

## Proteomics를 이용한 고랭지 배추의 고온장해 해석

신평균\* · 홍성창 · 장안철 · 김상호 · 이기상

농촌진흥청 농업과학기술원 식물영양과

Received November 13, 2007 / Accepted December 17, 2007

**Proteomic Analyses of Chinese Cabbage (*Brassica campestris* L. *pekinensis*) Affected by High Temperature Stresses in Highland Cultivation During Summer in Korea.** Pyung-Gyun Shin\*, Sung-Chang Hong, Ancheol Chang, Sang-Hyo Kim and Ki-Sang Lee. *Plant Nutrition Division, National Institute of Agricultural Science and Technology, RDA, Suwon, 441-707, Korea* - High temperature stresses have caused growth inhibition and delayed heading in highland cultivation Chinese cabbage during summer in Korea. We have studied high temperature stress responses in the terms of changes of inorganic components and proteins by proteomic analyses. Insufficiencies of nitrogen and phosphorus have affected growth rate and calcium deficiency has caused blunted heading. Proteins extracted from *Brassica* seedling grown at the altitude of 600m and 900m in the Mount Jilun were extracted and analysed by 2-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Profiles of protein expression was then analysed by 2-dimensional gel analyses. Protein spots showing different expression level were picked using the spot handling workstation and subjected to MALDI-TOF MS. Total 48 protein spots were analysed by MALDI-TOF MS and 30 proteins spots out of 48 were identified by peptide mass fingerprinting analyses. Fourteen proteins were up-regulated in extracts from the altitude of 900m and they were identified as oxygen-evolving proteins, rubisco activase and ATPase etc. Sixteen proteins were up-regulated in extracts from the altitude of 600m and they were identified as glutathione S-transferase(1, 28 kD cold induced- and 24 kD auxin-binding proteins) and salt-stress induced protein etc. These stress-induced proteins were related to the mediated protective mechanism against oxidative damage during various stresses. The results indicated that physiological phenomenon in response to high temperature stresses might be resulted by complex and multiple array of responses with drought, heat, oxidative, salt, and cold by high temperature.

**Key words :** High temperature stress, proteomics, highland Chinese cabbage

### 서 론

고랭지는 해발고도가 높아질수록 기온이 점차 낮아지는 기후특성 때문에 포장재배 가능기간이 짧다는 단점에도 불구하고 평산지에서 여름철 고온으로 재배가 어려운 각종 채소작물의 단경기 고품질 생산에 매우 중요한 역할을 맡고 있다. 주로 산간 고랭지인 강원도 태백의 매봉산과 귀네미골, 정선의 질운산 및 민등산, 강릉의 안반덕 등은 표고가 600~1200 m에서 비교적 안정적인 여름배추 집단재배지로서 각광을 받고 있다. 이 지역에서의 여름배추 재배는 6월 중순경에 정식하여 8월 하순경에 수확할 때까지 가장 중요한 시기는 7월 중하순경의 결구 시기이며 이 때의 결구온도는 18°C 내외로 유지되어야 하므로, 표고가 600~700 m 지역이 안전적으로 여름재배를 위한 한계온도지역에 속한다고 볼 수 있다. 최근에는 온난화에 의해 온도가 통계적으로 1990년까지 1.4°C 상승하였으나 2100년까지는 5.8°C로 급격히 상승한다고 예측하고 있으며, 특히 한반도는 다른 지역보다 빠르게

뜨거워지고 있다고 한다[7]. 온도가 상승됨에 따라 여름배추의 결구력이 약해지고 석회결핍에 의한 속썩음 증상 등으로 여름배추 재배적지에서 부적합한 지역으로 변하고 있으며 계속하여 높은 지대로 이동하고 있다. 2004년 질운산 두위봉 고랭지 채소단지의 여름배추 생육상황을 보면 표고 900 m 이상에서 재배되고 있는 배추는 생육이 정상이었던 반면 표고 600 m 이하에서는 결잎이 결구가 되지 않은 등 각종 생리장애가 발생한 것이 하나의 좋은 예다. 온도상승에 따른 고온장해라 함은 비가 오지 않음으로 해서 온도가 올라가고 토양이 건조와 함께 식물체 내부는 여분의 열을 물로 증발시키는 증산작용에 의해 고농도의 일부 양분이 축적되어 생리장애를 유발한다고 알려져 있으며, 이것은 가뭄(drought), 온도상승(heat), 양분과잉 및 결핍 등으로 복합적으로 동시에 나타난다고 볼 수 있다[1,4,5,10,11,18]. 식물체는 온도상승에 반응하여 스트레스관련 단백질의 급격한 변화가 일어나는 데, heat shock protein[15], ATPase[8], Glutathione S-transferase[3,9] 등의 단백질이 발현된다고 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 표고 600m와 900m에서 배추시료를 채취하여 proteomics를 이용하여 단백질 발현양상과 무기성분 함량 분석을 통하여 고랭지 여름배추의 온도상승에 따른 고온장

\*Corresponding author

Tel : +82-31-290-0321, Fax : +82-31-290-0208

E-mail : pgshin@rda.go.kr

해 원인을 해석하였다.

### 재료 및 방법

고랭지 여름배추의 고온장해 원인을 구명하기 위하여 2004년 8월 13일 강원도 정선군 절운산의 고랭지 채소단지에서 표고별로 배추시료를 채취하여 현장에서 액화질소를 이용하여 시료를 준비하였다. 식물체의 무기성분 함량분석은 토양 및 식물체 분석법[12]에 의해 산가수분해액 HClO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액으로 분해하여 질소는 micro-kjeldahl 증류법, 인산은 ammonium metavanadate에 의한 비색법으로 분석하였고, 양이온은 Inductively coupled plasma spectrometer ICP)로 측정하였다.

단백질 분리를 위한 시료는 고온장해를 받은 배추를 현장에서 액화질소 하에 막자사발로 분쇄하였다. 분쇄된 재료 1g를 Tris-HCl(pH 6.8)에 혼합하여 혼합액의 다섯배 부피의 아세톤(v/v)을 가한 다음 -20°C에서 2시간 침전시켜 원심분리한 침전물에 전기영동용액(7 M urea, 2 M thiourea, 4%(w/v) CHAPS, 1%(w/v) DTT, 2%(v/v) pharmalyte, 1mM benzamidine)에 녹여 -20°C에 보관하여 이차원전기영동 시료로 사용하였다. 단백질의 농도측정은 Bradford[2]법

으로 분석하였다. 일차적으로 등전점 전기영동(IEF)을 위하여 IPG strips를 전기영동용액(7 M urea, 2 M thiourea, 2% CHAPS, 1% DTT, 1% pharmalyte)에 상온에서 12-16시간 정도 reswelling하였고, Strip당 시료는 200 µg를 사용하여 Multiphore II system (Amersham Biosciences Co.)을 이용하여 상온에서 IEF를 수행하였다. 이차적으로 전기영동을 수행하기 위해 IPG Strips을 1% DTT를 함유한 equilibration buffer(50 mM Tris-Cl, pH6.8, 6 M urea, 2% SDS, 30% glycerol)로 10분간 incubation한 후 DALT 2D system Amersham Biosciences Co)을 이용하였다. 완료된 이차원 gel은 Oakley 등[14]의 방법으로 silver 염색한 후 스캐닝하여 컴퓨터에 저장하였다. 스캐닝된 단백질 spots의 발현변화 확인을 위한 정량적인 분석은 PDQuest software (BioRad Co.)를 이용하였고, 각 spot의 quantity는 대조군에 비해 두배 이상의 발현변화를 보여주는 단백질 spots을 선정하였다. 단백질 spots은 Shevchenko 등[16,17]의 방법에 따라 modified porcine trypsin을 이용하여 작은 단편으로 효소적으로 분해하여 C<sub>18</sub>ZipTips(Millipore)을 사용하여 탈염 및 농축한 후 질량분석을 위해 target plate 위에 적하하였다. 질량분석기는 Ettan MALDI-TOF (Amersham Biosciences Co)를 사용하여 Target plate 상에 적하되어 있는 단백질 단편들을

Table 1. Contents of inorganic components in highland Chinese cabbage stressed by high temperature

altitude	T-N	P	K	Ca	Mg	Cl	Fe	Cu	Mn	Zn	B
600m	2.46	0.41	6.76	1.25	0.31	0.09	146	10	40	46	30
900m	2.49	0.21	6.59	2.83	0.51	0.16	612	6	72	65	33
Optimal ranges	3.32~4.69	0.60~0.82	3.71~5.59	1.23~2.00	0.19~0.32	-	132~237	-	27~111	40~77	56~90

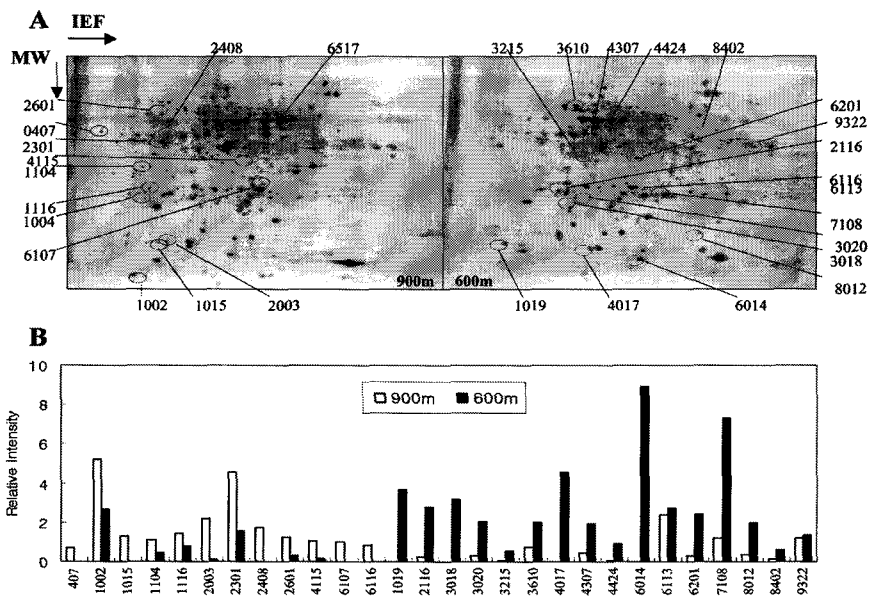


Fig. 1. Comparison of 2-DE gel maps of the expressed protein patterns isolated from seedlings grown either in 900m(normal) or in 600m(damage).

mass spectrum으로 분석한 후 ProFound 검색엔진[6]을 이용하여 단백질을 동정하였다.

## 결과 및 고찰

### 배추의 무기성분 함량

표고 600 m 및 900 m에서 고랭지 여름배추를 채취한 후 산분해하여 식물체의 무기성분을 Table 1와 같이 조사한 결과 질소함량은 고도에 따른 함량차이는 없지만 최적범위보다 낮게 나타났고, 석회함량도 낮게 나타났다.

이것은 생장에 필요한 질소와 식물체 조직을 튼튼하게 하는 석회 함량이 감소함으로써 결실의 결구가 되지 않고 늘어진 현상인 고온에 의한 장애가 발생되었다고 볼 수 있다[13]. 따라서 현장에서는 석회질소비료를 표층시비하거나 액비를 이용하여 살포하는 경향을 볼 수 있는데 이것은 석회질소 비료를 사용하는 것이 영양물질을 공급하는 측면과 함께 재배 환경을 조절한다는 양면성을 가지고 있다고 볼 수 있다.

### 배추의 단백질체 발현양상

고온장해 배추의 단백질 발현패턴을 분석하기 위해 Fig. 1의 2-DE gel과 같이 전체 127개의 단백질이 반복실험하여 분리되었고, 그 중 48개의 단백질이 고도에 따라 변화하는 양상을 보여주고 있으며 표고 900 m에서 발현이 14개, 600 m에서 16개의 단백질 발현이 높게 나타났으며 발현정도를 비교해보면 일반적으로 600m에서 더 강하게 발현되었다.

이러한 30개의 단백질 spots를 Table 2과 같이 단백질 서열을 결정하였고, 또한 기능적으로 Fig. 2와 같이 분석한 결과 Salt 37%, oxidative 13%, heat 10%, cold 10% 등으로 나타나 일반적으로 알려져 있는 고온장해와 일치하며 각종 stress 관련 단백질이 복합적으로 나타났다.

Hwang 등[5]은 식물이 불리한 환경에 처하면 기공에서 일어나는 증산작용에 의하여 체내의 수분상태를 조절하는데 이것은 여분의 열을 물로 증발시키는 작용을 함으로서 잎의 온도를 낮춘다고 하였다. 따라서 가뭄으로 인해 식물체내의 물이 증발됨으로서 drought관련 단백질이 발현될 수 있음은

Table 2. List of identified proteins from highland Chinese cabbage grown under 900m and 600m and resolved using 2-D gel electrophoresis as shown in Fig. 2

Spot No.	kDa	pI	No. of peptides matched	Identity	Accession No.(gi)
407	47.5	4.3	4	Protein T12C24.26( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	25402742
1002	15.2	4.6	8	Expressed protein At5g225801	18420541
1004	29.3	4.7	9	Oxygen-evolving complex protein 2 precursor	81723
1015	20.1	4.9	8	Glycine-rich RNA binding protein GRP1A	1346180
1019	18.0	4.7	8	Dihydroorotase	6226683
1104	34.4	4.6	6	Oxygen-evolving enhancer protein 1-1	15240013
1116	31.9	4.8	8	Nuclear receptor corepressor 1	47117817
2003	20.4	4.9	11	Glycine-rich RNA binding protein GRP2A	1346181
2116	30.5	5.1	8	GST(28kDa cold induced protein)	22038181
2301	43.0	4.9	6	RUBisCO activase	445628
2408	45.1	4.9	8	Phosphoglycerate kinase	129915
2601	55.9	4.9	10	ATPase alpha chain	20146763
3018	25.9	5.2	5	Probable transposase( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	11358700
3020	28.7	5.2	10	Glutathione S-transferase 1	15281781
3215	38.7	5.2	7	Isoflavone reductase	15223574
3610	59.3	5.2	3	Unnamed protein( <i>Oryza sativa</i> )	8468024
4017	17.8	5.3	7	Putative replication protein A1	15227464
4115	35.5	5.4	10	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor	15232133
4307	43.7	5.4	6	Protein kinase family protein	15238616
4424	47.5	5.4	10	Malate dehydrogenase	15239517
6014	16.5	5.9	8	Hevein-like protein precursor(PR-4)	15229342
6107	32.9	5.7	10	Drought-induced protein	480281
6113	29.7	5.9	4	Salt-stress induced protein	134190
6116	30.7	6.0	10	Carbonic anhydrase	1168745
6201	38.8	5.7	6	S-adenosyl methyltransferase	42559464
6517	52.5	6.1	7	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase	535134
7108	30.0	6.3	8	GST(24kDa auxin-binding protein)	21555418
8012	21.0	7.1	5	Phytochrome B	130189
8402	47.1	7.0	5	L-Ascorbate oxidase	34909242
9322	41.6	8.0	10	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	6166167

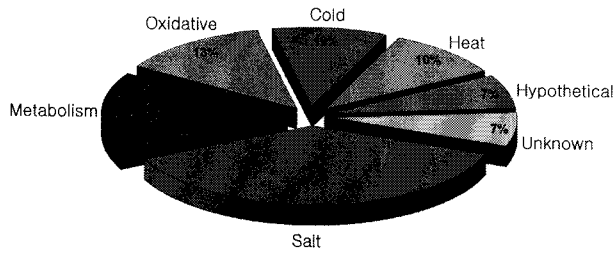


Fig. 2. Functional distribution of identified proteins differentially expressed in *Brassica* seedlings by high temperature.

시사하고 있으며 이에 관련된 단백질은 drought-induced protein(6107)이 600 m에서 발현되었다. 그 다음에 동반되는 온도상승에 따라 heat에 관련된 단백질인 ATPase와 heat shock protein이 있는데 여기서는 ATPase(2601)가 발현되었으며, 산화에 관련된 oxygen-evolving protein(1004, 1104), 양분과잉 및 결핍에 관련된 salt-stress induced protein(6113) 등이 발현되었으며 특히 산화적 스트레스에 관련된 GST proteins(Glutathione S-transferase 1(3020), 28kDa cold induced protein(2116), 24kDa auxin-binding protein(7108))등이 600m에서 강하게 발현됨은 환경 스트레스에 저항하기 위한 작물의 보호기능이라고 사료된다. 따라서 고랭지에서 고온장해의 유발요인인 결구시기에 비가 오지 않아 온도가 상승하고 토양은 건조하여 결실이 결구되지 않은 상태에서 밤낮의 온도차에 의해 이러한 현상이 반복되어 나타내는 식물체는 proteomics 분석에 의해 발현되는 stress관련 단백질의 발현과 유사성을 띄면서 복합적이면서 동시다발적으로 발현되는 양상을 보여 주었다.

### 요 약

무더운 날씨가 지속됨으로서 고랭지배추의 성장 및 결구가 지연되고 있는 강원도 정선군 질운산(새빛재)의 600 m와 900 m의 배추를 사용하여 무기성분 및 단백질 발현패턴을 분석하였다. 식물체 무기성분에서는 성장에 관련된 질소 및 인산의 부족현상과 결구에 관련된 칼슘이 부족하였다. 단백질 분석은 2차원 전기영동에 의해 전체 126개의 단백질이 분리되었고 그 중 48개의 단백질이 고도에 따라 변화하는 양상을 보여주었다. 이 중에서 30개의 단백질 서열이 결정되었는데, 해발 900 m에서 단백질 발현이 증가한 14개 중에서 oxygen-evolving proteins, rubisco activase and ATPase 등이, 해발 600 m에서는 glutathione S-transferase (1, 28 kD cold induced- and 24 kD auxin-binding proteins) and salt-stress induced protein 등 16개의 단백질 발현이 증가하였다. 이러한 단백질은 식물체 손상에 대한 보호기작을 가진 스트레스관련 단백질로 가뭄, 온도상승, 밤낮의 온도차 등의 반복으로 복합적이며 동시다발적으로 나타나는 고온장해 현상으로 사료된다.

### 참 고 문 헌

1. Angadi, S. V., H. W. Cutforth, P. R. Miller, B. G. McConkey, M. H. Entz, S. A. Brandt, and K. M. Volkmar. 2000. Response of three *Brassica* species to high temperature stress during reproductive growth. *Canadian J. Plant Science* **80**, 693-701.
2. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
3. Edwards, R., D. P. Dixon, and V. Walbot. 2000. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* **5**, 193-198.
4. Erickson, A. N., and A. H. Markhat. 2002. Flower developmental stage and organ sensitivity of bell pepper (*Capsicum annuum* L.) to elevated temperature. *Plant Cell Environ.* **25**, 155-163.
5. Hwang, S. W., J. Y. Lee, S. C. Hong, Y. H. Park, S. G. Yun, and M. H. Park. 2003. High temperature stress of summer Chinese cabbage in alpine region. *Korean J. Soil Fert.* **36**, 417-422.
6. [http://129.85.19.192/profound\\_bin/WebProFound.exe](http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)
7. IPCC Working Group I. 2001. Climate change : the scientific basis. Projections of future climate change, Geneva, Switzerland. [http://www.grida.no/climate/ipcc\\_tar/wg1/339.htm](http://www.grida.no/climate/ipcc_tar/wg1/339.htm).
8. Jiao, S., E. Hilaire, and A. J. Guikema. 2004. Identification and differential accumulation of two isoforms of the CF<sub>1</sub>-β subunit under high light stress in *Brassica rapa*. *Plant Physiol. Biochem.* **42**, 883-890.
9. Mang, H. G., E. O. Kang, J. H. Shim, S. Kim, K. Y. Park, Y. S. Kim, Y. Y. Bahk, and W. T. Kim. 2004. A proteomic analysis identifies glutathione S-transferase isoforms whose abundance is differentially regulated by ethylene during the formation of early root epidermis in *Arabidopsis* seedlings. *Biochem. Biophys. Acta.* **1676**, 231-239.
10. Mckersie, B. D., and Y. Y. Leshem. 1994. Stress and stress coping in cultivated plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherland.
11. Morrison, M. J. 1993. Heat stress during reproduction in summer rape. *Canadian J. Botany* **71**, 303-308.
12. National Institute of Agricultural Science and Technology(NIAST). 2000. Analysis method of soil and plant. pp. 202. National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon, Korea.
13. Nuttal, W. F., A. P. Moulin, and L. J. Townley-Smith. 1992. Yield response of canola to nitrogen, phosphorus, precipitation, and temperature. *Agronomy J.* **84**, 765-768.
14. Oakley, B. R., D. R. Kirsch and N. R. Morris. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for selecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **105**, 361-363.
15. Pareek, A., S. L. Singla, and A. Grover. 1995. Immunological evidence for accumulation of two high-molecular-weight (104 and 90 kDa) HSPs in response to different stresses in rice and in response to high temper-

- ature stress in diverse plant genera. *Plant Mol. Biol.* **29**, 293-301.
16. Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* **68**, 850-858.
  17. Shevchenko, A., O. N. Jensen, A. V. Podtelejnikov, F. Sagliocco, M. Wilm, O. Vorm, P. Mortensen, A. Shevchenko, H. Boucherie and M. Mann. 1996. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 14440-14445.
  18. Young, L. W., R. W. Wilen, and P. C. Bonham-Smith. 2004. High temperature stress of *Brassica napus* during flowering reduces micro- and megagametophyte fertility, induces fruit abortion, and disrupts seed production. *J. Exp. Botany* **55**, 485-495.