

Archicitrus와 Metacitrus로부터 Mitochondrial DNA의 분리 및 특성

이숙영 · 박민희* · 김종세* · 고대희** · 김홍섭*

조선대학교 자연과학대학 유전공학과, 생물학과*, 서강전문대학 식품영양과**

Isolation and Characterization of Mitochondrial DNA from Archicitrus and Metacitrus

Sook-Young Lee, Min-Hee Park*, Jong-Se Kim*, Dae-Hee Koh, Hong-Sub Kim***

Department of Genetic Engineering, College of Natural Science, Chosun University,

** Department of Biology, College of Natural Science, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea,*

*** Department of Food and Nutrition, Seokang Junior College, Kwangju 500-742, Korea.*

Abstract

The purity of mtDNAs isolated from *Archicitrus* and *Metacitrus* leaves was higher in percoll density gradient centrifugation than differential and sucrose density gradient centrifugation. The most clear mtDNAs were obtained from mitochondria included in the interface band of between 21% and 45% under isotonic, low viscosity conditions in the three step discontinuous percoll density gradient centrifugation.

DNase treatment to the crude mitochondrial suspension still more increased purity of mtDNA by the effective removal of the nuclear and chloroplast DNA and mtDNAs were appeared as a single band at middle position of tube by EtBr /CsCl density gradient centrifugation. Agarose gel electrophoresis of mtDNAs resolved a single, broad band containing high molecular weight DNAs in all preparation. Yield of mtDNAs was about 1 μ g and 2 μ g per 200g in mature and immature leaves respectively.

The mtDNA fragment patterns showed by *EcoR* I treatment were indistinguishable with respect to number and position of bands in *Archicitrus* and *Metacitrus*.

In the pattern of *Hind* III restriction, the *Metacitrus* displayed the unique band between 5.0 and 4.0kb, in addition to four fragments about 5.0, 2.4, 2.15, and 2.0kb, respectively, different from *Archicitrus*. Also the pattern of total mtDNAs fragment by the treatment of *Pst* I showed that the distinguishable fragment pattern was not appeared in *Archicitrus*(*C. iyo* Tanaka), but about 6.0, 5.5, 5.0 and 2.8kb fragments were appeared only in *Metacitrus*(*C. junos* Sieb).

Therefore it was indicated that two species in intra-subgenus were identical each other, whereas considerable difference was revealed for inter-subgenus.

Key words : *Archicitrus*, *Metacitrus*, mtDNAs

서 론

동물(Kruse *et al.*, 1989)이나 곰팡이(Greenawalt *et al.*, 1970)등 과는 달리 식물 특유의 복잡성으로 인

해 미토콘드리아와 mtDNA를 완전 분화된 고등식물로 부터 분리해 내는데 수반되는 여러가지 어려움 때문에 초기의 미토콘드리아 유전적 시스템에 대한 연구는 대부분 효모, 빵 곰팡이와 포유류 등에서 이루어졌으나 1970년 이후 Kolodner와 Tewari(1972)을 필두

로 하여 많은 종의 식물로부터의 미토콘드리아 및 mtDNA 정제과정이 확립되었다(Duve, 1976 ; Hanson *et al.*, 1986 ; Pay and Smith, 1988).

Chase와 Pring(1986) 그리고 Smith 등(1987)은 수수와 옥수수로부터 mtDNA를 분리하기 위해, 삼투제로써 NaCl을 포함한 세 종류의 완충액을 사용하여 1.25M potassium acetate를 가해 SDS-단백질-탄수화물 복합체를 제거함으로써 비교적 순도가 높은 mtDNA를 분리하였으며, Hsu와 Mullin(1988)도 1.2M NaCl이 포함된 완충액과 미토콘드리아 파괴시, SDS와 sarcosylate를 사용함으로써 폐놀복합체가 풍부한 목화에서 mtDNA를 분리하여 선명한 제한효소 분절을 확인하였다.

Dawson 등(1986)은 여러 단계의 비연속 자당 밀도구배를 이용하여 엽록체 DNA(cp DNA)와의 상호오염을 감소시키므로써 비교적 순수한 mtDNA를 분리하였으며, Jackson 등(1979)과 Moreau(1982) 그리고 Pay와 Smith(1988)는 밀도구배매질로서 percoll을 이용하여 미토콘드리아를 분리 정제하므로써 분별 원심분리나 자당밀도구배를 이용한 결과보다 훨씬 빠르고 용이하게 그리고 순도가 높은 다량의 mtDNA를 분리하였다.

이와 같이 mtDNA의 정제과정이 확립된 이후부터 mtDNA에 의해 암호화 되는 미토콘드리아의 특유 단백질들을 확인하게 되었고 식물세포내에서의 mtDNA의 유전자로서의 기능과 핵, 엽록체 그리고 세포질에 미치는 영향에 관한 연구가 활발히 진전되었다(Ceci, 1989). 특히 옥수수, 사탕수수, 그리고 밀 등의 유용작물에 공통적으로 발생하는 세포질 옹성불임 현상에 관한 연구는 우수한 교배종자의 생산을 증대시키는 식물 육종학적 측면에서 놀랄만한 향상을 가져오게 되었으며 미토콘드리아 게놈이 모성 유전되어진다는 사실을 알게 되었다(Pring and Levings, 1987; Young and Hanson, 1987). 또한 제한효소에 의한 분절 분석에 의해 미토콘드리아 게놈의 복합적인 절단양상과 구조 그리고 분자량이 결정되었으며, mtDNA는 기대한 환형 또는 선형 분자 그리고 분자량이 작은 소수의 환형, 선형 DNA들로 이루어져 있고 잠두를 제외하고는 포유류처럼 일정한 크기의 mtDNA분자들이 존재하지 않음을 알게 되었다(Spruill *et al.*, 1981).

최근에는 mtDNA내의 특정 유전자를 절단 분리하여 운반체내로 삽입한 후, 효모나 *E. coli*에서 발현시키는 효과적인 기법을 이용함으로써 여러 종의 식물체로부터 유래하는 mtDNA의 복제, 전사 그리고 번역 메커니즘을 규명하기 위하여 분자생물학적인 차원에서 많은 연구가 진행되고 있다(Schuster *et al.*, 1986 ; Oser, 1988).

한편 국내에서는 1980년대초부터 유용작물인 유채, 배, 고추, 보리, 담배 등으로부터 세포 소기관인 미토콘드리아와 엽록체를 분리하여 DNA를 정제하고 여러 종류의 제한효소로 처리하여 각각의 분절양상으로부터 정상개체와 옹성불임 개체의 mtDNA와 cpDNA를 비교 분석함으로써 농작물의 유전자를 재조합하여 우량품종을 개발하기 위한 시도로서 작물 미소기관의 유전자인 mtDNA를 해석, 연구하고 있다(이 등, 1986, 1987). 그러나 초본식물과는 달리 잎의 표면이 납질로 덮여 있는 목본식물에서의 mtDNA에 관한 연구 사례가 국내외에서 희박한 상태이다.

감귤속은 전생감귤아속(*Archicitrus*)과 후생감귤아속(*Metacitrus*)으로 구분되어지는 운향과 과수작물로서 잎의 표면이 큐틴질과 납질로 피복되어 있는 목본식물로서 실험재료로 주로 사용하였던 문단(*Citrus grandis* Osbeck)과 이예감(*Citrus iyo* Tanaka)은 *Archicitrus*에 속하며, 유자(*Citrus junos* Sieb)와 임은주(*Citrus unshiu* Marc)는 *Metacitrus*에 속하는 종이다(한과 권, 1991).

감귤식물에 관한 연구는 본 실험실에서 최근에 수년 동안 수행하여 왔으며 그 중 탕자의 mtDNA특성과 4종의 감귤속에서 분리된 Plasmid-like mtDNA와 엽록체 mtDNA와의 상동성 여부를 밝혔으며, 유자와 탕자의 배로부터 캘러스를 유도한 후 식물체를 재분화하였으며 동시에 *in vitro*에서 발생단계별로 유자의 조직세포의 분화 양상을 보고하였다(Kim, 1989 ; Lee, 1992 ; Park *et al.*, 1992 ; Lee *et al.*, 1993 ; Park *et al.*, 1995a, b).

따라서 본 실험에서는 잎을 각기 성장 시기별로 채취하여 세 단계의 percoll밀도구배 원심분리를 통하여 미토콘드리아를 순수 분리한 후 mtDNA를 분리 정제하므로써 소형의 목본식물로부터 mtDNA정제방법을 확립하고, 총 mtDNA를 세가지 제한효소(*Hind* III,

Eco RI, Pst I)로 처리하여 분절양상을 비교 분석하여 그에 따르는 감귤속의 Archicitrus와 Metacitrus의 특성을 미토콘드리아 계층의 차원에서 비교하였다.

재료 및 방법

1. 재 료

C. junos Sieb는 전남 완도의 재배농가에서 채취하였고, *C. iyo* Tanaka, *C. grandis* Osbeck, *C. unshiu* Marc는 제주도의 시귀포와 여미지 농원에서 채취하였다.

모두 봄, 여름에 시기별로 성엽과 신엽으로 각기 분리한 후 채취하였다. 채취한 잎으로부터 중앙맥과 엽병의 날개잎을 제거하고 드라이 아이스로 급냉시킨 다음 즉시 마쇄하여 분말화된 시료를 사용하였다.

2. 미토콘드리아의 분리 및 파괴

1) 분별 원심분리에 의한 방법

Bookjans 등(1984)과 Smith 등(1986)의 방법을 이용하였다. 잎 400g에 5배의 마쇄 완충액 A(1.0M NaCl, 50mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 0.1% BSA, 350 μ l mercaptoethanol, pH 7.5)를 가하여 마쇄한 후 거어즈와 nylon net(pore size 40 μ m)로 여과하여 3,500rpm(Beckman, JA-20 rotor)으로 10분간 원심분리한 후 상정액을 10,000rpm으로 30분간 원심분리하였다. 완충액 A로 미토콘드리아 침전물을 현탁하여 다시 3,500rpm으로 10분, 10,000rpm으로 30분간 반복 원심분리한 다음 80ml의 완충액 B(0.15M NaCl, 50mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂)와 DNase(DNase I, 50 μ g/ml)를 가하여 4°C에서 1시간 처리한 후 80ml의 shelf용액(0.6M sucrose, 20mM EDTA, 10mM Tris, pH 7.5)을 가하고 다시 10,000rpm으로 20분간 원심분리하여 침전된 미토콘드리아를 saline 세척액(1.0M NaCl, 50mM Tris, 20mM EDTA, pH 8.0)으로 처리한 다음 0.5% sodium sarcosyl과 proteinase K(10 μ g/ml)로 파괴하였다(Fig. 1A).

2) 자당 밀도구배 원심분리에 의한 방법

Fontarnau와 Hernandez-Yago(1982)의 방법을 변형하여 2단계 및 4단계 밀도구배에 의해 미토콘드리아를 분리하였다. 2배의 마쇄 완충액 A(0.3M mannitol, 50mM Tris, 3mM EDTA, 0.1% BSA, 1mM mercaptoethanol, pH 8.0)로 잎을 마쇄한 후 nylon net로 여과하여 3,500rpm으로 10분, 10,000rpm으로 30분씩 원심분리한 다음 40ml의 완충액 A로 미토콘드리아 침전물을 현탁하여 MgCl₂(최종농도 8mM)와 DNase(50 μ g/ml)으로 4°C에서 1시간 처리하였다. 240ml의 완충액 B(50mM Tris, 0.3M sucrose, 20mM EDTA, pH 8.0)로 희석한 후 10,000rpm으로 30분간 반복 원심분리하여 20ml의 완충액 B로 현탁한 다음 2 단계의 비연속 자당 밀도구배(30%, 60% sucrose in 50mM Tris, 0.3mM sucrose, 20mM EDTA, pH 8.0)의 상층에 부하한 후 22,000rpm(SW-27 rotor)으로 45분간 원심분리 하였다.

4 단계 자당 밀도구배의 경우 4ml의 2.0M sucrose, 10ml의 1.6M sucrose, 10ml의 1.2M sucrose, 8ml의 0.6M sucrose용액으로 밀도구배를 형성시켜 시료를 부하한 후 25,000rpm으로 1시간동안 원심분리한 다음 수확한 미토콘드리아를 상기의 원심분리법에서와 동일한 방법으로 파괴하였다(Fig. 1B).

3) Percoll밀도 구배 원심분리에 의한 방법

Jackson 등(1979)과 Moreau 등(1982)의 방법을 변형하여 사용하였다. 잎 400g에 4배의 마쇄완충액 A(0.3M mannitol, 50mM Tris, pH 8.0, 2mM EGTA, 0.1% BSA, 1mM mercaptoethanol, 1% polyvinyl pyrrolidone)를 가하여 마쇄한 다음 nylon net(pore size 40 μ m)로 마쇄액을 여과한 후 3,000rpm(JA-14, 4°C)에서 10분, 10,000rpm(Beckman JA-20, 4°C)으로 30분씩 반복 원심분리하여 세포 잔유물, 전분 과립, 파괴되지 않은 세포 그리고 그밖의 세포 기관들인 핵, 엽록체 등을 제거하였다. 50ml의 마쇄 완충액 A와 MgCl₂(최종농도 10mM)를 미토콘드리아 현탁액에 가한 다음 DNase(50 μ g/ml, 4°C)으로 1시간 동안 처리함으로써 핵 DNA와 엽록체 DNA를 제거하였다. 600ml의 완충액 B(0.3M mannitol, 2mM EGTA, 0.2% BSA, 20mM MOPS, pH 8.0)로 세척한 다음 미토콘드리아를 12ml의 완충

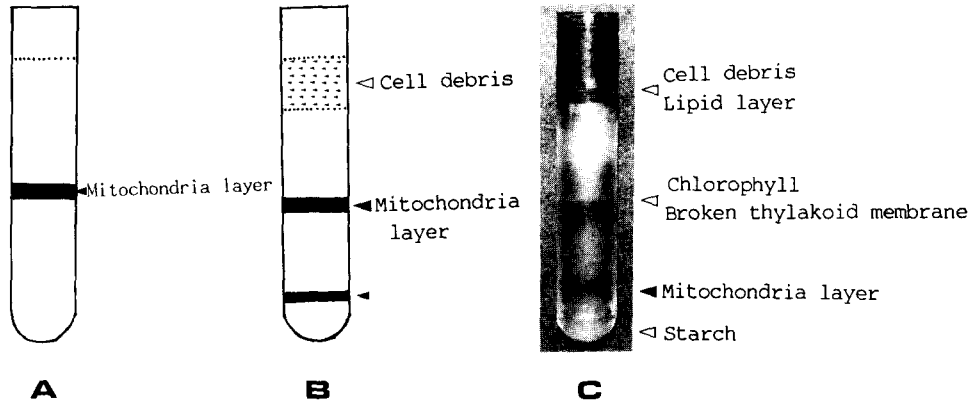


Fig 1. Isolation of mitochondria on the density gradients of the crude mitochondria isolated by differential centrifugation.

(A) Schematic diagram for two-step sucrose(60%, 30%) density gradients

(B) Schematic diagram for four-step sucrose(2.0M, 1.6M, 1.2M, 0.6M) density gradients

(C) Mitochondria layer isolated after three-step percoll(45%, 21%, 13.5%) density gradient

액 B로 현탁시키고 이 현탁액을 3단계 percoll 밀도구배 (13.5% percoll in 0.239M sucrose, 50mM propan 1,2-diol, 0.2% BSA, 10mM MOPS, pH 8.0; 21%, 45% percoll in 0.25M sucrose, 0.2% BSA, 10mM MOPS, pH 8.0)의 상층에 부하한 후 7,800rpm (JA-20.1, 4°C)으로 30분 원심분리 하였다. 21%와 45%의 경계면에 나타난 담황색의 미토콘드리아 밴드를 추출한 후 10배의 완충액 B로 희석하였다. Percoll성분이 제거된 미토콘드리아 시료를 4ml의 완충액 C(50mM Tris, 20mM EDTA, pH 8.0)로 현탁한 다음 proteinase K(10 g/ml)와 20% sodium sarcosyl(최종농도 1%), 10% SDS(최종농도 0.5%)로 37°C에서 1시간 처리하였다(Fig. 1C).

3. mtDNA 정제

Phenol-chloroform 추출법과 EtBr/CsCl 밀도구배법에 의해 파괴된 미토콘드리아 시료로부터 DNA를 분리하였으며 EtBr/CsCl 밀도구배를 이용한 mtDNA분리는 다음과 같다; 미토콘드리아 파괴액을 굴절계수가 1.3550~1.3600이 되도록 1M CsCl/EtBr(1M CsCl, 50mM Tris, pH 8.0, 10mM EDTA, 0.2mg/ml EtBr)용액에 잘 현탁시킨 후 ice bath

(4°C)에서 1시간 방치 후 5,000rpm으로 30분동안 원심분리하여 응집된 단백질성막 잔유물과 전분 성분을 제거한 다음 다시 굴절계수가 1.3600이 되도록 7M CsCl/EtBr(7M CsCl, 0.1% sarcosyl, 0.2mg/ml EtBr)용액을 가해 조심스럽게 섞어준 다음에 22°C에서 75,000rpm(Hitachi CS 120, RP 120 AT-154 rotor)으로 20시간 초원심분리하였다. mtDNA band를 UV (369nm)로 확인한 다음 1ml syringe로 추출(19 gauge needle)한 후, EtBr를 제거하기 위해 isopropanol로 5번 추출한 후, 4°C에서 24시간 TE 완충액(10mM Tris, pH 8.0, 1mM EDTA)으로 투석하였다. 100% 에탄올로 mtDNA를 침전시켜 건조시킨 후 TE완충액(10mM Tris-Cl, 1mM EDTA, pH 8.0)에 녹여 6×loading dye(0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 15% Ficoll 400)를 가하여 섞은 후 *Hind* III로 처리된 γ -DNA를 standard size marker로 사용하여 0.7% horizontal agarose gel에 70V로 5시간 전기영동(8 × 8 × 0.4cm, TAE 완충용액; 50mM Tris, 20mM sodium acetate, 2mM EDTA, 18mM NaCl, pH 8.0) 하였다.

4. 제한효소 처리 및 전기영동

정제된 mtDNA(2 μ g)에 제한효소 *Eco R I*, *Hind III*, *Pst I*(8unit/ μ g)과 10 \times digestion buffer (0.1M Tris, 50mM NaCl₂, 10mM MgCl₂, pH 7.5)를 가하여 각각 37°C에서 6시간 반응시켰다. 반응이 끝난 DNA용액을 *Hind III*로 처리된 γ -DNA와 1Kb ladder DNA (linear double-stranded DNA fragments, BRL)를 standard size marker로 사용하여 1% vertical agarose gel에 50V로 12~16시간 전기영동(36 \times 13 \times 0.4cm, 전개용액: 50mM Tris, 20mM sodium acetate, 2mM EDTA, 18mM NaCl, pH 8.0)하였다.

결 과

1. 미토콘드리아의 분리

분화된 목본 식물체의 잎에 다량으로 축적되어 있는 납질과 전분과립, 페놀 복합체, 그리고 파괴된 엽록체 조각 등과의 오염을 최소화하기 위해 분별 원심분리, 자당 밀도구배 및 percoll 밀도구배 원심분리법에 의해 mtDNA를 분리, 정제하여 그 결과를 비교하였다 (Fig. 1, 2).

분별 원심분리법의 경우, 5단계의 원심분리를 실시하여 미토콘드리아 이외의 세포 기관인 엽록체와 핵 등을 제거하고 그 밖의 세포 잔유물, 막조각, 전분과립 등을 분리 제거하였으나, 분리된 미토콘드리아 침전물은 상당량의 엽록체로 오염되고, DNase로 제거되지 않은 핵 DNA와도 오염된 것으로 나타났다(Fig. 2, lane 4). 뚜렷한 단일 mtDNA로 나타나지 않고 위, 아래로 강한 형광성 background를 형성한 넓고 길다란 밴드로 나타났다.

자당 밀도구배 원심분리법의 경우, 2 단계의 비연속 자당 밀도구배로부터 60%와 30%의 경계면에 위치한 미토콘드리아를 분리하였으며(Fig. 1-A) 분리된 미토콘드리아를 파괴하여 얻은 mtDNA는 Fig. 2(lane 3)와 같다. 분별원심분리에 의한 mtDNA보다는 순도가 높았으나 길다란 형광성 background는 미토콘드리아가 분리단계에서 오염되었음을 보여 주었다. 4 단계 자당 밀도구배의 경우, 가장 아래 부분에 형성된 2개의 밴드(2.0M /1.6M, 1.6M /1.2M)를 분리하여(Fig. 1-B) DNA를 정제한 결과 분별원심분리와 2단계 자당

밀도구배에 비해 상당히 순도 높은 mtDNA를 확인할 수 있었다(Fig. 2, lane 2).

3단계 percoll 밀도구배 원심분리법에 의해 분리된 미토콘드리아는 21%와 45% percoll 밀도구배의 경계면에 응집된 형태로써 뚜렷한 밴드로 구별되어 있으며 연한 녹색을 띤 담황색 밴드를 나타내었다(Fig. 1-C). 세포 잔유물들은 13.5%의 상층에 그대로 머물러 있으며 13.5%와 21%의 밀도구배층 사이에 상당량의 진록색을 띤 엽록소와 틸라코이드막 조각 등이 미토콘드리아 밴드 위치로 부터 분리되어 넓게 형성되어 있었고 전분립은 튜브의 밑바닥에 침전되어 있었다. 이와 같은 방법으로 분리된 DNA는 2단계 자당 밀도구배에 의한 mtDNA와 비교할 때 굉장히 높은 순도로 나타났으며 4단계 자당 밀도구배와는 커다란 차이를 나타내

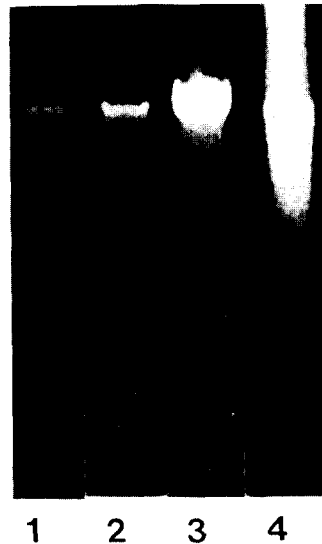


Fig 2. mtDNA isolated by the differential centrifugation, sucrose and percoll density gradients centrifugation.

Lane 1: mtDNA by three-step percoll density gradient centrifugation.

Lane 2: mtDNA by four-step percoll density gradient centrifugation.

Lane 3: mtDNA by two-step percoll density gradient centrifugation.

Lane 4: mtDNA by five-step differential centrifugation.

지 않았다(Fig. 2, lane 1).

2. mtDNA 정제

Fig. 3은 22℃에서 75,000rpm(Hitachi CS120, RP120, AT-154rotor)으로 10시간, EtBr /CsCl 밀도구배 원심분리한 결과로써 DNA는 튜브의 중간 위치와 가까운 부위에서 형광성 밴드로 약간 넓게 나타났으며 엽록소나 그 밖의 변성 단백질은 튜브의 맨 윗 층에 응집되어 있었고 RNA는 튜브의 바닥에 pellet으로 나타났다. 결과적으로 mtDNA는 튜브의 중간부위에서 단일밴드로 형성되어 있음을 알 수 있다.

Fig. 4는 phenol-chloroform 추출과 EtBr /CsCl 밀도구배 원심분리에 의해 분리한 mtDNA를 비교한 결과이다. EtBr /CsCl 밀도구배에 의한 mtDNA는 여타의 형광성 background가 없는 선명한 단일밴드로 나타났고 phenol-chloroform 추출에 의한 mtDNA는 추출시 절단된 DNA 분자들 때문에 상당히 넓은 밴드를 나타냈다.

식물체의 성숙 단계별로 변화하는 mtDNA의 양을 알아보기 위하여 책상조직이나 해면상 조직이 아직 형성되지 않은 분화중인 신엽과 완전분화되어 잎의 표면이 납질로 덮여 있는 광택을 띤 성엽을 각기 봄과 여름에 채취하여 200g씩 마쇄한 후 DNA를 분리하여 비교하였다(Fig. 5). 성엽(lane 2, 3)의 경우 절대량이 1μg /200g 정도이고 신엽(lane 4, 5, 6)의 경우엔 2μ

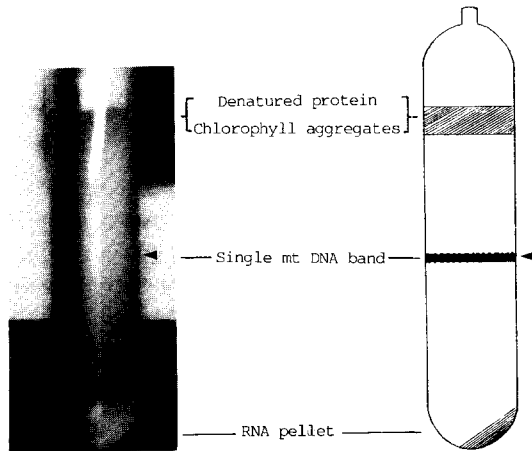


Fig 3. mtDNA band by the EtBr/CsCl buoyant density gradient centrifugation.

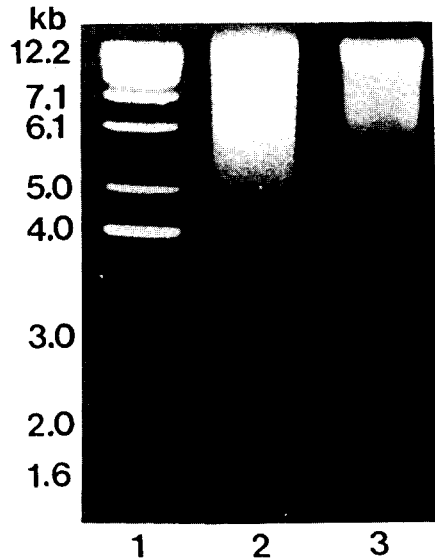


Fig 4. mtDNA isolated by the phenol-chloroform extraction and EtBr/CsCl density gradients centrifugation.

Lane 1: 1 Kb ladder DNA

Lane 2: mtDNA by phenol-chloroform extraction

Lane 3: mtDNA by EtBr/CsCl density gradient centrifugation

밀도구배 원심분리에 의해 분리한 mtDNA를 비교한 결과이다. EtBr /CsCl 밀도구배에 의한 mtDNA는 여타의 형광성 background가 없는 선명한 단일밴드로 나타났고 phenol-chloroform 추출에 의한 mtDNA는 추출시 절단된 DNA 분자들 때문에 상당히 넓은 밴드를 나타냈다.

식물체의 성숙 단계별로 변화하는 mtDNA의 양을 알아보기 위하여 책상조직이나 해면상 조직이 아직 형성되지 않은 분화중인 신엽과 완전분화되어 잎의 표면이 납질로 덮여 있는 광택을 띤 성엽을 각기 봄과 여름에 채취하여 200g씩 마쇄한 후 DNA를 분리하여 비교하였다(Fig. 5). 성엽(lane 2, 3)의 경우 절대량이 1μg /200g 정도이고 신엽(lane 4, 5, 6)의 경우엔 2μg /200g로 성엽의 DNA양에 비해 약 2배 더 많은 것으로 나타났다(Fig. 5, Table 1).

3. 제한효소 처리에 의한 mtDNA 분석

*Eco R I*로 처리된 mtDNA의 경우, 약 30여개의 분절이 나타났는데 4종 모두 거의 유사한 양상을 보였으며 특히 6.5Kb와 2.3Kb 사이에 나타난 뚜렷한 밴드가 4종에서 공통적으로 동일 위치에 존재해 있음을 알 수 있다(Fig. 6). 그 외 약간 확산되어 보이는 밴드들을 유사한 분자량의 분절들이 서로 위, 아래로 중첩된 결과이다. *Hind III*로 처리되어 나타난 제한효소 분절 패턴(Fig. 7)은 *Eco R I*과는 달리 고분자량(20-4Kb)을 가진 많은 DNA 분절들이 뚜렷한 양상으로 보여졌다. 4종에서의 밴드양상은 유사하지만 *Metacitrus* (Fig. 7, lane 2, 3)의 경우 *Archicitrus*(Fig. 7, lane 4, 5)에는 나타나지 않은 5.0Kb분절과 그 외에도 3개의 특이한 분절(2.4, 2.15, 2.0Kb)이 나타났으나, lane 4와 5의 경우엔 *Metacitrus*에 나타나지 않은 5.5Kb단편과 4.4, 4.0, 2.3, 1.5Kb의 특이한 분절들을 보여 주었다. 즉 *Archicitrus*(lane 4,5)과 *Metacitrus* (lane 2, 3)사이의 공통된 차이점을 *Hind III* 분절양상에서 보여주었다. *C. iyo* Tanaka와 *C. junos* Sieb을 *Pst I*으로 처리한 결과(Fig. 8)는 40여개의 분절들이 거의 중복되어 고분자량과 저분자량을 가진 분절들로

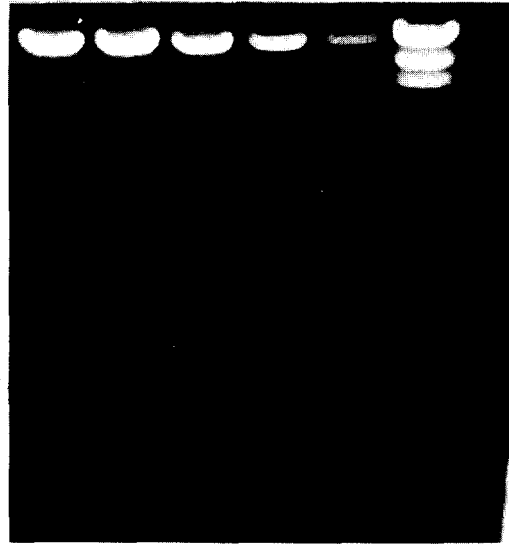


Fig 5. Comparison of mtDNA yield from the immature and mature leaves.

Lane 1, 2, 3: mtDNA isolated from immature leaves.

Lane 4, 5: mtDNA isolated from mature leaves.

Lane 6: γ -*Hind III* digested DNA.

Table 1. Purity and yield of mtDNAs isolated from the four species in genus *Citrus* leaves

		Differential centrifugation	Sucrose density gradients centrifugation	Percoll density gradients centrifugation
<i>Citrus grandis</i> Osbeck	M	-	+	++(1.0)
	Im	+	++	+++ (2.0)
<i>Citrus iyo</i> Tanaka	M	-	+	++(1.5)
	Im	+	++	+++ (2.5)
<i>Citrus junos</i> Sieb	M	+	+	++(1.5)
	Im	-	++	+++ (3)
<i>Citrus unshiu</i> Marc	M	-	-	+(1)
	Im	-	+	+++ (1.5)

M : mature leaves

Im : immature leaves

() : yield(μ g / 200g leaves)

+++ : excellent purity

++ : good purity

+

- : very inferior

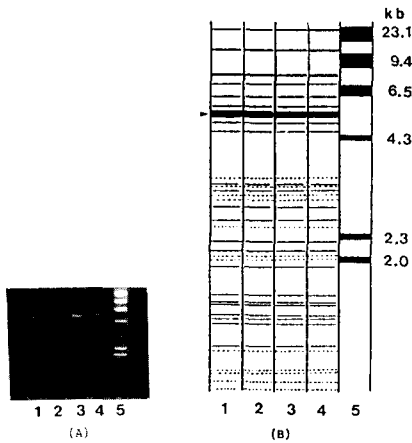


Fig 6. Agarose gel electrophoresis patterns of *Eco R I* digestion of mtDNA isolated from *Archicitrus* and *Metacitrus*.

(A) Agarose gel electrophoresis pattern
(B) Schematic diagrams

Lane 1: mtDNA pattern from *C. unshiu* Marc.
Lane 2: mtDNA pattern from *C. junos* Sieb.
Lane 3: mtDNA pattern from *C. iyo* Tanaka.
Lane 4: mtDNA pattern from *C. grandis* Osbeck.
Lane 5: γ -*Hind III* digested DNA

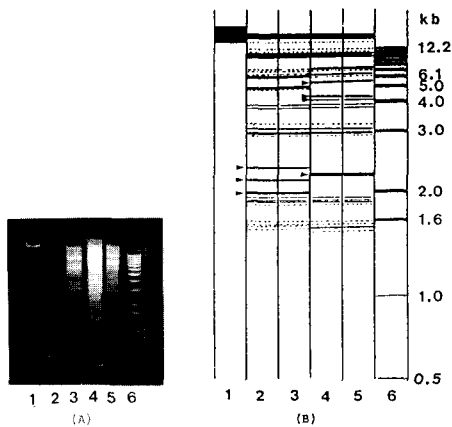


Fig 7. Agarose gel electrophoresis patterns of *Hind III* digestion of mtDNA isolated from *Archicitrus* and *Metacitrus*.

(A) Agarose gel electrophoresis pattern
(B) Schematic diagrams

Lane 1: Non-digested mtDNA.
Lane 2: mtDNA pattern from *C. unshiu* Marc.
Lane 3: mtDNA pattern from *C. junos* Sieb.
Lane 4: mtDNA pattern from *C. iyo* Tanaka.
Lane 5: mtDNA pattern from *C. grandis* Osbeck.
Lane 6: 1Kb ladder DNA

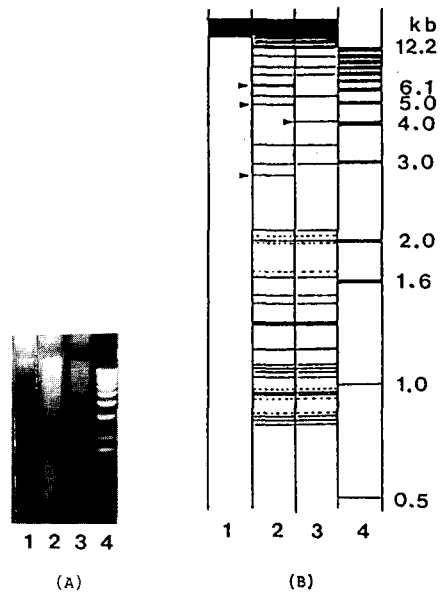


Fig 8. Comparison electrophoretic pattern of mtDNA isolated from *Archicitrus* and *Metacitrus* by *Pst I* digestion.

(A) Agarose gel electrophoresis pattern
(B) Schematic diagrams

Lane 1: Non-digested mtDNA.
Lane 2: mtDNA pattern from *C. junos* Sieb.
Lane 3: mtDNA pattern from *C. iyo* Tanaka.
Lane 4: 1Kb ladder DNA

고르게 나타났으며 두 종 사이에 특이할 만한 차이는 *C. junos* Sieb(lane 2)의 분절양상에 나타난 6.0, 5.0, 2.8Kb 분절들이 *C. iyo* Tanaka의 분절패턴에서는 보이지 않았다.

고 찰

본 실험에 사용한 식물체는 목본 쌍자엽 식물로서 초본식물과는 달리 잎의 표면이 큐틴질과 납질로 되어 있고 상당량의 페놀 복합체가 축적되어 있어서 mt-DNA의 분리 및 연구에 많은 어려움이 수반된다(Topping and Leaver, 1990). 김(1989)의 보고에 의하면 유자잎의 미세구조를 전자현미경으로 관찰한 결과, 다른 식물세포에 비해 액포가 크게 발달되어 있고, 많은 양의 전분립이 액포와 엽록체내에 존재한다고 하였는데 본 실험에서 사용한 4종의 감귤속의 경우, 채취시

기와 잎의 분화 정도에 따라 약간의 차이를 보였으나 대부분 잎의 마쇄액으로부터 미토콘드리아 원침물을 분리하는 과정중에 불투명한 백색 침전물로 미토콘드리아와 함께 섞여있는 전분립을 확인할 수 있었다.

Bookjans 등(1984)과 Smith 등(1986)은 분별 원심분리 과정을 이용하여 옥수수로부터 오염되지 않은 mtDNA를 분리하였다고 보고하였으나 상당량의 전분립과 다른 DNA와의 오염때문에 전기영동상에서 정확한 mtDNA 밴드를 확인할 수 없었으며(Fig. 2, lane 1) 자당 밀도구배를 이용했을 경우 본 실험에서는 비교적 순수한 미토콘드리아 밴드를 회수하므로써 보다 높은 순도의 DNA를 확인하였는데 이는 Fontarnau(1982)의 결과보다 높게 나타났다(Fig. 2, lane 2, 3). 그러나 자당의 경우 점성도가 높아 미토콘드리아 이외의 소기관과 잔유물 등이 미토콘드리아와 함께 인위적으로 밴드를 형성함으로써 일부 오염된 DNA 밴드가 나타났다고 사료된다.

특히 Jackson 등(1979)은 propane 1,2-diol에 의해 틸라코이드막이나 퍼옥시솜과 같은 오염물질과 미토콘드리아 사이의 친화성이 감소되므로써 순도 높은 미토콘드리아를 분리하였다고 보고한 바 본 실험에서는 13.5% percoll 구배 용액에 50mM propane 1,2-diol 첨가하므로써 대부분의 클로로필을 제거할 수 있었고 약간의 연두색을 띤 담황색 미토콘드리아를 분리하였으며 자당 밀도구배와는 대조적으로 미토콘드리아의 외막과 내막이 90% 정도 손상되지 않은 것으로 나타났다(Fig. 3, B).

Percoll 45%와 21% 사이의 경계면에 때때로 넓게 확산된 상태의 미토콘드리아 밴드가 형성되기도 하는데 이는 미토콘드리아 분리 과정 중 외막의 파괴로 인해 밀도가 변화되므로써 정상 미토콘드리아와 동일한 위치에 밴드를 형성하지 못하기 때문인 것으로 사료된다.

EtBr/CsCl 밀도구배 원심분리로 나타난 튜브 중간 부위의 단일 mtDNA밴드의 위치(Fig. 3)는 Synenki 등(1978)의 보고와 일치하였는데 대두의 경우 핵 DNA의 부력 밀도가 1.694g/cm³, cpDNA가 1.697g/cm³인 반면에 mtDNA는 1.706g/cm³로 핵이나 엽록체 DNA의 부력 밀도와는 상당한 차이가 있다고 하였다.

Dawson 등(1986)이 보고한 옥수수로부터 정제된

mtDNA의 수율이 10 μ g/200g인 것과는 대조적으로 Fontarnau(1982)가 목본 식물체에서 분리한 mtDNA의 수율은 약 1.5 μ g/200g정도였다. *C. unshiu* Marc의 경우, 4종중 전분립이 가장 많아 순도 및 수율이 다른 종에 비해 낮게 나타났으며, 그외 3종에서 분리된 mtDNA의 순도와 수율은 비슷하였다. 또한 percoll 밀도구배 원심분리를 이용하였을 때 mtDNA의 순도는 높았으며 수율 역시 약 2g/200g으로 세 가지 방법중 가장 높았는데 이는 Fontarnau(1982)의 결과보다 높은 수율이다.

성엽과 신엽의 경우 신엽에서 분리한 mtDNA가 성엽보다 많은 양으로 나타났는데 이는 분화된 잎에 많이 존재하는 납질이나 전분립, 다당류, 펙셀 복합체 등에 의한 미토콘드리아 파괴와 최대로 거대해진 세포의 액포내에 다량으로 존재하는 내재효소들에 의해 분리과정중 mtDNA가 절단되었을 가능성이 크며 분화 중인 신엽이 성엽보다 더 많은 양의 미토콘드리아가 존재하기 때문으로 사료된다(Table 1, Fig. 5).

Fig. 2에 나타난 mtDNA밴드가 단일하지만 넓게 smearing되어 나타난 것은 감귤속의 mtDNA가 이질성일 가능성과 많은 양의 저분자량 mtDNA 분자들이 존재한다는 것으로 사료되어지며 한편으로는 고분자량의 mtDNA가 절단되었을 가능성도 배제할 수 없으며 때때로 나타나는 지나친 smearing현상은 핵DNA의 절단에 의한 결과라고 사료된다. 이와 유사한 결과가 다른 종의 식물체에서도 보고되었으며(Quetier and Vedel, 1980; Sparks, *et al.*, 1980; Weissinger, 1982) Fontarnau가 보고한 전자현미경상에서의 오렌지류 mtDNA의 크기를 0.30~46 μ m이었고 김(1989)이 보고한 유자의 mtDNA가 0.9~16 μ m이었음을 볼 때, 그와 유사한 감귤속의 경우에도 일치하리라 생각된다.

감귤속과 유사한 오렌지류의 잎에서 mtDNA를 분리하여 제한효소 처리와 전자현미경 관찰을 한 Fontarnau(1982)의 결과를 보면 *Sal I*에 의한 분절 양상이 40여개로 나타났으나 종간의 차이를 거의 보이지 않았고 선형 DNA와 환형 DNA들이 0.30~46 μ m의 크기로 분포되어 있었고 최근 김 등(1989)의 유자 mtDNA에 대한 전자현미경 관찰에서도 유사한 결과가 나타났다.

미토콘드리아 계놈의 다양성을 분석하는데 가장 많이 이용되고 있는 제한 효소 분절 분석에 의한 방법은 분류학적 측면에서도 다양한 종으로부터 유래된 mtDNA 사이의 차이를 확인할 수 있으며 제한효소 분절양상에 흔히 나타나는 submolar band와 multimolar band는 mtDNA가 이질적임을 암시해 주었다 (Quetier, 1977; Fontarnau, 1982).

본 실험에서는 *Eco* RI, *Hind* III, *Pst* I을 사용하여 4종의 감귤속의 제한효소 분절 양상을 비교하였는데 분절들이 위, 아래로 중첩되어 있어서 분절을 정확히 파악하기 어려웠으나 전체적으로 30~40여 개의 분절들이 나타났다(Fig. 6, 7, 8).

Pst I의 경우 전생감귤아속과 후생감귤아속에서 상당한 차이를 나타낸 *Hind* III와 *Pst* I의 분절양상과 다름을 알 수 있다. 특히, *Hind* III에 의해 나타난 mtDNA의 특이한 분절 양상은 동일아속 사이에 공통된 mtDNA차원에서의 현상을 보여 주었으며(Fig. 7), *Pst* I 분절 양상에서도 이 두 아속은 차이를 보였으나, 그러나 *Eco* RI 분절 패턴의 경우에는 4종 모두에서 특이할 만한 차이를 보이지 않았다(Fig. 6, 8). 결과적으로 감귤속의 전체적인 mtDNA는 전생감귤아속과 후생감귤아속 사이에서 상당한 차이가 있음을 나타냈고, 동일 아속간에는 공통된 양상을 보여 주었다. 이상의 분절양상에서 특이하게 나타난 분절들은 DNA-DNA 분자 잡종화기법등을 이용하여 앞으로 더 상세하게 분석되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

분별 원심분리와 자당, percoll 밀도구배를 이용하여 목본식물인 *Archicitrus*와 *Metacitrus*으로부터 mtDNA 분리법을 확립하였으며, 제한효소에 의한 분절양상을 살펴보았다.

3단계의 비연속 percoll 밀도구배 원심분리에 의해 21%와, 45%의 경계면으로부터 미토콘드리아를 분리하여 정제한 mtDNA의 순도는 분별 원심분리나 자당 밀도구배 원심분리에 비해 훨씬 높았으며 EtBr / Cs-Cl 밀도구배 원심분리에 의해 분리된 mtDNA는 원심분리 튜브의 중간부위에 단일밴드로 형성되었다. 또한 성엽과 신엽으로부터 분리한 mtDNA 수율은 성엽(0.

5~1 μ g/200g)에 비해 신엽 (2 μ g/200g)이 약 2배 더 높게 나타남을 알 수 있었다. *Eco* RI에 의해 나타난 총 mtDNA의 분절 양상은 약 30개였으며 4종의 *Archicitrus*와 *Metacitrus* 모두 6.5Kb와 4.3Kb 사이에서 뚜렷한 분절 밴드를 나타냈으나 그 외의 분절양상은 거의 유사하게 보여졌다. *Hind* III로 처리된 총 mtDNA의 분절 양상도 *Eco* RI의 경우처럼 약 30개였으며 분자량이 큰 DNA 분절들이 뚜렷한 양상으로 나타났으나 *Eco* RI의 분절양상과는 달리 *Archicitrus*와 *Metacitrus*에서 각기 5개(5.5, 4.4, 4.0, 2.3, 1.5Kb), 4개(5.0, 2.4, 2.15, 2.0Kb)의 특이한 밴드들이 나타났다. *Pst* I에 의해 나타난 총 mtDNA의 분절 양상은 40여개였고 *C. iyo* Tanaka에는 결여된 6.0, 5.0, 2.8Kb 분절이 *C. junos* Sieb에 특이하게 나타났다. 이 상과 같이 4종의 감귤속으로부터 분리한 mtDNA를 세 종류의 제한효소로 분석한 결과 *Archicitrus*와 *Metacitrus*사이에 상당한 차이를 보여 주었으며 각 아속 내의 종 사이에는 거의 유사한 양상으로 나타남을 알 수 있었으며 이는 감귤속의 유전적 특성과 세포질 계놈으로 존재하는 mtDNA의 특성에 따라 감귤속을 분류하는 데 토대가 되리라 사료된다.

감사의 말

본 연구를 수행할 수 있도록 연구비를 지원해 준 교육부 기초과학 연구소와 한국과학재단에 감사드립니다.

참고문헌

1. Bookjans, G., Stummann, B. H. and Henningsen, K. W. : *Anal. Biochem.*, 141, 224-247 (1984)
2. Bonner, W.D. : *Methods in Enzymol.*, 10, 126-133 (1975)
3. Brennicke, A. : *Plant Physiol.*, 65, 1207-1210 (1980)
4. Ceci, L.R., Ambrosini, M., Siculella, L., and Gallerani, R. : *Plant Sci.*, 61, 219-225 (1989)
5. Chase, C.D. and Pring, D.R. : *Plant Mol. Biol.*, 53-64 (1986)

6. Dawson, A.J., Jones, V.P. and Leaver, C.J. : *Methods in Enzymol.*, **118**, 470-485 (1986)
7. Dewey, R.E., Timothy, D.H. and Levings, C. S. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 5374-5378 (1987)
8. Duve, C. : *Methods in Enzymol.*, **10**, 7-18 (1976)
9. Fontarnau, A. and Jose, H.Y. : *Plant Physiol.*, **70**, 1678-1682 (1982)
10. Greenawalt, J.W., Hall, D.D. and Walls, O.C. : *Methods in Enzymol.*, 142-147 (1970)
11. Hanson, M.R., Boeshore, M.L., McClean, P. E., O, Connell, M.A. and Nivison, O.T. : *Methodsin Enzymol.*, **118**, 437-453 (1986)
12. Hsu, C.L. and Mullin, B.C. : *Pant Cell Reports.*, **7**, 356-360 (1988)
13. Jackson, C., Dench, J.E., Hall, D.O. and Moore, A.L. : *Plant physiol.*, **64**, 150-15 (1979)
14. Kim, H.S. : Ph. D, thesis, Taegu Univ. (1989)
15. Koloner, R. and Tewari, K.K., : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **69**, 1830-1834 (1972)
16. Kruse, B., Narasimhan, N. and Attardi, G. : *Cell.*, **58**, 391-397 (1989)
17. Lee, S.Y. : Ph. D, Thesis Chosun Univ. (1992)
18. Lee, S.Y., Chun, H.S., Cheong, H.S., Kim, H.S. and Kim, S.J. : *Kor. Molecules and Cells* **3**, 177-181 (1993)
19. Levings, C.S. III., Kim, B.D. Dring, D.R., Conde, M.F., Mns, R.J., Laughnan, J.R. and Gabay-Laughnan, S.G. : *Science.*, **209**, 1021-1023 (1980)
20. Levings, C.S. III. and Meints, D.R. : *Methods in Enzymol.*, **118**, 485-488 (1986)
21. Moreau, F and Romani, R. : *Plant physiol.*, **70**, 1380-1384 (1982)
22. Oser, B. : *Nucleic Acids Res.*, **16**, 8729 (1988)
23. Park, J.P., Chun, H.S., Kim, Y.S., Lee, S.Y., and Kim, S.J. : *J. Gen-Biotech.*, **2**, 73-84 (1992)
24. Park, M.H., Lee, S.Y., Cheong, H.H. and Kim, H.S. : *J. Plant Tissue Culture.*, In Press (1995)
25. Park, M.H., Lee, S.Y., Cheong, H.S., Lee, S.R. and Kim, H.S. : *J. Oriental Bot. Res.*, In Press (1995)
26. Pay, A. and Smith, M.A. : *Plant Cell Reports.*, **7**, 96-99 (1988)
27. Quiter, F and Vedel, F. : *Nature.*, **268**, 365-368 (1977)
28. Quiter, F and Vedel, F. : *In Genome Organization and Expression in Plants(C. J. Le-aver, ed).*, pp. 401-406, Plenum New York (1980)
29. Schuster, W., Hiesel, R., Isaal, P.G., Leaverl, C.J. and Brennicke, A. : *Nucl-eic Acids Res.*, **14**, 5943-5944 (1986)
30. Smith, R.L., Chowdhury, M.K.U. and Pring, D. R. : *Plant Mol. Bio.*, **9**, 277-28 (1986)
32. Sparks, R.B., Jr. and Dale, R.M.K. : *Mol. Gen. Genet.*, **180**, 351-355 (1980)
33. Spruill, W.M., Levings, C.S. and Sederroff, R.R. : *Dev. Gen.*, **2**, 319-336 (1981)
34. Synenki, R.M., Levings, C.S. and Shah, D. M. : *Plant physiol.*, **61**, 460-464 (1978)
35. Tolbert, N.E. : *Methods in Enzymol.*, **31A**, 734-746 (1974)
36. Topping, J.F. and Leaver, C.J. : *Planta.*, **182**, 399-407 (1990)
37. Weissinger, A.K., Timothy, D.H., Levings, C.S. III., Hu, W.W.L. and Goodman, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **70**, 1-5 (1982)
38. Wilson, A.J. and Chourey, P.S. : plant sources. *Plant Cell Reports.*, **3**, 232-239 (1984)
39. Young, E.G. and Hanson, M.R. : *Cell.*, **50**, 41-49 (1987)
40. 김의부 : 유자 재배 기술, 서울특별시, 오성 출판사, pp. 31-75 (1989)
41. 이부영, 이승범, 이신우, 정태영, 김강권 : 시험연구보고서, 129-137 (1987)
42. 한해룡, 권오균 : 감귤원에 신서, 2판, 서울특별시, 선진 문화사, pp. 58-117 (1991)