

## 구름버섯균 KN9522에서 degenerate primer를 이용한 Mn-Peroxidase동위효소 유전자들의 PCR 클로닝

전상철 · 김규중\*

강릉대학교 자연과학대학 생물학과

구름버섯균 KN9522로부터 분리한 Mn-peroxidase동위효소 CVMP1, CVMP2, CVMP3 및 CVMP5를 코딩하는 게놈유전자를 분리하기 위해 4개의 동위효소 N-말단아미노산 서열을 기준으로 제작한 degenerate primer들이 사용되었다. 하나를 제외한 3개의 동위효소들은 그에 대응되는 염기서열 900정도 되는 PCR산물 (*cmp1*, *cmp2* 및 *cmp5*)을 얻었다. NCBI의 BLAST 프로그램을 사용하여 PCR산물들의 염기서열을 분석한 결과, *cmp1*, *cmp2* 및 *cmp5*는 구름버섯균 PRL572로부터 분리한 유전자 MPG-I (등록번호 Z30668) 및 PGV-II(등록번호 Z54279)와 유사하였다. *cmp1*과 *cmp2*는 MPG-I 유전자의 염기서열과 각각 77% 및 95%의 상동성을 보였고 *cmp5*는 PGV-II의 염기서열과 88%의 상동성을 보였다. 본 실험을 통하여 저자들은 Mn-peroxidase동위효소계의 아미노산 서열을 기준으로 제작된 degenerate primer들을 사용하여 게놈 DNA 조각을 분리할 수 있었다.

**Key words** □ degenerate primer, Mn-peroxidase, *Trametes versicolor*

Mullis 등(1985)에 의해 획기적인 증합효소연쇄반응법(PCR)이 처음 발표된 이후 특정 유전자를 증폭하기 위한 다양한 PCR기법이 개발되고 있다. 이 기법은 생명과학 전반에 걸쳐 특정 유전자의 대량증폭 및 증폭산물의 분석을 목적으로 필수적으로 사용되고 있는 수단이다. 아미노산 서열정보를 기초로 설계된 degenerate primer를 이용하여, 해당 아미노산을 암호화하는 미지의 유전자조각을 증폭하는 방법은 사용초기에는 유전자 증폭산물의 비 특이적 증폭과, 아미노산 서열을 알아야 primer를 제작할 수 있는 단점 등으로 인하여 활용에 제한요인이 되었다. 최근 이러한 단점을 보완하여 비 특이적인 유전자 증폭을 최대한 억제할 수 있게 되었다. 생물정보학의 발달로 해당유전자의 데이터베이스가 구축됨으로서 손쉽게 등록된 특정유전자의 모든 정보를 공유할 수 있게 됨으로써 degenerate primer를 이용한 유전자 증폭은 미지의 유전자를 탐색하기 위한 효과적인 방법이 되었다. 특히 degenerate primer를 이용하는 PCR기법은 게놈서열을 대상으로 특정유전자 family내에서 새로운 유전자를 탐색하기 위한 강력한 수단으로 이용될 수 있는데, 만약 특정유전자 family가 고도로 보존된 아미노산 서열부위를 가지고 있다면 DNA library를 이용한 hybridization방법보다 특이적이며 경제적이고, 빠른 시간 안에 해당 유전자를 증폭시킬 수 있다.

목재 부후균인 *Trametes versicolor*를 대상으로 리그닌분해에 관여하는 효소체인 Mn-peroxidase, lignin peroxidase 및 laccase에 관한 연구는 Johansson 등(4, 5)에 의한 효소학적 연구와 Jonsson 등(7, 8)에 의한 유전자연구를 시작으로 리그닌 분해효소

체에 대한 유전정보가 많이 밝혀졌다. 최근 국내에서 분리한 구름버섯균에서도 리그닌 분해효소 관련 유전자에 대한 연구보고가 다수 있다(1, 10, 11).

본 실험실에서는 목재 부후균인 *Trametes versicolor* KN9522로부터 정제된 Mn-peroxidase 동위효소 4종을 대상으로 degenerate primer를 이용한 PCR방법으로 Mn-peroxidase 동위효소를 코딩하는 게놈유전자를 탐색하여 보고된 유전자와 비교분석하였다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배양조건

사용된 균주는 본 실험실에서 분리한 *T. versicolor* KN9522 (12, 등록번호 AY686706)를 사용하였다. 본 균주의 배양은 맥아 한천 평판배지(2% malt extract, 2% glucose, 0.1% peptone, 2% agar)에 접종하여 25°C에서 일주일간 배양한 후 균사조각을 잘라내 망간이 제한된 LNHC (Low Nitrogen High Carbon)배지에 접종하여 일주일간 정치배양하였다. 배양된 균사체는 마쇄하여 현탁액을 MnSO<sub>4</sub>가 80 mg/L로 조절된 250 ml LNHC 배지에 10%(v/v)로 접종하여 25°C에서 9일간 120 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양을 위해 사용된 배지성분은 모두 Difco사 제품을 사용하였다.

#### Degenerate Primer 제작

Mn-peroxidase 동위효소를 증폭하기 위한 deoxyoligonucleotide primer들은 모두 바이오니아(Bioneer Co. Korea)사에 의뢰하여 합성하였다. 5'-primer들은 정제된 각 동위효소의 N-말단 아미노산 서열의 코돈을 바탕으로 하여 총 4개 (CVMP1, CVMP2 및

\*To whom correspondence should be addressed.  
Tel: 033-640-2314, Fax: 033-642-6124  
E-mail: kyujkim@kangnung.ac.kr

CVMP5)의 degenerate primer를 제작하였으며(9, Table 1), 3'-primer는 GenBank에 등록되어 있는 *Trametes versicolor* Mn-peroxidase 및 lignin peroxidase 유전자 family를 검색하여 cDNA 서열상에서 고도로 보존된 서열부위 2곳을 대상으로 2개 (CVMPR3 및 CVMPR4)의 reverse degenerate primer를 제작하였다(Fig. 1). 합성된 모든 degenerate primer는 각 primer의 mole %를 높이기 위해 degeneracy가 4이상인 아미노산은 혼합염기 대신 inosine을 사용하였다.

### Genomic DNA (gDNA) 추출 및 PCR

배양된 균사체는 멸균된 3차 증류수로 여러 번 세척 후 수분을 제거한 뒤 막자사발에 균사체와 액체질소를 넣고 급히 냉동시킨 상태에서 마쇄하였다. 균사분말은 Zolan과 Pukkila (1986)의 방법을 변형하여 DNA를 추출하였다. 균사분말 400 mg 당 400 µl의 DNA추출 완충제(SDS 3%, EDTA 50 mM, Tris-HCl pH 7.2 50 mM, 2-mercapto-ethanol 1%)를 첨가하여 65°C에서 1 시간 반응 후, 다시 400 µl의 phenol:chloroform:iso-amyl alcohol (25:24:1)을 첨가하여 25°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 상등액을 새로운 튜브로 옮긴 후 0.1 volume의 3 M sodium acetate와 0.54 volume의 isopropanol을 첨가한 뒤 원심 분리하여 상등액을 제거하고 침전된 genomic DNA만 취하였다. 침전된 genomic DNA는 멸균 3차 증류수로 녹여 분광광도계를 이용하여 DNA농도를 측정 후 PCR에 이용하였다.

PCR 반응조성은 0.5 ml PCR tube에 genomic DNA 40 ng과 degenerate primer 50-100 pmole을 혼합한 후, Tag DNA polymerase 1 U, dNTP 250 µM, KCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM 되게 20 µl의 10 mM Tris-HCl (pH 9.0)을 첨가하였다. PCR 실행 조건은 PTC-150 MiniCycler™ (MJ Research, USA)를 이용하여 94°C에서 4분간 pre-denaturation한 후 95°C에서 40초간 denaturation하였다. Annealing단계는 각 degenerate primer의 melting 온도에 따라서 annealing 온도를 가감하였고 반응시간은 모두 45초로 실행하였다. Extension은 72°C에서 1분간 실시하고 총 33cycle을 반응하였으며 final extension은 72°C로 5분간 실시하였다.

### 증폭산물의 클로닝 및 염기서열 분석

	←CMPR4	←CMPR3
<i>C. versicolor</i> CVMPa	GELRLQSDSELARSRRTACEWQSFVN	---NQAKLQSAFKAFAFRKMTVLGHDESL 308
<i>T. versicolor</i> MP2b	GELRLQSDSELARSRRTACEWQSFVN	---NQAKLQSAFKAFAFRKMTVLGHDESL 308
<i>T. versicolor</i> PGV11c	GEIRLQSDFLLRARSRTACEWQSFVN	---NQYKLQSAFKAFAFRKMTVLGSKEHN 307
<i>T. versicolor</i> LIP4d	GEMRLQSDHTIARSRRTACEWQSFVD	---NQPKAQMFQFVFDHLSIFGDDINT 310
<i>T. versicolor</i> VLG2e	GEFRQLQSDFAIARSRRTACEWQSFVD	---NQPKAQMFQFVFDHLSIFGDDINS 310
<i>T. versicolor</i> LP66f	GEIRLQTDHLLARSRRTSCEWQSFVN	---NQQAQDMFAFVFDHLSMLGDDPDS 310

**Fig. 1.** Design of reverse degenerate primers CMPR3 and CMPR4 for the Mn-peroxidase gene amplification in *Trametes versicolor*. The amino acid sequences of Mn-peroxidase were conserved in Mn-peroxidase and lignin peroxidase isozymes analyzed previously. Bold characters of WQSFVN and NQAKLQS represent amino acid sequences used for primer design. GenBank accession No. a: BAB03464, b: CAA91043, c: AAD02880, d:CAA83228, e: AAA91954, f: CAA83147.

PCR 반응 후 1.2% agarose gel 전기영동을 통하여 DNA 단편들의 증폭을 확인한 다음, genomic DNA상에서 각 degenerate primer에 의한 예상 DNA 증폭크기와 일치하는 DNA 단편들을 gel에서 잘라내어 정제하였다. 정제된 DNA 단편들은 염기서열을 분석하기 위해 pGEM-T Easy Vector System (Promega, USA)을 이용하여 제조사의 설명에 따라 TA-cloning한 후 *Escherichia coli* JM109 균주에 형질전환하였다. PCR 증폭산물이 삽입된 형질 전환체를 선별하여 pGEM-T Easy Plasmid를 추출, 정제한 다음 ABI PRISM 377 Automatic DNA Sequencer (Applied Biosystems, SA)를 이용하여 PCR 증폭산물의 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI의 Blast 검색프로그램을 통해 상동성 검색을 실시하였으며, Clustal X (Version 1.81)를 이용하여 multiple sequence alignment를 실시하였다.

### 결과 및 고찰

*T. versicolor* KN9522의 genomic DNA를 template로 하여 각각의 degenerate primer를 사용한 PCR을 통해서 *cmp1* (CMP1+CMPR4)은 911 bp, *cmp2* (CMP2+CMPR4)는 880 bp, *cmp3* (CMP3+CMPR4)는 872 bp 및 *cmp5* (CMP5+CMPR4)는 893 bp의 증폭산물을 얻을 수 있었다 (Fig. 2).

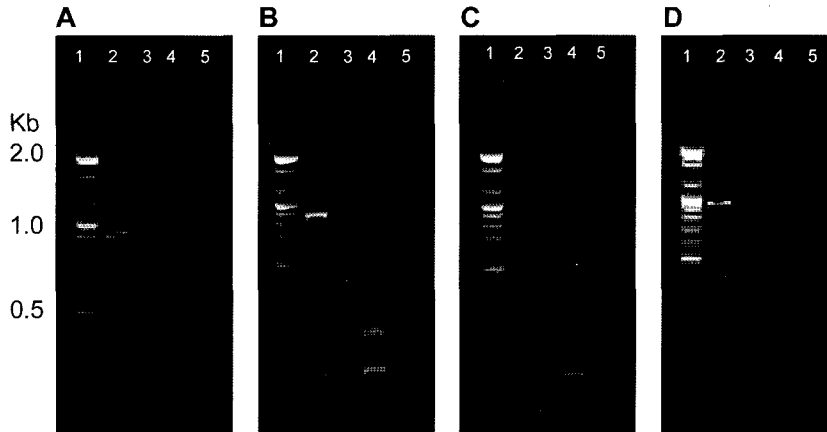
증폭된 4종의 PCR산물(*cmp1*, *cmp2*, *cmp3* 및 *cmp5*)을 염기서열 분석한 결과 각각의 primer조합에 의해 정상적으로 증폭되었

**Table 1.** Degenerate oligonucleotide primers used in this study.<sup>#</sup>

Primer	Amino acid sequence	Nucleotide sequence <sup>a</sup>	Degeneracy
Forward			
CMP1	GKIACPD	GGIAARATHGCITGYCCIGA(20)	12
CMP2	GVNTATN	CGTGAACACCGCTACCAAC(19)	1
CMP3	GQVTANA	GGICARGTIACIGCIAAYGC(20)	4
CMP5	GKVTCAG	GGIAARGTIACITGYGCI(20)	4
Reverse			
CMPR3	NQY(A)KLQS	GGACTGGAGCTTGKMCTGGT(20)	4
CMPR4	WQSFVN	ACGYACTGACGAAGGAYTGC(20)	4

<sup>a</sup>Degenerate alphabet used in this table: I (CGAT), R (AG), H (ATC), K (GT), M (AC) and Y (CT)

<sup>#</sup> See reference-9 for this data



**Fig. 2.** Agarose gel electrophoresis of amplified PCR products (A: *cmp1*, B: *cmp2*, C: *cmp3* and D: *cmp5*) with degenerate PCR primers. Lane 1: 100bp DNA ladder, Lane 2: degenerate primer PCR product, Lane 3, 4 and 5: negative PCR controls.

음을 확인할 수 있었으며, 이 중 특히 *cmp1*, *cmp2* 및 *cmp5* 염기서열은 *Trametes versicolor* KN9522의 Mn-peroxidase 동위효소 CVMP1, CVMP2 및 CVMP5의 N-말단 아미노산 부위를 코

당하고 있음을 알 수 있었다. 그러나 *cmp3*의 염기서열은 *cmp5* 와 100% 상동성을 가진 것을 확인하였다(Fig. 3, 4).

NCBI의 Blast-2 염기서열 검색 프로그램을 통해 *cmp1*, *cmp2*



**Fig. 3.** Amplified nucleotide sequence alignment of *T. versicolor* KN9522 *cmp1*, *cmp2* and *cmp5* gene fragments with degenerate PCR primers. The degenerate PCR primer sequences were underlined.



Province, Korea. *Kor J. Mycol.* 33(1), 1-10.

13. Zolan, M.E., and P.J. Pukkila. 1986. Inheritance of DNA methylation in *Coprinus cinereus*. *Mol.Cell.Biol.* 6, 185-200.

(Received March 8, 2006/Accepted March 14, 2006)

---

**ABSTRACT: PCR Cloning of Genes Encoding the Mn-Peroxidase Isozyme Family from *Trametes versicolor* KN9522 Using Degenerate Primers**

**Sang-Cheol Jun and Kyu-Joong Kim\*** (Dept of Biology, Division of Natural Sciences, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea)

Degenerate primers corresponding to the sequences of the N-terminal regions of Mn-peroxidase isozymes were used to isolate the genomic fragments encoding the isozymes of Mn-peroxidase, CVMP1, CVMP2, CVMP3 and CVMP5 from the white-rot fungus *Trametes versicolor* KN9522. Three isozymes except one gave the expected PCR products (*cmp1*, *cmp2* and *cmp5*) of about 900 base pairs, respectively. DNA sequence data obtained from each PCR products were used to analyze the BLAST program search on the National Center for Biotechnology Information. *cmp1*, *cmp2* and *cmp5* were similar to MPG-I (GenBank accession number, Z30668) and PGV-II (GenBank accession number, Z54279) gene in *T. versicolor* PRL572. PCR products of *cmp1* and *cmp2* showed 77%, 95% base sequence similarities to MPG-I gene and *cmp5* showed about 88% similarity to PGV-II gene from *T. versicolor* PRL572. From this experiment, we could isolate genomic DNA fragments with degenerate primers designed from the N-terminal amino acid sequences of Mn-peroxidase isozyme family.