

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF ACTINIDIN GENE FROM CHINESE WILD KIWI FRUIT

Nam-Keun Lee and Young-Tae Hahm

Chung Ang University, Department of Biotechnology

Tel. (0334) 670-3064, FAX (0334) 675-0406

A kiwi fruit, called as the Chinese gooseberry, is originated from the Yangtze River Valley of Northern China and Zhejiang Province on the coast of Eastern China. Around 1950, a large mass production began at New Zealand with an improved breeding. Plant origin actinidin from kiwi fruit belongs to the papain family of cysteine proteinase, which in plants includes papain from papaya, bromelain from pineapple, C14 protease from tomato and aleurain from barley. Actinidin is involved in the ripening-related gene family. In this study, protease gene of Chinese wild kiwi fruit was isolated and characterized. 1.2kb PCR-amplified fragment was obtained from the total RNA using RT-PCR. pWACT-1 was obtained by subcloning of amplified fragment into pGEM-T Easy cloning vector and analyzed nucleotide sequence by DNA sequencing and amino acid sequence. In result, high levels of homology between wild kiwi and New Zealand cultured-kiwi was obtained.

### 서 론

중국산 구즈베리 (Chinese gooseberry)라고 불리는 *Actinidia deliciosa*의 종자가 처음 뉴질랜드 땅에 상륙한 것은 20세기초의 일이다. Kiwi fruit는 중국 양자강 유역이 원산지로서 양다래로 불리며, 지속적인 품종 개량 및 연구가 계속되어 1950년경부터 New Zealand에서 대량 생산되기 시작하였다. 1974년 kiwi라는 국제적인 이름을 가지게 되었고, 현재는 미국, 남아프리카, 이탈리아, 칠레, 프랑스, 한국 등 세계 10여 개국에서 재배되고 있으며, 비타민과 다량의 단백질 분해효소를 함유하고 있다. kiwi fruit에서의 단백질 분해효소의 활성은 수확 후, 숙성기간 3주째에 가장 높으며, 껍질보다는 pulp에서 높게 나타난다<sup>1)</sup>. 식물 기원의 단백질 분해효소 중 Kiwi fruit 단백질 분해효소인 actinidin는 cysteine protease로 papain과 구조와 활성이 유사하다. Actinidin은 숙성된 kiwi fruit의 soluble fruit protein 중 가장 풍부하게 있으며, 과실을 숙성시키는데 관여한다<sup>2)</sup>. Kiwi fruit가 가지고 있는 단백질 분해효소는 육류연화제 등 산업적으로 유용하게 사용될 수 있으며, 단백질이 갖는 식

품학적 기능성을 높이는 데에도 이용될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 wild kiwi fruit에서 단백질 분해효소 중 actinidin 유전자를 분리하고자 하였으며, 뉴질랜드에서 재배되는 개량종 kiwi fruit와 유전자를 비교 분석하고자 하였다.

## 재 료 및 방 법

### total RNA isolation

Total RNA를 추출하기 위해서 Guanidine thiocyanate/Cesium chloride (CsCl) method 를 사용하였다<sup>3,4)</sup>.

### first Strand cDNA synthesis

First-strand cDNA의 합성은 first-strand cDNA synthesis kit(MBI,#K1611)를 이용하여 합성 하였다. 합성 조건은 total RNA 1-5 $\mu$ g과 oligo(dT)<sub>18</sub> primer (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ g를 mix하고, M-MuLV reverse transcriptase (20u/ $\mu$ l)를 이용하여 합성하였다.

### amplification of actinidin gene from first-strand cDNA synthesised

Total RNA로부터 synthesised된 first-strand cDNA에서 actinidin gene를 amplification 하기 의해서 NCBI gene data bank에서 actinidin gene sequence data 를 토대로 실행 하였다<sup>5)</sup>. Auto mated PCR machine은 Minicycler<sup>TM</sup>(MJ Research) 에 의해 수행되었다. amplification 조건은 pre-denature 94 $^{\circ}$ C, 3min, denature 94 $^{\circ}$ C, 1min, annealing 55 $^{\circ}$ C, 1min, extention은 72 $^{\circ}$ C, 1min, 30 cycles, final extention 72 $^{\circ}$ C, 10min을 실시하여 singel cDNA를 증폭시켰다.

### subcloning

Cloning vector인 pGEM-T Easy(Promega) 이용하여 subclonig를 실시하였다. ligation 조건은 T-vector와 insert DNA 비율이 1:4가 되도록 하였다. ligation된 mixture는 DH5  $\alpha$  (*supE44,  $\Delta$ lacU169(  $\phi$  80lacZ  $\Delta$ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1) competent cell를 이용하여 transformation를 실시하였다<sup>6)</sup>. LB/amp(50  $\mu$ g/ml)plate로 transformation colony를 선별하였다.*

### nucleotide sequence analysis

Dideoxynucleotide chain termination에 의한 reader<sup>TM</sup> DNA sequencing kit(MBI,#K1811)를 이용하여 Nucleotide sequence를 analysis 하였다. primer는 M13/puc sequencing primer, 22-mer, M13/puc reverse sequencing primer, 24-mer 를 사용하였다.

## 결 과 및 고 찰

### Total RNA isolation

야생종 중국산 kiwi fruit에서 Guanidine thiocyanate/Cesium chloride (CsCl) method에 의해 분리한 total RNA를 formaldehyde agrose gel로 분석한 결과, 28S

와 18S 밴드를 확인하였다 (Data not shown).

### RT-PCR

Total RNA 1-5 $\mu$ g과 oligo(dT)<sub>18</sub> primer (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ g로 First-strand cDNA의 합성을 하였다. 합성된 First-strand cDNA는 본 연구실에서 design 한 actinidin oligonucleotide primer<sup>5)</sup>인 5' -GAGAACA AAAAATGGGTTTGC - 3' (KAP-F1, 20mer) ,5' -TTCCTAAGCGCTGTACCTCT- 3' (KAP-R1, 20mer)으로 55°C, 1min를 annealing condition으로 PCR를 수행한 결과, 1.2kb 증폭된 유전자를 얻었다. Primer의 밑줄친 부분은 design된 oligonucleotide primer내의 시작 codon과 종결 codon을 보여주고 있다.

### Subcloning into pGEM-T Easy vector

1.2kb 증폭된 PCR product는 cloning vector인 pGEM-T Easy (3018bp)에 ligation 시켰다 (pWACT-1). 유전자의 삽입을 확인하고자, pWACT-1를 enzyme *Nco*I과 *Sac*I으로 절단하여 agarose gel에서 분석하여 본 결과, vector size인 3.0kb와 증폭된 PCR product size인 1.2kb로 분리되는 것을 알 수 있었다.

### Nucleotide sequence and amino acid sequence analysis

pWACT-1의 염기서열을 Blast와 DNASIS를 이용하여 뉴질랜드 Kiwi fruit의 actinidin gene<sup>5)</sup>과 similarity를 분석한 결과, 1158bp 중 18bp염기서열을 제외하고는 염기배열이 동일하게 나타났다. 이는 개량의 과정을 거치면서도 이 효소에서는 염기서열의 변화는 적은 것으로 나타났다. 아미노산 서열은 전체 380 amino acid residues에서 281~298번째의 amino acid residues에서 차이가 있음을 알 수 있었다 (Fig. 1). 전체적으로 볼 때 염기서열과 아미노산 서열이 90%이상의 매우 높은 상동성을 보이고 있기 때문에 actinidin gene이라 할 수 있으며, 차후 *E. coli*나 *Basillus* 등에서 발현시켜 그 분해능을 분석하고자 한다.

### 요약

중국산 야생키위로 total RNA를 추출하고 RT-PCR를 실시해서 증폭된 1.2kb fragment를 얻어 pGEM-T Easy에 cloning한 후 염기서열과 아미노산 서열을 비교 분석한 결과 actinidin gene인 것으로 분석되었다.

### 참고문헌

1. 강병선, 이용석, 김병용, 함영태., 한국산 재배품종별 kiwifruit 단백질 분해효소의 특성 및 산업적 이용 가능성에 관한 연구 (1996)., 大山論叢, 4, 125-132.

2. Lin, E., D.J.W. Burns, and R.C. Gardner., Fruit developmental regulation of the kiwi fruit actinidin promoter is conserved in transgenic petunia plants (1993)., *Plant Mol. Biol.* 23, 489-499.
3. Chirgwin, J.M., A.E. Przybyla, R.J. MacDonald, and W.J. Rutter., Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease (1979)., *Biochemistry* 18, 5294.
4. Georg, L., R. McHale, R.C. Gardner, and E. MacRae., Sucrose-phosphate synthase steady-state mRNA increases in ripening kiwifruit (1998)., *Plant Mol. Biol.* 36, 857-869.
5. Snowden, K.C., and R.C. Gardner., Nucleotide sequence of an actinidin genomic clone (1990)., *Nucl. Acid Res.* 18, 6684.
6. Mandel, M., and A. Higa., Calcium dependent bacteriophage DNA infection (1970)., *J. Mol.Biol.* 53, 159.

```

1  MGLPK SFVSM SLLFF STLLI LSLAF NAKNL TQRTN DEVKA →nk
   MGLPK SFVSM SLLFF STLLI LSLAF NAKNL TQRTN DEVKA →wk

41  MYESW LIKYG KSYNS LGEWE RRFEI FKETL RFIDE HNADT
   MYESW LIKYG KSYNS LGEWE RRFEI FKETL RFIDE HNADT

81  NRSYK VGLNQ FADLT DEEFR STYLG FTSGS NKTKV SNRY
   NRSYK VGLNQ FADLT DEEFR STYLR FTSGS NKTKV SNRY

120 EPRFG QVLPS YVDWR SAGAV VDIKS QGECG GCWAF SAIAT
    EPRVG QVLPS YVDWR SAGAV VDIKS QGECG GCWAF SAIAT

160 VEGIN KIVTG VLISL SEQEL IDCGR TQNTR GCNGG YITDGFQ
    VEGIN KIVTG VLISL SEQEL IDCGR TQNTR GCNGG YITDGFQ

202 FIINN GGINT EENYP YTAQD GECNL DLQNE KYVTI DTYENV
    FIINN GGINT EENYP YTAQD GECNV DLQNE KYVTI DTYENV
                                     281
243 PYNNE WALQT AVTYQ PVSVA LDAAG DAFKH YSSGI FTGPC
    PYNNE WALQT AVTYQ PVSVA LDAAG DAFKQ YSSGI FTGAM
                                     298
283 GTAID HAVTI VGYGT  EGGID YWIVK NSWDT TWGEE GYMR
    WNSSR PCCYY CWIWH RGGID YWIVK NSWDT TWGEE GYMR

322 ILRNV GGAGT CGIAT MPSYPV KYNNQ NHPKP YSSLI NPPAFS
    ILRNV GGAGT CGIAT MPSYPF KYNNQ NHPKP YSSLI NPPAFS
                                     380
364 MSKDG PVGVD DGQR YSA
    MSKDG PVGVD DGQR YSA

```

Figure 1. compare amino sequence between chinese wild kiwi and New Zealand cultured-kiwi (nk: New Zealand cultured-kiwi actinidin gene, wk: Chinese wild kiwi pWACT-1 gene)