의 활성도에 대한 연구가 절실히 요구되고 있다.

SOD는 Fridovich와 Mc Cord⁴⁾가 bovine erythrocyte로 부터 처음으로 분리·정제한 후 여러 고등식물의 종자 및 seedling, 그리고 잎에서 분리·동정되었다⁵⁻⁸⁾. 현재 SOD에 대한 연구는 아황산(SO_2)가스로 인한 대기오염과 관련지어, 강한 oxydant인 ozon(O_3) 등에 대한 식물체의 protective system으로써 활발히 연구되고 있으나⁹⁾, 인삼에서 SOD에 관한 연구는 전혀 시도된 바 없다.

본 연구에서는 인삼조직에서 보다 효과적인 SOD activity 측정방법을 정립하고, 광에 의한 SOD activity 변화를 측정하여 인삼엽소병의 원인구명을 위한 자료를 얻고자 수행하였다.

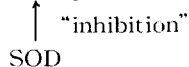
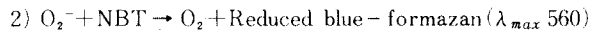
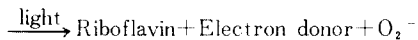
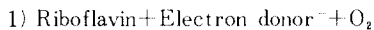
재료 및 연구방법

1. 시료 및 반응시약

본 실험에 사용한 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 한국인삼연구소에서 분양받은 묘삼을 일반관행법¹⁰⁾에 준하여 재배하였으며, 까마중(*Solanum nigrum* L.)은 자연광하에서 재배하였다. 반응시약(SOD, nitroblue tetrazolium, riboflavin, agarose 등)은 모두 Sigma사의 제품을 사용하였다.

2. SOD 활성 측정

효소액은 0.1g·fr·wt.의 잎조직을 50ml K-phosphate(0.05 M, pH 7.5) buffer로 3,500 rpm에서 30초간 homogenize한 후, 2,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 사용하였으며, SOD의 activity는 아래의 1), 2)와 같은 반응원리를 이용하여 측정하였다.



반응액은 암상태에서 2ml 효소액에 $8.56 \times 10^{-5} M$ NBT와 $1.86 \times 10^{-4} M$ riboflavin이 들어 있는 용액 2ml를 더하고, electron donor로써 $6.025 \times 10^{-2} M$ TEMED를 넣은 후 5000 Lux의 형광등하에서 40초간 반응시킨 다음, 560nm에서 NBT reduction에 대한 inhibition율을 측정하여 SOD의 activity로 환산하였다.

3. SOD isozyme pattern

SOD isozyme pattern 검정에 사용한 효소액의 extraction은 Bannister 등¹¹⁾의 방법을 다소 수정하여 수행하였으며(Fig.1), electrophoresis 및 SOD staining은 Beauchamp 등¹²⁾의 방법을 따랐다.

전기영동 시료는 Fig.1과 같이 3g · fr · wt. 인삼잎을 증류수로 세척한 후 homogenizer로 3,500 rpm에서 30초간 마쇄한 다음, icebath에서 30분간 stirring하여 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상등액에 ethanol-chloroform(3:1) precipitation, lead acetate precipitation 과정을 거쳐 tris-glycine (20 mM, pH 7.8) buffer로 1시간 동안 dialysis한 후 이를 전기영동 시료로 사용하였다.

전기영동은 1.5% agarose gel을 이용하여 250 V에서 30분간 수행하였고, peroxidase의 staining은 50 mM pyrogallol을 사용하였다.

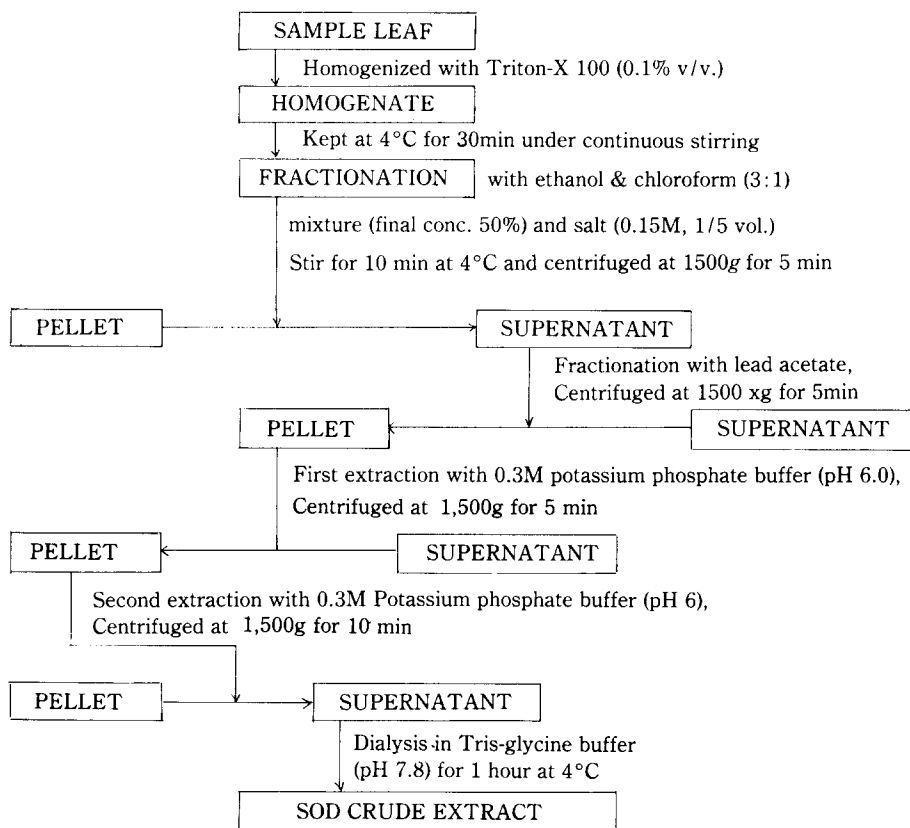


Fig. 1. Schematic flow chart described the major step for preparation of superoxide dismutase (SOD) extract.

결과 및 고찰

1. Photoreduced flavin을 이용한 SOD activity의 측정

Photoreduced flavin을 superoxide의 source로 이용하여 NBT reduction의 inhibition을 측정된 결과, Fig.2(A)에 나타난 바와 같이 SOD의 함량과 $1/\Delta E \cdot 40 \text{ sec}^{-1}$ 사이에는 매우 밀접한 상관관계($r=0.998$)를 나타내었으며, 인삼잎으로부터 추출한 enzyme extract의 농도

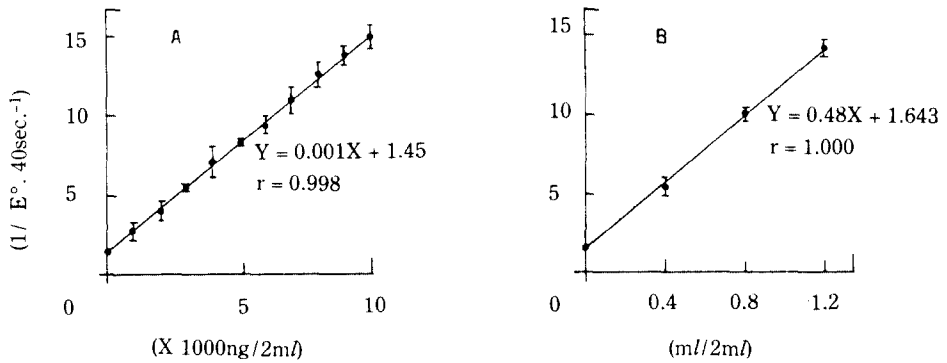


Fig. 2. A) Typical calibration curve for the NBT reduction assay.
 B) NBT reduction rate according to dilution of enzyme extract. The rate of reduction of NBT inhibited by SOD, is plotted as the reciprocal O.D. change per 40 sec. versus concentration of SOD standard.

에 따른 NBT 환원율 역시 높은 상관관계($r=0.999$)를 나타내었다[Fig.2(B)].

이러한 결과를 일반적으로 알려져 있는 xanthine-xanthine oxidase system과 비교해 보면 (Fig.3),

Photoreduced flavin; $\Delta E \cdot (\text{min} \cdot 1000 \text{ ng SOD})^{-1} = 0.080$

Xanthine-xanthine oxidase; $\Delta E \cdot (\text{min} \cdot 1000 \text{ ng SOD})^{-1} = 0.015$

로써, 1,000 ng SOD당 ΔE 값이 photoreduced flavin의 경우가 5배 이상 크게 나타나 측정

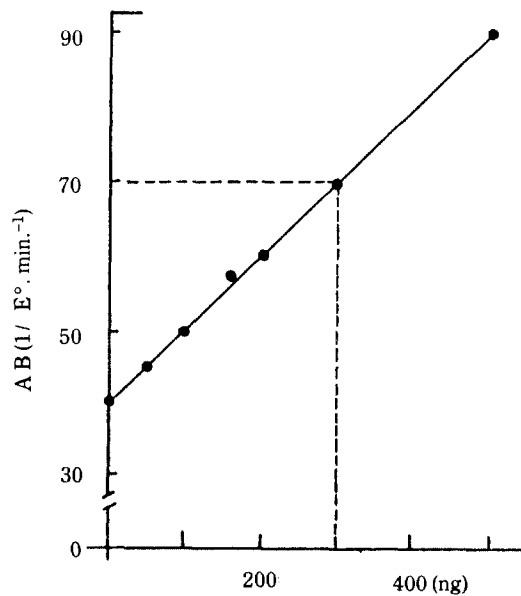


Fig. 3. Typical calibration curve of Xanthine-Xanthine oxidase system.⁴⁾

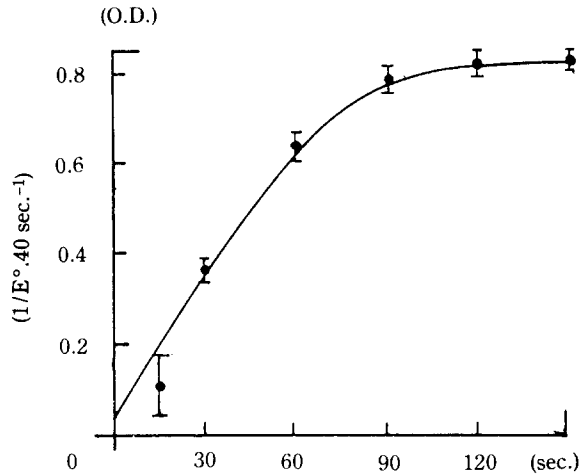


Fig. 4. NBT reduction rate according to time of light treatment.

과정에 의한 오차를 감소시킬 수 있으며, 따라서 보다 정확한 활성변화를 측정해 낼 수 있는 것으로 나타났다. 또한 photoreduced flavin system의 경우에는 superoxide를 생성하는 O_2 의 source로서 용존산소를 이용하기 때문에 Fig.4와 같이 NBT 환율이 O_2 농도(fixed temperature)에 따른 시간적인 제한을 받지만 약 40초 내에서는 O_2 의 공급이 문제가 없는 것으로 확인되었다.

Fig.5는 본 실험에서 정립된 방법으로 인삼과 까마중의 detached leaf를 사용하여 광처리에

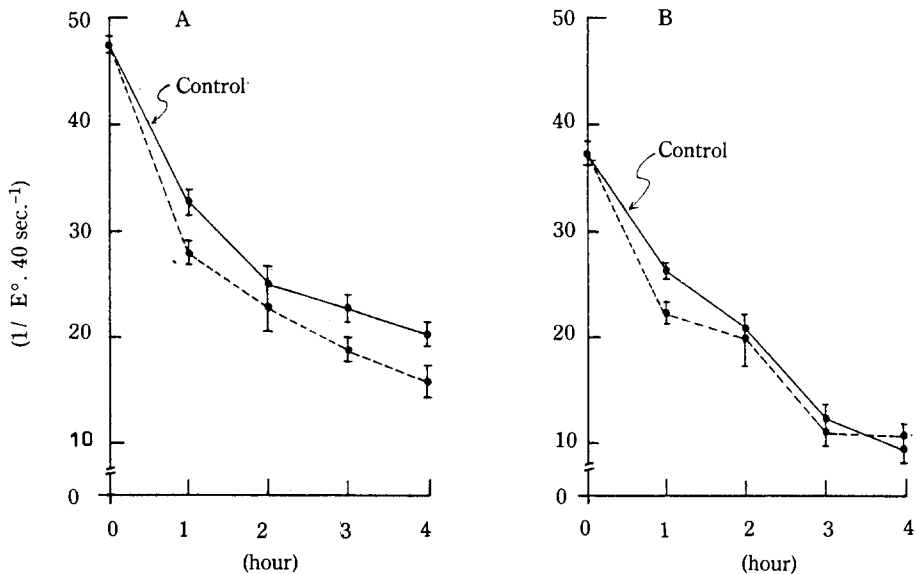


Fig. 5. Change of SOD activities in disc of *P. ginseng* C.A. Meyer (A) and *S. nigrum* L. leaf (B) by solar radiation (120,000 Lux).

따른 SOD의 activity를 측정된 결과로써 정상 식물에서는 인삼이 까마중보다 약 $10^1 \Delta E^\circ \cdot 40 \text{ sec}^{-1}$ 로 다소 높은 activity를 나타내었으며, 자연광(12만 Lux)을 조사한 후 SOD의 활성은 인삼잎과 까마중잎에서 공히 감소하는 경향을 나타내었고, 특히 인삼잎에서는 광처리구에서 SOD 활성 감소율이 대조구에 비하여 현저히 증가하였다.

이상의 결과로 미루어 볼 때 광에 따른 SOD activity의 감소는 인삼잎의 bleaching 현상과 밀접한 상관관계가 있는 것으로 생각된다.

2. 인삼잎에서 SOD isozyme pattern 및 SOD type 결정

인삼잎에 내재되어 있는 SOD의 isozymes은 이동속도에 따라 크게 3군으로 분류할 수 있었으며, 10개의 SOD band가 나타났다(Fig.6).

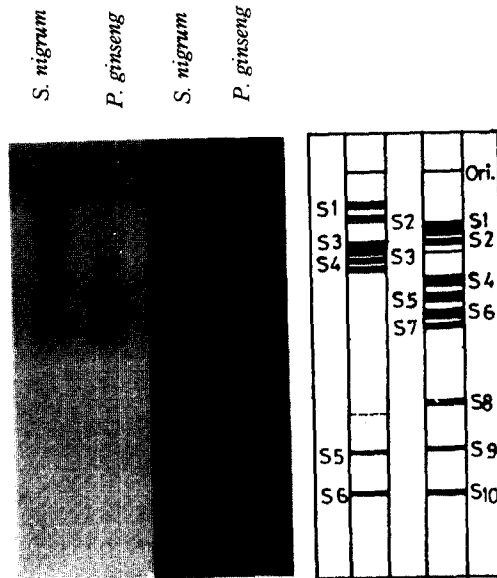


Fig. 6. SOD isozyme pattern by NBT test.

Patriarca 등¹³⁾은 NBT를 이용한 SOD isozyme 검정에서 peroxidase가 negative 한 영향을 미치는 것으로 보고한 바 있는데, 본 실험에서도 Fig.6에 나타난 SOD band의 contamination 여부를 확인하기 위하여 peroxidase를 staining해 본 결과 까마중에서 만이 peroxidase band가 존재함을 확인하였다.

따라서 인삼에서 나타난 band는 모두 SOD에 의해 형성된 것으로 증명되었다.

또한, SOD는 prosthetic group에 결합되어 있는 금속이온에 따라서 Cu, Zn-type SOD와 Mn-type SOD로 대별되는데 Beauchamp 등¹²⁾은 2mM cyanide에 의해 Cu, Zn-type SOD의 activity가 완전히 inhibition된다고 보고하였다. Fig.8은 각 band의 SOD-type을 결정하기 위하여 2mM cyanide를 처리한 결과로써, 10개의 band 중에서 6개의 band가

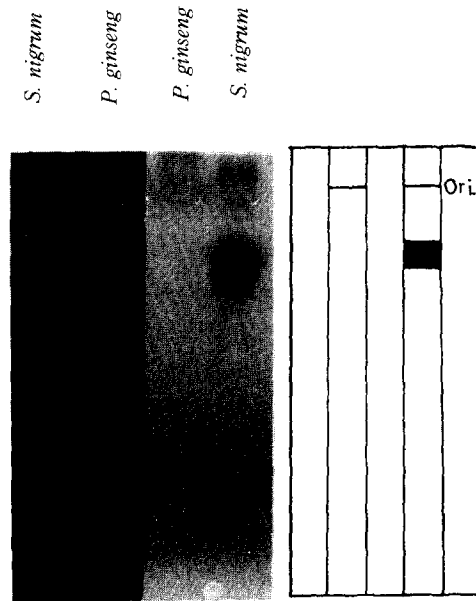


Fig. 7. Peroxidase pattern in SOD extract

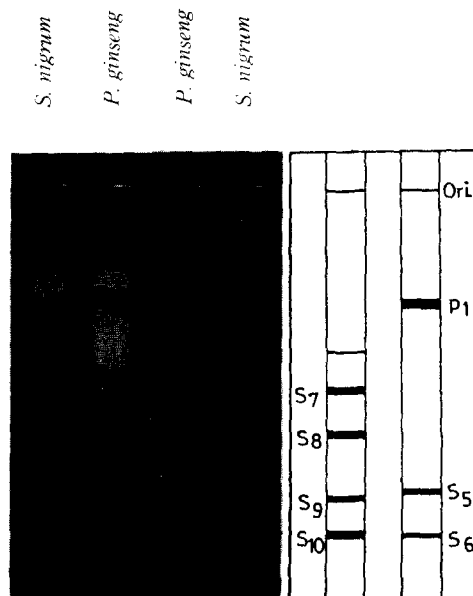


Fig. 8. Mn-type SOD isozyme pattern by 2mM cyanide.

CN⁻-sensitive Cu, Zn-type SOD인 것으로 밝혀졌다.

결 론

1. 본 실험에서 정립한 SOD activity 측정 방법은 xanthine-xanthine oxidase system과 비교해 볼 때, detection range가 5배 이상 큰 것으로 밝혀져 SOD activity 측정에 매우 효과적인 것으로 확인되었다.
2. 광처리에 따른 SOD activity는 인삼과 까마중에서 광히 감소하였으며, 특히 인삼에서 광처리시 활성감소율이 더욱 증가하였다.
3. 인삼잎에 내재되어 있는 SOD isozyme은 전기영동시 이동속도에 따라 3군으로 나눌 수 있었으며, 총 band수는 10개로 확인되었다.

인용문헌

1. 양덕조, 채쾌 : 전자과 복사선이 인삼엽조직 파괴현상과 광흡수 기구의 생화학적 반응에 미치는 영향, 산학협동 연보(1983).
2. 윤재준 : 인삼 엽소병에서 chlorophyll의 bleaching 현상에 대하여, 충북대학교 대학원 석사학위논문(1985).
3. 이성준 : 인삼 엽소병에서 효소 활성도에 관한 연구, 충북대학교 대학원 석사학위논문(1986).
4. McCord, J. M. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase; an enzymic function for erythrocyte. *J. Biol. Chem.* **244**, 6049 (1969)
5. Elstner, E.F. and Youngman, R.: Oxygen activation in chloroplasts; models for "in vivo" observations. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **91**, 462 (1977)
6. Fridovich, I.: Oxygen is toxic. *Biol. Sci.* **27**, 462 (1977)
7. Ginnolitis, C.N. and Ries, S.K.: Superoxide dismutase; I. occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* **59**, 309 (1977)
8. Robinowitch, E.D. and Sklan, D.: Superoxide dismutase activity in ripening cucumber and pepper fruit. *Plant Physiol.* **52**, 380 (1981)
9. Edward, H., Lee and Jesse H., Bennett.: Superoxide dismutase. *Plant Physiol.* **69**, 1444 (1982)
10. 김득중 : 인삼 재배, 일한도서출판사, p.47(1973).
11. Barr, D., Martini, F., Bannister, J.V., Schinina, M.E., Rotilio, G., Bannister, W.H. and Bossa, F.: *FEBS Lett.* **120**, 53 (1980)
12. Beauchamp, C. and Fridovich, I.: *Biochem. Biophys. Acta* **317**, 50 (1973)
13. Patriarca, P., Dri, P., and Snidero, M.: *J. Lab. Clin. Med.* **90**, 289 (1977)
14. Murphy, J.B. and Kies, M.W.: *Biochem. Biophys. Acta* **45**, 382 (1960)
15. Salin, M.L. and McCord, J.M.: *J. Clin. Invest.* **54**, 1005 (1974)