

PCR-aided RFLP기술을 이용한 인삼의 DNA분석

양덕춘# · 김무성

경희대학교, 생명과학대학 한방재료가공학과
(2003년 6월 2일 접수, 2003년 7월 12일 수리)

DNA Analysis of Ginseng Using PCR-aided RFLP Technology

Deok-Chun Yang[#] and Moo-Sung Kim

College of Life Science, Kyung Hee University, Yongin 449-701, Korea

(Received June 2, 2003, Accepted August 12, 2003)

Abstract : This study was carried out to obtain basic information on breeding using PCR-aided RFLP technology which can identify the variation inter- and intra-species of ginseng in the level of DNA. It was intended to investigate banding pattern on *psbA* and *rbcL* genes of chloroplast DNA in ginseng after treating with restriction enzymes. To isolate *psbA* and *rbcL* genes of chloroplast, both *psbA*-N, *psbA*-C primer and *rbcL*-N, PX-1 primer were used. As a result, 1,008 bp band of *psbA* gene and 1,336 bp band of *rbcL* gene were appeared, which was optimal and expected molecular weight. In addition, primers to isolate *atpB*, *rpoB*, *trnL*, and *trnF* genes were used, resulting in the expected 1366, 900, 1500 and 1008 bp bands. Genes of *psbA* and *rbcL* isolated by PCR were cut by restriction enzymes, *Sau3A*, *TaqI*, *AluI*, *HaeIII*, and RFLP pattern was investigated. KG line and other species of ginseng were cut by *TaqI* treatment, and bands were located in 800 bp. The treatment treated by *AluI* also showed the same 800 bp band in KG line and other species. In *HaeIII* treatment, 500 bp of faint bands were shown in case of KG line, whereas any bands were not observed in other species. All chloroplast genes formed bands by PCR amplification. However, it was not evident to distinguish intra-or inter-species of ginseng after restriction enzyme treatment. Therefore, more restriction enzyme treatment or sequence comparison method should be considered for further experiment.

Key words : PCR-aided RFLP, chloroplast DNA, primer

서 론

80년대까지 전 세계 인삼 생산량의 46%를 유지하던 우리나라는 90년대에 39%로 국제시장 점유율이 감소한 반면 미국삼과 중국삼의 수출이 90년대 50%이상 성장하여 연평균 7.2% 이상의 높은 생산증가율을 나타내어 UR로 인한 시장개방과 더불어 우리나라 인삼산업이 커다란 위협을 받고 있다.^{1,2)} 또한 인삼은 뿌리부분만이 주로 사용되기 때문에 이 부분을 마쇄하거나 그 외 방법으로 가공처리한다면 형태적, 조직학적 특성으로 구분하는 종래의 방법으로는 국내삼인지 타국삼인지 혹은 불량한 삼인지를 구별할 수 없다. 따라서 이러한 여건의 변화속에서 지역의 특성에 따른 고려인삼의 고품질화와 차별

화와 더불어 식물의 종 및 품종간 구별을 확인할 수 있는 방법의 보완책과 시장특성에 맞는 경쟁력을 갖추어야 한다.³⁾ 그러나 문제점은 인삼은 환경에 민감하여 그 유전적 조성이 다양하며, 또한 현재 일반농가에서 재배되고 있는 인삼은 품종이나 계통의 구분없이 오래전부터 재배되어 왔기 때문에 뿌리를 자세히 관찰하여 보면 여러 가지 모양의 많은 유전자형을 가지고 있는 혼계상태로서 개체간의 형질변이가 대단히 심하다는 것을 알 수 있다. 이러한 특성으로 인하여 유전 형질의 현상구명에도 상당한 시간이 필요하며 품종육성을 목적으로 한 교배 및 선발의 효율을 높이는 데도 많은 어려움이 따른다. 이러한 난점들로 인하여 종 및 품종육성에 상당한 시일이 지연되었으며, 인삼의 제반형질의 유전현상 구명과 유전자원의 수집, 분류 및 평가의 중요성이 대두되었고, 품종육성을 위한 중요형질의 선발 기술에 대한 사항도 주요 관심사항으로 떠오르게 되었다.

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 031-201-2688; (팩스) 031-202-2687
(E-mail) dcyang@khu.ac.kr

분류의 객관성과 정확성을 기하기 위하여 다수의 연구자들이 이 분야의 새로운 방법을 개발, 이용하고자 하였고 특히, 잎, 과실, 뿌리의 형태적, 조직학적 형질³⁻⁷⁾과 양적형질을 수리화한 동위효소분석 등이 인삼의 종간의 유연관계 해석에 적용되었다. 그러나 동위효소의 경우 시기별로 또는 같은 종이라도 생육상태에 따라 band양상이 달라질 수 있는 등 방법상의 제약이 많고 종 구분이나 특수 유전형질의 유무에 따른 개체간의 구분에는 그 적용성이 높지 못한 결점이 있다.⁸⁾

근래에, 분자생물학의 발전과 더불어 DNA수준에서 식물체간의 유전분석연구로서 restriction fragment length polymorphism(RFLP) 기술이 수행되어 종간 및 종내 개체간의 유전변이를 확인하는 새로운 방법이 등장하였다. RFLP는 서로 다른 개체의 DNA를 특정 염기서열을 인지하는 제한효소로 처리하였을 때 생기는 DNA의 절편 크기의 차이를 이용한다. 이 방법은 DNA 염기서열상의 자연 돌연변이에 의한 염기 하나의 차이로도 서로 다른 결과를 나타낼 수 있으므로 매우 정밀하게 유전자 변이를 식별할 수 있다. RFLP 분석에는 RFLP probe의 선발이 선행되어야 하는데 RFLP probe를 선발하는 데는 시간과 노력이 많이 들고 실험 수행상에 제한점이 따르는 단점이 있다. 따라서 이런 문제점을 보완하기 위해 최근에는 PCR-aided RFLP 기술이 이용되고 있는데, 이 방법을 수행하기 위하여 식물체에 따라서 염기배열의 차이를 보이는 엽록체 DNA⁹⁻¹¹⁾를 PCR을 사용하여 증폭한 후, 그 염기배열의 차이를 보기 위해서 제한효소를 이용하여 절단하고 그 단편의 양상을 조사하여 종 및 품종간의 차이를 보고한 바 있다.^{1,12,13)}

본 연구는 인삼의 종, 변종 및 계통간의 유전적 다양성을 PCR-aided RFLP기술을 이용하여 인삼의 품종육성을 위한 적용의 기초자료로 활용하고자 인삼의 엽록체 DNA중 *atpB*

gene 및 *rpoB* gene, *trnL* gene과 *trnF* gene, *psbA* gene 과 *rbcL* gene을 추출하여 그 중 *psbA* gene과 *rbcL* gene을 여러 제한효소로 절단하여 그 양상을 조사하였다. 또한 상기 추출한 *psbA* gene과 *rbcL* gene의 엽록체 DNA를 대상으로 하여 RAPD를 적용함으로써 그 양상을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료

본 연구에 사용된 재료는 구 한국인삼연초연구원(대덕연구단지소재)에서 분양받은 유전적으로 안정화되어 계통육성된 KG 9계통과 유전자원으로 분류된 고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)과 미국삼(*Panax quinquefolium* C. A. Meyer), 그리고 죽절삼(*Panax japonicum* C. A. Meyer)을 이종간 분류에 사용하였으며, 고려인삼을 일본에서 품종화한 미마끼(*Panax ginseng* C. A. Meyer), 고려인삼속인 중국삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer), 소련삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)과 고려인삼의 변종인 황숙종, 청경종, 자경종, 풍기황숙등의 잎과 뿌리를 채취하여 종 및 변종 분류에 사용하였다. 잎의 경우 인삼의 생육이 가장 왕성한 5월 전후에 상단부의 완전히 전개된 엽을 사용하였고 뿌리의 경우 11월 전후에 6년근과 묘삼을 채취하여 사용하였다. 각각의 시료는 채취 후 실험실에서 흐르는 물로 일차 깨끗이 세척한 후 3차 증류수로 행군 다음 표피의 물기를 제거한 즉시 total DNA 분리에 이용하거나 또는 필요시 까지 -80°C의 deep freezer에 냉동 밀폐 보관하였다.

2. Total DNA 분리 및 정제

0.3 g의 인삼잎을 1.5 mL Eppendorf tube에 넣고 600 µl

Table 1. Oligonucleotide primer used for chloroplast DNA analysis

No.	Primer ^a	Locus	Positiona)	Length(mer)	Sequence(5'→3')
1	<i>psbA</i> -N (S) <i>psbA</i>	<i>psbA</i>	+1	23	ATGACTGCAATTTTAGAGAGACG
	<i>psbA</i> -C (A) <i>psbA</i>	<i>psbA</i>	+1008	23	CATTACGTTTCATGCATAACTTCC
2	<i>rbcL</i> -N (S) <i>rbcL</i>	<i>rbcL</i>	+1	22	ATGTCACCACAAACAGAAACTA
	PX-1 (A) <i>rbcL</i>	<i>rbcL</i>	+1336	22	CTAGTTCAGGACTCCATTGCA
3	<i>atpB</i> -RV(S) <i>atpB</i>	<i>atpB</i>	+232	20	CCATCTGTAGCACTCATAGC
	RV-1 (A) <i>rbcL</i>	<i>rbcL</i>	+242	17	TTGTAACGATCAAGACT
4	<i>atpB</i> -NR(S) <i>atpB</i>	<i>atpB</i>	+22	22	AAGTAGTAGGATTGGTTCTCAT
	<i>rbcL</i> -NR(A) <i>rbcL</i>	<i>rbcL</i>	+22	22	TAGTTTCTGTTTGTGGTGACAT
5	<i>rpoB</i> -1 (S) <i>rpoB</i>	<i>rpoB</i>	+2759	21	TCGGGTTCAAATACCCATGGA
	<i>rpoB</i> -2 (A) <i>rpoB</i>	<i>rpoB</i>	+1473	23	TCAGGAAGAACAGGTTGTTCCAG
6	Uni'C (S) <i>trnL</i> (UAA)	<i>trnL</i> (UAA)	*	20	CCGAATCGGTAGACTCTACG
	Uni'f (A) <i>trnF</i> (GAA)	<i>trnF</i> (GAA)	*	20	ATTTGAAGTGGTGACACGAG

^aNucleotide position of a base at 5' end of the oligonucleotides in the corresponding genes.

의 추출 버퍼(100 mM Tris pH 7.5, 50 mM EDTA pH 8.0 500 mM NaCl, 10 mM Mercaptoethanol)를 넣고 드릴 팁으로 마쇄한 다음 12,000 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상등액 500 μ l를 새로운 튜브로 옮기고 phenol: chloroform:isoamylalcohol(25:24:1) 500 μ l를 첨가하여 30초간 vortex한 후 3분간 12,000 rpm으로 원심분리하였다. 상등액 300 μ l를 새로운 tube로 옮긴 다음 200 μ l의 isopropanol을 첨가하고 2분동안 실온에 방치한 후 -4°C에서 10분간 12,000 rpm으로 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액은 버리고 DNA pellet을 70%의 ethanol용액으로 세척 후 건조하였다. 건조가 끝난 DNA pellet은 100 μ l의 TE buffer를 넣고 용해하였다.

3. 엽록체 DNA의 PCR-aided RFLP

인삼의 엽록체 DNA에서 photosystem II인 32 kd protein(*psbA*) gene과 rubisco large subunit(*rbcL*) gene을 추출하여 RFLP를 실행하기 위하여 사용된 primer는 Table 1과 같이 *psbA*-N, *psbA*-C, *rbcL*-N, PX-1을 각각 사용하였다. PCR에 의해서 인삼으로부터 엽록체 DNA를 합성하기 위해서 인삼 DNA 50 ng과 primer 20 pmol을 Premix™에 넣고 total volume를 20 μ l로하여 PCR반응을 실시하였다. PCR 반응 조건은 92°C의 predenaturation 온도에서 2분 반응 후 94°C denaturation 온도에서 30초, 55 annealing 온도에서 30초, 72°C extension 온도에서 2분간의 반응을 45 cycle로 고정하였으며 post extension을 72°C에서 15분간 처리하였다. Data base에서 엽록체관련 유전자의 제한효소 site를 조사하여, 선발된 제한효소로 PCR product를 절단했다. 절단 후 1.2% agarose gel에서 전기영동하여 형성된 band를 분석하였다.

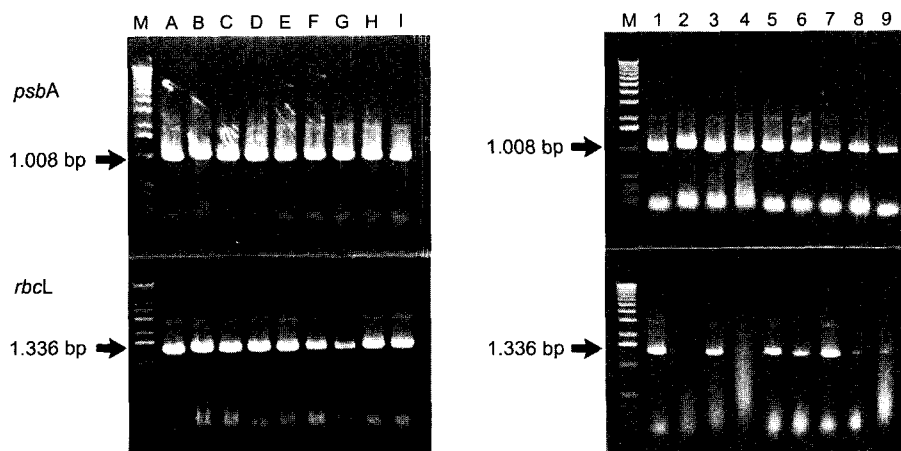


Fig. 1. PCR product of *Panax ginseng* using primer for *psbA* gene and *rbcL* gene. A: KG101, B: KG102, C: KG103, D: KG104, E: KG105, F: KG106, G: KG107, H: KG108, I: KG109, 1: *Panax quenquifolium*., 2: USSR, 3: China, 4: Mimaki, 5: *Panax japonicum*., 6: Hwangjukjong, 7: Chungkyungjong, 8: Sanyang 9: Jakyungjong; M, Molecular marker (1 Kb DNA ladder).

결과 및 고찰

1. 인삼 genomic DNA로부터 *psbA*, *rbcL*, *atpB*, *rpoB*, *trn* gene의 증폭

일반적으로 RAPD 방법에 사용된 primer는 10 mer 이기 때문에 PCR시 annealing temperature가 매우 낮아서 재현성에 문제가 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 10 mer의 primer 대신 20 mer 이상의 specific primer를 사용하여 annealing temperature를 높여서 매우 재현성이 높은 band를 획득하고자 하였다. 환경조건에 민감한 인삼에 있어 세포질 DNA(mt DNA, cpDNA)는 모본에 영향을 주지 않아 품종간에 세포질 DNA에 의한 차이가 있을 것으로 사료되는 바, 본 실험은 엽록체 DNA에 coding 되어 있는 *psbA* 및 *rbcL* gene을 추출하여 제한효소로 절단하여 그 절단 양상을 비교하고자 수행하였다. 사용한 인삼은 KG101-109계통 9종, 미국삼, 중국삼, 소련삼, 미마끼, 죽절삼, 황숙종, 청경종, 산양삼, 자경종등 모두 18종 및 변종을 사용하였다.

Chloroplast DNA의 *psbA*, *rbcL* gene(Fig. 1)과 *atpB*, *rpoB*, *trn* gene(Fig. 2)이 PCR로서 증폭되었다. Table 1에서와 같이 *psbA* gene을 분리하기 위해서는 *psbA*-N, *psbA*-C

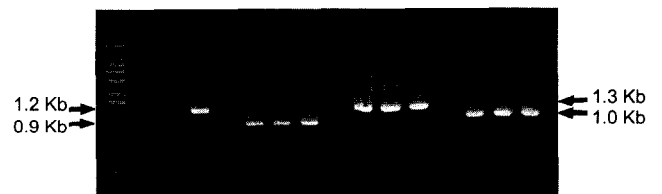


Fig. 2. PCR product of ginseng using primers for *atpB* gene, *rpoB* gene, *trnL* gene. A: *Panax ginseng*. B: *Panax quenquifolium*, C: *Panax japonicum*; M, Molecular marker (1 Kb DNA ladder).

primer를 그리고 *rbcL* gene을 분리하기 위해서는 *rbcL*-N, PX-1 Primer를 각각 사용하였으며, 그 외 동일한 방법으로 *gene* 추출을 위한 primer를 각각 사용하였고, PCR을 한 결과 *psbA* gene을 사용한 KG101-109에서는 1,008 bp에서 각각 유사한 1개의 band가 나타났다. *rbcL* gene을 사용한 KG101-109에서는 1,336 bp에서 유사한 1개씩의 band가 형성되었다.

PsbA gene을 사용한 종 및 변종간에는 1,008 bp에서 유사한 1개의 band가 동일하게 보였으며, *rbcL* gene을 사용한 종 및 변종간에는 밴드가 형성되지 않은 소련삼 미마끼를 제외하고는 1,336 bp에서 유사한 1개씩의 band가 형성되었다. 또한 Fig. 2에서 *atpB* gene을 사용한 자경종, 미국삼, 죽절삼간에는 1,336 bp와 900 bp에서 동일한 band양상을 보였으며, *rpoB* gene을 사용한 경우 1,300 bp에서 이종간 동일한 band양상을 보였다. 또한 *trnL* gene을 사용한 경우 자경종, 미국삼, 죽절삼간에도 1,008 bp에서와 같은 양상을 보임으로서 인삼의 엽록체에 coding되어 있음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 이(1995)가 백합의 엽록체 DNA에서 *psbA*와

rbcL gene을 추출하여 분리한 바 각각 유사한 banding pattern을 보여 본 실험과 유사한 결과를 보고하였고,¹⁴⁾ Terachi 등(1994)도 서로 다른 식물체 98종 중 59종에서 *psbA* product가 형성되었고 *rbcL* 경우에는 56종의 동일한 위치에서 *rbcL* product가 형성되었다고 보고하여 본 실험의 결과와도 유사하였다.¹⁵⁾ 이상의 결과에서 *psbA* gene을 사용한 종 및 변종간에는 1008 bp에서 유사한 1개의 band가 동일하게 보였으며, *rbcL* gene을 사용한 종 및 변종간에는 1,336 bp에서 동일한 1개씩의 band가 형성되었다.

2. *psbA* gene 및 *rbcL* gene의 PCR-aided RFLP

증폭된 인삼을 계통별 *psbA* gene 및 *rbcL* gene을 제한효소로 절단하여 RFLP pattern을 보고자 *TaqI*, *AluI*, *HaeIII*을 처리하여 2시간 동안 37°C에서 반응시킨 후 전기영동하여 band양상을 조사한 결과 *TaqI* 제한효소 처리구에서 KG Line 과 종 및 변종간 모두 절단이 되었으며 800 bp에서 band가 위치하고 있다(Fig. 3). *AluI*의 제한효소 처리구에서는 KG Line

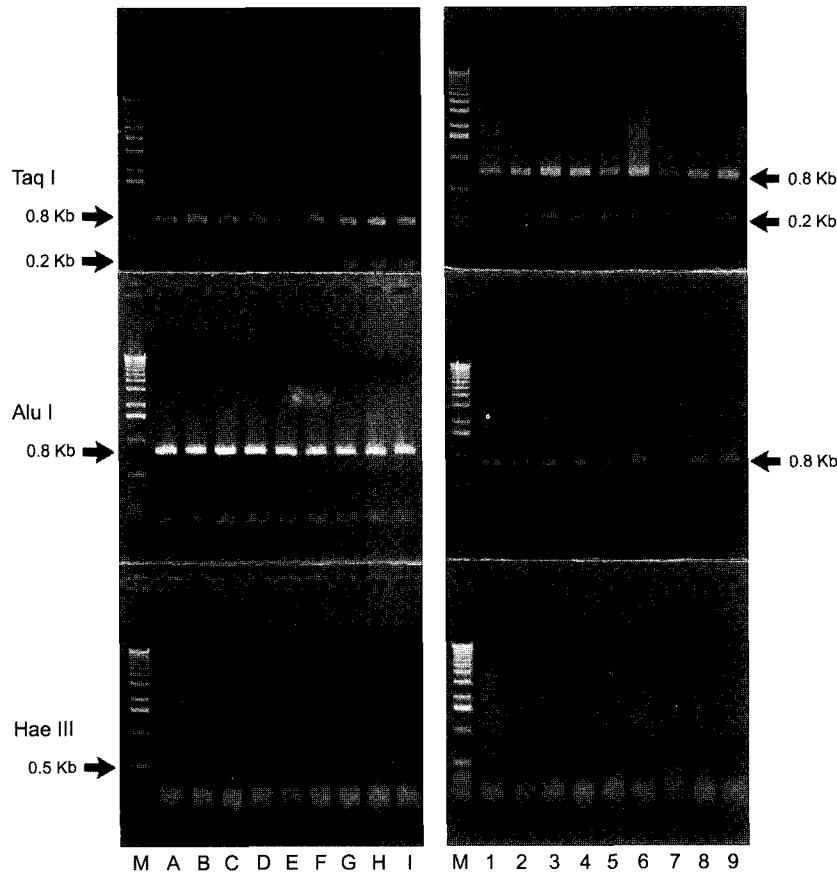


Fig. 3. Restriction fragment patterns of PCR products obtained from *psbA* gene in chloroplast of *Panax ginsengs* using *Taq* I, *Alu* I and *Hae* III restriction enzyme. A: KG101, B: KG102, C: KG103, D: KG104, E: KG105, F: KG106, G: KG107, H: KG108, I: KG109, 1: *Panax quenquifolium.*, 2: USSR, 3: *Panax notoginseng*, 4: Mimaki, 5: *Panax japonicum*, 6: Hwangsjukjong, 7: Chungkyungjong, 8: Sanyang, 9: Jakyungjong; M: Molecular marker(1Kb DNA ladder).

에 800 bp에서 1개의 동일한 band를 보였으나, 유전자원에서는 제한효소가 완전히 절단이 되어 band가 보이지 않았으므로 구별이 용이했다. 제한효소 *HaeIII*에서는 KG Line의 경우 500 bp의 위치에서 희미하게 band를 동일하게 보였다. 그러나 유전자원에 있어 *HaeIII* 제한효소처리구에서는 band가 관찰되지 않아 KG Line과 구별이 용이 했다. Mishio 등은 PCR-aided RFLP 방법을 사용하여 당근의 계통간 분류에 이용하였으며, 엽록체 DNA로부터 PCR의 증폭산물을 획득하여 PCR-aided RFLP분석에 의한 Rosaceae의 중간 구별을 보고하였다.¹⁶⁾ 한편 이 등은 엽록체 DNA를 이용하여 *Populus* 수종별 RAPD분석을 한 결과 primer *rpoC1* 및 *rpoC2*를 이용하여 각 수종에 특이한 band들을 확인할 수 있었다.¹⁾ Terachi 등(1994)도 9종의 *Filipendula*와 2종의 연관된 종들은 *rbcL* gene을 증폭한 후 여러종류의 제한효소로 절단하였을 때 다양한 밴드양상이 나타나서 종분류를 위한 좋은 marker가 될 수 있음을 나타내어,¹⁶⁾ PCR-aid RFLP방법에 의한 중간 혹은 종내의 구분이 가능할 것으로 사료되지만 인삼의 경우에는 현저한 차이를 보이지 않아 본 실험에서 사용한 제한효소로서는 어려움이 있는 것으로 판단된다. 따라서, 이와 같은 결과로 볼 때 4 mer 인식 제한효소뿐만 아니라 사용폭을 넓혀 6 mer 인식 제한효소등 여러종류의 제한효소를 사용하여 절단한다면 서로 차이가 나타나는 절편을 획득할 수 있을 것으로 사료되며, 어떤 경우에도 서로 다른 절편이 나오지 않을 경우에는 염기서열을 분석하여 분류하는 방법을 사용해야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 DNA수준에서 인삼의 종내 및 중간 개체간의 유전변이를 확인할 수 있는 새로운 방법인 PCR-aided RFLP를 사용하여 품종육성의 기초자료로 삼고자 수행하였다. 인삼의 엽록체 DNA중 *psbA* gene과 *rbcL* gene을 제한효소처리하여 그 band 양상을 조사하고자 하였다. Chloroplast DNA 중 *psbA* gene과 *rbcL* gene을 분리하기 위하여 각각 *psbA-N*, *psbA-C* primer 및 *rbcL-N*, PX-1 primer를 사용한 결과 적정 분자량인 *psbA* gene은 1,008 bp에서, *rbcL* gene은 1,336 bp에서 band가 나타났다. 또한 *atpB* gene, *rpoB* gene, *trn* gene을 분리하기 위한 primer를 사용한 결과 역시 예상대로 1,366 bp, 900 bp, 1,500 bp, 1,008 bp에서 band가 나타났다. PCR에 의하여 분리한 *psbA* gene과 *rbcL* gene을 *Sau3A*, *TaqI*, *AluI*, *HaeIII* 등의 제한효소로 절단하여 RFLP양상을 조사한 결과 모든 인삼에서 *TaqI* 제한효소 처리

구에서 KG Line 과 종 및 변종간 모두 절단이 되었으며 800 bp에서 band가 위치하고 있다. *AluI*의 제한효소 처리구에서도 KG Line과 유전자원에서 800 bp의 동일한 band를 보였다. 제한효소 *HaeIII*에서는 KG Line의 경우 500 bp의 위치에서 희미하게 band를 동일하게 보였다. 그러나 유전자원에 있어 *HaeIII* 제한효소처리구에서는 band가 관찰되지 않아 KG Line과 차이를 보였다. 모든 chloroplast gene은 PCR 증폭에 의하여 밴드를 형성하였으나 제한효소 처리후 각 인삼 종내 또는 중간 식별이 용이하지 않아서 좀 더 많은 제한효소를 사용하거나 증폭된 DNA를 염기서열을 분석하여 비교하는 방법이 고려 되어야 할 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 21세기 프론티어 사업인 자생식물 사업단의 연구비 일부지원(PF003101-01)에 의해 수행되었습니다.

인용문헌

1. 이재순, 노은운, 장석성, 이석구, 노의내, 이돈구 : 한국육종학회지 **26**(4), 335 (1994).
2. 박훈 : 고려인삼학회지 **18**(3), 200 (1994).
3. 최광태, 이명구, 권우생, 이장호 : 한국육종학회지 **26**(s), 83 (1994).
4. 안상득, 최광태 : 고려인삼학회지 **8**, 72 (1984).
5. 안상낙, 박희운, 최해춘, 문헌팔 : 한국육종학회지 **28**(2), 178 (1996).
6. 안상낙, 문헌팔 : 농업생명과학 **1**(1), 43 (1994).
7. 최광태, 신희석 : 고려인삼학회지 **6**(1), 67 (1982).
8. 박영은, 김관수, 정승룡, 유영숙, 송용남, 임학태 : 한국원예학회지 **37**(3), 386 (1996).
9. 고성룡, 최강주, 김석창, 한강완 : 고려인삼학회지 **19**(3), 254 (1995).
10. 한국인삼연초연구소 : 유전공학연구보고서 p. 48 (1991).
11. 정열영, 정찬문, 고성룡, 최광태 : 고려인삼학회지 **19**(2), 160 (1995).
12. 권우생, 정찬문, 김요태, 최광태 : 한국육종학회지 **19**(3), 254 (1991).
13. 경영전략연구소 : 인삼생산 환경분석 p. 4 (1994).
14. 이지용 : 공주대학교 석사학위논문 p. 16 (1995)
15. Terachi, T., Mukofujiwara, Y. Fujii, N. Shirai N. and Shimizu, T.: Kyoto Sangyo Univ. p. 45 (1994).
16. Mishio, T., Sakamoto, K. and Yamaguchi, J.: Plant Cell Reports **13**, 546 (1994).