

## 녹두 종자의 RNA 분리 방법

김경임 · 구자환<sup>†</sup>

작물과학원

### Isolation of High Quality RNA from Seeds of the Mungbean (*Vigna radiata*)

Kyeong-Im Kim and Ja-Hwan Ku<sup>†</sup>

National Institute of Crop Science, Suwon 441-857, Korea

**ABSTRACT** Mungbean (*Vigna radiata*) is a legume to East Asia that has great potential for development as traditional food and industrial crop. It produces both protein and starch rich grain. The low variability of the existing gene pool of the mungbean limits the use of conventional plant breeding to address this problem. For this purpose, an efficient means of RNA isolation from mungbean seed tissues was developed. The quality of RNA obtained by this method was sufficient for use in RT-PCR and RNA analysis.

**Keywords** : RNA, isolation, mungbean, seed

녹두는 우리나라를 비롯한 동아시아 지역에서 전통적인 음식 재료 및 단백질 공급원으로 이용되는 주요한 작물이다. 녹두는 재배 역사가 오래되었지만 녹두 속의 야생자원이 인도 및 동아시아에 폭넓게 존재하고 있으며, 이 야생자원 중에서 농업에 중요한 특성들이 재배종에 도입되기도 한다. 한가지 예로써 2001년에 작물과학원에서 육성된 장안 녹두는 바구미저항성을 지닌 야생녹두 자원의 총저항성유전자를 교배를 통하여 재배종에 전이시켜 육성한 품종이다. 이러한 농업적 중요 특성과 고품질을 갖는 품종을 개발하기 위하여는 유전자 분석을 위해 RNA를 순도 높게 분리하는 것이 분자유종연구에서 중요하다 할 것이다. 그런데 녹두에는 페놀류 2차 대사산물과 탄수화물류 다당체가 다량으로 함유되어 있어 hot phenol(Verwoerd 1989), Trizol 등 (Surzycki 2000)을 이용한 RNA 분리와 상용화 된 RNA 분리 키트를 이용하여 녹두 종자의 RNA를 분리하였지만 RNA 분석에 이용할 만한 순도의 RNA를 얻지 못하였고,

Tris 버퍼와 LiCl 버퍼를 이용한 RNA 분리(Hosein 2001)는 많은 단계와 시간이 소모되는 일이었다. 이에 본 실험에서는 녹두 종자에서 간편하고 신속하게 고순도의 RNA를 분리하는 방법을 확립하였기에 보고하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 식물체 재료

개화 후 13일에서 17일 사이의 성숙색을 띠기 시작한 꼬투리를 채취 후 바로 종실을 분리하여 Tris-buffer에 침적시켜 마쇄하거나 액체질소에 급속 동결 후 -65°C 이하로 유지되는 초저온 냉동고에 보관 후 필요시 이용하였다.

#### RNA 분리 추출

Tris-HCl 용액을 제외한 용액은 diethylpyrocarbonate (DEPC) 0.1% 첨가하여 잘 혼합 후 autoclave한 후 사용하였다.

RNA 분리 추출에 사용된 시약은 0.1 M Tris-HCl(pH 9.0), denaturing solution : 4 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate(pH 7.0), 0.5% sarcosyl, 0.1 M 2-mercaptoethanol, chloroform [혹은 chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1)], DEPC 처리 증류수였으며 그 절차를 요약하면 다음과 같다.

1. 유발을 얼음 위에 놓고 4°C로 냉각된 0.1 M Tris-HCl(pH 8.5~9.0)를 샘플 무게의 40배 이상 첨가 후 유발로 잘 마쇄한다.
2. 8000 g 이상, 4°C, 15분간 원심분리 후 상등액을 새 튜브에 옮긴다.
3. 상등액의 1/2 부피의 chloroform을 넣어주고 뒤집어 섞기를 5분간 해준다.
4. 8000 g, 4°C, 15분간 원심분리 후 상등액을 새 튜브에

<sup>†</sup>Corresponding author: (Phone) +82-31-290-6765  
(E-mail) kooch@rda.go.kr

옮긴다.

5. 위 3번과 4번 과정을 한 번 더해준다.
6. 상등액과 같은 부피의 denaturing 용액을 넣어주고 뒤집어 섞기를 5분간 해준다.
7. 위 3번과 4번 과정을 2회 반복한다.
8. 상등액과 동량의 isopropanol을 넣고 혼합 한 후 얼음에 10분간 정치시킨다.
9. 8000 g 이상, 4°C, 15분간 원심분리하여 RNA를 침전시킨다.
10. 상등액을 버리고 75% EtoH 10 ml 첨가하여 부드럽게 흔들어 침전물을 씻어준 후 8000 g 이상, 4°C, 15분간 원심분리하여 침전시킨다.
11. 위의 10번 세척 과정을 한 번 더 해주고 침전물이 팔러나가지 않도록 상등액을 버린다.
12. Speed Vaccum으로 5분 정도 건조시킨다. (침전물이 완전히 말라붙지 않도록 한다. 물방울이 보이지 않을 정도로 건조시키면 충분하다.)
13. 샘플 1 g당 DEPC 처리된 증류수 300  $\mu$ l를 첨가하여 RNA를 녹인다.

**RNA 분석**

분리된 RNA를 spectrophotometer와 agarose gel 전기영동으로 RNA 양과 품질 상태를 측정 한 후 잔존하는 DNA 제거 혹은 mRNA만 선별하기 위한 정제 과정을 진행하거나 RT-PCR 분석 등에 이용하였다.

Spectrophotometer를 이용한 RNA 농도 계산  
 농도(ng/ $\mu$ l) = 40 × A<sub>260</sub> × 희석계수

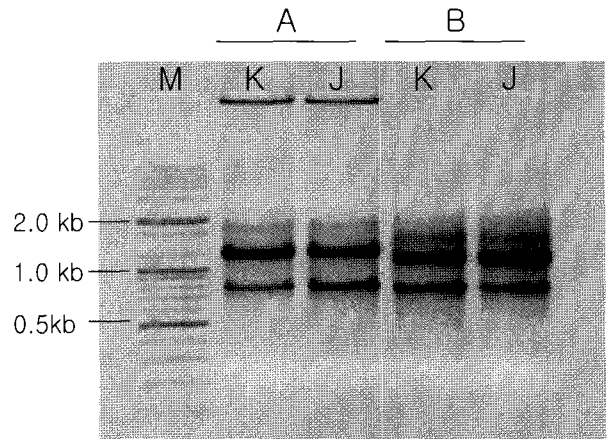
**결과 및 고찰**

바구미와 노린재에 저항성을 지닌 장안녹두와 감수성인 금성녹두의 개화 후 14일 경과한 성숙기의 종자를 채취하여 0.1M Tris-HCl buffer와 guanidium thiocyanate 단백질 변성 용액을 이용하여 RNA를 추출한 결과는 그림 1과 같다.

그림 1의 A는 장안녹두와 금성녹두의 성숙기 종실에서 추출한 total RNA로써 단백질과 오염물질 등이 남아있는 흔적이 나타남을 알 수 있었다. 0.5 g의 샘플에서 추출된 RNA의 양은 Spectrophotometer(Nanodrop 2.0)를 이용하여 측정 한 결과 금성은 369  $\mu$ g/300  $\mu$ l, 장안은 445  $\mu$ g/300  $\mu$ l였으며 RNA의 순도 지표인 260 nm/230 nm의 값은 금성은 1.36, 장안은 1.43으로 나타나 순도는 비교적 떨어지는 것으로 나타났으나 RNA 분석시 최소로 요구되는 순도 값 1.3

이상은 유지되었다. 본 시험에서 분리한 total RNA를 이용하여 유전자 분석 결과를 재현성 있게 얻을 수 있었다. 그림 1의 B는 total RNA에 남아있는 소량의 DNA와 오염물질을 제거하기 위하여 total RNA를 140  $\mu$ l씩 털어내어 멤브레인 컬럼 방식의 RNA 분리 키트(QUIAGEN Co.)와 DNase I을 이용하여 정제한 것이다. 그림에 보여지는 바와 같이 오염물질과 DNA가 제거되어 RNA의 순도가 높아졌음을 알 수 있었다. 정제 후의 RNA 양은 금성녹두는 26.3  $\mu$ g/40  $\mu$ l, 장안녹두는 29.6  $\mu$ g/40  $\mu$ l였으며 260 nm/230 nm 값은 금성녹두 2.06, 장안녹두 2.08로 나타나 순도가 높아졌음을 알 수 있었다. 상용 멤브레인 컬럼 RNA 추출 키트를 이용하여 식물체 앞에서 직접 RNA를 분리해 낼 경우 일반적으로 RNA의 260 nm/230 nm 값이 1.7 내외 정도가 된다. 이로 비추어 고순도의 RNA가 요구되는 RNA 분석 시험의 경우 많은 단계와 시간이 소요되는 LiCl 버퍼를 이용한 RNA 분리 방법 대신에 우리의 RNA 추출 방법으로 RNA를 분리한 후 멤브레인 컬럼 방식의 RNA 분리 키트를 이용하여 고순도 RNA를 분리하는 것이 손쉽고 시간을 대폭 단축하는 방법이 될 수 있을 것이다.

위에 기술된 RNA 분리 방법을 적용하면 단백질 혹은 탄수화물이 많은 다른 작물의 종실에서도 간편하고 쉽게 고순도의 RNA를 분리할 수 있을 것으로 생각한다.



**Fig. 1.** RNA isolation from mungbean seeds at maturity stage. The RNA samples were analyzed on 1% agarose gel stained with ethidium bromide. (For clarity, the grey-scale of the gel was inverted). (A) Total RNA prepared by our modification of the procedure of Hosein (2001) and Surzycki (2000). (B) Purified total RNA by the RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) and DNase I for eliminating contaminants and DNA. (M) : 100 bp plus ladder (Bioneer Co.), J : Jangannokdu, K : Keumseongnokdu.

## 적 요

다량의 페놀류 2차 대사산물과 다당류가 포함된 녹두 종자의 RNA를 Tris-buffer와 guanidium thiocyanate 용액을 이용하여 손쉽게 간편하게 고순도의 RNA를 분리하는 방법을 확립하였으며, 우리의 분리 방법을 이용하여 추출한 RNA를 사용하여 RT-PCR과 유전자 클로닝 등의 분석시험에 이용할 수 있었다.

## 사 사

본 방법을 확립하는데 조언을 하여 주신 농업생명공학연구원 김영태 박사님께 감사를 드립니다.

## 인용문헌

- Hosein F. 2001. Isolation of high quality RNA from Seeds and Tubers of the Mexican Yam Bean (*Pachyrhizus erosus*). *Plant Molecular Biology Reporter*. 19 : 65a-65e.
- Surzycki S. 2000. Basic techniques in molecular biology. *Springer Lab Manual* p 119-143.
- Verwoerd, T.C., B. M. M. Dekker, and A. Hockema. 1989. A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* 17 : 2362-2362.