

인삼 종자의 저장단백질에 관한 면역 세포화학적 연구

— Tris 완충액 가용성 단백질 —

김 우 갑

An Immunocytochemical Study on Storage Proteins of Ginseng Seed

— Tris Buffer Soluble Protein —

Kim, Woo Kap

(Received November 12, 1989)

Abstract

Buffer soluble storage proteins of ginseng seed have been localized by electron microscopy using post-embedding immunocytochemical gold labelling technique. Major components of the storage proteins were revealed to be storage protein-1(SP₁, MW 160,000) and storage protein-2(SP₂, MW 70,000). Both of the storage proteins are glycoproteins.

Anti-SP₁ and anti-SP₂ from rabbit, against SP₁ and SP₂, respectively, reacted on sections of ginseng endosperm tissue embedded in Spurr's epoxy resin. The rabbit antibodies were visualized indirectly by reaction with protein A labelled with colloidal gold. Both storage proteins were found to be accumulated together in the same protein bodies, but their relative contents are not equal.

서 론

종자의 저장 단백질은 용해도에 따라서 albumin, globulin 및 glutelin 등으로 구분되어지고 있으며 이들 각각의 성분비는 종에 따라서 다르게 알려지고 있다(Osborn, 1924). 이러한 저장단백질은 발아시 배 성장에 필요한 에너지원으로 사용되고 있으며 이들의 분해에 관여하는 protease는 작용하는 기질에 따라서 세가지 종류로 구분되어

지고 있다(Bewley와 Black, 1978).

저장단백질의 세포내 축적부위인 구형의 protein body는 단백질 기질내의 함유물의 유무 및 성상에 따라 5종류로 구분되어지고 있다(Rost, 1972 ; Dwart와 Ashford, 1982). 이들의 미세구조 및 성분에 관한 연구는 전자현미경, 전기영동법, 크로마토그래프법 등을 이용하여 다양하게 이루어져 왔으나 (Tulley와 Beevers, 1976 ; Kim들, 1979 ; Kim, 1984 ; Larkins와 Hurkman, 1978 ;

고려대학교 이과대학 생물학과

Dept. of Biology, College of Science, Korea University

본 연구는 1987년도 문교부 연구 지원비에 의해 수행되었음.

Nielsen과 Liener, 1984) 서로 다른 종류의 단백질이 배유세포내에서 혹은 다양한 종류의 protein body내에서 어떠한 분포를 하는지는 잘 알려져있지 않다.

특히 식물에서 면역 세포화학적 방법을 이용한 연구는 Craig들(1980), Craig와 Millerd(1981), Nieden들(1982), Craig와 Miller(1984) 등이 완두, 잠두 등 콩과식물의 종자내의 저장단백질의 양상, Doman과 Trelease(1985)에 의한 목화종자에서 isocitrate lyase의 조직내 존재양상, Tomura들(1985)의 *Vigna mungo* 유식물자엽내 α -amylase의 분포 양상에 대한 연구 등 일부가 있을 뿐이다.

따라서 본 연구는 인삼종자의 배유세포에서 저장단백질을 분리하여 그 특성을 규명하고 서로 다른 종류의 저장단백질의 조직내 분포양상을 밝히고자 조직내의 특정한 단백질만을 선택적으로 확인할 수 있는 면역 세포화학적 방법을 사용하여 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 연구에 사용된 재료는 한국인삼연초연구소 실험포장에서 재배하고 있는 3-5년생 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)의 홍숙종자를 제공받아서 과피를 제거한 홍숙종자, 과피를 제거하고 후숙과정을 거친 후 개갑이 완료된 종자, 발아시킨 종자 등으로 구분하여 각각 재료로 사용하였다.

2. 실험방법

1) 단백질 추출

종피를 제거한 종자를 0.1M Tris-HCl 완충액(pH 7.5)에 1시간 정도 담가둔 후 수분을 제거하고 액체질소를 사용하여 막사사발에서 곱게 분말로 만든 다음, 동일한 완충액을 넣고 4°C에서 자석교반기로 2시간동안 단백질을 용출시켰다.

이 시료를 4°C 원심분리기에서 12,000rpm

으로 20분간 원심분리한 후 상층액을 4점의 면포가아제로 걸러 지방을 제거하여 단백질 시료로 사용하였다.

2) 전기영동적 분석 및 저장단백질의 순수분리

전기영동은 Davis(1964) 법에 의하여 2.5% stacking 겔과 6% running 겔(tube size, 100mm×5mm)을 사용하였고, tracking dye로는 0.01% bromphenol blue 수용액을 사용하였다. 시료는 겔당 10 μ l씩 적용하였으며, 전류는 각 겔당 3mA가 되도록 하였고, 전기영동이 끝난 후 0.25% Coomassie brilliant blue R 250으로 염색한 후 7% 초산이 함유된 50% 메탄올로 탈색시켰으며, 완전히 탈색시킨 겔을 7.5% 초산에 고정한 후 관찰 및 분석하였다.

특정 단백질을 순수 분리하기 위하여는 겔 슬라이스 법을 사용하였다. 전기영동이 끝난 겔을 Coomassie brilliant blue 용액으로 약하게 염색한 후 해당부위(SP₁, SP₂)만을 각각 날카로운 면도날로 잘라내었고, 잘라낸 겔을 모아 electro-eluter로 단백질만을 추출한 후 동결건조기로 농축하고, 다시 0.5M Tris-glycine 완충액(pH 8.3)으로 투석시켰다. 이러한 과정을 3회이상 반복하여 정제된 저장단백질 SP₁과 SP₂를 얻었다. 각각의 단백질이 순수하게 분리되었는지를 확인하기 위하여 단백질 추출액과 순수분리한 단백질을 동시에 전기영동을 실시하여 비교 확인하였다.

3) 물리화학적 성질분석

(1) 분자량 측정

저장단백질 SP₁과 SP₂의 분자량은 Hedrick과 Smith(1968)의 방법에 따라 결정하였다. 5%, 6%, 7%, 8% 및 9%의 상이한 겔 퍼센트에 따라서 각각을 전기영동한 후 시료의 이동거리(R_f)에 대한 100×log(R_f×100) 값을 취하여 그 직선의 기울기를 조사하였다. 단백질 표준품은 모두 Sigma사 제품으로 carbonic anhydrase(29,000), chicken egg

albumin(45,000), bovine serum albumin monomer(66,000), bovine serum albumin dimer(132,000), urease dimer(240,000) 및 urease tetramer(480,000) 등을 사용하였다.

(2) 구성성분 조사

저장단백질에 결합되어 있는 탄수화물, 인 및 지질의 존재여부를 조사하기 위하여 단백질을 추출액을 전기영동하여 0.25% Coomassie brilliant blue로 저장단백질 밴드를 확인한 후 탄수화물의 존재는 Caldwell과 Pigmann(1965)의 PAS 염색법으로, 지질은 Chippendale와 Beck(1966)의 Sudan black B염색법으로, 그리고 인은 Cutting과 Roth(1973)의 Methyl green 염색법으로 확인하였다.

4) 면역학적 방법

순수분리된 저장단백질 SP₁과 SP₂를 항원으로 하여 단백질 시료 0.5ml에 Freund's complete adjuvant(Sigma Chemical Co.) 0.5ml씩을 혼합하여 각각 다른 토끼에 피하 주사하였다. 첫 주에는 격일로 주사하였으며 3회 주사 후 1주일 뒤에 4번째 주사하였고, 2주후 Freund's incomplete adjuvant(Sigma Chemical Co.) 0.5ml와 동량의 단백질 시료를 혼합하여 주사하였다. 최종주사 1주일 후 혈액을 채취하여 10,000rpm에서 10분간 원심분리시켜 상층액을 항체로 사용하였다. 이 상층액으로 Ouchterlony(1949)의 방법을 변형시켜 면역확산을 실시하였다. 즉 0.01M 인산완충액(pH 7.0)에 녹인 1% 아가로즈젤을 유리판에 3mm 두께로 부어 균한 후 실온에서 3일간 항원항체반응을 진행시켰으며 침강곡선이 형성된 젤을 사진촬영하였고 이렇게 하여 항체형성을 확인하였다.

5) 전자현미경적 방법

공시 재료를 1.5% paraformaldehyde-3% glutaraldehyde에 4°C에서 2시간 단일고정한 후 50mM K-phosphate 완충액(pH 6.8)

으로 20분씩 3회 세척하고 알코올 농도 상승순으로 무수 알코올까지 완전 탈수하여 propylene oxide로 치환하고 Spurr's low viscosity embedding medium(Spurr, 1969)에 포매하였다. 포매된 시료를 LKB-V형 ultramicrotome으로 은색절편을 제작하여 200 mesh nickel grid에 부착하였다.

6) Immunocytochemical labelling

절편을 부착한 grid를 NaN₃, BSA가 포함된 10mM PBS(pH 7.4)에 리본이 아래쪽으로 향하도록 띄운다음 항체와 30분 동안 반응시키고 PBS-BSA를 사용하여 세척한 후 protein A-gold complex 용액에 약 10-15분 반응시켰다. 반응이 끝난 리본을 PBS에 담가둔 후 증류수로 세척하고 uranyl acetate로 단일염색하여 JEM 100CX-II 전자현미경(80kV)으로 관찰하였다.

또한 대조군으로서는 NaN₃, BSA가 포함된 PBS에 전처리시킨 후 항체와의 반응을 실시하지 않고 이후의 과정은 위의 방법과 동일하게 시행하여 전자현미경으로 관찰하고 항체와 반응시킨 재료와 비교분석하였다.

결 과

1. 저장단백질의 순수분리

인삼종자의 배유세포에 protein body 형태로 존재하는 저장단백질 중 Tris 완충액 가용성 단백질을 추출하여 전기영동법에 의하여 분석해 본 결과 총 10개의 밴드가 확인되었으나 양적으로 다른 단백질에 비하여 월등하게 많으며 젤 상단부에 위치하는 2개의 밴드를 편의상 저장단백질-1(SP₁)과 저장단백질-2(SP₂)로 표시하였다. 이 두가지 단백질을 각각 젤스라이스 법으로 분리하여 추출한 후 다시 전기영동을 실시하여 확인한 결과 SP₁과 SP₂로 각각 잘 분리되었다.

Tris 완충액 가용성 단백질 전체를 전기영동했을 때와 동일한 이동도를 가짐으로써 그

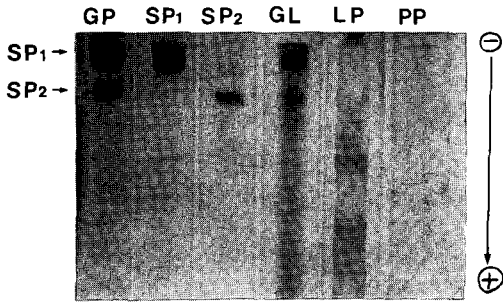


Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of buffer soluble storage proteins in the endosperm of ginseng seed. GP, general protein; SP₁, storage protein-1; SP₂, storage protein-2; GL, glycoprotein; LP, lipoprotein; PP, phosphoprotein.

분리도를 재확인할 수 있었으며 이러한 과정을 반복한 후 electro-eluter로 추출하여 순수 분리된 SP₁과 SP₂를 항원으로 하여 항체제조에 사용하였다.

2. 저장단백질의 물리화학적 성질

SP₁과 SP₂의 구성성분을 밝히고자 추출된 단백질을 전기영동한 후 젤을 PAS 반응과 Sudan black B 반응 및 Methyl green 염색 등을 실시하여 SP₁과 SP₂에 결합된 탄수화물, 지질 및 인의 구성성분을 조사한 결과 SP₁과 SP₂ 모두 PAS 반응에만 양성을 나타냄으로써(Fig. 1) 이들 저장단백질은 당단백질로 존재함을 보여 주었다.

또한 이들 SP₁과 SP₂의 분자량을 Hedrick과 Smith(1968)의 방법으로 추정한 결과 SP₁이 160,000 dalton이었고, SP₂가 70,000 dalton으로 나타났다(Fig. 2).

3. 면역세포화학적 결과

젤스라이스 방법에 의해 순수분리한 SP₁과 SP₂를 각각 항원으로 사용하여 서로 다른 토끼에 피하주사한 후 얻은 항체와 순수 분리된 SP₁ 및 SP₂, 그리고 단백질 추출액을 Ouchterlony(1949)의 이중면역확산법을 사용하여 항원항체반응을 시켜본 결과 SP₁(Fig. 3-A)과 SP₂(Fig. 3-B) 모두 하나의 침강곡

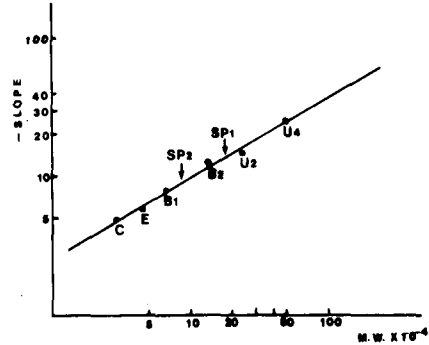


Fig. 2. Estimation of molecular weight for SP-1 and SP-2 under native conditions according to the method of Hedrick and Smith(1968) using standard proteins of known molecular weight. C, Carbonic anhydrase, 29,000; E, Chicken egg albumin, 45,000; B₁, Bovine serum albumin monomer, 66,000; B₂, Bovine serum albumin dimer, 132,000; U₂, Urease dimer, 240,000; U₄, Urease tetramer, 480,000

선만 나타남으로써 면역학적으로 동질성을 보이고 있었다.

NaN₃, BSA가 포함된 10mM PBS(pH 7.4)에 전처리한 후 항체와 반응시키지 않고 protein A-gold complex에 처리한 대조군에서는(Figs. 4-6) protein body 내에 금입자를 전혀 관찰할 수 없었다. 간혹 비특이성 결합이 관찰되긴 하였으나 그 수는 극히 미약하여 세포당 1-2개 정도였으며 특히 그러한 금입자는 spherosome에서 관찰된 것이 대부분이었다.

반면에 SP₁에 대한 항체와 반응시킨 후 protein A-gold에 표지시킨 것은(Figs. 7-9) protein body 전면에 골고루 분포하여 금입자가 관찰되었다. 그러나 protein body에 함유된 globoid내에는 전혀 반응이 일어나지 않았고(Fig. 8) 간혹 protein body의 일부분에 다수의 금입자가 밀집되어 나타나기도 하였으나(Fig. 7) 전반적으로 protein body의 가장자리와 중심부위 전체에 산재하여

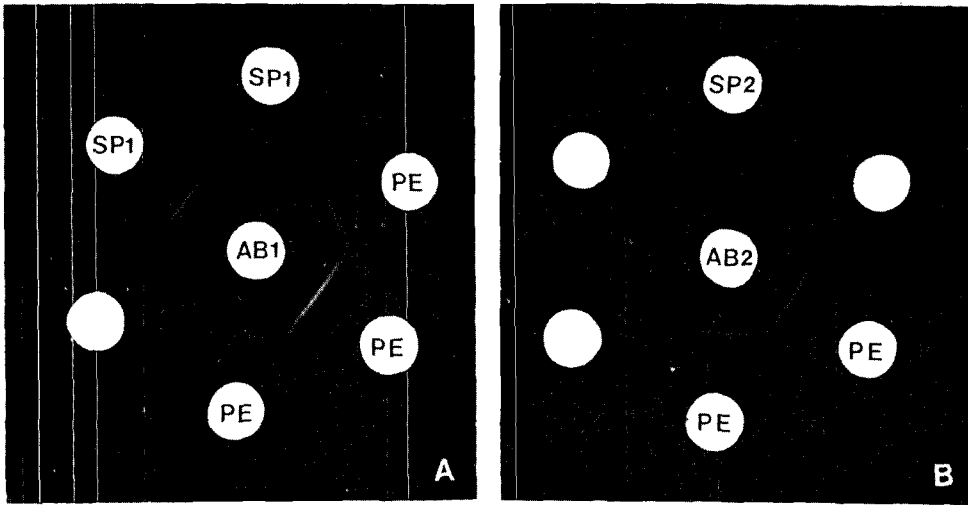


Fig. 3. Double immunodiffusion precipitation pattern against purified storage protein-1 (A) and storage protein-2 (B).
 SP₁, Storage Protein-1 ; SP₂, Storage Protein-2 ; PE, Protein Extract ; AB₁, Anti-Storage Protein-1 ; AB₂, Anti-Storage Protein-2

반응이 일어났음이 확인되었다(Figs. 8, 9).

Anti-SP₂에 대한 반응에 있어서도 anti-SP₁에서와 마찬가지로 protein body 전면에 골고루 산재하여 gold labelling이 일어났으나(Figs. 8-12) spherosome에 존재하는 비특이성 결합이 소수 관찰되었다. 특히 anti-SP₂에 대한 반응에 있어서는 anti-SP₁에 대한 반응에 비하여 금입자가 5-6개 모여서 관찰되는 경우도 종종 나타난 점이 특이하였다.

고 찰

조직 혹은 세포내의 특정한 단백질 또는 효소를 선택적으로 확인할 수 있는 방법인 면역 세포화학적 방법의 정확한 성공은 고정액의 종류, 농도, 고정시간 등에 따른 조직의 항원성(antigenicity)의 보존여부에 따라 결정되는데(Doman과 Trelease, 1985) 주로 알데히드계통의 고정액을 사용하는 전고정

만 실시하는 것이 항원성 보존에 유익하나, 미세구조 보존을 위하여 OsO₄를 사용하기도 하는데 이때는 Na-metaperiodate를 사용하여 손실된 항원성을 어느 정도 회복시킬 수 있다(Craig와 Goodchild, 1984). 또한 포매제로는 주로 Spurr's low viscosity embedding medium이 널리 쓰여져 왔으나 LR white(Craig와 Miller, 1984), glycol meta-crylate(Craig들, 1979 ; Nieden들, 1982) 등의 포매제도 항원성 보존능력이 뛰어나며 비특이성 결합의 최소화 등의 잇점이 있는 것으로 알려져서 최근에는 이것들도 많이 쓰이고 있다.

식물종자의 저장단백질에 관한 면역 세포화학적 연구는 *Vicia faba*(Nieden들, 1982)와 *pea*(Craig들, 1980 ; Craig와 Millerd, 1981) 등에서 저장단백질중 globulin의 일종인 legumin과 vicilin에 대해서만 이루어졌

다. Craig와 Millerd(1981)는 pea의 legumin과 vicilin은 protein body 전체에 골고루 분포한다고 하였고 Nieden들(1982)은 *Vicia faba*에서 이들 두 종류의 단백질이 동일한 protein body 내에 함께 존재한다고 하였다.

인삼의 경우에도 Tris 완충액 가용성 단백질이면서 160,000 dalton의 분자량을 갖는 당단백질인 SP₁과 70,000 dalton의 분자량을 가지며 역시 당단백질인 SP₂ 등의 두가지 저장단백질 모두가 구형의 protein body내에 고루 분포되어 있다. 이 두가지 protein은 동일한 protein body내에 함께 존재하고 있음이 확인되었다. 이러한 결과는 대조군에서 금입자가 전혀 관찰되지 않음으로써 anti-SP₁과 anti-SP₂에 의한 정확한 반응임을 확인할 수 있었다.

인삼종자의 배유세포내에 존재하는 protein body는 단백질 기질내에 함유물의 유무 및 성상에 따라 네가지 종류로 구분됨이 Kim(1984)에 의하여 이미 밝혀졌다. 특히 단백질 기질내에 globoid를 다량 함유하는 protein body가 다수 존재했던 바 이러한 globoid의 성분에 관하여는 알 수 없으나 본 실험에서 이러한 globoid에서는 gold labelling이 전혀 일어나지 않은 것으로 보아 이 globoid에는 SP₁과 SP₂는 함유되어 있지 않음을 알 수 있었다.

그러나 각각의 protein body가 anti-SP₁과 anti-SP₂에 모두 균일한 정도로 표지되지 않은 것으로 보아 동일한 세포내에 존재하는 protein body라 하더라도 SP₁과 SP₂의 함량에는 protein body마다 서로 차이가 있음을 알 수 있었다.

요 약

인삼 종자의 배유조직에서 Tris 완충액 가용성 저장단백질을 추출한 후 전기 영동적 분석으로 분리하여 SP₁(MW=160,000)과 SP₂(MW=70,000)의 두가지 저장단백질을

정제하였다. 이 두가지 저장단백질을 항원으로 사용하여 토끼에 피하주사하여 항체를 얻었으며, 이 항체를 이용하여 면역 세포화학적 금입자표지법을 실시한 결과, SP₁과 SP₂ 모두 구형의 protein body내에 산재하여 있음이 확인되었으며, globoid에는 이러한 두가지 단백질중 어느 것도 함유되어 있지 않은 것으로 나타났다. 또한 각각의 protein body에 함유된 SP₁과 SP₂의 상대적 함량에는 서로 차이가 있음이 확인되었다.

References

- Bewley, J. D. and M. Black. 1978. Physiology and biochemistry of seeds. I. Development, germination and growth. Springer-Verlag, New York pp. 177-244.
- Caldwell, R. C. and W. Pigmann. 1965. Disc electrophoresis of human saliva in polyacrylamide gel. Arch. Biochem. Biophys. 110, 91-96.
- Chippendale, G. M. and S. D. Beck. 1966. Haemolymph proteins of *Ostrinia nubilalis* diapause and prepupal differentiation. J. Insect Physiol. 12, 1629-1638.
- Craig, S. and D. J. Goodchild. 1984. Periodate-acid treatment of sections permits on-grid immunogold localization of pea seed vicilin in ER and Golgi. Protoplasma 122, 35-44.
- Craig, S., D. J. Goodchild and A. Millerd. 1979. Immunofluorescent localization of pea storage proteins in glycol metacrylate embedded tissue. J. Histochem. Cytochem. 27, 1312-1316.
- Craig, S. and C. Miller. 1984. LR white resin and improved on-grid immunogold detection of vicilin, a pea seed storage protein. Cell Biology, International Reports. 8, 879-886.

- Craig, S. and A. Millerd. 1981. Pea seed storage proteins-immunocytochemical localization with protein A-gold by electron microscopy. *Protoplasma*. 105, 333-339.
- Craig, S., A. Millerd and D. J. Goodchild. 1980. Structural aspects of protein accumulation in developing pea cotyledons. III. Immunocytochemical localization of legumin and vicilin using antibodies shown to be specific by the enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). *Aust. J. Plant Physiol.* 7, 339-351.
- Cutting, J. A. and T. F. Roth. 1973. Staining of phosphoprotein on acrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 54, 386-394.
- Davis, B. J. 1964. Disc electrophoresis. II. Methods and applications to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- Doman, D. C. and R. N. Trelease. 1985. Protein A-gold immunocytochemistry of isocitrate lyase in cotton seeds. *Protoplasma*. 124, 157-167.
- Dwarte, D. and A. E. Ashford. 1982. The chemistry and microstructure of protein bodies in cereley endosperm. *Bot. Gaz.* 143, 164-175.
- Hedrick, J. L. and A. J. Smith. 1968. Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 155-164.
- Kim, W. K. 1984. Ultrastructural and histochemical studies of ginseng endosperm cells. *Korean J. Electron Microscopy*. 14, 15-28.
- Kim, W. K., H. D. Park, E. S. Kim and S. S. Han. 1979. Ultrastructural changes during germination of ginseng seeds. *Korean J. Electron Microscopy*. 9, 57-69.
- Larkins, B. A. and W. J. Hurkman. 1978. Synthesis and deposition of zein in protein bodies of maize endosperm. *Plant Physiol.* 62, 256-263.
- Nieden, U., D. Neumann, R. Manteuffel and E. Weber. 1982. Electron microscopic immunocytochemical localization of storage proteins in *Vicia faba* seeds. *Eur. J. Cell Biol.* 26, 228-233.
- Nielsen, S. S. and I. E. Liener. 1984. Degradation of the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* during germination. *Plant Physiol.* 74, 494-498.
- Osborn, T. B. 1924. The vegetable proteins. 2nd ed. Longmans Green. pp. 56-132.
- Ouchterlony, O. 1949. Antigen-antibody reactions in gels. *Acta Path. Microbial. Scand.* 26, 507-515.
- Rost, T.L. 1972. The ultrastructure and physiology of protein bodies and lipids from hydrated dormant and nondormant embryos of *Setaria italicensis*(Gramineae). *Amer. J. Bot.* 59, 607-616.
- Spurr, A.P. 1969. A low-viscosity epoxy-resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* 26, 31-43.
- Tomura, H., T. Koshiba and T. Minamikawa. 1985. Immunohistochemical localization of α -amylase in cotyledons of *Vigna mungo* seedlings. *Plant Physiol.* 79, 935-938.
- Tully, R. E. and H. Beevers. 1976. Protein bodies of casters bean endosperm. Isolation, fractionation and the characterization of protein components. *Plant Physiol.* 58, 710-716.

Figure Legends

- Figs. 4-6. Electron micrographs of endosperm cells unincubated in anti-SP₁ and anti-SP₂ followed by protein A-gold as a control experiment comparing to the antigen-antibody reactions. No one gold particles can be observed on the protein bodies(P), spherosomes(S) and globoid(G) in the protein matrix. Fig. 4, $\times 16,000$; Fig. 5, $\times 14,000$; Fig. 6, $\times 39,000$
- Figs. 7-9. Sections are incubated in anti-SP₁ for 30 minutes and followed by protein A-gold solution diluted in ten volumes of PBS containing BSA. A lot of gold particles(arrow) are scattered on the whole surface of protein body(P), but no one of them can be observed on the globoid(G). Fig. 7, $\times 18,900$; Fig. 8, $\times 33,000$; Fig. 9, $\times 32,000$.
- Figs. 10-12. Protein A-gold labelling against anti-SP₂(buffer soluble glycoprotein, MW : 70,000) have scattered distribution on the whole protein bodies(P). The number of gold particles(arrow) are not same as the other protein bodies. A few non-specific bindings of gold particles on the spherosomes(S) appeared, but no one of the gold particles are observed on the cell wall(CW) and plasmodesmata(Pd). Fig. 10, $\times 24,000$; Fig. 11, $\times 19,000$; Fig. 12, $\times 23,000$

