

水稻의 細胞間隙 物質 抽出

박원목* · 손응룡* · 고영희* · 유영준** · 이용세*

Extraction of Intercellular Material from Rice Leaf Tissue

Park, W. M.*, E. R. Son*, Y. H. Ko*,
Y. J. Yoo**, and Y. S. Lee*

ABSTRACT

The intercellular material was extracted from rice leaf tissue. The quantitative tests of protein and soluble carbohydrate, and activity of peroxidase, showed differences between tissue extract and intercellular material. Also electrophoretic patterns of peroxidase and esterase isozymes were not similar between them. It indicated that the intercellular material which was extracted, was not the mixture of cellular materials.

較하였다.

緒 言

最近에 植物의 病에 對한 抵抗性 機作 및 生理的인 現象을 研究하기 위하여 植物體의 細胞間隙物質에 關한 關心이 높아졌다. 特히, 많은 植物病原菌은 表皮를 侵入한 後 潛伏期間 동안 主로 細胞間隙에서 生存하므로¹⁾ 이곳 物質의 構成成分에 따라 生死가 決定된다. 따라서 植物體의 抵抗性 機作을 밝히기 위하여서는 細胞間隙物質에 對한 研究가 매우 重要하다. 그러나, 植物組織에서 細胞를 破壞시키지 않고 細胞間隙物質만을 選擇的으로 抽出해 내기가 힘이 들었다. 細胞間隙物質만을 抽出하여 研究한 例로는 獨逸 Göttingen의 Wolf 등(personal communication)이 있는데 그는 강남콩의 細胞間隙物質을 抽出하여 콩 불마름病菌(*Xanthomonas phaseoli*)을 培養시켜본 結果 耐病性 品種의 細胞間隙物質에서는 病原菌이 잘 자라지 못한다는 事實을 밝혔다. 本實驗은 벼의 組織에서 細胞間隙物質만을 選擇的으로 抽出해 내는 方法을 研究하기 위하여 實施하였으며, 또한 그렇게 抽出해 낸 物質이 과연 細胞間隙物質만인가 아닌가를 究明하기 위하여 몇 가지 內容性分을 分析하고 酵素의 活性度와 同位酵素 型態(isozyme pattern)을 비

材料 및 方法

1. 植物材料

水稻品種인 密陽 30, 아끼바레, 漢江찰벼 및 太白벼 등, 4品種의 벼씨를 農村振興廳에서 分壤받아 本試驗에 使用하였다. 벼씨를 播種하여 草長이 약 25 cm 정도 자랐을 때 벼잎을 採取하였다. 採取한 잎上端 2cm 部分을 除去한 後 그 밑으로 5cm 길이로 잘라서 細胞間隙物質 및 隣組織 抽出物을 採取하는데 使用하였다.

2. 細胞間隙物質抽出

벼잎 20g을 유리봉에 묶은 後, 蒸溜水로 채워진 vacuum flask에 넣어 完全히 물에 잠기게 한 후 vacuum flask內의 空氣를 뽑아내어 flask內의 氣壓이 280mb로 떨어지도록 하여 5分間 그 狀態를 維持시켜 隣組織 속의 空氣가 다 빠져 나오게 한다. 이때, flask를 가볍게 두드리면 空氣가 빠지는 것을 助長할 수 있다. Vacuum pump를 끄고, flask 두껍을 열어 놓으면 flask內의 氣壓이 正常으로 되돌아 오면서 隣組織의 空氣가 빠져나간 細胞間隙에 蒸溜水가

* 高麗大學校 農科大學, ** 아이오와 州立大學

* College of Agriculture, Korea University, ** Department of Plant Pathology, Iowa State University, Ames 50011, U. S. A.

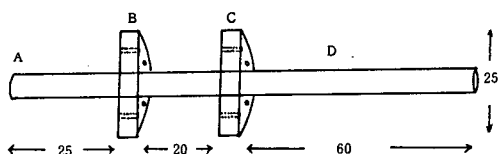


Fig. 1. Cross section of leaf holder (unit: mm)

- A. Base of axle
- B. Supporter of axle
- C. Supporter for leaves
- D. Axile for roll of leaves.

들어 차게 된다.硝子棒으로 試料을 flask에서 건져 내어 filter paper에 펼쳐놓아 葉面에 묻은 蒸溜水를 모두 除去하였다. 물기를 除去한 잎을 本實驗室에서 開發한 leaf holder (Fig. 1)에 비닐과 함께 말아서 50ml centrifuge tube에 넣어 3,000rpm에서 5分間 遠心分離하였다. 이때에 植物細胞間隙으로 들어갔던 蒸溜水가 밖으로 밀려나오며, 細胞間隙에 있는 可溶性物質도 같이 따라 나오게 된다. 이렇게 採取된 物質을 細胞間隙物質이라 하였으며, 이가 細胞間隙物質만인지, 혹은 細胞內 物質도 混合되었는가를 알기 위하여 隣組織 마쇄抽出液과 性分을 分析比較하였다. 隣組織 마쇄抽出液은 葉面 1g을 取하여 少量의 洗滌된 모래와 함께 5ml의 蒸溜水를 유발에 넣어 마쇄한 後, 冷凍高速遠心分離機에서 10,000 × g으로 30分間 回轉시킨 後, 上澄液을 取함으로써 얻었다.

3. 電氣泳凍法

分離 gel (separating gel)은 7% polyacrylamide disc gel을 使用하였다. Gel buffer는 0.1M Tris-HCl (pH 8.9)이었고, Tray buffer는 0.125M Tris-Glycine (pH 8.9)을 使用하였다. 試料은 tube當 200 μl를 使用하였으며, 電流은 3mA/tube를 維持하여 4時間 電氣泳動시켰다.

4. 染色法

電氣泳動이 끝난 後 gel을 꺼내어 觀察하고자 하는 酵素 種類에 따라서 다음과 같이 發色시켰다. 즉 Peroxidase는 gel을 發色液 (Benzidine solution: 0.03% H₂O₂: water = 1:1:4)에 浸漬하여 band가 명확한 때까지 (약 2~3分) 發色시켰다. Benzidine solution은 benzidine 1g, acetic acid 9ml와 蒸溜水 40ml의 溶液이다.⁹⁾

Esterase 發色을 α-naphthylacetate와 Fast Blue

RR Salt를 使用하였다.⁹⁾

5. Peroxidase 活性度 測定

粗酵素液 0.2ml를 酵素分析液 (guaiacol 1ml, 1% H₂O₂ 20ml, 0.1M acetate buffer (pH 5.27, 470 ml) 5ml에 넣어 60秒間 反應시킨 後 500nm에서 O.D를 測定하여 다음 公式으로 specific activity를 計算하였다.⁵⁾

$$\text{Specific activity} = \frac{\Delta O.D \times 100}{\text{protein (mg)}}$$

6. 溶性 炭水化合物과 蛋白質含量 分析

試料抽出液 2ml에 80% phenol을 0.2ml 넣고 잘 혼든 後 濃黃酸 5ml을 세게 밀어 넣고 잘 혼든 후 20分間 常溫에 放置시킨 다음 490 nm에서 optical density를 測定하였다. 標準線은 glucose를 使用하여 구하였다.²⁾ 蛋白質 分析은 Lowry method³⁾에 依하였으며, Bovine Serum Albumin을 使用하여 標準線을 얻었다.

結果 및 考察

1. 細胞間隙水 蒐集量

葉面 20g에서 1회에 약 2ml의 溶液을 蒐集할 수 있었다. 이 抽出液 속에는 細胞間隙物質을 포함하여 葉組織 속에 있는 可溶性物質이 녹아 있다. 이 抽出液 속에 많은 部分이 細胞間隙物質이라고 判斷되었으므로 以下 細胞間隙物質 (Intercellular material) 이라고 하였다. 同一 葉面 20g에서 細胞間隙物質을 10회 抽出하며, 每回 抽出液 속에 含有된 蛋白質과 炭水化合物量을 分析하여 이들 物質 含量 變化를 調査하였다. 또한, 細胞間隙物質을 抽出하기 위하여 10회 洗滌된 葉面을 마쇄하여 細胞內 物質을 抽出하여, 그 속에 들어 있는 蛋白質과 炭水化合物量을 測定하여 細胞內에 있던 이들 物質이 細胞間隙物質 抽出 도중, 어떠한 量的 變化가 있었는지를 調査하였다.

細胞間隙水を 뽑아내기 以前 本來의 組織 1g 속에는 蛋白質 含量이 19.25mg이었다. 1회 細胞間隙水를 抽出한 後의 組織 속에는 12.35mg의 蛋白質이 含有되었었으며, 細胞間隙物質 抽出液 1ml 속에는 0.35mg이 含有되었었다. 10회 洗滌한 細胞間隙物質에는 0.052mg으로 그 量이 많이 減小된 것으로 나타났다. 또한, 炭水化合物量은 原來의 組織 1g 속에는 10.95mg이 있고, 1회 細胞間隙水를 抽出한 後의 組

Table 1. Concentration of protein and soluble carbohydrate in tissue extract and intercellular fluid at 1st and 10th wash.

Parts	Protein		Carbohydrate	
	1st wash	10th wash	1st wash	10th wash
Tissue extract (m g /1 g tissue)	12.35	11.56	8.1	7.56
Intercellular f. (m g /ml sample)	0.35	0.052	0.25	0.04

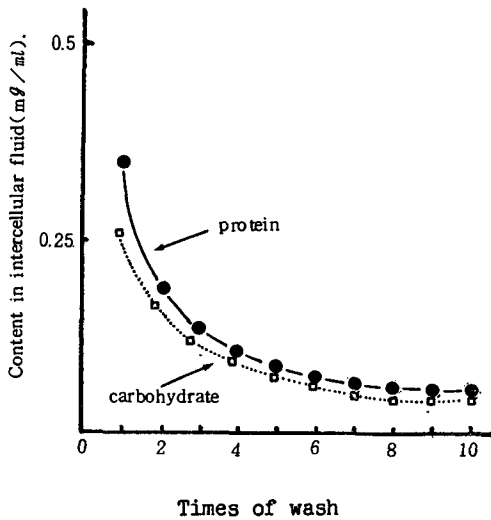


Fig. 2. Content of protein and soluble carbohydrate in intercellular fluid.

織 속에는 8.1 m g , 細胞間隙物質 抽出液 1 ml 속에는 0.25 m g 이 함유되어 있었다(Table 1). 每回 抽出된 細胞間隙物質 속의 蛋白質과 炭水化合物 含量을 測定한 結果 抽出回數를 거듭할 수록 이들의 含量이 점점 減少되어 5回부터는 그 含量이 매우 적었으며, 그 以後에는 10回 洗滌할 동안 每回 減少되는 量도 매우 적었다(Fig. 2). 이와 같은 現象은 5回 洗滌에서 細胞間隙內의 可溶性 物質이 아마 거의 다 씻겨나왔기 때문에 나타나는 現象이 아닌가 생각된다. 細胞間隙物質 抽出 도중 “細胞內의 物質”이 細胞 밖으로 나와 “細胞間隙物質”에 混合되는 것이 아닌가를 알기 위하여 10回나 細胞間隙物質을 抽出한 벼 葉組織을 마쇄하여 “細胞間隙物質”에 含有된 위의 두 成分을 比較한 結果 1回 抽出後 細胞內에서 蛋白質과 炭水化合物量이 各各 12.35 m g 과 8.1 m g 이었고, 10回 抽出後에는 11.56 m g 과 7.56 m g 으로 “細胞內 物質”의

경우는 1回 抽出後와 10回 抽出後의 量이 크게 差異되지 않았으나 細胞間隙物質은 1回 抽出時에는 蛋白質 0.35 m g , 炭水化合物 0.25 m g 이었으나 10回 抽出液에는 그들이 各各 0.052 m g 과 0.04 m g 만이 들어있어 “細胞間隙物質”의 경우는 처음과 마지막의 差異가 많았다(Table 1). 만약 細胞內 物質이 本 抽出 過程中 밖으로 새어 나왔다면 細胞內의 蛋白質과 炭水化合物 含量이 10回 洗滌後에는 매우 작아야 할 것인데 그 量의 差異가 크지 않았다. 따라서, 細胞間隙物質 抽出 중에 이들이 細胞 밖으로 나온 것 같지 않았으며, 더우기 Peroxidase의 活性을 調査하면 이와 같은 現象 즉, 細胞內 物質이 밖으로 流出되지 않은 것을 잘 보여주고 있다. 즉, 1回 洗滌時에는 細胞內와 細胞間隙에서 그의 活性이 各各 1,088 unit와 415 unit 이던 것이 10回 洗滌時에는 1,017 unit와 44 unit 로 細胞間隙에서는 그 活性度가 1/10로 줄어들었다(Table 2). 1回 洗滌時 細胞內物質의 蛋白質, 炭水化合物 및 peroxidase 活性度가 10回 洗滌後의 細胞內物質 중보다 많은 것은 1回 細胞物質 抽出時에는 細胞間隙物質 抽出이 充分치 못하여 細胞間隙에 남아있던 이들 物質이 細胞內物質과 混合되어 抽出된 것으로 結果의 1回 抽出時에 이들 物質含量이 細胞內에 많이 含有된 것으로 나타난 것으로 보인다.

Table 2. Peroxidase activity in tissue extract and intercellular material at 1st and 10th wash (sp. activity).

Parts	1st wash	10th wash
Tissue extract	1,088	1,017
Intercellular material	415	44

2. 同位酵素(Isozyme pattern)

細胞間隙物質과 細胞內物質의 그 構成物質에 差異가 있는가를 알아보기 위하여 電氣泳動法을 利用하여 Peroxidase와 Esterase의 isozyme pattern을 比較하였다.

Peroxidase의 isozyme pattern은 細胞內物質속의 isozyme과 細胞間隙內의 isozyme pattern이 서로 달랐다(Fig. 3). 또한, 細胞間隙物質 採取回數가 많아질 수록 細胞間隙의 Peroxidase band의 強度는 점점 弱하여졌으나 細胞內物質의 peroxidase isozyme band와는 달랐다. 이는 細胞間隙物質에는 細胞內物質이 混合되어 있지 않으며, 細胞間隙物質은 每回 洗

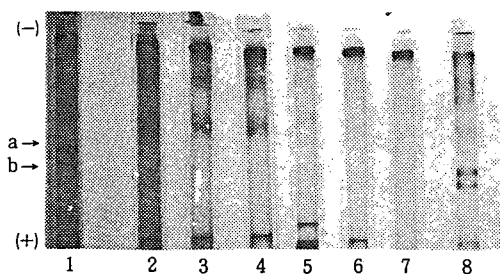


Fig. 3. Isozyme patterns of peroxidase from tissue extract and intercellular fluid.

1 & 8: Tissue extract after 1st & 10th wash.

2,3,4,5,6 & 7: Intercellular fluid at 1st, 2nd, 3rd, 6th, 7th & 9th wash.

a & b: The 2 bands appeared from only tissue extract

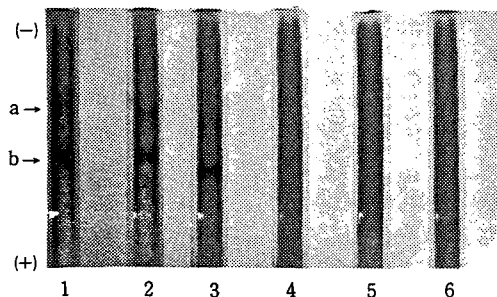


Fig. 4. Isozyme patterns of esterase from tissue extract and intercellular material.

1: Extract from intact tissue.

2 & 3: Tissue extract after 1st and 5th wash,

4, 5 & 6: Intercellular material at 1st, 3rd, & 5th wash,

a & b: Active sites of esterase on polyacrylamide gel. The sites appeared from only tissue extract.

滯으로 抽出되어 나간다는 것을 잘 보여주고 있다. 그 외에 4個品種에서도 같은現象으로 細胞間隙物質의 peroxidase는 細胞內物質의 peroxidase isozyme pattern과 同一하지 않았다.

특히, Esterase를 細胞內物質에서는 band를 볼수 있었으나 細胞間隙物質에서는 전혀 볼 수 없었다. 즉, Esterase는 細胞間隙物質內에는 活性이 없었다(Fig. 4). 만약에 細胞間隙物質抽出過程 중에 細胞內物質이 밖으로 흘러 나왔다면 細胞內物質에서 볼수 있는 酵素들의 Band가 細胞間隙物質에서도 나타나야 하는데 10회나 抽出하는 중 전혀 볼 수가 없었던 것은

아마도 本過程중에 細胞內物質이 밖으로 새어 나오지 않았던 것으로 思料된다.

本研究에 使用된 細胞間隙物質 抽出法은 蒸溜水를 細胞空間에 浸透시켰다가 遠心力으로 抽出했으므로 葉脈 등에 있던 物質도 함께 抽出되었으리라 생각된다. 그러나 本研究의 目的은 細胞內에 있는 物質을 除外한 物質採取에 重點을 두었고, 또한 本文에서 열거한 여러 試驗結果 細胞內物質의 混合이 안된 것 같고, 採取된 物質의 많은 部分이 細胞間隙物質(Intercellular material)일 것으로 思料되어 細胞間隙物質이라고 하였다. 完全히 純粹한 細胞間隙物質만을 選擇的으로 採取할 수 있는 方法의 改良이 必要하리라는 생각된다.

摘 要

1. 本研究는 細胞間隙物質을 抽出코자 實施하였다.
2. Vacuum flask에 물을 넣은 後 벗잎을 물에 잠기게 하고, 280mb로 氣壓을 줄여 葉組織의 細胞間隙內의 空氣를 抽出 後 Vacuum을 끊고 蒸溜水로 細胞間隙을 채운다. 벗잎에 물은 蒸溜水를 除去하고 本研究에서 使用한 leaf holder에 끼워 3,000 rpm으로 5分間 遠心分離하면 細胞間隙物質만 採取할 수 있다.
3. 細胞內物質과 細胞間隙物質의 成分分析 및 Peroxidase와 Esterase의 isozyme pattern을 比較한 結果 內容性分의 含量이 서로 다르고 酵素의 活性과 isozyme pattern이 다르게 나타나 細胞間隙物質 抽出液 속에는 細胞內物質이 混入되어 있지 않음을 證明하였다.

引 用 文 献

1. Dickison, C. H., and J. A. Lucas(1977) Plant pathology and plant pathogens. Blackwell Scientific Publications, London.
2. Dubois, M. K., J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith(1951) A colorimetric method for the determination of sugars. Nature 168:167.
3. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall(1951) Protein measurement with Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
4. Park, W. M., and H. Stegemann(1979) Rice protein patterns. Comparison by various PAGE-

- techniques in slabs. Z. Acker-u. Pflanzenbau 148:446-454.
5. Park, W. M., Y. H. Ko, Y. J. Yoo and J. Y. Lee(1982) The change of peroxidase activity in soybean seed followed by infection with *Cercospora kikuchii*. The Korean Journal of Plant Protection 21:23-26.
6. Son, E. R., W. M. Park and J. I. Lee(1981) Identification of Rape (*Brassica napus L.*) varieties by electrophoretic methods. The memorial papers for the sixtieth birthday of Dr. Jeong Haeng Ree 38-42.