

인삼 및 모상근의 프로테오믹 분석을 위한 단백질 추출 방법

김승일 · 김수정 · 남명희 · 서종복 · 김수현 · 권경훈 · 김영환 · 최중순 · 유종신 · 양덕춘¹ · 최광태¹ · 박영목*

한국기초과학지원연구원 프로테오믹분석팀, ¹인삼연초연구원

Purification of Crude Protein Mixture from *Panax ginseng* and Hairy Root for Proteome Analysis

KIM, Seung Il · KIM, Soo-Jung · NAM, Myung Hee · SEO, Jong Bok · KIM, Soohyun · KWON, Kyung-Hoon · KIM, Young Hwan · CHOI, Jong-Soon · YOO, Jong-shin · YANG, Deok-Chun · CHOI, Kwang-Tae · PARK, Young-Mok

Proteome Analysis Team, Korea Basic Science Institute, Daejeon, 305-806, Korea

¹Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Daejeon, 305-345, Korea

ABSTRACT *Panax ginseng* C.A. Meyer is a well-known Korean traditional medicine. Until now, even though major research of ginseng has been focused on the pharmacological effect, clinical application and chemical analysis of extracted secondary metabolite for several years, the physiology and gene functions of ginseng were not well known. In this research, we have developed the protein extraction methods of ginseng root and hairy root for proteome analysis in order to elucidate the gene(s) function of ginseng. Using the liquid nitrogen & TCA method as protein extraction method, about 660 protein spots were detected on the 2-DE gel of hairy root. Additionally, comparative analysis result of 2-DEs of ginseng root & hairy root suggested that proteomes of same organism could be changeable according to the culture condition, growth stages and other stimulus.

Key words: *Panax ginseng*, proteome, purification

서 론

인삼 (*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 우리나라를 비롯, 중국, 일본 등 동북아시아에서 삼천년 이상 강장제로 사용되어 왔으며, 약효 및 ginsenoside 등 성분에 대한 연구가 매우 활발하게 이루어져 왔다 (Ong et al. 2000). 반면 인삼의 분자생물학적 연구와 단백질 생화학적 연구는 매우 빈약하여 30여종의 단백질만이 보고되어 있을 뿐이며, 국내에서도 agmatine iminohydrolase (Kim et al. 1995)의 정제나 미국삼과의 단백질 비교 패턴 조사 (Park et al. 1996; Kim et al. 1989) 등 초보적인 연구만이 진행될 실정이다. 그러나 인삼의 효능과 생리생화학적 특성을 규명하기 위해서는 유전자 수준에서의 철저한 연구와 더불어 발현 단백질에 대한 연구가 상호 보완적으로 진행되어야 하는 것이 필수적이다. 최근 들어 발

전되고 있는 프로테오믹스 (proteomics) 방법은 생체 내 단백질군의 새로운 개념인 프로테오믹 (proteome)을 고속으로 분석하는 것을 가능하게 하며 인삼의 특성연구에 매우 유용하게 사용될 수 있다 (Pandey et al. 2000). 한편 프로테오믹 분석을 위해서는 시료준비 단계로 세포 내 단백질군의 분리 및 전처리를 위해 세포의 파쇄 및 비단백질 물질의 제거 등이 필요하다. 단세포 생물인 미생물이나 동물 세포 및 체액 등의 경우는 전처리 방법이 많이 개발되어 있으나 (Rabilloud T 1996), 식물의 경우는 많이 개발되지 않은 상태인데, 이는 두꺼운 세포벽과 더불어 세포 내 존재하는 페놀계 화합물 (phenolic compound)이 프로테오믹 분석을 위한 이차원 전기영동을 방해하는 것 때문으로 알려져 있다 (Rabilloud T 2000). 본 연구에서는 인삼의 프로테오믹 연구를 위한 첫 단계로 재현성 있고, 최적화된 이차원 전기영동 결과를 얻기 위한 단백질 추출방법을 확립하였으며, 이차원 전기영동을 통하여 그 유용성을 확인하였다.

*Corresponding author. Tel 042-865-3420

E-mail ympark@comp.kbsi.re.kr

재료 및 방법

식물 재료

모상근은 한국인삼연초연구원에서 제공받았으며, *Agrobacterium rhizogenes* A4 균주에 의해 유도된 KGHR-8 세포주이다 (Yang et al. 1998). 배지는 1/2 MS, 3% sucrose를 사용하였으며 4주 이상 배양한 모상근을 사용하였다. 모상근은 3차 증류수로 3~4차례 씻고 물기를 제거한 후 -80°C에서 10 g씩 분주하여 보관하였다. 인삼은 공주지역에서 수확한 4년생 천풍 (KG101)을 사용하였다. 모상근과 같이 3차 증류수로 씻은 뒤 약 10 g씩 잘라 -80°C에서 보관하였다.

모상근과 인삼의 파쇄 및 단백질 추출

Homogenization 방법

수정된 Park (1996)의 방법을 사용하였다. -80°C에서 보관한 모상근 50 g에 50 mM Tris (pH 8.0)를 첨가한 후, mixer로 분쇄 (1분씩 세 차례)하여 조직을 잘게 만든 후, 다시 homogenizer (Brinkmann homogenizer)로 1분씩 세 차례 분쇄하였다. 18,000 rpm에서 30분간 원심 분리한 후 상등액을 여과지로 통과하여 불순물을 제거하였다. 얻어진 상등액을 25~80%의 황산암모늄 침전을 실시한 후 50 mM Tris (pH 8.0)로 투석하고 단백질 양을 측정하여, 이차원 전기영동을 실시하였다. 단백질 정량은 Bradford 방법을 사용하였다 (Bradford, 1976).

Liquid Nitrogen 방법

-80°C에서 보관한 10 g의 모상근 및 인삼을 액체질소를 이용 얼린 후 막자사발을 이용해 30분 이상 미세하게 갈아 파쇄하였다. 모든 과정은 시료가 녹지 않도록 주의하였다. 미세하게 분쇄된 시료를 원심분리용 튜브로 옮긴 후 100°C의 sample buffer I (0.3% SDS, 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 200 mM DTT)에 넣어 10분간 증탕하여 단백질을 추출하였다 (Figure 1). 반응액을 얼음에 넣어 5분간 식힌 후 핵산제거를 위해 sample buffer II (DNase I, RNase A, 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 50 mM MgCl₂)를 넣어 10분간 얼음에서 반응시켰다. 반응액을 12,000 rpm에서 30분간 원심분리 한 다음 상등액을 회수하여 50% TCA 용액으로 최종농도가 10% TCA가 되게 한 후 -20°C에서 1시간 동안 단백질을 침전시켰다. 침전된 단백질들은 냉각된 acetone에 용해시켜 오염물질을 제거하였다. Acetone으로 3회 반복하여 씻은 후 얻은 단백질은 speed vacuum concentrator로 혹은 상온에서 건조하여 단백질 정량한 후 이차원 전기영동을 할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

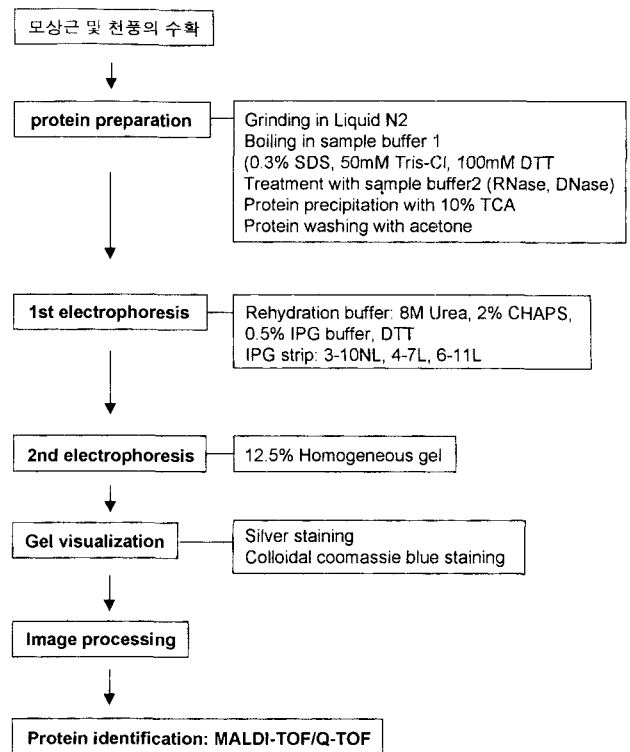


Figure 1. Schematic illustration of the sample preparation and two-dimensional electrophoresis of ginseng proteome.

이차원 전기영동

이차원 전기영동의 첫 단계로 전처리를 통해 얻은 250 µg의 인삼 단백질을 rehydration buffer (8 M Urea, 2% CHAPS, 0.5% IPG buffer)에 용해시켜 등전점 전기영동 (Isoelectric focusing)을 실시하였다. 이를 위해 Pharmacia사의 IPGphor isoelectric focusing unit를 이용하였으며 IPG (Immobilized pH Gradient) dry strip으로 18 cm pH 3~10 및 pH 4~7을 사용하였다. 일차원 전기영동 후 IPG strip을 SDS equilibration buffer (50 mM Tris-Cl pH 8.8, 6 M Urea, 30% glycerol, 2% SDS, bromophenol blue)에 평형화시키고 Laemmli의 방법에 의해 이차원 전기영동 (SDS-PAGE)을 실시하였다 (Laemmli 1970).

염색 및 이미지 분석

이차원 전기영동이 끝난 gel은 40% ethanol과 10% acetic acid로 고정화 (fixation)시키고 silver staining kit (Pharmacia)를 이용하여 염색하였다. Coomassie 염색의 경우 Colloidal Coomassie Brilliant blue G250 (Bio-rad)을 사용해 염색하였다. 이미지 분석 및 저장은 ImageMaster 2D Elite Software 및 ImageScanner (Pharmacia)를 사용하여 수행하였다.

결과 및 고찰

모상근 및 천풍의 단백질 추출

기존의 인삼 단백질의 추출방법은 잘게 썬 후 완충용액을 넣어 homogenization하는 방법이 주로 사용되었다 (Kim et al. 1995; Park et al. 1996). 본 연구에서 수정된 homogenization 방법에 따라 단백질을 추출한 후 SDS-PAGE를 해본 결과 비교적 단백질 추출 상태가 양호함을 확인하였다 (Data not shown). 그러나 이차원 전기영동을 한 결과 단백질 외의 불순물이 포함되어 있어 이미지에 영향을 줌을 확인할 수 있었다 (Figure 2). 이에 따라 추출과정 중 일어날 수 있는 세포 내 protease에 의한 proteolysis 방지 및 효과적인 세포벽 파쇄와 불순물 제거를 위해 액체질소와 TCA 침전법을 이용한 단백질 추출방법을 실시하였다. 단백질 추출을 위해서 0.3% SDS, 50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 200 mM DTT 조건 하에서 중탕하였다. 추출된 단백질에서 색소 등 폐놀계 화합물을 제거하기 위해 10% TCA에서 침전을 실시하였다 (Figure 1). 모상근 추출 단백질을 정량한 결과 10 g 모상근 당 7 mg 정제된 단백질을 얻었다. 이는 황산암모늄 (30~50%) 침전을 이용한 기존의 추출방법이 약 18 mg을 회수한 것 (Kim et al. 1995)에 비해 다소 떨어지나 정량 방법상 오차가 있을 수 있으며, 또한 획득된 양은 이차원 전기영동을 수행하기 위해 충분한 양으로 생각된다. 한편 모상근에 비해 조직이 비교적 단단한 인삼의 경우 파쇄를 위한 시간이 더 소요되었으나 추출 단백질의 양에는 큰 차이가 없어 두 시료 모두 액체 질소를 이용한 파쇄에 적합함을 확인하였다.

모상근 및 천풍의 이차원 전기영동

250 µg의 추출된 모상근 단백질을 이용하여 이차원 전기영

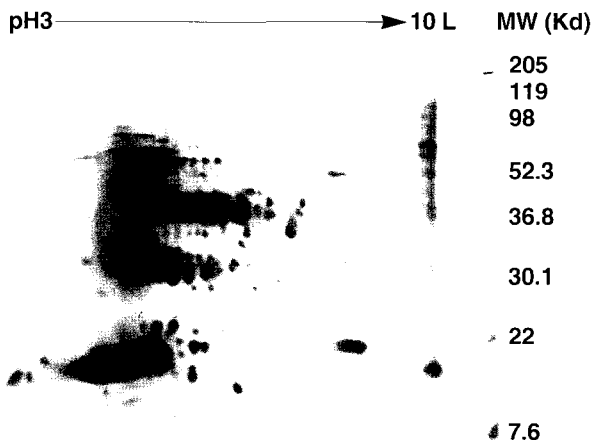


Figure 2. 2-DE of hairy root (KGHR8) proteome prepared by homogenization method. First dimension: IEF with IPG 3-10. Second dimension: SDS-PAGE, 12.5% homogeneous.

동을 실시한 결과 Figure 3의 결과를 얻을 수 있었다. 모상근에서 발현된 대부분의 단백질은 pH 3에서 pH 7 사이인 산 영역 (acidic region)에 분포하였으며, 100 kDa에서 5 kD 크기의 단백질이 확인되어 TCA 침전법에 의해 추출된 단백질에 특정크기의 단백질이 배제되지 않았음을 확인하였다. 또한 homogenization 및 황산암모늄 침전법보다 선명한 이차원 전기영동을 얻어, 이 방법이 이차원 전기영동을 방해하는 불순물 제거에 더욱 효과적인 방법임을 확인하였다. Non-linear pH strip를 사용한 결과 더 많은 spot을 확인하여 Silver 염색법에 의해 약 660여 개의 단백질을 검색하였으며, 이는 이차원 전기영동 겔 상에 확인할 수 있는 최대치에 가까운 수치로 (O'Farrell 1975), 이는 사용된 단백질 추출방법이 인삼 단백질 추출 방법으로 유용함을 증명한다 (Figure 4 A). 한편 이차원 전기영동으로 IPG strip pH 4~7을 사용한 후, Coomassie 염색한 경우 약 220여 개의 단백질이 검출되었다. 따라서 현재의 분석 감도를 감안, 질량분석기나 N-말단 아미노산 서열분석기를 이용한 동정이 가능한 단백질 수는 220개 이상으로 예상되며 현재 MALDI 및 ESI 질량분석기를 이용한 단백질의 동정이 진행중이다 (Figure 5 A). 또한 인삼 (천풍)에서 추출한 단백질을 이차원 전기영동 한 결과 약 400개 단백질이 검출되었으며, 모상근과는 현저히 다른 패턴을 보여주었다. 이는 모상근과 인삼이 같은 유전자를 보유함에도 불구하고 생장조건에 따른 단백질 발현 패턴에는 큰 차이를 보일 수 있음을 의미하며, 모상근의 배양조건과 인삼의 배양조건, 생리적 차이 및 형태적 차이에 기인하는 것으로 생각된다 (Figure 4 B). 따라서 앞으로 진행될 생장기별, 배양 조건별 프로테옴 분석은 인삼의 생리적 특성을 규명하는 데 많은 기여를 할 것으로 기대된다. 두 겔 이미지를 비교한 결과 약 180개의 경우 인삼과 모상근에서 동시 발현됨을 확인하였으

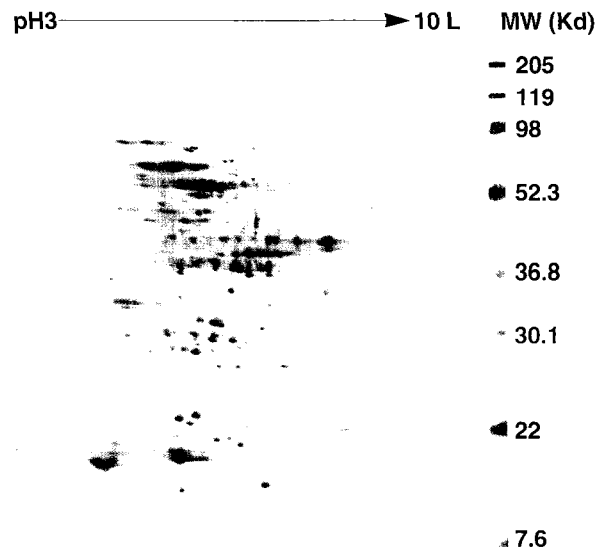


Figure 3. 2-DE of hairy root (KGHR8) proteomes prepared by liquid nitrogen method. First dimension: IEF with IPG 3-10. Second dimension: SDS-PAGE, 12.5% homogeneous.

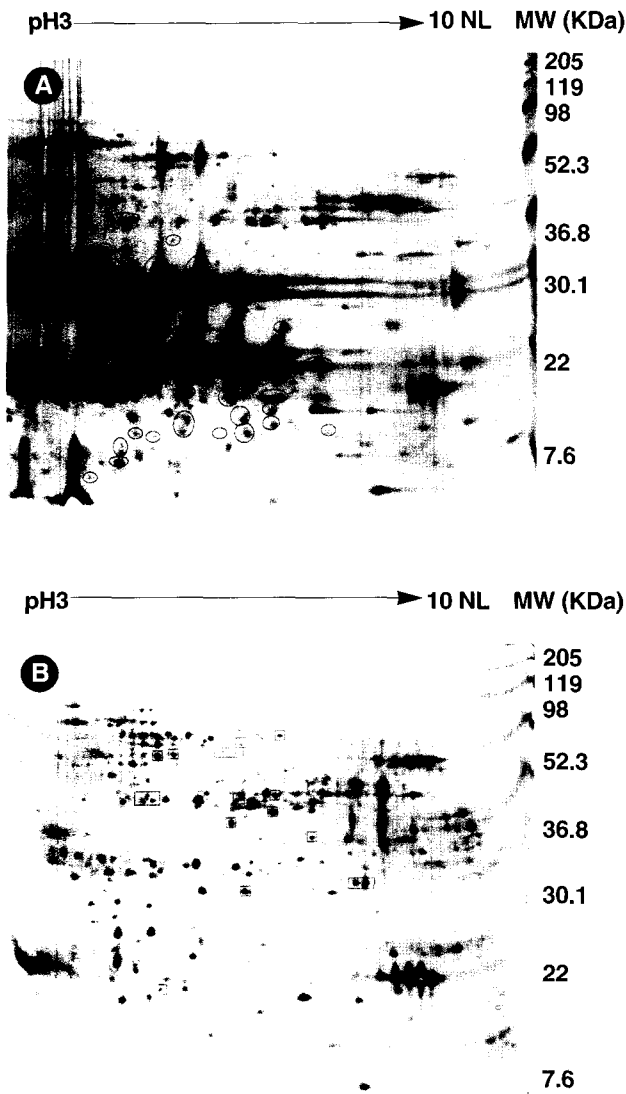


Figure 4. 2-DE of hairy root (KGHR8) proteomes and ginseng (KG101) using non-linear IPG 3-10 strip. A, Hairy root (KGHR8); B, Ginseng (KG101). Differentially expressed protein spots are marked with circle (ginseng) and with square (hairy root).

며, 모상근 및 천풍에서만 발현되는 단백질이 각각 20개 및 60개 이상이 존재함을 확인하였다. 특히 천풍의 경우 약 30 kDa 및 20 kDa에서 약 10여 개의 과발현된 단백질이 확인되며 단백질 동정이 진행중이다. 또한 전기영동을 반복 시행함으로써 재현성 있는 결과를 얻을 수 있음을 확인하였다.

인삼의 프로테옴 분석

액체질소/TCA방법에 의한 모상근 및 인삼 단백질의 추출 방법은 이차원 전기영동결과 염 및 전기영동 방해물질 제거 등에 효과적이어서 인삼 프로테옴 분석의 기본적인 추출방법으로 유용함을 확인하였다. 그러나 SDS 및 DTT와 같은 detergent 및 환원제가 첨가된 상태에서 중탕하므로 soluble protein뿐 아니라 insoluble protein도 일부 용해되어 나올 것

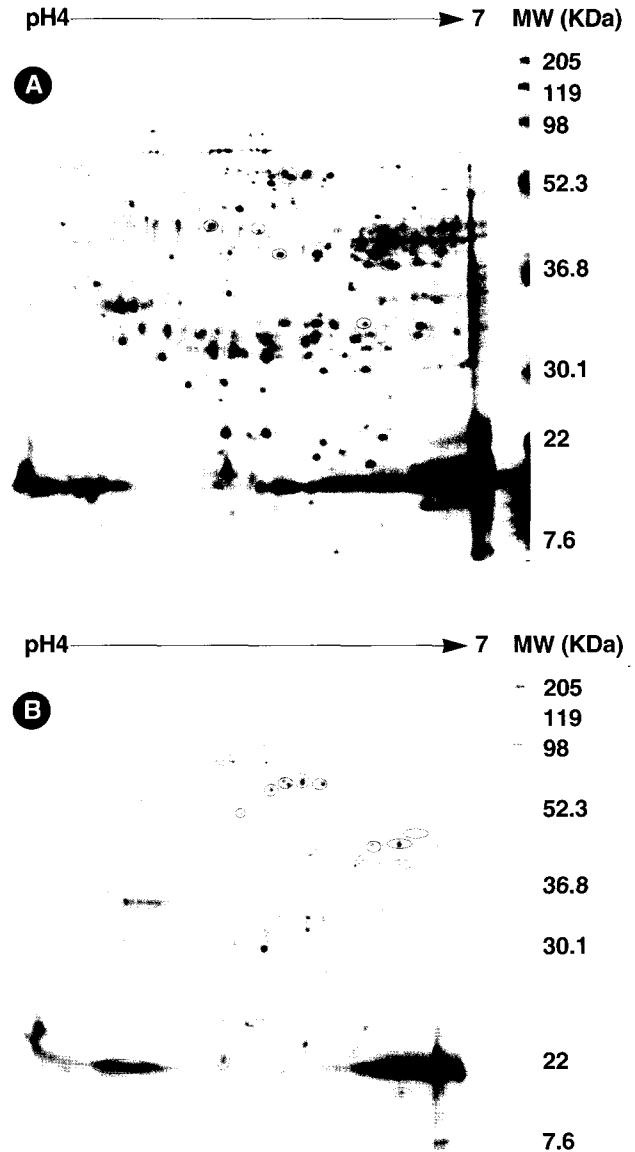


Figure 5. Silver & Coomassie Brilliant blue (G-250) staining with 2-DE of hairy root (KGHR8). First dimension: IEF with IPG 4-7. Second dimension: SDS-PAGE, 12.5% homogeneous. A, Silver staining; B, Coomassie Brilliant blue (G-250) staining.

으로 추정된다. 따라서 인삼세포 내에 존재하는 단백질의 위치에 따른 분리, 물리생화학적 성질에 따른 분리 및 세포 소기관에 따른 분리를 위해서는 좀더 세부적인 분리 방법이 개발되어야 할 것으로 생각된다.

적 요

인삼 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 우리나라의 전통약재로 수 세기 동안 사용되어 왔으며, 약효 및 성분에 대한 연구가 매우 활발하게 이루어져 왔으나, 인삼의 분자생물학적, 단백질 화학적 측면에서 생리연구는 매우 미미하였다. 본 연구에서는 프로테옴믹스를 이용한 인삼 단백질 균을 연구하기

위한 첫 단계로 인삼 (천풍) 및 모상근의 단백질 추출 방법을 확립하고, 이차원 전기영동을 통하여 추출방법의 유용성을 확인하였다. Homogenizer와 황산암모늄 침전을 통한 단백질 추출과 액체질소 및 TCA를 이용한 단백질 추출 방법을 수행하여 비교해 본 결과 추출 단백질 양에는 큰 차이가 없으나 이차원 전기영동 수행 시 액체질소 및 TCA를 통한 방법이 프로테옴 연구에 적합하여 훨씬 해상도가 높은 gel 이미지를 얻었을 뿐 아니라, gel당 660개 이상의 단백질 spot을 확인하였다. 또한 인삼과 모상근의 이차원 전기영동을 비교한 결과 상당히 다른 발현 패턴을 보여, 생장조건 등 외부 환경과 생리상태의 차이에 따라, 같은 유전자를 가지고 있는 조직체라 할지라도, 매우 다른 프로테옴 (proteome)을 보일 수 있음을 보여주었다.

사사 - 본 연구는 자생식물이용기술 개발사업단 (21C 프론티어 연구개발사업)의 연구비에 의해 수행되었음.

인용문헌

- Bradford MM** (1976) Rapid and sensitive methods for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Kim C, Park KA** (1989) Further purification of radioprotective ginseng protein fraction by gel filtration. *Korean J. Ginseng Sci.* **13**:254-259
- Kim HS, Kim HJ, Cho YD** (1995) Purification and characterization of agmatine iminohydrolase from *Panax ginseng* C.A. Meyer (l). *Korean J. Ginseng Sci.* **19**:237-243
- Laemmli UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685
- Liu C, Xiao PC** (1992) Recent advances on ginseng research in China. *Journal of Ethnopharmacology* **36**:27-38
- O'Farrell PH** (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem* **250**:4007-4021.
- Ong YC, Yong EL** (2000) *Panax* (Ginseng)- Panacea or Placebo? Molecular and cellular basis of its pharmacological activity. *Ann Acad Med Singapore* **29**:42-46
- Pandey A, Mann M** (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**:837-846.
- Park H, Kwon TH, Kim KH** (1996) Comparison of protein patterns of the root pith from *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. *Korean J. Ginseng Sci.* **20**:49-53
- Rabilloud T** (1996) Solubilization of proteins for electrophoretic analysis. *Electrophoresis* **17**:813-829
- Rabilloud T** (2000) Solubilization of proteins for electrophoretic analysis. In : Rabilloud T, (eds), *Proteome research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods*, Ed1, Springer-Verlag, Berlin. pp 9-29
- Yang DC, Kim YH, Yang DC, Min BH, Shin SL, Choi KT** (1998) Selection of active grow hairy root lines in ginseng. *Korean J. Plant. Tissue Culture* **25**:525-530

(접수일자 2001년 11월 26일)