

들깨로부터 Callus의 유기와 재분화에 따른 단백질 및 RNA의 변화

정상훈 · 양선경 · 김현경 · 정대수 · 조영수 · 김도훈[†]

동아대학교 생명자원과학대학

Changes of RNA and Protein During Callus Induction and Plant Regeneration from *Perilla frutescens*

Sang Hoon Jung, Sun Kyung Yang, Hyeon Kyoung Kim, Dae Soo Chung,
Young Su Cho, and Doh Hoon Kim[†]

College of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan

Abstract

Cotyledon and hypocotyl explants of perilla were cultured on MS medium containing a combined concentration of BA(0.5, 1.0 and 1.5mg/ℓ) and NAA(0.1, 0.5 and 2.0mg/ℓ) in order to regenerate the explant and induce the callus. The best regeneration of the explant and induction of the callus were observed in a combined concentration of 0.5mg/ℓ of BA and 0.5mg/ℓ NAA both in cotyledon and hypocotyl explants. In cotyledon explants, rooting was achieved upon transferring shoots to MS medium containing 0.5mg/ℓ of BA and 0.1mg/ℓ of NAA. We also investigated the change of protein and RNA content on developmental stage of callus and plant regeneration of perilla. Protein content was increased but RNA content was decreased as the culture period increases. The banding pattern of polypeptide revealed that both 30KD and 45KD polypeptides were obvious in cotyledon obtained from pre-culture explants, but only 30KD polypeptide was further getting obvious as the culture period increases.

Key words : *Perilla*, callus, regeneration, protein, RNA,

서 론

들깨는 꿀풀과[唇形科 : Labiatae]에 속하는 1년생 초본으로 종실내에는 35~54%의 비교적 높은 조지방을 함유할 뿐 만 아니라 지방의 산화에 크게 영향하는 고도 불포화지방산인 리놀렌산 함량이 높은 특성을 가지고 있다 [10]. 또한 들기름의 주성분은 linolenic acid로써 기름의 55~63%를 차지하고 있는데, 이 성분은 등푸른 생선에 다량 함유되어 있는 ω -3계열의 지방산이라는 사실이 최근에 밝

혀졌다[14]. 그리고 들기름은 건성유로서 페인트, 인쇄용 잉크 등 공업원료로 쓰이며, 들깨잎은 특유의 향인 perilla ketone과 amino acid, vitamine C 및 B₂, K 및 Ca 등의 함량이 많아 열채용으로 이용되고 있다 [4].

식물의 재분화는 식물 조직 절편에 대한 배지내 auxin과 cytokinin 조성에 좌우되는 것으로 알려져 있다[15]. 식물의 재분화시 식물 hormone의 처리 시간에 대한 연구는 Christianson 과 Warnick[3]에 의하여 이루어 졌으며, 이러한 재분화시 나타나는 특이 단백질은 Dhindsa 등[5]에

[†] Corresponding author

의하여 연구되었다. 식물의 재분화와 hormone에 대한 연구는 많이 이루어졌으나, 식물 기관분화에 작용하는 hormone의 작용 양상과 이에 따른 특이단백질의 변화 양상 등에 대한 연구는 미비한 실정이다. 특히 들깨의 경우 조직배양에 대한 연구도 거의 없으며, 품종과 조직에 따른 재분화의 차이 때문에 이에 대한 체계적 연구가 절실히 요구되고 있다.

따라서 본 연구는 들깨의 Callus 형성 및 재분화를 위한 적절한 성장조절제의 농도를 규명함과 동시에 재분화 과정중의 단백질 및 RNA 함량의 변화를 조사하여 들깨의 기내육종을 위한 기초자료를 얻고자 실시하였다.

재료 및 방법

1. Callus 형성 및 재분화

들깨의 종자를 70% ethanol에 1분간 표면소독한 후 멸균수로 수세를 하고 1% sodium hypochlorite에 7분간 살균한 다음 멸균수로 3~4회 수세를 하였다. 살균된 종자를 3% sucrose와 0.8% agar가 첨가된 MS배지[11]에 파종하고 발아 후 1주일이 지난 자엽조직과 하배축조직을 시료로 사용하였다. Callus 형성 및 재분화를 유도하기 위하여 MS 기본배지에 성장조절제 NAA와 BA를 혼용하여 자엽과 하배축조직을 치상하고 재분화 과정을 조사하였다.

2. 단백질 추출 및 SDS-PAGE

각 조직을 치상한 후 3, 4, 5 및 6주가 지난 시료를 조단백질 추출을 위해 각각 1g씩 취하여 냉동시킨 유발에 넣어 액체질소를 적당량 붓고 마쇄한 뒤 1mM EDTA, 5mM DTT 및 2% Triton X-100을 함유한 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.2) 1ml를 가하여 4℃에서 15,000 rpm로 40분간 원심분리한 후 상등액을 취해 조단백질을 추출하였다. 단백질의 함량은 Bradford법[1]에 따라 595nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

SDS-PAGE는 Laemmli 방법[9]에 따라 수행하였으며 Mini Gel System(Bio-Rad Co.)을 이용하였고, polyacrylamide는 separating gel과 stacking gel을 각각 12.5% 및 5.0%의 농도로 하였다. 단백질은 10μg씩 loading 하였고, 200volts에서 전기영동을 실시하였다. Gel의 염색은 0.1% Coomassie Brilliant Blue(G-250)로 하였으며, methanol과

acetic acid 혼합용액으로 탈색한 후 단백질의 밴드를 관찰하였다. 표준단백질(Protein Molecular Weight Markers, Bio-Rad Co.)은 14~116KD를 사용하였다.

3. Peroxidase 활성 측정

자엽 절편체를 치상하여 배양기간에 따라 시료3g을 채취하여 마쇄액(50mM potassium phosphate buffer pH6.1) 15ml를 유발에 넣고 마쇄하여 균질화 한다음 10,000g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 취하여 조효소액으로 사용하였다. Peroxidase 활성측정은 1% O-phenyldiamine 0.5ml, 0.3% H₂O₂ 0.5ml, 50mM potassium phosphate buffer (pH6.1) 7.8ml의 혼합액에 조효소액 0.2ml를 넣고 5분간 반응시킨 뒤 Sodium Hydrogen Sulfate 1ml을 가하여 반응을 정지시킨 뒤 30분간 방치한후 430nm에서 흡광도를 측정한후 ΔO.D.430/5min/mg protein으로 환산 하였다.

4. RNA 추출 및 정량

단백질 추출시료와 동일한 시료를 사용하였고, 실험에 사용되는 초자기구들은 180℃에서 24시간 고온살균 하였으며, 그 외의 실험기구들은 121℃에서 1시간동안 autoclave를 하고, 모든 시약들은 DEPC 처리를 하여 RNase 작용을 방지하였다.

RNA 추출은 시료 0.1g을 냉동유발에 넣고 적당량의 액체질소를 넣어 급냉시킨 뒤 마쇄하여 tube에 넣고 TRI reagent(Sigma Co.) 500μl을 넣어 실온에서 5분간 방치한 후 chloroform 100μl를 가하여 15초간 강하게 vortex를 하였고, 2~3분간 실온에서 방치한 후 4℃에서 12,000rpm으로, 20분간 원심분리하였다. 상등액은 새 tube에 옮기고 isopropanol을 0.25ml 넣고 잘 섞은 다음 4℃에서 12,000 rpm으로, 10분간 원심분리하여 상등액은 버리고 pellet만을 취하여 75% ethanol로 세척한 후 진공건조하고 DEPC water에 녹여 정량하였다.

RNA 정량은 spectrophotometer로 260 및 280nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 함량을 계산하였다.

결과 및 고찰

1. Callus의 형성 및 재분화

Callus의 형성 및 재분화 정도를 Table 1에서 보면 각

들깨로부터 Callus의 유기와 재분화에 따른 단백질 및 RNA의 변화

Table 1. Effect of growth regulators on the callus induction and shoot formation from explant of perilla after cultivation for 6 weeks

Growth regulators (mg/L)		Callus		Root		Shoot	
BA	NAA	Co-*	Hy-**	Co-	Hy-	Co-	Hy-
0.5	0.1	+	-	++	-	-	-
0.5	0.5	++	++	-	+	+++	++
0.5	1.0	+	+	-	-	-	-
0.5	1.5	+	+	-	-	+	-
0.5	2.0	++	+	-	-	++	-
1.0	0.1	++	++	-	-	++	++
1.0	0.5	++	++	-	-	++	+++
1.0	1.0	+	+	-	-	+	+
1.0	1.5	+	+	-	-	+	-
1.0	2.0	++	+	-	-	+	-
1.5	0.1	++	++	-	-	+	+++
1.5	0.5	++	++	-	-	+	+++
1.5	1.0	+	+	-	-	+	++
1.5	1.5	+	+	-	-	-	-
1.5	2.0	-	-	-	-	-	-

- none; + poor; ++ good; +++ very good, *: Cotyledon, **: Hypocotyl

hormone 조성에 따른 callus의 형성은 자엽과 하배축 절편에서 비슷한 양상을 보였고, 대부분의 처리에서 callus 형성이 좋았으며, 특히 BA 0.5mg/ℓ 과 NAA 0.5mg/ℓ, BA 1.0mg/ℓ 과 NAA 0.1mg/ℓ, BA 1.5mg/ℓ 과 NAA 0.5mg/ℓ 및 BA 1.5mg/ℓ 과 NAA 0.5mg/ℓ 처리구에서 callus의 형성이 좋았다. 그러나 BA 0.5mg/ℓ 과 NAA 0.1mg/ℓ 및 BA 1.5mg/ℓ 과 NAA 2.0mg/ℓ 처리구에서 callus의 형성이 이루어지지 않았다.

뿌리의 형성은 자엽절편의 경우 BA 0.5mg/ℓ 과 NAA 0.1mg/ℓ 처리구에서만 이루어 졌고, 하배축의 경우에는 BA 0.5mg/ℓ 과 NAA 0.5mg/ℓ 처리구에서만 뿌리의 발생이 약하게 이루어졌으며, 그외 hormone 조합에서는 뿌리의 발생이 없었다. Shoot의 분화는 자엽 절편에서는 BA 0.5mg/ℓ 과 NAA 0.5mg/ℓ 에서 가장 좋았고 BA 0.5mg/ℓ 과 NAA 2.0mg/ℓ, BA 1.0mg/ℓ 과 NAA 0.1mg/ℓ 및 BA 1.0mg/ℓ 과 NAA 0.5mg/ℓ 처리구에서도 좋았으며, BA 0.5mg/ℓ 과 NAA 0.1mg/ℓ, BA 0.5mg/ℓ 과 NAA 1.0mg/ℓ, BA 1.5mg/ℓ 과 NAA 1.5mg/ℓ 및 BA 1.5mg/ℓ 과 NAA 2.0mg/ℓ 처리구에서는 shoot가 분화되지 않았다. 그리고 하배축절편에서는 BA 1.0mg/ℓ 과 NAA 0.5mg/ℓ, BA 1.5mg/ℓ 과 NAA 0.1mg/ℓ 및 BA 1.5mg/ℓ 과 NAA 0.5mg/ℓ 처리구에서 shoot의 분화가 가장 좋았다.

이상의 결과에서 자엽과 하배축 절편의 callus 형성과 shoot의 재분화에 적합한 hormone 조합은 BA 0.5mg/ℓ 과 NAA 0.5mg/ℓ 및 BA 1.0mg/ℓ 과 NAA 0.5mg/ℓ 이었고, shoot 재분화의 경우 부위에 따른 hormone의 요구도가 다르게 나타났다. 뿌리의 경우 하배축에 비해 자엽절편에서 재분화가 잘 되었으나 본 실험에 사용된 BA 와 NAA 농도 범위에서는 재분화가 잘 일어나지 않았다.

Kim[8]은 하배축 조직에서는 callus형성만 있었고 재분화는 일어나지 않았다고 하였는데 본 실험의 결과 자엽조직은 물론 하배축 조직에서도 재분화가 일어났다. 그리고 재분화가 일어난 대부분의 처리구에서 특이하게 callus의 형성 정도가 낮았으며 callus의 형성단계를 거치지 않고 재분화되는 양상을 보였다. 자엽조직으로부터 재분화되어 가는 과정을 보면(Fig. 1) 치상후 2주가 지나면서 절편체가 부피생장을 하고 4주경에는 shoot의 분화가 일어났으며, 6주경에는 shoot의 완전한 성장이 이루어졌다.

2. 단백질의 변화 및 peroxidase 활성변화

들깨의 자엽, 하배축, 그리고 뿌리를 취하여 각 부위별 단백질 함량과 peroxidase 활성변화는 자엽의 경우 단백질 함량이 13.61mg/g으로 하배축의 0.71mg/g, 뿌리의 0.36mg/g보다는 높았다. 그러나 peroxidase specific activity는

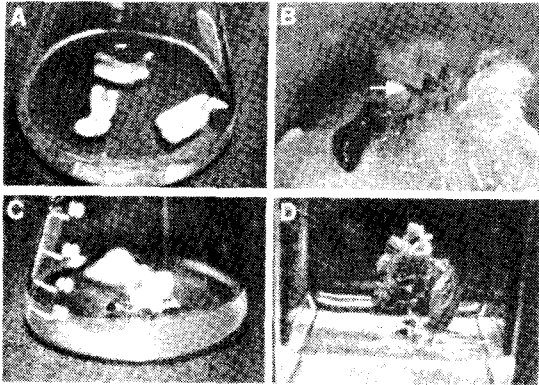


Fig. 1. Plant regeneration from cotyledon of perilla. A, Leaf discs on MS medium containing BA 0.5mg/ℓ, NAA 0.5 mg/ℓ after cultivation for 2 weeks; B,C, Shoot formation and development on MS medium containing BA 0.5mg/ℓ, NAA 0.5 mg/ℓ after cultivation for 4 and 6 weeks; D, Regenerated plantlet on MS medium after cultivation for 2 months.

자엽이 0.66(μ moles/min/mg protein), 하배축은 2.03(μ moles/min/mg protein), 뿌리는 3.03(μ moles/min/mg protein)으로 자엽이 가장 낮은 것으로 나타났다(Table 2).

자엽의 배양기간에 따른 단백질의 함량과 peroxidase 활성도를 보면 배양전 자엽절편체의 단백질 함량이 13.61 mg/g이었다. 그러나 배양 3주 후 callus 형성이 되었을때는 1.85mg/g로 급격히 감소되었고 4, 5주후 재분화가 되어가는 과정중에 2.46, 2.40mg/g으로 증가하였으며 배양 6후에는 1.25mg/g로 다소 낮아졌다. 배양기간에 따른 단백질 함량의 증가는 새로운 기관의 형성에서 기인된 것으로 생각되며, 하배축에 비해 자엽절편에서 단백질 함량이 높게 나타난 것은 자엽절편이 하배축에 비해 재분화가 활발히 일

Table 2. Peroxidase activity in the different tissues of perilla

Tissue	Protein content (mg/g f.w)	Peroxidase activity	
		Specific (μ moles/min/mg protein)	Total
Cotyledon	13.61	0.66	8.98
Hypocotly	0.71	2.03	1.44
Root	0.36	3.03	1.09

어났기 때문인 것으로 추측된다. 배양전 자엽절편체의 peroxidase specific activity가 0.66(μ moles/min/mg protein)이었던 것이 배양 3주후 callus 형성이 되었을때는 6.90(μ moles/min/mg protein)으로 증가되었고 4, 5주후 재분화가 되어가는 과정중에 peroxidase specific activity가 6.38, 6.24(μ moles/min/mg protein)이었으며 배양 6주 후에는 7.07(μ moles/min/mg protein)로 peroxidase specific activity가 증가하는 경향을 나타내고 있다(Table 3). 식물체의 분화가 유도되는 과정에 있어서 영양과 hormone이 peroxidase 활성도 변화에 영향을 미치는데, 특히 auxin은 분화시에 필요한 효소 단백질 합성의 전사에 관하여 peroxidase 활성을 변화시킨다고 보고하였다[7,12].

배양기간에 따른 polypeptide pattern을 조사하기 위하여 들깨 자엽과 callus로부터 추출한 단백질을 SDS-PAGE로 전기영동한 결과(Fig. 2) 배양전 자엽조직에서는 약 30KD과 45KD polypeptide가 진하게 나타났고 그외 여러 개의 polypeptide가 연하게 분리되었으며, 30KD polypeptide는 배양 3주경에 그 양이 급격히 증가하여 배양기간의 경과 따라 계속적으로 증가되었다. 약 45KD과 22KD의 polypeptide들은 배양 3주 후에는 나타나지 않았고, 자엽 조직에서 나타나지 않았던 29KD polypeptide는 배양 3주경부터 나타났으며, 배양기간에 따른 양적인 증가는 없었다. 배양기간의 경과에 따라 양적인 증가가 이루어지고 있는 30KD polypeptide가 들깨 조직배양시 callus의 유기와 기관의 재분화에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

30KD 전후의 polypeptide가 cotton[2]과 pumpkin[16]등에서 보고되었으며, 이들은 peroxisomal membrane poly-

Table 3. Changes of peroxidase activity during callus induction and shoot formation in cotyledon of perilla was observed in MS medium supplemented with 0.5mg/ℓ of BA and NAA

Culture period (weeks)	Protein content (mg/g f.w)	Peroxidase activity	
		Specific (μ moles/min/mg protein)	Total
3	1.85	6.90	12.77
4	2.46	6.38	15.70
5	2.40	6.24	14.98
6	1.25	7.07	8.84

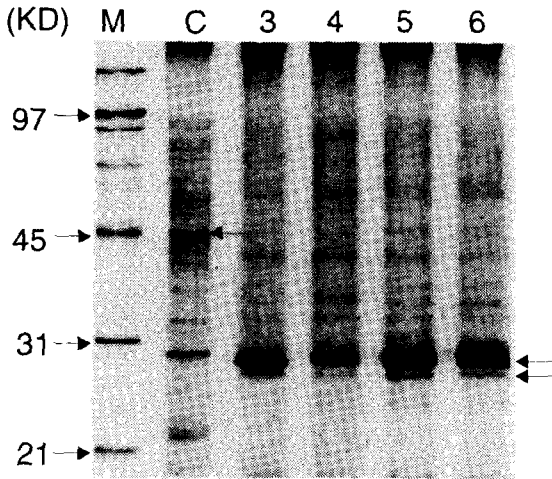


Fig. 2. SDS-PAGE of protein isolated from cotyledon and callus of perilla was observed in MS medium supplemented with 0.5mg/ℓ of BA and NAA. The gel electrophoresis was performed on 12.5% separating gel and 5% stacking gel in tris-glycine buffer system. The gel was stained with coomssie Blue R-250. M, Molecular weight standard(Sigma); C, Cotyledon; 3-6, Cultured calli for 3 to 6 weeks.

peptide와 glyoxysomal membrane polypeptide로 알려져 있다. 이들 polypeptide는 ascorbate peroxidase 활성을 가지며, 이러한 peroxidase는 조직의 분화, 기관의 형성 및 체세포배형성 등과 같은 형태형성 과정에 직접적으로 관여하는 것으로 알려져 있다[6]. 그러므로 본 실험에서 동정된 30KD polypeptide도 peroxidase의 일종일 것으로 추정되며 계속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

3. Total RNA의 변화

자엽과 하배축 절편체로부터 재분화 과정중의 total RNA 함량을 보면(Fig 3) 자엽의 경우 치상 후 2주경에는 322.95 μ g에서 4주 후에 shoot가 발생될 때는 375.96 μ g로 증가하였고, 6주가 지나 shoot가 성장된 후에는 267.3 μ g로 감소하는 경향을 나타내었다. 하배축의 경우도 치상후 2주경에는 531.84 μ g에서 4주 후에는 602.34 μ g로 증가하였고, 6주 후에는 389.88 μ g로 감소하였다. 그리고 하배축이 자엽 절편보다 total RNA 함량이 높게 나타났다. Palatnik[13] 등에 의하면 세포내에 존재하는 mRNA들의 adenylation 상태를 변화시킴으로써 peroxidase가 서로 다른 유전자의

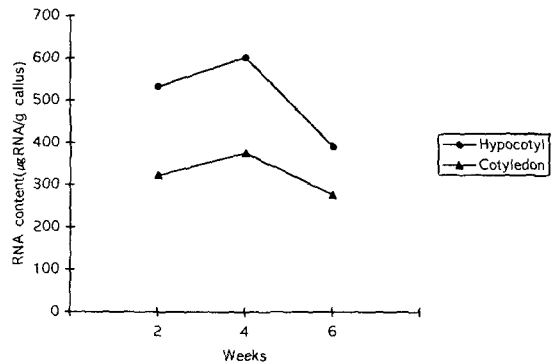


Fig. 3. Changes of RNA content during callus induction and plant regeneration from perilla was observed in MS medium supplemented with 0.5mg/ℓ of BA and NAA.

발현 조절을 받고 있을 가능성을 시사해 주며, 특히 peroxidase의 활성 변화는 전기영동적 특성의 변화와 일치하며, 이렇게 새로 형성된 band는 shoot나 근분화시 포함되는 유조직 세포의 발달과 연관된다는 보고가 있다.

적 요

들깨로부터 callus의 유기 및 재분화를 위해 MS 기본배지에 생장조절제 NAA(0.1, 0.5, 1.0, 및 2.0mg/ℓ)와 BA(0.5, 1.0 및 1.5mg/ℓ)를 혼용하여 자엽과 하배축 조직을 치상하고 3, 4, 5 및 6주로 나누어 재분화과정과 구성성분의 변화를 조사한 결과, BA 0.5mg/ℓ 과 NAA 0.5mg/ℓ 을 첨가한 배지에서 자엽과 하배축 모두 callus의 유기 및 재분화 정도가 좋았고, 자엽절편의 뿌리 발생은 BA 0.5mg/ℓ 과 NAA 0.1mg/ℓ 을 첨가한 배지에서만 발생하였다.

배양기간의 경과에 따라 단백질함량은 증가한 반면 RNA 함량은 감소하였고, polypeptide pattern은 배양전 자엽조직에서는 30KD와 45KD의 polypeptide가 진하게 나타났고, 30KD polypeptide는 배양기간의 경과에 따라 증가 하였다.

참고 문헌

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal-*

- ytical Biochem*, 72, 248.
2. Bunkelman, J. R. and Trelease, R. N. 1996. Ascorbate peroxidase ; A prominent membrane protein in oilseed glyoxysomes. *Plant Physiol*, 110, 589.
 3. Christianson, M. L., Warnick, D. A. 1984. Phenocritical times in the process of *in vitro* shoot organogenesis. *Developmental Biology*, 101, 382.
 4. Chung, D. S. 1988. Studies on the Fatty Acid Components of Local Varieties in *Perilla Frutescens*. Graduate school Gyeongsang National University.
 5. Dhindsa, S. R., Dong, G., Lalonde, L. 1987. Altered gene during expression a auxin-induced root development from excised mung bean seedling. *Plant Physiol*. 94, 1148.
 6. Joersbo, M., Anderson, J. M., Okkels and Rajagopal, R. 1989. Isoperoxidase as markers of somatic embryogenesis in carrot cell suspension culture. *Physiol Plant*, 76, 10.
 7. Katsuki, I. 1982. Isozyme polymorphism of peroxidase of *Eucalyptu* callus in relation to plant hormone contents. In, *Plant Tissue Culture*, A. Fugiwara (ed.) pp.215-216.
 8. Kim, J. A., Choi, H. J., Park, S. K. and Kim, D. U. 1993. Callus induction and plant regeneration from leaf segments and cotyledonary explants of *Perilla frutescens*. *Korean J. Plant Tissue Culture*, 20(1), 47.
 9. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
 10. Lee, J. I., Han, E. D., Lee, S. T. and Park, H. W. 1986. Study on the Evaluation of Oil Quality and the Differences of Fatty Acid Composition between Varieties in *Perilla*. *Korean J. Breed* 18(3), 228-233
 11. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol*, 15, 473.
 12. Nanda, N. N. and N. P. Karur. 1973. Effect of morpentine peroxidase and its relationship rooting hypocotyl cuttings *Impatiens balsamina*. *Plnt & Cell Physiol*. 14: 207-211.
 13. Palatnik, C. M., C. Wilkins and A. Jacobson. 1984. Translational control during early *Dictyostelium* development: Possible involvement of poly(A) sequence. *Cell*. 36: 1017-1025.
 14. Ryu, S. N., Lee, J. I., Lee, H. S., Park, C. B. and Sung, B. R. 1993. Varietal Difference of Oil Content and Omega Fatty Acid Composition in Korea Local *Perilla*. *Korean J. Crop Sci.* 38(6), 560-565.
 15. Skoog and Miller. 1957. The biological action of growth substances. *Symp. Soc. Exp. Biol.* no. 11. 118.
 16. Yamaguchi, K., Takeuchi, Y., Mori, H. and Nishimura, M. 1995. A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal and leaf peroxisomal membranes in pumpkin. *Plant Cell Physiol*, 36, 1157.