

고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)의 엽록체 DNA 분리 및 특성조사

이정헌 · 임용표*† · 최광태

한국인삼연초연구소 유전생리부

†충남대학교 농과대학 원예학과

(1993년 3월 22일 접수)

Isolation and Characterization of Chloroplast DNA in Korean Ginseng, *Panax ginseng* C.A. Meyer

Jeong Heon Lee, Yong Pyo Lim*† and Kwang-Tae Choi

Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Science Town, Taejon 305-345, Korea

*Department of Horticulture, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

(Received March 22, 1993)

Abstract □ In Korean ginseng, *Panax ginseng* C.A. Meyer, it was difficult to isolate chloroplast DNA with classical methods, because of the high polysaccharide content of ginseng chloroplast. The simple and efficient method of chloroplast DNA isolation from ginseng leaves has been developed by modification of recently advanced methods. Also, it can be successfully applied to ctDNA isolation of Chinese cabbage, radish, petunia, tobacco as well as ginseng. Isolated chloroplast DNA from ginseng was digested with various restriction endonucleases. It was estimated that the molecular weight of Korean ginseng chloroplast DNA was about 142 kb. There was no difference in restriction endonuclease digestion patterns between two variants of Korean ginseng, which are Jakyung-Jong (violet-stem variant) and Hwangsook-Jong (yellow-berry variant).

Key words □ *Panax ginseng*, chloroplast DNA.

서 론

인삼은 고대로부터 동양에서 매우 중요한 약재로 이용되어 경제적으로 매우 유용한 자원이나 생장이 대단히 늦으며 직사광선에 노출되면 엽소현상 등 생리적 피해를 입게 된다. 이러한 특성 때문에 인삼경작시 빛을 차단하는 시설을 설치해야 하는 등 부가적인 노력과 생산비가 필요한 문제점이 있다. 따라서 인삼의 광합성 기작의 특성을 검토하고 이해하며, 유전 형질상의 문제점을 밝히려는 노력이 매우 중요하며 이러한 연구가 생리학적 측면에서 많이 수행된바

있다.^{1,2)} 또한 엽록체는 세포가 광합성을 일으키는 중심 기관이므로 광합성과 관련하여 매우 많은 연구가 이루어졌다.³⁾

엽록체가 핵과는 별도의 DNA를 갖는다는 것이 발견⁴⁾된 이래 그 구조⁵⁾와 염기서열에 대하여 pea,^{6,7)} 연초,⁸⁾ *Euglena*,⁹⁾ *Chlamydomonas* 등¹⁰⁾에서 잘 알려져 있고 여러 가지 분자생물학적 특성이 알려졌다. 엽록체 DNA는 double strand, circular 구조를 가지고 있으며 그 크기는 관속식물에서 120 kb에서 160 kb 범위로 알려지고 있다. 특히 liverworth(*Marchantia polymorpha*),¹¹⁾ tobacco¹²⁾에서 엽록체 DNA의 전체 염기서열이 밝혀지는 등 괄목할 업적이 이루어지고

*To whom correspondence should be addressed.

있다.

이와 같이 엽록체 DNA에 대한 분자생물학적 접근이 수없이 이루어지고 있고 이로부터 광합성 관련 인자의 cloning 및 광합성 기작에 관한 분자생물학적 연구가 또한 많이 이루어지고 있음에도 불구하고 인삼의 경우에는 시료 확보 및 실험기술상의 어려움으로 인해 이러한 연구가 거의 전무한 실정이다.

따라서 본 연구는 인삼에서 엽록체 DNA 분리방법을 확립하고, 인삼 엽록체 DNA의 특성을 밝혀, 광합성기작 연구의 기초자료로 이용하기 위하여 수행되었다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용된 재료는 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer) 자경종이며 포장에서 잎을 수확하여 15 g씩 나누어 -70°C 에서 보관하였던 것을 사용하였다. Pancreatic DNase I, proteinase K 등은 Sigma Co.에서, 제한효소, electrophoresis grade agarose 등은 Bethesda Research Laboratories, International Biotech. Inc., Boeringer Mannheim 등으로부터 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 시약들은 모두 molecular biological grade 혹은 그 이상의 것을 사용하였다.

2. 엽록체의 분리 및 정제

인삼의 엽록체 DNA 분리를 위하여 mitochondria 정제방법으로 이용되고 있는 Lim과 Choi의 방법¹³⁾을 변형하여 Fig. 1과 같은 표준방법으로 엽록체를 정제하였다. 인삼 잎 15 g을 liquid nitrogen으로 얼린 상태에서 막자사발을 이용하여 신속하게 마쇄하였다. 고운가루로 마쇄된 시료에 Buffer I(0.1 M Tris pH 7.2, 1.4 M NaCl, 1 mM EGTA, 0.2% BSA, 0.05% Cysteine) 10 ml를 가하고 약 3분 동안 더 마쇄한 후 2장의 cheese cloth와 1장의 Miracloth™(Calbiochem)로 여과하였다. 남은 시료를 다시 10 ml의 Buffer I에 현탁한 후 여과하는 작업을 3회 반복한 후 얻은 여과액을 Sorval GSA rotor에서 500 rpm으로 10분 동안 원심분리하고, 상층액을 다시 4,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하였다. 침전물 중 녹색의 부분만을 부드러운 붓으로 조심스럽게 10 ml의 Buffer I에 현탁시켜 Sorval SS34 rotor에서 500 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 4,000 rpm에서 다시 원심분

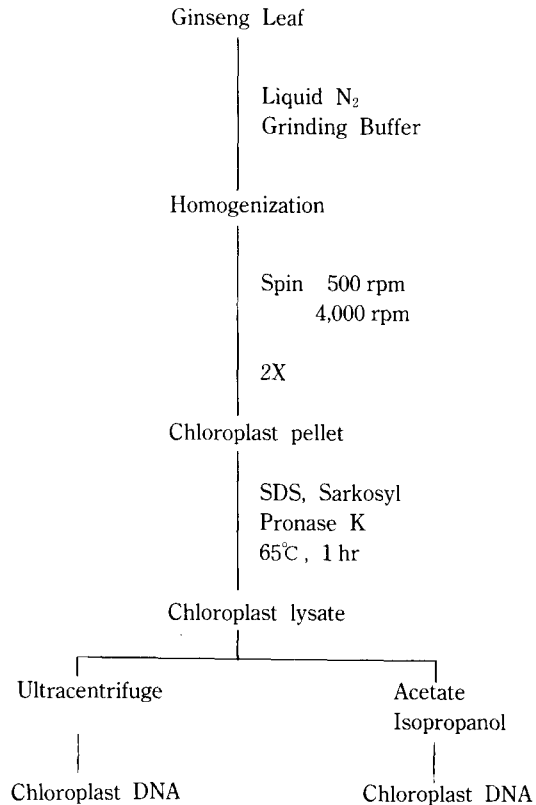


Fig. 1. Diagramatic new developed procedure shows the protocol for isolation of chloroplast DNA from Korean ginseng.

리하여 침전물을 얻었다. 침전물에서 우유빛의 부분이 사라질 때까지 이와 같은 일을 반복하였다. 이 침전물은 정제된 엽록체의 침전이며 이를 다시 2 ml의 Buffer II(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA)에 현탁시켰다.

3. 인삼 엽록체 DNA의 분리

엽록체로부터 DNA를 분리하는 방법은 Wilson과 Courey의 방법¹⁴⁾을 변형하여 사용하였다. 엽록체의 Buffer II 현탁액에 proteinase K를 1 mg/ml되게 가하고 상온에서 5분 동안 방치한 후 250 μl 의 Buffer III(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 10% SDS)와 150 μl 의 20% sarcosine을 가하고 65°C shaking water bath에서 incubation하였다. 1시간 후 2.4 ml의 Buffer IV(0.15 M Tris-HCl, pH 8.0, 80 mM EDTA, 0.1 M NaCl, 1.5% SDS)를 가하고 20분간 더 두었다. 1.6 ml의 5 M potassium acetate를 가한 후

가끔 inverting해 주면서 얼음에서 20분간 방치하였다. SS34 rotor에서 5분간 10,000 rpm으로 원심분리한 후 상층액을 Miracloth로 여과하여 여과액에 320 μ l의 5 M ammonium acetate를 가하였다. 3.2 ml의 chloroform-octanol(1:1)을 가하여 5분간 추출한 후 SS34 rotor에서 10,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 상층액에 동일 부피의 isopropyl alcohol을 가하고 상온에서 10분간 방치하였다가 SS34 rotor에서 10분간 15,000 rpm으로 원심분리하여 엽록체 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 70% ethanol로 wash하고 Speed VacTM(Savant)에서 건조시켰다.

4. 인삼 엽록체 DNA 분자량의 결정

인삼의 엽록체 DNA의 크기를 결정하기 위해 엽록체 DNA를 Boeringer Mannheim에서 구입한 제한효소 *SalI*, *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *ClaI* 등으로 각각 처리하여 37°C 에서 1시간 30분간 incubation하였으며, 각각을 0.8% agarose gel에서 전기영동하였다. 이 때 전기영동 buffer는 TBE(89 mM Tris borate, 2 mM EDTA, pH 8.,3)를 사용하였으며, 절단된 절편의 크기는 λ DNA를 제한효소 *PstI*과 *HindIII*로 절단하여 혼합하여 만든 marker를 사용하여 비교하였다.

결과 및 고찰

1. 엽록체의 분리 및 정제

식물의 엽록체 DNA를 분리하는 것은 일반적으로 어렵고 많은 시간과 노력이 필요하다. 식물의 엽록체 DNA를 분리하기 위하여는 엽록체 내에 존재하는 광합성산물인 전분 등 polysaccharide의 제거를 위하여 일반적으로 분리 2일전에 암처리를 실시하는 것이 관행이나 인삼의 경우 포장에서 직접 수확해야 하는

문제점을 안고 있어 전분 등의 제거가 가장 큰 문제였으며, 타 식물에 비해 잎 및 엽록체내에 2차대사산물과 phenolic compounds, 전분 등이 상대적으로 많아서 이들을 제거하지 않을 경우 제한효소 절단 등에 영향을 주게 되므로 이들을 제거하는 것이 매우 중요하였다. 따라서 인삼의 엽록체 DNA는 일반적으로 시금치, 옥수수 등에서 사용되어 온 Kolodner과 Tewari의 전형적인 방법¹⁵⁾인 mannitol buffer 방법을 사용하였을 때 전분의 양이 대단히 많고 제거가 어려우며 색소가 쉽게 제거되지 않으므로 기존의 엽록체분리 방법^{14,16)}을 사용했을 경우 DNA의 분리 수율이 대단히 낮고 제한효소 절단이 효과적으로 일어나지 않았다(자료 생략). 따라서 polysaccharide 등이 효과적으로 제거될 수 있다고 사료되는 NaCl buffer를 이용하였으며, chloroform과 octanol로 5분간 추출하는 방법은 polysaccharide 및 phenolic compounds 등을 충분히 제거하여 DNA 추출 및 제한효소 절단에 매우 효과적이었으며, 기존의 방법에서 핵 DNA의 제거를 위해 사용하였던 DNase I의 처리는 처리하지 않은 결과와 비교할 때 거의 차이를 보이지 않았으므로 본 실험에서는 생략하였다. 특히 chloroplast membrane을 SDS로 제거시키는 과정에서 sarkosyl을 첨가하였을 때 더욱 효과적이었으며, 65°C 에서 1시간 동안 pronase K의 사용이 proteinase보다 효과적이었으며, phenol extraction 보다는 acetate buffer를 이용한 SDS-acetate-protein 복합체를 만들어 protein 등 이물질 제거 하였을 때 DNA분리가 더욱 효과적이었다(Table 1).

또한 본 연구에서 개발 사용한 방법은 기존의 분리방법에 비해 비교적 간단하며 실험시간을 기존의 방법보다 약 2.5시간 단축시켜 6시간 정도에 마칠 수

Table 1. Differences between normal and new developed procedure of chloroplast DNA isolation in Korean ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer)

Procedure	Normal method	Developed method
Grinding buffer	Mannitol	NaCl
Centrifuge speed	500, 3,000 rpm	500, 4,000 rpm
DNase treatment	Required	Non-required
Lysis of ct membrane	SDS	SDS and sarkosyl
Elimination of DNA binding protein	Pronase or Pronase K	Pronase K
Pronase reaction temp.	37°C	65°C
Protein elimination	Phenol extraction	Acetate treatment
DNA precipitation	Ethanol, Isopropanol	Isopropanol

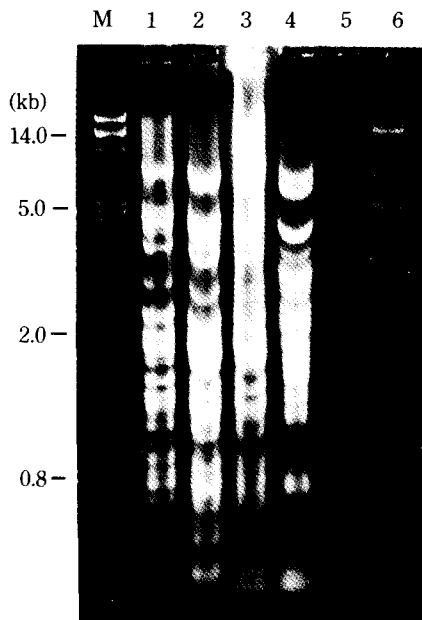


Fig. 2. Agarose gel electrophoretic patterns of radish MS line (Lane 1), Chinese cabbage CMS line, Okura background (Lane 2), radish MS line, Okura background (Lane 3), petunia (Lane 4), tobacco (Lane 5), and Korean ginseng (Lane 6) chloroplast DNA digested with *EcoRI*. Lane M; Lambda DNA digested with *HindIII* and *PstI*.

있으므로 시간 및 노력을 절약할 수 있음이 밝혀졌다.

2. 식물체의 엽록체 DNA 분리 및 제한효소 pattern

개발된 엽록체 DNA 분리방법의 원용성을 조사하기 위하여 인삼외의 식물로서 배추, 무, petunia, 연초 등의 엽록체 DNA를 분리하여 제한효소 *EcoRI*으로 처리한 후 restriction pattern을 조사하였던 바 그 결과는 Fig. 2와 같다.

개발된 엽록체 DNA 분리방법은 배추, 무, 페추니아, 담배, 인삼 모두에서 성공적으로 DNA가 분리되었으며, 제한효소 *EcoRI*에 의한 절단에도 성공적으로 반응하여 본 방법은 무, 배추, petunia, 연초 등 다른 식물에서도 유용하게 사용될 수 있는 유용한 방법임이 확인되었다.

3. 인삼 엽록체 DNA의 분석 및 분자량 측정

인삼의 엽록체 DNA를 *SalI*, *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *ClaI* 등 5가지 제한효소로 처리하여 Fig. 3와 같은 전기영동 결과를 얻었다. *SalI*의 경우 약 8개의

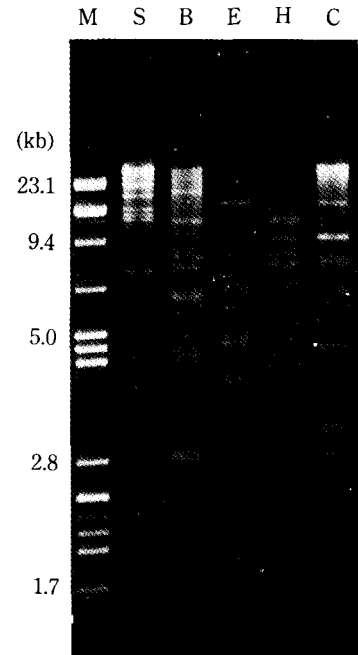


Fig. 3. Agarose gel electrophoretic patterns of Korean ginseng chloroplast DNA digested with *SalI* (Lane S), *BamHI* (Lane B), *EcoRI* (Lane E), *HindIII* (Lane H), and *ClaI* (Lane C). Lane M; Lambda DNA digested with *HindIII* and *PstI*.

band가 약 23 kb에서 1.6 kb까지, *BamHI*은 약 21 kb에서 1.5 kb까지, *EcoRI*은 약 18 kb에서 1.6 kb 정도까지, *HindIII*는 약 14.5 kb에서 1.45 kb까지, *ClaI*은 약 30 kb로부터 0.77 kb까지 다양하게 분포하였다. 인삼의 엽록체 DNA의 분자량을 측정하기 위하여 제한효소 처리하여 얻은 전기영동 결과를 분석하였으며(Table 2), 자경종인삼의 엽록체 DNA를 *BamHI*, *HindIII*, *ClaI*으로 처리하여 조사한 결과 각각 21개, 23개, 32개의 band를 확인하였으며 분자량을 측정할 결과 최소 142 kb 정도로 나타났다. 또한 전기영동 상에서도 명확하게 중복 염기서열의 존재를 확인할 수 있었다.

고등식물의 엽록체 DNA의 크기는 종에 따라서 큰 변이를 보이지 않아 약 120 kb에서 160 kb에 분포한다. 특히 전 염기서열이 밝혀진 liverwort는 121,024 bp,¹¹⁾ 연초는 155,844 bp¹²⁾로 구성되어 있으며, 약 140여개의 유전자를 함유하고 있다. 본 연구에서는 제한효소 처리에 의한 band 분석에 의해 인삼의 엽록체

Table 2. Estimation of ctDNA molecular weight of Korean ginseng variant Jakyung-Jong

Band No.	Mol. Wt.			Band No.	Mol. Wt.		
	<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	<i>Cla</i> I		<i>Bam</i> HI	<i>Hind</i> III	<i>Cla</i> I
1	21.0	14.5	30.2	17	2.4	2.8	1.89
2	21.0	13.2	14.01	18	2.2	2.7	1.83
3	12.5	13.2	9.8	19	1.7	1.95	1.78
4	12.5	12.6	9.8	20	1.6	1.8	1.72
5	8.6	12.6	8.4	21	1.5	1.6	1.72
6	7.8	10.5	8.0	22		1.6	1.67
7	6.3	10.5	7.52	23		1.45	1.57
8	6.2	9.0	6.3	24			1.44
9	5.2	8.5	5.9	25			1.44
10	4.7	6.8	4.8	26			1.40
11	4.4	6.2	3.2	27			1.29
12	3.8	4.5	2.8	28			1.25
13	3.2	4.6	2.66	29			1.04
14	3.05	4.2	2.52	30			0.99
15	2.8	3.25	2.02	31			0.79
16	2.6	2.8	2.02	32			0.77
				Sum	142.85	142.45	142.54

DNA 크기가 liverworth의 121,0⁴ bp 보다는 크고 tobacco의 155,844 b 보다는 작은 최소 142 kb로 분석되었으나(Table 2), 엽록체 DNA의 일반적인 구조상 repetitive sequence가 존재하고 있어 전자현미경 연구, DNA renaturation kinetics 연구, gene mapping 등을 수행해 봐야 정확한 크기를 알 수 있으리라 사료된다.

제한효소 처리가 종종 불완전한 절단효과를 보이는 경우가 있어 16시간 이상의 반응시간에 효소농도를 증가시켜 보았으나 위의 결과와 큰 차이가 없이 band가 일치하여 이 band들이 모두 제한효소에 의해 완전히 절단되어 나타난 결과로 사료되었다.

4. 인삼 엽록체 DNA의 변종별 분리 pattern

인삼은 재배기간이 길며 개화기까지 적어도 2~3년 이상의 장기간이 걸림으로 인해 유전 및 육종연구는 그간 순계분리, 육종 등을 통하여 이루어져 왔으나, 형태학적 단순성과 장기간의 연구가 요구됨으로써 열매와 줄기의 색소변화에 따른 4가지 변종으로만 분류되어 왔으며 아직까지 품종으로 확립되지 않고 있는 실정이다.

식물의 종 및 품종의 분류 및 동정을 위하여는 그간 많은 연구가 수행되어 왔으며 형태학적,¹⁷⁾ 세포학적,¹⁸⁾



Fig. 4. Agarose gel electrophoretic patterns of *Bam*HI digested ctDNA of Korean ginseng variants, Jakyung-Jong (Lane 1), and Hwangsook-Jong (Lane 2).

해부학적,¹⁹⁾ 생화학적,²⁰⁾ 생리생태학적²¹⁾ 방법 등 여러 가지 방법으로 비교분류되고 있으며, 최근에는 단백질 분리를 비롯한 화학적 분류방법이 발전되고 있고 특히 분자생물학의 발달로 DNA 수준에서의 분류연구가 활발하게 이루어지고 있다.^{22,23)}

본 연구에서는 인삼의 변종인 자경종, 황숙종의 염록체 DNA내 구조를 분석하여 그 차이를 검토하여 보았는바 그 결과는 Fig. 4와 같았다. 제한효소 *Bam*HI를 처리하여 인삼 변종들의 염록체 DNA band pattern을 비교하여 본 결과 그 차이는 인정되지 않았다.

요 약

본 연구에서는 기존의 방법으로는 분리 추출이 어려운 인삼 잎의 염록체 DNA를 분리하기 위하여 mannitol 대신 NaCl이 포함된 buffer를 사용하는 새로운 방법을 시도하였으며 효과적으로 분리할 수 있었다. 이 방법은 배추, 무, petunia, tobacco 등 다른 식물들에서도 성공적으로 염록체 DNA를 분리할 수 있었으며 제한효소 반응에 매우 효과적이었다. 또한 기존의 방법에 비해 실험시간도 상당히 단축할 수 있었다.

분리된 인삼의 염록체 DNA를 *Sall*, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Cla*I 등 5가지 제한효소로 처리하였으며, 이 중 *Bam*HI, *Hind*III, *Cla*I으로 처리되어 나타난 전기영동 결과를 분석한 결과 인삼의 염록체 DNA의 분자량은 약 142 kb임이 밝혀졌으며, 인삼 염록체 DNA도 타식물들과 같이 반복 염기서열을 가지고 있었다. 자경종 및 황숙종의 염록체 DNA 제한효소 패턴 비교시 차이가 없었다.

인용문헌

1. Lee, C.H.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **12**, 11 (1988).
2. Park, H.: *Proc. 3rd Intl. Ginseng. Sym.*, pp. 151 (1980).
3. Kim, K.S., Son, J.H. and Choi, K.T.: *Korean J. Bot.*, **33**(2), 111 (1990).
4. Palmer, J.D.: *Annu. Rev. Genet.*, **19**, 325 (1985).
5. Hsu, C.L. and Mullin, B.C.: *Plant Cell Reports*, **7**, 356 (1988).
6. Bergmann, P., Schneider, M., Burkard, G., Weil, J. and Rochaix, J.D.: *Plant Sci.*, **39**, 133 (1985).
7. Cozens, A.L. and Walker, J.E.: *Biochem. J.*, **236**, 453 (1986).
8. Sugiura, M.: *Bot. Mag.*, **100**, 407 (1987).
9. Gray, P.W. and Hallick, R.B.: *Biochemistry* **17**, 284 (1978).
10. Dron, M., Rahire, M. and Rochaix, J.D.: *J. Mol. Biol.*, **162**, 775 (1982).
11. Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T.S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H. and Ozeki, H.: *Nature*(London) **322**, 572 (1986).
12. Shinozaki, K., Ohme, M., Tanake, M., Wakasugi, T., Hayashida, N., Matsubauashi, T., Zaita, N., Chun-wonse, J., Obokata, J., Yamaguchi-Shinozaki, K., Ohto, C., Torazawa, K., Meng, B.Y., Sugita, M., Deno, H., Kamogashira, T., Yamada, K., Kusuda, J., Takaiwa, F., Kato, A., Tohdoh, N., Shimada, H. and Sugiura, M.: *EMBO J.*, **5**, 2043 (1986).
13. Lim, Y.P. and Choi, K-T.: *Korean J. Ginseng Sci.*, **14**(2), 310 (1990).
14. Wilson, A.J. and Chourey, P.S.: *Plant Cell Rep.*, **3**, 237 (1984).
15. Kolodner, R. and Tewari, K.K.: *J. Biol. Chem.*, **247** (19), 6355 (1973).
16. Sager, R. and Ishida, M.R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **50**, 725 (1963).
17. Eames, A.: *Morphology of the Angiosperms*. McGraw-Hill, New York (1961).
18. Stebbins, G.L.: *Chromosomal Evolution in Higher Plants*. Addison-Wesley, Reading, Mass (1971).
19. Radford, A.W., Dickison, W.C., Massey, J.R. and Bell, C.R.: *Vascular Plant Systematics*, Harper and Row, New York (1974).
20. Gibbs, R.D.: *Chemotaxonomy of Flowering Plants*. 4 vols. McGill-Queens University Press, Montreal (1974).
21. Kruckeberg, A.R.: *Taxon*, **18**, 92 (1969).
22. Hamrick, J.L. and Allard, R.W.: *Evolaution*, **29**, 438 (1975).
23. Mabry, T.J.: *Plant Syst. Evol.*, **126**, 79 (1976).