

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0062359 (43) 공개일자 2014년05월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) G01N 33/483 (2006.01) G01N 29/00 (2006.01)		(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(21) 출원번호 10-2012-0129044	(22) 출원일자 2012년11월14일 심사청구일자 없음	(72) 발명자 신성철 경상남도 진주시 평거로39번길 9 들말한보아파트 101동 609호 배동원 경상남도 진주시 진주대로 1317 이현하이클래스웰 가아파트 111동 203호 (뒷면에 계속)
		(74) 대리인 최규환

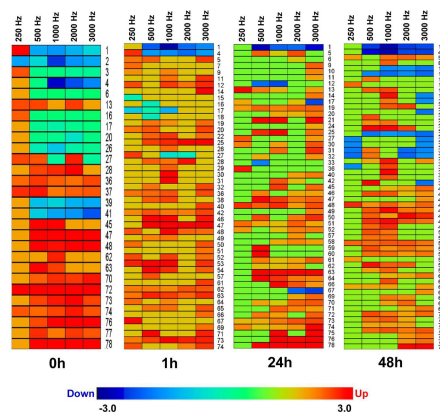
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 특정 음파에 반응하는 식물 단백질의 분석 방법

(57) 요약

본 발명은 식물체에 특정 파장의 음파를 처리하는 단계; 상기 음파 처리된 식물체로부터 단백질을 분리하는 단계; 및 상기 분리된 단백질로부터 음파에 반응하는 단백질을 동정하는 단계를 포함하는 음파에 반응하는 식물 단백질의 분석 방법에 관한 것으로, 본 발명은 특정 음파 파장에 대한 식물체의 단백질 조절 기작을 밝힘으로써 단백질 자원의 확보는 물론, 향후 신기능성 작물개발 및 병 저항성 작물개발에 이용될 수 있는 자료로 이용될 수 있고, 또한 상기 특정 단백질 코딩 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조를 통해 식량, 사료, 화훼, 원예, 에너지 작물 등의 다양한 작물 개발 분야에 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

정미정

경기도 수원시 장안구 화산로 85 천천푸르지오아파트 112동 902호

배한홍

대구광역시 수성구 무열로 47 태왕리더스아파트 107동 1205호

박수철

경기도 수원시 팔달구 화양로50번길 30 화서블루밍 푸른숲아파트 115동 1103호

권영상

경상남도 진주시 동부로67번길 10, 710호

정성우

경상남도 진주시 향교로 3, A동 1101호

차재율

경상남도 진주시 가호로 26 주공아파트 201동 605호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ907054

부처명 농촌진흥청

연구사업명 바이오21사업

연구과제명 오믹스 (omics) 기법을 이용, 음파처리 후 생성된 단백질 분석과 대사체를 이용한 식물병 저항물질의 지문분석 및 실용화

기 여 율 1/1

주관기관 영남대학교

연구기간 2011.03.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

식물체에 특정 파장의 음파를 처리하는 단계;

상기 음파 처리된 식물체로부터 단백질을 분리하는 단계; 및

상기 분리된 단백질로부터 음파에 반응하는 단백질을 동정하는 단계를 포함하는 음파에 반응하는 식물 단백질의 분석 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 식물체는 쌍자엽 식물 또는 단자엽 식물인 것을 특징으로 하는 음파에 반응하는 식물 단백질의 분석 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 식물체는 애기장대인 것을 특징으로 하는 음파에 반응하는 식물 단백질의 분석 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 특정 파장의 음파는 250, 500, 1000, 2000 또는 3000Hz 인 것을 특징으로 하는 음파에 반응하는 식물 단백질의 분석 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 특정 파장의 음파를 식물체에 60~100 dB로 0.5~1.5 시간 동안 처리하는 것을 특징으로 하는 음파에 반응하는 식물 단백질의 분석 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 음파에 반응하는 단백질의 동정은 단백질 2차원 전기영동과 말디토프 질량분석법(MALDI-TOF-MS)을 통해 수행하는 것을 특징으로 하는 음파에 반응하는 식물 단백질의 분석 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 동정된 단백질은 광합성에 관여하는 단백질, 탄수화물 대사 관련 단백질, 스트레스 및 방어 기작 관련 단백질, 유전 정보 처리 관련 단백질, 질소대사 관련 단백질, 아미노산대사 관련 단백질 및 핵산 대사 관련 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 음파에 반응하는 식물 단백질의 분석 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 동정된 단백질은 루비스코 작은 서브유닛 2B(RuBisCO small subunit 2B), 루비스코 작은 서브유닛 1A(RuBisCO small subunit 1A), 40S 리보솜 단백질 S20-1(40S ribosomal protein S20-1), 엽록체의 루비스코 작은 서브유닛 1A(RuBisCO small subunit 1A chloroplastic), 에프 유형의 수소이온 수송성 ATPase 서브유닛 델타(F-type H^+ -transporting ATPase subunit delta), 펩티딜-프로릴 시스-트랜스 아이소머라제 CYP20-3(Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP20-3), 진핵생물의 번역 개시 인자 5A-2(Eukaryotic translation initiation factor 5A-2), 뉴클레오시드 디포스페이트 키나아제 II(Nucleoside diphosphate kinase II), 추정되는 주요 라텍스 단백질(Putative major latex protein), 뉴클레오시드 디포스페이트 키나아제 I(Nucleoside diphosphate kinase 1), 시토크롬 b6-f 복합체 철-황 서브유닛(cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit), 2-Cys 퍼옥시레독신 BAS1(2-Cys peroxiredoxin BAS1), 리보스 5-포스페이트 아이소머라제 A(Ribose 5-phosphate isomerase A), 클로로필 a-b 결합 단백질 2(Chlorophyll a-b binding protein 2), ATP 합성 서브유닛 베타(ATP synthase subunit beta), 산소-발생 인핸서 단백질 1-2(Oxygen-evolving enhancer protein 1-2), 엽록체의 탄산탈수효소(Carbonic anhydrase 2 chloroplastic), 탄산탈수효소(AT2G37660 Carbonic anhydrase), Myb 도메인 단백질 17(Myb domain protein 17), 클루타티온 S-전이효소

DHAR2(Glutathione S-transferase DHAR2), 프로테아좀 서브유닛 베타 유형-6(Proteasome subunit beta type-6), L-아스코르브산염 페록시다아제 (L-ascorbate peroxidase), 저민 유사 단백질 서브패밀리 3(Germin-like protein subfamily 3), 글루타티온 S-전이효소 F2(Glutathione S-transferase F2), 엽록체의 슈퍼옥사이드 디스무타아제[철](Superoxide dismutase [Fe] chloroplastic), 글루타티온 S-전이효소 F9(Glutathione S-transferase F9), 식물 생장 저장 단백질 1(Vegetative storage protein 1), 리불로오스 비스포스페이트 카르복실라아제 라아지 체인(Ribulose biphosphate carboxylase large chain), 리불로오스 1,5-비스포스페이트 카르복실라아제/옥시게나아제 라아지 체인(Ribulose 1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase large chain), V-유형의 프로톤 ATPase 서브유닛 E1(AT5G02240, V-type proton ATPase subunit E1), 페레독신-NADP 환원효소 잎 아이소자임 2(Ferredoxin-NADP reductase leaf isozyme 2), 과당-비스포스페이트 알돌라아제(Fructose-bisphosphate aldolase), 아스파르테이트-세미알데히드 탈수소효소(Aspartate-semialdehyde dehydrogenase), 추측된 과당-비스포스페이트 알돌라아제 2(Probable fructose-bisphosphate aldolase 2), 페레독신-NADP⁺ 환원효소(Ferredoxin-NADP⁺ reductase), 포스포글리세레이트 키나아제(Phosphoglycerate kinase), 시스테인 합성효소(Cysteine synthase), 말레이트 탈수소효소(Malate dehydrogenase), 과당-비스포스페이트 알돌라아제(Fructose-bisphosphate aldolase), 엽록체 스템-루프 결합 단백질-41(Chloroplast stem-loop binding protein-41), 유로포르피리노젠 데카르복실라아제 2(Uroporphyrinogen decarboxylase 2), ATP 합성효소 감마체인 1(ATP synthase gamma chain 1), 글리세르알데히드 3-포스페이트 디히드로게나아제(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), RNA 결합 단백질(RNA binding protein), 히드록시피루베이트 환원효소(Hydroxypyruvate reductase), 글리세르알데히드-3-포스페이트 디히드로게나아제 A(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A), 에피티오스페시피어 모디피어 1(Epithiospecifier modifier 1), 글루타민 합성효소 세포질 아이소자임 1-1(Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-1), 글루타민 합성효소(Glutamine synthetase), 포스포리불로키나아제(Phosphoribulokinase), 리불로오스 비스포스페이트 카르복실라아제/옥시게나아제 액티바제(Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase), 포스포글리세레이트 키나아제(Phosphoglycerate kinase), 엽록체의 신장인자 Tu(Elongation factor Tu chloroplastic), S-아데노실메티오닌 신타아제 4(S-adenosylmethionine synthase 4), 샤페로닌 60 서브유닛 베타 2(Chaperonin 60 subunit beta 2), 미로시나아제 1(Myrosinase 1), 포스포글리세레이트 디하이드로게나아제 유사 단백질(Phosphoglycerate dehydrogenase-like protein), 글리세르알데히드-3-포스페이트 디히드로게나아제 B(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B), ATP-설퍼릴라아제 1(ATP sulfurylase 1), 이소시트레이트 탈수소효소(Isocitrate dehydrogenase), 모노디하이드로아스코르베이트 환원효소(Monodehydroascorbate reductase), 글루타메이트-글리옥실레이트 아미노전이효소 1(Glutamate-glyoxylate aminotransferase 1), NADP-의존적 글리세르알데히드-3-포스페이트 디히드로게나아제(NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), 카탈라아제(Catalase) 및 글리신 하이드록시메틸전달효소(Glycine hydroxymethyltransferase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 음파에 반응하는 식물 단백질의 분석 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 특정 음파에 반응하는 식물 단백질의 분석 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 식물체에 특정 과장의 음파를 처리하는 단계; 상기 음파 처리된 식물체로부터 단백질을 분리하는 단계; 및 상기 분리된 단백질로부터 음파에 반응하는 단백질을 동정하는 단계를 포함하는 음파에 반응하는 식물 단백질의 분석 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 식물체는 다양한 환경을 인지하고 그에 적응하기 위해서 고도로 복잡한 인지 메카니즘을 갖추고 있다. 식물에서 바람, 빗방울 및 지나가는 동물에 의한 문지름 등과 같은 기계적인 자극은 식물체의 여러 생리학적 변화를 유도하는데 주로 식물체의 신장이 억제되거나, 세포벽이 비대해지는 것과 같은 생육 형태의 변화를 가져온다. 이 같은 식물의 생육 변화는 이후 발생하는 기계적인 스트레스에 대한 저항성을 높여준다(Jaffe et al, 1993, Plant Growth Regul. 12:313-324).

[0003] 접촉형태형성(thigmomorphogenesis)은 식물이 기계적인 접촉자극에 반응하여 생육과 발육상에 변화를 가져오는 것을 의미하며(Lee D et al, 2005, New Phytol 165:429-444), 기계적인 스트레스에 반응하는 식물의 생리적 변

화 및 발육상의 변화는 다양한 식물 호르몬의 합성 및 유전자 발현의 변화에 의해 일어나며, 이와 같은 분자학적 반응들은 환경적 변화에 적응하는데 도움을 준다.

[0004] 음파(sound waves)는 기계적인 스트레스의 하나로, 식물의 생장과 발달에 영향을 미치며(Wang et al, 2002, Colloids Surf B Biointerfaces, 25:189-195), 또한 음파는 식물 세포벽의 전이 온도변화 및 식물 생장을 조장하며, 이것은 세포분화와 관련이 있다. 벼와 오이에 50 Hz 음파를 처리하면, 식물체의 뿌리 신장 및 종자 발아를 크게 촉진하였다. 또한, 음파는 막 유동성, 플라스마렘마(plasmalemma)의 H^+ -ATPase의 활성 및 캘러스 조직의 생장에 영향을 준다는 점이 보고되었다. 소리 자극에 의해 국화 캘러스는 H^+ -ATPase의 활성이 강하게 나타남이 보고되었으며(Xiujuan W, 2003, Colloids Surf B Biointerfaces, 29:99-102), 특정 진동수 및 세기를 가진 음파는 식물의 생장물과 세포 분열을 크게 촉진시키며, 또한 ATP 및 수용성 단백질의 함량을 증가시키며, 식물체 내의 항산화물질인 항산화효소 활성을 증가시킨다고 알려졌다. 음파를 처리한 국화 캘러스 내의 옥신 함량은 증가하였으며, 엽시스산의 함량은 감소되었다. 이는 음파가 캘러스 생장 조절뿐만 아니라 식물체의 내생 호르몬의 함량도 조절할 수 있음을 보여주었다(Bochu et al, 2004, Colloids Surf B Biointerfaces 37:107-112). 더불어, 벼에 뮤지컬 소리를 처리하면, 벼의 유전자 발현은 변화되지 않았으나, 특정 소리의 진동수에 노출된 벼에서는 몇몇의 유전자의 발현에 차이를 보여주었다. 125 Hz 및 250 Hz의 진동수에서 알돌라아제(AID) 유전자의 발현이 증가되는 반면, 50 Hz의 음파에서는 알돌라아제 발현이 감소됨을 보여 주었다(Jeong et al, 2008, Mol. Breeding, 21:217-226). 이것은 식물체의 유전자가 특정 음파에 의해 발현이 조절될 수 있는 가능성을 보여 주었다.

[0005] 한편, 음파와 식물체와의 상호작용 메카니즘에 대한 연구는 아직도 미비한 실정이며, 특히 프로테오믹스 연구기법을 활용한 연구 결과는 전무한 상태이다.

[0006] 본 발명에서는 음파에 대한 식물체의 분자적 기전을 더욱 잘 이해하기 위하여 음파에 의해 특이적으로 발현되는 단백질들을 탐색하여 동정하고 그 기능에 따라 분류하였다.

[0007] 한국공개특허 제2010-0070359호에는 "스트레스 음파를 이용한 해충 방제방법"이 개시되어 있고, 한국등록특허 제0481753호에는 "프테움 분석법으로 프로테아제의 생리학적 기질을 발굴하는 방법"이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 특정 음파에 반응하는 식물 단백질의 분석 방법에 관해서는 밝혀진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 식물체에 다양한 영역의 음파 파장을 처리하고, 이때 발현되는 단백질을 2차원 전기영동과 말디토프 질량분석기를 이용하여 음파에 의해 특이적으로 발현되는 단백질을 확인하여 탐색 및 동정함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 식물체에 특정 파장의 음파를 처리하는 단계; 상기 음파 처리된 식물체로부터 단백질을 분리하는 단계; 및 상기 분리된 단백질로부터 음파에 반응하는 단백질을 동정하는 단계를 포함하는 음파에 반응하는 식물 단백질의 분석 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 애기장대 식물체의 프로테움 분석을 통하여, 특정 음파에 반응하는 단백질을 확인함으로써, 음파에 의해 특이적으로 발현되는 단백질 종류를 규명하였다. 본 발명은 특정 음파 파장에 대한 식물체의 단백질 조절 기작을 밝힘으로써 단백질 자원의 확보는 물론, 향후 신기능성 작물개발 및 병 저항성 작물개발에 이용될 수 있는 자료로 이용될 수 있고, 또한 상기 특정 단백질 코딩 유전자를 이용한 형질전환 식물체의 제조를 통해 식량, 사료, 화훼, 원예, 에너지 작물 등의 다양한 작물 개발 분야에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 애기장대에 여러 파장을 처리할 수 있도록 고안된 음파처리 장치를 나타낸다.

도 2는 다양한 음파 파장에 반응하는 애기장대의 단백질 발현량을 2차원 전기영동을 수행한 겔 사진을

나타낸다. 음파의 처리는 250 Hz, 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz 또는 3000 Hz의 파장을 처리하였으며, (A)는 음파 처리 0시간, (B)는 음파처리 1시간 후의 단백질 발현량을 2차원 전기영동 겔 사진으로 나타낸 것이다. 음파를 처리하지 않은 대조구와 음파를 처리한 처리구 사이에 현저한 차이를 보이는 스팟을 일련의 단백질 번호로 표기하였다.

도 3은 다양한 음파 파장에 반응하는 애기장대 단백질을 대상으로 2차원 전기영동을 수행한 겔 사진을 나타낸다. 음파의 처리는 250 Hz, 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz 또는 3000 Hz의 파장을 처리하였으며, (A)는 음파 처리 24시간, (B)는 음파처리 48시간 후의 단백질 발현량을 2차원 전기영동 겔 사진으로 나타낸 것이다. 음파를 처리하지 않은 대조구와 음파를 처리한 처리구 사이에 현저한 차이를 보이는 스팟을 일련의 단백질 번호로 표기하였다.

도 4는 애기장대에 250 Hz, 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz 또는 3000 Hz의 음파 파장을 0, 1, 24 또는 48시간 처리하여, 음파 파장에 반응하는 애기장대 단백질을 대상으로 2차원 전기영동을 수행한 후, 음파를 처리하지 않은 처리구와 비교하여 발현량의 현저한 차이를 보이는 스팟의 단백질 발현 패턴을 분석한 결과를 나타낸다.

도 5는 음파 파장에 반응하는 애기장대의 단백질의 기능적인 분류를 나타낸다. 말디토프 질량분석기로 동정된 단백질을 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>), UniProtKB(<http://www.uniprot.org/>), KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>) 및 PIR(Protein Information Resource)의 데이터 베이스를 이용하여 분류한 것으로, 생물학적 기능별로 조사하여 분류한 벤다이어그램을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 식물체에 특정 파장의 음파를 처리하는 단계; 상기 음파 처리된 식물체로부터 단백질을 분리하는 단계; 및 상기 분리된 단백질로부터 음파에 반응하는 단백질을 동정하는 단계를 포함하는 음파에 반응하는 식물 단백질의 분석 방법을 제공한다.
- [0013] 용어 "단백질"은 유전자의 정보를 해독하여 만들어지며 궁극적으로 세포내 대사활동에 중요한 역할을 수행하는 기능적인 단위이며, 구조적으로나 기능적으로 역동성과 고도의 특이성을 나타내며 생명현상을 밝히는 중요한 요소이며 열쇠라고 할 수 있다.
- [0014] 용어 "프로테옴"은 게놈(genome)에서 발현되는 단백질의 총합을 나타낸다.
- [0015] 본 발명에 따른 방법이 적용될 수 있는 식물체는 쌍자엽 식물 또는 단자엽 식물이 포함된다. 상기 쌍자엽 식물의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 애기장대, 가지, 담배, 고추, 토마토, 우엉, 쑥갓, 상추, 도라지, 시금치, 근대, 고구마, 셀러리, 당근, 미나리, 파슬리, 배추, 양배추, 갯무, 수박, 참외, 오이 호박, 박, 딸기, 대두, 녹두, 강낭콩 및 완두가 있다. 상기 단자엽 식물의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 벼, 밀, 보리, 죽순, 옥수수, 토란, 아스파라거스, 양파, 마늘, 파, 부추, 달래, 마 및 생강이 있다. 상기 쌍자엽 식물체는 바람직하게는 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 특정 파장의 음파는 바람직하게는 100 Hz ~ 3500 Hz 일 수 있으며, 가장 바람직하게는 250 Hz, 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz 또는 3000 Hz 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 특정 파장의 음파를 식물체에 60~100 dB로 0.5~1.5 시간 처리할 수 있으며, 바람직하게는 80 dB로 1시간 처리할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 특정 파장의 음파에 반응하는 단백질의 동정은 단백질 2차원 전기영동과 말디토프 질량분석법(Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectroscopy; MALDI-TOF-MS)을 통해 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 2차원 전기영동은 단백질을 분리하기 위해 유용한 도구이며, 일반적으로 1차원에서 등전(isoelectric) 포커싱(IEF)으로 2차원에서 소듐도데실설페이트(SDS) 겔 전기영동(SDS-PAGE)으로 수행한다. 따라서 겔 위에 전개된 개개의 단백질은 먼저 전하(IEF)에 따라, 그 다음에 크기에 따라 분리된다. 그 결과는 1000 내지 5000 스팟 정도의 특성도로 되고 그 각각은 일반적으로 단일 단백질로 된다. 2차원 전기영동 겔에서 각각의 스팟들을 관찰할 수 있다. 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie brilliant blue)로 염색하면 100ng 이상으로 존재하는 단백질 스팟들을 관찰할 수 있고, 실버(Silver)로 염색하거나 또는 SYPRO 루비(ruby)와 같은 형광(fluorescent) 염색 시약을 사용할 경우에는 2-5ng 정도의 단백질 스팟들을 관찰할 수 있다. 단백질의 분해능은

겔 크기를 증가시킴으로 개선할 수 있으며, 겔 두께를 1.5mm 이하로 감소시켜 감응도를 향상시킬 수 있다.

- [0020] 본 발명에 있어서 일차원 IEF에서 IPG3-10 또는 IPG4-7과 같이 넓은 pH 간격을 갖는 IPG 스트립을 사용하면 한 겔에서 많은 단백질 스팟들을 관찰할 수 있다. 그러나 관찰할 수 있는 스팟수는 줄어들지만 분해능을 높이기 위하여, 2개의 겔 즉 IPG4-8과 같은 산성 단백질에 대한 IEF 겔과 IPG6-10과 같은 염기성 단백질에 대한 IEF 겔이 사용되기도 한다. 염기성이 높은 단백질의 분해능을 높이기 위하여, IPG9-12와 같은 좁은 pH 간격을 갖는 IPG 스트립을 사용하거나, 비평형 pH 구배 전기영동 겔을 사용할 수 있다. 또한, 특정 등전점 부위에서 최상의 분해능을 얻기 위하여 IPG5-6과 같이 좁은 pH 간격을 갖는 IPG 스트립이 사용되기도 한다.
- [0021] 분자량이 작은 단백질과 큰 단백질을 하나의 겔에서 관찰하기 위하여, 2차원 SDS 겔 전기영동에서 9~16%와 같은 구배 겔(gradient gel)을 사용할 수 있다. 그러나 분자량이 큰 단백질의 분해능을 높이기 위하여 예를 들어 5%와 같은 낮은 %의 비-구배 겔(non-gradient gel)이나 5~10%와 같은 낮은 % 범위의 구배 겔을 사용할 수 있다. 반대로, 분자량이 작은 단백질의 분해능을 높이기 위하여 높은 %의 비-구배 겔(non-gradient gel)이나 높은 % 범위의 구배 겔을 사용할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 분석된 단백질은 광합성에 관여하는 단백질, 탄수화물 대사 관련 단백질, 스트레스 및 방어 기작 관련 단백질, 유전 정보 프로세싱 관련 단백질, 질소대사 관련 단백질, 아미노산대사 관련 단백질 및 핵산대사 관련 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 단백질 분류는 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>), UniProtKB(<http://www.uniprot.org/>), KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>) 및 PIR(Protein Information Resource)의 데이터베이스를 이용하여 분류할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 동정된 단백질은 루비스코 작은 서브유닛 2B(RuBisCO small subunit 2B), 루비스코 작은 서브유닛 1A(RuBisCO small subunit 1A), 40S 리보솜 단백질 S20-1(40S ribosomal protein S20-1), 엽록체의 루비스코 작은 서브유닛 1A(RuBisCO small subunit 1A chloroplastic), 예프 유형의 수소이온 수송성 ATPase 서브유닛 델타(F-type H^+ -transporting ATPase subunit delta), 펩티딜-프로릴 시스-트랜스 아이소머라제 CYP20-3(Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP20-3), 진핵생물의 번역 개시 인자 5A-2(Eukaryotic translation initiation factor 5A-2), 뉴클레오시드 디포스페이트 키나아제 II(Nucleoside diphosphate kinase II), 추정되는 주요 라텍스 단백질(Putative major latex protein), 뉴클레오시드 디포스페이트 키나아제 I(Nucleoside diphosphate kinase 1), 시토크롬 b6-f 복합체 철-황 서브유닛(cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit), 2-Cys 퍼옥시레독신 BAS1(2-Cys peroxiredoxin BAS1), 리보스 5-포스페이트 아이소머라제 A(Ribose 5-phosphate isomerase A), 클로로필 a-b 결합 단백질 2(Chlorophyll a-b binding protein 2), ATP 합성 서브유닛 베타(ATP synthase subunit beta), 산소-발생 인핸서 단백질 1-2(Oxygen-evolving enhancer protein 1-2), 엽록체의 탄산탈수효소(Carbonic anhydrase 2 chloroplastic), 탄산탈수효소(AT2G37660 Carbonic anhydrase), Myb 도메인 단백질 17(Myb domain protein 17), 글루타티온 S-전이효소 DHAR2(Glutathione S-transferase DHAR2), 프로테아좀 서브유닛 베타 유형-6(Proteasome subunit beta type-6), L-아스코르브산염 페록시다아제 (L-ascorbate peroxidase), 저민 유사 단백질 서브패밀리 3(Germin-like protein subfamily 3), 글루타티온 S-전이효소 F2(Glutathione S-transferase F2), 엽록체의 슈퍼옥사이드 디스무타아제[철](Superoxide dismutase [Fe] chloroplastic), 글루타티온 S-전이효소 F9(Glutathione S-transferase F9), 식물 성장 저장 단백질 1(Vegetative storage protein 1), 리불로오스 비스포스페이트 카르복실라아제 라아지 체인(Ribulose biphosphate carboxylase large chain), 리불로오스 1,5-비스포스페이트 카르복실라아제/옥시게나아제 라아지 체인(Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large chain), V-유형의 프로톤 ATPase 서브유닛 E1(AT5G02240, V-type proton ATPase subunit E1), 페레독신-NADP 환원효소 잎 아이소자임 2(Ferredoxin-NADP reductase leaf isozyme 2), 과당-비스포스페이트 알돌라아제(Fructose-bisphosphate aldolase), 아스파르테이트-세미알데히드 탈수소효소(Aspartate-semialdehyde dehydrogenase), 추측된 과당-비스포스페이트 알돌라아제 2(Probable fructose-bisphosphate aldolase 2), 페레독신-NADP⁺ 환원효소(Ferredoxin-NADP⁺ reductase), 포스포글리세레이트 키나아제(Phosphoglycerate kinase), 시스테인 합성효소(Cysteine synthase), 말레이트 탈수소효소(Malate dehydrogenase), 과당-비스포스페이트 알돌라아제(Fructose-bisphosphate aldolase), 엽록체 스템-루프 결합 단백질-41(Chloroplast stem-loop binding protein-41), 유로포르피리노젠 데카르복실라아제 2(Uroporphyrinogen decarboxylase 2), ATP 합성효소 감마 체인 1(ATP synthase gamma chain 1), 글리세르알데히드 3-포스페이트 디히드로게나아제(Glyceraldehyde 3-

phosphate dehydrogenase), RNA 결합 단백질(RNA binding protein), 히드록시피루베이트 환원효소(Hydroxypyruvate reductase), 글리세르알데히드-3-포스페이트 디히드로게나아제 A(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A), 에피티오스페시피어 모디피어 1(Epithiospecifier modifier 1), 글루타민 합성효소 세포질 아이소자임 1-1(Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-1), 글루타민 합성효소(Glutamine synthetase), 포스포리불로키나아제(Phosphoribulokinase), 리불로오스 비스포스페이트 카복실라아제/옥시게나아제 액티바제(Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase), 포스포글리세레이트 키나아제(Phosphoglycerate kinase), 엽록체의 신장인자 Tu(Elongation factor Tu chloroplastic), S-아데노실메티오닌 신타아제 4(S-adenosylmethionine synthase 4), 샤페론인 60 서브유닛 베타 2(Chaperonin 60 subunit beta 2), 미로시나아제 1(Myrosinase 1), 포스포글리세레이트 디하이드로게나아제 유사 단백질(Phosphoglycerate dehydrogenase-like protein), 글리세르알데히드-3-포스페이트 디히드로게나아제 B(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B), ATP-설프릴라아제 1(ATP sulfurylase 1), 이소시트레이트 탈수소효소(Isocitrate dehydrogenase), 모노디하이드로아스코르베이트 환원효소(Monodehydroascorbate reductase), 글루타메이트-글리옥실레이트 아미노전이효소 1(Glutamate-glyoxylate aminotransferase 1), NADP-의존적 글리세르알데히드-3-포스페이트 디히드로게나아제(NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), 카탈라아제(Catalase) 및 글리신 하이드록시메틸전달효소(Glycine hydroxymethyltransferase)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 재료 및 방법

[0027] 1. 식물 재료 및 음파 파장 처리

[0028] 본 발명에서 애기장대(*Arabidopsis thaliana*, ecotype Columbia-0)를 사용하였다. 종자를 표면 살균한 후 MS 고체 배지에 파종하여 4℃에서 3일 동안 처리한 후 생장상(22℃, 상대습도 60%, 장일 조건(16시간 광/8시간 암))에서 재배하였다. 3주된 식물체는 80 dB로 60분 동안 다양한 음파(250 Hz, 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz 또는 3000 Hz)에 노출되었다. 대조구는 음향 간섭을 제외한 같은 조건으로 재배되었다. 음파 파장 처리후 애기장대의 잎을 시간별로(0, 1, 24 또는 48시간) 샘플링하였다. 모든 실험은 독립적으로 3번 수행하였다.

[0029] 2. 단백질 추출 및 정량

[0030] 단백질 추출을 위해 애기장대의 잎(3g)을 액체질소와 막대사발을 이용하여 마쇄하였다. 마쇄된 시료에 차가운 트리클로로아세트산/아세톤(Trichloroacetic acid(TCA)/acetone) 버퍼(10% TCA, 아세톤으로 녹인 0.07% 2-메르캅토에탄올(2-mercaptoethanol; 2ME))를 추가하여 5분간 진탕(shake)한 후 시료를 4℃에서 8,000 rpm 으로 10분간 원심분리하였다. 상등액을 버리고, 펠릿을 10ml의 아세톤 세척 용액(80% 아세톤, 0.07% 2-ME)으로 2회 세척한 후, SDS 추출버퍼[30% 수크로오스, 2% SDS, 0.1M Tris-HCl (pH 8.8), 5% 2-ME, 1% 폴리비닐폴리피롤리돈(polyvinylpolypyrrolidone; PVPP)]와 페놀을 1:1로 혼합한 용액을 첨가하여 상온에서 1시간 반응시켜 균질화하였다. 균질화된 시료를 8,000 rpm 으로 4℃에서 10분간 원심분리하여 상등액을 회수하고, 100% 메탄올에 녹인 0.1M 암모늄 아세테이트(ammonium acetate)를 시료 부피의 5배를 첨가하여 -20℃에서 2시간 동안 단백질을 침전시켰다. 침전된 시료를 8,000 rpm 으로 4℃에서 10분간 원심분리한 후, 상등액을 버리고 80% 아세톤으로 2회 세척하였다. 펠릿 상태의 단백질을 용해 버퍼[7M 우레아(urea), 2M 티오우레아(thiourea), 20mM DTT, 4% CHAPS([(3-cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]1-propanesulfonate), 2% 담체양성전해질(carrier ampholytes)]에 녹여 시료용액으로 사용하였다. 추출된 단백질을 2D-Quant kit(Amersham Biosciences)를 이용하여 정량한 뒤 실험에 사용하였다.

[0031] 3. 2차원 전기영동 및 겔 이미지 분석

[0032] 시료로부터 추출된 단백질 100μg을 재수화 버퍼(rehydration buffer) [8 M 우레아, 2% CHAPS, 20 mM DTT, 0.5% 담체양성전해질 (pH 3-10), 0.001% 브로모페놀블루 300]와 혼합한 후 IPG 스트립(Bio-Rad Co., Hercules, Canada; pH 5-8)에 12시간 동안 재수화하였다. 그리고 250V (15 min), 250-10,000 V (3 hr) 및 10,000 V (9

hr) 동안 등전기 초점화(isoelectrofocusing)를 수행하였다. 2차원 전기영동에서 SDS-PAGE를 수행하기 전에 IPG 겔은 평형버퍼(equilibration buffer) I[(50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M 우레아, 2% w/v SDS, 30% w/v 글리세롤, 1% w/v DTT)]에서 15분간 세척한 다음, 평형버퍼 II[50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 6 M 우레아, 2% w/v SDS, 30% w/v 글리세롤, 5% w/v 요오드아세트아미드(iodoacetamide)]에서 15분간 세척하였다. 이 IPG 스트립을 평판 겔 위에 올린 다음 SDS-PAGE 전기영동 버퍼에 0.3% 아가로스를 녹여 IPG 스트립을 고정하여 SDS-PAGE를 실시하였다. SDS-PAGE가 끝난 겔은 실버 염색하여 단백질 스팟을 확인하였다. 염색이 끝난 겔은 바이오 래드 GS 800 스캐너(Bio-rad GS 800 scanner)로 스캔하여 분석 프로그램인 피디퀘스트(PD-QUEST) 소프트웨어를 이용하여 변화된 단백질을 분석하였다.

4. 단백질 동정

음과 파장에 의해 증가 또는 감소하는 스팟을 멸균된 면도칼을 이용하여 분리하여 1ml의 튜브에 넣은 다음, 25 mM 중탄산(重碳酸) 암모늄 버퍼(ammonium bicarbonate buffer (pH 8.0))를 사용하여 제조한 50 % 아세토니트릴을 400 μ l 넣고, 15 분 동안 세척하였다. 이 과정을 2회 반복하여 수행한 후, 100 % 아세토니트릴을 넣고 5분간 방치한 다음, 아세토니트릴을 제거하였다. 그 후, 시료를 완전히 건조한 다음 트립신 용액(25 mM NH_4HCO_3 , pH 8.0 버퍼에 녹인 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 30 μl 을 넣고, 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 16시간 동안 반응하였다. 반응이 완료된 반응액을 새로운 튜브에 옮기고, 40 μl 의 50 % 아세토니트릴/5 % TFA를 첨가하여 펩타이드를 추출하였다. 추출된 용액은 완전히 건조하여 말디토프 질량분석기 분석에 사용하였다. 0.5 μl 의 알파-시아노-4-하이드록시신남산 매트릭스와 0.5 μl 의 분석물질(analyte) 용액을 혼합하여 말디토프 타겟 위에 올린 다음, 건조시킨 후, 말디-토프 질량 분석기(Applied Biosystems, Foster City, Ca)를 이용하여 질량 스펙트럼을 얻었다. 마스코트(Mascot(<http://www.matrixscience.com/>)) 데이터 베이스를 이용하여 단백질을 동정하였다.

5. 단백질의 기능적인 분류

단백질의 기능적인 분류를 위해서, 발현량에 차이가 있는 단백질들을 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>), UniProtKB(<http://www.uniprot.org/>), KEGG(<http://www.genome.jp/kegg/>) 및 PIR(Protein Information Resource)의 데이터 베이스를 이용하여 단백질을 분류하였다.

실시예 1. 음파처리에 의한 애기장대 단백질의 분리 및 동정

음파처리에 대한 식물의 반응을 조사하기 위해서, 애기장대의 잎의 프로테옴 프로파일을 2차원 겔 전기영동을 이용하여 수행하였다. 애기장대 식물체에 음파를 처리하기 위한 장치(도 1)를 이용하여 250 Hz, 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz 또는 3000 Hz 파장 영역의 음파를 80 dB로 1시간 처리한 후 0, 1, 24, 48시간 후에 애기장대 잎으로부터 단백질을 추출하였다. 전체 단백질에 대해 2차원 전기영동을 실시하여 단백질을 분리하였고, 실버염색법을 실시하여 분리된 단백질을 가시화시킨 후, 이미지 분석(Image analysis) 과정으로 피디퀘스트소프트웨어를 이용하여 변화된 단백질을 확인하였다(도 2 및 도 3). 또한, 확인된 각 단백질을 오퍼네어 트립신으로 절단한 후 펩타이드를 추출하고 펩타이드 혼합물을 말디토프(MALDI-TOF-MS)를 이용하여 분석한 후, 마스코트 데이터베이스를 이용하여 정확한 단백질을 동정 및 확인하였다(표 1).

실시예 2. 애기장대에서 다양한 음파 처리를 통한 단백질의 발현 패턴 분석

애기장대에 250 Hz, 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz 또는 3000 Hz의 음파 파장을 0, 1, 24 또는 48시간 처리하여, 음파 파장에 반응하는 애기장대의 단백질 발현량을 2차원 전기영동으로 수행한 후, 음파를 처리하지 않은 대조구와 비교하여 현저한 차이를 보이는 스팟의 단백질의 발현 패턴을 나타내었다(도 4).

[0042]

다양한 음과 파장에 의해 조절되는 단백질 리스트

No ^a	Protein	ID(NCBI)	MW/pI, theor. ^b	MP/TP ^c	SC ^d (%)
1	RuBisCO small subunit 2B	16194	20303/7.59	10/18	54
2	RuBisCO small subunit 1A	15219826	20203/7.59	12/27	48
3	40S ribosomal protein S20-1	7671404	13101/9.78	6/11	31
4	RuBisCO small subunit 1A, chloroplastic	13926229	14689/5.69	8/12	49
5	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit delta	15233985	25653/9.04	5/10	27
6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP20-3	15228674	28190/8.83	4/10	14
7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP20-3	15228674	28190/8.83	10/18	34
8	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	9295717	23781/6.49	4/8	18
9	Nucleoside diphosphate kinase II	56965987	17049/5.54	7/12	43
10	Nucleoside diphosphate kinase II	3063661	16962/5.54	4/8	19
11	Putative major latex protein	15236566	17507/5.91	5/11	19
12	Nucleoside diphosphate kinase 1	16396	16229/7.03	6/11	38
13	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit	30679426	22518/8.58	5/12	28
14	2-Cys peroxiredoxin BAS1	15229806	29074/6.92	6/11	38
15	Ribose 5-phosphate isomerase A	15229349	29287/5.72	4/11	27
16	Chlorophyll a-b binding protein 2	18397286	28209/5.29	4/9	13
17	ATP synthase subunit beta	7525040	53900/5.38	11/28	26
18	Oxygen-evolving enhancer protein 1-2	15230324	34998/5.92	4/8	14
19	Carbonic anhydrase 2, chloroplastic	42573371	28326/5.36	7/13	26
20	AT2G37660	18404496	34858/8.37	7/15	23
21	Carbonic anhydrase	62320917	28166/5.29	6/10	30
22	Myb domain protein 17	15233066	33269/6.46	5/5	12
23	Glutathione S-transferase DHAR2	15222163	23392/5.79	5/11	25
24	Proteasome subunit beta type-6	15235889	25136/5.31	6/11	27
25	L-ascorbate peroxidase	145323784	27503/5.85	8/13	32
26	Germin-like protein subfamily 3	15242028	21822/6.26	5.12	34
27	Glutathione S-transferase F2	15235401	24114/5.92	10/16	50
28	Superoxide dismutase [Fe], chloroplastic	15234913	23776/6.06	7/12	22
29	Glutathione S-transferase F9	15224581	24131/6.17	7/14	47
30	Vegetative storage protein 1	18420838	30243/5.49	5/11	22
31	Vegetative storage protein 1	18420838	30243/5.49	4/7	13
32	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	1944432	47609/6.12	5/9	17
33	Ribulose 1,5-biphosphate carboxylase /oxygenase large chain	27752799	47464/6.12	6/14	15
34	AT5G02240	18413869	27086/6.19	5/8	18
35	V-type proton ATPase subunit E1	1143394	26054/6.04	12/19	40
36	Ribulose biphosphate carboxylase large chain	7525041	52922/5.88	7/11	16
37	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme 2	15223753	41142/8.51	7/10	18
38	Ferredoxin--NADP reductase, leaf isozyme 2	15223753	41142/8.51	6/12	18
39	Fructose-bisphosphate aldolase	79322651	41781/5.94	4/6	12
40	Aspartate-semialdehyde dehydrogenase	11228579	36620/5.39	5/8	10
41	Probable fructose-bisphosphate aldolase 2	18420348	42961/6.78	8/12	27
42	Ferredoxin--NADP+ reductase	145334919	29665/5.91	7/15	21
43	Phosphoglycerate kinase	15219412	42105/5.49	7/9	18
44	Phosphoglycerate kinase	15219412	42105/5.49	5/9	17

45	Cysteine synthase	15233613	33784/5.91	5/10	12
46	Malate dehydrogenase	15219721	35548/6.11	9/11	29
47	Fructose-bisphosphate aldolase	15231715	38516/6.05	12/18	34
48	Chloroplast stem-loop binding protein-41	15229384	43903/8.54	7/16	14
49	Uroporphyrinogen decarboxylase 2	15226690	43553/8.29	23/26	38
50	ATP synthase gamma chain 1	18412632	40886/8.13	6/9	13
51	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	15222848	36890/6.67	20/23	51
52	RNA binding protein	15217485	42593/8.19	13/21	39
53	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	15229231	36891/6.62	7/11	22
54	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	15229231	36891/6.62	11/23	30
55	Hydroxypyruvate reductase	15220620	42221/6.68	18/18	43
56	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A	166702	37652/7.00	10/27	23
57	Epithiospecifier modifier 1	15231805	44032/7.59	6/10	27
58	Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-1	15240288	39090/5.28	7/8	13
59	Glutamine synthetase	15238559	47381/6.43	8/19	30
60	Glutamine synthetase	15238559	47381/6.43	10/18	31
61	Phosphoribulokinase	15222551	44436/5.71	12/18	31
62	Ribulose biphosphate carboxylase /oxygenase activase	30687999	48469/7.55	14/24	31
63	Phosphoglycerate kinase	15219412	42105/5.49	5/8	12
64	Elongation factor Tu, chloroplastic	23397095	51624/5.84	12/24	15
65	S-adenosylmethionine synthase 4	15229033	42769/5.51	12/15	33
66	Chaperonin 60 subunit beta 2	15231255	63302/5.60	15/18	22
67	Myrosinase 1	30690085	61094/5.61	17/20	33
68	Phosphoglycerate dehydrogenase-like protein	21536501	63271/6.32	8/14	14
69	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	336390	42769/5.60	6/9	15
70	ATP sulfurylase 1	6606509	51412/6.30	7/12	14
71	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	336390	42769/5.60	10/14	23
72	Isocitrate dehydrogenase	15218869	45717/6.13	13/18	23
73	Monodehydroascorbate reductase	15231702	46458/6.41	10/14	25
74	Glutamate-glyoxylate aminotransferase 1	30688330	53267/6.49	18/29	30
75	NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	15224111	53026/6.23	5/9	11
76	Glycine hydroxymethyltransferase	15235745	57364/8.13	10/14	10
77	Catalase	79326317	54960/6.34	12/18	29
78	Glycine hydroxymethyltransferase	15235745	57364/8.13	11/15	16

[0043] ^a 숫자는 도 2 및 도 3에 보여준 2-DE 겔의 숫자에 해당한다.

[0044] ^b 이론적인 MW (Da) 및 pI 값.

[0045] ^c 매칭된(matched) 펩티드/검출된(detected) 펩티드의 비율.

[0046] ^d 서열 커버리지(sequence coverage).

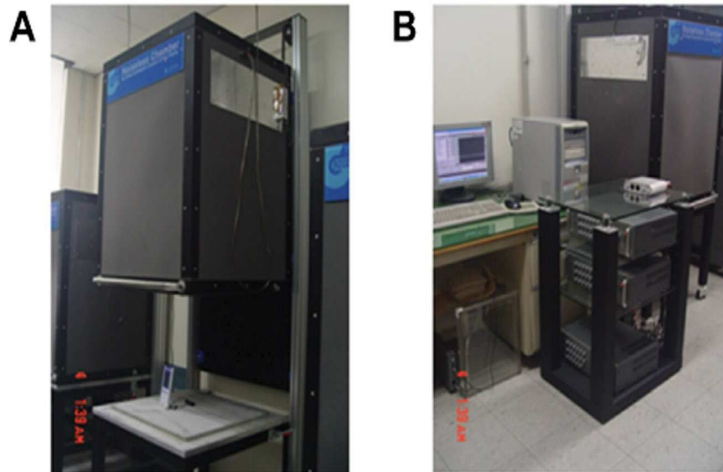
[0047] 실시예 3. 애기장대에 다양한 음파를 처리하여 동정된 단백질의 기능적 분류

[0048] 250 Hz, 500 Hz, 1000 Hz, 2000 Hz 또는 3000 Hz의 음파 영역에 의해 증가 또는 감소하는 78개 단백질을 스크

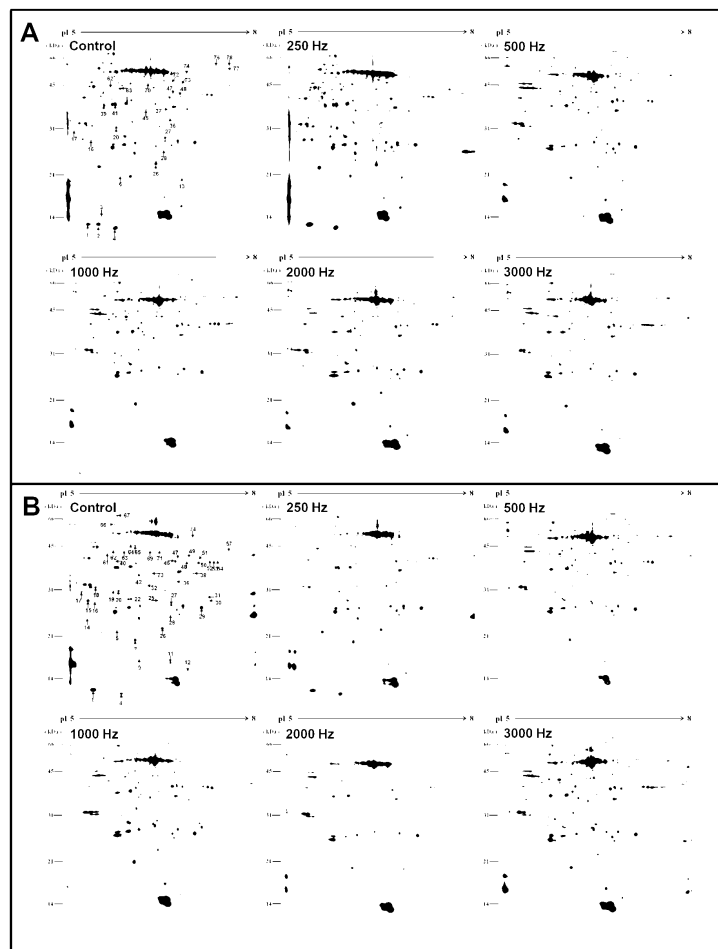
리닝 하였고, 말디토프 질량분석기를 이용하여 동정하였다. 음파에 의해 발현이 조절되는 애기장대의 단백질을 문헌을 통하여 각 단백질의 생물학적 기능별로 분류한 결과, 전체 78개 단백질 중에서 광합성에 관여하는 단백질(23%), 탄수화물 대사(24%), 스트레스 및 방어기작(14%), 유전 정보 처리(13%), 질소대사(7%), 아미노산대사(6%), 핵산대사(4%) 등으로 분류되었다(도 5).

도면

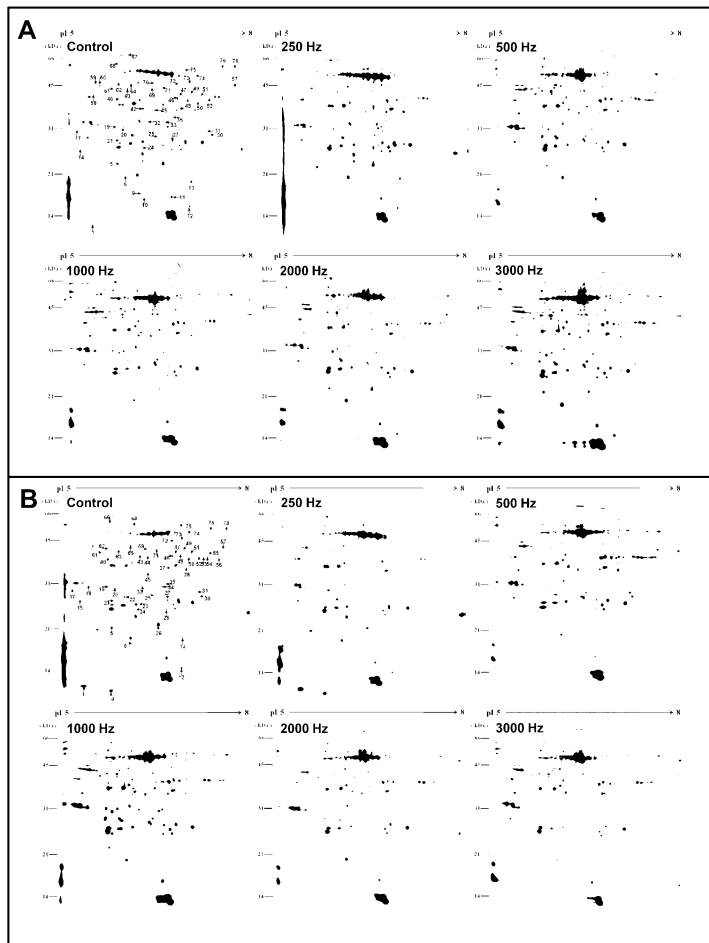
도면1



도면2



도면3



도면5

