

## 식물 호르몬에 의한 옥수수 *rbcL* mRNA의 양적 변화

李榮珍·李在善·李龍昱·安正善\*·沈雄雙

(고려대학교 이과대학 생물학과, \*서울대학교 자연과학대학 생물학과)

### Quantitative Change in *rbcL* mRNA of Maize by Phytohormones

Lee, Young-Jin, Jae-Sun Lee, Yong-Woog Lee,  
Chung Sun An\* and Woong-Seop Sim

(Department of Biology, Korea University, Seoul and

\*Department of Biology, Seoul National University, Seoul)

#### ABSTRACT

In order to investigate the effects of plant hormones on the quantitative changes in mRNA of maize (*Zea mays* L.) *rbcL*, we used GA<sub>3</sub>, IAA, ABA and BAP. GA<sub>3</sub> at the concentration of 10<sup>-4</sup> M resulted in decrease in *rbcL* gene transcript to 62%. IAA decreased the amount of *rbcL* transcript to about 70% at all the hormone concentrations tested. ABA did not cause a noticeable change in the amount of *rbcL* transcript, but BAP increased the amount of *rbcL* transcript to 153% at 10<sup>-8</sup> M and 123% at 10<sup>-5</sup> M, respectively. Thus, it appears that BAP is related to the increase in the amount of *rbcL* transcript by light.

#### 서론

식물 유전자의 발현은 특정 엽록체 유전자와 같이 빛에 의하여 조절되는 경우도 있고(Fromm *et al.*, 1985; Berry *et al.*, 1986), 식물 호르몬에 의하여 조절되는 경우도 있다(Apel, 1981; Stabel *et al.*, 1991; Yamada and Yasuda, 1971; Yasuda and Yamada, 1971).

RuBisCo(ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase)는 캘빈회로에서 carboxylation과 광호흡에 동시에 관여하는 단백질로서 지구상에서 가장 풍부한 단백질 중 하나인 한편 엽록체 수용성 단백질의 60% 이상을 차지하는 매우 중요한 효소이며, 두 소단위체인 LSU(large subunit)와 SSU(small subunit)로 구성되고, 각각 엽록체와 핵의 DNA에 암호화되어 있다(Gutteridge and Gatenby, 1987; Link and Bogorad, 1980; Zurawski *et al.*, 1981; Gringrich and Hallick, 1985). 이중 LSU를 암호화하고 있는 *rbcL*

유전자는 옥수수(*Z. mays* L.)의 경우, 엽록체 DNA의 4.35 kb 크기의 *Bam*HI 9번 절편내에 2.5 kb 크기로 존재한다는 것이 밝혀진 바 있다(Coen *et al.*, 1977). *rbcL* 유전자의 발현에 미치는 빛의 효과는 지금까지 많이 연구되어 왔으나(Nelson *et al.*, 1984; Tobin and Suttie, 1985; Rodermel and Bogorad, 1985), 식물의 각종 호르몬이 *rbcL* 유전자의 발현에 미치는 영향에 대해서는 폭넓은 연구가 이루어지지 않았으므로 이에 관한 구체적인 사실 규명이 필요하다고 할 수 있다.

GA<sub>3</sub>는 식물의 발생과정 중 여러 단계에 관련이 되어 있으나, 그 중 대표적인 것이 줄기의 길이신장이다(Chory *et al.*, 1987). 선천적으로 GA<sub>3</sub>를 합성하지 못하는 난쟁이 식물에 GA<sub>3</sub>를 처리하면 특정유전자의 발현이 유도되는데(Chory *et al.*, 1987), 이는 GA<sub>3</sub>가 세포의 길이생장과 세포분열에 관여하는 특정유전자의 전사율이나 mRNA 안정성, 또는 특정 mRNA의 해독효율을 변화시키는데 기인하는 것으로 추측된다(Chory *et al.*, 1987).

ABA는 식물체에 첨가했을 때 다양한 생리적 반응들을 볼 수 있는데, 밀과 완두콩에 ABA를 처리하면 *rbcS*

본 연구는 1992년도 교육부 기초과학 육성 연구비의 지원에 의한 것임.

mRNA와 rubisco 단백질의 양적인 감소를 보이기도 한다 (Medford and Sussex, 1989).

IAA는 일반적으로 여러가지 mRNA의 합성을 촉진하는 것으로 잘 알려져 있다(Theologis and Peter, 1982; Jacobsen, 1977; Chen *et al.*, 1975). 옥수수(*Z. mays* var. Bear Hybrid)에 IAA를 처리하였을 때 식물세포벽의 산성화를 야기함으로써 성장을 자극하며 이는 낮은 pH값에서 세포의 분열과 성장을 활발하게 이루어지도록 유도하기 때문인 것을 알 수 있었다(Jacobs *et al.*, 1976). IAA가 처리된 콩하배축의 엽색질은 IAA가 처리되지 않은 경우보다 높은 전사수준을 보였으며 nuclear RNA의 양과 단백질의 양이 두 배로 증가하였고 인의 모양이 더 커지는 현상을 보였다 (Jacobsen, 1977; Chen *et al.*, 1975).

Cytokinin의 일종인 BAP는 노르웨이 가문비나무(*Picea abies* L. karst)의 잎에 존재하는 etioplast를 엽록체로 전환하는데 관여하고 *rbcs*와 같이 핵에 암호화되어 있는 유전자로부터 유래한 단백질의 합성을 촉진한다(Stabel *et al.*, 1991). 그러나, 배 발생시기에 처리하면, *rbcs*, 엽록체 ATPase의 2개의 소단위, photochlorophyllide reductase, 광계 II의 23,000-Mr component 등의 단백질합성이 억제되며, 길이의 생장도 억제된다. 만일, 이 식물체의 각 기관들이 형성된 후에 BAP를 처리하면 엽록체 단백질들의 합성이 활성화되어 길이생장이 활발하게 진행이 된다(Stabel *et al.*, 1991). BAP에 의한 길이생장 촉진효과는 식물의 발생과정에서 따라 다르게 나타나는 BAP의 특징 때문이다. 또한 암상태에 있는 식물체에 BAP를 처리해 주변 빛이 있는 상태에서 볼 수 있는 엽록체의 발생현상을 유도하는 효과가

있다(Stabel *et al.*, 1991).

본 연구에서는 이상 설명한 gibberellic acid, abscisic acid, indole-3-acetic acid, N<sup>6</sup>-benzylaminopurine과 옥수수 내 *rbcs* mRNA의 양적변화와의 관계를 조사하여, 빛에 의한 *rbcs* 유전자 발현의 조절과 phytohormone들과의 관련성을 구명하려 한다.

### 재료 및 방법

**균주와 플라스미드.** 본 연구에 사용된 *E. coli* DH5  $\alpha$ 는 재조합 플라스미드의 숙주세포로 사용하였으며, pUC 19은 재조합 플라스미드 합성시 vector로 사용하였다. 본 연구에서 사용된 pRLYS1(Lee *et al.*, 1992)은 본 연구실에서 제작한 것으로서 옥수수의 완전한 *rbcs* 유전자가 클로닝된 재조합 플라스미드이다.

**종자의 발아 및 배양.** 본 연구에 사용한 옥수수(*Z. mays* L. Park early) 종자는 일본 Sakada 종자회사로부터 구입하였으며, 이를 2% sodium hypochlorite 용액에서 살균하여 28°C에서 GA<sub>3</sub>, ABA, IAA, BAP 각각을 Table 1에 표시한 바와 같은 농도로 처리하여, 24시간 동안 암처에서 침윤시킨 후, 27°C 배양기에서 2일 동안 암조건에서 발아시키고, 발아된 옥수수를 광 16시간, 암 8시간의 조건에서 다시 3일 동안 성장시켜 동일한 시기에 수확하였다. 실험에 사용한 광도는 1.46 W·m<sup>-2</sup>였다. 처음 2일 동안 암조건에서 발아시킬 때는 식물체가 백색을 띠었으며 길이생장이 활발하게 이루어졌고, 3일째 광조건으로 옮겼을 때는 길이생장은 완화되고 부피생장이 시작되었으며 백색체가 연한

Table 1. The relative amounts of *rbcs* transcript depending on phytohormones. The relative amounts are shown as cpm

Hor.	Exp. times		1st Exp.		2nd Exp.		3rd Exp.		Mean value	
	c.p.m	conc.	c.p.m	%	c.p.m	%	c.p.m	%	c.p.m	%
GA <sub>3</sub>		control	3189	100	3329	100	3352	100	3290	100
		10 <sup>-8</sup> M	2983	94	2882	87	3315	99	3060	93
		10 <sup>-6</sup> M	3726	117	3421	103	3413	102	3520	107
		10 <sup>-4</sup> M	1958	61	2125	64	2037	61	2040	62
ABA		control	3852	100	3920	100	4177	100	3983	100
		10 <sup>-4</sup> M	3875	101	4222	108	4209	101	4102	103
		10 <sup>-6</sup> M	4313	112	4209	107	4264	103	4262	107
IAA		control	3625	100	3811	100	3973	100	3803	100
		10 <sup>-8</sup> M	2725	75	2663	70	2712	68	2700	71
		10 <sup>-6</sup> M	2599	71	2638	69	2635	66	2624	69
BAP		control	3486	100	3622	100	3626	100	3578	100
		10 <sup>-8</sup> M	5511	158	5387	149	5524	152	5474	153
		10 <sup>-5</sup> M	4230	121	4522	125	4451	123	4401	123

녹색을 띠기 시작하면서 녹화현상을 보였다. 4일부터 5일까지는 녹화현상이 더욱 진전되면서 줄기의 끝에서 잎이 퍼지기 시작하였고 부피성장이 진전되었다.

실험에 사용한 GA<sub>3</sub>의 농도는 옥수수(*Z. mays* var dwarf d-5)의 줄기신장을 뚜렷이 촉진하는 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-4</sup> M (Chory et al., 1987)을 선택하였고, ABA의 농도를 10<sup>-9</sup> M과 10<sup>-6</sup> M로 정한 이유는 보리(*Hordeum vulgare* L. cv. Himalaya) 호분증을 분리하여 ABA를 가한 증류수에 일정시간 처리하였을 때, 보리의 호분증에는 특정 mRNA가 합성되는데(Hong et al., 1988), ABA의 농도가 10<sup>-9</sup> M과 10<sup>-6</sup> M일 때 mRNA 양이 뚜렷이 증가하기 때문이다. IAA의 농도를 10<sup>-8</sup> M과 10<sup>-6</sup> M로 정한 이유는 10<sup>-8</sup> M과 10<sup>-6</sup> M에서 오이(*Cucumis sativas* L.)의 자엽하배축의 건조량이 뚜렷이 증가했기 때문이며(Cohen et al., 1991), BAP의 경우에는 사과(*Malus domestica* L. Borkh)의 측생묘조의 건조량을 뚜렷이 증가시킨 10<sup>-8</sup> M과 10<sup>-5</sup> M(Watillon et al., 1991)을 선택해서 실험하였다.

**플라스미드의 대량 분리.** 플라스미드의 대량 분리는 Marco 등(1982)의 방법을 변형시켜 사용하였다. 플라스미드를 포함하고 있는 *E. coli*를 ampicillin 100 µg/mL이 포함된 1 L의 LB 배지(trypton 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g, D.W to 1 L, pH 7.0)에 접종하고 37°C에서 진탕배양한 후, 원심분리하여 수회하였다. 침전물을 20 mL의 Sol. I(50 mM glucose, 25 mM Tris. Cl, pH 7.0)에 현탁시킨 후, 400 µL lysozyme 용액(50 mg/mL in D.W)을 가하여 섞어주고 0°C에서 1시간 동안 방치하였다. 여기서 40 mL의 Sol. II (0.2 N NaOH, 1% SDS)를 가하여 균질한 상태가 될 때까지 조심스럽게 현탁하고 0°C에서 15분 동안 방치한 후, 30 mL의 Sol. III(3 M sodium acetate, pH 4.8)를 가하여 점성이 감소할 때까지 조심스럽게 빨리 섞은 다음 0°C에서 30분간 방치하였다. 이 혼합액을 12,000 g에서 20분간 원심분리하여 상층액을 4겹의 cheesecloth로 거른 후, 0.6 부피의 isopropanol을 넣고 -20°C에서 1시간 이상 방치하고 12,000 g에서 20분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 8 mL의 TE 완충용액(10 mM Tris. Cl, 1 mM EDTA, pH 7.6)에 현탁시킨 후, 8 g cesium chloride와 0.8 mL ethidium bromide(10 mg/mL) 용액을 첨가하여 113, 800 g에서 48시간 동안 초원심분리하였다. 형성된 circular closed form의 DNA 밴드는 UV light 하에서 회수한 후, 동일 부피의 증류수에 포화된 n-butanol로 여러 번 추출하여 ethidium bromide를 제거하고 2 부피의 TE 완충용액과 6 부피의 에탄올을 첨가해 -20°C에서 DNA를 침전시켰다. 이 후 12,000 g에서 10분간 원심분리하여 얻은 침전물을 70% 에탄올로 3번 세척한 후 TE 완충용액에 용해시키고, 소량의 시료를 취하여 이를 증류수로 희석시킨 후, UV-spectrophotometer(Beckmann DU-64)를 이용하여

DNA의 농도를 측정하여 사용하였다.

**RNA의 분리.** 옥수수 shoot로부터의 RNA 분리는 Bogorad 등(1983)의 방법을 변형하여 수행하였으며, Wilkinson(1991) 방법을 이용하여 ribonuclease free 상태를 유지하면서 실험하였다. 각 호르몬의 농도에서 5일간 성장시킨 옥수수 shoot 5 g을 액체질소로 얼린 후, 액체질소를 계속 공급하면서 막자사발에서 곱게 마쇄시켰다. 이를 비이커로 옮기고 100°C로 가열한 SDS lysis 완충용액(0.2 M sodium borate, pH 9.0, 1% SDS, 30 mM ethylene glycol bis(β-amino ethyl eter)-N,N'-tetraacetic acid(EGTA))을 가하고 Miracloth로 거른 후, 동량의 phenol 용액을 가하여 잘 섞고 원심분리하여 층을 분리시킨 후, 상정액을 다시 phenol-chloroform 용액으로 두 번 처리하고 chloroform 용액(chloroform : isoamylalcohol=24 : 1)으로 한 번 처리하였다. 에탄올 침전으로 핵산을 한 번 침전시킨 후, 침전물을 RNase-free water(최종농도 0.1%되게 diethylpyrocarbonate를 가해 1시간 동안 멸균하고 30분 이상 끓인 3차 증류수)에 재료 1 g당 1.5 mL되게 녹이고 동량의 4 M LiCl 용액을 가해 4°C에서 12~16시간 동안 방치하였다. 이를 12,000 g에서 10분간 원심분리하여 얻은 핵산의 RNA 침전물을 RNase-free water에 녹인 후, 다시 두 번의 phenol-chloroform 처리를 수행한 다음 한 번의 chloroform 처리를 수행하였다. 이를 다시 에탄올 침전하여 최종적으로 얻은 순수한 RNA 침전물을 RNase-free water에 녹여 UV-spectrophotometer(Beckman DU-64)로 정량하고 -70°C에 보관하였다.

**전기영동.** DNA의 전기영동은 DNA 시료에 5 : 1의 비율로 gel-loading buffer(0.25% bromophenol blue, 40% sucrose)를 섞은 후, EtBr이 0.5 µg/mL 농도로 포함된 0.7~1.5% agarose gel을 사용하여 2~8 V/cm로 전기영동하였다. 전기영동 완충용액으로는 1×TAE 완충용액(40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA)이나 1×TBE 완충용액(45 mM Tris. Cl, pH 8.0, 45 mM boric acid, 1 mM EDTA)을 사용하였다. RNA의 전기영동은 Lehrach 등(1977)의 방법과 Goldberg(1980)의 방법을 변형하여 formaldehyde를 포함하는 1% agarose gel에서 수행하였다. Agarose를 최종부피에 대해 1%되게 증류수에 녹인 후 60°C로 식혀 증류수와 5×gel running buffer(0.2 M MOPS, 50 mM sodium acetate, 5 mM EDTA, final pH 8.0) 및 formaldehyde를 125 mL : 40 mL : 35 mL의 비율로 가한 후 전기영동관에 부어 2시간 이상 방치하였다. 준비된 RNA 시료에 RNA, 5×gel running buffer와 formaldehyde 및 formamide를 4.0, 2.0, 3.0 및 10.0 µL의 비율로 섞어 55°C에서 15분간 처리한 후, 5 V/cm로 2시간 동안 전기영동하였다.

**제한효소의 처리.** 절단하려는 DNA 시료들은 적절한

양의 제한효소와 제한효소에 따른 10×완충용액을 1/10 부피되게 가해서 2시간 동안 37°C에서 반응시켰다. 이중 일부를 전기영동하여 제한효소에 의한 DNA의 절단을 확인하고 제한효소의 활성을 제거하기 위해 phenol-chloroform 용액으로 탈단백질화한 후, 에탄올 침전하여 TE 완충용액에 용해시켰다.

**Gel로부터 DNA의 회수.** Gel로부터 DNA를 회수하는 방법은 Sambrook 등(1989)의 방법을 사용하였다. 제한효소로 절단된 DNA 시료를 agarose gel에서 전기영동한 후, 회수하려는 DNA 절편 부위의 gel을 절단하여, 1×TAE 완충용액으로 채운 dialysis bag에 넣고, 1×TAE 완충용액에서 4~5 V/cm로 전기영동하였다. UV hand monitor (Spectroline)를 이용하여 DNA 절편이 agarose gel로부터 완전히 빠져 나왔는지를 확인한 후, 1분간 전류를 역으로 흐르게 하여 dialysis bag으로부터 DNA를 분리시키고 dialysis bag을 열어 완충용액을 eppendorf tube로 옮긴 후, 소량의 1×TAE 완충용액으로 dialysis bag을 세척하여 잔여 DNA 용액을 eppendorf tube에 모았다. 이렇게 모은 용액을 Sephadex G-50 column에 통과시킨 후, 동일부피의 2-butanol로 농축시키고 phenol-chloroform 용액으로 두 번 추출한 후, 에탄올 침전시켜 얻은 DNA 침전물을 TE 완충용액에 용해시켰다.

**탐침의 제조.** 방사성 동위원소로 표지된 DNA 탐침의 제조는 Maniatis 등(1975)과 Tomashow 등(1980)의 방법을 사용하였다. 0.5 µg의 DNA 용액에 10×nick translational buffer(0.5 M Tris, Cl, pH 7.5, 0.1 M MgSO<sub>4</sub>, 1 mM DTT, 500 µg/mL BSA)를 가하고 unlabeled dATP, dGTP, dTTP를 각 20 nmoles, [<sup>32</sup>P] dCTP를 16 pmoles되게 가한 후, 0°C로 냉각시키고 희석된 DNase 10 ng/mL을 최종농도 1 ng/mL되게 가하고 2.5 unit의 *E. coli* DNA polymerase I large fragment를 가한다. 조심스럽게 용액을 혼합하여 16°C에서 60분간 반응시키고, 0.5 M EDTA(pH 8.0) 용액을 1/25 부피가 되게 가해 반응을 중지시킨 후, 이 혼합액을 Sephadex G-50 column을 통과시켜 방사성 동위원소로 표지된 DNA를 unincorporated dNTP로부터 분리하여 제거하였다.

**Northern hybridization.** 다양한 조건에서 성장한 옥수수 shoot내 *rbcl* mRNA의 양적변화를 알아보기 위한 Northern hybridization은 Thomas(1983)의 방법과 Sambrook 등(1989)의 방법을 변형하여 수행하였다. 전기영동한 gel은 formaldehyde를 제거하기 위해 증류수에 여러 번 세척하고, 0.05 N NaOH 용액에 20분간 담근 후, 다시 증류수로 세척하였다. 이후 6×SSPE 용액(3.6 M NaCl, 200 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM EDTA, pH 7.4)에 10분간 담근 후, 이 gel을 6×SSPE 용액에 적신 Whatmann 3MM paper 위에 거꾸로 올려놓고 Whatmann 3MM paper의 양쪽 가

장자리를 6×SSPE 용액에 잠기게 하였다. Nitrocellulose filter를 미리 증류수에 포화시킨 후, 6×SSPE 용액에 적서 gel의 위에 덮고 그 위에 6×SSPE 용액에 적신 2장의 3 MM paper와 filter paper를 5~8 cm 정도의 두께로 쌓고 그 위에 500 g의 무게를 가해 48시간 동안 전이시켰다. RNA가 전이된 nitrocellulose filter에 gel slot를 표시하고 gel을 제거한 후, filter를 6×SSPE에 담가 실온에서 5분간 방치하여 잔여 agarose를 제거하고 실온에서 건조시킨 후, 80°C의 진공상태에서 2시간 동안 baking하였다. Gel로 전이되어 있는 RNA와 방사성 동위원소로 표지된 탐침간의 hybridization을 수행하였다. 단, 이 때 사용한 prehybridization 용액의 조성은 50% formamide, 5×SSPE, 2×Denhardt's solution(0.2 g Ficoll, 0.2 g polyvinylpyrrolidone, 0.2 g BSA, H<sub>2</sub>O to 20 mL), 0.1% SDS이다. Prehybridization을 42°C에서 2시간 동안 실시한 후, 방사성 동위원소로 표지된 탐침을 첨가해 주고, 48시간 동안 42°C에서 유지시켜 준 후, 2×SSPE, 0.2% SDS 용액에서 42°C로 20분씩 filter를 네 번 세척하고, 실온에서 건조시켜서 autoradiography하였다. X-ray film에 감광된 *rbcl* mRNA 부위에 해당하는 nitrocellulose filter 부위를 잘라 scintillation cocktail solution(PPO 4 g, POPOP 0.1 g, toluen to 1 L)에 담근 후, radioactivity의 양을 liquid scintillation counter(Beckman LS 5,000 TA-counter)로 측정하였다.

**Autoradiography.** Hybridization 실험 후에는 nitrocellulose filter를 상온에서 건조시킨 후에 X-ray film 위에 올려놓고 intensifying screen을 이용해 -70°C에서 48시간 동안 autoradiography하였다.

## 결과 및 고찰

**탐침 DNA 절편의 제조.** pRLYS1은 본 연구실에서 옥수수의 광합성 암반응에 관여하는 *rbcl* 유전자 절편을 pUC19에 클로닝한 재조합 플라스미드이며(Lee et al., 1992), *E. coli* DH5α에 형질전환되어 있다. 이 재조합 플라스미드내의 옥수수의 *rbcl* 유전자를 포함하는 DNA 절편의 크기는 4.35 kb로서, 이 플라스미드를 제한효소 *Bam*HI으로 가수분해하여 2.69 kb의 vector와 4.35 kb의 삽입된 *rbcl* 절편으로 나누어짐을 확인하였다(Fig. 1). pRLYS1을 *Pst*I으로 절단하면 4.51, 1.76, 0.58, 0.19 kb로 나누어지는데 이들 절편들 중 0.58 kb 절편이 *rbcl* 유전자의 구조유전자절편이므로(Lee et al., 1992), 이 절편을 전기영동으로 확인하고(Fig. 1), 이를 분리하여 *rbcl* mRNA에 대한 탐침으로 사용하였다.

**옥수수 shoot로부터 *rbcl* mRNA의 확인.** 옥수수의 시료로부터 total RNA를 분리하였고, 분리된 RNA는 UV-spectrophotometer를 이용해 정량한 후, RNA를 각각

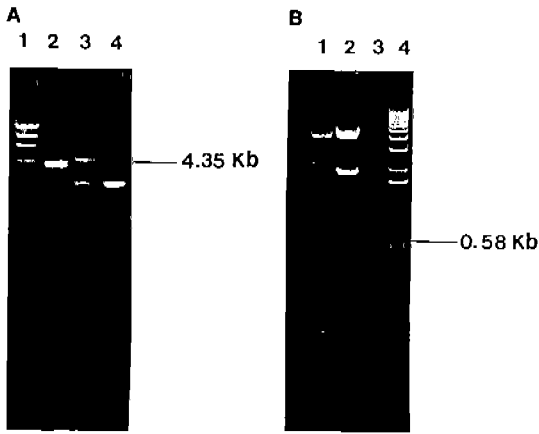


Fig. 1. A. Identification of the cloned 4.35 kb DNA fragment containing maize *rbcL* gene. pRLYS1 and pUC19 were digested with *Bam*HI and electrophoresed in 1% agarose gel at 7 V/cm. Lane 1,  $\lambda$  digested with *Hind*III (size marker); 2, pRLYS1 (intact form); 3, pRLYS1 digested with *Bam*HI; 4, pUC19 digested with *Bam*HI (linear). B. Restriction fragment of pRLYS1 and isolation of cloned maize 0.58 kb *rbcL* structural gene fragment from pRLYS1. 0.58 kb fragment was eluted by electroelution method. pRLYS1 was digested with *Pst*I and electrophoresed in 1% agarose gel at 7 V/cm. Lane 1, pRLYS1 (intact form); 2, pRLYS1 digested with *Pst*I; 3, eluted *rbcL* 0.58 kb fragment; 4, 1 kb ladder (size marker).

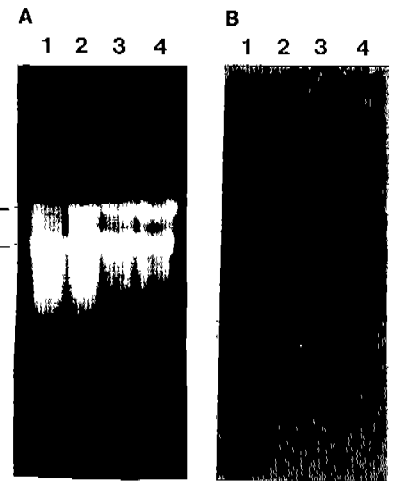


Fig. 2. DNA-RNA hybridization analysis of total cellular RNAs isolated from maize shoot grown in four  $GA_3$  concentration. A. The agarose gel electrophoretic patterns of purified total cellular RNAs (20  $\mu$ g/lane). The 1% agarose gel containing formaldehyde was runned at 5 V/cm. B. Autoradiograph of the DNA-RNA hybridization with  $^{32}P$ -labeled *Pst*I fragment from maize *rbcL* gene. Lane 1, control (no  $GA_3$  treatment); 2,  $GA_3$   $10^{-4}$  M; 3,  $GA_3$   $10^{-6}$  M; 4,  $GA_3$   $10^{-8}$  M.

20  $\mu$ L씩 동일한 양을 취하여 전기영동하였다(Fig. 2A, 3A, 4A, 5A). 각 그림에서 보는 바와 같이 옥수수에서 분리한 전체 RNA는 처리된 호르몬의 종류와 농도마다 비슷한 형태로 전기영동되었으며, 모든 경우에 위로부터 28S, 18S와 그 이하 작은 크기의 RNA 순서로 전기영동된 것을 확인하였다. 각 그림에서 28S와 18S의 밴드가 확인되었기 때문에, 세포내의 다른 0.58 kb *rbcL* DNA 절편을 탐침으로 하여 이들 전체 RNA와 Northern hybridization을 실시한 결과, 모든 blot이 18S RNA의 약간 아래 부분에 나타났으며 (Fig. 2B, 3B, 4B, 5B), 이를 통해 *rbcL* mRNA의 위치를 확인할 수 있었다.

옥수수의 *rbcL* mRNA 양에 미치는 식물 호르몬의 효과. Nitrocellulose filter로 전이되어 있는 옥수수의 total RNA들을 변성시킨 탐침과 48시간 동안 hybridization시킨 후, autoradiography한 결과는 Fig. 2B, 3B, 4B, 5B와 같다. 또한, 이들의 방사성 동위원소의 양은 Beckman LS 5,000 TD  $\beta$ -counter를 이용하여 3회 counting한 후, 그 값을 평균하여 나타내었다(Table 1).

$GA_3$ 의 경우, Fig. 2B와 Table 1에서 보는 바와 같이 가장 낮은 농도인  $10^{-8}$  M과  $10^{-6}$  M로 처리했을 때, *rbcL* mRNA

양은 대조구의 그것과 비슷한 양상을 보였으나,  $10^{-4}$  M의 농도로 처리했을 때는 control 대비 62%의 전사수준을 보였다.

ABA의 경우 본 실험에서 사용된 식물 호르몬 중 가장 독특한 특징을 나타내었는데  $10^{-9}$  M의 경우와  $10^{-6}$  M의 농도에서 *rbcL* mRNA의 전사수준이 ABA를 처리하지 않은 시료의 양적수준을 100%로 기준했을 때 각각 103%와 107%로, 처리해준 ABA의 농도에 관계없이 *rbcL* mRNA의 양이 거의 일정하다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3 and Table 1). 이러한 결과는 Bartholomew 등(1991)의 보고에서도 볼 수 있듯이 토마토에 인위적인 수분의 결핍을 야기하여 간접적으로 토마토 조직내에 ABA의 생성을 유도함으로써 토마토의 *rbcL* mRNA의 양을 측정했을 때 수분의 부족으로 야기되었던 토마토 조직내의 ABA 농도의 증가에 거의 무관하게 *rbcL* mRNA 양이 유지되었음을 보였던 실험결과와도 일치한다고 볼 수 있다.

IAA에서는  $10^{-8}$  M의 경우와  $10^{-6}$  M의 농도에서의 *rbcL* mRNA의 양은 대조구에 비해 각각 71%와 69%로 처리한 농도에 관계없이 현저한 감소현상을 보였다(Table 1). 처리된 IAA의 농도에 무관하게 *rbcL* mRNA 양이 비슷하게 감소되는 것은 IAA에 의한 *rbcL* mRNA의 전사억제 효과는  $10^{-8}$  M에서 이미 포화상태에 달했다고 할 수 있다.

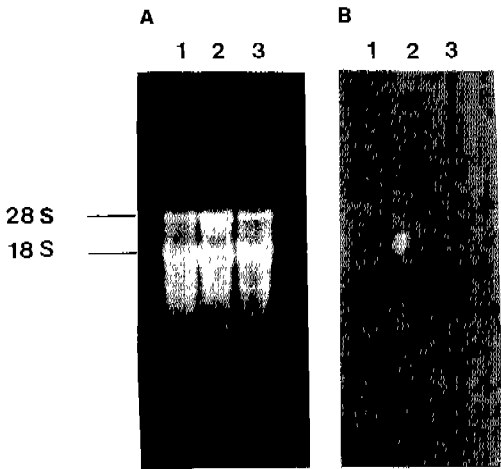


Fig. 3. DNA-RNA hybridization analysis of total cellular RNAs isolated from maize shoots grown in three ABA concentration. A. The agarose gel electrophoretic patterns of purified total cellular RNAs (20 µg/lane). The 1% agarose gel containing formaldehyde was runned at 5 V/cm. B. Autoradiograph of the DNA-RNA hybridization with <sup>32</sup>P-labeled *Pst*I fragment from maize *rbcL* gene. Lane 1, control (no ABA treatment); 2, ABA 10<sup>-6</sup> M; 3, ABA 10<sup>-9</sup> M.

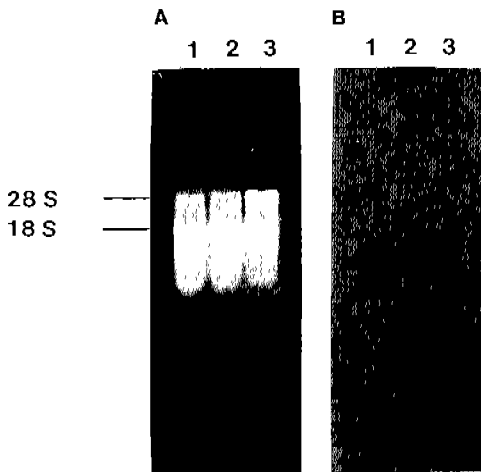


Fig. 4. DNA-RNA hybridization analysis of total cellular RNAs isolated from maize shoots grown in three IAA concentration. A. The agarose gel electrophoretic patterns of purified total cellular RNAs (20 µg/lane). The 1% agarose gel containing formaldehyde was runned at 5 V/cm. B. Autoradiograph of the DNA-RNA hybridization with <sup>32</sup>P-labeled *Pst*I fragment from maize *rbcL* gene. Lane 1, control (no IAA treatment); 2, IAA 10<sup>-6</sup> M; 3, IAA 10<sup>-8</sup> M.

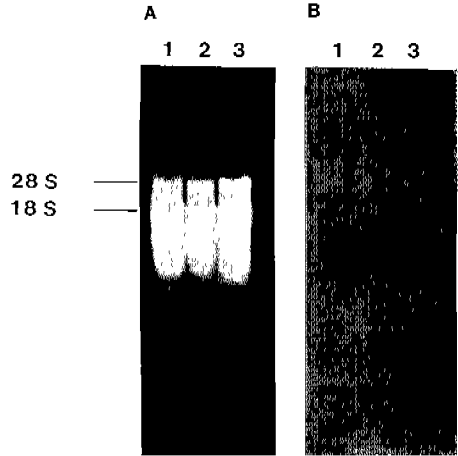


Fig. 5. DNA-RNA hybridization analysis of total cellular RNAs isolated from maize shoots grown in three BAP concentration. A. The agarose gel electrophoretic patterns of purified total cellular RNAs (20 µg/lane). The 1% agarose gel containing formaldehyde was runned at 5 V/cm. B. Autoradiograph of the DNA-RNA hybridization with <sup>32</sup>P-labeled *Pst*I fragment from maize *rbcL* gene. Lane 1, control (no BAP treatment); 2, BAP 10<sup>-5</sup> M; 3, BAP 10<sup>-8</sup> M.

BAP의 경우에서는 10<sup>-8</sup> M의 경우와 10<sup>-5</sup> M의 농도에서의 *rbcL* mRNA의 전사수준이 BAP를 처리하지 않은 시료의 경우의 전사수준을 100%로 기준했을 때 각각 153%와 123%로 현저한 증가를 보였다(Fig. 5 and Table 1). 그러나, 본 실험의 결과로는 처리해준 BAP의 농도가 10<sup>-8</sup> M일 때는 *rbcL*의 mRNA 양이 153%로서 큰 폭으로 증가를 보였지만 이보다 호르몬의 농도가 1,000배 높은 10<sup>-5</sup> M을 처리해 주었을 경우 mRNA의 증가폭이 122%로 나타났기 때문에, 10<sup>-8</sup> M 전후에서 더 많은 촉진효과를 나타낼 수도 있을 것으로 생각된다. 이것은 따라서 BAP는 옥수수의 *rbcL* mRNA의 전사수준을 증가시키든지 또는 그의 안정성을 유지시켜 주는 식물 호르몬으로 생각된다.

적 요

옥수수(*Zea mays* L.)의 *rbcL* 유전자로부터 유래한 mRNA의 양적 변화에 대한 식물 호르몬의 효과를 연구하기 위하여 GA<sub>3</sub>, IAA, ABA, BAP를 택하여 그 효과를 조사하였다. 먼저 GA<sub>3</sub>를 처리했을 때, GA<sub>3</sub>의 농도가 10<sup>-4</sup> M인 경우에 *rbcL* mRNA 양이 62%로 감소하였다. IAA의 경우 모든 농도에서 *rbcL* mRNA 양을 약 70%로 감소시켰으며, ABA는 *rbcL* mRNA 양에 뚜렷한 변화를 보이지 않았다.

BAP는 모든 호르몬 농도에서 *rbcL* mRNA 양이 증가하여  $10^{-8}$  M과  $10^{-5}$  M에서 각각 153%와 123%를 나타내었다. BAP는 광에 의한 *rbcL* mRNA의 증가와 어떤 관계가 있을 것으로 생각된다.

### 참 고 문 헌

- Apel, K. 1981. The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare* L.). Phytochrome-induced decrease of translatable mRNA coding for the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase. *Eur. J. Bio Chem.* **120**: 89-93.
- Bartholomew, D.M., G.E. Bartley and P.A. Scolnik. 1991. Abscisic acid control of *rbcL* and *cab* transcription in tomato leaves. *Plant Physiol.* **96**: 291-296.
- Berry, J.O., B.J. Nikolau, J.P. Carr and D.F. Klessig. 1986. Translational regulation of light-induced ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase gene expression in amaranth. *Mol. Cell. Biol.* **6**: 2347-2353.
- Bogorad, L., E.J. Gubbins, E. Krebbers, I.M. Larrinua, K.M. Mulligan, T. Muskavitch, E.A. Orr, S.R. Rodermeil, R. Schantz, A.A. Sthnmetz, G.D. Vos and Y.K. Ye. 1983. Cloning and physical mapping of maize plastid genes. *Methods in Enzymol.* **97**: 524-554.
- Chen, Y., C. Lin, H. Chang, Guilfoyle. 1975. Auxin-treated soybean hypocotyl. *Plant Physiol.* **56**: 78-82.
- Chory, J., D.F. Voytas, N.E. Olszewski and F.M. Ausubel. 1987. Gibberellin-induced changes in the populations translatable mRNAs and accumulated polypeptides in dwarfs of maize and pea. *Plant physiol.* **83**: 15-23.
- Coen, D.M., J.R. Bedbrood, L. Bogorad and A. Rich. 1977. Maize chloroplast DNA fragment encoding the large subunit of ribulose bisphosphate carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5487-5491.
- Cohen, L., S. Gepstein and B.A. Horwitz. 1991. Similarity between cytokinin and blue light inhibition of cucumber hypocotyl elongation. *Plant Physiol.* **95**: 77-81.
- Fromm, H., M. Devic, R. Fluhr and M. Edelman. 1985. Control of *psbA* gene expression: On mature spirodela chloroplast light regulation of 32-kd protein synthesis is independent of transcript level. *EMBO J.* **4**: 291-295.
- Goldberg, D.A. 1980. Isolation and partial characterization of the *Drosophila* alcohol dehydrogenase gene. *Proc. Natl. Acad. USA.* **77**: 5794-5797.
- Gringrich, J.C. and R.B. Hallick. 1985. The *Euglena gracilis* chloroplast ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase gene. *J. Biol. Chem.* **260**: 16162-16168.
- Gutteridge, S. and A.A. Gatenby. 1987. The molecular analysis of the assembly, structure and function of Rubisco. *Oxford Surveys of Plant Mol. Cell Biol.* **4**: 95-135.
- Hong, B., S.J. Uknes and T.H.D. Ho. 1988. Cloning and characterization of a cDNA encoding a mRNA rapidly induced by ABA in barley aleurone layers. *Plant Mol. Biol.* **11**: 495-506.
- Jacobs, M. and M.R. Peter. 1976. Rapid auxin-induced decrease in free space pH and its relationship to auxin-induced growth in maize and pea. *Plant Physiol.* **58**: 203-203.
- Jacobsen, J.V. 1977. Regulation of ribonucleic acid metabolism by plant hormones. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **28**: 537-564.
- Lee, J.S., J.S. Eum, H.Y. Moon and W.S. Sim. 1992. Cloning of the *rbcL* gene from maize chloroplast. *Korean J. Bot.* **35**: 165-171.
- Lehrach, H., D. Diamond, J.M. Worney and H. Boedtker. 1977. RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochem.* **16**: 4347-4751.
- Link, G. and L. Bogorad. 1980. Size, locations and directions of transcription of two genes on a cloned maize chloroplast DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 1832-1836.
- Maniatis, T., A. Jeffrey and D.G. Kleid. 1975. Nucleotide sequence of the rightward operator of phage  $\lambda$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**: 1184-1188.
- Marco, M.A., R. Chipperfield and H.C. Birnboim. 1982. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Anal. Biochem.* **121**: 382-387.
- Medford, J.I. and I.M. Sussex. 1989. Regulation of chlorophyll and RuBisCo levels in embryonic cotyledons of *Phaseolus vulgaris*. *Planta* **179**: 309-315.
- Nelson, T., M.H. Harpster, S.P. Mayfield and W.C. Taylor. 1984. Light-regulated gene expression during maize leaf development. *J. Cell Biol.* **98**: 558-564.
- Rodermeil, S.R. and L. Bogorad. 1985. Maize plastid photogenes: Mapping and photoregulation of transcript levels during light-induced development. *J. Cell Biol.* **100**: 463-476.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor laboratory, New York. pp. 628-629.
- Stabel, P.A. Sundas and P. Engstrom. 1991. Cytokinin treatment of embryos inhibits the synthesis of chloroplast proteins in Norway spruce. *Planta* **183**: 520-527.
- Theologis, A. and Peter M. Ray. 1982. Early auxin-regulated polyadenylated mRNA sequences in pea stem tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 418-421.
- Thomas, P.S. 1983. Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper. *Methods in Enzymol.* **100**: 255-266.
- Tobin, E.M. and J.L. Suttie. 1980. Light effects on the synthesis of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in *Lemna gibba* L. G-3. *Plant Physiol.* **65**: 641-647.

- Tomashow, M.F., R. Nutter, A.L. Montoya, M.P. Gordon and E.W. Nester. 1980. Interaction and organization of Ti-plasmid sequences in crown gall tumor. *Cell* **19**: 729-739.
- Watillon, B., R. Kettmann, P. Boxus and A. Burny. 1991. Characterization of two gene transcripts modulated by cytokinins in micropropagated apple (*Malus domestica* L. borkh) plantlets. *Plant Physiol.* **96**: 479-484.
- Wilkinson, M. 1991. Purification of RNA. In, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, T.A. Brown (ed.). Vol. 1. Oxford University, Oxford. pp. 69-81.
- Yamada, Y. and T. Yasuda. 1971. Changes in the basicity of histone fractions during callus induction. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **43**: 488-493.
- Yasuda, T. and Y. Yamada. 1971. The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid of the basicity of proteins during 0callus induction. *FEBS Lett.* **18**: 115-117.
- Zurawski, G., B. Perrot, W. Bottomley and P.R. Whitfeld. 1981. The structure of the gene for the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from spinach chloroplast DNA. *Nucl. Acids Res.* **9**: 3251-3270.
- (1993. 2. 26 接受)