

# 화색 변이체에 대한 분자유전학적 분석

최정두<sup>†</sup> · 김규원<sup>\*</sup>

<sup>†</sup>경북바이오산업연구원, <sup>\*</sup>영남대학교

## I. 서 언

식물의 꽃이 아름다운 색을 나타내는 것은 꽃잎에 그 원인이 되는 색소가 함유되어 있기 때문인데, 꽃의 색소 가운데 가장 폭넓게 분포하며 청색부터 적색까지 다양하게 발현하는 것은 플라보노이드(flavonoid) 특히, 안토시아닌(anthocyanin)이다. 플라보노이드는 A환과 B환으로 불리는 두개의 페닐기가 세 개의 탄소를 매개로 하여 결합되어 있는 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>의 구조를 갖는 식물 색소의 총칭이다. 이외에도 식물의 화색소로는 황색을 나타내는 카로테노이드(carotenoid)와 베타레인(betalain) 그리고 녹색을 나타내는 클로로필(chlorophyll) 등이 잘 알려져 있다. 식물의 화색 가운데 대부분을 차지하는 안토시아닌은 배당체 또는 아실화배당체로서 존재하는데, 그 가운데 색소본체를 안토시아닌이라 한다. 비록, 화색소에 대한 생화학적 연구는 오래전부터 많은 연구자들에 의해 집중적으로 이루어져 왔지만, 분자유전학을 이용한 화색 연구의 역사는 비교적 근래에 시작되었으며, 페튜니아, 금어초, 나팔꽃 등 일부 식물들을 중심으로 이루어져 왔다.

## II. 연구 배경

안토시아닌은 대표적인 2차 대사산물로서 그 생합성에는 일련의 효소들이 관여한다. 안토시아닌 생합성 경로에 대한 분자유전학적 연구의 모델 식물들 가운데 특히 나팔꽃(*Ipomoea nil*; Japanese morning glory)은 일본에서 원예화 된 이래 현재까지 다양한 형태 및 화색의 변이체들이 분리되어 있으며, 특히 화색의 경우에는 검은색, 녹색, 노란색 그리고 주황색 등 일부를 제외한 대부분의 화색이 존재하는 것으로 알려져 있다. 나팔꽃 안토시아닌의 생합성 경로에 대한 분자유전학적 연구는 최근 15년 동안 집중적으로 진행되어 현재는 안토시아닌 생합성 경로에 관여하는 대부분의 구조유전자(structural genes: *CHS*, chalcone synthase; *CHI*, chalcone isomerase; *F3H*, flavanone 3-hydroxylase; *F3'H*, flavonoid 3'-hydroxylase; *DFR*, dihydroflavonol 4-reductase; *ANS*, anthocyanidin synthase; *UF3GT*, UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase 등)들이 분리, 동정되었다(그림 1). 나팔꽃의 화색은 안토시아닌 생합성 경로 가운데 어떤 과정을 거치느냐에 따라 결정되는데 즉, F3H 효소가 작용한 이후에 곧바

Corresponding author: (Phone) +82-54-823-6901 (E-mail) floracjd@yumail.ac.kr

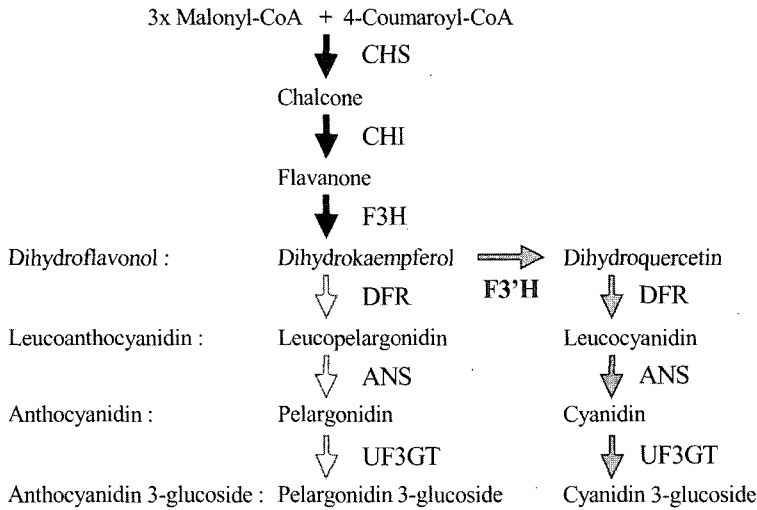


그림 1. 나팔꽃의 안토시아닌 생합성 경로.

CHS: chalcone synthase, CHI: chalcone isomerase, F3H: flavanone 3-hydroxylase, F3'H: Flavonoid 3'-hydroxylase, DFR: dihydroflavonol 4-reducase, ANS: anthocyanidin synthase, UF3GT: UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase

로 DFR이 작용하는 과정을 거치면 적색계통의 pelargonidin이 생합성되지만, 그렇지 않고 F3H 이후에 안토시아닌 B환의 세 번째 탄소를 수산화시키는 F3'H가 작용하는 과정을 거치게 되면 청색계통의 cyanidin이 만들어진다.

한편, 나팔꽃에는 *I. nil* 외에도 서양나팔꽃(*I. tricolor*)과 등근잎나팔꽃(*I. purpurea*) 등 다양한 종이 존재한다. 이 가운데 특히 서양나팔꽃은 1940년대에 미국에서 원예화되어 현재 미국과 유럽에서 가장 널리 재배되고 있는 나팔꽃이다(그림 2). 서양나팔꽃의 야생형 품종인 'Heavenly Blue' (HB)는 선명한 청색꽃을 피우지만, 서양나팔꽃에는 그 외에도 자연발생 돌연변이체인 적색꽃을 피우는 'Wedding Bells' (WB), 흰색바탕에 청색의 얼룩무늬 꽃을 피우

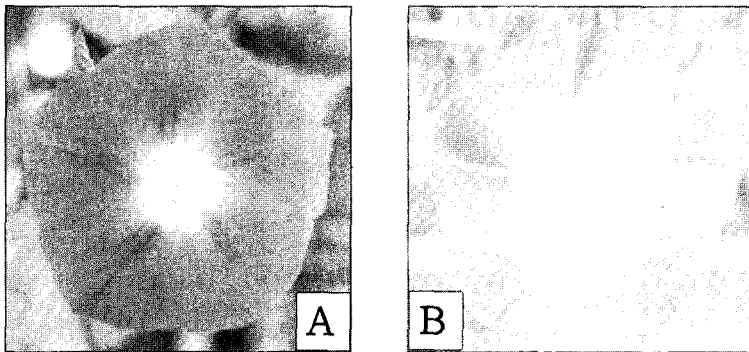


그림 2. 서양나팔꽃(*Ipomoea tricolor*)의 야생형 품종인 Heavenly Blue (HB; A)와 변이체 품종인 Wedding Bells (WB; B)의 화색 표현형.

는 ‘Flying Saucers’, 흰색꽃을 피우는 ‘Pearly Gates’ 그리고 옅은 하늘색 바탕에 성상의 ray 부분이 짙은 청색인 ‘Blue Star’ 등의 화색 변이체들이 분리되어 있다. 최근까지의 실험 결과 이들은 모두 열성 변이체임이 밝혀졌다. 이들 서양나팔꽃의 화색 변이체들 가운데 적색꽃을 피우는 WB는 Northern 분석 결과 안토시아닌 생합성 경로의 효소 유전자들 가운데 유일하게 *F3'H* 유전자의 전사량이 야생형에 비해 현저히 감소한 것으로 확인되었다. 또한, *F3'H* 유전자에 대한 Southern 분석과 게놈 영역에 대한 염기서열을 분석한 결과, WB는 *F3'H* 유전자의 두 번째 exon에 “T” 염기가 한개 더 삽입되므로써 곧바로 “TAG”라는 정지 코돈(stop codon 또는 nonsense codon)이 생성되고 이로 인해 *F3'H* 유전자의 번역(translation)이 중단된다는 것이 밝혀졌다.

그러나, 이와 같은 삽입변이로 인한 정지 코돈의 생성은 엄밀히 말하면 *F3'H* 유전자의 전사에 관련된 문제가 아니라 번역에 영향을 미칠 수 있는 문제이다. 즉, 이론상으로라면 WB는 *F3'H* 유전자의 전사에는 문제가 없고, 단지 *F3'H* 효소(단백질)의 생합성이 정상적으로 이루어지지 않아야 할 것이다. 이러한 의문점을 해소하기 위하여 본 실험에서는 경쟁 RT-PCR 법(competitive RT-PCR)을 이용하여 WB의 *F3'H* 전사량이 야생형에 비해 현저히 감소하게 된 원인이 *F3'H*의 전사 효율이 저하되었기 때문인지, 아니면 전사된 *F3'H* 유전자의 mRNA가 구조적인 불안정성 등의 이유로 인해 쉽게 분해되므로써 세포질 내에서 축적이 제대로 되지 않기 때문인지를 구명하였다.

따라서, 여기서는 WB 변이에 대한 분자유전학적 분석 가운데 그 핵심이 되는 경쟁 RT-PCR 법에 대해 소개하고자 하며, 이를 위해 대조구인 HB와 더불어 WB의 꽃봉오리로부터 총 RNA를 분리하는 방법과 분리한 RNA를 이용한 경쟁 RT-PCR 방법 및 그 결과에 대해 기술하고자 한다.

### III. 분석방법

#### 1. 서양나팔꽃 꽃봉오리로부터 총 RNA 추출

식물체로부터 총 RNA를 추출하는 방법은 여러 가지가 있으며, 최근에는 간편한 kit들이 많이 개발되어 있다. 그러나, 여기서는 Guanidine isothiocyanate (GIT) 추출액과 초고속원심분리기를 사용하여 추출하는 방법에 대해 소개하겠다. 이 방법은 추출과정이 다소 번거로운 단점이 있으나, 별도의 kit를 사용하지 않아 경제적이며, DNA와 단백질이 거의 혼합되지 않은 고 순도의 RNA를 대량 추출할 수 있어서 Northern blot 분석과 전장의 cDNA library 제작을 목적으로 주로 이용되는 추출법이다.

##### 1) 장치 및 기구

유발, 유봉, 항온수조, 초순수제조기, 고속원심분리기, 초고속원심분리기, 30 ml 원심분리용 튜브, 두껍이 있는 6 ml 튜브, 6 ml 초원심분리용 튜브(이상 Falcon사), 유리 피펫(10 ml), 피펫 에이드 또는 필러, 마이크로 피펫(20, 200, 1000  $\mu$ l), 파스퇴르 피펫, 감압 펌프, 디지털 저울, vortex mixer, 1.5 ml 마이크로 튜브, 블록 인큐베이터(이상의 기구, 장비들 가운데 시료와

직접 접촉하는 기구들은 모두 멸균된 것을 사용해야 하며, 또한 RNase free 상태이어야 함), 길이가 긴 문구용 칼, 분젠버너

## 2) RNA 추출 시약 및 조제

- Guanidine isothiocyanate(GIT) 추출 용액
  - 4M Guanidine isothiocyanate
  - 0.1M Tris-HCl (pH 7.5)
  - 필터 멸균한 후 실온에서 차광하여 보관 (약 1개월 정도 보관 가능함)
- 1M acetic acid
- Tris/Sarc (pH 8.0)
  - 10 mM Tris
  - 1.0% Sodium lauroylsarcosinate
  - HCl로 pH를 8.0으로 보정
- Tris/Sarc/CsCl (pH 8.0)
  - 10 mM Tris
  - 1.0% Sodium lauroylsarcosinate
  - 5.7M CsCl
  - HCl로 pH를 8.0으로 보정
- 3M NaOAC
- $\beta$ -mercaptoethanol, 에탄올, 70% 에탄올, 멸균초순수, 액체질소

## 3) 시료의 준비 및 총 RNA 추출 과정

- HB(야생형, 대조구)와 WB(변이체)의 개화 48시간 전 꽃봉오리(길이 4~5 cm) 3개씩을 채취하여 아이스박스에 담아 음.
- 유발에 액체 질소를 붓고 꽃봉오리의 꽃잎(petal) 부분만(약 1 g)을 가위로 잘라 넣은 후 유봉으로 고운 가루가 되도록 마쇄함.
- 피펫으로 GIT 추출액을 시료 당 10 ml를 넣고 다시 유봉으로 균질화 시킨 후 30 ml 원심분리 튜브에 전량 옮김.
- $\beta$ -mercaptoethanol을 200  $\mu$ l 첨가하고 천천히 흔들어서 섞은 후 얼음에 꽂아 둠.
- 저울로 튜브의 무게를 맞춘 후 4°C, 10,000 rpm에서 10분 동안 원심분리함.
- 원심분리하는 동안 새 원심분리용 튜브에 1M acetic acid 250  $\mu$ l, 에탄올 7.5 ml 분주하여 얼음에 꽂아 둠.
- 상정액(supernatant)을 acetic acid와 에탄올이 든 새 원심분리용 튜브로 옮김.
  - 이 상태의 시료는 -30°C의 냉동고에서 보관할 수 있는데, 이후의 실험은 약 2시간 반 정도 소요된 후 12시간 동안 초원심분리 과정이 있으므로 다음날 초원심분리가 끝나는 시간을 고려하여 실험 시간을 결정함.
- 4°C, 10,000 rpm에서 20분 동안 재원심분리함.
  - 항온수조의 온도를 68°C로 맞추어 둠.

- 상징액을 제거한 후 70% 에탄올을 10 ml 분주한 다음 튜브를 조심스럽게 돌리면서 수세함.
  - 이 과정에서 튜브 내벽에 붙어 있던 잔사(pellet)가 떨어지면 다시 원심분리해야 하나, 만약 잔사가 떨어지지 않으면 수세액을 그냥 쏟아 버리면 됨.
- 잔사에 Tris/Sarc를 3.5 ml 분주한 후 68°C의 항온수조에 꽂아 두고 약 5분 간격으로 vortexing해서 잔사를 완전히 용해시킴(약 15분 정도 소요됨).
- 4°C, 8,000 rpm으로 20분 동안 원심분리함.
  - 기다리는 동안 두경이 있는 6 ml의 튜브에 CsCl을 3 g 넣어 둠.
  - 6 ml의 초원심분리용 튜브에 Tris/Sarc/CsCl 1.25 ml를 분주하고 튜브의 위쪽과 아래쪽 둥근 부분에 유성펜으로 표기해 둠.
- 상징액(3 ml)을 CsCl이 들어 있는 6 ml의 튜브에 옮긴 후 아래위로 흔들어서 완전히 용해시킴.
- 용해된 용액을 전량 Tris/Sarc/CsCl이 든 초원심분리 튜브로 옮김.
  - 이 때 가능한 한 아래쪽의 Tris/Sarc/CsCl 용액과 뒤섞이지 않도록 1 ml 마이크로 피펫으로 한 방울씩 튜브 벽면을 타고 흐르도록 조심스럽게 옮김.
- 초원심분리 튜브를 swinging bucket에 꽂은 상태에서 디지털 저울로 대칭되는 시료간의 무게를 정확히 맞춤.
  - 만약, 무게가 일치하지 않을 경우에는 무거운 쪽의 시료를 마이크로 피펫으로 들어 내어 맞춤.
- Swinging bucket을 rotor에 조심스럽게 장착한 후 20°C, 42,000 rpm으로 12시간 동안 초원심분리함.
  - Rotor가 자연스럽게 멎도록 Decel을 별도로 설정하지 않음.
  - 초순수 100 ml를 고압멸균해 둠.
- 초원심분리 과정이 끝나기 약 30분전에 항온수조의 온도를 68°C로 설정해 두고, 핀셋, 멸균된 초순수, 1.5 ml 마이크로 튜브, 길이가 긴 문구용 칼, 분젠버너, 마이크로 피펫(200 µl, 1 ml)을 준비해 둠.
- Swinging bucket rotor가 완전히 멎었으면, 초원심분리 튜브를 핀셋으로 조심스럽게 들어내어 튜브 랙에 꽂아 두고, 1.5 ml 마이크로 튜브에 표기해 둔 다음 파스퇴르 피펫과 감압 펌프를 사용하여 튜브의 아래쪽 둥근 부분까지 상징액을 조심스럽게 제거함.
  - 상징액 제거 후 초원심 튜브의 아래쪽에 콘택트 렌즈 모양의 투명한 잔사가 보이는데 이것이 RNA임.
- 초원심 튜브의 아래쪽을 잡고 위쪽 부분을 불에 달군 칼로 잘라냄.
  - 화상 주의할 것.
- 200 µl 피펫으로 상징액(CsCl)을 제거한 후 300 µl의 멸균 초순수로 튜브의 측면을 수세하며, 이 과정을 3회 반복함.
  - 이 과정에서 주의할 것은 최초 CsCl을 제거할 때와 2회의 수세 과정에서는 용액을 완전히 제거하지 말고 조금 남겨두는 것이 좋음. 왜냐하면 CsCl이 완전히 제거되면 콘택트 렌즈 상의 RNA가 용해되므로 수세가 불가능하기 때문임. 즉, CsCl이 남아

- 있는 한은 RNA가 용해되지 않으므로 최종 수세단계에서 용액을 완전히 제거하면 됨.
- 잔사에 멸균 초순수를 200  $\mu$ l 가해 용해시킨 후 1.5 ml의 마이크로 튜브로 옮기고 이 과정을 1회 반복함(총 400  $\mu$ l).
  - 68°C의 항온수조에서 약 5분 동안 가온하면서 RNA 잔사를 완전히 용해시킴.
    - 이 때 Vortex mixer를 사용해도 무방함.
  - 3M NaOAC 1/10배(40  $\mu$ l), 냉동보관된 에탄올 2배(800  $\mu$ l) 분주한 후 vortexing.
  - -30°C의 냉동고에 10분간 방치함.
  - 4°C, 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상정액을 제거함.
  - 70% 에탄올로 2회 수세함.
    - 이 때 잔사가 튜브 벽면에서 떨어지면 재원심분리함.
  - 마이크로 튜브의 두경을 연 상태로 수분이 모두 없어질 때까지 감압건조하거나 무균 상에 넣어서 자연 건조시킴.
  - 잔사의 양을 고려하여 멸균 초순수를 적당량(30-50  $\mu$ l) 분주하여 68°C의 항온수조에 넣고 vortexing하면서 잔사를 용해시킴.
  - RNA/DNA 정량
    - 멸균 초순수로 200배 희석(1  $\mu$ l/200  $\mu$ l)하여 260 nm에서의 흡광도(A260) 및 ratio를 측정하여 기록해 둠.
    - 총 RNA는 대개 rRNA 약 80%, tRNA 10-15% 그리고 mRNA 1-5%로 구성됨.
    - 정량 계산식 :  $A_{260} \times 40 (A_{260}$ 이 1일 때의 RNA 양)  $\times 200$ (희석배수)/1000 = X  $\mu$ g/ $\mu$ l
  - 라벨한 후 -80°C의 Deep freezer에서 보관함.

## 2. 경쟁 RT-PCR (competitive RT-PCR) 분석

경쟁 RT-PCR은 변이체에 있어서 특정 유전자의 전사량이 야생형(대조구)에 비해 감소했을 때, 그 원인이 전사 효율의 저하 때문인지, 아니면 전사 산물의 구조적인 불안정성으로 인해 그 전사 산물이 축적되지 못하고 쉽게 분해되기 때문인지를 증명할 수 있는 좋은 방법 가운데 하나이다. 경쟁 RT-PCR을 성공적으로 수행하기 위해서는 1) RT-PCR로 증폭시키고자 하는 영역에 있어서 야생형과 변이체 간의 증폭 효율이 동일하여야 하며, 2) 또한 단일 밴드가 증폭될 수 있는 조건을 찾아야 한다. 3) 그리고, RT-PCR 산물에서 야생형 유래와 변이체 유래의 산물을 구분할 수 있는 수단(분자 마커)이 반드시 마련되어야 한다. 본 실험에서는 그림 3에서 보는 바와 같이 WB의 경우 'T' 염기 한 개의 삽입으로 인해 야생형에는 존재하는 특정 제한효소(*Dde*I) 자리가 소멸되었으며, 이는 변이체를 구분할 수 있는 분자 마커이자 경쟁 RT-PCR에서 변이체 유래의 산물을 구분해 내는 좋은 수단으로 이용될 수 있다.

### 1) 경쟁 RT-PCR의 원리

mRNA는 핵내에서 DNA로부터 전사된 pre-messenger RNA(pre-mRNA)가 핵 밖(세포질)으로 나오면서 intron 부분이 절제되고 exon과 exon이 연결되어 만들어 진다. 따라서, 핵내에는 intron을 포함하고 있는 pre-mRNA가, 세포질에는 exon만으로 연결된 messenger RNA(mRNA)

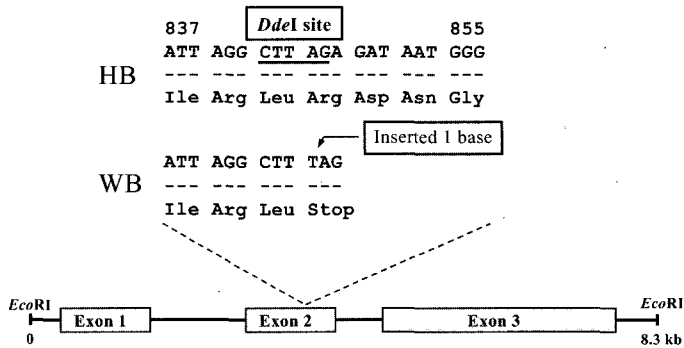


그림 3. 'Wedding Bells'의 F3'H 유전자의 게놈 구조.

HB; 'Heavenly Blue', WB; 'Wedding Bells'

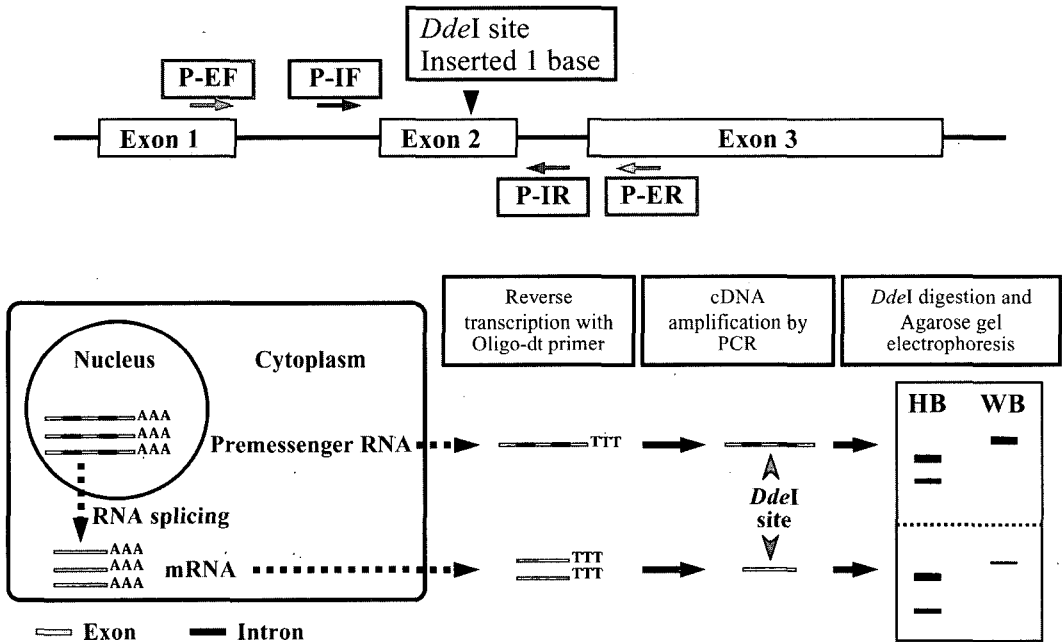


그림 4. 경쟁 RT-PCR의 원리.

가 존재하게 된다. 그러므로, HB와 WB의 꽃봉오리로부터 추출한 RNA에 대해 그림 4와 같이 삽입 변이가 발생한 부위가 증폭될 수 있도록 해서 intron에 위치하는 primers(P-IF/P-IR)를 사용하여 RT-PCR하면 pre-mRNA 유래의 RT-PCR 산물이, 그리고 exon에 위치하는 primers(P-EF/P-ER)를 사용하여 RT-PCR하면 mRNA 유래의 PCR 산물이 증폭될 것이다. 또한, 이렇게 해서 증폭된 PCR 산물에 대해 야생형인 HB의 F3'H 유전자에만 특이적으로 작용하는 DdeI을 처리하게 되면 HB 유래의 PCR 산물은 두개의 분자로 절단되지만, WB 유래의 PCR 산물은 절단되지 않고 남을 것이며, 이렇게 해서 검출된 HB 유래의 밴드와 WB 유래의 밴드를 정량함으로써 WB F3'H 유전자의 pre-mRNA와 mRNA의 양을 상대적으로 비교·분석할 수 있을 것이다(그림 4).

2) 장치 및 기구

항온수조, block incubator, PCR 기계, agarose gel 전기영동 장치, Image analyzer (예; FMBIOII Multi-View, HITACHI 사), 마이크로 피펫(20, 200, 1000 $\mu$ l), 1.2ml 마이크로 튜브

3) 시약 및 재료

- cDNA 합성 kit (예; SuperScriptII reverse transcriptase kit, Invitrogen사)
- RT-PCR primers :
  - P-IF ; 5'-TAATTGCTCAATTAAGCTT-3'
  - P-IR ; 5'-TGCGCGTGTGCATATGTATC-3'
  - P-EF ; 5'-TCTGACGCGCAGTCTAGCAA-3'
  - P-ER ; 5'-CCACCACTAAGTCAAGCTCT-3'
- 제한효소 (*Dde*I, Toyobo사)
- 1x TAE buffer : 0.04M Tris-acetate, 0.001M EDTA (pH 8.0)
- EtBr 염색액 (10 mg/ml의 EtBr st.을 1x TAE buffer 200 ml에 20  $\mu$ l 가해 만듦)

4) 실험 방법

- First-strand cDNA 합성
  - 앞서 guanidine isothiocyanate (GIT) 추출액과 초고속원심분리기를 사용하여 추출한 HB와 WB의 RNA를 0.5  $\mu$ g/ml 농도로 희석해 둠.
  - RT 반응액 (Invitrogen 사의 SuperScriptII kit를 사용한 경우)

처리구	총 RNA			Total vol.
	HB	WB		
1	2.5 $\mu$ g	2.5 $\mu$ g		10 $\mu$ l
2	1.25 $\mu$ g	"	+	"
3	0.5 $\mu$ g	"	DEPC-Treated	"
4	0.25 $\mu$ g	"	Water	"
5	0.05 $\mu$ g	"		"
6	0.025 $\mu$ g	"		"
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> (0.5 $\mu$ g/ $\mu$ l)				1 $\mu$ l
DEPC-Treated Water 1 $\mu$ l				1 $\mu$ l
Total vol. 12 $\mu$ l				12 $\mu$ l

( 이때 , 대조구는 HB 와 WB 의 RNA 를 각각 5  $\mu$ g(10 $\mu$ l) 반응시킨 것으로 함.)

- 70°C의 항온수조에서 10분 동안 처리한 후 얼음에 꽂아 둠.
- 계속해서 상기한 SuperScriptII kit의 내용물을 다음과 같이 첨가

10x PCR buffer	2 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	2 $\mu$ l



10 mM dNTP Mix	1 $\mu$ l
0.1M DTT	2 $\mu$ l

- 42°C의 'block' incubator에서 5분 동안 처리.
- SuperScriptII RT (200U)를 1  $\mu$ l 첨가 후 피펫으로 섞음.  
이렇게 하면 총 반응액이 20  $\mu$ l가 됨.
- 70°C의 항온수조에서 15분 동안 처리하여 RT 반응시킨 후 얼음에 꽂아 둠.

• PCR에 의한 single strand cDNA의 증폭

- 본 PCR에서 사용한 DNA polymerase는 Takara 사의 rTaq DNA polymerase를 사용함.
- PCR primers  
핵내의 pre-mRNA 증폭용 primers : P-IF/P-IR  
세포질내의 mRNA 증폭용 primers : P-EF/P-ER
- PCR 반응액 :

조 성		시료 당 첨가량 ( $\mu$ l)
별균초순수		36.5
dNTP		4
10x buffer		5
Primers (50 $\mu$ M)	Forward	1
	Reverse	1
rTaq DNA polymerase		0.5
Template cDNA		2
Total vol.		50

- PCR 조건 :

- ① Initial denaturation - 94°C, 3 min
- ② Denaturation step - 94°C, 30 sec
- ③ Annealing step - 60°C, 30 sec
- ④ Extension step - 72°C, 2 min (②에서 ④의 과정을 30회 반복)
- ⑤ 4°C에서 보관

- PCR 반응액 10  $\mu$ l를 2% agarose gel에서 전기영동하고 EtBr로 염색한 후 Image analyzer로 PCR 산물 확인

• 제한효소(DdeI; Toyobo사) 처리

멸균 초순수	PCR 산물	10x buffer	DdeI	Total vol.
7.5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	2 $\mu$ l	0.5	20 $\mu$ l

- 마이크로 피펫으로 천천히 섞은 후 37°C의 인큐베이터에서 2시간 동안 처리
- 제한효소 반응액 20  $\mu$ l를 2% agarose gel에서 전기영동하고 EtBr로 염색한 후 Image analyzer로 밴드 확인 및 정량

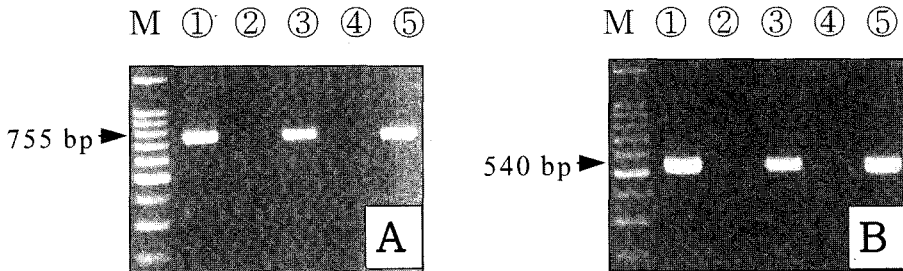


그림 5. Guanidine isothiocyanate (GIT) 추출액과 초고속원심분리기를 사용하여 추출한 RNA에 대해 DNA 오염 유무를 확인하기 위한 RT-PCR 결과. HB와 WB의 *F3'H* pre-mRNA(A; primer P-IF/P-IR)와 mRNA(B; primer P-EF/P-ER)에 대해 각각 선택적으로 증폭시킨 후 2% agarose gel 상에서 전기영동하여 EtBr로 염색함.

M; size marker(100 bp DNA ladder, Promega 사), Lane ①; HB의 총 RNA 5  $\mu$ g에 대해 RT(reverse transcriptase; 역전사효소)를 처리한 후 그 반응액의 1/10을 template로 하여 PCR한 결과, ②; ①의 대조구로서 RT를 처리하지 않고 PCR한 결과, ③; WB의 총 RNA 5  $\mu$ g에 대해 RT를 처리한 후 PCR한 결과, ④; ③의 대조구로서 RT를 처리하지 않고 PCR한 결과, ⑤; HB와 WB의 총 RNA를 각각 2.5  $\mu$ g씩 혼합하여 RT를 처리한 후 PCR한 결과.

### 3. 결과 해석

그림 5에서처럼 GIT 추출액과 초고속원심분리기를 사용하여 추출한 RNA에 대해 RT(reverse transcriptase, 역전사효소)를 처리한 후 PCR한 경우(lane ①, ③, ⑤)에는 예상했던 크기의 PCR 산물이 증폭되지만, RT를 처리하지 않았을 경우(②, ④)에는 어떠한 밴드도 증폭되지 않았음. 따라서, GIT 추출액과 초고속원심분리기를 사용하면 DNA 오염이 거의 없는 고 순도의 RNA를 추출할 수 있는 것으로 판단됨. 한편, 이와 같은 결과는 PCR cycle을 35회로 늘리더라도 동일하였음(결과는 생략함). 따라서, 상기와 같은 방법으로 추출한 RNA를 사용하여 pre-mRNA를 증폭할 경우에는 별도로 DNase를 처리하지 않더라도 무방할 것으로 판단됨.

HB와 WB의 총 RNA를 다양한 농도로 희석하여 *F3'H* 유전자의 pre-mRNA와 mRNA에 대해 경쟁 RT-PCR을 수행한 결과(그림 6), WB의 *F3'H* 전사산물은 pre-mRNA 상태에서도 HB

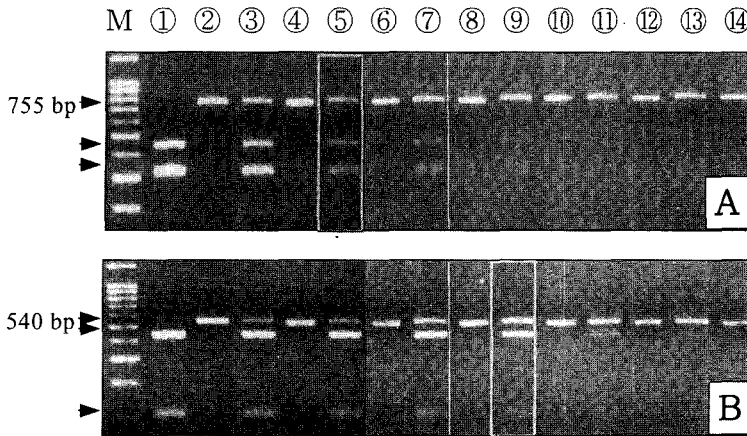


그림 6. 경쟁 RT-PCR법을 이용한 HB와 WB에 있어서 *F3'H* 유전자의 pre-mRNA(A; primer P-IF/P-IR)와 mRNA(B; primer P-EF/P-ER)에 대한 정량 분석 결과. 각 lane들은 cDNA를 template로 하여 PCR한 후 그 PCR 산물에 *DdeI*을 처리해서 2% agarose gel 상에서 전기영동한 결과임. M; size marker(100bp DNA ladder, Promega사), Lane ①; HB 총 RNA 5  $\mu$ g 처리구(대조구), ②; WB 총 RNA 5  $\mu$ g 처리구(대조구), ③, ④; HB와 WB 각각 2.5  $\mu$ g 처리구, ⑤, ⑥; WB 2.5  $\mu$ g + HB 1.25  $\mu$ g 처리구, ⑦, ⑧; WB 2.5  $\mu$ g + HB 0.5  $\mu$ g 처리구, ⑨, ⑩; WB 2.5  $\mu$ g + HB 0.25  $\mu$ g 처리구, ⑪, ⑫; WB 2.5  $\mu$ g + HB 0.05  $\mu$ g 처리구, ⑬, ⑭; WB 2.5  $\mu$ g + HB 0.025  $\mu$ g 처리구 Lane ③, ⑤, ⑦, ⑨, ⑪, ⑬은 PCR 산물에 *DdeI*을 처리한 구이며, lane ④, ⑥, ⑧, ⑩, ⑫, ⑭는 이들에 대한 대조구로서 PCR 산물에 *DdeI*을 처리하지 않은 구

에 비해 다소 감소하긴 하였으나, 특히 mRNA 상태에서 HB의 1/10 수준으로 급격히 감소하는 것이 확인됨. 이와 관련하여 Schell 등(2002)은 RNA에 있어서 가장 마지막의 exon-exon 연결 부위로부터 50 bp 이상의 상류에 변이로 인한 stop codon(nonsense codon)이 발생할 경우 RNA의 안정성에 영향을 미치며 그 결과 RNA가 쉽게 분해된다는 사실을 밝힌 바 있으며, 이러한 현상을 nonsense-mediated RNA decay(NMD)라 보고하였음. 따라서, 이러한 사실들로 미루어 볼 때, WB에 있어서 *F3'H* 유전자의 전사산물이 HB에 비해 현저히 감소한 이유는 WB의 경우 *F3'H* RNA의 가장 마지막 exon-exon 연결 부위로부터 85 bp 상류에 T 염기 하나가 부가적으로 삽입되고 이로 인해 바로 그 위치에서 TAG라는 stop codon이 형성됨에 따라 NMD가 일어난 것으로 판단되었음. 이상과 같이 본 실험에서 소개한 경쟁 RT-PCR법은 비교적 간단하게 RNA의 전사와 축적을 분석할 수 있는 하나의 방법으로서 이용할 수 있을 것으로 판단됨.

## 참고문헌

1. Brugliera, F., G. Barri-Rewell, T. A. Holton, and J. G. Mason. 1999. Isolation and characterization of a flavonoid 3'-hydroxylase cDNA clone corresponding to the *Ht1* locus of *Petunia hybrida*. *Plant J.* 19: 441-451.

2. Habu, Y., Y. Hisatomi, and S. Iida. 1998. Molecular characterization of the mutable *flaked* allele for flower variegation in the common morning glory. *Plant J.* 16 : 371-376.
3. Hoshino, A., Y. Morita, J. D. Choi, N. Saito, K. Toki, Y. Tanaka, and S. Iida. 2003. Spontaneous mutations of the flavonoid 3'-hydroxylase gene conferring reddish flowers in the three morning glory species. *Plant Cell Physiol.* 44 : 990-1001.
4. Lorkovic, Z. J., D. A. Wicczorek Kirk, M. H. L. Lambermon, and W. Filipowicz. 2000. Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends Plant Sci.* 5 : 160-167.
5. Mol, J., E. Grotewold, and R. Koes. 1998. How genes paint flowers and seeds. *Trends Plant Sci.* 3 : 212-217.
6. Schell, T., A. E. Kulozik, and M. W. Hentze. 2002. Integration of splicing, transport and translation to achieve mRNA quality control by the nonsense-mediated decay pathway. *Genome Biol.* 3 : 1001-1006.
7. Shirley, B. W. 2001. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.* 126 : 485-493.
8. Toki, K., N. Saito, S. Iida, A. Hoshino, A. Shigihara, and T. Honda. 2001. A novel acylated pelargonidin 3-sophoroside-5-glucoside from greyish-purple flowers of the Japanese morning glory. *Heterocycles* 55 : 2261-2267.

## *A Practice of Molecular and Genetic Analysis on Flower Color Mutant*

*Jeong-Doo Choi<sup>†</sup> and Kiu-Weon Kim\**

<sup>†</sup>Gyeongbuk Institute for Bio Industry, Andong 760-380, Korea

\*Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

+82-54-823-6901, floracjd@yumail.ac.kr; +82-53-810-2944, kwkim@yumail.ac.kr