

## 보리品種 區分에 適合한 電氣泳動法과 酵素

손응룡\* · 이용세\* · 윤경은\*\* · 하용웅\*\*\*

# Appropriate Electrophoresis Techniques and Isozymes to Identification of Barley Cultivars

Eung Ryong Son\*, Yong Se Lee\*, Kyung Eun Yoon\*\* and Yong Woong Ha\*\*\*

### ABSTRACT

The buffer soluble proteins were extracted from six cultivars of barley grains and analyzed by various electrophoresis; 7.5% polyacrylamide slab gel, 2-30% polyacrylamide porosity gradient tube gel, isoelectric focusing (pH4-9) and starch gel electrophoresis. The proteins, esterase, acid phosphatase, malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase and leucine aminopeptidase were investigated to find out the best method to differentiate barley cultivars.

The result were that protein and esterase bands in 2-30% polyacrylamide porosity gradient tube gel electrophoresis and protein bands in 7.5% polyacrylamide slab gel electrophoresis showed typical varietal differences. Therefore, those methods were suitable for differentiation of barley cultivars.

It was difficult to differentiate the cultivars by the other methodes and patterns of the other enzymes.

### 緒 言

電氣泳動法에 의한 蛋白質의 pattern은 動·植物과 微生物의 分類 및 遺傳研究 등에 利用되어져왔다.<sup>1,14)</sup> 特히 農作物은 品種이 다르나 形態가 유사한 경우가 많으므로 品種區分에 힘든 경우가 있다.

遺傳의 形質이 다른 動·植物의 電氣泳動에 의한 蛋白質 및 同位酵素의 形態가 서로 다르다는 것을 利用하여 區分 및 遺傳學研究에서 좋은 結果들이 報告되었다.<sup>2,5)</sup>

電氣泳動法에 의한 品種區分은 蛋白質 혹은 酵素의 band數와 위치에 의하여 決定짓는다.

그러나 電氣泳動法이 여러 가지가 있고 電氣泳動法에 따른 蛋白質 및 同位酵素의 分리가 같지 않으므로

分類코겨 하는 對象 植物에 따라 適當한 方法을 使用하여야만이 명확한 結果를 얻을 수 있다. 또한 여러 가지 酵素중에서 品種區分에 適當한 酵素를 선택함이 바람직하다.

品種區分에는 Esterase<sup>2)</sup>, Phosphatase<sup>4)</sup> Malate dehydrogenase<sup>3)</sup> 및 Protein<sup>7)</sup>의 band pattern이 많이 使用되었다.

本 研究에서는 보리品種의 區分에 使用될 가장 適合한 電氣泳動法과 酵素를 究明코져 實施하였다.

### 材料 및 方法

#### 1. 品 種

皮麥 3 品種(알찬보리, 수원 216 號, 조풍보리) 麥酒麥 2 品種(사천 6 號, 향맥) 稈麥 1 品種(히노데하다

\* 고려대학교 농과대학(College of Agriculture, Korea University, Seoul 132, Korea)

\*\* 수원대학 유전공학과(Dept. of Genetic Engineering, Suwon College, Suwon, 170, Korea)

\*\*\* 맥류연구소(Wheat and Barley Research Institute, Suwon, 170, Korea) <1985. 10. 23 接受>

가) 등 6個品種의 種子를 농촌진흥청 맥류연구소에서 분양받아 使用하였다.

## 2. 電氣泳動試料의 採取

효소추출완충용액으로는 0.1 M Tris-HCl(pH 7.5)을 使用하였다. 건조된 종자 2g에 6ml의 완충용액을 첨가하여 유발로 마쇄한 후 고속냉동원심분리기(4℃)에서 12,000×g로 30分間 원심분리시킨 다음 상澄液을 취하여 45,000×g에서 30分間 원심분리하여 상澄液을 電氣泳動試料로 使用하였다.

## 3. 電氣泳動法

電氣泳動法은 gel의 方法과 素材를 달리하여 아래와 같이 4가지 方法을 使用하였다.

가. Homogenous polyacrylamide gel : Desaga system으로 7.5% vertical polyacrylamide slab gel (1.5mm×10cm)을 使用하였다. Gel buffer는 0.1 M Tris-HCl(pH 8.9), Tray buffer는 양극 buffer로 0.12 M Tris-HCl(pH 8.08), 음극 buffer로는 0.04 M Tris-glycine(pH 8.9)를 使用하였다. Sample 은 50μl을 使用하였으며 電流는 90 mA를 維持하여 약 4時間 電氣泳動시켰다.

나. 2-30% polyacrylamide porosity gradient gel : Tube gel (diameter 0.5cm, length 13cm)을 使用하였다. Gel buffer는 0.25 M Tris-HCl(pH 8.9)를 使用하였으며 gel은 獨日 Göttingen의 G. Wolf가 고안한 기구를 사용하여 만들었다.<sup>6)</sup> Tray buffer는 0.05 M Tris-glycine(pH 8.3)을 1:7로 희석 使用하였으며 電流는 처음 100V에서 1時間 泳動시킨 후 200V로 하여 23時間 泳動시켰다. Tube 당 sample 량은 500μg의 protein을 使用하였다.

다. Isoelectric focusing : 6% polyacrylamide 와 1% servalyt(pH 4~9)를 使用하였다. Tube gel (diameter 0.5cm, length 10cm)로 양극 buffer는 0.1% phosphoric acid, 음극 buffer는 Ca(OH)<sub>2</sub>의 포화용액을 使用하였다. sample 량은 500μg의 protein 량을 使用하였고 電流는 처음 100V에서 1時間 泳動한 후 200V에서 3時間 實施하였다.<sup>12)</sup>

라. Starch gel : 12% gel을 使用하였으며 gel buffer는 0.076 M Tris-citrate(pH 8.7)을 使用하였다. Tray buffer는 0.3 M Boric acid-NaOH(pH 8.2)를 使用하였으며 電流는 100V에서 시작하여 borate ion이 약 5cm 이동할 때까지 3時間程度 泳動시켰다.<sup>9)</sup>

## 4. 發色法

Protein은 Coomassie Brilliant Blue R250 용액을 使用 發色시켰으며 acetic acid : methanol : water = 2 : 12 : 28의 탈색액에 탈색시켰다.<sup>12)</sup>

Esterase는 α-naphthyl acetate(5 mg/10ml), fast blue RR salt(5 mg/10 ml)를 0.1 M Tris-HCl(pH 7.2)에 녹인 발색액에 36℃에서 약 30分間 침적시켜 發色시켰다.<sup>3)</sup>

Acid phosphatase는 α-naphthyl phosphate(8 mg/10ml)와 Fast Garnet GBC salt(7mg/10ml)를 0.1 M sodium acetate(pH 4.8) buffer에 녹인 發色液을 使用하였다.<sup>3)</sup>

Malate dehydrogenase는 100ml의 0.1 M Tris-HCl(pH 7.0) buffer에 20mg NADP, 20mg NBT, 3mg, PMS, 1g DL malic acid를 첨가한 發色液에 36℃에서 약 30分間 發色시켰다.<sup>9)</sup>

Glutamate dehydrogenase는 100ml의 0.1 M Tris-HCl(pH 7.0) buffer에 10mg NAD, 20mg NBT, 3mg PMS, 0.45g sodium glutamate를 첨가한 발색액을 使用하였다.<sup>4)</sup>

Leucine aminopeptidase는 100ml의 0.05 M Tris-malente(pH 5.4) buffer에 15mg Fast Black K salt와 20mg L-leucylamide HCl을 첨가한 發色液에 發色시켰다.<sup>4)</sup>

## 結果 및 考察

電氣泳動法에 의한 蛋白質 및 同位酵素의 pattern은 한 品種內에서도 組織部位別로 다르며<sup>10)</sup> 環境要因의 영향을 받을 수 있기 때문에 電氣泳動法을 使用하여 品種을 區分할 때 試料의 선택이 重要하다.

따라서 環境條件이 同一하게 주어진 條件下의 個體를 使用하는 것이 원칙이다. 本 實驗에서는 건조 종자를 使用하였다. 이는 모든 實驗種자가 生理적으로 同一한 條件 즉 休止狀態에 있었으므로 實驗結果 나타나는 pattern의 差異는 遺傳的인 變異로 간주하였다. 各 品種의 種子는 농촌진흥청 맥류연구소에서 同一한 年度(1984年)에 수확하였다.

7.5% polyacrylamide homogenous slab gel을 使用한 蛋白質의 pattern은 모든 品種이 4個의 major band가 R.f 0.16, 0.35, 0.52와 0.65의 위치에 분포되어 있으므로 類似한 形態를 보이고 있으나 minor band에서 特定 band의 有·無에 의해 各 品種을 區分할 수 있었다(Fig. 1).

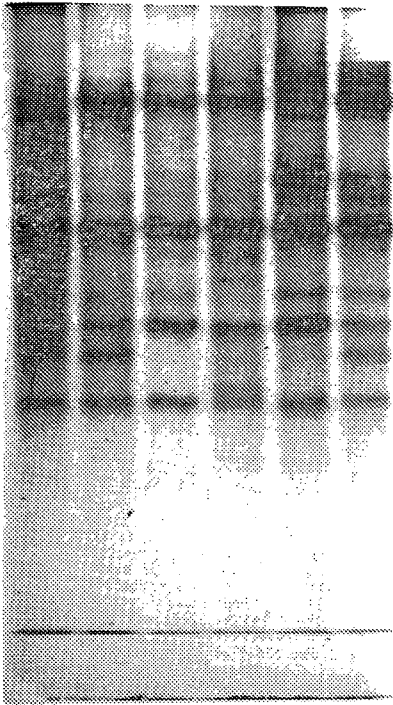


Fig. 1. Buffer soluble proteins of dry barley kernels: Patterns in 7.5% polyacrylamide slab gel. 1) Sachun #6, 2) Hyangmaeg, 3) Alchanbori, 4) Hinodehadaka 5) Suwon #216, 6) Jopungbori.

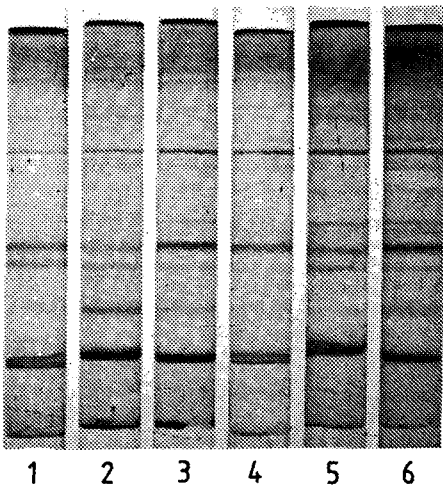


Fig. 2. Buffer soluble proteins of dry barley kernels: Patterns in polyacrylamide gel isoelectric focusing (pH4.9). 1) Sachun #6, 2) Hyangmaeg, 3) Alchanbori, 4) Hinodehadaka, 5) Suwon #216, 6) Jopungbori.



Fig. 3. Buffer soluble proteins of dry barley kernels: Patterns in polyacrylamide porosity gradient (2-30%) tube gel 1) Sachun #6, 2) Hyangmaeg, 3) Alchanbori, 4) Hinodehadaka, 5) Suwon #216, 6) Jopungbori.

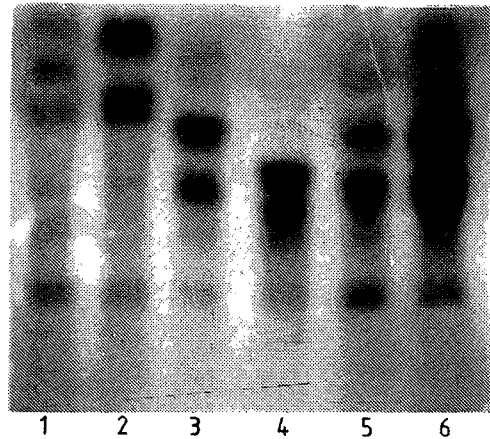


Fig. 4. Esterase isozyme patterns of barley kernels in starch gel. 1) Sachun #6, 2) Hyangmaeg, 3) Alchanbori, 4) Hinodehadaka, 5) Suwon #216, 6) Jopungbori.

Isoelectricfocusing에 의한 蛋白質 pattern은 미세한 minor band까지 관찰되었으나 모든品種이 거의同一한形態를 보이고 특히 수원 216호와 알찬보리는 서로同一한形態를 보이므로品種分類에利用하기에는 적합하지 않았다(Fig. 2).

2~30% polyacrylamide gradient gel을 사용한結果 蛋白質 pattern이 가장 명확히 보였으며各品種間 band의數 및 位置에 差異가 뚜렷하므로 特定 band에 의해各品種의特性을 잘 나타내기는 하였으나 너무 많은 미세한 band까지 보이므로 각각의

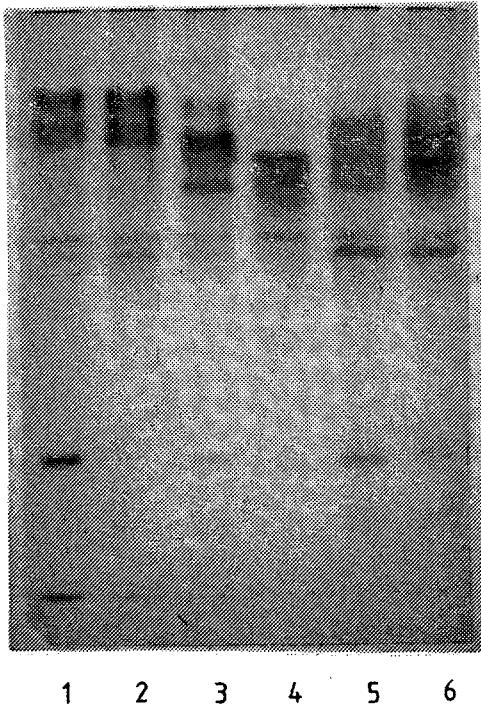


Fig. 5. Esterase isozyme patterns of dry barley kernels in 7.5% polyacrylamide slab gel. 1) Sachun #6, 2) Hyangmaeg, 3) Alchanbiri, 4) Hinodehadaka, 5) Suwon #216, 6) Jopungbori.

band의 위치를 比較하는 데는 어려움이 따른다(Fig. 3).

Starch gel에 의한 esterase의 同位酵素 pattern을 관찰하였던바 band의 숫자가 4~6개 밖에 분리되지 않았으며 더욱이 band의 形態가 명확치 않았다. 또한 major band에 의한 品種의 區別도 할 수 없었다. 즉 수원 216호와 조풍보리, 알찬보리 등은 서로 同一한 形態를 보여 品種區分에 利用하기에는 적합하지 않았다(Fig. 4).

7.5% polyacrylamide slab gel에서는 약 6개의 esterase 同位酵素 band를 볼 수 있었으나 조풍보리와 알찬보리는 同一한 pattern을 보여 두 品種의 區分이 되지 않았다. 따라서 homogenous gel은 좋은 方法이라 할 수 없었다(Fig. 5).

Isoelectric focusing에 의한 esterase의 同位酵素 pattern은 명확히 분리된 band를 보였으나 사천 6호와 향맥 또한 수원 216호와 알찬보리, 조풍보리에서 同一한 pattern을 보이는 것이 있어 品種을 區別할 수 없었으므로 적합하지 않았다(Fig. 6).

gradient gel에서의 esterase 同位酵素 pattern은

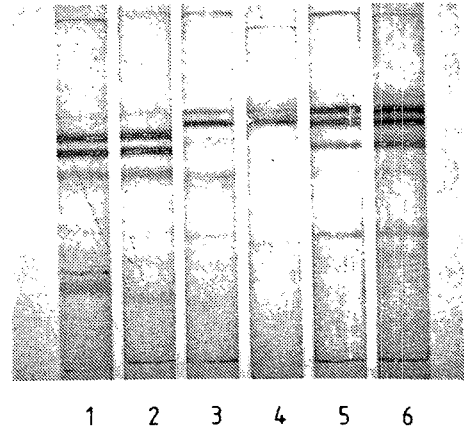


Fig. 6. Esterase isozyme patterns of dry barley kernels in polyacrylamide gel isoelectric focusing (pH4-9). 1) Sachun #6, 2) Hyangmaeg, 3) Alchanbiri, 4) Hinodehadaka, 5) Suwon #216, 6) Jopungbori.

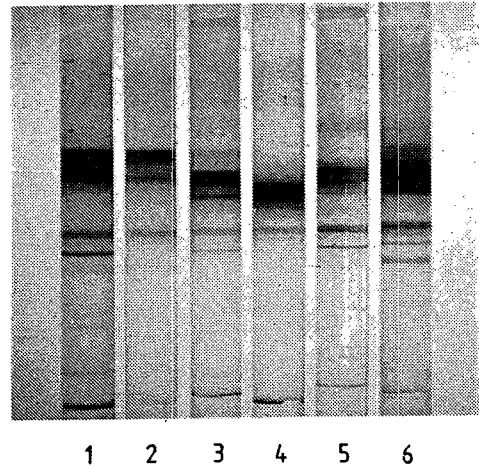


Fig. 7. Esterase isozyme patterns of dry barley kernels in polyacrylamide porosity gradients (2-30%) tube gel. 1) Sachun #6, 2) Hyangmaeg, 3) Alchanbiri, 4) Hinodehadaka, 5) Suwon #216, 6) Jopungbori.

band의 분리가 명확하였고 숫자도 가장 많게 분리되었다. 또한 各 品種間의 差異를 特定 band의 有·無 및 位置에 의해 區別 可能하여 다른 方法에서는 거의 同一한 pattern을 보였던 사천 6호와 향맥 및 수원 216호, 조풍보리, 알찬보리도 區分할 수 있었다(Fig. 7).

Phosphatase의 同位酵素 pattern은 gradient gel과 7.5% homogenous slab gel에서 모두 各 品種이

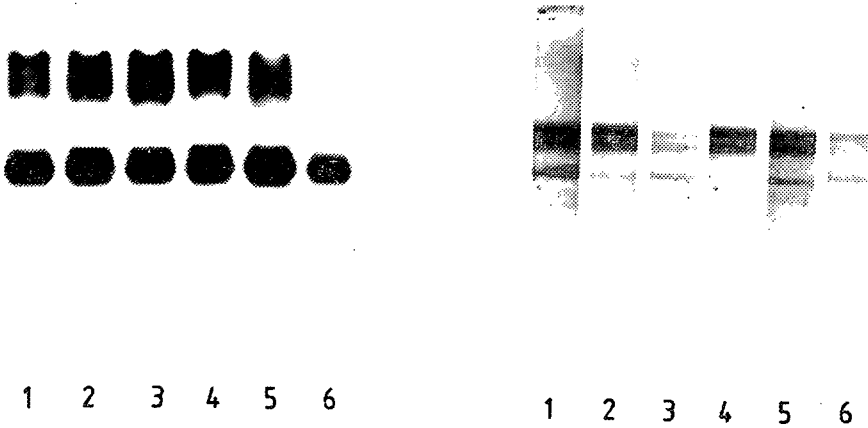


Fig. 8. Acid phosphatase isozyme patterns of dry barley kernels in 7.5% polyacrylamide slab gel(left) and polyacrylamide porosity gradient (2-30%) tube gel(right). 1) Sachun #6, 2) Hynagmaeg, 3) Alchanbori, 4) Hinodehadaka, 5) Suwon #216, 6) Jopungbori.

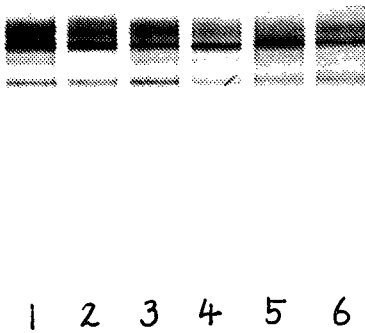


Fig. 9. Malate dehydrogenase isozyme patterns of dry barley kernel in polyacrylamide porosity gradient (2-30%) tube gel. 1) Sachun #6, 2) Hyangmaeg, 3) Alchanbori, 4) Hino-dehadaka, 5) Suwon #216, 6) Jopungbori.

同一한 pattern을 가지고 있어品種 區分에 적합한 酵素라 할 수 없었으며 malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase 및 leucine aminopeptidase도 모든 品種히 同一한 pattern을 보여 品種의 區分에 利用하기에는 적합하지 않았다(Fig. 8, 9, 10).

6가지 보리品種의 種子에서 抽出한 同一한 試料를 여러 가지 電氣泳動法에서의 pattern을 比較 하였던

바 方法에 따라 서로 다른 形態를 보였다.

Starch gel과 7.5% homogenous slab gel은 tube gel을 사용한 gradient gel과 Isoelectricfocusing보다 同一한 gel 상에서 분리된 形態를 볼 수 있기 때문에 各 品種을 比較하기에 용이하였으며 發色時 使用하는 基質이 적게 使用되어 경제적인 이점을 가지고 있으나 분리가 명확히 되지 않았다.

Isoelectricfocusing에 의한 蛋白質과 esterase의 同位酵素의 band는 명확히 분리되지만 各 品種間 band의 위치 比較가 어려웠다. 즉 gel이 각각 분리되어 있으므로 band의 위치 決定時 놓는 위치에 따라 달라질 수도 있었다. 또한 두 品種이 同一한 pattern을 보이는 것이 있어 品種區分에 利用하기에 적합하지 않았다.

本 實驗結果 보리品種區分에 가장 적합한 方法은 gradient gel을 使用하여 蛋白質形態와 esterase 同位酵素 形態를 관찰하는 것이었으며 다음으로는 7.5% homogenous slab gel로서 蛋白質形態를 比較하는 것이었다.

이러한 結果는 감자에서 Stegemann<sup>11)</sup>이 報告한 것과 벼 品種間 實驗을 통해 Park<sup>7)</sup> 등이 電氣泳動法과 酵素의 선택이 電氣泳動法을 利用한 品種의 區分에 매우 중요하다는 것과 일치한다. 즉 실험대상 作物의 種類 및 目的에 맞는 電氣泳動法과 酵素가 선택되어야 한다.

보리品種을 電氣泳動法에 의해 區分하는데는 gradient gel을 使用하여 蛋白質과 esterase의 同位酵素

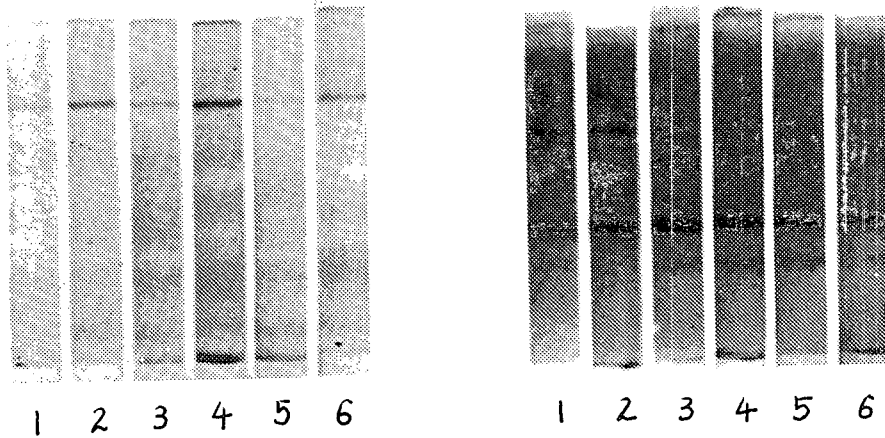


Fig. 10. Glutamate dehydrogenase(left) and leucine aminopeptidase (right) isozyme patterns of dry barley kernels in polyacrylamide porosity gradient (2-30%) tube gel. 1) Sachun #6, 2) Hyangmaeg, 3) Alchanbori, 4) Hinodehadaica, 5) Suwon #216, 6) Jopungbori.

pattern을 比較하는 것이 가장 바람직하다.

### 摘 要

本實驗은 보리品種의 區分에 가장 적합한 電氣泳動法과 酵素를 究明하고자 6個 보리品種(알찬보리, 수원 216호, 조풍보리, 사천 6호, 향맥, 히노데하다가)의 種實 蛋白質을 7.5% polyacrylamide slab gel, 2-30% polyacrylamide porosity gradient tube gel, isoelectricfocusing (pH 4-9)과 starch gel을 使用 電氣泳動後 protein band pattern과 esterase, acid phosphatase, malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase 및 leucine aminopeptidase의 同位酵素 pattern을 관찰하였던 結果는 다음과 같았다.

1. 7.5% polyacrylamide slab gel에서 단백질 pattern과 2-30% polyacrylamide porosity gradient tube gel에서의 단백질과 esterase의 band pattern이 品種間 뚜렷한 差異를 보여 보리品種區分에 가장 적합하였다.

2. Acid phosphatase, malate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase 및 leucine aminopeptidase 등의 同位酵素 pattern은 모든 實驗한 品種이 同一한 형태를 보여 品種區分에 利用하기에는 적합하지 않았다.

### REFERENCES

1. Baptist, J. N. and C. J. Kurtzman. 1976. Comparative enzyme pattern in *Cryptococcus laurentii* and its taxonomic varieties. *Mycologia* 68: 1195-1203.
2. Carlos, F. Q. 1980. Identification of Alfalfa plants by enzyme electrophoresis. *Crop Science* 20: 262-264.
3. Gebriel, O. 1971. Locating enzymes on gels. In *Methods in Enzymology XXII*. Academic press, New York.
4. Green, R. L., A. E. Dudeck, L. C. Hannah and R. L. Smith. 1981. Isoenzyme polymorphism in St. Augustinegrass. *Crop Science* 21: 778-782.
5. Hirofumi, U. and G. Wildman. 1978. Evolution of fraction I protein in relation to origin of amphidiploid *Brassica* species of the Cruciferae. *The journal of Heredity* 69: 299-303.
6. Hwang, B. K., G. Wolf and R. Heitefuss. 1982. Soluble proteins and multiple forms of esterases in leaf tissue at first and flag leaf stages of spring barley plants in relation to their powdery mildew (*Erysiphe Graminis* f. sp. *hordei*). *Physiological Plant Pathology* 21: 367-372.
7. Park, W. M. and H. Stegemann. 1979. Rice protein patterns. Comparison by various PAGE-techniques in slabs. *Z. Acker und Pflanzenbau*. 148: 446-454.
8. Poulick, M. D. 1957. Starch gel electrophoresis

- in a discontinuous system of buffers. Nature 180: 1477-1478.
9. Scandalios, J. G. 1969. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. A review. Biochem. Genet. 3: 37-79.
  10. Son, E. R., W. M. Park, Y. S. Lee, S. D. Ahn, and S. R. Chun. 1984. Comparison of isozyme patterns among varieties of Ginseng, *Panax* spp. Kor. J. of Crop Sci. 29: 350-355.
  11. Stegemann, H. 1979. Characterization of proteins from Potatoes as the "Index of European varieties". In: Hawkes, J. G., Lester, R. N., Skelding, A. D. (Eds), The biology and taxonomy of the Solanaceae. Linn. Soc. Symp. Ser. No. 7, 279-284. held July 1976.
  12. Stegemann, H. 1979. Electrophoresis and focusing in slabs using the Panta-Phor apparatus for analytical and preparative separations in gels (polyacrylamide, polyacrylamide/agarose, starch, sephadex etc.) Inst. Biochemi, Messeweg 11, D-3300 Braunschweig (W-Germany)
  13. Van Geyt, J. P. C. F. and E. Smed. 1984. Polymorphism of some marker enzymes of the Sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) Investigated by polyacrylamide gel electrophoresis and starch gel electrophoresis Z. Pflanzenzuchtg. 92: 295-308.
  14. Villamil, G. B., R. W. Duell, D. E. Faizbrothers and J. Sadowski. 1982. Isoelectric focusing of esterases for Fine Fescue identification. Crop Science 22:786-793.