

고-Lysine 보리 돌연변이 계통 M98 종실의 아미노산 조성 및 Proteome Profile 특성

김대욱[†] · 김홍식^{**} · 박형호^{*} · 황종진^{*} · 김선림^{*} · 이재은^{*} ·
정건호^{*} · 황태영^{*} · 김정태^{*} · 김시주^{*} · Randeep Rakwal^{***} · 권영업^{*}

*농촌진흥청 국립식량과학원, 경기도 수원시 권선구 수인로 125, **농촌진흥청 국제기술협력과, 경기도 수원시 권선구 수인로 126, ***University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

Characterization of Grain Amino Acid Composition and Proteome Profile of a High-lysine Barley Mutant Line M98

Dea-Wook Kim[†], Hong-Sik Kim^{**}, Hyung-Ho Park^{*}, Jong-Jin Hwang^{*}, Sun-Lim Kim^{*}, Jae-Eun Lee^{*}, Gun-Ho Jung^{*},
Tae-Young Hwang^{*}, Jung-Tae Kim^{*}, Si-Ju Kim^{*}, Randeep Rakwal^{***}, Young-Up Kwon^{*}

^{*}National Institute of Crop Science, RDA, Suwon, 441-857, Korea

^{**}International Technology Cooperation Center, RDA, Suwon, 441-707, Korea

^{***}University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305-8572, Japan

ABSTRACT Lysine is the first limiting essential amino acid in cereals for humans and monogastric animals, although its content is generally low. A chemically induced high-lysine barley mutant, M98, has an agronomically undesirable shrunken endosperm trait. In order to obtain detailed insight into the atypical traits of M98 grains, we characterized amino acid composition and protein profiles of M98 and its parent cultivar Chalssalbori. Among a total of 16 amino acids, the percentage of each of the 7 amino acids, including lysine, was 1.2~1.8 times higher in M98, comparing to Chalssalbori. The percentage of proline and its precursor, glutamic acid, in M98 was about the half of that of the amino acids in Chalssalbori, but arginine synthesized from glutamic acid was 1.8 times higher in M98, compared that in the parent cultivar. These results indicated that the mutation in M98 grains might alter the proportion of amino acids linked to each other in a biosynthetic pathway. A comparison of grain proteome profiles between Chalssalbori and M98 revealed 70 differentially expressed protein spots, where 45 protein spots were up-regulated and 25 protein spots down-regulated in M98 compared to those in Chalssalbori. Of these changed protein spots, 53 were identified using nano-electrospray ionization liquid chromatography mass spectrometry. Most of these identified proteins were involved in various biological processes. In particular, 28 protein spots such as β -amylase, serpins and B3-hordein were identified as proteins associated with the atypical traits of M98. It was thought that a genetic study on the unique protein profile of M98 would be needed to develop an agronomically feasible barley

cultivar with high-lysine trait.

Keywords : high-lysine, barley, grain, mutant, amino acid, proteome

Lysine은 인간과 단위가축이 섭취해야 하는 필수아미노산으로서 화곡류에 부족한 첫 번째 제한 아미노산이다. 화곡류 종실의 lysine 함량은 정조를 기준으로 벼 299 mg/100g, 옥수수 254 mg/100 g, 귀리 517 mg/100g, 보리 406 mg/100 g, 호밀 401 mg/100 g 등으로써 콩 2,653 mg/100 g을 비롯한 두류에 비해 매우 낮다(www.fao.org/DOCREP/005/AC854T/AC854T00.htm). 한편, 식품 및 단위가축 사료의 영양성분으로서 단백질은 이것을 구성하는 아미노산의 균형 있는 조성비가 품질을 결정하는 주요 요인이 되는데, 이러한 점에서 lysine의 조성비가 낮은 화곡류 단백질의 품질은 두류 단백질에 비해 낮게 평가된다(Tallberg, 1982).

1960년대에 최초로 발견된 옥수수의 고-Lysine 돌연변이 opaque-2를 시작으로(Mertz *et al.*, 1964) 보리를 비롯한 화곡류 작물에서 종실의 영양가치 향상을 위한 고-Lysine 돌연변이 개발 및 이것을 이용한 유전·육종학적 연구가 보고되었으며(Eggum *et al.*, 1995), 동물 사양시험을 통하여 일반 품종보다 영양가치가 높다는 사실이 판명되었다(Oria *et al.*,

[†]Corresponding author: (Phone) +82-31-290-6749 (E-mail) dwkim08@korea.kr

<Received 1 June, 2012; Revised 18 June, 2012; Accepted 21 June, 2012>

2000). 보리의 경우 1967년에 세계 최초로 자연적인 고-Lysine 보리 돌연변이 Hiproly가 발견된 이후, 1970년대에는 화학 물질이나 방사능 처리를 통하여 다수의 고-Lysine 돌연변이 계통이 개발되었다(Tallberg, 1982). 한편, 고-Lysine 형질관련 유전분석이 수행되어 현재까지 유전적 배경이 다른 7개의 고-Lysine 연관 유전자가 보고되었는데, 이러한 단일 유전자들은 대부분 다면적 발현에 의해 종실의 전분축적 억제효과를 나타내는 것으로 추정되고 있다(Jensen & Doll, 1979). 국내에서는 영양가치가 높은 보리 품종개발을 목적으로 국산 쌀보리 품종인 찰쌀보리에 돌연변이 유도물질인 MNU(N-methyl-N-nitrosourea)를 처리하여 1998년에 lysine 함량이 약 2배 증가된 고-Lysine 돌연변이 계통인 M98이 개발되었다(Kim *et al.*, 2011).

기존의 인위적인 고-Lysine 보리 돌연변이 계통은 공통적으로 모본에 비해 종실의 배가 크고 배유가 함몰되어 있는 형태적인 특성을 보이는 것으로 알려져 있다(Tallberg, 1982). M98에서도 이러한 특성은 뚜렷하게 나타나는데, 특히 배유의 함몰로 인해 상품성이 떨어지고 수량성도 낮아 종실의 높은 영양적 가치에도 불구하고 농업적 이용에는 한계가 있다. 한편, M98 종실의 형태적 특성과 관련하여 Kim *et al.*(2011)은 M98의 함몰배유 형질에 관여하는 단일 열성 유전자가 기존에 보고된 고-Lysine 돌연변이 계통의 함몰배유 유전자와 다른 것이라고 보고하였다.

배유가 함몰되지 않은 고-Lysine 보리 계통을 선발하기 위한 간접적인 방법으로 거대 배 특성과 lysine 함량간의 상관관계를 이용하는 방법을 생각할 수 있다. 이와 관련하여 Kim *et al.*(2011)은 종실에서 배가 차지하는 비율이 찰쌀보리에 비해 M98이 높다고 보고하였다. 한편, Tallberg(1982)는 대표적인 고-Lysine 돌연변이 계통인 Risø1508의 경우에도 종실 무게에서 배가 차지하는 비율은 7%에 불과하며 모본 품종과의 lysine 함량차이는 전적으로 배유의 단백질 조성에 기인한다고 하였다.

보리의 종실에서 hordein은 전체 단백질의 40%를 차지하는 주요 저장 단백질로써(Shewry *et al.*, 1977) 이것의 구성 아미노산에서 lysine 비율은 1% 이하로 매우 적은 반면 proline과 glutamic acid 비율이 매우 높다(Tallberg, 1982). 인위적 고-Lysine 돌연변이의 경우 종실의 hordein 함량은 적고 상대적으로 lysine 조성비가 높은 염 용해성 단백질이나 glutelin 등의 함량이 많다(Shewry *et al.*, 1980).

고-Lysine 보리 돌연변이 계통의 종실은 배유가 함몰되었으며 전분함량이 일반 보리에 비해 적는데, 이러한 특성은 수량성 저하의 주된 원인으로 지적된다(Tallberg, 1982). Kreis & Doll(1980)은 대표적인 인위적 고-Lysine 돌연변이 계

통인 Risø1508의 경우 모본에 비해 종실의 전분함량이 적고 상대적으로 sucrose가 축적되었다고 하였는데, 이것은 전분의 생합성 경로가 차단되었기 때문이라고 생각하였다. 또한, Patron *et al.*(2004)은 고-Lysine 돌연변이 계통의 경우 ADP-glucose transporter의 기능이 저해되어 배유의 amyloplast에서 전분으로 합성되지 못한 ADP-glucose가 축적되는 반면 전분의 함량은 감소되었다고 보고하였다.

돌연변이에 따른 특정 아미노산의 비율 증가는 전체 아미노산 조성의 변화를 야기하며, 이러한 변화는 단백질의 종류 및 발현특성과 밀접한 연관성을 나타낼 것으로 생각할 수 있다. 이러한 관점에서, 생물체의 특정 조직이나 세포에 포함된 전체 단백질을 분석대상으로 하는 proteomics 기법은 돌연변이에 따른 단백질 특성 변화 구명에 유용할 것으로 판단된다. 최근 급속도로 발전하는 proteomics 분야의 기술적 장점을 기반으로, 식량작물의 종실 단백질 특성에 대한 proteomics 수준의 분석 결과가 보고되고 있으며(Finnie & Svensson, 2009; Agrawal *et al.*, 2006; Skylas *et al.*, 2005), 보리의 경우 종실의 전체 또는 부위별 특성, 성숙단계별 변화, 등숙기 고온 등 환경의 영향 및 발아 관련 특성 등이 보고되었다(Finnie & Svensson, 2009).

M98을 이용하여 농업적으로 유용한 고-Lysine 보리 품종을 개발하기 위해서는 M98의 형질적 장단점에 대한 생화학 수준의 이해가 필요하다고 생각된다. 따라서 본 연구는 찰쌀보리와 M98 종실의 아미노산 조성 및 단백질 profile의 특성 차이를 분석하여 M98의 고-Lysine 및 함몰배유 형질에 관련된 생화학적 정보를 얻고자 수행하였다.

재료 및 방법

시험재료 및 재배법

본 연구에서는 국산 쌀보리 품종인 찰쌀보리와 이것에 2.0 mM의 돌연변이 유도물질인 MNU를 처리하여 개발한 고-Lysine 돌연변이 계통인 M98 종실을 대상으로 분석하였다. 보리 종자는 수원시 소재 농촌진흥청 국립식량과학원 발작물 시험 포장에 협폭파 (40 cm x 18 cm)로 10월 중순에 파종하였으며, 시비 등 재배관리는 농촌진흥청의 맥류 표준재배법에 준하여 수행하였다.

종실의 아미노산 조성

아미노산 분석은 2009년부터 2011년까지 3년간 매해 수확된 찰쌀보리와 M98의 종실을 대상으로 Kim *et al.*(2006)의 방법에 따라 수행하였다. 수분함량이 측정된 종실 5 g을 분쇄한 후 500 mesh 체를 통과한 분말 0.5 g을 0.1% phenol

이 함유된 6N HCl로 가수분해하였다. 증류수를 첨가하여 가수분해액의 부피를 100 ml로 맞춘 후 여과지로 여과하고 Sep-pak C₁₈ cartridge를 이용하여 불순물을 제거하였다. 가수분해액의 아미노산은 아미노산 자동분석기(Hitachi L-8800, Japan)를 이용하여 ninhydrin 방식으로 분석하였다. 찰쌀보리와 M98 종실에 함유된 총 16개 아미노산의 전체 함량에 대한 각 아미노산 함량 비율(%)을 계산하고, 그것의 3년 평균값을 아미노산 조성비로 나타내었으며, 찰쌀보리와 M98간의 각 아미노산 조성비 차이에 대한 최소유의차검정(LSD, P<0.05)을 수행하였다.

Proteome 분석

보리 종실 단백질을 추출하기 위하여 외관상으로 균일한 찰쌀보리와 M98 종실을 액체질소로 동결·마쇄하여 약 100 mg의 분말시료를 준비하였다. 각각의 시료는 50 % 추출완충용액[0.9 M sucrose, 0.1 M Tris(pH8.8), 10 mM EDTA (pH8.0), 0.4 % 2-mercaptoethanol]과 50% 페놀(pH8.8)을 이용하여 단백질 이외의 불순물을 제거하였다. 페놀에 녹아 있는 단백질은 0.1 M ammonium acetate와 섞어서 -20°C에서 12시간 동안 침전시킨 후 원심분리하였다. 펠렛 상태의 단백질은 다시 0.1 M ammonium acetate로 -20°C에서 30분간 침전 및 원심분리한 후 80% 아세톤 및 70% 에탄올을 이용하여 정제하였다. 펠렛 상태의 단백질을 lysis buffer[LBTT: 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 18 mM Tris-HCl (pH 8.0), 14 mM Tris, 0.2% Triton X-100, EDTA free proteinase inhibitor, 50 mM dithiothreitol(DTT)]로 용해하였으며, 원심분리하여 취한 상청액을 이차원전기영동(2-dimensional gel electrophoresis, 2DGE)에 필요한 단백질 시료로 사용하였다. 시료의 단백질 농도는 Conassie Plus™ protein assay kit (Pierce)로 측정하였다.

2DGE에 의한 단백질 분리는 Westermeier *et al.*(2008)의 방법에 따라 수행하였다. 단백질의 1차 분리과정인 isoelectric focusing(IEF)를 위하여 24 cm의 IPG(immobilized pH gradient, pH 4-7) strip gel을 이용하였다. IPG strip gel은 단백질 추출액이 포함된 용액[0.5% IPG buffer, LBTT]으로 상온에서 15시간 동안 재수화하였다. IPG strip gel에 부하된 단백질의 IEF는 IPGphor unit(GE-Healthcare)을 이용하여 수행하였으며 최종 70,000 Vh가 되도록 설정하였다.

단백질의 2차 분리과정인 SDS-PAGE 수행에 앞서 IPG strip은 2% DTT를 함유한 equilibration buffer(50 mM Tris-HCl, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS)로 15분 처리한 후, 이어서 2.5% iodoacetamide가 함유된 equilibration buffer로 15분 처리하였다. SDS-PAGE(DALT VI, GE-Healthcare, 12.5%

gel)는 12°C에서 1시간동안 1.5 W/gel 이후 5시간동안 10 W/gel로 유지하여 수행하였다. 2DGE가 완료된 gel에서 점상의 단백질(단백질 spot)을 염색하기 위하여 coomassie brilliant blue (CBB) R-250을 사용하였으며, 염색된 2DGE gel을 스캐닝하여 TIFF 파일로 저장하였다. 디지털 이미지화 된 2DGE gel의 단백질 spot에 대한 양적 분석을 위하여 ImageMaster 2D platinum software(ver. 6.0, GE-Healthcare)를 사용하였다. 전체 단백질 spot의 발현양에 대한 개별 단백질 spot의 발현양을 상대값(% volume)으로 계산하였으며, 독립적으로 작성된 gel 이미지를 1반복으로 하여 3회 반복 수행하였다. 단백질 spot에 대한 양적 분석결과 발현양이 M98에서 찰쌀보리에 비해 1/2 이하로 감소하였거나 1.5배 이상으로 증가한 53개 단백질 spot을 선정하여 질량분석 및 동정을 수행하였다.

발현양의 변화가 확인된 각각의 단백질 spot에 대한 동정은 Kottapalli *et al.*(2008)의 방법에 따라 수행하였다. Gel 조각에 포함된 단백질을 trypsin으로 분해하기에 앞서 ammonium bicarbonate(AMBI)과 acetonitrile을 이용하여 gel 조각에 포함된 염색시약 등의 불순물을 세척하였다. Gel 조각에 포함된 단백질에 trypsin을 첨가하여 peptide 단편으로 분해한 후 AMBI와 trifluoroacetic acid를 이용하여 추출한 peptide를 질량분석에 필요한 농축시료(20 µl)로 이용하였다. Peptide 농축액은 역상 트랩 칼럼과 C₁₈ 칼럼을 이용하여 분리·정제한 후 nESI-LC-MS/MS(nano-electrospray ionization liquid chromatography mass spectrometry) 방식으로 질량분석을 수행하였다. MASCOT 소프트웨어(Matrix Science, London, U.K.)를 이용하여 nESI-LC-MS/MS 분석으로 얻어진 단백질 spot별 MS/MS spectrum 정보에 상응하는 단백질을 NCBI nr (National Center for Biotechnology Information)의 식물 단백질 database에서 검색하였다.

결과 및 고찰

찰쌀보리와 M98 종실의 아미노산 조성 차이

찰쌀보리와 M98 종실에 함유된 총 16개 아미노산을 분석한 결과, 10개 아미노산에서 돌연변이에 따른 조성비 변화가 확인되었다(Fig. 1). 기존에 보고된 결과에서와 같이, M98 종실의 lysine 조성비는 7.5%로써 찰쌀보리의 4.6%에 비해 현저한 증가를 보였다(Kim *et al.*, 2011). Aspartic acid를 비롯하여 총 6개 아미노산의 조성비가 M98에서 찰쌀보리에 비해 1.2~1.8배 높았으나, proline과 glutamic acid의 조성비는 M98에서 각각 7.4%와 17.5%로 찰쌀보리의 14.8%과 28.6%에 비해 절반수준으로 낮았다.

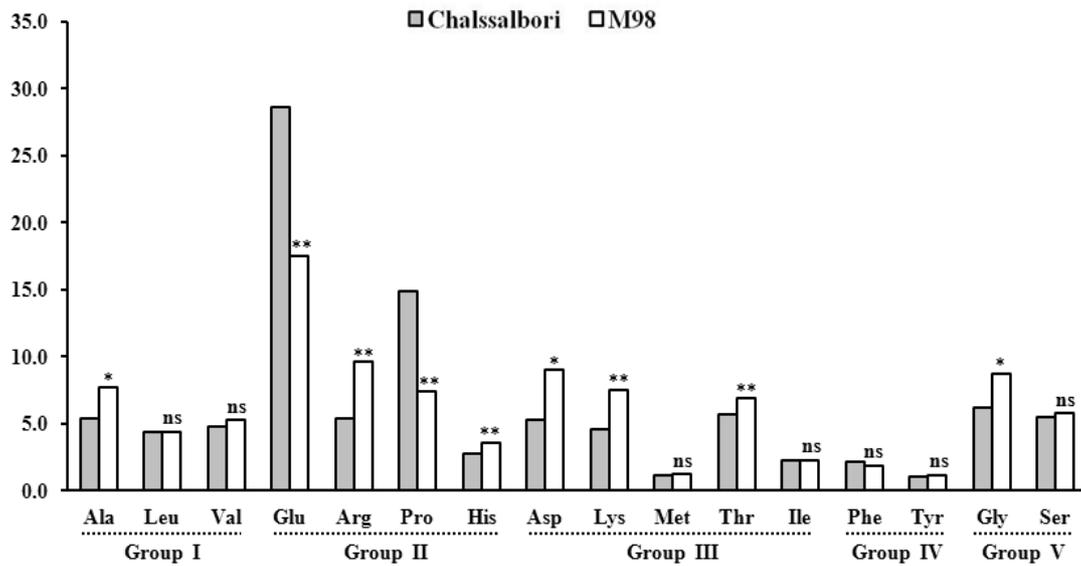


Fig. 1. Difference in amino acid composition of Chalssalbori and M98. The percentage values of each amino acid are the average of materials harvested over 3 years from 2009 to 2011. Asterisks indicate significant difference at $P < 0.05$ by Least Significant difference test. NS means “not significant”. Amino acids in the same group are linked to each other in a biosynthetic pathway.

단위가축용 사료로써 보리의 제한 아미노산은 양돈용 사료의 경우 lysine과 threonine이며, 양계용 사료에서는 methionine, lysine 및 threonine이다(Lange *et al.*, 2007). M98의 경우 threonine 조성비는 6.9%로써 찰쌀보리에 비해 1.2배 높았으며, methionine의 조성비 역시 높았으나 유의한 수준은 아니었다.

일반적으로 보리의 종실 아미노산에서 proline의 조성비는

상당히 높으며, 가축에게 급여하여 이용되지 않는 것은 질소 함량이 높은 배설물로 배출되는데, 이것은 양돈 및 양계농가가 밀집된 지역의 환경에 영향을 미칠 수 있다(Lange *et al.*, 2007). 대표적인 고-Lysine 보리 돌연변이 계통의 특성에 대한 Tallberg(1982)의 분석에 따르면, 인위적인 고-Lysine 돌연변이 계통의 경우 proline의 조성비가 높은 hordein의 함량이 저하되어 상대적으로 낮은 proline 조성비를 나타낸다고

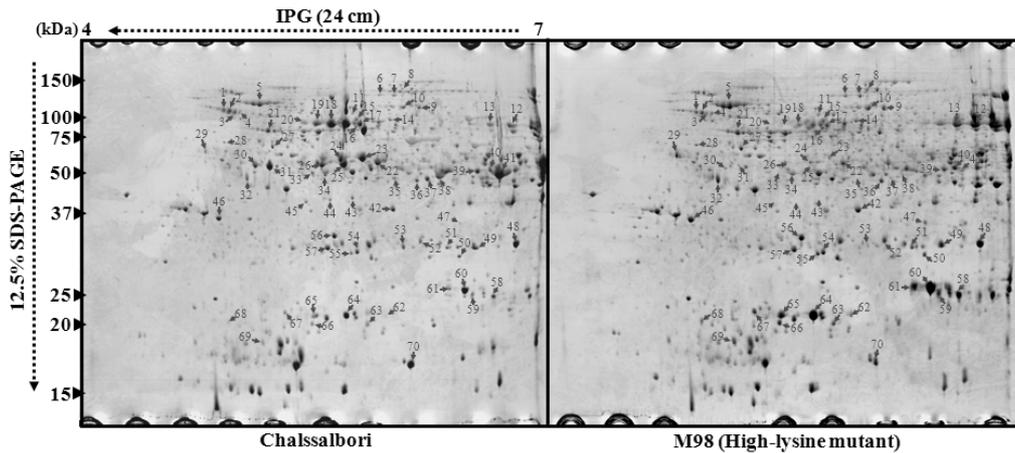


Fig. 2. The 2DGE protein profiles in the grains of Chalssalbori and M98. Total protein extracted with LB-TT was separated by 2DGE and visualized with CBB stain. Numbered arrows show differences in proteins. First dimension (right to left): IEF (pI 4-7) and second dimension (top to bottom): SDS-PAGE (12.5%). Isoelectric points (pI) and molecular mass standards are indicated on the top and the left hand side, respectively.

하였다. 한편, M98에서 proline과 glutamic acid의 조성비가 현저하게 낮아진 것과는 대조적으로, M98의 arginine 조성비는 찰쌀보리에 비해 1.8배 높았다. 이러한 결과는, 찰쌀보리의 proline과 arginine 생합성과정에서 glutamic acid의 전환과정이 돌연변이에 의해 영향을 받았음을 시사하는 것으로 생각되었다.

찰쌀보리와 M98의 proteome 특성

찰쌀보리와 그것의 화학적 돌연변이인 M98의 종실에서 아미노산 조성이 변화한 것은 각각의 종실에 함유된 단백질의 조성 및 밀접한 연관성이 있을 것으로 생각할 수 있다. 본 연구에서는 돌연변이 처리에 의한 보리 종실의 형태적, 생화학적 변화를 종실의 단백질 수준에서 이해하고자 찰쌀보리와 M98 종실의 proteome profile을 분석하였다.

2DGE에 기반한 proteome 분석에서 단백질의 효율적인 정제 및 추출은 전체 분석과정의 시작이며 매우 중요한 단계로써(Agrawal & Rakwal, 2006), 본 연구에서는 phenol buffer를 사용하여 종실의 단백질을 정제하였고, 펠릿 상태의 단백질을 urea가 포함된 lysis buffer로 용해시켜 2DGE을 위한 시료로 사용하였다. 단백질 spot은 2DGE gel에서 각각의 등전점 및 분자량을 기준으로 분리되었으며(Fig. 2), 전체적인 단백질의 발현양상은 찰쌀보리와 M98에서 명확한 차이를 보였다. 육안으로 관찰하여 발현양상의 변화가 확인된 70개의 단백질 spot에 대하여 2DGE gel image analyzer로 발현양을 측정된 결과는 Fig. 3와 같다.

찰쌀보리에 비해 M98에서 발현양이 증가한 단백질 spot은 44개였으며, 감소한 것은 18개였다. 나머지 8개 단백질 spot의 발현은 찰쌀보리(S19, S25, S26, S33, S35, S44, S45) 또는 M98(S8)에서만 확인되었다. 단백질 spot의 발현양이 M98에서 찰쌀보리에 비해 1/2 이하로 감소하였거나 1.5배 이상으로 증가한 53개 단백질 spot을 절취하여 nESI-LC-MS/MS 방식에 의해 질량분석을 수행하고 그것을 바탕으로 NCBI 생물정보 데이터베이스를 이용하여 동정하였다(Table 1).

M98의 경우와 같이 인위적으로 개발된 고-Lysine 돌연변이는 대부분 종실의 배유가 함유된 특성을 보인다(Thalberg, 1982). 이러한 특성은 전분 생합성 경로의 차단에 따른 전분 함량의 감소와 관련이 있으며, 이 때 전분으로 합성되지 못한 sucrose 등이 축적된다고 알려져 있다(Kreis & Doll, 1980). 본 연구에서는 종실의 전분 및 당 대사와 관련하여 4개의 단백질 spot이 β -amylase로 동정되었고, 1개의 단백질 spot은 sucrose synthase로 동정되었다. β -amylase로 동정된 단백질 spot은 M98에서 찰쌀보리에 비해 발현양이 감소하였거나(S17, S18, S20) 전혀 발현되지 않았다(S19). β -amylase의 발

현양상은 보리 유전자원별로 다양한 변이를 보이며(Shewry *et al.*, 1988), 그것의 함량과 종실내 분포는 고-Lysine 돌연변이 계통 별로 상이하다고 알려져 있다(Shen-miller *et al.*, 1991). 한편, sucrose synthase로 동정된 S11은 M98에서 발현양이 2.3배 증가하였는데, Johnson *et al.*(2003)은 전분함량이 감소한 돌연변이 계통(Risø16)의 sucrose synthase 활성이 모본보다 증가하였다고 보고하였다.

전분과 당 대사관련 변화는 해당작용 관련 효소의 발현에도 영향을 미칠 것으로 생각할 수 있다. 이러한 관점에서, 4개의 단백질 spot(S10, S34, S38, S52)이 해당작용 관련 효소들과 상동성을 나타내었으며, 각각의 발현양은 M98에서 찰쌀보리에 비해 S38은 10분의 1로 감소하였고 나머지는 약 2배 증가하였다. 이와 관련하여, Rolletschek(2002) 등은 ADP-glucose 합성효소의 발현이 억제된 형질전환 완두의 자엽에서 전분함량의 감소와 당 함량의 증가를 확인하였으나, 해당작용에 관여하는 효소들의 활성변화는 확인할 수 없었다.

보리 종실 단백질의 30~50%를 차지하는 hordein은 lysine 조성비가 낮은 저장 단백질이며 그것의 폴리펩티드 구성에 따라 A, B, C hordein으로 분류된다. 인위적인 고-Lysine 보리 돌연변이 계통의 경우 hordein의 함량은 모본에 비하여 낮으며 특히 B, C hordein 분획의 비율이 크게 저하되는 특징을 나타낸다(Salcedo *et al.*, 1980). Hordein과 관련하여 본 연구에서는 2개의 단백질 spot(S40, S41)이 B3-hordein으로 동정되었으며, 각각의 발현양은 M98에서 찰쌀보리에 비해 약 2배 높거나(S40), 10분의 1수준으로 낮았다(S41). 이와 관련하여, Klemsdal *et al.*(1987)은 SDS-PAGE gel에서 분리된 3개의 B3-hordein 구성 펩티드가 고-Lysine 돌연변이 계통과 모본간에 양적인 차이를 나타내었다고 보고하였다.

Tallberg(1982)는 자연적인 고-Lysine 보리 돌연변이인 Hiplory와 그것에서 유래된 계통의 경우 hordein의 감소가 적은 반면, 수용성 및 염용해성 단백질의 lysine 비율이 높았다고 하였다. 이와 관련하여, 본 연구에서 7개 단백질 spot(S43, S45, S62, S64, S67-S69)은 밀의 storage protein로 동정되었으며, 각각의 발현양은 S43과 S45를 제외한 5개 spot의 경우 M98에서 찰쌀보리에 비해 최고 8.8배까지 증가하였다. 흥미롭게도 이 단백질의 아미노산 서열은 보리의 embryo globulin(gi:112055110)과 정확한 상동성을 나타내었는데, 곡류 단백질의 용해특성에 따른 분류에서 globulin은 albumin과 함께 수용성 및 염용해성 단백질로 분류된다(Finnie *et al.*, 2002).

보리 종실의 lysine 함량을 높이는 방안으로써 lysine이 풍부한 특정 단백질의 비율을 높이는 방법을 생각할 수 있는데, 대표적인 단백질에는 β -amylase, protein Z, Chymotrypsin

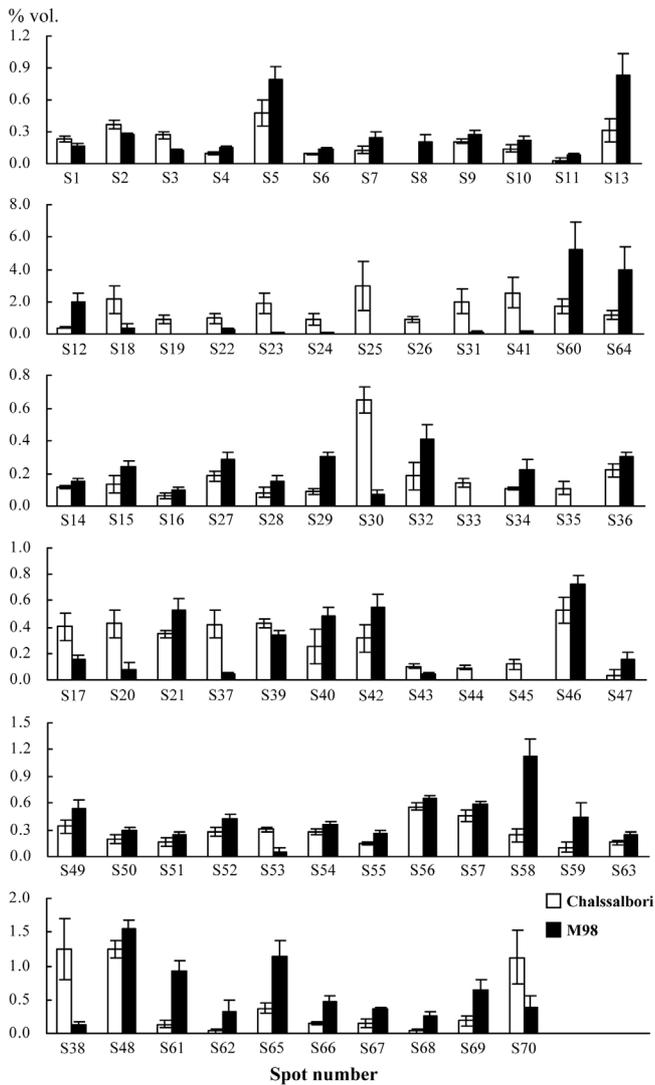


Fig. 3. Graphical presentation of spot volume mean of 70 proteins spots. The relative spot volume was determined using the ImageMaster 2D Platinum imaging software. Values are means from three replications. Bars indicate standard errors of the mean.

inhibitor CI-1과 CI-2 등이 알려져 있다(Tallberg, 1982). 한편, Hejgaard & Boisen(1980)은 이러한 4가지 단백질의 lysine 이 Hiproly 유래 고-Lysine 계통에서 일반 보리에 비해 증가한 lysine 함량의 50% 이상을 차지하였다고 보고하였다. Protein Z는 생물학적인 기능이 정확하게 구명되지 않은 보리의 종실 단백질로서 동물성 protease의 활성억제 단백질인 serpin(serine protease inhibitor)과 아미노산 서열상의 상동성이 밝혀지면서 식물 serpin의 한 종류로 분류되었다(Roberts & Hejgaard, 2008). 본 연구에서는 총 12개 단백질 spot이 β-amylase 또는 serpin으로 동정되었으며, 각각의 발현량은 M98에서 찰

쌀보리에 비해 3개 단백질 spot(S29, S32, S42)은 증가하였고, 7개 단백질 spot(S17, S20, S22, S23, S24, S30, S31)은 감소하였으며, 나머지 3개 단백질 spot(S19, S25, S26)은 발현되지 않았다.

본 연구의 아미노산 분석을 통해서 보리 종실의 돌연변이에 의해 lysine을 비롯하여 다수의 아미노산 조성비가 변화된 것이 확인되었다(Fig. 1). Lange *et al.*(2007)은 C-hordein의 생성을 억제한 형질전환 보리에서 lysine과 함께 methionine의 함량이 증가되었다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 찰쌀보리에 비해 M98에서 lysine이 유의하게 증가하였으나 methionine 함량의 증가는 유의하지 않았다(Fig. 1). 흥미롭게도, M98에서 찰쌀보리에 비해 발현량이 약 1.6배와 2배 증가한 2개의 단백질 spot(S6, S7)이 methionine synthase로 동정되었다.

본 연구에서 분석한 총 53개 단백질 spot 중에서 24개 단백질 spot의 경우 M98의 특이한 형질과 직접적인 연관성을 찾을 수 없었다. 단지, 생물학적 기능이 구명되지 않은 4개의 단백질(S35, S37, S47, S61)을 제외한 20개 단백질 spot은 식물의 종실에서 다양한 생물학적 기능을 수행하는 단백질로 동정되었다.

종실에서는 발달과정에서 건조에 의한 산화스트레스가 발생하며 이것의 피해를 방지하기 위한 항산화 시스템이 알려져 있다(Noctor & Foyer, 1998). 본 연구에서는 항산화 작용을 하는 단백질(S49~51)로 동정된 3가지 단백질 spot 발현량이 M98에서 찰쌀보리에 비해 1.5~1.6배 증가하였다. 1-Cys peroxiredoxin(S49)는 과산화수소를 소거하는 기능을 하고(Lee *et al.*, 2000), Mn-superoxide dismutase(S50)는 미토콘드리아에 존재하는 효소로써 superoxide를 소거하며, glutathione-S-transferase(S51)는 식물의 과산화수소 소거 시스템에서 중요한 역할을 하는 glutathione의 재생에 관여한다. S8은 M98에서만 발현된 단백질 spot으로써 lipoxygenase 1으로 동정되었다. 보리의 LOX-1은 맥주의 품질저하와 관계있는 9-hydroperoxide의 생성을 촉매하는 효소(Yang *et al.*, 1993)로써, Hirota *et al.*(2005)은 LOX-1이 제거된 보리를 재료로 맥주를 만들면 생산과정의 변화 없이 맥주의 풍미와 거품 안정성 등 품질을 향상시킬 수 있을 것으로 생각하였다. S13은 cytosolic 6-phosphogluconate dehydrogenase(6PGDH)로 동정되었고 M98에서 찰쌀보리에 비해 발현량이 2.7배 증가하였다. 이 단백질은 5탄당 인산경로에 관여하는 효소로써, Witzel *et al.*(2011)은 보리 계통의 proteome 분석을 통하여 발아기의 내염성이 강한 계통에서 그렇지 않은 계통보다 6PGDH의 발현량이 높았다고 하였다. 3개의 단백질 spot(S3, S4 S28)이 protein modification에 관여하는 protein disulfide isomerase

Table 1. Identification of the differentially expressed protein spots on 2DGE gel by using nESI-LC-MS/MS.

Spot No.	Distinct peptides	Score	MW(Da) /pI	Accession	Protein name	Up/Down (Fold)	Function
3	25	439	56,656/5.0	gi 1709617	Protein disulfide-isomerase precursor	Down (0.4)	Protein modification
4	24	319	56,656/5.0	gi 1709617	Protein disulfide-isomerase precursor	Up (1.5)	Protein modification
5	21	375	71,932/5.3	gi 108707472	Heat shock cognate 70kDa protein	Up (1.7)	Stress responsive
6	20	449	84,794/5.7	gi 50897038	Methionine synthase	Up (1.6)	Amino acid metabolism
7	32	400	84,794/5.7	gi 50897038	Methionine synthase	Up (2.0)	Amino acid metabolism
8	39	516	96,447/5.7	gi 2506825	Lipoxygenase 1	M98 ^a	Lipid metabolism
10	6	136	60,833/5.5	gi 21537260	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Up (1.6)	Glycolysis
11	3	108	92,495/6.0	gi 19106	Sucrose synthase	Up (2.3)	Starch and sucrose metabolism
13	4	102	51,784/6.6	gi 38426301	cytosolic 6-phosphogluconate dehydrogenase	Up (2.7)	Pentose phosphate pathway
15	12	212	55,098/5.8	gi 15147873	Betaine aldehyde dehydrogenase	Up (1.8)	Stress responsive
16	24	279	47,840/6.0	gi 9408186	F0-F1ATPase α -subunit	Up (1.6)	ATP synthesis
17	24	370	57,883/5.7	gi 38349539	β -amylase 1	Down (0.4)	Starch and sucrose metabolism
18	32	1411	59,886/5.6	gi 29134857	Endosperm-specific β -amylase 1	Down (0.2)	Starch and sucrose metabolism
20	13	83	59,912/5.6	gi 3779258	β -amylase	Down (0.2)	Starch and sucrose metabolism
22	15	432	43,307/5.6	gi 1310677	Protein Z-type serpin]	Down (0.3)	Protease inhibitor
23	26	2744	43,307/5.6	gi 1310677	Protein Z-type serpin	Down (0.1)	Protease inhibitor
24	18	702	42,851/5.5	gi 1197577	Serpin	Down (0.1)	Protease inhibitor
25	18	1228	42,851/5.5	gi 1197577	Serpin	Chalssalbori ^b	Protease inhibitor
26	18	867	42,851/5.5	gi 1197577	Serpin	Chalssalbori	Protease inhibitor
27	3	137	41,987/5.5	gi 21536	Actin	Up (1.5)	Structural protein
28	2	73	33,316/4.8	gi 493591	Disulfide isomerase	Up (1.8)	Protein modification
29	6	114	42,851/5.5	gi 1197577	Serpin	Up (3.3)	Protease inhibitor
30	11	670	42,851/5.5	gi 1197577	Serpin	Down (0.1)	Protease inhibitor
31	11	701	42,851/5.5	gi 1197577	Serpin	Down (0.1)	Protease inhibitor
32	7	62	42,851/5.5	gi 1197577	Serpin	Up (2.2)	Protease inhibitor
34	7	198	41,741/7.0	gi 50946053	NAD-malate dehydrogenase	Up (2.1)	Glycolysis
35	1	35	22,603/5.6	gi 37531070	Putative proline-rich protein	Chalssalbori	Unknown
37	1	126	38,017/6.8	gi 50916172	Homoserinekinase	Down (0.1)	Unknown
38	9	232	39,151/6.6	gi 218157	Cytoplasmic aldolase	Down (0.1)	Glycolysis
40	3	456	30,618/7.7	gi 82371	B3-hordein (clone pB7)	Up (1.9)	Storageprotein
41	3	534	30,618/7.7	gi 82371	B3-hordein (clone pB7)	Down (0.1)	Storageprotein
42	1	73	42,851/5.5	gi 1197577	Serpin	Up (1.8)	Protease inhibitor
43	1	49	72,551/6.8	gi 170696	Storage protein	Down (0.4)	Storage protein
44	1	37	45,831/6.6	gi 37721129	photosystem II CP43 protein	Chalssalbori	Photosynthesis
45	1	119	72,551/6.8	gi 170696	Storage protein	Chalssalbori	Storage protein

Table 1. Continued

Spot No.	Distinct peptides	Score	MW(Da) /pI	Accession	Protein name	Up/Down (Fold)	Function
47	2	29	111,112/5.2	gi 113596078	Os06g0608300	Up (5.6)	Unknown
49	15	304	24,106/6.3	gi 12247762	1-Cys peroxiredoxin	Up (1.6)	Antioxidant
50	7	169	25,283/7.9	gi 1654387	Mn-superoxide dismutase	Up (1.5)	Antioxidant
51	14	165	25,124/6.4	gi 75674128	Glutathione-S-transferase	Up (1.5)	Antioxidant
52	1	118	35,909/5.8	gi 18202485	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	Up (1.5)	Glycolysis
53	8	98	35,736/8.9	gi 729003	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor	Down (0.2)	Nitrogen metabolism
55	2	117	26,147/5.3	gi 66271071	beta1proteasome-1D	Up (1.8)	Peptidase
58	3	64	22,462/7.8	gi 18916	Bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor(BASI)	Up (4.8)	Protein inhibitor
59	3	69	21,970/9.5	gi 38353642	ADP-ribosylation factor1	Up (4.2)	Signal transduction
60	3	108	22,730/6.8	gi 396808	ADP-ribosylation factor1	Up (3.0)	Signal transduction
61	1	30	38,968/9.5	gi 113533595	Os01g0715600	Up (6.6)	Unknown
62	7	214	72,551/6.8	gi 170696	Storage protein	Up (8.8)	Storage protein
63	8	149	17,826/6.0	gi 14009833	Heat shock protein HSP17.8	Up (1.5)	Stress responsive
64	10	807	72,551/6.8	gi 170696	Storage protein	Up (3.3)	Storage protein
67	6	118	72,551/6.8	gi 170696	Storage protein	Up (2.3)	Storage protein
68	5	178	72,551/6.8	gi 170696	Storage protein	Up (6.7)	Storage protein
69	7	82	72,551/6.8	gi 170696	Storage protein	Up (3.4)	Storage protein
70	1	41	56,652/9.3	gi 21539880	Transcription activator	Down (0.3)	Transcription

^a A protein spot (spot No. 8) was detected only in M98.

^b Protein spots (spot No. 25, 26, 35, 44, 45) were detected only in Chalssalbori.

(PDI)로 동정되었으며, 각각의 발현양은 M98에서 찰쌀보리에 비해 40% 수준으로 감소하였거나(S3), 1.7~1.8배 증가하였다. Finnie *et al.*(2002)은 PDI를 보리의 성숙기간 동안에 일시적으로 발현되는 단백질로 분류하였다.

S59와 S60은 M98에서 찰쌀보리에 비해 발현양이 3배와 4.2배 증가하였으며 동정결과 ADP-ribosylation factor(ARF) 1과 상동성을 나타내었다. ARF는 식물체의 발달을 위한 세포의 분열 및 분화에 역할을 하는 것으로 알려진 단백질로써, Zhou *et al.*(2010)은 벼 종실의 미성숙 배와 호분층에서 ARF 유전자의 mRNA 발현양이 출수 후 2일까지 높게 유지되는 것을 확인하였다.

S58은 bifunctional alpha-amylase/subtilisin inhibitor(BASI)로 동정되었으며 그것의 발현양은 M98에서 찰쌀보리에 비해 4.8배 증가하였다. BASI는 종실의 내충성 및 조기발아 방지에 관여하는 것으로 알려진 protein inhibitor로써 고-Lysine 돌연변이 계통의 경우 종실발달 과정에서 BASI의 mRNA 발현양과 발현기간이 모본에 비해 증가하였다고 보고되었다

(Lea & Mundy, 1989).

식물의 스트레스 반응과 관련된 단백질로써 3개의 단백질 spot(S5, S15, S63)이 Heat shock protein(HSP)으로 동정되었으며, 각각의 발현양은 M98에서 찰쌀보리에 비해 1.5~1.8배 높았다. Finnie *et al.*(2006)은 HSP70을 보리 종실의 발달과정 중에 발현양이 점진적으로 증가되는 단백질로 분류하였다.

Glycine betaine은 식물의 내재해성에 관여하는 물질로 알려져 있으며 betaine aldehyde dehydrogenase(BADH, S15)은 그것의 생합성을 촉매하는 효소이다. Abebe *et al.*(2010)은 등숙기의 건조에 따른 보리 이삭의 부위별 유전자 발현을 탐색한 결과 BADH 유전자가 종실에서 발현되지 않았다고 하였다. 한편, Catusse *et al.*(2008)은 사탕수수 종실의 proteome을 분석하여 BADH 발현을 확인하고 내염성과의 관계를 추론하였는데, 관련된 추가 실험을 통해 염 스트레스 조건에서 glycine betaine을 함유한 사탕수수 종실이 그것을 함유하지 않은 arabidopsis 종실에 비해 2~5배 높은 발아력을 보였다

고 하였다.

결론

국내에서 개발된 고-Lysine 보리 돌연변이 계통 M98은 우수한 영양학적 가치와 함몰배유 등 농업적으로 불리한 단점을 함께 가지고 있는데, 이러한 M98의 형질을 정확하게 이해하기 위하여 종실의 아미노산 조성 및 단백질 profile 분석이 필요할 것으로 판단되었다.

찰쌀보리와 M98 종실의 아미노산 profile을 비교한 결과, 일련의 아미노산 생합성 과정에 속한 각 아미노산별 조성이 특이한 차이를 나타내었다. 우선, 찰쌀보리와 비교하여 M98에서는 lysine과 이것의 전구물질인 aspartic acid의 조성비가 현저하게 높았고, 동일한 전구물질에서 합성되는 threonine의 조성비도 유의하게 높았다. 한편, M98에서는 aspartic acid 생성에 이용되는 glutamic acid의 조성비가 낮았는데, 이것을 전구물질로 하는 proline의 조성비가 크게 낮아진 반면, arginine의 조성비는 현저하게 높았다. 이러한 결과는 M98 종실의 lysine 증가를 이해하기 위한 유용한 정보로 판단되었으며, 향후 M98의 아미노산 생합성에 관여하는 주요 효소의 특성에 대한 검토가 필요할 것으로 생각되었다.

종실 아미노산 조성에서 확인된 찰쌀보리와 M98 차이는 종실 단백질 수준에서도 현저하게 나타났다. 2DGE를 기반으로 찰쌀보리와 M98 종실의 proteome profile을 분석한 결과, 발현양 차이를 보이는 총 70개 단백질 spot이 확인되었으며, 이 중에서 49개 단백질 spot이 종실의 다양한 생물학적 과정에 관여하는 단백질로 동정되었다. 이러한 단백질 spot 중에서 8개는 M98의 함몰배유 형질과의 연관성을 생각할 수 있는 전분 및 당 대사관련 단백질이었다. 한편, 총 20개의 단백질 spot이 serpin 등 lysine 고함유 단백질로 동정되었는데, 이것은 M98의 고-Lysine 특성이 lysine 고함유 단백질의 발현패턴과 연관되어 있다는 사실을 보여주는 결과라고 생각되었다. 본 연구에서 나타난 M98 종실 단백질의 발현특성과 동정정보는 향후 M98 유래 계통을 이용한 유전학적 검토 및 고-Lysine 연관 바이오마커 개발에 유용할 것으로 판단되었다.

적요

본 연구는 찰쌀보리와 M98의 종실에 함유된 아미노산 조성 및 단백질 profile의 특성 차이를 분석하여 M98의 고-Lysine 및 함몰배유 형질에 관련된 생화학적 정보를 얻고자 수행하였으며, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

- 찰쌀보리와 M98 종실의 총 16개 아미노산 조성을 분석한 결과, lysine을 비롯하여 총 6개 아미노산의 조성비가 M98에서 찰쌀보리에 비해 1.2~1.8배 높았다. Proline과 그것의 전구물질인 glutamic acid의 조성비는 M98에서 찰쌀보리에 비해 절반수준으로 낮았는데, glutamic acid를 전구물질로 하여 합성되는 arginine의 조성비는 M98에서 찰쌀보리보다 1.8배 높았다.
- 찰쌀보리와 M98간의 종실 단백질을 이차원전기영동으로 분리한 결과, 총 70개 단백질 spot에서 발현양상의 차이가 확인되었다. 찰쌀보리에 비해 M98에서 발현양이 높은 단백질 spot은 44개였으며, 발현양이 낮은 단백질 spot은 18개였다. 나머지 8개 단백질 spot에서 7개의 발현은 찰쌀보리에서만 확인되었고, 1개의 발현은 M98에서만 확인되었다.
- 찰쌀보리와 M98의 종실에서 발현양상 차이를 나타낸 총 53개의 단백질 spot을 선택하여 nESI-LC-MS/MS 방식으로 동정하였으며, 대부분의 단백질 spot은 종실의 다양한 생물학적 과정에 관여하는 단백질이었다. 특히, 28개 단백질 spot은 M98의 함몰배유 및 고-Lysine 형질과 연관된 단백질이었다.
- 본 연구에서 밝혀진 M98 종실의 아미노산 조성 및 단백질 발현특성 정보는 향후 M98 유래 계통을 이용한 유전학적 검토 등을 통하여 고-Lysine 형질 연관 바이오마커 및 보리 신품종 개발에 유용한 정보로 활용될 수 있을 것으로 판단되었다.

인용문헌

- Abebe, T., K. V. B. Melmaiee, and R. P. Wise. 2010. Drought response in the spikes of barley: gene expression in the lemma, palea, awn, and seed. *Funct. Integr. Genomics* 10 : 191-205.
- Agrawal, G. K., N. S. Jwa, Y. Iwahashi, M. Yonekura, H. Iwahashi, and R. Rakwal. 2006. Rejuvenating rice proteomics: Facts, challenges, and visions. *Proteomics* 6 : 5549-5576.
- Agrawal, G. K. and R. Rakwal. 2006. Rice proteomics : A cornerstone for cereal food crop proteomes. *Mass Spec. Rev.* 25 : 1-53.
- Catusse, J., J. M. Strub, C. Job, A. V. Dorselaer, and D. Job. 2008. Proteome-wide characterization of sugarbeet seed vigor and its tissue specific expression. *PNAS.* 105 : 10262-10267.
- Eggum, B. O., G. Brunsgaard, and J. Jensen. 1995. The nutritive value of new high-lysine barley mutants. *J. Cereal Sci.* 22 : 171-176.
- Finnie, C., S. Melchior, P. Roepstorff, and B. Svensson. 2002. Proteome analysis of grain filling and seed maturation in

- barley. *Plant Physiol.* 129 : 1308-1319.
- Finnie, C., K. S. Bak-Jensen, S. Laugesen, P. Roepstorff, and B. Svensson. 2006. Differential appearance of isoforms and cultivar variation in protein temporal profiles revealed in the maturing barley grain proteome. *Plant Sci.* 170 : 808-821.
- Finnie, C., and B. Svensson. 2009. Barley seed proteomics from spots to structures. *J. Proteome Res.* 72 : 315-324.
- Hejgaard, J., and S. Boisen. 1980. High-lysine proteins in Hiproly barley breeding : Identification, nutritional significance and new screening methods. *Hereditas* 93 : 311-320.
- Hirota, N., T. Kaneko, H. Kuroda, H. Kaneda, M. Takashio, K. Ito, and K. Takeda. 2005. Characterization of lipoxygenase -1 null mutants in barley. *Theor. Appl. Genet.* 111 : 1580-1584.
- Jensen, J. and H. Doll. 1979. Gene symbols for barley high-lysine mutants. *Barley Genet. Newsl.* 9 : 33-37.
- Johnson, P. E., N. J. Patron, A. R. Bottrill, J. R. Dinges, B. F. Fahy, M. L. Parker, D. N. Waite, and K. Denyer. 2003. A low-starch barley mutant, Risø 16, lacking the cytosolic small subunit of ADP-Glucose pyrophosphorylase, reveals the importance of the cytosolic isoform and the identity of the plastidial small subunit. *Plant Physiol.* 131 : 684-696.
- Kim, H. S., D. W. Kim, S. L. Kim, S. B. Baek, H. H. Park, J. J. Hwang, and S. J. Kim. 2011. Characterization of a new high-lysine mutant in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Kor. J. Breed. Sci.* 43 : 307-314.
- Kim, S. L., B. Y. Son, T. W. Jung, H. G. Moon, and J. R. Son. 2006. Characterization on fatty acids and amino acids of quality protein maize lines. *Korean J. Crop Sci.* 51 : 458-465.
- Klemsdal, S. S., O. A. Olsen, and K. A. Rørvik. 1987. The barley high lysine genes of mutants 1508 and 527 alter hordein polypeptide composition quantitatively, but not qualitatively. *Hereditas* 107 : 107-114.
- Kottapalli, K. R., P. Payton, R. Rakwal, G. K. Agrawal, J. Shibato, M. Burow, and N. Puppala. 2008. Proteomics analysis of mature seed of four peanut cultivars using two-dimensional gel electrophoresis reveals distinct differential expression of storage, anti-nutritional, and allergenic proteins. *Plant Sci.* 175 : 321-329.
- Kreis, M. and H. Doll. 1980. Starch and prolamin level in single and double high-lysine barley mutants. *Physiol. Plant.* 48 : 139-143.
- Lange, M., E. Vincze, H. Wieser, J. K. Schjoerring, and P. B. Holm. 2007. Suppression of C-Hordein synthesis in barley by antisense constructs results in a more balanced amino acid composition. *J. Agric. Food Chem.* 55 : 6074-6081.
- Lea, R. and J. Mundy. 1989. The bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor of barley : nucleotide sequence and patterns of seed-specific expression. *Plant Mol. Biol.* 12 : 673-682.
- Lee, K. O., H. H. Jang, B. G. Jung, Y. H. Chi, J. Y. Lee, Y. O. Choi, J. R. Lee, C. O. Lim, M. J. Cho, and S. Y. Lee. 2000. Rice 1 Cys-peroxiredoxin over-expressed in transgenic tobacco does not maintain dormancy but enhances antioxidant activity. *FEBS Lett.* 486 : 103-106.
- Mertz, E. T., L. S. Bates, and O. E. Nelson. 1964. Mutant gene that changes protein composition and increases lysine content in maize endosperm. *Science* 145 : 279-280.
- Noctor, G. and C. H. Foyer. 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 : 249-279.
- Oria, M. P., B. R. Hamaker, and J. D. Axtell. 2000. A highly digestible sorghum cultivar exhibits a unique folded structure of endosperm protein bodies. *PNAS.* 97 : 5065-5070.
- Patron, N. J., B. Greber, B. F. Fahy, D. A. Laurie, M. L. Parker, and K. Denyer. 2004. The lys5 Mutations of Barley Reveal the Nature and Importance of Plastidial ADP-Glc Transporters for Starch Synthesis in Cereal Endosperm. *Plant Physiol.* 135 : 2088-2097.
- Roberts, T. H. and J. Hejgaard. 2008. Serpins in plants and green algae. *Funct. Integr. Genomics* 8 : 1-27.
- Rolletschek, H., M. R. Hajirezaei, U. Wobus, and H. Weber. 2002. Antisense-inhibition of ADP-glucose pyrophosphorylase in *Vicia narbonensis* seeds increases soluble sugars and leads to higher water and nitrogen uptake. *Planta* 214 : 954-964.
- Salcedo, G., R. Sanchez-Monge, A. Argamenteria, and C. Aragoncillo. 1980. The A-hordeins as a group of salt soluble hydrophobic proteins. *Plant Sci. Letters.* 19 : 109-119.
- Shen-Miller, J., M. Kreis, P. R. Shewry, and D. R. Springall. 1991. Spatial distribution of β -amylase in germinating barley seeds based on the avidin-biotin-peroxidase complex method. *Protoplasma* 163 : 162-173.
- Shewry, P. R., A. J. Faulks, B. J. Mifflin. 1980. Effect of high-lysine mutations on the protein fractions of barley grain. *Biochem. Genet.* 18 : 133-151.
- Shewry, P. R., S. Parmar, B. Buxton, M. D. Gale, C. J. Liu, J. Hejgaard, and M. Kreis. 1988. Multiple molecular forms of β -amylase in seeds and vegetative tissues of barley. *Planta* 176 : 127-134.
- Shewry, P. R., H. M. Pratt, M. J. Charlton, and B. J. Mifflin. 1977. Two-dimensional separation of the prolamins of normal and high lysine barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 104 : 597-606.
- Skylas, D. J., D. Van Dyk, and C. W. Wrigley. 2005. Proteomics of wheat grain. *J. Cereal Sci.* 41 : 165-179.
- Tallberg, A. 1982. Characterization of high-lysine barley genotypes. *Hereditas* 96 : 229-245.
- Westermeyer, R., T. Naven, and H. R. Höcker. 2008. Proteomics in practice : a guide to successful experimental design, 2nd ed. Wiley-VCH, Germany. pp. 309-356.
- Witzel, K., A. Weidner, G. K. Surabhi, R. K. Varshney, G. Kunze, G. H. Buck-Sorlin, A. Börner, and H. P. Mock.

2010. Comparative analysis of the grain proteome fraction in barley genotypes with contrasting salinity tolerance during germination. *Plant Cell Environ.* 33 : 211-222.
- Yang, G., P. B. Schwarz, and B. A. Vick. 1993. Purification and characterization of lipoxygenase isozymes in germinating barley. *Cereal. Chem.* 70 : 589-595.
- Zhou, X., J. Li, W. Cheng, H. Liu, M. Li, Y. Zhang, W. Li, S. Han, and Y. Wang. 2010. Gene structure analysis of rice ADP-ribosylation factors(OsARFs) and their mRNA expression in developing rice plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 28 : 692-703.