

## Polyphenol 고함유 식물의 간편 PCR 분석

유남희<sup>1,3)</sup> · 백소현<sup>1)</sup> · 윤성중<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>전북대학교 농업과학기술연구소, <sup>2)</sup>전북대학교 생물자원과학부, <sup>3)</sup>(주) 그린바이오텍 생명공학연구소

### A Simple and Reliable Method for PCR-Based Analyses in Plant Species Containing High Amounts of Polyphenols

Nam Hee Yoo<sup>1,3)</sup>, So Hyeon Baek<sup>1)</sup> and Song Joong Yun<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>Institute of Agricultural Science and Technology, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

<sup>2)</sup>Faculty of Biological Resources Sciences, Chonbuk National University, Chonju 561-756, Korea

<sup>3)</sup>Institute of Biotechnology, Greenbiotech Co., Ltd., Paju 413-830, Korea

#### ABSTRACT

Polymerase chain reaction (PCR) is used in a wide array of researches in plant molecular genetics and breeding. However, considerable time and cost are still required for the preparation of DNA suitable for reliable PCR results, especially in plant species containing high amounts of polyphenols. To reduce time and effort for PCR-based analysis, a simplified but reliable method was developed by a combinational employment of a simple and fast DNA extraction procedure and BLOTTO (Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer) in reaction mixture. Genomic DNAs prepared by one-step extraction method from recalcitrant plant species such as *Rubus coreanus*, apple, grape and lettuce were successfully amplified by random primers in the reaction mixture containing 2 to 4% BLOTTO. Successful amplification of  $\gamma$ -TMT transgene in lettuce transformants by the specific primers was also achieved in the same condition, making rapid screening of positive transformants possible. Our results suggest that use of a simple DNA extraction procedure and incorporation of BLOTTO in reaction mixture in combination can reduce time and effort required for the analyses of a large number of germplasm and transformants by PCR-based techniques.

**Key words :** *Rubus coreanus*, apple, grape, lettuce, BLOTTO,  $\gamma$ -TMT

#### 서 언

1980년대 후반에 개발된 PCR 기술은 고고학, 고생물학, 의료계의 임상진단 뿐만 아니라 작물 유전,

육종 분야에서도 유연관계 분석, 마커를 이용한 유전자 지도작성, 유용 유전자 분리 및 형질전환 식물체의 외래 유전자 확인 등에 이용되고 있는 중요한 기술이다.

PCR 분석시 사용하는 DNA의 순도는 분석결과

---

Corresponding author: 윤성중, (우) 561-756 전북 전주시 덕진동 1가 664-14 전북대학교 농과대학 생물자원과학부 Tel: 063-270-2508, Fax: 063-270-2640, E-mail: sjyun@moak.chonbuk.ac.kr

정확성과 재현성을 좌우하는 중요한 요인으로 작용한다. DNA 중에 오염되어 있는 폴리페놀 화합물은 DNA의 분해를 초래하며 (John 1992), PCR 반응액 중의  $Mg^{2+}$ 과 반응하여 polymerase의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다 (De Boer et al. 1995). 따라서 polyphenol 화합물 함량이 높은 식물체로부터 고순도 DNA를 추출하기 위한 방법이 개발되고 있다. Kim et al. (1997)은 추출액에 PVP (polyvinylpyrrolidone)를 첨가하여 포도, 사과, 배 그리고 감과 같은 과수 잎으로부터 추출한 genomic DNA를 이용하여 RAPD (random amplified polymorphic DNA) 분석을 실시한 바 있다. 그러나 polyphenol 화합물 함량이 높은 식물체로부터 고순도의 DNA를 얻는데는 DNA의 선택적 침전 및 정제와 같은 단계가 필요하여 많은 시간과 경비가 소요되고 있어 다량의 시료에 대한 PCR 분석의 제한 요인이 되고 있다. 신속 간편한 방법에 의해 추출한 genomic DNA가 PCR에 사용될 수 있다는 보고도 있으나 (Edwards et al. 1991; Wang et al. 1993; Steiner et al. 1995), 본 연구진의 조사에 의하면 polyphenol 함량이 높은 과수류에서는 매우 제한적인 경우에 한하여 사용이 가능한 것으로 나타났다. 특히, 복분자, 사과, 포도의 경우에는 간편법에 의해 추출한 genomic DNA로부터는 PCR 반응산물의 출현이 전혀 이루어지지 않았다.

PCR에 적합한 고순도 DNA 분리를 위한 노력과 함께 DNA에 오염된 polyphenol 화합물에 의한 PCR 억제작용을 감소시키는 방법도 개발되고 있다. De Boer et al. (1995)은 Western이나 Southern 분석시 단백질이나 핵산이 전이막에 비특이적으로 결합하는 것을 방지하기 위해 사용하는 BLOTTO (Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer)가 polyphenol에 의한 PCR 억제작용을 경감시킬 수 있음을 보고하였다. BLOTTO의 polyphenol 화합물에 의한 PCR 억제 경감효과는 벼, 콩, 옥수수 배추, 감자 등 초본식물에서 확인된 바 있다 (De Boer et al. 1995; Hwang & Kim 2000). 그러나 polyphenol 화합물의 함량이 높은 과수류에서의 BLOTTO 효과에 대하여는 보고된 바가 없다.

본 연구진은 복분자의 RAPD 분석 및 상추 형질전환체 검정시 신속 간편법에 의해 추출한 genomic DNA를 사용함으로써 다수의 시료에 대한 RAPD 분석 및 형질전환 계통 선발 효율을 증진시킬 목적으로 본 실험을 실시하였다. 본 연구의 결과에 의하면 2-4%의 BLOTTO를 PCR 반응액에 첨가하면 신속 간편법에 의해 추출한 복분자, 포도, 사과 및 상추의 genomic DNA로부터 비특이적 및 특이적 DNA 단편의 증폭이 재현적으로 가능하였다.

## 재료 및 방법

### 1. NaOH를 이용한 신속 간편한 식물체 DNA 분리

본 실험에서는 복분자 (재배종 고창 복분자), 사과 (품종명, 후지), 포도 (품종명, 캠벨얼리),  $\gamma$ -TMT( $\gamma$ -tocopherol methyltransferase) 형질전환 상추 (품종명, 청치마)를 사용하였으며, 농가포장과 실험온실에서 재배되고 있는 생육이 건전한 식물체의 잎을 실험재료로 채취하였다. 간편법을 이용한 genomic DNA 추출용 시료는 식물체 잎을 microfuge tube의 몸체와 뚜껑 사이에 놓고 뚜껑을 닫음으로서 시료를 직접 microtube에 채취하였다. 간편법에 의한 genomic DNA 분리는 Wang et al. (1993)의 방법을 변형하여 실시하였다. 시료의 무게를 정량한 후 생체시료 mg 당 0.5 N NaOH 10  $\mu$ 를 첨가한 후, 즉시 polypropylene pestle (Sigma Z35994-7, USA)를 이용하여 얼음물 위에서 homogenizer로 균질화하여 4°C, 10,000 x g에서 5분간 원심분리한 후 얻어진 상징액을 회수하였다. 상징액을 0.1 M Tris (pH 8.0)로 10배 희석하여 PCR 반응용 genomic DNA 용액으로 사용하였다.

### 2. BLOTTO 처리

BLOTTO의 DNA 용액 중에 함유되어 있는 물질에 의한 PCR 반응 억제작용 상쇄효과를 조사하기 위하여 BLOTTO (10% skim milk powder, 0.2%  $NaN_3$ )를 제조하여 사용하였다. 간편법에 의해 추출한 genomic DNA 중의 오염물질에 의한 PCR 반응 억제작용에 대한 BLOTTO의 상쇄효과 최적 농도를 결

정하기 위해 복분자 DNA가 포함된 PCR 반응액 중 BLOTTO의 최종농도가 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10%가 되도록 조정하였다.

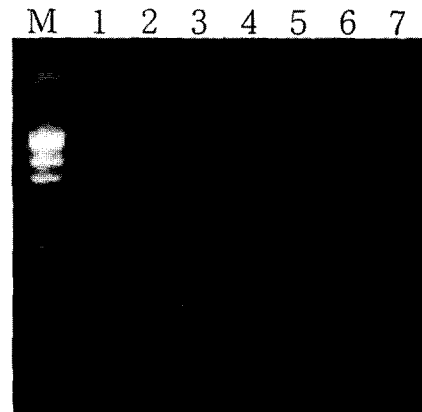
### 3. PCR

간편법에 의하여 추출된 복분자, 사과, 포도 및 상추 genomic DNA의 비특이적 증폭반응에 대한 BLOTTO 효과를 조사하기 위하여 두 종의 random primer (Amersham 27-9501-01, USA)를 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR 반응액의 조성은 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 μM primer, 100 μM dNTPs, 주형 DNA (1 μl/25 μl) 그리고 Taq polymerase (1 unit/25 μl) 이었다. PCR 반응은 92℃에서 10분간 pre-denaturation을 거친 후 증폭반응 (92℃에서 15초, 34℃에서 1분, 72℃에서 2분)을 45회 진행하고 최종 신장반응을 72℃에서 10분간 실시하였다. 특정 유전자에 대한 특이적 primer를 이용한 PCR에서의 BLOTTO 효과를 조사하기 위하여 γ-TMT (γ-tocopherol methyltransferase) 유전자의 형질 전환이 확인된 상추계통으로부터 간편법을 이용하여 추출한 genomic DNA를 이용하였다. PCR 반응액의 조성은 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 μM primer, 200 μM dNTPs, 주형 DNA (1 μl/25 μl) 그리고 Taq polymerase (1 unit/25 μl) 이었다. PCR 반응 조건은 94℃에서 5분간 pre-denaturation 반응을 거친 후 증폭반응 (94℃에서 1분, 57℃에서 1분, 72℃에서 2분)을 35회 진행하고 최종 신장반응을 72℃에서 7분간 실시하였다. PCR 반응이 종료된 반응액 10 μl를 0.5 μL EtBr이 포함된 1% agarose gel에서 전기영동하여 PCR 반응 산물을 확인하였다.

## 결 과

### 1. BLOTTO 첨가 농도

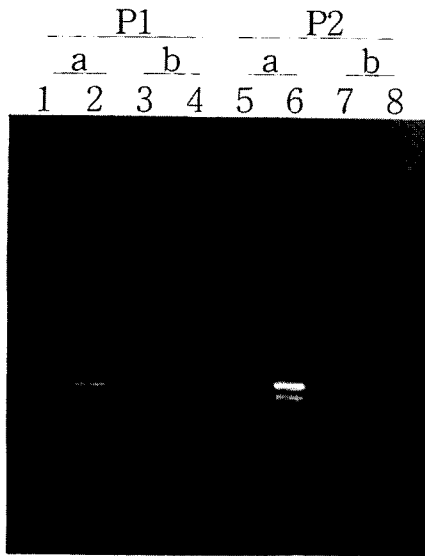
간편법에 의해 추출한 genomic DNA에 대한 BLOTTO의 PCR 반응억제 상쇄효과를 조사하기 위하여 PCR 반응액에 BLOTTO를 첨가하고 random primer를 사용하여 복분자의 genomic DNA를 PCR을



**Fig. 1.** Attenuation of PCR inhibition by addition of BLOTTO in PCR with a random primer using genomic DNA prepared from *R. coreanus* by a simple one-tube extraction procedure. M, lamda DNA/*Hind* III DNA ladder; lane 1, no BLOTTO; lane 2-7, BLOTTO (1, 2, 4, 6, 8 or 10% BLOTTO, respectively) was added to the PCR mix.

통하여 증폭하였으며 그 결과는 그림 1과 같다. 그림에서 보는 것처럼 BLOTTO를 0 (lane 1) 또는 10% (lane 7) 첨가한 경우에는 DNA의 증폭이 전혀 이루어지지 않았으나, BLOTTO를 1 (lane 2), 2 (lane 3), 4 (lane 4), 6 (lane 5), 8% (lane 6) 첨가한 경우에는 2개의 선명한 band와 1개의 약한 band가 증폭되었다. 가장 양호한 DNA 증폭 결과는 2%에서 나타났으며, 1%와 4%에서도 비교적 양호한 증폭결과를 나타내었다. BLOTTO 농도가 6% 이상의 고농도일 경우에는 첨가 농도에 비례하여 증폭된 band의 DNA양과 선명도가 현저히 감소하였다. 이상의 결과로 보아 간편법에 의해 추출한 DNA를 이용하는 PCR에서 BLOTTO의 첨가 효과가 현저하며, BLOTTO 첨가 최적농도는 2%로 생각된다 (Fig. 1)

간편법에 의해 추출한 genomic DNA를 이용한 PCR에서의 BLOTTO 효과가 품종 및 primer 특이적인지의 여부를 두 품종의 복분자 DNA와 두 종의 random primer를 이용하여 조사하였다. 품종 및 primer에 관계없이 BLOTTO 무첨가 조건 (lane 1, 3, 5, 7)에서는 DNA 단편의 증폭이 전혀 이루어지지 않았으나 BLOTTO 첨가 조건 (lane 2, 4, 6, 8)에서는 품종 또는 primer 특이적인 DNA 단편이 증폭되었다

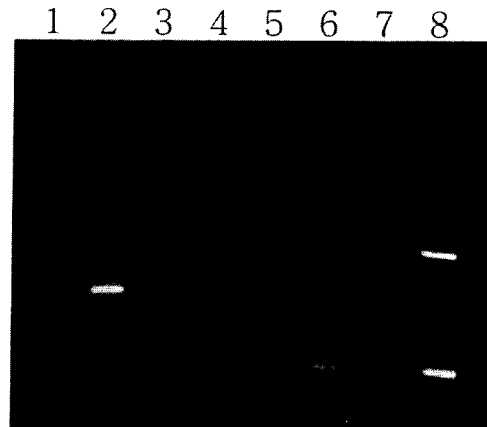


**Fig. 2.** Attenuation of PCR inhibition by addition of BLOTTO in PCR with random primers using genomic DNAs prepared from *R. coreanus* by a simple one-tube extraction procedure. P1, random primer #1; P2, random primer #2; a, Gochang *R. coreanus*; b, Heptafoliate *R. coreanus*; lanes 1, 3, 5 and 7, no BLOTTO; lanes 2, 4, 6 and 8, 2% BLOTTO added to the PCR mix.

(Fig. 2). 이는 간편법에 의해 추출한 genomic DNA를 이용한 PCR에서 BLOTTO 첨가 효과가 품종 및 primer에 관계없이 나타남을 의미한다.

## 2. 여러식물에서의 BLOTTO 첨가 효과

간편법에 의해 추출된 복분자 DNA에 대한 PCR에서 확인된 BLOTTO 효과가 다른 식물의 DNA에서도 나타나는지의 여부를 상추, 사과, 포도를 대상으로 조사하였다. 복분자에서 BLOTTO 효과 최적 농도가 2%로 나타났으므로 BLOTTO의 농도는 2%를 사용하여 PCR을 수행하였다. BLOTTO가 첨가되지 않은 상추 (lane 1), 복분자 (lane 3), 사과 (lane 5), 포도 (lane 7)의 PCR에서는 DNA의 증폭이 전혀 이루어지지 않았으나, 2% BLOTTO가 첨가된 상추 (lane 2), 복분자 (lane 4), 사과 (lane 6), 포도 (lane 8)의 PCR에서는 각 식물종에 특이적인 양상의 DNA 단편이 증폭되었다 (Fig. 3). 복분자의 경우 DNA 단편의 증폭양상이 그림 1의 2% BLOTTO 첨가시와 동일하여



**Fig. 3.** Attenuation of PCR inhibition by addition of BLOTTO in PCR with a random primer using genomic DNAs prepared from lettuce (lanes 1 and 2), *R. coreanus* (lanes 3 and 4), grape (lane 5 and 6) and apple (lanes 7 and 8) leaves by a simple one-tube extraction procedure. Lanes 1, 3, 5 and 7, no BLOTTO; lanes 2, 4, 6 and 8, 2% BLOTTO added to the PCR mix.

BLOTTO 효과가 높은 특이성과 재현성이 있음을 나타낸다. 따라서 이상의 결과는 BLOTTO가 여러 식물종의 간편 추출 DNA에 대한 PCR에 효과가 있음을 의미한다.

## 3. 형질전환 식물체 유전자 확인

위에서 확인한 BLOTTO 효과가 특정 유전자를 대상으로 하는 PCR에도 효과가 있는지를 상추 형질 전환체를 이용하여 조사하였다.  $\gamma$ -TMT 유전자의 도입이 확인된 T3 4계통의 상추 잎으로부터 간편법을 이용하여 추출한 genomic DNA를  $\gamma$ -TMT 특이적 primer 쌍으로 PCR 증폭하였다 (Fig. 4).  $\gamma$ -TMT 유전자가 재조합된 binary vector에 대하여 BLOTTO 첨가 또는 무첨가 조건에서 PCR을 실시할 경우 예상된 크기의 단편이 증폭되었다 (lane 1, 2). 형질전환되지 않은 상추로부터 간편법으로 추출한 genomic DNA에 대하여 BLOTTO 무첨가 (lane 3) 또는 첨가 (lane 4) 조건에서 PCR을 실시하면 예상대로 단편이 증폭되지 않았다. 한편, 형질전환 식물체 4계통의 genomic DNA에 대하여 BLOTTO 무첨가 (lane 5, 7, 9, 11) 또는 첨가 조건 (lane 6, 8, 10, 12)에서 PCR을

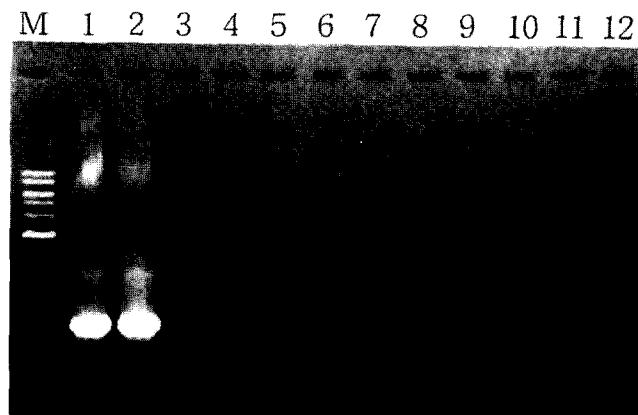
실시한 경우, BLOTTO 무첨가 반응액에서는 삽입 DNA가 증폭되지 않았으나 BLOTTO 첨가 반응액에서는 모든 형질전환 계통으로부터 예상된 1.1 kb의 DNA가 증폭되었다 (Fig. 4). 이러한 결과는 BLOTTO 효과가 특정 유전자에 대한 특이적 primer를 이용하는 PCR에서도 효과가 있음을 의미한다.

## 고 찰

PCR의 민감성과 특이성을 이용하여 다양한 생물 재료로부터 추출된 DNA의 신속한 특성조사가 가능하므로 식물유전 육종분야에서도 PCR 기법이 광범위하게 활용되고 있다. 그러나 다양한 종류의 2차 대사산물이 함유되어 있는 식물재료에서 추출된 DNA에는 PCR을 저해하는 물질이 존재하는 것으로 알려지고 있다. 특히, polyphenol 화합물이 다량 함유된 과수류와 임목류에서 추출한 DNA에서는 PCR 억제 현상이 현저하게 나타난다 (Kim et al. 1997). PCR 반응액에 함유되어 있는 polyphenol 화합물은 DNA에 결합하여 DNA를 분해하며 (John 1992) Mg<sup>2+</sup>와의 착염형성을 통하여 PCR을 억제하는 것으로 알려지고 있다. 따라서 polyphenol류의 오염이 낮은 DNA를 준비하기 위해 PVPP (John 1992; Pich & Schubert 1993; Steiner et al. 1995), PVP (Kim et al. 1997)와 같은

polyphenol 화합물과 결합하는 물질이 추출과정에 사용되고 있다. PVP나 PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) 등이 polyphenol 화합물의 제거에 효과가 있으나 침전 및 정제과정을 필요로 하므로 다량의 시료에 대한 효과적인 PCR 분석을 위해서는 보다 신속하고 간편한 DNA 추출 방법의 사용이 필요하다. 하지만 보다 간편한 one-tube 추출방법의 경우에는 추출된 DNA의 순도가 크게 저하되어 PCR 억제물질이 존재하게 된다. 그런데 간편한 추출법에 의해 준비된 DNA 중의 PCR 저해작용을 상쇄할 수 있으면 간편법으로 추출한 DNA를 사용하여 PCR을 실시할 수 있을 것이다.

유지방이 제거된 우유가 주성분인 BLOTTO는 Western과 Southern blotting 분석시 단백질과 핵산의 비특이적 결합을 방지하기 위하여 광범위하게 사용되고 있는 물질로서 polyphenol 화합물에 의한 PCR 억제작용을 상쇄시키는 활성을 나타내는 것으로 확인되어 (De Boer et al. 1995; Hwang & Kim 2000) 초본류 식물의 PCR에 사용된 바 있다. BLOTTO의 polyphenol에 의한 PCR 억제작용 상쇄효과 발현 기작은 잘 알려져 있지 않지만 polyphenol 화합물에 의한 DNA의 손상과 Mg<sup>2+</sup>와의 착염형성을 억제하여 효과를 나타내는 것으로 추정되고 있다 (De Boer et al. 1995). 그러나 bovine serum albumin이나 가수분해



**Fig. 4.** Attenuation of PCR inhibition by addition of BLOTTO in PCR with the  $\gamma$ -TMT specific primers using genomic DNAs prepared from T3 transgenic lettuce lines by a simple one-tube extraction procedure. M, 1kb ladder; lanes 1 and 2, pMG-TMT plasmid vector; lanes 3 and 4, nontransgenic plants, lanes 5-12, transgenic plants transformed with pMG-TMT. Lanes 1, 3, 5, 7, 9 and 11, no BLOTTO; lanes 2, 4, 6, 8, 10 and 12, 2% BLOTTO added to the PCRmix. 1.1kb amplification products are arrowed.

카제인과 같은 물질은 polyphenol 억제작용에 대한 상쇄 효과가 없다고 한다 (De Boer et al. 1995).

본 연구에서는 polyphenol 화합물 함량이 높은 과수류의 간편법에 의해 추출한 genomic DNA에 대하여도 BLOTTO의 효과가 현저히 나타나는 것으로 확인되었다. 서로 다른 식물종의 조직에 함유된 polyphenol 화합물의 종류와 양은 서로 다를 가능성이 매우 높은 것으로 보아 (Seigler 1998), BLOTTO의 효과는 특정 polyphenol에 의한 polymerase 억제작용의 상쇄효과보다는 광범위한 polyphenol에 대한 일반적 상쇄효과로 생각된다. 본 연구에서도 BLOTTO의 일반적 효과와 일관되게 primer나 품종 또는 식물종에 관계없이 PCR 반응시 BLOTTO의 polyphenol 억제작용 상쇄효과가 나타났다.

본 연구에서는 PCR 반응액에 2%의 BLOTTO를 첨가시킴으로서 polyphenol 화합물이 다량 함유된 식물종의 간편법에 의해 추출된 genomic DNA를 직접 PCR 분석에 사용할 수 있음을 확인하였다. 따라서 NaOH를 이용한 간편한 DNA 추출법과 BLOTTO가 첨가된 반응액을 조합하여 사용함으로써 DNA 추출에 소요되는 시간과 노력을 현저히 경감시켜 다수의 유전자원 및 형질전환체의 유전분석 효율을 증가시킬 수 있을 것으로 생각된다.

## 적 요

Polyphenol 화합물이 다량 함유된 식물종의 유전형 분석이나 형질전환 유전자 확인 등을 위해 PCR을 이용할 경우 다량의 재료로부터 신속 간편하게 분리한 DNA를 이용할 수 있는 조건을 설정하였다. 폴리페놀 함량이 높은 포도, 사과, 복분자와 같은 과수류에서 간편법에 의해 추출된 DNA를 이용한 PCR 반응액에 2%의 BLOTTO를 첨가함으로써 DNA의 재현적 증폭이 가능하였다. 간편 추출 DNA를 이용한 PCR에서의 BLOTTO 효과는 primer, 품종, 식물종에 관계없이 일반적으로 발현되었다. 상추의 형질전환 유전자 검색을 위한 PCR에서도 BLOTTO 효과가 확인되었다. 따라서 PCR 반응액에 2% BLOTTO를 첨가하면 간편법에 의해 추출된

polyphenol 화합물 고함유 식물종의 DNA를 이용하여서도 PCR에 의한 유전배경 및 특정 유전자의 대량 신속 분석이 가능할 것이다.

## 인 용 문 헌

- De Boer SH, Ward LJ, Li X, Chittaranjan. 1995. Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. *Nucleic Acids Res.* 23(13):2567-2568.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C. 1991. Simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* 19(6):1349.
- Hwang SK, Kim YM. 2000. A simple and Reliable Method for Preparation of Cross-Contamination Free Plant Genomic DNA for PCR-Based Detection of Transgenes. *J. Biochem. Mol. Biol.* 33(6):537-546.
- John ME. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res.* 20(9):2381.
- Kim CS, Lee CH, Shin JS, Chung YS, Hyung NI. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Res.* 25(5):1085-1086.
- Pich U, Schubert I. 1993. Midiprep method for isolation of DNA from plants with a high content of polyphenolics. *Nucleic Acids Res.* 21(14):3328.
- Seigler DS. 1998. *Plant Secondary Metabolism*. Kluwer Academic Publishers. Boston, pp106-214.
- Steiner JJ, Poklemba CJ, Fjellstrom, Elliott LF. 1995. A rapid one-tube genomic DNA extraction process for PCR and RAPD analyses. *Nucleic Acids Res.* 23(13):2569-2570.
- Wang H, Qi M, Cutler AJ. 1993. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21(17):4153-4154.

(접수일 2001. 9. 5)

(수락일 2001. 11. 3)