

통통마디로부터 2CysPrx 유전자 분리 및 특성 분석^{1a}

김석규^{2*} · 정상옥² · 나종길^{3*}

Molecular Isolation and Characterization of the 2CysPrx Gene from *Salicornia herbacea*^{1a}

Suk-Kyu Kim^{2*}, Sang Ok Chung², Gil-Jong Na^{3*}

요약

염생식물 통통마디의 종자 발아에 영향을 미치는 환경 요인을 조사하고 환경 스트레스에 의해 유도되는 2CysPrx 유전자를 클로닝한 후 스트레스 조건에 따른 2CysPrx 유전자의 발현 양상에 대하여 조사하였다. 염생식물에 대한 가장 대표적인 스트레스는 염분 스트레스로서 통통마디 발아에 중요한 요인으로 작용하고 있다. 통통마디의 발아에 대한 NaCl의 한계 농도는 7%로 나타났고, 최적의 발아 조건은 NaCl이 없는 상태로 확인되었다. 통통마디 발아에서 최적 온도는 20°C로 98%의 발아율을 보였다. 스트레스에 유도되는 유전자 후보군 중 2CysPrx 유전자의 cDNA를 클로닝하여 분석한 결과 275개의 아미노산으로 이루어져 있고 두 개의 시스테인 잔기를 가지고 있으며 분자량은 30.1kDa으로 나타났다. 2CysPrx 유전자는 서던 블롯에 의해 유전체에 한 카피 존재하는 것으로 나타났고, 6개의 인트론과 7개의 엑손으로 구성되어 있다. qPCR에 의한 2CysPrx 유전자의 전사율을 분석한 결과, 3.5% NaCl과 40mM H₂O₂ 처리 조건에서 전사율이 가장 높게 나타났고, 고온(40°C)과 75μM ABA 처리 조건에서는 처리 후 8시간에 최고의 전사율을 보였으며, 저온(4°C)에서는 유전자 발현이 일어나지 않는 것으로 나타났다. 우리는 여러 환경 스트레스에 의해 유도되는 다른 유전자의 클로닝을 시도하고 있다.

주요어: 염생식물, 염분농도, 환경스트레스, 발아율, 퍼옥시리독신

ABSTRACT

This study is focused on the investigation of the genes which are induced by various stresses of the halophyte *Salicornia herbacea*. One of the factors influencing in the germination of *Salicornia herbacea* is salt stress. The highest germination rate was found in the condition without NaCl, and the upper limit of the NaCl concentration for the germination of *Salicornia herbacea* was 7%. The optimal temperature of 20°C showed a germination rate of 98%. Among genes induced by stress the 2CysPrx gene was cloned and analyzed for this study. The 2CysPrx gene has two cysteine conserved residues and is composed of 275 amino acids with molecular weight of 30.1kDa. The 2CysPrx gene appeared to be one copy in the genome and consists of 6 introns and 7 exons. Quantitative real-time PCR revealed that the highest transcription rate induced by NaCl and H₂O₂ appeared to be at the concentration of 3.5% NaCl and 40mM H₂O₂, respectively. The amount of transcript

1 접수 2016년 8월 17일, 수정 (1차: 2016년 9월 28일), 게재확정 2016년 9월 29일

Received 17 August 2016; Revised (1st: 28 September 2016); Accepted 29 September 2016

2 국립수산물품질관리원 서해수산연구소 갯벌연구센터 Tidal Flat Research Center-National Institute of Fisheries Science, Gunsan, Jeonbuk 54014, Republic of Korea

3 군산대학교 생물학과 Dept. of Biology, Kunsan Nat'l Univ., Gunsan, Jeonbuk 54150, Korea

a 이 논문은 군산대학교 연구교수지원금과 국립수산물품질관리원 수산과학연구소 연구사업 품소만·근소만 갯벌 어장환경 생태연구(R2016057)의 지원에 의하여 수행되었음.

* 교신저자 Corresponding author: Tel: +82-63-469-4587, Fax: +82-63-472-8617, E-mail: jgna@kunsan.ac.kr, sisil2@hanmail.net

induced by high temperature(40°C) and 75µM of ABA was respectively highest. The gene at low temperature (4°C) appeared not to be expressed. We are conducting to clone other peroxyredoxin genes induced by various environmental stresses.

KEY WORDS: HALOPHYTE, SALT CONCENTRATION, ENVIRONMENTAL STRESS, GERMINATION RATE, PEROXYREDOXIN

서 론

통통마디(*Salicornia herbacea* L.)는 칠면초, 해홍나물, 나문재와 함께 우리나라 서·남해안의 갯벌과 염전 주변에 자생하는 대표적인 염생식물로서 높은 염분 농도 환경에서 생육이 가능하고 염류를 흡수하여 체내에 저장하는 능력을 가지고 있는 식물이다(Park *et al.*, 2004). 이들 염생식물 서식지역은 다른 식물군의 생육이 어렵기 때문에 호염성 식물군으로 한정되고, 생육 환경에서 토양의 염분 농도는 다른 환경 조건보다 크게 관여하며(Kim *et al.*, 2012a) 염분에 대한 적응 반응에 따라 염 배제형과 염 축적형으로 분류할 수 있다(Kinzel, 1989). 통통마디는 염 축적형 식물로 염전 주변처럼 염분 농도가 높은 지역에 주로 서식하며 흡수된 염을 액포에 저장하고 수분 유입을 증가시켜 흡수된 염 이온을 희석함으로써 염분 스트레스에 대한 내성을 보이고 있으며 급격한 염분 농도 변화에도 빠른 삼투 적응을 보여 염습지 환경에 성공적으로 생육할 수 있다(Breckle, 1990). 염분 농도에 따른 통통마디의 발아율은 높은 염분농도에서 염분 스트레스로 인해 낮게 나타나지만 일단 발아가 이루어진 이후 높은 농도의 토양 염분조건에서 생존할 수 있는 것은 체내에 염분을 축적하여 높은 삼투압을 갖는 환경에서 수분 흡수를 용이하게 할 수 있는 적응 능력 때문이다(Jo *et al.*, 2002). 통통마디에 대한 연구는 염에 의해 유도되는 *aldolase* 유전자 분리 및 발현 분석(Cha *et al.*, 2003), 당노 유발 쥐에 통통마디를 섭취시켰을 시 신장에서 당노로 인하여 증가한 Glutathione S-transferase(GST) 활성 감소(Bang *et al.*, 2002), 통통마디 추출물에서 SOD 유사활성 측정 결과 농도 의존적인 활성증가(Kim *et al.*, 2009), 통통마디의 항산화 효과에 관한 연구(Han and Kim, 2003) 등이 있다.

퍼옥시레독신은 항산화 효소 특성을 보이는 퍼옥시다제로 생명체 내에서 4개의 작은 그룹으로 분류되며, 식물에서 발견되는 퍼옥시레독신은 1CysPrx, 2CysPrx, Type II Prx, 그리고 PrxQ가 있다. 애기장대의 유전체에서 10개의 Prx를 암호화하는 유전자가 발견되었다(Horiling *et al.*, 2002). 모든 퍼옥시레독신은 보존된 시스테인 잔기를 가지고 있으며

1CysPrx는 1개, 2CysPrx, Type II Prx, PrxQ는 두 개의 시스테인 잔기를 포함한다(Dietz, 2003; Laura *et al.*, 2004). 식물의 2CysPrx는 보리와 시금치에서 처음으로 클로닝 되었으며, 아미노산 서열은 세균의 AhpC와 사람 및 효모의 Tpx와 높은 유사성을 보인다(Baier and Dietz, 1996). 식물을 포함한 고등 진핵 생물의 2CysPrx는 구조적, 기능적 변화를 통해 H₂O₂ 신호전달 과정을 민감하게 조절하고 식물체 외부의 스트레스로부터 식물을 보호하기 위해 산화-환원의존적으로 단백질의 구조와 위치를 변화시킨다(Jang *et al.*, 2006).

본 연구는 여러 생육조건에서 통통마디 종자의 발아율을 조사하였으며, 환경스트레스에 의해 유도되는 퍼옥시레독신 유전자 중 2CysPrx 유전자를 클로닝 한 후 NaCl 농도 및 노출 시간, H₂O₂ 농도 및 노출 시간, 건조 스트레스, 저온 및 고온 등의 환경스트레스 조건에 따른 유전자 발현 양상을 조사하였다. 이 결과는 향후 각각의 스트레스 환경에서 2CysPrx 유전자의 기능 연구에 기초자료를 제공할 것이며, 퍼옥시레독신의 다른 유전자의 클로닝과 특성 분석에 초점을 맞추어 연구가 진행 중에 있다.

재료 및 방법

1. 연구대상 및 성장조건

유전체 DNA 및 cDNA 합성을 위한 RNA를 추출하기 위하여 통통마디(*Salicornia herbacea* L.)는 염습지 토양과 버미큘라이트를 1:3으로 혼합한 토양에 파종하여 발아시킨 후 16시간 실내 광조건과 22°C의 온도에서 4주간 성장시킨 유식물을 사용하였다. 염분 농도에 따른 통통마디의 발아율을 확인하기 위해 0%, 1.75%, 3.5%, 7%, 10.5% 그리고 14%의 NaCl을 사용하였다. 종자는 각각의 NaCl 농도를 갖는 용액과 2% NaOCl로 멸균시킨 후 페트리접시에 각각 200립씩 치상하고 12시간 간격으로 발아된 종자의 수를 조사하였다. 추가적으로 3.5%와 7% 사이에서 발아율의 차이가 크게 나타나 4%, 5%, 6% NaCl 농도에서 발아율을 측정하였다. 온도 조건에 따른 통통마디 발아율을 확인하기 위해 증류수와 2% NaOCl를 사용하여 멸균 한 후 페트리접시

에 200립씩 치상하고 4°C, 10°C, 15°C, 20°C 그리고 25°C의 온도조건에서 발아하였으며, 24시간 간격으로 발아된 종자의 수를 세어 백분율로 환산하였다. 환경스트레스 조건에서 유도되는 유전자의 발현 양상을 확인하기 위한 식물 재료는 발아 후 1주간 성장시킨 유식물에 각각의 스트레스 환경을 적용한 후 RNA를 추출한 후 -80°C 냉동고에 보관하여 사용하였다. 유전자 발현을 유도하기 위한 환경스트레스 조건은 염분 농도 및 노출시간, 과산화수소 농도 및 노출시간, 75µM ABA의 노출시간 그리고 저온(4°C) 및 고온(40°C)을 적용하였다.

2. RNA 추출 및 full-length cDNA 합성

cDNA 합성을 위한 total RNA는 4주간 성장시킨 통통마디 유식물로부터 TRI reagent(Sigma, USA)를 사용하여 추출하였다. 추출한 RNA는 포름알데히드 RNA 겔에서 전기영동하여 확인한 후 분광광도계(Beckman, USA)를 이용해 순도 확인 및 정량한 후, PrimeScript™ 1st strand cDNA synthesis kit(TAKARA, Japan)를 사용하여 1st strand cDNA를 합성하였다. oligo dT를 변형한 프라이머(GGAATTC CGCTCTAGAGCGGGATCCCGGAAGCTTCTTTTTTTT TTTTTTTTTT)를 제작하여 2CysPrx 유전자의 full-length cDNA를 합성하였다. 2CysPrx 유전자의 cDNA를 합성하기 위해 GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에서 아미노산 서열을 검색하여 보존적 공통염기서열을 분석한 후 프라이머를 제작하여 partial cDNA 서열을 확보한 후 RACE-PCR방법을 이용하여 full-length cDNA를 합성하였으며 5'DNA를 합성하기 위해 5'-Full RACE Core set(TAKARA,

Japan)를 이용하였다(Table 1).

3. cDNA 클로닝과 염기서열 분석

PCR을 통해 합성된 cDNA는 pGEM T-easy vector system (Promega, USA)을 사용하여 plasmid vector에 삽입한 후 42°C 열충격 방법으로 대장균 *DH5* α 형질전환하였으며, 앰피실린과 X-gal을 첨가한 LB 배지에 도말하여 cDNA 삽입 콜로니를 선발하였다. Plasmid DNA 추출은 Axyprep plasmid miniprep kit(Axygen, USA)를 사용하였으며, 제한효소 *EcoR* I으로 절단하여 삽입된 cDNA를 확인하였다. cDNA 염기서열은 ABI PRISM 3700 GENETIC analyzer (Applied Biosystems, USA)를 사용하여 확보하였다. 염기서열 분석은 DNASIS®MAX 프로그램을 사용하여 GenBank에 등록되어 있는 염기서열과 비교 검토하였으며, 아미노산 서열을 밝힌 후 보존적 도메인을 확인하여 유전자를 동정하였으며 MEGA6 프로그램을 이용하여 계통수를 작성하였다.

4. 서던 블롯 및 엑손, 인트론 구조 분석

유전체 DNA는 4주간 성장시킨 통통마디 유식물을 액체 질소로 곱게 마쇄한 후 DNeasy® plant mini kit(Qiagen, Germany)를 사용하여 추출하였다. 서던 블롯에 사용한 DNA는 제한효소로 절단한 후 1.0% 아가로스 겔에서 전기영동하여 크기별로 분리된 DNA를 Sambrook and Russell (2000)의 방법에 따라 Hybond-N nylon membrane(GE Healthcare, UK)에 전이시키고 254nm UV로 고정하여 핵산교잡반응을 실시하였다. 핵산교잡반응에 사용한 탐침은 Amersham Alkphos direct labeling kit(GE Healthcare, UK)를 사용하여 표지하고 CDP-Star™ Detection Reagent (GE Healthcare, UK)를 사용하여 반응시킨 후 X-ray 필름에 노출하여 탐색하였다.

엑손, 인트론 구조 분석은 유전체 DNA를 PCR을 이용하여 증폭한 후 프라이머 워킹 방법을 사용하여 염기서열을 확인하였으며 gDNA 염기서열과 cDNA 염기서열을 비교하여 확인하였다.

5. 유전자 발현 양상 분석을 위한 qRT-PCR

스트레스에 유도되는 유전자 2CysPrx 유전자의 발현 양상을 확인하기 위해 NaCl 농도 및 노출 시간, 과산화수소 농도 및 노출 시간, 75µM ABA 노출 시간, 저온 및 고온 환경 조건을 조절하여 진행하였다. 각각의 스트레스로 처리된 통통마디 유식물로부터 TRI reagent(Sigma, USA)를 사

Table 1. 2CysPrx primer sequences used for RACE-PCR in this study

cDNA region	Primers	Sequence(5'→3')
Conserved region primers	2Cys2	GGGCAMACYTCATCNGGGTT*
	KSQT	GGAATTCGCTCTAGAGCGGGATCCCGGAAGCTTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT
3'-raced primers	KSQ1	GGAATTCGCTCTAGAGC
	KSQ2	CGGGATCCCGGAAGCTTC
	2CysP1	TGATGTAACCAAGTCCGTCG
	2CysP2	TGTTCTAATCCAGACCAGG
5'-raced primers	2CysRT (P)	TTCATCAACTGCGGCCAA
	2CysA1	TCTCAAATTCACCATGACGG
	2CysA2	GAGAAAACGTCGTGATGGA
	2CysS1	TGATGTAACCAAGTCCGTCG
	2CysS2	TGTTCTAATCCAGACCAGG
	Open Reading Frame	<i>Sh2CysF</i>
<i>Sh2CysR</i>		GGCATACTATGAGACAATTTAAATGGC

* N: A+T+G+C, M: A+C, Y: C+T

용하여 total RNA를 추출한 후 PrimeScript™ 1st strand cDNA synthesis kit(TAKARA, Japan)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. qRT-PCR(quantitative real time PCR) 반응을 위하여 ABI StepOne Real Time PCR System(Applied Biosystems, USA)과 TAKARA SYBR®Premix EX Taq™ (TAKARA, Japan)을 사용하였다. Endogenous control로 통통마디의 actin 유전자를 사용하였다(Table 2).

Table 2. Primer pair sequences used in the qRT-PCR

name	Primer	Primer sequence(5'-3')
2CysPrx	Sh2CysPrxRTF	ACAGCGTTTCTCGCACCTT
	Sh2CysPrxRTR	GATCACCCAAACCACCAGATT
Actin	ShActinRTF	CTCTGCCATTGAGAAGAAGT
	ShActinRTR	GATACCAGCAGCTTCCATAC

결과 및 고찰

1. 통통마디 발아율에 영향을 미치는 환경요인

1) NaCl 농도

NaCl 농도 조건에 따른 통통마디의 발아율은 12시간 후에 0% NaCl에서 4%의 발아율을 보였으며 1.75%~14%까지의 농도에서는 발아하지 않았다. 24시간 후 발아율은 0% NaCl에서 8%, 1.75%와 3.5% NaCl에서 1%의 발아율을 보였으며 7% 이상의 NaCl 농도에서 발아되지 않았다. 36시간 후 발아율은 0% NaCl에서 70%의 발아율을 보였으며, 1.75% NaCl에서 31%, 3.5% NaCl에서 18%의 발아율을 보였으며 7% NaCl 이상에서는 발아되지 않았다. 48시간 후 0% NaCl에서 90%의 발아율을 보였으며 1.75%와 3.5% NaCl에서 각각 59%와 18%의 발아율을 보였으며 72시간 후 통통마디의 발아율은 0% NaCl에서 97%, 1.75% NaCl에서 83% 그리고 3.5% NaCl에서 54%의 발아율을 보여 시간이 경과함에 따라 꾸준히 증가하는 것으로 나타났다. 한편 7% NaCl에서의 발아율은 60시간 이후 2%의 발아율을 보였으며 10.5% NaCl에서는 1%, 14% NaCl에서는 발아되지 않았다. 종자 치상 6일 후 0% NaCl과 1.75% NaCl에서 각각 98%와 95%의 발아율을 나타내었으며 3.5% NaCl에서 88%의 종자가 발아하였으며 7일 후에는 91%의 발아율을 보여 통통마디의 발아율은 염분의 농도가 낮아수록 빠르게 발아하며 해수의 농도범위인 3.5% NaCl에서 시간 경과에 따라 높은 발아율을 보여 자연상태의 해안에서도 충분히 발아가 이루어질 것으로 판단된다. 염분 농도에 따른 통통마디의 발아율의 한계는 7%의 NaCl로 나타났으며 4%, 5%, 6% NaCl 농도에서의 발아율을 확인해 본 결과

7일 경과 후 통통마디 발아율은 4% NaCl에서 60%, 5% NaCl에서 31% 그리고 6% NaCl에서 8%의 발아율을 보여 해수 농도보다 높은 염분농도에서는 발아가 잘 이루어지지 않는 것으로 나타났다(Figure 1).

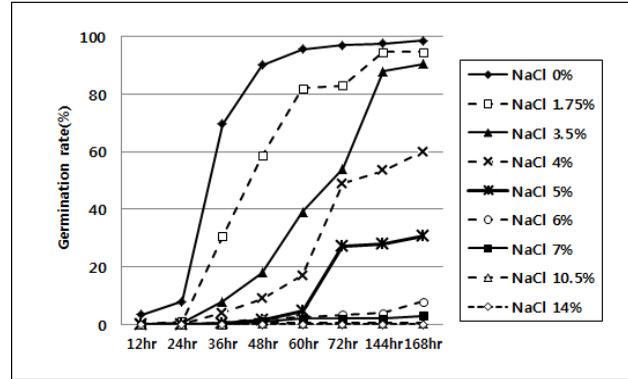


Figure 1. Comparison of germination rate of *S. herbacea* under various NaCl concentration. Seeds were germinated only in less than 7% NaCl

통통마디의 종자는 고염도 환경에서 발아기능을 상실하지 않고 휴면상태를 유지하며, 염분 농도가 낮아지면 발아를 진행하게 되며 7일 동안 7%, 10.5%, 14% NaCl에서 발아되지 않은 종자를 0% NaCl 농도 조건으로 옮겨 치상하였을 때 24시간 후 7% NaCl에 있던 종자는 40%가 발아하였고 10.5%와 14% NaCl에 있던 종자는 각각 5%가 발아하였으며, 72시간 후에 높은 염분농도에서 휴면을 유지하던 종자가 각각 94%, 97% 그리고 98%의 발아율을 보였다 (Figure 2). 통통마디의 발아율에 관한 연구는 Jo *et al.*, (2002)에 의해 보고되었으며 1.5% NaCl 농도에서 30%의 발아율을 보이는 결과로 본 연구에서 제시한 4% NaCl 농도

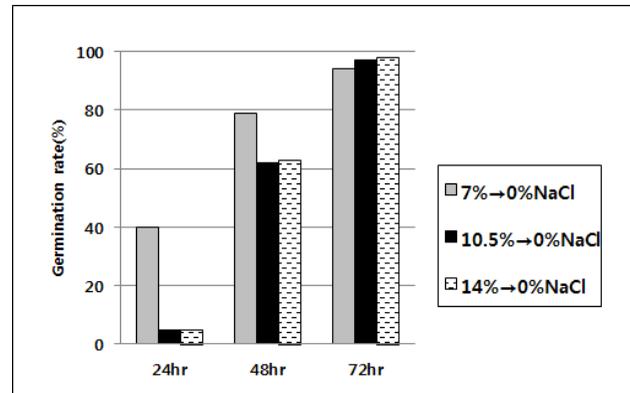


Figure 2. Seeds of *S. herbacea* treated with more than 7% NaCl for 7 days can be germinated when transferred in 0% NaCl solution

에서 60%의 발아가 이루어진 것에 비해 큰 차이를 보이고 있다. 이러한 결과는 통통마디 발아 한계가 일반적인 해수의 염분 농도보다 높기 때문에 염전과 같은 염분이 축적된 토양에서 자생할 수 있는 근거를 제시할 수 있다. 염분이 통통마디 종자의 발아에 영향을 미치는 요인으로 삼투 스트레스에 따른 수분 포텐셜의 감소가 그 원인으로 판단되며, 높은 염분 농도에서 발아되지 않은 종자에 대한 낮은 농도에서 재 발아를 통해 삼투스트레스가 해소되면 발아가 이루어지는 것을 알 수 있다.

2) 온도 조건

온도 조건에 따른 통통마디의 발아율은 24시간 후 4℃에서는 발아되지 않았으며 10℃에서 8%, 15℃에서 30%, 20℃에서 86% 그리고 25℃에서 82%가 발아하였다. 48시간 경과 후 4℃에서 4%, 10℃에서 34%, 15℃에서 54%, 20℃에서 92%, 25℃에서 86%가 발아하였으며, 염분이 없는 농도에서 대부분의 종자가 발아되는 72시간 후 4℃에서 6%, 10℃에서 48%, 15℃에서 86%, 20℃에서 98% 그리고 25℃에서 86%가 발아하였다. 이러한 결과로 미루어볼 때 통통마디의 발아를 위한 온도 조건은 10℃ 이상 되어야 발아가 이루어지며, 최적의 온도조건은 20℃임을 알 수 있다 (Figure 3). Jeong *et al.*(2013)의 연구에서 온도에 따른 통통마디의 발아율은 10℃에서 발아가 지연되고 20℃에서 5일 경과했을 때 최대 발아율을 보이는 결과와 같았으나 30℃에서 가장 빠르게 발아가 이루어지는 결과와는 차이가 나타난다. 자연 상태에서 통통마디의 발아에 영향을 미치는 중요한 요인으로 강수량과 기온이 있으며 통통마디의 발아는 적어도 10℃ 이상의 온도에서 이루어지며 충분한 강수량이 동반되어 토양의 염분농도가 희석되면 빠르게 발아하는 것으로 보여진다.

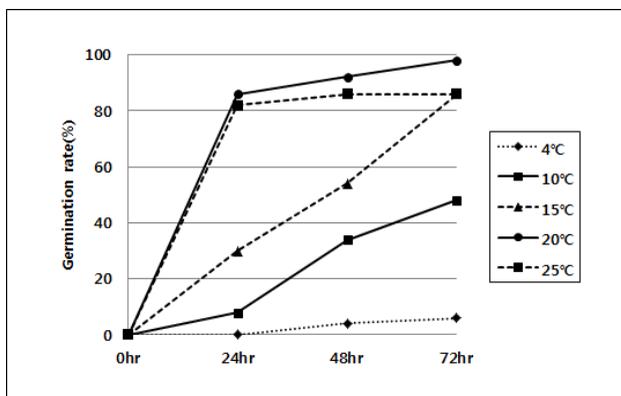


Figure 3. Comparison of germination rate of *S. herbacea* under various temperature

2. 통통마디의 내염성 연관 유전자 탐색 및 발현양상

1) 통통마디 2CysPrx 유전자 클로닝 및 특성

통통마디 2CysPrx 유전자를 탐색하기 위해 GenBank에 등록되어있는 식물 종의 2CysPrx 아미노산 서열 중 보존되어 있는 공통 아미노산 서열을 바탕으로 프라이머를 제작하고 PCR을 수행하여 얻은 부분 염기를 증폭하고 이를 중심으로 5' RACE와 3' RACE를 실시하여 2CysPrx 유전자의 full-length cDNA 염기서열을 확보하였다(Accession No. KU847997). 2CysPrx 유전자는 아미노산 서열에 2개의 보존된 시스테인 잔기를 포함하고 있다. cDNA 염기서열은 1,181bp로 이루어져 있으며 단백질을 번역하는 ORF(Open Reading Frame)는 275개의 아미노산을 암호화하고 있으며, 단백질의 분자량은 30.1kDa이다. 2CysPrx 유전자 내에 존재하는 보존된 시스테인 잔기의 위치는 128번과 250번째 아미노산 서열에 위치하고 있다(Figure 4).

2) 통통마디 2CysPrx 유전자 탐색 및 발현 분석

(1) 2CysPrx 유전자 염기서열 분석

통통마디 2CysPrx 유전자의 염기서열은 1,181bp이며 5' UTR은 57bp이며 ORF는 825bp이고 3' UTR은 299bp이다. 통통마디 2CysPrx의 아미노산 서열을 데이터베이스에서 검색한 결과 염생식물에 대한 선행연구는 검색되지 않았으며 식물 2CysPrx를 대상으로 미나리, 연, 뽕나무, 참외, 카카오 그리고 애기장대의 아미노산 서열과 비교하여 분석하였다. 그 결과 활성부위로 트레오닌 및 아르기닌과의 수소 결합을 통해 촉진되는 보존된 시스테인 티올 촉매 도메인을 확인할 수 있었으며 과산화물 기질 환원 시 발생하는 술펜산 중간체 분해를 위한 이황화결합 형성 시스테인 도메인이 존재하였다(Figure 4). 고등 식물의 2CysPrx 유전자는 보리와 시금치에서 처음 발견되었으며(Baier and Dietz, 1996), 동종이량체 효소로 N-말단과 C-말단에 위치한 시스테인이 각각 촉매로 작용하여 과산화물질을 환원한다(König *et al.*, 2002).

통통마디 2CysPrx 아미노산 서열을 이용하여 각 식물 종 간 상동성을 확인해본 결과 연과 80%의 상동성으로 가장 높게 나타났으며 참외 78%, 뽕나무 77%, 미나리 76%, 카카오 75% 그리고 애기장대 65%의 상동성을 나타내었고 계통수를 작성하여 유연관계를 확인해본 결과 뽕나무와 가장 가까운 유연관계를 보이고 있다(Figure 5).

(2) 서던 블롯 및 엑손, 인트론 구조 분석

통통마디 유전체에 존재하는 2CysPrx 유전자의 copy 수

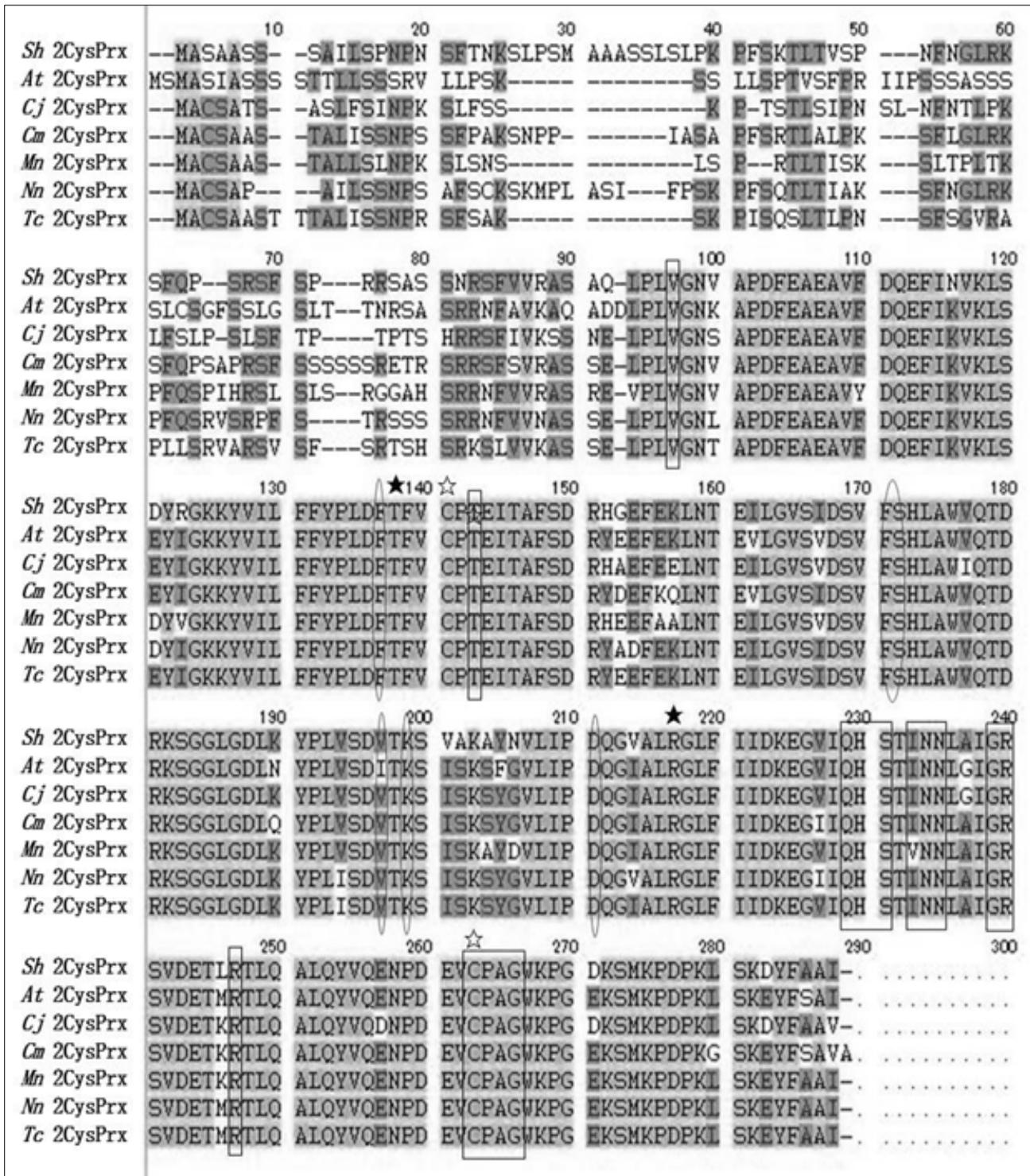


Figure 4. Alignment analysis of the deduced amino acid sequences of 2CysPrxs in *S. herbacea*(KU847997) and other plants. The accession numbers is *C. jubata* (ADX30686.1), *N. nucifera* (XP010246607.1), *M. notabilis* (XP010104788.1), *A. thaliana* (NP187769.1), *C. melo* (XP008442899.1), *T. cacao* (XP007027930.1). The white asterisks indicate the conserved cysteine residues, and black asterisks indicate the thiol cysteine activity site

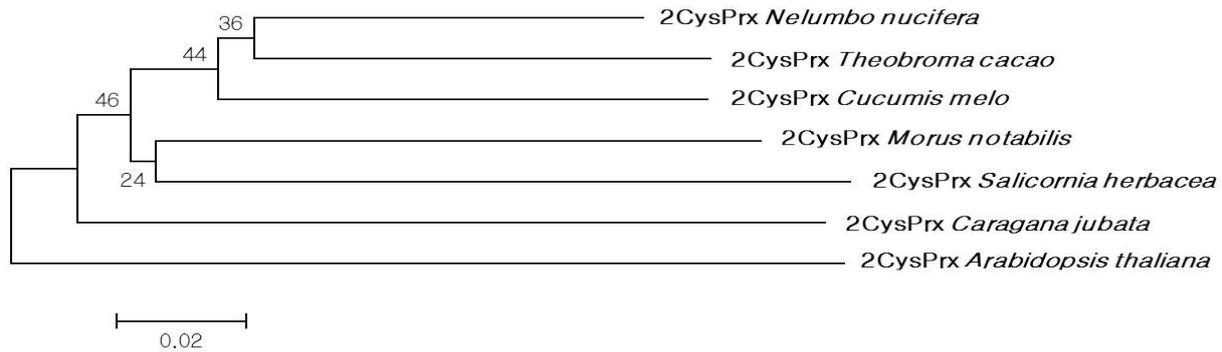


Figure 5. Phylogenetic analysis of 2CysPrxs using the program MEGA6 in *S. herbacea* and other plants. Bar below diagram represents genetic distance

를 확인하기 위해 서던 블롯을 수행하였다. 통통마디로부터 분리한 유전체 DNA를 2CysPrx cDNA를 자르지 못하는 제한효소 *EcoR* I 과 *Xba* I 그리고 1개의 절편을 갖는 *Hind*

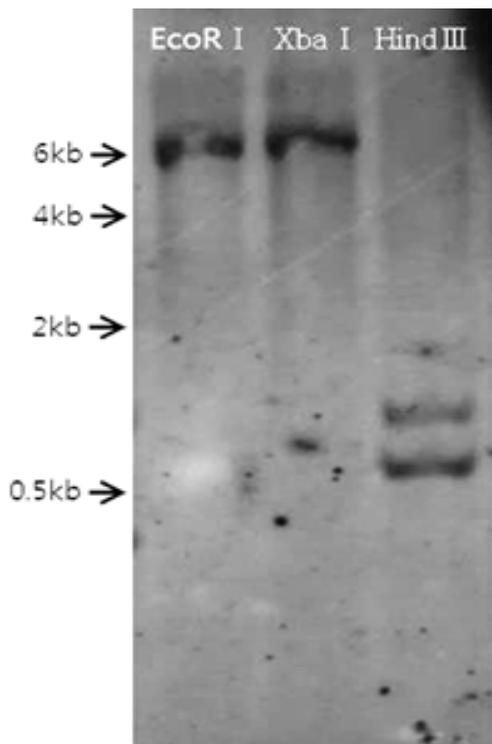


Figure 6. 2CysPrx Southern blot analysis of genomic DNA from *S. herbacea*. genomic DNA was digested with *EcoR* I, *Xba* I, *Hind*III, fractionated on a 1.0% agarose gel and transferred to a nylon membrane. The filter was allowed to hybridize with alkaline phosphatase labeled fragment of the *S. herbacea* 2CysPrx cDNA

III를 사용하여 반응시킨 후 핵산 교잡반응하여 검출한 결과 *EcoR* I 과 *Xba* I 에서 1개의 밴드가 검출되었으며 *Hind* III 에서 2개의 밴드가 검출되었다. 따라서 통통마디 2CysPrx 유전자는 유전체 상에 1개의 copy로 존재하는 것으로 추정된다(Figure 6). 애기장대에서 확인된 2CysPrx A형과 B형에서 1개의 copy로 나타나는 결과와 같았으며 통통마디의 2CysPrx는 B형의 유전자로 확인되었다(Baier and Dietz, 1997, 1999).

통통마디 유전체 DNA의 2CysPrx 유전자의 엑손과 인트론 구조를 분석하기 위해 ORF를 포함하는 cDNA 염기서열을 이용하여 제작한 프라이머를 가지고 약 4kb 길이의 PCR 산물을 증폭한 후 프라이머 워킹 방법으로 3,875bp의 염기서열을 결정하였다. 결정된 유전체 DNA 염기서열과 cDNA 염기서열을 비교 분석하여 엑손과 인트론의 수와 위치를 분석하였다. 통통마디 유전체 DNA 상의 2CysPrx 유전자는 7개의 엑손과 6개의 인트론으로 구성되는 것으로 나타났다. 이 결과는 콩과식물인 벌노랑이에 있는 2CysPrx 유전자의 엑손 수와 일치하였지만 인트론의 염기서열은 많은 차이를 나타냈다(Tovar-Méndez *et al*, 2011). 통통마디의 엑손, 인트론 구조를 데이터베이스(GenBank)에 등록되어 있는 다른 식물 종의 것과 비교한 결과 명아주과의 근대와 가장 유사하게 나타났으며 기타 다른 식물 종들과는 많은 차이를 보였다. 근연 계통 간 콩과 식물인 벌노랑이와 돌콩의 인트론 구조가 유사하게 나타나 진화과정에서 엑손과 인트론 구조의 변화가 있는 것으로 나타났다(Figure 7).

(3) qRT-PCR을 이용한 2CysPrx 유전자 발현 분석

환경 스트레스에 유도되는 2CysPrx 유전자 발현 양상을 알아보기 위해 여러 환경 스트레스 조건에 노출시킨 통통마디 유식물의 RNA를 추출하고 cDNA를 합성한 다음 qRT-PCR을 실시하였으며 반응은 3회 반복하고 cDNA는 반응 시 새로 합성하여 사용하였다. Endogenous control DNA로 통통마디의 actin 유전자를 사용하였다.

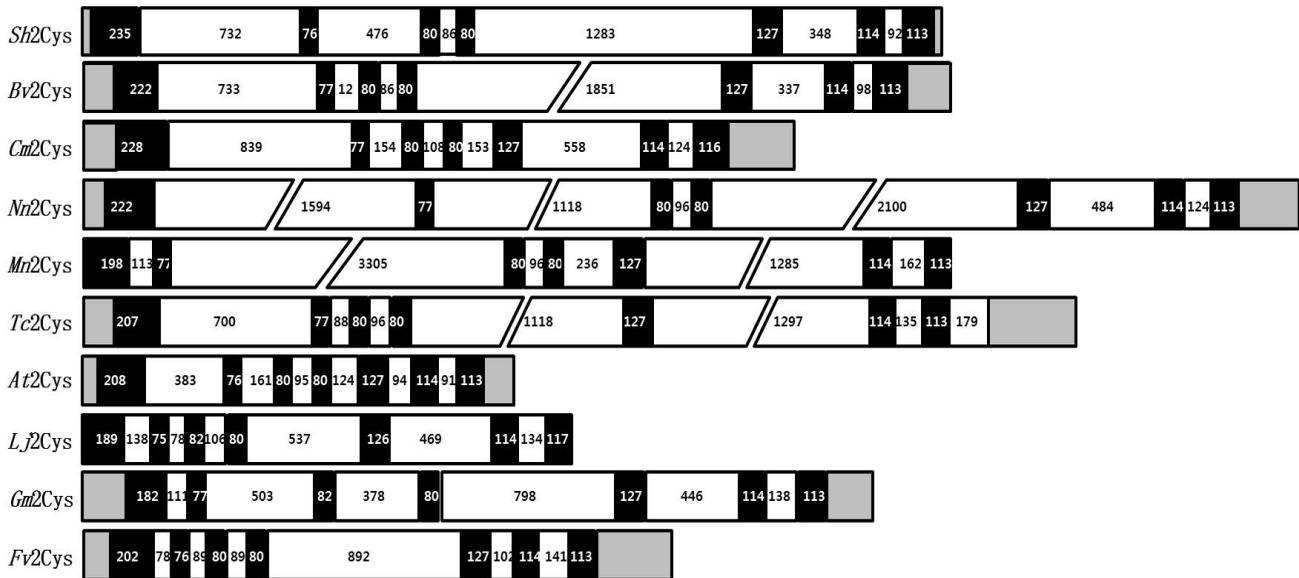


Figure 7. Exon-intron organization of the 2CysPrx gene of *S. herbacea*. The untranslated regions are depicted as gray boxes and open reading frames are indicated by black boxes, and introns are shown as white boxes. Exon and intron sizes are indicated in numbers of base pairs. The plants species are *Sh*(*S. herbacea*), *Bv*(*B. vulgaris*), *Cm*(*C. melo*), *Nn*(*N. nucifera*), *Mn*(*M. notabilis*), *Tc*(*T. cacao*), *At*(*A. thaliana*), *Lj*(*L. japonicus*), *Fv*(*F. vesca*) and *Gm*(*G. max*)

NaCl 처리에 따른 2CysPrx 유전자 발현 양상은 0% NaCl을 기준으로 1.75% NaCl에서 1.166, 3.5% NaCl에서 1.325로 발현량이 가장 높게 나타났으며 7% NaCl에서 1.048로 감소하기 시작하여 10.5%와 14% NaCl 농도에서 각각 0.552와 0.520으로 감소하였다. NaCl 처리 후 시간 경과에 따른 유전자 발현량을 알아보기 위해 해수 농도 3.5% NaCl를 처리하고 유전자 발현양상을 확인한 결과 시간 경과에 따라 유전자 발현량이 증가하였으며 8시간 후 2.259로 두 배 이상 증가하였으며 32시간이 경과하여도 2.287로 지속적인 유전자 발현이 이루어지고 있었다. 애기장대에서 NaCl 스트레스에 의해 발현되는 2CysPrx 유전자의 발현 양상은 감소하는 것으로 나타났으나(Horling *et al*, 2002) 통통마디에서는 3.5% NaCl 농도까지 증가하다 그 이상의 염분 농도에서 감소하는 경향을 보이는 점에서 차이가 나타났다. 시간 경과에 따른 유전자 발현 양상은 Guo *et al*,(2004)의 좁은해홍나물의 2CysPrx 유전자 발현 양상과 같은 결과를 보였다. Kang and Shim(1998)과 Kim *et al*,(2002)의 연구에 의하면 명아주과 염생식물은 염분 처리에도 강한 내성을 보이고 있다고 보고하였으며 이는 통통마디의 내염성이 해수와 유사한 농도에서 지속적인 유전자 발현을 통해 염분 스트레스에 대항하는 것으로 판단된다.

과산화수소 농도에 따른 2CysPrx 유전자 발현 양상은 10mM H₂O₂ 1.247, 20mM H₂O₂ 1.289, 30mM H₂O₂ 1.229

그리고 40mM H₂O₂에서 1.405로 가장 높게 나타났다. 10mM H₂O₂를 처리한 후 시간 경과에 따른 유전자 발현량은 18시간 경과 후 1.132로 증가하여 24시간 경과하였을 때 1.288로 가장 높은 발현량을 나타냈다. Dietz *et al*.(2002)의 연구에서 보리의 2CysPrx와 대장균의 티오레독신의 이중 발현 결과에서 50μM에서 높은 활성이 나타났으며, 1,000μM에서 활성이 낮게 나타난다고 보고한 결과와 다른 양상을 보이고 있다.

온도 조건에 따른 2CysPrx 유전자 발현량은 4℃에서 6시간 후 0.787, 12시간 0.780, 18시간 0.910, 24시간 후 0.857로 나타나 유전자 발현이 거의 일어나지 않는 것으로 나타났다, 40℃에서는 6시간 후 1.415, 12시간 2.414, 18시간 1.197 그리고 24시간 후 1.512로 나타나 유전자 발현이 증가하는 것으로 나타났다. 배추에 45℃ 열 충격을 가했을 때 2CysPrx와 Type II Prx 유전자의 발현이 감소한다는 결과(Kim *et al*, 2012b)와 다르게 나타났다. 통통마디의 고온 조건은 하절기 생장온도 보다 약간 높은 온도에서 생장 반응을 지속시킨 것에 반하여 배추의 열 충격 조건은 짧은 시간에 강한 열을 가한 결과로 예측된다. 건조 스트레스에 대한 2CysPrx 유전자의 발현 양상은 75μM ABA를 처리하고 4시간 경과 했을 때 1.255로 증가하였으며 8시간 후 2.803으로 가장 높은 발현량을 보였다(Figure 8).

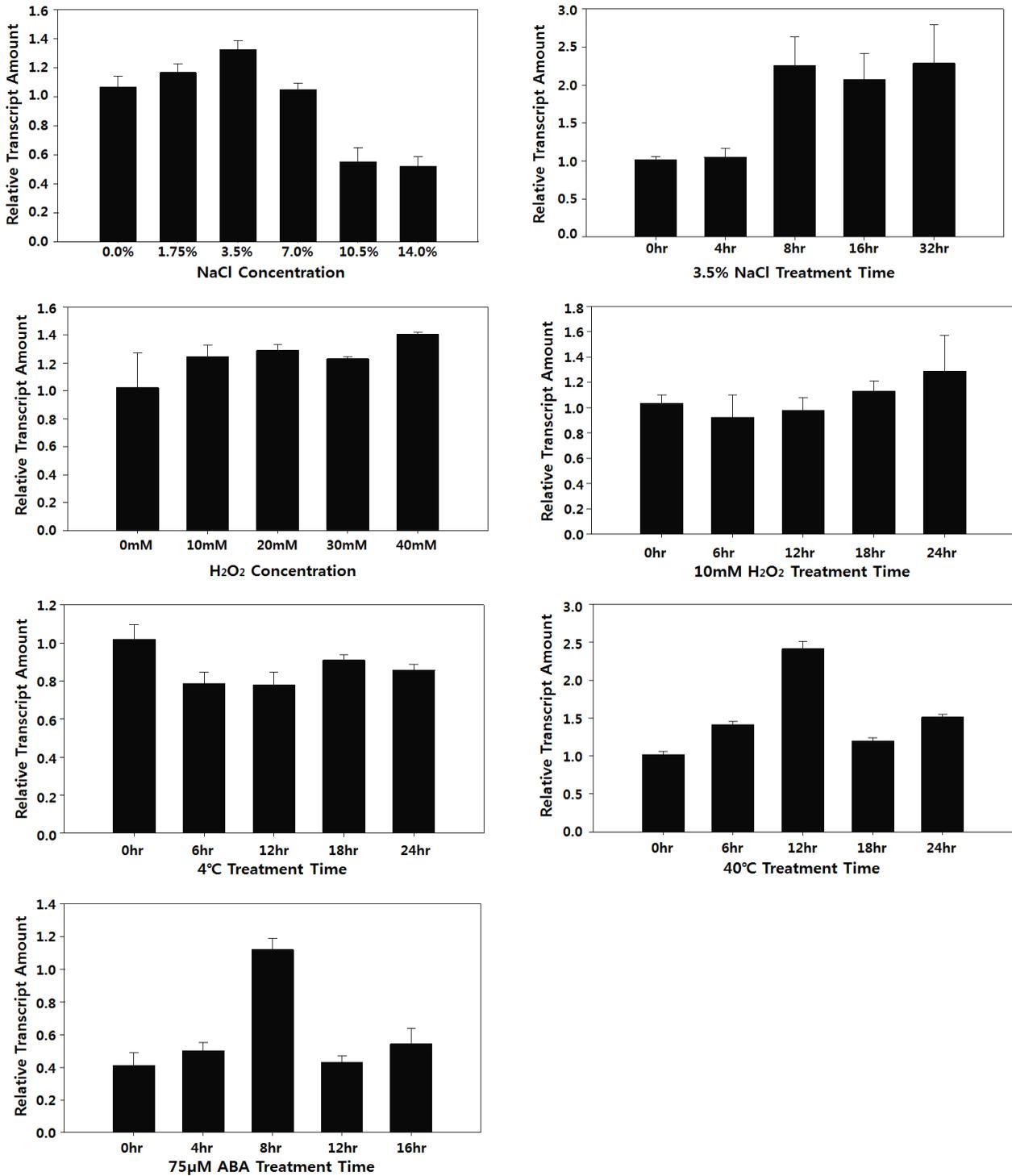


Figure 8. Analysis of relative transcript amounts by quantitative real time-PCR for the 2CysPrx gene under environment stress in *S. herbacea*. Salt stress with various NaCl concentration(a) and treatment time(b) in 3.5% NaCl, oxidative stress with various H₂O₂ concentration(c) and treatment time(d) in 10mM H₂O₂, temperature stresses in 4°C(e) and 40°C(f), drought stress in 75µM ABA(g) was treated time for 0hr~32hr

감사의 글

이 논문은 군산대학교 연구교수지원금과 2016년도 국립수산물품질관리원 수산물안전연구사업 품소만·근소만 갯벌 어장환경 생태연구(R2016057)의 지원으로 수행된 연구입니다

REFERENCES

- Baier, M and K.J. Dietz(1996) Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductases and bacterial alkyl hydroperoxide reductases. *Plant Mol Biol.* 31: 553-564.
- Baier, M and K.J. Dietz(1997) The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclear encoded chloroplast protein. its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plant. *Plant J.* 12: 179-190.
- Baier, M and K.J. Dietz(1999) Protective function of chloroplast 2-Cysteine peroxiredoxin in photosynthesis. Evidence from transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 119: 1407-1414.
- Bang, M.A., H.A. Kim and Y.J. Cho(2002) Hypoglycemic and antioxidant effect of dietary hamcho powder in Streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Kor Soc Food Sci Nutr.* 31: 840-846.(in Korean with English abstract)
- Breckle, S.W(1990) Salinity tolerance of different halophyte types in *N. bassam* and *M. dambroth*, genetic aspects of plant mineral nutrition. Kluwer Academic Publishers Dordrecht.. 167-175.
- Cha, J.Y., E. Netty, S.G. Kim, J.J. Lee, C.O. Lim, W.S. Chung, K.H. Lee and D.Y. Son(2003) Molecular cloning and characterization of salt-inducible Aldolase from *Salicornia herbacea*. *Kor J. Plant Biotechnol.* 30(4): 323-328.(in Korean with English abstract)
- Dietz K.J.(2003) Plant peroxiredoxins. *Annu Rev Plant Biol.* 54: 93-107.
- Dietz, K.J., F. Horling, J. König and M. Baier(2002) The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. *J Exp Bot.* 53: 1321-1329.
- Guo, X.L., Y.R. Cao, Z.Y. Cao, Y.X. Zhao and H. Zhang(2004) Molecular cloning and characterization of a stress-induced peroxiredoxin Q gene in halophyte *S. salsa*. *Plant Science.* 167: 969-975.
- Han, S.K and S.M. Kim(2003) Antioxidative effect of *Salicornia herbacea* L. grown in closed sea beach. *J. Kor Soc Food Sci Nutr* .. 32: 207-210.(in Korean with English abstract)
- Horling, F., P. Lamkemeyer, J. König, I. Finkemeier, A. Kandlbinder, M. Baier and K.J. Dietz(2002) Divergent light-, ascorbate- and oxidative stress-dependent regulation of expression of the peroxiredoxin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 131: 317-325.
- Jang, H.H., S.Y. Kim and S.Y. Lee(2006) Oxidative stress-dependent structural and functional regulation of 2-cysteine peroxiredoxins in eukaryotes including plant cells. *Korean J. Plant Biotech.* 33(1): 1-9.(in Korean with English abstract)
- Jeong, J.H., T.K. Kim, W.Y. Choi, N.H. Baek, C.H. Yang, D.H. Kim, S. Kim, Y.D. Kim, S.B. Lee, K.B. Lee, K.H. Park and K.M. Cho(2013) Optimum salinity concentration and nitrogen fertilization for *Salicornia herbacea* growth in reclaimed land. *Korean J. Intl Agri.* 25(1): 62-67.(in Korean with English abstract)
- Jo, Y.C., K.S. Lee, S.M. Chon and D.S. Byun(2002) Characteristics of growth and germination of *S. herbacea* L. for the soil salinity and manure condition. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 10: 100-108.(in Korean with English abstract)
- Kang, B.H and S.I. Shim(1998) Screening of saline tolerant plant and development of biological monitoring technique for saline stress. Survey of vegetation in saline region and determination of saline tolerance of the plant species of the region. *Korean J. Environ Agriculture.* 17(1): 26-33.(in Korean with English abstract)
- Kim, H.S., J.W. Park, Y.J. Lee, G.W. Shin, I.B. Park and Y.C. Jo(2009) The amino acid content and antioxidant activities of glasswort. *Kor J Food Preserv.* 16: 427-434.(in Korean with English abstract)
- Kim, J.A., Y.S. Choo, I.J. Lee, J.J. Bae, I.S. Kim, B.H. Choo and S.D. Song(2002) Adaptations and physiological characteristics of three chenopodiaceae species under saline environments. *Korean J. Ecology.* 25(3): 171-177.(in Korean with English abstract)
- Kim, S., T.K. Kim, J.H. Jeong, C.H. Yang, J.H. Lee, W.Y. Choi, Y.D. Kim, S.J. Kim and K.Y. Seong(2012a) Characteristics of vegetation on soils having different salinity in recently reclaimed Saemangeum in region of Korea. *Korean J. Weed Sci.* 32(1): 1-9.(in Korean with English abstract)
- Kim, S.Y., Y.J. Jung, M.R. Shin, J.H. Park, G. M. Nawkar, P. Maibam, E.S. Lee, K.S. Kim, S.K. Paeng, W.Y. Kim, K.O. Lee, D.J. Yun, C.H. Kang and S.Y. Lee(2012b) Molecular and functional properties of three different peroxiredoxin isoforms in Chinese cabbage. *Mol Cells.* 33: 27-33.
- Kinzel, H(1989) Calcium in the vacuoles and cell wall of plant tissue. *Flora.* 182: 99-125.
- König, J., M. Baier, F. Horling, U. Kahmann, G. Harris, P. Schurmann and K.J. Dietz(2002) The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 5738-5743.
- Laura, B.V., N. Eusebio, S. Francisca and J.J. Lazaro(2004) Cloning and characterization of a 2-Cys peroxiredoxin from *Pisum sativum*. *J Experi Botany.* 55: 2191-2199.

Park, J.C., Y.O. Jeong, Y.S. Kim and M.R. Huh(2004) Research on transplant possibility of glasswort(*Salicornia herbacea*) into new reclaimed land. *KSPP Envir.* 7: 59-63.(in Korean with English abstract)

Sambrook, J and D.W. Russell(2000) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Ed 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Cold Spring Harbor. New York.

Tovar-Méndez, A., M.A. Matamoros, P. Bustos-Sanmamed, K.J. Dietz, J.C. Francisco, N. Rouhier, S. Sato, S. Tabata and M. Becana(2011) Preoxiredoxins and NADPH-dependent thio-redoxin systems in the model legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.* 156: 1535-1547.