

시금치 nitrate reductase cDNA 클로닝 및 염기서열 분석

박상규* · 박누리 · 정종배

대구대학교 자연자원대학 생명환경학부

(2002년 7월 23일 접수, 2002년 8월 12일 수리)

키토산 분해물을 시금치와 상추에 살포하였을 때, nitrate 함량이 감소되었으며, 이러한 감소는 nitrate reductase 활성의 증가에 기인한 것으로 나타났다. 이에 따라 채소 중 질산염을 가장 많이 축적하는 채소 중 하나인 시금치의 nitrate reductase를 식물체내에 과량 발현시켜 질산염 축적을 줄이기 위한 연구를 수행하였다. 첫 단계로 시금치 mRNA로부터 RT-PCR을 이용하여 cDNA를 분리, 증폭하고 벡터에 클로닝하여 염기서열을 결정하였다. 시금치 nitrate reductase cDNA의 염기서열은 다른 식물체에서 분리된 nitrate reductase 유전자들과 상당히 높은 상동성(71~82%)을 보였고, 이미 발표된 시금치 nitrate reductase cDNA의 염기서열과 비교하였을 때 단 두 염기만이 달랐다.

Key words: 시금치, 질산염환원효소, cDNA, RT-PCR

서 론

근년에 식품업체나 일반농가에서 생산, 시판중인 유기농산물에서 인체내에서 발암성 물질을 생성하는 질산염이 과량 검출되었다고 '소비자문제를 연구하는 시민의 모임'이 발표하였고¹⁾, 식품의약품안전본부가 일반농법 및 유기농법으로 재배한 채소류에서 질산염 검출수치가 위험 수준이라고 발표하였다²⁾. 채소류를 비롯한 시중 유통 농산물시료 162점 중 56.2%인 91점이 질산염 1일 허용섭취량(219 mg)을 넘어선 것으로 밝혀졌다. 또한 높은 수준(30~298 ppm)의 질산염이 검출된 지하수를 먹은 갓난아기가 청색증 환자로 판명되기도 하였다³⁾. 음용수에 있어서 미국 환경보호국(EPA)의 최대오염수준은 질산태질소($\text{NO}_3\text{-N}$)의 경우 10 ppm으로 규정하고 있다⁴⁾. 그리고 채소류 섭취량이 서양인에 비해 1.7~3.4배나 많기 때문에 우리나라 성인의 질산염 섭취량은 하루 340~720 mg로 세계보건기구의 질산염 섭취 허용량인 219 mg의 두 배 이상일 것으로 추정하고 있다고 한다²⁾.

질산염 자체는 유해한 것이 아니지만 일단 체내에서 아질산으로 변화되고 니트로소아민(nitrosoamine)이라는 유독성분으로 변하는 것으로 알려져 있으며 음용수의 질산염과 만성질환과의 필연적 관계를 조사한 연구가 여럿 있으며⁵⁻⁸⁾ 발암 위험성과도 밀접한 관계가 있다는 보고도 많이 있다⁹⁻¹³⁾. 즉, 갑상기능항진증(hyperthyroidism)이 음용수의 질산염 노출과 관련이 있으며⁵⁾, 26 ppm 이상의 질산태 질소를 함유한 우물물을 마신 엄마의 신생아에게 중추신경계 이상이 증가했거나⁶⁾, 매우 높은 수준의 질산염이 함유된 물을 마신 사람들에게 염색체 이상이 발견됐으며⁷⁾, 2~8 ppm의 질산태 질소가 함유된 물이 인슐린-의존성 당뇨병을 야기했다고 한다⁸⁾. 발암 위험성 증가의 경우는 위암의

사망을 증가⁹⁾, 낭포암의 사망을 증가¹⁰⁾, 비호지킨스성 임파종의 증가¹¹⁻¹³⁾와 높은 수준의 질산염이 함유된 음용수와 관련 있다고 한다. 물론 질산염이 성인에게 실질적인 건강 위험 요소라는 증거는 없다고 하는 의견¹⁴⁾과 특정 암을 일으키는데 관련이 없다는 의견들¹⁵⁻¹⁸⁾도 있다. 그렇지만 높은 수준의 질산염이 장기적으로는 건강에 영향을 줄 수 있다는데 이견은 없으며 따라서 음용수에 있어서 질산염의 최대 검출 수준을 유지하여야 하고 음식물을 통한 질산염의 섭취를 되도록 낮추어 한다고 판단하고 있다^{4,19)}.

질산염(NO_3)은 질소가 토양 중에서 자연적으로 발견되는 형태로 질소는 모든 생물에 필수적이며 대부분 작물의 높은 생산량을 유지하기 위하여 반드시 필요한 원소이다. 질산염의 형성은 환경에 있어서 질소 순환의 주요 부분이며 비료, 식물의 부식, 분뇨 등이 미생물에 의해 분해될 때 생성된다⁴⁾. 식물은 토양으로부터 영양요구에 맞춰 질산염을 이용하고 잎이나 줄기에 축적하기도 한다. 식물체내로 흡수된 질산염은 nitrate reductase (NR, 질산염환원효소)에 의해 아질산염(NO_2)으로 변하고 nitrite reductase(아질산염환원효소)에 의해 아미노산 등의 유기태 질소로 환원된다²⁰⁾.

이에 본 연구에서는 질산염을 가장 많이 축적하는 것 중 하나인 시금치¹⁹⁾의 질산염 축적을 감소시키기 위한 방안으로 우선 시금치의 NR cDNA를 얻고자 reverse transcriptase를 이용하는 polymerase chain reaction(RT-PCR)으로 cDNA를 분리, 증폭하고 벡터에 클로닝한 후 염기서열을 확인하고 이미 알려진 식물의 동일 기능 유전자들과 비교하였다.

재료 및 방법

공시식물. 대구대학교 온실에서 재배한 시금치(*Spinacia oleracea* L. cv Ace)를 공시 재료로 하였다. 시금치 생육을 위하여 비료성분 21-17-17($\text{N-P}_2\text{O}_5\text{-K}_2\text{O}$)을 10 g씩 처리하였다.

시금치 RNA 분리 및 primer 제작. 시금치 잎을 증류수로

*연락처

Phone: 82-53-850-6754; Fax: 82-53-850-6759

E-mail: sgpark@daegu.ac.kr

Table 1. Oligonucleotide primers for the nitrate reductase cDNA synthesis

Primers	Oligonucleotide sequence
5'-primer	5'-GGGGACTAGTGAGCTATGGGCGGCGTCAGT-3'
3'-internal primer	5'-CCCCTCTCTTGGTGGTCCAA-3
5'-internal primer	5'-GACCACCAAGAGAGGGGAAG-3'
3'-primer	5'-CCGAGCTCCTTCCCAACGTAACAGTACTTT-3'

세척한 후, total RNA 분리에는 High Pure RNA Tissue Kit (Roche)를 이용하였다. NR cDNA 클로닝을 위한 5'-primer, 3'-primer 및 internal primer들의 염기서열은 이미 발표된 시금치 NR cDNA의 것(GenBank accession number: M32600)²¹⁾을 이용하여 제조하였다(Table 1). 5'-primer와 3'-primer만을 이용하여 NR cDNA를 합성하려 하였으나 예상되는 질산염환원효소 cDNA의 크기가 2.8 kb로 한 번의 PCR로 얻기에는 너무 커서 합성에 어려움이 있었다. 따라서 1.3 kb와 1.5 kb의 두 개의 단편으로 합성되도록 내부의 염기서열을 이용하여 중첩되도록 두 개의 internal primer를 제조하여 RT-PCR을 수행하여서 두 개의 cDNA 단편을 획득할 수 있었다.

Reverse Transcriptase-PCR 및 cDNA 합성. Reverse Transcriptase-PCR을 위하여 Takara사의 Bca BEST™ RNA PCR kit를 이용하여 시금치 잎에서 분리한 total RNA로부터 합성하였다. PCR 반응 조건은 다음과 같다. Taq DNA polymerase(5 units/μl) 0.5 μl 10X PCR buffer 5.0 μl, 25 mM dNTP mixture (2.5 mM each) 8.0 μl template cDNA, primers 10 pmol에 멸균수를 첨가하여 전체 50 μl로 하였다. 혼합액을 95°C에서 1분간 반응시킨 후, 94°C 1분(denaturation), 45°C 30 초(annealing), 72°C 2분(polymerization)의 순환과정을 35 cycle 반복한 후 4°C가 되도록 하였다. 합성된 PCR 산물은 MEGA-based Agarose gel extraction kit(Intron)를 이용하여 추출하였다.

Subcloning과 염기서열분석. 추출한 PCR 산물을 클로닝 벡터인 pGEM-T에 ligation한 후 *E. coli* JM109에 도입시켜 ampicillin 함유 배지에서 선발하였다. 이들 중 1.3 kb와 1.5 kb의 NR cDNA를 포함한 것을 동정하여 그 plasmid를 추출하여 ABI 3700 자동염기서열 분석기(Applied Biosystems Inc.)를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

결과 및 고찰

(주)태훈바이오의 키토산 분해물을 시금치와 상추에 살포하였을 때, 질산염 함량이 감소되었으며, 이러한 감소는 NR 활성의 증가에 기인한 것으로 나타났다²²⁾. 또한 당 함량이 질산염 함량의 감소와 반대로 증가되었던 바, 이는 키토산 분해물의 미량원소에 의한 광합성량 증가에 기인하는 것으로 판단된다.²²⁾ 따라서 강력한 promoter를 이용하여 시금치의 NR 유전자의 발현을 높여 효소활성을 높이면서 동시에 키토산 분해물을 살포한다면 식물체내의 질산염 함량을 상당 수준 낮출 수 있으리라 생각되었다. 이에 따라 먼저 시금치의 total RNA를 분리하고 이미 발표된 시금치 NR cDNA의 것(GenBank accession number M32600)²¹⁾을 참조하여 제조한 primer들을 이

용하여 RT-PCR 방법으로 cDNA를 분리, 증폭하고 벡터에 클로닝하여 nucleotide 염기서열을 분석하였다(Fig. 1).

염기서열 분석한 2,805 개의 nucleotide는 926개의 아미노산으로 이루어진 약 104×10^3 dalton의 단백질을 만들 수 있다. 염기서열 순서를 이미 발표된 cDNA²²⁾와 genomic DNA²³⁾의 것과 비교하였을 때(Table 2), 단지 두 개의 nucleotide의 염기(C)가 또 다른 시금치의 NR cDNA에서는 A와 T로 나타나 있다. 이러한 염기의 변화는 각각 아미노산 alanine의 aspartic acid로의 변화와 methionine의 threonine으로의 변화를 야기했다. cDNA(M32600)와 genomic DNA(D86226)의 염기서열 순서를 비교하였을 때, 한 염기의 차이(C→A)와 genomic DNA의 3'-untranslated region의 6,925~6,984 위치에 60-nucleotide 길이의 5'-agatattgtgttacctgacattgcaatcgcacgtgtgtaacacatgcggtgtgcttt-3'가 더 있는 것을 제외하면 5'-untranslated region과 coding region에 있어서 정확히 동일하다. NR cDNA는 영국의 브리스틀대학교 연구팀이 시금치(품종명 'Hoyo')의 λ-ZAPII genomic library로부터 영국의 시금치 NR cDNA를 probe로 이용하여 분리한 것이다²²⁾. 반면에 genomic DNA는 일본의 연구팀이 현탁 배양한 시금치 (품종명 'Hoyo')의 λ-ZAPII genomic library로부터 영국의 시금치 NR cDNA를 probe로 이용하여 분리하였다²³⁾. 그러나 아미노산을 구성하는 염기서열 중 단 하나의 염기만이 다르게 나타났다. 이번에 분리한 시금치(품종명 'Ace') NR cDNA의 염기서열 결과를 비추어 보면, 이미 발표된 시금치 cDNA의 염기서열 중 1,023번째 A는 C가 잘못 읽혀진 것으로 짐작된다. 시금치 genomic DNA를 NR cDNA를 probe로 하여 Southern blot 하였을 때, single copy로 존재하는 것으로 나타났으므로²³⁾ 유사한 유전자 family가 존재할 가능성은 없다고 판단된다. 물론 Ace cDNA의 염기서열 중 1,573번째의 C(Fig. 1)는 이미 발표된 시금치의 cDNA(M32600)의 1,683번째 T와 달랐다. 따라서 이번에 분리한 시금치 cDNA의 염기서열은 이미 발표된 시금치 cDNA의 염기서열과 단지 두 염기만이 다르게 나타났고 genomic DNA의 coding region의 염기서열과는 한 염기만이 다르게 나타났다. 이러한 차이가 염기서열 분석 과정 중의 오류에 의한 것인지 아니면 시금치 품종의 차이에 의한 것인지 알 수는 없지만 분리한 nitrate reductase cDNA를 다음 단계의 실험인 시금치에서의 과량 발현에 이용하는 데는 문제가 되지 않는다고 판단된다.

본 연구에서 분리한 시금치 nitrate reductase cDNA의 염기서열에서 비롯된 아미노산 순서를 다른 식물들(애기장대풀²⁵⁾, 담배²⁶⁾, 옥수수²⁷⁾, 콩²⁸⁾)의 것과 비교하면 71~82%의 아미노산 동일성을 보이며 그들 사이에도 70~81%의 아미노산 동일성을 보인다. 따라서 식물의 NR는 상당히 높은 수준의 아미노산 동일성을 갖고 있다고 판단된다.

1 gagctatggc ggcgtcagtc gatcgtcaat atcatccggc gccgatgagc ggtgtcgttc
 61 gtaccccaatt tagcaaccac caccgttccg actctccggt tcggaacggg tatactttta
 121 gtaacccgcc ttctcaaat ggcgttgta aacccgggtga aaaaatcaag ctcgtagata
 181 ataataagtaa tagtaataat ggtagcaata ataataataa tcgctatgat agcgatagtg
 241 aagaagatga tgacgaaaaat gagatgaatg tctggaatga gatgatcaaa aaaggtaaca
 301 gcgaattgga gccgtctcc gtcgatagcc gtgatgaagg aacggctgat caatggattg
 361 agaggaaatcc tcaatgatc cgtctcacag ggaagcacc gttcaattcg gacccctcat
 421 tgaccgatt gatgcaccac ggggttctca ccccgttcc gttcattac gttcggaaac
 481 acgggtccagt ccccaacgct aagtgggagg attggaccgt tgaggtgacc gggttagica
 541 aaagaccaat ccggttact atggaccaat tegtcaatga ctccaagc cgtgatttc
 601 cggtagcgtc tctctgcc gcctaaccgga ggaaggaaca gaatatgacg aaacaatcga
 661 tagggtttaa ctgggggtcc gccgccgtgt caactccgt gtggcgcggg gttccacttc
 721 gcgacgtgct taagcgggtg ggggtcatga gttcgttaaa aggggctctc aacgtttgt
 781 ttgagggggc tgaggattta ccaggagggt gcgggtcgaa atatgttaca agtgttaaaa
 841 gggagtggc aatggatccg gcccgtaga ttattctage gtacatgcaa aatggggaga
 901 agttgagccc gg©ctcatggg tatccggttc ggatgatcat acccgggttt attggtggg
 961 ggatggttaa gtggttgaag aggattatg tgactacaac agagtctgat aattattacc
 1021 attacaagga taatagggtc ctccctctc atgttgatgc tgaactgcc aattctgaag
 1081 ctggtggta caacaagag tacatcataa atgagctgaa cgftaacctg gtgataacat
 1141 gcgccgtcca cgaagaaatc ttgcctatca acgacctgac taccacaact ccttacaca
 1201 tgagggggta cgctattct gggggaggaa gaaaagtgc ccgagtgga gtgacaatgg
 1261 atggtggaga cacatgggac atatgtgaat tgaccacca agagagggga agcaaatatg
 1321 gtaaattctg gtgttggtt ttctgtctt tagagtcga agtactagac ttactcggag
 1381 ccaagagat tgggggtccg gcttgggatg aaagcctcaa cacccaact gaaaagctca
 1441 ttggaatgt catgggtatg atgaacaact gctggttcg tttaagacc aactgtgca
 1501 agcctcaca gggagagatc ggtatcgtgt tcgaacacc gacccaacce ggtaacaagt
 1561 cgggggggtg ga©eggccct gaacgccacc tcgagatcic cgattctggc ccaacattga
 1621 agaggacagc atccaccca tcatgaaca ccacctcaa gatgtactca atgacagagg
 1681 tgaagaaaca caaactgct gactcagctt ggattgtagt ccatggaat gtctacaacg
 1741 cgacccggtt cctaaaggat caccgggtg ggtcagacag tatectatc aatgcaggaa
 1801 ccgactgcac cgaagagtc gatcaatc actcagaca ggccaagagg ctctagaag
 1861 attcaggat aggtgagttg atctcaacgg gctacacctc tgactctcc tcgcccgta
 1921 actcagtcca tggcgggtcg gttactccg ggttagccgg gttagccca attacagaag
 1981 cggttccatt acgtaatgt gcttfaaac cacgggttaa gatcccatgc aaactattg
 2041 agaaagtcc actttccat gacgaagaa ggttccgatt cgggttacc tctgaagacc
 2101 aggtgttggg ttacctgta gaaaacaca tcttctttg tgctaattgt gatgataagc
 2161 ttgtatgag agcttatac ccatcaagta ccatgatgt ggttgggtac ttgatctg
 2221 tggttaagg ttactcaag gatgtcacc ctaggctcc taacgggtgg gtgatgtcac
 2281 aacatctaga ctactttct tgggctcga ttgtgacgt gaaagccca ttggccata
 2341 ttgagtatt aggaagggg aatttcacag tccatggaaa gcccaagttt gctaaaagc
 2401 ttgctatgat atcagtggtg accgggatta ccccgatta tcaggtgatg caggcaatac
 2461 tgaagatcc tgaggataag actgagatgc atgttctgta tcaaatcgg acggaggagg
 2521 atatctgct tagagaagag ctgataaat gggctgatga gtttagatg cgggttaaaag
 2581 tatgtactg ttgtgaaaag gcggaggaag ggtgaaata tgataccggg ttatatctg
 2641 agaagatac tagatcac gtgccggcgg ttgggatga tgtgtggca ctacgtgacg
 2701 gtctctcc tatgattcaa ttgcggtc aacctactt ggataagatg ggtttgata
 2761 taaagaaac gttgtgatt tttgaagt actgttacgt tggga

Fig. 1. Nucleotide sequence of spinach nitrate reductase cDNA. Sequences for the translation start (ATG), translation stop (TGA) and internal primer for PCR are underlined. Circled nucleotide (©) is a different one comparing with another published cDNA sequences (GenBank accession number: M32600).

Table 2. Comparison of spinach nitrate reductase cDNA sequences with genomic DNA sequences

Nucleotide and deduced amino acid sequences with numbers ^a	Gene	GenBank Accession Number
1013 tgg agc ccg gat cat ggg tat 1034 - 1673 ggc ggg tgg atg gcc cgt gaa 1694 L S P D H G Y G G W M A R E	cDNA	M32600
2560 tgg agc ccg gct cat ggg tat 2581 - 5757 ggc ggg tgg atg gcc cgt gaa 5778 L S P A H G Y G G W M A R E	Genomic	D86226
903 tgg agc ccg gct cat ggg tat 924 - 1563 ggc ggg tgg acg gcc cgt gaa 1584 L S P A H G Y G G W T A R E	cDNA	this work

^aNumbers are from the respective sequence numbers shown in the GenBank.

이렇게 분리한 NR cDNA를 강력한 프로모터인 CaMV 35S promoter에 연결한 후 시금치에 도입하여 NR 활성을 증대시켜 시금치의 질산염 동화능력을 높여 생육을 증대시키고 아울러 질산염의 식물체내 함량을 낮추어서 안전 건강 시금치를 생산 하도록 하려한다. 이러한 방법이 식물 중 가장 많이 질산염을 축적한다고 알려진¹⁹⁾ 시금치에서 성공하면 다른 채소인 상추, 무, 배추 등에도 적용하여 특별한 가공 없이 섭취하는 안전 건강 채소를 생산하도록 유도할 수 있을 것이다. 물론 nitrate reductase 유전자를 과량 발현하여 질산염의 동화능력 증진을 담배를 모델식물로 하여 시도되었다²⁴⁾. 담배의 nitrate reductase cDNA를 cauliflower mosaic virus 35S promoter와 연결하여 담배에 도입시켜 얻은 여럿의 형질전환 담배가 형질전환하지 않은 담배보다 질산염환원효소의 mRNA량 및 활성이 증가하였다고 보고하였다.

감사의 글

본 연구는 대구대학교 연구비 지원(2001)에 의해 수행된 과제로서 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. <http://www.chosun.com/w21data/html/news/199606/1996060161.html>
2. <http://www.chosun.com/w21data/html/news/199704/199704120045.html>
3. <http://www.chosun.com/w21data/html/news/199306/199306201904.html>
4. Weyer, P. (1999) Should we worry about nitrate in our water? (<http://leopold.iastate.edu/99-3nitrate.html>)
5. Van Maanen, J. M., van Dijk, A., Mulder, K., de Baets, M. H., Menheere, P. C., van der Heide, O., Mertens, P. L. and Kleinjans, J. C. (1994) Consumption of drinking water with high nitrate levels causes hypertrophy of the thyroid. *Toxicology Letters* **72**, 365-374.
6. Arbuckle, T. E., Sherman, G. J., Corey, P. N., Walters, D. and Lo., B. (1988) Water nitrates and CNS birth defects: A population-based case-control study. *Archives of Environmental Health* **43**, 162-167.
7. Van Maanen, J. M., Welle, I. J., Hageman, G., Dallinga, J. W., Mertens, P. L. and Kleinjans, J. C. (1996) Nitrate contamination of drinking water: Relationship with HPRT variant frequency in lymphocyte DNA and urinary excretion of N-nitrosamines. *Environmental Health Perspectives* **104**, 522-528.
8. Kostraba, J. N., Gay, E. C., Rewers, M. and Hamman, R. F. (1992) Nitrate levels in community drinking waters and risk of IDDM: An ecological analysis. *Diabetes Care* **15**, 1505-1508.
9. Morales-Suarez, V. M., Llopis-Gonzalez, A. L. and Tejerizo-Perez, M. L. (1995) Impact of nitrates in drinking water on cancer mortality in Valencia, Spain. *European J. Epidemiology* **11**, 15-21.
10. Morales-Suarez, V. M., Llopis-Gonzalez, A. L., Tejerizo-Perez, M. L. and Ferrandiz-Ferrugud, J. (1993) Concentration of nitrates in drinking water and its relationship with bladder cancer. *J. Environmental Pathology Toxicology & Oncology* **12**, 229-236.
11. Ward, M. H., Cantor, K. P., Blair, A. and Riley, D. (1998) Nitrate from public water supplies and risk of non-Hodgkin's lymphoma in Iowa (abstract). *Epidermiology* **9** (4 suppl), S77.
12. Ward, M. H., Mark, S. D., Cantor, K. P., Weisenburger, D. D., Correa-Vilasenore, A. and Zahm, S. H. (1996) Drinking water nitrate and the risk of non-Hodgkin's lymphoma. *Epidermiology* **7**, 465-471.
13. Weisenburger, D. (1993) Potential health consequences of groundwater contamination of nitrates in Nebraska. *Nebraska Medical Journal* **78**, 7-10.
14. Avery, A. A. (1999) Dispel myths about the dangers of nitrates. The Des Moines Register. June 24, 1999
15. Leclerc, H. P., Vincent, P. and Vanervenue, P. (1991) Nitrates in drinking water and cancer. *Annal. Gastroenteology and Hepatology* **27**, 326-332.
16. Rademacher, J. J., Young, T. B. and Kanarrek, M. S. (1992) Gastric cancer mortality and nitrate levels in Wisconsin drinking water. *Archives of Environmental Health* **47**, 292-294.
17. Rogers, M. A., Vaughan, T. L., Davis, S. and Thomas, D. B. (1995) Consumption of nitrate, nitrite, and nitrosodimethylamine and risk of upper aerodigestive tract cancer. *Cancer Epidermiology, Biomarkers and Prevention* **4**, 29-36.
18. Freedman, D. M., Cantor, K. P., Ward, M. H. and Helszouer, K. J. (1998) Drinking water and non-Hodgkin's lymphoma: A population-based case-control study (abstract). *Epidermiology* **9**(4 suppl), S31.
19. Hill, M. J. (1999) Nitrate toxicity: myth or reality? *British Journal of Nutrition* **81**, 343-344.
20. Ruiz, J. M., Castilla, N. and Romero, L. (2000) Nitrogen metabolism in pepper plants applied with different bioregulators. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2925-2929.
21. Prosser, I. M. and Lazarus, C. M. (1990) Nucleotide sequence of a spinach reductase cDNA. *Plant Mol. Biol.* **15**, 187-190.

22. Eom, J.-S., Park, N.-R., Park, S.-G., Park, S. and Chung, J.-B. (2001) Suppression of nitrate accumulation in vegetables by foliar application of micronutrients. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotech.* **44**, 240-245.
23. Tamura, N., Takahashi, H., Takeba, G., Sato, T. and Nakagawa, H. (1997) The nitrate reductase gene isolated from DNA of cultured spinach cells. *Bioch. Biophys. Acta* **1338**, 151-155.
24. Dorlhac de Borne, F., Vincentz, M. and Vaucheret, H. (1994) Co-suppression of nitrate reductase host genes and transgenes in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* **243**, 613-621.
25. Crawford, N. M., Smith, M., Bellissimo, D. and Davis, R. W. (1988) Sequence and nitrate regulation of the *Arabidopsis thaliana* mRNAs encoding nitrate reductase: A metalloflavoprotein with three functional domains (nitrate assimilation/plant gene expression). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 5006-5010.
26. Calza, R., Hurrner, E., Vincentz, M., Rouze, P., Galangau, F., Vaucheret, H., Cherel, I., Kronenberger, J. and Caboche, M. (1987) Cloning of DNA fragments complementary to tobacco nitrate reductase mRNA and encoding epitopes common to the nitrate reductase from higher plants. *Mol. Gen. Genet.* **209**, 552-562.
27. Katagi, H., Cheng, C.-L. and Conkling, M. A. (1999) Characterization of nitrate reductase genes in maize. (Unpublished, GenBank accession number AF153448)
28. Wu, S., Lu, Q., Kriz, A. L. and Harper, J. E. (1995) Identification of cDNA clones corresponding to two inducible nitrate reductase genes in soybean: analysis in wild-type and nr1 mutant. *Plant Mol. Biol.* **29**, 491-506.

Cloning and Sequence Analysis of Spinach (*Spinacia oleracea* L. cv Ace) Nitrate Reductase cDNA

Sanggyu Park*, Nu-Ri Park and Jong-Bae Chung (Department of Agricultural Chemistry, Daegu University, Gyungsan 712-714, Korea)

Abstract: Suppression of nitrate accumulation in spinach and lettuce through foliar application of chitosan formula containing micronutrients is related with the increase of the nitrate reductase (NR) activity. If NR in spinach were highly expressed to increase the assimilatory activity, nitrate content could be reduced. For this, NR cDNA was cloned from the isolated mRNAs of spinach using reverse transcriptase-PCR. Nucleotide sequence of cloned spinach NR cDNA showed highly deduced amino acid sequence identity (71~82%) with other known plant NR genes. Only two nucleotide-base differences were observed in the cloned NR cDNA compared with that of the published spinach NR cDNA.

Key words: spinach, nitrate reductase, cDNA, RT-PCR

*Corresponding author