식물체 내의 포스포리파제 D 활성 측정

안태현

농촌자원개발연구소

I. 서 언

수확 후의 품질 유지가 매우 중요한 신선식품, 채소나 과일 등에서 나타나는 품질 저하 현상은 세포벽이나 세포막과 같은 세포 구조의 이화학적 분해 및 기능 저하와 관련이 있으며 이는 식물의 성장과 발달 및 수확, 저장 그리고 가공처리 중 일어나는 상처(wounding), 냉해(chilling) 및 절단, 혼합, 침지, 가열처리(cutting, blending, maceration, heating) 등의 상해(injury)에 의하여 가속화될 수 있다. 세포 구조의 이화학적 분해 및 기능 저하 과정 중에서 세포막 지질의 분해는 환경적인 스트레스와 노화(senescence)에 대한 호르몬(ethylene)의 반응 과정 중 일어나는 신호변환경로(signal transduction pathway)에서 볼 수 있는 일반적인 양상이다. 인지질의 분해 경로는 PLD(phospholipase D), phosphatidate phosphatase, lipolytic acyl hydrolase 및 lipoxygenase 등의 효소들을 포함하는 인지질과 효소들의 작용 중에 생성된 각각의 재반응 산물에 대한 일련의 작용을 포함하는 경로이다. 이러한 효소들 중 PLD는 지질분해 대사경로에서 phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, phosphatidylglycerol과 같은 세포막 인지질의 가수분해를 촉진하는 효소이며 세포막 인지질을 phosphatidic acid로 전환시킨다. 최근에는 식물 내의 다양한 PLD isozymes(PLDα, PLDβ, PLDγ, PLDδ)와 신호변환과정에서의 잠재적인 역할 등이 보고되었고 씨앗의 발아 및 성장, 환경적인 스트레스 및 노화 등에서 일어나는 다양한 물리적인 현상들은 PLD에 의해서 조절되어진다고 제안되고 있다.

다음은 세포질 내의 PLD의 활성을 측정하는 방법을 소개하고자 하는데 이 방법은 기존의 형광물질(fluorescent substrates)을 이용한 PLD의 활성 측정법보다 편리하고 신속한 방법으로 방사선동위원소인 ^{3}H(Tritium)를 사용하여 PLD의 활성 정도를 측정한다. 이 방법은 다양한 조건의 영향으로 다르게 나타나는 PLD의 활성을 membrane, mitochondria 또는 cytosol fraction 수준에서 분석할 수 있으나 다음은 membrane fraction 수준에서의 분석만을 기술하고자 한다. radiolabelled choline이 유리되는 정도 또는 기질로부터 phosphatidic acid가 유리되는 양을 관찰하여 membranous PLD의 활성도나 활성변화 추이를 분석할 수 있다.

Corresponding author: (Phone) +82-31-299-0579 (E-mail) happyt27@rda.go.kr

II. 분석방법

1. 재료

완숙되지 않은 어린 방울토마토 (*Lycopersicon esculentum Mill.* cv. Favorita)

2. Buffer

1) Extraction buffer(pH 7.0)

10 mM EDTA, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF(DMSO로 용해시킴) 및 0.5% PEG (mol. wt; 8,000)를 함유한 100 mM Hepes 용액을 제조한다.

2) Resuspension buffer(pH 7.0)

0.2 mM EGTA, 1 mM DTT 및 0.5% PEG(mol. wt; 8,000)를 함유한 100 mM Hepes 용액을 제조한다.

3) Assay buffer(pH 7.0)

2 mM EGTA를 함유한 500 mM Hepes를 제조한다.

3. 기타시약

10 mM $MgCl_2$, 5 mM $CaCl_2$, 0.5% PEG(mol. wt; 8,000), ^3H labelled phosphatidyl choline (substrate)

4. Membrane 분리

1) 씨를 제거한 어린 토마토 과육 50 g을 취해 작게 자른다.
2) 50 mL의 extraction buffer에 작게 자른 토마토 시료를 넣은 후(시료 : 용액 = 1 : 1(w:v)) 후 균질기를 사용하여 2-3분간 균질화시킨다.
3) 4겹의 면거즈를 이용하여 손으로 압착하여 여과시킨다.
4) 위의 단계에서 얻어진 여과물을 원심분리하여 membrane fraction을 얻는다.
   분리되어지는 단계는 다음과 같다.
   ① 1단계: 4,000 rpm, 10분 - 상등액만을 취한다.
   ② 2단계: 9,000 rpm, 20분 - 1단계에서 얻어진 상등액을 원심분리하여 침전된 부분과 상등액을 분리하여 취한다. (침전된 물질-mitochondria)
   ③ 3단계: 50,000 rpm, 1시간 - 2단계에서 얻어진 상등액을 다시 원심분리하여 침전된 부분과 상등액을 분리하여 취한다. (상등액-cytosol, 침전된 물질-membrane)
5) 얻어진 membrane에 resuspension buffer(pH 7.0)를 2 mL씩 2-3회 나누어 가하면서 유리로 된 cell grinder를 이용하여 한번 더 균질화시킨 후 -20°C에 보관한다.

5. 단백질 농도 측정

BSA(bovine serum albumin)를 사용한 Bradford법으로 검량선을 구한 후 토마토 membrane fraction 내의 단백질 함량을 계산한다.

6. PLD 활성 측정

1) Membrane 속의 단백질 함량이 10 μg에 해당되는 양을 계산하여 assay buffer인 Hepes buffer 100 μL에 넣고 10 mM $MgCl_2$, 5 mM $CaCl_2$ 및 0.5% PEG 각각 100 μL 그리고 substrate 25 μL를 가한 후 전체량이 1 mL가 되게 증류수를 넣는다. 이때 대조군으로 사용되는 blank는 assay buffer 100 μL, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM $CaCl_2$ 및 0.5% PEG 각각 100 μL 그리고 substrate 25 μL(전체 425 μL)에 증류수 575 μL를 가하여 전체량 1 mL를 만들어 사용한다.
2) 잘 저어 섞은 후 실온에 10분간 방치하여 반응시킨다.
3) 4 N HCl 100 μL와 chloroform과 methanol의 혼합물(chloroform : methanol = 2 : 1) 1 mL를 사용하여 반응을 정지시킨다.
4) 잘 저어 섞어주고 난 뒤 알루미늄 호일로 빛을 차단시킨 후 4°C의 냉암소에서 하룻밤 방치시킨다(냉장고 사용).
5) 다음날, 실온에 30분간 방치한다.
6) 맑고 깨끗한 상등액 부분(aqueous surface)에서 500 μL를 취하여 scintillation vial에 담은 후 5 mL scintillation fluid(Ecolume, ICN)를 가하여 잘 섞어준다.
7) scintillation counter(섬광계수기, LS 6800, Beckman Instruments Inc.)에서 3분 동안 반응시킨 후 PLD 활성값을 구한다.

<substrate (^3H, Tritium)의 제조>

1. Phosphatidyl choline [1,2-dipalmitoyl-L-3-phosphatidyl(N-methyl-^3H) choline (3.00 TBq $mmol^{-1}$)] (Amersham Life Science) 10 μL (10 μci)를 취한다.
2. 증류수 0.5 mL와 chloroform과 methanol 혼합물(chloroform : methanol = 2 : 1) 0.5 mL를 가한다.
3. 잘 섞은 후 물층(aqueous phase)인 상등액층을 제거한다.
4. 질소가스를 사용하여 시험관 바닥의 유기물층(organic phase)을 증발시킨다. (증발 후 시험관 바닥은 건조하고 깨끗하며 단지 약간의 투명한 물질만을 확인할 수 있다.)
5. 건조된 유기물층에 1%의 Triton X-100과 assay buffer인 Hepes buffer을 각각 100 μL씩 가한다.
6. 증류수 800 μL를 가하여 전체량이 1 mL가 되게 한다.
7. 초음파세척기(sonicator)에서 4분간 초음파세척을 한다.
8. 만들어진 substrate를 25 μL 취한 후 5 mL의 scintillation fluid과 함께 substrate의 activity를 확인한다.
9. -20°C에 보관한다.

<Bradford method를 이용한 단백질 함량의 측정>

1. Bradford reagent 제조

1) 100% ethanol 50 mL에 Coomasie brilliant blue G-250을 100 mg 용해시킨다.
2) 85% phosphoric acid 100 mL을 가한다.
3) 증류수를 가하여 전체량을 500 mL로 만든 후 잘 섞는다.
4) 갈색병에 담아 냉암소에 보관한다.

2. 방법

1) sample 만들기
   ① blank: Bradford reagent 2.5 mL + 증류수 2.5 mL = 5.0 mL
   ② BSA(bovine serum albumin) standard samples:
   Bradford reagent 2.5 mL + BSA standard solution 각각 2 μL, 4 μL, 6 μL, 8 μL 또는 10 μL + 증류수 = 5.0 mL
   ③ 토마토에서 분리된 membrane 시료:
   Bradford reagent 2.5 mL + membrane 시료 20 μL + 증류수 = 5.0 mL
2) 잘 섞은 후 10분간 실온에 방치한다.
3) 595 nm에서 흡광도를 측정한다.
4) 검량선을 이용하여 시료의 단백질 함량을 계산한다.

<PLD activity의 계산>

1) 측정된 시료의 dpm값에서 blank의 dpm값을 빼준다.
2) 단위는 dpm(disintegration per minute)값 또는 Bq(Becquerel)값으로 표시될 수 있다. dpm값의 효율은 cpm(count per minute)값의 80%이며, 1 Bq = 1 dps(disintegration per second), 1 Ci(Curie) = 3.7×10^{10} dps 이다. 일반적으로, 다음과 같은 단위들이 사용 되어진다.
   Radioactivity = dpm / mg protein
   Choline released PLD activity = Bq / mg protein

III. 결 과

PLD의 활성은 세포 내의 다양한 성분변화와 환경적 자극에 따라 조절되어진다. 일반적으로 PLD의 원활한 작용을 위한 최적 pH는 약산성 범위(pH 5.5-6.0)였고 최적 온도는 40°C였다. Diethylether나 chloroform과 같은 용매에 의해서도 활성이 자극되어졌으며, 식물 세포 내에서 호르몬(ethylene)의 작용 기작과 관련된 Ca^{2+}은 1-40 μM 정도의 micromolar level에서 세포막 내 PLD의 활성을 촉진시켰다. 그러나 식물 세포내 단백질의 활성 조절물질로 알려진 Ca^{2+} 결합 단백질인 calmodulin(CaM)은 PLD의 활성에 직접적인 영향을 미치지 않았다.

비고

1. 본 실험은 방사성 동위원소 ^{3}H(Tritium)를 사용하므로 사용 전 반드시 사용방법과 안전수칙 등에 관하여 철저한 교육을 받아야 하며 인체에 피해를 입지 않도록 사용규칙을 잘 지키고 허가를 받은 일정한 장소에서만 사용하여야 한다. 사용 후 처리 또한 정해진 규정 대로 폐기하여야만 한다.
2. 모든 과정은 4°C 냉장실에서 이루어져야 하지만 부득이한 경우 얼음이 채워진 용기를 사용하여 실온에서 이루어질 수 있다.
3. 시료는 열매, 잎, 뿌리 및 씨앗 등을 이용할 수 있다.
4. 일반적으로, 미리 만들어진 substrate는 사용 전에 역가를 확인한 후 양을 조절하여 사용한다.
5. assay buffer는 Hepes 외에도 Bis-Tri, Sodium citrate 등을 사용할 수 있다.
6. PLD 활성에 대한 pH나 Ca^{2+} 등의 영향은 extraction buffer, resuspension buffer 및 assay buffer를 이용할 때 계획한 조건대로 실험환경을 조정하거나 성분을 가감하여 실험할 수 있다.
7. BSA standard solution의 사용 시 그 농도는 사용되는 시료의 단백질 함량에 따라 가감 될 수 있다.

Abbreviation :

DTT, dithiothreitol
EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid disodium
EGTA, ethylene glycol bis(β-aminoethyl ether) N,N,N',N'-tetraacetic acid
PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride
DMSO, dimethyl sulfoxide
PEG, polyethylene glycol
Hepes, N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]

참고문헌

1. Harris, W. E., C. M. Knutson, and W. L. Stahl. 1995. A fluorescent method for study of cabbage phospholipase D activity. Plant Physiol. Biochem. 33 : 389-398.
2. Jandus, J., O. Valentova, J. Kas, J. Daussant, and C. Thevenot. 1997. Phospholipase D during tomato fruit ripening. Plant Physiol. Biochem. 35 : 123-128.
3. Paliyath, G. and J. E. Thompson. 1987. Calcium and calmodulin-regulated breakdown of phospholipid by microsomal membranes from bean cotyledons. Plant Physiol. 83 : 63-68.
4. Paliyath, G. and M. J. Droillard. 1992. The mechanisms of membrane deterioration and disassembly during senescence. Plant Physiol. Biochem. 30 : 789-812.
5. Paliyath, G., R. G. Pinhero, R. Y. Yada, and D. P. Murr. 1999. Effect of processing conditions on phospholipase D activity of corn kernel subcellular fractions. J. Agric. Food Chem. 47 : 2579-2588.

6. Pinhero, R. G., G. Paliyath, R. Y. Yada, and D. P. Murr. 1998. modulation of phospholipase D and lipoxygenase activities during chilling. Relation to chilling tolerance of maize seedlings. Plant Physiol. Biochem. 36 : 213-224.
7. Pinhero, R. G., K. C. Almquist, Z. Novotna, and G. Paliyath. 2003. Developmental regration of phospholipase D in tomato fruits. Plant Physiol. Biochem. 41 : 223-240.

Assay of Phospholipase D Activity in Plant

Tae-Hyun Ahn

Rural Resources Development Institute, NIAST, R.D.A., Suwon 441-853, Korea
+82-31-299-0579, happyt27@rda.go.kr