

## NaCl 처리로 벼 유묘에서 유도된 단백질의 분리와 정제

閔庚洙\* · 黃台益\* · 林賢玉\* · 安裝淳\*

### Purification of A Novel Protein Induced by Salt Treatment in Rice Seedling

Kyung Soo Min, Tay Eak Hwang, Hyun Oak Lim and Jang Soon Ahn

**ABSTRACT :** The monoclonal antibody against a novel protein, which was induced in the roots of rice seedlings treated with NaCl, was produced.

*Oryza sativa* L. cv. Annapruna grains were sown on clean sands and grown for 10days and then the seedlings were soaked in 50mM NaCl aqueous solution. In 48hrs of the NaCl treatment, the roots were collected and homogenated with liquid nitrogen and extraction buffer. The homogenate was centrifuged and to the supernatant 75% ammonium sulfate was added to precipitate proteins. From these proteins a novel protein was purified through DEAE-ion chromatography and FPLC(Phenyl column). This protein appeared as a single band in the native electrophoresis. Using this protein as antigen, monoclonal antibody was produced. Five cell lines that secreted antibodies specifically bound to this protein were constructed.

**Key words :** Rice, NaCl, Protein.

우리나라의 서남해안은 많은 농업용 간척지를 보유하고 있다. 간척지는 그 특성상 재배할 수 있는 작물이 한정되어 있다. 대부분의 간척지는 잔류되어 있는 제염을 위하여 하천이나 강을 끼고 있는 것이 원칙이지만 갈수록 이 관개수의 양 부족과 염분 함유가 문제점으로 제기되고 있다. 특히 한발과 가뭄이 계속될 때의 간척지는 치명적인 염분장해를 가져오게 된다. 때문에 내염성 품종의 육성에 노력하는 소이가 여기에 있는 것이다.

그래서 염분 스트레스에 대한 생리적 연구들 뿐만 아니라 우수한 내염성 품종육성을 위한 연구, 즉 분자 생물학적인 연구가 최근 많이 수행되고 있다. 내염성 기전에 관한 연구로는 무선 무기염 이온의 농도와 삼투압 그리고 전기적인 힘에 관한

연구가 많다. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>이온의 교환은 염조건에 노출된 15분 이내에 촉진된다<sup>19)</sup>. 또한 세포영양학적으로 인지질에 비하여 당지질의 증가를 초래하며<sup>5)</sup> 삼투압 보호 역할을 하는 물질 즉 당질, proline 등이 증가하기도 하며<sup>1,10)</sup> 삼투압이 증가하면 abscisic acid의 함량이 증가된다<sup>18)</sup>고 보고하고 있다.

생리적 장애에 대한 식물의 반응과정에서 세포 단백질 일부의 증감이 나타난다는 보고가 있다<sup>6,9,16)</sup>. 더 구체적인 연구로는 이러한 단백질을 osmoticum으로 정의하기도 했다<sup>15,17)</sup>. 이 분자량 26,000의 단백질의 생리적 기능은 알려져 있지 않았지만 옥수수의 염분장해에 의해서 축적된다는 사실을 보고하였다. 그러나 이러한 osmoticum은

본 연구는 학술진흥재단 연구비 지원에 의하여 수행되었음.

\* 全南大學校 農科大學(Coll. of Agri. Chonnam National Univ., Kwang-ju 500-757, Korea).

◁'96. 8. 30 接受▷

여러가지 쌍자엽 식물에서 발견되지만 화곡류인 보리에서는 발견되지 않았다고 한다<sup>7,9)</sup>. 또 다른 삼투압을 조정하는 것으로 알려진 단백질이 발견되기도 했다<sup>4,13)</sup>. 비슷한 단백질로 목화에서 발견된 경우도 있다<sup>3)</sup>. 물론 이러한 모든 경우가 직접 삼투압을 조절하는 기능의 유전자와 관계가 있는 가에는 의문의 여지가 남아 있다.

본 연구에서는 내염성 품종으로 알려진 안나프르나를 이용하여 NaCl을 처리하여 발현되는 단백질을 탐색하고 이를 정제하여 그 특성을 구명하고자 하였다. 그 결과 염치리에 의해서 특이하게 나타나는 단백질을 분리 정제하였다.

## 재료 및 방법

식물재료는 내염성 벼품종으로 알려진 안나프르나를 사용하였으며 동물은 Balb/c mouse를 사용하였다. 단백질 정제를 위한 ammonium sulfate 등 시약은 Sigma 화학사에서 구입하여 사용하였으며 단일클론 항체생산을 위한 fetal bovine serum, RPMI-1640 등은 Gibco 제품을 사용하였고, DEAE-cellulose 등 크로마토그래피에 사용되는 시약은 Pharmacia 제품을 사용하였다. 기타 시약들도 시약급으로 사용하여 실험을 수행하였다.

### 1. 식물시료

바닥이 배수가 용이하도록 제작된 상자에 멸균된 vermiculite를 10cm 깊이로 하여 벼(안나프르나) 종자를 파종하여 1/2 Hoagland 용액을 이용하여 10일 동안 25°C에서 유묘를 육성하였다. NaCl의 처리는 배양상자를 완전히 배수시킨 후 NaCl 50mM 용액을 vermiculite에 포화시켜 24시간 동안 방치 후 식물체가 염해를 입도록 하였다.

### 2. 시료조제

뿌리를 채취하여 즉시 세척 -70°C에 저장하거나 액체 질소를 가하여 막자사발을 이용하여 완전히 분말화시킨 다음 추출용액(50mM Tris-Hepes pH 7.2, 3mM EDTA, 2.5mM DTT, 0.3M

sucrose, 100ug/ml BHT, 10% PVP insoluble)를 가하였다. 3겹의 거즈를 통과시킨 다음 15,000×g로 원심하여 침전물을 제거한 후에 80,000×g에서 2시간 원심분리 후 상등액을 취하여 75%포화 ammonium sulfate를 가하고 4°C 6시간 방치 후 6,000×g에서 30분간 원심침전시켜 단백질 침전물을 얻었다. 이 단백질 침전물을 소량 0.04M phosphate buffer(pH 6)에 녹여 외액 0.004M phosphate buffer에 24시간 투석하였다. 투석중 외액을 3회 이상 교환하였다. 동일 buffer로 평형을 유지시킨 DEAE-cellulose column(3×15cm)을 통과시키고 0.25M KCl/0.004M phosphate buffer을 농도구배로 흘러 보내면서 분획을 채취하였다.

### 3. FPLC

전술한 DEAE-cellulose 분획을 더욱 정제하기 위하여 사용 buffer에 투석 후 다시 FPLC(Water 650 system)을 이용하여 표 1과 같이 DEAE column과 phenyl column을 통과시켜 정제하였다.

Table 1. Chromatographic conditions of FPLC

Ion exchange chromatography	
Column	: DEAE-5PW(7.5×80mm, Waters)
Buffer	: Tris 20mM pH 6.5
Gradient	: 0→0.4M KCl
Flow rate	: 1ml/min
Pressure	: 200psi
Reversed phase chromatography	
Column	: phenyl-5PW (Waters)
Buffer	: Hepes 20mM pH 6.5
Gradient	: 1→0M ammonium sulfate
Flow rate	: 1ml/min
Pressure	: 200psi

### 4. 전기영동

전기영동은 Ofarrell<sup>13)</sup>의 방법을 약간 변경하여 사용하였다. 20×20cm slab gel을 사용하여 3.5% stacking gel과 10% separating gel을 이용

하여 30mA 전류하에서 수행하였고 염색을 coomassie brilliant blue R-250 0.05%용액에서 4시간, 그리고 7% acetic acid로 72시간 동안 탈색하였다.

## 5. 단일클론 항체 생산

### 1) 항원

분리 정제된 단백질을 0.45nm filter로 통과시켜 동결건조 후 앰플화하여 -20℃에 저장하였다가 항원으로 사용하였다.

### 2) 면역

8주된 생쥐에 처음 200 $\mu$ g을 접종하고 3차례 2주 간격으로 50 $\mu$ g씩 추가 접종하였다. 접종 항원은 처음은 Freund's complete adjuvant와 유효하여 조제하였으며 추가 접종시에는 incomplete adjuvant를 이용하였다.

### 3) 세포융합

세포융합은 Köhler and Milstein의 방법을 이용하였다<sup>10,11)</sup>. 접종이 완료된 생쥐로부터 비장세포를 분리하여 세포를 계수하여 RPMI-1640으로 세척하였다. 미리 배양한 myeloma cell(SP 2/0-14)를 1:10으로 혼합하여 원심침전하여 배지를 완전히 제거하고 여기에 50% polyethylene glycol 1ml를 가하여 1분간 융합시키고 배지로 원심세척 후 20% fetal bovine serum과 2% HAT가 들어 있는 배지를 가하여 96 well plate에 분주하고 세포배양 기법에 따라서 배양하였다.

### 4) Hybridoma

상기와 같이 융합된 배양세포는 2주간 배양 후 항원이 coating된 plate를 이용하여 이중 형광항체법을 이용하여 항체의 분비 여부를 검사하고 양성으로 나타난 세포주는 특이성과 역가가 높은 것을 골라 제한 희석법에 의하여 단일 세포주를 작성하였다.

### 5) Ascetic fluid

다량의 항체를 생산하기 위하여 상기의 hybr-

idoma를 1주일 전 pristane이 처리된 생쥐의 복강에 주입하여 복수암을 유발시키고 복수를 채취하여 이를 protein A-Sepharose 4B column chromatography하여 순수한 항체만을 정제하였다. 생산된 항체의 isotype은 이차 항체와의 결합 방법에 의하여 확인하였다.

### 6) 단백질 정량

Lowry방법에 따라 bovine albumin을 표준으로 하여 단백질을 정량하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Salt 유도 단백질의 분리 정제

50mM NaCl 처리에 의해서 유도된 단백질을 정제하기 위하여 우선 native 전기영동을 실시하여 중요한 밴드 차이를 구명하였다(그림 7). 가장 분명한 밴드의 정제를 결정하고 아래와 같은 방법으로 정제를 수행하였다.

유묘에 NaCl을 처리하여 뿌리를 100g 채취하여 그림 1에 표시한 바와 같이 ammonium sulfate분획을 DEAE-cellulose chromatography를 수행하여 하나의 큰 피크와 두 개의 작은 피크를 얻었다. 이 3개의 피크를 확인하였던 바 Na-

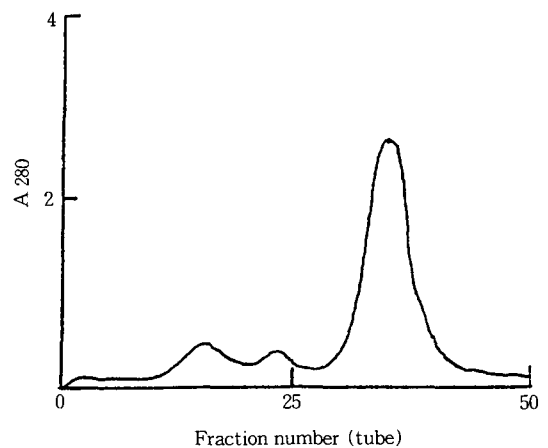


Fig. 1. Ion exchange chromatography of 75% saturated ammonium sulfate precipitate on DEAE-cellulose.

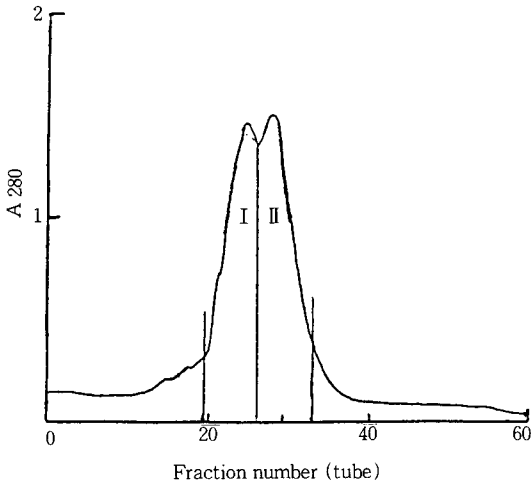


Fig. 2. Ion exchange chromatography of main peak (Fig. 1) on DEAE column-FPLC.

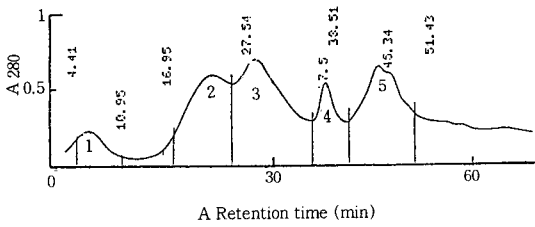


Fig. 3. Hydrophobic chromatography of peak 1 (Fig. 2) on phenyl column in FPLC.

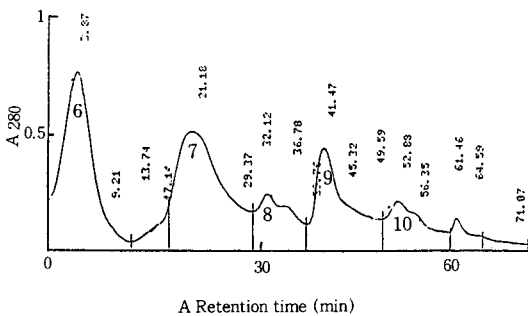


Fig. 4. Hydrophobic chromatography of peak 2 (Fig. 2) on phenyl column in FPLC.

C1의 처리에 의해서 유도된 단백질은 가장 큰 피크에 포함되어 있다는 것을 전기영동을 통하여 확인하고 이 큰 피크 분획을 FPLC에 의한 DEAE정제를 재료 및 방법과 같이 수행하였다.

그림 2에서는 두 개의 큰 피크가 나타났는데, 이 두 개의 피크를 분획 1과 2로 하여 소수성 크로마토그래피(phenyl column)를 수행하였다. 그 결과는 그림 3과 4에 나타난 바와 같이 비교적 양호한 분리 패턴을 나타냈다. 유도된 단백질이 나타난 분획을 다시 농축하여 Sephadex-G100 column chromatography를 수행하여 순수분리하였다. 이 분획을 확인하기 위하여 전기영동을 수행하였다(그림 5~7). 그 결과 NaCl에 의해서 유도된 단백질이 완벽하게 정제되어 전기영동 패턴에서 단일 밴드를 확인할 수가 있었다.

이 단백질을 확인한 전기영동이 단백질을 변성시키지 않은 native gel 때문에 Sephadex-G100 column chromatography를 수행하여 확인

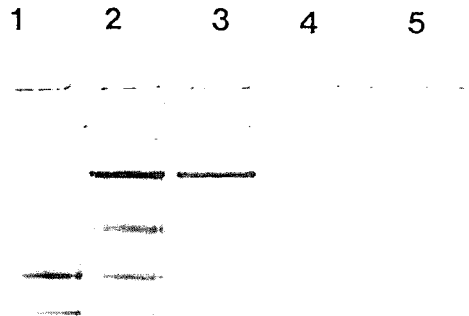


Fig. 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of FPLC fractions. The lane 1~5 represent the fraction numbers of Fig. 3.

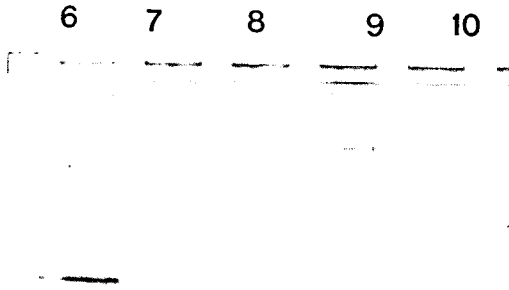


Fig. 6. Polyacrylamide gel electrophoresis of FPLC fractions. The lane 6~10 represent the fraction numbers of Fig. 4.

하였다. 그 결과 그림 8에 표시한 바와 같이 분자량은 약 64,000임을 확인할 수가 있었다. 이는 지금까지 벽에서 정제된 salt에 의해서 유도된 단백질보다 분자량이 큰 것이었다. 이것은 전기영동이 native이기 때문에 다른 보고자들의 SDS-PAGE에 의한 것보다 분자량이 큰 것이라고 사료된다.

Table 2. Monoclonal antibodies to 6.4kd protein

Description	Isotype	Titer 50% binding in ELISA
SA-6-12	IgG <sub>2a</sub>	50,000 : 1
SA-3-9	IgG <sub>1</sub>	125,000 : 1
SA-7-10	IgG <sub>1</sub>	250,000 : 1

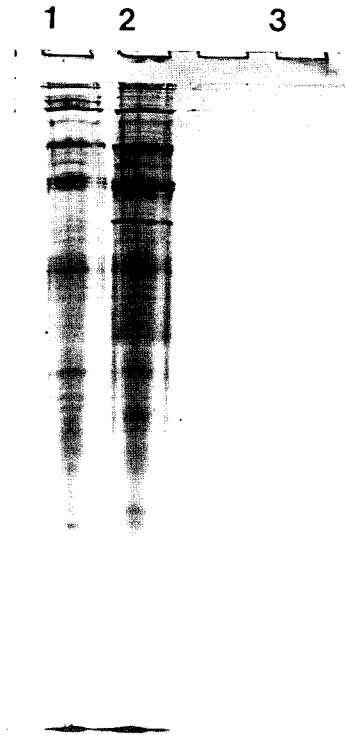


Fig. 7. Single band appeared after polyacrylamide gel electrophoresis. Lane 1, 2 and 3 were control, 50mM NaCl and novel protein, respectively.

## 2. 단일클론 항체생산

상기 정제된 NaCl 유도 단백질에 대한 단일클론 항체를 생산하였다. 정제된 단백질을 항원으로 하여 표 2에서 보는 바와 같이 3개의 역가가 높은 항체를 분비하는 hybridoma 세포주를 작성하고 특성을 검사하였다.

이 단일클론 항체를 이용하여 항체의 특이성과 유도 단백질의 생성 정도를 판단하기 위하여 immunoblot를 수행하였다. 그 결과 염분의 처리 정도에 따라서 단백질의 양이 증가하고 있음을 관찰할 수가 있었다(그림 9).

상기의 결과에 따라서 NaCl 처리에 의해서 유도된 단백질을 EPLC의 DEAE와 phenyl column이용하여 순수하게 정제할 수 있음을 확인

## 적 요

수도의 내염성 품종 안나프르나에 NaCl 50 mM을 처리하여 유도된 단백질의 분리정제를 수행하여 한 개의 새로운 단백질을 분리 정제하였다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 10일된 유묘에 50mM NaCl을 48시간 처리하여 유도된 단백질의 존재를 전기영동을 통하여 확인하였다.
2. FPLC를 이용한 DEAE와 phenyl column을 이용하여 순수한 정제가 가능하였고, 이 과정을 통하여 전기영동상에서 단일 밴드를 나타내는 하나의 단백질을 정제하였다.
3. 이 단백질의 분자량이 64,000이라는 것을 Sephadex-G 100 column chromatography를 통하여 확인하였다.
4. 이 단백질에 대한 단일 항체를 조제하여 고역가 항체를 분비하는 hybridoma 세포주 3개를 작성하고 isotype등 특성을 조사하였다.

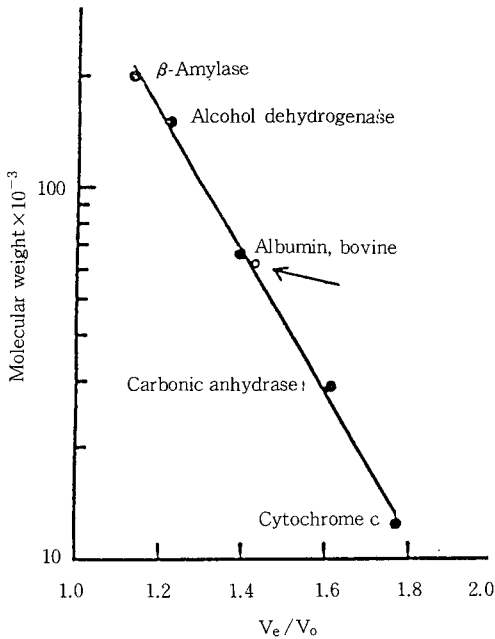


Fig. 8. Molecular weight determination of novel protein by Sephadex-G100 gel filtration.

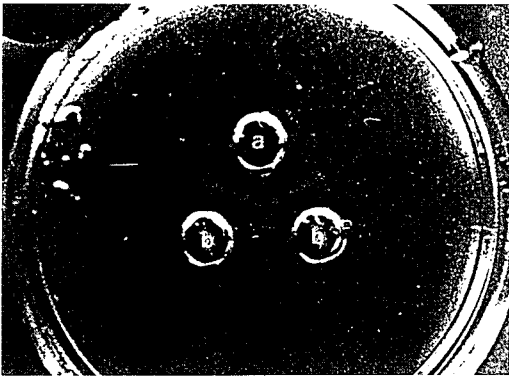


Fig. 9. Ouchterlony immunodouble diffusion analysis of the 6.4kd protein.  
a : antigen  
b : monoclonal antibody

하였고 이에 대한 단일클론 항체를 제조하여 그 특이성과 특성 및 활용의 가능성을 확인하였다.

## LITERATURE CITED

1. Binzel M.L, Gasegawa P.M, Rhodes D, Handa S, Handa A.K and Bressan R.A. 1987. Solute accumulation in tobacco cells adapted to NaCl. *Plant Physiol.* 84: 1408-1415.
2. Binzel M.L, Hess F.D, Bressan R.A and Hasegawa P.M. 1988. Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. *Plant Physiol.* 86:607-614.
3. Dure L, Crouch M, Harada J, Ho T.H.D, Mundy J, Quatrano R, Thomas T and Sung Z.R. 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12: 475-486.
4. Gomez J, Sanchez-Martinez D, Stiefel V, Rigau J, Puigdomenech P and Pages M.

1988. A gene induced by the plant hormone abscisic acid in response to water stress encodes a glycine-rich protein. *Nature* 334:262-264.
5. Hirayama O and Mihara M. 1987. Characterization of membrane lipids of higher plants different in salt-tolerance. *Agric. Biol. Chem.* 51:3215-3221.
  6. Hurkman W.J and Tanaka C.K 1986. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* 81:802-806.
  7. \_\_\_\_\_ 1987. The effects of salt on the pattern of protein synthesis in barley roots. *Plant Physiol.* 83:517-524.
  8. \_\_\_\_\_ and DuPont F.M. 1988. The effects of salt stress on polypeptides in membrane fractions from barley roots. *Plant Physiol.* 88:1263-1273.
  9. King G.J, Hussey C.E and Tumer V.A. 1986. A protein induced by NaCl in suspension cultures of *Nicotiana tabacum* accumulates in whole plant roots. *Plant Mol. Biol.* 7:441-449.
  10. Köhler G. 1985. The technique of hybridoma production. in *Immune Meth.* Vol. III. pp. 285-308.
  11. \_\_\_\_\_ and Milstein C. 1975. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 495-256.
  12. LaRosa P.C, Hasegawa P.M, Rhodes D, Clithero J.M, Watad A.E.A and Bressan R.A. 1987. Abscisic acid stimulated osmotic adjustment and its involvement in adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* 85:174-181.
  13. Mortenson E and Dreyfuss G. 1987. The effect of sodium chloride on solute potential and proline accumulation in soybean leaves. *Plant Physiol.* 83:238-240.
  14. O'Farrell P.H. 1970. High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. *J. Biol. Chem.* 250:4077-4021.
  15. Singh N.K, Bracker C.A, Hasegawa P. M, Handa A.K, Buckel S, Hermodson M. A, Pfankovh E, Regnier F.E and Bressan R.A. 1987. Characterization of osmotin, A thaumatin-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. *Plant Physiol.* 85:529-536.
  16. \_\_\_\_\_, Handa A.K, Hasegawa P.M and Bressan R.A. 1985. Proteins associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* 79:126-137.
  17. \_\_\_\_\_, LaRoas C, Handa A.K, Hasegawa P.M and Bressan R.A. 1987. Hormonal regulation of protein synthesis associated with salt tolerance in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:739-743
  18. Steward C.R and Voetberg G. 1985. Relationship between stress induced ABA and proline accumulations and ABA induced proline accumulation in excised barley leaves. *Plant Physiol.* 79:24-27.
  19. Watad A.E.A, Pesci P.A, Reinhold L and Lener H.R. 1986. Proton Fluxes as a response to external salinity in wild type and NaCl adapted *Nicotiana* cell lines. *Plant Physiol.* 81:454-459.