ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY
Vol. 9, No. 1, 1996
Printed in the Republic of Korea

전기영동에 의한 피마자 자엽과 뿌리에서 Abscisic acid(ABA) 처리에 의한 단백질의 분석

조봉희† · 박선영* · 이종호**
수원대학교 자연과학대학 생물학과
건국대학교 이과대학 화학과*
성균관대학교 이과대학 생물학과**
(1995. 8. 9. 접수)

Electrophoretic Analysis of Cotyledons and Roots of *Ricinius communis* L. by Abscisic Acid(ABA) Treatment

Bong-Heuy Cho, Sun Young Park*, Jong Ho Lee**
Department of Biology, University of Suwon, Suwon 445-743, Korea
**Department of Chemistry, University of Kon-Kuk, Seoul 133-701, Korea*
***Department of Biology, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-748, Korea*
(Received Aug. 9, 1995)

요약 : 피마자 자엽을 ABA로 처리하였더니 53, 54, 56, 58과 73.5kD의 분자량을 가진 단백질이 유도되었다. 이 중 54와 56kD는 외부배지에 주어진 ABA의 농도가 증가되면 더 증가되었다.

뿌리는 ABA로 처리하면 35, 49, 53, 54, 62, 65와 79kD가 유도되었다. 자엽에서는 73.5kD와 뿌리에서는 62kD를 제외하면 이들 유도 단백질들도 저온처리 때 유도되는 단백질들과 같지 않았다. 49, 58와 79kD는 단백질 합성 방해물질인 cycloheximide(CH)와 상관 없이 계속 유도되어 미래의 연구에 중요한 가치를 부여한다.

Abstract : To treatment of *Ricinus* cotyledons with ABA, induced several proteins with molecular weights of 53, 54, 56, 58 and 73.5 kD. 54 and 56kD among those proteins resulted in increased more when ABA concentrations in external media are increased. The molecular weight of 35, 49, 53, 54, 62, 65 and 79kD of proteins are induced by ABA treatment of roots. The induced proteins are not the same a those by cold treatment exception of 73.5kD of cotyledons and 62kD of roots. 49, 58 and 79kD of proteins are important to research in future because of the induction of proteins in the presence of cycloheximide(CH) which is blocked the synthesis of proteins.

Key words : ABA, cotyledons, roots, hypocotyl, *Ricinus*.

1. 서 론

생리 · 화학학적인 연구결과들을 보면 식물을 저온에 처리하면 새로운 단백질을 합성하는 것으로 알려져 왔다.[1,2] 이들 유도 단백질들은 동결억제 단백질(anti-freeze protein)로써 서로 다른 특성과 구조를 가지고

있었다.[3] 귀리에서 동결억제 단백질에는 19, 26, 32, 34와 36kD가 존재하며, 이 단백질들은 5%의 cysteine을 가지고 있으며, histidine은 존재하지 않았다.[4] 이 단백질들은 물고기와 곤충에서 보고되었던 동결억제 단백질과는 아주 다르다는 사실도 알았다.[4] 복숭아나무의 어린 싹에서는 저온처리 때 60kD의 사부(phloem) 단백질이 유도되고, 이들은 열에 강하며 친수성의 특성을 가졌다.[5] 면역학적인 연구에서 60kD 단백질은 수분스트레스에 저항력을 주는 dehydrin family와 매우 유사함을 보였다.[25]

쌀을 수분고갈, polyethyleneglycol(PEG)와 abscisic acid(ABA)로 처리하면 23kD의 polypeptide가 유도되는 것을 SDS-PAGE로 확인하였고, 이 단백질은 ABA에 반응을 나타내는 RA1316 family와 유사함을 알았다.[6,7] 담배세포에서 염분처리를 하면 osmotin이라 불리는 26kD의 단백질이 유도되었고, osmotin에 대한 cDNA colne을 추출하여 ABA가 osmotin을 전사하는 mRNA를 유도한다는 사실을 밝혔다.[8] 이 osmotin은 수분고갈, 염분처리와 ABA 처리로 유도되는 공통적인 단백질로, 이 3가지 스트레스요인에 대해서 내적인 ABA 농도가 실제로 증가됨이 관찰되었다.[10] 만약 단백질 합성을 억제하는 물질인 cycloheximide를 첨가한 후 스트레스를 주면 내적인 ABA 농도의 증가가 관찰되지 않았고 따라서 단백질의 합성도 방해당하였다.[7] 그러나 외부에서 처리된 ABA는 mRNA에 변화를 주지 않는다는 사실도 동시에 관찰되었다.[9] 이런 결과들을 종합하면 ABA는 저온처리 뿐만 아니라, 수분고갈, 염분처리 때에도 공통적인 단백질을 유도하여 급작스런 스트레스에 대처하는 것처럼 보이며, 모든 스트레스에 대하여 ABA의 역할이 중요함을 알 수 있다. 그러므로 본 실험에서는 저온에 강한 피마자 식물을 이용하여[11] 외부에서 처리한 ABA가 과연 저온 스트레스를 받은 것과 똑같은 역할을 하는지의 여부를 밝히고, 똑같은 역할을 한다면 저온처리의 결과와 ABA의 처리결과가 같을 것이라고 기대하였다.

만약 저온처리 결과와 ABA의 처리결과가 다르다면 지금까지 발표된 연구와는 다른 결과로 주목되므로 본 연구를 시행하였다.

2. 실험방법

2. 1. 기기 및 시약

기기는 electrophoresis kit(ATTO, AE-6600, JAPAN), automatic power supply(Vision Scientific Co., Ltd.), cold microcentrifuge(Vs-1500. CF, Vision Scientific Co., Ltd)를 사용하였다. 전기영동과 본 실험에 사용된 모든 시약은 Sigma사 것을 사용했고, 표준 단백질은 Bio-rad, U.S.A.를 사용하였다.

2. 2. 실험재료

실험재료는 *Ricinus communis* L.(피마자)로, 경기도 신갈에서 실험용으로 직접 재배한 것이다. 실험에는 매년 수확된 새 재료를 사용하였다.

2. 3. 발아조건

씨에 있는 붙순물을 제거하기 위해서 피마자씨를 2% NaOCl 용액에 10분간 소독하던지, 흐르는 물에 하룻밤 씻었다. 소독된 씨는 질석에 심은 후 25℃ 암소에서 5일간 발아시켰다. 물은 매일 적당량을 규칙적으로 주고, 습기는 일정량 유지시켜 주어 발아 조건을 균일하게 하였다.

2. 4. Cycloheximide의 처리

5일 동안 자란 유식물을 소독된 여과지가 들어 있는 용기에 담고, 0~1mM 사이에 ABA 용액을 첨가한 후 암소에서 1~3일간 처리시킨다. 모든 배양 조건은 발아조건과 같다. ABA가 들어 있지 않은 용액을 첨가한 유식물을 대조군으로 하였다. Cycloheximide는 ABA 처리 10분 전에 처리하거나 또는 ABA와 동시에 처리하여 새로 유도되는 단백질의 변화를 비교하는 데 사용하였다.

2. 5. 단백질의 분석법

추출법 : 0.5g의 자엽 또는 1g의 상배축과 뿌리 시료를 즉시 액체 질소에 처리시킨 후 0.5ml의 추출용액(62mM Tris-HCl, pH 6.8 : 2% sodium dodecyl sulfate(DSD), 5% mercaptoethanol : 10% glycerol : 0.00125% bromophenol blue)을 넣고, 얼음 위에 있는 막자사발에서 분쇄하였다. 분쇄된 시료를 12,000rpm에서 15분간 원심분리시킨 후 침전물은 제거하고, 상등액은 단백질 분석을 위해서 모았다. 추출된 시료에다 냉동시킨 아세톤 2배를 가한 후 얼음 위에서 단백질의 침전을 유도하였다. 다시 12,000rpm에서 15분간 원심분리한 후 침전된 단백질은 다시 추출완충액을 넣고

5분간 100℃에서 끓인 후 침전물을 미니저온 원심분리기를 사용하여 12,000rpm에서 10분간 원심분리시킨 후 상등액을 단백질을 분석할 때까지 −80℃에서 보관하였다. 단백질의 정량분석은 Lowry 등의 보고를 수정하여 사용하였다. 각 lane에는 동일한 무게의 추출액으로부터 동량의 부피를(약 20㎕의 단백질)을 넣었다.

전기영동법 : 단백질의 분석에는 discontinuous 완충용액을 이용한 10% polyacrylamide gel을 사용하였고, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 25mA에서 5~6시간 행하였다.

전기영동 후 gel은 0.1% coomassie brilliant blue R-250으로 염색되었고, destaining시킨 후 영구보존을 위해서 두 겹의 cellophane으로 상온에서 건조하였다.

단백질 marker의 표준분자량으로는 phosphorylase B(106kD), BSA(80kD), obalbumin(49.5kD), carbonic anhydrase(32.5kD), trypsin inhibitor(27.5kD), lysozyme(18.8kD)을 사용하였다.

3. 결과 및 논의

3. 1. 피마자 자엽에 ABA와 CH 처리의 영향

5일 된 피마자의 어린 싹 자엽에서 ABA와 cycloheximide를 동시에 처리하였다(*Fig.* 1). Lane 1은 대조구이고, Lane 2는 다른 처리와 마찬가지로 ABA와 cycloheximide 없이 2시간 30분을 용액에서 있었던 시료이다. ABA 처리로 54, 56과 58kD의 단백질이 대조구보다 더 많이 유도되었다.

Lane 8을 보면 cycloheximide 처리 후 54kD의 단백질은 사라졌다가 그 이후 ABA의 농도의 증가에 따라 다시 나타났다. 이 결과는 지금까지 발표되었던 논문의 결과와는 다른 중요한 의미를 준다. 일반적으로 cycloheximide를 처리하면 단백질 합성이 방해당하나, 그럼에도 불구하고 피마자에서 단백질이 계속 합성되었다. 이것으로 보아 cycloheximide는 단백질 합성을 방해하는 동시에 또 다른 작용역할이 있을 것으로 추측되는 중요한 결과이다. 이 결과를 보면 다른 연구자들이 주장하는 저온처리(Cho et al., 1995, 논문게재중)와 ABA의 결과는 동일하다는 내용과 다르므로 ABA의 농도를 조금 더 높여서 처리하였다.

0~500mM ABA를 자엽에 처리하면 *Fig.* 1보다 더 뚜렷한 결과를 보였다(*Fig.* 2). ABA 처리로 유도된 새로운 단백질들은 13, 54와 56kD들이고, 20과 73.5kD는 ABA 처리 동안 대조구보다 더 증가되었다. 54와

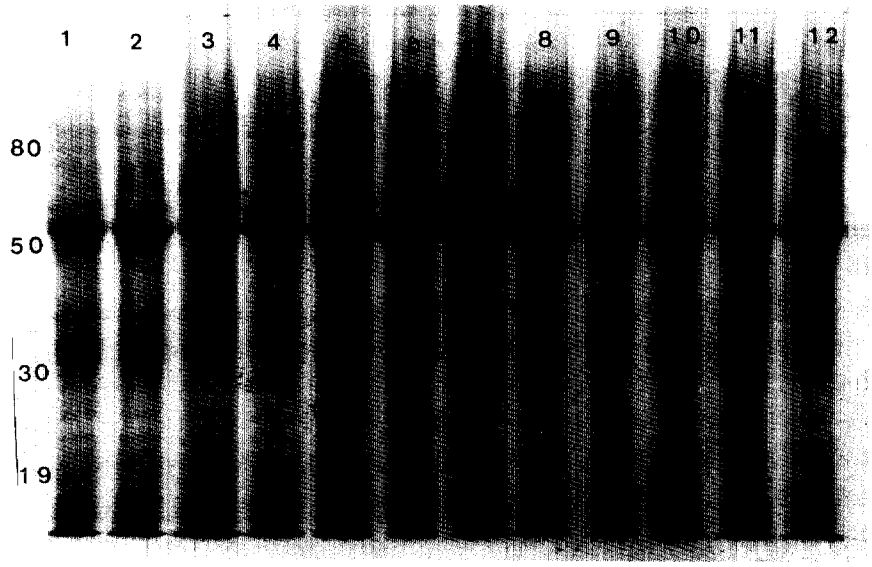

Fig. 1. SDS-PAGE profile of proteins extracted from ABA treated cotyledons. The cotyledons were incubated at 25℃ for 2.5h with various concentration of ABA and 50㎛M CH. 1. control, 2. water, 3-7. ABA treated samples ; 3. 10㎛M, 4. 20㎛M, 5. 50㎛M, 6. 100㎛M, 7. 200㎛M ; 8-12 were treated ABA and 50㎛M CH at the same time ; 8. 10㎛M, 9. 20㎛M, 10. 50㎛M, 11. 100㎛M, 12. 200㎛M. The increased proteins were indicated by arrow. Each lane contains the same volume(20㎕) of extract from the cotyledons.

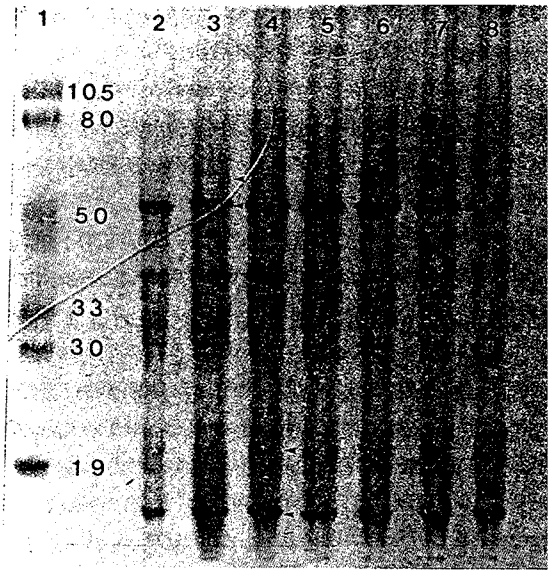

Fig. 2. Effect of ABA treatment on proteins profiles in cotyledons. The cotyledons were incubated at 25℃ for 2.5h with various concentration of ABA. 1. standard, 2. control, 3. 10mM ABA, 4. 20mM ABA, 5. 50mM ABA, 6. 100mM ABA, 7. 200mM ABA, 8. 500mM ABA. The increased proteins were indicated by arrow. Each lane contains the same volume(20μl) of extract from the cotyledons.

56kD는 ABA의 농도가 증가될수록 점점 더 증가되었다. 그러므로 저온처리와 ABA 처리는 반드시 일치하는 것이 아님을 보였다.

3. 2. 피마자 뿌리에서 ABA와 CH 처리의 영향

뿌리에서도 ABA 처리로 유도 또는 변화되는 단백질이 자엽과 같을 것으로 보았다. *Fig.* 3은 뿌리에 ABA와 CH를 동시에 처리하였을 때의 결과이다. 35, 49와 65kD는 ABA 처리로 현저한 증가를 보였다. 54kD는 대조구에 존재하다 저농도의 ABA 처리 때는 사라졌다가 50μM 이상의 ABA 농도에서부터 다시 나타났다. ABA 처리와 저온처리로 증가하는 단백질 중 일치하는 것은 없다.[12] 저온처리 때는 뿌리에서 42와 62kD가 유도되었다(미발표). CH로 처리하면 65kD의 단백질의 농도가 감소하여 새로 합성된 단백질임을 알 수 있었다. ABA 처리 10분 전에 CH로 전처리하면, *Fig.* 3과는 다른 결과를 보였다(*Fig.* 4). ABA 처리로 유도된 단백질인 79kD는, 20μM ABA 처리 때는 CH에 의해서 단백질 합성이 방해당했다. 그러나 20μM 이상의 ABA 농도에서는 CH에 의해서 약하게 방해당했다. 34, 49와 53kD의 단백질들은 CH 처리와는 상관없이 ABA 처리로 유도되었다. CH를 처리했을 때 대부분의 단백질 합성은 농도에 따라서 단백질의 양이 감소되거나 또는 전혀 유도가 되지 못했다. 여러 종류의 단백질들이 CH 전처리에도 불구하고 유도되는 것은 다음과 같이 생각될 수 있다. 저온처리나 ABA 처리로 유도되는 단백질은 이미 세포질 내에 mRNA가 장기적으로 존재했다가 스트레스를 받으면 갑자기 활성화되어서 즉시 스트레스에 대응하는 단백질을 합성시키거나[2] 또는 스트레스에 관여하는 단백질의 활성화 방해물질에 잡혀 있다가 스트레스 처리와 함께 활성화되어 기능을 발휘하는 것으로 보인다. 이처럼 CH 처리와 상관 없이 유도되는 단백질은 아주 드문 경우로 CH 처리로 mRNA의 변화가 없다는 논문과도 일치되는 부분이다.[9] 아직까지 어떤 논문도 이 내용에 대해서 언급한 바 없다. 그러므로 이 결과는 생물체가 스트레스를 받으면 노화를 촉진시킨다는 일반적인 논리와 연결해 보면 앞으로 이 부분을 중점적으로 연구할 부분이며, 따라서 이들 CH 처리와 무관한 이들 단백질들은 중요한 단서를 제공할 것으로 매우 기대되는 부분이다.

저온처리와 ABA 처리 때 유도되는 단백질은 같은 식물에서도 매우 달랐다(*Table* 1). 자엽에서 저온처리와 ABA 처리로 유도되는 단백질 중 같은 것은 73.5kD이고 뿌리에서는 62kD이다.[13] 우리의 결과는 ABA가 세포 내에 수분 고갈을 주어 세포가 스트레스를 받게 되면, 이 스트레스에 대항하여 새로운 단백질을 유도시키므로 저온, 수분고갈, 염분 처리 때에 같은 단백질이 유도된다는 보고와[6,7] 일치되지 않았다. 따라서 자엽에서 73.5kD의 단백질과 뿌리에서 62kD의 단백질은 미래에 생리 및 생화학적인 의미가 밝혀져야 되는 관심 있는 단백질로 계속 분석할 것이다.

감사의 글

본 연구는 1994년도 교육부 기초과학연구소 학술연구조성비 지원에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

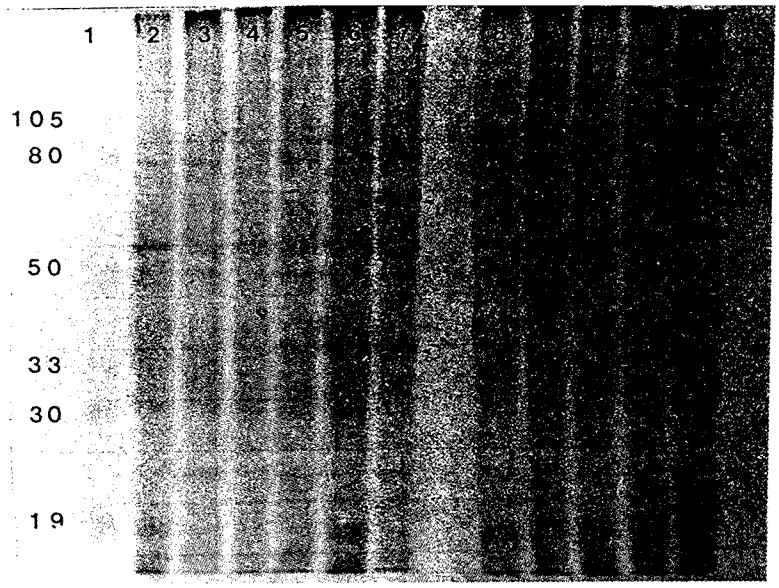

Fig. 3. SDS-PAGE profile of proteins estracted from ABA treated roots. The roots were incubated at 25℃ for 2.5h with various concentration of ABA and 50μM CH. 1. standard, 2. control, 3-7. ABA treated samples : 3. 10μM ABA, 4. 20μM ABA, 5. 50μM ABA, 6. 100μM ABA, 7. 200μM ABA, 8-12. samples were treated ABA and 50μM CH at the same time : 8. 10μM ABA, 9. 20μM ABA, 10. 50μM ABA, 11. 100μM ABA, 12. 200μM ABA. The increased proteins were indicated by arrow. Each lane contains the same volume(10μl) of extract from the roots.

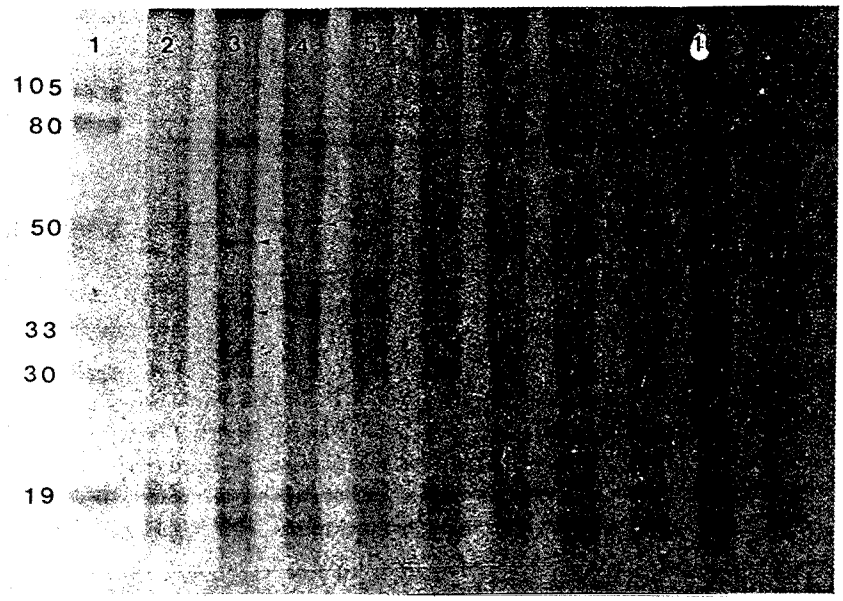

Fig. 4. SDS-PAGE profile of proteins extracted from ABA treated roots. The roots were incubated at 25℃ for 2.5h with various concentration of ABA and 50μM CH 1. standard, 2. control, 3. water, 4-7. ABA treated samples : 4. 20μM ABA, 5. 50μM ABA, 6. 100μM ABA, 7. 200μM ABA ; 8-11. samples were pretreated with 50μM CH before ABA treated : 8. 20μM ABA, 9. 50μM ABA, 10. 100μM ABA, 11. 200μM ABA. The increased proteins were indicated by arrow. Each lane contains the same volume(10μl) of extract from the roots.

Table 1. Comparision to changes in protein patterns of cotyledons, hypocotyls and roots of *Ricinus communis* L. induced by cold-and ABA treatment.

단백질 (kD)	증가되는 단백질(kD)				
	저온처리(4℃)			ABA	
	자엽	줄기	뿌리	자엽	뿌리
13				−	
14	−				
20				−	
24	−				
35					−
42	−		−		
49	−				−
52	−				
53	−				−
54				−	−
55		−		−	
56		−		−	
58				−	
62			−	−	−
65					−
73.5	−	−		−	
79					−

참고문헌

1. D. K. Hincha, and J. M. Schmitt, *J. Plant Physiol.*, **140**, 236(1992).
2. R. Arora, and M. E. Wisniewski, *Plant Physiol.*, **105**, 95(1994).
3. P. L. Davies, C. L. Hew, *2FESEB J.* **4**, 2460 (1990).
4. W. C. Hon, M. Griftith, P. Chong, and D. S. C. Xang, *Plant Physiol.*, **104**, 971(1994).
5. T. J. Close, R. D. Fenton, F. Moonan, *Plant Mol. Birl.*, **23**, 279(1993).
6. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and A. Randall, *J. Biol. Chem.*, **192**, 263(1951).
7. A. H. Ras, B. Karunasrec, and A. R. Reddy, *J. Plant Physiol.*, **142**, 88(1993).
8. J. Mundy, and W. H. Chu, *EMBO J.*, **7**, 2279 (1988).
9. N. K. Singh, D. E. Nelson, D. Kuhn, P. M. Haregawa, R. A. Bressan, *Plant Physiol.*, **90**, 1096 (1989).
10. Y. Li, and D. C. Waiton, *Plant Physiol.*, **92**, 551 (1990).
11. B. H. Cho, and S. O. Moon, *J. Inst. Nat. Engi.*, **5**,

87(1990).

12. S. E. Fender, and M. A. Oconnell, *Plant Physiol.*, **93**, 1140(1990).

13. V. K. Laemmli, *Nature*, **227**, 680(1970).