

야생 흰 제비꽃 (*Viola patrinii* DC.) 배양세포의 성장과정 중 단백질 및 아미노산의 함량변화

정용모 · 임현희¹ · 조영수¹ · 정정한¹ · 이재현¹ · 서정해² · 권오창^{1*}
경남농업기술원 화훼시험장, ¹동아대학교 생명자원과학부, ²경남정보대학 환경조경과

Alterations in Protein and Amino acid Contents During Growth on Culture Cells of Wild Viola (*Viola patrinii* DC.)

CHUNG, Yong Mo · IM, Hyun Hee¹ · CHO, Young Su¹ · CHUNG, Chung Han¹
LEE, Jai Heon¹ · SUH, Jung hae² · KWON, Oh Chang^{1*}

Floricultural Experiment Station, Kyungnam ARES, ChangWon, 641-920, Korea

¹Dep. of Natural Resources and Life Science, Dong-A University, Pusan, 604-714, Korea

²Dep. of Environment Landscape architecture, KyungNam College of Information and Technology, Pusan, Korea

ABSTRACT Proteins in friable and compact calli of *Viola patrinii* DC. were analysed. The protein contents in friable calli were lower than those in compact calli. In suspension culture, it increased to the maximum after 3 weeks culture from inoculation and decreased after 4 weeks culture. Several strong level signals were detected with the SDS-PAGE analysis. The polypeptides of 28, 31 and 35 KD were observed from the friable cell culture, from the compact cell culture strong band of 30 KD was determined, indicating that these polypeptides may be the major protein occurring during their cultures. Changes in amino acid contents during culture of the viola suspension cells were investigated the amino acid contents were greatest between two and three weeks culture of the viola suspension cells.

Key Words : amino acid, compact callus, friable callus, protein, suspension culture, SDS-PAGE, *Viola patrinii* DC

서 론

우리 나라의 야생 *viola*속을 개량하기 위한 기초연구로서 제비꽃 중 우리 나라에 자생하는 야생 흰 제비꽃 (*Viola patrinii* DC.)의 엽병조직으로부터 유도된 callus를 다년간 계대배양 중에 두 가지의 callus로 성장함을 관찰하였다. 그 중 하나인 friable callus는 비배발생 callus로서 분열능이 없고 부서지기 쉬운 callus이며, 또 다른 하나인 compact callus는 배발생 callus로서 세포분열이 왕성한 callus이다. 일반적

으로 callus 상태로 오랫동안 계대배양시 식물체 분화능력이 상실되거나 감소하므로 callus 배양이나 현탁배양을 이용하여 장기간 계대배양된 세포나 callus로부터 식물체를 분화시키는 체계확립이 중요하다.

Callus나 세포현탁배양을 통한 부정아 및 체세포 유기과정을 거쳐 대량번식 체계를 확립할 경우 배양세포의 핵형의 변화나 엽색체 등의 증감으로 인하여 재생력의 급속한 상실과 변이체의 발생위험 때문에 대상 식물의 callus 배양 특성을 확인할 필요가 있다. 현탁배양한 세포는 비교적 동질성의 집단으로 이루어져 있고 외부로부터 첨가된 화학물질에 신속하고 균일하게 노출되기 때문에 효소의 유도 및 유전자 발현 그리고 첨가된 화학물질의 대사나 분리 및 돌연변이체의 특성을 조사하는 생리·생화학적 특성을 파악하는 데 중요한 연구재

*Corresponding author. Tel 051-200-7500

E-mail ockwon@mail.donga.ac.kr

료로 활용될 수 있다. 또한 비배발생 callus들은 재분화가 가능한 세포들과 비교분석을 통해 재분화 능력 상실과 연관된 유전적 또는 생리적 변화 그리고 그들 세포의 기원과 특성을 파악하는 데 중요한 연구재료로 활용될 수 있으며, 배발생 callus는 현탁배양을 통해 부정배 (체세포배)를 유도하여 식물체로 재분화시킬 수 있다.

이와 같이 callus는 기관형성 연구에 매우 유용한 재료이다. 최근 들어 제비꽃 callus로부터 식물체 재생 (Tadahiko Sato et al. 1995) 및 잡종식물 창출을 위한 원형질 융합의 미세구조 관찰에 관한 연구 (Kwon O.C. et al. 1992; Kwon O.C. et al. 1992) 등의 연구가 활발히 이루어지고 있으나 callus로부터의 기관형성에 관한 생리·생화학적 기초는 불충분한 실정이다.

따라서 본 실험에서는 분화능을 소실한 callus (friable callus)를 현탁배양하여 분열활성 및 분화능이 높은 callus (compact callus)로 전환하는 과정중의 생리화학적 특성을 구명하기 위해 이 두 callus의 단백질과 아미노산의 함량변화를 관찰하였다.

재료 및 방법

실험 재료는 야생 흰 제비꽃 (*Viola patrinii* DC.)의 엽병으로부터 callus를 유도하여 그 callus를 다년간 계대배양으로 증식시킨 callus mass를 사용하였다.

Callus 계대배지는 Murashige T. and Skoog F. (MS 1962) 기본배지에 sucrose 30 g/L, casein hydrolysate 3 g/L, agar 8 g/L, NAA 5×10^{-6} M + kinetine 5×10^{-7} M를 첨가하였으며, pH는 멸균하기 전에 5.8로 조절하였다. 배양조건은 온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 광도 3,000 lux의 형광등 하에서 16시간 광배양조건으로 배양하였다. 세포 현탁배양은 agar만을 제외시킨 동일 조성의 액체배지에서 100 rpm의 진탕배양기에서 배양하였다.

단백질정량 및 전기영동

계대배양 후 6주 경과한 friable callus와 현탁배양에 의한 분열활성이 높은 compact callus를 1주 간격으로 0.7 g씩 채취하여 -80°C 에 보관해 두었다가 마쇄하는 동안 시료가 변하지 않도록 액체질소를 가하여 마쇄한 후 0.1M potassium phosphate (pH 7.2), 400mM NaCl, 10mM 2-mercaptoethanol 추출 buffer에 넣어 15,000rpm에서 40분 동안 원심분리하였다. 그 상정액으로 단백질 함량을 측정하고 동일량의 단백질 농도가 되도록 조정하였다. 단백질 정량은 Bradford법에 따라 정량하였으며 (Bradford 1976) 흡광도는 596 nm에서 측정하였다.

전기영동은 Laemmli (1970)이 행한 방법에 따라 Bio-Rad mini gel system을 이용하여 polyacrylamide 농도를

stacking gel은 5.0%, seperating gel은 12.5%로 이용하였다. 전기 영동을 마친 후 gel은 0.1% coomassie blue로 염색하여 밴드 패턴을 비교하였다.

Amino acids 분석

시료는 계대배양 후 6주 경과한 friable callus와 현탁배양에 의한 분열활성이 높은 compact callus를 1주 간격으로 2 g씩 채취하여 -80°C 에 보관해 둔 것을 동결건조시켜 마쇄한 것 중 단백질 시료 약 100-200 mg을 가수분해용 시험관에 정확히 칭량하여 6N-HCl 2~3 mL를 가하고, 탈기, 질소가스를 충전시키면서 밀봉하고, 110°C 에서 24시간 가수분해시킨 후, 개관하여 염소를 제거한 후 pH 2.2인 sodium citrate buffer에 용해시켜 0.2 μm membrane filter로 여과하여 아미노산 자동분석기 (Biochrom 20, Pharmacia Biotech. Co., U.S.A)로 분석하였다.

결과 및 고찰

단백질 정량 및 전기영동

배양 조건에 따라 새로운 단백질 합성의 유도, 일부 단백질 합성의 억제, 감소 및 증대 등 다양한 단백질 유형의 변화가 일어난다. 배양세포의 생사 및 활력은 배양세포 내 단백질의 변화와 밀접한 관련이 있다. 이러한 단백질을 정량한 결과 friable callus에서는 그 양이 현저히 낮았으며 최대 생장기가 되는 2~3주 동안에 증가함을 알수 있었다. 세포가 정지기에 들어서는 6주째에는 다시 그 단백질의 양이 낮아졌다 (Figure 1). 배양조건에 따라 새로운 단백질 합성의 유도, 일부 단백질 합성의 억제, 감소 또는 증대 등 다양한 단백질 유형의 변화가 일어난다. 셀러리에 있어서 ABA 및 저온처리에 의해 환경변화에 적응하기 위한 대사상의 변화로서 단백질이

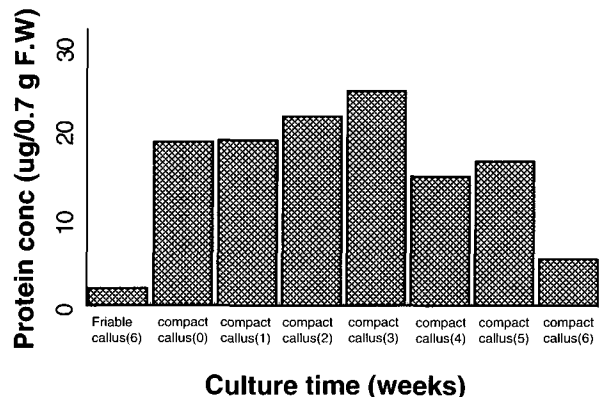


Figure 1. Protein Contents of viola suspension culture cell (0: 0 week, 1: 1 week, 2: 2 weeks, 3: 3 weeks, 4: 4 weeks, 5: 5 weeks, 6: 6 weeks).

합성되어지거나 억제되는 것이 동시에 일어난다는 보고가 있다 (Sung et al. 1981). 벼 배양 세포 단백질의 이차 전기 영동에서 이 배양세포에 고중력을 처리했을 때 생존의 극한 상황에서 특정의 단백질이 사라지거나 다시 생성되는 것으로 보아 배양세포의 생사 및 활력은 배양세포 내 단백질의 변화와 밀접한 관련이 있다고 보고하였다 (Soh et al. 1994.).

조직배양으로 유기 증식된 compact callus와 friable callus로부터 준비된 시료를 전기 영동하여 coomassie blue로 염색한 결과 단백질 밴드의 변화가 전기영동상에 나타났다 (Figure 2).

Callus가 성장하는 과정 동안 10여 개의 주요 단백질 밴드를 볼 수 있었으며 이들 중 몇몇 단백질의 변화가 나타났다. 이는 성장 과정이 진행됨에 따라 그 기능을 달리하는 새로운 단백질이 만들어짐을 의미한다. 단백질 패턴의 비교에서 friable callus는 약 28 KD, 31 KD과 35 KD에서 특이적으로 나타났다. Compact callus에서는 30 KD부근의 밴드에서 많은 변화가 일어났다. 시간이 지나 5주가 되면서 30 KD에서 단백질 밴드가 뚜렷한 이중선으로 나타났다. 또한 배양 시일이 지나면서 28 KD의 밴드가 더 진하게 나타나고 있다. 이 밴드는 friable callus에서는 나타나지 않는 밴드이다.

배양세포의 생장이 활발한 2~4주간 된 callus는 대부분의 세포의 크기가 작고 세포질이 농후한 상태로 비교적 균일한 세포로 구성되어 있고 액포화가 거의 이루어지지 않은 상태로 세포의 분열이 왕성하므로 성장에 필요한 단백질 함량이 높은 것으로 보인다. 6주간 배양된 callus는 신장되고 액포화된 세포들로 구성되어 세포 분열이 정지기에 들어가므로 성장에 필요한 단백질 함량이 현저히 낮았다.

단백질 분석결과 특이 단백질이 체세포배 발생 및 성숙에 관련된다는 보고가 많다. 당근에서는 체세포배 발생에 관련된 특이 단백질이 분리된 바 있으며 (Soh et al. 1994), 미나리의 배발생 callus와 비배발생 callus, 체세포배간의 단백질 패턴

을 비교한 결과 다수의 특이 단백질 밴드가 나타나는 것으로 보고한 바 있다 (Kim et al. 1992). 배발생 callus와 비배발생 callus간에 isozyme pattern 비교에서 비배발생 specific esterase가 존재하는 것으로 보고되었다. 이 실험에서 행한 단백질 패턴의 비교에서 friable callus는 약 28 KD, 31 KD과 35 KD에서 특이적으로 나타났으며 compact callus에서는 30 KD부근의 밴드에서 많은 변화가 일어났다. Compact callus와 friable callus에서 나타나는 단백질의 패턴차이를 비교해 볼 때 이들간의 유전자 발현은 물론 생리 생화학적 특성이 매우 다르다는 것을 알 수 있다. 따라서 이에 대해서는 발생학적인 관점에서 더욱 연구되어야 할 것으로 사료된다.

아미노산 분석

Callus 단백질의 주요 구성 아미노산은 aspartic acid, glutamic acid, leucine, phenylalanine, lysine, arginine 등이었으며, 염기성 아미노산인 histidine, lysine, arginine은 세포의 성장에 따라 꾸준히 증가하였으나 세포가 정지기에 들어서면서 그 함량이 감소하였다. 배지중에 첨가되어 callus형성에 많이 이용될 것으로 생각되어지는 glycine은 주별로 비교할 때 별다른 증감이 관찰되지 않았으나 특히 5주째에 성장에 많은 이용이 되어 그 함량이 큰 폭으로 감소 되었으나 6주째에는 다시 증가하는 경향이 있다. 전체 단백질의 구성 아미노산은 배양 2~3주에 높은 함량을 보였고, friable callus에서 그 함량이 가장 낮았다. 기관분화를 조절하는 것으로 알려진 방향족 아미노산 중 tyrosine의 함량은 compact callus가 7배 정도 높게 나타났으나 phenylalanine은 큰 차이를 보

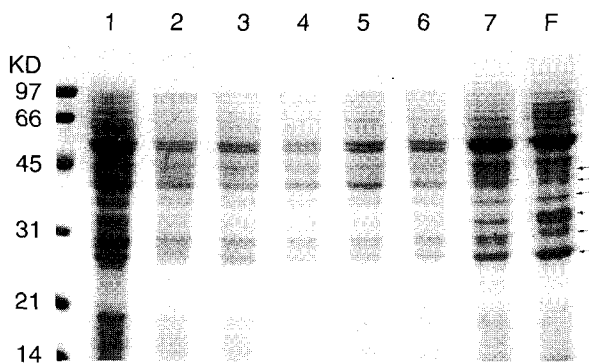


Figure 2. SDS-PAGE electrophoretic pattern of proteins extracted compact calluses (1:0week, 2:1week, 3:2weeks, 4:3weeks, 5:4weeks, 6:5weeks, 7:6weeks) and friable calluses that during 6 weeks(F) of viola suspension culture cell. The calluses were cultured on MS medium (Arrow indicate specific proteins(←)).

Table 1. Amino acids Contents of viola suspension culture cell Unit : mg/g.

Amino acids	Samples							Friable
	0W	1W	2W	3W	4W	5W	6W	
Histidine	2.36	2.74	2.58	2.61	2.39	2.28	1.91	1.86
Lysine	5.44	5.36	6.20	6.97	4.27	4.36	2.27	5.16
Arginine	7.04	6.42	7.74	8.21	7.75	8.04	8.93	14.04
Proline	4.18	-	-	-	-	-	4.69	-
Glycine	2.78	2.84	2.80	3.01	2.87	0.40	2.23	1.76
Alanine	3.10	3.42	3.74	3.75	3.07	3.28	2.87	1.82
Cystine	0.46	0.72	1.18	1.15	0.95	0.90	0.13	0.31
Valine	3.18	1.82	3.34	3.45	3.35	3.16	2.95	2.22
Methionine	1.32	1.98	1.42	1.73	1.53	1.54	0.93	0.40
Isoleucine	3.10	3.30	3.02	3.19	3.05	3.12	2.55	1.54
Leucine	4.20	4.76	4.24	4.27	3.93	4.20	0.33	2.66
Tyrosine	2.52	2.40	2.34	2.31	2.09	2.66	1.61	0.27
Phenylalanine	4.14	4.30	4.02	3.99	3.55	4.18	3.89	2.94
Aspartic acid	5.60	3.28	5.16	4.95	4.03	3.96	4.31	6.14
Threonine	3.46	3.68	3.42	3.49	3.49	3.54	3.07	2.16
Serine	3.40	3.60	3.42	3.59	3.51	3.46	2.91	2.18
Glutamic acid	5.94	12.52	10.70	10.37	8.51	9.98	7.79	6.34
Total	62.22	63.14	65.32	66.96	58.26	59.06	53.40	51.83

이지는 않았다. 생장이 활발한 시기에는 proline의 이용이 왕성하였으나 생장이 정지기에 있는 6주째에는 proline이 다시 생성됨을 보였다.

Kim 등 (1993)은 당근 체세포배 형성과정 중 단백질 구성상태의 방향족 아미노산은 배양기간이 경과함에 따라 점차 증가하며 배형성 억제제에서는 감소한다고 하였다.

Claparols 등 (1993)은 proline을 제거한 배지에서 embryogenic callus의 발생비율이 높다고 보고하였으며 배발생배지에서 자란 coconut callus에서도 proline의 함량이 낮았다는 보고도 있다 (Magnaval et al. 1995).

적 요

Friable callus와 compact callus를 배양 단계별로 단백질 을 정량한 결과 friable callus가 가장 낮았고 배양 0주째부터 단백질 함량이 서서히 증가하여 배양 3주째 최대함량이 되었으며, 4주째부터는 감소하기 시작했다.

전기영동법으로 단백질의 패턴을 조사한 결과 compact callus와 friable callus간에 특징적인 차이를 보이는 단백질 밴드가 관찰되었다. Friable callus는 약 28 KD, 31 KD과 35 KD에서 특이적으로 나타났으며, compact callus에서는 30 KD부근의 밴드에서 많은 변화가 일어났다

전체 단백질의 구성 아미노산은 배양 2~3주에 가장 높은 함량을 보였고, friable callus에서 그 함량이 가장 낮았다.

인용문헌

- Armstrong CL & Green CE (1985) Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. *Planta* **164**:207-214
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **72**:248-254
- Manaval C., M. Noiro, L. Verdeil, A. Blattes, C. Huet, F. Grosdemange, and J. Buffard-Morel (1995) Free Amino Acid Composition of Coconut (Cocos nucifera L.) Calli under Somatic Embryogenesis Induction Conditions. *J. Plant Physiol.* **146**:155-161
- Claparols I., M.A.Santos & J.M.Torne (1993) Influence of some exogenous amino acid on the production of maize embryogenic callus and on endogenous amino acid content. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **34**:1-11
- Duncan DR, Willinms ME, Zehr BE & Widholm JM (1985) The production of callus capable of plant regeneration from immature embryos of numerous Zea mays genotypes. *Planta* **165**:322-332
- Green CE & Rhodes CA (1982) Plant regeneration in tissue cultures of maize. In: Sheridan WF (Ed) *Maize for Biological Research*. Plant Molecular Biology Association. 367-372
- Kim Y.S., D.Y. Cho, and W.Y. Soh (1992) Protein Analysis and Structural Aspects during Somatic Embryogenesis in *Oenantha javanica*. *Korean J. Plant Tissue Culture* **19**(1):23-28
- Kim E.S., M.W. Kim, Y.H.Kang and T.J.Han (1993) Growth and Differentiation of suspension Culture Carrot Cells II. Alteration in Energy Metabolism Activity and Aromatic Amino Acid Content During Somatic Embryogenesis. *Korean J. Plant Tissue Culture* **20**(5): 267-275
- Kwon O.C., C.H. Chung, J.K. Park, T. Sato, T. Taniguchi, and E. Maeda (1992) Electrofusion of Protoplasts from Wild Viola and Pansy and the Ultrastructure of the Fusion Product. *Korean J. Plant Tissue Culture* **19**(3):125-132
- Kwon O.C., C.H. Chung, T. Sato, T. Taniguchi, and E. Maeda (1992) Ultrastructure of Electrofused Products from Pansy (*Viola tricolor*) Mesophyll and Wild Viola (*V. patrinii*) petiole callus protoplasts. *Jpn J. Crop Sci* **61**:469-475
- Leamli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* **227**:680-685
- Soh W.Y., U.P. Yeo, S.S. So, and D.Y. Cho (1994) Protein Synthesis during Somatic Embryo Development and Artificial Seed Germination of *Apium graveolens* L. after Abscisic Acid or Cold Treatment. *Korean J. Plant Tissue Culture* **21**(1):15-22
- Sung ZR, Okimoto R (1981) Embryogenic proteins in somatic embryos of carrot. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**:2661-2665
- Tadahiko Sato, Kwon oh-chang, Hiroshi Miyake, Takeshi Taniguchi and Eizo MAEDA (1995) Regeneration of plantlets from petiole callus of wild viola (*Viola patrinii* DC.), *Plant Cell Reports* **14**:768-772
- Tomes DT & Smith OS (1985) The effect of parental genotype on initiation of embryogenic callus from the elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. *Theor. Appl. Genet.* **70**:505-509

(접수일자 2000년 5월 23일)