

지모에서 McFISH를 이용한 rDNAs의 물리지도 작성

김수영* · 최혜운* · 방재욱*†

*충남대학교 생명과학부

Physical Mapping of rDNAs Using McFISH in *Anemarrhena asphodeloides* Bunge

Soo Young Kim*, Hae Woon Choi*, and Jae Wook Bang*†

*School of Biosciences & Biotechnology, Chungnam Natl. Univ., Daejeon 305-764, Korea.

ABSTRACT : *Anemarrhena asphodeloides*, a medicinal plant, has chromosome number of $2n=2x=22$. To characterize the somatic metaphase chromosomes, physical mapping of 45S and 5S rDNAs using McFISH (multi-color fluorescence *in situ* hybridization) was applied. Two pairs of 45S rDNA loci were detected on the terminal regions of the short arm of chromosomes 1 and 3. A pair of 5S rDNA signal was observed on the short arm of chromosome 3. 5S rDNA site seemed to be the same locus as one of the 45S rDNA site. McFISH was very useful tool for the localization and identification of rDNAs on the metaphase chromosomes in *A. asphodeloides*.

Key words : *Anemarrhena asphodeloides*, McFISH, physical mapping, rDNAs

서 언

지모 (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)는 지모과에 속하는 다년생 초본식물로 근경을 약용으로 사용하는 한방의 주요 생약재로 우리나라 전국에서 재배되고 있다 (Bae, 2000). 지모는 열을 내리고 체액을 보강하는 효능이 있으며, 가슴이 답답하고 체액이 소모되어 갈증을 자주 느끼는 증상에 좋고, 폐의 기능이 약화되어 기침, 가래가 많을 때 사용하며, 변비 증상과 소변이 잘 나오지 않는 것을 치료하는데 쓰이고 있다 (Bae, 2003). 지모를 대상으로 한 성분 분석이나 약효에 대한 연구 결과는 다수 보고 (Lee *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1997; Ichiki *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1999) 된 바 있으나, 식물 유전자원 이용에서 기초가 되는 세포유전학적 연구는 미미한 실정이다. 지모의 체세포 염색체 수는 $2n=22$ (Sato, 1942)로 염색체의 조성은 상대적으로 길이가 긴 3쌍의 염색체와 8쌍의 작은

염색체들과 8쌍의 중부 염색체, 2쌍의 차중부 염색체 그리고 1쌍의 차단부 염색체로 이루어져 있다 (Kim *et al.*, 2002).

FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 기법은 특정 DNA 염기서열로 이루어진 탐침 (probe)의 사용으로 염색체상 위치를 직접 확인 할 수 있는 방법으로 식물 염색체 연구에는 Schwarzscher 등 (1989)과 Yamamoto와 Mukai (1989)에 의해 처음으로 도입되었다. 최근에는 Multi-color fluorescence *in situ* hybridization (McFISH) 기법의 사용으로 게놈 염색체상에서 정교한 분자지도 작성이 가능해졌고 (Jiang & Gill, 1994; Fransz *et al.*, 2000), 특히 반복서열로 어느 식물종이나 공통으로 가지고 있는 45S 와 5S rDNA를 이용한 physical mapping은 핵형분석, 게놈의 구조분석 및 세포 수준에서의 종 동정을 위한 분자 마커로 널리 사용되고 있다 (Koo *et al.*, 2003). 본 연구는 약용식물로 이용되고 있는 지모를 대상으로

† Corresponding author : (Phone) +82-42-821-5497 (E-mail) bangjw@cnu.ac.kr

Received October 18, 2004 / Accepted November 6, 2004

McFISH 기법을 이용하여 45S 와 5S rDNA의 염색체상에서의 위치를 확인하여 세포유전학적 기초를 확립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용된 재료는 충남농업기술원에서 분양받은 지모 종자를 파종하여 근단을 채취하여 실험에 이용하였다.

2. 근단의 고정과 FISH 슬라이드 제작

FISH용 슬라이드를 제작하기 위해 약 1cm 정도 자란 근단을 채취하여 1-bromonaphthalene 포화 수용액에 담가서 4시간 전처리 한 다음, glacial acetic acid : ethanol (1:3, v/v)에 고정하여 냉장실에 보관하면서 재료로 이용하였다. 고정된 근단은 효소 혼합용액 (2% cellulase, 1.5% macerozyme, 1% pectolyase, 0.5 mM EDTA, pH 4.2)에 담가 40분간 처리 (37°C) 후, glacial acetic acid : ethanol (1:3, v/v) 용액을 이용하여 슬라이드글라스 위에서 가는 핀셋으로 염색체를 전개 후 상온에서 2-3일간 건조시켰다. 위상차 현미경 하에서 분열상이 양호한 슬라이드를 선별하여 FISH에 사용하였다.

3. 탐침의 준비와 McFISH

FISH를 위한 탐침으로는 digoxigenin-11dUTP로 표지된 오이 (*Cucumis sativus* L.)의 5S rDNA와 biotin-16dUTP로 표지된 45S rDNA를 이용하였으며 (Koo *et al.*, 2003), McFISH는 Kim 등 (1998)의 방법을 변용하여 사용하였다.

건조된 슬라이드 상의 염색체 변성을 위하여 70% formamide/2x SSC 용액에 2분간 처리 하고, -20°C의 70% 에탄올에서 급냉 후, 95%와 99% 에탄올에서 각각 5분씩 탈수하여 상온에서 30분 정도 건조시켰다. 탐침 혼합액 (digoxigenin-11dUTP 와 biotin-16dUTP로 각각 표지된 100 ng의 probe DNA, 50% formamide, 2x SSC, 10% dextran sulfate, 10 ng ssDNA)은 90°C에서 10분간 변성시킨 후, 급냉시켜 준비하였다. 건조된 슬라이드 상에 15µl의 탐침 혼합액을 가한 다음, 커버글라스를 덮고 paper bond로 봉하여, 37°C에서 16시간 이상 hybridization 하였다. Hybridization시킨 슬라이드는 40°C의 2XSSC, 50% formamide/2XSSC, 2XSSC, 4XSSC 용액에서 각각 5분씩 수세하였다. 탐침의 비 특이적인 결합을 막기 위해 염색체 슬라이드를 5% BSA/BT (1M NaHCO₃ + 0.5% Tween-20, pH 8.3) 완충액으로 37°C에서 5분간 blocking 한 후, 1%의 avidin-FITC (fluorescein isothiocyanate)

와 anti-digoxigenin rhodamine 이 포함된 100µl의 1% BSA/4XSSC의 혼합액을 슬라이드에 가한 다음 37°C에서 30분 동안 반응시켜 biotin과 digoxigenin으로 표지된 DNA 탐침을 동시에 검출하였다. 4XSSC/0.2% tween-20 완충액으로 37°C에서 5분씩 3번 수세 후, 1µg/ml DAPI (4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride) 용액을 포함한 Vectashield (Vector Lab.) 15 ml를 도포하여 커버를 덮은 후 cooled CCD 카메라 (Cool SNAP, Photometrics)와 형광현미경을 이용하여 signal을 관찰하고 사진을 촬영하였다. 확인된 signal들은 Meta Imaging Series TM 4.6 (Universal Imaging Corporation) 소프트웨어를 사용하여 합성하였다.

결과 및 고찰

지모는 약용으로 널리 사용되는 유용한 식물이나 유전자원 연구의 기초가 되는 세포유전학적인 연구 보고는 거의 없는 실정으로 기본 염색체 수 (Sato, 1942; Darlington & Wylie, 1955)와 핵형만이 보고 (Kim *et al.*, 2002) 되었다. 본 연구에서는 45S와 5S rDNA 유전자의 염색체상의

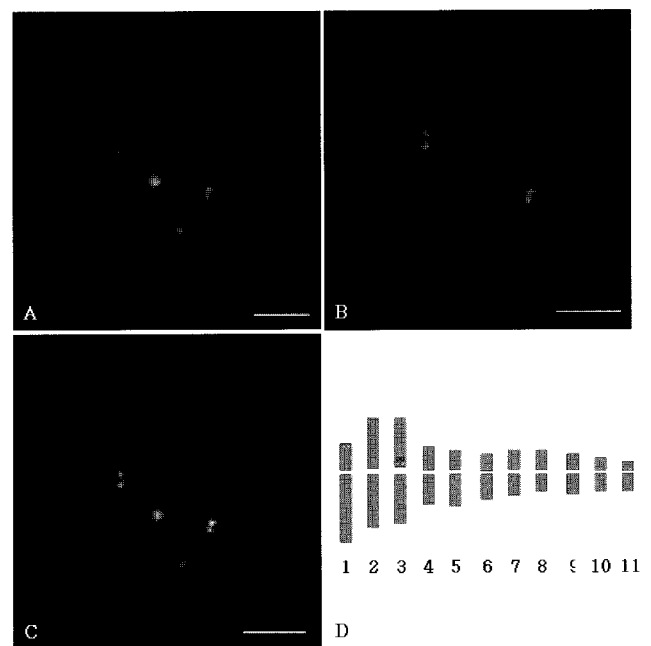


Fig. 1. Localization and physical mapping of rDNAs in somatic metaphase chromosomes of *Anemarrhena asphodeloides*. A: biotin-labeled 45S rDNA probes, B: digoxigenin-labeled 5S rDNA probes, C: McFISH with 45S and 5S rDNAs, D: ideogram of karyotype showing the physical location of the 45S (green) and 5S rDNA (red) loci. Bar, 5 µm.

위치를 확인하기 위해 biotin으로 표지 한 45S rDNA는 FITC로, digoxigenin으로 표지 한 5S rDNA는 rhodamine으로 검출하여 McFISH를 수행한 결과 45S rDNA signal은 두 쌍, 5S rDNA signal은 한 쌍으로 각각 관찰되었다. Sato (1942)는 1쌍의 차중부 염색체 말단에서 NOR (nucleolar organizer region)이 위치한 2차 협착을 보고하였으나 본 연구에서는 NOR의 위치가 1번 염색체의 단완과 3번 염색체의 동원체 부위에서 정확하게 확인되었다 (Fig. 1A). 또한 두 쌍의 45S rDNA signal들 중 1번 염색체 단완 말단 부위의 signal이 3번 염색체의 동원체 부위에서 관찰되는 것 보다 더 강하게 나타나 차이를 보였다.

5S rDNA의 염색체상 위치는 3번 염색체의 동원체 부위에서 관찰되었는데 (Fig. 1B), 같은 위치에 존재하는 45S rDNA signal에 비해 강하게 관찰되었다. 3번 염색체 동원체 부위에서 45S와 5S rDNA signal이 함께 관찰되어 McFISH를 통하여 이들 rDNA 유전자들의 위치를 확인한 결과 같은 위치에 존재함을 알 수 있었다 (Fig. 1C). McFISH를 통한 45S와 5S rDNA signal의 위치에 따른 체세포 염색체의 ideogram은 Figure 1D에서 보는 바와 같다.

45S rDNA와 5S rDNA의 유전자는 리보솜의 구성 성분으로 45S rDNA는 인형성 부위를 포함하고 있는 부수체 염색체에서 관찰되며, 두 유전자 모두 염색체상에 1쌍 이상이 존재하고 (Maluszynska & Heslop-Harrison, 1991), 거의 모든 진핵 생물의 염색체 상에서 multigene family로 존재한다 (Murata *et al.*, 1997). rDNA는 식물 종에 따라 다양하게 나타나기 때문에 특정 식물의 염색체 지도 작성에서 다른 유용 유전자의 물리적 위치를 탐색하기 위한 기초 자료로 이용될 수 있다 (Lapitan *et al.*, 1989; Mukai *et al.*, 1991; Leitch & Heslop-Harrison, 1993; Juliano *et al.*, 1998). 본 연구에서는 지모 염색체상의 rDNA 분석에 McFISH 기술을 처음으로 도입하여 rDNAs의 염색체상 물리 지도를 완성하였으며, 45S rDNA 탐침을 이용해 상염색체법으로 구분할 수 없었던 부수체 염색체를 확인할 수 있었다.

적 요

약용식물로 재배되고 있는 지모를 대상으로 McFISH 기법을 이용하여 45S와 5S rDNA 유전자의 염색체상의 위치를 확인하여 물리지도를 확립하였다. 2쌍의 45S rDNA는 1번 염색체의 단완 말단과 3번 염색체의 동원체 부위에서 관찰되었고, 1번 염색체의 signal이 3번 염색체에서의 signal보다 더 강하게 나타났다. 한 쌍의 5S rDNA signal은 45S rDNA signal과 함께 3번 염색체의 동원체 부위에

서 관찰되었다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업인 특용작물연구단의 연구비 지원 (PI, 방재욱)에 의해 수행되었습니다.

LITERATURE CITED

- Bae KH (2000) The Medicinal Plants of Korea. Kyohaksa, Seoul, Korea. p. 546.
- Bae KH (2003) Illustrated Book of Health for Longevity. Kyohaksa Seoul, Korea. p. 363.
- Darlington CD, Wylie AP (1955) Chromosome Atlas of Flowering Plants. 2nd Ed. George Allen & Unwin Ltd, London. p. 365.
- Fransz PF, Armstrong S, De Jong JH, Pamell LD (2000) Integrated cytogenetic map of chromosome arm 45S of *Arabidopsis thaliana*: Structural organization of heterochromatic knob and centromere region. Cell 100:367-376.
- Ichiki H, Miura T, Kubo M, Ishihara E, Komatsu Y, Tanigawa K, Okada M (1998) New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoide. Biol. Pharm. Bull. 21:1389-1390.
- Jiang J, Gill BS (1994) Nonisotopic *in situ* hybridization and plant genome mapping: The first ten years. Genome 37:717-725.
- Juliano O, Jonathan C, Gill H, Heslop-Harrison JS (1998) Molecular cytogenetics of *Musa* species, cultivars and hybrids: Location of 18S-5.8S-25S and 5S rDNA and telomere-like sequences. Ann. Bot. 82:243-248.
- Kim SM, Park CK, Seong JD, Kim HT, Han SI, Kwack YH (1999) Isolation and HPLC analysis of timosaponin A III from rhizomes of *Anemarrhena asphodeloides* BUNGE. Korean J. Medicinal Crop Sci. 7:45-50.
- Kim SY, Lim YP, Bang JW (1998) Cytogenetic analysis of *Brassica campestris* var. *pekinensis* using C-banding and FISH. Korean J. Genetics 20:285-294.
- Kim SY, Koo DH, Bang JW (2002) Karyotype analysis of *Anemarrhena asphodeloides* Bunge. Korean J. Medicinal Crop Sci. 10:144-146.
- Koo DH, Hur YK, Bang JW (2003) FISH mapping of rDNAs and repeated DNA sequences on pachytene chromosomes of cucumber (*Cucumis sativus* L.). Plant & Animal genome XI: p. 145.
- Koo DH, Kim SY, Bang KH, Seong NS, Bang JW (2003) Cytogenetic analyses of *Angelica* plants using Feulgen staining and multicolor fluorescence *in situ* hybridization. Korean J. Plant Biotech. 30:123-127.
- Lapitan NLV, Ganai MW, Tanksley SD (1989) Somatic chromosome karyotype of tomato based on *in situ* hybridization of the TAGI satellite repeat. Genome 32:992-998.
- Lee SH, Ryu SY, Choi SU, No ZS, Kim SK, Lee CO, Ahn JW (1995) Antitumor agent from the rhizome of *Anemarrhena*

- asphodeloides*. Korean J. Pharmacogn. 26:47-50.
- Leitch IJ, Heslop-Harrison JS** (1993) Physical mapping of four sites of 5S ribosomal DNA sequences and one site of the X-amylase 2 gene in barley (*Hordeum vulgare*). Genome 36:517-523.
- Ma B, Wang B, Dong J, Yan X, Zhang H, Tu A** (1997) New spirostanol glycosides from *Anemarrhena asphodeloides*. Planta Med. 63:376-379.
- Maluszynska J, Heslop-Harrison JS** (1991) Localization of tandemly repeated DNA sequences in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 1:159-166.
- Mukai Y, Endo TR, Gill BS** (1991) Physical mapping of the 18S-26S rRNA multigene family in common wheat: identification of a new locus. Chromosoma 100:71-78.
- Murata M, Heslop-Harrison JS, Motoyoshi F** (1997) Physical mapping of the 5S ribosomal RNA genes in *Arabidopsis thaliana* by multi-color fluorescence *in situ* hybridization with cosmid clones. Plant J. 12:31-37.
- Sato D** (1942) Karyotype alteration and phylogeny in Liliaceae and allied families. Jap. J. Bot. 12:57-161.
- Schwarzacher T, Leitch AR, Heslop-Harrison JS** (1989) *In situ* hybridization and the architecture of the nucleus. Trans. R. Microscop Soc. 1:669-674.
- Yamamoto M, Mukai Y** (1989) Application of fluorescence *in situ* hybridization to molecular cytogenetics of wheat. Wheat Inf. Serv. 69:30-33.